

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Química

Júlia Dietsche Monfardini

Diterpenos tetranorlabdanos e isocumarinas produzidos
por *Botryosphaeria parva*, um fungo endofítico em
Eugenia jambolana Lam. (Myrtaceae)

Araraquara
2016

Júlia Dietsche Monfardini

Diterpenos tetranorlabdanos e isocumarinas produzidos por
Botryosphaeria parva, um fungo endofítico em *Eugenia jambolana* Lam.
(Myrtaceae)

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

Orientadora: Prof^a Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

M734d Monfardini, Júlia Dietsche
Diterpenos tetranorlabdanos e isocumarinas produzidos por
Botryosphaeria parva, um fungo endofítico em *Eugenia
jambolana* Lam. (Myrtaceae) / Júlia Dietsche Monfardini –
Araraquara : [s.n], 2016
177 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo


1. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos. 3. Antioxidantes.
4. Atividade antifúngica. 5. Ressonância magnética nuclear.
I. Título.

JULIA DIETSCHÉ MONFARDINI

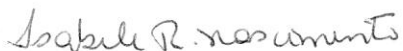
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 10 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Isabelle Rodrigues Nascimento
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Mônica Tallarico Pupo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto - SP

À minha família,
que me apoiou em minhas decisões e,
me deu forças para continuar trilhando este caminho.

AGRADECIMENTOS

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

À prof^a Dra. Angela R. Araujo pela orientação, dedicação, compreensão, carinho, amizade, muito obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

Ao prof. Dr. Humberto Marcio Santos Milagre e ao prof. Dr. Ian Castro Gamboa que participaram do exame de qualificação, e contribuíram para a finalização deste trabalho.

À prof^a Dra. Isabele Rodrigues Nascimento e à prof^a Dra. Mônica Tallarico Pupo, membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para a avaliação desta dissertação.

Aos professores do departamento de Química Orgânica, por seus ensinamentos e amizade.

A todos os funcionários do IQ da Unesp.

Ao querido Nivaldo Borallo pela realização dos espectros de RMN, por estar sempre disposto a compartilhar os seus conhecimentos.

Aos técnicos Marquinhos, João e Juliana.

À prof^a Dra. Maria Cláudia M. Young pela realização dos ensaios biológicos.

A todos os meus amigos, em especial à Vivi, Tony, Gigi, Gustavo, Maiara, que não foram apenas amigos, mas sim grandes irmãos.

Aos amigos da turma de pesquisa Carolina, Andressa, Fernandinho, Juzinha, Mayra, Isabela, Juliana e Ian.

Aos colegas do Departamento de Química Orgânica em especial aos do NuBBE, pela convivência e que de uma maneira ou de outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

E, por fim, aqueles que são as pessoas mais importantes na minha vida, a minha família, que mesmo de “longe” sempre me apoiaram. Dedico a vocês este trabalho, não fosse por vocês, não teria chegado ao lugar que eu cheguei. Pai, Mãe, minha irmã Raquel, minhas avós Elisabeth e Magda (em memória), meu tio Félix e meu primo Elton.

As pessoas são como janelas de vidro jateado.
Brilham e reluzem quando o sol está no céu, mas quando chegam as
sombras, sua verdadeira beleza só se revela se houver uma luz dentro.

– Elisabeth Kübler-Ross –

RESUMO

Os micro-organismos têm demonstrado serem valiosas fontes de princípios ativos de uso clínico, no qual a penicilina é o exemplo mais conhecido de metabólito secundário, de importância medicinal, produzido por fungos. A espécie vegetal *Eugenia jambolana* Lam., popularmente conhecida como Jambolão, é utilizada na medicina popular brasileira, principalmente no tratamento de diabetes. O fungo *Botryosphaeria parva*, isolado das folhas da *E. jambolana* (L.) e codificado como Ej_F01, foi cultivado em escala ampliada em três meios de cultivo: Czapek[®], PDB e Milho. Após o período de fermentação do endófito no meio de milho, foi feita uma extração direta com MeOH, seguida de filtração e evaporação do solvente. O extrato obtido foi solubilizado em AcOEt e fez-se três partições líquido-líquido com H₂O, após a evaporação do solvente orgânico, o extrato foi dissolvido em CH₃CN e foi feita uma nova partição líquido-líquido com Hexano, após a evaporação da CH₃CN, foi obtido o extrato de interesse. Após o período de fermentação do endófito nos meios líquidos (PDB e Czapek[®]), a suspensão micelar foi filtrada a pressão reduzida, separando os micélios dos meios fermentados. Em seguida, os filtrados aquosos foram submetidos a três partições líquido-líquido com AcOEt, e após a evaporação do solvente orgânico, foram obtidos os extratos brutos de interesse. Todos os extratos foram fracionados utilizando técnicas cromatográficas, como Cromatografia em Coluna e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativa. Após o fracionamento dos extratos brutos, foi possível obter sete substâncias oriundas do extrato do milho, seis substâncias do extrato do Czapek[®], e uma do extrato de PDB, que foram submetidas a análises espectrométricas (EM, RMN de ¹H, ¹³C, 1D e 2D) para a determinação/identificação estrutural. As substâncias **05**, **08**, **09** e **11** foram identificadas como 5-hidroximeleina, *rel.* (3*S*, 4*S*)-4-hidroximeleina, meleina e *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hidroximeleina, respectivamente, pertencentes à classe das isocumarinas; as substâncias **01**, **03**, **06** e **07** foram identificadas como botryosphaerin A, 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6 β :12,17-diolídeo, CJ-14445 e oidiolactona E, respectivamente, pertencentes à classe dos diterpenos tetranorlabdanos; a substância **12** foi identificada como botryosphaerona D, pertencente à classe das naftalenonas. A substância **02**, inédita, foi nomeada como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*R*, 10*S*)-18-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-7,9-dieno-19,6 β :12,17-diolídeo, codificada como botryosphaerin I. Os estudos relacionados ao *B. parva* têm como finalidade verificar sua produção metabólica em diferentes meios de cultivo, bem como a avaliação do potencial biológico dos extratos brutos, frente aos ensaios antioxidante, antifúngico e anticolinesterásico.

Palavras Chave: Botryosphaerin I. Botryosphaerona D. Atividades Antioxidante, Antifúngica e Anticolinesterásica.

ABSTRACT

Microorganisms have proven to be valuable sources of active principles for clinical use, wherein the penicillin is the best known example of a secondary metabolite of medicinal importance, produced by fungi. The plant species *Eugenia jambolana* Lam., commonly called Black Plum, is used in traditional Brazilian medicine, especially in the treatment of diabetes. The *Botryosphaeria parva* fungus, isolated from leaves of *E. jambolana* (L.) encoded as Ej_F01, was grown on an enlarged scale in three different culture media: Czapek[®], PDB and corn. After the fermentation period in the corn media, a direct extraction was done with MeOH followed by filtration and evaporation of the solvent. The extract was dissolved in AcOEt and made three liquid-liquid partition with H₂O, after evaporation of the organic solvent, the extract was dissolved in CH₃CN and was made a new liquid-liquid partition with Hexane, after evaporation of the CH₃CN, it was obtained extract of interest. After the fermentation period in liquid media (PDB and Czapek[®]), the micellar suspension was filtered under reduced pressure, separating the mycelium from the fermented broth. Then, the aqueous filtrates were subjected to three liquid-liquid partition with AcOEt, and after evaporation of the organic solvent, there were obtained the crude extracts of interest. All extracts were fractionated using chromatographic techniques such as column chromatography and/or preparative High Performance Liquid Chromatography efficiency. After the fractioning of crude extracts, it was possible to obtain seven substances derived from corn extract, six substances obtained from Czapek extract, and a substance obtained from the PDB extract, which were submitted to spectrometric analysis (MS-ESI, NMR ¹H, ¹³C, 1D and 2D) for determining and structural identification. The substances **05**, **08**, **09** and **11** were identified as 5-hydroxymelein, *rel.* (3*S*, 4*S*)-4-hydroxymelein, Melein and *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hydroxymelein, respectively, belonging to the class of isocoumarins; the substances **01**, **03**, **06** and **07** were identified as botryosphaerin A, 13,14,15,16-tetranorlabd-7-ene-19,6 β :12,17-diolide, CJ-14445 and oidiolactone E, respectively, belonging to the class of tetranorlabdanes diterpenoids, and substance **12** was identified as botryosphaerone D, belonging to the class of naftalenones. A new tetranorlabdane diterpenoid was obtained, substance **02**, named *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*R*, 10*S*)-18-hydroxy-13,14,15,16-tetranorlabd-7,9-dien-19,6 β :12,17-diolide and encoded botryosphaerin I. These studies related to the *B. parva* are intended to verify your metabolic production in different culture media as well as the evaluation of the biological potential of extracts compared to antioxidant, antifungal and anticholinesterase trials.

Keywords: Botryosphaerin I. Botryosphaerone D. Antioxidant, Antifungal and Acetylcholinesterase Activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Alguns exemplos de metabólitos secundários, oriundos de fungos endofíticos, com atividades biológicas.	23
Figura 02 – Exemplar adulto (a), folhas (b), flores (c) e frutos (d) de <i>Eugenia jambolana</i> Lam.	24
Figura 03 – Representação estrutural de três antocianinas presentes nos frutos de <i>Eugenia jambolana</i> (L.).....	25
Figura 04 – <i>Botryosphaeria parva</i> no meio de cultivo PDA.	27
Figura 05 – Isocumarinas isoladas de <i>Botryosphaeria parva</i>	28
Figura 07 – Comparação estrutural de uma isocumarina com uma cumarina.	30
Figura 08 – Esqueleto base de uma naftalenona.....	30
Figura 09 – Exemplo de diterpeno labdano e diterpeno tetranorlabdano. ...	32
Figura 10 – Comparação da coloração do meio de Czapek®, de alguns frascos de Erlenmeyer, no final do período de fermentação.	44
Figura 11 – Comparação da coloração do meio de PDB, de alguns frascos de Erlenmeyer, no final do período de fermentação.	47
Figura 12 – Comparação dos Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em diferentes comprimentos de onda.	52
Figura 13 – Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, dos extratos brutos, em CD ₃ OD e 300 MHz.	53
Figura 14 – Ensaio biológico realizado com os extratos brutos.	55
Figura 15 – Esquema de reação envolvida no ensaio antioxidante.	58
Figura 16 – Comparação dos Cromatogramas das frações oriundas do Milho.	59
Figura 17 – Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, das frações oriundas do extrato bruto de Milho, em CD ₃ OD e 300 MHz.	61
Figura 18 – Ensaio Antioxidante das Frações do extrato de Milho na condição de 90:10 CHCl ₃ /MeOH.	62
Figura 19 – Representação estrutural das substâncias isoladas do meio de cultivo de milho.	63
Figura 20 – Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, dos extratos cristalinos e oleosos dos extratos de Czapek®, em CD ₃ OD e 300 mHz.	64
Figura 21 – Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, das frações 02 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD ₃ OD e 600 MHz.	65
Figura 22 – Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, das frações 07 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD ₃ OD e 600 MHz.	66

Figura 23	– Representação estrutural das substâncias isoladas do meio de cultivo de Czapek®.	67
Figura 24	– Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, da Fração 04 do extrato CZ_E_O com a Fr. 02_8 do extrato de Milho, em CD ₃ OD e 600 MHz.	68
Figura 25	– Comparação dos cromatogramas dos extratos brutos de PDB (Azul = PDB_C; Preto = PDB_E) em diferentes comprimentos de onda.	69
Figura 26	– Comparação dos cromatogramas das frações dos extratos de PDB.	70
Figura 27	– Comparação dos espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, das frações 03 dos extratos PDB_C e PDB_E com as frações 07 dos extratos de CZ_C_O e CZ_E_O, em CD ₃ OD e 600 MHz.	72
Figura 28	– Representação estrutural da substância 01	73
Figura 29	– Estrutura parcial A de 01	74
Figura 30	– Estrutura parcial B de 01	75
Figura 31	– Conexão das estruturas parciais A e B pelas correlações entre H-7↔C-17 e H11↔C10.	75
Figura 32	– Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de 01	76
Figura 33	– Representação estrutural da substância 03	77
Figura 34	– Correlações a ³ J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 03	78
Figura 35	– Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de 03	78
Figura 36	– Representação estrutural da substância 06	80
Figura 37	– Correlações a ³ J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 06	81
Figura 38	– Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de 06	81
Figura 39	– Representação estrutural da substância 02	83
Figura 40	– Correlações ³ J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 02	84
Figura 41	– Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de 02	84
Figura 42	– Representação estrutural da substância 07	86
Figura 43	– Correlações ³ J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 07	87
Figura 44	– Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de 07	88
Figura 45	– Comparação das estruturas dos diterpenos tetranolabdanos. .	89
Figura 46	– Representação estrutural da Substância 05	93
Figura 47	– Correlações a ³ J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 05	94
Figura 48	– Representação estrutural da Substância 08	95
Figura 49	– Correlações a ³ J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 08	96
Figura 50	– Representação estrutural da Substância 11	97

Figura 51 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância <u>11</u>	98
Figura 52 – Representação estrutural da Substância <u>09</u>	99
Figura 53 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância <u>09</u>	100
Figura 54 – Representação estrutural da Substância <u>12</u>	104
Figura 55 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância <u>12</u>	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	– Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato oriundo do Milho.	42
Tabela 02	– Massas obtidas de cada fração oriunda da Fr. 02 do extrato do Milho.....	43
Tabela 03	– Quantidade dos sais e de sacarose utilizadas no meio de cultivo Czapek [®] , para um frasco de Erlenmeyer.....	43
Tabela 04	– Massas dos extratos, e seus respectivos códigos, provenientes do meio de cultivo Czapek [®]	44
Tabela 05	– Massas obtidas após a recristalização dos extratos de Czapek [®] , e seus respectivos códigos de identificação.....	45
Tabela 06	– Tempos de retenção das frações coletadas dos extratos oleosos, CZ_C_O e CZ_E_O, e suas respectivas massas.....	46
Tabela 07	– Massas dos extratos, e seus respectivos códigos, provenientes do meio de cultivo PDB.	47
Tabela 08	– Composição das Fases Móveis utilizadas no fracionamento dos extratos de PDB.....	48
Tabela 09	– Soluções utilizadas na análise de potencial anticolinesterásico dos extratos brutos.	50
Tabela 10	– Rendimento dos extratos brutos referentes a um grama dos meios de cultivo utilizados.....	51
Tabela 12	– Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio das frações 02 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD ₃ OD e 600 MHz.	65
Tabela 13	– Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio das frações 07 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD ₃ OD e 600 MHz.	66
Tabela 14	– Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio da Fração 04 do extrato CZ_E_O com a Fr. 02_8 do extrato de Milho, em CD ₃ OD e 600 MHz.	68
Tabela 15	– Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio das frações 03 dos extratos PDB_C e PDB_E com as frações 07 dos extratos de CZ_C_O e CZ_E_O, em CD ₃ OD e 600 MHz.	72
Tabela 16	– Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁶¹ da substância botryosphaerin A (01)..	76
Tabela 17	– Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁶² , da substância 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6β:12,17-diolídeo (03).	79
Tabela 18	– Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁶³ , da substância CJ-14445 (06)..	82

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da Substância 02 , em CD_3OD e 14,1 T.	85
Tabela 20 – Comparação dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-11 das substâncias 01 e 07 , com δ em ppm, J em Hz.	87
Tabela 21 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁶⁴ , da substância oidiolactona E (07).	88
Tabela 22 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁵¹ , da substância 5-hidroximeleina (05).	94
Tabela 23 – Comparação dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-5, H-6 e H-7 da substância 08 em dois solventes deuterados (600 MHz), com δ em ppm, J em Hz.....	96
Tabela 24 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁵¹ , da substância <i>rel.</i> (3S, 4S)-4-hidroximeleina (08).	97
Tabela 25 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁵¹ , da substância <i>rel.</i> (3S, 4R)-4-hidroximeleina (11).	99
Tabela 26 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁵¹ , da substância meleina (09)...	101
Tabela 27 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁴⁶ , da substância botryosphaerona D (12).....	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
Å	Ångström
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
C18	Adsorvente de Fase Reversa tipo Octadecil Silano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Sigla em inglês para <i>Espectroscopia Correlacional Homonuclear</i>
cm	Centímetro
CZ_C_C	Czapek®_Claro_Cristais
CZ_C_O	Czapek®_Claro_Oleoso
CZ_E_C	Czapek®_Escuro_Cristais
CZ_E_O	Czapek®_Escuro_Oleoso
δ_c	Deslocamento Químico de Carbono
δ_H	Deslocamento Químico de Hidrogênio
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
$D_{int.}$	Diâmetro Interno
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
ddd	Duplo-duplo-dubleto
dq	Duplo-quadruplete
dt	Duplo-triplete
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Ej_F01	Fungo endofítico obtido das folhas da <i>Eugenia jambolana</i> Lam.
EM	Espectrometria de Massas
ESI-qQ-TOF	Sigla em inglês para <i>Ionização por Eletrospray – Tempo de Voo</i>
Fr.	Fração
g	Gramas
H	Altura
HMBC	Sigla em inglês para <i>Correlação Heteronuclear de Ligação Múltipla</i>
HOMODEC	Sigla em inglês para <i>Desacoplamento Homonuclear</i>
HPLC	Sigla em inglês para <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
HSQC	Sigla em inglês para <i>Correlação Heteronuclear Quântica Única</i>
°C	Graus Celsius
J	Constante de Acoplamento
Kg	Kilograma
L	Litro

<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min.	Minutos
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mm	Milimetro
m/v	Massa/Volume
m/z	Razão Massa-Carga
n.	Número
nm	Nanômetro
NOESY	Sigla em inglês para <i>Espectroscopia de efeito nuclear de Overhauser</i>
P.A	Para Análise
p.	Página
PDA	Sigla em inglês para <i>Batata, Dextrose e Agar</i>
PDB	Sigla em inglês para <i>Batata e Dextrose</i>
PDB_C	PDB_Claro
PDB_E	PDB_Escuro
ppm	Parte por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
SPE	Sigla em inglês para <i>Extração em Fase Sólida</i>
T	Tesla
<i>t</i>	Triplete
v.	Volume
V _{inj.}	Volume de Injeção
λ	Comprimento de Onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Fungos: uma visão geral.....	20
1.2	Fungos Endofíticos.....	21
1.3	Espécie Vegetal Hospedeira.....	24
1.4	O Endófito <i>Botryosphaeria parva</i>	26
1.5	Policetídeos.....	29
1.5.1	As Isocumarinas.....	29
1.5.2	As Naftalenonas.....	30
1.6	Os Diterpenos Tetranorlabdanos.....	31
2	OBJETIVO.....	33
2.1	Objetivos Específicos.....	33
3	FLUXOGRAMAS.....	34
3.1	Meio de Cultivo Sólido – Milho.....	34
3.2	Meio de Cultivo Líquido – Czapek®.....	35
3.3	Meio de Cultivo Líquido – PDB.....	36
4	MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS.....	37
4.1	Manipulação do Micro-organismo.....	37
4.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	37
4.3	Cromatografia em Coluna (CC).....	37
4.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD).....	37
4.5	Preparo de amostra para análises de CLAE-DAD.....	38
4.6	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	38
4.7	Espectrometria de Massas (EM).....	39
4.8	Solventes utilizados.....	39
4.9	Outros Equipamentos.....	39
5	METODOLOGIA.....	40
5.1	Obtenção dos Extratos Brutos.....	40
5.1.1	Meio de Cultivo Sólido – Milho.....	40
5.1.2	Meio de Cultivo Líquido – Czapek®.....	43
5.1.3	Meio de Cultivo Líquido – PDB.....	46
5.2	Ensaio Biológicos.....	48

5.2.1	Ensaio Antioxidante	48
5.2.2	Ensaio Antifúngico	49
5.2.3	Ensaio Anticolinesterásico	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1	Ensaio Biológicos dos Extratos Brutos	54
6.1.1	Atividade Antifúngica	56
6.1.2	Atividade Anticolinesterásica.....	57
6.1.3	Atividade Antioxidante	57
6.2	Meio de Cultivo Sólido – Milho	58
6.2.1	Purificação da Fração 02	61
6.3	Meio de Cultivo Líquido – Czapek®	63
6.4	Meio de Cultivo Líquido – PDB.....	68
7	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS	73
7.1	Substância 01	73
7.2	Substância 03	77
7.3	Substância 06	80
7.4	Substância 02	83
7.5	Substância 07	86
7.6	Comparação dos perfis químicos dos diterpenos tetranorlabdanos ..	89
7.7	Substância 05	93
7.8	Substância 08	95
7.9	Substância 11	97
7.10	Substância 09	99
7.11	Comparação dos perfis químicos das isocumarinas.....	101
7.12	Substância 12	104
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE.....	113

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, existem diversas estratégias e metodologias para a síntese ou para a descoberta de novos fármacos, e a química de produtos naturais representa uma dessas alternativas de sucesso.

Os produtos naturais podem ser obtidos de diversas fontes, em que as mais conhecidas e utilizadas são os micro-organismos, plantas ou animais. Esses produtos incluem classes de compostos tais como: os terpenos, policetídeos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, entre outras. Esses metabólitos são oriundos da expressão natural da complexidade dos organismos.¹

Ao longo da maior parte da história, a natureza, especialmente as plantas, tem fornecido uma diversificada fonte de produtos naturais que são utilizados como medicamentos populares no tratamento de várias doenças.^{2,3} No início do século XVII, os avanços nas áreas de conhecimento científico levaram a descoberta de produtos naturais bioativos, sendo que os primeiros relatos referentes a esses produtos são: a estricnina, morfina, atropina, quinina e a colchicina.⁴ A Organização Mundial da Saúde – OMS estima que aproximadamente 80% da população mundial recorre à medicina popular como fonte dos primeiros tratamentos farmacológicos.¹

A maioria dos trabalhos que envolvem produtos naturais estão voltados para o isolamento e identificação de substâncias, muitas vezes associados a ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos.⁵

Os produtos naturais são produzidos em um estágio específico de desenvolvimento dos organismos vivos, e as condições do ambiente (estresse e/ou disponibilidade de nutrientes) em que esse organismo se encontra influencia a produção dessas substâncias. Portanto, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a produção dos metabólitos secundários bioativos destes organismos. As estratégias incluem: a triagem e seleção dos organismos com alta produção de metabólitos de interesse; a cultura de órgãos, cultura de células imobilizadas; disponibilização de precursores biossintéticos, e a produção em escala ampliada.⁶

Considerando todas as limitações associadas com a produtividade e vulnerabilidade de alguns organismos, como algumas espécies de plantas, como fontes de novos metabólitos, os micro-organismos servem como uma fonte alternativa na obtenção de substâncias com potencial farmacêutico.⁶

Dentro do contexto medicinal, os micro-organismos têm demonstrado serem valiosas fontes de princípios ativos de uso clínico, por possuírem alta capacidade de produção metabólica diversificada, e um exemplo desses produtos é a penicilina, um antibiótico produzido pelo fungo filamentosso *Penicillium notatum*.⁷ A descoberta acidental, feita por Alexander Fleming em 1928, batizou o período de 1940 a 1970 de “Idade de Ouro dos Antibióticos”.⁸ Essa denominação se deve a uma extensa investigação, principalmente por empresas farmacêuticas, de micro-organismos como sendo fontes de novos antibióticos. Os antibióticos descobertos nessa época não eram apenas as penicilinas, mas uma variedade de novos antibióticos, como: as cefalosporinas, as tetraciclina, os aminoglicosídeos, os glicopeptídeos, os lipopeptídeos e compostos macrocíclicos, tais como a eritomicina.⁴

Durante séculos, os micro-organismos fascinaram e ainda fascinam os estudiosos da área, que perceberam a importância de bactérias, fungos e vírus para a saúde humana, animal e vegetal com a produção de compostos bioquímicos (vitaminas e antibióticos), além de realizarem processos como a fermentação, a transformação e a decomposição de materiais orgânicos.⁹ Atualmente, existe uma vertente que considera que os micro-organismos constituem uma das mais importantes formas de vidas que fornecem ferramentas biotecnológicas que auxiliam na fabricação de substâncias químicas e bioquímicas.⁹

A diversidade microbiana e os nichos em que os micro-organismos vivem são enormes e realmente impressionantes, variando de sedimentos do oceano profundo a piscinas térmicas da Terra. Uma fonte relativamente inexplorada dessa diversidade microbiana são as florestas tropicais¹⁰, onde existe uma grande variedade de nichos microbianos, como exemplo os fungos endofíticos (fungos que habitam espécies vegetais) que são

considerados benéficos por possuírem a capacidade de produzir antibióticos, hormônios e enzimas.^{11,12}

1.1 Fungos: uma visão geral

Inicialmente, organismos vivos foram divididos em dois reinos: o Reino Vegetal e o Reino Animal, no entanto, os biólogos se conscientizaram de que essa divisão não era totalmente satisfatória, reconhecendo, pelo menos, quatro grandes grupos: o Reino Animal, o Reino Vegetal, o Reino Fungi e o Reino Monera.¹³

Estima-se que o Reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta.¹⁴

A ciência da micologia teve um início modesto no século XVIII, muitas vezes como um passatempo de domingo para os médicos. Nos dias atuais, os fungos são a preocupação do taxonomista, morfologista, geneticista, ecologista, patologista de plantas, médico, bioquímico e microbiologista comercial.¹⁵

Os fungos diferem fundamentalmente das plantas verdes em sua falta de clorofila, o que significa que eles não são capazes de fotossintetizar o seu próprio alimento (organismos heterotróficos), e são, portanto, como animais, obrigados a viver quer como saprófitos na matéria orgânica morta ou como parasita em outros organismos vivos.¹³ Constituem um grupo de micro-organismos eucarióticos, uni (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos), em geral, com parede celular e cujas estruturas reprodutivas apresentam uma variedade de formas.^{16,17}

Os fungos podem ser classificados de acordo com local que eles são encontrados nas espécies vegetais. As classificações são¹⁸:

- Fungos Epifíticos – que habitam a superfície do material vegetal;
- Fungos Fitopatogênicos – que causam doenças em vegetais;
- Fungos Micorrízicos – habitam o interior das raízes das plantas;

- Fungos Rizosféricos – habitam o solo que está em contato com as raízes da planta;
- Fungos Endofíticos – que habitam o interior dos tecidos vegetais da planta.

Este trabalho tem como foco de estudo os fungos endofíticos de plantas, pois estes micro-organismos vêm desempenhando um importante papel na descoberta de substâncias novas e bioativas.^{19,20}

1.2 Fungos Endofíticos

Toda espécie vegetal suporta um conjunto de micro-organismos conhecidos como endófitos³, que habitam seus espaços inter e intracelulares, durante toda ou parte de sua vida^{21,22} sem causar danos aparentes à planta.²³

Estudos realizados com fungos endofíticos, mostra a existência de um número incontável de novos gêneros de fungos em associação planta – micro-organismos.¹⁰

Um fungo endofítico encontra-se em um processo de relacionamento biológico com a planta hospedeira, em que ele pode influenciar várias características expressas pelo hospedeiro e desempenhar relevantes funções para a sanidade vegetal, pois podem atuar como agentes controladores de fitopatógenos no controle de insetos e até na proteção da planta contra herbívoros.²⁴

A espécie vegetal pode hospedar uma ou mais espécies de endófitos¹⁰, e em algumas plantas pode-se observar a predominância de uma ou mais espécies, evidenciando a especificidade de espécies de fungos com a espécie hospedeira. Essa especificidade pode ser influenciada pelas condições ambientais em que a espécie hospedeira se encontra²⁵, e pode trazer grandes perdas à biodiversidade, uma vez que se extinguindo uma espécie vegetal estará eliminando toda uma flora microbiana.¹¹

Os fungos endofíticos podem se relacionar de duas maneiras diferentes com o organismo vegetal. Essas relações são:

- Relações Mutualísticas – garantem a sobrevivência do fungo pela absorção de nutrientes fornecidos pela planta, e do hospedeiro pela proteção contra insetos, animais e micro-organismos fitopatógenos, garantida por substâncias de defesa produzidas pelos endófitos.
- Relações de Comensalismo – apenas um organismo se beneficia, no entanto, o outro não é prejudicado.

Fungos endofíticos possuem muitos fatores de virulência que são contra atacados pelos mecanismos de defesa da planta. Se a virulência do fungo e o mecanismo de defesa da planta são equilibrados, a associação permanece aparentemente assintomática e avirulenta.²⁶ No entanto, se a planta sucumbe à virulência do fungo, ocorre um relacionamento planta – patógeno, em que muitos endófitos podem ser patógenos latentes e seu metabolismo secundário passa a ser prejudicial ao hospedeiro, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas às plantas. Essa mudança no relacionamento com o hospedeiro, de endófito a parasita, se deve a certos fatores intrínsecos ou ambientais para expressar fatores que levam à patogenicidade.²⁶

Muitos estudiosos comprovaram que o tipo de interação/relação entre o endófito e a espécie vegetal é controlada pelos genes de ambos os organismos e modulada pelo meio ambiente, no entanto, como essa interação ocorre é pouco conhecida.²⁷ Essas interações envolvem um conjunto de passos em que os genes de ambos os organismos são ativados/desativados por sinais específicos, que são frequentemente efetivos em determinadas condições fisiológicas a uma dada condição ambiental.²⁸

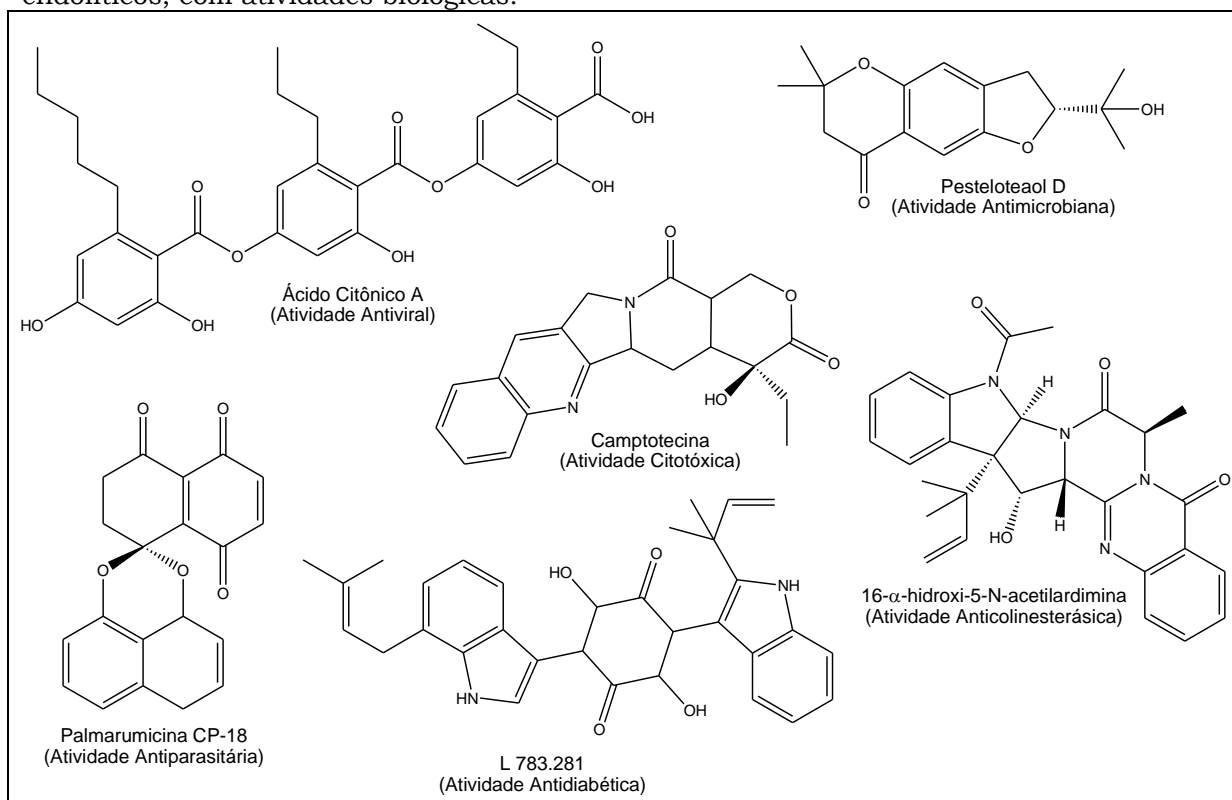
Dessa forma, uma característica importante dos fungos endofíticos é de que eles são generalizados e diversificados na sua ocorrência, e são conhecidos por colonizar plantas que crescem em diferentes regiões ambientais. Esses ambientes variam desde o Ártico e Antártica a solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas e mangues.²⁷

Em um programa de triagem de produtos naturais, oriundos de fungos endofíticos, verificou-se que estes constituem o grupo mais produtivo

quimicamente entre os fungos filamentosos e que apresentam uma produção metabólica 73% superior a outros fungos.²⁹ A alta produtividade desses fungos pode estar relacionada a dois fatores ecológicos: o alto nível de estresse ambiental e intensas interações com outros organismos.²⁸ Estes relatos sugerem que a seleção do endófito para estudo deve ser realizada com espécies vegetais de diferentes biotas, principalmente as que enfrentam frequentes e intensas interações no ambiente, como plantas de regiões áridas, florestas tropicais, entre outras.³⁰

Apesar de existir poucos estudos químicos dos fungos endofíticos, foi isolado um número considerável de substâncias com atividades biológicas (Figura 01).¹⁸ Adicionalmente, os fungos endofíticos apresentam vantagens sobre outras fontes de produtos naturais, porque são recursos renováveis e a produção em escala ampliada dos metabólitos pode ser realizada utilizando a tecnologia e o conhecimento sobre as técnicas já existentes.³¹

Figura 01 – Alguns exemplos de metabólitos secundários, oriundos de fungos endofíticos, com atividades biológicas.



Fonte: adaptada de Chapla¹⁸.

A possibilidade de obtenção de novas substâncias, com potencial biológico, oriundas de fungos endofíticos mostra que esses micro-organismos constituem uma potencial fonte de metabólitos secundários. Estas observações justificam o estudo químico e biológico destes micro-organismos.

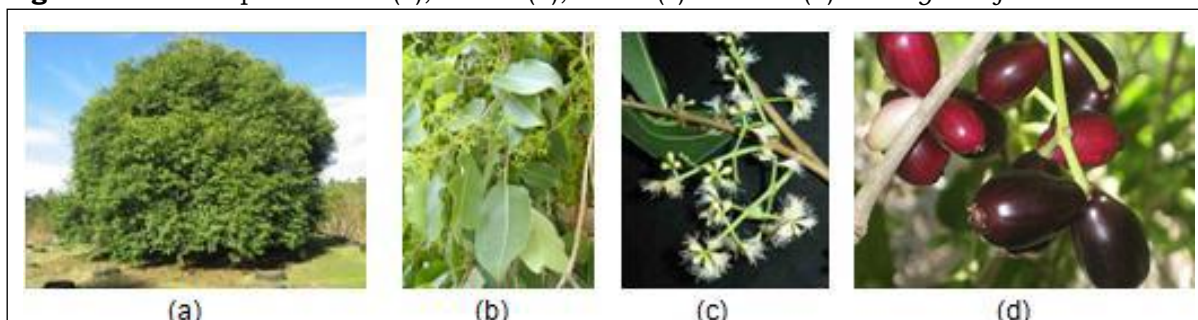
1.3 Espécie Vegetal Hospedeira

A espécie escolhida para esta investigação pertence ao gênero *Eugenia*, amplamente conhecida por ser utilizada na medicina popular brasileira no tratamento de diabetes.³²

A espécie vegetal *Eugenia jambolana* Lam. (Figura 02) tem sido usada na medicina tradicional brasileira, e em outros países tropicais, devido suas propriedades hipoglicêmicas e antidiabéticas, que estão associadas às atividades antioxidante e anti-inflamatória.³³ É cultivada como planta ornamental, e na medicina tradicional possui aplicações como adstringente, estomáquica e diurética.

Pertencente à família Myrtaceae, é encontrada amplamente no subcontinente asiático e em outras regiões tropicais do mundo, incluindo América do Sul e Madagascar.³⁴ No Brasil, é conhecida com Jambolão, Jamelão ou Jambol.³²

Figura 02 – Exemplar adulto (a), folhas (b), flores (c) e frutos (d) de *Eugenia jambolana* Lam.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Pesquisas realizadas com as sementes de *E. jambolana* (L.), mostraram que estas contêm vários princípios ativos, como flavonoides, ácido gálico, ácido elágico e taninos, e seu extrato possui atividades hipoglicêmica, anti-inflamatória, antibacteriana, anti-HIV e antidiaréia.³⁵

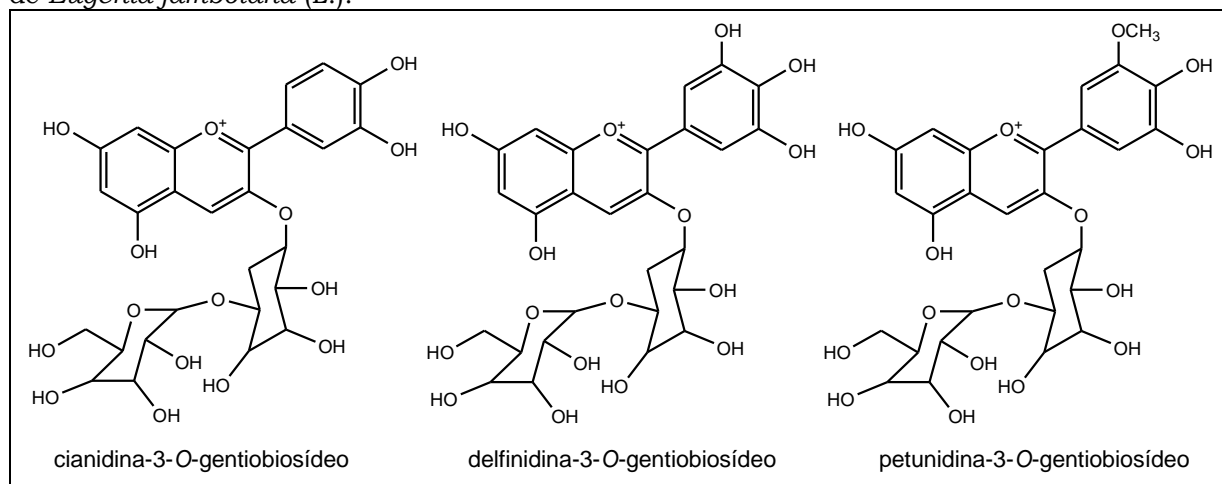
Suas folhas contêm uma mistura de polifenóis, principalmente flavonoides glicosilados, ácidos fenólicos, e são ricas em taninos e saponinas³², sendo também relatado a presença de triterpenos.³⁶

As propriedades adstringentes encontradas em sua casca fazem com que estas sejam utilizadas no tratamento de diarreias crônicas, disenteria e menorragia. São também utilizadas no enxágue bucal para o tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais.³⁷ Além dessas propriedades, a casca também apresenta propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica e serve, também, como medicamento para controle de diabetes.

Seus frutos são comestíveis e considerados nutraceuticos (alimentos e componentes alimentícios com apelo médico ou de saúde), e são utilizados como adstringente, estomáquico, diurético e antidiabético.³⁶ Extratos do fruto apresentam forte atividade antioxidante devido à presença de Vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas.

O estudo realizado por Dametto³⁸ com os frutos da *E. jambolana* (L.), permitiu a identificação de antocianinas, como a delphinidina-diglicosídeo, a cianidina-diglicosídeo e a petunidina-diglicosídeo (Figura 03).

Figura 03 – Representação estrutural de três antocianinas presentes nos frutos de *Eugenia jambolana* (L.).



Fonte: adaptada de Dametto³⁸.

Estudos preliminares de extratos e frações de *E. jambolana* (L.), mostraram que esta espécie apresenta elevada ação sequestradora de radicais livres e quimiopreventiva, atividade antimalárica, antifúngica contra

patógenos-humanos e anticolinesterásica. Estes fatos, associados às observações que micro-organismos endofíticos podem produzir as mesmas substâncias que as plantas, e que as substâncias produzidas pelos fungos endofíticos, em associação com o hospedeiro, podem ser as responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas pela espécie vegetal nos conduziram ao estudo dos fungos endofíticos associados com *Eugenia jambolana* (L.).

1.4 O Endófito *Botryosphaeria parva*

A primeira descrição de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae ocorreu na década de 1820, e foram classificados como patógenos de plantas. Apenas na década de 80, os fungos dessa família foram descritos como fungos endofíticos, e a partir de então, diversas espécies foram isoladas como fungos endofíticos.³⁹

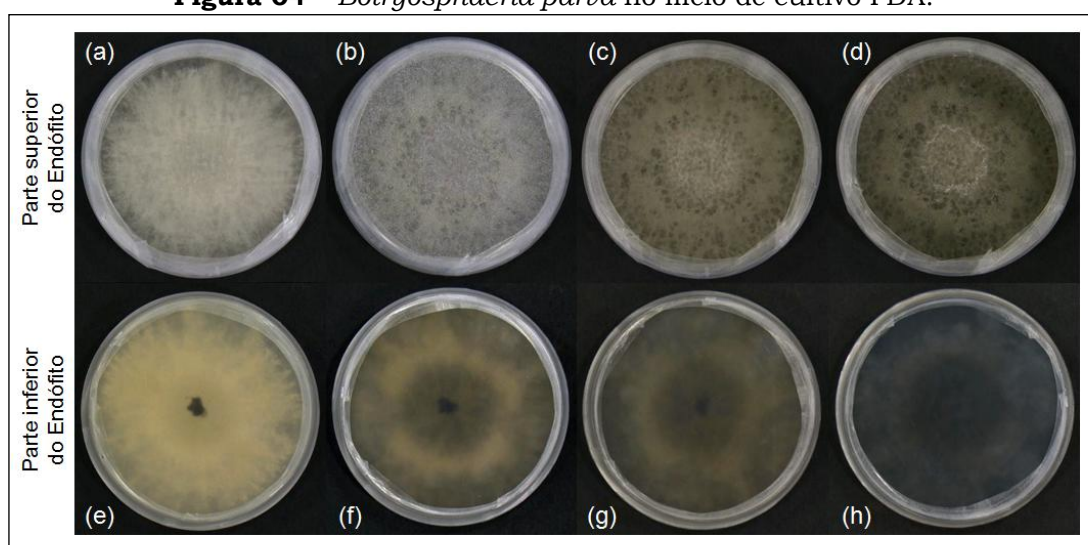
A alta distribuição taxonômica e frequência de infecções dos fungos endofíticos dessa família, em diferentes hospedeiros, indica que a maioria ou todos os fungos da família Botryosphaeriaceae podem ter uma fase endófito. A maioria dos gêneros dessa família é descrita como endófitos, como por exemplo, o gênero *Botryosphaeria* (anamorfo *Fusicoccum*), descrito apenas em 1863.³⁹

Fungos do gênero *Botryosphaeria* são encontrados em regiões temperadas, tropicais e subtropicais ao redor do mundo, no entanto, aparentemente não são encontrados nas regiões polares. Eles ocorrem em uma ampla faixa de famílias de plantas, como: monocotiledôneas, dicotiledôneas e gimnospermas. Eles podem ocorrer como fitopatógenos, causando cancrios e necrose da madeira, ou ocorrer como endófitos, habitando o interior dos tecidos do hospedeiro.^{40,18}

Alguns estudos relacionados ao fungo *Botryosphaeria parva*, o mencionam como um fungo fitopatogênico, causador de apodrecimento do tronco, morte dos brotos e necrose de *Vitis vinifera* (uva utilizada na produção de vinho)^{41,42}, sendo possível observar também estes sintomas em outras plantas, como macieiras e pereiras ao redor do mundo.⁴³

Esses estudos de fitopatogenicidade apontam que o cultivo desse micro-organismo gera uma colônia de coloração branca com hifas aéreas, ligeiramente rígidas, e com o passar do tempo de inoculação, essa colônia assume uma tonalidade cinza escuro (Figura 04), e suas hifas ficam ainda mais rígidas, características que não são observadas para os fungos do mesmo gênero.⁴³

Figura 04 – *Botryosphaeria parva* no meio de cultivo PDA.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

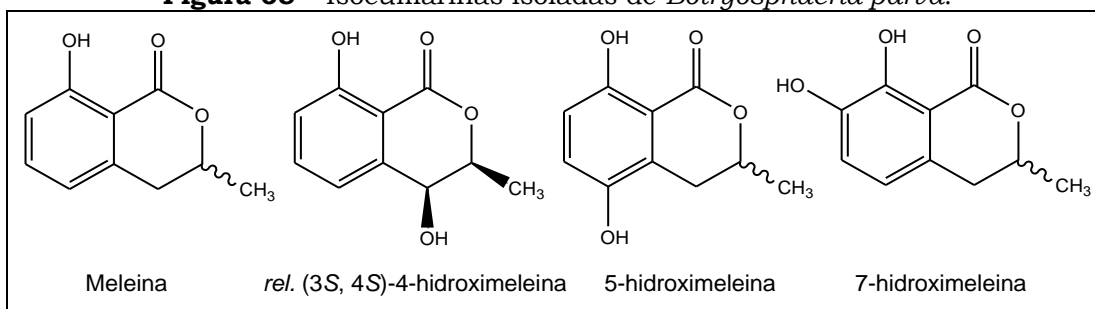
((a) e (e)) após 05 dias de inoculação

((b) e (f)) após 10 dias de inoculação

((c) e (g)) após 15 dias de inoculação

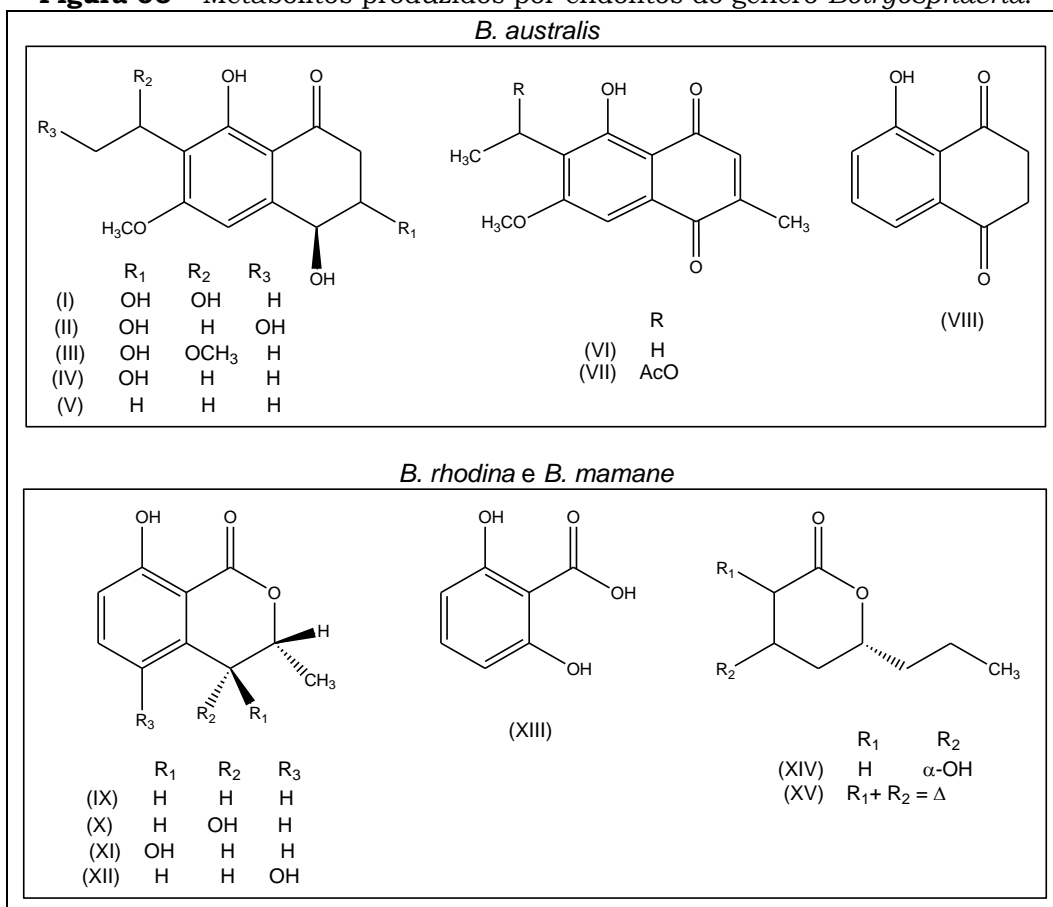
((d) e (h)) após 20 dias de inoculação

Os estudos químicos descritos para este endófito foram realizados por nosso grupo de pesquisa, em que sua bioprospecção indicou um enorme potencial biológico, como atividade antifúngica e anticolinesterásica, além do isolamento de quatro isocumarinas (Figura 05, p. 28).¹⁸

Figura 05 – Isocumarinas isoladas de *Botryosphaeria parva*.

Fonte: adaptada de Chapla¹⁸.

Em uma busca realizada na literatura (Scifinder e Web of Science) não foram encontrados outros estudos químicos referentes ao fungo endofítico *B. parva*. No entanto, foram encontrados estudos de outras espécies do gênero *Botryosphaeria*, em que pode-se destacar a produção variada de isocumarinas, naftoquinonas, naftalenonas e lactonas produzidos por *Botryosphaeria rhodina*⁴⁴, *Botryosphaeria mamane*⁴⁵ e *Botryosphaeria australis*⁴⁶ (Figura 06).

Figura 06 – Metabólitos produzidos por endófitos do gênero *Botryosphaeria*.

Fonte: adaptada de Rukachaisirikul, et al.⁴⁴; Pongchroen, et al.⁴⁵ e Xu, et al.⁴⁶.

1.5 Policetídeos

Policetídeos são metabólitos secundários oriundos de organismos vivos, e são normalmente biossintetizados através da condensação de unidades acetil ou malonil, por enzimas especializadas.⁴⁷ Estruturalmente, trata-se de um grupo muito diverso de produtos naturais, com diversas atividades biológicas e propriedades farmacológicas. Nessa classe de substância, pode-se incluir os ácidos graxos, poliacetilenos, prostaglandinas, antibióticos macrólídeos e diversos compostos aromáticos (antraquinonas e tetraciclinas).⁴⁷

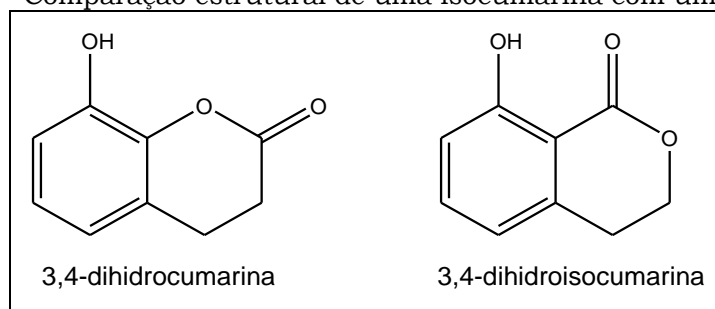
Os policetídeos de origem fúngica constituem uma grande classe de metabólitos secundários, apresentando uma das maiores diversidades estruturais entre os produtos naturais.⁴⁸

A maioria dessas substâncias é ativa em diversos sistemas biológicos.⁴⁹ Devido a esse fato, a busca por policetídeos em microorganismos é apontada como uma boa estratégia para pesquisas de substâncias bioativas.

1.5.1 As Isocumarinas

Sabe-se que uma grande parte de substâncias introduzidas como medicamentos em todo o mundo pode ser atribuída a, ou são inspirados em, produtos naturais. A prevalência de isocumarinas em vários produtos naturais que exibem uma vasta gama de atividades biológicas gerou um interesse contínuo e enorme entre os químicos sintéticos e medicinais.⁵⁰

As isocumarinas são pentacetídeos aromáticos que possuem um esqueleto base de nove carbonos, estruturalmente semelhantes às cumarinas (Figura 07, p. 30), possuindo como diferença um anel lactônico invertido, e desempenham papéis importantes na área medicinal.⁵⁰

Figura 07 – Comparação estrutural de uma isocumarina com uma cumarina.

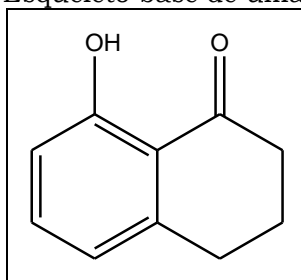
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

As isocumarinas podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos, como bactérias, líquens e fungos, sendo relatadas de diferentes espécies e gêneros de fungos endofíticos.^{51,30} Essa classe de substâncias pode apresentar diversas atividades biológicas, como por exemplo, inibição de proteases; atividade antimicrobiana, antialérgica, antimalárica; reguladores de crescimento, entre outras atividades.^{51,52}

Devido a inúmeras atividades biológicas e ao enorme valor farmacêutico, esforços têm sido devotados para desenvolver novos métodos para a obtenção e síntese de compostos contendo esta estrutura privilegiada.⁵⁰

1.5.2 As Naftalenonas

Da mesma forma que as isocumarinas, as naftalenonas também são pentacetídeos aromáticos, no entanto, diferentemente das isocumarinas, essa classe de substâncias apresenta um esqueleto base de dez carbonos, como mostrado na Figura 08.

Figura 08 – Esqueleto base de uma naftalenona.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Essas substâncias são metabólitos secundários de fungos e plantas, e são muito conhecidas por apresentarem atividade fitotóxica.⁵³

Por serem fitotoxinas, fungos produtores dessas substâncias estão associados à doença Esca e “doença de Petri” ou “chocolate”, observadas em vinhedos e outras plantações ao redor do mundo. Atualmente, estudos “*in vivo*” relacionados a essas substâncias verificam a transferência desses metabólitos fúngicos para o xilema de seus hospedeiros, e estudos “*in vitro*” verificam fatores abióticos (temperatura, pH, entre outros fatores) na produção dessas substâncias por fungos fitopatogênicos.⁵³ Tais estudos poderão ajudar os produtores de uvas e outros vegetais a melhorarem as condições de suas plantações.

1.6 Os Diterpenos Tetranelabdano

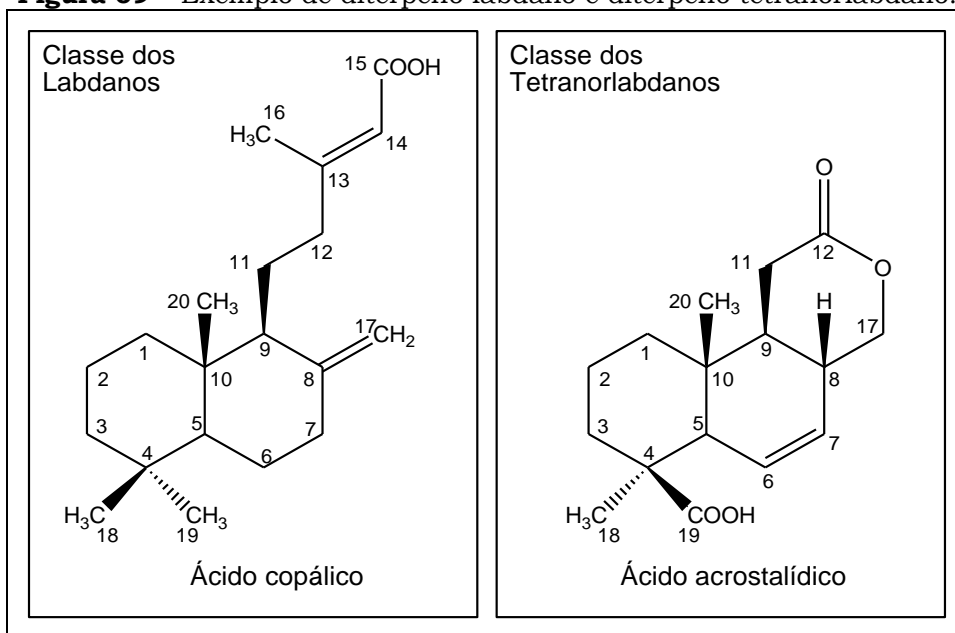
Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis formados por cadeias que contém 20 carbonos. Apesar de serem produzidos, principalmente, por plantas e fungos, alguns organismos marinhos e também insetos são capazes de produzir esses compostos.⁵⁴ Essa classe de substâncias tem sido encontrada em diferentes estados de oxidação, desde hidrocarbonetos até compostos altamente oxigenados que apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, por exemplo o Paclitaxel, que tem sido utilizado no tratamento do câncer de ovário.⁵⁴

Um número muito grande de diterpenos possui um esqueleto labdano, que são substâncias naturais isoladas principalmente de espécies vegetais, que apresentam um sistema bicíclico formado por unidades de isopreno.⁵⁵ O interesse em estudar os diterpenos labdanos é devido à vasta gama de atividades biológicas que estas substâncias apresentam, tais como: atividades antibacteriana, antifúngica, antiprotzoária, anti-inflamatória, citotóxica, entre outras.^{56,57}

Dentro da classe dos diterpenos labdanos, existem substâncias classificadas como diterpenos tetranelabdano. Substâncias que se enquadram nessa classificação apresentam estrutura química semelhante à classe dos labdanos, e a diferença entre esses dois tipos de substâncias está

no número de carbonos que as compõem. Como o nome da subclasse indica (“*tetranor*” do latim: quatro a menos), os tetranorlabdanos apresentam quatro carbonos a menos em sua estrutura quando comparados ao labdanos (Figura 09).

Figura 09 – Exemplo de diterpeno labdano e diterpeno tetranorlabdano.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Por apresentarem estrutura semelhante aos diterpenos labdanos, os diterpenos tetranorlabdanos também apresentam diversas atividades biológicas, tais como: antifúngica, citotóxica, herbicida, entre outras, justificando as recentes buscas e estudos sobre essa classe substância.

2 OBJETIVO

Estudar quimicamente o fungo endofítico *B. parva* associado à espécie vegetal *E. jambolana* Lam.

2.1 Objetivos Específicos

Cultivar o fungo endofítico *B. parva* em escala ampliada nos meios de cultura Czapek®, PDB (meios líquidos) e Milho (meio sólido) para a obtenção dos respectivos extratos brutos;

Fracionar os extratos brutos até o isolamento dos metabólitos secundários, utilizando métodos cromatográficos convencionais, como: Cromatografia em Coluna – CC e CLAE-DAD_{preparativa} (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativa);

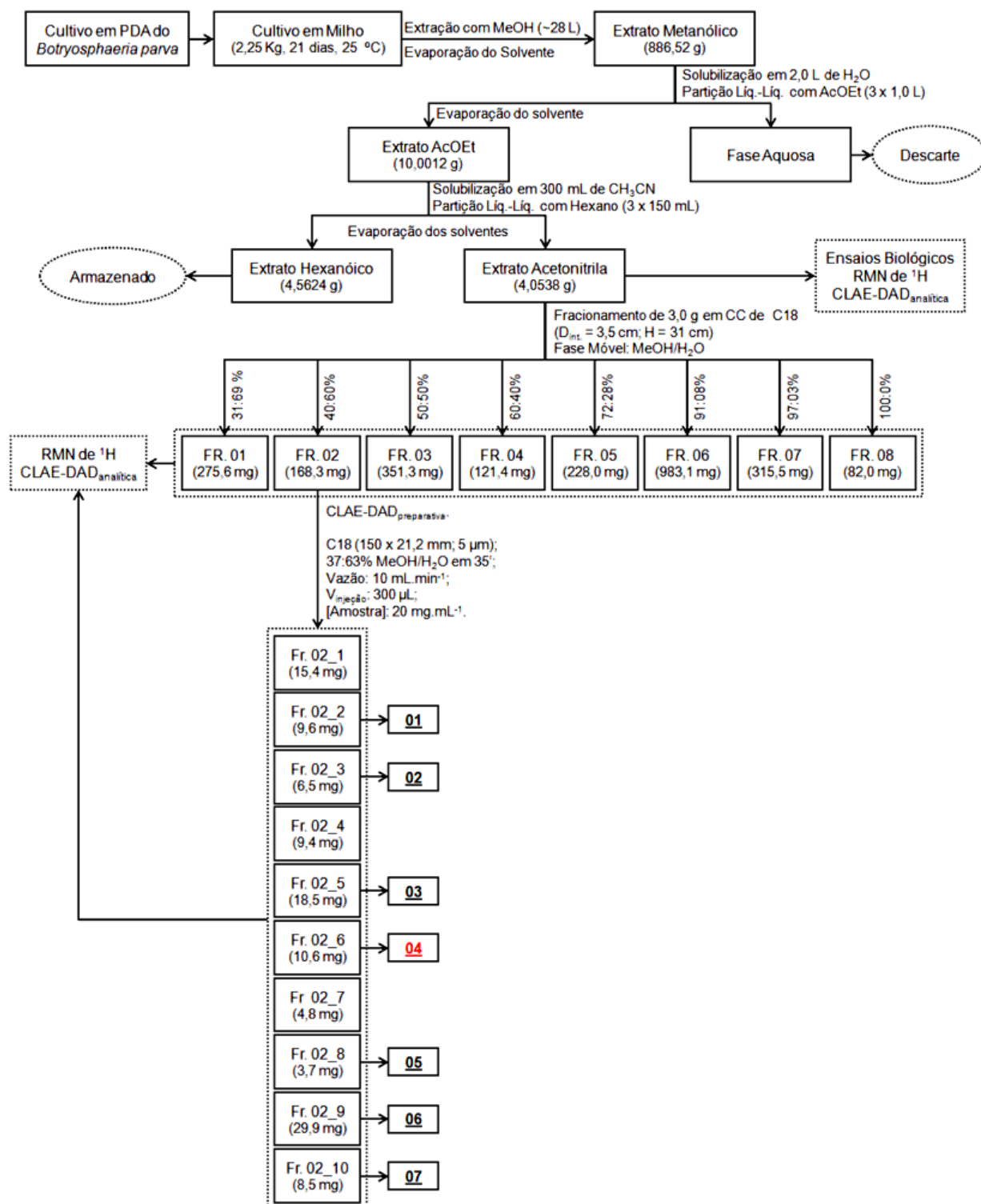
Determinar ou elucidar as estruturas das substâncias isoladas, utilizando métodos espectrométricos, como: RMN de ¹H, de ¹³C, Unidimensional e Bidimensional, e Espectrometria de Massas;

Submeter os extratos brutos a ensaios biológicos para avaliação do potencial antioxidante, antifúngico e anticolinesterásico.

