

CAMILA MARTINS DE OLIVEIRA

**Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com
a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**

Araraquara
2009

CAMILA MARTINS DE OLIVEIRA

**Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com
a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Camila Martins de
O48e Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) / Camila Martins de Oliveira. - Araraquara : [s.n], 2009
288 f. : il.

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

1. Química orgânica. 2. Atividades biológicas. 3. *Alibertia macrophylla*.
4. Fungos endofíticos. 5. *Penicillium* I. Título.

CAMILA MARTINS DE OLIVEIRA


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

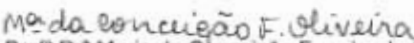
Araraquara, 17 de abril de 2009.

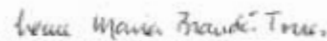
BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Angela Regina Araujo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Dr.ª Sílvia Noel López
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof.ª Dr.ª Mônica Tallarico Pupo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto


Prof.ª Dr.ª Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Centro de Ciências – UFC, Fortaleza


Dr.ª Luce Maria Brandão Torres
Instituto de Botânica – IB, São Paulo

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Camila Martins de Oliveira
Filiação: Mario Sérgio Martins e Eliana de Souza Martins
Nascimento: 21 de junho de 1978
Nacionalidade: brasileira
Estado civil: casada

Endereço Profissional

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais,
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Rua: Francisco Degni, sn, bairro Quitandinha, Araraquara-SP, Cep 14800-900
Telefones: 16-33016600 (ramais 6793 ou 6785)
camartinscm@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

- (1) Doutorado em Química pelo Instituto de Química – UNESP- Araraquara (2005-2009).
- (2) Mestrado em Ciências, UNIFRAN – Franca (2003-2004);
- (3) Especialização em Fármacos e Medicamentos, UNIFRAN – Franca (2002-2002);
- (4) Graduação em Licenciatura Plena em Química, UNIFRAN – Franca (1998-2001).

Bolsas Concedidas

- (1) Bolsista de Doutorado em Química – FAPESP (2005 – 2009)

Titulo do projeto: Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae);

(2) Bolsista de Mestrado – CAPES (2003-2004)

Título do projeto: Estudo químico e avaliação da atividade tripanocida de duas espécies de *Miconias* (Melastomataceae);

(3) Bolsa de especialização - UNIFRAN (2002-2002)

Título do projeto: Atividade analgésica de extratos brutos e substâncias isoladas de espécies de *Miconias*;

(4) Bolsista de Iniciação Científica – FAPESP (2001-2001)

Título do projeto: Estudo químico e avaliação da atividade tripanocida de *Miconia fallax* e *Miconia stenostachya* (Melastomataceae).

Prêmios

(1) Premio de melhor trabalho de conclusão de curso, UNIFRAN- Franca.

Idiomas

(1) Inglês – básico (conversação e escrita); intermediário (leitura)

(2) Espanhol – Intermediário (leitura, escrita e conversação)

Artigos completos publicados em periódicos

(1) Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, p. 4609-4613, 2008.

(2) *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 468-470, 2003.

(3) Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax* (Melastomataceae). **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 2, p.158-160, 2002.

Artigos submetidos para publicação

(1) Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp1 and sp2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2008.

Últimos resumos publicados em anais de congresso

- (1) Two new metabolites of an undescribed endophytic fungus belonging to the order Pleosporales isolated from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). In: 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008, Atenas;
- (2) Bioactive compounds produced by the endophytic fungus am-04, isolated from leaves of *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). In: Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro;
- (3) Bioactive isocoumarins produced by the endophytic fungus AM-01, isolated from leaves of *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). In: CIFARP, 2007, Ribeirão Preto;
- (4) Chemical study of the endophytic fungi *Xylaria* sp. and *Colletotrichum crassipes*, associated to *Casearia sylvestris*. In: Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro;
- (5) Isocumarinas produzidas pelo fungo endofítico AM-01 isolado das folhas de *Alibertia macrophylla* In: 30^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.
- (6) Substâncias bioativas produzidas pelo fungo endofítico AM-04 isolado das folhas de *Alibertia macrophylla* In: 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia.

DEDICO ESTE TRABALHO...

A Deus, por permitir que eu chegasse ao fim de mais um desafio.

Ao meu querido marido João Marcos, pela paciência, compreensão e apoio incondicional. Sem o seu apoio não teria suportado a distância. Você é um anjo que Deus colocou em minha vida no momento em que eu mais precisava. Dividir minha vida com você, me faz muito feliz. Você faz parte desta conquista e espero que faça parte de muitas outras.

A minha mãe, Eliana por todo apoio, incentivo e conselhos, pela paciência em ouvir minhas lamentações. Ao meu pai, Mario pelas inúmeras caronas dadas até a faculdade e longas conversas (sem muito sentido) que eu inventava para que ele não dormisse na estrada. Agradeço o enorme sacrifício que vocês fizeram para pagar meus estudos, esta foi a melhor herança que vocês podiam ter me dado. Com vocês aprendi a nunca desistir frente a um problema e a lutar até alcançar os objetivos desejados.

As minhas irmãs Cássia e Cristina, pelo apoio.

A minha orientadora Ângela, que mesmo em seus piores momentos encontrou tempo e paciência para me atender.

AGRADEÇO...

***A** Deus, a meu anjo da guarda e aos espíritos a fins, pela presença constante em minha vida, por guiar e iluminar meus caminhos e me amparar nos momentos difíceis.*

***AOS** docentes da Universidade de Franca: Profa. Katia Jorge Ciuffi, Prof. Márcio Luís Andrade e Silva, Prof. Eduardo José Nassar, Prof. Cesar Mello e em especial ao Prof. Wilson Roberto Cunha por terem me recebido no grupo de pesquisa como aluna de iniciação científica. Esta experiência fez com que crescesse em mim a paixão pela química e a pesquisa. Posso dizer que com vocês dei o primeiro passo de uma longa caminhada.*

***AO** Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP – Araraquara, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário de uma etapa importante da minha vida.*

***A** Profa. Ângela pela orientação e pelos ensinamentos de química e de vida, a qual serei eternamente grata.*

***AO** Prof. Henrique Celso Trevisan (in memoriam), por sua valiosa contribuição neste trabalho e colaboração na revisão de relatórios e artigos. Tenho certeza que outros irmãos estão sendo beneficiados com seus ensinamentos.*

A todos os docentes do Departamento de Química Orgânica, por seus ensinamentos e amizade, em especial a Profa. Lúcia Xavier, por seus ensinamentos de RMN.

AOS membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta tese.

AO Dr. Nivaldo Boralle pela realização dos inúmeros espectros, amizade e por estar sempre disposto a compartilhar seus ensinamentos.

AO Dr. Alberto Alcício por ser tão prestativo, não medindo esforços para colaborar com o trabalho científico.

AOS meus amigos Dr. Geraldo H. Silva e Dr. Helder L. Teles, ex-colegas de grupo e competentes profissionais.

AOS meus amigos Lisinéia Zanardi, Douglas Gatti, Fernando Contiguiba, Luís Otávio Regasini e Sílvia López, pelas aulas particulares, colaborações em artigos e pelo apoio dentro e fora do laboratório. A vocês sou eternamente grata.

A todos os amigos do Departamento de Química Orgânica em especial aos do NuBBE, que de uma maneira ou outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho (não vou citar nomes, para não correr o risco de esquecer alguém).

A minha amiga Wanda, obrigada por sua amizade, sua prontidão em me ajudar e principalmente pelos conselhos e incentivos dados.

AOS funcionários da biblioteca e da secretaria por sua dedicação e disposição em ajudar.

A todos que participaram direta e indiretamente do desenvolvimento deste trabalho.

AO CNPq pelo apoio financeiro e a CAPES e FAPESP pelas bolsas concedidas.



A ESTRELINHA VERDE

Era uma vez.....milhões e milhões de estrelas no céu. Havia estrelas de todas as cores: brancas, prateadas, douradas, vermelhas e azuis. Um dia elas procuraram o Senhor Deus e disseram-lhe:

- *“Senhor Deus, gostaríamos de viver na Terra entre os homens”. E Deus respondeu:*

- *“Já que assim desejam, assim será feito. Conservarei todas vocês pequeninas como são vistas e podem descer a Terra”.*

Conta-se que naquela noite houve uma linda chuva de estrelas. Algumas se aninharam nas torres das igrejas, outras foram correr e brincar com os vagalumes do campo e outras se misturaram aos brinquedos das crianças. E a Terra ficou maravilhosamente iluminada. Porém, passado algum tempo às estrelas resolveram abandonar os homens e voltar para o céu, deixando a terra escura e triste.

- *“Porque voltaram?”*, perguntou Deus à medida que elas chegavam ao céu.

- *“Senhor, não nos foi possível permanecer na Terra, lá existe muita miséria, fome, violência, muitas guerras, maldades e doenças”. E o Senhor lhes disse:*

- *“Claro, o lugar de vocês é aqui no céu. A Terra é um lugar transitório daquilo que passa, do ruim, daquele que cai, daquele que morre e onde nada é perfeito. Aqui no céu é o lugar da perfeição. O lugar onde tudo é imutável, onde tudo é eterno, onde nada perece”.*

Depois de chegarem todas as estrelas e conferido seu número, Deus notou a falta de uma estrela e perguntou aos anjos por ela. Um deles respondeu:

- *“A estrela que esta faltando resolveu ficar entre os homens; ela descobriu que o seu lugar é exatamente onde existe a imperfeição, onde há limites e onde as coisas não vão bem”.*

- *“Mas que estrela é esta?” voltou Deus a perguntar.*

- *“Por coincidência, Senhor, era a única estrela desta cor. É a esperança, Senhor. A estrela verde”.*

E quando olharam para a Terra, a estrela já não estava só. A Terra estava novamente iluminada, porque havia uma estrela verde no coração de cada pessoa. Deus já conhece o futuro e a esperança é própria da natureza humana. Receba neste momento esta “estrelinha” em seu coração, sua estrela verde. Não deixe que ela fuja e nem se apague. Tenha certeza que ela iluminará seu caminho.

Que a estrela verde permaneça sempre em seus corações.

Autor desconhecido

RESUMO

Este trabalho, descreve a busca de substâncias bioativas a partir do estudo químico e biológico dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos AM-01 identificado como *Penicillium* sp1, AM-02 e AM-03 não identificados e AM-04, também pertencente ao gênero *Penicillium*, que foram isolados das folhas de *Alibertia macrophylla*. Os fungos endofíticos isolados, foram cultivados em meio líquido MBD, e sólido (milho) a 25°C, sob agitação, e no modo estático, respectivamente. Para o meio líquido, o caldo foi separado do micélio e submetido à partição com AcOEt, fornecendo os extratos brutos após a evaporação do solvente. Para o meio sólido, foi realizado uma extração com metanol, seguido de filtração e evaporação do solvente, originando os extratos brutos. Após análises por RMN de ¹H e CLAE-DAD, os extratos brutos obtidos em milho, foram fracionados por cromatografia em coluna, seguida de separação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE_{prep.}). O extrato bruto de AM-01 (*Penicillium* sp1) forneceu seis substâncias da classe das isocumarinas, sendo duas inéditas. O fracionamento cromatográfico do extrato bruto de AM-02, conduziu ao isolamento de três sesquiterpenos inéditos identificados como Xylarenonas C, D e E. Também do extrato bruto de AM-02 foi isolado um composto furânico identificado como (*E*)-5-(1-hidroxiálil)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-ácido carboxílico. O fracionamento cromatográfico de AM-04, permitiu o isolamento de um benzenóide, identificado como orcinol. O estudo químico dos extratos brutos obtidos em MBD, de AM-03 e AM-04, permitiram o isolamento das dicetopiperazinas ciclo (Pro-Try) e ciclo (L-Pro-L-Val), além da uracila. As substâncias isoladas foram identificadas por análises de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas, bem como por comparação com dados da literatura. Os extratos brutos e as substâncias puras, foram enviados para a realização de ensaios antifúngicos, antioxidantes, anticolinesterásicos e de inibição de protease. Todas as substâncias enviadas para estes ensaios apresentaram atividade.

Palavras-chave: fungo endofítico, *Alibertia macrophylla*, *Penicillium*.

ABSTRACT

This work describes the search for bioactive substances from the chemical/biological of the crude extracts produced by endophytic fungi AM-01 identified as *Penicillium* sp1, AM-02, AM-03 and AM-04 also belonging to the genus *Penicillium* isolated from the leaves of *Alibertia macrophylla*. The endophytic fungal isolates were grown in liquid medium and solid MBD to 25 °C under shaking and static mode, respectively. For the liquid medium the mycelium was separated from the broth and subjected to partition with AcOEt, giving the crude extracts after evaporation of the solvent. For solid medium, the extraction was performed with MeOH, followed by filtration and evaporation of the solvent yielding the crude extracts. After analysis by the ¹H NMR and HPLC-DAD, the crude extracts from maize were fractionated by chromatography on a column followed by separation using High Performance Liquid Chromatography (HPLC_{prep.}). The crude extract of AM-01 (*Penicillium* sp1) provided six isocoumarins, two news. Chromatographic fractionation of the crude extract of AM-02 led to the isolation of three novel sesquiterpenes identified as Xylarenonas C, D and E and a furanic compound identified as 2,5-dihydro-5-(1-hydroxyallyl)-4-(*E*)-pent-1-enyl)furan-3-carboxylic acid.

Chromatographic fractionation of AM-04 allowed the isolation of a benzenoid, identified as orcinol. The chemical study of AM-03 crude extracts and AM-04 cultivated in MDB allowed the isolation of diketopiperazines cyclo (Pro-Try), cyclo (L-Pro-L-Val), and uracil. The substances isolated were identified through analysis of ¹H NMR, mass spectrometry and by comparison with literature data. The crude extracts and pure substances were submitted for trials for antifungal agents, antioxidants, anticholinesterasic and inhibition of protease. All substances showed biological activities.

Keywords: endophytic fungus, *Alibertia macrophylla*, *Penicillium*.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	18
LISTA DE FIGURAS	20
LISTA DE TABELAS	24
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Aspectos gerais.....	27
1.2 Produtos naturais de microrganismos.....	28
1.3 Endofítico ou epifíticos.....	29
1.4 Microrganismos endofíticos.....	29
1.4.1 Interações microrganismos endofíticos e plantas.....	30
1.4.2 Transmissão.....	31
1.4.3 Produtos naturais bioativos de fungos endofíticos.....	31
1.4.3.1 Produtos de fungos como antibióticos.....	32
1.4.3.2 Produtos de fungos como agentes anticâncer.....	33
1.4.3.3 Produtos de fungos como antioxidantes.....	33
1.4.3.4 Produtos de fungos como antimaláricos.....	34
1.4.3.5 Produtos de fungos com atividade inseticida.....	34
1.4.3.6 Produtos de fungos com atividade de inibição de protease.....	34
1.5 A espécie vegetal hospedeira.....	36
1.5.1 <i>Alibertia macrophylla</i> K. Schum (Rubiaceae).....	36
1.6 Fungos endofíticos isolados de <i>Alibertia macrophylla</i>	37
1.6.1 Fungos <i>Penicillium</i> sp1 e <i>Penicillium</i> sp2.....	37
1.6.2 O gênero <i>Penicillium</i>	37
1.6.3 Metabólitos bioativos isolados do gênero <i>Penicillium</i>	38
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	41
3.1 Especificações dos materiais, instrumentos e técnicas utilizadas.....	42
3.1.1 Especificações dos instrumentos.....	42
3.1.2 Especificações das colunas e fases estacionárias.....	42

3.1.3 Especificações dos solventes e reagentes.....	43
3.1.4 Meios para cultivo dos microrganismos.....	44
3.1.5 Outros equipamentos.....	44
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
4.1 Seleção da espécie vegetal.....	46
4.2 Coleta do material vegetal.....	46
4.3 Obtenção das cepas fúngicas.....	46
4.4 Identificação dos microrganismos.....	47
4.5 Extração e isolamento.....	47
4.5.1 Cultivo dos endófitos em milho e obtenção dos extratos brutos.....	47
4.5.2 Partição do extrato bruto obtido do cultivo em milho de AM-01 (<i>Penicillium</i> sp1).....	49
4.5.2.1 Fracionamento fase ACN-milho de AM-01 (<i>Penicillium</i> sp1)..	49
4.5.2.2 Fracionamento e purificação das frações selecionadas.....	50
4.5.2.2.1 Fracionamento da fração AM-01-Mi-ACN-C.....	50
4.5.2.2.2 Fracionamento da fração AM-01-Mi-ACN-D.....	50
4.5.3 Partição do extrato bruto obtido em milho de AM-02.....	53
4.5.3.1 Fracionamento da fase ACM-milho de AM-02.....	53
4.5.3.2 Fracionamento e purificações das frações selecionadas.....	54
4.5.3.2.1 Fracionamento da fração AM-02-Mi-ACN-C e D.....	54
4.5.3.2.2 Fracionamento da fração AM-02-Mi-ACN-F.....	54
4.5.3.2.3 Fracionamento da fração AM-02-Mi-ACN-G.....	55
4.5.3.2.4 Fracionamento da fração AM-02-Mi-ACN-H.....	55
4.5.4 Partição do extrato bruto obtido do cultivo em milho de AM-03.....	58
4.5.5 Partição do extrato bruto em milho de AM-04 (<i>Penicillium</i> sp2).....	58
4.5.5.1 Fracionamento da fase ACN-milho de AM-04 (<i>Penicillium</i> sp2) e obtenção da substância pura.....	59
4.5.6 Cultivo dos endófitos em MBD e obtenção dos extratos brutos.....	60
4.5.7 Fracionamento do extrato bruto em MBD de AM-03.....	62
4.5.8 Fracionamento do extrato bruto em MBD de AM-04 (<i>Penicillium</i> sp2).....	63
4.5.8.1 Fracionamento e purificação das frações selecionadas.....	63

4.5.8.1.1	Fracionamento e purificação da fração AM-04-MBD-B.....	63
4.5.8.1.2	Fracionamento e purificação da fração AM-04-MBD-C.....	64
4.5.9	Obtenção dos perfis cromatográficos.....	65
4.5.10	Ensaio biológicos realizados.....	65
4.5.10.1	Bioautografia com fungos do gênero <i>Cladosporium</i> – detecção de atividade antifúngica.....	65
4.5.10.2	Determinação da atividade anticolinesterásica.....	66
4.5.10.3	Ensaio espectrofotométrico com DPPH.....	67
4.5.10.4	Atividade do potencial antimalárica através da inibição da formação de β -hematina.....	68
4.5.10.5	Avaliação do potencial de inibição de protease.....	69
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
5.1	Isolamento, purificação e cultivo dos endofíticos.....	72
5.2	Extração e isolamento.....	72
5.2.1	Análise dos extratos brutos obtidos do cultivo em milho dos fungos endofíticos por CLAE.....	72
5.2.2	Análise do meio de cultivo (milho) por RMN de ^1H	73
5.2.3	Análise dos extratos brutos obtidos do cultivo em milho dos fungos endofíticos por RMN de ^1H	74
5.2.4	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-01 (<i>Penicillium</i> sp1) e obtenção das substâncias puras.....	77
5.2.4.1	Fracionamento de AM-01-Mi-ACN-C.....	80
5.2.4.2	Fracionamento de AM-01-Mi-ACN-D.....	81
5.2.4.3	Fracionamento de AM-01-Mi-ACN-Fr-2.....	82
5.2.5	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-02 e obtenção das substâncias puras.....	83
5.2.5.1	Fracionamento de AM-02-Mi-ACN-C-D.....	88
5.2.5.2	Fracionamento de AM-02-Mi-ACN-F.....	88
5.2.5.3	Fracionamento de AM-02-Mi-ACN-G e H.....	89
5.2.6	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-03.....	90

5.2.7 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-04 e obtenção das substâncias puras.....	90
5.2.8 Análise dos extratos brutos em MBD dos endofíticos por CLAE.....	90
5.2.9 Observação sobre o meio de cultivo MBD.....	91
5.2.10 Análise dos extratos brutos em MBD dos endófitos por RMN de ¹ H.....	92
5.2.11 Estudo do extrato bruto em MBD de AM-01 (<i>Penicillium</i> sp1).....	94
5.2.12 Fracionamento do extrato bruto em MBD de AM-03 e obtenção das substâncias puras.....	95
5.2.13 Fracionamento do extrato bruto em MBD de AM-04 (<i>Penicillium</i> sp2) e obtenção das substâncias puras.....	95
5.2.13.1 Fracionamento e purificação da fração AM-04-MBD-B.....	97
5.2.14 Substâncias isoladas.....	98
5.2.15 Determinação estrutural.....	99
5.2.15.1 Determinação/identificação das substâncias produzidas pelo fungo <i>Penicillium</i> sp1.....	100
5.2.15.1.1 Identificação das substâncias <u>1</u> e <u>2</u>	100
5.2.15.1.2 Identificação das substâncias <u>3</u> e <u>4</u>	102
5.2.15.1.3 Determinação das substâncias <u>5</u> e <u>6</u>	105
5.2.15.2 Determinação/identificação das substâncias produzidas pelo fungo AM-02.....	108
5.2.15.2.1 Identificação da substância <u>7</u>	108
5.2.15.2.2 Determinação da substância <u>8</u>	112
5.2.15.2.3 Determinação da substância <u>9</u>	115
5.2.15.2.4 Determinação da substância <u>10</u>	118
5.2.15.2.5 Determinação da substância <u>11</u>	121
5.2.15.3 Identificação da substância produzida pelo fungo AM-03.....	124
5.2.15.3.1 Identificação da substância <u>12</u>	124
5.2.15.4 Identificação das substâncias produzidas pelo fungo <i>Penicillium</i> sp2.....	127
5.2.15.4.1 Identificação da substância <u>13</u>	127
5.2.15.4.2 Identificação da substância <u>14</u>	129

5.2.15.4.3 Identificação da substância 15	130
5.2.16 Obtenção dos perfis cromatográficos.....	131
5.2.16.1 Perfil químico de <i>Alibertia macrophylla</i>	132
5.2.16.2 Perfil químico dos fungos endofíticos.....	134
5.2.17 Ensaio biológicos.....	138
5.2.17.1 Ensaio realizados com os extratos brutos dos fungos endofíticos obtidos em milho e MBD.....	138
5.2.17.1.1 Atividade antifúngica.....	138
5.2.17.1.2 Atividade antioxidante.....	139
5.2.17.1.3 Atividade do potencial antimalária <i>in vitro</i>	141
5.2.17.1.4 Atividade anticolinesterásica.....	145
5.2.17.1.5 Atividade de inibição de protease.....	146
5.2.17.2 Ensaio realizados com as substâncias puras.....	148
5.2.17.2.1 Atividade antifúngica.....	149
5.2.17.2.2 Atividade antioxidante.....	150
5.2.17.2.3 Atividade anticolinesterásica.....	151
5.2.17.2.4 Atividade de inibição de protease.....	152
6. BIOSÍNTESE	154
6.1 Isocumarinas derivadas de cadeias policetônicas.....	155
6.1.1 Proposta biossintética para a formação das isocumarinas 1 e 2	155
6.2 Compostos furânicos derivados de cadeias policetônicas.....	157
6.2.1 Proposta biossintética para a formação do derivado furânico.....	157
6.3 Sesquiterpenos derivados do FPP.....	159
6.3.1 Proposta biossintética para a formação da Xylarenona C.....	159
7. CONCLUSÕES	161
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
9. ANEXOS	179

LISTA SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA – Ágar-ágar

AchE – Enzima acetilcolinesterase

AcOEt - Acetato de etila

ACN – Acetonitrila

AM – *Alibertia macrophylla*

BDA – Batata-dextrose-ágar

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

C-18 - Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano

CDCl₃ - Clorofórmio deuterado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE_{prep.} - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência modo preparativo

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido Deuterado

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazina

d – dubleto

dd – duplo-dubleto

ddd – duplo-duplo-dubleto

dq – duplo-quadrupleteo

dsept – duplo-septeto

dt – duplo-tripleteo

EM – Extrato de malte

ESI-MS - Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry

δ – Deslocamento químico

gCOSY – Gradient Correlated Spectroscopy

gHMBC - Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation

gHMQC - Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HRESI-MS – High Resolution Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry

Hex – Hexano

I V – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

m – Multiplete

Mi - milho

MeOH – Metanol

MBD – Meio de batata e dextrose

m/z – Relação massa-carga

NaClO – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

P.A. – Para análise

p. - Página

ppm – Parte por milhão

prep. – Preparativo

q – quarteto

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s – singleto

t – tripleto

TMS – Tetrametilsilano

UV-Vis - Ultra Violeta – Visível

v/v – volume/volume

λ – Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos.....	35
Figura 2 - <i>Alibertia macrophylla</i> K. Schum.....	36
Figura 3 - Fluxograma dos extratos brutos obtidos em milho.....	48
Figura 4 - Fluxograma da partição do extrato bruto em milho de AM-01.....	49
Figura 5 - Fluxograma do fracionamento de AM-01-Mi-ACN.....	51
Figura 6 - Fluxograma do fracionamento de AM-01-Mi-ACN (segunda etapa)	52
Figura 7 - Fluxograma da partição do extrato bruto em milho de AM-02.....	53
Figura 8 - Fluxograma do fracionamento de AM-02-Mi-ACN-C e G.....	56
Figura 9 - Fluxograma do fracionamento de AM-02-Mi-ACN-H.....	57
Figura 10 - Fluxograma da partição do extrato bruto em milho de AM-03.....	58
Figura 11 - Fluxograma da partição do extrato bruto em milho de AM-04.....	59
Figura 12 - Fluxograma do fracionamento de AM-04-Mi-ACN.....	60
Figura 13 - Fluxograma dos extratos brutos em MBD.....	61
Figura 14 - Fluxograma do fracionamento de AM-03 MBD.....	62
Figura 15 - Fluxograma do fracionamento de AM-04 MBD	64
Figura 16 - Galantamina.....	66
Figura 17 - Cromatogramas em CLAE-DAD dos extratos brutos em milho.....	73
Figura18 - Espectro de RMN de ¹ H do milho (branco).....	74
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de AM-01 milho.....	75
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de AM-02 milho.....	75
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de AM-03 milho.....	76
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de AM-04 milho.....	76
Figura 23 - Cromatograma em CLAE-DAD AM-01-Mi-ACN-C.....	77
Figura 24 - Cromatograma em CLAE-DAD AM-01-Mi-ACN-D.....	78

Figura 25-	Espectro de RMN de ^1H de AM-01-Mi-ACN-C.....	78
Figura 26-	Espectro de RMN de ^1H de AM-01-Mi-ACN-D.....	79
Figura 27-	Cromatograma CLAE-DAD de AM-01-Mi-ACN-Fr-2.....	79
Figura 28-	Espectro de RMN de ^1H de AM-01-Mi-ACN-Fr-2.....	80
Figura 29-	Cromatograma de AM-01-Mi-ACN-C em CLAE _{prep}	81
Figura 30-	Cromatograma de AM-01-Mi-ACN-D em CLAE _{prep}	82
Figura 31-	Cromatograma de AM-01-Mi-ACN-Fr-2 em CLAE _{prep}	83
Figura 32-	Cromatograma CLAE-DAD de AM-01-Mi-ACN-C-D.....	84
Figura 33-	Cromatograma CLAE-DAD de AM-02-Mi-ACN-F.....	84
Figura 34-	Cromatograma CLAE-DAD de AM-02-Mi-ACN-G.....	85
Figura 35-	Cromatograma CLAE-DAD de AM-02-Mi-ACN-H.....	85
Figura 36-	Espectro de RMN de ^1H de AM-02-Mi-ACN-C-D.....	86
Figura 37-	Espectro de RMN de ^1H de AM-02-Mi-ACN-F.....	86
Figura 38-	Espectro de RMN de ^1H de AM-02-Mi-ACN-G.....	87
Figura 39-	Espectro de RMN de ^1H de AM-02-Mi-ACN-H.....	87
Figura 40-	Cromatograma de AM-02-Mi-ACN-C-D em CLAE _{prep}	88
Figura 41-	Cromatograma de AM-02-Mi-ACN-F em CLAE _{prep}	89
Figura 42-	Cromatograma CLAE-DAD dos extratos brutos em MBD.....	91
Figura 43-	Espectro de RMN de ^1H de AM-01 MBD.....	92
Figura 44-	Espectro de RMN de ^1H de AM-02 MBD.....	93
Figura 45-	Espectro de RMN de ^1H de AM-03 MBD.....	93
Figura 46-	Espectro de RMN de ^1H de AM-04 MBD.....	94
Figura 47-	Cromatograma CLAE-DAD de AM-04-MBD-B.....	96
Figura 48-	Espectro de RMN de ^1H de AM-04-MBD-B.....	96
Figura 49-	Substâncias isoladas do fungo endofítico AM-01 (<i>Penicillium</i> sp1).	98

Figura 50- Substâncias isoladas do fungo endofítico AM-02.....	98
Figura 51- Substâncias isoladas do fungo endofítico AM-03.....	99
Figura 52- Substâncias isoladas do fungo endofítico AM-04 (<i>Penicillium</i> sp2).	99
Figura 53- Principais correlações observadas em gHMBC das subs. 5 e 6	107
Figura 54- Estrutura parcial A da substância 7	109
Figura 55- Estrutura parcial B da substância 7	109
Figura 56- Estrutura da Xylarenona A.....	110
Figura 57- Principais correlações observadas em gHMBC da subs. 8	114
Figura 58- Principais correlações observadas em gHMBC da subs. 9	116
Figura 59- Principais correlações observadas em gHMBC da subs. 10	119
Figura 60- Principais correlações observadas em gHMBC da subs. 11	123
Figura 61- Cromatograma em CLAE-UV das folhas de <i>A. macrophylla</i>	133
Figura 62- Espectro de UV característico de iridóides e ácido clorogênico.....	134
Figura 63- Cromatograma em CLAE-UV dos extratos brutos em milho dos endófitos.....	135
Figura 64- Espectro de UV de compostos aromáticos e isocumarinas.....	136
Figura 65- Cromatograma em CLAE-UV dos extratos brutos em MBD dos endófitos.....	137
Figura 66- Mecanismo da reação envolvido no ensaio com DPPH.....	140
Figura 67- Alguns fármacos antimaláricos.....	142
Figura 68- Degradação da hemoglobina e formação da hemozoína.....	144
Figura 69- Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos.....	146
Figura 70- Estruturas das substâncias submetidas à avaliação biológica.....	148
Figura 71- Sesquiterpenos submetidos à avaliação de inibição de protease....	153
Figura 72- Proposta biossintética para os compostos 1 e 2	156

Figura 73- Proposta biossintética para o composto 3	158
Figura 74- Proposta biossintética para o composto 4	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 das substâncias 1 e 2	102
Tabela 2 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 das substâncias 3 e 4	104
Tabela 3 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 das substâncias 5 e 6	107
Tabela 4 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 da substância 7	111
Tabela 5 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 da substância 8	114
Tabela 6 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 da substância 9	117
Tabela 7 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 da substância 10	120
Tabela 8 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 da substância 11	123
Tabela 9 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em CDCl_3 da substância 12	126
Tabela 10 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em $\text{DMSO}-d_6$ da substância 13	128
Tabela 11 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em $\text{DMSO}-d_6$ da substância 14	130
Tabela 12 - Dados de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dados de RMN em $\text{DMSO}-d_6$ da substância 15	131
Tabela 13 - Resultado da atividade antifúngica dos extratos brutos.....	139
Tabela 14 - Resultado da atividade antioxidante dos extratos brutos.....	141
Tabela 15 - Resultado da atividade antimalárica dos extratos brutos.....	145
Tabela 16 - Resultado da atividade de inibição de protease dos extratos.....	147
Tabela 17 - Resultado da atividade antifúngica das substâncias puras.....	149

Tabela 18- Resultado da atividade antioxidante das isocumarinas.....	150
Tabela 19- Resultado da atividade anticolinesterásica das subst. puras.....	151
Tabela 20- Resultado da atividade de inibição de protease das substâncias puras.	152

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A utilização de fontes naturais tais como plantas, animais e microrganismos, é há muito tempo, uma prática constante exercida pela humanidade. A grande variedade de aplicações destas fontes naturais, abrange desde a alimentação, até o tratamento de doenças,¹ sendo as civilizações Orientais e Ocidentais ricas em exemplos da utilização destes recursos.² Ao longo da história, os produtos naturais têm proporcionado, uma fonte rica de compostos que têm encontrado muitas aplicações nos campos da medicina, farmácia e biologia.³ Sendo, que os compostos farmacêuticos mais importantes conhecidos pela humanidade, são de origem vegetal e microbiana.⁴

Segundo NEWMAN das 1010 novas entidades químicas relatadas entre 1981 a 2006 com indicações médicas, 42% são de origem natural, derivado de produtos naturais, ou inspirados neles. Dentre as 230 novas drogas antimicrobianas descritas neste período, 37,5% são de origem natural, ou derivados de produtos naturais.⁵

Não somente em indicações médicas, mas também em ensaios clínicos, e em fase de registro, os produtos naturais ganham destaque. O grande número de compostos derivados de produtos naturais utilizados em diferentes fases de desenvolvimento clínico, indica que a utilização de modelos oriundos de produtos naturais, é ainda uma fonte viável de novos candidatos a medicamentos.⁶ No entanto, a descoberta de novos modelos, a partir de produtos naturais, é tão difícil como tem sido ao longo dos últimos 20 anos ou mais⁶, devido à variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas e outros organismos.²

Apesar dos avanços nos processos envolvidos no planejamento racional de fármacos, incluindo química combinatória, síntese orgânica, e bibliotecas virtuais, as fontes naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novas fármacos.⁷

1.2 PRODUTOS NATURAIS DE MICRORGANISMOS

Desde a descoberta da penicilina por Fleming, inúmeros esforços de investigação, têm-se concentrado no isolamento de metabólitos secundários de origem microbiana. Devido a sua diversidade, e sua capacidade de adaptação, de modo a colonizar diferentes ecossistemas, os microrganismos representam a parte mais importante da biodiversidade da Terra. Sua capacidade adaptativa, mesmo em ambientes tão inóspito como o Mar Morto, Antártida, lagos alcalinos, vulcões e solos, podem ser convertidos em um potencial impressionante para o surgimento de novas entidades químicas.⁸

Entre os 250.000 produtos naturais bioativos conhecidos hoje, cerca de 22.000 (aproximadamente 10%), foram isolados de metabólitos secundários microbianos. Estes compostos têm provado sua eficácia em uma gama de atividades biológicas, que vão desde antibacterianos, antifúngicos, antitumorais, antivirais, antiinflamatórios e compostos com propriedades imunossupressoras.⁸

Dentre os microrganismos existentes, os fungos, apresentam cerca de 1,5 milhões de espécies. Destes, apenas 1% tiveram seus metabólitos secundários isolados.⁹ Com isso, culturas de microrganismos, especialmente de fungos, de diversas famílias e gêneros, vêm sendo sistematicamente estudadas, como fontes importantes na busca por fármacos úteis no tratamento de doenças graves, como câncer, malária e infecções bacterianas, dentre outras, e representam uma valiosa alternativa na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.¹⁰

Outro aspecto importante, no isolamento de metabólitos de origem microbiana é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido, em menor tempo e espaço. Além disso as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração) podem ser modificadas, a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos de interesse.¹¹

O aumento na produção destes metabólitos, também estão relacionados, com o isolamento de novas culturas, a partir de uma ampla variedade de ambientes, substratos, e do avanço de técnicas químicas, que possibilitaram a caracterização destes compostos de um modo mais rápido. Além do entendimento

de muitas doenças a nível bioquímico e genético, que tornou possível a busca de metabólicos microbianos com ação direcionada para alvos específicos no metabolismo celular.¹⁰

1.3 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS OU EPIFÍTICOS?

Enquanto o interior das folhas é susceptível a mudanças de temperatura, e outras condições, as superfícies das folhas, podem estar sujeitas a condições extremas em termos de estresse abiótico. Petrini em 1991 verificou que muitas comunidades de endófitos, freqüentemente apresentavam em suas comunidades, espécies classicamente consideradas epifíticas, incluindo *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, dentre outros. Estes microrganismos, inicialmente epifíticos, entram nos tecidos vegetais no início da senescência foliar. Outra observação foi que curiosamente, fungos endofíticos e epifíticos podem apresentar distintas propriedades biológicas.¹²

1.4 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Eles distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais.¹³ Os microrganismos endofíticos foram encontrados em todas as espécies vegetais examinadas até o momento. Das 300.000 espécies de plantas existentes na terra, todas, hospedam um ou mais endofíticos, podendo ser encontrado cerca de 1 milhão de diferentes espécies de microrganismos.¹⁴

Diferentes espécies de endofíticos são encontrados em vários tecidos vegetais: parênquimas, dutos vasculares, epiderme, etc. A utilização de tecidos especializados, tem sido considerada, como uma estratégia, para a melhor utilização dos recursos encontrados no vegetal por diferentes espécies de endofíticos. O que reduz a concorrência entre eles, e impede o crescimento excessivo da população endofítica em determinados órgãos. Um exemplo, são as bananeiras que possuem

mais fungos endofíticos nas raízes (67%) do que no córtex (23%) ou no cilindro central (10%).¹⁵

O termo endofítico significa “dentro da planta” (*endon*=dentro e *phytón*=planta) e pode ser usado para fungos, bactérias, e outros organismos (vírus e nematóides). Este termo, tem sido utilizado desde o século XIX, mas foi Bary quem a utilizou pela primeira vez, para se referir a fungos que vivem no interior de vegetais.¹⁵

1.4.1 Interações microrganismos endofíticos e plantas

Os microrganismos endofíticos podem modificar plantas em níveis genéticos, fisiológicos e ecológicos, e estas modificações podem induzir mudanças profundas, na forma como as plantas respondem a seus ambientes.¹⁶ Os mecanismos destes fenômenos, de interação fungo endofítico, e planta hospedeira, têm sido investigados, e pode ser caracterizado, por um equilíbrio, entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta. Se o balanço é perturbado por ambos, uma diminuição da defesa da planta, ou o aumento do poder de virulência do microrganismo, pode desenvolver.^{17,18}

Os fungos não produzem clorofila (são heterotróficos), então, em alguns casos, sua sobrevivência depende do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas, ou de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente.¹⁹

As interações endófito/planta, ainda não são muitos bem compreendidos, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem, ou induzem a produção de metabólitos primários, e secundários, que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos como: tolerância à seca, metais, doenças, calor e/ou promover o crescimento, e aquisição de nutrientes, além do controle de outros microrganismos. Exemplos de metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas, ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes.²⁰

Em alguns casos, estes microrganismos podem adquirir a capacidade de biossintetizar os mesmos produtos naturais produzidos pela planta,²¹ como o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* que produz taxol, um importante fármaco anticancerígena. Isto pode ser possível, devido à recombinação genética entre o microrganismo e o hospedeiro, que ocorreu ao longo da evolução.²²

1.4.2 Transmissão

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de uma geração para outra. A transmissão dos endófitos pode ser vertical ou horizontal. A primeira ocorre quando a semente fica infectada pelo endófito e é então transmitida para a próxima geração. Normalmente, estas são infecções sistêmicas, que permite ao fungo endofítico chegar à semente durante o seu período de formação. A transmissão horizontal exige a produção de esporos externos e dispersão destes esporos para infectar outras plantas. Este é o mecanismo preferido de espécies endofíticas, geralmente associadas a espécies lenhosas, e localizados em determinados órgãos da planta hospedeira. Os esporos podem ser assexuados (conídios), ou sexuais (ascósporos), e a transmissão também pode ocorrer por outros organismos como os insetos, que contribuem para a fecundação e a dispersão dos esporos.¹⁵

1.4.3 Produtos naturais bioativos de fungos

Dentre os microrganismos já estudados do ponto de vista químico e biológico estão os fungos endofíticos. Estes microrganismos são capazes de produzir substâncias bioativas que podem estar envolvidos em seu relacionamento com o hospedeiro.²³ Em estudos recentes, foi constatado que cerca de 51% das substâncias biologicamente ativas, isoladas de fungos endofíticos eram desconhecidas anteriormente. Muitos outros produtos naturais bioativos têm sido produzidos por estes microrganismos, incluindo alguns compostos com atividades antibacterianas,²⁴ propriedades anticâncer, agentes de controle biológico e outros compostos bioativos com diferentes papéis funcionais.¹⁴

Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas, destacam-se os antibióticos β -lactâmicos, da classe das penicilinas (Figura 1, p. 35), e cefalosporina, como os exemplos mais conhecidos de

produtos de fungos. Outras substâncias de grande relevância como medicamentos, incluem o imunossupressivo ciclosporina A, e agentes redutores de colesterol, que são responsáveis por um mercado mundial de 1,5 e 8,4 bilhões de dólares, respectivamente.²⁵ Como fármacos potenciais, destacam-se aspercilina (Figura 1, p. 35) (ação em doenças gastrointestinais), papulacandinas (antifúngico), (Figura 1, p. 35) entre outros.²⁶

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, calculado em bilhões de dólares em prejuízos. Esses metabólitos, atuam como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas) (Figura 1, p. 35), além de várias fitotoxinas (herbicidas).²⁷

Ao longo desses anos, os fungos endofíticos, provaram ser uma rica fonte de novos compostos orgânicos, com interessantes atividades biológicas, e um alto nível de biodiversidade química. A maioria dos trabalhos sobre fungos endofíticos foi centrada em estudos com vegetais de florestas tropicais e temperadas, localizadas em diversas regiões do mundo.²⁸

O interesse em produtos naturais de microrganismos endofíticos é evidente, a partir da análise do número de artigos que têm surgido na literatura recentemente. O primeiro destes artigos foi de Gusman e Vanhaelen,²⁹ onde os autores descrevem os metabólitos secundários de 38 fungos endofíticos, juntamente com suas atividades biológicas. Em um estudo mais amplo Tan e Zou³⁰ reportaram 138 metabólitos isolados de bactérias e fungos até o ano de 2000. Em seu último review publicado em 2001, os mesmos autores, já descreviam 184 metabólitos, isolados de 59 microrganismos, sendo 96 destes metabólitos, inéditos na literatura.

Estes estudos vêm afirmar o grande potencial destes microrganismos na produção de compostos bioativos com aplicações nas mais diversas áreas.³¹

1.4.3.1 Produtos de fungos com propriedades antimicrobianas

Os antibióticos são definidos, como produtos naturais orgânicos, de baixo peso molecular, que são ativos em baixas concentrações, contra microrganismos. Muitos microrganismos endofíticos são fontes naturais de substâncias antimicrobianas, que são utilizadas para inibir, ou matar, uma ampla

variedade de agentes causadores de doenças perigosas, originadas por fungos, bactérias, vírus e protozoários que afetam os seres humanos e animais.³²

Dentre estas substâncias de origem endofítica estão a Criptocandina A, um peptídeo antimicótico isolado de *Cryptosporiopsis quercina* associado a *Tripterigeum wilfordii*³³, e os ácidos citônicos A e B, que inibem viroses, isolados de *Cytonaema sp*³⁴.

1.4.3.2 Produtos de fungos como agentes anticâncer

Paclitaxel[®] é um diterpenóide, altamente funcionalizado, isolado de *Taxomyces andreanae*, que juntamente com seus derivados, representam um grande grupo de agentes anticancerígenos produzido por endofíticos. Alguns alcalóides da classe das citocalasinas, também com propriedades antitumorais, são comumente encontrados em fungos endofíticos dos gêneros *Xylaria*, *Phoma*, *Hypoxylon*, e *Chalara*, mas que devido a sua alta toxicidade celular, não foram transformados em produtos farmacêuticos.³²

Também com propriedades anticâncer, foi isolado recentemente do fungo endofítico *Fusarium solani*, a camptotecina (Figura 1, p. 35), um alcalóide pentacíclico, além de dois derivados identificados como 9-metoxicamptotecina e 10-hidroxycamptotecina que se encontram em fase de estudos clínicos.¹¹⁹

1.4.3.3 Produtos de fungos como antioxidantes

Em vários artigos é discutida a correlação entre a capacidade antioxidante, e a presença de compostos fenólicos em muitos extratos de plantas medicinais. No entanto, não há informações disponíveis sobre a relação que existe entre a atividade antioxidante de alguns extratos de microrganismos endofíticos, e seus metabólitos. Em um estudo recente, foi investigada a relação entre a capacidade antioxidante e a presença de compostos fenólicos, em extratos de 292 fungos endofíticos morfológicamente distintos, isolados a partir de 29 plantas medicinais chinesas. A capacidade antioxidante das culturas de fungos endofíticos, foi significativamente correlacionada com o seu conteúdo fenólico. Este estudo

revela que os metabólitos produzidos por uma grande diversidade de fungos endofíticos pode ser uma fonte potencial de novos antioxidantes naturais.³⁵

Das substâncias já isoladas, a isopestacin (Figura 1, p. 35), isolada da cultura de *Pestalotiopsis microspora*, associado ao vegetal *Terminalia morobensis*, apresenta atividade antioxidante, possivelmente pela similaridade estrutural com substâncias da classe dos flavonóides.³⁶

1.4.3.4 Produtos de fungos como antimaláricos

Do microrganismo endofítico *Geotrichum* sp, associado ao vegetal *Crassocephalum crepidioides*, foram isoladas isocumarinas³⁷, do gênero *Phomopsis*, foram isoladas substâncias pertencentes à classe das xantonas: phomoxantonas A e B³⁸, do endofítico *Pullularia* sp. foram isolados derivados de peptídeos³⁹, além de taxanos produzidos pela espécie *Penicillium raistrickii* são descritos na literatura por apresentarem atividade antimalárica.⁴⁰

1.4.3.5 Produtos de fungos com atividade inseticida

Vários são os microrganismos endofíticos conhecidos por apresentarem propriedades inseticidas, como por exemplo, diterpenos indólicos produzidos pelo fungo *Nodulisporium* sp., associado a planta *Bontia daphnoides* apresentaram forte atividade inseticida contra larvas de moscas.³² Alcalóides quinolínicos⁴¹ e substâncias da classe dos rotenóides isolados de espécies de *Penicillium*, também foram considerados alternativas seguras e seletivas na busca por novos agentes inseticidas.⁴²

1.4.3.6 Produtos de fungos com atividade de inibição da enzima integrase (HIV)

Um importante trabalho realizado com *Xylaria* sp., envolve a descoberta de um novo sesquiterpenóide eremofilano que inibe a enzima integrase do vírus HIV-1, uma das três responsáveis por sua replicação. Esta enzima está ausente no homem, parecendo ser muito específica do HIV-1, sendo portanto, um alvo potencial para o desenvolvimento de agentes anti-HIV de alta seletividade.⁴³

Descobertos a partir de ensaios *in vitro*, realizados com extratos brutos obtidos do fungo endofítico *Ascochyta* sp., as substâncias puras isoladas Integrastatin A (Figura 1, p. 35), B e C também inibem a enzima integrase do vírus HIV-1.⁴⁴

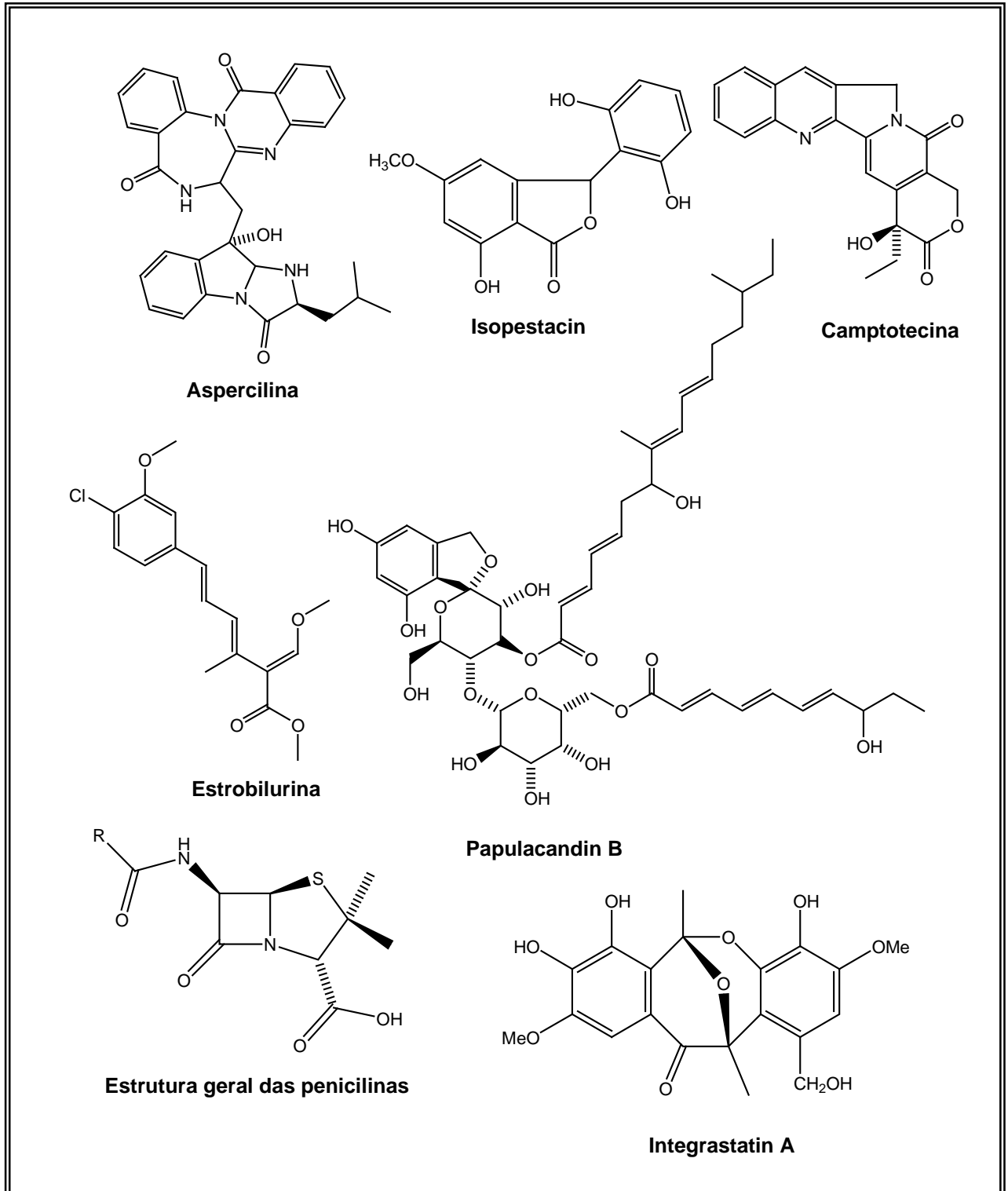


Figura 1: Substâncias bioativas de fungos

1.5 A ESPÉCIE VEGETAL HOSPEDEIRA

1.5.1 *Alibertia macrophylla* K. Schum (Rubiaceae).



Figura 2 - *Alibertia macrophylla* K. Schum

A família Rubiaceae inclui aproximadamente 637 gêneros, e cerca de 10.700 espécies, sendo considerada a quarta maior família dentro do grupo das Angiospermas.⁴⁵ Constitui-se fundamentalmente de plantas lenhosas de *habitat* tropical e subtropical, compreendendo ervas, arbustos e árvores. Apenas 20% de seus gêneros são plantas herbáceas que habitam regiões temperadas e frias da Europa, e norte do Canadá.⁴⁶ A importância econômica e terapêutica de algumas espécies de Rubiaceae é bem conhecida no Brasil, onde a família é muito bem representada, estando descritas, só no estado de São Paulo, 228 espécies, incluídas em 47 gêneros. As espécies são encontradas nas regiões de cerrado de Mogi-Guaçu, São Carlos, Botucatu, e na Mata Atlântica.⁴⁶

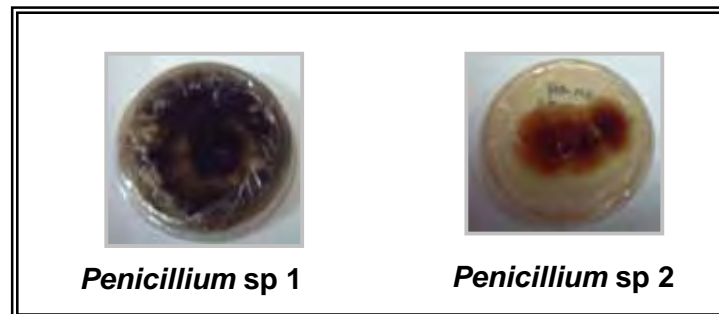
A espécie vegetal *Alibertia macrophylla* é uma árvore conhecida popularmente como marmelo ou marmelada. É encontrada em ambiente de cerrado (Figura 2, p. 36), e não apresenta qualquer uso popular descrito na literatura.⁴⁷

Estudos fitoquímicos realizados com folhas da espécie *Alibertia macrophylla* no Instituto de Química da Unesp-Araraquara, levaram ao isolamento de iridóides não glicosilados.⁴⁸ Dos extratos polares das folhas foram isolados o ácido cafeico, cafeoato de 2-feniletina e cafeoato de 2-metil-4-hidroxibutila e dos caules, triterpenos. Os extratos obtidos foram submetidos a bioensaios com os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, e *Colletotrichum gloeosporioides*, e mostraram uma forte ação fungitóxica. Esta atividade foi atribuída à presença dos derivados de ácido cafeico, das agliconas

iridoidais, e ao éster cafeoato de 2-metil-4-hidroxitubila, constatado pela inibição do crescimento dos respectivos fungos.⁴⁹

1.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Alibertia macrophylla*

1.6.1 Fungos *Penicillium* sp1 e *Penicillium* sp2



Os fungos *Penicillium* sp1 e *Penicillium* sp2 pertencem ao filo Ascomycota, a ordem Eurotiales e família Trichomaceae. O filo Ascomycota possui 2000 gêneros, e aproximadamente 30.000 espécies descritas, com grande importância econômica.⁵⁰

1.6.2 O gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é um dos mais importantes gêneros fúngicos, e muitas espécies são utilizadas na obtenção de medicamentos importantes, tais como penicilina e compactina. Outros, são empregados em fermentações de alimentos como *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti* e *P. nalgiovense*, os quais também podem causar deterioração de alimentos, e de materiais armazenados.⁵¹

Os fungos pertencentes a este gênero são fungos filamentosos, e suas colônias podem ter aspecto algodonoso ou pulverulento. São constituídos por estruturas multicelulares, em forma de tubo, denominadas hifas. As hifas são septadas, e ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio do interior do substrato, que funciona como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes é chamado micélio vegetativo. O micélio da superfície, que cresce acima do meio de cultivo é o aéreo.⁵² Durante a reprodução, o micélio aéreo se diferencia formando os

conídios. As cores do conídio especialmente as verdes são um importante critério na identificação das espécies. Sua cor depende do meio de cultivo, tempo de incubação, iluminação da colônia e fatores ambientais.⁵¹

1.6.3 Metabólitos bioativos isolados do gênero *Penicillium*

Do gênero *Penicillium*, já foram isolados diversos metabólitos secundários bioativos, que vão desde policetídeos macrocíclicos a diterpenos indólicos.⁵³ Entre os compostos isolados das diversas espécies deste gênero, estão o ácido berkelico, isolado de *Penicillium sp*, com propriedades anticancerígenas, os alcalóides paraherquamidas H e I, isolados de *Penicillium cluniae*, com atividade inseticida⁵⁴ e pironas, que exibem um largo espectro de atividades que incluem antibióticos, antifúngicos, citotóxicos, neurotóxicos e fitotóxicos.⁵⁵ Também são descritos policetídeos, que inibem a clivagem da enzima integrase do vírus HIV-1 isolado de *Penicillium chrysogenum*⁵⁶, assim como oligopeptídeos, com propriedades fitotóxica, citotóxicas e antifúngicas originárias do *Penicillium lilacinum*.³⁰ Alguns derivados do ácido tetrâmico, que possuem atividades antivirais e antibióticas⁵⁷, também foram isolados, além da mevastatina isolada do *Penicillium citrinu*, que é um potente agente redutor de colesterol.⁵⁸

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- ✓ Cultivar os fungos endofíticos isolados de *A. macrophylla* codificados como AM-01, AM-02, AM-03 e AM-04 em meio líquido MBD (meio de batata e dextrose) e sólido (milho) para a obtenção dos extratos brutos;
- ✓ Realizar o isolamento, determinação e/ou identificação estrutural dos metabólitos secundários, utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas;
- ✓ Submeter as substâncias puras isoladas aos ensaios para avaliação do potencial antioxidante, antifúngico, anticolinestático e inibidor de protease;
- ✓ Comparar os perfis químicos dos extratos brutos obtidos de *A. macrophylla* com os obtidos dos fungos endofíticos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Especificações dos materiais, instrumentos e técnicas utilizadas.

3.1.1 Especificações dos instrumentos

- ✓ As análises por CLAE no modo analítico foram realizadas em cromatógrafo Varian ProStar com detectores de arranjo de diodos (DAD) e UV-Vis e Varian ProStar acoplado ao detector ProStar UV-Vis, respectivamente. No modo preparativo, as análises por CLAE foram realizadas em equipamento Varian ProStar acoplado ao detector ProStar UV-Vis;
- ✓ As concentrações dos extratos e/ou frações foram efetuadas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Buchi);
- ✓ Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500, operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e a 125 MHz para o núcleo de ^{13}C e TMS como referência interna;
- ✓ Reveladores de CCDC: Lâmpada de radiação ultravioleta (254 e 366).
- ✓ Os espectros de massas de baixa e alta resolução foram obtidos em espectrômetro Modelo ultrOTOFQ - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker);
- ✓ Os espectros de absorção no IV foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer –FTIR Série 1600, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio;
- ✓ Os valores de rotação óptica específica foram obtidos em polarímetro Perkin-Elmer com lâmpada de sódio operando a 589 nm a 25°C. O volume da célula foi de 1mL e as amostras foram solubilizadas em MeOH.

3.1.2 Especificações das colunas e fases estacionárias

- ✓ Nas separações cromatográficas em coluna sob pressão foram utilizadas como fase estacionária sílica gel 60 (0,035-0,070 mm, Merck) em colunas de 32 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro e 10 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro. Nas separações utilizando sílica gel 60 (0,0063-0,200 mm, Merck) foi utilizada coluna de 55 cm de altura e 2,57 cm de diâmetro. Nas separações com sílica de fase reversa foi utilizada coluna de 30 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro e coluna de 20cm de altura e 3,7cm de diâmetro;
- ✓ Para o preparo das placas cromatográficas em camada delgada comparativa (CCDC), foram utilizadas placas de vidro de 5, 10 e 20x20 cm aplicada na forma de suspensão em água (1:2), com espalhador tipo Quickfitt formando-se uma camada de sílica 0,25mm de espessura;
- ✓ Para CLAE no modo analítico foram utilizadas colunas Phenomenex com sílica tipo C-18 (250 x 4,60mm; 5µm). No modo preparativo foi utilizado coluna Phenomenex com sílica C-18 (250 x 21,20mm; 10µm).

3.1.3 Especificações dos solventes e reagentes

- ✓ Os solventes utilizados apresentam grau de pureza P.A. e analítico;
- ✓ Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e os experimentos bidimensionais, foram utilizados solventes deuterados das marcas: Merck, Aldrich e Fluka;
- ✓ Para as partições e separações cromatográficas em coluna, dos extratos brutos obtidos em MBD e milho, foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol, acetonitrila das marcas: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt;
- ✓ Para as revelações em CCDC foram utilizados os seguintes reveladores: anisaldeído seguido de aquecimento em chapa ou exposição a iodo sublimado até o aparecimento das manchas correspondentes às substâncias presentes;

- ✓ Para o fracionamento dos extratos brutos em colunas cromatográficas, foram utilizados os seguintes solventes: metanol, acetonitrila, acetato de etila e hexano das marcas: Merck, J.T. Baker, Synth e Mallinckrodt;
- ✓ Para a extração, líquido-líquido, do meio MBD e sólido, foi utilizado acetato de etila e metanol das marcas: Merck, J.T. Baker, Synth e Mallinckrodt;
- ✓ Para as separações cromatográficas realizadas por CLAE foram utilizados metanol da marca Merck e água.

3.1.4 Meios para cultivo dos microrganismos

- ✓ Meios de cultura sólidos:
 - BDA – Batata Dextrose Agar (Sigma): 39g/L de água;
- ✓ Milho descascado “canjica” (Yoki): 90g em 75 mL de água;
- ✓ Meio de cultura líquido:
 - MBD – Meio de batata e dextrose (DIFCO): 24g/L de água.

3.1.5 Outros equipamentos

- ✓ Balança analítica – Mettler Toledo AG 245;
- ✓ Autoclave vertical – Quimis Aparelhos Científicos Ltda;
- ✓ Câmara de fluxo laminar – NUAIRE II, A/B3
- ✓ Incubadora rotatória (“shaker”) – Marconi.

4. Parte Experimental

4.1 Seleção da espécie vegetal

O conhecimento prévio da química e bioatividade de *Alibertia macrophylla* em estudos realizados pelo NuBBE, nos conduziram a escolha desta espécie vegetal para se isolar os endófitos associados, objetivando um melhor entendimento desta relação.

4.2 Coleta do material vegetal

As folhas de *A. macrophylla* foram coletadas na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha, e identificadas pela Profa. Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo. A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo (N° SP 370.915).

4.3 Obtenção das cepas fúngicas

As superfícies das folhas saudáveis de *A. macrophylla* foram esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 minutos) e etanol 70% (1 minuto), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (1 minuto). A água da segunda lavagem foi plaqueada para verificação da presença de fungos remanescentes. Pedacinhos de folhas seccionadas assepticamente (3 a 4) foram inseridos em meio de cultura sólida contendo batata-dextrose-ágar (BDA) ou ágar-ágar (AA), preparados com antibiótico (sulfato de gentamicina 50 mg/mL), para evitar o crescimento bacteriano*. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em frascos com água esterilizada.⁵⁰ Das folhas de *A. macrophylla* foram isolados quatro linhagens puras que foram codificadas como AM-01, 02, 03, 04. As linhagens isoladas estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica/IQAr-SP.

* O processo de isolamento e preservação das cepas fúngicas foi realizado pelo Dr. Geraldo H. Silva.

4.4 Identificação dos microrganismos

Os fungos codificados como AM-01 e AM-04 foram enviados à Fundação André Tosello e classificados como *Penicillium* sp. A identificação dos fungos codificados como AM-02 e AM-03, não foi possível por não ocorrer à formação de esporos, conseqüentemente, características morfológicas, possíveis de identificar em nível de gênero. O fungo codificado como AM-02 pertence à classe dos Dothideomycetes.

4.5 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

4.5.1 Cultivo dos endófitos AM-01 (*Penicillium* sp1), AM-02, AM-03 e AM-04 (*Penicillium* sp 2) em milho e obtenção dos extratos brutos

Os endófitos isolados de *A. macrophylla* foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados de sete a dez dias, de acordo com o período de crescimento de cada fungo, a 25 °C. O cultivo em meio sólido foi realizado em frascos de Erlenmeyers (500mL) contendo 90g de milho e 75mL de água cada (seis Erlenmeyers por fungo). Estes meios foram autoclavados três vezes (em dias alternados) à temperatura de 121°C, por 40 minutos. Após resfriamento os meios foram inoculados com os endófitos e incubados a 25°C de modo estático por 21 dias. Terminado o período de incubação, as culturas sólidas foram trituradas, e extraídas com MeOH (6 x 250mL), em seguida o solvente foi evaporado fornecendo os extratos brutos (Figura 3, p. 48). Este procedimento foi realizado duas vezes com o fungo endofítico codificado como AM-01.

Utilizando as mesmas condições de cultivo acima descritas também foi obtido o extrato bruto do milho (Branco) sem a inoculação dos micélios com o objetivo de realizar uma comparação a fim de identificar possíveis interferentes do meio extraído com metanol.

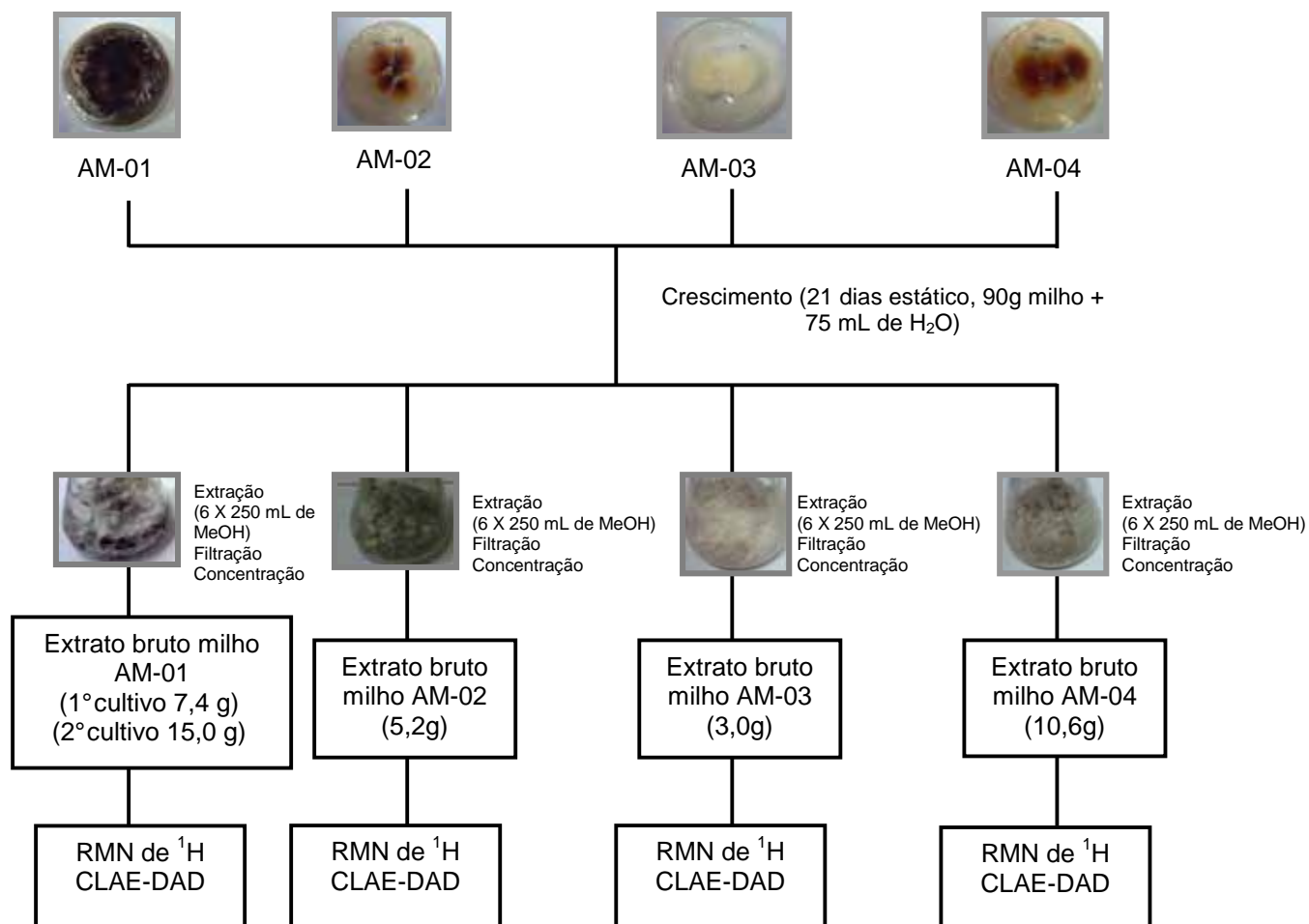


Figura 3 – Fluxograma da obtenção e análise dos extratos brutos obtidos em milho

Os extratos brutos obtidos em milho foram submetidos à análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD em gradiente exploratório e análise por RMN ¹H. O sistema utilizado para análise em CLAE foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H₂O/MeOH (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL/min. e λ de 254 nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda.

4.5.2 Partição do extrato bruto em MeOH obtido do cultivo em milho de AM-01 (*Penicillium* sp1)

O extrato bruto obtido em milho de AM-01 (*Penicillium* sp1) foi fracionado de acordo com a figura 4, p. 49.

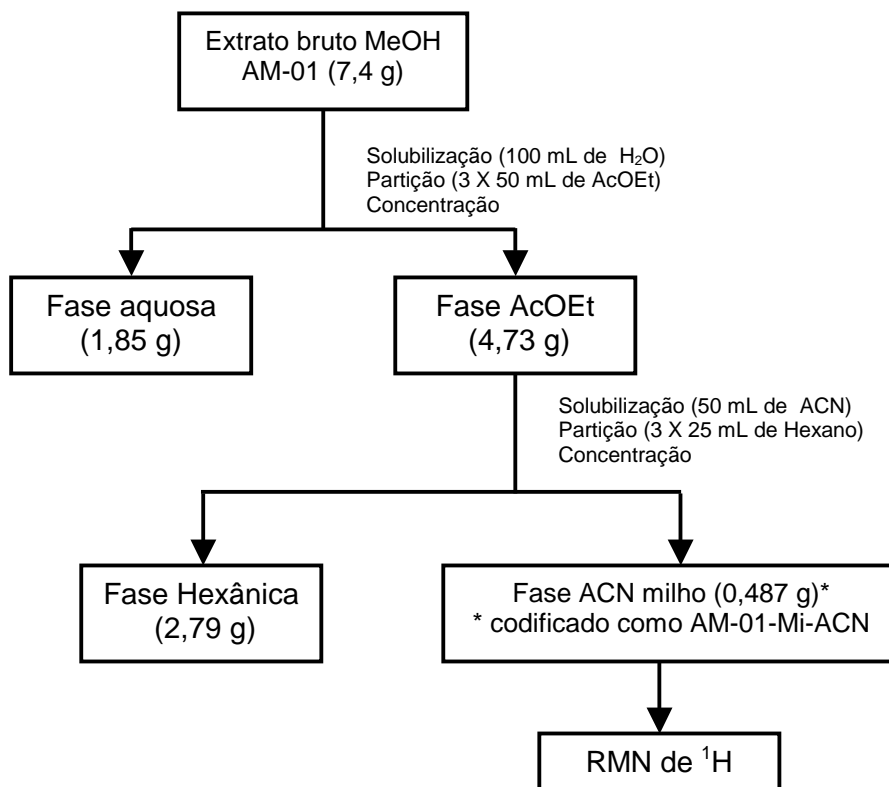


Figura 4 - Fluxograma da partição do extrato bruto em MeOH obtido do cultivo em milho de AM-01(*Penicillium* sp1)

4.5.2.1 Fracionamento de AM-01-Mi-ACN (*Penicillium* sp1)

A fração AM-01-Mi-ACN (0,487 g), foi fracionada por cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica de fase reversa como fase estacionária e sistema de eluição em gradiente H₂O/ACN (90:10→0:100). Foram coletadas sete frações de 120 mL cada (AM-01-Mi-ACN-A-G). As frações obtidas foram analisadas por CCDC, objetivando uma avaliação do grau de pureza. As massas obtidas destas frações, aliadas à resolução por CCDC, conduziram à seleção das frações AM-01-Mi-ACN-A a AM-01-Mi-ACN-D, para serem analisadas por RMN ¹H e por CLAE-DAD.

O sistema utilizado para análise foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C-18) e eluição em gradiente H₂O/ACN (95:05→0:100) por 40 min, permanecendo nesta condição por mais 10 min, num fluxo de 1,0mL/min e detector de arranjo de diodo com λ inicial de 254nm. A partir desta avaliação, as frações AM-01-Mi-ACN-C e AM-01-Mi-ACN-D foram escolhidas para separação em escala preparativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.2.2 Fracionamento e purificação das frações selecionadas

4.5.2.2.1 Fracionamento e purificação da fração AM-01-Mi-ACN-C

A fração AM-01-Mi-ACN-C foi submetida a uma separação em CLAE preparativo. Utilizado um sistema de eluição no modo isocrático com H₂O/ACN (97:03 v/v) por 60 minutos num fluxo de 15 mL/min e como fase estacionária foi utilizada coluna Phenomenex Luna com sílica C-18. O fracionamento resultou em seis sub-frações (AM-01-Mi-ACN-CP1 a CP6), que foram secas em evaporador rotatório. A sub-fração AM-01-Mi-ACN-CP3 se apresentou pura e foi submetida a análises de RMN uni bidimensionais para determinação estrutural.

4.5.2.2.2 Fracionamento e purificação da fração AM-01-Mi-ACN-D

A fração AM-01-Mi-ACN-D foi submetida a uma separação em CLAE preparativo. Foi utilizado um sistema de eluição no modo isocrático com H₂O/ACN (85:15 v/v) por 40 minutos num fluxo de 15 mL/min, e como fase estacionária foi utilizada coluna Phenomenex Luna com sílica C-18. O fracionamento resultou em 4 sub-frações (AM-01-Mi-ACN-DP1 a DP4), que foram secas em evaporador rotatório e suas massas obtidas. A sub-fração AM-01-Mi-ACN-DP4 se apresentou pura e foi submetida a análises uni e bidimensionais para identificação estrutural. Todo o procedimento de fracionamento, purificação e obtenção das substâncias puras estão resumidamente apresentadas na figura 5, p. 51.

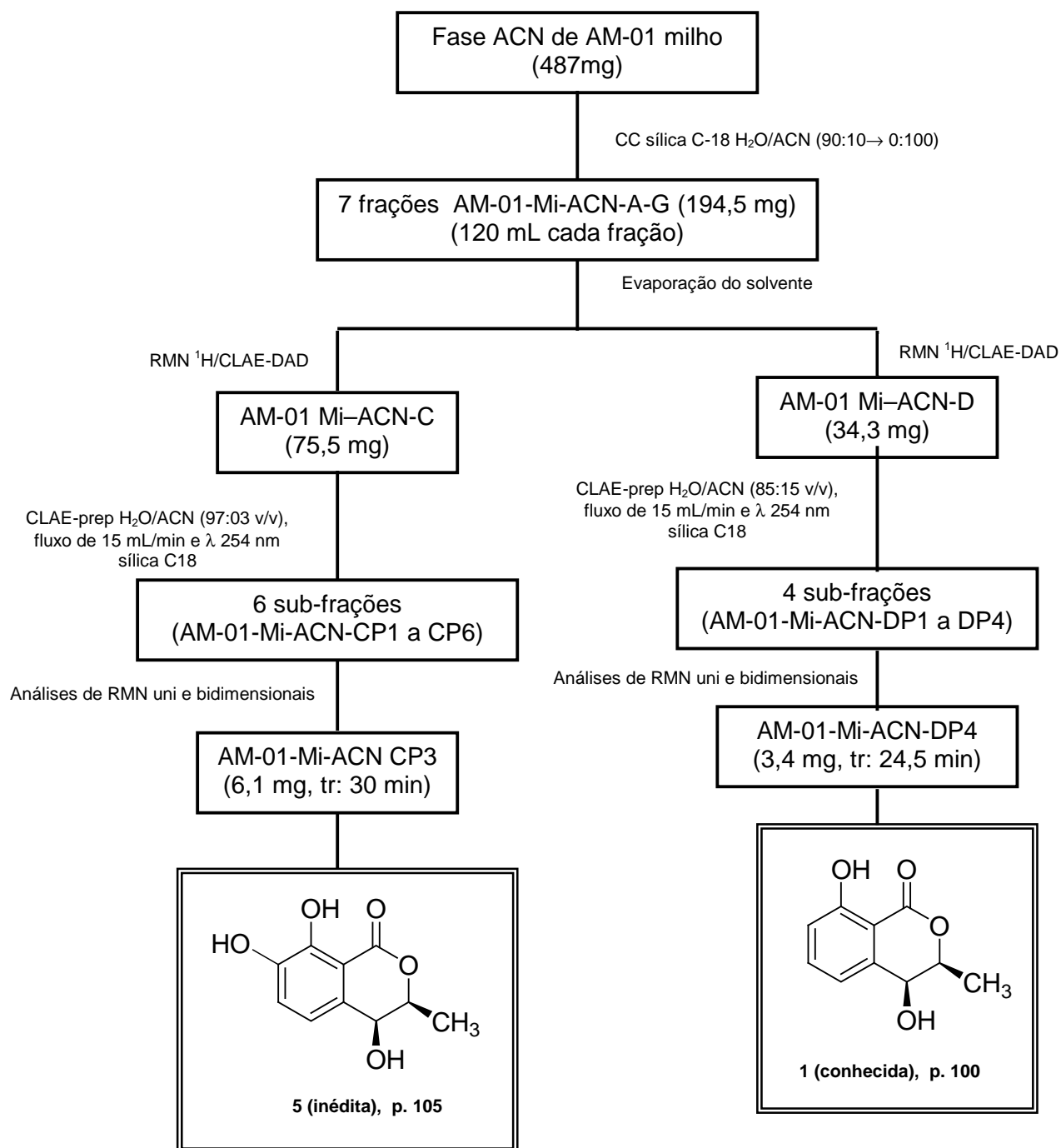


Figura 5 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AM-01-Mi-ACN e obtenção das substâncias puras.

Como a fase obtida em ACN de AM-01 (*Penicillium* sp1) se mostrou rica em substâncias da classe das isocumarinas, optou-se por realizar um novo cultivo em milho deste endófito a fim de se isolar outras substâncias desta mesma classe. Os procedimentos citados na figura 4, p. 47-49 para obtenção e

fracionamento do extrato bruto foram mantidos nesta segunda etapa de cultivo, e o fracionamento da fase ACN proveniente do segundo cultivo esta na figura 6, p. 52.

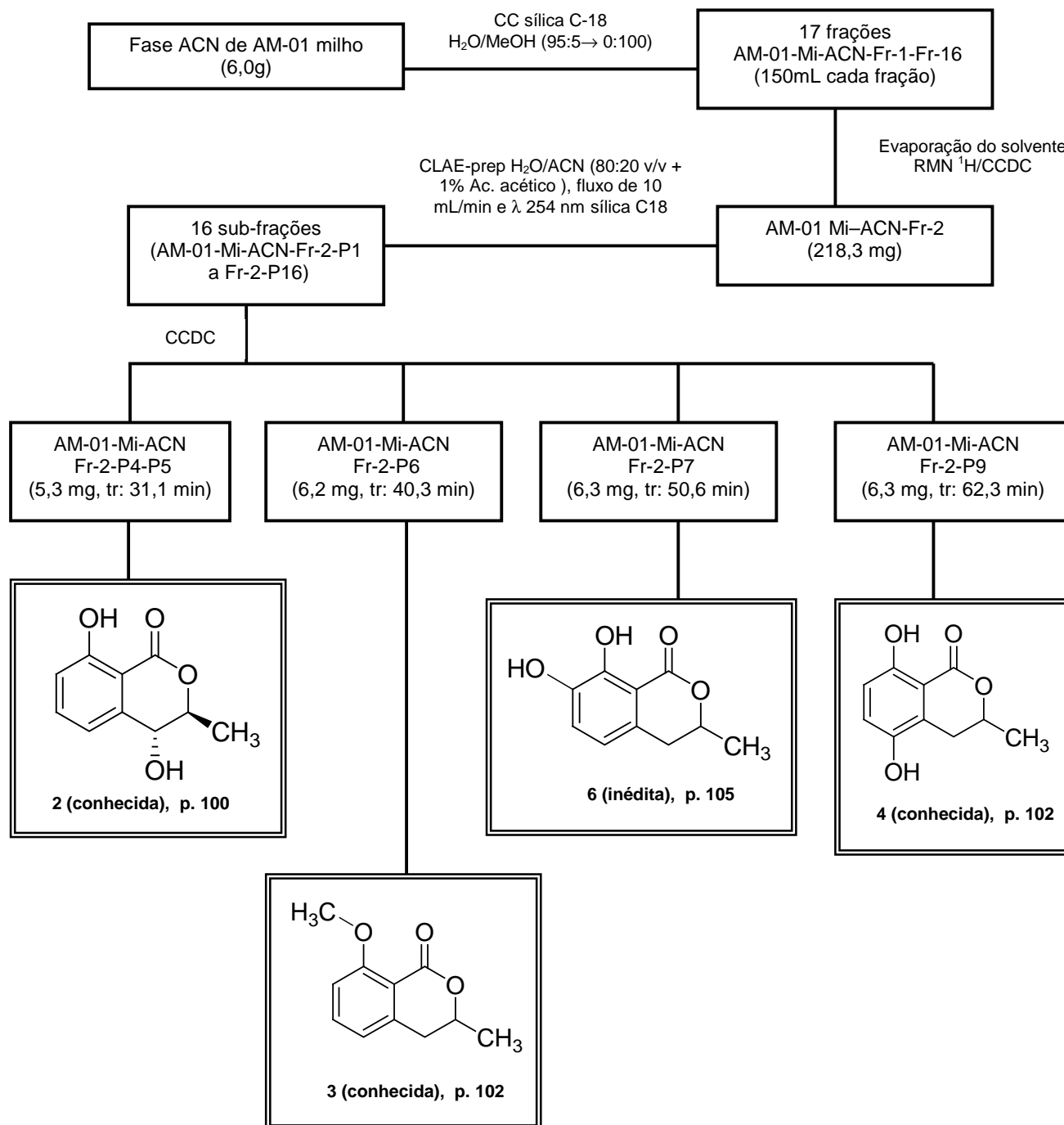


Figura 6 - Fluxograma do segundo fracionamento cromatográfico de AM-01-Mi-ACN e obtenção das substâncias puras.

4.5.3 Partição do extrato bruto em MEOH obtido do cultivo em milho de AM-02

O extrato bruto obtido em milho de AM-02 foi fracionado de acordo com a figura 7, p. 53.

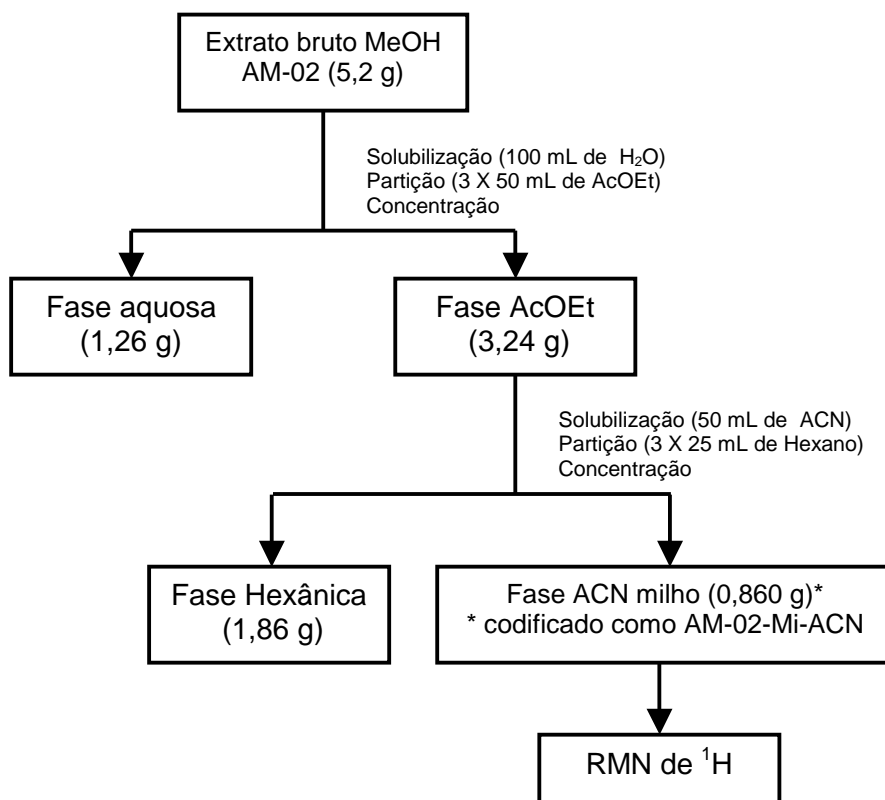


Figura 7 - Fluxograma da partição do extrato bruto em MEOH obtido do cultivo em milho de AM-02

4.5.3.1 Fracionamento da fração AM-02-Mi-ACN

A fração AM-02-Mi-ACN (0,860 g), foi fracionada por cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica de fase reversa como fase estacionária e sistema de eluição em gradiente H₂O/MeOH (80:20→0:100). Foram coletadas dez frações de 130 mL cada (AM-02-Mi-ACN-A-J). Estas foram analisadas por CCDC, objetivando uma avaliação do grau de pureza. As massas obtidas destas frações, aliadas à resolução por CCDC, conduziram à seleção das frações AM-02-Mi-ACN-C a AM-02-Mi-ACN-H, a serem analisadas por RMN ¹H e CLAE-DAD. O sistema utilizado para análise foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-

18) e eluição em gradiente H₂O/ACN (95:05→0:100) por 40 min, permanecendo nesta condição por mais 10 min, com fluxo de 1,0mL/min e λ inicial de 254nm. A partir desta avaliação, estas foram submetidas a procedimentos de purificação visando à obtenção de substâncias puras.

4.5.3.2 Fracionamento e purificação das frações selecionadas

4.5.3.2.1 Fracionamento e purificação da fração AM-02-Mi-ACN-C e D

As frações AM-02-Mi-ACN-C e D (67,4 mg) por apresentarem perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e submetidas a fracionamento via CLAE preparativo após otimização em CLAE analítico. Foi utilizado um sistema de eluição isocrático com H₂O/MeOH (60:40 v/v) por 30 minutos com fluxo de 15 mL/min e como fase estacionária foi utilizada coluna Phenomenex Luna com sílica C-18. O fracionamento resultou em 14 sub-frações (AM-02-Mi-ACN-CD-P1 a CD-P14). A sub-fração AM-02-Mi-ACN-CD-P13 se apresentou pura e foi submetida a análises de RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural.

4.5.3.2.2 Fracionamento e purificação da fração AM-02-Mi-ACN-F

A fração AM-02-Mi-ACN-F (100 mg) foi submetida a uma separação em CLAE_{prep.} sendo utilizado um sistema de eluição em gradiente com H₂O/MeOH (75:25→0:100) por 90 minutos com fluxo de 10 mL/min e como fase estacionária foi utilizada coluna Phenomenex Luna com sílica C-18. O fracionamento resultou em 16 sub-frações, (AM-02-Mi-ACN-FP1 a F-P16), que foram secas em evaporador rotatório e suas massas obtidas. A sub-fração AM-02-Mi-ACN-F-P12 mostrou-se pura e foi submetida a análises espectroscópicas para determinação estrutural.

4.5.3.2.3 Fracionamento e purificação da fração AM-02-Mi-ACN-G

A fração AM-02-Mi-ACN-G (230,34 mg) foi submetida à cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica C-18 fase reversa como fase estacionária, e H₂O/MeOH (70:30→0:100) como eluente. Foram coletadas 11 sub-frações de 135 mL cada (AM-02-Mi-ACN-GA a GK). As sub-frações AM-02-Mi-ACN-GG a GD foram agrupadas pois apresentaram comportamento cromatográfico semelhante. A sub-fração AM-02-Mi-ACN-GD mostrou-se pura e foi submetida a análises espectroscópicas para identificação estrutural. Todo o procedimento de fracionamento, purificação e obtenção das substâncias puras estão resumidamente apresentadas na figura 8, p. 56.

4.5.3.2.4 Fracionamento e purificação da fração AM-02-Mi-ACN-H

A fração AM-02-Mi-ACN-H (205 mg) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária Sílica Gel Acros e sistema de eluente em gradiente Hex/AcOEt (30:70→0:100) com posterior limpeza em MeOH 100%. Deste fracionamento resultou em 14 sub-frações (AM-02 Mi-ACN-HA a HN), que foram analisadas por CCDC e as que apresentaram comportamento cromatográfico semelhante foram reunidas. A fração AM-02-Mi-ACN-HD-HH, foi submetida a sucessivas purificações em coluna até a obtenção da substância pura. A fração AM-02 Mi-ACN-H se apresentou pura e foi submetida a análises de RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural. Todo o procedimento de fracionamento, purificação e obtenção das substâncias puras estão resumidamente apresentadas na figura 9, p. 57.

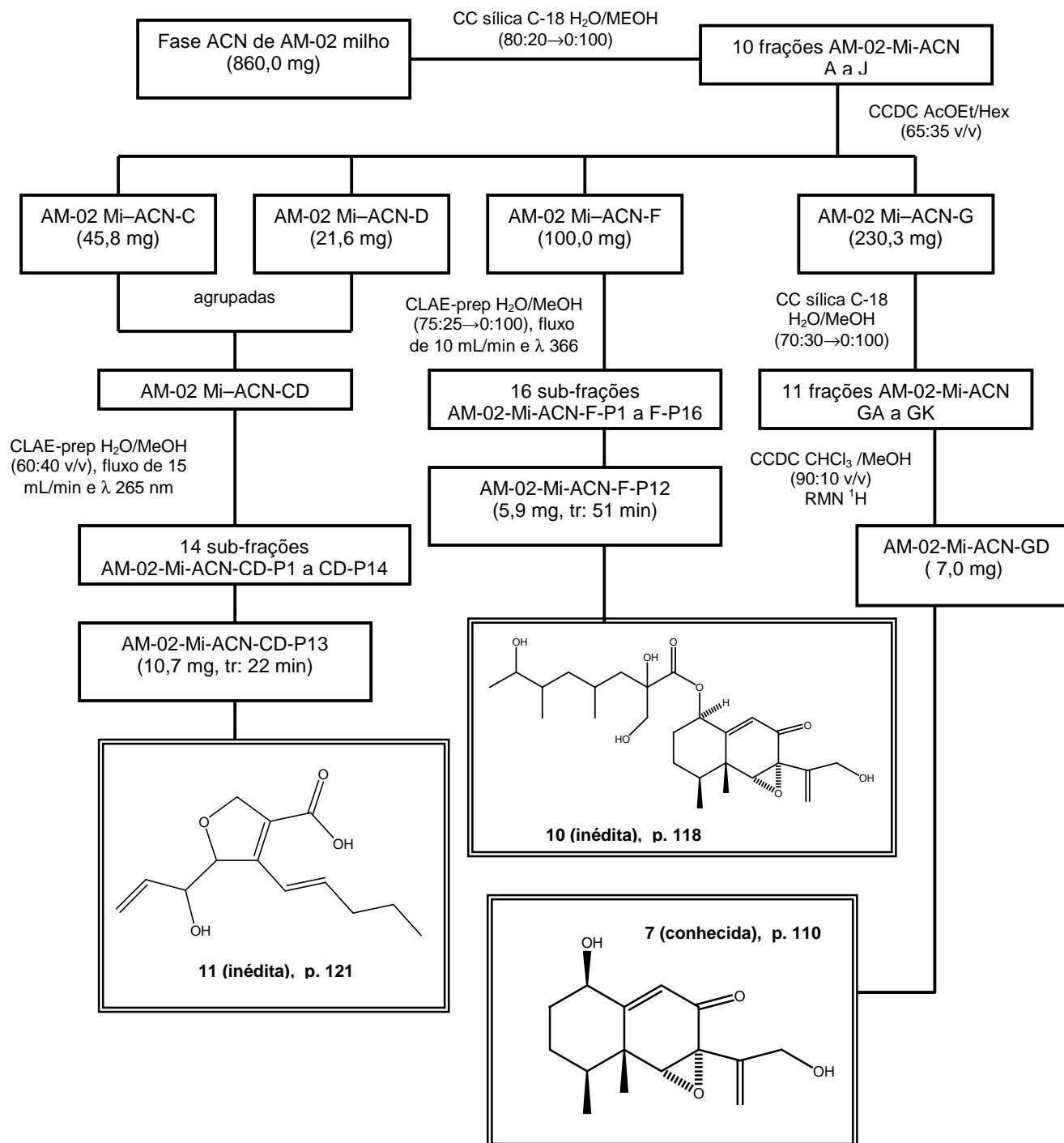


Figura 8 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fase ACN de AM-02 e obtenção das substâncias puras.

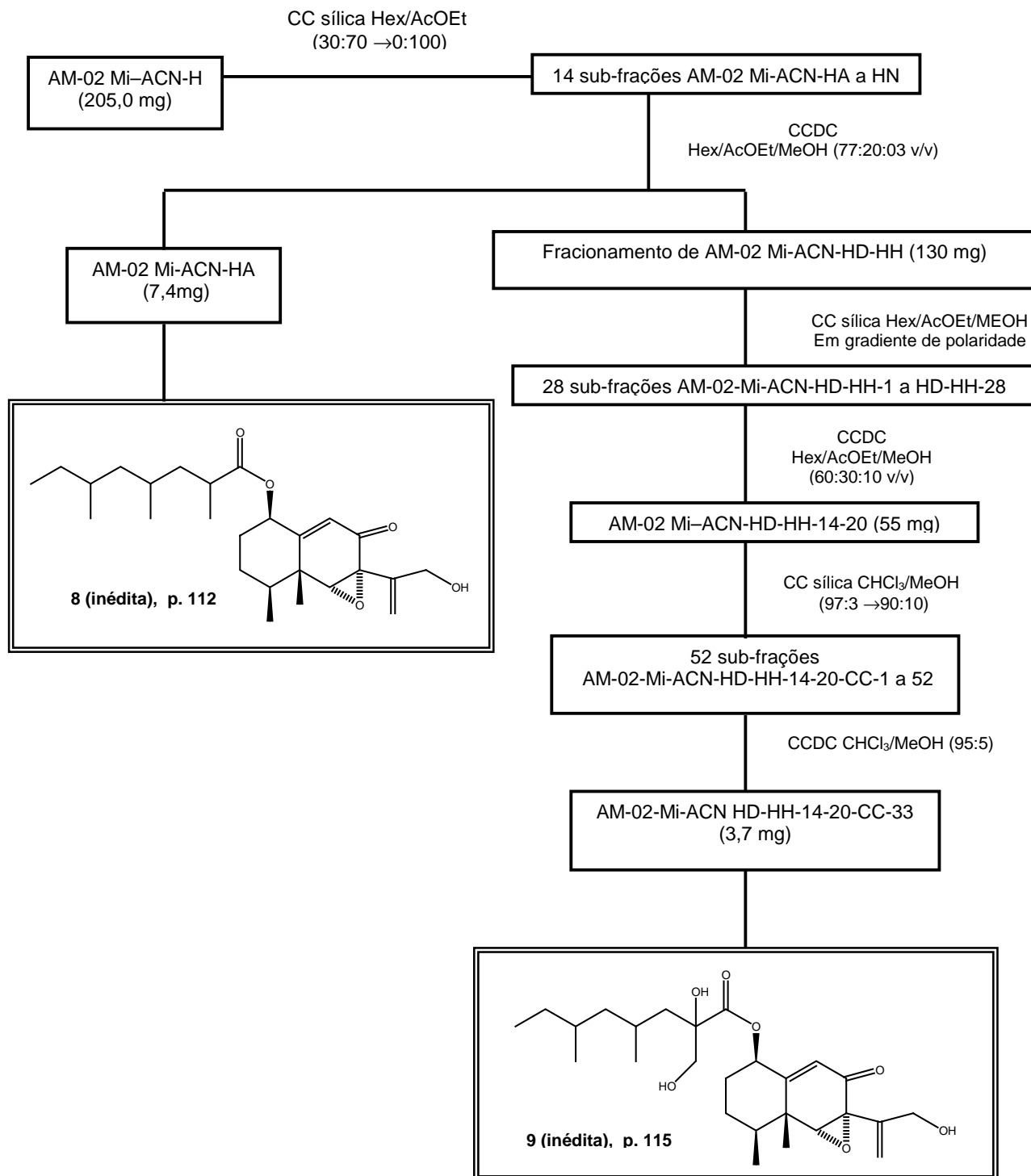


Figura 9 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AM-02 Mi-ACN-H e obtenção das substâncias puras.

4.5.4 Partição do extrato bruto obtido do cultivo em milho de AM-03

O extrato bruto obtido em milho de AM-03 foi fracionado de acordo com a figura 10, p. 58.

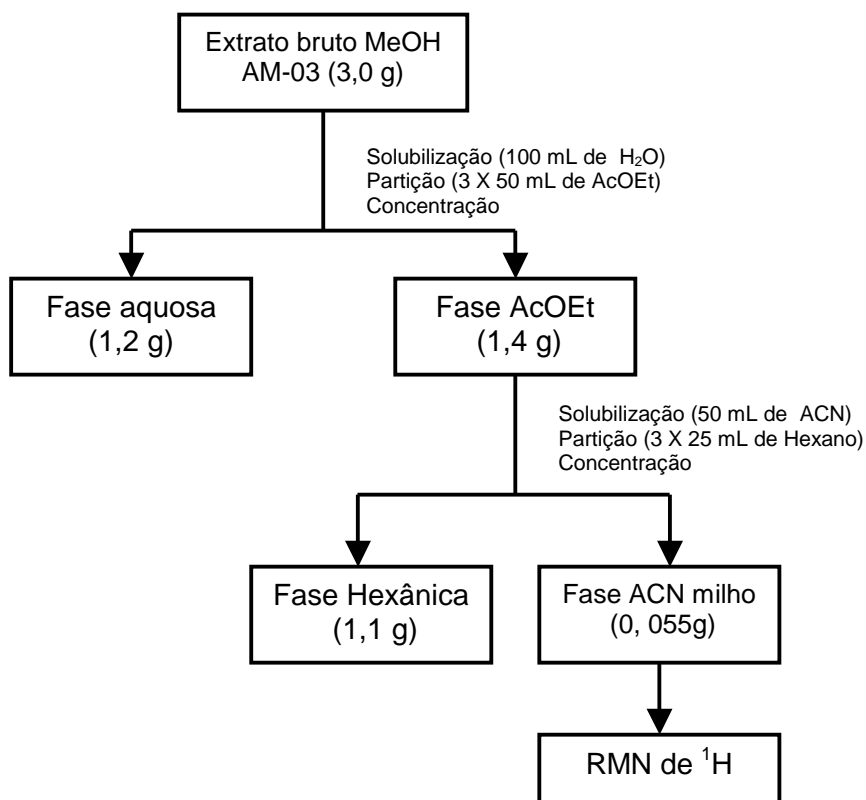


Figura 10 - Fluxograma da partição do extrato bruto em MEOH obtido do cultivo em milho de AM-03

4.5.5 Partição do extrato bruto em MEOH obtido do cultivo em milho de AM-04 (*Penicillium* sp2)

O extrato bruto obtido em milho de AM-04 (*Penicillium* sp2) foi fracionado de acordo com a figura 11, p. 59.

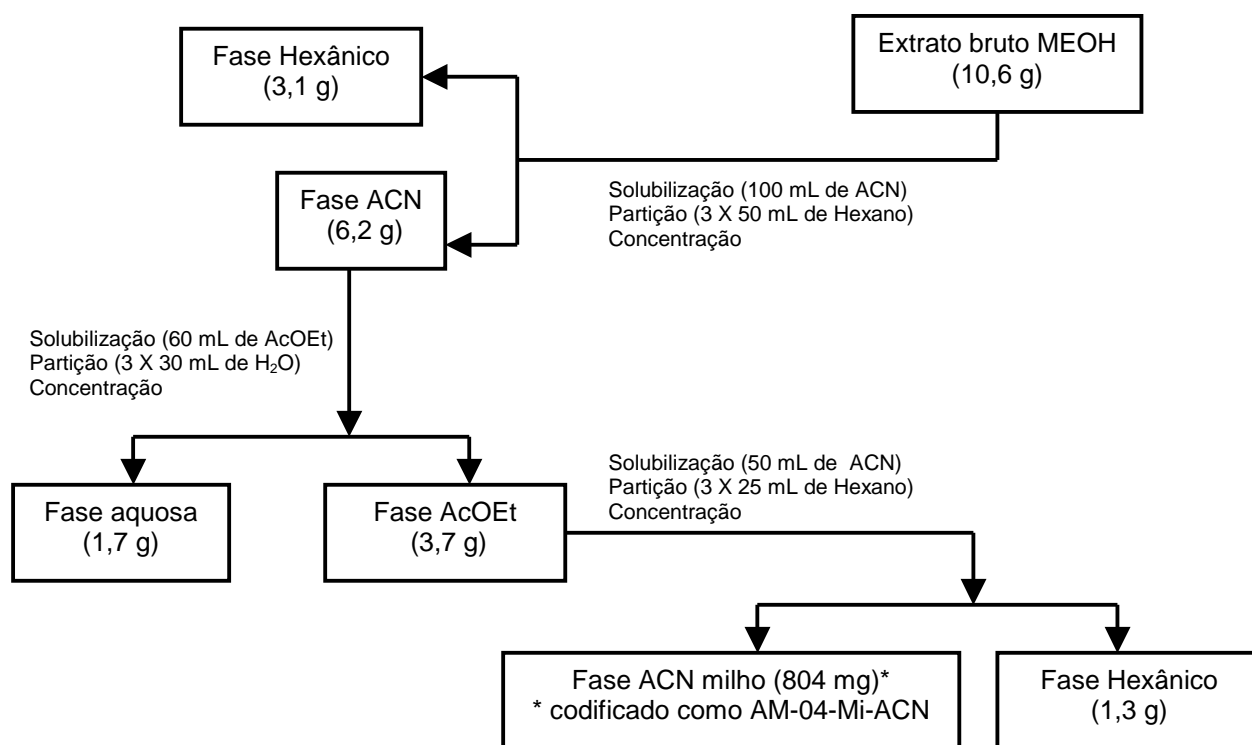


Figura 11 - Fluxograma da partição do extrato bruto em MEOH obtido do cultivo em milho de AM-04 (*Penicillium* sp2).

