



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Tese de Doutorado

**“BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM FUNGOS ASSOCIADOS
COM A ESPÉCIE *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae)”**

IOANIS HCRISTOS LEPTOKARYDIS

Araraquara – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

L611b Leptokarydis, Ioanis Hcristos
Busca de substâncias bioativas em fungos endofíticos associados com a espécie *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae) / Ioanis Hcristos Leptokarydis.
- Araraquara : [s.n], 2008
262 f. : il.

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

1. Química orgânica. 2. Fungos endofíticos. 3. *Colletotrichum*

gloeosporioides. 4. *Michelia champaca* L. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

IOANIS HCRISTOS LEPTOKARYDIS

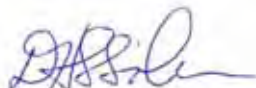
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 20 de março de 2008.

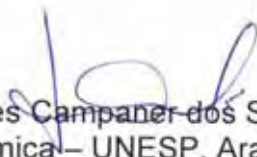
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araújo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



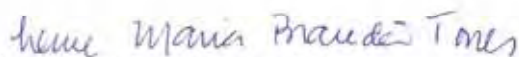
Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Lourdes Campaner dos Santos
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Drª Luce Maria Brandão Torres
Instituto de Botânica – IBT, São Paulo

IOANIS HCRISTOS LEPTOKARYDIS

**Busca de Substâncias Bioativas em Fungos Associados com a Espécie *Michelia
champaca* L. (Magnoliaceae)”**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Ângela Regina Araújo.

Araraquara
2008

Dedico este trabalho...

À minha Mãe, pela pessoa maravilhosa e que sempre esteve presente, apoiando e me fortalecendo em todos os momentos. É meu exemplo de vida.

À meu irmão (Daniel) e cunhada (Simone) que sempre estiveram ao meu lado, participando de cada momento de desafio e alegria durante esta trajetória. E meu querido sobrinho, Thiago que traz mais felicidade a nossa família, e um novo sentido a minha vida.

À minha querida Veridiana Dionizio pelo amor, constante incentivo e companheirismo. Conhecê-la me fez uma pessoa melhor, amá-la me fez uma pessoa muito mais feliz.

À querida Prof.^a Ângela, a qual serei grato pelos seus ensinamentos. Graças a sua dedicação se tornou possível a realização deste trabalho sendo de fundamental importância para minha formação.

À querida Prof.^a Márcia Nasser, a qual serei eternamente grato pelos seus conselhos, ensinamentos e sua dedicação nos momentos mais difíceis que passei durante este trajeto, tornando possível a finalização deste trabalho.

À todas as pessoas que por motivos profissionais, pessoais ou acadêmicos chegarem a esta Tese.

AGRADECIMENTOS

“O cientista que raciocina segundo o plano da percepção dos sentidos é o que se acha mais afastado do reconhecimento da verdade, porque toma todas as ilusões produzidas pelos sentidos como realidades e repele as revelações de sua própria intuição. O filósofo, incapaz de perceber a verdade, procura adquiri-la por meio da inteligência, podendo dela aproximar-se até certo ponto. Só aquele que adquiriu a condição consciente da verdade, reconhecendo-a por percepção direta, a ela se acha intimamente unido e não pode absolutamente enganar-se. poderosa tribuna do aperfeiçoamento.” (Prof. José Henrique de Sousa)

A Deus, pela presença constante iluminando minha vida, orientando meus caminhos e me dando sabedoria.

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 muito importante da minha vida.

À Prof.^a Dra. Ângela R. Araújo pela orientação. Obrigado por sua dedicação em todos estes anos.

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

Aos docentes do Departamento de Química Orgânica: Vanderlan S. Bolzani, Márcia Nasser Lopes, Maysa Furlan, Alberto J. Cavalheiro, Lúcia M. X. Lopes, Dulce H. Siqueira, Wagner Vilegas, Lourdes Campaner dos Santos, Ian Castro-Gamboa e Isabele Nascimento pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Às Professoras Lúcia M. X. Lopes, Wagner Vilegas que participaram do meu exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

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

Ao Dr. Alberto Camilo Alécio por ser tão prestativo, não medindo esforços para colaborar com o trabalho científico.

Aos meus grandes amigos Ms. Renata Sordi, Dr. Helder L. Teles, ex-colegas de grupo e competentes profissionais. Obrigado pelas inúmeras dicas, discussões pertinentes e ensinamentos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos amigos de grupo: Mariana C. Cafêu, Lisinéia M. Zanardi, Camila M. de Oliveira, pela amizade convivência e colaboração dentro e fora do laboratório.

A todos os amigos do departamento, que ainda estão ou já passaram por lá: Carenina Vidoti, Daniara, Karin Bandeira, Fernanda Garcia, Amanda Danuelo, Marcos Pivato, Cláudio Viegas, Guilherme Zucolo, Cristiano, Fernando Continguiba, Otávio Fausino, Ana Lúcia, Andréa Morandim, Viviane Cândida, Amélia, Jonas Mota, Hosana, Douglas Pichi, Aline, André, Gisele Baraidi, Marcos Batista, Patrícia Pauleti, Marcos, Wanessa, Magela, Sara, Aristeu Tininis e a todos que passaram por este grupo, pelos momentos de alegria compartilhados que fizeram a rotina do laboratório ainda mais agradável.

As festinhas de defesa e de final de ano, reuniões de grupo e congressos serão para sempre lembradas.

Aos meus eternos amigos da Tarraketa local onde morei e guardarei pela eternidade os momentos maravilhosos que tive lá.

Aos meus eternos amigos da República GA: Allynsom, Marcos (Tomate) Norberto (Yo) pelas inúmeras conversas que tivemos e pelos momentos de amizade que sempre ficarão em minha mente.

Às secretárias da Pós-Graduação - Sandra, Patrícia e Célia – por serem atenciosas e gentis.

Às funcionárias da Biblioteca: Cristina e Valéria, sempre a disposição para ajudar e a todos os outros funcionários que estão ou já passaram por lá, pela dedicação e auxílio.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho e aos meus inimigos ocultos que ao tentarem me atrapalhar acabaram me ajudando muito no meu desenvolvimento.

As Empresas Anaber Cosméticos e Asca Brinquedos por permitir que eu pudesse trabalhar em período diferenciado dando a possibilidade de continuar o meu Doutorado.

PENSAMENTOS

“O mestre está disponível para todas as pessoas e não rejeita nenhuma delas. Ele está pronto a usar todas as situações e nada desperdiça. Isto é o que se chama personificar a luz.” (Lao-Tzu, Tão Te King)

“Nunca desista nesse momento, porque é exatamente neste lugar e hora que a maré vai mudar.” (Harriet Beecher Stowe)

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores.” (Sócrates)

“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.” (Sócrates)

“Três coisas devem ser feitas por um juiz: ouvir atentamente, considerar sobriamente e decidir imparcialmente.” (Sócrates)

RESUMO

Os fungos, diferente dos vegetais são heterotróficos, mais especificamente quimiorganotróficos, por suas características específicas pertencem a um reino separado. Alguns dos fungos através de sua evolução se especializaram em invadir os espaços intercelulares das plantas passando a sobreviver dentro dos seus hospedeiros, não provocando nenhuma patologia. Estes microrganismos são denominados de fungos endofíticos. A disputa por alimentos entre os fungos no interior das espécies vegetais, gerou a necessidade dos fungos produzirem metabólitos secundários com atividades contra outros microrganismos, podendo assim demarcar seu território. Todo este processo deve acontecer de forma a não causar patologias na planta que é a fonte de seu alimento, em alguns casos essas relações de mutualismo e comensalismo se aprimoraram sendo muito comum alguns vegetais possuírem fungos endofíticos protegendo contra pragas insetos e patógenos. Este trabalho descreve o isolamento e a purificação dos fungos endofíticos associados às folhas, caules, raízes e sementes da espécie vegetal *Michelia champaca*. Foram isolados 8 fungos, sendo 3 dos caules, 4 das folhas, 1 das raízes, nenhum fungo foi isolado das sementes. Os extratos brutos produzidos por estes fungos em caldo de dextrose e batata foram avaliados quimicamente (CLAE-DAD e RMN¹H) e submetidos à bioensaios para avaliação da potencialidade anticancerígena, antifúngica e anticolinesterásica. Todos os extratos apresentaram atividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e 40% apresentaram atividade frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Após esta triagem, os fungos endofíticos Mc-8R (ainda não identificado) e *Colletotrichum gloeosporioides* (Mc-7F) foram selecionados para estudo químico/biológico. Estes foram cultivados em culturas fermentativas em larga escala em CDB para obtenção dos extratos brutos. O extrato bruto AcOEt, obtido após cultivo de Mc-8R em CDB, levou, após fracionamento cromatográfico, ao isolamento das Pirenocinas A (1), E (2) e B (3) e dos Ácidos Pirenochaéticos, C (4), A (5) e B (6), já descritos na literatura e os Ácidos Pirenochaéticos (7) e (8) inéditos. No estudo da variação metabólica, modificando os meios de cultivo, foi possível identificar o Ergosterol (9) e o Peróxido de Ergosterol (10) nos extratos hexânicos de Arroz e Milho, respectivamente. O extrato AcOEt de Mc-7F identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*, foi submetido a técnicas cromatográficas e espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais e permitiu o isolamento e identificação das substâncias Uracila (11), ciclo-(S*-Pro-S*-Tyr) (12), ciclo-(S*-Pro-S*-Val) (13), Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (14), Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15), 4-Hidroxi-benzamida (16) e Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17), e dos derivados indólicos inéditos (18) e (19). Dos extratos AcOEt de Mc-C3 (*Xylaria* sp.) e Mc-6F (*Phomopsis stipata*) foram isoladas as substâncias Ácido 2- hexilideno-3- metilsuccínico (20) e o Ácido 3-nitropropiónico (21). Todas substâncias tiveram suas estruturas identificadas ou determinadas através de técnicas espectroscópicas (RMN de ¹H e ¹³C, HMBC, HMQC, NOESY, COSY) e espectrometria de massas (ESI-MS). Das substâncias isoladas de Mc-8R e *Colletotrichum gloeosporioides*, 72% e 66% apresentaram atividade antifúngica e 56% e 89 % atividade anticolinesterase, respectivamente.

Palavras-chave: fungo endofítico, *Colletotrichum gloeosporioides*; *Michelia champaca*

ABSTRACT

Some fungal species, through their evolution, have specialized in invading plants and surviving inside their hosts causing no harm to them. These microorganisms have been called endophytic which in the invasion process, produce chemical substances that inhibit competitors to invade their neighborhood and thus survive in harmony with the host. This work seeks to evaluate the chemical diversity of substances from endophytic fungi associated to *Michelia champaca* L. that present biological activity by isolating and identification of their secondary metabolites. This work resulted in the isolation of eight fungi species and selection of 2 strains which presented strong antifungal activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, both of them pathogenic fungus; and a weak antitumor activity against mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The first one was codified as Mc-8R and chromatographic fractionation of its EtOAc extract allowed the identification of the Pirenocines A (**1**), E (**2**) and B (**3**) and the Pirenochaetic acids, C (**4**), A (**5**) and B (**6**), and in addition to the novel (**7**) and (**8**). Ergosterol (**9**), was found in the hexanic extract obtained from growing Mc-8R in rice, and the Ergosterol peroxide (**10**), which was isolated from the hexanic extract in corn. The other selected fungi species was identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. The fractioning of its EtOAc extract led to the isolation of the known substances as Uracil (**11**), *cyclo*-(S*-Pro-S*-Tyr) (**12**), *cyclo*-(S*-Pro-S*-Val) (**13**), 2-Aminophenyl acetic acid (2-APA), (**14**), *p*-Hydroxyphenylacetic acid (**15**), 4-Hydroxybenzamide (**16**) and (2-Hydroxy-phenyl)- acetic acid (**17**), in addition to the novel compounds (**18**) and (**19**). 2-Hexylidene-3-methylsuccinic acid (**20**) was also identified as major compound from the fungus Mc-C3, (*Xylaria* sp.). The fungus Mc-6F was identified as *Phomopsis stipata* and its extract contained 3-Nitro-propionic acid (**21**) as major compound. The eight endophytic studied presented activity against the phytopathogenic fungi *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides*; about 40% of the isolated fungi had also presented activity against mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Of isolated substances from Mc-8R, 72% they had presented antifungal activity and 56% had presented anticholinesterasic activity. From *Colletotrichum gloeosporioides*, 78% of the isolated compounds presented antifungal and anticholinesterase activity.

Keywords: endophytic fungus; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Michelia champaca*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias bioativas obtidas a partir de fungos	22
Figura 2: Foto de <i>Michelia Champaca</i> L. (Magnoliaceae) Fonte: Ioanis H. Leptokarydis	31
Figura 3: Substâncias bioativas obtidas a partir do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	33
Figura 4: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R XAD Solto e XAD Saco (H ₂ O _{0,5%} _{HOAc} /MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm) em C-18.....	48
Figura 5: Cromatogramas em grad. explorat. do extrato Mc-8R (H ₂ O/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40' em C-18.....	52
Figura 6: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R1, Mc-8R2, e Mc-8R3 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R (H ₂ O _{0,5%} _{HOAc} /MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	54
Figura 7: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R3, Mc-8R4, e Mc-8R5 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R (H ₂ O _{0,5%} _{HOAc} /MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	55
Figura 8: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R5, Mc-8R6, e Mc-8R7 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R (H ₂ O _{0,5%} _{HOAc} /MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	55
Figura 9: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R7, Mc-8R8, Mc-8R9 e Mc-8R10 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R (H ₂ O _{0,5%} _{HOAc} /MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).	56
Figura 10: Gráfico 01: variação metabólica de Mc-8R com vários meios de culturas e condições de crescimento	68
Figura 11: Estrutura da Citreopirona (Pirenocina A) (1).....	74
Figura 12: Estrutura da Pirenocina E (2)	76
Figura 13: Estrutura da Pirenocina B (3)	77
Figura 14: Estrutura parcial A para substância (4).....	79
Figura 15: Estrutura parcial B para substância (4).....	79
Figura 16: Estrutura do Ácido Pirenochaético C (4).....	79
Figura 17: Estrutura parcial B para a substância (5).....	80
Figura 18: Estrutura do Ácido Pirenochaético A (5).....	81
Figura 19: Estrutura parcial B para a substância (6).....	81
Figura 20: Estrutura do Ácido Pirenochaético B (6).....	83
Figura 21: Estrutura parcial B para a substância (7).....	84
Figura 22: Estrutura da substância (7)	84
Figura 23: Estrutura parcial B para a substância (8)	85
Figura 24: Estrutura da substância (8)	85
Figura 25: Estrutura da do Ergosterol (9)	87
Figura 26: Estrutura do Peróxido de Ergosterol (10)	88
Figura 27: Estrutura da Uracila (11)	89
Figura 28: Estrutura <i>ciclo</i> -(S*-Pro-S*-Tyr) substância (12)	91
Figura 29: Estrutura da <i>ciclo</i> -(S*-Pro-S*-Val) para substância (13)	93
Figura 30: Estrutura da Ácido-(2-Amino-fenil)-acético para substância (14)	95
Figura 31: Estrutura da Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético para substância (15).....	97
Figura 32: Estrutura da 4-Hidroxi-benzamida para substância (16)	98
Figura 33: Estrutura da Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético para substância (17)	99
Figura 34: Estruturas Parciais A e B da Substância (18)	101
Figura 35: Principais correlações observadas em gHMBC para a substância (18).....	102
Figura 36: Estruturas Parciais A e B da Substância (19)	104
Figura 37: Principais correlações observadas em gHMBC para a substância (19).....	104
Figura 38: Estrutura do Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (20).....	106

Figura 39: Gráfico 2: Atividade antifúngica das substâncias (1) a (19) frente os fungos <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	108
Figura 40: Gráfico 3: Atividade antifúngica das substâncias isoladas de Mc-7F frente os fungos <i>Cladosporium cladosporioides</i> em limite de detecção.....	108
Figura 41: Gráfico 4: Atividade antifúngica das substâncias isoladas de Mc-7F frente os fungos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> em limite de detecção.....	109
Figura 42: Gráfico 5 e 6: Atividade inibidora da acetilcolinesterase das substâncias isoladas de Mc-8R e Mc-7F	110
Figura 43: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-1C (CDCl ₃ a 11,7 T).....	121
Figura 44: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-2C (CDCl ₃ a 11,7 T).....	122
Figura 45: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-3C (CDCl ₃ a 11,7 T).....	122
Figura 46: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-4F (CDCl ₃ a 11,7 T).....	122
Figura 47: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-5F (CDCl ₃ a 11,7 T)	123
Figura 48: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-6F (CDCl ₃ a 11,7 T)	123
Figura 49: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-7F (CDCl ₃ a 11,7 T)	124
Figura 50: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R (CDCl ₃ a 11,7 T).....	124
Figura 51: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Czapek com detecção monitorada em 254nm.	125
Figura 52: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R Czapek (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	125
Figura 53: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Nutriente com detecção monitorada em 254nm.	126
Figura 54: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R Nutriente (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	126
Figura 55: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R YM com detecção monitorada em 254nm. .	127
Figura 56: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R YM (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	127
Figura 57: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Extrato de Malte com detecção monitorada em 254nm.....	128
Figura 58: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R Extrato de Malte (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	128
Figura 59: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Arroz ACN com detecção monitorada em 254nm.....	129
Figura 60: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R Arroz ACN (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	129
Figura 61: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Milho ACN com detecção monitorada em 254nm.....	130
Figura 62: Espectro de RMN de ¹ H de Mc-8R Milho ACN (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	130
Figura 63: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-8R Arroz Hex (CDCl ₃ a 11,7 T).....	131
Figura 64: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-8R Milho Hex (CDCl ₃ a 11,7 T)	131
Figura 65: CCDC das fases Hexânicas do Milho, Arroz e Arroz hex ppt, com eluente em 86% Hex 3% HAc 11 % (Solução A) em tripla eluição.	131
Figura 66: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.1 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	132
Figura 67: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.1 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	132
Figura 68: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.2 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	133
Figura 69: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.2 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	133
Figura 70: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.3 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	134
Figura 71: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.3 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	134
Figura 72: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.4 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	135
Figura 73: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.4 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	135
Figura 74: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.5 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	136
Figura 75: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.5 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	136
Figura 76: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.6 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	137
Figura 77: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.6 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	137

Figura 78: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.7 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	138
Figura 79: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.7 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	138
Figura 80: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.8 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	139
Figura 81: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.8 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	139
Figura 82: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.9 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	140
Figura 83: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.9 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	140
Figura 84: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.10 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	141
Figura 85: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.10 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	141
Figura 86: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.11 (H ₂ O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).....	142
Figura 87: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de Mc-7F.11 (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	142
Figura 88: Espectro de RMN de ¹ H de (1) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	143
Figura 89: Espectro de RMN de ¹³ C de (1) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	144
Figura 90: Mapa de contorno gHMQC de (1) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	145
Figura 91: Mapa de contorno gHMBC de (1) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	146
Figura 92: Espectro de RMN de gCOSY de (1) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	147
Figura 93: Espectro de Massas de (1).....	148
Figura 94: Espectro de RMN de ¹ H de (2) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	149
Figura 95: Espectro de RMN de ¹³ C de (2) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	150
Figura 96: Mapa de contorno gHMQC de (2) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	151
Figura 97: Mapa de contorno gHMBC de (2) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	152
Figura 98: Espectro de RMN de gCOSY de (2) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	153
Figura 99: Espectro de Massas de (2).....	154
Figura 100: Espectro de RMN de ¹ H de (3) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	155
Figura 101: Mapa de contorno gHMQC de (3) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	156
Figura 102: Mapa de contorno gHMBC de (3) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	157
Figura 103: Espectro de RMN gCOSY de (3) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	158
Figura 104: Espectro de Massas de (3).....	159
Figura 105: Espectro de RMN de ¹ H de (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	160
Figura 106: Espectro de RMN de ¹³ C de (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	161
Figura 107: Mapa de contorno gHMQC de (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	162
Figura 108: Mapa de contorno gHMBC de (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	163
Figura 109: Espectro de gCOSY de (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	164
Figura 110: Espectro de NOESY 1D de (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	165
Figura 111: Espectro de Massas de (4).....	166
Figura 112: Espectro de RMN de ¹ H de (5) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	167
Figura 113: Espectro de RMN de ¹³ C de (5) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	168
Figura 114: Mapa de contorno gHMQC de (5) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	169
Figura 115: Mapa de contorno gHMBC de (5) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	170
Figura 116: Espectro de gCOSY de (5) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	171
Figura 117: Espectro de Massas de (5).....	172
Figura 118: Espectro de RMN de ¹ H de (6) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	173
Figura 119: Espectro de RMN de ¹³ C de (6) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	174
Figura 120: Mapa de contorno gHMQC de (6) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	175
Figura 121: Mapa de contorno gHMBC de (6) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	176
Figura 122: Espectro de gCOSY de (6) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	177
Figura 123: Espectro de Massas de (6).....	178
Figura 124: Espectro de RMN de ¹ H de (7) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	179
Figura 125: Espectro de RMN de ¹³ C de (7) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	180
Figura 126: Mapa de contorno gHMQC de (7) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	181
Figura 127: Mapa de contorno gHMBC de (7) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T)	182

Figura 128: Espectro de gCOSY de (7) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	183
Figura 129: Espectro de Massas de (7).....	184
Figura 130: Espectro de RMN de ¹ H de (8) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	185
Figura 131: Espectro de RMN de ¹³ C de (8) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	186
Figura 132: Mapa de contorno gHMQC de (8) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	187
Figura 133: Mapa de contorno gHMBC de (8) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	188
Figura 134: Espectro de gCOSY de (8) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	189
Figura 135: Espectros de Massas de (8).....	190
Figura 136: Espectro de RMN de ¹ H de (9) (CDCl ₃ a 11,7 T).....	191
Figura 137: Espectro de RMN de ¹³ C de (9) (CDCl ₃ a 11,7 T).....	192
Figura 138: Espectro de RMN de ¹ H de (10) (CDCl ₃ a 11,7 T).....	193
Figura 139: Espectro de RMN de ¹³ C de (10) (CDCl ₃ a 11,7 T).....	194
Figura 140: Mapa de contorno gHMQC de (10) (CDCl ₃ a 11,7 T).....	195
Figura 141: Mapa de contorno gHMBC de (10) (CDCl ₃ a 11,7 T).....	196
Figura 142: Espectro de RMN de ¹ H de (11) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	197
Figura 143: Espectro de RMN de ¹³ C de (11) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	198
Figura 144: Mapa de contorno gHMQC de (11) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	199
Figura 145: Mapa de contorno gHMBC de (11) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	200
Figura 146: Espectro de gCOSY de (11) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	201
Figura 147: Espectro de RMN de ¹ H de (12) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	202
Figura 148: Espectro de RMN de ¹³ C de (12) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	203
Figura 149: Mapa de contorno gHMQC de (12) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	204
Figura 150: Mapa de contorno gHMBC de (12) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	205
Figura 151: Espectro de gCOSY de (12) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	206
Figura 152: Espectro de NOESY 1D de (12) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	207
Figura 153: Espectro de Massas de (12).....	208
Figura 154: Espectro de RMN de ¹ H de (13) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	209
Figura 155: Espectro de RMN de ¹³ C de (13) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	210
Figura 156: Mapa de contorno gHMQC de (13) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	211
Figura 157: Mapa de contorno gHMBC de (13) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	212
Figura 158: Espectro de gCOSY de (13) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	213
Figura 159: Espectro de NOESY 1D de (13) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	214
Figura 160: Espectro de Massas de (13).....	215
Figura 161: Espectro de RMN de ¹ H de (14) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	216
Figura 162: Espectro de RMN de ¹³ C de (14) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	217
Figura 163: Mapa de contorno gHMQC de (14) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	218
Figura 164: Mapa de contorno gHMBC de (14) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	219
Figura 165: Espectro de gCOSY de (14) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	220
Figura 166: Espectros de Massas de (14).....	221
Figura 167: Espectro de RMN de ¹ H de (15) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	222
Figura 168: Espectro de RMN de ¹³ C de (15) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	223
Figura 169: Espectro de DEPT 135 de (15) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	224
Figura 170: Mapa de contorno gHMQC de (15) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	225
Figura 171: Mapa de contorno gHMBC de (15) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	226
Figura 172: Espectros de Massas de (15).....	227
Figura 173: Espectro de RMN de ¹ H de (16) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	228
Figura 174: Espectro de RMN de ¹³ C de (16) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	229
Figura 175: Mapa de contorno gHMQC de (16) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	230
Figura 176: Mapa de contorno gHMBC de (16) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	231
Figura 177: Espectro de RMN de ¹ H de (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	232
Figura 178: Espectro de RMN de ¹³ C de (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	233
Figura 179: Espectros de DEPT de (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	234
Figura 180: Mapa de contorno gHMQC de (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	235
Figura 181: Mapa de contorno gHMBC de (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ a 11,7 T).....	236
Figura 182: Espectros de Massas de (17).....	237

Figura 183: Espectro de RMN de ^1H de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	238
Figura 184: Espectro de RMN de ^{13}C de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	239
Figura 185: Espectro de DEPT de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	240
Figura 186: Mapa de contorno gHMQC de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	241
Figura 187: Mapa de contorno gHMBC de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	242
Figura 188: Espectro de gCOSY de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T).....	243
Figura 189: Espectro de NOESY 1D de (18) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	244
Figura 190: Espectros de Massas de (18)	245
Figura 191: Espectro de RMN de ^1H de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	246
Figura 192: Espectro de RMN de ^{13}C de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	247
Figura 193: Espectro de DEPT de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	248
Figura 194: Mapa de contorno gHMQC de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T).....	249
Figura 195: Mapa de contorno gHMBC de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	250
Figura 196: Espectro de gCOSY de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T).....	251
Figura 197: Espectro de NOESY 1D de (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	252
Figura 198: Espectros de Massas de (19)	253
Figura 199: Espectro de RMN de ^1H de (20) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	254
Figura 200: Espectro de RMN de ^{13}C de (20) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	255
Figura 201: Espectro de DEPT de (20) (DMSO- d_6 a 11,7 T).....	256
Figura 202: Mapa de contorno gHMQC de (20) (DMSO- d_6 a 11,7 T).....	257
Figura 203: Mapa de contorno gHMBC de (20) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	258
Figura 204: Espectro de gCOSY de (20) (DMSO- d_6 a 11,7 T).....	259
Figura 205: Espectros de Massas de (20)	260
Figura 206: Espectro de RMN de ^1H de (21) (DMSO- d_6 a 11,7 T)	261
Figura 207: Espectros de Massas de (21)	262

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Isolamento dos fungos associados.....	44
Esquema 2: Cultivo dos fungos, obtenção dos extratos e triagem químico/biológica.....	46
Esquema 3: Extrato Produzido por Mc-8R em CDB	46
Esquema 4: Extrato Produzido por Mc-8R em CDB na Presença de XAD 2.....	47
Esquema 5: Extratos obtidos em Mc-8R em Czapek, Nutriente, YM e Extrato de Malte.....	49
Esquema 6: Extratos Obtidos da Variação Metabólica de Mc-8R em Arroz e Milho.....	51
Esquema 7: Separação Cromatográfica do Extrato de Mc-8R obtido no crescimento em CDB via CLAE.	53
Esquema 8: Separação Cromatográfica do Extrato Mc-8R XAD Saco via CLAE.....	53
Esquema 9: Fracionamento em coluna comatográfica do Extrato Mc-8R obtido no crescimento em CDB	54
Esquema 10: Fracionamento Cromatográfico Fração Mc-8R.3	57
Esquema 11: Fracionamento Cromatográfico de Mc-8R4	58
Esquema 12: Fracionamento Cromatográfico Fração Mc-8R Milho Hex	59
Esquema 13: Extrato obtido do crescimento de <i>Colletotrichum Gloeosporioides</i> (Mc-7F) em CDB.	59
Esquema 14: Fracionamento Cromatográfico do Extrato Mc-7F em C-18	60
Esquema 15: Fracionamento Cromatográfico em C-18 do Extrato Mc-7F.1	61
Esquema 16: Fracionamento Cromatográfico Extrato Mc-7F.1	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos.	25
Tabela 2: Meios de cultura utilizados para os crescimentos dos fungos.....	39
Tabela 3: Rendimento dos extratos dos fungos endofíticos fermentados em 500 ml de CDB	62
Tabela 4: Resultados das atividades antifúngicas dos extratos produzidos pelos endofíticos isolados de <i>M. champaca</i>	62
Tabela 5: Resultados obtidos no ensaio com <i>S. cerevisiae</i> dos extratos produzidos pelos endofíticos isolados de <i>M. champaca</i>	63
Tabela 6: Resultados obtidos no ensaio ensaios de inibição da acetilcolinesterase para os extratos dos endofíticos isolados de <i>M. champaca</i>	63
Tabela 7: Resultados do limite de detecção em bioautografia dos extratos Mc-6F e Mc-8R.	64
Tabela 8: Relação produtiva dos fungos por quantidade de meio de cultura.....	68
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Pirenocina A (1) (CDCl_3 a 11,7 T).....	75
Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Pirenocina E (2) (CDCl_3 a 11,7 T).....	76
Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Pirenocina B (3) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	77
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e NOESY 1D do Ácido Pirenochaético C (4) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	80
Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos Ácidos Pirenochaéticos A, B, 7 e 8 ($\text{DMSO}-d_6$ e CDCl_3 , a 11,7 T).....	82
Tabela 14: Dados de RMN de ^{13}C do Ergosterol (9) (CDCl_3 a 11,7 T) e dados de RMN de ^{13}C literatura para o Ergosterol (SHIRANE, et al., 1996).	87
Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C do Peróxido de Ergosterol (10) (CDCl_3 a 11,7 T) e dados de RMN de ^{13}C literatura para o Peróxido de Ergosterol (YUE, J. M. et al, 2001).....	88
Tabela 16: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e gCOSY da Uracila (11) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	89
Tabela 17: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e NOESY 1D da <i>ciclo-(S*-Pro-S*-Tyr)</i> (12) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	92
Tabela 18: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e NOESY 1D da <i>ciclo-(S*-Pro-S*-Val)</i> (13) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	94
Tabela 19: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (14) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	95
Tabela 20: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	97
Tabela 21: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC 4-Hidroxi-benzamida (16) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T) ...	98
Tabela 22: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T).....	100
Tabela 23: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC da Substância (18) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T)	102
Tabela 24: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC da Substância (19) ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T)	104
Tabela 25: Dados de RMN ^1H , ^{13}C , gHMBC, e gCOSY do Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (20) (CDCl_3 , a 11,7 T)	106
Tabela 26: Resultados da atividade antifúngica das substâncias isoladas do extrato de Mc-7F <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e Mc-8R.	107
Tabela 27: Resultados da atividade antifúngica em limite de detecção das substâncias isoladas do extrato de Mc-7F frente o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	108
Tabela 28: Resultados da atividade antifúngica em limite de detecção das substâncias isoladas do extrato de Mc-7F frente o fungo <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	109
Tabela 29: Resultados dos ensaios de inibição da acetilcolinesterase das substâncias isoladas.	110

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
BDA	Batata Dextrose Agar
CDB	Caldo de Batata Dextrose
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector em arranjo de diodos
C-18	Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano
Czapek	Sacarose, NaNO ₃ , Na ₂ (PO ₄) ₃ , MgSO ₄ , KCl, FeSO ₄
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
explorat.	Exploratório
gCOSY	Gradient Correlated Spectroscopy
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
gHMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
grad.	Gradiente
HAc	Ácido acético
Hex.	Hexano
ISP	Isopropanol
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
¹ J _{CH}	Correlação entre carbono hidrogênio a uma ligação
² J _{CH}	Correlação entre carbono hidrogênio a duas ligações
³ J _{CH}	Correlação entre carbono hidrogênio a três ligações
⁴ J _{CH}	Correlação entre carbono hidrogênio a quatro ligações
ME	Extrato de Malte
MeOH	Metanol
min.	Minutos
multip.	Multiplicidade
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
Nutrient	Extrato de carne, peptona
p.	Página
pgs.	Páginas
ppt	Precipitado
rf	Retention factor
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
subst.	Substância
TMS	Tetrametilsilano
tr.	Tempo de retenção
YM	Extrato de levedura, extrato de malte, peptona e dextrose
δ _C	Deslocamento químico de carbono
δ _H	Deslocamento químico de hidrogênio

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	20
1.1 - A Importância Ecológica e Biotecnológica dos Microrganismos em Química de Produtos Naturais	20
1.2 - A Importância Ecológica e Biotecnológica dos Fungos	21
1.3 - Microrganismos Endofíticos	23
1.3.1 - Fungos Endofíticos.	23
1.4 - A Espécie Vegetal <i>Michelia champaca</i> (Magnoliaceae) Planta Exótica.	30
1.5 – O Fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Isolado de <i>Michelia champaca</i>	31
1.5.1 – O Gênero <i>Colletotrichum</i>	31
1.5.1.1 – O Fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32
2 - OBJETIVOS	34
3 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	35
3.1 - Especificação dos Materiais, Instrumentos e Técnicas Utilizadas.	35
3.1.1 - Solventes Utilizados:	35
3.1.2 - Evaporador Rotatório:.....	35
3.1.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:	35
3.1.4 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC):.....	36
3.1.5 - Cromatografia em Coluna:.....	36
3.1.6 - Ressonância Magnética Nuclear:	37
3.1.7 - Espectrometria de Massas (EM):	37
3.1.8 – Ensaio Bioautográfico:.....	38
3.1.9 - Bioensaio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	38
3.1.10 - Cultivo dos Fungos Endofíticos em Vários Meios de Cultura:.....	38
3.2 - Análises Químicas e Biológicas.....	39
3.2.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV em Arranjo de Diodos (CLAE-DAD):.....	39
3.2.2 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC):.....	39
3.2.3 - Critérios de Pureza:.....	40
3.2.4 - Ensaio para Detecção de Substâncias com Atividade Antitumoral Potencial e/ou Citotóxica: ..	40
3.2.5 - Ensaio para Avaliação da Atividade Antifúngica Através de Bioautografia:	41
3.2.6 - Ensaio Preliminar para a Detecção de Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase:	42
3.3 - Isolamento e Purificação dos Fungos Endofíticos Associados à <i>Michelia champaca</i>	43
3.3.1 – Identificação dos Fungos Isolados de <i>Michelia champaca</i>	45
3.4 - Cultivo dos Microrganismos e Obtenção dos Extratos.	45
3.4.1 - Triagem Química e Biológica dos Extratos dos Fungos Associados à <i>Michelia champaca</i>	45
3.5 – Cultivo com CDB em Larga Escala do Fungo Endofítico Mc-8R com CDB.	46
3.5.1 – Variação Metabólica de Mc-8R em CDB na Presença de XAD 2	47
3.5.2 Variação Metabólica de Mc-8R em Diferentes Meios de Cultura.	48
3.5.3 – Variação Metabólica Triagem dos Extratos para Estudo de Mc-8R em Arroz e Milho.....	49
3.6 - Fracionamento do Extrato Mc-8R	51
3.6.1 - Fracionamento via CLAE do Extrato Mc-8R Obtido em CDB	51
3.6.2 – Fracionamento do Extrato Mc-8R XAD Saco via CLAE.	53
3.6.3 - Fracionamento via CC do Extrato Mc-8R Obtido em CDB	54
3.6.4 – Purificação da Fração Mc-8R Milho Hex.	58
3.7 – Cultivo do Fungo Mc-7F com CDB em Larga Escala.	59
3.8 - Fracionamento do Extrato Mc-7F Obtido em CDB.....	59
3.8.1 - Fracionamento em CLAE das Frações Mc-7F.1 e Mc-7F.2	60
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.	62
4.1 – Triagem Química e Biológica dos Extratos dos Fungos Endofíticos Isolados de <i>Michelia champaca</i>	62

4.1.1 – Fungos Endofíticos Isolados dos Caules de <i>Michelia champaca</i>	64
4.1.2 – Fungos Endofíticos Isolados das Folhas de <i>Michelia champaca</i>	65
4.1.3 – Fungos Endofíticos Isolados das Raízes de <i>Michelia champaca</i>	67
4.2 – Cultivo do Endofítico Mc-8R em Diferentes Meios de Cultura.....	67
4.3 – Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas.....	73
4.3.1 – Elucidação Estrutural das Substâncias Produzidas por Mc-8R.....	73
4.3.1.1 – Identificação Estrutural da Citreopirona (Pirenocina A) (1).....	73
4.3.1.2 – Identificação Estrutural da Pirenocina E (2).....	75
4.3.1.3 – Identificação Estrutural da Pirenocina B (3).....	76
4.3.1.4 – Identificação Estrutural do Ácido Pirenochaético C (4).....	78
4.3.1.5 – Identificação Estrutural do Ácido Pirenochaético A (5).....	80
4.3.1.6 – Identificação Estrutural do Ácido Pirenochaético B (6).....	81
4.3.1.7 – Elucidação Estrutural do Ácido Pirenochaético (7).....	83
4.3.1.8 – Elucidação Estrutural do Ácido Pirenochaético (8).....	84
4.3.1.9 – Identificação Estrutural de Ergosterol (9).....	86
4.3.1.10 – Identificação Estrutural do Peróxido de Ergosterol (10).....	87
4.3.2 – Elucidação Estrutural das Substâncias Produzidas por Mc-7F.....	89
4.3.2.1 – Identificação Estrutural da Uracila (11).....	89
4.3.2.2 – Identificação Estrutural do <i>ciclo</i> -(S*-Pro-S*-Tyr) (12).....	90
4.3.2.3 – Identificação Estrutural do <i>ciclo</i> -(S*-Pro-S*-Val) (13).....	92
4.3.2.4 – Identificação Estrutural de Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (14).....	94
4.3.2.5 – Identificação Estrutural de Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15).....	96
4.3.2.6 – Identificação Estrutural de 4-Hidroxi-benzamida (16).....	97
4.3.2.7 – Identificação Estrutural do Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17).....	98
4.3.2.8 – Elucidação Estrutural de (18).....	100
4.3.2.9 – Elucidação Estrutural de (19).....	102
4.3.3 – Elucidação Estrutural da Substância Produzida por Mc-3C <i>Xylaria</i> sp.....	105
4.3.3.1 – Identificação Estrutural do diácido Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (20).....	105
4.4 – Atividade Biológica das Frações e Substâncias Isoladas de Mc-7F e Mc-8R.....	107
4.4.1 – Avaliação da Atividade Antifúngica de (1) a (19) Frente aos Fungos Fitopatogênicos <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	107
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
REFERÊNCIAS.....	114
ANEXOS.....	120

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - A Importância Ecológica e Biotecnológica dos Microrganismos em Química de Produtos Naturais

Entre todos os produtores de moléculas naturais conhecidas, os microrganismos representam uma rica fonte de metabólitos biologicamente ativos com larga aplicação como agroquímicos, antitumorais, antiparasitários, imunossuppressores entre outros. Estima-se que apenas 1% das bactérias e 5% dos fungos encontrados nos solos são conhecidos, indicando a possibilidade de se encontrarem milhares de espécies ainda desconhecidas. Estes microrganismos são encontrados na Antártida, Ártico, Alpes, desertos, regiões áridas, vulcânicas e solos férteis ou inférteis, englobando assim todo planeta abrangendo todos os ecossistemas, independente de suas condições geográficas ou climáticas.

Historicamente, de todos os microrganismos estudados, os actinomicetos e os fungos imperfeitos mostraram-se melhores produtores de metabólitos secundários. Isto sugere que os fungos são essenciais para a saúde e prosperidade de todo ecossistema terrestre sendo essenciais para sua sustentabilidade e biodiversidade. Existem as relações simbióticas entre espécies que se beneficiam reciprocamente (mutualismo) que oferecem proteção a pragas e outros microrganismos patogênicos através da produção de metabólitos secundários ou uma relação, alimentar, na qual uma espécie se beneficia sem prejudicar a outra (comensalismo), tendo assim uma relação harmônica entre microrganismos e hospedeiros.

A evolução dos estudos biológicos vem demonstrando um ciclo de interação intrinsecamente forte entre hospedeiros e microrganismos sendo estes endofítico. Em estudos mais aprofundados é possível averiguar a existência de fungos micorrízicos arbusculares migrando para o interior da planta e estabelecendo uma relação mutualista (GUNATILAKA, 2006).

1.2 - A Importância Ecológica e Biotecnológica dos Fungos

Os fungos são organismos heterotróficos, mais especificamente quimiorganotróficos típicos de ambientes úmidos e encontra-se distribuídos em habitats diversos como água, solo, ar e sobre partículas em suspensão e podem ser unicelulares (leveduriforme) ou pluricelulares (micélio). São divididos, conforme o habitat, em grupos como coprófilos, micoparasitas de água doce ou marinhos, termofílicos, filoplanos, epifíticos, endofíticos, entre outros. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos comumente prosperam em ambientes competitivos, mantendo relações simbióticas (mutualismo ou comensalismo), tróficas (predação e parasitismo) e de competição (por território e recursos alimentares) com outros organismos do seu ecossistema. Eles podem ser predadores de insetos e nematóides. Fungos endofíticos do gênero *Claviceps* são encontrados principalmente em gramíneas e produzem os alcalóides de ergot, substâncias que ao serem ingeridas junto com a planta provocam doenças em insetos e mamíferos herbívoros, protegendo a planta e o fungo dos predadores (TAN; ZHANG; SONG, 2006).

A relação de parasitismo fungo-planta envolve a produção de fitoalexinas, que são produzidas pela planta visando conter a infecção fúngica (GLOER, 1995). Os fungos por sua vez, produzem fitotoxinas que causam a necrose e a morte do tecido vegetal (HARBONE, 1994). Fungos patogênicos de ervas daninhas apontam como uma fonte de novos herbicidas, com forte atividade (HOAGLAND, 1990). Nas relações de competição, o mecanismo de antagonismo envolve a produção de agentes químicos por uma espécie, inibindo o crescimento da outra. Isto é um indicativo de que os metabólitos responsáveis por esses efeitos são essencialmente antibióticos naturais (WICKLOW, 1992 e CARROL, 1992).

Aproximadamente 25% dos produtos naturais biologicamente ativos até hoje conhecidos, foram obtidos a partir de fungos (KONGSAEREE, et al., 2003).

Dentre eles destacam-se os antibióticos β -lactâmicos das classes da Penicilina F (*Penicillium chrysogenum*) e Cefalosporina C (*Cephalosporium acremonium*) que juntos representam um mercado mundial de 15,0 bilhões de dólares e a Ciclosporina A (*Tolypocladium inflatum gams*) (imunossupressor) e Lovastatina (*Aspergillus terreus*) (reduzidor de colesterol), (**Figura 1**: p. 22) que são responsáveis por um mercado mundial de 1,5 e 8,4 bilhões de dólares, respectivamente (DEMAIN, 2000). Entre 2000 e 2003, de todos os fármacos originados de produtos naturais ou derivados destes lançados nos EUA, Europa e Japão, pelo menos quatro foram derivadas ou sintetizadas a partir de metabólitos secundários de fungos (BUTLER, 2004).

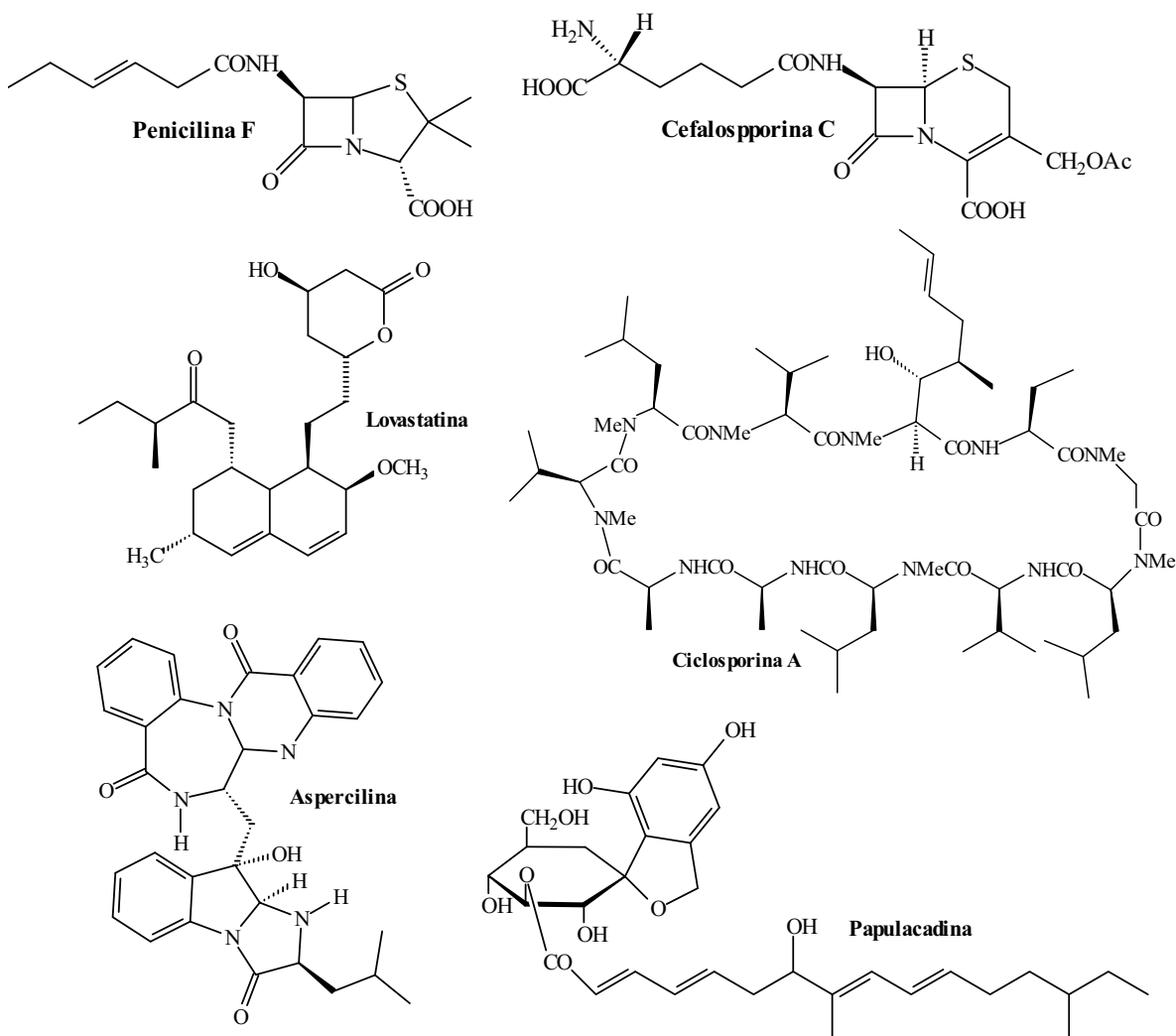


Figura 1: Substâncias bioativas obtidas a partir de fungos

1.3 - Microrganismos Endofíticos

Microrganismos endofíticos são geralmente bactérias e/ou fungos que colonizam o interior de órgãos vegetais, sem causarem nenhuma patologia ou danos ao hospedeiro. Esta é uma relação simbiótica (GUNATILAKA, 2006).

Os primeiros relatos de endofíticos datam de 1904. Na época foi dada pouca relevância a esta classe. Recentemente, descobriram a importância ecológica destes microrganismos através da produção de metabólitos secundários com diferentes estruturas e atividades biológicas. Há duas décadas atrás existiam apenas 100 espécies de endofíticos avaliados sob a ótica de suas produções metabólicas, cujas estruturas apresentaram atividades biológicas interessantes (GUNATILAKA, 2006).

1.3.1 - Fungos Endofíticos.

Com a evolução das espécies fúngicas algumas se tornaram endofíticas se especializando em invadir os espaços celulares dos tecidos vegetais, através das raízes, estômatos e feridas (ANDREWS; HIRANO, 1991).

Apresentam um enorme potencial ainda muito pouco explorado sendo um importante nicho de produção de novos metabólitos secundários bioativos (GUNATILAKA, 2006).

Uma vez instalado, o endófito pode habitar a planta por toda sua vida, em alguns casos sendo transmitido através das sementes (CARROL, 1988).

Qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 e 100 diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo no mínimo duas específicas do hospedeiro (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). Os endofíticos não apresentam estruturas que perfuram as células da planta e digerem as substâncias no seu interior (haustórios), estrutura comum em fungos fitopatogênicos e em geral, as infecções causadas por fungos endofíticos não produzem sintomas externos, podendo estar latentes ou serem assintomáticas (PETRINI; CARROL, 1981 & PETRINI, 1986).

Entretanto, mudanças no hospedeiro causadas por fatores de stress, podem induzir a transição de um estado simbiótico (mutualismo ou comensalismo) a trófico (parasitismo) (PETRINI, O, 1991).

Nas relações mutualistas, além de proteger as plantas contra insetos e patógenos, os fungos endofíticos ainda são capazes de produzir metabólitos que aumentam o crescimento e enraizamento da planta hospedeira e a sua resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN, J. et al., 1997). Estas moléculas que podem possuir várias atividades: hormônios, antibióticos, antitumorais entre outras funções biológicas, apresentam grande interesse industrial e biotecnológico. Pesquisadores da Sandoz, em um programa de triagem de produtos naturais oriundos de fungos verificaram que entre os fungos filamentosos, os endofíticos são os mais produtivos quimicamente, apresentando uma produção de metabólitos secundários 73% maior que os outros fungos (DREYFUSS, M. M., 1994).

O estudo feito por Schulz, B. et al., (2002), mostra que 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos eram inéditas em comparação com somente 38% de novas substâncias isoladas da microbiota de solo.

Gunatilaka A. A. L. (2006) fez um levantamento da diversidade dos metabólitos isolados de microrganismos endofíticos e relatou o isolamento de substâncias pertencentes a diversos grupos estruturais como esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, alcalóides, quinonas, furandionas, terpenóides, peptídeos, citocalasinas compostos alifáticos entre outros. Levantamento bibliográfico sobre a ocorrência de metabólitos secundários isolados de microrganismos endofíticos evidenciou um grande número de substâncias bioativas, sendo destacadas algumas na **Tabela 1**: p. 25

Tabela 1: Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos.

Microrganismo	Hospedeiro (tecido vegetal)	Produto Natural	Atividade Biológica
<i>Acremonium zeae</i> (NRRL 13540) (mitosporic Hypocreales)	<i>Zea mays</i> L. (Milho) (Poaceae); (Semente)	pirrocidina A pirrocidina B	Antifúngico; bactericida
<i>Aspergillus clavatus</i> strain H-037 (Trichocomaceae)	<i>Taxus mairei</i> (Lemée & Lév.) and <i>Torreya grandis</i> Arn. (Taxaceae); Casca	Brefeldina A	antifúngico; antiviral; anticancer; herbicida
<i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); folha	asperfumoide asperfumina monometilsulocina fumigaclavina C fumitremorgina C pisiona ergosterol ácido helvolico peróxido de ergosterol <i>cyclo</i> (Ala-Leu) <i>cyclo</i> (Ala-Ile)	antifúngico; antimicótico antifúngico; antimicótico
<i>Aspergillus niger</i> IFB-E003 (Trichocomaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); folhas	rubrofusarina B fonsecinona A aurasperona A asperpirona B sequoiatona C sequoiatona D sequoiatona E sequoiatona F sequoiamonascina A	citotóxico; inibidor da xantina oxidase antifúngico; inibidor da xantina oxidase
<i>Aspergillus parasiticus</i> RDWD1-2 (Trichocomaceae)	<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl. (Taxodiaceae); casca	sequoiamonascina B sequoiamonascina C sequoiamonascina D	tóxico para Artêmia salina tóxico para Artêmia salina tóxico para Artêmia salina tóxico para Artêmia salina tóxico para Artêmia salina; citotóxico tóxico para Artêmia salina tóxico para Artêmia salina tóxico para Artêmia salina
<i>Aspergillus sp.</i> (Strain #CY725) (Trichocomaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); folhas	monometilsulocrim ácido helvolico ergosterol peróxido de ergosterol	antibiótico; inibidor de célula brancas bactericida
<i>Botrytis sp.</i> (Sclerotiniaceae)	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt. (Taxaceae); casca	ramulosina 6-hidroqramulosina 8-dihidroramulosina grafislactona A	antibiótico antibiótico antibiótico antioxidante; anti radicais livres
<i>Cephalosporium sp.</i> IFB-E001 (mitosporic Hypocreales)	<i>Trachelospermum jasminoides</i> Lemoire (Apocynaceae); vine	ergosterol <i>cyclo</i> (Gly-Val) ácido butanodioico sulfato de colina 2-[2-(hidroxi-tetracosanoil) amino]-1,3,4-octadecatriol leucine D-manitol <i>meso</i> -eritritol ácido piridina-3-carboxílico α -estearina uracila	
<i>Cephalosporium sp.</i> (mitosporic Hypocreales)	<i>Dendrobium nobile</i> Sw. (Orchidaceae); raízes		
<i>Ceratopycnidium baccharidicola</i> (Ascomycetes, Incerte sedis)	<i>Baccharis cordifolia</i> L. (Asteraceae); tronco; folhas	rodicins verrucarins	Tóxico para animais Tóxico para animais

Tabela 1: Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos (continuação).

Microrganismo	Hospedeiro (tecido vegetal)	Produto Natural	Atividade Biológica
<i>Chaetomium chiversii</i> CS-36-62 (Chaetomiaceae)	<i>Ephedra fasciculata</i> A. Nels (Ephedraceae); tronco	radicicol	citotóxico; inibidor da Hsp90
<i>Chaetomium globosum</i> (chaetomiaceae)	<i>Ephedra fasciculata</i> A. Nels (Ephedraceae); tronco	ácido orselínico globosumona A globosumona B globosumona C tricodiona orcinol	citotóxico citotóxico
<i>Cladosporium herbarum</i> IFB-E002 (Mycosphaerellaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); folhas	aspernigrina A rubrofusarina B fonsecinona A 3 α ,5 α ,6 β -trihidroxi- ergosta-7,22-diene 7-hidroxi-4-metoxi-5- metilcoumarina orlandina kotanina	citotóxico; inibidor da xantina oxidase Inibidor de germinação de plantas
<i>Colletotrichum sp.</i> strain EG4 (Phyllachoraceae)	<i>Ginkgo biloba</i> L. (Ginkgoaceae); folhas	compostos flavonóidicos	
<i>Cytospora sp.</i> CR 200 (Valsaceae)	<i>Conocarpus erecta</i> L. (Combretaceae); tronco	citospórone A citospórone B citospórone C citospórone D citospórone E citoskirina A citoskirina B	citotóxico; antifúngico bactericida
<i>Diaporthe sp.</i> CR 146 (Valsaceae)	<i>Forsteronia spicata</i> G. Meyer (Apocynaceae); tronco	citospórone A citospórone B citospórone C citospórone D citospórone E	citotóxico; antifúngico
<i>Dothiorella sp.</i> strain HTF3 (Botryosphaeriaceae)	<i>Aegiceras corniculatum</i> Gaertner. (Myrsinaceae) (Mangrove); casca	citospórone B dothiarelone A dothiarelone B dothiarelone C dothiarelone D	bactericida citotóxico; antifúngico citotóxico citotóxico citotóxico
<i>Eupenicillium sp.</i> (Trichocomaceae)	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack (Rutaceae); folhas	alanditripinona alantrifenona alantripinene alantrileunona	
<i>Fusarium oxysporum</i> strain 97CG3 (mitosporic Hypocreales)	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (Apocynaceae); casca interna	vincristina	anticancerígena
<i>Fusarium sp.</i> IFB-121 (mitosporic Hypocreales)	<i>Quercus Variabilis</i> L. (Fagaceae); casca	cerebrosíde fusarusíde	Bactericida; inibidor da xantina oxidase bactericida; inibidor da xantina oxidase
<i>Fusidium sp.</i> (Mitosporic fungi)	<i>Mentha aVensis</i> L. (Lamiaceae); folhas	fusidilactona A fusidilactona B fusidilactona C <i>cis</i> -4-hidroxi-6- deoxiscitalona	
<i>Guignardia sp.</i> (Botryosphaeriaceae)	<i>Spondias mombin</i> L. (Anacardiaceae); folhas	ácido (-)-(<i>S</i>)-guignardic (72)*	
<i>Hormonema sp.</i> ATCC 74360 (Dothioraceae)	<i>Juniperus communis</i> L. (Cupressaceae); folhas	enfumafungina	Antifúngico
<i>Leptosphaeria sp.</i> strain IV403 (Leptosphaeriaceae)	<i>Artemisia annua</i> L. (Asteraceae); tronco	ácido leptosfaerico leptosfaerona	
<i>Melanconium betulinum</i> (Melanconidaceae)	<i>Betula pendula</i> Roth; <i>B. pubescens</i> Ehrh. (Betulaceae); partes acima do solo	ácido 3-hidroxi- <i>propionico</i>	Anti nematóide

Tabela 1: Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos (continuação).

Microrganismo	Hospedeiro (tecido vegetal)	Produto Natural	Atividade Biológica
<i>Microsphaeropsis olivacea</i> (mitosporic Ascomycota)	<i>Pilgerodendron uviferum</i> (D. Don) flores (Cupressaceae) [Gymnosperm]; Floema	7-hidroxi-2,4-dimetil-3(2H)-benzofuranona enalina grafislactona A botralina ulocladol 2,5-diacetilfenol butirolactona I	inibidor da acetilcolinesterase inibidor da acetilcolinesterase
<i>Microsphaeropsis sp.</i> strain NRRL15684 (mitosporic Ascomycota)	<i>Buxus sempervirens</i> L. (Buxaceae); folhas	lactona S 39163/F-I	antimicrobial; antiviral
<i>Monochaetia sp.</i> (Amphisphaeriaceae)	Folhas tronco pecíolo de várias plantas floresta tropical	ácido ambuico	antimicótico
<i>Muscodor albus</i> (mitosporic Xylariales)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Schaelter. (Lauraceae); caules	Antibióticos volateis	antibiótico
<i>Mycelia sterila</i> strain 4567 (Ascomycota)	<i>Cirsium arvense</i> (Canadian thistle) (Asteraceae); ns	3-acetil-6-hidroxi-4-metil-2,3-dihidrobenzo-furano 3-(3',5'-dihidroxi-2'-metilfenil)-2-butanona 4-acetil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-5-metilisocoumarina 4-acetil-3,4-dihidro-6,8- dihidroxi-3-metoxi-5- metilisocoumarina 3,4-dihidro-3,6,8-tri- hidroxi-3,5-dimetil-isocoumarina 6,8-diacetoxi-3,5-dimetilisocoumarina	
<i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)	<i>Atropa belladonna</i> L. (Solanaceae); raízes	preussomerina G preussomerina H preussomerina I preussomerina J preussomerina K preussomerina L	bactericida; antifúngico; inibidor da FPTase bactericida; antifúngico; bactericida; antifúngico; bactericida; antifúngico; bactericida; antifúngico; bactericida; antifúngico;
<i>Nectria galligena</i> (Nectriaceae)	<i>Malus x domestica</i> Borkch (apple) (Rosaceae); xilema	colletorina B colletoclorina B ilicicolina C ilicicolina E ilicicolina F α,β -dehidrocurvularina	inibidor da acetilcolinesterase; inibidor da β -glucuronidase inibidor da acetilcolinesterase; inibidor da β -glucuronidase inibidor da acetilcolinesterase; inibidor da β -glucuronidase citotóxico para germinação de sementes e inibidor de crescimento de novas raízes
<i>Nodulisporium sp.</i> MF 5954, ATCC74245 (microsporic Xylariales)	<i>Bontia daphnoides</i> L. (Scrophulariaceae); madeira	ácido nodulisporico A ácido nodulisporico A1 ácido nodulisporico A2	inseticida inseticida
<i>Paecilomyces sp.</i> H-036 and W-001 (Trichocomaceae)	<i>Taxus mairei</i> (Lemée & Lév) and <i>Torreya grandis</i> Arn. (Taxaceae); tronco	brefeldina A	Antifúngico; antiviral; anticancerígeno; herbicida
<i>Penicillium implicatum</i> (isolate SJ21) (Trichocomaceae)	<i>Diphylleia sinensis</i> H L. Li (Berberidaceae); raízes; nódulos; pecíolos	Substâncias análogas ao podofilotoxina	anticancerígeno

Tabela 1: Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos (continuação).

Microrganismo	Hospedeiro (tecido vegetal)	Produto Natural	Atividade Biológica
<i>Penicillium janczewskii</i> (Trichocomaceae)	<i>Prumnopitys andina</i> (Endl.) Laubenf. (Podocarpaceae); floema	peniprequinolona	nematicida; hormônio de crescimento das raízes
<i>Periconia sp.</i> OBW-15 (Halosphaeriaceae)	<i>Taxus cuspidata</i> Siebold & Zucc. (Taxaceae); interior das cascas	gliovicina melleina periconicina A periconicina B	citotóxico contra bactérias; antiviral; fitotóxico antimicótico; aumento da germinação e crescimento das raízes (em baixa concentração) aumento da germinação e crescimento das raízes (em baixa concentração) antifúngico; antimycotic
<i>Pestalotiopsis jesteri</i> (Amphisphaeriaceae)	<i>Fragraea bodenii</i> Thunb. (Gentianaceae); interior das cascas	jesterona hidroxijesterona	
<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Amphisphaeriaceae)	<i>Terminalia morobensis</i> L. (Combretaceae); tronco	pestacina Isopestacina	antimicótico; antioxidante antifúngico; antioxidante
<i>Pestalotiopsis spp.</i> (Amphisphaeriaceae)	folhas e troncos de plantas tropicais	ácido ambuico	antimicótico
<i>Phomopsis phaseoli</i> (Valsaceae)	Folhas de plantas tropicais	ácido 3-hidroxi propiônico	nematicida
<i>Phomopsis sp.</i> (Valsaceae)	<i>Erythrina crista-galli</i> L. (Fabaceae); galhos mortos	phomol	bactericida; antifúngico; antiinflamatório (ensaio com edemas em ratos); fracamente citotóxico
<i>Phyllosticta capitalensis</i> (telemorph <i>Guignardia mangiferae</i>) (Botryosphaeriaceae)	temperate and tropical madeira e folhas da árvore		
<i>Pseudomassaria sp.</i> ATCC 74411 (Hyponectriaceae)	Planta não identificada (collected near Kinshasa, Democratic Republic of Congo); folhas	demetilasterriquinona B1 (DMAQ-B1) Asterriquinona Asterriquinona oxidada e decomposta	Ativador de receptores de insulina
<i>Rhizoctonia sp.</i> Cy064 (mitosporic Hymemomycetes)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); folhas	ácido rizotônico monometilsulocrim ergosterol 3 β ,5 α ,6 β -trihidroergosta-7,22-dieno (-)-oocidina A	bactericida fraco bactericida fraco bactericida fraco bactericida fraco
<i>Serratia marcescens</i> MSU-97 (Enterobacteriaceae)	<i>Rhyncholaxis penicillata</i> Tul. (Podostemaceae); ns		antifúngico
<i>Scytalidium sp.</i> (mitosporic Ascomycota)	<i>Salix sp.</i> (Salicaceae); folhas	ácido 4,6-dihidroxi-3-metil-2-(2-oxopropionico)-benzoico ácido 2-(1-acetil-2-hidroxivinil)-4,4-dihidroxi-3-metilbenzoico 4-acetil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-5-metilisocoumarina 4-acetil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-3-metoxi-5-metilisocoumarina descarboxicitrinona 6,8-dihidroxi-4-hidroxi-3,5-dimetilisocromo-1-ona 4-acetoximetil-6,8-dihidroxi-3,5-dimetilisocromo-1-ona 4-acetil-6,8-dihidroxi-5-metil-2-benzopirano-1-ona (+)-dihidronaftol(1,2- <i>b</i>)-furano-5,6-dicarboxílico anidrido acetona aduto com atronetinona	

Tabela 1: Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos (continuação).

Microrganismo	Hospedeiro (tecido vegetal)	Produto Natural	Atividade Biológica
Fungo não identificado SWS 2611L (DAOM 229664)	<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss. (Pinaceae); needles	6,7-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olida 5,6,8-trihidroxi-4-(1'-hidroxietil) isocoumarina sescandelina sescandelina B	tóxico cultura de células de CF-1 praga mariposa fracamente tóxico cultura de células de CF-1 praga mariposa fracamente tóxico cultura de células de CF-1 praga mariposa fracamente tóxico cultura de células de CF-1 praga mariposa
Fungo não identificado No. 2524	<i>Avicennia marina</i> Forssk. (Acanthaceae); sementes (Mangue)	4-hidroxi-2-metoxiacetanilida (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-dihidroxi-(6 <i>S</i>)- undecil- α -piranona <i>cyclo</i> -(L-Phe-L-Leu ¹ -L-Leu ² -L-Leu ³ -L-Ile)	não citotóxico não citotóxico
Fungo não identificado No. 2533	<i>Avicennia marina</i> Forssk. (Acanthaceae); folhas novas	vermopirona avicenina A avicenina B 5-decloroavicenina A 6,7-dimetil-8-hidroxi-3-metilisocoumarina	
Fungo não identificado No. 2534	<i>Kandelia candel</i> (L.) Druce (Rhizophoraceae);	ergosterol 5 α ,8 α -epidioxiergosterol 3 β ,8 α ,6 β -trihidroxiergosta-7,22-dieno <i>cyclo</i> -(Phe-Phe) <i>cyclo</i> -(Leu-Tyr) guanidina 4-hidroxi-2-metoxiacetofenona ácido protocatecuico metil ester	
Fungo não identificado E-3	<i>Prumnopitys andina</i> (Endl.) Laubenf. (Podocarpaceae); floema	meleina <i>p</i> -hidroxibenzaldeido 4-(2-hidroxi)fenol	bactericida ; antiviral; fitotóxico

Fonte: GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, Nov. 2006.

1.4 - A Espécie Vegetal *Michelia champaca* (Magnoliaceae) Planta Exótica.

A família Magnoliaceae compreende cerca de 10 gêneros encontrados na Ásia (Índia, Malásia) e América do Sul (Brasil) sendo que a maioria ocorre no hemisfério Norte. No Brasil são cultivadas várias espécies dos gêneros *Magnolia* e *Michelia* (popularmente conhecida como magnólia amarela). O gênero nativo do Brasil é o *Talauma*, com seu fruto seco muito característico, que floresce no Sul do Brasil durante a primavera (JOLY, 1975).

Michelia champaca é uma árvore sempre verde e a madeira obtida da árvore adulta é macia, forte e muito durável, com uma densidade de 706,0 Kg/m³. São fáceis de trabalhar,

sendo usadas para a fabricação de móveis, madeira compensada, navios, artigos decorativos, na construção civil, etc. (NOATAY, 2007).

Medicinalmente eram empregadas em Java, como tônico, estimulante, diurético e febrífugo. O chá das raízes e das folhas é usado para provocar a menstruação e no combate às infecções da garganta, respectivamente. A casca, após a decocção, possui propriedades digestivas e o óleo essencial das sementes é empregado em fricção, contra as dores articulares e os reumatismos (PIO CORRÊA, 1974). O extrato da casca da raiz de *M. champaca* mostrou-se um potente inseticida frente à larva do *Aedes aegyptii* (JACOBSSON, et al., 1995).



Figura 2: Foto de *Michelia Champaca* L. (Magnoliaceae) Fonte: Ioanis H. Leptokarydis

1.5 – O Fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Isolado de *Michelia champaca*

1.5.1 – O Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* é membro da subdivisão Deuteromycotinia da ordem das Melanconidiales e se caracterizam pela formação de estruturas denominadas acérvulos, em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforos simples e alongados, conídios hialinos unicelulares, geralmente em forma de bastonete, que permanecem nos acérvulos aderidos por uma massa mucilaginosa de polissacarídeos, solúveis

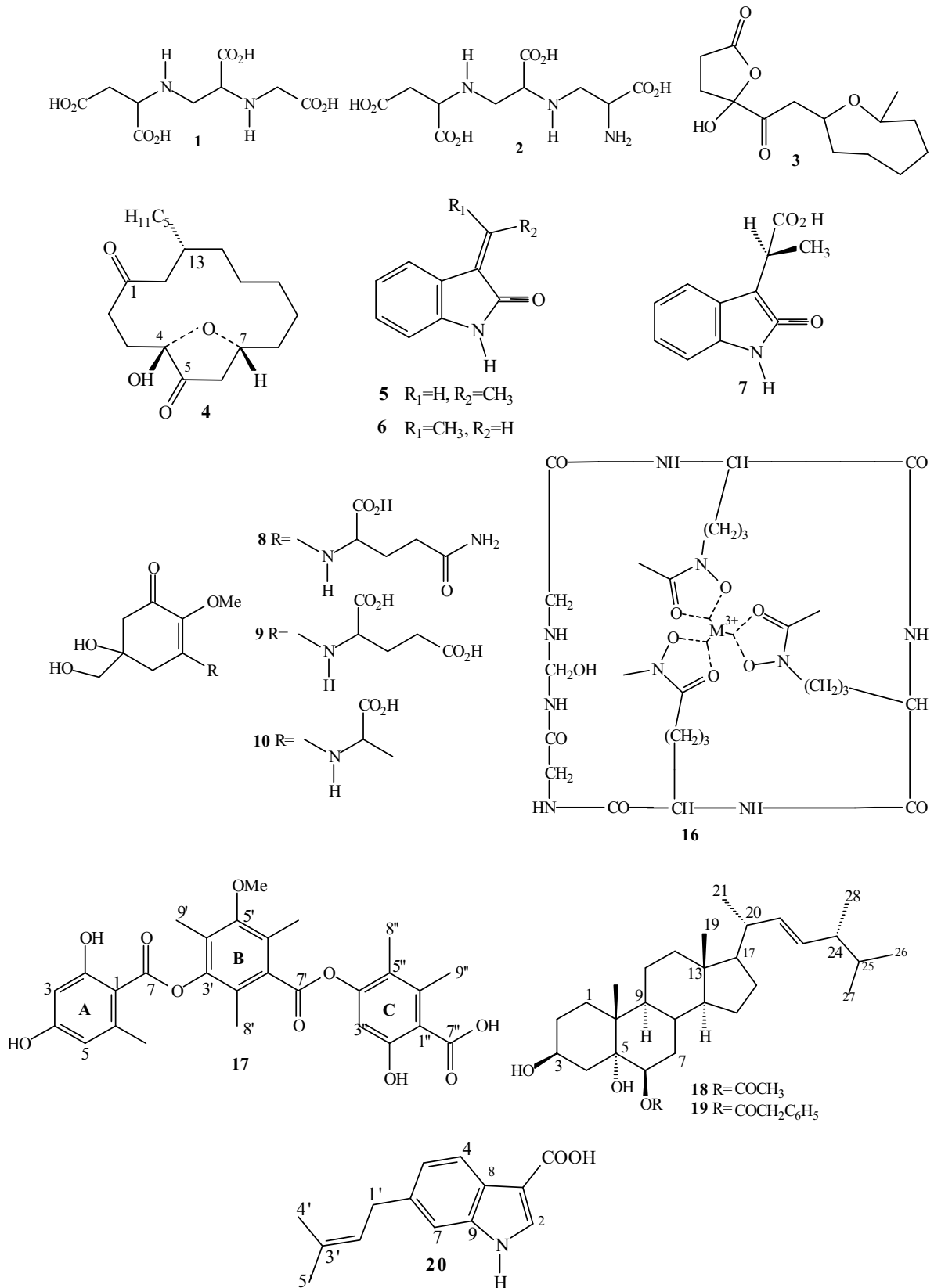
em água. Apesar destes esporos não serem estruturas de resistência, os micélios do fungo podem permanecer viáveis por longo período de tempo, em sementes, restos culturais, ou em infecções latentes em frutos. As espécies anamórficas do gênero *Colletotrichum* (teleomorph, *Glomerella*) geralmente são as responsáveis pela doença antracnose formando lesões neuróticas ovais em frutas. As várias espécies de *Colletotrichum* incluem as mais devastadoras pragas patogênicas infectando plantas como cereais, frutas, legumes, etc. Estas têm crescimento rápido em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), formando colônias concêntricas, de coloração verde-oliva à marrom, podendo ocorrer à formação ou não de setores (GARCIA-PAJÓN; COLLADO, 2003).

1.5.1.1 – O Fungo *Colletotrichum gloeosporioides*

O Fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma espécie, pertencente à ordem Melanconiales da classe Coelomycetes, cuja fase perfeita é classificada com estirpes homotáticas ou heterotáticas de ascomicetos do gênero *Glomerella* sp.. Os fungos deste gênero, juntamente com sua fase perfeita, são considerados os maiores patógenos de plantas em todo o mundo. A antracnose se constitui um dos mais sérios problemas do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Simmonds f. *flavicarpa*). Essa doença tem como agente causal o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (GARCIA-PAJÓN; COLLADO, 2002).

C. gloeosporioides possui uma ampla gama de hospedeiros infectando goiabeira, mangueira, mamoeiro, cajueiro, jaqueira, certas anonáceas, como pinha, biriba, cherimóia, condessa, frutíferas do grupo da *Spondia* como cajazeira, cajarana, seriguela, umbu, e emboquela (MENEZES, 2002 & SANTOS FILHO, SANTOS, 2003).

È muito bem conhecido que *Colletotrichum gloeosporioides* é uma espécie que produz metabólitos fitotóxicos similares aos produzidos por outros do mesmo gênero. Alguns destes metabólitos (**Figura 3**, p. 33), é que lhe conferem resistência contra outros patógenos (GARCIA-PAJÓN; COLLADO, 2003).

**Figura 3:** Substâncias bioativas obtidas a partir do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*

2 - OBJETIVOS

- ✓ Isolar, purificar, identificar e preservar os fungos associados à espécie vegetal *Michelia champaca* (Magnoliaceae);
- ✓ Isolar, determinar e/ou identificar os metabólitos secundários;
- ✓ Busca de substâncias com atividade biológica frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e atividade inibidora da acetilcolinesterase;
- ✓ Realizar o isolamento, elucidação e identificação estrutural dos metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e espectrométricas;
- ✓ Verificar a co-produção de metabólitos secundários;
- ✓ Avaliar as substâncias puras frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e atividade inibidora da acetilcolinesterase;
- ✓ Realizar a variação metabólica cultivando o fungo Mc-8R em diferentes meios de cultura e condições;
- ✓ Contribuir para o estudo quimiotaxonômico de fungos endofíticos e verificar a simbiose dos fungos endofíticos com a espécie vegetal (*Michelia champaca*).

3 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Especificação dos Materiais, Instrumentos e Técnicas Utilizadas.

3.1.1 - Solventes Utilizados:

Foram utilizados solventes Pa. e CLAE dos fabricantes JT. Backer p., Mallinckrodt e Synth. Nos experimentos de RMN, foram utilizados os solventes deuterados CDCl_3 e DMSO-d_6 produzidos por Merck, Aldrich e Fluka.

3.1.2 - Evaporador Rotatório:

As soluções foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida do fabricante Buchi.

3.1.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:

As análises cromatográficas foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelhos:

- Varian Pro Star (Solvent Delivery Module 240 e Auto Sampler 410) acoplado ao detector Varian Pro Star Photodiode Array Ultra-violet (PDA-UV) 330 e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Varian Star Chromatography Workstation versão 5.52 – Modo analítico em gradiente exploratório.

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

- Shimadzu (bomba Shimadzu LC-10 AD, auto injetor Shimadzu SIL 10 A) acoplado ao detector ultravioleta em arranjo de diodos Shimadzu SPD MX AVP e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Shimadzu CLASS-LC10 versão 1.64A – Modo analítico e/ou gradiente exploratório.

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

Foram utilizadas colunas analíticas Phenomenex tipo LUNA (C18 e Fenil-Hexil, 250 x 4,6 mm, 5 μ m) e coluna preparativa Phenomenex tipo LUNA (C18 e Fenil-Hexil, 250 x 21,20 mm, 10 μ m).

3.1.4 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC):

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas pré-prontas de sílica gel da marca Sorbent Technologies (TLC Plates W/UV 254, Aluminium backed, 200 μ m 20 x 20 cm) recortadas em pedaços de 5 x 5 cm. Foram também utilizadas placas de vidro preparadas com sílica gel 60G. As placas foram feitas aplicando-se uma suspensão de sílica em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placa de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura para placas comparativas e 0,75 mm de espessura para as placas de preparativas, através da utilização de espalhador Quickfitt. Após a preparação das placas, estas foram deixadas em repouso por cerca de 6 horas à temperatura ambiente, posteriormente sendo ativadas em estufa a 120 °C por 120 minutos. As visualizações foram por radiação na região do ultravioleta nos λ 254 e 366 nm os cromatogramas foram obtidos por nebulização com anisaldeído seguida de aquecimento ou exposição a iodo sublimado.

3.1.5 - Cromatografia em Coluna:

Nas separações cromatográficas em coluna aberta ou sob pressão se utilizou como fases estacionárias sílica gel de fase reversa C18 (Merck) e sílica gel de fase normal (Acros com diâmetro de partícula de 0,035-0,070 mm).

3.1.6 - Ressonância Magnética Nuclear:

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e experimentos uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Varian AS 500 - OXFORD operando com campo magnético de 11,7 T, utilizando TMS como referência interna.

3.1.7 - Espectrometria de Massas (EM):

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas de alta resolução utilizando as técnicas EI e ESI (+ e/ou -).

- Modelo: ultrOTOFO^Q - ESI-TOF Mass Spectrometer
- Fabricante: Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA.
- Preparação e condições do experimento:

Solubilização da amostra em: MeOH, MeOH/H₂O ou CHCl₃ com ou sem a adição de 0,1% de Ácido acético

Injeção da Amostra: Bomba de Infusão, Fluxo 100µl/h

Condições de operação:

End Plate: 4000 Volts

Capillary: 4500 Volts

Capillary Exit: 300 Volts

Skimmer 1: 55 Volts

Skimmer 2: 25 Volts

Dry Gas Temp 150C

Dry Gas Flow 4 L/min

Neb Gas Pressure 2 Bar

Calibração quando utilizado em alta resolução: usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10mg/ml e na calibração externa uma solução de Formiato de Sódio, a 10 mM.

3.1.8 – Ensaio Bioautográfico:

O ensaio para avaliação do potencial antifúngico foi realizado com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*. Foram utilizadas placas de CCDC da Merck TLC Sílica Gel 60 F 254. Para a preparação da solução estoque utilizou-se: quantidades especificadas de glicose. A solução foi autoclavada a 120 °C, por 20 minutos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

3.1.9 - Bioensaio com *Saccharomyces cerevisiae*:

O meio de cultura utilizado para o desenvolvimento e crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* constitui-se em 2% de peptona, 2% de dextrose e 2% de Agar (GUNATILAKA et al., 1994). Foram utilizadas as seguintes linhagens:

- Rad +: Linhagem selvagem
- Rad 6: Linhagem controle
- Rad 52Y: Linhagem mutante recombinante (associada com reparo na dupla hélice e recombinação meiótica)
- Rad 321N: Linhagem mutante associada à Topoisomerase II (enzima vital no processo de divisão celular)

3.1.10 - Cultivo dos Fungos Endofíticos em Vários Meios de Cultura:

O meio de cultura sólido BDA foi preparado com o antibiótico Sulfato de Gentamicina e acondicionado e homogeneizado em frascos tampados com pedaços de espumas com 1 cm de espessura amarradas com elástico. Estes foram autoclavados a 121°C durante 40 min., e resfriados a 45 °C em câmara asséptica. O meio BDA foi depositado em placas de Petri até formar uma camada de aproximadamente 0,5 cm, sendo posteriormente tampadas e vedadas com filme plástico. Os meios de cultura líquidos utilizam o mesmo procedimento citado anteriormente tendo as diferenças da não adição de antibiótico e não deposição em placas de Petri permanecendo em seus frascos originais. As concentrações utilizadas para cada meio de

cultura estão descritas na (Tabela 2: p.39). Para o cultivo dos fungos endofíticos em meios líquidos foi utilizado às incubadoras rotatórias dos fabricantes Marconi e Tecnal.

Tabela 2: Meios de cultura utilizados para os crescimentos dos fungos.

Meio de cultura	Tipo	C g/L	Composição	Especificação	Fabricante
BDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), agar (15g)	Base para cultivo de leveduras e fungos	SIGMA
CDB	Líquido	24	Caldo de Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	Base para cultivo de leveduras e fungos	DIFCO
ME	Líquido	20	Extrato de malte (20g)	Base para cultivo de fungos e bactérias	DIFCO
YM	Líquido	21	Extrato de levedura (3g), extrato de malte (3g), peptona (5g), dextrose (10g)	Base para cultivo de leveduras, fungos e outros microrganismos acidúricos	DIFCO
Nutrient	Líquido	8	Extrato de carne (3g), peptona (5g)	Base para cultivo de microrganismos não-fastidiosos	DIFCO
Czapek	Líquido	35	Sacarose (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	Base para cultivo de fungos e bactérias capazes de utilizar Nitrogênio inorgânico	DIFCO

3.2 - Análises Químicas e Biológicas

3.2.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV em Arranjo de Diodos (CLAE-DAD):

Os extratos e frações escolhidos foram submetidos a gradiente exploratório utilizando coluna analítica de fase reversa Fenil-Hexil ou C-18 tipo Luna da Phenomenex e eluídos com H₂O/ACN ou H₂O/MeOH (95:5) até (0:100) em 40 min., permanecendo 10 min. nesta condição, com fluxo de 1,0 mL/min., utilizando ou não a adição de 0,5% de ácido acético dopando a água, utilizando detector UV-DAD operando inicialmente a 254 nm.

Os extratos foram pré-tratados por “Clean up” por solubilização em MeOH/H₂O (95:5), centrifugação, eluição em C-18 e filtração em acrodisc 13CR PTFE 0,45µm da Gelman.

3.2.2 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC):

Estabelecer condições primárias de separação cromatográfica, como etapa inicial para o ensaio de detecção de substâncias antifúngicas. Para isso, empregou-se a metodologia do triângulo de seletividade com solventes dos tipos Localizante Básico, Localizante não Básico,

Não Localizante e Doador ou Receptor de prótons. Realizaram-se experimentos com solventes puros, misturas binárias, ternárias e quaternárias ajustando-se a força de eluição com Hex. (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

3.2.3 - Critérios de Pureza:

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

3.2.4 - Ensaio para Detecção de Substâncias com Atividade Antitumoral Potencial e/ou Citotóxica:

O bioensaio utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, é um modelo para avaliação do potencial antitumoral e citotóxico, e se fundamenta no emprego de células desta levedura (eucarióticas com propriedades similares às das células humanas) que foram geneticamente modificadas, para apresentarem os mesmos defeitos observados em células cancerígenas humanas, com a principal vantagem de serem facilmente crescidas “*in vitro*”, e assim serem ensaiadas frente a substâncias candidatas a novos fármacos anticancerígenos. Este bioensaio constitui uma importante ferramenta no estudo de produtos naturais, pois permitem a detecção de substâncias puras potencialmente antitumorais, como também extratos e frações cromatográficas, possibilitando um estudo biomonitorado.

Para o desenvolvimento e crescimento das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, o meio de cultura utilizado foi levado ao aquecimento sob agitação constante até a homogeneização. Em seguida, o mesmo foi esterilizado em autoclave, sendo posteriormente resfriado a 45-50 °C e transferido para placas de Petri em capela de fluxo laminar, formando uma camada fina. Da cultura estoque de cada linhagem, preparou-se uma suspensão diluída com água destilada nas seguintes densidades ópticas, lidas a 600 nm: Rad 52Y (0,05-0,1), Rad⁺ (0,05) e Rad 321 (0,05 a 0,1). Soluções destas linhagens foram adicionadas sobre as

placas contendo os meios de cultura, de modo a cobri-los. Após a retirada do excesso e secagem das placas foram feitos poços sobre sua superfície (6 mm de diâmetro) através de um tubo conectado a uma bomba de vácuo.

Todos os extratos foram avaliados na concentração de 2mg/mL, utilizando-se como veículo solução de DMSO:MeOH (50:50) e aplicados cerca de 100 µL dentro dos poços do meio de cultura para cada linhagem e posteriormente incubados por 48 horas. São utilizados como substâncias referências: Camptotecina (4 e 5 µg/mL) respectivamente para RAD⁺ e 52Y; estreptonigrina (200 µg/mL) para 321N. Os resultados preliminares obtidos através do ensaio são relatados como halos de inibição do crescimento das linhagens. Resultados mais elaborados (para substâncias já isoladas) são expressos como valores de IC₁₂, que é a concentração (em µg/mL) requerida para produzir uma zona de inibição de 12 mm de diâmetro ao redor do ponto de aplicação da amostra (halo considerado mínimo para a atividade antitumoral).

Um extrato é considerado ativo como um potencial antitumoral, se apresentar atividade seletiva frente uma ou mais linhagens mutantes (IC₁₂ menor que 1/3 do IC₁₂ de Rad⁺) e também ter IC₁₂ menor que 2.000 µg/mL. Se o halo de inibição das linhagens for maior que 12 mm, porém não obedecer estas condições, este indica ser citotóxico. (GUNATILAKA, et al., 1994).

3.2.5 - Ensaio para Avaliação da Atividade Antifúngica Através de Bioautografia:

A bioautografia consiste da associação entre a cromatografia em camada delgada e um ensaio biológico “*in situ*” (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991), possibilitando localizar constituintes biologicamente ativos presentes em uma matriz complexa ou indicar o potencial biológico de substâncias puras.

O método fundamenta-se na capacidade de inibição do crescimento do microrganismo aplicado sobre um cromatograma e incubação deste visando o aparecimento de possíveis zonas de inibição por constituintes ativos (HOMANS; FUCHS, 1970).

Todos os extratos dos endofíticos foram submetidos a este bioensaio, sendo aplicados (em duplicatas) na concentração 2,0 mg/mL em placas cromatográficas pré-prontas, utilizando 400 ug para extrato bruto; 200 ug para fração e 100 ug para subfração e substância pura, posteriormente eluídos empregando-se um sistema de solventes pré-estabelecido, à temperatura de ~ 30°C.

Após a evaporação dos solventes e localização das manchas (substâncias) por meio de absorção no UV, nebulizou-se as placas cromatográficas com uma suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* em um meio preparado no ato da aplicação do ensaio (10 mL de solução aquosa de glicose a 30% e 60 mL da solução estoque do fungo). Após nebulização, procedeu-se a incubação das placas em atmosfera úmida por 2 a 3 dias a 25 °C. O aparecimento de zonas de inibição indicaram a presença de substâncias com potencial antifúngico.

3.2.6 - Ensaio Preliminar para a Detecção de Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase:

A inibição da AChE é possível seguindo-se a metodologia de Marston; Kissling; Hostettmann, (2002) para cromatografia em camada delgada fina. Neste ensaio o extrato foi dissolvido em metanol (80 mg/mL). Uma amostra de 200 µg (2,5 µL) do extrato foi analisada em CCDC de sílica gel 60 F254 (0,2 mm, MERCK).

Como controles positivos foram utilizados galantamina (1 µg) e fisostigmina (0,3 µg), dissolvidos em metanol. Foi utilizado como eluente CHCl₃:MeOH (90:10). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (Solução A) seguida da evaporação do solvente.

A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a solução D.

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados são observados e fotografados em câmera fotográfica Epson e os valores de rf calculados onde houver inibição da reação.

Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto no C2880) dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH = 7,9), a solução estoque foi armazenada a 4 °C, no momento do uso é adicionado 0,1% de albumina de soro bovino fração V;

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

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

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

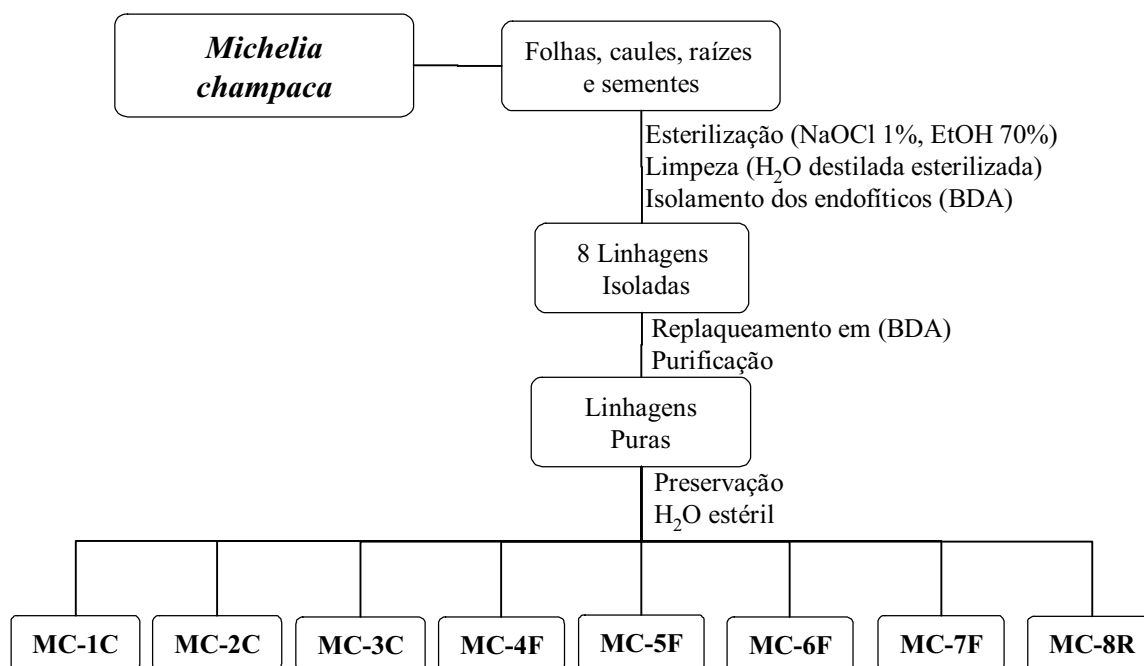
Todos os ensaios foram realizados no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia M. Young.

3.3 - Isolamento e Purificação dos Fungos Endofíticos Associados à *Michelia champaca*.

O material botânico coletado (caules, folhas, raízes e sementes) de *Michelia champaca* foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta. A retirada dos epifíticos superficiais foi realizada lavando o material coletado abundantemente com água corrente e detergente neutro. Em câmara asséptica, o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 1% por 5 minutos e novamente em álcool 70% por 1 minuto. Realizou-se então uma dupla lavagem em água destilada estéril (1 minuto) da qual se retirou 5 mL para fazer o controle da assepsia (MAIER, et al., 1997).

Os pedaços de caules, folhas, raízes e sementes (esterilizados), foram seccionados assepticamente e inseridos nas placas de Petri contendo BDA preparado com sulfato de gentamicina e incubados durante 10 dias a 25 °C. O crescimento dos fungos foi monitorado até que suas hifas atingissem aproximadamente 2-3 cm de diâmetro, em seguida as culturas foram repicadas e replaqueadas sucessivamente até a obtenção de linhagens puras avaliadas através da aparência uniforme nas placas, sendo posteriormente preservadas em água estéril.

Os órgãos vegetais de *M. champaca* possibilitaram o isolamento de 8 fungos endofíticos sendo todos codificados com Mc de *Michelia champaca* em seguida organizados por ordem alfabética sendo os 3 fungos dos caules numerados de 1 a 3 (Mc-1C, Mc-2C e Mc-3C), 4 das folhas sendo numerados de 4 a 7 (Mc-4F, Mc-5F, Mc-6F e Mc-7F) e 1 das raízes sendo o 8 (Mc-8R). Nenhum fungo foi isolado das sementes (**Esquema 1**, p. 44).



Esquema 1: Isolamento dos fungos associados

3.3.1 – Identificação dos Fungos Isolados de *Michelia champaca*.

Dos 8 endofíticos isolados de *Michelia champaca*, as linhagens Mc-3C, Mc-6F e Mc-7C foram identificadas como sendo *Xylaria* sp., *Phomopsis stipata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - MG.

3.4 - Cultivo dos Microrganismos e Obtenção dos Extratos.

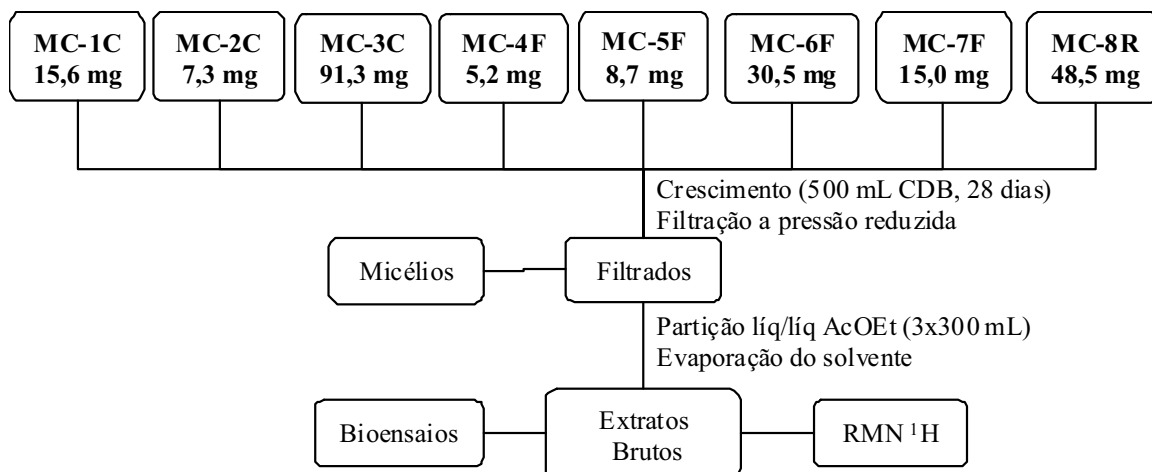
O cultivo das cepas foi realizado em meio sólido BDA conforme procedimento citado no item 3.1.10; p. 38 e incubadas a 25 °C até que suas hifas atingissem 2 a 3 cm de crescimento. Estas foram inoculadas em dois frascos de 500 mL contendo 250 mL cada do meio líquido CDB, e incubadas em mesa agitadora orbital (shaker) sob temperatura de 25°C por 28 dias.

Ao término do processo de fermentação, a fase aquosa foi separada dos micélios por filtração sob pressão reduzida e particionados com AcOEt, (3X 300 ml) fornecendo os extratos, após evaporação do solvente (**Esquema 2**, p. 46). Este mesmo procedimento foi aplicado para crescimento nos meios de cultura: Czapek, Nutriente, YM, Extrato de Malte.

3.4.1 - Triagem Química e Biológica dos Extratos dos Fungos Associados à *Michelia champaca*.

Os extratos obtidos dos fungos isolados foram enviados para avaliação da atividade antifúngica frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, ensaios antitumoral e de citotoxicidade frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e inibição da enzima acetilcolinesterase.

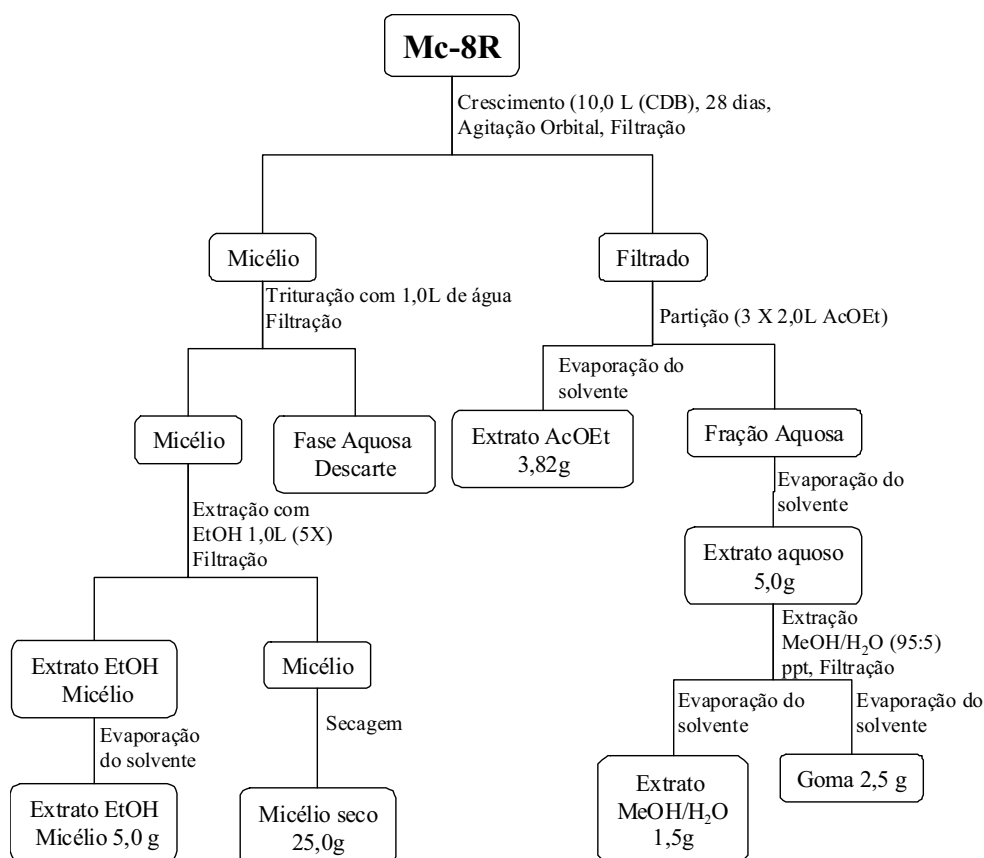
Todos os extratos obtidos foram submetidos à análise espectrométrica de RMN ¹H (**Figura 43-Figura 50**; pgs. 121-124) (**Esquema 2**, p. 46).



Esquema 2: Cultivo dos fungos, obtenção dos extratos e triagem químico/biológica

3.5 – Cultivo com CDB em Larga Escala do Fungo Endofítico Mc-8R com CDB.

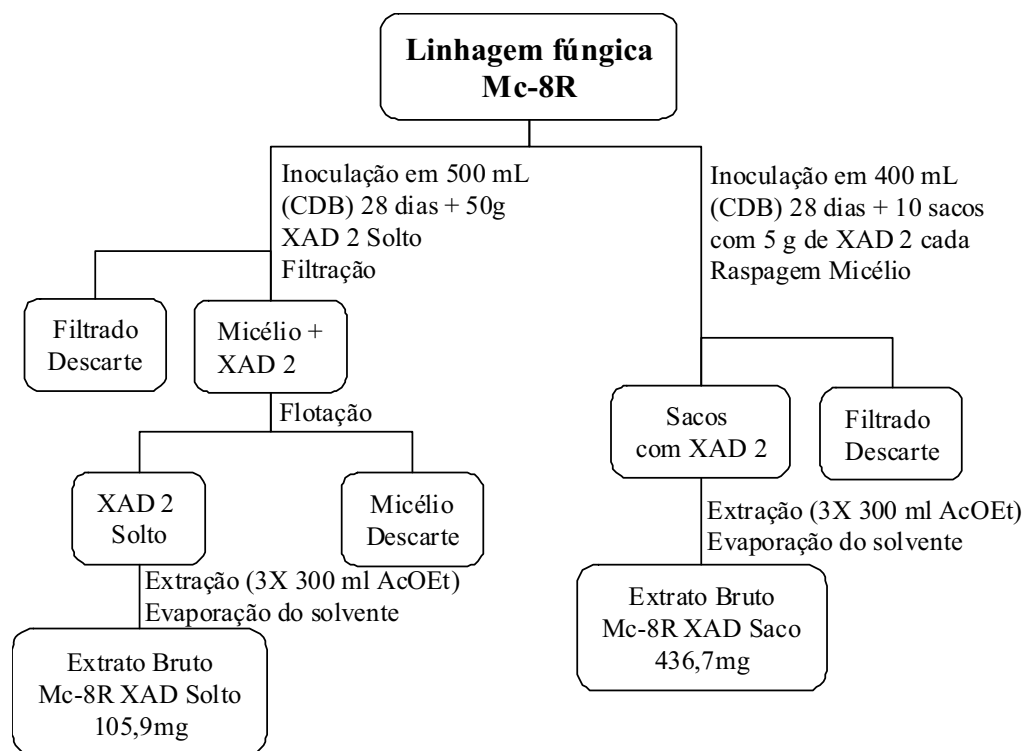
O fungo Mc-8R foi cultivado em 10 L CDB divididos em 40 frascos de 500 mL contendo 250 mL em cada frasco, de acordo com os procedimentos citados no item 3.4; p. 45, obtendo-se 3,82 g de extrato, (**Esquema 3**, p. 46).



Esquema 3: Extrato Produzido por Mc-8R em CDB

3.5.1 – Variação Metabólica de Mc-8R em CDB na Presença de XAD 2

Utilizando o procedimento citado no item 3.4; p. 45 o isolado Mc-8R foi cultivado na presença de XAD 2 em 500 mL de CDB contendo 50 g de XAD 2 solto e em 500 mL de CDB contendo 10 cartuchos de tecido sintético preenchidos com 5,0 g de XAD 2. No termino do período da fermentação, o frasco contendo XAD 2 solto foi submetido à filtração. A fração aquosa foi descartada ao XAD 2 impregnado com o micélio foi adicionado 500 mL água, ocorrendo a decantação parcial do XAD 2 e flotação do micélio. Este foi retirado cuidadosamente com uma espátula côncava. O frasco com XAD 2 Saco foi submetido à raspagem do micélio aderido. Ambos, separadamente foram extraídos com AcOEt (3 x 300 mL). Após a evaporação do solvente obteve-se os extratos Mc-8R XAD Saco (436,7 mg) e Mc-8R XAD Solto (105,9 mg). Estes extratos foram analisados por CLAE, de acordo com o procedimento citado no item 3.2.2. p. 39 utilizando como fase estacionária C-18, adicionando 0,5% HOAc a água (**Esquema 4**, p. 47, **Figura 4:**, p. 48).



Esquema 4: Extrato Produzido por Mc-8R em CDB na Presença de XAD 2

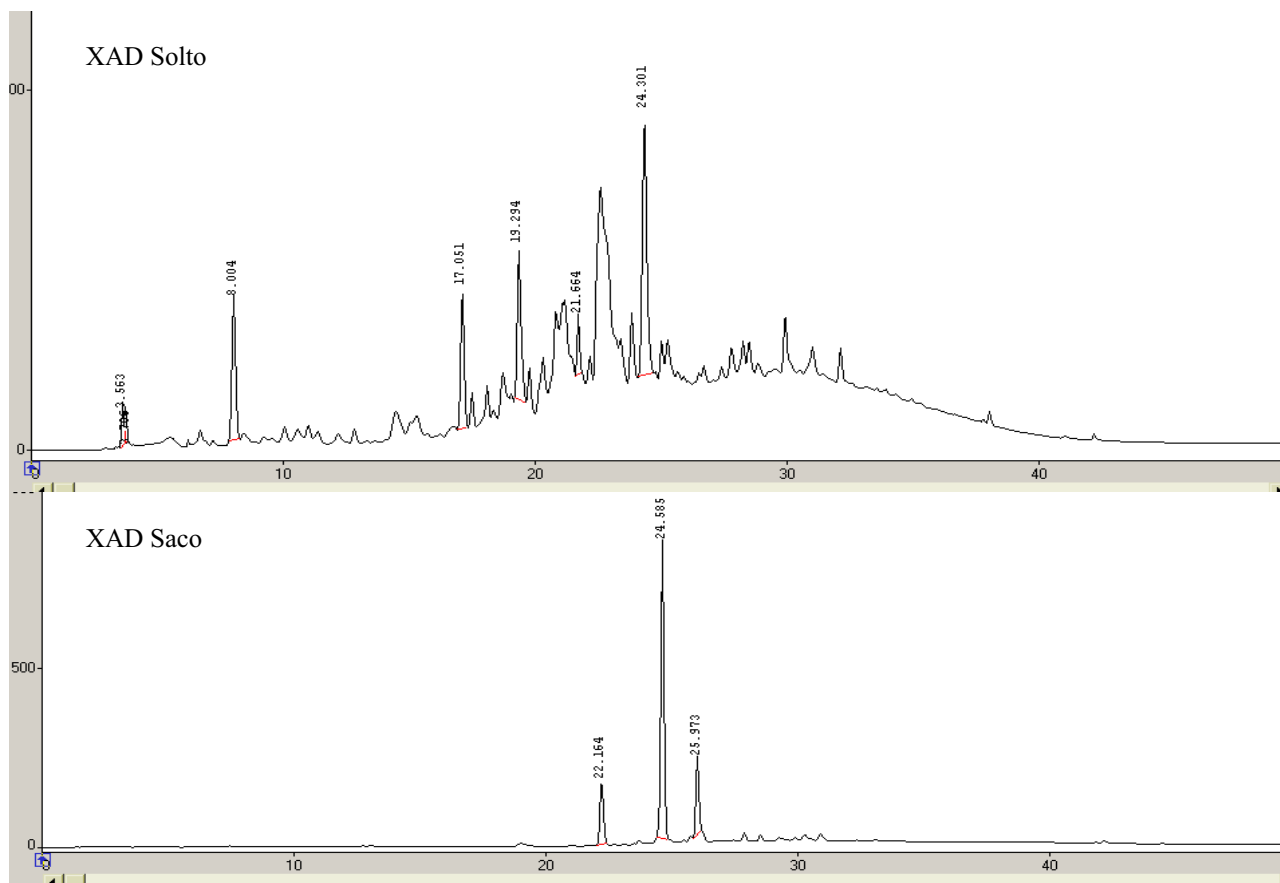
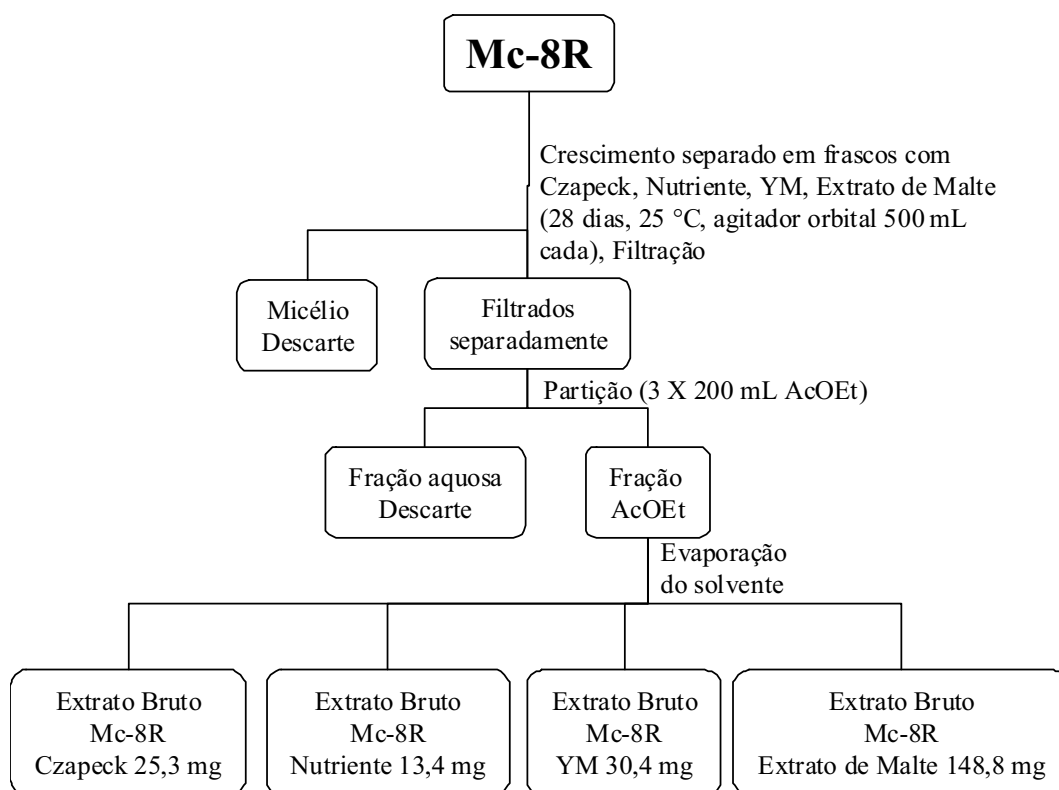


Figura 4: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R XAD Solto e XAD Saco ($\text{H}_2\text{O}_{0,5\%}\text{HOAc}/\text{MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm) em C-18.

