
Alana Evangelista Honório

**Prospecção química e biológica do fungo
endofítico *Saccharicola* sp. isolado de
Eugenia jambolana (*Myrtaceae*).**

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara

2013

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

Programa de Pós-graduação em Química

Data de Ingresso no Programa: 08/08/2011

Alana Evangelista Honório

**Prospecção Química e Biológica do Fungo
Endofítico *Saccharicola* sp. isolado de
Eugenia jambolana (Myrtaceae)**



Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara
2013

ALANA EVANGELISTA HONÓRIO

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

Araraquara, 09 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. ANGELA REGINA ARAUJO (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. JAIRO KENUPP BASTOS
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. ANDERSSON BARISON
Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Alana Evangelista Honório

Filiação: Manoel Augusto Honório e Margareth Martins Evangelista

Data de Nascimento: 25 de fevereiro de 1987

Naturalidade: São João da Boa Vista - SP

Nacionalidade: Brasileira

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, n. 55 – Araraquara-SP,

CEP: 14081-970, SP - Brasil

Telefone: 16 3301-9600 (ramal 9793)

e-mail: lana_quim@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2011 - 2013

Mestrado em Química

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

Título: Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).

(Ano de obtenção: 2013)

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2006 - 2010

Graduação em Licenciatura Química.

Universidade Estadual Paulista – UNESP- Araraquara, SP.

BOLSAS CONCEDIDAS

(1) Bolsista de Mestrado – CAPES (2011-2013)

Título do projeto: Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).

Orientação: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

(2) Bolsista de Extensão – CNPQ (2009-2009)

Título do projeto: Síntese Eletroquímica de Nano partículas de Magnetita e Funcionalização com Polietilenoglicol para uso em Biomedicina, voltado principalmente para utilização em tratamento antitumoral.

Orientação: Prof. Dr. Miguel Jafellici

(3) Bolsista de Extensão – BAE (2007-2009)

Título do projeto: Prospecção química e biológica do fungo endofítico AM-01 isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).

Orientação: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

(4) Bolsista de Extensão Centro de Ciências de Araraquara – BAE (2006-2007)

Título do projeto: Ciência Viva (programa de visitação ao Centro de Ciências de Araraquara de alunos de escolas públicas e privadas, comunidade em geral).

Elaboração de jogos didáticos.

Plantão de dúvidas (programa de tira-dúvidas destinado aos estudantes do Ensino Fundamental, Médio e de Cursos Pré-Vestibulares).

Ciência Vai à Escola (laboratório volante visitando as escolas com experimentos e recursos audiovisuais nas diferentes áreas da ciência).

Orientação: Prof. Dr. Luiz Antonio Andrade de Oliveira

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

(1). HONÓRIO, A.E.; GUBIANI, J. R.; CHAPLA, V.M.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. *Saccharicola* sp. um endófito de *Eugenia jambolana*, um prolífico produtor de metabólitos bioativos. In: 36ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia.

(2). ROMERO, J. H. S.; BONI, A. C; **HONORIO, A. E**; BOCANEGRA, C. H.; ZANON, D. A. V. Era uma vez em atomolândia: o lúdico para contextualizar o ensino de Química. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

(3). Oliveira, Camila M.; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; ZANARDI, L. M.; **EVANGELISTA, A. H.**; Young, Maria C.M.; Bolzani, Vanderlan da S.; ARAUJO, A. R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, two endophytes associated. Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences, v. 64, p. 824-830, 2009.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

(1). **Honorio. A.E.** VII Evento de Educação em Química - VII EVEQ (Comissão Organizadora), 2009. (Congresso).

Aos meus queridos e amados pais Margareth e Manoel (*in memoriam*) por todo apoio, incentivo e amor. Vocês são meu alicerce.

A minha irmã Paula pela amizade e carinho e por sempre apoiar meus sonhos.

Ao meu namorado Ronaldo por todo amor, apoio, companheirismo e por sempre estar ao meu lado.

A minha orientadora Angela pela amizade, respeito e ensinamentos.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margareth e Manoel Augusto (*in memoriam*), por todo apoio, incentivo, amor e carinho. Por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos; por estarem sempre ao meu lado e me incentivar a seguir em frente; por nunca me deixarem desistir nos momentos difíceis e serem meus melhores amigos. Sem o apoio e a força de vocês não teria chego até aqui.

A minha irmã Paula por todo carinho, amizade, lealdade e cumplicidade. Por todas as coisas que superamos juntas e estarmos sempre unidas.

A minha prima Jennifer por toda amizade, companheirismo, e por todas as risadas que demos juntas.

Ao meu namorado Ronaldo por todo amor, incentivo, paciência, amizade e companheirismo. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e dividir a vida comigo. Você é o amor que eu sempre quis.

A todas as pessoas da família do meu namorado por me acolher, apoiar e por todo carinho nesses 5 anos.

A minha querida orientadora Angela, pelos ensinamentos, confiança, amizade e carinho. Por todo apoio e por sempre me acalmar e dar diferentes perspectivas. Não podia ter escolhido uma orientadora melhor.

Aos professores do Instituto de Química pelos conhecimentos transmitidos, em especial aos professores Mauro, Miguel Jafellici e Rodrigo (Jataí) por toda amizade e carinho durante todos esses anos.

Aos queridos Nivaldo, Lucineia, Silvia, Jú Rodrigues, João, Marquinhos e Albertinho por todo apoio, ajuda, carinho e por todas as risadas e conversas.

A Camila Martins e Lisinéia Zanardi por todo apoio e ensinamentos no início da minha trajetória.

Aos amigos dentro e fora do laboratório, Juzinha, Vanessa e Fernandinho pela amizade, risadas, conversas e confraternizações, por sempre me incentivar, apoiar e principalmente me acalmar. É fácil trabalhar quando se tem pessoas como vocês ao lado. Agradeço em especial a Juzinha que foi meu braço direito e esquerdo, sempre me apoiando e ajudando. Sem você não seria a mesma coisa.

Aos amigos de graduação que duram até hoje e que espero que dure para sempre, Carol, Susi, Nathalia, Lucy, Gislaine, Daniely, Sara e João, por todas as risadas, alegria, brincadeiras, conversas e piadas e principalmente por mantermos essa amizade e estarmos sempre ao lado um do outro, mesmo com a distancia que às vezes nos separa.

Ao colégio Integral São João e a todos os professores e funcionários, em especial aos queridos Ana Claudia, Frank e Rodrigo por acreditarem em mim, por me incentivar e pelas oportunidades que me deram. Toda minha formação e conquistas agradeço a vocês.

Ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP - Araraquara pela possibilidade de realização deste projeto.

Ao Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE, pelo aceite no grupo de pesquisa, pelo desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário de mais uma etapa importante da minha vida.

A todos os funcionários da biblioteca que sempre foram muito solícitos, educados, sempre prontos para nos ajudar e auxiliar.

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

Á CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP e CNPQ pelo financiamento.

E, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras repostas; é quem faz as verdadeiras perguntas” (Claude Lévi-Strauss).

“A persistência é o menor caminho para o êxito” (Charles Chaplin).

HONÓRIO, Alana Evangelista. **Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)** 2013. Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

RESUMO

O projeto proposto tem como objetivo principal a obtenção de substâncias bioativas a partir do estudo químico e biológico do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado do caule da espécie vegetal *Eugenia jambolana*. O extrato bruto foi analisado por RMN de ^1H e HPLC-DAD, objetivando a avaliação do perfil químico e assim, definir a metodologia de isolamento das substâncias. A seguir, o extrato bruto foi submetido a técnicas cromatográficas e espectrométricas para o isolamento e a determinação estrutural das substâncias isoladas, respectivamente. Uma das substâncias isoladas é inédita, com esqueleto também inédito na literatura e produzida em grande quantidade, a outra é conhecida como ácido anofínico, pertencente a classe dos cromenos, com poucos trabalhos descritos e através de ESI-MS foram identificadas as substâncias ácido 4-hidróxi-3-prenilbenzóico, ácido 4-hidróxi-3-(3-metil-3-buten-1-il) benzóico, ácido 2,2-dimetil-2H cromeno-6-carboxílico além de outras três pertencentes a classe da substância inédita.

Palavras-chave: Fungo endofítico. *Saccharicola* sp.. *Eugenia jambolana*.

Honorio, Alana Evangelista. **Chemical and Biological Evaluation of Endophytic Fungus *Saccharicola* sp. isolated from *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).** 2013. Dissertation in Chemistry, Institute of Chemistry of Araraquara - UNESP.

ABSTRACT

The proposed project's main objective is to obtain bioactive substances from chemical and biological study of the crude extract produced by the endophytic fungus *Saccharicola* sp. isolated from the stem of the plant species *Eugenia jambolana*. The crude extract was analyzed by ^1H NMR and HPLC-DAD, aiming at assessing the chemical profile and thus define the methodology for isolation of substances. Next, the crude extract was subjected to chromatographic and spectrometric techniques for the isolation and structural determination of individual substances, respectively. One of the isolated substance is unique, with skeleton also unprecedented in the literature, which was produced in large quantities, and another one known as anofinic acid belonging to the class of chromenes, with few studies in the literature, and by ESI-MS were identified substances 4-hydroxy-3-prenilbenzóico acid, 4-hydroxy-3-(3-methyl-3-buten-1-yl) benzoic acid, 2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carboxylic acid plus three others belonging to the class of novel substance.

Keywords: Endophytic fungus. *Saccharicola* sp.. *Eugenia jambolana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fungo endofítico <i>Penicillium notatum</i> e estrutura da penicilina.	Pág. 23
Figura 2- Substâncias isoladas de fungos	Pág. 24
Figura 3- Substâncias anticâncer produzidas por fungos endofíticos	Pág. 27
Figura 4- Modos de infecção da planta hospedeira pelo fungo endofítico.	Pág. 28
Figura 5- Frutos e folhas, árvore e flores de <i>Eugenia jambolana</i> .	Pág. 29
Figura 6- Metodologia de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos	Pág. 35
Figura 07- <i>Saccharicola</i> sp.	Pág. 39
Figura 08- Crescimento do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. em meio líquido.	Pág. 39
Figura 09- Comparação entre os cromatogramas obtidos em Malte	Pág. 55
Figura 10- Cromatograma da Substância <u>1</u> registrado em 228 nm.	Pág. 57
Figura 11- Cromatograma da Substância <u>2</u> registrado em 261 nm.	Pág. 57
Figura 12- Espectro de IV da substância <u>1</u> .	Pág. 58
Figura 13- Espectro de RMN de ^1H da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 600 MHz)	Pág. 60
Figura 14- Espectro de RMN de ^1H com D_2O da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 600 MHz)	Pág. 61
Figura 15- Espectro de RMN de ^{13}C da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 150 MHz)	Pág. 62
Figura 16- Espectro de DEPT 135 da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 150 MHz)	Pág. 63
Figura 17- Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 150 MHz)	Pág. 64
Figura 18- Mapa de correlação H-C a longa distancia (HMBC) da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 150 MHz)	Pág. 65
Figura 19- Ampliação mapa de correlação H-C a uma ligação (HMBC) da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 150 MHz)	Pág. 66
Figura 20- Estrutura parcial A da substância <u>1</u>	Pág. 67
Figura 21- Estrutura parcial B da substância <u>1</u>	Pág. 68
Figura 22- Mapa de correlação (COSY) da Substância <u>1</u> (DMSO- d_6 , 150 MHz)	Pág. 69

Figura 23- Ampliação Mapa de correlação COSY da Substância <u>1</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz)	Pág. 70
Figura 24- Estrutura parcial C da substância <u>1</u>	Pág. 71
Figura 25- Estrutura parcial D da substância <u>1</u>	Pág. 71
Figura 26- Substância <u>1</u> e as principais correlações em HMBC.	Pág. 72
Figura 27- Espectro de UV da substância <u>1</u> .	Pág. 72
Figura 28- Correlações observadas por NOESY entre H-12↔H-2.	Pág. 74
Figura 29- Correlações observadas por NOESY entre H-12↔H-6	Pág. 75
Figura 30- Correlações observadas por NOESY entre H13↔H2/H6/H15	Pág. 76
Figura 31- Correlações observadas por NOESY entre H6↔H5	Pág. 77
Figura 32- Mapa de correlação HSQC TOCSY da Substancia <u>1</u> (DMSO-d ₆ , 150 MHz)	Pág. 78
Figura 33- Mapa de correlação HSQC TOCSY Ampliado da Substancia <u>1</u> (DMSO-d ₆ , 150 MHz)	Pág. 79
Figura 34- Correlações observadas em NOESY 1D para <u>1</u>	Pág. 80
Figura 35- Configuração relativa proposta para substância <u>1</u>	Pág. 80
Figura 36- Espectro de IV da substância <u>2</u> .	Pág. 81
Figura 37- Espectro de RMN de ¹ H da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 300 MHz)	Pág. 83
Figura 38- Espectro de RMN de ¹ H com D ₂ O da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 300 MHz)	Pág. 84
Figura 39- Espectro de RMN de ¹³ C da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 75 MHz)	Pág. 85
Figura 40- Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 100 MHz)	Pág. 86
Figura 41- Mapa de correlação H-C a longa distancia (HMBC) da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 100 MHz)	Pág. 87
Figura 42- Espectro de UV da substância <u>2</u> .	Pág. 88
Figura 43- Substância <u>2</u> e as principais correlações em HMBC.	Pág. 89
Figura 44- Configuração <i>trans</i> da substância <u>2</u> .	Pág. 90
Figura 45- Configuração <i>cis</i> da substância <u>2</u> .	Pág. 90

Figura 46- Substâncias identificadas por de ESI-MS	Pág. 92
Figura 47- Atividade antifúngica dos extratos brutos, frações e substâncias puras de <i>Saccharicola</i> sp.	Pág. 93
Figura 48- Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos, frações e substâncias puras de <i>Saccharicola</i> sp.	Pág. 94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Resultado do ensaio antitumoral dos endófitos isolados de *E. jambolana*. Pág. 37
- Tabela 2-** Resultado do ensaio antitumoral dos extratos obtidos nos diferentes meios de cultivo. Pág. 38
- Tabela 3-** Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da substância 1 em DMSO- d_6 . Pág. 67
- Tabela 4-** Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (100MHz) da substância 2 em DMSO- d_6 . Pág. 88
- Tabela 5-** Atividade antitumoral do extrato bruto, frações e substâncias puras de *Saccharicola* sp. Pág. 95
- Tabela 6-** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos frente aos bacilos *M. tuberculosis* Pág. 96
- Tabela 7-**Atividade tripanocida das substâncias 1 e 2 isoladas de *Saccharicola* sp.. Pág. 97

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1-** Obtenção e triagem dos extratos brutos obtidos de *E. jambolana* Pág. 36
- Fluxograma 2-** Metodologia de obtenção do Extrato bruto Ssp-AcOEt-1 e Extrato bruto Ssp-AcOEt-2 para avaliação do perfil químico e biológico Pág. 40
- Fluxograma 3 -** Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1 Pág. 42
- Fluxograma 4 -** Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-2 Pág. 43
- Fluxograma 5 -** Fracionamento da Fração Ssp-Si-Fr8 Pág. 46
- Fluxograma 6-** Fracionamento cromatográfico de Ssp-C18-Fr1 Pág. 47

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AchE – Enzima acetilcolinesterase

AcOEt - Acetato de etila

MeOH – Metanol

BDA – Batata-dextrose-ágar

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

C18 - Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO-d6 – Dimetilsulfóxido Deuterado

d – Dupleto

dd – Duplo - dupleto

ddd – Duplo – duplo – dupleto

dt – Duplo-tripleto

EM – Espectrometria de Massas

E. jambolana– *Eugenia jambolana*

Ejc – *Eugenia jambolana* caule

Extr- extrato bruto

Fr – Fração

δ – Deslocamento químico

gCOSY – Gradient Correlated Spectroscopy

gHMBC - Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation

gHMQC - Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hex – Hexano

IC50 – Concentração Inibitória

IQAr – Instituto de Química de Araraquara

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

m – Multiplete

MHz - Megahertz

min. – Minutos

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

m/z – Relação massa-carga

NaClO – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

NOESY 1D – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy em uma dimensões

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

pág. - Página

ppm – Parte por milhão

q – Quarteto

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s – Simpleto

sl – Simpleto largo

Subst- Substância

t – Triplete

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

v/v – Volume/volume

λ – Comprimento de onda

μm – Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	Pág. 21
1.1 Produtos Naturais como Fontes de Substâncias Bioativas	Pág. 21
1.2 Fungos, uma Fonte Promissora de Metabólitos Bioativos	Pág. 21
1.3 Fungos endofíticos	Pág. 24
1.4 Espécie vegetal hospedeira: <i>Eugenia jambolana</i>	Pág. 27
2 OBJETIVOS	Pág. 29
2.1 Objetivo Geral	Pág. 29
2.2 Objetivos Específicos	Pág. 29
3 PARTE EXPERIMENTAL	Pág. 30
3.1 Materiais, Equipamentos e Técnicas Utilizadas	Pág. 30
3.1.1 Meio de cultivo do micro-organismo	Pág. 30
3.1.2 Esterilização dos materiais	Pág. 30
3.1.3 Manipulação do micro-organismo	Pág. 30
3.1.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	Pág. 30
3.1.5 Cromatografia em coluna (CC)	Pág. 31
3.1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Pág. 31
3.1.7 Análise de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C)	Pág. 31
3.1.8 Preparo das amostras para análise via HPLC (<i>clean-up</i>)	Pág. 32
3.1.9 Análise de Infravermelho (IV)	Pág. 32
3.1.10 Solventes utilizados	Pág. 32
3.1.11 Outros equipamentos	Pág. 32
3.2. Obtenção do Material Vegetal e Isolamento da Cepa Fúngica	Pág. 33
3.2.1 Seleção e coleta da espécie vegetal	Pág. 33
3.2.2 Obtenção e cultivo do endófito	Pág. 33

3.3 Escolha do Fungo Endofítico.	Pág. 34
3.3.1 Cultivo dos fungos endofíticos em escala reduzida para avaliação dos extratos brutos.	Pág. 34
3.3.2 Classificação do fungo endofítico	Pág. 36
3.3.3 Escolha do meio de cultivo*	Pág. 36
3.3.4 Cultivo do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. e obtenção do extrato bruto.	Pág. 37
3.3.5 Crescimento do endófito e obtenção dos extratos brutos para avaliação do perfil químico e biológico e isolamento dos metabólitos secundários.	Pág. 38
3.3.6 Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1 produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em extrato de malte.	Pág. 40
3.3.7 Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-2 produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em extrato de malte.	Pág. 40
3.3.8 Purificação das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1 produzido por <i>Saccharicola</i> sp.	Pág. 43
3.3.8.1 Purificação da fração Ssp-Si-Fr-17	Pág. 43
3.3.8.2 Purificação da fração Ssp-Si-Fr-13	Pág. 43
3.3.9 Purificação das frações obtidas do fracionamento do Extrato Bruto Ssp-AcOEt-2 produzido por <i>Saccharicola</i> sp..	Pág. 43
3.3.9.1 Purificação da fração Ssp-C18-Fr1	Pág. 43
3.10 Análises químicas e avaliação do perfil químico do extrato bruto AcOEt de <i>Saccharicola</i> sp.	Pág. 47
3.10.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).	Pág. 47
3.10.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).	Pág. 47
3.10.3 Análise por RMN de ¹ H.	Pág. 48
3.11 Avaliação do perfil biológico dos extratos, frações e substâncias puras obtidos de <i>Saccharicola</i> sp.	Pág. 48
3.11.1 Avaliação da Atividade Antifúngica.	Pág. 48
3.11.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica	Pág. 49
3.11.3 Avaliação da Atividade Antitumoral	Pág. 50
3.11.4 Avaliação da Atividade Tripanocida utilizando MTT	Pág. 51

3.11.5 Avaliação da atividade anti-tuberculose	Pág. 52
4 Resultados e Discussão	Pág. 54
4.1 Análise do extrato AcOEt obtido do cultivo em Extrato de Malte do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. por HPLC-DAD.	Pág. 54
4.2 Análise do extrato AcOEt obtido em Extrato de Malte por RMN de ¹ H.	Pág. 55
4.3 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt obtido em malte de <i>Saccharicola</i> sp. e obtenção das substâncias puras	Pág. 55
4.4 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas	Pág. 57
4.4.1 Determinação Estrutural da Substância <u>1</u>	Pág. 57
4.4.2 Determinação Estrutural da Substância <u>2</u>	Pág. 77
4.5 Avaliação das substâncias encontradas no extrato bruto por ESI-MS.	Pág. 87
4.6 Ensaios biológicos dos extratos brutos Ssp-AcOEt-1 e Ssp-AcOEt-2, frações e das substâncias puras <u>1</u> e <u>2</u> .	Pág. 89
4.6.1 Avaliação da Atividade Antifúngica*	Pág. 89
4.6.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica*	Pág. 90
4.6.3 Avaliação da Atividade Antitumoral	Pág. 90
4.6.4 Avaliação da Atividade antituberculose	Pág. 91
4.6.5 Avaliação da Atividade Tripanocida utilizando MTT	Pág. 92
5 Conclusões	Pág. 94
Referências	Pág. 95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais como Fontes de Substâncias Bioativas

A pesquisa em produtos naturais é uma das áreas mais tradicionais da Química no Brasil, devido principalmente à grande biodiversidade do país. A maioria dos trabalhos está voltada para o isolamento e a identificação de substâncias, muitas vezes associados a ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (HARVEY, 2008).

Dos anos quarenta até os dias atuais, um bom exemplo da importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos está no tratamento de câncer. Dos 155 fármacos utilizados, 73% são sintéticos, sendo que desses aproximadamente 47% foram baseados em produtos naturais ou derivados de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2012).

1.2 Fungos, uma Fonte Promissora de Metabólitos Bioativos

Certamente, foram os antibióticos que mais contribuíram para o interesse do setor farmacêutico pelos produtos naturais. Diversos metabólitos secundários com importantes propriedades farmacológicas foram isolados de espécies de bactérias e fungos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

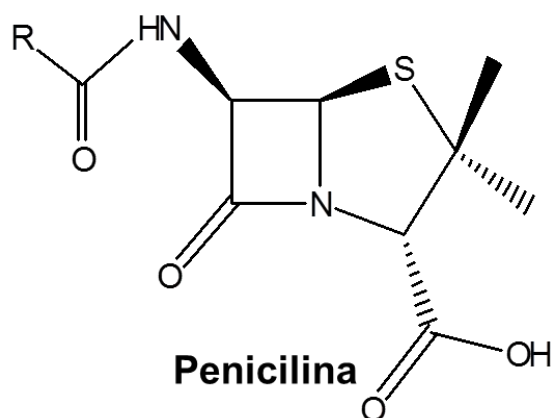
Desde a descoberta da penicilina, isolada por Fleming, do fungo *Penicillium notatum* (Figura 1, pág. 23), inúmeros esforços, têm-se concentrado no isolamento de metabólitos secundários de origem microbiana.

Devido a sua diversidade, capacidade de adaptação e modo a colonizar diferentes ecossistemas, os micro-organismos representam um importante componente da biodiversidade da Terra (LEFEVRE, 2008).

Figura 1- Fungo endofítico *Penicillium notatum* e estrutura da penicilina.



Penicillium notatum



Fonte: A autora

A partir dessa descoberta foi dado maior ênfase ao estudo desses micro-organismos que são uma das fontes mais prolíficas de produtos naturais.

Outro aspecto importante, no isolamento de metabólitos de origem microbiana é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido, em menor tempo e espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração) podem ser modificadas, a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos de interesse (ALY et al. 2011; PEARCE, C.1997).

Os fungos podem ser filamentosos, constituídos por filamentos longos e ramificados denominados hifas; leveduriformes, constituídos por células individuais que se reproduzem por brotamento ou fissão binária; ou dimorfos, que podem ser filamentosos ou leveduriformes dependendo das condições ambientais, principalmente a temperatura (ESPOSITO, AZEVEDO, 2010).

Ocorrem em três modos de vida: saprófitos que são micro-organismos que se nutrem de restos de material orgânico de organismos mortos; parasitas que vivem à custa de outros seres vivos e somente o fungo se beneficia; e simbiótico que se associam a outros seres e ambos se beneficiam com essa interação.

Os fungos tem demonstrado grande potencial como uma importante fonte de compostos biologicamente ativos com aplicações alimentícias, agrícolas e medicinais (ZHANG et al. 2006; ALY et al. 2011), como por exemplo na indústria alimentícia, na fabricação de pães, queijos, vinhos e outras bebidas alcoólicas.

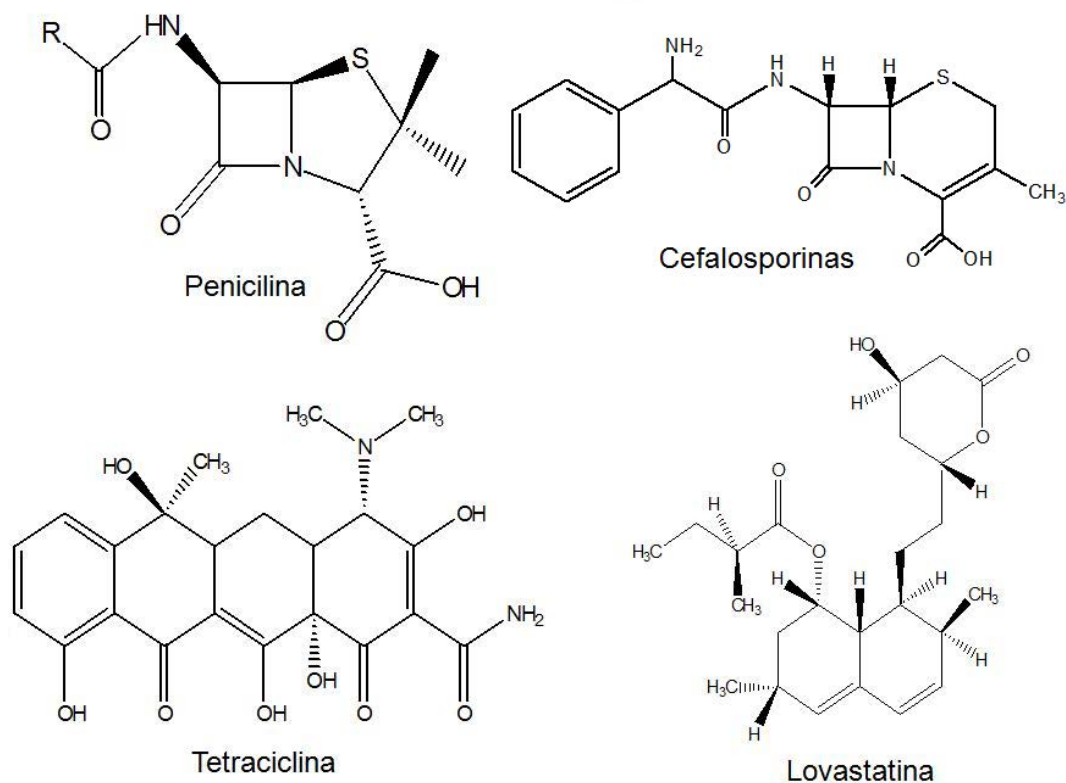
Na agricultura através da produção de micoinseticidas, que são produtos a base de fungos benéficos utilizados no controle de insetos-praga podendo desempenhar um importante papel no futuro de uma agricultura moderna e sustentável. O Brasil é um

grande exemplo de utilização de controle biológico em escala ampliada, como o uso do *Baculovirus anticarsa* para o controle da lagarta da soja, entre outros (ALVES, 2010).

Na indústria farmacêutica tem demonstrado uma crescente importância através da produção de metabólitos secundários bioativos como, por exemplo, a ciclosporina, que é uma droga imunossupressora isolada do fungo *Tolypocladium Inflatum* que suprime as reações imunológicas que causam rejeição de órgãos transplantados (CORDEIRO, et al. 2005; BAEDE VAN DIJK et al., 2000).

Estudos realizados com fungos na prospecção de metabólitos secundários bioativos demonstraram que esses micro-organismos produzem substâncias com uma enorme diversidade estrutural, as quais têm fornecido produtos muito importantes na indústria farmacêutica (**Figura 2**, pág. 24), incluindo agentes antibacterianos, como as penicilinas (obtidas de espécies de *Penicillium*), cefalosporinas (*Cephalosporium crytosporium*), aminoglicosídeos, tetraciclina e outros polipeptídeos de vários tipos estruturais (*Actinomycetales*), agentes redutores de colesterol, tais como mevostatina (compactina) e lovastatina (da espécie *Penicillium*) (GRAGG e NEWMAN, 2005; GREVE et al., 2010).

Figura 2- Substâncias isoladas de fungos



Fonte: A autora

Plantas superiores são um complexo habitat que abrigam vários tipos de micro-organismos. Dentre estes, os fungos são componentes dominantes nas associações com as espécies vegetais, podendo ser encontrados colonizando superfícies vegetais (epifíticos), tecidos internos (endofíticos), o interior ou superfícies das raízes (micorrízicos) ou ainda desenvolvendo-se no solo próximo as raízes (rizosfera), (STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. Jr., 2004).

Dentre todas as espécies de fungos, os endofíticos constituem o grupo mais produtivo quimicamente entre os outros fungos filamentosos, apresentando uma produção de metabólitos secundários bioativos 73% superior aos demais (DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H, 1994).

1.3 Fungos endofíticos

Fungos endófitos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas hospedeiras sem causar efeitos negativos imediatos (KHARWAR et al., 2011) e representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com diversas substâncias descritas (OWNLEY, GWINN 2010). Destas, 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica, evidenciando o seu potencial biológico e biossintético (YANG et al., 2012; PARANAGAMA et al., 2007).

A especificidade de um endófito em relação a uma espécie vegetal pode ser influenciada pelas condições ambientais (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Essa especificidade pode trazer grandes perdas da biodiversidade, uma vez extinguindo-se uma espécie vegetal, estará eliminando toda sua flora microbiana (GUNATILAKA, 2006).