4.5.5.1 Fracionamento da fase ACN-milho de AM-04 (*Penicillium* sp2) e obtenção da substância pura

A fase AM-04-Mi-ACN (0,804g) foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica C-18 como fase estacionária e H₂O/ACN (90:10→0:100) como eluente. Foram coletadas dez frações de 120 mL cada (AM-04-Mi-ACN-A a J). A fração AM-02-Mi-ACN-D apresentou grau de pureza satisfatório e foi submetida a análises espectrométricas para determinação estrutural. Todo o procedimento de fracionamento, purificação e obtenção da substância pura esta resumidamente apresentadas na figura 12, p. 60.

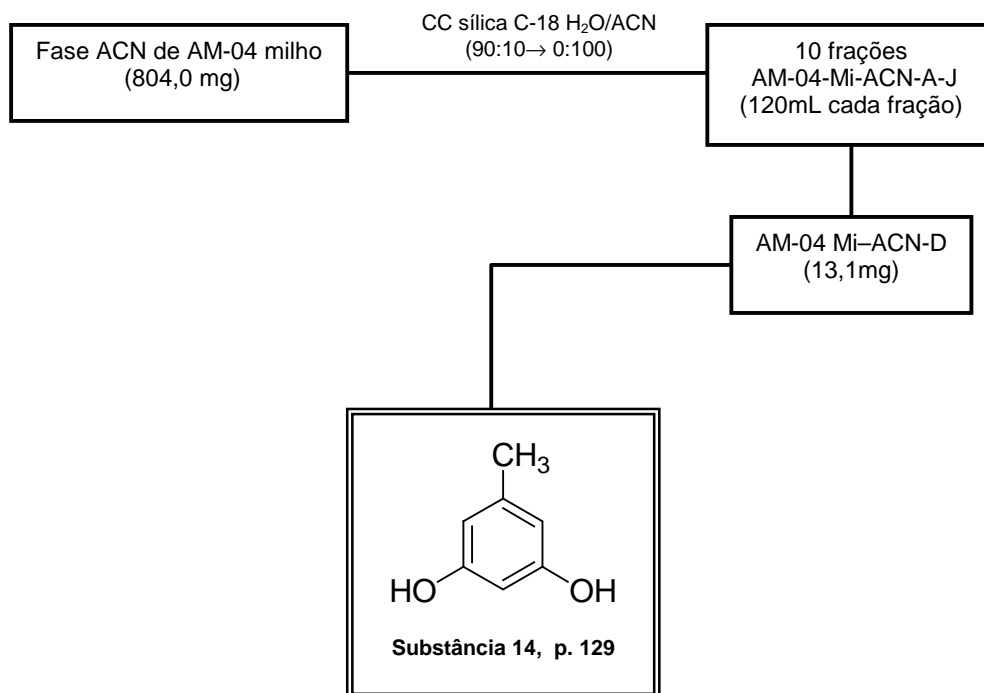


Figura 12 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AM-04 Mi-ACN

4.5.6 Cultivo dos endófitos AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e 04 (*Penicillium* sp2) em MBD e obtenção dos extratos brutos

Cada endófito foi repicado em vinte placas de Petri contendo BDA, e incubados em temperatura ambiente por sete ou dez dias de acordo com o período de crescimento de cada fungo. Após este período, cada fungo foi inoculado em 5L de meio de cultivo MBD (20 Erlenmeyers de 500 mL cada, com 250 mL de meio) e mantidos em incubadora rotatória “shaker” sob temperatura controlada 25°C por 28 dias. Em seguida, o caldo foi separado do micélio por filtração e submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila que foi evaporado em evaporador rotatório, fornecendo os extratos brutos (Figura 13, p. 61).

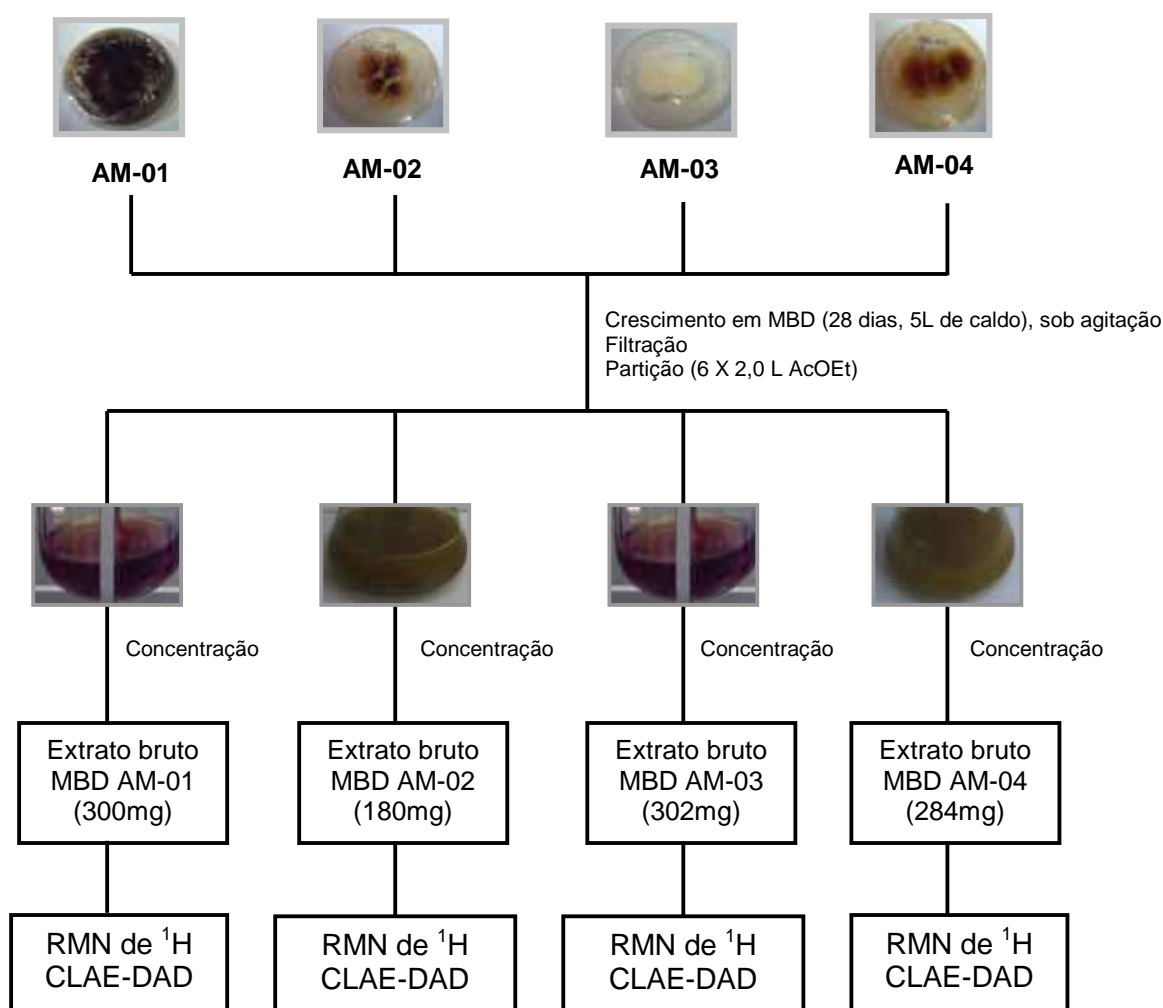


Figura 13 – Fluxograma da obtenção dos extratos brutos obtidos em MBD

Os extratos brutos obtidos em MBD foram submetidos à análises do perfil cromatográfico por CLAE-DAD em gradiente exploratório e análise por RMH ¹H. O sistema utilizado para análise em CLAE foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H₂O/MeOH (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL/min. e λ de 254 nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda.

4.5.7 Fracionamento do extrato em MBD de AM-03 (AM-03-MBD)

O extrato bruto AM-03-MBD (0,302 g) foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica flash como fase estacionária e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (03:97→0:100) como eluente. Foram coletadas oitenta frações de 190 mL cada (AM-03-MBD-1 a 80). As frações obtidas foram analisadas por CCDC e as que apresentaram comportamento cromatográfico semelhante foram reunidas em 22 frações. A fração AM-03-MBD-33-37 apresentou grau de pureza satisfatório e foi submetida a análises de RMN uni e bidimensionais para identificação estrutural. Todo o procedimento de fracionamento, purificação e obtenção das substâncias puras estão resumidamente apresentadas na figura 14, p. 62.

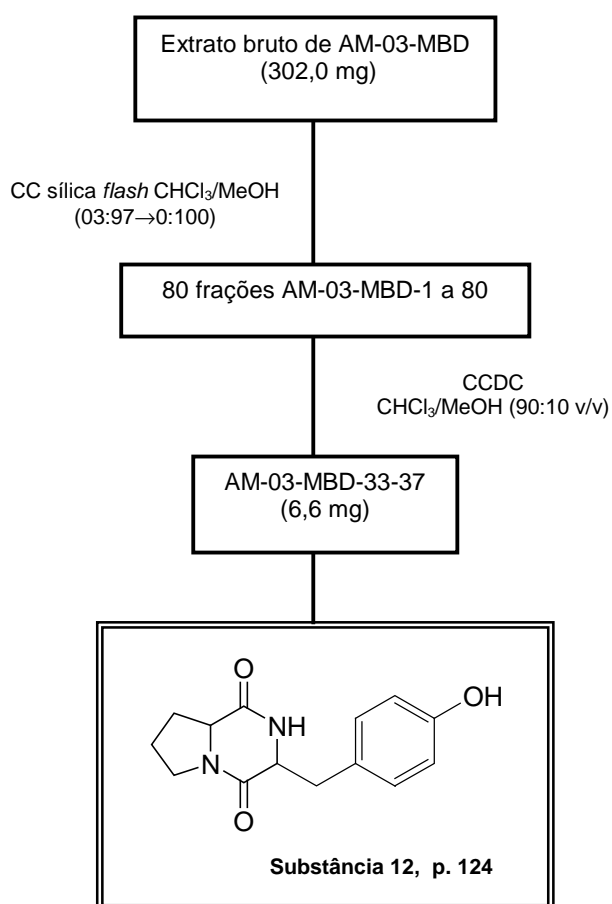


Figura 14 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AM-03-MBD e obtenção das substâncias puras.

4.5.8 Fracionamento do extrato em MBD de AM-04 (*Penicillium* sp2) (AM-04-MBD)

O extrato bruto obtido em MBD (284 mg) foi fracionado por cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica de fase reversa C-18 como fase estacionária e sistema de eluição em gradiente H₂O/ACN (90:10→0:100). Foram coletadas 5 frações de 150 mL cada (AM-04-MBD-A a E). As frações obtidas foram analisadas por CCDC, objetivando uma avaliação do grau de pureza. As massas obtidas destas frações, aliadas à resolução por CCDC, conduziram à seleção das frações AM-04-MBD-B (40,2 mg) e AM-04-MBD-C (30,5 mg), para serem analisadas por RMN¹ H e por CLAE-DAD. O sistema utilizado para análise foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H₂O/ACN (95:05→0:100) por 40 min, permanecendo nesta condição por mais 10 min, com fluxo de 1,0mL/min e detector de arranjo de diodo com λ inicial de 254nm. A partir desta avaliação, as frações AM-04-MBD-B e AM-04-MBD-C foram levadas para separação em escala preparativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.8.1 Fracionamento e purificação das frações selecionadas

4.5.8.1.1 Fracionamento e purificação da fração AM-04-MBD-B

A fração AM-04-MBD-B (40,2 mg) foi submetida a uma separação em CLAE preparativo. Foi utilizado um sistema de eluição no modo isocrático com H₂O/ACN (90:10 v/v) por 40 minutos com fluxo de 12 mL/min, e como fase estacionária foi utilizada coluna Phenomenex Luna com sílica C-18. O fracionamento resultou em 5 sub-frações (AM-04-MBD-B-P1 a B-P5), que foram secas em evaporador rotatório e suas massas obtidas. A sub-fração AM-04-MBD-B-P2 apresentou-se pura e foi submetida a análises uni e bidimensionais para identificação estrutural. Todo o procedimento de fracionamento, purificação e obtenção das substâncias puras estão resumidamente apresentadas na figura 15, p. 64.

4.5.8.1.2 Fracionamento e purificação da fração AM-04-MBD-C

A fração AM-04-MBD-C (30,5 mg) apresentou aspecto cristalino e após recristalização em MeOH levou ao isolamento da substância **13**.

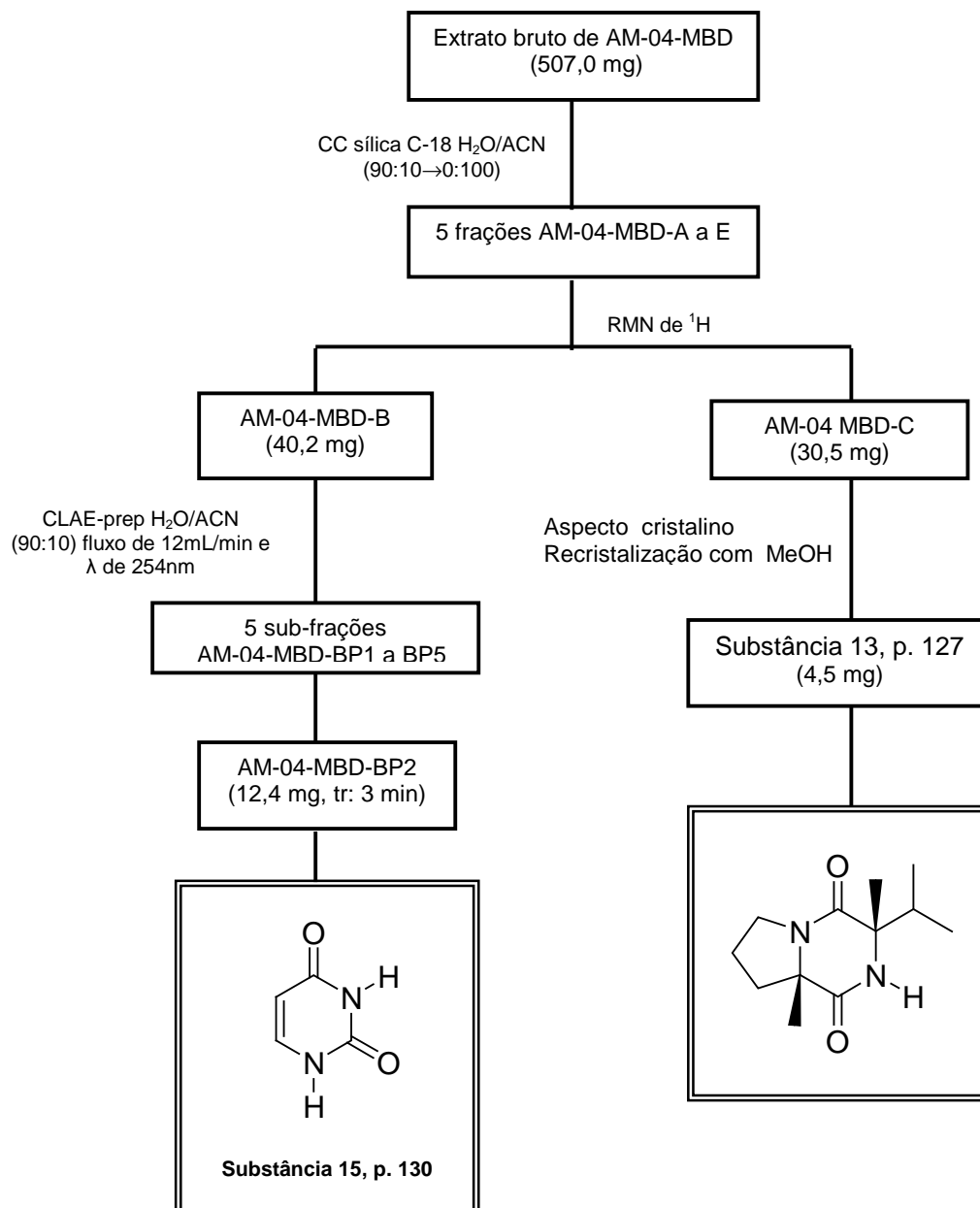


Figura 15 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AM-04-MBD e obtenção das substâncias puras.

4.5.9 Obtenção dos perfis cromatográficos

Os perfis cromatográficos dos extratos brutos de *A. macrophylla* e dos fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04, foram realizados por CLAE-DAD em coluna sílica Phenomenex fase reversa C-18 e eluição em gradiente H₂O/MeOH (95:05→0:100 - 1,2mL/min., λ de 254) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min.

4.5.10 Ensaio Biológicos Realizados

Os extratos brutos obtidos em milho e MBD e as substâncias puras isoladas foram submetidos à avaliação da atividade antifúngica, antioxidante, anticolinesterásica, antimalárica e avaliação de inibição de protease.

4.5.10.1 Bioautografia com fungos do gênero *Cladosporium* – detecção de atividade antifúngica.

Os extratos brutos (400µg), e as substâncias puras (100µg, 50µg, 25µg, 10µg, 5µg e 1µg), foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel e eluídas com solventes adequados AcOEt/Hex e MeOH/AcOEt. Em seguida foram evaporadas para completa remoção dos solventes. As cromatoplasmas foram borrifadas com uma suspensão de fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, na concentração de 5×10^7 esporos/mL, em solução de glicose e sais. As placas aspergidas com suspensão de fungos foram incubadas em câmara úmida a 25°C, durante 48 horas, na ausência de luz. Decorrido o período de incubação, o fungo cresceu por toda placa, exceto nas regiões onde se encontravam as substâncias ativas inibindo o crescimento do fungo, em comparação com o padrão positivo nistatina 1µg *.⁶⁰

*Ensaio realizado no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal – sob orientação da Dra. Maria Claudia Marx Young.

4.5.10.2 Determinação da atividade anticolinesterásica (AChE)

O ensaio qualitativo e quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD) consiste na eluição de uma cromatoplaça da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), galantamina (Figura 16, p. 66). As amostras e o controle foram aplicados em ordem decrescente de massa, objetivando encontrar a menor quantidade inibidora da AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66 U) (solução A) e o solvente evaporado com secador de cabelo. A placa cromatográfica foi incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a (solução D).⁶¹

O aparecimento de mancha branca sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase*.

Soluções:

- ✓ Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto n° C2880) foi dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9), a solução estoque foi armazenada a 4 °C e no momento do uso foi adicionado 0,1% de albumina de soro bovino;
- ✓ Solução B: 250 mg de acetato de 1-naftila 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.

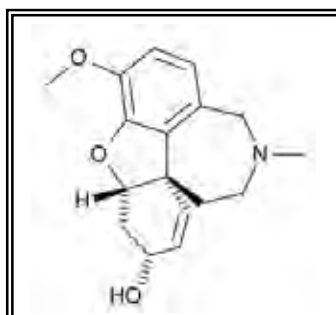


Figura 16 - Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição de AChE

*Ensaio realizado no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal – sob orientação da Dra. Maria Claudia Marx Young.

4.5.10.3 Ensaio espectrofotométrico com 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH)

Os padrões utilizados para comparar a atividade seqüestradora de radicais livres dos extratos brutos de AM-01, 02, 03 e 04 foram a quercetina diidratada, o α -tocoferol (vitamina E) e a rutina, dissolvidos em MeOH, nas seguintes concentrações: 33,3 μ M; 26,7 μ M; 20,0 μ M; 13,3 μ M; 6,7 μ M; 3,3 μ M; 1,7 μ M.

A solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,04g/L, em MeOH. Os extratos foram diluídos em MeOH nas concentrações: 0,667 mg/mL; 0,333 mg/mL; 0,0100 mg/mL; 0,0067 mg/mL; 0,0033 mg/mL; 0,0027 mg/mL; 0,0017 mg/mL. A análise foi feita em microplacas transparentes de 96 poços, com capacidade para 400 μ L.

A primeira placa foi preenchida com o branco (300 μ L de MeOH por poço), e sua leitura foi feita antes da placa contendo os extratos. A segunda placa foi preenchida com as sete diferentes concentrações do extrato (100 μ L do extrato por poço), sendo que a última fileira de poços, continha apenas MeOH e foi utilizada como controle. Então, foram adicionados 200 μ L da solução de DPPH em cada poço. Todas as amostras foram analisadas em triplicada e tiveram seus desvios padrões calculados. As amostras que apresentaram desvio maior que 4 foram testadas novamente.

A placa foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos após a adição da solução de DDPH, posteriormente, foi feita a leitura em leitor de microplacas Synergy-HTS em λ 517 . Os dados obtidos foram então processados empregando a fórmula a seguir que foi inserida no programa KC4, o qual calculou e gerou os gráficos da atividade seqüestradora de radicais livres.

Processamento dos dados:

Fórmula: % de seqüestro do radical livre estável DPPH

$$\% \Delta A = \frac{(\text{absorbância do CONTROLE-DPPH} - \text{absorbância da AMOSTRA ou PADRÃO}) * 100}{\text{Absorbância do CONTROLE-DPPH}}$$

A atividade antioxidante foi expressa em termos de IC₅₀ (concentração em mg/mL do extrato, necessário para seqüestrar 50% do radical livre DPPH). O radical DPPH tem um máximo de absorção em 515 nm, o decréscimo na absorbância, devido à captura de um hidrogênio radicalar cedido pela espécie antioxidante e conseqüente estabilização do radical, é evidenciado pela mudança da cor violeta para amarelo*.⁶²

* Ensaio realizado no Instituto de Química em Araraquara – Departamento de Química Orgânica pela aluna Caroline Mariana Pereira.

4.5.10.4 Atividade potencial antimalárica através da inibição da formação de β-hematina

As seguintes soluções foram preparadas:

- Amostras: 100 µL de cloreto de hemina (6,4 mM em NaOH 0,1 M), 50 µL da amostra (2,5 mg/mL, extrato bruto), 200 µL de acetato de sódio 0,5 M e 50 µL de ácido acético 17,4 M.
- Controle: 100 µL de cloreto de hemina (6,4 mM em NaOH 0,1 M), 50 µL de solvente, 200 µL de acetato de sódio 0,5 M e 50 µL de ácido acético 17,4 M.
- Branco: 50 µL da amostra (2,5 mg/mL), 100 µL de NaOH 0,1 M, 200 µL de acetato de sódio 0,5 M e 50 µL de ácido acético 17,4 M.

As soluções foram incubadas a 37°C por uma noite. Após incubação, os tubos contendo as soluções foram centrifugados por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado lavado com 400 µL de DMSO, e centrifugado por 15 minutos. Por último, foi lavado com 400 µL de metanol e centrifugado por 15 minutos novamente. Para a quantificação foram adicionados 1,0 mL de NaOH 0,1 M, sendo que uma alíquota de 10 µL desta solução, foi transferida para uma microplaca onde foram adicionados 190 µL NaOH 0,1 M, e a absorbância foi medida a λ 405 nm. A quinina e a cloroquina foram utilizadas como padrões. Este ensaio foi realizado em triplicata*.⁶³

Processamento dos dados:

Fórmula: % de inibição da formação de β -hematina

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

*Ensaio realizado no Instituto de Química em Araraquara – Departamento de Química Orgânica pela aluna Caroline Mariana Pereira.

4.5.10.5 Avaliação do potencial de inibição das proteases subtilisina e pepsina

Reagentes: Protease HIV-1, acetil-pepstatina, substrato fluorogênico Arg-Glu-(EDANS)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-Lys-(DALBCYL)-Arg (EDANS-DABCYL), subtilisina Carlsberg, pepsina, *N*-succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (AMC), aprotinina e DMSO grau espectrofotométrico (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, EUA).

Ensaio Enzimático: enzimas, substratos, inibidores padrão e solução tampão:

- ✓ protease HIV-1 (25 nM), substrato fluorogênico EDANS-DABCYL (2 μ M), pepstatina (50 μ M), tampão acetato 0,1 M (pH 4,7) (1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% DMSO e 1 mg/mL BSA);
- ✓ pepsina (1,7 nM), substrato fluorogênico EDANS-DABCYL (2 μ M), pepstatina (50 μ M), tampão acetato 0,1 M (pH 4,4);
- ✓ subtilisina Carlsberg (37 nM), substrato fluorogênico EDANS-DABCYL (2 μ M), aprotinina (50 μ M), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5);

As soluções enzimáticas foram preparadas no dia do experimento. As soluções contendo substratos ou inibidores padrão ou amostras testadas foram congeladas em freezer a -80° C. As soluções tampão foram armazenadas a 8° C.

Protocolo experimental e análise por espectrometria de fluorescência

Inicialmente a enzima foi incubada com as amostras a serem testadas ou com o inibidor padrão por 1 hora em solução tampão. Em seguida 20 μ L desta mistura foi transferida para as micro-placas pretas opacas, e 80 μ L do substrato foi adicionado automaticamente pelo injetor do aparelho para se dar início à reação enzimática. Imediatamente iniciou-se a leitura em intervalos de aproximadamente 1

minuto durante o período de 1 hora. A intensidade de fluorescência foi medida em comprimento de onda de 360 nm de excitação e de 460 nm de filtro de emissão.

As medidas de atividade inibitória sobre as proteases por meio da espectrometria de fluorescência foram realizadas em um leitor de microplacas com multidetecção Synergy™ HT (Bio-Tek® Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA) (figura 7). As intensidades de fluorescência medidas foram analisadas por meio do software de análise de dados KC4™ (Bio-Tek® Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA), considerando a intensidade de fluorescência (IF) como resultado da atividade enzimática.^{64,65}

Os dados foram transferidos para o Microsoft Excel e comparado com os resultados obtidos com o ensaio padrão (enzima + tampão + substrato), com o inibidor padrão (enzima + inibidor + substrato) e com as amostras experimentais (enzima + amostra + substrato). Para todas as amostras testadas foram realizados ensaios “branco” (10 µL amostra + 90 µL tampão), para medida da fluorescência basal, detecção de autofluorescência das substâncias, e determinação da sensibilidade de operação do espectrofotômetro.

O “branco” foi lido por um período de 1 hora, em triplicata, sendo calculados a média, o desvio padrão (DV) e o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) (DVR). A média é utilizada posteriormente para subtração dos valores obtidos com os ensaios enzimáticos.

Inicialmente, é realizado um *screening* utilizando-se duas concentrações das amostras testadas (1 µg/mL e 0,1 µg/mL). A média aritmética dos valores de IF das triplicatas é calculada minuto a minuto. Deste valor obtido é subtraída a média encontrada no respectivo ensaio “branco”. Os valores finais obtidos são comparados aos resultados do ensaio padrão para determinar se houve ou não diminuição da atividade enzimática. A análise da atividade das amostras testadas é verificada por meio da porcentagem de inibição (% I), i.e, porcentagem de diminuição da atividade enzimática em relação ao padrão, de acordo com a fórmula abaixo*

$$\% I = [(IF \text{ padrão} - IF \text{ inibidor}) / IF \text{ padrão}] * 100$$

onde:

IF padrão = intensidade de fluorescência obtida no ensaio padrão

IF inibidor = intensidade de fluorescência obtida no ensaio com amostra testada.

*Ensaio realizado no IQ-Araraquara, sob a supervisão do Dr. Otávio Flausino Jr.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento, purificação e cultivo dos endófitos

No procedimento de isolamento e purificação dos endófitos, foram utilizados três diferentes meios de cultura; batata-dextrose-ágar (BDA), extrato de malte (EM) ou ágar-ágar (AA) que possuem nutrientes primários para o crescimento dos fungos. No entanto, devemos considerar a hipótese de que existem linhagens fúngicas que somente crescem em condições especiais na presença de nutrientes específicos. Neste contexto, os fungos isolados foram os que melhores se adaptaram as condições de crescimento empregadas.

Considerando também, que cada microrganismo endofítico possui diferentes condições ótimas de cultivo e como não faz parte dos objetivos de nosso trabalho determina-las, foi empregado a mesma metodologia para todos os endofíticos em estudo.

5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

5.2.1 Análise dos extratos brutos obtidos do cultivo em milho dos fungos endofíticos AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e AM-04 (*Penicillium* sp2) por CLAE-DAD

As análises dos cromatogramas em CLAE-DAD dos extratos brutos obtidos em milho dos fungos endofíticos AM-01 (*Penicillium* sp1), 02 e AM-04 (*Penicillium* sp2) (Figura 17, p. 73) revelaram a presença de vários picos com polaridades variando de média a alta e boa resolução, evidenciando esta técnica como um bom método de separação cromatográfica. Com exceção do extrato bruto de AM-03 que não apresentou boa resolução ainda que em diferentes comprimentos de onda.

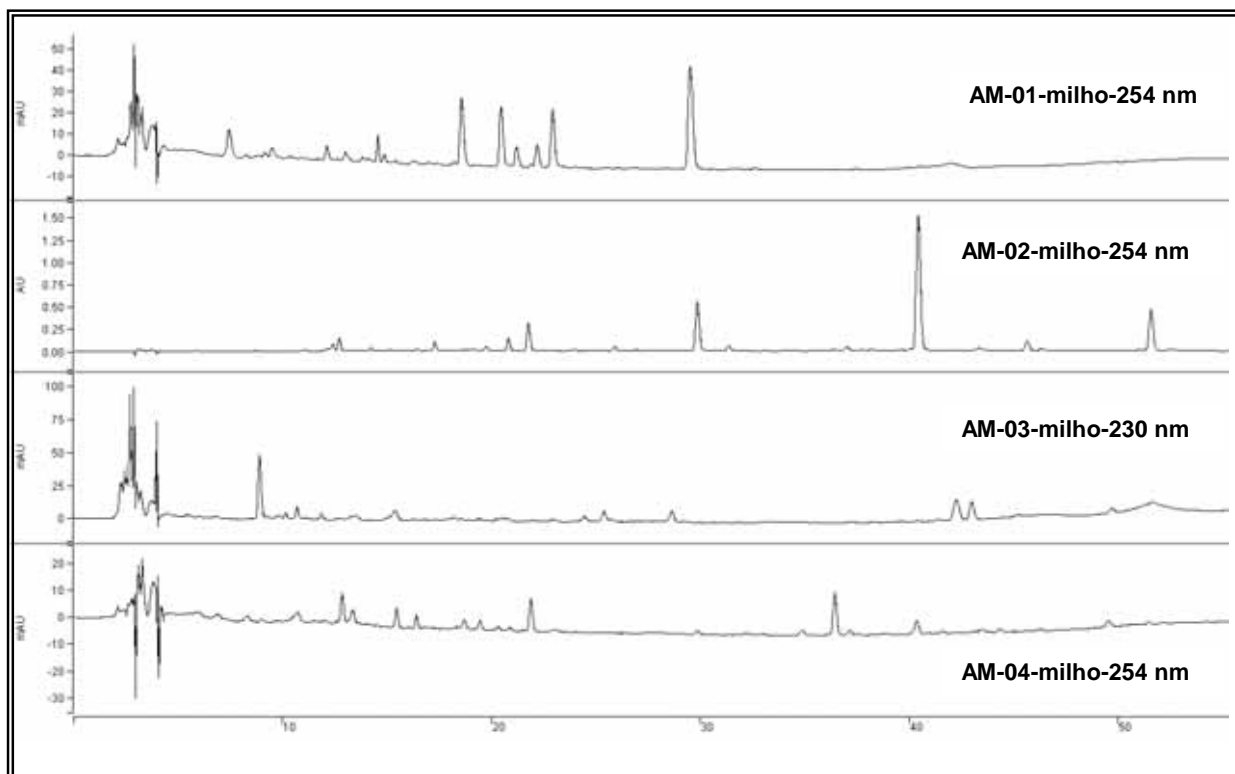


Figura 17 – Cromatogramas em CLAE-DAD dos extratos brutos obtidos em milho de AM-01, 02 e 04 registrados em 254 nm e 230 nm para AM-03.

5.2.2 Análise do extrato bruto obtido em milho por RMN de ^1H

A fim de diminuir e/ou eliminar os interferentes provenientes do meio de cultivo (milho) os extratos brutos obtidos foram fracionados com ACN e hexano. Este procedimento foi adotado após avaliação do espectro de RMN ^1H (Figura 18, p. 74) do milho sem inoculação dos endófitos (branco), que se mostrou rico em substâncias graxas.

Deste modo, nos asseguramos que os metabólitos isolados foram produzidos pelos microrganismos e não procedentes do meio de cultura.

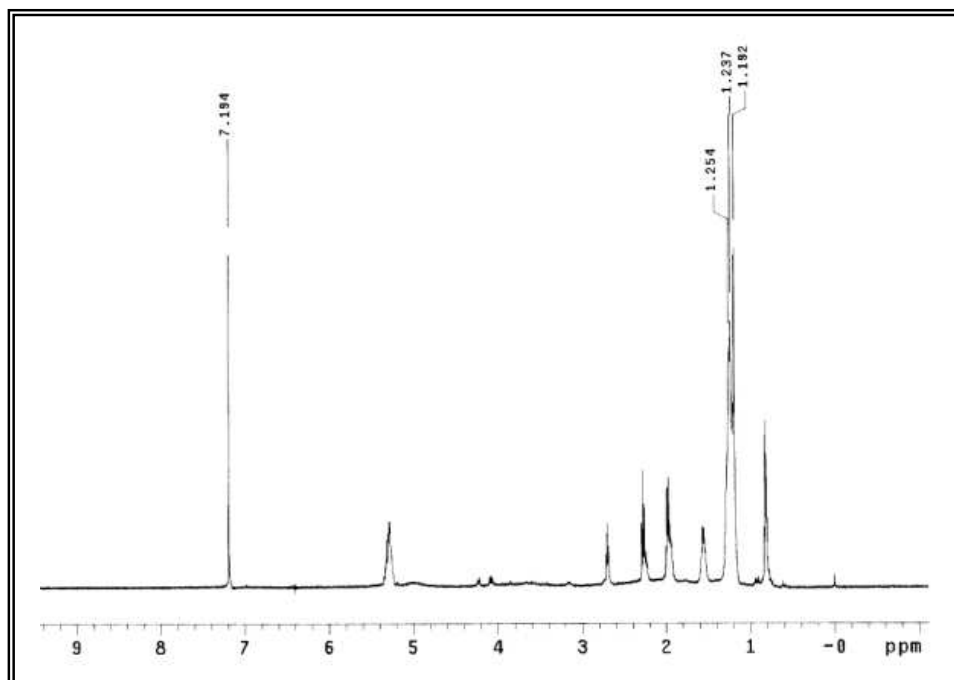


Figura 18 - Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de milho-branco (CDCl_3 , 500 MHz).

5.2.3 Análise dos extratos brutos obtidos do cultivo em milho dos fungos endofíticos AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e AM-04 (*Penicillium* sp2) por RMN de ^1H

De um modo geral, os espectros de RMN de ^1H (Figuras 19-22, p. 75-76) dos extratos brutos obtidos em milho de AM-01 (*Penicillium* sp1), 02 e AM-04 (*Penicillium* sp2) após as partições, evidenciaram sinais por toda faixa espectral, demonstrando a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, carbinólicos, olefínicos, aromáticos e fenólicos. No entanto, o extrato bruto produzido por AM-03 apresentou diversidade de hidrogênios reduzido, além de um perfil cromatográfico por CCDC, pouco promissor.

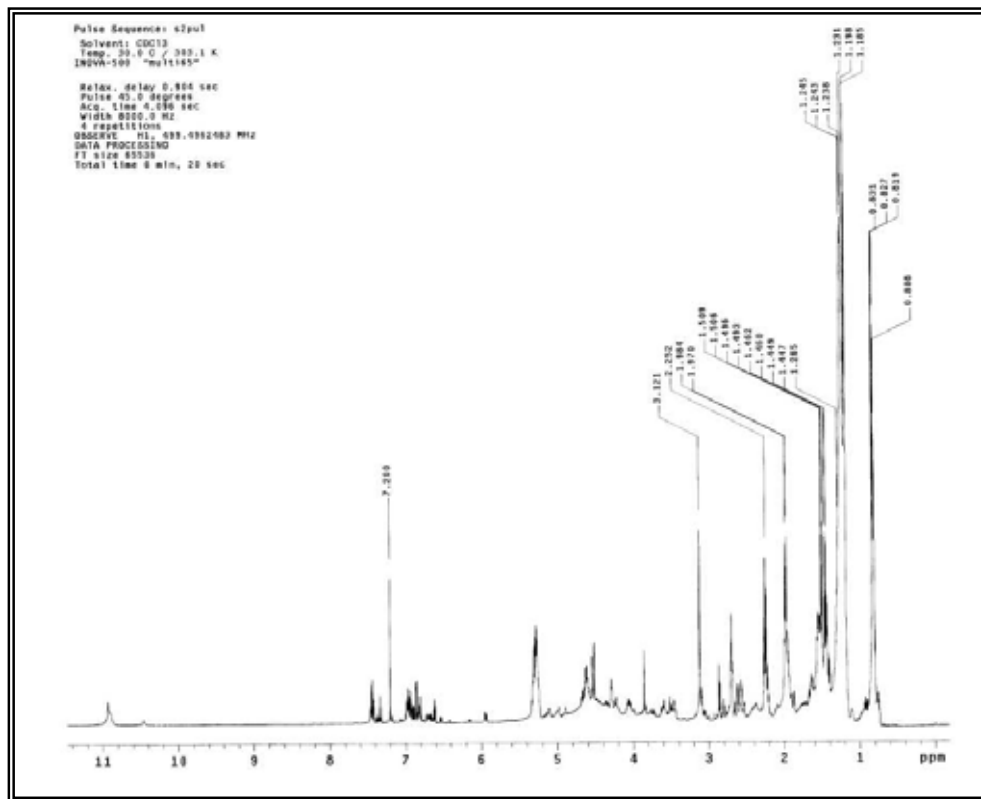


Figura 19 - Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de AM-01-Milho (CDCl₃, 500 MHz).

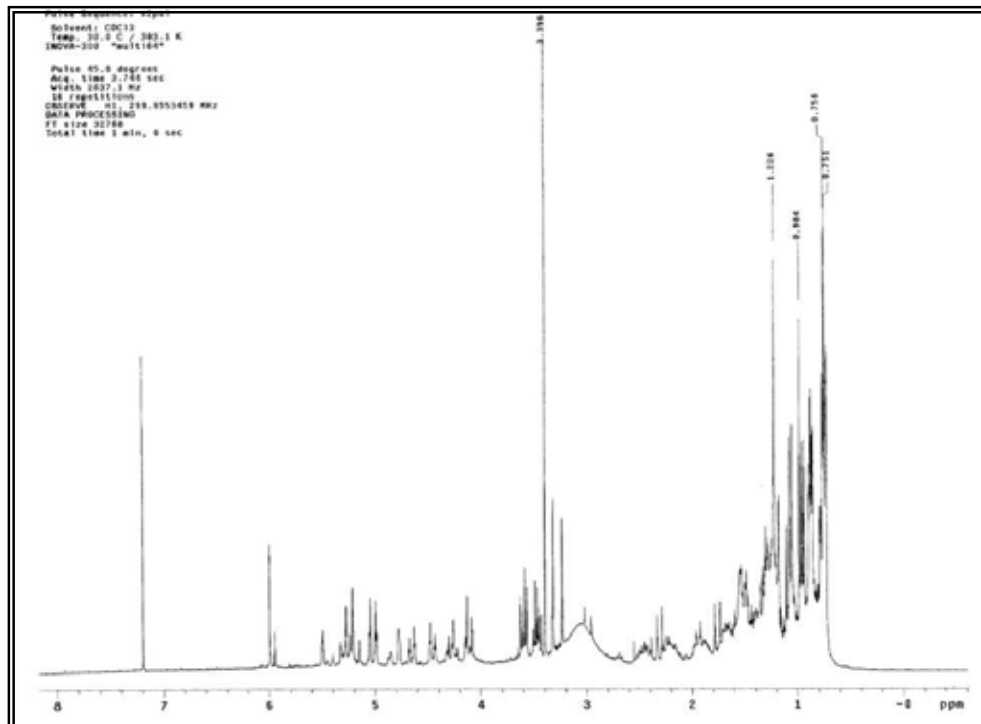


Figura 20 - Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de AM-02-Milho (CDCl₃, 500 MHz).

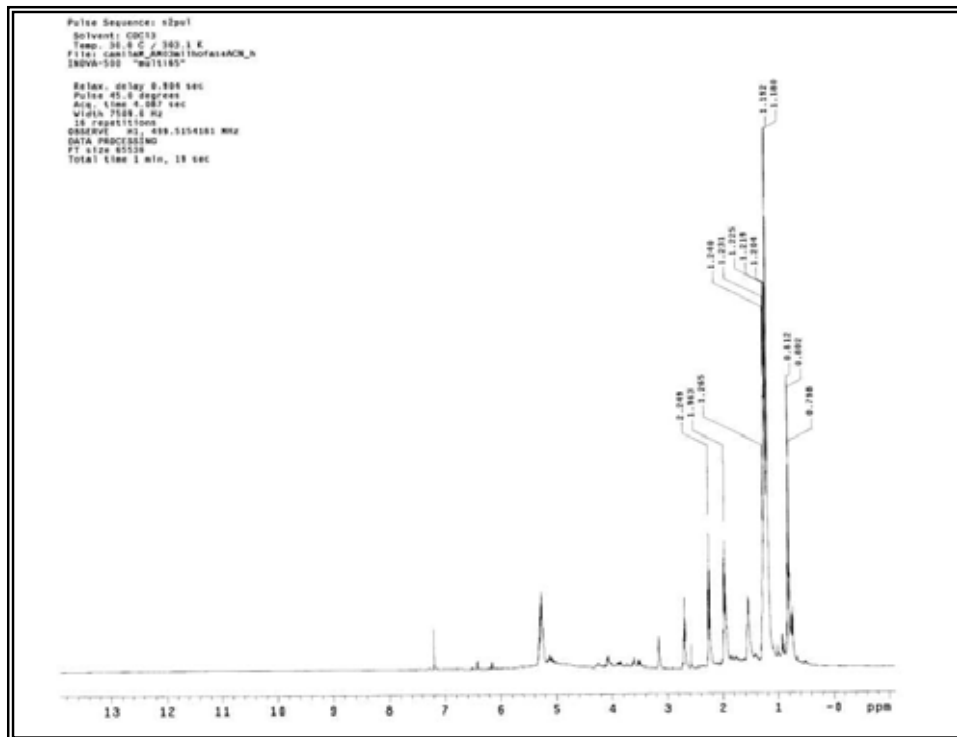


Figura 21 - Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de AM-03-Milho (CDCl₃, 500 MHz).

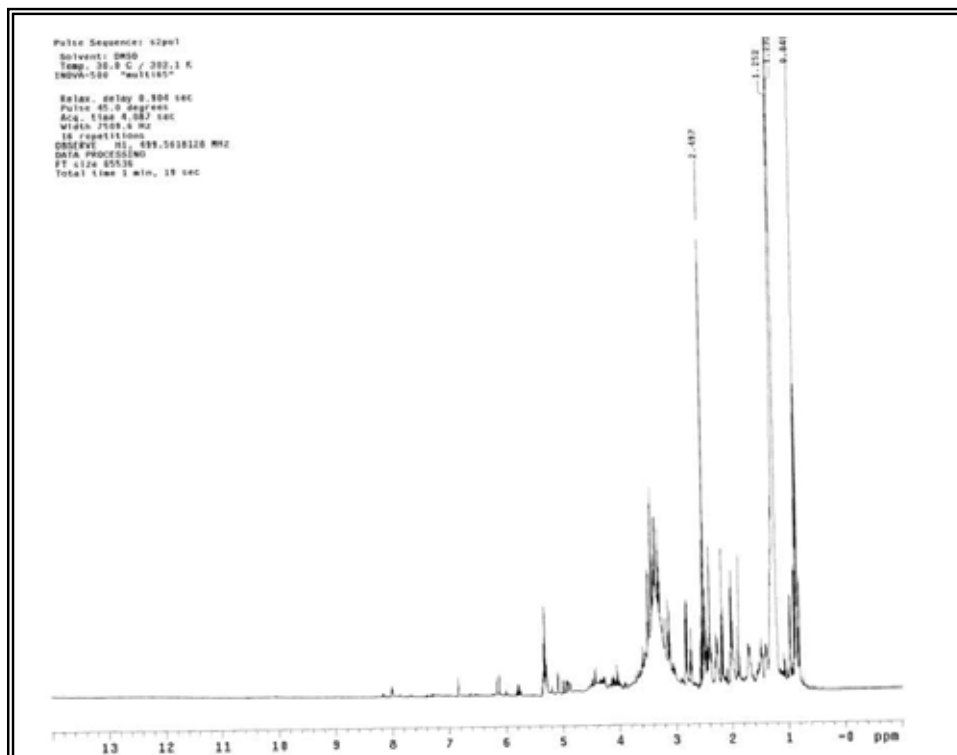


Figura 22 - Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de AM-04-Milho (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

5.2.4 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-01 (*Penicillium* sp1) e obtenção das substâncias puras

Como discutido anteriormente, o extrato bruto obtido em milho de AM-01 (*Penicillium* sp1) apresentou por CLAE-DAD um grande número de picos com boa resolução cromatográfica, o que, juntamente com análise em CCDC, conduziu a um fracionamento cromatográfico em coluna que resultou em sete frações (AM-01-Mi-ACN-A-G). As frações obtidas que apresentaram maior massa e boa resolução por CCDC, foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ^1H para avaliação do grau de pureza, o que possibilitou a seleção das frações AM-01-Mi-ACN-C (Figura 23 e 25, p. 77 e 78) e AM-01-Mi-ACN-D (Figura 24 e 26, p. 78 e 79) para separação por CLAE preparativo. Em um segundo cultivo de AM-01 (*Penicillium* sp1) em milho, a fração Fr-2 foi selecionada para separação por CLAE preparativo também por apresentar um cromatograma bem resolvido (Figura 27, p. 79) e espectro de RMN ^1H rico em sinais (Figura 28, p. 80).

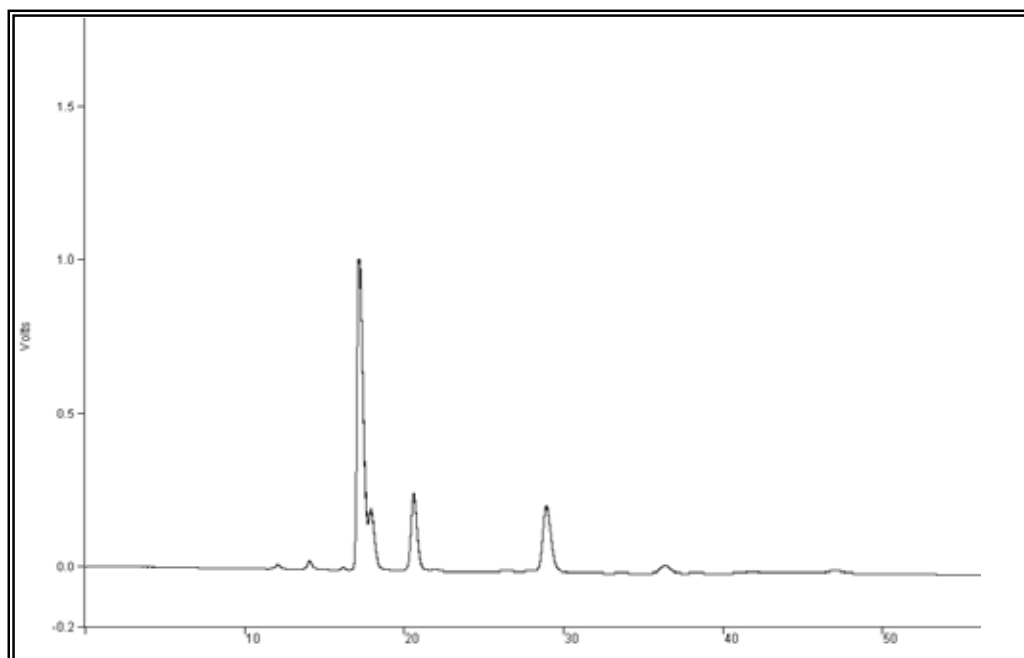


Figura 23 – Cromatograma CLAE-DAD de AM-01-Mi-ACN-C, registrado em 254 nm.

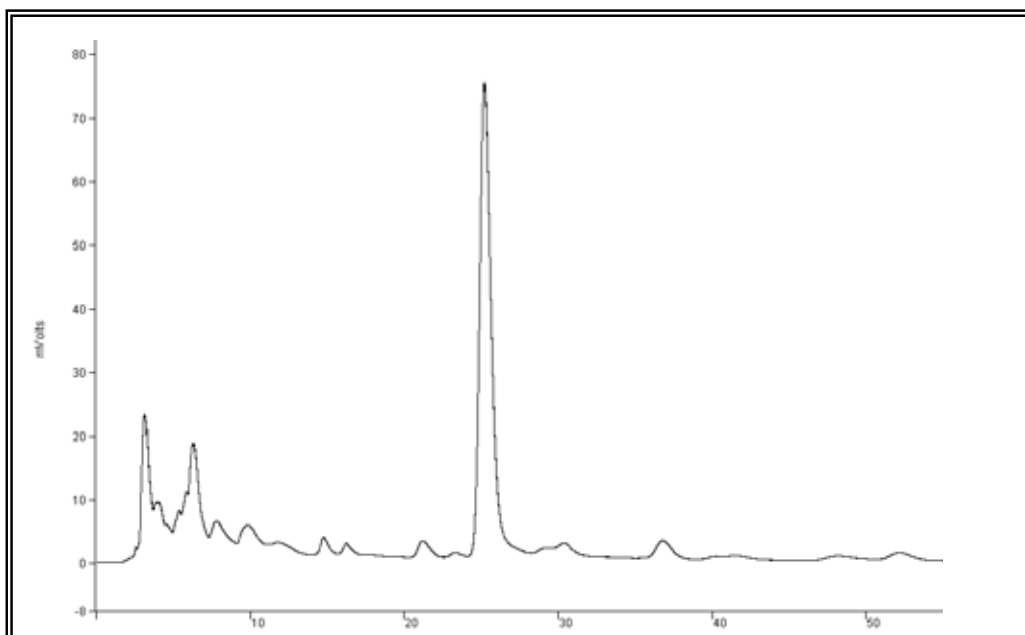


Figura 24 – Cromatograma CLAE-DAD de AM-01-Mi-ACN-D, registrado em 254 nm.

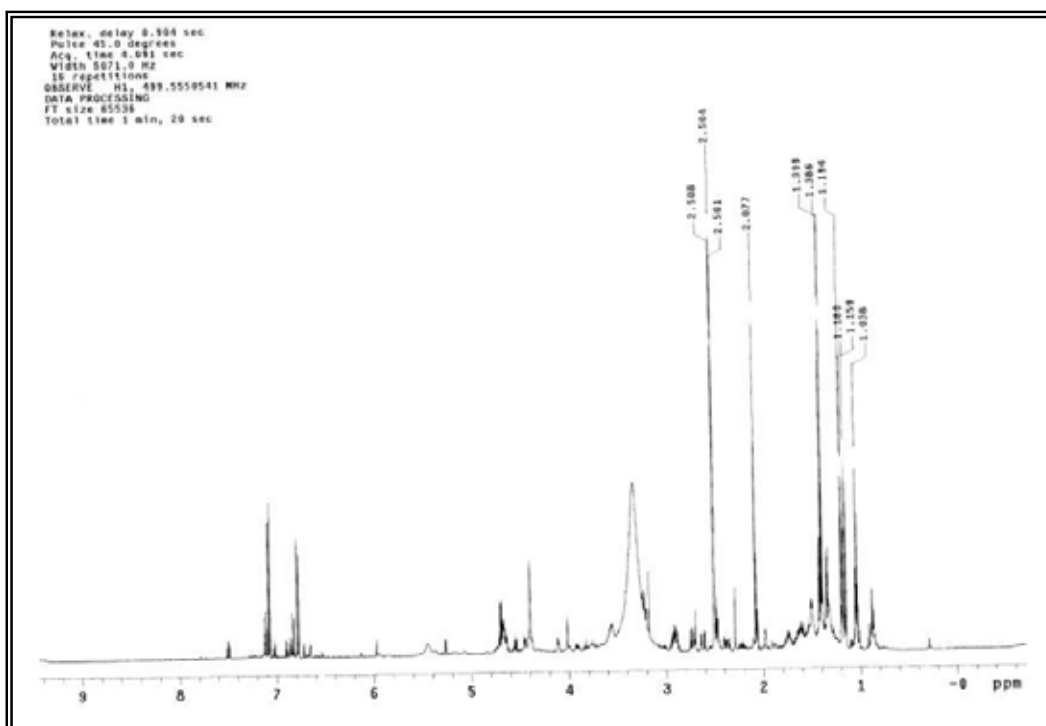


Figura 25 - Espectro de RMN ¹H de AM-01-Mi-ACN-C (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

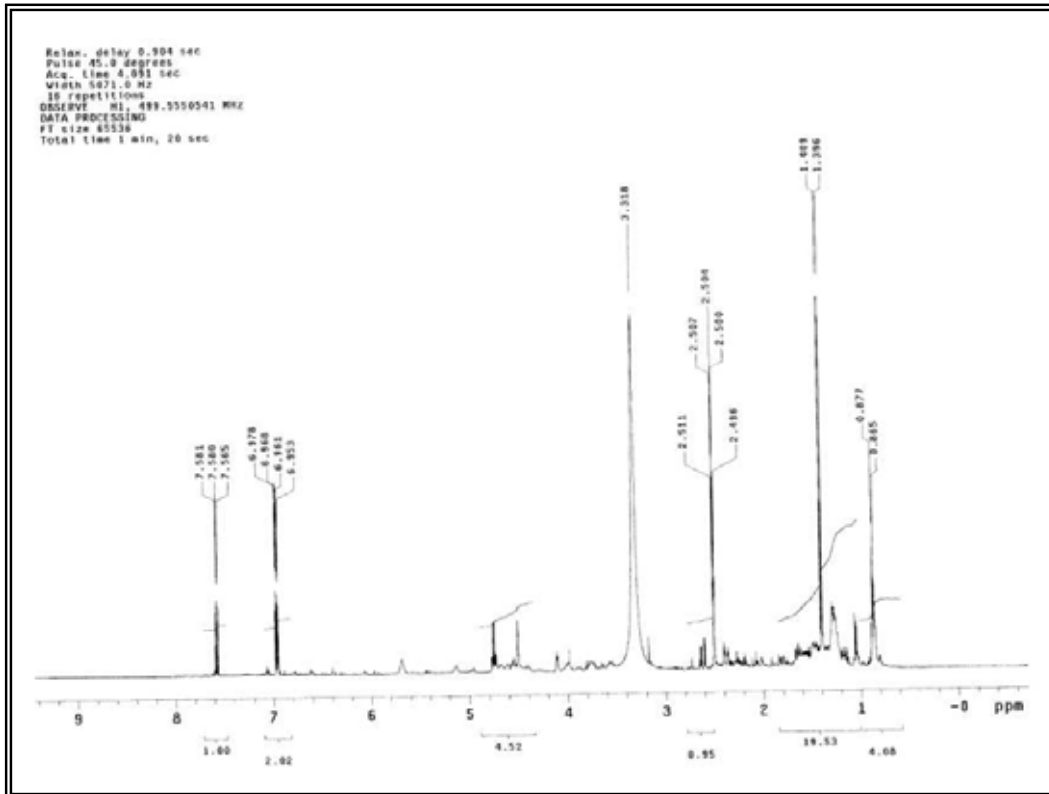


Figura 26 - Espectro de RMN ¹H de AM-01-Mi-ACN-D (DMSO-d₆, 500 MHz).

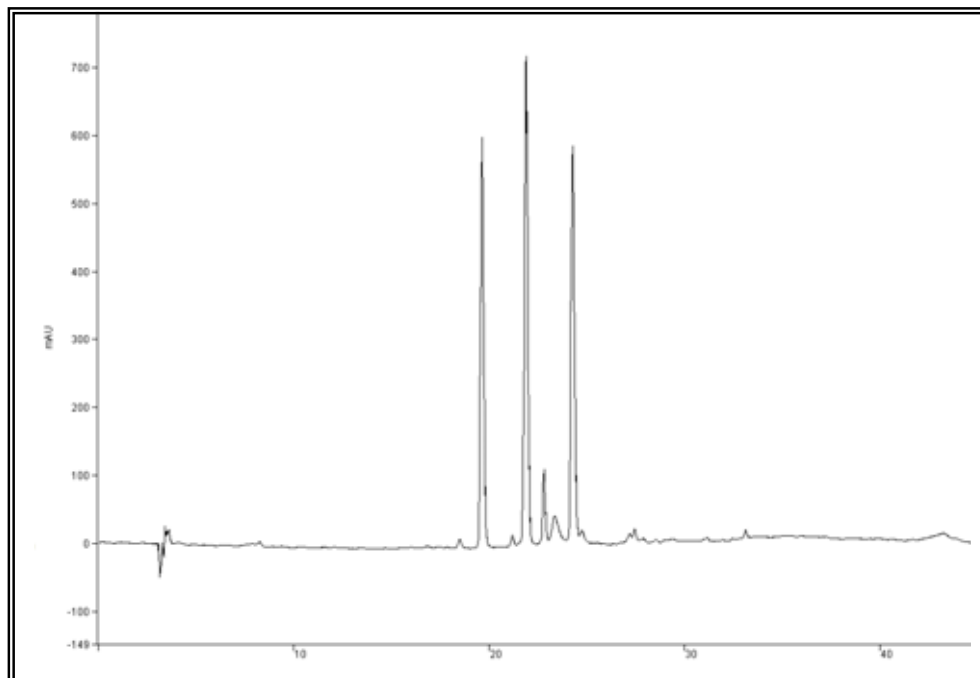


Figura 27 – Cromatograma CLAE-DAD de AM-01-Mi-ACN-Fr-2 registrado em 254 nm.

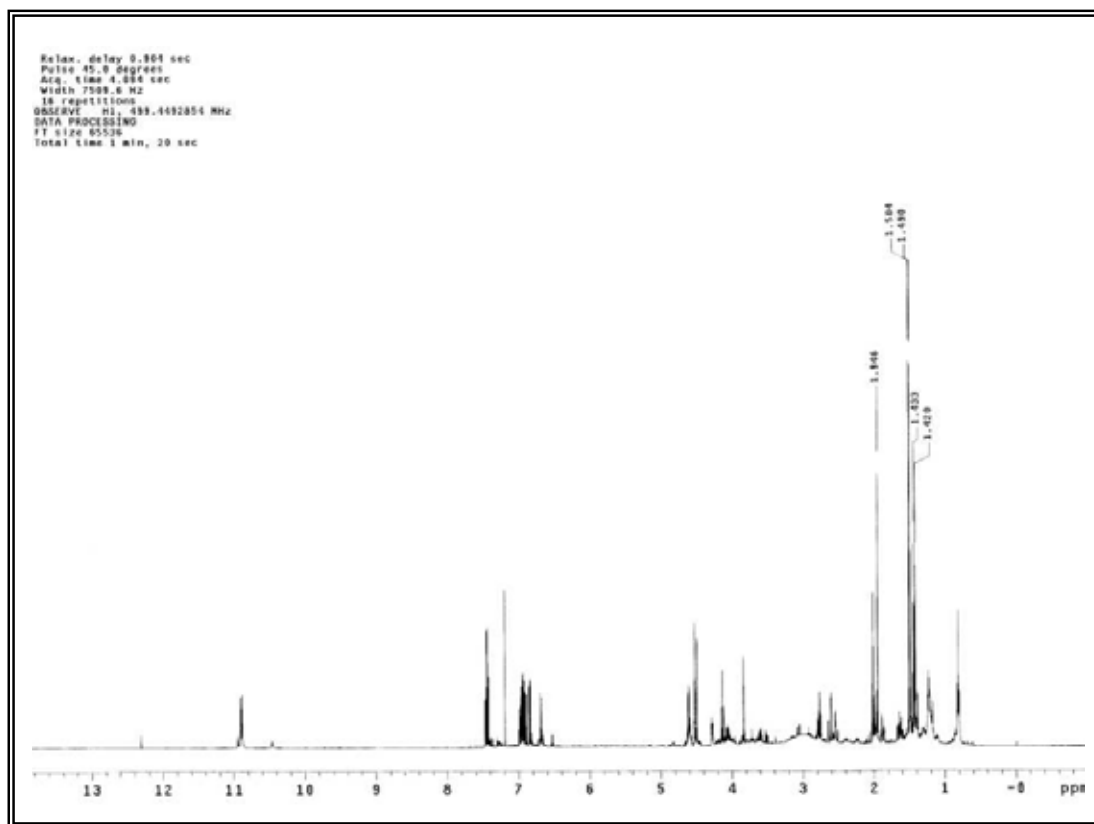


Figura 28 - Espectro de RMN ^1H de AM-01-Mi-ACN-Fr-2 (CDCl_3 , 500 MHz).

5.2.4.1 Fracionamento de AM-01-Mi-ACN-C

Esta fração foi submetida a fracionamento em CLAE preparativo (Figura 29, p. 81), após otimização em CLAE analítico. Este procedimento resultou em 6 sub-frações (AM-01-Mi-ACN-CP1 a CP6), a que apresentou maior grau de pureza e massa (AM-01-Mi-ACN-CP3), foi submetida à análise de RMN uni e bidimensionais.

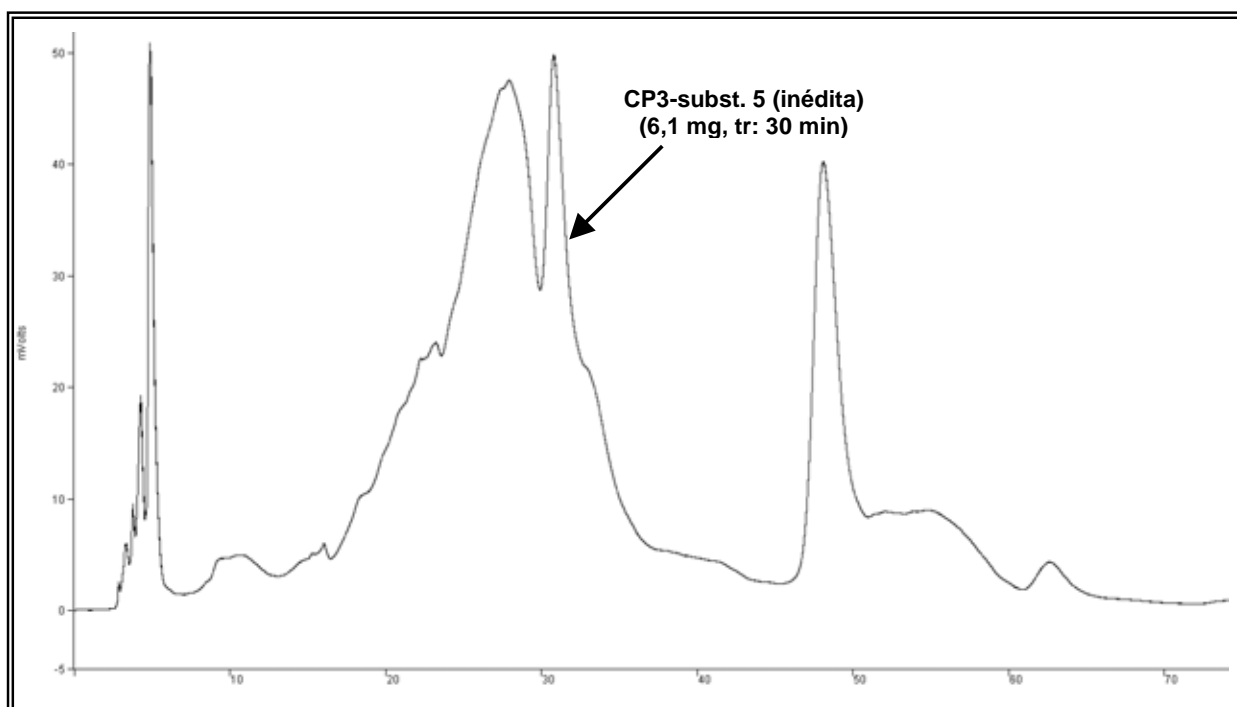


Figura 29 – Cromatograma de AM-01-Mi-ACN-C em CLAE_{prep.} registrado em 230 nm.

5.2.4.2 Fracionamento de AM-01-Mi-ACN-D

Esta fração também foi submetida a fracionamento em CLAE preparativo (Figura 30, p. 82) após otimização em CLAE analítico. O fracionamento resultou em 4 sub-frações (AM-01-Mi-ACN-DP1 a DP4), que foram secas em evaporador rotatório e suas massas obtidas. A sub-fração AM-01-Mi-ACN-DP4 se apresentou pura e foi submetida a análises de RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural.

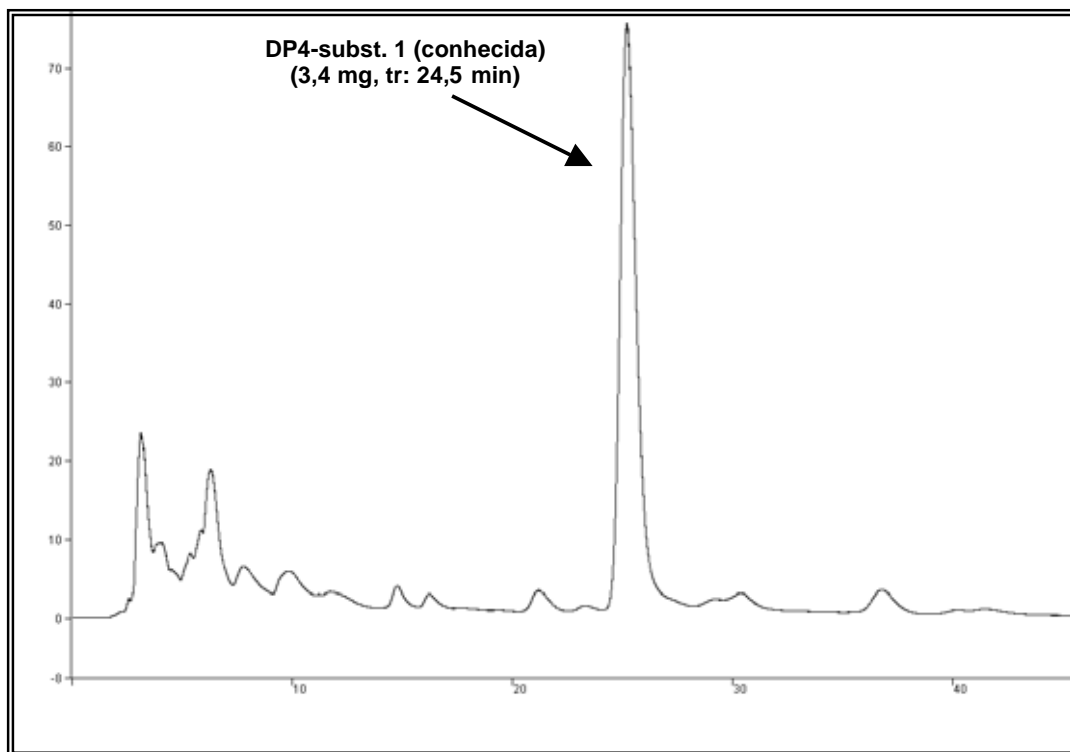


Figura 30 – Cromatograma de AM-01-Mi-ACN-D em CLAE_{prep.} registrado em 230 nm.

5.2.4.3 Fracionamento de AM-01-Mi-ACN-Fr-2

Tendo em vista o procedimento experimental adotado com sucesso para as frações AM-01-Mi-ACN-C e AM-01-Mi-ACN-D, o qual permitiu o isolamento de duas substâncias, adotou-se um fracionamento cromatográfico similar, para a purificação da fração AM-01-Mi-ACN-Fr-2 empregando CLAE preparativo.

Para a purificação de AM-01-Mi-ACN-Fr-2 foi otimizado um sistema de eluição no modo isocrático com 20% de ACN como fase móvel e sílica de fase reversa como fase estacionária. Esta metodologia resultou na separação de 16 sub-frações (AM-01-Mi-ACN-Fr-2-P1 a Fr-2-P16) e destas as que apresentaram maior massa (AM-01-Mi-ACN-Fr-2-P4 a P9) foram submetidas à análise por RMN de ^1H para avaliação do grau de pureza. Deste procedimento, foram obtidas 4 substâncias puras, que após análises de RMN uni e bidimensionais tiveram suas estruturas determinadas (Figura 31, p. 83).

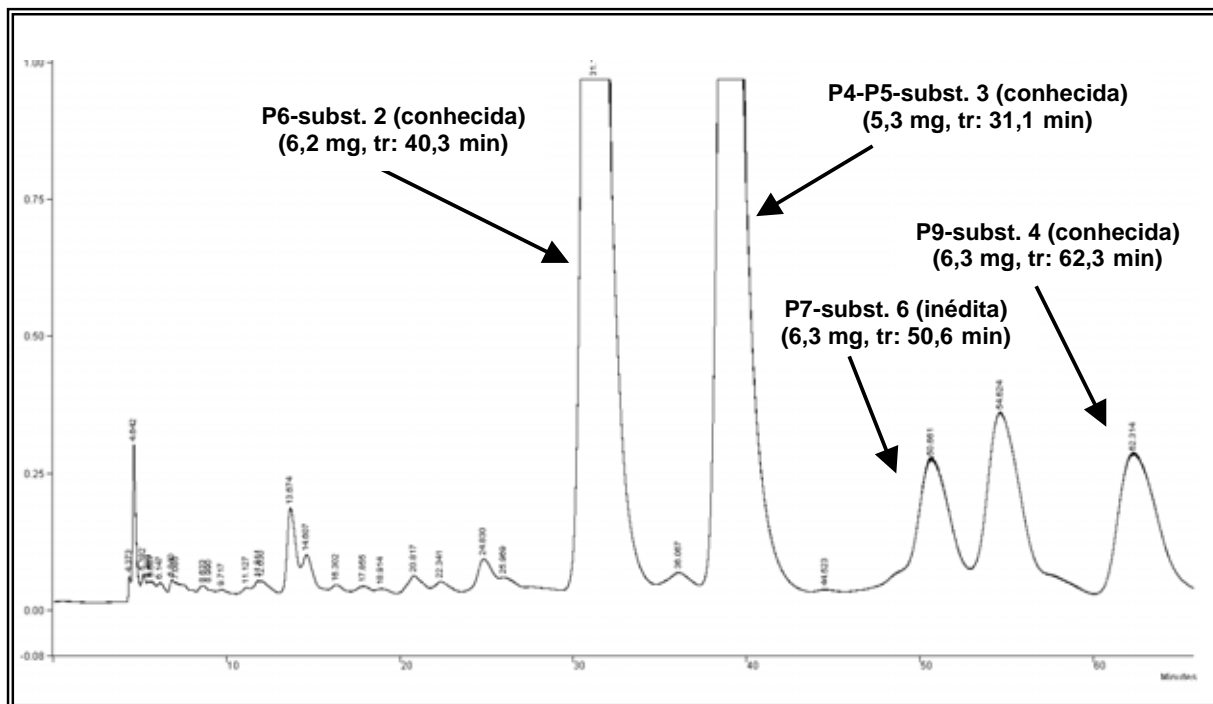


Figura 31 – Cromatograma de AM-01-Mi-ACN-Fr-2 em CLAE_{prep.} registrado em 254 nm.

5.2.5 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-02 e obtenção das substâncias puras

O extrato bruto obtido em milho de AM-02 apresentou por CLAE-DAD uma boa resolução cromatográfica, mesmo sendo observada uma diminuição de picos em determinados comprimentos de onda. Após análise por CLAE-DAD, o extrato bruto foi fracionado em coluna cromatográfica sob pressão, utilizando sílica C-18 como fase estacionária e sistema de eluição em gradiente, levando a 10 frações (AM-02-Mi-ACN-A-J). Estas frações foram analisadas por CCDC para avaliar o grau de pureza e as que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas. As frações que apresentaram maior massa e espectros de RMN de ^1H promissores, AM-02-Mi-ACN-C a AM-02-Mi-ACN-H (Figuras 36-39, p. 86-87), foram analisadas por CLAE-DAD (Figuras 32-35, p. 84-85) e posteriormente purificadas através de CLAE preparativo e/ou por cromatografia em coluna sob pressão.

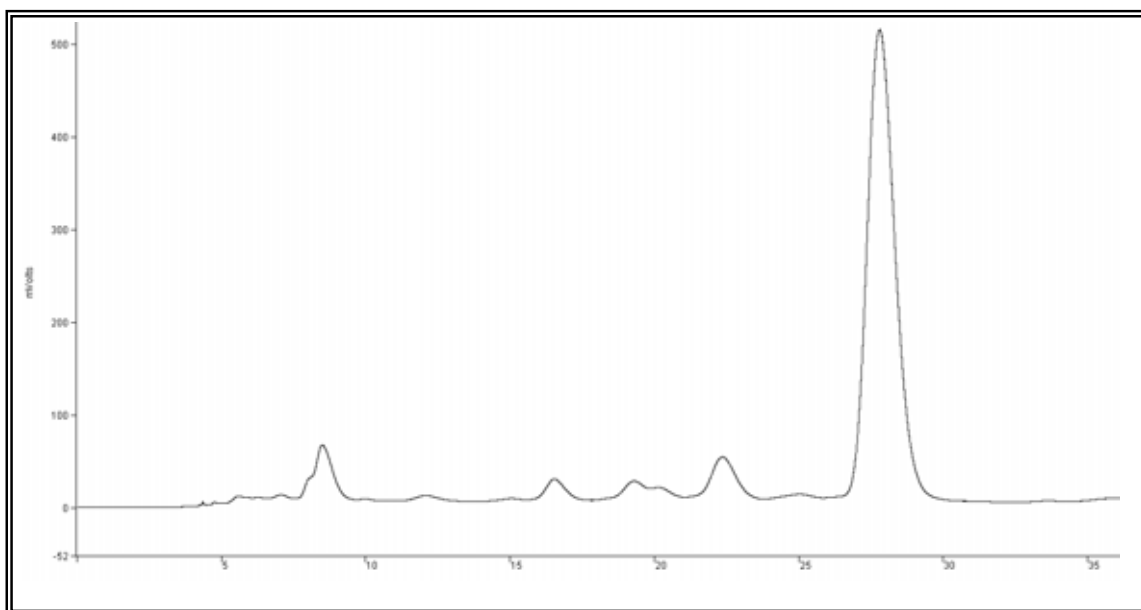


Figura 32 - Cromatograma CLAE-DAD de AM-02 Mi-ACN-C-D registrado em 265 nm

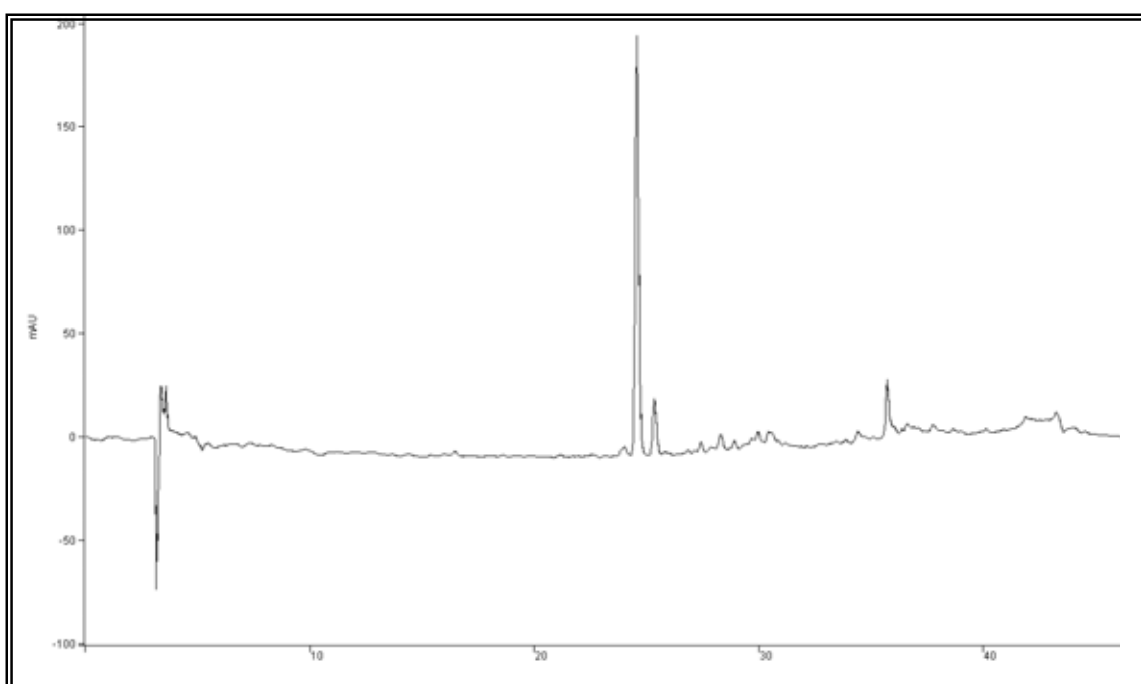


Figura 33 - Cromatograma CLAE-DAD de AM-02 Mi-ACN-F registrado em 254 nm

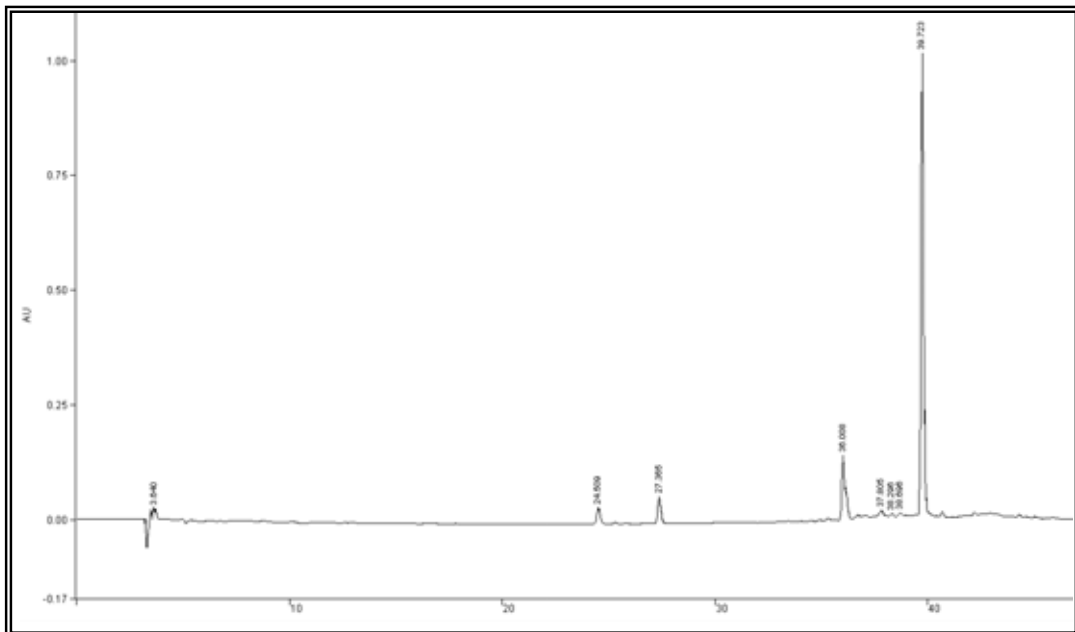


Figura 34 - Cromatograma CLAE-DAD de AM-02 Mi-ACN-G registrado em 254 nm

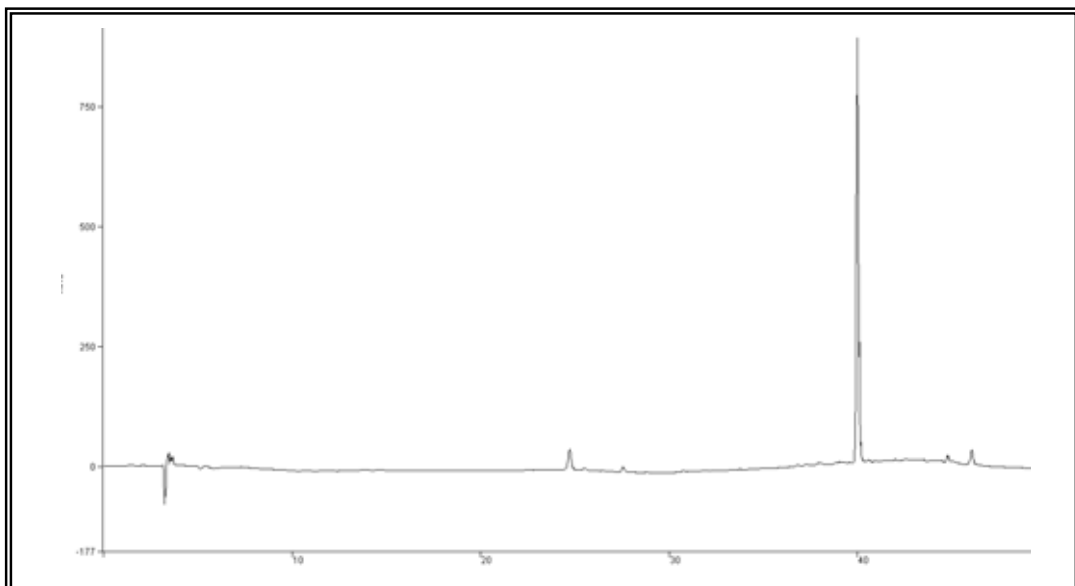


Figura 35 - Cromatograma CLAE-DAD de AM-02 Mi-ACN-H registrado em 254 nm

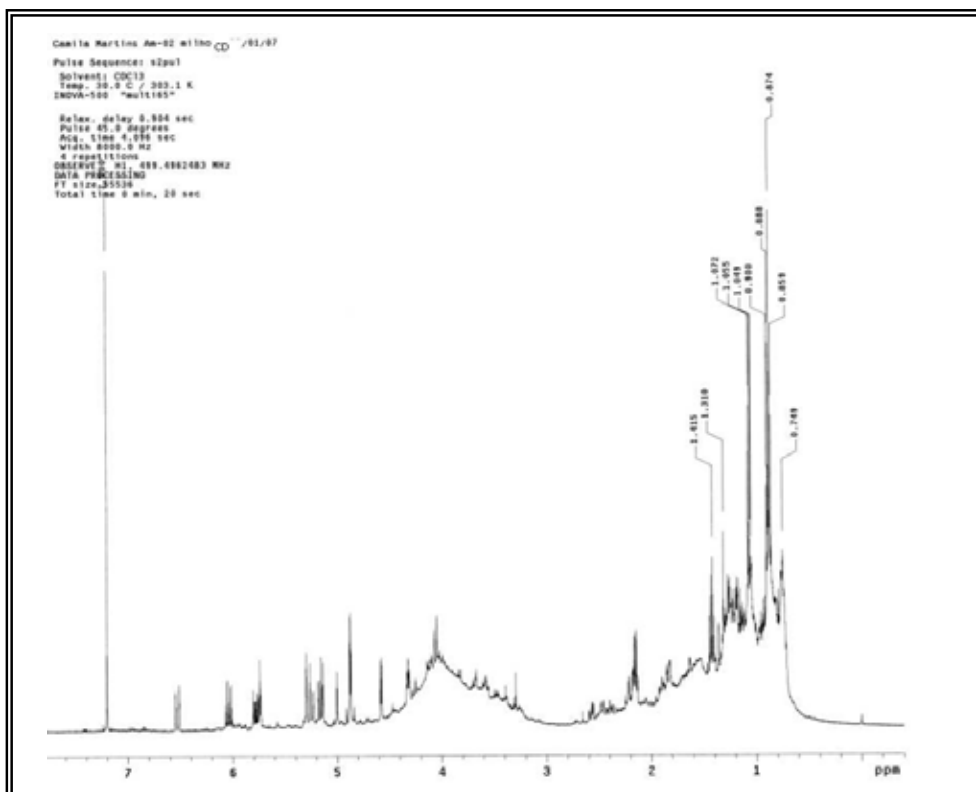


Figura 36 - Espectro de RMN ¹H de AM-02-Mi-ACN-C-D (CDCl₃, 500 MHz).

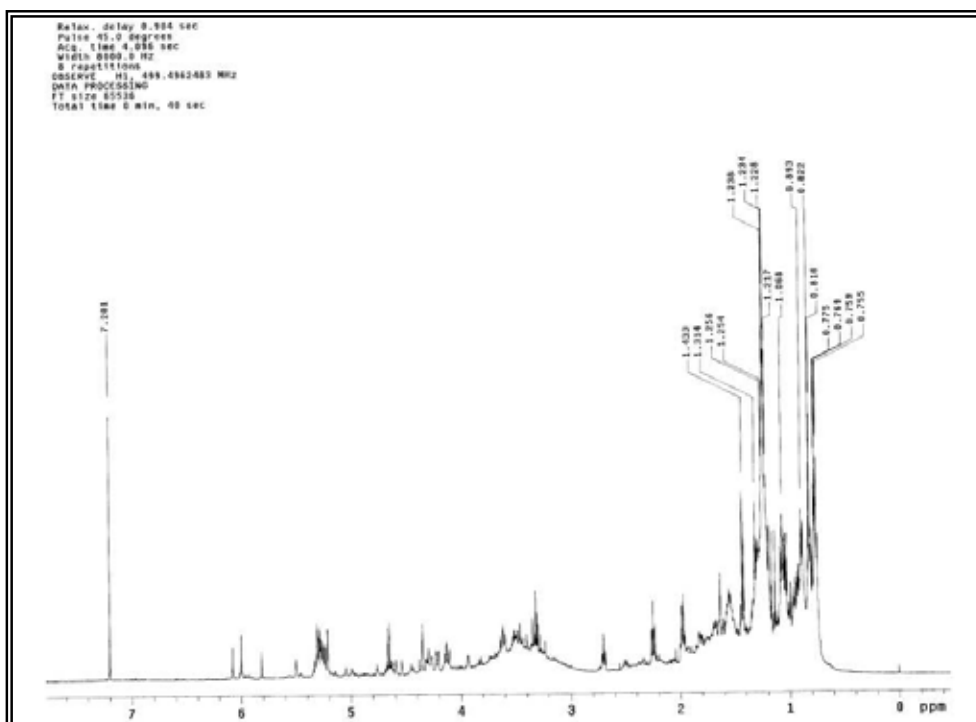


Figura 37 - Espectro de RMN ¹H de AM-02-Mi-ACN-F (CDCl₃, 500 MHz).

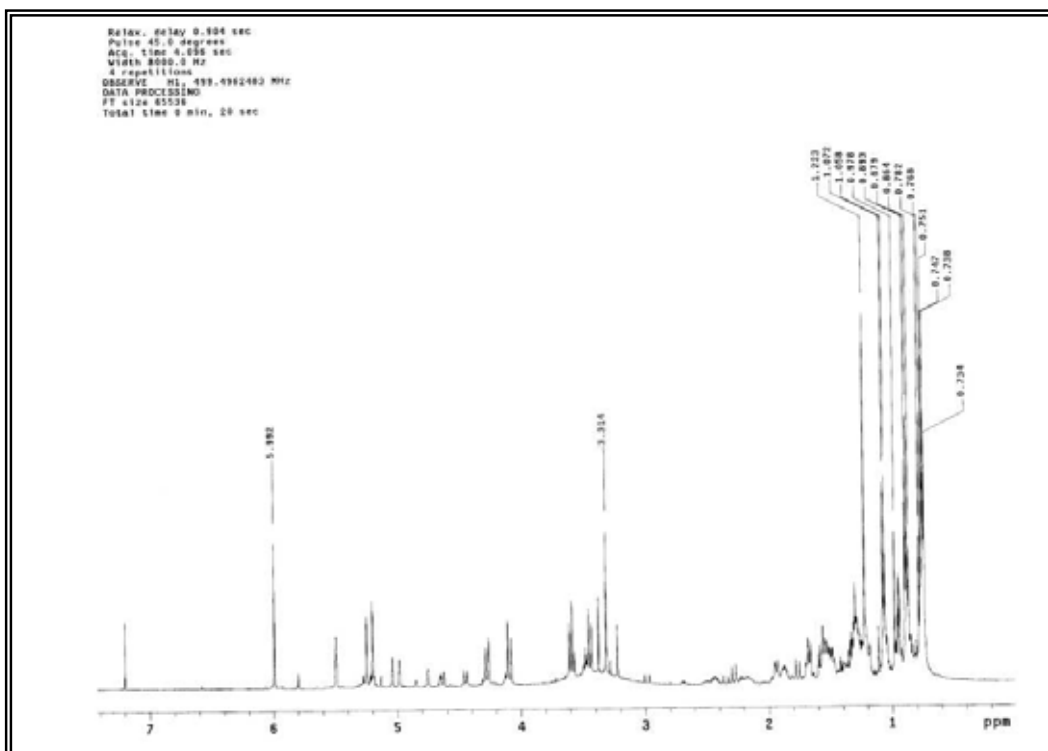


Figura 38 - Espectro de RMN ¹H de AM-02 Mi-ACN-G (CDCl₃, 500 MHz).

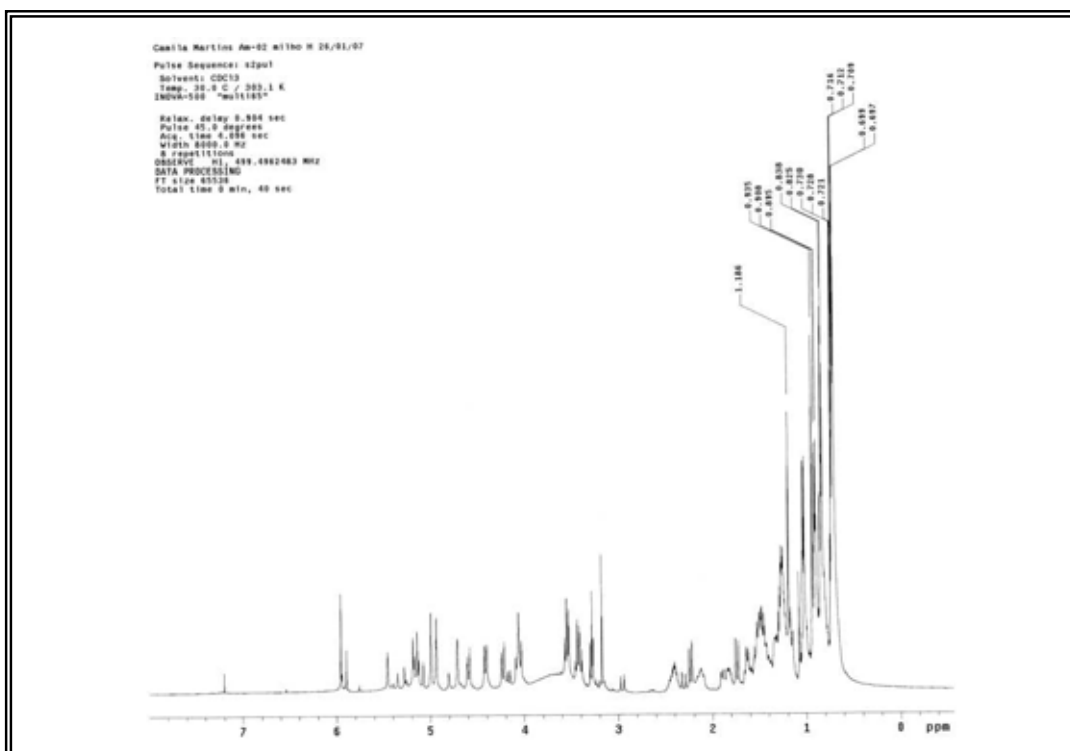


Figura 39 - Espectro de RMN ¹H de AM-02 Mi-ACN-H (CDCl₃, 500 MHz)

5.2.5.1 Fracionamento de AM-02-Mi-ACN-C-D

As frações AM-02-Mi-ACN-C e D (67,4 mg) por apresentarem perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e submetidas a fracionamento via CLAE preparativo (Figura 40, p. 88). Esta metodologia resultou na separação de 14 sub-frações (AM-02-Mi-ACN-CD-P1 a CD-P14), a sub-fração AM-02-Mi-ACN-CD-P13 se apresentou pura e foi submetida a análises de RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural.

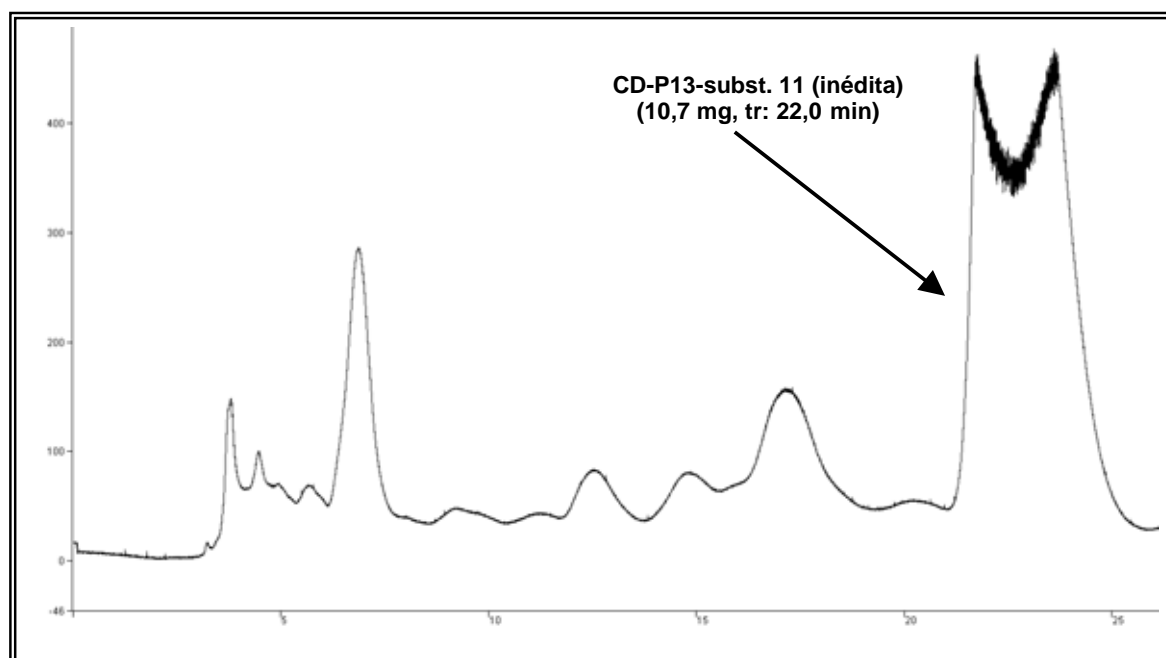


Figura 40 – Cromatograma de AM-02-Mi-ACN-C-D em CLAE_{prep.} registrado em 265 nm.

5.2.5.2 Fracionamento de AM-02-Mi-ACN-F

A fração AM-02-Mi-ACN-F também foi purificada em CLAE preparativo. Deste fracionamento resultou em 16 sub-frações, (AM-02-Mi-ACN-F-P1 a F-P16) que foram secas em evaporador rotatório e suas massas obtidas. As sub-frações que apresentaram maior massa foram analisadas por RMN de ^1H . A sub-fração AM-02-Mi-

ACN-F-P-12 se mostrou pura e foi submetida a análises espectroscópicas para determinação estrutural (Figura 41, p. 89).

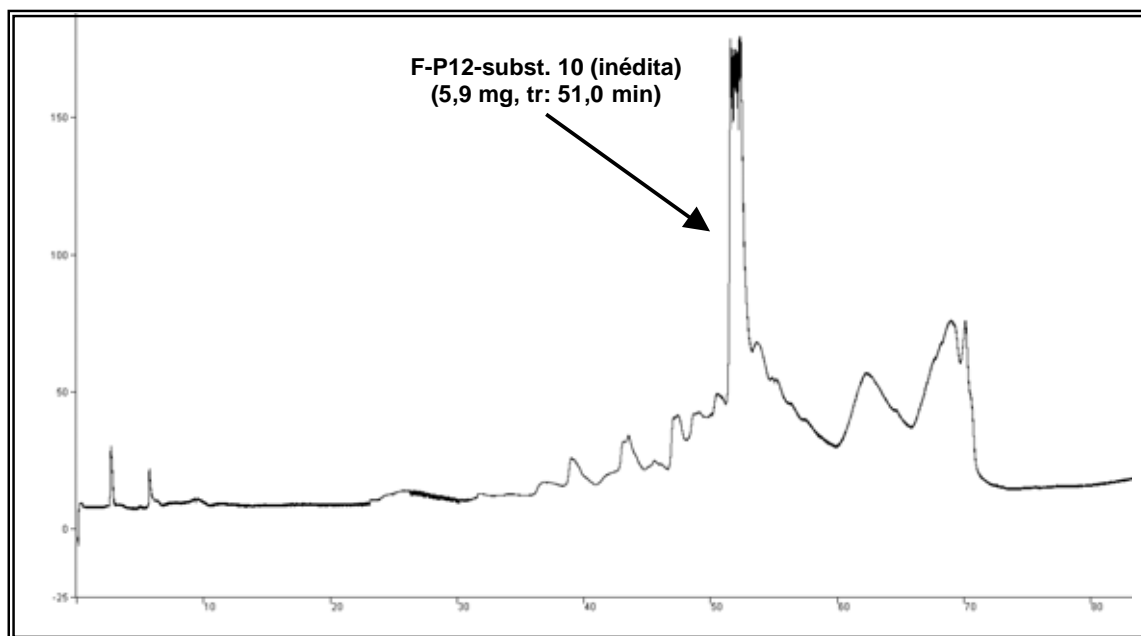


Figura 41 – Cromatograma de AM-02-Mi-ACN-F em CLAE_{prep}, registrado em 366 nm.

5.2.5.3 Fracionamento de AM-02-Mi-ACN-G e H

As frações AM-02-Mi-ACN-G e H foram purificadas através de sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna, devido a não reprodutibilidade das condições de separação em CLAE preparativo, evitando assim, sub-frações com pequena quantidade de massa, o que impossibilitaria as análises para determinação estrutural.

O fracionamento de AM-02-Mi-ACN-G levou ao isolamento da substância **7** já descrita na literatura⁷³ e o fracionamento de AM-02-Mi-ACN-H culminou no isolamento das substâncias **8**, **9** e **10** ambas inéditas na literatura.

5.2.6 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-03

Como discutido anteriormente, nos itens 5.2.1 e 5.2.3, o extrato bruto de AM-03, revelou a presença de poucos picos com baixa absorvidade molar, inviabilizando uma separação cromatográfica via CLAE. Adicionalmente seu espectro de RMN de ^1H não apresentou dados promissores. Estes fatos nos conduziram a exclusão deste extrato para posterior estudo químico.

5.2.7 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em milho de AM-04 e obtenção das substâncias puras

O fracionamento do extrato bruto obtido em milho de AM-04 (*Penicillium sp*) foi realizado por cromatografia em coluna, pois apresentou boa resolução quando analisado por CCDC. Deste fracionamento foram coletadas dez frações (AM-04-Mi-ACN-A a J), sendo que a fração AM-02-Mi-ACN-D indicou um médio grau de pureza, possibilitando a identificação da substância **14**.

5.2.8 Análise dos extratos brutos obtidos do cultivo em MBD dos fungos endofíticos AM-01 (*Penicillium sp1*), 02, 03 e AM-04 (*Penicillium sp2*) por CLAE

As análises dos cromatogramas em CLAE-DAD dos extratos brutos obtidos em MBD dos fungos endofíticos AM-01 (*Penicillium sp1*) e AM-03 (Figuras 42, p. 91) revelaram a presença de vários picos com boa absorvidade molar, evidenciando esta técnica um excelente método de separação cromatográfica para esses extratos. No entanto, os extratos brutos de AM-02 e AM-04 (*Penicillium sp2*) (Figuras 42, p. 91) não apresentaram boa resolução cromatográfica, além da intensidade e diversidade de picos serem reduzidos quando comparados com os demais extratos, ainda que em diferentes comprimentos de onda.