3 FLUXOGRAMAS

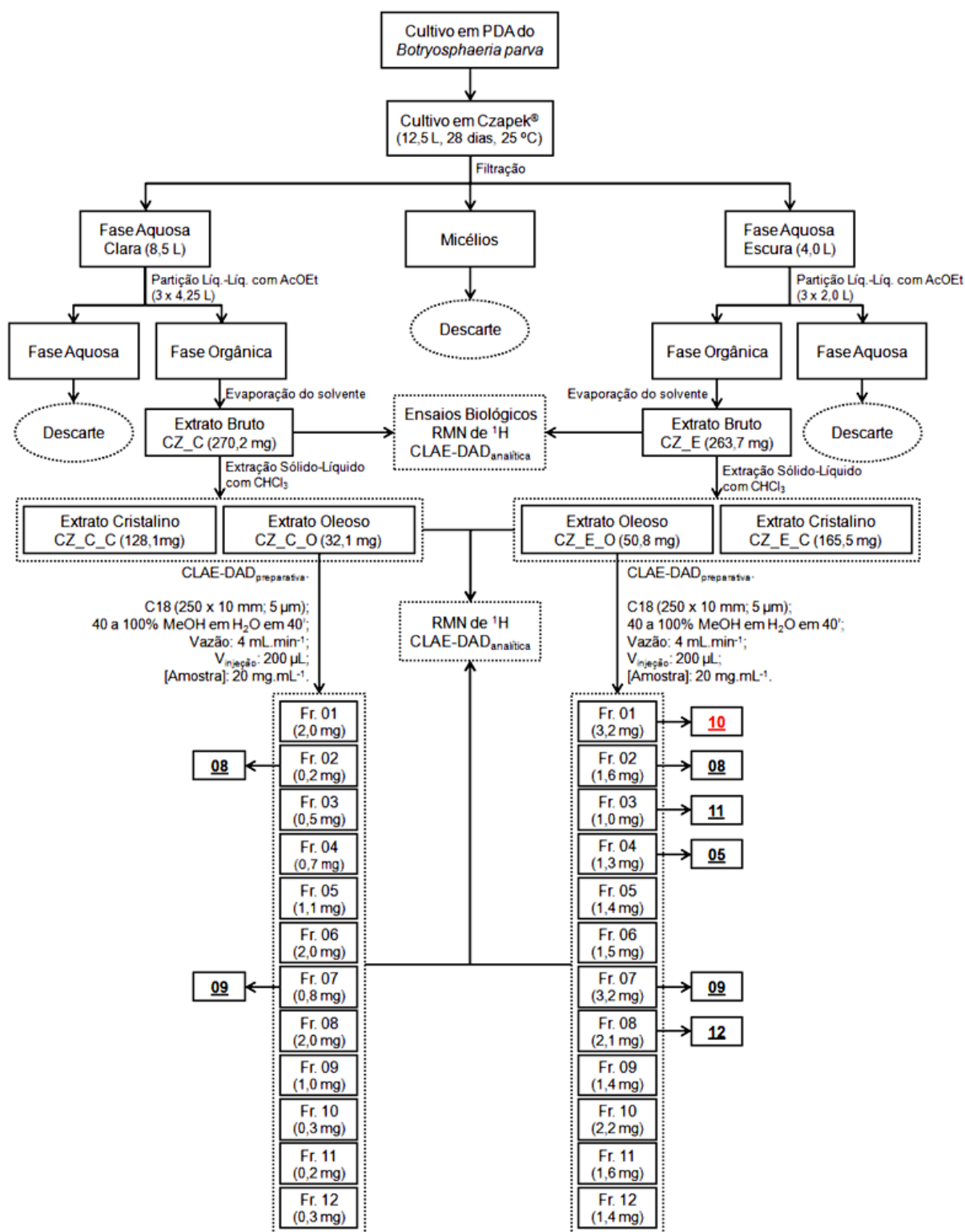
Este item compreende, de forma simplificada, uma representação esquemática do processo de obtenção dos extratos brutos e obtenção das substâncias puras oriundas de cada extrato.

3.1 Meio de Cultivo Sólido – Milho



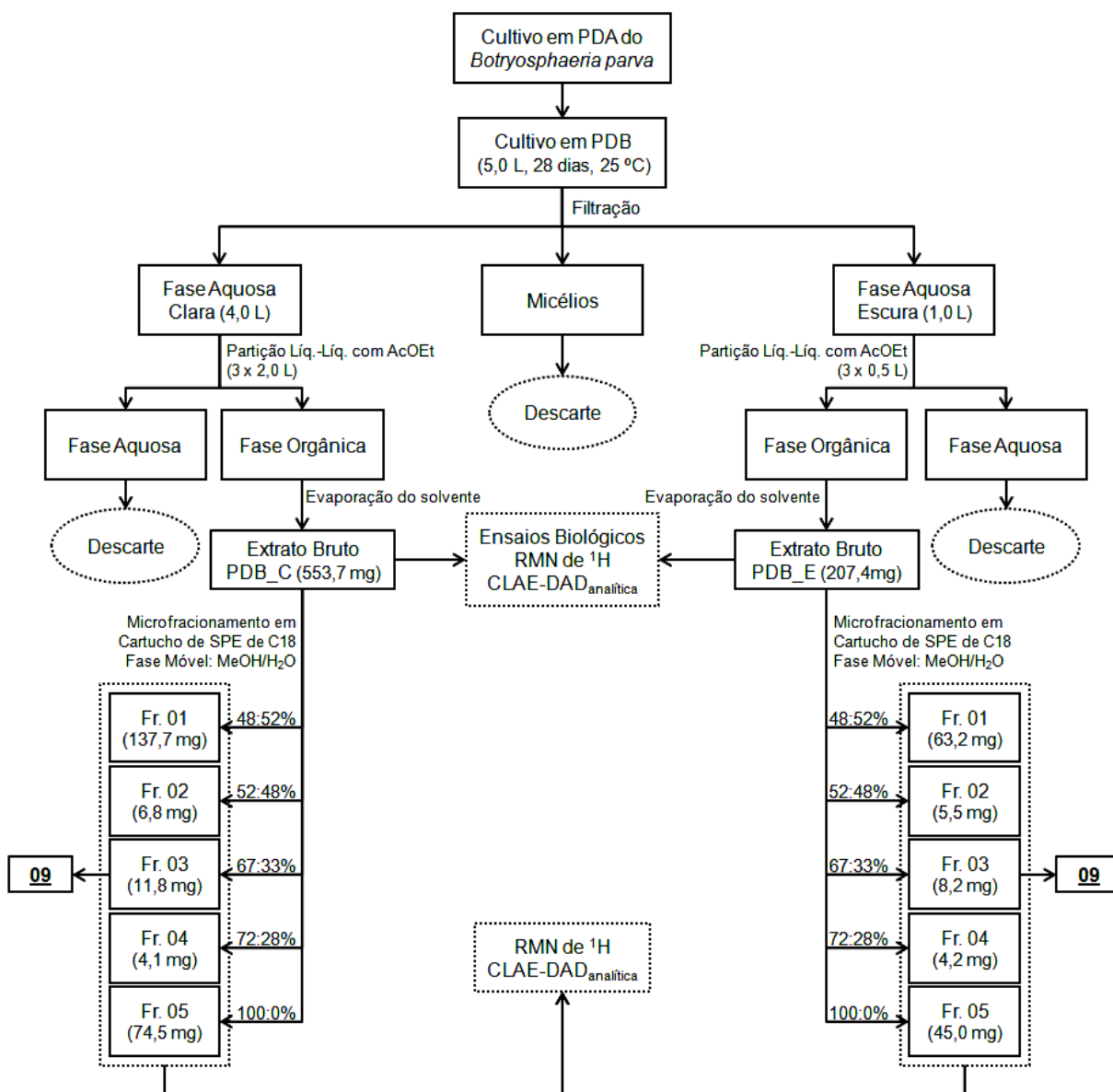
Fonte: esquema elaborado pela autora, 2016.

3.2 Meio de Cultivo Líquido – Czapek®



Fonte: esquema elaborado pela autora, 2016.

3.3 Meio de Cultivo Líquido – PDB



Fonte: esquema elaborado pela autora, 2016.

4 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS

Este item compreende uma descrição detalhada dos materiais e equipamentos utilizados na obtenção e fracionamento de cada extrato bruto, bem como as técnicas utilizadas na preparação e análise das amostras.

4.1 Manipulação do Micro-organismo

Todo o procedimento de manipulação do endófito *B. parva* foi realizado em Capela de Fluxo Laminar (Pachame® PA 310-Série 172-99 e SterilGARD® Advance).

4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para estas análises foram utilizadas cromatoplasas comerciais de sílica gel em fase normal (Macherey-Nagel: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄), e as revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm).

4.3 Cromatografia em Coluna (CC)

Na separação cromatográfica em coluna, à pressão reduzida, foi utilizada uma coluna de vidro de diâmetro interno ($D_{int.}$) de 3,5 cm, e a fase estacionária utilizada foi o adsorvente de fase reversa C18 (60 Å, 40-75 µm, Sorbent Technologies). A coluna foi preenchida com o adsorvente até uma altura (H) de 31 cm.

4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Para as análises de perfil cromatográfico das amostras, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido da Shimadzu (bombas: LC-6AD; injetor automático: SIL-10AF; detector Ultravioleta, em arranjo de diodos: SPD-

M20A; módulo de comunicação: CBM-20A; degaseificador: DGU-20A5R; software: LC-Solution).

As colunas utilizadas foram:

- Coluna de C18 – 2 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 μm);
- Coluna de C18 – 2 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 10,0 mm e 5 μm);
- Coluna de C18 – 2 (Phenomenex LUNA: 150 mm x 21,2 mm e 5 μm).

O tratamento de dados foi realizado utilizando o software LC-Solution.

4.5 Preparo de amostra para análises de CLAE-DAD

Nas análise de CLAE-DAD_{analítica}, 4,0 mg de amostra foi dissolvida em pequena quantidade (~1,0 mL) de Metanol com o auxílio de ultrassom. Em seguida, esta solução foi aplicada em cartucho de SPE de RP18, previamente ativado com Metanol (5,0 mL). A solução coletada foi filtrada em Filtro de membrana Millipore® (0,22 μm). A solução final foi seca, e a massa obtida foi preparada em uma concentração de 4,0 mg.mL⁻¹ em “vials” de 2 mL na proporção de 9:1 Metanol/H₂O (v/v).

Para as etapas de fracionamento em CLAE-DAD_{preparativa}, as amostras foram submetidas à mesma etapa de “*clean-up*”, em que a concentração final para análise foi de 20 mg.mL⁻¹, na proporção de 9:1 Metanol/H₂O (v/v).

4.6 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

As análise de perfil químico (RMN 1D e 2D) foram realizadas nos espectrômetros:

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Bruker Fourier 300 (7,0 T), usando sonda dual ¹H/¹³C 5 mm;

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Bruker Avance III 600 HD (14,1T), utilizando as sondas BBFO-Z plus SmartProbe Broadband Observe e Triple Inverse TCI Cryo-probehead, ambas de 5 mm;

Os espectros foram registrados em CD₃OD, como solvente deuterado.

4.7 Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de alta resolução Bruker Maxis Impact. A faixa de aquisição foi de m/z 50-1500. O software Data Analysis Schorcut 4.2 (Bruker Baltonik®) foi utilizado durante a aquisição dos dados e no processamento dos dados espectrométricos. As condições de análise foram:

- End Plate: -500 Volts;
- Capillary: 4500 Volts;
- Dry Gas Temp.: 180 °C;
- Dry Gas Flow: 4 L.min⁻¹;
- Neb. Gas Pressure: 0,3 Bar;
- Gás: Nitrogênio.

4.8 Solventes utilizados

- Deuterados: Merck e Aldrich;
- Não Deuterados: Merck, J. T. Baker;
- Água ultra pura

4.9 Outros Equipamentos

- Autoclave Vertical (Phoenix Lufenco – AV-137);
- Balança Analítica (Mettler Toledo – AG204);
- Balança Semi-analitica (Gehaka – BG2000);
- Câmara de Ultravioleta (CAMAG Reprostar 3);
- Evaporador Rotativo (Heidolph);
- Milli-Q (Millipore);

5 METODOLOGIA

Este item compreende uma descrição detalhada da obtenção de cada extrato bruto e das substâncias puras, além das condições dos equipamentos nas análises utilizadas.

5.1 Obtenção dos Extratos Brutos

O fungo endofítico *B. parva*, isolado das folhas da *E. jabolana* (L.) pela Dra. Vanessa Mara Chapla e preservado em água ultra pura, foi inoculado em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio de cultura sólido PDA (meio de batata, dextrose e Agar) para a obtenção de uma quantidade de massa micelar suficiente para crescimento em escala ampliada. Em cada frasco de Erlenmeyer contendo meio de cultivo, inoculou-se $\frac{1}{4}$ da placa de Petri contendo PDA e massa micelar:

- 25 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de cultivo sólido - Milho (2,250 Kg de milho “Canjica de Milho *Yok?*”);
- 50 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de cultivo líquido - Czapek[®] (preparado em laboratório), totalizando 12,5 L de meio de cultivo;
- 20 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de cultivo líquido - PDB (meio de cultivo de batata e dextrose, Acumedia – Neogen Corporation), totalizando 5,0L de meio de cultivo.

5.1.1 Meio de Cultivo Sólido – Milho

O meio de cultivo foi preparado pesando-se 90,0 g de milho em cada frasco de Erlenmeyer, adicionando 75,0 mL de água ultra pura a cada frasco. Em seguida, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave três vezes com uma diferença de 24 horas a cada esterilização, sendo o período de esterilização de 20 minutos com uma temperatura de aproximadamente 121 °C. O período de fermentação do endófito, no meio de cultivo, foi de 21 dias em temperatura controlada de 25 °C.

Após o período de incubação, a cultura sólida foi triturada com o auxílio de uma bagueta e iniciou-se uma extração direta com Metanol P.A (~ 28,0 L), seguida de filtração à pressão reduzida. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se o respectivo extrato (886,52 g de extrato metanólico). O extrato metanólico foi dissolvido em 2,0 L de água ultra pura, e com a solução resultante fez-se três partições líquido-líquido, utilizando em cada partição 1,0 L de Acetato de Etila P.A, totalizando 3,0 L de extrato orgânico. Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado, originando o respectivo extrato (10,00 g), e a fase aquosa foi descartada em local apropriado.

O extrato obtido foi dissolvido em 300 mL de Acetonitrila P.A, e com a solução fez-se três partições líquido-líquido, utilizando em cada partição 150 mL de Hexano. O extrato em Acetonitrila foi obtido após a evaporação do solvente, obtendo-se o extrato bruto de interesse (4,0538 g de extrato), e a evaporação do Hexano gerou um extrato que foi armazenado em geladeira para estudos posteriores.

O extrato de interesse foi submetido às análises de RMN de ^1H , Ensaio Biológicos (item 5.2, p. 48) e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em modo analítico (CLAE-DAD_{analítica}), nas condições:

- Eluição: Gradiente Exploratório (5-95 a 100-0% de MeOH/H₂O em 40 minutos);
- Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 μm);
- Vazão: 1,0 mL.min⁻¹;
- V_{inj.}: 15 μL ;
- λ : 200 – 800 nm;
- [Amostra]: 4,0 mg.mL⁻¹.

A partir do resultado obtido da análise de CLAE-DAD_{analítica}, foi realizado um fracionamento desse extrato em Cromatografia em Coluna (CC), utilizando como adsorvente fase reversa C18 (60 Å , 40-75 μm). A coluna foi preparada em laboratório, utilizando uma coluna de vidro de diâmetro interno de 3,5 cm, preenchida com o adsorvente até uma altura de 31 cm, e

o empacotamento foi feito a seco. Utilizou-se Metanol P.A para a ativação da fase estacionária. Três gramas do extrato foram dissolvidos em uma pequena quantidade de Metanol P.A, dessa forma, o extrato foi aplicado em pasta na coluna. A Tabela 01 mostra a composição das fases móveis utilizadas, e as respectivas massas obtidas após fracionamento.

Tabela 01 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato oriundo do Milho.

Fração	MeOH/H₂O	Massa (mg)
01	31:69 %	275,6
02	40:60 %	168,3
03	50:50 %	351,3
04	60:40 %	121,4
05	72:28 %	228,0
06	91:09 %	983,1
07	97:03 %	315,5
08	100:0 %	82,0

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

As frações coletadas foram submetidas às análises de RMN de ¹H, Ensaio Antioxidante (item 5.2.1, p. 48) e CLAE-DAD_{analítica}, nas condições descritas anteriormente.

Com base nos resultados obtidos, foi escolhida a fração 02 para estudo, realizando-se seu fracionamento por meio da CLAE-DAD_{preparativa}, nas condições mostradas a seguir, padronizada anteriormente no modo analítico:

- Eluição: Isocrático (37-63% de MeOH/H₂O em 35 minutos);
- Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 150 mm x 21,2 mm e 5 µm);
- Vazão: 10,0 mL.min⁻¹;
- V_{inj.}: 300 µL;
- λ: 200 – 800 nm;
- [Amostra]: 20,0 mg.mL⁻¹.

Deste fracionamento, coletou-se 10 frações, em que a Tabela 02 (p. 43) mostra as massas obtidas de cada fração.

Tabela 02 – Massas obtidas de cada fração oriunda da Fr. 02 do extrato do Milho.

Fração	Tempo de Retenção	Massa (mg)
02_01	03 – 11'	15,4
02_02	11 – 13'	9,6
02_03	13 – 16'	6,5
02_04	16 – 20'	9,4
02_05	20 – 22,5'	18,5
02_06	22,5 – 24'	10,6
02_07	24 – 28'	4,8
02_08	28 – 30'	3,7
02_09	30 – 33'	29,9
02_10	33 – 40'	8,5

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

As frações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H e CLAE-DAD_{analítica}, na condição padronizada. Por meio das análises de RMN de ^1H , fez-se a escolha de sete frações (02_2, 02_3, 02_05, 02_6, 02_8, 02_9 e 02_10) para análise de RMN Bidimensional (COSY, HSQC e HMBC), com o intuito de identificar ou elucidar os compostos presentes em cada fração.

5.1.2 Meio de Cultivo Líquido – Czapek®

O meio de cultivo Czapek® foi preparado em laboratório utilizando 250 mL de água ultra pura e com a quantidade das substâncias indicadas na Tabela 03, para cada frasco de Erlenmeyer.

Tabela 03 – Quantidade dos sais e de sacarose utilizadas no meio de cultivo Czapek®, para um frasco de Erlenmeyer.

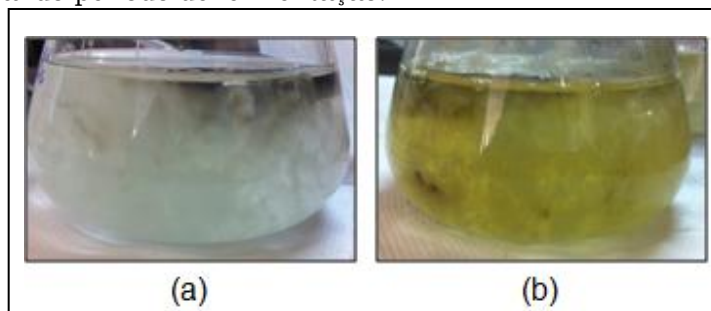
Substância	Fórmula Química	Massa (g)
Sacarose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	7,5000
Nitrato de Sódio	NaNO_3	0,5000
Hidrogenofosfato de Potássio	K_2HPO_4	0,2500
Cloreto de Potássio	KCl	0,1250
Sulfato de Magnésio	MgSO_4	0,1250
Sulfato Ferroso	FeSO_4	0,0025

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

Depois do preparo do meio de cultivo, este foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de aproximadamente 121 °C. No período de inoculação, 28 dias a 25 °C, a cultura fúngica foi mantida em

modo estático, com agitação manual a cada 24 horas. Durante o período de fermentação, observou-se a mudança de coloração do meio de cultivo de alguns frascos de Erlenmeyer, como mostra a Figura 10.

Figura 10 – Comparação da coloração do meio de Czapek®, de alguns frascos de Erlenmeyer, no final do período de fermentação.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Ao final do período de fermentação, a suspensão micelar foi filtrada, separando o micélio do filtrado, em que as soluções de coloração diferente foram coletadas separadamente, e os filtrados foram rotulados:

- Czapek®_Claro (Figura 10(a));
- Czapek®_Escuro (Figura 10(b)).

Os filtrados aquosos foram submetidos à partição líquido-líquido com Acetato de Etila (3 x metade do volume de cada filtrado), totalizando 12,75 L de fase orgânica clara e 6,0 L de fase orgânica escura. Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se os respectivos extratos brutos (Tabela 04).

Tabela 04 – Massas dos extratos, e seus respectivos códigos, provenientes do meio de cultivo Czapek®.

Extrato	Código	Massa (mg)
Czapek®_Claro	CZ_C	270,2
Czapek®_Escuro	CZ_E	263,7

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

Os extratos foram submetidos às análises de RMN de ^1H , Ensaio Biológicos (item 5.2, p. 48) e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em modo analítico (CLAE-DAD_{analítica}), nas condições:

- Eluição: Gradiente Exploratório (5-95 a 100-0% de MeOH/H₂O em 40 minutos);
- Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 μm);
- Vazão: 1,0 mL.min⁻¹;
- V_{inj.}: 15 μL;
- λ: 200 – 800 nm;
- [Amostra]: 4,0 mg.mL⁻¹.

Os extratos obtidos foram submetidos a uma extração sólido-líquido com Clorofórmio (CHCl₃), obtendo-se dois extratos cristalinos (CZ_C_C e CZ_E_C) e dois extratos oleosos (CZ_C_O e CZ_E_O), e a massa obtida de cada extrato está indicada na Tabela 05.

Tabela 05 – Massas obtidas após a recristalização dos extratos de Czapek[®], e seus respectivos códigos de identificação.

Códigos	Extrato			
	Czapek [®] _Claro		Czapek [®] _Escuro	
	CZ_C_C	CZ_C_O	CZ_E_C	CZ_E_O
Massa (mg)	128,1	32,1	165,5	50,8

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

Estes extratos foram analisados por RMN de ¹H e por CLAE-DAD_{analítica}, nas condições descritas anteriormente.

Com base nos resultados obtidos, foram escolhidos os extratos CZ_C_O e CZ_E_O para estudo, realizando-se os fracionamentos por meio da CLAE-DAD_{semipreparativa}, nas condições mostradas a seguir, padronizada anteriormente no modo analítico. A Tabela 06 (p. 46) contém os tempos de retenção de cada fração e suas respectivas massas.

- Eluição: Gradiente (40-60 a 100-0% de MeOH/H₂O em 40 minutos);
- Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 10 mm e 5 μm);
- Vazão: 4,0 mL.min⁻¹;
- V_{inj.}: 200 μL;
- λ: 200 – 800 nm;
- [Amostra]: 20,0 mg.mL⁻¹.

Tabela 06 – Tempos de retenção das frações coletadas dos extratos oleosos, CZ_C_O e CZ_E_O, e suas respectivas massas.

CZ_C_O			CZ_E_O		
Frações	T _R (min.)	Massa (mg)	Frações	T _R (min.)	Massa (mg)
01	06	2,0	01	06	3,2
02	09	0,2	02	09	1,6
03	12	0,5	03	11	1,0
04	14	0,7	04	13,5	1,3
05	16-19	1,1	05	14	1,4
06	16,5	2,0	06	16,5	1,5
07	19	0,8	07	17,5	3,2
08	23,5	2,0	08	20,5	2,1
09	29	1,0	09	26,5	1,4
10	32,5	0,3	10	30	2,2
11	33,5	0,2	11	31	1,6
12	34	0,3	12	31,5	1,4

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

As frações dos extratos de Czapek® coletadas foram analisadas por RMN de ¹H e por CLAE-DAD_{analítica}, na condição padronizada.

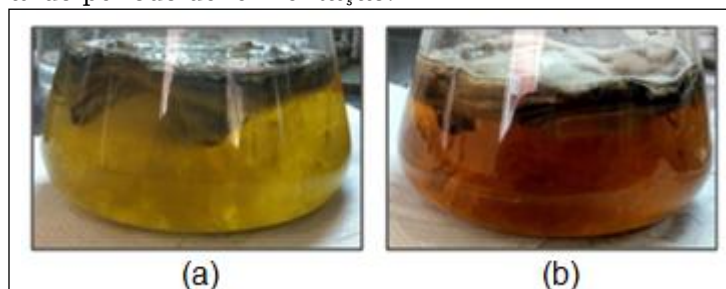
Das frações do extrato CZ_C_O, foram escolhidas duas frações (Fr. 02 e Fr.07) e das frações do extrato CZ_E_O, foram escolhidas três frações (Fr. 01, Fr. 03 e Fr.08) para análise de RMN Bidimensional (COSY, HSQC e HMBC), com o intuito de identificar ou elucidar as substâncias presentes nestas frações.

5.1.3 Meio de Cultivo Líquido – PDB

O meio de cultivo PDB foi preparado utilizando 250 mL de água ultra pura e 6,0 g de meio de cultivo em cada frasco de Erlenmeyer. Depois do preparo do meio de cultivo, este foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de aproximadamente 121 °C.

No período de inoculação, 28 dias a 25 °C, a cultura fúngica foi mantida em modo estático, com agitação manual a cada 24 horas. O mesmo fenômeno observado para o meio de cultivo Czapek® foi observado para o PDB, à mudança de coloração do meio de cultivo de alguns frascos de Erlenmeyer durante o período de fermentação, como mostra a Figura 11, p. 47.

Figura 11 – Comparação da coloração do meio de PDB, de alguns frascos de Erlenmeyer, no final do período de fermentação.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

No final do período de fermentação, a suspensão micelar foi filtrada, separando o micélio do filtrado, em que as soluções de coloração diferente foram coletadas separadamente, e os filtrados foram rotulados:

- PDB_Claro (Figura 11(a));
- PDB_Escuro (Figura 11(b)).

Os filtrados aquosos foram submetidos à partição líquido-líquido com Acetato de Etila (3 x metade do volume de cada filtrado), totalizando 6,0 L de fase orgânica clara e 1,5 L de fase orgânica escura. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se os respectivos extratos brutos (Tabela 07).

Tabela 07 – Massas dos extratos, e seus respectivos códigos, provenientes do meio de cultivo PDB.

Extrato	Código	Massa (mg)
PDB_Claro	PDB_C	553,7
PDB_Escuro	PDB_E	207,4

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

Os extratos foram submetidos às análises de RMN de ^1H , Ensaio Biológicos (item 5.2, p. 48) e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em modo analítico (CLAE-DAD_{analítica}), nas condições:

- Eluição: Gradiente Exploratório (5-95 a 100-0% de MeOH/H₂O em 40 minutos);
- Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 μm);

- Vazão: 1,0 mL.min⁻¹;
- V_{inj.}: 15 µL;
- λ: 200 – 800 nm;
- [Amostra]: 4,0 mg.mL⁻¹.

Em seguida, com base nos resultados obtidos, os extratos obtidos foram microfracionados em Cartucho SPE de C18 (Chromabond – Macherey-Nagel, C18-6 mL/1000 mg), e a composição de cada fase móvel utilizada está mostrada na Tabela 08.

Tabela 08 – Composição das Fases Móveis utilizadas no fracionamento dos extratos de PDB.

Fração	MeOH/H ₂ O	Massa (mg)	
		PDB_C	PDB_E
01	48:52%	137,7	63,2
02	52:48%	6,8	5,5
03	67:33%	11,8	8,2
04	72:28%	4,2	4,2
05	100:0%	74,5	45,0

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

As frações coletadas foram analisadas por CLAE-DAD_{analítica} na condição descrita anteriormente. De ambos os extratos, foram escolhidas as frações 03 para análise de RMN de ¹H.

5.2 Ensaios Biológicos

Todos os extratos brutos foram submetidos a ensaios biológicos para verificação de atividade antifúngica, atividade anticolinesterásica e atividade antioxidante.

5.2.1 Ensaio Antioxidante

O ensaio de avaliação da atividade Antioxidante foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP – Araraquara/SP. Os extratos brutos foram

avaliados quanto à reatividade frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) utilizando o método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

No desenvolvimento do método, aplicou-se 500 µg de cada extrato e 05 µg dos padrões positivos Rutina e Quercetina em uma cromatoplaça de sílica gel. Após a eluição dos extratos e dos padrões na cromatoplaça, na condição de 90:10 CHCl₃/MeOH (v/v), esta foi seca e em seguida nebulizada com solução de DPPH• 0,2% (m/v) em Metanol grau HPLC. A cromatoplaça foi mantida no escuro por 01 hora, e após esse período foi observada com luz branca.

As frações oriundas do extrato de Milho também foram analisadas quanto aos seus potenciais antioxidantes, em que, no desenvolvimento do método, aplicou-se 100 µg de cada Fração e 05 µg dos padrões positivos em uma placa de sílica gel. A placa foi eluída na mesma condição utilizada para os extratos brutos, e após secagem foi nebulizada com solução de DPPH• 0,2% (m/v) em MeOH grau HPLC e mantida no escuro por 01 hora. Depois desse período, foi observada em luz branca.

5.2.2 Ensaio Antifúngico

O ensaio Antifúngico foi realizado no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal – com orientação da Dra. Maria Claudia Marx Young. A atividade antifúngica foi determinada pela técnica de bioautografia para detecção da atividade fungitóxica, pela nebulização dos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos.mL⁻¹ em solução de glicose e sais) em cromatoplaças contendo 400 µg dos extratos brutos, previamente eluídas com CHCl₃/MeOH (90:10 v/v). As cromatoplaças foram incubadas a 25 °C por 48 horas, verificando a presença de halos de inibição do crescimento dos fungos, em comparação com o padrão positivo nistatina (05 µg).

5.2.3 Ensaio Anticolinesterásico

O ensaio Anticolinesterásico foi realizado no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal – com orientação da Dra. Maria Claudia Marx Young.

Os extratos brutos foram submetidos à avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com a literatura⁵⁸, utilizando cromatoplasas. Foram aplicados 200 µg dos extratos brutos em uma cromatoplasa de sílica gel. A placa foi eluída com CHCl₃/MeOH (90:10 v/v) e seca após a eluição. Em seguida foi nebulizada com a **Solução A** (Tabela 09), e incubada em câmara úmida fechada, a 37 °C por 2 minutos. Após esse período, a cromatoplasa foi nebulizada com uma **Solução D** (Tabela 09). Utilizou-se 0,05 µg do padrão positivo fisostigmina.

Tabela 09 – Soluções utilizadas na análise de potencial anticolinesterásico dos extratos brutos.

Solução A	Acetilcolinesterase dissolvida em 150 mL do Tampão Tris-HCl (0,05 M; pH = 7,9), estocada a 4 °C. No momento do uso adicionou-se 0,1% de albumina de soro bovino
Solução B	250 mg de Acetato de 1-naftila em 100 mL de Etanol P.A
Solução C	400 mg do sal “Fast Blue” B em 160 mL de Água Destilada
Solução D	Mistura de 10 mL da Solução B e 40 mL da Solução C

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos brutos produzidos por *B. parva* foram obtidos de acordo com a metodologia descrita anteriormente, e a Tabela 10 mostra o rendimento dos extratos considerando um grama de cada meio de cultivo utilizado.

Tabela 10 – Rendimento dos extratos brutos referentes a um grama dos meios de cultivo utilizados.

Extratos	Massa do Extrato (mg)	Massa do Meio de Cultivo (mg)	Rendimento por grama de Meio de Cultivo (mg)
Milho	4053,8	2250	1,8000
CZ_C	270,2	289	0,9350
CZ_E	263,7	136	1,9390
PDB_C	553,7	96	5,7680
PDB_E	207,4	24	8,6416

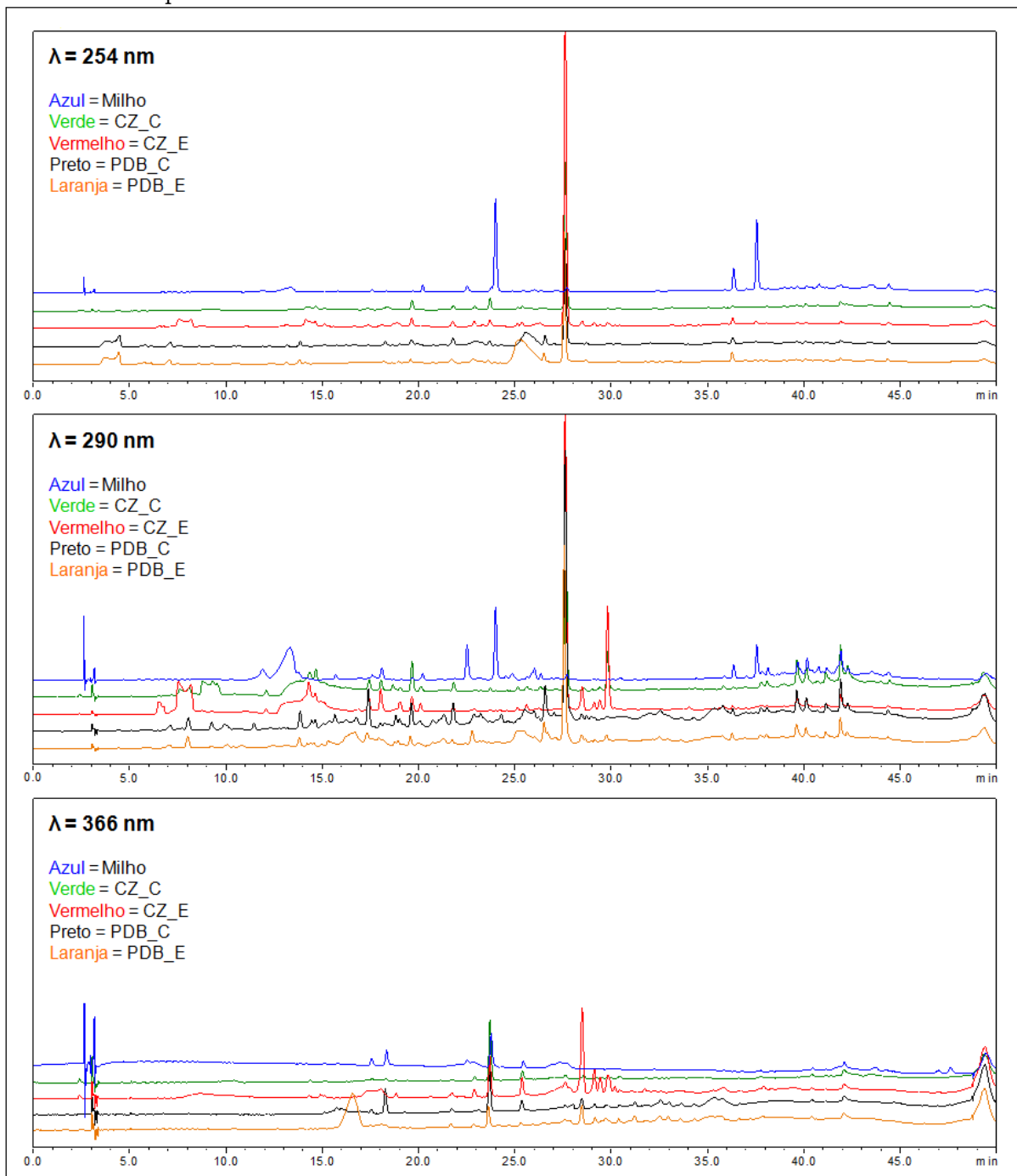
Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

É interessante observar que para o endófito *B. parva*, ocorreu variação dos rendimentos obtidos com a variação do meio de cultivo, indicando que sua produção metabólica é dependente da natureza destes. Essa natureza é referente à quantidade/variedade de nutrientes que esse meio de cultivo fornece para o micro-organismo. Um meio mais rico em nutrientes, como o PDB, fornece mais nutrientes para o endófito, por isso observa-se maior quantidade de extrato por grama de meio de cultivo. Em comparação, um meio pobre em nutrientes (Czapek®), apresentou menor quantidade de extrato por grama de meio de cultivo.

Depois de realizada a etapa de obtenção dos extratos, estes foram submetidos à análise por RMN de ^1H e por CLAE-DAD_{analítica} para verificação de seus perfis químicos e cromatográficos.

A Figura 12 (p. 52) mostra a comparação dos cromatogramas, de cada extrato bruto, obtidos na análise de CLAE-DAD_{analítica}, e os tempos de retenção observados, nos três meios de cultivo, evidenciam que as substâncias produzidas apresentam polaridades variadas, abrangendo toda a faixa de polaridade (baixa a alta polaridade).

Figura 12 – Comparação dos Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em diferentes comprimentos de onda.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

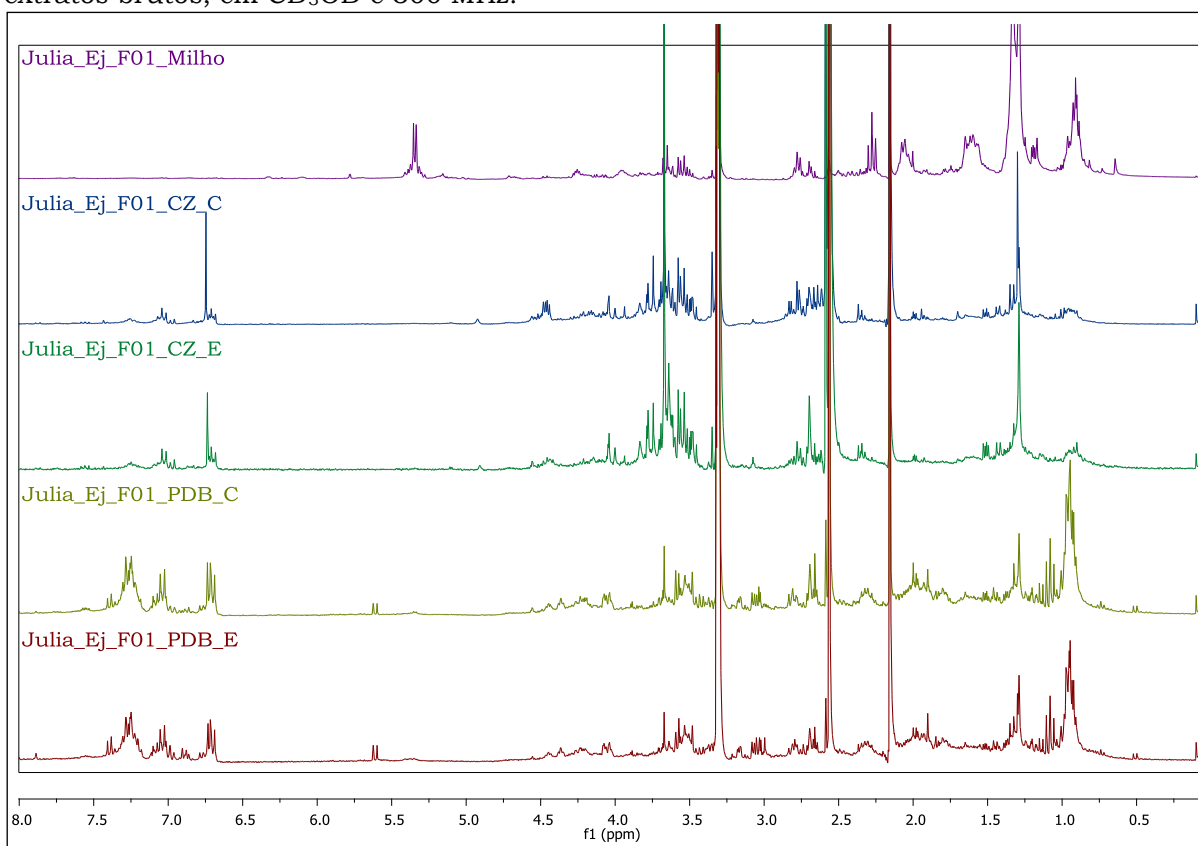
Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μm); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/H₂O em 40'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μL ; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹.

É importante ressaltar que todos os cromatogramas obtidos foram comparados com os cromatogramas dos extratos dos Brancos (Apêndices 01-03, p. 113-115), meios de cultivo sem inoculação do endófito, e comprovou-se que os extratos brutos não apresentaram picos com o mesmo tempo de

retenção dos Extratos dos Brancos, evidenciando que os picos observados nos cromatogramas são provenientes da produção metabólica do fungo.

Os perfis químicos (espectros de RMN de ^1H) dos extratos brutos (Figura 13) apresentaram sinais característicos de hidrogênios aromáticos na região de δ_{H} 6,5-8; vinílicos (δ_{H} 5-6); carbinólicos (δ_{H} 3-4); metínicos, metilênicos e metílicos (δ_{H} 0,8-3).

Figura 13 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, dos extratos brutos, em CD_3OD e 300 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Quando comparamos os perfis químicos dos extratos brutos, as informações obtidas dessa comparação sustentam a afirmação feita anteriormente, de que a natureza do meio de cultivo influencia a produção metabólica do endófito, uma vez que é possível observar na Figura 13 grandes diferenças nos sinais de hidrogênios aromáticos, olefinicos e carbinólicos de cada extrato.

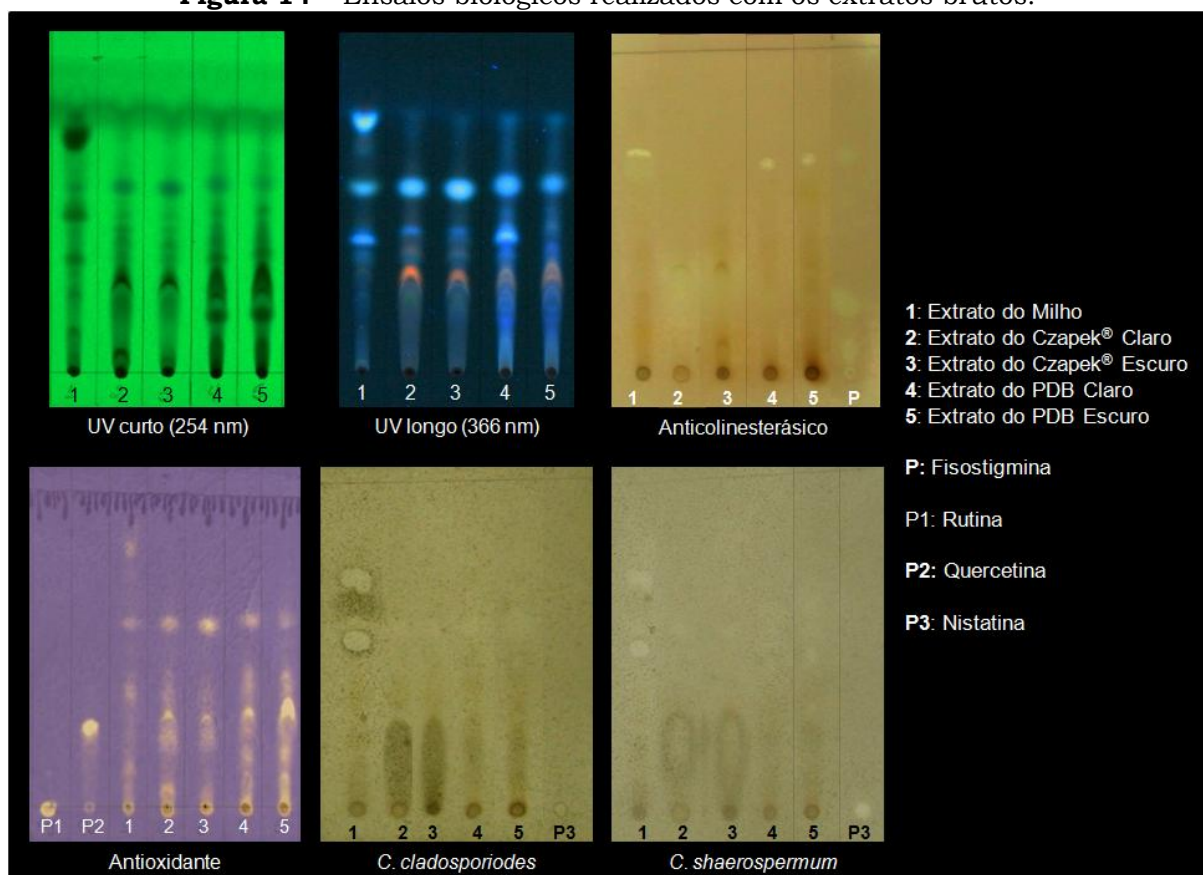
Ao observar os perfis químicos e cromatográficos dos extratos de Czapek[®], verifica-se que os extratos Claro e Escuro são semelhantes,

sugerindo produção metabólica parecida. Pode-se notar o mesmo padrão para o meio de cultivo PDB, por isso também é esperado que os dois tipos de extrato (Claro e Escuro) apresentem compostos parecidos.

Devido a esses resultados, levantou-se a hipótese de que a mudança na coloração pode ser devido à produção de melanina em alguns frascos. Tal hipótese foi considerada, uma vez que a retirada do micélio para a inoculação foi realizada desde as bordas até o centro da placa de Petri, e a idade do micélio era diferente nestas regiões. A produção de melanina é decorrente de um sistema de proteção do fungo contra fatores abióticos (temperatura e radiação ultravioleta, entre outros), proporcionando um aumento em sua resistência contra o estresse no ambiente. Portanto, a ideia de uma possível contaminação dos meios de cultivo durante o período de fermentação foi descartada.

6.1 Ensaio Biológicos dos Extratos Brutos

Como mencionado na Metodologia, todos os extratos brutos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos, e a Figura 14 (p.55) mostra os resultados qualitativos dos ensaios antioxidante, antifúngicos e anticolinesterásico.

Figura 14 – Ensaio biológico realizado com os extratos brutos.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Tabela 11 – Fator de Retenção das substâncias que apresentaram atividade biológica.

Extratos	Antioxidante	Antifúngico		Anticolinesterásico
		<i>C. cladosporiodes</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	
1	0,12*/0,36* 0,58*/0,82*	0,48 a 0,55*** 0,56* 0,67 a 0,73***	0,48 a 0,55*** 0,56* 0,67 a 0,73***	0,6 a 0,67* 0,68*
2	0,06*/0,27** 0,58*	0,56*	0,56*	0,23 a 0,34*
3	0,27**/0,58**	0,56*	0,56*	0,23 a 0,34*
4	0,30**/0,58**	0,56*	0,60*	0,65***
5	0,30***/0,58*	0,56*	0,31*/0,47* 0,56*/0,60*	0,65***
P	-----	-----	-----	0,36***
P1	Origem***	-----	-----	-----
P2	0,24***	-----	-----	-----
P3	-----	Origem***	Origem***	-----

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

1 – Extrato do milho; 2 – Extrato do Czapek®_Claro; 3 – Extrato do Czapek®_Escuro; 4 – Extrato do PDB_Claro; 5 – Extrato do PDB_Escuro; P – Padrão Fisostigmina; P1 – Padrão Rutina; P2 – Padrão Quercetina; P3 – Padrão Nistatina; * intensidade fraca; ** intensidade média; *** intensidade forte

Com os resultados obtidos, foram calculados os fatores de retenção (Tabela 11, p. 55) das substâncias que apresentaram atividades biológicas, e aos halos observados foram atribuídas (qualitativamente) intensidades para os potenciais biológicos destas.

6.1.1 Atividade Antifúngica

Diversas doenças que ocorrem em plantas, animais e até mesmo em humanos, são devidas à fungos fitopatogênico e patogênicos. Esse fato tem incentivado pesquisadores a buscar novas substâncias com potencial antifúngico de origem natural.⁵¹

O potencial antifúngico dos extratos brutos foi executado por bioautobiografia com a nebulização dos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. A nebulização da cromatoplaca (Figura 14, p. 55), após a eluição dos extratos, com as soluções contendo micélios de cada micro-organismo, permitiu a observação da inibição do crescimento dos fungos em todos os extratos brutos, indicando a presença de metabólitos secundários com potencial antifúngico nesses extratos.

A Tabela 11 (p. 55) mostra a intensidade (qualitativa) das substâncias que apresentam potencial antifúngico. Dessa forma, destaca-se o extrato oriundo do milho, pois é possível verificar a presença de substâncias com potencial antifúngico interessante quando comparado com os outros dois extratos.

Os resultados obtidos podem estar diretamente relacionados à ecologia química do endófito, uma vez que os micro-organismos endofíticos podem produzir substâncias bioativas para auto defesa contra micro-organismos fitopatogênicos, ou para a proteção do hospedeiro contra estresse bióticos e abióticos. Esses dados confirmam o quão promissores são os fungos endofíticos associados à espécies vegetais na busca por novos metabólitos secundários bioativos.

6.1.2 Atividade Anticolinesterásica

Um indivíduo que tem uma deficiência de acetilcolina no processo sináptico apresenta uma patologia neurodegenerativa progressiva no sistema nervoso central, chamada de doença de Alzheimer, que causa um comprometimento da memória, dificuldade no raciocínio e alterações comportamentais desse indivíduo.⁵⁹ As alternativas presentes no mercado para reverter, ou amenizar, as causas dessa doença implicam em inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE). Dessa forma, a possibilidade de obter novas substâncias, oriundas de estudos fitoquímicos, que apresentam esse potencial de inibição tem animado e muito os pesquisadores dessa área.⁶⁰

O ensaio para avaliação da atividade anticolinesterásica foi definido através de manchas brancas em contraste com o fundo avermelhado da cromatoplaca, indicando atividade inibitória positiva da enzima acetilcolinesterase.

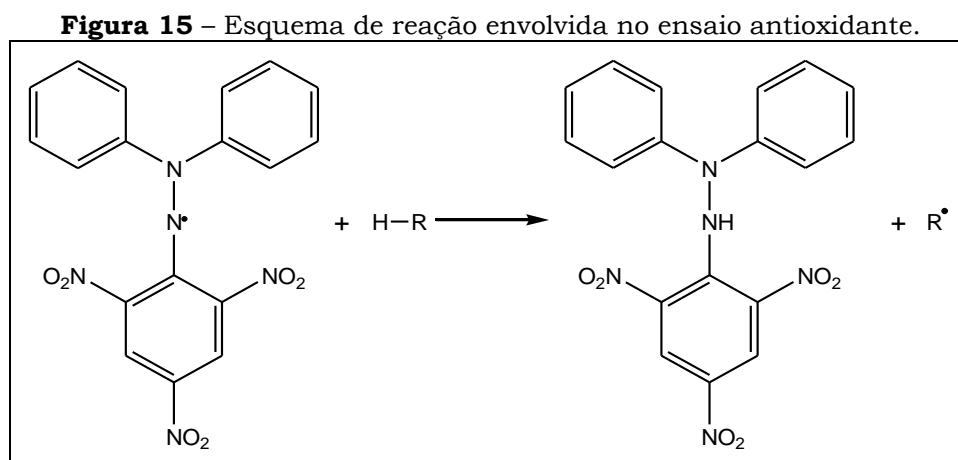
De acordo com a Figura 14 na p. 55, observou-se que todos os extratos continham manchas brancas, evidenciando que alguns metabólitos produzidos pelo *B. parva* apresentam potencial anticolinesterásico. As manchas brancas são proporcionais à inibição da enzima acetilcolinesterase, portanto quanto mais brancas forem essas manchas, maior potencial inibitório a substância irá apresentar. A Tabela 11 na p. 55 mostra a intensidade (qualitativa) das substâncias que apresentam tal propriedade, e verifica-se que os extratos Brutos do PDB (Claro e Escuro) se mostraram mais ativos que os outros três extratos.

6.1.3 Atividade Antioxidante

Atualmente, diversas técnicas para detecção de atividade antioxidante de substâncias têm sido utilizadas, pois substâncias que apresentam esse tipo de potencial podem ser utilizadas na prevenção de doenças crônico-degenerativas.⁵¹

Dentre essas técnicas, pode-se destacar o sequestro de radicais livres, como o DPPH•. Este ensaio é baseado na mudança de coloração do

radical livre (roxo) para o radical reduzido (amarelo) na presença de substâncias antioxidantes (Figura 15).⁵¹

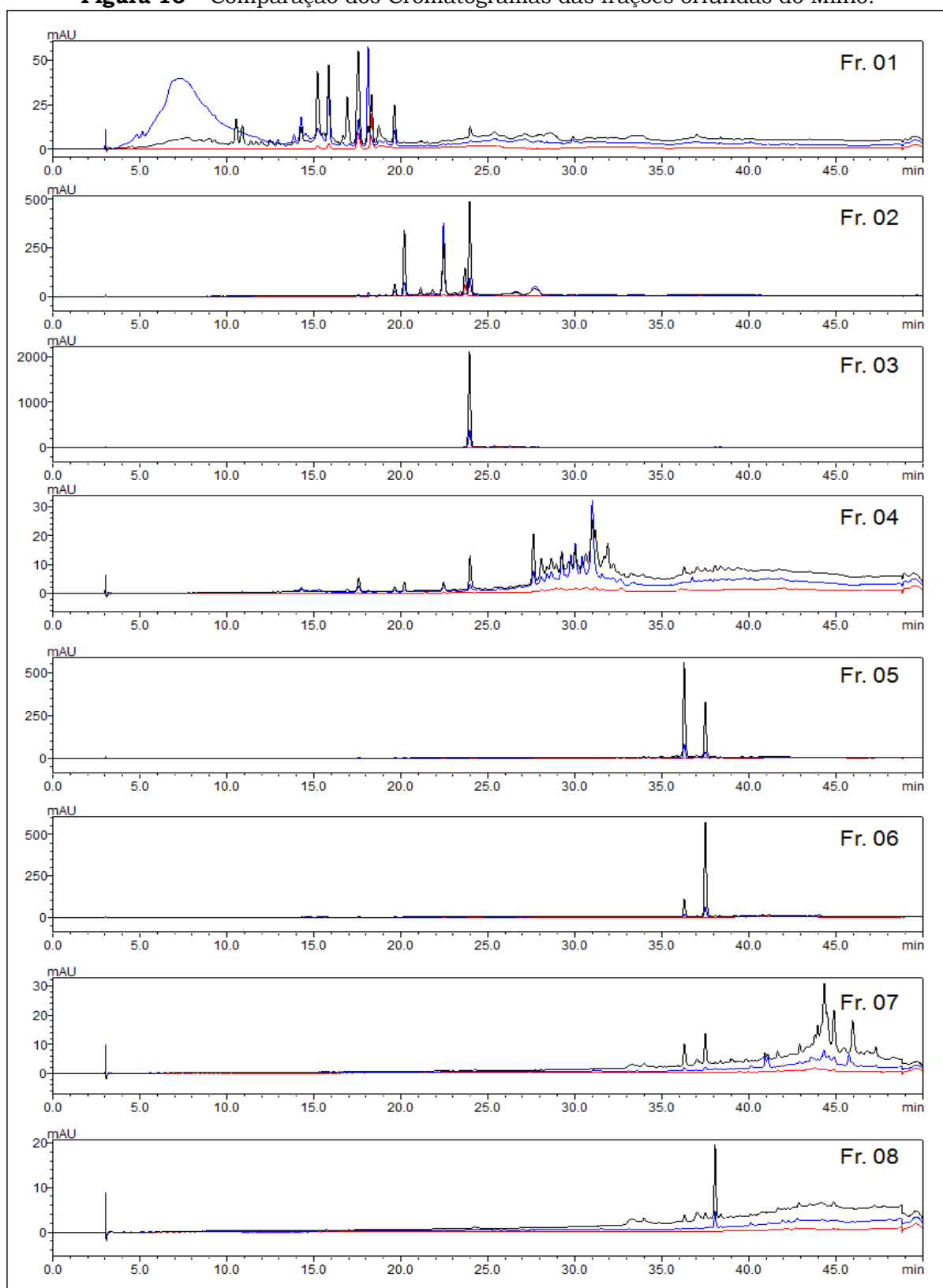


Este ensaio evidenciou a presença de substâncias com potencial antioxidante em todos os extratos brutos, pois foi observado a redução do DPPH• pela presença de manchas amarelas em contraste com o fundo roxo na cromatoplaça (Figura 14, p. 55).

A intensidade das manchas foi atribuída qualitativamente (Tabela 11, p. 55), e pode-se dizer que o extrato de PDB_E se mostrou mais ativo quando comparado aos outros extratos.

6.2 Meio de Cultivo Sólido – Milho

Como mencionado anteriormente, realizou-se o fracionamento do extrato obtido do meio de cultivo Milho em coluna cromatográfica com fase reversa C18 (a pressão reduzida). As oito frações obtidas foram submetidas à análise de CLAE-DAD_{analítica}, e os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 16 (p. 59).

Figura 16 – Comparação dos Cromatogramas das frações oriundas do Milho.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/H₂O em 40 min.; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹, e λ = 254 (preto), 290 (azul) e 366 nm (vermelho).

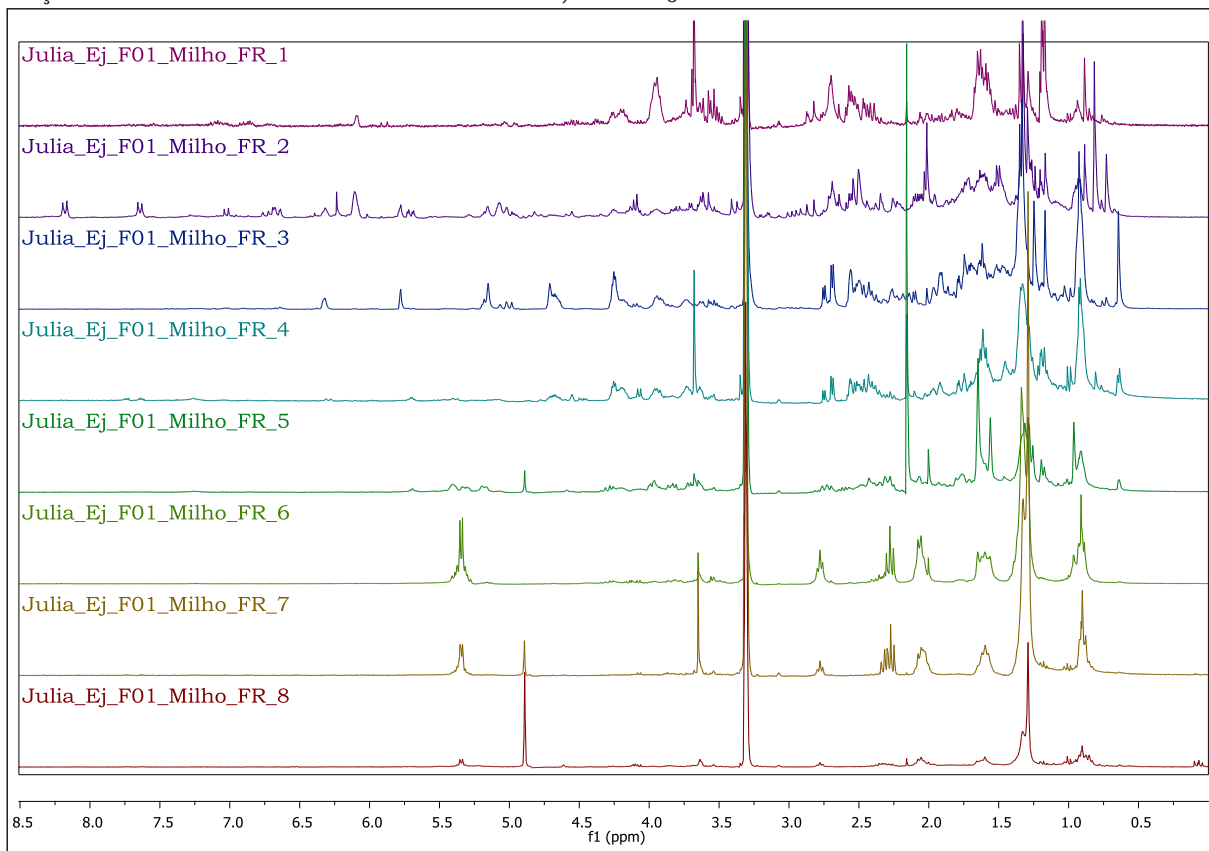
A comparação dos cromatogramas da Figura 16 (p. 59) mostra que ocorreu separação das substâncias do extrato bruto, e, ao observar o cromatograma da Fr. 03, verifica-se que este contém apenas um pico, indicando que essa fração contém uma substância majoritária, podendo estar pura. No entanto, seu espectro de RMN de ^1H (Figura 17, p. 61), evidenciou uma mistura que poderia dificultar a identificação da substância majoritária por RMN 1D e 2D.

Na análise do cromatograma da Fr. 01, observou-se que a composição da fase móvel utilizada não foi adequada, uma vez que algumas substâncias que deveriam ser coletadas na Fr. 02 eluíram nesta fração. Este fato se deve à força de eluição da fase móvel, que para este caso era elevada.

Pela análise dos cromatogramas das frações 05 e 06, pode-se observar a inversão da substância majoritária de uma fração para outra, sendo que a diferença observada nos tempos de retenção dessas substâncias sugere que possam ser facilmente purificadas.

Os espectros de RMN de ^1H dessas frações (Figura 17, p. 61), reforçam o que foi mencionado anteriormente, que ocorreu a separação por faixa de polaridades das substâncias presentes no extrato bruto. Observou-se também que a Fr. 02 apresentou muitos hidrogênios aromáticos, quando comparada às outras frações, e como mencionado anteriormente, ocorreu uma inversão das substâncias majoritárias entre as frações 05 e 06, que pode ser comprovada ao se comparar a região de deslocamento químico entre δ_{H} 1,5-3,0 e no deslocamento químico de δ_{H} ~5,3 das duas frações.

Figura 17 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações oriundas do extrato bruto de Milho, em CD_3OD e 300 MHz.



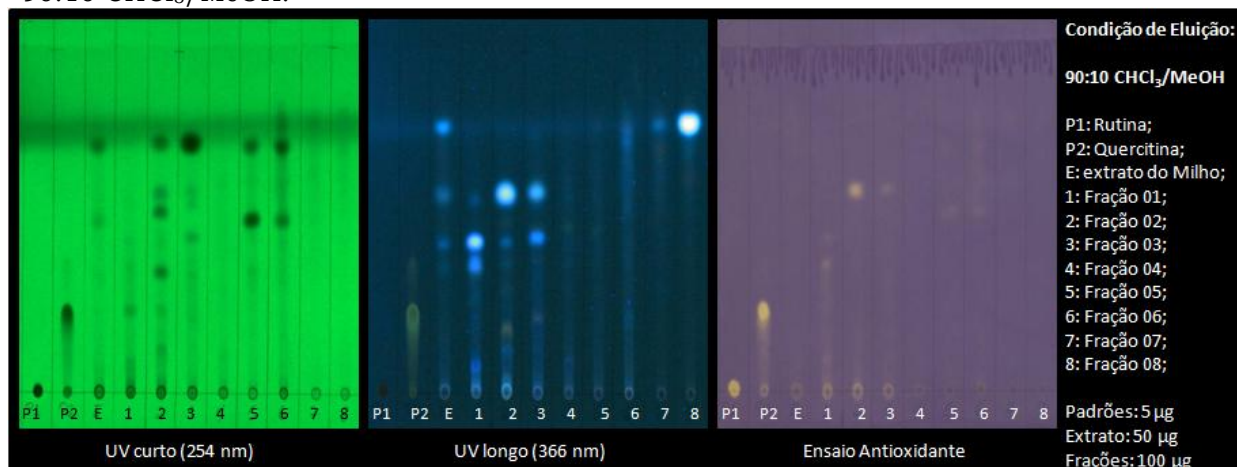
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

6.2.1 Purificação da Fração 02

A escolha da fração 02 para estudo químico não foi baseada no perfil cromatográfico (Figura 16, p. 59), devido a complexidade quando comparadas com as frações Fr. 03, Fr. 05 ou a Fr. 06, mas sim devido aos sinais de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,5-8), observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 17), que sugeriram a presença de isocumarinas, um dos objetos desta dissertação. Tais sinais não foram observados nas outras três frações mencionadas.

Outro resultado relevante para essa escolha foi o ensaio da avaliação antioxidante (Figura 18, p. 62) realizado com as frações obtidas, em que apenas a Fr. 02 apresentou potencial antioxidante. Este dado também corrobora com a hipótese de que as isocumarinas estariam presentes nesta fração.