Durante o longo período de co-evolução, fungos endofíticos têm se adaptado aos seus microambientes pela variação genética, incluindo a absorção de alguns segmentos de DNA da planta hospedeira em seus genomas próprios, bem como a inserção de seus próprios segmentos de DNA no genoma do hospedeiro. Este fato pode ter levado certos endófitos a apresentar a capacidade de biosintetizar alguns metabólitos secundários bioativos originalmente obtidos da planta hospedeira (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

A associação planta micro-organismo sugere que estes co-evoluíram com os seus hospedeiros, apresentando uma relação simbiótica onde os endófitos recebem nutrientes, água e proteção enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação, como maior resistência a fatores bióticos, como insetos, herbívoros,

parasitas e outros micro-organismos e fatores abióticos, como pH, temperatura e estresse hídrico (SANTOS, L.C; et al. 2013).

A maioria das variações de uma interação simbiótica para uma interação parasita são caracterizados pelos fatores genéticos, desequilíbrio na troca de nutrientes ou variações ambientais. A mudança do tipo de interação está associado ao fato de a planta estar submetida a um estresse simbiótico ou senescência (ALY et al., 2011). Em conclusão, as interações simbióticas entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira são compreendidos como um equilíbrio, que está sob controle ambiental, fisiológico e genético, resultando em benefício para ambos (ALY et al., 2011).

Alguns estudos demonstram que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas, sugerindo dessa forma que os endófitos são uma fonte alternativa na produção destes metabólitos (ALY et al., 2011; PRITI et al. 2009).

Um exemplo é o taxol (paclitaxel) utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, sendo isolada na quantidade 0,01 a 0,03 % das cascas de *Taxus brevifolia*, uma espécie vegetal em extinção, que também é produzida pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* obtido de *Taxus brevifolia* (GRAGG e NEWMAN, 2007).

O paclitaxol é um diterpenóide tetracíclico altamente bioativo, e inicialmente isolado da casca de *Taxus brevifolia* em 1971. É um medicamento usado, em conjunto com outros medicamentos, tendo aplicação no tratamento de uma variedade de cânceres, incluindo o de ovário, de mama, leucemias, linfomas, testicular e de pulmão (ZHAO, 2011). O modo de ação ocorre quando o paclitaxol se liga à β -tubulina e impede a despolimerização durante o processo de divisão celular (ZHAO, 2011).

No entanto, para a surpresa dos pesquisadores, em 1993, o paclitaxol foi isolado do extrato bruto produzido por *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico isolado de *Taxus brevifolia*, evidenciando que o fungo endofítico isolado da planta apresenta a mesma capacidade que seu hospedeiro em biosintetizar o paclitaxol (ZHAO, 2011).

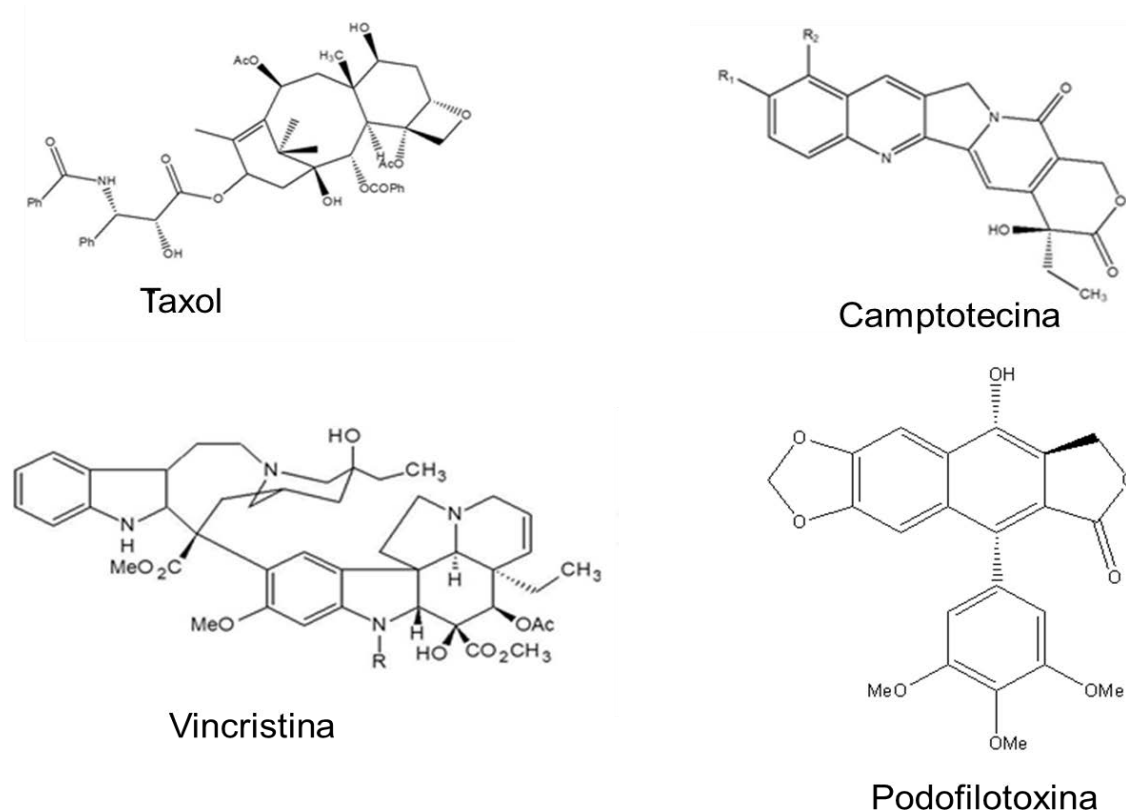
Outro exemplo de produto natural isolado tanto da espécie vegetal, quanto do fungo endofítico que a habita, é a camptotecina (**Figura 3**, pág. 27) um alcalóide pentacíclico que inibe a topoisomerase I, uma enzima envolvida na replicação do DNA. O composto age como um potente agente antineoplásico, exercendo seu efeito citotóxico, inibindo a dissociação dos complexos de DNA-topoisomerase I durante a replicação (KHARWAR, 2011). A camptotecina foi isolada pela primeira vez da espécie vegetal *Camptotheca acuminata* e, apresentou potente atividade antitumoral e

antileucêmica. Mais tarde, em 2005, a camptotecina, também, foi isolada de um fungo endofítico, sendo este, pertencente à família Phycomycetes e, identificado como *Entrophospora infrequens*, o qual foi isolado do interior da casca de *Nothapodytes foetida* (ZHAO, 2011).

Vincristina, outra droga anticâncer originalmente obtida de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), foi detectada em culturas do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* isolado da mesma planta (ALY et al., 2011; LINGQI et al., 2000). Este composto anticancerígeno inibe a mitose por ligação a dímeros de tubulina e inibindo a sua montagem para estruturas de microtúbulos.

Plantas da espécie *Podophyllum* são conhecidas por produzir podofilotoxina, o precursor das drogas anticâncer utilizadas clinicamente, etoposídeo e teniposídeo. Ambas as drogas inibem a topoisomerase II, bloqueando assim o passo de ligação do ciclo celular, prejudicando a integridade do genoma e, subsequentemente, levando à morte celular. Mais tarde essa substância foi relatada de *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii*, que são endófitos isolados de *Phialocephala hexandrum* e *Phialocephala peltatum*, respectivamente (ALY et al, 2011; EYBERGER et al. 2006;. PURI et al., 2006).

Figura 3- Substâncias anticâncer produzidas por fungos endofíticos

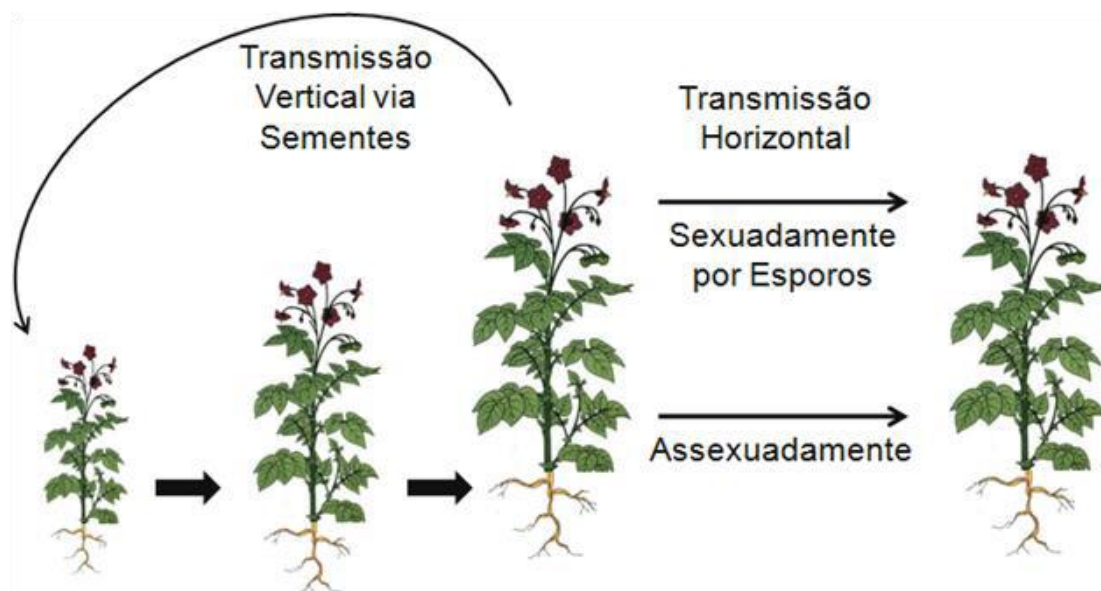


Os fungos endofíticos podem infectar a planta hospedeira de dois modos (**Figura 4**, pág. 28).

Horizontalmente, através de lesões naturais como estômatos e crescimento das raízes, e artificialmente através de fissuras causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente através das sementes do hospedeiro, neste caso o endófito pode se instalar na planta por toda sua vida (ALY et al., 2011).

Uma vez dentro do tecido do hospedeiro, eles assumem um estado de repouso (latente) quer para toda a vida da planta hospedeira ou por um período de tempo prolongado, ou seja, até que as condições ambientais sejam favoráveis para o fungo (ALY et al. 2011; SIEBER 2007).

Figura 4- Modos de infecção da planta hospedeira pelo fungo endofítico.



Fonte: SAIKKONEN, K.et al. 2004.

1.4 Espécie vegetal hospedeira: *Eugenia jambolana*

Devido ao enorme número de espécies de plantas no mundo, algumas estratégias de seleção podem ser utilizadas na busca por fungos endofíticos produtores de substâncias bioativas (STROBEL, 2004), tais como: plantas com história etnobotânica que relata uso e aplicação específica de partes do vegetal; plantas endêmicas que ocupam solos mais antigos, plantas nativas de áreas com grande biodiversidade, plantas de habitats extremos, entre outras, pode nos garantir oportunidade de isolamento de novas espécies e gêneros de fungos endofíticos.

Para este trabalho a espécie escolhida pertence ao gênero *Eugenia*, amplamente conhecida por ser utilizada no tratamento de diabetes (SHARMA et al., 2008). A espécie vegetal *Eugenia jambolana* (**Figura 5**, pág. 29) pertence a família Myrtaceae, e é encontrada em todo o continente asiático, na África Oriental, América do Sul e Madagascar (BALIGA et al., 2011). Muitos produtos naturais isolados de *E. jambolana* apresentaram diferentes atividades biológicas como hipoglicêmica, adstringente, diurética, antidiabética, antioxidante, antibiótica e anti-inflamatória e tem sido utilizada na medicina tradicional por apresentar essas propriedades (VASI et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Figura 5- Frutos e folhas, árvore e flores de *Eugenia jambolana*.



Fonte: DAMETTO (2010)

Estudos realizados por DAMETTO (2010) com os frutos de *E. jambolana* permitiu a identificação de várias antocianinas. As análises preliminares com os extratos e frações de *E. jambolana* mostraram que esta espécie apresenta elevada ação sequestradora de radicais livres e quimiopreventiva, atividade antimalárica, antifúngica contra patógenos-humanos e anticolinesterásica.

Considerando o potencial dos micro-organismos endofíticos na produção de substâncias potencialmente bioativas e o fato de que os micro-organismos endofíticos associados a espécies vegetais da flora brasileira permanecem, praticamente, sem qualquer estudo químico e biológico nos propomos neste trabalho ao estudo de *Saccharicola* sp. associado a *E. jambolana*, objetivando estabelecer correlação entre as substâncias produzidas pelo endófito e a espécie vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Geral

- Isolamento, identificação e avaliação das atividades antifúngica, anticancerígena, tripanocida, anti-tuberculose e anticolinesterásica dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico *Saccharicola* sp..

2.2 Objetivos Específicos

- Cultivo em escala ampliada de *Saccharicola* sp. no meio líquido de extrato de Malte para a obtenção do extrato bruto;

- Triagem química e biológica do extrato bruto obtido por RMN de ^1H e HPLC/DAD.

- Fracionamento do extrato bruto obtido por técnicas cromatográficas convencionais até o isolamento de metabólitos secundários;

- Elucidação ou determinação estrutural das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas de RMN uni e bidimensionais, EM, UV, IV;

- Avaliação das substâncias puras isoladas para verificar a potencialidade biológica;

- Contribuir para uma melhor compreensão da relação ecológica entre os fungos endofíticos e as espécies vegetais hospedeiras

3.1 Materiais, Equipamentos e Técnicas Utilizadas

3.1.1 Meio de cultivo do micro-organismo

Para cultivo dos microrganismos foram utilizados os meios:

- BDA (Acumedia): Batata Dextrose Ágar: 39 g L⁻¹ de água;
- YM: Extrato de Levedura (3g), Extrato de Malte (3g), Peptona (5g), Dextrose (10g), 21 g L⁻¹ de água.
- Malte: Extrato de Malte 20 g L⁻¹ de água

Os meios de cultura líquidos foram submetidos à esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.1.2 Esterilização dos materiais

A esterilização de todo material utilizado na manipulação do micro-organismo, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave, sendo mantidos à temperatura de 121°C por aproximadamente 20 minutos.

3.1.3 Manipulação do micro-organismo

Todo o procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação do micro-organismo foram realizados em Capela de Fluxo Laminar.

3.1.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas comerciais da Merck, com sílica de fase normal (sílica G TLC Plates W/UV 254, 200µm) e sílica de fase reversa (C18 sílica TLC Plates w/UV; 150µm). Os solventes utilizados nos sistemas cromatográficos foram selecionados de acordo com a fase estacionária.

As revelações foram obtidas por exposição à irradiação ultravioleta (UV 254 e 365 nm) e nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento.

3.1.5 Cromatografia em coluna (CC)

Nas separações cromatográficas em coluna aberta ou sob pressão foram utilizadas colunas de vidro de diferentes diâmetros interno e comprimentos.

Fases estacionárias utilizadas:

- Sílica gel C18 (tamanho da partícula: 40-63 μm ; Merck);
- Sílica gel fase normal (tamanho da partícula: 0,060–0,200 μm ; diâmetro do poro 6nm; ACROS organics).

3.1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para as análises do perfil químico, otimização e isolamento das substâncias por HPLC foram utilizados equipamentos Varian ProStar com detectores de arranjos de diodo (DAD), Shimadzu com detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20A e Shimadzu (CBM-20A) com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A). O tratamento dos dados foi obtido através de um microcomputador, utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

Colunas utilizadas:

- Analítica:

Luna Phenomenex C18 (250,0 x 4,60mm; 5 μm ; 100A)

- Preparativa:

Luna Phenomenex C18 (150,0 x 21,20mm, 5 μm)

3.1.7 Análise de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-300 operando em 300 MHz (^1H) e em 75 MHz (^{13}C) e Bruker Avance III HD operando em 600 MHz (^1H) e em 200 MHz (^{13}C). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C bidimensionais foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III HD operando em 600 MHz (^1H) e em 200 MHz (^{13}C), Bruker Avance DRX operando em 500 MHz, 500 MHz (^1H), 125 MHz (^{13}C), (Campo magnético 11,75 T) e Bruker Avance DRX operando em 400 MHz, 400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), (Campo magnético 9,4 T).

Foi utilizado TMS como referência interna.

3.1.8 Preparo das amostras para análise via HPLC (*clean-up*)

Os extratos brutos e as substâncias puras obtidos em meios líquidos foram submetidos à análise por HPLC-DAD em gradiente exploratório. Antes das análises as amostras foram solubilizadas em CH₃OH:H₂O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 mm). Após este procedimento, as amostras (1,5 mg mL⁻¹) foram armazenadas em frascos, para posterior injeção.

3.1.9 Análise de Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrômetro FT-IR, Spectrum 2000 da Perkin Elmer, Série 1600 sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 32 varreduras, com resolução de 1 cm⁻¹, na faixa de absorção de 4000-400 cm⁻¹.

3.1.10 Solventes utilizados

Para a obtenção dos extratos brutos, partição líquido-líquido, fracionamentos em coluna aberta, corridas cromatográficas em placas comparativas e preparativas, foram utilizados Hexano (Hex), Acetato de Etila (AcOEt), Metanol (MeOH) e Clorofórmio (CHCl₃) da marca J. T. Baker.

Para as análises por HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo) e Espectrometria de Massas (EM) foi utilizado Metanol grau HPLC das marcas Merck, J. T. Baker e Panreac.

Nas análises por RMN foi utilizado DMSO-d₆ (dimetilsulfoxido) das marcas CIL e DECROS.

3.1.11 Outros equipamentos

- Evaporador rotatório – Buchi;
- Balança analítica – Mettler Toledo;
- Autoclave vertical – Quimis Aparelhos Científicos Ltda;
- Câmara de Fluxo laminar vertical – PACHANS;

3.2. Obtenção do Material Vegetal e Isolamento da Cepa Fúngica

3.2.1 Seleção e coleta da espécie vegetal

Folhas e caules saudáveis de *E. jambolana* foram coletadas na cidade de Araraquara-SP, em abril e dezembro de 2010 pela doutoranda Vanessa Mara Chapla. Para isolamento dos fungos endofíticos, foi selecionada a mesma espécime utilizada para o estudo fitoquímico, pelo grupo da Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva.

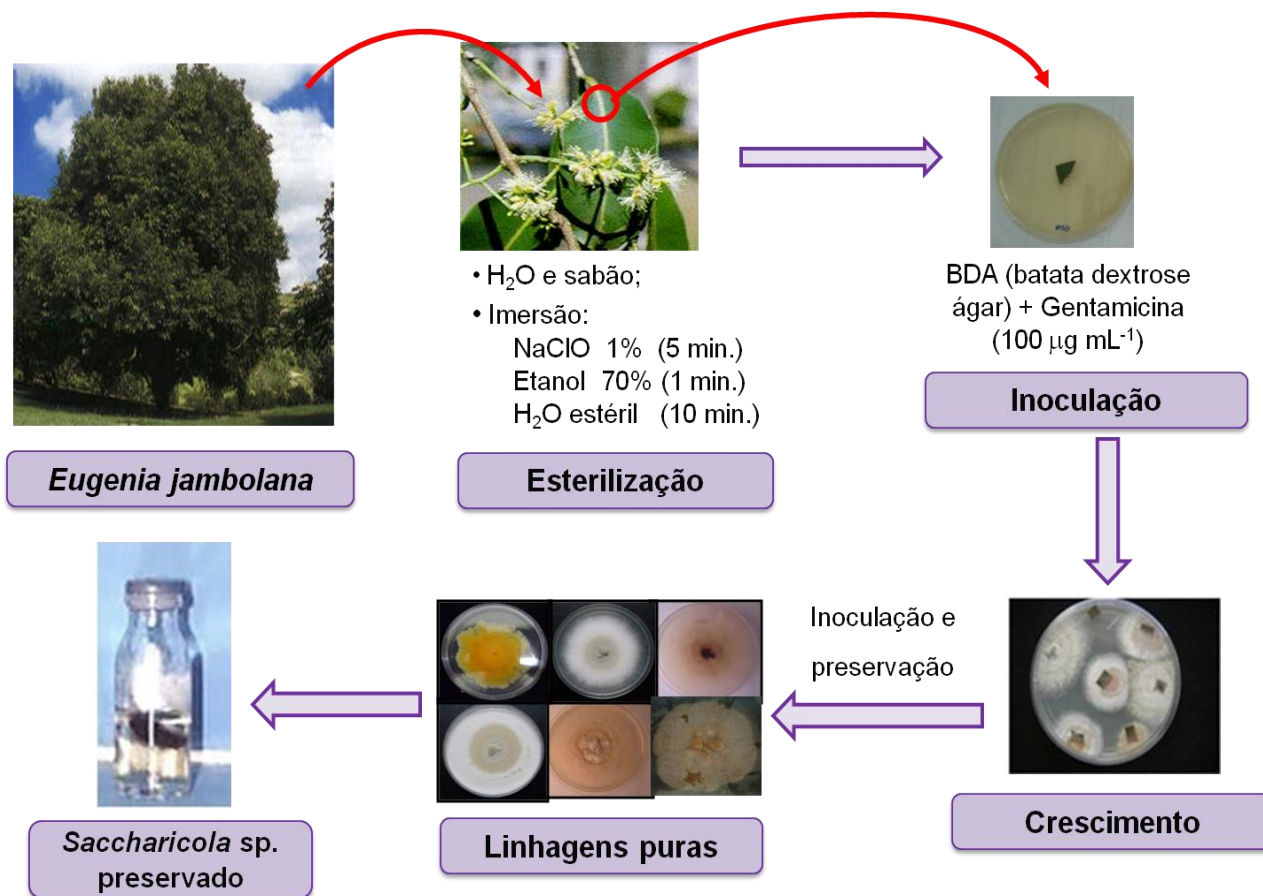
A classificação foi realizada por Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo e classificado como SP 384109.

3.2.2 Obtenção e cultivo do endófito*

Folhas, caules e frutos jovens e saudáveis foram selecionados para o isolamento dos endófitos seguindo o procedimento: a superfície do material foi lavada com água corrente e sabão neutro, e esterilizada por imersão em uma solução de NaClO 1% (1 minuto), etanol aquoso 70% (1 minuto), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (5 minutos) e posterior secagem. A seguir, pedaços de folha e caule foram seccionadas assepticamente (3 a 4 de 0,5 cm) e transferidos para placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose e Agar), ao qual foi adicionado, após esterilização em autoclave, antibiótico sulfato de gentamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para evitar o crescimento de bactérias.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em frascos com água esterilizada (LANDECKER, E. M., 1996) e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP, conforme pode ser visualizado na **Figura 6** (pág. 35).

Figura 6- Metodologia de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos *



Procedimento realizado pela doutoranda Vanessa Mara Chapla

3.3 Escolha do Fungo Endofítico.

3.3.1 Cultivo dos fungos endofíticos em escala reduzida para avaliação dos extratos brutos.

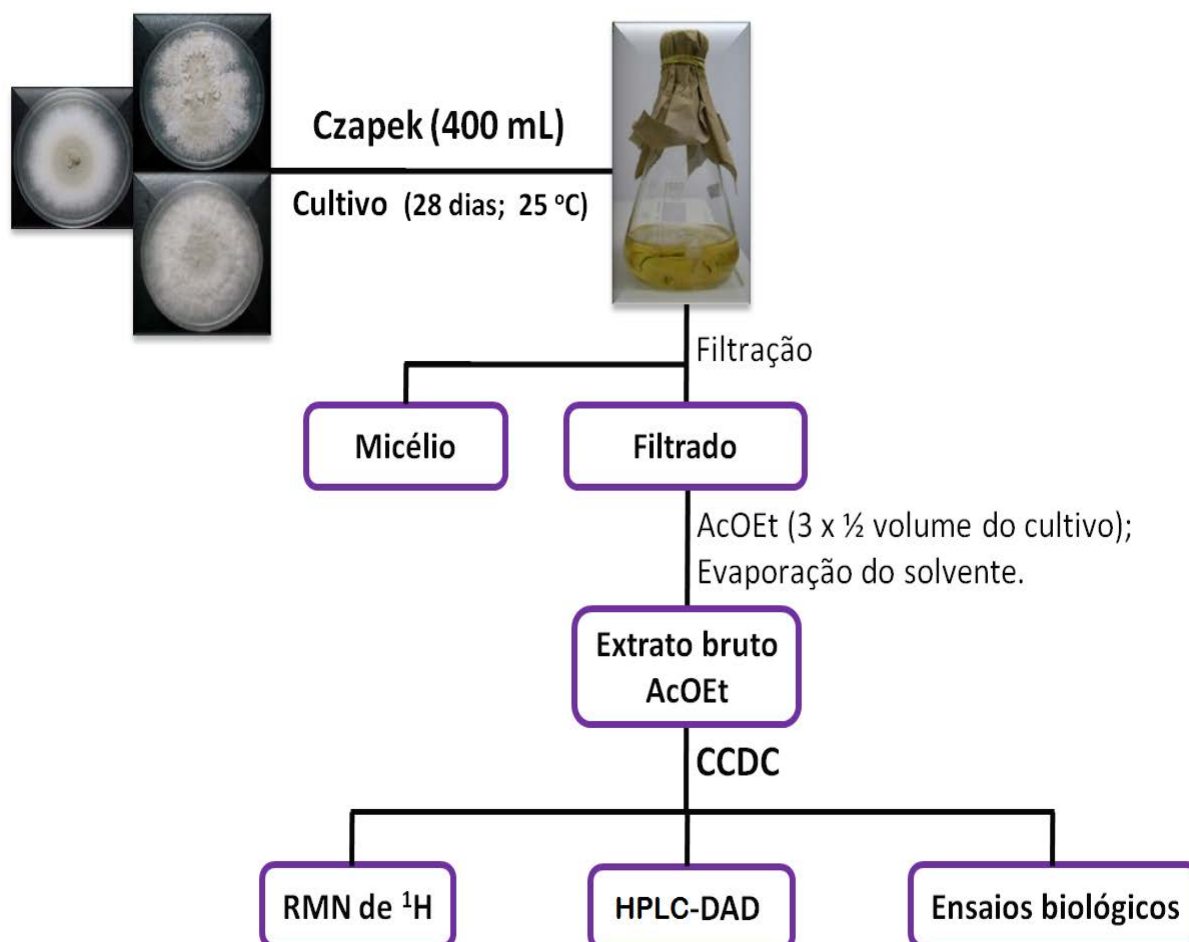
Os fungos endofíticos isolados do caule, folha e frutos foram repicados para placas de Petri contendo BDA e incubados por 7 dias. A seguir cada fungo foi inoculado em 2 frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio de cultivo Czapek, preparado na concentração de 35 g L⁻¹, os quais foram mantidos sobre a bancada a 25°C por 28 dias, com agitações manuais a cada 24 horas. Após esse período o caldo foi separado do micélio por filtração. O caldo fermentado foi submetido a uma partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 200 mL) e concentrado, fornecendo o extrato bruto AcOEt de cada fungo (**Fluxograma 1**, pág. 36).

Os extratos brutos foram submetidos a avaliação química, por CCDC utilizando placas de sílica gel e fase móvel [Hex:AcOEt (3:7 v/v)], HPLC-DAD e RMN de ^1H .

O perfil cromatográfico obtido em equipamento de HPLC-DAD foi realizado em gradiente exploratório, utilizando como fase estacionária uma coluna analítica Phenomenex (tipo Gemini, C18) e eluição em gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (95:05 v/v a 0:100% em 40 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 min.), com uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Os extratos brutos AcOEt foram submetidos a avaliação antitumoral (**Tabela 1**, pág. 37) para verificar o potencial biológico de cada fungo.

Fluxograma 1- Obtenção e triagem dos extratos brutos obtidos de *E. jambolana*



*Processo realizado pela Doutoranda Vanessa Mara Chapla.

Tabela 1- Resultado do ensaio antitumoral dos endófitos isolados de *E. jambolana*

Amostra	SF- 295		OVCAR		HCT-116	
Identificação	GI% (média)	DPM	GI% (média)	DPM	GI% (média)	DPM
Ej- c (05)	11,38%	6,81%	23,43%	5,02%	5,38%	4,50%
Ej- c (03)	12,68%	8,65%	22,08%	1,67%	5,93%	1,80%
Ej- c (04)	100,74%	0,18%	99,75%	0,12%	98,82%	0,00%
Ej- f (01)	20,49%	8,53%	15,49%	13,63%	7,47%	7,98%
Ej- f (02)	19,01%	7,30%	23,35%	1,79%	9,25%	18,85%
Ej- c (01)	14,24%	8,90%	23,01%	3,94%	-1,35%	27,15%
Ej- f (03)	76,10%	1,53%	59,01%	3,47%	69,70%	0,64%

*Processo realizado pela Doutoranda Vanessa Mara Chapla.

Após análise dos resultados deste ensaio o fungo endofítico codificado como Ejc-04 foi selecionado para ser estudado devido a sua promissora atividade antitumoral.

3.3.2 Classificação do fungo endofítico

Saccharicola sp. foi isolado da espécie *Eugenia jambolana* coletada na cidade de Araraquara-SP e identificado, por taxonomia molecular, pela funcionária Fabiana F. Garboggini do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) em Paulínia-SP, e depositado na micoteca do NuBBE com o código Ejc-04.

3.3.3 Escolha do meio de cultivo*

Saccharicola sp. foi cultivado em 3 meios líquidos, Czapek, Yeast Medium (YM) e Extrato de Malte (EM) e 2 meios sólidos, Milho e Arroz, a fim de verificarmos a sua produção metabólica nos diferentes meios de cultivo.

Após obtenção de todos os extratos brutos, estes foram enviados para ensaio antitumoral onde pudemos observar que os meios EM, YM, Milho e Arroz apresentaram

uma promissora atividade antitumoral (**Tabela 2**, pág. 38), sendo escolhido para continuidade desse trabalho o meio líquido EM.