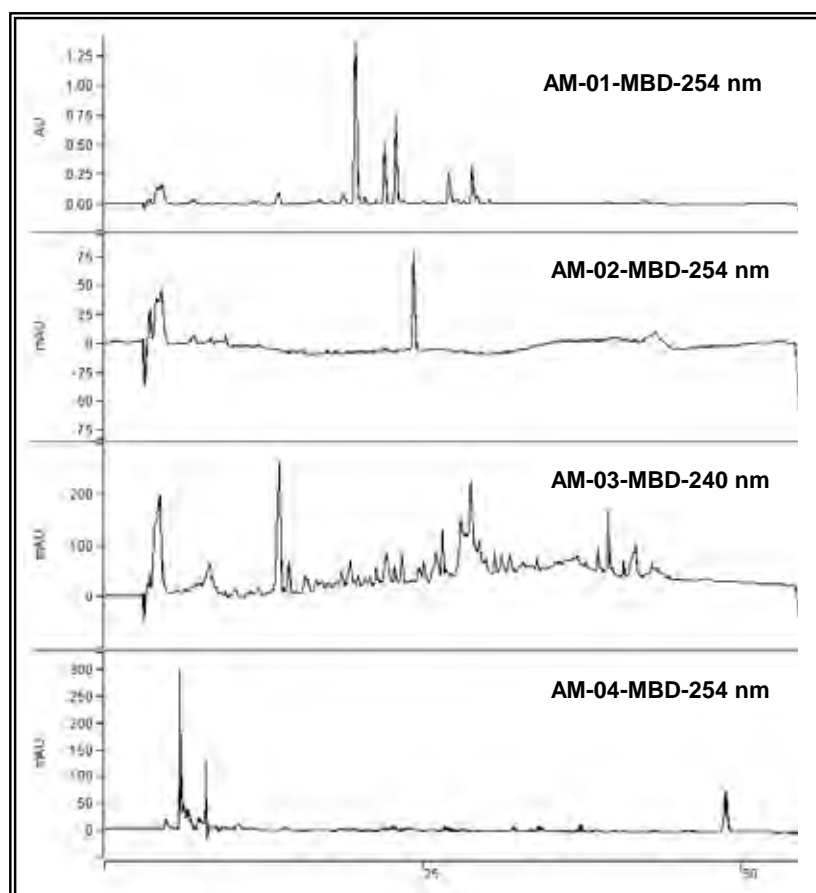


Figura 42 - Cromatograma CLAE-DAD dos extratos brutos obtidos em MBD de AM-01, 02 e 04 registrados em 254 nm e 240 nm para AM-03.

5.2.9 Observação sobre o meio de cultivo (MBD)

A escolha do solvente AcOEt, para a partição líquido-líquido dos meios de cultura foram baseados em dados da literatura e metodologia utilizada no laboratório, uma vez que todos os trabalhos descritos na investigação química de substâncias isoladas de fungos endofíticos fizeram uso desse solvente. No entanto, compreendo que a utilização deste único solvente poderia comprometer a extração total dos metabólitos, o que seria uma variável para cada fungo. Assim, visando uma padronização de metodologia, empregou-se somente AcOEt.

5.2.10 Análise dos extratos brutos obtidos do cultivo em MBD dos fungos endofíticos AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e AM-04 (*Penicillium* sp2) por RMN de ^1H

De um modo geral os espectros de RMN de ^1H (Figuras 43-46, p. 92-94) dos extratos brutos obtidos em MBD de AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e AM-04 (*Penicillium* sp2), mostraram-se ricos em sinais, abrangendo grande parte da largura espectral. Também foi possível observar nos espectros de RMN de ^1H de AM-02, 03 e 04 um aumento na intensidade dos picos na região de aromáticos, sugerindo um número maior destas substâncias nestes extratos quando comparados aos extratos brutos obtidos em milho (Figura 22, p. 76).

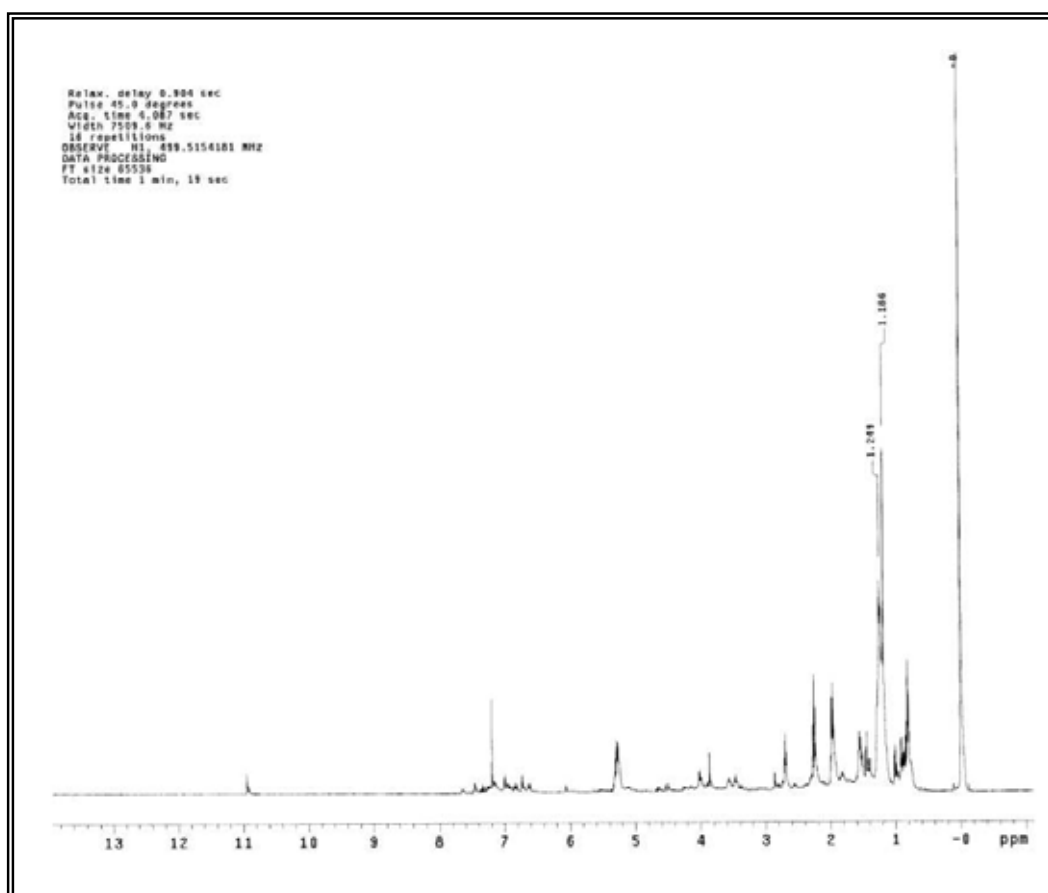


Figura 43 - Espectro de RMN ^1H de AM-01MBD (CDCl_3 , 500 MHz).

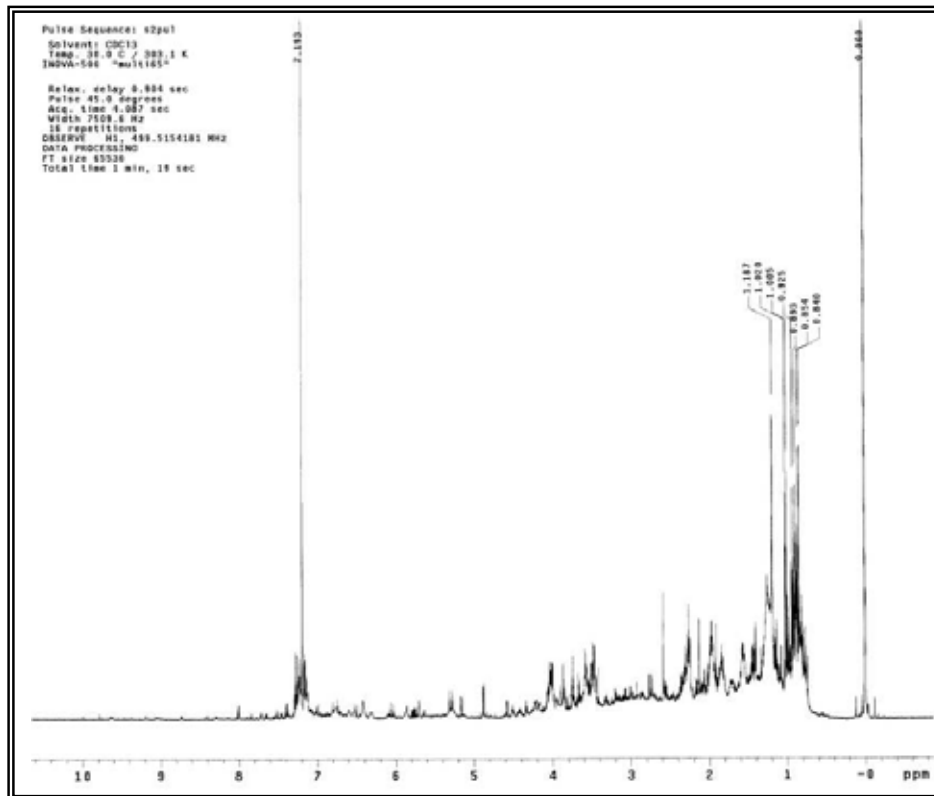


Figura 44 - Espectro de RMN ¹H de AM-02 MBD (CDCl₃, 500 MHz).

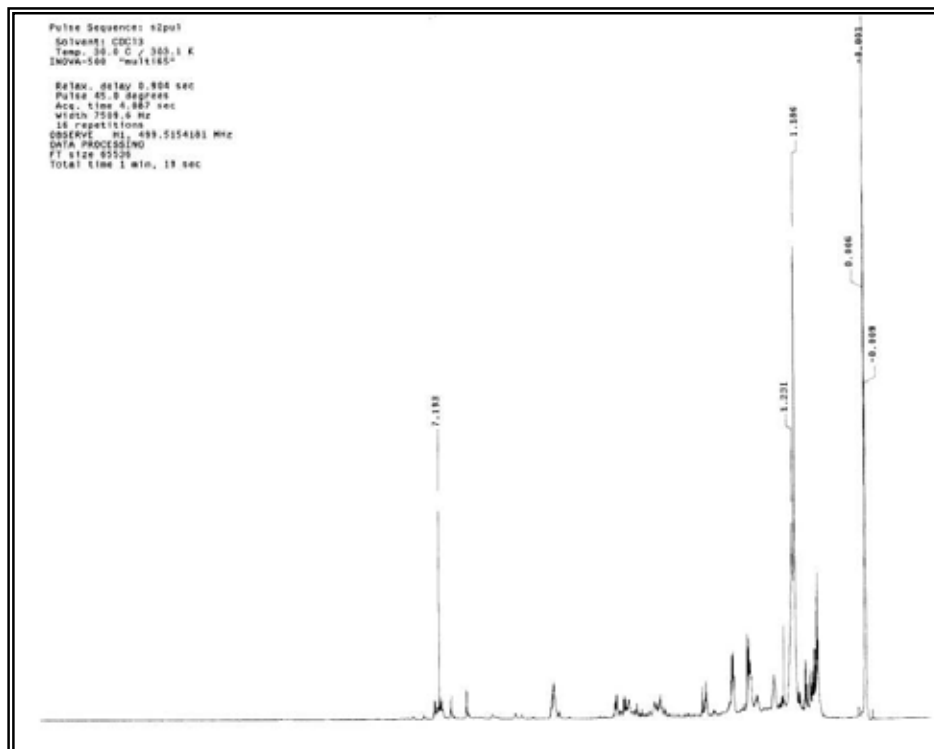


Figura 45 - Espectro de RMN ¹H de AM-03 MBD (CDCl₃, 500 MHz).

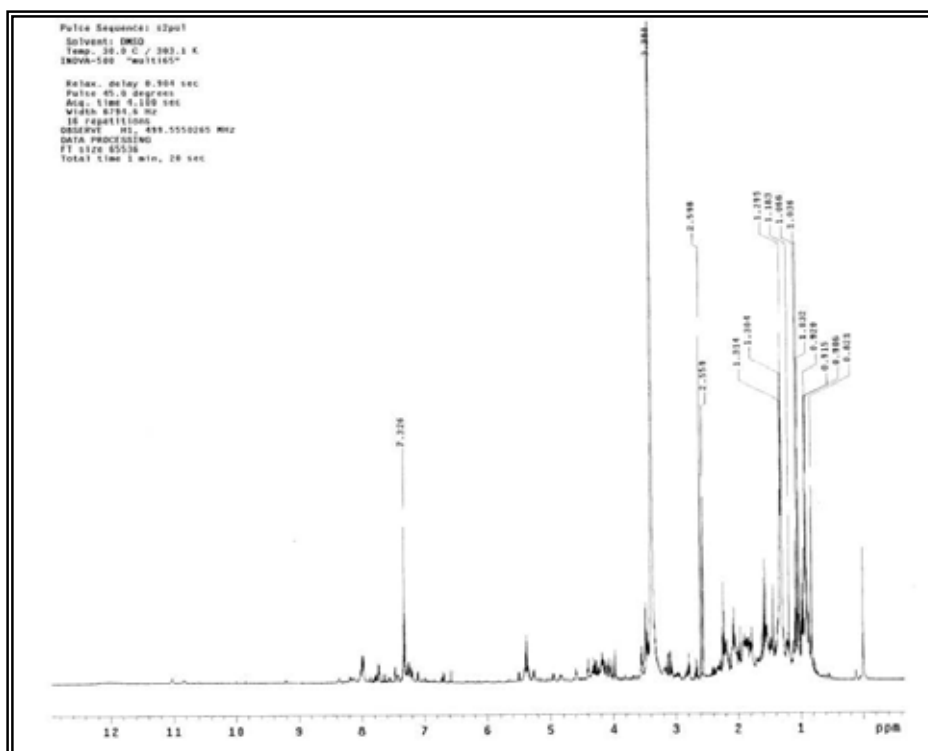


Figura 46 - Espectro de RMN ^1H de AM-04 MBD (DMSO- d_6 , 500 MHz).

5.2.11 Estudo do extrato bruto obtido em MBD de AM-01 (*Penicillium* sp1)

O espectro de absorção na região do ultravioleta das substâncias presentes no extrato bruto cultivado em MBD de AM-01, não exibiu absorções típicas de isocumarinas. Considerando que a produção metabólica de microrganismos é altamente dependente das condições e meios de cultivo, podemos concluir que este meio não favoreceu a produção metabólica desta classe de substâncias.

5.2.12 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em MBD de AM-03 e obtenção as substâncias puras

O extrato bruto obtido do cultivo em MBD de AM-03, mostrou maior rendimento e um espectro de RMN de ^1H rico em sinais, quando comparado ao extrato bruto obtido do cultivo em milho (Figura 21, p. 76), mostrando que este meio favoreceu a produção metabólica do microrganismo.

Após análise do cromatograma em diferentes comprimentos de onda, optou-se pela purificação do extrato por CC, devido à presença de substâncias em diferentes faixas de polaridades. Foram coletadas oitenta sub-frações (AM-03-MBD-1 a 80), as quais foram analisadas por CCDC e as que apresentaram comportamento cromatográfico semelhante foram reunidas resultando em 22 sub-frações. Da fração AM-03-MBD-33-37 foi isolado a substância conhecida **12**.

5.2.13 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido em MBD de AM-04 (*Penicillium* sp2) e obtenção as substâncias puras

O fracionamento de AM-04 MBD (*Penicillium* sp2) por CC forneceu 5 frações (AM-04-MBD-A a E). As frações obtidas foram analisadas por CCDC, objetivando uma avaliação do grau de pureza. As massas obtidas destas frações, aliadas à resolução por CCDC, conduziram à seleção da fração AM-04-MBD-B para ser analisada por RMN ^1H (Figuras 48, p. 96) e por CLAE-DAD (Figuras 47, p. 96). A fração AM-04-MBD-C apresentou aspecto cristalino e após recristalização em MeOH levou ao isolamento da substância **13**.

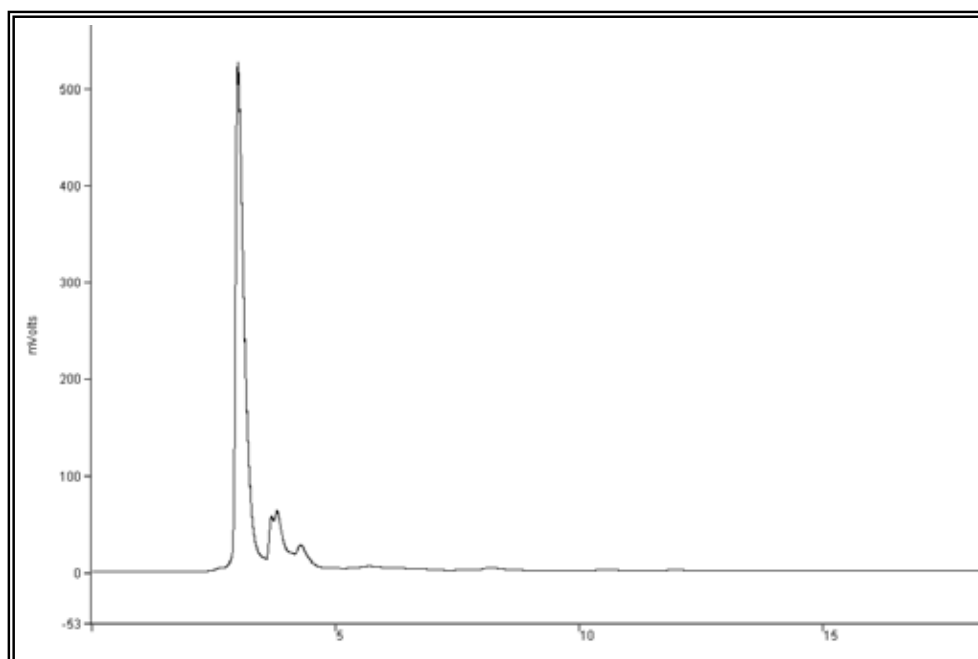


Figura 47 - Cromatograma CLAE-DAD de AM-04-MBD-B registrado em 254 nm.

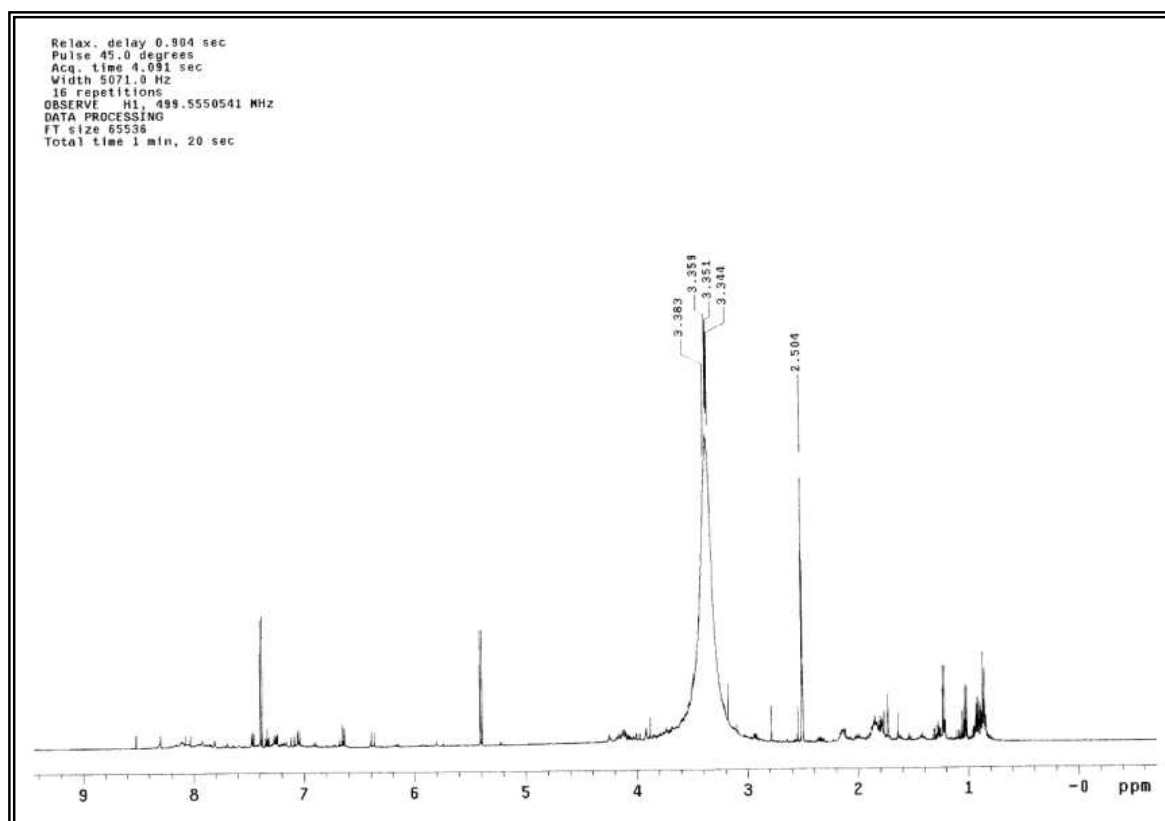


Figura 48 - Espectro de RMN ^1H de AM-04-MBD-B (DMSO- d_6 , 500 MHz).

5.2.13.1 Fracionamento e purificação da fração AM-04-MBD-B

No intuito de se isolar a substância majoritária observada no espectro de ^1H da fração AM-04-MBD-B, esta foi submetida à purificação por CLAE preparativo. O fracionamento resultou em 5 sub-frações (AM-04-MBD-B-P1 a B-P5), que foram secas em evaporador rotatório. Da sub-fração AM-04-MBD-B-P2 foi isolada a substância conhecida **15**.

5.2.14 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NO ESTUDO QUÍMICO DOS FUNGOS SELECIONADOS

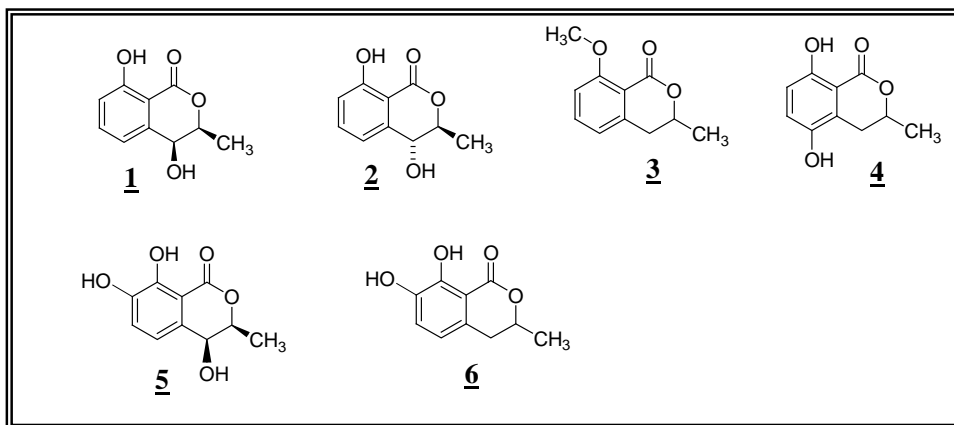


Figura 49 - Substâncias isoladas do fungo endofítico *Penicillium* sp1 (AM-01)

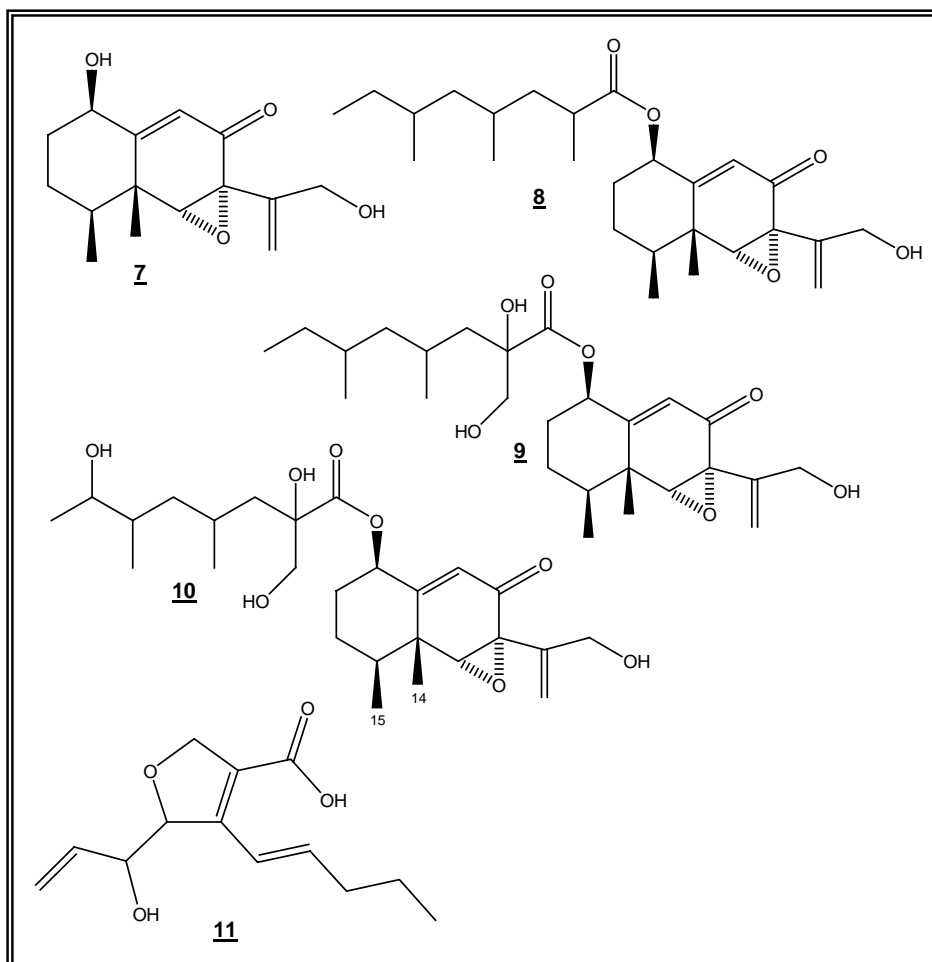


Figura 50 - Substâncias isoladas do fungo endofítico AM-02

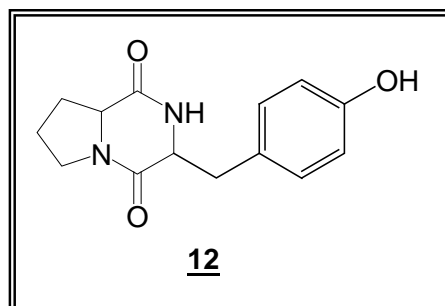


Figura 51 - Substância isolada do fungo endofítico AM-03

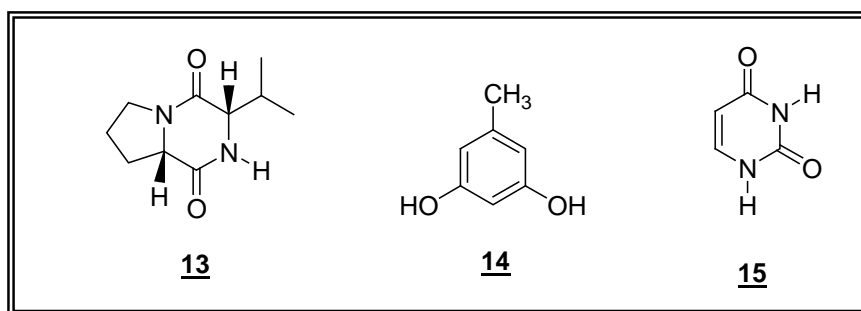


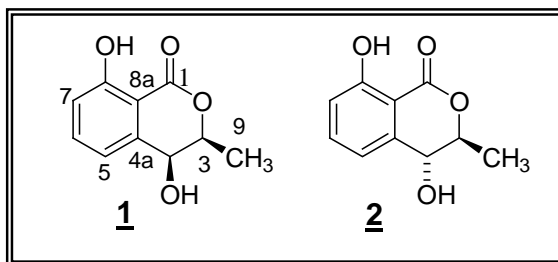
Figura 52 - Substâncias isoladas do fungo endofítico *Penicillium* sp2 (AM-04)

5.2.15 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

Para facilitar a discussão sobre a determinação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho, estas foram separadas por classe de metabólitos. As substâncias com estruturas moleculares já relatadas na literatura foram identificadas utilizando-se as análises dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , bem como por comparação com dados da literatura. As substâncias que apresentam estruturas moleculares ainda não descritas foram elucidadas por meio de técnicas espectroscópicas: RMN uni e bidimensionais, UV, IV e espectrometria de massas de alta resolução.

5.2.15.1 Determinação/identificação estrutural das substâncias produzidas pelo fungo *Penicillium* sp1 (AM-01)

5.2.15.1.1 Identificação da *Rel.*(3*S*,4*S*)-4-hidroximeleina **1** e *Rel.*(3*S*,4*R*)-4-hidroximeleina **2**



A substância **1** foi isolada como um sólido amorfo de coloração branca, após purificação por CLAE_{prep}. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas por ionização em eletrospray ESI-MS (Anexo 1, p. 179) onde foi visualizado o íon m/z 217 indicando a formação do íon quasi-molecular $[M+Na]^+$ o que confirmou a fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$.

O espectro de RMN de 1H (Tabela 1, p. 102) (Anexo 2, p. 180) mostrou dubletos para dois hidrogênios aromáticos em δ_H 6,86 ($J=7,5$ Hz, 1H, H-5) e δ_H 6,96 ($J=7,5$ Hz, 1H, H-7). Estes sinais evidenciaram um anel aromático trissubstituído. Foi observado também um sinal em δ_H 1,51 característico de hidrogênio metílico, que foi atribuído a H-9. Um singlete largo em δ_H 11,0 (1H), indicou a presença de uma ligação intramolecular entre o grupo hidroxila em (8-OH) e o grupo carbonila (C-1).

No experimento de g COSY (Anexo 3, p. 181) foi possível observar os acoplamentos entre o hidrogênio metílico em 4,63 (dq , $J=6,5$ e 2,0 Hz, 1H, H-3) com os hidrogênios em 1,51 (d , $J=6,5$ Hz, 3H, H-9) e δ_H 4,50 (d , $J=2,0$ Hz, 1H, H-4), permitindo estabelecer a sub-unidade α -metil-hidroxi para a substância **1**. Esta observação foi confirmada, através das correlações observadas em g HMBC (Anexo 4, p. 182) (Tabela 1, p. 102) de H-9 com C3/C4 e H-3 com C-9/C-4. Os experimentos de g HMQC (Anexo 5, p. 183), permitiram atribuir todos os átomos de hidrogênios a seus respectivos carbonos. Análise detalhada dos espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 1, p. 102) (Anexo 6, p. 184) mostrou a presença de dez sinais, uma metila [δ_C 16,0 (C-9)], cinco carbonos

metínicos [δ_C 78,1 (C-3), δ_C 67,2 (C-4), δ_C 118,5 (C-5), δ_C 136,7 (C-6) e δ_C 118,2 (C-7)], três carbonos quaternários aromáticos [δ_C 162,1 (C-8), δ_C 106,8 (C-8a), δ_C 140,5 (C-4a)], e um sinal em δ_C 169,1 (C-1), que foi atribuído a uma carbonila, sugerindo que a substância **1** é uma isocoumarina. A configuração relativa de **1** foi definida com base na constante de acoplamento de H-4 com H-3 de 2,0 Hz, indicando que estes dois hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*. Estas informações aliadas aos dados da literatura⁶⁶, permitiram sugerir que a substância **1** trata-se de uma isocoumarina denominada de *Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina*.

A substância **2** foi isolada como um sólido amorfo de cor branca, depois de purificado por CLAE_{prep}. O espectro de massas utilizando a técnica ESI-MS, apresentou o íon $[M+H]^+$ de 195 (Anexo 7, p. 185), sugeriu também para esta substância a fórmula molecular C₁₀H₁₀O₄. O conjunto de sinais observado no espectro de RMN de ¹H (Tabela 1, p. 102) (Anexo 8, p. 186) em δ_H 6,91 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H, δ_C 117,8), δ_H 7,45 (*t*, *J* = 8,0 Hz, 1H, δ_C 136,8) e δ_H 6,96 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H, δ_C 116,2) evidenciou acoplamentos de sistema aromático *orto/meta*, *orto/orto* e *orto/meta* em anel trissubstituído, atribuídos a H-7, H-6 e H-5, respectivamente. O espectro apresentou outro conjunto de sinais em δ_H 1,45 (*d*, *J* = 6,0 Hz, 1H, H-9, δ_C 17,9), δ_H 4,52 (*dq*, *J* = 6,0 Hz, 1H, H-4) e δ_H 4,54 (*m*, 1H, H-3), que aliado aos espectros de RMN ¹³C (Tabela 1, p. 102) (Anexo 9, p. 187) e aos experimentos de gHMBC (Anexo 10, p. 188) (Tabela 1, p. 102) permitiram propor para a substância **2** o esqueleto de uma isocoumarina.

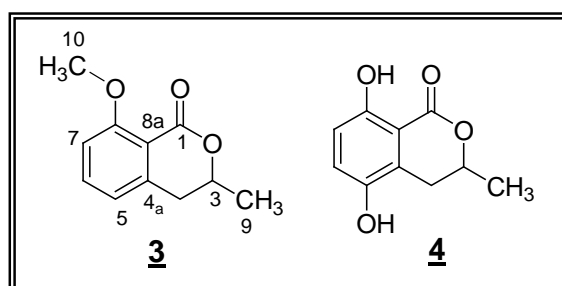
A principal diferença entre as substâncias **2** e **1**, encontra-se na constante de acoplamento entre os hidrogênios H-4 e H-3, com valor de 6,0 Hz, sugerindo que estes dois hidrogênios encontram-se em uma relação *trans*. A partir da análise destas informações e dados da literatura⁶⁷ pode-se concluir que **2** é um isômero de **1**, nomeado *Rel.(3S,4R)-4-hidroximeleina*.

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) das substâncias **1** e **2** em CDCl_3 ^a

Posição	1			2		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	<i>g</i> HMBC	^1H (δ)	^{13}C (δ)	<i>g</i> HMBC
1		162,1			168,4	
2						
3	4,63 <i>dq</i> (6,5; 2,0)	78,1		4,52 <i>dq</i> (6,0)	80,0	C-4 _a
4	4,50 <i>d</i> (2,0)	67,2	C-4a,C-5, C-8a	4,54 <i>m</i>	69,1	C-3
4a		140,5			141,1	
5	6,86 <i>d</i> (7,5)	118,5	C-4, C-8a	6,96 <i>d</i> (8,0)	116,2	C-7
6	7,45 <i>dd</i> (7,5; 8,5)	136,7	C-4a, C-8	7,45 <i>t</i> (8,0)	136,8	C-4 _a ; C-8
7	6,96 <i>d</i> (7,5)	118,2	C-8a	6,91 <i>d</i> (8,0)	117,8	C-8; C-8 _a
8		162,1			162,0	
8a		106,8			106,6	
9	1,51 <i>d</i> (6,5)	16,0	C-3, C-4	1,45 <i>d</i> (6,0)	17,9	C-3; C-4

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

5.2.15.1.2 Identificação do 8-metoximeleina **3** e 5-hidroximeleina **4**



O espectro de massas da substância **3**, obtido com a técnica ESI-MS (+) em baixa resolução, apresentou o íon m/z 193 indicando a formação do íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Anexo 11, p. 189). A presença deste íon, em conjunto com os dados espectroscópicos de RMN, sugeriram a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$.

O conjunto de sinais em δ_H 6,83 (1H, *d*, 8,0), δ_H 6,71 (1H, *d*, 8,0), δ_H 7,35 (1H, *t*, 8,0) evidenciou o sistema aromático *orto/meta*, *orto/meta* e *orto/orto* em anel trissubstituído, atribuídos a H-7, H-5 e H-6, respectivamente.

O espectro de RMN de 1H de **3** (Tabela 2, p. 104) (Anexo 12, p. 190) apresentou sinal um singleto em δ_H 3,88 (3H, H-10) sugerindo uma *O*-metilação. A correlação observada no espectro de gHMBC (Tabela 2, p. 104) (Anexo 13-14, p. 191-192) entre H-10 e δ_C 161,2 (C-8), confirma a posição do grupo metoxi em C-8. O espectro de ^{13}C (Tabela 2, p. 104) (Anexo 15, p. 193) apresentou sinais em δ_C 162,5 e δ_C 56,1 evidenciando a presença do grupo carbonílico em C-1 e do grupo metoxílico em C-10. Três sinais foram registrados em δ_C 119,1 (C-5), δ_C 134,3 (C-6) e δ_C 110,9 (C-7), atribuídos aos carbonos aromáticos.

Estes dados evidenciaram uma grande similaridade estrutural entre **1** e **3**, sendo que uma das diferenças observadas entre as duas substâncias trata-se da redução de C-4 que passou de um carbono metínico oxibenzílico para um carbono metilênico benzílico.

Estas informações aliadas aos dados da literatura, sugerem a estrutura da 8-metoximeleina para a substância **3**.⁶⁸

A diidroisocumarina **4** foi isolada como um sólido amorfo de coloração branca que apresentou em seu espectro de massas de baixa resolução (Anexo 16, p. 194) o pico *m/z* 193, indicando a formação do íon quasi-molecular $[M-H]^-$, sugerindo a fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$.

Uma das principais diferenças está nos espectros de RMN de 1H de **4** (Tabela 2, p. 104) (Anexo 17, p. 195) e **1**, estão no padrão de substituição do anel aromático, onde **4** exibiu dois hidrogênios com sistema aromático *ort/orto* em δ_H 6,73 ($J= 9,0$ Hz, 1H, H-6) e δ_H 6,92 ($J= 9,0$ Hz, 1H, H-7), o que sugeriu um anel aromático tetrasubstituído, além da redução de C-4 que passou de um carbono metínico oxibenzílico para um carbono metilênico benzílico.

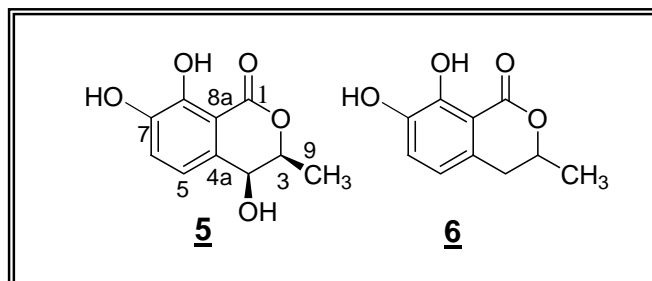
Os espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 2, p. 104) (Anexo 18, p. 196) mostraram sinais em δ_C 156,5 e δ_C 143,0, que foram atribuídos aos carbonos hidroxilados C-8 e C-5, respectivamente. As correlações observadas nos experimentos gHMBC (Tabela 2, p. 104) (Anexo 19-20, p. 197-198), como as observadas entre 8-

OH/C-7 e H-4/C-5, suportaram o posicionamento das hidroxilas. Estes dados indicam um anel hidroquinônico na estrutura molecular de **4**, que foi identificada como 5-hidroximeleina.⁶⁹

Tabela 2 - Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) das substâncias **3** e **4** em CDCl₃^a

Posição	3			4		
	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	gHMBC	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	gHMBC
1		162,5			161,5	
2						
3	4,48 <i>m</i>	74,0		4,63 <i>m</i>	76,0	C-4;C-9
4	2,80 <i>m</i>	36,1	C-3, C-5, C-4a, C-9	3,08 _{Ha} , <i>dd</i> (16,5; 3,5) 2,62 _{Hb} , <i>dd</i> (16,5; 11,5)	28,0 28,0	C-5; C-4 _a ; C-8 _a C-4a
4a		141,8			125,0	
5	6,71 <i>d</i> (8,0)	119,1	C-7		143,0	
6	7,35 <i>t</i> (8,0)	134,3	C-4a, C-8	6,92 <i>d</i> (9,0)	124,0	C-4 _a ; C-8
7	6,83 <i>d</i> (8,0)	110,9	C-5	6,73 <i>d</i> (9,0)	116,0	C-5; C-8 _a
8		161,2			156,5	
8a		113,0			108,5	
9	1,40 <i>d</i> (6,0)	20,6	C-3, C-4	1,49 <i>d</i> (6,5)	21,0	C-3; C-4
10	3,88 <i>s</i>	56,1	C-8			

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

5. 2.15.1.3 Determinação de *Rel.*(3*S*,4*S*)-4,7-diidroximeleina **5** e 7-hidroximeleina **6**

A substância **5** foi isolada como um sólido branco amorfo. O espectro de UV (Anexo 21, p. 199) em MeOH mostrou absorções máximas em 220, 277 e 343 nm. O espectro de IV (Anexo 21, p. 199) confirmou tratar-se de uma substância aromática (ν_{\max} 1645, 1583 e 1476 cm^{-1}) e evidenciou a presença de uma lactona (ν_{\max} 1665 cm^{-1}). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em eletrospray (HRESI-MS) onde foi visualizado o íon quasi-molecular m/z 209,0485 referente à formação de aduto $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Anexo 22, p. 200). A massa para $[\text{M}-\text{H}]^-$ foi calculada em 209,045 o que confirmou a fórmula molecular proposta $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 23, p. 201) (Tabela 3, p. 107), foram verificados dois hidrogênios aromáticos com acoplamento *orto* em δ_{H} 6,78 (*d*, $J = 8,0$, 1H, H-5, δ_{C} 118,6) e δ_{H} 7,07 (*d*, $J = 8,0$, 1H, H-6, δ_{C} 120,8) revelando um anel aromático tetra-substituído, um singlete em δ_{H} 11,0 indicou a presença de uma ligação intramolecular entre um hidrogênio fenólico e um grupo carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 24, p. 202) (Tabela 3, p. 107) indicou a presença de uma metila, quatro carbonos metínicos, sendo dois aromáticos, um oxibenzílico e um carbinólico. Um sinal em δ_{C} 169,5 indicou a presença de uma lactona ligada em um anel aromático em C-8a (δ_{C} 107,0).

Através da análise dos mapas de contorno gCOSY (Anexo 25, p. 203) foi possível observar as correlações $^1\text{H}-^1\text{H}$ entre a metila em C-9 (δ_{H} 1,52; *d*) com os hidrogênios H-3 e H-4 permitindo estabelecer a subunidade $\text{H}_3\text{C}-\text{CHO}-\text{CHOH}$.

As correlações observadas entre o hidrogênio metílico H-9 (δ_{H} 1,52) com os carbonos metínicos C-3 (δ_{C} 79,2) e C-4 (δ_{C} 66,8) nos experimentos *g*HMBC (Anexo 26-27, p. 204-205) (Tabela 3, p. 107) em conjunto com os dados obtidos nos experimentos de *g*COSY sugeriram o esqueleto de uma isocumarina.

A configuração relativa de **5** foi deduzida com base nas constantes de acoplamento. O pequeno valor de *J* para H-4 (δ_{H} 4,4; *J*=2,0 Hz, 1H) sugeriu que este se encontra em uma relação *cis* com H-3. O experimento de *g*HMQC (Anexo 28, p. 206) colaborou para a atribuição dos valores de ^{13}C aos respectivos hidrogênios.

Os dados obtidos, possibilitaram a elucidação estrutural de **5** como a substância inédita *Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina*.

A substância **6** foi isolada como um sólido amorfo de cor branca, $[\alpha]_{\text{D}}^{28} - 70,5$ (c 0,13, MeOH) e submetida a espectrometria de massas de alta resolução (Anexo 29, p. 207) HRESI-MS no modo negativo, onde o espectro apresentou os pico base *m/z* 195,0650 indicando a formação do íon quasi-molecular $[\text{M}-\text{H}]^{-}$. A massa para $[\text{M}]^{-}$ foi calculada em 195,0657 confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$.

O espectro de UV em MeOH mostrou absorção máxima em 249 e 313 nm. O espectro de RMN de ^1H de **6** (Anexo 30, p. 208) (Tabela 3, p. 107) apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,55 (*d*, *J*= 8,0, H-5, δ_{C} 117,7) e δ_{H} 7,01 (*d*, *J*= 8,0, H-6, δ_{C} 120,4) integrados para 1H cada, evidenciando um acoplamento *orto* entre os hidrogênios H-5 e H-6.

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Anexo 31, p. 209) (Tabela 3, p. 107) foi visualizado um carbono metílico, um carbono metileno benzílico e um carbono metínico carbinólico. Um singlete em δ_{H} 11,0 indicou a presença de uma ligação intramolecular entre um hidrogênio fenólico e um grupo carbonila assim como em **5**, devido à ausência de correlação em *g*HMQC (Anexo 32, p. 210).

Estes dados evidenciaram uma grande similaridade estrutural entre **5** e **6**, sendo que a diferença observada entre as duas substâncias trata-se da redução de C-4 que passou de um carbono metínico oxibenzílico para um carbono metilênico benzílico.

Análises dos espectros de RMN bidimensionais *g*HMBC (Anexo 33-34, p. 211-212), (Figura 53, p. 107) (Tabela 3, p. 107) e *g*COSY (Anexo 35, p. 213), auxiliaram

na elucidação da estrutura. Estes dados permitiram a elucidação de **6** como a substância inédita como 7-hidroximeleina.

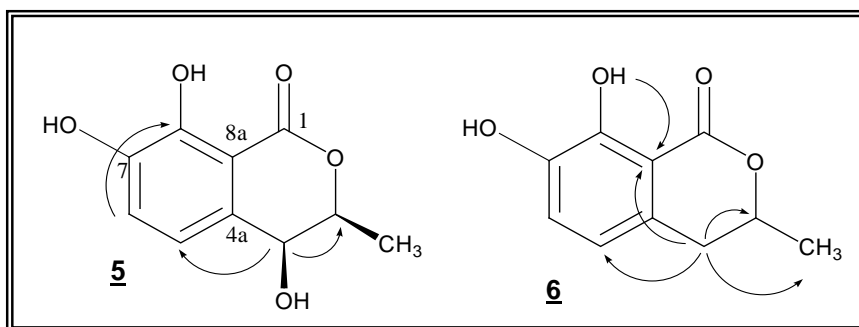


Figura 53 - Principais correlações observadas no experimento gHMBC

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) das substâncias **5** e **6** em CDCl_3 ^a

Posição	5			6		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1		169,5			N.D	
2						
3	4,62 <i>dq</i> (6,5; 2,0)	79,2		4,66 <i>dq</i> (6,5; 6,5)	77,0	
4	4,40 <i>d</i> (2,0)	66,8	C-3,C-4a,C-5, C-8a	2,80 <i>d</i> (6,5)	34,0	C-3;C-5;C-8 _a
4a		131,4			129,6	
5	6,78 <i>d</i> (8,0)	118,6	C-4, C-7, C-8	6,55 <i>d</i> (8,0)	117,7	C-4;C-7;C-8 _a
6	7,07 <i>d</i> (8,0)	120,8	C-4a, C-7, C-8a	7,01 <i>d</i> (8,0)	120,4	C-7;C-8;C-4 _a
7		145,7			143,9	
8		149,1			149,0	
8a		107,0			108,2	
9	1,52 <i>d</i> (6,5)	16,2	C-3, C-4	1,47 <i>d</i> (6,5)	20,7	C-3; C-4

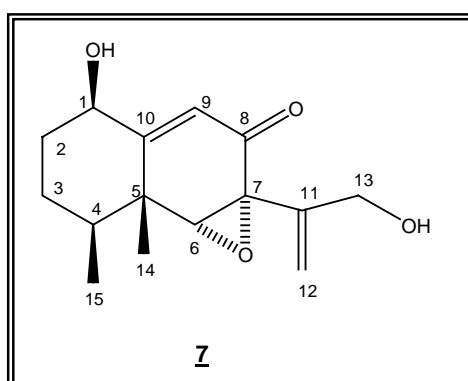
^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

As substâncias **1-6** pertencem à classe das isocumarinas que são metabólitos que ocorrem em uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias, fungos e líquens.⁷⁰ Esta classe de substâncias apresenta diversas atividades biológicas,

tais como inibidores de proteases, antimicrobiana, antialérgicas, antimaláricos⁷¹ e reguladores de crescimento.⁷²

5.2.15.2 Determinação/identificação estrutural das substâncias produzidas pelo fungo AM-02

5.2.15.2.1 Determinação da Xylarenona A 7



A substância 7 foi isolada como um óleo de coloração amarela, $[\alpha]_D^{24} +97,5$ (c 0,04, MeOH) A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em eletrospray (HRESI-MS) onde foi visualizado o íon quasi-molecular m/z 287,1253 referente à formação de aduto $[M+Na]^+$ (Anexo 36, p. 214). A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 287,1253, o que aliado aos dados de RMN de ^{13}C (Anexo 40, p. 218) (Tabela 4, p. 111) permitiu sugerir a fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$ 7.

O espectro de RMN de 1H de 7 (Anexo 37, p. 215) (Tabela 4, p. 111) apresentou um tripleto em δ_H 4,33 (δ_C 73,6) e um singleto em δ_H 3,30 (δ_C 69,6) integrados para 1H cada e que baseados nos deslocamentos de RMN de ^{13}C foram conferidos aos hidrogênios carbinólicos H-1 e H-6, respectivamente. Também no espectro de RMN 1H , foram observados sinais de hidrogênios olefínicos em δ_H 5,25/5,32 (s, H-12_a, H-12_b, δ_C 116,3) sugerindo uma ligação exocíclica e hidrogênios carbinólicos em δ 4,25/4,15 (*d*, $J = 13,0$ Hz, δ_C 63,8, H-13_a, H-13_b), além de dois sinais atribuídos a duas metilas em δ_H 1,31 (s, H-14, δ_C 19,2) e δ_H 1,06 (*d*, $J = 6,5$ Hz, H-15, δ_C 15,7).

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 4, p. 111) e DEPT (Anexo 41-42, p. 219-220) foi possível observar 15 sinais: duas metilas, quatro carbonos metilênicos sendo dois sp^3 , um sp^2 terminal e outro oxi-vinílico, quatro metínicos e cinco carbonos quaternários.

Nos mapas de contorno do experimento $g\text{HMBC}$ (Anexo 38, p. 216) (Tabela 4, p. 111, Figura 56, p. 111) foi possível visualizar as correlações a longa distância entre os átomos de hidrogênio H-14 (δ_{H} 1,31, s) com os carbonos C-4 (δ_{C} 37,7), C-5 (δ_{C} 41,0), C-6 (δ_{C} 69,9) e C-10 (δ_{C} 163,3), de H-15 (δ_{H} 1,06, d) com C-3 (δ_{C} 24,4), C-4 (δ_{C} 37,7) e C-5 (δ_{C} 41,0). Estes dados aliados às correlações observadas em $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ (Anexo 39, p. 217) entre $\text{H-15} \leftrightarrow \text{H-4} \leftrightarrow \text{H-3} \leftrightarrow \text{H-2} \leftrightarrow \text{H-1}$ nos conduziram a estabelecer a estrutura parcial **A** (Figura 54, p. 109).

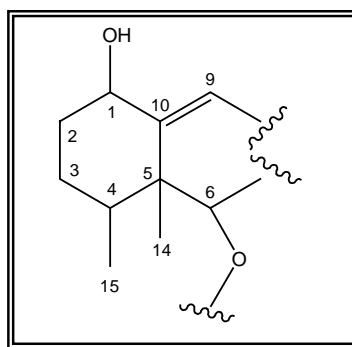


Figura 54 - Estrutura parcial **A**

Também nos mapas de contorno dos experimentos de $g\text{HMBC}$ foi possível observar as correlações à longa distância entre H-12 (δ_{H} 5,25 e 5,32, s) com os carbonos C-7, C-11 e C-13. Estes dados aliados aos de RMN de ^1H permitiram estabelecer a estrutura parcial **B** (Figura 55, p. 109).

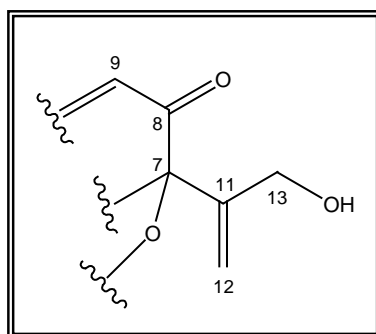


Figura 55 - Estrutura parcial B

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono, foi realizada após avaliação das interações a curta distância 1J , no experimento bidimensional gHMQC (Anexo 43, p. 221). Os valores de deslocamentos químicos observados em RMN ^1H e ^{13}C sugeriram tratar-se de um sesquiterpeno do tipo eremofilano.

A junção entre as estruturas parciais **A** e **B** foi realizada após detalhada análise dos mapas de contorno nos experimentos de gHMBC onde foram observadas as correlações de H-6 (δ_{H} 3,30) com C-7, e de H-9 (δ_{H} 5,82) com C-7, C-5 e C-1.

A configuração relativa de **7** foi determinada pela análise dos espectros de NOESY (Anexo 44, p. 222), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*.

Estas análises aliadas aos dados da literatura, nos permitiram determinar a estrutura de **7** como Xylarenona A, isolada do fungo endofítico *Xylaria* sp, descrito na literatura por apresentar atividade antitumoral e antibacteriana.⁷³

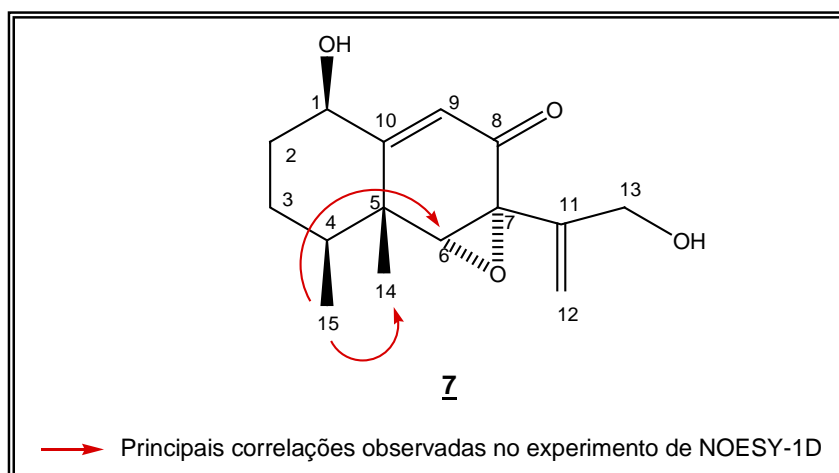
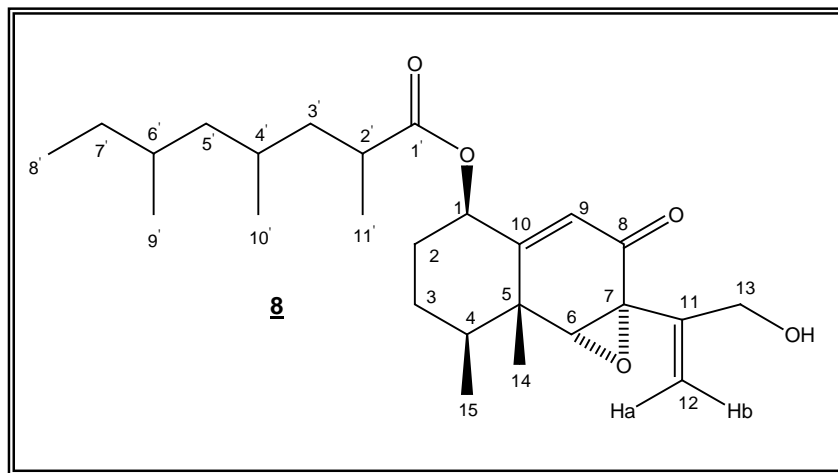


Figura 56 - Estrutura da Xylarenona A

Tabela 4 - Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) da substância **7** em CDCl₃^a

Posição	7		
	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	gHMBC
1	4,33 <i>t</i> (3,0)	73,6	-
2	1,92 <i>m</i>	33,1	-
3	1,60 <i>m</i>	24,4	-
	1,84 <i>m</i>		
4	1,40 <i>m</i>	37,7	-
	1,82 <i>m</i>		
5	-	41,0	-
6	3,30 <i>s</i>	69,6	C-5; C-7; C-10; C-14
7	-	62,9	-
8	-	195,2	-
9	5,82 <i>s</i>	123,3	C-1; C-5; C-13
10	-	163,3	-
11	-	142,7	-
12	5,25 _a <i>s</i>	116,3	C-11; C-13
	5,32 _b <i>s</i>		C-7
13	4,25 <i>d</i> (13,0)	63,8	C-7; C-11; C-12
	4,15 <i>d</i> (13,0)		C-7; C-11; C-12
14	1,31 <i>s</i>	19,2	C-4; C-5; C-6; C-10
15	1,06 <i>d</i> (6,0)	15,7	C-3; C-4; C-5; C-14

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

5.2.15.2.2 Determinação da Xylarenona C **8**

A substância **8** foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]_D^{28} +14,5$ (c 0,18, MeOH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em eletrospray (HRESI-MS) onde foi visualizado o íon quasi-molecular m/z 455,2773 referente à formação de aduto $[M+Na]^+$ (Anexo 45, p. 223). A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 455,2773, o que aliado aos dados de RMN de ^{13}C (Anexo 46, p. 224) (Tabela 5, p. 114) confirmou a fórmula molecular $C_{26}H_{40}NaO_5$.

O espectro de UV em MeOH de **8** mostrou absorção máxima em 235 nm, característico de cetona α,β insaturada. O espectro de IV (Anexo 47, p. 225) exibiu uma banda larga em 3442 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada a cetona α,β -insaturada em 1679 cm^{-1} e outra associada a um éster alifático em 1730 cm^{-1} .

O espectro de RMN de 1H (Anexo 48-49, p. 226-227) (Tabela 5, p. 114) exibiu a presença de dois hidrogênios oximetínicos em δ_H 3,32 (H-6, 1H, s) e em δ_H 5,41 (H-1, 1H, t, $J=3,0$ Hz), sendo o último, devido ao valor de deslocamento, sugerimos estar posicionado α a um grupo acila. Ainda no espectro de RMN de 1H foi possível visualizar a presença de três hidrogênios olefínicos: δ_H 5,95 (H-9, s, δ_C 125,7) e δ_H 5,25_a/5,33_b (H-12_a, s e H-12_b, t, $J=1,5$ Hz, δ_C 116,4). A presença de duas metilas, δ_H 1,23 (s, δ_C 18,6) e δ_H 1,06 (d, δ_C 15,7) permitiu sugerir que **8** possua o mesmo esqueleto básico de **7**.

A análise do espectro de RMN de ^1H associado aos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (Anexo 50-51, p. 228-229) revelaram a presença de seis metilas, sete carbonos metilênicos, sete carbonos metínicos. Ainda no espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar os sinais em δ_{C} 125,7 (δ_{H} 5,95, H-9, s) e δ_{C} 157,8 que evidenciaram a presença de uma cetona α,β insaturada, além de um sinal em δ_{C} 175,0, característico de função éster.

Também foram observadas quatro metilas adicionais quando comparado com **7**, sendo um tripleto e três dubletos integrados para 3H cada em δ_{H} 0,77 (H-8', t, $J=6,5$ Hz), δ_{H} 0,74 (H-9', d, $J=6,5$ Hz), 0,77 (H-10', d, $J=6,5$ Hz) e 1,08 (H-11', d, $J=7,0$ Hz) que aliado ao deslocamento de H-1, permitiu propor a esterificação da hidroxila em C-1.

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono, foi realizada após avaliação das interações 1J , no experimento bidimensional gHMQC (Anexo 55-56, p. 233-234).

Um levantamento bibliográfico realizado na literatura evidenciou que as posições C-1 e C-3 dos esqueletos eremofilânicos podem apresentar uma esterificação.¹²¹ Para a substância **8**, sugerimos que a esterificação ocorreu em C-1 com base nas correlações observadas em gHMBC (Anexo 52-54, p. 230-232, Figura 57, p. 114) entre H-9 e C-1. A cadeia lateral do grupo acila foi definida através das multiplicidades de H-10', H-11', H-9' e H-8' e das correlações observadas no gHMBC (Tabela 5, p. 114).

A configuração relativa de **8** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY (Anexo 57, p. 235), onde a irradiação de H-15 mostrou correlação espacial com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis* assim como em **7**.

Estes resultados revelaram **8** como uma nova substância, com uma cadeia ramificada na posição C-1, denominado Xylarenona C.

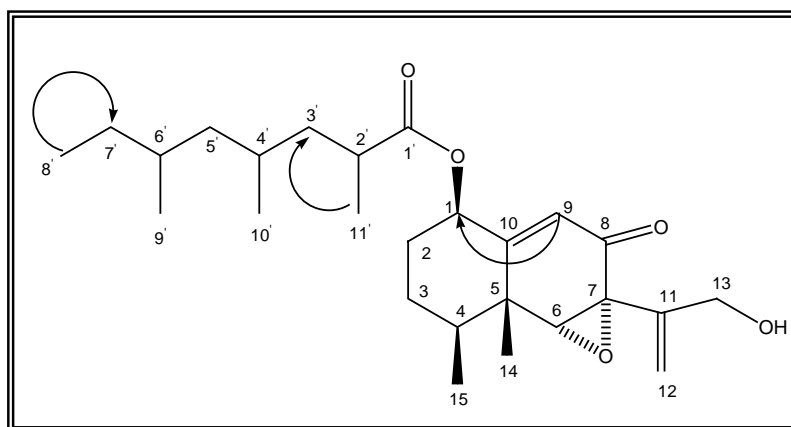
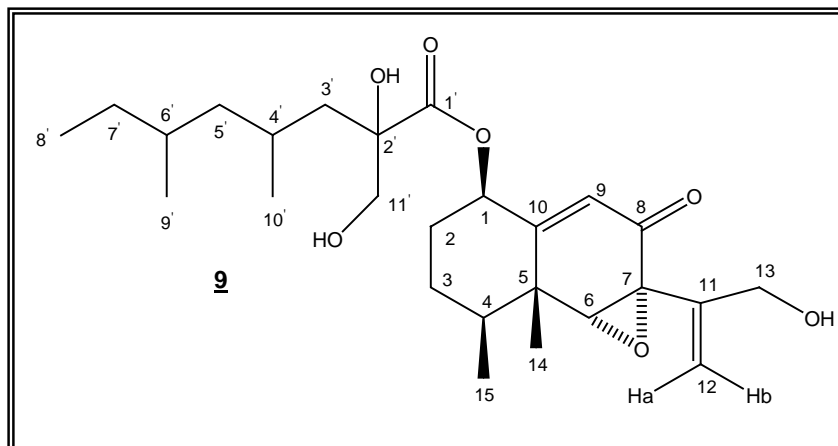


Figura 57: Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **8** em CDCl_3 ^a

Posição	Posição			Posição	Posição		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC		^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	5,41 (<i>t</i> , 3,0)	74,0	-	14	1,23 (<i>s</i>)	18,6	C-4; C-5
2	1,94 (<i>m</i>)	25,0	-	15	1,06 (<i>d</i> , 7,0)	15,7	C-2; C-4
3	1,86 (<i>m</i>) 1,42 (<i>m</i>)	31,0	-	1'		175,0	-
4	1,88 (<i>m</i>)	37,2	-	2'	2,50 (<i>m</i>)	37,9	-
5	-	40,9	-	3'	1,63 (<i>m</i>)	41,5	-
6	3,32 (<i>s</i>)	69,1	C-5; C-10	4'	1,39 (<i>m</i>)	28,3	-
7	-	63,2	-	5'	1,29 (<i>m</i>)	44,8	-
8	-	NO	-	6'	1,19 (<i>m</i>)	31,4	-
9	5,95 (<i>s</i>)	125,7	C-1; C-5; C-7	7'	1,35 (<i>m</i>)	29,0	-
10	-	157,8	-	8'	0,77 (<i>t</i> , 6,5)	11,1	C-5'; C-6'; C-7'
11	-	142,6	-	9'	0,75 (<i>d</i> , 6,5)	19,6	C-5'; C-6'; C-7'
12	5,25 _a (<i>s</i>) 5,33 _b (<i>t</i> , 1,5)	116,4	C-11; C-13 C-13	10'	0,77 (<i>d</i> , 6,5)	19,6	C-3'; C-4'; C-5'; C-6'
13	4,12 (<i>d</i> , 13,5) 4,27 (<i>d</i> , 13,5)	63,7	C-11; C-12; C-13 C-11; C-12	11'	1,08 (<i>d</i> , 7,0)	18,1	C-3'

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

5.2.15.2.3 Determinação da Xylarenona D **9**

A substância **9** foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]_D^{29} + 40,5$ (c 0,1 MeOH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em eletrospray (HRESI-MS) onde foi visualizado o íon quasi-molecular m/z 487,2666 referente à formação de aduto $[M+Na]^+$ (Anexo 58, p. 236). A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 487,2666 o que com auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C permitiu confirmar a fórmula molecular $C_{26}H_{40}O_7$.

O espectro de RMN de 1H (Anexo 59-60, p. 237-238) (Tabela 6, p. 117) apresentou sinais de hidrogênios olefínicos em δ_H 5,24_a/5,33_b (δ_C 116,1) e carbinólicos em δ 4,28/4,14 (*d*, $J= 13,0$ Hz, δ_C 63,7, H-13), confirmando assim como em **7**, a estrutura parcial **B** para a substância **9**.

Após análise dos espectros de RMN de 1H e RMN de ^{13}C da substância **9** foi possível averiguar características muito semelhantes às de **8**, sendo que a principal diferença observada foi à presença de 2H metilênicos adicionais na região dos hidrogênios carbinólicos δ_H 3,44-3,60 (δ_C 68,3/C-11') ligado ao carbono carbinólico δ_C 79,0, sugerindo a presença de outros dois carbonos hidroxilados. A ausência de interação 1J nos experimentos de gHMQC (Anexo 66, p. 244) permitiu assegurar que o sinal observado em δ_C 79,0 é de um carbono carbinólico sp^3 não hidrogenado.

Através da análise dos experimentos de DEPT (Anexo 61-62, p. 239-240) e RMN de ^{13}C (Anexo 63, p. 241) (Tabela 6, p. 117) foi possível averiguar a presença de cinco carbonos metílicos, sete metilênicos e seis carbonos metínicos.

Nos experimentos de gHMBC (Anexo 64-65, p. 242-243) (Figura 58, p. 116) foi possível observar as correlações 2J entre H-11' (H_a 3,44; d , $J=11,0$ Hz) e (H_b 3,60; d , $J=11,0$ Hz) com o carbono carbinólico em δ_C 79,0 e 3J com o carbono em δ_C 174,6 característico de função éster, o que permitiu posicionar este grupo.

A configuração relativa de **9** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY (Anexo 67, p. 245), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*.

Estas análises nos permitiram determinar a estrutura de **9** como Xylarenona D, inédita na literatura.

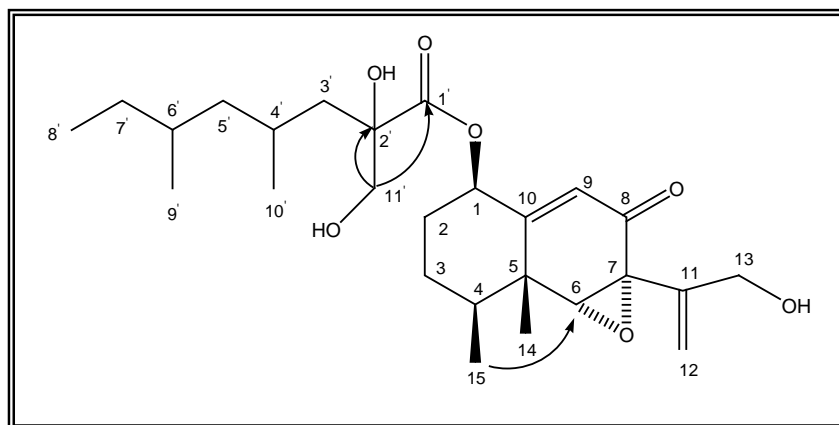
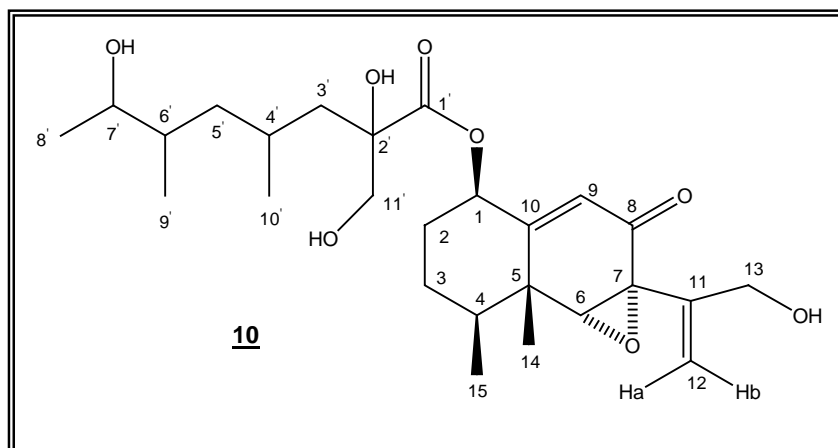


Figura 58: Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 6 - Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) da substância **9** em CDCl₃^a

Posição	Posição			Posição	Posição		gHMBC
	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	gHMBC		¹ H (δ)	¹³ C (δ)	
1	5,49 (<i>t</i> , 2,0)	76,6	-	14	1,23 (<i>s</i>)	18,3	C-6; C-10
2	1,56 (<i>m</i>)	25,0	-	15	1,08 (<i>d</i> ; 7,0)	15,7	C-2; C-4; C-5
3	1,68 (<i>m</i>)	31,0	-	1'	-	174,6	-
4	1,88 (<i>m</i>)	37,1	-	2'	-	79,0	-
5	-	40,8	-	3'	1,35 (<i>dd</i> , 11,0 Hz) 1,60 (<i>d</i> , 11,0 Hz)	41,8	C-2'; C-4'; C-10'; C-11'
6	3,33 (<i>s</i>)	69,1	C-7; C-5; C-14	4'	1,55 (<i>m</i>)	26,7	C-10'
7	-	63,1	-	5'	0,83 (<i>m</i>) 1,38 (<i>m</i>)	45,8	C-6' C-4'; C-10'
8	-	194,4	-	6'	1,23 (<i>m</i>)	31,5	-
9	6,0 (<i>s</i>)	126,4	C-1; C-5; C-7	7'	1,28 (<i>m</i>)	28,7	-
10	-	156,4	-	8'	0,78 (<i>t</i> , 7,5)	11,1	C-6'; C-7'
11	-	142,3	-	9'	0,75 (<i>d</i> ; 6,5)	18,3	C-6'; C-7'
12	5,24 _a (<i>s</i>) 5,31 _b (<i>t</i> , 1,5)	116,1	C-7; C-11 C-13	10'	0,88 (<i>m</i>)	21,6	-
13	4,14 (<i>d</i> ; 13,0) 4,28 (<i>d</i> ; 13,0)	63,7	C-11; C-12	11'	3,44 (<i>d</i> ; 11,0) 3,60 (<i>d</i> ; 11,0)	68,3	C-1'; C-2'

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

5.2.15.2.4 Determinação da Xylarenona E **10**

A substância **10** foi isolada como um óleo amarelo após purificação por CLAE_{prep.} $[\alpha]_D^{28} +13,5$ (c 0,11, MeOH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em eletrospray (HRESI-MS) onde foi visualizado o íon quasi-molecular m/z 479, 2647 referente à formação de íon $[M-H]^-$ (Anexo 68, p. 246). A massa para $[M-H]^-$ foi calculada em 479, 2645 o que com auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C permitiu confirmar a fórmula molecular $C_{26}H_{40}O_8$.

Através da análise dos dados de RMN de 1H (Anexo 69-70, p. 247-248) (Tabela 7, p. 120) e ^{13}C (Anexo 71, p. 249) (Tabela 7, p. 120) foi possível notar uma grande similaridade ente as substâncias **9** e **10**, sugerindo a presença do mesmo esqueleto carbônico.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **10**, foi notado a ausência do sinal em δ_C 28,7 (C-7') e a presença de um sinal característico de carbono carbinólico em δ_C 71,7 indicando que este carbono sofreu oxidação. Outra diferença observada encontra-se no deslocamento químico do hidrogênio H-7' que passou de δ_H 1,28 para δ_H 3,52, o que confirma a presença de um grupo hidroxila adicional em **10**.

A atribuição de todos os valores de RMN de ^{13}C aos respectivos hidrogênios foi realizada com base nas correlações observadas no experimento gHMQC (Anexo 72, p. 250). Dados obtidos dos experimentos de RMN bidimensionais

gHMBC (Anexo 73-75, p. 251-253, Figura 59, p. 119) (Tabela 7, p. 120), corroboraram para a confirmação da estrutura proposta.

A configuração relativa de **10** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY (Anexo 76, p. 254), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*.

Estas análises nos permitiram determinar a estrutura de **10** como Xylarenona E, inédita na literatura.

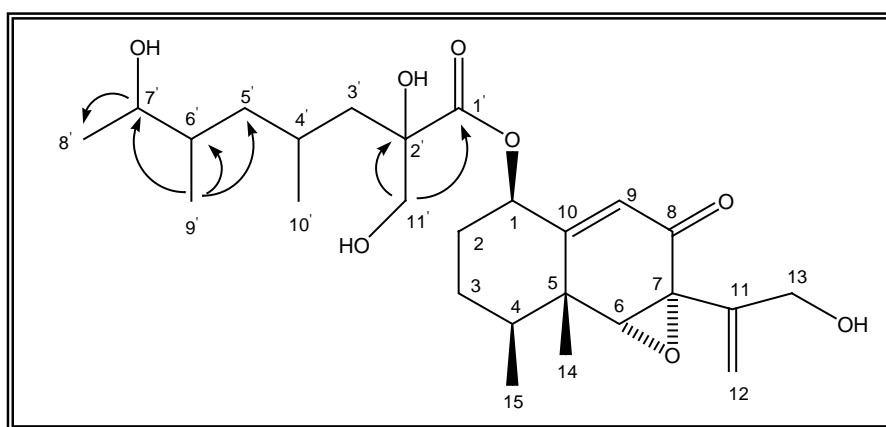


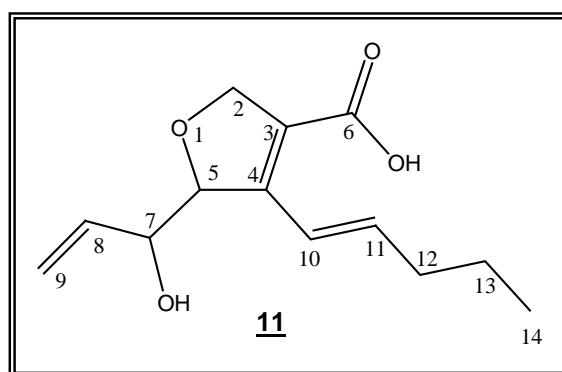
Figura 59: Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **10** em CDCl_3 ^a

Posição	Posição			gHMBC			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC	^1H (δ)	^{13}C (δ)		
1	5,50 (s)	76,5	-	14	1,23 (s)	18,4	C-4; C-5
2	1,50 (m)	25,0	-	15	1,08 (d; 6,5)	15,8	C-2; C-4; C-5
3	1,70 (m)	31,0	-	1'	-	174,0	-
4	1,87 (m)	37,2	-	2'	-	79,0	-
5	-	40,9	-	3'	1,30 (m) 1,38 (m)	42,0	C-2'; C-4'; C-10'
6	3,32 (s)	69,2	C-5; C-7; C-14	4'	1,62 (m)	27,5	C-10'
7	-	63,7	-	5'	0,82 (m) 0,84 (m)	41,3	C-4'; C-10'; C-6' C-7'
8	-	194,4	-	6'	1,46 (m)	37,5	-
9	6,0 (s)	126,4	C-1; C-5; C-7	7'	3,52 (q; 5,5)	71,7	C-8'
10	-	156,4	-	8'	1,03 (d; 6,5)	19,3	C-6'; C-7'
11	-	142,6	-	9'	0,76 (d; 7,0)	15,7	C-3'; C-6'; C-7'
12	5,29 _a (s) 5,23 _b (s)	115,9	C-7; C-11	10'	0,94 (d; 6,5)	22,0	C-4'
13	4,14 (d; 13,0) 4,28 (d; 13,0)	63,7	C-11; C-12	11'	3,62 (d; 11,0) 3,46 (d; 11,0)	68,3	C-1'; C-2'

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

As substâncias **7-10** pertencem à classe dos sesquiterpenos do tipo eremofilano, que são metabólitos secundários encontrados em fungos e plantas superiores. Estes compostos, possuem diversas propriedades biológicas como ação fitotóxica, mitotóxica⁷⁴ e antifúngica. Alguns são considerados fitoalexinas.⁷⁵

5.2.15.2.5 Determinação do (*E*)-5-(1-hidroxiálil)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-ácido carboxílico **11**

A substância **11** foi isolada como um óleo de cor amarela, após purificação por CLAE_{prep.} $[\alpha]_D^{28} -38,5$ (c 0,1, MeOH). O espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por eletrospray no modo positivo (HRESI-MS), apresentou o íon quasi-molecular m/z 261,1157 referente à formação de aduto $[M+Na]^+$ (Anexo 77, p. 255). A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 261,1103 confirmando a fórmula molecular $C_{13}H_{18}NaO_4$.

O espectro de UV em MeOH mostrou absorção máxima em 267 nm. O espectro de IV (Anexo 78, p. 256) exibiu uma banda intensa e larga em 3411 cm^{-1} característico de hidroxila de ácido carboxílico e uma banda associada a C=O em 1737 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 79, p. 257) (Tabela 8, p. 123) registrou 13 átomos de carbonos, consistentes com seis olefínicos (2 quaternários, três metínicos e um metilênico), três metilênicos (dois vinílicos e um alílico), dois metínicos (um oxivinílicos e um carbonílico), uma metila e um carbono atribuído a um ácido carboxílico.

Através da análise dos espectros de RMN de 1H (Anexo 81-83, p. 259-261) (Tabela 8, p. 123) em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 aliado às correlações observadas no experimento de

*g*HMBC entre H-2 com C-4 e C-5, foi possível sugerir um anel diidrofurânico para a substância **11**.

Na interpretação cuidadosa e detalhada do experimento de *g*COSY (Anexo 84, p. 262) foi possível definir dois sistemas contíguos e independentes de spins. No primeiro caso as interações visualizadas entre H-14↔H-13↔H-12↔H-11↔H-10 permitiram estabelecer um substituinte 1-pentenila, -CH=CHCH₂CH₂CH₃ (subunidade **A**). A configuração *trans* da ligação dupla foi estabelecida pelo valor da constante de acoplamento de 16,0 Hz entre H-10 (δ_{H} 6,52, *d*) e H-11 (δ_{H} 6,04, *dt*).

No segundo caso, as interações dos spins ¹H-¹H entre H-7↔H-8↔H-9 conduziu a subunidade 1-hidroxi-2-propenila, H₂C=CHCHOH- (subunidade **B**).

Estas subunidades foram ratificadas pelas correlações observadas a longa distância ³*J* (Figura 60, p. 123) nos experimentos de *g*HMBC (Anexo 85-86, p. 263-264) (Tabela 8, p. 123), pelos deslocamentos químicos em RMN de ¹H e ¹³C, assim como as respectivas multiplicidades dos hidrogênios.

Análise do mapa de contorno do experimento *g*HMBC foi decisivo na determinação estrutural desta substância, fornecendo subsídio para posicionar os substituintes no anel furânico. A subunidade **A** foi conectada em C-3, devido às correlações a longa distância observada entre H-10↔C-4/C-5, assim como de H-5↔C-4/C-10. A análise do espectro de NOESY (Anexo 87, p. 265) confirmou a posição da subunidade **A** em C-3, devido à interação espacial observada entre H-10 e H-2.

A subunidade **B** foi posicionada em C-2 devido às correlações a longa distância observada no experimento *g*HMBC entre H-2↔C7/C-8 e H-7↔C-3/C-9/C-8/C-2.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos *g*HMQC (Anexo 80, p. 258).

Estas análises nos permitiram determinar a estrutura de **11** como (*E*)-5-(1-hidroxi-2-propenil)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-ácido carboxílico, que apresenta esqueleto carbônico inédito na literatura.

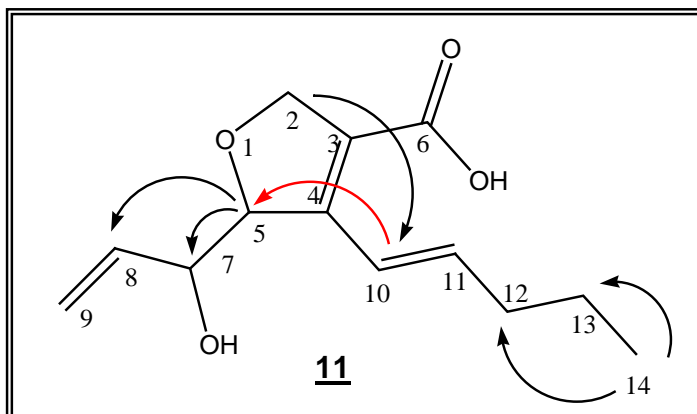


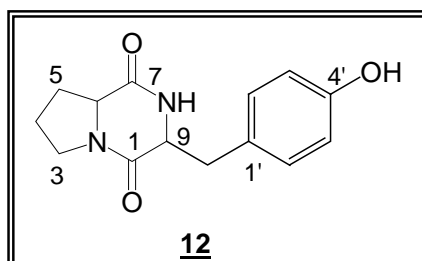
Figura 60 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC
 Principal correlação observada no experimento NOESY-1D

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **11** em CDCl_3 ^a

Posição	11		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
2	4,57 (<i>d</i> ; 5,5)	69,2	C-4; C-5; C-6; C-7; C-8
3	-	122,7	-
4	-	157,6	-
5	4,88 (<i>d</i> ; $W_{1/2}$; 16,2) 4,85 (<i>d</i> ; $W_{1/2}$; 16,2)	70,0	C-4; C-6; C-10
6	-	175,1	-
7	4,33 (<i>ddt</i> , 5,5; 5,5; 1,5)	74,8	C-2; C-3; C-8; C-9
8	5,77 (<i>ddd</i> , 16,0; 10,0; 5,5)	135,8	C-7
9	5,29 (<i>ddd</i> , 16,0; 3,0; 1,5) 5,16 (<i>ddd</i> , 10,0; 3,0; 1,5)	117,5	C-7; C-8 C-7
10	6,52 (<i>d</i> ; 16,0)	120,3	C-4; C-5; C-12
11	6,04 (<i>dt</i> ; 16,0 e 7,0)	142,0	C-4; C-12; C-13
12	2,16 (<i>ddd</i> ; 14,5; 7,0; 1,5)	35,5	C-10; C-11; C-13; C-14
13	1,42 (<i>q</i> ; 7,5)	21,7	C-11; C-12; C-13
14	0,87 (<i>t</i> ; 7,5)	13,6	C-12; C-13

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

5.2.15.3 Identificação estrutural da substância produzida pelo fungo AM-03

5.2.15.3.1 Identificação do ciclo (Pro-Tyr) 12

A substância 12 foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais e espectrometria de massas.

O espectro de RMN de ^1H (Anexo 88, p 266) (Tabela 9, p. 126), apresentou na região de alifáticos, três multipletos em (δ_{H} 3,55 e δ_{H} 3,49, H-3), δ_{H} 1,90 H-4 e (δ_{H} 1,83 e δ_{H} 2,26, H-5), integrando para dois hidrogênios cada. Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_{H} 7,0 (*d*, 2H, δ_{C} 130,3), δ_{H} 6,71 (*d*, 2H, δ_{C} 116,1) e um sinal em δ_{C} 155,5 que indicou a presença de um grupo OH ligado ao anel aromático. Dois duplos dubletos em δ_{H} 2,70_a (1H, *J*= 4,5 e 14,5, δ_{C} 36,0) e δ_{H} 3,41_b (1H, *J*= 4,5 e 14,5, δ_{C} 36,0), evidenciaram um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído. Foram observados ainda, dois tripletos em δ_{H} 4,04 (1H, *J*= 7,5, δ_{C} 59,1) e δ_{H} 4,14 (1H, *J*= 3,0; δ_{C} 56,3).

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Anexo 89, p 267) (Tabela 9, p. 126), foram observados quatro carbonos metilênicos, sendo um benzílico, seis metínicos, um quaternário aromático e dois carbonos típicos de amida em δ_{C} 165,2 (H-7) e δ_{C} 169,7 (H-1). Os três multipletos visualizados em (δ_{H} 3,55 e δ_{H} 3,49, H-3), (δ_{H} 1,90 H-4) e (δ_{H} 1,83 e δ_{H} 2,26, H-5) são característicos dos hidrogênios metilênicos atribuídos a uma unidade do aminoácido prolina. Estes dados nos permitiram identificar a substância 12 como pertencente à classe das dicetopiperazinas, que são substâncias normalmente formadas pela condensação de dois ou mais aminoácidos.

A presença de um anel aromático observado em RMN de ^1H associado à correlação a longa distância observada no experimento de gHMBC (Anexo 90-91, p 268-269) (Tabela 9, p. 126), entre H-10 (δ_{H} 2,70_a) com C-1' e C-2' conduziram a presença do resíduo de tirosina (Tyr) como outro aminoácido da molécula. No experimento de gCOSY (Anexo 92, p 270) foi possível observar a correlação entre H-10_a/H-10_b/H-9, confirmando a presença deste aminoácido. A configuração relativa de **12** foi realizada com base nas interações espaciais observadas, no experimento de NOESY-1D (Anexo 93, p. 271) entre H-6 e H-9, posicionando-os no mesmo plano da molécula.

O espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS, modo positivo) foi obtido para confirmação da estrutura proposta (Anexo 94, p 272). Íon em m/z 261 $[\text{M}+\text{H}]^+$ esta coerente com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$. Os dados espectrais foram comparados com a literatura⁷⁶ e permitiram identificar a substância **12** como ciclo (Pro-Tyr).

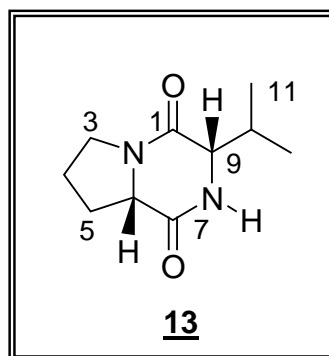
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **12** em CDCl_3 ^a

Posição	12		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	-	165,2	-
3	3,55 _a (2H, <i>m</i>)	45,4	-
	3,49 _b (2H, <i>m</i>)	45,4	-
4	1,90 (2H, <i>m</i>)	22,5	C-1
5	1,83 _a (2H, <i>m</i>)	28,3	C-4; C-6
	2,26 _b (2H, <i>m</i>)	28,3	C-3
6	4,01 (<i>t</i> , 7,5)	59,1	C-1
7	-	169,7	-
9	4,14 (<i>t</i> , 4,5)	56,3	C-7
10	2,70 _a (<i>dd</i> , 4,5; 14,5)	36,0	C-7; C-1'; C-2'
	3,41 _b (<i>dd</i> , 4,5; 14,5)	36,0	C-7
1'	-	127,2	-
2' e 6'	7,0 (2H, <i>d</i> , 8,5)	130,3	C-10; C-3'; C-4'
3' e 5'	6,71 (2H, <i>d</i> , 8,5)	116,1	C-1'; C-4'
4'	-	155,5	-

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

5.2.15.4 Identificação estrutural das substâncias produzidas pelo fungo *Penicillium* sp2 (AM-04)

5.2.15.4.1 Identificação do ciclo (L-Pro-L-Val) **13**



A substância **13** foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono pela análise de *g*HMQC (Anexo 95, p. 273).

O espectro de RMN de ^1H (Anexo 96-97, p. 274-275) (Tabela 10, p. 128) e ^{13}C (Anexo 98, p. 276) (Tabela 10, p. 128) permitiu notar a presença dos hidrogênios em δ_{H} 4,12 (*t*, $J=7,5$ Hz, 1H, H-6), e δ_{H} 3,92 (*sl*, 1H, H-9) e duas carbonilas em δ_{C} 170,2 e δ_{C} 165,2. Estes sinais são característicos de anel dicetopiperazínico.

A presença de três sinais na forma de multipletos δ_{H} 3,40 (2H, H-3), 1,78 (2H, H-4) e 2,13 (2H, H-5) referentes aos hidrogênios metilênicos observados nos experimentos de RMN de ^1H , indicou a presença de resíduo do aminoácido Prolina na estrutura.

O espectro de RMN de ^1H apresentou dubletos em 1,02 (3H, *d*, 6,5) e 0,86 (3H, *d*, 6,5) que foram atribuídos aos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) e um sinal em δ_{H} 2,35 (1H, *dsept*, 2,5 e 6,5) que foi atribuído a H-10. O espectro de *g*HMBC (Anexo 99, p. 277) (Tabela 10, p. 128), mostrou correlações dos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) com o carbono metínico em δ_{C} 27,7 evidenciando uma unidade isopropila, indicando o aminoácido Valina como um dos componentes da substância **13**.

A ausência de correlação em *g*HMQC para o sinal em δ_{H} 7,92 (1H, *sl*), permitiu atribuir este deslocamento químico a H-8 (N-H).

Baseado nos dados espectroscópicos, e nas correlações observadas, nos experimentos uni e bidimensionais, foi proposto que a substância **13** é uma dicetopiperazinas constituída pelos aminoácidos Prolina (Pro) e Valina (Val).

A configuração relativa de **13** foi realizada pela análise do espectro de NOESY-1D (Anexo 100, p. 278) onde foi observados interação espacial entre os hidrogênios em H-9 (δ_{H} 3,92) e H-6 (δ_{H} 4,12), colocando-os no mesmo plano espacial da molécula. Comparação destes valores com a literatura^{76,77}, confirmam esta proposta indicando ser a substância ciclo (L-Pro-L-Val).

O espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS, modo positivo) (Anexo 101, p. 279) foi obtido para confirmação da estrutura indicada. O íon observado em m/z 197 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) está coerente com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$.

As configurações absolutas das dicetopiperazinas **12** e **13** poderiam ser determinadas utilizando-se a metodologia de Marley, no entanto a massa reduzida impossibilitou esta análise.¹²⁰

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **13** em $\text{DMSO}-d_6^a$

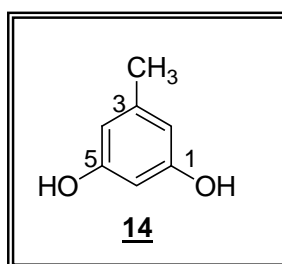
Posição	13		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	$g\text{HMBC}$
3	3,40 <i>m</i>	44,6	C-4; C-5
4	1,78 <i>m</i>	22,0	C-3
5	2,13 <i>m</i>	27,7	C-3
6	4,12 <i>t</i> (7,5)	58,2	-
9	3,92 <i>sl</i>	59,5	C-11; C-12
10	2,35 <i>dsept</i> (2,5; 6,5)	27,7	C-9; C-12
11	0,86 <i>d</i> (6,5)	16,4	C-9; C-10; C-12
12	1,02 <i>d</i> (6,5)	18,3	C-9; C-10

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

As dicetopiperazinas são compostos bioativos, comumente encontrados em fungos da classe dos deuteromicetos, ascomicetos e basidiomicetos⁷⁸ tais como,

Penicillium sp., *P. verrucosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium chlamydosporum*, *Gliocladium virens*, *Rhodotorula pilimanae*, *Phoma lingan*, *Streptomyces* sp., *Penicillium janczewskii*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium griseofulvum*, *Thielavia minor*, *Emericella striata*, entre outros.⁷⁹ Fungos do gênero *Colletotrichum*, como *C. gloesporioides*, também são produtores de substâncias dicetopiperazínicas. Há descrito na literatura diversas atividades biológicas para esta classe de substância, sendo que as propriedades antifúngicas e citotóxicas são as mais encontradas.⁸⁰

5.2.15.4.2 Identificação do orcinol **14**



A substância **14** foi isolada como um sólido amorfo de coloração marrom após purificação por CLAE_{prep}. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas por ionização em eletrospray ESI-MS (Anexo 102, p. 280) que apresentou o íon $[M-H]^-$ de 123 sugerindo a fórmula molecular $C_7H_8O_2$.

Seu espectro de RMN de 1H (Tabela 11, p. 130) (Anexo 103, p. 281) mostrou dois sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 5,99 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2) e δ_H 6,01 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 2H, H-4 e H-6), sugerindo um anel aromático trissubstituído.

Em seu espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 11, p. 130) (Anexo 104, p. 282) foi possível observar cinco sinais, dois aromáticos oxigenados em δ_C 158,1 (C-1 e C-5), dois metinos em δ_C 99,7 (C-6) e δ_C 106,9 (C-2 e C-4) e um grupo metil em δ_C 21,1 (C-7). A posição da metila em C-3 foi atribuída com base nos experimentos de gHMBC (Anexo 105, p. 283), que indicaram a correlação de δ_H 2,43 (H-7) com δ_C 138,9 (C-3) e δ_C 106,9. Estas informações, aliadas aos dados da literatura, nos permitiram identificar a substância **14** como orcinol⁸¹.

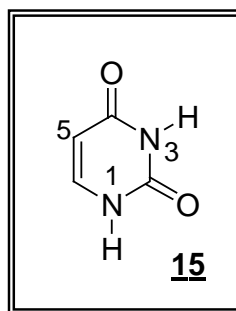
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **14** em $\text{DMSO-}d_6^a$

Posição	14		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	-	158,1	-
2	6,01 <i>d</i> (2,0)	106,9	C-1; C-6
3	-	138,9	-
4	6,01 <i>d</i> (2,0)	106,9	C-1; C-6
5	-	158,1	-
6	5,99 <i>d</i> (2,0)	99,6	C-4
7	2,43 <i>s</i>	21,1	C-2, C-3, C-4

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

O orcinol tem sido isolado de plantas, líquens, e do fungo *Aspergillus fumigatus*, e apresenta atividade antibacteriana e antifúngica.⁸²⁻⁸⁴

5.2.15.4.3 identificação da uracila **15**



A substância **15** foi isolada como um sólido amorfo amarelo que submetido a ESI-MS apresentou o íon $[\text{M-H}]^-$ 111,0152, sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (Anexo 110, p. 288).

O espectro de RMN de ^1H de **15** (Anexo 106, p. 284) (Tabela 12, p. 131) apresentou dois hidrogênios metínicos em δ 5,41 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H, δ_{C} 99,9, H-5) e δ 7,38 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H, δ_{C} 142,9, H-6). A grande diferença de deslocamento químico

observado para estes dois hidrogênios sugere que estejam em uma vizinhança química muito diferenciada, sugerindo hidrogênios vinílicos de uma olefina conjugada com C=O.

O espectro de RMN de ^{13}C , (Anexo 107, p. 285), (Tabela 12, p. 131), apresentou quatro carbonos, sendo dois quaternários, δ_{C} 151,9 (H-2) e δ_{C} 164,4 (H-4), e dois metínicos δ_{C} 99,9 (H-5) e δ_{C} 142,9 (H-6). O espectro gHMQC (Anexo 108, p.286) confirmou as atribuições aos carbonos ligados a hidrogênios.

Estas observações aliadas aos resultados observados nos mapas de contorno dos experimentos de gHMBC (Anexo 109, p. 287) (Tabela 12, p. 131), onde foi possível visualizar as correlações 2J e 3J H-5 \leftrightarrow C-4/C-6 e H-6 \leftrightarrow C-2/C-4 /C-5 e comparação com a literatura nos permitiu atribuir para a substância **15** a estrutura da uracila.^{85,86}. Existe uma vasta literatura sobre atividades biológicas da uracila, mas sempre associada a outras moléculas como açúcares, aminoácidos, proteínas etc.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **15** em DMSO- d_6^a

Posição	15		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
2	-	151,9	-
4	-	164,4	-
5	5,41 <i>d</i> (8,0)	99,9	C-4; C-6
6	7,38 <i>d</i> (8,0)	142,9	C-2; C-4; C-5

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

5.2.16 OBTENÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS

Com o intuito de realizarmos uma comparação inicial entre os extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos isolados de *A. macrophylla* com os obtidos das folhas da planta hospedeira, os extratos brutos de ambos foram analisados por CLAE-DAD.

5.2.16.1 Perfil químico de *A. macrophylla*

Os poucos relatos químicos encontrados na literatura sobre o gênero *Alibertia*, pertencente à subfamília Ixoroideae, fazem destaque a sua rica constituição terpenoídica. Espécies de *Alibertia* são conhecidas como fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano.⁸⁷⁻⁹⁰ Adicionalmente, iridóides e flavonóides glicosilados foram isolados de *A. sessilis*⁹⁰, flavonas e cumarinas de *A. myrcifolia*.⁸⁷

Estudos realizados com a espécie *A. macrophylla* levaram ao isolamento de alguns metabólitos secundários com atividade antifúngica: ésteres do ácido cafeico, e iridóides não glicosilados.^{90,48}

Em um estudo recente realizado no Instituto de Química em Araraquara pela Dra. Viviane Cândida da Silva foram estudados os caules de *A. macrophylla* e deles foram isolados iridóides, triterpenos, esteróides, derivados fenólicos e um diterpeno.

Neste trabalho, apesar de fracionados somente os extratos dos caules, uma comparação do perfil químico entre os extratos dos caules e das folhas (Figura 61, p. 133) mostra que estes possuem a mesma constituição química. Os extratos das folhas se caracterizam principalmente pela presença de iridóides ($t_r = 19,68$ min; 239 nm) e derivados do ácido clorogênico ($t_r = 26,58$ e 31,23 min; 202, 270 e 315 nm) (Figura 62, p. 134).⁹¹

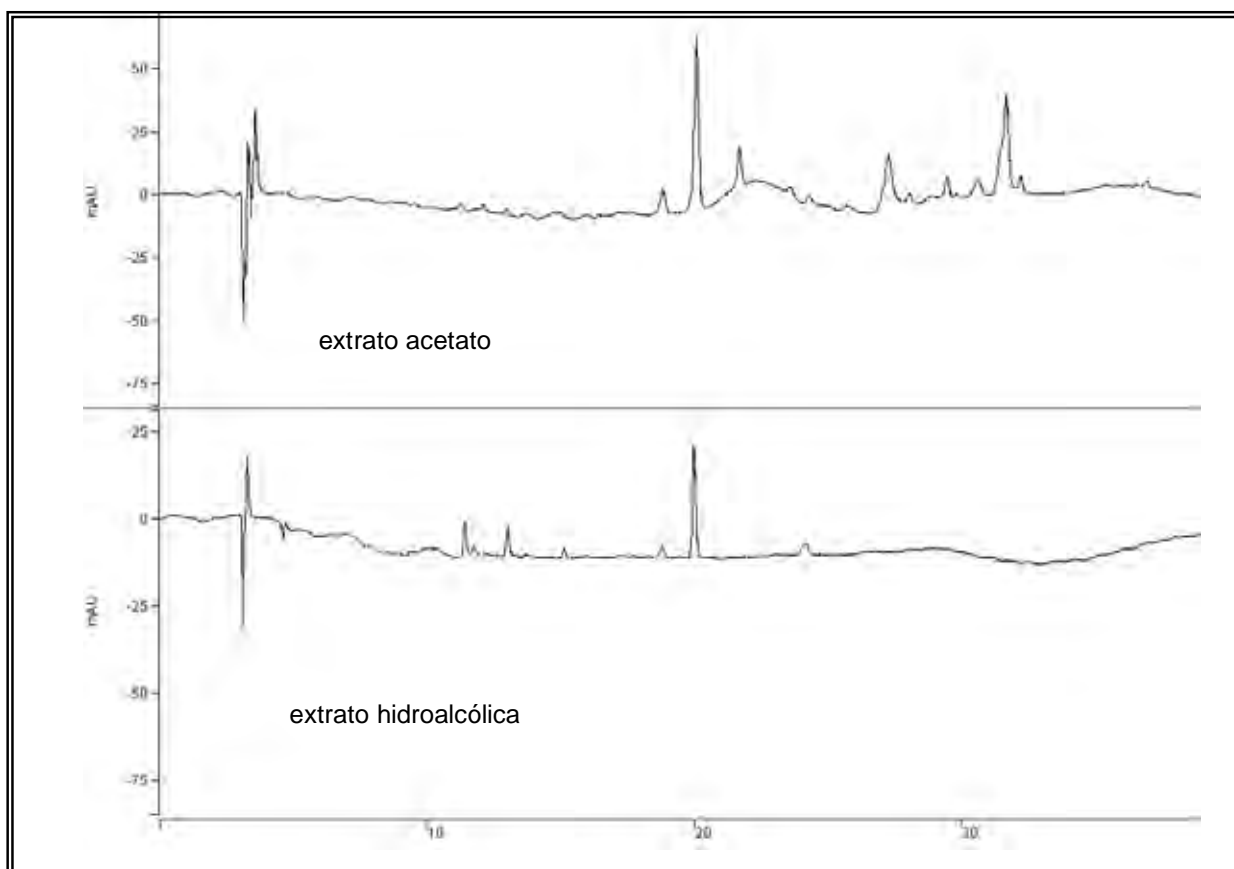


Figura 61 - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV das folhas de *A. macrophylla*, eluído com H₂O/MeOH (95:05→0:100 - 1,2mL/min) e detecção em $\lambda=254$.

