

## ERIKA THALYTA VERAS PEREIRA

Bioprospecção do fungo endofítico *Microascus intricatus* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: investigação química e avaliação do potencial farmacológico.

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Siqueira Silva

ARARAQUARA  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

P436b Pereira, Erika Thalyta Veras  
Bioprospecção do fungo endofítico *Microascus intricatus*  
associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*  
investigação química e avaliação do potencial  
farmacológico / Erika Thalyta Veras Pereira. –  
Araraquara : [s.n.], 2017  
96 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos. 3. Produtos  
naturais. 4. Alga. 5. Inibidores de colinesterase. I. Título.

ERIKA THALYTA VERAS PEREIRA

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

Araraquara, 08 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cíntia Duarte de Freitas Milagre  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlana Helena Chaves  
Universidade Federal do Piauí / UFPI / Teresina - PI

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Erika Thalyta Veras Pereira

**Nome em citações bibliográficas:** PEREIRA, E. T. V.,

### ENDEREÇO PROFISSIONAL:

NUBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade

Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP - Brasil

**e-mail:** erikathalyta@hotmail.com

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### 2010 - 2014

-Graduação em Licenciatura plena em Química- Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina -PI. Título da Monografia: Quimiodiversidade e potencial biológico de *Combretum duarteanum* Cambess. em duas regiões de Cerrado do estado do Piauí.

Orientadora: Prof. Dra. Mariana Helena Chaves

-Bolsista de Iniciação Científica (2011-2012) - UFPI - Título do projeto: Documentação química e farmacológica de extratos vegetais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Helena Chaves

- Bolsista de Iniciação Científica (2012 - 2014) - UFPI - Título do projeto: Potencial químico e farmacológico de três plantas da família Combretaceae coletadas em regiões de cerrado do Estado do Piauí

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Helena Chaves

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Avaliação da Aprendizagem no Ensino Superior e as Tecnologias Educacionais- Curso de aperfeiçoamento (Carga horária:100 hrs), NEaD-UNESP, 2016.

Projeto de extensão: Desenvolvimento da capacidade argumentativa dos estudantes: ações no ensino básico e na formação inicial de professores de ciências e matemática. (Carga horária: 32 h), UFPI, 2013.

Coordenador do projeto: Jerino Queiroz.

Minicurso: Curso de química forense. (Carga horária: 9h). Renova Cursos-Ribeirão Preto-SP, 2015.

Minicurso: Multivariate Curve Resolution (MCR). (Carga horária: 8h). II Escola de Inverno de Quimiometria-UNICAMP, 2015.

Minicurso Second and Higher-Order Data Generation and Processing. (Cara horária: 8h). II Escola de Inverno de Quimiometria-UNICAMP, 2015.

Minicurso: Drogas de Abuso: Identificação e Casuística. (Cara horária: 8h). XXXI Encontro Nacional de Estudantes de Química, 2013.

Minicurso: Produtos naturais marinhos: Ecologia, atividade farmacológica e caracterização química. (Cara horária: 8h). XXXI Encontro Nacional de Estudantes de Química, 2013.

Minicurso: Produtos naturais de plantas brasileiras: Potencial e importância biotecnológica. (Cara horária: 4h) Simpósio Latino-americano de biotecnologia do Nordeste, 2013

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Trabalhos publicados em periódico:**

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; CHAVES, M. H. ; CASTRO, A. A. J. F.. Prospecção científica e tecnológica das espécies *Combretum duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* Eichler. Revista GEINTEC: gestao, inovacao e tecnologias, v. 5, p. 1606-1616, 2015.

FARIAS, R. R. S.; LOIOLA, M. I. B.; CASTRO, A. A. J. F.; Chaves, M. H.; PEREIRA, E. T. V. Botânica (Aspectos Morfológicos) e Distribuição Geográfica de Três Espécies de Combretaceae nos Cerrados do Piauí, Nordeste do Brasil. Publicações Avulsas em Conservação de Ecossistemas, v. 31, p. 1, 2014.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:**

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; Chaves, M. H.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. O.; LIMA, D. J. B. Citotoxicidade in vitro das espécies *Combretum duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* EICHLER (Combretaceae). In: Simpósio latino-americano de biotecnologia do nordeste, 2013, Parnaíba. Simpósio latino-americano de biotecnologia do nordeste, 2013.

PEREIRA, E. T. V.; FARIAS, R. R. S.; Chaves, M. H. . POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICO DE QUATRO ESPÉCIES DE COMBRETACEAE. In: XXI Seminário de Iniciação científica IV Seminário em desenvolvimento tecnológico e Inovação, 2012.

Chaves, M. H. ; PEREIRA, E. T. V. ; FARIAS, R. R. S. . Potencial Farmacológico de *C. duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* Eicher. In: I Encontro estratégico de Ciências Farmacéuticas e I Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos, 2013, Teresina. Aspectos interdisciplinares de P&D de medicamentos. Teresina: EDUFPI, 2013

**Apresentação de trabalho durante o período do mestrado:**

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; CHAVES, M. H.; CARVALHO, R. B. F.; FERREIRA, P. M. P. Potencial Farmacológico de *Terminalia actinophylla* MART. II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, Teresina-PI, 2015.

**Participação em eventos científicos durante o período do mestrado:**

-II Escola de Inverno de Quimiometria (UNICAMP- Julho de 2015)

-XXIII Congresso Nacional de Criminalística (Novembro de 2015)

**A minha família por acreditar e apoiar minhas decisões  
e a Ruth Raquel por carregar comigo  
os sentimentos que a vida acadêmica traz.**

## VIR A SER

Eu procuro por mim.  
Eu procuro por tudo o que é meu  
e que em mim se esconde.  
Eu procuro por um saber  
que ainda não sei,  
mas que de alguma forma já sabe em mim.  
Eu sou assim...  
processo constante de vir a ser.  
O que sou e ainda serei  
são verbos que se conjugam  
sob áurea de um mistério fascinante.  
Eu me recebo de Deus e a Ele me devolvo.  
Movimento que não termina  
porque terminar é o mesmo que deixar de ser.  
Eu sou o que sou na medida em que  
me permito ser.  
E quando não sou é porque o ser eu não  
soube escolher.

**Fábio de Melo**



## Agradecimentos

A Deus por me dar a paz e tranquilidade necessária em cada momento, mesmo quando as vezes tudo parecia não está tão certo, eu tinha certeza que o melhor sempre aconteceria. Eu, humana e falha que sou, nunca conseguirei agradecer o sacrifício e amor desprendido a mim.

Aos meus pais, que apesar de nem sempre concordarem ou compreenderem todas as minhas decisões, acreditam no meu julgamento, apoiam cada uma delas e sonham junto comigo, se hoje sou quem sou é resultado do esforço e abnegação deles.

A minha irmã, que sempre foi fonte de inspiração, a primeira a me dizer pra escolher o melhor, mesmo que não fosse o mais cômodo, e a me mostrar que podemos ir além.

A profa. Dulce Helena, por ser gentil, por todo conhecimento compartilhado, e conversas inspiradoras; por ir além e não só ensinar química, mas ensinar também qual a minha responsabilidade depois de tudo que aprendi e vivi.

A Ruth Raquel, por ser a pessoa mais amável que tive o prazer de conhecer, por sonhar e caminhar comigo cada passo da minha vida acadêmica, você sempre será minha orientadora, companheira de laboratório e amiga, a parte bióloga desta química.

A minha família, que sempre vibra com as minhas conquistas e sonhos. Impossível descrever em palavras o amor de tias, que são como mães, e de primas, que são como irmãs. Sinto muito por não usufruir esse amor de perto e obrigada por compreenderem.

Aos amigos do Piauí, em especial a Tauani e a Thatá pela constante companhia mesmo há kms de distância. Tauani, você tem me ensinado a ser alguém melhor. Thatá, pare de fazer rir quando a situação demanda choro.

A Cibeli Lira, que desde 2010 tem sido a coragem das minhas ideias, juntas compartilhamos expectativa, a vontade de conquistar o mundo e ao mesmo tempo manter nossas raízes. Obrigada por me emprestar seus pais e ainda termos muitas desventuras.

A minha colônia de piauiense e agregados. Sobre nós: de algum feito a gente acha um cantinho, se acomoda, se sente confortável. No meio de tantas diferenças encontramos algo em comum, o desejo de sentir em casa. E a gente ri, torce, fica triste, desabafa, conta “segredos”, planeja, faz festa ou simplesmente não faz nada. Tentamos de alguma forma tornar isso o mais real possível, por que daqui há algum tempo nos perguntaremos se sentimos tudo isso mesmo, se vivemos tudo isso juntos. Tudo será só lembrança. Agradecimento especial aos meus irmãos científicos Everton e Luis Paulo pela ajuda com os PNs.

A IASD, por ser família onde quer que se esteja, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, as orações e palavras de incentivo, em especial Victor e Andressa por me acolherem tão gentilmente.

Aos técnicos Nivaldo, Juliana e João, pela disponibilidade e ENORME paciência. Tudo seria mais difícil sem a ajuda e sorriso de vocês.

Aos “alunos da Dulce”, pela amizade e conhecimento compartilhado; em especial a Rebeca, pela paciência frente aos meus muitos questionamentos, e a Alana, por “sutilmente” nos influenciar a amar os fungos.

Aos professores do IQ, em especial aos professores do NuBBE, por todos os ensinamentos e gentileza.

Ao instituto de química da UNESP de Araraquara e o departamento de química orgânica, pelos recursos e possibilidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e aos demais órgãos que fomentam o ensino e a pesquisa no instituto de química da UNESP de Araraquara.

## Resumo

Sabe-se que os fungos exercem importantes papéis no cotidiano, sendo utilizados na produção de alimentos fermentados e de enzimas de interesse industrial, em processos de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, além de auxiliar na agricultura como parte do corpo de decompositores, e ainda na defesa e crescimento de plantas em que vivem em simbiose. Adicionalmente, nos últimos anos, as pesquisas com fungos e outros micro-organismos têm-se intensificado pelo surgimento de evidências crescentes de seu potencial como fonte de substâncias bioativas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, como as penicilinas e cefalosporinas – antibióticos, a mevastatina e lovastatina - redutores de colesterol, ciclosporina e rapamicina-imunossuppressores, entre outros. Muitos fungos endofíticos possuem potencial farmacológico, demonstrando atividades como citotóxica, antibacteriana, anticolinesterásica, antifúngica, antiplasmódica, entre outras. Além de indicarem ser fonte de uma grande variedade de novos metabólitos secundários, decorrente de sua quimiodiversidade marcante. Este contexto levou à investigação de uma linhagem fúngica isolada da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan, identificada como *Microascus intricatus*. O cultivo desta linhagem em meio PDB por 28 dias, 65 frascos de Erlenmeyer forneceu o extrato AT-07, que foi submetido a partição com acetato de etila. As frações AT-07 F3, AT-07 F4 e AT-07 F6 foram submetidas a procedimentos cromatográficos e levou ao isolamento de produtos naturais pertencentes às classes das dicetopiperazinas e uma isoflavona. As substâncias isoladas foram identificadas como ciclo-(Pro-Tir), ciclo-(Pro-Phe), ciclo-(Phe-Phe) e daidzeína com base em seus dados espectrométricos e espectroscópicos, como EM, RMN, IV DC e UV. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento da pesquisa na área de Produtos Naturais de micro-organismos marinhos, com destaque para a pesquisa de bioprospecção visando a descoberta de novos agentes terapêuticos, e realçam, ainda, a importância das relações ecológicas e da preservação de ambientes marinhos, pois são locais de grande biodiversidade tanto biológica como química.

**Palavras Chaves:** Fungos. Dicetopiperazina. *Microascus intricatus*.

## Abstract

Fungi play important roles in our daily life as in the production of fermented food and enzymes for industrial applications, biodegradation processes and biological treatment of effluents, in addition to its roles in agriculture, enhancing decomposition, and defense and growth of plants living in symbiosis. Research involving fungi and other microorganisms has been intensified in the last decades owing to growing evidence of their potential as important sources of novel bioactive compounds for the development of therapeutic agents as penicillins, cephalosporins (antibiotics), mevastatin and lovastatin (cholesterol lowering agents), cyclosporine and rapamycin (immunosuppressors), among others. Several endophytic fungal strains exhibit pharmacological potential as cytotoxic, antibacterial, anticholinesterase antifungal, antiplasmodial activities, which has been markedly associated to the huge chemodiversity of their secondary metabolites. Such context prompted us to investigate one fungal strain isolated from marine red alga *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan, which has been identified as *Microascus intricatus*. Cultivation of the fungal strain in PDB media for 28 days, Erlenmeyer flasks yielded extract AT-07 partition with etoac extract which was submitted to chromatographic procedures and led to the isolation of natural products belonging to diketopiperazines classes and one isoflavone. The isolated compounds were identified as cyclo-(Pro-Tir), cyclo-(Pro-Phe), cyclo-(Phe-Phe) and daidzein based on their spectrometric and spectroscopic data, mainly MS, NMR, IR, CD and UV. Such results contribute to the development of research on marine microorganisms natural products, including the discovery of novel therapeutic agents, in addition to the importance of their ecological roles and preservation of marine environment, as they host a huge diversity both regarding biological and chemical aspects.

**Keywords:** Fungus. Diketopiperazine. *Microascus intricatus*.

## Lista de figuras

<b>Figura 1-</b> Locais de coleta para a descoberta de produtos naturais marinhos, 1965- 2014.	22
<b>Figura 2-</b> Novos compostos por região/país durante o período 1965-2014,por semi-década.	23
<b>Figura 3-</b> Filos mais estudados no ambiente marinho de 1963 a 2013.	24
<b>Figura 4-</b> Estrutura básica da 2,5-dicetopiperazina.	29
<b>Figura 5-</b> Fungo AT-07.	34
<b>Figura 6-</b> Fracionamento do extrato AT-07 por CC sobre Sephadex LH-20 e eluente metanol 100%.	35
<b>Figura 7-</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD do extrato bruto de AT-07.	39
<b>Figura 8-</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do extrato bruto de AT-07 (2) e do meio de cultivo (1) (DMSO- <i>d</i> 6, 300 MHz).	40
<b>Figura 9-</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD das frações AT-07 F1, AT-07 F2, AT-07 F3, AT-07 F4, AT-07 F5, AT-07 F6.	42
<b>Figura 10-</b> Espectro de RMN de hidrogênio das frações AT-07 F1(1), AT-07 F2 (2), AT-07 F3 (3), AT-07 F4 (4), AT-07 F5 (5) e AT-07 F6 (6) (DMSO- <i>d</i> 6,300MHz).	43
<b>Figura 11-</b> Estrutura da 2,5 dicetopiperazina ciclo (Pro-Phe).	44
<b>Figura 12-</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração F3-13.	44
<b>Figura 13-</b> Espectro no UV-Vis das substâncias F3-13S1 e F3-13S2.	45
<b>Figura 14-</b> Correlações de HMBC (→) e COSY (—) da substância F3-13S1	46
<b>Figura 15-</b> Correlações de HMBC (→) e COSY (—) da substância F3-13S2	46

<b>Figura 16-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).	48
<b>Figura 17-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6, 150 MHz).	49
<b>Figura 18-</b> Mapa de contorno HSQC da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz)	50
<b>Figura 19-</b> Mapa de contorno COSY da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	50
<b>Figura 20-</b> Mapa de contorno HMBC da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	51
<b>Figura 21-</b> Espectro de TOCSY irradiado no H-3 ( $\delta_{\text{H}}$ : 3.21) da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	51
<b>Figura 22-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).	52
<b>Figura 23-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6, 150 MHz).	53
<b>Figura 24-</b> Mapa de contorno HSQC da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	54
<b>Figura 25-</b> Mapa de contorno COSY da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	54
<b>Figura 26-</b> Mapa de contorno HMBC da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	55
<b>Figura 27-</b> Configuração relativa proposta pelo NOESY 2D para substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	56
<b>Figura 28-</b> Configuração relativa proposta pelo NOESY 1D para substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	56
<b>Figura 29-</b> Espectro de NOESY 2D da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	57
<b>Figura 30-</b> Expansão do espectro de NOESY 2D da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	57