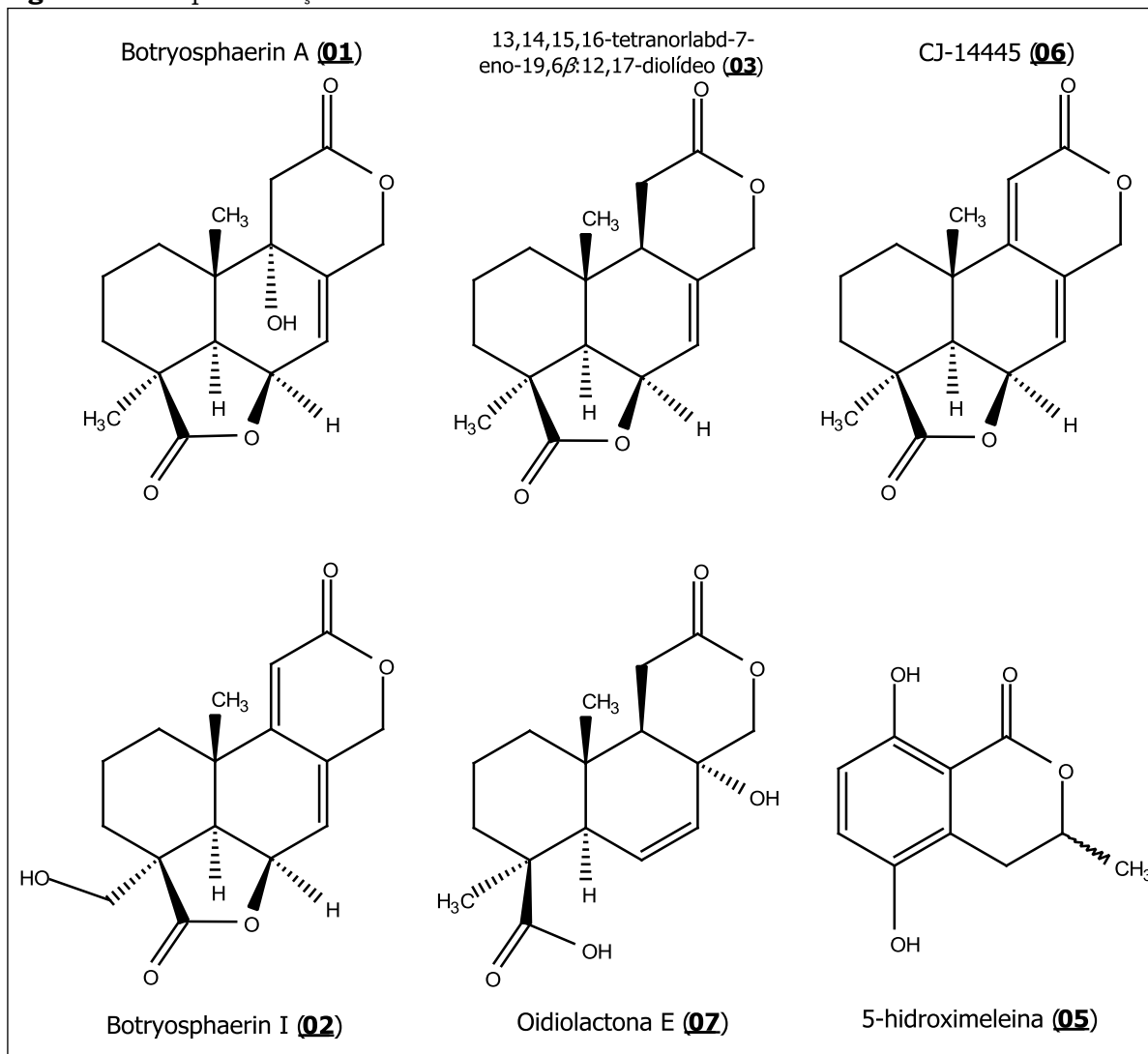
Figura 18 – Ensaio Antioxidante das Frações do extrato de Milho na condição de 90:10 CHCl₃/MeOH.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Dessa forma, a Fr. 02 foi fracionada coletando-se 10 frações por CLAE-DAD_{preparativa} (item 3.1, p. 34), que foram submetidas à análise RMN de ¹H e de CLAE-DAD_{analítica} (Apêndice 04 e 05, p. 116 e 117). Com base nesses resultados, foi observado que as frações Fr. 02_2, Fr. 02_3, Fr. 02_5, Fr. 02_6, Fr. 02_8, Fr. 02_9 e Fr. 02_10 poderiam ser submetidas a análises de RMN 1D e 2D para identificação das substâncias. A análise dos dados obtidos nos permitiu identificar a substância **05** (Fr. 02_8) como sendo a 5-hidroximeleina, pertencente a classe das isocumarinas.

Também foram identificadas as substâncias botryosphaerin A (**01**), botryosphaerin I (**02**), 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6β:12,17-diolídeo (**03**), CJ-14445 (**06**) e oidiolactona E (**07**), pertencentes à classe dos diterpenos tetranorlabdanos. A determinação estrutural destas substâncias (Figura 19, p. 63) está descrita no item 7, p. 73. A substância presente na fração Fr. 02_6 não teve sua estrutura determinada.

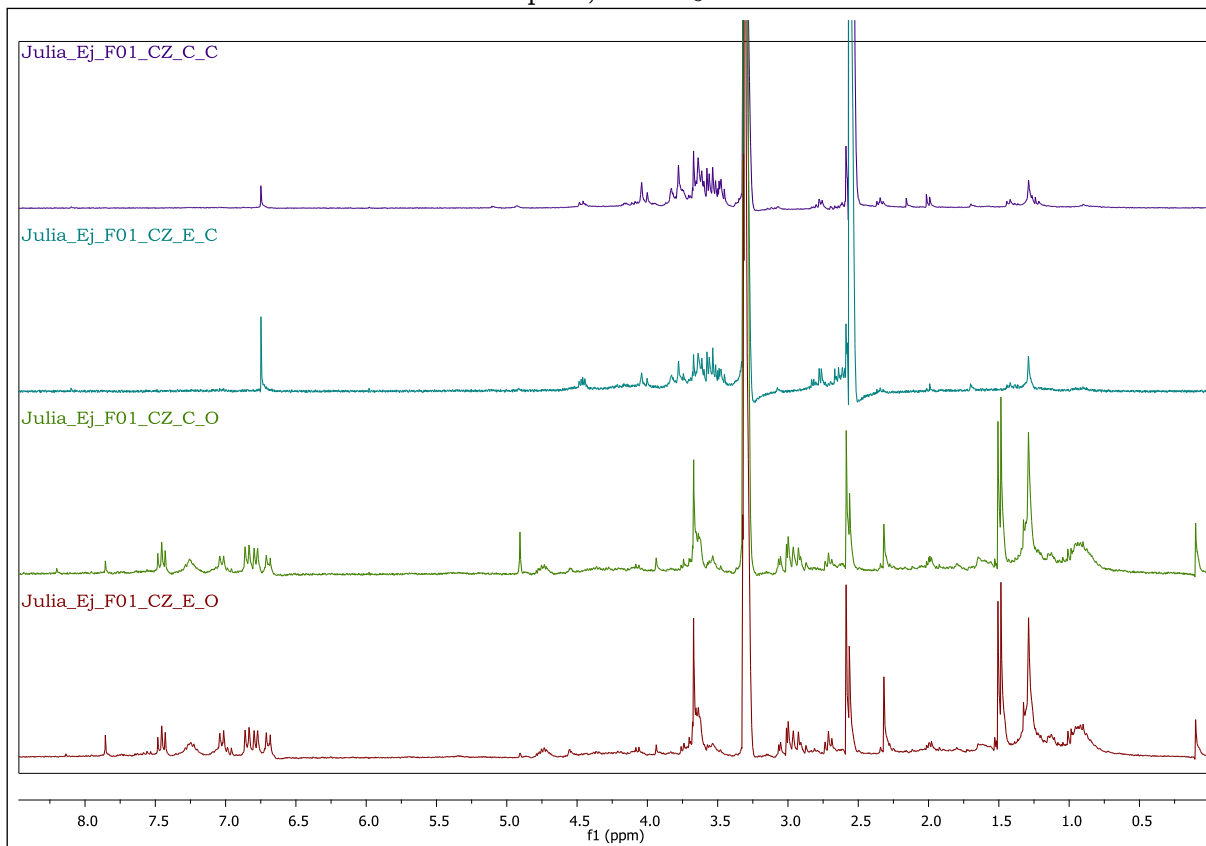
Figura 19 – Representação estrutural das substâncias isoladas do meio de cultivo de milho.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

6.3 Meio de Cultivo Líquido – Czapek®

Como descrito na metodologia, foram obtidos dois extratos de Czapek®, denominados Claro e Escuro (item 3.2, p. 35). Estes foram submetidos a uma extração sólido-líquido com clorofórmio P.A dando origem a quatro extratos, codificados, extratos Cristalinos (CZ_C_C e CZ_E_C) e extratos Oleosos (CZ_C_O e CZ_E_O). Estes foram submetidos à análise de RMN de ^1H , e com base nos resultados obtidos (Figura 20, p. 64), foram selecionados os extratos oleosos (CZ_C_O e CZ_E_O) para purificação das substâncias.

Figura 20 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, dos extratos cristalinos e oleosos dos extratos de Czapek[®], em CD_3OD e 300 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

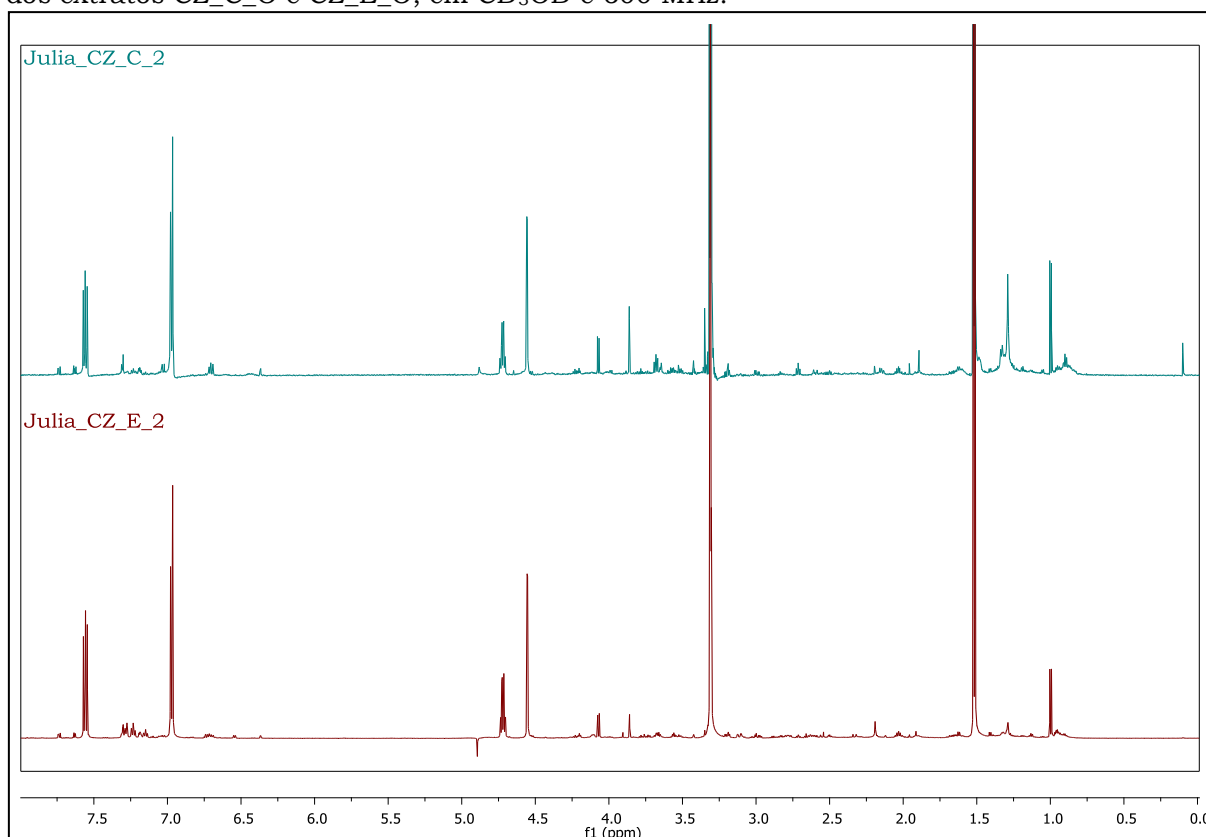
A escolha dos extratos oleosos foi baseada em seus perfis químicos, que apresentaram sinais de hidrogênio em δ_{H} 6,5-8, indicando substâncias aromáticas, possivelmente pertencentes à classe das isocumarinas.

Dessa forma os extratos oleosos (CZ_C_O e CZ_E_O) foram fracionados por CLAE-DAD_{semipreparativa}, coletando-se 12 frações de cada extrato. As 24 frações coletadas foram submetidas à análise de RMN de ^1H e de CLAE-DAD_{analítica} para verificação do grau de pureza (Apêndices 07-09, p. 118-119). Dessas análises, as frações 02 e 07 do extrato CZ_C_O, e as frações 01, 03 e 08 do extrato CZ_E_O foram analisadas por RMN Bidimensional, possibilitando a identificação das substâncias **08** e **09** (Fr. 02 e 07) como sendo a *rel.* (3*S*, 4*S*)-4-hidroximeleina e meleina, respectivamente, pertencentes à classe da isocumarinas. O estudo dos resultados obtidos também nos permitiu identificar a substância **11** (Fr. 03) como sendo a *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hidroximeleina, pertencente à classe das

isocumarinas, e a substância **12** (Fr. 08) como sendo a botryosphaerona D, pertencente a classe das naftalenonas.

A análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H das frações 02 de ambos os extratos (Figura 21, Tabela 12), nos mostrou o mesmo perfil químico, indicando que a Fr. 02, oriunda do CZ_E_O, seja a substância *rel.* (3*S*, 4*S*)-4-hidroxiemeleina (**08**).

Figura 21 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações 02 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

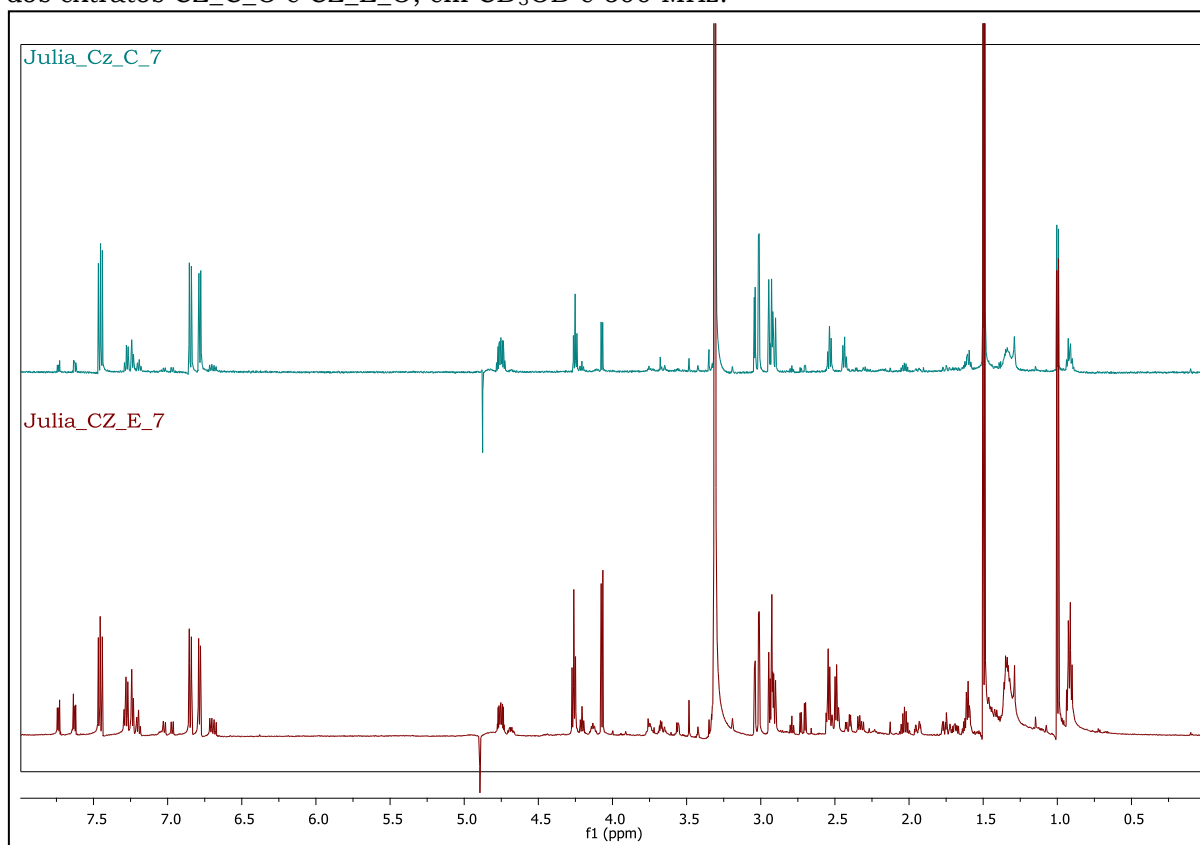
Tabela 12 – Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio das frações 02 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.

CZ_C_O_2		CZ_E_O_2	
δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^1H (ppm)	J (Hz)
7,56	<i>dd</i> (8,3 e 7,5)	7,58	<i>dd</i> (8,3 e 7,5)
6,98	<i>m</i>	7,00	<i>m</i>
6,96	<i>sl</i>	6,98	<i>sl</i>
4,73	<i>qd</i> (6,6 e 2,1)	4,74	<i>qd</i> (6,6 e 2,1)
4,56	<i>d</i> (2,1)	4,56	<i>d</i> (2,1)
1,51	<i>d</i> (6,6)	1,54	<i>d</i> (6,6)

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

A mesma comparação foi feita com as frações 07 de ambos os extratos, e também se verificou o mesmo perfil químico (Figura 22, Tabela 13), sugerindo que a Fr. 07, oriunda do CZ_E_O, seja a substância Meleina (**09**).

Figura 22 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações 07 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

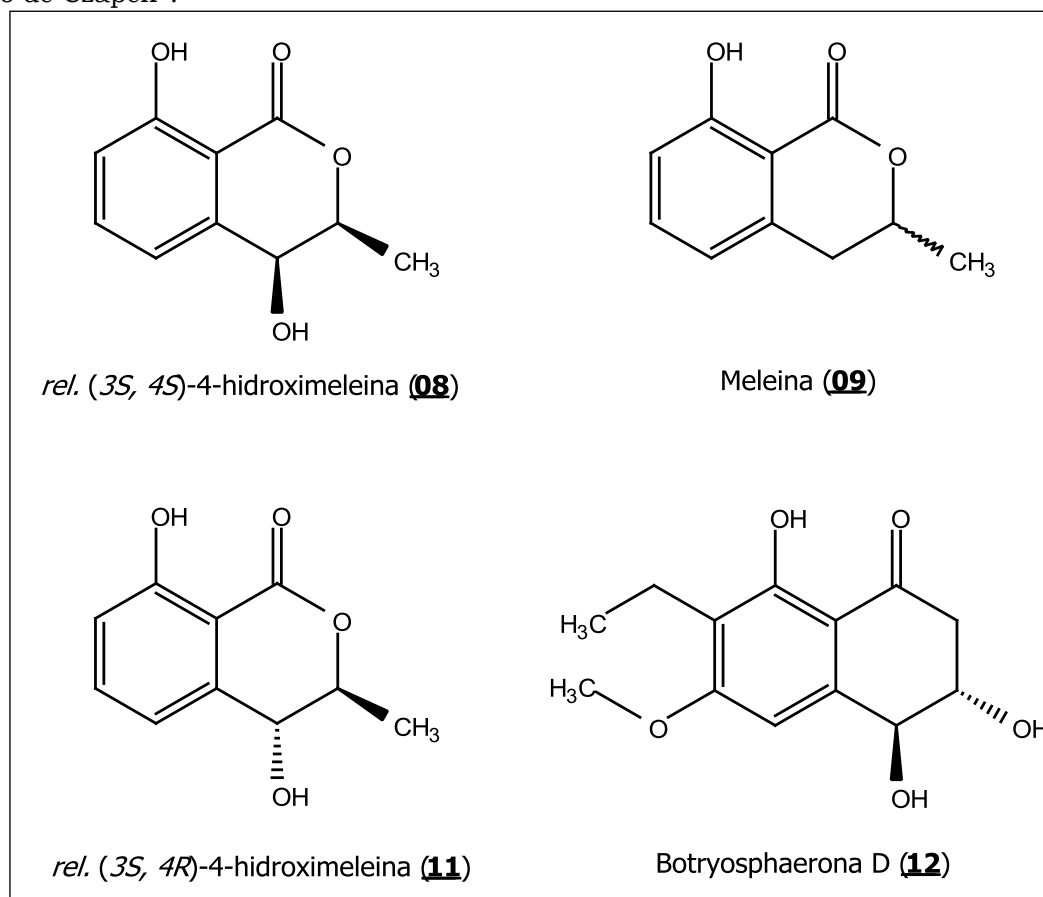
Tabela 13 – Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio das frações 07 dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.

CZ_C_O_7		CZ_E_O_7	
δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^1H (ppm)	J (Hz)
7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,4)	7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,4)
6,85	<i>d</i> (7,4)	6,85	<i>d</i> (7,4)
6,78	<i>d</i> (8,4)	6,78	<i>d</i> (8,4)
4,75	<i>m</i>	4,75	<i>m</i>
3,04	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)	3,03	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)
2,92	<i>m</i>	2,92	<i>m</i>
1,51	<i>d</i> (6,3)	1,50	<i>d</i> (6,3)

Fonte: tabela elaborada pela autora.

As determinações estruturais das substâncias **08**, **09**, **11** e **12** (Figura 23) estão descritas no item 7, p. 73. A substância presente na fração Fr. 01, oriunda do extrato CZ_E_O, não teve sua estrutura determinada.

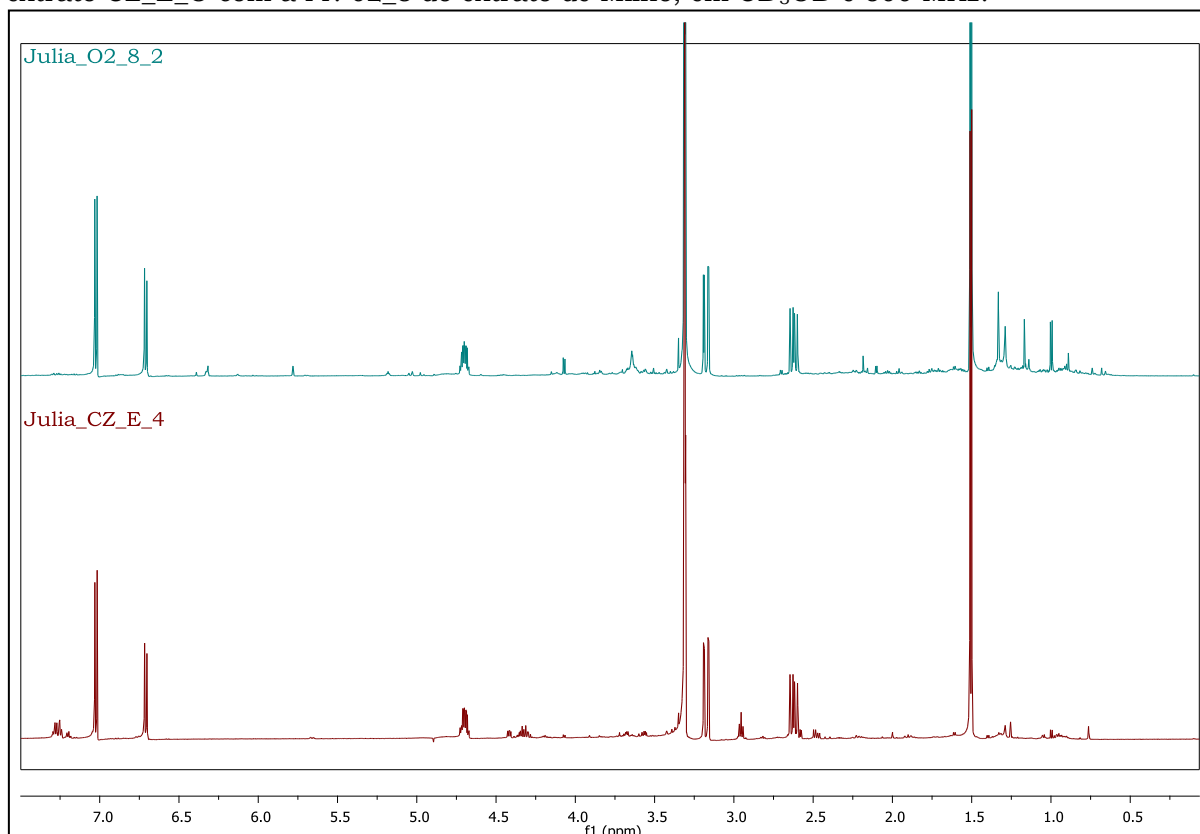
Figura 23 – Representação estrutural das substâncias isoladas do meio de cultivo de Czapek®.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A comparação (Figura 24, Tabela 14, p. 68) do espectro de RMN de ^1H da fração Fr. 04, oriunda do extrato CZ_E_O, com o espectro de RMN de ^1H da fração Fr. 02_8, oriunda do extrato de Milho, sugere que a Fr. 04 também pertence à classe das isocumarinas e é denominada 5-hidroximeleina (**05**).

Figura 24 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, da Fração 04 do extrato CZ_E_O com a Fr. 02_8 do extrato de Milho, em CD_3OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Tabela 14 – Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio da Fração 04 do extrato CZ_E_O com a Fr. 02_8 do extrato de Milho, em CD_3OD e 600 MHz.

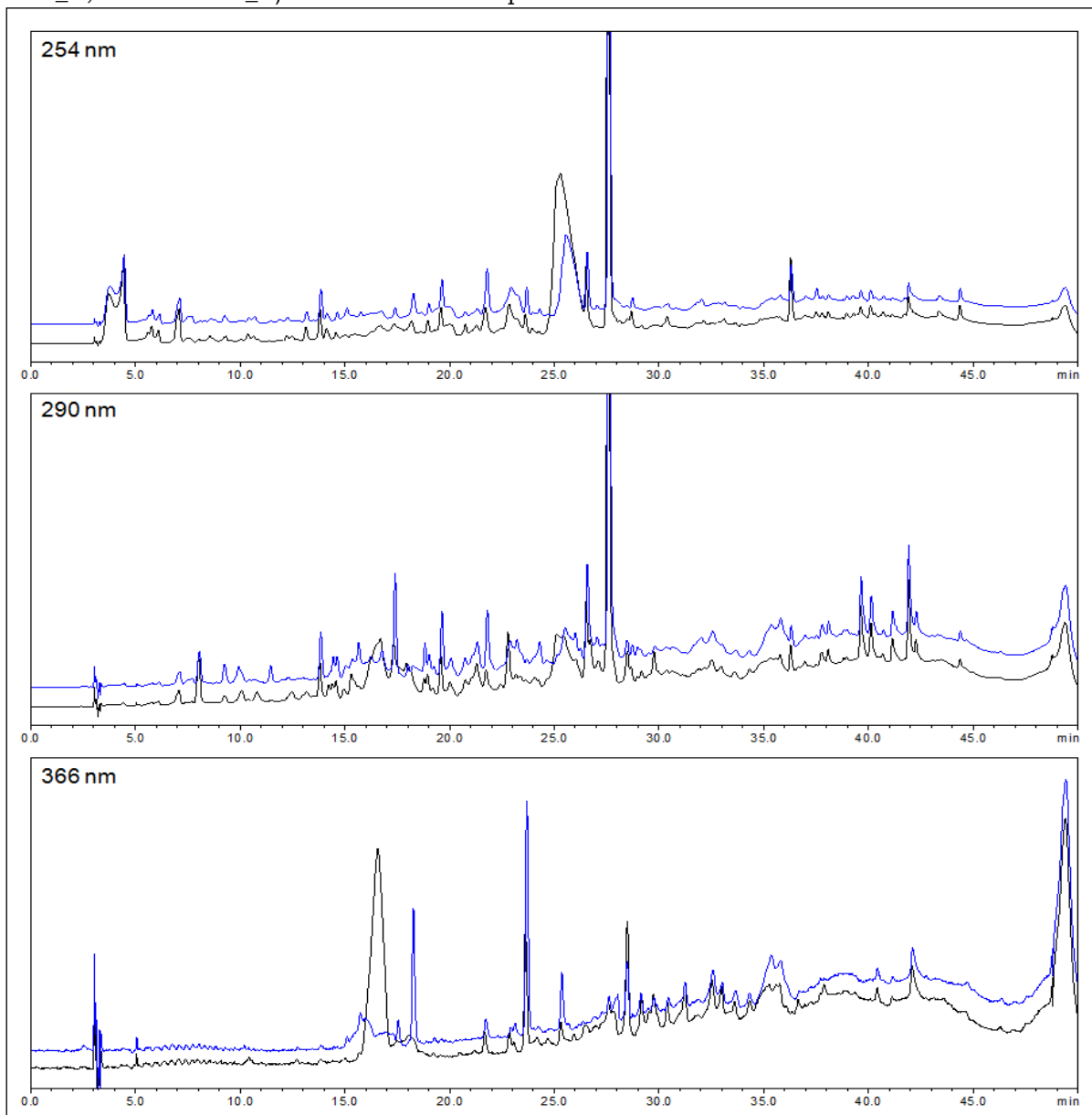
Fr. 02_8 (Milho)		CZ_E_O_4	
δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^1H (ppm)	J (Hz)
7,02	<i>d</i> (8,9)	7,02	<i>d</i> (8,9)
6,71	<i>d</i> (8,9)	6,71	<i>d</i> (8,9)
4,69	<i>m</i>	4,70	<i>m</i>
3,16	<i>dd</i> (16,9 e 3,3)	3,17	<i>dd</i> (16,9 e 3,4)
2,62	<i>dd</i> (16,9 e 11,4)	2,62	<i>dd</i> (16,9 e 11,4)
1,51	<i>d</i> (6,3)	1,50	<i>d</i> (6,3)

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

6.4 Meio de Cultivo Líquido – PDB

Como mencionado na metodologia (item 3.3, p. 36), foram obtidos dois extratos de PDB (Claro e Escuro), cujos cromatogramas podem ser visualizados a seguir (Figura 25, p. 69).

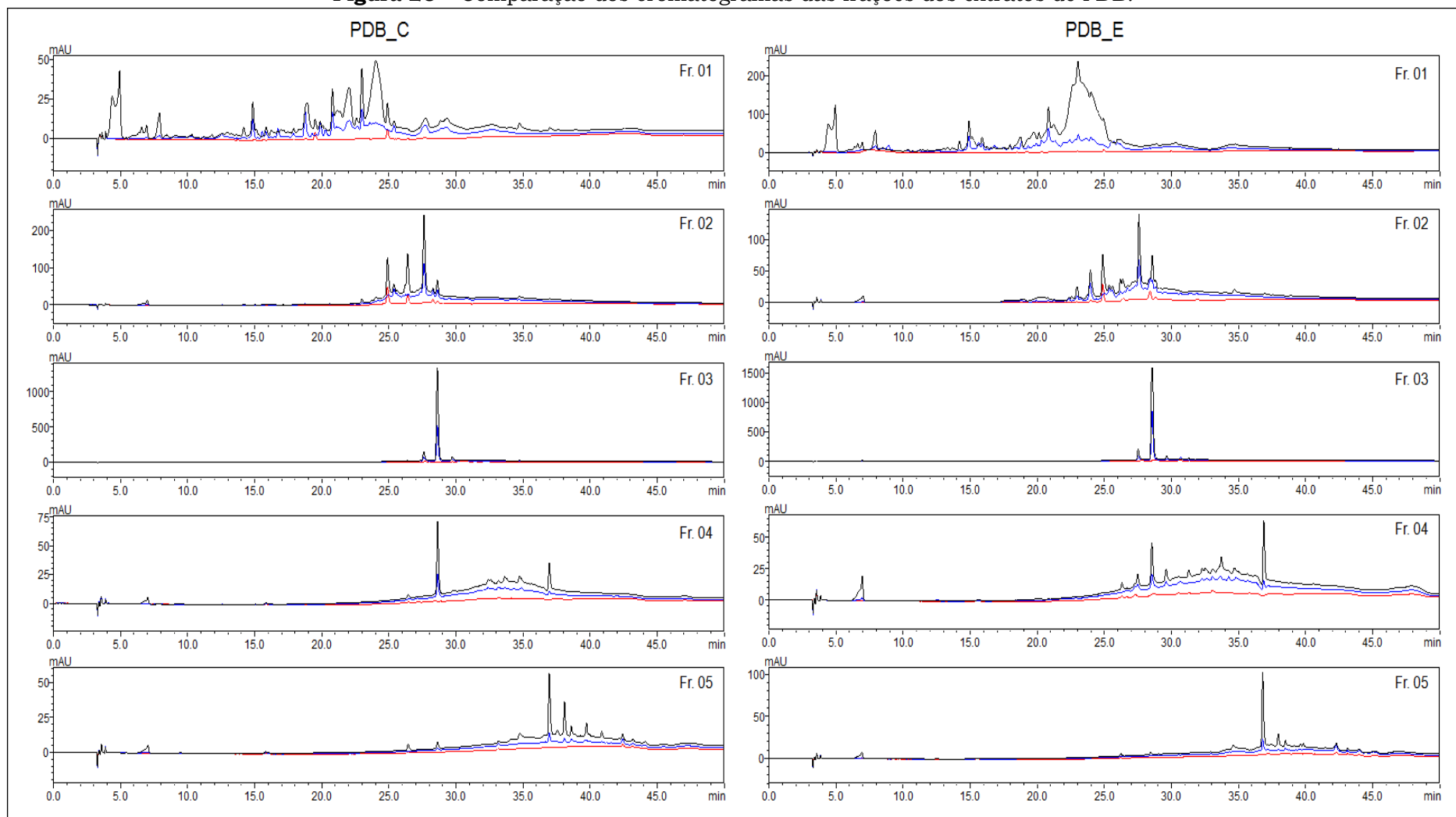
Figura 25 – Comparação dos cromatogramas dos extratos brutos de PDB (Azul = PDB_C; Preto = PDB_E) em diferentes comprimentos de onda.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Coluna C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/ H₂O em 40 min.; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹.

Estes extratos foram microfracionados em Cartucho de SPE de C18, devido à quantidade de massa e ao aspecto dos cromatogramas, objetivando um fracionamento prévio para posterior purificação das substâncias por CLAE-DAD_{preparativa}. Dessa forma, cada extrato originou cinco frações (Figura 26, p. 70).

Figura 26 – Comparação dos cromatogramas das frações dos extratos de PDB.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Coluna C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/ H₂O em 40'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹, e λ = 254 (preto), 290 (azul) e 366 nm (vermelho).

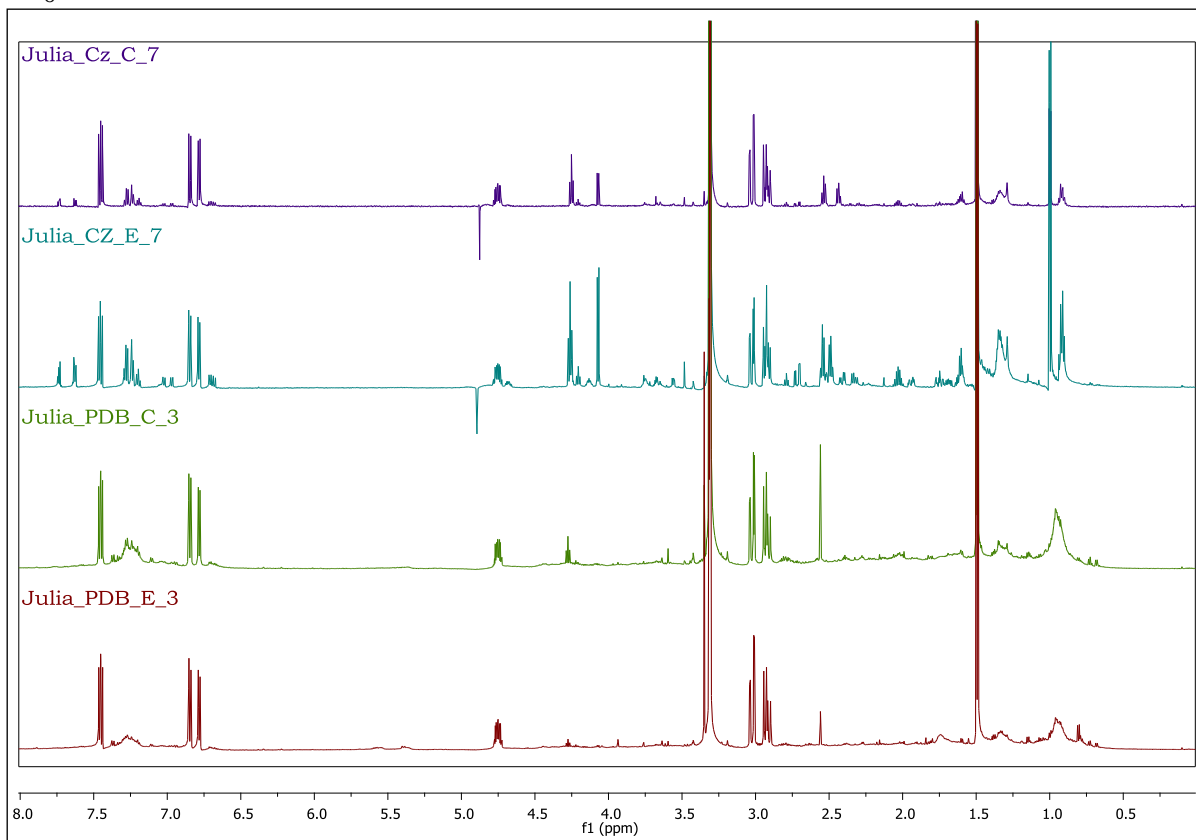
A análise dos cromatogramas das frações obtidas (Figura 26, p. 70) permitiram tirar as conclusões descritas abaixo:

- **Fração 01:** não foi obtido o resultado esperado, uma vez que em ambas as frações foram visualizados picos por todo o cromatograma. Um dos fatores que pode ter influenciado esses resultados foi a pressão aplicada no cartucho no momento do fracionamento. Se a pressão aplicada foi muito grande, como deve ter sido o caso, não ocorre separação dos componentes como seria o esperado, no entanto, ocorre um arraste das substâncias que deveriam ficar retidas na fase estacionária. Outro fator que pode ter influenciado essa má separação dos componentes, associado à pressão aplicada, foi o volume de fase móvel aplicado no momento do fracionamento. Um volume grande de fase móvel (\geq que 5 mL) também tem o mesmo efeito da pressão, ou seja, ocorre um arraste das substâncias que deveriam ficar retidas na fase estacionária.

- **Fração 03:** pelos cromatogramas, observa-se que o resultado foi satisfatório, uma vez que foi possível detectar a presença de uma substância majoritária. A análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H dessas frações com os espectros oriundos das frações 07 dos extratos de Czapek® (Figura 27, Tabela 15, p. 72) nos permitiram identificar a Meleina.

Para as demais frações, a quantidade de massa obtida foi pequena para realizar, posteriormente, a purificação das substâncias contidas nestas frações.

Figura 27 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações 03 dos extratos PDB_C e PDB_E com as frações 07 dos extratos de CZ_C_O e CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Tabela 15 – Comparação dos deslocamentos químicos de hidrogênio das frações 03 dos extratos PDB_C e PDB_E com as frações 07 dos extratos de CZ_C_O e CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.

CZ_C_O_7		CZ_E_O_7		PDB_C_3		PDB_E_3	
δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^1H (ppm)	J (Hz)
7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,4)	7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,4)	7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,5)	7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,5)
6,85	<i>d</i> (7,4)	6,85	<i>d</i> (7,4)	6,85	<i>d</i> (7,5)	6,85	<i>d</i> (7,5)
6,78	<i>d</i> (8,4)	6,78	<i>d</i> (8,4)	6,78	<i>d</i> (8,4)	6,78	<i>d</i> (8,4)
4,75	<i>m</i>	4,75	<i>m</i>	4,75	<i>m</i>	4,75	<i>m</i>
3,04	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)	3,03	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)	3,04	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)	3,02	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)
2,92	<i>m</i>	2,92	<i>m</i>	2,93	<i>m</i>	2,92	<i>m</i>
1,51	<i>d</i> (6,3)	1,50	<i>d</i> (6,3)	1,49	<i>d</i> (6,3)	1,49	<i>d</i> (6,3)

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

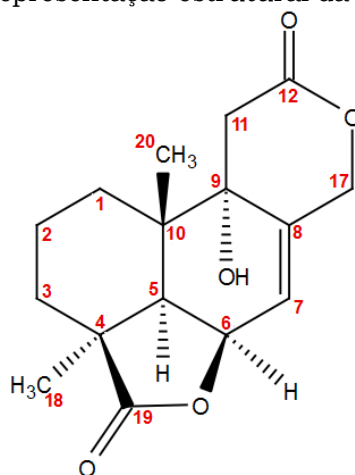
Neste item estão compreendidos os dados espectrométricos que auxiliaram a determinação estrutural ou identificação das substâncias isoladas.

A determinação estrutural das substâncias produzidas por *B. parva* será apresentada não na sequência em que foram obtidas ou do meio de cultivo onde foram produzidas, mas sim por similaridade estrutural.

7.1 Substância **01**

A substância **01** (Fr. 02_2 do extrato de Milho, Figura 28) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua fórmula molecular $C_{16}H_{20}O_5$ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e de Espectrometria de Massas, ESI-Qq-TOF, no modo positivo ($[M+H]^+$ em m/z 293,1386; cal. 293,1392; Erro = 2,04 ppm; Apêndice 10, p. 120).

Figura 28 – Representação estrutural da substância **01**.

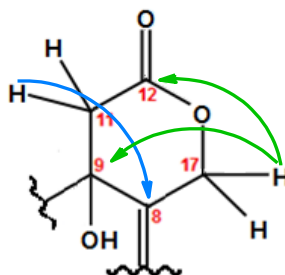


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 12, p. 122) de **01** apresentou 16 carbonos, sendo: dois na região de carboxilas (δ_C 184,8 e 174,5); dois quaternários (δ_C 39,0 e 44,0); dois carbonos sp^2 (121,0 e 140,8); três carbonos carbinólicos (δ_C 70,1; 73,4 e 74,0); um carbono metínico sp^3 (δ_C 44,6); quatro carbonos metilênicos (δ_C 18,9; 27,1; 29,0 e 38,2), e dois carbonos metílicos (δ_C 22,6 e 24,6).

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 11, p. 121) apresentou dois sinais em δ_{H} 0,89 (s, δ_{C} 22,6, 3H, H-20) e δ_{H} 1,35 (s, δ_{C} 24,6, 3H, H-18), característicos de metilas; δ_{H} 6,09 (m, δ_{C} 121,0, 1H, H-7) atribuído a um hidrogênio vinílico; e sinal em δ_{H} 5,04 (m, δ_{C} 74,0, 1H, H-6) atribuído a um hidrogênio carbinólico. Adicionalmente foram observados sinais em δ_{H} 4,99 (dd, δ_{C} 70,1; $J = 14,7$ e $1,1$ Hz, 1H, H-17'), δ_{H} 4,94 (d, δ_{C} 70,1; $J = 14,7$ Hz, 1H, H-17''), característicos de hidrogênios carbinólicos diastereotópicos, e em δ_{H} 2,62 (d, δ_{C} 38,2; $J = 15,2$ Hz, 1H, H-11') e δ_{H} 2,85 (d, δ_{C} 38,2; $J = 15,2$ Hz, 1H, H-11''), atribuídos a hidrogênios metilênicos posicionados α a uma carbonila. Esta observação, juntamente com as correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (Apêndice 15, p. 125) entre os hidrogênios diastereotópicos H-17 \leftrightarrow C-9/C-12 de H-11 \leftrightarrow C-8, nos permitiu propor uma unidade δ lactona (Figura 29).

Figura 29 – Estrutura parcial A de **01**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

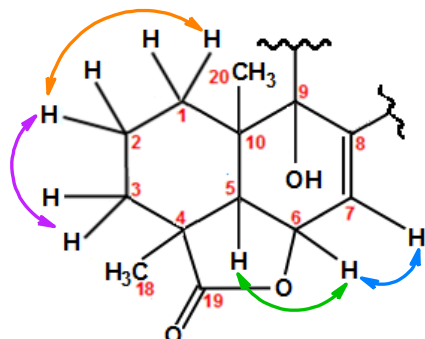
O sinal observado em δ_{H} 2,54 (d, δ_{C} 44,6, $J = 5,1$ Hz, 1H, H-5), foi atribuído a hidrogênio metínico de junção de anel. A visualização dos multipletos em δ_{H} 1,29 e 1,85; 1,60 e 1,75 e 1,50 e 2,06, correlacionados por COSY (Apêndice 13, p. 123) evidenciaram uma unidade $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno do experimento de HSQC (Apêndice 14, p. 124).

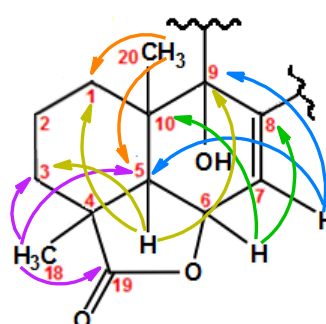
Pelo mapa de contorno de COSY, foram observadas as correlações spin-spin entre H-5 \leftrightarrow H-6 \leftrightarrow H-7, e por HMBC de H-7 \leftrightarrow C-5/C-9; H-6 \leftrightarrow C-10/C-8; H-5 \leftrightarrow C-3/C-1/C-9; H-18 \leftrightarrow C-3/C-5/C-19 e H-20 \leftrightarrow C-1/C-5. Estas correlações foram muito importantes, e nos permitiram visualizar a estrutura parcial B (Figura 30, p. 75).

Figura 30 – Estrutura parcial B de **01**.

Correlações observadas no mapa de contorno de COSY



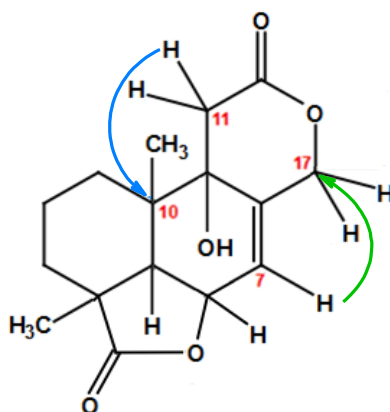
Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

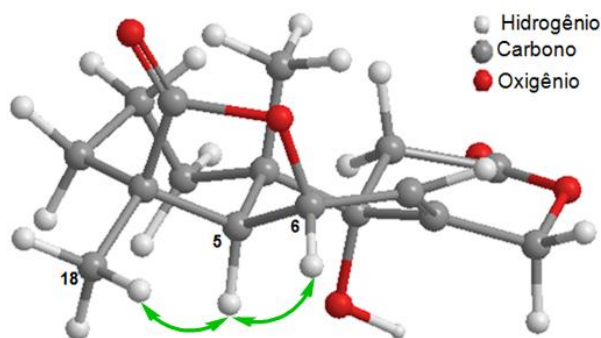
As estruturas parciais A e B foram conectadas pelas correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (Apêndice 15, p. 125), entre H-7 com C-17 e de H-11 com C-10 (Figura 31).

Figura 31 – Conexão das estruturas parciais A e B pelas correlações entre H-7↔C-17 e H11↔C10.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A configuração relativa de **01** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 16, p. 126), em que foi possível observar a correlação de H-5 com H-6 e H-18, indicando que estes hidrogênios encontram-se na mesma face do anel. A ausência da correlação entre H-20 com os hidrogênios H-18, H-5 e H-6 sugere que H₃C-20 encontra-se orientada em β (Figura 32, p. 76).

Figura 32 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de **01**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A estrutura proposta para a substância **01** foi confirmada por comparação com os dados literatura⁶¹ (Tabela 16), permitindo identificá-la como botryosphaerin A, um diterpeno da classe dos tetranorlabdanos.

Tabela 16 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁶¹ da substância botryosphaerin A (**01**).

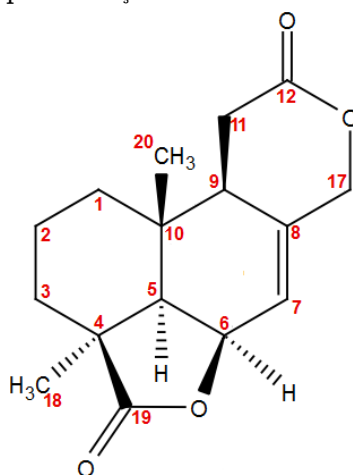
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)
01	27,1	1,29	<i>m</i>	26,5	1,21-1,25	<i>m</i>
		1,85	<i>m</i>		2,09-2,11	<i>m</i>
02	18,9	1,60	<i>m</i>	18,2	1,50-1,53	<i>m</i>
		1,75	<i>m</i>		1,60-1,64	<i>m</i>
03	29,0	1,50	<i>m</i>	28,3	1,44-1,49	<i>m</i>
		2,06	<i>m</i>		2,18-2,22	<i>m</i>
04	44,0	----	----	42,8	----	----
05	44,6	2,54	<i>d</i> (5,1)	43,8	2,90	<i>d</i> (5,1)
06	74,0	5,04	<i>m</i>	72,5	5,01-5,02	<i>m</i>
07	121,0	6,09	<i>m</i>	119,3	6,05	<i>sl</i>
08	140,8	----	----	140,9	----	----
09	73,4	----	----	72,6	----	----
10	39,0	----	----	38,2	----	----
11	38,2	2,62	<i>d</i> (15,2)	38,0	3,01	<i>sl</i>
		2,85	<i>d</i> (15,2)			
12	174,5	----	----	171,8	----	----
17	70,1	4,99	<i>dd</i> (14,7 e 1,1)	69,2	5,04	<i>s</i>
		4,94	<i>d</i> (14,7)			
18	24,6	1,35	<i>s</i>	24,3	1,28	<i>s</i>
19	184,8	----	----	182,2	----	----
20	22,6	0,89	<i>s</i>	22,1	1,03	<i>s</i>

*em CD_3OD , 150 e 600 MHz. **em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 e 400 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.2 Substância **03**

A substância **03** (Fr. 02_5 do extrato de Milho, Figura 33) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e a fórmula molecular, $C_{16}H_{20}O_4$ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D, e de Espectrometria de Massas, ESI-Qq-TOF, no modo positivo ($[M+H]^+$ em m/z 277,1437; Erro = 0,36 ppm; cal. 277,1438; Apêndice 17, p. **Apêndice 17** – Espectro de Massas de alta resolução, no modo positivo da substância **03**).

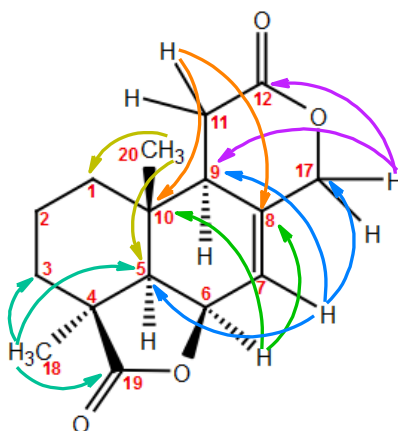
Figura 33 – Representação estrutural da substância **03**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

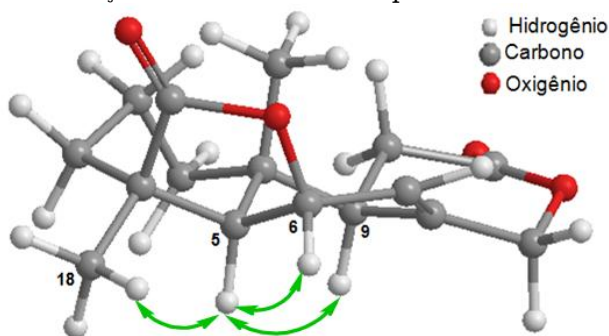
A substância **03** apresentou perfil espectroscópico muito parecido com a substância **01**, em que a única diferença observada foi a ausência de um carbono carbinólico quaternário (δ_c 73,4) e a presença de um carbono metínico (δ_c 45,7). Esta constatação aliada à perda de 16 Da em EM indica a redução de C-9 na substância **03**.

Com os dados obtidos do mapa de contorno de COSY (Apêndice 20, p. 130), foi possível observar o acoplamento a 3J do hidrogênio H-5, como o hidrogênio alílico carbinólico H-6 e com o hidrogênio vinílico H-7. Adicionalmente, foi observado o acoplamento a 3J e 4J do hidrogênio olefínico, H-7, com os hidrogênios H-6, H-9 e H-17. Pelas correlações observadas no experimento de HMBC (Apêndice 22, p. 132), a proposta estrutural para a substância **03** foi definida (Figura 34, p. 78).

Figura 34 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **03**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A configuração relativa de **03** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 23, p. 133), em que foi possível observar, assim como em **01**, a correlação do hidrogênio H-5 \leftrightarrow H-6 \leftrightarrow H-18, evidenciando que estes hidrogênios encontram-se na mesma face da molécula. A ausência de interação espacial de H-20 com outros núcleos sugere que a mesma esteja em plano diferente de H-18, H-5 e H-6, portanto, orientada em β (Figura 35). A configuração relativa proposta para a substância **03** esta coerente com a mesma proposta para a substância **01** e com a literatura.⁶⁰

Figura 35 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de **03**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A comparação com os dados da literatura⁶² (Tabela 17, p. 79) permitiram identificar a substância **03** como 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6 β :12,17-diolídeo.

Tabela 17 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁶², da substância 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6 β :12,17-diolídeo (**03**).

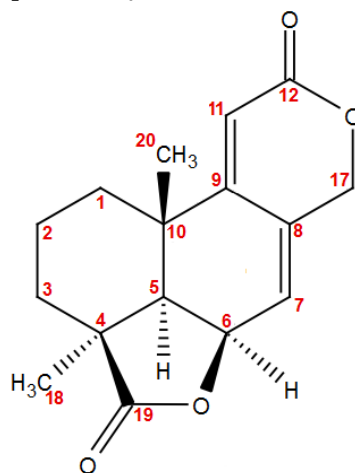
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)
01	33,0	1,35 1,60	m m	32,3	1,05-1,22	m
02	18,6	1,62 1,74	m m	17,6	1,45-1,49 1,44-1,57	m m
03	29,0	1,51 2,07	m m	27,8	1,81-1,88 2,18-2,22	m m
04	43,9	----	----	42,5	----	----
05	51,7	2,01	d (5,2)	51,2	1,82	dd (5,1)
06	74,5	5,08	ddd (5,2; 3,6 e 1,8)	72,2	4,93	m
07	120,5	6,11	m	119,2	6,03	m
08	140,3	----	----	138,4	----	----
09	45,7	2,48	m	44,9	2,61	m
10	34,7	----	----	33,6	----	----
11	29,9	2,52 2,70	m dd (14,7 e 6,3)	29,2	2,43 2,31	m m
12	175,9	----	----	172,4	----	----
17	71,2	4,80 4,87	m m	69,9	4,72 4,80	dd (14,2 e 1,2) d (14,2)
18	24,3	1,33	s	24,2	1,32	s
19	184,3	----	----	181,3	----	----
20	18,0	0,81	s	17,5	0,85	s

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 75 e 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.3 Substância **06**

A substância **06** (Fr. 02_9 do extrato de Milho, Figura 36) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e a fórmula molecular, $C_{16}H_{18}O_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D, e ESI-Qq-TOF, modo positivo ($[M+H]^+$ em m/z 275,1275; cal. 275,1285; Erro = 3,63 ppm; Apêndice 24, p. 134).

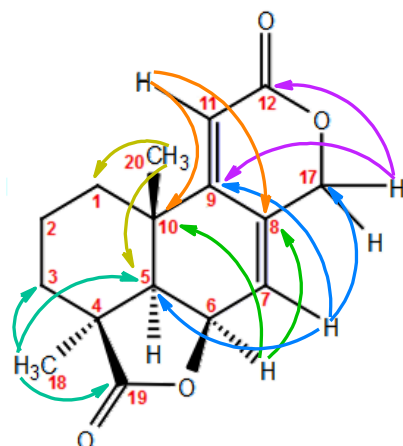
Figura 36 – Representação estrutural da substância **06**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

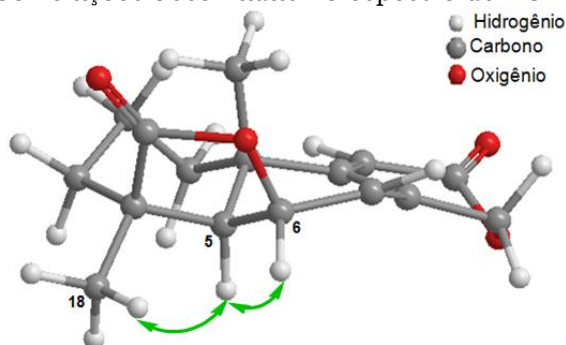
A substância **06** apresentou dados espectroscópicos muito parecido com a substância **01**, em que a única diferença observada foi a ausência de um carbono carbinólico quaternário (δ_C 73,4) e a presença de dois carbonos sp^2 , δ_C 112,2 e 161,2. Estas observações, associadas à blindagem sofrida no carbono da carbonila, C-12, que passou de δ_C 174,5 para 166,4 e a diferença de 18 Da no EM, evidenciando a perda de água, sugerem fortemente que a carbonila do anel C passou a ser conjugada com uma insaturação.

Pelo mapa de contorno de COSY (Apêndice 27, p. 137), foi possível observar as correlações 1H - 1H a 3J , 4J e 5J do hidrogênio vinílico H-7 \leftrightarrow H-6 \leftrightarrow H-17 \leftrightarrow H-11, respectivamente. Pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 29, p. 139), foi possível observar a correlação a 3J de H-7 \leftrightarrow C-9, H-11 \leftrightarrow C-8/C-10/C-12 e de H-17 \leftrightarrow C-7/C-9/C-12, reforçando a estrutura proposta (Figura 37, p. 81).

Figura 37 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **06**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A configuração relativa de **06** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 30, p. 140), em que foi possível observar a correlação do hidrogênio H-5↔H-6↔H-18, evidenciando que estes hidrogênios encontram-se na mesma face da molécula. A ausência de interação espacial de H-20 com outros núcleos sugere que a mesma esteja em plano diferente de H-18, H-5 e H-6, e que a H₃C-20 esteja orientada em β (Figura 38). A configuração relativa proposta para a substância **06** esta coerente com a mesma proposta para a substância **01** e com a literatura.⁶¹

Figura 38 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de **06**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A comparação com os dados da literatura⁶³ (Tabela 18, p. 82) permitiram identificar a substância **06** como CJ-14445.

Tabela 18 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁶³, da substância CJ-14445 (**06**).

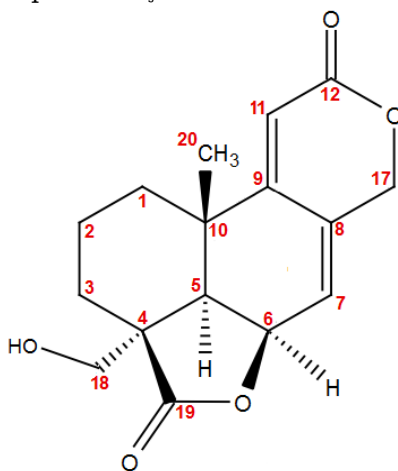
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)
01	30,5	1,70	<i>m</i>	29,6	1,67	<i>m</i>
		1,77	<i>m</i>		1,74	<i>m</i>
02	18,4	1,73	<i>m</i>	17,3	1,70	<i>m</i>
		1,84	<i>m</i>		1,87	<i>m</i>
03	28,9	1,55	<i>m</i>	27,7	1,56	<i>m</i>
		2,20	<i>m</i>		2,27	<i>m</i>
04	44,3	----	----	42,8	----	----
05	48,7	2,10	<i>d</i> (4,7)	47,9	1,94	<i>d</i> (5,0)
06	73,3	5,18	<i>ddd</i> (9,3, 4,7 e 1,5)	71,3	5,04	<i>m</i>
07	123,4	6,32	<i>m</i>	121,8	6,22	<i>m</i>
08	133,6	----	----	132,3	----	----
09	161,2	----	----	158,7	----	----
10	36,2	----	----	35,0	----	----
11	112,2	5,78	<i>d</i> (1,7)	111,8	5,78	<i>d</i> (2,0)
12	166,4	----	----	163,6	----	----
17	70,9	4,97	<i>d</i> (13,6)	69,6	4,89	<i>d</i> (14,0)
		5,04	<i>dt</i> (13,6 e 1,9)		4,99	<i>m</i>
18	24,3	1,33	<i>s</i>	24,1	1,35	<i>s</i>
19	183,7	----	----	180,9	----	----
20	25,2	1,17	<i>s</i>	24,7	1,19	<i>s</i>

* em CD₃OD, 150 e 600 MHz.** em CDCl₃, 125 e 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.4 Substância **02**

A substância **02** (Fr. 02_3 do extrato de Milho, Figura 39) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e a fórmula molecular, $C_{16}H_{18}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D, e ESI-Qq-TOF, modo positivo ($[M+H]^+$ em m/z 291,1235; cal. 291,1228; Erro = 2,40 ppm; Apêndice 31, p. 141).

Figura 39 – Representação estrutural da substância **02**.

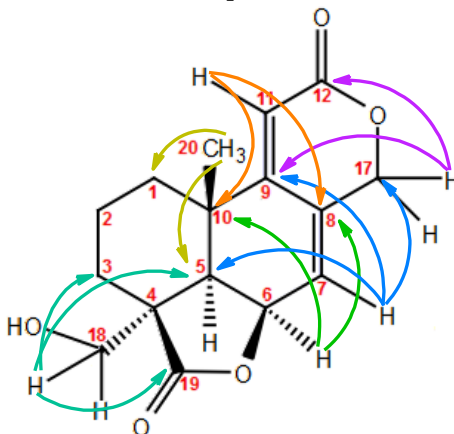


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A substância **02** apresentou perfil espectroscópico semelhante ao da substância **06**, em que a diferença observada foi a ausência de um carbono metílico (δ_C 24,3) e a presença de um carbono metilênico oxigenado (δ_C 67,5). Esta observação, associada com o ganho de 16 Da quando comparado com a substância **06**, evidencia a oxidação de uma das metilas (H_3C -18 ou H_3C -20).

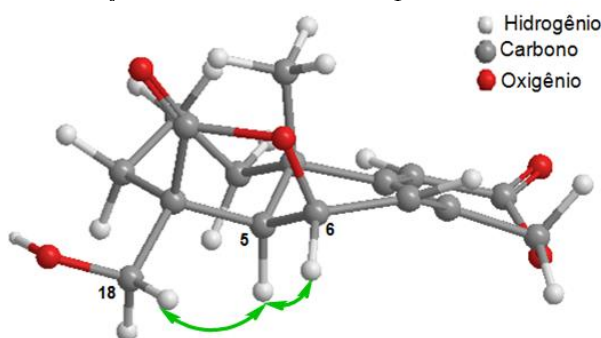
A correlação observada no experimento de HMBC (Apêndice 37, p. 147) a 3J entre os hidrogênios carbinólicos (δ_H 3,64 e 3,71) com a carbonila em C-19 (δ_C 182,5) evidencia que a oxidação ocorreu em C-18 e não em C-20.

Pelo mapa de contorno de COSY (Apêndice 35, p. 145), foi possível observar o acoplamento a 3J , 4J e 5J do hidrogênio vinílico H-7 com o hidrogênio carbinólico H-6, com os hidrogênios metilênicos carbinólicos H-17 e com o hidrogênio olefínico H-11, respectivamente. Pelas correlações observadas no mapa de contorno de HMBC, a proposta estrutural para a substância **02** foi definida (Figura 40, p. 84).

Figura 40 – Correlações 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **02**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A configuração relativa de **02** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 38, p. 148), em que foi possível observar a interação/correlação do hidrogênio H-5 com os hidrogênios H-6 e H-18, mostrando que o anel lactônico γ à carbonila está orientado em β (Figura 41).

Figura 41 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de **02**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

O levantamento bibliográfico realizado na Web of Science e SciFinder não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como *rel. (4S, 5R, 6R, 10S)-18-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-7,9-dieno-19,6 β :12,17-diolídeo* (botryosphaerin I). Este nome foi atribuído seguindo o critério adotado para outras substâncias da mesma série codificadas como botryosphaerin A – botryosphaerin H.

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da Substância **02**, em CD_3OD e 14,1 T.