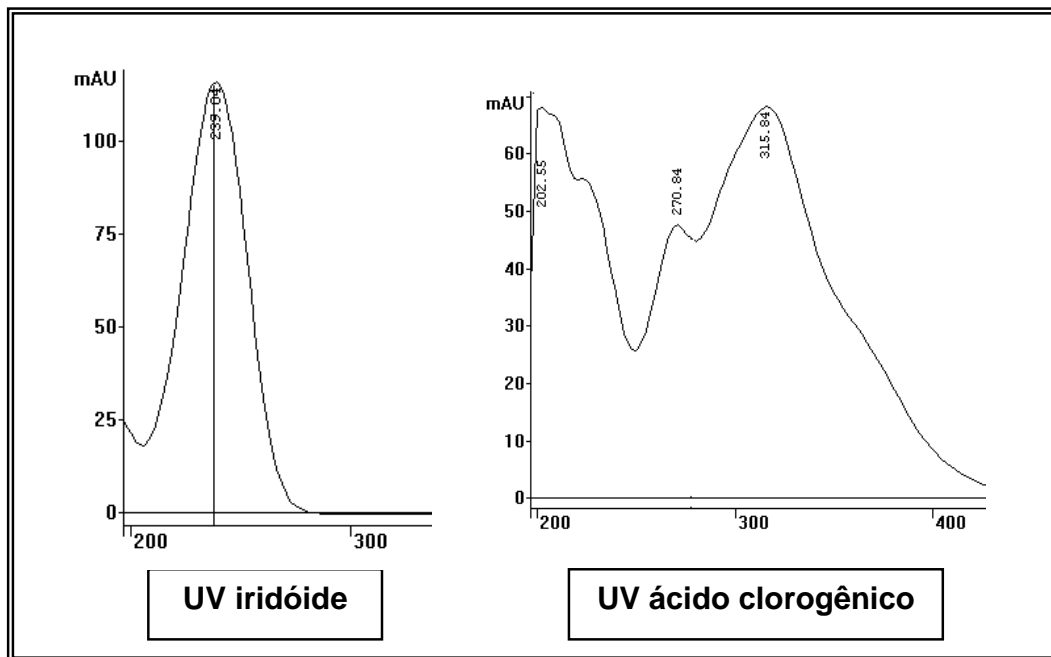


Figura 62 - Espectros de UV característico de iridóide e ácido clorogênico

5.2.16.2 Perfil químico dos fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04

Os fungos endofíticos isolados de *Alibertia macrophylla* mostraram-se bons produtores de biomassa tanto no cultivo em meio líquido (MBD) quanto sólido (milho). Esta boa produtividade permitiu o isolamento de isocumarinas, benzenóides, dicetopiperazinas, sesquiterpenos e substâncias furânicas.

Os perfis cromatográficos obtidos dos extratos em milho dos fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04 (Figura, 63, p. 135), diferem da fração hidroalcólica das folhas de *A. macrophylla* (Figura 61, p. 133) na região acima de 20 min, apresentando o cromatograma dos endófitos um maior número de substâncias. Já na região abaixo de 20 min, nota-se uma semelhança entre o cromatograma de AM-01 milho e os extratos acetato de etila e hidroalcólico das folhas da planta hospedeira.

Os três cromatogramas apresentam um pico com tempo de retenção em comum ($t_r = 19,58$ min, 238 nm, extratos acetato de etila e hidroalcólico das folhas) e ($t_r = 19,43$ min, 209, 244 e 313 nm de AM-01 milho), porém com espectros de UV bem distintos.

Enquanto os cromatogramas dos extratos hidroalcolico e acetato de etila das folhas da planta hospedeira, se caracterizam pela presença de iridóides ($t_r= 19,68$ min; 239 nm) (Figura 62, p. 134)⁹¹, no cromatograma de AM-01 milho é verificada a presença de compostos aromáticos ($t_r= 19,43$ min, 209, 244 e 313 nm) (Figura 64, p. 136). O cromatograma de AM-01 também evidencia a presença de compostos da classe das isocumarinas ($t_r= 23,93$ min, 201, 221 e 344 nm) (Figura 64, p. 136).

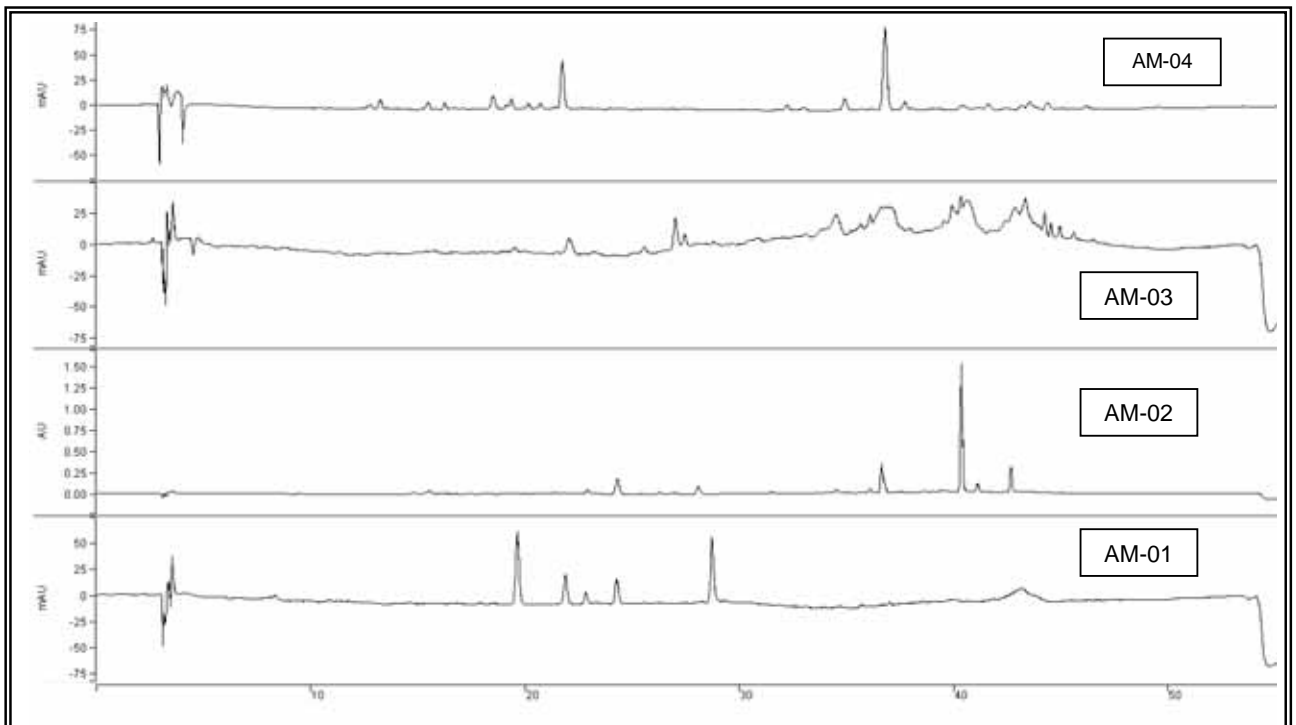


Figura 63 - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV dos extratos brutos em milho de AM-01, 02, 03 e 04, eluído com H₂O/MeOH (95:05→0:100 - 1,2mL/min) e detecção em $\lambda=254$.

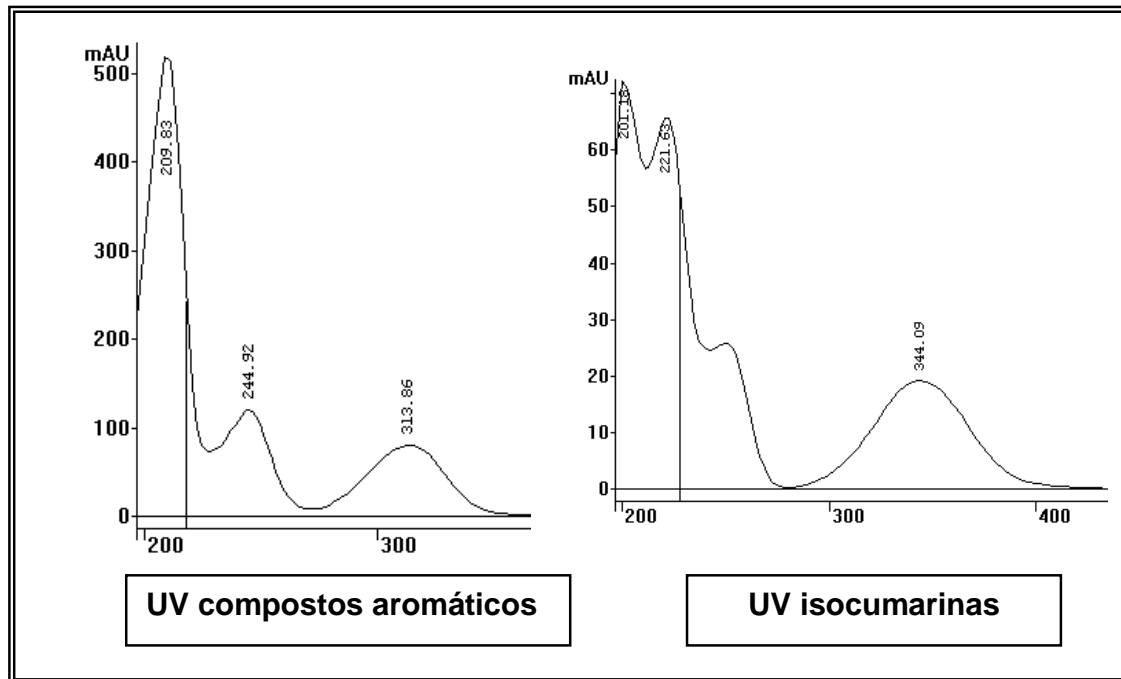


Figura 64 - Espectros de UV característicos de compostos aromáticos e isocumarinas

Finalmente, uma comparação entre os extratos em MBD do fungo endofítico AM-01 (Figura 65, p. 137), e dos dois extratos obtidos das folhas de *A. macrophylla* (Figura 61, p. 133), também mostrou semelhança nos perfis cromatográficos, na região entre 19 e 20 min; (t_r = 19,58 min, 238 nm, extratos acetato de etila e hidroalcolico das folhas, iridóides) (Figura 62, p. 134) e (t_r = 19,43 min, 217, 244 e 313 nm de AM-01 MBD; compostos aromáticos), porém o espectro de UV de AM-01 MBD também evidencia a presença de compostos da classe das isocumarinas (Figura 64, p. 136).

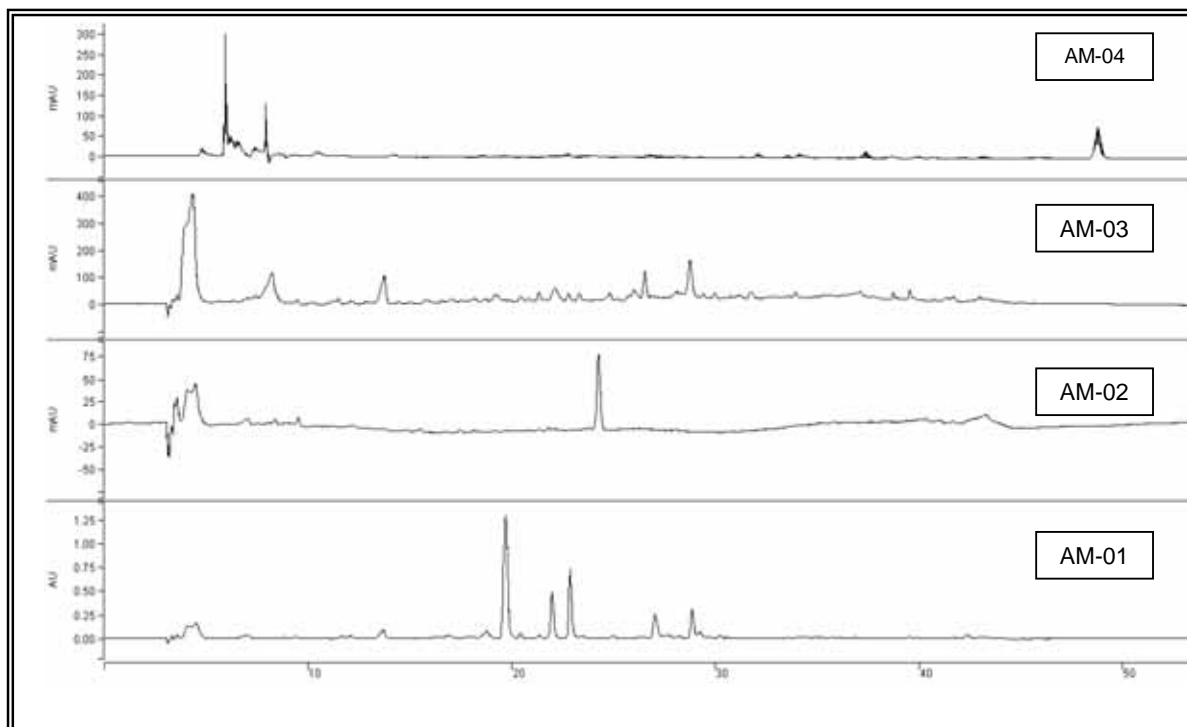


Figura 65 - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV dos extratos brutos em MBD de AM-01, 02, 03 e 04, eluído com H₂O/MeOH (95:05→0:100 - 1,2mL/min) e detecção em $\lambda=254$

Através da comparação entre os perfis cromatográficos, e das substâncias já isoladas dos fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04, e do vegetal hospedeiro *Alibertia macrophylla*, não foi verificado a co-produção de metabólitos secundários. No entanto, deve-se considerar, que não há segurança de que todos os fungos associados a esta espécie vegetal foram isolados, e de que os meios de cultivos utilizados foram os ideais.

Fundamentado nos estudos realizados, podemos concluir, que através do cultivo dos fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04 para avaliação do perfil químico, foi possível perceber a especificidade de cada fungo em produzir, e liberar seus metabólitos para o meio, pois houve considerável variação de um fungo para outro, dentro das mesmas condições de cultivo.

5.2.17 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os extratos brutos e as substâncias isoladas no presente trabalho tiveram seu potencial biológico avaliado por ensaios químicos (atividade antioxidante e potencial antimalárico), biológicos (atividade antifúngica) e bioquímicos (avaliação do potencial de inibição de proteases e determinação da atividade anticolinesterásica).

5.2.17.1 Ensaios realizados com os extratos brutos obtidos de AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e 04 (*Penicillium* sp2) cultivados em milho e MBD

5.2.17.1.1 Bioautografia com fungos do gênero *Cladosporium* – detecção de atividade antifúngica.

Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente. Tal fato tem incentivado pesquisas que busquem novas substâncias antifúngicas de origem natural.⁹² Considerando esta necessidade e a ecologia química relacionada com os fungos endofíticos que habitam ambientes hostis, 400µg dos extratos brutos dos endófitos AM-01 (*Penicillium* sp1), AM-02, AM-03 e AM-04 (*Penicillium* sp2) foram avaliados quanto ao seu potencial antifúngico.

A atividade antifúngica em potencial dos extratos brutos foi avaliada frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, utilizando o método da bioautografia. Após a revelação da cromatoplaca (contendo os extratos) com a solução fúngica, foi observada a inibição do crescimento do fungo em vários extratos, indicando a atividade antifúngica potencial. O padrão utilizado foi a nistatina (1µg).

Os resultados obtidos neste bioensaio estão apresentados na (Tabela 13, p. 139).

Tabela 13 - Extratos brutos analisados frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Extros brutos	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
	Rf	Potencial	Rf	Potencial
AM-02 milho	0,18	*	-	i
AM-02 MBD	0,32	***	0,55	*
AM-03 milho	-	i	-	i
AM-03 MBD	0,08	**	-	i
AM-01 MBD	0,77	***	0,70	***
AM-01 milho	0,76	***	0,50 a 0,70	***
AM-04 MBD	0,45	**	0,38	*
AM-04 milho	0,64	***	0,51	**

Atividade fraca * Atividade moderada** Atividade forte*** Inativo = i

Os resultados obtidos neste bioensaio evidenciam a maioria dos extratos brutos como potencialmente antifúngicos. Este dado pode estar diretamente relacionado à ecologia química onde estes microrganismos produzem substâncias bioativas para autodefesa contra outros microrganismos fitopatogênicos. Estes dados confirmam quão promissores são os fungos associados a espécies vegetais de Cerrado na busca por novos metabólitos secundários bioativos.

5.2.17.1.2 Avaliação da atividade antioxidante

Atualmente, a etiologia de diversas doenças ainda permanece desconhecida. Entretanto, várias evidências, indicam que a toxicidade dos radicais livres tem um papel importante em muitas patologias degenerativas como câncer e arteriosclerose, já que estes estão presentes nas células e tecidos, como resultantes de reações radiculares.⁹³ O consumo de frutas e vegetais auxilia na prevenção de processos degenerativos, diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares.⁹⁴

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisas com produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. Proporcionando a descoberta de novos fármacos, que possam agir sobre diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo.⁹⁷ Atualmente diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou

misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas.

Dentre estes métodos destacam-se o seqüestro de radicais livres com DPPH, que se baseia no descolorimento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta, que na presença de substâncias antioxidantes, faz com que o radical DPPH se estabilize, o que é indicado pela mudança de cor violeta para amarelo (Figura 66, p. 140).⁹⁵

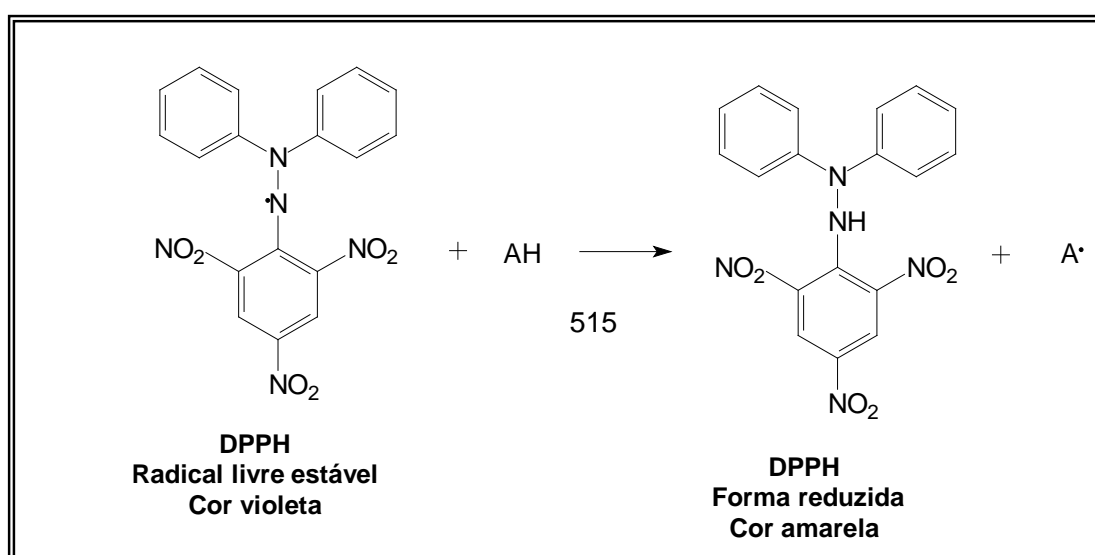


Figura 66 - Simplificação do mecanismo da reação envolvido no ensaio com DPPH.

A atividade antioxidante de compostos orgânicos depende de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros aromáticos são os principais alvos na procura por antioxidantes.⁹³

Neste contexto, os extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04, obtidos em milho e MBD foram testados com DPPH e os resultados demonstrados na tabela 14, p. 141. Os padrões utilizados foram quercetina, rutina e α -tocoferol nas concentrações: 33,3 μ M; 26,7 μ M; 20,0 μ M; 13,3 μ M; 6,7 μ M; 3,3 μ M; 1,7 μ M.

Tabela 14 - Atividade antioxidante dos extratos brutos dos endófitos isolados

DPPH		
Amostra	IC ₅₀ (mg/mL)*	Seqüestro (10ppm ^{**})
AM-01 Milho	> 0,0700	9,8%
AM-01 MBD	> 0,0700	4,5%
AM-02 Milho	> 0,0700	0,8%
AM-02 MBD	> 0,0700	2,3%
AM-03 Milho	> 0,0700	0,0%
AM-03 MBD	> 0,0700	0,0%
AM-04 Milho	> 0,0700	0,0%
AM-04 MBD	> 0,0700	0,0%

* Inativo: seqüestro menor que 50%

** Concentração dos extratos brutos

Através da análise deste ensaio qualitativo foi possível observar que todos os extratos brutos, obtidos de fungos endofíticos, foram inativos.

5.2.17.1.3 Atividade potencial antimalárica (*ensaio in vitro*)

A malária é considerada uma doença infecto-parasitária grave, transmitida por protozoários do gênero *Plasmodium* que aflige mais de 500 milhões de pessoas causando, pelo menos, 1 milhão de óbitos anuais, tendo como agravante a resistência do parasita à quimioterapia e a falta de uma vacina eficaz. A maioria dos casos de malária, estão localizados na África, seguido da Índia e do Brasil, estando presente também no sudoeste da Ásia, na América Central, América do Sul e na Oceania. No Brasil, a região amazônica concentra mais de 99% da transmissão da malária, representando um dos maiores problemas de saúde pública, vindo figurar entre as grandes endemias que assolam o país.⁹⁶⁻⁹⁸

Várias estratégias podem ser utilizadas na busca de novos agentes antimaláricos, entre elas os produtos naturais. Eles podem servir como protótipos para novos fármacos *in natura*, semi-sintéticos e/ou sintéticos. Uma prova da eficiência dessa estratégia é a quinina (I) e a artemisinina (II), sendo que o desenvolvimento desta culminou no artemeter (III) que possui melhores propriedades farmacocinéticas. A quinina inspirou o desenvolvimento dos fármacos 4-aminoquinolinos e 8-

aminoquinolinos, sendo a cloroquina (IV) e a primaquina (V) os principais representantes dessas classes de antimaláricos (Figura 67, p. 142).^{99,100}

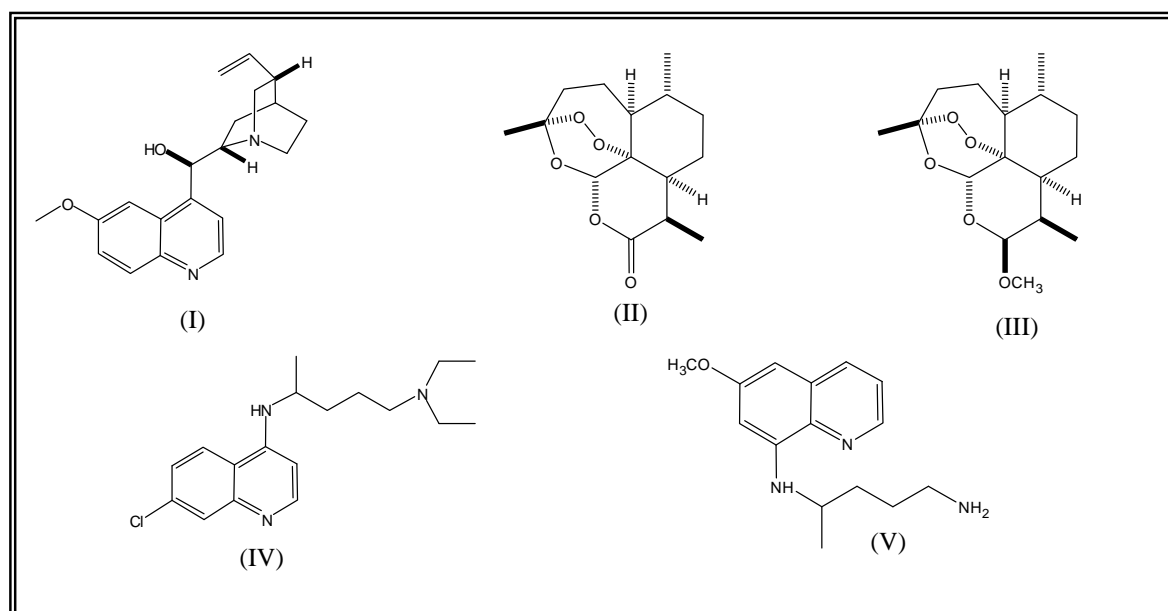


Figura 67 - Alguns fármacos antimaláricos.

Uma das mais importantes estratégias na busca de novos fármacos antimaláricos é a identificação de novos alvos e a subsequente descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nestes alvos. Um destes alvos é a polimerização de heme.⁹⁹ No vacúolo digestivo ácido, o *Plasmodium* degrada 75 % da hemoglobina do hospedeiro e utiliza os seus aminoácidos para a síntese de proteínas. Nesse processo, heme tóxica é liberada, armazenando-se na forma de um polímero inerte chamado hemozoína ou pigmento maçarico, onde o grupo propionato do heme liga-se ao Fe^{+2} do outro heme. Sendo assim, substâncias capazes de inibir a síntese de hemozoína podem servir de modelos na terapia da malária.^{101,102} Paralelamente ao seu efeito inibitório nas enzimas do parasita (proteases que degradam a hemoglobina) e de ruptura de membranas, o heme é tóxico às células por um mecanismo radicalar. Após a degradação da hemoglobina, o ferro do heme é oxidado a Fe^{+2} gerando espécies de oxigênio reativas. A atividade catalítica de heme converte estas espécies em água e oxigênio e a peroxidativa reduz H_2O_2 em presença de substratos orgânicos, como a glutatona (GSH), ou em sua ausência, lipídeos e proteínas. A formação de complexos

entre heme e derivados 4-aminoquinolínicos pode levar a um desequilíbrio e aumento na meia vida de H_2O_2 (Figura 68, p. 144).¹⁰³⁻¹⁰⁵

A hemozoína parece ser estruturalmente idêntica a β -hematina que pode formar-se espontaneamente em condições não fisiológicas sem a adição de nenhuma proteína. O conhecimento bioquímico deste processo experimental permitiu o desenvolvimento de um método rápido, barato e eficiente na busca de substâncias que inibam a polimerização do heme.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

A formação de β -hematina *in vitro* pode ser realizada através de vários procedimentos experimentais. Os protocolos descritos na literatura envolvem incubação a 37 °C (24 horas) ou 60 °C (1 hora) de hemina bovina (preparada em DMSO ou NaOH 0,1 M) num tampão apropriado (pH 3,0 – 5,5). A formação de β -hematina pode ocorrer espontaneamente ou pela adição de um catalisador.¹⁰⁹ A diferença na solubilidade do heme monomérico e/ou agregado em relação à β -hematina, em solventes orgânicos apróticos (DMSO) e soluções levemente alcalinas de bicarbonato, tem sido usada no isolamento de β -hematina, que é separada por centrifugação. Na quantificação podem ser empregados métodos tais como espectrofotometria, CLAE, IV, radioisótopos e espectrofluorímetros.¹⁰⁹

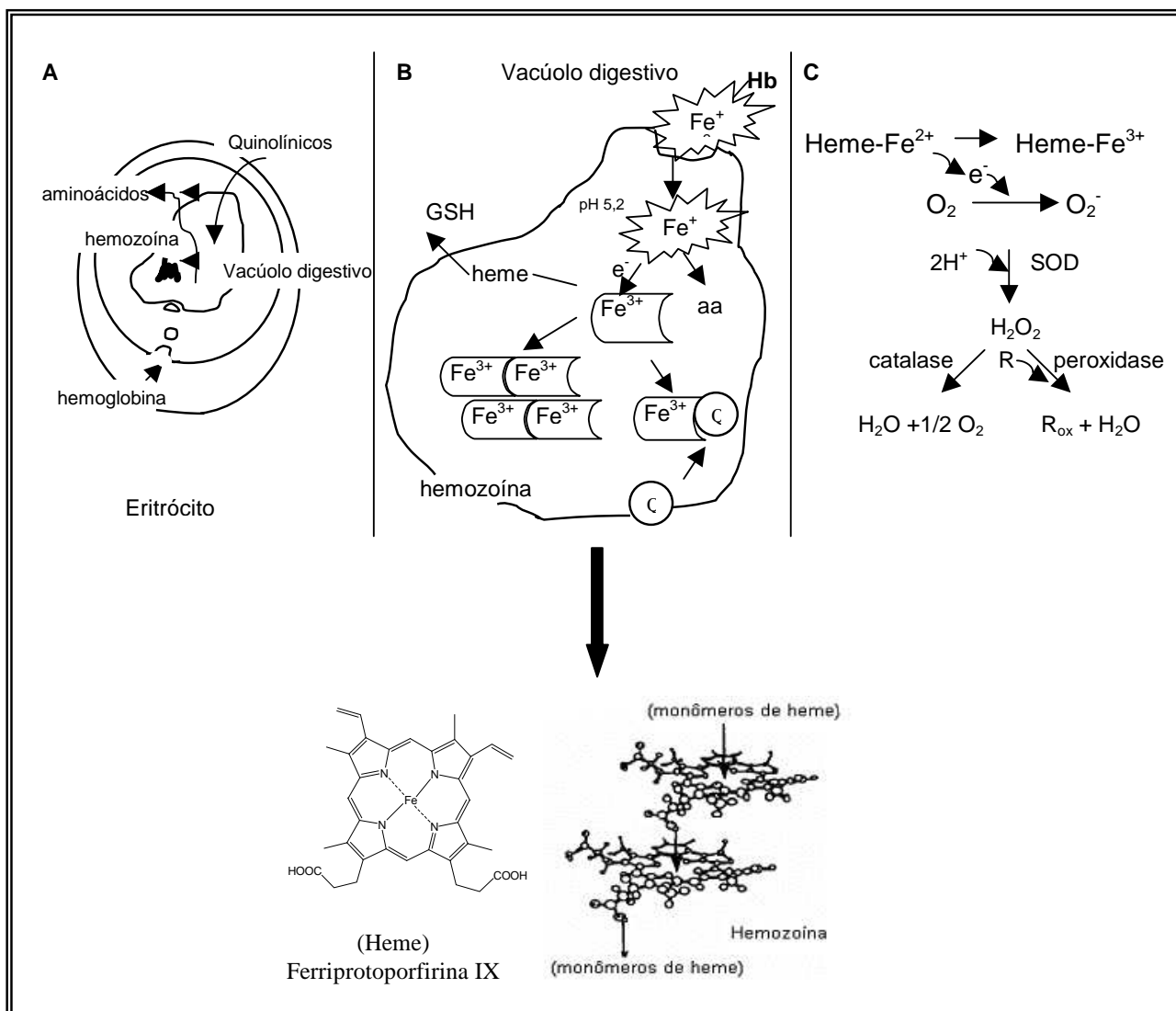


Figura 68 - Degradação da Hemoglobina e formação de hemozoína.

Com bases nestes dados estatísticos, culturas de microrganismos, especialmente de fungos de diversas famílias e gêneros, vêm sendo sistematicamente estudadas como importantes fontes na busca por fármacos úteis no tratamento de malária¹¹⁰. Sendo assim, os extratos brutos obtidos de AM-01, 02, 03 e 04, obtidos em milho e MBD foram testados.

Ensaio empregando os extratos brutos dos endófitos evidenciaram uma forte interação com o grupo heme, em valores de inibição de $70\% \pm 8$ a 2,5 mg/mL para o extrato de AM-02 milho e $69\% \pm 4$ a 2,5 mg/mL para o extrato em MBD de AM-01, sugerindo a presença de substâncias com potencial antimalárico nestes extratos

(Tabela 15, p. 145). Sendo considerado inativo apenas os extratos brutos de AM-04 cultivados em milho e MBD.

Tabela 15 - Atividade inibitória *in vitro* no ensaio de formação de β -hematina

Extratos	% de inibição
AM-01 Milho	54±5
AM-01 MBD	69± 4
AM-02 Milho	70 ± 8
AM-02 MBD	64 ± 3
AM-03 Milho	53 ± 6
AM-03 MBD	67 ± 3
AM-04 Milho	45 ± 6
AM-04 Milho	42 ± 7
Quinina	94 ± 3
Cloroquina	91 ± 1

* Inativo= inibição < 50%

5.2.17.1.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa, progressiva, que causa comprometimento da memória, dificuldade no raciocínio e alterações comportamentais. Estima-se que até 4 milhões de pessoas são afetadas nos EUA.⁶³ De todas as alternativas terapêuticas possíveis, as mais eficientes disponíveis no mercado funcionam corrigindo uma deficiência de acetilcolina no processo sináptico. Com o crescente impacto da doença de Alzheimer e os poucos agentes terapêuticos seguros, os extratos brutos obtidos em milho ou MBD de AM-01, 02, 03 e 04 foram testados a fim de avaliar a possível potencialidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.¹¹¹

A avaliação da atividade anticolinesterásica em potencial dos extratos brutos foi realizada seguindo-se a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002)⁶¹ para cromatografia em camada delgada fina. Após a eluição da cromatoplaça, a coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática) em alguns extratos, sobre um fundo de coloração roxa, indicou que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (Figura 69, p. 146).

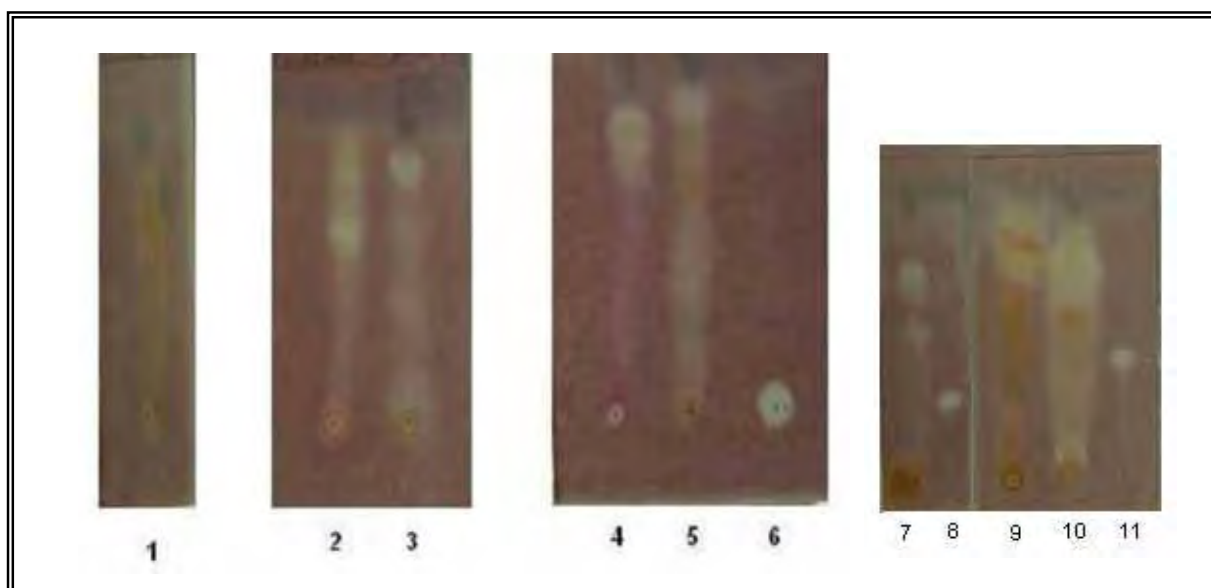


Figura 69 - Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica: 1- AM-02 MBD; 2- AM-02 milho; 3- AM-03 MBD; 4- AM-03 milho; 5- AM-01 MBD; 6- padrão galantamina; 7- AM-04 milho; 8- padrão galantamina; 9- AM-04 MBD; 10- AM-01 MBD e 11-padrão galantamina.

Este ensaio anticolinesterásico realizado CCDC é qualitativo e é definido através do halo branco em fundo roxo, para atividade inibitória positiva. De acordo com o observado na cromatoplate da figura 69 apenas os extratos AM-02 MBD e AM-04 MBD não apresentaram atividade positiva neste bioensaio. Este resultado evidencia a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade anticolinesterásica.

5.2.17.1.5 Atividade de inibição das proteases subtilisina e pepsina

Atualmente, a busca de novas substâncias com potencial terapêutico tem alcançado grandes avanços, tendo como foco os alvos moleculares que participam de processos básicos do funcionamento celular. Para isso os ensaios biológicos constituem um importante instrumento de “*screening*” farmacológico proporcionando o estudo de novas substâncias em larga escala.

As proteases são alvos enzimáticos muito estudados, principalmente em pesquisas relacionadas à descoberta e desenvolvimento de novas substâncias com

potencial terapêutico. Alguns tipos de proteases estão despertando grande atenção da comunidade científica e médica, pois são responsáveis pela formação de proteínas funcionais que participam do controle fisiológico do organismo humano ou de proteínas virais responsáveis por processos infecciosos. Como exemplo, de algumas proteases de interesse médico-científico temos a metaloproteinase (apoptose), a cathepsina D (câncer de mama e endometrial), a renina (hipertensão) e as proteases dos vírus do herpes, da hepatite C e do HIV.¹¹²

Para o estudo de inibição tempo-dependente, a protease subtilisina foi empregada como ferramenta para o *screening* dos extratos brutos (Tabela 16, p. 147). A aprotinina foi utilizada como padrão positivo na concentração de 50µM.

Tabela 16 - Resultado da atividade de inibição de protease realizada com os extratos brutos.

Extratos	0,1 µg/mL
AM-01 Milho	42,11*
AM-01 MBD	41,53
AM-02 Milho	67,02
AM-02 MBD	39,91
AM-03 Milho	24,15
AM-03 MBD	23,15
AM-04 Milho	30,12
AM-04 MBD	32,53
aprotinina	24,15

* resultados expressos em porcentagem

Neste ensaio foram considerados ativos, todos os extratos brutos que apresentaram porcentagem de inibição superior a 30%. Como se pode observar, o extrato bruto do endófito AM-02 cultivado em milho, apresentou maior atividade de inibição.

5.2.17.2 Ensaio realizados com as substâncias puras isoladas de AM-01 (*Penicillium* sp1), 02, 03 e 04 (*Penicillium* sp2) cultivados em milho e MBD

Convém lembrar, que algumas substâncias puras, não foram testadas em determinados ensaios biológicos, bioquímicos e/ou químicos. Isto se deve, ao fato da necessidade de maior quantidade de massa exigida em certos ensaios. Na figura 70, p. 148, estão às substâncias que foram testadas nos ensaios antifúngicos, antioxidante e anticolinesterásico.

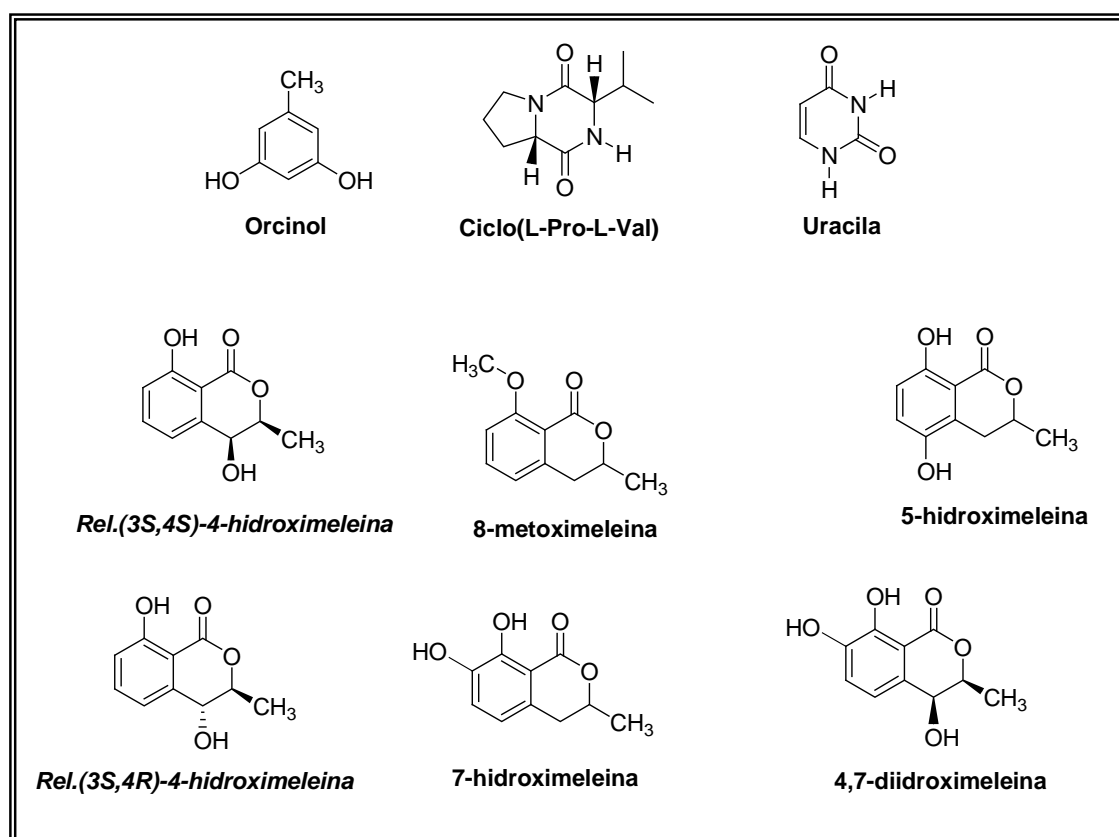


Figura 70 - Substâncias submetidas à avaliação do potencial biológico

5.2.17.2.1 Bioautografia com fungos do gênero *Cladosporium* – detecção de atividade antifúngica.

As substâncias que apresentaram massa suficiente, foram enviadas para o bioensaio por bioautografia frente os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Na tabela 17, p. 149 estão os resultados dos ensaios realizados com as substâncias e os dois fungos fitopatógenos. O padrão utilizado foi a nistatina que apresenta atividade forte em 1µg.

Tabela 17 - Substâncias puras analisadas frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>						
Substâncias	100µg	50µg	25µg	10µg	5µg	1µg
<i>Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina</i>	***	***	**	*	*	¡
<i>Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina</i>	***	***	***	**	*	¡
7-hidroximeleina	**	**	*	¡	¡	¡
<i>Rel.(3S,4R)-4-hidroximeleina</i>	**	**	**	**	*	
8-metoximeleina	**	*	*	*	¡	¡
5-hidroximeleina	*	¡	¡	¡	¡	¡
uracila	**	*	*	¡	¡	¡
ciclo (L-Pro-L-Val)	**	*	¡	¡	¡	¡
orcinol	***	***	**	*	*	¡
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>						
Substâncias	100µg	50µg	25µg	10µg	5µg	1µg
<i>Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina</i>	***	**	*	¡	¡	¡
<i>Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina</i>	***	***	**	*	¡	¡
7-hidroximeleina	**	**	*	*	¡	¡
<i>Rel.(3S,4R)-4-hidroximeleina</i>	***	**	*	¡	¡	¡
8-metoximeleina	***	**	*	¡	¡	¡
5-hidroximeleina	*	*	¡	¡	¡	¡
uracila	*	*	*	¡	¡	¡
ciclo (L-Pro-L-Val)	**	*	¡	¡	¡	¡
orcinol	***	**	*	*	¡	¡

*nistatina ativa em 1µg

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir, que todas as substâncias testadas foram ativas neste ensaio, alterando apenas o limite de detecção. As substâncias orcinol, *Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina* e *Rel.(3S,4R)-4-hidroximeleina* mostraram potente atividade inibitória frente ao fungo fitopatogênico *C.*

cladosporioides. A 5-hidroximeleina e 8-metoximeleina, apresentaram fraca atividade inibitória frente às duas linhagens testadas, quando comparadas com as demais isocumarinas, o que ressalta a importância dos grupos hidroxila em C-4 e C-8.

5.2.17.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

Neste ensaio apenas as substâncias da classe das isocumarinas (Figura 70, p. 148) foram avaliadas, as demais substâncias não apresentaram massa suficiente para realizar os ensaios. Os resultados obtidos são demonstrados na tabela 18, p. 150.

Tabela 18 - Atividade antioxidante das isocumarinas isoladas de AM-01 cultivado em milho.

ISOCUMARINAS	DPPH IC ₅₀ (µM)
<i>Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina</i>	i
<i>Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina</i>	24,1
7-hidroximeleina	24,1
<i>Rel.(3S,4R)-4-hidroximeleina</i>	i
8-metoximeleina	i
5-hidroximeleina	24,1
Rutina	9,0

* i= inativo=IC₅₀ > 33,3µM

As isocumarinas *Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina*, 7-hidroximeleina e 5-hidroximeleina consideradas neste ensaio como antioxidantes potenciais, têm essa propriedade devido à presença de núcleos fenólicos e catecóis que são fundamentais para a atividade seqüestradora de radicais livres. A relação estrutura-atividade desse núcleo relaciona-se com a capacidade de estabilizar os radicais livres formados após a doação de hidrogênios pelas substâncias antioxidantes em potencial. A maior estabilidade relaciona-se com o maior número de estruturas mesoméricas formadas nesses radicais¹¹³, causando uma melhora na atividade quando comparado com os outros derivados.

Apesar da inatividade dos extratos, as isocumarinas isoladas de AM-01 milho, apresentaram atividade significativa quando comparadas ao padrão utilizado rutina. O que pode ser explicado pela baixa concentração destas substâncias no extrato.

5.2.17.2.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Tendo em vista os resultados obtidos com os extratos brutos, todas as substâncias isoladas que apresentaram massa suficiente (Figura 70, p. 148) foram submetidas a este ensaio com o objetivo de se verificar quais são responsáveis pela atividade inicialmente observada no extrato bruto. Para isto foram realizadas análises quantitativas usando 60 µg, 30 µg, 10 µg, 3 µg e 1 µg (Tabela 19, p. 151).

Tabela 19 - Atividade anticolinesterásica das substâncias puras

Substâncias puras	60 µg	30 µg	10 µg	3 µg	1 µg	I **
<i>Rel.(3S,4S)-4-hidroximeleina</i>	x	X				
ciclo (L-Pro-L-Val)	X	x	X			
<i>Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina</i>	X	x	X			
uracila	X					
<i>Rel.(3S,4R)-4-hidroximeleina</i>	X	X				
orcinol	X					
8-metoximeleina						X
5-hidroximeleina						X
7-hidroximeleina	X	X				

* A galantamina ativa em 1µg

** inativo

As substâncias ciclo (L-Pro-L-Val) e *Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina* apresentaram atividade com limite de 10 µg resultados promissores quando comparados com o padrão galantamina. Apesar da substância ciclo (L-Pro-L-Val) ser descrita por apresentarem atividade antioxidante¹¹⁴, este é o primeiro relato de atividade anticolinesterásica.

5.2.17.2.4 Atividade de inibição das proteases subtilisina e pepsina

Os ensaios foram realizados por meio de espectrometria de fluorescência, utilizando-se como modelos moleculares à protease aspártica (PA) pepsina, da mesma família da protease HIV, e a protease serínica (PS) subtilisina, da família da protease elastase. O substrato fluorescente HIV-1 utilizado, possui um sítio específico de clivagem na ligação peptídica entre os resíduos de triptofano e prolina, os quais estão inseridos em uma porção peptídica que separa um cromóforo doador (EDANS) de um receptor (DABCYL). A atividade biológica pode ser observada pelo decréscimo nas medidas de fluorescência, resultante da diminuição da atividade enzimática pelas substâncias testes, uma vez que o substrato intacto não emite fluorescência. Esta metodologia tem sido utilizada na busca de substâncias capazes de inibir a enzima HIV protease, importante alvo na terapia contra a AIDS.⁶⁵

A IC_{50} é calculada para as substâncias puras que apresentam % de inibição maior que 30%. Quando o coeficiente de determinação (R^2), que revela se os dados estimados estão próximos aos dados reais apresentados, é menor que 0,6 o ensaio com a respectiva substância é repetido.

Na tabela 20, p. 152, estão apresentados os valores de IC_{50} obtidos para as substâncias isoladas do extrato ativo de AM-02, cultivado em milho (Figura 71, p. 153).

Tabela 20 - Resultados obtidos utilizando as enzimas subtilisina e pepsina

Substância	Subtilisina	Pepsina
	$IC_{50} \mu M (R^2)$	
VIII	0,462 (0,92)	0,288 (0,82)
IX	nd	2,43 (0,82)
VII	nd	115 (0,89)
VI	nd	127,2 (0,99)
Varfarina	24,59 (0,79)	0,00832 (1,00)
Dicumarol	1,30 (0,81)	4,57 (0,95)

nd – não determinado

Os sesquiterpenos **VIII** e **IX** apresentaram potente atividade inibitória da enzima pepsina com ($IC_{50}=0,288\mu M$) e ($IC_{50}=2,43\mu M$), respectivamente, quando comparados com o padrão Dicumarol ($IC_{50}=4,57\mu M$).

Devido aos baixos valores de % de inibição encontrados (< que 10%) para as outras substâncias no ensaio com a subtilisina nas quatro concentrações testadas (1,00; 0,1; 0,01 e 0,001 $\mu g/mL$) não foi possível o cálculo de IC_{50} .

Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que os fungos endofíticos são uma fonte promissora de produtos naturais bioativos e poderia ser uma fonte importante para o desenvolvimento de potenciais fármacos inibidores da protease.

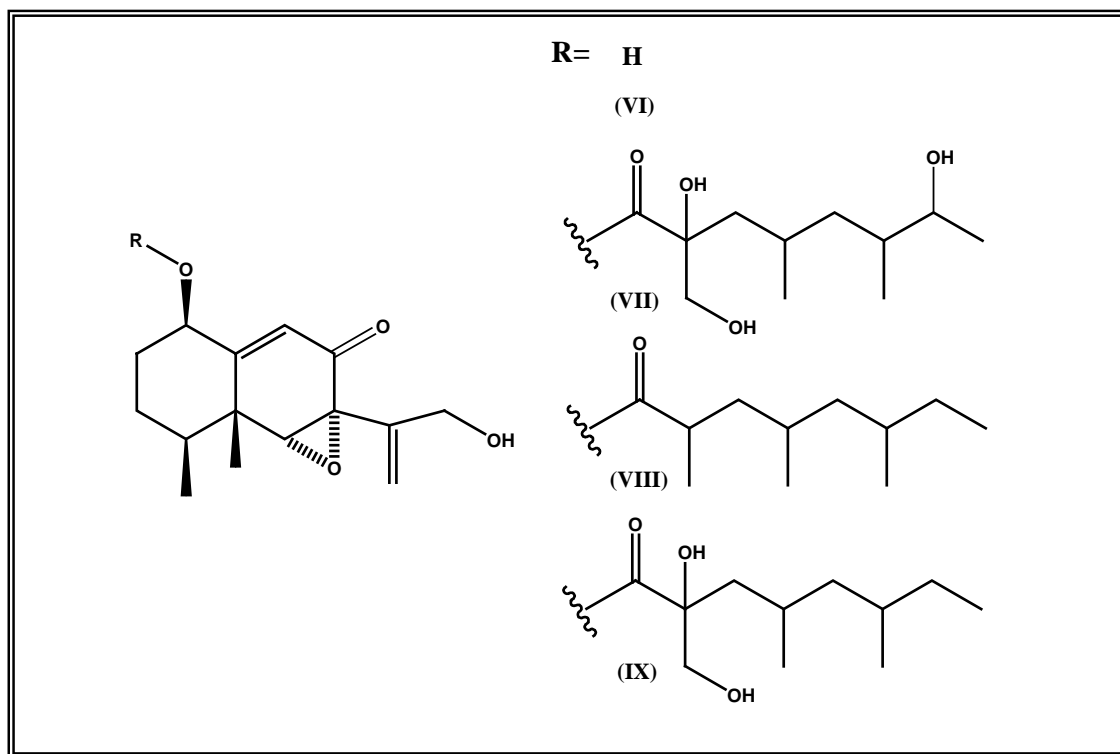


Figura 71 - Sesquiterpenos submetidos à avaliação do potencial de inibição de protease

6. PROPOSTA BIOSSINTÉTICA

6.1 Isocumarinas derivadas de poliacetatos

O mecanismo que leva a formação de poliacetatos aromáticos dá origem quase exclusivamente a metabólitos secundários, e encontra-se especialmente em fungos e em menor escala, em bactérias e plantas superiores.

Mesmo em fungos, a possibilidade de formação de poliacetatos não se encontra uniformemente distribuída, sendo características principalmente de fungos imperfeitos e Ascomicetos.¹¹⁶

Os poliacetatos aromáticos são metabólitos de fungos amplamente conhecidos e seu processo de síntese é análogo ao dos ácidos graxos.

6.1.1 Proposta biossintética para a formação das isocumarinas (1) e (2)

A proposta biossintética para a formação das isocumarinas 7-hidroximeleina (1) e 4,7-diidroxi-meleina 2 se baseia na condensação de uma molécula de acetil-ScoA com duas de malonil-ScoA, seguida de descarboxilação.¹¹⁶ Na figura 72, p. 156, encontra-se uma possível rota biossintética para estes dois compostos.

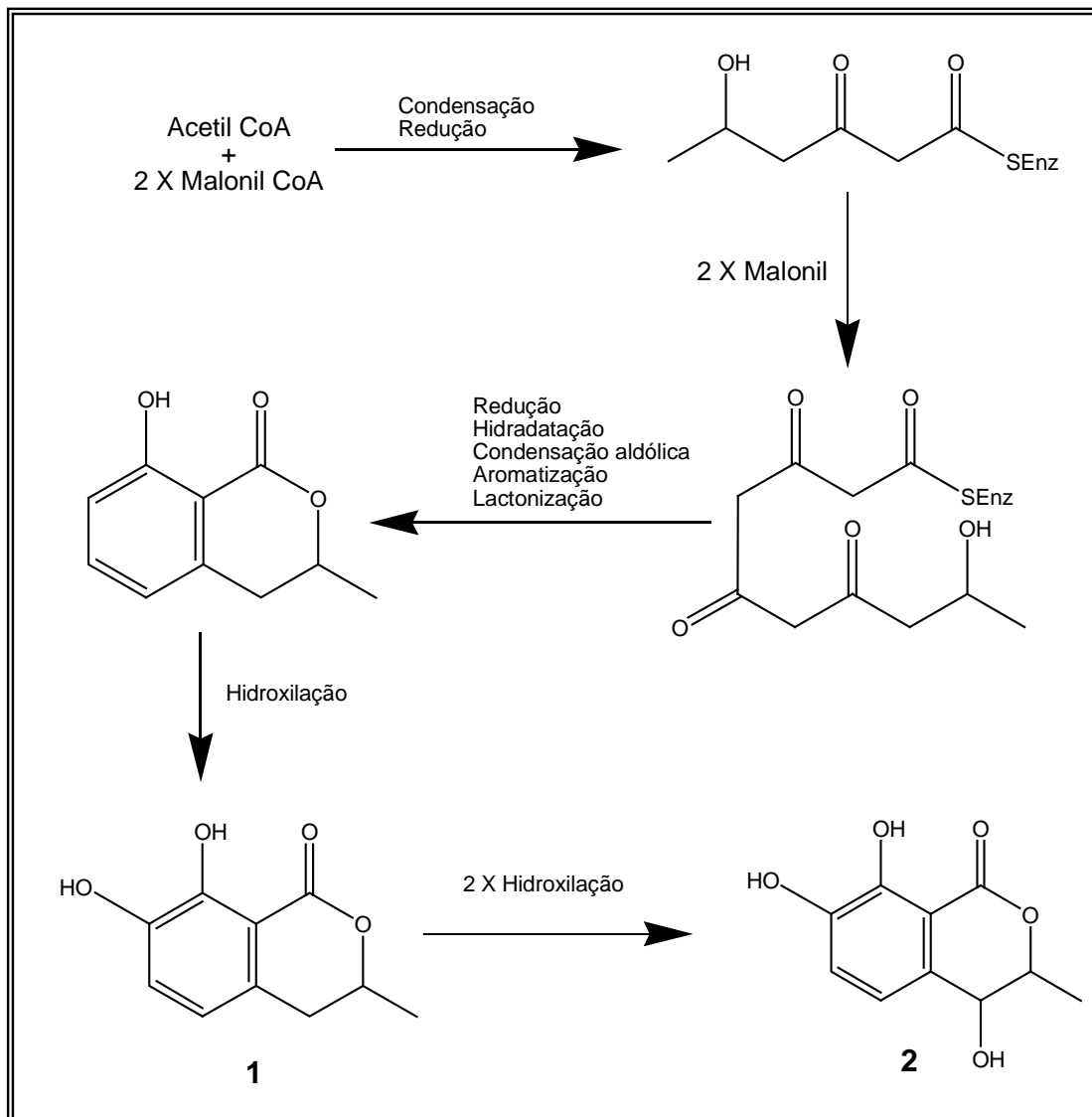


Figura 72 - Proposta biossintética para os compostos 1 e 2.

6.2 Compostos furânicos derivados de poliacetatos

Uma cadeia resultante da união de quatro unidades C₂, pode ciclizar de vários modos, dando origem a anéis de diferentes esqueletos.

6.2.1 Proposta biossintética para a formação do derivado furânico *

A proposta biossintética para a formação do derivado furânico (**3**), se baseia na condensação de dois blocos derivados do acetato (**A** e **B**).

A opção **1** (Figura 73, p. 1587), ocorreria pela condensação de uma molécula de acetil-SCoA com três moléculas de malonil-ScoA, seguido por uma C-alquilação com SAM em C-2.

Na opção **2** (Figura 73, p. 158), seria a condensação de uma molécula de acetil-SCoA, duas de malonil-SCoA e uma de metilmalonil-SCoA como grupo extensor. A opção **2** é a mais comum em fungos que tendem a empregar propionato (como metilmalonil) como unidade extensora¹¹⁷.

* Proposta sugerida pela Dra. Sílvia Noeli López – Instituto de Química-UNESP

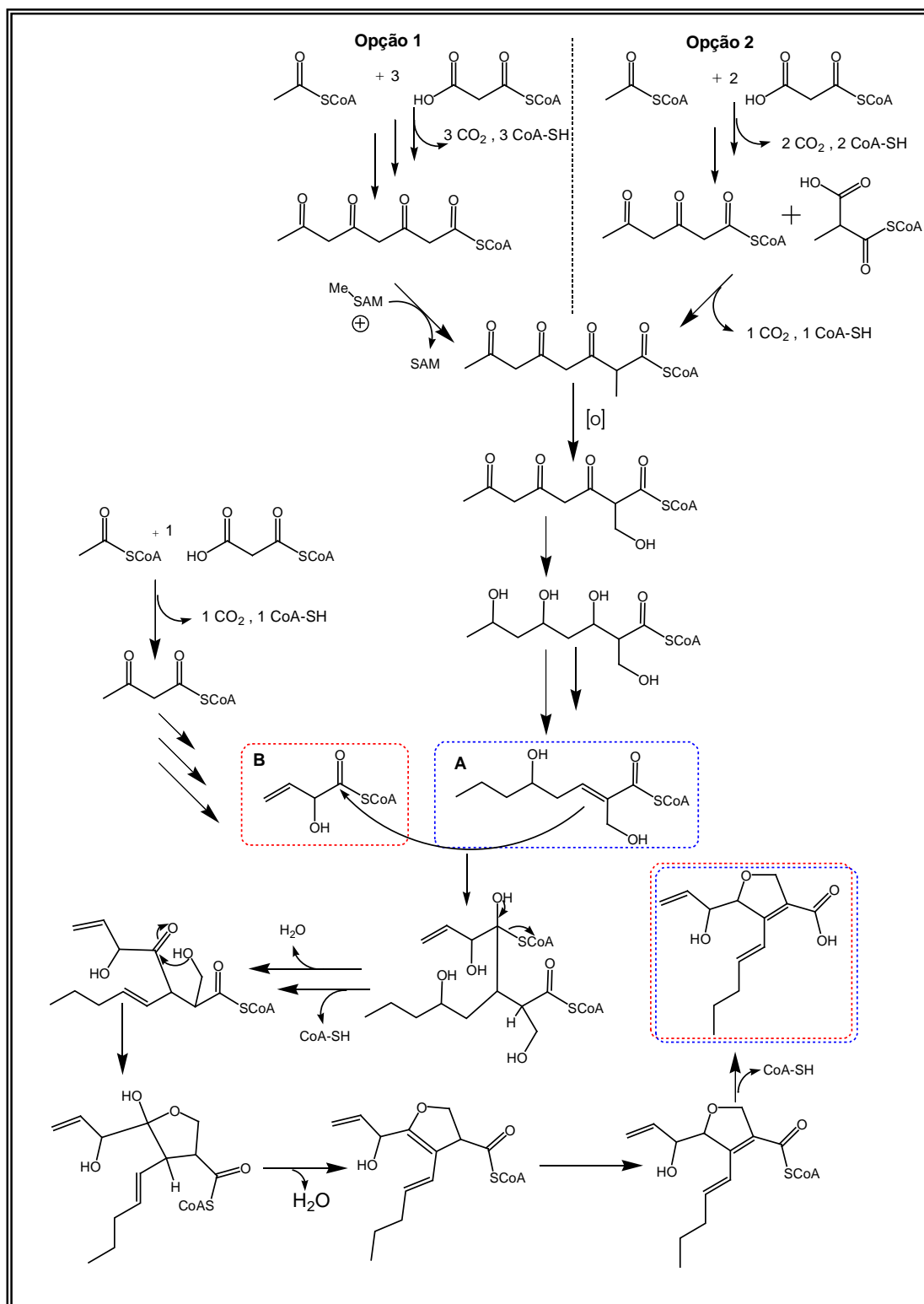


Figura 73 - Proposta biossintética para o composto 3.

6.3 Sesquiterpenos derivados do (FPP)

A cadeia farnesil pirofosfato (FPP) pode dar origem a estruturas de diferentes configurações, dos quais resultam em diversos esqueletos que constituem as estruturas dos sesquiterpenos. Assim, conforme a cadeia de FPP seja *trans-trans*, *cis-cis* ou *cis-trans*, os compostos que se obtêm são significativamente diferentes¹¹⁶.

6.3.1 Proposta biossintética para a formação da Xylarenona C (4)

A proposta sugerida para a formação parcial do composto **4** foi baseada na biossíntese do Capsidiol, um sesquiterpeno do tipo eremofilano que ocorre em muitas espécies de solanáceas.¹¹⁸

Nesta proposta, a enzima aristolocheno sintase catalisa a ciclização do FPP via germacreno A produzindo o aristolocheno (um intermediário biossintético) que por sua vez sofre extensão de cadeia através da condensação de acetil-ScoA e metilmalonil-ScoA (Figura 74, p. 160).¹¹⁷

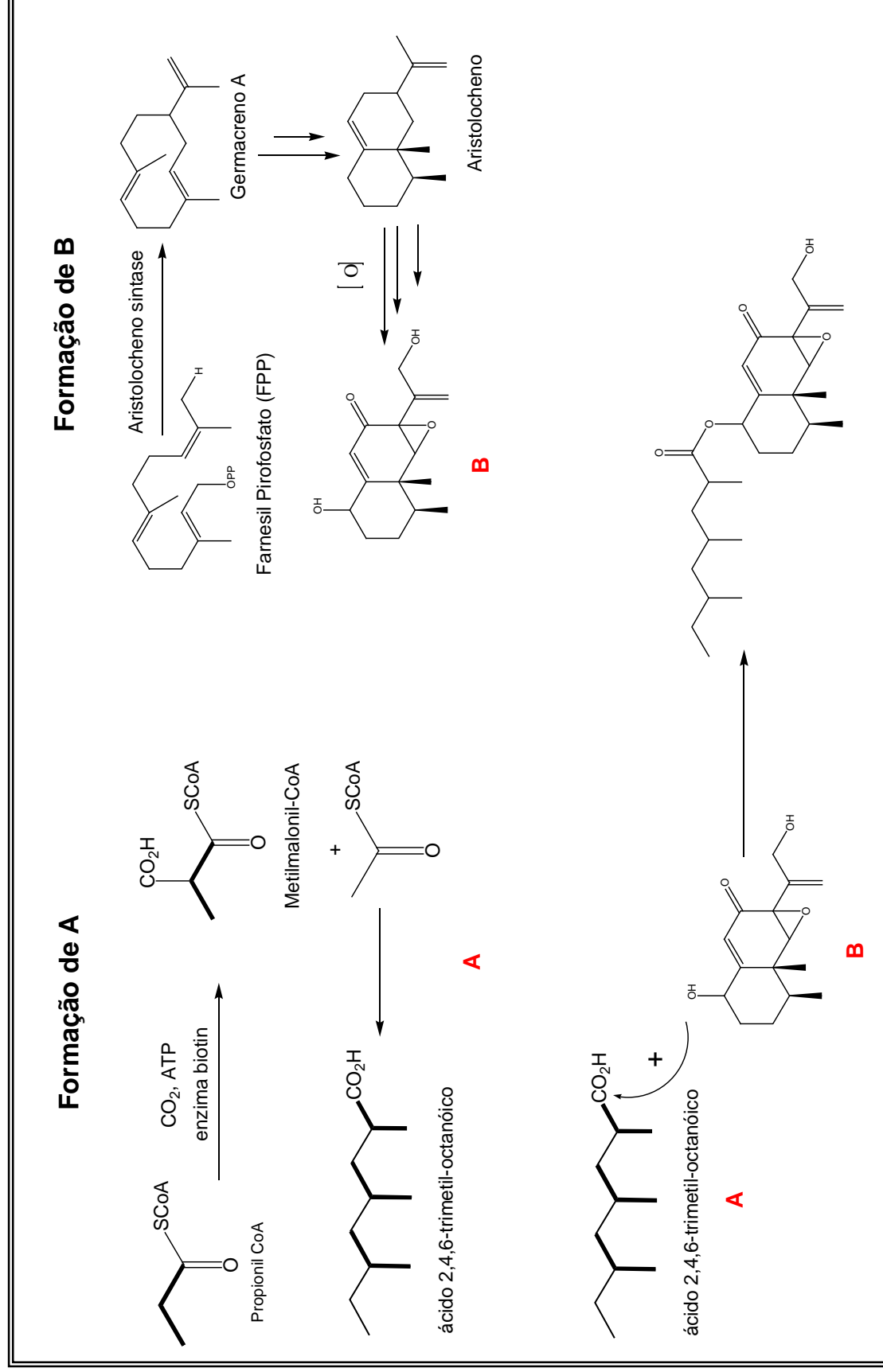


Figura 74 - Proposta biossintética para o composto 4

7. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu o isolamento e a identificação e/ou determinação estrutural de 15 metabólitos, sendo seis inéditos na literatura: as isocumarinas *Rel.(3S,4S)-4,7-diidroximeleina* e 7-hidroximeleina, os sesquiterpenos do tipo eremofilano Xylarenona C, D e E e um composto furânico, que apresentou esqueleto carbônico inédito para substâncias de origem natural, o que evidencia a diversidade de metabólitos produzidos por estes microrganismos.

Todos os endofíticos estudados neste trabalho merecem destaque ao serem os primeiros relatados pertencente ao gênero *Alibertia*. Nesse contexto, destaca-se o isolamento do fungo endofítico codificado como AM-02, pertencente à classe dos Dothideomicetes e possivelmente uma nova espécie fúngica. A identificação de duas espécies de *Penicillium* que apresentaram distinta produção metabólica, sendo o endofítico *Penicillium* sp1 um grande produtor de isocumarinas quando cultivado em milho. O mesmo não ocorreu quando este endófito foi cultivado em MBD, o que comprova a influência do meio de cultivo sobre a produção de substâncias.

Nos estudos realizados para averiguar a existência de co-produção metabólica entre os fungos endofíticos AM-01, 02, 03 e 04 e do vegetal hospedeiro *Alibertia macrophylla* através da comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos brutos e das substâncias já isoladas, pode-se verificar que não houve a co-produção de metabólitos secundários. No entanto devemos considerar que não temos a segurança de que todos os fungos associados a esta espécie vegetal foram isolados e de que os meios de cultivos utilizados foram os ideais.

Também foi possível observar que dentre as substâncias isoladas neste trabalho, uma grande parte enquadram-se nas vias biossintéticas dos derivados de aminoácidos e policetideos.

Para determinar a atividade biológica dos extratos brutos e das substâncias isoladas, estes foram enviados para colaboradores inseridos no projeto de bioprospecção BIOprospecTA, financiado pelo programa BIOTA-FAPESP, em desenvolvimento pelo NuBBE, obtendo-se dados valiosos de atividade biológica.

Dentre esses resultados destacou-se:

- Os extratos brutos em milho e em MBD de AM-02 que foram considerados ativos nos ensaios antimaláricos e de inibição de protease;
- As atividades inibitórias de proteases do sesquiterpeno do tipo eremofilano Xylarenona C, contra as enzimas subtilisina e pepsina o qual apresentou valores de CI_{50} de 0,462 e 0,288 μ M, sendo mais potente que o padrão utilizado;
- A atividade antifúngica dos derivados isocumarínicos contra aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e a atividade anticolinesterásica da dicetopiperazina ciclo (L-Pro-L-Val).

Levando-se em consideração que os fungos estudados foram isolados de folhas de um espécime saudável de *A. macrophylla*, 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. Os dados de potencial biológicos obtidos são preliminares, porém mostram a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos bioativos.

As informações contidas nesse trabalho demonstraram a importância do estudo com microrganismos endofíticos, pois conduziram a significativos resultados, proporcionando o conhecimento da composição química dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Alibertia macrophylla*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n.12, p. 2141-2153, 2004.
- 2 VIEGAS C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- 3 GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 9, p. 767-776, 2007.
- 4 ZHANG, W.; TANG, Y. Combinatorial biosynthesis of natural products. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 2629-2633, 2008.
- 5 NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- 6 BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 25, p. 475-516, 2008.
- 7 HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Disc. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.
- 8 LEFEVRE, F.; ROBE, P.; JARRIN, C.; GINOLHAC, A.; ZAGO, C.; AURIOL, D.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P.; NALIN, R. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. **Res. Microbiol.**, v. 159, p. 153-161, 2008.
- 9 SOUZA, A. D. L.; RODRIGUES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O.; CALGAROTTO, A. K.; MASO, V.; MARANGONI, S.; SILVA, S. L. Koninginins, phospholipase A2 inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma koningii*. **Toxicon**, v. 51, p. 240-250, 2008.
- 10 KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, p. 446-458, 2003.

11 PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 1-68, 1997.

12 ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fung. Biol. Rev.**, v. 21, p. 51-66, 2007.

13 AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Rev. Brasil Bot.**, v. 22, n. 2, p.225-229, 1999.

14 GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Appl. Bioch. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

15 GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Curr. Org. Chem.**, v. 11, p. 707-720, 2007.

16 LUCERO, M. E.; BARROW, J.; OSUNA, P.; REYES, I. Plant–fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: large-scale impacts from microscale processes. **J. Arid Environ.**, v. 65, p. 276–284, 2006.

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

18 SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Resear.**, v.109, n. 6, p. 661-686, 2005.

19 ZOBBERI, M. H. **Tropical microfungi**. London: MacMillan Press, 1972. p. 1.

20 RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **J. Exp. Bot.**, v. 59, n. 5, p. 1109-1114, 2008.

- 21 SMITH, S. A.; STROBEL, G. A.; DONOGHUE, M. J.; STROBEL, S. A. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3052, 2008.
- 22 STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Curr. Opinion Microbiol.**, v. 9, p. 240-244, 2006.
- 23 STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microb. Infect.**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- 24 XU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, J.; LI, L.; LI, X.; WANG, J. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, p. 68-72, 2007.
- 25 MAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotech. Adv.**, v. 18, p. 499-514, 2000.
- 26 ASUREKAR, P. S. Therapeutic metabolites. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 241-301.
- 27 LARRAN, S.; PERELLO, A.; SIMON, M. R.; MORENO, V. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 565-572, 2007.
- 28 SHAO-HUA, W.; YOU-WEI, C.; SHI-CHENG, S.; LI-DONG, W.; ZHI-YING, LI.; LI-YUAN, Y.; SHAO-LAN, L.; HUANG, R. Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 4, p. 731-734, 2008.
- 29 GUSMAN, J.; VANHAELEN, M. Recent research developments. **Phytochemistry**, v. 4, p. 187-206, 2000.
- 30 TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, v.18, n. 4, p. 448-459, 2001.

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

32 STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

33 STROBEL, G. A. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Microbiology**, v. 145, p. 1919-1926, 1999.

34 GUO, B. Cytonic acids A e B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora species*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 602-604, 2000.

35 HUANG, W. Y. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Econ. Bot.**, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2007.

36 STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopoestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p. 179-183, 2002.

37 ZHANG, H. Z.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 753-771, 2006.

38 PHONGPAICHIT, S. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 517-525, 2007.

39 ISAKA, M.; PITCHAPA, B.; KAMOLPHAN, I.; SOMJIT, K.; THIPTIWA, S. Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. BCC 8613. **Tetrahedron**, v. 63, n. 29, p. 6855-6860, 2007.

40 STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B. Bioactive compounds from four endophytic *Penicillium* sp. of a northwest pacific yew tree. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 24, Part E, p. 933-977, 2000.

- 41 UCHIDA, R.; RIE, I.; YUICHI, Y.; ROKURO, M.; KAZURO, S.; HIROSHI, T.; SATOSHI, O. Yaequinolones, new insecticidal antibiotics produced by *Penicillium* sp. FKI-2140. **J. Ant.**, v. 59, n. 10, p. 646-651, 2006.
- 42 HU, M. Y.; ZHONG, G. H.; SUN, Z. T.; LUO, J. J.; GAO, Y. Insecticidal activities of secondary metabolites of endophytic *Penicillium* sp. in *Deris elliptica Benth.* **J. Apl. Ent.**, v. 129, n. 8, p. 413-417, 2005.
- 43 SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; SPARTACO, A. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- 44 SINGH, I.; BHARATE, S. B.; BHUTANI, K. K. Anti-HIV natural products. **Curr. Science**, v. 89, n. 2, p. 269-290, 2005.
- 45 MARTIN-GAJARDO, I. S.; MORELATTO, L. P. C. Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v. 26, n. 3, p. 299-309, 2003.
- 46 BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: Ed. UFV, 1986. v.3.
- 47 GOODLAND, R.; FERRI, M. G. **Ecologia do Cerrado**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1979. p. 61-79.
- 48 BRAGA, M. R.; YOUNG, M. C. M.; DIETRICH, S. M. C.; GOTTLIEB, H. E.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. S. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3433-3435, 1992.
- 49 BOLZANI, V. S.; TREVISAN, M. V. L.; YOUNG, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.
- 50 LANDECKER, E. M. **Fundamental of the fungi**. 4 th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

51 CLEMMENSEN, L. H. A method for comparison of growth media in objective identification of *Penicillium* based on multi-spectral imaging. **J. Microbiol. Methods**, v. 69, p. 249-255, 2007.

52 TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

53 RUKACHAISIRIKUL, V.; KAEOBAMRUNG, J.; PANWIRIYARAT, W.; SAITAI, P.; SUKPONDMMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. A new pyrone derivative from the endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, p. 1383-1384, 2007.

54 DAVIS, R. A.; LONGDEN, J.; AVERY, V. M.; HEALY, P. C. The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 2836-2839, 2008.

55 GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 134-144, 2008.

56 SINGH, S. B. Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of xanthoviridicatin E and F, two novel fungal metabolites produced by *Penicillium chrysogenum*. **Helv. Chim. Acta.**, v. 86, p. 3380-3385, 2003.

57 LIN, Z-J. Penicillenols from penicillium sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 56, n. 2, p. 217-221, 2008.

58 BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

59 SILVA, H. G. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp, *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados a espécies vegetais de cerrado**. 2005. 306 f. (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

- 60 RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; MONOD, M.; FRENK, E. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochem. Anal.**, v.2, p. 199-201, 1991.
- 61 MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- 62 PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New antioxidant C-Glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samyoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1384-1387, 2003.
- 63 BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUÑOZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products?. **J. Ethnopharm.**, v. 73, p. 271-275, 2000.
- 64 DAVIS, D. A.; BROWN, C. A.; SINGER, K. E.; WANG, V.; KAUFMAN, J.; STAHL, S. J.; WINGFIELD, P.; MAEDA, K.; HARADA, S.; YOSHIMURA, K.; KOSALARAKSA, P.; MITSUYA, H.; YARCHOAN, R. Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. **Antiviral Res.**, v. 72, p. 89-99, 2006.
- 65 HIRATA, J.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; IRTH, H. Continuous-flow protease assay based on fluorescence resonance energy transfer. **Anal. Chim. Acta.**, v. 478, p. 1-10, 2003.
- 66 HOLLER, U.; KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Tree new metabolites from Marine-Derivad Fungi of the *Genera Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 114-118, 1999.
- 67 ASHA, K. N.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Steroids and polyketides from *Uvaria hamiltonii* stem bark. **Acta Pharm.**, v. 54, p. 57-63, 2004.
- 68 KAMISUKI, S. Nodulisporol and Nodulisporone, novel specific inhibitors of human DNA polymerase α from a fungus, *Nodulisporium* sp. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 3109-3114, 2007.

69 HARWOOD, L. M. Access to phenolic fungal metabolites *via* the acid-catalysed Claisen Rearrangement. The total synthesis of (+)-Mellein, Aurocitrin, and 5',6'-dihydroaurocitrin. **J. Chem. Soc. Perkin Trans**, v. 1, p. 2577-2582, 1984.

70 KUTSCHERA, G. L.; ENGELMEIER, D.; HADACEK, F.; WERNER, A.; GREGER, H.; HOFER, O. Synthesis of side chain substituted 3-butylicoumarins and absolute configuration of natural isocoumarins from *Artemisia dracunculus*. **Monatsh. Chem.**, v. 134, p. 1195-1206, 2003.

71 ÖZCAN, S.; SAHIN, E.; BALCI, M. The synthesis of unusual isocoumarin derivatives: the chemistry of homophthalic acid. **Tetrahedron Lett.**, v. 48, p. 151-2154, 2007.

72 KURAMATA, M.; FUJIOKA, S.; SHIMADA, A.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Citronolactones A, B and C, and sclerotinin C, plant growth regulators from *Penicillium citrinum*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 71, n. 2, p. 499-503, 2007.

73 HU, Z-Y. Three New Sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. **Helv. Chim. Acta**, v. 91, p. 46-52, 2008.

74 HUANG, Y. F.; QIAO, L.; LI, L.; PEI, Y. H.; TIAN, L. Eremophilane sesquiterpenes from the marine fungus *Penicillium* sp. BL27-2. **Chinese Chem. Lett.**, v. 19, p. 562-564, 2008.

75 ZHAO, Y. Eremophilane Sesquiterpenes from Capsidiol. **J. Org. Chem.**, v. 69, p. 7428-7435, 2004.

76 DE ROSA, S.; MITOVA, M.; TOMMONARO, G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. **Biomol. Eng.**, v. 20, p. 311- 316, 2003.

77 ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx* cf. *Podatypa*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 201-208, 2003.

78 WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant. **J. Chem. Ecol.**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1999.

79 GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 208 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

80 COLLADO, I. G.; GARCÍA-PAJON, C. M.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Biotransformations by *Colletotrichum* species. **Tetrahedron Asymm.**, v. 14, p. 1229-1239, 2003.

81 MONDE, K. Organochlorine compounds from a terrestrial higher plant: structures and origin of chlorinated orcinol derivatives from diseased bulbs of *Lilium maximowiczii*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 913-921, 1998.

82 TULP, M.; BOHLIN, L. Rediscovery of known natural compounds: Nuisance or Golmine?. **Bioorg. Med. Chem.**, v.13, p. 5274-5282, 2005.

83 LASTRA, A. C. Isolation of caffeic and chlorogenic acids and orcinol from *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. Antimicrobial activity. **Plant. Med. Phytother.**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 1988.

84 MIN, T-J.; BAE, K-G. Structure and antibiotic activities of phenolic compounds from *Umbilicaria vellea*. **J. Korean Chem. Soc.**, v. 40, n. 9, p. 623-629, 1996.

85 MARTIN, F. P. J. Effects of metabolic profiles probed *via* magic-angle-spinning NMR spectroscopy. **J. Prot. Resear.**, v. 6, p. 1471-1481, 2007.

86 SCHINDLER, M. Magnetic properties in terms of localized quantities. The DNA bases and the protonation of Adenine. **J. American Chem. Soc.**, v. 110, p. 6623-6630, 1988.

87 LUCIANO, J. H. S.; LIMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochem. System. Ecol.**, v. 12, p. 1227-1229, 2004.

88 OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. S. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 3, p. 257-259, 1997.

89 BROCHINI, C. B. MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. S. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1293-1295, 1994.

90 BOLZANI, V. S.; TREVISAN, M. V. L.; YOUNG, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.

91 SILVA, V. C. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. 2007. 330 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

92 GRAYER, R. J.; HARBORNE, J. B. A. A survey of antifungal compounds from higher-plants 1982-1993. **Phytochemistry**, v. 37, p. 19-41, 1994.

93 YOKOZAWA, T. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochem. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 213-222, 1998.

94 YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chem.**, v. 74, p. 471-478, 2001.

95 VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase**. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

96 KRETTLI, A. U. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1033-1042, 2001.

97 ALVES, M. J. C. P.; RANGEL, O.; SOUZA, S. S. A. L. Malária na região de Campinas, São Paulo, Brasil, 1980 a 1994. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 53-60, 2000.

98 ALECRIM, M. C.; CARVALHO, L. M.; FERNANDES, M. C.; ANDRADE, S. D. L.; CARDOSO, A.; ARCANJO, A. R. L.; ALECRIM, W. D. Tratamento da malária com artesunate (retocaps®) em crianças da Amazônia brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 2, p.163-168, 2000.

99 ROSENTHAL, P. J. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **J. Experim. Biol.**, v. 206, p. 3735-3744, 2003.

100 WEISS, C.; SULAIKAH, V. K.; MOIDEEN, S. L. C.; HOUGHTON, P. J. Activity of extracts and isolated naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Plasmodium falciparum*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 9, p. 1306-1309, 2000.

101 TRIPATHI, A. K.; KHAN, S. I.; WALKER, L. A.; TEKWANI, B. L. Spectrophotometric determination of de novo hemozoin β -hematin formation in an *in vitro* assay. **Anal. Biochem.**, v. 325, p. 85-91, 2004.

102 PANDEY, A. V.; BABBARWAL, V. K.; OKOYEH, J. N.; JOSHI, R. M.; PURI, S. K.; SINGH, R. L.; CHAUHAN, V. S. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 308, p. 736-743, 2003.

103 FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharm. Therapeutics**, v. 79, p. 55-87, 1998.

104 STEELE, J. C. P.; PHELPS, R. J.; SIMMONDS, M. S. J.; WARHURST, D. C.; MEYER, D. J. Two novel assays for the detection of haemin-binding properties of antimalarials evaluated with compounds isolated from medicinal plants. **J. Antim. Chem.**, v. 50, p. 25-31, 2002.

105 SULLIVAN, D. J.; GLUZMAN, I. Y.; GOLDBERG, D. E. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. **Science**, v. 271, p. 219, 1996.

106 PAGOLA, S.; STEPHENS, P. W.; BOHLE, D. S.; KOSAR, A. D.; MADSEN, S. K. The structure of malaria pigment-haematin. **Nature**, v. 404, p. 307-310, 2000.

107 BOHLE, D. S.; KOSAR, A. D.; MADSEN, S. K. Propionic acid side chain hydrogen bonding in the malaria pigment β -hematin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 294, p. 132-135, 2002.

- 108 DORN, A.; STOF, R. Malarial haemozoin-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature**, v. 374, p. 269-271, 1995.
- 109 TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A. Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for *in vitro* hemozoin formation assay. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v. 8, p. 63-79, 2005.
- 110 KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, p. 446-458, 2003.
- 111 TABARRINI, O.; CECCHETTI, V.; TEMPERINI, A.; FILIPPONI, E.; GIUSEPPINA, M. L.; FRAVOLINI, A. Velnacrine thriaanalogues as potential agents for treating Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 9, p. 2921-2928, 2001.
- 112 TOMASSELLI, A. G.; HEINRIKSON, R. L. Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 189-214, 2000.
- 113 SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and esters analogues: structure-activity relationship. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 468-472, 2002.
- 114 TAKAYA, Y.; FURUKAWA, T.; MIURA, S.; AKUTAGAWA, T.; HOTTA, Y.; ISHIKAWA, N.; NIWA, M. Antioxidant constituents in distillation residue of Awamori spirits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n.1, p. 75-79, 2007.
- 115 SINGH, S. B. Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrase inhibitor integrin acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. **Tetrahedron Lett.**, v. 40, p. 8775-8779, 1999.
- 116 LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. Metabólitos derivados do ácido acético. In: LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST, 2007. Cap. 3, p. 73-117.
- 117 DEWICK, P. M. **A biosynthetic approach medicinal natural products**. Chichester: Wiley & Sons, 2002.

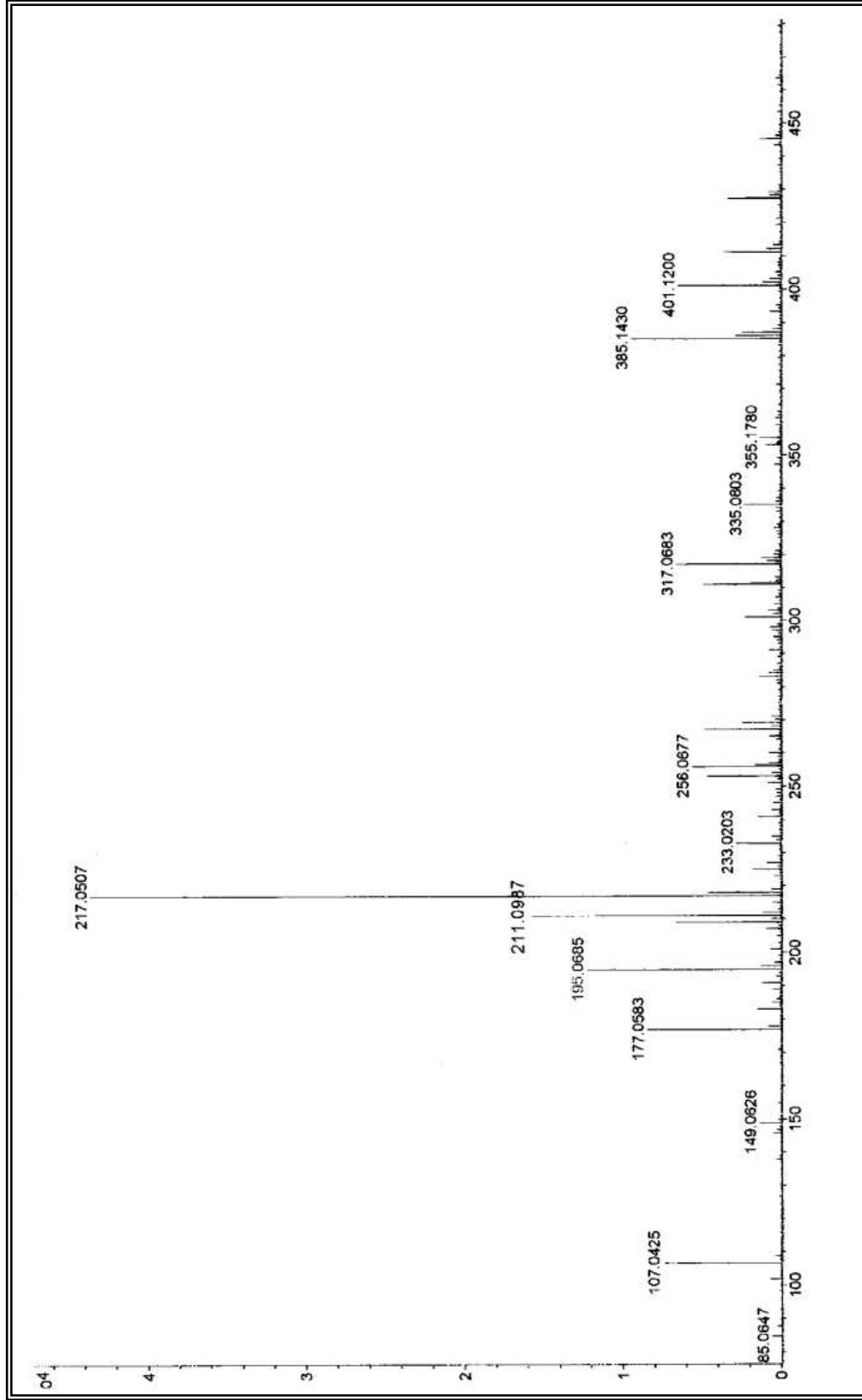
118 CANE, D. E.; TSANTRIZOS, Y. S. Aristolochene synthase elucidation of the cryptic gemacrene. A synthase activity using the anomalous substrate dihydrofarnesyl diphosphate. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, n. 40, p. 10037-10040, 1996.

119 KUSARI, S.; ZULKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 72, p. 2-7, 2009.

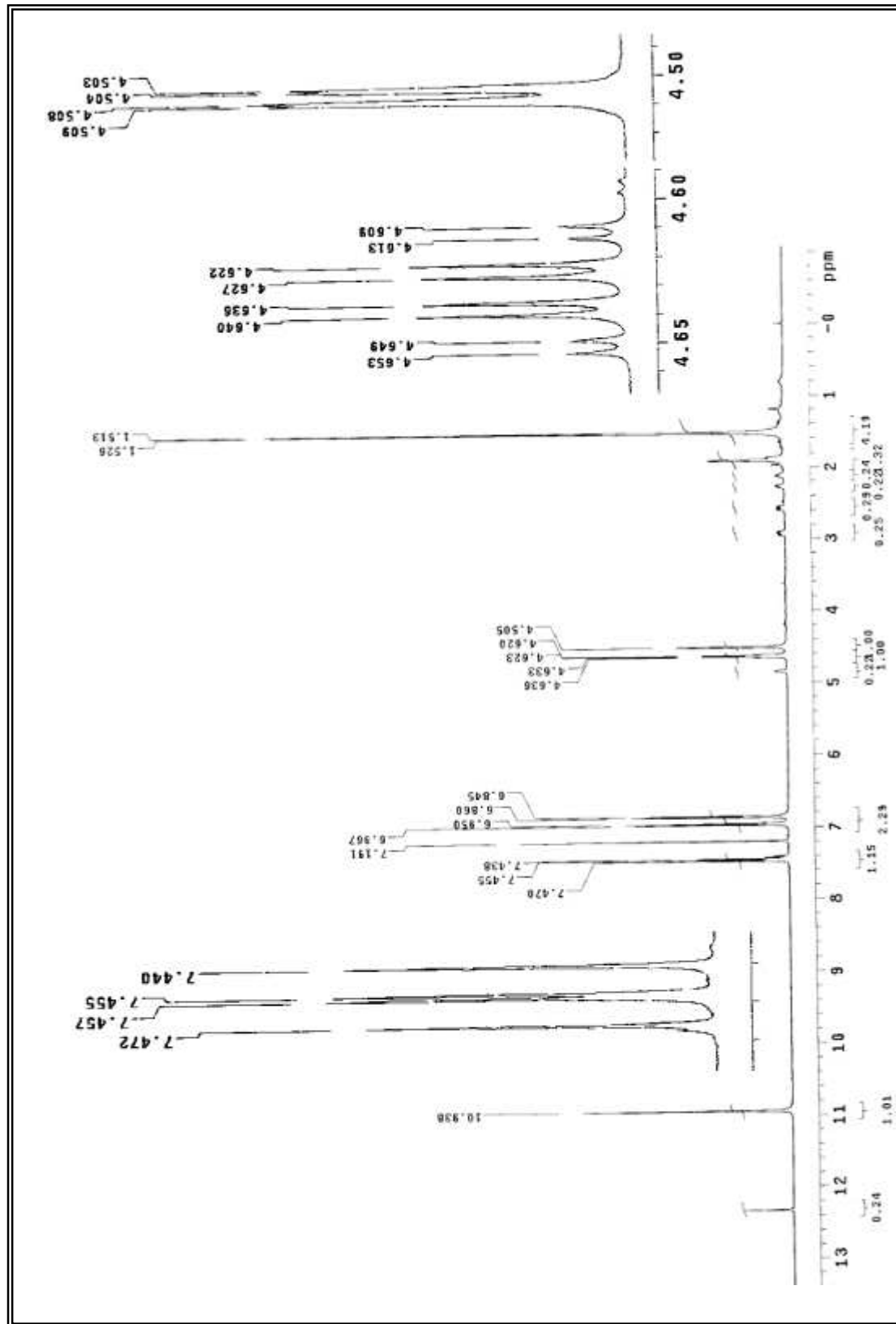
120 FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus Fumigatus* Strain. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6B, p. 1448-1453, 2005.

121 NUNES, F. M.; OLIVEIRA, M. C. F.; ARRIAGA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; ANDRADE NETO, M.; MATTOS, M. C.; MAFEZOLI, J.; VIANA, F. M. P.; FERREIRA, V. M.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, A. G. A New eremophilane-type sesquiterpene from the phytopathogen fungus *Lasiodiplodia theobromae* (Sphaeropsidaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 19, n. 3, p. 478-482, 2008.