<b>Figura 31-</b> Espectro de NOESY 1D da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	58
<b>Figura 32-</b> Estrutura e espectro no UV-Vis da substância F4-2 (2,5-dicetopiperazina ciclo-(Pro-Tir).	59
<b>Figura 33-</b> Correlações de HMBC (→) e COSY (—) observadas para a substância F4-2.	60
<b>Figura 34-</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4, 500 MHz).	62
<b>Figura 35-</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4, 125 MHz).	63
<b>Figura 36-</b> Mapa de contorno HSQC da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4; 500 e 125 MHz).	63
<b>Figura 37-</b> Mapa de contorno COSY da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4; 500 e 125 MHz)	64
<b>Figura 38-</b> Mapa de contorno HMBC da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4; 500 e 125 MHz).	64
<b>Figura 39-</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (3), HOMODEC com irradiação em δ <sub>H</sub> 4.36 (2), HOMODEC com irradiação em δ <sub>H</sub> 4.05 (3) (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	65
<b>Figura 40-</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H da substância F4-2 (1) e NOESY 1D irradiado em δ <sub>H</sub> 4.36 (2) (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	65
<b>Figura 41-</b> Estrutura e espectro no UV-Vis da substância F4-10, ciclo-(Phe-Phe).	66
<b>Figura 42-</b> Correlações de HMBC (→) e COSY (—) para a substância F4-10.	67
<b>Figura 43-</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	68
<b>Figura 44-</b> Mapa de contorno HSQC da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	69
<b>Figura 45-</b> Mapa de contorno COSY da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	69

<b>Figura 46-</b> Mapa de contorno HMBC da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	70
<b>Figura 47-</b> Estrutura e espectro de UV-Vis da substância daidzeína F6-9.	70
<b>Figura 48-</b> Correlações de HMBC da substância F6-9.	71
<b>Figura 49-</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância F6-9 (MeOH- <i>d</i> 4; 600 MHz).	73
<b>Figura 50-</b> Mapa de contorno HSQC da substância F6-9 (MeOH- <i>d</i> 4; 600 e 150 MHz).	74
<b>Figura 51-</b> Mapa de contorno HMBC da substância F6-9 (MeOH- <i>d</i> 4; 600 e 150 MHz).	74
<b>Figura 52-</b> Estrutura da substância F6-15	67
<b>Figura 53-</b> Sistemas de spins observados pelos experimentos de TOCSY da substância F6-15	76
<b>Figura 54-</b> Correlações observadas no HMBC da substância F6-15	77
<b>Figura 55-</b> Espectro de RMN de H da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz)	79
<b>Figura 56-</b> Mapa de contorno HSQC da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz)	80
<b>Figura 57-</b> Mapa de contorno COSY da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz)	80
<b>Figura 58-</b> Mapa de contorno HMBC da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz)	81
<b>Figura 59-</b> Espectro de TOCSY irradiado no H-1 (4 $\delta_H$ 6.71) , H-3 (3 $\delta_H$ 6.30), H-5 (2 $\delta_H$ 4.40) e RMN de <sup>1</sup> H (1) da substância F6-15.	81
<b>Figura 60-</b> Espectro de TOCSY irradiado no H-11 (3 $\delta_H$ 5.63), H-12 (2 $\delta_H$ 4.60) e RMN de <sup>1</sup> H (1) da substância F6-15.	82



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1-</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e HMBC (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz) das substâncias F3-13S1 e F3-13S2.	47
<b>Tabela 2-</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4, 500 e 125 MHz) da substância F4-2.	61
<b>Tabela 3-</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e dos mapas de contorno HSQC e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4 600 e 150 MHz) da substância F4-10.	67
<b>Tabela 4-</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e mapa de contorno HSQC e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4 600 e 150 MHz) da substância F6-9.	72
<b>Tabela 5-</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e dos mapas de contorno HSQC e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4 600 e 150 MHz) da substância F6-15 e dados da literatura	78
<b>Tabela 6-</b> Atividade anticolinesterásica do extrato e frações do fungo AT-07.	83

## Lista de abreviaturas e siglas

AT-07	<i>Microascus intricatus</i>
AChE-ee	Enzimas acetilcolinesterase de enguia elétrica
AChE-hu	Enzimas acetilcolinesterase humana
ATChI	Acetilcolina
$\delta_H$	Deslocamento químico de $^1\text{H}$ (em ppm)
$\delta_C$	Deslocamento químico de $^{13}\text{C}$ (em ppm)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> - Espectroscopia de correlação ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ )
C-18	Sílica de fase reversa do tipo octadecil-silano
d	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Dicroísmo circular
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
EI	Ionização por elétron
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por Eletrospray
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> – correlação heteronuclear a múltiplas ligações ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ )
HOMODEC	<i>Homonuclear Decoupling</i> - Desacoplamento homonuclear (H-H)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> – correlação heteronuclear a uma ligação ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ )
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> 4	Metanol deuterado
mg	Miligramas
MHz	Mega Hertz
Min	Minutos
mL	Mililitro

mult.	Multiplicidade
$m/z$	Relação massa/carga
nm	Nanômetro
NOESY-1D	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> – espectroscopia de efeito nuclear Overhauser em uma dimensão
NOESY-2D	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> – espectroscopia de efeito nuclear Overhauser em duas dimensões
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OVCAR-8	Linhagem de células de carcinoma de ovário
PDA	Potato-Dextrose-Agar- Batata Dextrose e Agar
PDB	Potato Dextrose Broth- Caldo de Dextrose e Batata
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
ppm	Partes por milhão
Q-TOF	Quadrupolo-Tempo de Voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultra-violeta
UV-Vis	Ultra-violeta-visível
s	Sinpleto
t	Tripleto
Tir	Tirosina
TMS	Grupo trimetilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> - espectroscopia de correlação total
tR	Tempo de retenção
$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{m}$	Micro
$[\text{M}+\text{H}]^+$	Molécula protonada
$[\text{M}-\text{H}]^-$	Molécula desprotonada

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>21</b>
1.1	<i>Fungos endofíticos</i>	25
1.2	<i>Fungos endofíticos de algas</i>	26
1.3	<i>Gênero Microascus</i>	26
1.4	<i>2,5-Dicetopiperazinas</i>	28
<b>2</b>	<b>Parte experimental</b>	<b>31</b>
2.1	<i>Materiais</i>	31
2.1.1	Solventes e equipamentos gerais	31
2.1.2	Cromatografias em coluna	31
2.1.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
2.1.4	Ressonância magnética nuclear	33
2.1.5	Espectrometria de massas	33
2.2	<i>Métodos</i>	33
2.2.1	Identificação da linhagem fúngica	33
2.2.2	Obtenção do extrato bruto em escala ampliada	34
2.2.3	Perfil do extrato e frações	35
2.2.4	Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia por exclusão de tamanho	35
2.2.5	Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F3	36
2.2.6	Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F4	36
2.2.7	Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F6	36
2.2.8	Identificação das substâncias isoladas	37

2.2.9 Avaliação da atividade anticolinesterásica	37
<b>3 Resultados e discussão</b>	<b>38</b>
3.1 <i>Perfil químico do extrato e frações</i>	38
3.2 <i>Identificação estrutural das substâncias F3-13S1 e F3-13S2</i>	44
3.3 <i>Identificação estrutural da substância F4-2</i>	58
3.4 <i>Identificação estrutural da substância F4-10</i>	66
3.5 <i>Identificação estrutural da substância F6-9</i>	70
3.6 <i>Identificação estrutural da substância F6-15</i>	75
3.7 <i>Atividade anticolinesterásica</i>	84
<b>4 Conclusão</b>	<b>76</b>
<b>Referências</b>	<b>85</b>

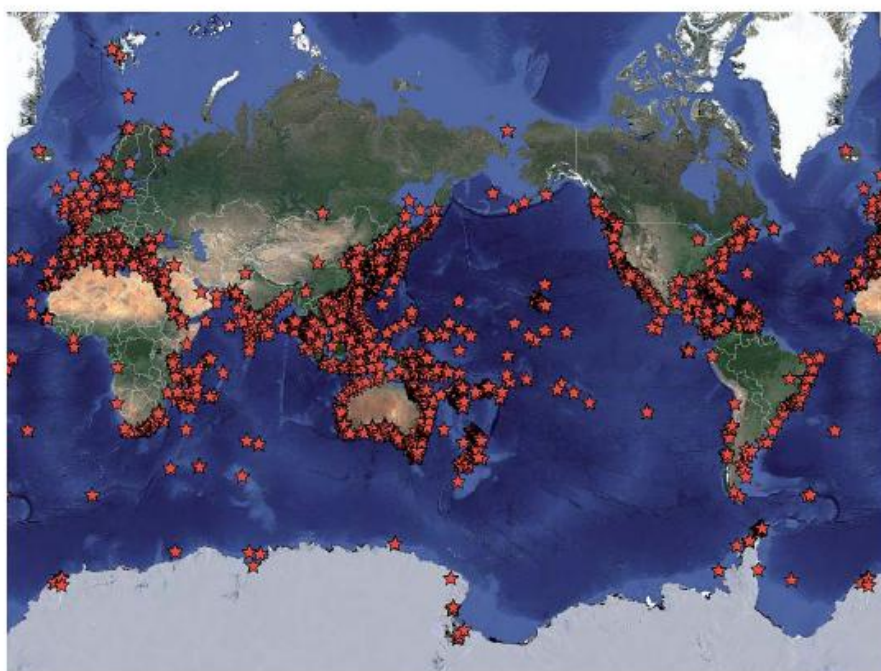
## 1 Introdução

A natureza como fonte terapêutica está bem consolidada seja no âmbito social (BARRETOS, 2014), espiritual (WHITE, 2008) ou científico (FIRN; JONES, 2003). Sua potencialidade tem sido explorada de forma empírica, com o uso de chás e infusões desde civilizações antigas, como os egípcios, sumérios, babilônios e chineses (GROTHAUS; CRAGG; NEWMAN, 2010), e de forma mais sistemática, com o isolamento da morfina em 1804, pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam. Esta substância foi o primeiro produto natural a ser comercializado por E. Merck em 1826, e seu uso na segunda guerra mundial foi de suma importância, permanecendo até hoje como analgésico ou como fonte de inspiração de novas substâncias com propriedades analgésicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Entendendo a potencialidade e importância da natureza, o homem tem buscado diferentes fontes de produtos naturais com potencial farmacológico, e como exemplos de fontes de substâncias bioativas temos as plantas (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006), animais, algas (BLUNT et al., 2016) e mais recentemente os micro-organismos, como as bactérias e fungos (NEWMAN; CRAGG, 2015).

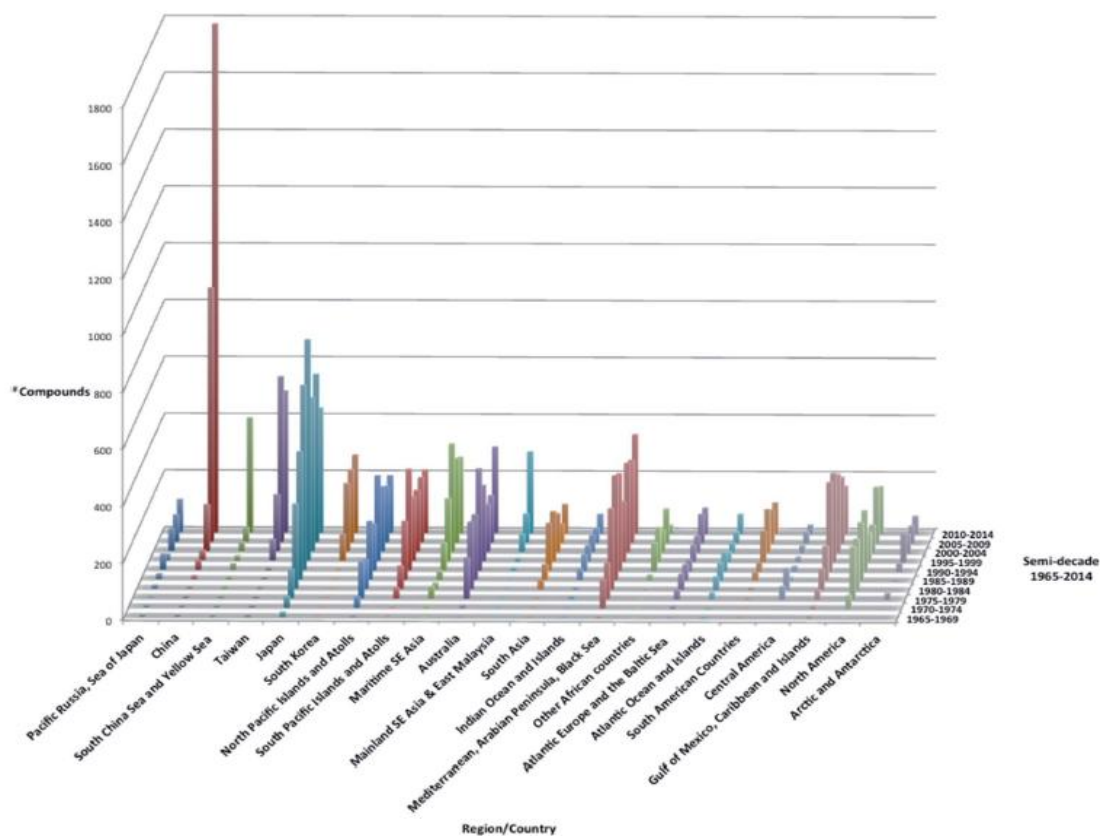
As plantas foram extensivamente estudadas e renderam ao homem substâncias valiosas como os salicilatos, isolados da *Salix alba*, com propriedades analgésicas, antipiréticas, anti-inflamatória e de inibição da agregação plaquetária, (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI, 2006); a quinina, um alcaloide isolado de espécies do gênero *Cinchona*, com atividade antimalárica (CRAGG; NEWMAN, 2013); a artemisinina, o fármaco atual de mais rápida ação contra a malária isolado da espécie *Artemisia annua* (O'NEILL; POSNER, 2004) e que levou à concessão de parte do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015 à chinesa Youyou Tu; além de uma extensa lista de substâncias com atividade antitumoral, como por exemplo o Taxol, isolado de espécies do gênero *Taxus*, entre outras atividades (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Atualmente o ambiente marinho tem conquistado espaço como importante fonte de produtos naturais. Blunt e colaboradores (2016) no artigo de revisão "Marine natural products" relatam que o número de novos produtos naturais marinhos descritos em cada ano cresceu de 332 em 1984 para 1378 em 2014. As substâncias foram isoladas de esponjas, algas, moluscos, cnidários, tunicados, briozoários, equinodermos, plantas, além de organismos do fitoplâncton e micro-organismos. No Brasil o ambiente marinho ainda é pouco explorado (Figura 1), e em toda a América do

Sul há relato de apenas 538 novos compostos em 210 artigos no período de 1965 a 2014 (Figura 2). Como ilustração da importância dos produtos naturais marinhos temos a trabectedina (**6**, ET-743, Yondelis<sup>®</sup>), um alcaloide isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata* (POMMIER et al., 1996), utilizado como fármaco no tratamento de câncer de tecidos moles desde 2007, além de estar em fase 3 para tratamento de câncer de ovário, em fase 2 para câncer de próstata e endometrial, e em estudo para tratamento de câncer de mama, lipossarcoma, mielossarcoma, leiomiossarcoma e tumores sólidos pediátricos (ClinicalTrials.gov).