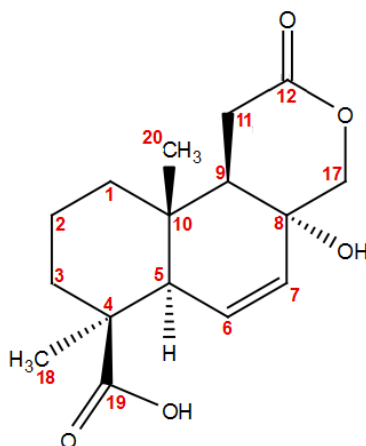
Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	HMBC
01	29,9	1,70	<i>m</i>	C-2/C-3/C-5/ C-10/C-20
		1,77	<i>m</i>	
02	18,3	1,74	<i>m</i>	C-1/C-3/C-4/C-10
		1,86	<i>m</i>	
03	23,8	1,65	<i>m</i>	C-1/C-2/C-4/ C-18/C-19
		2,01	<i>m</i>	
04	51,0	----	----	----
05	45,2	2,34	<i>d</i> (5,0)	C-1/C-4/C-9/C-10/ C-18/C-19/C-20
06	74,1	5,30	<i>dt</i> (5,0 e 1,7)	C-7/C-8/C-10
07	123,6	6,31	<i>m</i>	C-5/C-9/C-17
08	133,0	----	----	----
09	161,3	----	----	----
10	35,7	----	----	----
11	112,7	5,79	<i>d</i> (1,3)	C-8/C-10/C-12
12	166,5	----	----	----
17	71,0	4,97	<i>d</i> (13,5)	C-7/C-8/C-9/C-12
		5,04	<i>d</i> (13,5)	
18	67,5	3,64	<i>d</i> (11,1)	C-3/C-4/C-5/C-19
		3,71	<i>d</i> (11,1)	
19	182,5	----	----	----
20	25,8	1,20	<i>s</i>	C-1/C-5/ C-9/C-10

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.5 Substância **07**

A substância **07** (Fr. 02_10 do extrato de Milho, Figura 42) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua fórmula molecular, $C_{16}H_{22}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D, e de EM ESI-Qq-TOF, no modo negativo ($[M-H]^-$ em m/z 293,1395; cal. 293,1382; Erro = 4,43 ppm; Apêndice 39, p. 149).

Figura 42 – Representação estrutural da substância **07**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A substância **07** apresentou o mesmo perfil espectroscópico que a substância **01**, inclusive o mesmo peso molecular, sugerindo que diferença entre as duas se deva à posição dos grupos funcionais.

A principal diferença observada entre **01** e **07** foi a ausência de um carbono quaternário carbinólico (δ_C 73,4) e a presença de dois duplos dubletos em δ_H 6,66 (*dd*, 10,4 e 2,5 Hz; δ_C 136,0; 1H) e δ_H 5,71 (*dd*, 10,4 e 2,5 Hz; δ_C 122,7; 1H), evidenciando uma ligação dupla com isomeria *cis*. Considerando que os pesos moleculares de **01** e **07** são idênticos, e que em **07** foi visualizado uma ligação dupla dissubstituída ao invés de trissubstituída como em **01**, foi proposta a isomerização da ligação dupla de $\Delta^{7,8}$ para $\Delta^{6,7}$. Essa proposta está coerente com a abertura da γ lactona em C-6, levando a transformação do hidrogênio carbinólico H-6, em **01**, a um hidrogênio vinílico em **07**.

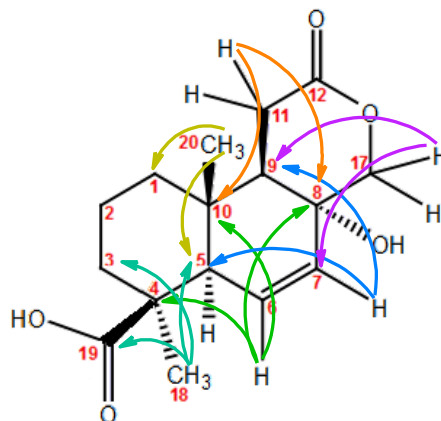
Tabela 20 – Comparação dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-11 das substâncias **01** e **07**, com δ em ppm, J em Hz.

	01			07		
	δ_H	δ_C	Multiplicidade, J	δ_H	δ_C	Multiplicidade, J
H-11'	2,62	38,2	<i>d</i> , 15,2	2,41	32,8	<i>dd</i> , <i>d</i> , 15,2 e 2,5
H-11''	2,85	38,2	<i>d</i> , 15,2	2,96	32,8	<i>dd</i> , <i>d</i> , 15,2 e 2,5

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Com a comparação feita na Tabela 20 fica evidente que C-9 passou de um carbono quaternário carbinólico para um carbono terciário metínico, caso contrário a multiplicidade de H-11 não passaria de dubleto para duplo dubleto. Corroborando com esta suposição temos as interações observadas em ^1H - ^1H no COSY (Apêndice 42, p. 152), o acoplamento H-9 \leftrightarrow H-11. Adicionalmente a correlação observada à longa distância em HMBC (Apêndice 44, p. 154) comprova a redução de C-9, oxidação de C-8 e migração da ligação dupla $\Delta^{7,8}$ para $\Delta^{6,7}$, seguido da abertura da γ lactona, nos permitindo posicionar a ligação dupla entre $\Delta^{6,7}$. A correlação de H₃C-20 \leftrightarrow C-9 (δ_C 50,8) e de H-6 \leftrightarrow C-8 (δ_C 86,4) mais uma vez confirmou a redução de C-9 para CH (Figura 43).

Figura 43 – Correlações 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **07**.

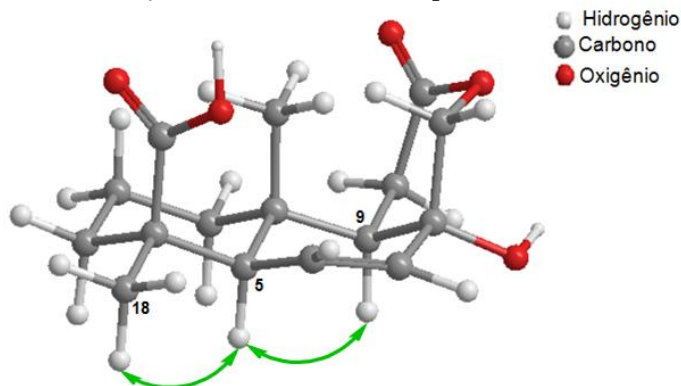


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A posição da insaturação foi novamente confirmada pela correlação em COSY entre H-5 \leftrightarrow H-6/H-7, e em HMBC de H-6 \leftrightarrow C-4/C-10. Com a fixação da ligação dupla em $\Delta^{6,7}$, fica evidente que a substância **07** não está lactonizada em C-4/C-6; ao invés disto, encontra-se como um ácido carboxílico no carbono C-4. A configuração relativa de **07** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Anexo 45, p. 155), em que foi possível

observar a interação/correlação entre H-6 e H-18, colocando-os no mesmo plano e a função carboxílica orientada em β (Figura 44).

Figura 44 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de **07**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A comparação dos dados com os dados apresentados na literatura⁶⁴ (Tabela 21) nos permitiu identificar a **07** como sendo a oidiolactona E.

Tabela 21 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁶⁴, da substância oidiolactona E (**07**).

Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)
01	38,6	1,75 1,10	<i>m</i> <i>m</i>	37,7	1,05-1,22	<i>m</i>
02	20,0	1,52 1,85	<i>m</i> <i>m</i>	19,2	1,45-1,49 1,44-1,57	<i>m</i> <i>m</i>
03	38,3	1,73 2,23	<i>m</i> <i>m</i>	37,5	1,81-1,88 2,18-2,22	<i>m</i> <i>m</i>
04	44,0	----	----	42,9	----	----
05	52,7	1,96	<i>t</i> (2,5)	51,7	2,04	<i>dd</i>
06	136,0	6,66	<i>dd</i> (10,4 e 2,5)	134,4	6,65	<i>dd</i> (1,7 e 10,4)
07	122,7	5,71	<i>dd</i> (10,4 e 2,5)	122,7	5,73	<i>dd</i> (3,0 e 10,4)
08	86,4	----	----	84,2	----	----
09	50,8	2,25	<i>d</i> (9,5)	49,7	2,29	<i>d</i> (9,1)
10	37,3	----	----	36,5	----	----
11	32,8	2,41 2,96	<i>d</i> (18,2) <i>dd</i> (18,2 e 9,5)	31,7	2,35 2,95	<i>d</i> (17,8) <i>dd</i> (9,1 e 17,8)
12	179,9	----	----	176,4	----	----
17	69,5	3,40 3,60	<i>d</i> (11,8) <i>d</i> (11,8)	69,0	3,46 3,66	<i>d</i> (11,4) <i>d</i> (11,4)
18	28,6	1,29	<i>s</i>	28,0	1,30	<i>s</i>
19	180,5	----	----	177,9	----	----
20	12,7	0,73	<i>s</i>	12,1	0,76	<i>s</i>

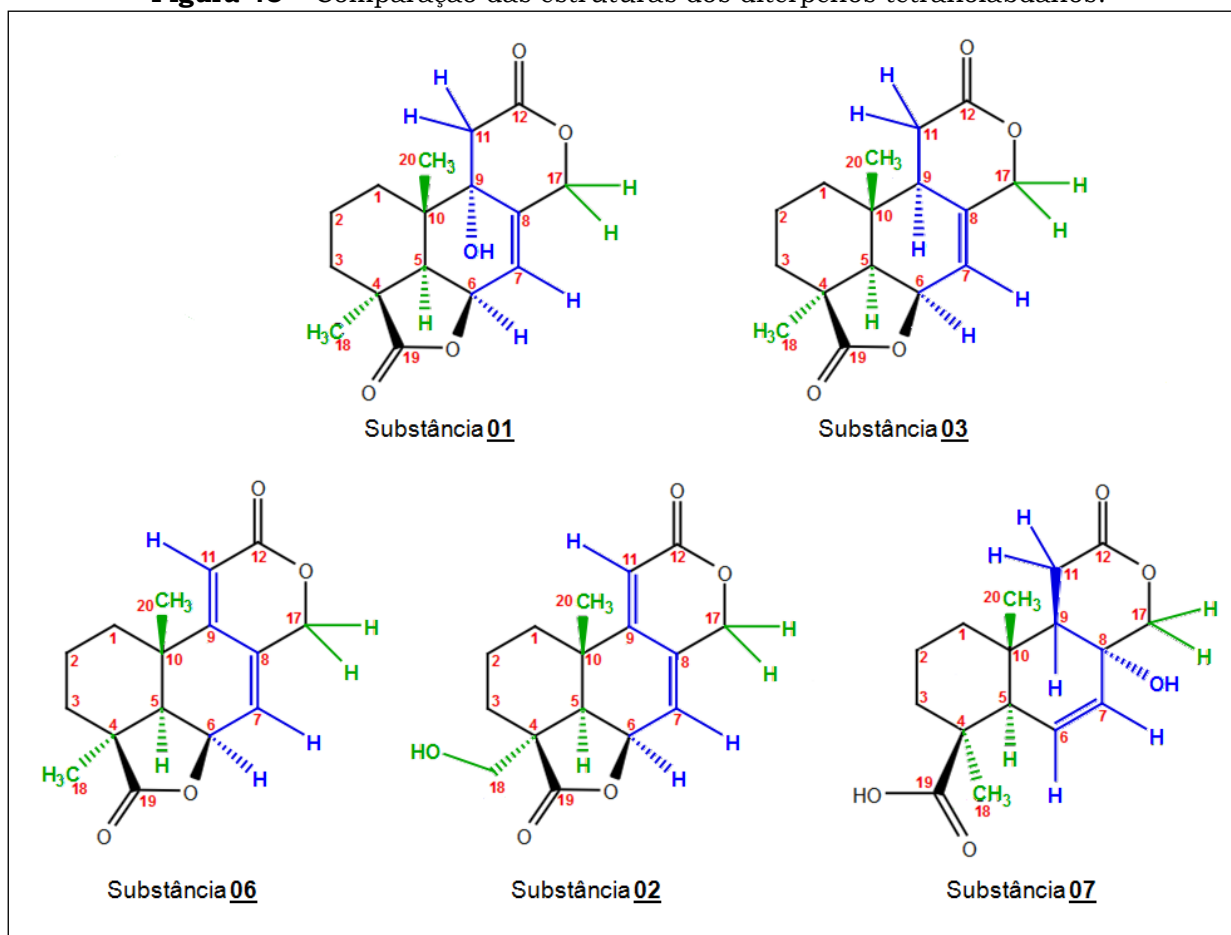
*em CD_3OD , 150 e 600 MHz. **em CDCl_3 . Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.6 Comparação dos perfis químicos dos diterpenos tetranorlabdanos

Este item compreende uma comparação dos dados espectroscópicos das substâncias **01**, **02**, **03**, **06** e **07** para melhor compreensão de suas diferenças estruturais.

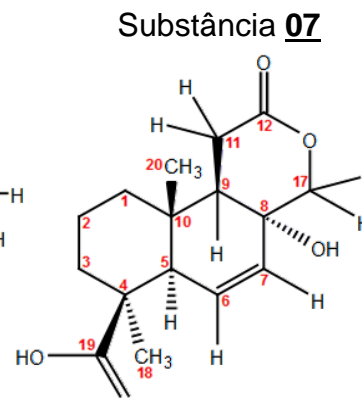
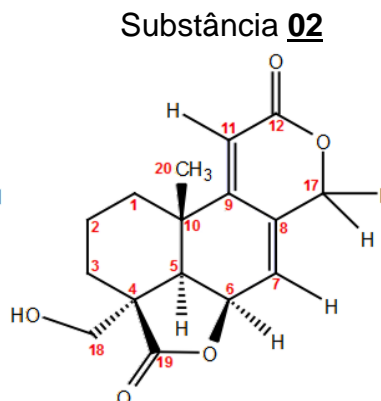
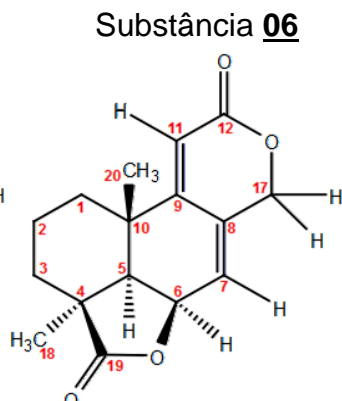
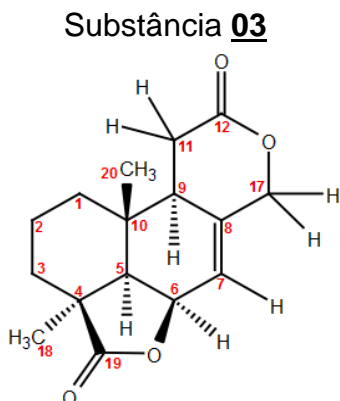
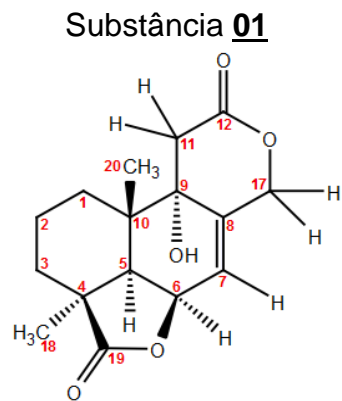
A Figura 45 mostra as substâncias elucidadas nos itens anteriores, em que, as ligações e átomos marcados em azul sinalizam as principais diferenças estruturais no esqueleto base e os átomos em verde, apresentam deslocamentos químicos e multiplicidades diferentes.

Figura 45 – Comparação das estruturas dos diterpenos tetranorlabdanos.

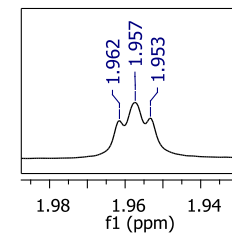
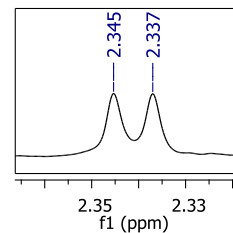
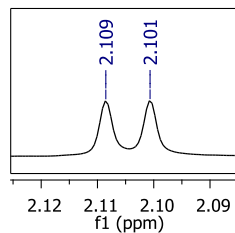
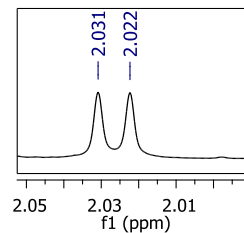
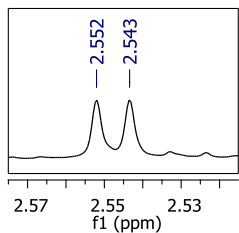


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

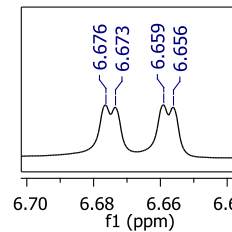
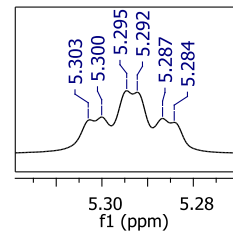
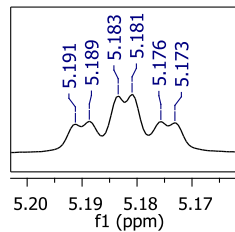
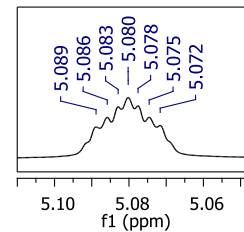
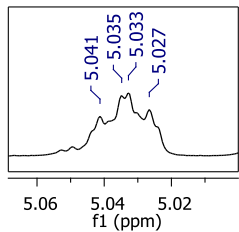
Essas informações podem ser comprovadas ao se observar os esquemas de comparação mostrados nas páginas 90 - 92.



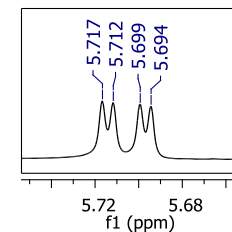
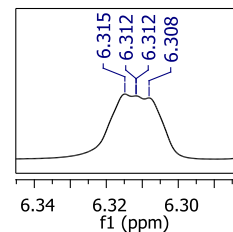
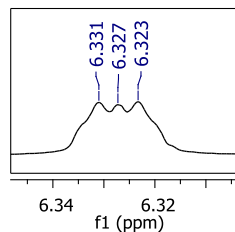
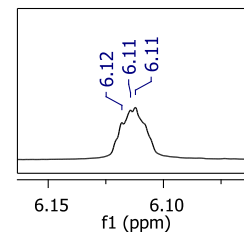
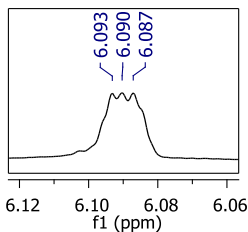
H-5



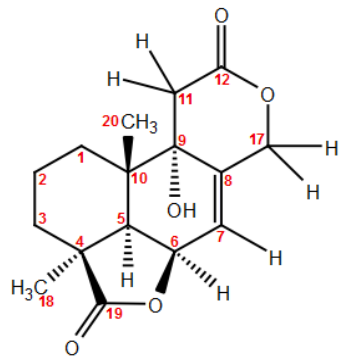
H-6



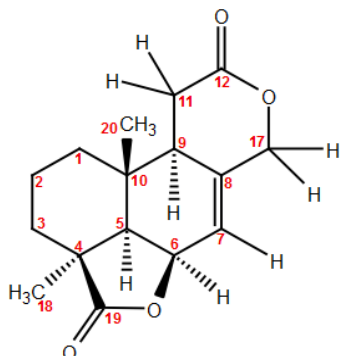
H-7



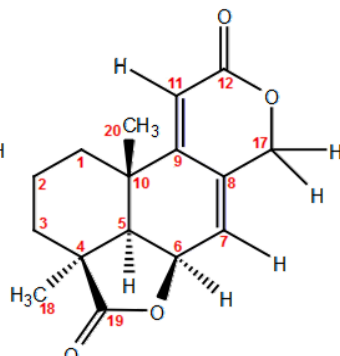
Substância **01**



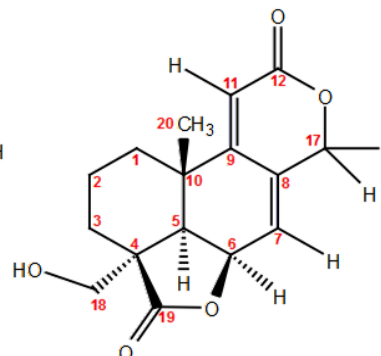
Substância **03**



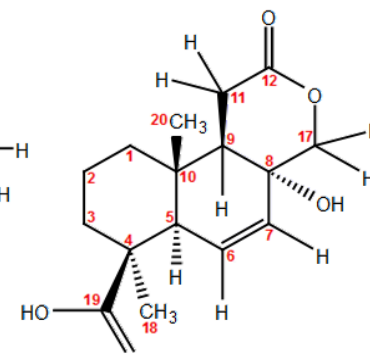
Substância **06**



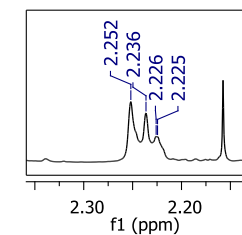
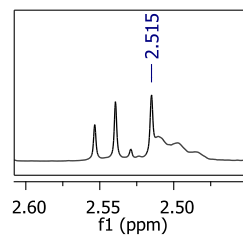
Substância **02**



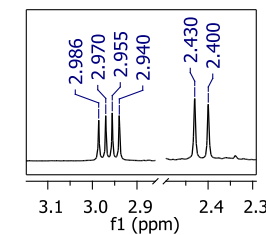
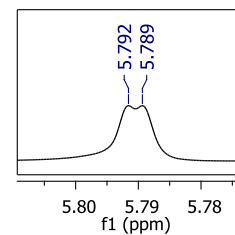
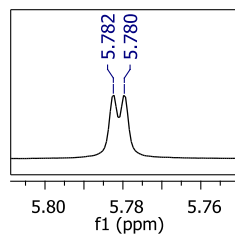
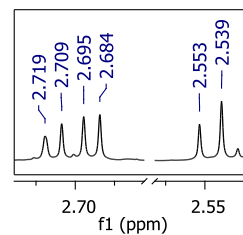
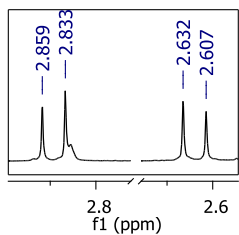
Substância **07**



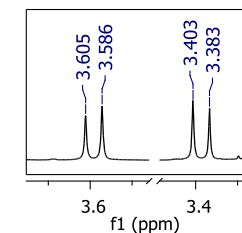
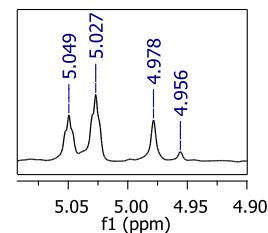
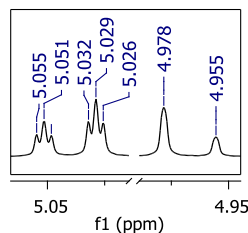
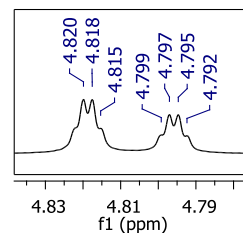
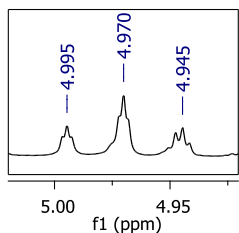
H-9

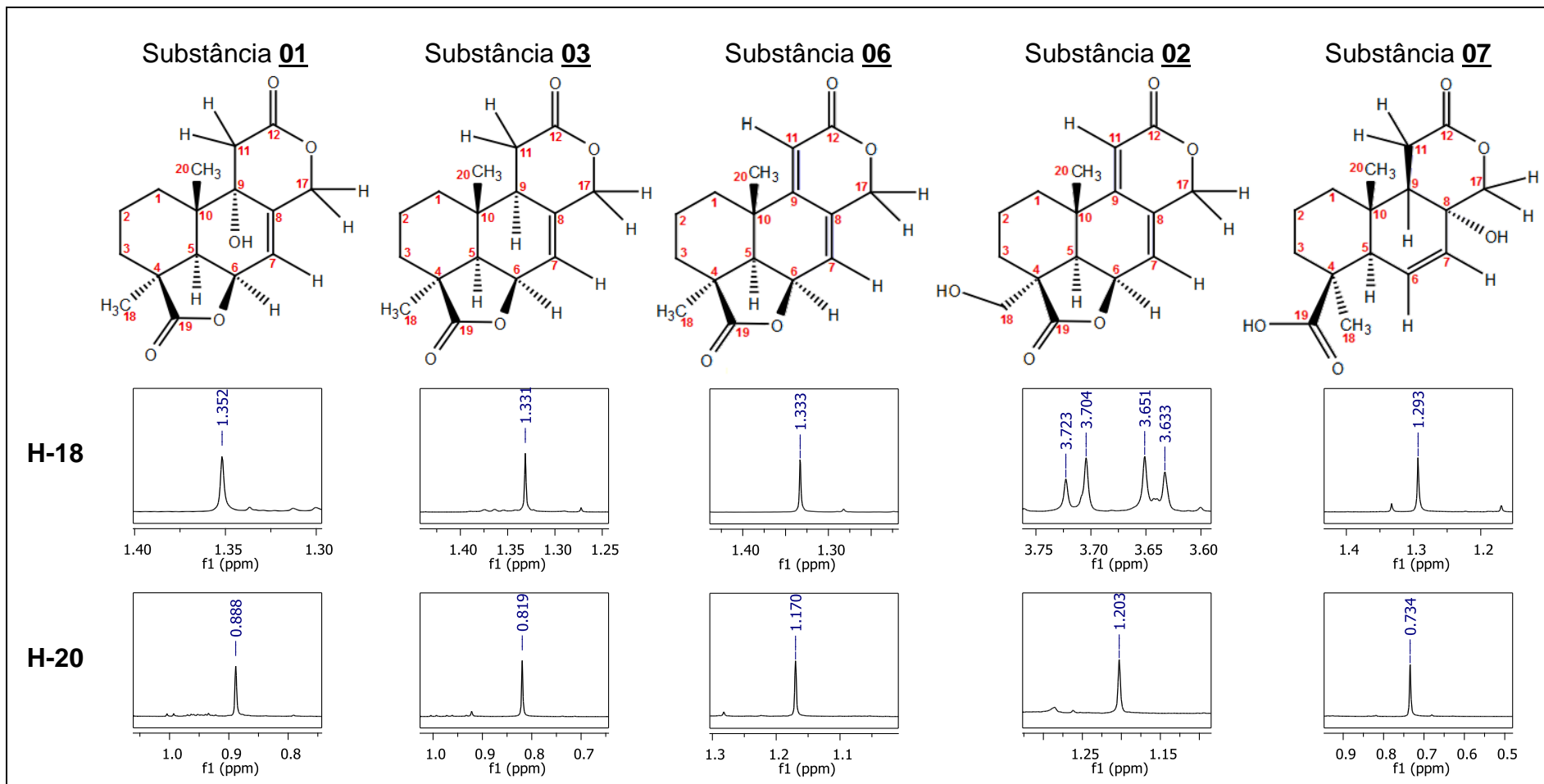


H-11



H-17

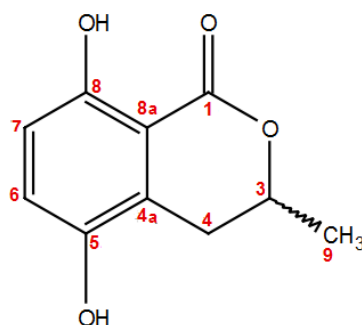




7.7 Substância 05

A substância **05** (Fr. 02_8 do extrato de Milho, e a Fr. 04 oriunda do extrato CZ_E_O, Figura 46) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua fórmula molecular, $C_{10}H_{10}O_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 46 – Representação estrutural da Substância **05**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 46, p. 156) apresentou dois dubletos, integrando para um hidrogênio aromático cada, em δ_H 7,02 (*d*, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-6) e δ_H 6,71 (*d*, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-7), característico um sistema aromático tetrassubstituído. Também foi possível observar sinais de hidrogênios metilênicos benzílicos que apresentam deslocamento químico em δ_H 3,16 (*dd*, $J = 16,9$ e 3,3 Hz, 1H, H-4') e δ_H 2,62 (*dd*, $J = 16,9$ e 11,4 Hz, 1H, H-4''), evidenciando serem diastereotópicos.

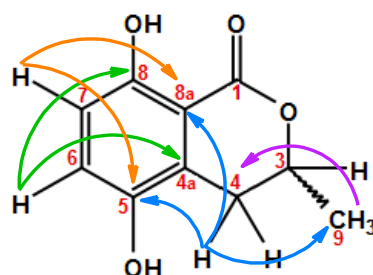
Outras informações obtidas do espectro de RMN de 1H foram um sinal em δ_H 4,69 (*m*, H-3) característico de um hidrogênio carbinólico metínico, e um sinal intenso em δ_H 1,51 (*d*, $J = 6,3$ Hz, 3H, H-9), característico de hidrogênios metílicos, atribuído ao grupo metila ligado ao carbono C-3.

Com os dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 47, p. 157), foram visualizados seis carbonos aromáticos, uma carboxila (δ_C 170,4), um carbono benzílico (δ_C 28,0), um carbono metínico carbinólico (δ_C 76,3) e uma metila (δ_C 19,7).

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 489, p. 159). Com o

experimento de COSY (Apêndice 48, p. 158), verificou-se as interações ^1H - ^1H do hidrogênio carbinólico (H-3) com os hidrogênios metilênicos benzílicos (H-4' e H-4'') e hidrogênios metílicos (H-9). Pelo experimento de HMBC (Apêndice 50, p. 160), foi possível observar as correlações de H-7 com C-1/C-4a/C-5/C-8 e C-8a; de H-6↔C-4/C-4a/C-5/C-8/C-8a; de H-9↔C-3/C-4. Dessa forma, confirmou-se as posições dos carbonos C-4a e C-8a com os deslocamentos característicos de isocumarinas (Figura 47).

Figura 47 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **05**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁵¹ (Tabela 22), foi possível identificar a substância **05** como sendo a 5-hidroximeleina.

Tabela 22 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁵¹, da substância 5-hidroximeleina (**05**).

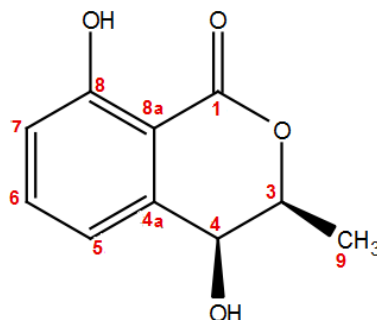
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	170,4	----	----	161,5	----	----
03	76,3	4,69	<i>m</i>	76,0	4,63	<i>m</i>
04	28,0	3,16 2,62	<i>dd</i> (16,9 e 3,3) <i>dd</i> (16,9 e 11,4)	28,0	3,08 2,62	<i>dd</i> (16,5 e 3,5) <i>dd</i> (16,5 e 11,5)
04^a	124,4	----	----	125,0	----	----
05	145,5	----	----	143,0	----	----
06	123,7	7,02	<i>d</i> (8,9)	124,0	6,92	<i>d</i> (9,0)
07	115,1	6,71	<i>d</i> (8,9)	116,0	6,73	<i>d</i> (9,0)
08	154,9	----	----	156,5	----	----
08^a	107,7	----	----	108,5	----	----
09	19,7	1,51	<i>d</i> (6,3)	21,0	1,49	<i>d</i> (6,5)

*em CD_3OD , 150 e 600 MHz. **em CDCl_3 , 125 e 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.8 Substância **08**

A substância **08** (Fr. 02 do extrato CZ_C_O, Figura 48) foi obtida como um sólido amorfo incolor, e a fórmula molecular, C₁₀H₁₀O₄, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 48 – Representação estrutural da Substância **08**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

O espectro de RMN de ¹H (Apêndice 51, p. 161) da substância **08** apresentou sinais em δ_H 7,56 (*dd*, $J = 8,4$ e $7,5$ Hz, 1H, H-6); δ_H 6,98 (*m*, 1H, H-5), e em δ_H 6,96 (*m*, 1H, H-7). Também foi observado o sinal de um hidrogênio metínico oxibenzílico com δ_H 4,56 (*d*, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4), e outro em δ_H 4,72 (*dq*, $J = 6,6$ e $2,1$ Hz, 1H, H-3) característico de um hidrogênio metínico carbinólico. Adicionalmente foi observado uma metila em δ_H 1,51 (*d*, $J = 6,6$ Hz, 3H, H-9).

O experimento de RMN de ¹H foi refeito em CDCl₃ (Apêndice 52, p. 162), para verificação da multiplicidade e da constante de acoplamentos dos sinais de hidrogênio em δ_H 6,98 e 6,96. A comparação dos dados dos dois espectros pode se observada na Tabela 23 (p. 96), em que, é possível verificar que ocorreu a interferência do solvente CD₃OD na obtenção dos sinais de hidrogênio. Dessa forma, os sinais observados no espectro de RMN de ¹H em CDCl₃, indica que a substância **08** apresenta um anel aromático trissubstituído devido à presença de um duplo dubleto e dois dubletos na região dos hidrogênios aromáticos. Outra informação obtida desse espectro, é um sinal em δ_H 11,0 (*s*, 1H), referente ao hidrogênio da hidroxila ligada ao anel aromático, que não é observado no primeiro espectro porque se encontra quelado com o oxigênio da carbonila devido à influência do CD₃OD.

Tabela 23 – Comparação dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-5, H-6 e H-7 da substância **08** em dois solventes deuterados (600 MHz), com δ em ppm, J em Hz.

	CD ₃ OD		CDCl ₃	
	δ_H	Multiplicidade, J	δ_H	Multiplicidade, J
H-5	6,98	<i>m</i>	7,04	<i>d</i> (8,5)
H-6	7,56	<i>dd</i> (8,4 e 7,5)	7,53	<i>dd</i> (8,5 e 7,4)
H-7	6,96	<i>m</i>	6,92	<i>d</i> (7,4)

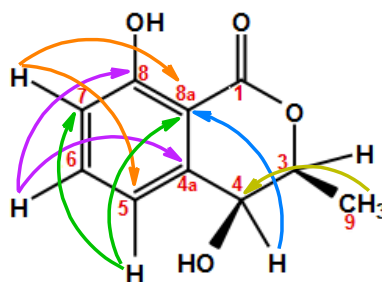
Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no mapa de contorno de HSQC (Apêndice 54, p. 164).

No experimento de COSY (Apêndice 53, p. 163), as correlações ¹H-¹H do hidrogênio metínico carbinólico (H-3) com o hidrogênio oxibenzílico (H-4) e com hidrogênios metílicos (H-9) permitiram estabelecer a subunidade α -metil-hidroxi para a substância **08**. Essa informação foi confirmada pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 55, p. 165), em que é possível observar as correlações dos hidrogênios metílicos, H-9 \leftrightarrow C-3/C-4.

Pelo mapa de contorno de HMBC, observam-se as correlações do H-7 \leftrightarrow C-5/C-8a; do H-6 \leftrightarrow C-4a/C-8; do H-5 \leftrightarrow C-7/C-8a, confirmando as posições dos carbonos C-4a e C-8a com os deslocamentos característicos de isocumarinas (Figura 49).

Figura 49 – Correlações a ³J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **08**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A configuração relativa de C-3 e C-4 foi determinada com base na constante de acoplamento dos hidrogênios H-3 e H-4, $J = 2,1$ Hz, indicando que a relação entre esses hidrogênios é uma relação *cis*.

A comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁵¹ (Tabela 24, p. 97), foi possível identificar a substância **08** como sendo a *rel.* (3*S*, 4*S*)-4-hidroximeleina.

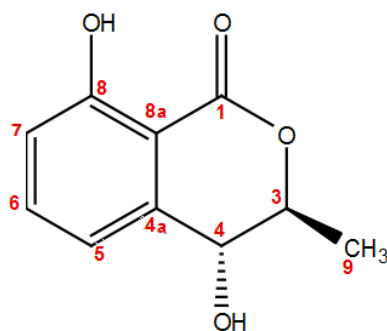
Tabela 24 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁵¹, da substância *rel. (3S, 4S)-4-hidroximeleina (08)*.

Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)
01	Não observado	----	----	162,1	----	----
03	80,0	4,73	<i>dq</i> (6,6 e 2,1)	78,1	4,63	<i>dq</i> (6,5 e 2,0)
04	67,6	4,56	<i>d</i> (2,1)	67,2	4,50	<i>d</i> (2,0)
04^a	143,1	----	----	140,5	----	----
05	119,8	6,98	<i>m</i>	118,5	6,86	<i>d</i> (7,5)
06	137,7	7,56	<i>dd</i> (8,4 e 7,5)	136,7	7,45	<i>dd</i> (8,5 e 7,5)
07	118,5	6,96	<i>m</i>	118,2	6,96	<i>d</i> (7,5)
08	162,6	----	----	162,1	----	----
08^a	108,4	----	----	106,8	----	----
09	16,4	1,51	<i>d</i> (6,6)	16,0	1,51	<i>d</i> (6,5)

*em CD₃OD; 150 e 600 MHz. **em CDCl₃; , 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.9 Substância 11

A substância **11** (Fr. 03 do extrato CZ_E_O, Figura 50) foi obtida como um sólido amorfo incolor, e sua fórmula molecular, C₁₀H₁₀O₄, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

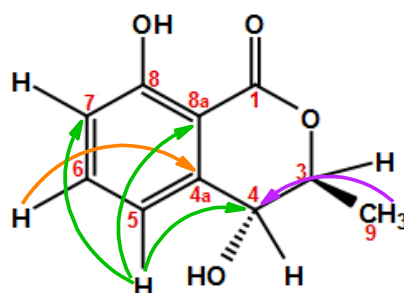
Figura 50 – Representação estrutural da Substância **11**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Seu espectro de RMN de ¹H (Apêndice 56, p. 166) apresentou sinais em δ_{H} 7,56 (*dd*, *J* = 8,4 e 7,5 Hz, 1H, H-6); δ_{H} 7,08 (*d*, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-5), e um dubleto em δ_{H} 6,93 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-7), integrando para um hidrogênio aromático cada, sugerindo um anel aromático trissubstituído. Também foi observado um multipletto em δ_{H} 4,56 integrando para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios metínico oxibenzílico e metínico carbinólico, H-4 e H-3 respectivamente. Adicionalmente foi observada uma

metila em δ_H 1,47 (*d*, $J = 6,6$ Hz, 3H, H-9), que, aliados aos dados obtidos dos espectros de HSQC (Apêndice 58, p. 168) e ao experimento de HMBC (Apêndice 59, p. 169), permitiu atribuir o esqueleto de uma isocumarina para a substância **11** (Figura 51).

Figura 51 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **11**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

O experimento de RMN de 1H foi refeito trocando-se o CD_3OD por $CDCl_3$ para verificação da constante de acoplamento do hidrogênio H-4. Pelo espectro em $CDCl_3$, verificou-se que a troca de solventes não foi eficiente, pois os sinais dos dois hidrogênios (H-3 e H-4) ainda estavam sobrepostos. No entanto, foi possível verificar a constante de acoplamento do hidrogênio H-4 como sendo igual a 6,1 Hz, sugerindo que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *trans*.

A única diferença entre as substâncias **08** e **11** encontra-se na constante de acoplamento entre os hidrogênios H-3 e H-4, e com estas informações, aliadas a dados da literatura⁵¹ (Tabela 25, p. 99), pôde-se concluir que **08** e **11** são estereoisômeros, portanto, **11** é nomeada *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hidroximeleina.

Tabela 25 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁵¹, da substância *rel. (3S, 4R)*-4-hidroximeleina (**11**).

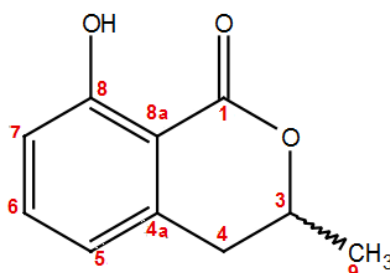
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade <i>J</i> (Hz)
01	Não observado	----	----	168,4	----	----
03	81,4	4,56	<i>m</i>	80,0	4,52	<i>dq</i> (6,0)
04	69,2	4,55	<i>m</i>	69,1	4,54	<i>m</i>
04^a	143,9	----	----	141,1	----	----
05	117,5	7,08	<i>d</i> (7,5)	116,2	6,96	<i>d</i> (8,0)
06	137,7	7,57	<i>dd</i> (8,4 e 7,5)	136,8	7,45	<i>t</i> (8,0)
07	117,6	6,93	<i>d</i> (8,4)	117,8	6,91	<i>d</i> (8,0)
08	162,6	----	----	162,0	----	----
08^a	107,3	----	----	106,6	----	----
09	17,8	1,47	<i>d</i> (6,2)	17,9	1,45	<i>d</i> (6,0)

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

7.10 Substância **09**

A substância **09** (Fr. 07 do extrato CZ_C_O, Figura 52) foi obtida como um sólido amorfo incolor, e sua fórmula molecular, C₁₀H₁₀O₃, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 52 – Representação estrutural da Substância **09**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A substância **09** apresentou o mesmo perfil espectroscópico que **08**, em que a única diferença observada foi a ausência do carbono carbinólico C-4. Em **09** observamos H-4 como duplo dubleto e em **08** como dubleto.

O espectro de RMN de ¹H (Apêndice 60, p. 170) apresentou três duplos dubletos, integrando para um hidrogênio aromático cada, em δ_{H} 6,78 (*dd*, *J* = 7,4 e 0,9 Hz, 1H, H-5), δ_{H} 7,45 (*dd*, *J* = 8,4 e 7,4 Hz, 1H, H-6) e δ_{H} 6,85 (*dd*, *J* = 8,4 e 0,9 Hz, 1H, H-7), sugerindo um anel aromático trissubstituído. Também foi possível observar hidrogênios metilênicos que

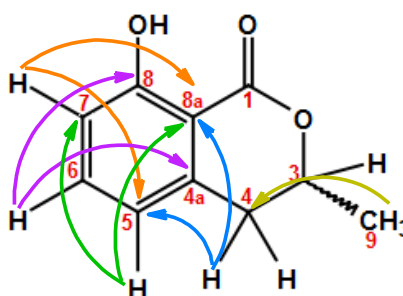
apresentam deslocamento químico em δ_H 3,04 (*dd*, $J = 16,4$ e $3,3$ Hz, 1H, H-4') e δ_H 2,93 (*m*, H-4'').

Outras informações obtidas do espectro de RMN de 1H foi um sinal em δ_H 4,75 (*m*, H-3) característico de um hidrogênio metínico carbinólico, e um sinal em δ_H 1,50 (*d*, $J = 6,3$ Hz, 3H, H-9), característico de hidrogênios metílicos, atribuído ao grupo metila ligado ao carbono C-3.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos pela análise do mapa de contorno do experimento de HSQC (Apêndice 62, p. 172).

Com o experimento de COSY (Apêndice 61, p. 171), verificaram-se as interações 1H - 1H do hidrogênio carbinólico, H-3 \leftrightarrow H-4'/H-4'', permitindo estabelecer o grupo benzílico para a substância **09**. Essa informação foi confirmada pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 63, p. 173), em que observou-se as correlações dos hidrogênios metílicos, H-9 \leftrightarrow C-3/C-4, e de H-5 \leftrightarrow C-4. Ainda pelo experimento de HMBC, foi observado as correlações do H-7 \leftrightarrow C-5/C-8a; do H-6 \leftrightarrow C-4a/C-8; do H-5 \leftrightarrow C-4/C-7/C-8a, confirmando as posições dos carbonos C-4a e C-8a com os deslocamentos característicos de isocumarinas (Figura 53).

Figura 53 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **09**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Os dados acima evidenciaram uma grande similaridade estrutural entre a substância **08** e **09**, em que a diferença observada foi a redução do carbono C-4 da substância **08**, que passou de um carbono metínico oxibenzílico para um metilênico benzílico na substância **09**.

A comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁵¹ (Tabela 26, p. 101), foi possível identificar a substância **09** como sendo a meleina.

Tabela 26 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁵¹, da substância meleina (**09**).

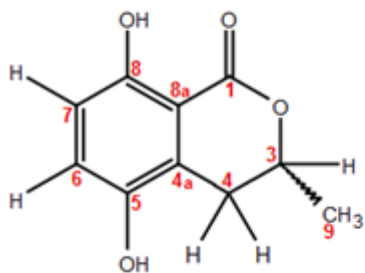
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)
01	Não observado	----	----	Não observado	----	----
03	77,8	4,75	<i>m</i>	76,4	4,79	<i>m</i>
04	35,1	3,04 2,93	<i>dd</i> (16,4 e 3,3) <i>m</i>	32,8	3,10 2,99	<i>dd</i> (16,5 e 3,5) <i>dd</i> (16,5 e 11,0)
04^a	141,6	----	----	140,7	----	----
05	119,2	6,78	<i>dd</i> (7,4 e 0,9)	114,8	6,81	<i>d</i> (8,0)
06	137,2	7,45	<i>dd</i> (8,4 e 7,4)	135,7	7,49	<i>t</i> (8,0)
07	116,8	6,85	<i>dd</i> (8,4 e 0,9)	117,8	6,86	<i>d</i> (8,0)
08	163,3	----	----	161,3	----	----
08^a	109,2	----	----	108,5	----	----
09	20,7	1,51	<i>d</i> (6,3)	19,5	1,41	<i>d</i> (6,5)

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

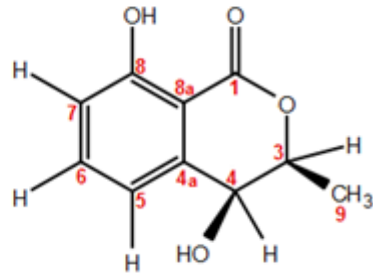
7.11 Comparação dos perfis químicos das isocumarinas

Este item compreende uma comparação dos dados espectroscópicos das substâncias **05**, **08**, **09** e **11**. Os esquemas a seguir (p. 102 e 103), mostram os sinais observados nos espectros de RMN de ¹H dessas substâncias, justificando as diferenças estruturais observadas.

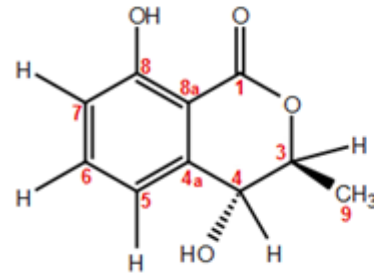
Substância **05**



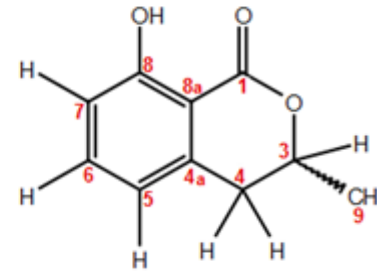
Substância **08**



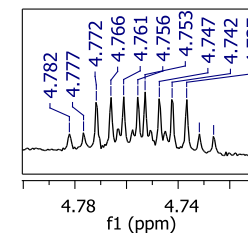
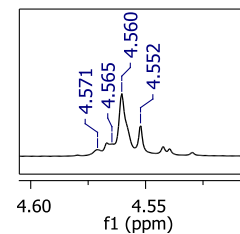
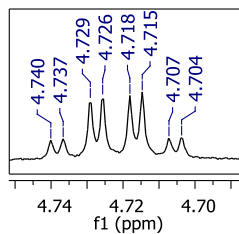
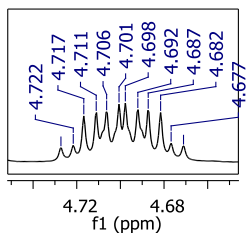
Substância **11**



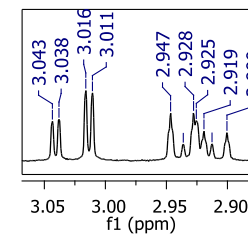
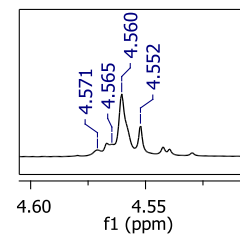
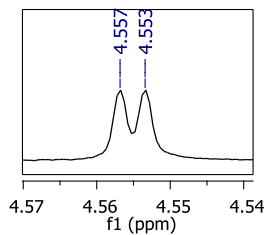
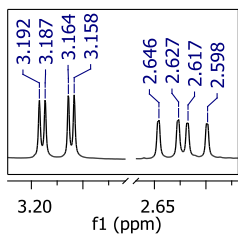
Substância **09**



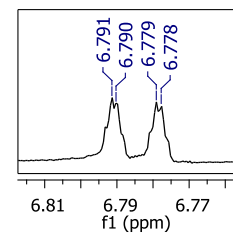
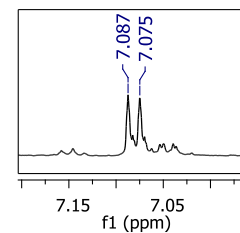
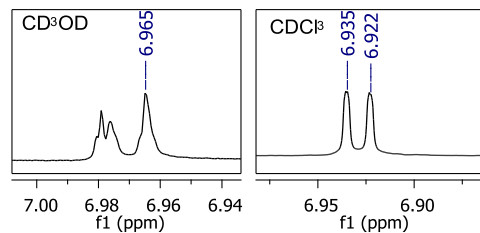
H-3

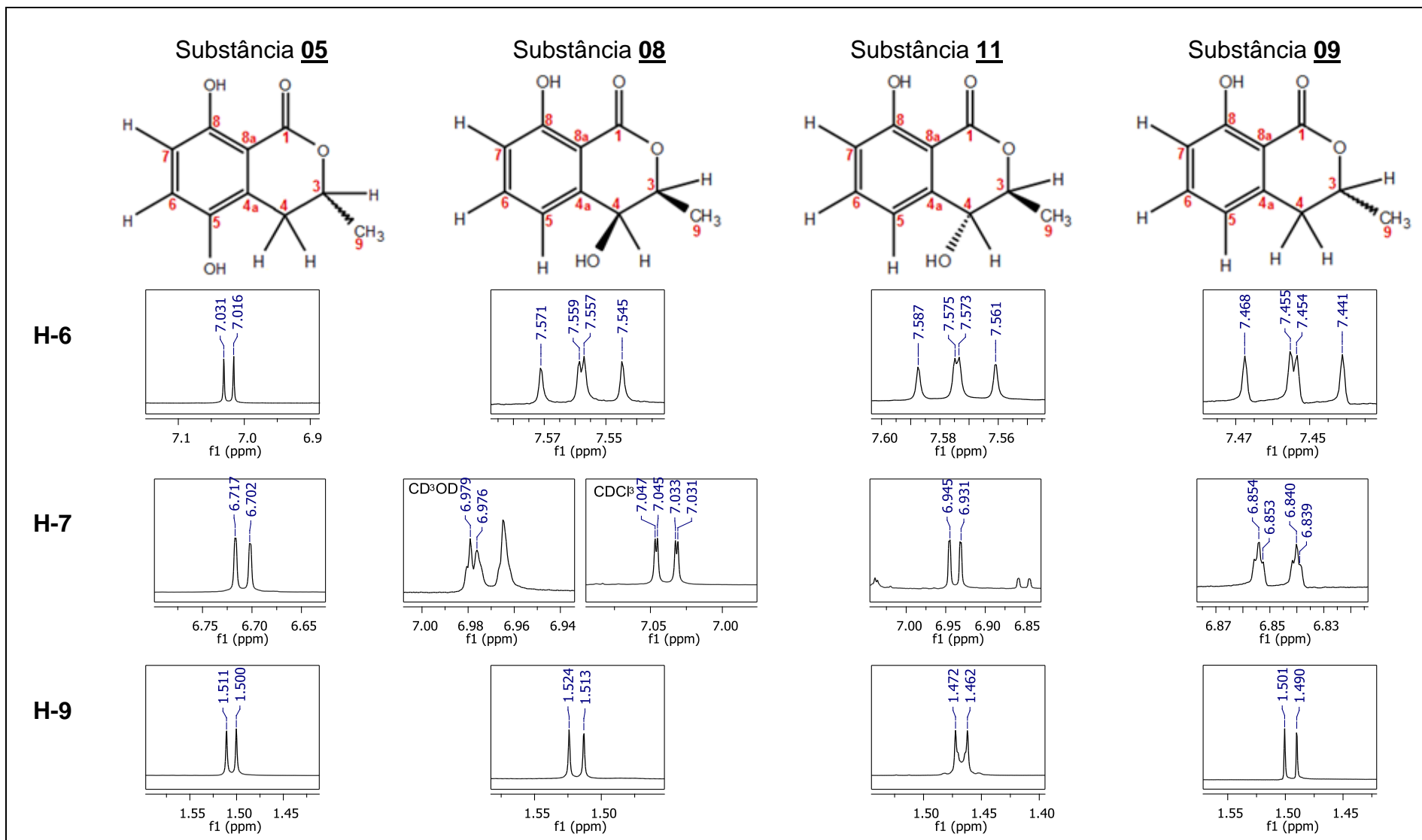


H-4



H-5

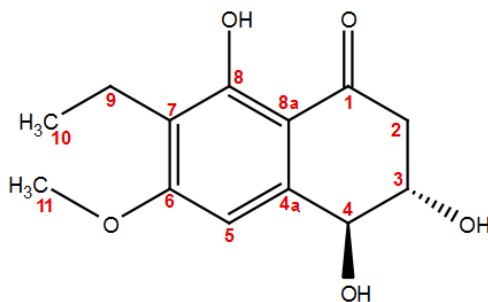




7.12 Substância 12

A substância 12 (Fr. 08 do extrato CZ_E_O, Figura 54) foi obtida como um sólido amorfo incolor, e sua fórmula molecular, $C_{13}H_{16}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 54 – Representação estrutural da Substância 12.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

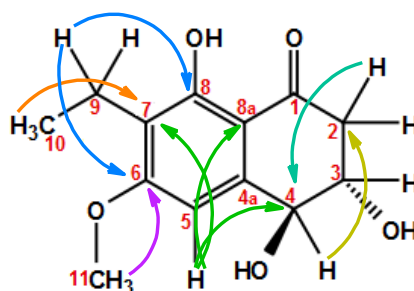
O espectro de RMN de 1H (Apêndice 64, p. 174) apresentou um singlete, integrando para um hidrogênio aromático, em δ_H 6,83 (s, 1H, H-5), sugerindo um anel aromático pentassubstituído. Observou-se também, um sinal em δ_H 3,99 (*ddd*, $J = 8,9; 7,5$ e $4,3$ Hz, 1H, H-3), e um dubleto em δ_H 4,55 (*d*, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-4) característicos de hidrogênios metínicos carbinólicos. Outras informações obtidas foram dois duplos dubletos em δ_H 2,99 (*dd*, $J = 17,1$ e $4,3$ Hz, 1H, H-2') e em δ_H 2,67 (*dd*, $J = 17,1$ e $8,9$ Hz, 1H, H-2''), evidenciando estarem posicionados vizinhos a um centro estereogênico; um singlete em δ_H 3,94 (s, 3H, H-11), característico de uma metoxila aromática; um quadrupletos em δ_H 2,63 (*q*, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-9) característico de hidrogênios metilênicos, e um triplete em δ_H 1,05 (*t*, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-10), característico de hidrogênios metílicos atribuídos ao grupo metila ligado ao carbono C-9.

Com os dados obtidos do mapa de contorno de HSQC (Apêndice 66, p. 176), sabe-se que a substância contém 11 carbonos, em que seis sinais são de carbonos aromáticos, uma carbonila (δ_C 202,1), dois carbonos oxigenados (δ_C 73,4 e 71,3), uma metoxila aromática (δ_C 55,3), e um grupo etil caracterizado pelo quadrupletos em (δ_C 15,8) e um triplete em (δ_C 12,6).

Com o mapa de contorno de COSY (Apêndice 65, p. 175), verificou-se os acoplamentos 1H - 1H dos hidrogênios metilênicos H-2' e H-2'' com os

hidrogênios carbinólicos H-3 e H-4. O radical etil também foi confirmado em COSY pelas interações entre H-9↔ H-10. Pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 67, p. 177), foi observado os principais acoplamentos a 3J que contribuíram para a determinação estrutural da substância **12** (Figura 55).

Figura 55 – Correlações a 3J observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **12**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

A configuração relativa dos carbonos C-3 e C-4 foi determinada pela constante de acoplamento, em que o valor de J igual a 7,5 Hz indica que os hidrogênios H-3 e H-4 se encontram em uma relação *trans*. A comparação dos dados acima com os dados da literatura⁴⁶ (Tabela 27), foi possível determinar a substância **12** como sendo a botryosphaerona D.

Tabela 27 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁴⁶, da substância botryosphaerona D (**12**).

Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	202,1	----	----	201,2	----	----
02	44,2	2,67 2,99	<i>dd</i> (17,1 e 8,9) <i>dd</i> (17,1 e 4,3)	43,7	2,70 2,98	<i>dd</i> (9,5 e 17,0) <i>dd</i> (4,4 e 17,0)
03	71,3	3,99	<i>ddd</i> (8,9; 7,5 e 4,3)	70,8	4,01- 4,06	<i>m</i>
04	73,4	4,55	<i>d</i> (7,5)	72,9	4,61	<i>d (overlap)</i>
04a	145,3	----	----	145,1	----	----
05	102,4	6,83	<i>s</i>	101,2	6,88	<i>s</i>
06	164,8	----	----	163,7	----	----
07	118,7	----	----	117,2	----	----
08	161,9	----	----	161,2	----	----
08a	110,8	----	----	110,1	----	----
09	15,8	2,64	<i>q</i> (7,4)	15,1	2,63	<i>q</i> (7,4)
10	12,6	1,05	<i>t</i> (7,4)	12,6	1,06	<i>t</i> (7,4)
11	55,7	3,94	<i>s</i>	55,3	3,94	<i>s</i>

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em C₃D₆O, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2016.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude dos resultados apresentados, conclui-se que o estudo químico de *B. parva* em três meios de cultivo (Czapek®, PDB e Milho) apresentou uma produção metabólica vasta, verificada pelos sinais e picos observados nos experimentos de RMN e CLAE-DAD. Os estudos dos extratos obtidos nos permitiu a obtenção de dez metabólitos secundários pertencentes a três classes distintas de substâncias, indicando que o perfil metabólico deste endófito é dependente do meio de cultivo, ou seja, a diferença dos microcomponentes/nutrientes de cada meio influencia a expressão da rota biossintética do micro-organismo. Esta afirmação indica que estudos posteriores devem ser realizados com este endófito para exploração de seu metaboloma.

Destaca-se a presença de um metabólito inédito dentre os 12 identificados, o diterpeno tetranorlabdano botryosphaerin I. Este resultado fortalece a necessidade de estudos químicos com fungos endofíticos, uma vez que esses micro-organismos podem ser uma fonte promissora de metabólitos secundários novos e/ou bioativos.

Levando-se em consideração que o endófito foi isolado das folhas de um espécime vegetal saudável de *E. jabolana*, e que todos os extratos brutos apresentaram atividade biológica, a hipótese de uma simbiose endófito-planta não pode ser descartada. Esses dados de potencial biológico são preliminares, no entanto, mostram que fungos endofíticos apresentam um grande potencial na produção de metabólitos secundários bioativos.

Os resultados obtidos neste trabalho são muito encorajadores, pois reforçam o conhecimento da grande diversidade química e potencialidade biológica dos metabólitos secundários produzidos por micro-organismos associados a espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

- 1 SPAINHOUR, C. B. Natural products. In: GAD, S. C. (Ed.). **Drug discovery handbook**. New York: Wiley-Interscience, 2005. Chap. 1, p. 12-72.
- 2 BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, Nov. 2004.
- 3 STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 491-502, Dec. 2003.
- 4 CRAGG, M. G.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and dugs leads. **J. Nat. Prod.**, v. 77, p. 703-723, Feb. 2014.
- 5 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.
- 6 CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 47-59, July 2012.
- 7 LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 284 p. (Série biotecnologia, 1).
- 8 PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). **Rev. Fac. Let.**, v. 6, p. 129-151, 2005.
- 9 IOCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINK, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Nat. Prod. Rep.**, v. 3, p. 646-675, May 2014.
- 10 MITCHELL, A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 156, p. 270-277, Jan. 2010.
- 11 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, Mar. 2006.
- 12 MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau *Theobroma cacao* L.** 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- 13 INGOLD, C. T.; HUDSON, H. J. **The biology of fungi**. 6th ed. London: Chapman & Hall, 1996. 224 p.

- 14 HAWKSORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 1422-1432, Dec. 2001.
- 15 MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 574 p.
- 16 ARAUJO, W. L. et al. (Coord.) **Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos**. Piracicaba: Copiadora "Luiz de Queirós", 2010. 167 p.
- 17 ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010.
- 18 CHAPLA, V. M. **Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp.** 2014. 251 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- 19 KAUL, S. et al. Entophytic fungi from medicinal plants: a treasure Hunt for bioactive metabolites. **Phytochem. Rev.**, v. 11, p. 487-505, Dec. 2012.
- 20 ZHENG, C. J. et al. Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 7617-7625, Sept. 2013.
- 21 DAÍ, J. et al. Novel highly substituted biaryl ethers, phomosines D-G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **Europ. J. Organ. Chem.**, n. 23, p. 5100-5105, Oct. 2005.
- 22 STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, Feb. 2004.
- 23 KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, n. 7, p. 1208-1228, July 2011.
- 24 PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.**, v. 5, n. 29, p. 62-76, dez. 2002.
- 25 ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 753-771, Oct. 2006.
- 26 KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chem. Biol.**, v. 19, n. 7, p. 792-798, July 2012.

- 27 JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **J. Microbiol. Biotechnol. Res.**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- 28 MAYER, A. M. Plant-fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 311-317, Feb. 1989.
- 29 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. Chap. 3, p. 49-80.
- 30 CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos uma nova fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Rev. Virtual Quím.**, v. 5, n. 3, p. 421-437, nov. 2013.
- 31 TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quím. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, dez. 2008.
- 32 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, Oct. 2008.
- 33 VASI, S.; AUSTIN, A. Antioxidant potential of *Eugenia jambolana* Lam. Seeds. **J. Biol. Sci.**, v. 9, n. 8, p. 894-898, 2009.
- 34 LI, L. et al. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 826-831, Feb. 2009.
- 35 RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 1433-1439, Sept. 2005.
- 36 TIMBOLA, A. K. et. al. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 174-176, Apr. 2002.
- 37 LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, abr. 2005.
- 38 DAMETTO, A. C. **Bioprospeção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**. 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 39 SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biol. Rev.**, v. 21, n. 2/3, p. 90-106, Aug. 2007.