3.5.2 Variação Metabólica de Mc-8R em Diferentes Meios de Cultura.

Os extratos produzidos por Mc-8R quando cultivado em Czapek, Nutriente, YM e Extrato de Malte foram obtidos de acordo com o procedimento citado no item 3.4; p. 45 (**Esquema 5**, p. 49).

Estes extratos foram analisados por CLAE, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa C-18, de acordo com o procedimento citado no item 3.2.2, p. 39 adicionando 0,5% HOAc a água (**Figura 51-Figura 57**, pgs. 125-128) e experimentos de RMN ^1H (**Figura 52-Figura 58**, pgs. 125-128).



Esquema 5: Extratos obtidos em Mc-8R em Czapek, Nutriente, YM e Extrato de Malte

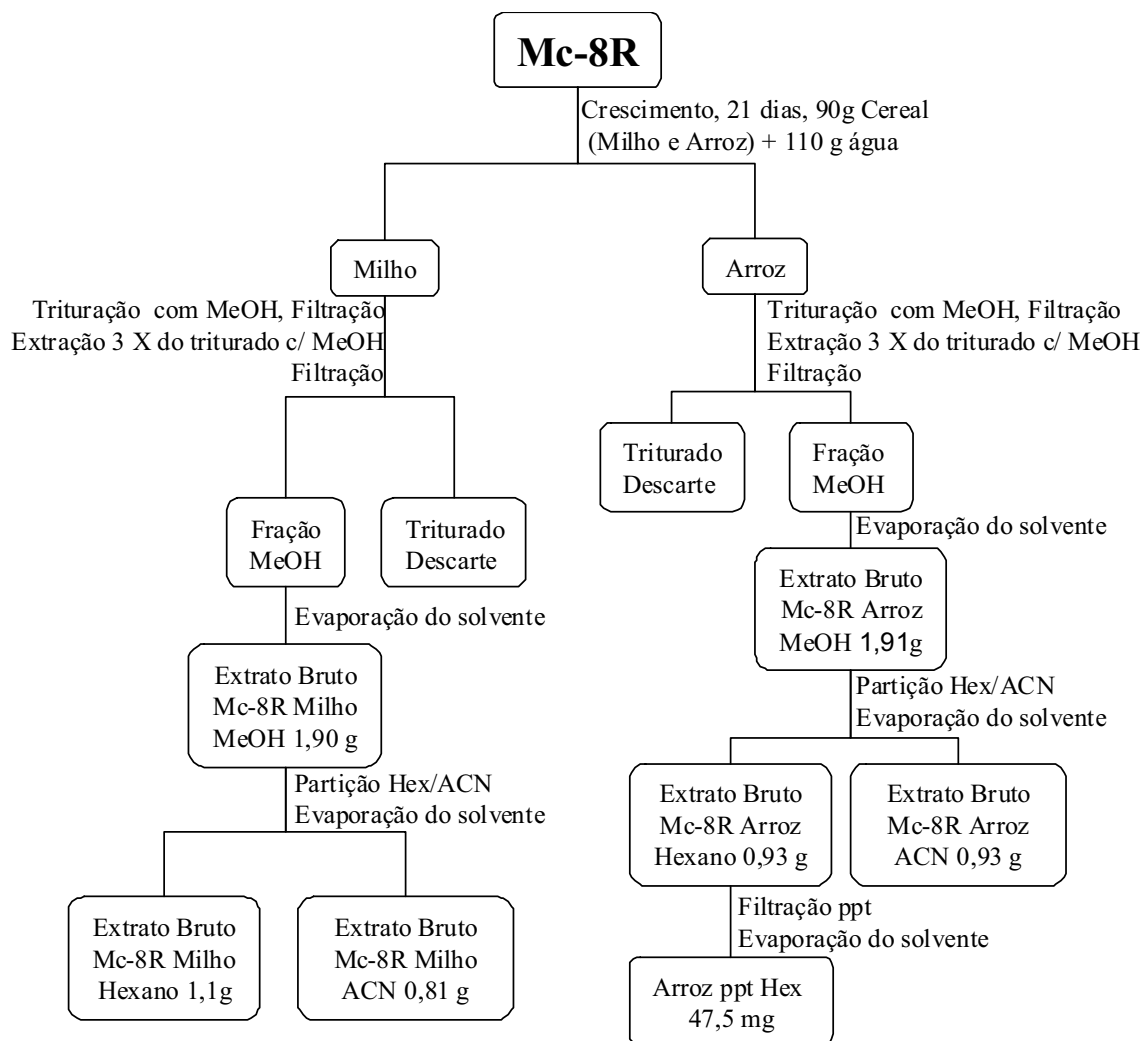
3.5.3 – Variação Metabólica Triagem dos Extratos para Estudo de Mc-8R em Arroz e Milho

Para o cultivo do endofítico em cereais, foram utilizados 90 g de arroz parboilizado (Tio João) e 90 de milho de canjica descascado (Yoki) colocados em quatro frascos de 500 mL contendo 90 mL de água destilada cada.

Estes meios foram autoclavados quatro vezes de 12 em 12 horas por 40 minutos à temperatura de 121 °C. Após as primeiras 24 horas foram adicionados mais 20 mL de água deionizada em cada frasco, dando seqüência a autoclavagem. Após o termino do processo de altoclavagem o fungo foi inoculado nos meios de cultura e foram incubados por 21 dias à temperatura ambiente (cultura estática). Após este período procedeu-se a extração dos cereais com metanol por trituração em liquidificador, seguida de filtração a pressão reduzida.

A massa triturada foi novamente extraída com MeOH (3x500 mL). Após a evaporação do solvente forneceram 1,86 g e 1,90 g de extrato de Arroz e Milho, respectivamente (**Esquema 6**, p. 51).

Ambos os extratos foram solubilizados em ACN (1L) e particionados com Hexano (3x300 mL) separadamente. Após a evaporação dos solventes, obteve-se 1,10 g e 0,93 g de extrato Hexânico Milho e Arroz, respectivamente e 0,81 g e 0,93 g de extrato ACN Milho e Arroz, respectivamente (**Esquema 6**, p. 51). Na manipulação do extrato Mc-8R Arroz Hex., observou-se a formação de um precipitado que foi separado e seco fornecendo 47,5 mg, foram realizados experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C onde pode-se identificar o Ergosterol (**Esquema 6**, p. 51, **Figura 136** e **Figura 137**, p. 191 e 192). Os extratos Mc-8R-ACN-Arroz e Mc-8R-ACN-Milho foram analisados por CLAE, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa C-18, seguindo o mesmo procedimento citado no item 3.2.2, p. 39. Adicionando-se 0,5% de HOAc a água, (**Figura 59** e **Figura 61**, pgs. 129 e 130) os extratos Mc-8R-Hex-Arroz, Mc-8R-Hex-Milho e Mc-8R-Hex-Arroz-ppt (Ergosterol) foram analisados em CCDC (**Figura 65**, p. 131). Os extratos Mc-8R-ACN-Arroz, Mc-8R-ACN-Milho, Mc-8R-Hex-Arroz e Mc-8R-Hex-Milho foram submetidos a experimentos de RMN de ^1H (**Figura 60** - **Figura 64**, pgs. 129-131).



Esquema 6: Extratos Obtidos da Variação Metabólica de Mc-8R em Arroz e Milho

3.6 - Fracionamento do Extrato Mc-8R

3.6.1 - Fracionamento via CLAE do Extrato Mc-8R Obtido em CDB

Nesta etapa do trabalho foram testadas em CLAE, duas condições de eluição: $H_2O/MeOH$, com e sem a dopagem de 0,5% de HAc na água em Fenil-hexil utilizando gradiente exploratório seguindo o mesmo procedimento citado no item 3.2.2, p. 39 e de detecção em 254 e 319 nm (**Figura 5**, p. 52). Posteriormente parte do extrato de Mc-8R (0,32 g) foi submetida a “clean up” e analisado em CLAE. Em que otimizou-se a separação cromatográfica do extrato foi em sistema de eluição isocrático $H_2O_{0,5\%HOAc}/MeOH$ (65:35) a 319 nm com fluxo de 1 ml/min.

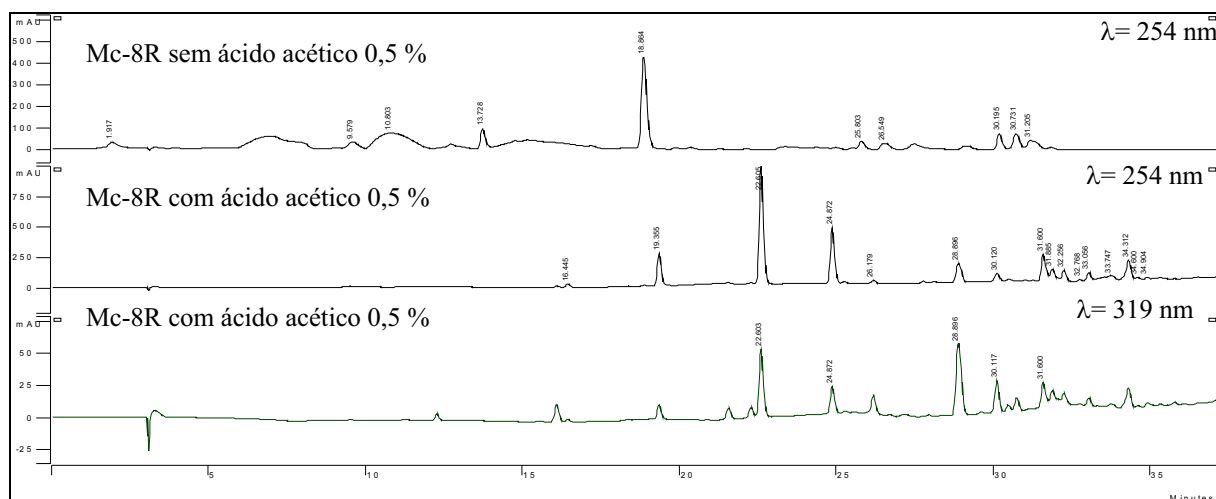
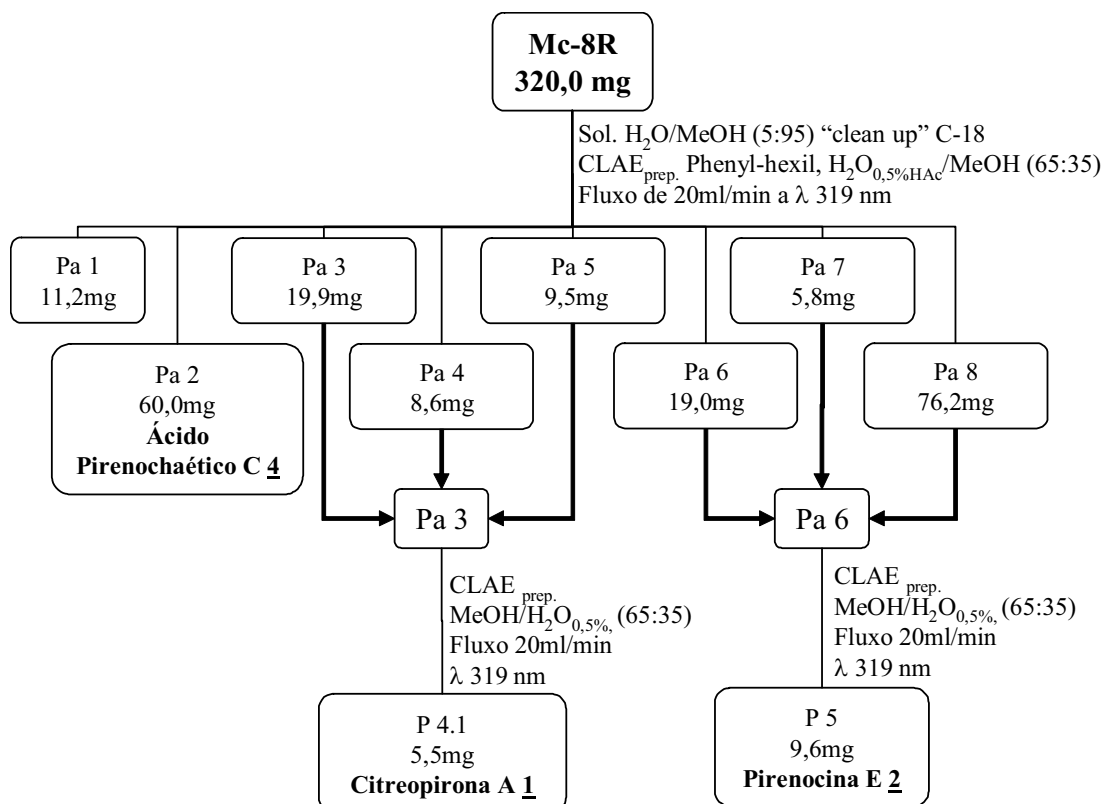


Figura 5: Cromatogramas em grad. explorat. do extrato Mc-8R (H₂O/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40' em C-18

O extrato AcOEt Mc-8R foi submetido à análise em CLAE analítico acertando a sua melhor condição utilizando sistema de eluição isocrático H₂O_{0,5%HOAc}/MeOH (65:35) a 320 nm, em coluna Fenil-hexil (**Esquema 7**, p. 53).

Esta condição foi transportada para CLAE preparativo em Fenil-Hexil com fluxo de 20 mL/min., resultando em oito frações codificadas Pa1-Pa8. A fração Pa2 apresentou pureza analítica suficiente para realização de experimentos de RMN possibilitando a identificação do ácido Pirenochaético C (**4**) (**Esquema 7**, p. 53). As frações Pa.3, 4 e 5 por apresentarem perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e submetidas a fracionamento via CLAE preparativa nas mesmas condições utilizadas para purificação do extrato citado no parágrafo anterior, resultando no isolamento da citreopirona (**1**). As frações Pa.6, 7 e 8 também foram reunidas e submetidas à CLAE preparativo nas mesmas condições citadas anteriormente, resultando no isolamento da Pirenocina E (**2**) (**Esquema 7**, p. 53).

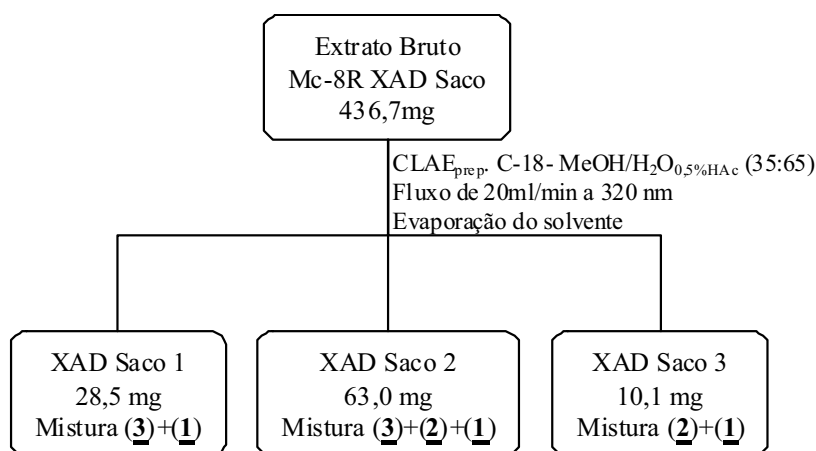
As substâncias isoladas tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas espectrométricas RMN de ¹H, ¹³C, gHMQC, gHMBC, gCOSY, NOESY 1D e EM.



Esquema 7: Separação Cromatográfica do Extrato de Mc-8R obtido no crescimento em CDB via CLAE.

3.6.2 – Fracionamento do Extrato Mc-8R XAD Saco via CLAE.

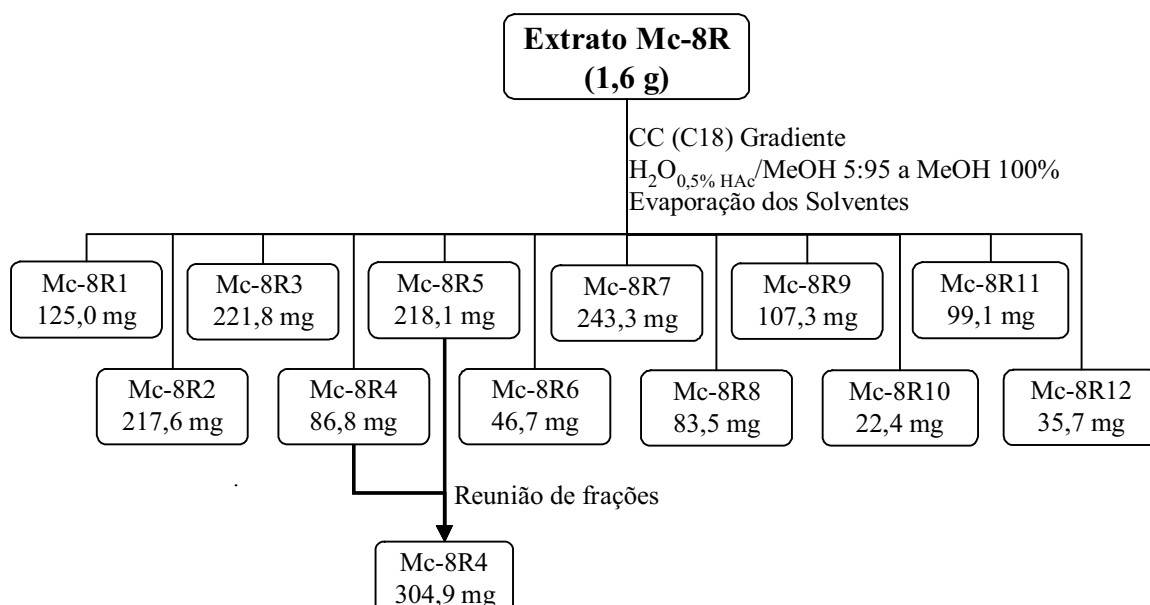
O extrato Mc-8R XAD Saco foi submetido a fracionamento via CLAE preparativo utilizando sistema de eluição isocrático H₂O_{0,5%HOAc}/MeOH (65:35) a 320 nm, em coluna C-18 (**Esquema 8**, p. 53). As frações isoladas foram analisadas por experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, possibilitando a identificação das Pirenocinas A (**1**), B (**3**) e E (**2**).



Esquema 8: Separação Cromatográfica do Extrato Mc-8R XAD Saco via CLAE

3.6.3 - Fracionamento via CC do Extrato Mc-8R Obtido em CDB

Uma parte do extrato de Mc-8R (1,6 g) foi submetida à CC em fase reversa C-18 sob pressão reduzida, utilizando como eluente ($\text{H}_2\text{O}_{0,5\% \text{HOAc}}/\text{MeOH}$ 95:5 a 0:100), fornecendo 12 frações de aproximadamente 100 mL cada, codificadas Mc-8R.1-10 e submetidas a CLAE em gradiente exploratório, utilizando como fase estacionária C-18, seguindo o procedimento citado no item 3.2.2, p. 39 adicionando-se 0,5% de HOAc a H_2O . (**Esquema 9**, p. 54).



Esquema 9: Fracionamento em coluna comatográfica do Extrato Mc-8R obtido no crescimento em CDB

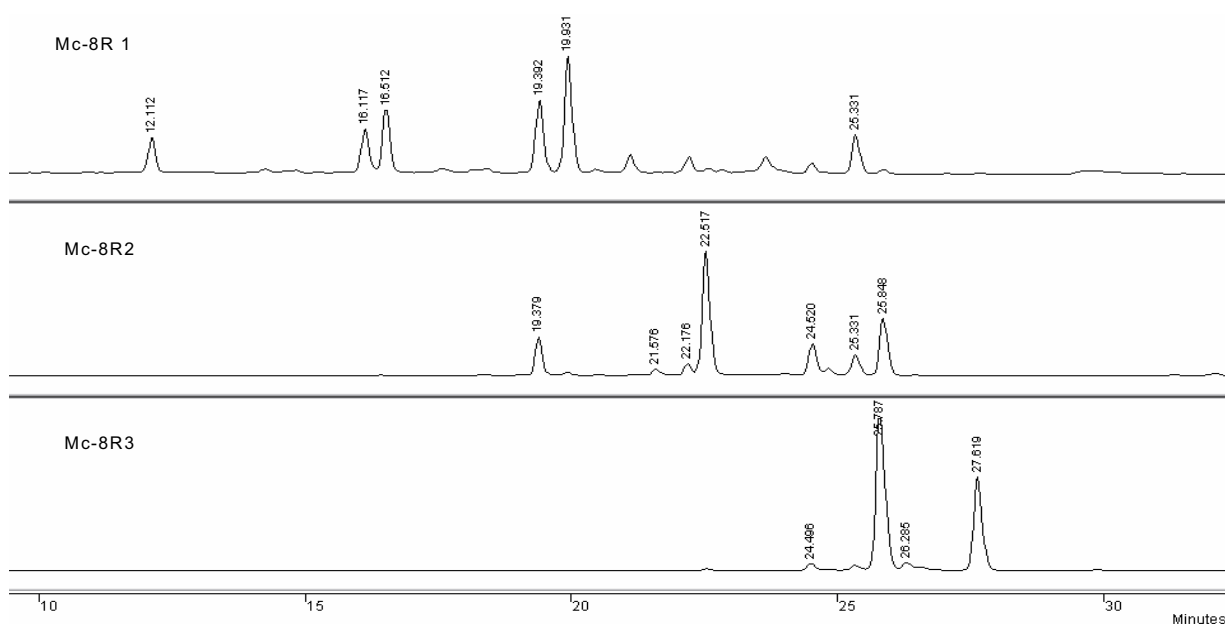


Figura 6: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R1, Mc-8R2, e Mc-8R3 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R ($\text{H}_2\text{O}_{0,5\% \text{HOAc}}/\text{MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).

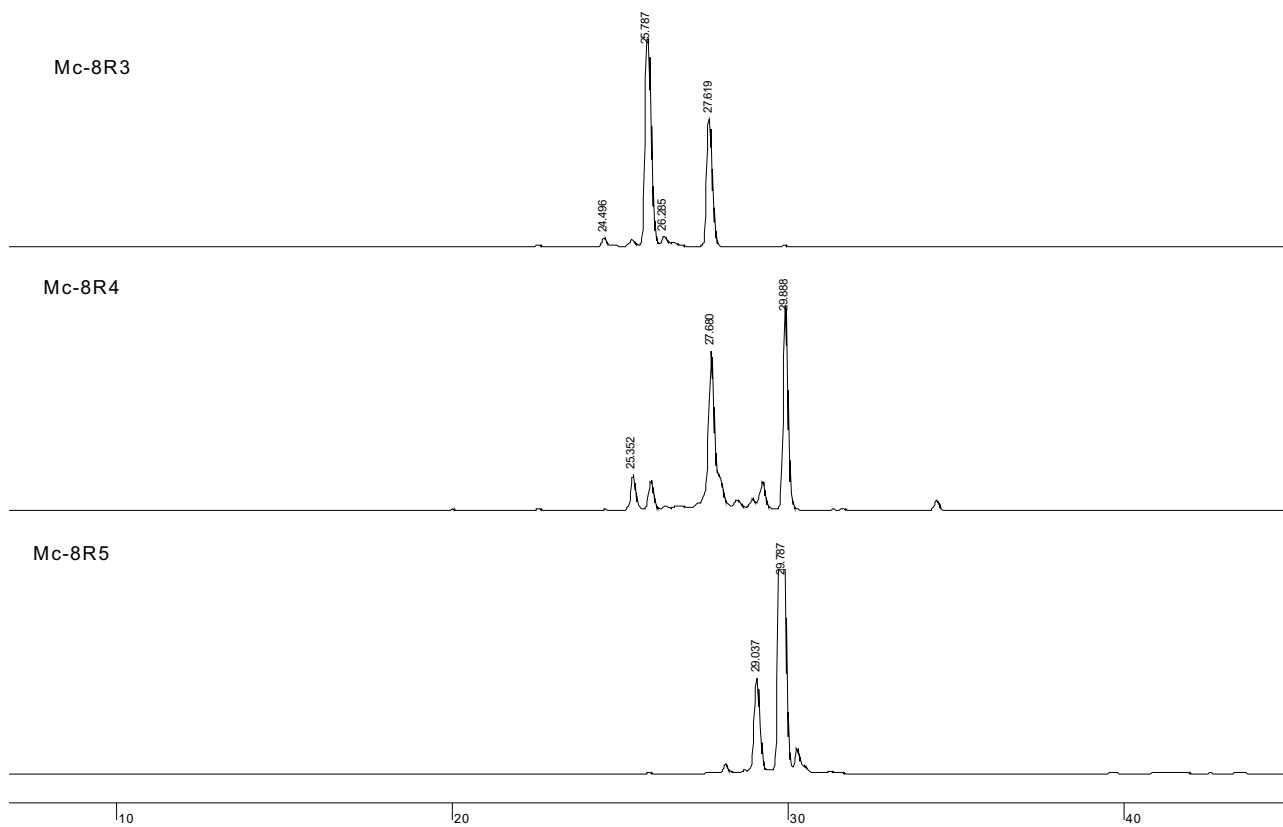


Figura 7: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R3, Mc-8R4, e Mc-8R5 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R ($H_2O_{0,5\%} HOAc/MeOH$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).

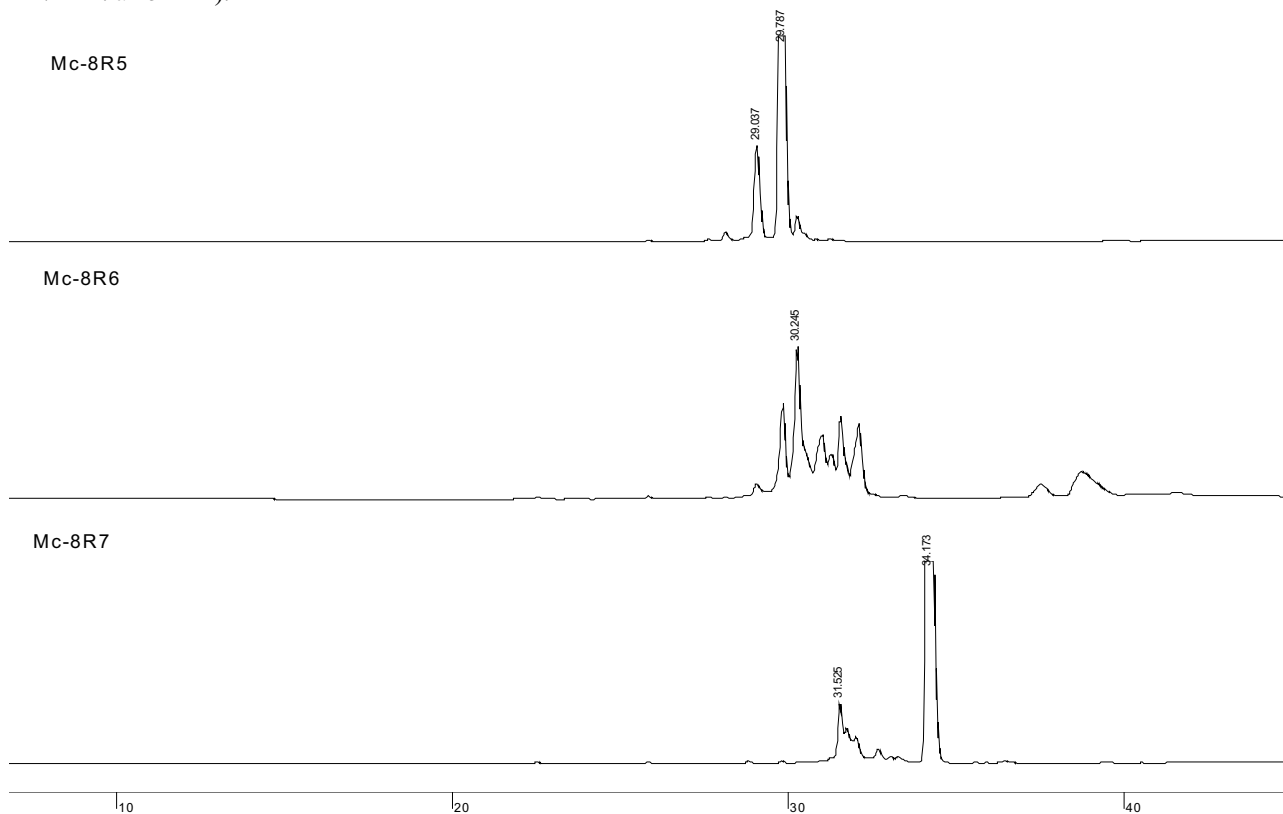


Figura 8: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R5, Mc-8R6, e Mc-8R7 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R ($H_2O_{0,5\%} HOAc/MeOH$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm).

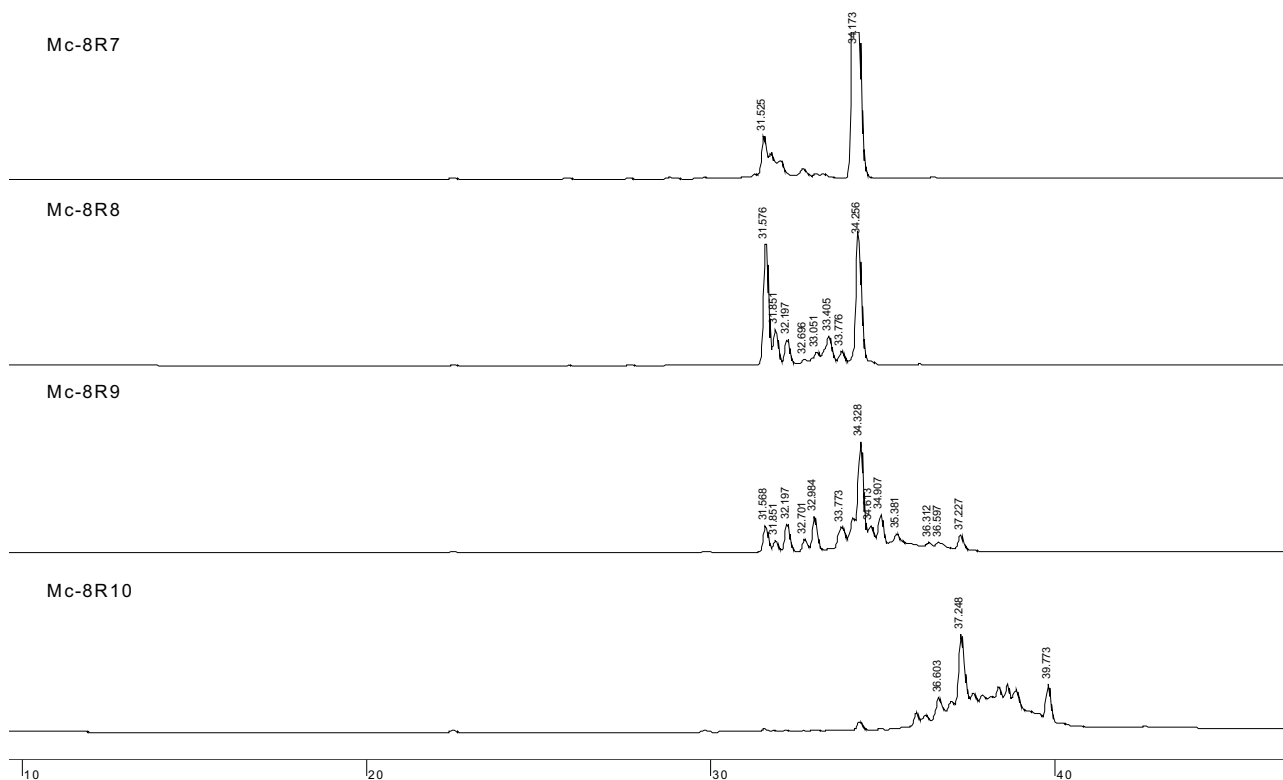
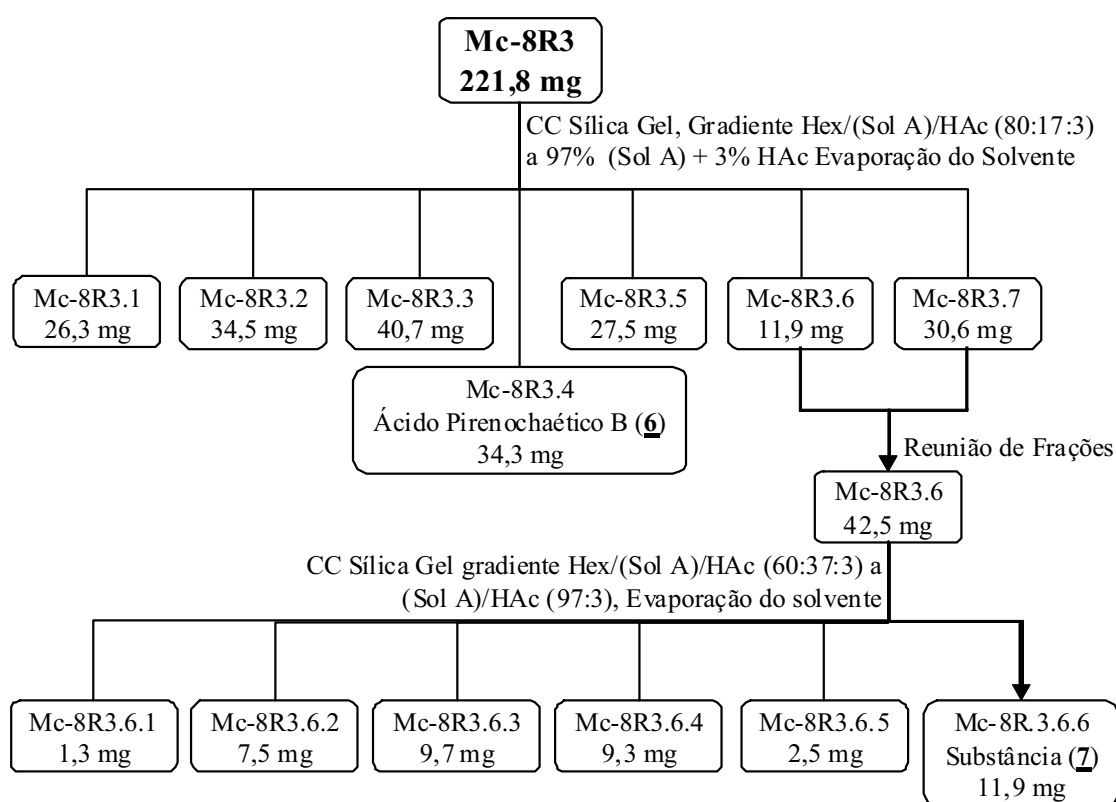


Figura 9: Cromatogramas em grad. explorat. das frações Mc-8R7, Mc-8R8, Mc-8R9 e Mc-8R10 obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de Mc-8R ($\text{H}_2\text{O}_{0,5\%}\text{HOAc}/\text{MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm).

Após a análise em CLAE as frações Mc-8R 3, 4 e 5 foram escolhidas por apresentarem um bom perfil cromatográfico e foram submetidas a CCDC utilizando a metodologia citada no item 3.2.3; p. 39. A melhor condição acertada foi: [75% Hexano + 3% HOAc + 22% da (Sol A) = (CHCl_3/ISP 90:10)] em tripla eluição.

A fração Mc-8R.3 foi fracionada em CC utilizando com fase estacionária Sílica Gel Acros, e sistema de eluente em gradiente iniciando a Hex/(Sol A)/HAc (80:17:3) a (Sol A)/HOAc (97:3) com posterior limpeza em MeOH 100% (**Esquema 10**, p. 57), resultando em 20 frações que foram analisadas em CCDC com a fase móvel, Hex/(Sol A)/HOAc (75:22:3) sendo reunidas em 7 frações (Mc-8R.3.1-3.7) (**Esquema 10**, p. 57). Destas, a fração Mc-8R.3.4 (34,3 mg) foi enviada para fazer espectros de RMN, possibilitando a identificação do Ácido Pirenochaético B (**6**).

As frações Mc-8R.3.6 e 3.7 foram reunidas (42,5 mg) e fracionadas por CC, utilizando com fase estacionária Sílica Gel Acros e sistema de eluição Hex/(Sol A)/HOAc (60:37:3) em gradiente até (Sol A)/HOAc (97:3) com posterior limpeza em MeOH 100% (**Esquema 10**, p. 57). O fracionamento resultou em 10 frações, que foram reunidas em 6. (**Esquema 10**, p. 57). Destas, a fração Mc-8R.3.6.6 apresentou alto grau de pureza em CCDC, sendo então submetida a experimentos de RMN uni e bidimensionais sendo identificada como a Ácido Pirenochaético Inédito (**7**).

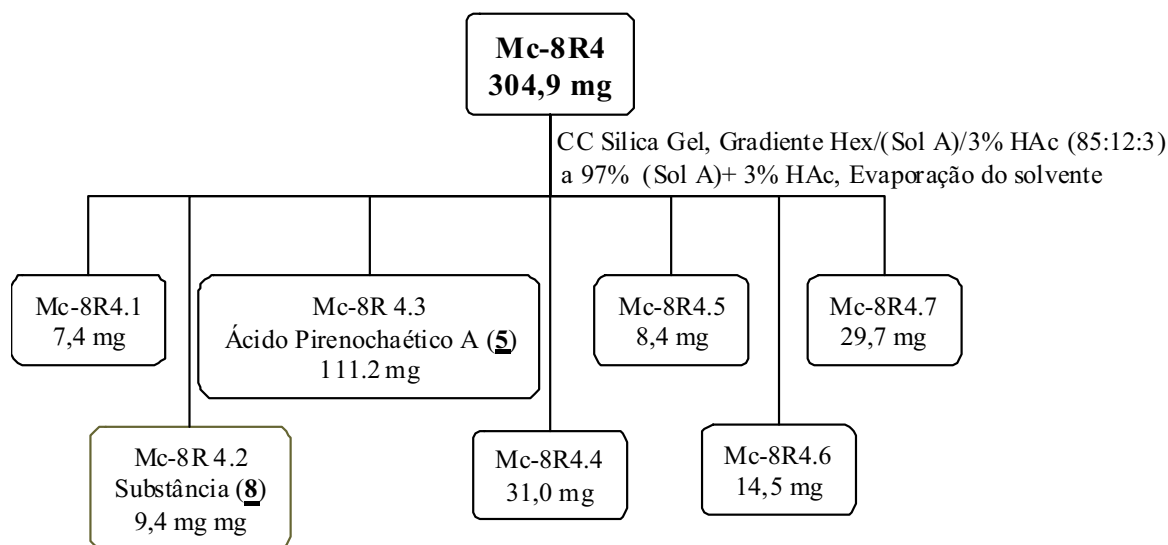


Esquema 10: Fracionamento Cromatográfico Fração Mc-8R.3

As frações Mc-8R4 e Mc-8R5 (**Esquema 9**, p. 54) foram reunidas por apresentarem mesmo perfil cromatográfico e renomeadas como Mc-8R.4. Foi realizado o fracionamento por CC, utilizando com fase estacionária Sílica gel Acros e sistema de eluição em Hex/(Sol A)/HAc (85:12:3) em gradiente até (Sol A)/HOAc (97:3) com posterior limpeza em MeOH 100% (**Esquema 11**, p. 58). O fracionamento resultou em 35 frações, que após análise por CCDC foram reunidas em 7 e codificadas Mc-8R.4.1 a 4.7 (**Esquema 11**, p. 58).

Destas, a fração Mc-8R.4.3 apresentou alto grau de pureza e foi submetida a experimentos de RMN uni e bidimensionais permitindo a identificação do Ácido Pirenochaético A (**5**).

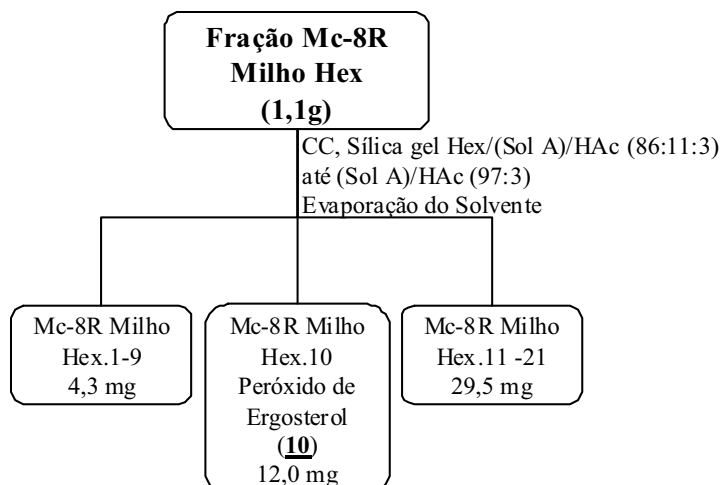
A fração Mc-8R4.2 foi avaliada por RMN de ^1H e ^{13}C e após análise dos espectros obtidos identificou-se a Ácido Pirenochaético inédito (**8**).



Esquema 11: Fracionamento Cromatográfico de Mc-8R4

3.6.4 – Purificação da Fração Mc-8R Milho Hex.

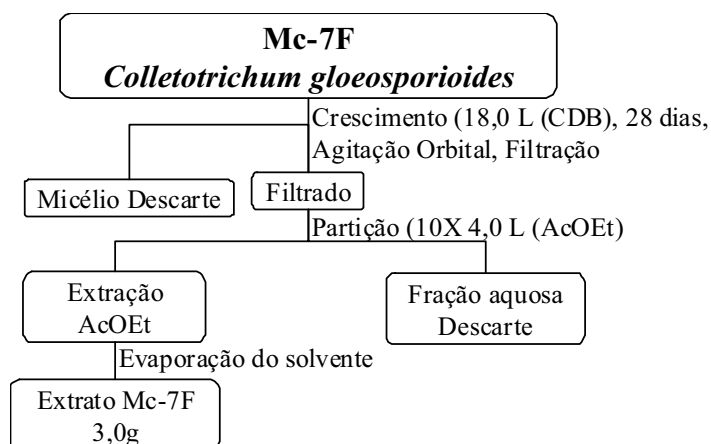
A fração Mc-8R Milho Hex (1,10 g) foi submetida a CC, utilizando com fase estacionária Sílica gel Acros e sistema de eluição em Hex/(Sol A)/HOAc (86:11:3) em gradiente até (Sol A)/HOAc (97:3), resultando em 44 frações, sendo reunidas por CCDC em 21 frações e codificadas Mc-8R Milho hex.1 a 21 (**Esquema 12**, p. 59). Destas a fração Mc-8R Milho Hex.10 (12,0 mg) apresentou alto grau de pureza e foi submetida a experimentos de RMN uni e bidimensionais identificando do Peróxido de Ergosterol (**10**).



Esquema 12: Fracionamento Cromatográfico Fração Mc-8R Milho Hex

3.7 – Cultivo do Fungo Mc-7F com CDB em Larga Escala.

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Mc-7F) foi cultivado em 18 L de CDB divididos em 6 frascos de 4 litros com 3 litros cada de acordo com os procedimentos citados no item 3.4; p. 45, obteve-se 3,0 g de extrato (**Esquema 13**, p. 59).

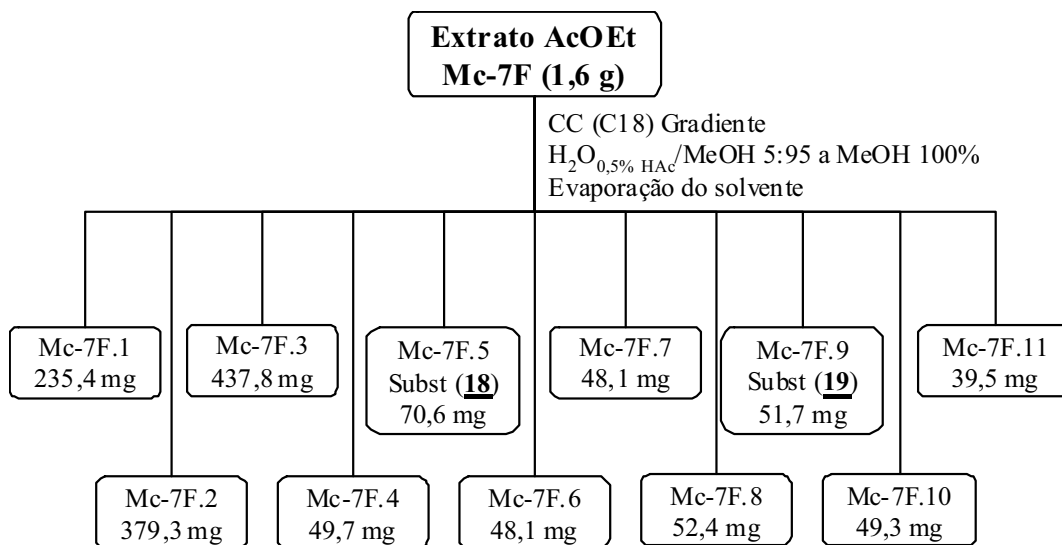


Esquema 13: Extrato obtido do crescimento de *Colletotrichum Gloeosporioides* (Mc-7F) em CDB

3.8 - Fracionamento do Extrato Mc-7F Obtido em CDB

Parte do extrato produzido pelo fungo Mc-7F, obtido em larga escala (1,60 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em CC, utilizando sílica de fase reversa (C-18) e sistema de eluentes em forma de gradiente iniciando em $\text{H}_2\text{O}_{0,5\%}\text{HOAc}/\text{MeOH}$ (95:05) até 100% MeOH sob pressão reduzida obtendo-se 11 frações que foram codificadas Mc-7F.1 a 11 (**Esquema 14**, p. 60). Estas foram submetidas à análise por RMN de ^1H (**Figura 67-Figura**

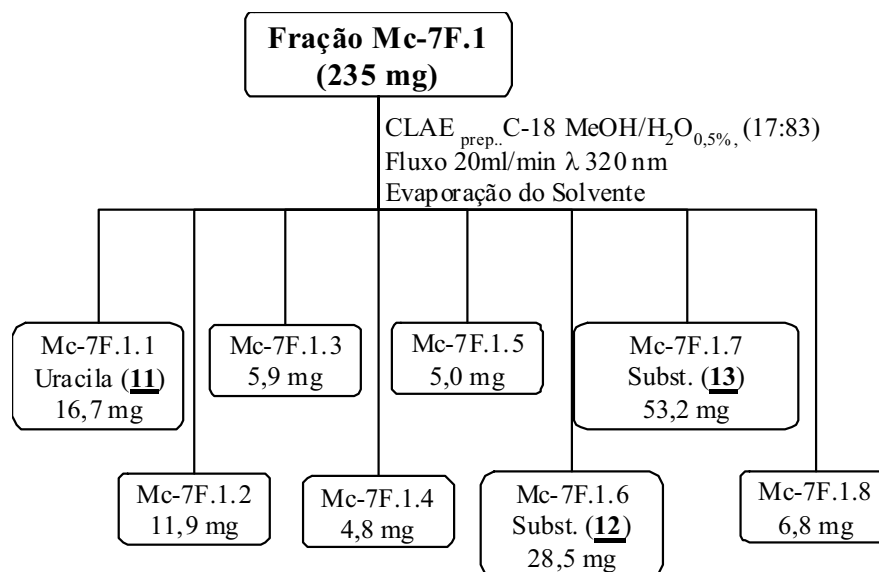
87, pgs. 132-142) e CLAE, utilizando-se como fase estacionária sílica de fase reversa C-18, conforme o procedimento citado no item 3.2.2, p. 39 adicionou-se 0,5% de HOAc a água (**Figura 66-Figura 86**, pgs. 132-142). Destas as frações Mc-7F.5 e Mc-7F.9 apresentaram espectros de RMN de ^1H de substâncias puras, sendo submetidos a experimentos de RMN uni e bidimensionais possibilitando a identificação dos derivados indólicos (**18**) e (**19**).



Esquema 14: Fracionamento Cromatográfico do Extrato Mc-7F em C-18

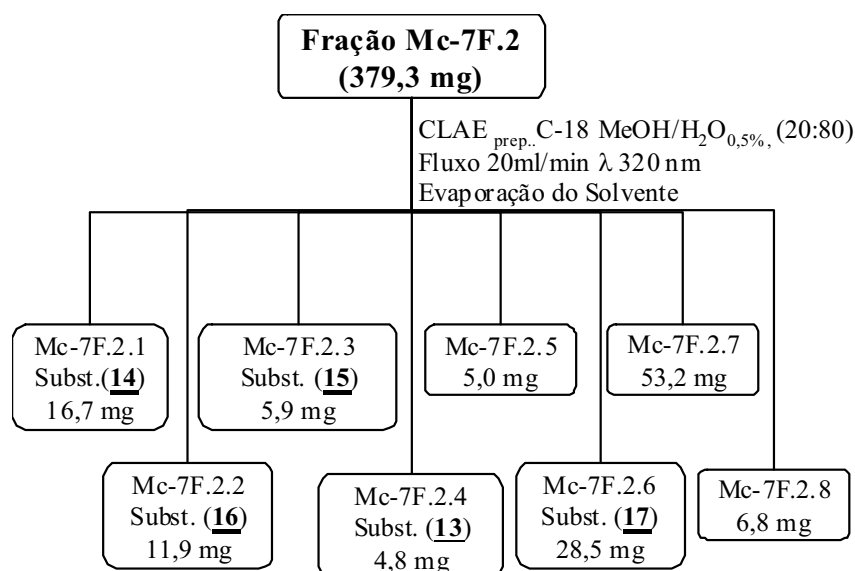
3.8.1 - Fracionamento em CLAE das Frações Mc-7F.1 e Mc-7F.2

Nesta etapa do trabalho foram testadas em CLAE, quatro condições de eluição: H₂O/MeOH, H₂O/ACN, com e sem 0,5%HOAc em duas fases estacionárias C-18 e Fenil-Hexil. Destas a fração Mc-7F.1 demonstrou melhor resolução em C-18 e a fração Mc-7F.2 demonstrou melhor resolução em Fenil-Hexil ambas com 0,5% de HOAc misturado a água. As Frações Mc-7F.1 e Mc-7F.2 tiveram otimizadas suas separações em CLAE isocrático, nas condições H₂O_{0,5%HOAc}/MeOH (83:17) a 320 nm para Mc-7F.1 e (80:20) a 320 nm para Mc-7F.2 ambas com fluxo de 1 ml/min. Estas condições foram transportada para CLAE preparativo com fluxo de 20 mL/min. (**Esquema 15 e Esquema 16**, pgs. 61 e 61). Este fracionamento resultou em oito frações para Mc-7F.1 e Mc-7F.2, posteriormente analisadas por espectros de RMN de ^1H .



Esquema 15: Fracionamento Cromatográfico em C-18 do Extrato Mc-7F.1

Após análises de RMN de ¹H, as frações (Mc-7F.1.1, 1.4, 1.6, 1.7 e Mc7F.2.1, 2.2, 2.4, 2.6) foram submetidas a técnicas espectrométricas RMN ¹³C, gHMQC, gHMBC, gCOSY, NOESY 1D e EM, sendo possível identificar as substâncias Uracila (**11**), *ciclo*-(S*-Pro-S*-Tyr) (**12**), *ciclo*-(S*-Pro-S*-Val) (**13**), Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (**14**), Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (**15**), 4-Hidroxi-benzamida (**16**) e Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (**17**).



Esquema 16: Fracionamento Cromatográfico Extrato Mc-7F.1

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.

4.1 – Triagem Química e Biológica dos Extratos dos Fungos Endofíticos Isolados de *Michelia champaca*.

Os extratos produzidos pelos oito fungos endofíticos em CDB (Tabela 3: p. 62) foram analisados por RMN de ^1H (Figura 43-Figura 51, pgs. 121-124) (Tabela 6: p. 63) para avaliação do perfil químico. Foram submetidos aos ensaios de bioautografia contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* para detecção do potencial antifúngico (Tabela 4: p. 62), com *Saccharomyces cerevisiae* para detecção da atividade antitumoral (Tabela 5: p. 63), e com a enzima acetilcolinesterase para a avaliação da atividade anticolinesterásica.

Tabela 3: Rendimento dos extratos dos fungos endofíticos fermentados em 500 ml de CDB

Código do Fungo	Fungos Identificados	Massa (mg)
Mc-1C	<i>Xylaria</i> sp.	15,6
Mc-2C		7,2
Mc-3C		91,3
Mc-4F		5,2
Mc-5F		8,7
Mc-6F	<i>Phomopsis stipata</i>	30,5
Mc-7F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	15,0
Mc-8R		48,5

Tabela 4: Resultados das atividades antifúngicas dos extratos produzidos pelos endofíticos isolados de *M. champaca*.

Código Fungo	Concentração μg	Bioautografia em camada delgada			
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	
		rf	Potencial	rf	Potencial
Mc-1C	200	0,26/ rastro	**/ *	0,28/ 0,51/ 0,6	**/ */ *
Mc-2C	200	Origem/ rastro	*/ *	Origem/rastro	*/ *
Mc-3C	200	0,38/ rastro	***/ *	0,38	***
Mc-4F	200	0,42/ 0,61	*/ *	0,46/ 0,59	**/ *
Mc-5F	200	0,51/ 0,59	*/ *	0,24/ 0,51/ 0,6	*/ **/ **
Mc-6F	200	Origem/0,07 /rastro/0,61	**/ **/ */ ***	Origem/08/0,31/0,37/0,51	**/**/ **/ **/ **/ **
Mc-7F	200	0,66	*	Origem/ 0,62	**/ **
Mc-8R	200	Origem/ 0,2/ 0,48	**/ ***/ ***	Origem/0,17/0,49/0,59	***/**/ **/ **/ **/ **
Nistatina	100	-	***	-	***

*= atividade fraca **= atividade média ***= atividade forte

Tabela 5: Resultados obtidos no ensaio com *S. cerevisiae* dos extratos produzidos pelos endofíticos isolados de *M. champaca*.

Extrato do fungo	Concentração da Amostra (µg/mL)	Halo de Inibição (mm)		
		Rad+	Rad 52Y	Rad 321
Mc-1C	2000,0	-	-	-
Mc-2C	2000,0	-	-	-
Mc-3C	2000,0	-	-	-
Mc-4F	2000,0	-	-	-
Mc-5F	2000,0	-	-	-
Mc-6F	2000,0	-	15	13
Mc-7F	2000,0	-	-	13
Mc-8R	2000,0	-	-	14
Padrão 1 estreptonigrina	4,0	-	-	20
Padrão 2 camptotecina	200,0	19	-	-
Padrão 3 camptotecina	5,0	-	17	-

Tabela 6: Resultados obtidos no ensaio ensaios de inibição da acetilcolinesterase para os extratos dos endofíticos isolados de *M. champaca*.

Extrato do fungo	Concentração (µg/mL)	rf
Mc-1C	200	-
Mc-2C	200	0,49/ 0,02
Mc-3C	200	0,51/ 0,39
Mc-4F	200	0,03
Mc-5F	200	0,52/ 0,02
Mc-6F	200	0,54
Mc-7F	200	0,7/ 0,47/ 0,3
Mc-8R	200	0,7/ 0,53/ 0,44

Os fungos Mc-8R e Mc-6F apresentaram forte atividade no ensaio de bioautografia e foram submetidos novamente ao mesmo ensaio para verificação do limite de detecção (Tabela 7: p. 64).

Os resultados observados nas Tabela 4:, Tabela 5: e Tabela 6: evidenciam a potencialidade dos endofíticos na produção de metabólitos secundários bioativos, que aliados aos dados observados nos espectros de RMN de ^1H , nos conduziram à seleção dos fungos codificados como Mc-7F e Mc-8R para crescimento em larga escala e estudo químico/biológico.

Tabela 7: Resultados do limite de detecção em bioautografia dos extratos Mc-6F e Mc-8R.

Concentração	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	
	Fator de retenção	Potencial	Fator de retenção	Potencial
Mc-6F				
400 ug	0,14/ 0,40/ 0,65	**/ */ **/ *	0,04/ 0,14/ 0,37	***/ ***/ **/ **
200 ug	0,14/ 0,40/ 0,65	**/ */ */ *	0,14/ 0,37	***/ */ *
100 ug	0,14/ 0,40/ 0,65	**/ */ */ *	0,14/ 0,38	**/ */ *
10 ug	Origem	*	i	-
1 ug	I	-	i	-
Nistatina	-	***	-	***
Mc-8R				
400 ug	0,18/ 0,43/ 0,63	**/ ***/ ***/ ***	0,18/ 0,32/ 0,42/ 0,49/ 0,62	**/ ***/ ***/ ***/ ***/ **
200 ug	0,18/ 0,43/ 0,63	*/ ***/ ***/ *	0,18/ 0,32/ 0,42/ 0,49/ 0,62	*/ ***/ **/ ***/ **/ *
100 ug	0,18/ 0,43/ 0,63	*/ ***/ ***/ *	0,18/ 0,32/ 0,42/ 0,49/ 0,62	*/ ***/ */ ***/ **/ *
50 ug	0,18/ 0,43/ 0,63	**/ ***/ *	0,18/ 0,32/ 0,42/ 0,49	*/ ***/ */ ***/ *
10 ug	0,18/ 0,43	*/ ***	0,18/ 0,42	***/ ***
1 ug	0,18/ 0,43	*/ **	0,18/ 0,42	**/ **
Nistatina	-	***	-	***

*= atividade fraca **= atividade média ***= atividade forte

4.1.1 – Fungos Endofíticos Isolados dos Caules de *Michelia champaca*.

A experiência adquirida no crescimento de endofíticos em larga escala, permitiu estabelecer que a quantidade mínima de extrato produzida para cada 500 mL de meio de cultura CDB fosse de 30 mg. Abaixo desta quantidade foi considerado um rendimento baixo e o dobro desta quantidade é considerado um rendimento alto. Estes dados em conjunto com seus respectivos espectros de RMN de ^1H permitiram fazer algumas considerações:

Mc-1C: (15,6 mg) este fungo tem uma produção metabólica baixa, mas o espectro de RMN de ^1H apresentou grande quantidade de sinais abrangendo toda região espectral, destacando-se sinais característicos de metoxilas, metilas e hidrogênios aromáticos (**Figura 43**, p. 121). O extrato produzido por este endofítico apresentou fraca atividade frente aos fungos fitopatogênicos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62), não apresentou atividade contra as linhagens mutantes de *S. cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63) e de inibição da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63).

Mc-2C: (7,2 mg) No cultivo deste fungo obteve-se um rendimento muito baixo. A análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 44**, p. 122) mostrou sinais característicos de hidrogênios aromáticos, metilênicos, olefínicos e de metoxilas. Os ensaios biológicos demonstram que este fungo é inativo frente *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63), apresentou atividade fraca frente *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62), e inibidora da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63).

Mc-3C: (91,3 mg) Este fungo apresentou um ótimo rendimento metabólico. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 45**, p. 122) mostrou a existência de uma substância majoritária que após experimentos de RMN, uni e bidimensionais, foi identificada como sendo o ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (**20**) (**Figura 38**, p. 106). Este fungo foi classificado como *Xylaria* sp. gênero já estudado pelo grupo, do qual se isolou o mesmo diácido identificado no extrato e este diácido isolado apresentou atividade antifúngica frente *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (CAFÊU, et al. 2005). Esta atividade também foi encontrada no extrato produzido por Mc-3C (**Tabela 4:** p. 62), entretanto não se observou nenhuma atividade antitumoral frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63), mas apresentou atividade inibidora da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63).

4.1.2 – Fungos Endofíticos Isolados das Folhas de *Michelia champaca*.

Mc-4F: (5,2 mg) Este fungo não apresentou um bom rendimento, mas uma análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 46**, p.122) evidenciou sinais de metilas e metoxilas alifáticas, hidrogênios olefínicos e carbinólicos. O extrato produzido por este fungo apresentou fraca atividade frente *C. sphaerospermum*, atividade média frente *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62) e nenhuma atividade contra *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63), mas apresentou atividade inibidora da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63).

Mc-5F: (8,7 mg) Apesar do baixo rendimento metabólico, o espectro de RMN de ^1H (**Figura 47**, p. 123) apresentou vários sinais de hidrogênios metílicos, metoxílicos, carbinólicos e poucos sinais de hidrogênios aromáticos e olefínicos. Nos ensaios biológicos, o endofítico apresentou fraca atividade frente *Cladosporium sphaerospermum* e média atividade frente *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62), sendo inativo frente *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63), mas apresentou atividade inibidora da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63).

Mc-6F: (30,5 mg) Este endofítico apresentou o mínimo rendimento metabólico necessário e foi identificado como *Phomopsis stipata*, Uma cuidadosa avaliação do espectro de RMN de ^1H do extrato deste endófito, evidenciou uma substância predominante. Podendo ser identificado a presença do ácido 3-nitropropiónico (**21**) através dos sinais característicos em δ_{H} 3,00 (2H, t, $J = 6,0$ Hz) e 4,63 (2H, t, $J = 6,0$ Hz) (**Figura 206**, p. 261). A confirmação da presença desta substância foi através do espectro de massas de baixa resolução (**Figura 207**, p. 262), obtido através da técnica ESI-MS (+), e observado o pico do íon m/z 98 indicando a formação do fragmento $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$.

Esta mesma substância já foi isolada do fungo *Phomopsis* sp. e apresentou atividade frente 15 tipos de micobactérias de plantas (CHOMEHEON, et al., 2005).

O extrato produzido por Mc-6F apresentou atividade forte frente aos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e atividade média com *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62). Este extrato também apresentou atividade frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63) e nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63).

Mc-7F: (15,0 mg) Esta linhagem foi identificada como *Colletotrichum gloeosporioides*, apresentando um rendimento metabólico baixo, mas o espectro de RMN de ^1H (**Figura 49**, p. 124) apresentou muitos sinais de hidrogênios aromáticos e metoxilas, algumas metilas aromáticas e alifáticas.

Nos ensaios biológicos, o endofítico apresentou fraca atividade frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*, média frente *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62) e atividade seletiva frente *Saccharomyces cerevisiae* (**Tabela 5:** p. 63), apresentou também atividade inibidora da acetilcolinesterase (**Tabela 6:** p. 63). Apesar do baixo rendimento metabólico, estes resultados motivaram a seleção deste fungo para estudo químico.

4.1.3 – Fungos Endofíticos Isolados das Raízes de *Michelia champaca*

Mc-8R: (48,5 mg) Apresenta um rendimento metabólico razoável. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 50**, p.124) mostrou sinais abrangendo toda região espectral. O extrato produzido por este fungo mostrou forte atividade antifúngica frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (**Tabela 4:** p. 62), além de atividade seletiva em *Saccharomyces cerevisiae*, onde atingiu 70% da atividade do padrão utilizado (estreptonigrina) (**Tabela 5:** p. 63). Nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase também apresentou atividade (**Tabela 6:** p. 63) estes resultados fizeram com que este fungo fosse escolhido para o estudo químico.

4.2 – Cultivo do Endofítico Mc-8R em Diferentes Meios de Cultura.

Os fungos endofíticos Mc-8R e Mc-7F se mostraram excelentes produtores de metabólitos potencialmente bioativos e com uma diversidade estrutural notável. Considerando estes fatos, e que a produção metabólica de microrganismos é altamente dependente das condições e meios de cultivo, nos propusemos a avaliar a produção metabólica de Mc-8R em outros meios.

Com este procedimento, objetivávamos a obtenção de outros metabólitos secundários, talvez mais bioativos que os inicialmente obtidos.

Levando-se em consideração que cada meio de cultura tem concentrações diferentes estabelecemos a relação de massa de extrato produzido em (mg) para cada (grama) de substrato utilizado, estes dados estão apresentados na **Tabela 8:** p. 68.

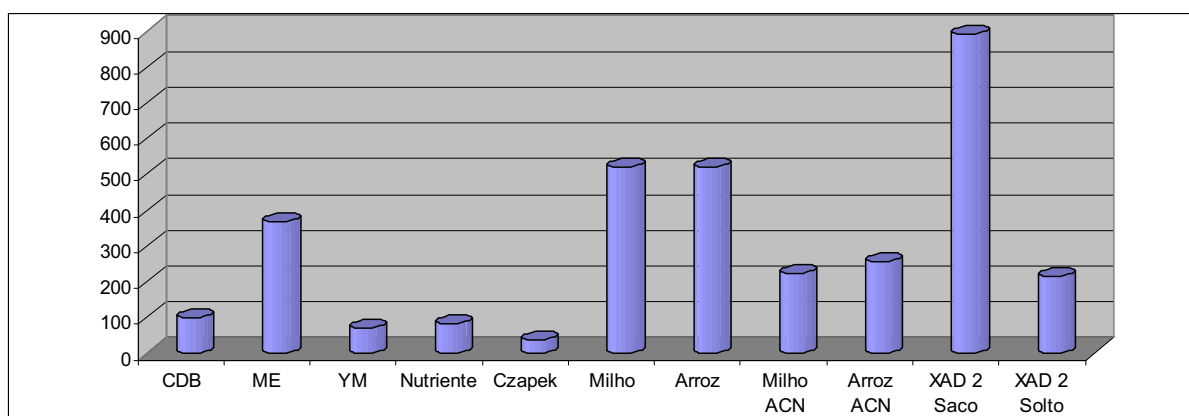
Tabela 8: Relação produtiva dos fungos por quantidade de meio de cultura

Meio	Conc. g/L	Quant. gramas (g) p/ 500 ml	Massa extrato (mg)	Massa de extrato/Meio de cultura (mg/g)
CDB	24	12,0	48,8	4,07
ME	20	10,0	148,8	14,88
YM	21	10,5	30,4	2,89
Nutriente	8	4,0	13,4	3,35
Czapek	35	17,5	25,3	1,44
Milho	90	Sólido = 90	1910,0	21,22
Arroz	90	Sólido = 90	1900,0	21,11
Milho ACN	90	Sólido = 90	810,0	9,00
Arroz ACN	90	Sólido = 90	930,0	10,33
XAD 2 Saco	24 CDB	12	436	36,33
XAD 2 Solto	24 CDB	12	105	8,75

O cultivo em diferentes meios forneceu massa de extrato bruta distintas o que pode ser observado **Figura 10**, Gráfico 01, p. 68 evidenciando que em XAD 2 saco, a massa obtida apresentou melhor rendimento.

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

Estes dados em conjunto com seus respectivos espectros de RMN de ^1H permitiram fazer algumas considerações:

**Figura 10:** Gráfico 01: variação metabólica de Mc-8R com vários meios de culturas e condições de crescimento

Czapek: O fungo apresentou baixa produção metabólica neste meio de cultura (25,3 mg) (1,44 mg/g). O cromatograma em gradiente exploratório deste extrato (**Figura 51**, p. 125) mostrou poucos picos de baixa à média absorvância. Observou-se no espectro e RMN de ^1H (**Figura 52**, p. 125) a presença de sinais característicos de pironas e a ausência dos sinais aromáticos característicos de ácidos pirenochaéticos.

YM: Neste meio o fungo produziu a quantidade de (30,4 mg) mas sua massa proporcional foi de (2,89 mg/g), se apresentando intermediário em comparação com os meios Czapek e Nutriente. O cromatograma em gradiente exploratório (**Figura 55**, p. 127) apresentou cinco picos com maior absorvância, indicando média variação metabólica. Uma análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 56**, p. 127) mostrou sinais característicos de pironas mais intensos do que os de ácidos pirenochaéticos, portanto, pode-se concluir que este meio também favorece a produção de pironas.

Nutriente: O cultivo de Mc-8R neste meio apresentou o menor rendimento em massa (13,4 mg), mas um rendimento proporcional (3,35 mg/g) maior que em Czapek. Uma análise do cromatograma em gradiente exploratório deste extrato (**Figura 53**, p. 126) confirma a baixa produção metabólica devido à presença de apenas três picos. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 54**, p. 126), observaram-se poucos sinais característicos de ácido pirenochaético não se observando sinais de pironas. Aparentemente, este meio de cultura favorece a produção dos ácidos em relação às pironas, ao contrário meio Czapek.

CDB: Este meio de cultura é o mais utilizado para crescimento de fungos endofíticos tanto na literatura como nos trabalhos de nosso grupo. Seria de se esperar que este meio fosse o meio que apresentasse o maior rendimento metabólico, mas para este fungo em questão isso não é observado, apresentando uma produção de (48,8 mg), com a produção proporcional de (4,0 mg/g) demonstrando ter uma produção pouco maior do que no meio Nutriente.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 50**, p.124), observaram-se poucos sinais característicos de ácido pirenochaético e observando sinais de pironas em maior intensidade. Aparentemente, este meio de cultura favorece a produção de pironas em relação aos ácidos pirenochaéticos.

Extrato de Malte: De todos os meios de cultura líquidos, este apresentou o maior rendimento em massa (148,8 mg) e em massa proporcional (14,9 mg/g). Uma análise do cromatograma em gradiente exploratório (**Figura 57**, p. 128) revelou vasta produção metabólica apresentando vários picos abrangendo toda a extensão do cromatograma. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 58**, p. 128) apresentou sinais característicos de pironas mais intensos que os sinais de ácidos pirenochaéticos, indicando que a produção de pironas é favorecida neste meio de cultura.

Arroz: Em meio sólido a produção de extrato foi de 1,90 g e a produção proporcional foi de (21,2 mg/g). Análise do espectro de RMN de ^1H deste extrato revelou uma grande quantidade de triglicerídeos, que atrapalham a visualização de outros metabólitos. Para contornar este problema o extrato foi submetido a uma partição líquido/líquido com Hex/ACN retirando material apolar.

Este processo resultou em 0,93 g de extrato Hexânico e 0,93 g de extrato ACN, ou seja, 50% do extrato total de natureza graxa, não podendo ser analisado em CLAE de fase reversa. O cromatograma em gradiente exploratório do extrato ACN/Arroz (**Figura 59**, p. 129) revelou uma vasta variação metabólica, com picos abrangendo toda a região do cromatograma. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 60**, p. 129), apresentou sinais característicos de pironas e de ácidos pirenochaéticos, sendo estes mais intensos, sugerindo uma maior produção de ácidos pirenochaéticos do que de pironas.

Milho: O extrato produzido neste meio sólido foi submetido ao mesmo procedimento que o extrato obtido em Arroz, resultando em 1,10 g de extrato Hexânico e 0,81g de extrato ACN. O cromatograma em gradiente exploratório do extrato ACN/Milho (**Figura 61**, p. 130),

apresentou-se semelhante ao do extrato ACN/Arroz, apenas diferenciando-se na intensidade de alguns sinais. Apesar dos extratos obtidos em milho e arroz serem muito parecidos pode-se observar uma pequena diferença na produção metabólica de Mc-8R quando cultivado nestes dois meios. Uma análise dos dados de RMN de ^1H (**Figura 62**, p. 130) mostra sinais característicos de pironas e ácidos pirenochaéticos, onde os ácidos estão em maior quantidade.

Os Extratos hexânicos obtidos das culturas de Arroz e Milho foram submetidos à CCDC (**Figura 65**, p. 131), onde se observa a semelhança na constituição química destes. Os espectros de RMN ^1H (**Figura 63 e Figura 65**, p. 131 e 131) dos extratos Hexânicos confirmaram essa similaridade. Se observou também sinais característicos de ergosterol (**9**), substância encontrada no resíduo insolúvel obtido a partir do extrato Hex/Milho (**Figura 136**, p. 191).

XAD 2 Saco: Esta é uma variação metodológica por estar utilizando o meio de cultura CDB juntamente com XAD 2 acondicionados em sacos de tecido sintético.

Esta técnica foi desenvolvida única e exclusivamente por mim e apresentou resultados surpreendentes. Seria de se esperar que por estar utilizando o meio de cultura CDB o rendimento fosse estar próximo aos (4,0 mg/g), mas este rendimento passou para a ordem de (36,3 mg/g), isso demonstra que a idéia de o XAD 2 estar seqüestrando do meio de cultura os metabólitos produzidos pelo fungo é verídico e pode ser observado no cromatograma que apresenta apenas a produção de 3 substâncias.

XAD 2 Solto: Nesta variação metodológica o procedimento adotado foi o de se adicionar XAD 2 solto no meio de cultura CDB. Seria de se esperar um rendimento metabólico parecido com o XAD 2 Saco, mas se observou uma produção bem menor. No experimento é observado que o XAD 2 Solto atrapalha o desenvolvimento micelar do fungo onde verifica-se o micélio todo triturado juntamente com o XAD 2 no meio. Sugerimos este o motivo deste experimento ter apresentado o rendimento metabólico de (8,0 mg/g). Apesar

de ser bem inferior a XAD 2 Saco este ainda apresenta um rendimento duas vezes maior que o crescimento apenas em CDB.

No cromatograma é observada uma variação metabólica muito grande, podemos sugerir que neste experimento o XAD 2 não tem a mesma eficiência quanto comparado com este estando acondicionado em sacos de tecido sintético.

Aparentemente não se observa variação no crescimento de Mc-8R utilizando vários meios, tendo por base apenas o volume de micélio obtido no momento da filtração, seria intuitivo imaginar que houvesse a mesma relação de produção de extrato nos vários meios. No entanto observa-se que o meio onde se obteve a menor produção foi o meio mais artificial contendo vários sais e um açúcar como nutrientes (Czapek). O meio rico em açúcares e pobre em fonte de nitrogênio (YM), apresenta-se com um rendimento um pouco maior, o meio que tem fonte de carbono na forma de açúcares e nitrogênio na forma de proteínas (Nutriente) vem com uma produção um pouco maior que os anteriores. Mas os meios que realmente são favoráveis a este fungo em questão, são os de origem natural sem aditivos, como CDB extrato de malte, milho e arroz.

Destes últimos dois existe a possibilidade de se extrair óleos que já fazem parte da constituição das sementes milho e arroz, podendo resultar em uma constatação errônea, mas mesmo se utilizando dos dados do extrato sem a parte graxa, a produção é muito mais significativa quando comparado aos outros meios de cultura líquidos, chegando a ser da ordem de 3 vezes mais extrato. Seguindo neste raciocínio ainda podemos estar cometendo o erro de desconsiderar a existência de uma produção metabólica de caráter apolar que pode ser produzida pelo fungo. Exemplo disso foi a identificação dos ergosteróis (9) e (10) muito encontrados em fermentados de fungos endofíticos.

Algumas considerações que podem ser feitas com relação à variação é que aparentemente não houve uma grande alteração na produção de metabólitos secundários tendo por base apenas os sinais de RMN de ^1H característicos das pironas e ácidos pirenochaéticos.

Observando os cromatogramas pode-se constatar que em alguns casos ocorre uma variação na quantidade de picos sugerindo uma maior variação metabólica.

Este estudo serviu para nos concluirmos que, tomando por base as análises realizadas nesta triagem, este endofítico deva produzir estruturas com pelo menos os mesmos esqueletos das substâncias já identificadas.

4.3 – Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas.

4.3.1 – Elucidação Estrutural das Substâncias Produzidas por Mc-8R.

4.3.1.1 – Identificação Estrutural da Citreopirona (Pirenocina A) (**1**).

A substância (**1**) foi submetida à análise por espectrometria de massas (**Figura 93**, p. 148), utilizando-se a técnica ESI-MS-MS (+) e apresentou o pico base m/z 209, referente à formação do íon *quasi* molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$. A massa calculada foi de 208, sugerindo à fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

O espectro de RMN de ^1H (**Tabela 9**: p. 75, **Figura 88**, p. 143) mostrou um singlete em δ_{H} 5,46 (1H, s, H-3), dois duplos quartetos em δ_{H} 6,30 (1H, dq, $J = 1,6$ e $15,5$ Hz, H-10) e δ_{H} 6,78 (1H, dq, $J = 6,9$ e $15,5$ Hz, H-11), característicos de hidrogênios olefínicos, onde a constante de acoplamento de $15,5$ Hz aponta para uma dupla ligação em *trans*. O deslocamento observado em δ_{H} 1,95 (3H, dd, $J = 1,6$ e $6,9$ Hz, H-12) refere-se à metila ligada a insaturação. Estas posições são confirmadas pelas constantes de acoplamento e multiplicidade características. O espectro apresentou ainda sinais de metoxila em δ_{H} 3,79 (3H, s, H-8) e metila ligada a carbono olefínico em δ_{H} 2,16 (3H, s, H-7).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 9**: p. 75, **Figura 89**, p. 144) apresentou sinais em 161,5 (C-6), 114,0 (C-5), 133,1 (C-10), 147,2 (C-11), 168,7 (C-4) e 87,7 (C-3)

correspondentes aos carbonos olefínicos. O sinal observado em δ_C 163,0 (C-2) é característico de carbonila de lactona e o sinal em δ_C 190,5 (C-9) característico de cetona α,β -insaturada. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou ainda sinais em δ_C 18,5 (C-12) e δ_C 18,2 (C-7) correspondentes aos carbonos metílicos.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de 1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMBC (correlações diretas $^1H \times ^{13}C - gHMBC - ^1J_{CH}$) (Tabela 9: p. 75, Figura 90, p. 145) todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono.

Os experimentos bidimensionais de gHMBC (Figura 91, p.146) a curta e longa distância $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ e $^4J_{CH}$, mostraram correlação entre a metoxila $H-8 \leftrightarrow C-3$ e $H-7 \leftrightarrow C-6$. O hidrogênio desprotegido em δ 5,46 s $H-3 \leftrightarrow C-4/C-2$ sugere um anel característico de pironas.

Uma análise adicional dos mapas de contorno bidimensionais de gHMBC (Figura 91, p.146) evidenciou as correlações $H-11 \leftrightarrow C-12/C-9$.

A correlação entre $H-10 \leftrightarrow C-5$ não foi observada nos experimentos de gHMBC, mas um levantamento na literatura conduziu à estrutura da citreopirona (Pirenocina A), um metabólito produzido por *Penicillium citreo-viride* B. (SHIZURI; KOSEMURA; YAMAMURA, 1984) permitindo atribuir a estrutura (**1**) para a pirona em análise (Figura 11, p.74).

Verificou-se que *Pirenochaeta terrestris*, também produz esta substância e apresenta alta atividade citotóxica frente à germinação de alface (SATO; KONOMA; SAKAMURA, 1981) e atividade citotóxica frente girassol (TAL; ROBESON, 1986).

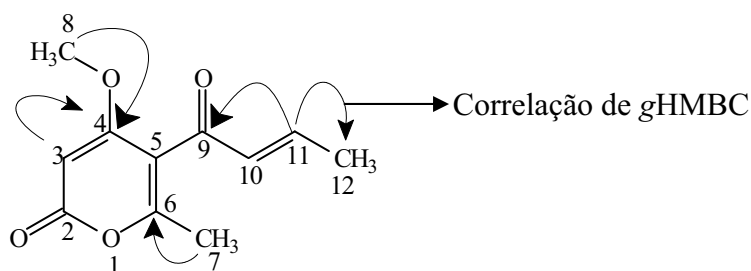


Figura 11: Estrutura da Citreopirona (Pirenocina A) (**1**)

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Pirenocina A (**1**) (CDCl_3 a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip. $J=$ Hz)	^{13}C (ppm)
2		163,0
3	5,46 (s)	87,7
4	-	168,7
5	-	114,0
6	-	161,5
7	2,16 (s)	18,2
8	3,79 (s)	56,3
9	-	190,5
10	6,30 (dq, 1,6/15,5)	133,1
11	6,78 (dq, 6,9/15,5)	147,2
12	1,95 (dd, 1,6/6,9)	18,5

4.3.1.2 – Identificação Estrutural da Pirenocina E (**2**).

A substância (**2**) foi submetida à análise por espectrometria de massas de baixa resolução (**Figura 99**, p. 154) utilizando-se a técnica ESI-MS-MS (+) e apresentou o pico base m/z 263 indicando a formação do aduto com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e o fragmento em 209 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$. A massa calculada foi de 240, sugerindo à fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5$.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (**Tabela 9:** e **Tabela 10:** p. 75 e 76, **Figura 88** e **Figura 89** (**1**) e **Figura 94** e **Figura 95**, (**2**), pgs. 143 e 144, 149 e 150), gHMQC (**Figura 90** e **Figura 96** pgs. 145 e 151) e gHMBC (**Figura 91** e **Figura 97**, pgs. 146 e 152) mostraram muita semelhança entre (**1**) e (**2**) evidenciado o desaparecimento dos hidrogênios olefínicos H-10 e H-11 e o aparecimento dos hidrogênios diastereotópicos α à carbonila em δ_{H} 2,72 (1H, dd, $J=$ 4,9 e δ_{H} 15,8 Hz, H-10) e δ_{H} 2,92 (1H, dd, $J=$ 8,2 e 15,8 Hz, H-10) e uma metoxila alifática em δ_{H} 3,26 (3H, s, H-13), indicando que a estrutura parcial B perdeu a conjugação.

A análise dos dados de ^{13}C (**Tabela 10:** p. 76, **Figura 95**, p. 150) desta parte da estrutura permitiu confirmar o desaparecimento dos carbonos olefínicos e o aparecimento dos carbonos em δ_{C} 51,6 (C-10), 73,7 (C-11) e 56,1 (C-13) característicos de um carbono α carbonílico, com influencia de desproteção e dos carbonos metínico e metílico, ambos ligado a oxigênio.

As correlações observadas nos espectros de RMN de gHMBC (**Figura 97**, p. 152) a curta e longa distância $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$, mostraram correlação entre H-13 \leftrightarrow C-11 confirmando a

presença da metoxila em C-11. Esta informação possibilitou propor a estrutura para a substância (**2**). Uma comparação com dados da literatura permitiu atribuir, sem ambigüidades, a estrutura da pirona (**2**) como sendo a Pirenocina E (**Figura 12**, p. 76).

Uma pirona produzida por *Penicillium waksmanii*, e que apresentou atividade citotóxica (AMAGATA, et al., 1998).

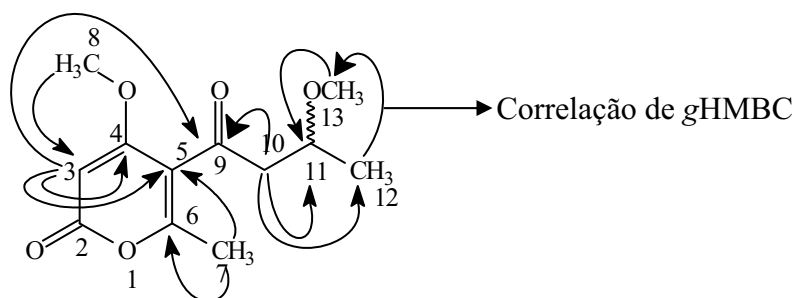


Figura 12: Estrutura da Pirenocina E (**2**)

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Pirenocina E (**2**) (CDCl_3 a 11,7 T)

Nº	^1H (multip. $J = \text{Hz}$)	^{13}C (ppm)
2	-	162,6
3	5,46 (s)	87,6
4	-	168,4
5	-	115,9
6	-	163,4
7	2,23 (s)	18,3
8	3,84 (s)	56,3
9	-	199,3
10	2,72 (dd, 4,9/15,8) 2,92 (dd, 8,2/15,8)	51,6
11	3,81 (tq 1,3/4,9/6,0/8,2)	73,7
12	1,18 (d, 6,0)	18,9
13	3,26 (s)	56,1

4.3.1.3 – Identificação Estrutural da Pirenocina B (**3**).

A substância (**3**) foi isolada em mistura com (**1**) e (**2**) devido a pouca quantidade de material optamos pela determinação estrutural de (**3**) em mistura. Esta foi submetida à espectrometria de massas de baixa resolução (**Figura 104**, p. 159), utilizando-se a técnica ESI-MS-MS (+) e apresentou o pico base m/z 249 indicando a formação do aduto com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$. A massa calculada foi de 226, sugerindo à fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e gHMQC **Tabela 11:** p. 77, (**Figura 94** e **Figura 95** (**2**), **Figura 100** e **Figura 101** (**3**), pgs. 149 e 150, 155 e 156) e gHMBC (**Figura**

97 e Figura 102, pgs. 152 e 157) de (2) e (3) mostram muitas semelhanças entre as substâncias (1) e (2). Entretanto, a diferença observada entre (2) e (3) ocorre com o desaparecimento dos hidrogênios da metoxila em δ_H 3,26 (3H, s, H-13) e o deslocamento do hidrogênio carbinólico em δ_H 3,81 (1H, qt, 1,3/4,9/6,0 e 8,2 Hz, H-11) de (2) para δ_H 4,01 (1H, m, H-11) de (3) evidenciando que ocorreu a desmetilação da hidroxila em C-11.

Uma comparação com dados da literatura permitiu atribuir sem ambigüidades a estrutura da pirona (3) como sendo a Pirenocina B, uma pirona produzida por *Penicillium citreo-viride* B e *Pyrenochaeta terrestris* (SHIZURI; KOSEMURA; YAMAMURA, 1984) (Figura 13, p. 77). Esta substância apresentou atividade citotóxica ao girassol (TAL; ROBESON, 1986).

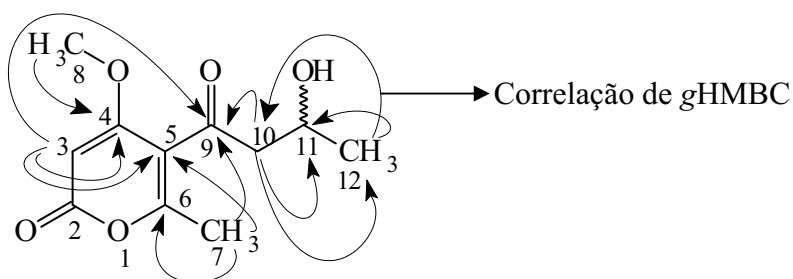


Figura 13: Estrutura da Pirenocina B (3)

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Pirenocina B (3) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	^1H (multip. J = Hz)	^{13}C (ppm)
2	-	162,2
3	5,66 (s)	87,5
4	-	168,4
5	-	115,4
6	-	162,0
7	2,13 (s)	18,2
8	3,84 (s)	56,8
9	-	200,1
10	2.72 (d, 3,0)	53,4
	2.74 (s)	
11	4,01 (m)	63,4
12	1.08 (d, 6,2)	23,7

4.3.1.4 – Identificação Estrutural do Ácido Pirenochaético C (4)

A substância (4) foi submetida à espectrometria de massas de baixa resolução (Figura 111, p. 166), utilizando-se a técnica ESI-MS (+) e apresentou o pico em m/z 259 (100%) indicando a formação do aduto com sódio $[M+Na]^+$ e o íon *quasi* molecular em $237 [M+H]^+$. A massa calculada foi de 236, sugerindo à fórmula molecular $C_{13}H_{16}O_4$.

O espectro de RMN de 1H (Tabela 12: p. 80, Figura 105, p. 160) apresentou sinais em δ_H 3,81 (3H, s, H-11) e 2,15 (3H, s, H-12), característicos de metoxila e metila aromáticas respectivamente, além de dois singletos em δ_H 7,38 (1H, s, H-2) e δ_H 7,42 (1H, s, H-6), evidenciando a presença de um anel tetrasubstituído.

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 12: p. 80, Figura 106, p. 161) apresentou seis carbonos aromáticos (quatro quaternários), três carbonos metílicos, sendo um ligado a oxigênio, dois carbonos metilênicos, além de uma carbonila de cetona e outra de ácido carboxílico.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de 1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1H \times ^{13}C - gHMQC - ^1J_{CH}$) (Tabela 12: p. 80, Figura 107, p. 162), foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

Através das correlações observadas nos experimentos bidimensionais de gHMBC (Tabela 12: p. 80, Figura 108, p. 163) a longa distância $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$, foi possível visualizar as interações entre os hidrogênios aromáticos entre $H-2 \leftrightarrow C-6/C-13$ e $H-6 \leftrightarrow C-2/C-5/C-12/C-13$ e atribuir a estrutura parcial A para a substância (4) (Figura 14, p.79). A localização dos substituintes no anel foi estabelecida com base nas informações obtidas no espectro unidimensional de NOESY-1D (Tabela 12: p. 80, Figura 110, p. 165).

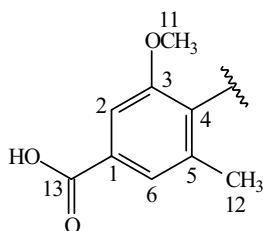


Figura 14: Estrutura parcial A para substância (**4**)

Uma análise adicional do mapa de contorno gHMBC (**Figura 108**, p. 163) evidenciou as correlações a longa distância $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ de H-8 \leftrightarrow C-7/C-10/C-12, H-9 \leftrightarrow C-8/ C-7/C-10 e H-10 \leftrightarrow C-9/C-8. Observou-se ainda a mesma constante de acoplamento (7 Hz) entre os hidrogênios H-8 e H-9 o que juntamente com as multiplicidades apresentadas permitiram sugerir a estrutura parcial **B** (unidade não aromática) para a substância (**4**) (**Figura 15**, p. 79).

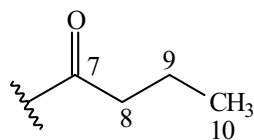


Figura 15: Estrutura parcial B para substância (**4**)

A conexão entre as estruturas parciais **A** e **B** foi determinada com base nos experimentos de NOESY-1D (**Tabela 12:** p. 80, **Figura 110**, p. 165), onde foi verificada a interação espacial entre H-8 \leftrightarrow H-10/H-9/H-12/H-11.

Estas informações, aliadas aos dados da literatura permitiu identificar a substância em questão como sendo o ácido Pirenochaético C (**4**), também produzido pelo fungo *Pyrenochaeta terrestris* (**Figura 16**, p. 79), e com alta atividade citotóxica frente à germinação de alface (SATO; KONOMA; SAKAMURA, 1981).

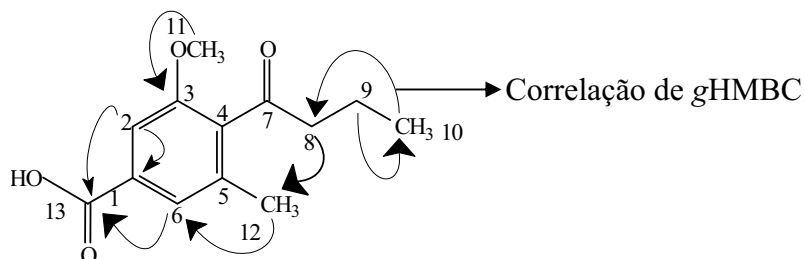


Figura 16: Estrutura do Ácido Pirenochaético C (**4**)

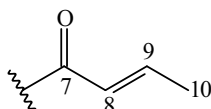
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e NOESY 1D do Ácido Pirenochaético C (**4**) (DMSO- d_6 a 11,7 T).

Nº	^1H ppm (multip., J = Hz)	^{13}C (ppm)	gHMBC	NOESY 1D
1	-	134,5	-	
2	7,38 (s)	109,3	C-6/C-5/C-13	H-11
3	-	155,6	-	
4	-	-	-	
5	-	134,6	-	
6	7,42 (s)	123,7	C-1/C-2/C-12/C-13	H-12
7	-	206,5	-	
8	2,69 (t, 7,0)	45,4	C-7 / C-10 / C-12	H-9/H-10/H-11/H-12
9	1,58 (sex, 7,0)	16,4	C-7 / C-8/ C-10	
10	0,90 (t, 7,0)	13,4	C-8/C-9	
11	3,81 (s)	55,8	C-3	H-6
12	2,15 (s)	18,2	C-5/C-6	H-6/H-8
13	-	166,7	-	

4.3.1.5 – Identificação Estrutural do Ácido Pirenochaético A (**5**).

A substância (**5**) foi submetida à espectrometria de massas de baixa resolução (**Figura 117**, p. 172), utilizando-se a técnica ESI-MS (+) e apresentou o pico base m/z 257 indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e o íon pseudo molecular em 235 $[\text{M}+\text{H}]^+$. A massa calculada foi de 234 sugerindo à fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

As semelhanças observadas entre os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (**Tabela 13:** p. 81, **Figura 105** e **Figura 106** (**4**), **Figura 112** e **Figura 113** (**5**), pgs. 160 e 161, 167 e 168), gHMQC (**Figura 107** e **Figura 114**, pgs. 162 e 169) e gHMBC (**Figura 108** e **Figura 115**, pgs. 163 e 170) de (**4**) e (**5**) apontam para a mesma estrutura parcial **A** (**Figura 14**, p.79). Entretanto, observa-se o aparecimento de dois duplos dubletos em δ_{H} 6,35 (1H, dq, J = 1,5 e 15,5 Hz, H-8) e δ_{H} 6,55 (1H, dq, J = 7,0 e 15,5 Hz, H-9), característicos de hidrogênios olefínicos, e constante de acoplamento (J = 15,5 Hz) correspondente a dupla ligação em *trans* na unidade não aromática, sugerindo a estrutura parcial **B** (**Figura 17**, p. 80).

**Figura 17:** Estrutura parcial B para a substância (**5**)

Comparação com dados da literatura permitiu atribuir à estrutura de (**5**) como sendo o Ácido Pirenochaético **A** (**Figura 18**, p. 81), também produzido por *Pyrenochaeta terrestris* e

apresentando uma alta atividade citotóxica frente à germinação de alface (SATO; KONOMA; SAKAMURA, 1981).

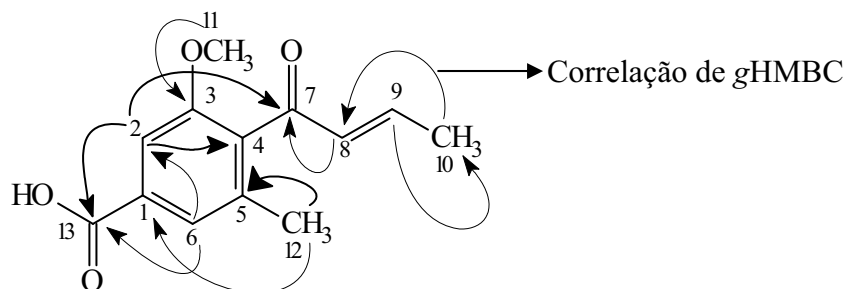


Figura 18: Estrutura do Ácido Pirenochaético A (5)

4.3.1.6 – Identificação Estrutural do Ácido Pirenochaético B (6)

O espectro de massas de (6) (Figura 123, p. 178), foi obtido utilizando-se a técnica ESI-MS (+) em baixa resolução, apresentou o pico em m/z 275 indicando a formação do aduto $[M+Na]^+$. A massa calculada foi de 252, sugerindo a fórmula molecular $(C_{13}H_{16}O_5)$

As semelhanças observadas entre os dados de RMN de 1H e ^{13}C (Tabela 13: p. 81, Figura 112 e Figura 113 (5), Figura 118 e Figura 119 (6), pgs. 167 e 168, 173 e 174), gHMQC (Figura 114 e Figura 120 pgs. 169 e 175) e gHMBC (Figura 115 e Figura 121 pgs. 170 e 176) de (5) e (6) apontam para a mesma estrutura parcial (A). Entretanto, na unidade não aromática, observa-se o desaparecimento dos hidrogênios olefinicos H-8 e H-9 e o aparecimento de um carbono carbinólico em δ_C 62,8 (C-9) que desloca o valor da metila C-10 para δ_C 23,7. De acordo com estas considerações e análise dos experimentos bidimensionais de gHMBC (Figura 121 p. 176), foi possível determinar a estrutura parcial B para a substância (6) (Figura 19, p. 81).

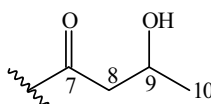
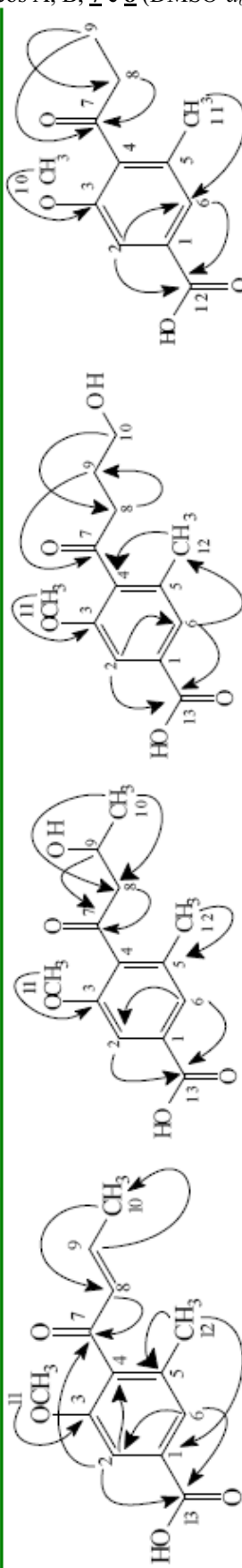


Figura 19: Estrutura parcial B para a substância (6)

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos Ácidos Pirenochaéticos A, B, **7** e **8** (DMSO- d_6 e CDCl_3 , a 11,7 T)

N ^o	Ácido Pirenochaético A (5)		Ácido Pirenochaético B (6)		Ácido Pirenochaético (7)		Ácido Pirenochaético (8)	
	^1H ppm (multip., $J=$ Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (multip., $J=$ Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (multip., $J=$ Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (multip., $J=$ Hz)	^{13}C (ppm)
1	-	134,6	-	135,5	-	134,5	-	129,4
2	7,47 (s)	109,7	7,38 (s)	109,3	7,38 (s)	109,2	7,46 (s)	110,1
3	-	156,5	-	155,8	-	155,5	-	159,0
4	-	130,3	-	132,9	-	-	-	-
5	-	136,5	-	134,5	-	134,5	-	140,6
6	7,59 (s)	124,7	7,41 (s)	123,8	7,41 (s)	123,6	7,62 (s)	125,7
7	-	197,2	-	205,5	-	206,7	-	201,4
8	6,35 (dq, 1,5 e 15,5)	133,4	2,80 (m)	53,5	2,74 (t, 7,3)	40,3	2,88 (q, 7,3)	29,8
9	6,55 (dq, 7,0 e 15,5)	147,6	4,06 (sext, 6,2 e 12,3)	62,8	1,71 (dddd, 6,0/6,5/7,3 e 14,3)	26,5	1,19 (t, 7,3)	7,0
10	1,92 (dd, 1,5, 7,0)	18,5	1,10 (d, 6,2)	23,7	3,40 (t, 6,5)	59,9	3,82 (s)	56,2
11	3,82 (s)	56,0	3,81 (s)	55,8	3,80 (s)	55,8	2,39 (s)	19,5
12	2,22 (s)	18,8	2,18 (s)	18,4	2,14 (s)	18,2	-	169,8
13	-	171,3	-	166,8	-	167,0	-	-



Correlações de gHMBC

Apesar da conexão das estruturas parciais **A** e **B** não serem visualizada nos experimentos de gHMBC, um levantamento na literatura, para a substância (**6**) pode-se identificá-la como Ácido Pirenochaético B (**Figura 20**, p. 83), também produzido pelo fitopatógeno *Pyrenochaeta terrestris*, com alta atividade citotóxica frente à germinação de alface (SATO; KONOMA; SAKAMURA, 1981)

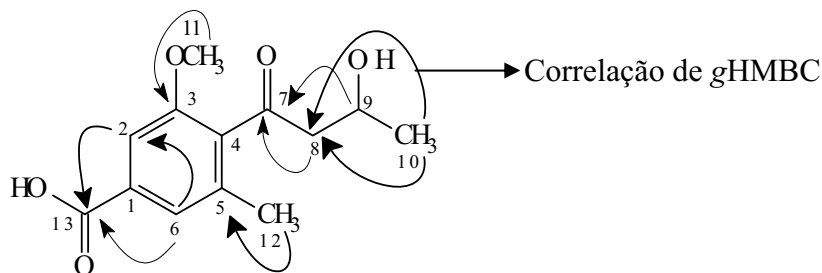


Figura 20: Estrutura do Ácido Pirenochaético B (**6**)

4.3.1.7 – Elucidação Estrutural do Ácido Pirenochaético (**7**)

O espectro de massas de (**7**) foi obtido utilizando-se a técnica ESI-MS (+) em alta resolução (**Figura 129**, p. 184), apresentou o pico base em m/z 275,0894 correspondendo ao aduto com sódio $[M+Na]^+$, o pico em 235,097 correspondendo à perda de água $[M-H_2O+H]^+$. A massa calculada foi de 252,0997 sugerindo a fórmula molecular (C₁₃H₁₆O₅).

As semelhanças observadas entre os dados de RMN de ¹H e ¹³C (**Tabela 13**: p. 81, **Figura 118** e **Figura 119** (**6**), **Figura 124** e **Figura 125** (**7**), pgs. 173 e 174, 179 e 180), gHMQC (**Figura 120** e **Figura 126**, pgs. 175 e 181) e gHMBC (**Figura 121** e **Figura 127**, pgs. 176 e 182 de (**6**) e (**7**) apontam para a mesma estrutura parcial **A** (**Figura 14**, p.79). Entretanto, na unidade não aromática, observa-se o aparecimento do sinal em δ_H 1,71 (2H, dddd, $J= 6,0/6,5/7,3$ e 14,3 Hz, H-9) referente aos hidrogênios metilênicos H-9. Observou-se ainda o desaparecimento da metila terminal. O espectro de ¹³C observa-se a desproteção do carbono em δ_C 59,9 (C-10), sugerindo o aparecimento de uma hidroxila nesta posição. A análise do espectro de gCOSY (**Figura 128**, p. 183), revelou a correlação do hidrogênio H-9↔H-8/H-10, possibilitando sugerir uma nova estrutura parcial **B** (**Figura 21**, p. 84).

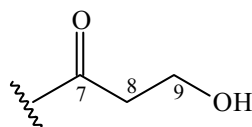


Figura 21: Estrutura parcial B para a substância (7)

A substância (7) foi identificada como sendo um Ácido Pirenochaético de estrutura ainda não descrita, através da análise dos dados espectrométricos e comparação com similares da literatura (SATO; KONOMA; SAKAMURA, 1981), pôde-se atribuir a estrutura da substância (7) (Figura 22, p. 84). Esta apresentou forte atividade biológica frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e atividade inibidora da acetilcolinesterase. O levantamento bibliográfico foi realizado utilizando-se o sistema SciFinder Scholar na data de 10 de Agosto de 2007.

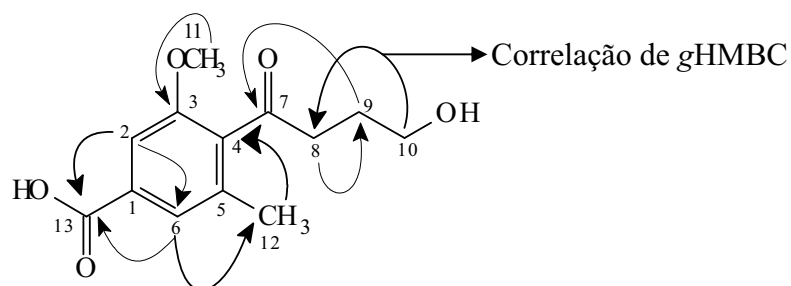


Figura 22: Estrutura da substância (7)

4.3.1.8 – Elucidação Estrutural do Ácido Pirenochaético (8)

A substância (8) foi identificada através da análise dos dados espectrométricos e comparação com similares da literatura (SATO; KONOMA; SAKAMURA, 1981), como sendo um Ácido Pirenochaético também de estrutura desconhecida, com fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_4$, sugerida pelo espectro de massas de alta resolução, obtido pela técnica ESI-MS (+) (Figura 135, p. 190), que apresentou o pico com m/z 262,035, sugerindo ser a molécula com seu hidrogênio ácido trocado por deutério proveniente do solvente deuterado nos experimentos de RMN formando o aduto com potássio $[M+K]^+$.