**Figura 1-** Locais de coleta para a descoberta de produtos naturais marinhos, 1965-2014.  
**Fonte:** Blunt et al., 2016

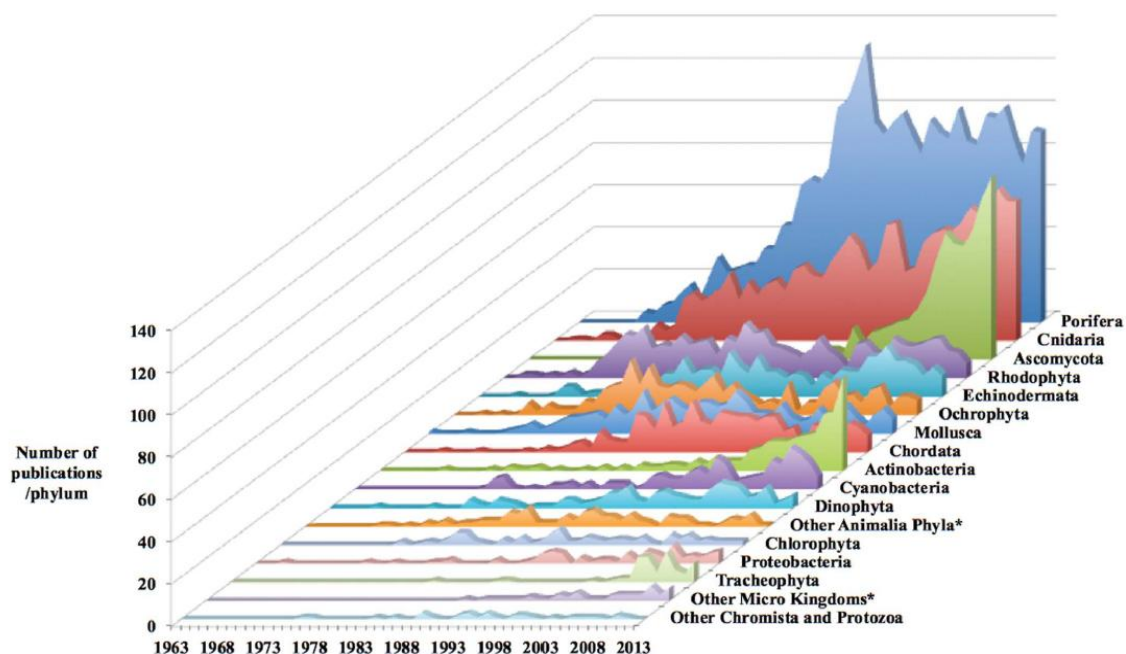


**Figura 2-** Novos compostos por região/país durante o período 1965-2014, por semi-década.  
**Fonte:** Blunt et al., 2016

No ambiente marinho os filos Porifera e Cnidaria possuem o maior número de publicações, com ressalva para os filos Ascomycota, Actinobacteria e Cyanobacteria, que apresentaram um rápido crescimento a partir da década de 1990 (Figura 3) (BLUNT, et al. 2015), isso possui relação com o recente interesse no estudo de micro-organismos como fonte de metabólitos bioativos, os quais têm fornecido importantes produtos naturais para a indústria farmacêutica.

Dentre os micro-organismos, os fungos têm recebido atenção especial pela produção de substâncias complexas e com alto valor agregado por seu potencial farmacológico (MORAES et al., 2014; RATEB; EBEL, 2011).





**Figura 3-** Filos mais estudados no ambiente marinho de 1963 a 2013.

**Fonte:** Blunt et al. 2015

Durante muitos anos os fungos foram taxados como seres nocivos por produzirem substâncias tóxicas ao ser humano, conhecidas como micotoxinas. As aflatoxinas são micotoxinas que se destacam por estarem presentes em alimentos comuns como amendoim, castanhas, feijão, milho e arroz. (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). A partir de 1940, com a descoberta da penicilina, isolada do *Penicillium notatum*, e seu sucesso como antibiótico, os fungos passaram a ser vistos como uma fonte de produtos naturais valiosa (SURYANARAYANAN, et al., 2009).

Atualmente sabe-se que os fungos exercem importantes papéis no cotidiano, sendo utilizados na produção de alimentos fermentados e de enzimas de interesse industrial, na biotransformação e em processos de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, auxiliam na agricultura, como parte do corpo de decompositores ou na defesa e crescimento de plantas em que vivem em simbiose. (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015). Além de serem fontes de produtos naturais utilizados como fármacos, por exemplo, as cefalosporinas (antibióticos), a mevastatina e lovastatina (redutores de colesterol), ciclosporina e rapamicina (imunossupressores), entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2005).

Os fungos têm-se mostrado prolíficos na produção de metabólitos secundários, sendo descrito o isolamento de esteroides, lactonas (MARINHO; MARINHO; RODRIGUES FILHO, 2007), antraquinonas, terpenos, alcaloides (XUE et al., 2012),

lignananas (PURI et al., 2006), flavonoides, peptídeos (PINTO et al., 2011) dentre outros. Seus extratos e substâncias isoladas exibem ainda várias atividades farmacológicas, tais como antibacteriana, citotóxica (RAMASAMY et al., 2010), antidiabética (ZHANG et al., 1999), antifúngica (CHAPLA et al., 2014), antimalárica (ISAKA et al., 2010), tripanocida, antileishmania (COTA et al., 2008), além da inibição de diversas enzimas, como mieloperoxidase e acetilcolinesterase, associadas a importantes patologias como a Doença de Alzheimer, artrite reumatoide, dentre outras.

### 1.1 Fungos endofíticos

Embora muito tenha sido escrito sobre organismos endofíticos há uma discussão sobre o real significado do termo. A definição mais usada e aceita é a de Petrini (1991), que os define como: “Todo organismo que habita órgãos de plantas em algum momento de sua vida, podendo colonizar tecidos internos da planta sem causar dano aparente ao hospedeiro.” (PETRINI, 1991 apud HYDE; SOYTONG, 2008, tradução nossa), os vários significados que Hyde e Soyton (2008) utilizam remetem sempre a organismos vivendo dentro de planta por um período de tempo sem produzir dano aparente.

Embora o termo ‘fito’ refira-se a plantas aquáticas ou terrestres, o termo endofítico é comumente usado também para micro-organismos que vivem em associação com esponjas (PROKSCH et al., 2010), anêmonas, moluscos, (ZHANG et al., 2009), estrela-do-mar e corais (BLUNT et al., 2015) ou com algas (ELSEBAI et al., 2011a). Estes fungos podem trazer benefícios ao hospedeiro, como mecanismo de defesa contra doenças (ARNOLD et al., 2003) e insetos (AKELO et al., 2007), resistência a estresse hídrico e aumento da temperatura, entre outros (BAE et al., 2009).

Zang e colaboradores (2009), comparando diversos substratos utilizados (plantas aquáticas superiores, moluscos, anêmonas, algas e esponjas) para isolamento de fungos observou que as duas algas *Sargassum thunbergii* (marrom) e *Gracilaria lemaneiformis* (vermelha), e a esponja *Perlevis hymeniacidon* foram os substratos que renderam mais variedades de fungos e que possuem os fungos que produziram extratos mais bioativos.

## 1.2 Fungos endofíticos de algas

Fungos isolados de algas marinhas têm-se mostrado uma interessante fonte de produtos naturais, apresentando diversas atividades farmacológicas como citotóxica, antibacteriana (ELSEBAI et al., 2011b), anticolinesterásica (QIAO et al., 2011), antifúngica (DAÍ et al., 2010), antimalárica (OSTERHAGE et al., 2000), entre outras (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

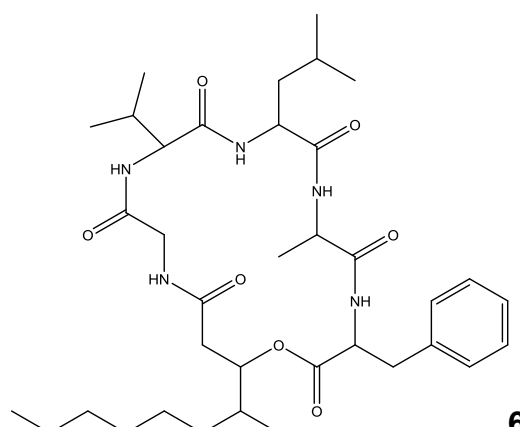
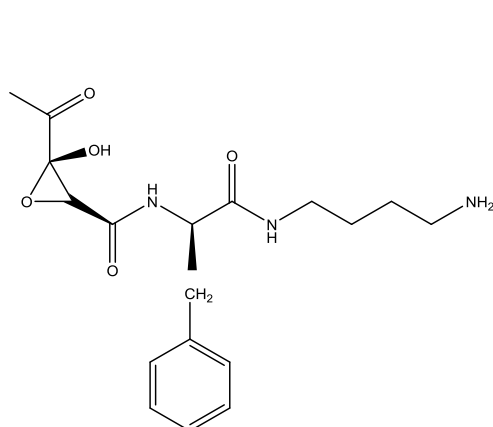
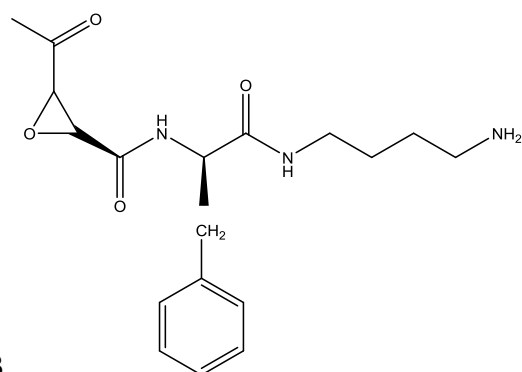
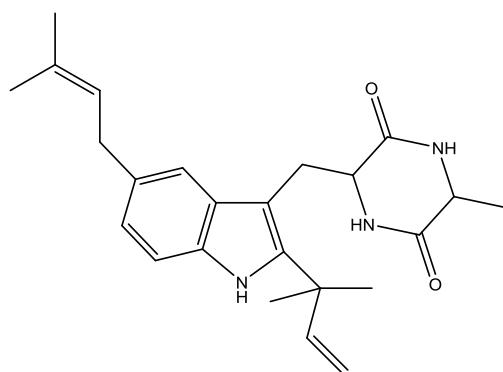
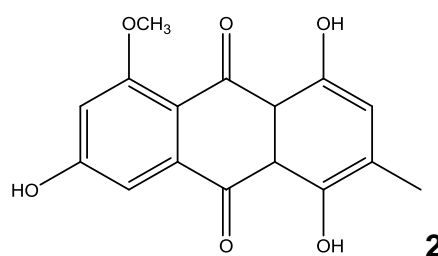
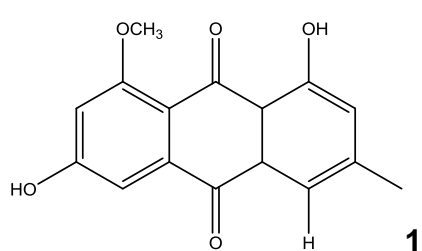
Fungos endofíticos de algas já indicaram ser fonte de uma grande variedade de novos metabólitos secundários. Elsebai e colaboradores (2011b) isolaram sete novos derivados de fenalenona do fungo *Coniothyrium cereale* extraído da alga verde *Enteromorpha* sp. Lin e colaboradores (2008) isolaram dois derivados de 5-hidroxi-2-pirona de *Aspergillus flavus*, extraído de *Enteromorpha tubulosa*. Metabólitos de biossíntese mista como derivados de policetídeos acoplados a unidade de glicerol e de monoterpreno foram isolados do fungo *Penicillium chrysogenum*, associado à alga vermelha *Laurencia* sp. (GAO, et al., 2011), enquanto a linhagem de *Aspergillus niger* isolada da alga marrom *Colpomenia sinuosa* forneceu um novo derivado de naftoquinoneimina (ZHANG et al., 2007). Além dessas substâncias inéditas, muitas outras foram relatadas nos últimos anos, confirmando a imensa quimiodiversidade exibida por fungos endofíticos isolados a partir de algas marinhas.

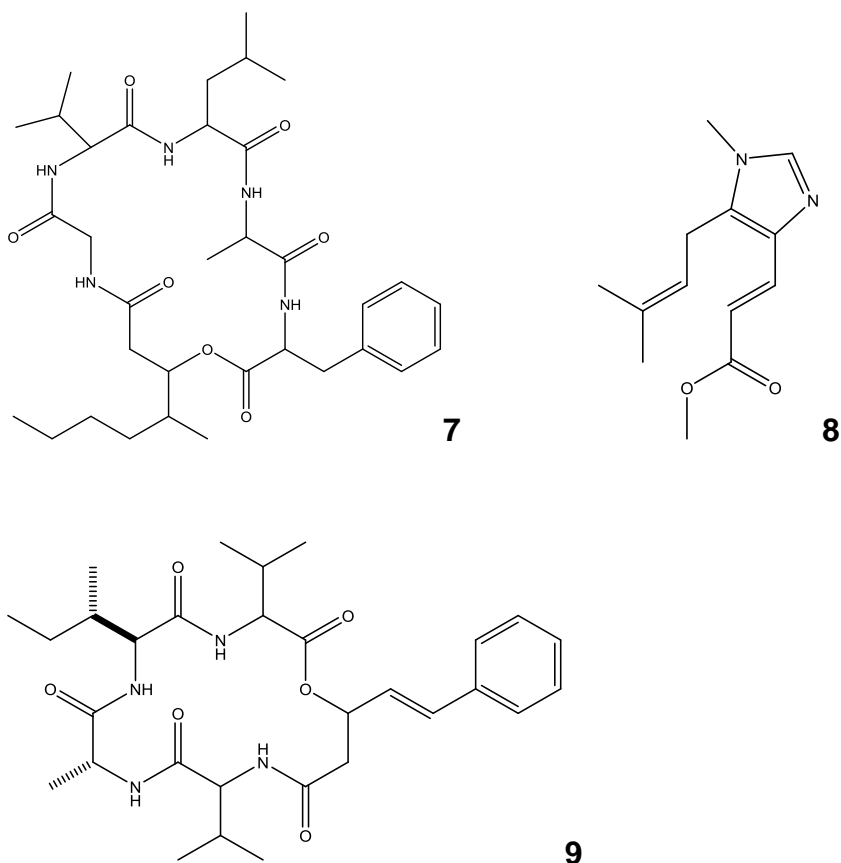
## 1.3 Gênero *Microascus*

Fungos do gênero *Microascus* são conhecidos por serem patogênicos, vinculados principalmente a infecções pulmonares, como a pneumonia (MOHAMMEDI, I. et al, 2004). Fungos deste gênero já foram isolado de plantas (SIQUEIRA et al.,2011), solo (KAUL; SUMBALI, 2000), esponjas (HOLLER et al., 2000), queijos (MARÍN;PALMERO; JURADO, 2014) e algas (MEDINA, 2016).

Fujimoto e colaboradores (1999) isolaram oito constituintes químicos do fungo endofítico *Microascus tardifaciens*, sendo que três deles: a questina (1), rubrocristina (2) e a tardioxopiperazina A (3), mostraram atividade imunossupressora. De *Microascus longirostris* foram isoladas as catestatinas A (4) e B (5), com atividade inibitória de cisteína protease, indicativo de atividade antiviral (YU et al. 1995). Yu e colaboradores (2008) isolaram os scopularídeos A (6) e B (7) da fase anaforma do *Mi-*

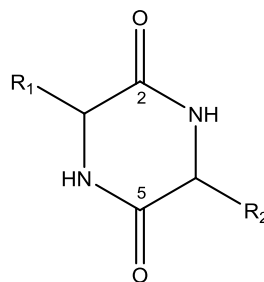
*croascus brevicaulis*, substâncias com atividade antitumoral frente às linhagens de Colo357 (colorretal) e Panc89 (pâncreas), além de atividade antibacteriana. Holler e colaboradores (2000) isolaram do extrato acetato de etila do fungo *Microascus* sp., o alcaloide fungerina (**8**), com atividade antimicrobiana, enquanto a substância EGM-556 (**9**), um ciclodepsipeptídeo de biossíntese mista, foi isolada de outra linhagem do fungo *Microascus* sp., ao se empregar o ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) como manipulador epigenético (VERVOORT; DRASKOVIC; CREWS, 2011).