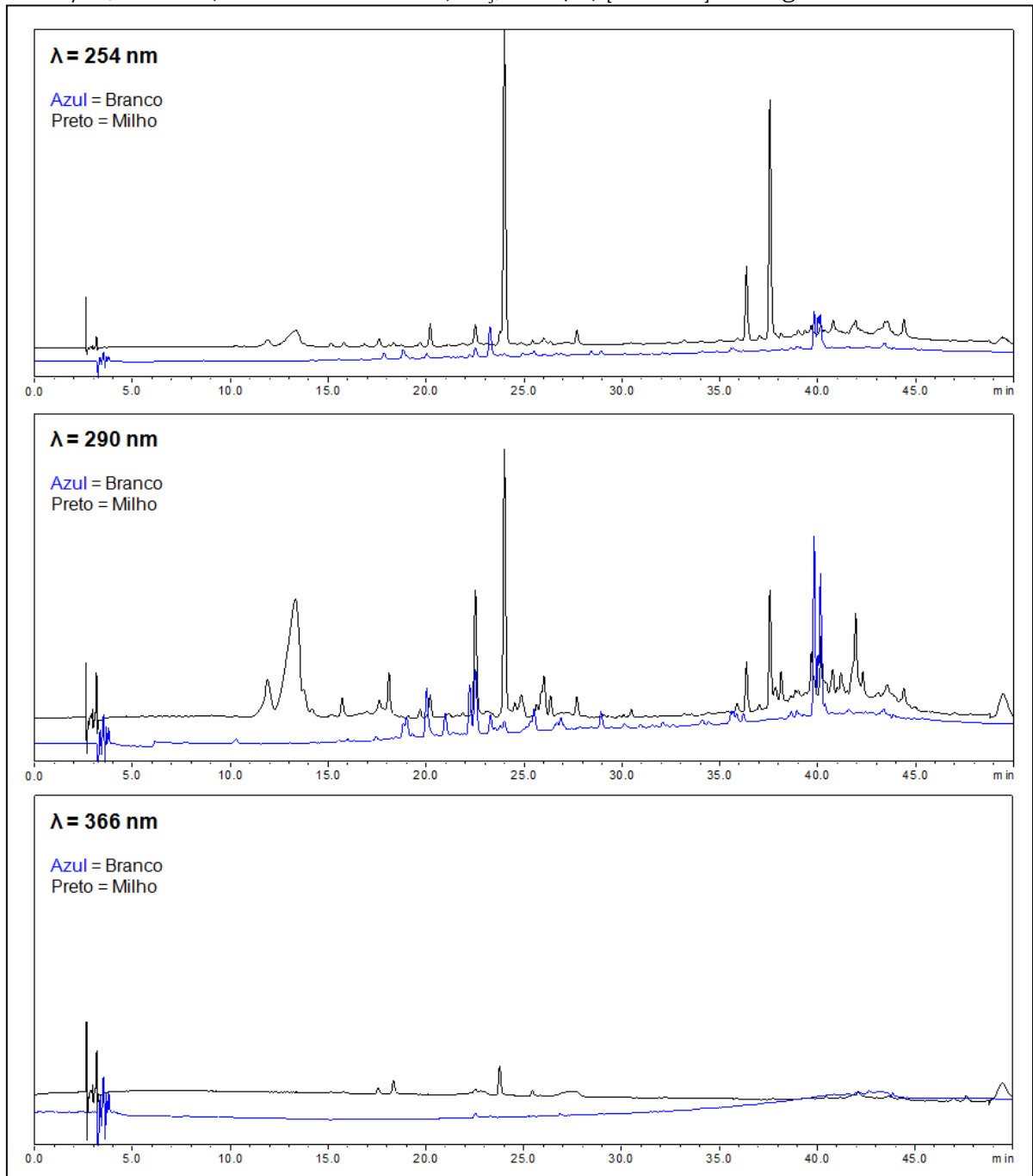
- 40 PHILLIPS, A. J. L. **The *Botryosphaeria* site**. Caparica: Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Centro de Recursos Microbiológicos, 2004. Disponível em: <www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/introduction.htm>. Acesso em: 03 set. 2015.
- 41 NIEKERK, J. M. V. et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 781-798, Aug. 2004.
- 42 PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 41, n. 1, p. 3-18, Apr. 2002.
- 43 ZHAI, L. et al. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing wart and stem canker in China. **Plant Dis.**, v. 98, n. 6, p. 716-726, June 2014.
- 44 RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. **Tetrahedron**, v. 65, n. 51, p. 10590-10595, Dec. 2009.
- 45 PONGCHROEN, W. et al. A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 9, p. 1404-1405, Sept. 2007.
- 46 XU, Y. et al. New polyketides isolated from *Botryosphaeria australis* strain ZJ12-1A. **Helv. Chim. Acta**, v. 94, n. 5, p. 897-902, May 2011.
- 47 ROBINSON, J. A. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. **Philos. Trans. R. Soc., London, Ser. B**, v. 332, n. 1263, p. 107-114, May 1991.
- 48 SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **J. Biotechnol.**, v. 124, n. 4, p. 690-703, Aug. 2006.
- 49 WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. **Philos. Trans. R. Soc., London, Ser. A**, v. 362, n. 1825, p. 2671-2690, Dec. 2004.
- 50 PAL, S.; CHATARE, V.; PAL, M. Isocoumarin and its derivatives: an overview on their synthesis and applications. **Curr. Org. Chem.**, v. 15, n. 5, p. 782-800. Feb. 2011.
- 51 OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

- 52 KROHN, K. et al. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 313-320, May 1997.
- 53 CIMMINO, A. et al. Botrytone, a new naphthalenone pentaketide produced by *Botrytis fabae*, the causal agent of chocolate spot disease on *Vicia faba*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 17, p. 9201-9206, July 2011.
- 54 ROBBERS J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. 9th ed. Baltimore: William & Wilkins. 1996. 337 p.
- 55 CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. **Dictionary of terpenoids**. London: Chapman & Hall, 1991. v. 2. p. 657-1460.
- 56 SINGH, M.; PAL, M.; SHARMA, R. P. Biological activity of the labdane diterpenes. **Planta Med.**, v. 65, p. 2-8, Feb. 1999.
- 57 DEMETZOS, C.; DIMAS, K. S. Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 25, p. 235-292, 2001.
- 58 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, n. 1, p. 51-54. Jan. 2002.
- 59 AWASTHI, M. et al. Alzheimer's disease: an overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with *in silico* approaches emphasizing the role of natural products. **J. Neurol. Sci.**, v. 361, n. 15, p. 256-271. Feb. 2016.
- 60 VIEGAS JUNIOR, C. et al. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, n. 13, p. 4184-4190, July 2005.
- 61 YUAN, L. et al. Labdane and tetranorlabdane diterpenoids from *Botryosphaeria* sp. MHF, an endophytic fungus of *Maytenus hookeri*. **Helv. Chim. Acta**, v. 92, n. 6, p. 1118-1125, June 2009.
- 62 BARRERO, A. F. et al. Preparation of bioactive podolactones via a new Pd-catalysed bislactonisation reaction. Synthesis of Oidiolactone C. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, n. 27, p. 5203-5206, July 2000.
- 63 PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents. 488. Isolation and structure of yukonin from Yukon territory fungus. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 2, p. 276-278. Jan. 2003.

64 JOHN, M. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi. 12. Oidiolactones A – F, labdane diterpene derivatives isolated from *Oidiodedron truncata*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 9, p. 1218-1221, Aug. 1999.

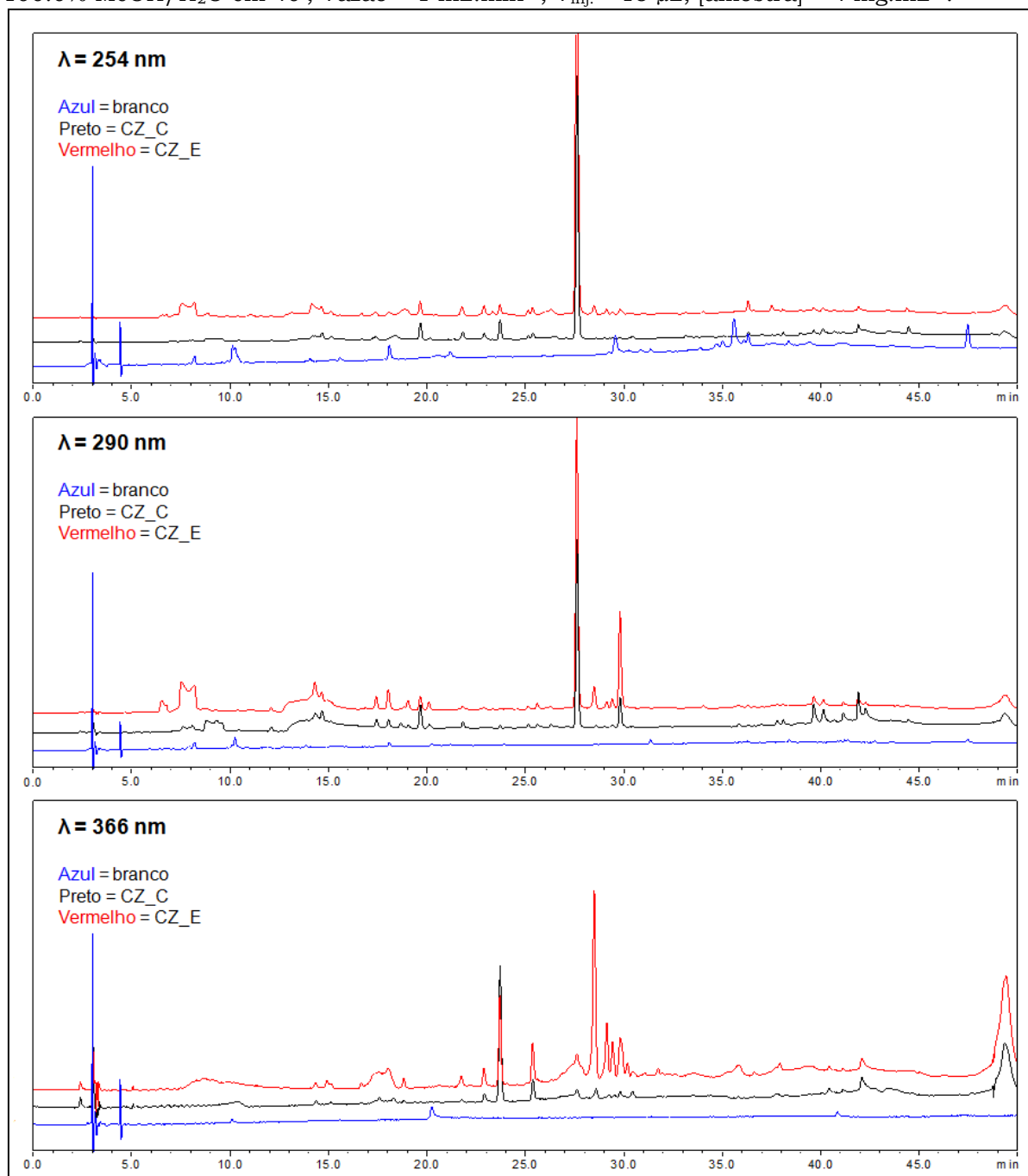
APÊNDICE

Apêndice 01 – Comparação dos cromatogramas do extrato bruto do Milho com o extrato do Branco*, na condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/H₂O em 40'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹.



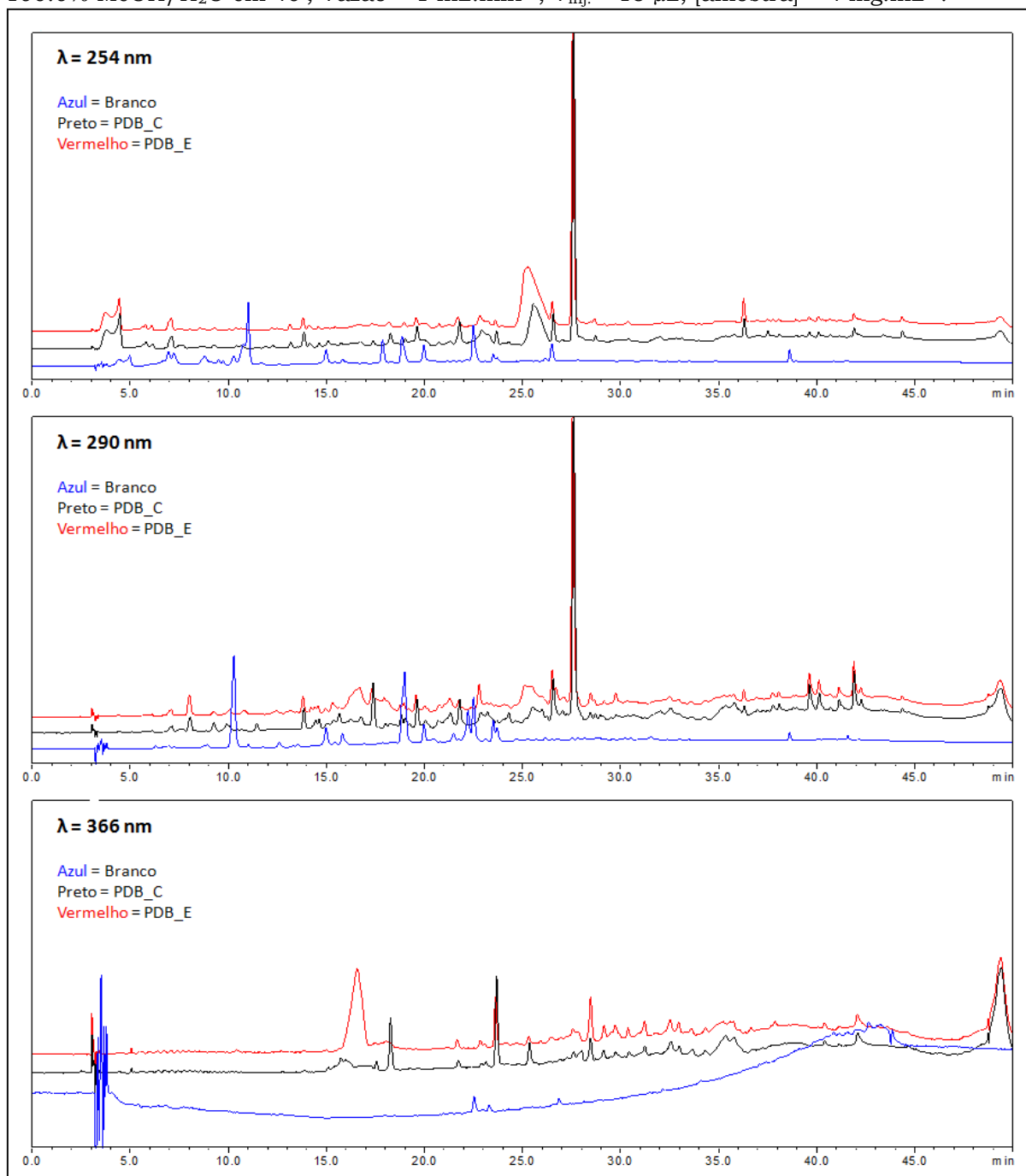
*Extrato do Milho sem a inoculação do endófito. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 02 – Comparação dos cromatogramas dos extratos brutos de Czapek® com o extrato do Branco*, na condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 µm); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/H₂O em 40'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 µL; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹.



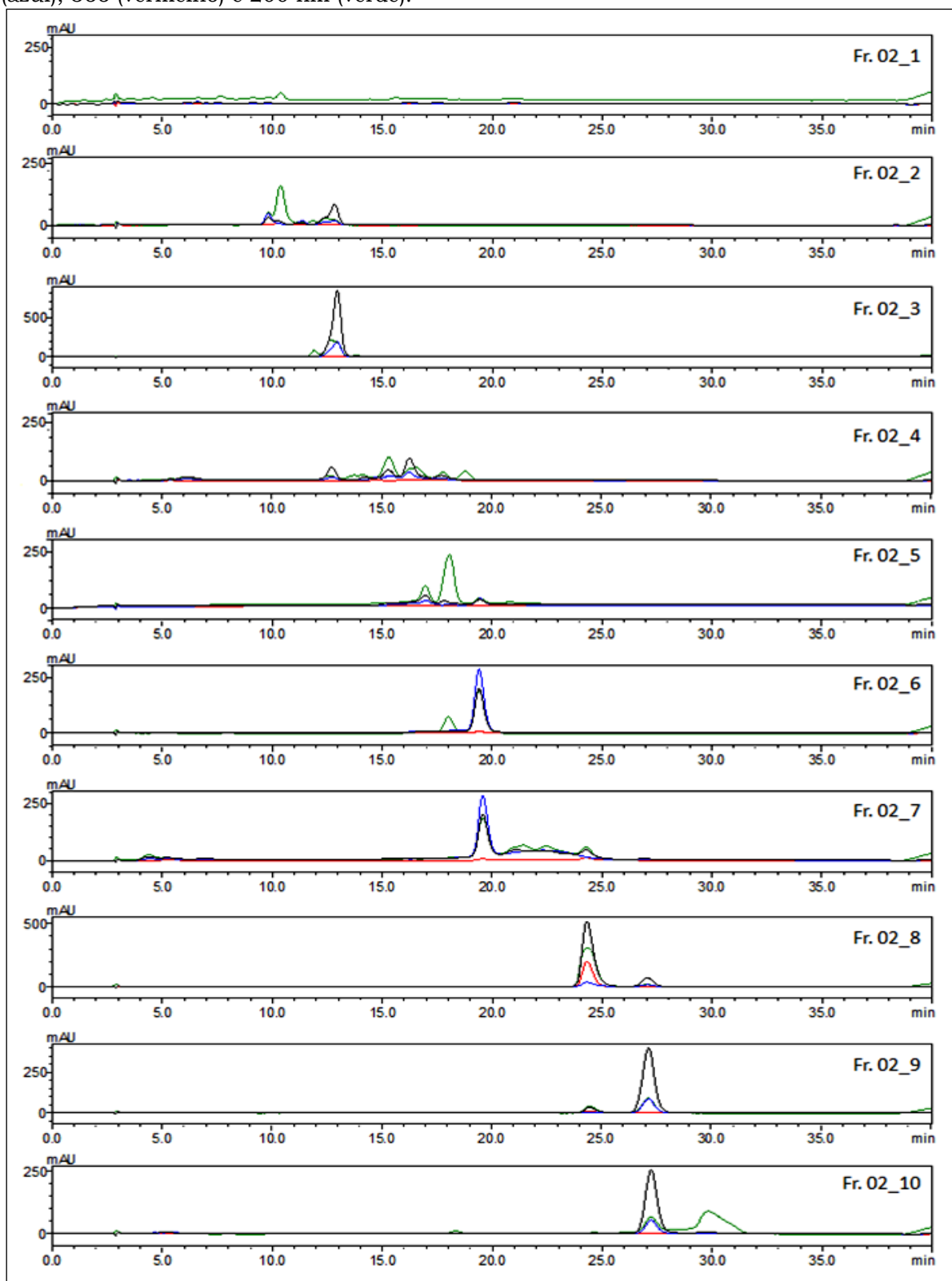
*Extrato do Czapek® sem a inoculação do endófito. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 03 – Comparação dos cromatogramas dos extratos brutos de PDB com o extrato do Branco*, na condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/H₂O em 40'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹.



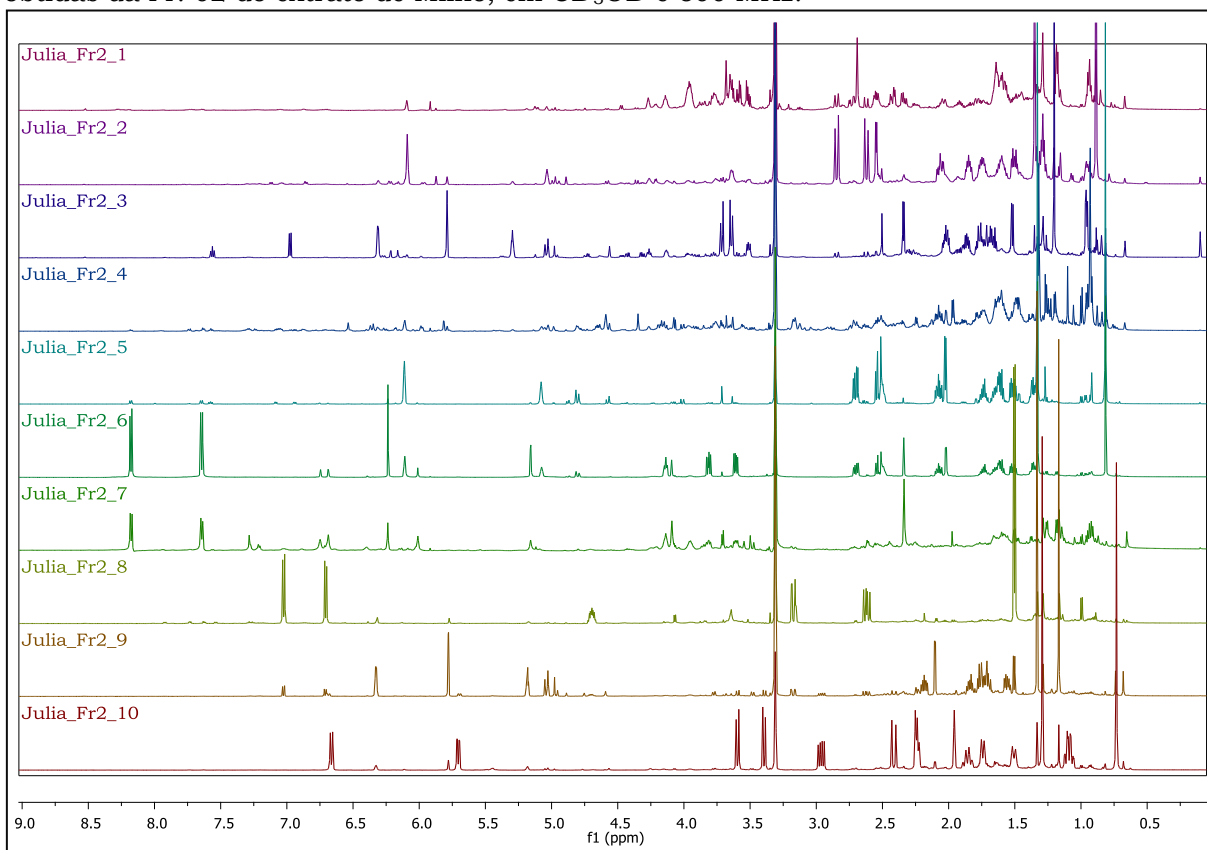
*Extrato do PDB sem a inoculação do endófito. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 04 – Comparação dos Cromatogramas das frações oriundas da Fr. 02 do Milho, obtidos na Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); isocrático 37:63% MeOH/H₂O em 35'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; Vinj. = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹, e λ = 254 (preto), 290 (azul), 366 (vermelho) e 200 nm (verde).



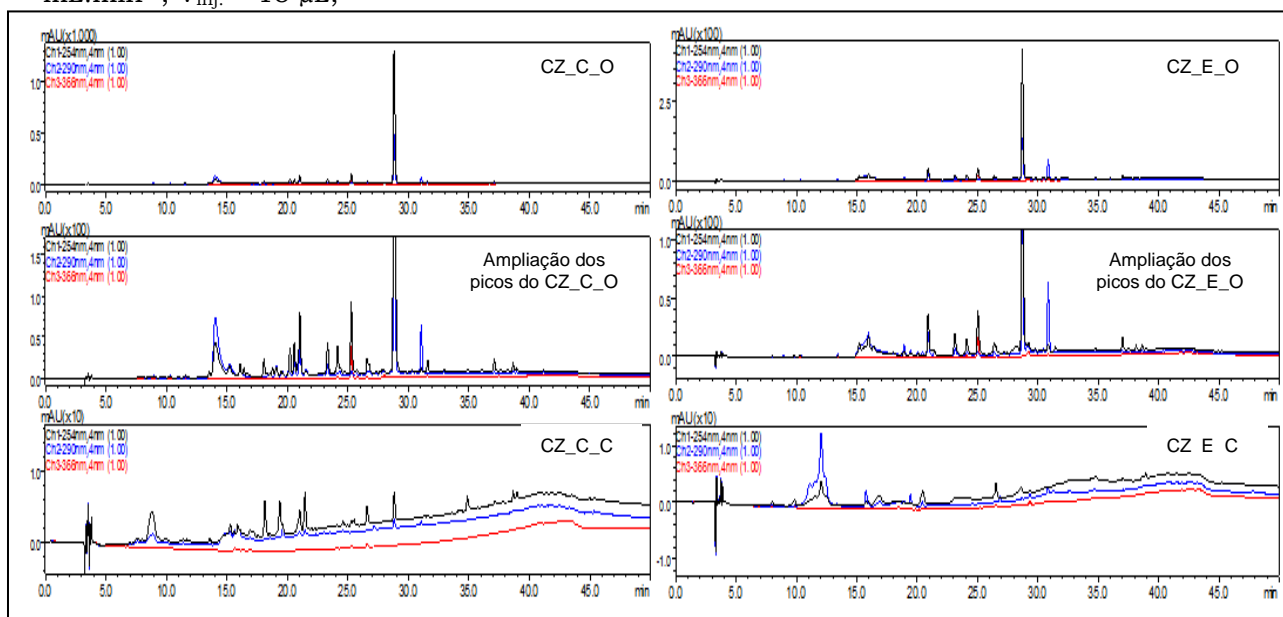
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 05 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações obtidas da Fr. 02 do extrato de Milho, em CD_3OD e 600 MHz.



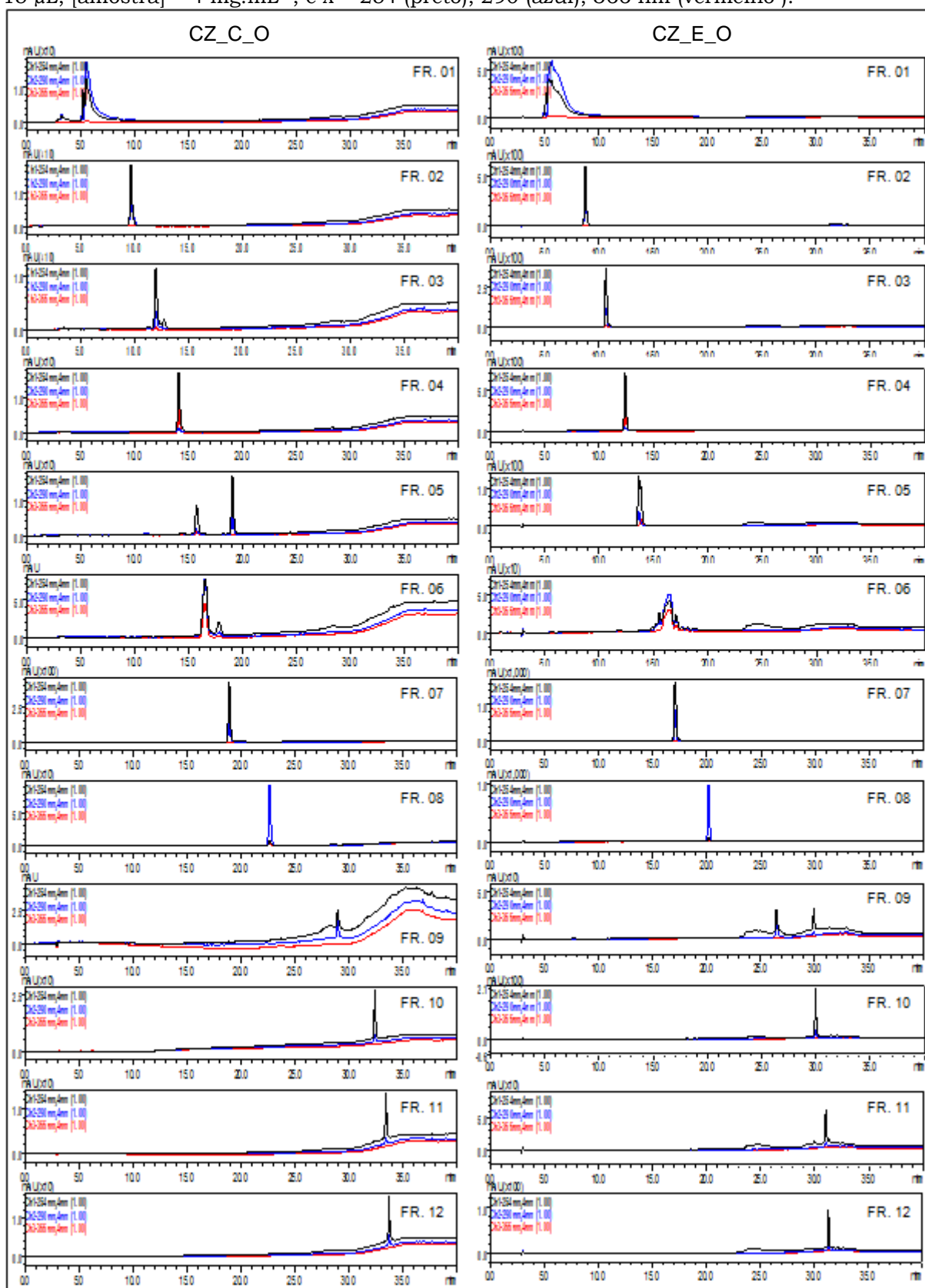
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 06 – Comparação dos cromatogramas dos extratos cristalinos e oleosos dos extratos em Czapek[®], obtidos por CLAE-DADanalítica, na condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μm); gradiente de 5:95 a 100:0% MeOH/ H_2O em 40'; Vazão = 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $V_{\text{inj.}}$ = 15 μL ;



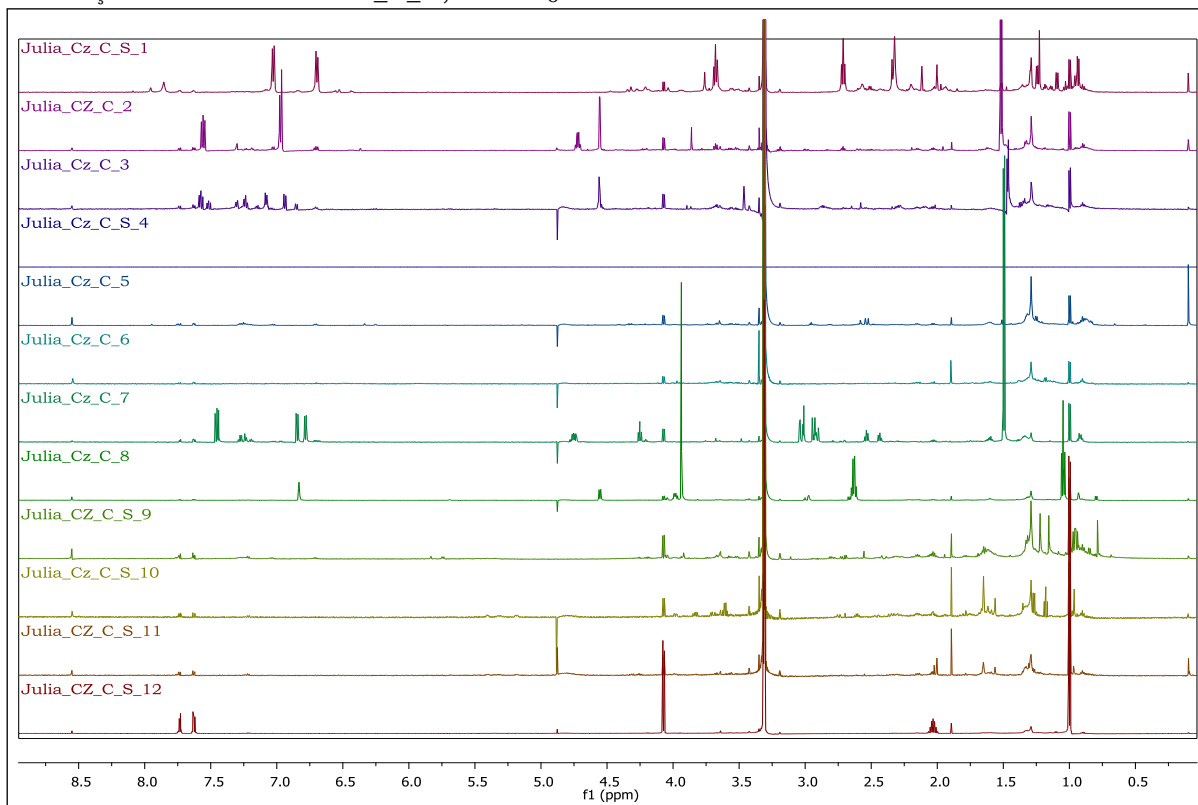
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 07 – Comparação dos cromatogramas das frações oriundas do fracionamento dos extratos CZ_C_O e CZ_E_O, obtidos na Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente 40:60 a 100:0% MeOH/H₂O em 40'; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 15 μ L; [amostra] = 4 mg.mL⁻¹, e λ = 254 (preto), 290 (azul), 366 nm (vermelho).



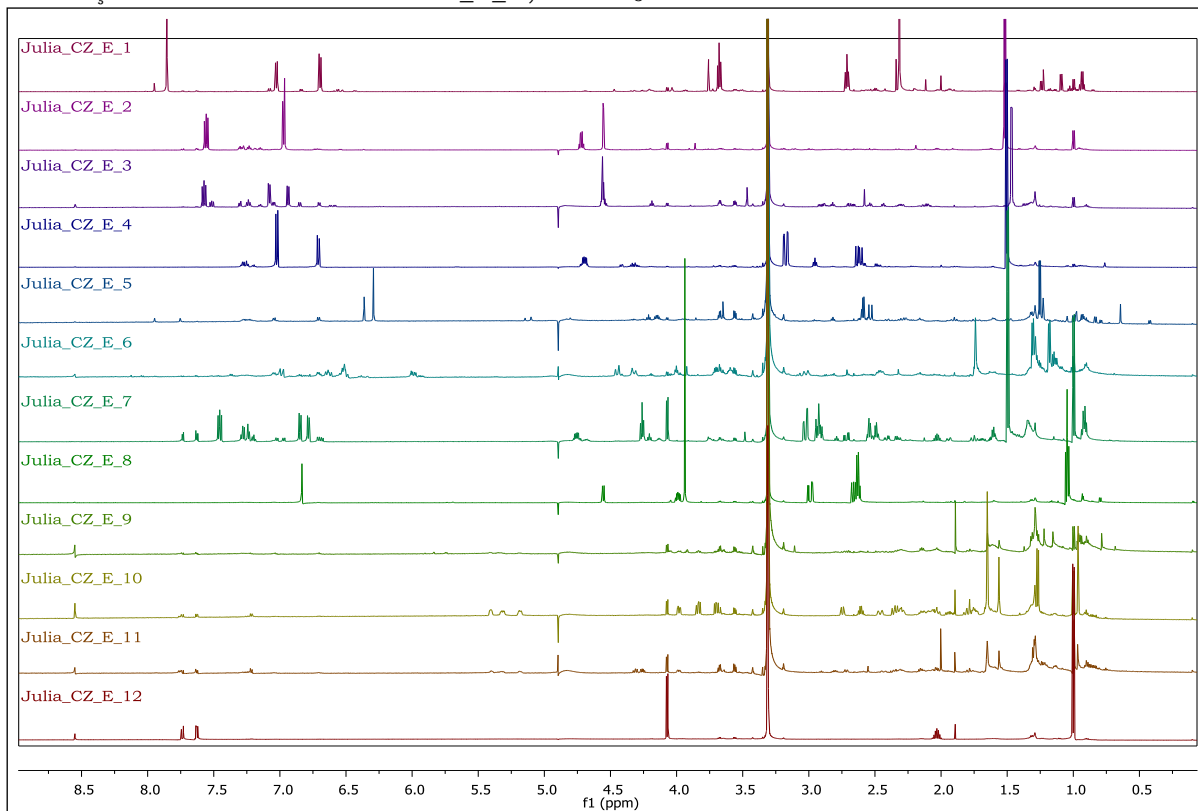
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 08 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações do extrato de CZ_C_O, em CD_3OD e 600 MHz.

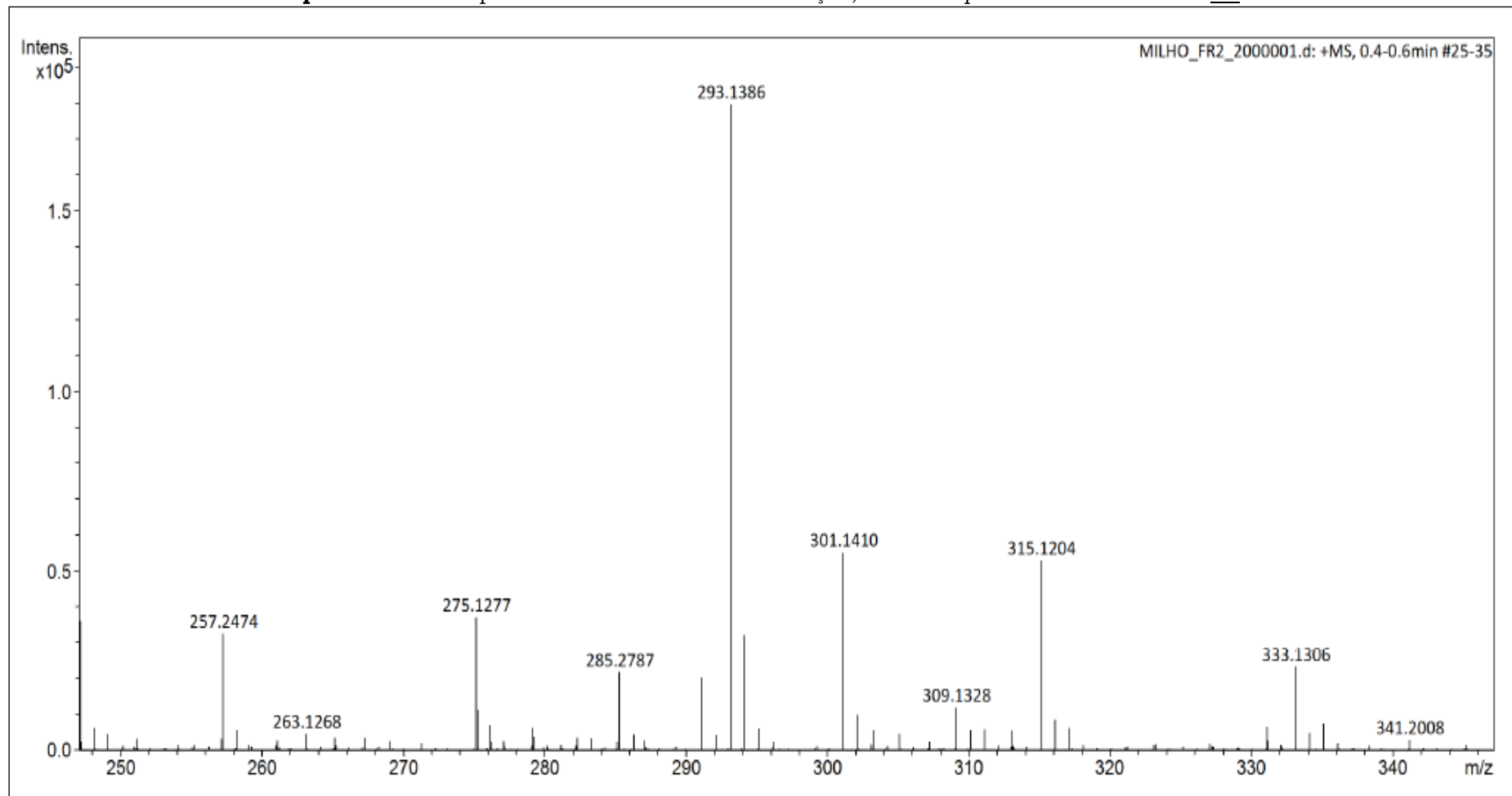


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 09 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, das frações oriundas do extrato CZ_E_O, em CD_3OD e 600 MHz.

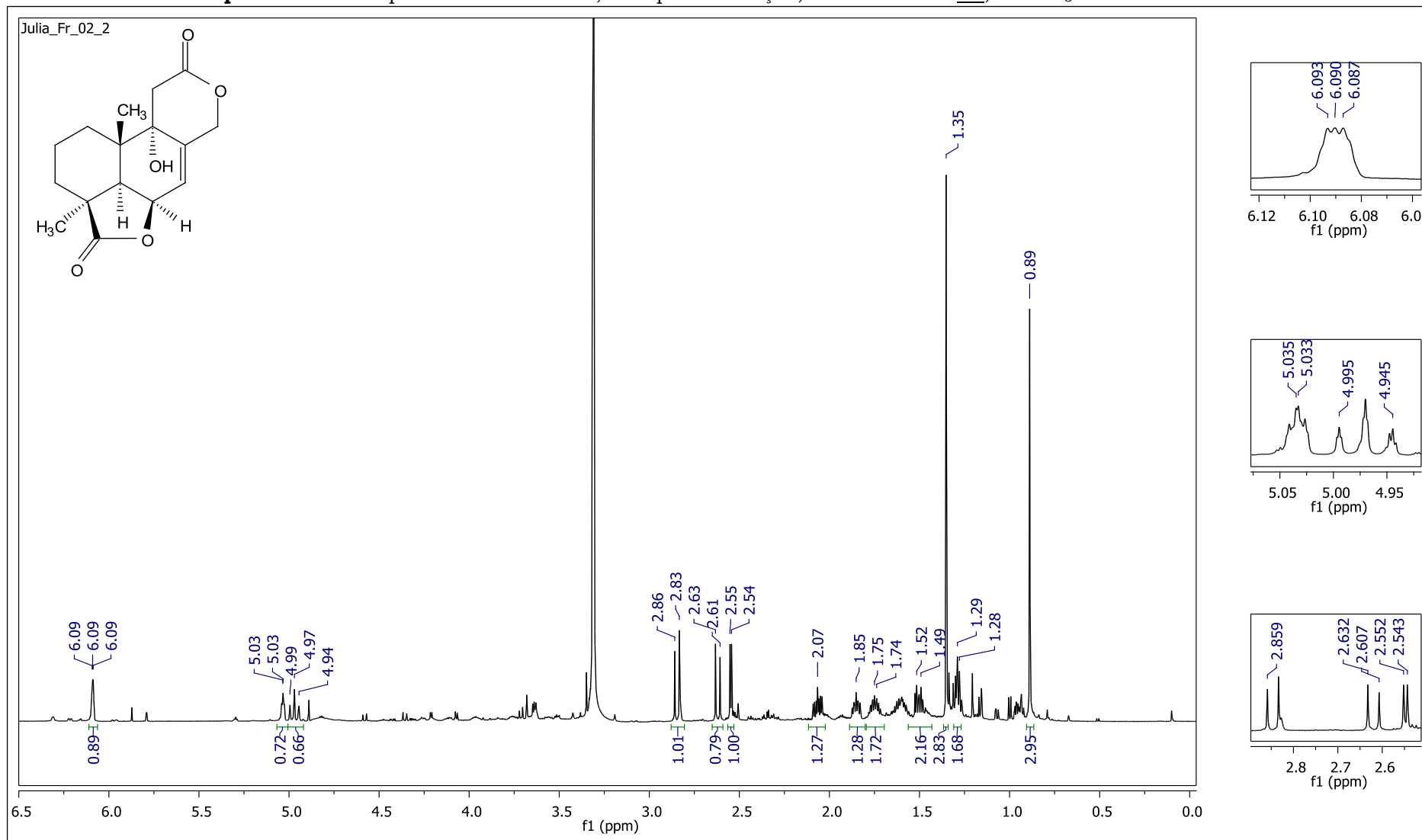


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 10 – Espectro de Massas de alta resolução, no modo positivo da substância **01**.

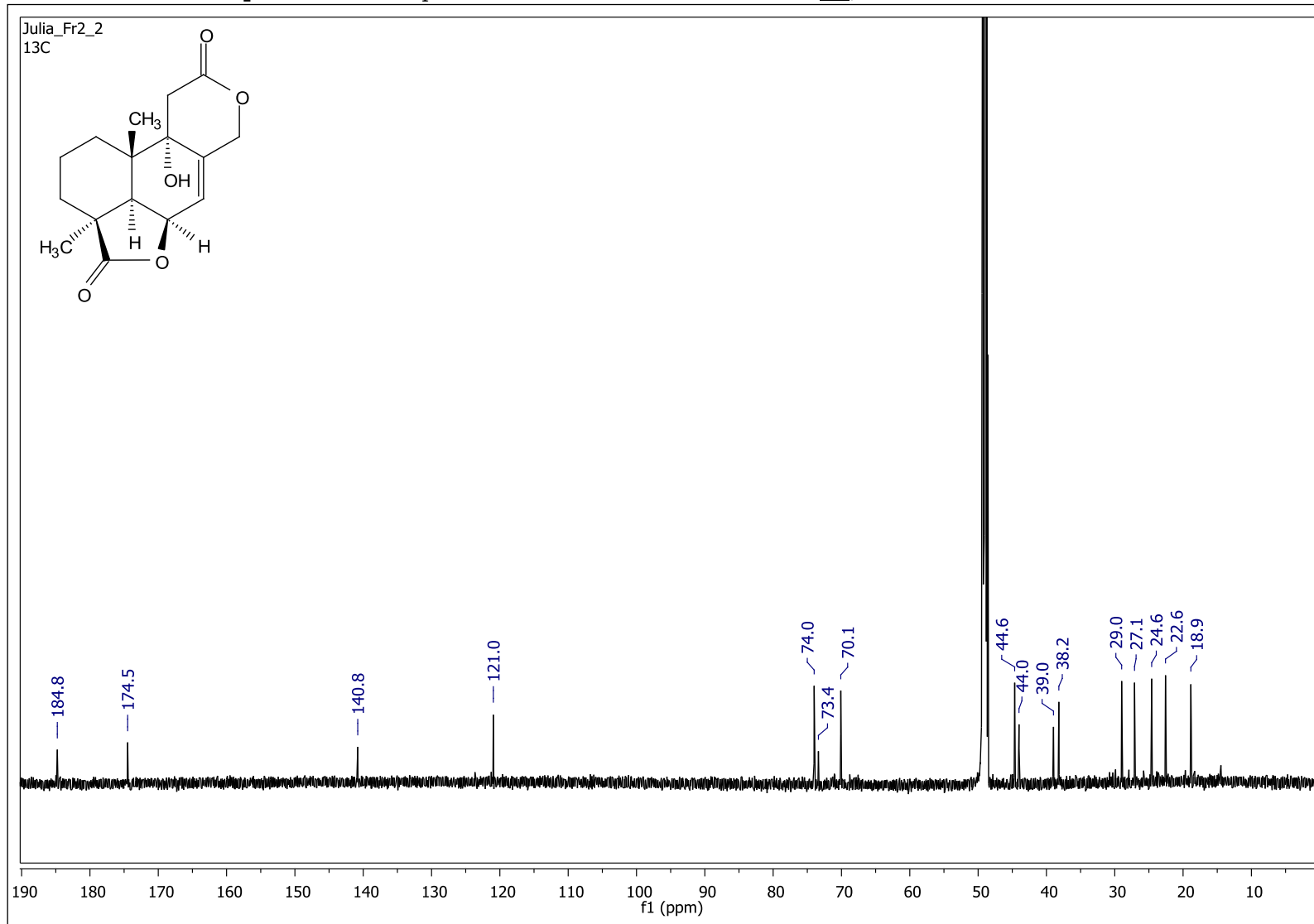
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 11 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **01**, em CD_3OD e 600 MHz.



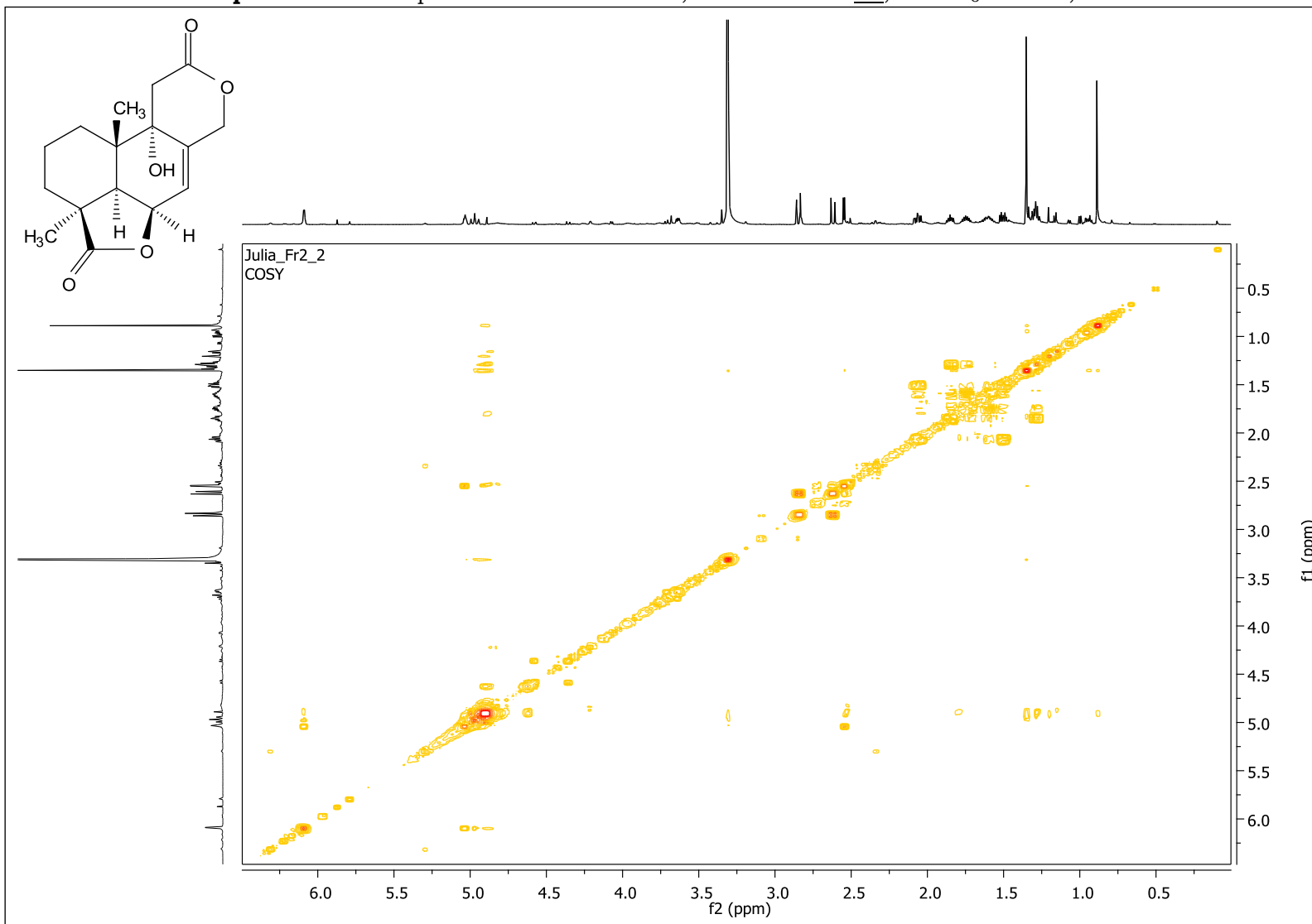
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 12 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **01**, em CD_3OD e 150 MHz.



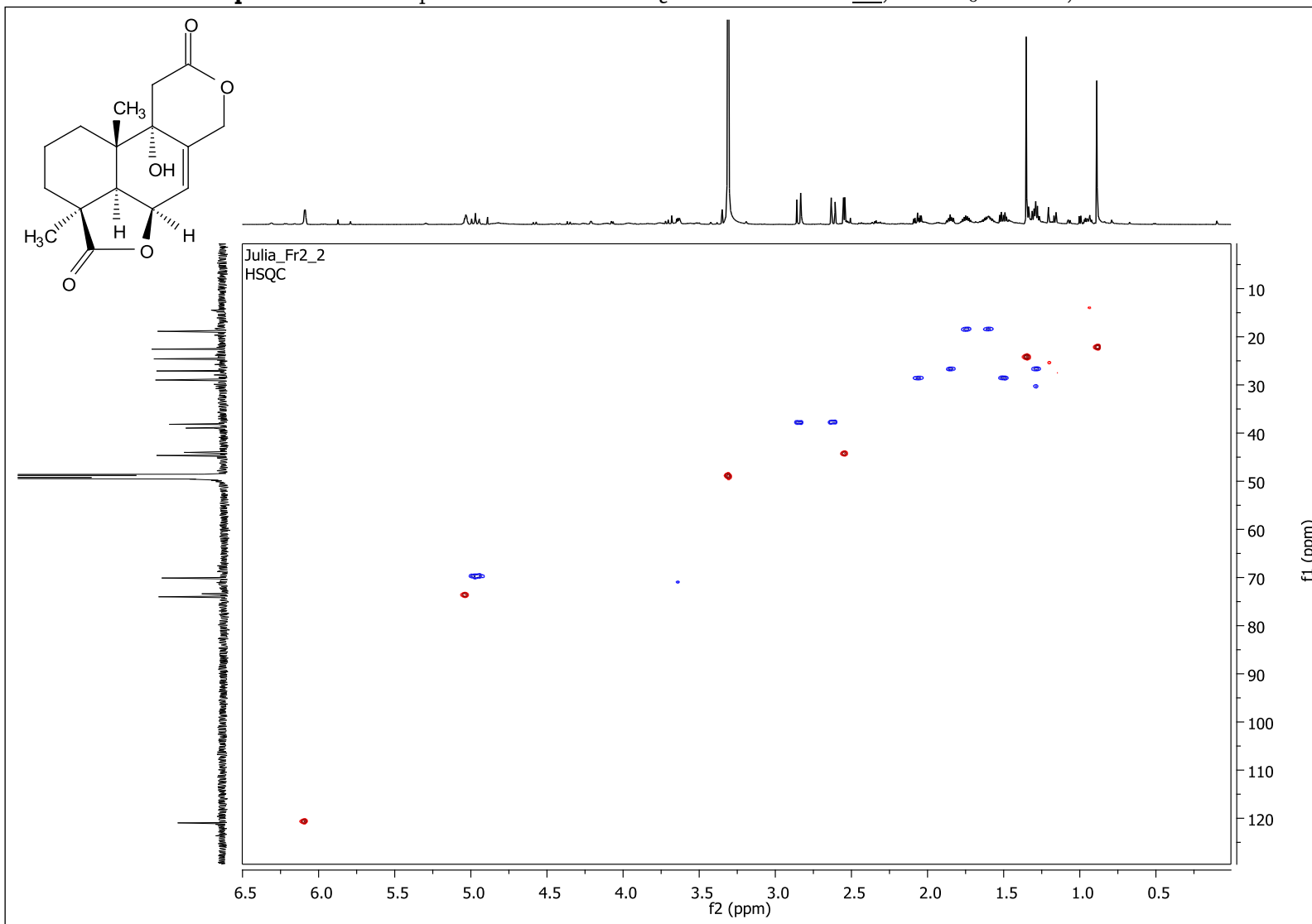
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 13 – Mapa de contorno de COSY, da substância **01**, em CD₃OD e 14,1 T.



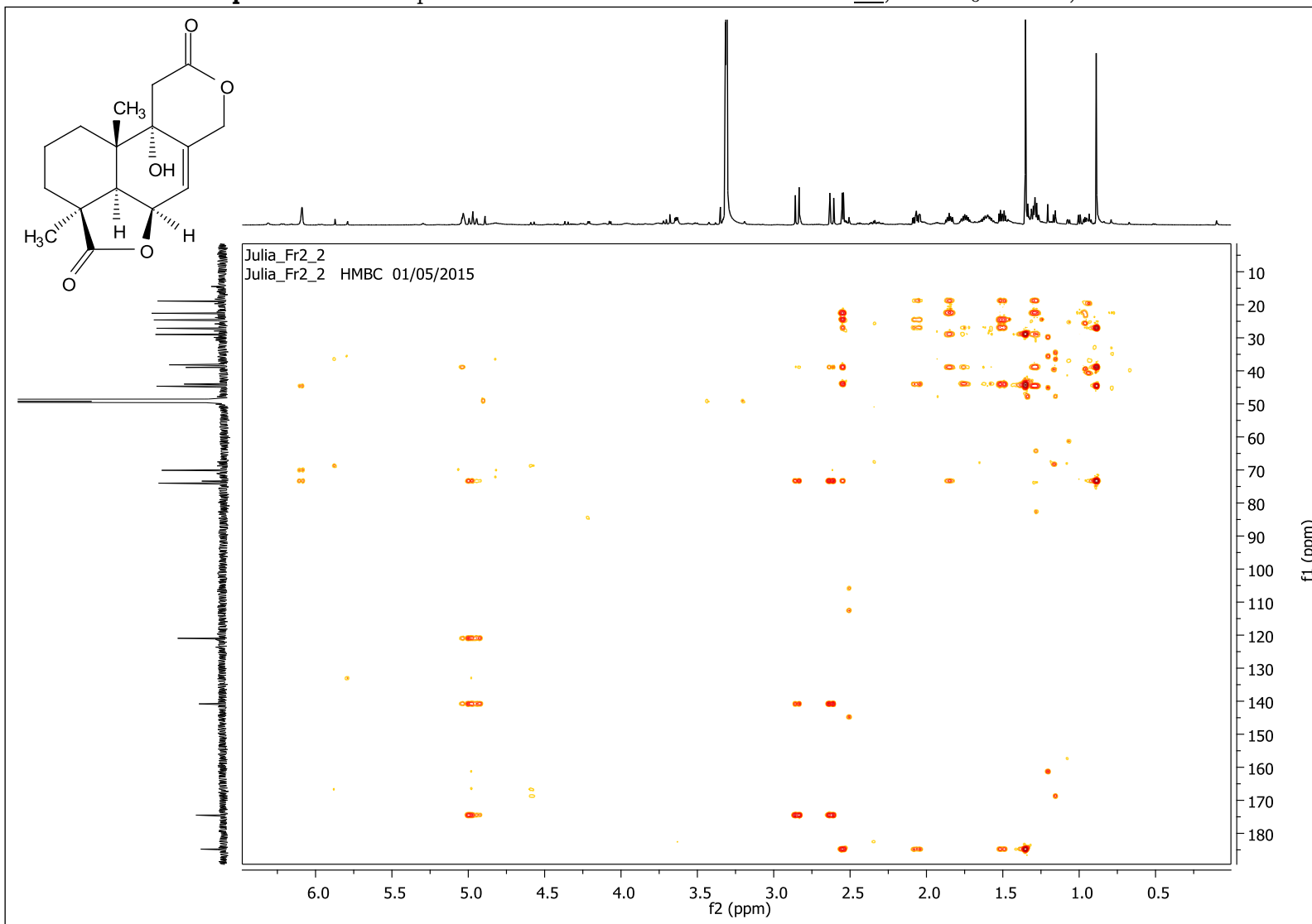
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 14 – Mapa de contorno de HSQC da substância **01**, em CD₃OD e 14,1 T.



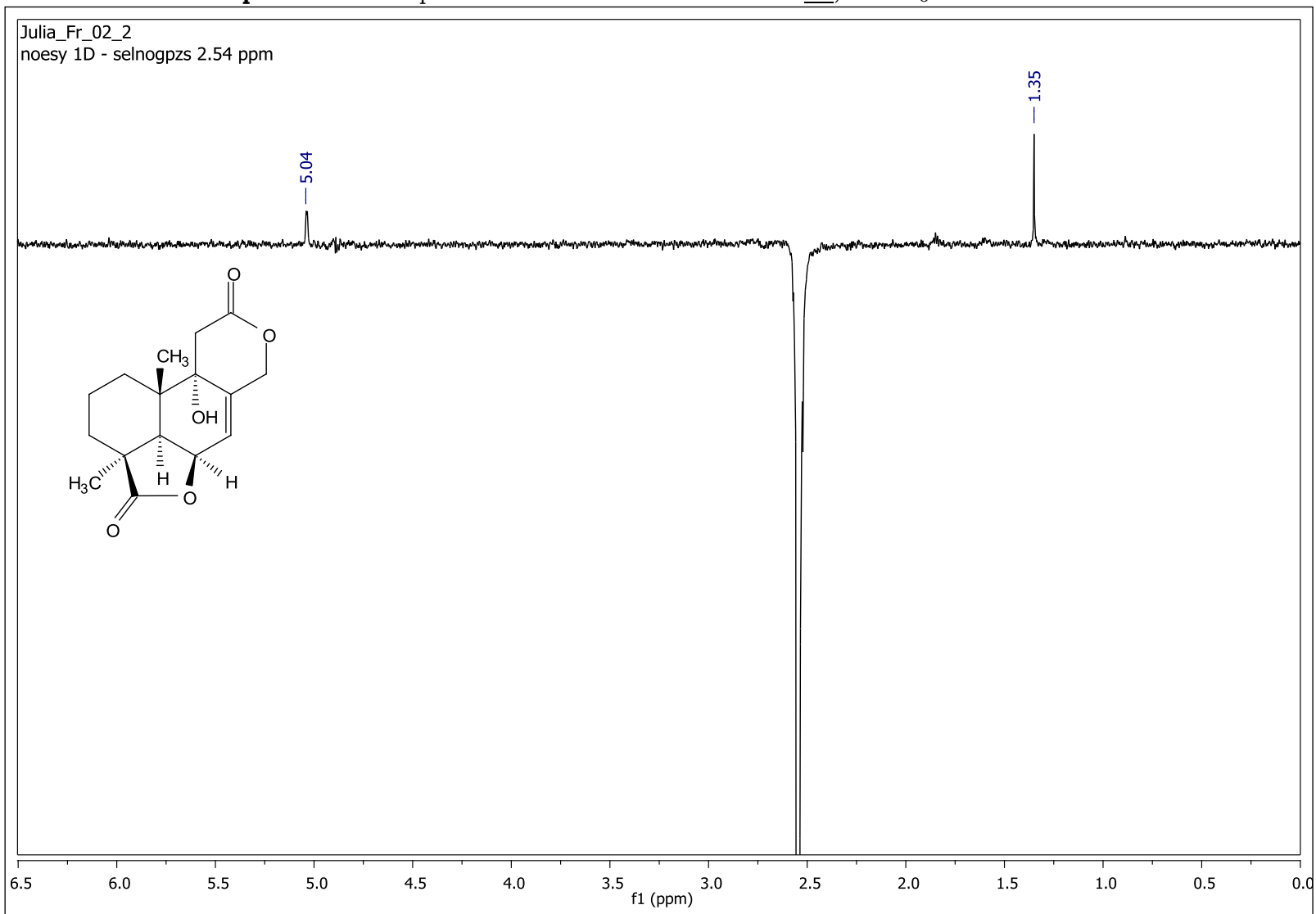
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 15 – Mapa de contorno de HMBC da substância **01**, em CD₃OD e 14,1 T.

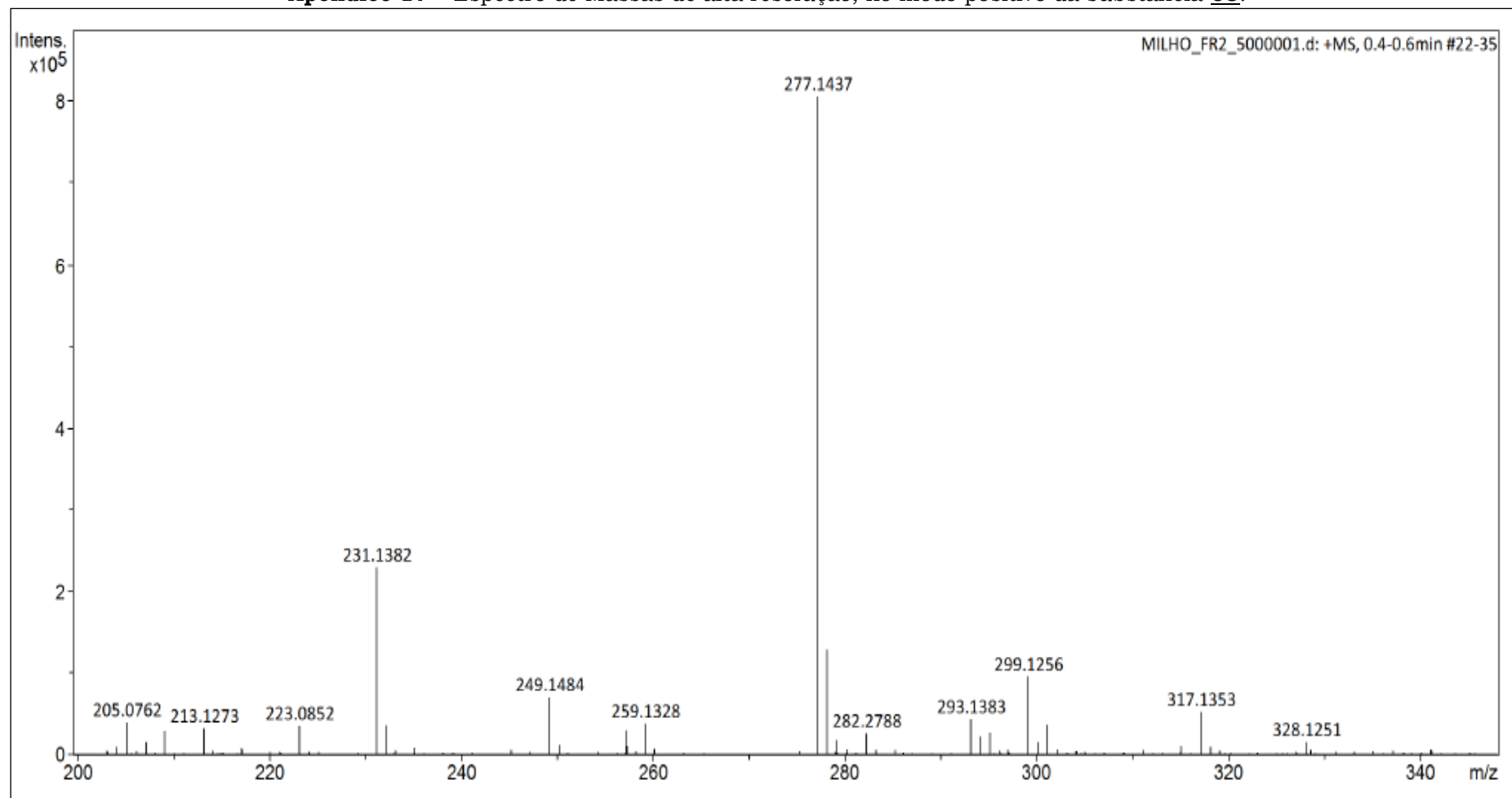


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 16 – Espectro de NOESY 1D da substância **01**, em CD₃OD e 600 MHz.