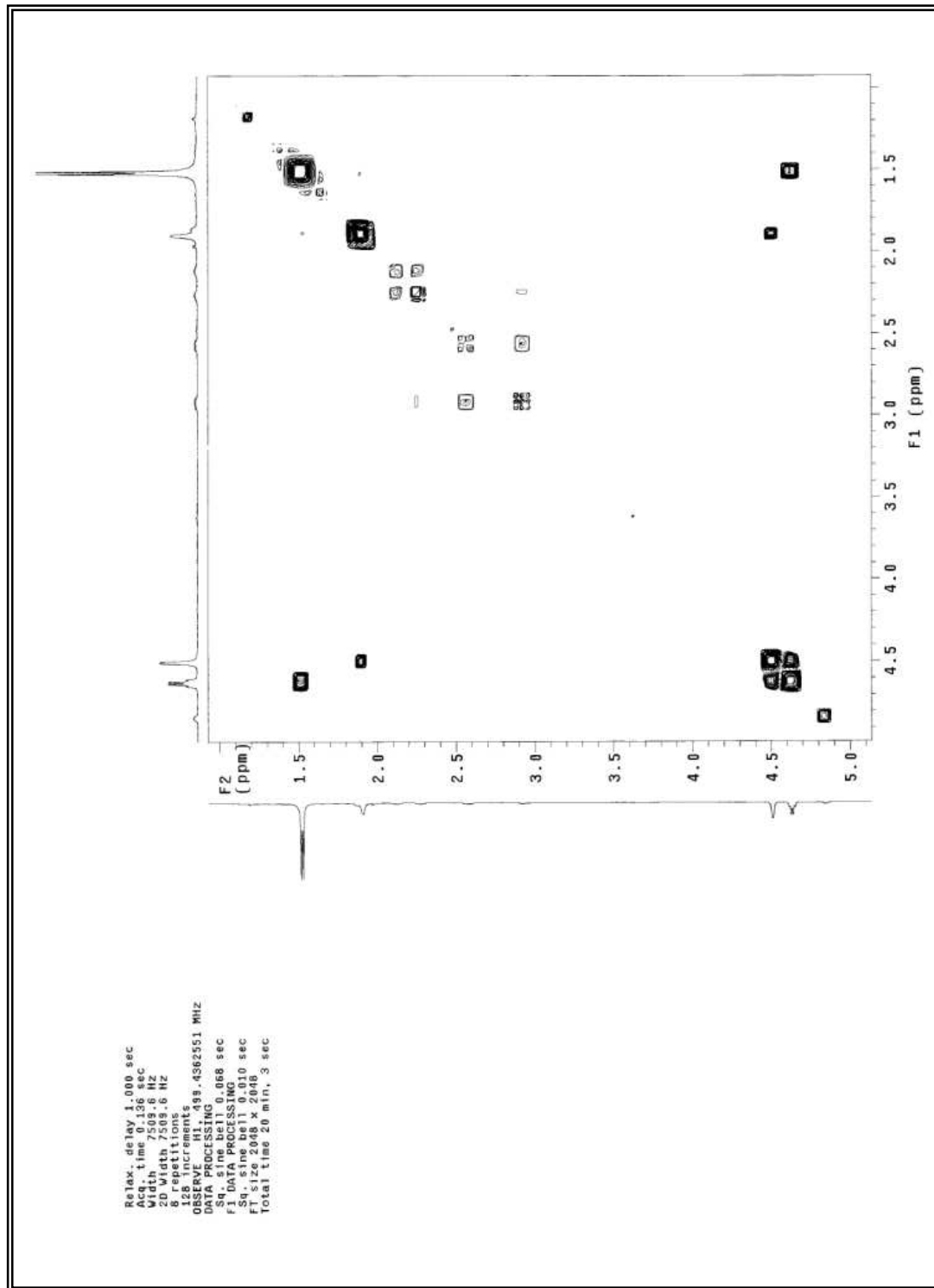
9. ANEXOS

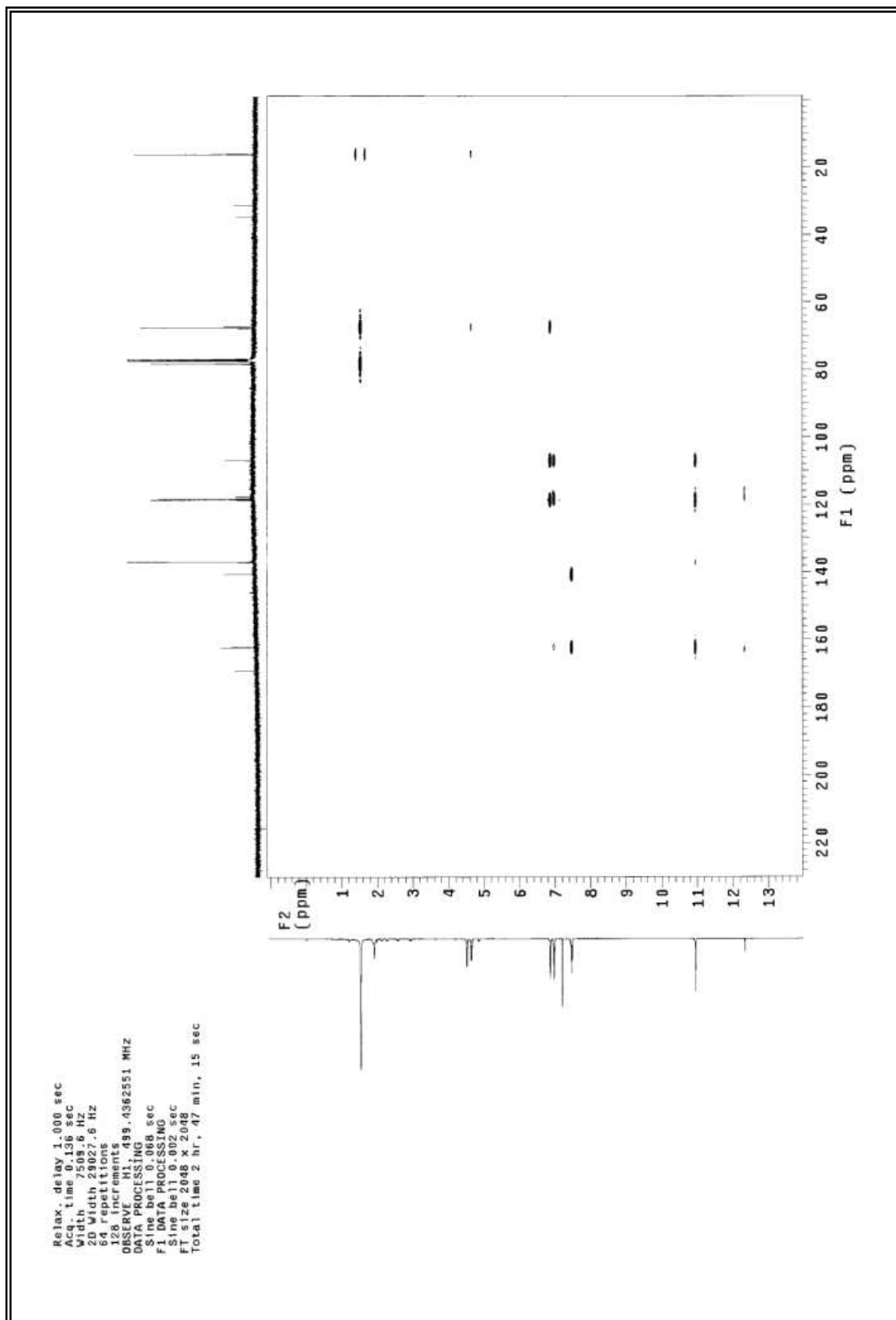


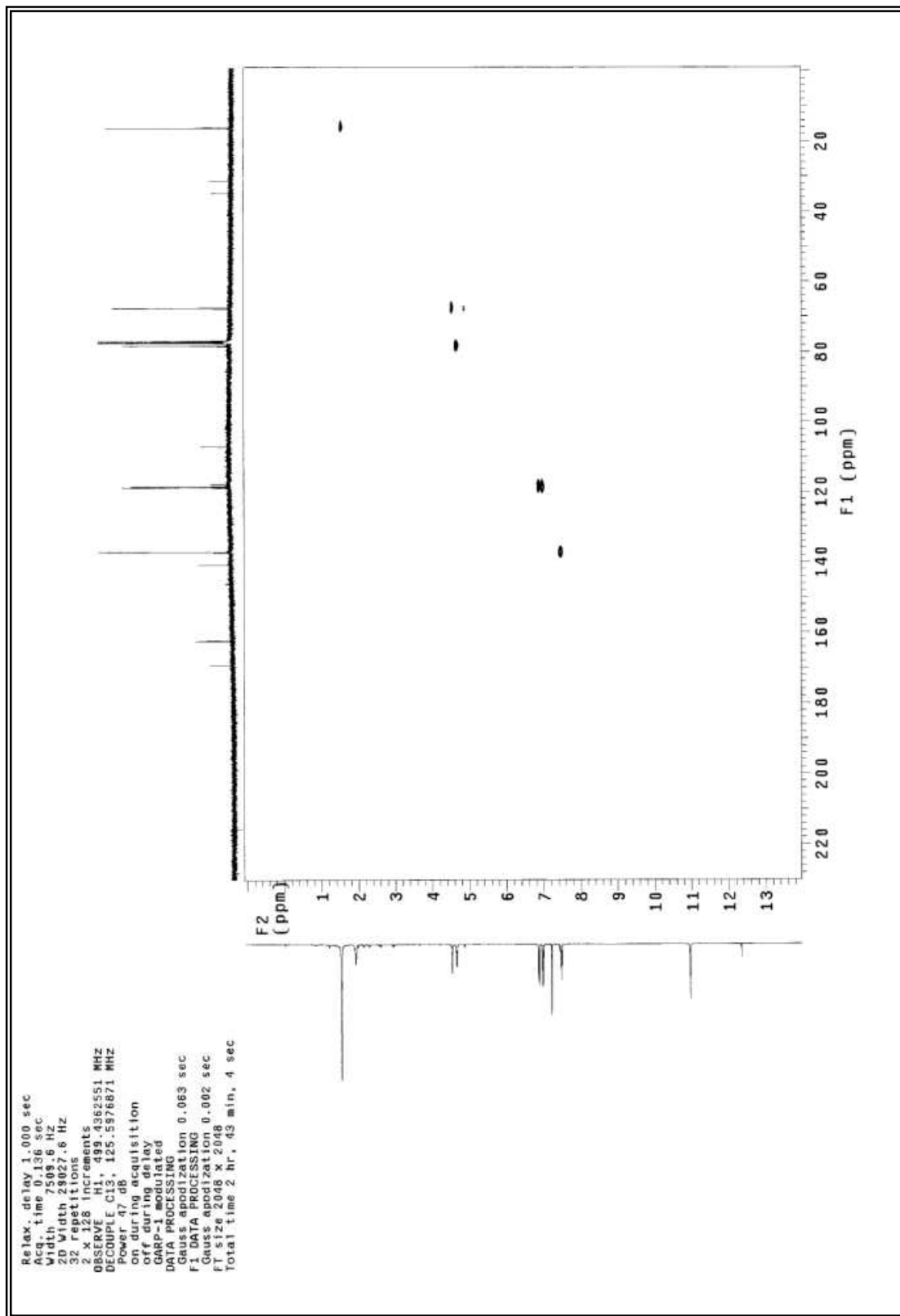
Anexo 1 - Espectro de ESI-MS [M+Na]⁺ da substância 1

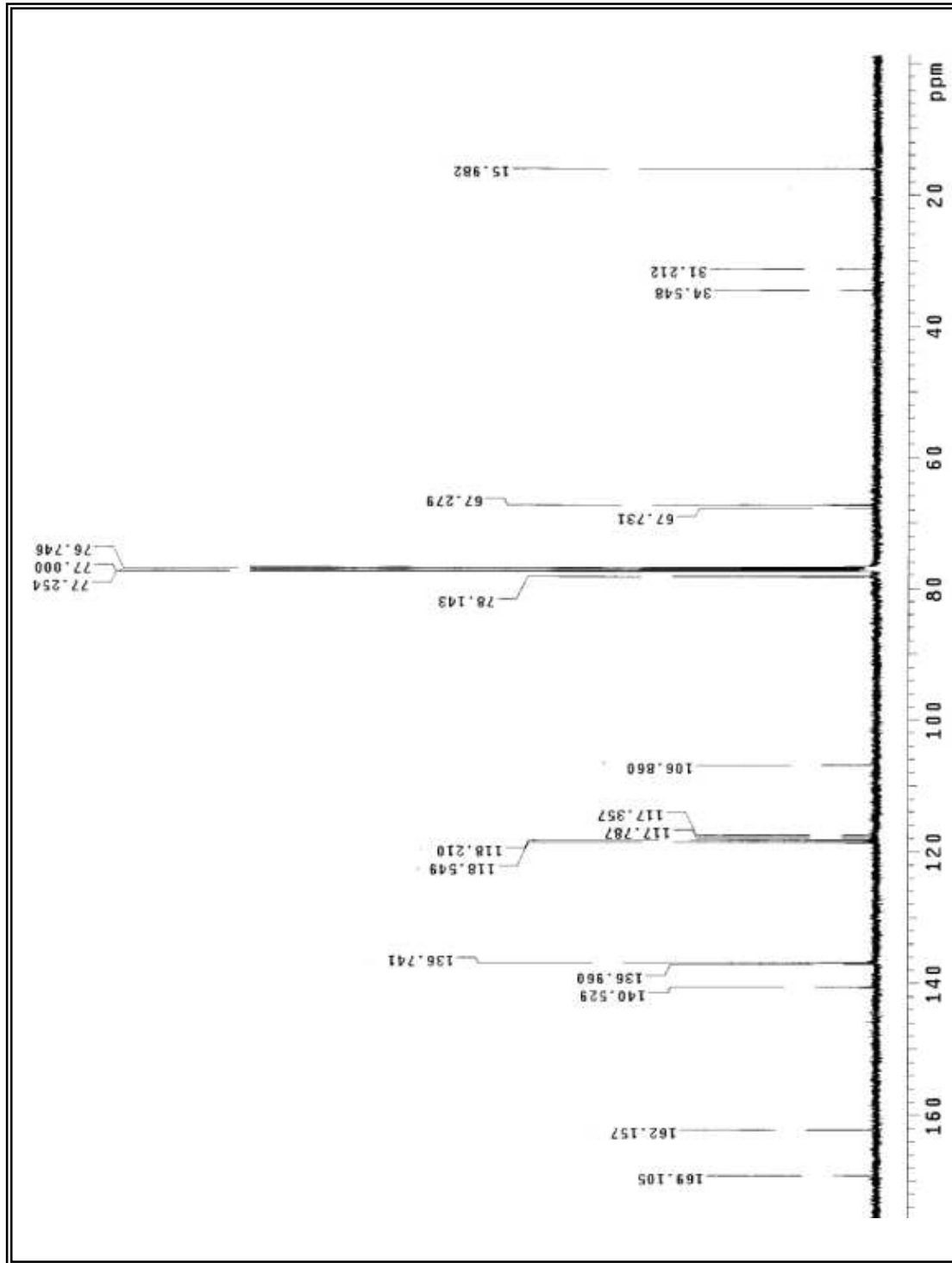


Anexo 2 - Espectro de RMN ^1H da substância **1** (CDCl_3 , 500 MHz)

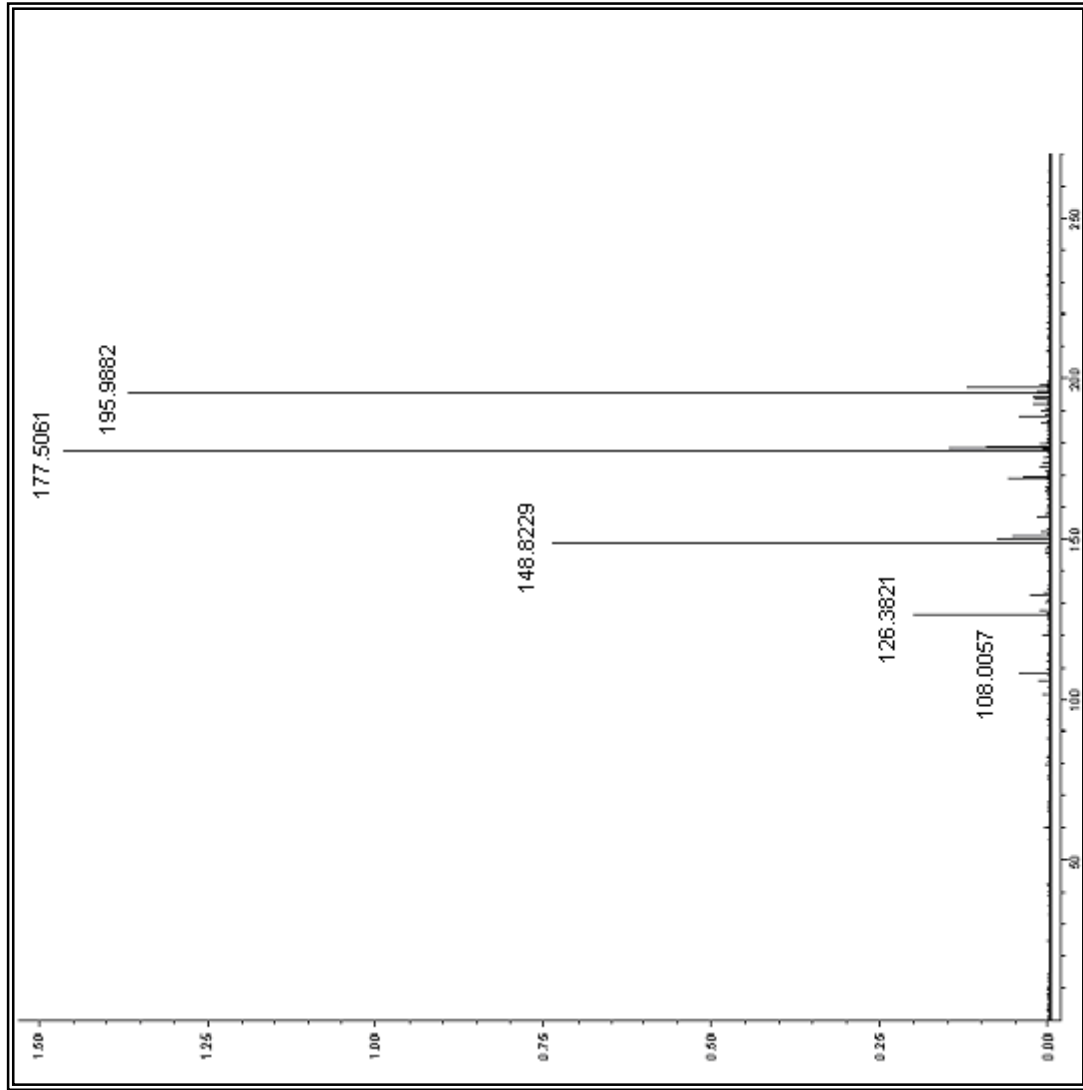
Anexo 3 - Espectro de gCOSY da substância 1 (CDCl₃, 125 MHz)

Anexo 4 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **1** (CDCl₃, 125 MHz)

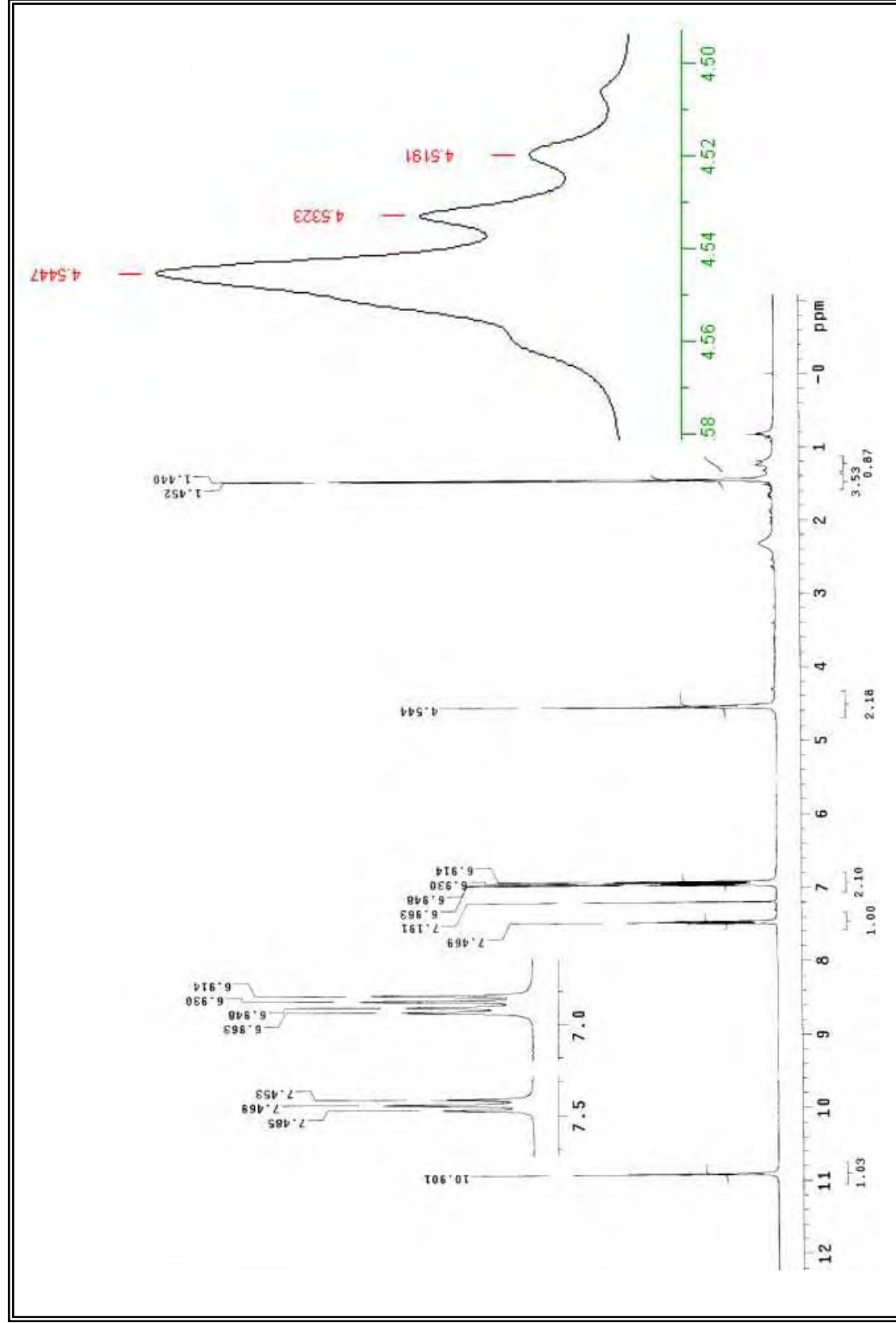
Anexo 5 - Mapa de contorno de gHMQC da substância **1** (CDCl₃, 125 MHz)

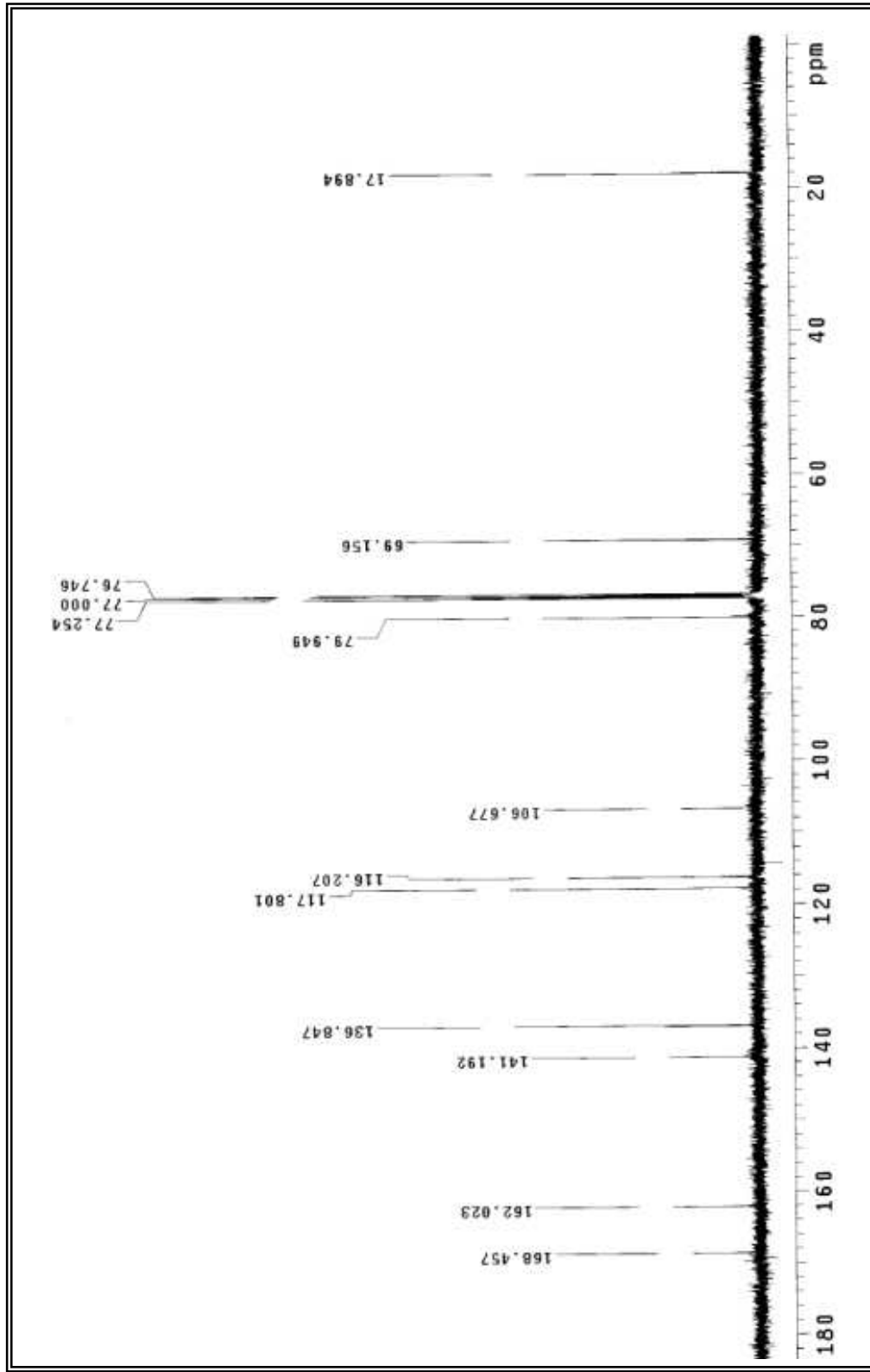


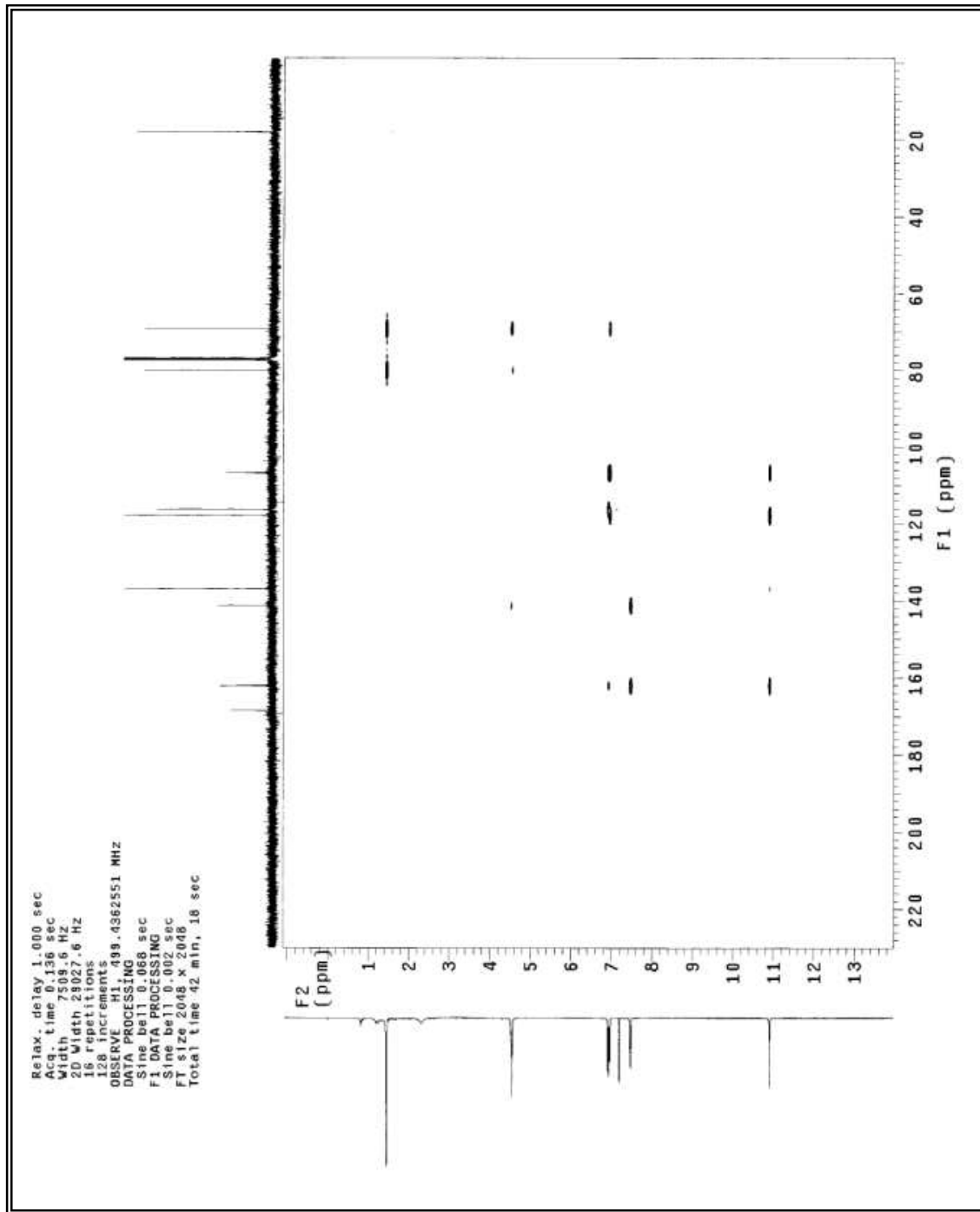
Anexo 6 - Espectro de ¹³C da substância 1 (CDCl₃ 125MHz)

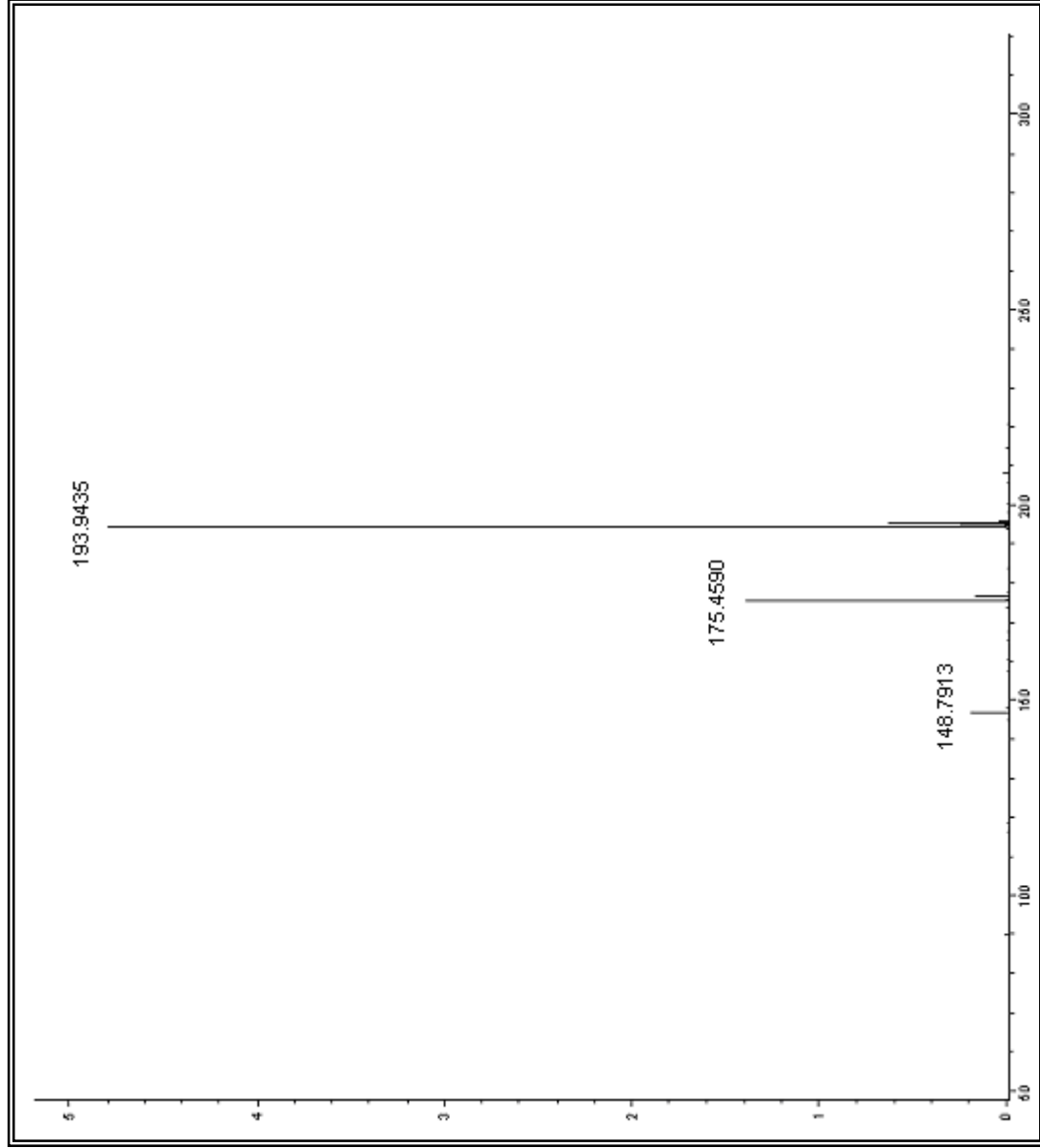


Anexo 7 - Espectro de ESI-MS [M+H]⁺ da substância 2

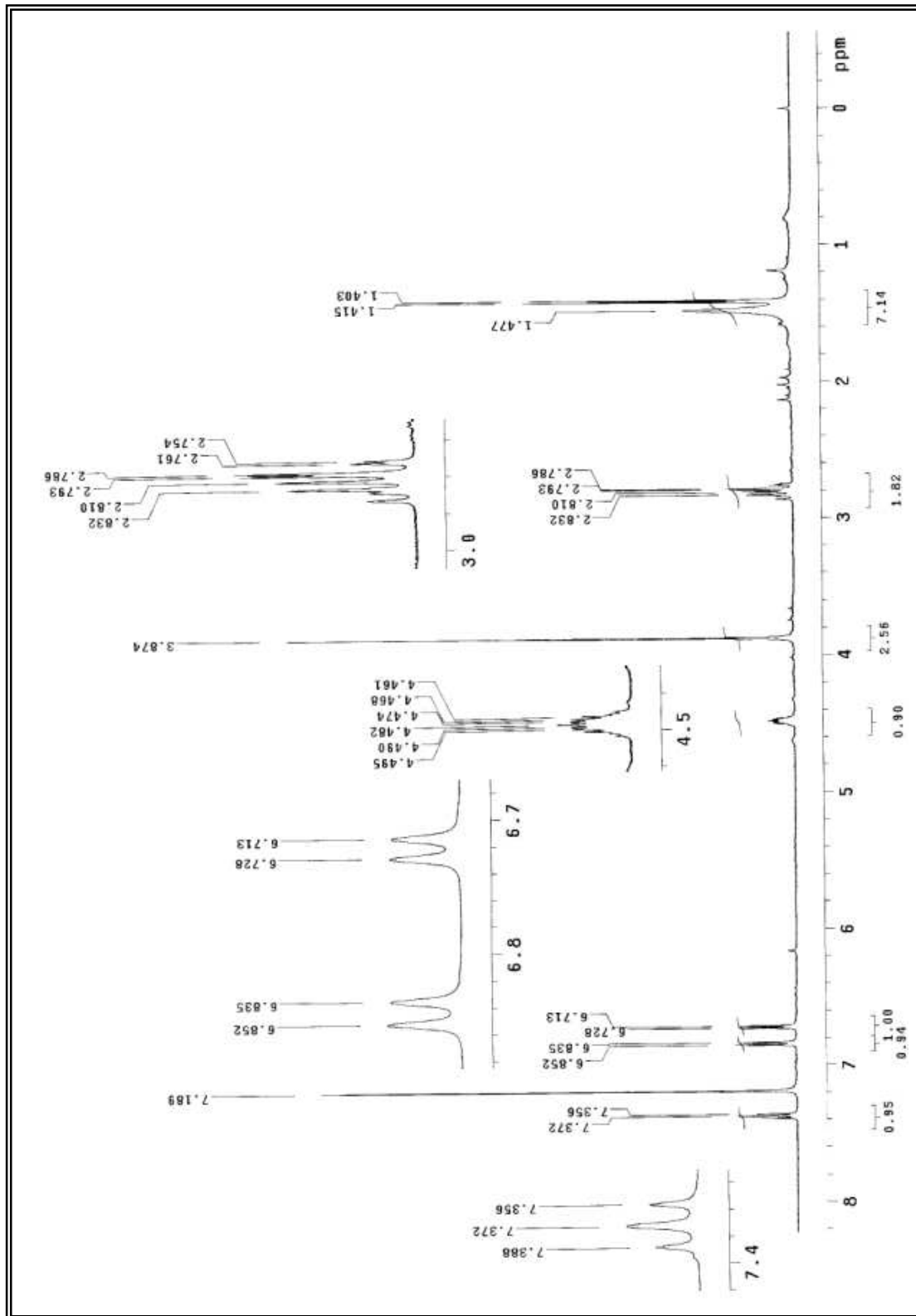
Anexo 8 - Espectro de RMN ^1H da substância **2** (CDCl_3 , 500 MHz)

Anexo 9 - Espectro de ^{13}C da substância **2** (CDCl_3 125MHz)

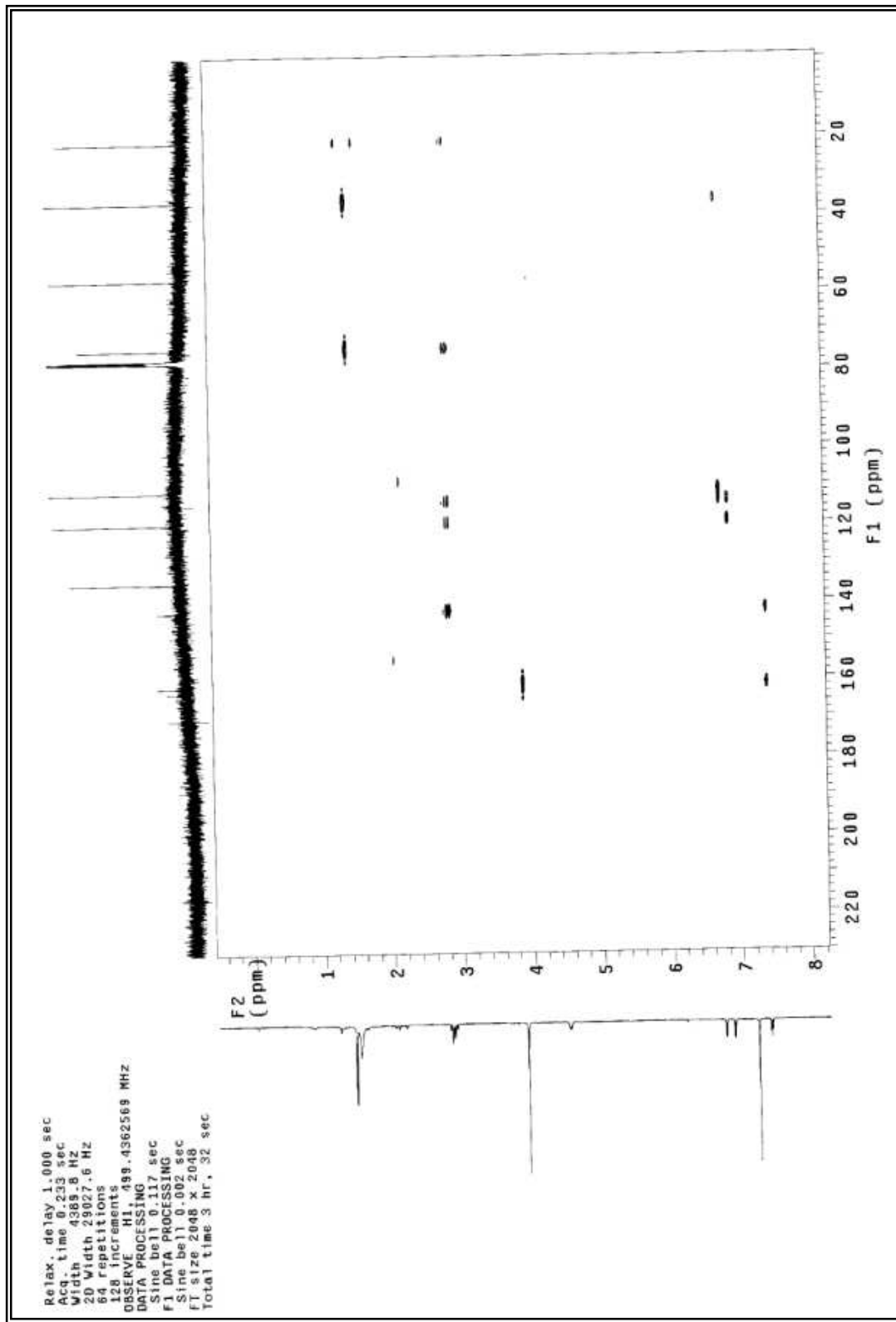
Anexo 10 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **2** (CDCl₃, 125 MHz)

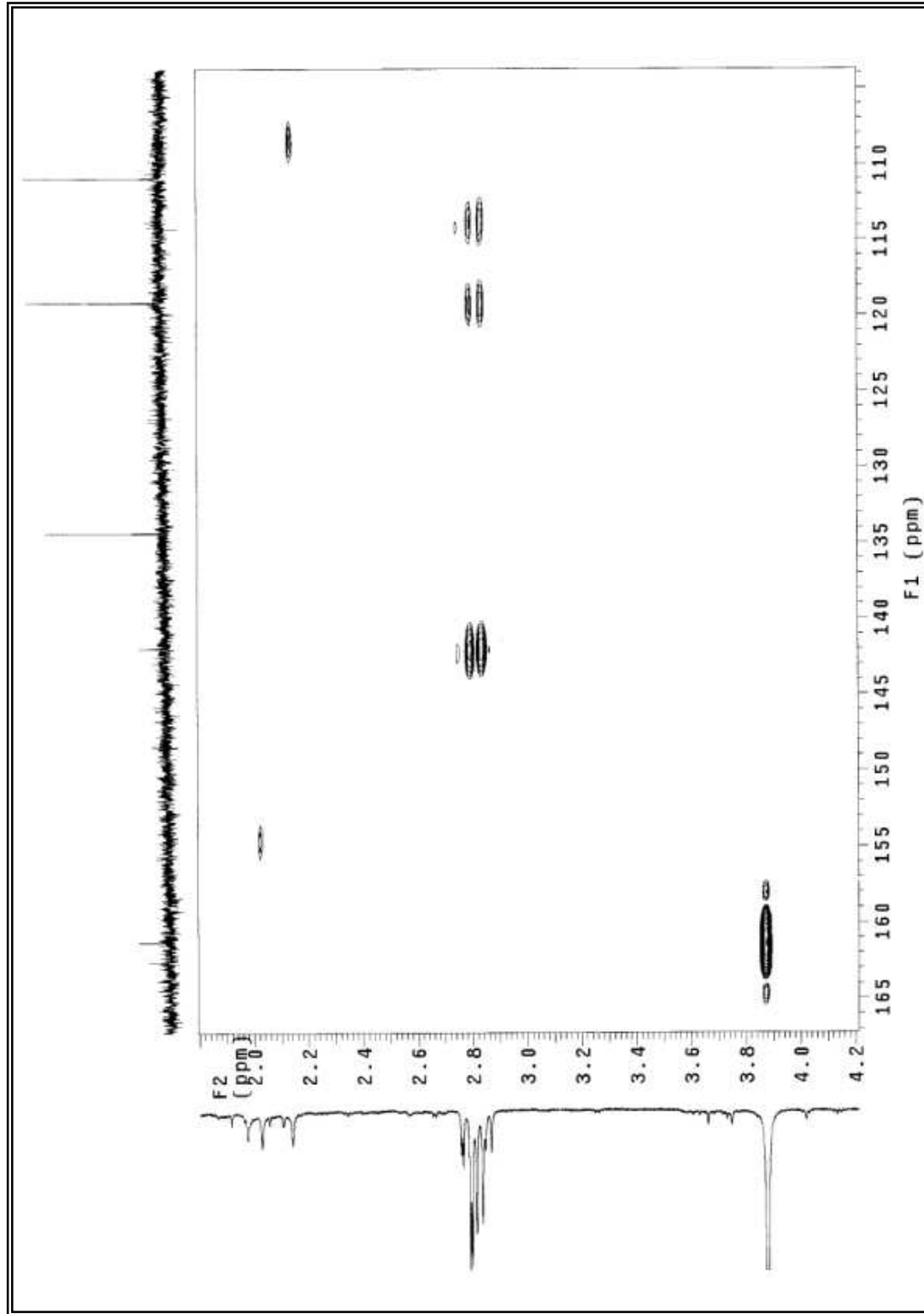


Anexo 11 - Espectro de ESI-MS $[M+H]^+$ da substância **3**

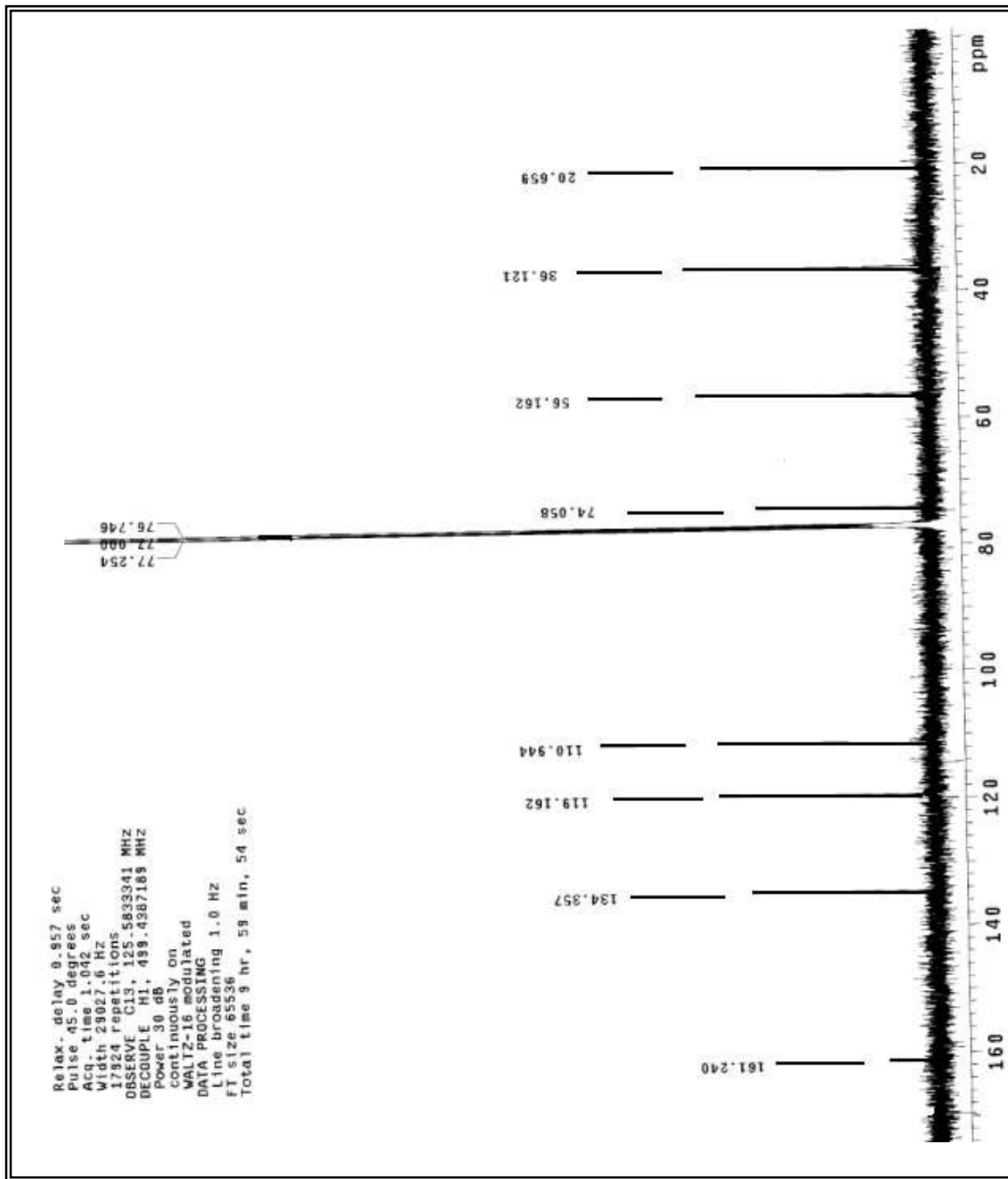


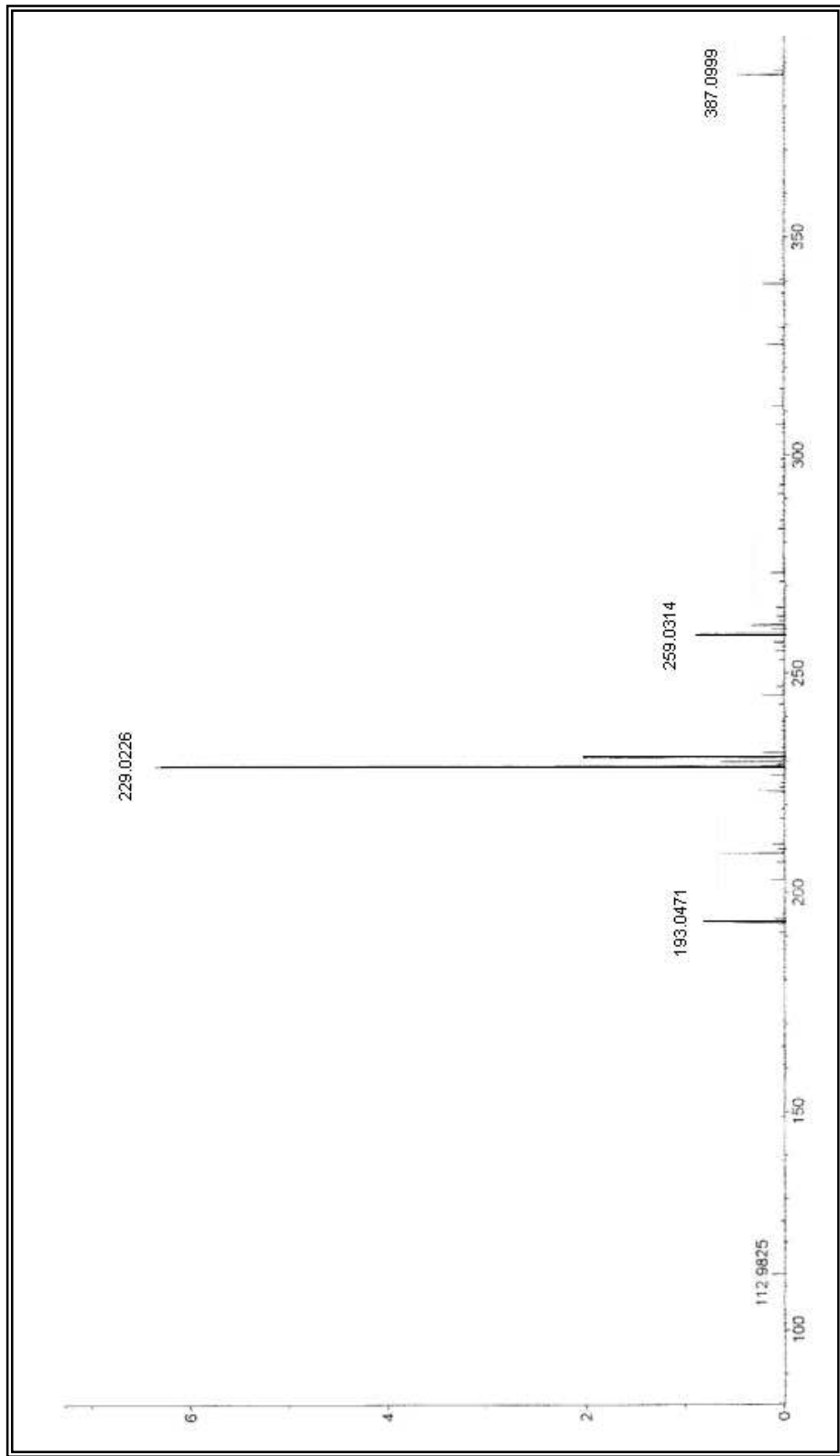
Anexo 12 - Espectro de RMN ¹H da substância **3** (CDCl₃, 500 MHz)

Anexo 13 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **3** (CDCl₃, 125 MHz)

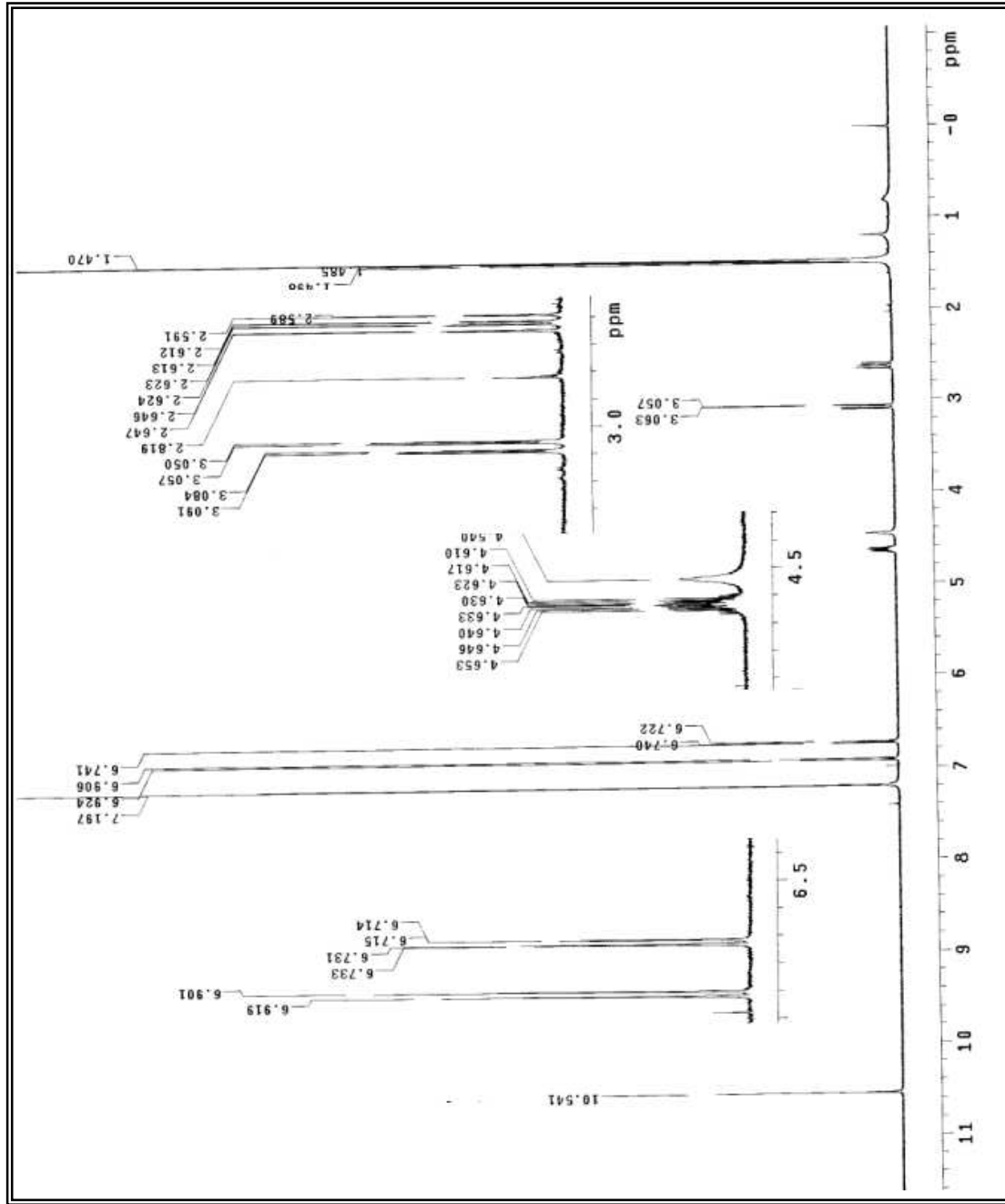


Anexo 14 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **3** (CDCl_3 , 125 MHz)

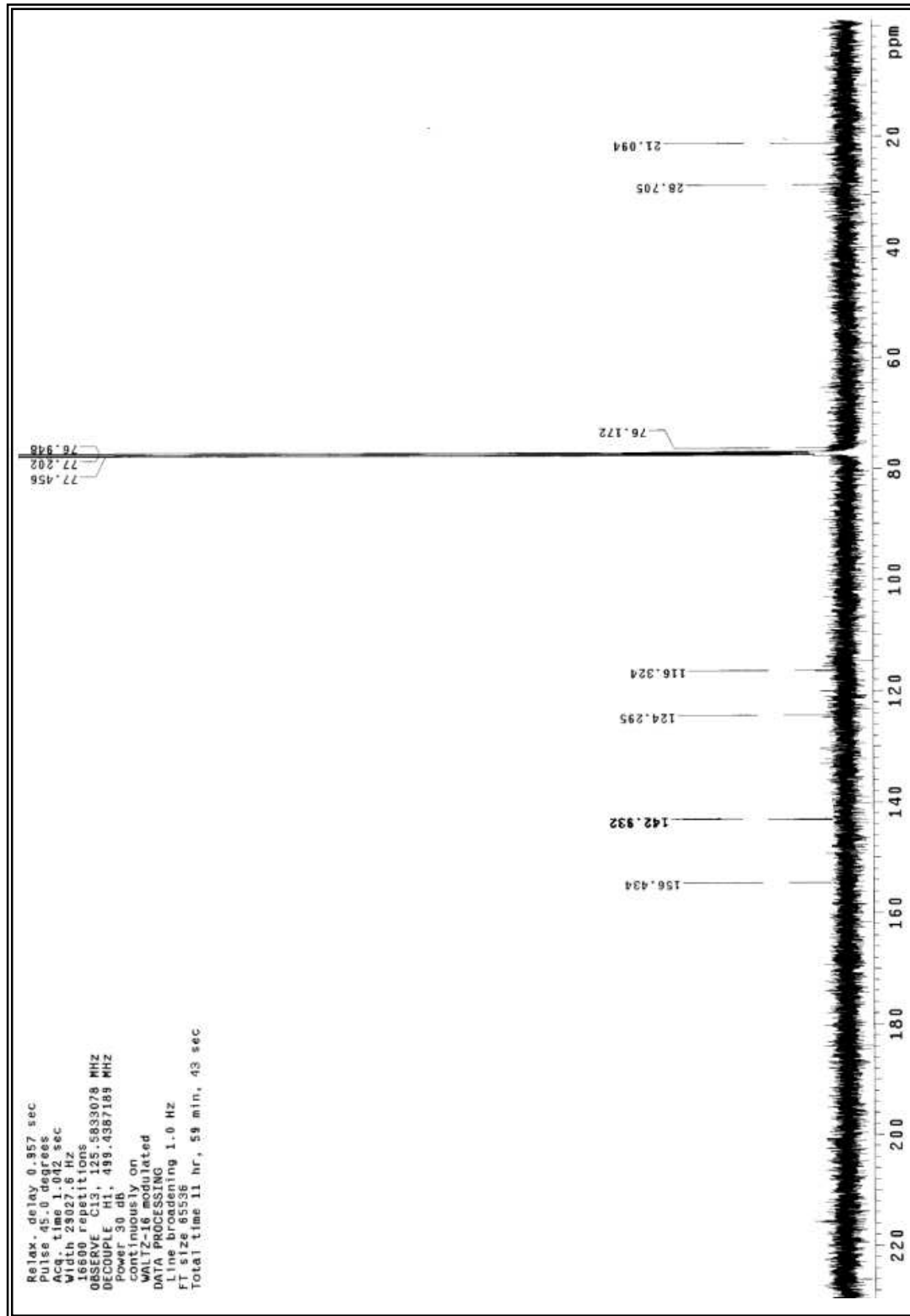
Anexo 15 - Espectro de ^{13}C da substância **3** (CDCl_3 125MHz)

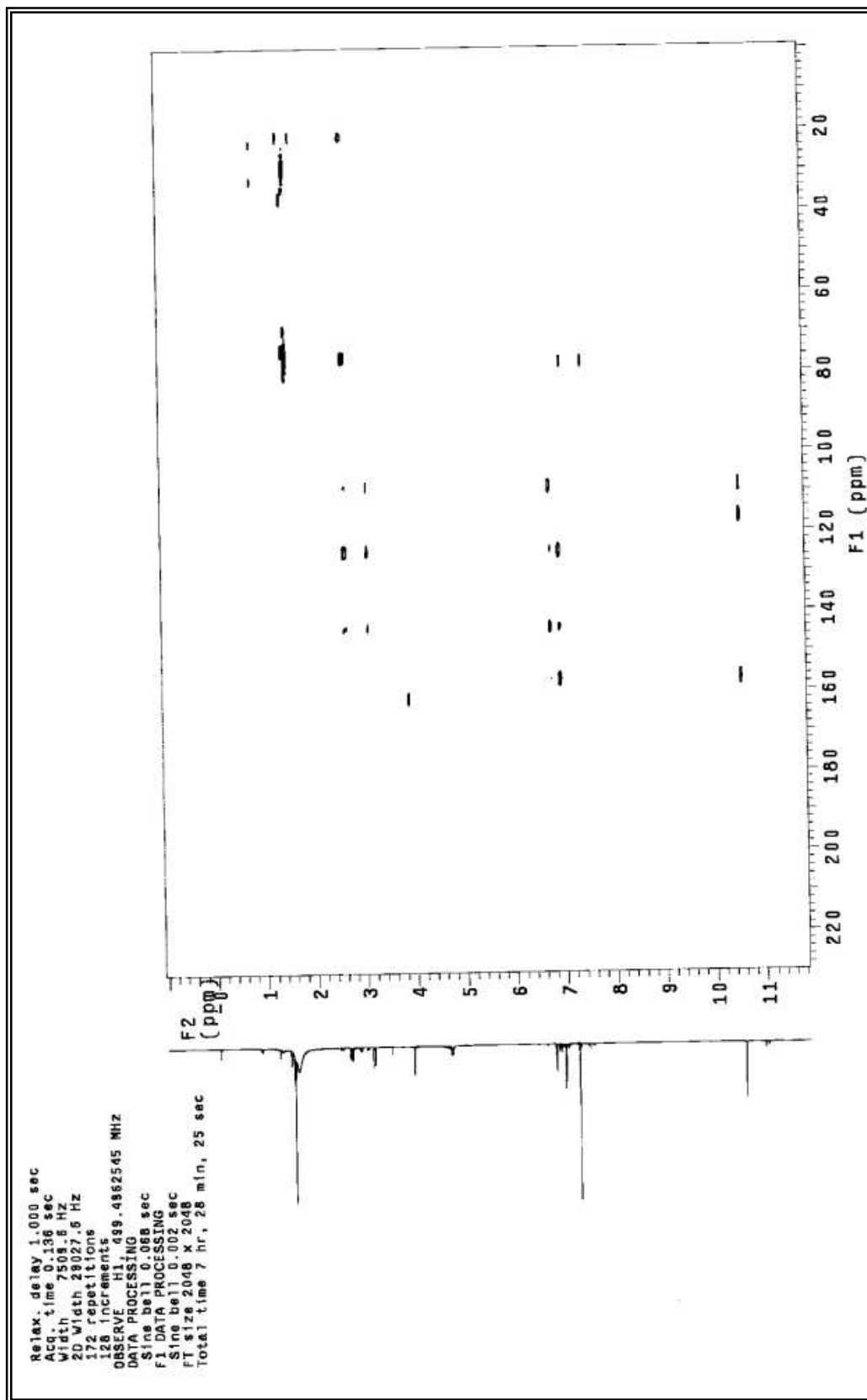


Anexo 16 - Espectro de ESI-MS [M-H]⁻ da substância 4

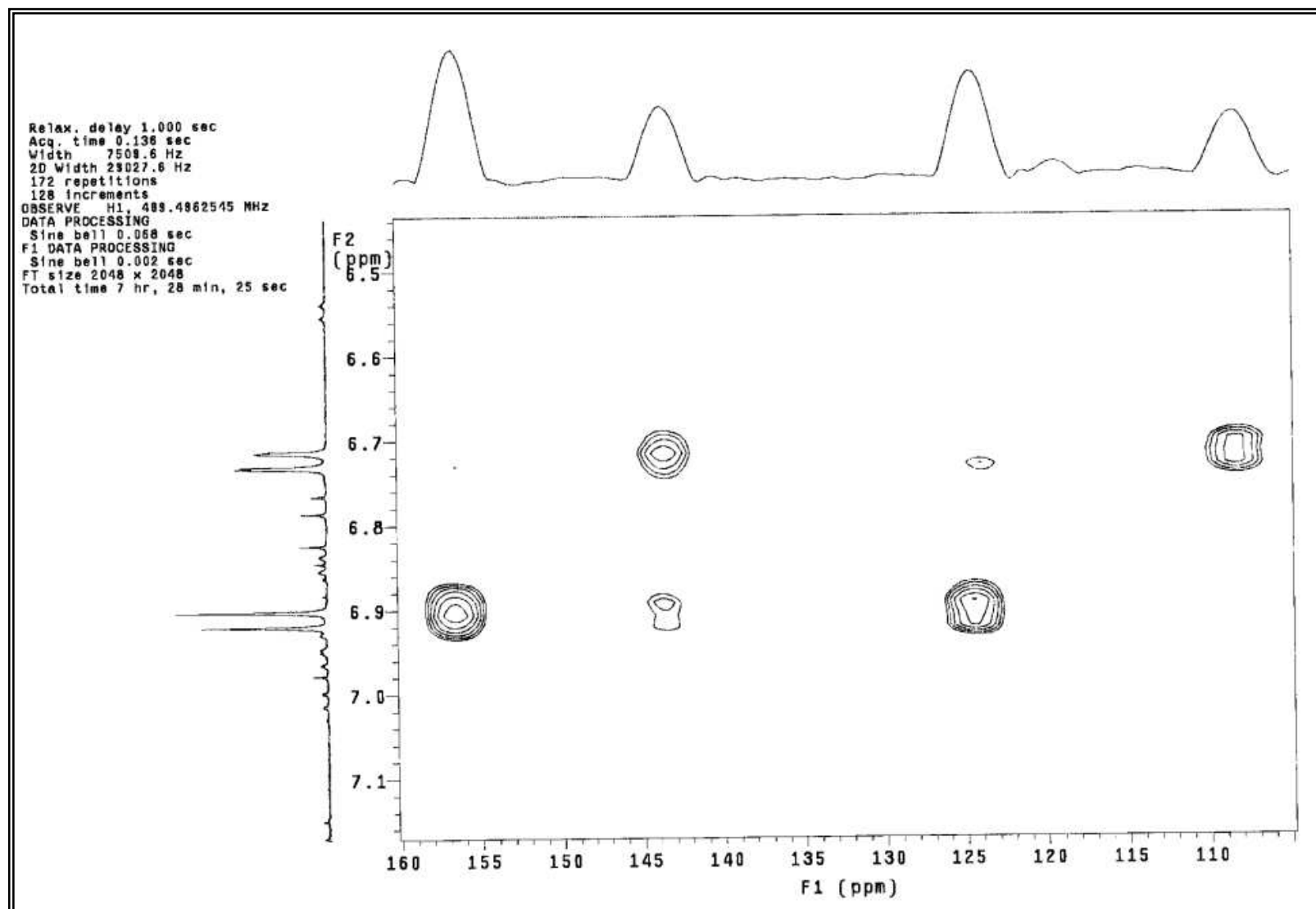


Anexo 17- Espectro de RMN ^1H da substância **4** (CDCl_3 , 500 MHz)

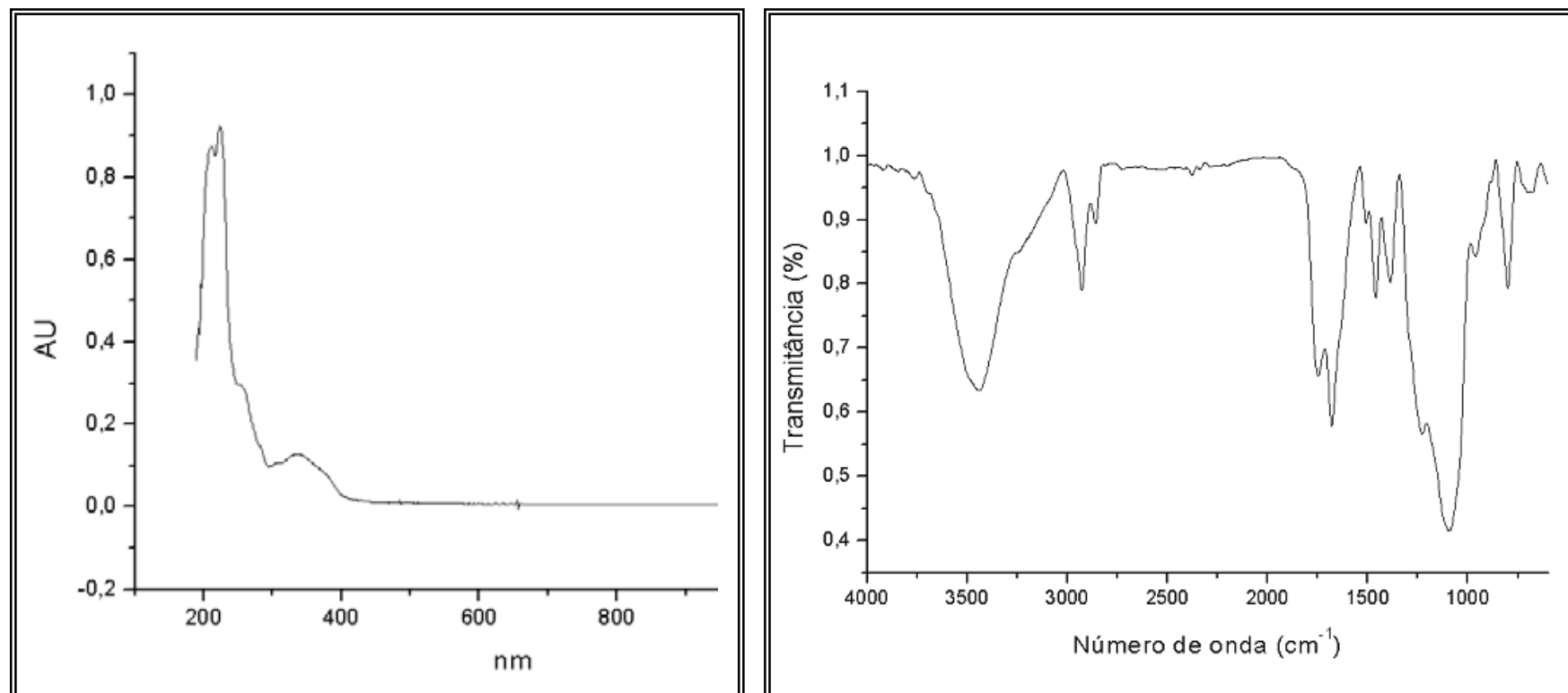
Anexo 18 - Espectro de ^{13}C da substância **4** (CDCl_3 125MHz)



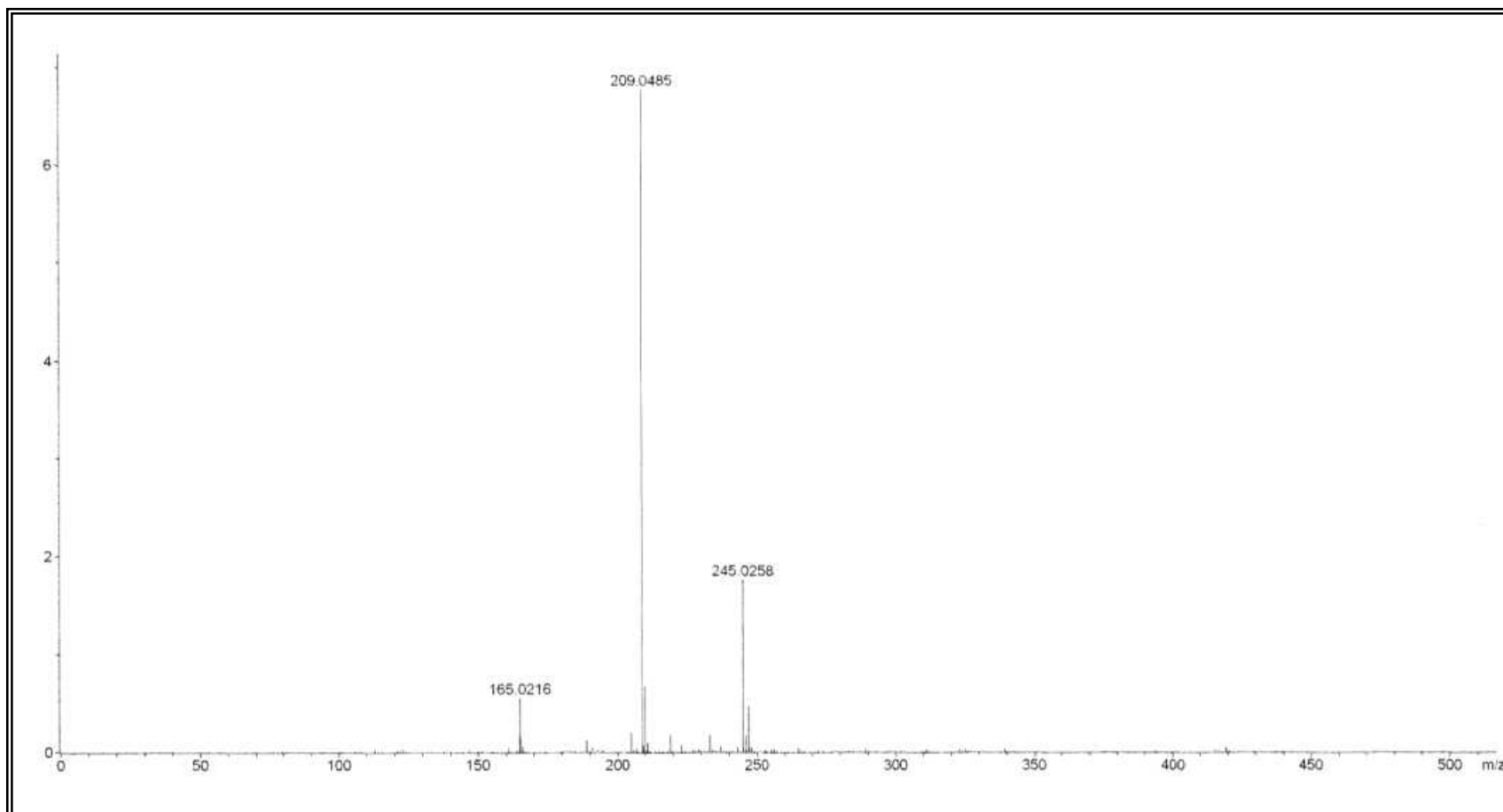
Anexo 19 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **4** (CDCl₃, 125 MHz)



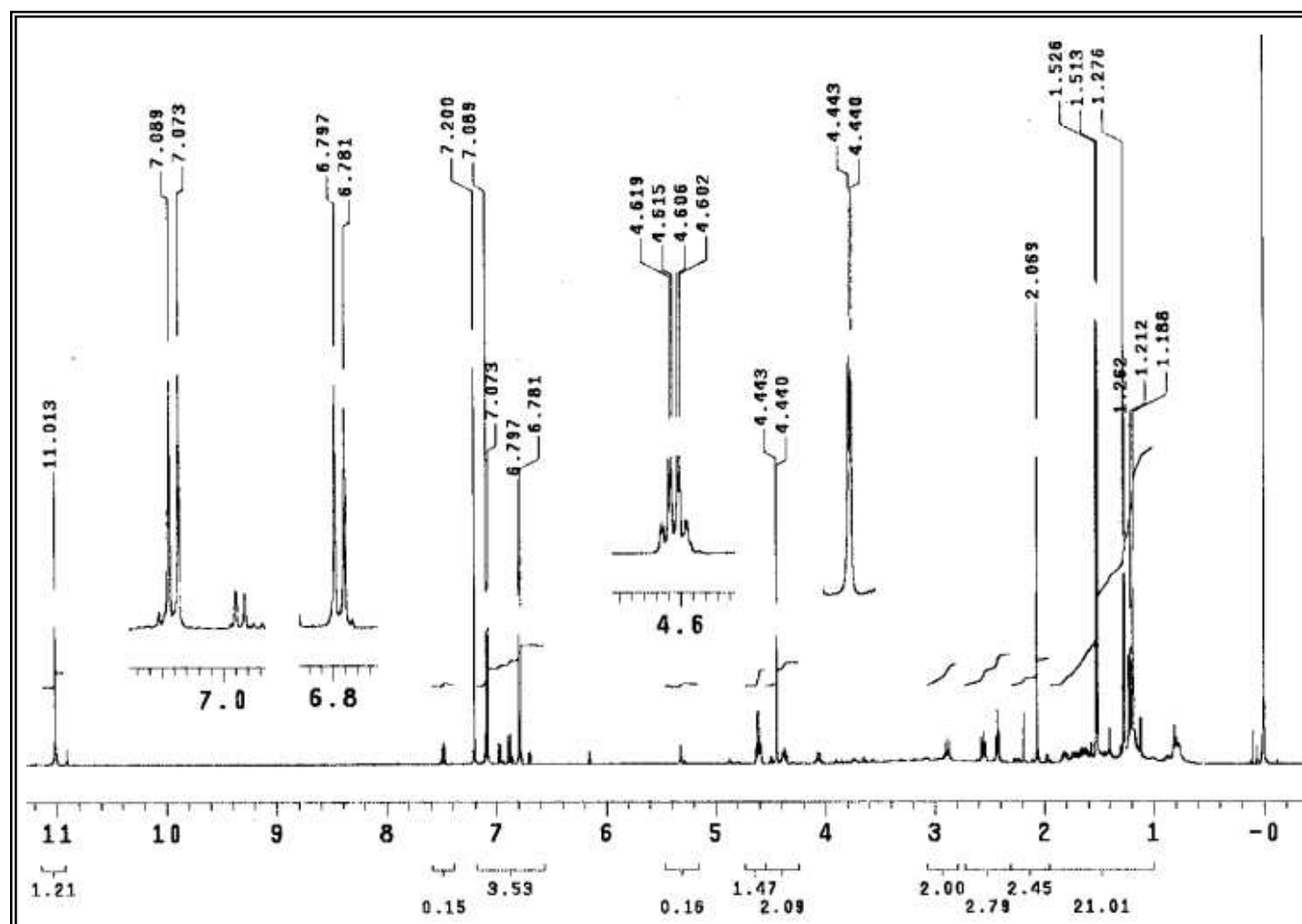
Anexo 20 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **4** (CDCl₃, 125 MHz)



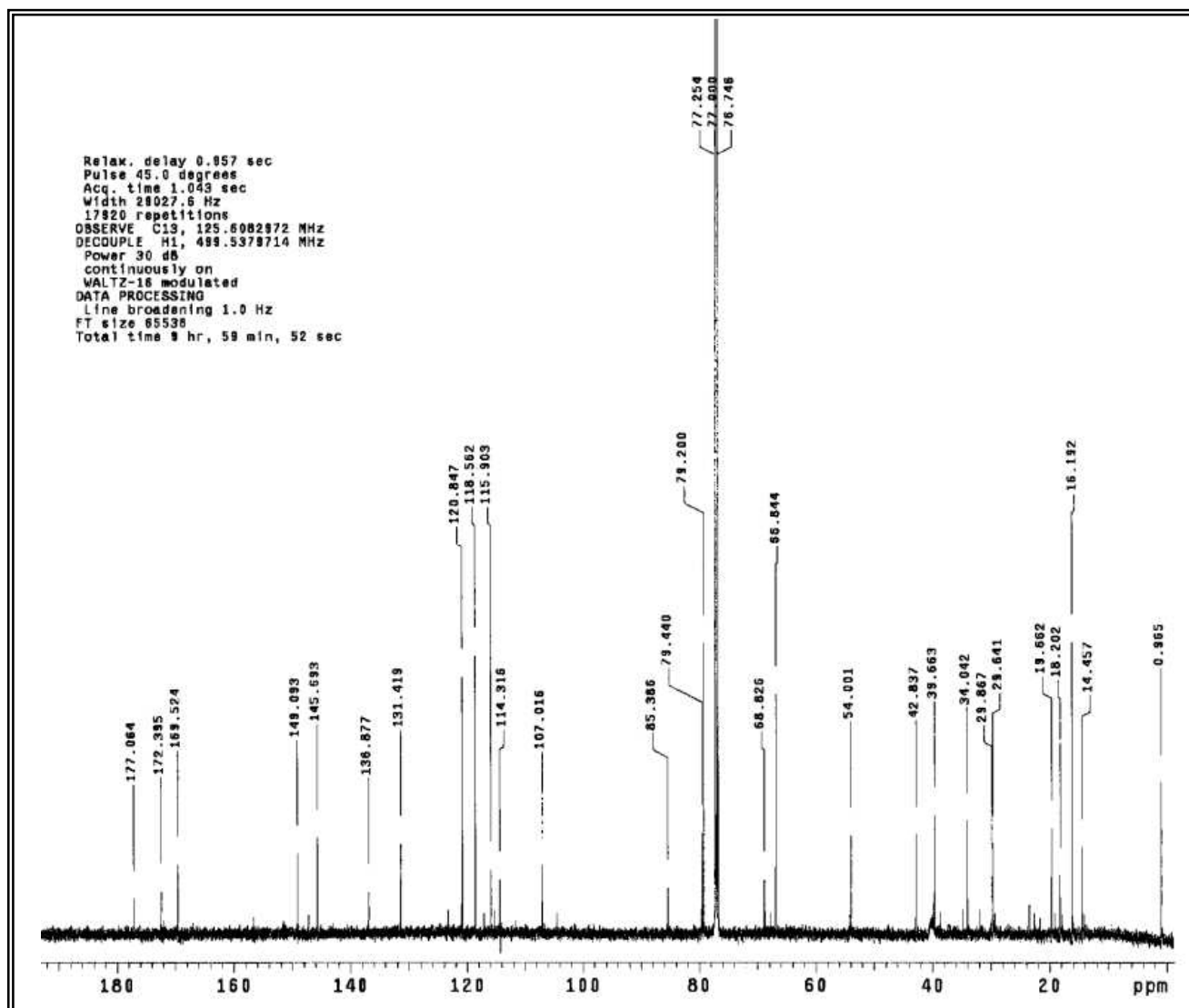
Anexo 21 - Espectro no UV visível e Espectro de Infra Vermelho da substância **5**



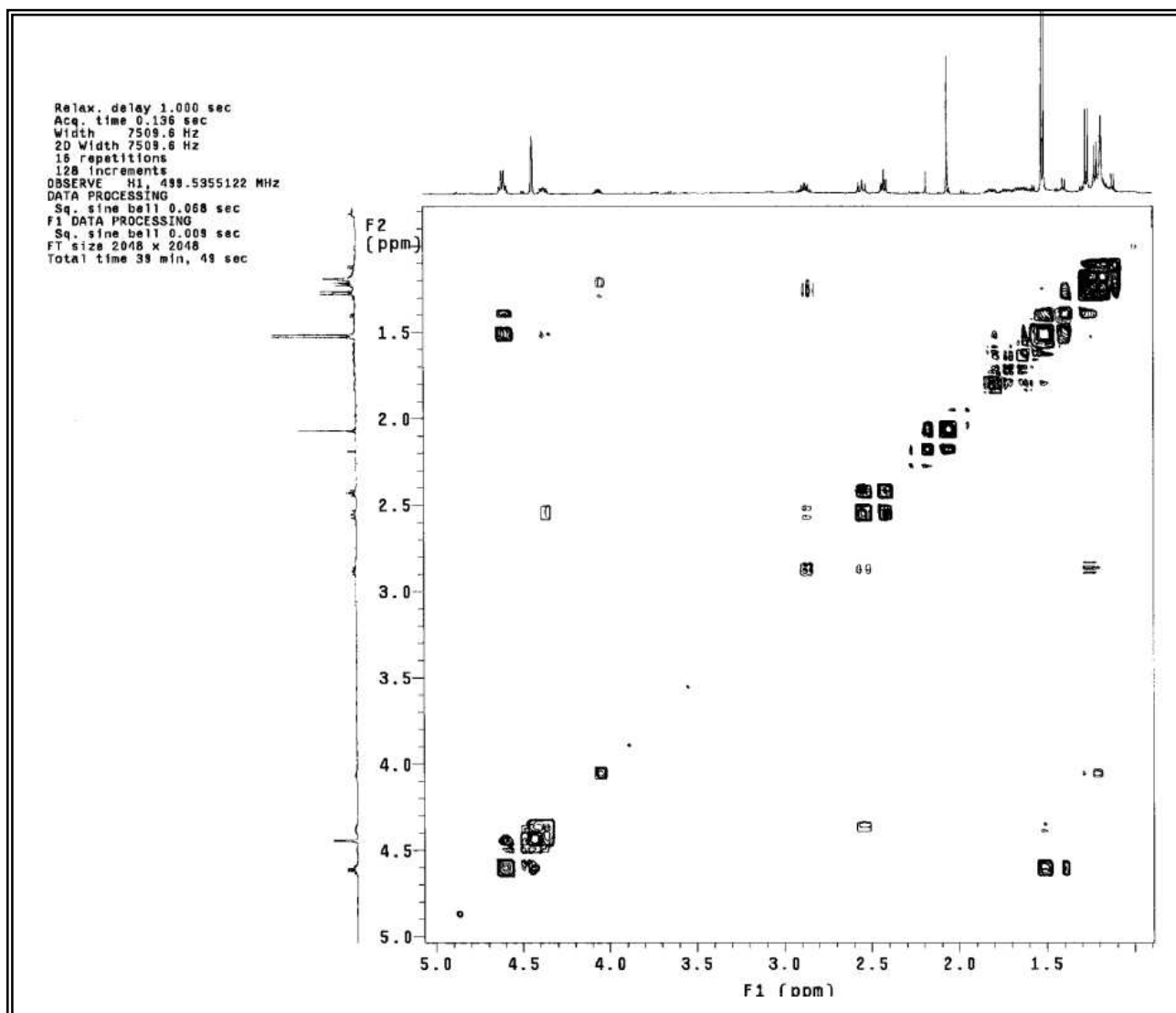
Anexo 22 - Espectro de HRESI-MS $[M-H]^-$ da substância 5



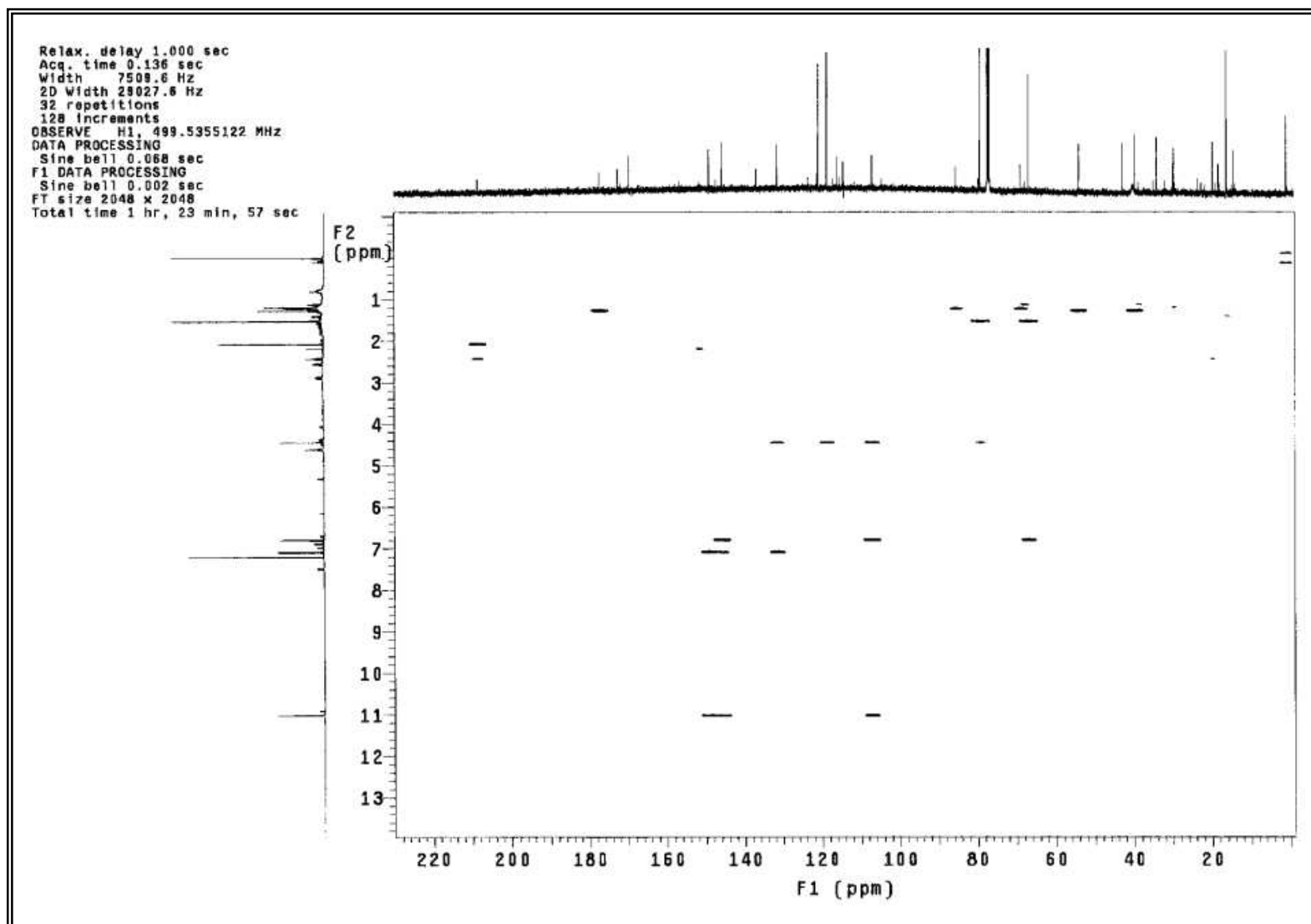
Anexo 23 - Espectro de RMN ^1H da substância **5** (CDCl_3 , 500 MHz)



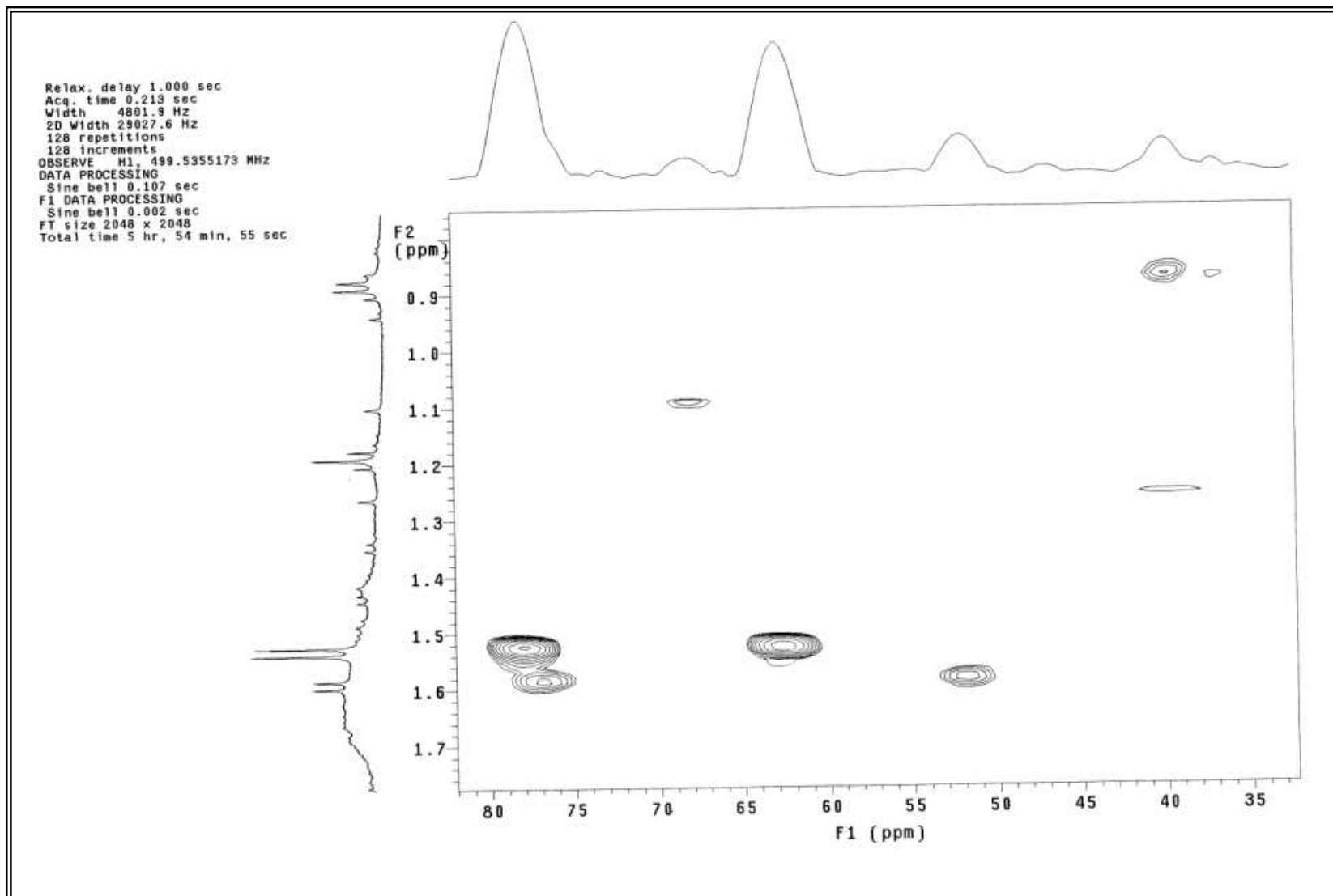
Anexo 24 - Espectro de ^{13}C da substância 5 (CDCl_3 125MHz)



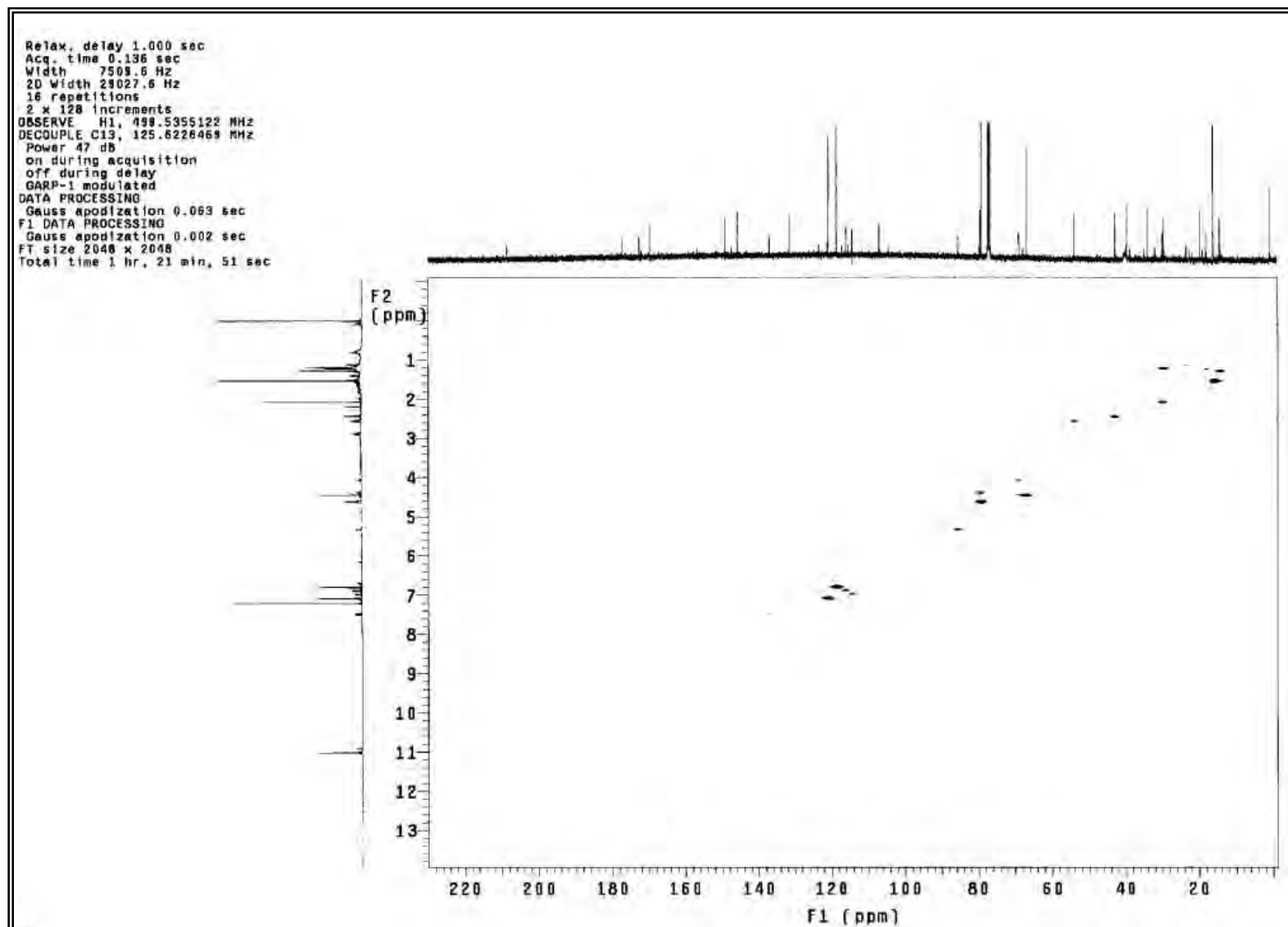
Anexo 25 - Expansão do espectro de gCOSY da substância 5 (CDCl₃, 125 MHz)



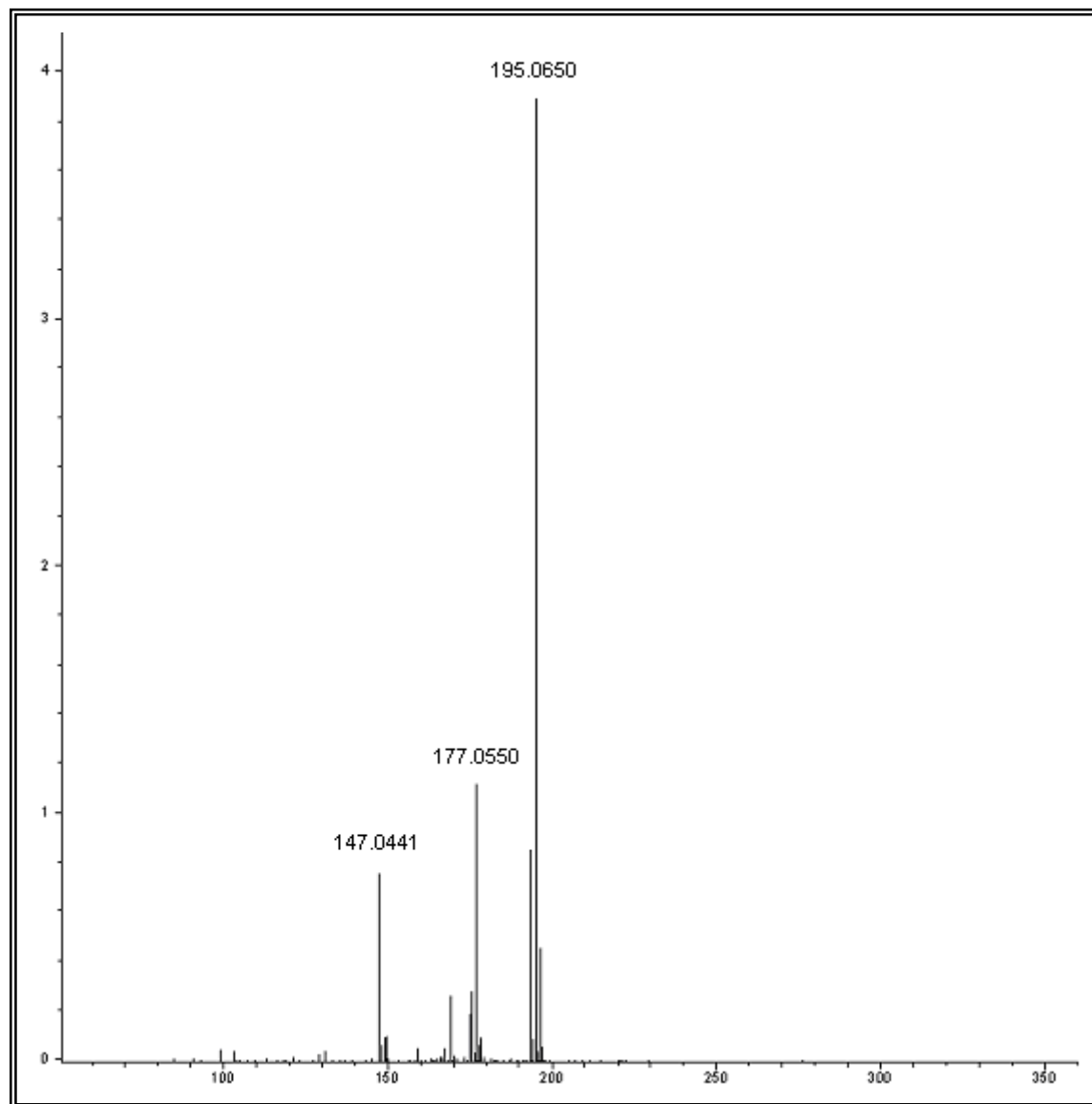
Anexo 26 - Mapa de contorno de *g*HMBC da substância 5 (CDCl₃, 125 MHz)



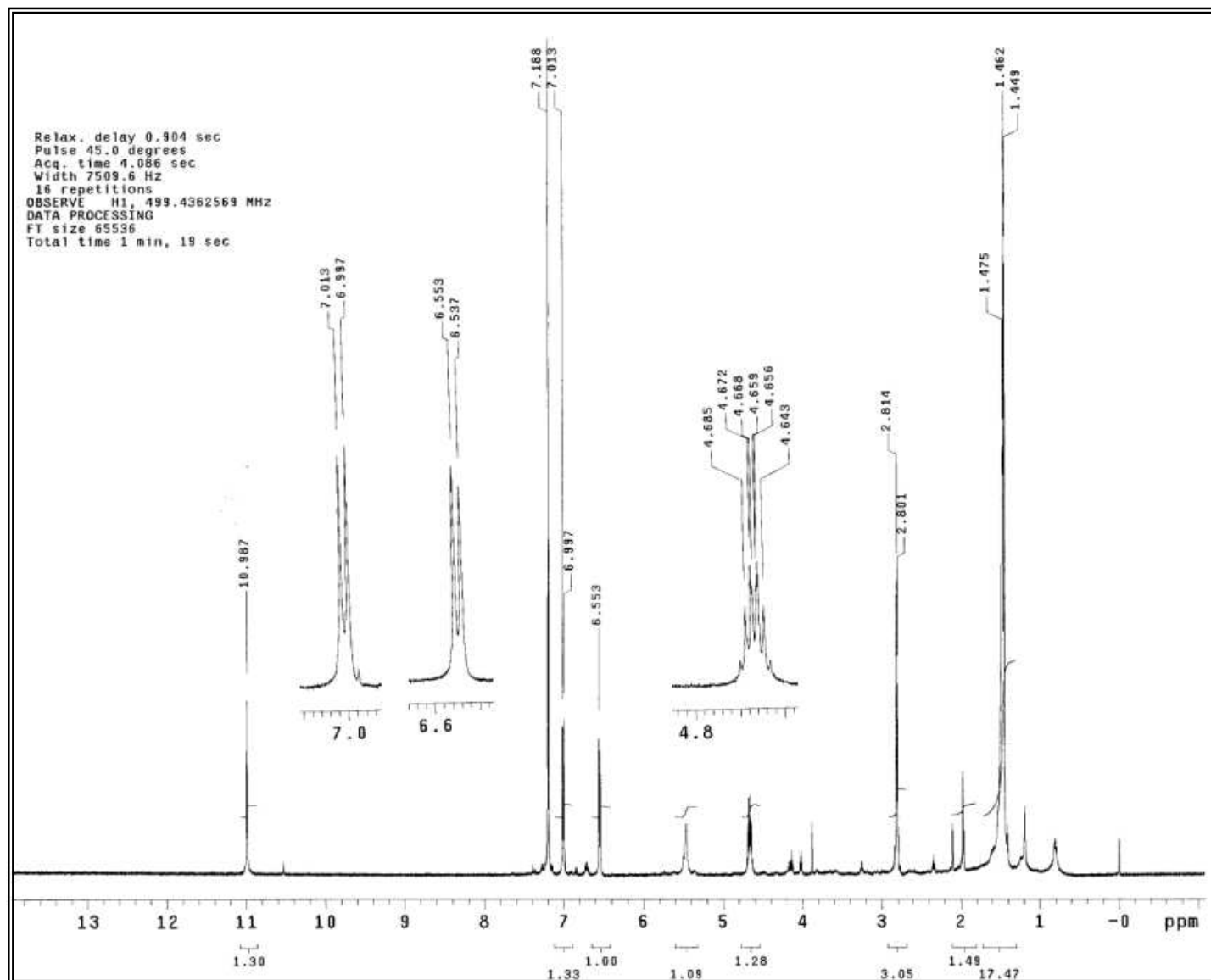
Anexo 27 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância 5 (CDCl₃, 125 MHz)