#### 1.4 2,5-Dicetopiperazinas

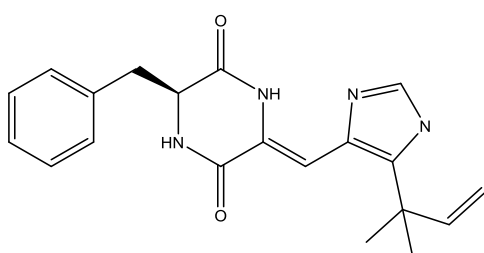
As dicetopiperazinas constituem uma classe de metabólitos secundários frequentemente isolada de fungos. As mais comuns são as 2,5-dicetopiperazinas que são biossintetizadas pela condensação de dois aminoácidos por substituição nucleofílica entre os grupos aminos e as carboxilas, formando um ciclodipeptídeo (Figura 4). Possuem uma estrutura capaz de se ligar a diversos receptores, além de um esqueleto heterocíclico pequeno, conformacionalmente rígido, com estereoquímica controlada em quatro posições e possibilidade de introduzir substituintes seis substituintes. Essas características conferem às 2,5-dicetopiperazinas uma série de atividades farmacológicas (BORTHWICK, 2012).



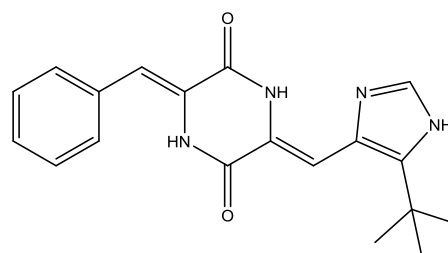
**Figura 4-** Estrutura básica da 2,5-dicetopiperazina.

Os diversos estudos descritos na literatura comprovam a variedade de estruturas e atividades farmacológicas das 2,5-dicetopiperazinas, sendo relatadas atividades como antimicrobiana (KUMAR et al., 2013), inseticida (LAN et al., 2016), antifúngica (PUOPOLLO et al., 2014), antibacteriana (FDHILA et al., 2003), cardioprotetora (MITSUI-SAITOH et al., 2011), citotóxica (ZHAO et al., 2002), antiviral (MAS et al., 2006) entre outras (BORTHWICK, 2012) para estas substâncias.

A 2,5-dicetopiperazina plinabulina, um derivado sintético da halimida obtida do fungo *Aspergillus* sp. encontrado em associação à alga verde *Halimeda copiosa* (FENICAL 1999), demonstrou ser um potente agente antitumoral em amplo espectro de células cancerígenas, incluindo câncer de mama, próstata, ovário e gastrointestinal. Atualmente encontra-se na fase 3 de testes clínicos para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas aliado ao quimioterápico docetaxel; e será avaliada em fase 3 no tratamento de neutropenia, além de 140 patentes relacionadas a estudos em fase 1 e 2. (BEYONDSRING PHARMACEUTICALS, 2015).



**Halimida**



**Plinabulina**

O elevado potencial químico e farmacológico atribuído aos fungos endofíticos na produção de substâncias inéditas e bioativas, aliado ao recente

interesse em estudá-los, demonstra a necessidade de se pesquisar esse grupo de organismos, principalmente os fungos endofíticos de algas.

Além disso, a escassez de estudos químicos e a inexistência de relatos na literatura sobre o fungo *Microascus intricatus* despertou o interesse de estudar este fungo, visando a oportunidade de encontrar na linhagem do fungo em estudo, uma fonte de substâncias bioativas. Esta abordagem permitirá agregar valor à espécie, para seu possível emprego como produtora de substâncias para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, além de contribuir para a conservação e utilização sustentável da biodiversidade marinha do Brasil.

### **Objetivos:**

*Geral:* Realizar a investigação química e prospecção farmacológica do fungo codificado como AT-07 isolado da alga *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan.

#### *Específicos:*

- Cultivar em larga escala o fungo endofítico codificado como AT-07 em meio líquido de PDB para obtenção do extrato bruto com massa suficiente para investigação estrutural de metabólitos secundários e prospecção farmacológica;
- Obter o perfil químico do extrato bruto utilizando RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE/DAD;
- Fracionar o extrato bruto utilizando técnicas cromatográficas convencionais e/ou sofisticadas para o isolamento e/ou identificação em mistura de metabólitos secundários;
- Elucidar e/ou identificar as substâncias isoladas utilizando técnicas espectroscópicas (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, DC, Ultravioleta, Infravermelho) e espectrométricas (EM);
- Avaliar o potencial farmacológico, por meio dos ensaios de atividade antifúngica e anticolinesterásica do extrato e frações;
- Fornecer informações químicas e farmacológicas para o desenvolvimento de pesquisas visando à valorização e utilização sustentável da espécie e conservação da biodiversidade do ambiente marinho.

## 2 Parte experimental

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Solventes e equipamentos gerais

Para obtenção do extrato bruto, obtenção de perfil por cromatografia de camada delgada (CCD), fracionamento e isolamento das substâncias, foram utilizados, acetato de etila, etanol, metanol, e hexano, das marcas Synth, Dinâmica, Vetec e Merck e água ultra pura (MilliQ).

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments e refrigeração Marconi BTC-9090. Posteriormente foram secos em liofilizador da marca Christ, modelo Alpha 1-2 LD plus, equipado com bomba de vácuo Vacuubrand, modelo RZ 2.5 e Speed vac.

A esterilização do material foi efetuada em autoclave vertical da marca Phoenix Luferco, e a manipulação dos micro-organismos foi realizada uma câmara de fluxo laminar vertical da marca Pachane.

As amostras foram pesadas em balanças Mettler Toledo AG245 e AG204 (analíticas) e Marconi BG2000 (semi-analítica). O equipamento de ultrassom modelo Unique foi utilizado na dissolução dos extratos e frações.

Nas análises por CCD foram utilizadas placas comerciais de gel de sílica 60 Whatman® e Sorbent Technologies®, base de alumínio 200 µm e 0,20 mm de espessura, reveladas em câmara de UV (comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm) e/ou anisaldeído.

#### 2.1.2 Cromatografias em coluna

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro utilizando como fase estacionária:

(a) *Sephadex* LH-20 (em coluna de 120 cm x 3 cm) utilizando metanol como eluente;



(b) *Sílica de fase reversa do tipo octadecil-silano (C-18)*, da marca Sorbent Technologies, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 40-75 µm (200-400 mesh) 30 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, sob baixa pressão.

### 2.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Todas as amostras passaram por tratamento prévio utilizando membrana filtrante de 0,22 µm. O tratamento dos dados foi realizado em um microcomputador com processador Intel® Celeron®, utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

(a) *Modo Analítico*: equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), degaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20A. Coluna analítica Phenomenex Luna derivatizada com octadecilsilano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm; 100 Å) com vazão de 1,0 mL/min, temperatura ambiente (25 °C) e injeção de 20 µL de amostra sob análise em concentração de 4,0 mg/mL, usando detecção em  $\lambda = 200$  nm até 400 nm.

(b) *Modo Semipreparativo*: equipamento Shimadzu (sistema binário de bombas LC-6AD, detector UV SPD-M20A, injetor manual), detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e coluna semipreparativa Phenomenex Luna tipo octadecil-silano C-18 (250 x 10,00 mm; 5 µm; 100Å), vazão de 3 mL/min e injeções de 300 µL de amostra sob análise em concentração de 20,0 mg/mL. detecção de 200 nm a 400 nm.

(c) *Modo Semipreparativo (Industrial)*: equipamento Shimadzu (sistema binário de bombas LC-8AD, detector UV SPD-10<sup>a</sup>, injetor automático) e coluna semipreparativa Phenomenex Luna tipo octadecil-silano C-18 (250 x 10,00 mm; 5 µm; 100Å), vazão de 3,0 mL/min, temperatura ambiente (25 °C) e injeções de 300 µL de amostra sob análise em concentração de 20,0 mg/mL. Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm.

#### 2.1.4 Ressonância magnética nuclear

Os solventes CD<sub>3</sub>OD e DMSO-*d*<sub>6</sub> foram utilizados na dissolução das amostras, o TMS ou o solvente residual não deuterado foi usado como padrão interno. Espectrômetros utilizados:

(a) Bruker - 300 MHz com campo magnético de 7,1 T, sonda de 5 mm com Dual probe <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H e detecção inversa;

(b) Bruker Avance III HD 600 com campo magnético de 14,1 T com criosonda TCI (Triple Chanel Inverse) de 5 mm;

(c) Varian Inova 500 com campo magnético de 11,7 T, sonda de 5 mm, com detecção inversa.

#### 2.1.5 Espectrometria de massas

A Espectrometria de Massas (EM) de alta resolução foi realizada em espectrômetro Bruker, modelo Maxis Impact, fonte de ionização eletrospray (ESI) e analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Identificação da linhagem fúngica

A identificação da linhagem fúngica foi feita pela Divisão Micro-organismos da Genotyping Biotecnologia, por meio de sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank. Este procedimento permitiu a identificação do gênero *Microascus*. Posteriormente foram realizados procedimentos

para análise morfológica e genética em colaboração com o Prof. Marco Antônio Soares, (UFMT), que permitiram a identificação da espécie *Microascus intricatus*.



**Figura 5-** Fungo AT-07

### 2.2.2 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada

A linhagem AT-07 foi anteriormente isolada pela Dra. Rebeca Previante Medina no Laboratório de Micro-organismos do NuBBE, a partir da macroalga *Asparagopsis taxiformis*, coletada no costão direito da praia da Fortaleza, Ubatuba – SP em junho de 2012. Após a purificação e isolamento do fungo, a linhagem foi preservada em “slants” (frascos contendo água ultra pura – MilliQ - estéril e o fungo em meio sólido BDA- Batata Dextrose e Ágar), que foram lacrados e mantidos em temperatura ambiente (MEDINA, 2016).

A linhagem do fungo isolado e preservado foi repicada em 25 placas de Petri contendo BDA. Após o crescimento desses fungos, aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido MBD (Meio de Batata e Dextrose) contendo água MilliQ esterilizada para incubação por 28 dias a 25 °C. Para isso foram utilizados 65 frascos de Erlenmeyer, cada um contendo 300 mL de meio líquido. Todo o material utilizado na manipulação do micro-organismo foi previamente esterilizado (Materiais 2.1.1.).

Após o período de incubação, o caldo foi separado do micélio por filtração e submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila por três vezes consecutivas e uma vez com água MilliQ, para retirada de resíduos do meio. A solução resultante foi concentrada, obtendo-se assim o extrato bruto (1,18g).

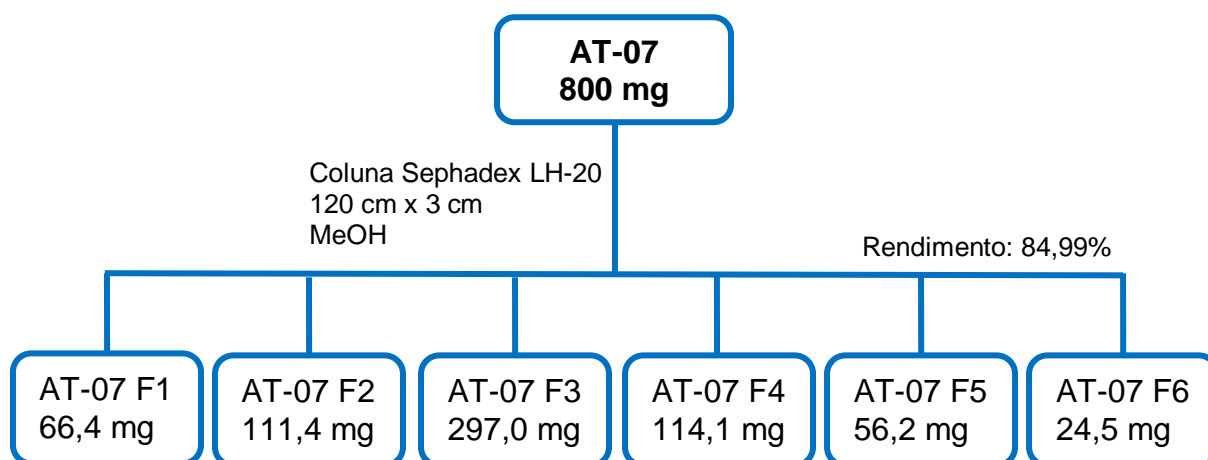
### 2.2.3 Perfil do extrato e frações

O perfil cromatográfico das amostras por CLAE foi realizado no equipamento Shimadzu (Materiais 2.1.3.a), sendo a amostra preparada com 4 mg do extrato bruto ou fração solubilizado em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) e eluição com MeOH/H<sub>2</sub>O em modo gradiente (5 → 100% em 40 min), permanecendo em 100% MeOH até 45 minutos.

Os perfis em RMN de <sup>1</sup>H foram realizados em espectrômetro Bruker 300 (Materiais 2.1.4.a). As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado, DMSO-*d*<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich).

### 2.2.4 Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia por exclusão de tamanho

O fracionamento do extrato bruto de AT-07 foi realizado utilizando Cromatografia de exclusão por tamanho em coluna de Sephadex LH-20 (Materiais 2.1.2.a). Foram feitas duas eluições, cada uma com 400 mg de extrato. A amostra foi solubilizada em metanol, e cada coluna forneceu 103 subfrações de aproximadamente 7 mL. Após remoção do solvente e análise por CCD em gel de sílica, as frações foram reunidas de acordo com a similaridade de cor e fatores de retenção (R<sub>f</sub>) originando 6 frações (Figura 6).



**Figura 6-** Fracionamento do extrato AT-07 por CC em Sephadex LH-20 e eluente metanol 100%.

As frações AT-03, AT-04 e AT-06 foram analisadas e selecionadas a partir de seus perfis cromatográficos e espectros de RMN, procedimento descrito no item 2.2.3, para isolamento dos metabólitos secundários.

#### 2.2.5 Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F3

A fração AT-07 F3 (297,0 mg) foi solubilizada em metanol 100% e submetida a fracionamento por CLAE-DAD (Materiais 2.1.2. b), eluída com MeOH/H<sub>2</sub>O em modo gradiente tipo *step* iniciando com 10 até 100% de MeOH em sucessivos acréscimos de 10% de MeOH. Foram obtidas 22 subfrações que foram analisadas por CLAE e selecionadas para purificação.

Os metabólitos secundários das subfrações foram isolados por CLAE (Materiais 2.1.3 a), sendo as amostras preparadas na concentração de 4 mg/mL, e cada injeção feita em volume de 30µL.

A subfração F3-13, foi eluída em modo isocrático 45% de MeOH, e levou ao isolamento das substâncias F3-13-S1 (4,4 mg) e F3-13-S2 (10,5 mg).

#### 2.2.6 Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F4

A fração AT-07 F4 (114,1 mg) foi submetida a CLAE em escala semipreparativa (Materiais 2.1.3.c) eluída com MeOH/H<sub>2</sub>O em modo gradiente, variando de 20/45/45/60/100% de MeOH em 0/20/30/45/47 min, O fracionamento permitiu isolar as substâncias F4-2 (2,3 mg) e F4-10 (1,1 mg).