Tabela 2- Resultado do ensaio antitumoral dos diferentes meios de cultivo

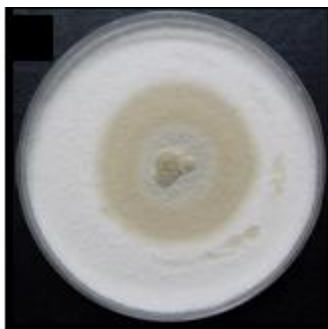
Amostra	SF- 295	DPM	OVCAR	DPM	HCT-116	DPM
Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
Ssp. CZAPEK	9,45%	3,15%	4,44%	7,99%	14,91%	5,70%
Ssp. EM	91,66%	0,79%	98,37%	0,39%	32,49%	9,86%
Ssp. YM	89,30%	3,21%	98,37%	0,19%	47,69%	5,39%
Ssp. ARROZ	77,80%	5,44%	98,91%	0,77%	71,59%	13,96%
Ssp. MILHO	93,42%	0,92%	99,66%	0,10%	94,85%	0,18%

*Variação do meio de cultivo foi realizado pelo aluno de iniciação André Iagalo.

3.3.4 Cultivo do fungo endofítico *Saccharicola* sp. e obtenção do extrato bruto.

Saccharicola sp. preservado em “slants” foi repicado em placas de Petri contendo meio YM (**Figura 07**, pág. 39) e incubado por quinze dias a 25°C. O cultivo em meio líquido (**Figura 08**, pág. 39) foi realizado em frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 6g de Extrato de Malte e 300 mL de água cada (num total de 16 frascos de Erlenmeyer). Estes meios foram autoclavados à temperatura de 121 °C, por 40 minutos. Após resfriamento os meios foram inoculados com o endófito e incubados a 25 °C em modo estático por 28 dias. Terminado o período de incubação, as culturas foram filtradas, e o caldo fermentado foi particionado com AcOEt (3 x 1L), em seguida o solvente foi evaporado fornecendo o extrato AcOEt.

Figura 07- *Saccharicola* sp.



Fonte: A autora

Figura 08- Crescimento do fungo endofítico *Saccharicola* sp. em meio líquido.

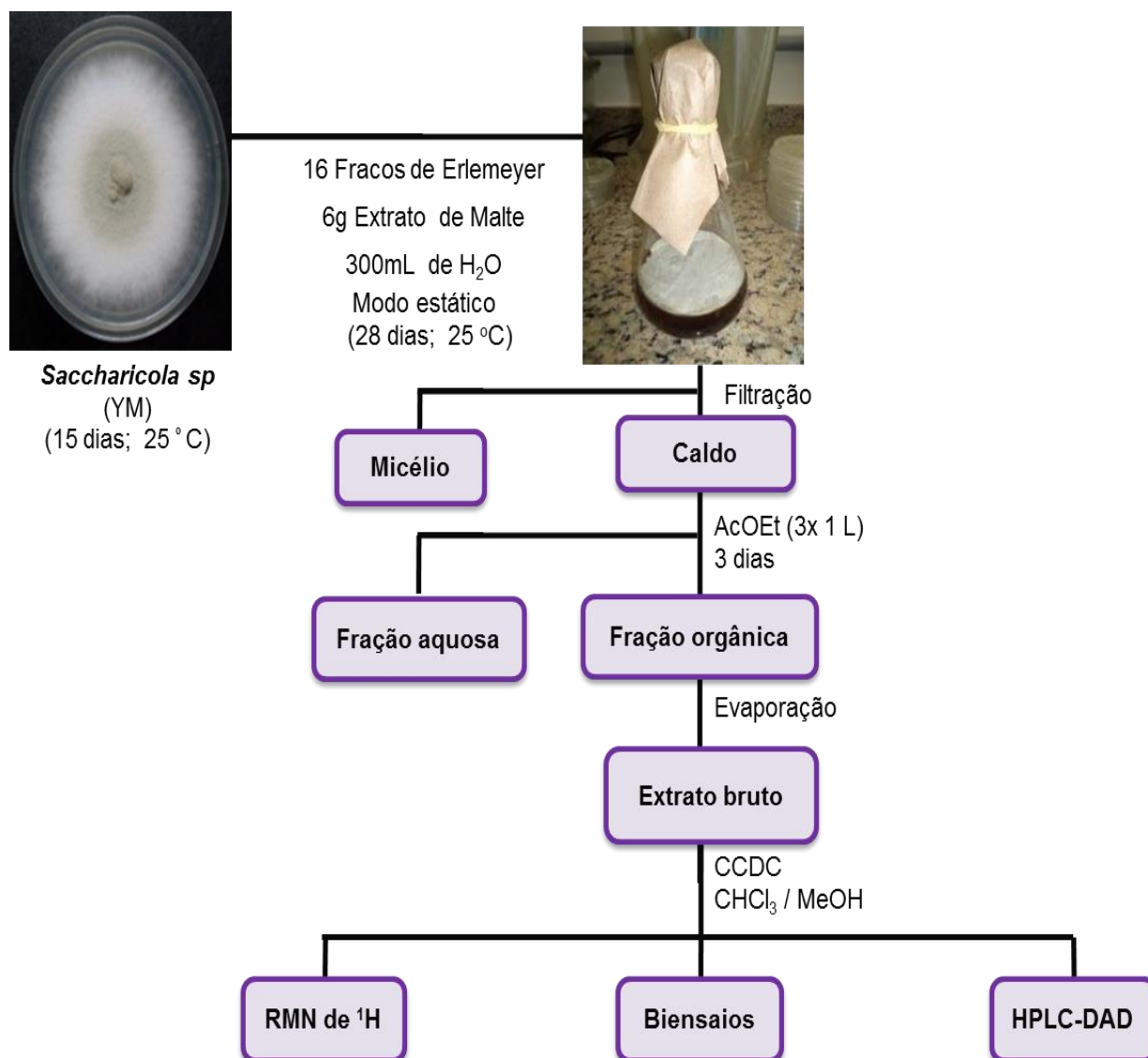


Fonte: A autora

3.3.5 Crescimento do endófito e obtenção dos extratos brutos para avaliação do perfil químico e biológico e isolamento dos metabólitos secundários.

O cultivo em meio líquido foi realizado duas vezes de acordo com o **Fluxograma 2** pág. 40, fornecendo os extratos brutos codificados Ssp-AcOEt-1(1,4g) e Ssp-AcOEt-2 (1,2g).

Fluxograma 2– Metodologia de obtenção do Extrato bruto Ssp-AcOEt-1 e Extrato bruto Ssp-AcOEt-2 para avaliação do perfil químico e biológico



Fonte: A autora

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

Os extratos brutos foram enviados para análise das atividades antifúngica frente a fungos fitopatogênicos, antitumoral e anticolinesterásica.

3.3.6 Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1 produzido por *Saccharicola* sp. em extrato de malte.

O extrato bruto Ssp-AcOEt-1 obtido do fungo endofítico *Saccharicola* sp. foi analisado por HPLC-DAD e posteriormente fracionado em CC utilizando sílica gel de fase normal como fase estacionária e como eluentes AcOEt/Hexano e MeOH/AcOEt em gradiente de polaridade de acordo com o **Fluxograma 3**, pág. 42.

As frações obtidas foram analisadas por CCDC para avaliar o grau de pureza e após união das frações iguais estas foram analisadas por RMN de ^1H e HPLC-DAD para avaliação do perfil químico, utilizando coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL/min. em vários comprimentos de onda.

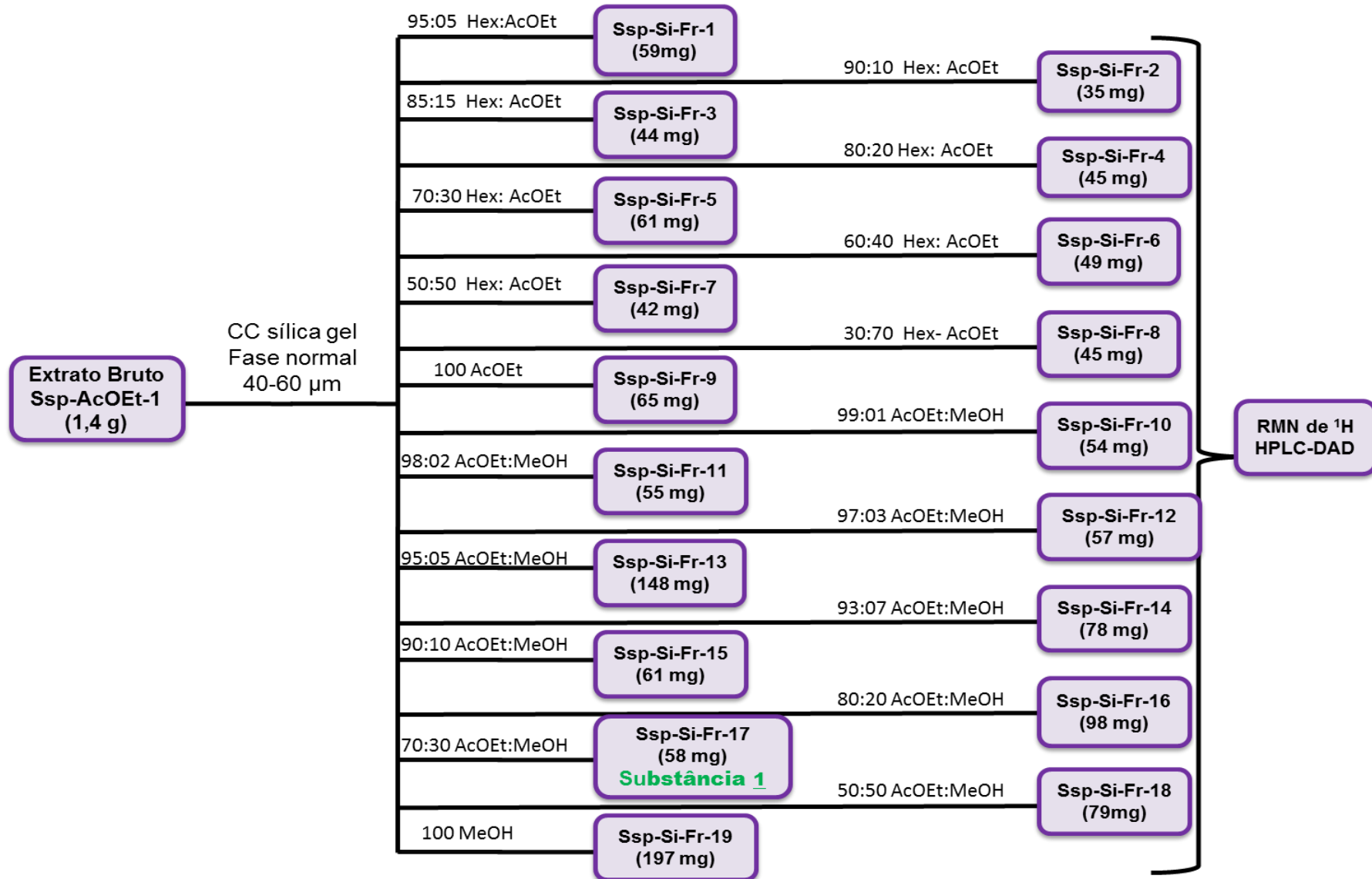
As dezenove frações obtidas do fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1 foram codificadas como Ssp-Si-Fr1 a Ssp-Si-Fr19 e analisadas por RMN de ^1H e CCDC utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:05), utilizando como revelador luz ultra-violeta nos comprimentos de onda λ 254 e 366nm e analisado, seguido de aquecimento.

3.3.7 Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-2 produzido por *Saccharicola* sp. em extrato de malte (Fluxograma 3).

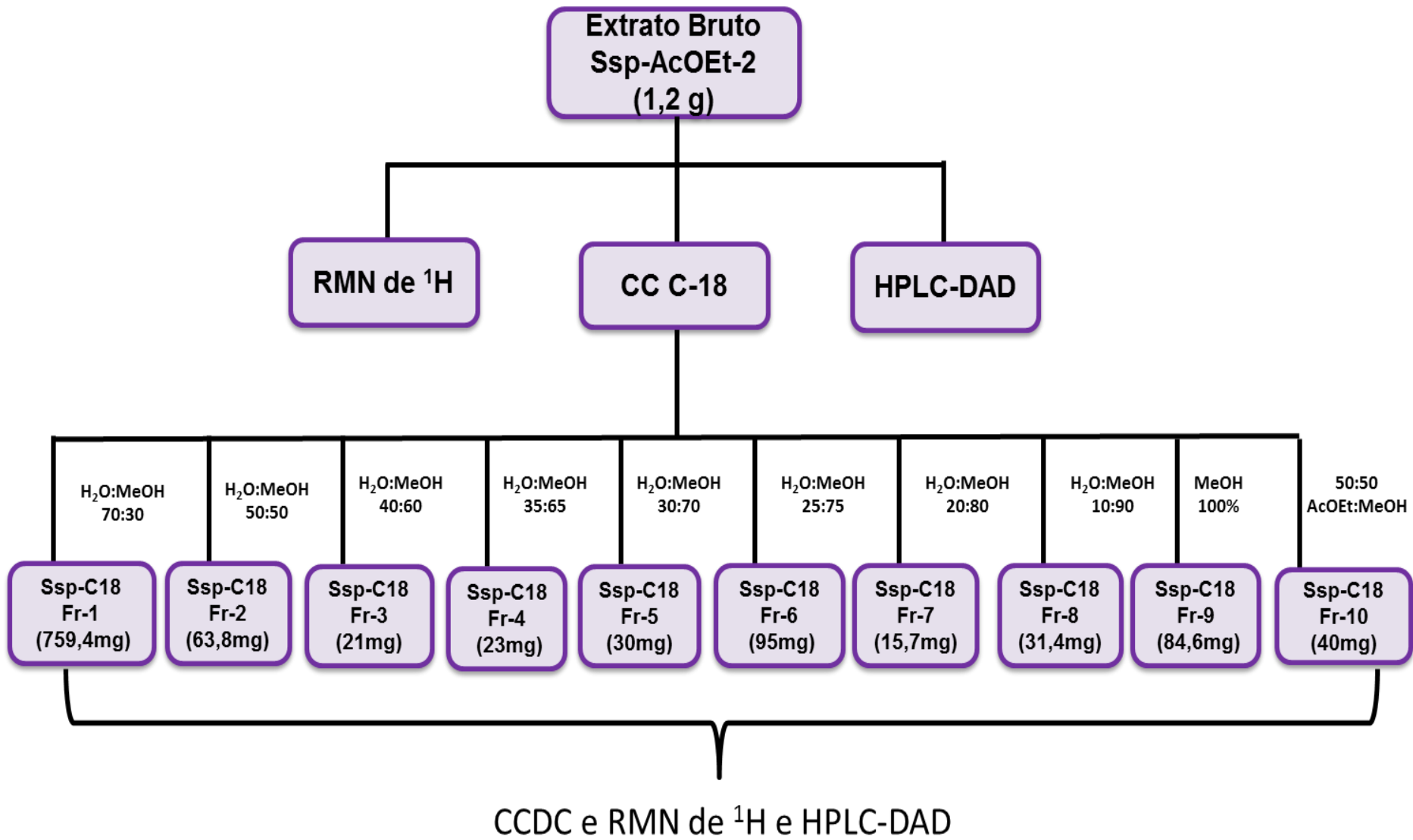
O extrato bruto Ssp-AcOEt-2 foi analisado por HPLC-DAD e posteriormente fracionado em CC utilizando sílica de fase reversa C-18 como fase estacionária e como eluentes $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ e MeOH/AcOEt em gradiente de polaridade de acordo com o **Fluxograma 4**, pág. 43.

As dez frações obtidas foram codificadas como Ssp-C18-Fr1 a Ssp-C18-Fr10 e analisadas por CCDC para avaliar o grau de pureza e analisadas por RMN de ^1H e HPLC-DAD para avaliação do perfil químico, utilizando coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL/min. em vários comprimentos de onda.

Fluxograma 3 - Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1



Fluxograma 4 - Fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-2



3.3.8 Purificação das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto Ssp-AcOEt-1 produzido por *Saccharicola* sp.

3.3.8.1 Purificação da fração Ssp-Si-Fr-17

Análise desta fração por CCDC indicou tratar-se de uma substância pura, sendo confirmada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e HPLC-DAD, fornecendo a substância **1**. A substância foi enviada para ensaios antitumoral, anticolinesterásico, antifúngico, tripanocida e antituberculose.

3.3.8.2 Purificação da fração Ssp-Si-Fr-13

A fração Ssp-Si-Fr-13 foi analisada por CCDC para avaliar o grau de pureza e a polaridade da substância majoritária e posteriormente submetida à cromatografia em coluna, onde utilizou-se sílica gel como fase estacionária e eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ em gradiente de polaridade. Foram coletadas dez subfrações, codificadas como Ssp-Si-Fr13-1 a Ssp-Si-Fr13-10 como visualizado na **Fluxograma 5**, pág. 46.

Estas foram analisadas por RMN de ^1H e CCDC utilizando uma série de eluentes, e anisaldeído seguido de aquecimento como revelador. Após esta análise, verificou-se que a subfração Ssp-Si-Fr13-8 e Ssp-Si-Fr13-9 apresentavam-se puras. Estas foram analisadas por CCDC onde observou-se tratar da mesma substância. Esta foi submetida à análise de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, HPLC-DAD e EM para auxiliar na determinação estrutural, fornecendo a substância **2**.

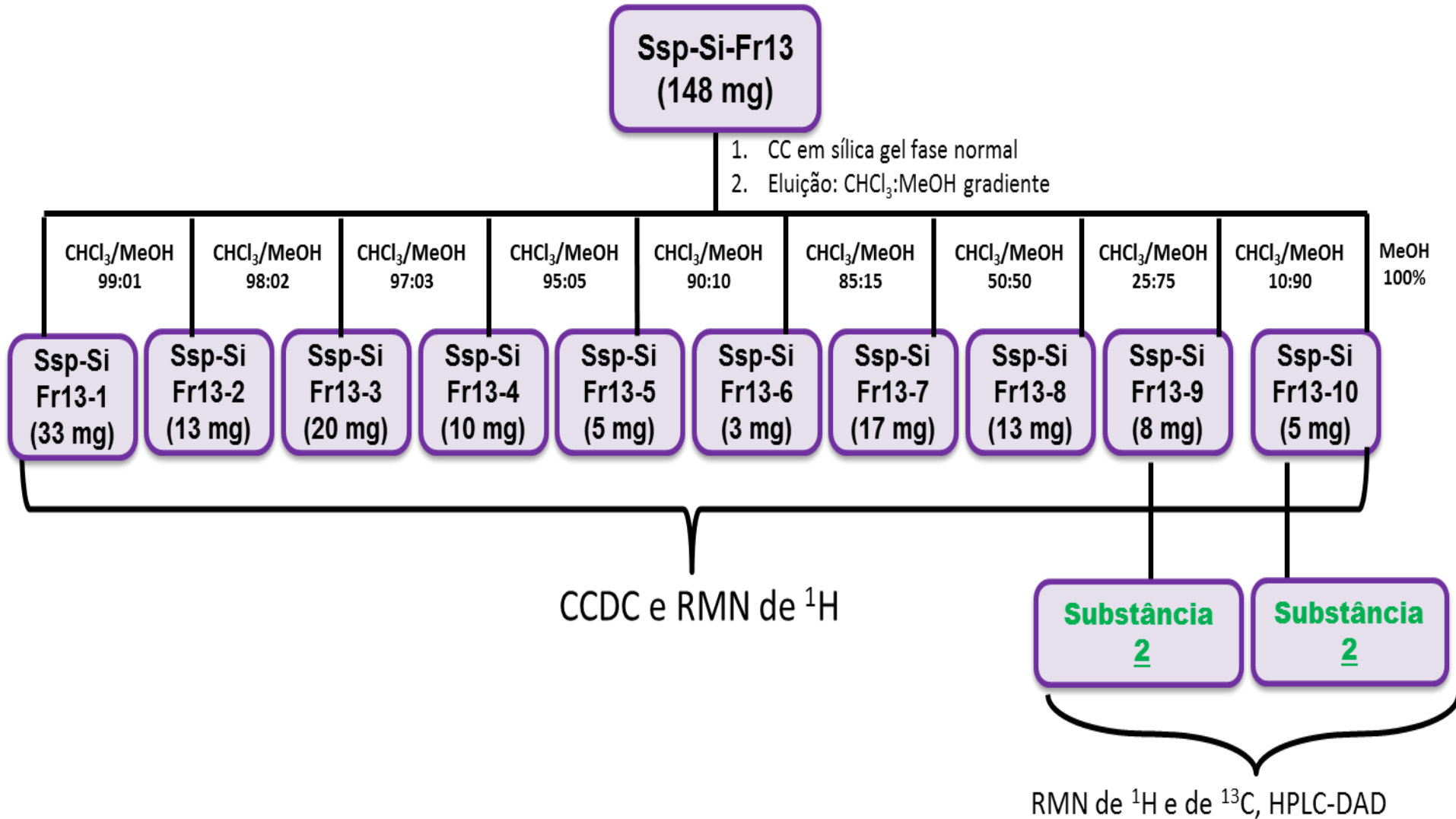
3.3.9 Purificação das frações obtidas do fracionamento do Extrato Bruto Ssp-AcOEt-2 produzido por *Saccharicola* sp..

3.3.9.1 Purificação da fração Ssp-C18-Fr1

A fração Ssp-C18-Fr1 foi analisadas por CCDC para avaliar o grau de pureza e a polaridade das substâncias majoritárias. Em seguida foi submetida à CC sob pressão, onde utilizou-se como fase estacionária sílica de fase reversa C18 e eluentes $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ em gradiente. Foram obtidas nove subfrações (Ssp.C18-Fr1-1 a Ssp-C18-

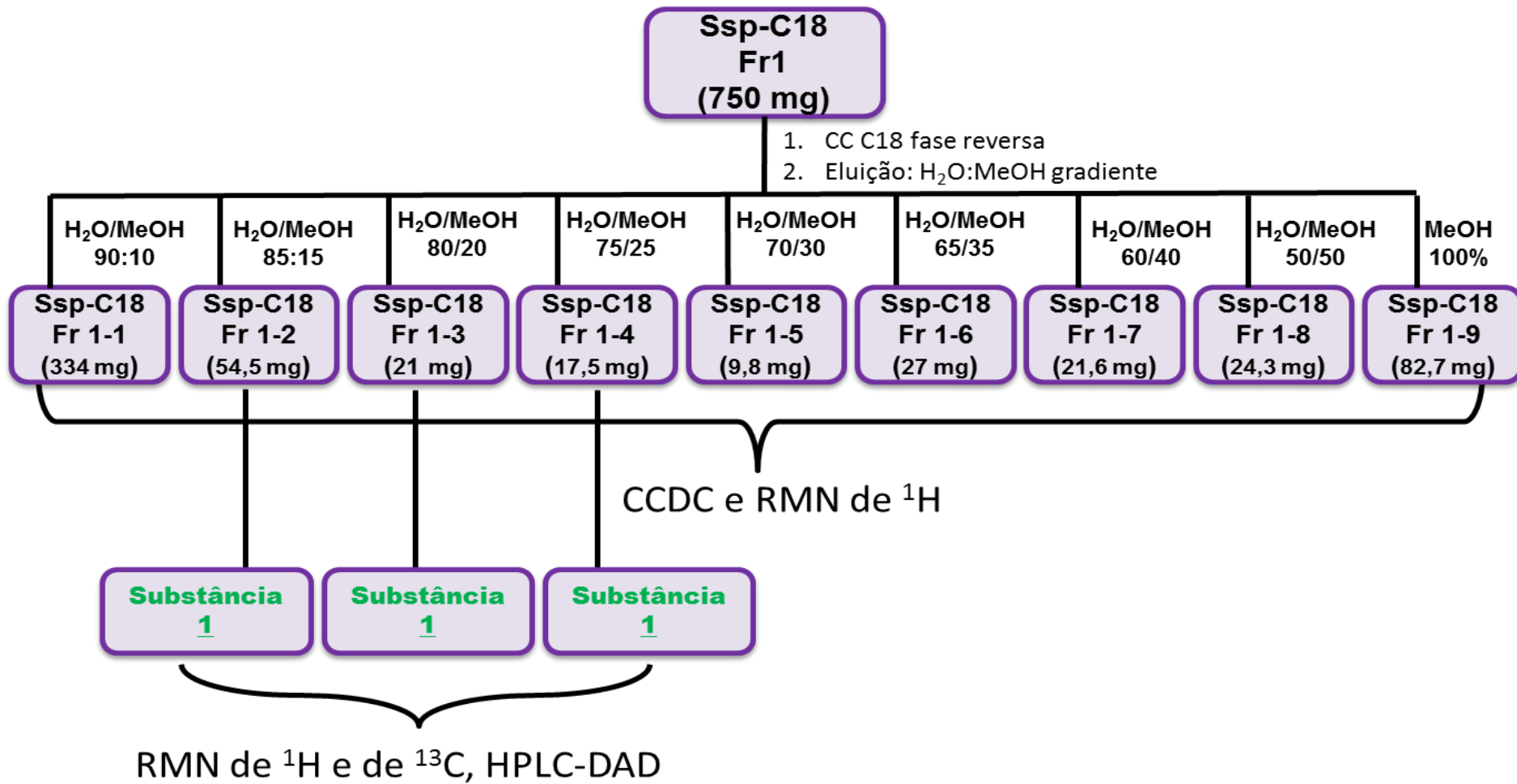
Fr1-9) como visualizado na **Fluxograma 6**, pág. 47. Estas foram analisadas por RMN de ^1H e CCDC utilizando uma série de eluentes, e anisaldeído seguido de aquecimento como reveladores. Após esta análise verificou-se que as subfrações Ssp-C18-Fr1-2, Ssp-C18-Fr1-3 e Ssp-C18-Fr1-4 apresentaram-se puras. Estas foram submetidas a análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e EM para auxiliar na determinação estrutural, no entanto após determinação estrutural concluímos tratar-se de apenas uma substância com mesma estrutura da substância isolada da fração Ssp-Si-Fr17 codificada **1**.

Fluxograma 5 - Fracionamento da Fração Ssp-Si-Fr8



Fonte: A autora

Fluxograma 6- Fracionamento cromatográfico de Ssp-C18-Fr1.



3.10 Análises químicas e avaliação do perfil químico do extrato bruto AcOEt de *Saccharicola* sp.

O extrato AcOEt obtido do fungo endofítico *Saccharicola* sp. foi submetido à análises químicas utilizando as seguintes técnicas:

3.10.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

Esta técnica tem o objetivo de estabelecer condições primárias de separação cromatográfica, obtendo indícios da natureza química das substâncias presentes no extrato.

As análises do extrato AcOEt realizadas por CCDC foram otimizadas utilizando sílica de fase normal e fase reversa (C18) como fases estacionárias e misturas binárias dos solventes AcOEt, Hex, CH₃OH e CHCl₃ para a seleção da fase móvel. O sistema que apresentou melhor separação e resolução cromatográfica foi sílica de fase normal como fase estacionária e eluição com CHCl₃:CH₃OH (90:10 v/v).

3.10.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).

A submissão do extrato AcOEt à HPLC-DAD foi importante para se verificar a adequação desta técnica cromatográfica ao trabalho experimental, e também contribuir para o conhecimento da natureza química das substâncias presentes, auxiliando na escolha das fases móveis para separação em CC.

Nas análises do perfil químico do extrato AcOEt realizadas por HPLC-DAD, as amostras foram submetidas à eluição em gradiente exploratório com coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C18) e eluição em gradiente H₂O/CH₃OH (95:05/0:100) por 40min., permanecendo nesta condição por mais 10min., com fluxo de 1,0 mL/min. e λ de 254nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda.

3.10.3 Análise por RMN de ^1H .

O objetivo desta técnica é a obtenção de indícios sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos pelo endófito no extrato AcOEt.

Para obtenção dos espectros de RMN de ^1H do extrato AcOEt, as amostras foram submetidas à análise utilizando DMSO- d_6 como solvente.

3.11 Avaliação do perfil biológico dos extratos, frações e substâncias puras obtidos de *Saccharicola* sp.

As análises biológicas realizadas para os extratos AcOEt, frações oriundas do fracionamento e as substâncias puras obtidas do cultivo em Extrato de Malte do endófito *Saccharicola* sp. foram:

3.11.1 Avaliação da atividade antifúngica.

Diversas doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são causadas por fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente. Esse fato associado a quantidade de metabólitos diferentes isolados de plantas e micro-organismos tem incentivado pesquisas na busca de novas substâncias antifúngicas de origem natural (CARDOSO,2003).

Considerando esta necessidade e a ecologia química relacionada com os fungos endofíticos que habitam ambientes propícios ao ataque de fitopatógenos, foram realizados ensaios da atividade antifúngica com os extratos brutos, frações e substâncias puras produzidas pelo endófito *Saccharicola* sp.

Os ensaios de atividade antifúngica foram desenvolvidos no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal, sob supervisão da Dra. Maria Claudia Marx Young.

A atividade antifúngica foi determinada por bioautografia pela nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos mL^{-1} em solução de glicose e sais) em placas de CCDC contendo as frações de interesse, previamente eluídas com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas, na ausência de luz. Após este período verificou-se a presença de halos de inibição do crescimento dos fungos, em comparação com o padrão positivo nistatina $1\mu\text{g}$ (RAHALISON, 91).

3.11.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa, progressiva, que causa comprometimento da memória, dificuldade no raciocínio e alterações comportamentais. De todas as alternativas terapêuticas possíveis, as mais eficientes disponíveis no mercado funcionam corrigindo uma deficiência de acetilcolina no processo sináptico (TABARRINI, 2001).

Com o crescente impacto da doença de Alzheimer e os poucos agentes terapêuticos seguros, há uma grande procura por substâncias potencialmente ativas.

A partir disso os extratos brutos, frações e substâncias puras produzidas pelo endófito *Saccharicola* sp foram testados a fim de avaliar a possível potencialidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Os ensaios de atividade anticolinesterásica foram desenvolvidos no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal, sob supervisão da Dra. Maria Claudia Marx Young.

O ensaio qualitativo e quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD) consiste na eluição de uma cromatoplaça da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), galantamina. As amostras e o controle foram aplicados em placas de sílica com eluente adequado [CHCl₃:CH₃OH (9:1)], objetivando encontrar a menor quantidade inibidora da AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66U) (**solução A**). A placa cromatográfica foi incubada em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a (**solução D**) (MARSTON et al., 2002).