As semelhanças observadas entre os dados de RMN de 1H e ^{13}C (Tabela 13: p. 81, Figura 105 e Figura 106 (4), Figura 130 e Figura 131 (8), pgs. 160 e 161, 185 e 186),

gHMQC (**Figura 107** e **Figura 132**, pgs 162 e 187) e gHMBC (**Figura 108** e **Figura 133**, pgs. 163 e 188) de **(4)** e **(8)** apontam para a mesma estrutura parcial **A** (**Figura 14**, p.79). Entretanto, na região não aromática, observa-se o desaparecimento da metila em δ_C 13,4 (C-10) de **(4)** e o surgimento de uma metila protegida em δ_C 7,0 (C-9) sugerindo que esta se encontra em posição β à cetona. Observou-se ainda a desproteção do carbono C-8 em δ_C 29,8 (C-8), evidenciando sua posição α à carbonila. No espectro de gCOSY (**Figura 134**, p. 189) observou-se apenas uma correlação entre H-8 \leftrightarrow H-9 confirmando as observações acima. De acordo com estas considerações foi possível propor a estrutura parcial **B** visualizada abaixo na **Figura 23**, p. 85.

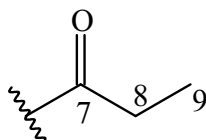


Figura 23: Estrutura parcial B para a substância **(8)**

Comparação com dados da literatura (SATO, 1981) permitiu identificar a substância **(8)** (**Figura 24**, 85) como sendo um Ácido Pirenochaético de estrutura ainda não descrita e similar a do Ácido pirenochaético C **(4)**. A substância **(8)** também apresentou uma forte atividade biológica frente os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e atividade inibidora da acetilcolinesterase. O levantamento bibliográfico foi realizado utilizando-se o sistema SciFinder Scholar na data de 10 de agosto de 2007.

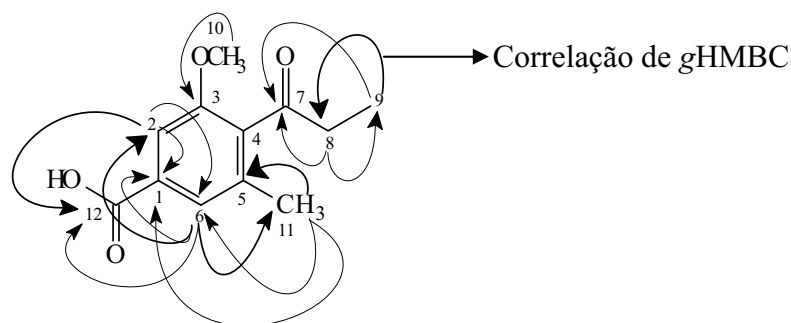


Figura 24: Estrutura da substância **(8)**

4.3.1.9 – Identificação Estrutural de Ergosterol (9)

O espectro de RMN de ^1H de (9) (Figura 136, p. 191) apresenta sinais de hidrogênios alifáticos, metílicos, carbinólicos. No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 14: p. 87, Figura 137, p. 192) foi possível observar a presença de 28 átomos de carbono. A comparação dos dados da literatura (SHIRANE, et al., 1996) com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância (9) sugeriu tratar-se do ergosterol, um esteróide comum em fungos (Figura 25, p. 87).

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 14: p. 87, Figura 137, p. 192) foram observados seis carbonos olefínicos em δ_{C} 139,8 (C-5), 119,6 (C-6), 116,3 (C-7), 141,3 (C-8), 135,6 (C-22) e 132,0 (C-23) e um carbinólico em δ_{C} 70,4, (C-3).

No espectro de RMN de ^1H , (Figura 136, p. 191) foram observados sinais de metilas, hidrogênios carbinólicos e olefínicos. O multiplete em δ_{H} 3,62 (1H, m, H-3) foi atribuído ao hidrogênio carbinólico, um duplo dubleto em δ_{H} 5,55 (1H, dd, $J= 2,3$ e $5,6$ Hz, H-7) e um multiplete em δ_{H} 5,33 (1H, m, H-6) pertencentes dos hidrogênios olefínicos do dieno e um duplo quarteto em δ_{H} 5,19 (2H, dq, $7,0/7,7$ e $15,5$ Hz) pertence aos hidrogênios do sistema olefínico H-22 e H-23.

Na região entre δ_{H} 0,5-1,0 observa-se a presença de dois singletos e quatro dubletos, sendo que dois destes coalescem se apresentando como um tripleto com constantes de acoplamento diferentes. Os singletos foram atribuídos aos hidrogênios metílicos H-18 e H-19 em δ_{H} 0,93 (3H, s) e 0,62 (3H, s), respectivamente; os dubletos que coalescenram estão em δ_{H} 0,81-0,82 (3H, d, $J= 7,1$ Hz, H-26), 0,82-0,83 ($J= 6,9$ Hz H-27) e os dubletos em δ_{H} 1,02 (3H, d, $J= 6,6$ Hz, H-28) e δ_{H} 0,90 (3H, d, $J= 6,8$ Hz, H-21) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos H-28 e H-21 respectivamente (SHIRANE, et al., 1996).

Os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono do ergosterol encontram-se na Tabela 14: p. 87 esta substância é muito comum em fungos e segundo

SUBBIAH; ABPLANALP, 2003 o ergosterol tem atividade inibidora de células cancerígenas em ensaios realizados “in vitro”.

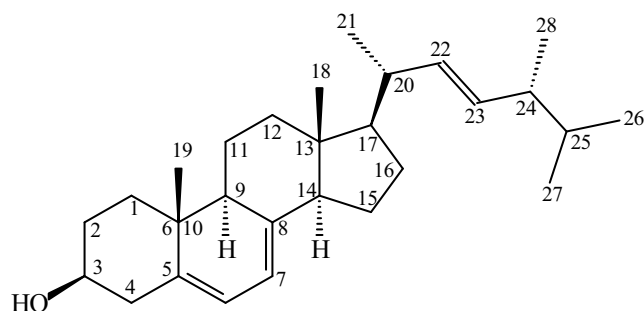


Figura 25: Estrutura da do Ergosterol (9)

Tabela 14: Dados de RMN de ^{13}C do Ergosterol (9) (CDCl_3 a 11,7 T) e dados de RMN de ^{13}C literatura para o Ergosterol (SHIRANE, et al., 1996).

Nº	(9) ^{13}C (ppm)	(SHIRANE, et al., 1996) ^{13}C (ppm)	Nº	(9) ^{13}C (ppm)	(SHIRANE, et al., 1996) ^{13}C (ppm)
1	38,4	38,3	15	23,0	23,0
2	31,9	32,0	16	28,3	28,2
3	70,4	70,4	17	55,7	55,7
4	40,7	40,8	18	12,0	12,0
5	139,8	139,8	19	16,3	16,2
6	119,6	119,6	20	40,4	40,4
7	116,3	116,3	21	21,1	21,1
8	141,3	141,3	22	135,6	135,5
9	46,3	46,2	23	132,0	132,0
10	37,0	37,0	24	42,8	42,8
11	21,1	21,1	25	33,0	33,1
12	39,1	39,1	26	19,9	19,9
13	42,8	42,8	27	19,6	19,6
14	54,6	54,5	28	17,6	17,6

4.3.1.10 – Identificação Estrutural do Peróxido de Ergosterol (10)

O espectro de RMN de ^1H de (10) (Tabela 15: p. 88, Figura 138, p. 193) apresenta sinais de hidrogênios alifáticos, metílicos, carbinólicos e vinílicos. A presença de um duplo duplo dubleto em δ_{H} 3,96 (1H, dddd, $J= 5,1/6,5/11,0$ e $11,5$ Hz, H-3), evidencia o hidrogênio metínico carbinólico. Os dois dubletos em δ_{H} 6,23 (1H, d, $J= 8,5$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,48 (1H, d, $J= 8,5$ Hz, H-7) apresentam constantes de acoplamento característica de dupla ligação em *cis*, enquanto os dois duplos dubletos em δ_{H} 5,21 (1H, dd, $J= 7,5$ e $15,6$ Hz, H-22) e 5,14 (1H, dd, $J= 8,1$ e $15,6$ Hz, H-23), apresentam constantes de acoplamento característica de dupla ligação em *trans*. Na região entre δ_{H} 0,75-1,10 pode-se observar a presença de dois

singletos e quatro dubletos. Os singletos em δ_H 0,87 (3H, s, H-18) e 0,81 (3H, s, H-19) e os dubletos em δ_H 0,90 (3H, d, $J= 6,8$ Hz, H-21), 0,80-0,81 (3H, d, $J= 6,8$ Hz, H-26), 0,82-0,83 ($J= 6,8$ Hz, H-27) e 1,02 (3H, d, $J= 6,6$ Hz, H-28), foram atribuídos aos hidrogênios metílicos

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 15: p. 88, Figura 139, p. 194) foi possível observar 28 átomos de carbono, sendo que quatro são olefínicos δ_C 135,2 (C-6), 130,7 (C-7), 135,4 (C-22) e 132,3 (C-23) e três carbinólicos δ_C 70,4 (C-3), 82,1 (C-5) e 79,4 (C-8).

Comparação dos dados da literatura (YUE, et al, 2001) com todos os valores encontrados no espectro de RMN de 1H e ^{13}C da substância 10, sugeriu tratar-se do Peróxido de Ergosterol (Figura 26, p. 88), um esteróide comum em fungos (SUBBIAH; ABPLANALP, 2003) e com atividade inibidora de células cancerígenas em ensaios realizados “in vitro”.

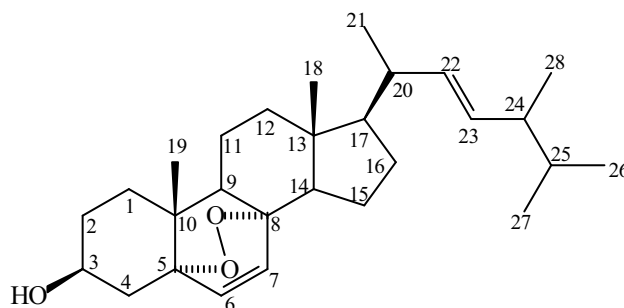


Figura 26: Estrutura do Peróxido de Ergosterol (10)

Tabela 15: Dados de RMN de ^{13}C do Peróxido de Ergosterol (10) ($CDCl_3$ a 11,7 T) e dados de RMN de ^{13}C literatura para o Peróxido de Ergosterol (YUE, J. M. et al, 2001)

Nº	1H ppm (multip., $J=$ Hz)	(10) ^{13}C (ppm)	YUE, J. M. et al, 2001 ^{13}C (ppm)	Nº	1H ppm (multip., $J=$ Hz)	(10) ^{13}C (ppm)	YUE, J. M. et al, 2001 ^{13}C (ppm)
1		30,1	30,2	15	1,48 (m)	23,4	23,4
2	1,67 (m)	34,7	34,8	16	1,31 (m)	28,6	28,6
3	3,96 (oct, 5,1/6,5/11,0/11,5)	66,5	66,5	17	1,20 (m)	56,3	56,3
4	1,21 (m)	39,4	39,4	18	0,81 (s)	12,9	12,9
5	-	82,1	82,1	19	0,87 (s)	18,2	18,2
6	6,23 (d, 8,5)	135,2	135,2	20	1,92 (m)	39,7	39,6
7	6,48 (d, 8,5)	130,7	130,8	21	0,90 (d, 6,9)	20,9	20,9
8	-	79,4	79,4	22	5,21 (dd, 7,5, 15,6)	135,4	135,4
9	1,47 (m)	51,1	51,2	23	5,14 (dd, 8,1, 15,6)	132,3	132,4
10	-	37,0	37,0	24	1,83 (m)	42,8	42,8
11	0,98 (d, 6,6)	20,6	20,7	25	2,30 (m)	33,1	33,1
12	2,0 (m)	36,9	37,03	26	0,80 (d, 6,8)	19,6	19,6
13	-	44,6	44,6	27	0,82 (d, 6,8)	19,9	19,9
14	1,57 (m)	51,7	51,8	28	1,00 (d, 6,6)	17,5	17,6

4.3.2 – Elucidação Estrutural das Substâncias Produzidas por Mc-7F

4.3.2.1 – Identificação Estrutural da Uracila (**11**)

O espectro de RMN de ^1H de (**11**) (Tabela 16: p. 89, Figura 142, p. 197) apresentou apenas dois sinais em δ_{H} 5,43 (1H, *d*, $J= 7,5$ Hz, H-5), e 7,35 (1H, *d*, $J= 7,5$ Hz, H-6).

A grande diferença de deslocamento químico observado para estes dois hidrogênios sugere que estejam em vizinhança química muito diferenciada, como em hidrogênios localizados nas posições α,β de uma carbonila α,β insaturada, com constantes de acoplamento características de uma dupla ligação em *cis*.

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 16: p. 89, Figura 143, p. 198) observados sinais em δ_{C} 151,5 (C-2), 164,3 (C-4), 100,2 (C-5) e 142,1 (C-6) destes, dois são quaternários e dois metínicos.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMBC (correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{gHMBC} - ^1J_{\text{CH}}$), (Tabela 16: p. 89, Figura 144, p. 199), foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

Através dos mapas de contorno dos experimentos de gHMBC (Figura 145, p. 200), onde foi possível visualizar as correlações a curta e longa distância $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ entre H-5 \leftrightarrow C-4/C-6 e H-6 \leftrightarrow C-2/C-4, comparação com dados da literatura (BLICHARSKA; KUPKA, 2002) permitiu atribuir para a substância (**11**) a estrutura da uracila (Figura 27, p. 89). Existe uma vasta literatura sobre atividades biológicas da uracila, mas sempre associada a outras moléculas como açúcares, aminoácidos, proteínas etc. Nos ensaios biológicos realizados não foi detectada nenhuma atividade.

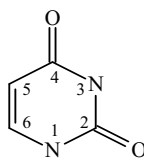


Figura 27: Estrutura da Uracila (**11**)

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e gCOSY da Uracila (**11**) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip., $J=$ Hz)	^{13}C	gHMBC	gCOSY
NH-1	10,95 (s)			
2		151,5		
NH-3	10,79 (s)			
4		164,3		
5	5,43 (d, 7,5)	100,2	C-4/C-6	H-6
6	7,35 (d, 7,5)	142,1	C-2/C-4/C-5	H-5

4.3.2.2 – Identificação Estrutural do *ciclo*-(S*-Pro-S*-Tyr) (**12**)

O espectro de RMN de ^1H de (**12**) (Tabela 17: p. 92, Figura 147, p. 202) apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,03 (2H, d, $J= 8,1$ Hz, H-2') e 6,62 (2H, d, $J= 8,3$ Hz, H3') indicando um sistema de anel aromático *para*-dissubstituído. A presença do sinal em δ_{C} 155,8 (C-4'). No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 17: p. 92, Figura 148, p. 203) indicou a presença de um grupo (-OH) ligado a carbono do anel aromático, evidenciando a presença do resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr). O espectro de gCOSY (Figura 151, p. 206) apresentou correlações entre os hidrogênios benzílicos H-10 \leftrightarrow H-9 (δ_{H} 2,94 e 4,23), demonstra a possibilidade da presença da unidade de Tyr. Considerando que os hidrogênios H-10 são diastereotópicos, a multiplicidade esperada seria de dois duplos dubletos o que é visualizado no espectro de RMN de ^1H (Tabela 17: p. 92, Figura 147, p. 202), tal fato é suportado pela observação em gHMQC duas correlações para este mesmo valor de carbono.

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 17: p. 92, Figura 148, p. 203) apresentou sinais em δ_{C} 165,0 (C-1) e 168,0 (C-7) indicando os grupos (CONH), que aliado aos deslocamentos químicos de RMN de ^1H em δ_{H} 4,03 (1H, ddl, $J= 6,4$ e 9,3 Hz, H-6) e 4,23 (1H, t, $J= 4,2$ Hz, H-9) conduziram a presença de um anel dicetopiperazínico (JAYATILAKE, et al., 1996)

Análise detalhada dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMQC, gCOSY e gHMBC (Figura 147 a Figura 150, pgs.202 a 205) evidenciaram a presença do resíduo Prolina (Pro) nesta molécula (JAYATILAKE, H. et al., 1996).

A análise dos mapas de contorno gHMQC de (**12**) permitiu atribuir os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono (Tabela 17: p. 92, Figura 149, p. 204).

O sinal em δ_{H} 7,78 (s) no experimento de RMN de ^1H foi atribuído ao (NH-8) uma vez que não apresentou correlação direta com o átomo de carbono em gHMQC, mas mostra correlação a longa distância por gHMBC com C-6 (δ_{C} 58,3) e C-1 (δ_{C} 165,0)

A configuração relativa de (**12**) foi atribuída com base na interação espacial observada no experimento de NOESY-1D (**Tabela 17**: p. 92, **Figura 152**, p. 207), entre H-6↔H-9 colocando-os no mesmo plano da molécula.

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 153**, p. 208), obtido através da técnica ESI-MS (+) apresentou o íon m/z 283, correspondente ao aduto $[M+Na]^+$ e o íon quasi molecular m/z 261, $[M+H]^+$. A massa calculada foi de 260, sugerindo à fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$.

Os dados espectrais foram comparados com a literatura (JAYATILAKE, H. et al., 1996) e permitiram identificar a substância (**12**) como *ciclo*-(S-Pro-S-Tyr). Esta substância é relatada como metabólito de diversos fungos e bactérias como por ex., *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria associada à esponja marinha *Isodictya seteira* (JAYATILAKE, et al., 1996). Os ensaios biológicos realizados apontam para uma atividade inibidora da acetilcolinesterase, mas sem atividade observada frente aos fungos fitopatogênicos.

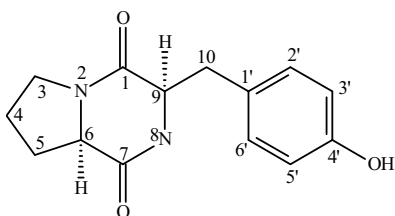


Figura 28: Estrutura *ciclo*-(S*-Pro-S*-Tyr) substância (**12**)

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e NOESY 1D da *ciclo*-(S^* -Pro- S^* -Tyr) (**12**) (DMSO- d_6 a 11,7 T).

Nº	^1H ppm (multip., $J=$ Hz)	^{13}C	gHMBC	NOESY 1D
1	-	165,0		
3	3,24 (qui, 5,7/6,5/11,5) 3,40 (dt, 8,0/11,5)	44,5	C-4	
4	1,70 (m)	21,8	C-3/C-5	
5	1,40 (sext, 9,3/9,7/11,0/12,5) 1,99 (sext, 5,1/6,3/6,4/12,5)	27,8	C-3	
6	4,03 (ddl, 6,4/9,3)	58,3	C-5/C-7	H-5/H4/H-9
7	-	168,8	-	
9	4,23 (tl, 4,5)	56,0	C-10/C-1'/C-1	H-10/H-6/H2'/NH-8
10	2,90 (dd, 4,5/14,0) 2,94 (dd, 4,5/14,0)	34,7	C-9/C-2'/C-1'/C-1	
1'	-	127,0		
2'	7,03 (d, 8,1)	130,7	C-4'/C-6'/C-3' e 5'/C-10	
3'	6,62 (d, 8,3)	114,7	C-1'/C-4'	
4'	-	155,8		
5'	6,62 (d, 8,3 Hz)	114,7	C-1'/C-4'	
6'	7,03 (d, 8,1Hz)	130,7	C4'/C-2'/C-3' e 5'/C-10	
NH-8	7,78 (s)		C-6	

4.3.2.3 – Identificação Estrutural do *ciclo*-(S^* -Pro- S^* -Val) (**13**)

A substância (**13**) foi submetida á 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 gHMQC (**Figura 156**, p. 211).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostrou a presença de dois hidrogênios em δ_{H} 4,10 (δ_{C} 58,2; 1H, tl, $J=$ 7,5 Hz, H-6) e δ_{H} 3,89 (δ_{C} 59,4; 1H, sl, H-9) e duas carbonilas em δ_{C} 165,1 e 170,1 característicos de anel dicetopiperazínico.

A presença de três multipletos (3,33; 3,40 e 1,75-1,85) referentes aos hidrogênios metilênicos, observados no espectro de RMN de ^1H (**Tabela 18**: p. 94, **Figura 154**, p. 209), aliado as correlações em gCOSY (**Figura 158**, p. 213) entre H-3 \leftrightarrow H-4 \leftrightarrow H-5 indicaram a presença do resíduo de aminoácido Prolina na estrutura (FDHILA et al., 2003).

O espectro de RMN de ^1H (**Tabela 18**: p. 94, **Figura 154**, p. 209) apresentou ainda dois dubletos em δ_{H} 0,84 (3H, d, $J=$ 6,7 Hz) e 1,00 (3H, d, $J=$ 7,2 Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) em multiplete em δ_{H} 2,30-2,36 (m, H-10) que foi atribuído a H-10. O espectro de gCOSY (**Figura 158**, p. 213), mostrou correlação dos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) com um hidrogênio metínico em δ_{H} 2,30-2,36 (m, H-10;

δ_C 27,7) e evidenciou uma unidade isopropila, indicando o aminoácido Valina como um dos componentes desta substância (**13**).

A ausência de correlação gHMQC (**Figura 156**, p. 211) do sinal em δ_H 7,91, evidenciou que este hidrogênio esteja ligado a átomos de nitrogênio ou oxigênio.

As correlações a longa distância observadas em gHMBC (**Tabela 18**: p. 94, **Figura 157**, p. 212) de δ_H 7,91 com os carbonos em δ_{C-6} 58,2 e δ_{C-7} 165,1, permitiram atribuir este deslocamento ao (NH-8).

Baseando-se nos espectros e nas correlações e nas correlações observadas nos experimentos uni e bidimensionais, foi proposto que a substância (**13**) é uma dicetopiperazina constituída pelos aminoácidos Prolina (Pro) e Valina (Val).

A configuração relativa de (**13**) foi determinada pela análise do espectro de NOESY-1D (**Tabela 18**: p. 94, **Figura 159**, p. 214) onde foi observada a interação espacial entre os hidrogênios H-9 \leftrightarrow H-6 colocando-os no mesmo plano espacial da molécula. Comparação com dados da literatura (FDHILA, et al., 2003), confirmou esta proposta.

O espectro de massas de baixa resolução ESI-MS (+) (**Figura 160**, p. 215), apresentou o pico do íon pseudo molecular com m/z 197 $[M+H]^+$ e pico em m/z 219, correspondente a formação do aduto com sódio $[M+Na]^+$. A massa calculada foi de 196, sugerindo à fórmula molecular $C_{10}H_{16}N_2O_2$ estão coerentes com a estrutura proposta (**Figura 29**, p. 93) confirmando.

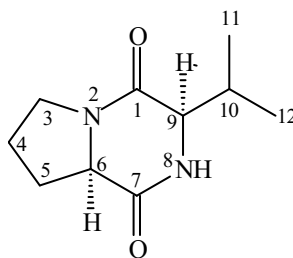


Figura 29: Estrutura da *ciclo*-(S*-Pro-S*-Val) para substância (**13**)

Há relato (GARCIA-PAJÓN; COLLADO, 2003) da produção deste metabólito pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* exatamente o mesmo fungo de onde foi isolada esta substância, e por outros fungos deste gênero. Esta substância é relatada como fitotóxica e como um bioerbicida em potencial. Nossos ensaios biológicos apontam para uma atividade inibidora da acetilcolinesterase e uma atividade mediana frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC e NOESY 1D da *ciclo-(S*-Pro-S*-Val)* (**13**) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip., J = Hz)	^{13}C ppm	gHMBC	NOESY 1D
1	-	170,1	-	
3	3,33 (m) 3,40 (m)	44,5	C-4/C-5/C-6	
4	1,75-1,85 (m)	22,0	C-5/C-3/C-6	
5	1,75-1,85 (m)	27,8	C-4/C-3/C-6	
6	4,10 (tl, 7,5)	58,2	C-5/C-1	3,89/2,10
7	-	165,1	-	
9	3,89 (sl)	59,4	C-12/C-10/C-7	4,10/2,30/1,00/0,84
10	2,10-2,15 (m) 2,30-2,36 (m)	27,7	C-12/C-11/C-1	
11	1,00 (d, 7,2)	18,2	C-12/C-10/C-9	
12	0,84 (d, 6,7)	16,4	C-11/C-10/C-9	
NH-8	7,90		C-6/C-7	

4.3.2.4 – Identificação Estrutural de Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (**14**)

A substância (**14**) foi submetida à espectrometria de massas (**Figura 166**, p. 221), utilizando-se a técnica ESI-MS (+) e apresentou o pico base m/z 107 indicando a formação do fragmento $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$. A massa calculada foi de 151, sugerindo à fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$.

O espectro de RMN de ^1H (**Tabela 19**: p. 95, **Figura 161**, p. 216) apresentou dois duplo tripletos em δ_{H} 7,15 (1H dt, J = 7,7 e 1,1 Hz, H-4) e 6,89 (1H, dt, J = 7,5 e 0,7 Hz, H-5), característico de sistema aromático orto substituído, ainda nesta região do espectro apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,28 (1H, d, J = 7,4 Hz, H-3) e 6,75 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-6) confirmando a existência do sistema aromático. Foi observado também um sinal em δ_{H} 2,73 (2H, d, J = 15,0 Hz H-7), característico de grupo metilênico vizinho a carbonos quaternários.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 19**: p. 95, **Figura 162**, p. 217) apresentou um sinal em δ_{C} 178,2 (C-8) característico de carbonila ácida, e sinais dos carbonos aromáticos em δ_{C} 134,0 (C-1), 142,2 (C-2), 123,8 (C-3), 128,7 (C-4), 121,1 (C-5), e 109,2 (C-6). O espectro mostrou ainda um sinal em δ_{C} 41,8 (C-7) característico de carbono benzílico α carbonílico.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - gHMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$), (**Tabela 19**: p. 95), pudemos atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

Através dos experimentos bidimensionais de gHMBC (**Tabela 19**: p. 95, **Figura 164**, p. 219) foi possível visualizar as correlações a curta e longa distância $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ entre H-3 \leftrightarrow C-2/C-4, H-4 \leftrightarrow C-3/C-2, H-5 \leftrightarrow C-1/C-6, H-6 \leftrightarrow C-1/C-5 e H-7 \leftrightarrow C-8. Estes dados aliados aos deslocamentos dos carbonos e hidrogênios permitiram propor a estrutura da substância (**14**) como sendo o Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (**Figura 30**, p. 95). Nenhum relato de atividade biológica foi encontrado na literatura, sendo que em nossos ensaios também não foi observada nenhuma atividade frente aos fungos patogênicos, mas a apresentou atividade inibidora da acetilcolinesterase.

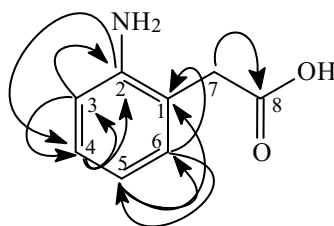


Figura 30: Estrutura da Ácido-(2-Amino-fenil)-acético para substância (**14**)

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (**14**) (DMSO- d_6 a 11,7 T).

Nº	^1H ppm (multip., J = Hz)	^{13}C , ppm	gHMBC
1		134,0	
2	-	142,2	
3	7,28 (d, 7,4)	123,8	C-2/C-4
4	7,15 (ddd, 7,6/7,8/1,1)	128,7	C-2/C-3
5	6,89 (ddd, 7,4/7,6/0,7)	121,1	C-1/C-6
6	6,75 (d, 7,8)	109,2	C-1/C-5
7	2,73 (d, 15,0)	41,8	C-8
8		178,2	

4.3.2.5 – Identificação Estrutural de Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (**15**)

A substância (**15**) foi submetida à espectrometria de massas baixa resolução (**Figura 172**, p. 227), utilizando-se a técnica ESI-MS (+) e apresentou o pico com m/z 175, correspondente ao aduto com sódio $[M+Na]^+$, o pico em 197 (100%) pode corresponder a troca do hidrogênio ácido por sódio apresentando-se como um sal sódico formando aduto com sódio $[NaM+Na]^+$. A massa calculada foi de 152 sugerindo a fórmula molecular $C_8H_8O_3$.

O espectro de RMN de 1H (**Tabela 20**: p. 97, **Figura 167**, p. 222) apresentou dois dubletos em 7,02 (2H, d, $J= 8,5$ Hz, H-2/H-6) e 6,68 (2H, d, $J= 8,5$ Hz, H-3/5), característicos de sistema aromático *para*-substituído. O espectro apresentou ainda um singlete em δ_H 3,40 (s) que foi atribuído a um metileno benzílico com ajuda do experimento de DEPT (**Figura 169**, p. 224)

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 20**: p. 97, **Figura 168**, p. 223), apresentou um sinal em δ_C 156,0 (C-4) característico de carbono fenólico, dois sinais em δ_C 130,2 (C-2/6) e δ_C 115,1 (C-3/5) atribuídos a dois carbonos metínico sp^2 e uma carbonila em δ_C 173,2 que foi visualizada no experimento de gHMBC (**Tabela 20**: p. 97, **Figura 171**, p. 226).

Pela análise conjunta dos dados de RMN de 1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1H \times ^{13}C - gHMQC - ^1J_{CH}$), (**Tabela 20**: p. 97, **Figura 170**, p. 225), foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

As correlações observadas nos experimentos bidimensionais de gHMBC (**Tabela 20**: p. 97, **Figura 171**, p. 226), a curta e longa distância $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ entre H-7 \leftrightarrow C-1/C-2/C-8, e H-2/6 \leftrightarrow (C-3/5)/C-4/C-7 e H-3/5 \leftrightarrow C-1/C-4, permitiu propor a estrutura da substância (**15**) (**Figura 31**, p. 97) como sendo o ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético. Esta substância avaliada em conjunto com mais 20 substâncias extraídas da planta *Vulpia myuros*, apresenta atividade alelopática mediana e colabora para a atividade do extrato da planta 2,63% de atividade (AN; PRATLEY; HAIG, 2001).

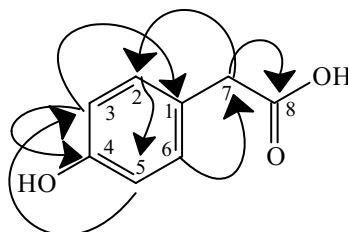


Figura 31: Estrutura da Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético para substância (15)

Tabela 20: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip., J = Hz)	^{13}C , ppm	gHMBC
1	-	125,2	
2	7,02 (d, 8,5)	130,2	C-3 e 5/C-4/C-6/C-7
3	6,68 (d, 8,5)	115,1	C-1/C-4/C-5
4	-	156,0	-
5	6,68 (d, 8,5)	115,1	C-1/C-3/C-4
6	7,02 (d, 8,5)	130,2	C-2/C-3 e 5/C-4/C-7
7	3,40 (s)	40,1	C-1/C-2/C-8
8	-	173,2	-

4.3.2.6 – Identificação Estrutural de 4-Hidroxi-benzamida (16)

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 21: p. 98, Figura 173, p. 228) apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,79 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-3/5) e 7,76 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2/6), com multiplicidades e constantes de acoplamento características de sistema aromático *para* substituído.

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 21: p. 98, Figura 174, p. 229), apresentou um sinal em δ_{C} 161,3 (C-4) característico de carbono fenólico. Os sinais dos carbonos em δ_{C} 131,3 (C-2/6) e 115,0 (C-3/5) apresentaram o dobro da intensidade, confirmando a presença de um sistema aromático *para*-substituído.

Pela análise do experimento de gHMBC (Tabela 21: p. 98, Figura 176, p. 231) foi visualizado um carbono δ_{C} 167,1 atribuído a uma carbonila de amida.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - gHMQC - $^1J_{\text{CH}}$), (Tabela 21: p. 98, Figura 175, p. 230), foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

As correlações observadas nos experimentos bidimensionais de gHMBC (**Tabela 21**: p. 98, **Figura 176**, p. 231), permitiu visualizar as correlações a curta e longa distância $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ entre H-2/6 \leftrightarrow C-4/C-7 e entre H-3/5 \leftrightarrow C-1/C-4 apontando a presença de um carbono aromático em δ_C 122,0 (C-1), Estes dados em conjunto com os deslocamentos dos carbonos e hidrogênios, permitiu propor a estrutura da substância (**16**) como sendo a 4-Hidroxi-benzamida (**Figura 32**, p. 98). Segundo Thakur, et al., 2004 esta substância tem atividade media frente células leucêmicas “in vitro” confirmando a atividade teórica em QSAR.

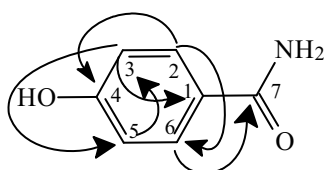


Figura 32: Estrutura da 4-Hidroxi-benzamida para substância (**16**)

Tabela 21: Dados de RMN de 1H , ^{13}C e gHMBC 4-Hidroxi-benzamida (**16**) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	1H ppm (multip., $J=$ Hz)	^{13}C	gHMBC	COSY
1	-	122,0		
2	7,76 (d, 8,6)	131,3	C-4/C-6/C-7	H-3 e 5
3	6,79 (d, 8,5)	115,0	C-1/ C-4/C-5	H-2 e 6
4	-	161,3	-	
5	6,79 (d, 8,5)	115,0	C-1/C-3/C-4	H-2 e 6
6	7,76 (d, 8,6)	131,3	C-2 e 6/C-4/C-7	H-3 e 5
7	-	167,1		

4.3.2.7 – Identificação Estrutural do Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (**17**)

A substância (**17**) foi submetida à espectrometria de massas de baixa resolução (**Figura 182**, p. 237), utilizando-se a técnica ESI-MS (+), e apresentou o pico com m/z 191, indicando a formação do aduto com potássio $[M+K]^+$, foi observado ainda a formação do aduto com sódio em 175 $[M+Na]^+$ e a presença do sal sódico com aduto com sódio em 197 (100%) $[NaM+Na]^+$. A massa calculada foi de 152 sugerendo a fórmula molecular $C_8H_8O_3$.

O espectro de RMN de 1H (**Tabela 22**: p. 100, **Figura 177**, p. 232) apresentou um duplo dubleto em δ_H 7,07 (1H, dd, $J=$ 1,2 e 7,5 Hz, H-3), um duplo tripleto em δ_H 7,03 (1H, dt, $J=$ 1,6 e 7,5 Hz, H-4), um tripleto em δ_H 6,70 (1H, t, $J=$ 7,5 Hz, H-5) e um dubleto em δ_H 6,76

(1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-6), característicos de sistema aromático *orto*-substituído. O espectro apresentou ainda um singlete em $\delta_{\text{H}} 3,45$ (2H, s, H-7) o que com o auxílio dos experimentos de RMN de ^{13}C e DEPT (**Figura 179**, p. 234) demonstrou se tratar de um CH_2 , carbinólico benzílico.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 22**: p. 100, **Figura 178**, p. 233) apresentou um sinal em $\delta_{\text{C}} 172,8$ (C-8) característico de carbonila de ácido, quatro carbonos metínicos sp^2 em $\delta_{\text{C}} 131,0$ (C-3), 127,7 (C-4), 114,8 (C-5) 118,7 (C-6) e dois carbonos quaternários em $\delta_{\text{C}} 121,9$ (C-1) e 155,4 (C-2) característicos de anel aromático *orto*-substituído. Foi visualizado também um metileno em $\delta_{\text{C}} 35,5$ atribuído à C-7.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - gHMQC - $^1J_{\text{CH}}$), (**Tabela 22**: p. 100, **Figura 180**, p. 235), foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

As correlações observadas nos experimentos bidimensionais de gHMBC (**Tabela 22**: p. 100, **Figura 181**, p. 236), permitiu visualizar as correlações a curta e longa distância $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ entre H-3 \leftrightarrow C-2/C-4, H-4 \leftrightarrow C-2/C-3, H-5 \leftrightarrow C-1/C-4, H-6 \leftrightarrow C-1/C-2/C-7 e H-7 \leftrightarrow C-1/C-2/C-3/C-8. Estes dados, em conjunto com os deslocamentos e multiplicidades características dos carbonos e hidrogênios permitiu propor a estrutura da substância (**17**) como sendo o Ácido-(2-hidroxi-fenil)-acético (**Figura 33**, p. 99). Apesar de não se ter encontrado dados sobre atividade biológica desta substância na literatura esta apresentou uma forte atividade frente *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* e atividade inibidora da acetilcolinesterase.

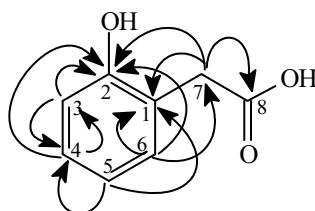


Figura 33: Estrutura da Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético para substância (**17**)

Tabela 22: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (**17**) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip., $J=$ Hz)	^{13}C	gHMBC
1	-	121,9	-
2	-	155,4	-
3	7,07 (dd, 1,6 e 7,5)	131,0	C-2/C-4
4	7,03 (dt, 1,6 e 7,5)	127,7	C-2/C-3
5	6,70 (t, 7,5)	114,8	C-1/C-4
6	6,76 (d, 8,0)	118,7	C-1/C-2/C-7
7	3,45 (s)	35,5	C-1/C-2/C-3/ C-8
8	-	172,8	-

4.3.2.8 – Elucidação Estrutural de (**18**)

A substância (**18**) foi submetida à espectrometria de massas de alta resolução (**Figura 190**, p. 245), através técnica ESI-MS (+) e apresentou o pico do íon molecular m/z 265,119 sugerindo ser o íon *quasi* molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, e a fragmentação em 212,080 sugerindo que o fragmento formou aduto com potássio $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}+\text{K}]^+$. A massa calculada foi de 264,126 sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$.

O espectro de RMN de ^1H (**Tabela 23:** p. 102, **Figura 183**, p. 238) apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,36 (1H, d, $J=$ 8,0 Hz, H-6) e 7,49 (1H, d, $J=$ 8,0 Hz, H-9) e dois tripletos largos em δ_{H} 7,08 (1H, tl, $J=$ 7,6 Hz, H-7) e 6,99 (1H, tl, $J=$ 7,6 Hz, H-8), que foram atribuídos a um anel aromático dissubstituído em posição *orto*.

Os outros sinais em δ_{H} 7,27 (2H, m, H-14/18), 7,30 (2H, m, H-15/17), e 7,24 (1H, m, H-16), foram atribuídos ao sistema aromático mono-substituído. Foram observados ainda dois singletos em δ_{H} 3,74 (3H, s, H-11) com valor característico de hidrogênio metílico ligado ao nitrogênio e δ_{H} 3,60 (2H, s, H-12), atribuído ao hidrogênio metilênico ligado a carbono α carbonílico de amida α anel aromático. O singlete em δ_{H} 10,90 (s), foi atribuído a NH .

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 23:** p. 102, **Figura 184**, p. 239) apresentou 18 sinais de carbonos sendo 12 auferidos aos anéis aromáticos com deslocamentos em δ_{C} 129,7 (C-4), 136,1 (C-5), 111,4 (C-6), 121,0 (C-7), 118,5 (C-8), 118,4 (C-9), 130,2 (C-13), 129,7 (C-14/18), 128,3 (C-15/17), 124,0 (C-16). Observou-se ainda um sinal em δ_{C} 172,0 (C-10) pode ser de carbonila de amida e outros sinais em δ_{C} 51,5 (C-12) e 30,5 (C-11) que com o

auxílio dos experimentos de DEPT (**Figura 185**, p. 240) demonstrou se tratar de uma metila ligada a nitrogênio e um CH₂ α carbonila de amida.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ¹H, ¹³C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas ¹H x ¹³C - gHMQC - ¹J_{CH}) (**Tabela 23**: p. 102, **Figura 186**, p. 241) todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono.

Com base em todos os dados obtidos e uma criteriosa análise nos mapas de contorno dos experimentos bidimensionais gHMBC (**Tabela 23**: p. 102, **Figura 187**, p. 242), foi possível propor as estruturas parciais A e B para a substância (**18**) (**Figura 34**, p. 101).

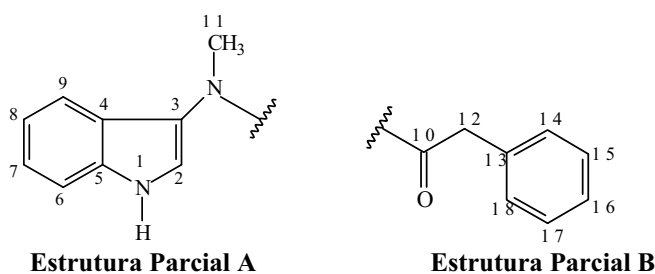


Figura 34: Estruturas Parciais A e B da Substância (**18**)

A conexão entre as estruturas parciais A e B foi realizada com auxílio do experimento bidimensional gHMBC (**Tabela 23**: p. 102, **Figura 187**, p. 242) com o qual foi possível visualizar a correlação a longa distância ²J_{CH} e ³J_{CH} entre H-11 ↔ C-10 e H-11 ↔ C-3/C-2. Deste modo foi possível propor para a substância (**18**) (**Figura 35**, p. 102) como sendo uma substância inédita de acordo com o sistema SciFinder Scholar na data de 10 de agosto de 2007.

A localização dos hidrogênios H-11 e H-12 foi estabelecida com base nas informações obtidas no espectro unidimensional de NOESY-1D e gHMBC (**Tabela 23**: p. 102, **Figura 189**, p. 244 e **Figura 187**, p. 242).

7,18 (1H, m, H-17) e δ_{H} 7,22 (1H, m, H-10). O singlete em δ_{H} 3,70 (3H, s, H-10) corresponde aos hidrogênios metilênicos α carbonila, o tripleto em δ_{H} 2,87 (2H, t, 6,8 Hz, H-13), corresponde ao metileno benzílico um duplo tripleto em δ_{H} 4,24 (2H, dt $J= 1,2$ e 6,8 Hz, H-12), corresponde a outro metileno com deslocamento característico de hidrogênios ligados a carbono carbinólico. Observou-se ainda o singlete δ_{H} 10,90, atribuído a -NH.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 24:** p. 104, **Figura 192,** p. 247) apresentou 19 sinais de carbono onde 6 foram auferidos a anel aromático *orto* substituído em δ_{C} 126,3 (C-4), 136,1 (C-5), 111,4 (C-6), 121,0 (C-7), 118,50 (C-8) e 118,4 (C-9) e 6 foram auferidos ao anel aromático mono-substituído em δ_{C} 138,0 (C-14), e 124,0 (C-17) destes, dois com intensidades duplicadas correspondendo aos carbonos em δ_{C} 128,8 (C-15/19), 128,3 (C-16/18). O espectro apresentou ainda um sinal em δ_{C} 171,4 (C-11) sugerindo ser uma carbonila de éster e um sinal em δ_{C} 64,6 (C-12), característico de carbono metilênico ligado a oxigênio. Os sinais em δ_{C} 34,3 (13) e 30,8 (10) correspondem aos grupos metilênico e metílico ligados em carbonos sp^2 , com o auxílio dos experimentos de DEPT (**Figura 193,** p. 248) foi possível atribuir todos os carbonos metilênicos.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - gHMQC - $^1J_{\text{CH}}$) (**Tabela 24:** p. 104, **Figura 194,** p. 248) todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono. Com base em todos os dados obtidos e uma criteriosa análise nos mapas de contorno dos experimentos bidimensionais gHMBC (**Tabela 24:** p. 104, **Figura 195,** p. 250) foi possível visualizar a correlação a longa distância $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ entre H-12 \leftrightarrow C-11, e definiu a conexão entre as estruturas parciais A e B (**Figura 36,** p. 104). Deste modo foi possível propor para a substância em questão a estrutura (**19**) (**Figura 37,** p. 104), inédita segundo o sistema SciFinder Scholar, na data de 10 de agosto de 2007

A localização dos hidrogênios H-2, H-10 e H-12 foi estabelecida com base nas informações obtidas no espectro unidimensional de NOESY-1D (Tabela 24: p. 104, Figura 197, p. 252)

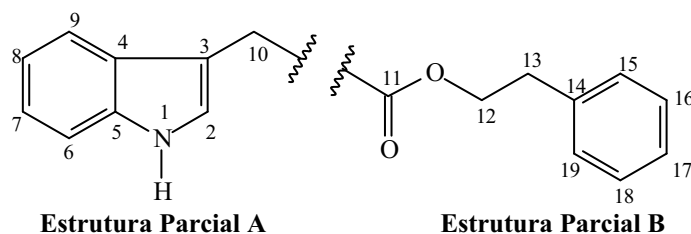


Figura 36: Estruturas Parciais A e B da Substância (19)

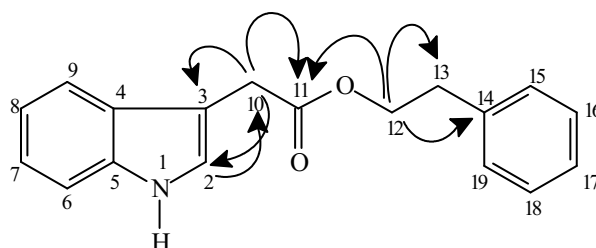


Figura 37: Principais correlações observadas em gHMBC para a substância (19)

Tabela 24: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e gHMBC da Substância (19) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip., $J=$ Hz)	^{13}C	gHMBC	NOESY 1D
2	7,18 (m)	127,0	C-10	
3	-	106,9	-	
4	-	126,3	-	
5	-	136,1	-	
6	7,35 (d, 8,0)	111,4	C-2/C-8	
7	7,08 (t, 7,5)	121,0	C-5/C-8	
8	6,97 (t, 7,5)	118,5	C-4/C-6	
9	7,42 (d, 8,0)	118,4	C-5/C-7	
10	3,70 (s)	30,8	C-2/C-3/C-11	H-2/H-9
11	-	171,4	-	
12	4,24 (dt, 1,2/6,8)	64,6	C-11/C-13/C-14	H-13/H-15
13	2,87 (t, 6,8)	34,4	C-12/ C-14/C-15/C-19	H-12/H-2
14	-	138,0	-	
15	7,14 (d, 6,7)	128,8	C-13/C-15 e 19	
16	7,26 (d, 7,5)	128,3	C-14/C-16 e 18	
17	7,18 (m)	124,0	-	
18	7,26 (d, 7,5)	128,3	C-14/C16/C-18	
19	7,14 (d, 6,7)	128,8	C-13/C-15/C-19	
	10,90 (s)	N	C-6	H-2/H-6

4.3.3 – Elucidação Estrutural da Substância Produzida por *Mc-3C Xylaria* sp.

4.3.3.1 – Identificação Estrutural do diácido Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (**20**)

A substância (**20**) foi submetida à espectrometria de massas (**Figura 205**, p. 260) com a técnica ESI-MS (+) e apresentou o pico m/z 237 (100%) indicando a formação do aduto $[M+Na]^+$. A massa calculada foi de 214 sugerindo a fórmula molecular $C_{11}H_{18}O_4$.

O espectro de RMN de 1H (**Tabela 25**: p. 106, **Figura 199**, p. 254) apresentou sinais em δ_H 1,28 (2H, m, H-2') e δ_H 2,20 (2H, m, H3') referentes aos hidrogênios alifáticos, um tripleto em δ_H 0,87 (3H, t, $J= 7,1$ Hz, H-6') referente à metila terminal e um quinteto em δ_H 1,47 (2H, qui, $J= 7,2$ Hz, H-4') pertencente à cadeia lateral hexilideno. O quarteto em δ_H 3,59 (1H, q, $J = 7,1$ Hz, H-3) e o dubleto em δ_H 1,32 (3H, d, $J= 7,0$ Hz, H-Me (3)) tem multiplicidades e constantes de acoplamento característicos as posições onde foram atribuídos.

A configuração da insaturação $\Delta^{2,1'}$ foi estabelecida com base na fórmula de Pascual (PASCUAL; MEIER; SIMON, 1966) que atribuiu valores de deslocamento químico para o hidrogênio olefínico em aproximadamente δ_H 6,8 e δ_H 6,2 ppm que correspondem as formas *E* e *Z*, respectivamente (ANDERSON; EDWARDS; WHALLEY, 1985). Para (**20**), o deslocamento químico de H-1' em δ_H 6,97, sugere a configuração *E*.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 25**: p. 106, **Figura 200**, p. 255) mostraram sinais característicos de carbonilas ácidas em δ_C 171,0 (C-1) e 179,0 (C-4). Os sinais em δ_C 31,5 (C-2'), 28,8 (C-3'), 28,1 (C-4') e 22,4 (C-5'), foram atribuídos as suas posições, baseado em seus deslocamentos e dados obtidos nos espectros de DEPT (**Figura 201**, p. 256), os sinais em δ_C 15,5 (MeC-3) e 13,9 (C-6') tem valores e multiplicidades característicos de metila vicinal a carbono metínico e metilênico respectivamente.

Pela análise conjunta dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno gHMQC (correlações diretas $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - gHMQC - $^1J_{\text{CH}}$ (Tabela 25: p. 106, Figura 202, p. 257) todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono.

Com base em todos os dados obtidos e uma criteriosa análise nos mapas de contorno dos experimentos bidimensionais gHMBC (Tabela 25: p. 106, Figura 203, p. 258) foi possível visualizar a correlação a longa distância $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ entre H-3 \leftrightarrow C-Me (3)/C-2/C-1'/C-1/C-4 e H-Me (3) \leftrightarrow C-3/C-2/C-4 o confirma a posição do carbono metílico Me(3). Observou-se ainda as correlações entre H-1' \leftrightarrow C-1/ C-2/ C-3/C-4', H-3' \leftrightarrow C-4'/C-2/C-1', H-4' \leftrightarrow C-1'/C-6' e H-6' \leftrightarrow C-5'/C-2'.

Uma análise das correlações feitas a partir das correlações citadas e gCOSY (Tabela 25: p. 106, Figura 204, p. 259) permitiu propor a estrutura para este diácido (20) como sendo o Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (Figura 38, p. 106).

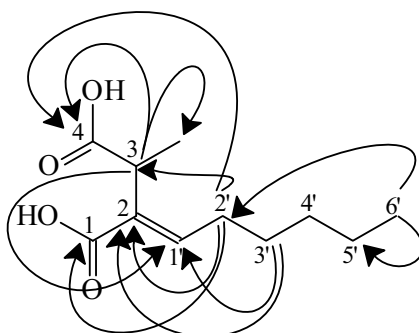


Figura 38: Estrutura do Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (20)

Tabela 25: Dados de RMN ^1H , ^{13}C , gHMBC, e gCOSY do Ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico (20) (CDCl_3 , a 11,7 T)

Nº	^1H ppm (multip., J = Hz)	^{13}C (ppm)	gHMBC	COSY
1	-	171,0	-	-
2	-	131,3	-	-
3	3,59 (q, 7,1)	37,5	C-Me(3)/C-2/C-1'/C-1/C-4	H-4'/H-2'
4	-	179,0	-	-
1'	6,97 (t, 7,7)	146,9	C-4'/C-3/-2/-1	H-3'
2'	1,28 (m)	31,5	-	-
3'	2,20 (m)	28,8	C-4'/C-2/C-1'	H-4'
4'	1,47 (qui, 7,2)	28,1	C-6'/C-1'	H-3'
5'	1,27 (m)	22,4	-	-
6'	0,87 (t, 7,1)	13,9	C-5'/C-2'	H2'
Me (3)	1,32 (d, 7,1)	15,5	C-3/C-2/C-4	-

4.4 – Atividade Biológica das Frações e Substâncias Isoladas de Mc-7F e Mc-8R.

4.4.1 – Avaliação da Atividade Antifúngica de (1) a (19) Frente aos Fungos

Fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*

As substâncias de (1) a (19) foram isoladas do extrato do fungo Mc-7F (*Colletotrichum gloeosporioides*) e Mc-8R e testadas contra aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, (Tabela 26: p. 107). As substâncias (1), (2), (3), (5), (6) e (8) apresentaram forte atividade contra os dois fungos, enquanto a substância (7) e (4) apresentaram forte atividade frente *C. cladosporioides* e média frente *C. sphaerospermum*, a substância (9) mostrou-se inativa. As substâncias (16), (17) e (18) apresentaram forte atividade frente os fungos fitopatogênicos, à substância (15) apresentou forte atividade apenas com *C. cladosporioides* e média frente *C. sphaerospermum*, a substância (19) apresentou atividade média com ambos os fungos e a substância (13) apresentou fraca atividade também com ambos os fungos, todas as outras substâncias foram inativas (Tabela 26: p. 107) o que pode ser melhor visualizado no Gráfico 02 (Figura 39:, p. 108).

Tabela 26: Resultados da atividade antifúngica das substâncias isoladas do extrato de Mc-7F *Colletotrichum gloeosporioides* e Mc-8R.

Substância	Quantidade	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
		Potencial	Potencial
Pirenocinas A e B (1) e (3)	100 µg	***/**	***/**
Pirenocinas A, E e B (1), (2) e (3)	100 µg	***/**	***/**
Pirenocinas A, e E (1) e (2)	100 µg	***/**/*	***/**/*
Ác Pirenochaético C (4)	100 µg	***/**/*	**
Ác Pirenochaético A (5)	100 µg	**/**	**/**
Ácido Pirenochaético B (6)	100 µg	***/*/**	***/*/**
Ácido Pirenochaético (7)	100 µg	***	**
Ácido Pirenochaético (8)	100 µg	**	***/**/*
Ergosterol (9)	100 µg	i	i
Uracila (11)	100 µg	i	i
ciclo-(S*-Pro-S*-Tyr) (12)	100 µg	i	i
ciclo-(S*-Pro-S*-Val) (13)	100 µg	*	*
Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (14)	100 µg	*	i
Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15)	100 µg	***	**
4-Hidroxi-benzamida (16)	100 µg	***	***
Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17)	100 µg	***	***
Inédita (18)	100 µg	***	***
Inédita (19)	100 µg	***	***
Nistatina	100 µg	***	***

Atividade fraca = * Média atividade = ** Atividade forte = *** inativo = i

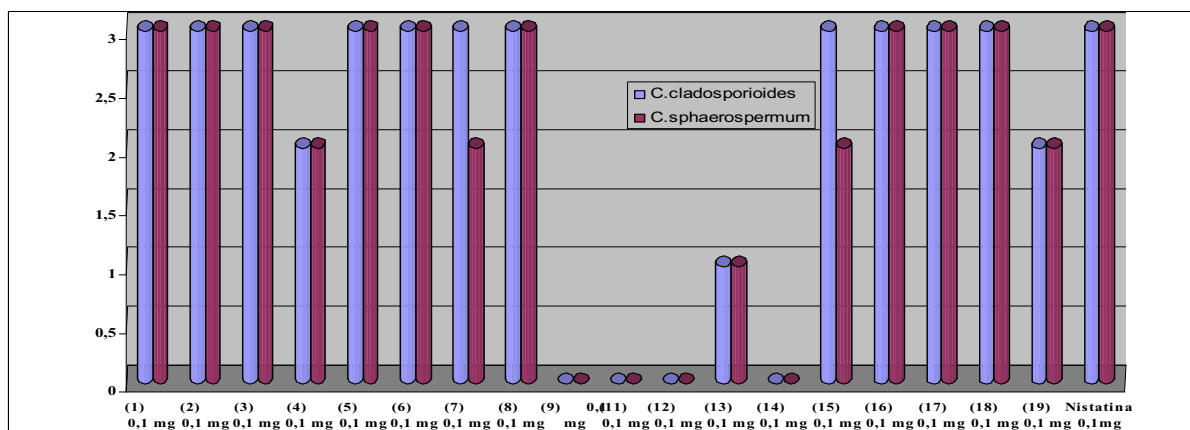


Figura 39: Gráfico 2: Atividade antifúngica das substâncias (1) a (19) frente os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*

Através destes resultados as Substâncias (13), (15), (16), (17), (18) e (19) foram submetidas aos ensaios frente os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* em limite de detecção, estes resultados demonstraram quantidade mínima inibitória de cada substância. Verificou-se que as substâncias (18) e (19) apresentaram as atividades promissoras, podendo ser melhor visualizadas nas Tabela 27: e Tabela 28: pgs. 108 e 109, Gráficos 03 e 04 (Figura 40: e Figura 41:, pgs. 108 e 109).

Tabela 27: Resultados da atividade antifúngica em limite de detecção das substâncias isoladas do extrato de Mc-7F frente o fungo *Cladosporium cladosporioides*

Amostras	100 µg	50 µg	25 µg	10 µg	5 µg	1 µg
ciclo-(S*-Pro-S*-Val) (13)	*	i	I	i	i	i
Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15)	**	i	I	i	i	i
4-Hidroxi-benzamida (16)	***	*	I	i	i	i
Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17)	***	**	*	i	i	i
Inédita (18)	***	***	**	**	**	i
Inédita (19)	**	**	*	*	*	*
Nistatina	***	***	***	***	***	***

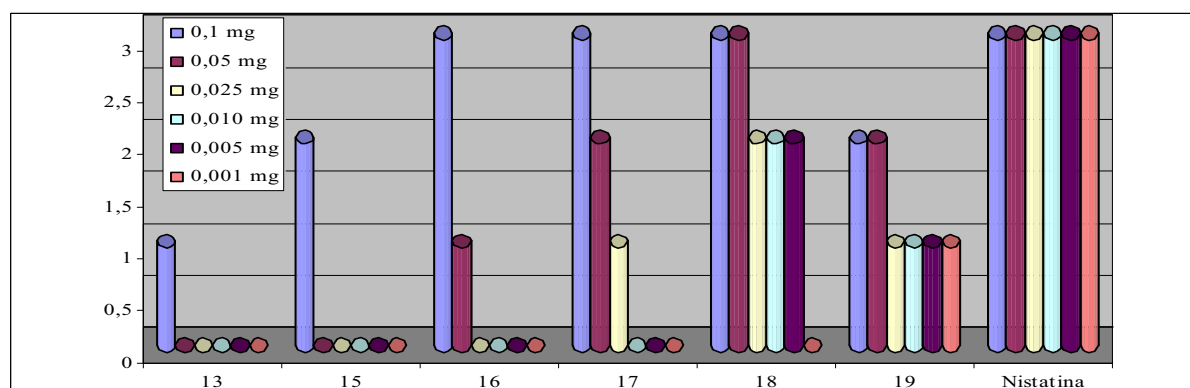
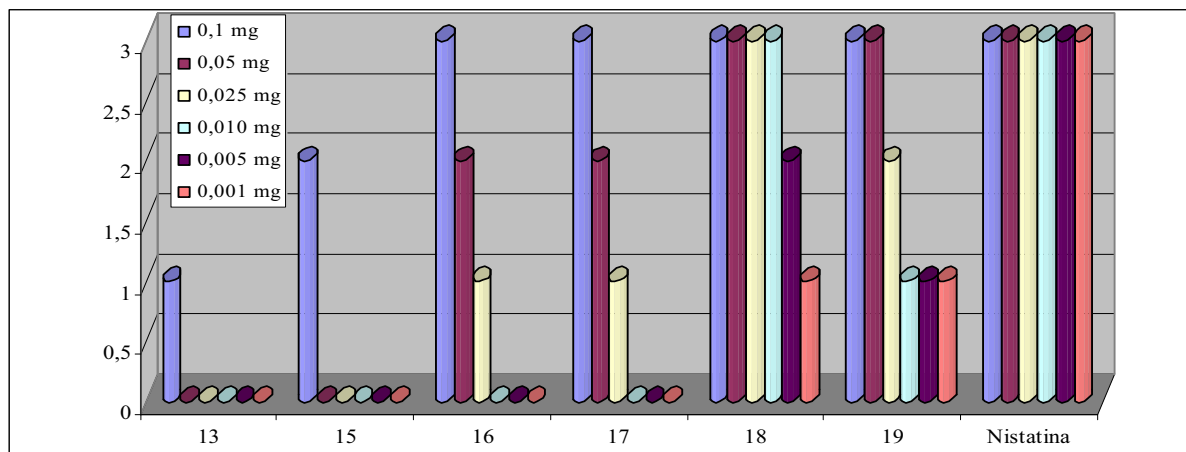


Figura 40: Gráfico 3: Atividade antifúngica das substâncias isoladas de Mc-7F frente os fungos *Cladosporium cladosporioides* em limite de detecção

Tabela 28: Resultados da atividade antifúngica em limite de detecção das substâncias isoladas do extrato de Mc-7F frente o fungo *Cladosporium sphaerospermum*

Amostras	100 µg	50 µg	25 µg	10 µg	5 µg	1 µg
ciclo-(S*-Pro-S*-Val) (13)	*	i	I	i	i	i
Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15)	**	i	I	i	i	i
4-Hidroxi-benzamida (16)	***	**	*	i	i	i
Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17)	***	**	*	i	i	i
Inédita (18)	***	***	***	***	**	*
Inédita (19)	***	***	**	*	*	*
Nistatina	***	***	***	***	***	***

**Figura 41:** Gráfico 4: Atividade antifúngica das substâncias isoladas de Mc-7F frente os fungos *Cladosporium sphaerospermum* em limite de detecção

4.4.2– Avaliação da Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase de (1) a (19) de Mc-7F (*Colletotrichum gloeosporioides*) e Mc-8R.

Das substâncias isoladas de Mc-8R (1) a (9) 60% apresentaram atividade inibidora da acetilcolinesterase. Estes resultados indicam que o fungo em questão pode ser promissor na produção de substâncias bioativas e serão melhor visualizados na (Tabela 29: p. 110); Gráfico 05 (Figura 42:, p. 110). Para as substâncias de (11) a (19) isoladas de Mc-7F os resultados mostraram-se ainda mais promissores e 80% das substâncias apresentaram atividade inibidora da acetilcolinesterase. Estes resultados são visualizados na (Tabela 29: p. 110); Gráfico 06 (Figura 42:, p. 110).

Tabela 29: Resultados dos ensaios de inibição da acetilcolinesterase das substâncias isoladas.

Substâncias	Dose µg	rf
Pirenocinas A e B (1) e (3)	200	-
Pirenocinas A, E e B (1), (2) e (3)	200	-
Pirenocinas A, e E (1) e (2)	200	-
Ác Pirenochaético C (4)	200	0,15
Ác Pirenochaético A (5)	200	0,14
Ácido Pirenochaético B (6)	200	0,14
Ácido Pirenochaético (7)	200	0,03
Ácido Pirenochaético (8)	200	0,03
Ergosterol (9)	200	-
Uracila (11)	200	-
ciclo-(S*-Pro-S*-Tyr) (12)	200	0,93
ciclo-(S*-Pro-S*-Val) (13)	200	0,89
Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (14)	200	0,92
Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (15)	200	0,84
4-Hidroxi-benzamida (16)	200	0,86
Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (17)	200	0,69
Inédita (18)	200	0,89
Inédita (19)	200	0,92 / 0,86

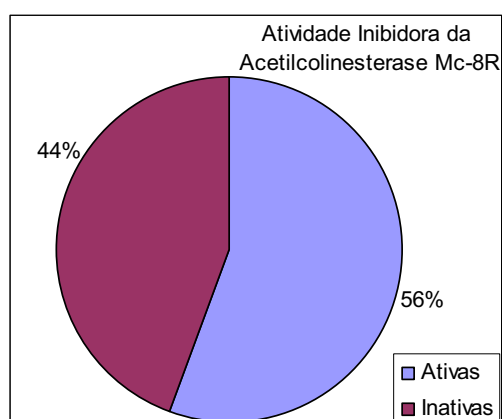


Gráfico 5

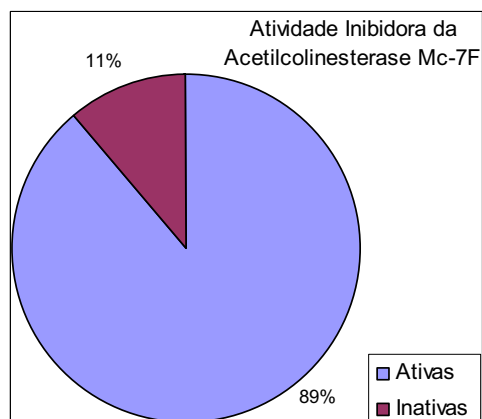


Gráfico 6

Figura 42: Gráfico 5 e 6: Atividade inibidora da acetilcolinesterase das substâncias isoladas de Mc-8R e Mc-7F

Após análise de todos os resultados das atividades biológicas pode-se observar que tanto o fungo Mc-8R quanto o fungo Mc-7F são endofíticos com um potencial grande na produção de metabólitos bioativos. Observa-se que a produção de ácidos é uma ocorrência comum nos endofíticos isolados de *Michelia champaca*.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho desenvolvido com a espécie vegetal de *M. champaca* conduziu ao isolamento e purificação de oito fungos endofíticos, que foram cultivados em meio líquido CDB e forneceram os respectivos extratos brutos. A metodologia para triagem, desenvolvida pelo grupo, para avaliar o perfil químico por RMN¹H e CLAE-DAD e a bioatividade frente aos ensaios específicos, foi fundamental para a seleção dos extratos brutos estudados.

Todos os extratos brutos apresentaram atividade, variando de fraca a forte, contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, 40% apresentaram atividade seletiva frente às linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e 87,5% atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.

A triagem química e biológica do fungo endofítico Mc-8R, seguido do estudo químico resultou no isolamento de substâncias com diversidade estrutural notável como as pironas, Pirenocina A (**1**), E (**2**), B (**3**), dos Ácidos Pirenochaéticos C (**4**), A (**5**), B (**6**), (**7**) e (**8**), os dois últimos inéditos, do Ergosterol (**9**) e Peróxido de Ergosterol (**10**). Do endófito Mc-7F, foram isolados e identificados a Uracila (**11**), as dicetopiperazinas, *ciclo*-(S*-Pro-S*-Tyr) (**12**) e *ciclo*-(S*-Pro-S*-Val) (**13**), Ácido-(2-Amino-fenil)-acético (**14**), Ácido-(4-Hidroxi-fenil)-acético (**15**), 4-H droxi-benzamida (**16**) e Ácido-(2-Hidroxi fenil)-acético (**17**), e dois derivados indólicos, ainda não descritos na literatura (**18**) e (**19**). Também foi possível identificar nos extratos brutos produzidos por Mc-3C e Mc-6F, os Ácidos 2- hexilideno-3-metilsuccínico (**20**) e o ácido 3-nitropropiónico (**21**), respectivamente.

Os resultados obtidos com o estudo químico biomonitorado dos fungos endofíticos selecionados Mc-8R (ainda não identificado) e Mc-7F (*Colletotrichum gloeosporioides*) foram muito bons, pois das substâncias isoladas 80% e 66% apresentaram atividades antifúngica, 56% e 89% apresentaram atividade inibidora da acetilcolinesterase, respectivamente.

A identificação de Mc-8R não foi possível pela taxonomia clássica, talvez este possa ser um fungo pertencente ao gênero *Pyrenochaeta*. Esta observação é baseada em dados da literatura, onde encontrou-se que o fungo patogênico *Pyrenochaeta terrestris*, produz substâncias da mesma classe química que as isoladas de Mc-8R.

O fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* (Mc-7F) é o responsável pela antracnose, doença de plantas frutíferas, devastando plantações por todo o mundo. É curioso averiguar que este não causa nenhum mal a *Michelia champaca*, pois esta se encontra saudável, evidenciando a robustez da espécie.

Um levantamento bibliográfico da literatura mostrou que os Ácidos Pirenochaéticos A, B, C e Pirenocina A, atuam como fitotoxinas inibindo a germinação de sementes de alface e crescimento de mudas de arroz e cebola. As pirenocinas A, B e E são fitotóxicos ao girassol e inibem a germinação da alface.

Considerando a forte atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* apresentada pelo extrato bruto do fungo Mc-8R, sugerimos que este possa estar atuando na proteção de *M. champaca* contra microrganismos fitopatogênicos a esta espécie vegetal ou então, impedindo a entrada de outros microrganismos.

Estes resultados são relevantes e promissores, pois evidenciam os fungos endofíticos como uma fonte de substâncias com diversidade estrutural e potencialmente bioativas, justificando a necessidade do estudo químico desta classe de microrganismos. Esta observação é condizente com a teoria ecológica a qual prediz que microrganismos que vivem sob alto nível de “stress” ambiental e intensas e freqüentes interações com outros microrganismos, apresentam alta diversidade metabólica.

O estudo da variação na produção metabólica de Mc-8R quando cultivado em diferentes meios líquidos e condições, indicou que o meio CDB em XAD 2 ensacado, produziu uma excelente massa e evidenciou por RMN ^1H uma variação na produção metabólica (PM). Observou-se uma PM de aproximadamente 9 vezes maior que o padrão CDB, com a presença de apenas três substâncias, quando avaliado por CLAE-DAD. Esta observação permite inferir que o polímero XAD-2 ensacado, agiu como adsorvente, seqüestrando os principais compostos produzidos pelo endófito. Este fato impediu a biotransformação dos mesmos, pela enzimas excretadas no meio de cultivo, resultando em uma melhor especificidade metabólica.

Os dois extratos obtidos (XAD Saco e XAD Solto) apresentaram diferenças na constituição metabólica, por CLAE-DAD. Foi observado melhor desenvolvimento, maior quantidade de micélio e massa de extrato e especificidade de substâncias, quando o polímero foi acondicionado em cartuchos de tecido. Pode-se sugerir que o microrganismo se desenvolveu melhor na presença de uma superfície onde possa se instalar.

De acordo com o livro *Evolution and Classification of Flowering Plants*, 1988, a família Magnoliaceae é considerada a mais primitiva de todos os vegetais encontrados no angiosperma. Assim, *Michelia champaca* (Magnoliaceae) é uma espécie considerada primitiva, o que pode ser constatado pela não alteração de suas características morfológicas durante a evolução vegetal em milhares de anos. Será possível sugerir, que o fato desta espécie não ter evoluído, esteja de algum modo, relacionado com os microrganismos endofíticos associados? Será que as bioatividades observadas pelas substâncias isoladas de *M. champaca* colaboraram para robustez da espécie?

Outro fato a ser considerado, é que esta espécie vegetal encontra-se monitorada e permanece saudável desde o isolamento dos endófitos. Nenhuma patologia, aparente, foi constatada neste indivíduo, sugerindo uma relação de simbiose entre o hospedeiro e o microrganismos (comensalismo ou mutualismo).

REFERÊNCIAS

- AMAGATA, A. T.; USAMI, Y.; MINOURA, K.; ITO, T.; NUMATA, A. Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a Sargassum alga. **Journal of Antibiotics**, v. 51, p. 432-434, Apr. 1998.
- AN, M.; PRATLEY, J. E.; HAIG, T. Phytotoxicity of *Vulpia* residues: III. Biological activity of identified allelochemicals from *Vulpia Myuros*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 2, p. 383-392, Oct. 2001.
- ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher fungi. Part 22. 2-Butyl-3-methylsuccinic acid and 2-hexylidene-3-methylsuccinic acid from xylariaceous fungi. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1**, v. 1, p. 1481-1485, 1985.
- ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 499. (Brock / springer series in contemporary bioscience).
- BLICHARSKA, B.; KUPKA, T. Theoretical DFT and experimental NMR studies on uracil and 5-fluorouracil. **Journal of Molecular Structure**, v. 613, p. 153-166, Apr. 2002.
- BUTLER, M. The role of natural product chemistry in drug discovery: a review. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, Apr. 2004.
- CAFEU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, out. 2005.
- CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p.2-9, Feb. 1988.
- CARROLL, G. C. Fungal mutualism. In: CARROLL, G. C.; WICKLOW, D. T. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 327-354.
- CHOMEHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 103-1105, Jan. 2005.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. New York: Botanical Garden, 1988.
- DEMAIN, A. L. Research review paper small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, Oct. 2000.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel , low - molecular - weight pharmaceuticals. In: GULLO V. P. (Ed.). **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994, p. 49-80. (Biotechnology Series, v. 26).

FDHILA, F.; VÁZQUEZ, V.; SÁNCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against vibrio anguillarum isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, Sept. 2003.

GARCIA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* Species. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 426–431, May 2003.

GLOER, J. B. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, v. 73, p. 1265–1274, 1995.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, Nov. 2006.

GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; JOHNSON, R. K. Mechanism-based isolation and structure of some anticancer active natural-products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 2219-2222, Oct. 1994.

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

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4th ed. London: Academic, 1994.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422–1432, Dec. 2001.

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

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

JACOBSSON, U.; KUMAR, V.; SAMINATHAN, S. Sesquiterpene lactones from michelia champaca. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 839-843, Nov. 1995.

JAYASURIYA, H.; BILLS, G. F.; CASCALES, C.; ZINK, D. L.; GOETZ, M. A.; JENKINS, R. G.; SILVERMAN, K. C.; LINGHAM, R. B.; SINGH, S. B. Oreganic acid: a potent novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from an endophytic fungus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 2081-2084, Sept. 1996.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. 2. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1975.

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

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

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

MAIER, W.; HAMMER, U.; DAMMANN, U.; SCHULZ, B.; STRACK, D. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the poaceae. **Planta**, v. 202, p. 36-42, Dec. 1997.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies de gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 23-27, 2002.

NOATAY, K. L. Asia's useful trees and plants: Lingri. **Agriculture Tribune**, 10 Dec. 2001. Disponível em: <<http://www.tribuneindia.com/2001/20011210/agro.htm#2>>. Acesso em: 12 ago. 2007.

PASCUAL, C.; MEIER, J.; SIMON, W. Regel zur abschatzung der chemischen verschiebung von protonen an einer doppelbindung. **Helvetica Chimica Acta**, v. 49, p. 164-168, 1966.

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

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

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

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: J. Di-Giorgio, 1974. p. 31-32.

SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, C. C. F.; CORDEIRO, Z. J. M. Doenças causadas por fungos e bactérias e seu controle. In: LIMA, A. A. (Org.). **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 76-84. (Frutas do Brasil, 15).

SATO, H.; KONOMA, K.; SAKAMURA, S. New phytotoxins produced by pyrenochaeta-terrestris - pyrenochaetic acid-A, acid-B, and acid-C. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1675-1679, July 1981.

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

SHIRANE, N.; TAKENAKA, H.; UEDA, K.; HASHIMOTO, Y.; KATOH, K.; ISHII, H. Sterol analysis of dmi-resistant and -sensitive strains of venturia inaequalis. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1301-1308, Mar. 1996.

SHIZURI, Y.; KOSEMURA, S.; YAMAMURA, S. Biosynthesis of citreothiolactone, citreopyrone and pyrenocine-B. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 15, p. 1583-1584, 1984.

SNYDER, R. L.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Non-ionic sample: reversed and normal phase HPLC. In: _____. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1997. cap. 6, p. 233-289.

SUBBIAH, M. T.; ABPLANALP, W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 73, p. 19-23, Jan. 2003.

TAL, B.; RODESON, D. The production of pyrenicine A and B by a novel alternaria species. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 41c, p. 1032-1036, Aug. 1986.

TAN, R. X.; ZHANG, H. W.; SONG, Y. C. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, Aug. 2006.

THAKUR, M.; AGARWAL, A.; THAKUR, A.; KHADIKAR, P. V. QSAR study on phenolic activity: need of positive hydrophobic term (log P) in QSAR. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2287-2293, June 2004.

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

YUE, J. M.; CHEN, S. N.; LIN, Z. W. SUN, H. D. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 801-806, Sept. 2001.

Ioanis Hcristos Leptokarydis

DADOS PESSOAIS.

- **Endereço residencial.**
- Rua Dr. Luiz Nougues nº 681
- Tel (residencial): (019) 81366560.
- E-mail: ioanlept@itelefonica.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA.

- Pós-graduação (**Mestrado**) em Química Orgânica – Estudo Fitoquímico Biomonitorado de *Michelia champaca* (Magnoliaceae). UNESP – Araraquara, 2003.
- Bacharel em Química (Instituto de Química). UNESP – Araraquara, 2000.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL.

- **Empresa:** Asca Brinquedos ind e com de brinquedos ltda
Função: Responsável pelas atividades relacionadas a P&D, gestão da qualidade e controle de qualidade, certificação e inclusão dos produtos junto aos órgãos certificadores
Período: 06/2006 (emprego atual)
- **Empresa:** Anaber Cosméticos ind e com de cosméticos ltda
Função: Responsável pelo departamento de P&D de novos produtos, treinamento de técnicos, certificação e inclusão dos produtos junto aos órgãos certificadores
Período: 03/2004 - 02/2007
- **Instituição:** Escola Estadual Professora Lea de Freitas Monteiro
Disciplina: Química e Matemática.
Período: 07/2003 – 12/2003
 - **Professor do Ensino Médio.**
- **Instituição:** Escola Estadual Bento de Abreu - EEBA.
Disciplina: Química, Física e Matemática.
Período: 02/2003 – 12/2003
 - **Estágio de Docência.**
- **Instituição:** Instituto de Química da UNESP Araraquara.
Curso: Química Orgânica Experimental.
Período: 02/2001 – 07/2001.
 - **Monitor em Química Orgânica I**
- **Instituição:** Instituto de Química da UNESP Araraquara.
Curso: Química Orgânica I e II.
Período: 02/2000 – 12/2000.

IDIOMAS.

- **Inglês:** avançado.
- **Espanhol:** avançado.

CONHECIMENTO EM INFORMÁTICA.

- **Sistemas Operacionais:** MS-DOS e WINDOWS (todos) Iniciante em LINUX.
- **Programas do Office:** Excel, Front Page, Power Point e Word.
- **Outros programas:** Corel Draw, ACDLabs 1D e 2D, Text Bridge, Chemwin, Chem Office Win Zip, Vírus Scan, Adobe Acrobat, ChemSketch, Conhecimento sobre rede, formatação e configuração de micros.

TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC.

- Estudo Fitoquímico Biomonitorado das Sementes de *Michelia champaca* (Magnoliaceae), 2000.

CURSOS NA ÁREA QUÍMICA

Teia do saber Título “A água” - UNESP 2004

- O Cotidiano do Ensino Médio – UNESP 2003
- Didática no Ensino Médio – UNESP, 2000.
- Química Medicinal – UNESP, 2000.
- Diversidade Química de Plantas de Serrado e mata Atlântica e seu Potencial Biológico – UNESP, 1999.
- Lixiviação de Metais por Bactéria – UNESP, 1999.
- Cristais Líquidos – UNESP, 1997.
- Cuidados no Manuseio de Substâncias Químicas em Laboratório – UNESP, 1996.
- Tópicos de Produtos Naturais (1ª Parte) Produção de Metabólitos secundários através de células e tecidos de plantas (2ª Parte) – UNESP, 1996.

PRÊMIOS & HONRARIAS.

- Premiação por melhor trabalho da área de Ciências Exatas do Congresso de Iniciação Científica da UNESP – UNESP, 2000.

ANEXOS

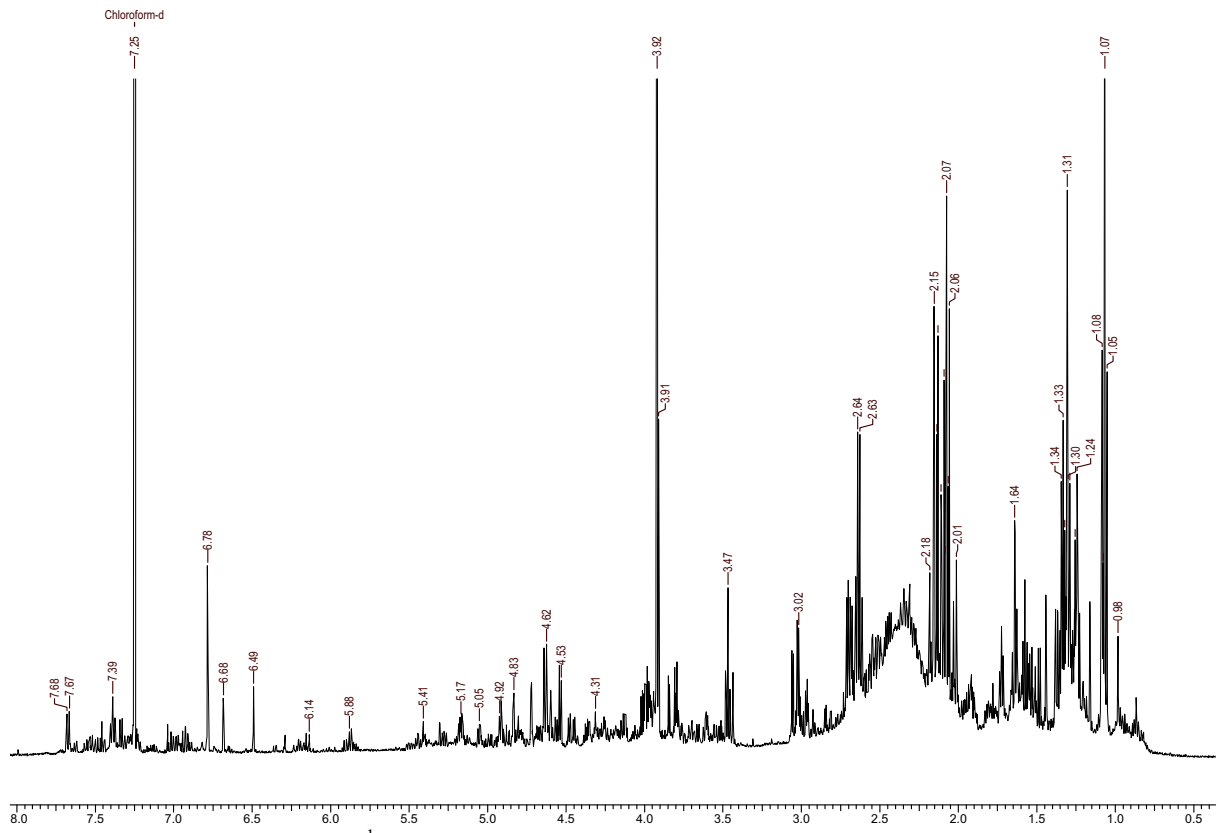


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H de Mc-1C (CDCl_3 a 11,7 T)

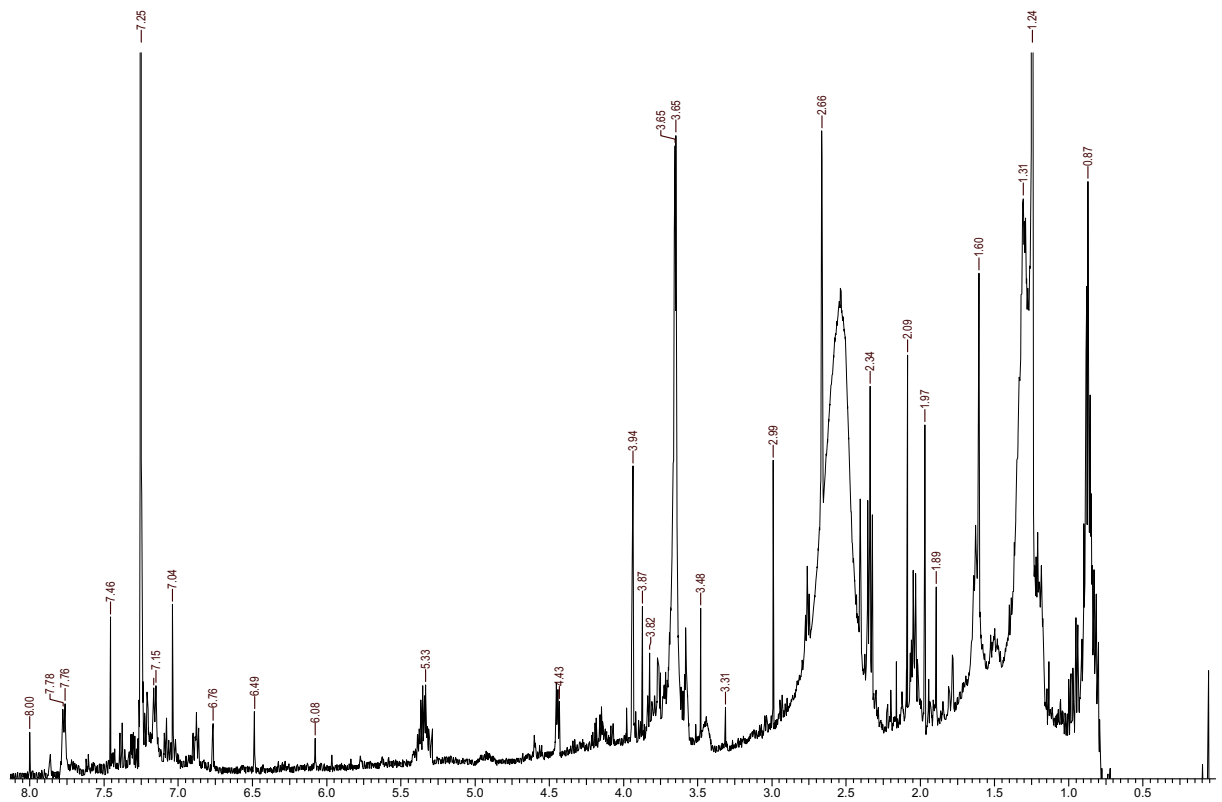
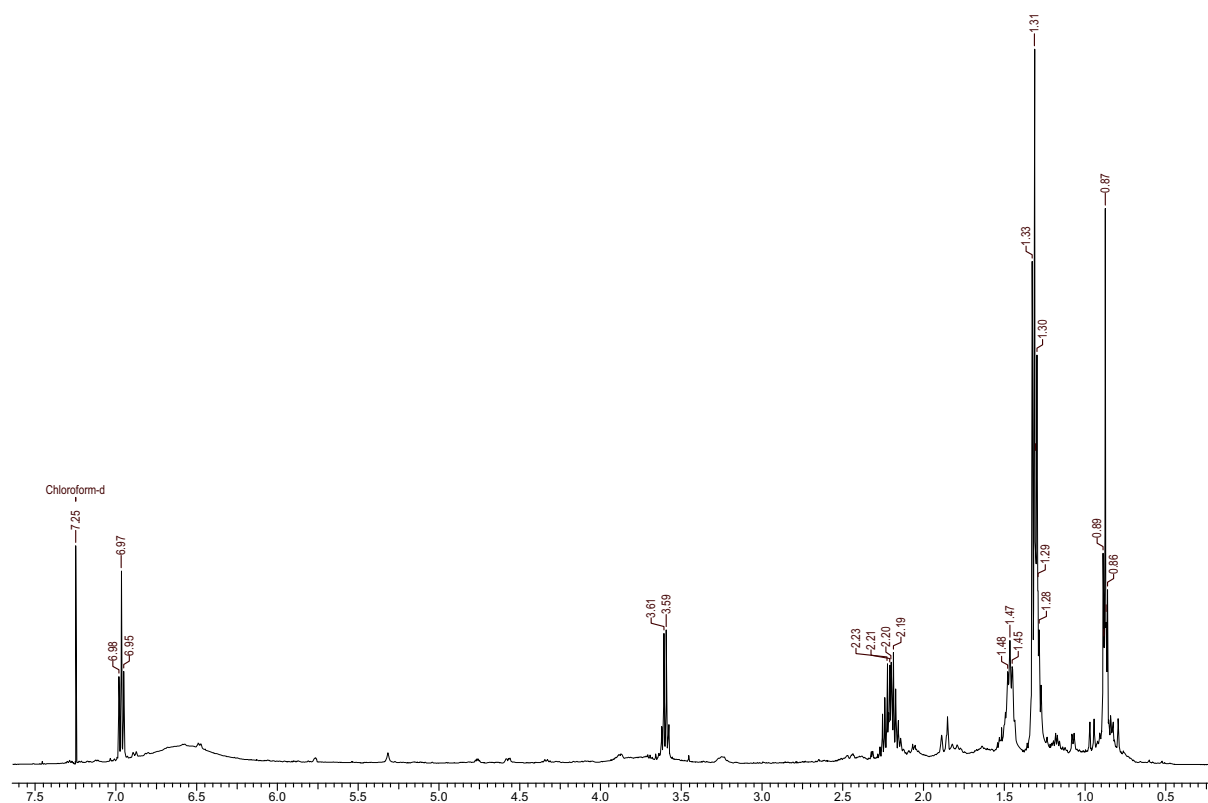
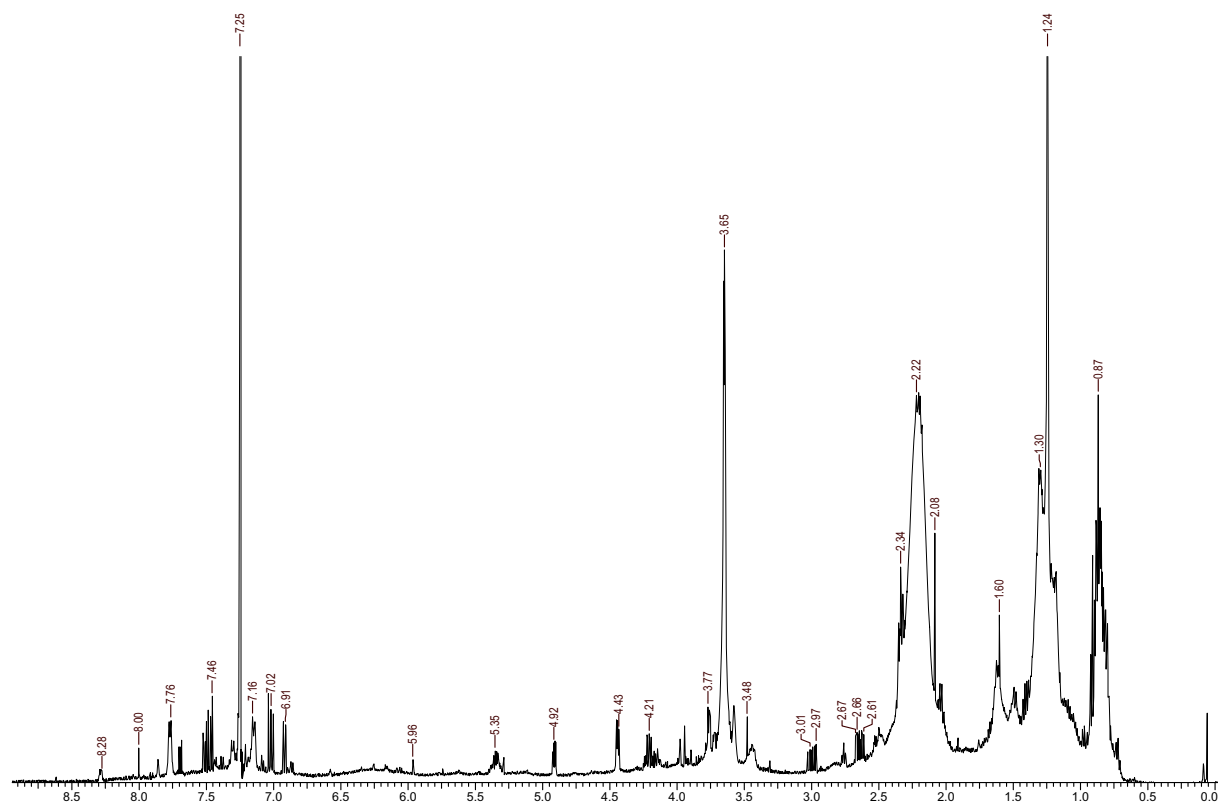


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H de Mc-2C (CDCl_3 a 11,7 T)**Figura 45:** Espectro de RMN de ^1H de Mc-3C (CDCl_3 a 11,7 T)**Figura 46:** Espectro de RMN de ^1H de Mc-4F (CDCl_3 a 11,7 T)

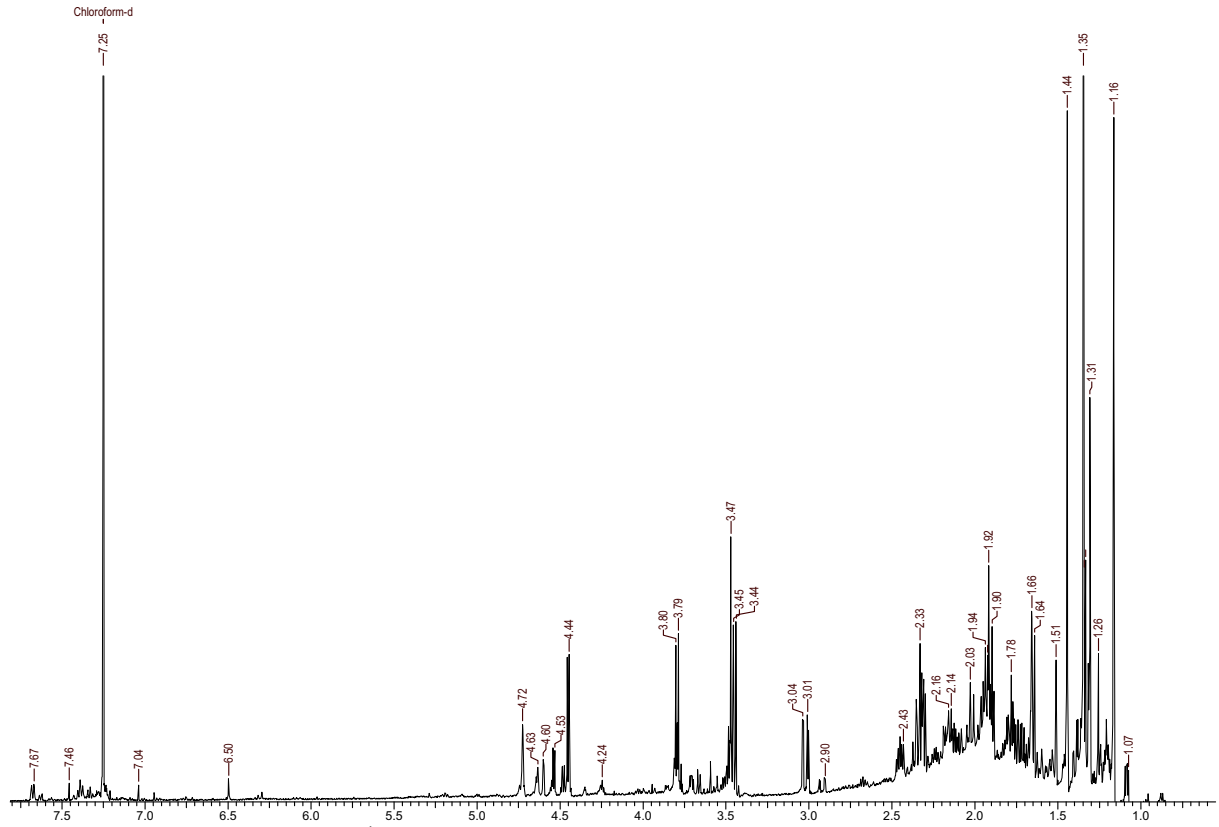


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de Mc-5F (CDCl_3 a 11,7 T)

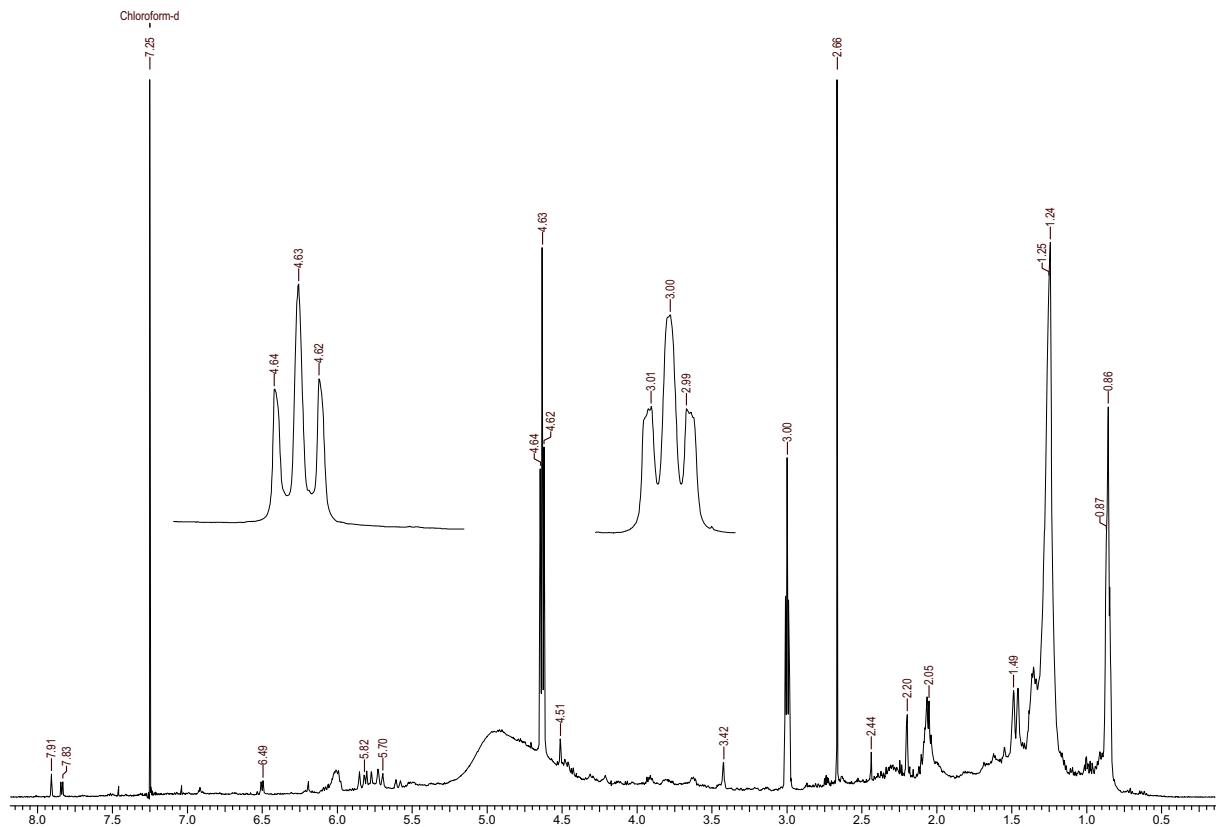


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H de Mc-6F (CDCl_3 a 11,7 T)

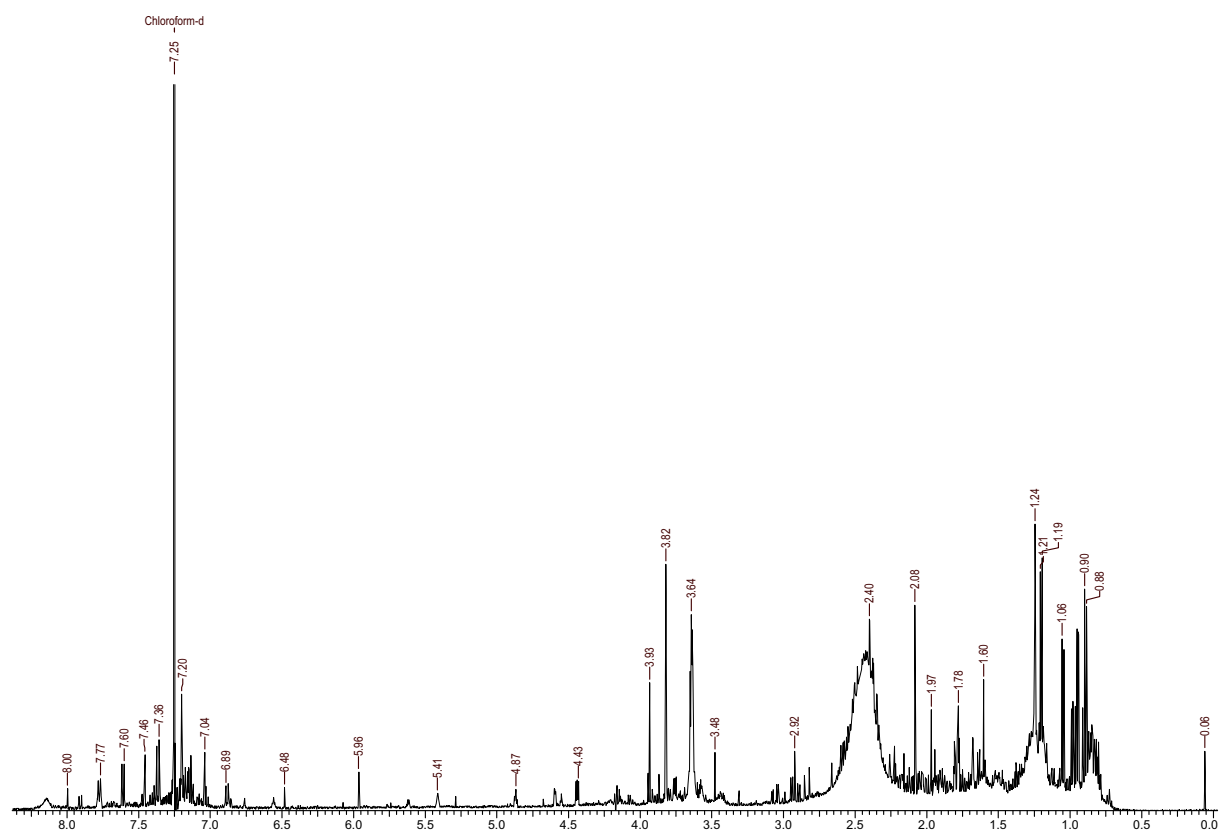


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H de Mc-7F (CDCl_3 a 11,7 T)

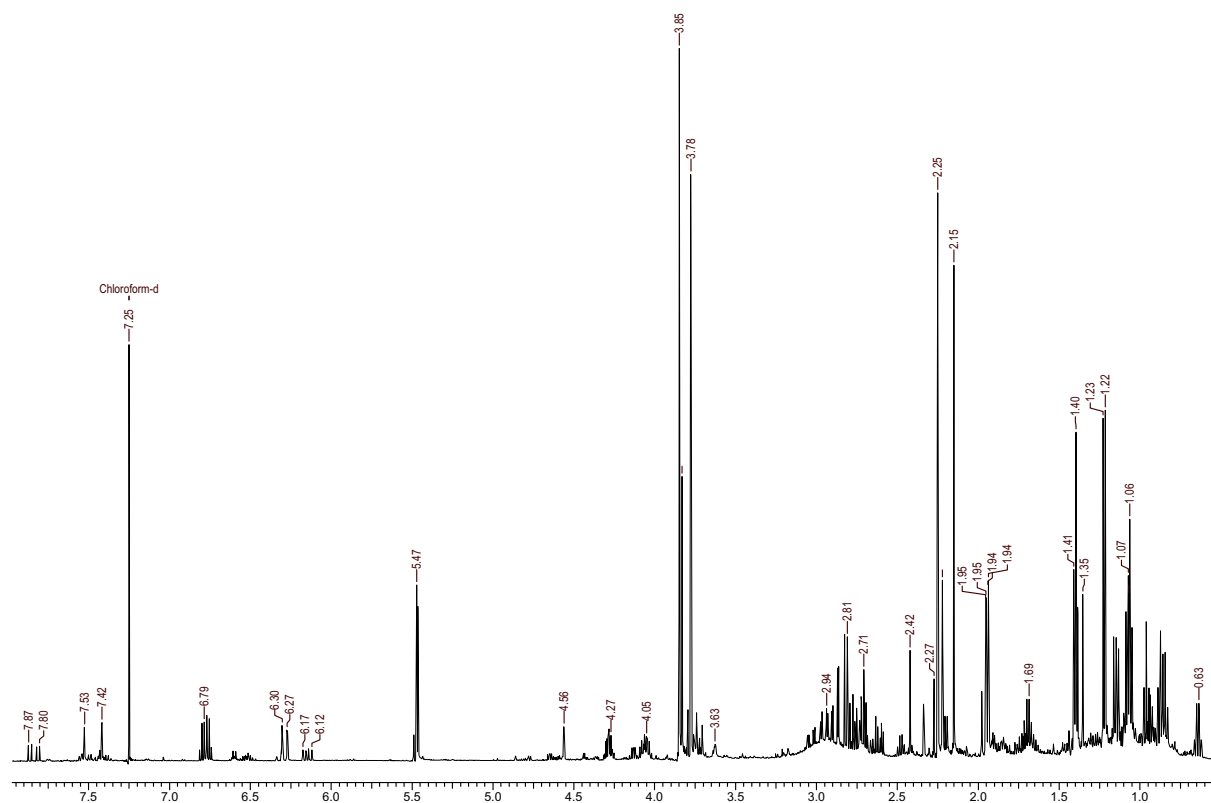


Figura 50: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R (CDCl_3 a 11,7 T)

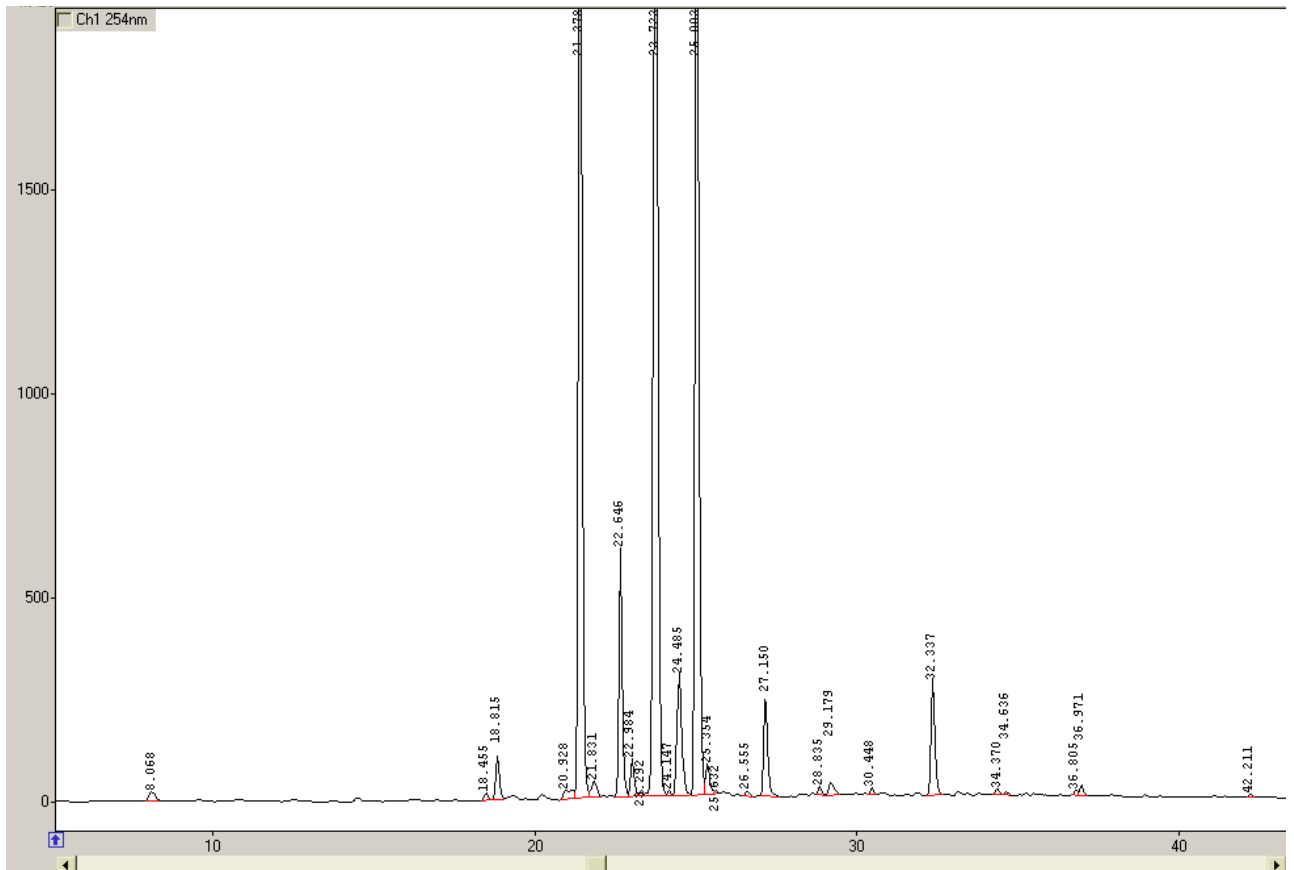


Figura 51: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Czapek com detecção monitorada em 254nm.