#### 2.2.7 Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F6

O isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07-F6 (24,5 mg) foi realizado por CLAE-DAD semipreparativa (Materiais 2.1.3.b), eluída com MeOH/H<sub>2</sub>O em modo gradiente (20/70/100% de MeOH em 0/35/37 min). Este procedimento permitiu isolar as substâncias F6-9 (1,5 mg) e F6-15 (0,8 mg).

### 2.2.8 Identificação das substâncias isoladas

As substâncias isoladas foram identificadas por meio de técnicas espectroscópicas, como Ressonância magnética (RMN) nuclear uni e bi-dimensional, e espectrometria de massas, além de comparação com dados da literatura (Materiais 2.1.4. b/c e 2.1.4).

### 2.2.9 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, pelo grupo de “Cromatografia de bioafinidade e Produtos Naturais” sob supervisão da professora Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso.

As amostras foram submetidas ao ensaio anticolinesterásico *on-flow* com as enzimas acetilcolinesterase humana (AChE-hu) e de enguia elétrica (AChE-ee) imobilizadas em capilar de sílica fundida, resultando em biorreatores denominados ICER (Immobilized Capillary Enzyme Reactor) que foram acoplados a um sistema de CLAE, utilizando como fase móvel Tampão Tris 0,1M pH 8,0 e reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) 0,126 mM, vazão de 0,05 mLmin<sup>-1</sup>. Aplicou-se 10 µL da solução contendo 1 mM de Acetilcolina (ATChI) para AChE ee e 2 mM para AChE hu e 300 µg mL<sup>-1</sup> do extrato e frações dos extratos a serem testados.

O resultado do teste foi expresso em percentuais de inibição da enzima acetilcolinesterase de enguia elétrica e humana, obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (A<sub>i</sub>) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (A<sub>0</sub>), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left[ 1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Perfil químico do extrato e frações

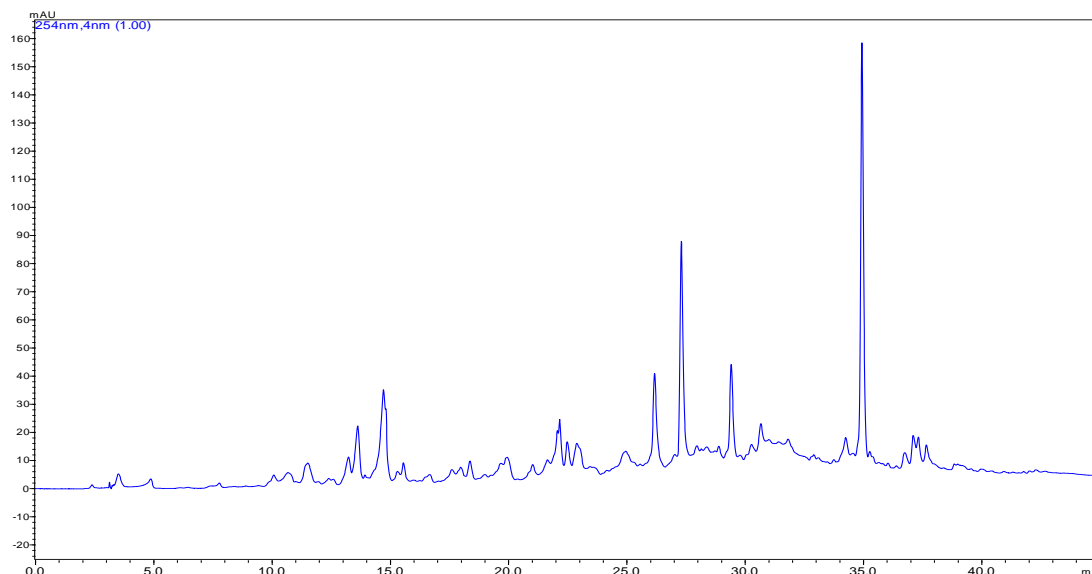
O fungo endofítico AT-07 foi identificado como *Microascus intricatus* com 86% de identidade. A linhagem do fungo AT-07 quando cultivado em pequena escala, em 3 erlenmeyers, rendeu massa de 50,8 mg. Assim, o cultivo em 64 erlenmeyers produziria aproximadamente 1,08 g, enquanto a massa real obtida do extrato foi de 1,185 g, valor próximo ao esperado.

O perfil cromatográfico do extrato bruto da linhagem fúngica AT-07 obtido por CLAE (Figura 7) e o espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio do extrato do fungo AT-07 e do meio de cultivo PDB (Figura 8) mostram a produção metabólica do fungo *Microascus* sp..

A análise do perfil cromatográfico evidencia a produção de substâncias de média e baixa polaridade. Além disso, a ausência de bandas de alta polaridade nos primeiros minutos da corrida indica que a partição com água foi eficiente na retirada dos resíduos de açúcar provenientes do meio.

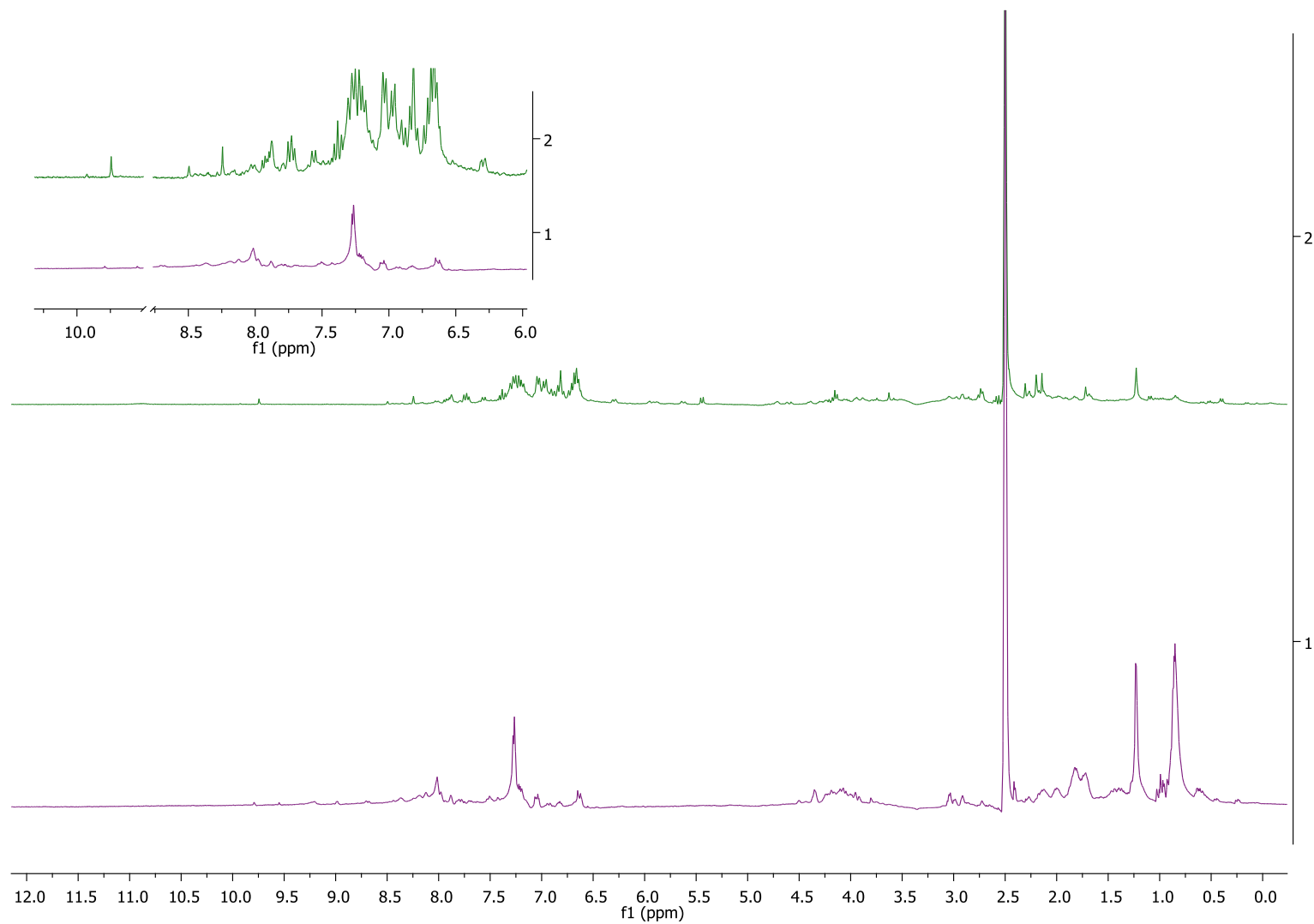
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato da linhagem AT-07 evidenciou hidrogênios olefínicos, carbinólicos, metílicos, metilênicos e metínicos, com sinais de  $\delta_{\text{H}}$  0.8 até aproximadamente  $\delta_{\text{H}}$  8.0, incluindo uma região complexa associada a H aromáticos, aproximadamente em  $\delta_{\text{H}}$  7.0, além do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  9.75, indicativo de grupo aldeído. Esses dados, associados ao perfil cromatográfico por CLAE-DAD, reforçam a diversidade metabólica deste extrato.

As diferenças entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  podem ser observadas no padrão e número de sinais, principalmente na região de H aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  aproximadamente 7.0) e na região característica de hidrogênios olefínicos, carbinólicos, metílicos, metilênicos e metínicos entre  $\delta_{\text{H}}$  0.8 e 5.0.



**Figura 7-** Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD do extrato bruto de AT-07. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5  $\mu$ m), eluição em gradiente com MeOH/H<sub>2</sub>O 5%  $\rightarrow$  100% em 40 min, 1 mL/min, detecção em 254 nm).



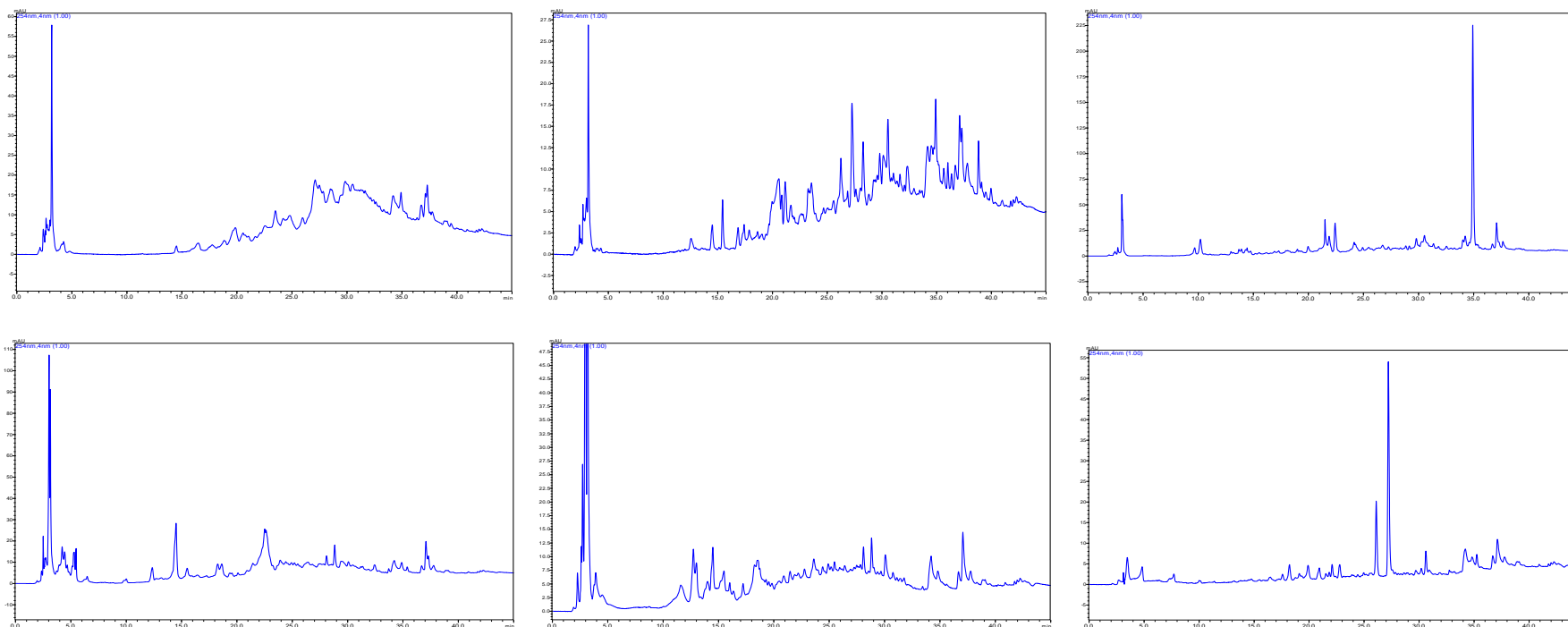


**Figura 8-** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do extrato bruto de AT-07 (**2**) e do meio de cultivo (**1**) (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).

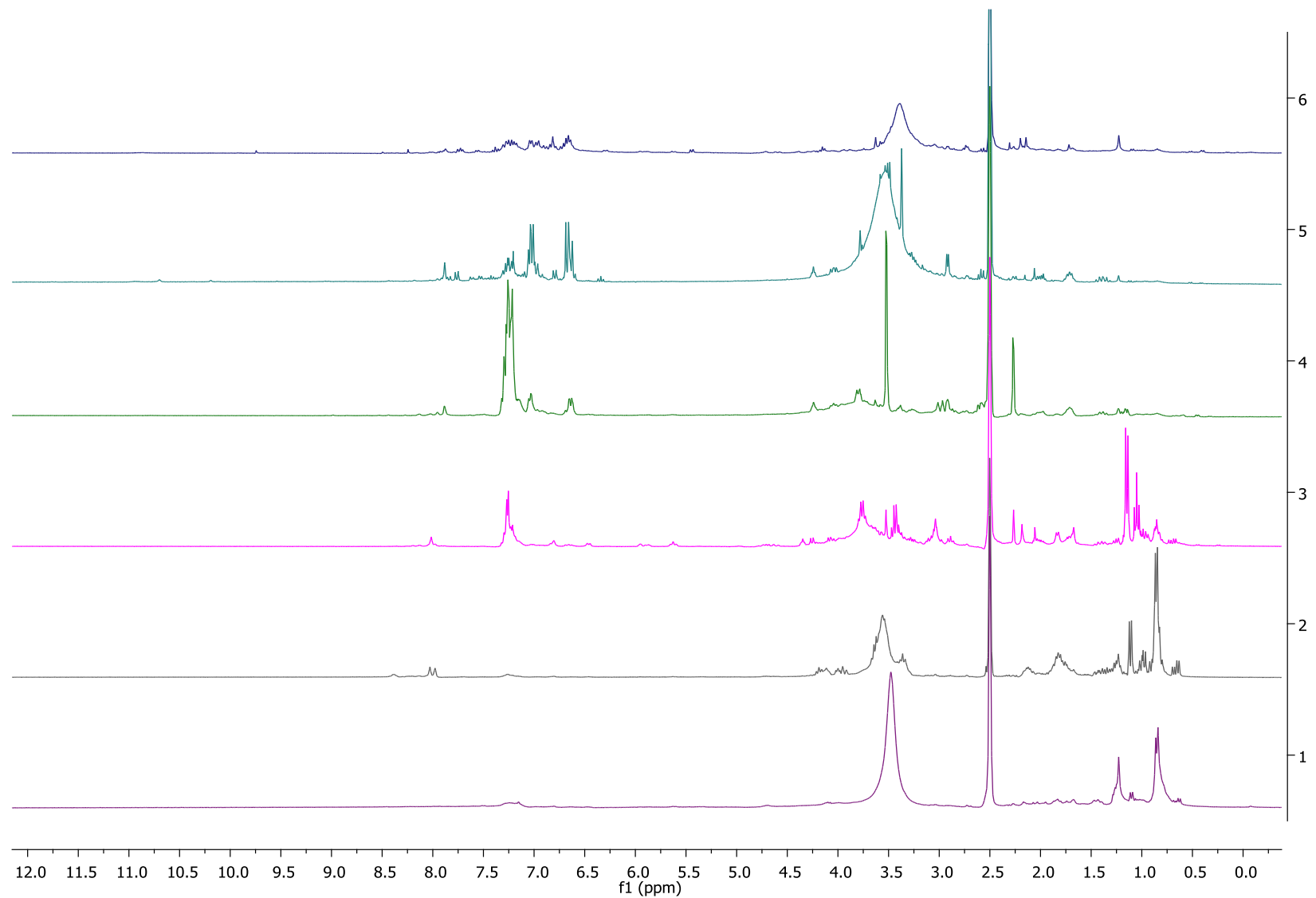
O extrato do fungo *Microascus intricatus* foi fracionado por CC de Sephadex LH-20, resultando em 6 frações. Os perfis cromatográficos das frações apresentaram bandas por todo o cromatograma, demonstrando a presença de substâncias com diferentes polaridades, o que era esperado, pois um fracionamento com Sephadex LH-20 separa as moléculas preferencialmente por tamanho (exclusão), sendo a separação por polaridade (adsorção) menos acentuada (Figura 9).