O aparecimento de manchas brancas sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Soluções:

- ✓ **Solução A:** Acetilcolinesterase (1000U, Sigma, produto n° C2880) foi dissolvida em 150mL do tampão Tris-HCl (0,05M; pH=7.9), a solução estoque e foi armazenada a 4°C e no momento do uso foi adicionado 0,1% de albumina de soro bovino;
- ✓ **Solução B:** 250mg de acetato de 1-naftila em 100mL de etanol;
- ✓ **Solução C:** 400mg do sal Fast Blue B em 160mL de água destilada;
- ✓ **Solução D:** mistura de 10mL da solução B + 40mL da solução C.

3.11.3 Avaliação da Atividade Antitumoral

Os ensaios antitumorais foram desenvolvidos no Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de screening do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As substâncias previamente diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 10 mg/mL e adicionadas à placa de 96 poços (50 µg/mL - 100 µL/poço) usando sistema automatizado de plaqueamento (High Throughput Screening). O quimioterápico doxorubicina (Dox) foi usado como controle positivo na concentração de 0,3 µg/mL. Após um período de incubação de 69 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 µL de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO₂ por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e precipitado foi ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por 10 min até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm.

As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37^oC e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 10 mg/mL.

As substâncias foram testadas em duplicata. Os valores dos resultados e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

3.11.4 Avaliação da atividade Tripanocida utilizando MTT

Atualmente, cerca de 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina estão infectadas com o protozoário do gênero *Trypanosoma*, causador da doença de Chagas, transmitida pelo inseto barbeiro. A terapêutica continua parcialmente ineficaz, apesar dos esforços de pesquisadores. Na literatura atual, encontram-se investigações sobre a atividade tripanocida com uma grande variedade de produtos naturais (CICARELLI, 2010).

Os ensaios Tripanocida utilizando MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio), foram desenvolvidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara-SP, sob supervisão da Profa Dra. Regina Maria Cicarelli.

Após observação de ausência de contaminação na cultura de *T. cruzi*, os parasitas foram tratados como descrito a seguir, para contagem em câmara de Neubauer para leitura em microscópio óptico comum.

Em um tubo de 1,5 mL, adicionou-se:

- ✓ **Solução A:** 0,5 µL de formol
- ✓ **Solução B:** 19 µL de meio de cultura
- ✓ **Solução C:** 1 µL de parasita (diluição 1:20)

Obs.: o formol tem a finalidade de imobilizar os parasitos para facilitar sua contagem.

Para substâncias puras, iniciou-se com uma diluição de 5 mg/ml, colocada no poço H: 10 µL 20mg/ml (estoque) + 30 µL DMSO.

Adicionar 3 µL de cada uma das concentrações nos poços da nova placa em triplicatas (fileiras A a G, colunas 1 a 6). Em seguida, adiciona-se 97 µL de meio de cultura contendo parasitas nas colunas 1, 2 e 3 e apenas meio de cultura nas colunas 4, 5 e 6 (controle). A fileira H serve como controle: colunas 1 a 3, contendo somente parasitas, sem substância; e 4 a 6, somente meio de cultura, sem substâncias.

A seguir, incuba-se as placas em câmara úmida a 28°C (BOD) por 72 horas. Após este período adiciona-se 10µL de solução MTT + PMS por orifício (2,5mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS), repetindo-se a incubação por mais 1h15min ao abrigo da luz, seguido da adição de 100 µL de solução SDS 10%/HCl 0,01M para dissolver os cristais de formazana; incuba-se por mais 30 min.

A leitura da Densidade Óptica (DO) é realizada em leitor de Elisa (BioRad) a 595 nm. Com as absorbâncias obtidas elabora-se gráficos para determinação da CI50 (concentração que mata 50% dos parasitas).

3.11.5 Avaliação da atividade anti-tuberculose

A tuberculose, chamada antigamente de "peste cinzenta" (HARAKI, 2010), conhecida também em português como tísica pulmonar (BUENO, 2010) ou "doença do peito", é uma das doenças infecciosas documentadas desde mais longa data e que continua a afligir a Humanidade nos dias atuais.

Essa doença é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como *bacilo de Koch*.

Os ensaios do REMA (Resazurin Microtiter Assay) foram desenvolvidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara-SP, sob supervisão do Prof Dr. Fernando Rogério Pavan.

Para o ensaio do REMA foi utilizado como substância reveladora a Resazurina na concentração de 0,01% em água destilada estéril, que possui potencial REDOX (Óxido-Redução), com mudança colorimétrica e um indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular (PAVAN, 2009).

A cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv - ATCC 27294 foi utilizada na técnica do REMA, para determinar CIM (Concentração Inibitória Mínima) de todas as amostras analisadas. A cultura bacilar foi mantida congelada a -80° C até o momento do uso.

Na coluna 12 de uma microplaca estéril de 96 orifícios foi depositado 200 μ L de água destilada estéril, para evitar a desidratação do meio de cultura no ensaio durante a incubação na estufa. A substância testada foi diluída em DMSO, obtendo solução estoque de 10 mg/mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas destas soluções na própria microplaca, de maneira a se obter concentrações variáveis de rifampicina (fármaco controle) (de 1 a 0,03 μ g/mL) e da substância testada (de 25 μ g/mL a 0,09 μ g/mL). O primeiro orifício da microplaca contendo cada composto a ser analisado foi utilizado para controle de contaminação do composto. Neste orifício foi adicionado apenas o meio de cultura e a amostra na diluição de 1/4, onde espera-se não haver crescimento de nenhuma espécie bacteriana. A cepa de *M. tuberculosis* H37RV ATCC 27294 congelada foi utilizada no início do ensaio na concentração de 10^5 UFC/mL para que no final do experimento fosse obtido população de 10^7 UFC/mL. 100 μ L da diluição de 10^5 UFC/mL foi inoculada em cada um dos orifícios contendo a substância em análise e a rifampicina. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37°C. Após sete dias de incubação foi adicionado no orifício de controle de cepa micobacteriana e no orifício de controle de meio, o volume de 30 μ L da resazurina 0.01% (PAVAN, 2009).

Leitura da placa foi feita no aparelho SpectraFluor PLUS (tecan) com filtros de excitação e emissão de 530nm e 590nm.

A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de *M. tuberculosis*. A porcentagem de inibição da multiplicação bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle-positivos (orifícios apenas com bactéria e meio de cultura) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado (PAVAN, 2009).

$$100 \times (1 - b/a) = \% \text{ de Inibição da Multiplicação Bacteriana.}$$

4 Resultados e Discussão

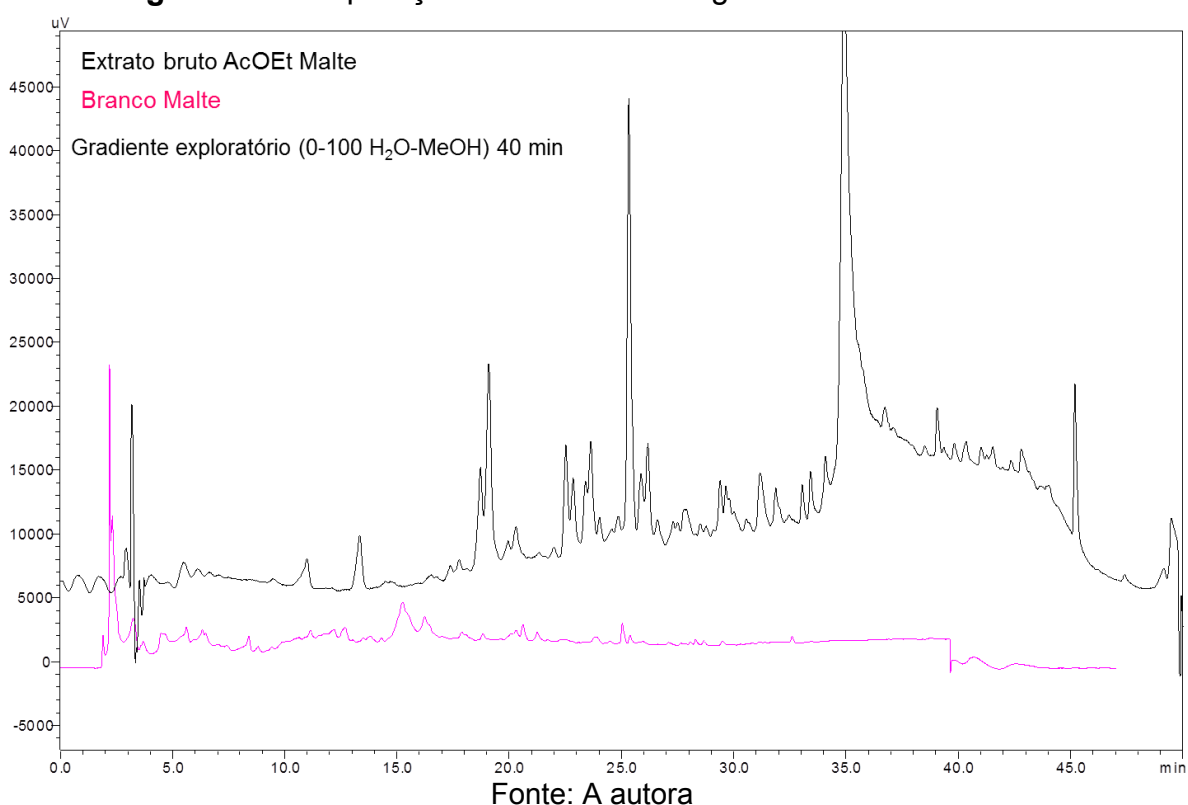
4.1 Análise do extrato AcOEt obtido do cultivo em Extrato de Malte do fungo endófito *Saccharicola* sp. por HPLC-DAD.

O extrato AcOEt foi submetido à análise do perfil químico por HPLC-DAD para verificar a adequação desta técnica cromatográfica no trabalho experimental e, também contribuir para uma avaliação prévia da natureza química das substâncias presentes.

No cromatograma obtido em gradiente exploratório foi observada uma grande variedade metabólica, com bandas cromatográficas com diferentes tempos de retenção, variando de média a alta polaridade. O estudo dos tempos de retenção nos auxiliaram na escolha das condições da fase móvel para o fracionamento por CC usando sílica comum para o extrato bruto Ssp-AcOEt 1 e de fase reversa (C-18) para o extrato bruto Ssp-AcOEt 2.

Uma comparação entre o cromatograma do extrato bruto e o obtido do branco (Figura 09, pág. 55) revelou que a variedade dos sinais corresponde somente aos metabólitos produzidos pelo fungo, uma vez que o cromatograma do branco apresentou picos não coincidentes com os do extrato AcOEt obtido do endófito *Saccharicola* sp.

Figura 09- Comparação entre os cromatogramas obtidos em Malte



4.2 Análise do extrato AcOEt obtido em Extrato de Malte por RMN de ^1H .

O extrato AcOEt foi submetido à análise de RMN de ^1H com o objetivo de obter indícios sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos pelo fungo endofítico.

De um modo geral, o espectro de RMN de ^1H evidenciou sinais em uma ampla faixa espectral demonstrando a presença de substâncias aromáticas, sinais de hidrogênios carbinólicos, metílicos, metilênicos, metínicos, entre outros. A diversidade de sinais ressalta a grande diversidade química do extrato AcOEt produzido pelo fungo endofítico *Saccharicola* sp.

4.3 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt obtido em malte de *Saccharicola* sp. e obtenção das substâncias puras

Após análise por HPLC-DAD, o extrato Ssp-AcOEt-1 foi fracionado em CC utilizando sílica de fase normal como fase estacionária e sistema de eluição Hex:AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente, levando a obtenção de dezenove frações (Ssp-Si-Fr1 a Ssp-Si-Fr19). O extrato bruto Ssp-AcOEt-2 foi fracionado em CC sob pressão, utilizando sílica de fase reversa (C-18) como fase estacionária e sistema de eluição H_2O :MeOH em gradiente, levando a obtenção de dez frações (Ssp-C18-Fr1 a Ssp-C18-Fr10). Todas as frações foram analisadas por CCDC para avaliar o grau de pureza e em seguida foram analisadas por HPLC-DAD e por RMN de ^1H . As frações que apresentavam-se puras foram codificadas como substância **1** e substância **2** e analisadas por HPLC-DAD (**Figuras 10-11**, pág. 57) e demais técnicas espectrométricas para determinação estrutural.

Figura 10- Cromatograma da Substância 1 registrado em 228 nm.

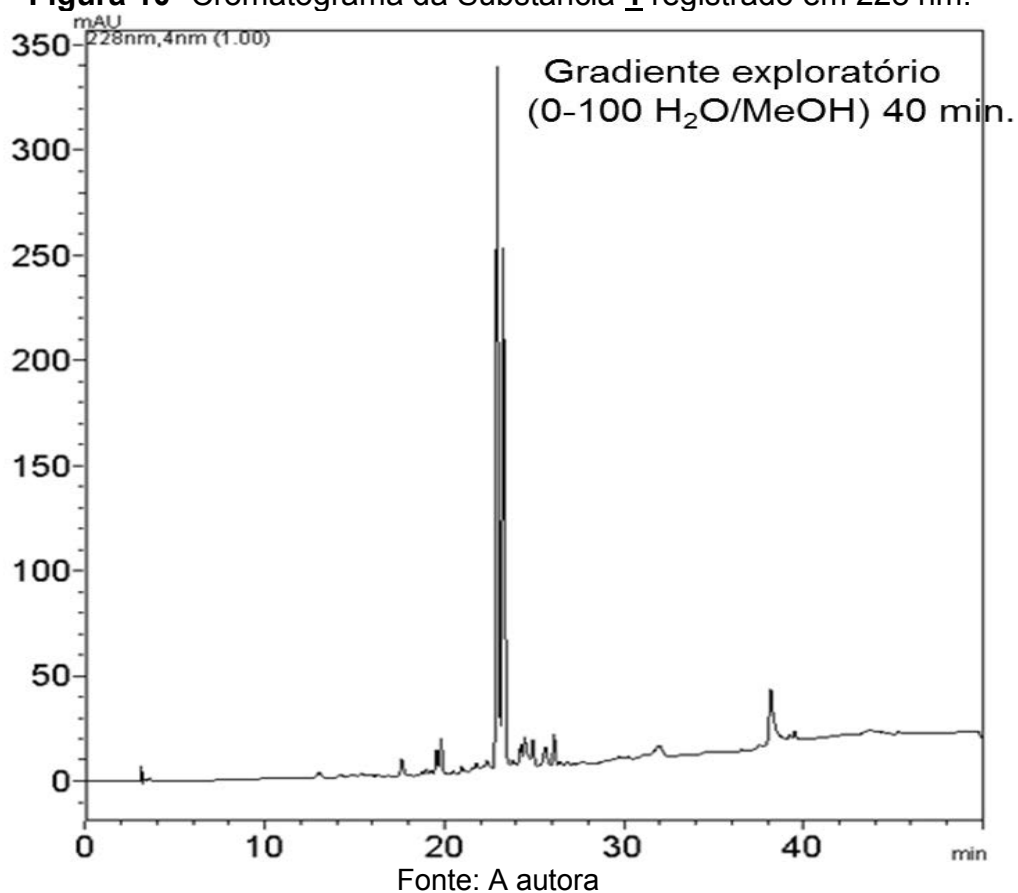
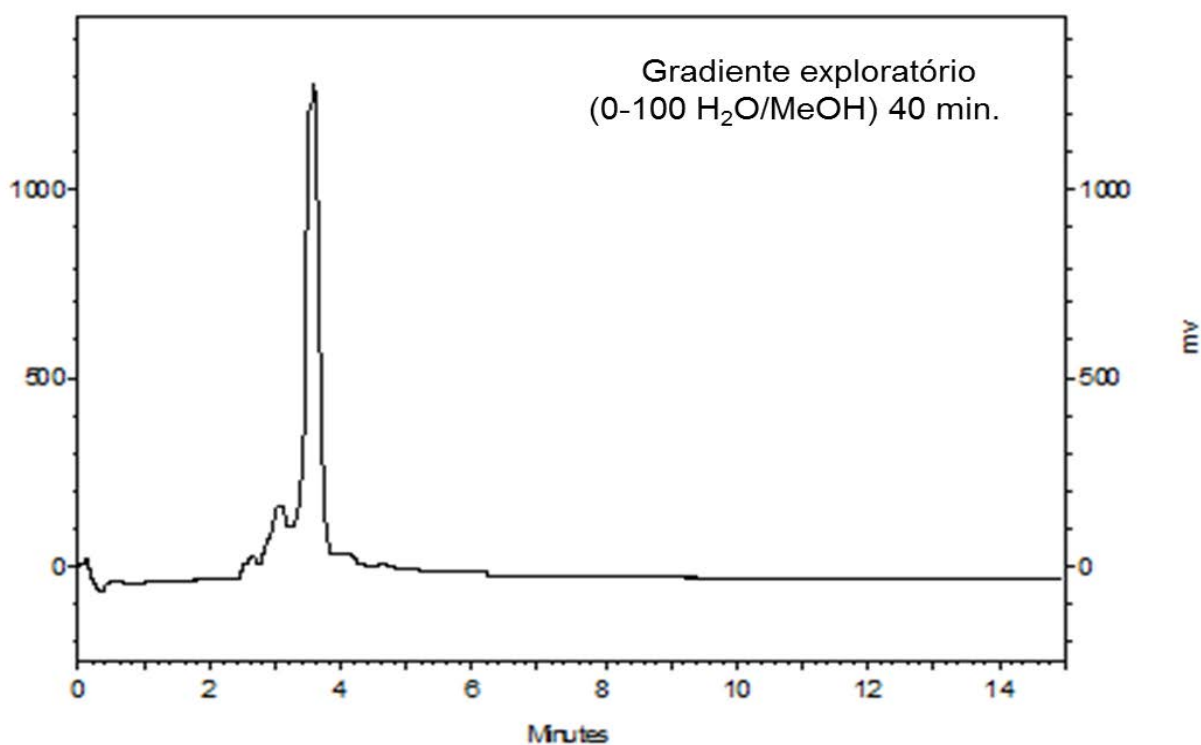


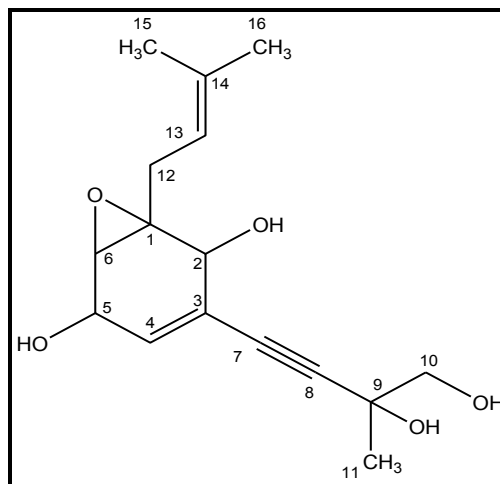
Figura 11- Cromatograma da Substância 2 registrado em 261 nm.



Fonte: A autora

4.4 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

4.4.1 Determinação Estrutural da Substância 1

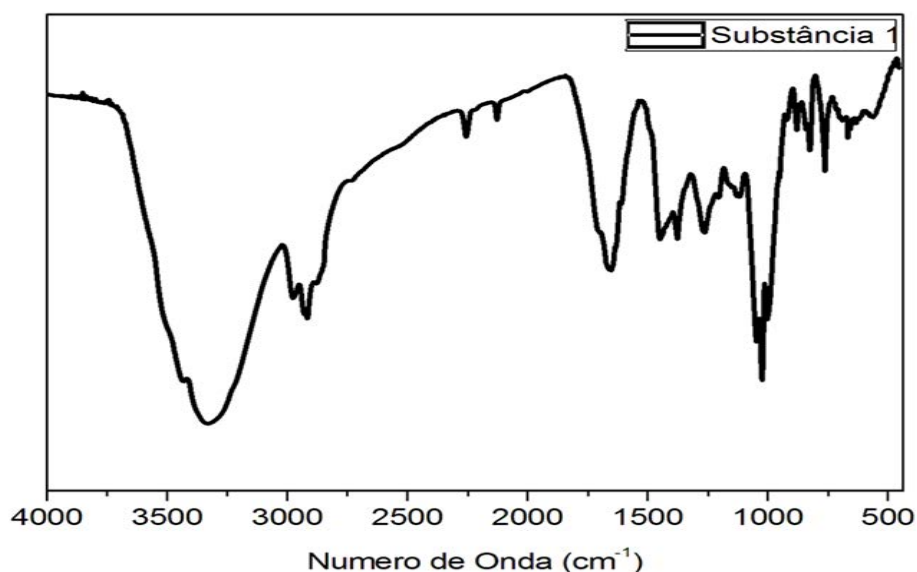


Fonte: A autora

Considerando que após um levantamento bibliográfico ter sido realizado nas bases de dados Scifinder e Web of Science e não encontrarmos a substância descrita acima, e sequer esqueleto básico parecido propomos uma numeração (que pode ser modificada) apenas para efeito de determinação estrutural.

O espectro de IV (**Figura 12**, pág. 58) exibiu uma banda larga em 3300 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda fina e fraca em aproximadamente 2150 cm^{-1} característico de uma ligação tripla, banda em 1650 cm^{-1} característico de ligação dupla e banda em 775 cm^{-1} característico de um epóxido dissustituído.

Figura 12- Espectro de IV da substância 1.



Fonte: A autora

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 13**, pág. 60) da substância **1** apresentou sinais referentes a três metilas δ_{H} 1,59 (s, H-15), δ_{H} 1,69 (s, H-16) e δ_{H} 1,30 (s, H-11) sendo duas sobre carbono sp^2 e uma sobre carbono carbinólico, cinco hidrogênios carbinólicos δ_{H} 3,13 (s, 1H, H-6), δ_{H} 4,45 (sl, 1H, H-5) e δ_{H} 3,90 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H-2) e dois hidrogênios metínicos de carbono sp^2 em δ_{H} 5,13 (t, $J=7,0\text{Hz}$, H-13) e δ_{H} 5,57 (sl, H-4).

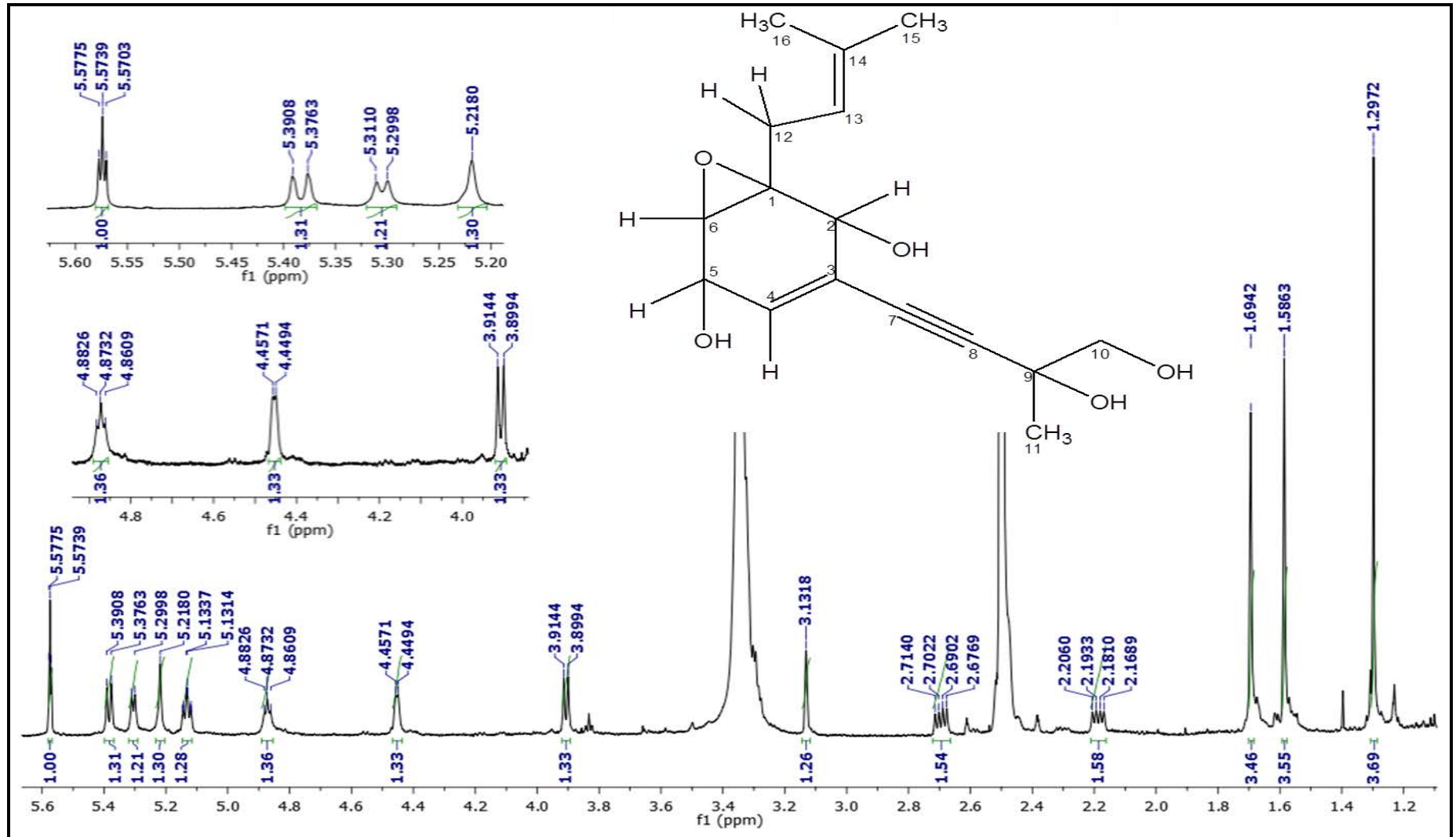
Adicionalmente, foram observados um tripleto em 4,88, um simpleto em 5,22, dois dubletos em 5,31 e 5,38, sem correlação no experimento de HSQC sendo portanto atribuídos aos hidrogênios ligados ao oxigênio nas hidroxilas OH_{10} , OH_9 , OH_5 e OH_2 respectivamente, sendo confirmados através do desaparecimento dos mesmos quando foram submetidos a análise por RMN de ^1H na presença de D_2O (**Figura 14**, pág. 61).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 15**, pág. 62) com auxílio de experimento de DEPT (**Figura 16**, pág. 63) evidenciou seis carbonos carbinólicos sendo atribuídos a três carbonos metínicos (δ_{C} 59,2, δ_{C} 64,8 e δ_{C} 67,7), um metilênico (δ_{C} 70,1) e dois quaternários (δ_{C} 61,7, δ_{C} 68,1), sendo que o observado em δ_{C} 61,7 foi atribuído ao carbono carbinólico de um epóxido.

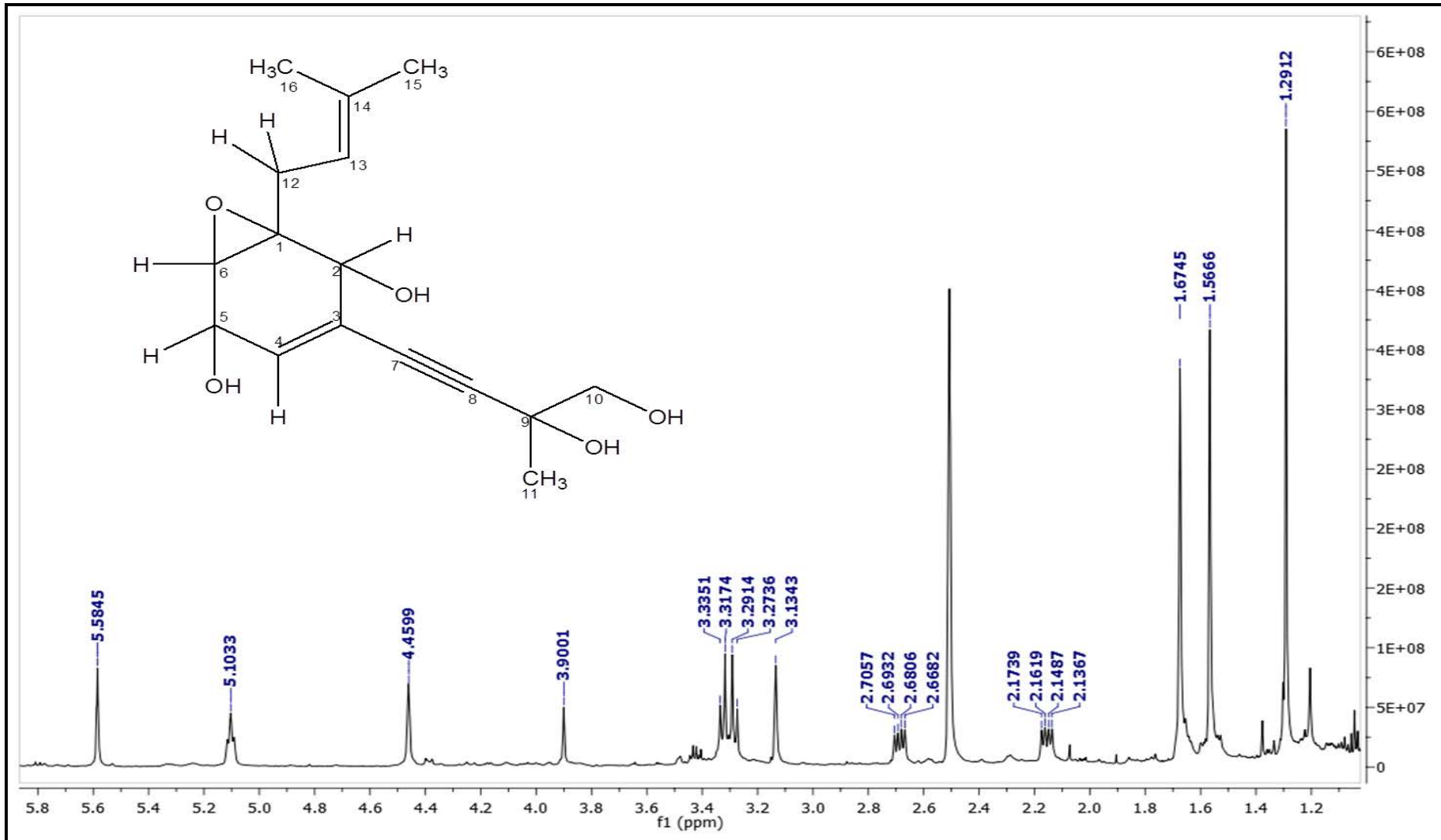
Com auxílio do experimento de HSQC (**Figura 17**, pág. 64) foi possível atribuir todos átomos de hidrogênios aos respectivos carbonos.