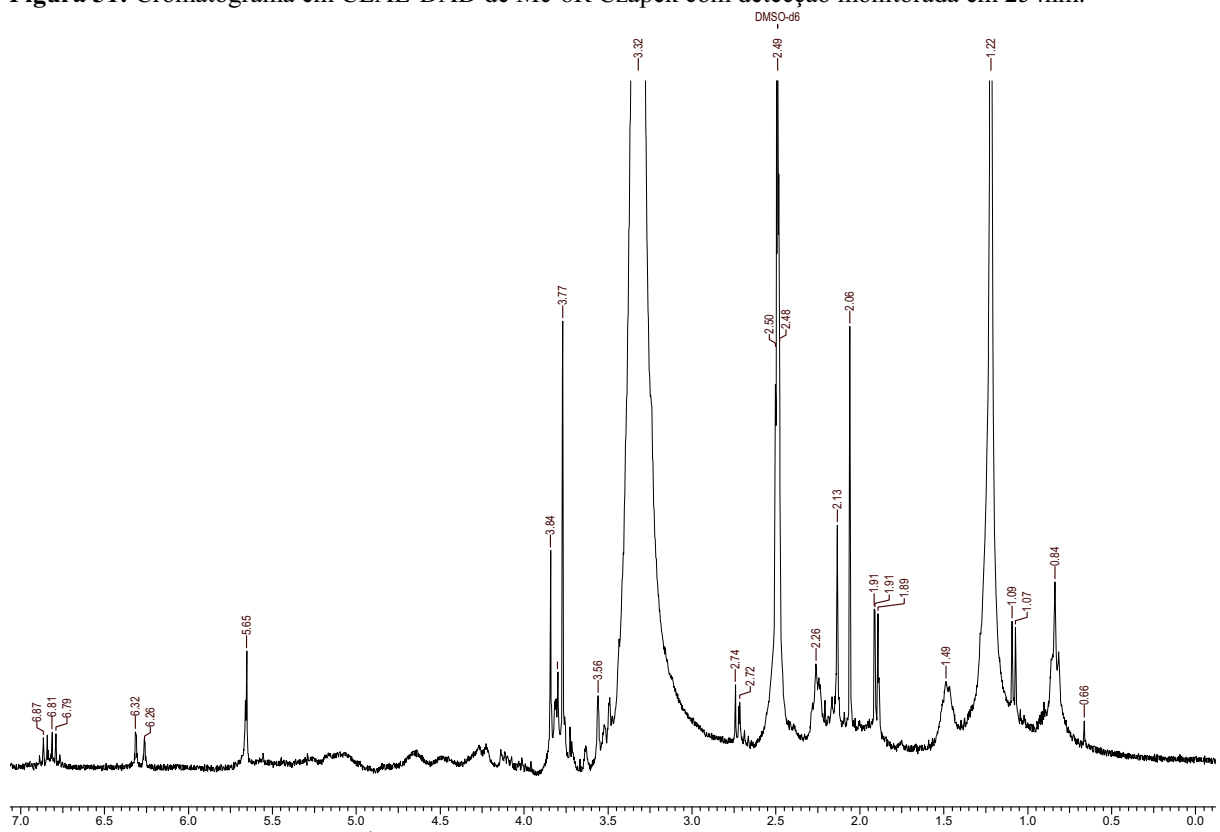


Figura 52: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R Czapek ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

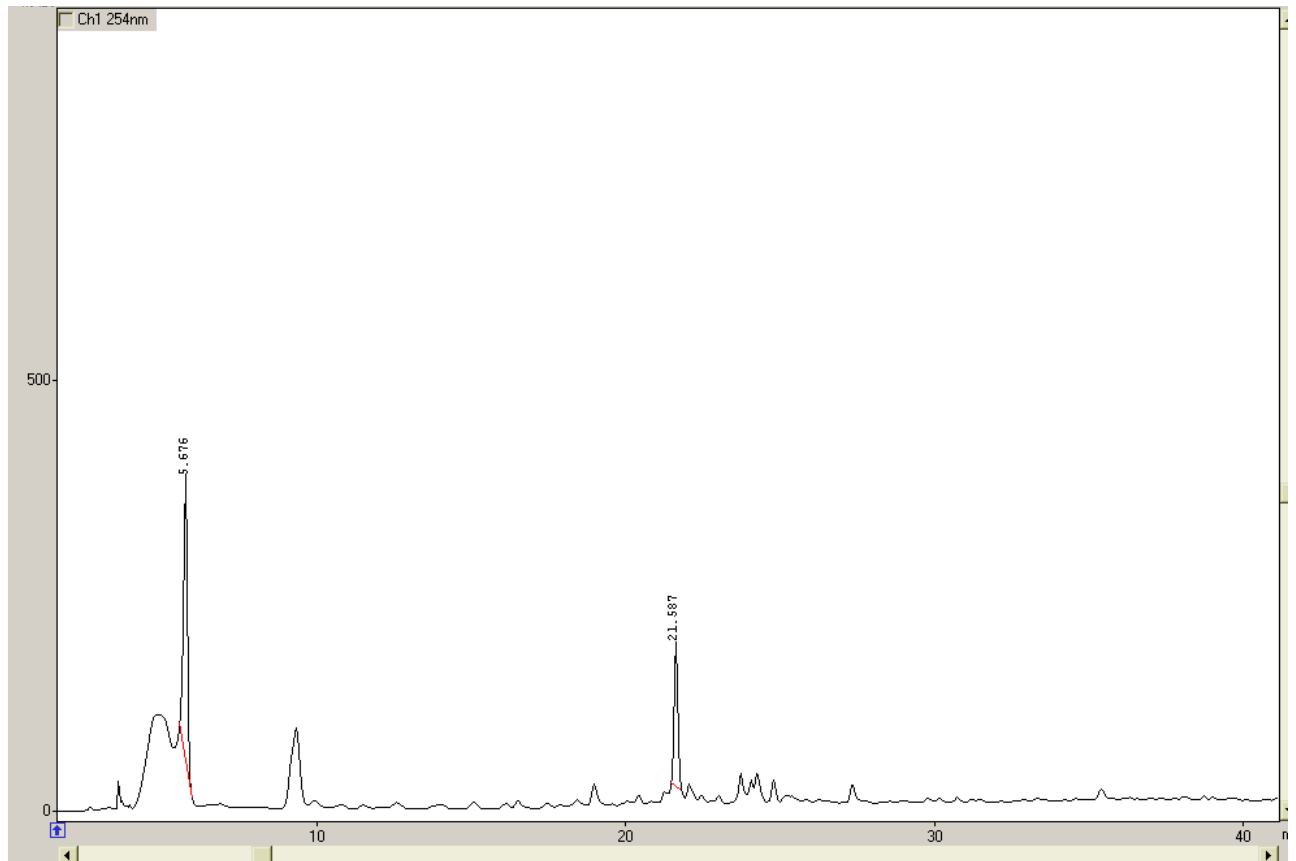


Figura 53: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Nutriente com detecção monitorada em 254nm.

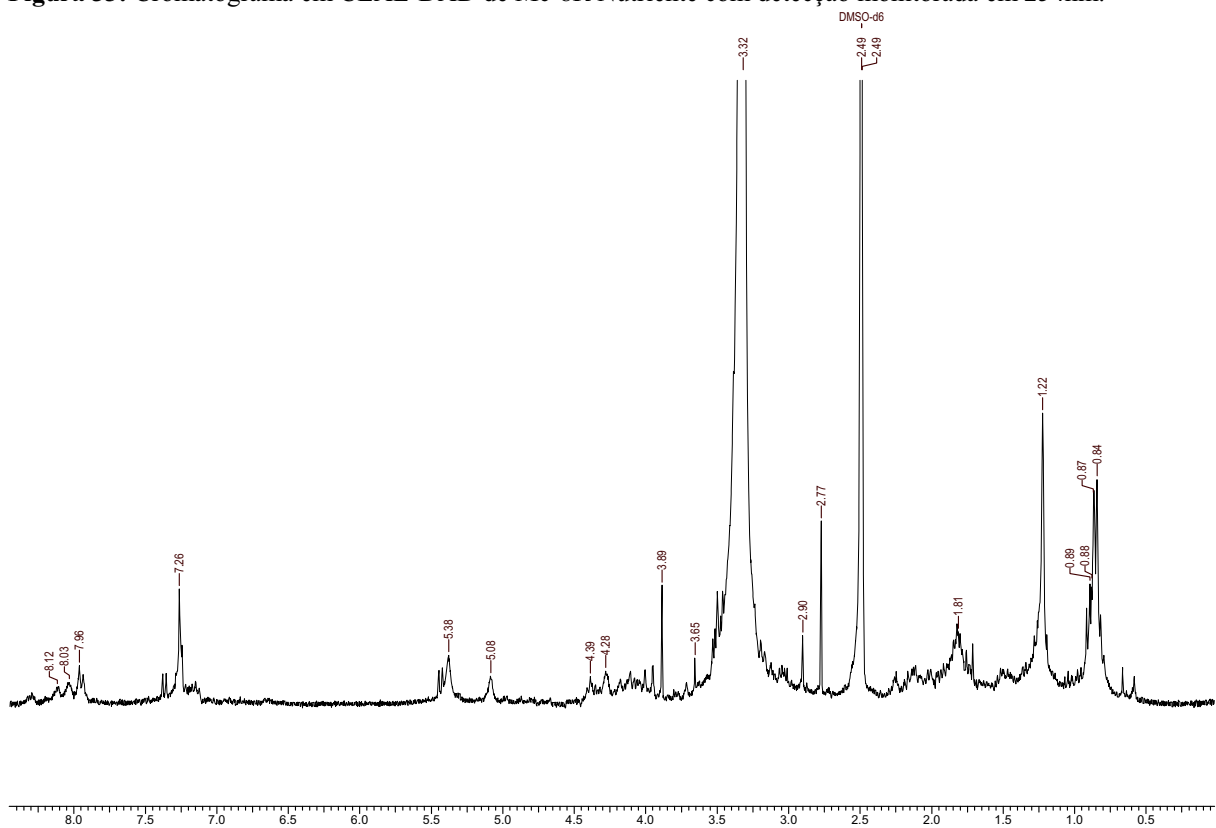


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R Nutriente ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

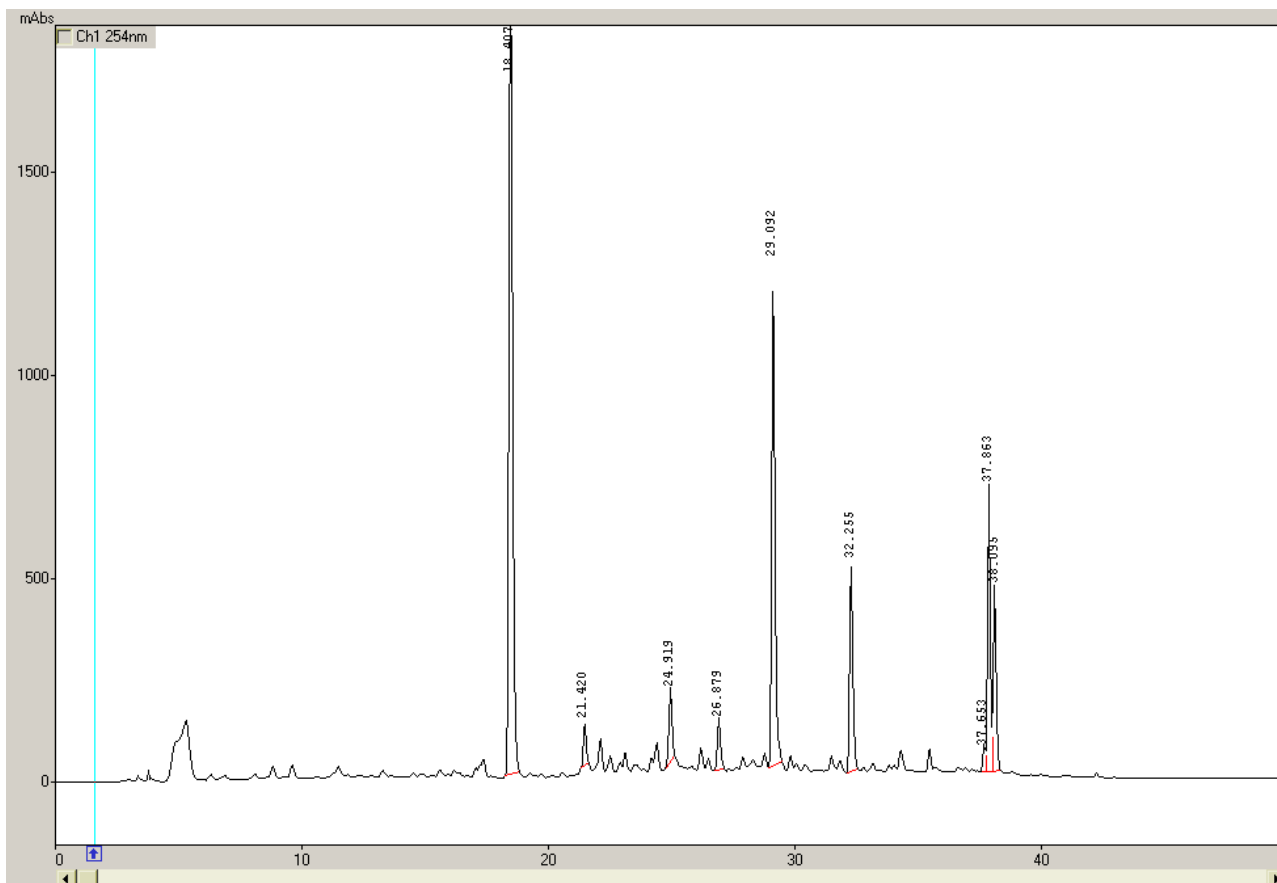


Figura 55: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R YM com detecção monitorada em 254nm.

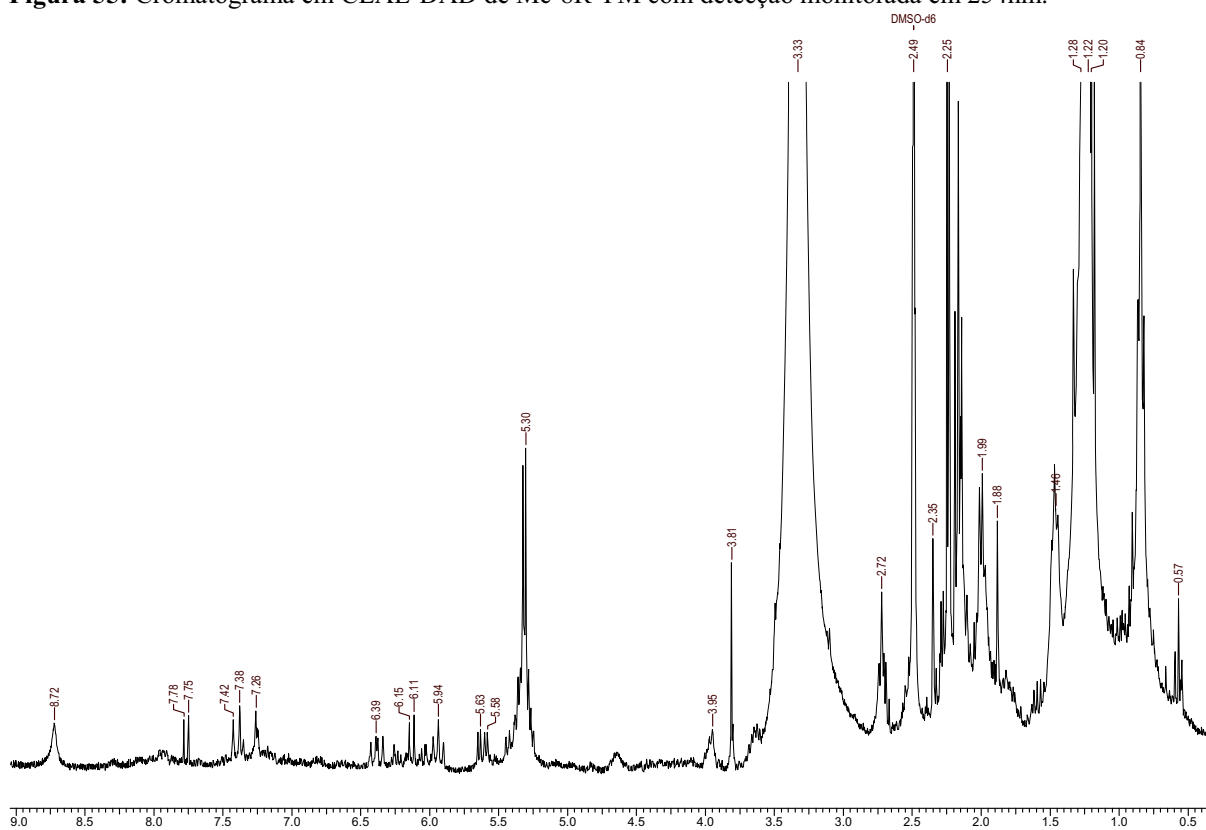


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R YM ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

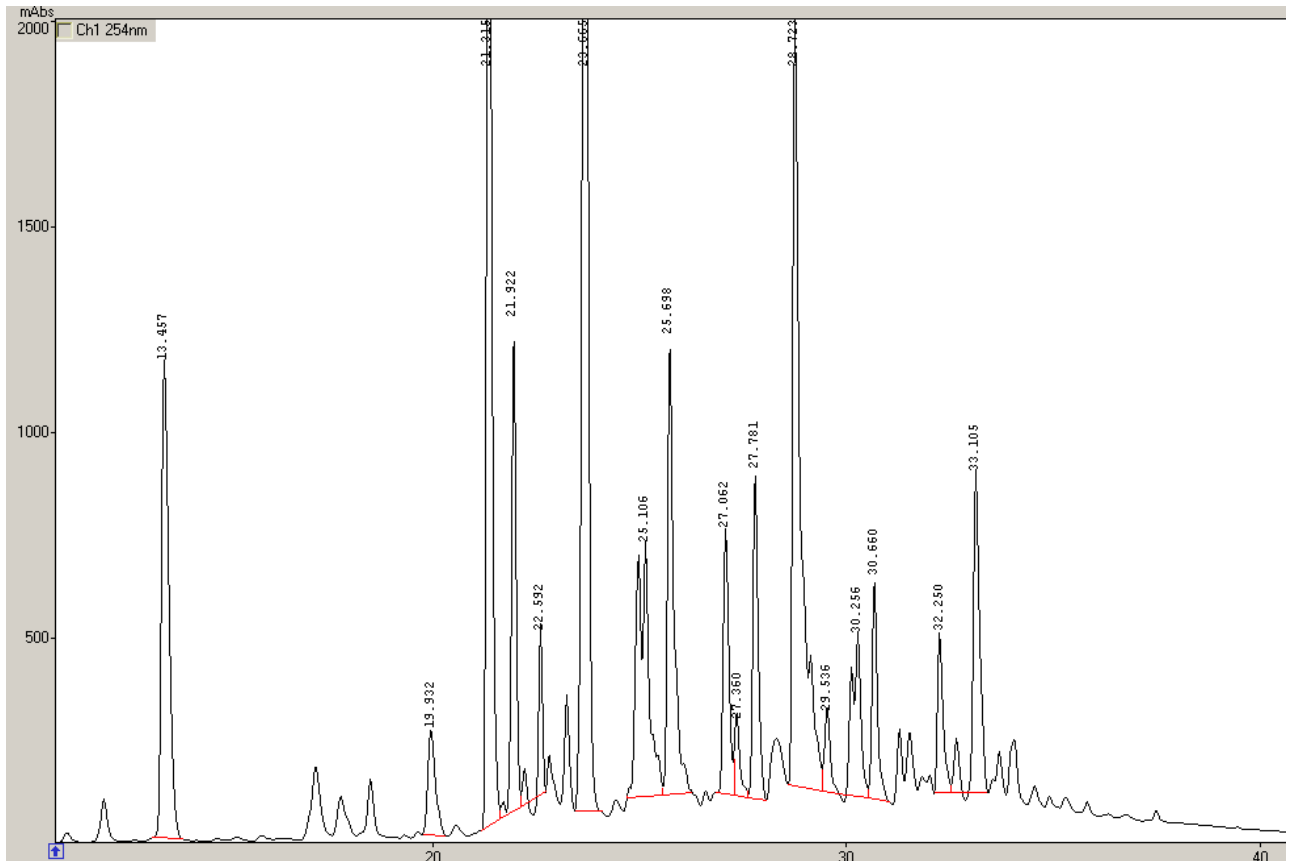


Figura 57: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Extrato de Malte com detecção monitorada em 254nm.

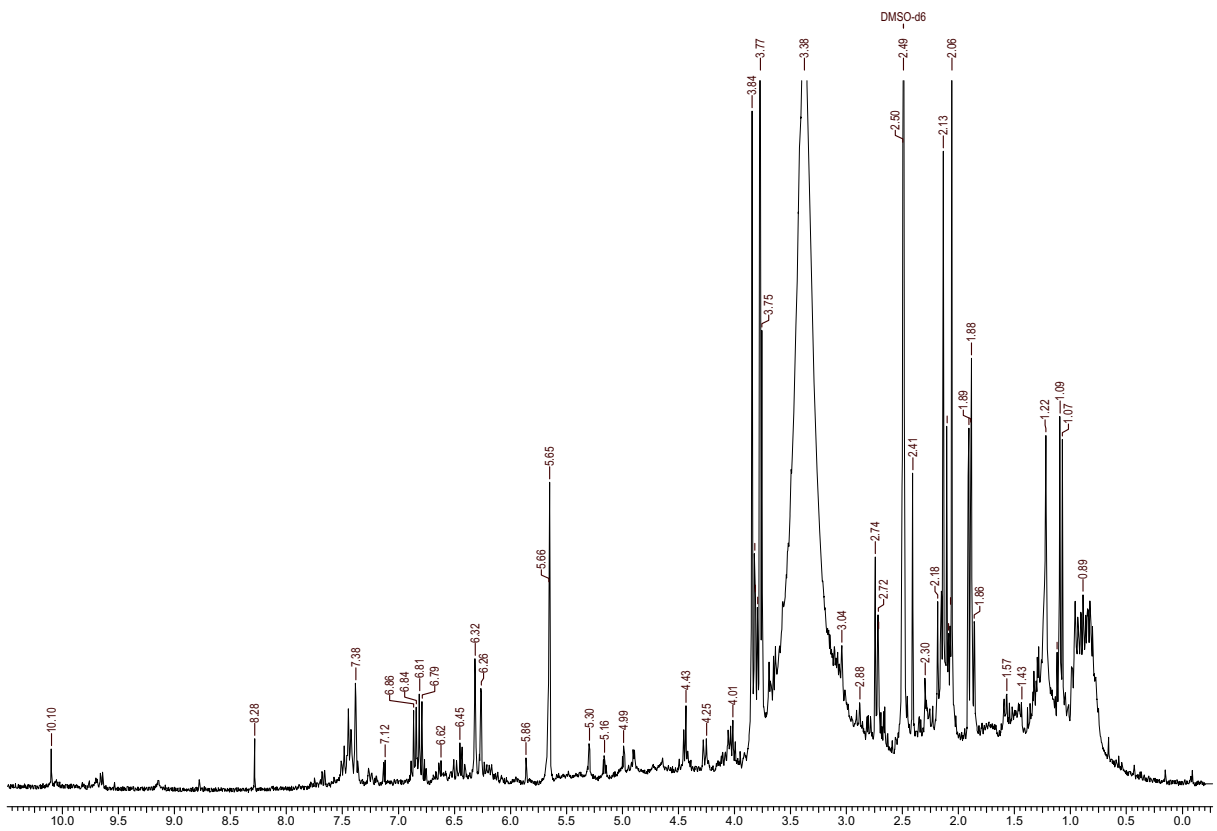


Figura 58: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R Extrato de Malte (DMSO- d_6 a 11,7 T)

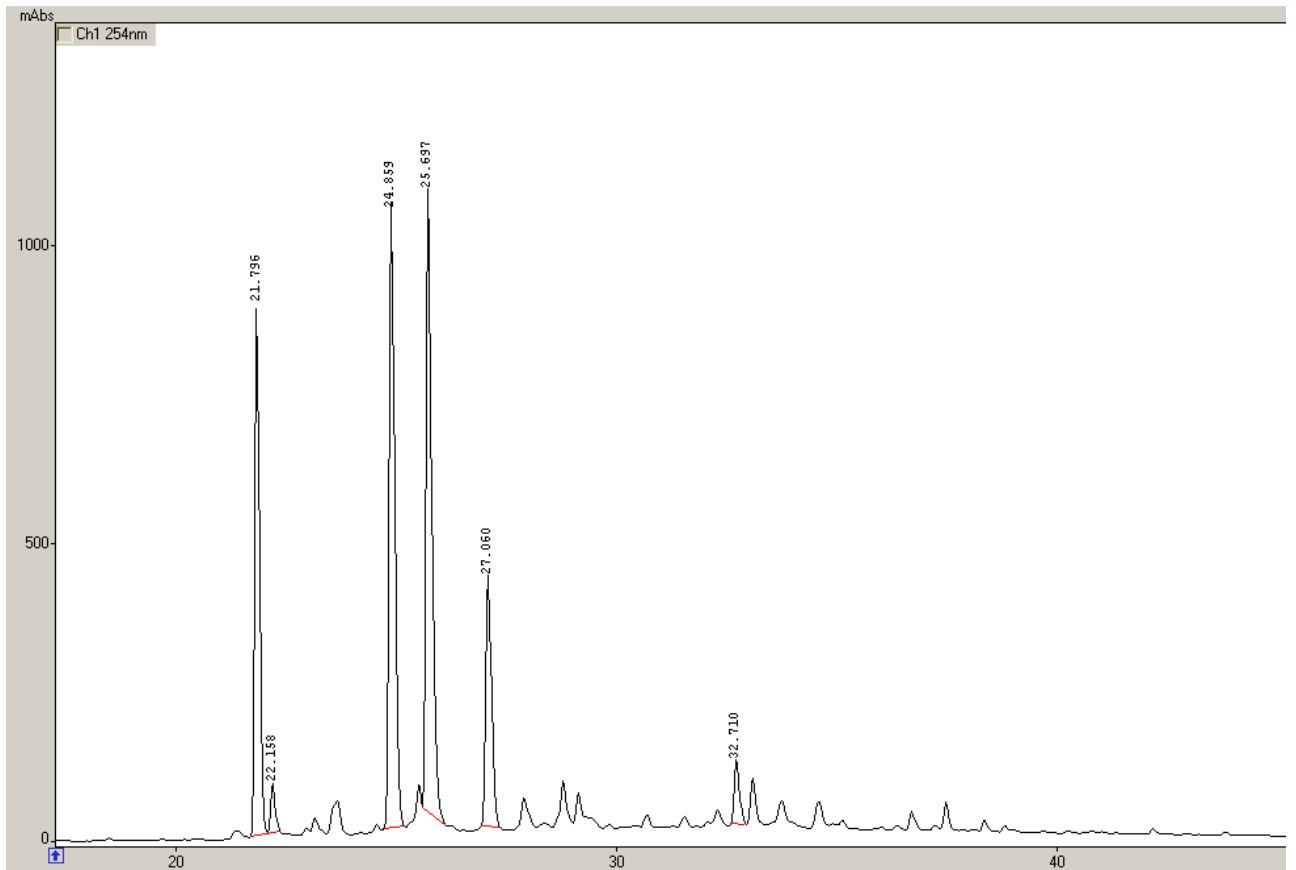


Figura 59: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Arroz ACN com detecção monitorada em 254nm.

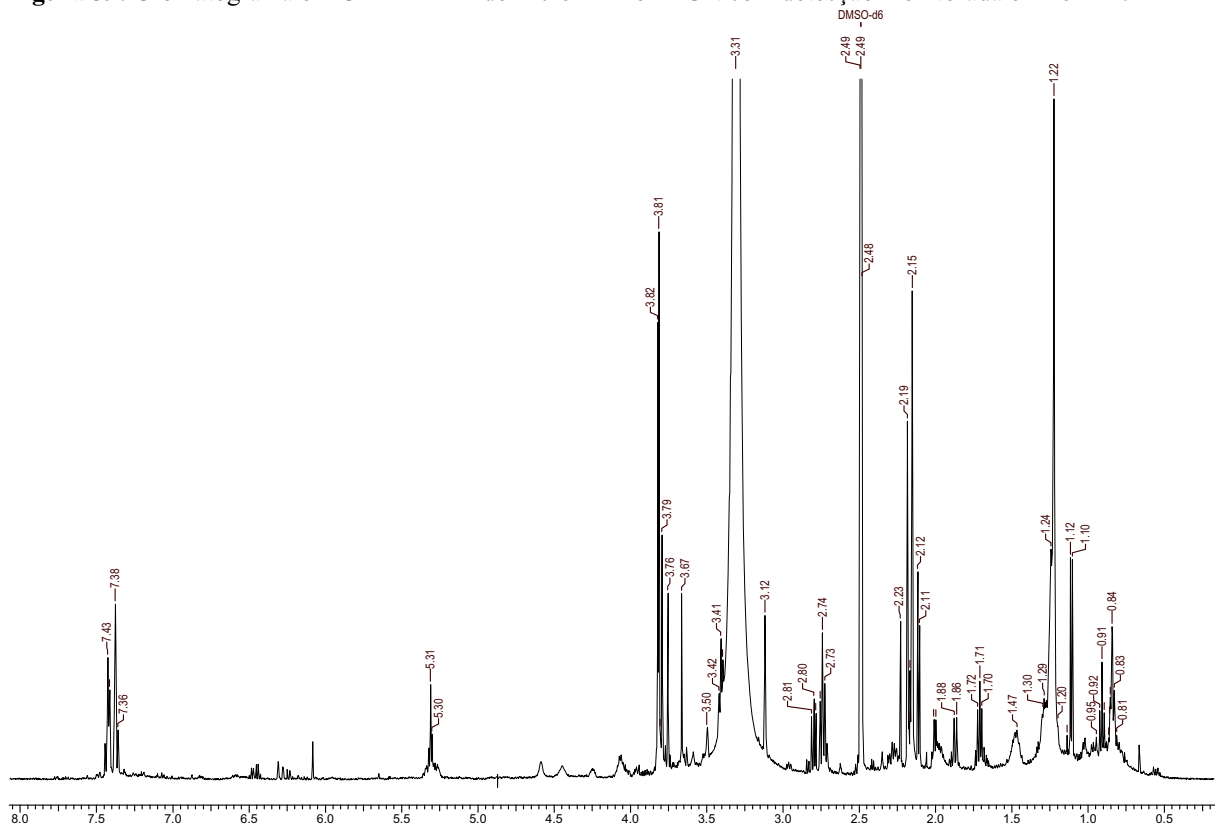


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R Arroz ACN (DMSO- d_6 a 11,7 T)

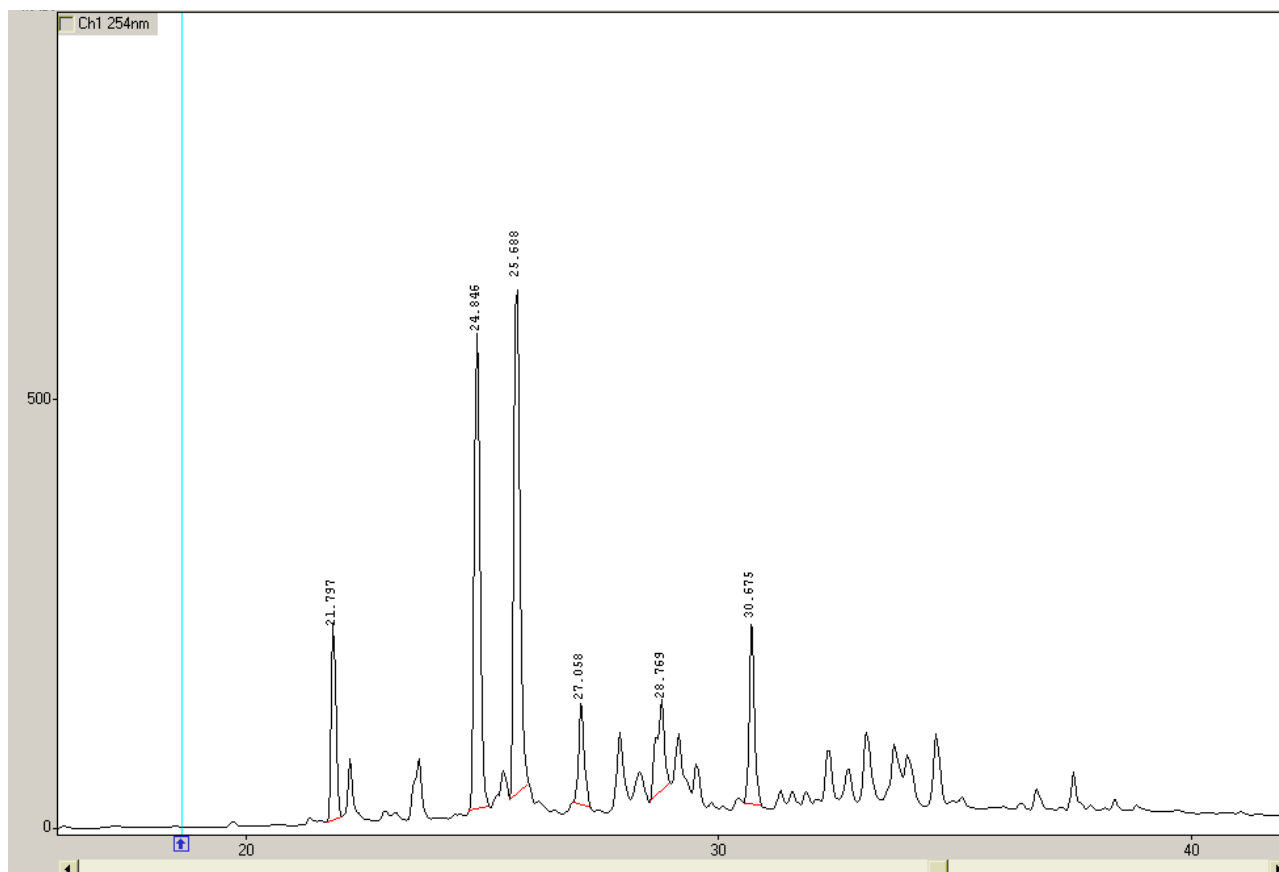


Figura 61: Cromatograma em CLAE-DAD de Mc-8R Milho ACN com detecção monitorada em 254nm.

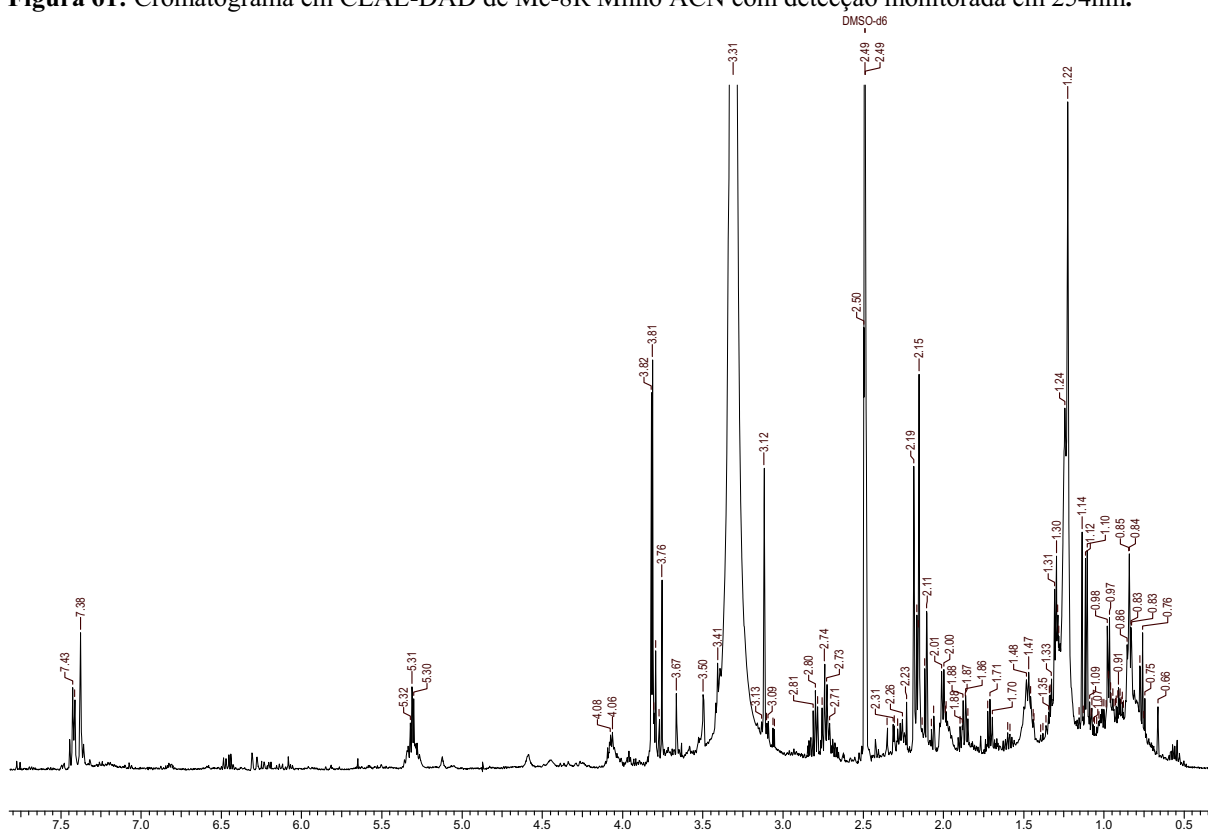


Figura 62: Espectro de RMN de ^1H de Mc-8R Milho ACN (DMSO- d_6 a 11,7 T)

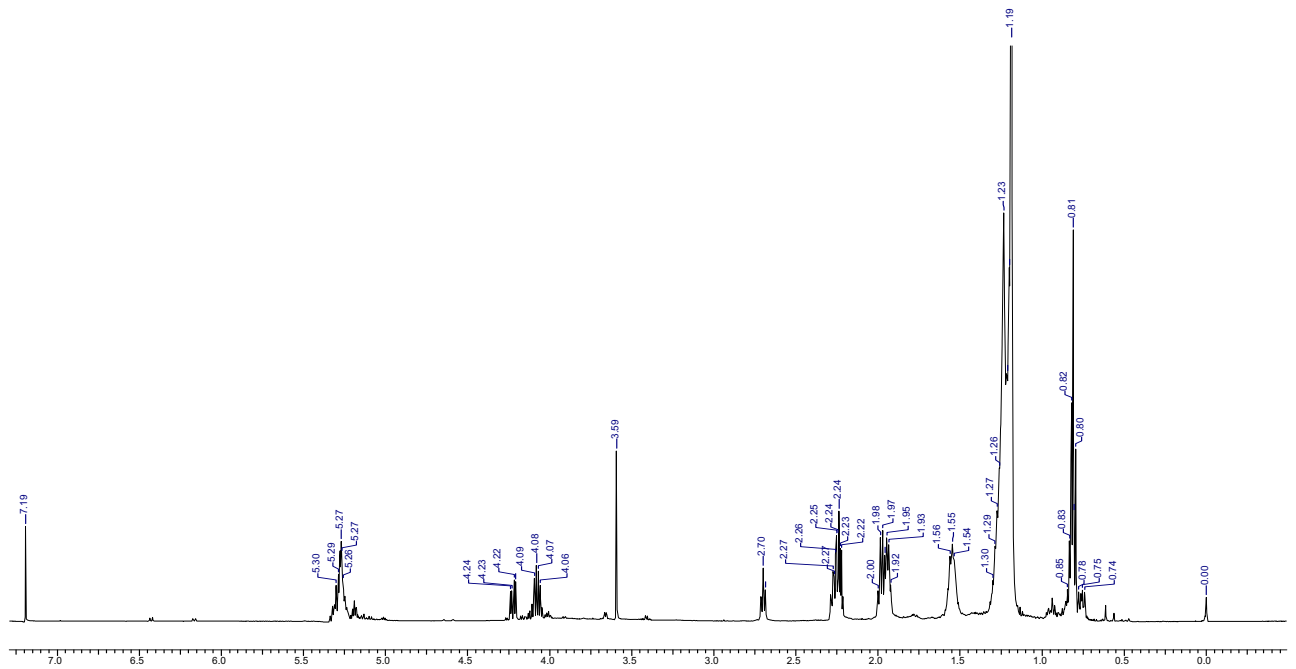


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-8R Arroz Hex (CDCl_3 a 11,7 T)

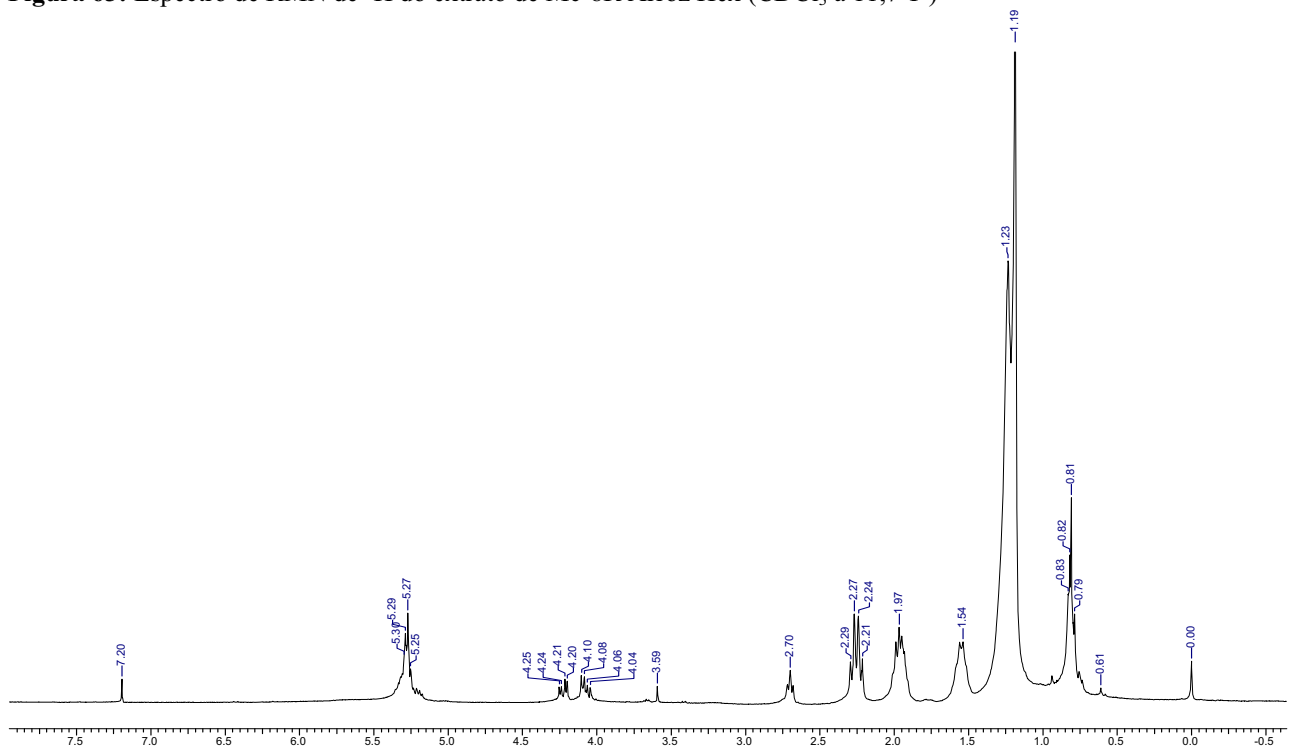


Figura 64: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-8R Milho Hex (CDCl_3 a 11,7 T)



Figura 65: CCDC das fases Hexânicas do Milho, Arroz e Arroz hex ppt, com eluente em 86% Hex 3% Hac 11 % (Solução A) em tripla eluição.

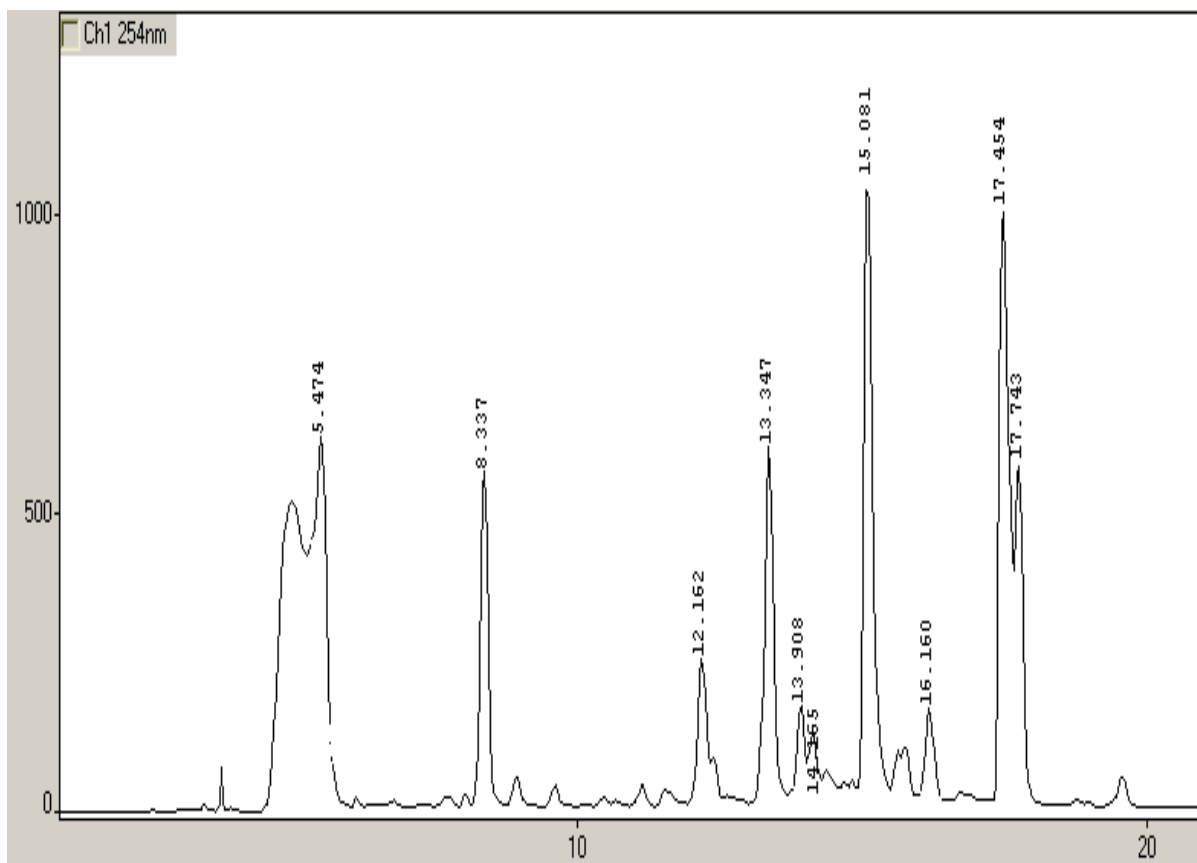


Figura 66: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.1 ($H_2O+0,5\%$ HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm)

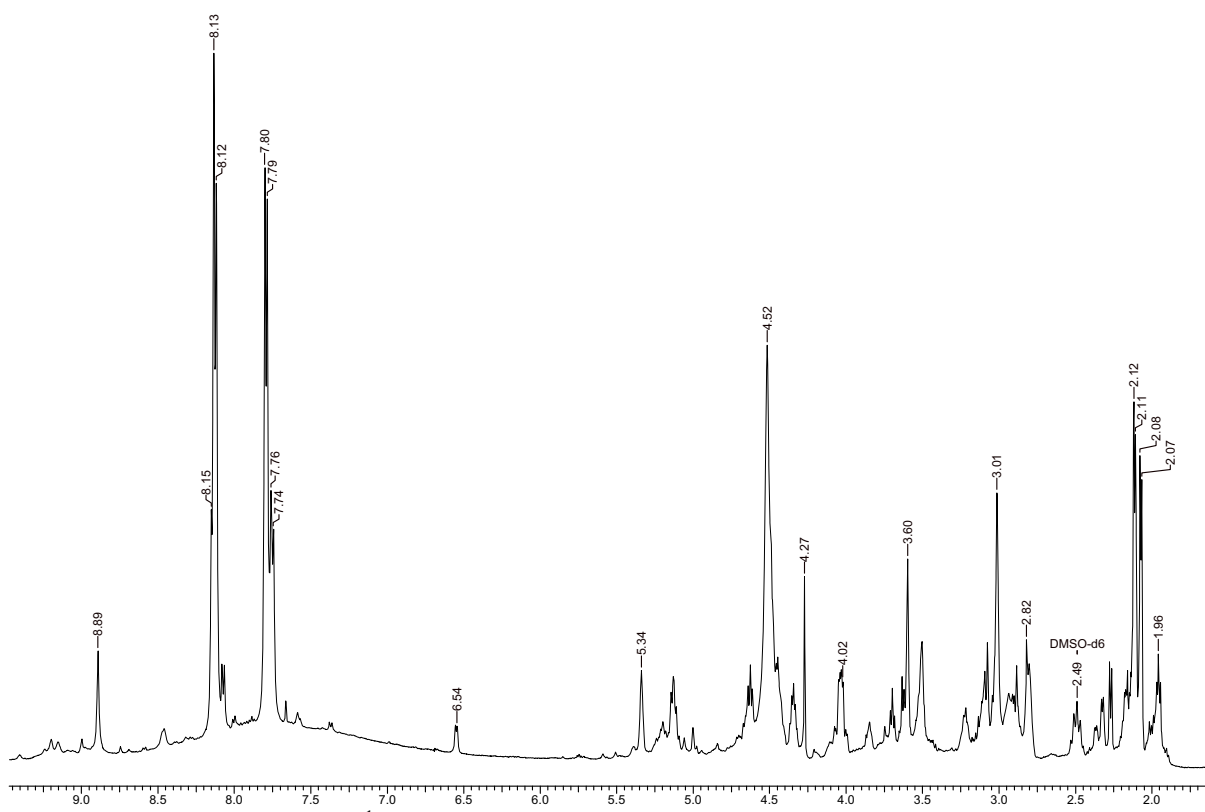


Figura 67: Espectro de RMN de 1H do extrato de Mc-7F.1 ($DMSO-d_6$ a 11,7 T)

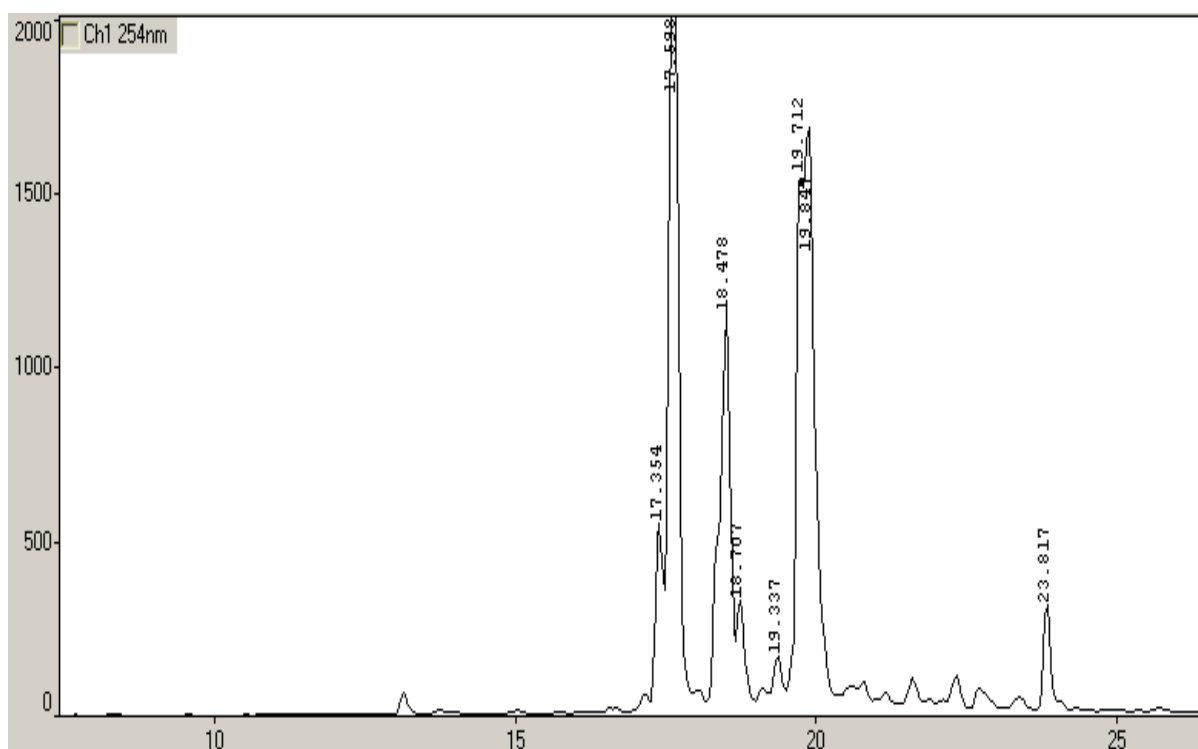


Figura 68: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.2 ($\text{H}_2\text{O}+0,5\%$ HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm)

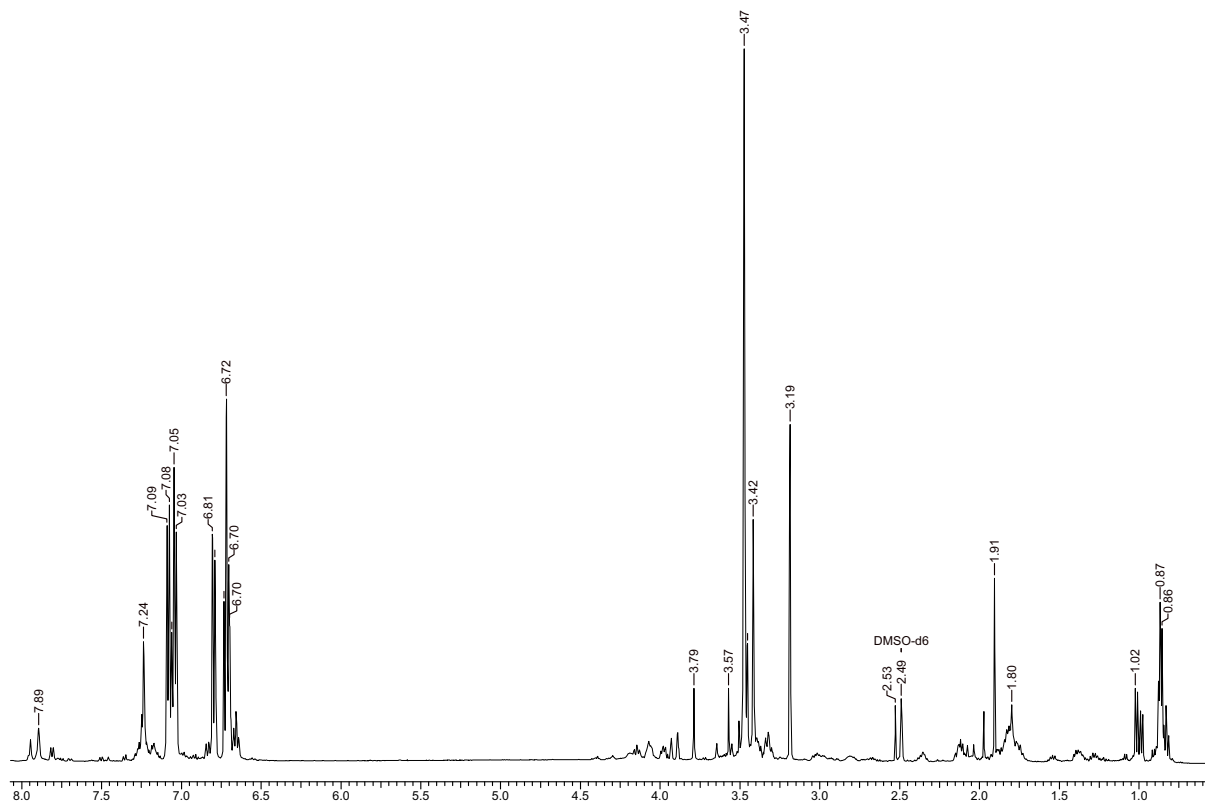


Figura 69: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-7F.2 ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T)

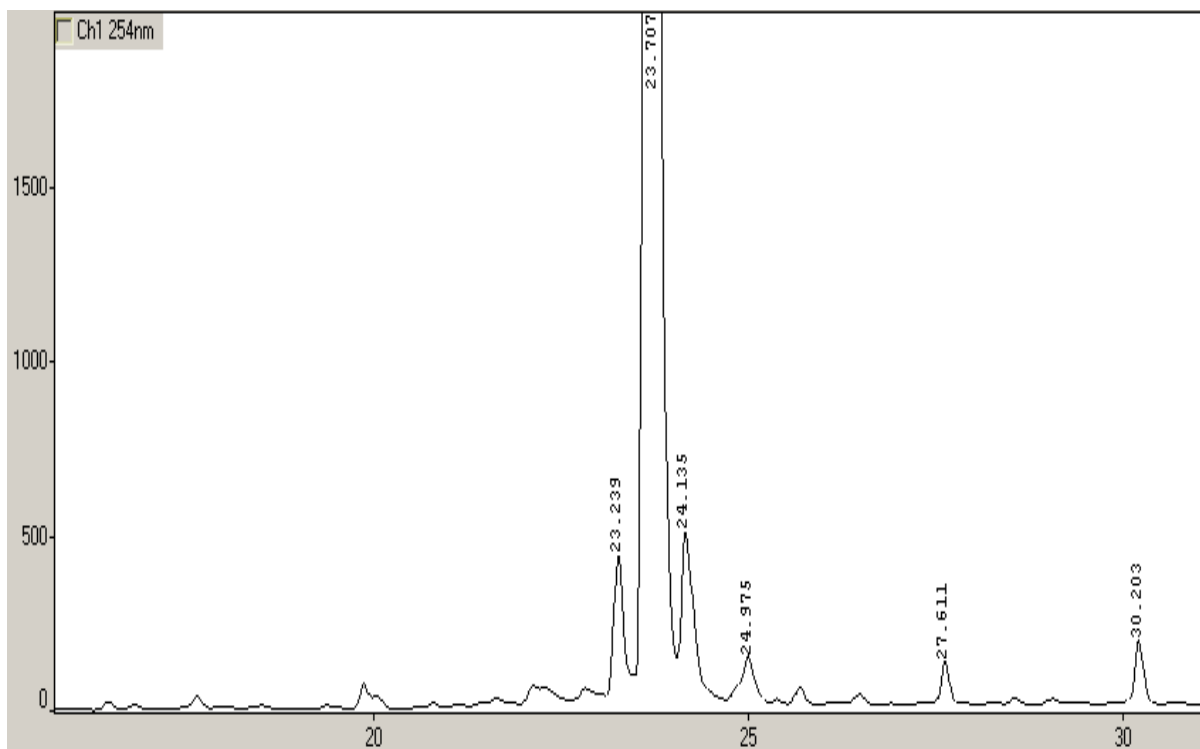


Figura 70: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.3 (H₂O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm)

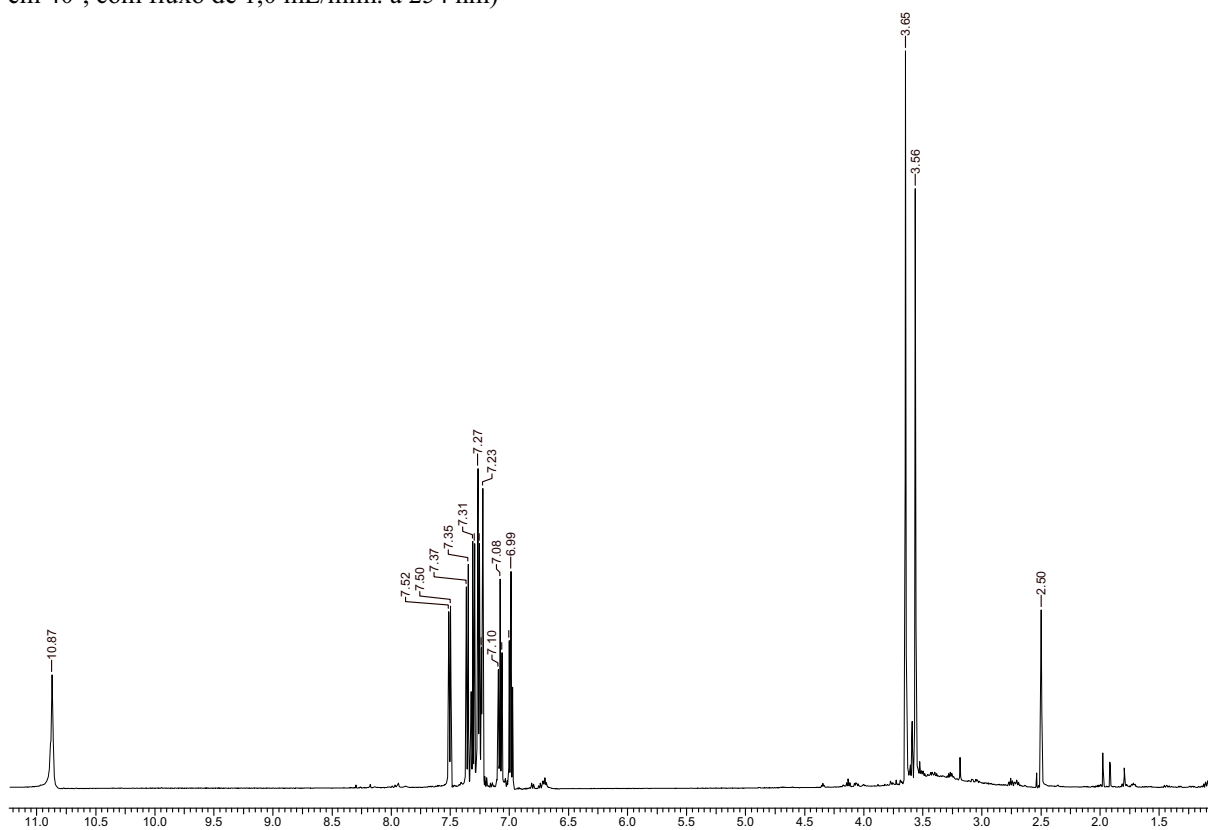


Figura 71: Espectro de RMN de ¹H do extrato de Mc-7F.3 (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

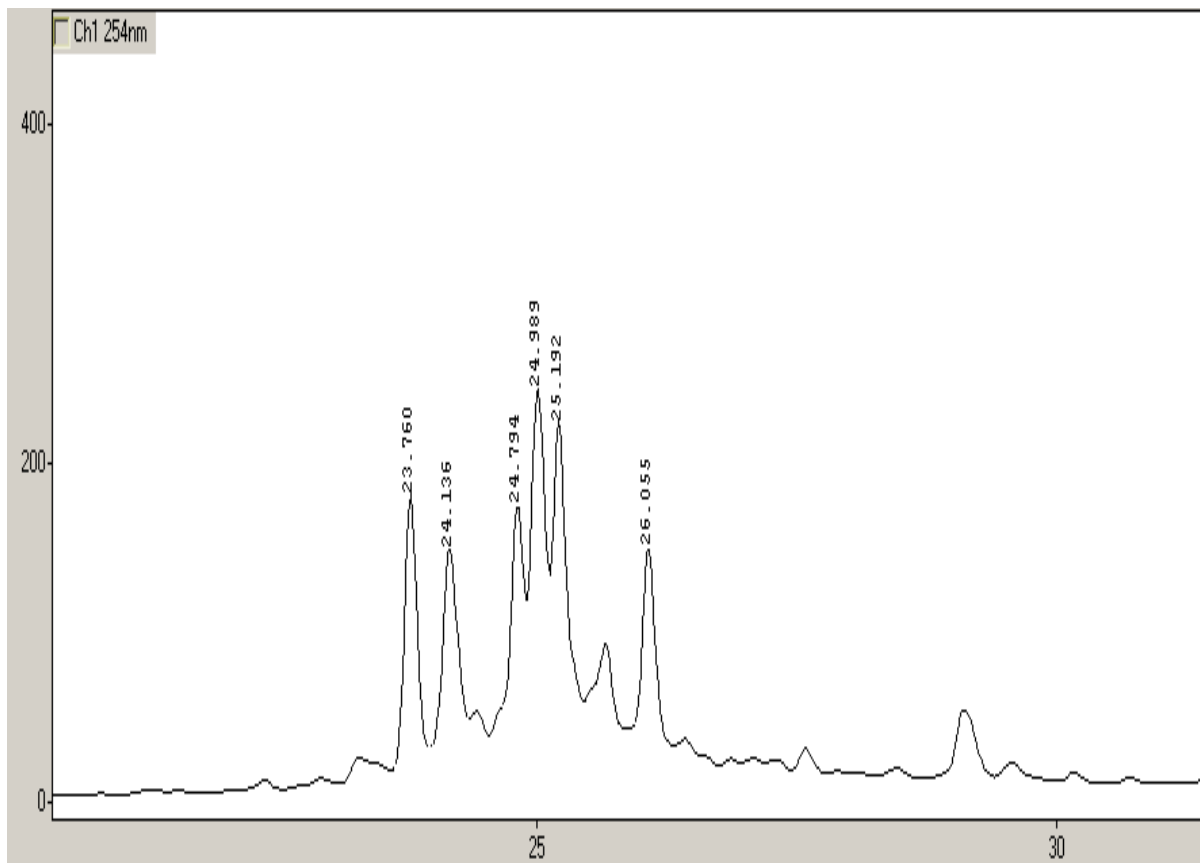


Figura 72: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.4 (H₂O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm)

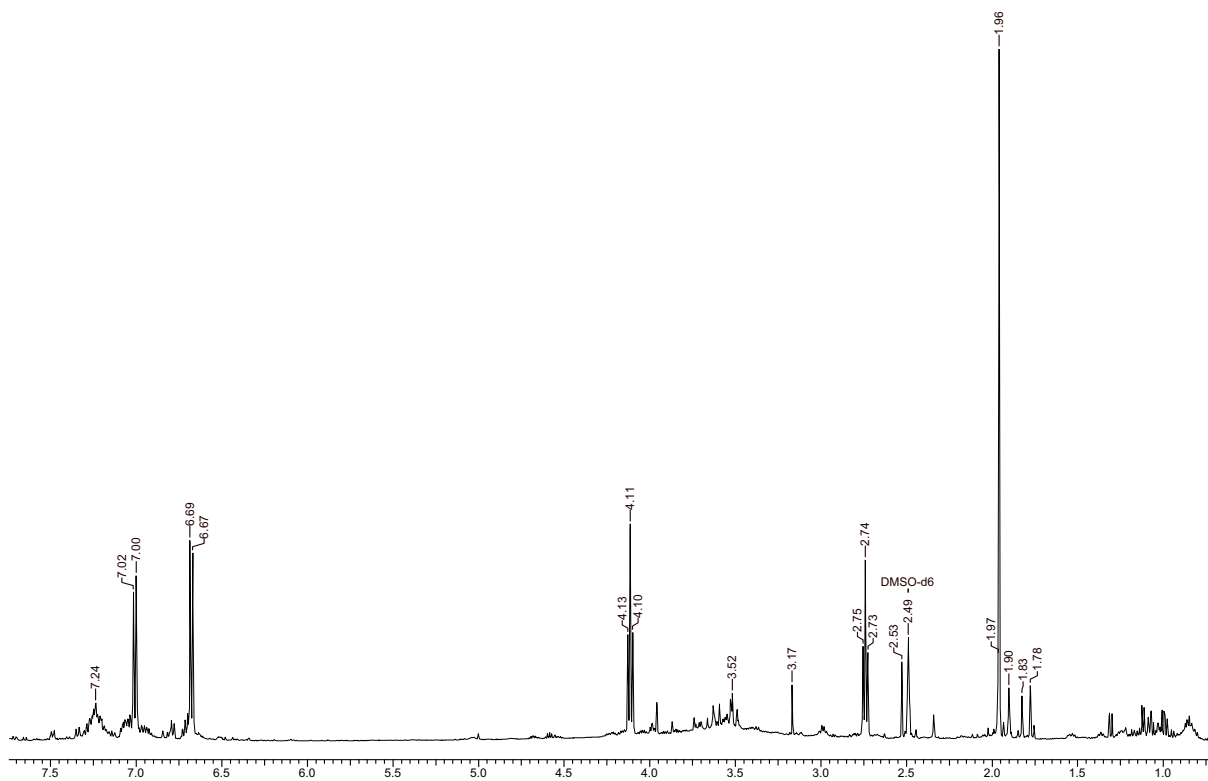


Figura 73: Espectro de RMN de ¹H do extrato de Mc-7F.4 (DMSO-d₆ a 11,7 T)

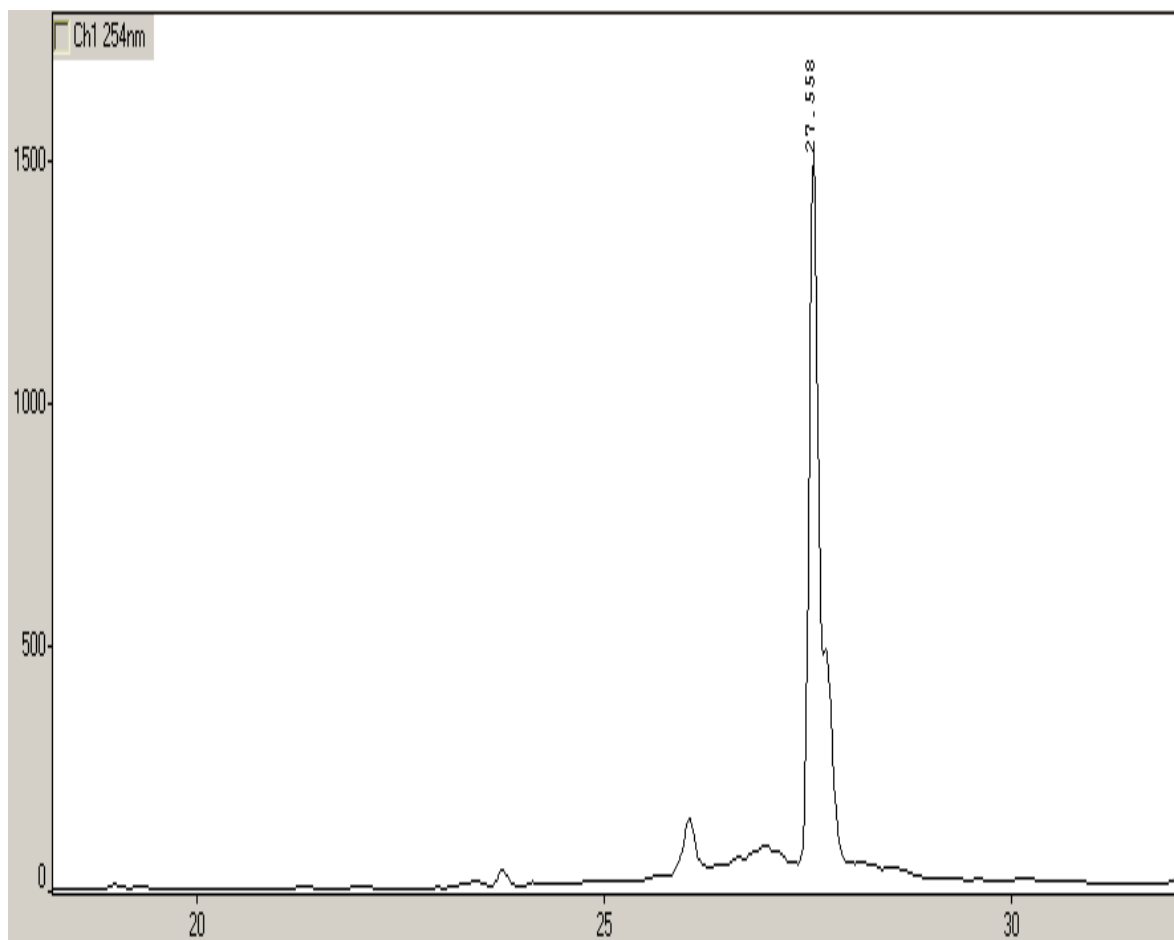


Figura 74: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.5 ($\text{H}_2\text{O}+0,5\% \text{HAc/MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm)

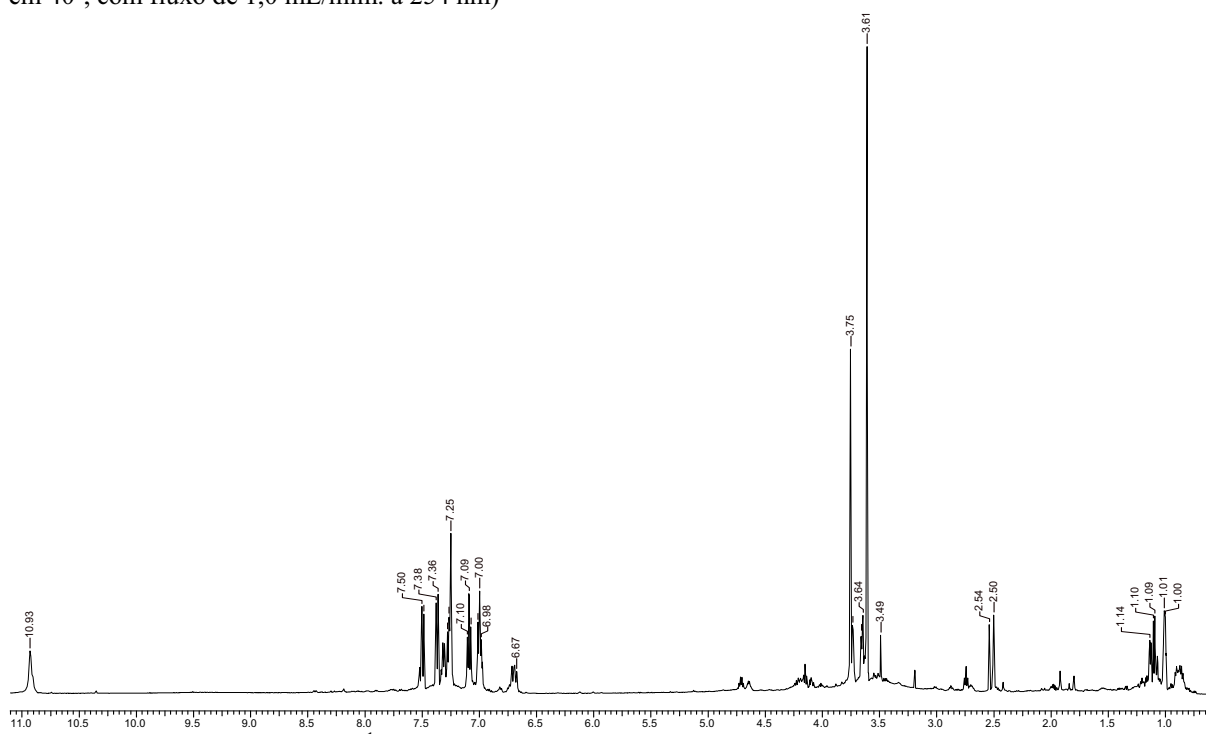


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-7F.5 ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

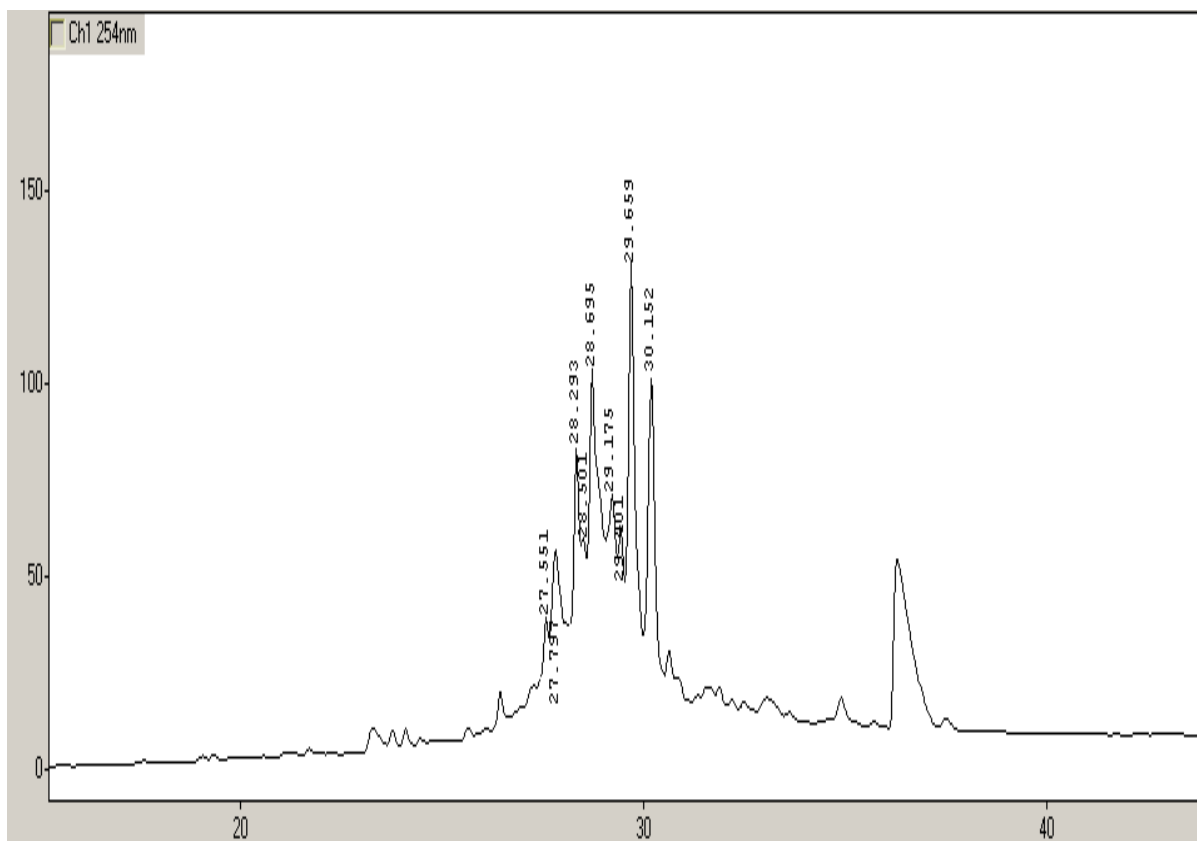


Figura 76: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.6 ($H_2O+0,5\% HAc/MeOH$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm)

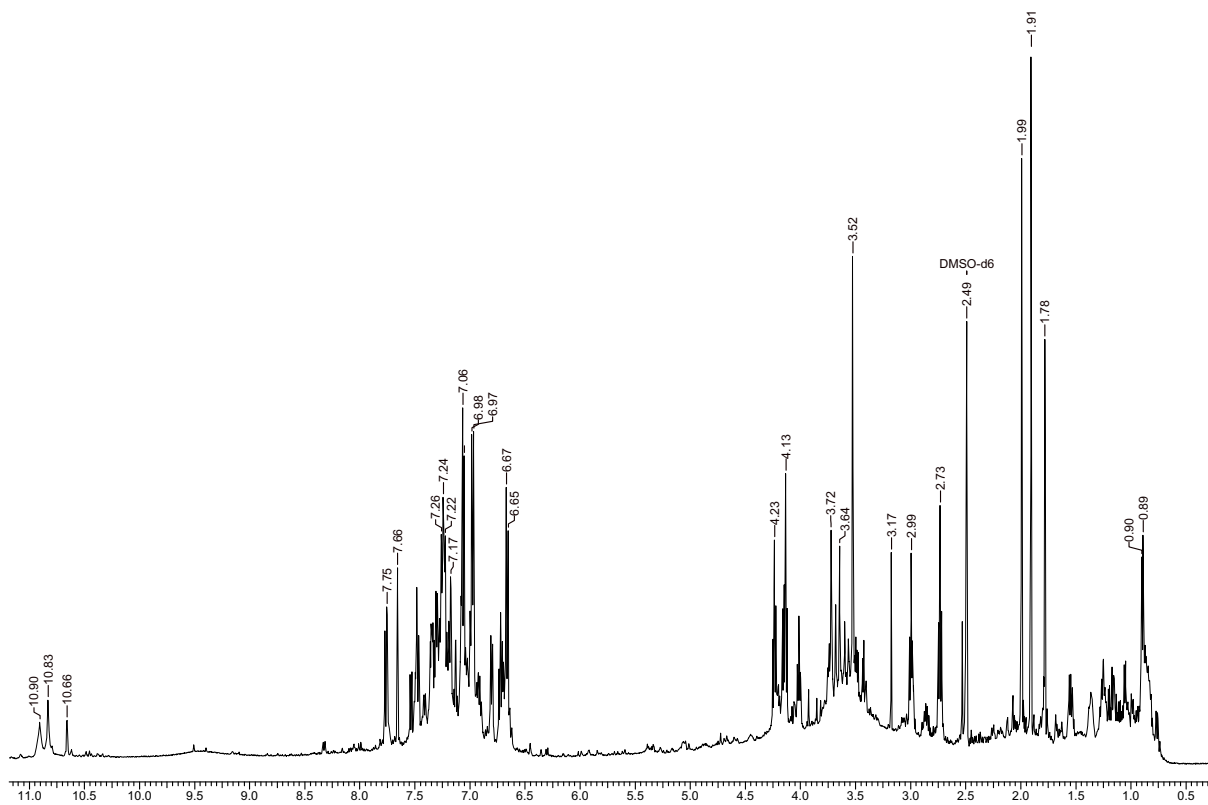


Figura 77: Espectro de RMN de 1H do extrato de Mc-7F.6 ($DMSO-d_6$ a 11,7 T)

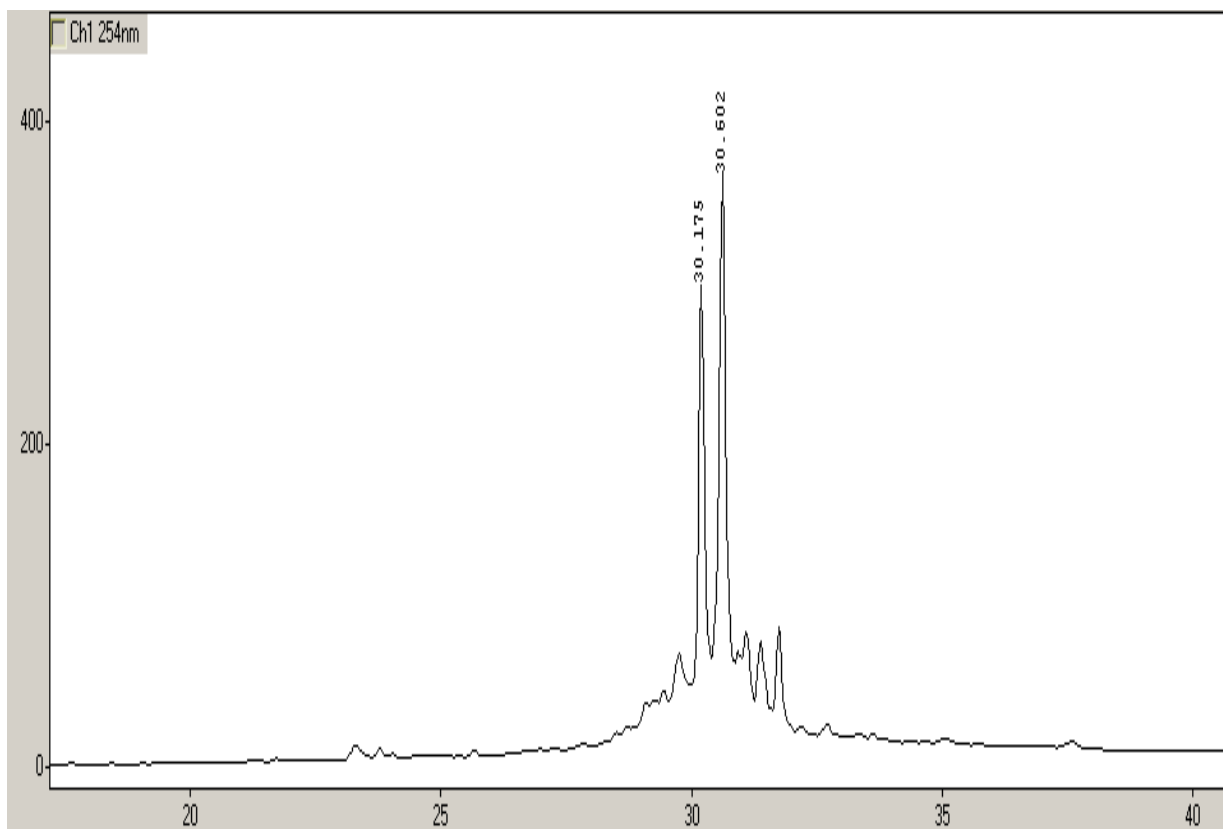


Figura 78: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.7 ($\text{H}_2\text{O}+0,5\% \text{HAc}/\text{MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm)

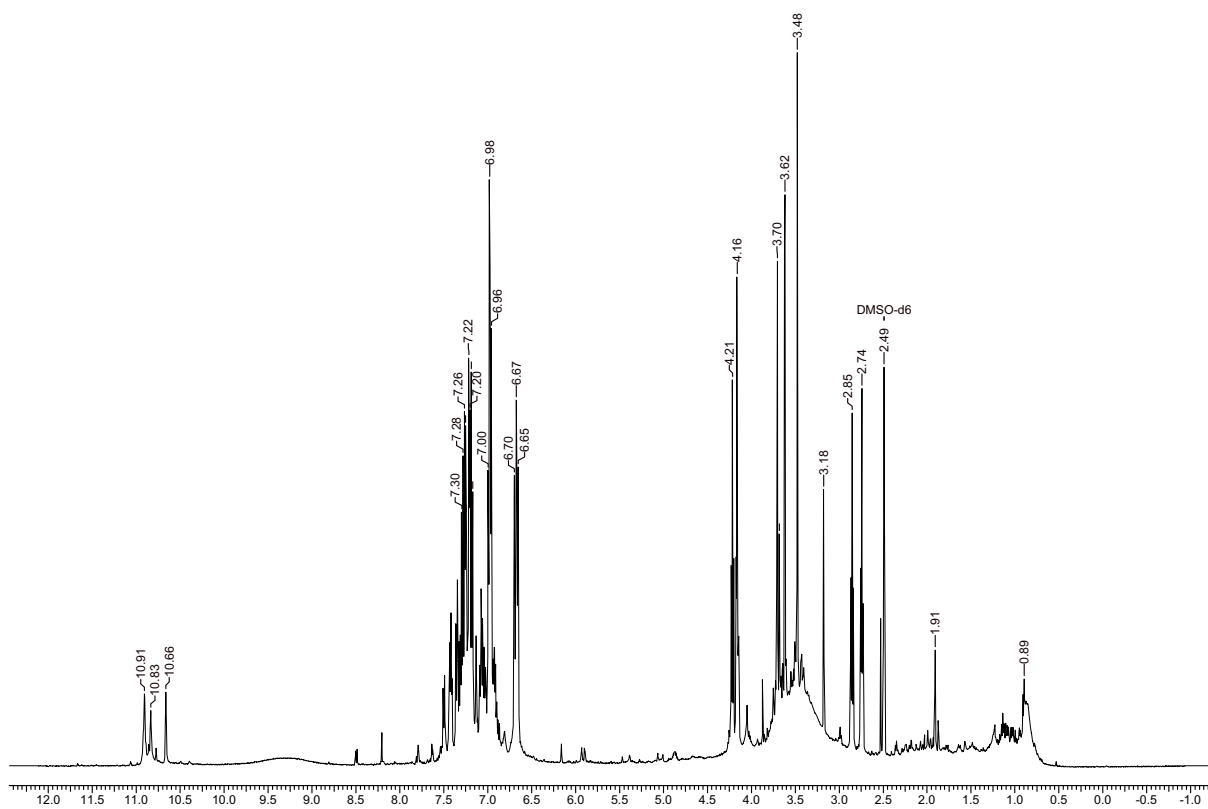


Figura 79: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-7F.7 ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T)

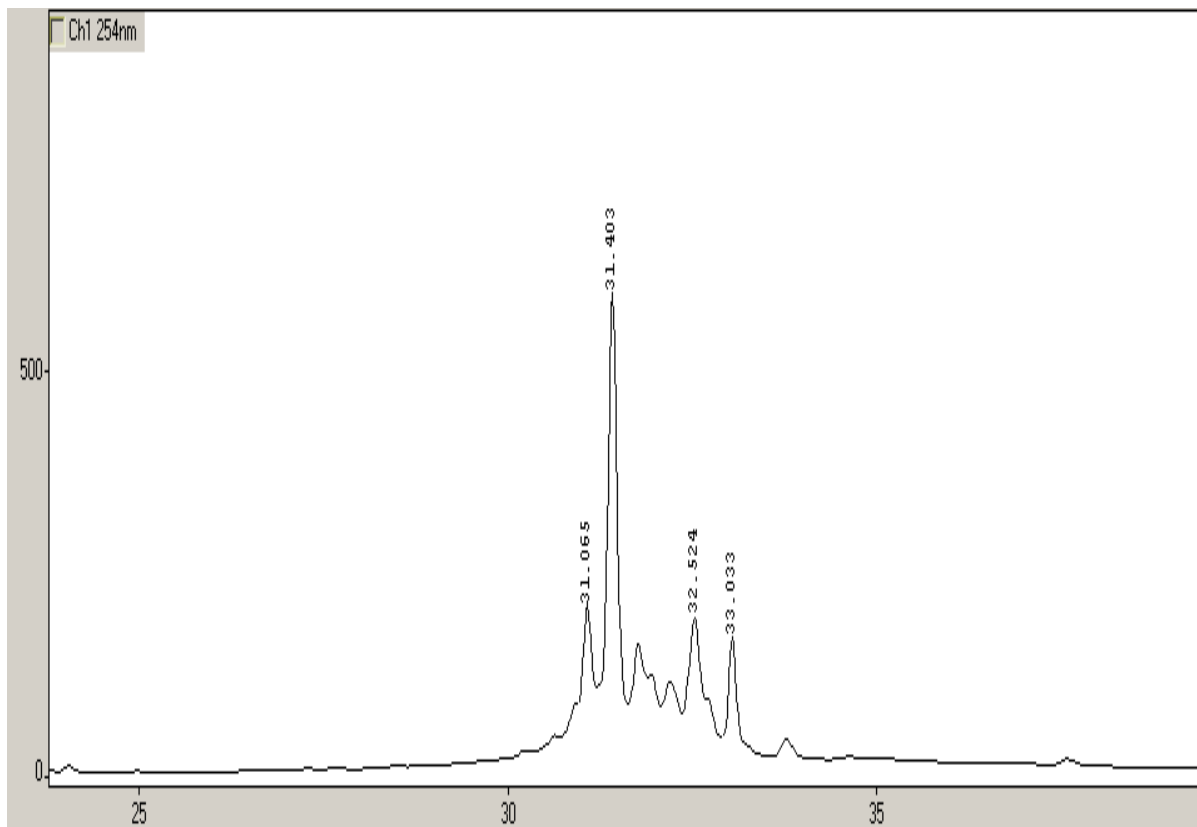


Figura 80: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.8 (H₂O+0,5% HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm)

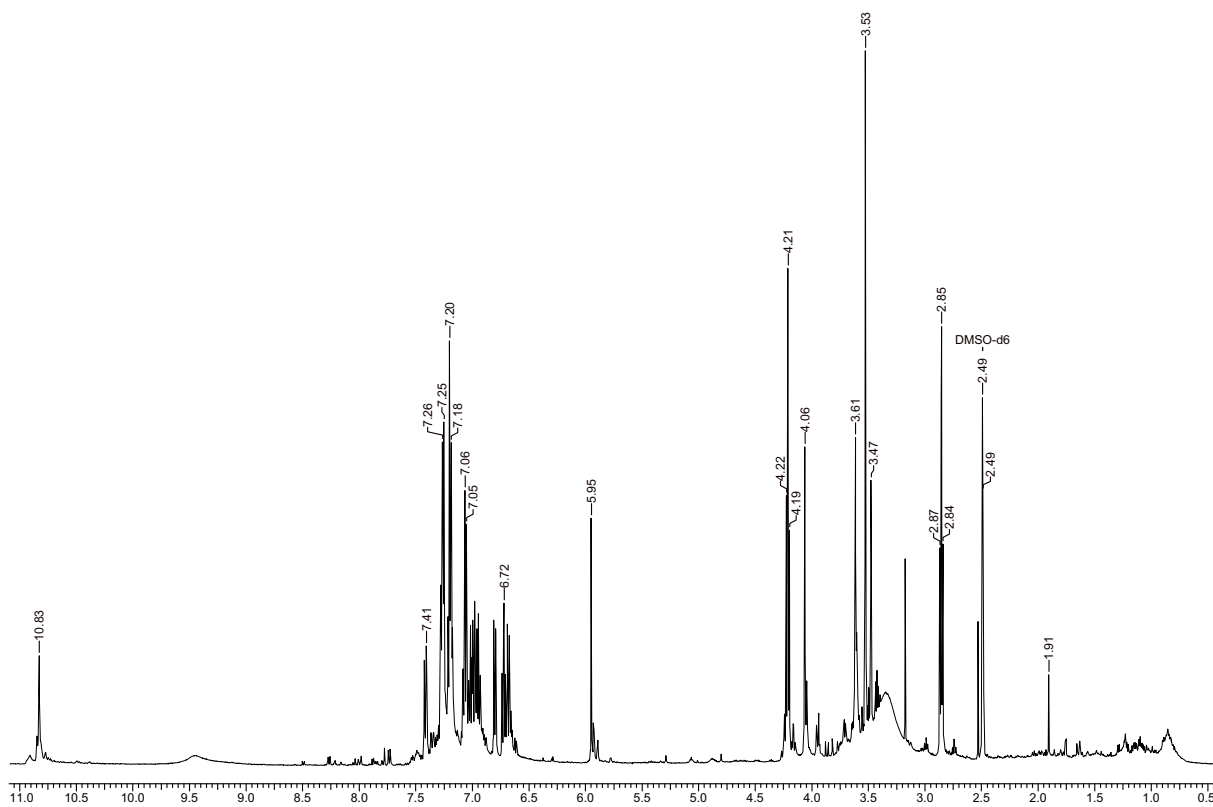


Figura 81: Espectro de RMN de ¹H do extrato de Mc-7F.8 (DMSO-d₆ a 11,7 T)

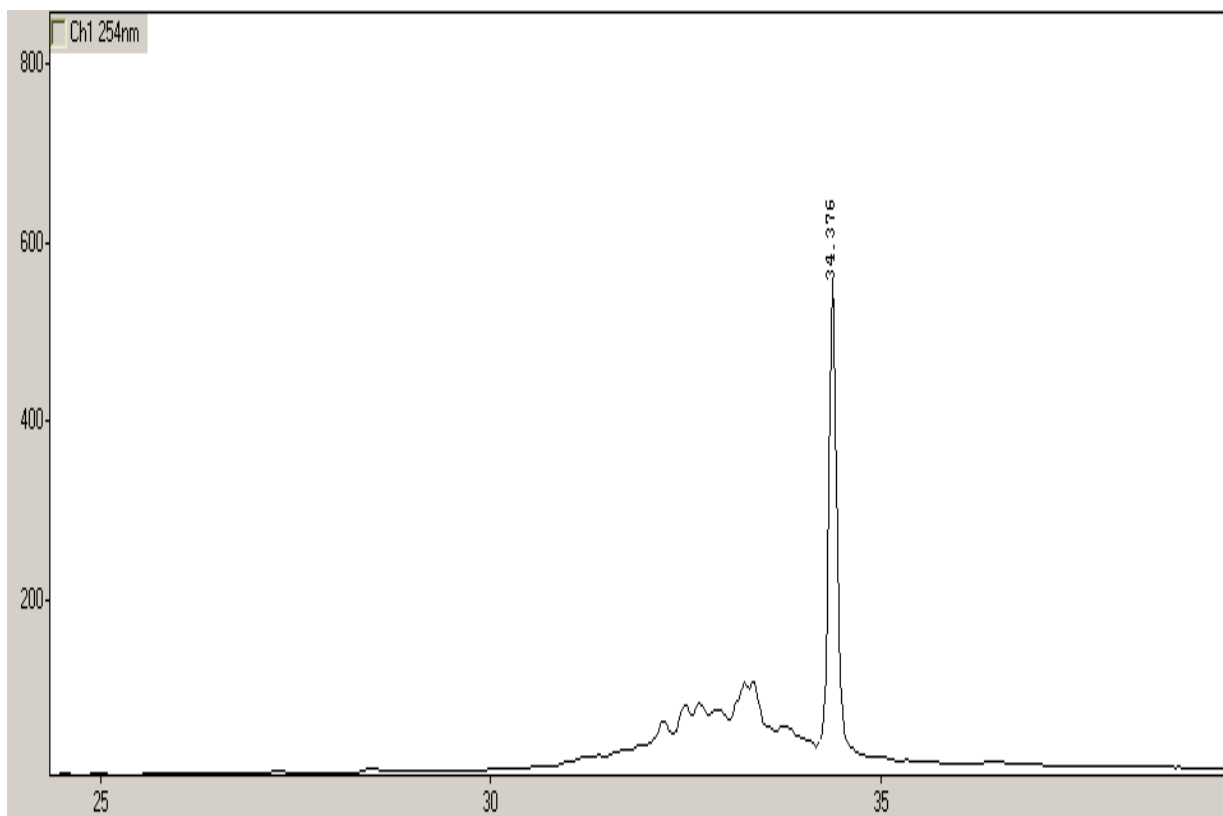


Figura 82: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.9 ($\text{H}_2\text{O}+0,5\% \text{HAc/MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm)

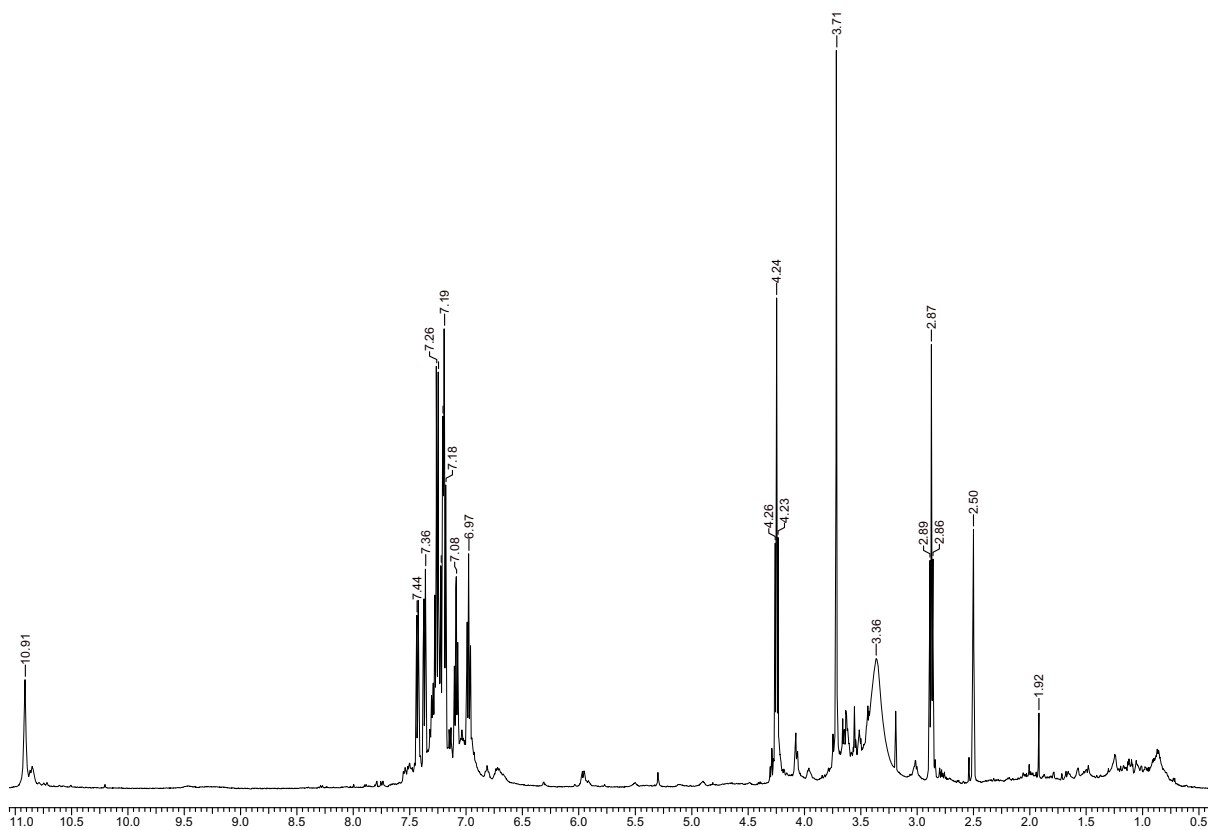


Figura 83: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-7F.9 ($\text{DMSO}-d_6$ a 11,7 T)

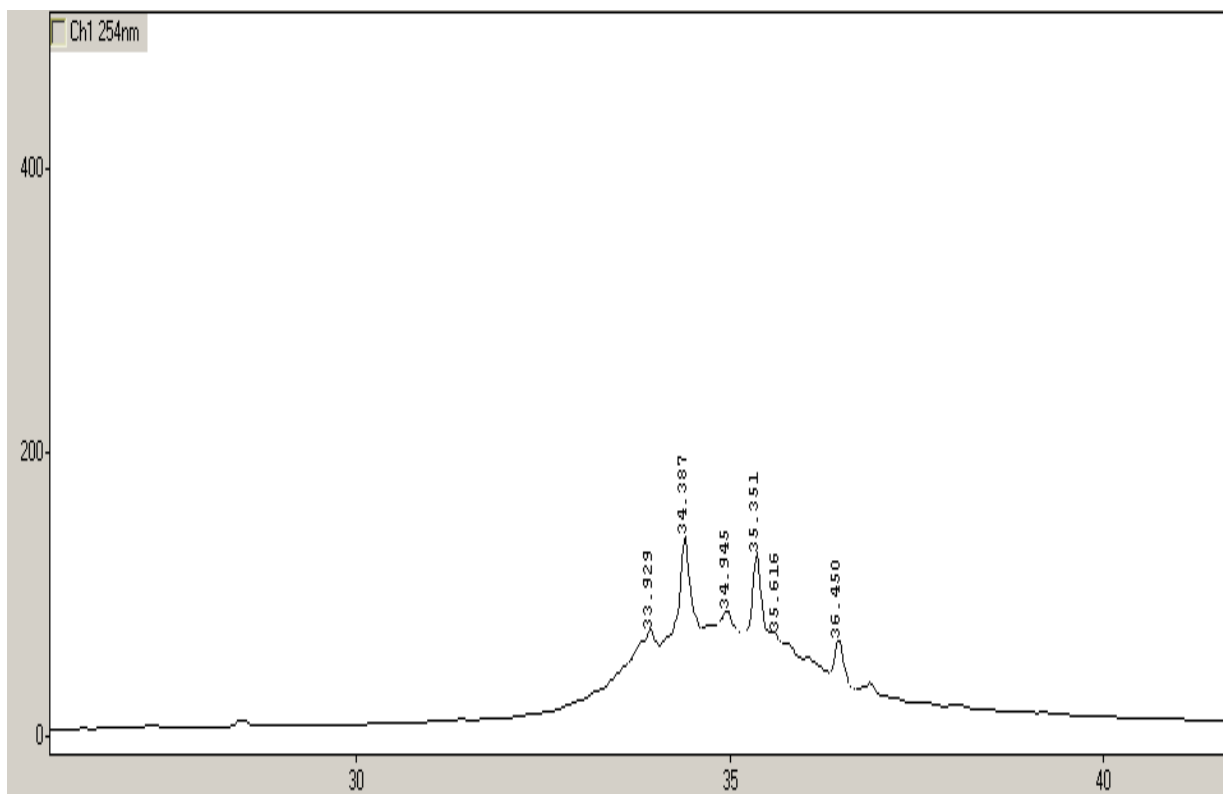


Figura 84: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.10 ($\text{H}_2\text{O}+0,5\% \text{HAc/MeOH}$; 95:5 a 0:100 em 40', com fluxo de 1,0 mL/mim. a 254 nm)