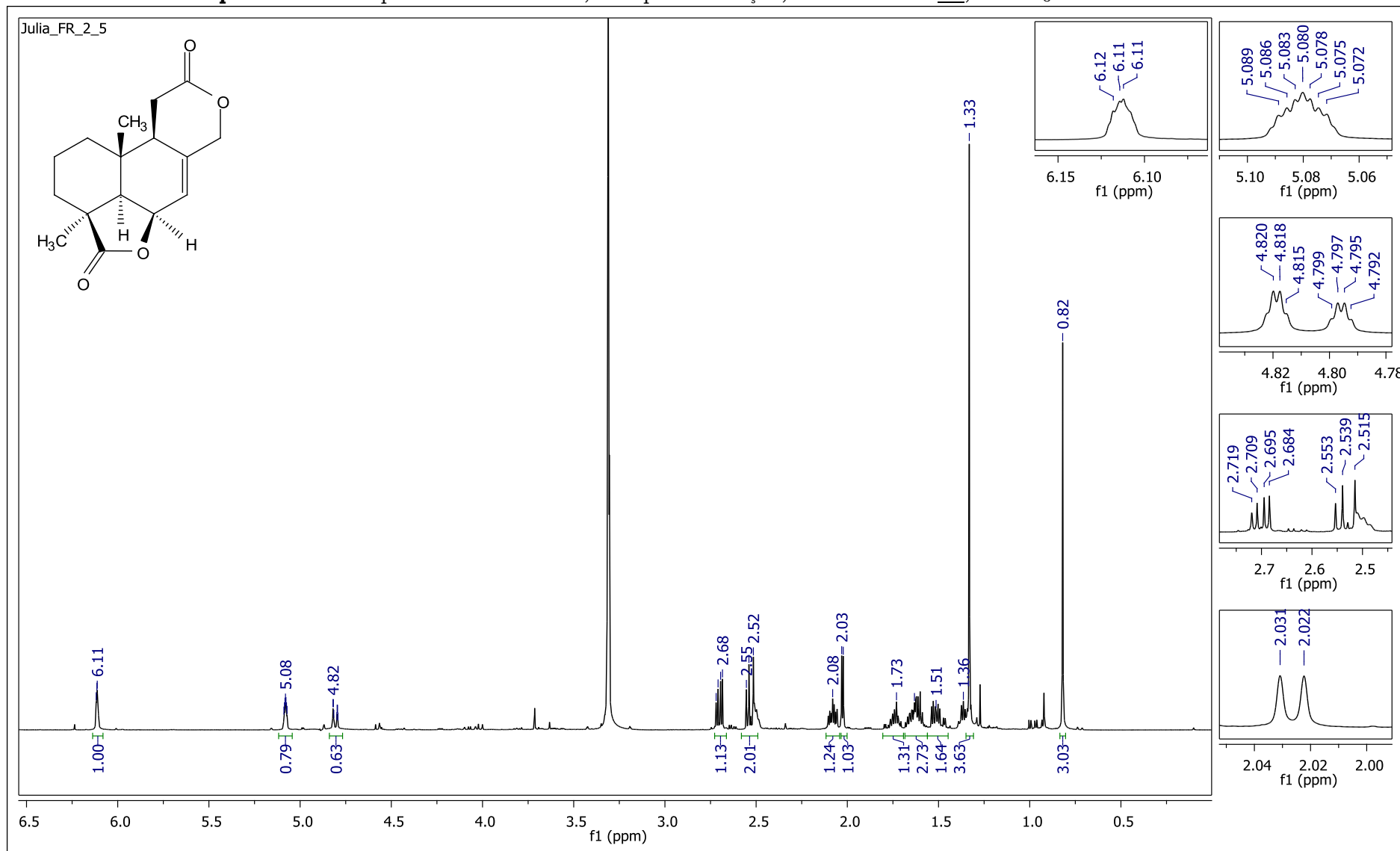


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 17 – Espectro de Massas de alta resolução, no modo positivo da substância **03**.

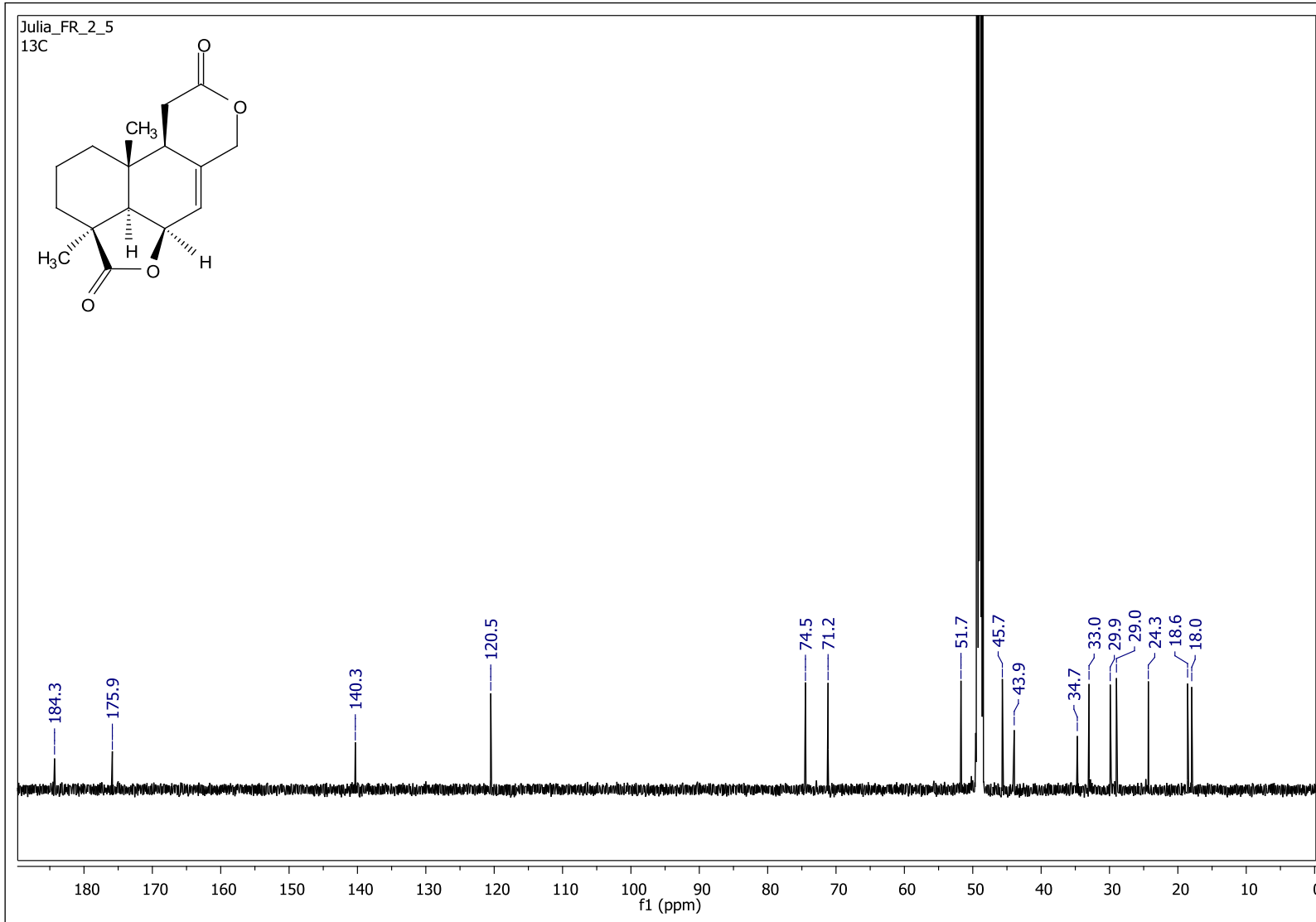
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 18 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **03**, em CD_3OD e 600 MHz.



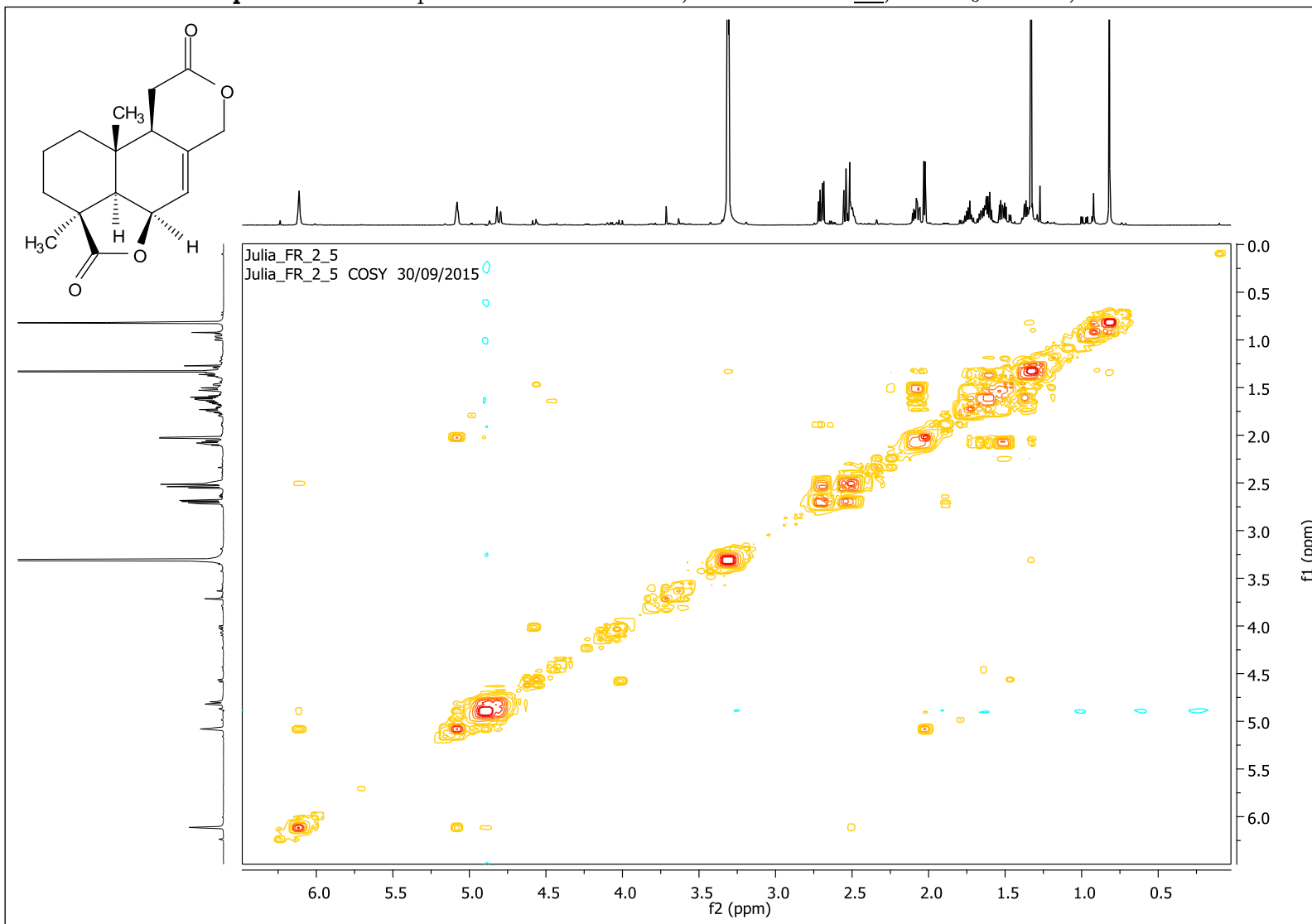
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 19 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **03**, em CD_3OD e 150 MHz.



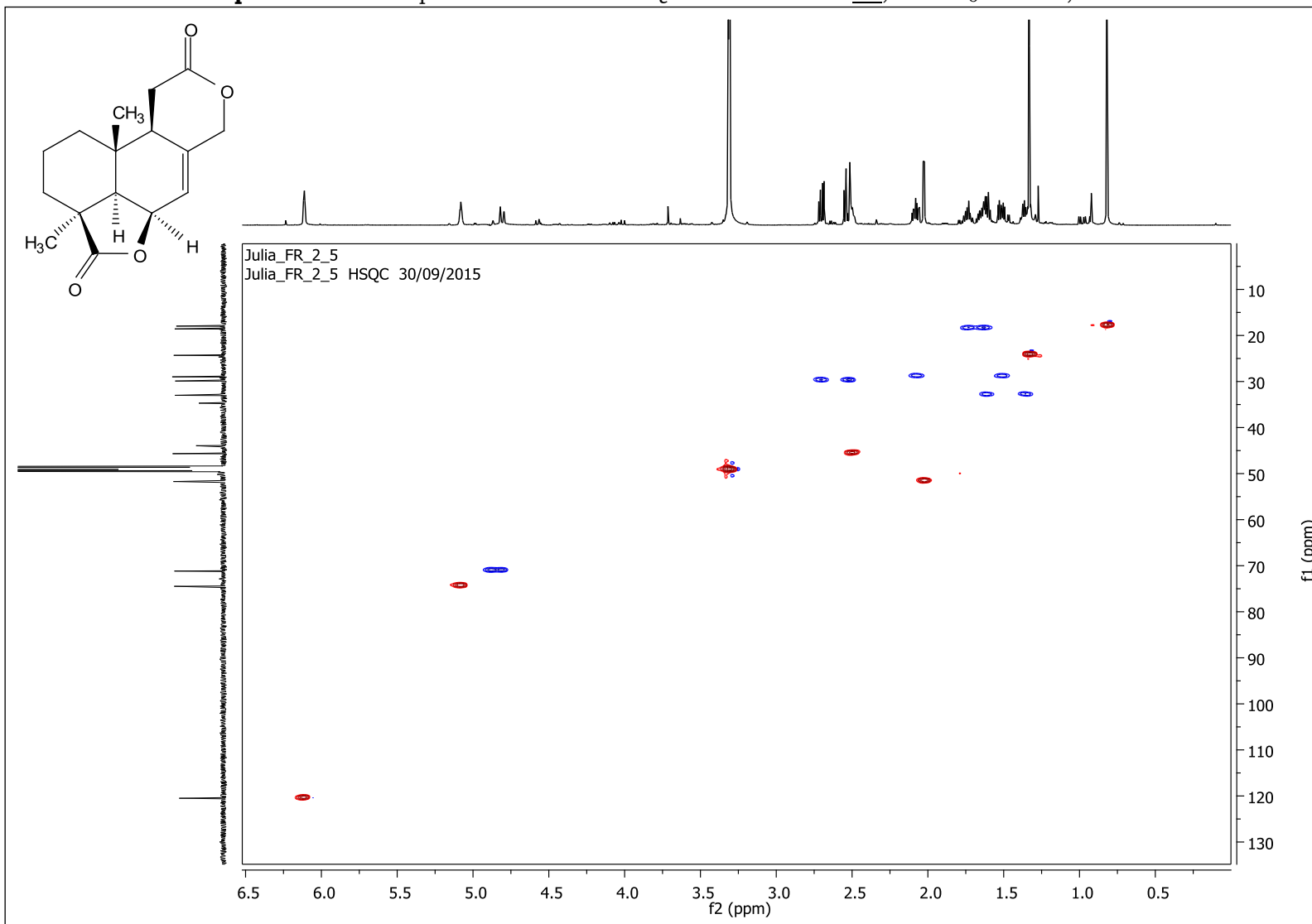
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 20 – Mapa de contorno de COSY, da substância **03**, em CD₃OD e 14,1 T.



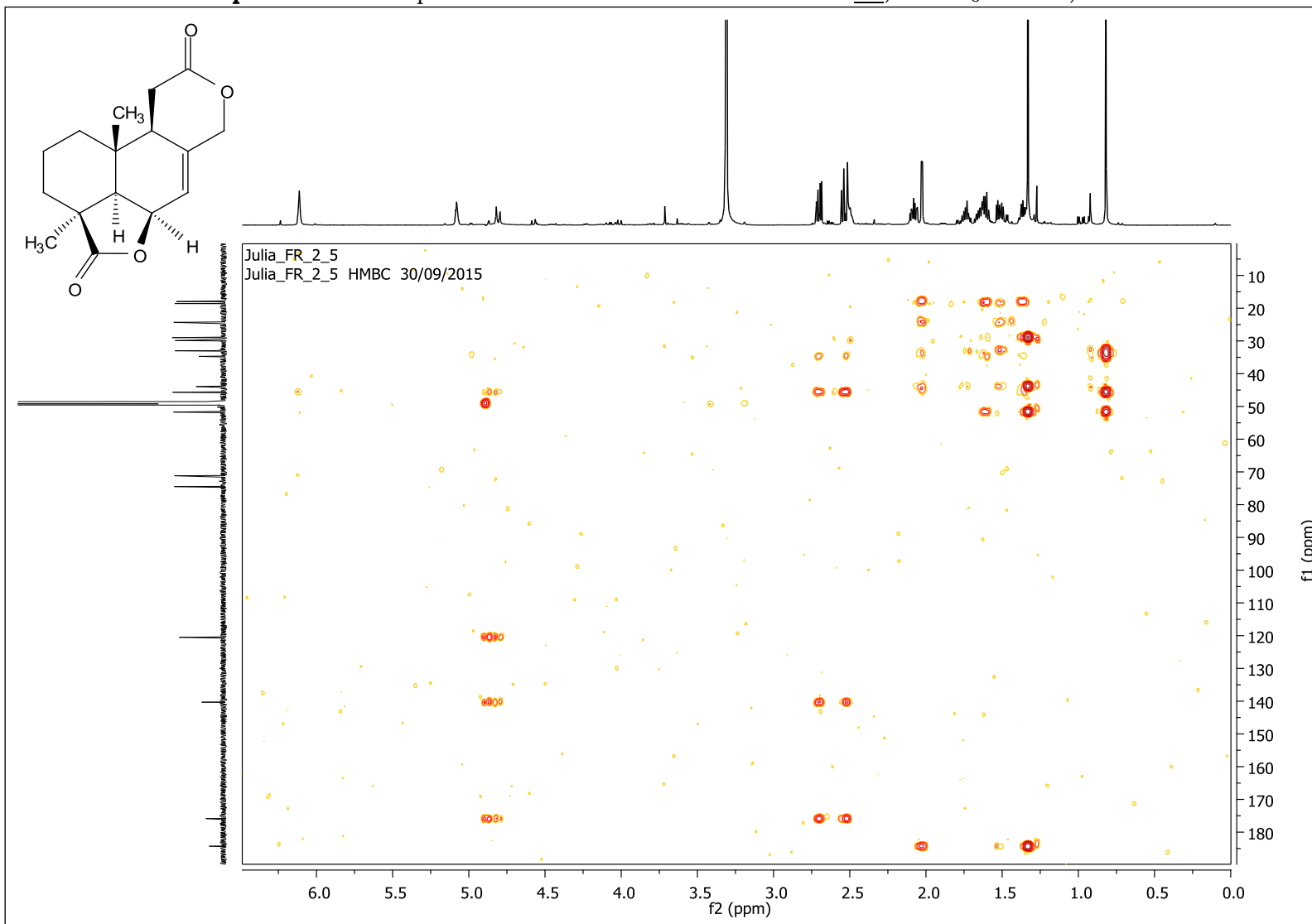
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 21 – Mapa de contorno de HSQC da substância **03**, em CD₃OD e 14,1 T.



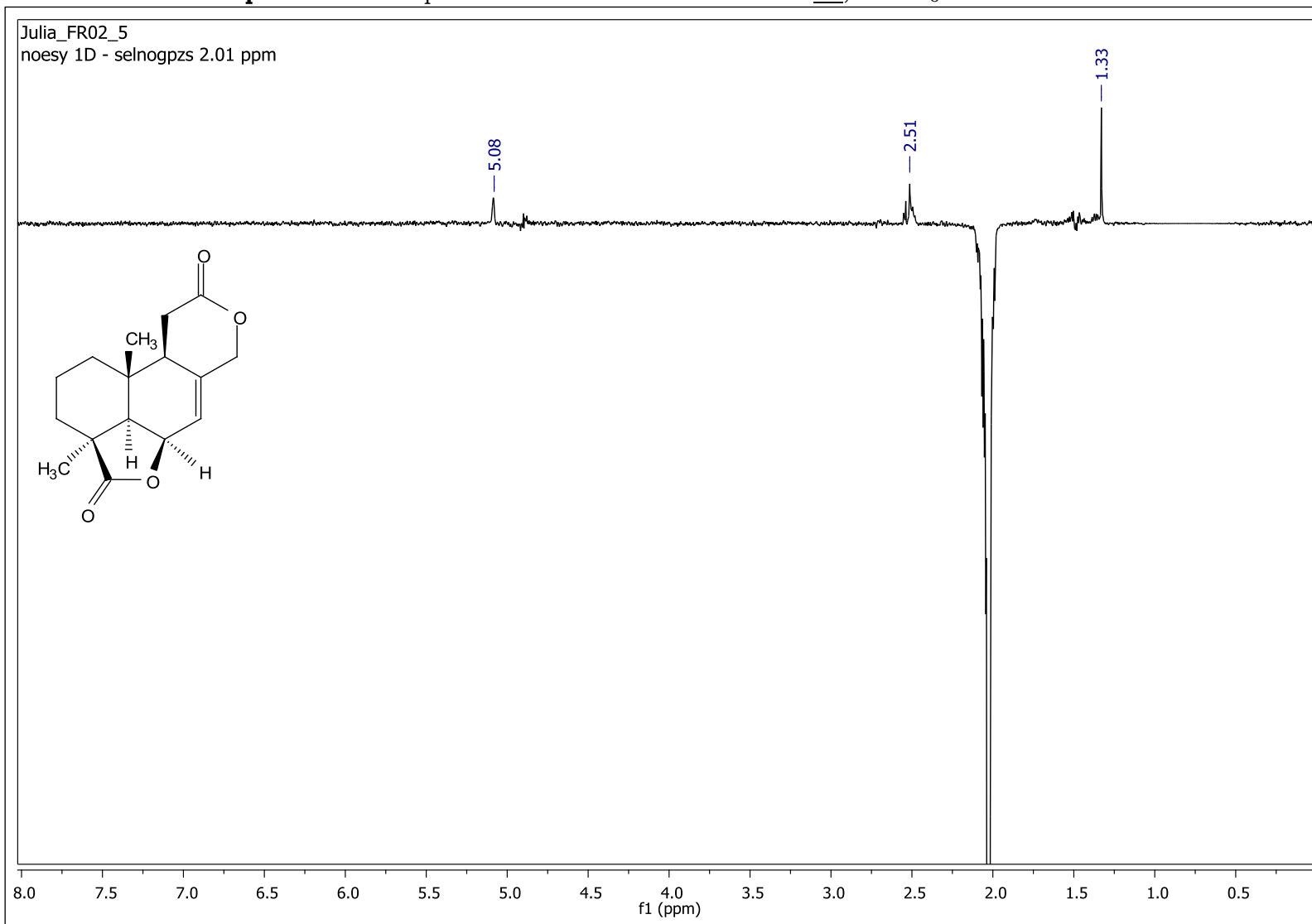
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 22 – Mapa de contorno de HMBC da substância **03**, em CD₃OD e 14,1 T.

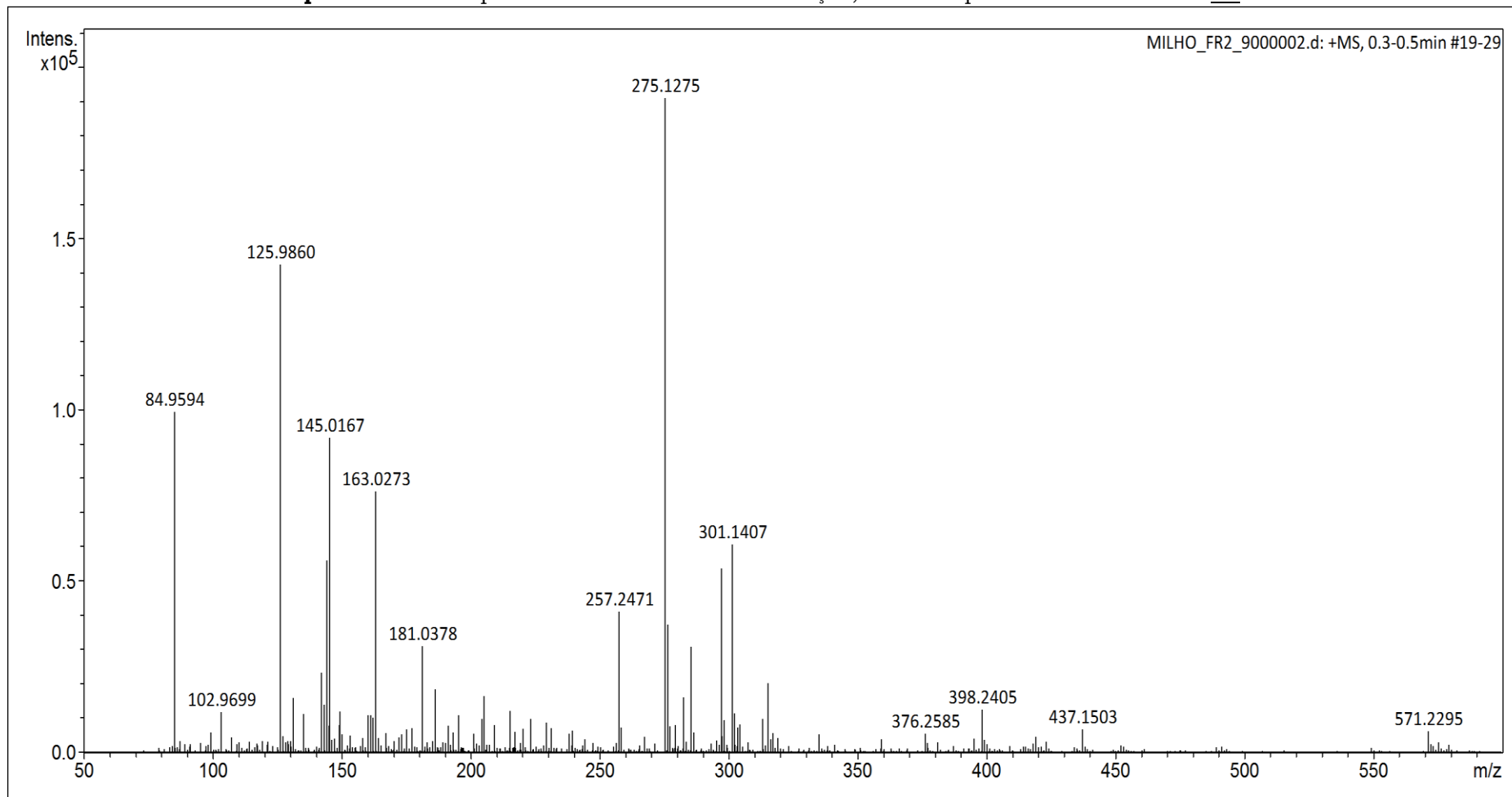


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 23 – Espectro de NOESY 1D da substância **03**, em CD₃OD e 600 MHz.

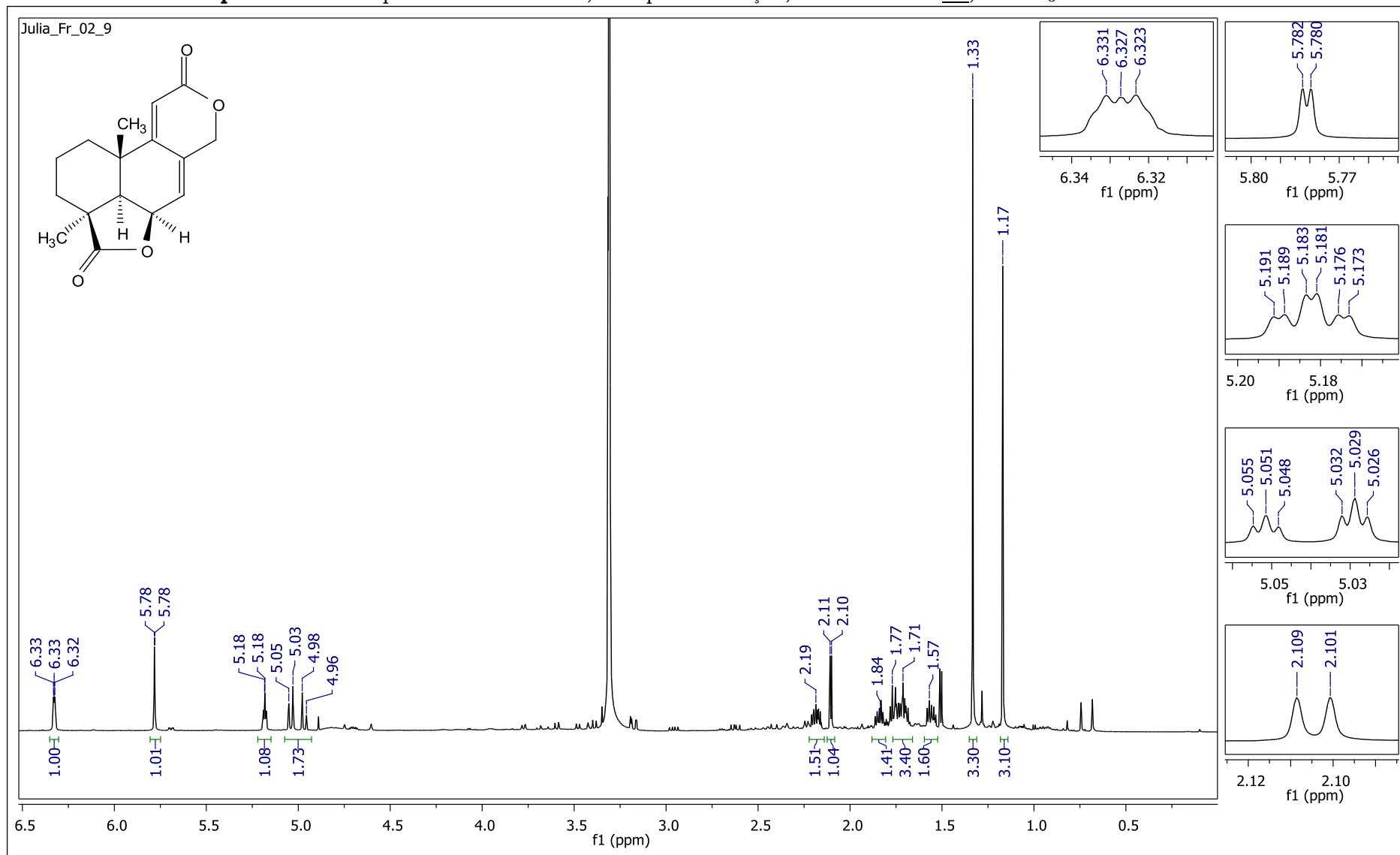


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 24 – Espectro de Massas de alta resolução, no modo positivo da substância **06**.

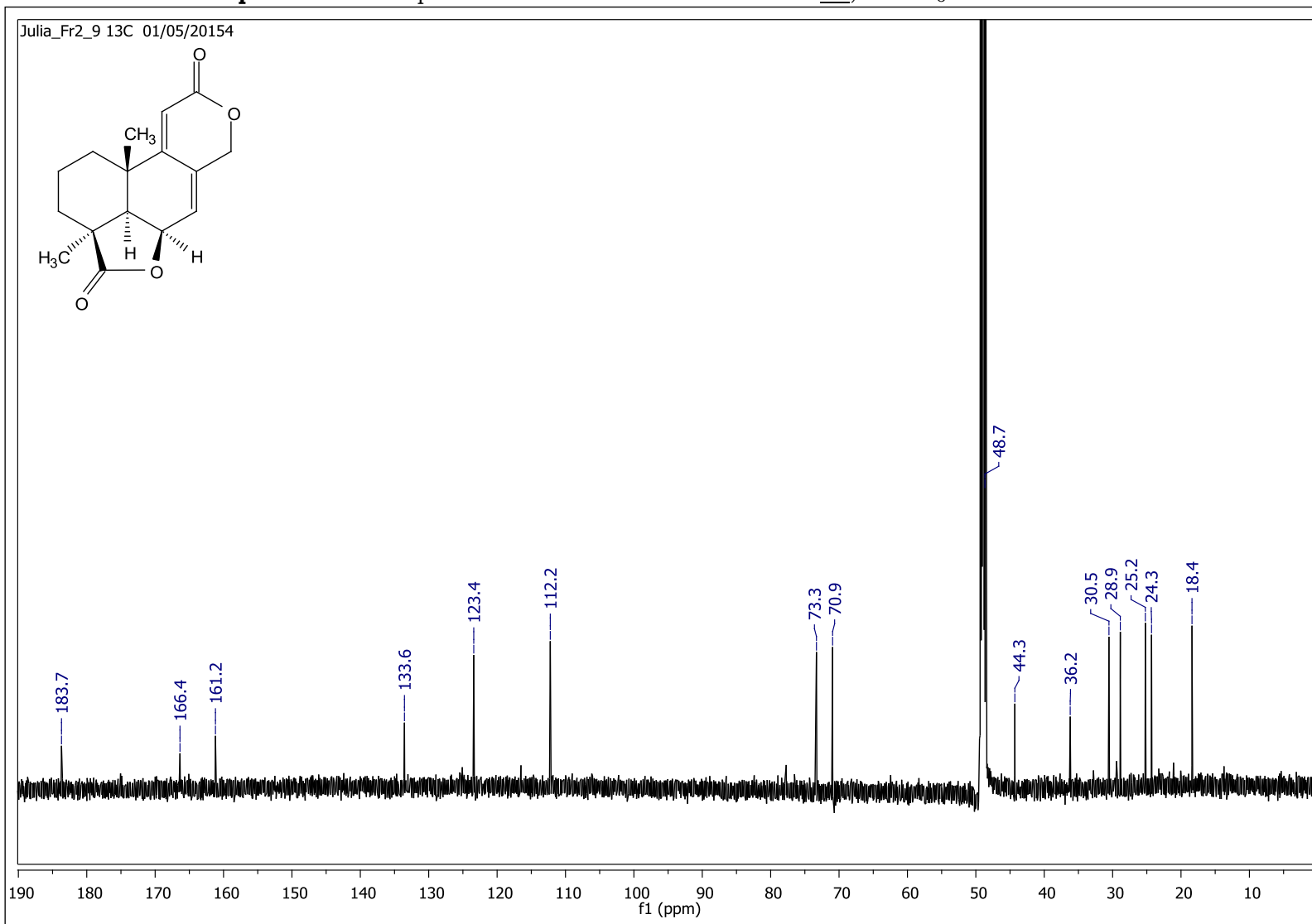
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 25 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **06**, em CD_3OD e 600 MHz.



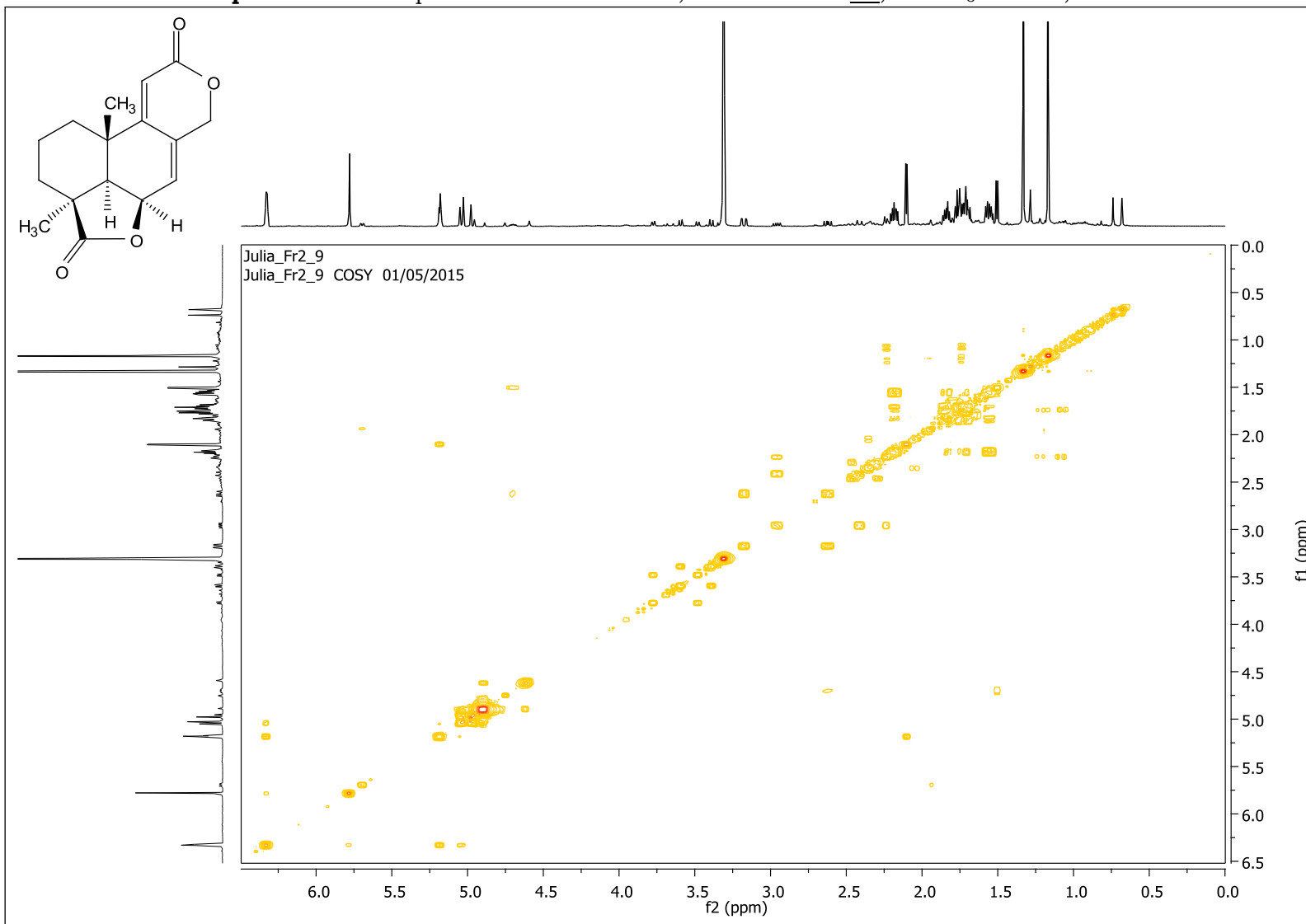
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 26 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **06**, em CD_3OD e 150 MHz.



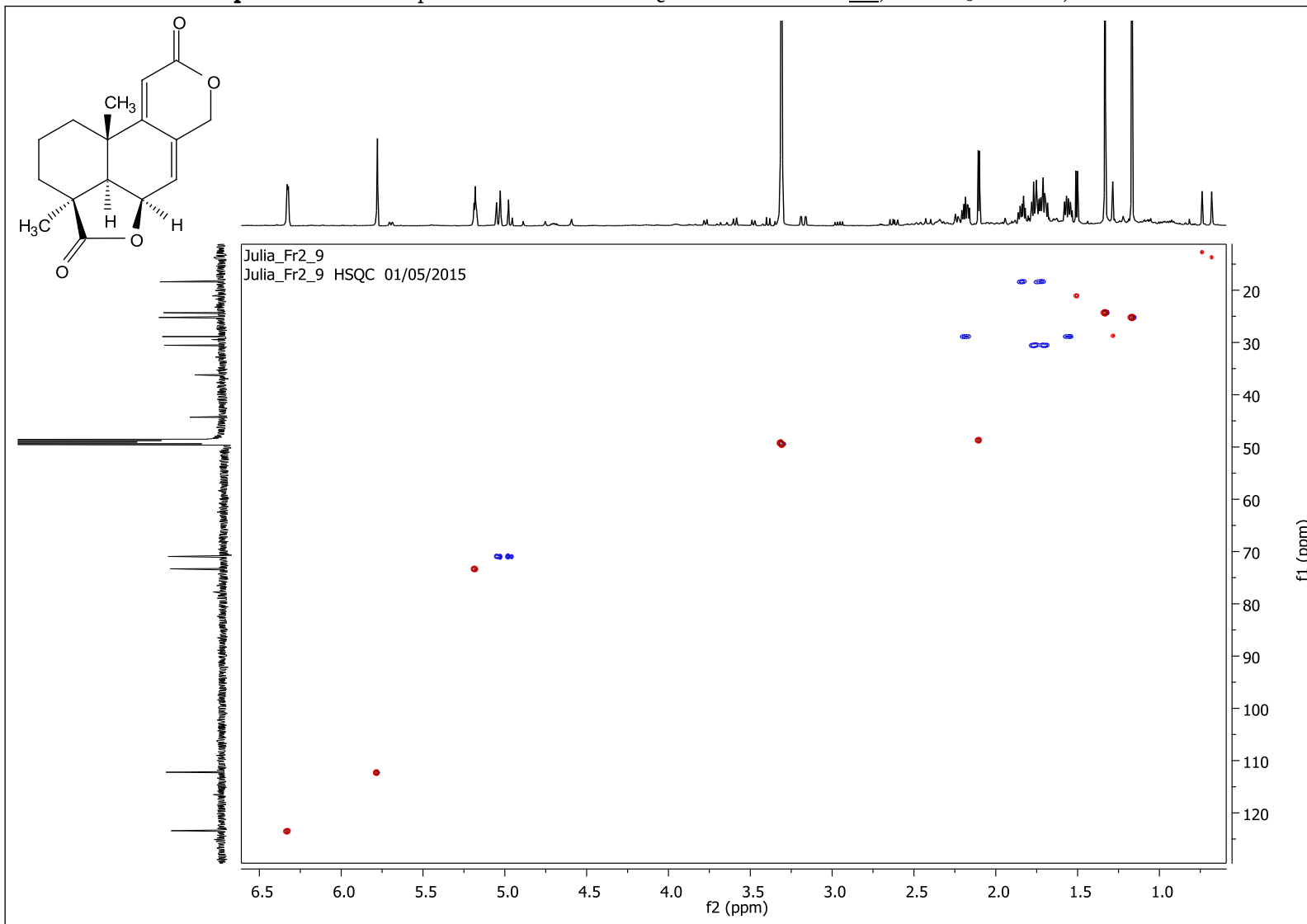
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 27 – Mapa de contorno de COSY, da substância **06**, em CD₃OD e 14,1 T.



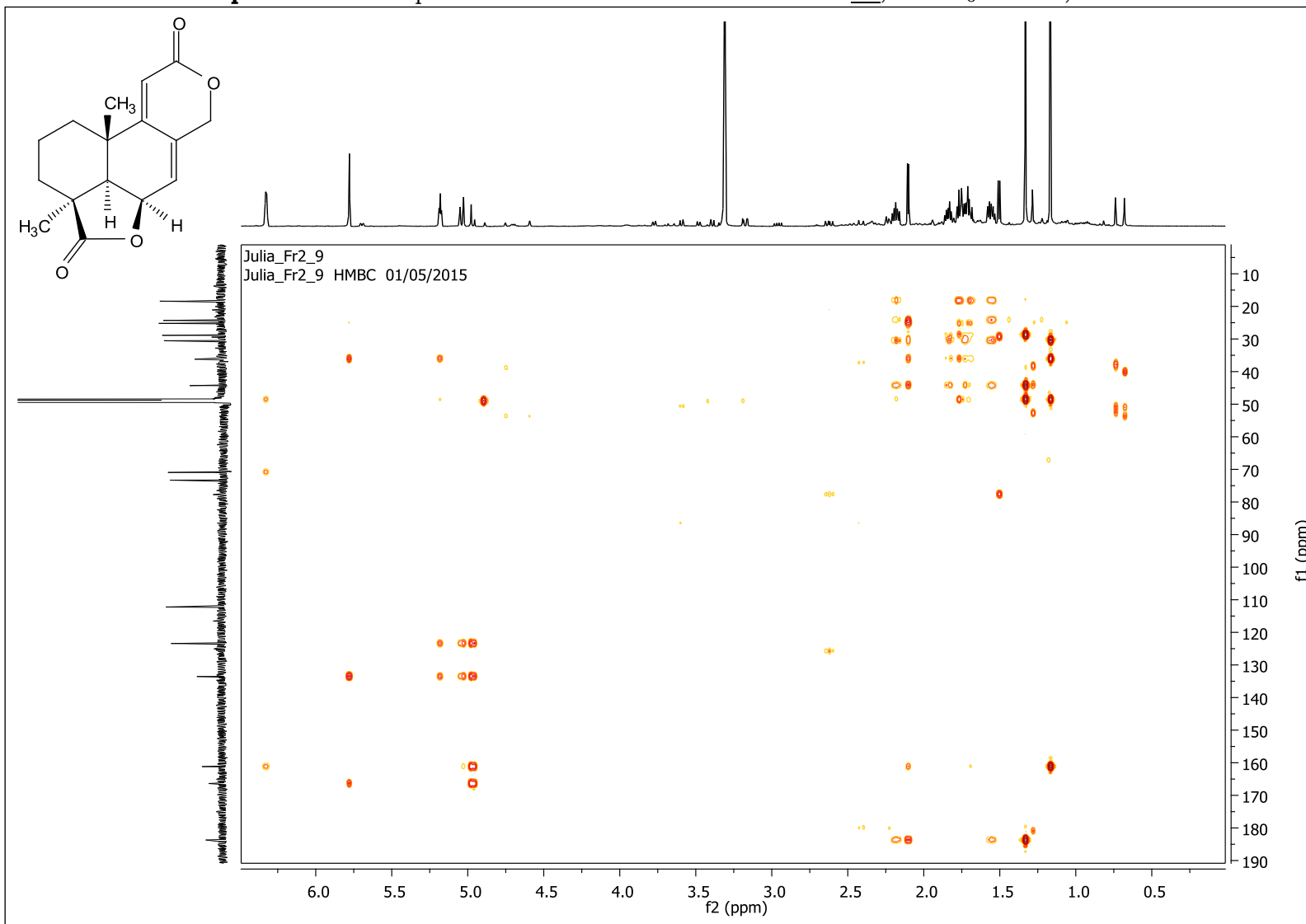
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 28 – Mapa de contorno de HSQC da substância **06**, em CD₃OD e 14,1 T.



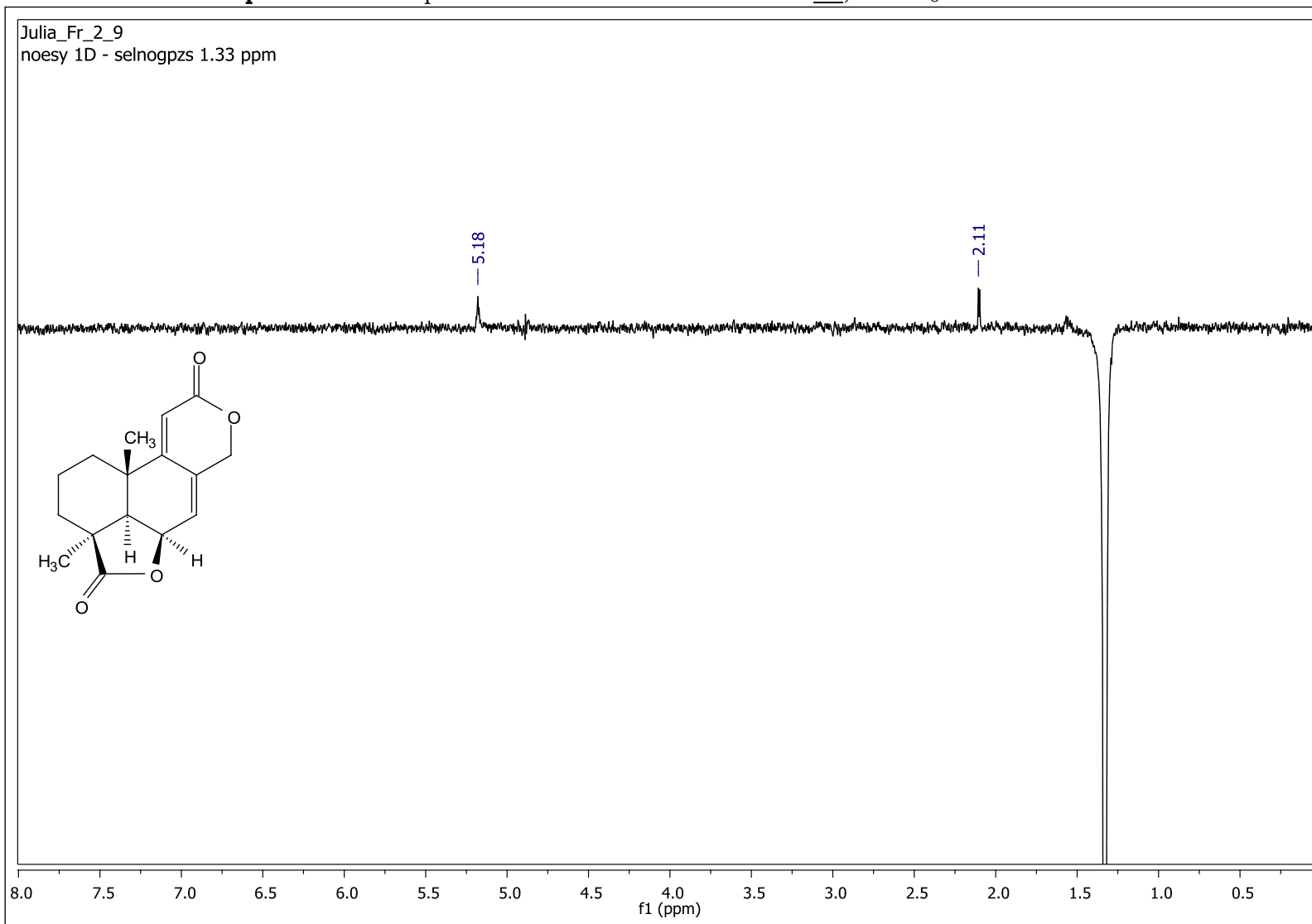
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 29 – Mapa de contorno de HMBC da substância **06**, em CD₃OD e 14,1 T.

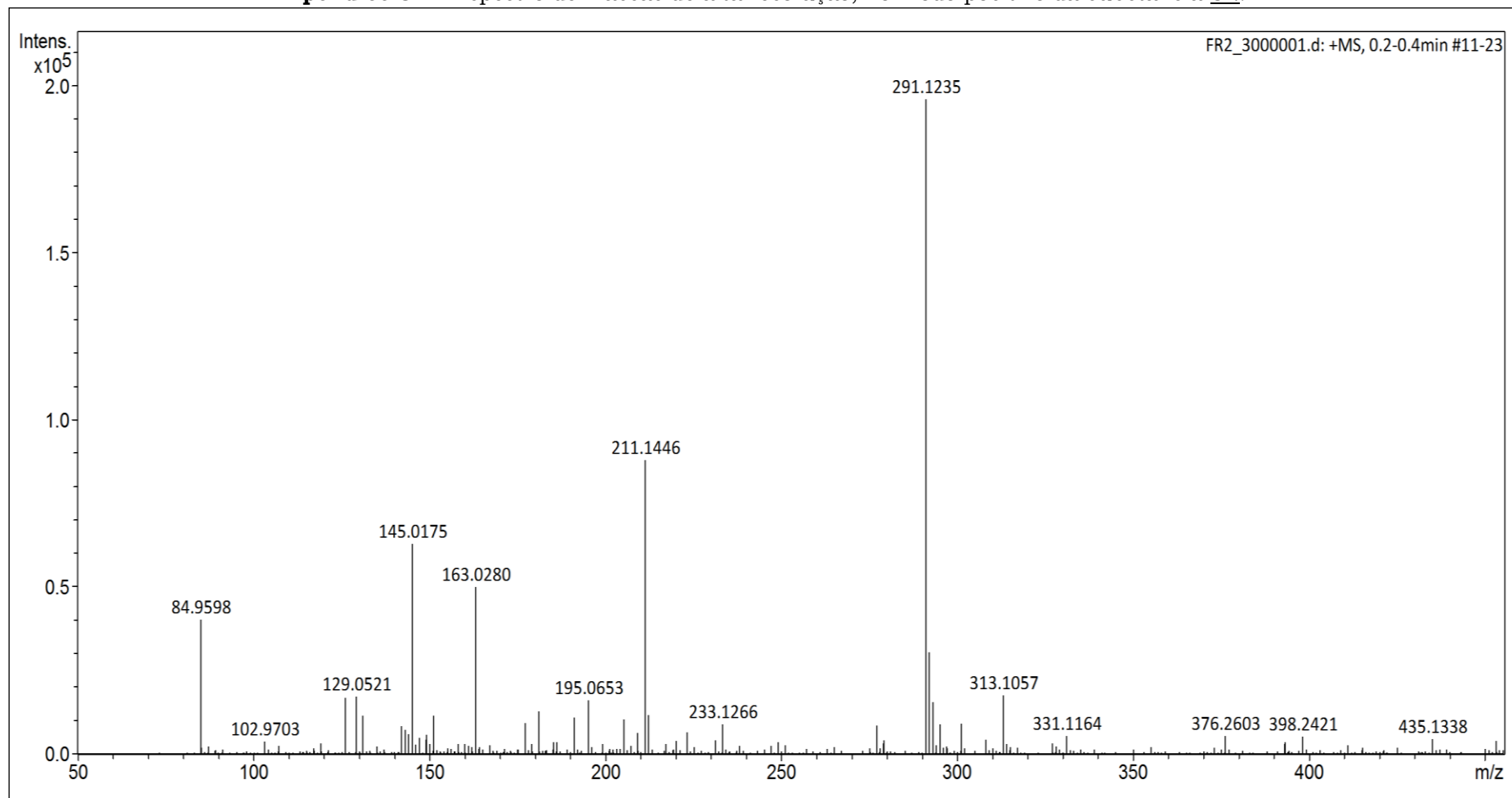


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 30 – Espectro de NOESY 1D da substância **06**, em CD₃OD e 600 MHz.

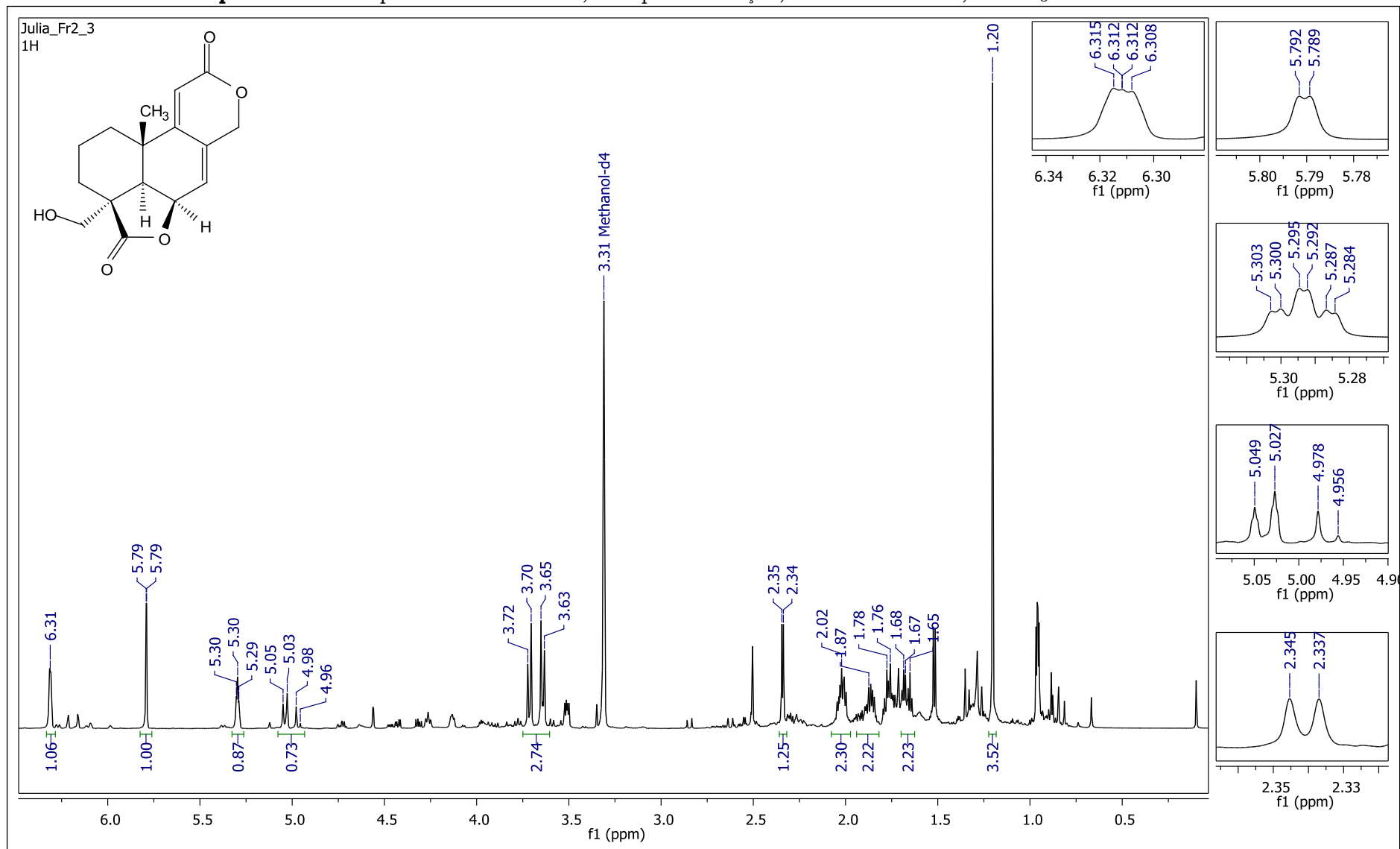


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 31 – Espectro de Massas de alta resolução, no modo positivo da substância **02**.

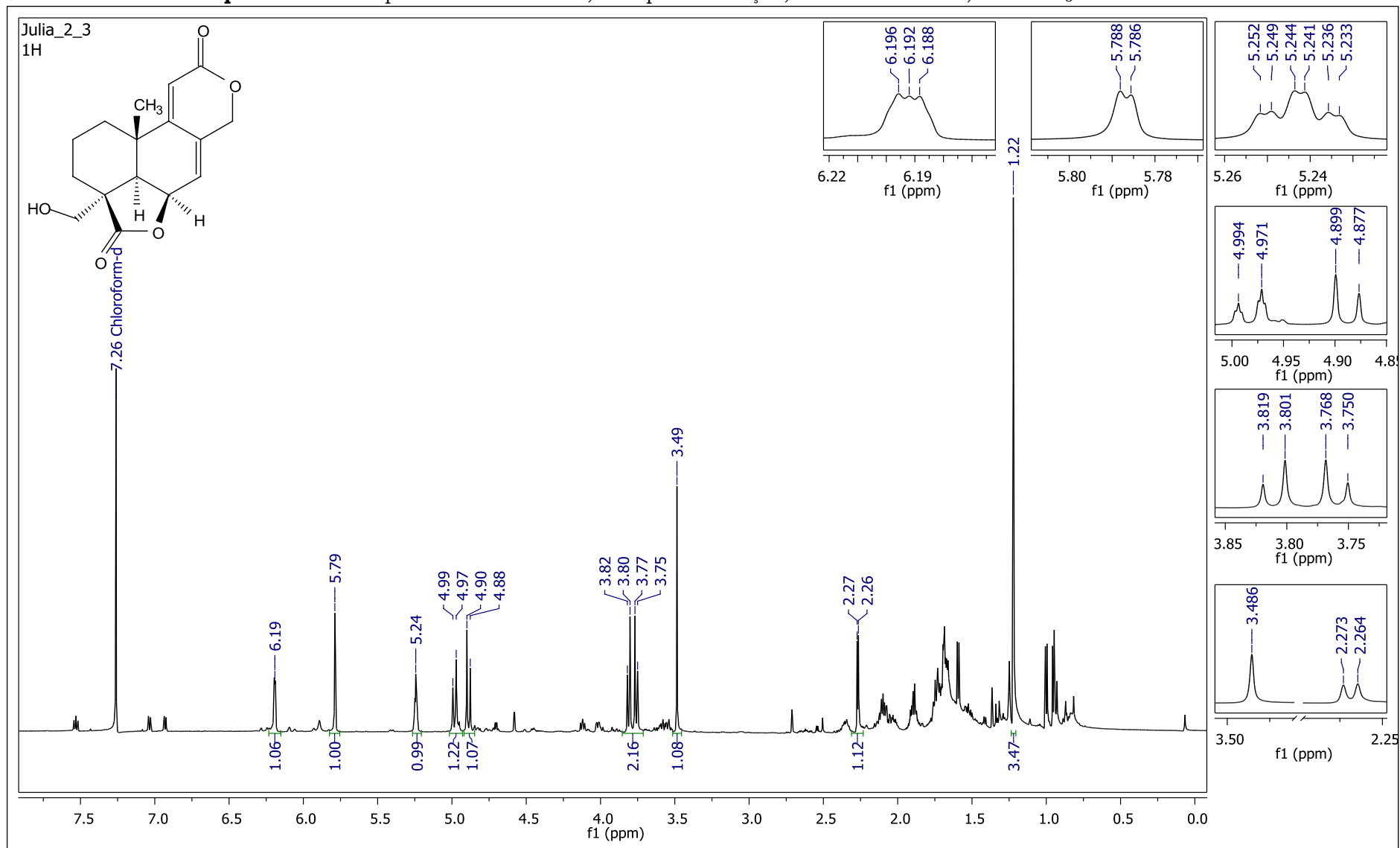
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 32 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **02**, em CD_3OD e 600 MHz.



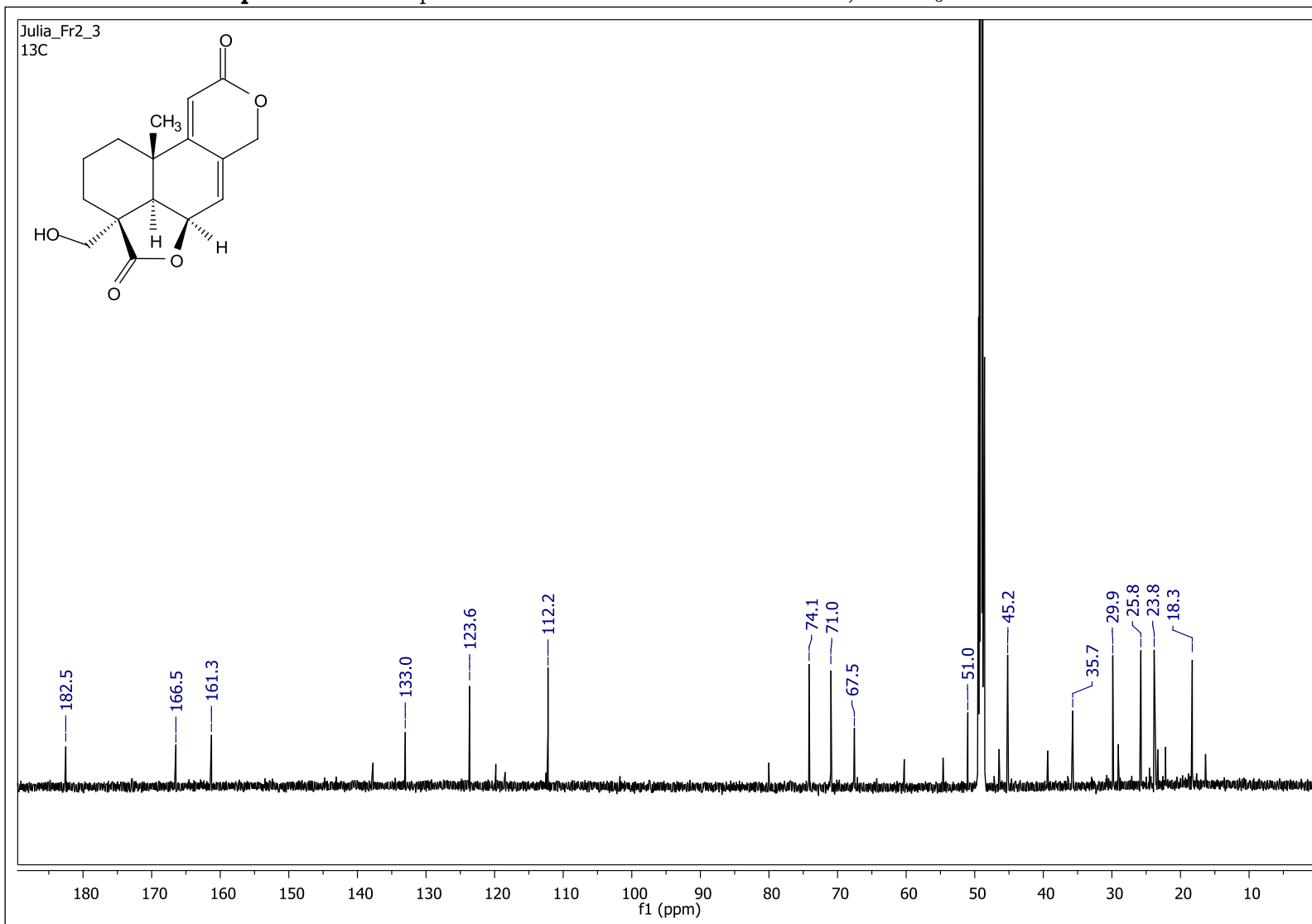
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 33 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **02**, em CDCl_3 e 600 MHz.