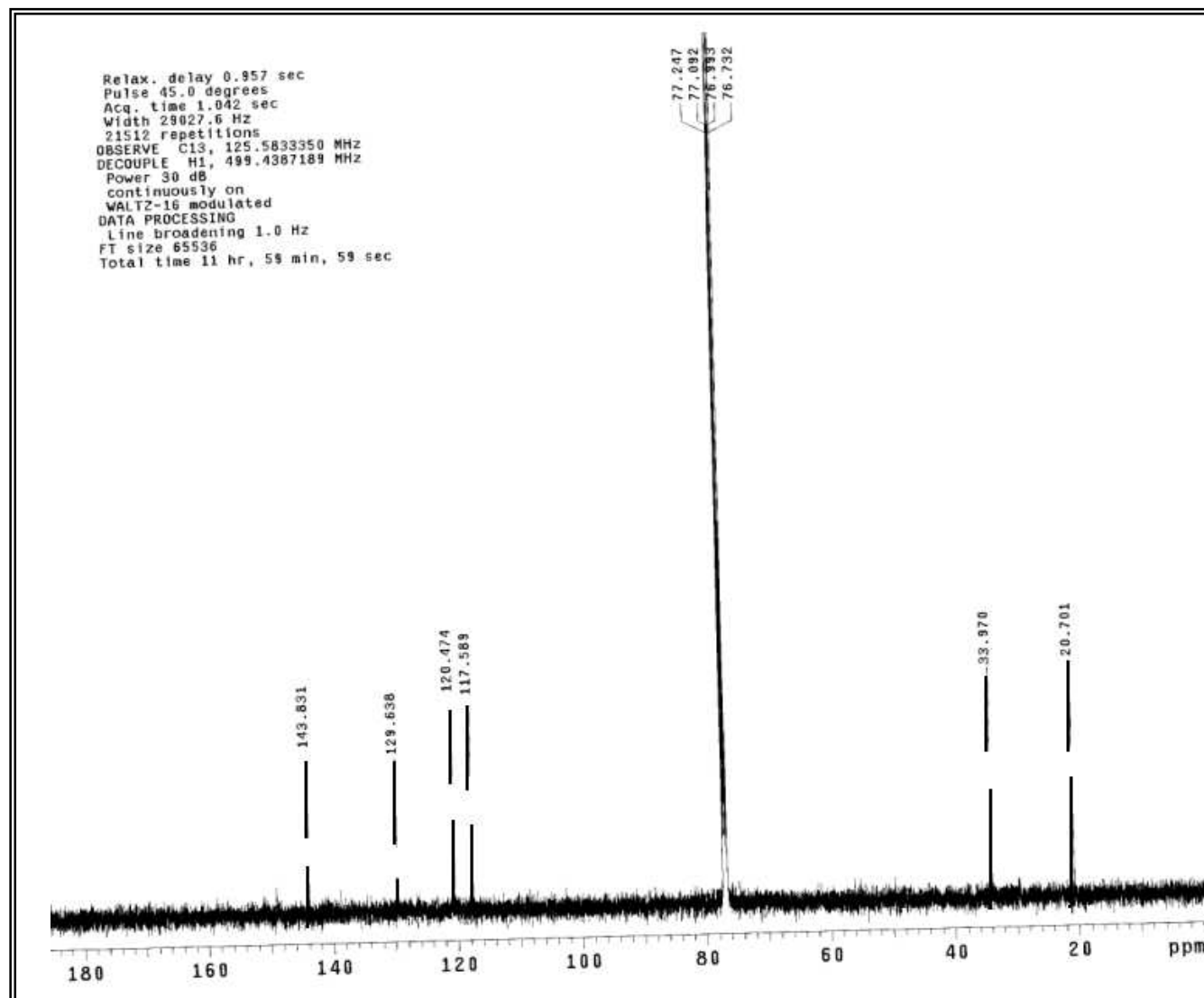
Anexo 28 - Mapa de contorno de gHMQC da substância 5 (CDCl₃, 125 MHz)



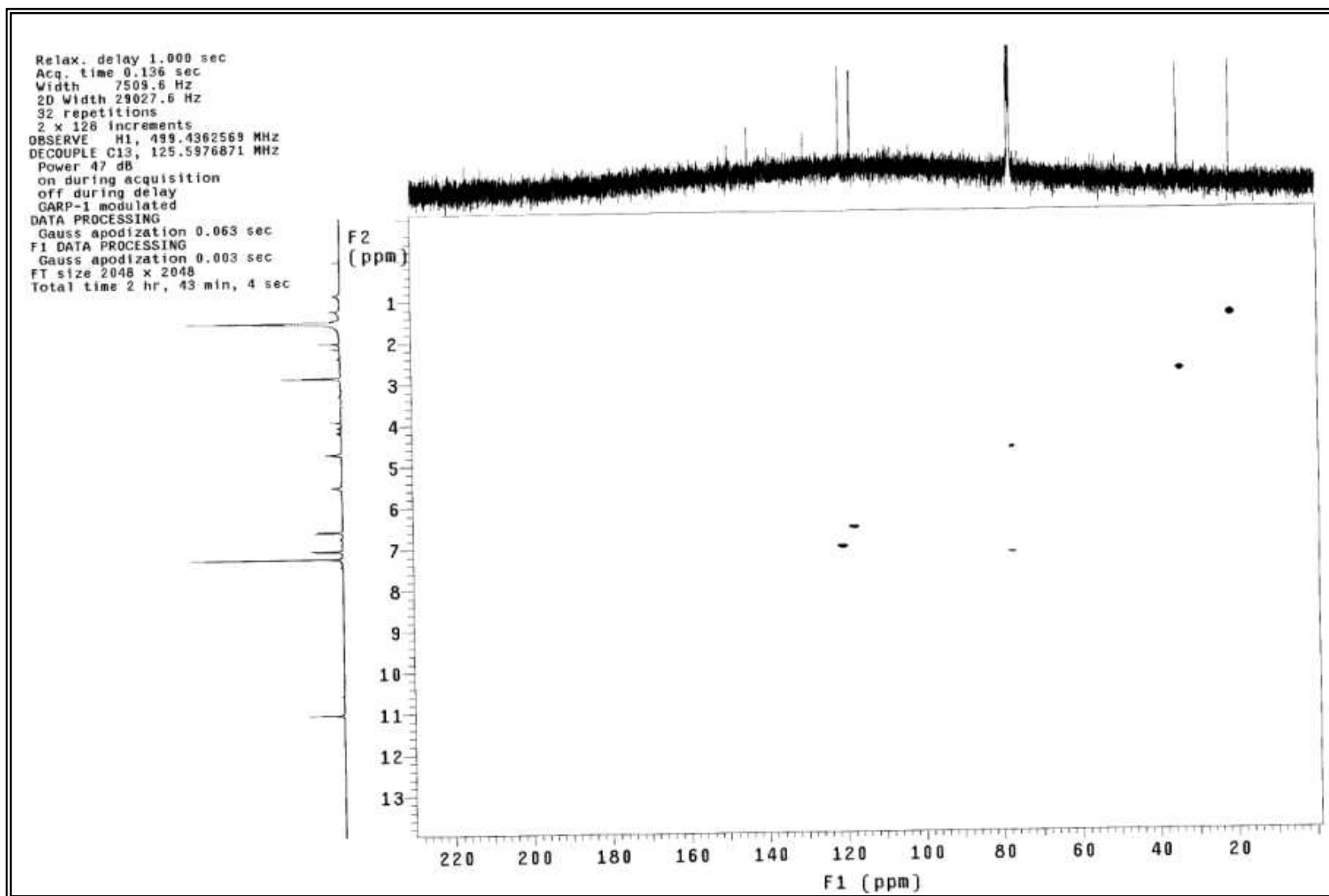
Anexo 29 - Espectro de HRESI-MS $[M-H]^-$ da substância **6**



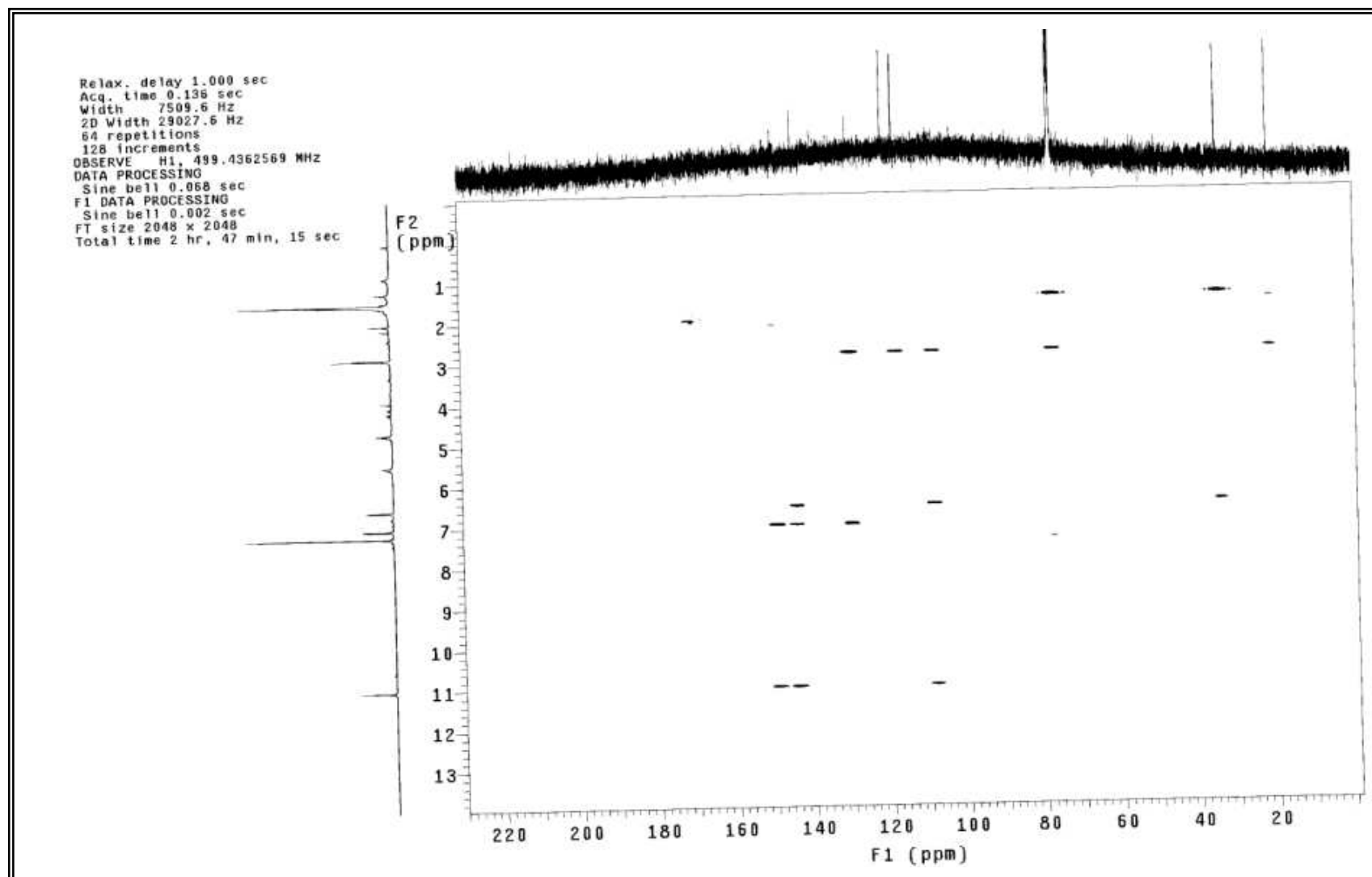
Anexo 30 - Espectro de RMN H da substância **6** (CDCl₃, 500 MHz)



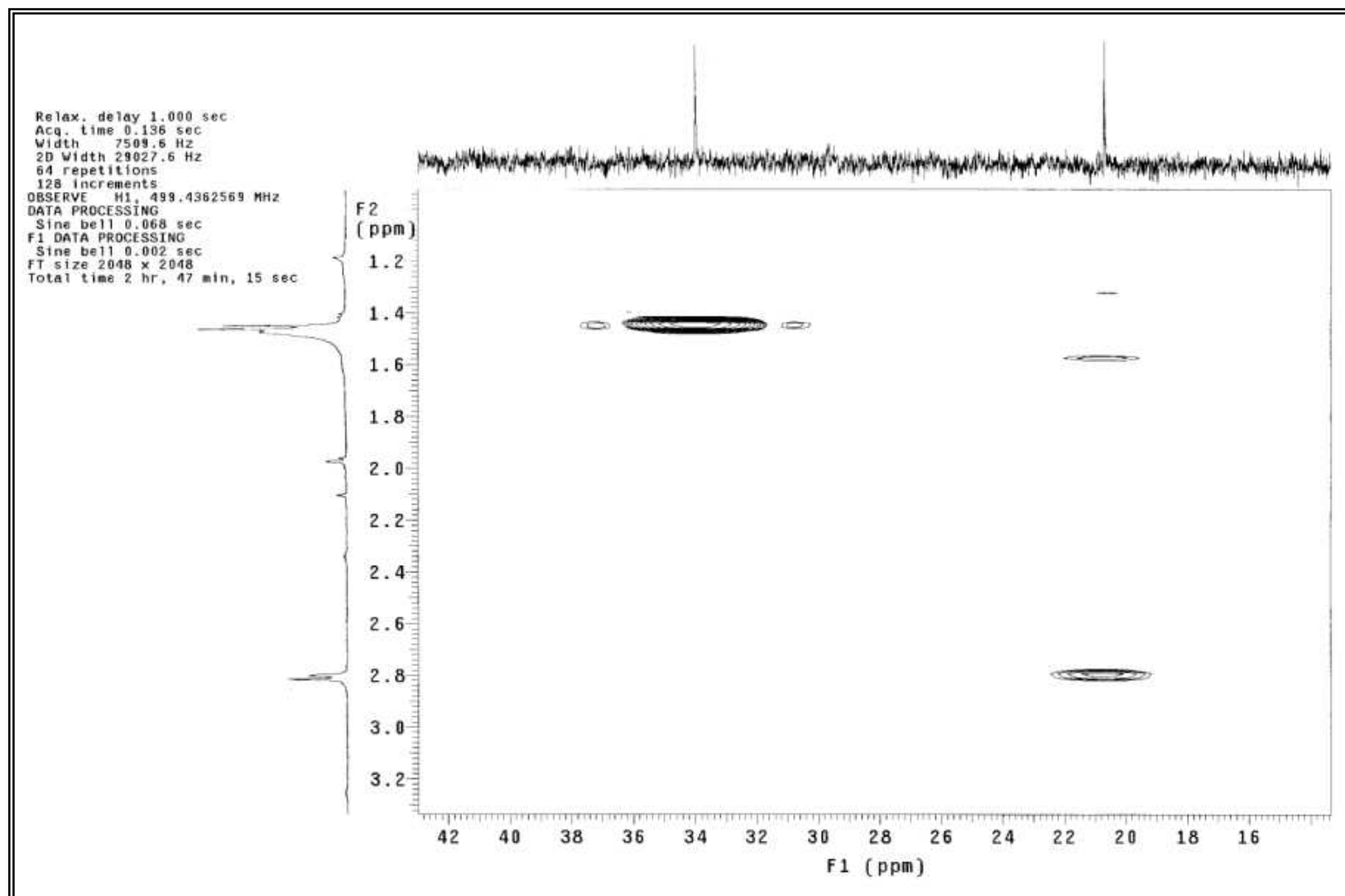
Anexo 31 - Espectro de ^{13}C da substância 6 (CDCl_3 125MHz)



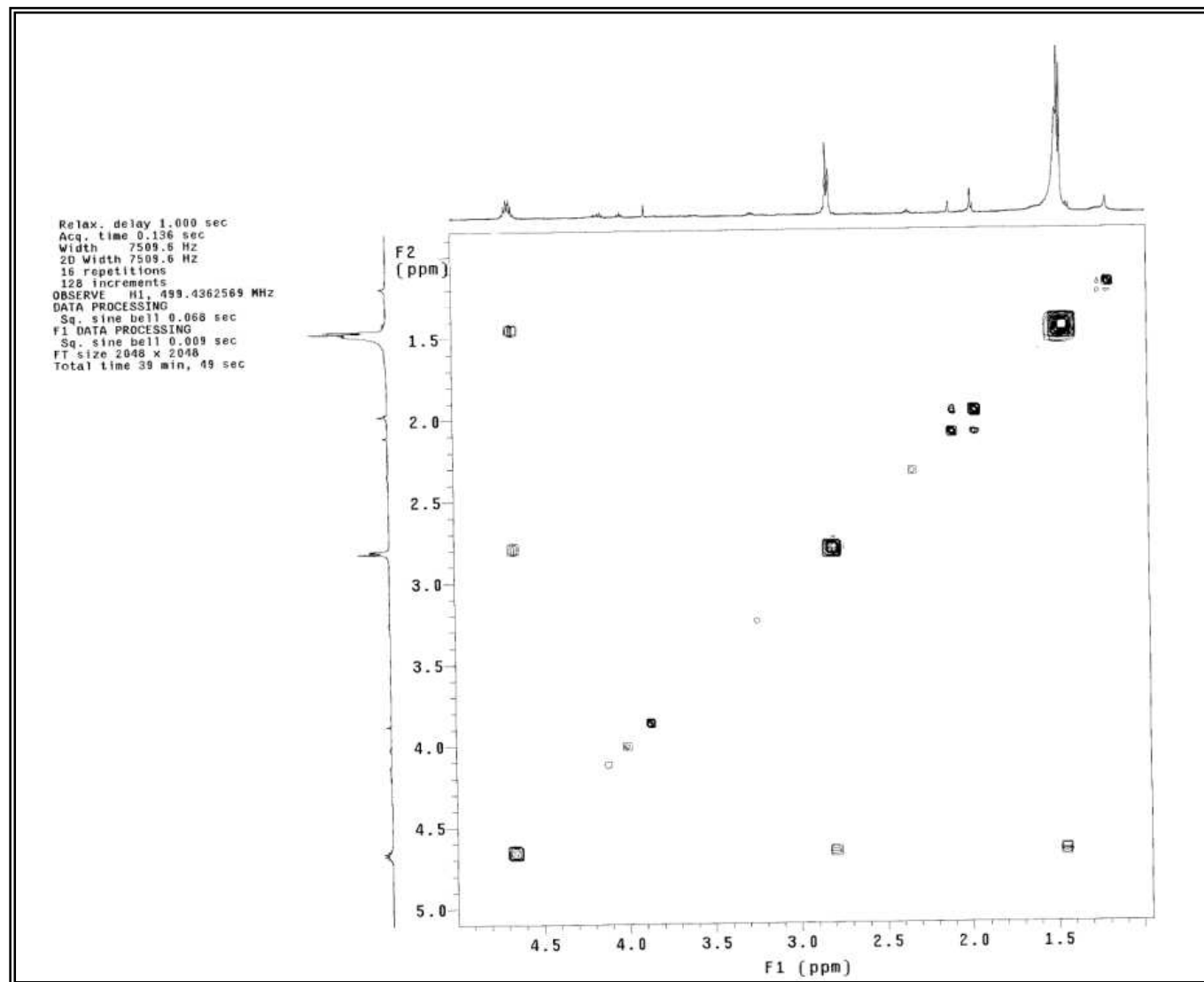
Anexo 32 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 6 (CDCl₃, 125 MHz)



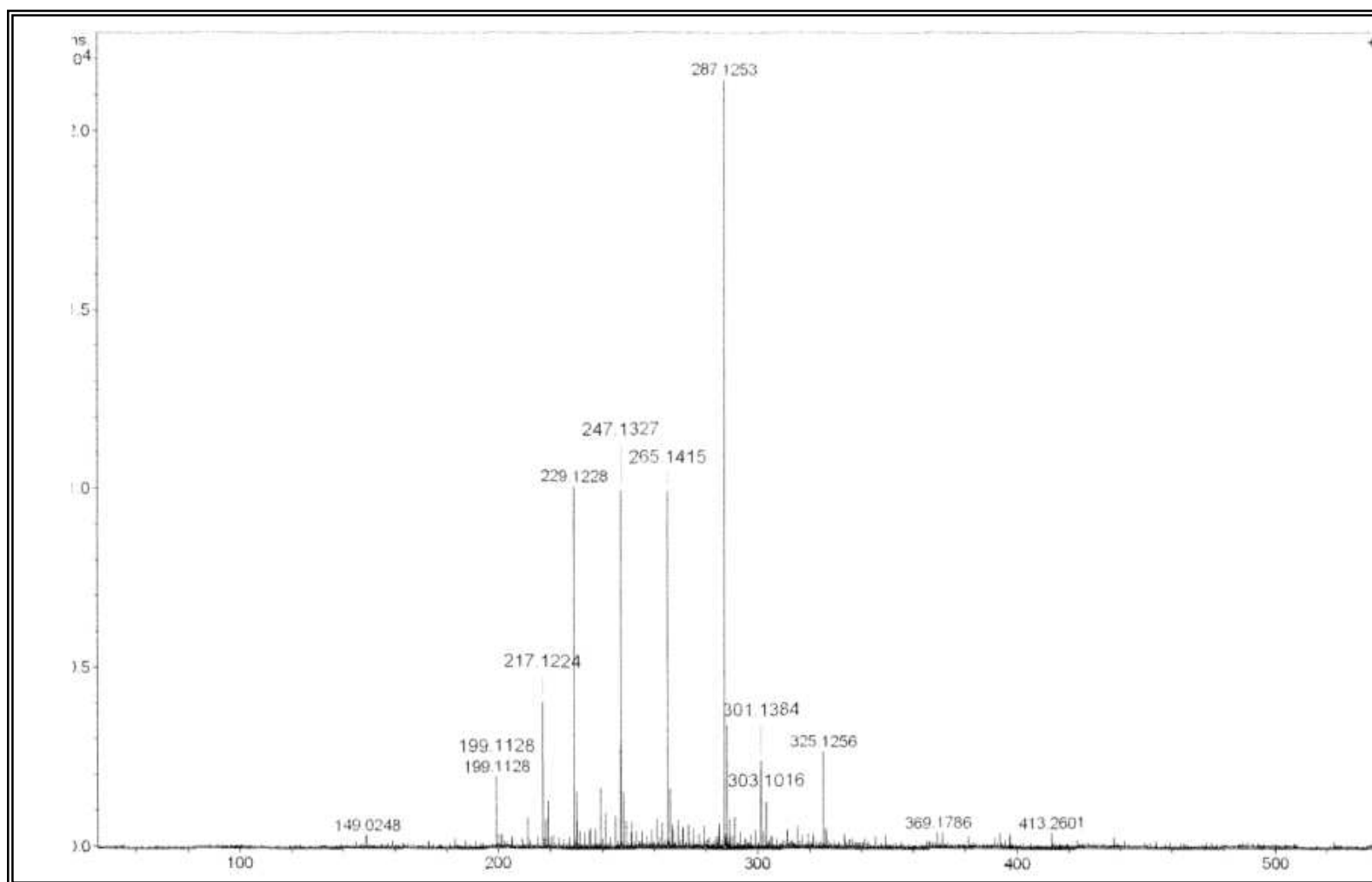
Anexo 33 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 6 (CDCl₃, 125 MHz)



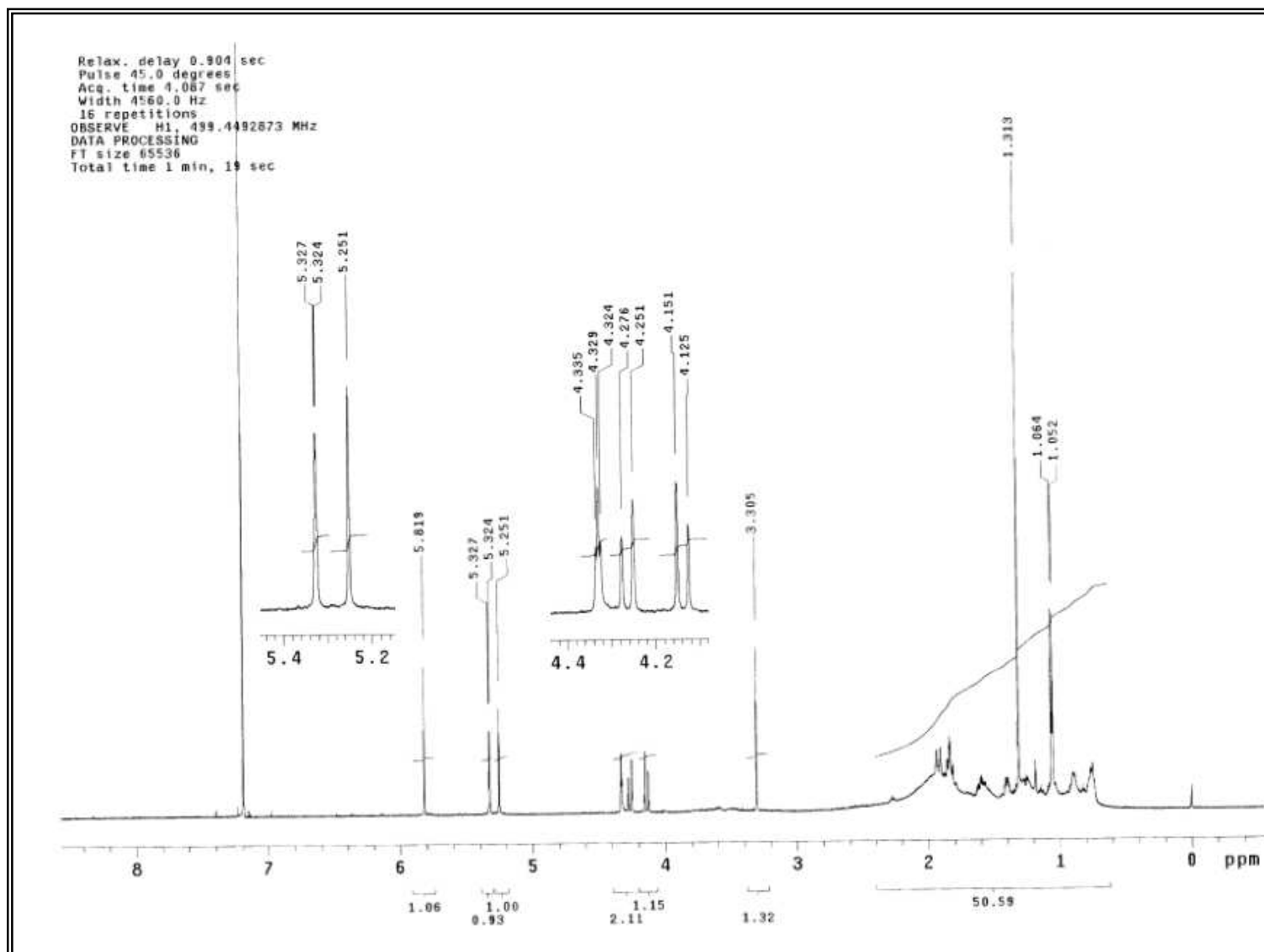
Anexo 34 - Expansão do mapa de contorno de *g*HMBC da substância **6** (CDCl₃, 125 MHz)



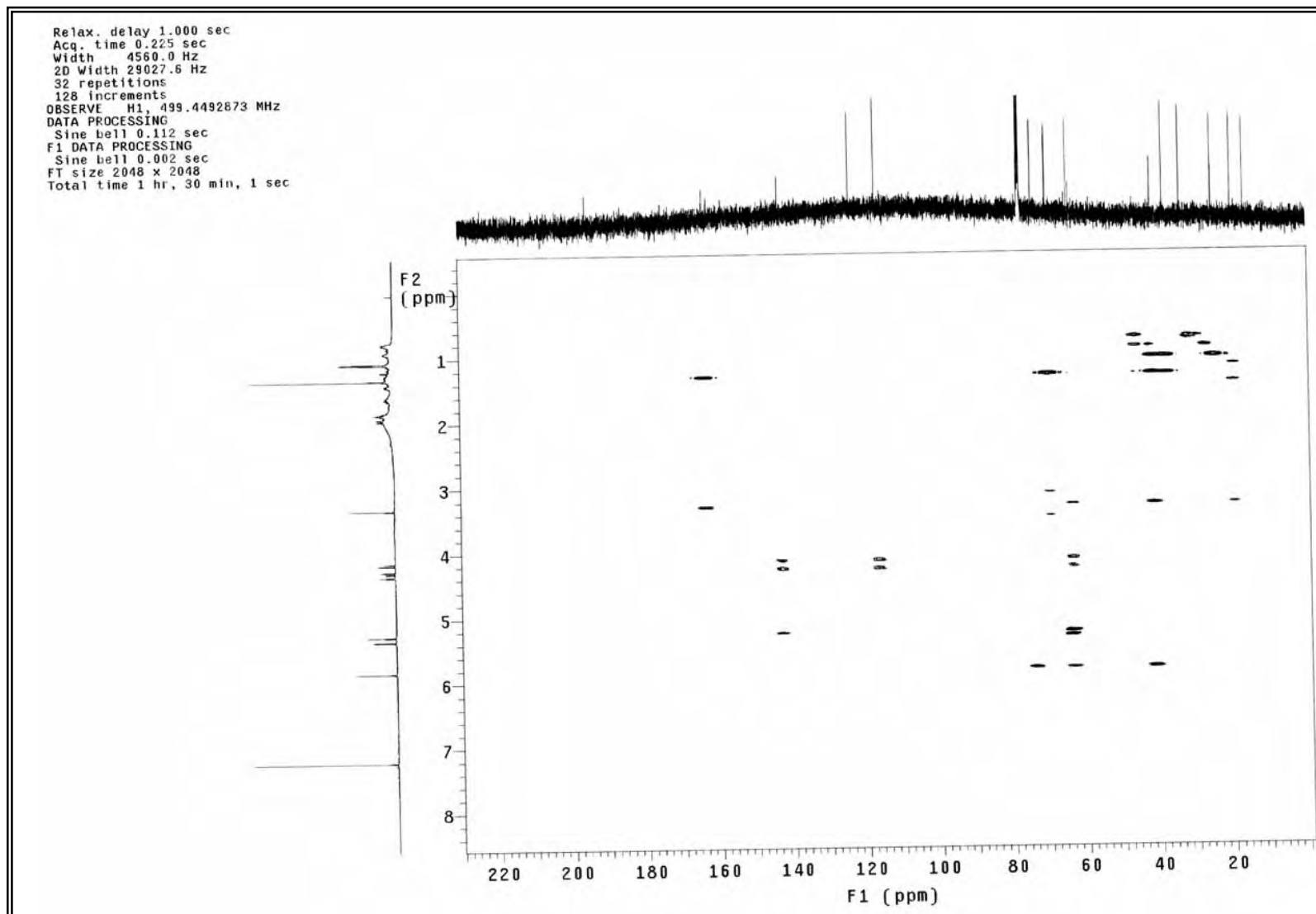
Anexo 35 - Expansão do espectro de gCOSY da substância **6** (CDCl₃, 125 MHz)



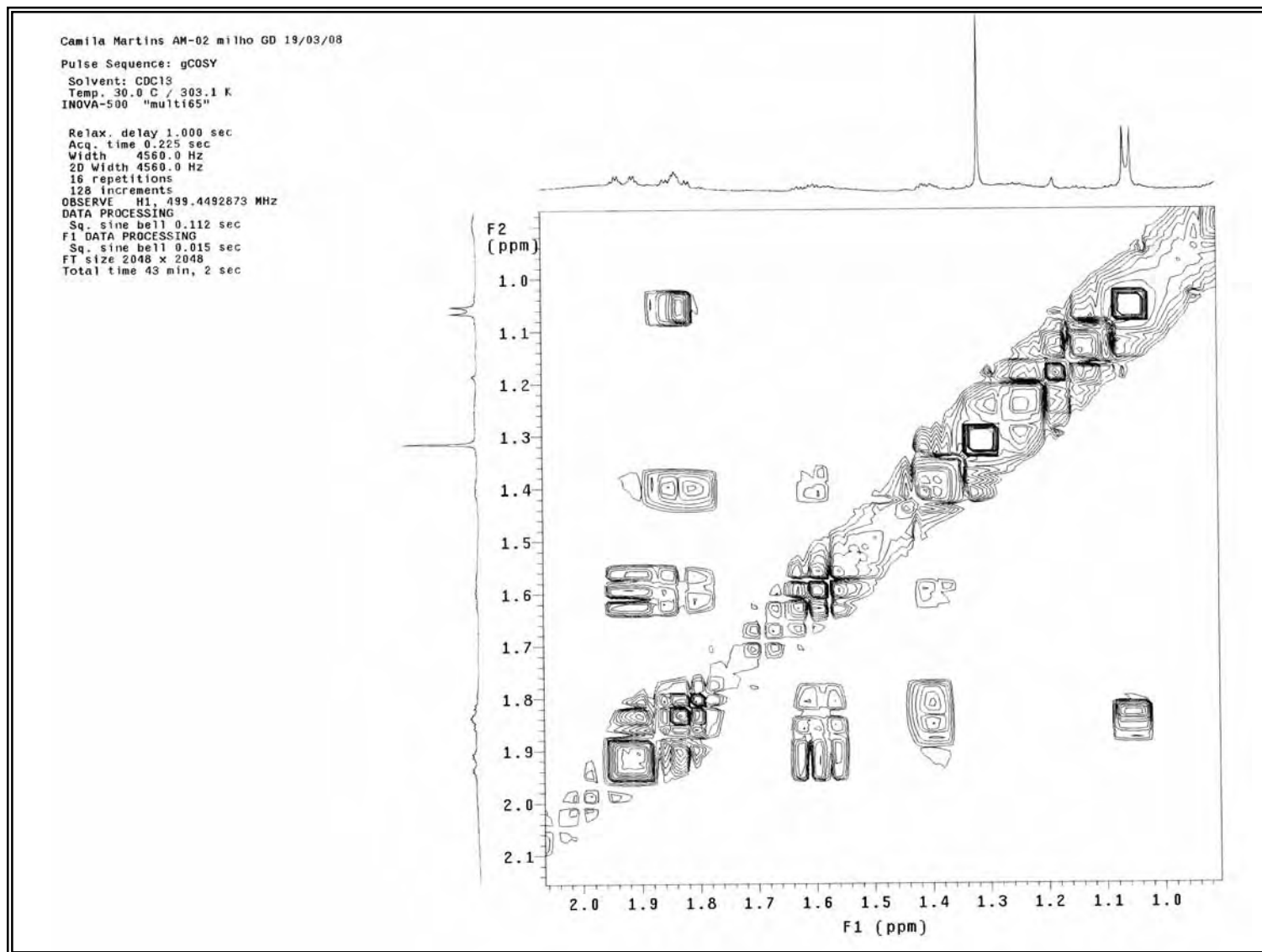
Anexo 36 - Espectro de HRESI-MS $[M+Na]^+$ da substância Z



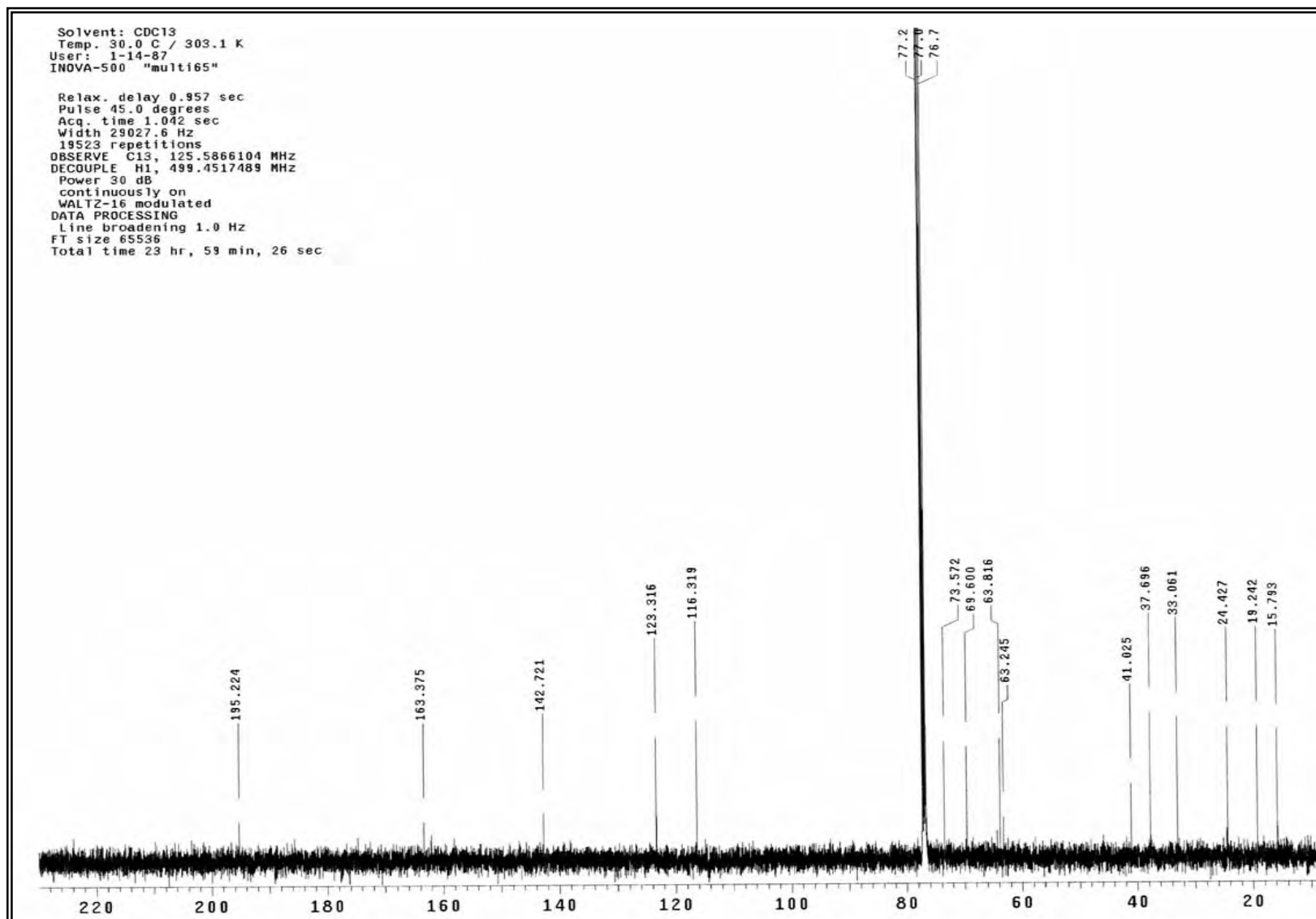
Anexo 37 - Espectro de RMN ^1H da substância **7** (CDCl_3 , 500 MHz)



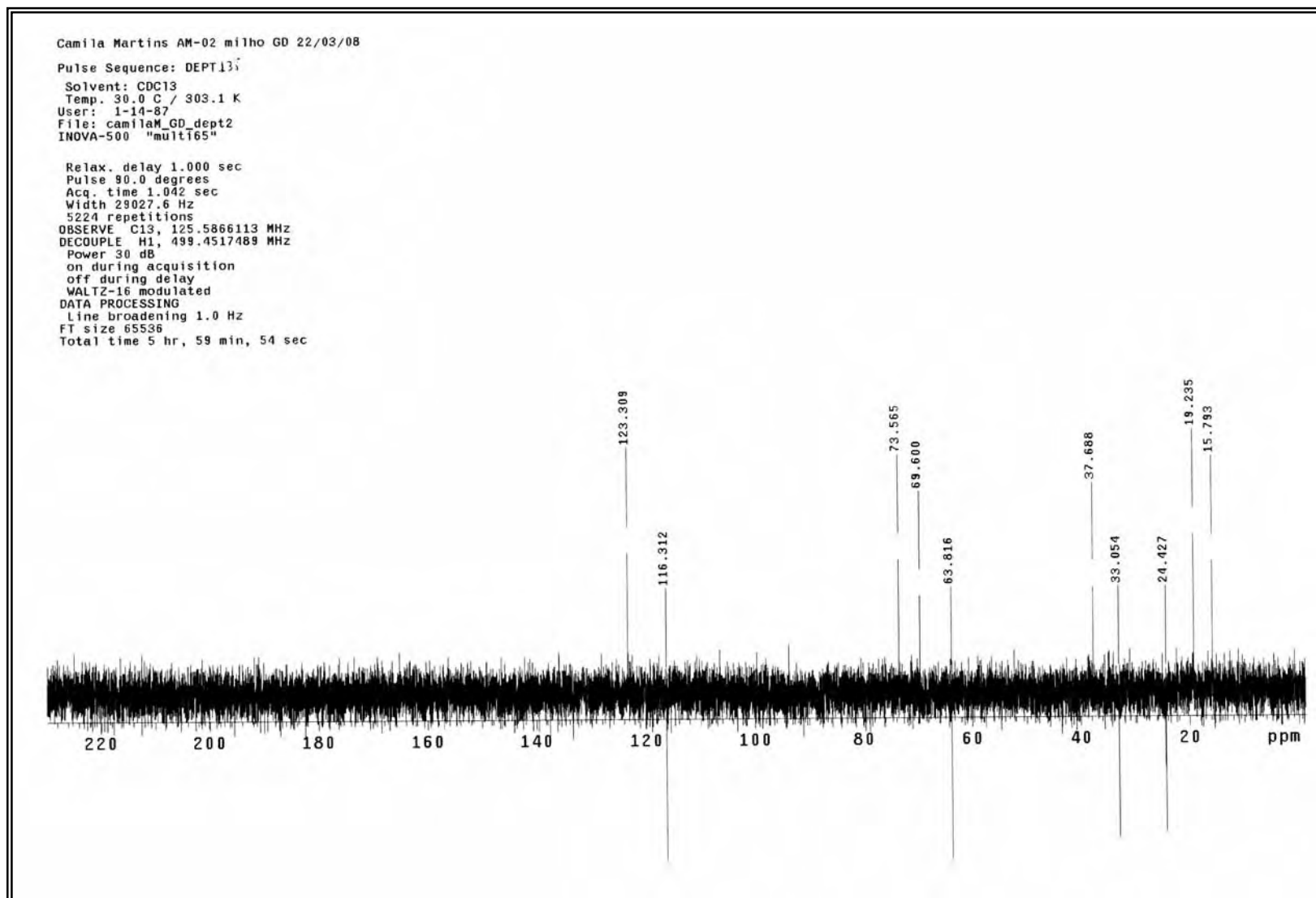
Anexo 38 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 7 (CDCl₃, 125 MHz)



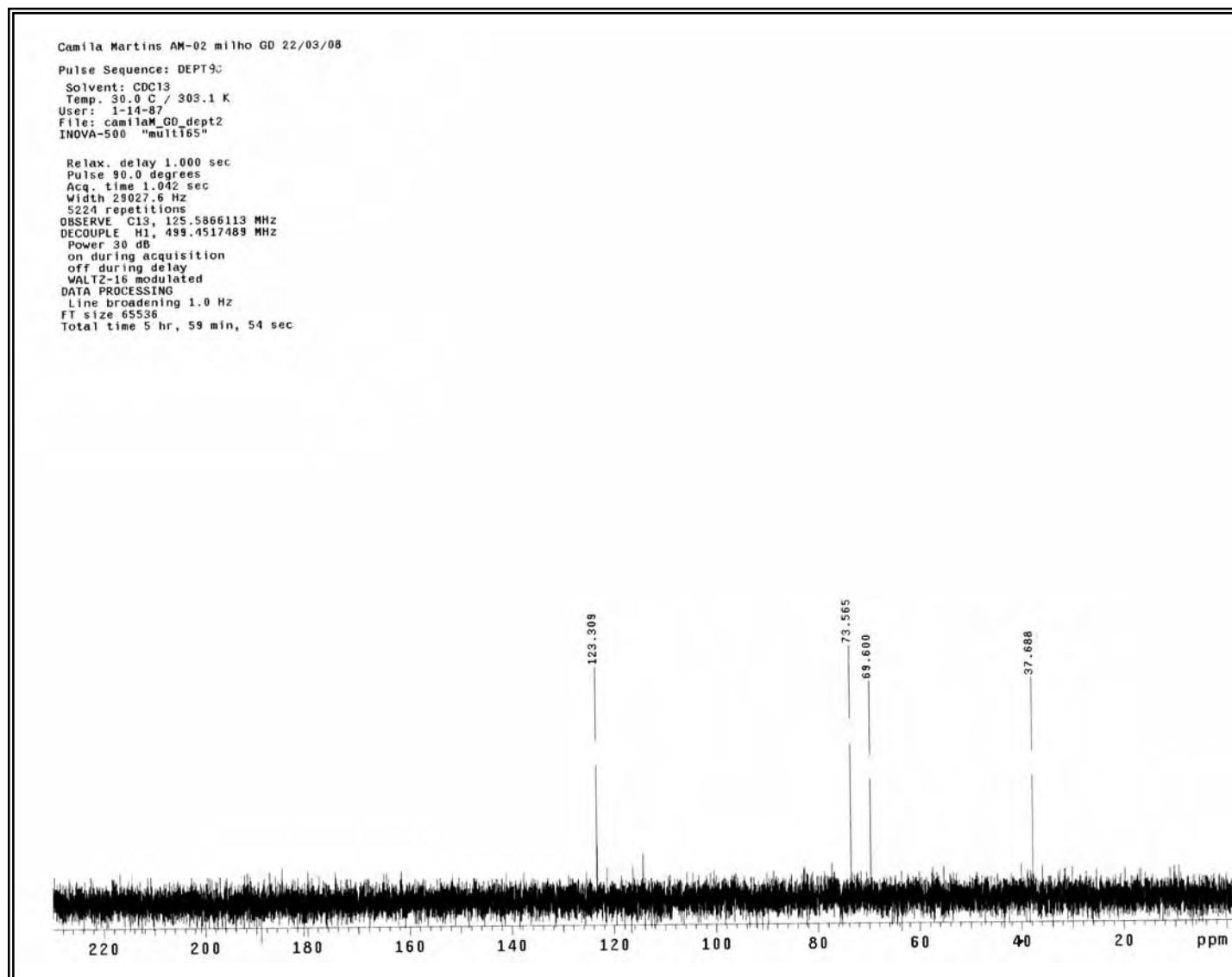
Anexo 39 – Expansão do espectro de gCOSY da substância 7 (CDCl₃, 125 MHz)



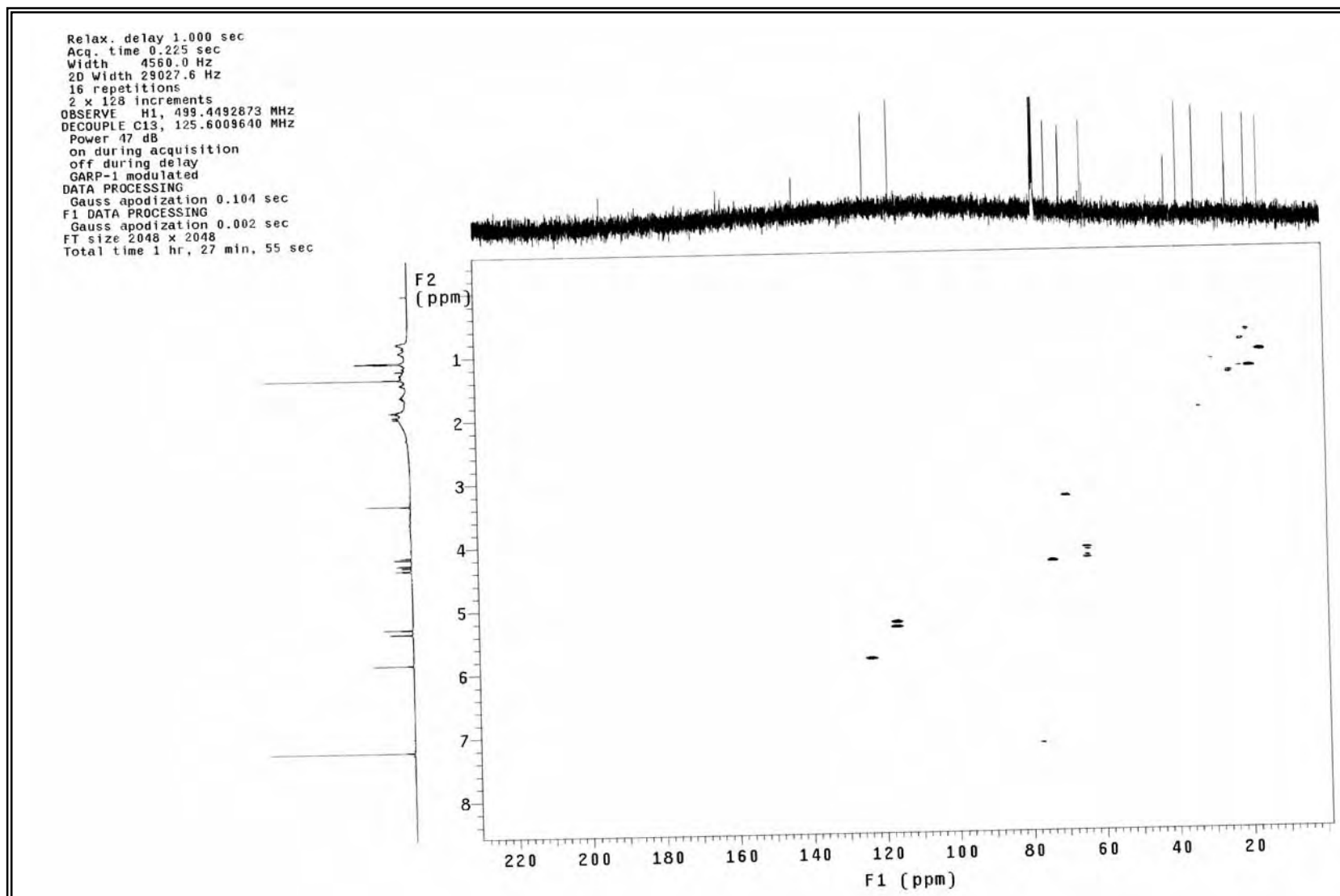
Anexo 40 - Espectro de ¹³C da substância 7 (CDCl₃ 125MHz)



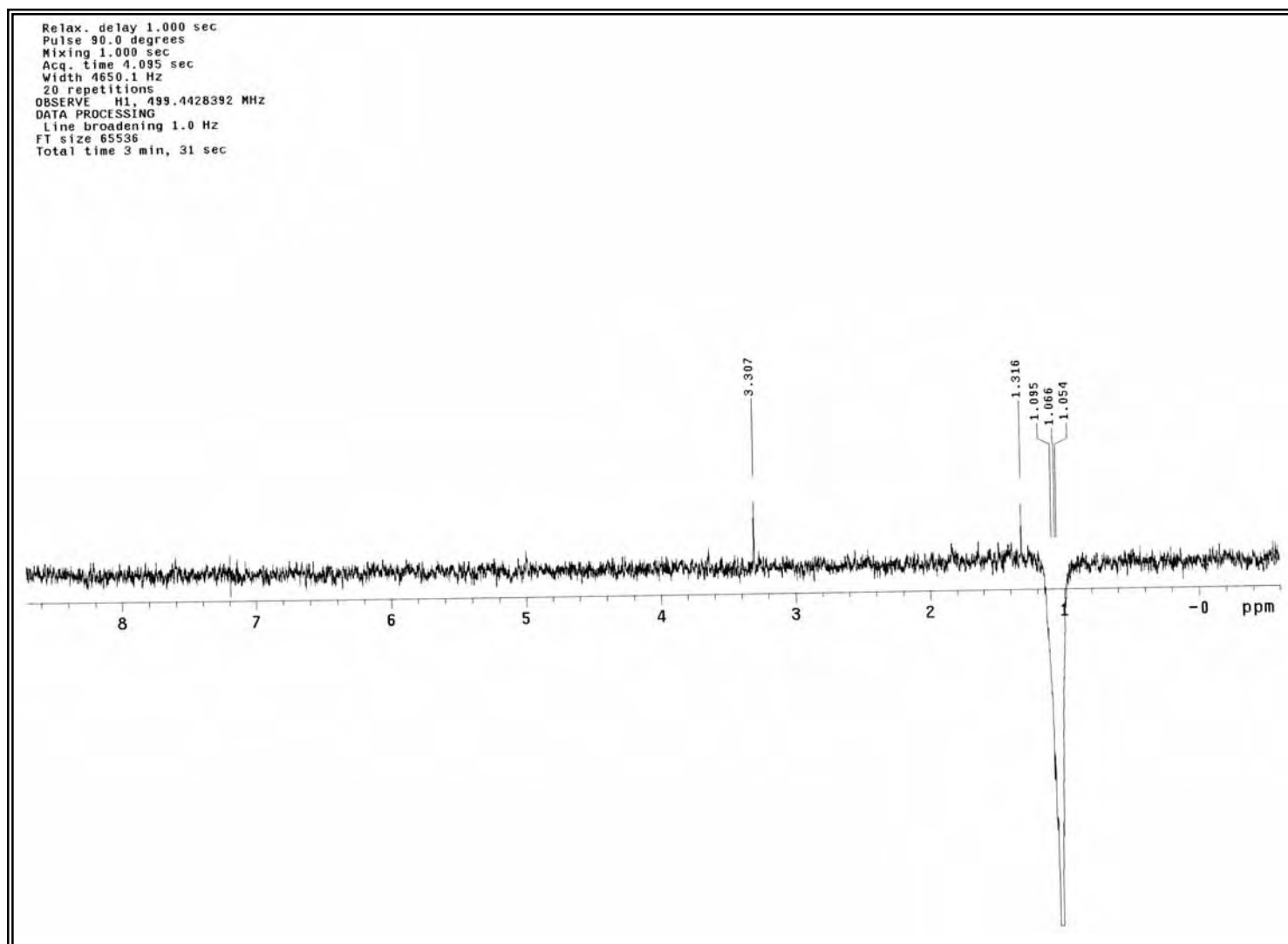
Anexo 41 - Espectro de DEPT-135 da substância 7



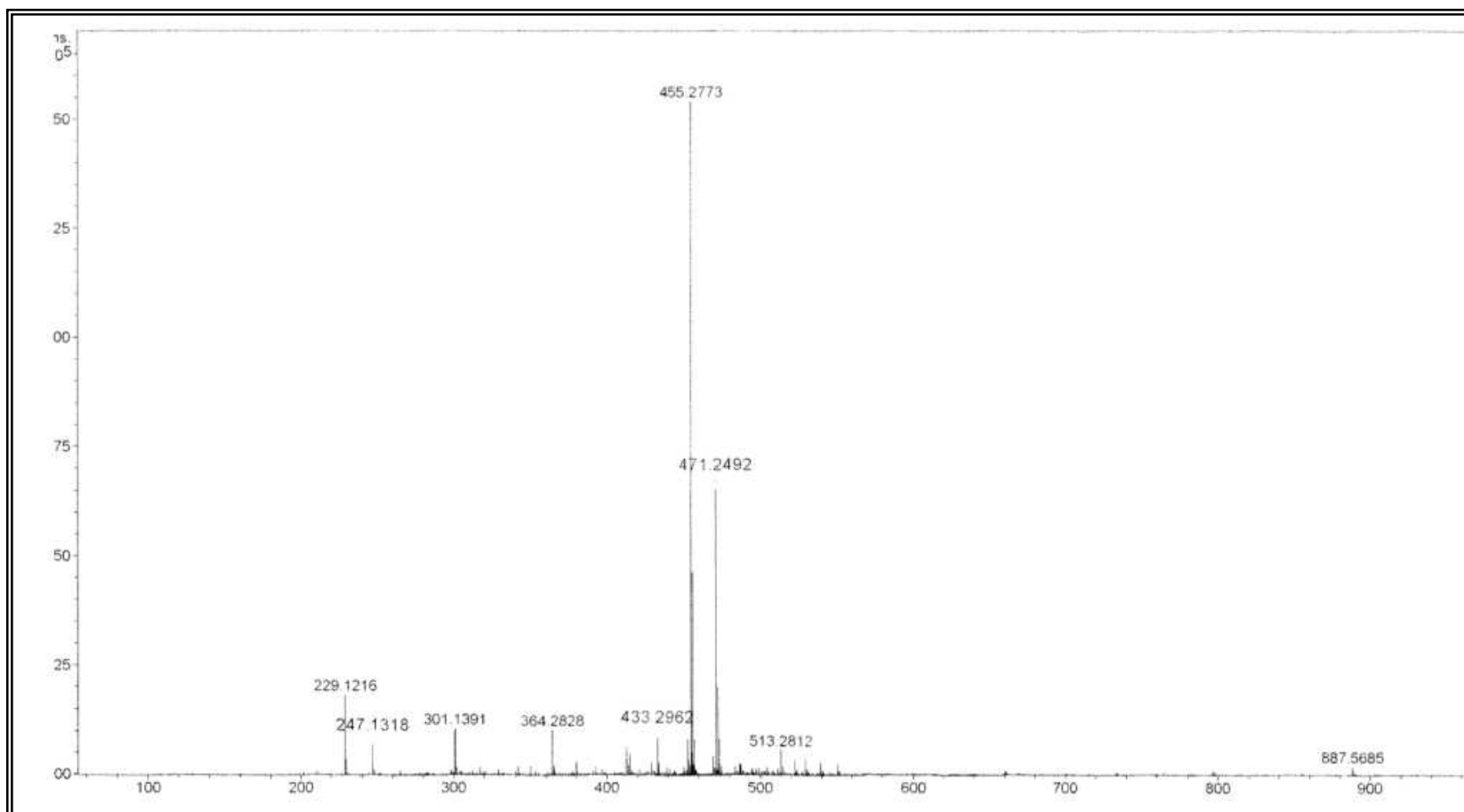
Anexo 42 - Espectro de DEPT-90 da substância 7



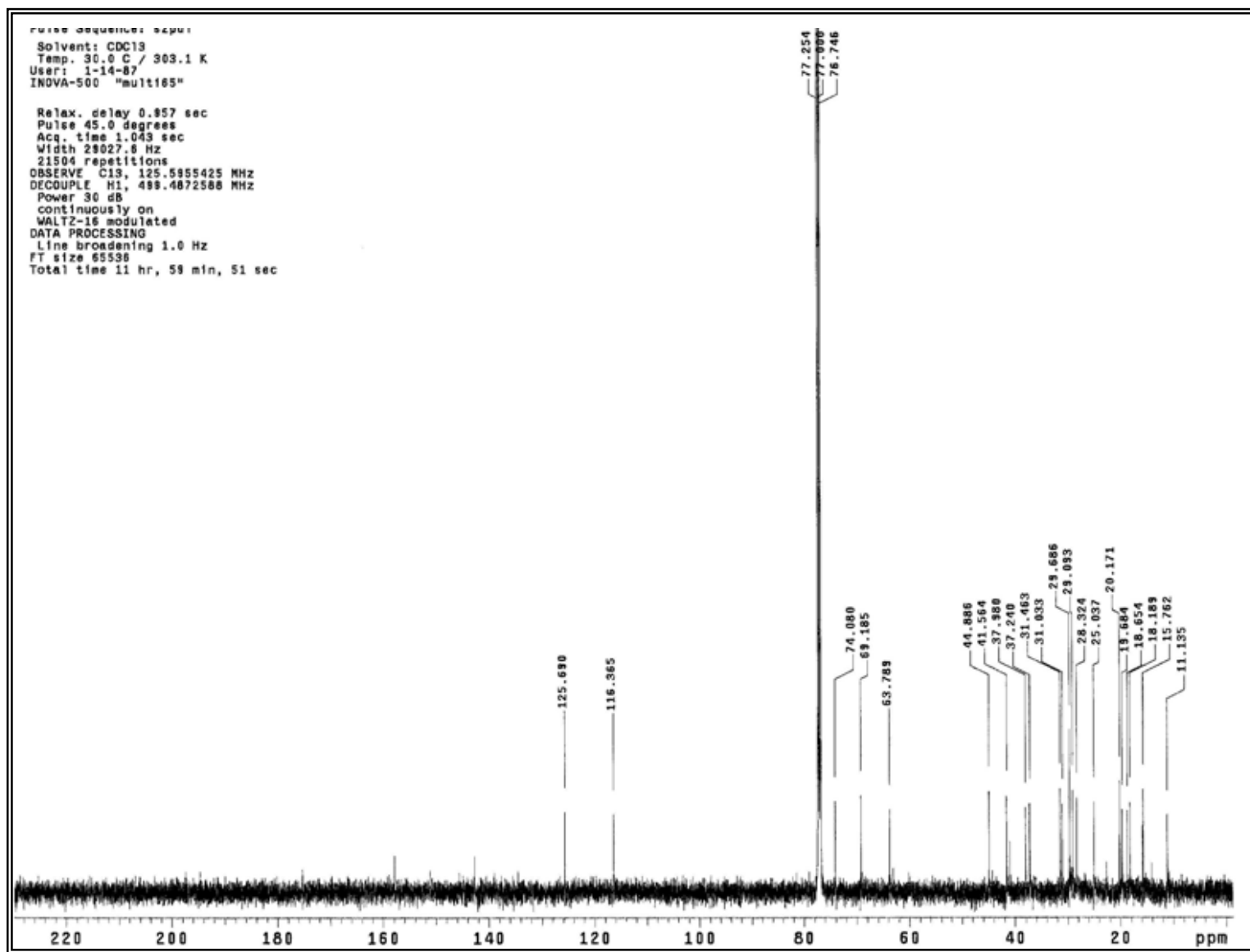
Anexo 43 - Mapa de contorno de gHMQC da substância 7 (CDCl₃, 125 MHz)



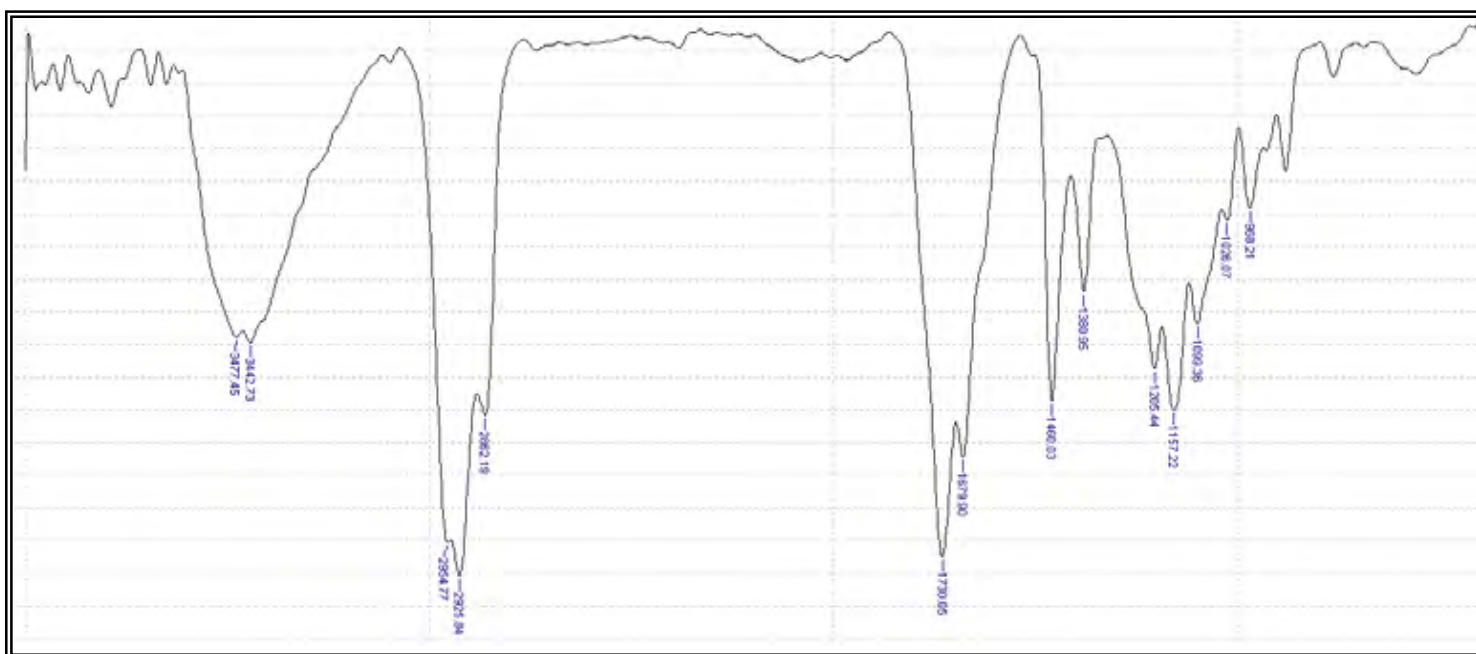
Anexo 44 - Espectro de NOESY 1D da substância **7** (CDCl₃, 125 MHz), hidrogênio irradiado H-15



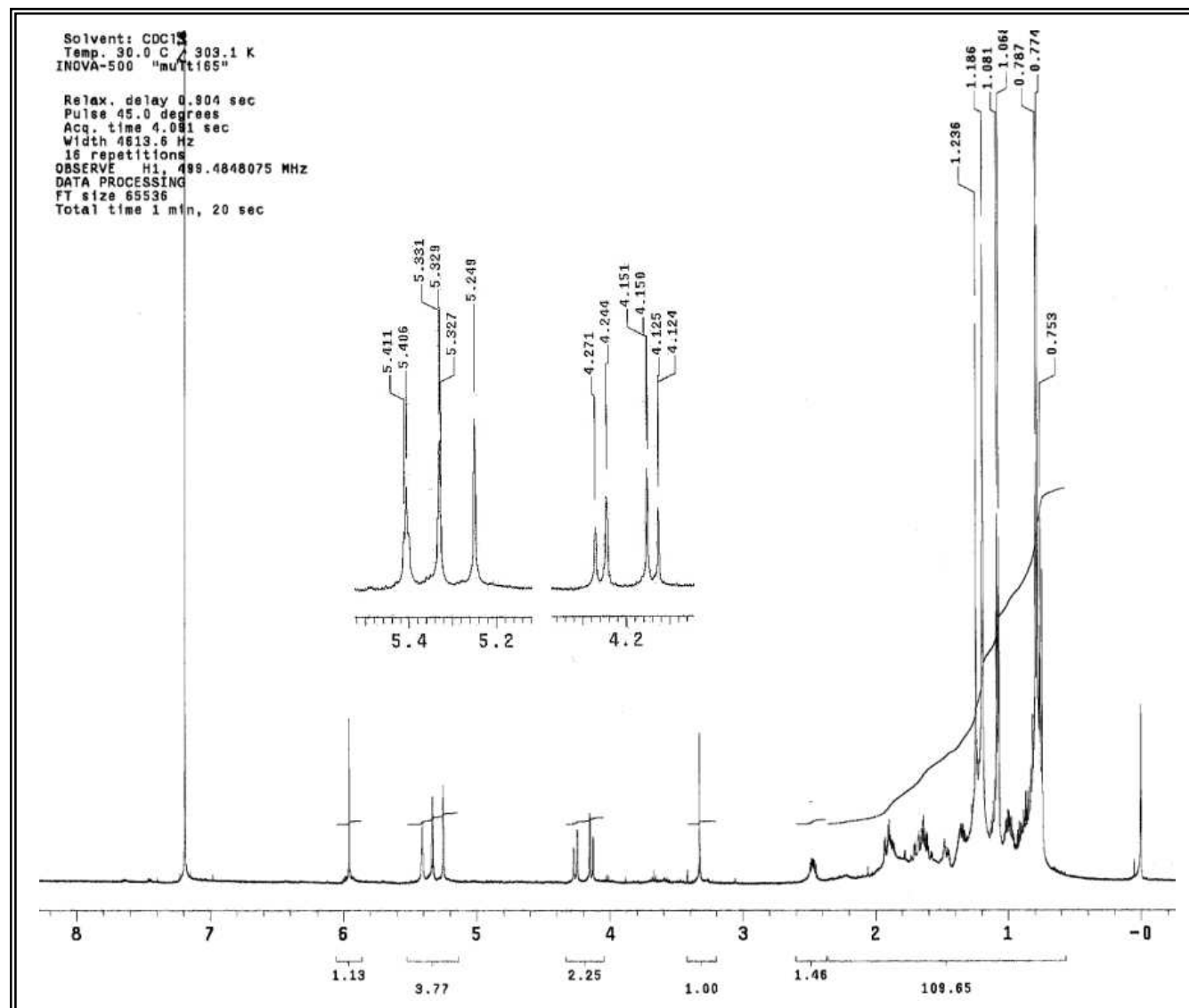
Anexo 45 - Espectro de HRESI-MS $[M+Na]^+$ da substância **8**



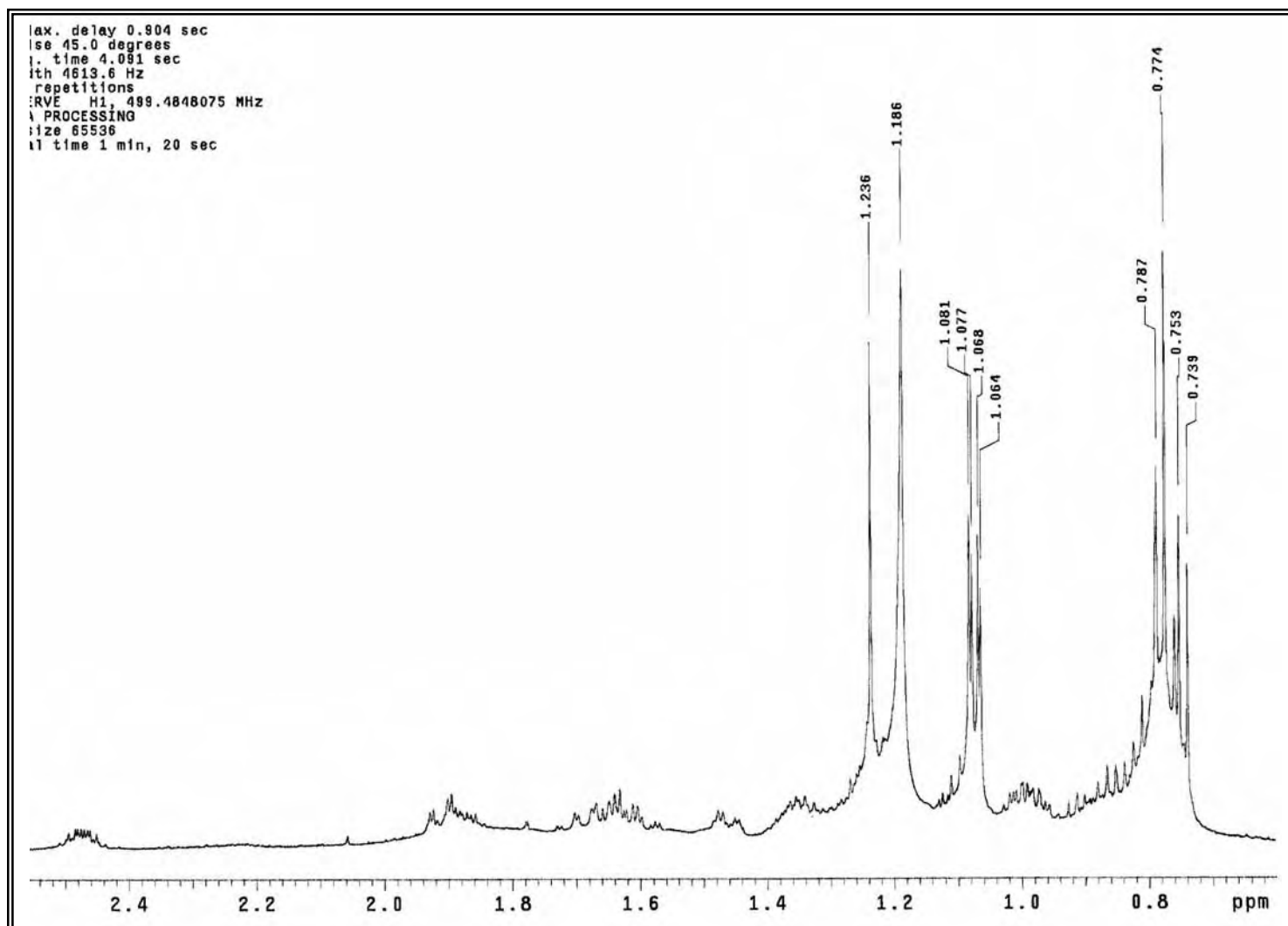
Anexo 46 - Espectro de ^{13}C da substância **8** (CDCl_3 125MHz)



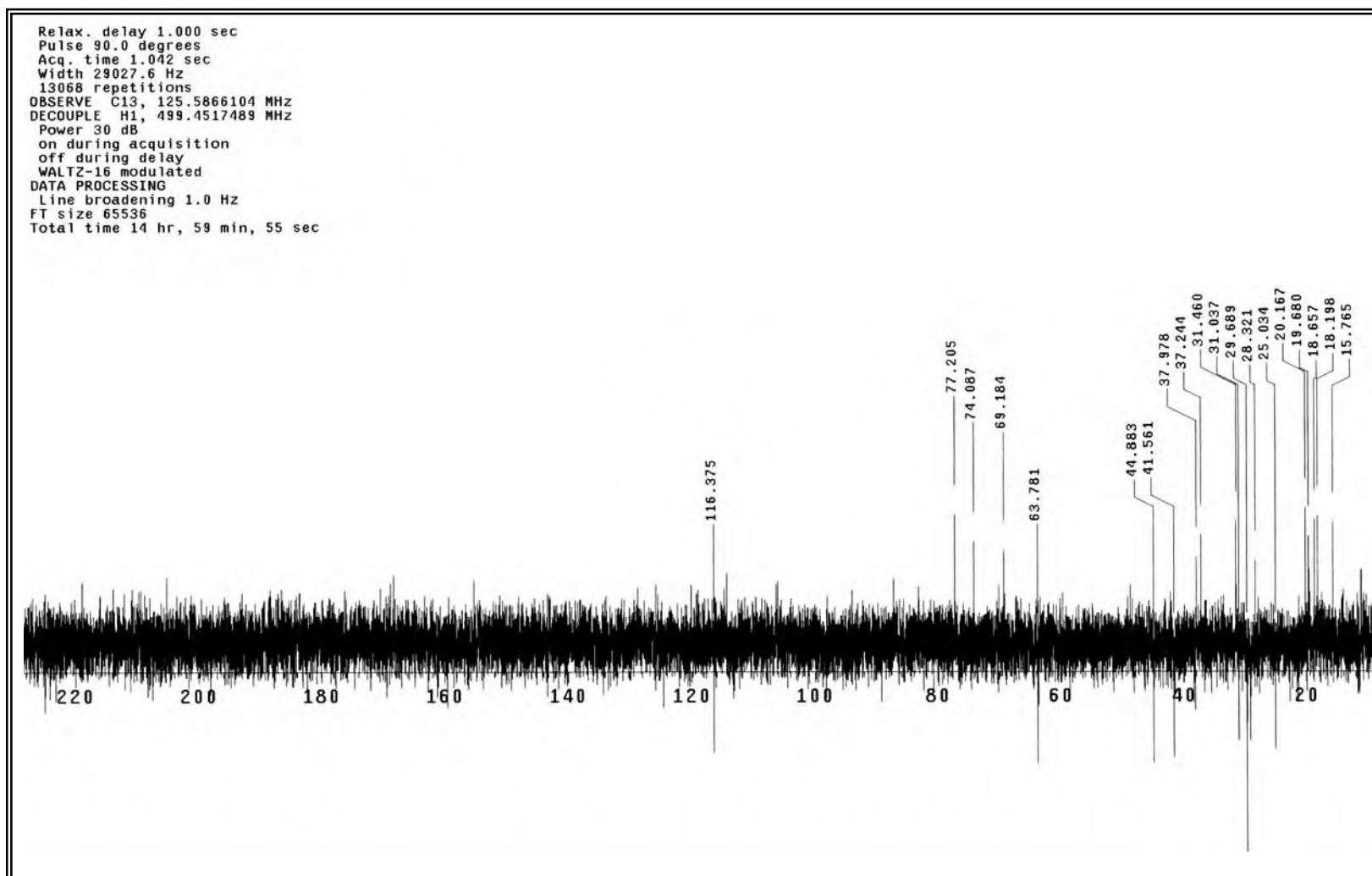
Anexo 47 - Espectro no UV visível e Espectro de Infra Vermelho da substância **8**



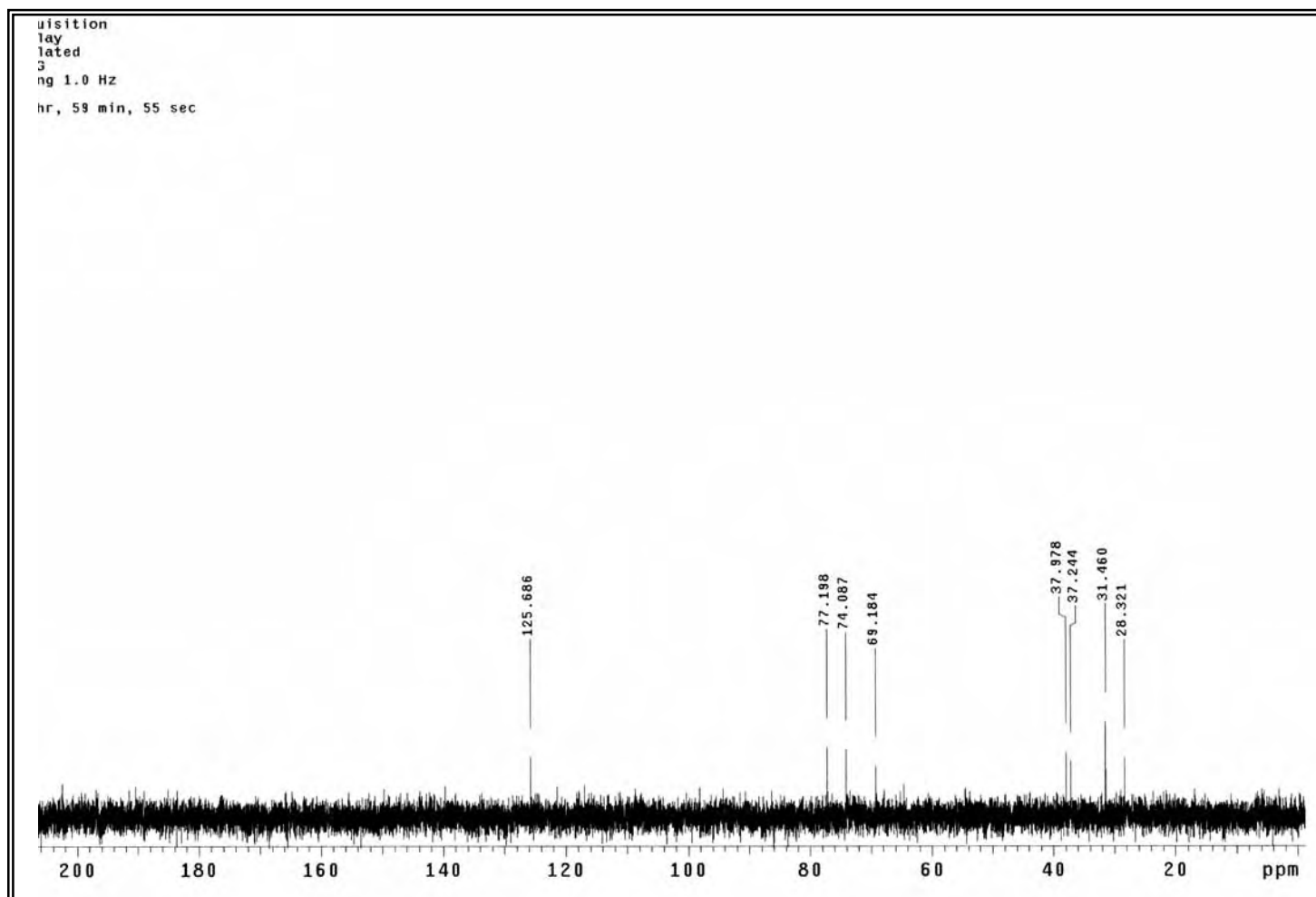
Anexo 48 - Espectro de RMN ¹H da substância **8** (CDCl₃, 500 MHz).



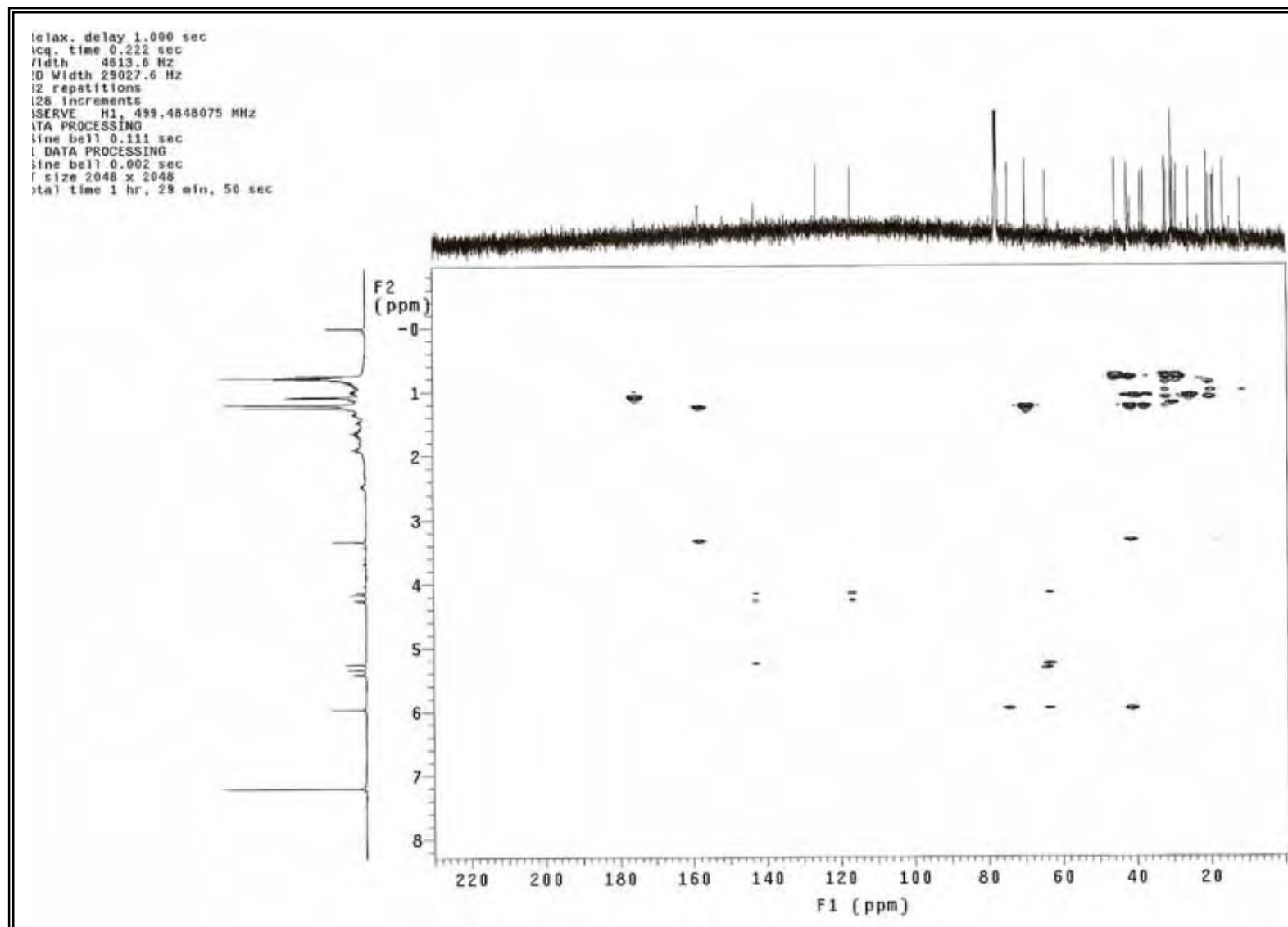
Anexo 49 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância **8** (CDCl_3 , 500 MHz).



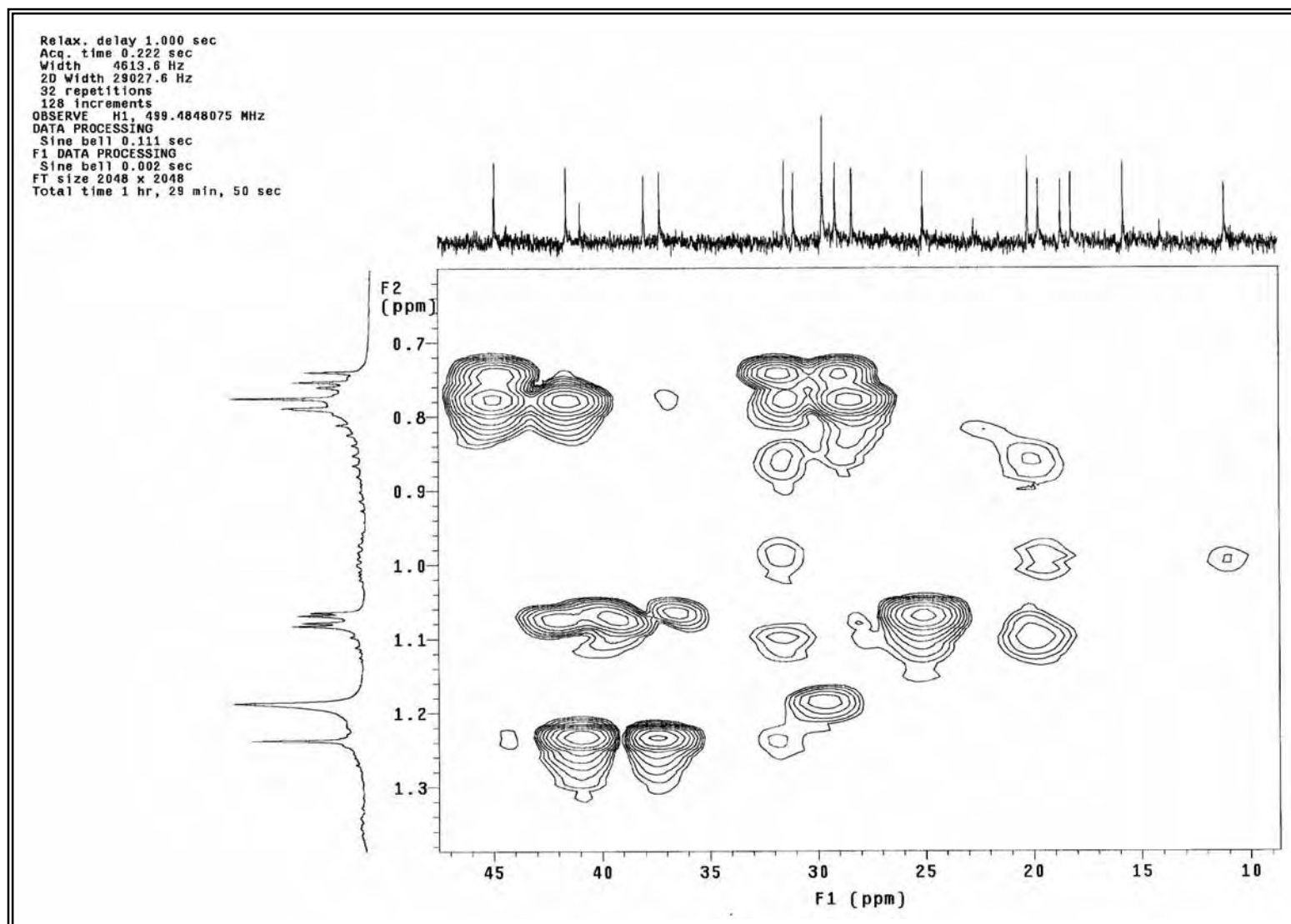
Anexo 50 - Espectro de DEPT-135 da substância **8**



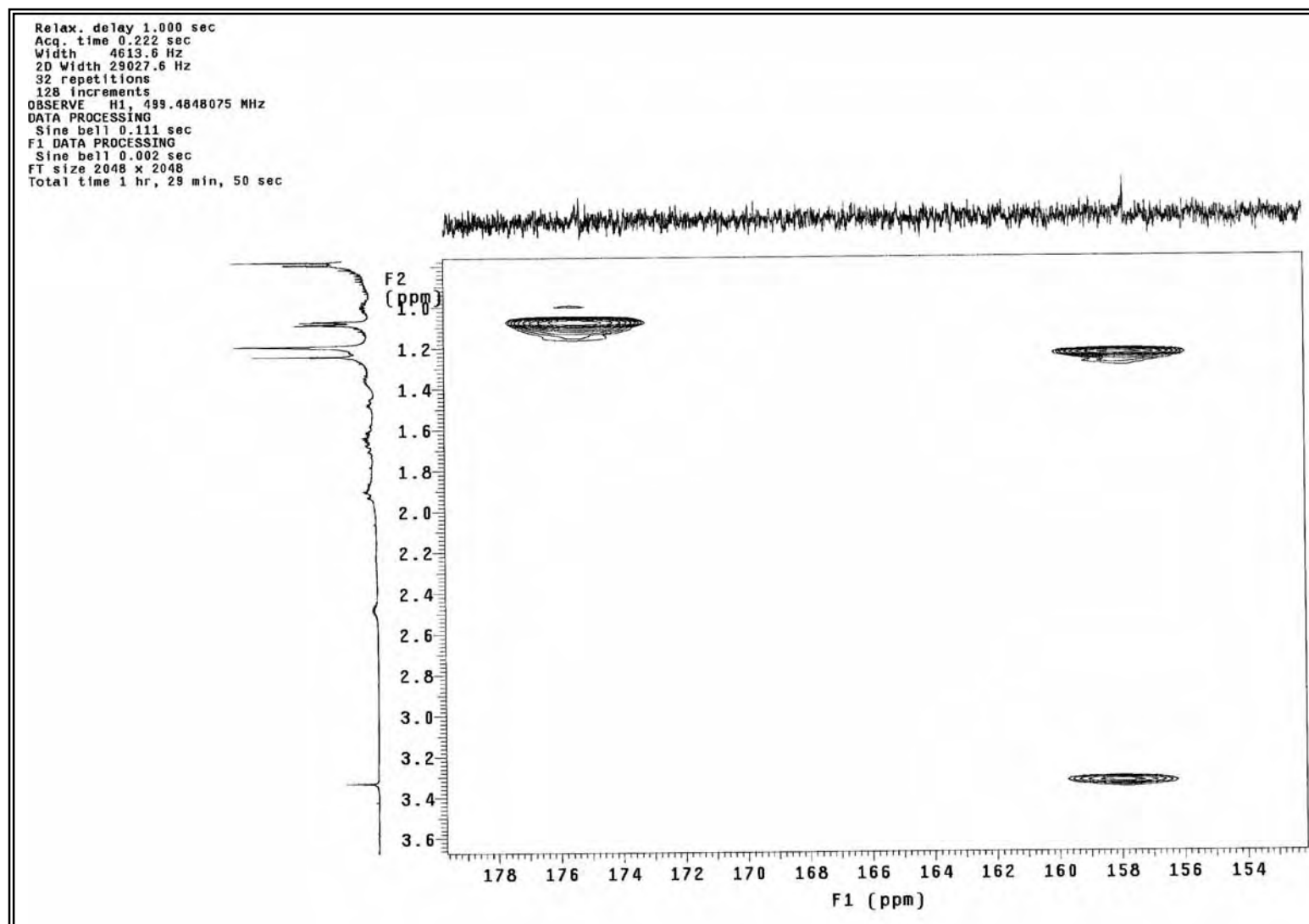
Anexo 51 - Espectro de DEPT- 90 da substância 8



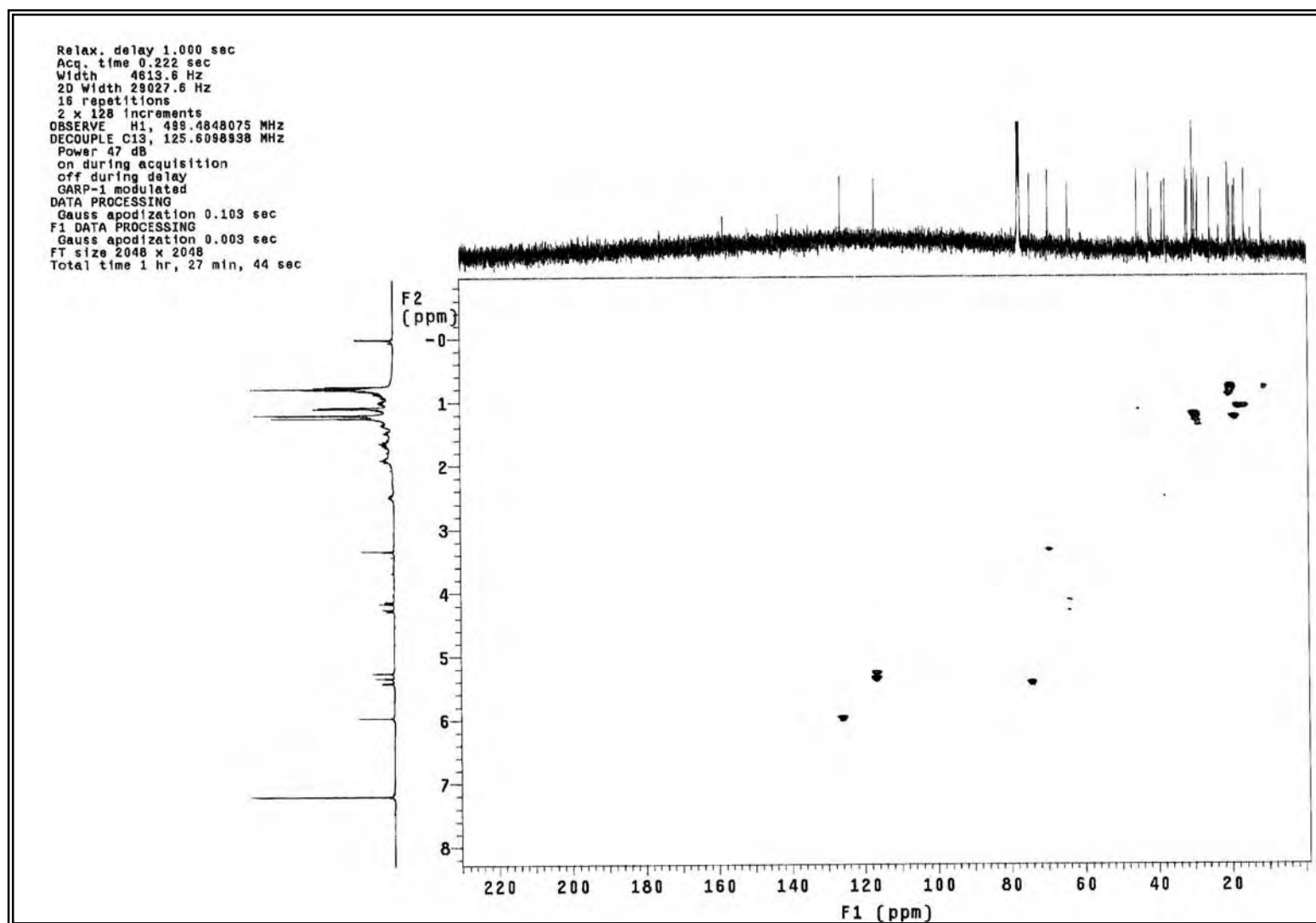
Anexo 52 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **8** (CDCl₃, 125 MHz).



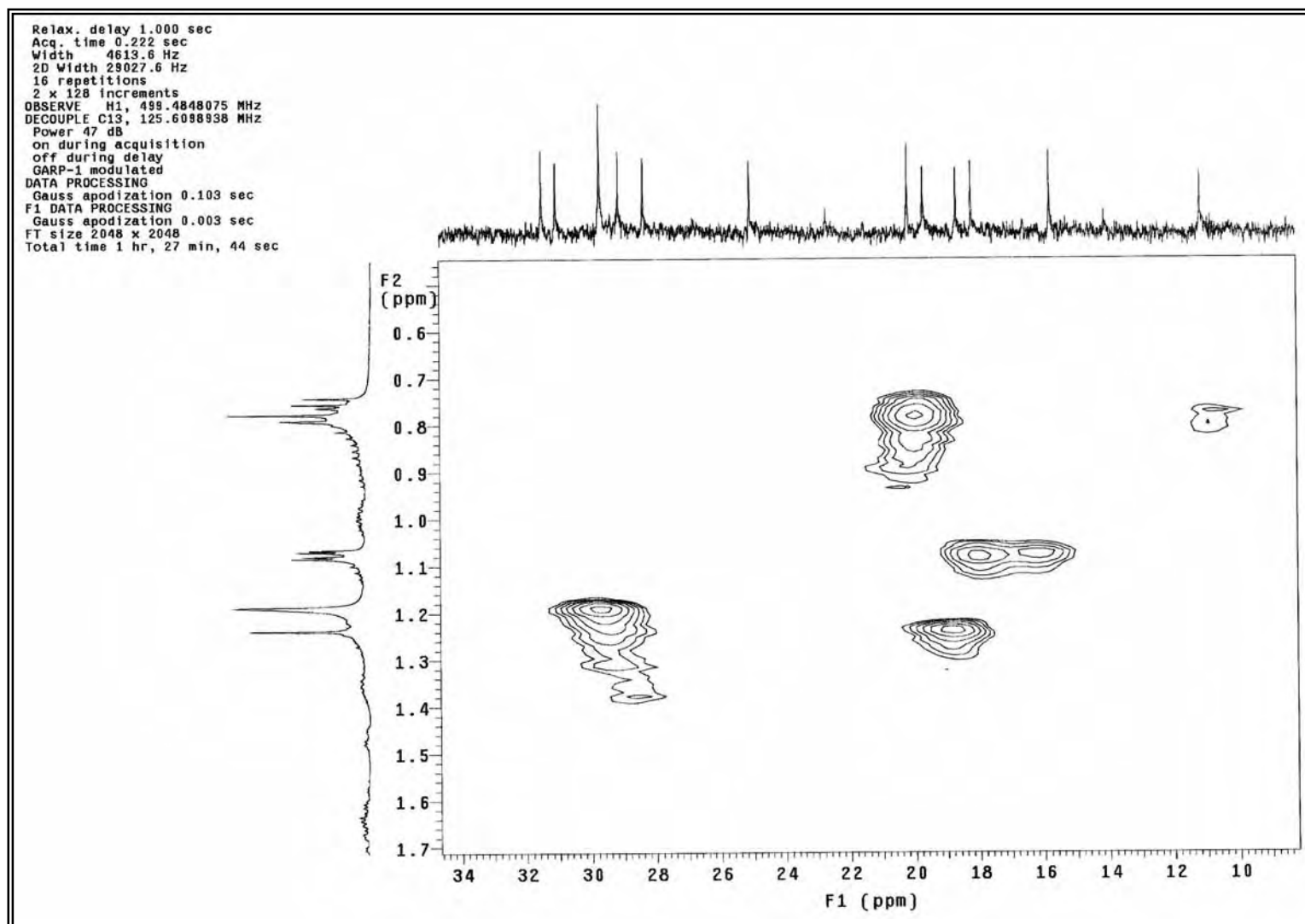
Anexo 53 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **8** (CDCl₃, 125 MHz).