Na análise dos mapas de correlação no experimento de HMBC (**Figura 18**, pág. 65), foi observado a correlações dos hidrogênios H-16 e H-15 com os carbonos C-13 e C-14, hidrogênio H-13 com os carbonos C-15 e C-16 e hidrogênio H-12 com os carbonos C-1, C-13 e C-14, e através da ampliação (**Figura 19**, pág. 66) foi possível atribuir também as hidroxilas, como observado na **Tabela 3** (pág. 67) evidenciando uma unidade prenila como mostrado na estrutura parcial **A** (**Figura 20**, pág. 67).

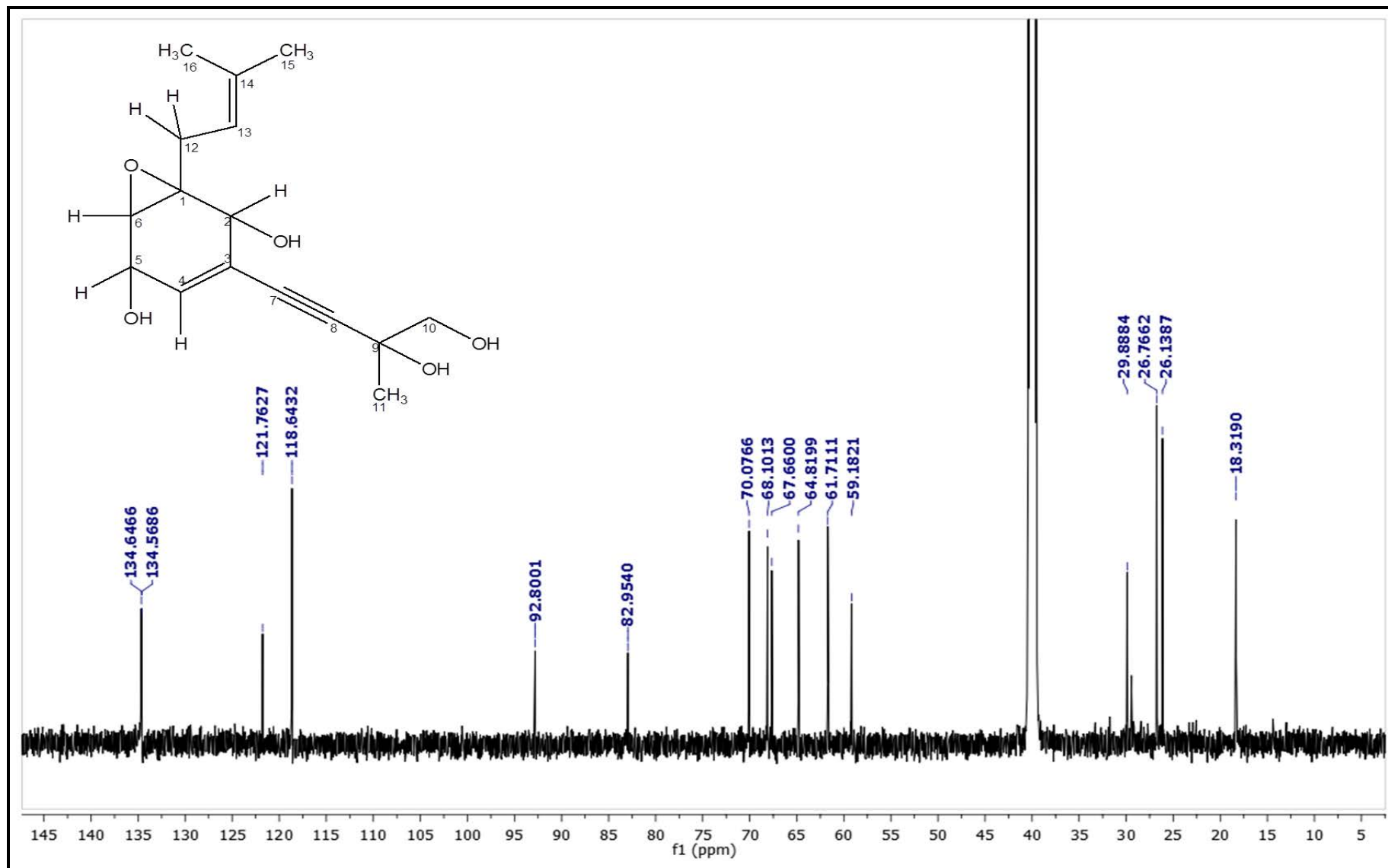
Figura 13- Espectro de RMN de ^1H da Substância **1** (DMSO- d_6 , 600 MHz)



Fonte: A autora

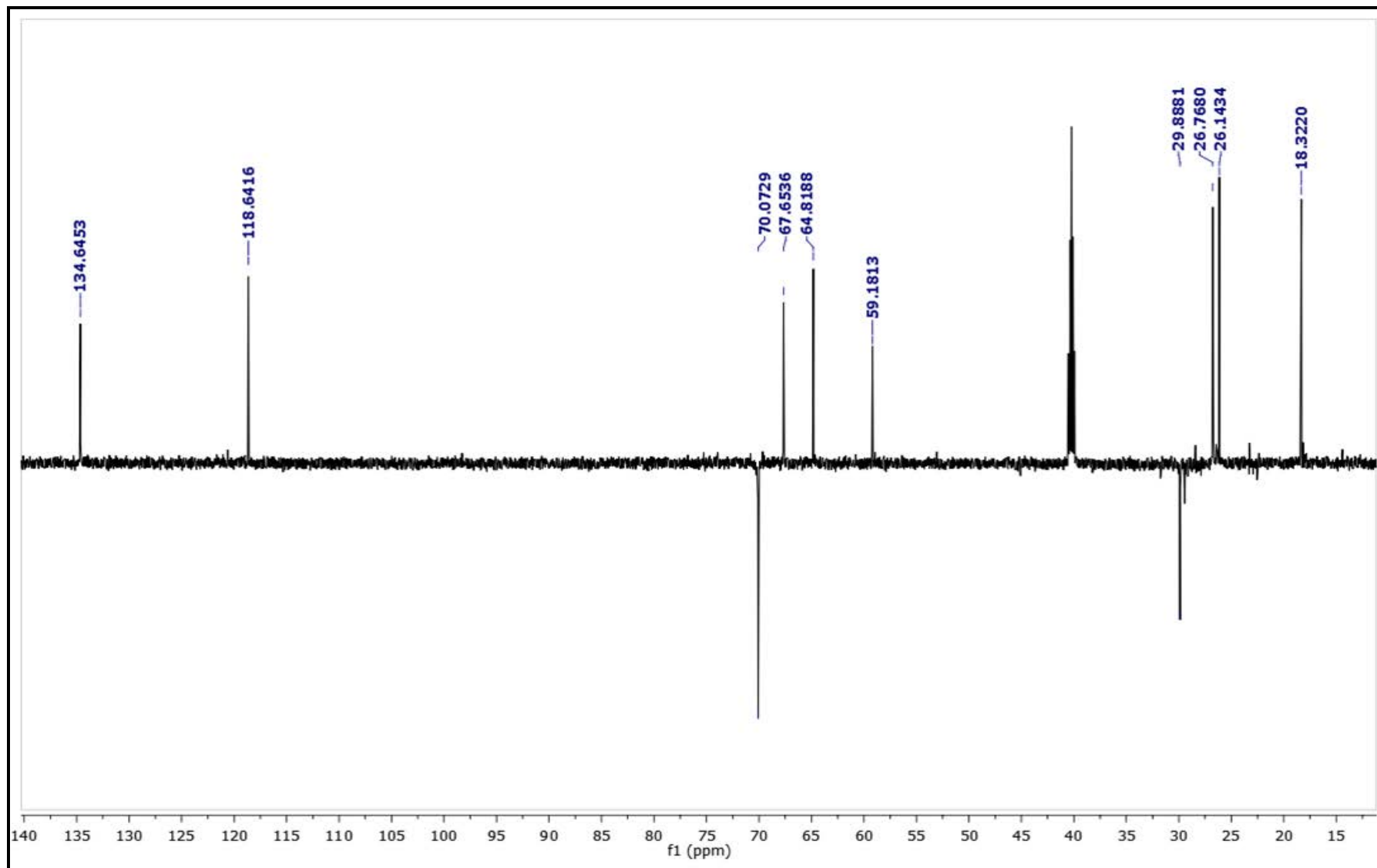
Figura 14- Espectro de RMN de ^1H com D_2O da Substância **1** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz)

Fonte: A autora

Figura 15-Espectro de RMN de ^{13}C da Substância **1** (DMSO- d_6 , 150 MHz)

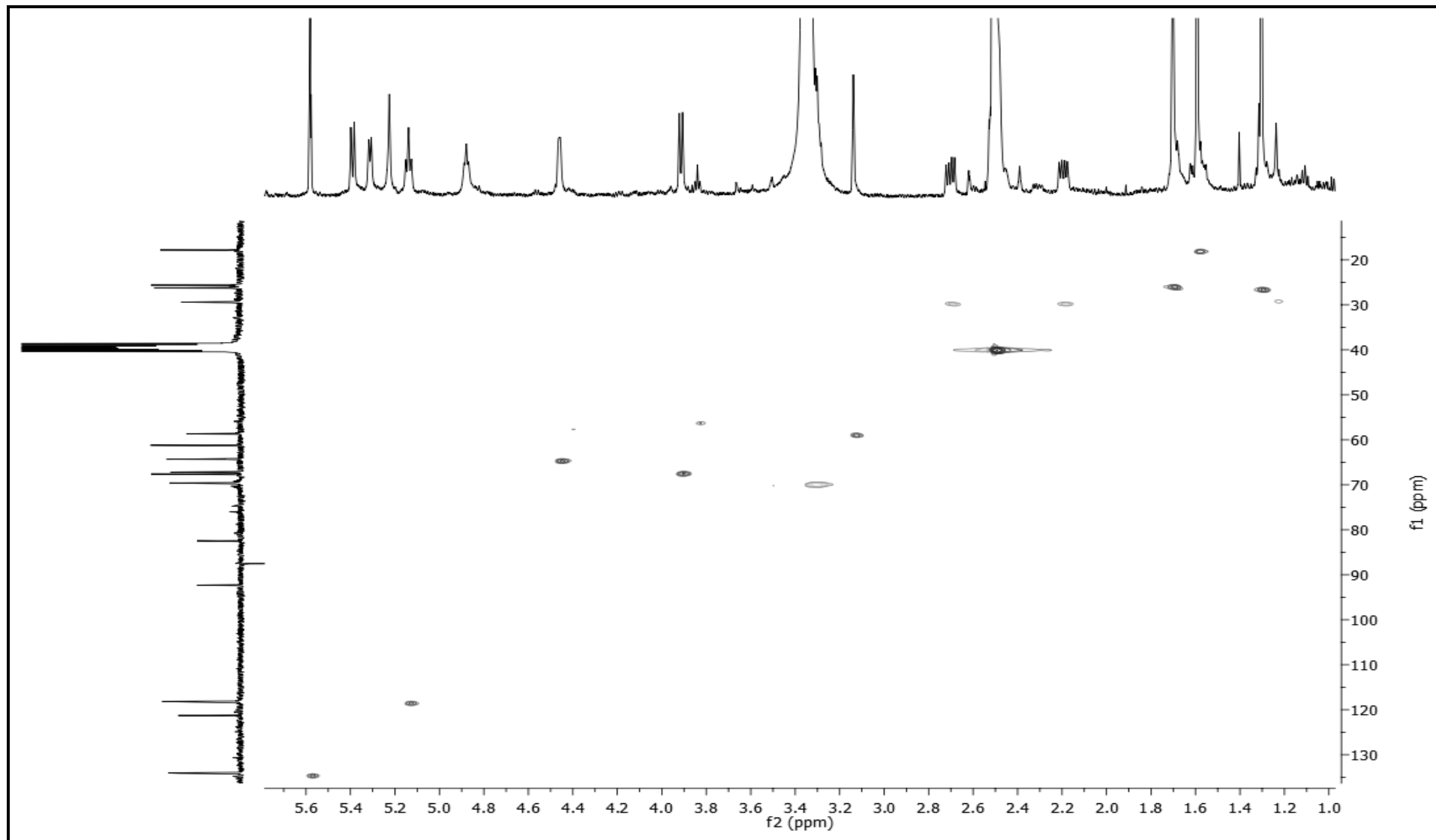
Fonte: A autora

Figura 16- Espectro de DEPT 135 da Substância 1 (DMSO- d_6 , 150 MHz)



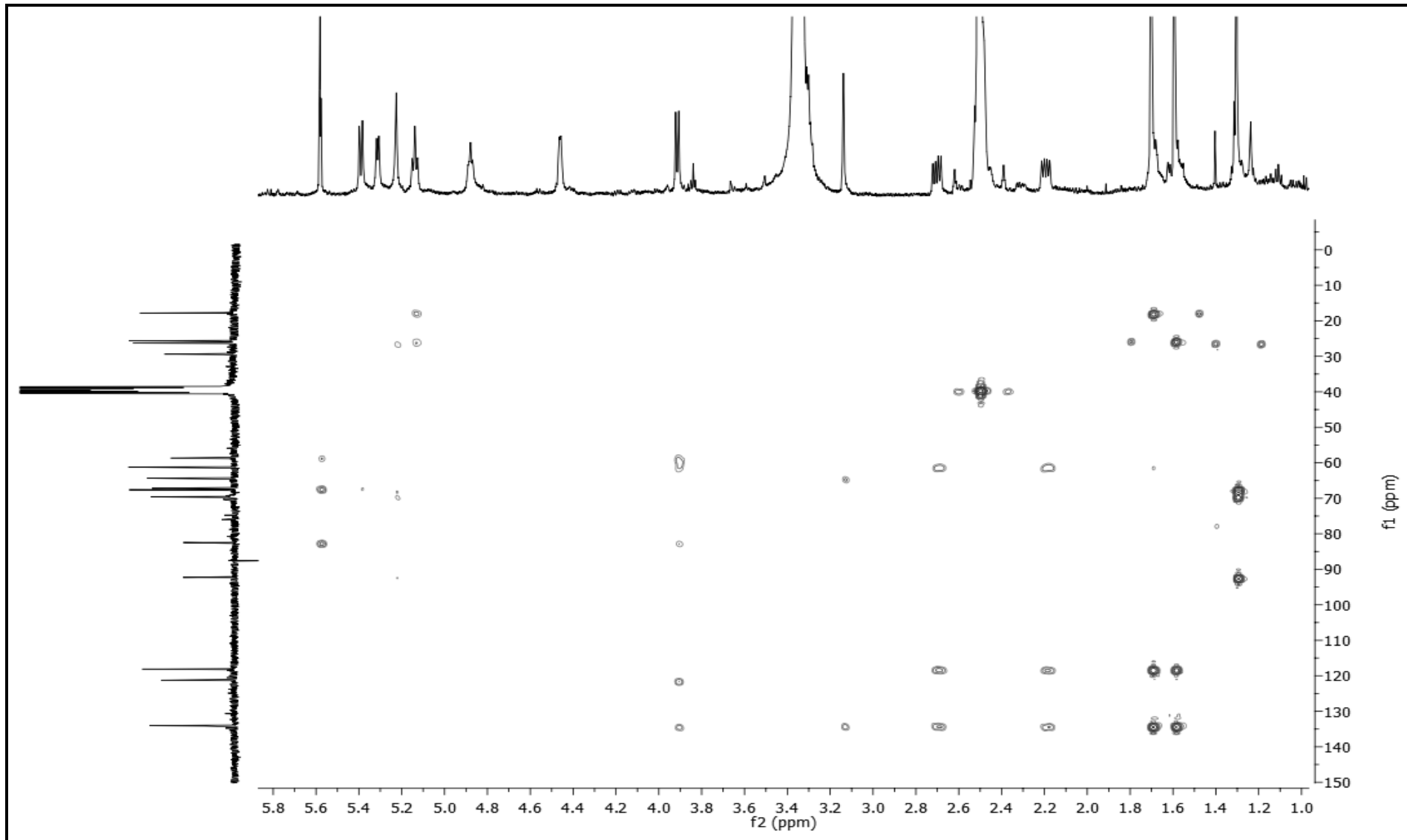
Fonte: A autora

Figura 17- Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da Substância **1** (DMSO- d_6 , 150 MHz)



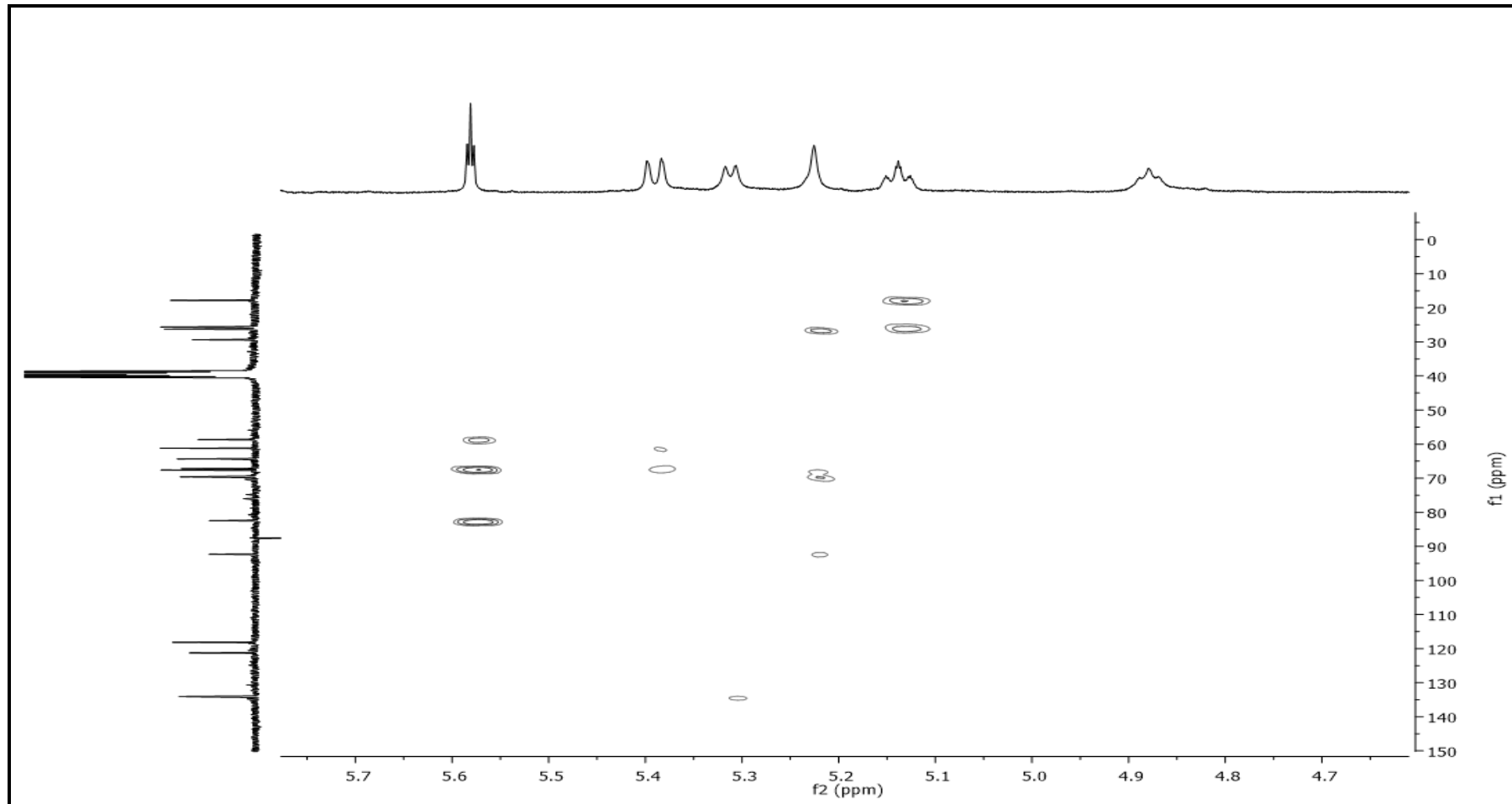
Fonte: A autora

Figura 18- Mapa de correlação H-C a longa distancia (HMBC) da Substância 1 (DMSO- d_6 , 150 MHz)



Fonte: A autora

Figura 19- Ampliação mapa de correlação H-C a uma ligação (HMBC) da Substância **1** (DMSO- d_6 , 150 MHz)



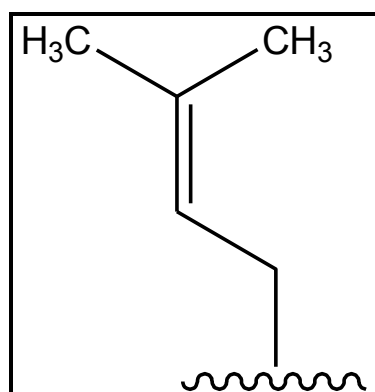
Fonte: A autora

Tabela 3- Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) da substância **1** em $\text{DMSO-}d_6$.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	-	61,7	-
2	3,90 (d, 8Hz)	67,7	C-1; C-3; C-6
3	-	121,8	-
4	5,57 (t, 1,29/1,32Hz)	134,6	C-5; C-6; C-7
5	4,45 (dq)	64,8	-
6	3,13 (ddd, 1,2/0,54/1,17Hz)	59,2	C-4; C-5
7	-	82,9	-
8	-	92,8	-
9	-	67,7	-
10	3,32*	70,1	C-8; C-9; C-11
11	1,30 (s)	26,8	C-8; C-9; C-10
12 a	2,70 (dd, 7Hz)	29,9	C-1; C-13; C-14
12 b	2,18 (dd, 7Hz)	29,9	C-1; C-13; C-14
13	5,13 (ddqq, 7Hz)	118,6	C-15; C-16
14	-	134,7	-
15	1,58 (s)	18,3	C13; C-14; C-16
16	1,70 (s)	26,8	C-13; C-14; C-15
OH-2	5,38	67,7	-
OH-5	5,31	64,8	-
OH-9	5,22	67,7	-
OH-10	4,88	70,1	-

*(encoberto pela água)

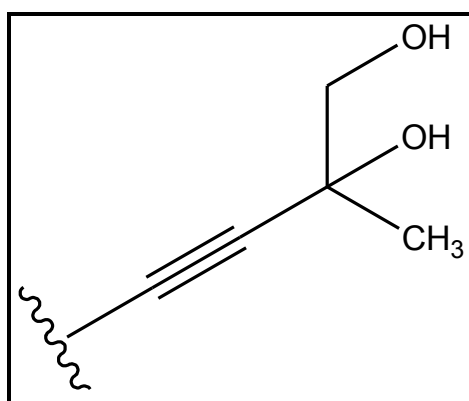
Figura 20- Estrutura parcial **A** da substância **1**



Fonte: A autora

Os valores de deslocamentos químicos em δ_C 82,9 e δ_C 92,8 associados à ausência de hidrogênio, como visualizado no experimento de HSQC e DEPT, evidenciaram a presença de uma ligação tripla. Correlações observadas em HMBC do hidrogênio H-11 com os carbonos C-8 e C-10, associado aos valores de deslocamento químico de carbono e hidrogênio e as respectivas multiplicidades permitiram propor a estrutura parcial **B** (**Figura 21**, pág. 68).

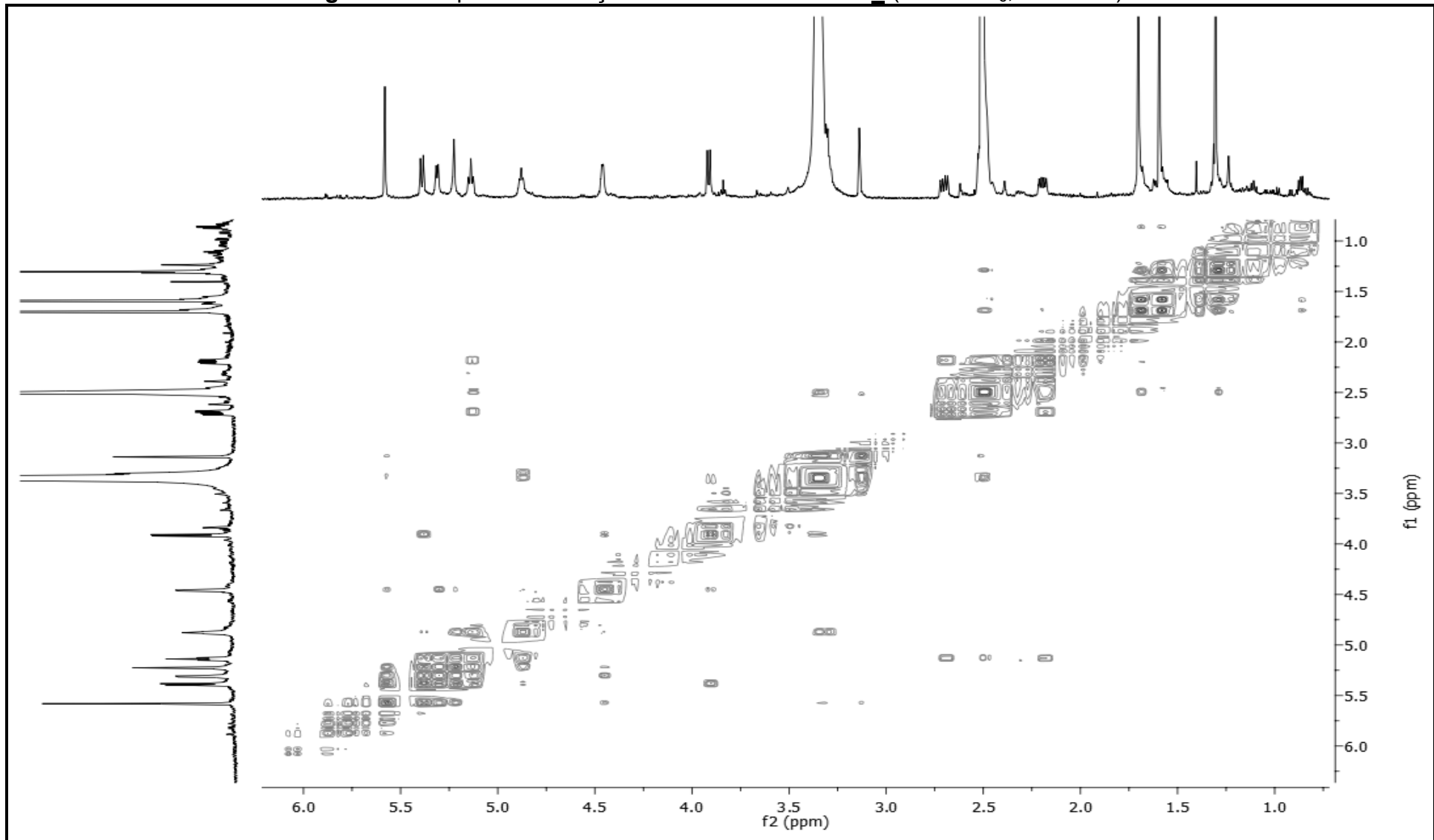
Figura 21- Estrutura parcial **B** da substância **1**



Fonte: A autora

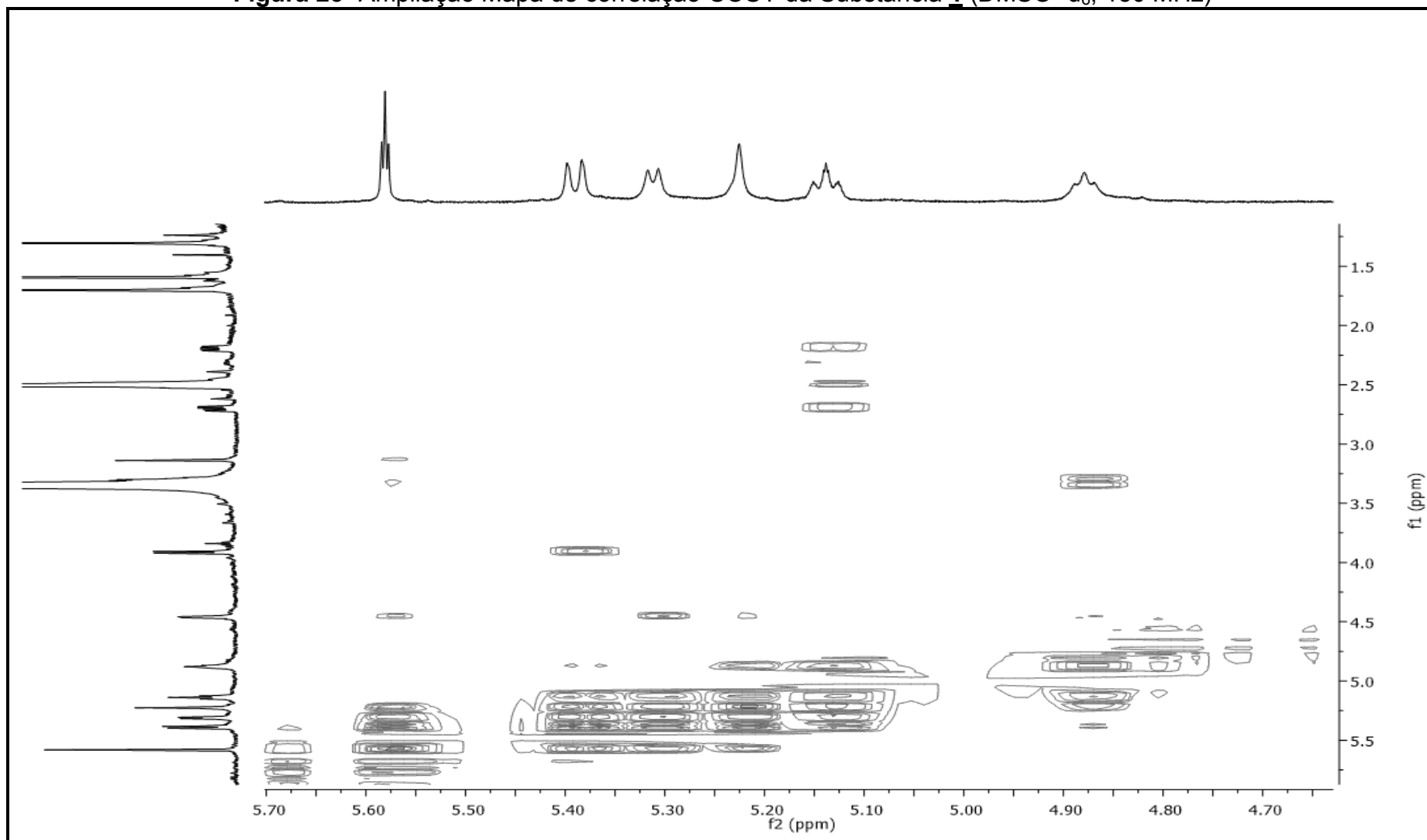
Análise do experimento de COSY (**Figura 22**, pág. 69) evidenciou correlações entre os hidrogênios H-6, H-5 e H-4 e entre o hidrogênio H-2 com a hidroxila OH₂ como observado na ampliação (**Figura 23**, pág.70), o que associado com as correlações observadas em HMBC entre o hidrogênio H-2 com os carbonos C-1 e C-6, hidrogênio H-4 com o carbono C-6 e do hidrogênio H-6 com o carbono C-4, juntamente com os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C nos permitiram propor a estrutura parcial **C** (**Figura 24**, pág. 71).