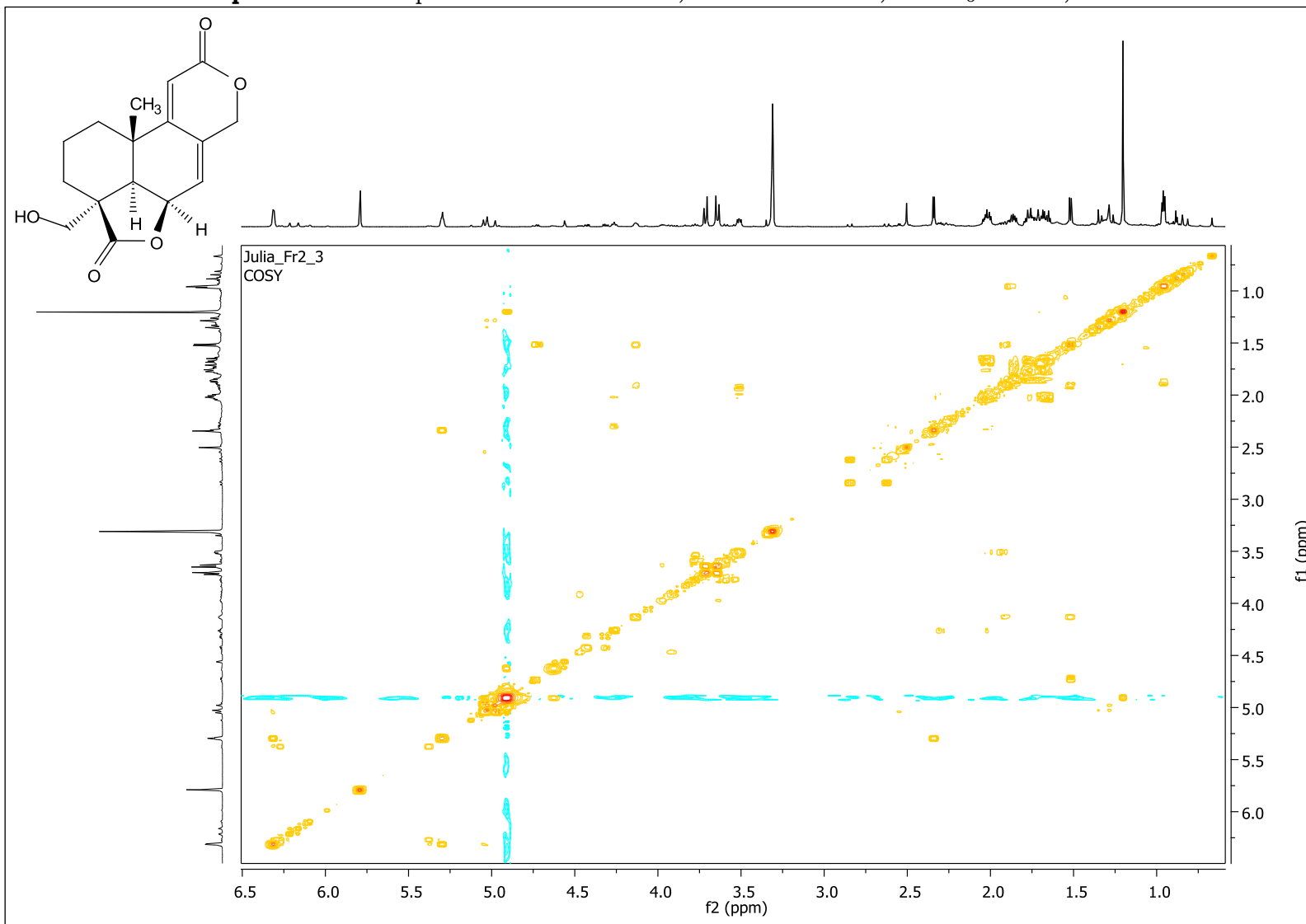
Fonte: ilustração elaborada pela autora.

Apêndice 34 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **02**, em CD_3OD e 150 MHz.



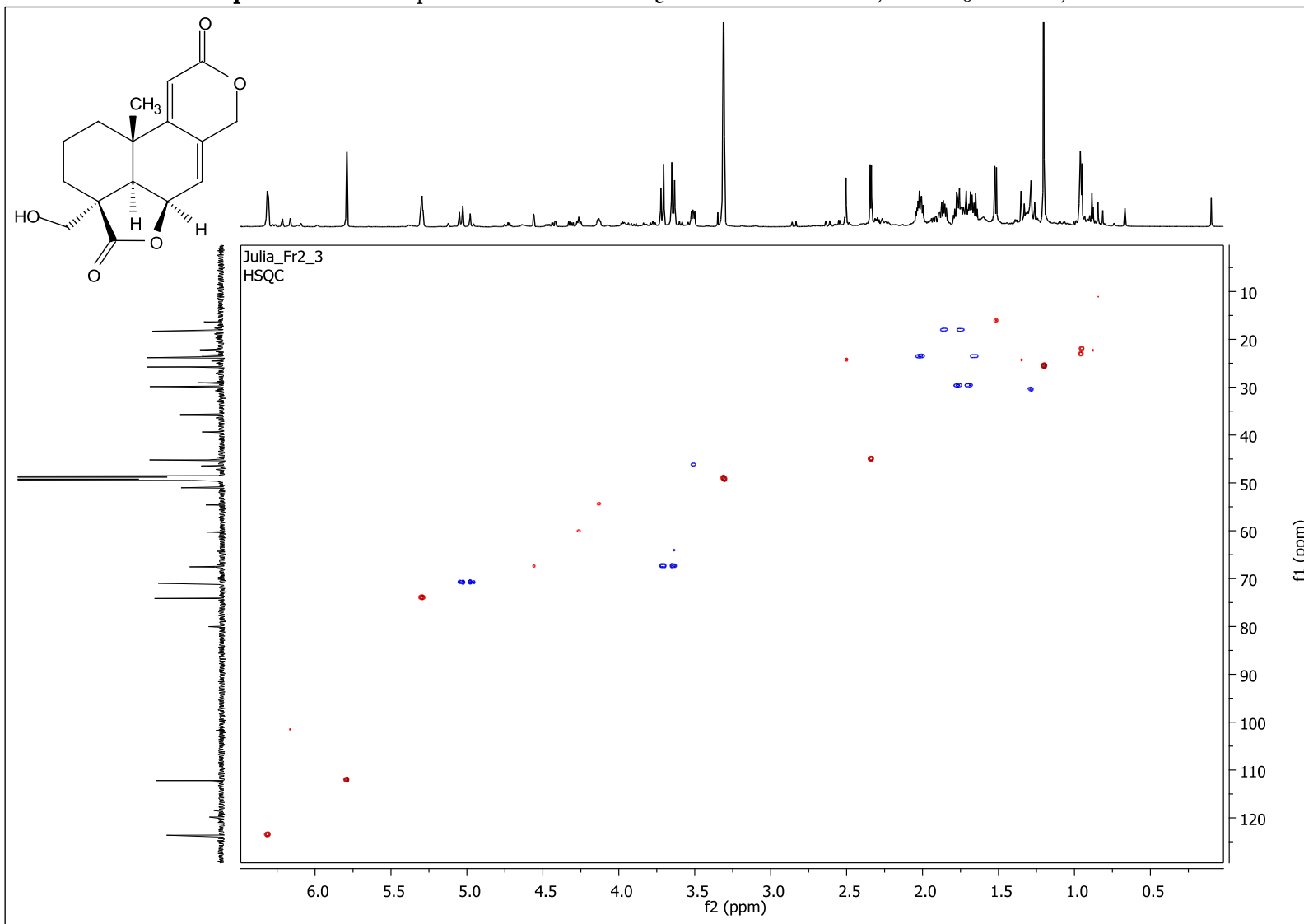
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 35 – Mapa de contorno de COSY, da substância **02**, em CD₃OD e 14,1 T.



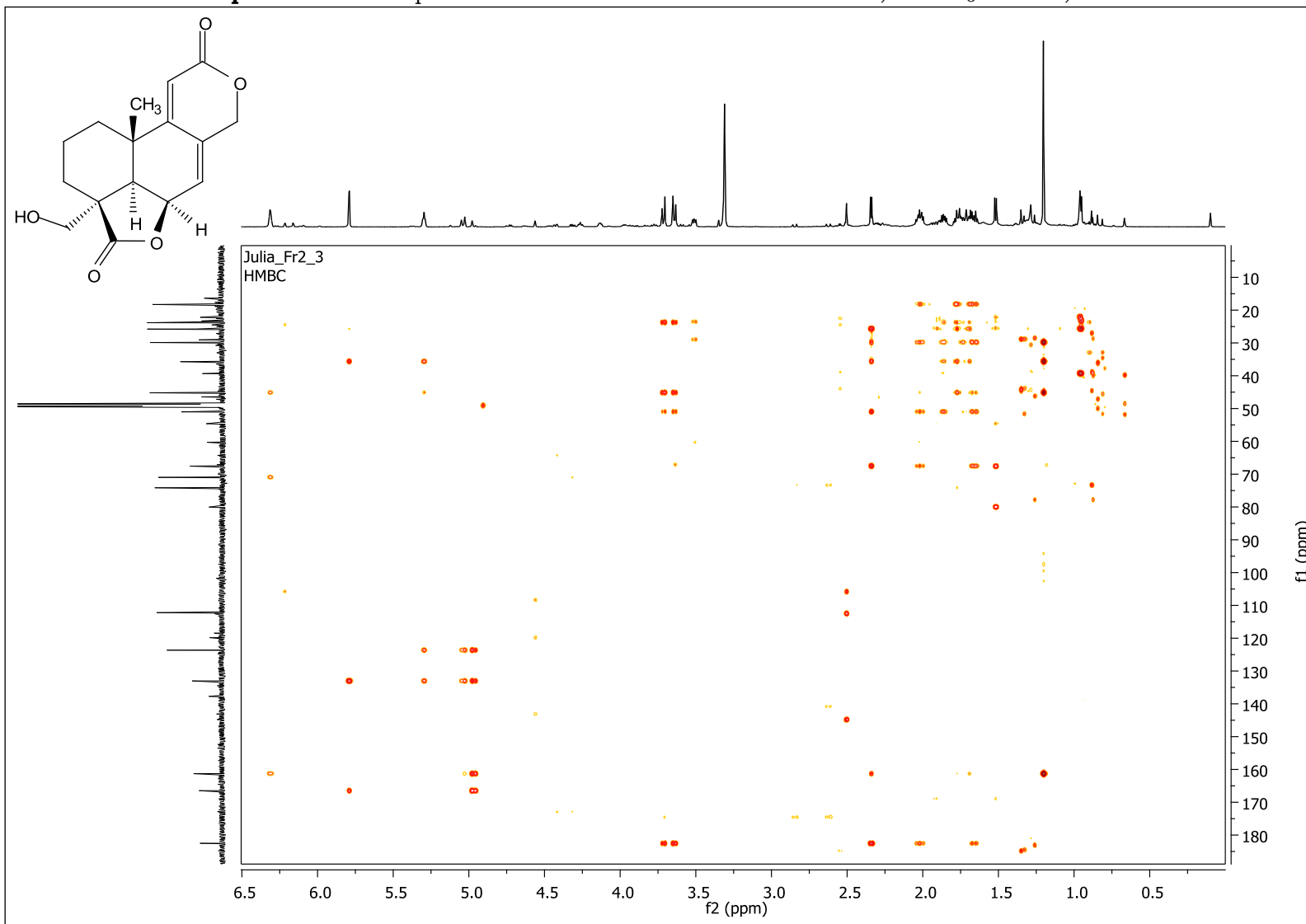
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 36 – Mapa de contorno de HSQC da substância **02**, em CD₃OD e 14,1 T.



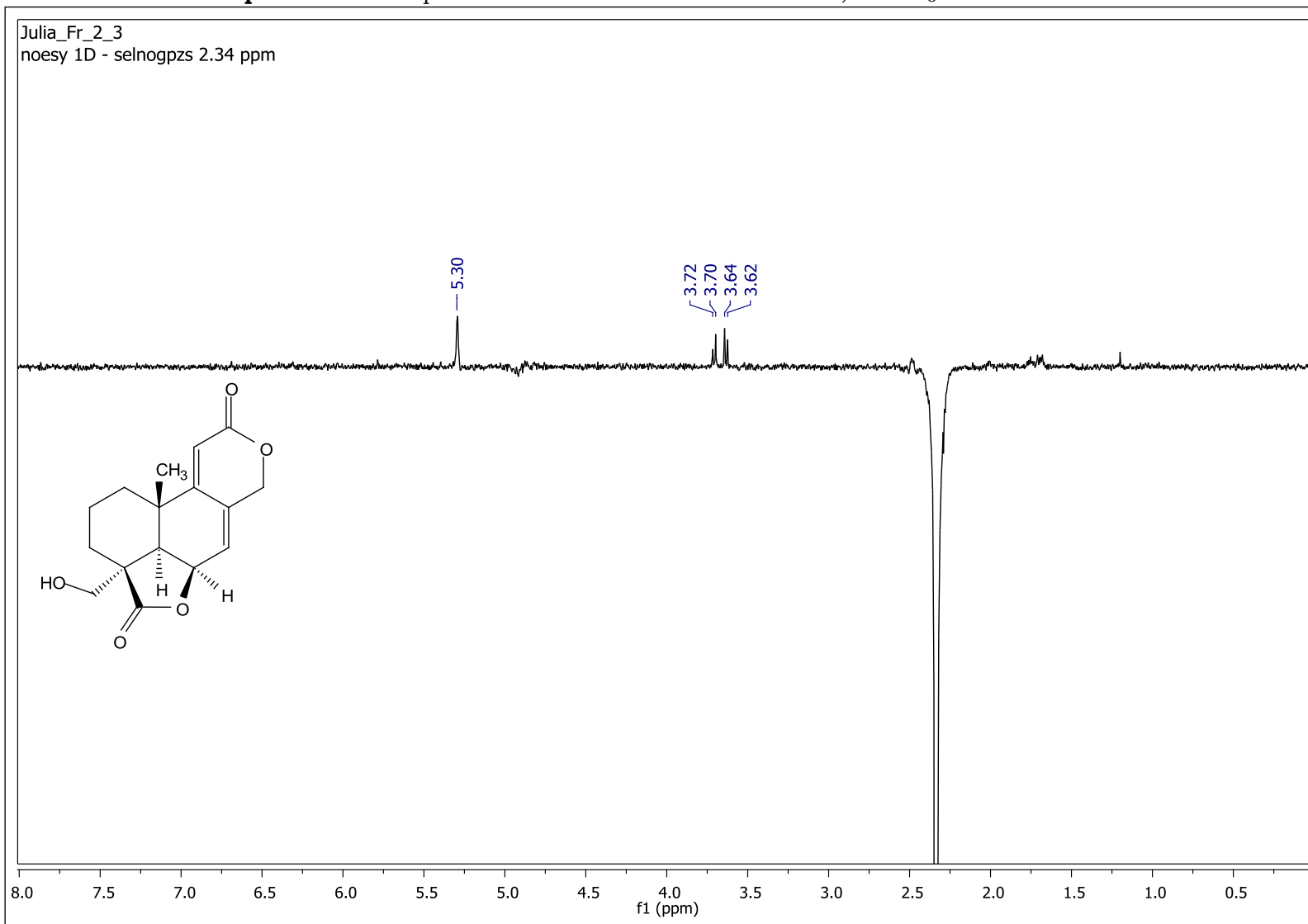
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 37 – Mapa de contorno de HMBC da substância **02**, em CD₃OD e 14,1 T.

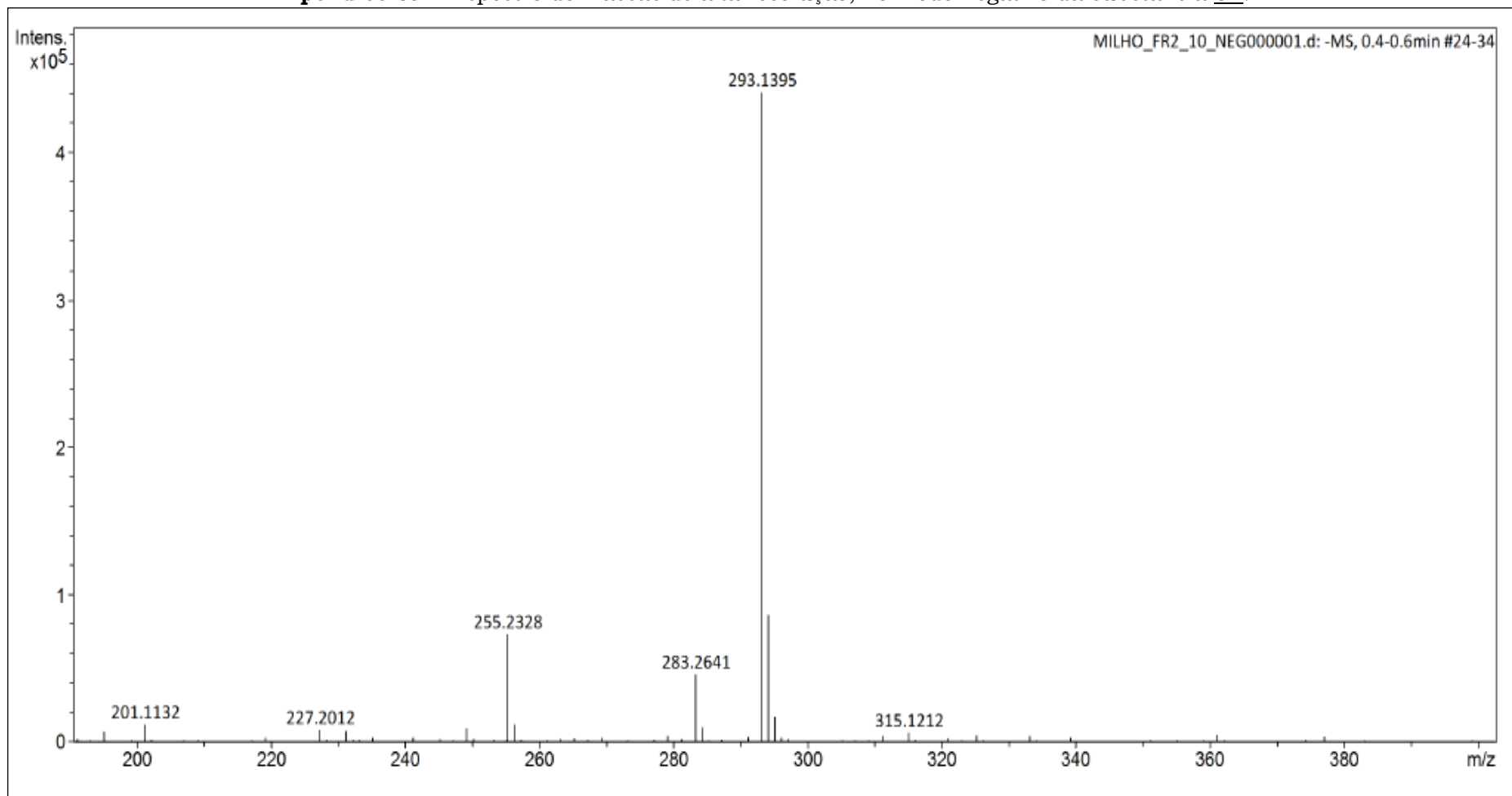


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 38 – Espectro de NOESY 1D da substância **02**, em CD₃OD e 600 MHz.

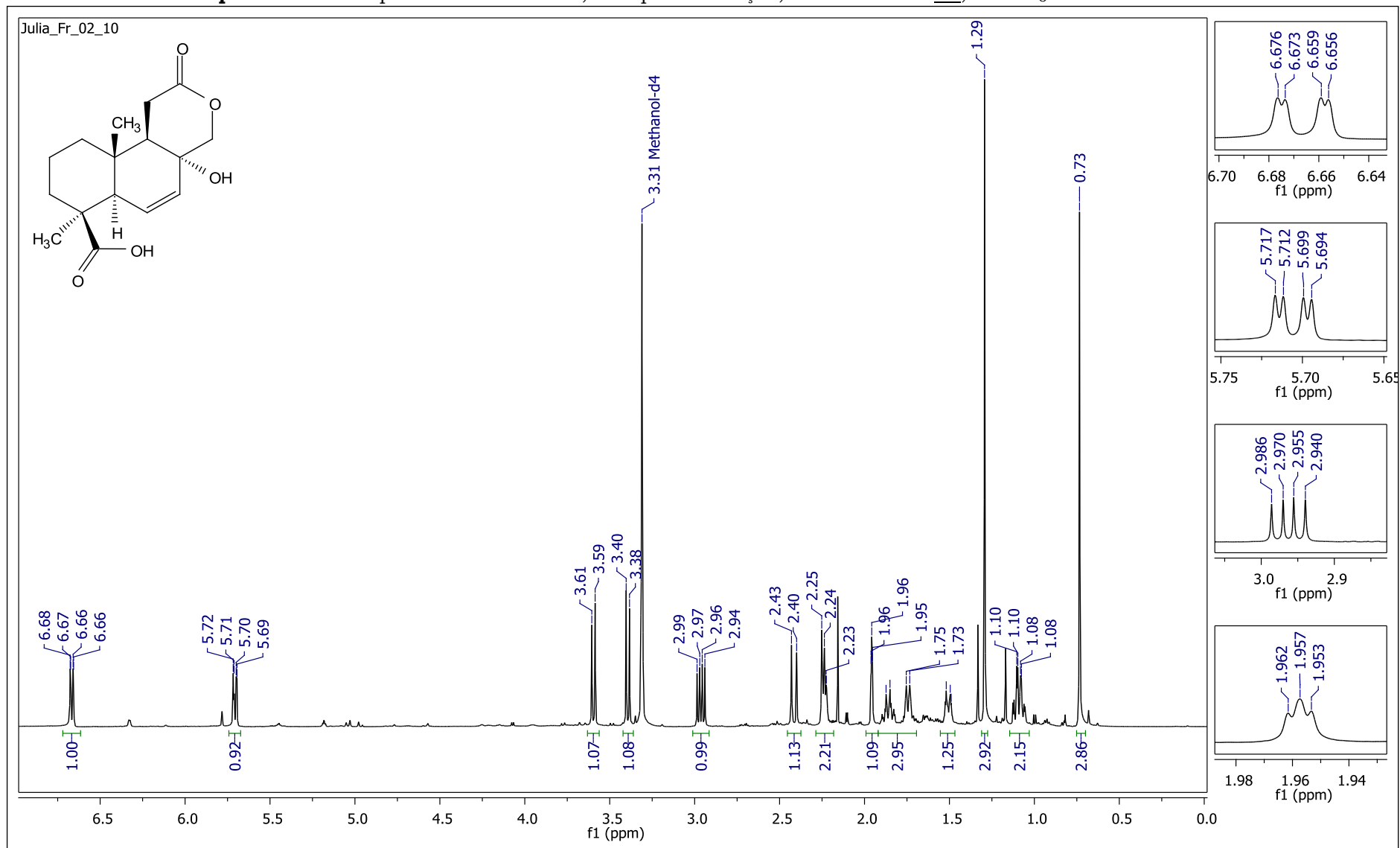


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 39 – Espectro de Massas de alta resolução, no modo negativo da substância **07**.

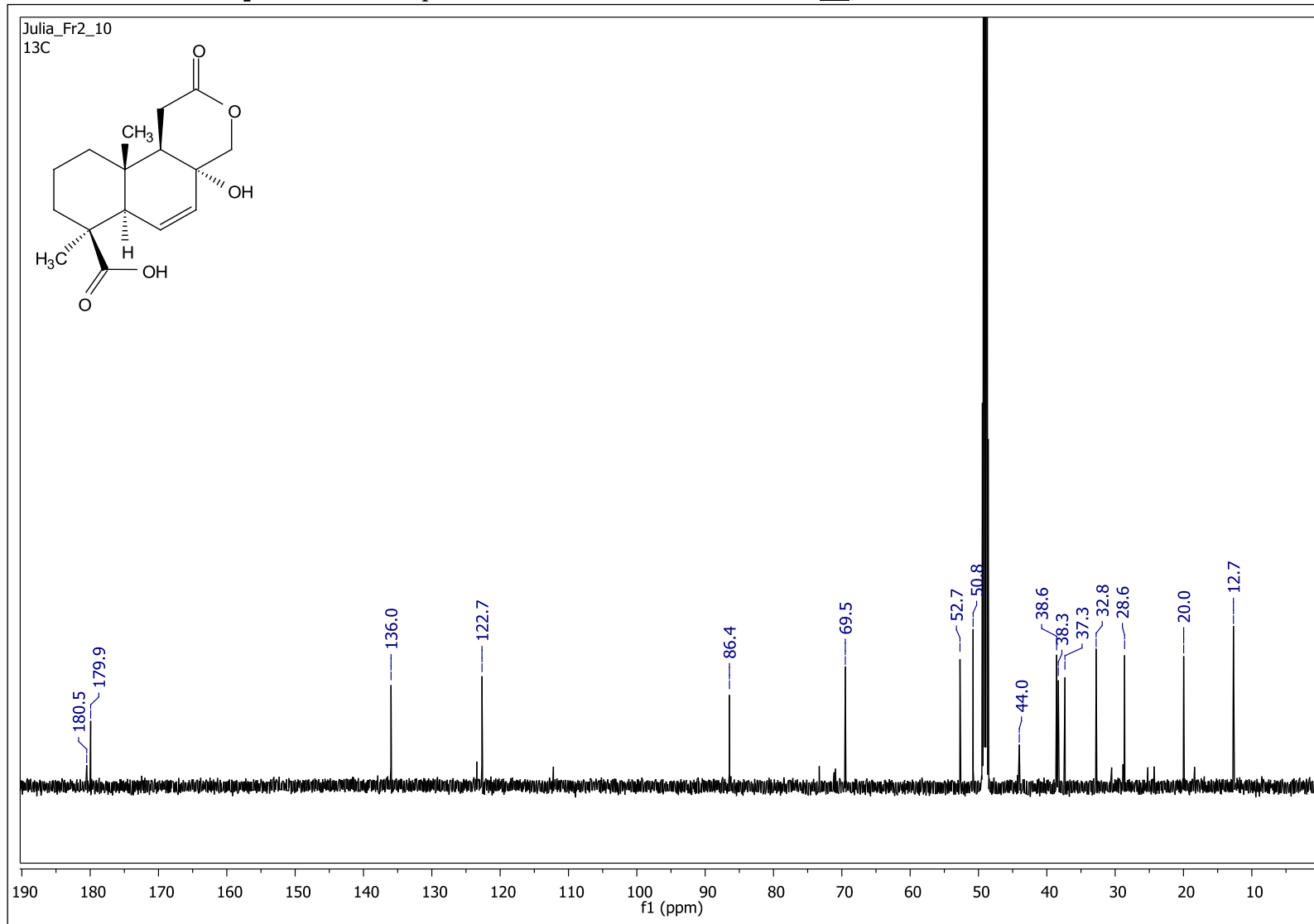
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 40 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **07**, em CD_3OD e 600 MHz.



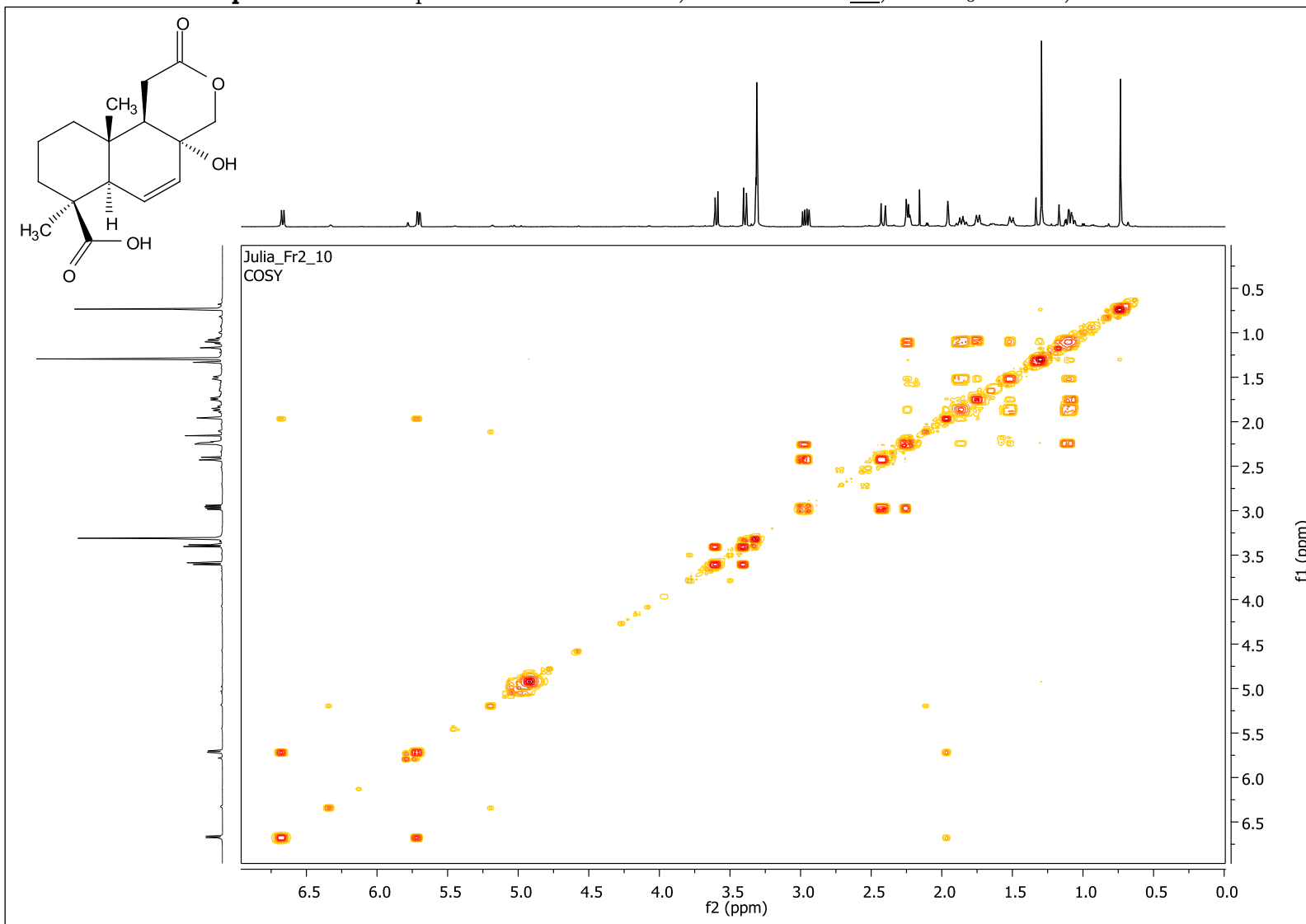
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 41 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **07**, em CD_3OD e 150 MHz.



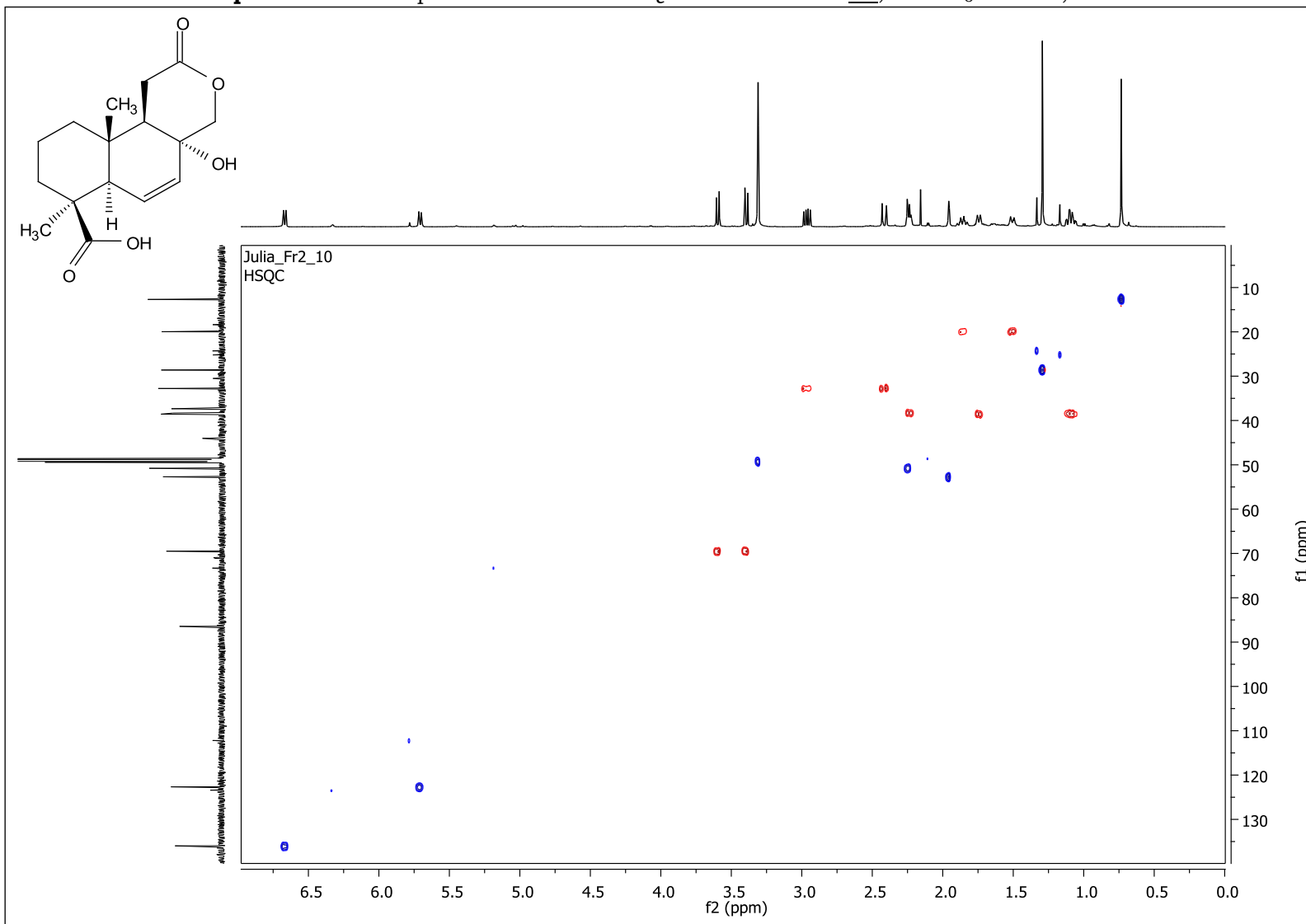
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 42 – Mapa de contorno de COSY, da substância **07**, em CD₃OD e 14,1 T.



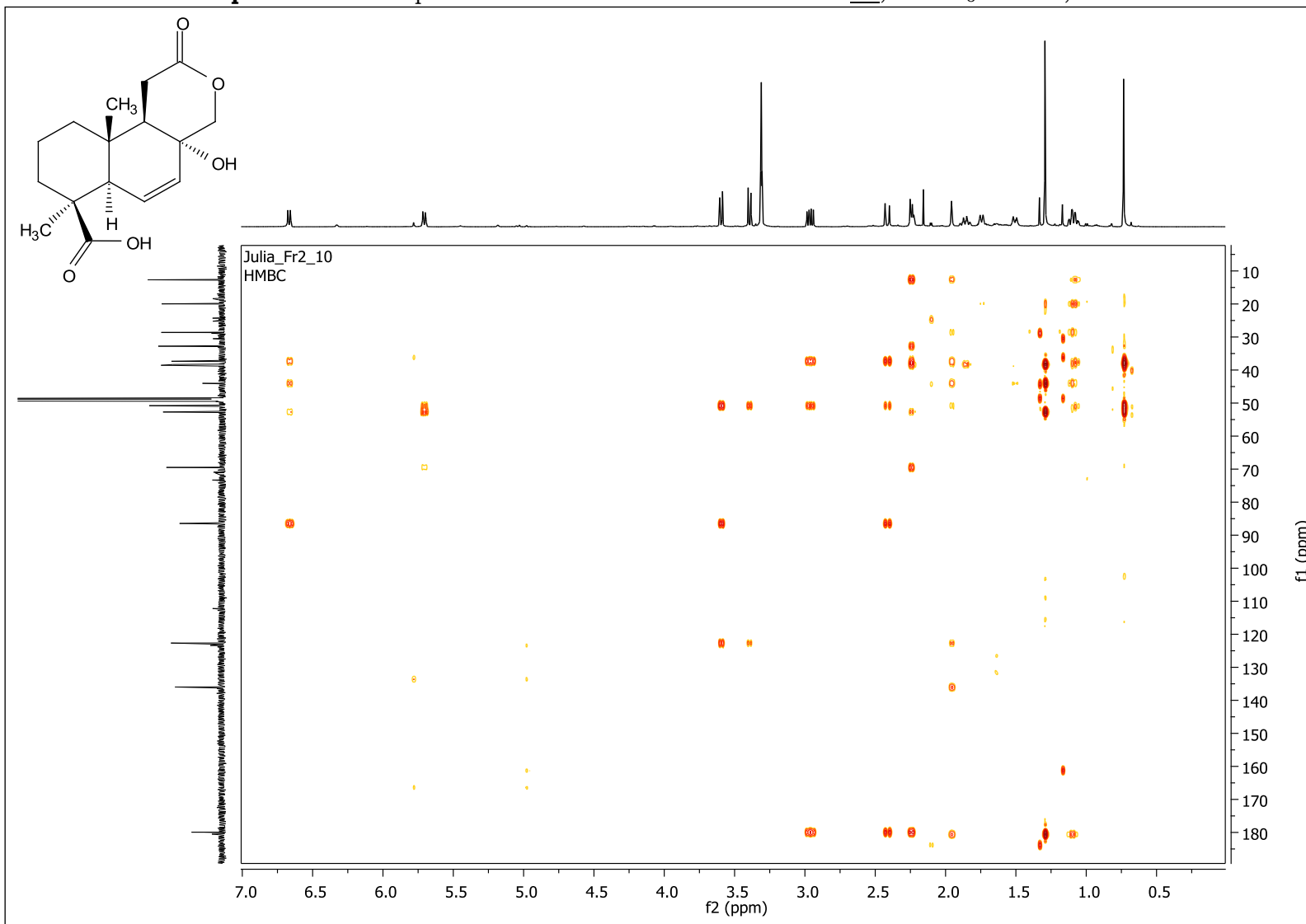
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 43 – Mapa de contorno de HSQC da substância **07**, em CD₃OD e 14,1 T.



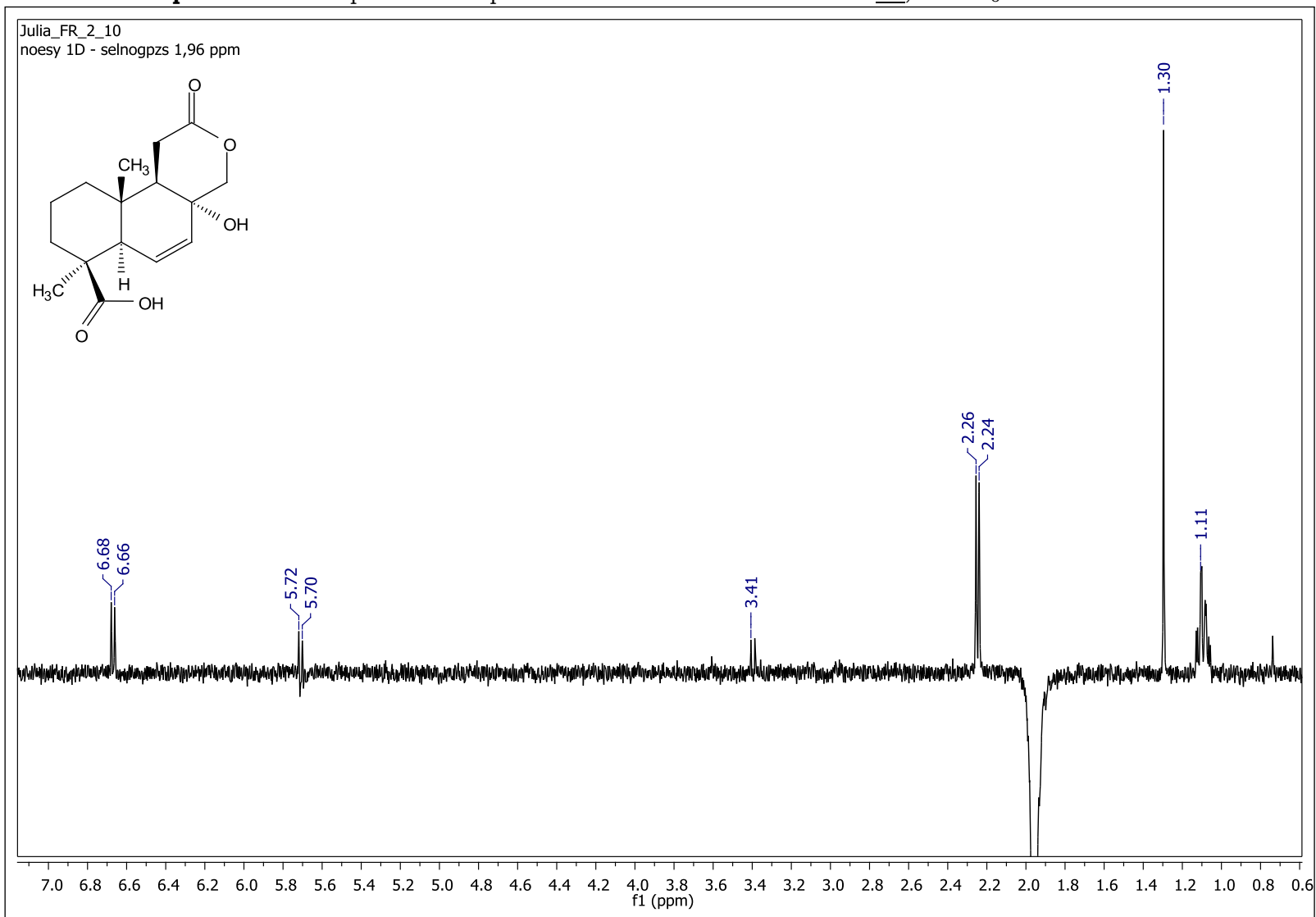
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 44 – Mapa de contorno de HMBC da substância **07**, em CD₃OD e 14,1 T.



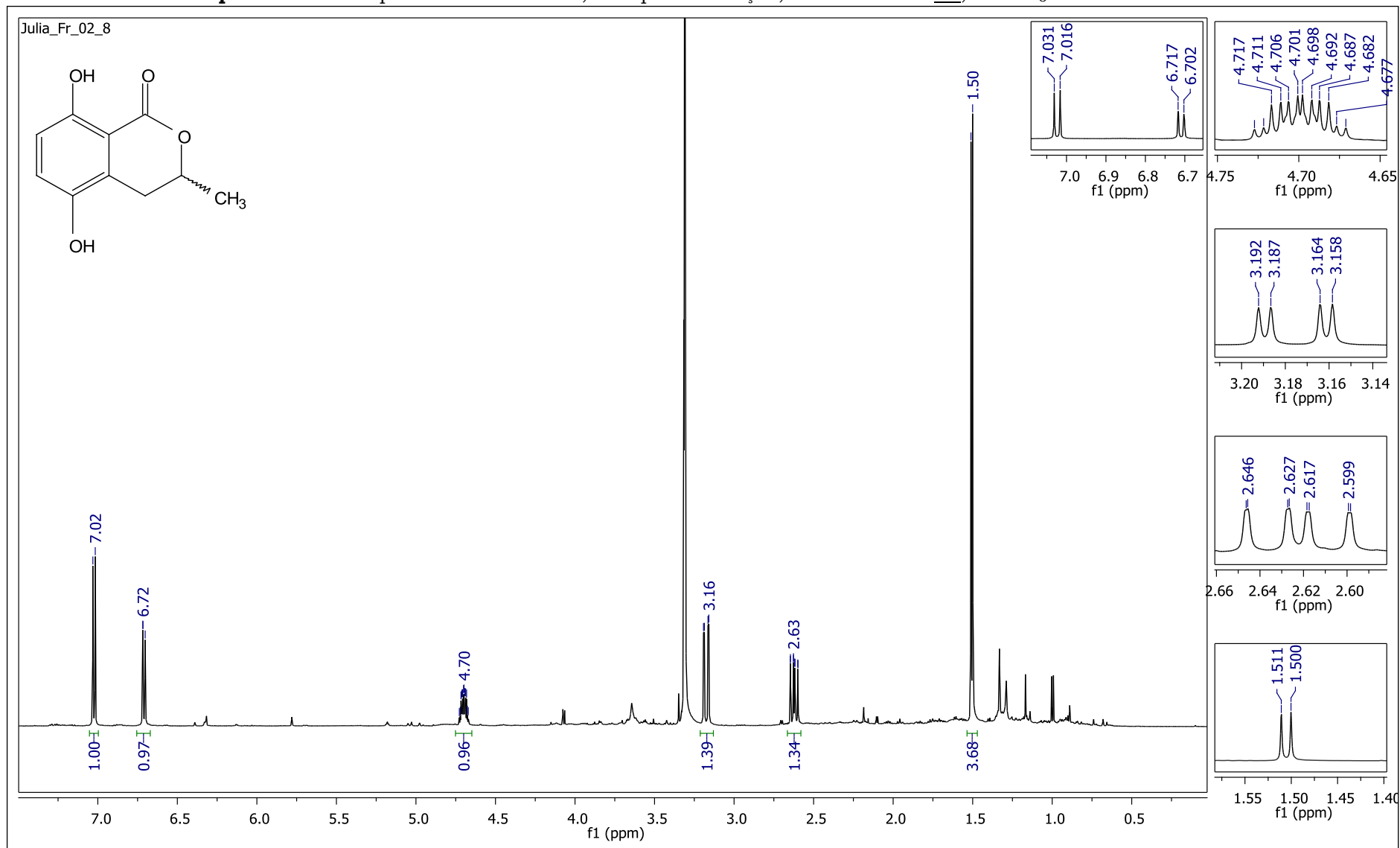
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 45 – Expansão do espectro de NOESY 1D da substância **07**, em CD₃OD e 600 MHz.



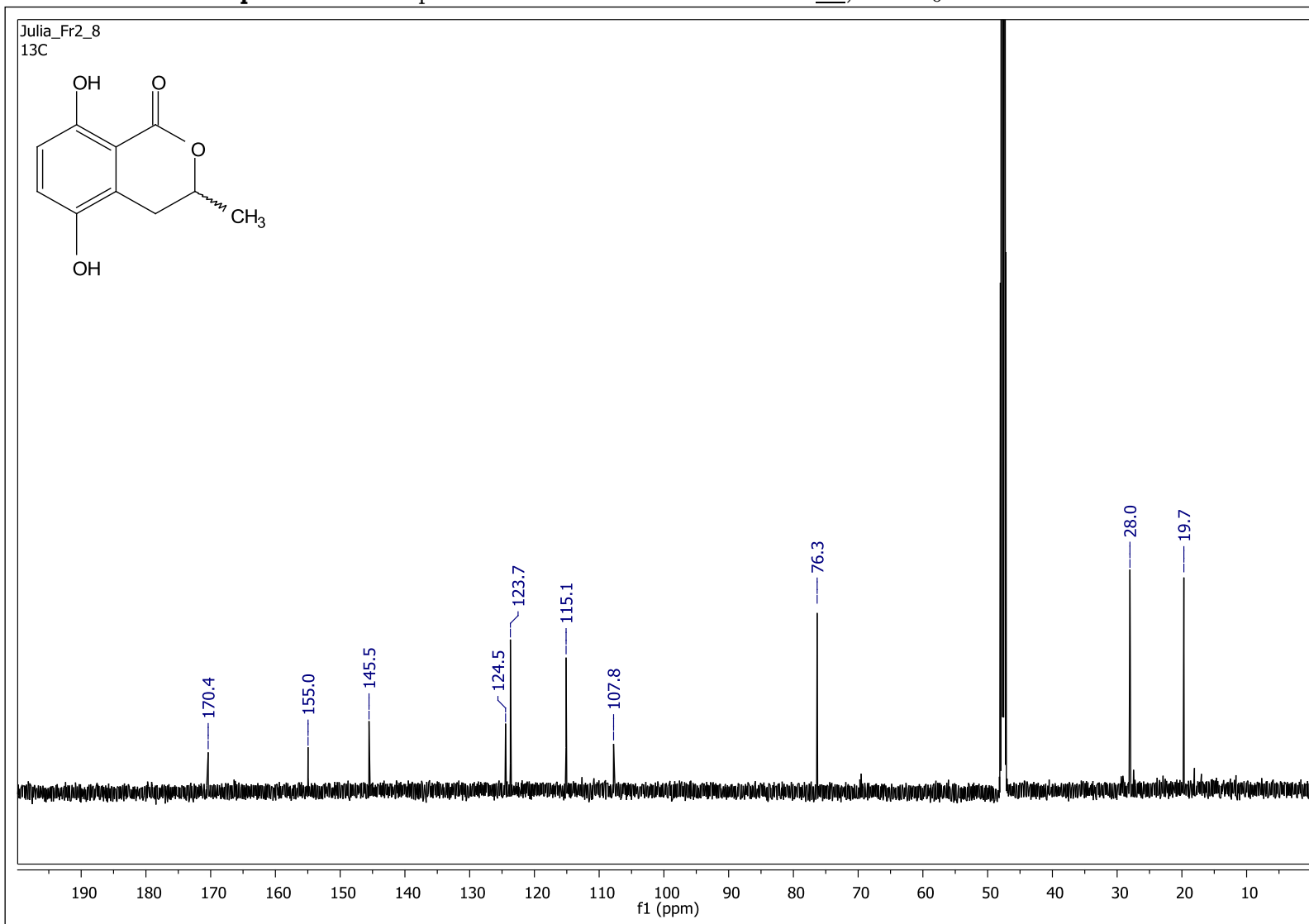
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 46 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **05**, em CD_3OD e 600 MHz.



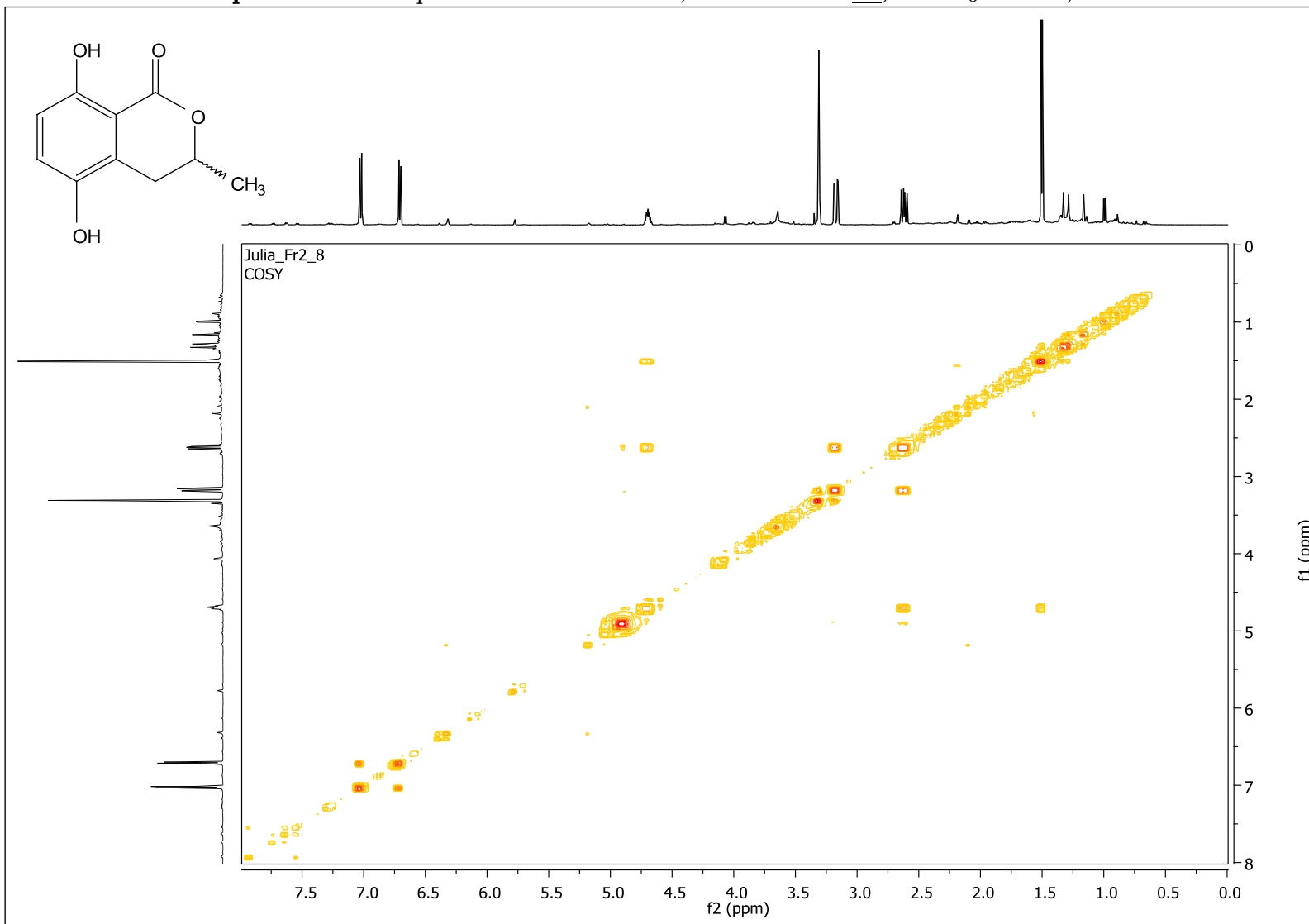
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 47 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 05, em CD_3OD e 150 MHz.



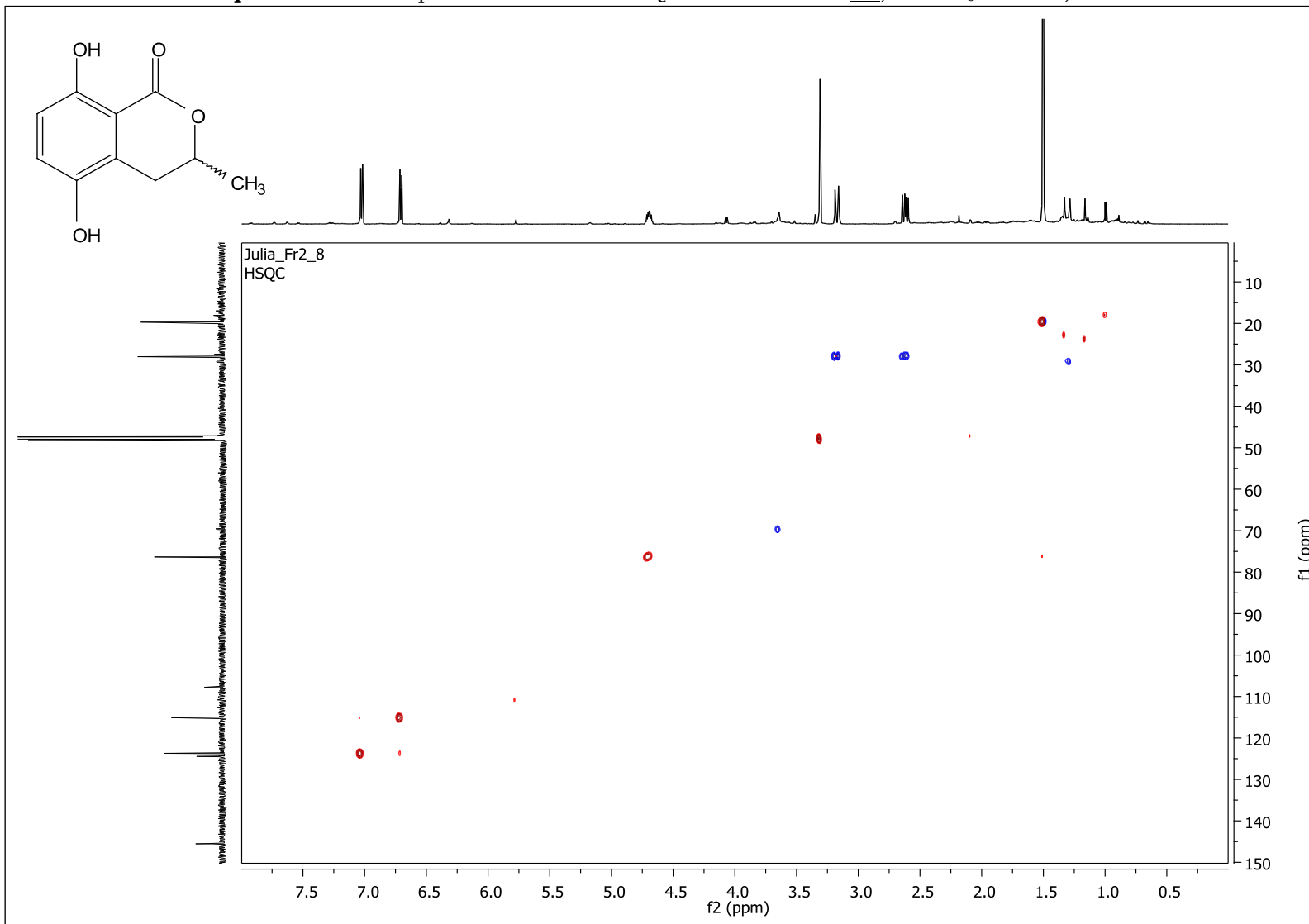
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 48 – Mapa de contorno de COSY, da substância **05**, em CD₃OD e 14,1 T.



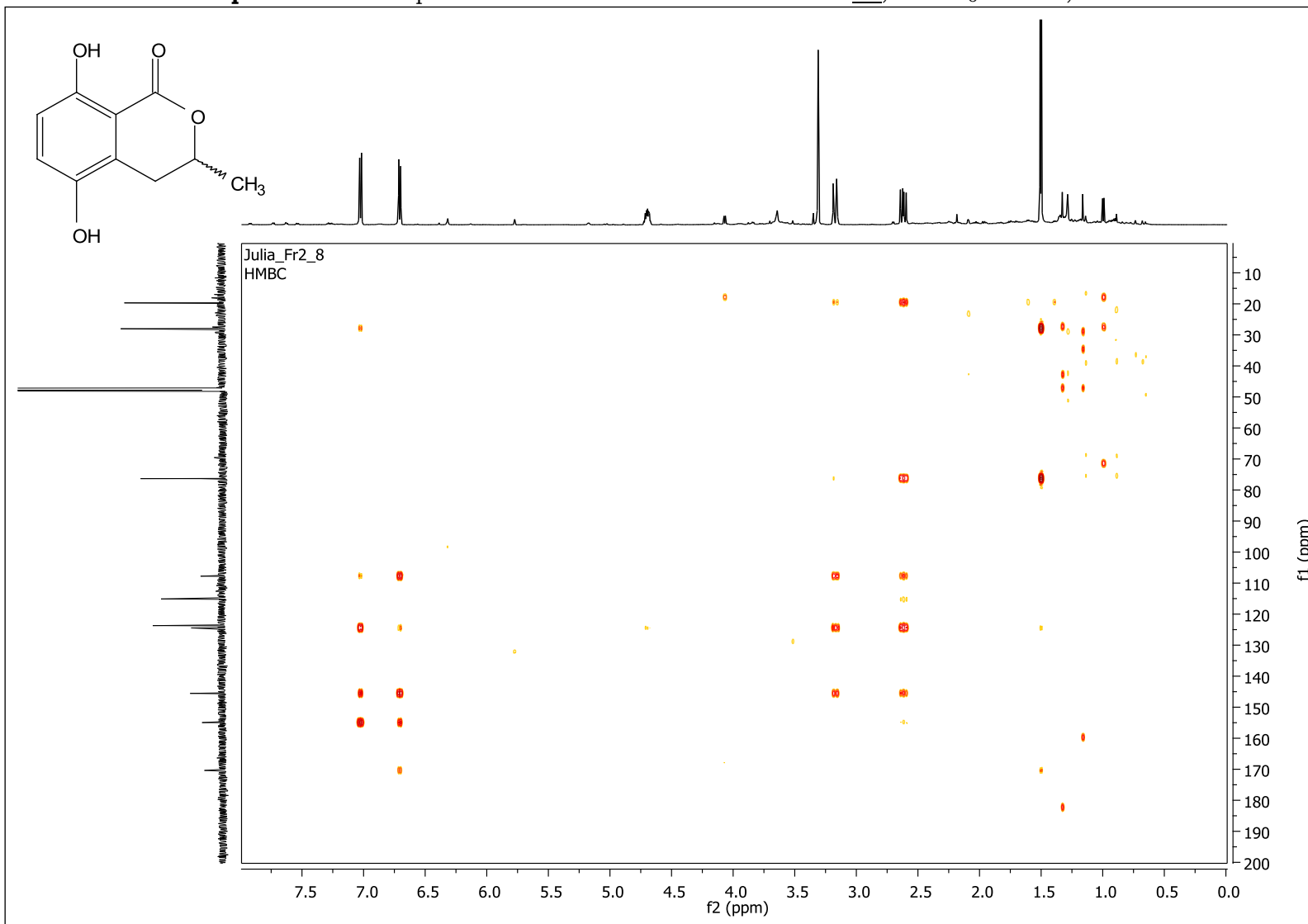
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 49 – Mapa de contorno de HSQC da substância **05**, em CD₃OD e 14,1 T.