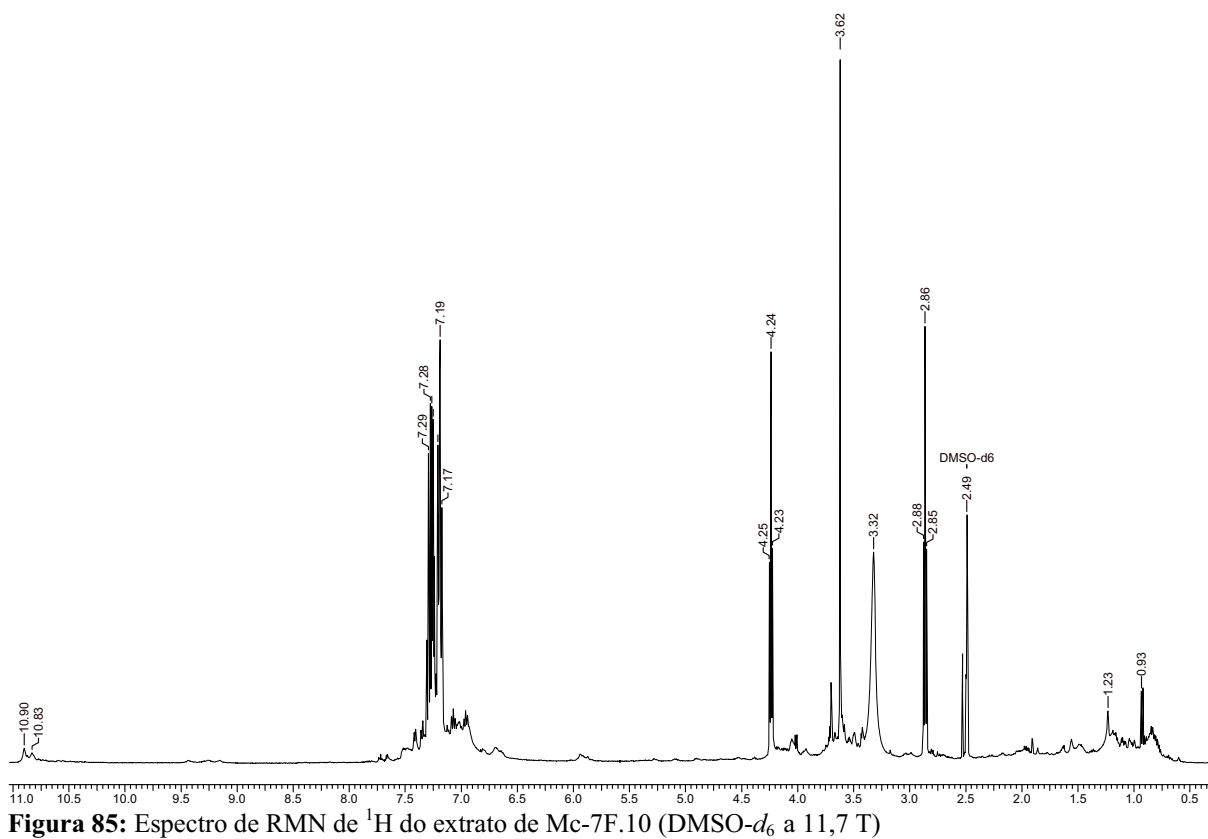


Figura 85: Espectro de RMN de ^1H do extrato de Mc-7F.10 ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

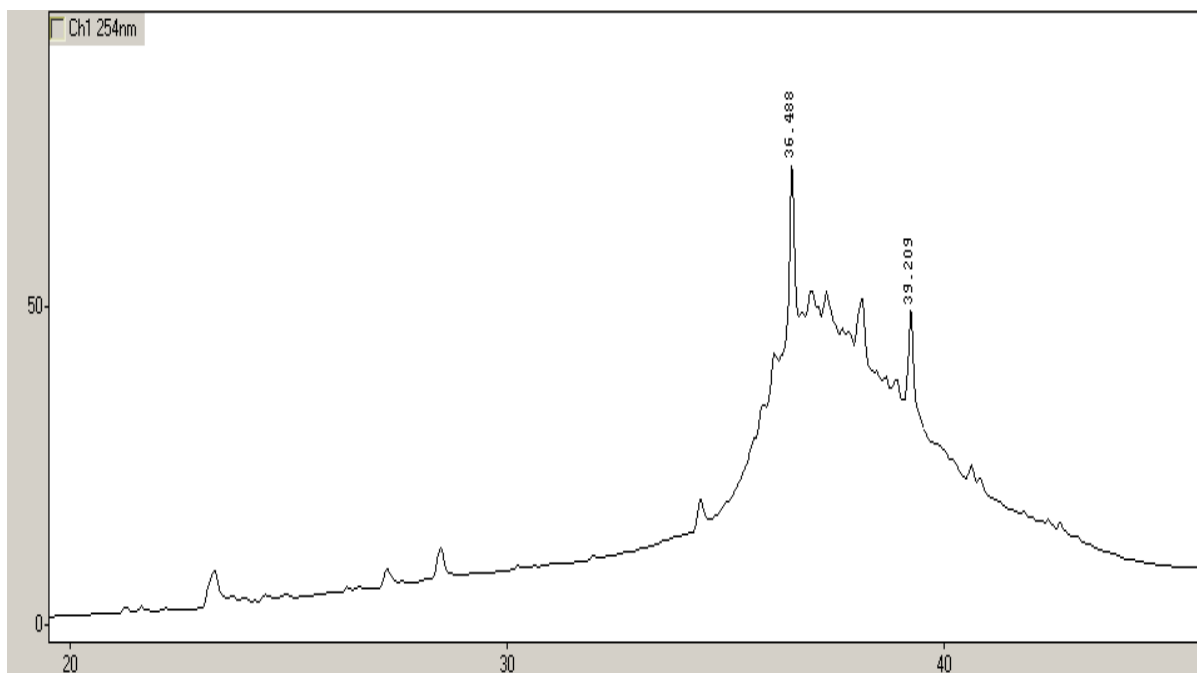


Figura 86: Cromatograma em grad. explorat. do extrato AcOEt Mc-7F.11 ($H_2O+0,5\%$ HAc/MeOH; 95:5 a 0:100 em 40° , com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm)

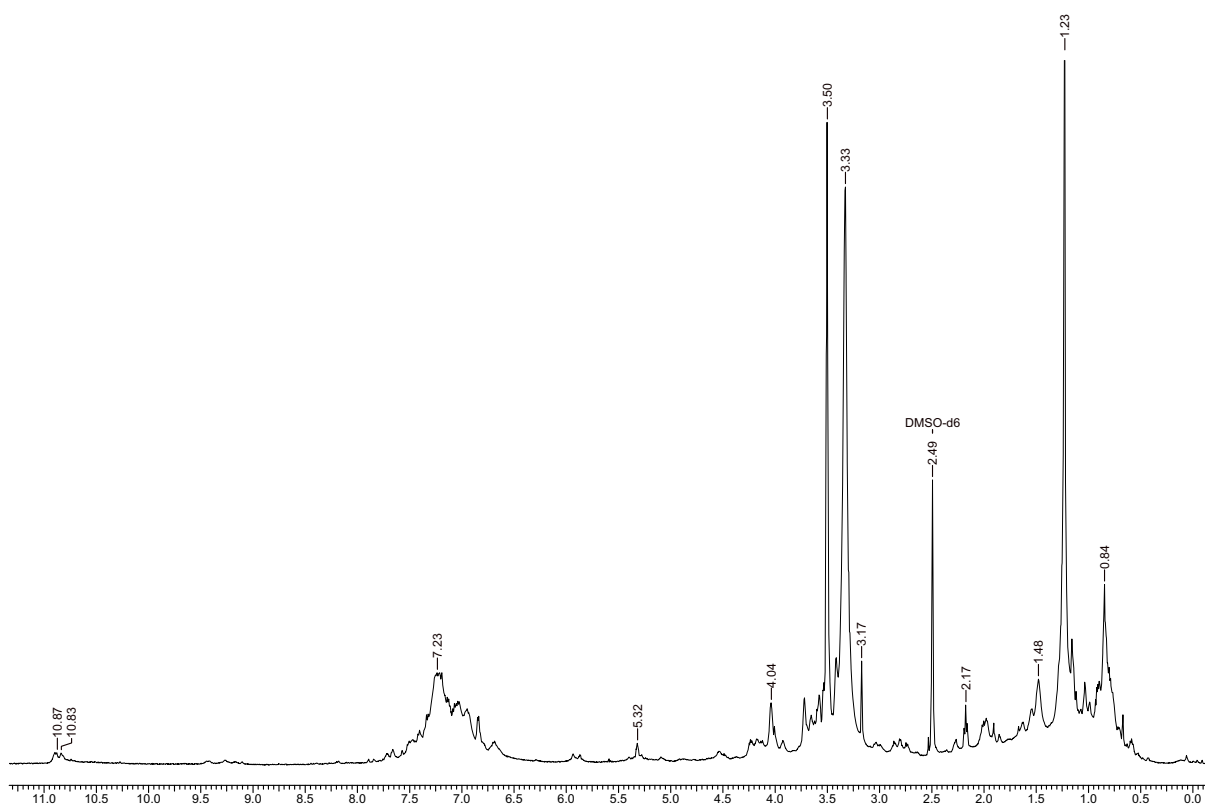


Figura 87: Espectro de RMN de 1H do extrato de Mc-7F.11 ($DMSO-d_6$ a 11,7 T)

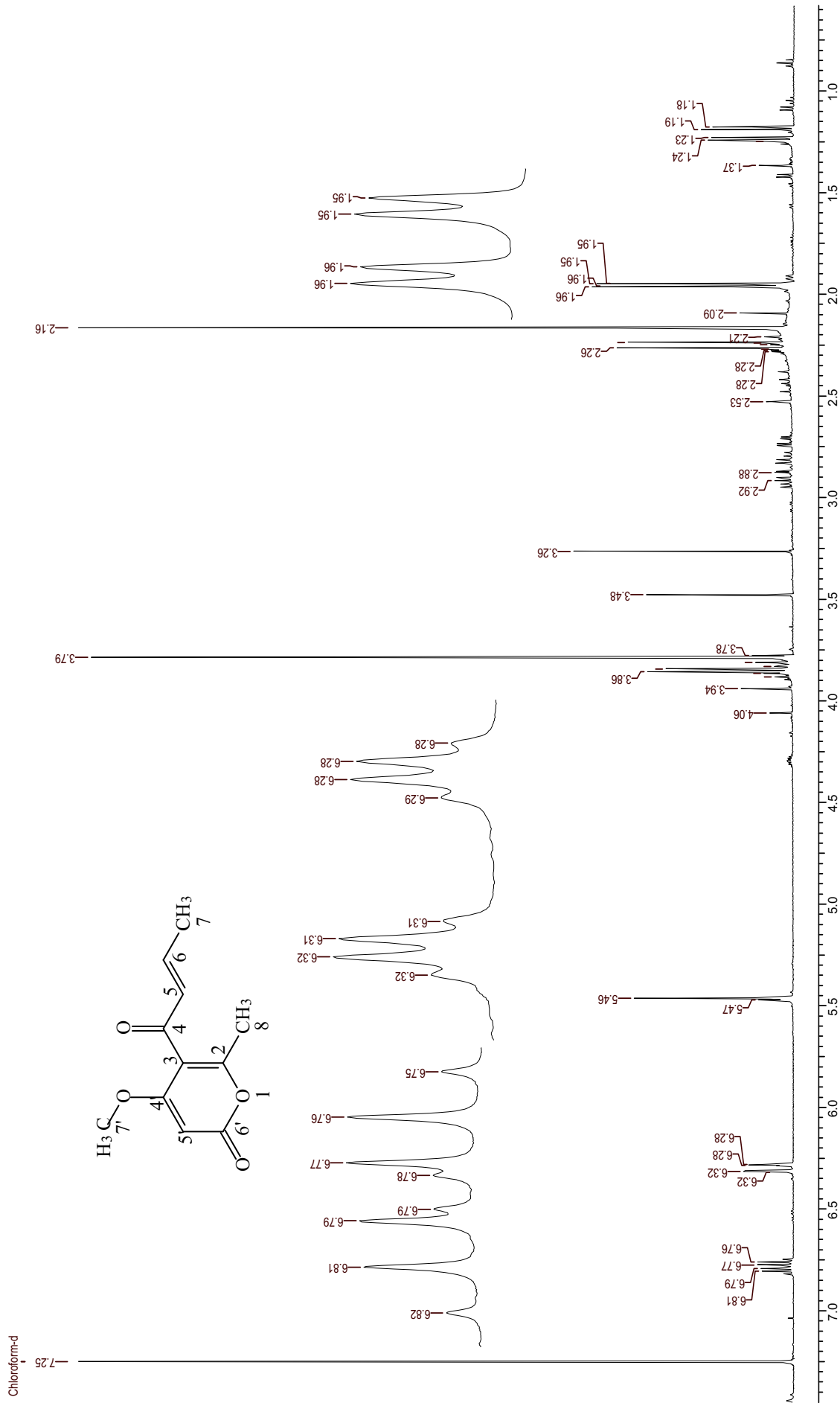


Figura 88: Espectro de RMN de ¹H de **1** (DMSO-d₆ a 11,7 T)

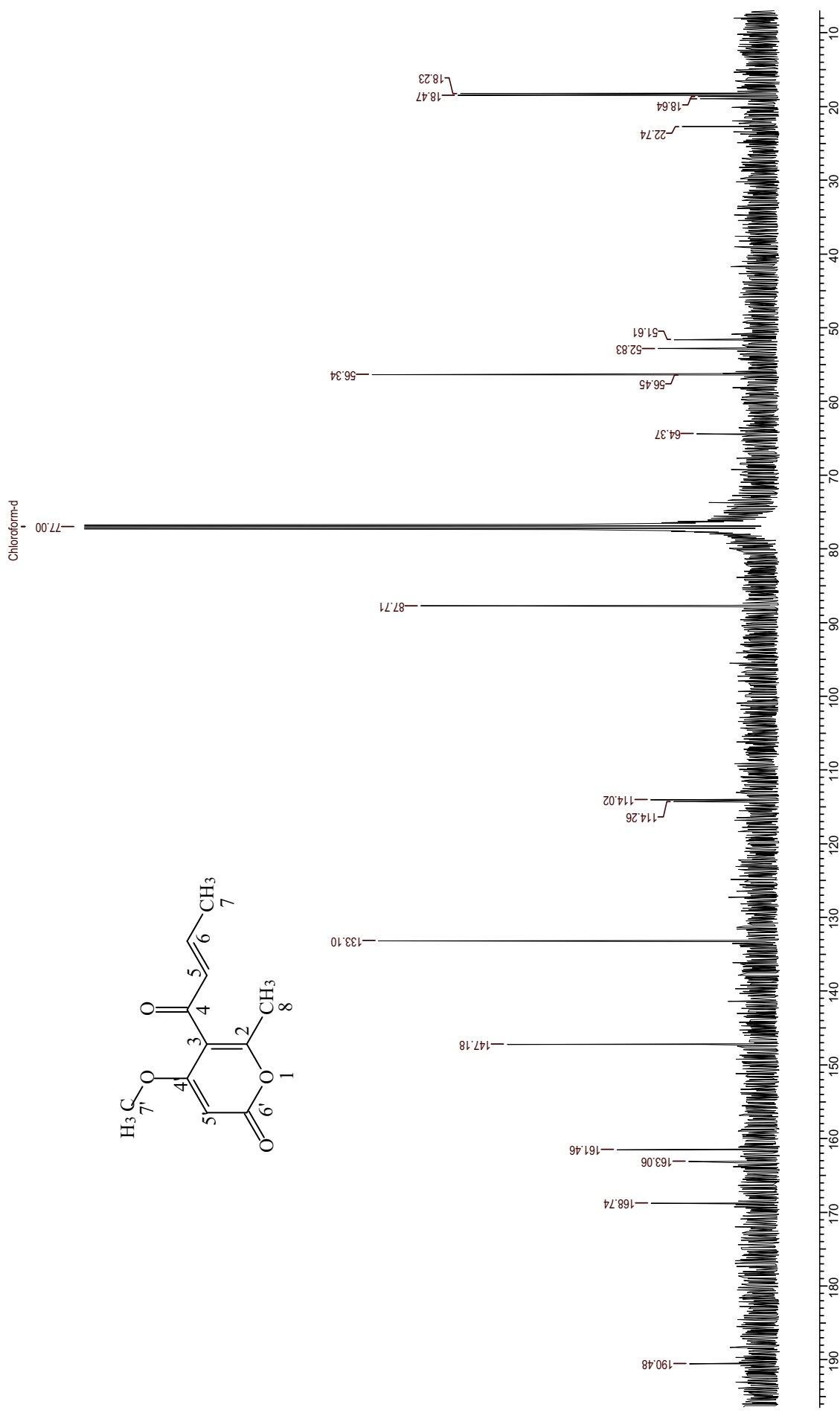


Figura 89: Espectro de RMN de ¹³C de **1** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

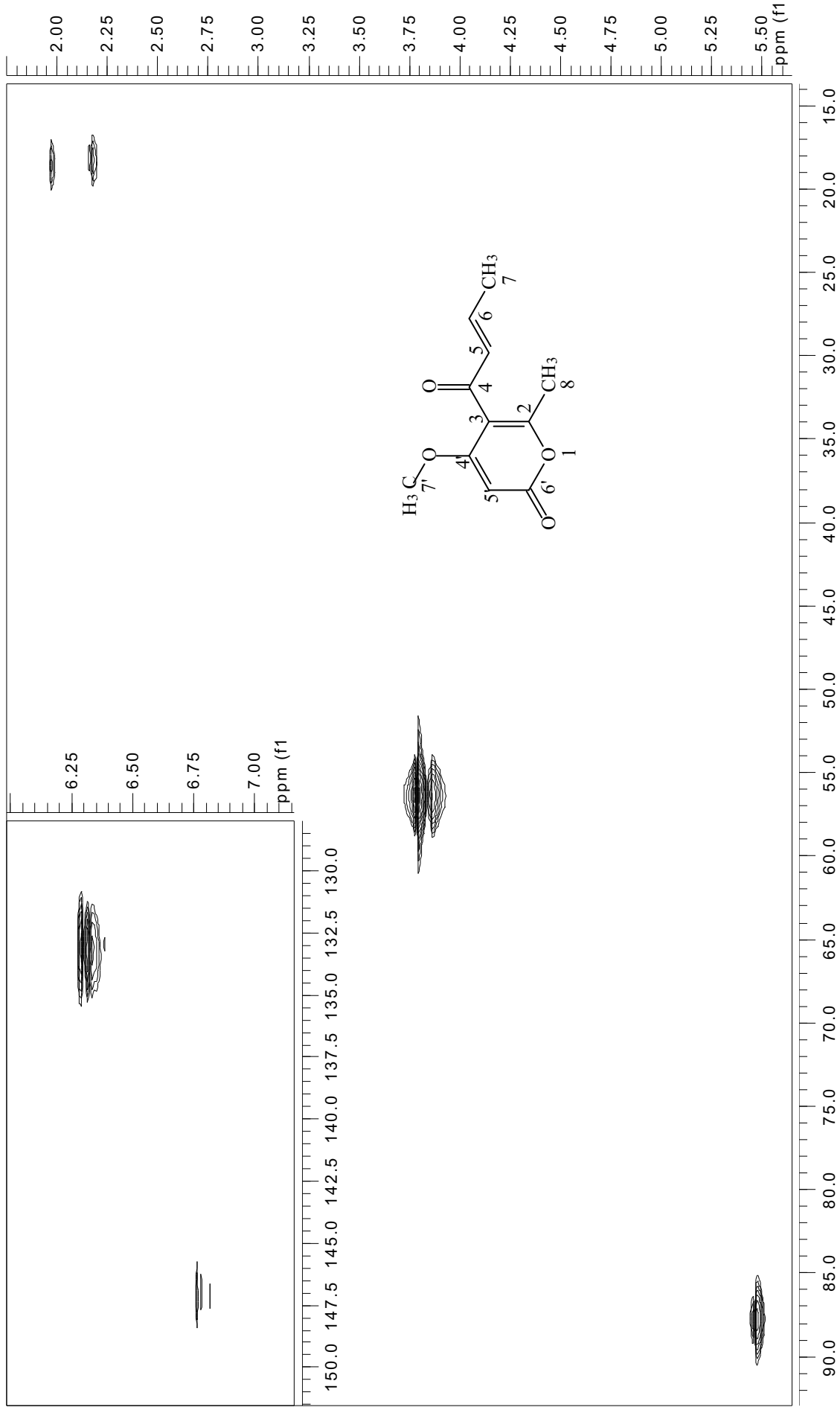


Figura 90: Mapa de contorno gHMQC de (I) ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

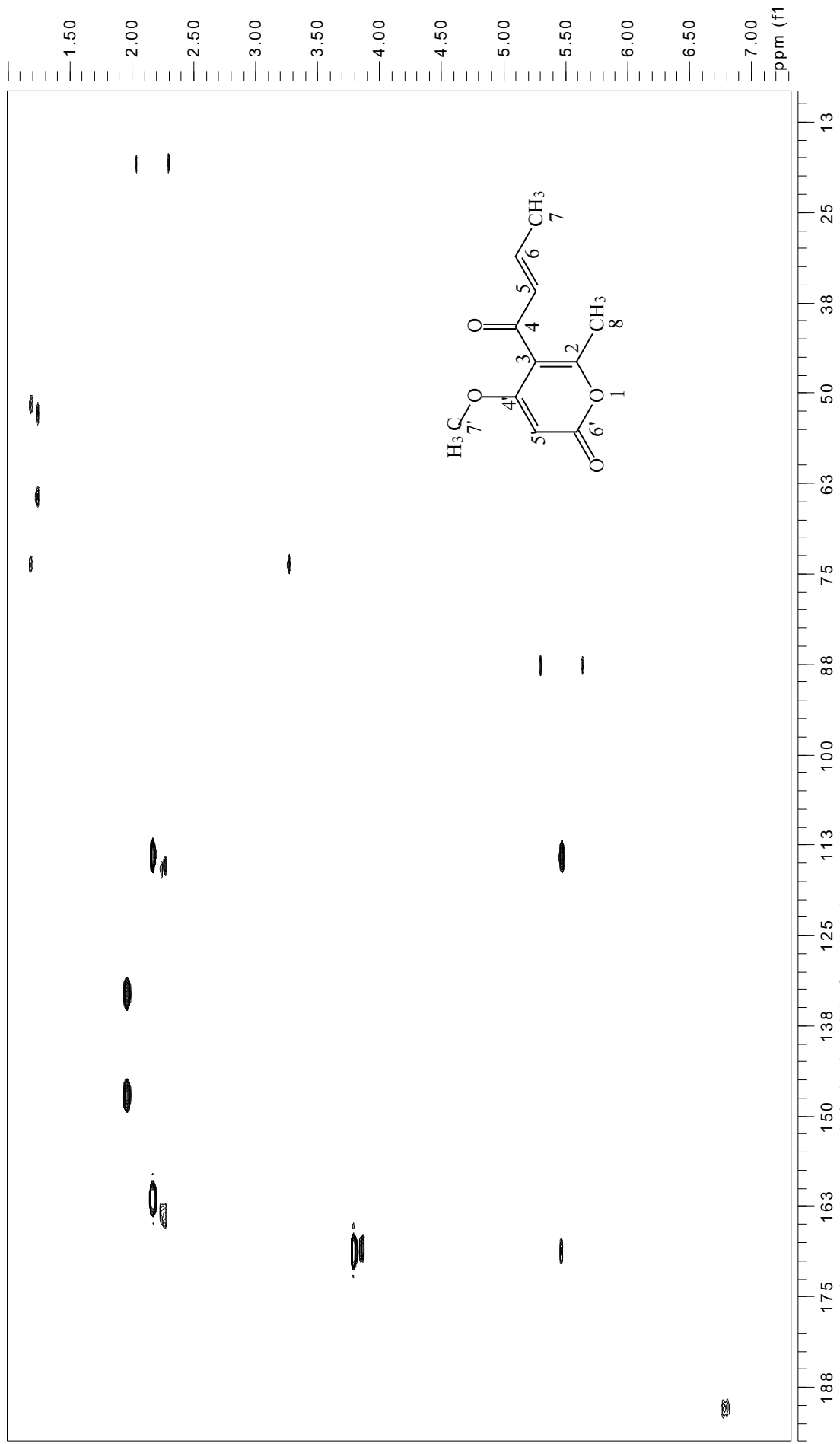


Figura 91: Mapa de contorno gHMBC de **1** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

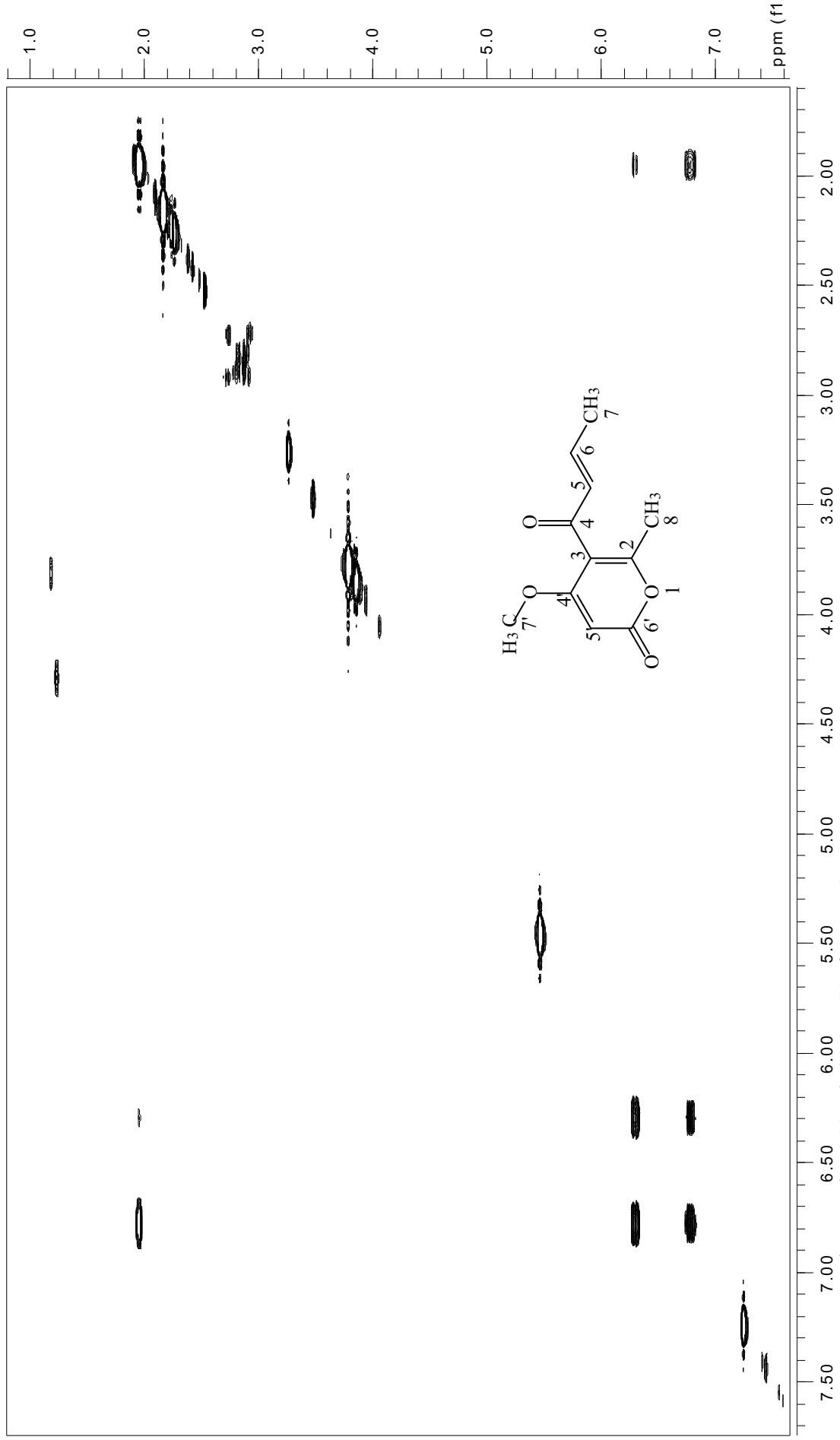


Figura 92: Espectro de RMN de gCOSY de **1** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

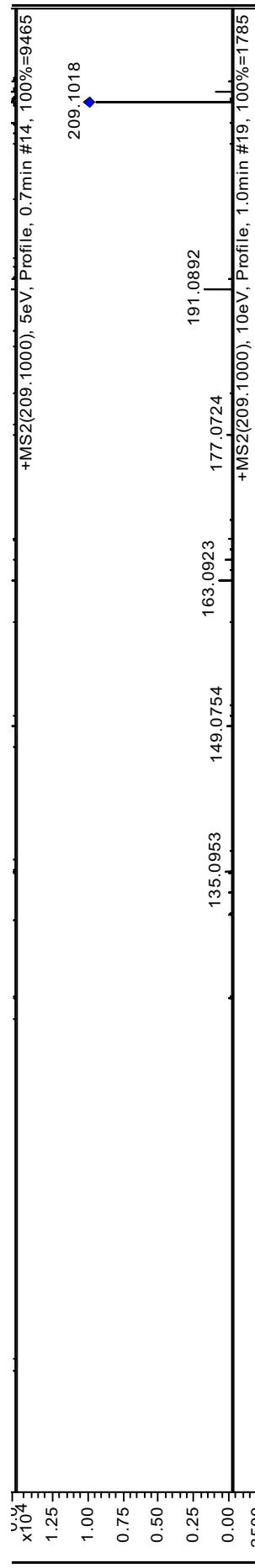
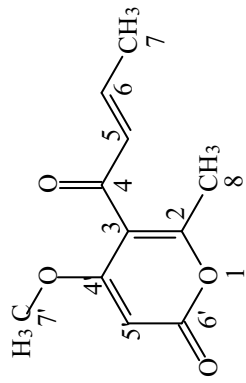


Figura 93: Espectro de Massas de (1)



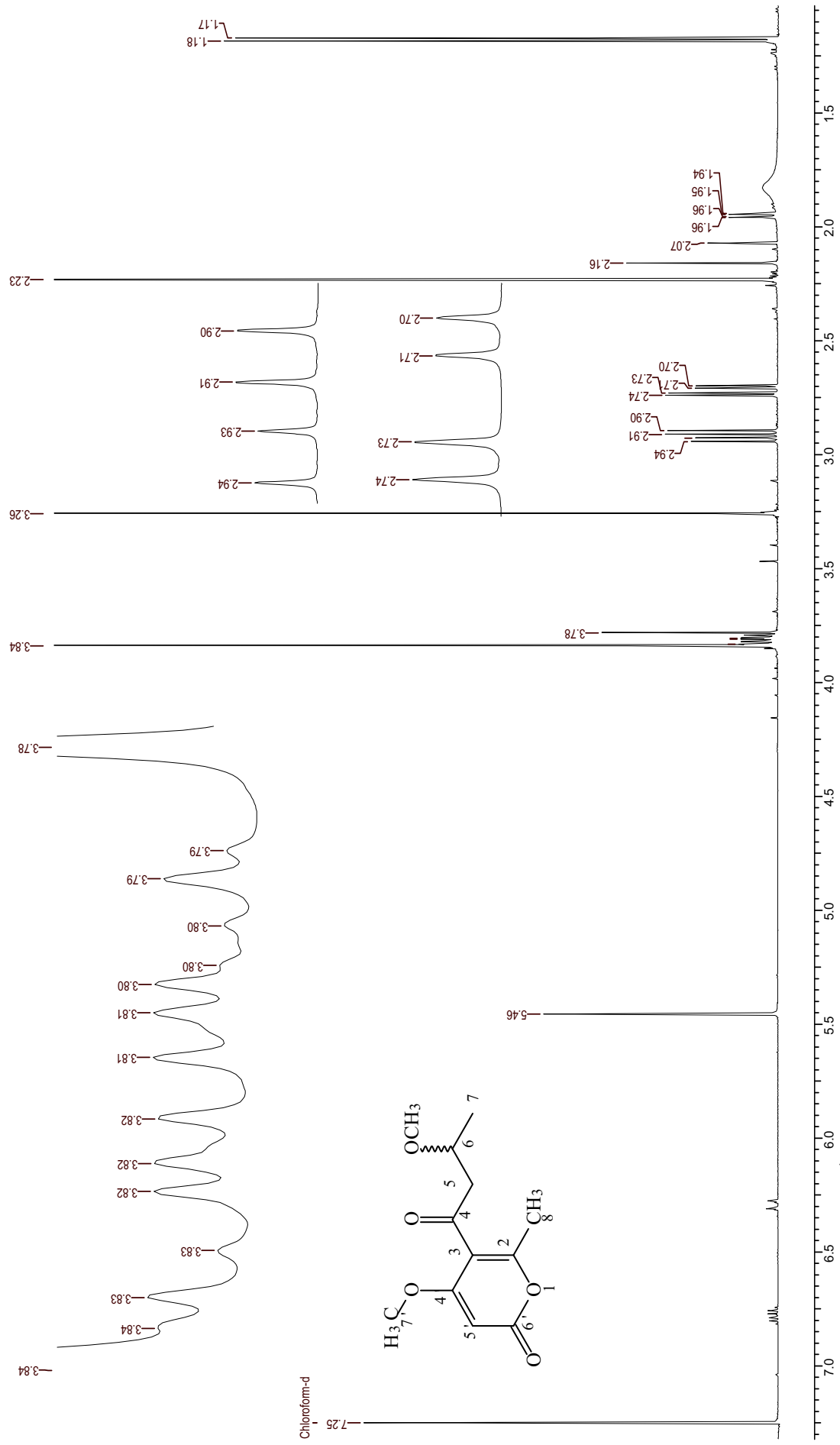


Figura 94: Espectro de RMN de ^1H de **2** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

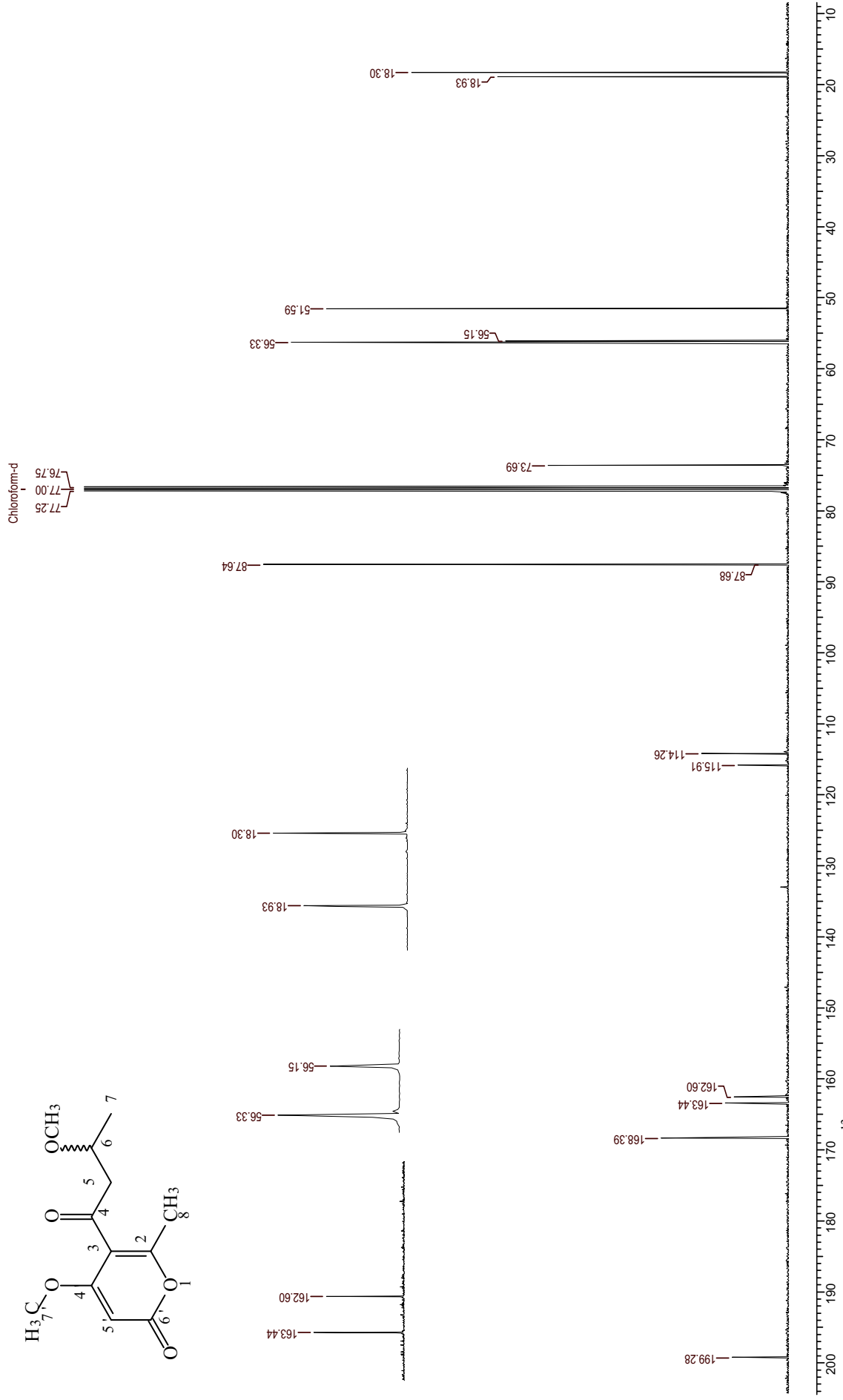


Figura 95: Espectro de RMN de ¹³C de **(2)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T T)

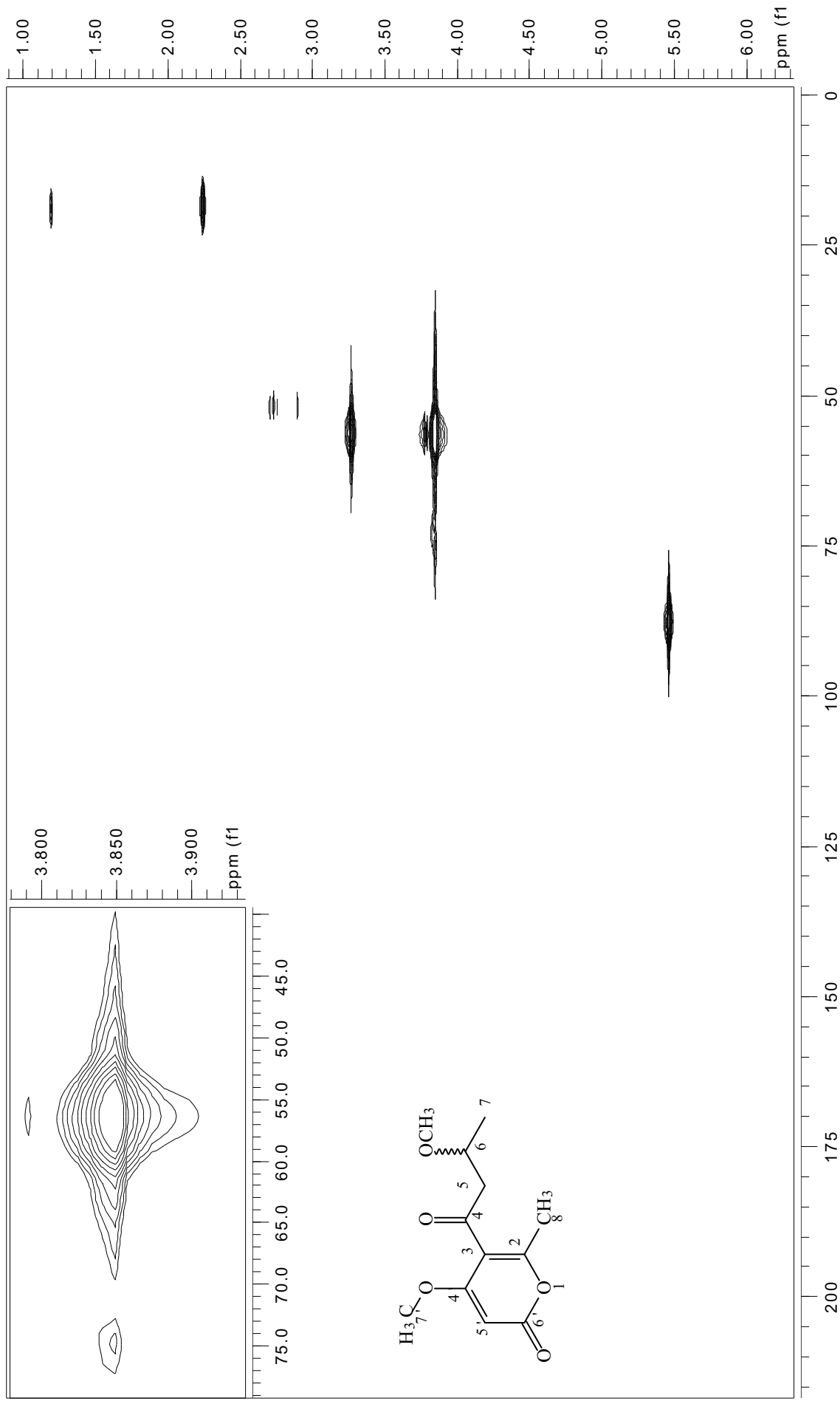


Figura 96: Mapa de contorno gHMBC de **(2)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

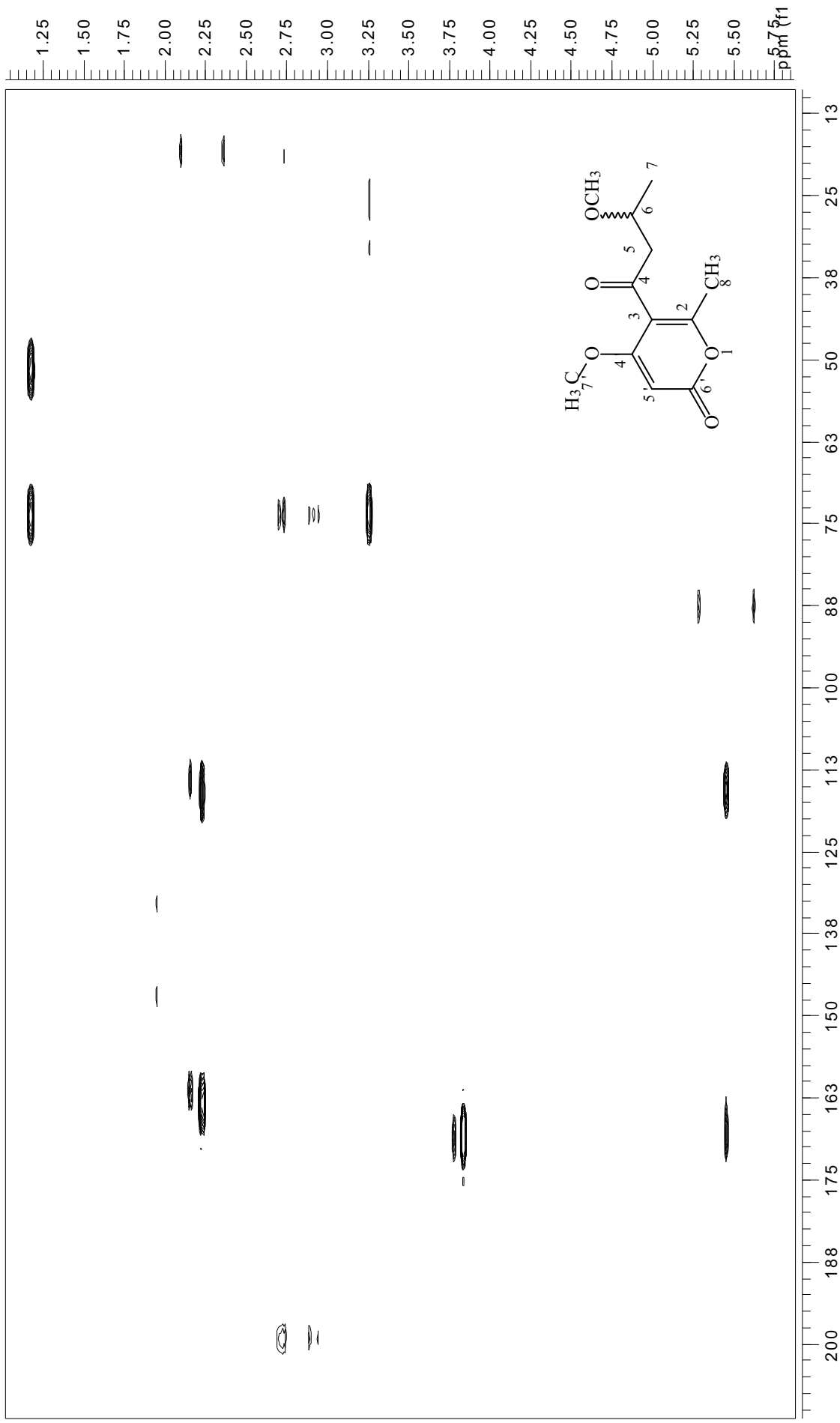


Figura 97: Mapa de contorno gHMBC de **2** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

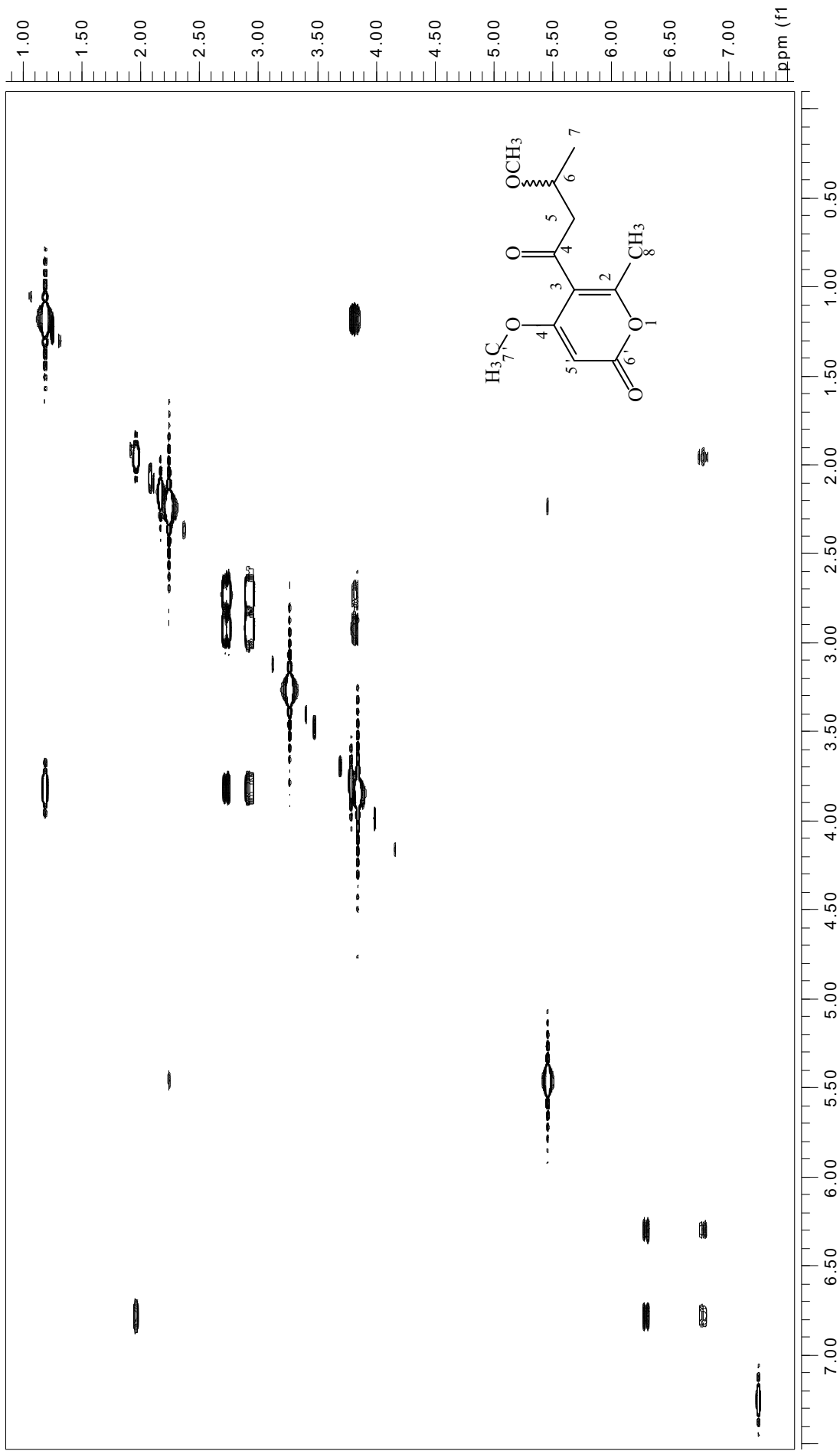


Figura 98: Espectro de RMN de gCOSY de **(2)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

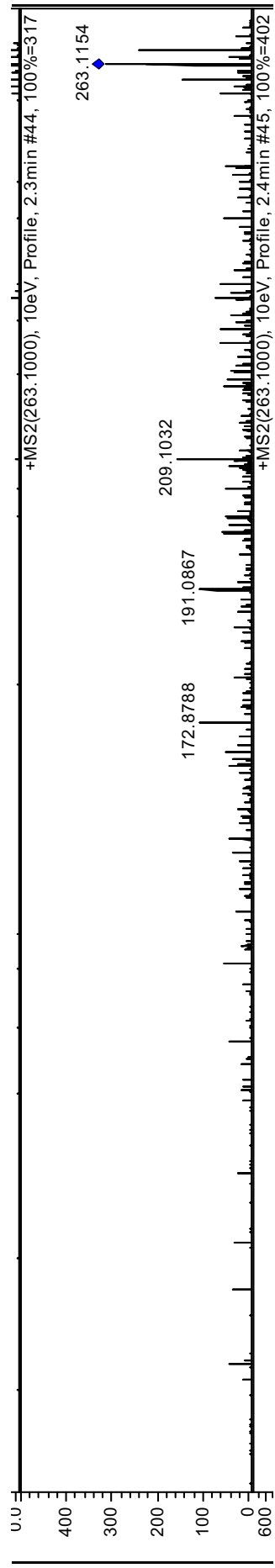
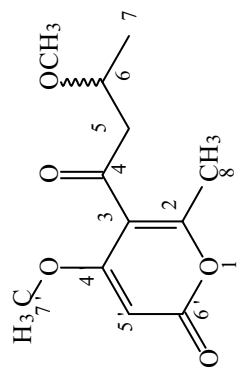


Figura 99: Espectro de Massas de (2)



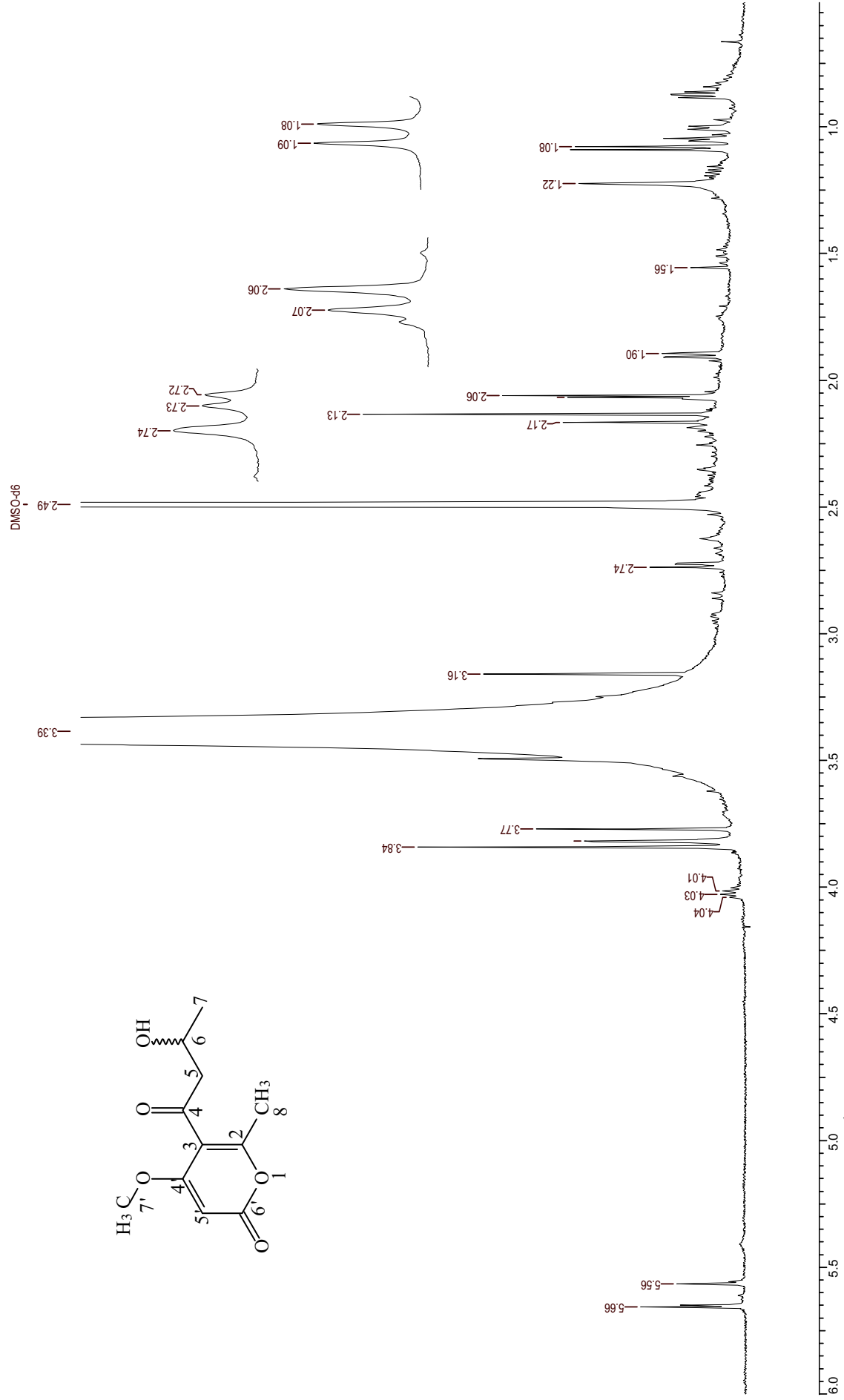


Figura 100: Espectro de RMN de ¹H de **3** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

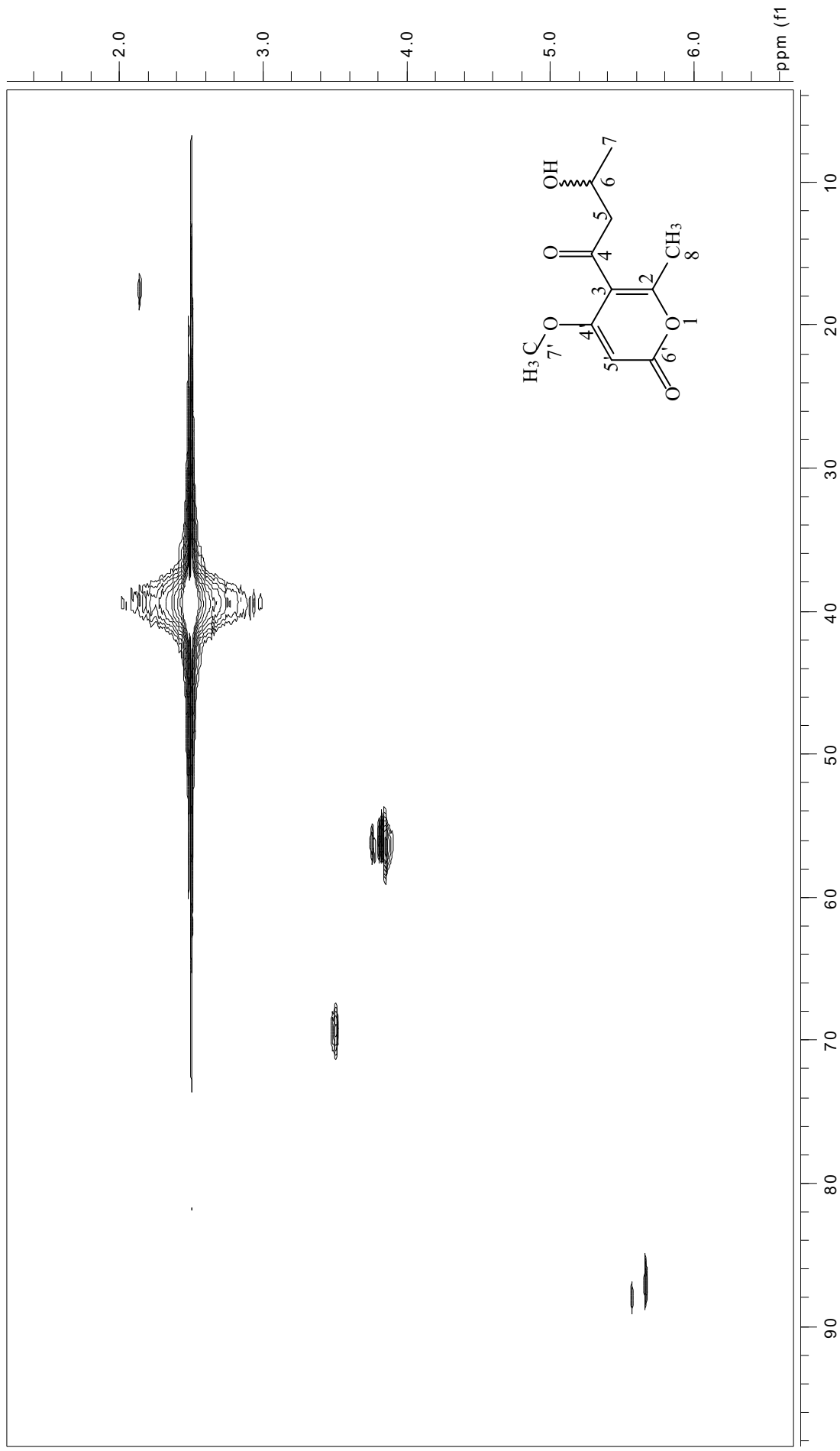


Figura 101: Mapa de contorno gHMJC de **(3)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

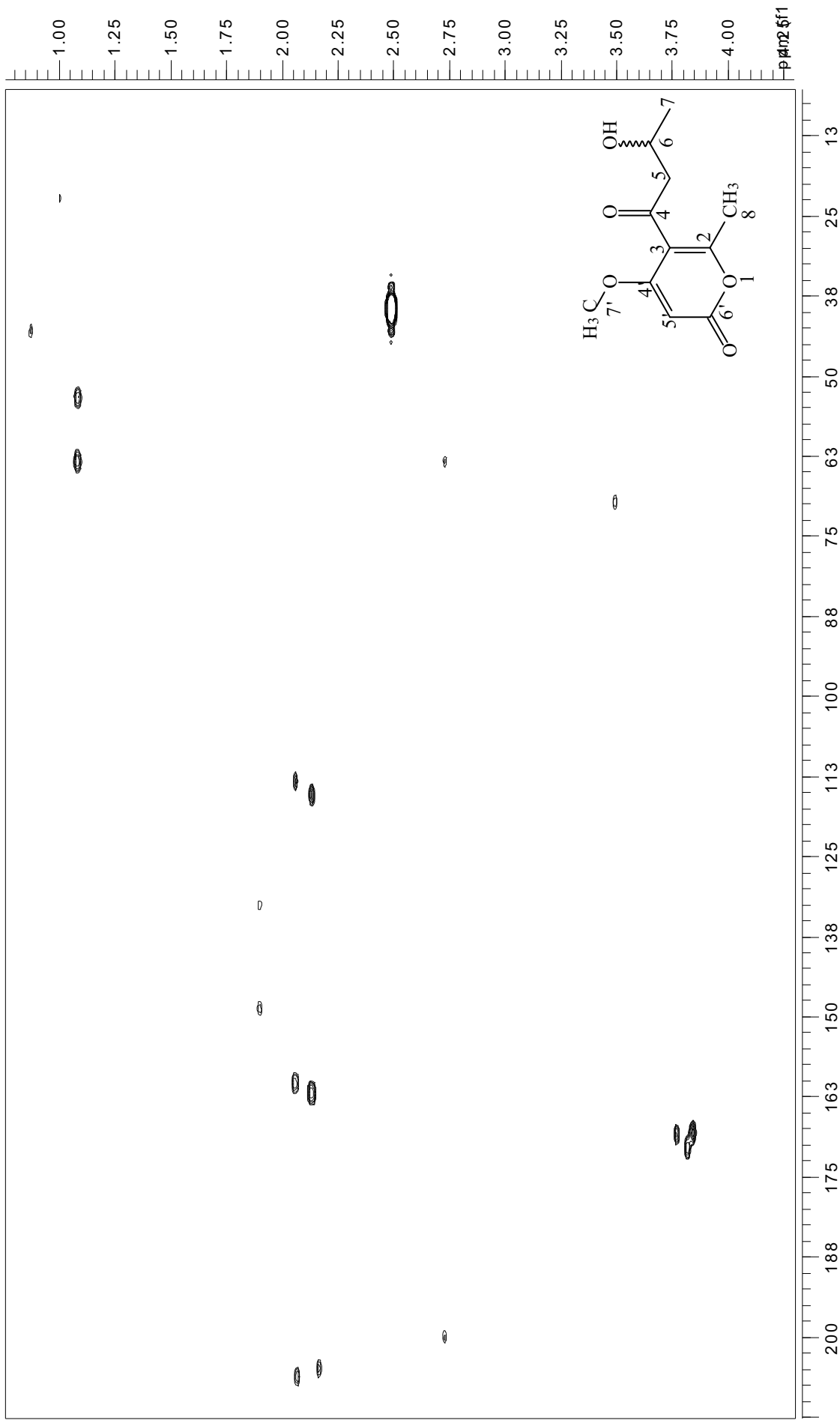


Figura 102: Mapa de contorno gHMBC de **(3)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

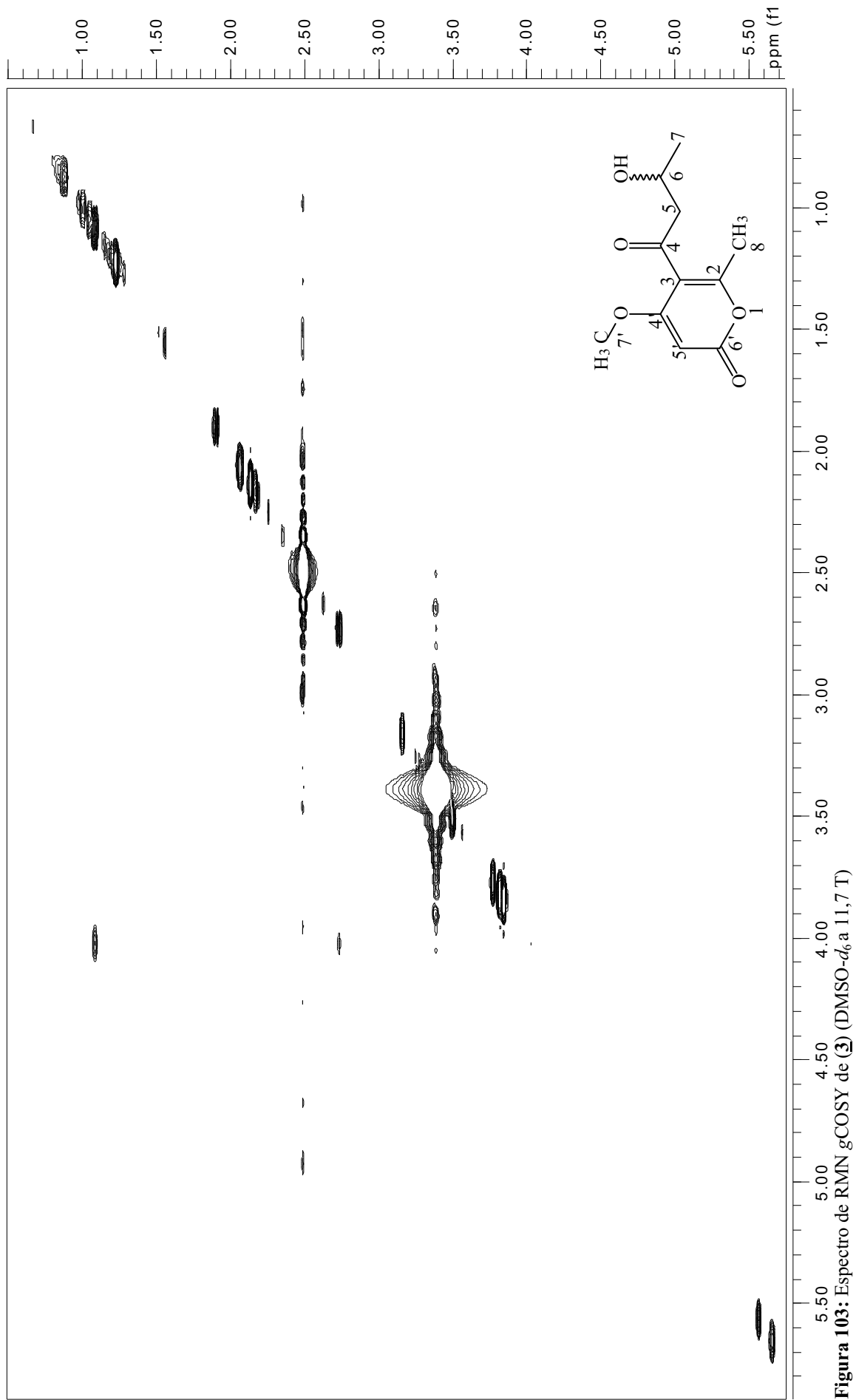


Figura 103: Espectro de RMN gCOSY de **3** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

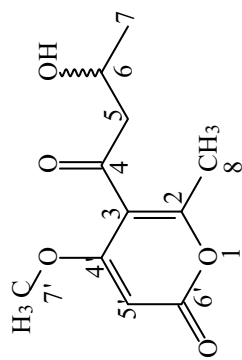
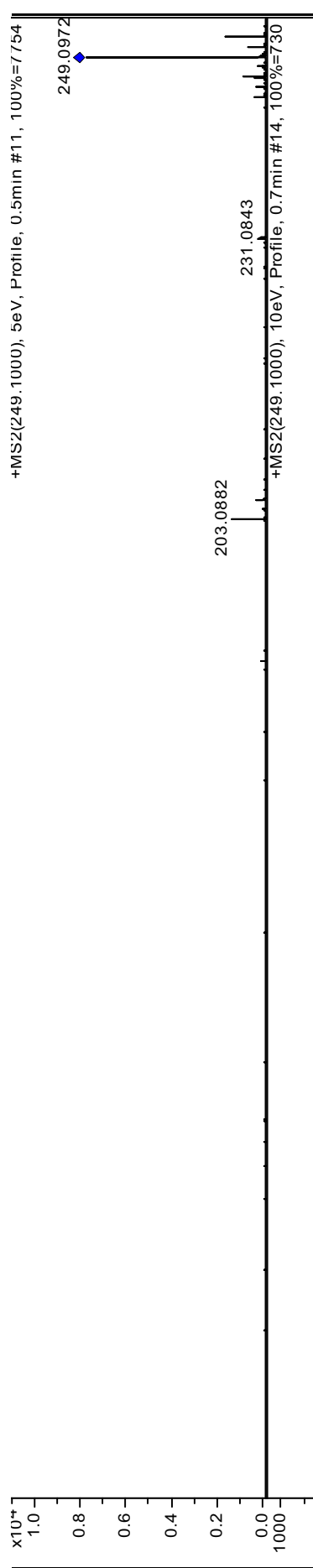


Figura 104: Espectro de Massas de (3)

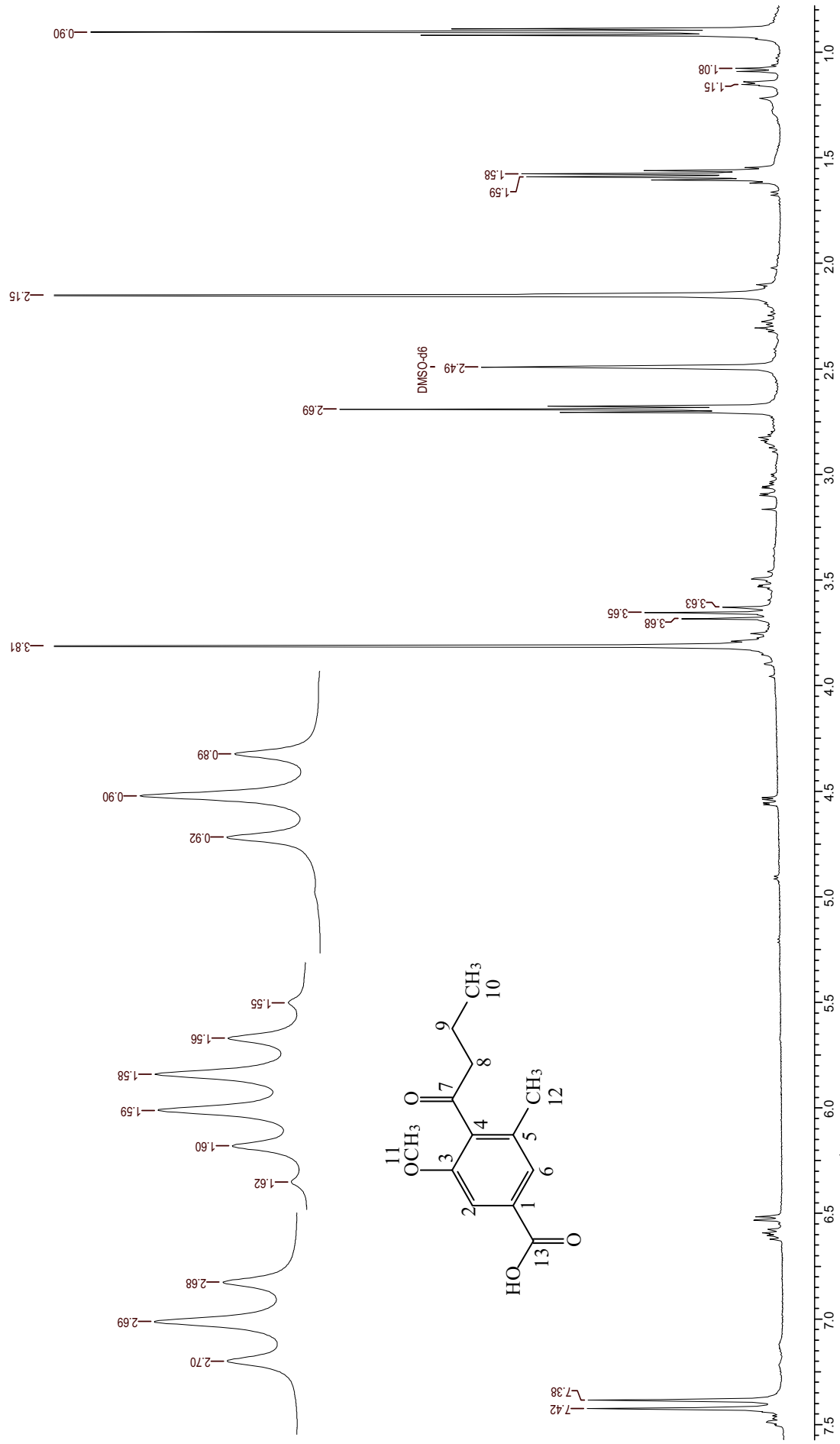


Figura 105: Espectro de RMN de ^1H de **4** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

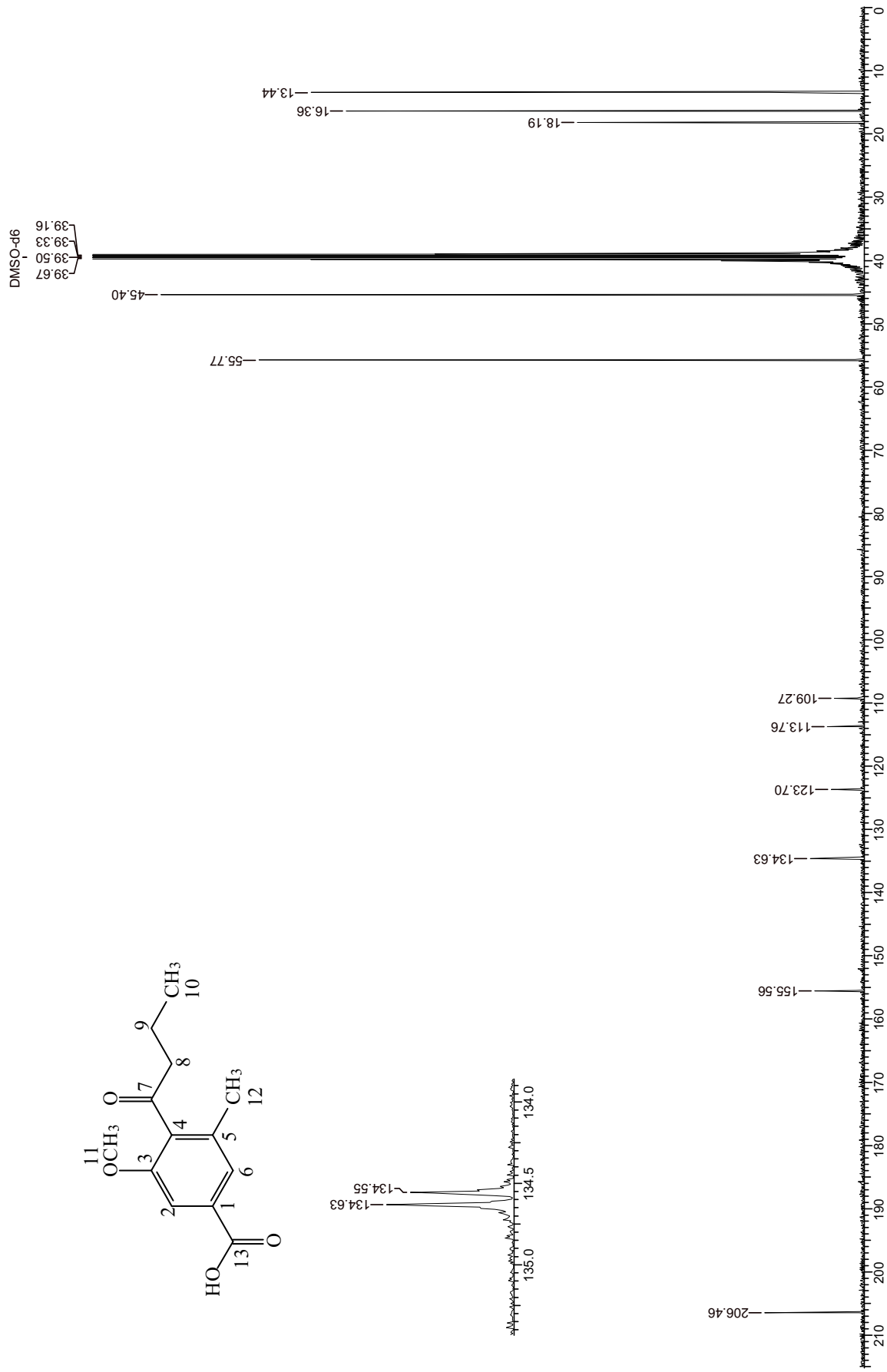


Figura 106: Espectro de RMN de ¹³C de (**4**) (DMSO-d₆ a 11,7 T)

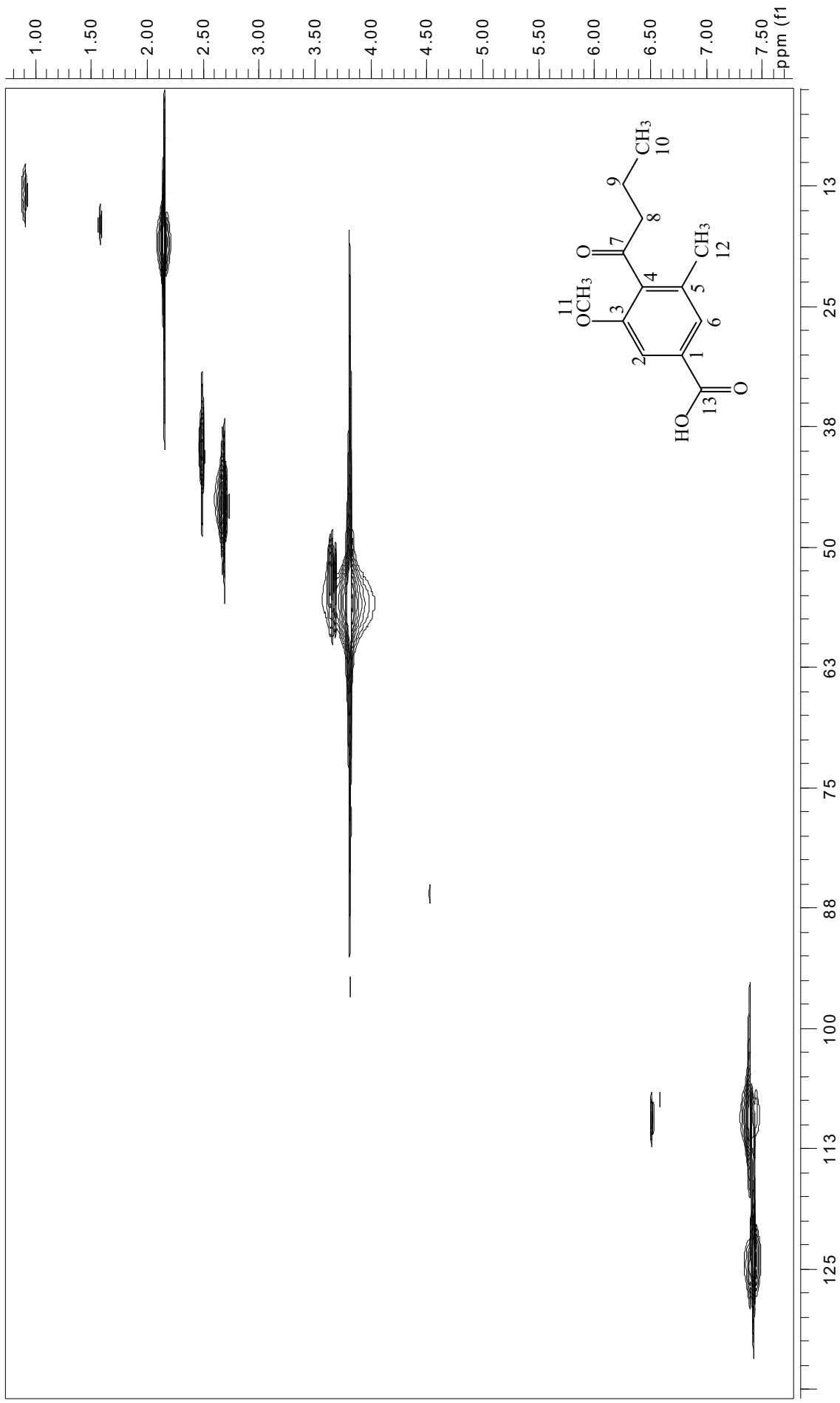


Figura 107: Mapa de contorno gHMBC de **4** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

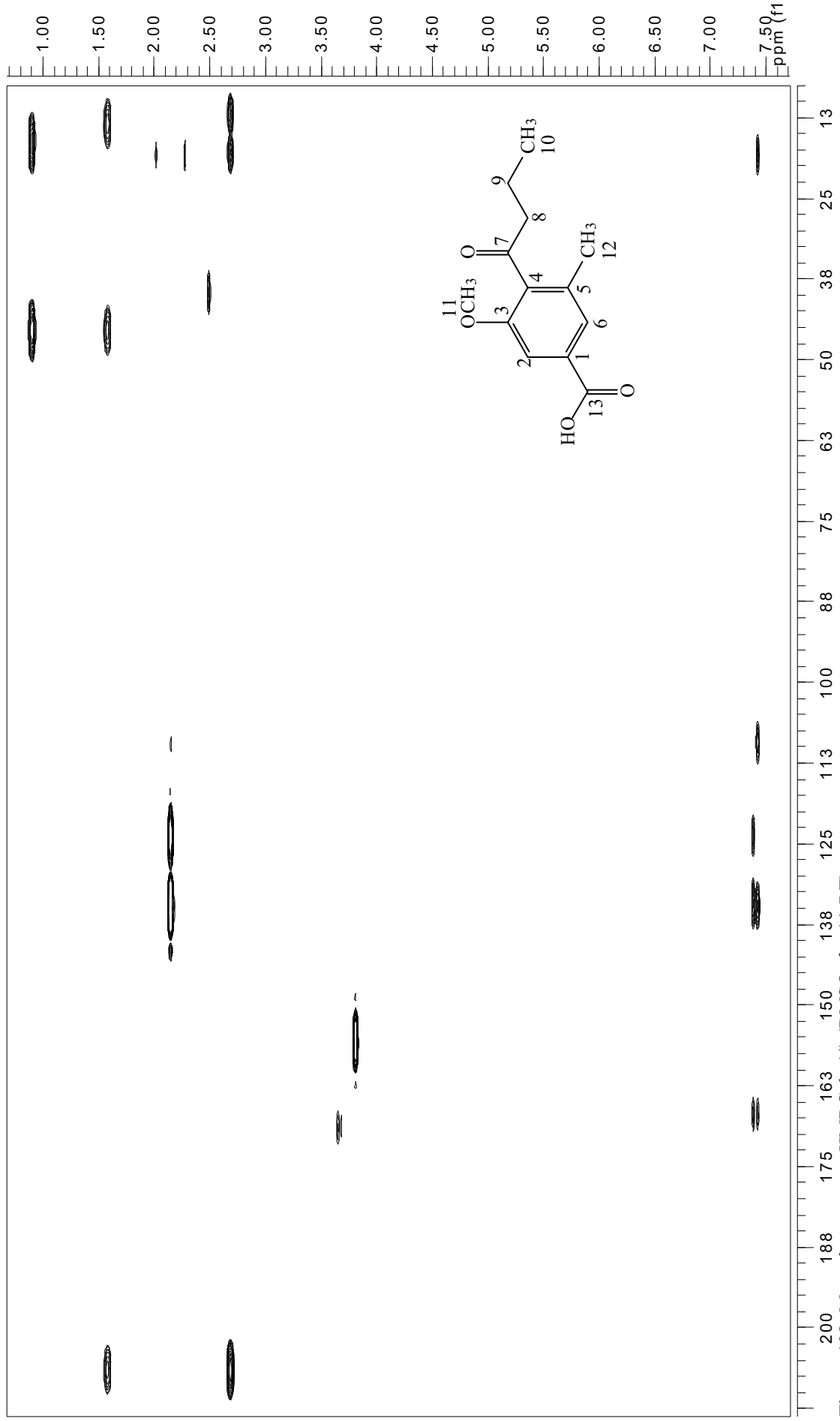


Figura 108: Mapa de contorno gHMBC de **(4)** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

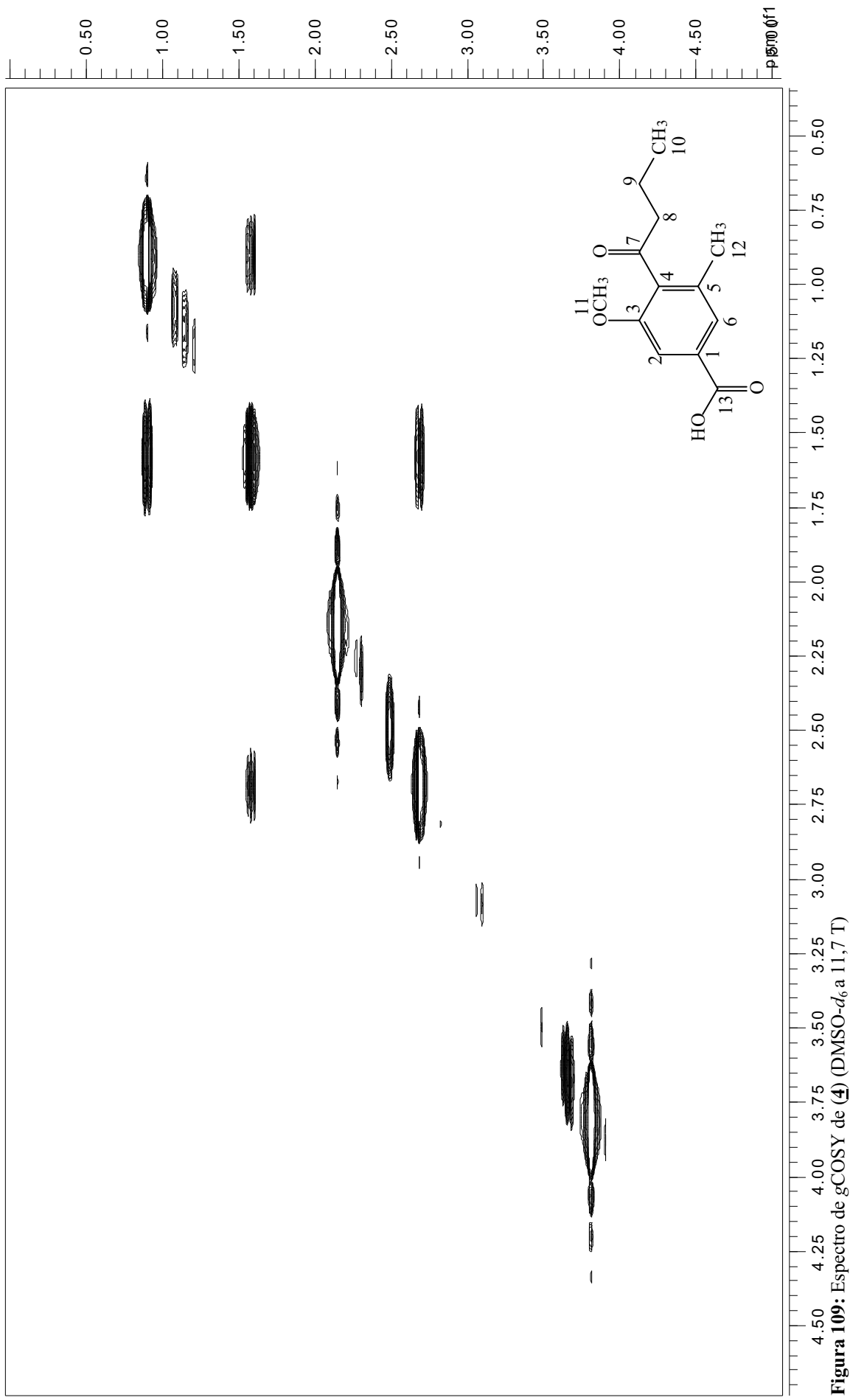


Figura 109: Espectro de gCOSY de **4** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

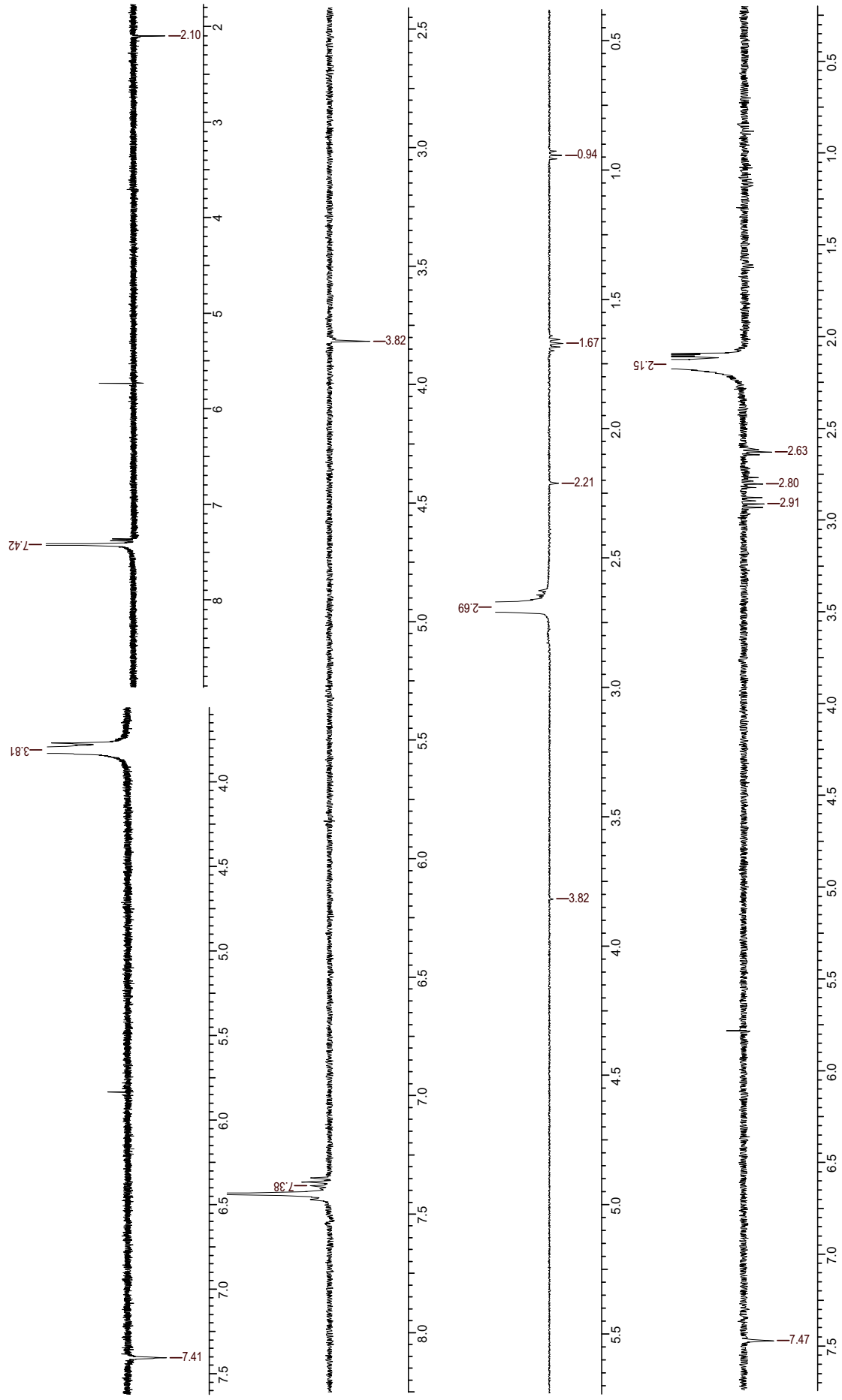


Figura 110: Espectro de NOESY 1D de **4** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

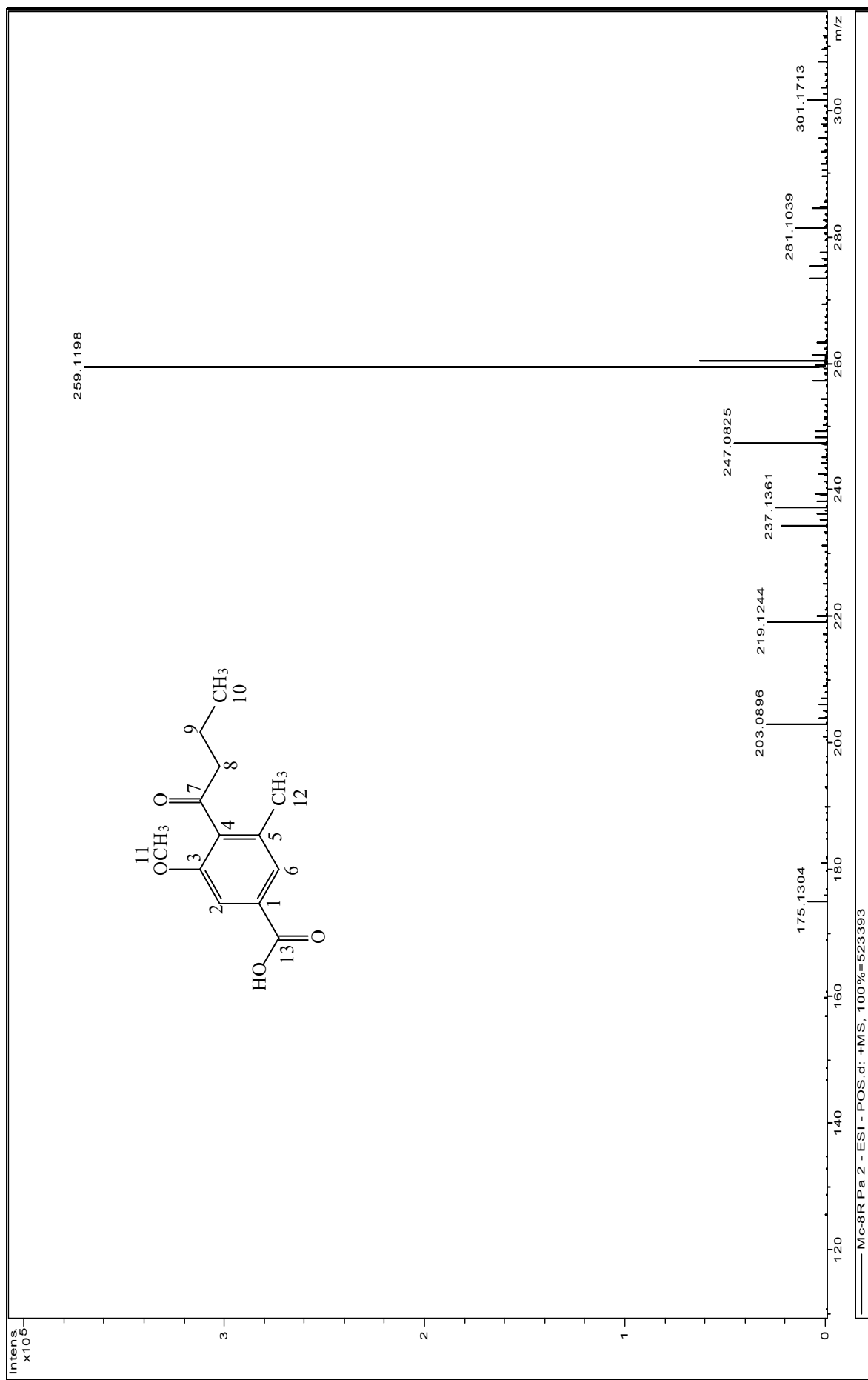


Figura 111: Espectro de Massas de (**4**)

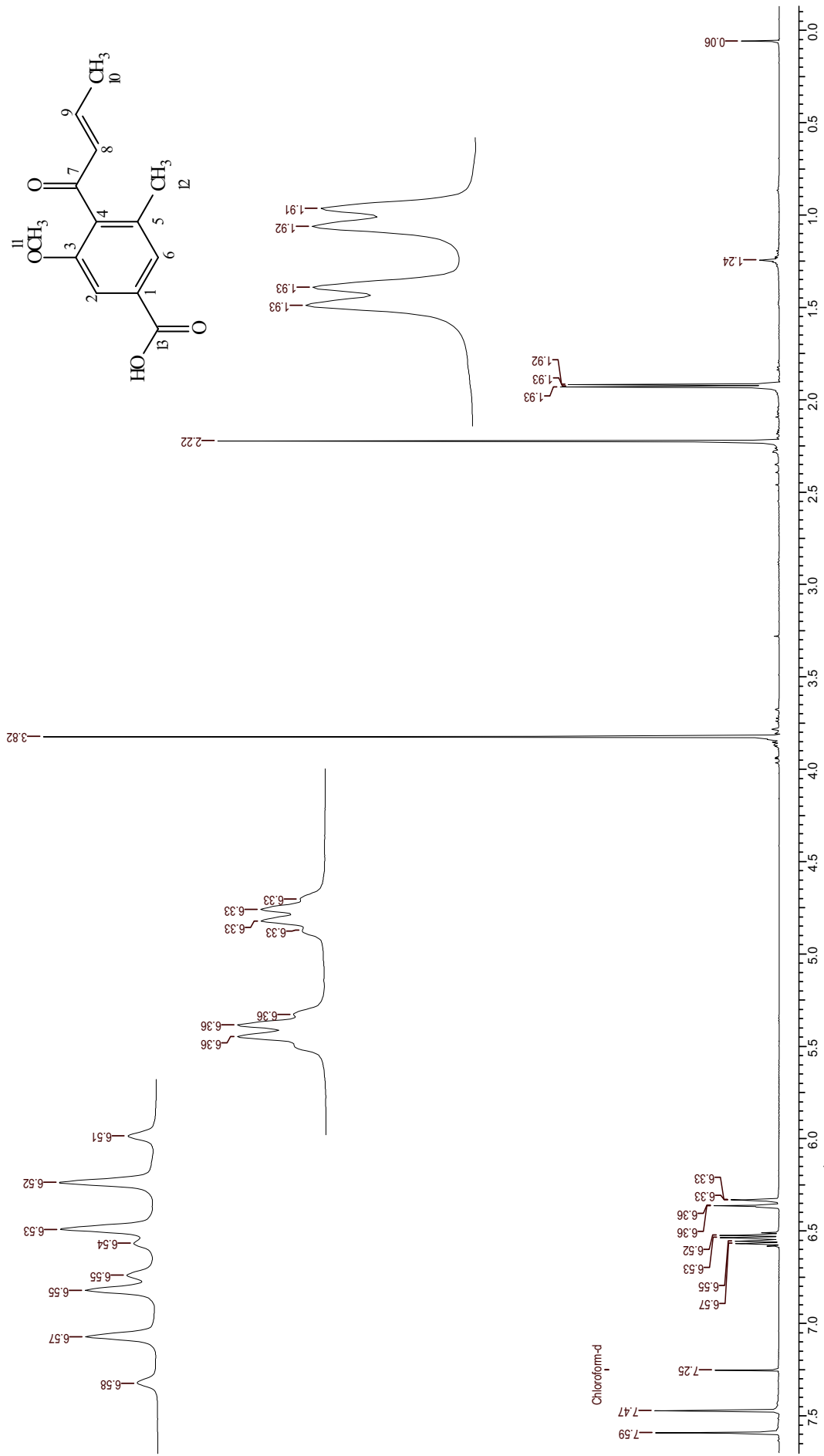


Figura 112: Espectro de RMN de ^1H de **5** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

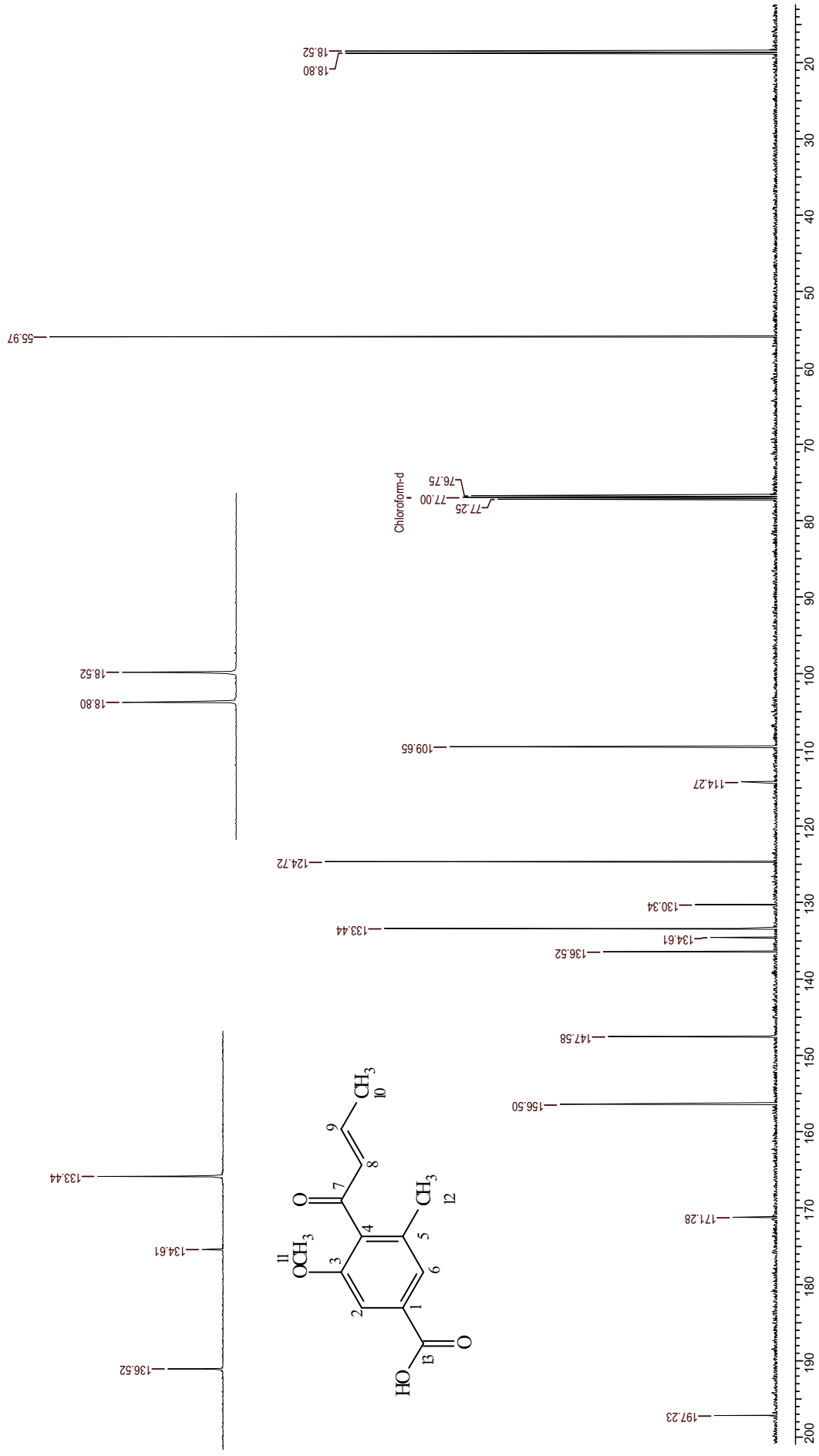


Figura 113: Espectro de RMN de ^{13}C de **5** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

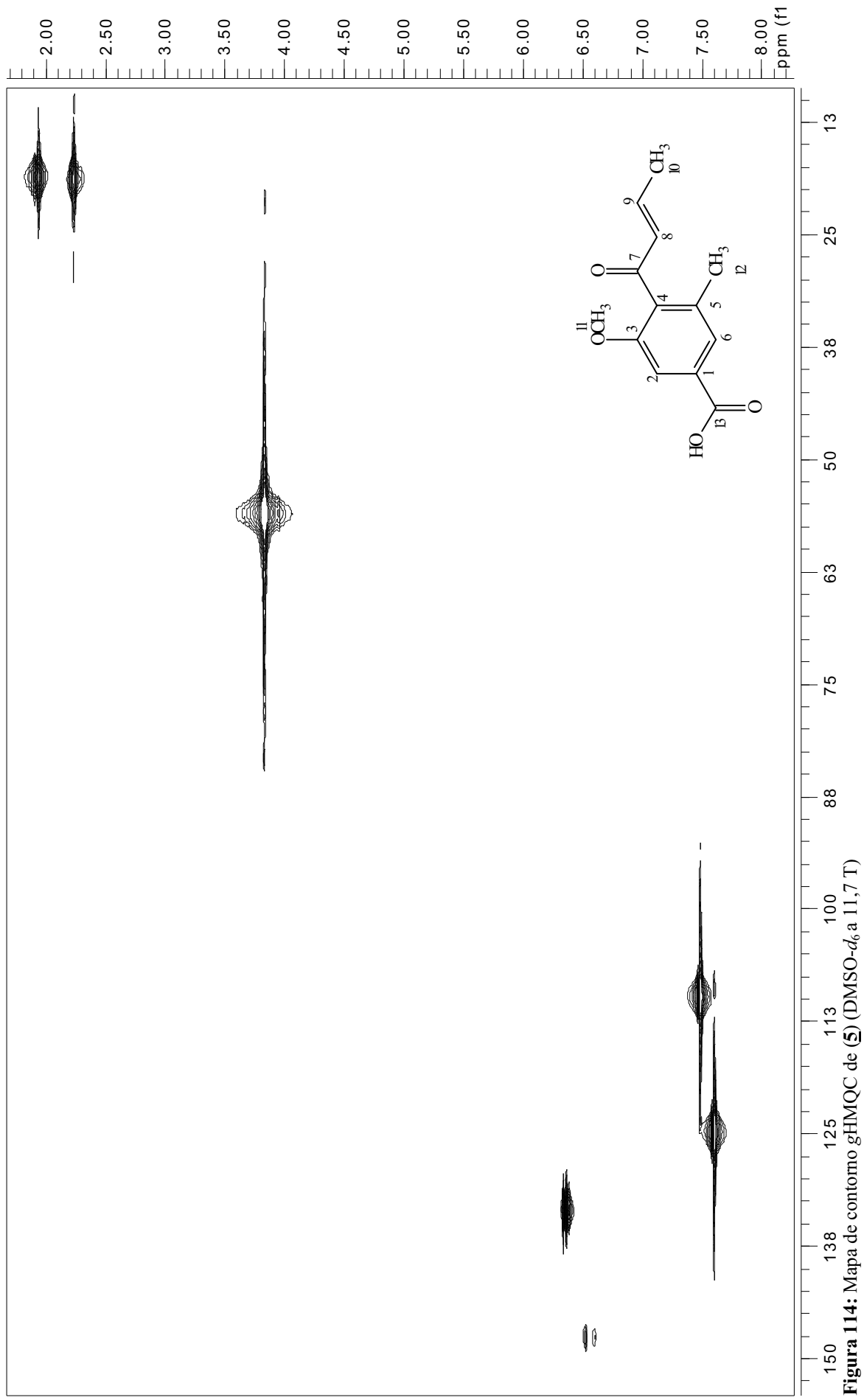


Figura 114: Mapa de contorno gHMBC de **5** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