Figura 22- Mapa de correlação COSY da Substância **1** (DMSO- d_6 , 150 MHz)



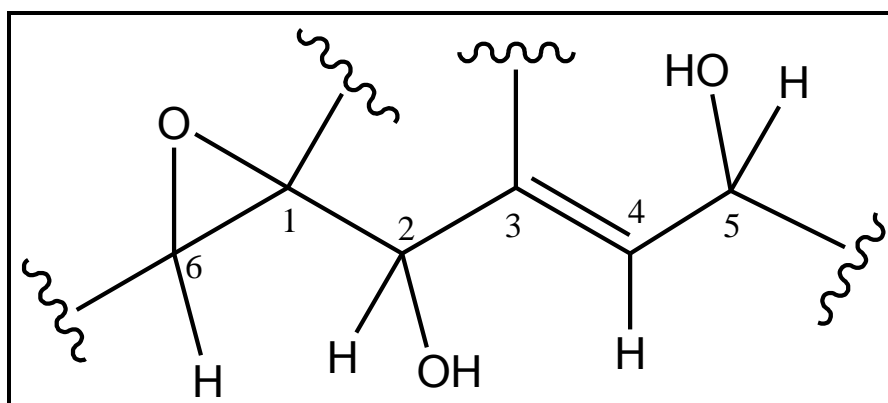
Fonte: A autora

Figura 23- Ampliação Mapa de correlação COSY da Substância **1** (DMSO- d_6 , 150 MHz)



Fonte: A autora

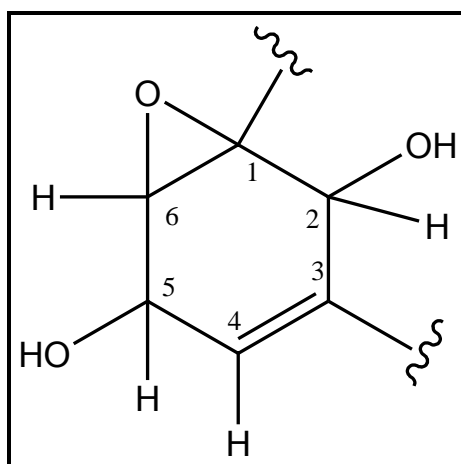
Figura 24 Estrutura parcial **C** da substância **1**



Fonte: A autora

A junção de C-6 e C-5 foi realizada com base nas correlações observadas em HMBC do hidrogênio H-4 com o carbono C-6 e do hidrogênio H-6 com o carbono C-4, dando origem a estrutura parcial **D** (**Figura 25**, pág. 71).

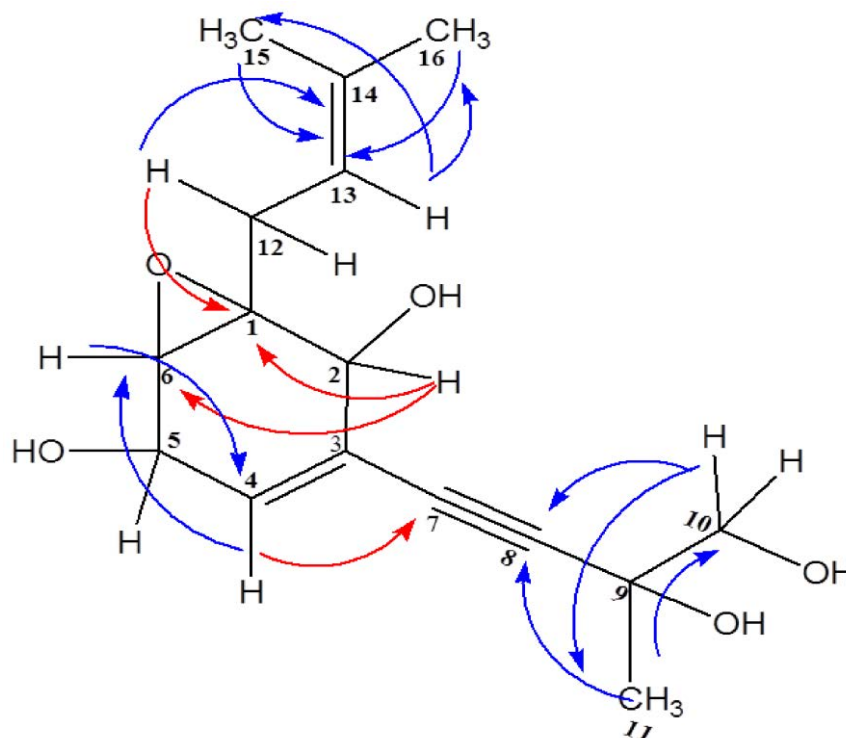
Figura 25- Estrutura parcial **D** da substância **1**



Fonte: A autora

A junção entre as estruturas parciais A, B e D foi realizada com base nas correlações observadas em HMBC do hidrogênio H-12 com o carbono C-1 e do hidrogênio H-4 com o carbono C-7 fornecendo a estrutura final da substância **1** (**Figura 26**, pág. 72).

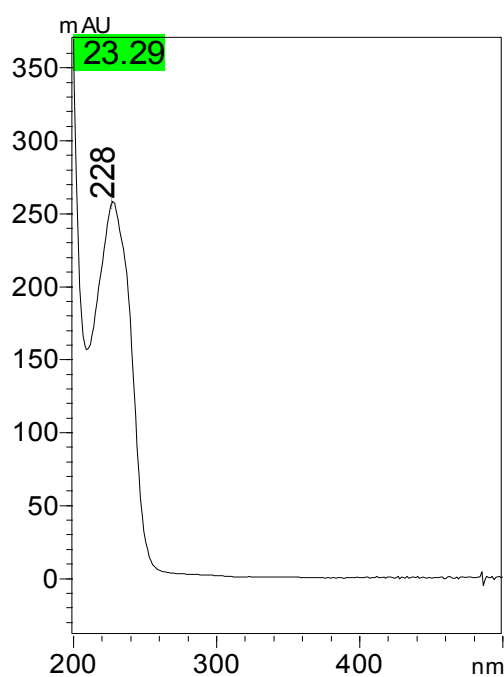
Figura 26- Substância **1** e as principais correlações em HMBC.



Fonte: A autora

No espectro de UV em MeOH grau HPLC da substância **1** (Figura 27, pág. 72) observamos um máximo de absorção em 228 nm característico de uma ligação dupla conjugada com uma ligação tripla.

Figura 27- Espectro de UV da substância **1**.



Fonte: A autora

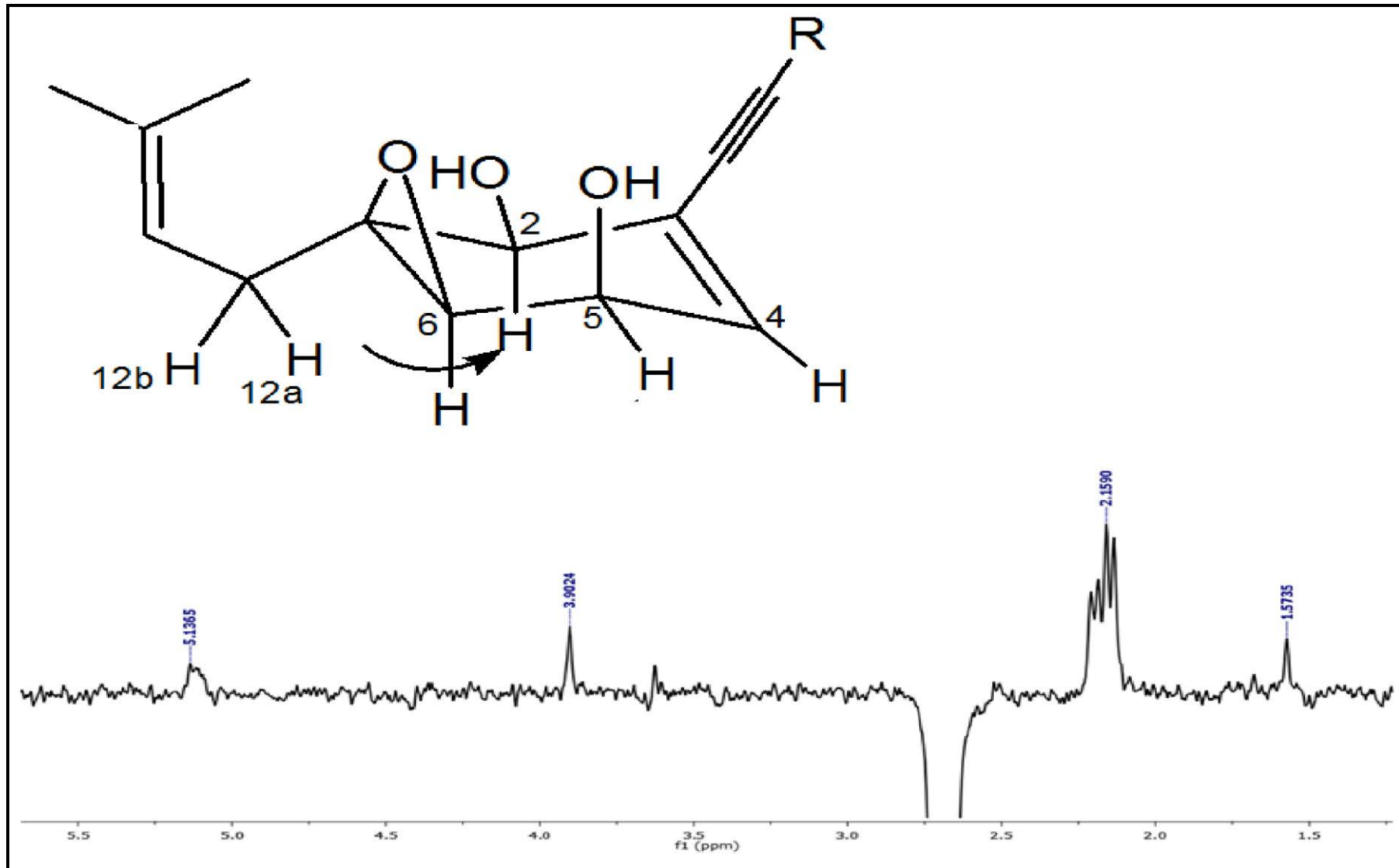
Para a confirmação da estrutura proposta, a substância **1** foi analisada por ESI-MS de alta resolução, no modo positivo, onde a presença do pico base em m/z em 317,1356 (100%) indicando a formação aduto sódio $[M+Na^+]$. Verificou-se também a presença do pico em m/z 611,2839 $[2M+Na^+]$, confirmando a massa molecular da substância. Ao analisarmos o Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) verificamos a presença de 6 insaturações. Após analisarmos todas essas informações confirmamos a fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_5$.

A estereoquímica relativa de **1** foi definida com base nos experimentos de NOESY 1D onde observou-se que a irradiação relativa dos sinais em 2,70 ppm e 2,18 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-12 intensificava por NOE os sinais em 3,90 ppm e 3,13 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-6 respectivamente (**Figura 28**, pág. 74/ **Figura 29**, pág. 75), a irradiação relativa do sinal em 5,13 ppm atribuído ao hidrogênio H-13 intensificava por NOE os sinais em 3,90 ppm, 3,13 ppm e 1,70 atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-16, respectivamente (**Figura 30**, pág. 76), a irradiação relativa do sinal em 3,1 ppm atribuído ao hidrogênio H-6 intensificava por NOE o sinal em 4,45 ppm atribuído ao hidrogênio H-5 (**Figura 31**, pág. 77).

O epóxido poderia ser posicionado entre C-1/C-6 ou C-5/C-6, no entanto a segunda hipótese foi descartada devido às interações observadas no experimento de HMBC entre o hidrogênio H-4 com o carbono C-6 e a correlação em COSY do hidrogênio H-5 com a hidroxila OH-5.

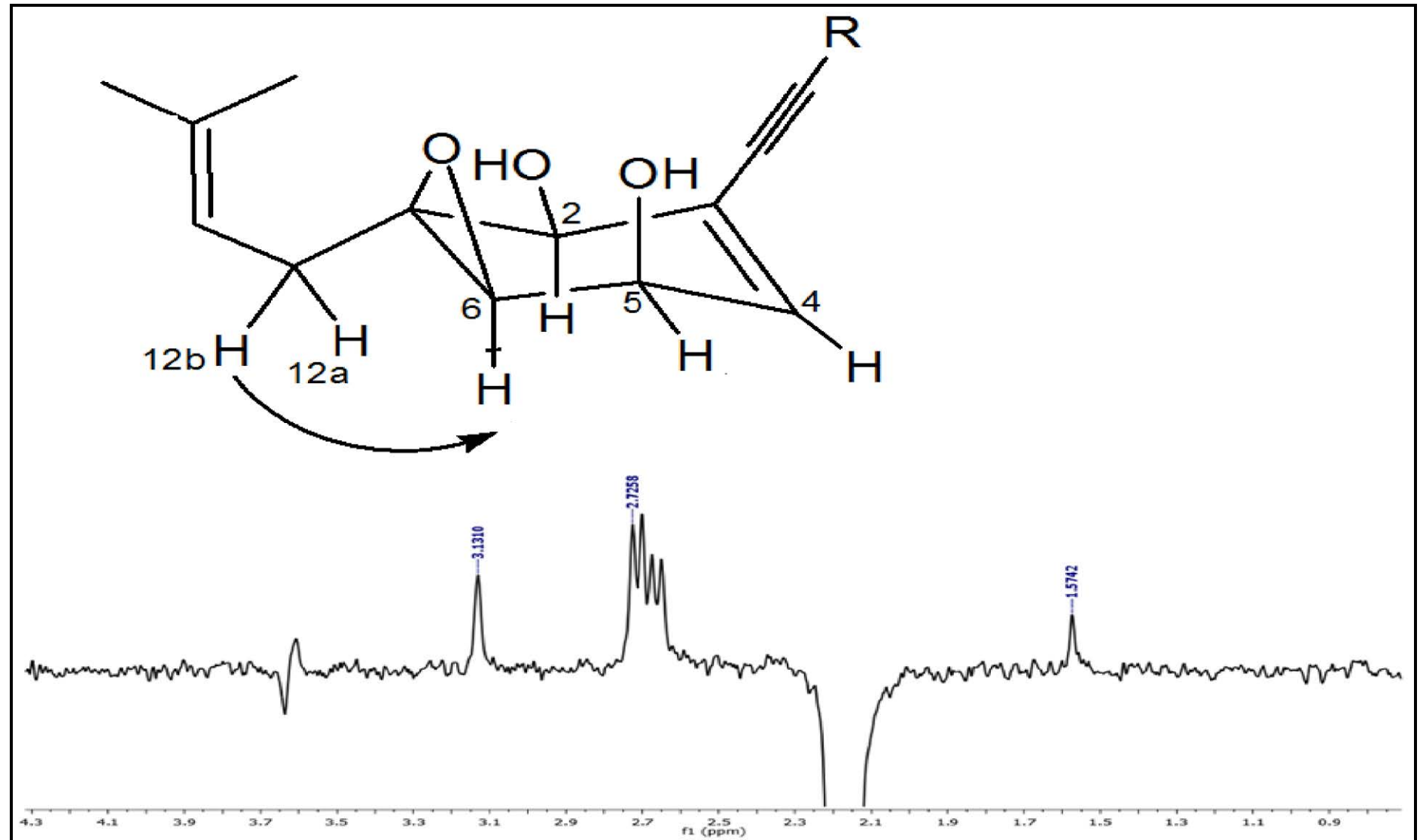
Através do experimento de HSQC TOCSY (**Figura 32**, pág. 78) podemos observar um sistema de spin entre os hidrogênios H-4, H-5 e H-6, e outro sistema de spin entre os hidrogênios H-13 e os dois hidrogênios H-12. Também é possível observar interações entre a hidroxila OH-5 com os hidrogênios H-4, H-5 e H-6, além de interações entre a hidroxila OH-2 com o hidrogênio H-2 (**Figura 33**, pág. 79), confirmando, portanto, tanto a posição das hidroxilas quanto a do epóxido, como proposto entre os carbonos C-1/C-6, permitindo propor para a substância **1** (**Figura 34**, pág. 80) a estereoquímica relativa (**Figura 35**, pág. 80) demonstrada abaixo.

Figura 28- Correlações observadas por NOESY entre H-12 \leftrightarrow H-2.

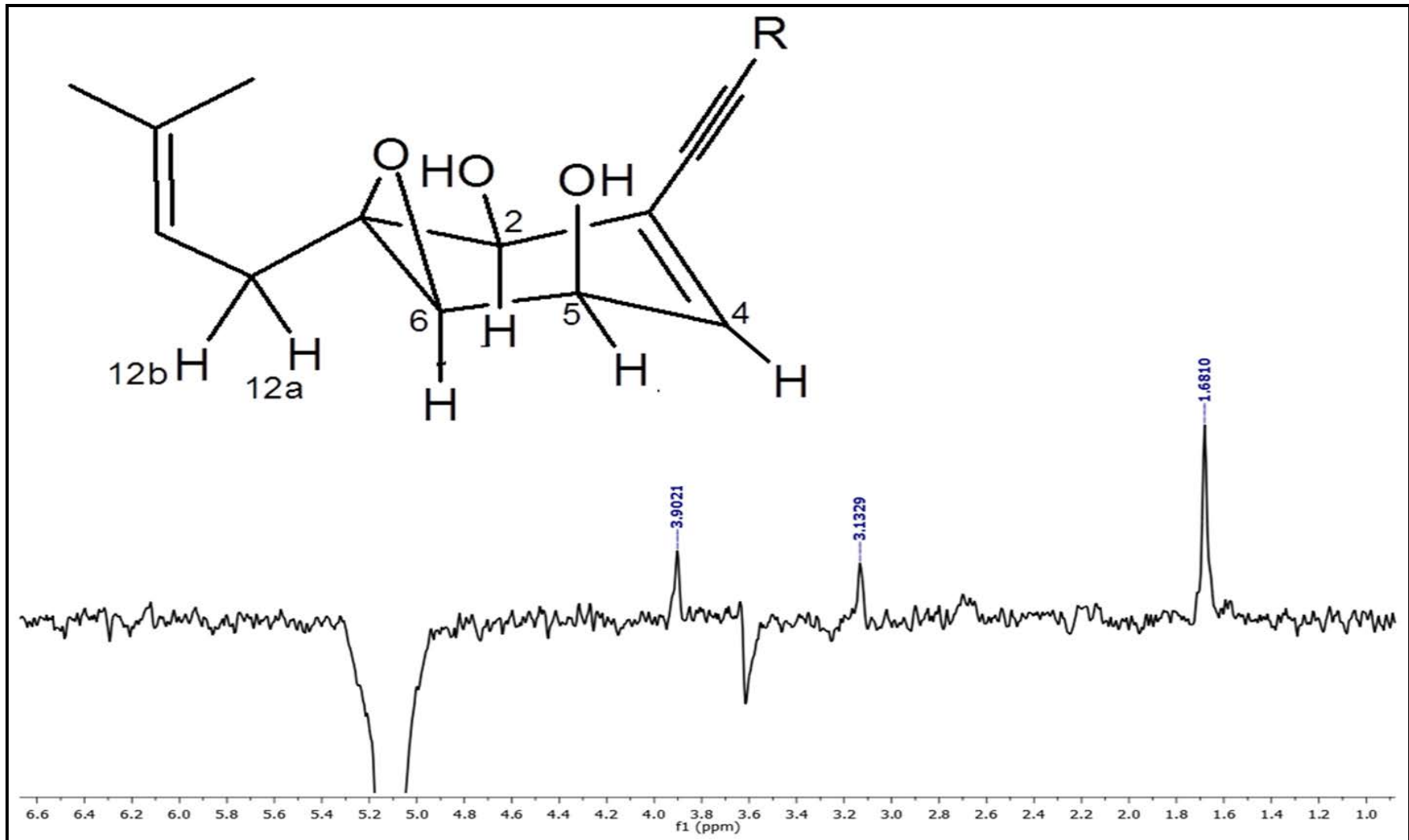


Fonte: A autora

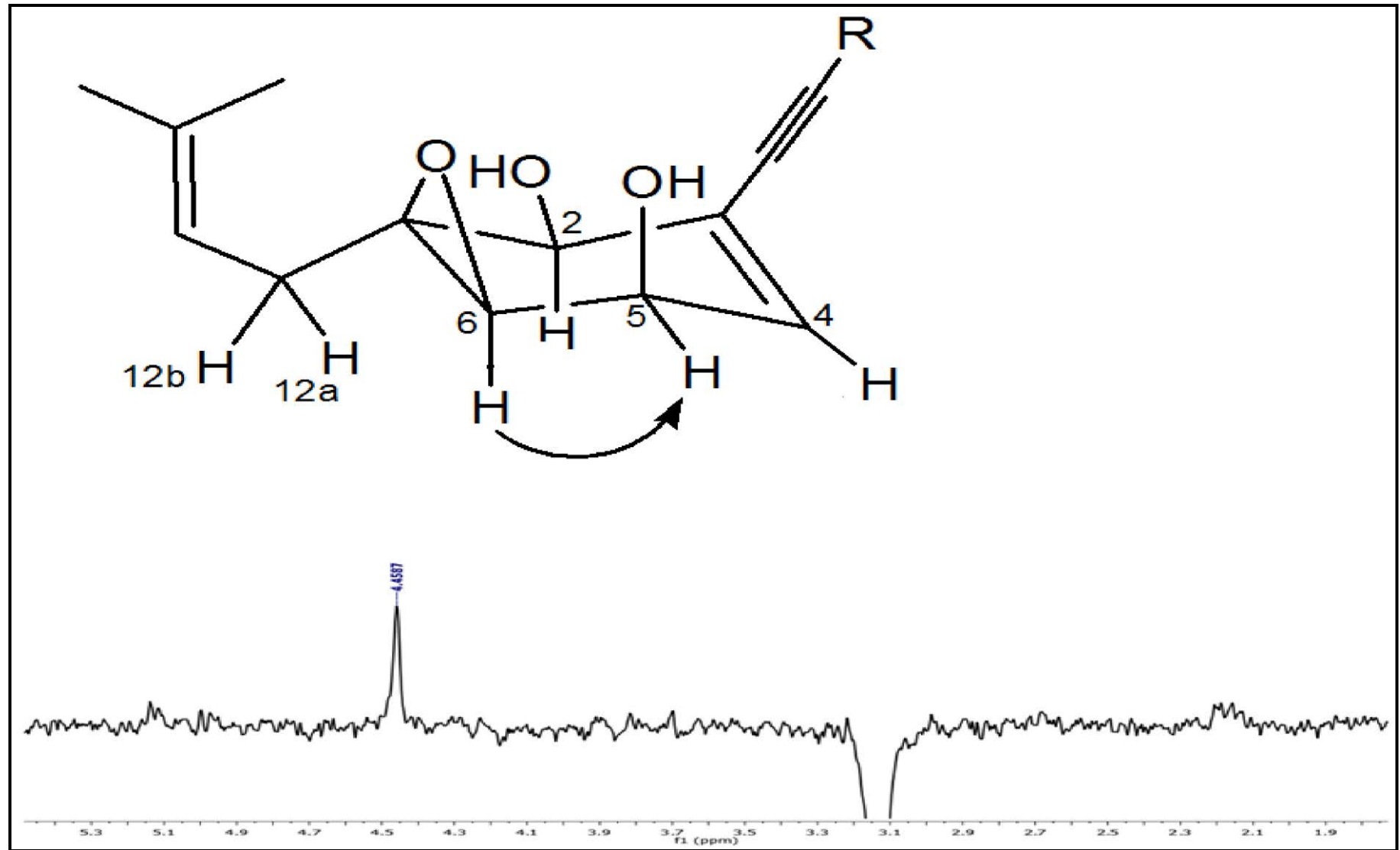
Figura 29- Correlações observadas por NOESY entre H-12↔H-6



Fonte: A autora

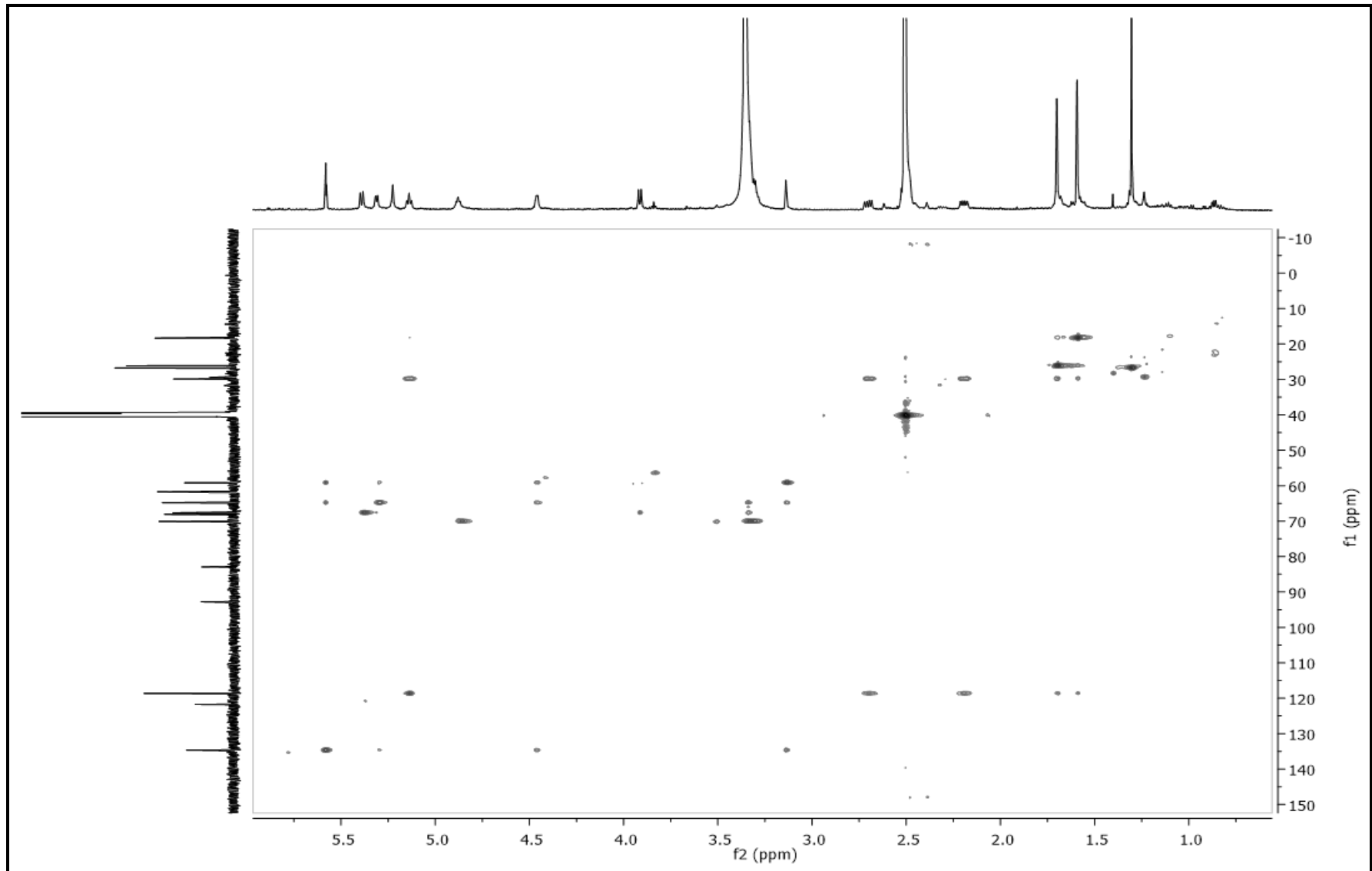
Figura 30- Correlações observadas por NOESY entre H13↔H2/H6/H15