A complexidade dos espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das frações obtidas sugerem a presença de constituintes de várias classes metabólicas, evidenciando assim a quimiodiversidade dos metabólitos produzidos pelo fungo *Microascus intricatus* (Figura 10). As frações 3 a 6 apresentaram uma região complexa de hidrogênios aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  6.0 e 8.0) e as frações 1 a 3 apresentaram sinais intensos na região de hidrogênios alifáticos, entre  $\delta_{\text{H}}$  1.0 e 3.0.

Após análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e perfis cromatográficos das frações, as frações AT-07 F3, AT-07 F4 e AT-07 F6 foram selecionadas para estudo químico mais detalhado, incluindo a purificação de seus constituintes químicos.



**Figura 9-** Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD das frações AT-07 F1, AT-07 F2, AT-07 F3, AT-07 F4, AT-07 F5, AT-07 F6. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5  $\mu$ m) eluída em gradiente com MeOH/H<sub>2</sub>O 5%→100% em 40min, 1mL/min, 254 nm).

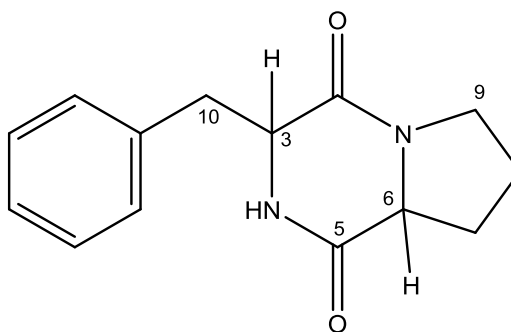


**Figura 10-** Espectro de RMN de hidrogênio das frações AT-07 F1(1), AT-07 F2 (2), AT-07 F3 (3), AT-07 F4 (4), AT-07 F5 (5) e AT-07 F6 (6) (DMSO-*d*<sub>6</sub>,300 MHz).

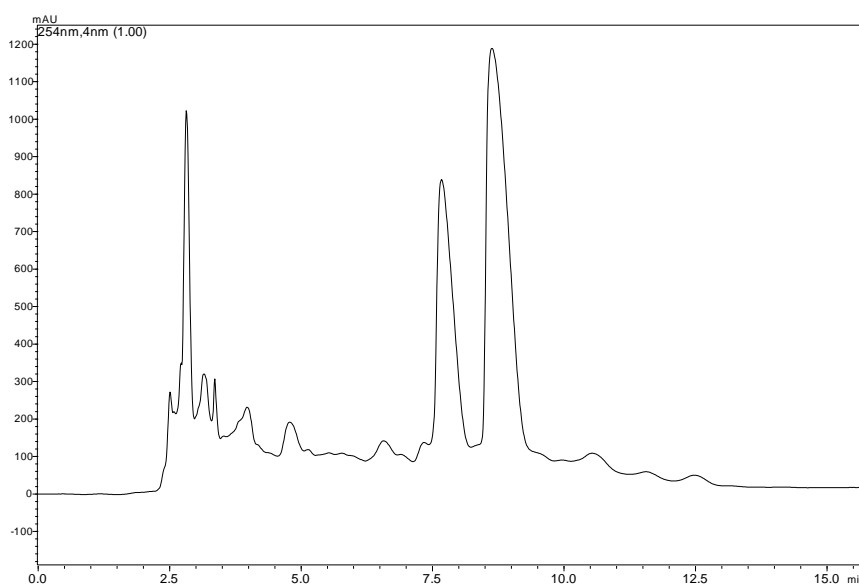
### 3.2. Identificação estrutural das substâncias F3-13S1 e F3-13S2

As substâncias F3-13 S1 e F3-13 S2 foram isoladas da subfração F3-13, e identificadas por meio da análise dos espectros de massas, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC, bem como comparação com dados relatados na literatura, como a 2,5-dicetopiperazina ciclo (Pro-Phe) (Figura 11). Os experimentos de NOESY evidenciaram algumas diferenças possivelmente associadas a estereoquímica destas substâncias..

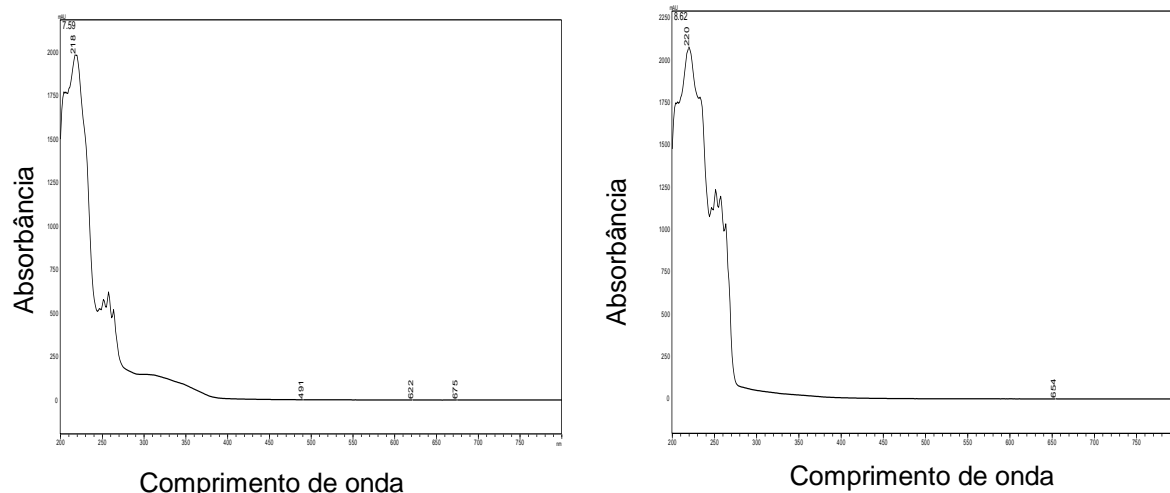
Evidências adicionais da similaridade estrutural decorrem dos tempos de retenção muito próximos para F3-13S1  $t_r=7,6$  e F3-13S2  $t_r= 8,6$  (Figura12), durante seu isolamento por CLAE-DAD (Método 2.2.5) e dos espectros de UV (Figura 13) praticamente iguais com absorção em 251 nm, sugerindo pertencerem à mesma classe de metabólitos.



**Figura 11-** Estrutura da 2,5-dicetopiperazina ciclo (Pro-Phe).



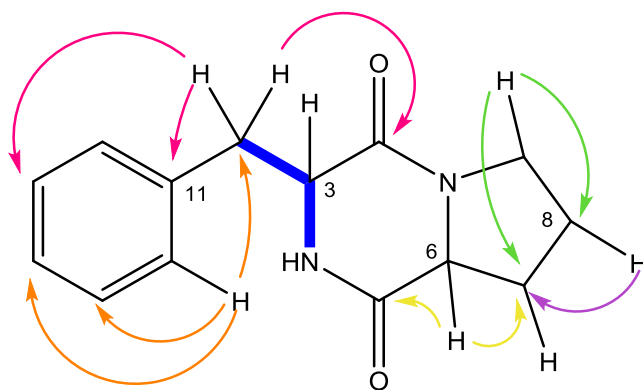
**Figura 12-** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração F3-13. Coluna C-18 (250 x 4,6 nm 5 $\mu\text{m}$ ) eluído em modo isocrático com MeOH/H<sub>2</sub>O (45:55) em 15 minutos, 1mL/min, 254 nm.



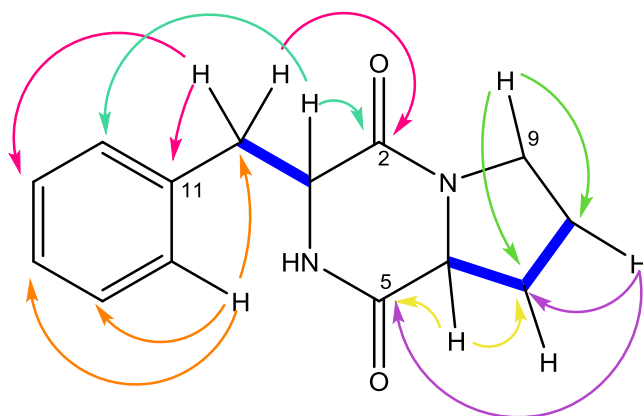
**Figura 13-** Espectro no UV-Vis das substâncias F3-13S1 e F3-13S2.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância F3-13 S1 (Figuras 16 e 17) sugeriu tratar-se de uma dicetopiperazina, pela presença de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7.28 e 7.14 – região de aromáticos - próximos e poucos resolvidos, com integral para 5 hidrogênios, indicando um anel aromático monossustituído; sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2.90 (H-10;  $\delta_{\text{C}}$  39.6) e 3,03 (H-10;  $\delta_{\text{C}}$  39.6) pouco resolvidos, atribuídos a hidrogênios diastereotópicos, que se correlacionam (Figura 14 e 20) com os carbonos do anel aromático, como evidenciado pelo experimento HMBC, e com um duplete de duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4.00 (H-3;  $\delta_{\text{C}}$  58.0), como evidenciado pelo experimento COSY (Figuras 14 e 19), sugerindo assim uma unidade do aminoácido fenilalanina. O experimento TOCSY (Figura 21) irradiado em  $\delta_{\text{H}}$ : 3.21 (H-9;  $\delta_{\text{C}}$  44.7) demonstrou que os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1.79 e 1.57 (H-8;  $\delta_{\text{C}}$  21.4),  $\delta_{\text{H}}$  1.94 e 1.58 (H-7;  $\delta_{\text{C}}$  28.6) e  $\delta_{\text{H}}$  2.94 (H-6;  $\delta_{\text{C}}$  57.3) fazem parte do mesmo sistema, e foram atribuídos ao aminoácido prolina. Além destes, os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  164.8 (C-2) e  $\delta_{\text{C}}$  168.4 (C-5), atribuídos a carbonos de carbonila, e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  8.20 (H-4), atribuído ao hidrogênio ligado a nitrogênio, confirmam a estrutura de uma 2,5-diketopiperazina, a ciclo-(Pro-Phe).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância F3-13S2 (Figuras 22 e 23) são similares aos espectros obtidos para substância F3-13S1, diferindo principalmente no sinal do H-6 em  $\delta_{\text{H}}$  2.94 ( $\delta_{\text{C}}$  57.3) para a substância F3-13S1 e  $\delta_{\text{H}}$  4.07 ( $\delta_{\text{C}}$  58.5) para substância F3-13S2 (Tabela 1).



**Figura 14-** Correlações de HMBC (→) e COSY (—) da substância F3-13S1



**Figura 15-** Correlações de HMBC (→) e COSY (—) da substância F3-13S2

**Tabela 1-** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e HMBC (DMSO- $d_6$ , 600 e 150 MHz) das substâncias F3-13S1 e F3-13S2.

Nº	F3-13 S1			F3-13 S2		Correlações via HMBC
	$\delta\text{H}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta\text{C}$	Correlações via HMBC	$\delta\text{H}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta\text{C}$	
2	--	164.8		--	165.1	
3	4.00 (dd; $J= 9.5$ e $5.3\text{Hz}$ )	58.0		4.36 (t; $J= 4.9$ )	55.8	C-1 C-11
4	8.20 (s)	--	C-1 C-6	8.03 (s)	--	C-1 C-6
5	--	168.8		--	169.1	
6	2.94 (m)	57.2	C-5 C-7	4.07 (dd; $J=9.0$ e $7.5$ )	58.5	C-5 C-7
7	1.94 (m)	28.6	C-3 C-4 C-7	1.41 (m)	27.8	C-3 C-4 C-6
	1.58 (m)			2.01 (m)		
8	1.79 (m)	21.4	C-5	1.72 (m)	21.9	C-3 C-5 C-6 C-7
	1.57 (m)					
9	3.42 (m)	44.7	C-4 C-5	3.40 (m)	44.6	C-4 C-5
	3.21 (ddd $J= 11.7$ ; $8.9$ e $2.9\text{Hz}$ )			3.27 (m)		
10	2.90 (m)	39.6	C-1 C-9 C-11 C-12	3.03 (dd; $J= 14.2$ e $5.0$ )	35.4	C-1 C-9 C-11 C-12
	3.03 (m)			3.07 (dd; $J= 14.2$ e $5.2$ )		
11	--	136.1		--	137.3	
12 e 16	7.14 (m)	129.9	C-10 C-13 C-14	7.27 (m)	129.9	
13 e 15	7.28 (m)	128.3		7.27 (m)	128.0	
14	7.28 (m)	127.0		7.20 (m)	126.4	C-12



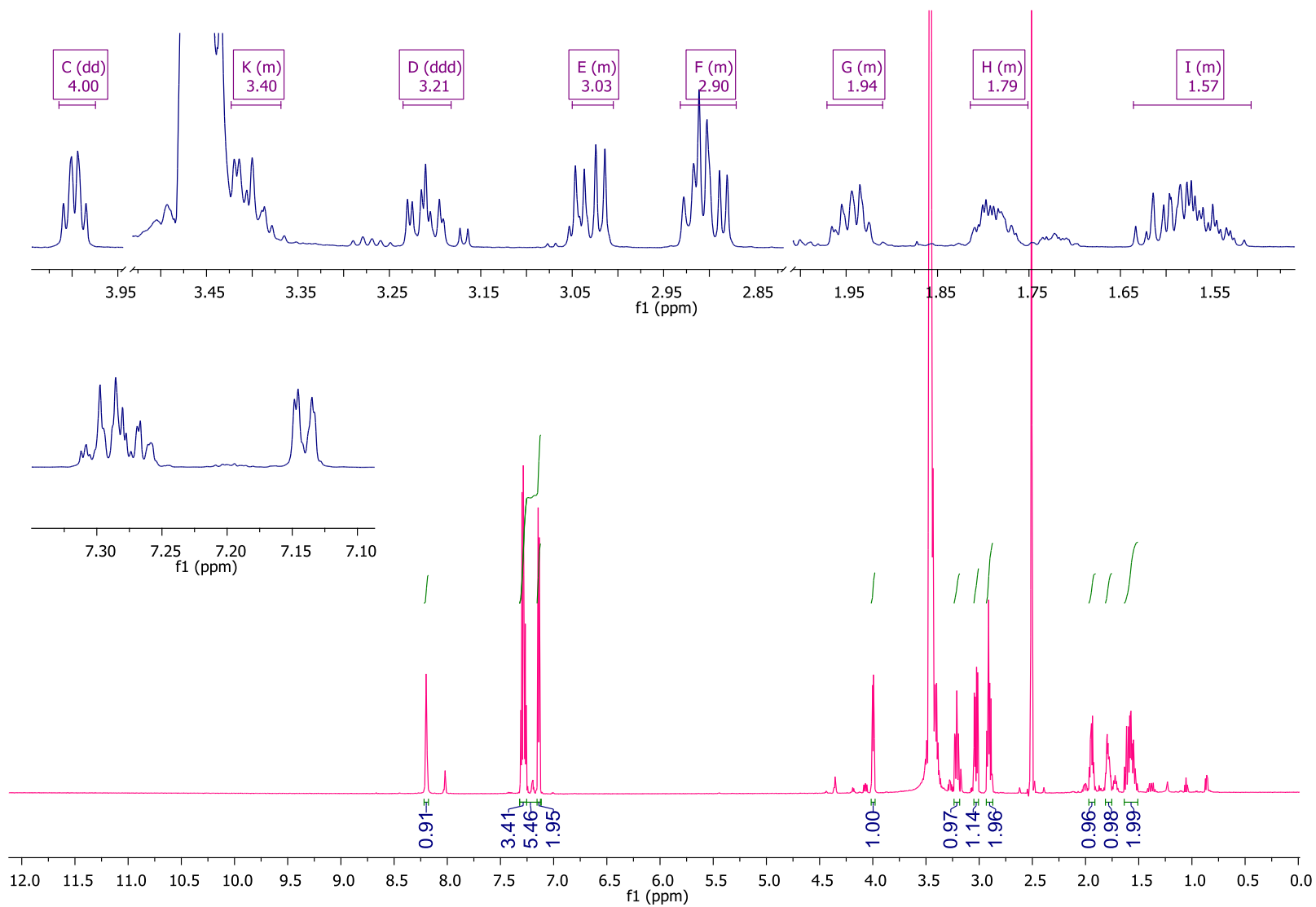


Figura 16- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância F3-13S1 (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz).