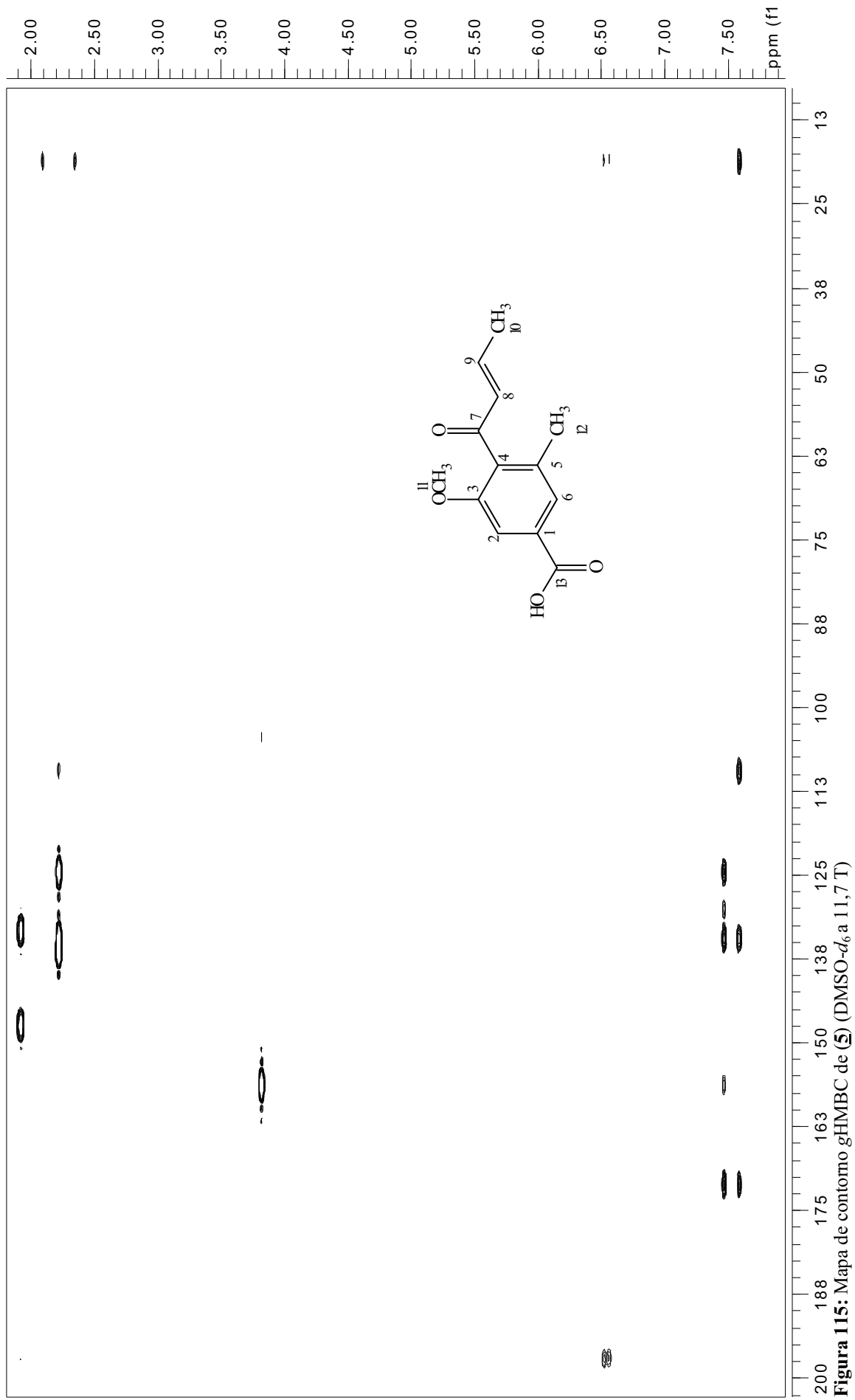


Figura 115: Mapa de contorno gHMBC de **5** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

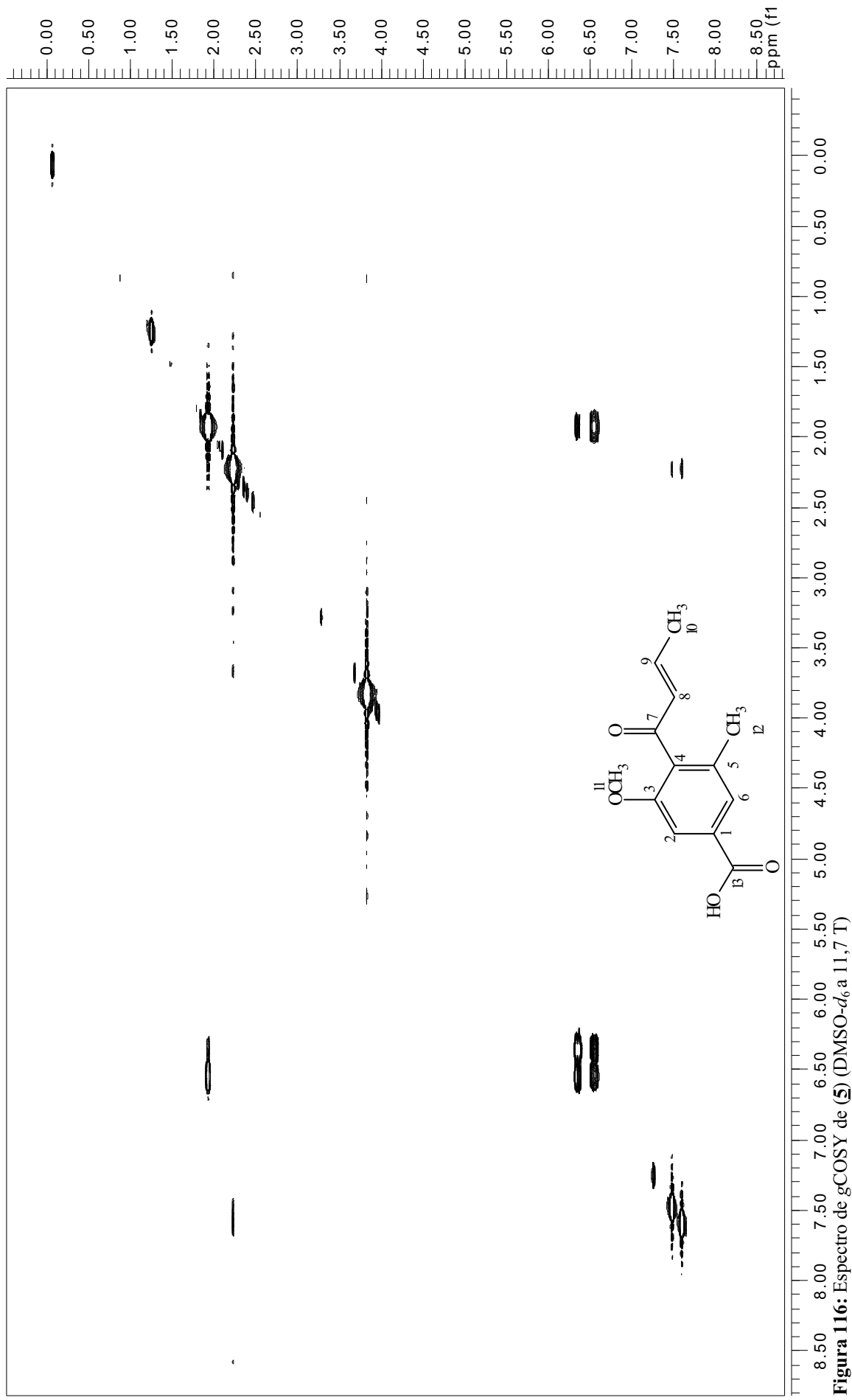


Figura 116: Espectro de gCOSY de **5** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

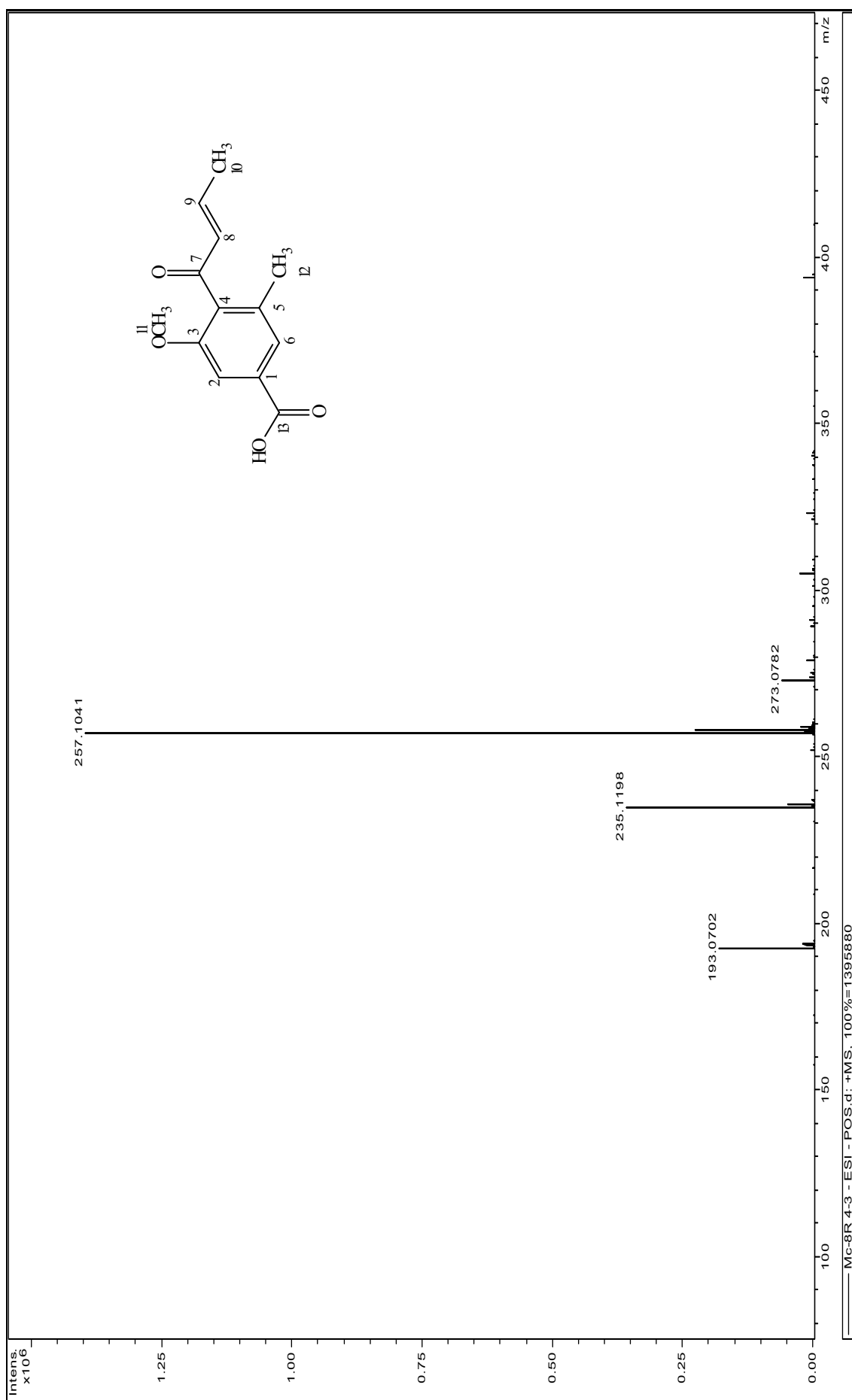


Figura 117: Espectro de Massas de (5)

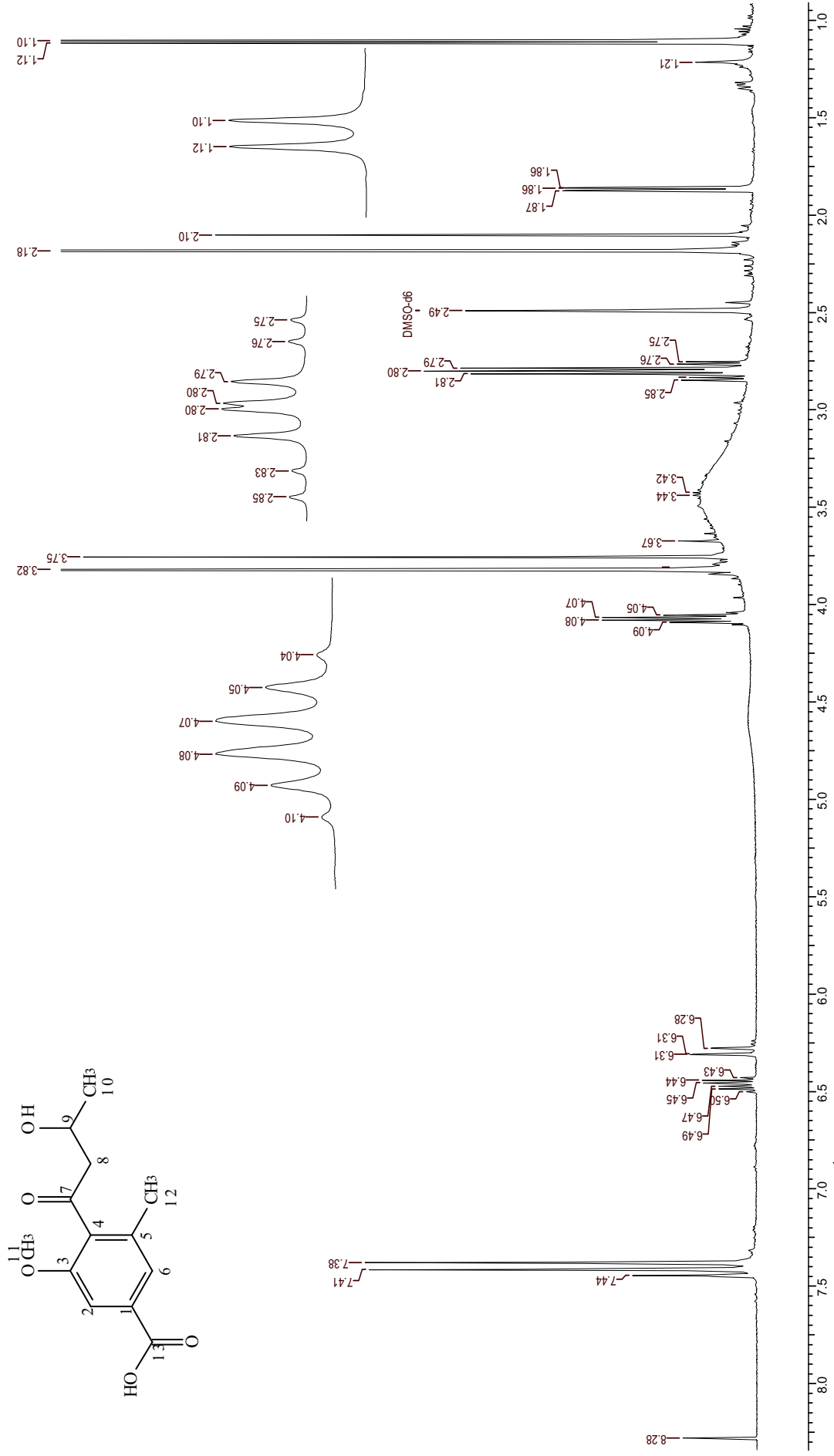


Figura 118: Espectro de RMN de ¹H de **6** (DMSO-d₆ a 11,7 T)

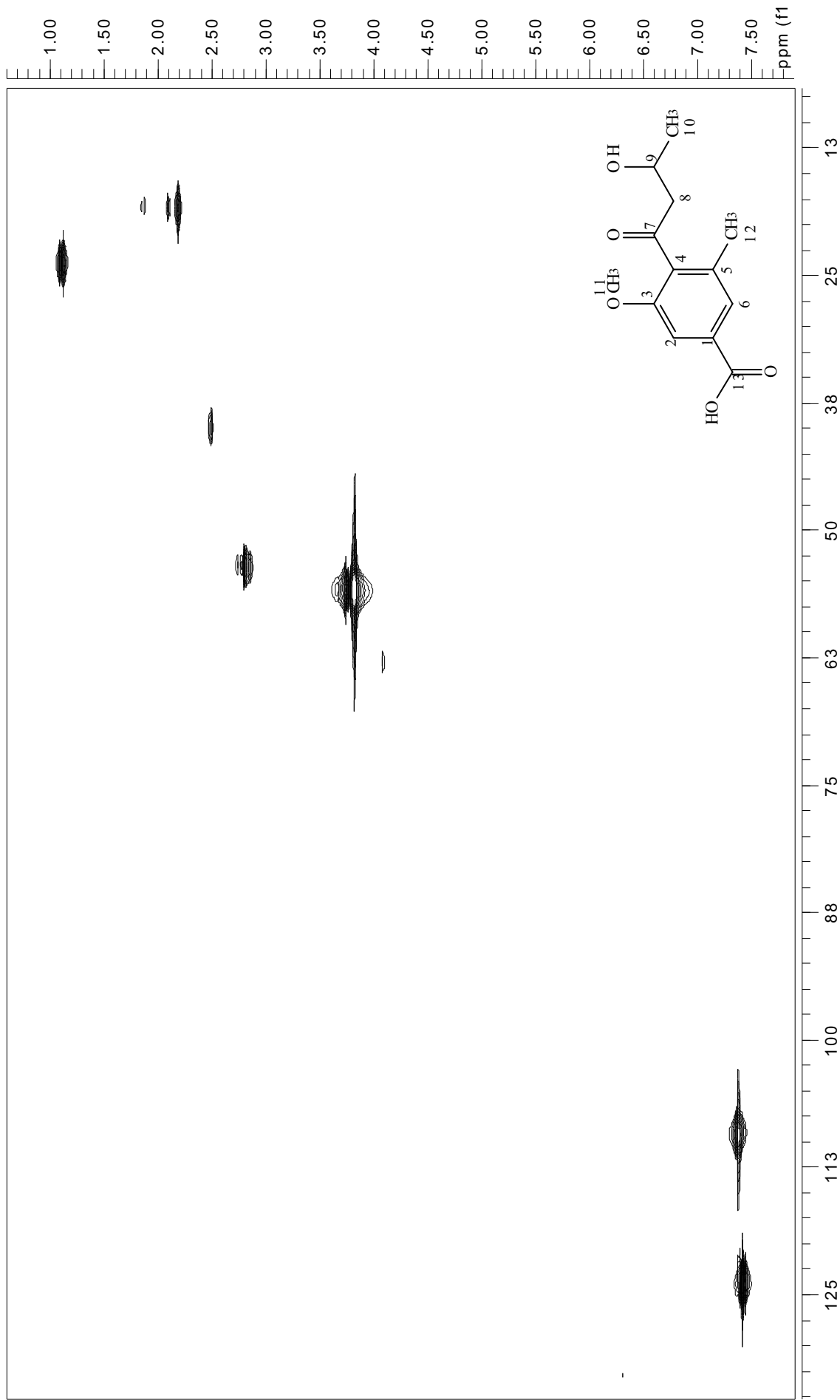


Figura 120: Mapa de contorno gHMQC de **6** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

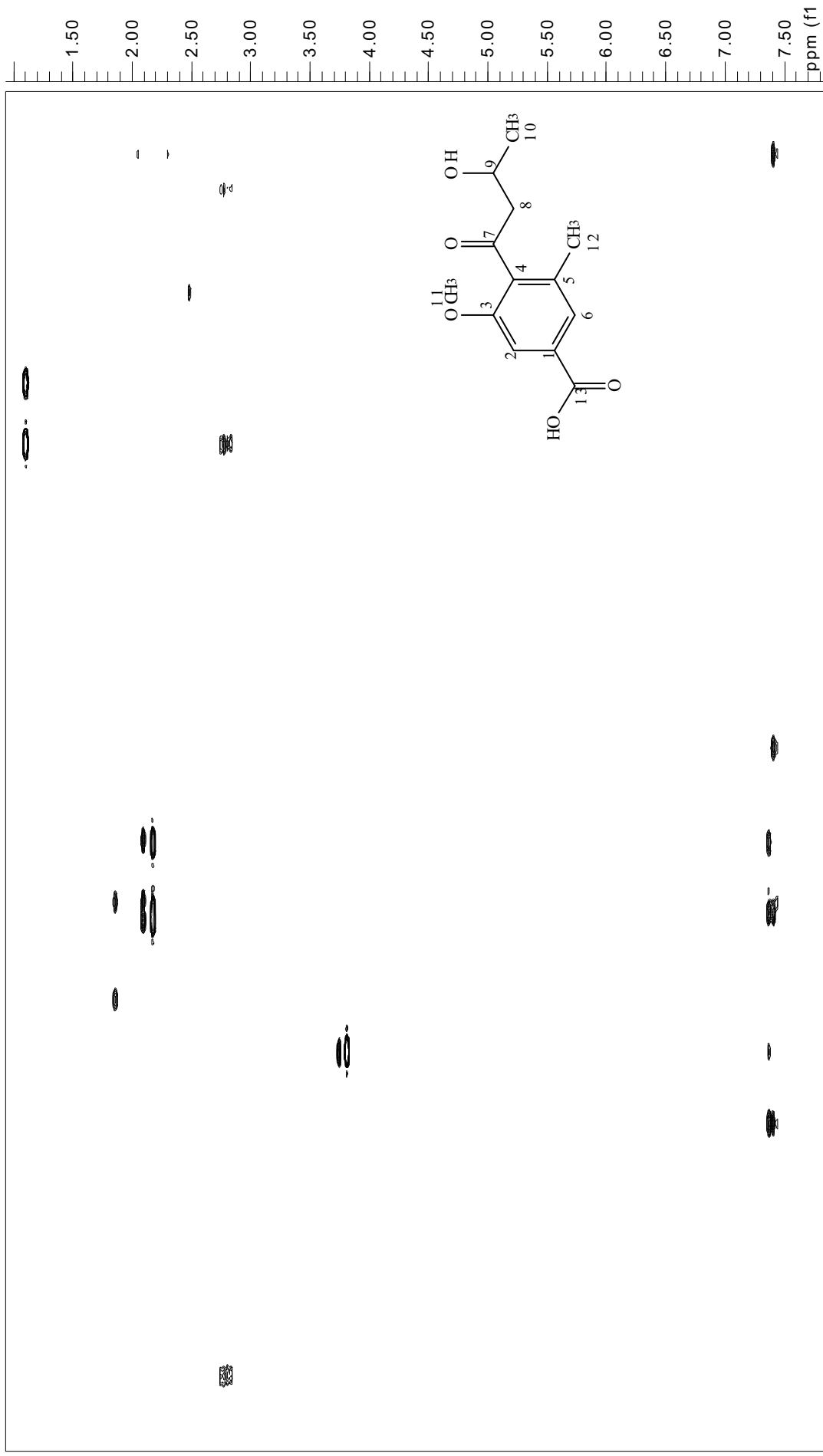
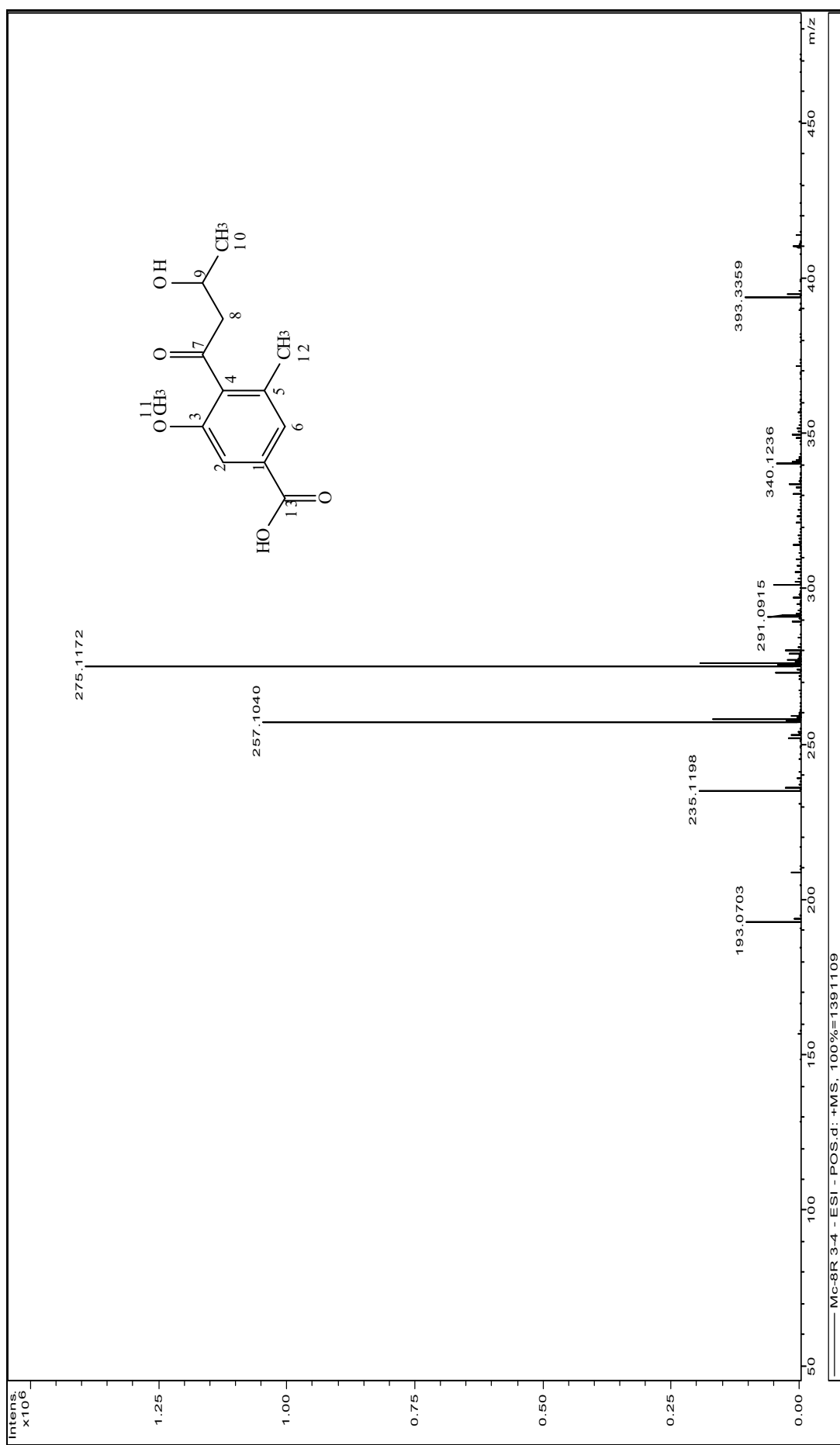


Figura 121: Mapa de contorno gHMBC de **6** (DMSO- d_6 a 11,7 T)



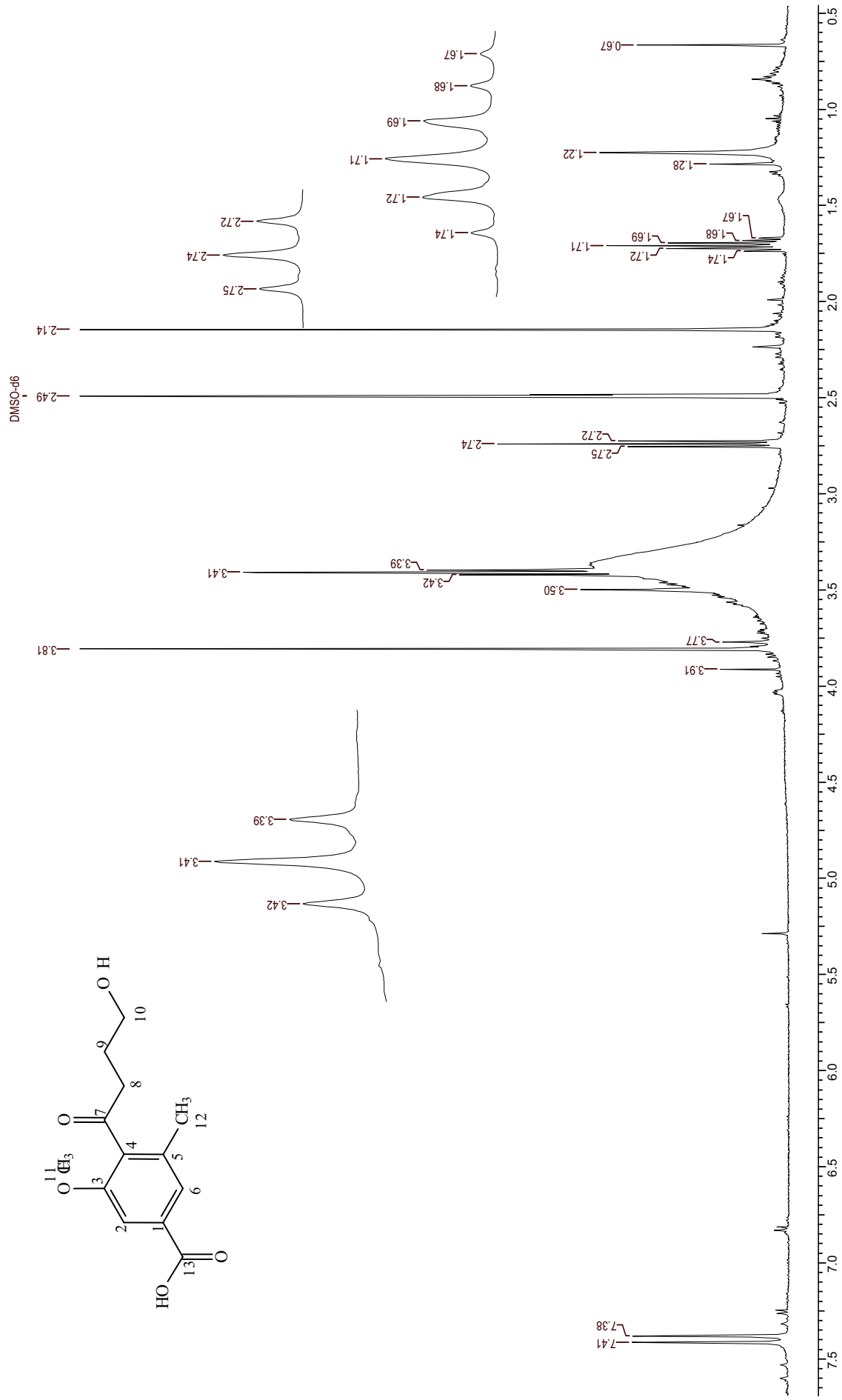


Figura 124: Espectro de RMN de ¹H de (**7**) (DMSO-d₆ a 11,7 T)

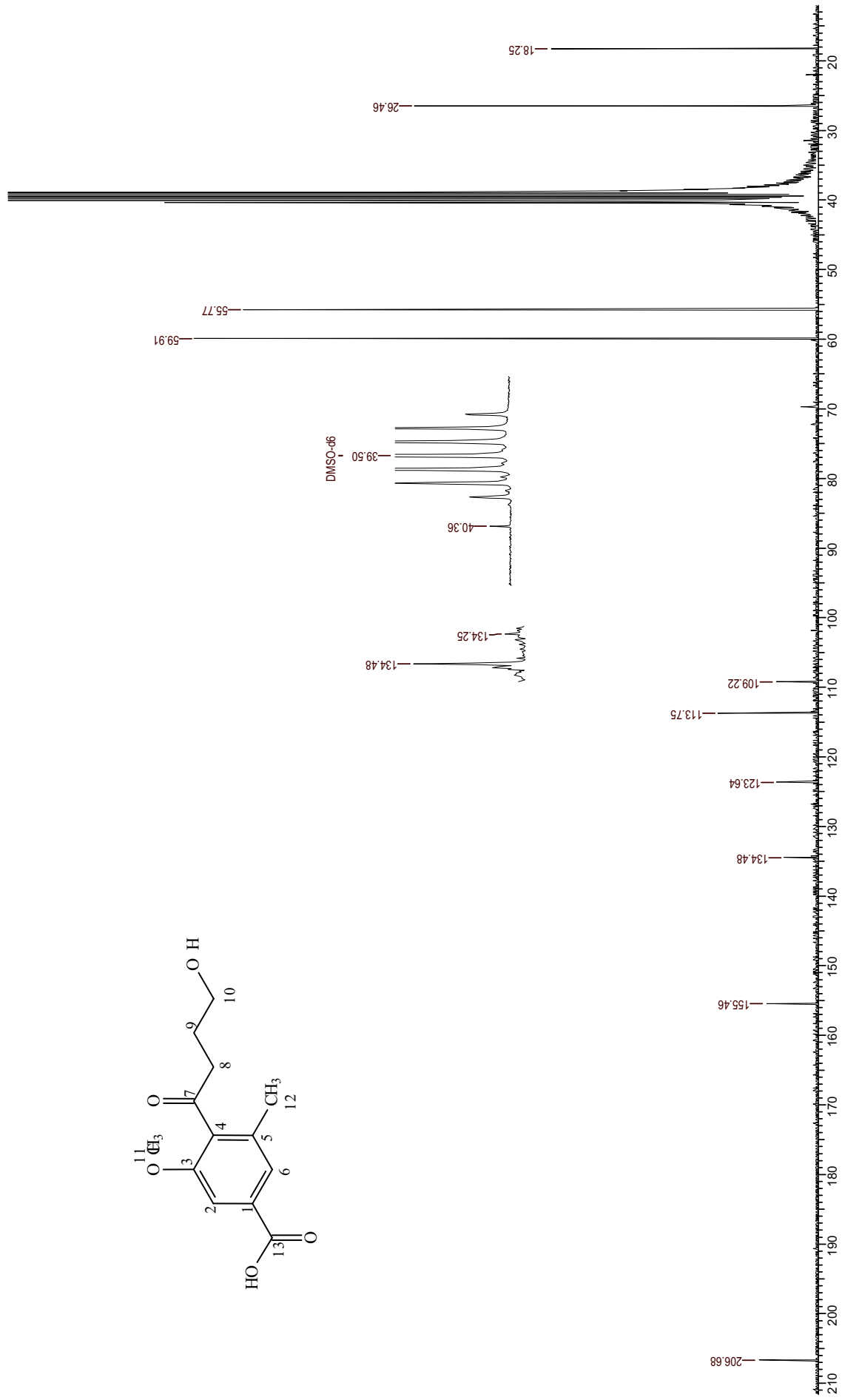


Figura 125: Espectro de RMN de ^{13}C de (Z) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

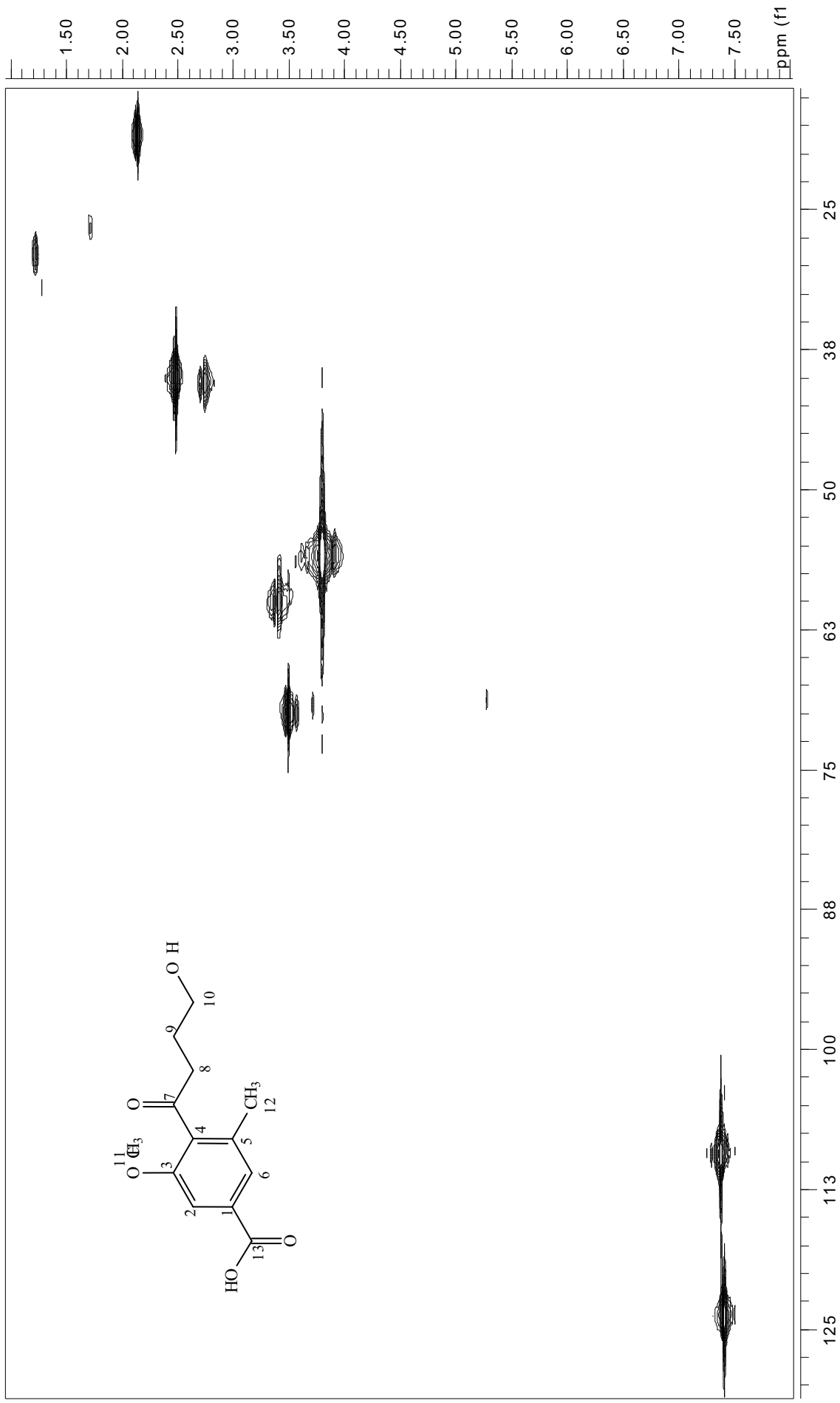


Figura 126: Mapa de contorno gHMBC de **11** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

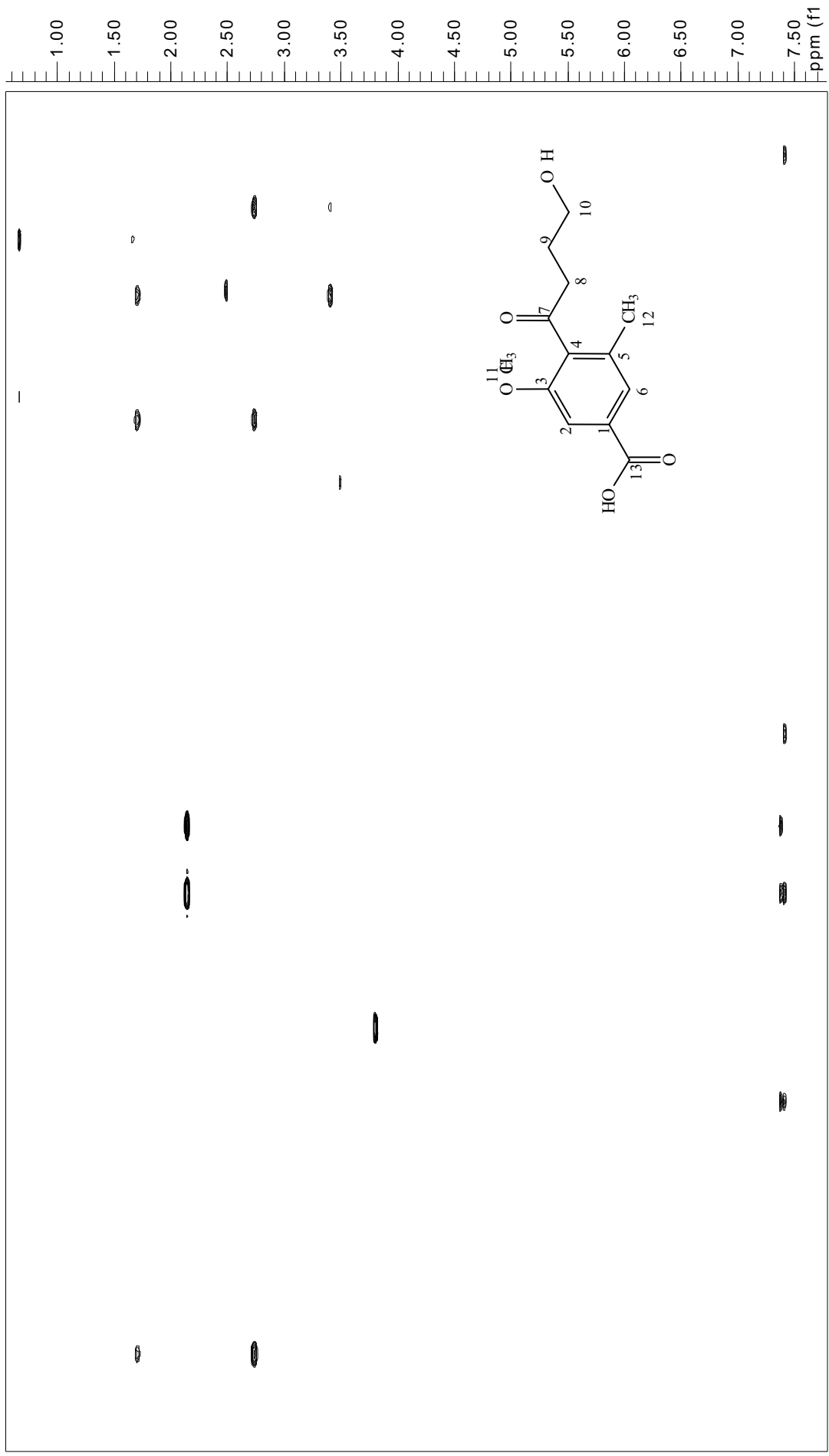


Figura 127: Mapa de contorno gHMBC de **7** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

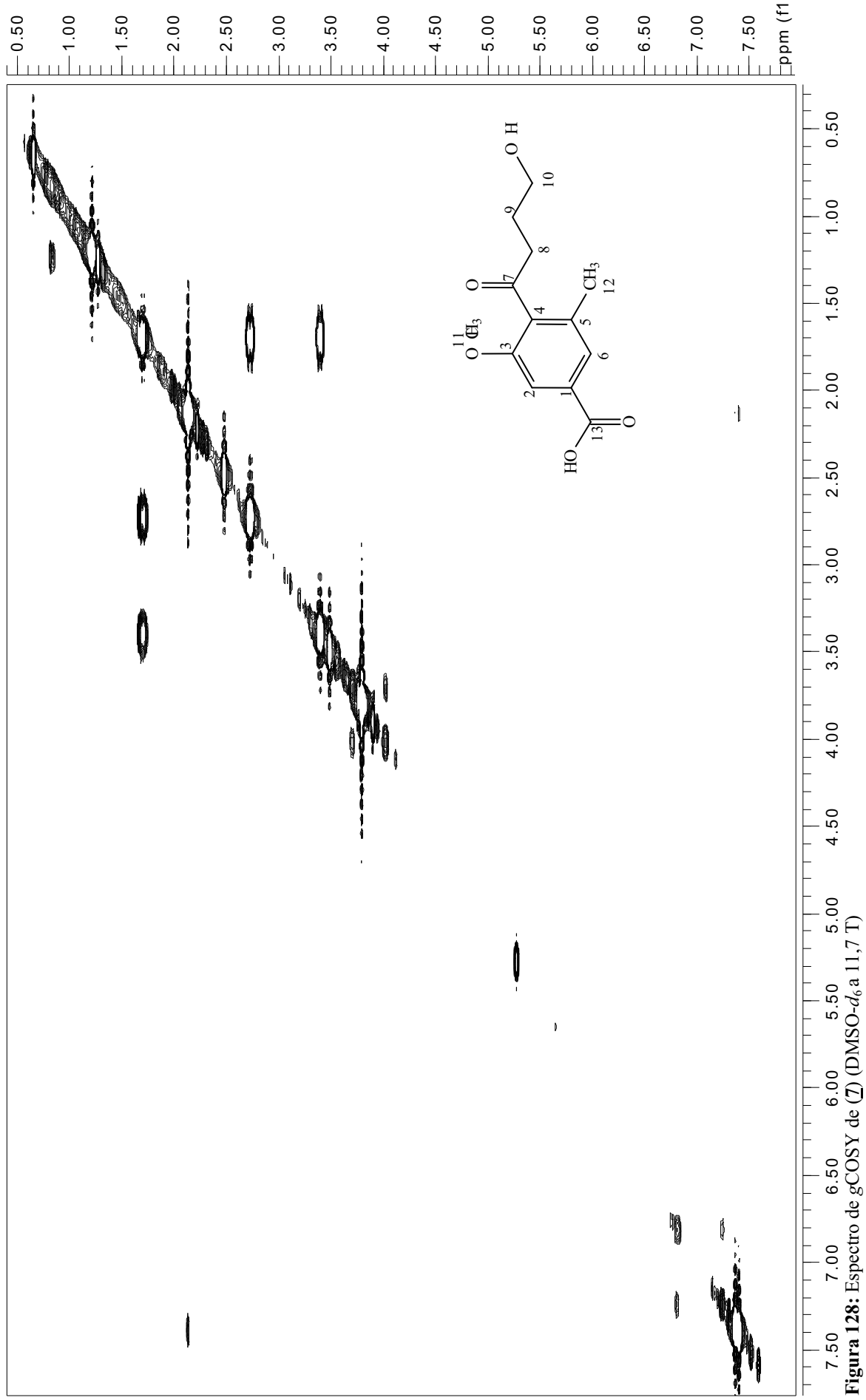


Figura 128: Espectro de gCOSY de **11,7 T** (DMSO-*d*₆)

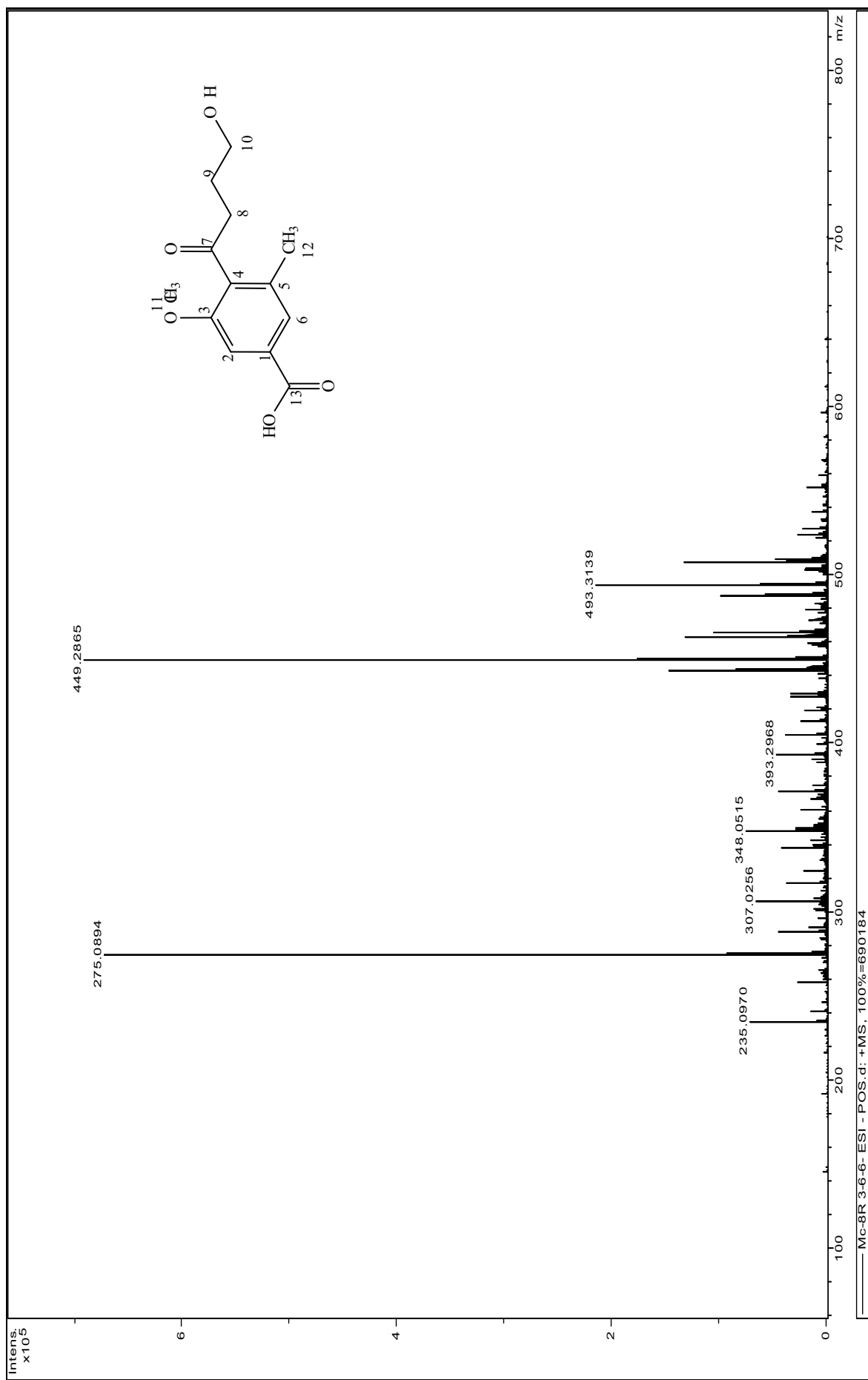


Figura 129: Espectro de Massas de (7)

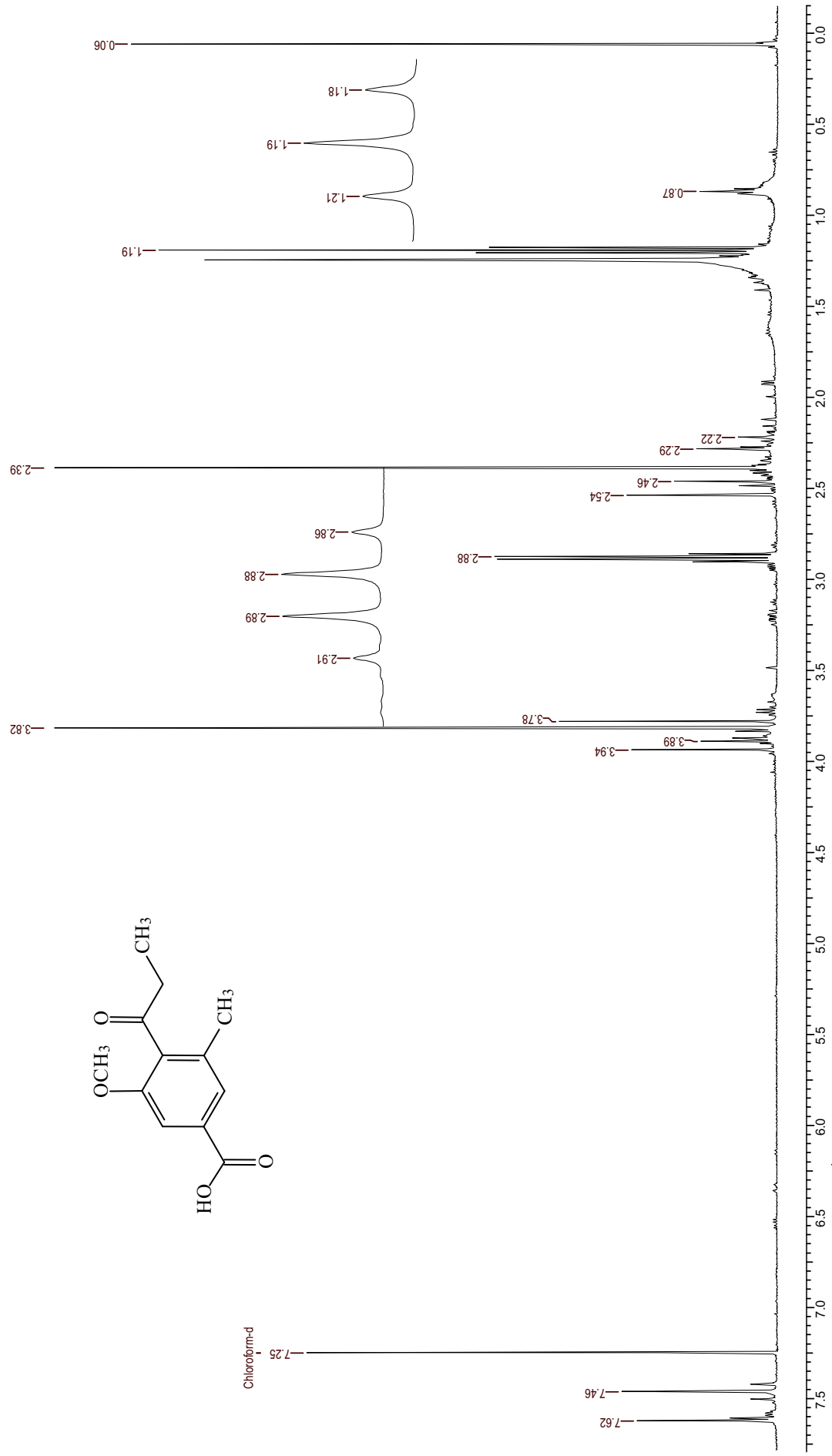


Figura 130: Espectro de RMN de ^1H de **(8)** ($\text{DMSO-}d_6$, a 11,7 T)

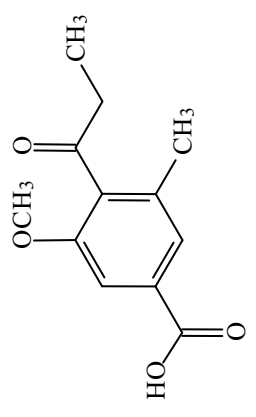
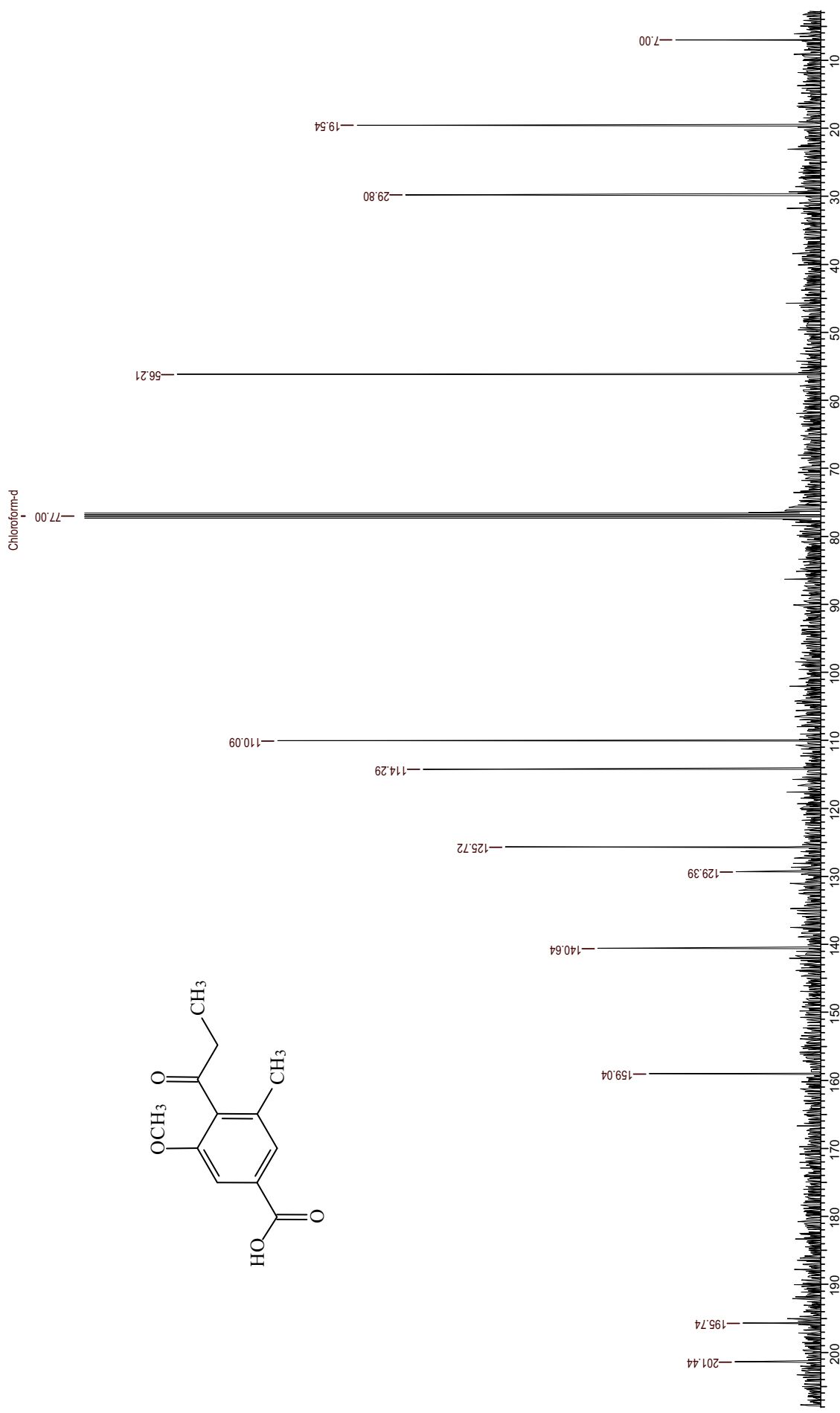


Figura 131: Espectro de RMN de ^{13}C de **(8)** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

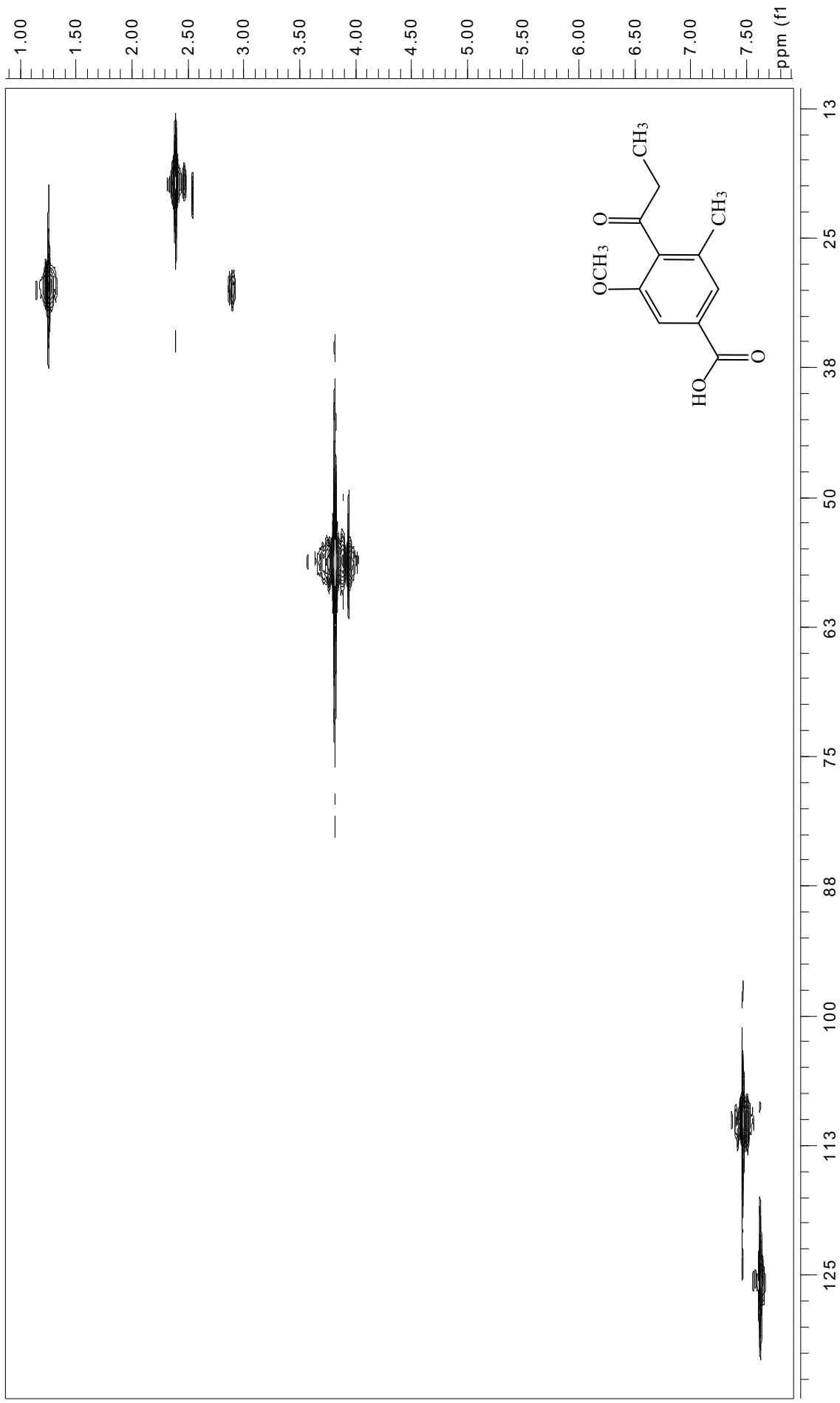


Figura 132: Mapa de contorno gHMQC de **8** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

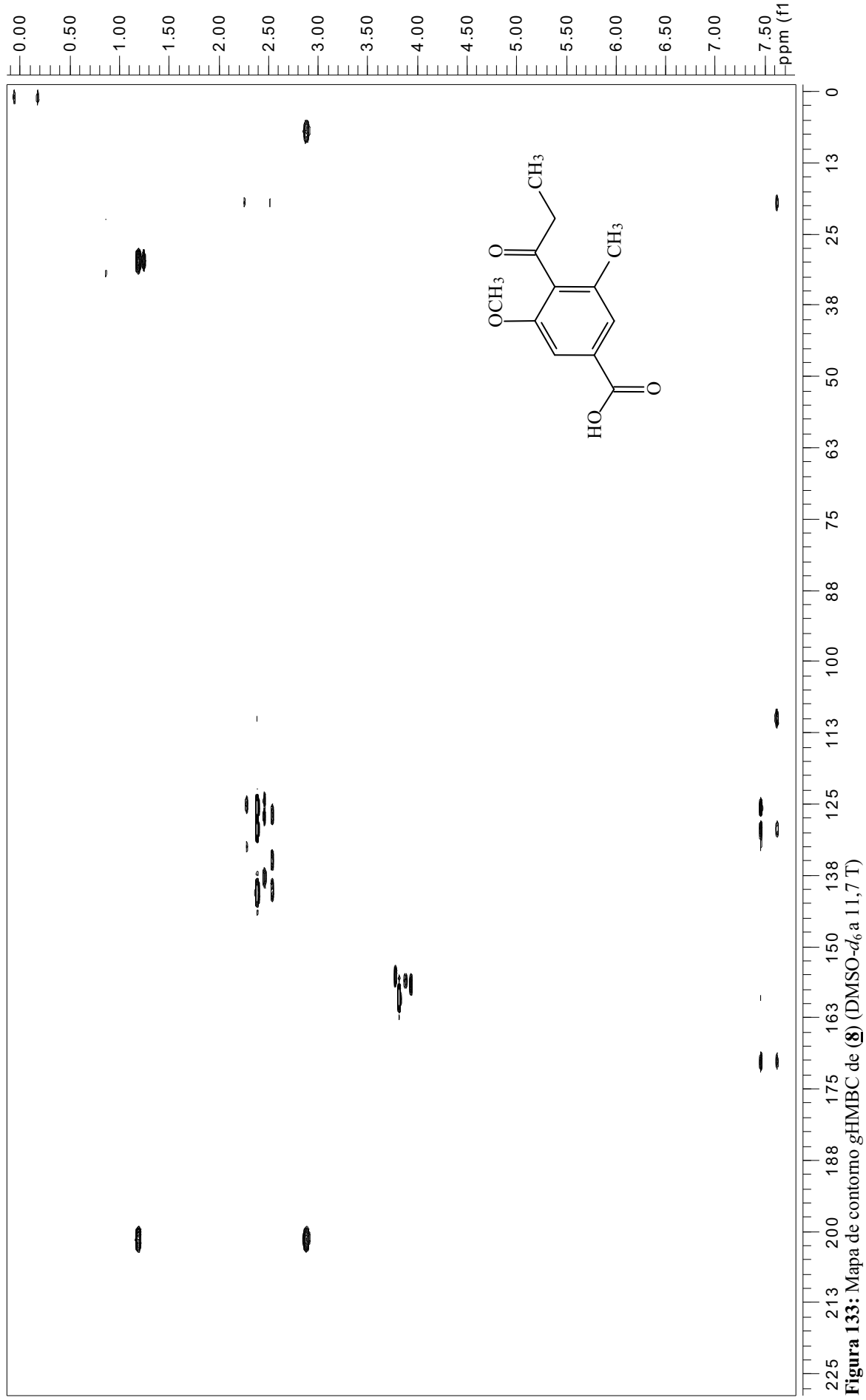


Figura 133: Mapa de contorno gHMBC de **8** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

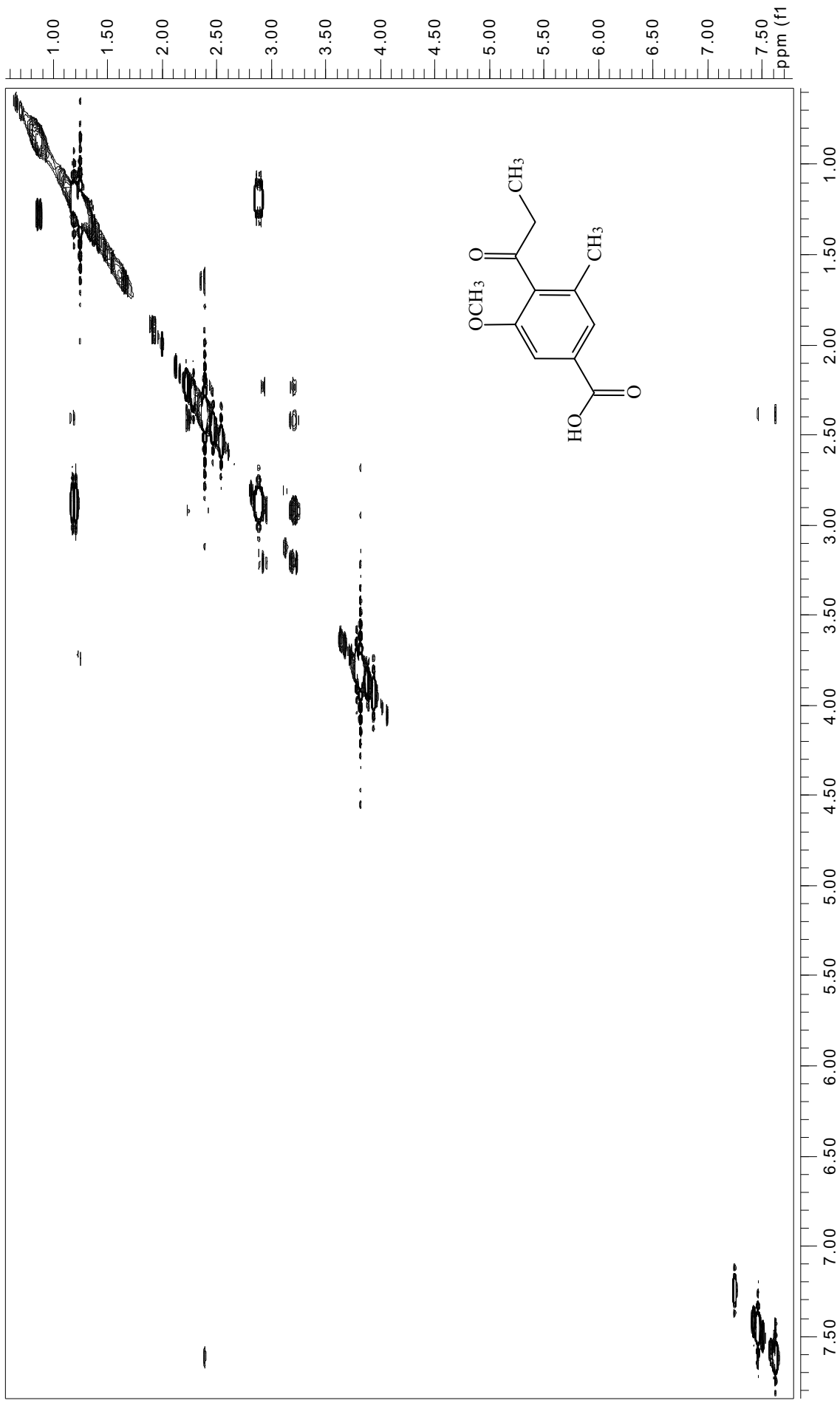


Figura 134: Espectro de gCOSY de **8** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

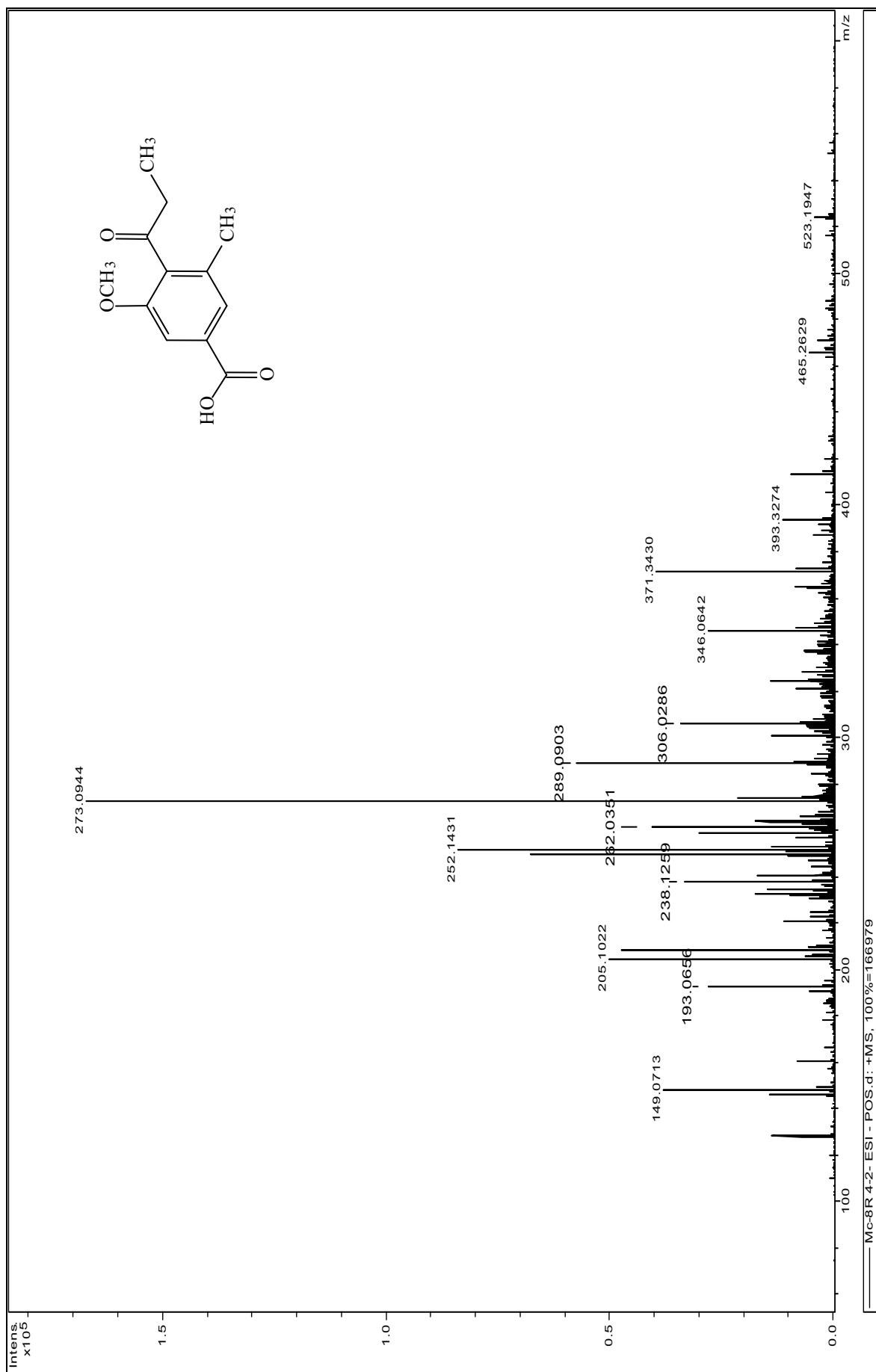


Figura 135: Espectros de Massas de (**8**)

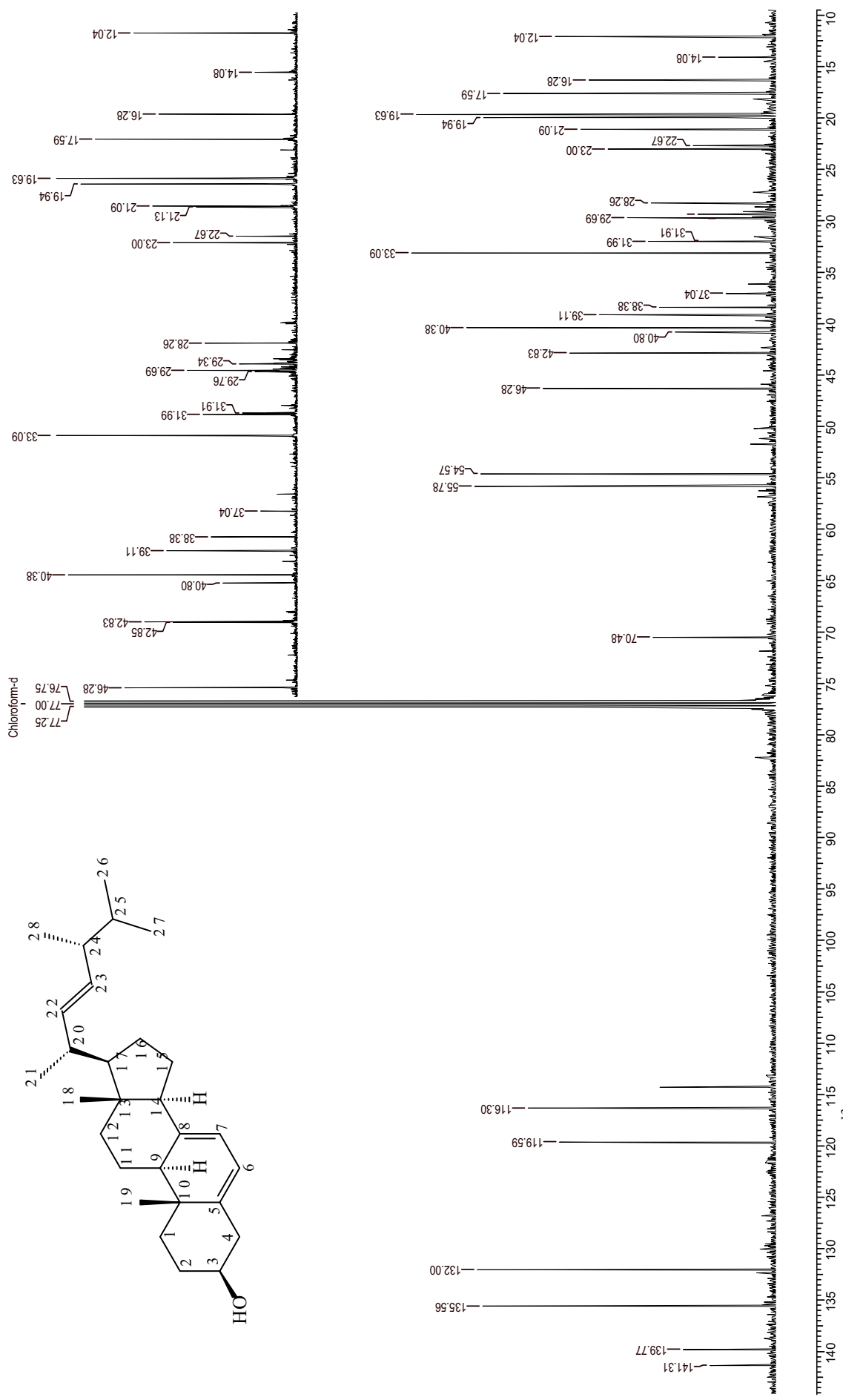


Figura 137: Espectro de RMN de ^{13}C de **9** (CDCl_3 a 11,7 T)

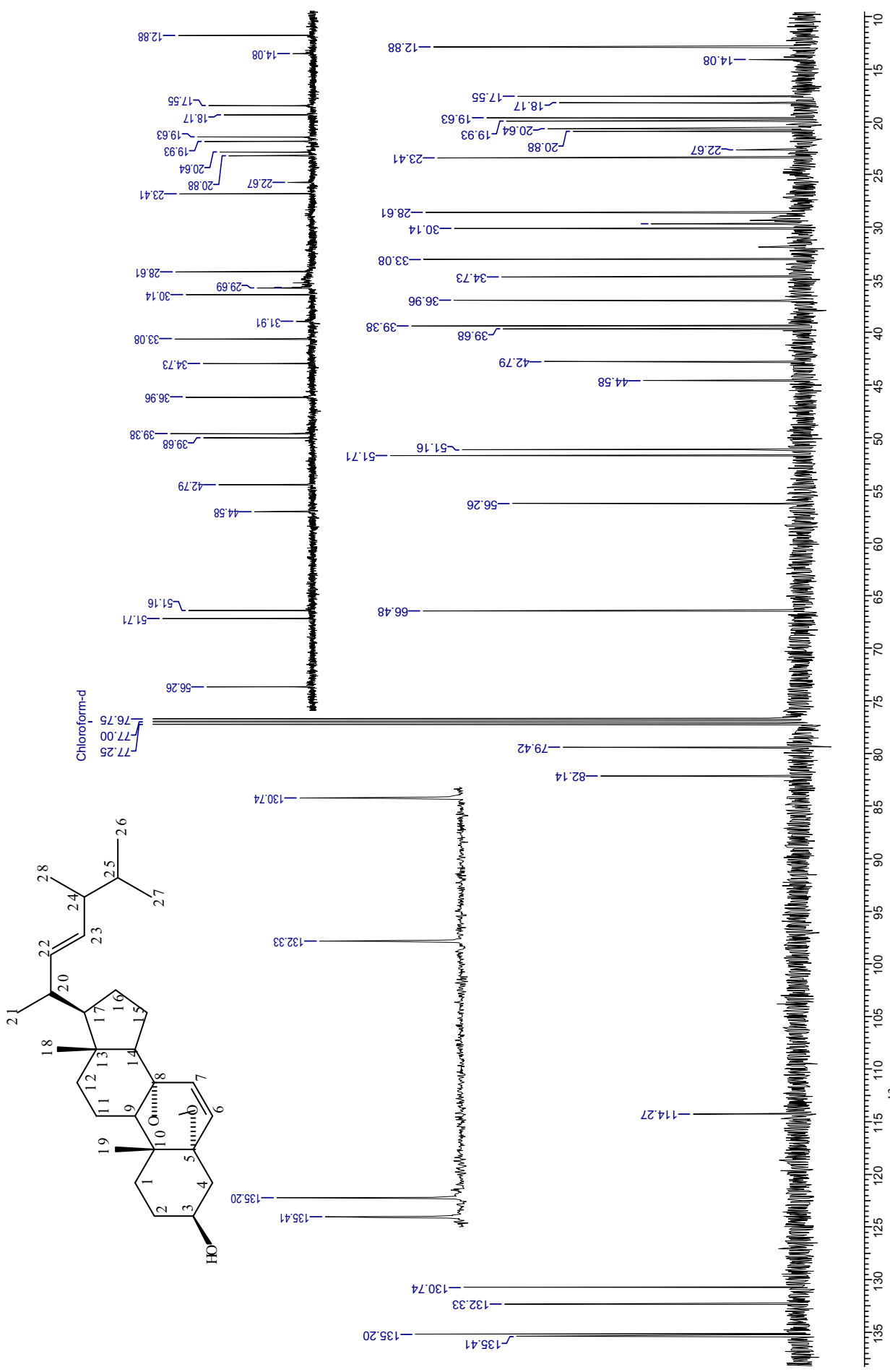


Figura 139: Espectro de RMN de ^{13}C de **(10)** (CDCl_3 a 11,7 T)

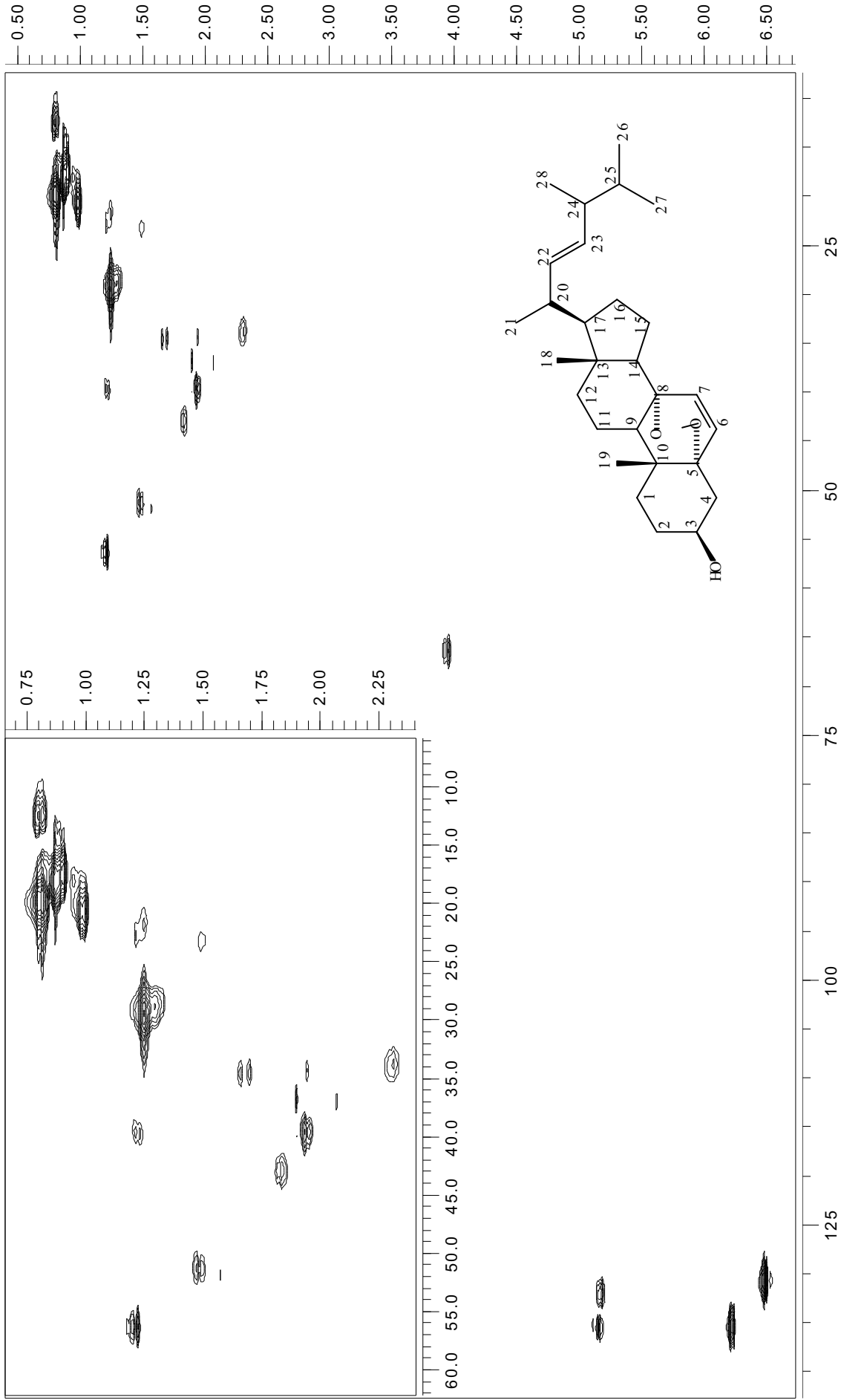


Figura 140: Mapa de contorno gHMOC de **10** (CDCl_3 a 11,7 T)



Figura 141: Mapa de contorno gHMBC de **(10)** (CDCl₃ a 11,7 T)

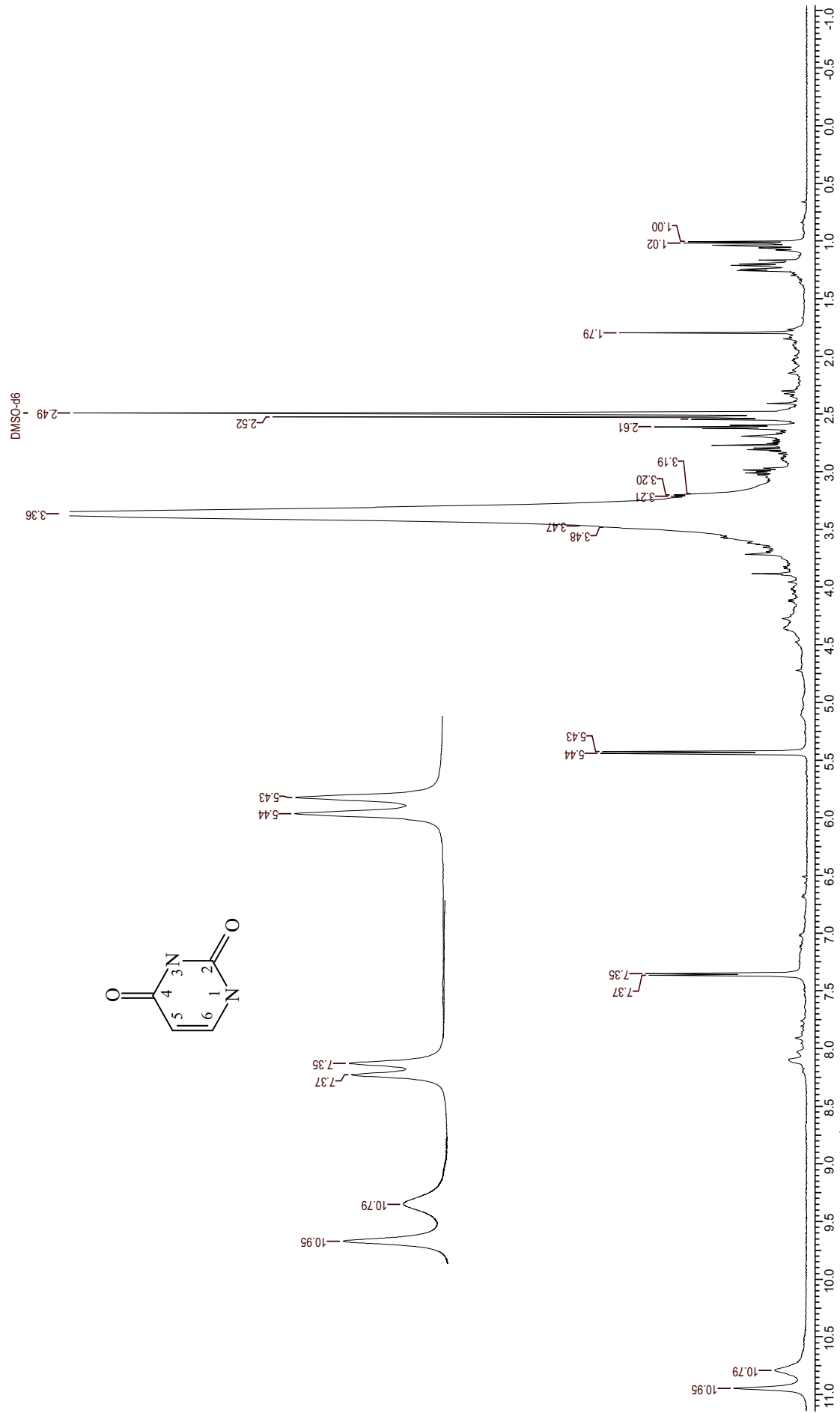


Figura 142: Espectro de RMN de ¹H de (II) (DMSO-d₆ a 11,7 T)

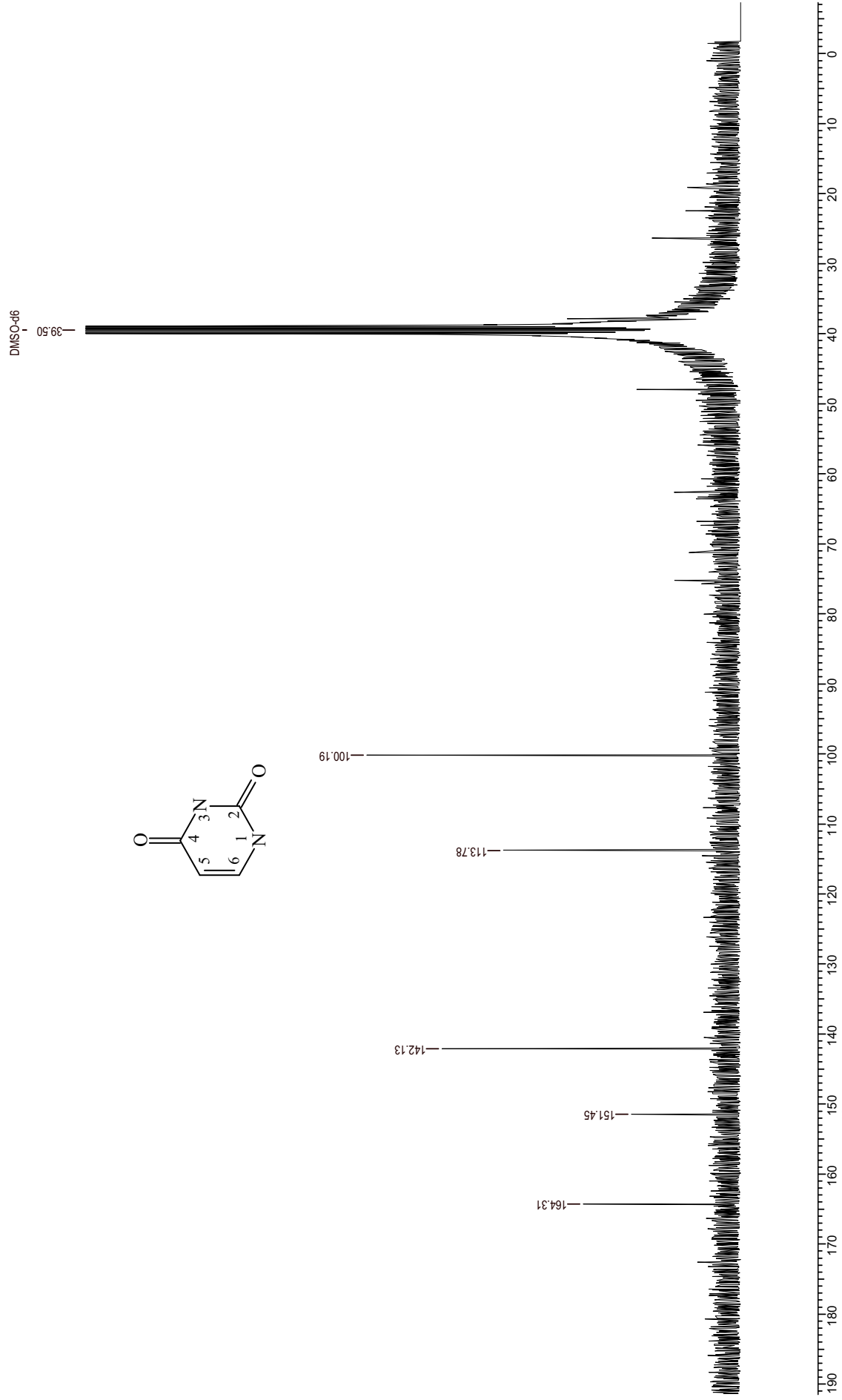


Figura 143: Espectro de RMN de ^{13}C de **(II)** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

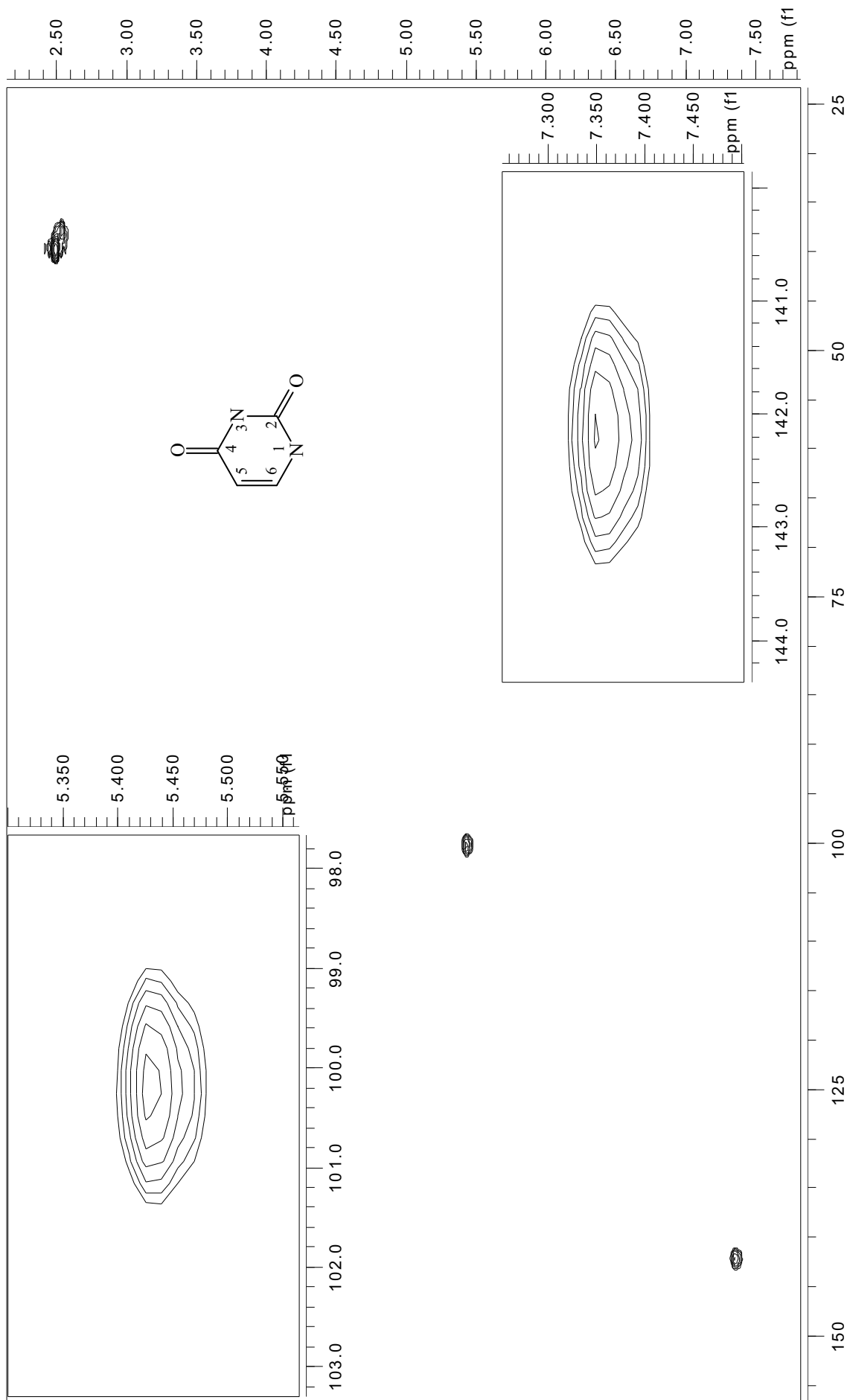


Figura 144: Mapa de contorno gHMBC de **(11)** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

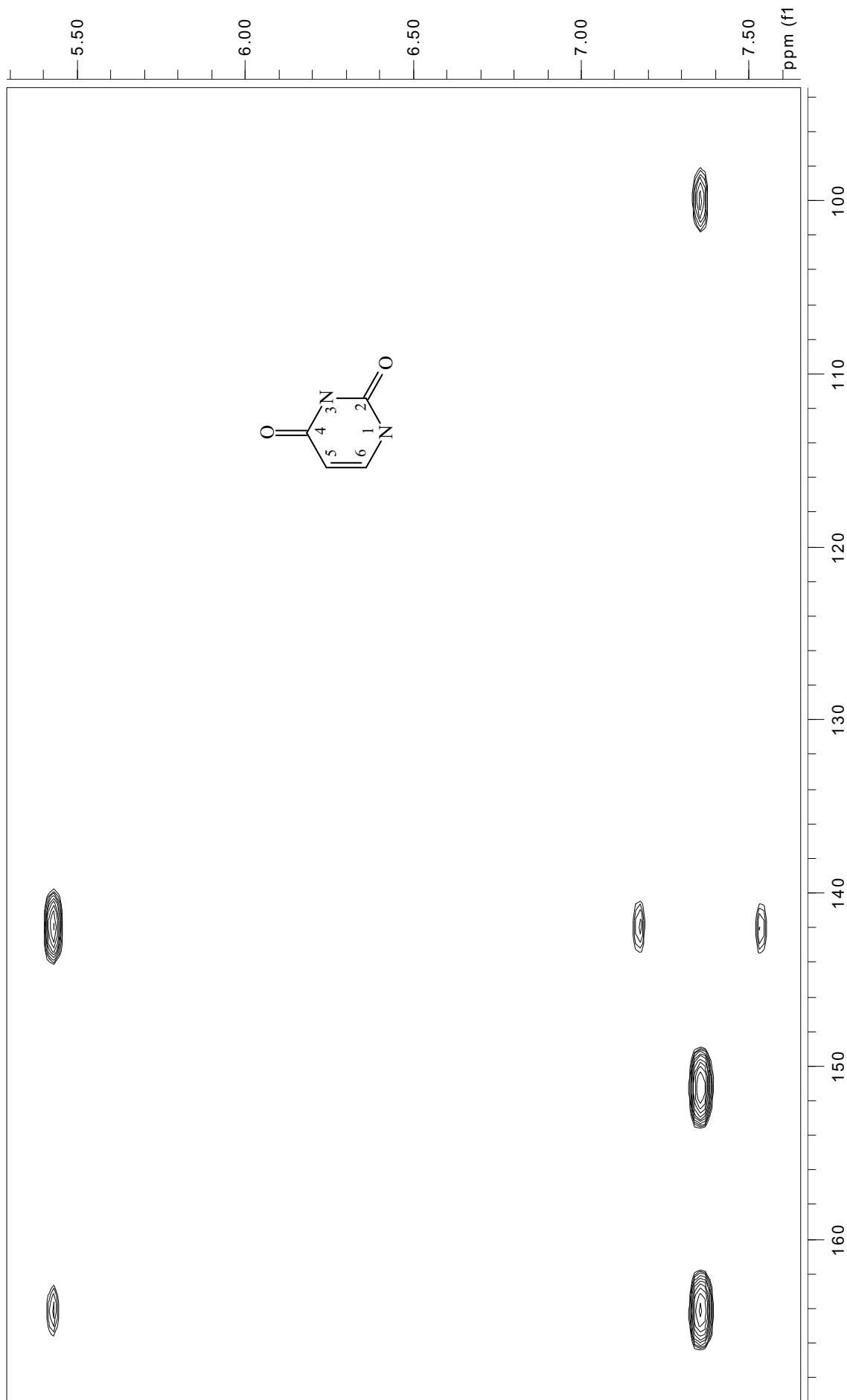


Figura 145: Mapa de contomo gHMBC de (II) (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

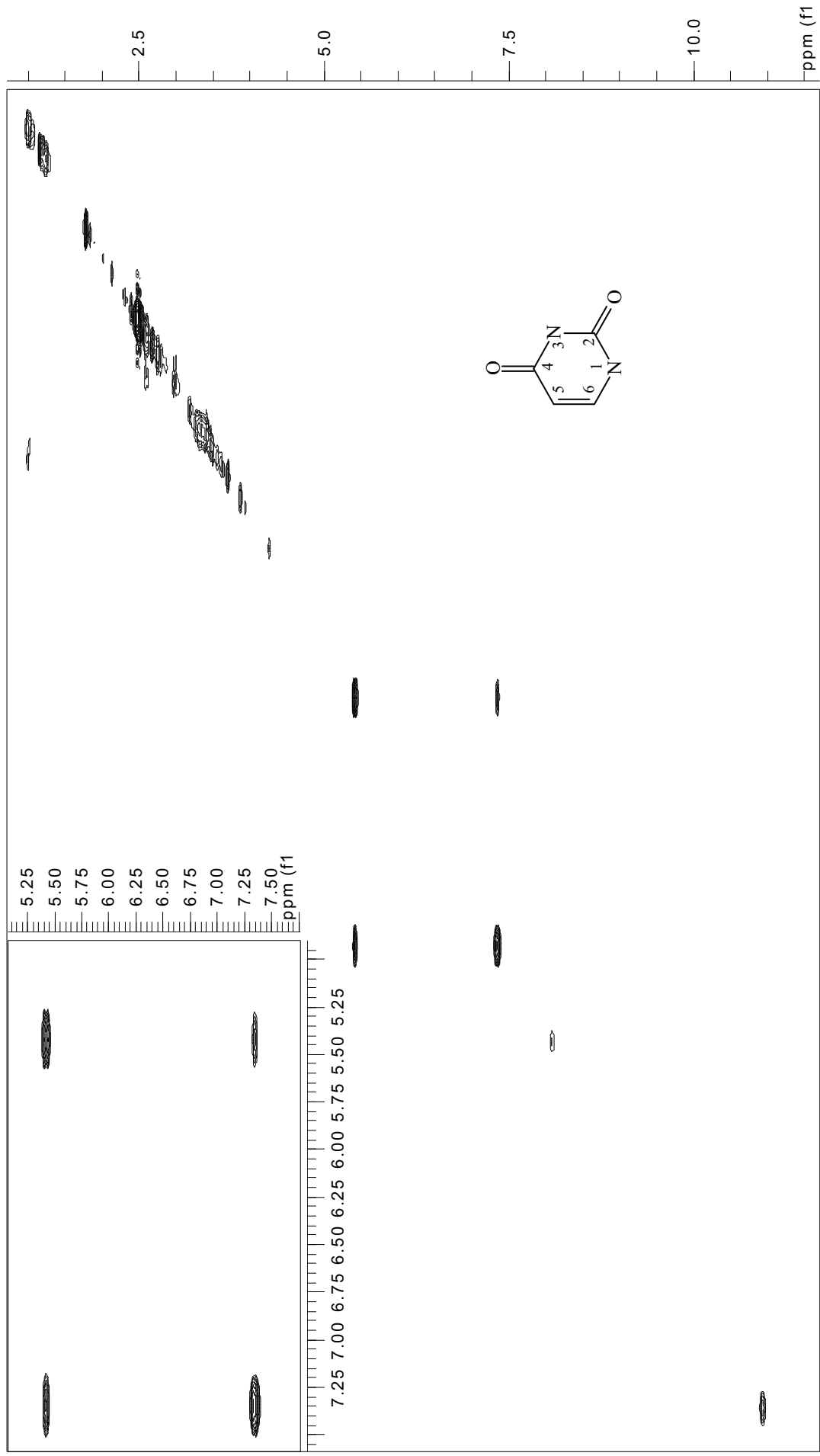


Figura 146: Espectro de gCOSY de **11** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

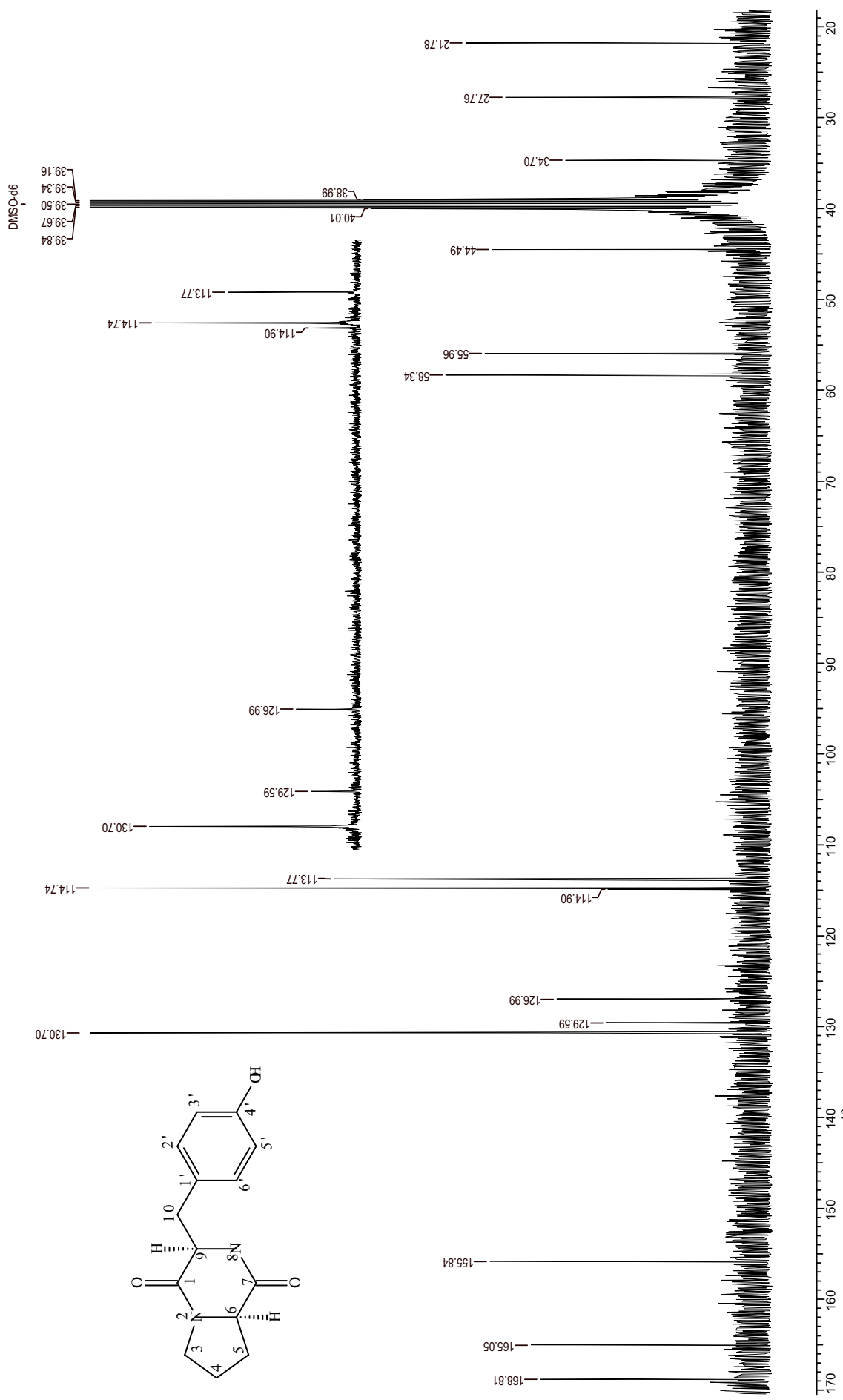


Figura 148: Espectro de RMN de ^{13}C de **12** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