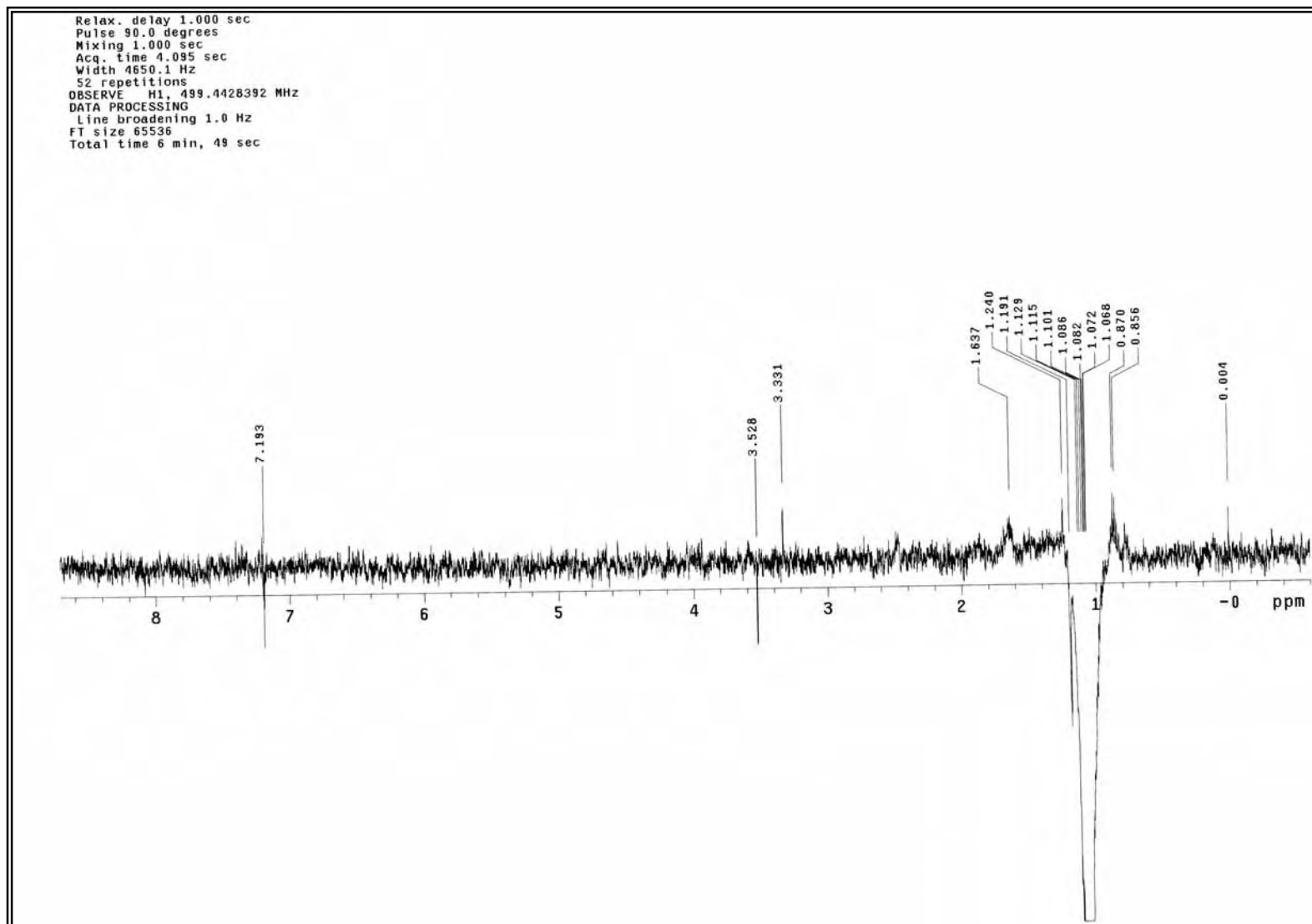
Anexo 54 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **8** (CDCl₃, 125 MHz).



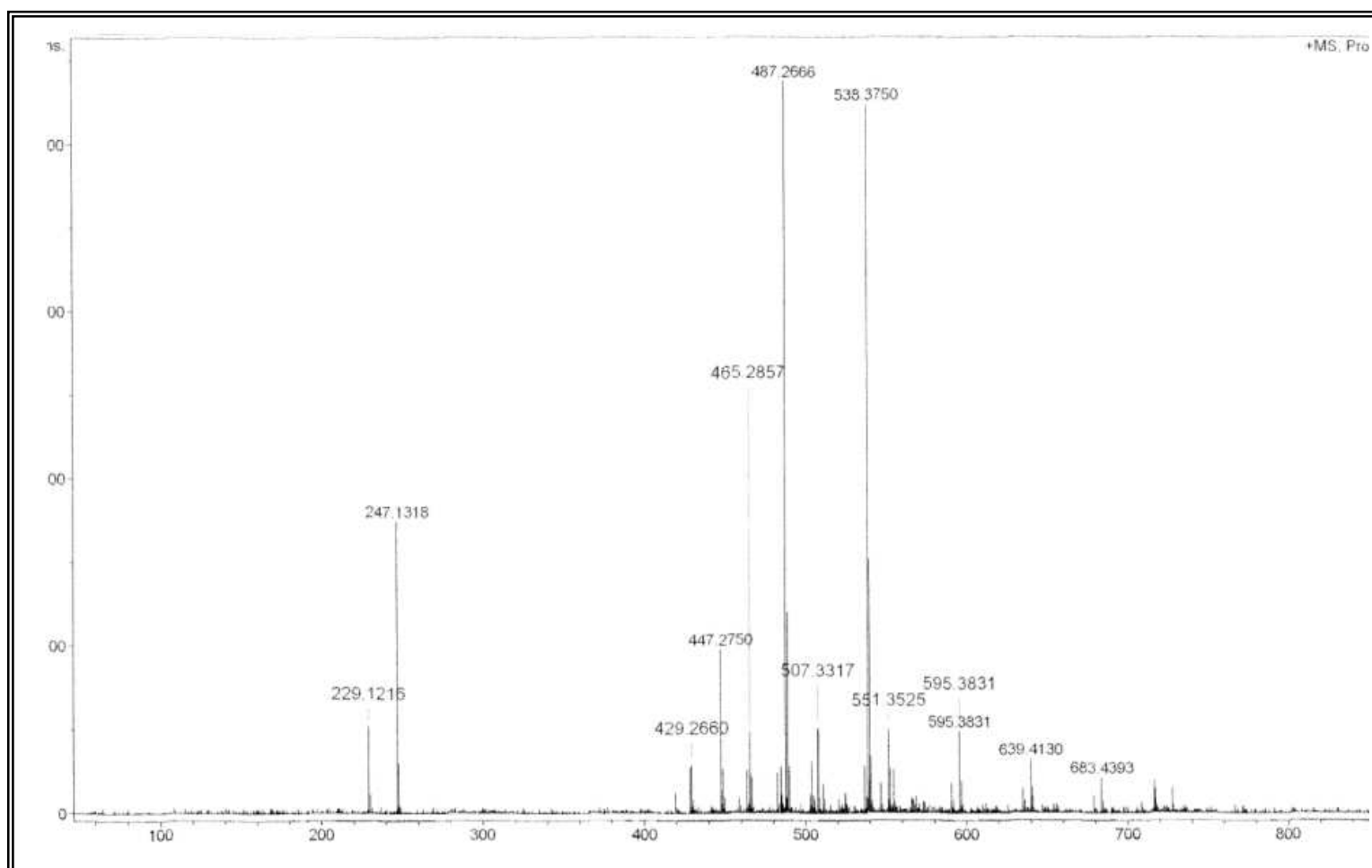
Anexo 55 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **8** (CDCl₃, 125 MHz).



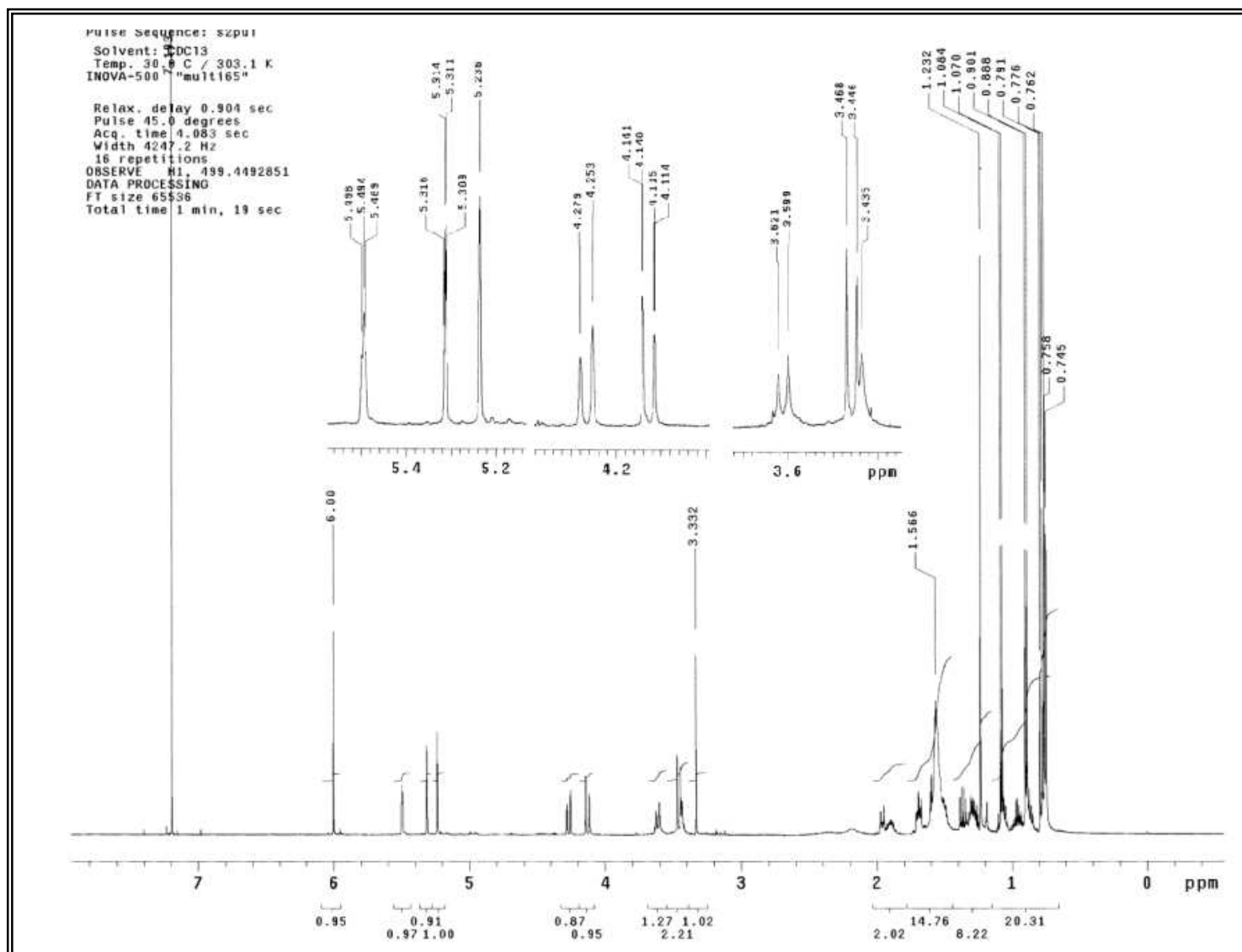
Anexo 56 - Expansão do mapa de contorno de gHMQC da substância **8** (CDCl₃, 125 MHz).



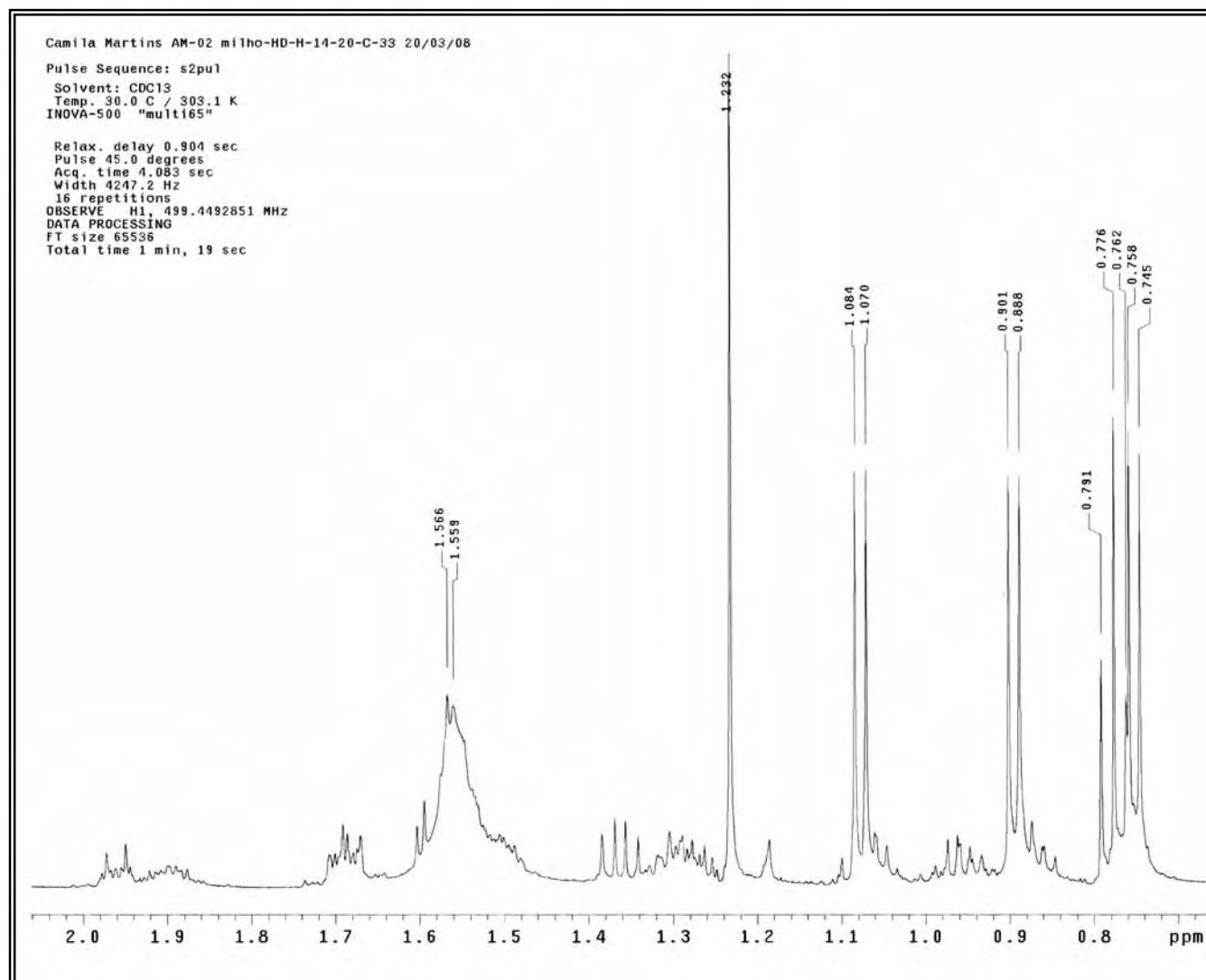
Anexo 57 - Espectro de NOESY 1D da substância **8** (CDCl₃, 125 MHz), hidrogênio irradiado H-15



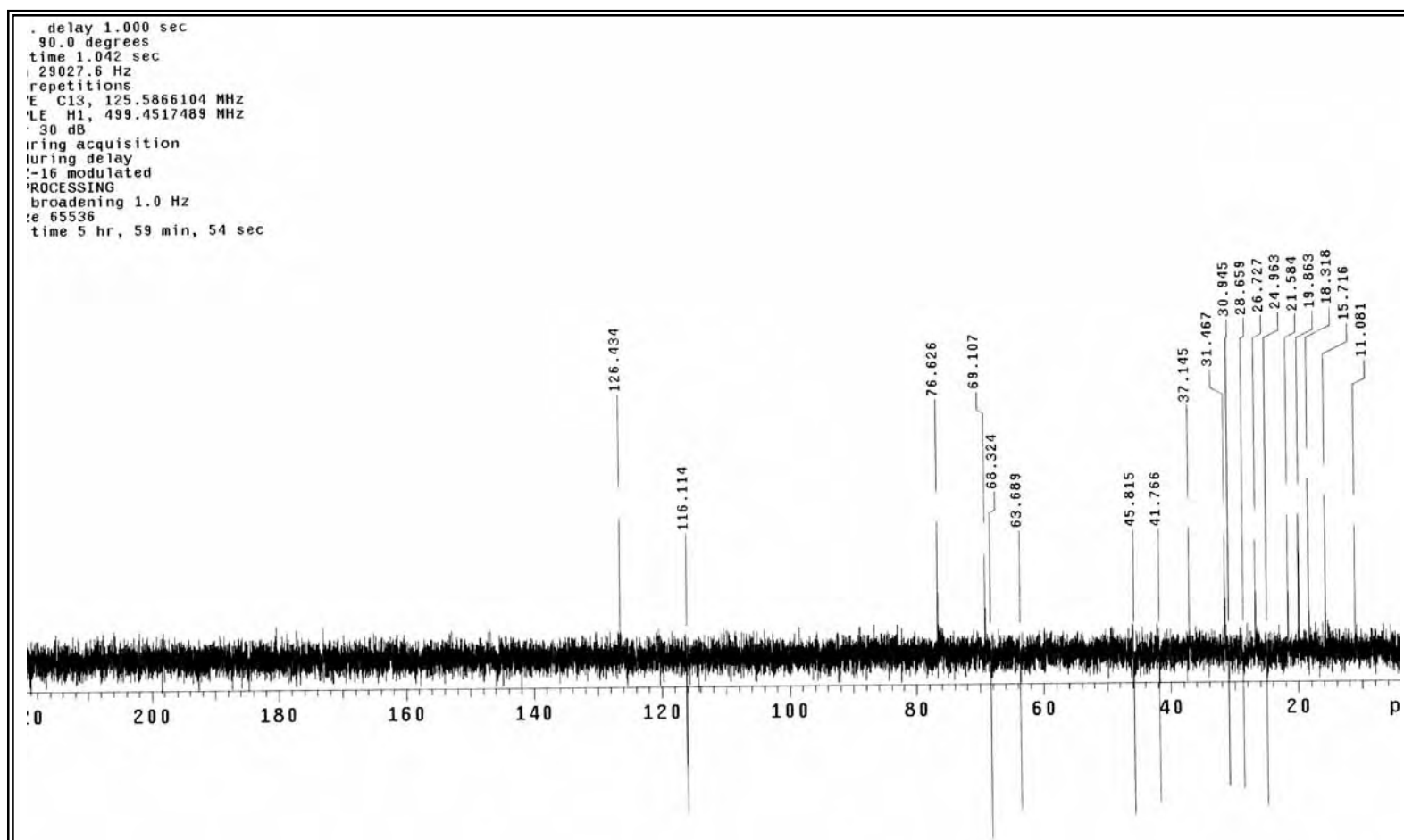
Anexo 58 - Espectro de HRESI-MS $[M+Na]^+$ da substância **9**



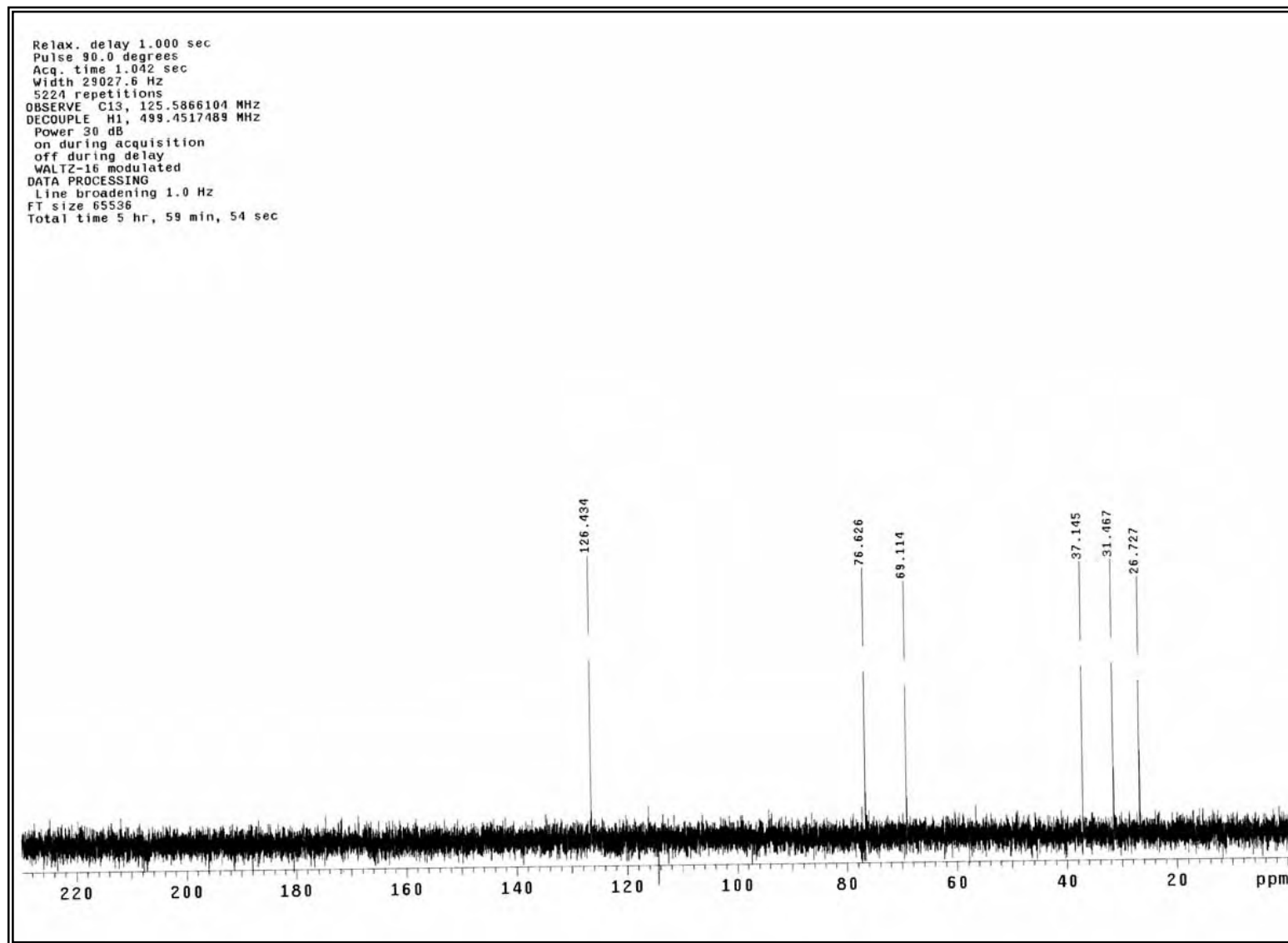
Anexo 59 - Espectro de RMN ^1H da substância 9 (CDCl_3 , 500 MHz)



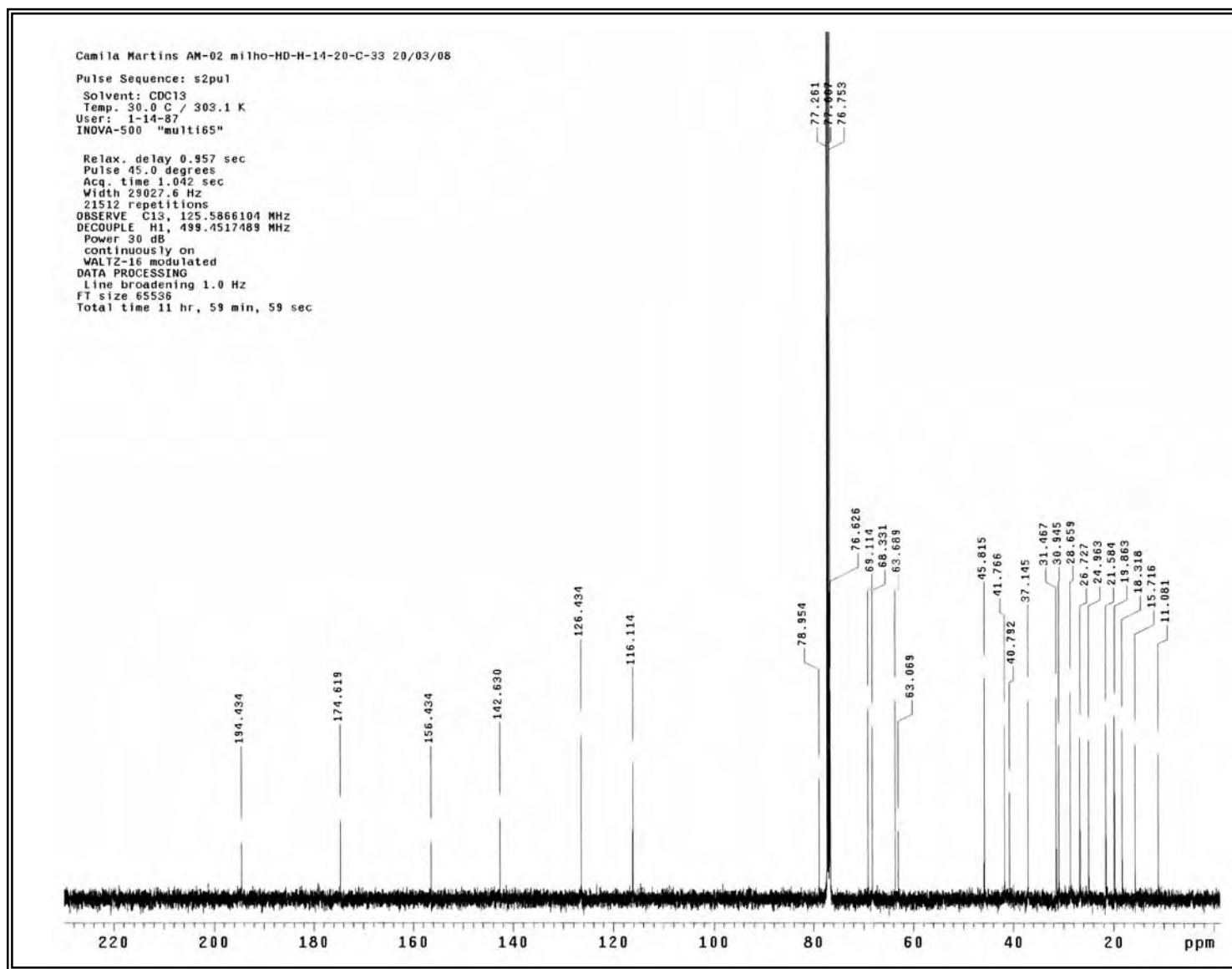
Anexo 60 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância **9** (CDCl_3 , 500 MHz)



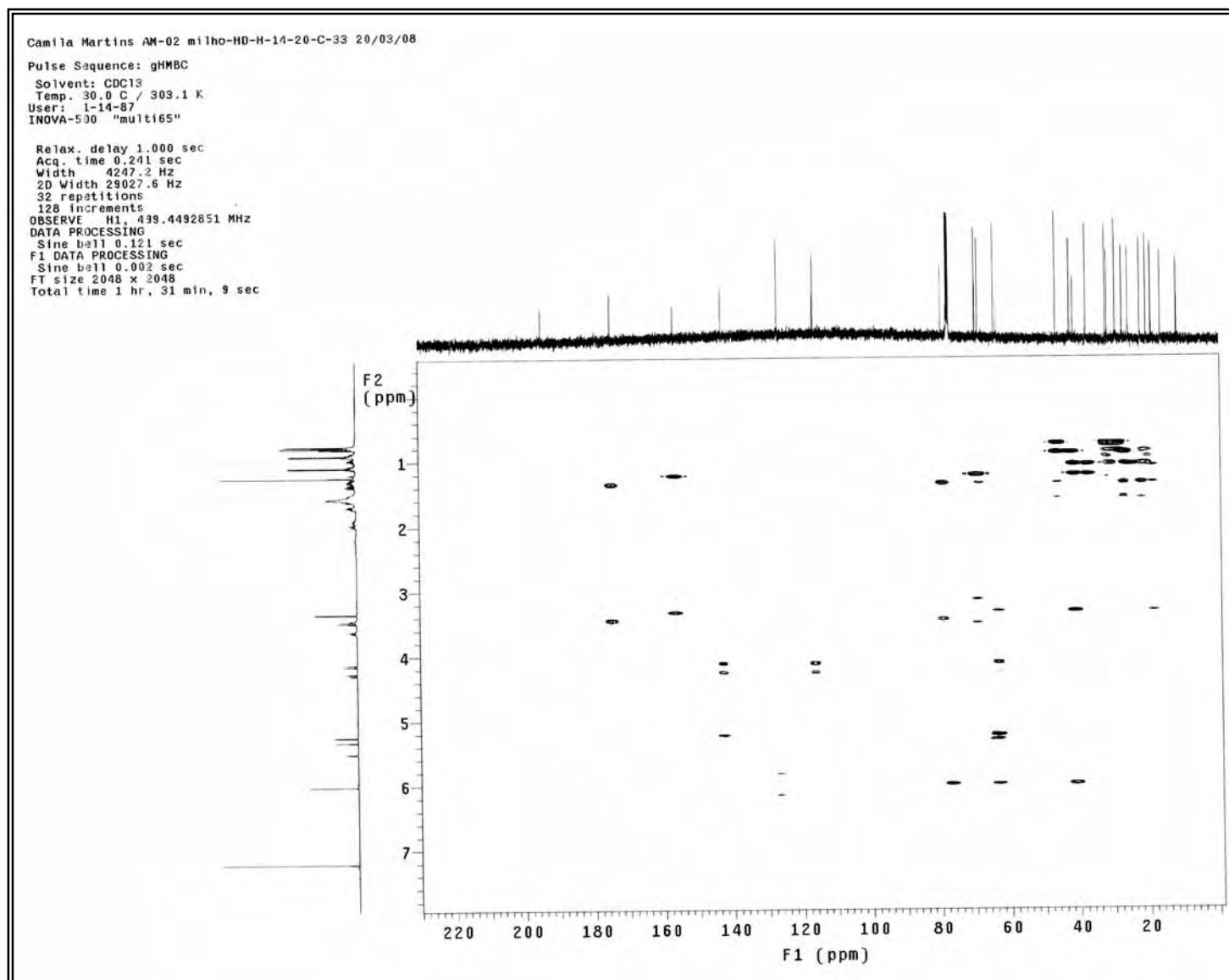
Anexo 61 - Espectro de DEPT-135 da substância 9



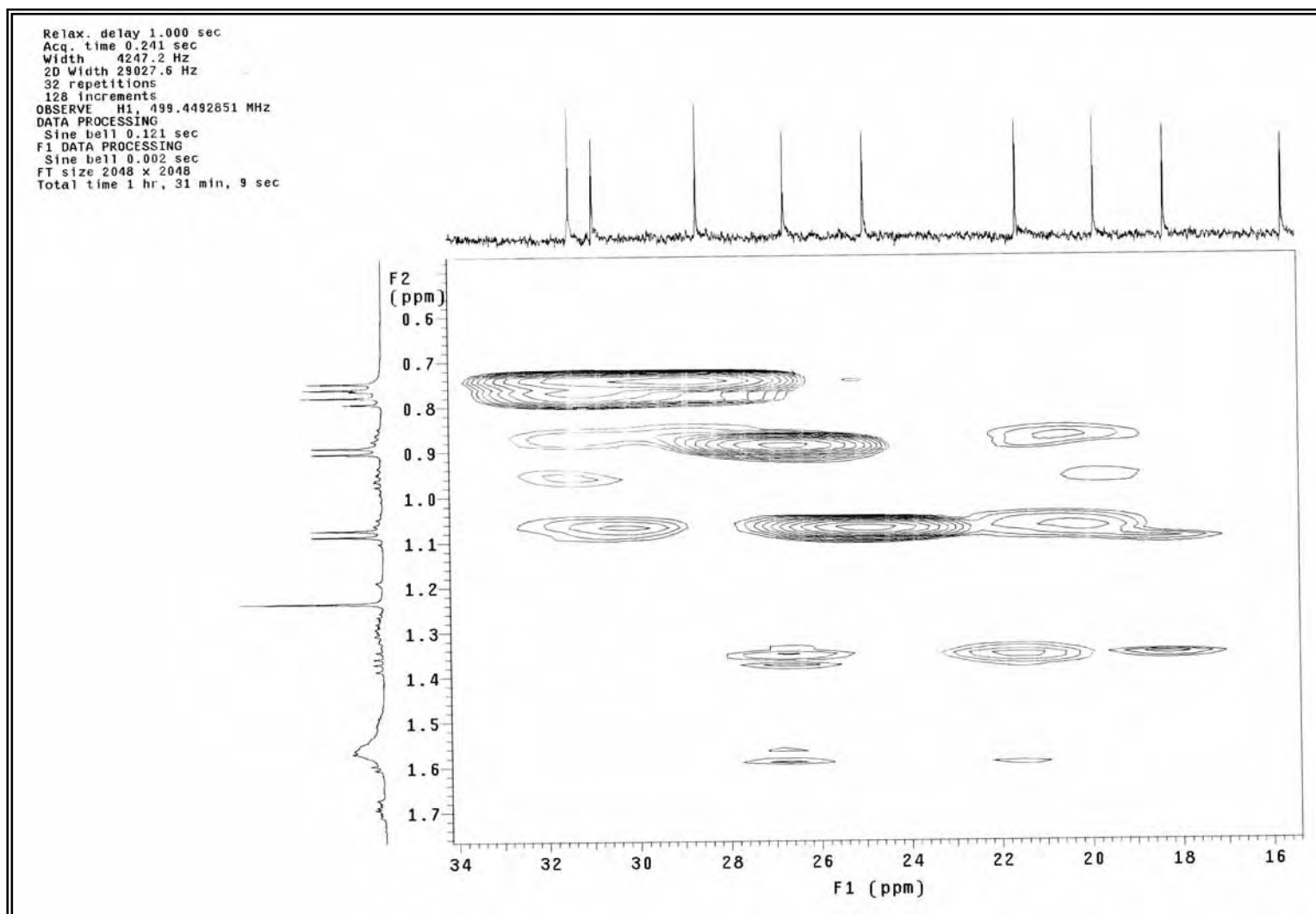
Anexo 62 - Espectro de DEPT-90 da substância 9



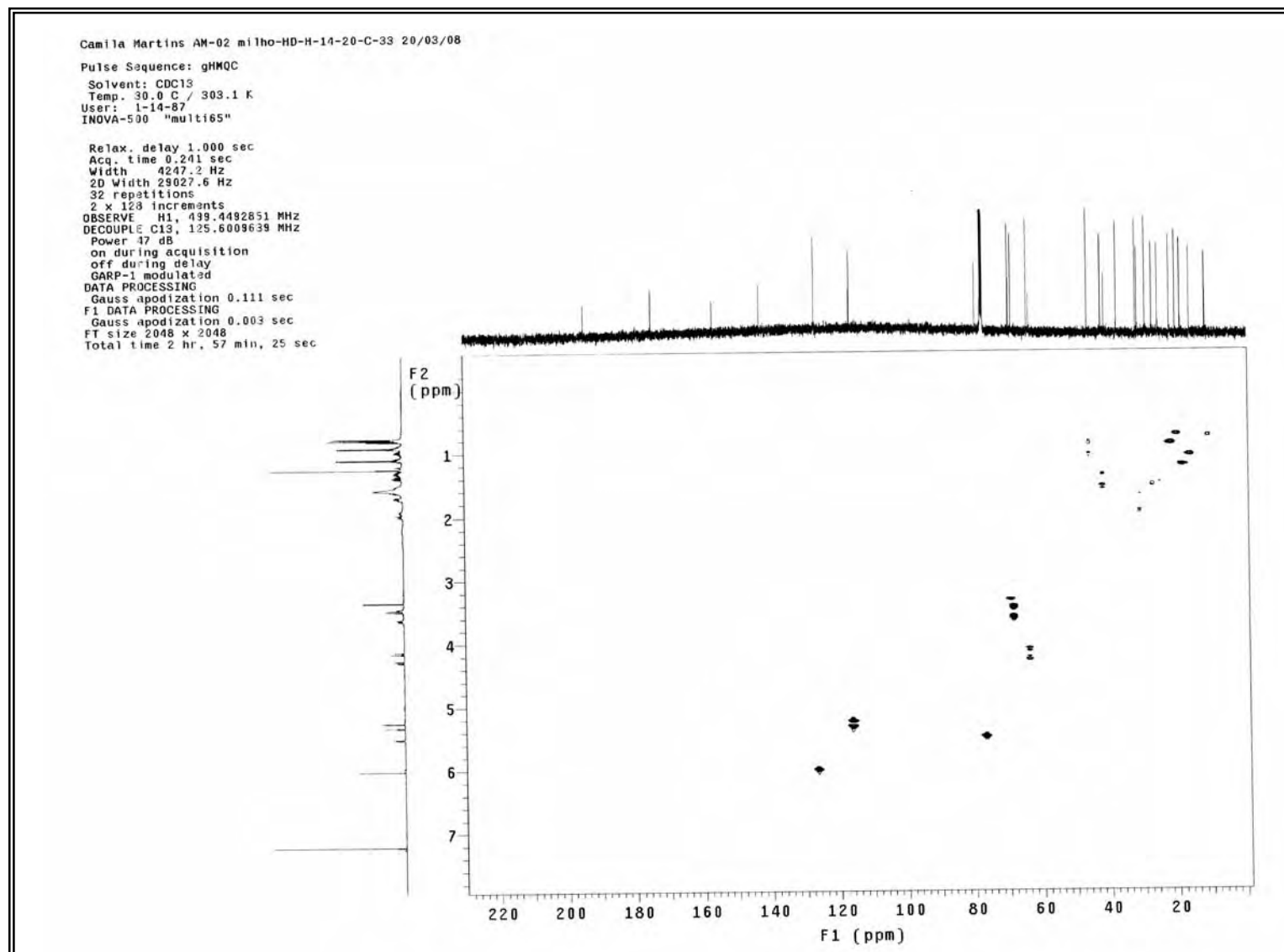
Anexo 63 - Espectro de ^{13}C da substância **9** (CDCl_3 125MHz)



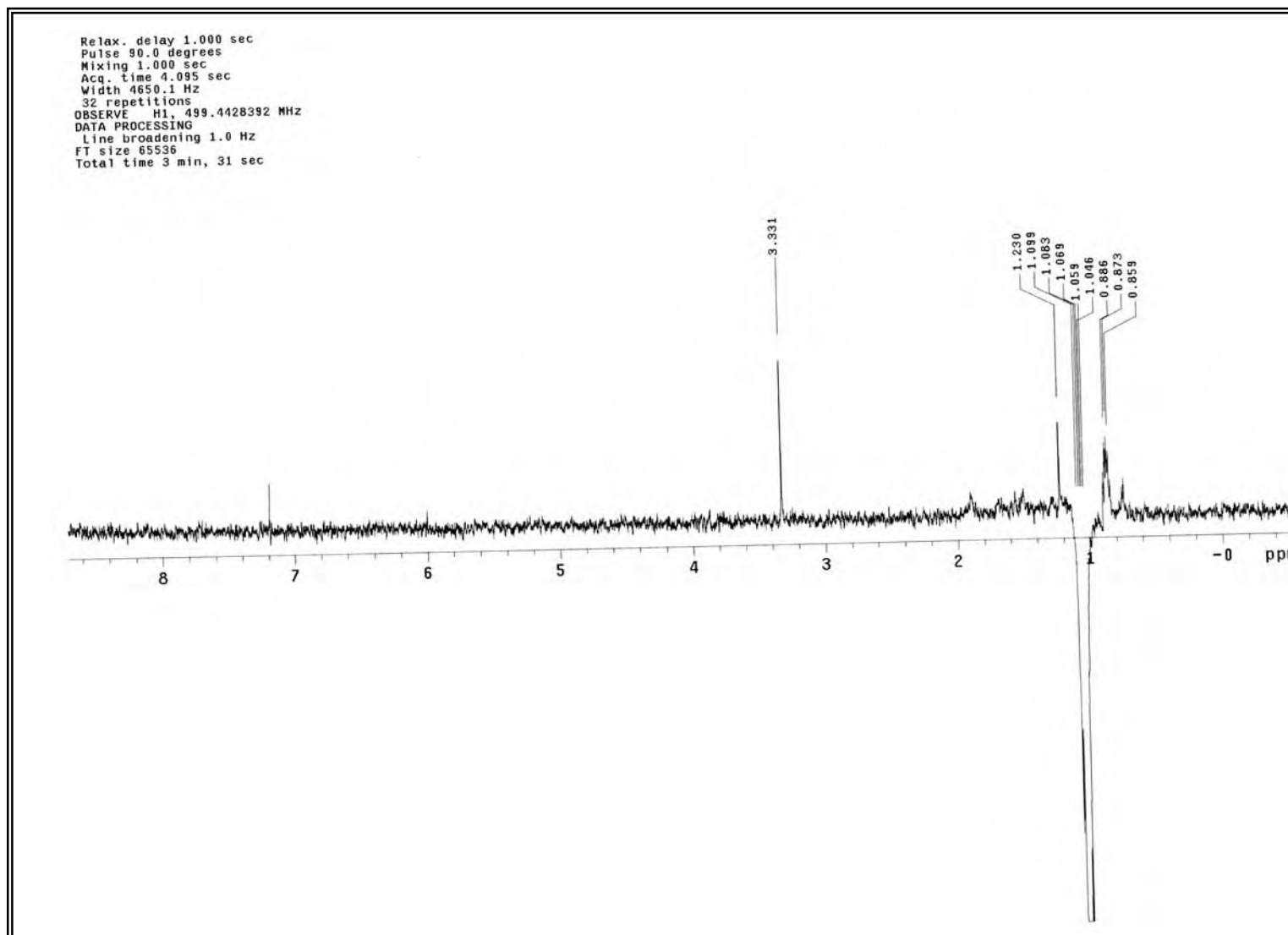
Anexo 64 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 9 (CDCl₃, 125 MHz)



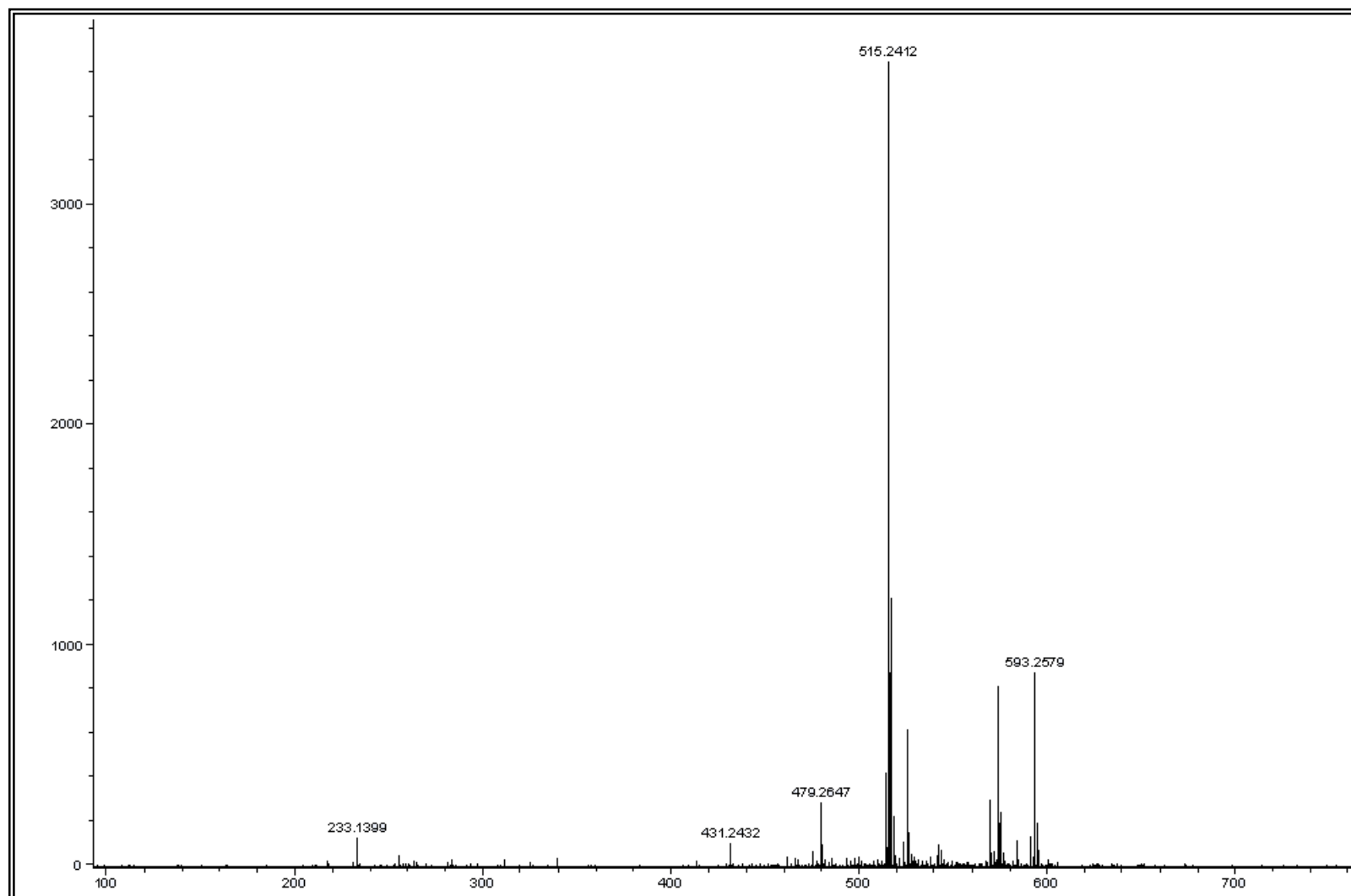
Anexo 65 - Expansão do mapa de contorno de *g*HMBC da substância 9 (CDCl₃, 125 MHz)



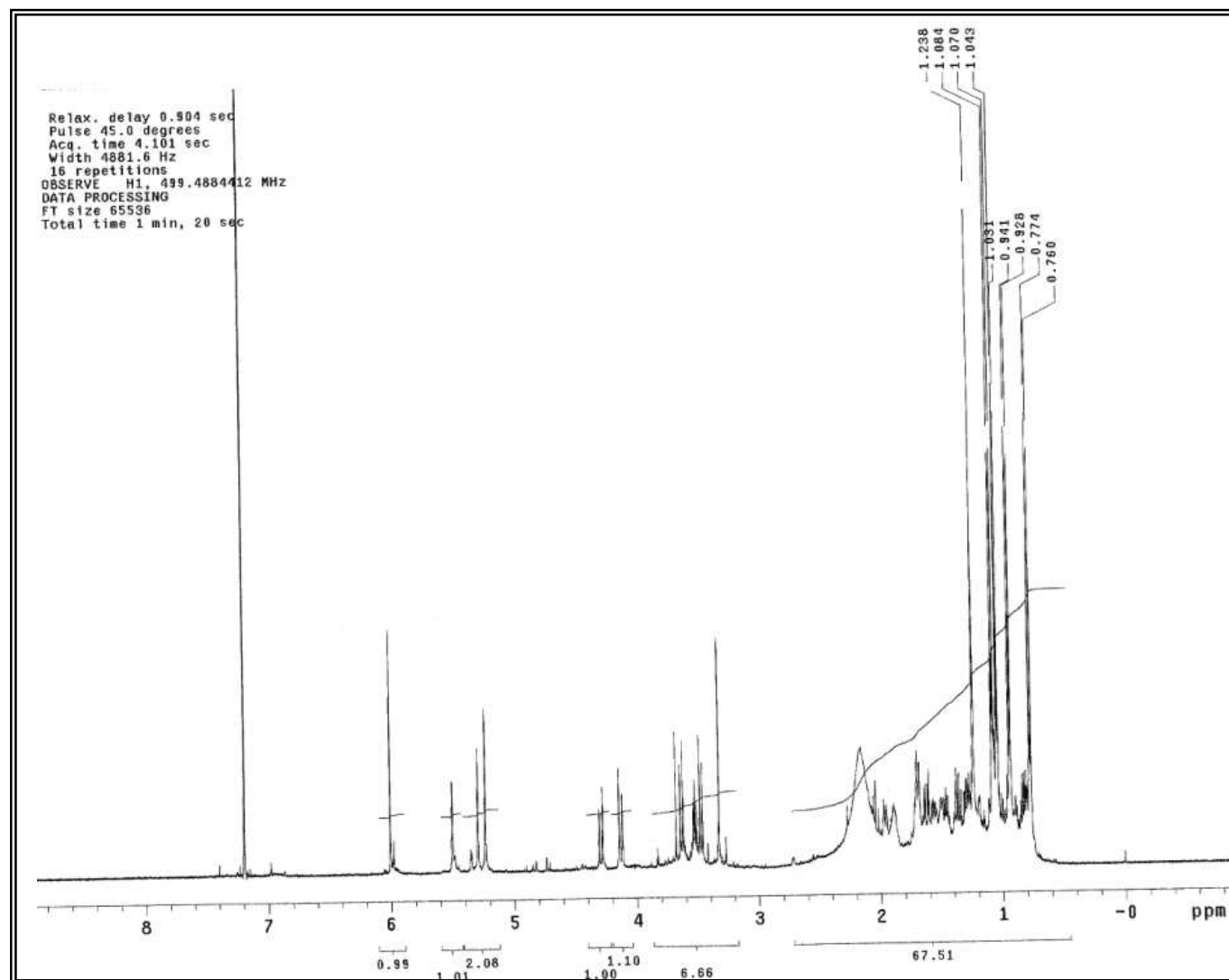
Anexo 66 - Mapa de contorno de gHMQC da substância **9** (CDCl₃, 125 MHz)



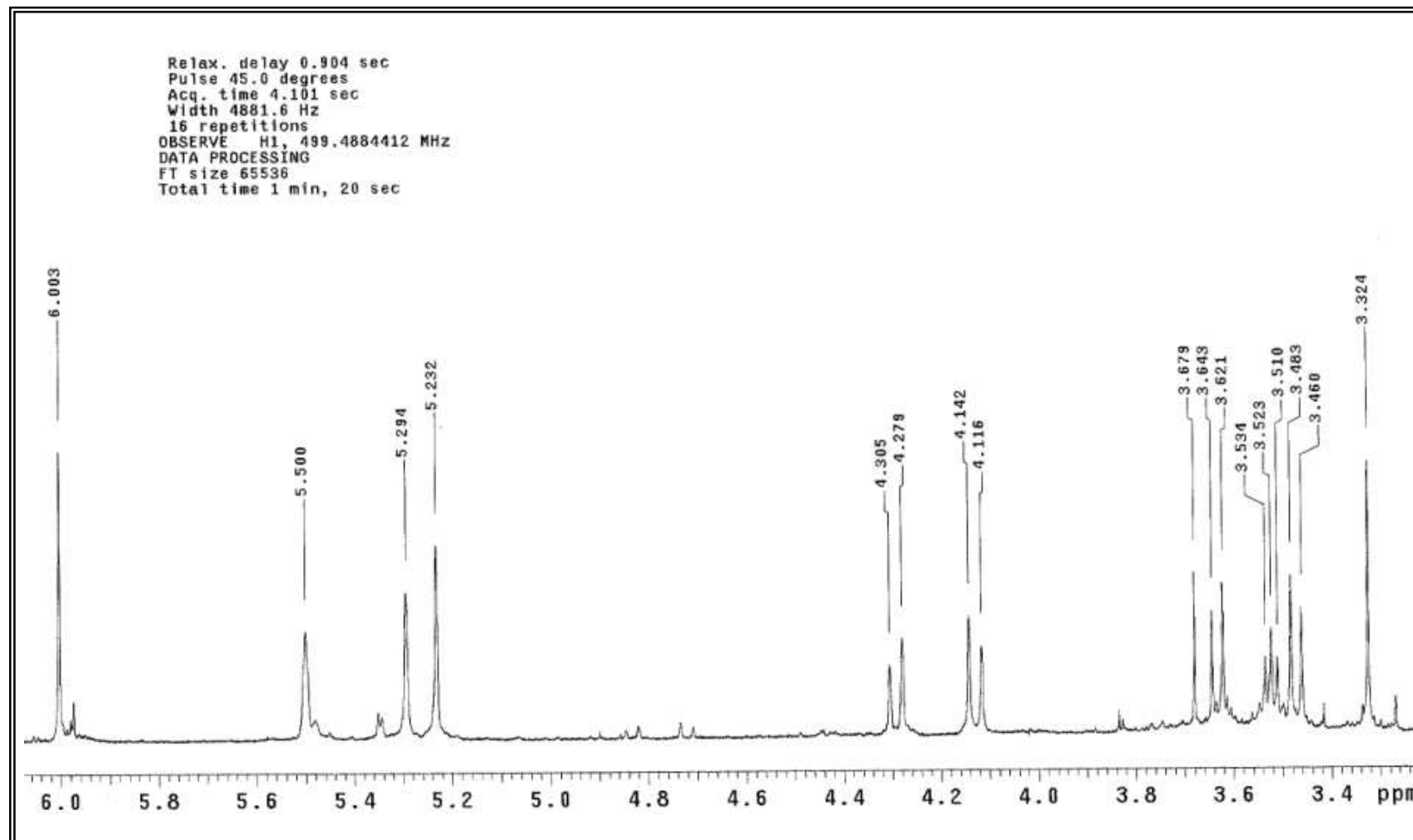
Anexo 67 - Espectro de NOESY 1D da substância 9 (CDCl_3 , 125 MHz), hidrogênio irradiado H-15



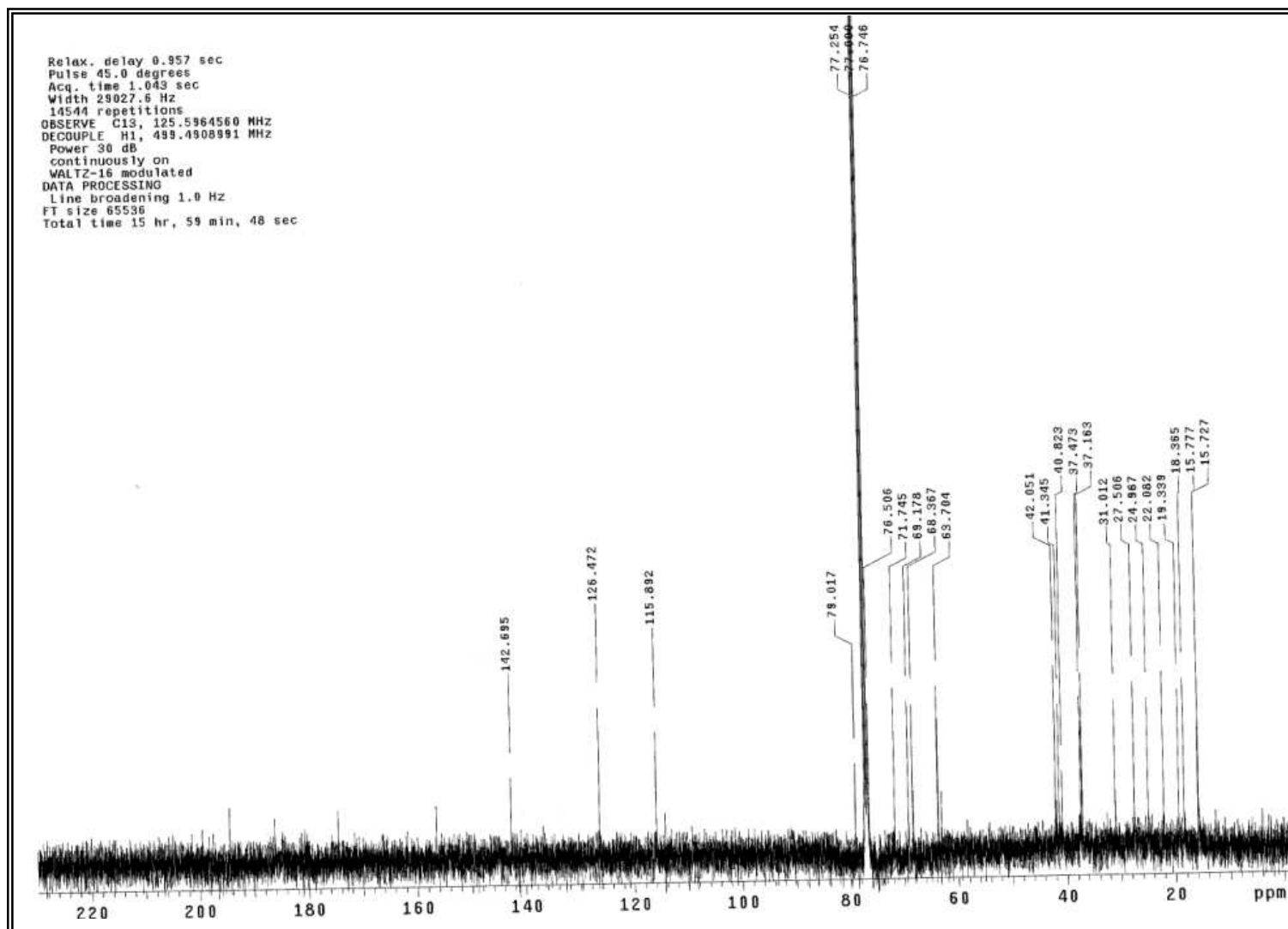
Anexo 68 - Espectro de HRESI-MS $[M-H]^-$ da substância **10**



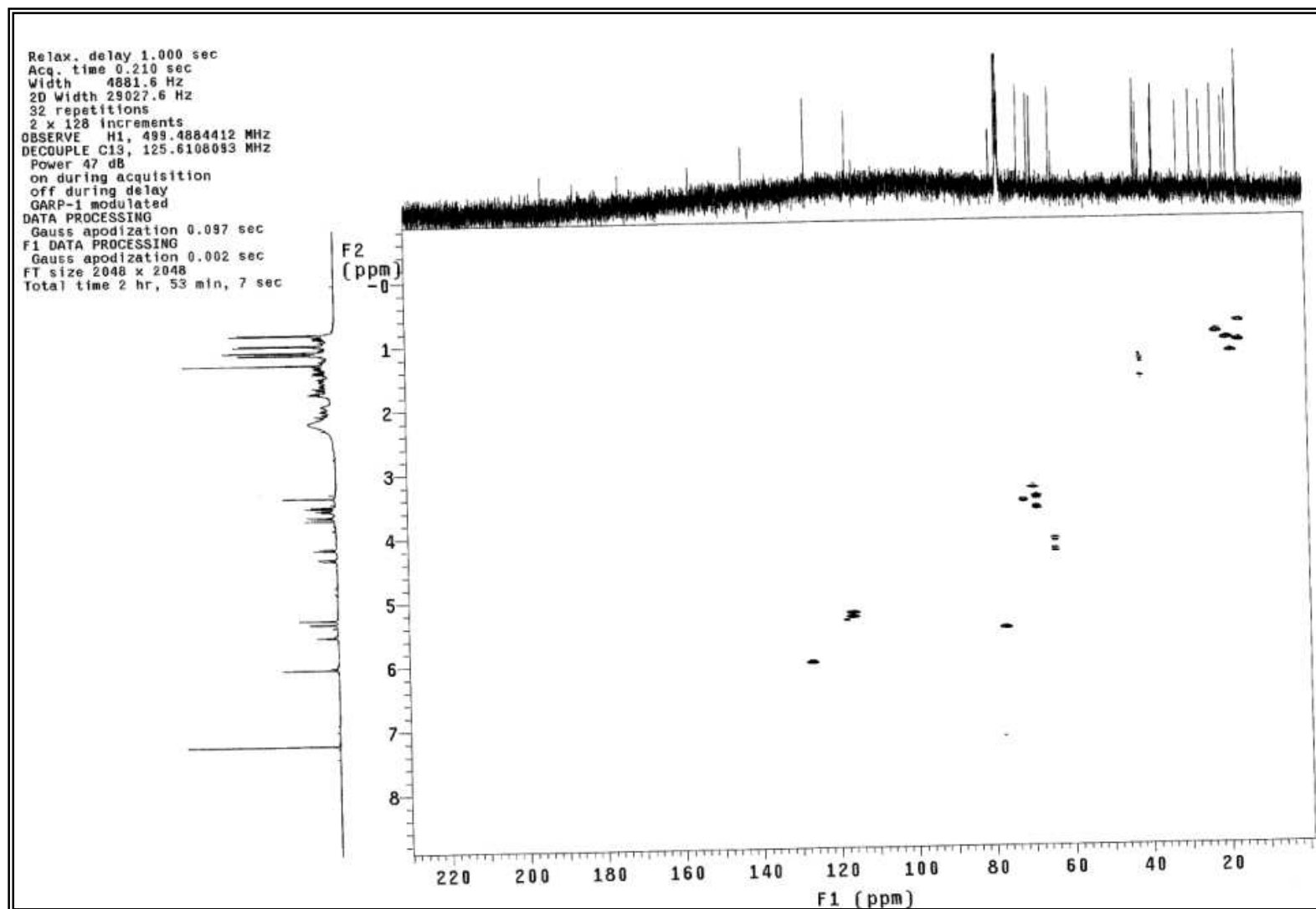
Anexo 69 - Espectro de RMN ^1H da substância **10** (CDCl_3 , 500 MHz)



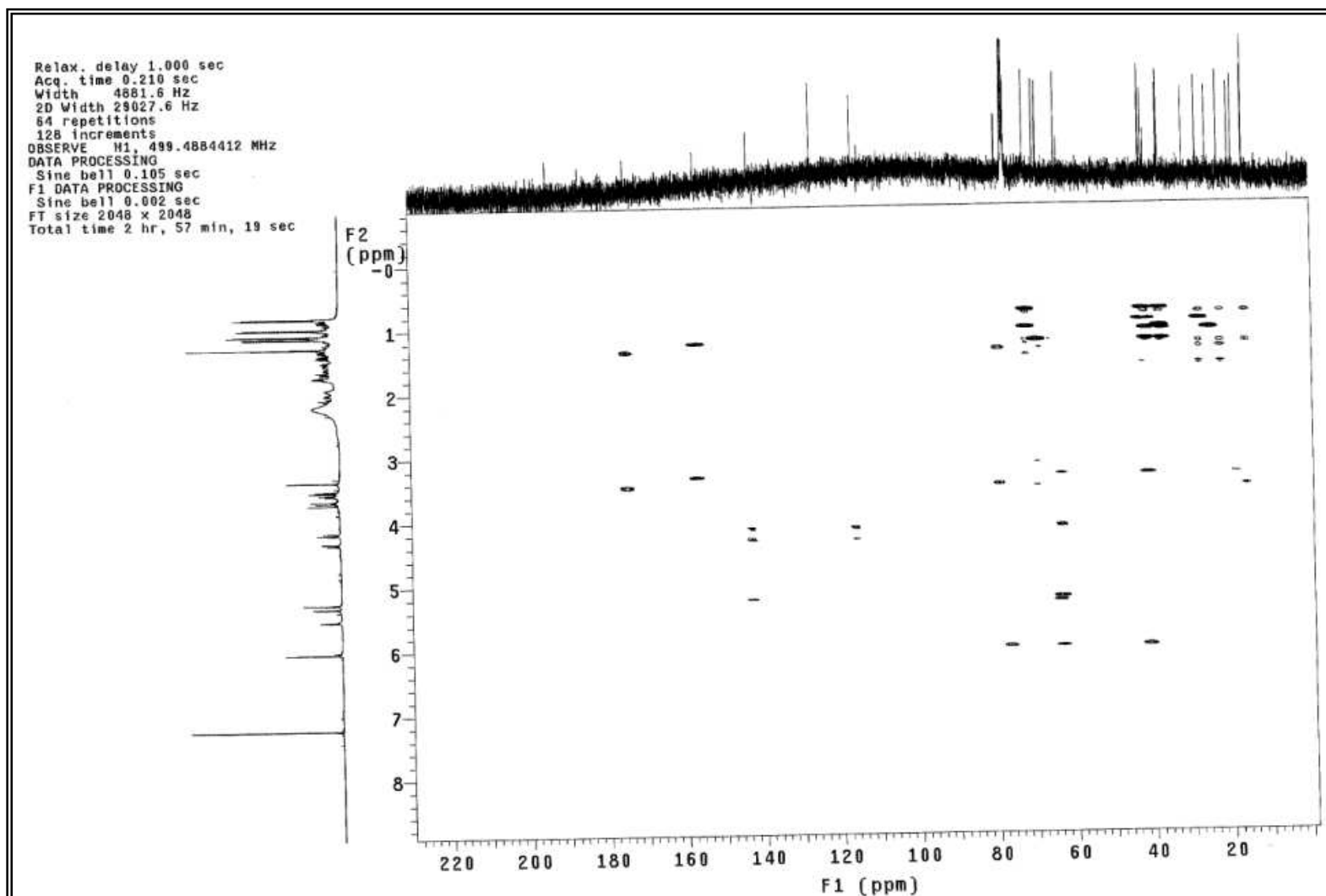
Anexo 70 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância **10** (CDCl_3 , 500 MHz)



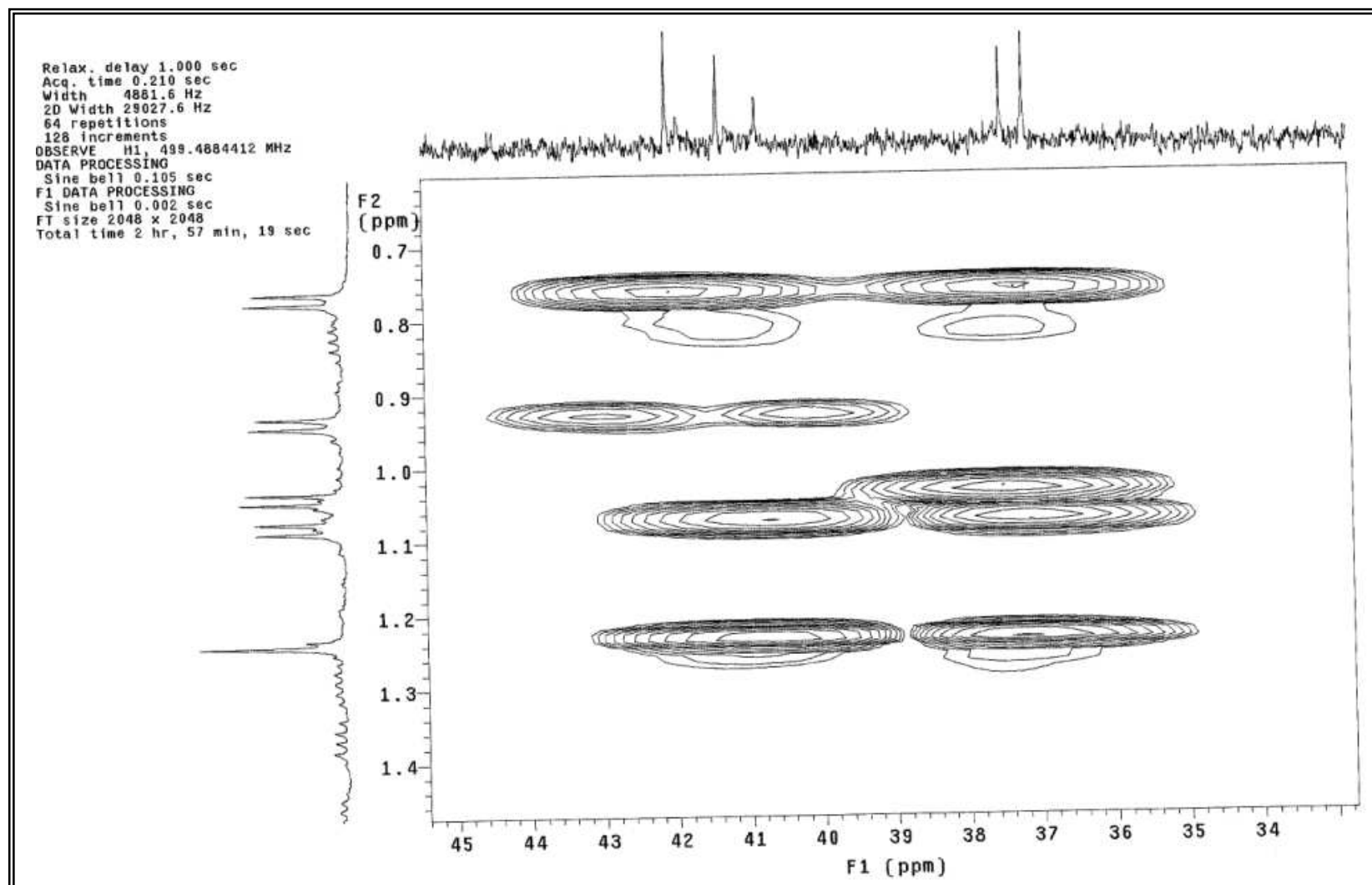
Anexo 71 - Espectro de ^{13}C da substância **10** (CDCl_3 125MHz)



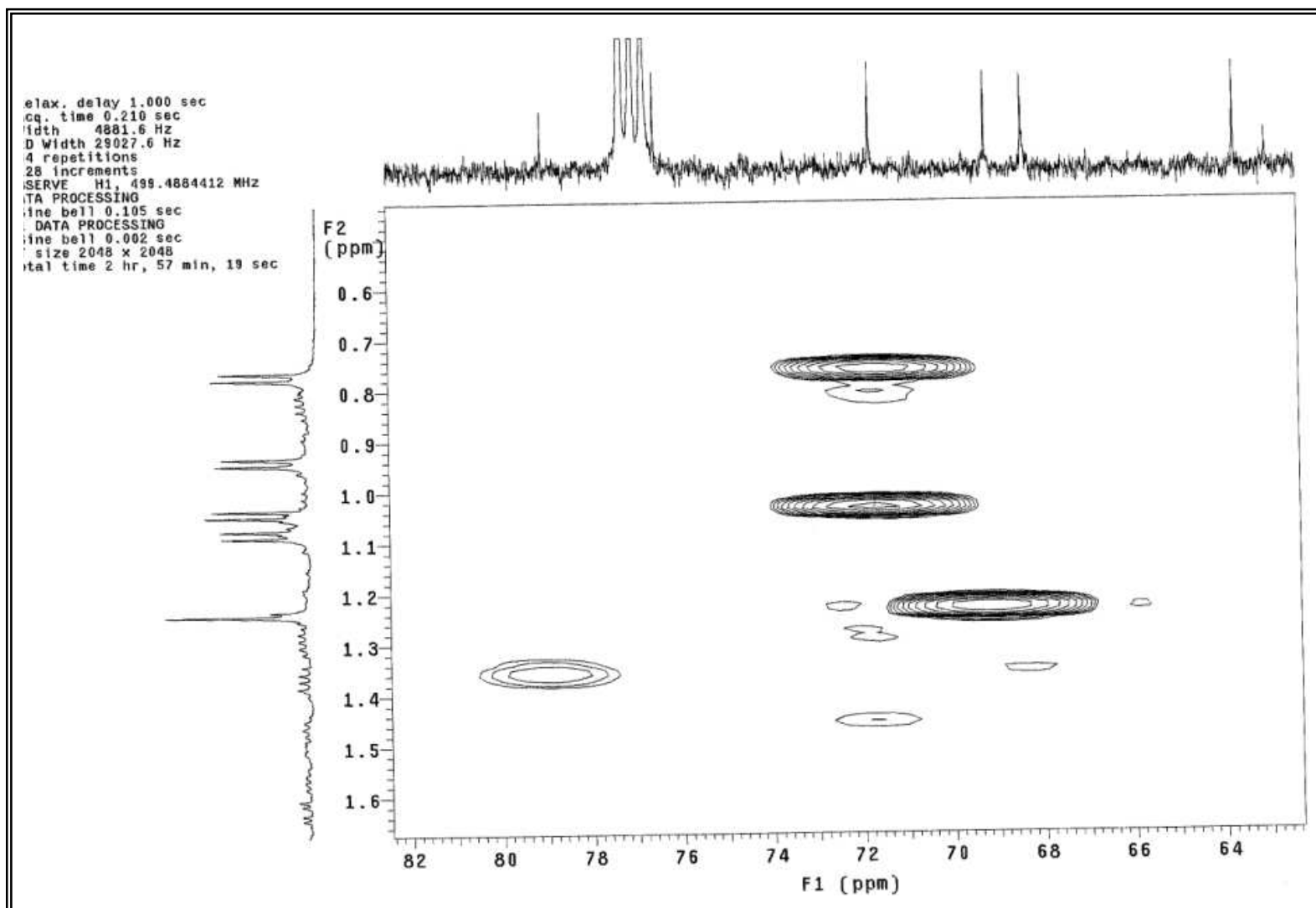
Anexo 72 - Mapa de contorno de gHMQC da substância 10 (CDCl₃, 125 MHz)



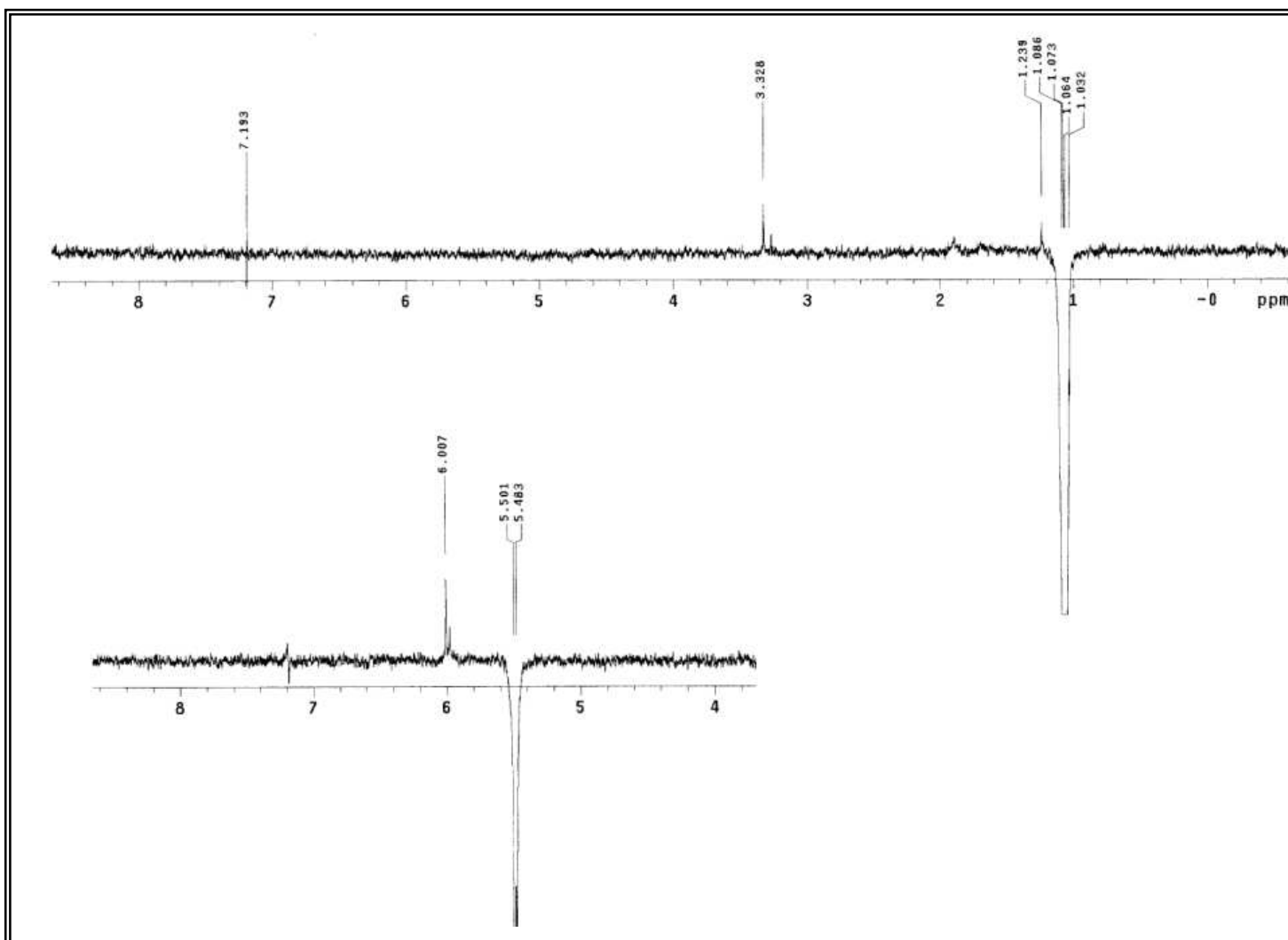
Anexo 73 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **10** (CDCl₃, 125 MHz)



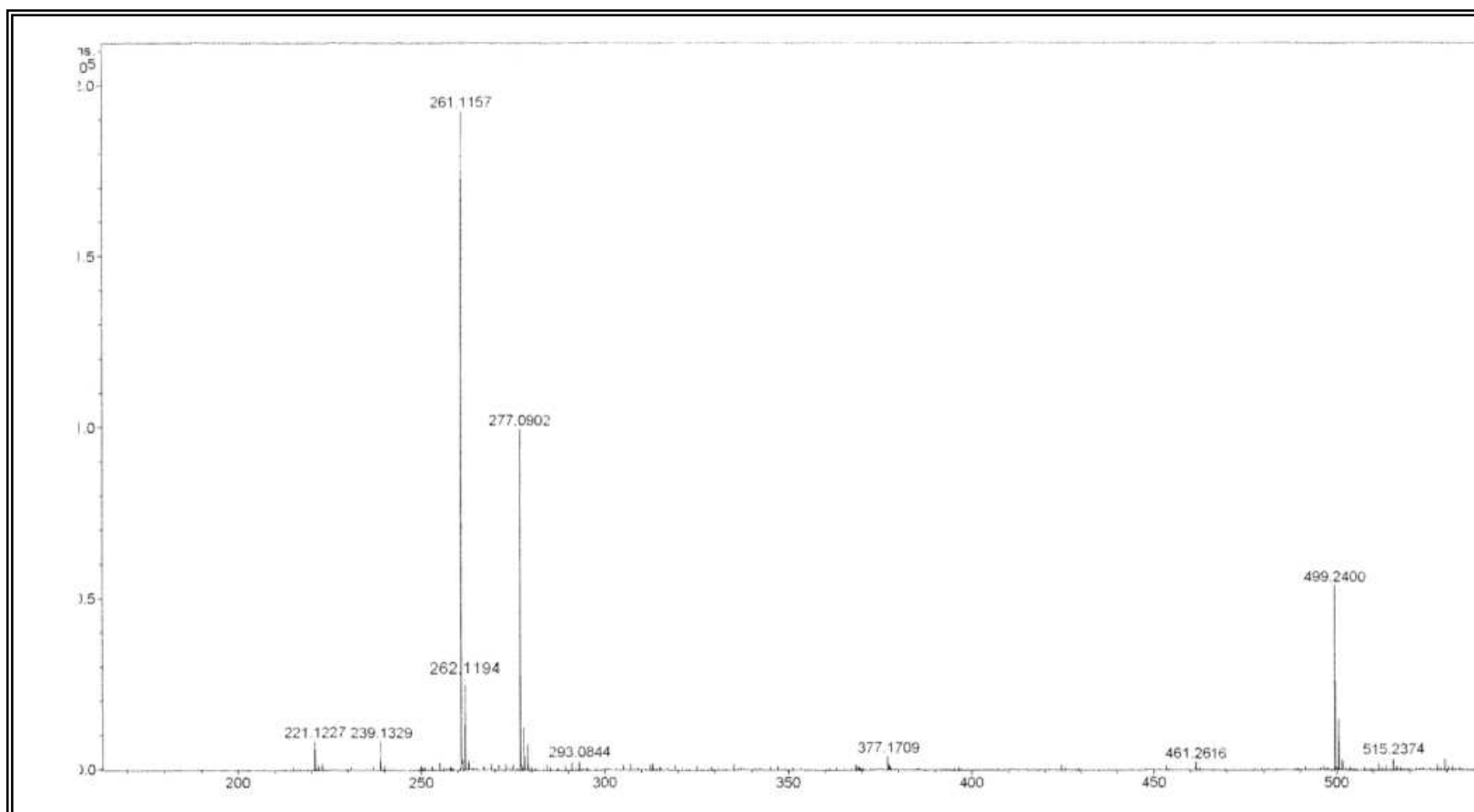
Anexo 74 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **10** (CDCl₃, 125 MHz)



Anexo 75 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **10** (CDCl₃, 125 MHz)



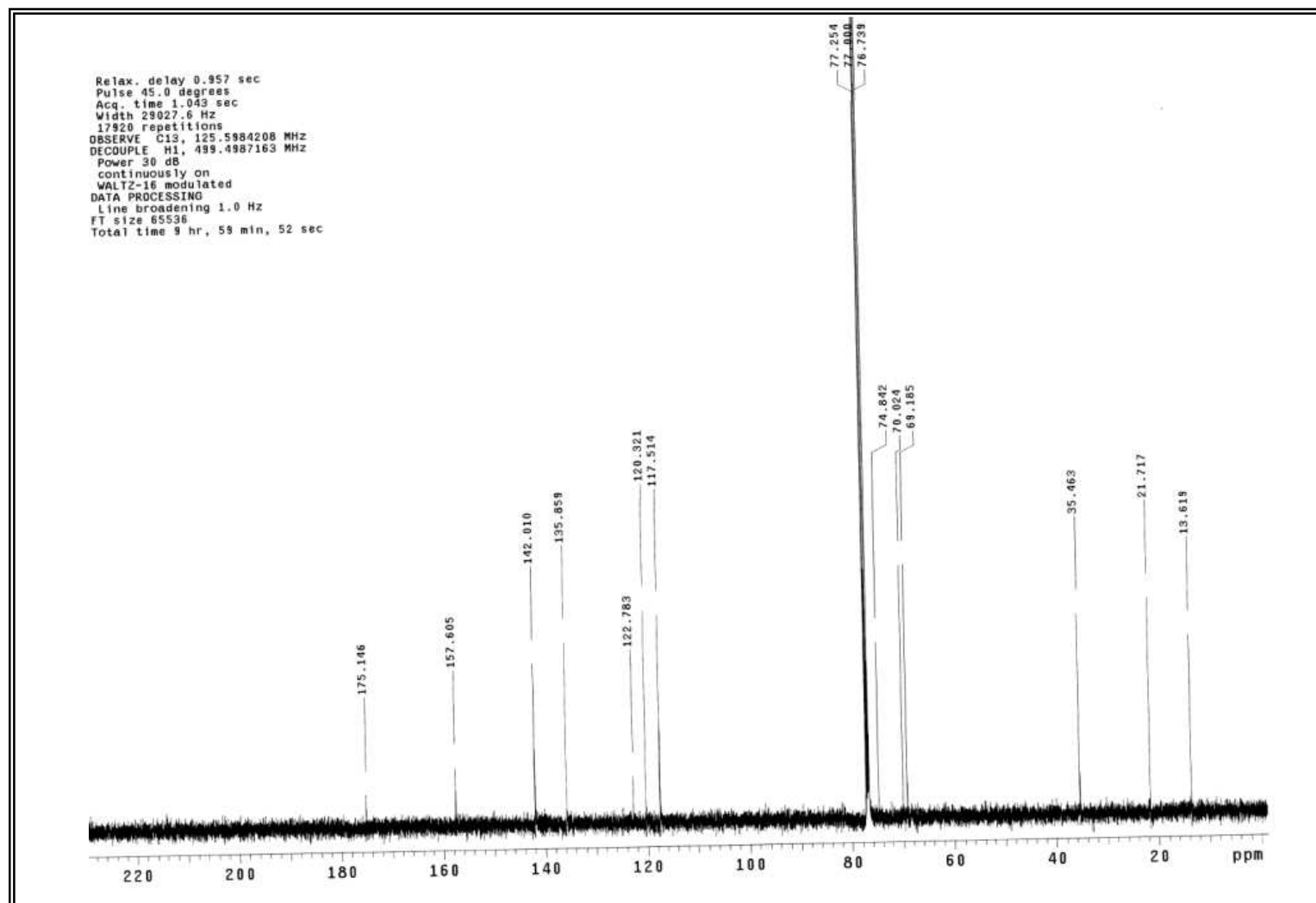
Anexo 76 - Espectro de NOESY 1D da substância **10** (CDCl_3 , 125 MHz), hidrogênio irradiado H-15



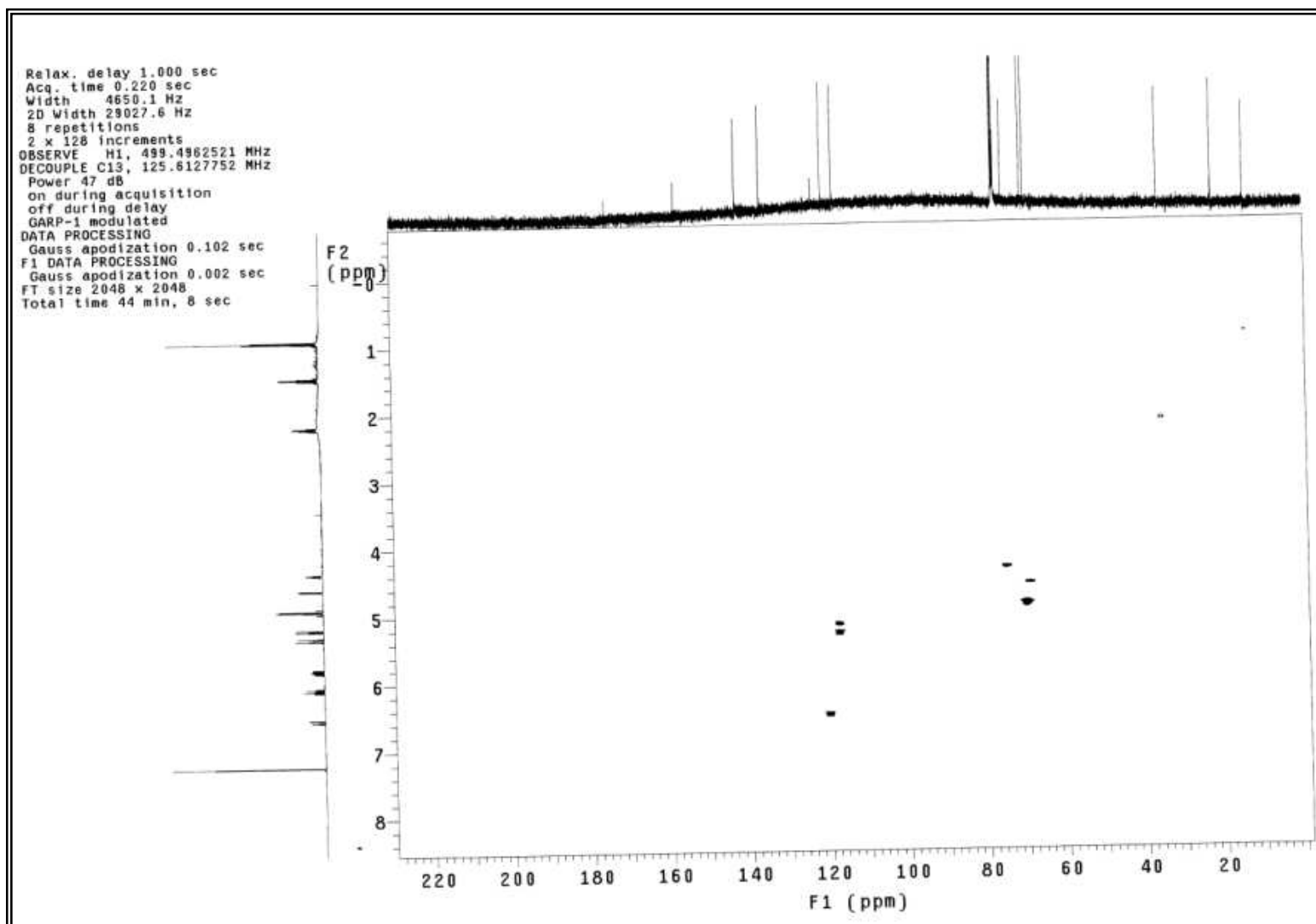
Anexo 77 - Espectro de HRESI-MS $[M+Na]^+$ da substância 11



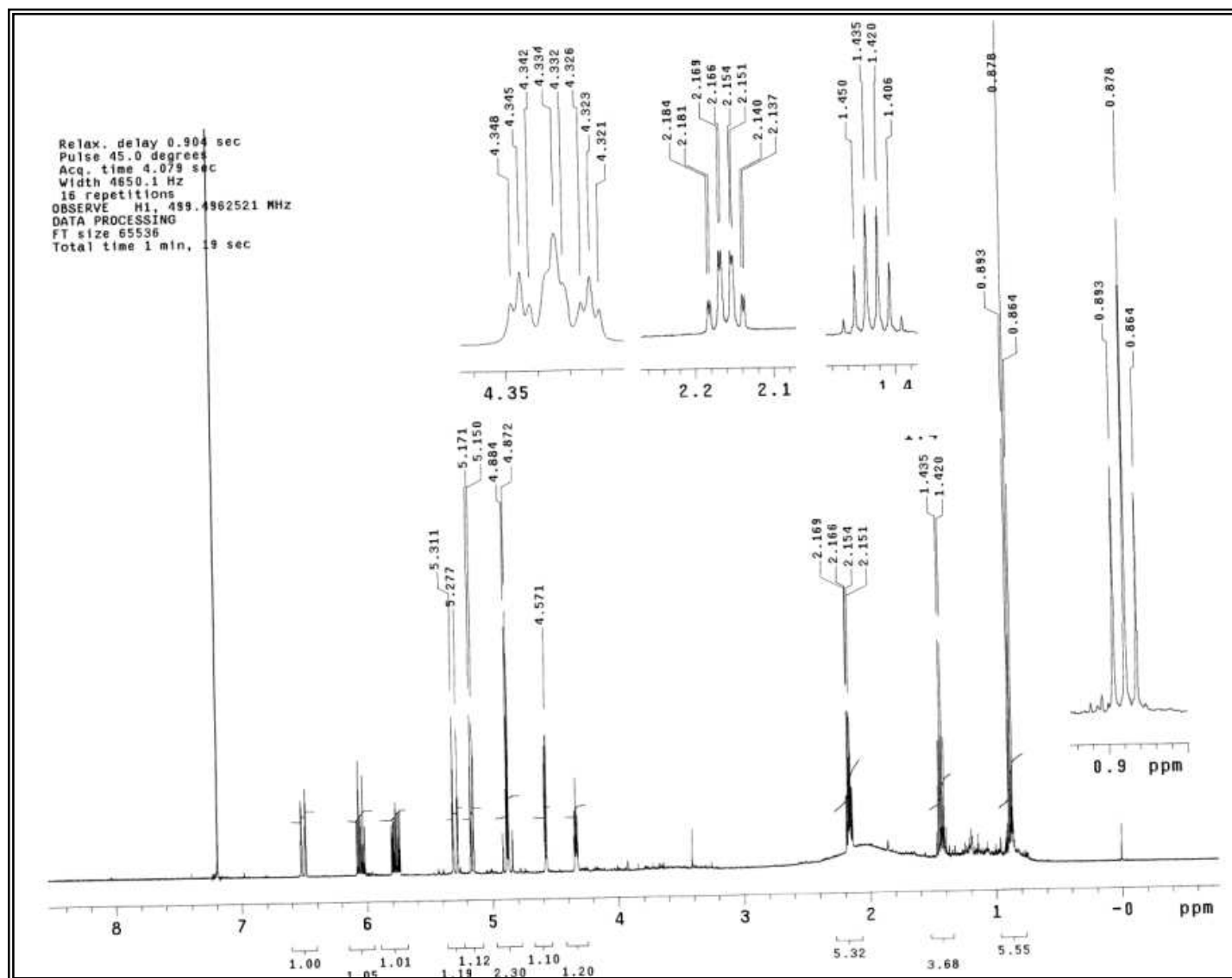
Anexo 78 - Espectro de Infra Vermelho da substância 11



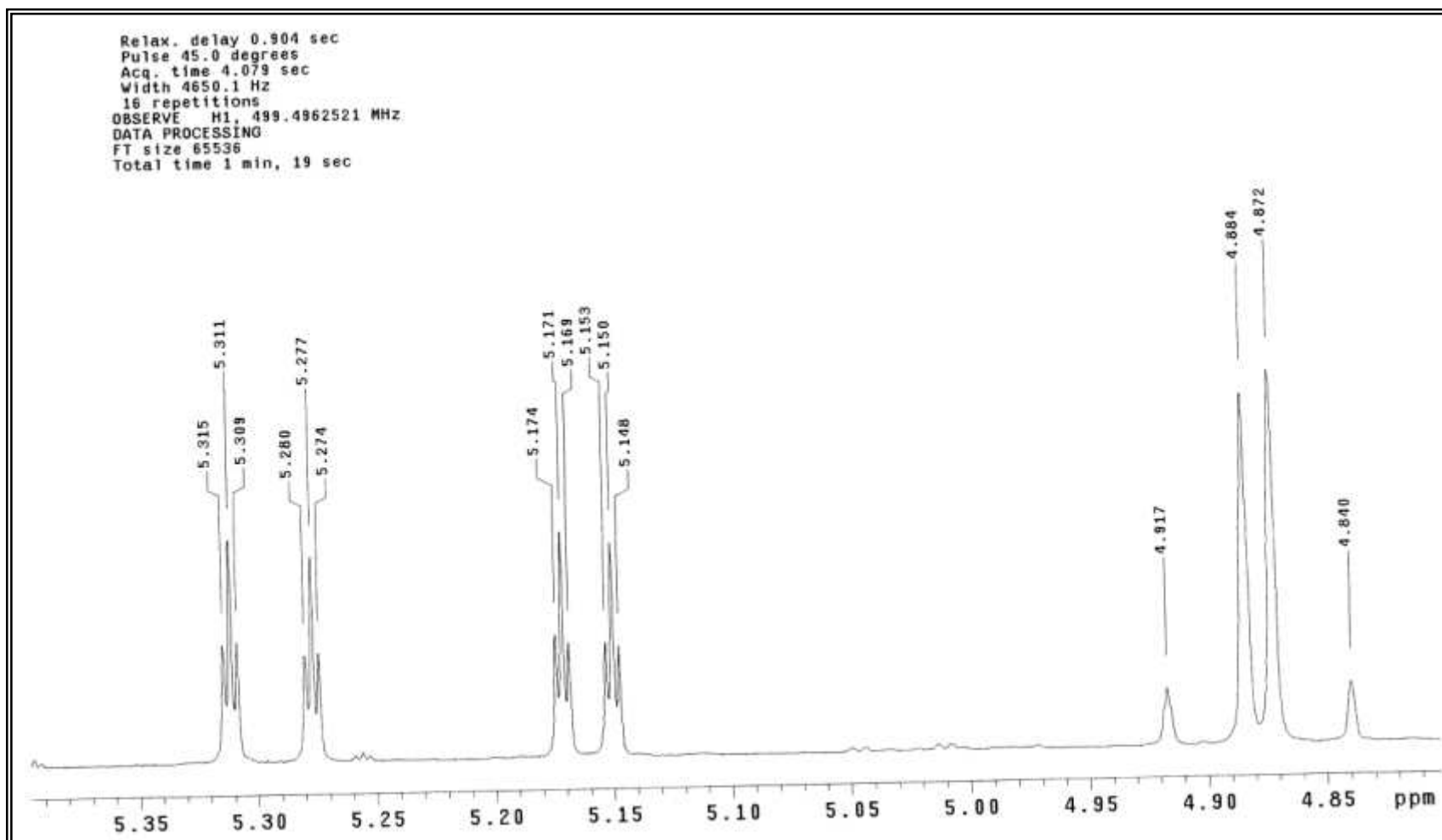
Anexo 79 - Espectro de ^{13}C da substância **11** (CDCl_3 125MHz)



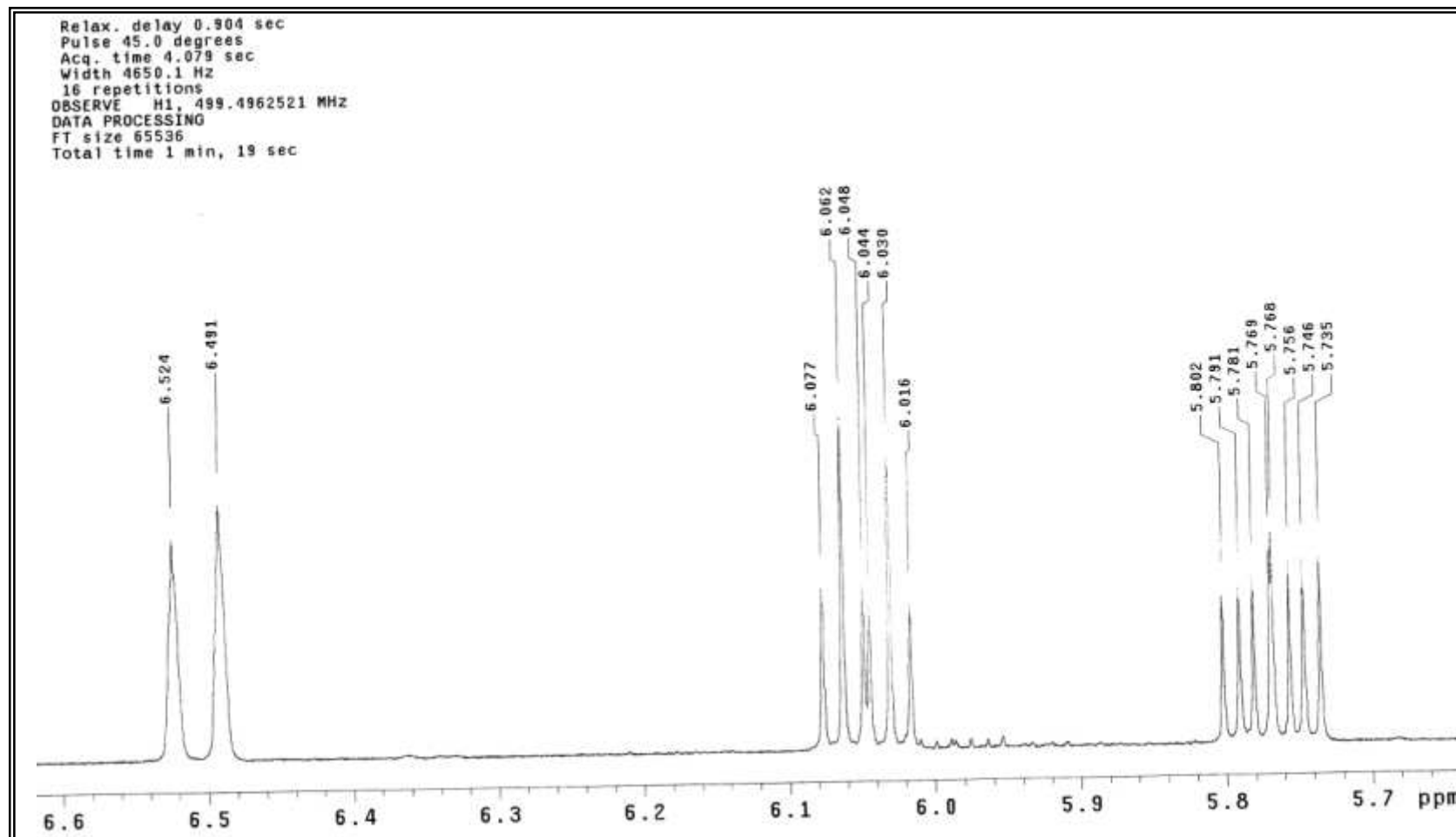
Anexo 80 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 11 (CDCl₃, 125 MHz)