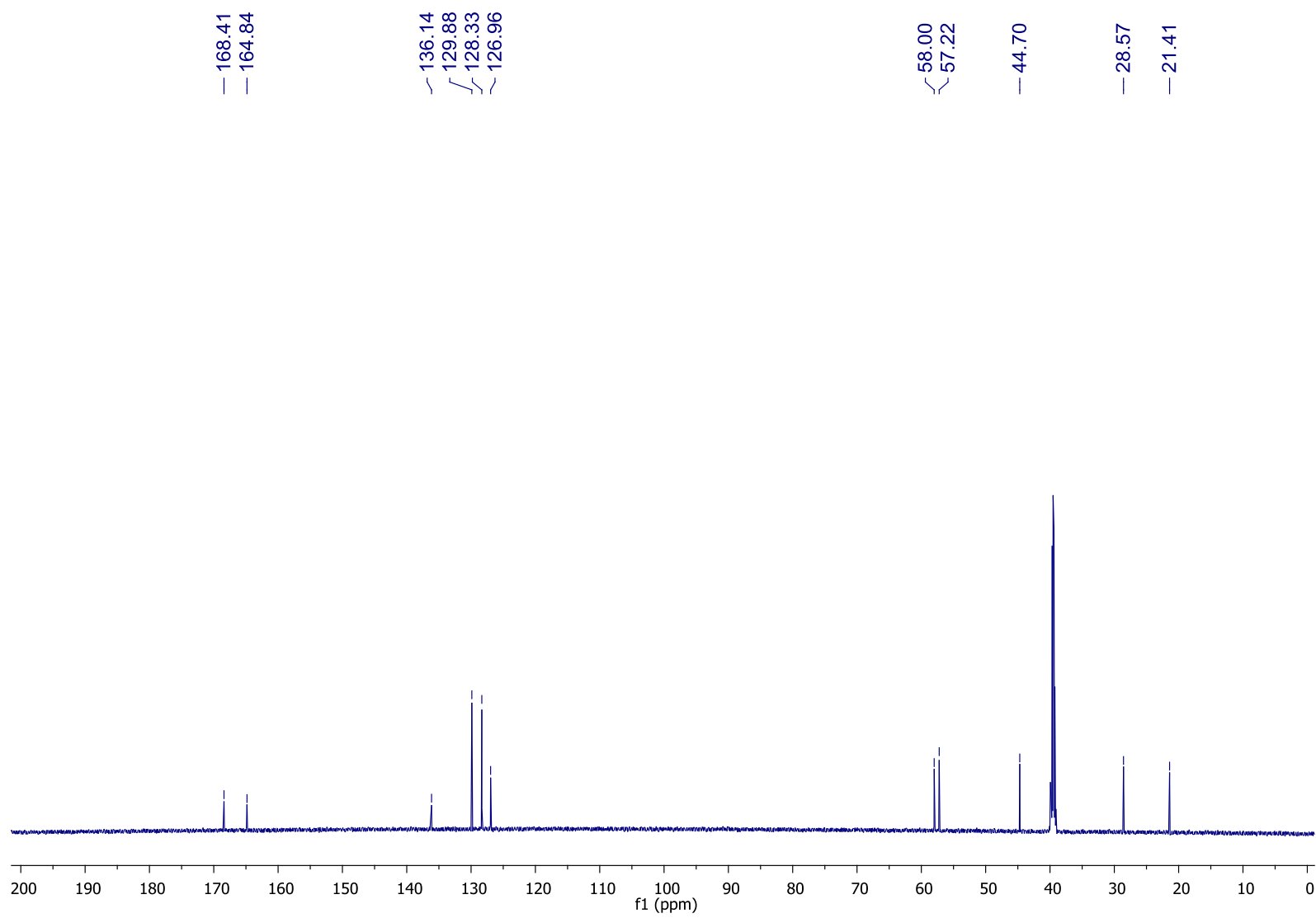
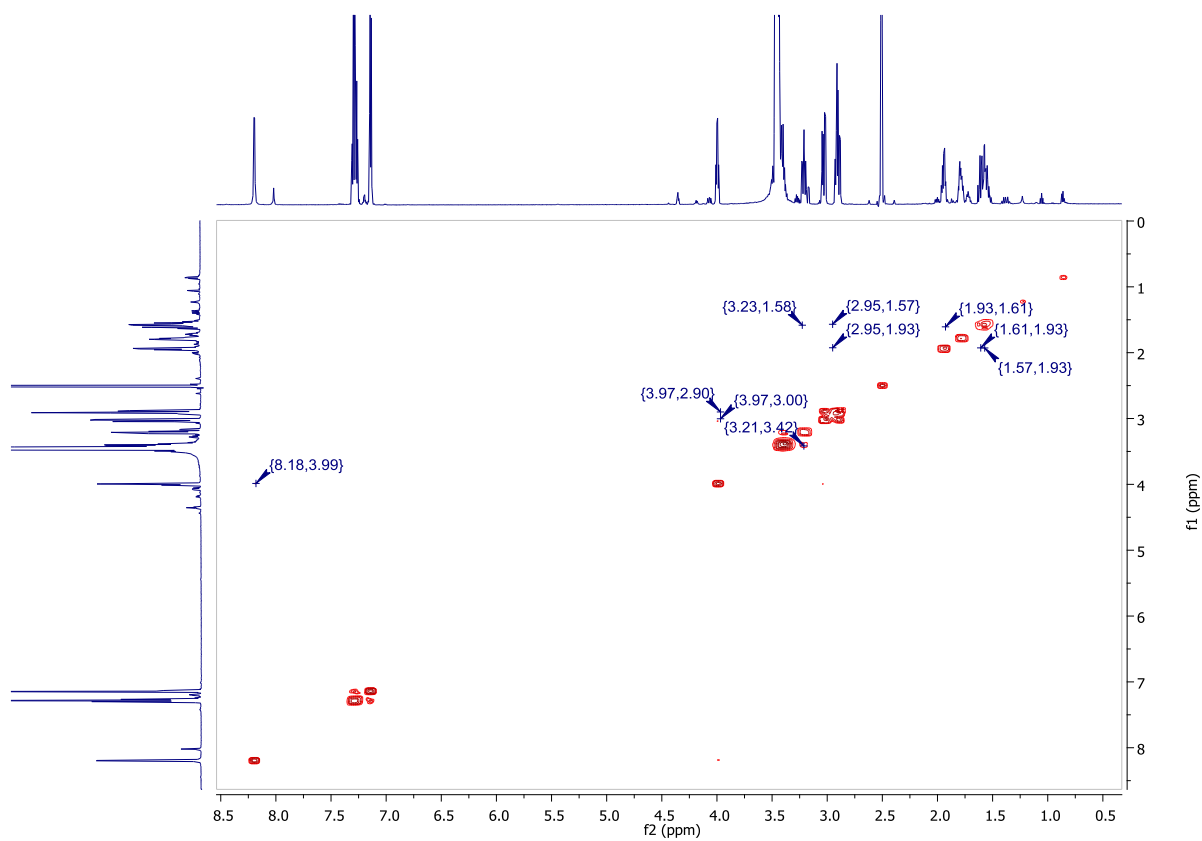
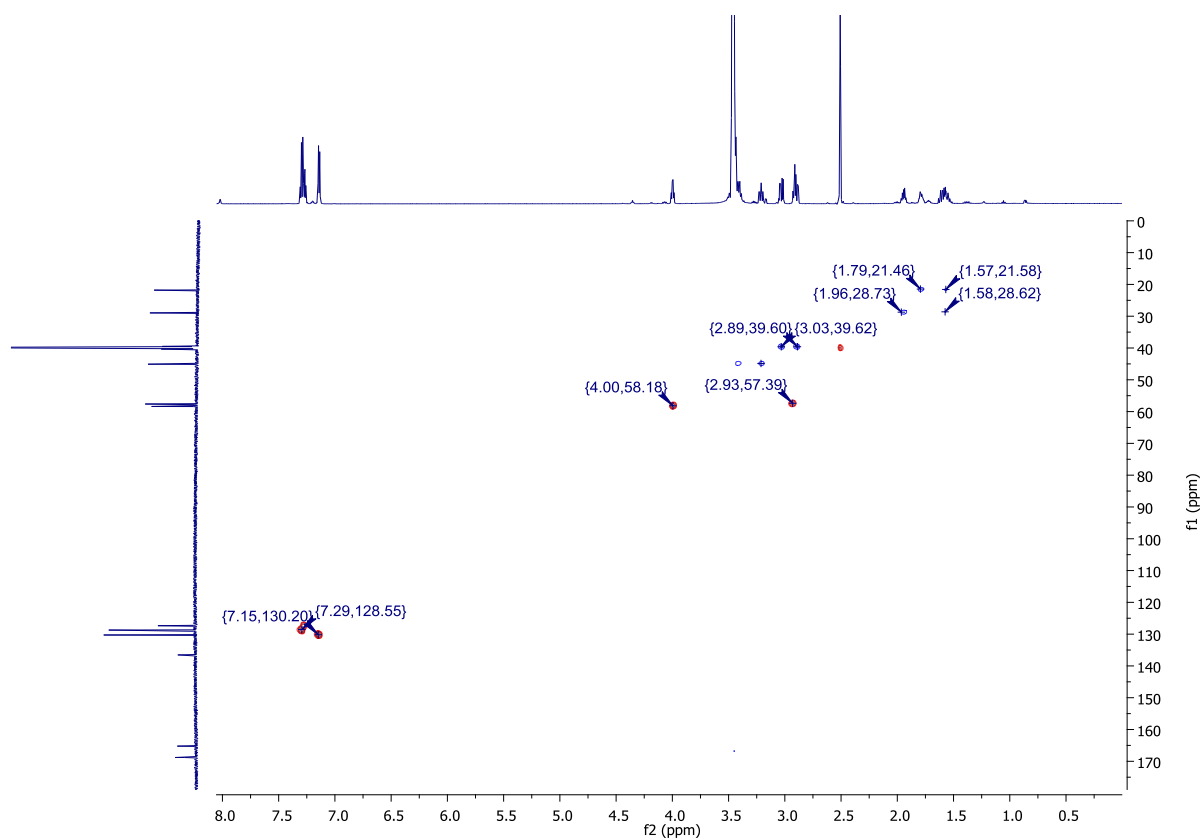


Figura 17- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F3-13S1 (DMSO- $d_6$ , 150 MHz).



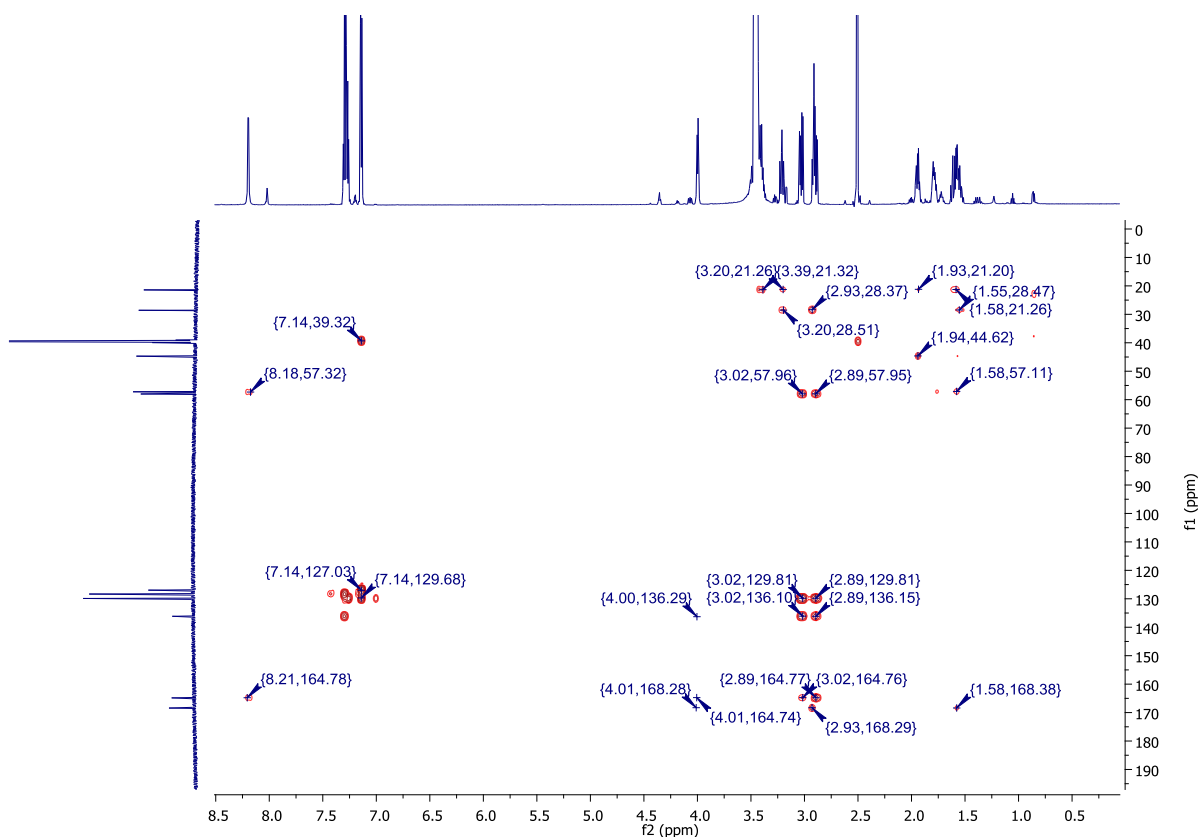


Figura 20- Mapa de contorno HMBC da substância F3-13S1 (DMSO- $d_6$ ; 600 e 150 MHz).