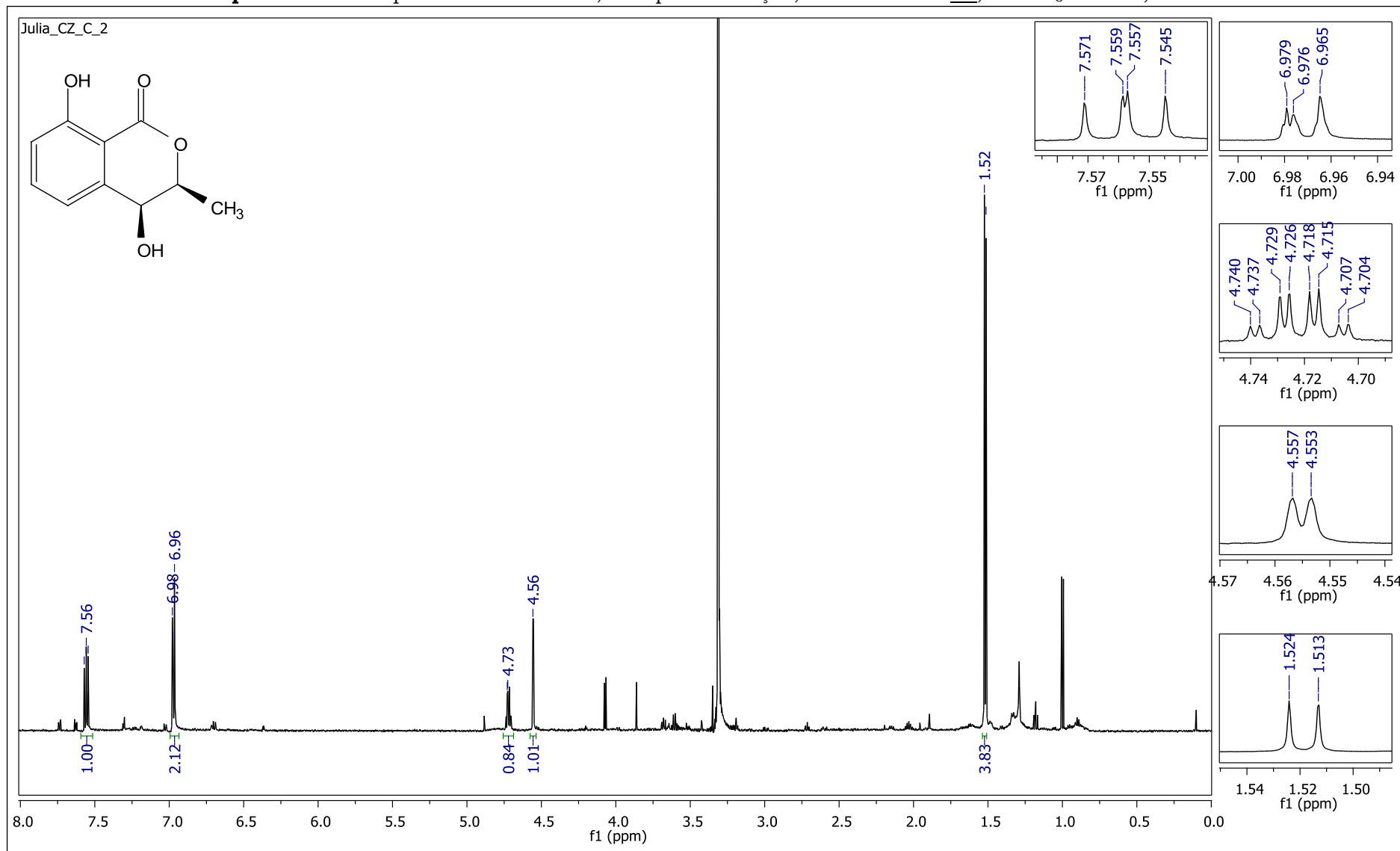
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 50 – Mapa de contorno de HMBC da substância **05**, em CD₃OD e 14,1 T.



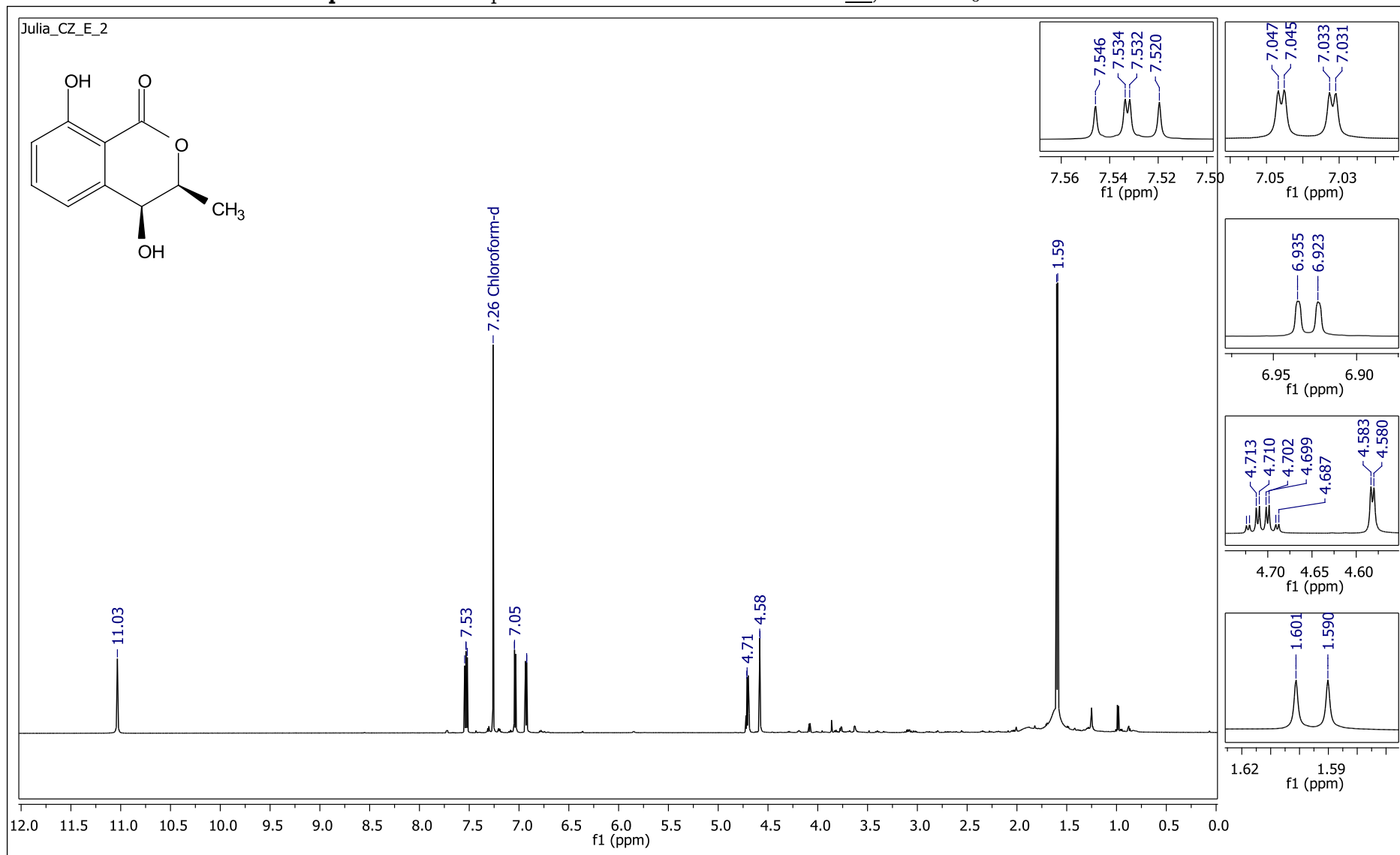
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 51 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **08**, em CD_3OD e 14,1 T.



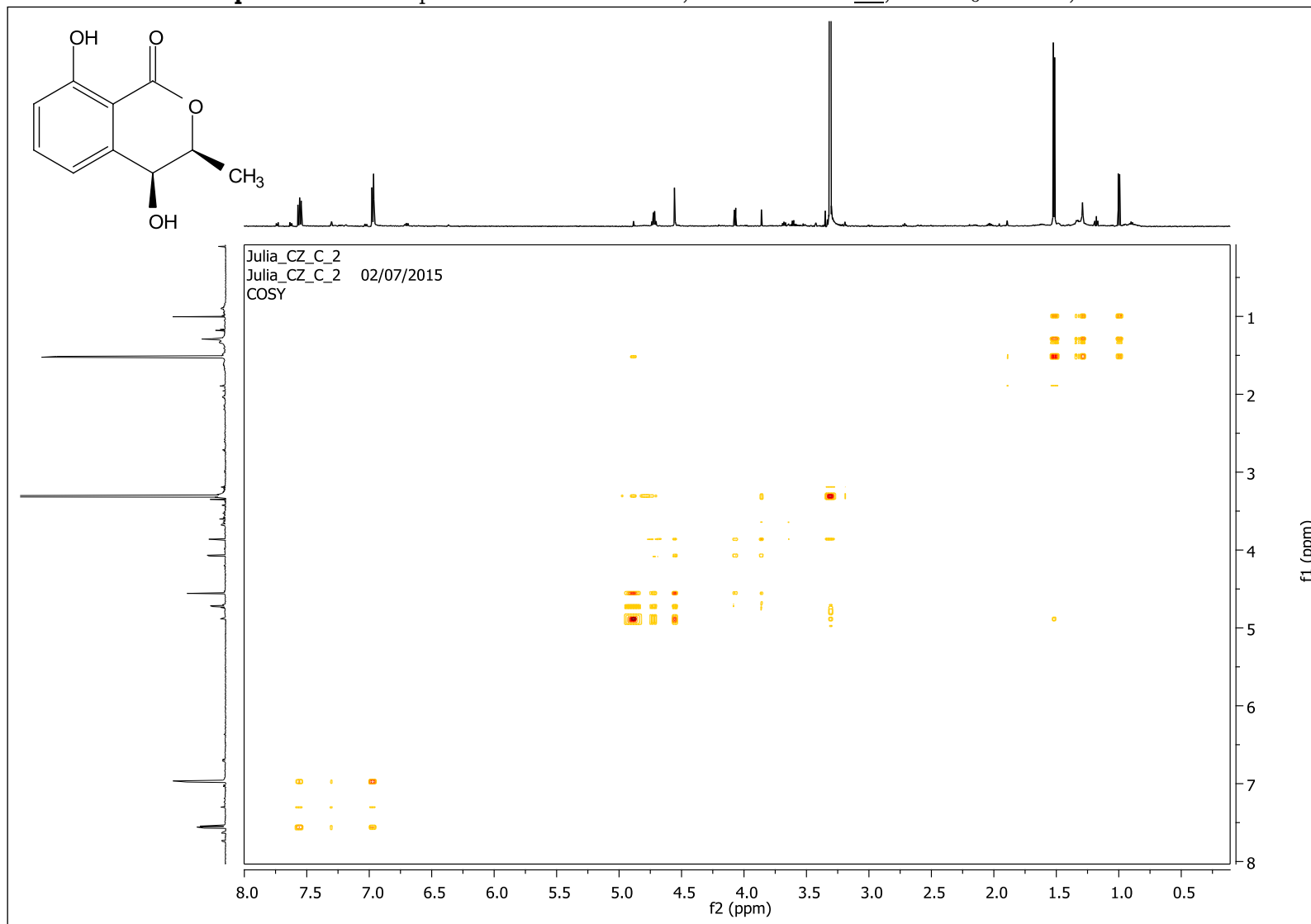
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 52 – Espectro de RMN de ^1H da substância **08**, em CDCl_3 e 600 MHz.



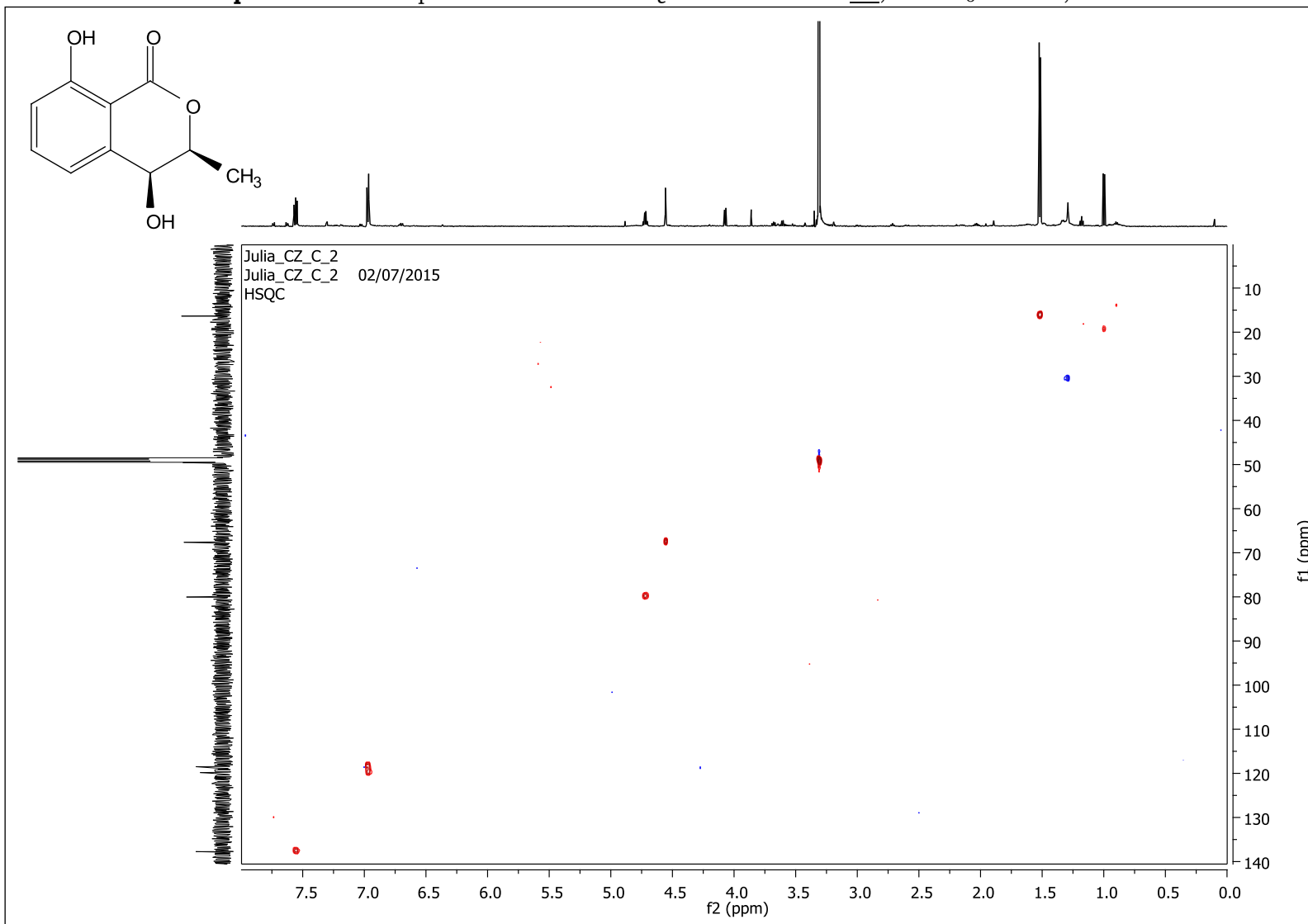
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 53 – Mapa de contorno de COSY, da substância **08**, em CD₃OD e 14,1 T.



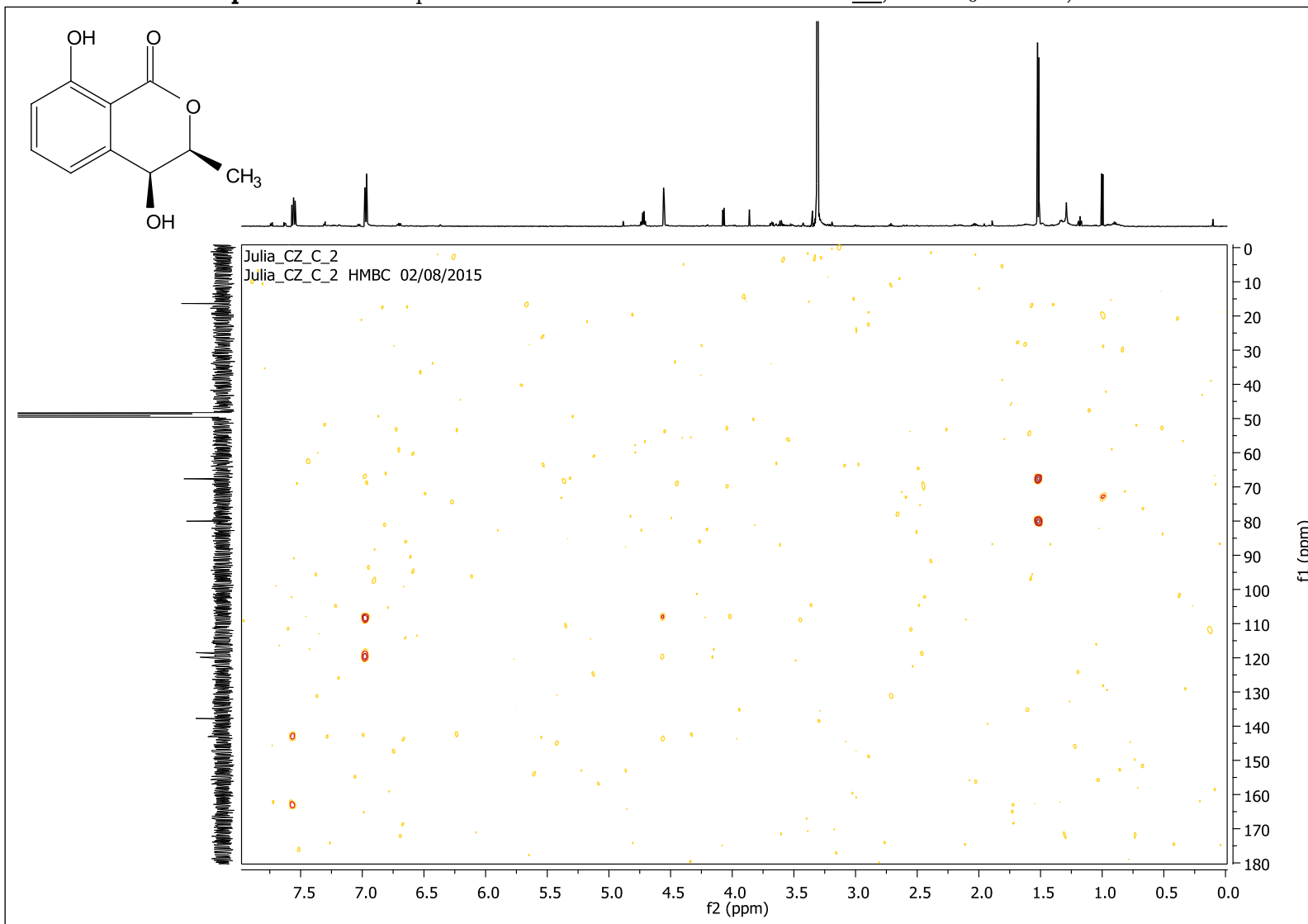
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 54 – Mapa de contorno de HSQC da substância **08**, em CD₃OD e 14,1 T.



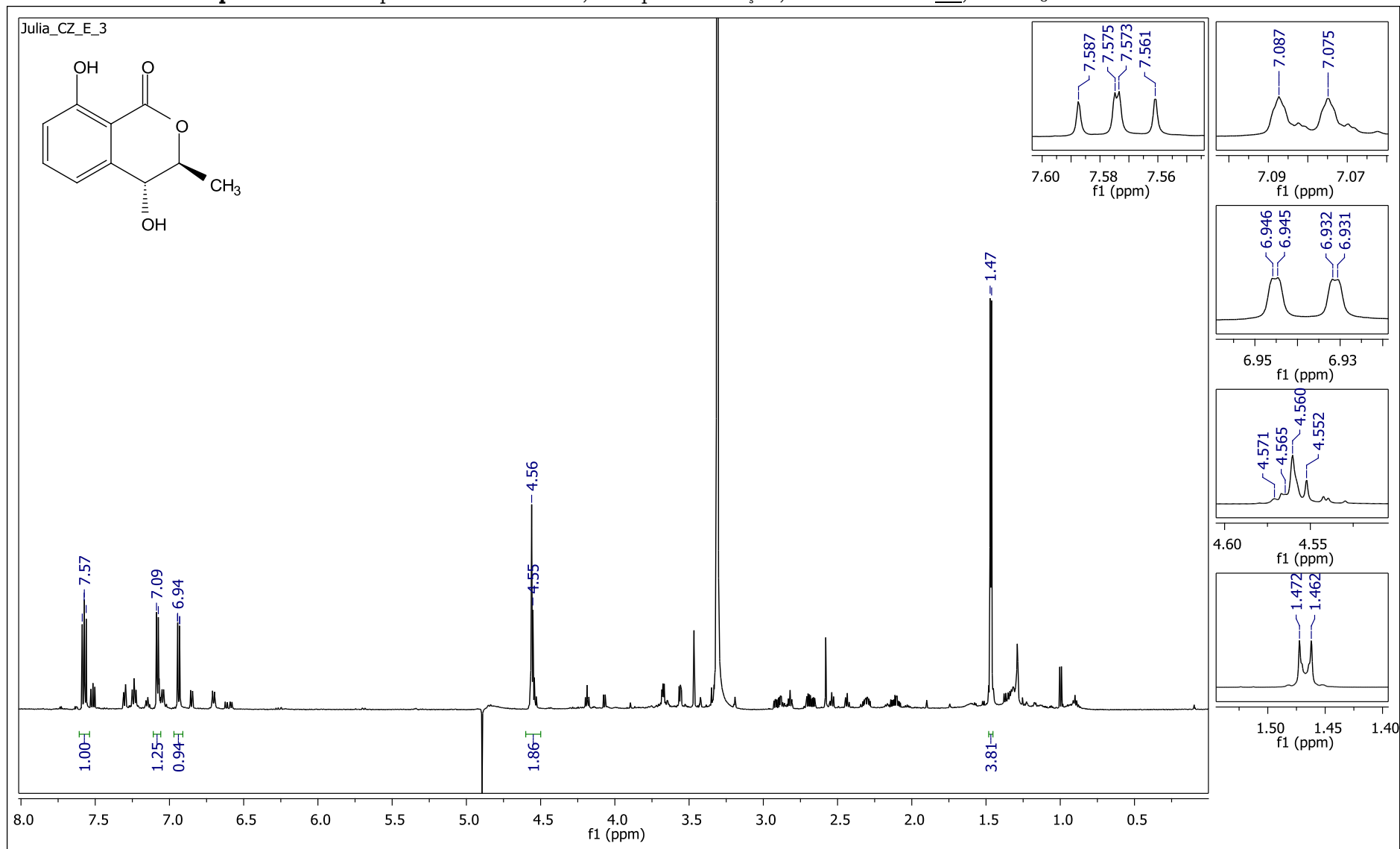
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 55 – Mapa de contorno de HMBC da substância **08**, em CD₃OD e 14,1 T.



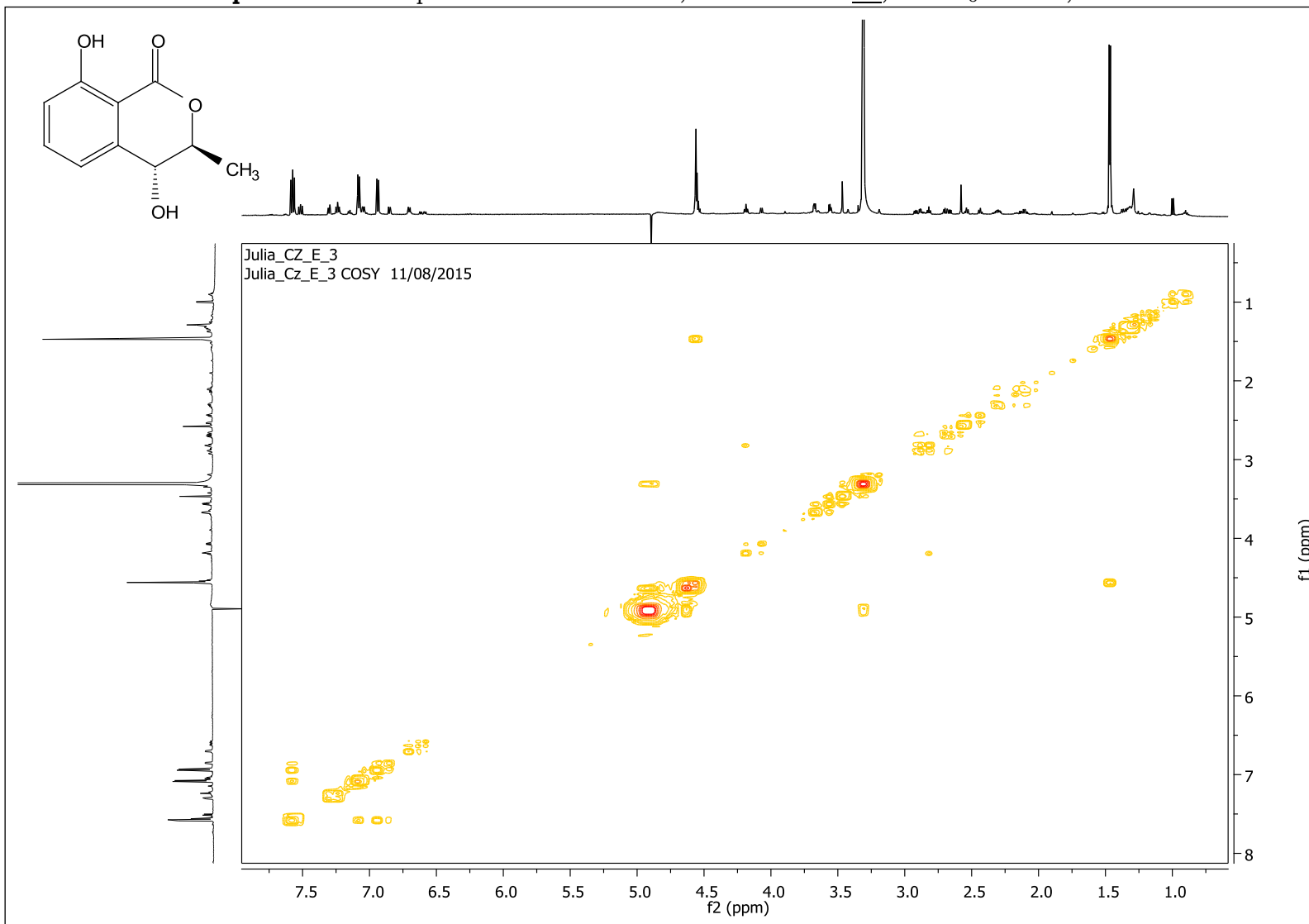
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 56 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **11**, em CD_3OD e 600 MHz.



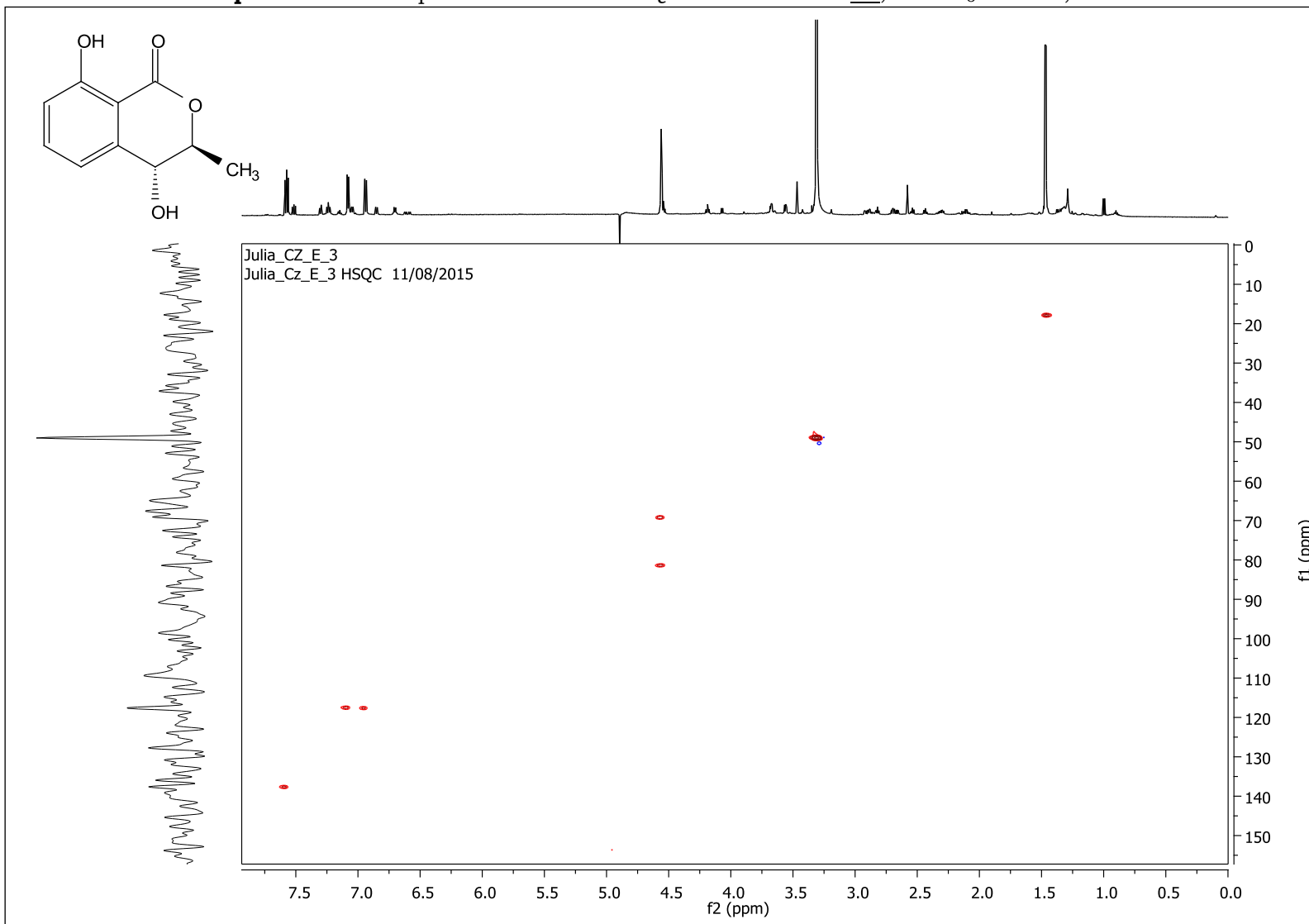
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 57 – Mapa de contorno de COSY, da substância **11**, em CD₃OD e 14,1 T.



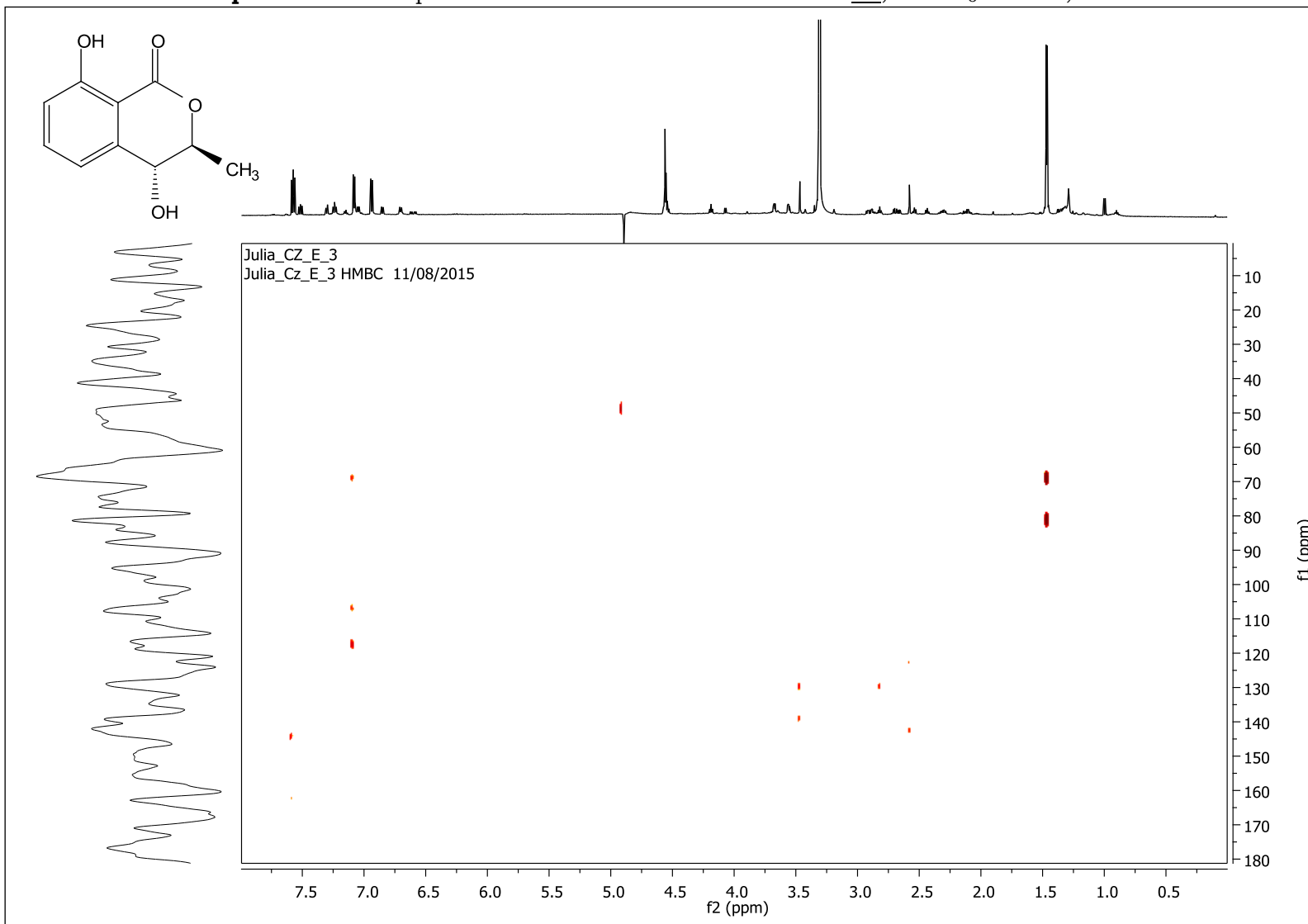
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 58 – Mapa de contorno de HSQC da substância **11**, em CD₃OD e 14,1 T.



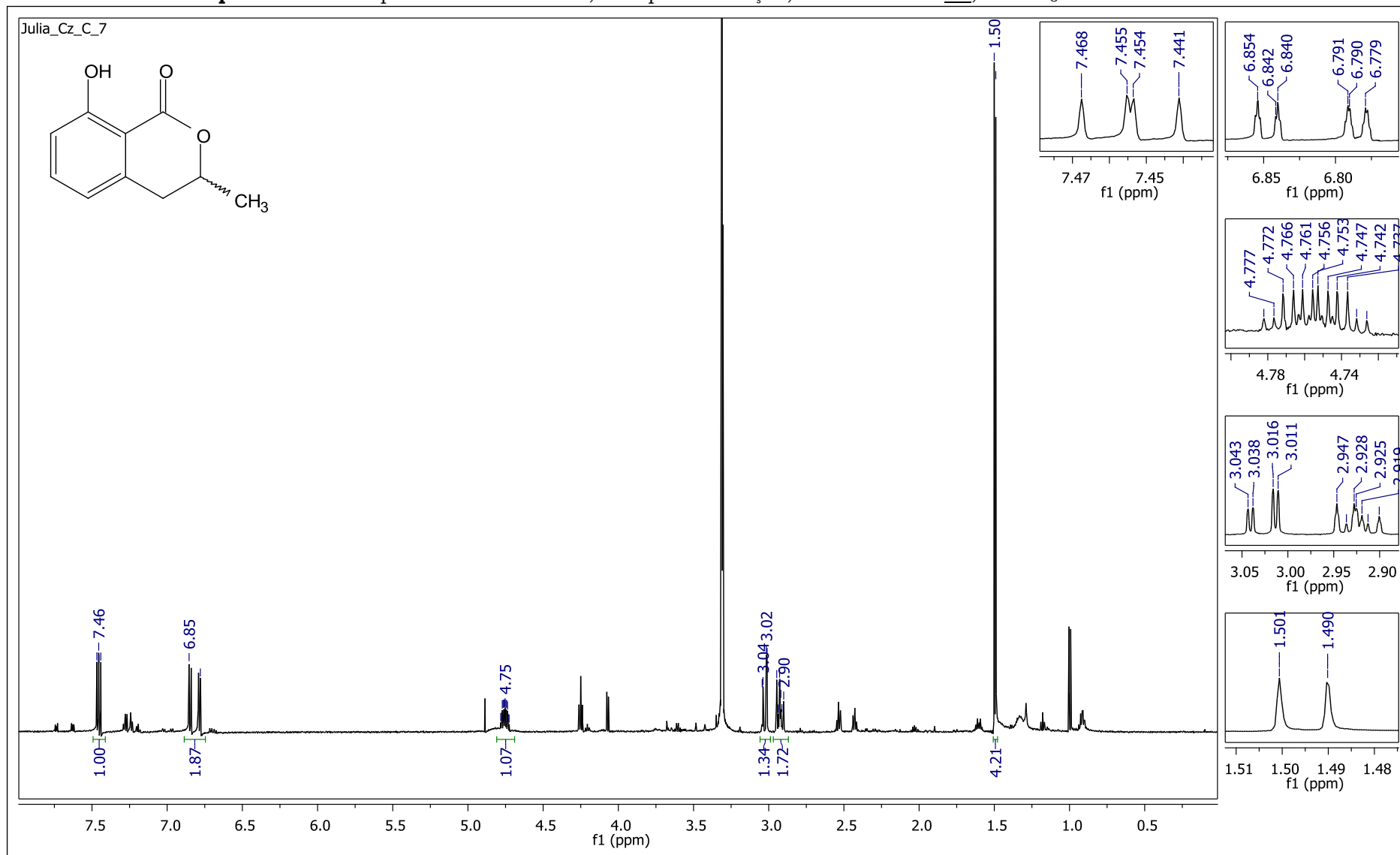
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 59 – Mapa de contorno de HMBC da substância **11**, em CD₃OD e 14,1 T.



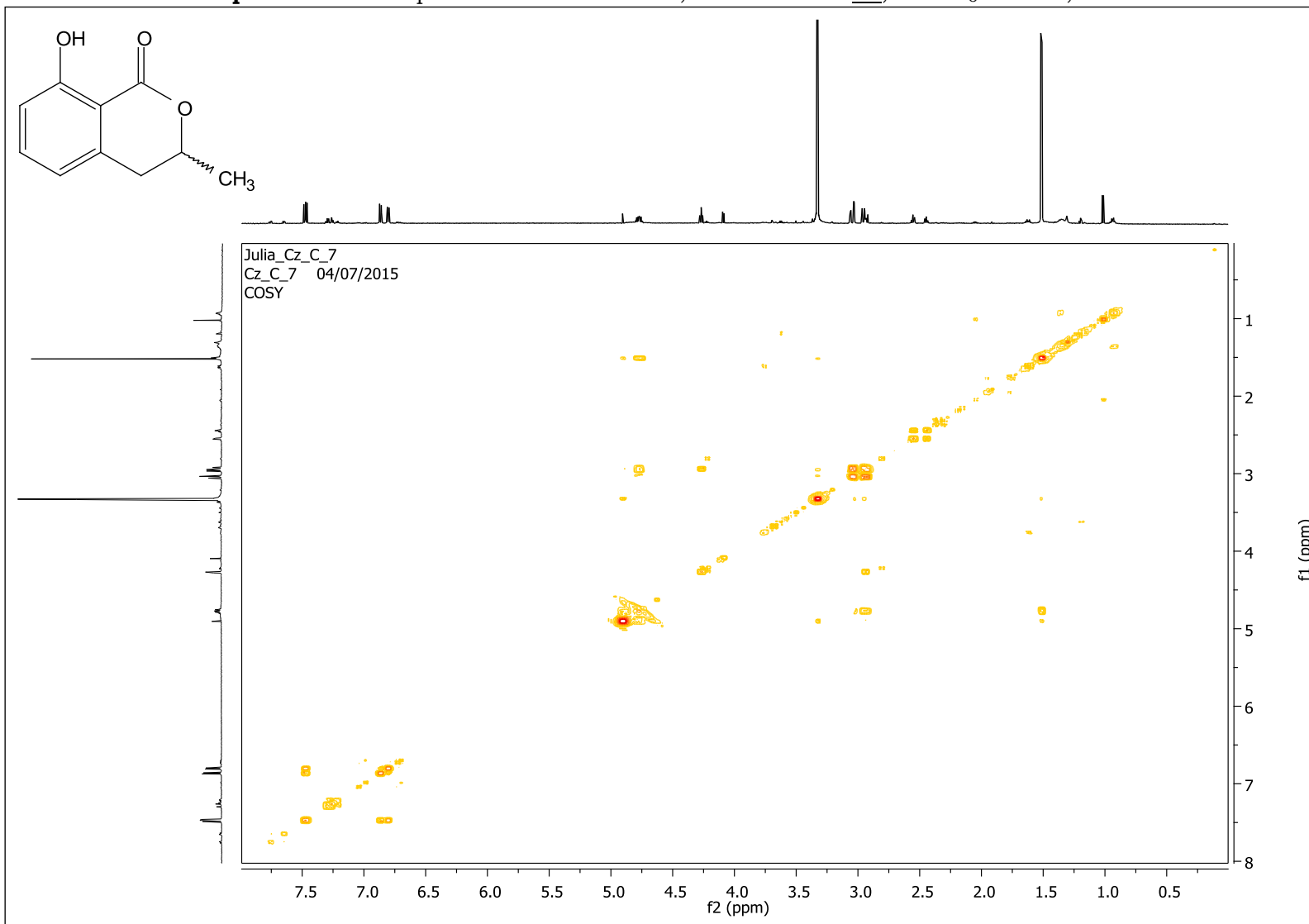
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 60 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **09**, em CD_3OD e 600 MHz.



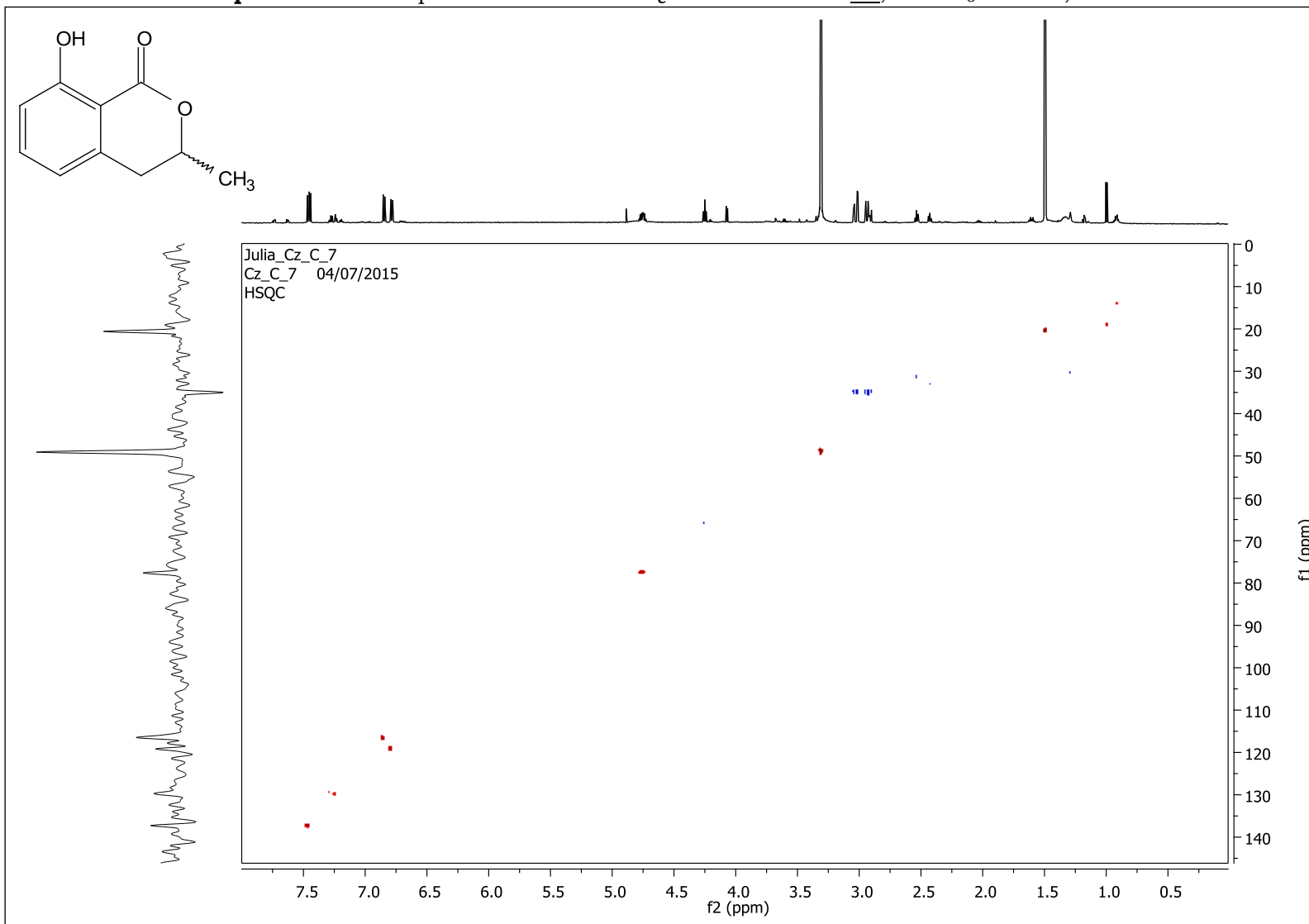
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 61 – Mapa de contorno de COSY, da substância **09**, em CD₃OD e 14,1 T.



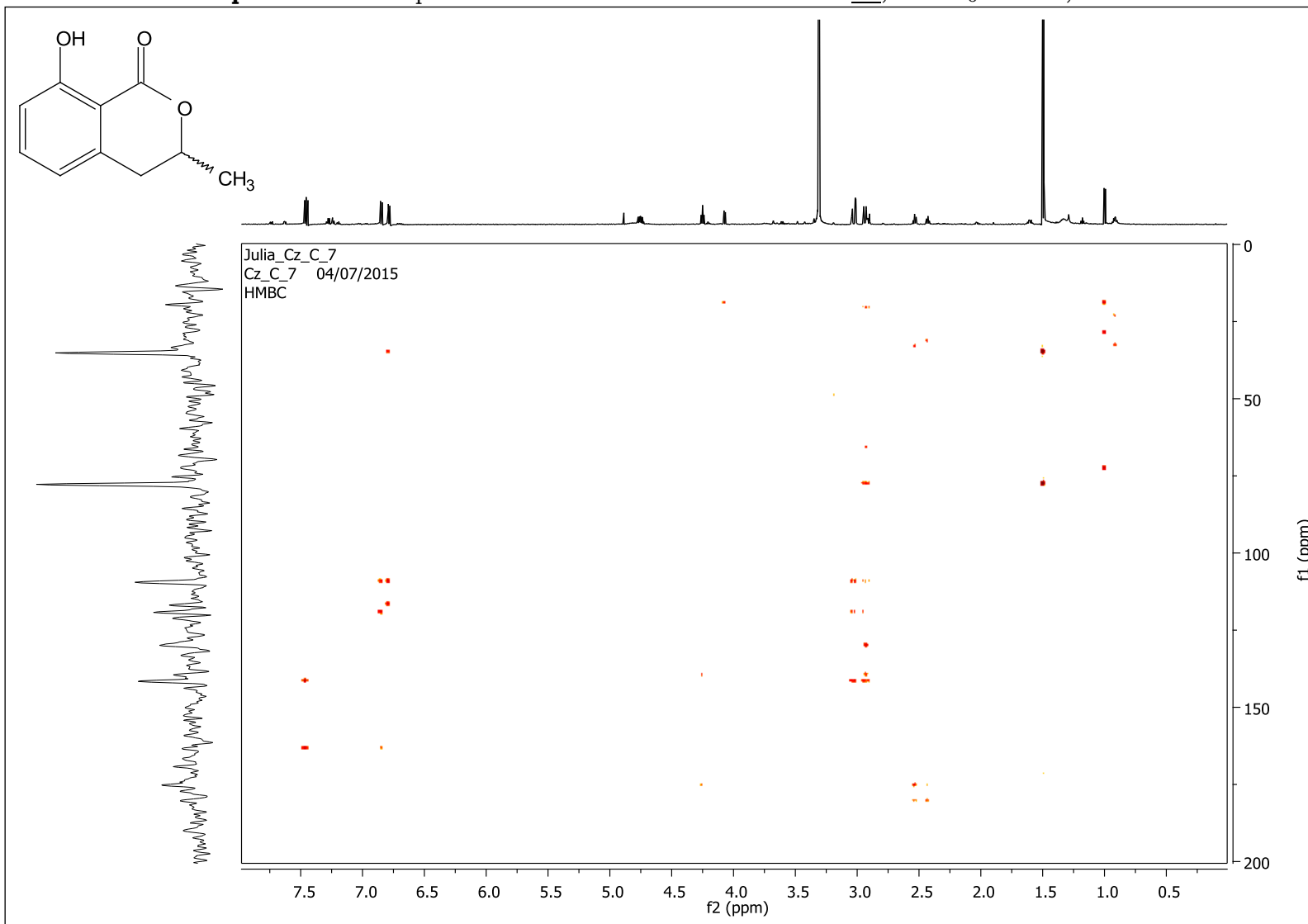
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 62 – Mapa de contorno de HSQC da substância **09**, em CD₃OD e 14,1 T.



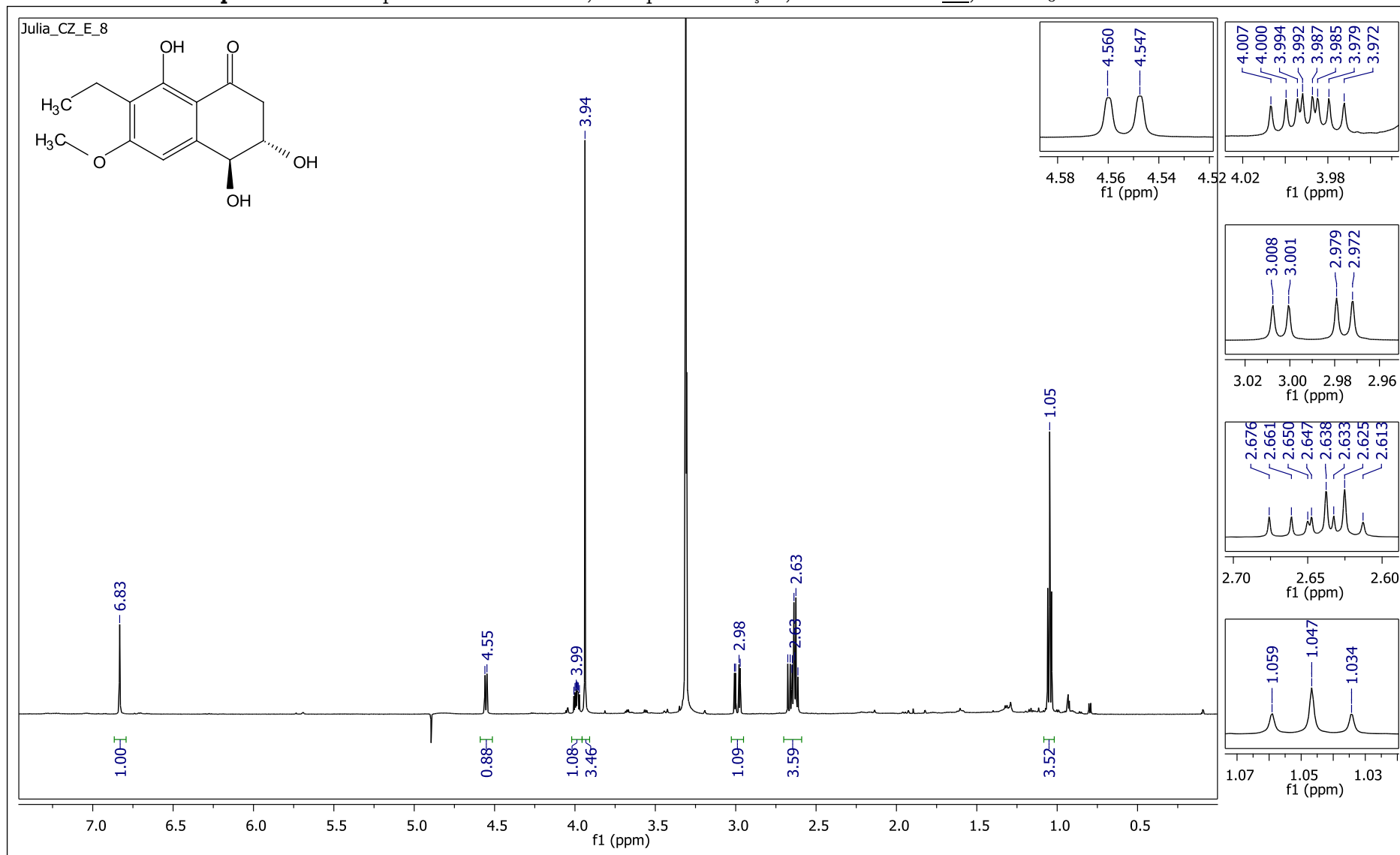
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 63 – Mapa de contorno de HMBC da substância **09**, em CD₃OD e 14,1 T.



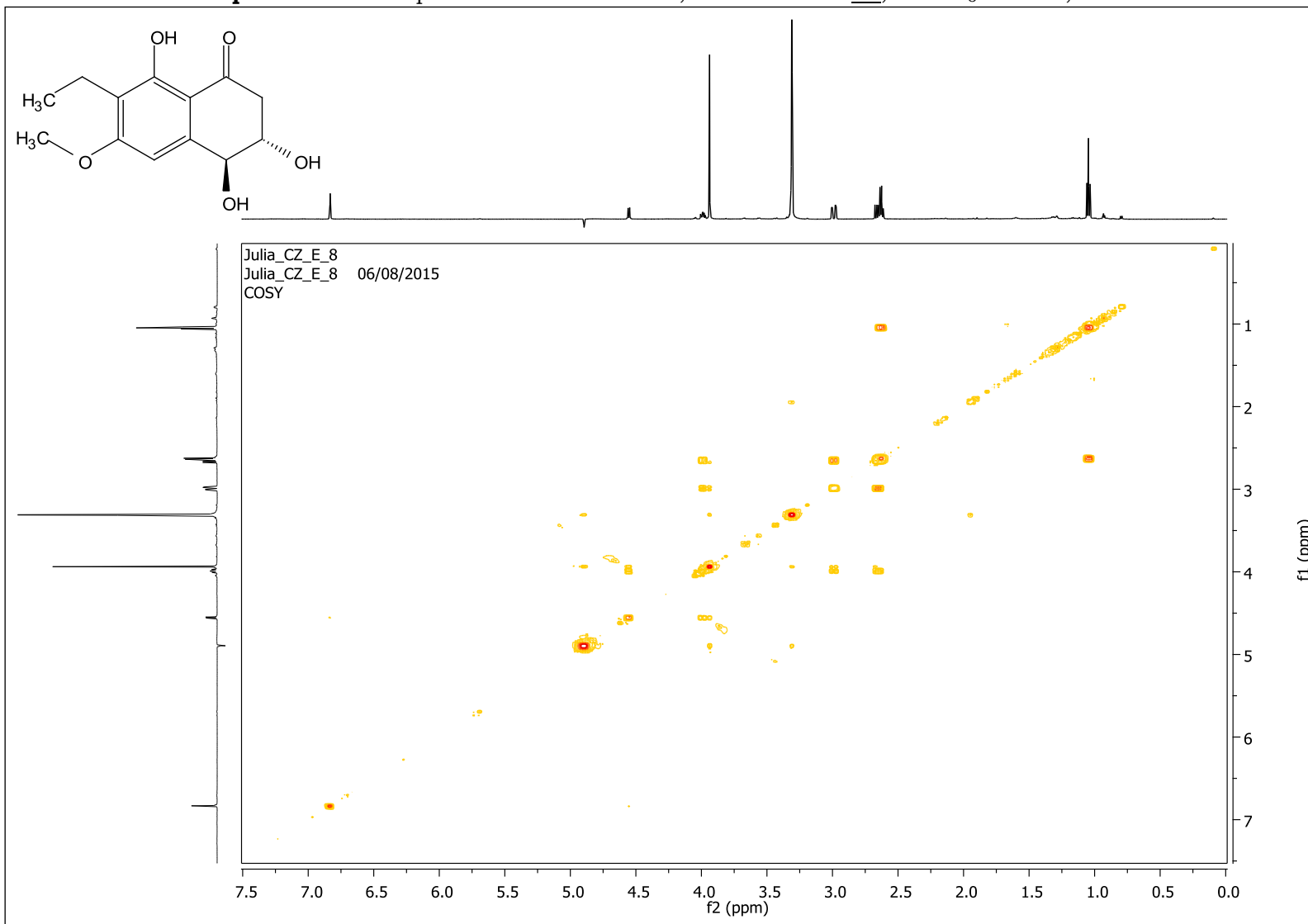
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 64 – Espectro de RMN de ^1H , com pressaturação, da substância **12**, em CD_3OD e 600 MHz.



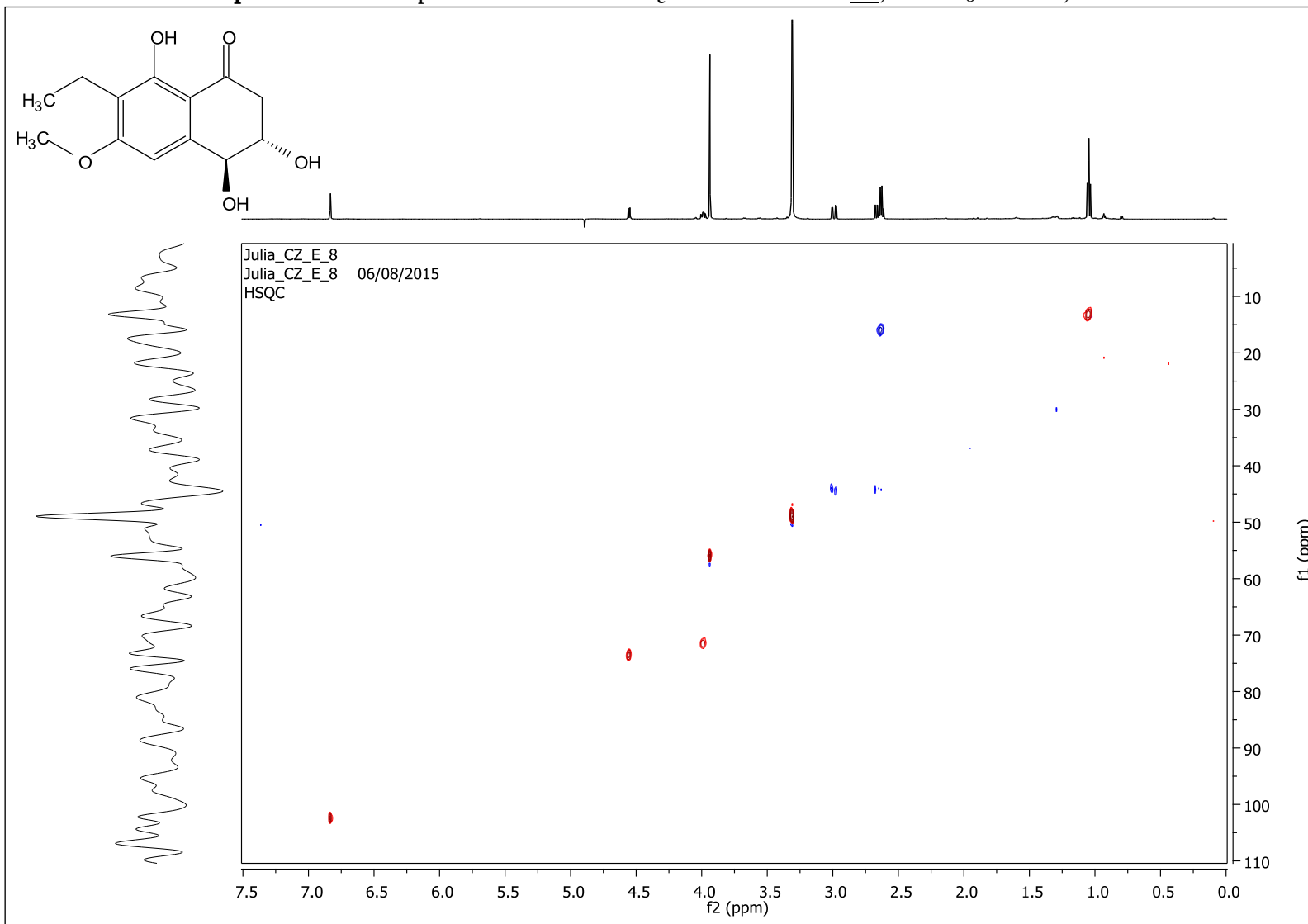
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 65 – Mapa de contorno de COSY, da substância **12**, em CD₃OD e 14,1 T.



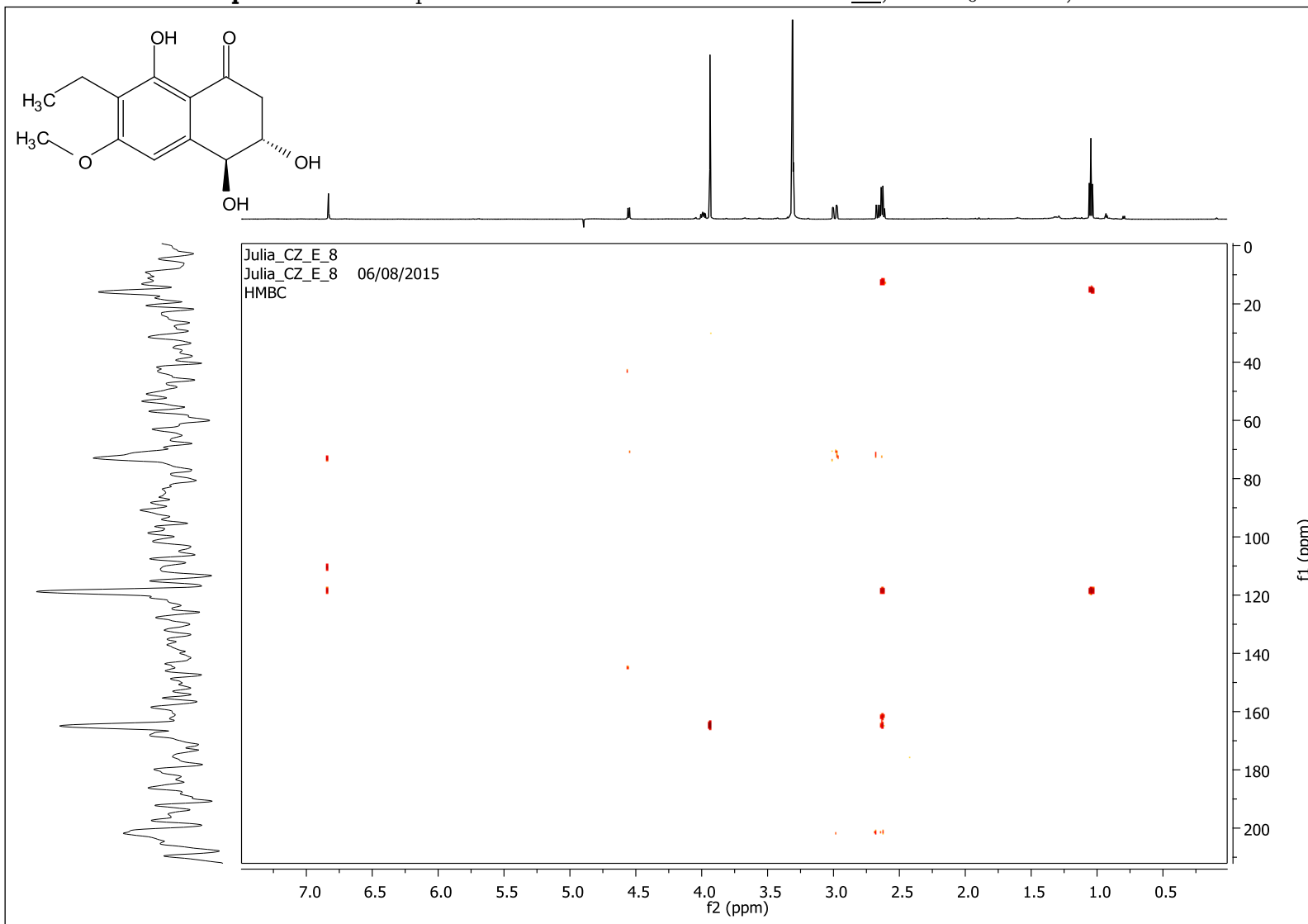
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 66 – Mapa de contorno de HSQC da substância **12**, em CD₃OD e 14,1 T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.

Apêndice 67 – Mapa de contorno de HMBC da substância **12**, em CD₃OD e 14,1 T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2016.