Fonte: A autora

Figura 31- Correlações observadas por NOESY entre H6↔H5

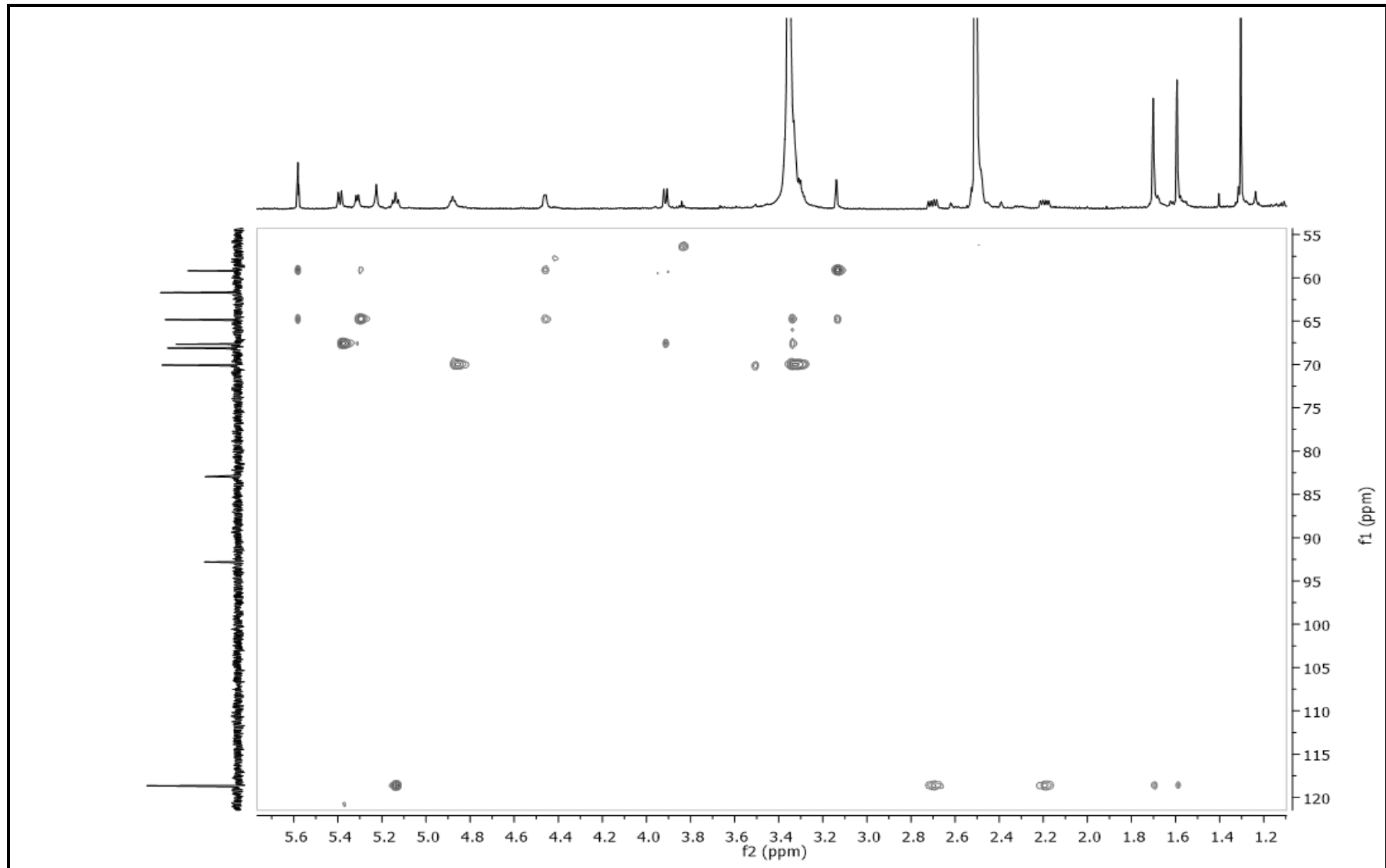
Fonte: A autora

Figura 32: Mapa de correlação HSQC TOCSY da Substancia **1** (DMSO-d6, 150 MHz)



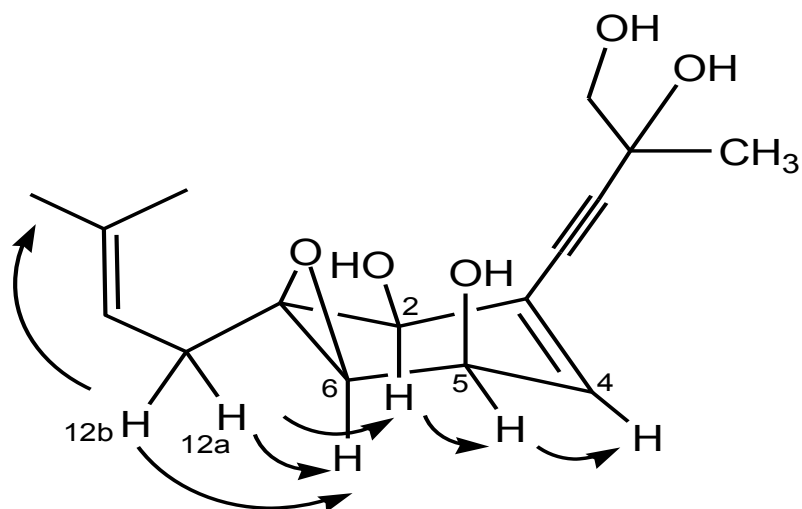
Fonte: A autora

Figura 33: Mapa de correlação HSQC TOCSY Ampliado da Substancia 1 (DMSO-d6, 150 MHz)



Fonte: A autora

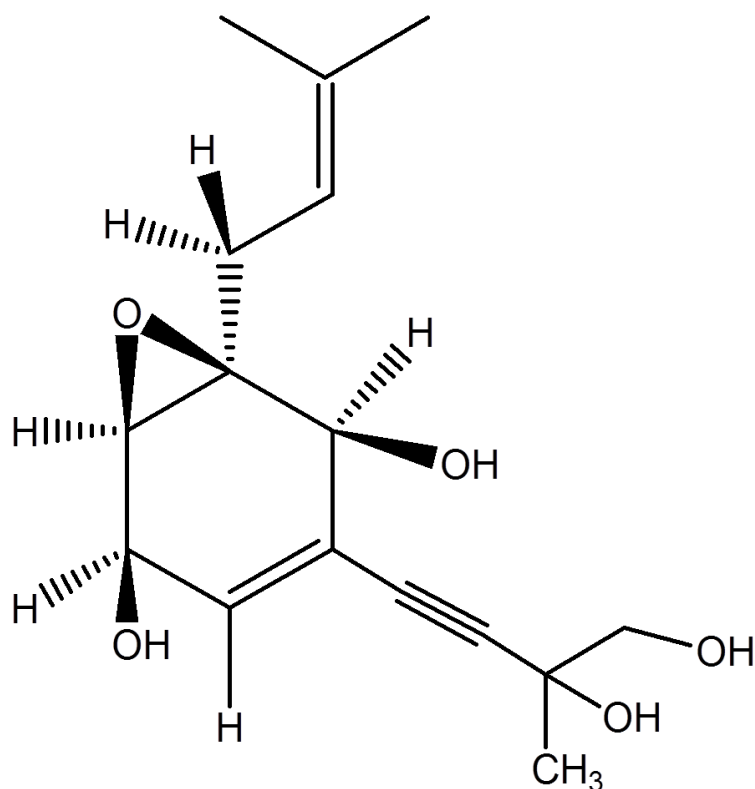
Figura 34- Correlações observadas em NOESY 1D para **1**



Correlações observadas em NOESY 1D

Fonte: A autora

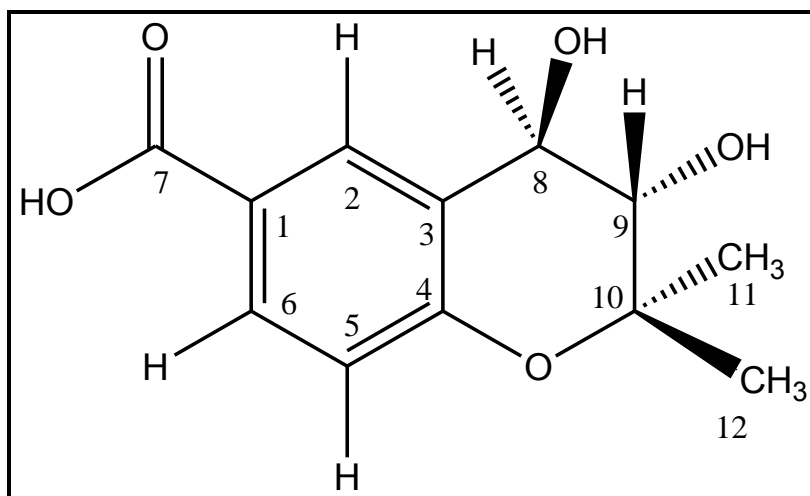
Figura 35- Configuração relativa proposta para substância **1**



Fonte: A autora

Levantamento bibliográfico realizado até o momento na Web of Science e Scinfinder indica tratar-se de uma substância inédita.

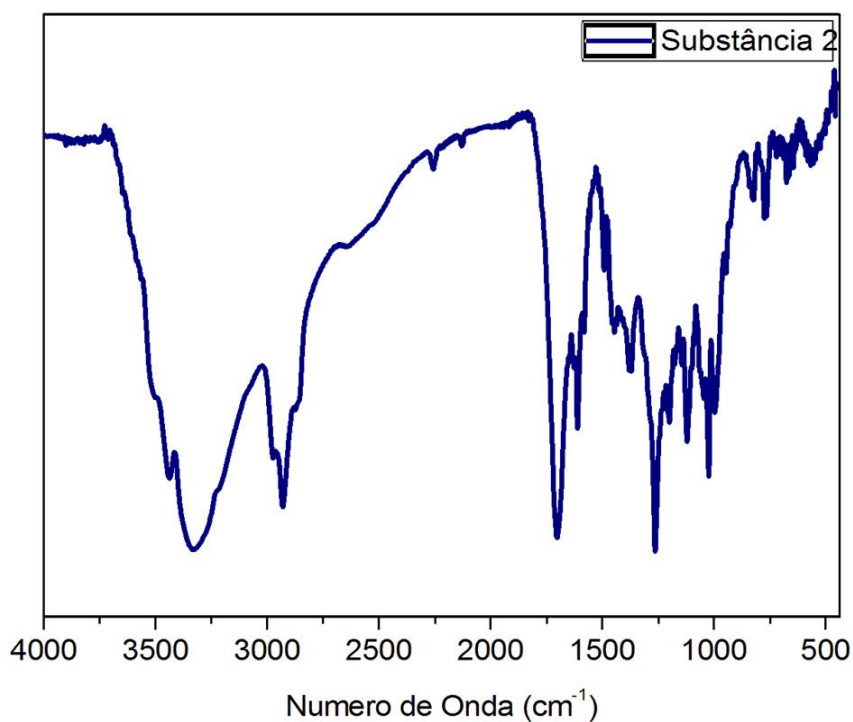
4.4.2 Determinação Estrutural da Substância 2



Fonte: A autora

O espectro de IV (**Figura 36**, pág. 81) exibiu uma banda larga em 3350 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada à carbonila em 1700 cm^{-1} , banda pequena em 1150 cm^{-1} característico de éter e uma banda de forte absorção em 1600 cm^{-1} característico de anel aromático.

Figura 36- Espectro de IV da substância **2**.

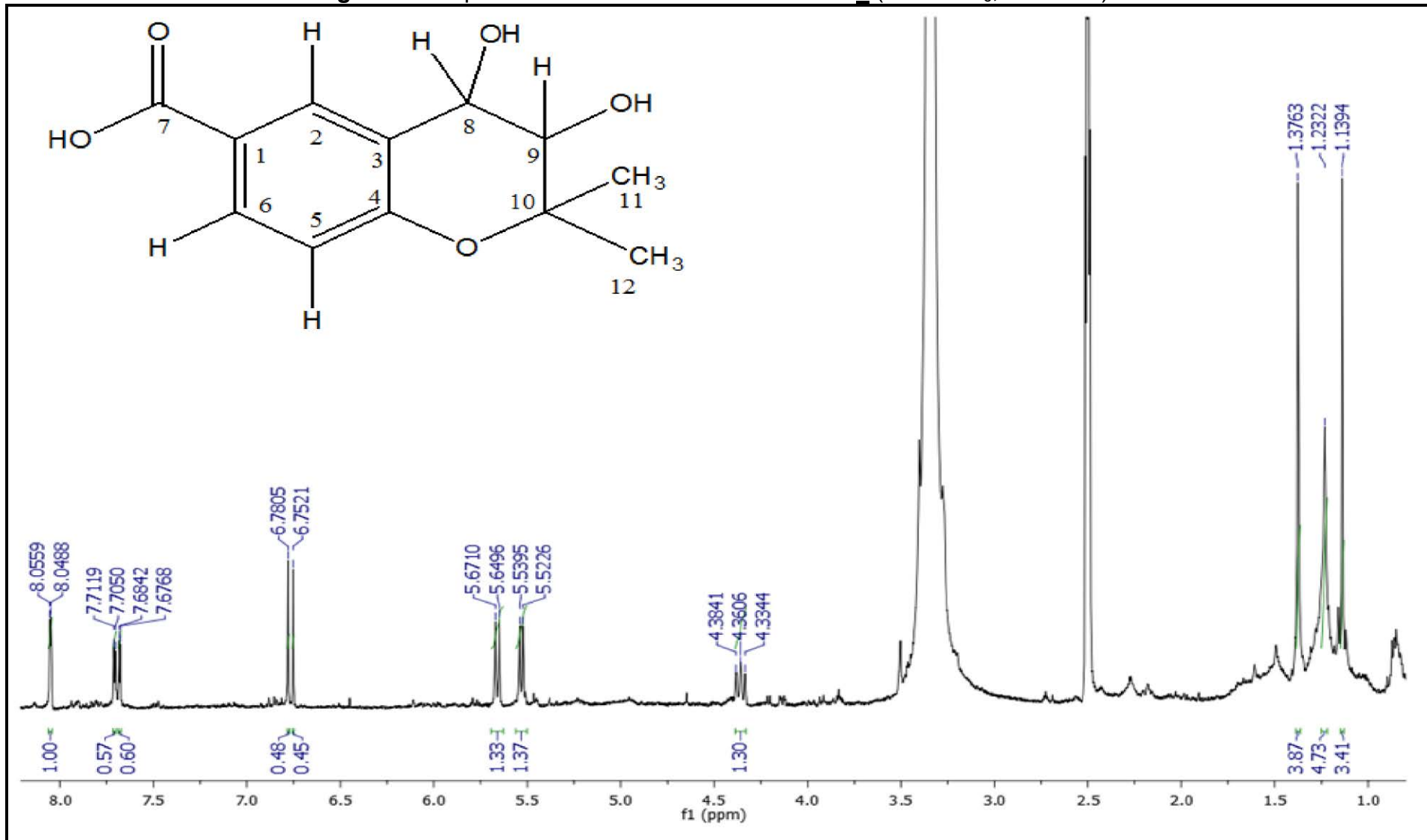


Fonte: A autora

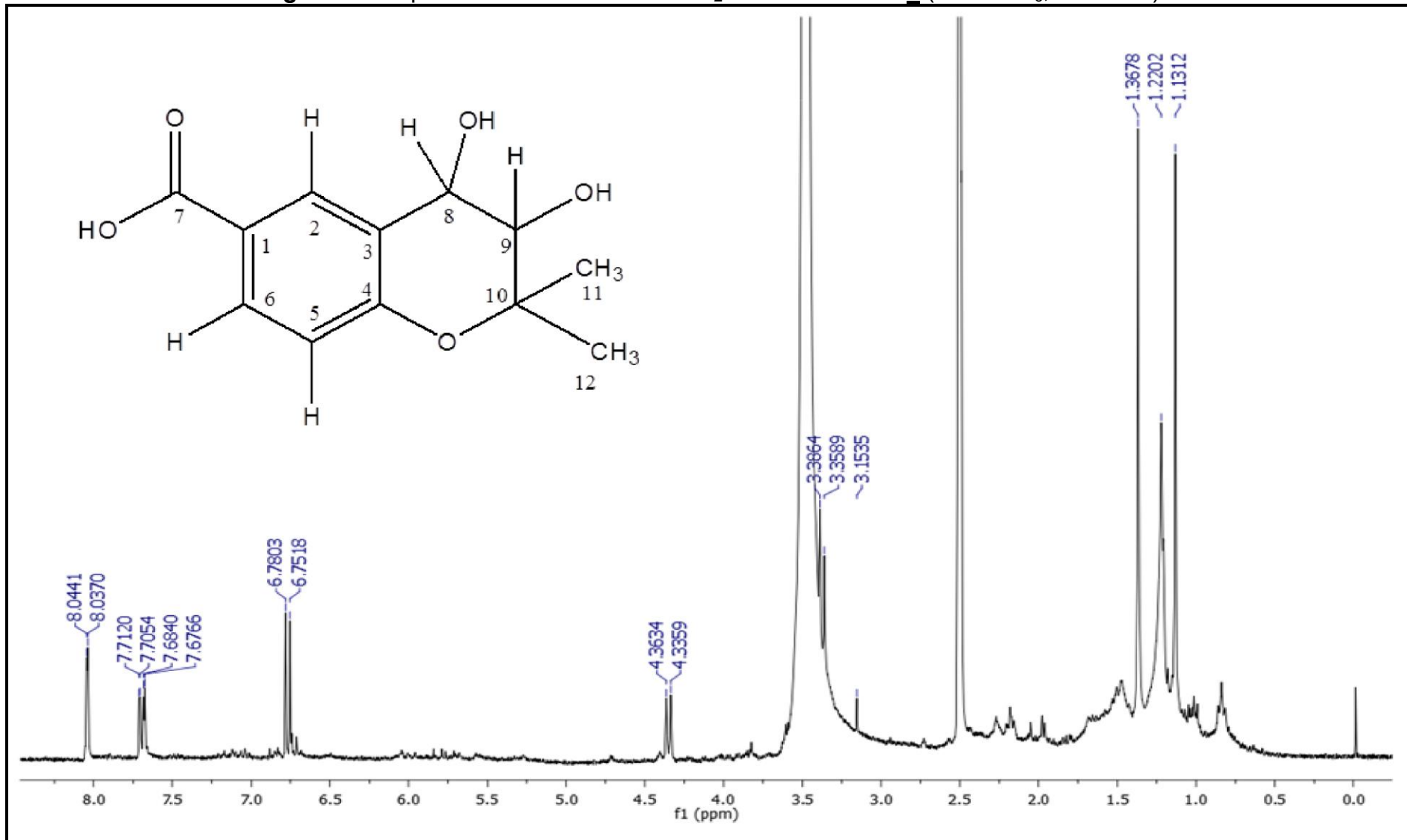
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 37**, pág. 80) da substância **2** apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,76 (*d*, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H-5), δ_{H} 7,69 (*dd*, $J=8,0$ e $2,0\text{Hz}$, 1H, H-6) e δ_{H} 8,04 (*d*, $J=2,0\text{Hz}$, 1H, H-2) indicando um anel aromático 1,3,4 trissubstituído. Foram observados, dois sinais em δ_{H} 1,14 (*s*, 3H, H-11) e δ_{H} 1,38 (*s*, 3H, H-12) atribuídos a duas metilas ligadas a um carbono carbinólico quaternário sp^3 , um tripleto em δ_{H} 4,34 (*t*, $J=7,0\text{ Hz}$, 1H) que devido ao valor do deslocamento químico foi atribuído a um hidrogênio oxibenzílico. Adição de D_2O simplifica este tripleto para dubleto (*d*, $J=8,0\text{Hz}$), evidenciando que o mesmo estava acoplado com $-\text{OH}_8$. Com auxílio do experimento de HSQC, foi observado um sinal em δ_{H} 3,50 (encoberto pela água do DMSO), atribuído a outro hidrogênio carbinólico. Adicionalmente, foram observados dois dubletos em 5,53 (*d*, $J=6,0\text{Hz}$, 1H, O-H₈) e 5,65 (*d*, $J=6,0\text{ Hz}$, 1H, O-H₉), estes dois sinais foram atribuídos aos hidrogênios ligados ao oxigênio devido a falta de correlação em HSQC e ao desaparecimento dos mesmos quando foram submetidos a análise por RMN de ^1H na presença de D_2O (**Figura 38**, pág. 84).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 39**, pág. 85) foram visualizados seis carbonos aromáticos, dois metílicos, três carbinólicos sendo um oximetínico, outro metílico e o terceiro quaternário aos quais foram atribuídos aos respectivos hidrogênios com base nas correlações observadas nos experimento de HSQC (**Figura 40**, pág. 86).

No experimento de HMBC (**Figura 41**, pág. 87) foram observadas as correlações entre o hidrogênio H-2 com os carbonos C-4 e C-6, e do hidrogênio H-5 com os carbonos C-3 e C-4, o que, associado aos valores dos deslocamentos químicos, confirmou a presença de um anel aromático 1,3,4 trissubstituído. Adicionalmente, a correlação existente entre os hidrogênios H-12 e H-11 com os carbonos C-8 e C-9, como observado na **Tabela 4** (pág. 88), indicou tratar-se de um cromeno oxidado em C-8 e C-9. Os valores de deslocamento químico dos átomos de carbono e de hidrogênio permitiram posicionar uma carboxila em C-1.

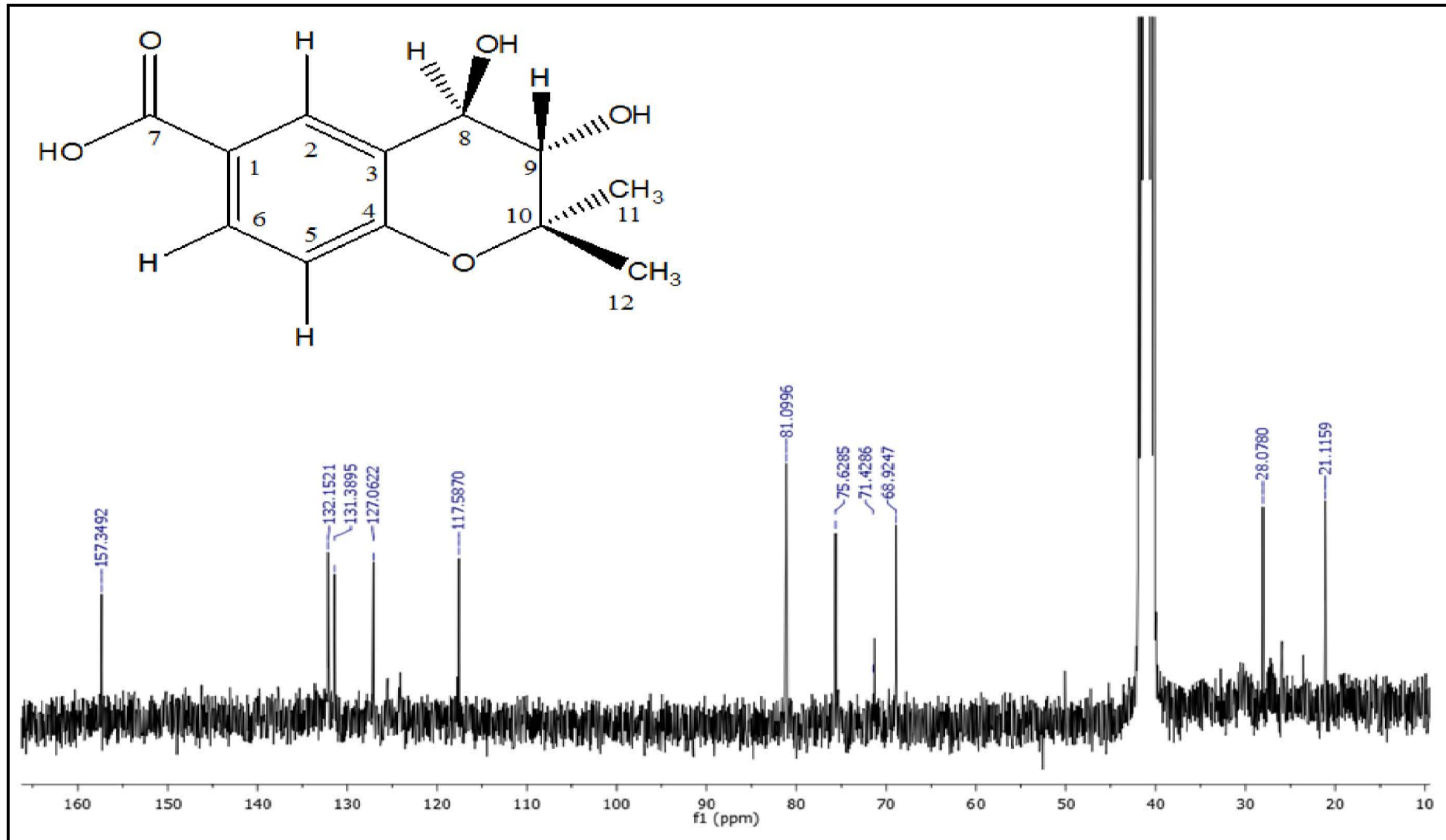
Figura 37- Espectro de RMN de ^1H da Substância **2** (DMSO- d_6 , 300 MHz)

Fonte: A autora

Figura 38- Espectro de RMN de ^1H com D_2O da Substância **2** ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz)

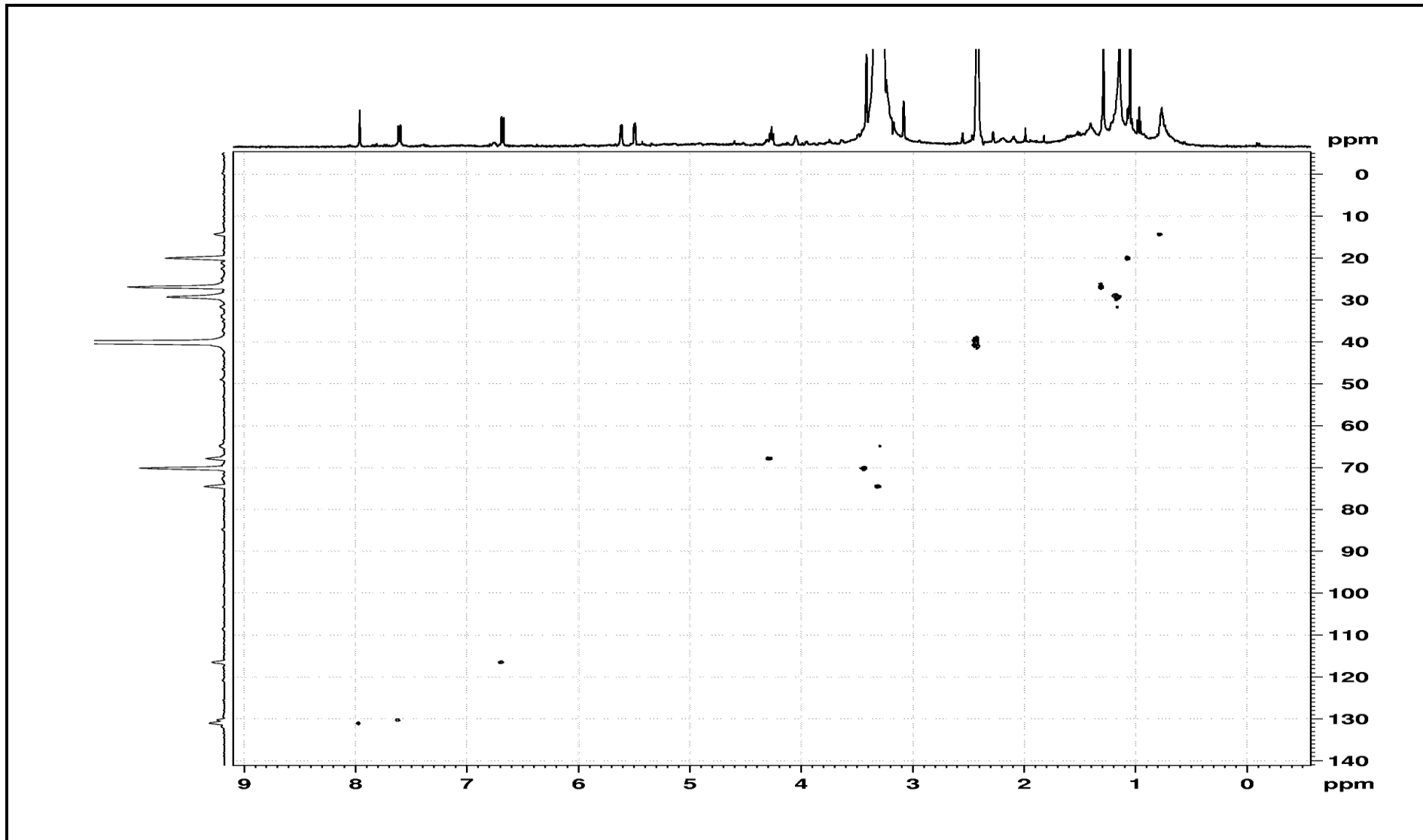
Fonte: A autora

Figura 39- Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 2 (DMSO- d_6 , 75 MHz)



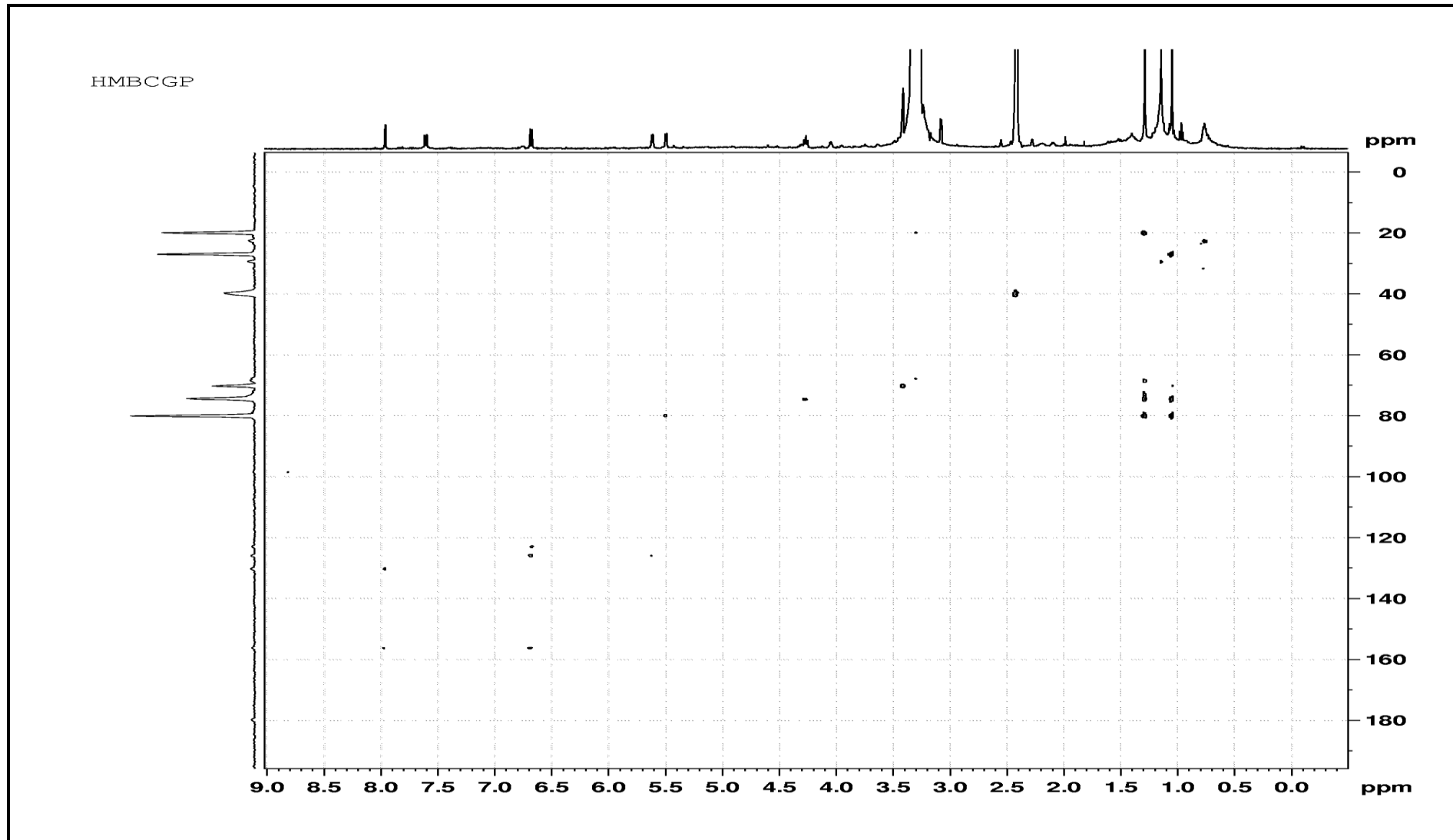
Fonte: A autora

Figura 40- Mapa de correlação H-C a uma ligação (HSQC) da Substância **2** (DMSO- d_6 , 100 MHz)



Fonte: A autora

Figura 41- Mapa de correlação H-C a longa distancia (HMBC) da Substância 2 (DMSO- d_6 , 100 MHz)



Fonte: A autora

Tabela 4- Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (100MHz) da substância **2** em $\text{DMSO-}d_6$.