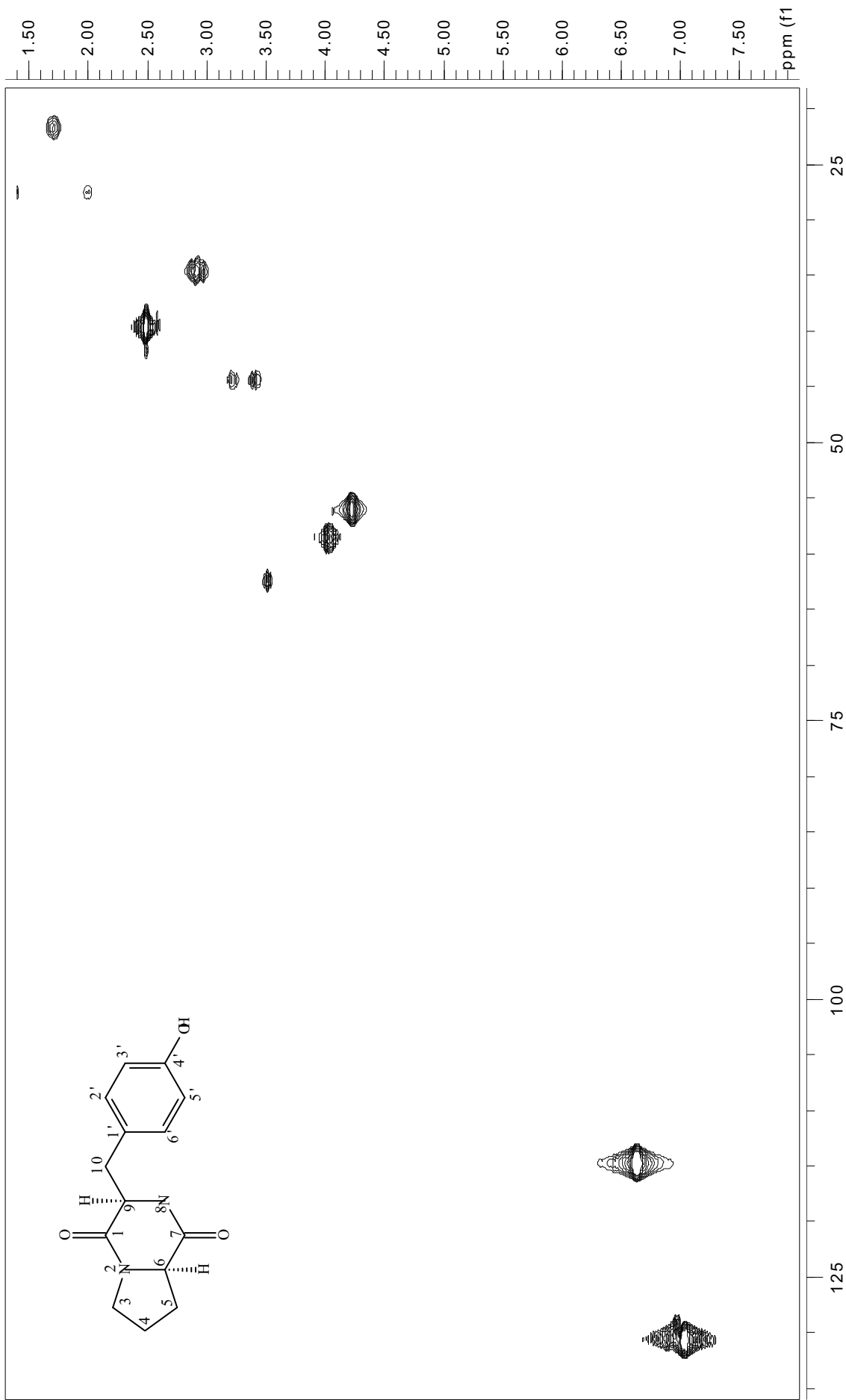


Figura 149: Mapa de contorno gHMBC de **12** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

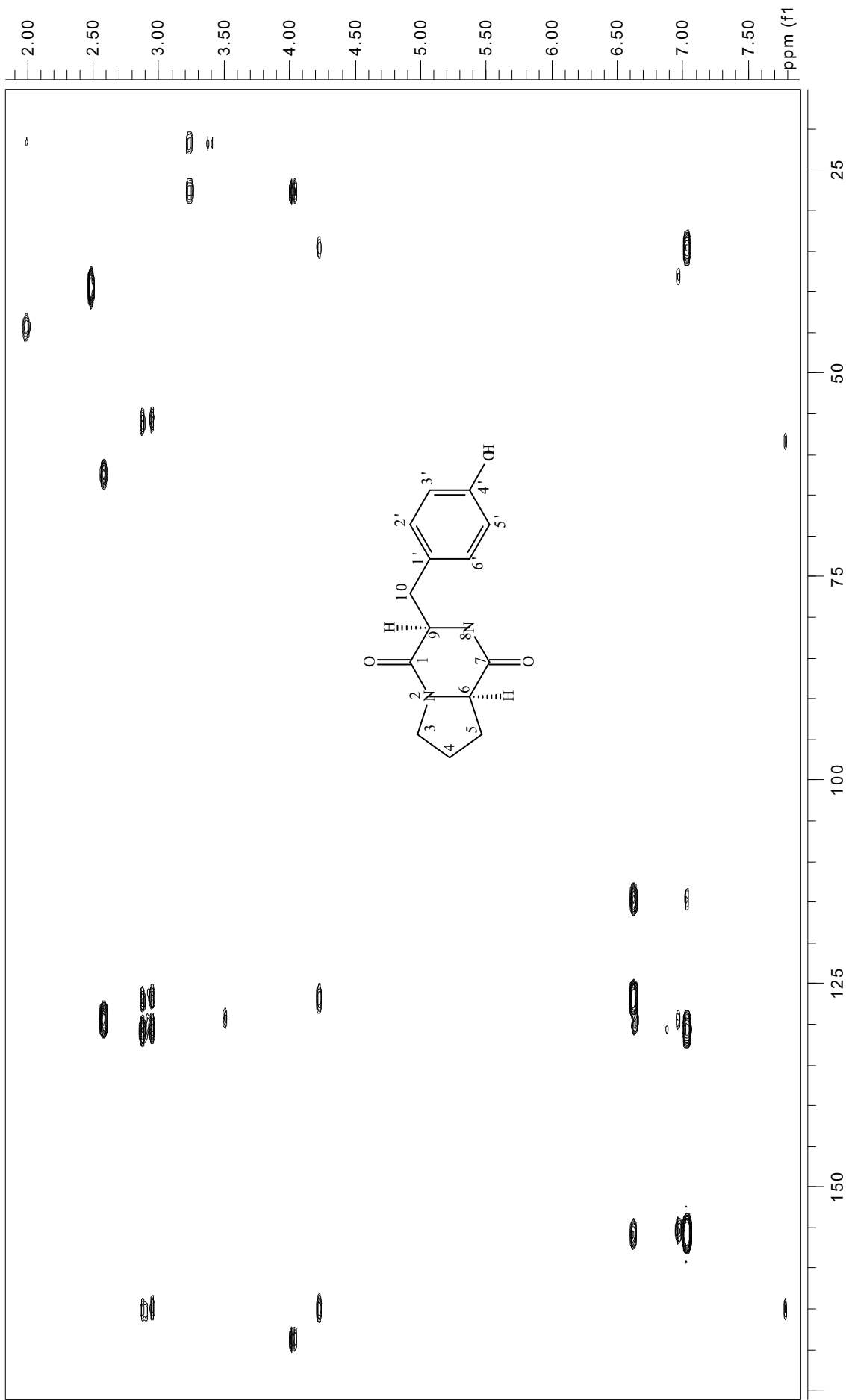


Figura 150: Mapa de contorno gHMBC de **12** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

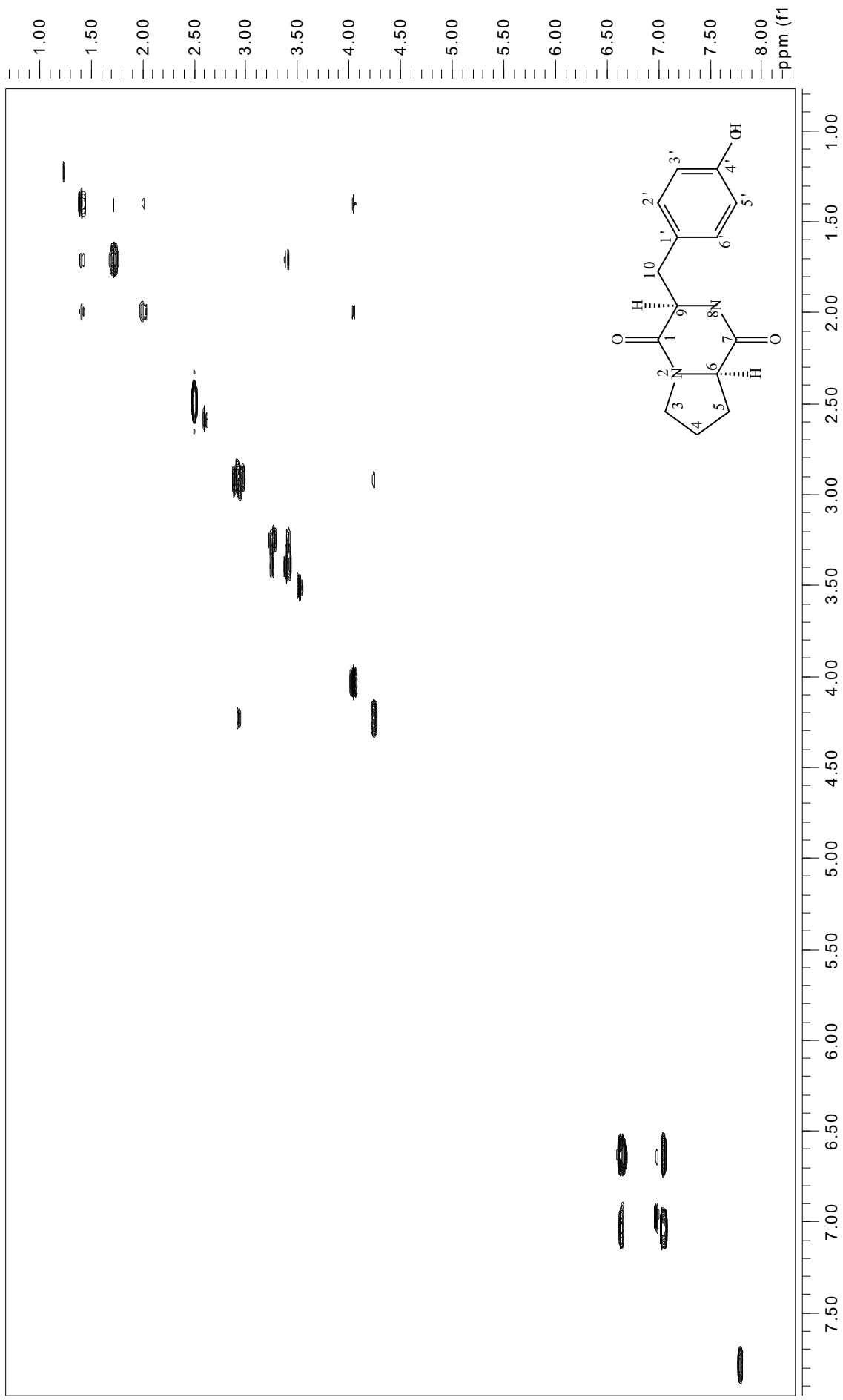


Figura 151: Espectro de gCOSY de **12** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

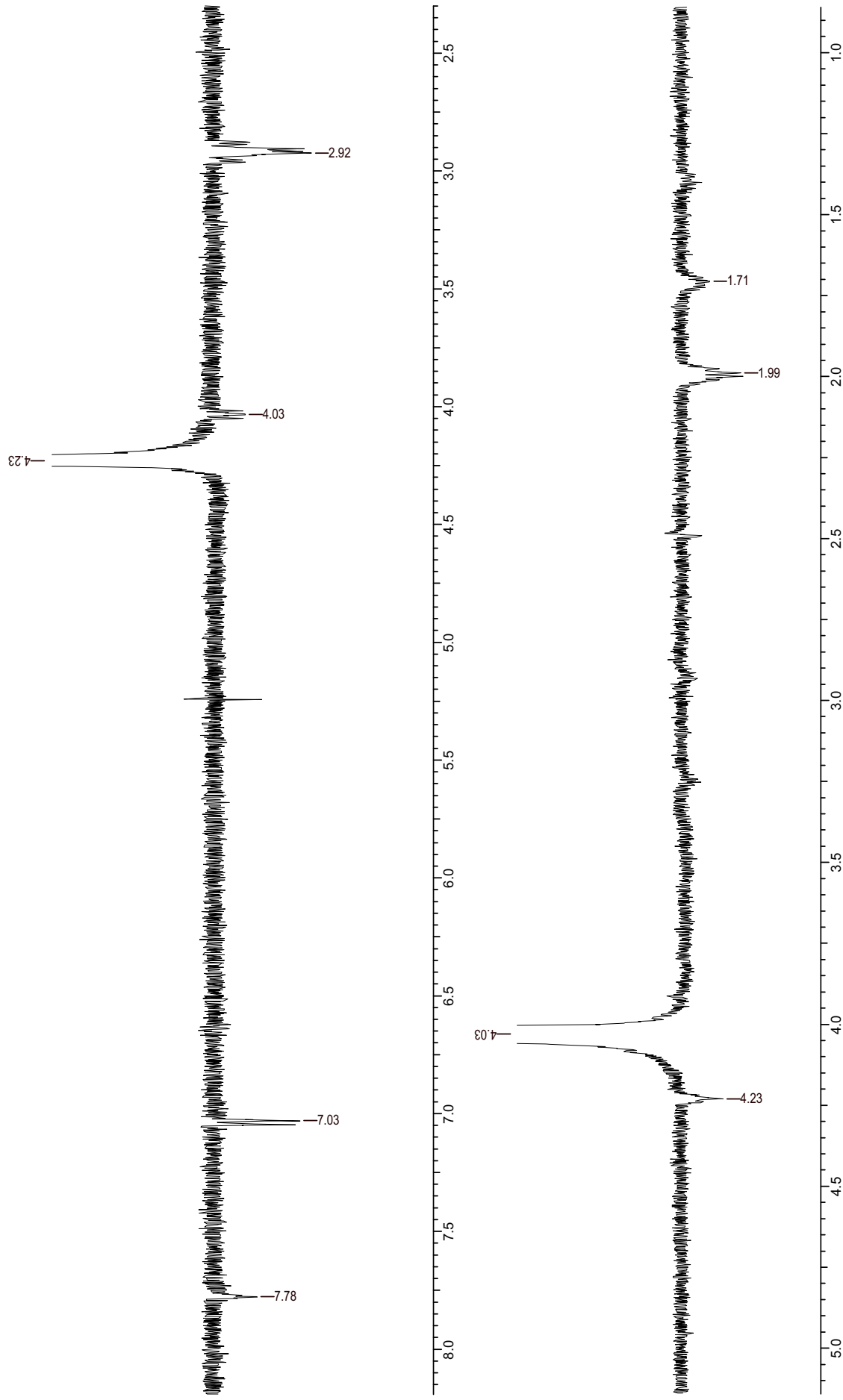


Figura 152: Espectro de NOESY 1D de **12** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

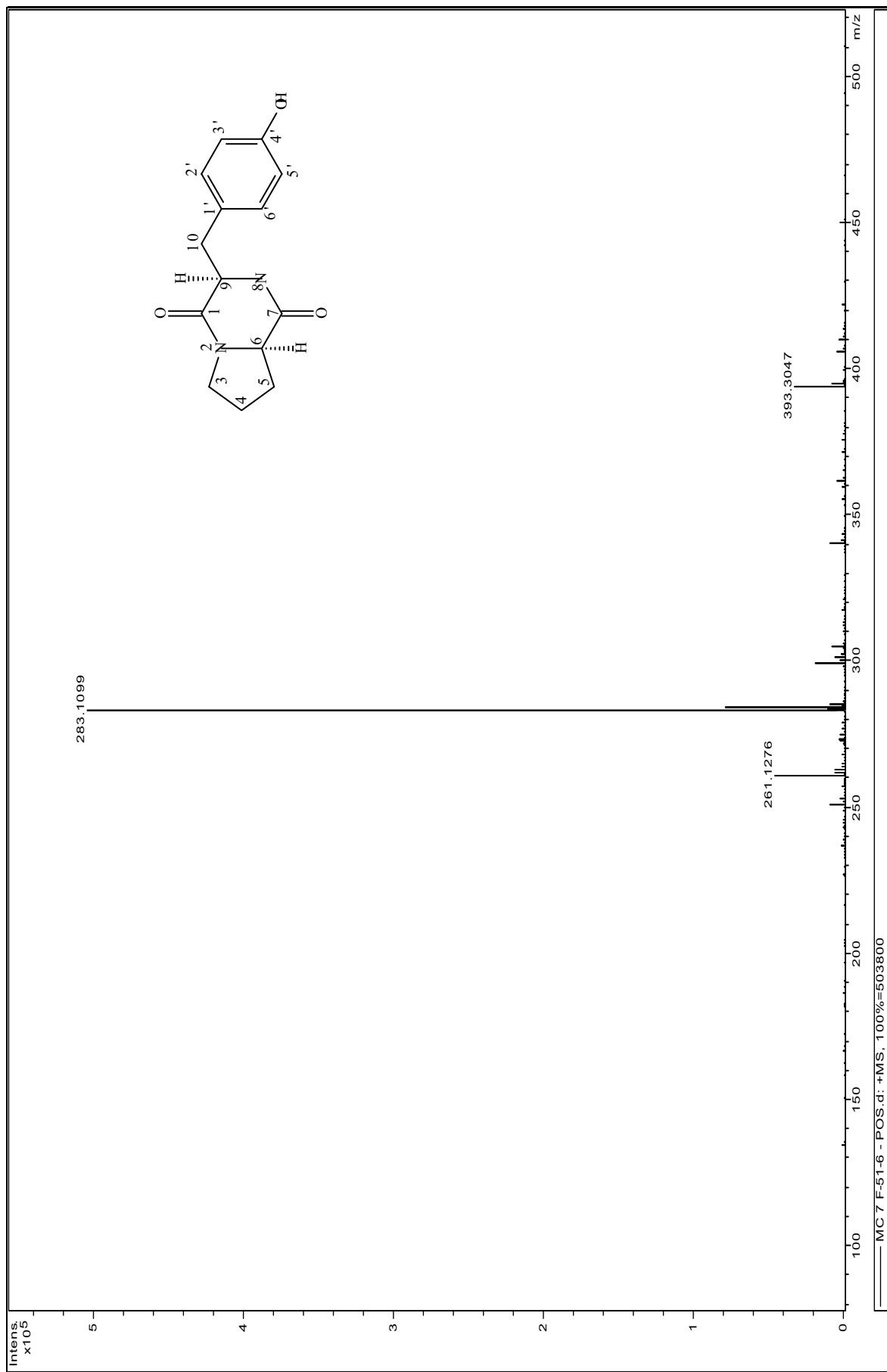
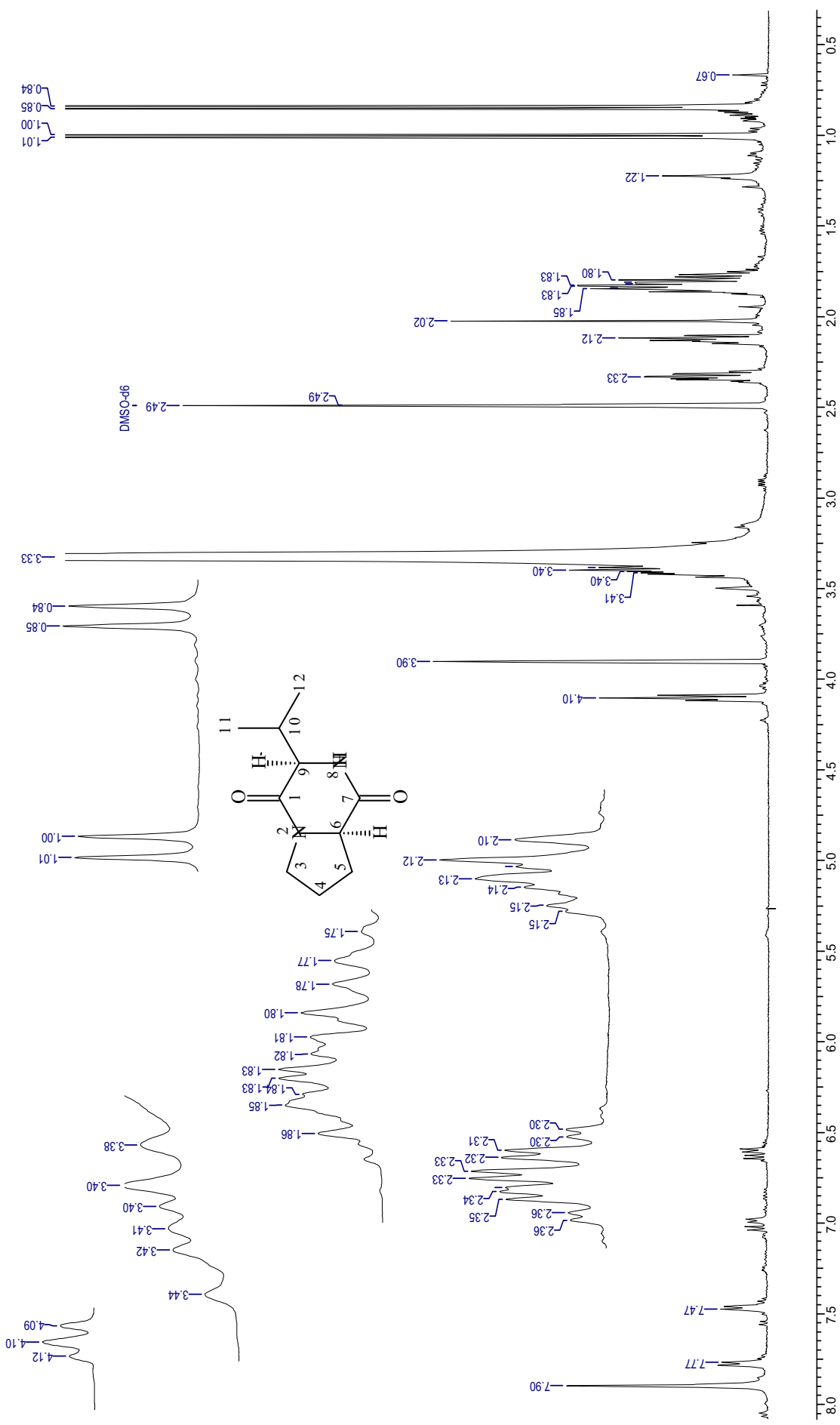


Figura 153: Espectro de Massas de (12)



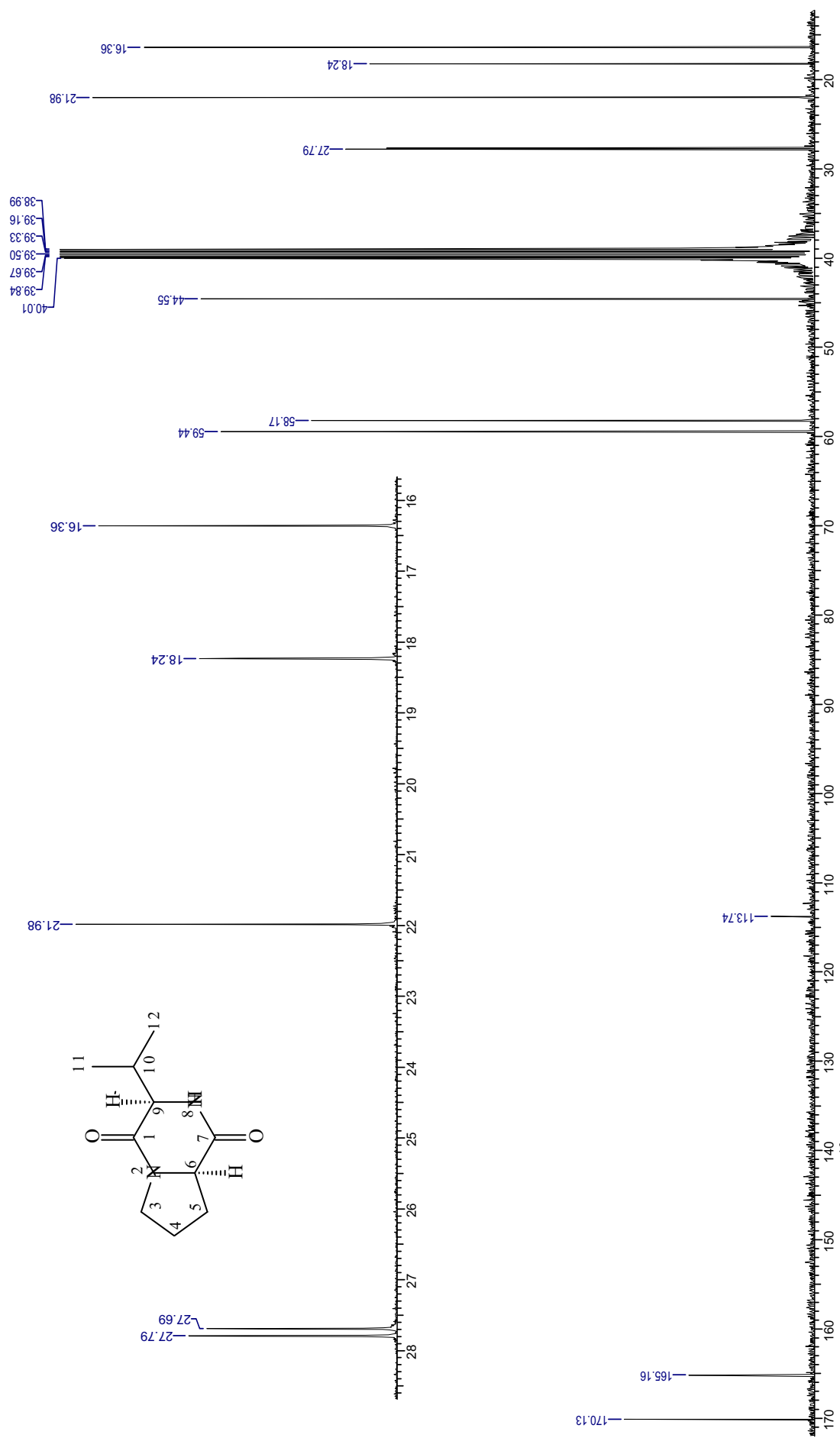


Figura 155: Espectro de RMN de ^{13}C de **13** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

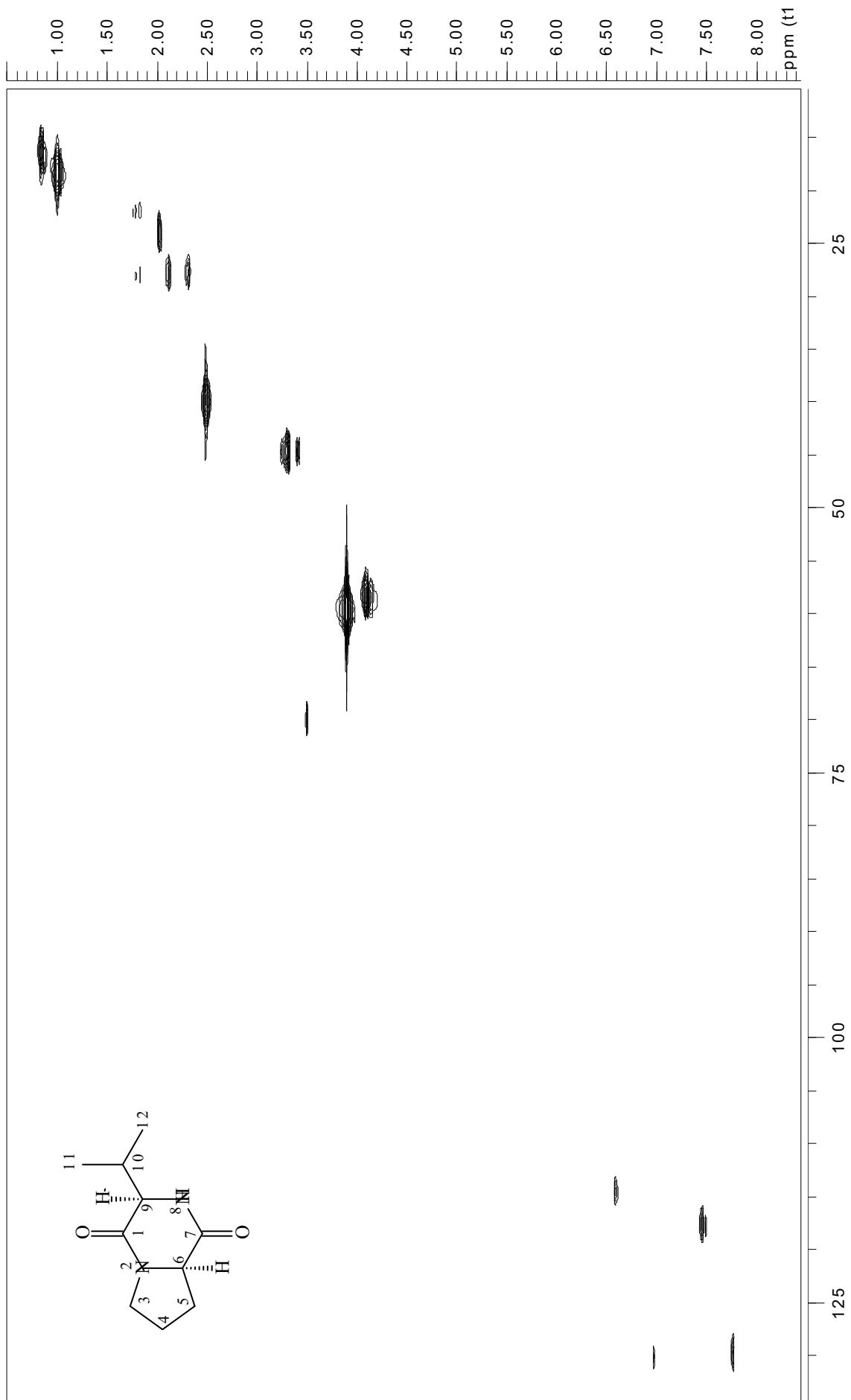


Figura 156: Mapa de contorno gHMBC de **13** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

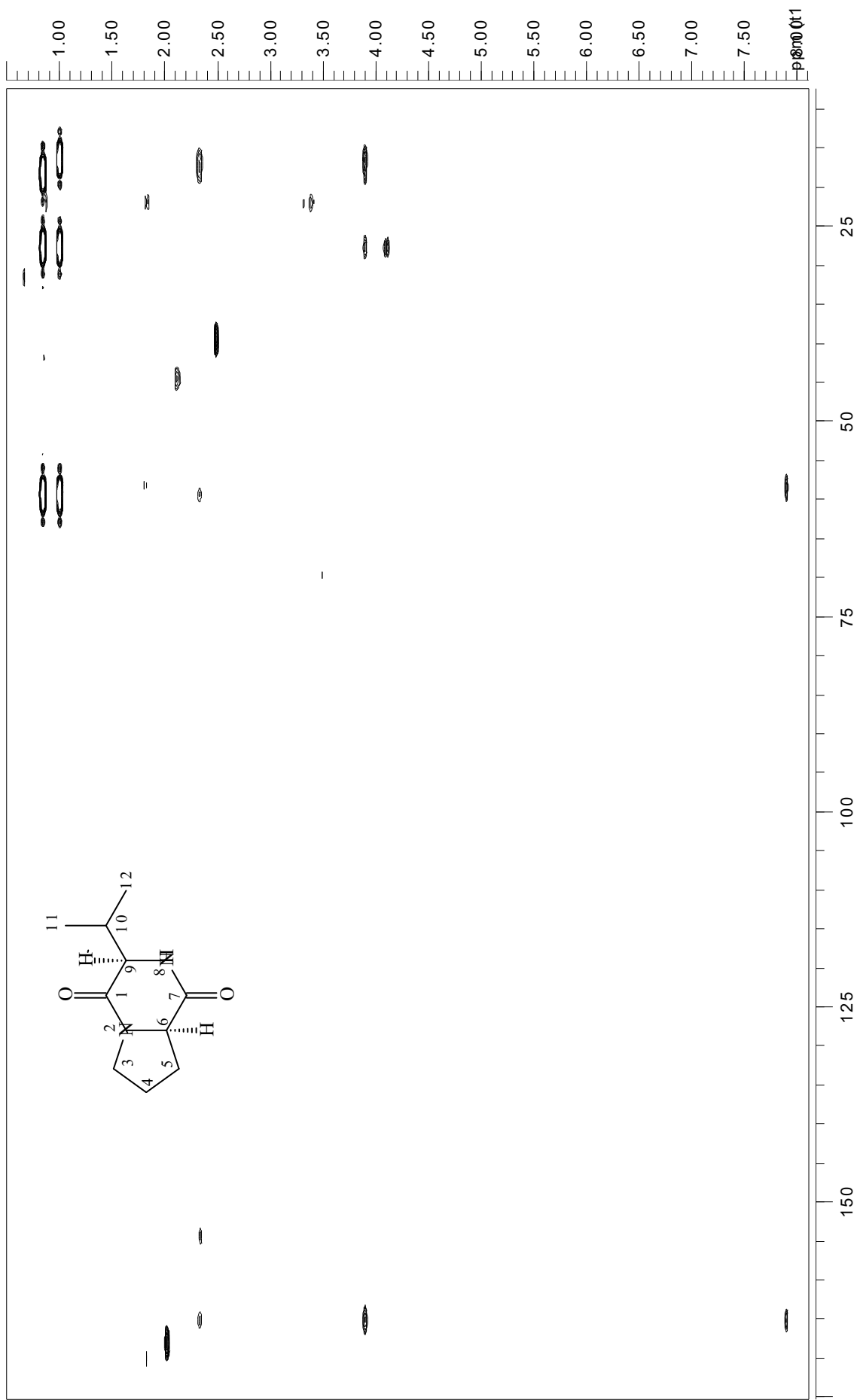


Figura 157: Mapa de contorno gHMBC de **13** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

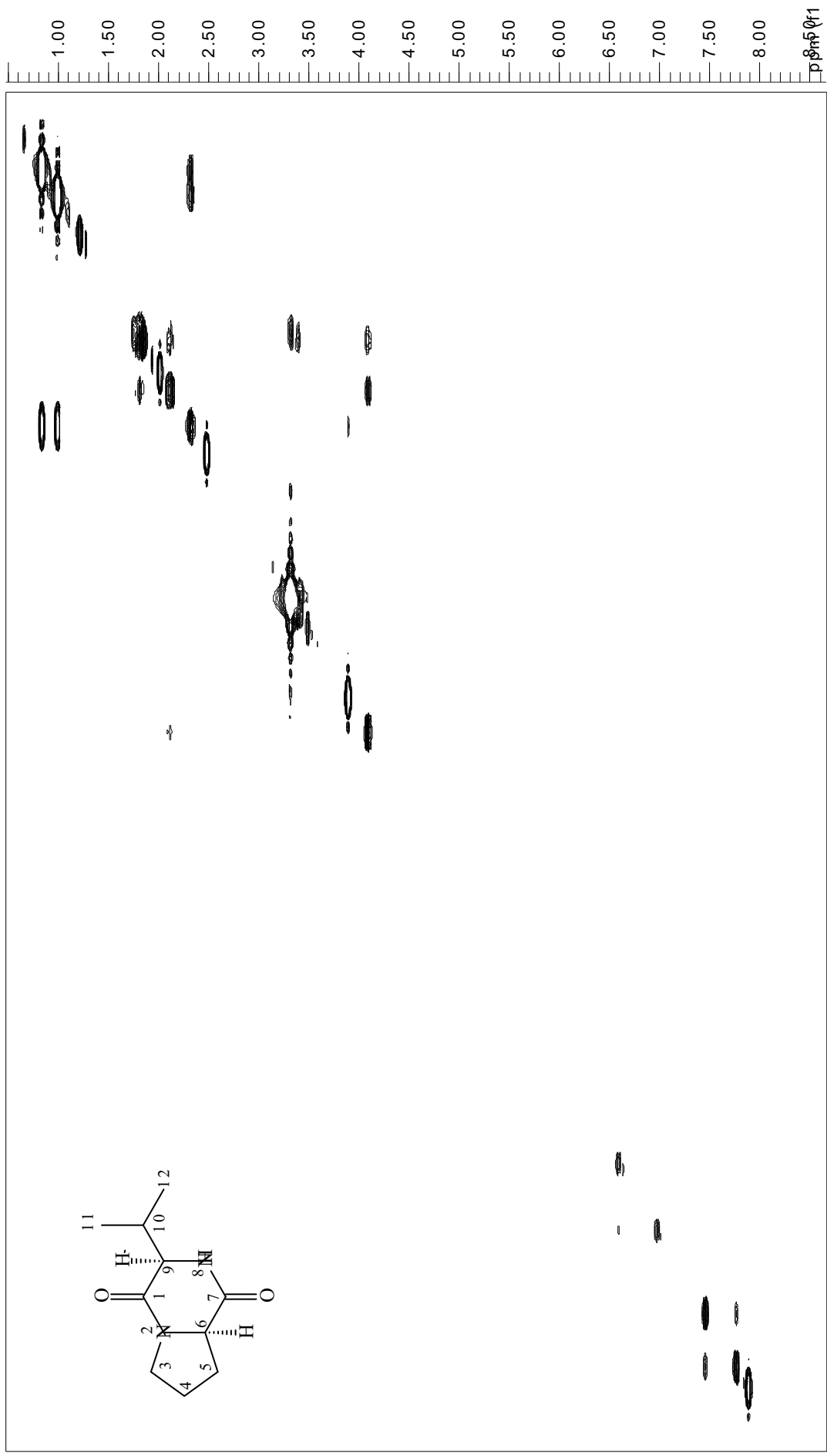


Figura 158: Espectro de gCOSY de **13** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

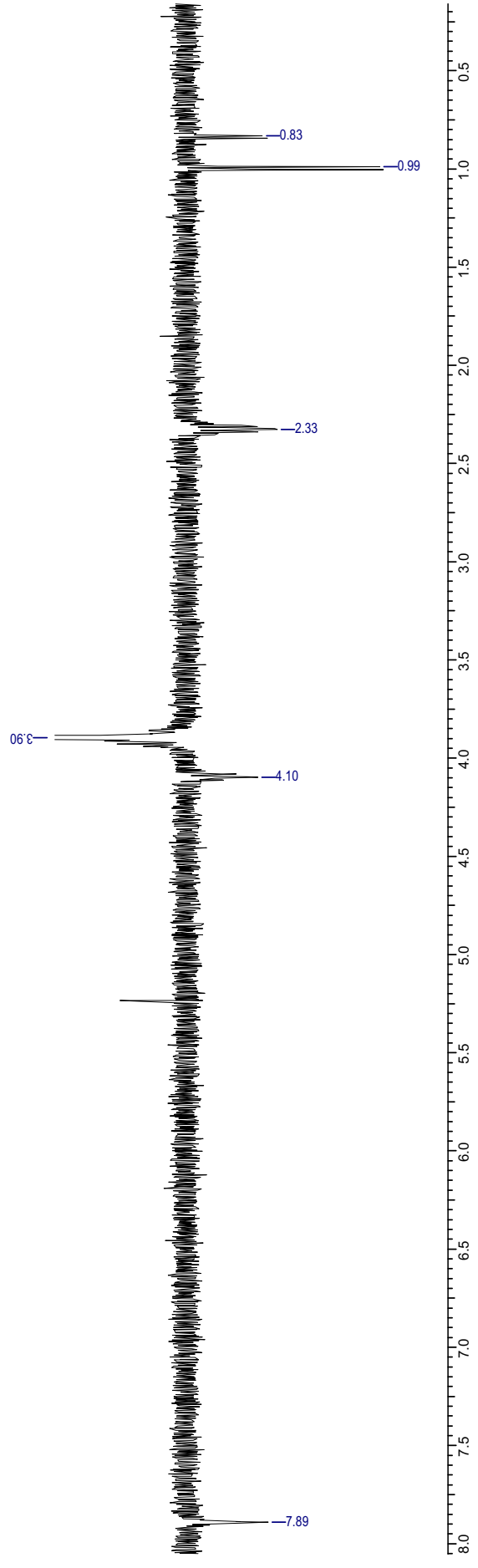
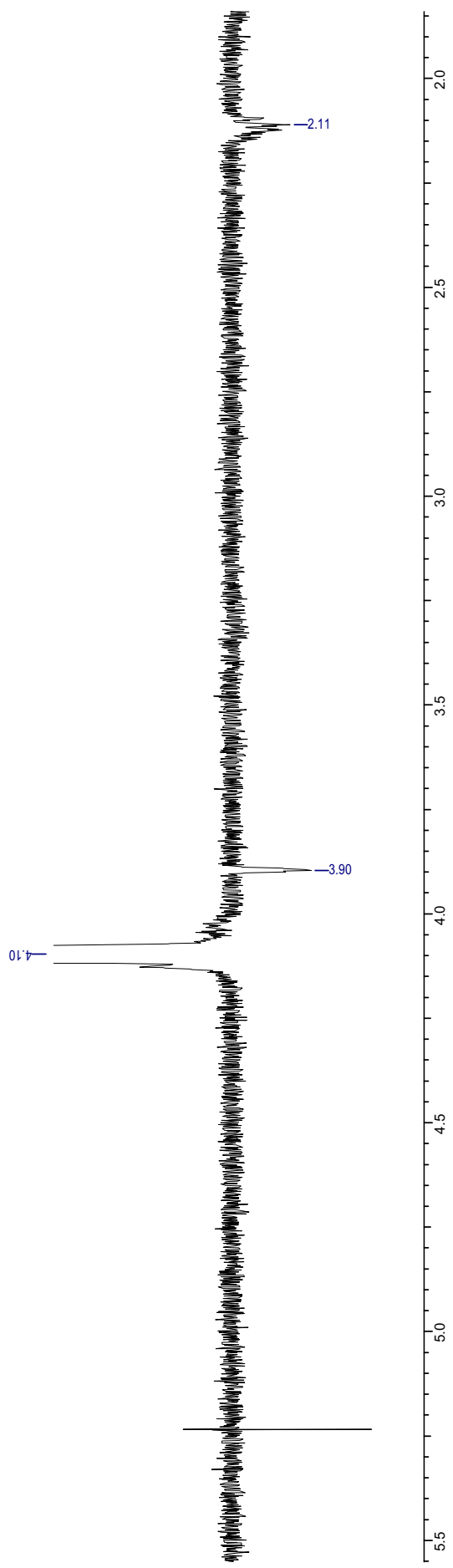


Figura 159: Espectro de NOESY 1D de **13** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

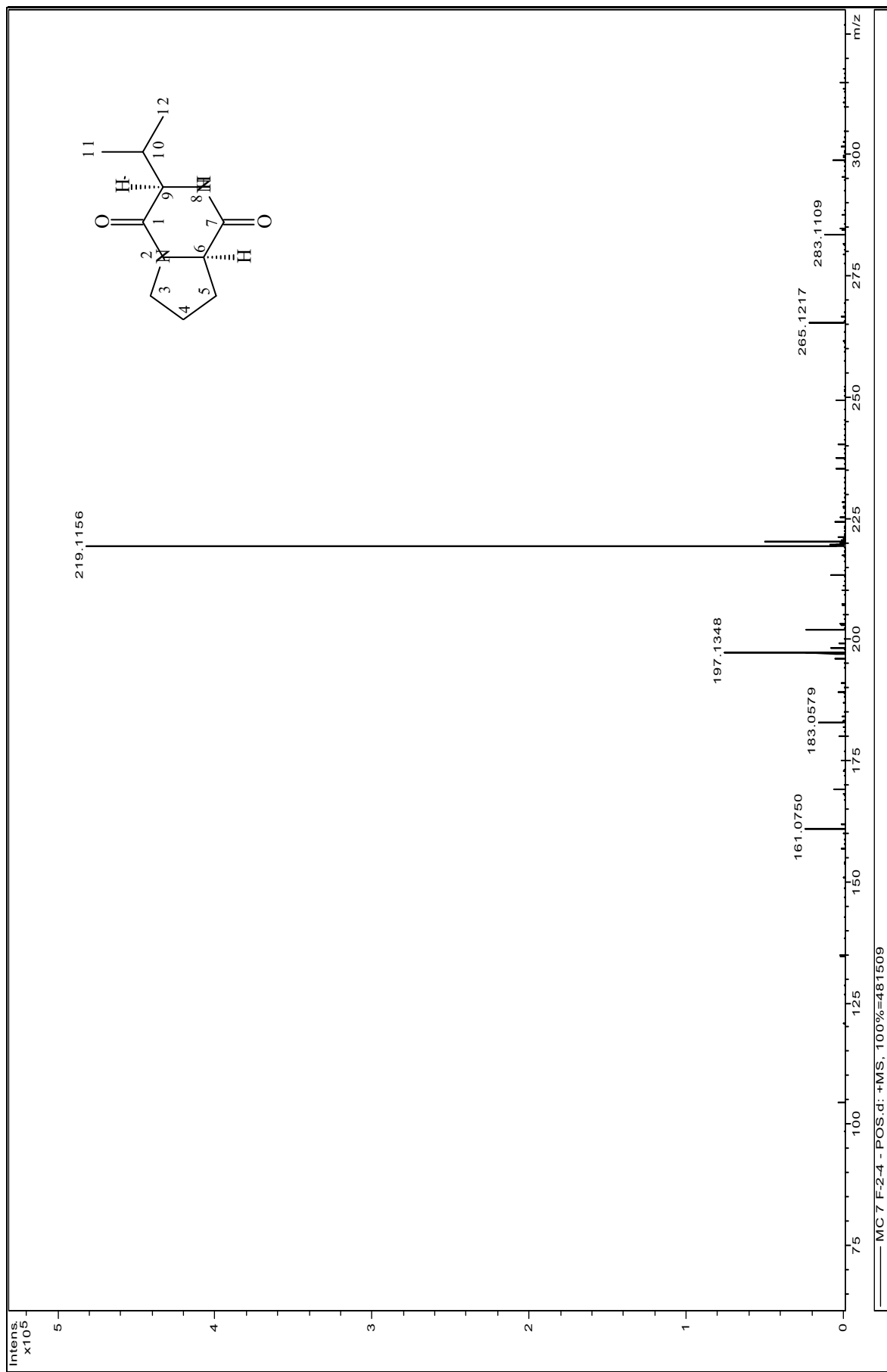


Figura 160: Espectro de Massas de (13)

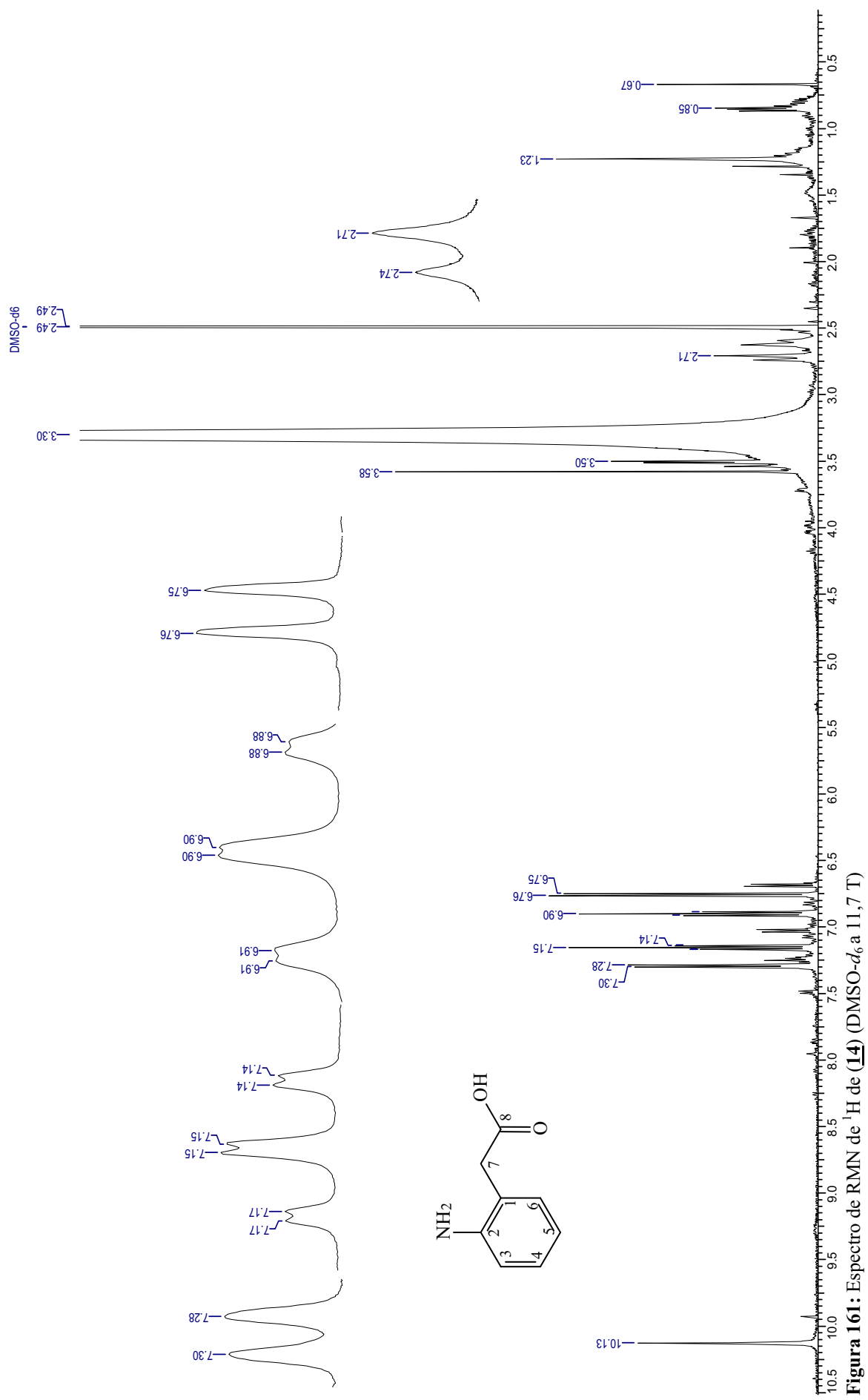


Figura 161: Espectro de RMN de ^1H de **14** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

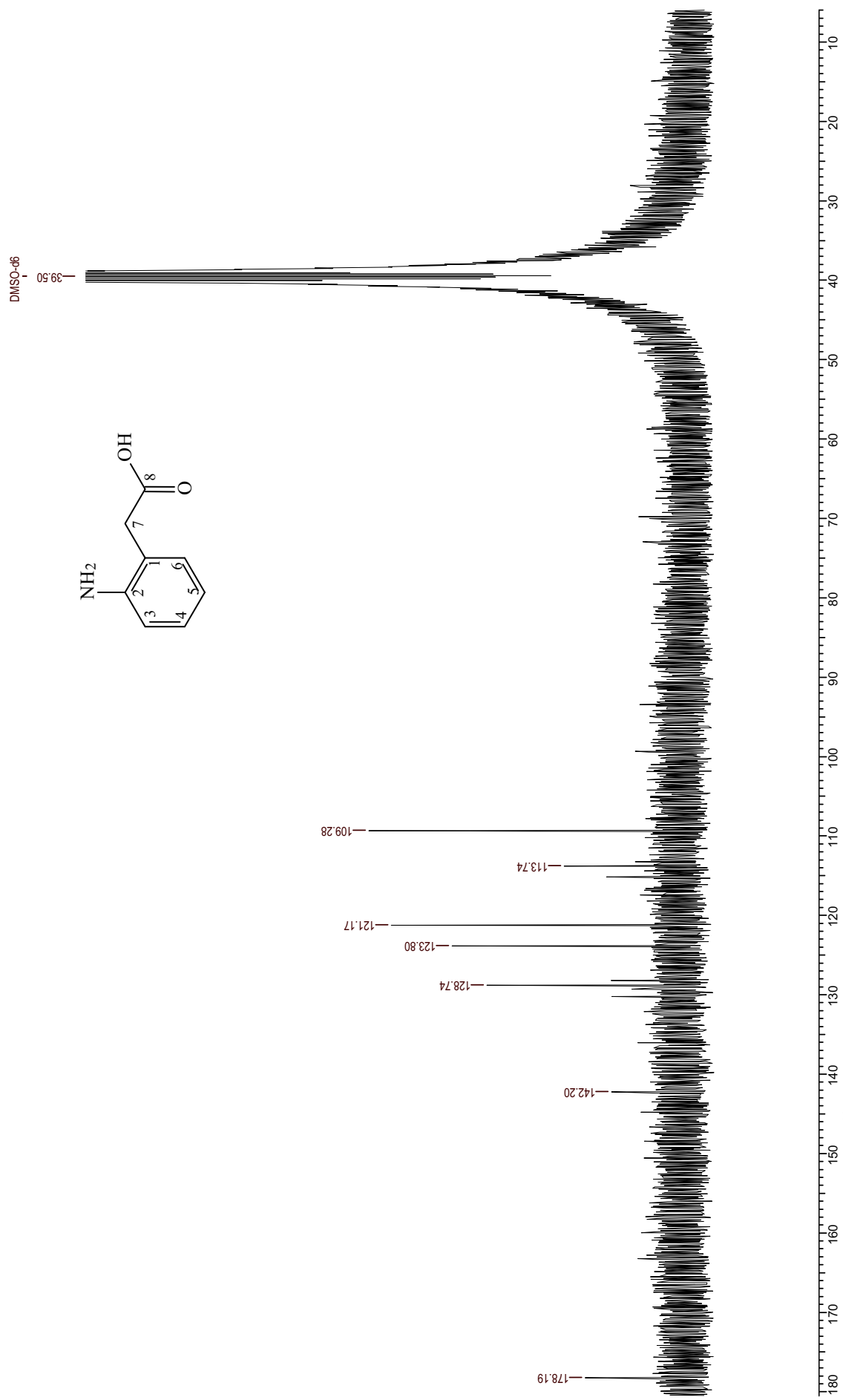


Figura 162: Espectro de RMN de ¹³C de **14** (DMSO-d₆ a 11,7 T)

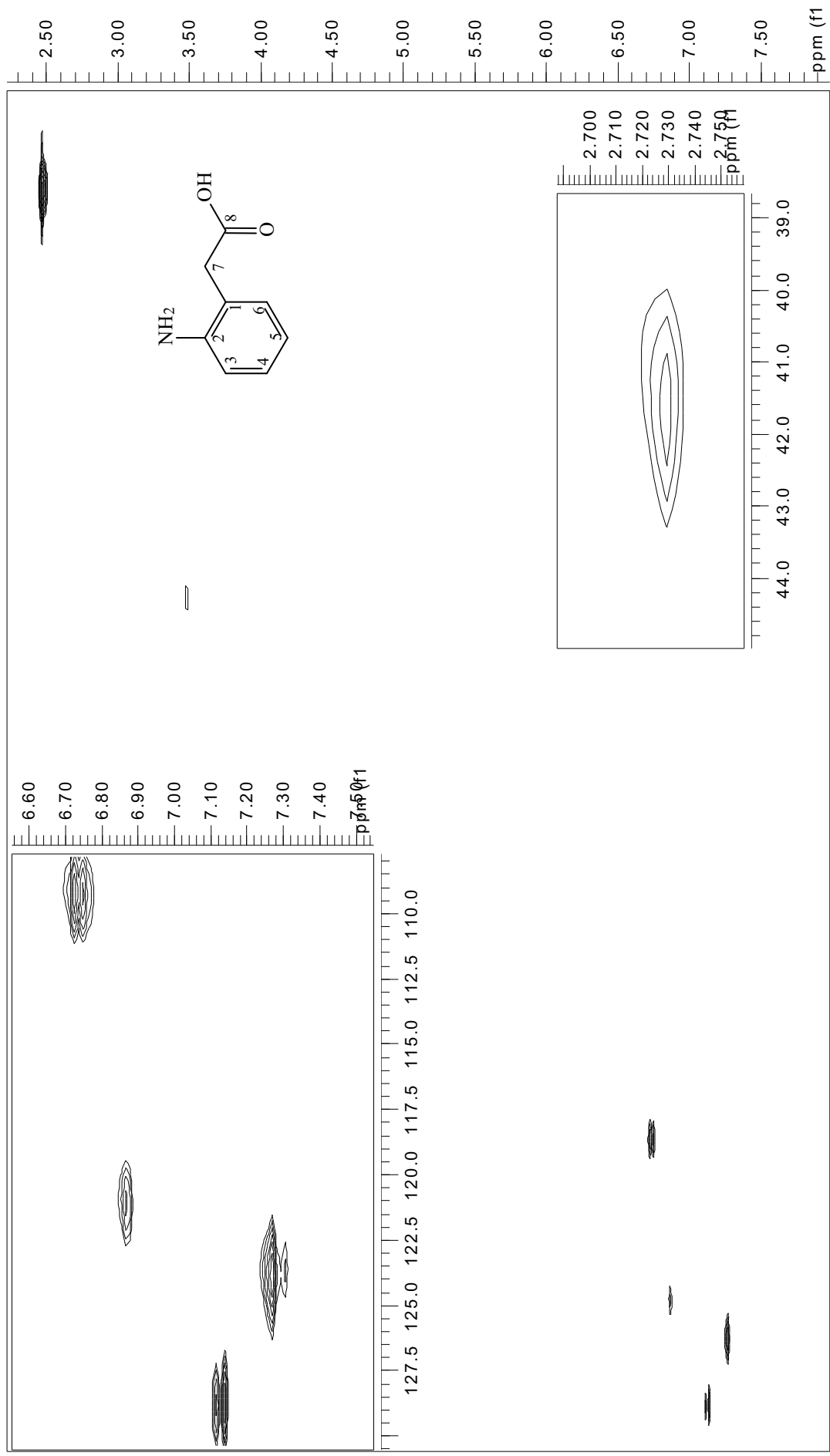


Figura 163: Mapa de contorno gHMBC de **14** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

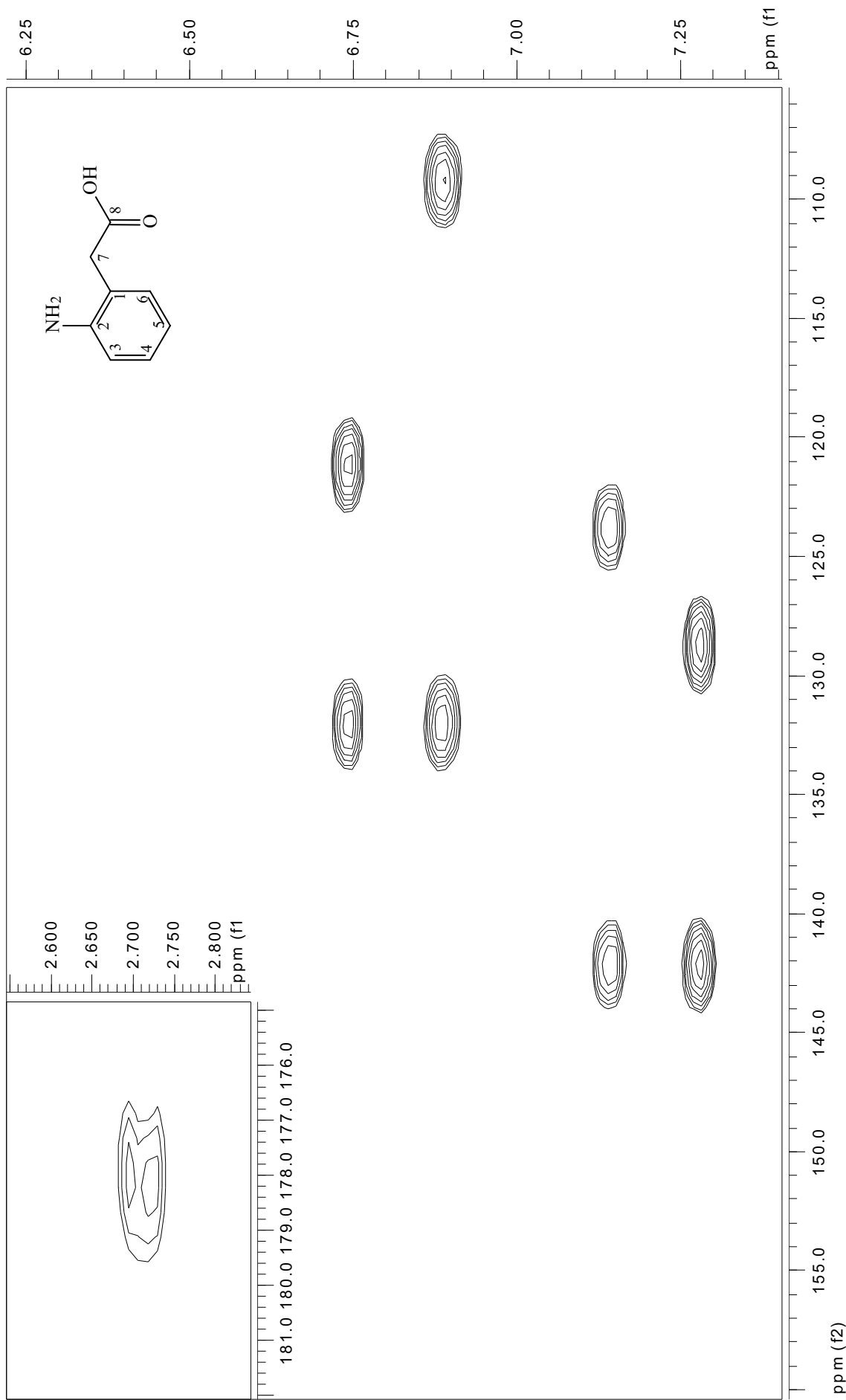


Figura 164: Mapa de contorno gHMBC de **14** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

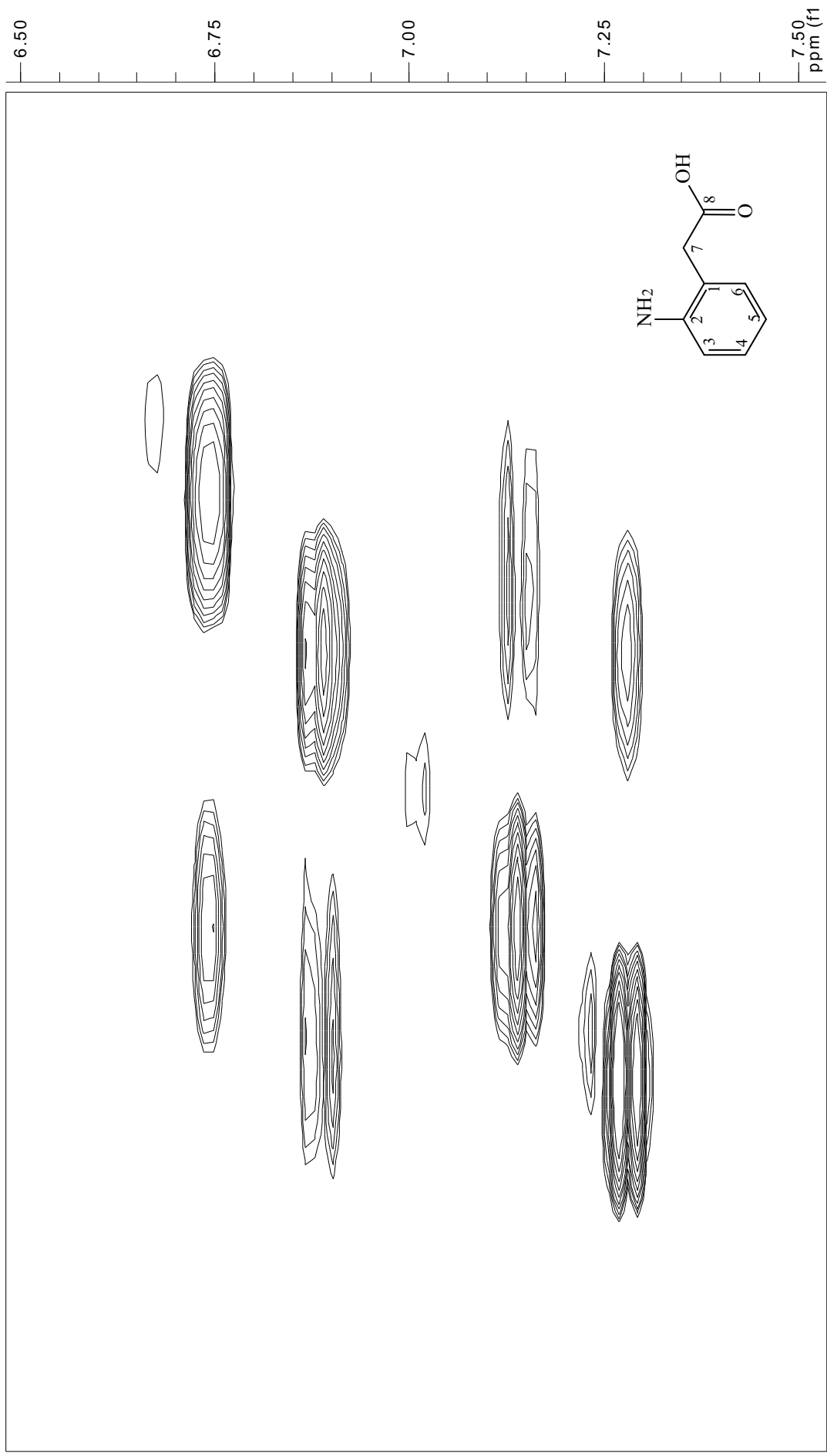


Figura 165: Espectro de gCOSY de **14** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

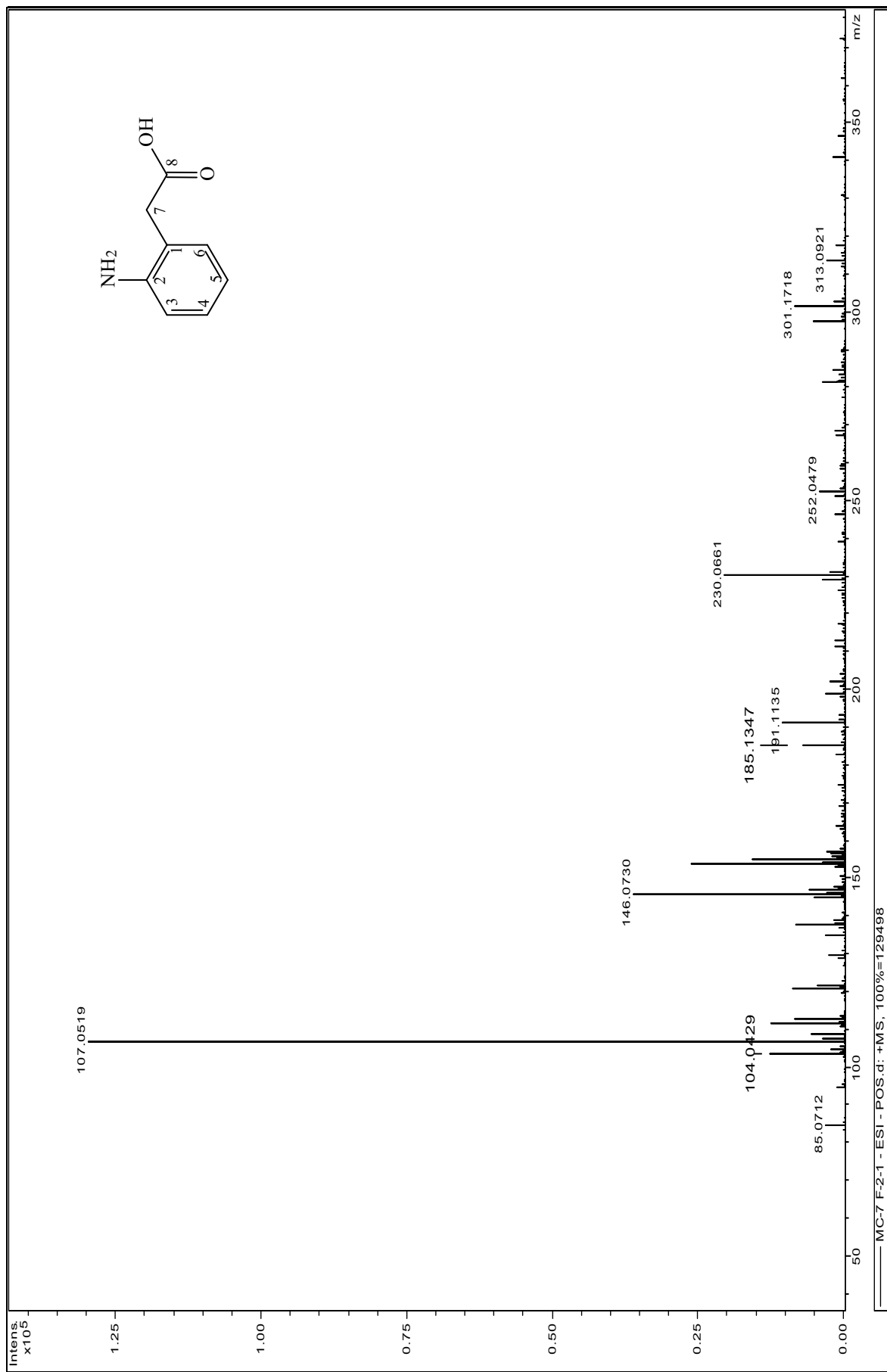


Figura 166: Espectros de Massas de (14)

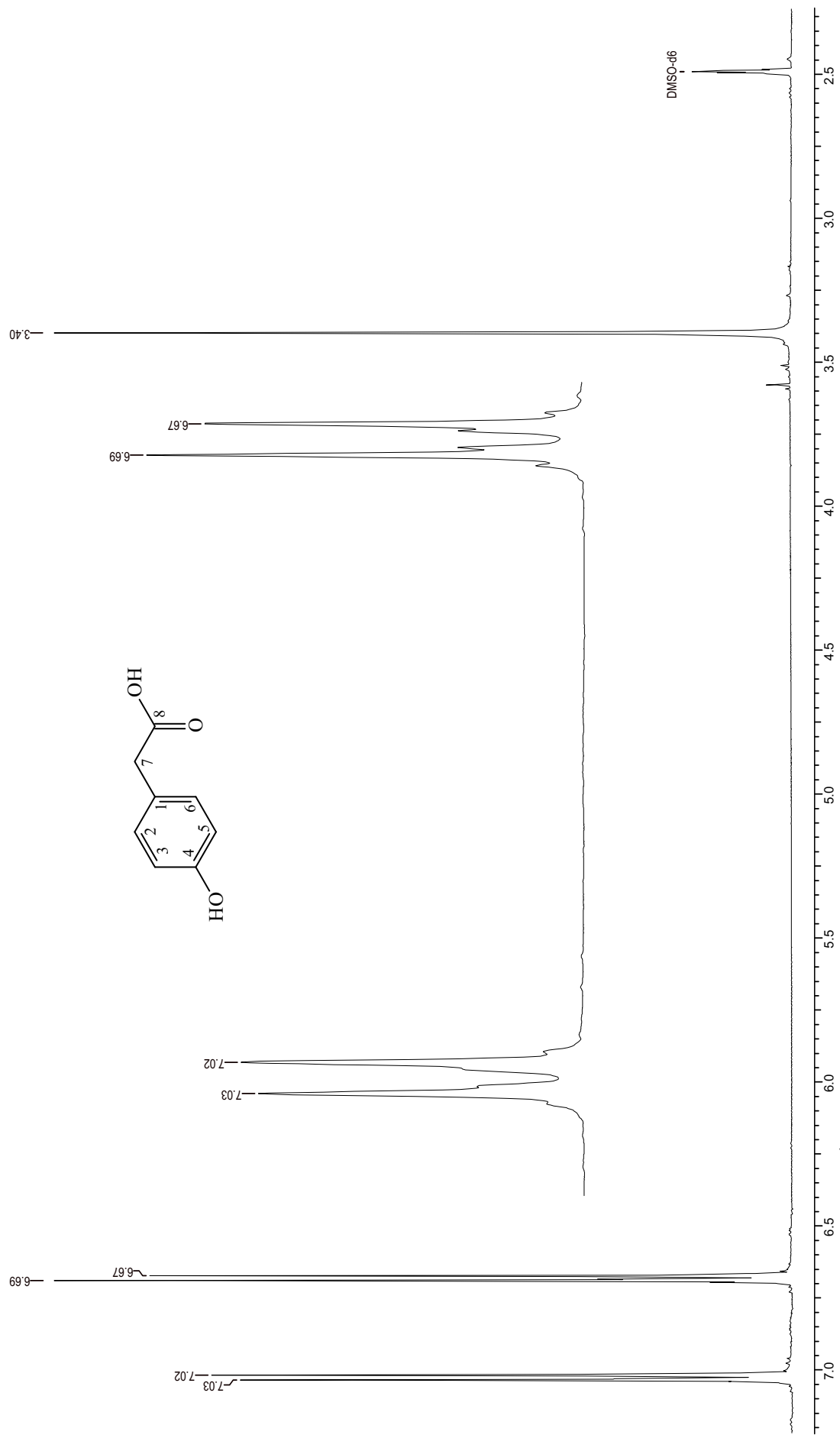


Figura 167: Espectro de RMN de ^1H de **15** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

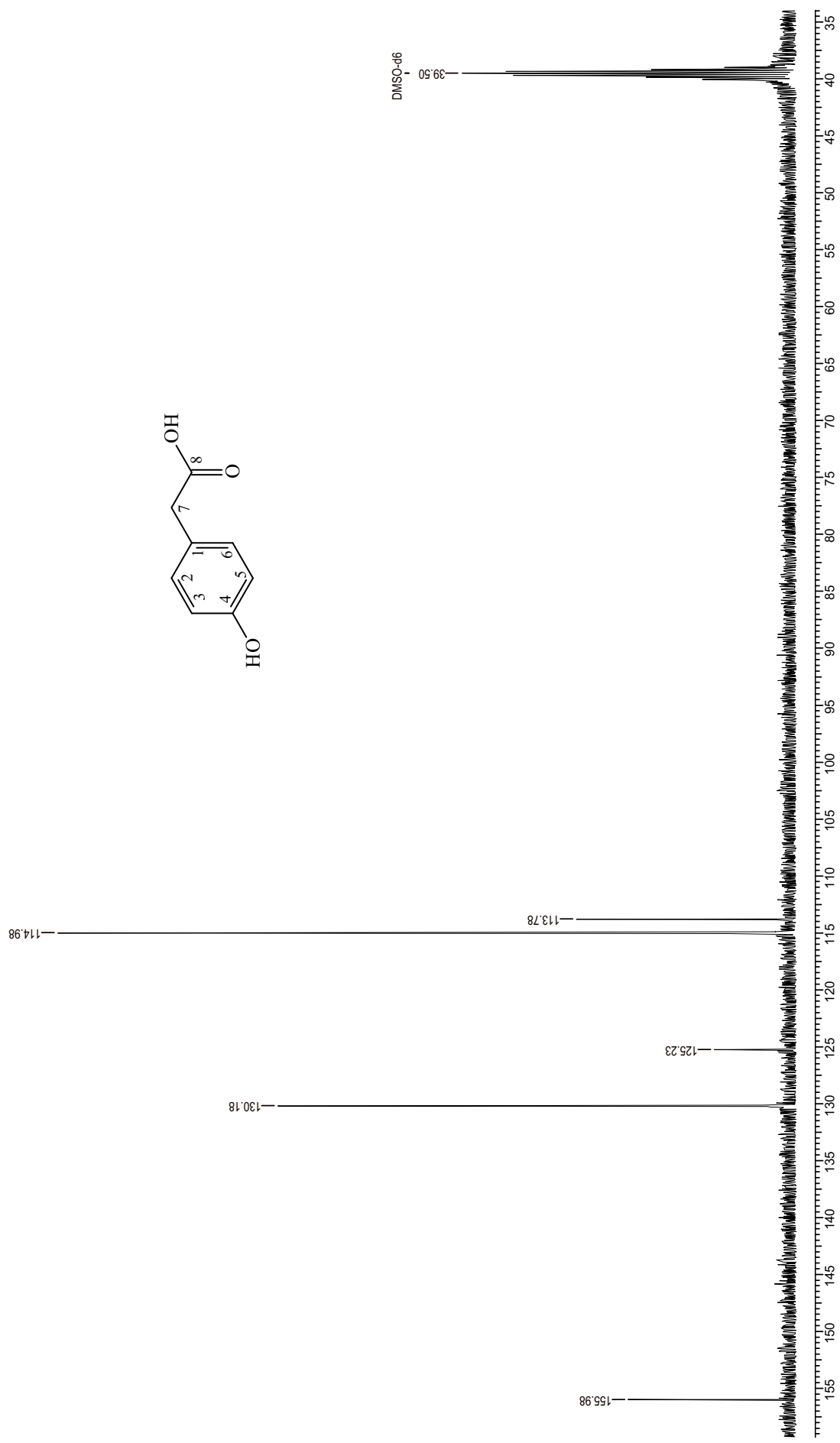


Figura 168: Espectro de RMN de ^{13}C de **15** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

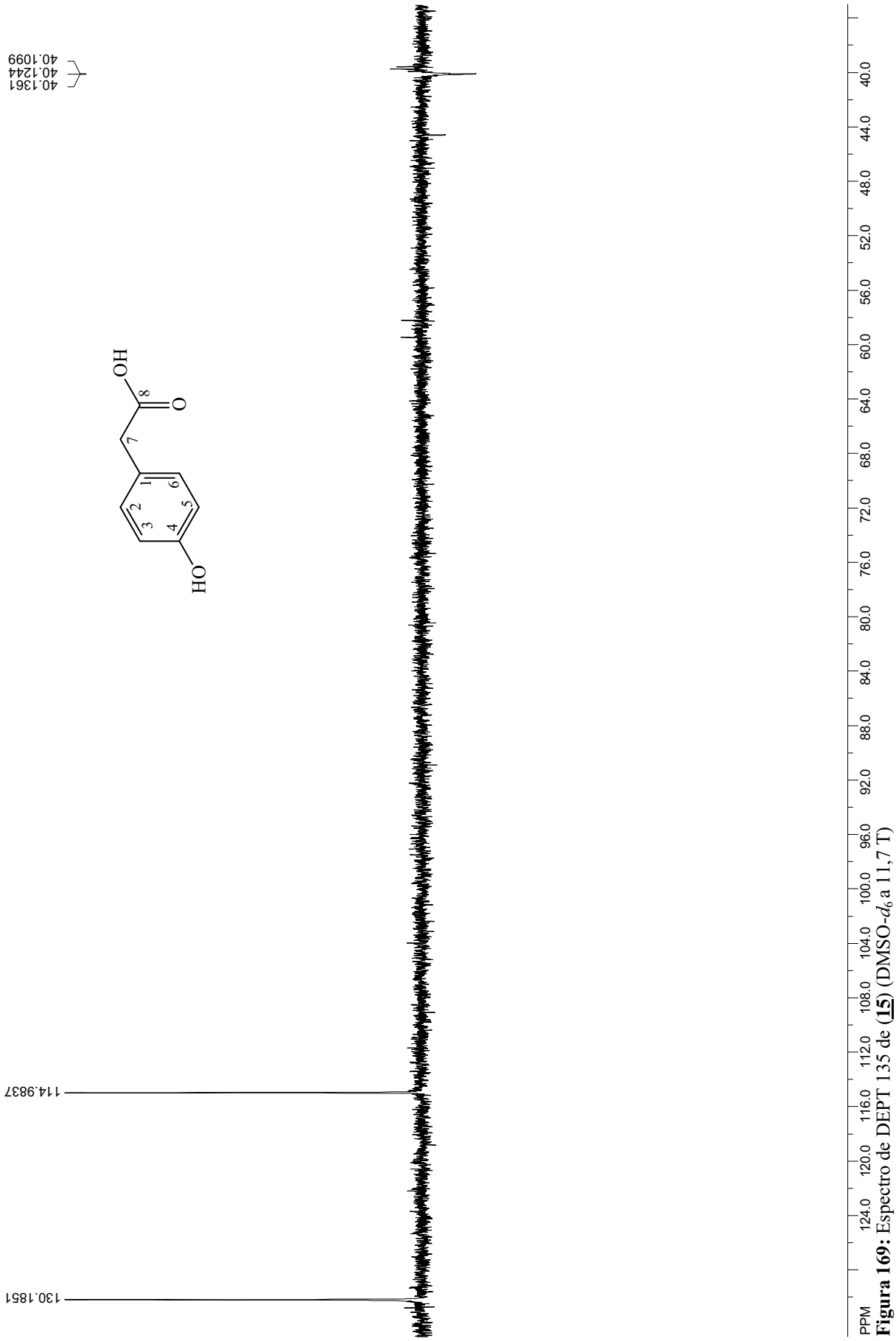


Figura 169: Espectro de DEPT 135 de (15) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

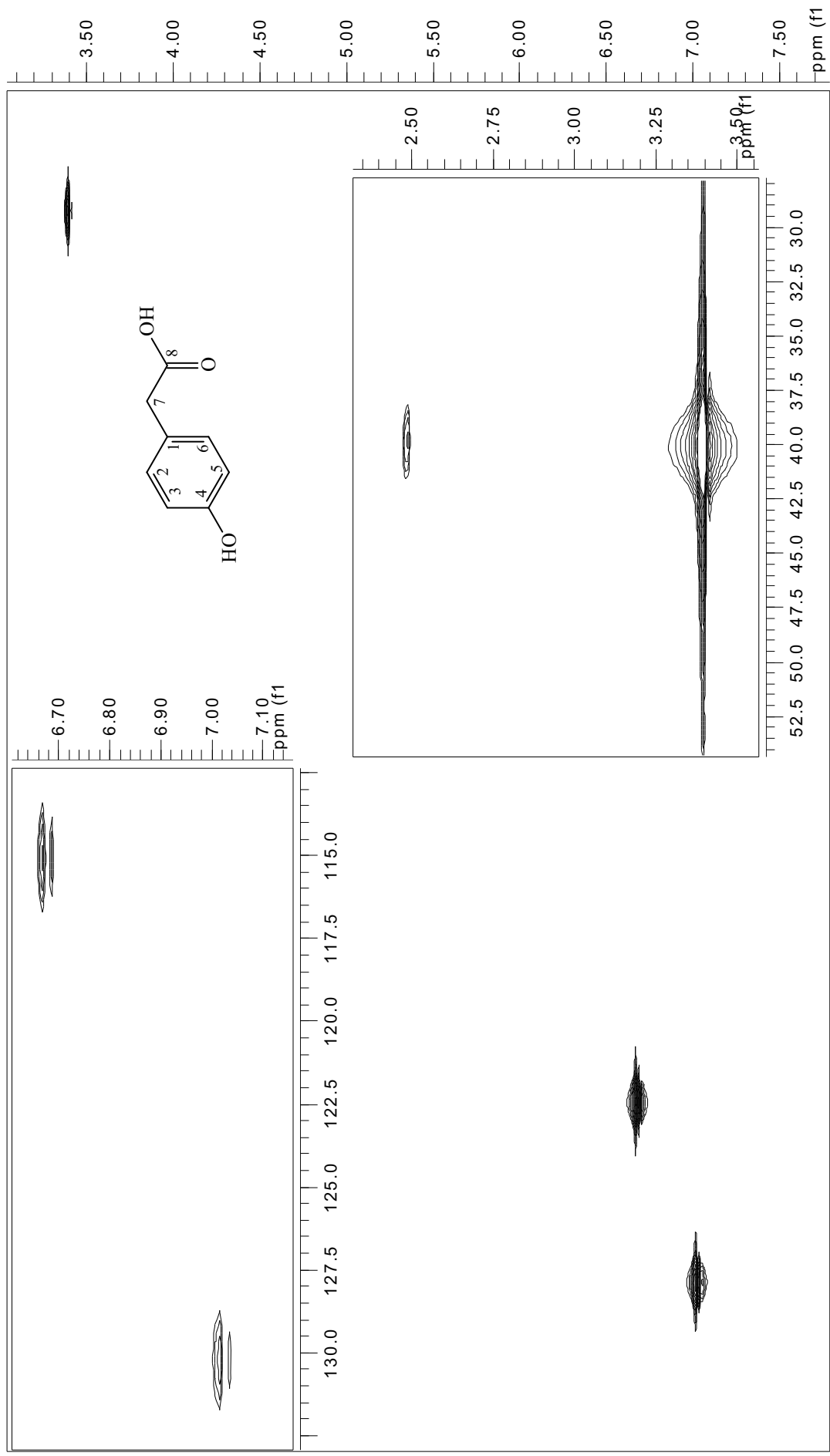


Figura 170: Mapa de contorno gHMBC de **15** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

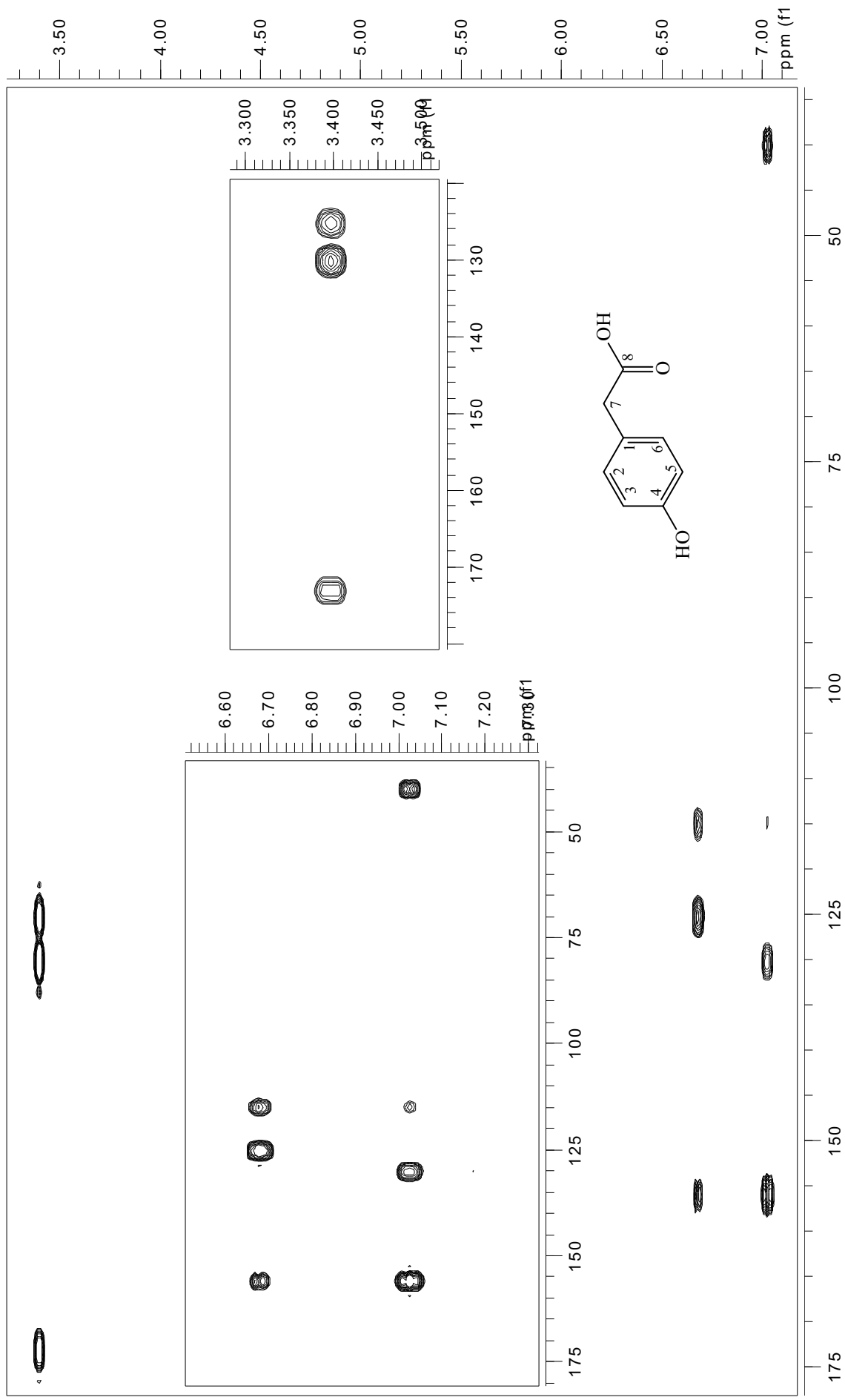


Figura 171: Mapa de contorno gHMBC de **15** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

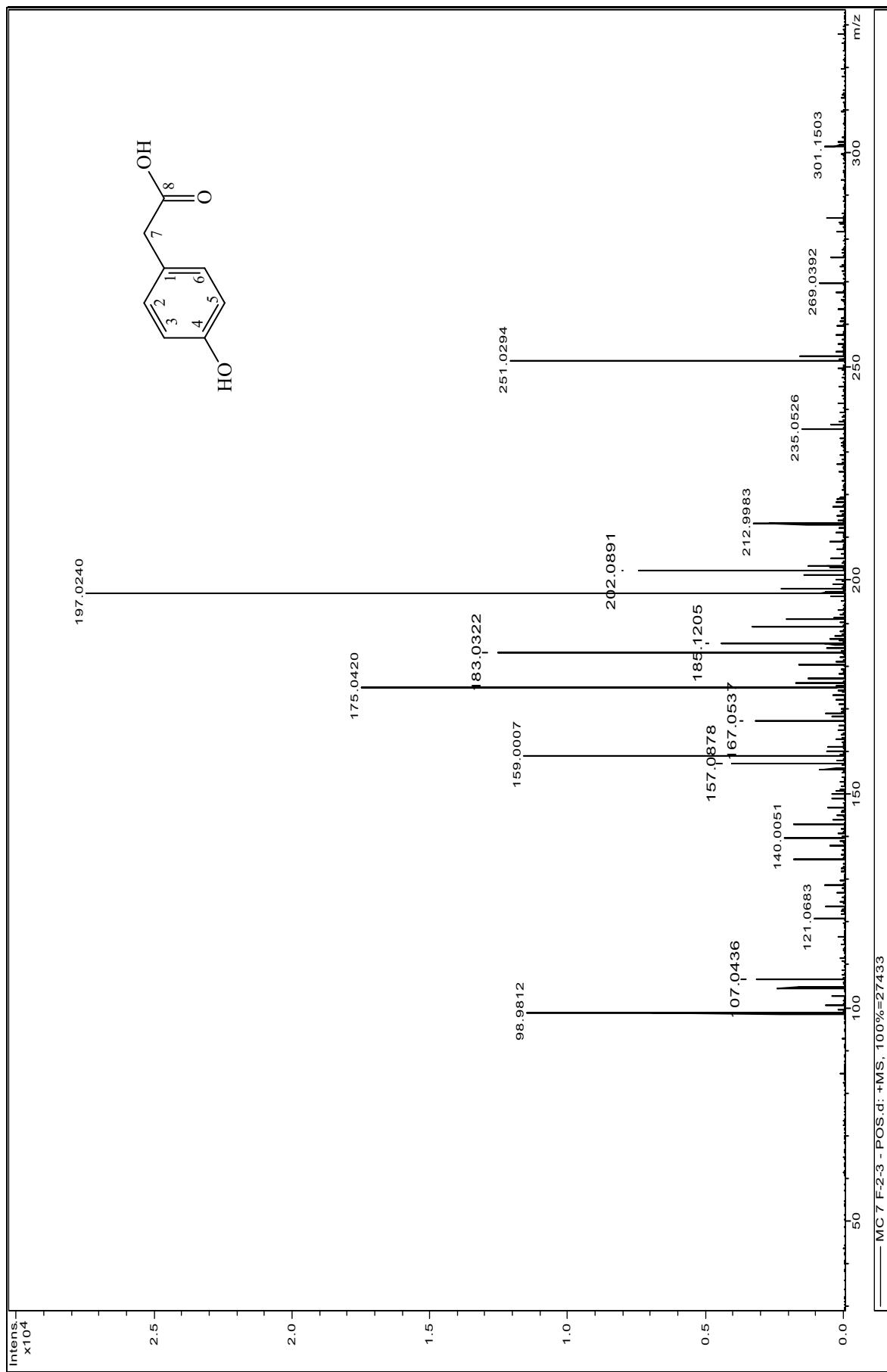


Figura 172: Espectros de Massas de (15)

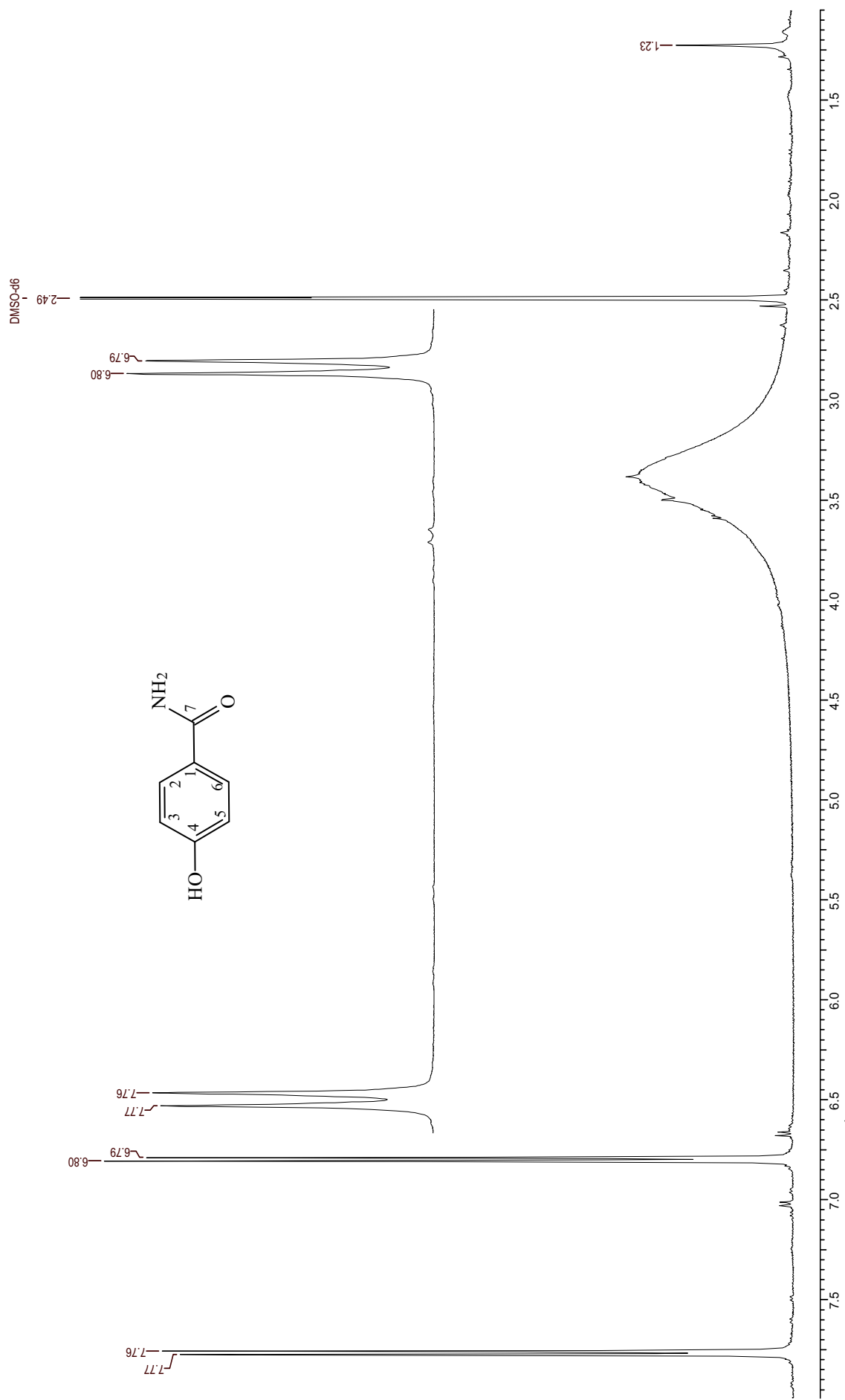


Figura 173: Espectro de RMN de ^1H de **(16)** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

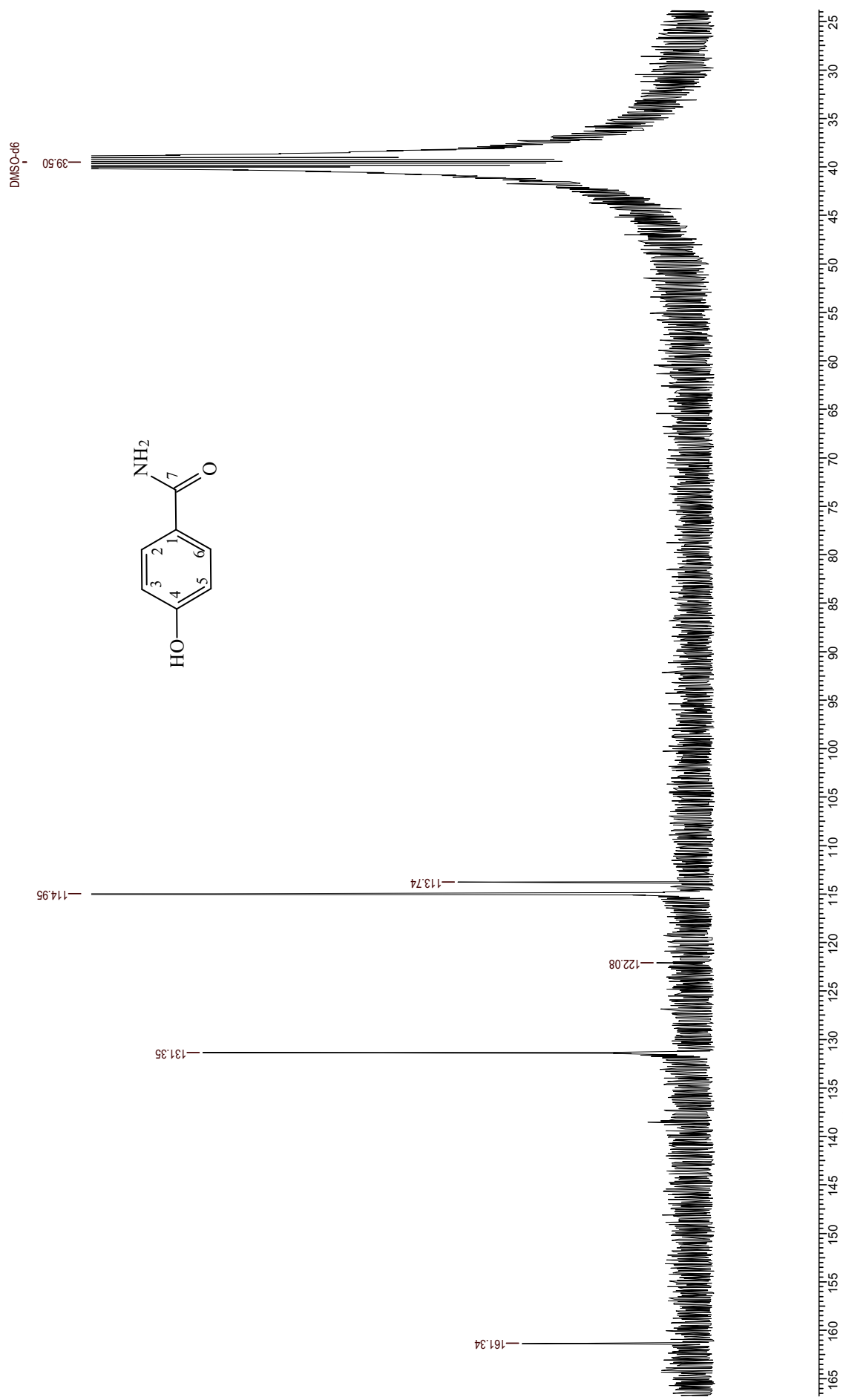


Figura 174: Espectro de RMN de ^{13}C de **16** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

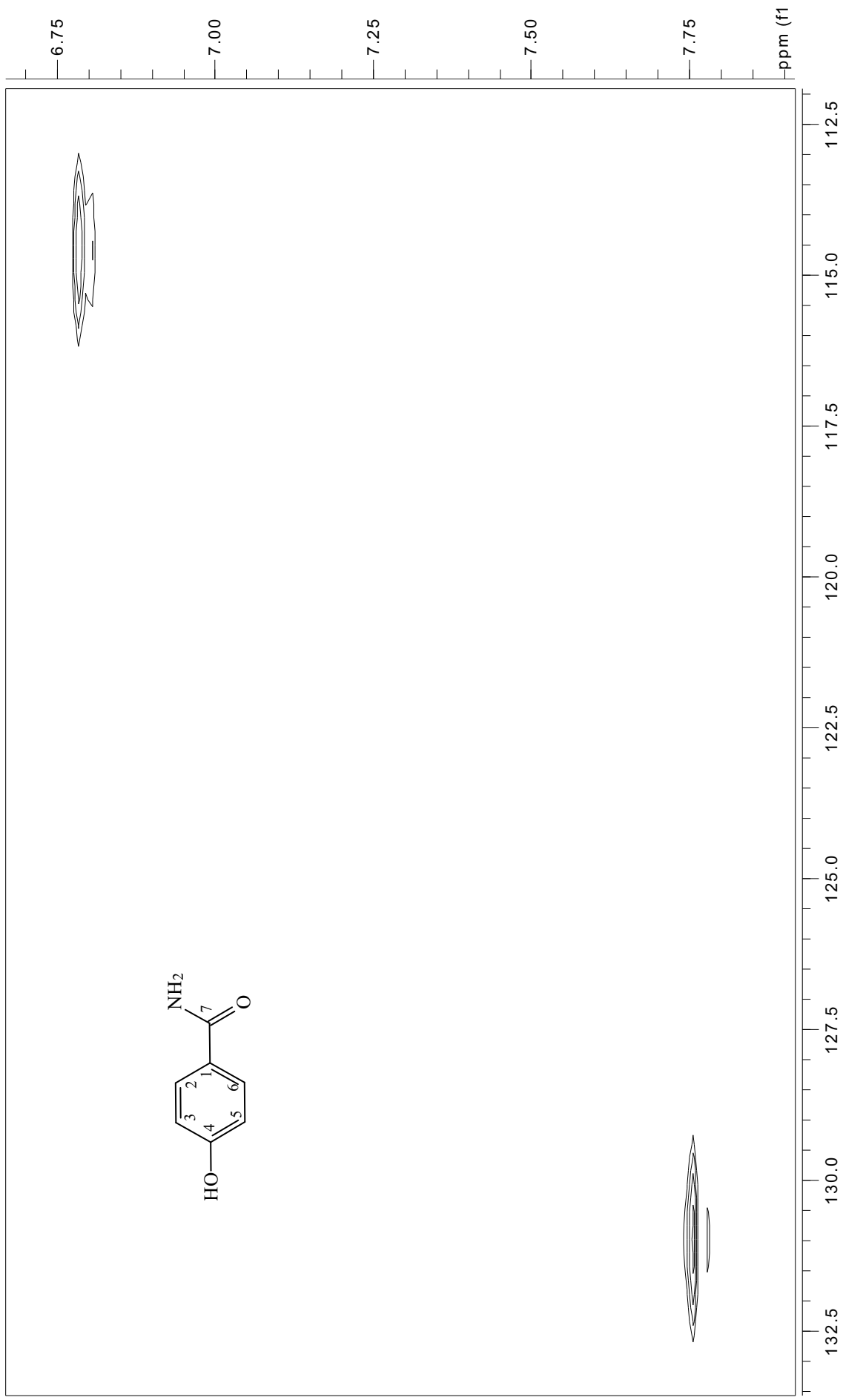


Figura 175: Mapa de contorno gHMBC de **16** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