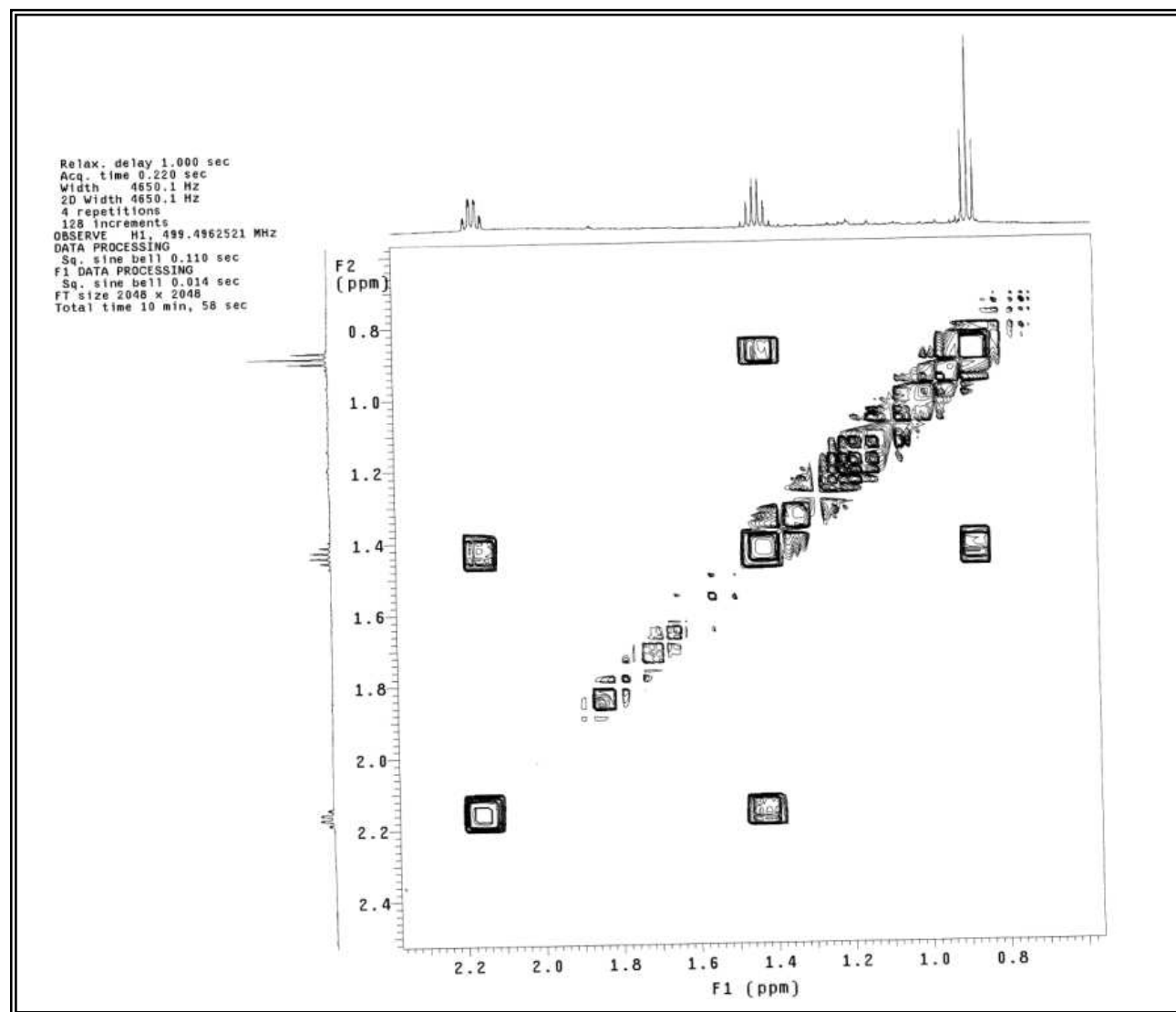
Anexo 81 - Espectro de RMN ^1H da substância **11** (CDCl_3 , 500 MHz)



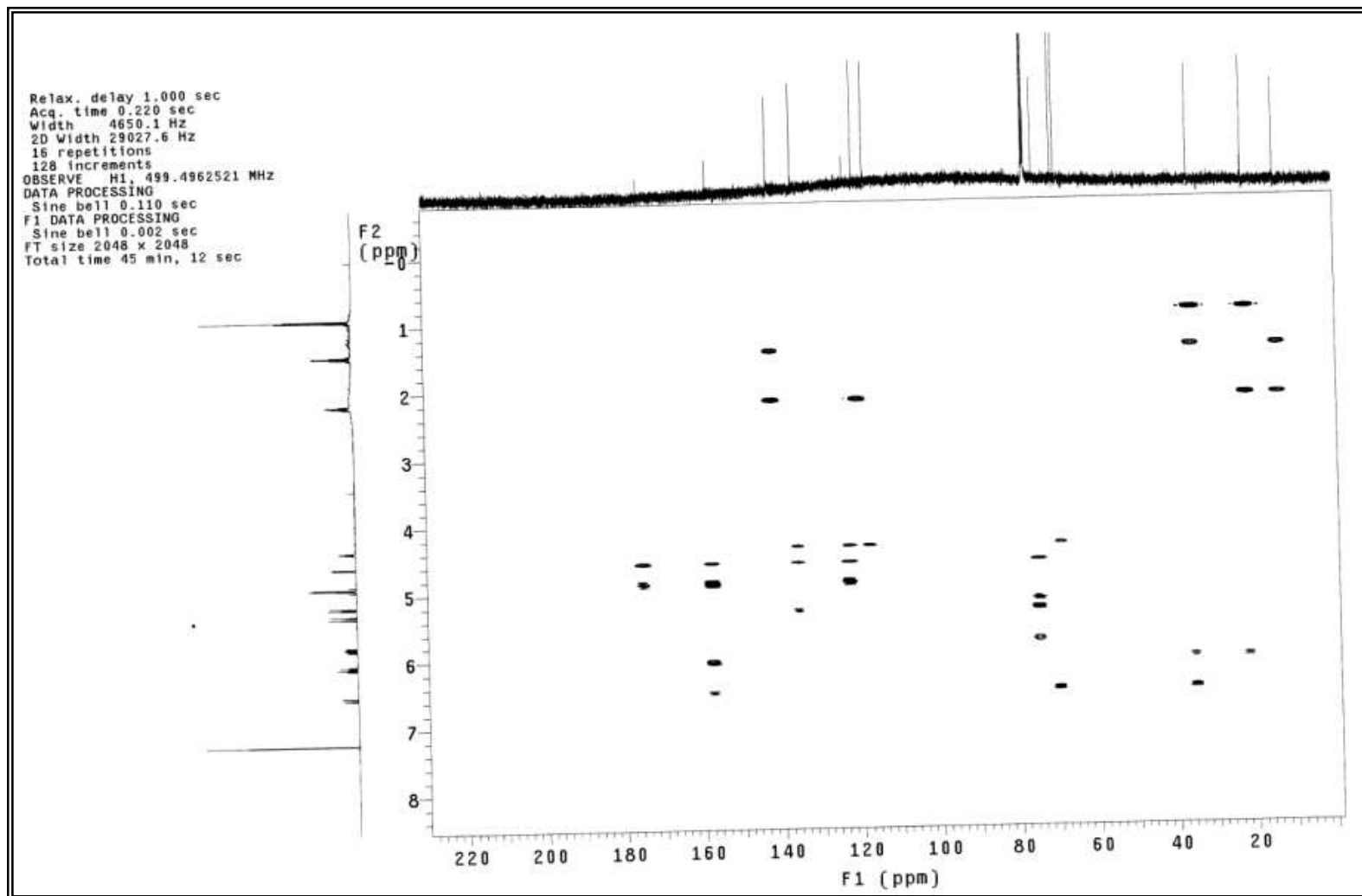
Anexo 82 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância **11** (CDCl_3 , 500 MHz)



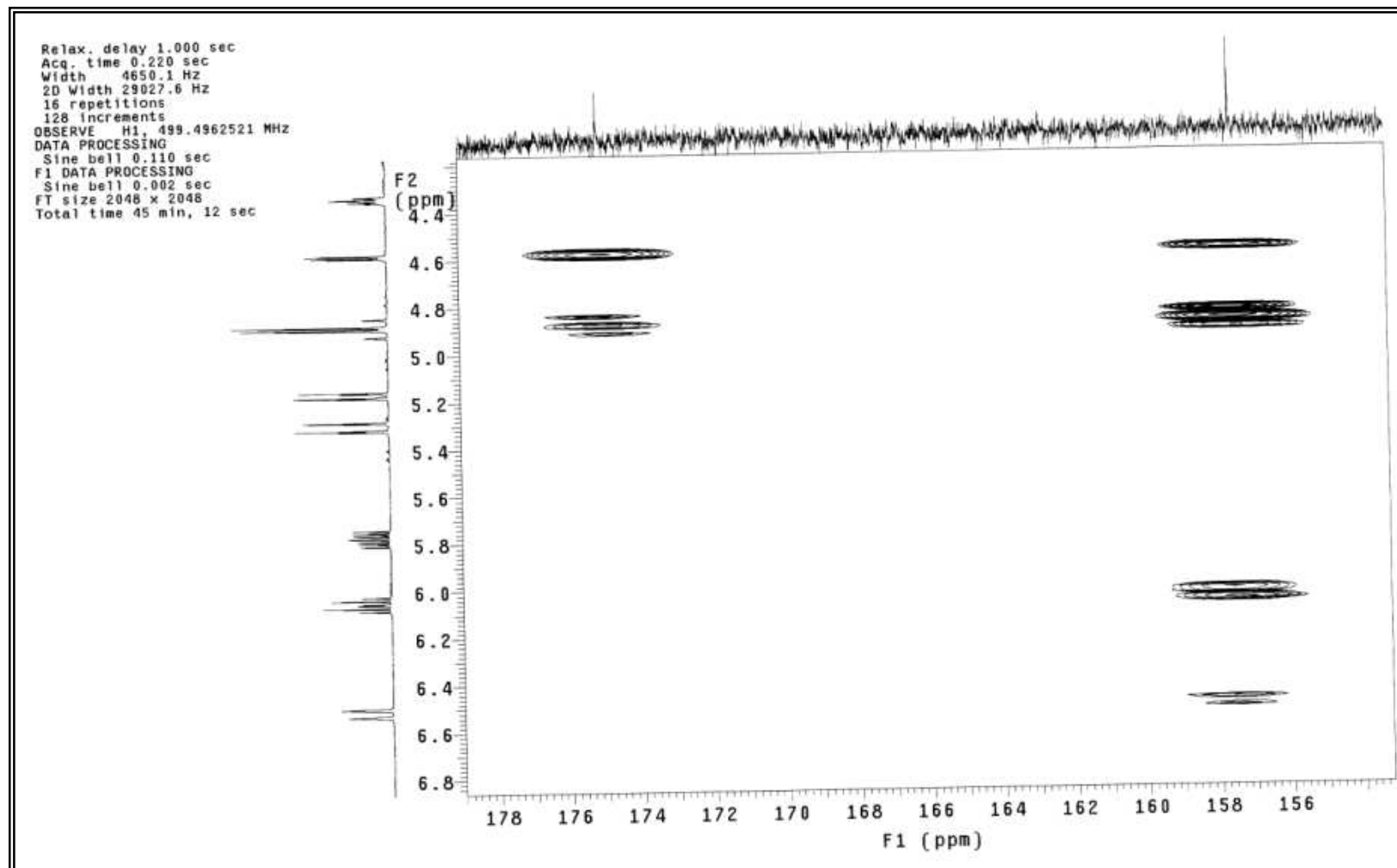
Anexo 83 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância **11** (CDCl_3 , 500 MHz)



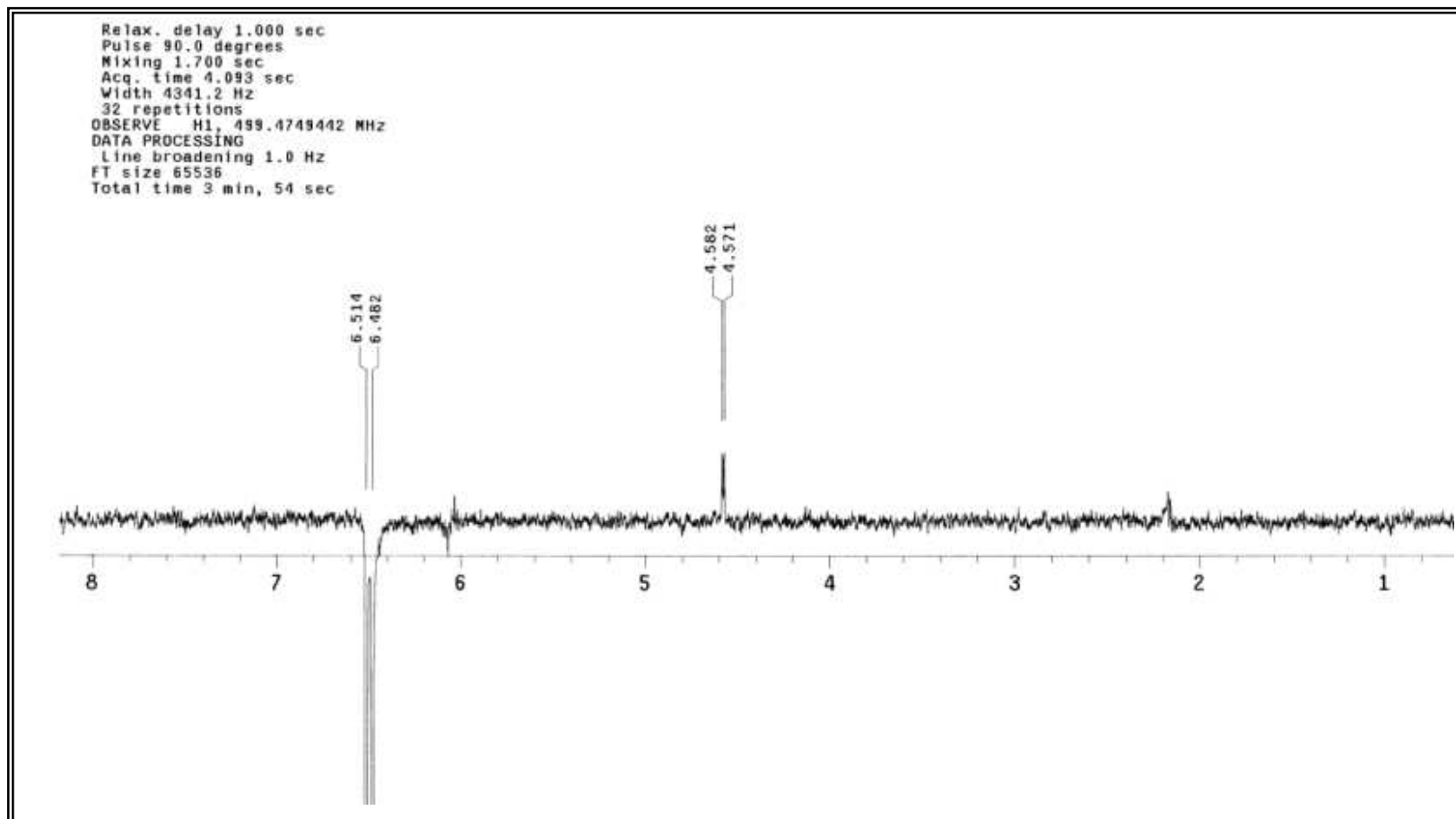
Anexo 84 – Expansão do espectro de gCOSY da substância **11** (CDCl₃, 125 MHz)



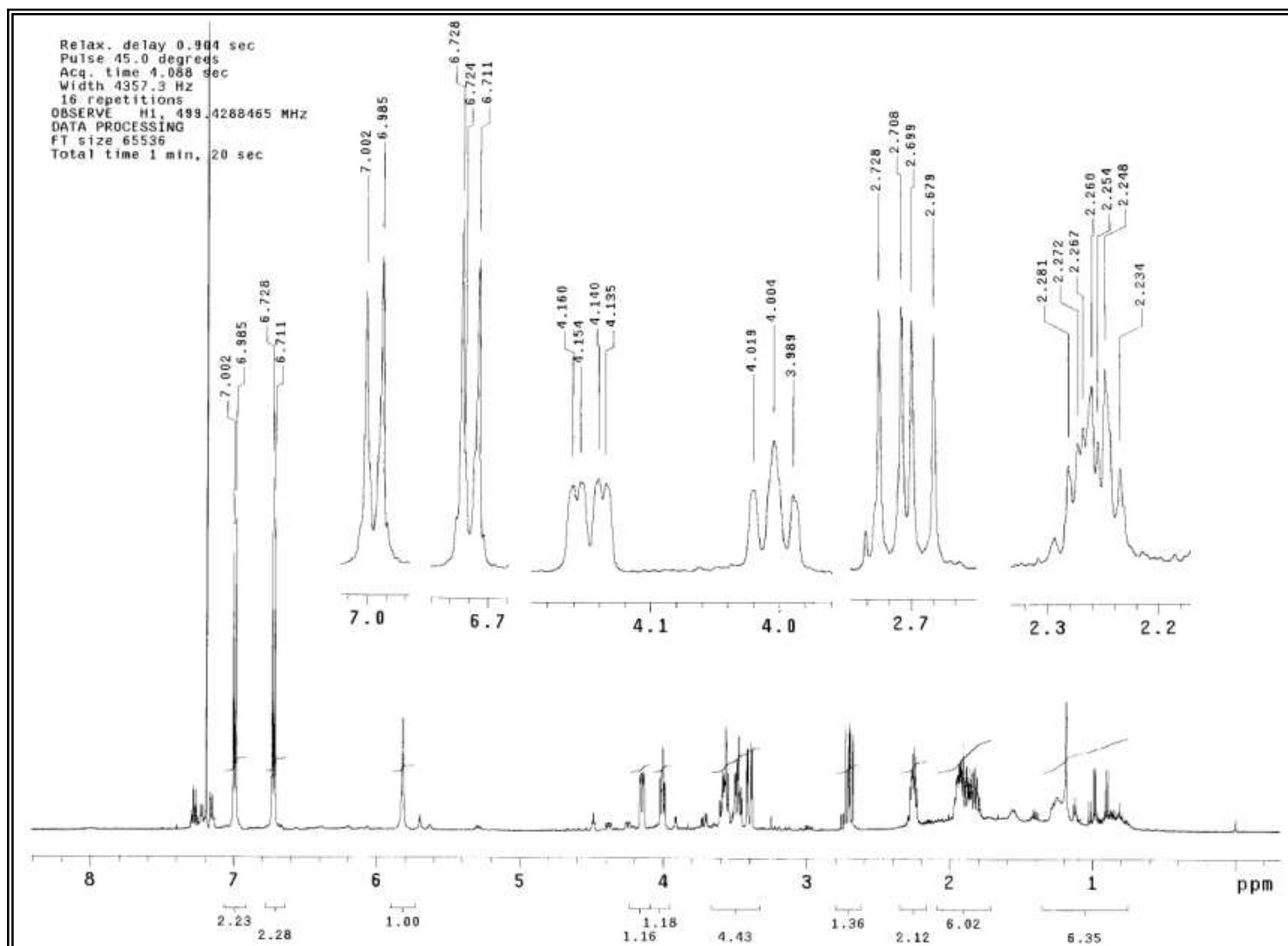
Anexo 85 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **11** (CDI₃, 125 MHz)



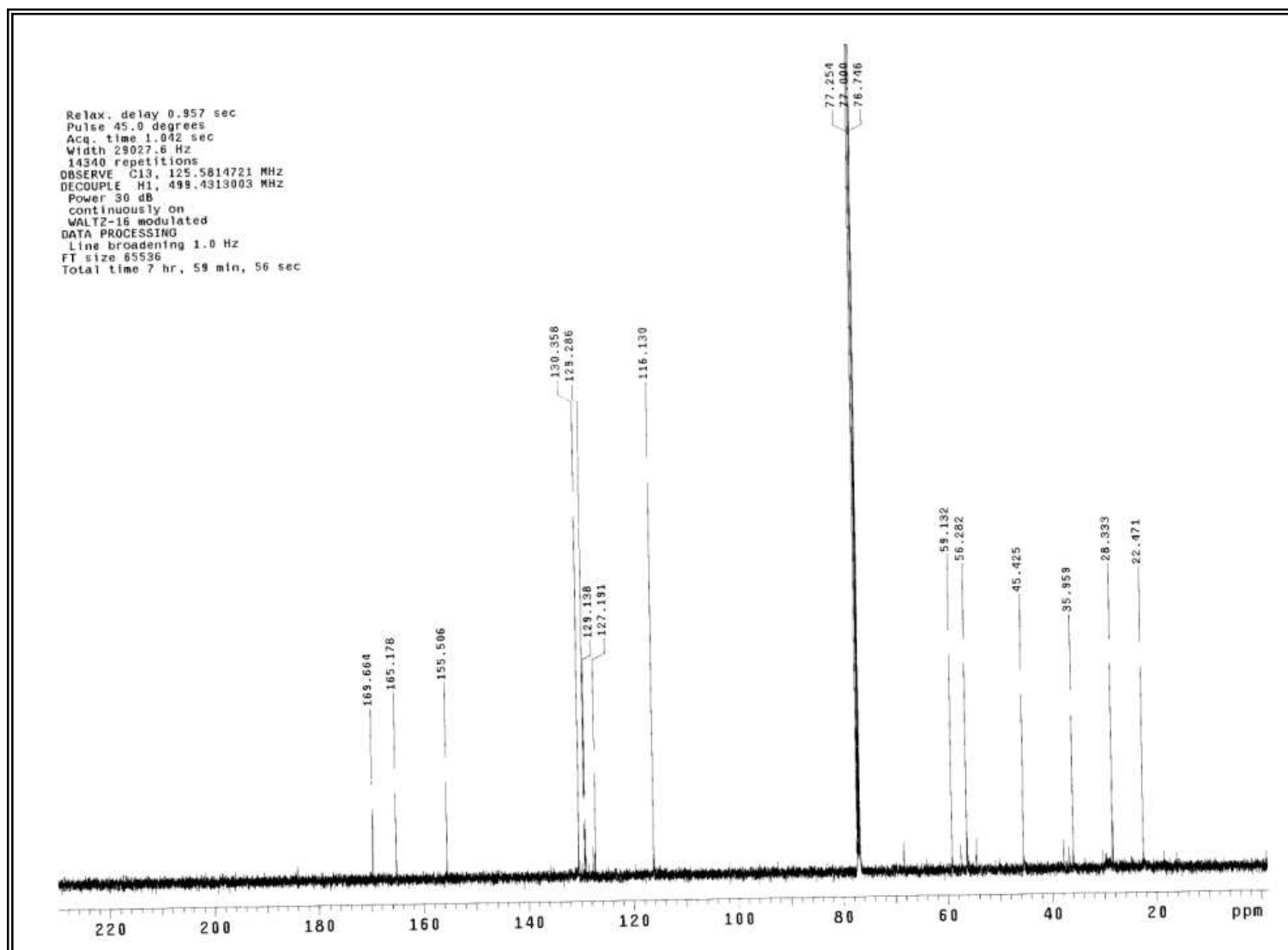
Anexo 86 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância 11 (CDCl₃, 125 MHz)



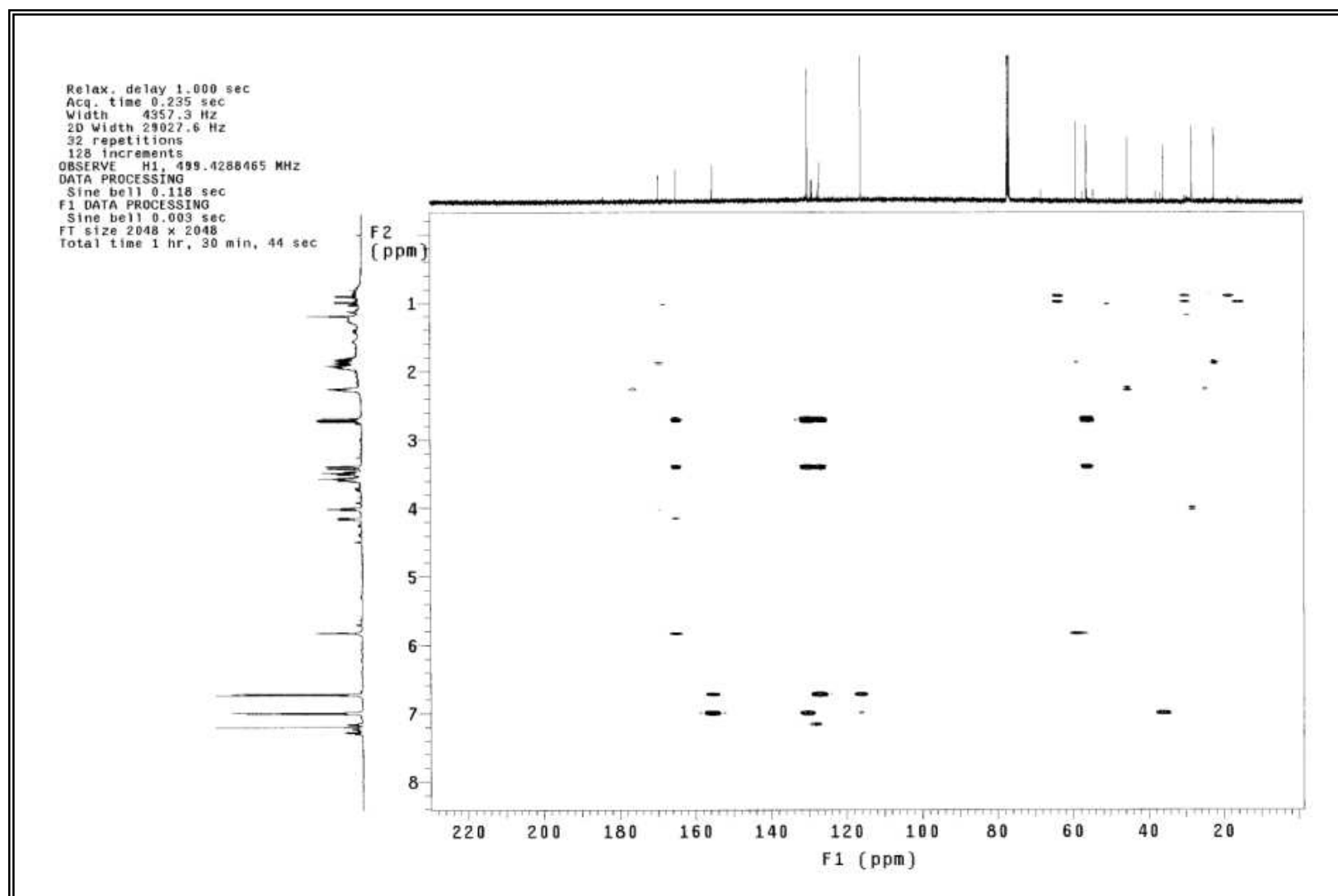
Anexo 87 - Espectro de NOESY 1D da substância **11** (CDCl₃, 125 MHz), hidrogênio irradiado H-10



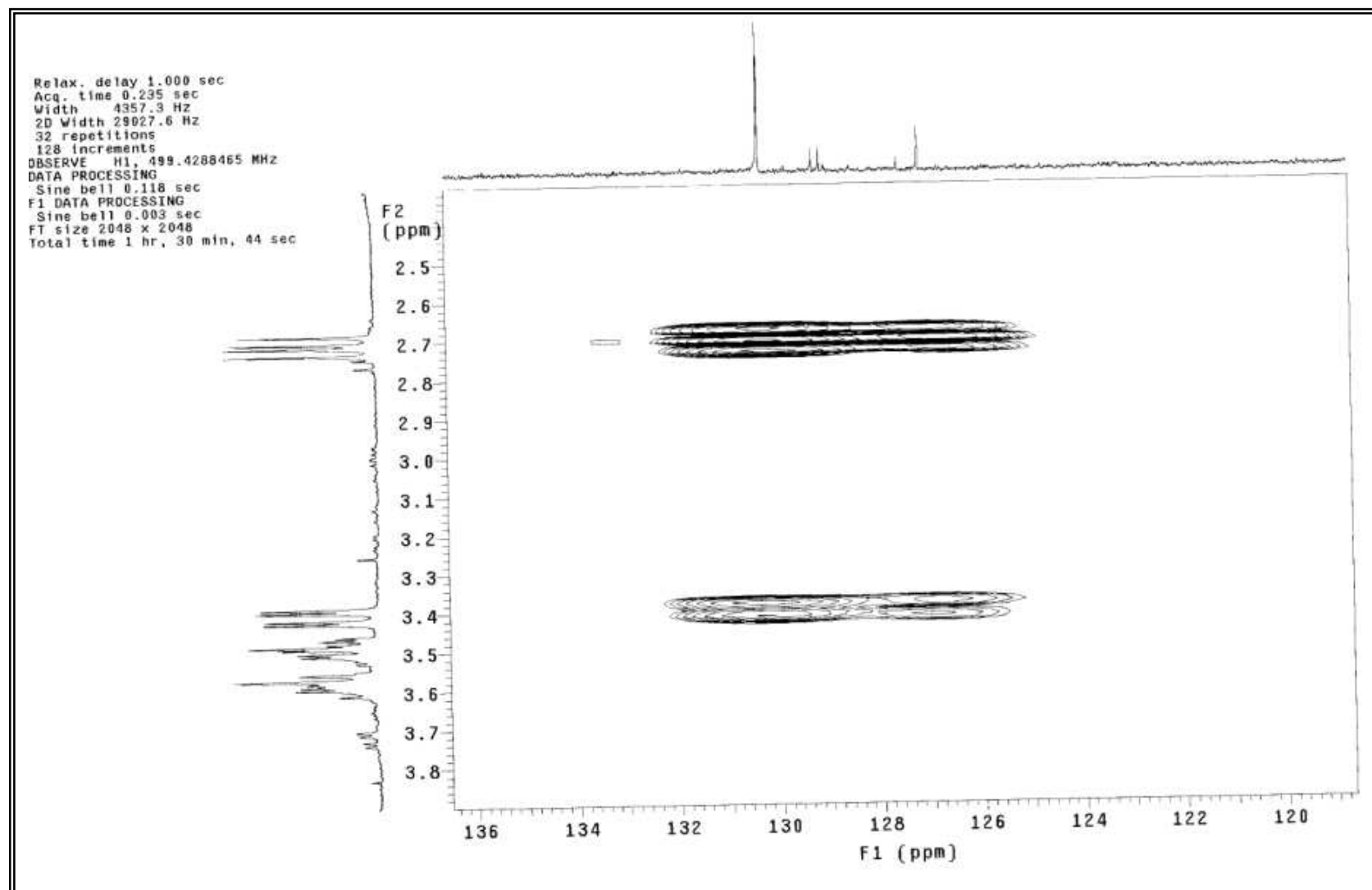
Anexo 88 - Espectro de RMN ^1H da substância **12** (CDCl_3 , 500 MHz)



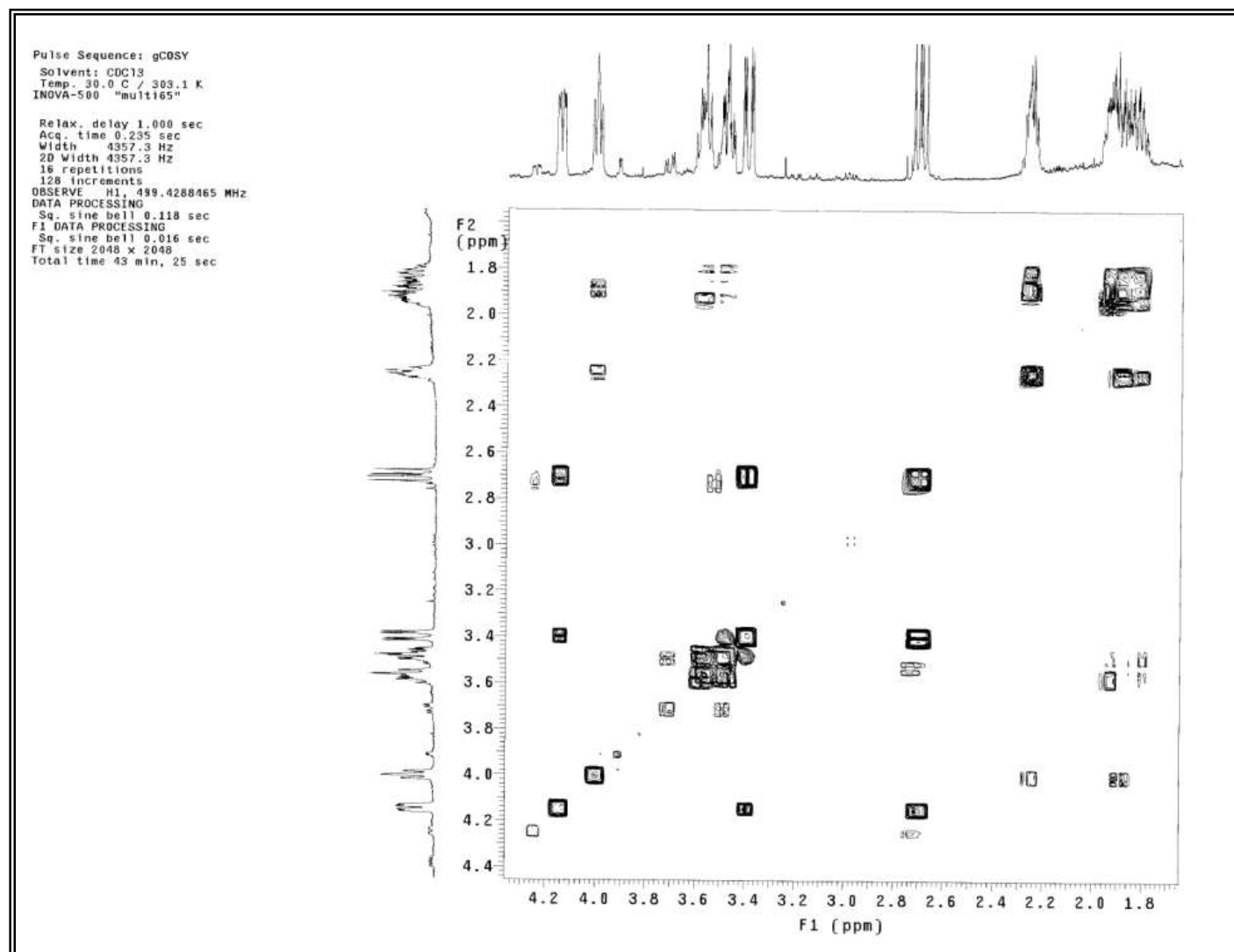
Anexo 89 - Espectro de ^{13}C da substância 12 (CDCl_3 125MHz)



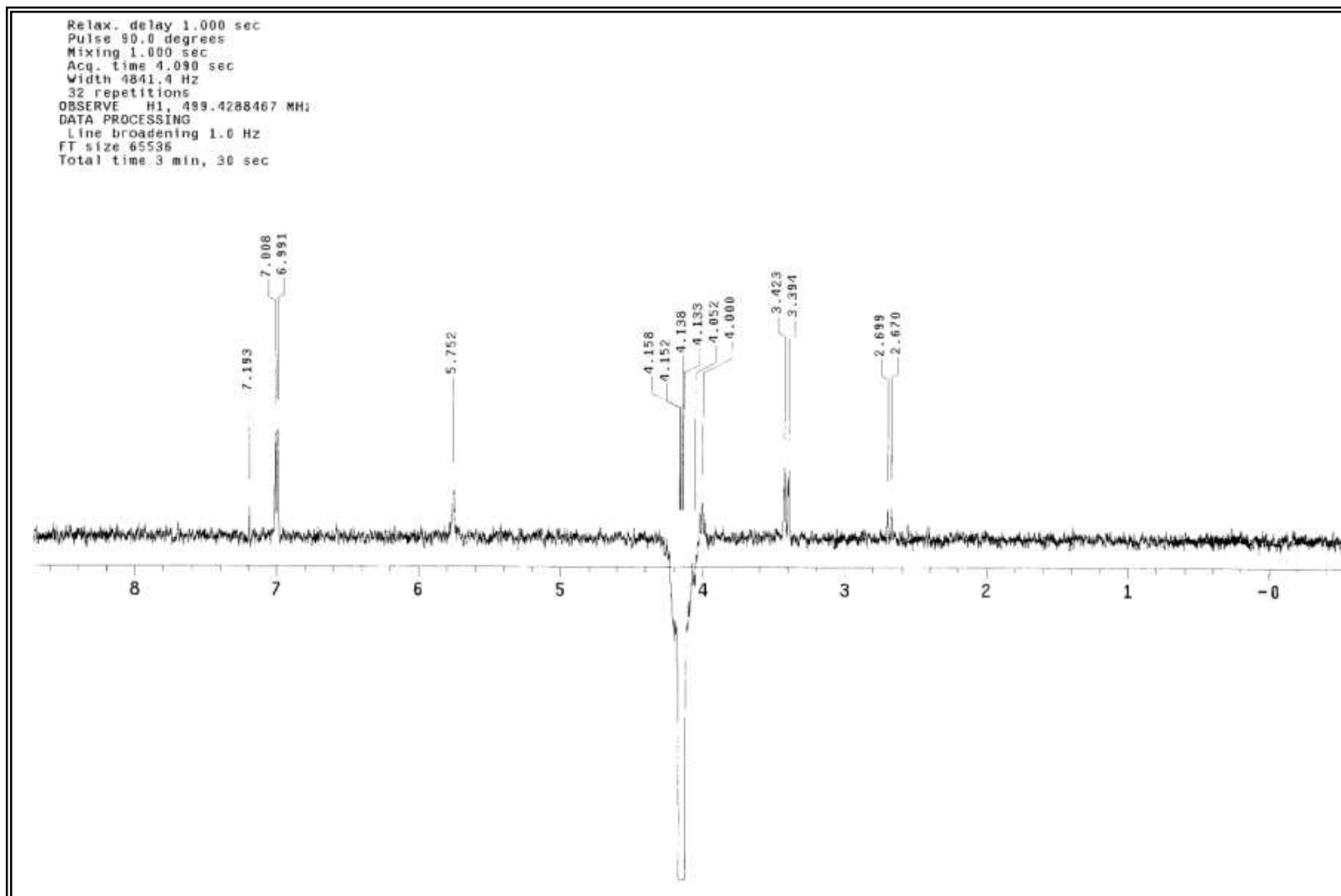
Anexo 90 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **12** (CDI₃, 125 MHz)



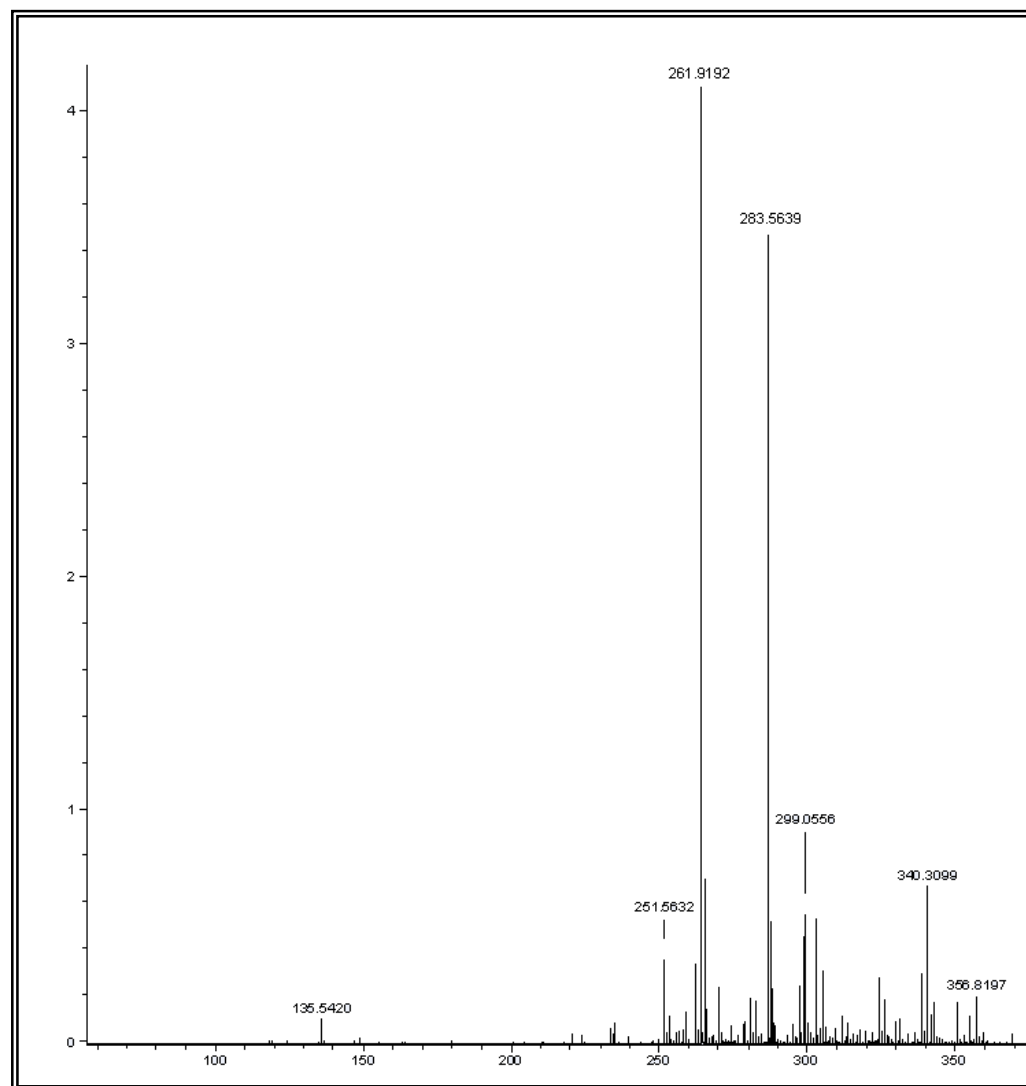
Anexo 91 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **12** (CDCl₃, 125 MHz)



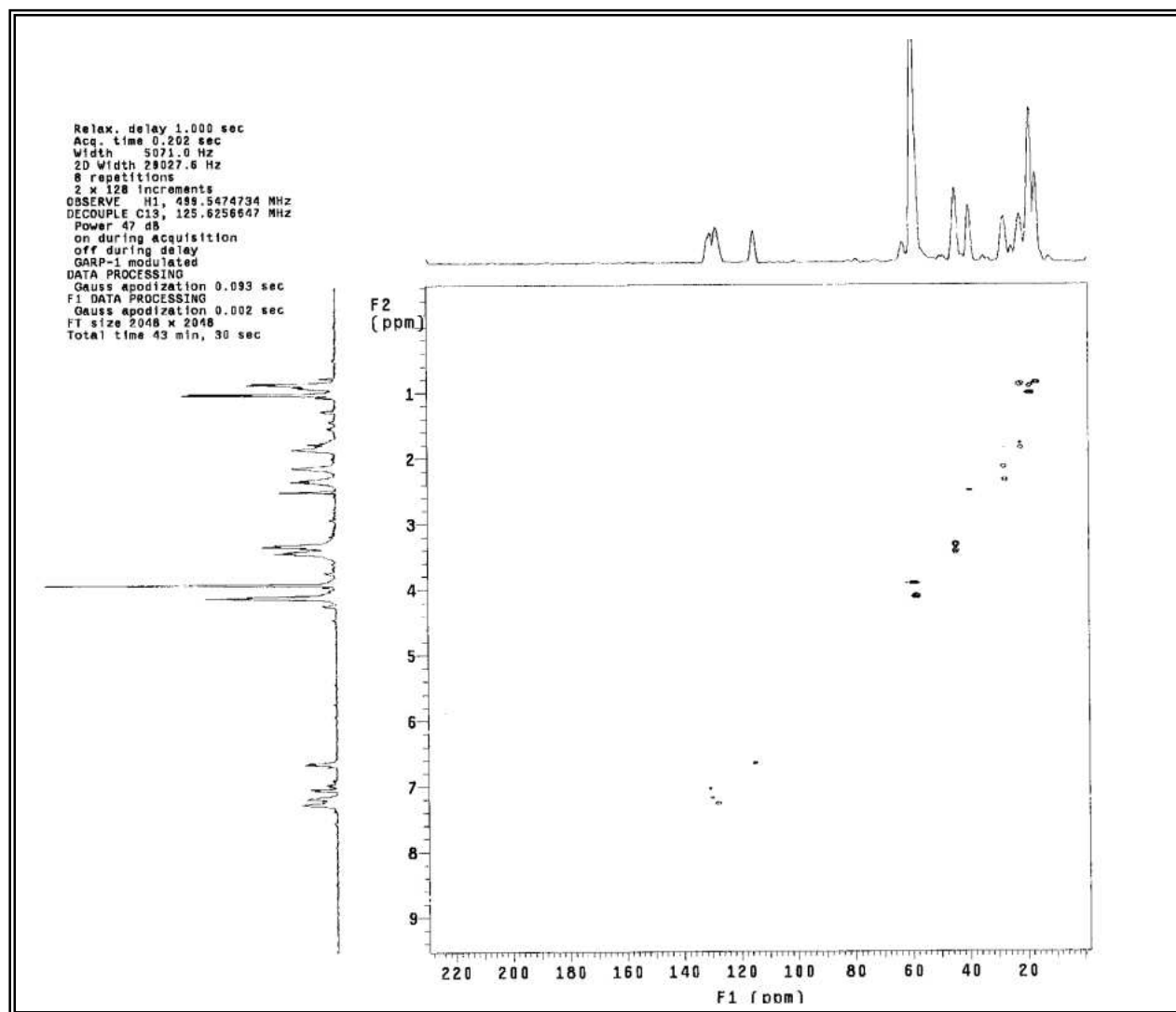
Anexo 92 – Expansão do espectro de gCOSY da substância **12** (CDCl₃, 125 MHz)



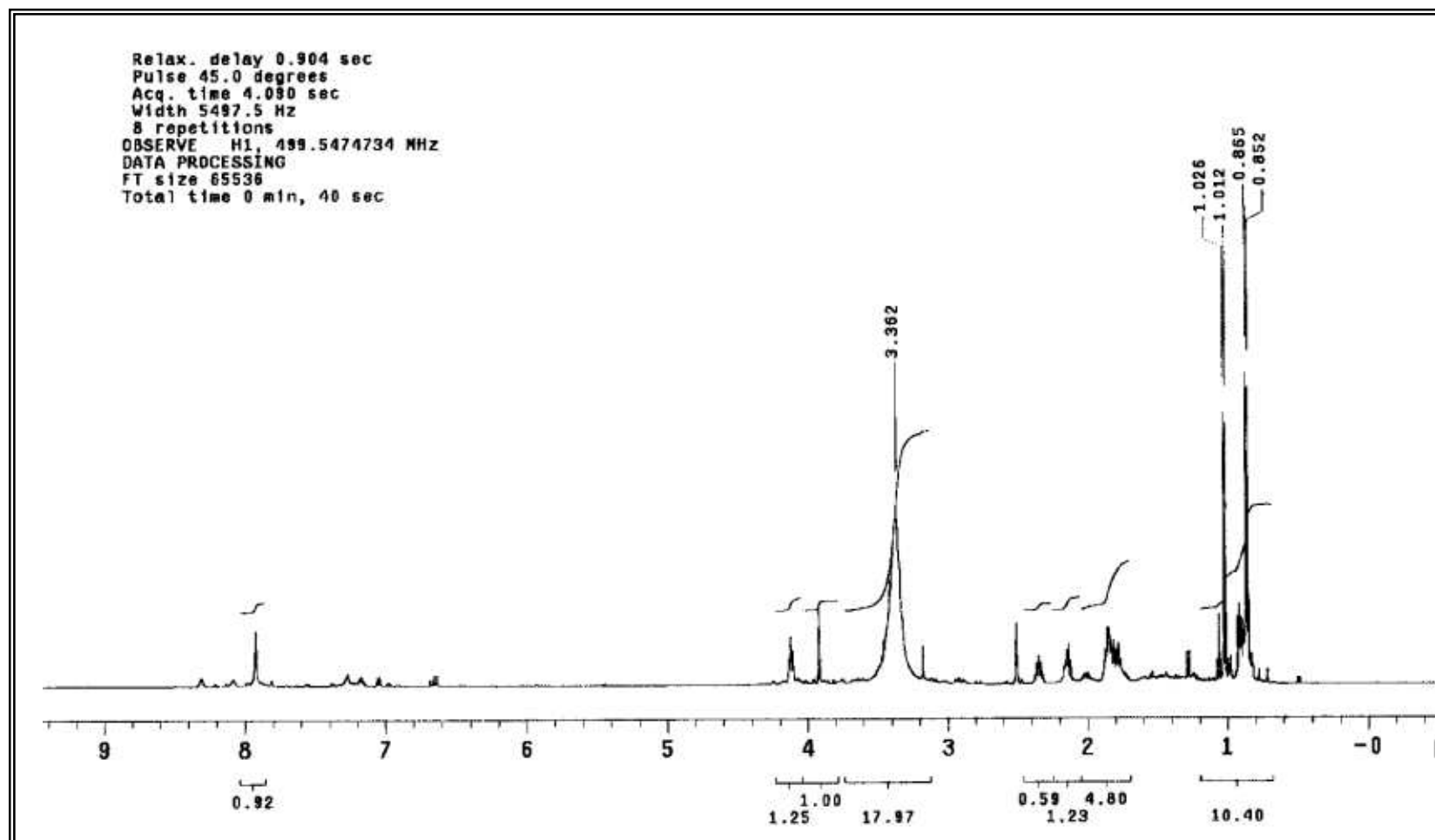
Anexo 93 - Espectro de NOESY 1D da substância **12** (CDCl₃, 125 MHz), hidrogênio irradiado H-9



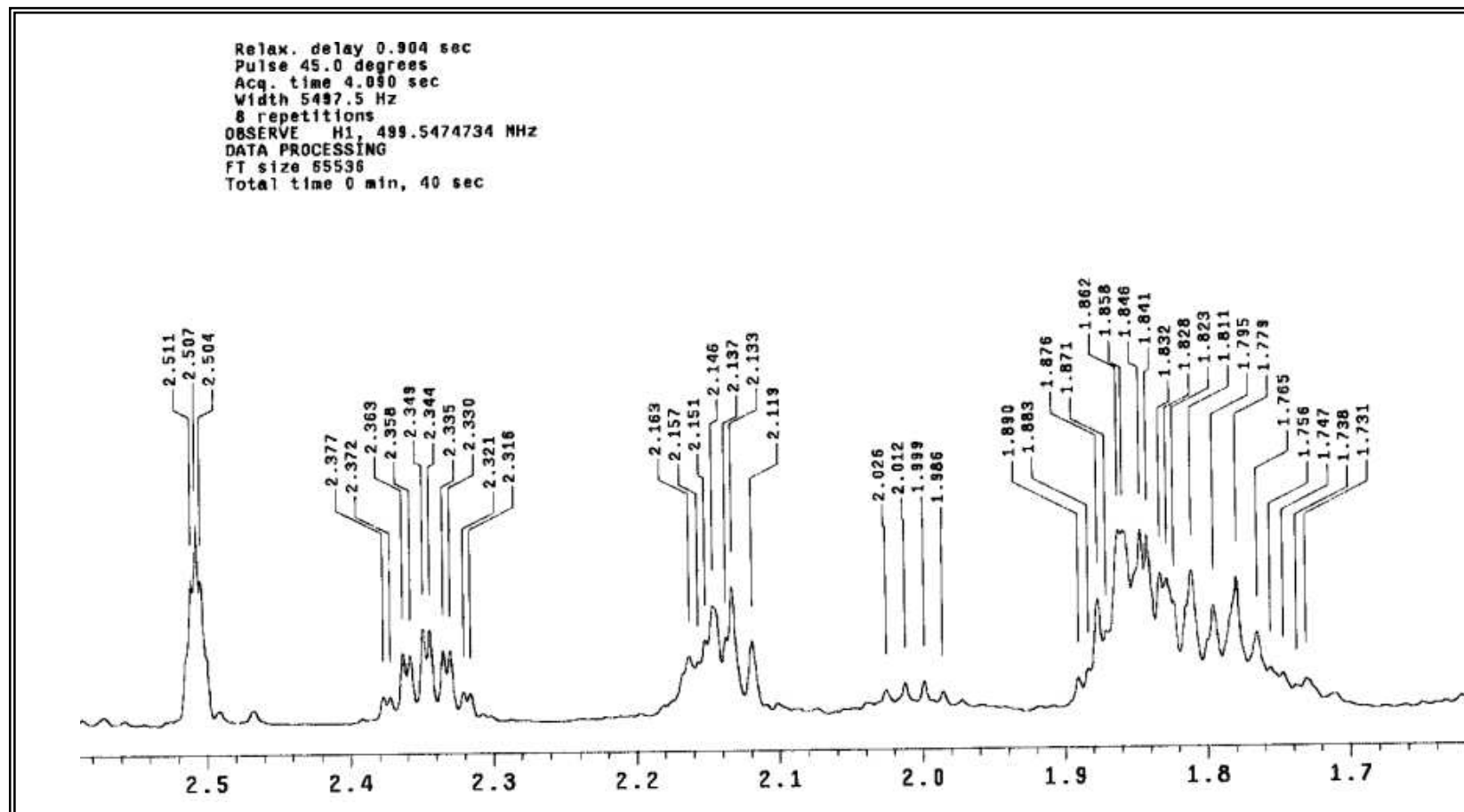
Anexo 94 - Espectro de ESI-MS $[M+H]^+$ da substância **12**



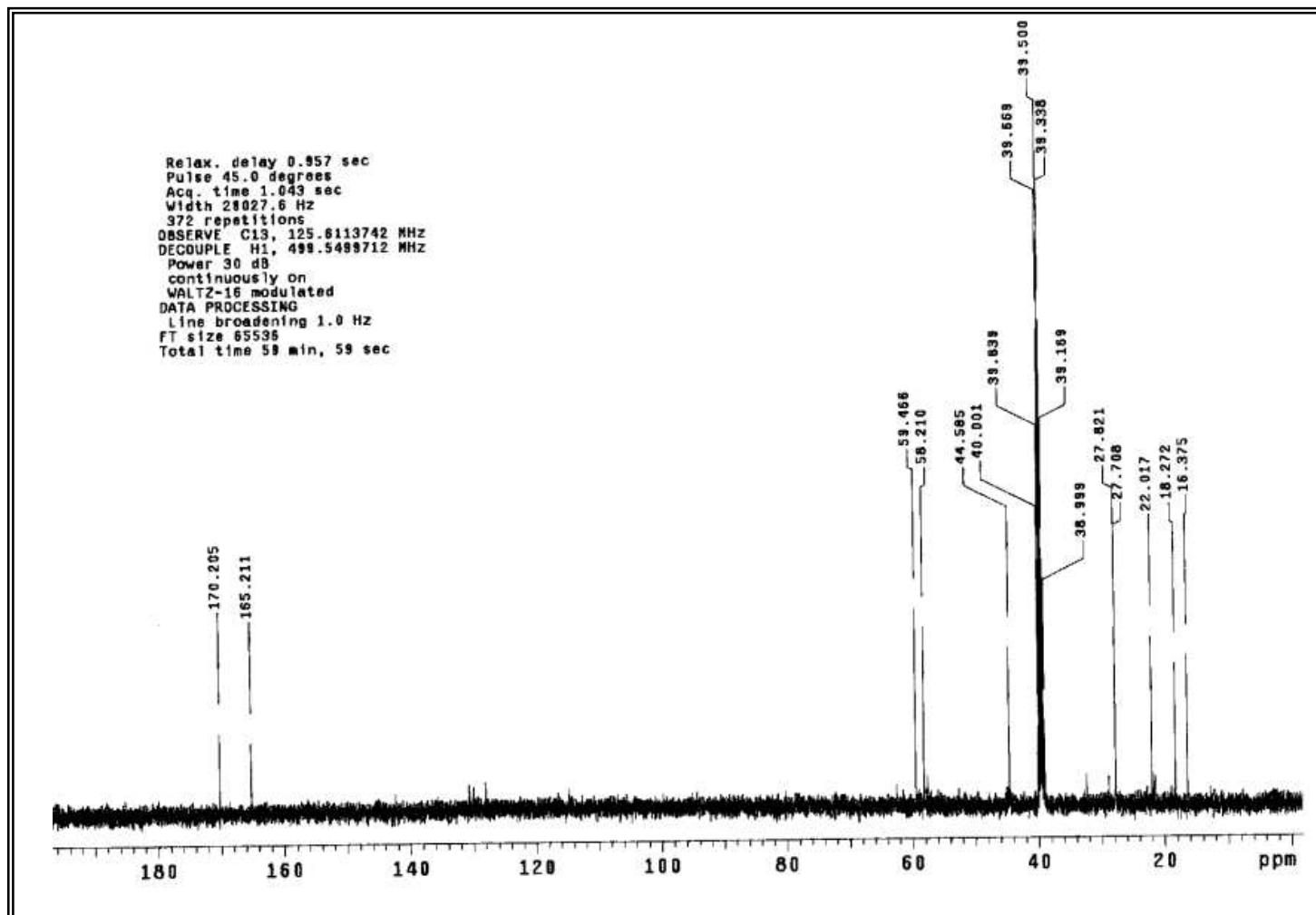
Anexo 95 - Mapa de contorno de gHMQC da substância **13** (DMSO- d_6 , 125 MHz)



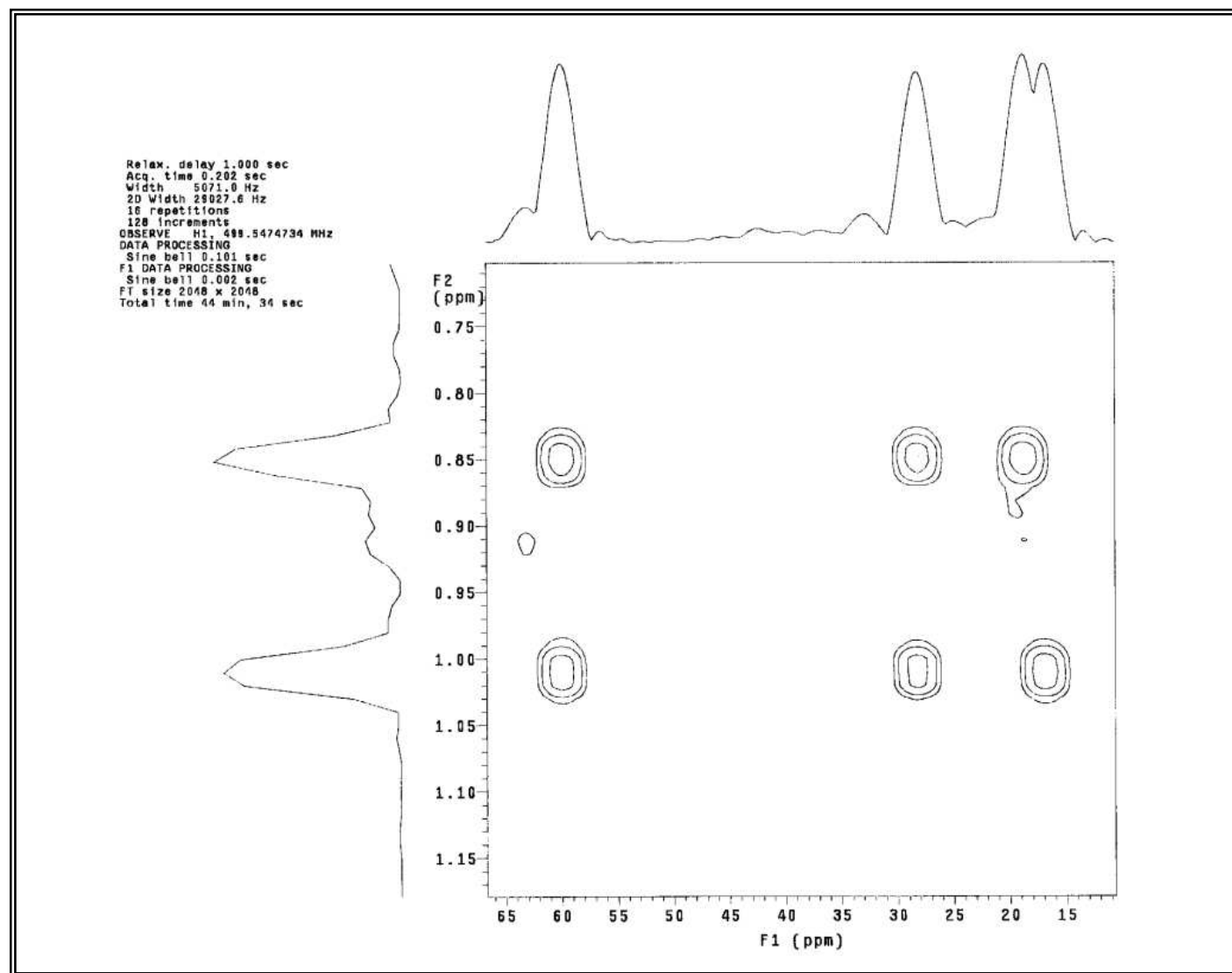
Anexo 96 - Espectro de RMN ^1H da substância 13 (DMSO- d_6 , 500 MHz)



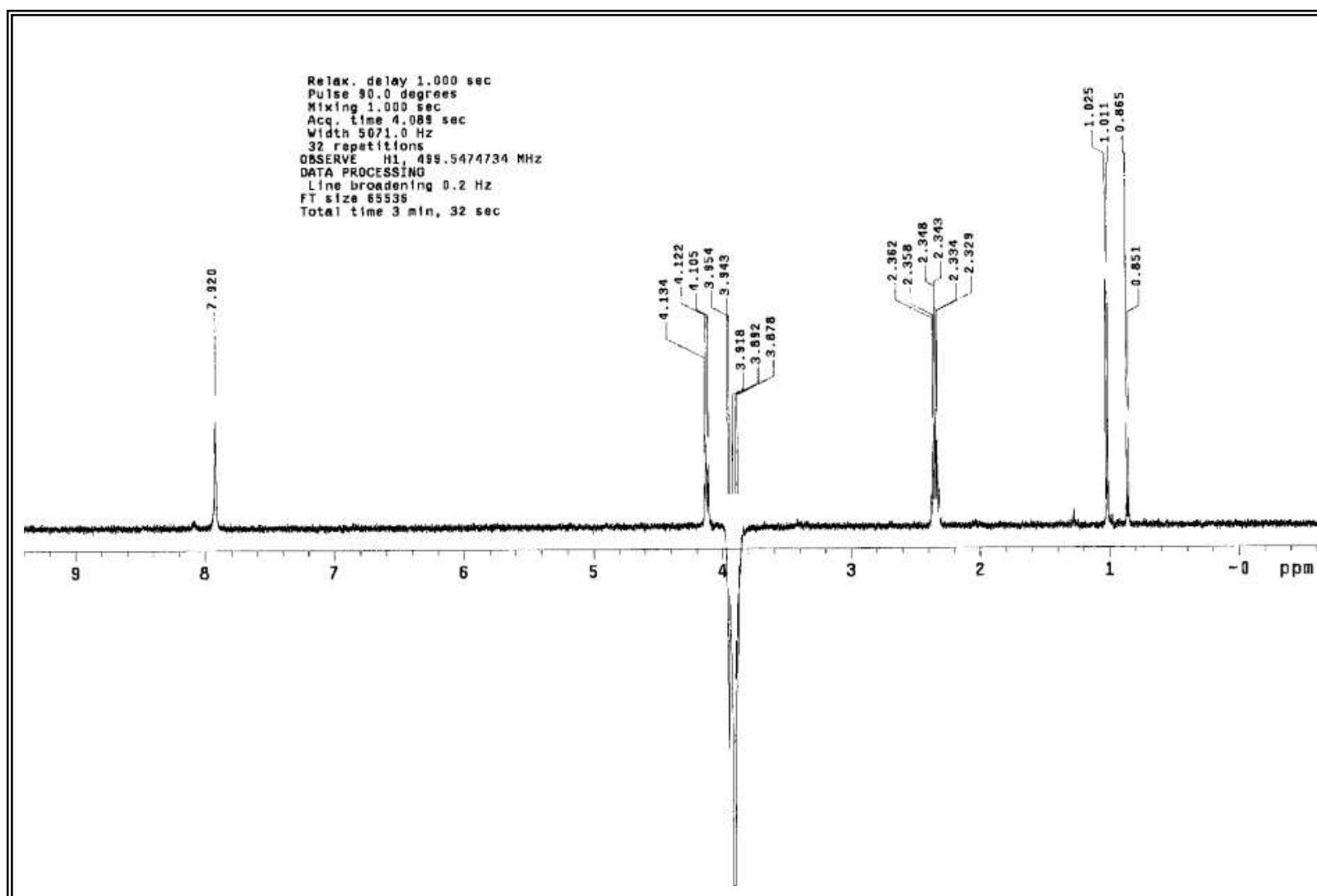
Anexo 97 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância **13** (DMSO- d_6 , 500 MHz)



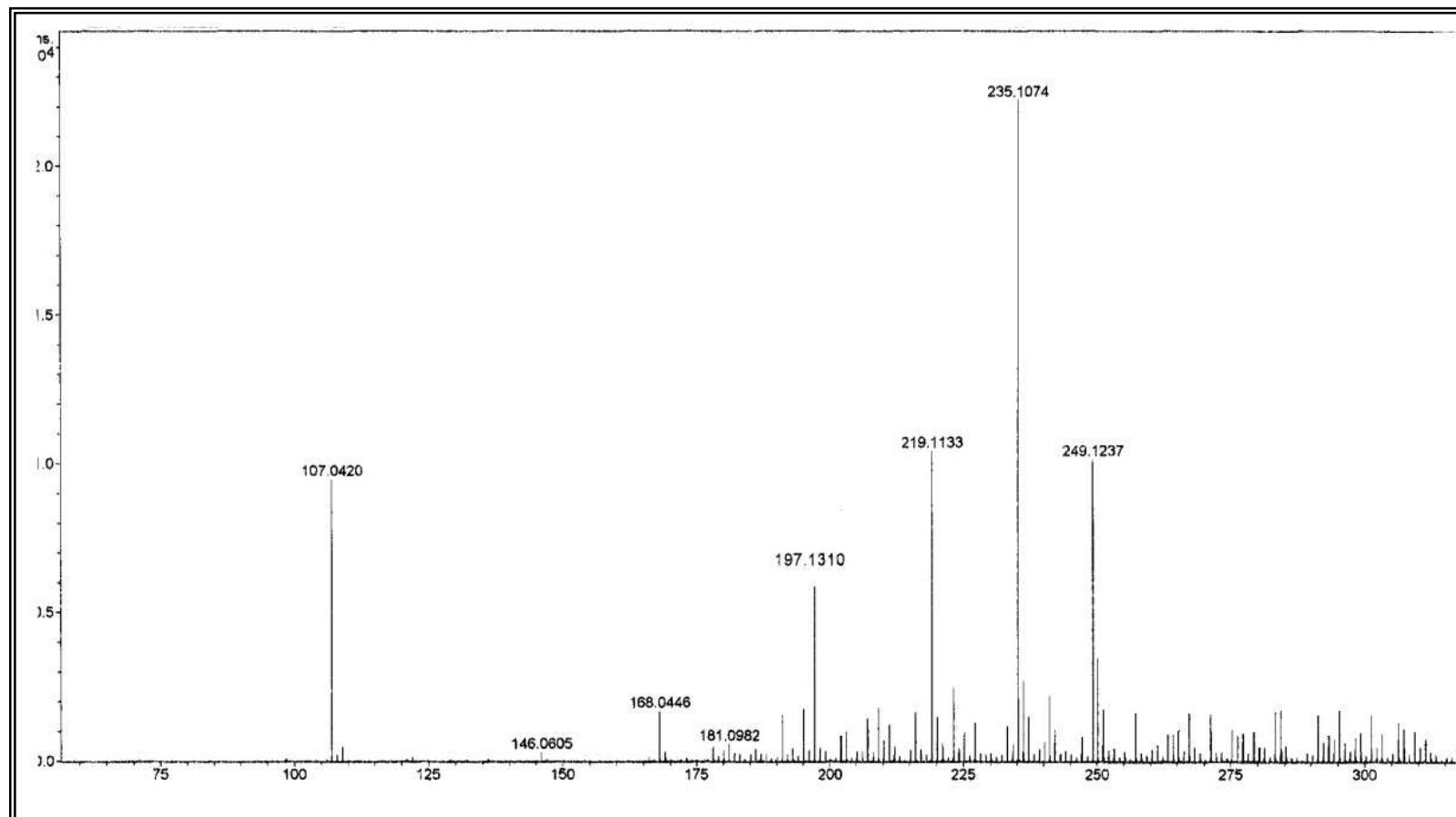
Anexo 98 - Espectro de ^{13}C da substância 13 (DMSO- d_6 125MHz)



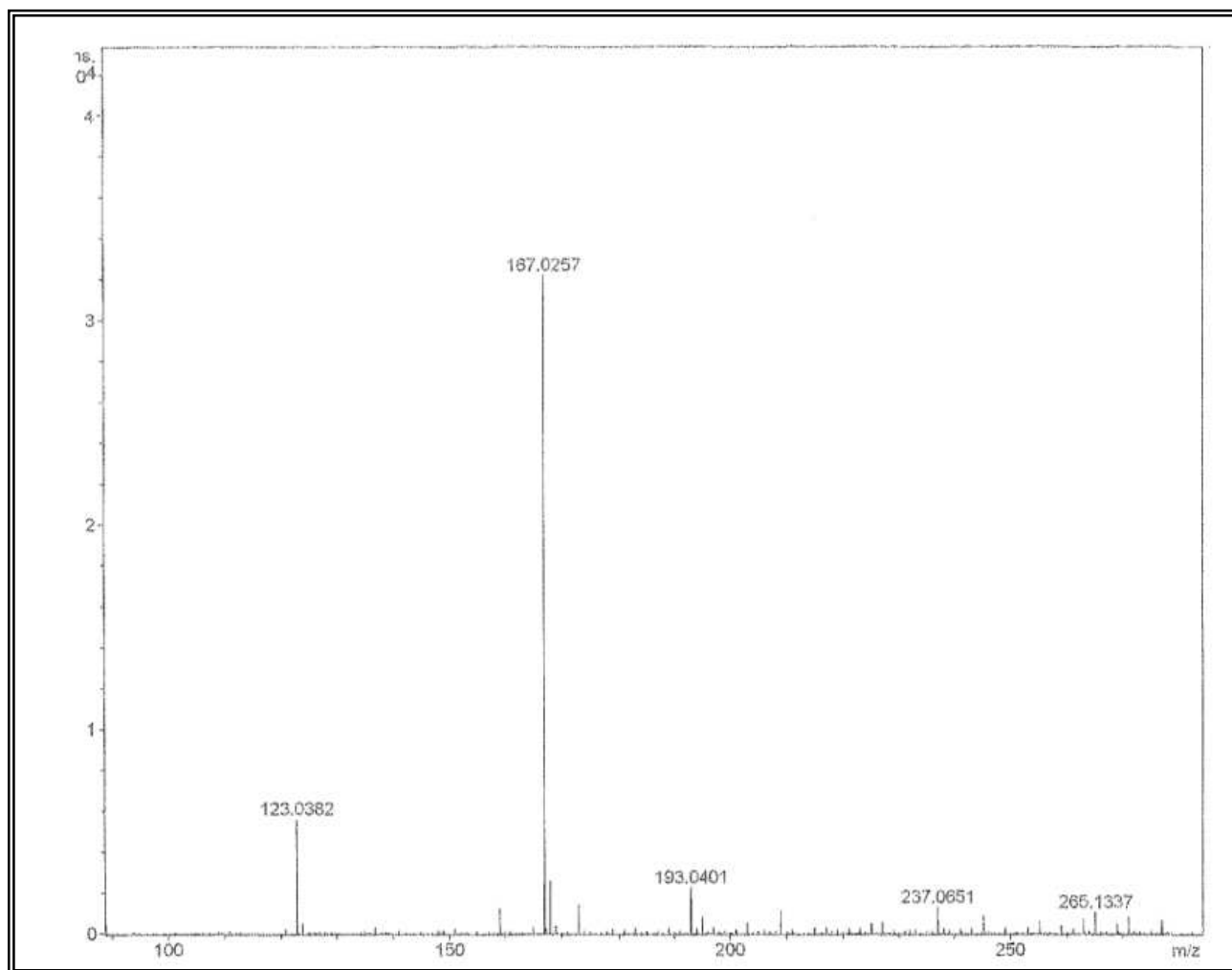
Anexo 99 - Expansão do mapa de contorno de gHMBC da substância **13** (DMSO- d_6 , 125 MHz)



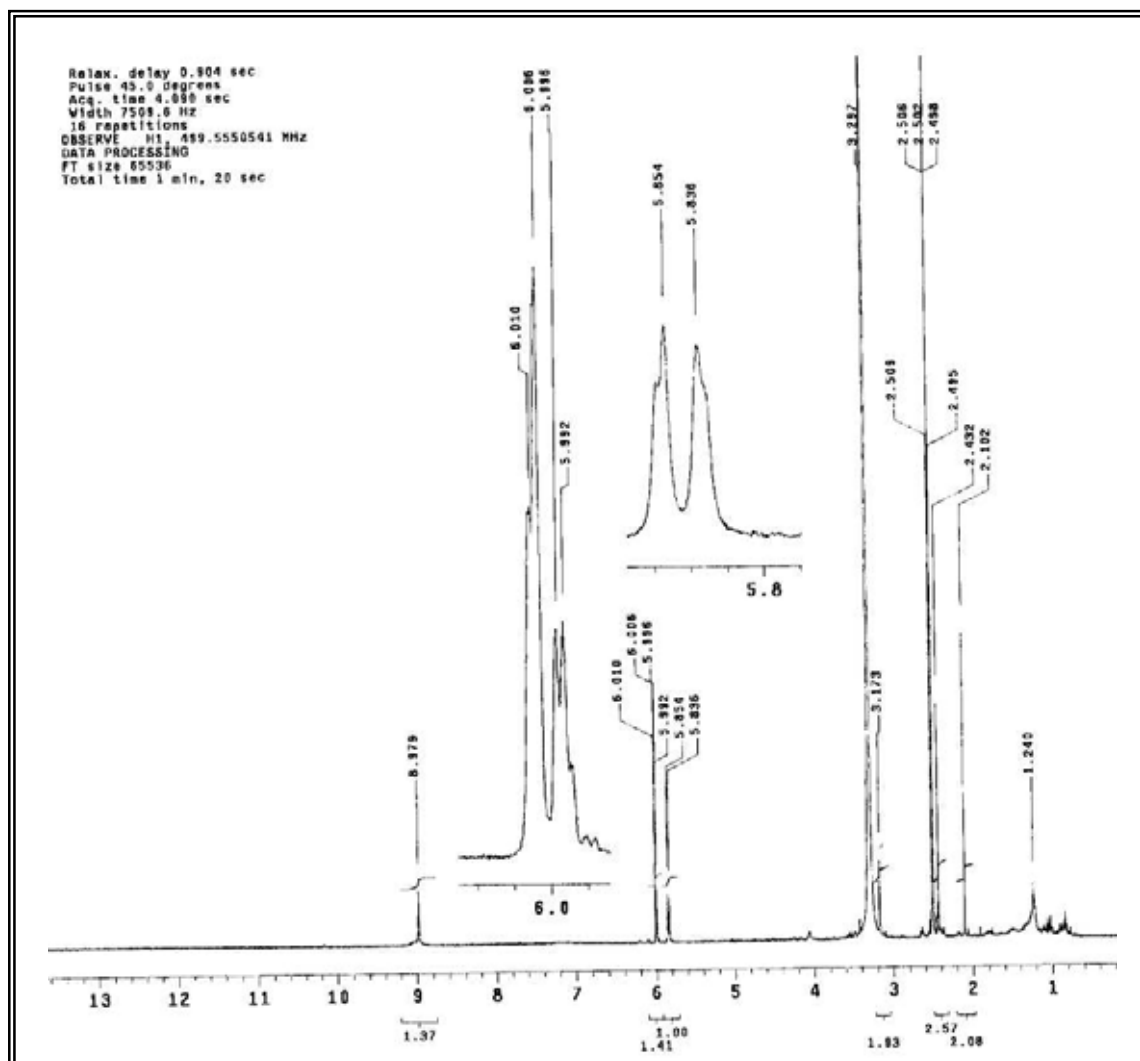
Anexo 100 - Espectro de NOESY 1D da substância **13** (DMSO- d_6 , 125 MHz), hidrogênio irradiado H-9



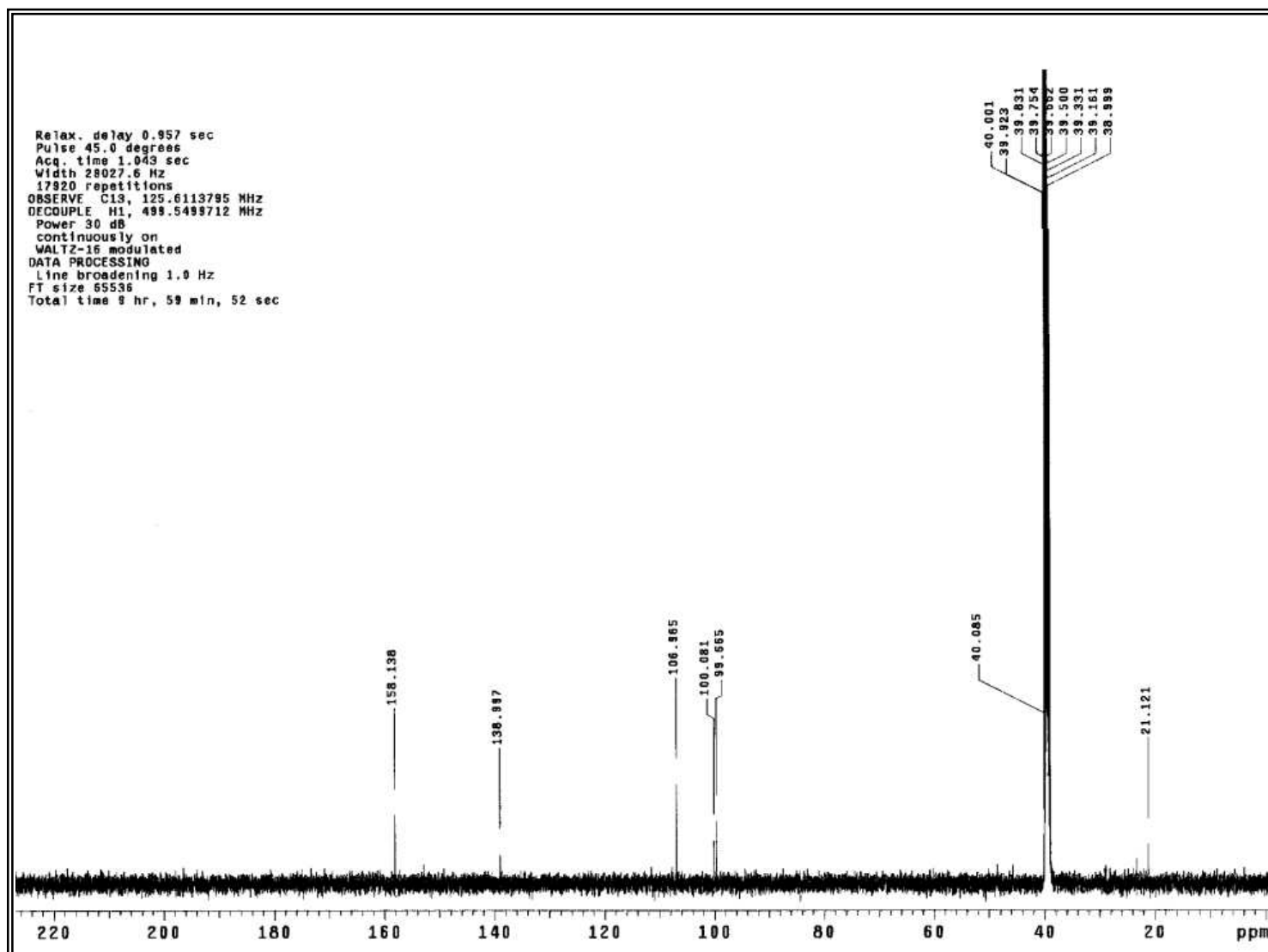
Anexo 101 - Espectro de ESI-MS $[M+H]^+$ da substância 13



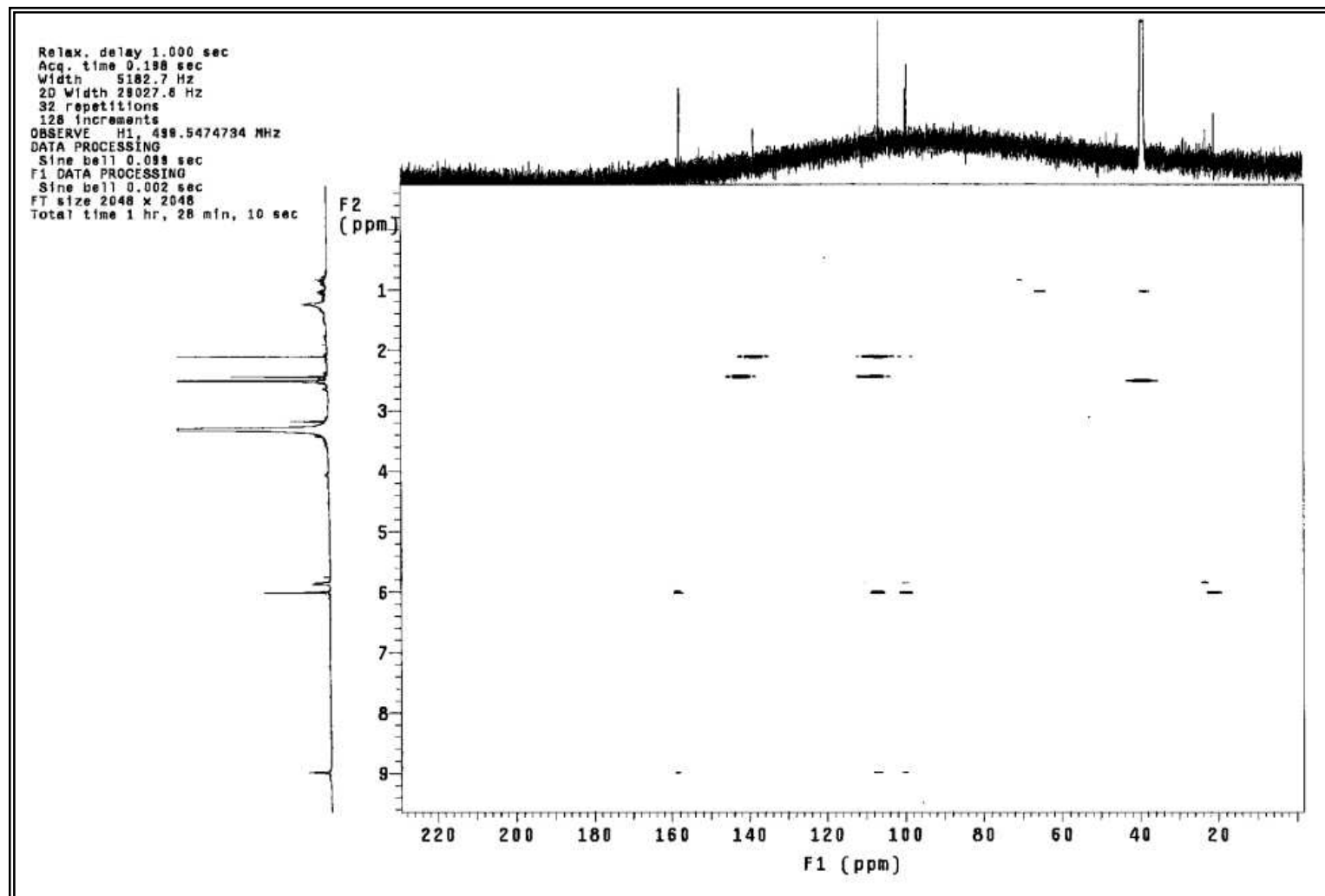
Anexo 102- Espectro de ESI-MS $[M-H]^-$ da substância 14



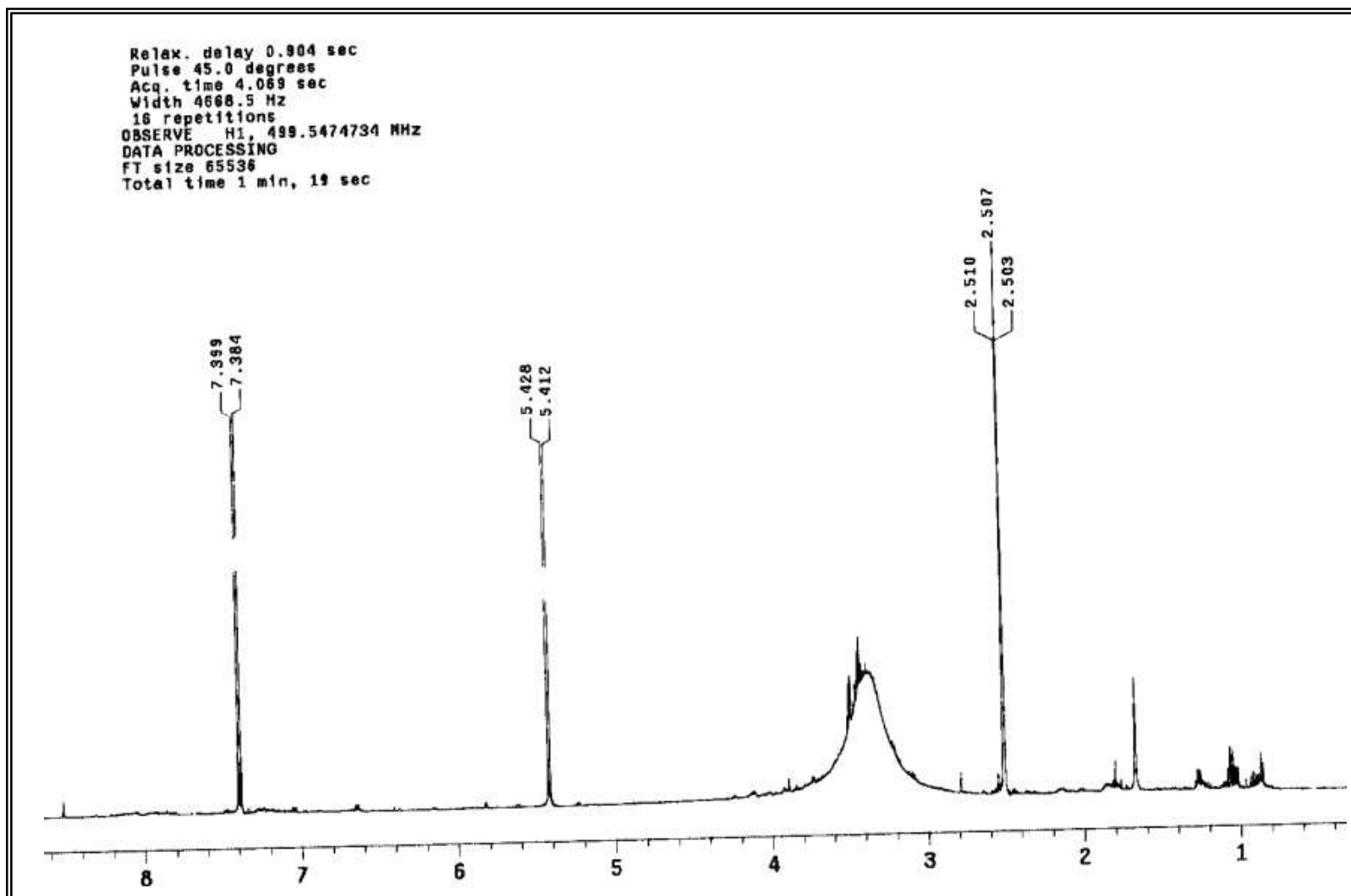
Anexo 103 - Espectro de RMN ^1H da substância 14 (DMSO- d_6 , 500 MHz)



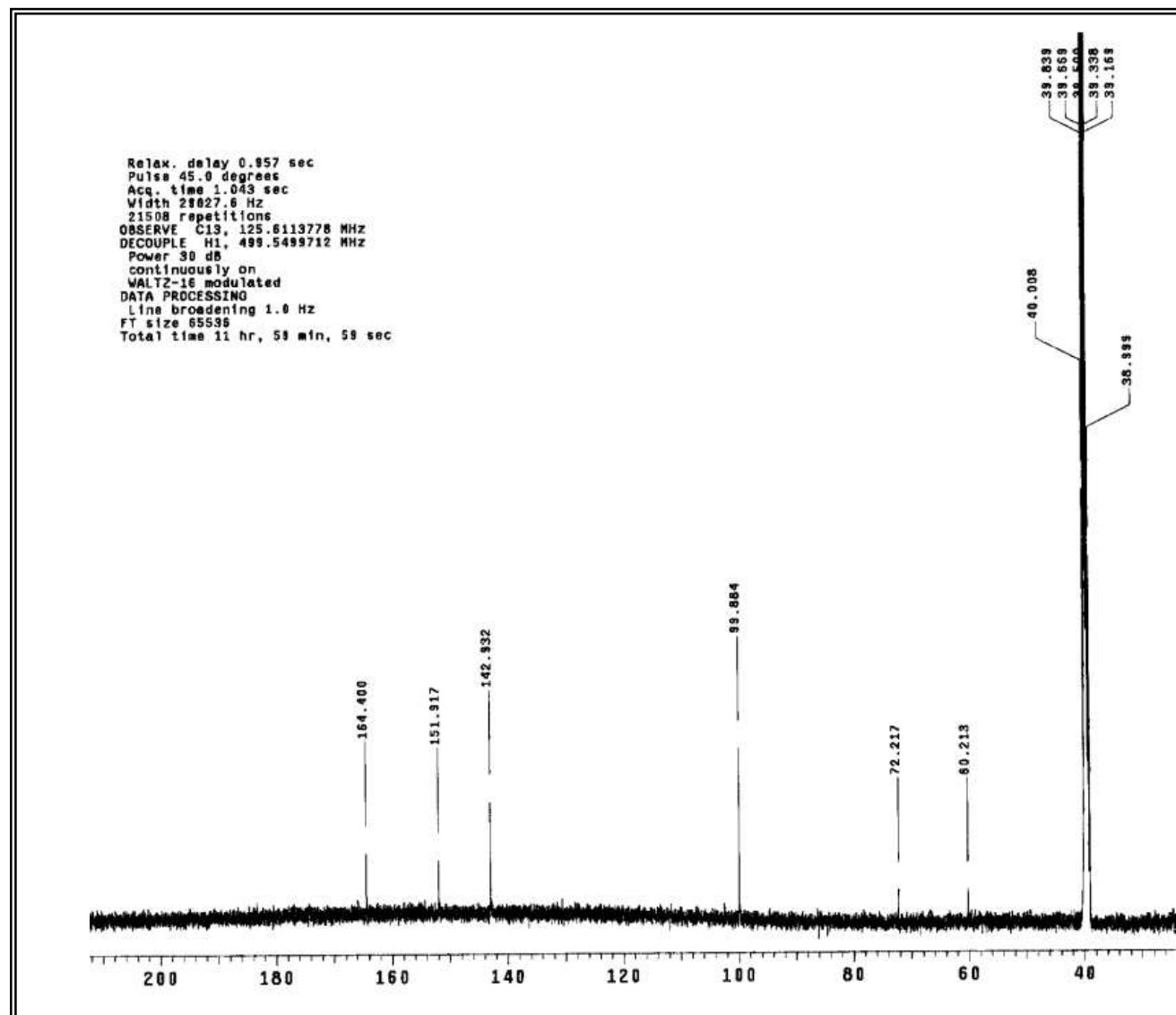
Anexo 104 - Espectro de ^{13}C da substância 14 (DMSO- d_6 , 125MHz)



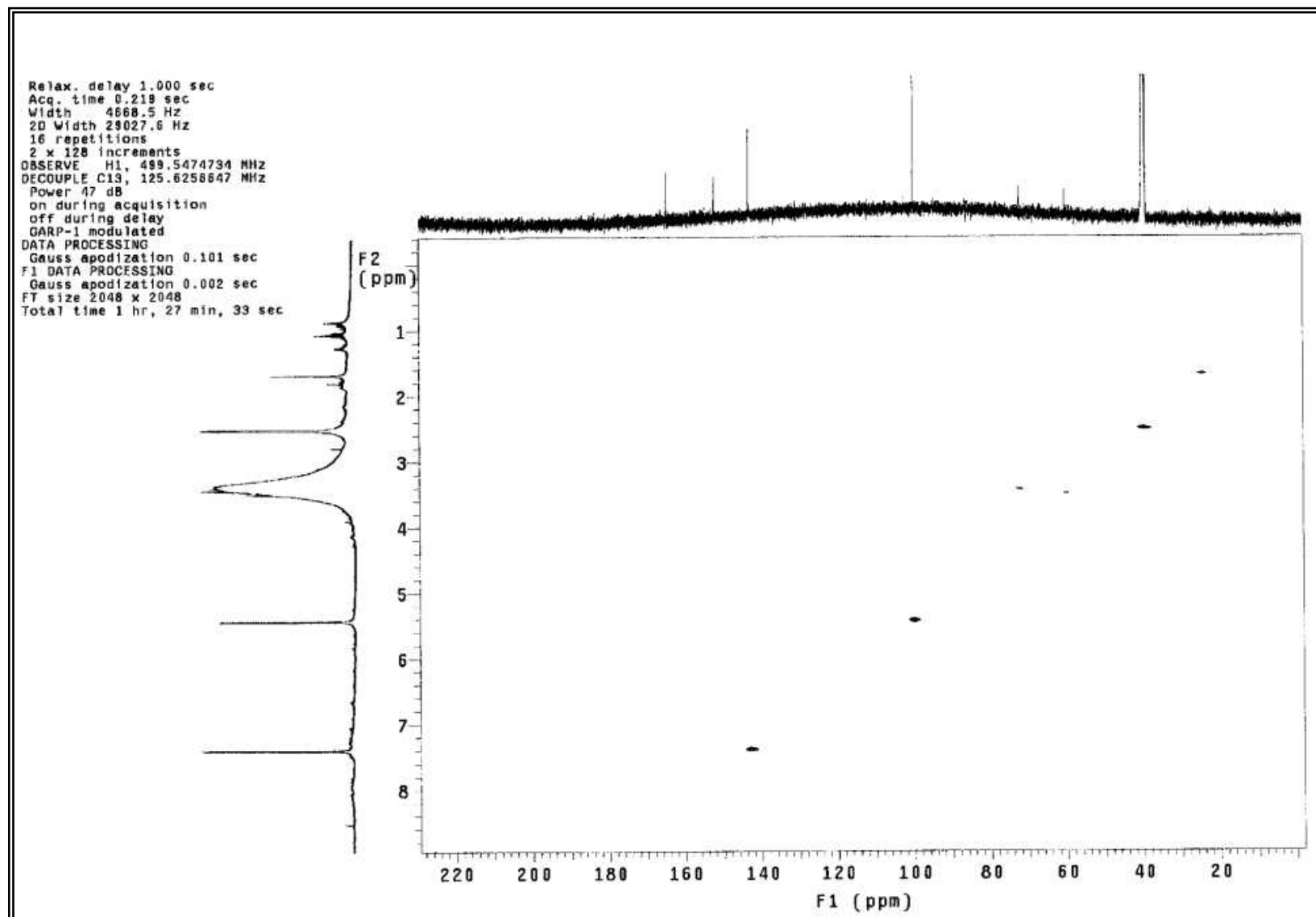
Anexo 105 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 14 (DMSO- d_6 , 125 MHz)



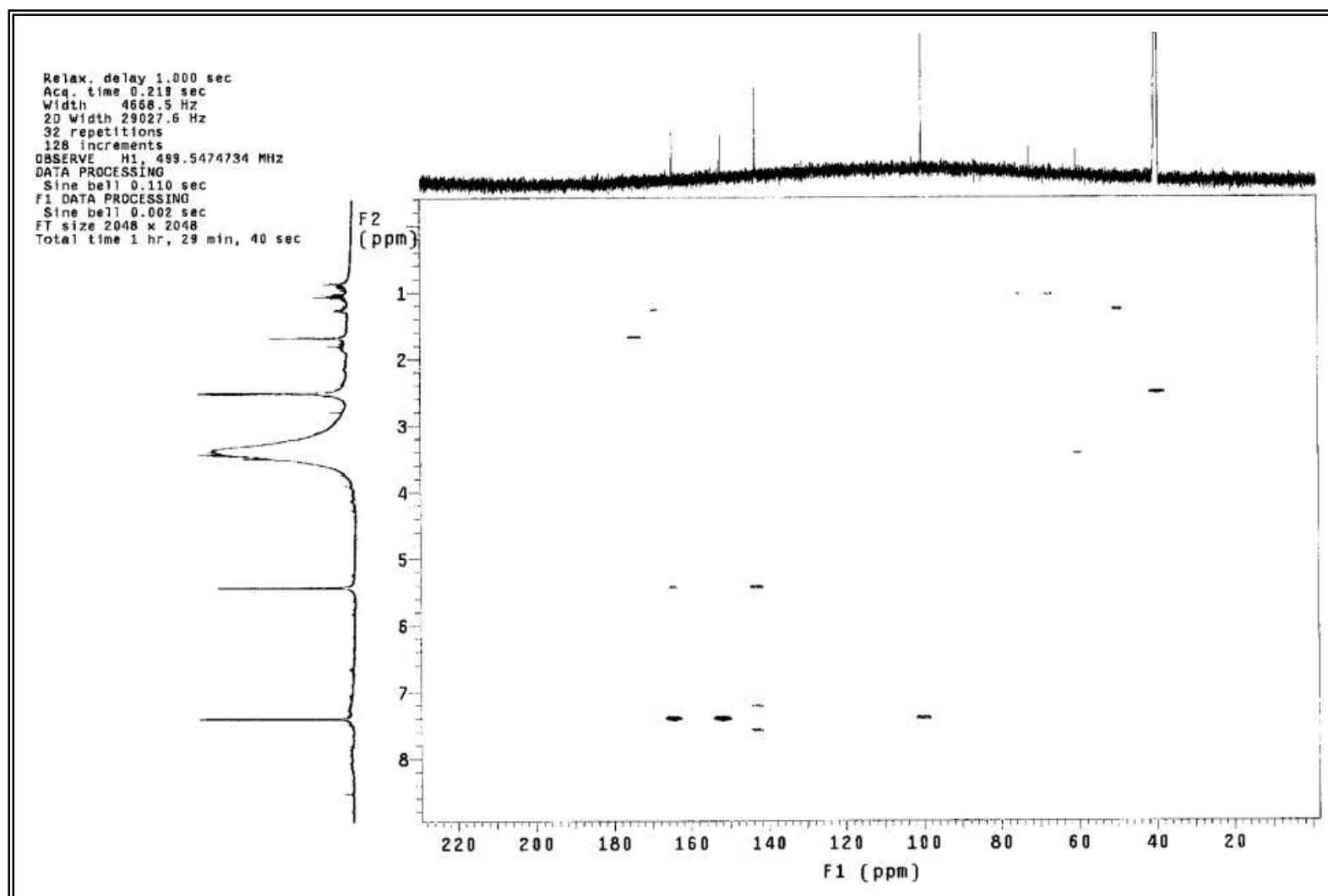
Anexo 106 - Espectro de RMN ^1H da substância 15 (DMSO- d_6 , 500 MHz)



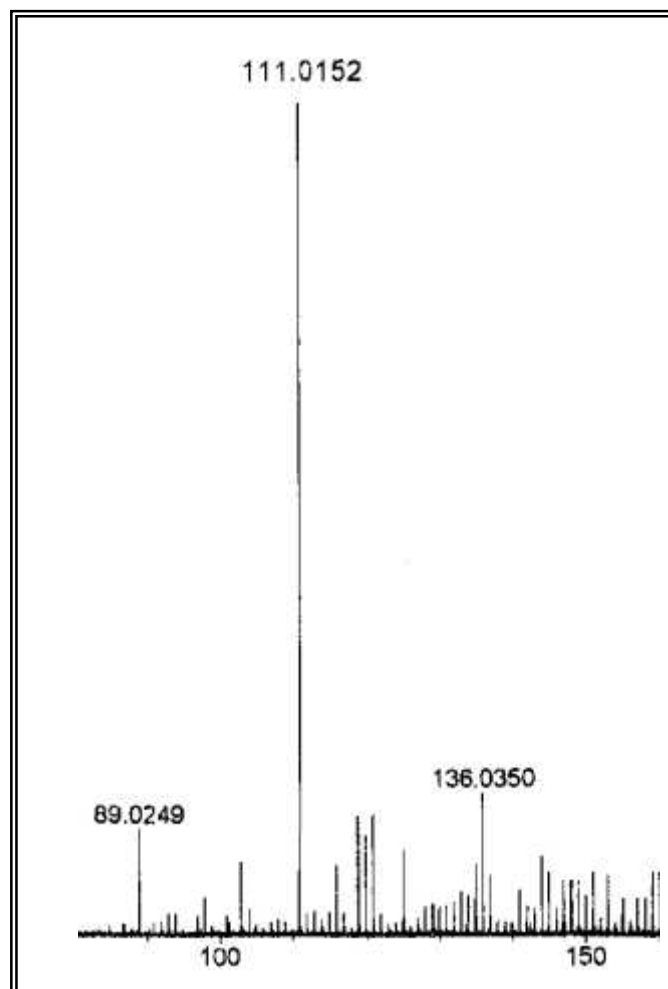
Anexo 107 - Espectro de ^{13}C da substância 15 (DMSO- d_6 , 125MHz)



Anexo 108 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 15 (DMSO- d_6 , 125 MHz)



Anexo 109 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 15 (DMSO- d_6 , 125 MHz)



Anexo 110- Espectro de ESI-MS $[M-H]^-$ da substância **15**