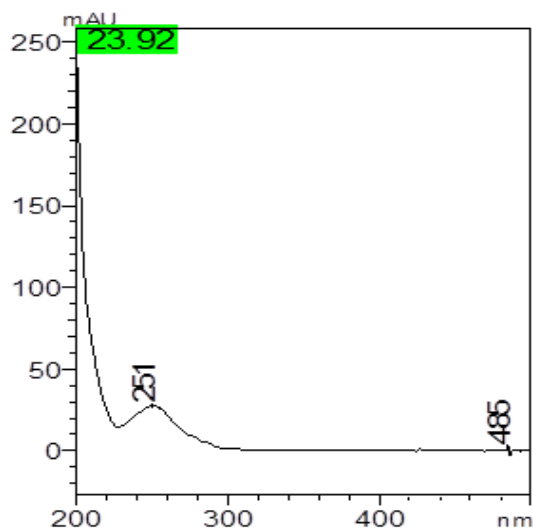
Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	$g\text{HMBC}$
1	-	125	-
2	8,04 (dd, 0,87/0,57Hz)	132	C-4; C-6
3	-	127	-
4	-	157	-
5	6,76 (d, 8Hz)	118	C-3; C-4
6	7,69 (dd, 2/2Hz)	131	-
7	-	125	-
8	4,34 (t, 7/7Hz)	71	C-9
9	3,5 (s)*	75	C-8
10	-	81	-
11	1,14 (s)	21	C-8; C-9; C-10; C-12
12	1,38 (s)	28	C-8; C-9; C-10; C-11
-OH-8	5,53 (d, 5Hz)		
-OH-9	5,65 (d, 6Hz)		

*(encoberto pelo $\text{DMSO-}d_6$)

Fonte: A autora

No espectro de UV em MeOH grau HPLC da substância **2** (**Figura 42**, pág. 88) observamos um máximo de absorção em 251 nm característico de substâncias da classe dos cromenos.

Figura 42- Espectro de UV da substâncias **2**.

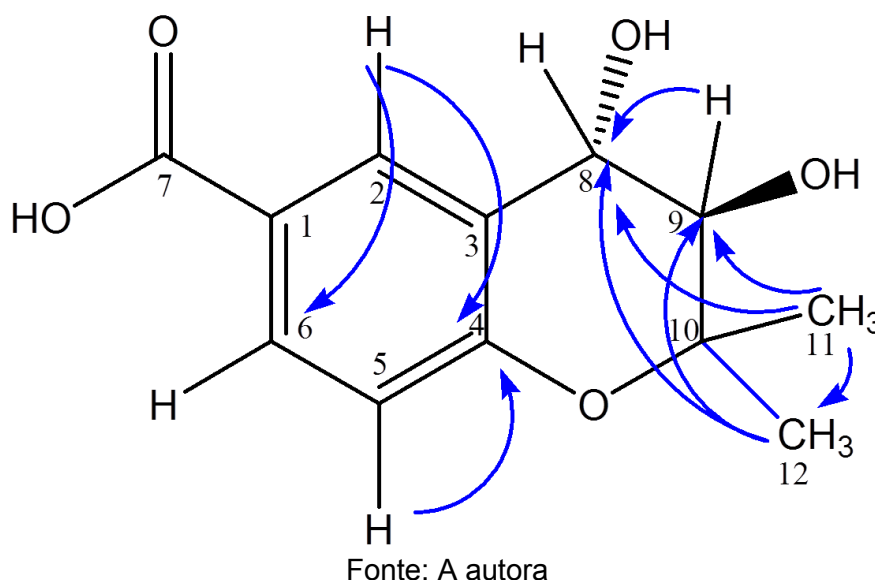


Fonte: A autora

Para a confirmação da estrutura proposta, esta foi analisada por ESI-MS, no modo positivo, onde a presença do íon molecular em m/z 237,0792 está coerente com a fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_5$ e com a estrutura proposta para a substância **2** (Figura 43, pág. 89).

Comparando-se os dados espectrométricos com a literatura foi possível identificar a substâncias **2** como sendo o ácido anofínico isolado pela primeira vez de *Anodendron affine* (ABRAHAM, ARFMANN 1990). Essa substância foi relatada do fungo *Eutypa lata* (DEFRANQ, ZESIGER, TABACCHI 1993) e do fungo *Culvularia fallax* (ABRAHAM, ARFMANN 1990), e apresenta citotoxicidade contra várias espécies de *Fusarium* (CHRISTEN et al.,2005).

Figura 43- Substância **2** e suas principais correlações em HMBC.



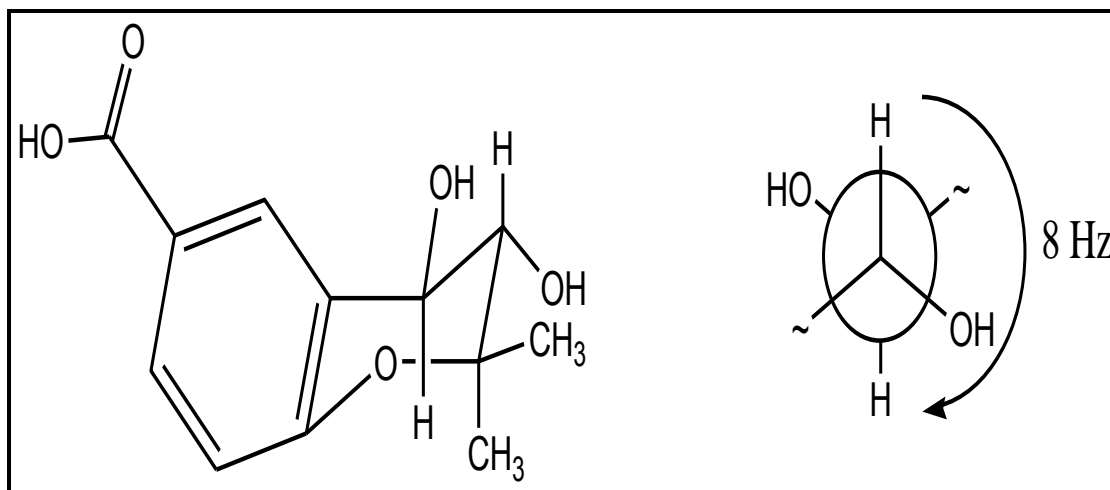
A estereoquímica relativa de H-8 e H-9 foi determinada como *trans* com base nas constantes de acoplamento de 8,0 Hz (Figura 44, pág. 90) que foram observadas no espectro de RMN de 1H da substância, pois se a relação entre H-8 e H-9 fosse *cis* teríamos uma constante de acoplamento de 2,0 Hz (Figura 45, pág. 90).

Isso por ser confirmado também ao analisarmos a estabilidade das duas configurações.

Na configuração *Trans*, observamos uma possível ligação de hidrogênio entre o OH-8 e o H-9, além de termos os grupos maiores (OH-9 e CH₃-10) nas posições equatoriais, o que confere maior estabilidade a essa estrutura.

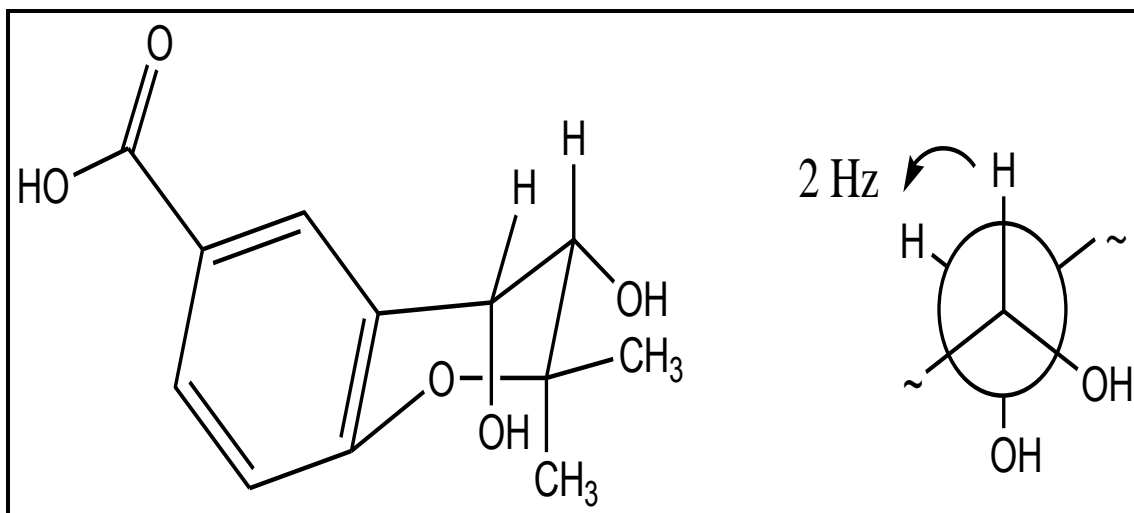
Já na configuração Cis, não observamos ligações de hidrogênio, e os grupos maiores (OH-8 e CH₃-10) estão na posição axial, o que confere menor estabilidade a essa estrutura.

Figura 44- Configuração *trans* da substância 2.



Fonte: A autora

Figura 45- Configuração *cis* da substância 2.



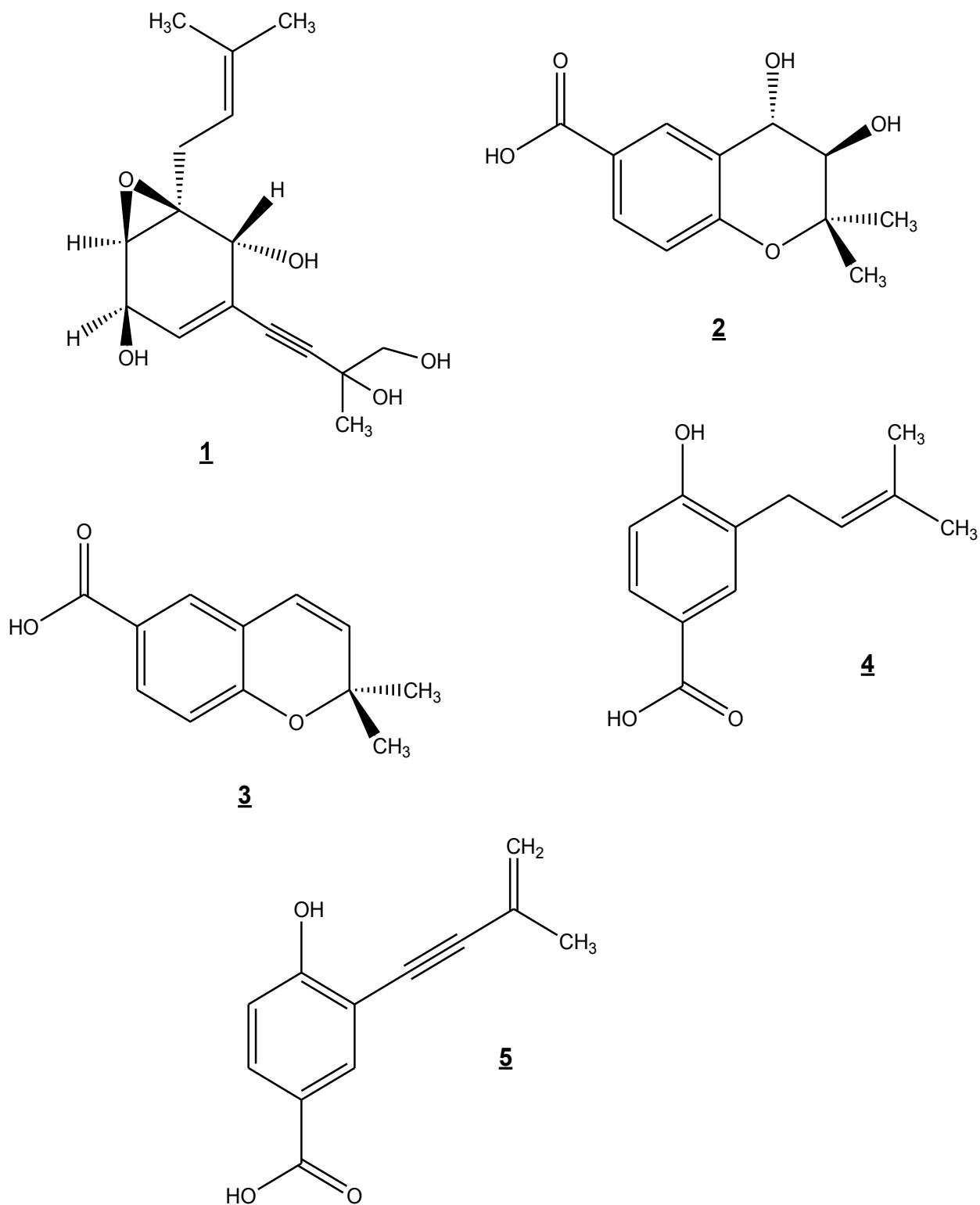
Fonte: A autora

4.5 Avaliação das substâncias encontradas no extrato bruto por ESI-MS.

Considerando que nas análises dos experimentos de CCDC utilizando uma série de eluentes e reveladores específicos, HPLC-DAD e RMN de ^1H foram visualizadas inúmeras substâncias, as quais não foram isoladas por encontrarem-se em menor quantidade, inviabilizando a utilização de qualquer técnica cromatográfica para o isolamento das mesmas, a técnica de desreplicação utilizando ESI-MS foi utilizada, objetivando a identificação destas substâncias.

Deste modo, o extrato bruto produzido por *Saccharicola* sp. em Extrato de Malte foi submetido a “*clean up*” e analisado por ESI-MS. Desta análise foram identificadas as substâncias, substância **1**, ácido anofínico (**2**), ácido 2,2-dimetil-2H cromeno-6-carboxílico (**3**), ácido 4-hidróxi-3-prenilbenzóico (**4**) e ácido 4-hidróxi-3-(3'-metil-3'-buten-1'-il) benzóico (**5**), (**Figura 46**, pág. 92) além de outras três substâncias aparentemente da mesma classe da substância **1**.

Os resultados encontrados sugerem que o meio de cultivo não está influenciando, diretamente, na produção metabólica de *Saccharicola* sp. apesar de diferenças marcantes terem sido observadas na triagem realizada em diferentes meios de cultivo.

Figura 46- Substâncias identificadas por de ESI-MS

Fonte: A autora

4.6 Ensaios biológicos dos extratos brutos Ssp-AcOEt-1 e Ssp-AcOEt-2, frações e das substâncias puras 1 e 2.

4.6.1 Avaliação da Atividade Antifúngica*

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Figura 47, pág. 93) evidenciaram que ambos os Extratos brutos, as frações Fr 4-Si, Fr 5-Si, Fr 6-Si, Fr 7-Si, Fr 8-Si e as substâncias puras 1 e 2 apresentaram fraco potencial antifúngico contra *Cladosporium cladosporioides* e somente as frações Fr 4-Si, Fr 5-Si e Fr 6-Si apresentaram fraco potencial antifúngico contra *C. sphaerospermum*.

Figura 47- Atividade antifúngica dos extratos brutos, frações e substâncias puras de *Saccharicola* sp.

Posição	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>
	Amostra	Atividade	Atividade
1	Ssp-Si-Fr1	-	-
2	Ssp-Si-Fr2	-	-
3	Ssp-Si-Fr3	-	-
4	Ssp-Si-Fr4	*	*
5	Ssp-Si-Fr5	*	*
6	Ssp-Si-Fr6	*	*
7	Ssp-Si-Fr7	*	-
8	Ssp-Si-Fr8	*	-
9	Ssp-Si-Fr9	-	-
10	Ssp-Si-Fr10	-	-
11	Ssp-Si-Fr11	-	-
12	Ssp-Si-Fr12	-	-
13	Ssp-Si-Fr13	-	-
14	Ssp-Si-Fr14	-	-
15	Ssp-Si-Fr15	-	-
16	Extr. 1	*	-
17	Extr. 2	*	-
18	Subst. 1	*	-
19	Subst. 2	-	-

LEGENDA

- * atividade fraca
- ** atividade média
- *** atividade forte

*Os testes de atividade antifúngica foram feitos pela Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

4.6.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica*

Este ensaio, realizado em CCD, é qualitativo e é definido através do halo branco em fundo roxo, para atividade inibitória positiva. De acordo com o observado nas cromatoplasas (**Figura 48**, pág. 94) nenhuma amostra apresentou atividade, evidenciando que esse fungo em questão não apresenta inibição da enzima acetilcolinesterase.

Figura 48- Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos, frações e substâncias puras de *Saccharicola* sp..

Posição	Amostra	Atividade	Atividade
1	Ssp-Si-Fr4	-	-
2	Ssp-Si-Fr5	-	-
3	Ssp-Si-Fr6	-	-
4	Ssp-Si-Fr7	-	-
5	Ssp-Si-Fr8	-	-
6	Ssp-Si-Fr9	-	-
7	Ssp-Si-Fr10	-	-
8	Ssp-Si-Fr11	-	-
9	Ssp-Si-Fr12	-	-
10	Ssp-Si-Fr13	-	-
11	Ssp-Si-Fr14	-	-
12	Ssp-Si-Fr15	-	-
13	Extr. 1	-	-
14	Subst. 1	-	-
15	Subst. 2	-	-

LEGENDA

- * atividade fraca
- ** atividade média
- *** atividade forte

4.6.3 Avaliação da Atividade Antitumoral

Para realização deste ensaio, o extrato bruto AcOEt, algumas frações e as substâncias puras **1** e **2** foram avaliadas, as demais substâncias não apresentaram

massa suficiente para realizar os ensaios, sendo que este ensaio requer uma quantidade maior de massa quando comparado com os outros ensaios realizados.

O potencial antitumoral foi avaliado frente a três linhagens tumorais humanas e comparadas com o controle positivo (doxorrubicina).

A atividade citotóxica das substâncias testadas está apresentada na **Tabela 05** (pág. 95) com seus respectivos percentuais de inibição. Somente as substâncias que apresentaram valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como cut-off para o screening de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 05- Atividade antitumoral do extrato bruto, frações e substâncias puras de *Saccharicola* sp.

Amostra		HCT-116	SD	OVCAR-8	SD	SF-295	SD
Nº	Identificação	GI%(media)		GI%(media)		GI%(media)	
1	Subst 1	16,56	1,15	14,28	5,67	25,6	0,93
2	Subst 2	26,54	4,10	28,73	2,35	31,00	6,94
3	Extr 1	4,18	0,19	10,80	8,88	14,42	2,11
4	Ssp-Si-Fr 4	91,66	8,98	99,47	0,32	38,40	5,15
5	Ssp-Si-Fr 5	25,99	9,88	3,35	14,77	23,89	3,60
6	Ssp-Si-Fr 6	28,04	5,07	14,73	6,53	23,72	2,60
7	Ssp-Si-Fr 7	25,99	3,85	10,12	4,28	17,45	4,77
8	Ssp-Si-Fr 8	20,73	2,44	36,60	0,43	29,02	1,80
9	Ssp-Si-Fr 9	73,52	2,57	70,34	14,98	40,25	49,54
10	Ssp-Si-Fr 10	28,08	3,33	68,30	8,88	17,62	5,27
11	Ssp-Si-Fr 11	5,77	0,13	16,85	19,58	13,28	3,47
12	Ssp-Si-Fr 12	26,13	5,58	23,89	3,21	38,45	

De acordo com o observado na tabela acima apenas a fração Ssp-Fr4 apresentou potencial citotóxico relevante frente às linhagens tumorais testadas.

4.6.4 Avaliação da Atividade antituberculose

Atualmente há um crescente interesse pela busca de novas substâncias com potencial antibiótica, sendo assim, as substâncias **1** e **2** foram enviadas para ensaio de inibição do crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose humana, linhagem H37Rv ATCC – 27294. Os valores de CIM dos ensaios

estão apresentados na **Tabela 6**, pág. 96. Os valores encontrados para a concentração inibitória mínima (CIM) representam a menor concentração da droga capaz de impedir a multiplicação da micobactéria, eliminando pelo menos 90% das mesmas.

Tabela 06- Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos frente aos bacilos *M. tuberculosis*

Composto	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
CMC13	>25
CMC14	2,782
SUBST-1	>25
SUBST-2	>25
RESVERATROL	>25
RFP (PADRÃO)	0,373

Fonte: A autora

Na pesquisa de novos fármacos contra a tuberculose classificam-se como promissores aqueles com atividades iguais ou inferiores a 10 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores apresentados pelas substâncias **1** e **2** de CIM foram >25 $\mu\text{g/mL}$, portanto, concluímos que essas substâncias não apresentam resultado positivo frente a este bioensaio.

4.6.5 Avaliação da Atividade Tripanocida utilizando MTT

As substâncias **1** e **2** foram enviadas para ensaio tripanocida utilizando MTT (**Tabela 07**, pág. 97).

O teste é realizado em triplicata, em varias concentrações. Para as substâncias puras as concentrações realizadas são: 100, 50, 25, 10,5, 2,5 e 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 07- Atividade tripanocida das substâncias **1** e **2** isoladas de *Saccharicola* sp..

Amostras	IC ₅₀
Substância 1	>100
Substância 2	>100

IC₅₀ do benzonidazol: 9,01µg/mL

Fonte: A autora

Ao realizamos o calculo do IC₅₀ observamos um valor acima de 100 µg/ml, indicando que ambas as substâncias não possuem atividade tripanocida de interesse farmacológico.

5 Conclusões

O meio de cultivo líquido Malte apresentou uma boa produção metabólica e perfil químico promissor, visualizado pelo espectro de RMN de ^1H e HPLC-DAD.

O fracionamento dos extratos brutos Ssp-AcOEt-1 e Ssp-AcOEt-2 nos conduziu ao isolamento das substâncias **1** (inérita) e **2** (ácido anofínico).

Houve uma produção majoritária da substância **1** sugerindo que esta substância esteja exercendo algum papel ecológico no nicho em que o micro-organismo se encontra e aparentemente adaptado, uma vez que foi isolado de material saudável.

Até o momento não foi encontrada atividade biológica para as substâncias isoladas, mas outros ensaios encontram-se em andamento, a fim de verificarmos a sua função para o endófito e tentar compreender a relação endófito-planta hospedeira.

A fração Ssp-Si-Fr4 apresentou excelente atividade antitumoral e encontra-se em fase de fracionamento cromatográfico objetivando o isolamento e a determinação estrutural das substâncias responsáveis pela citotoxicidade observada.

Através de ESI-MS foi possível a identificação de outras 5 substâncias presentes em menor quantidade no extrato bruto, além da presença de outras 3 substâncias pertencentes a classe da substância **1**.

As informações contidas nesse trabalho demonstraram a importância do estudo de micro-organismos endofíticos, pois conduziram a significativos resultados, proporcionando o conhecimento da composição química do fungo endofítico *Saccharicola* sp. associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana*.

Os resultados encontrados até o momento confirmam os fungos endofíticos como fontes prolífica de metabólitos novos e bioativos e estruturalmente diversos.

Referências

ABRAHAM, W-R.; ARFMANN, A-H. Hidroxy-(Methybutenylnyl)-benzoic acid and derivatives from *Culvularia fallax*. **Phytochem. Rev.**, v. 29, n. 8, p. 264-2644, 1990.

ALVES, R. T. **Desenvolvimento de formulações de micoinseticidas e de técnicas de aplicação apropriadas para o controle biológico de insetos-praga**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/229/>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

ALY, H. A.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.

BAEDE, V. D.; GALEN, E. V.; LEKKERKERKER, J. F. Drug interactions of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) are potentially hazardous. **Ned. Tijdschr. Geneesk.**, v. 144, p. 811-812, 2000.

BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Res. Int.**, v. 44, p. 1776-1789, 2011.
BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BUENO, E.; TAITELBAUM, P. **Vendendo saúde: a história da propaganda de medicamentos no Brasil**. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/propaganda/vendendo_saude.pdf>. Acesso em: 11 jun 2013.

CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* dc. Prodr. (*Rubiaceae*)**. 2003. 224 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

CHRISTEN, D. et al. Transformation of eutypa dieback and esca disease pathogen toxins by antagonistic fungal strains reveals a second detoxification pathway not present in *Vitis vinifera*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 7043-7051, 2005.

CICARELLI, R. M. B. **Avaliação da atividade tripanocida de extratos e frações de planta da família *Piperaceae***. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Vigência: 01 nov. 2007-31 out. 2010. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/23454/avaliacao-da-atividade-tripanocida-de-extratos-e-fracoes-de-planta-da-familia-piperaceae>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure App. Chem.**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2012.

DAMETTO, A. C. **Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**. 2010, 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

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

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 1121-1124, 2006.

GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochem. Rev.**, v. 9, p. 537-545, 2010.

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

HARAKI, A. Y. Tuberculose - a peste cinzenta: a importância da pasteurização do leite. **Boletim Informativo Via-Láctea**, n. 8, 2009. Disponível em:
< http://cac-php.unioeste.br/projetos/cmetloeste/boletins/VIA_LACTEA_Dezembro.pdf
>. Acesso em: 18 jun. 2010.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Disc. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **J. Microb. Biotechnol. Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **J. Nat. Prod.**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.

LANDECKER, E. M. **Fundamental of the fungi**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996.

LEFEVRE, F. et al. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. **Res. Microbiol.**, v. 159, p. 153-161, 2008.

- LINGQI, Z. et al. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. **Zhong Cao Yao**, v. 31, p. 805-807, 2000.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- OWNLEY, B.; GWINN, K.; VEJA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **Biocontrol Sci. Technol.**, v. 55, p. 113-128, 2010.
- PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *paraphaeosphaeria quadrisepata* and *chaetomium chiversii*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1939-1945, 2007.
- PAVAN, F. R. **Atividade anti *mycobacterium tuberculosis* intra e extracelular e citotoxicidade dos complexos de rutênio e vanádio e seus ligantes**. 2009, 93 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 1-68, 1997.
- PRITI, V. et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Curr. Sci.**, v. 97, p. 477-478, 2009.
- PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.
- PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **J. Biotechnol.**, v. 122, p. 494-510, 2006.
- RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochem. Anal.**, v. 2, p. 199-201, 1991.
- SAIKKONEN, K. et al. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- SANTOS, K. K. A. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **J Med Food**, v.15, p. 66-70, 2012.
- SANTOS, L. S. et al. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **Rev. Saúde e Biol.**, v. 8, n. 1, p. 92-101, 2013.

SHARMA, B. et al. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chem.**, v. 110, p. 697-705, 2008.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biol. Rev.**, v. 21, p. 75-89, 2007.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. Jr. Endophytic fungi. In: FOSTER, M.; MULLER, G.; BILLS, G. (Ed.). **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. Amsterdam: Elsevier, 2004. Cap. 12, p. 241-270.

STROBEL, G. et al. J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-258, 2004.

TABARRINI, O. et al. Velnacrine thriaanalogues as potential agents for treating Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 9, p. 2921-2928, 2001.

VASI, S.; AUSTIN, A. Antioxidant potential of *Eugenia jambolana* Lam. Seeds. **J. Biol. Sci.**, v. 9, n. 8, p. 894-898, 2009.

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **J. Nat. Prod.**, v. 29, p. 622-641, 2012.

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

ZHAO, J. et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Med. Chem.**, v. 11, p. 159-168, 2011.