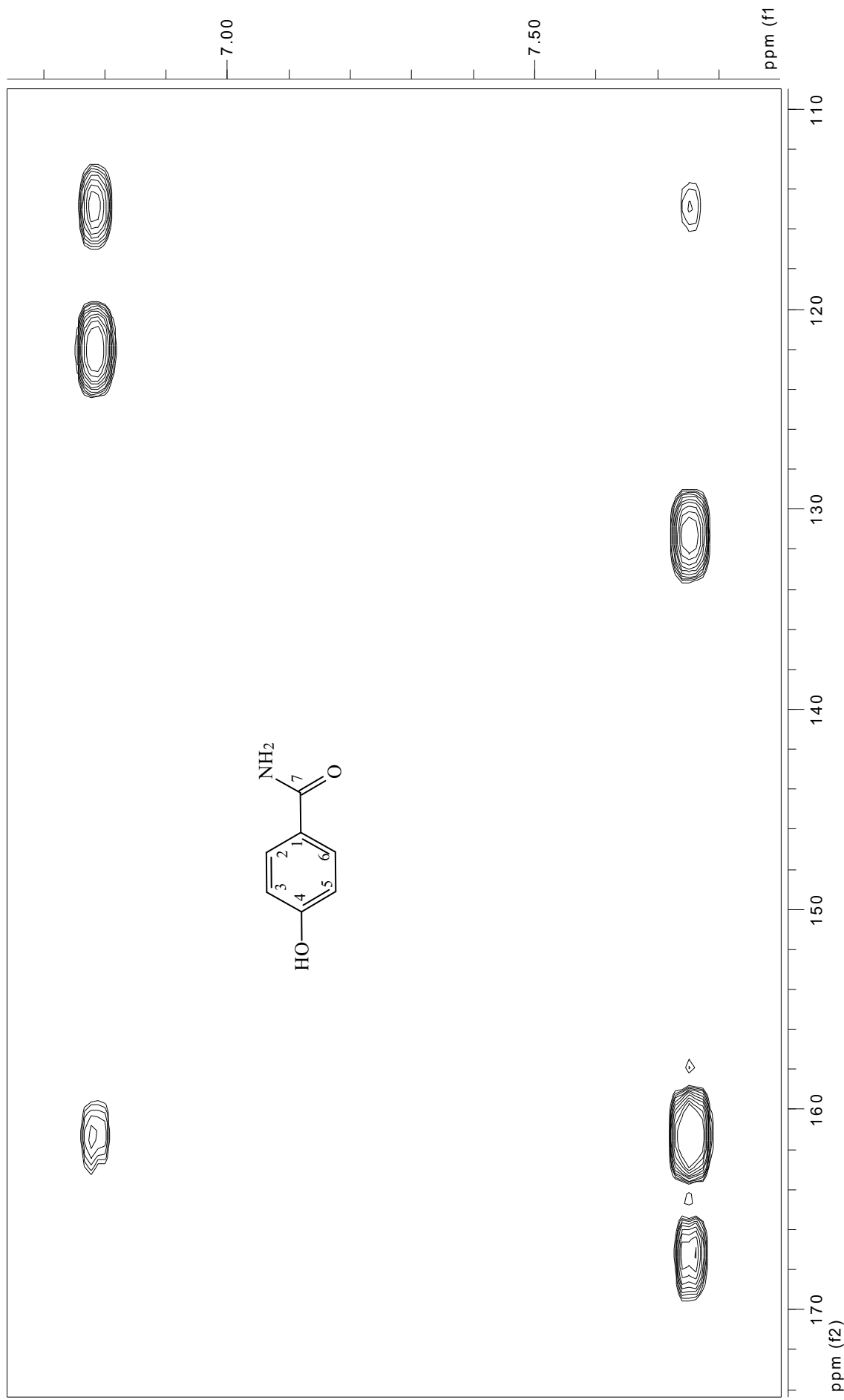


Figura 176: Mapa de contorno gHMBC de **16** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

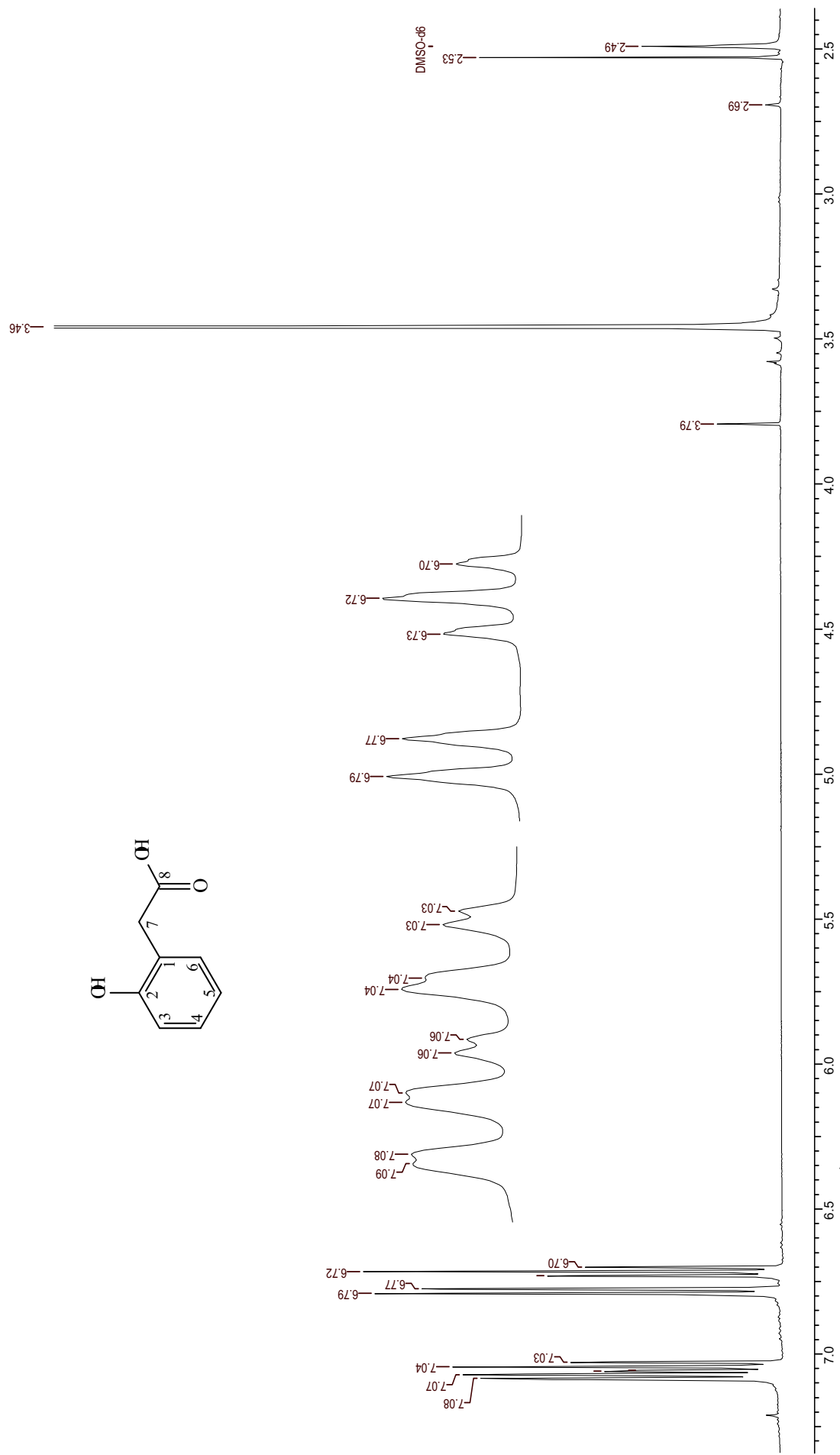


Figura 177: Espectro de RMN de ^1H de **17** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

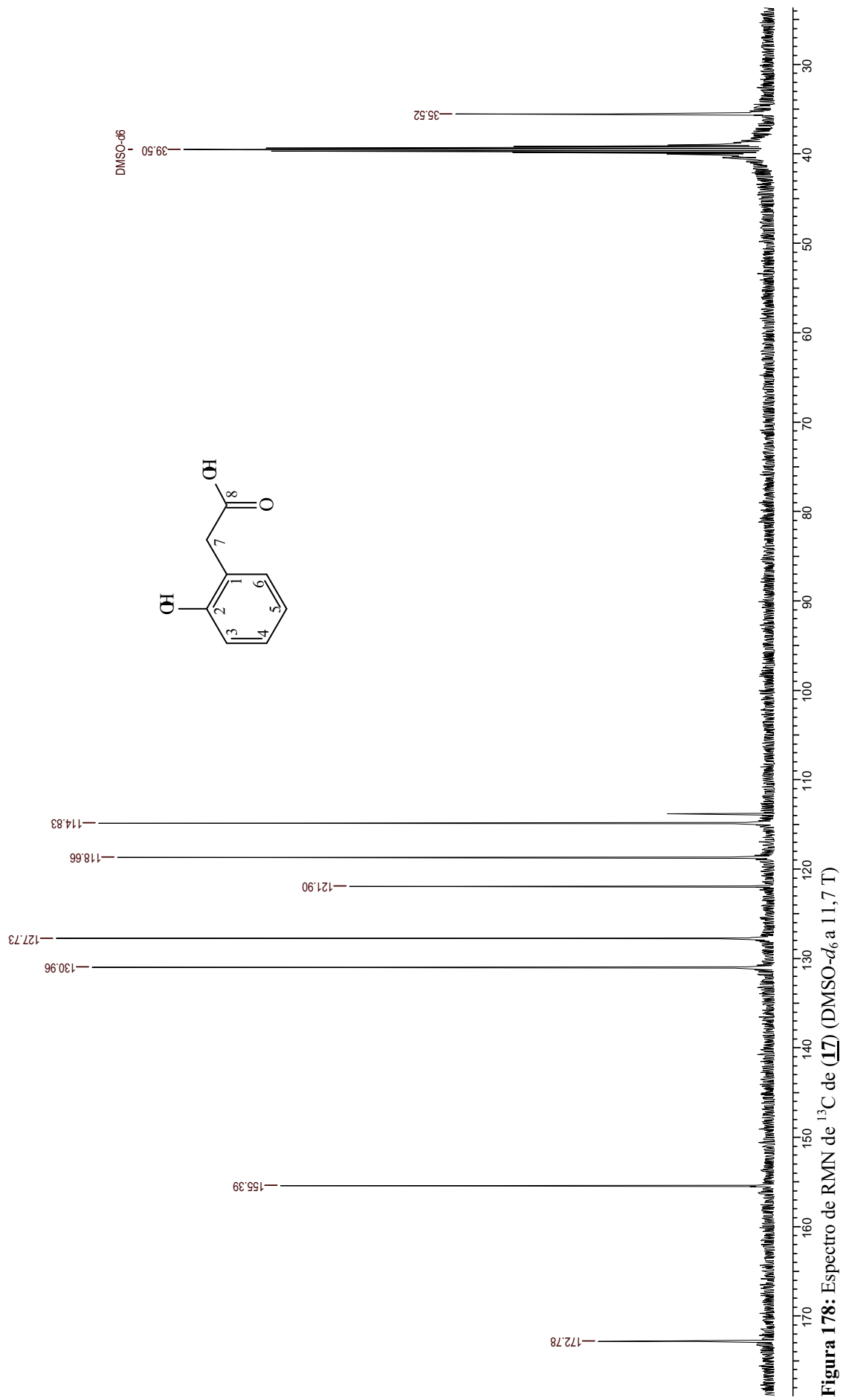


Figura 178: Espectro de RMN de ^{13}C de (17) (DMSO- d_6 a 11,7 T)

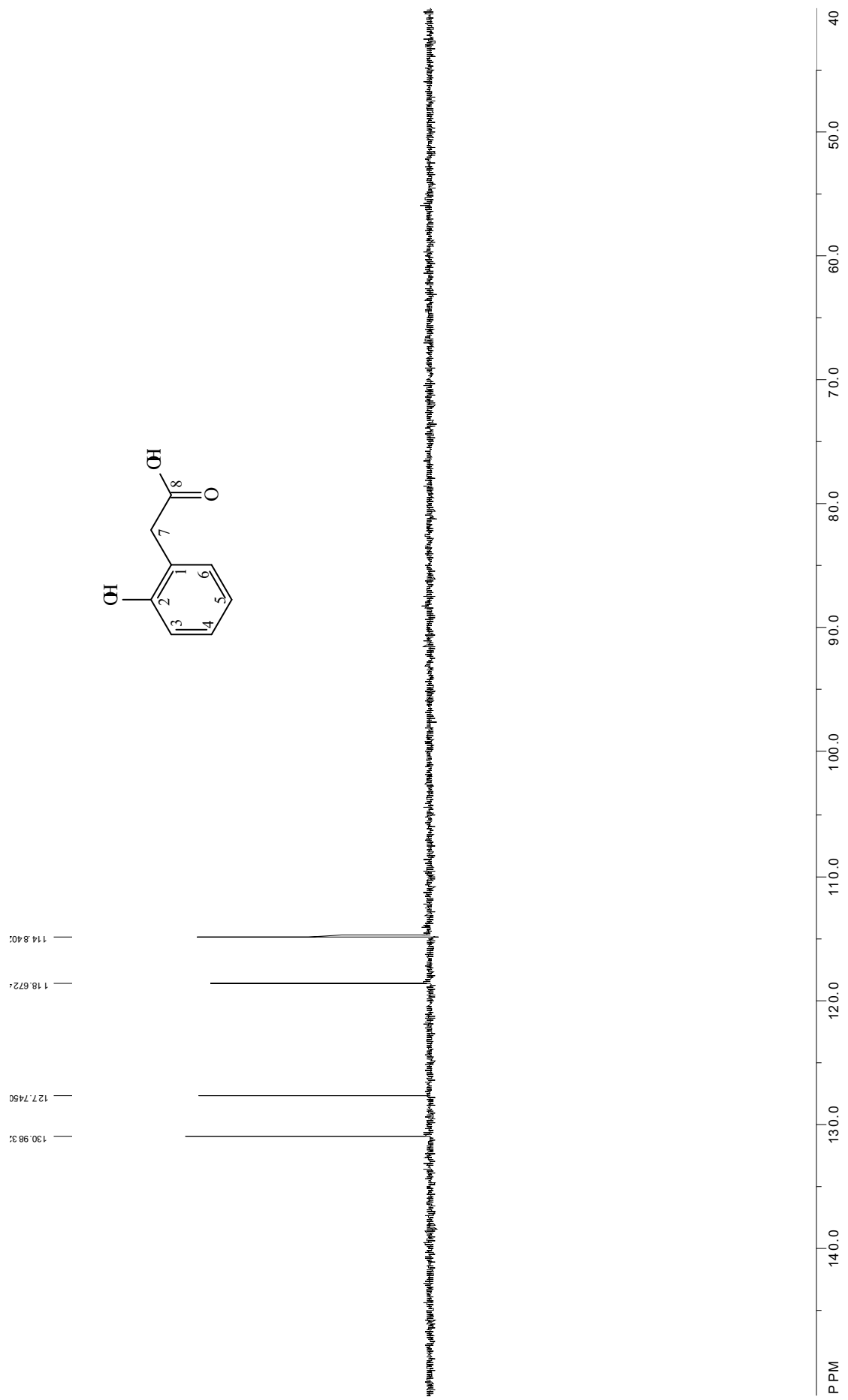


Figura 179: Espectros de DEPT de **(17)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

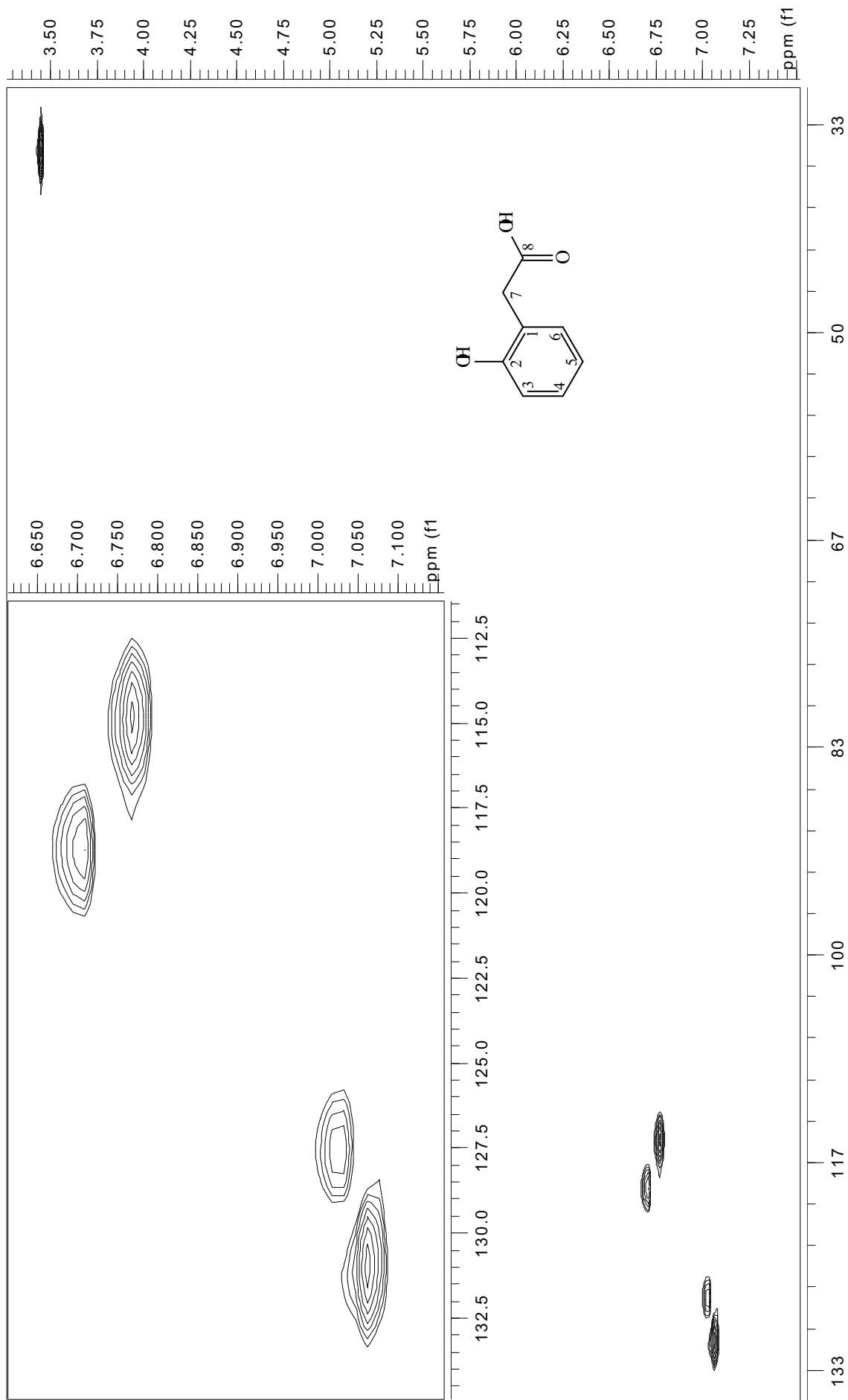


Figura 180: Mapa de contorno gHMBC de **17** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

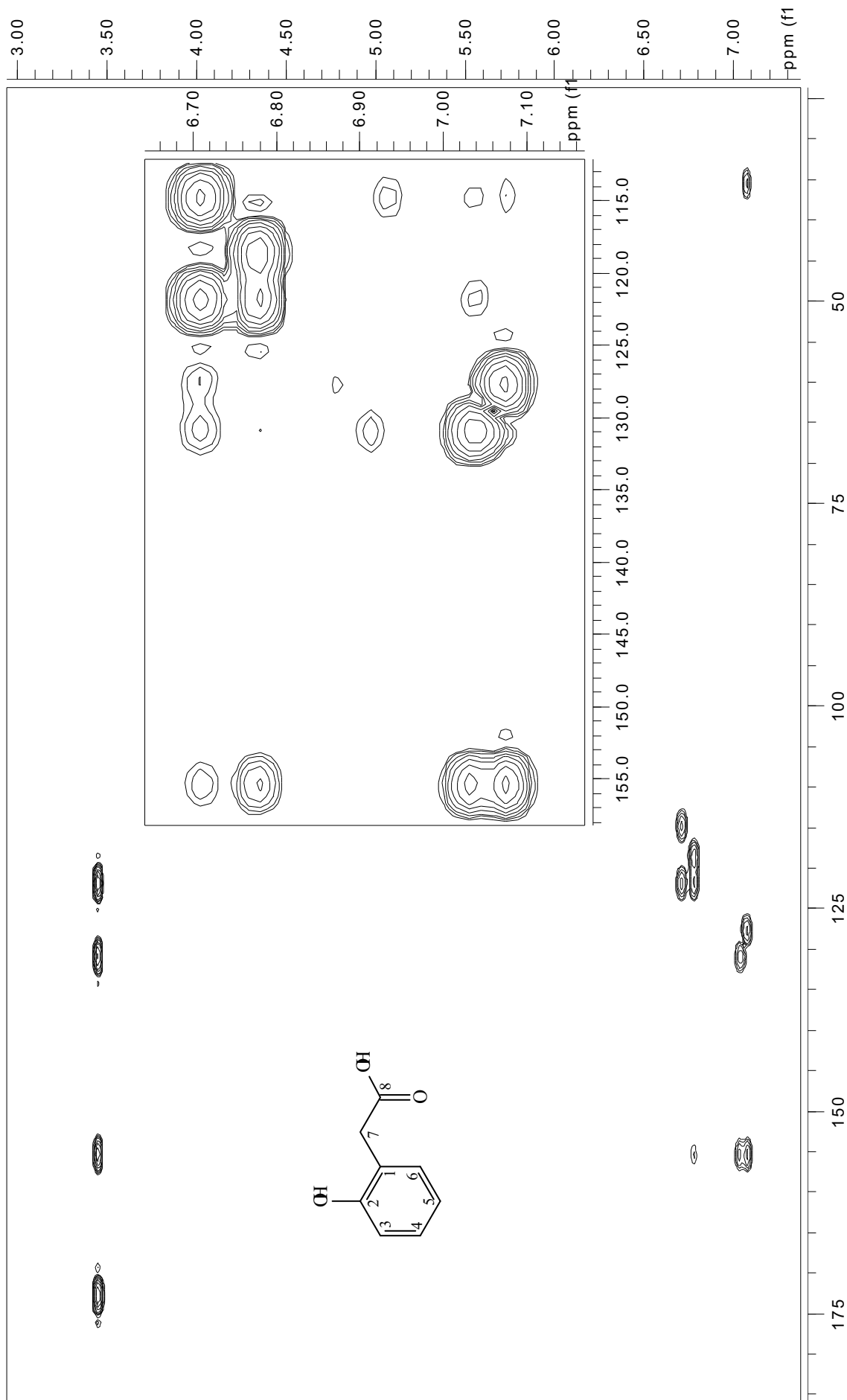


Figura 181: Mapa de contorno gHMBC de **17** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

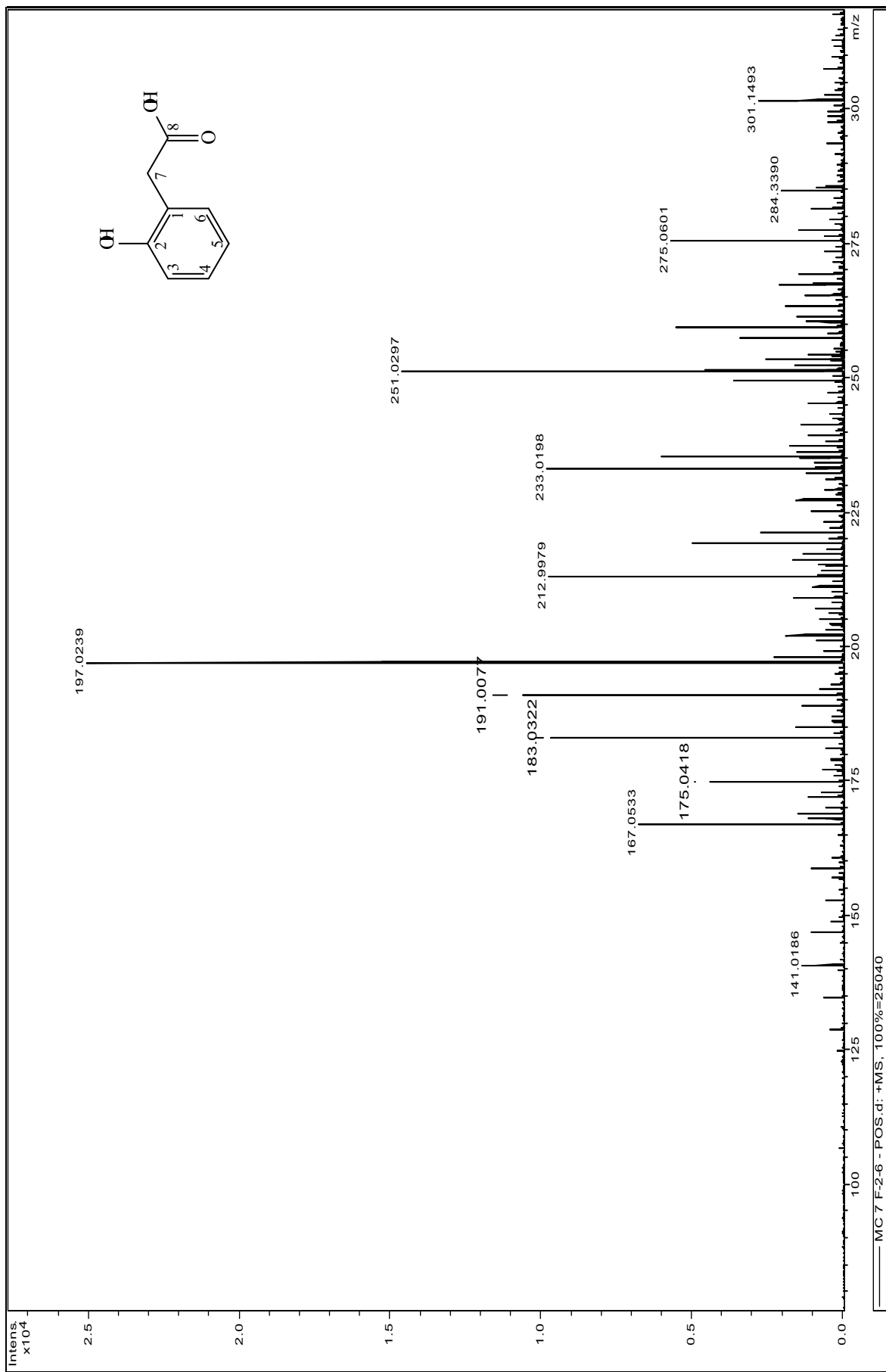
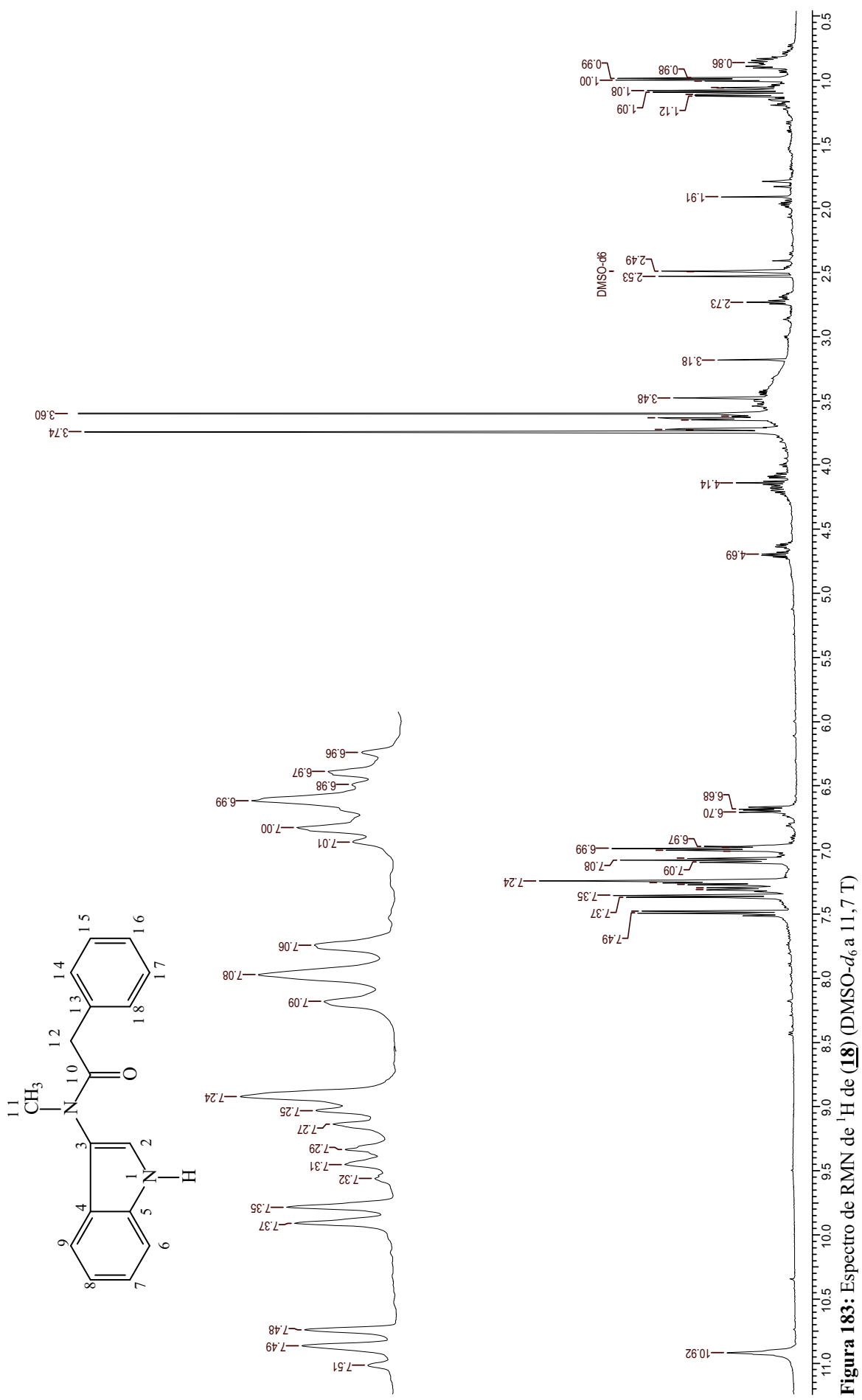


Figura 182: Espectros de Massas de (17)



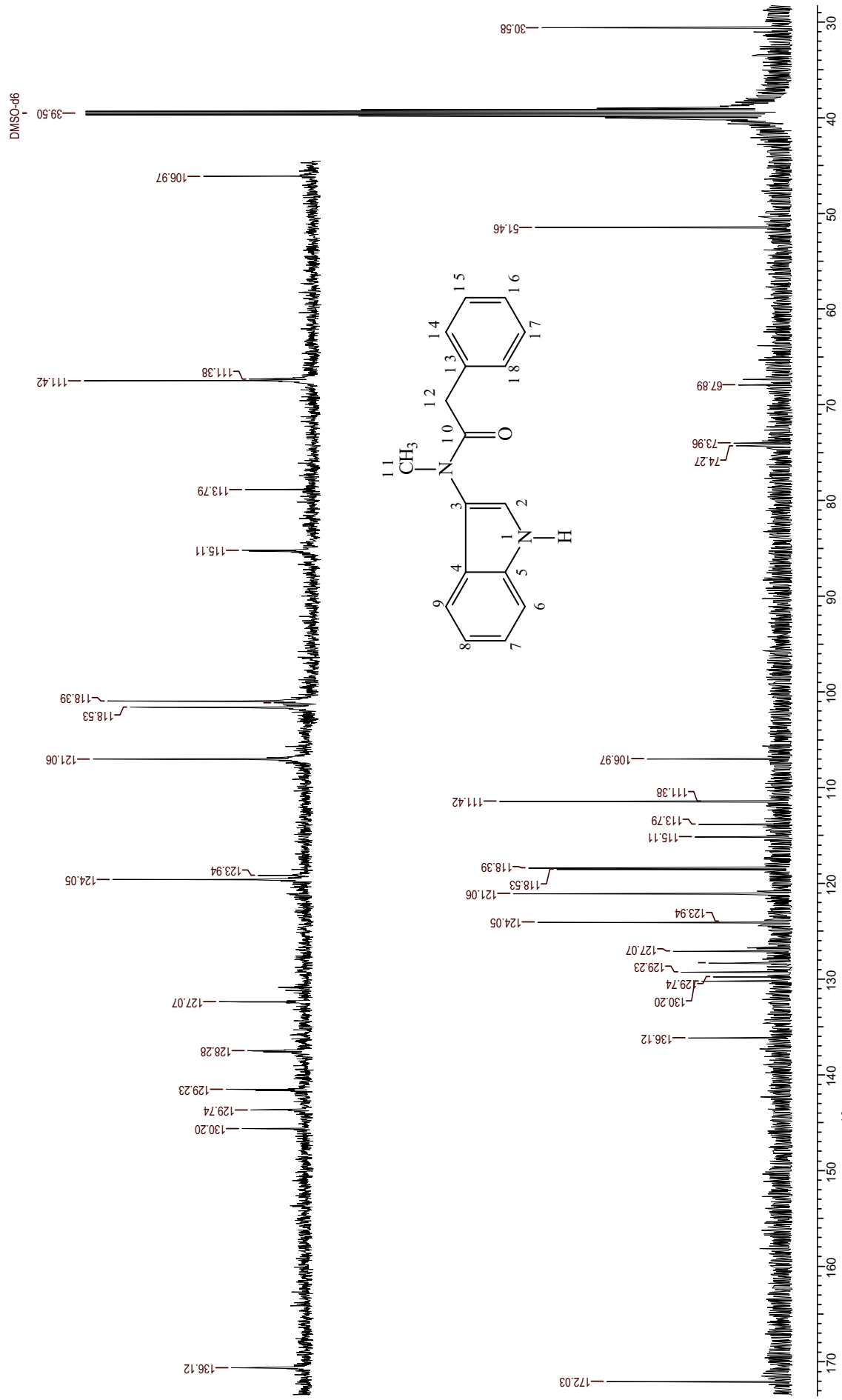


Figura 184: Espectro de RMN de ¹³C de **18** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

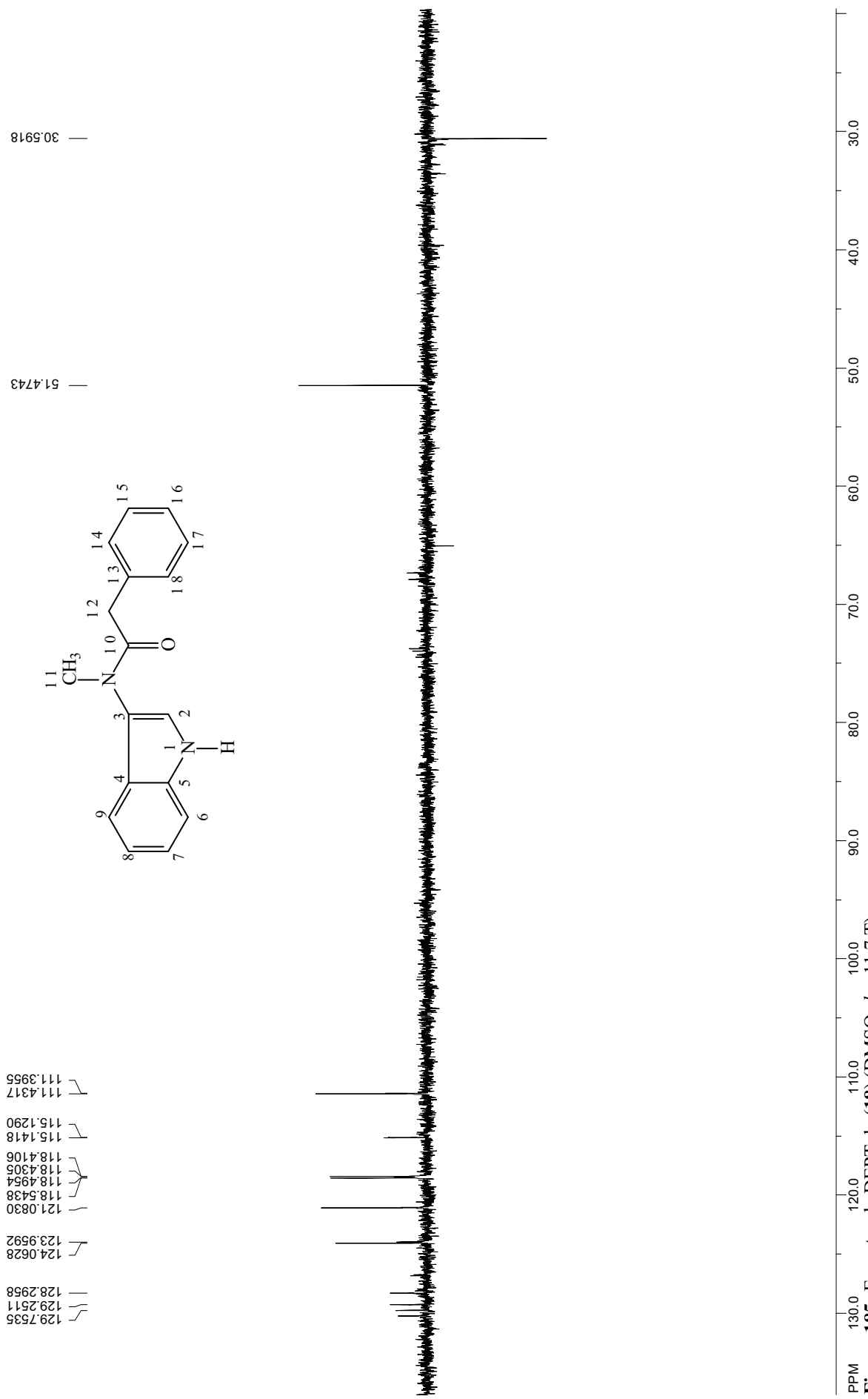


Figura 185: Espectro de DEPT de **18** (DMSO-d₆, a 11,7 T)

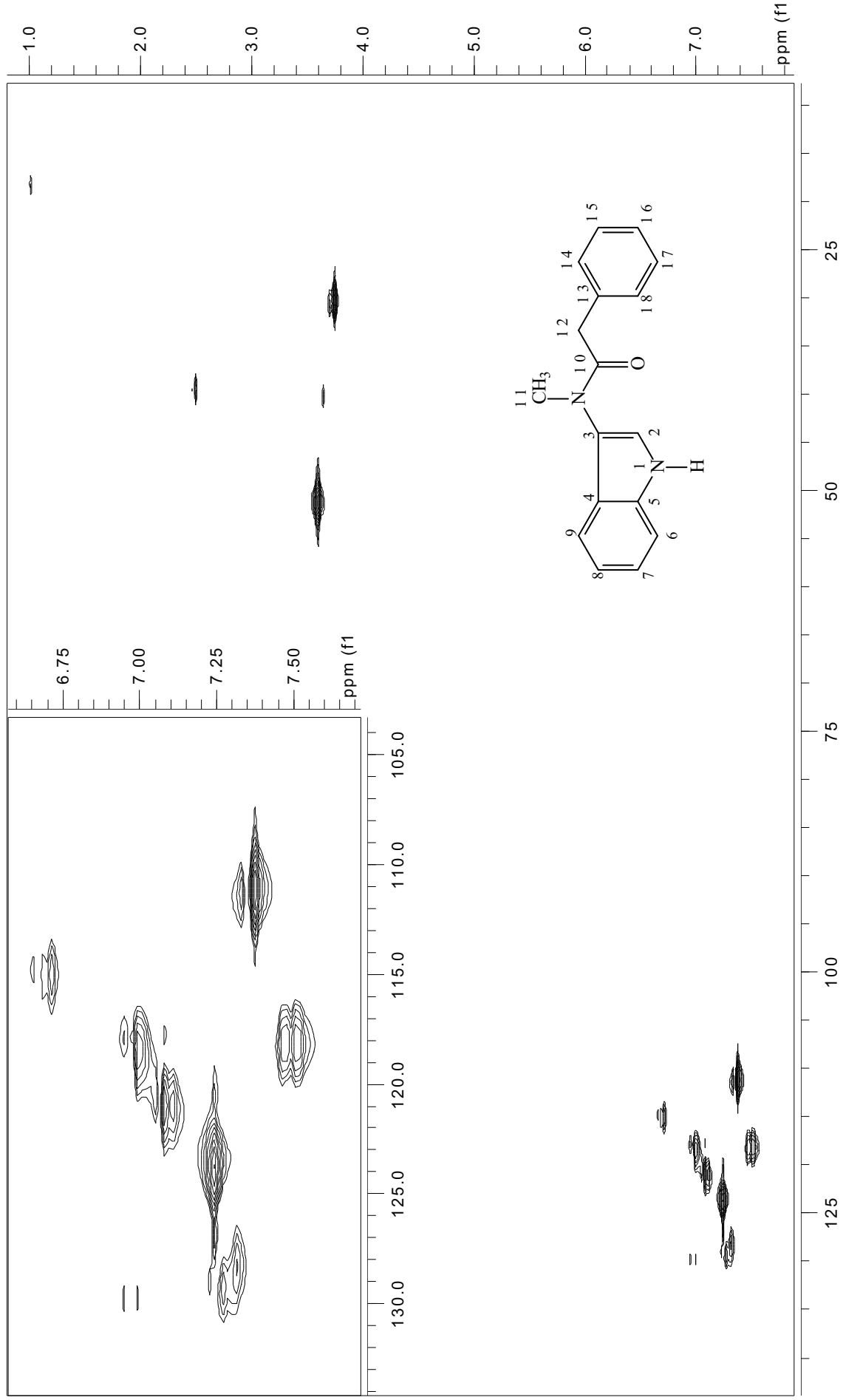


Figura 186: Mapa de contorno gHMBC de **(18)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

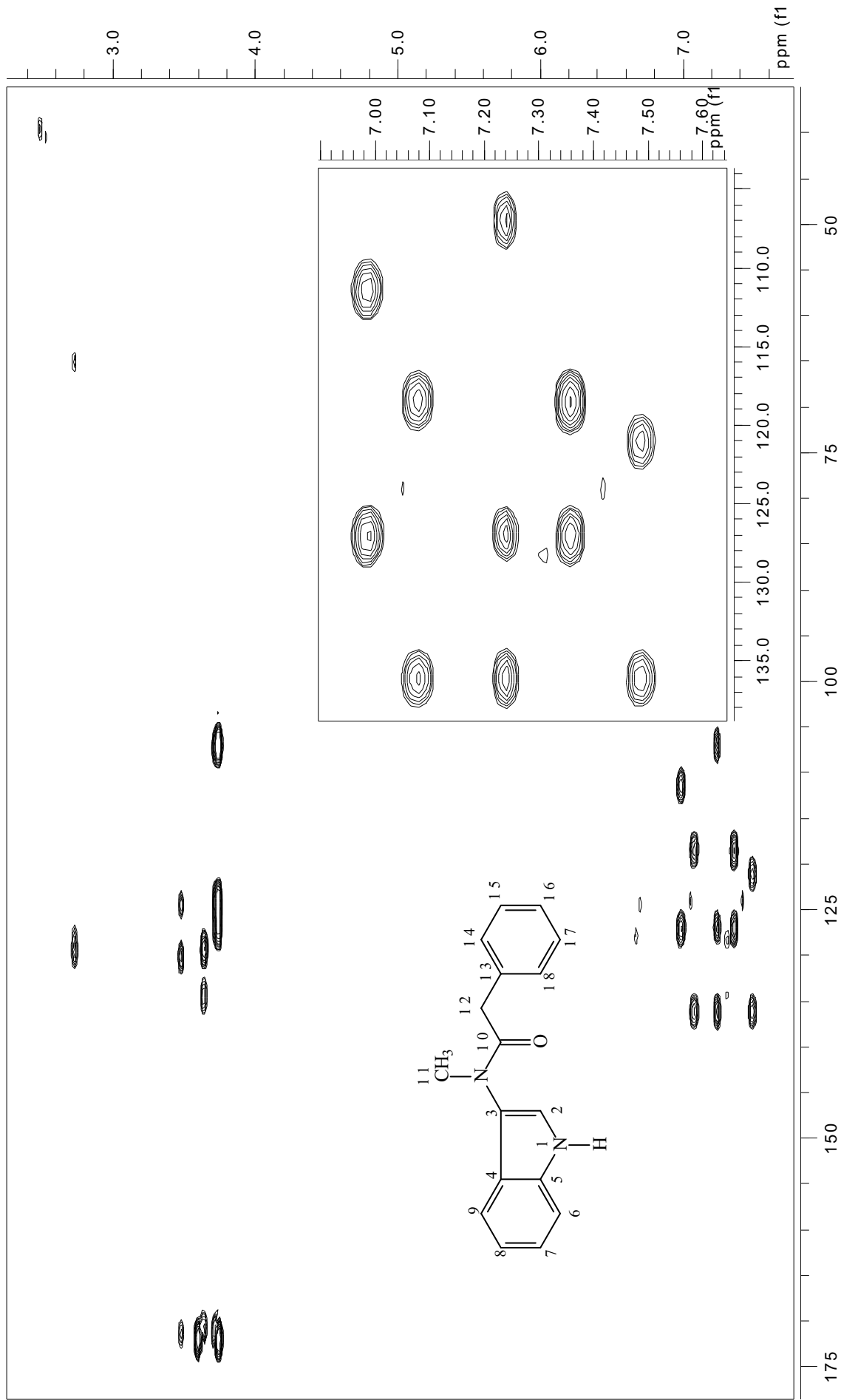


Figura 187: Mapa de contorno gHMBC de **18** (DMSO- d_6 a 11,7 T)

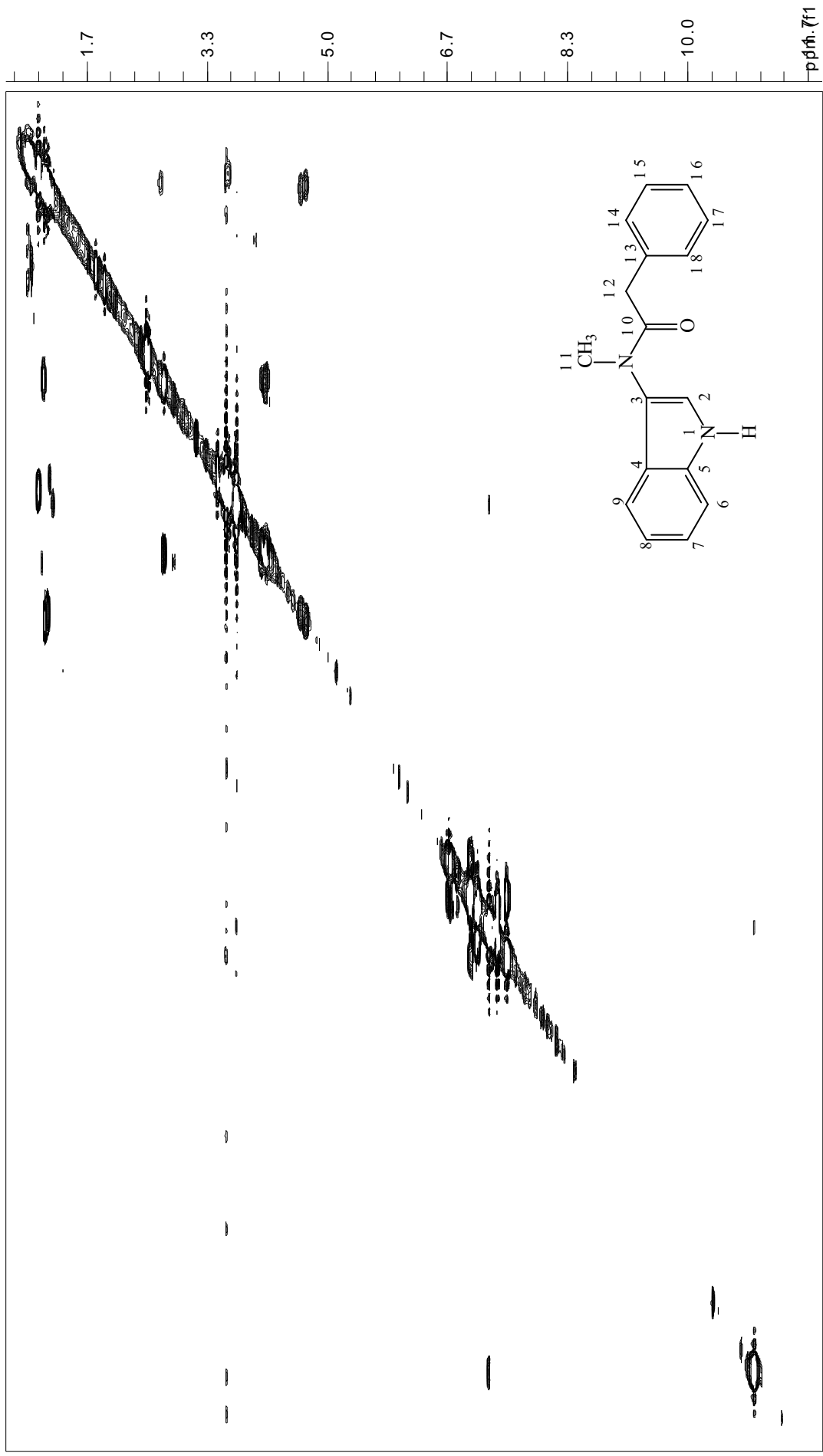
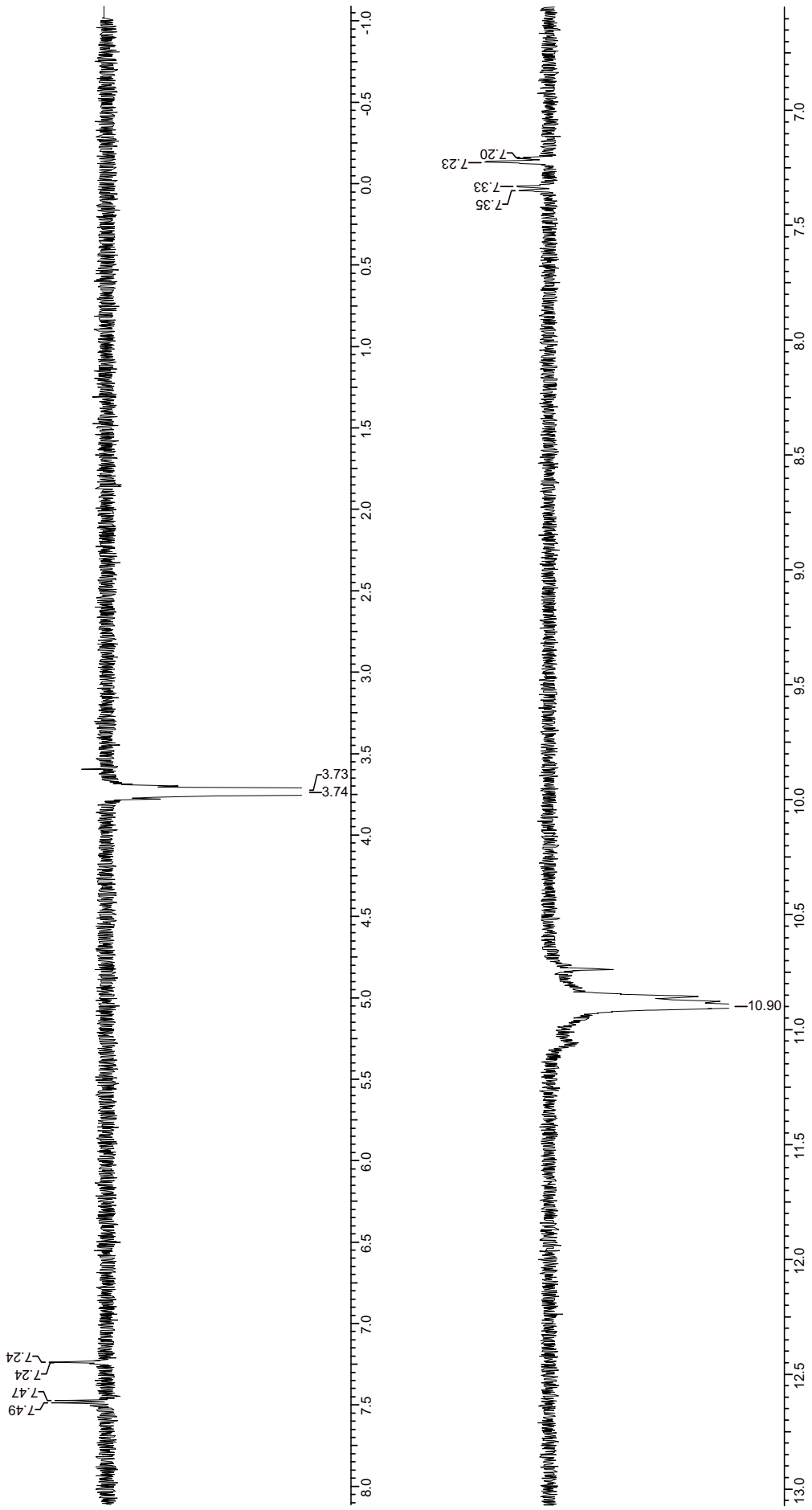


Figura 188: Espectro de gCOSY de **18** (DMSO- d_6 a 11,7 T)



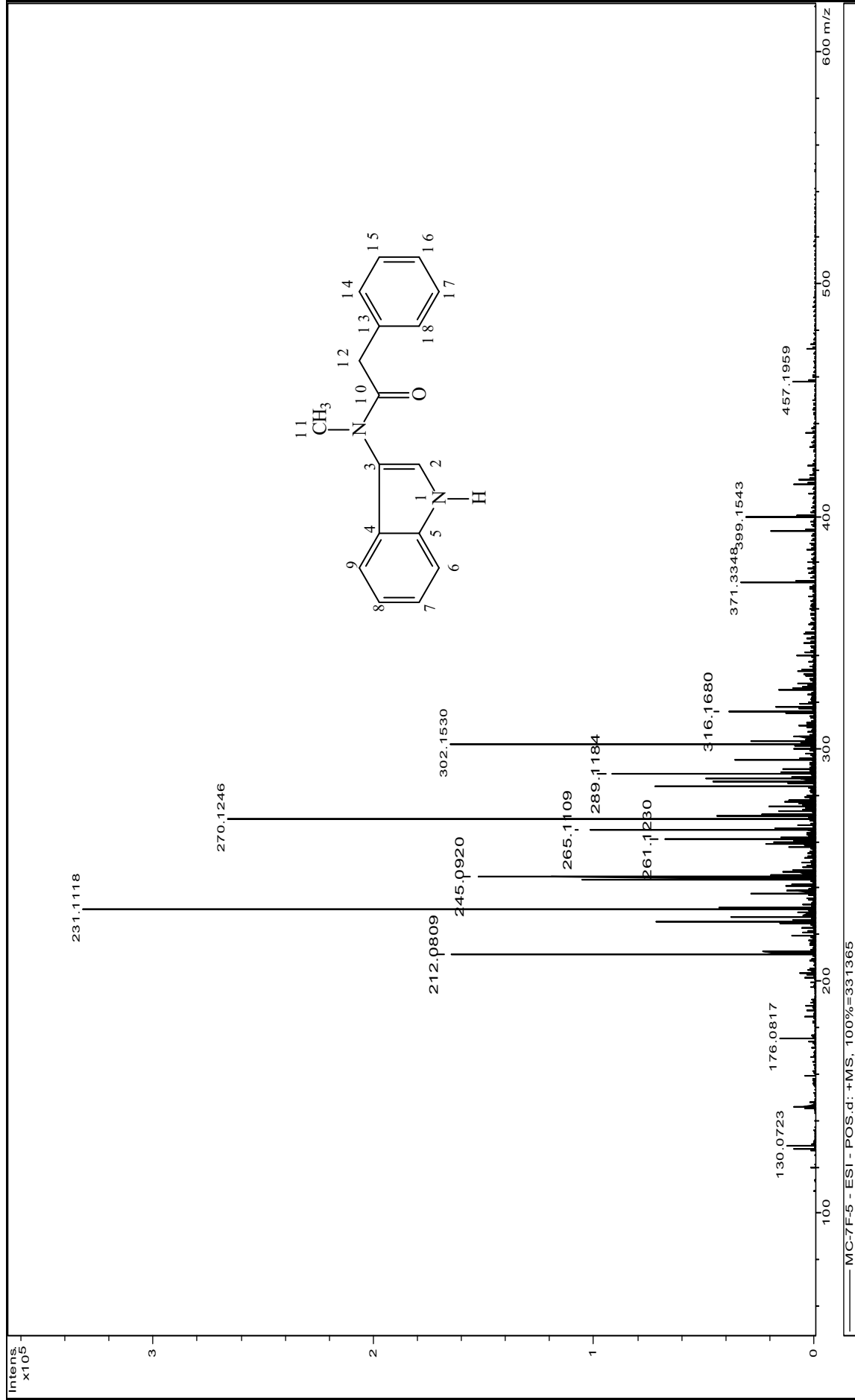


Figura 190: Espectros de Massas de (18)

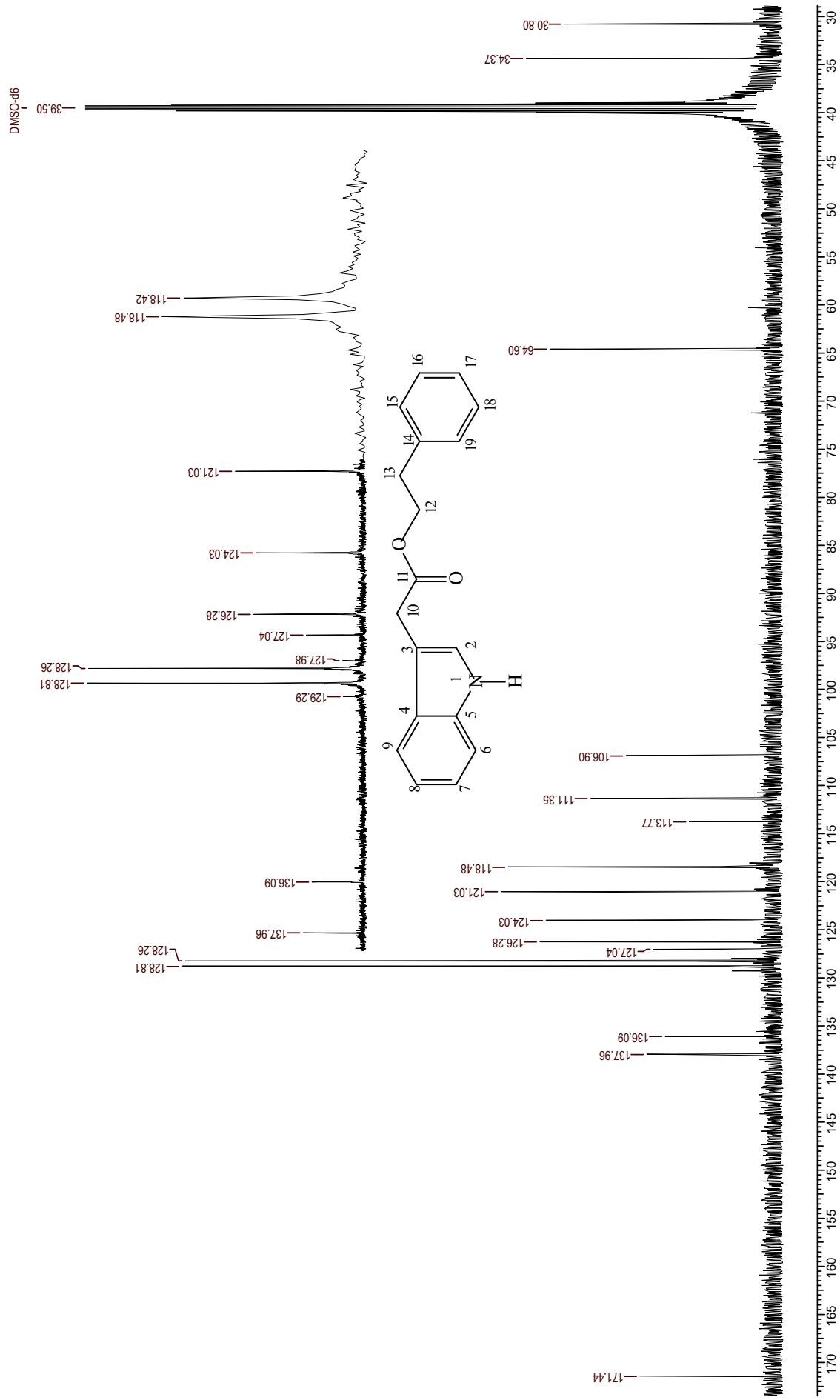
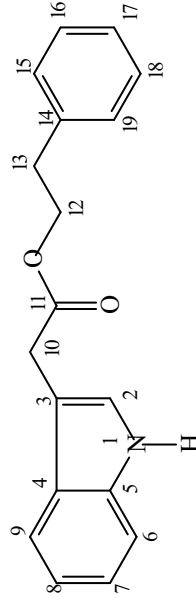


Figura 192: Espectro de RMN de ^{13}C de **19** (DMSO- d_6 a 11,7 T)



PPM 120.0 110.0 100.0 90.0 80.0 70.0 60.0 50.0 40.0 30.0

Figura 193: Espectro de DEPT de **(19)** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

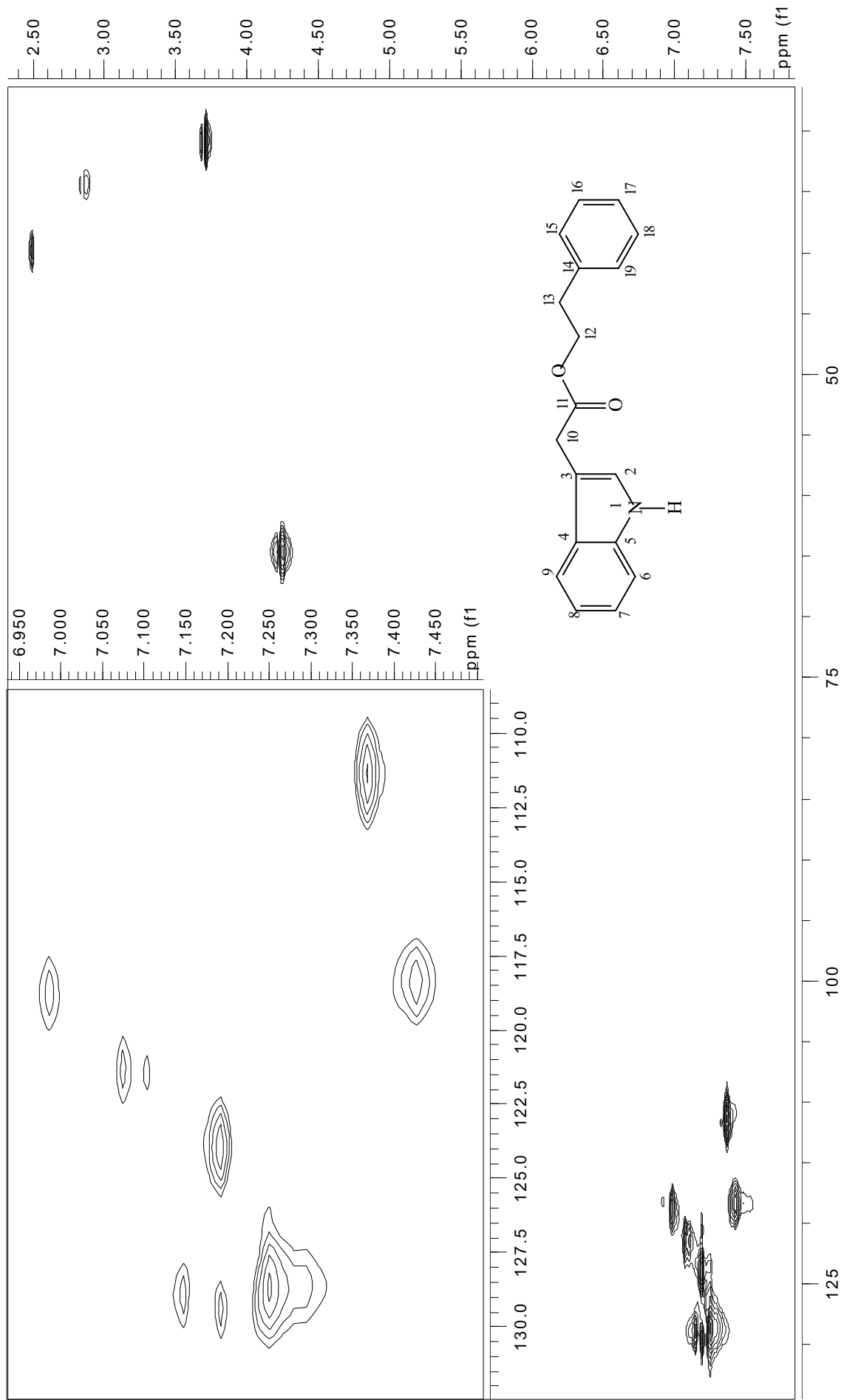


Figura 194: Mapa de contorno gHMBC de **19** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

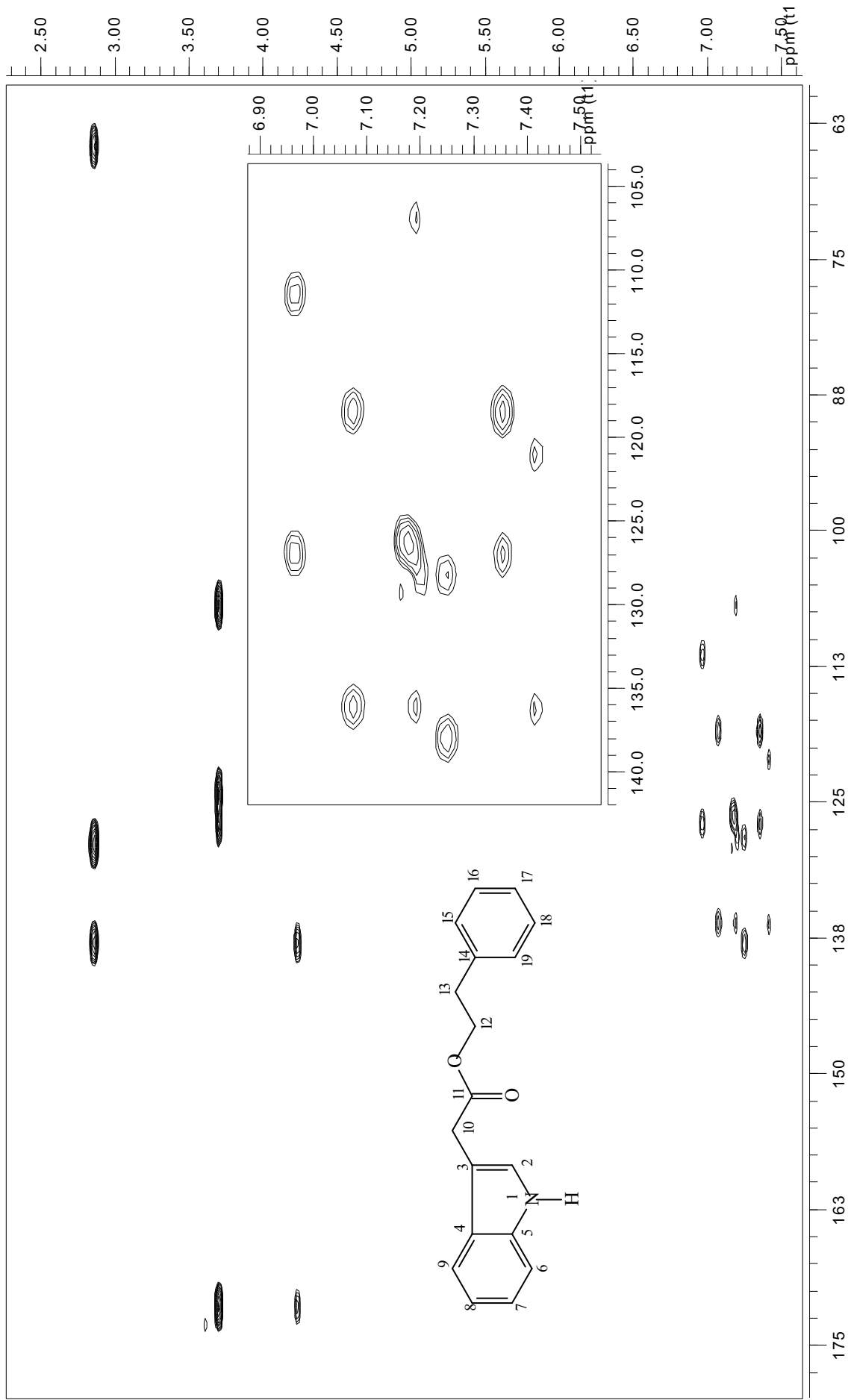


Figura 195: Mapa de contorno gHMBC de **(19)** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

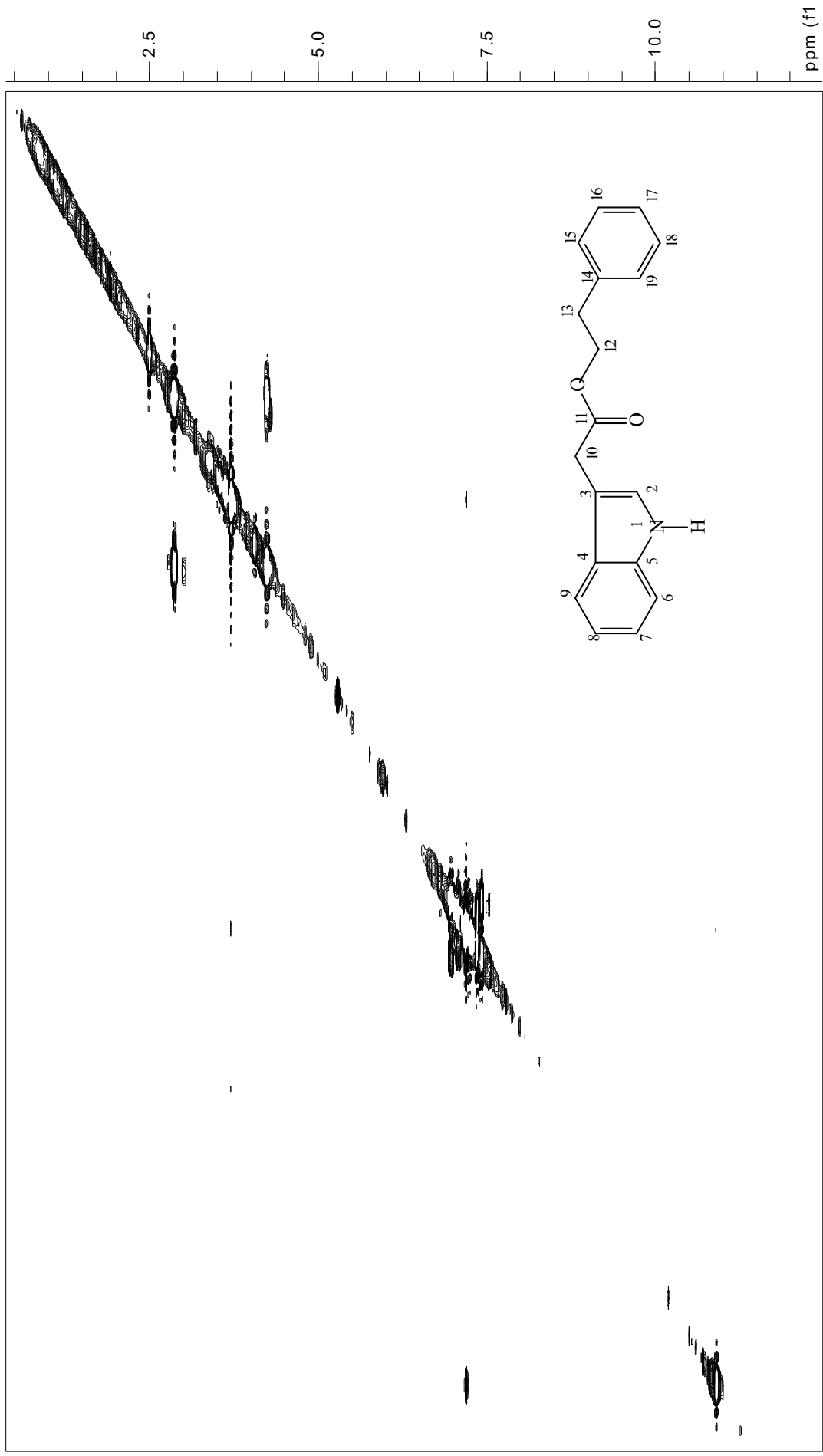


Figura 196: Espectro de gCOSY de **19** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

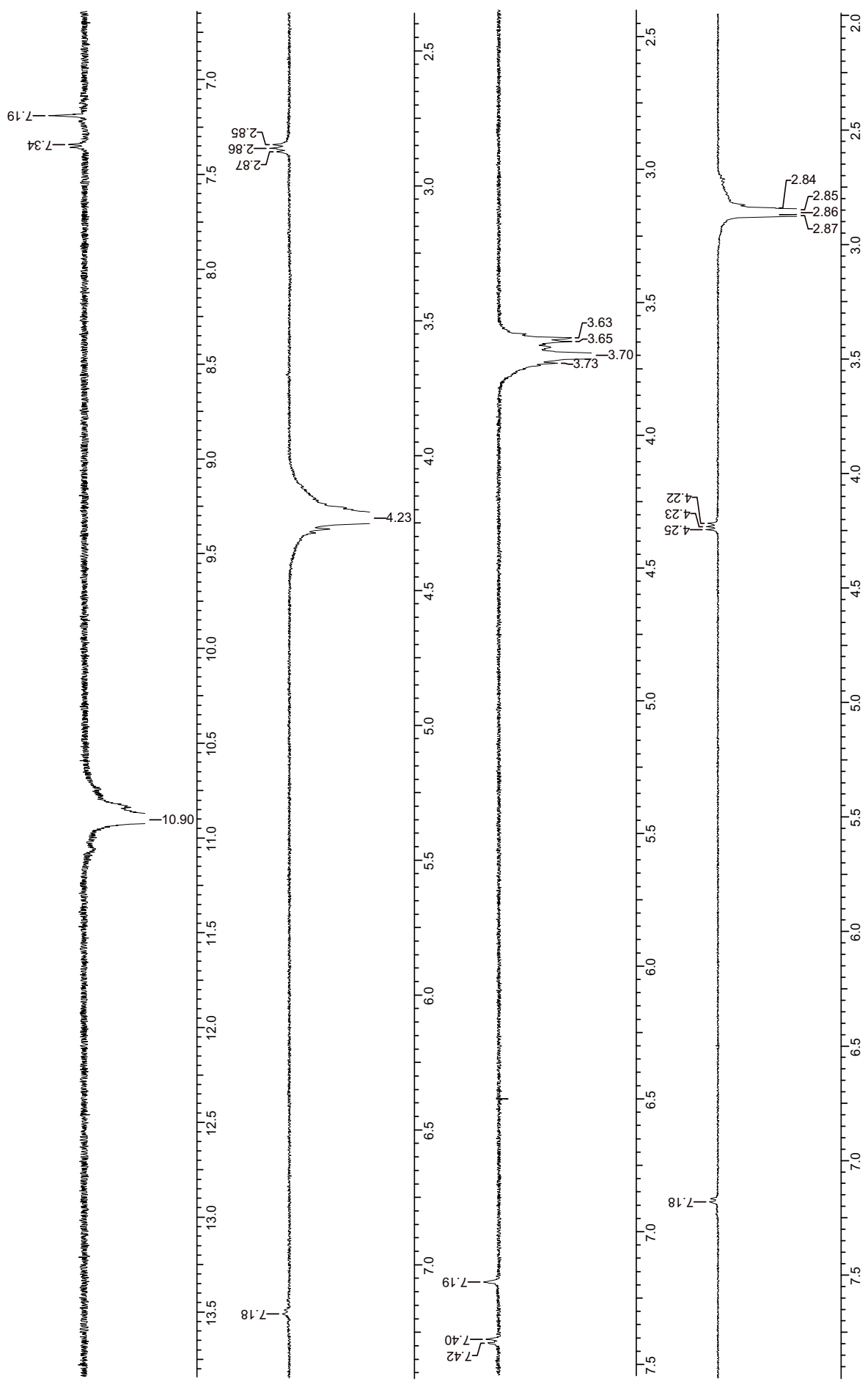


Figura 197: Espectro de NOESY 1D de **19** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

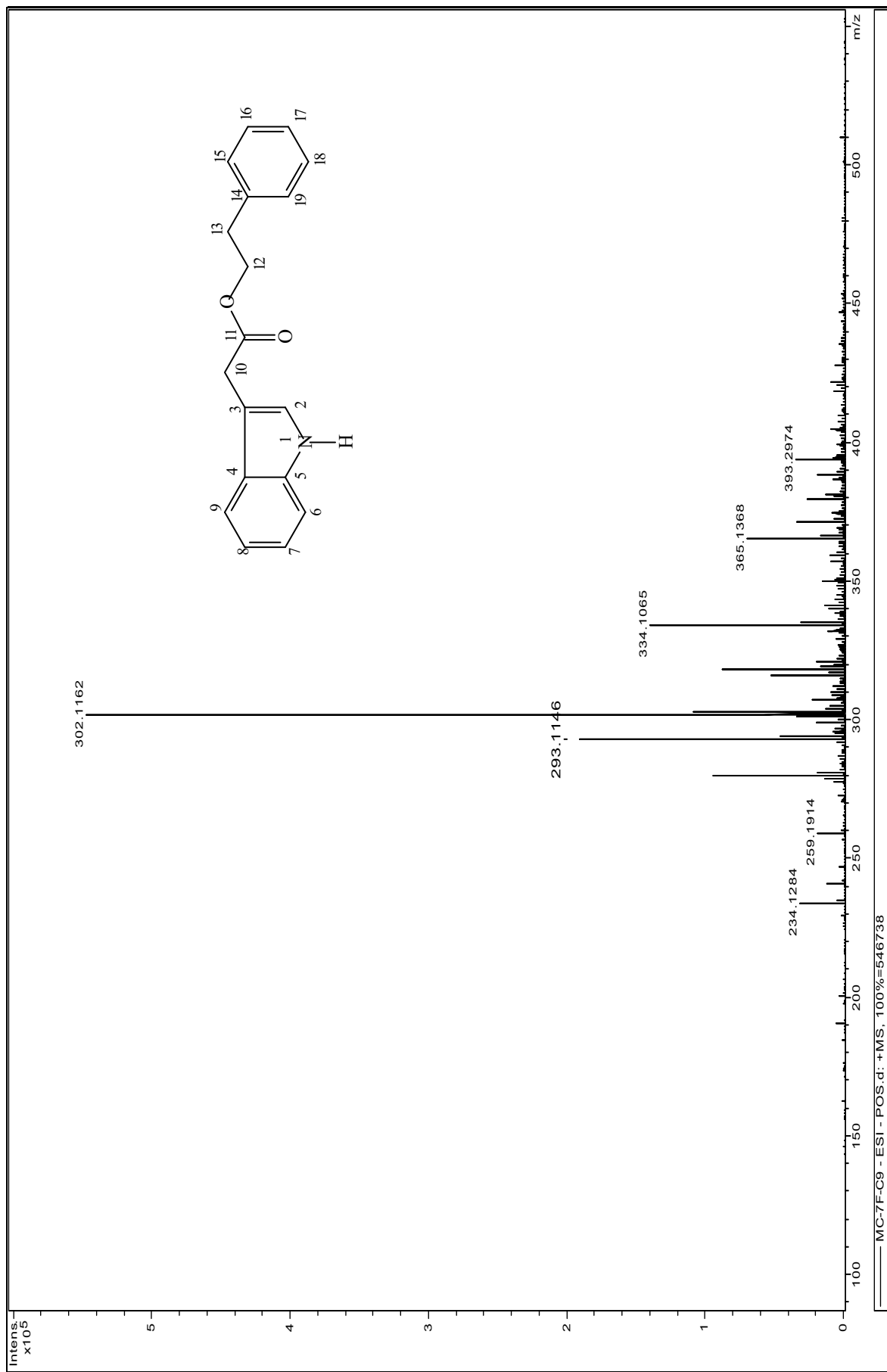


Figura 198: Espectros de Massas de (19)

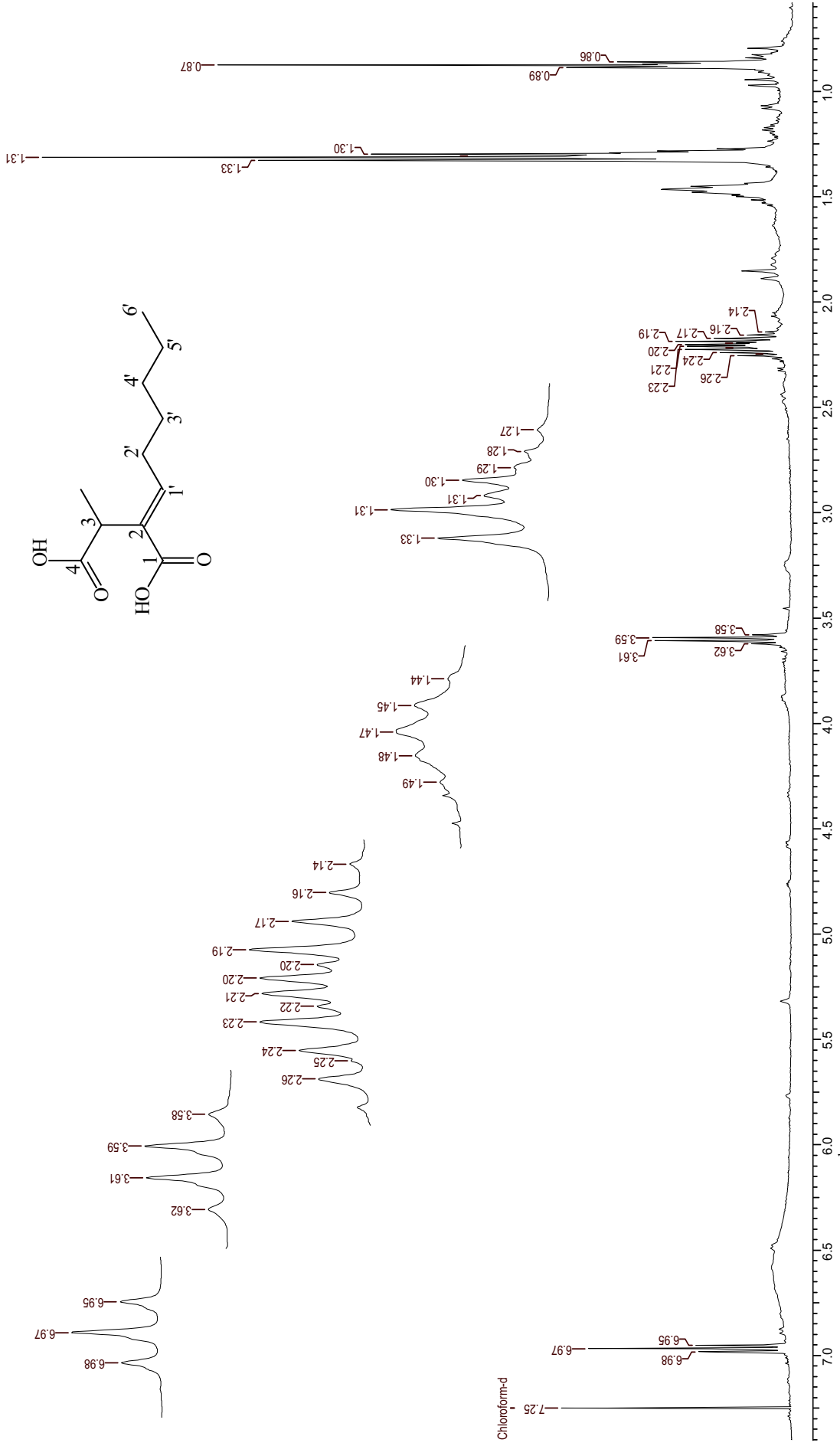


Figura 199: Espectro de RMN de ¹H de **20** (DMSO-d₆ a 11,7 T)



Figura 200: Espectro de RMN de ¹³C de **20** (DMSO-d₆ a 11,7 T)

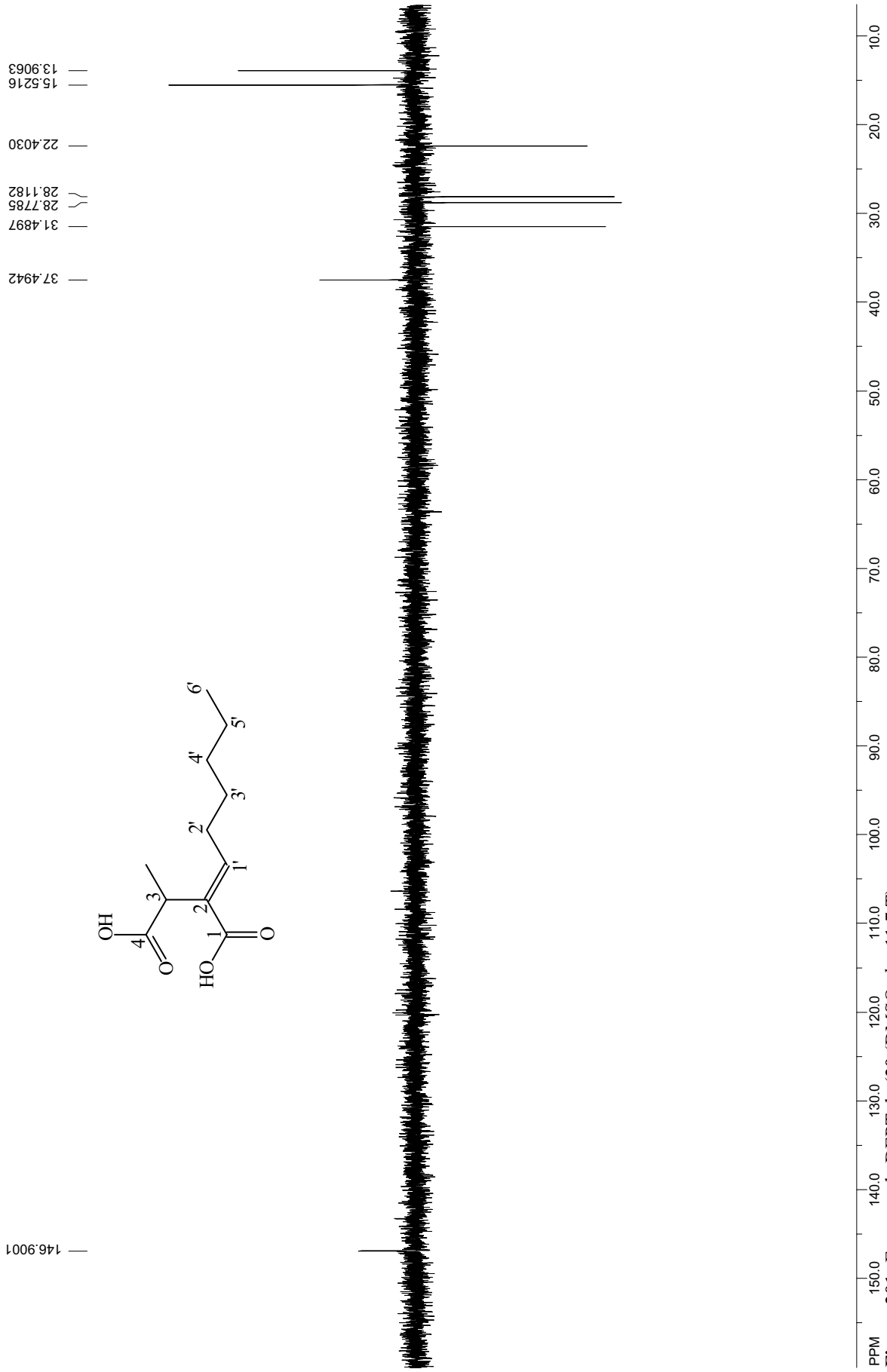


Figura 201: Espectro de DEPT de **20** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

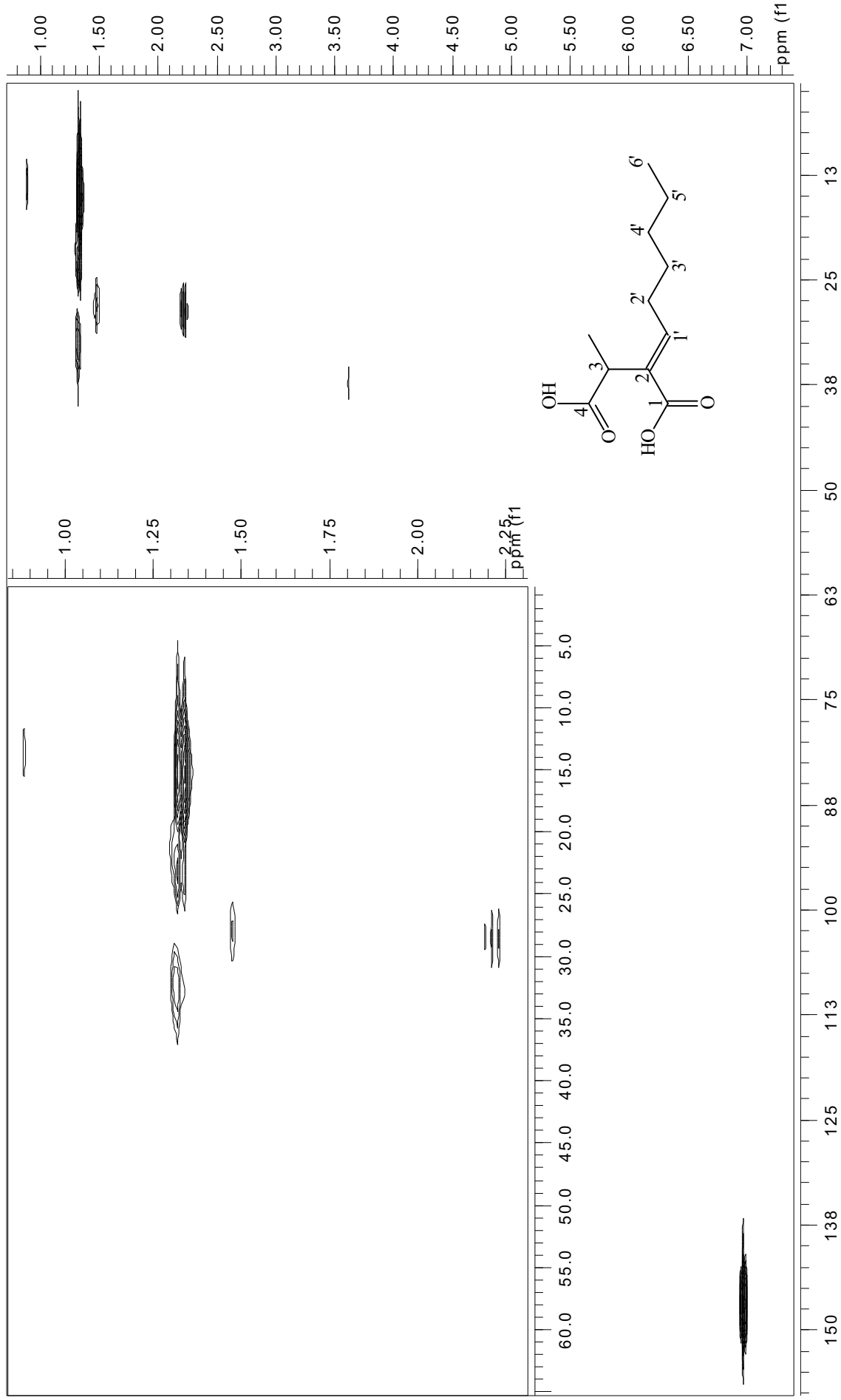


Figura 202: Mapa de contorno gHMQC de **(20)** ($\text{DMSO-}d_6$ a 11,7 T)

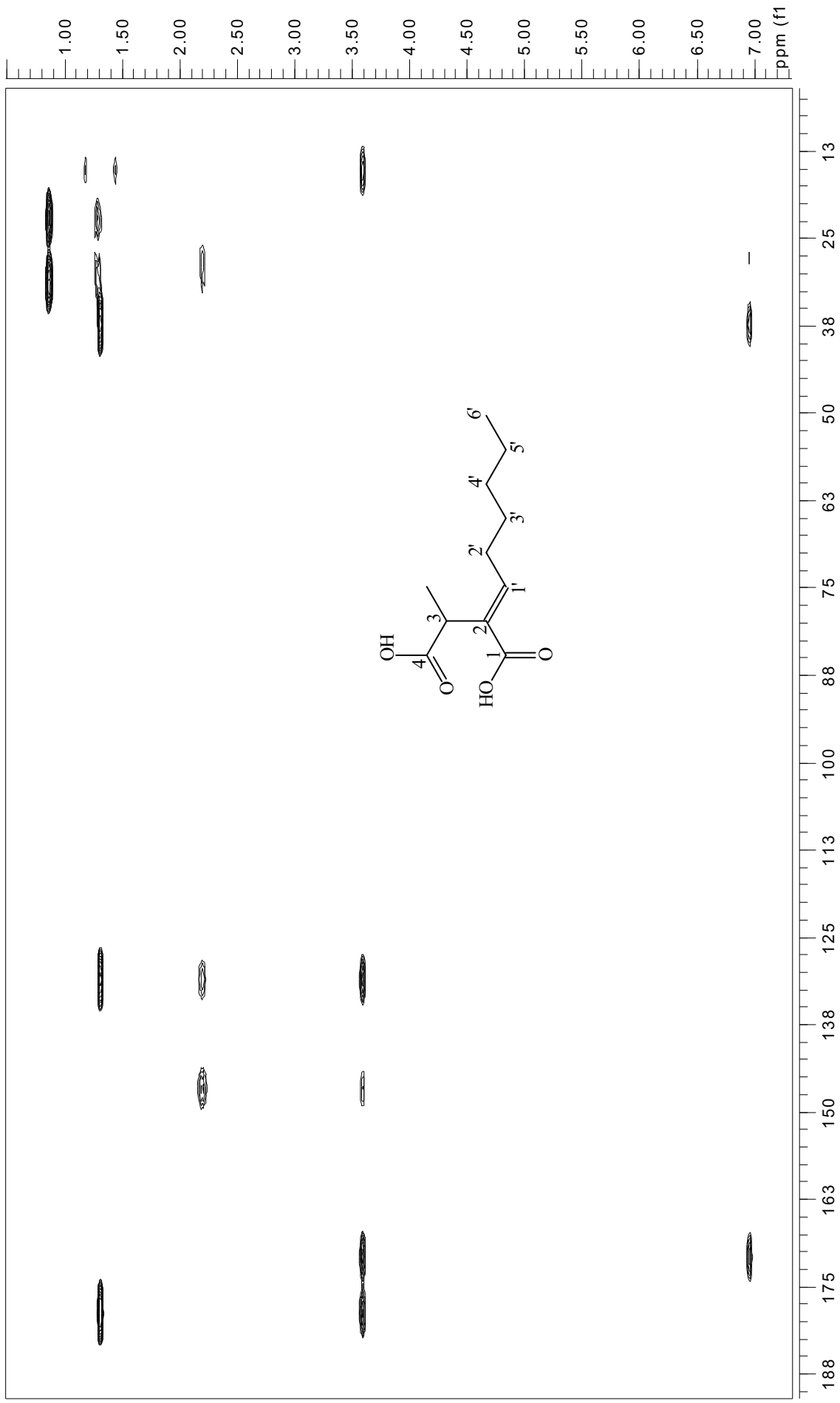


Figura 203: Mapa de contorno gHMBC de **20** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

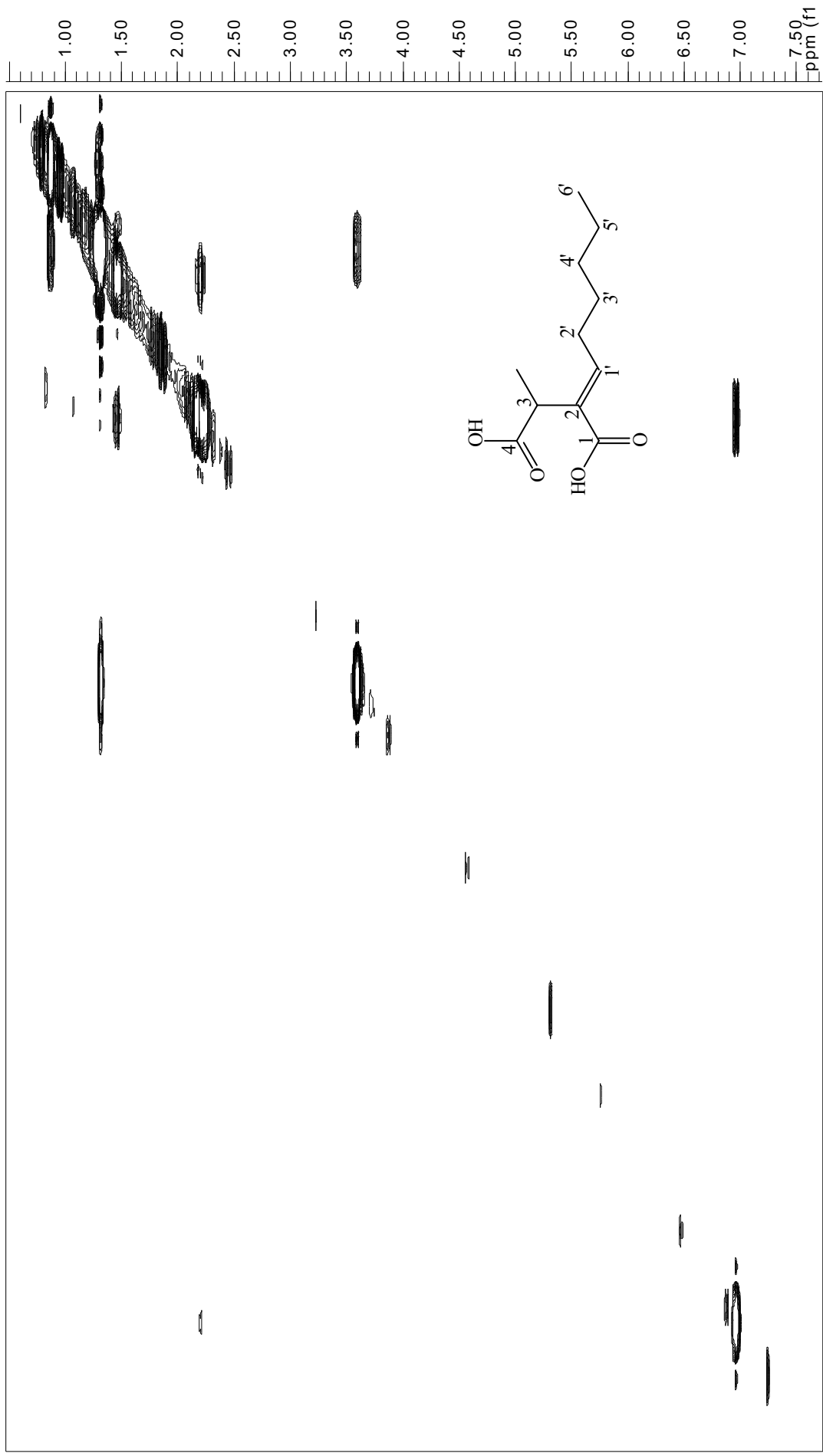


Figura 204: Espectro de gCOSY de **20** (DMSO-*d*₆ a 11,7 T)

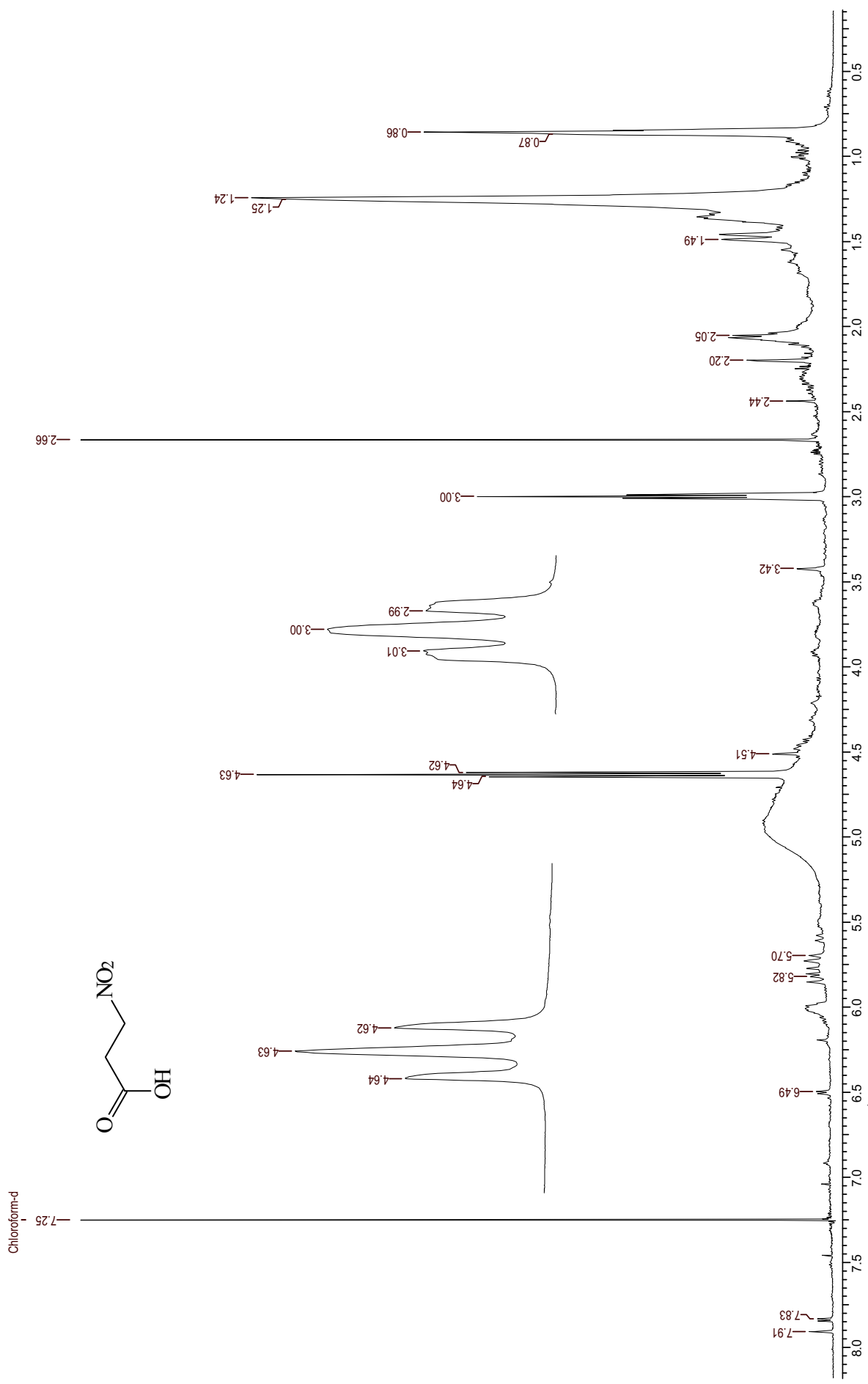


Figura 206: Espectro de RMN de ¹H de (21) (DMSO-d₆ a 11,7 T)

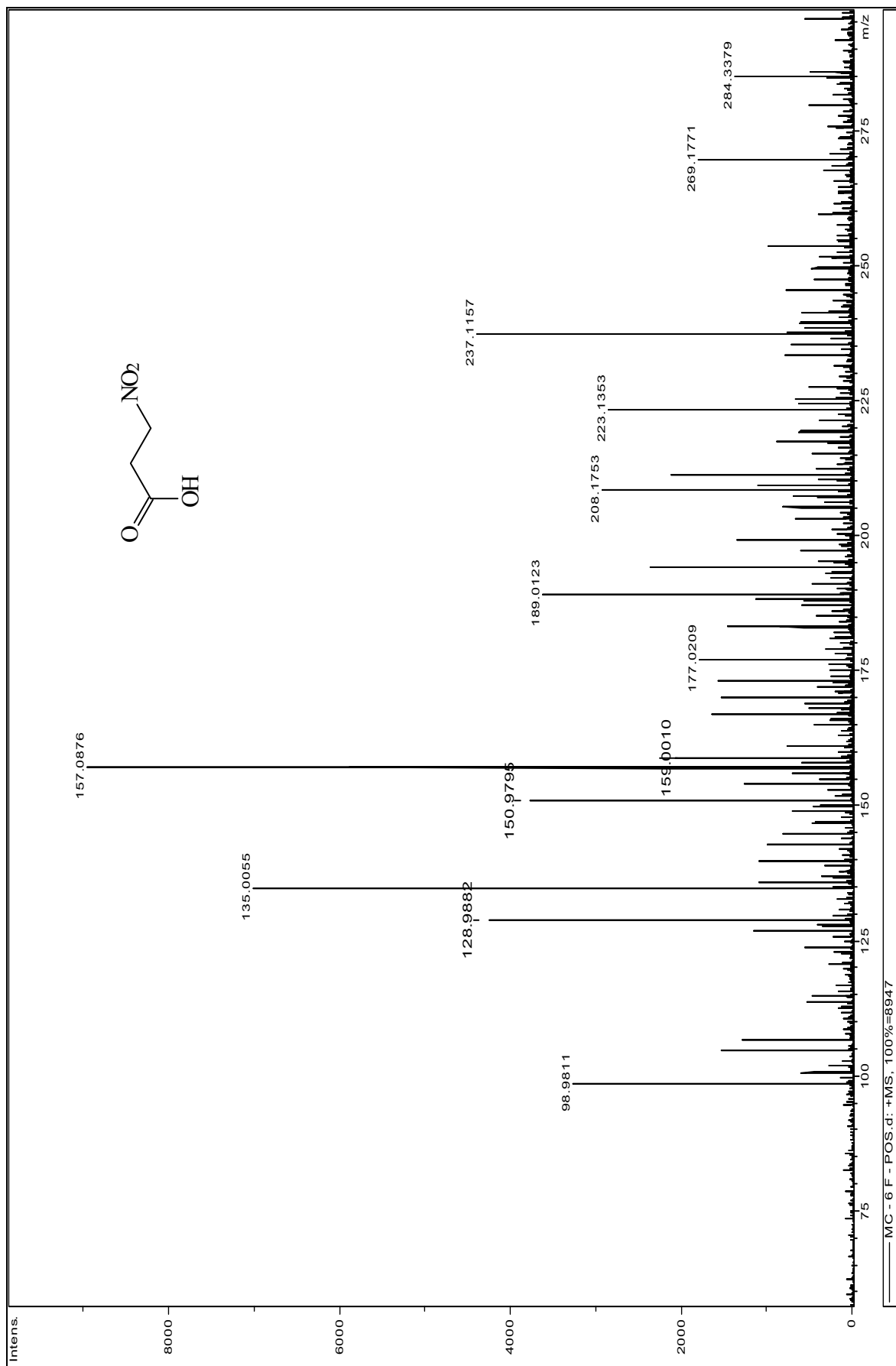


Figura 207: Espectros de Massas de (21)