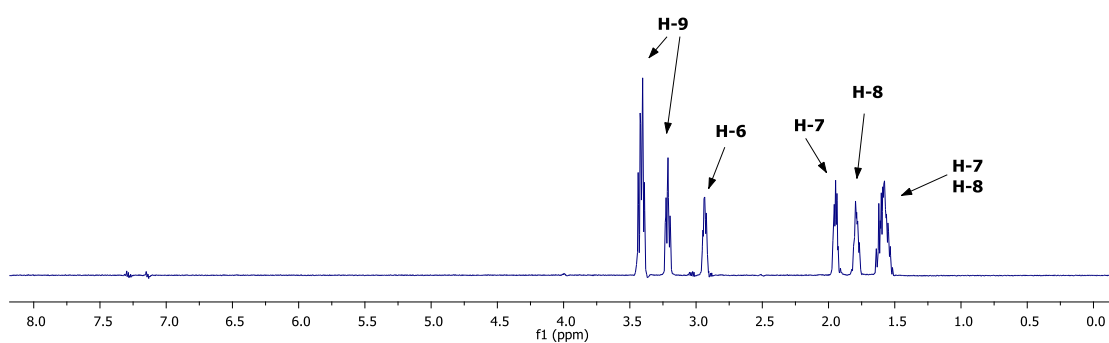


Figura 21- Espectro de TOCSY irradiado no H-9 ( $\delta_H$ : 3.21) da substância F3-13S1 (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).

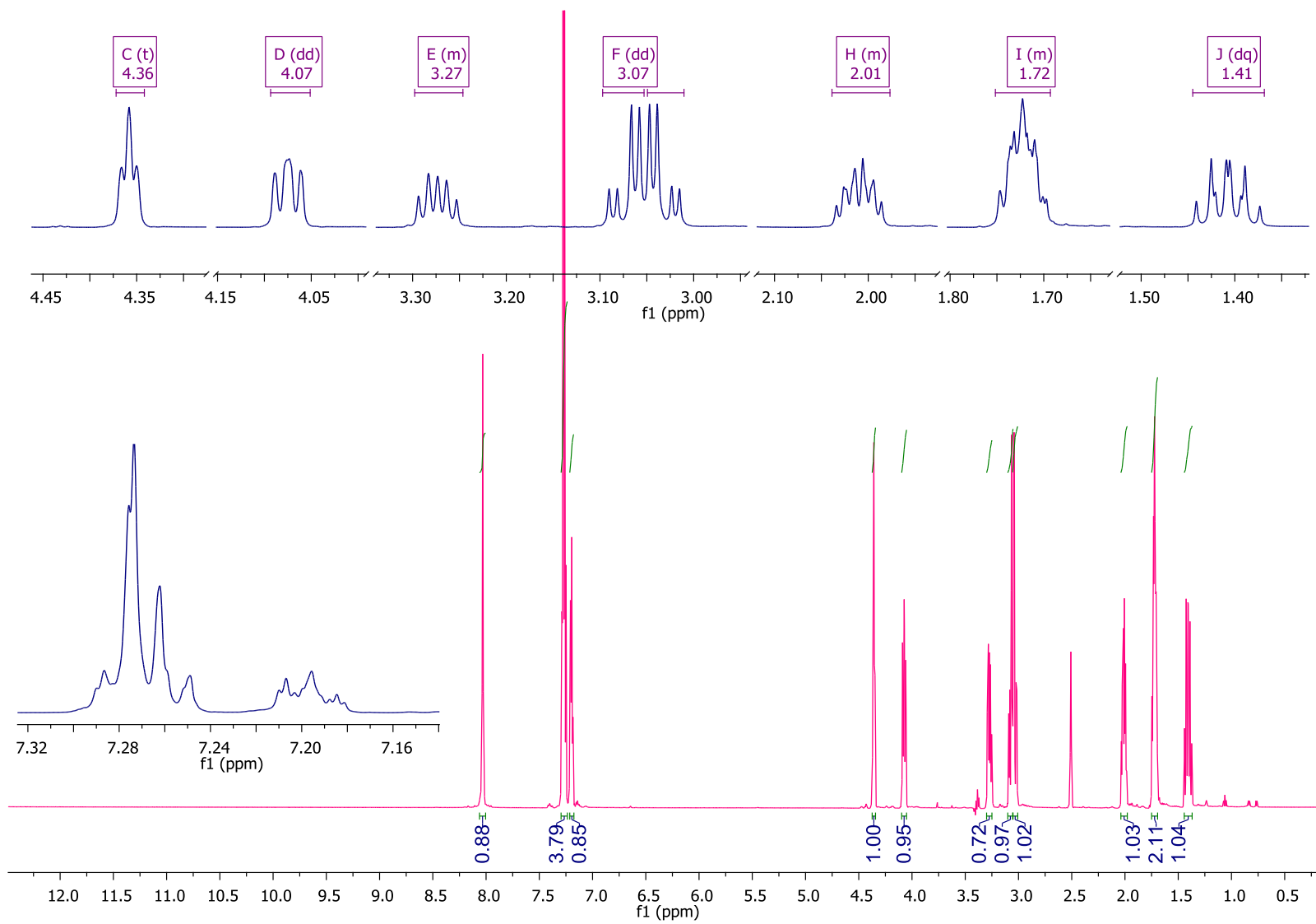
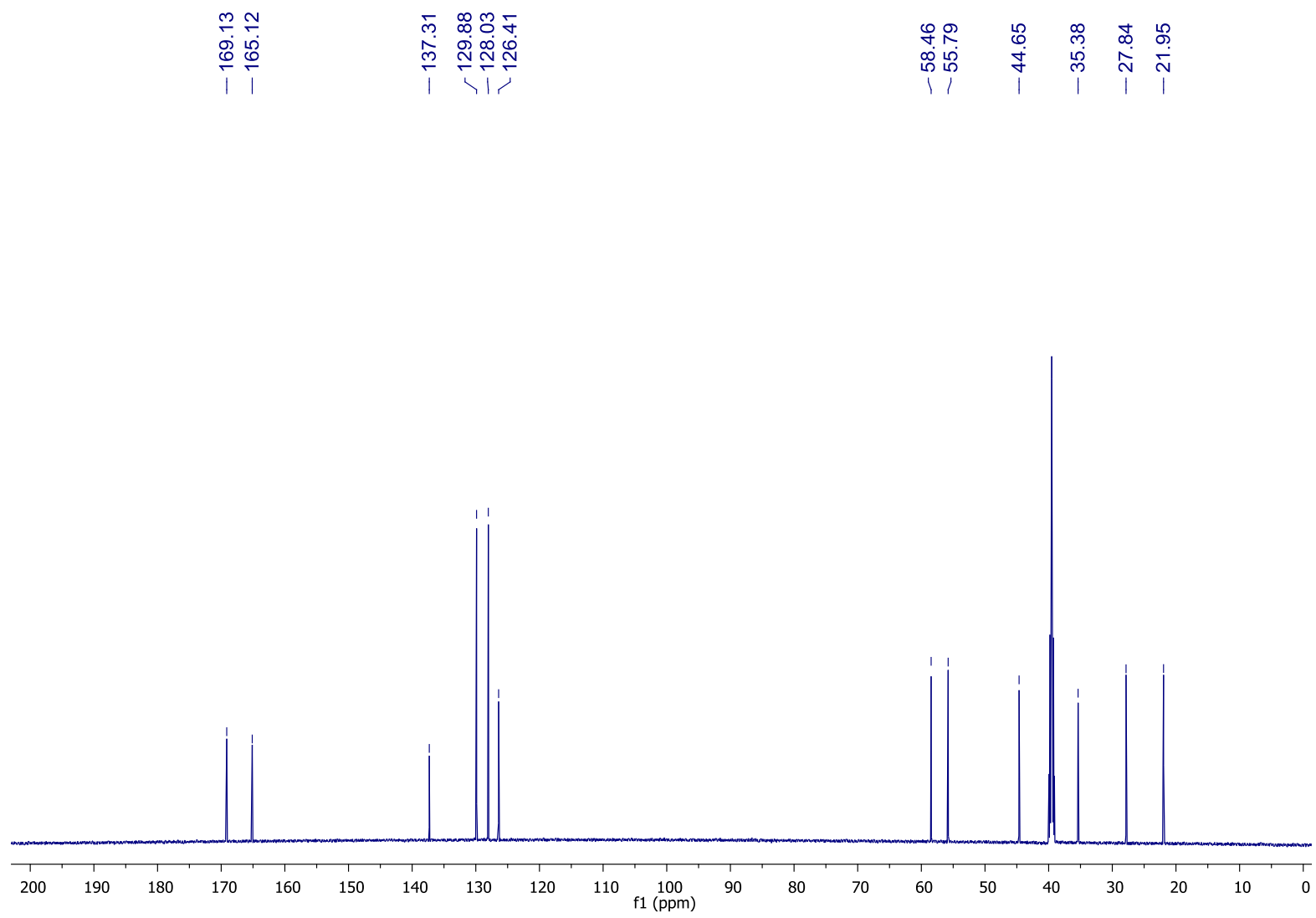


Figura 22- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F3-13S2 ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz).



**Figura 23-** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F3-13S2 (DMSO- $d_6$ , 150 MHz).

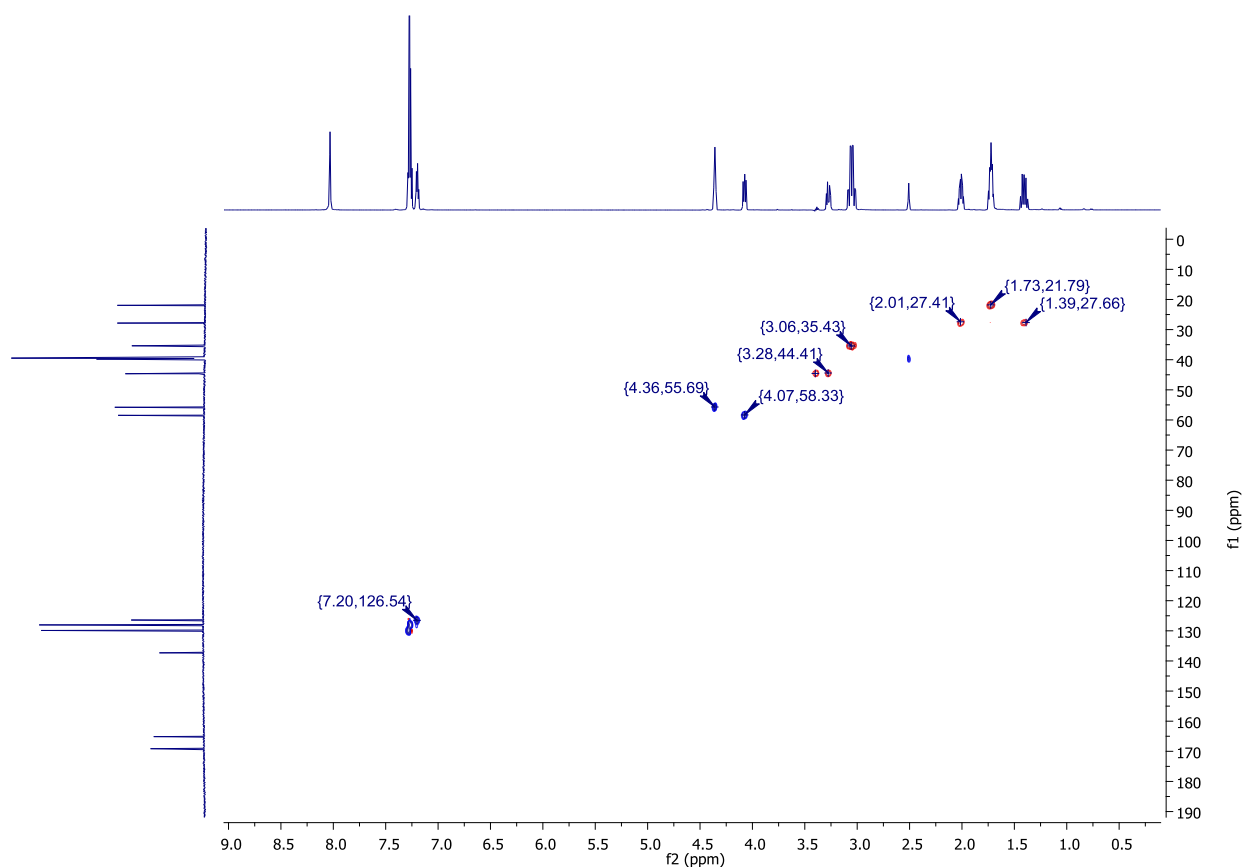


Figura 24- Mapa de contorno HSQC da substância F3-13S2 (DMSO- $d_6$ ; 600 e 150 MHz).

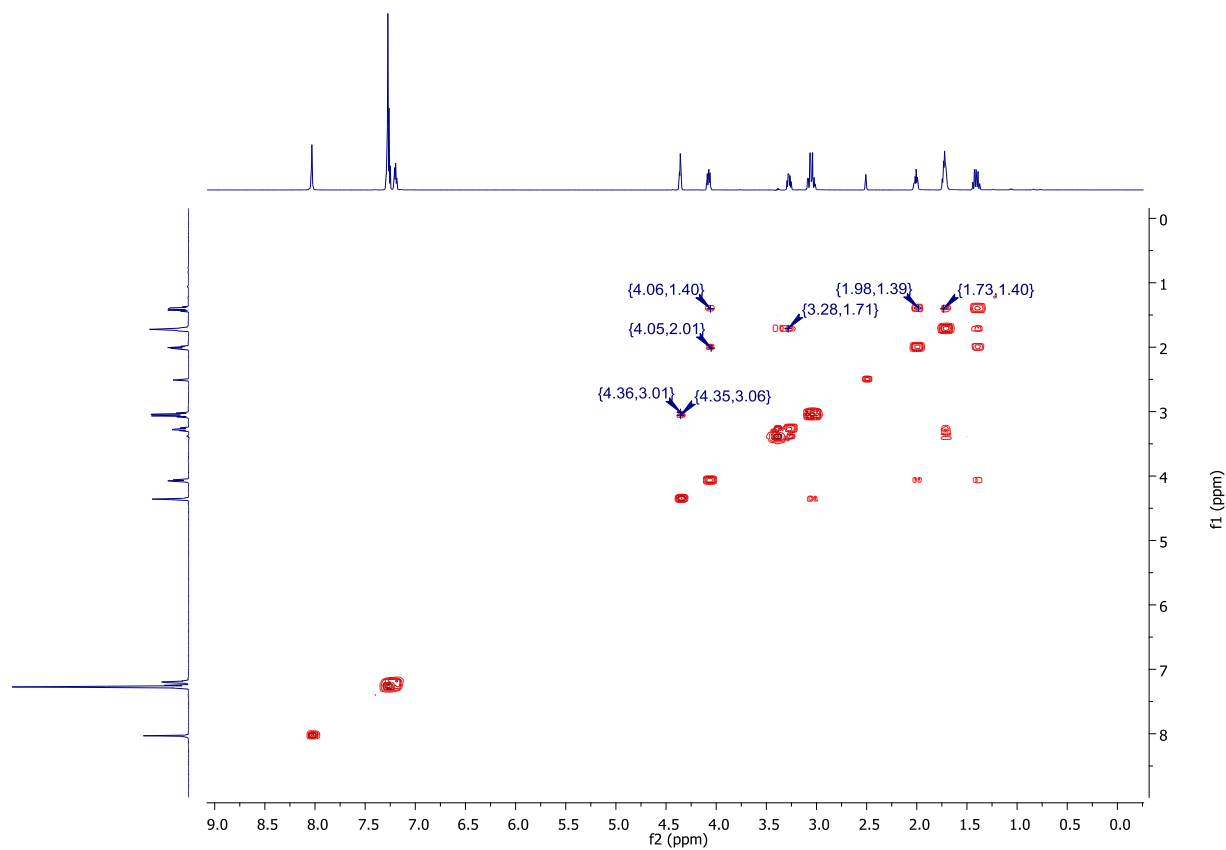
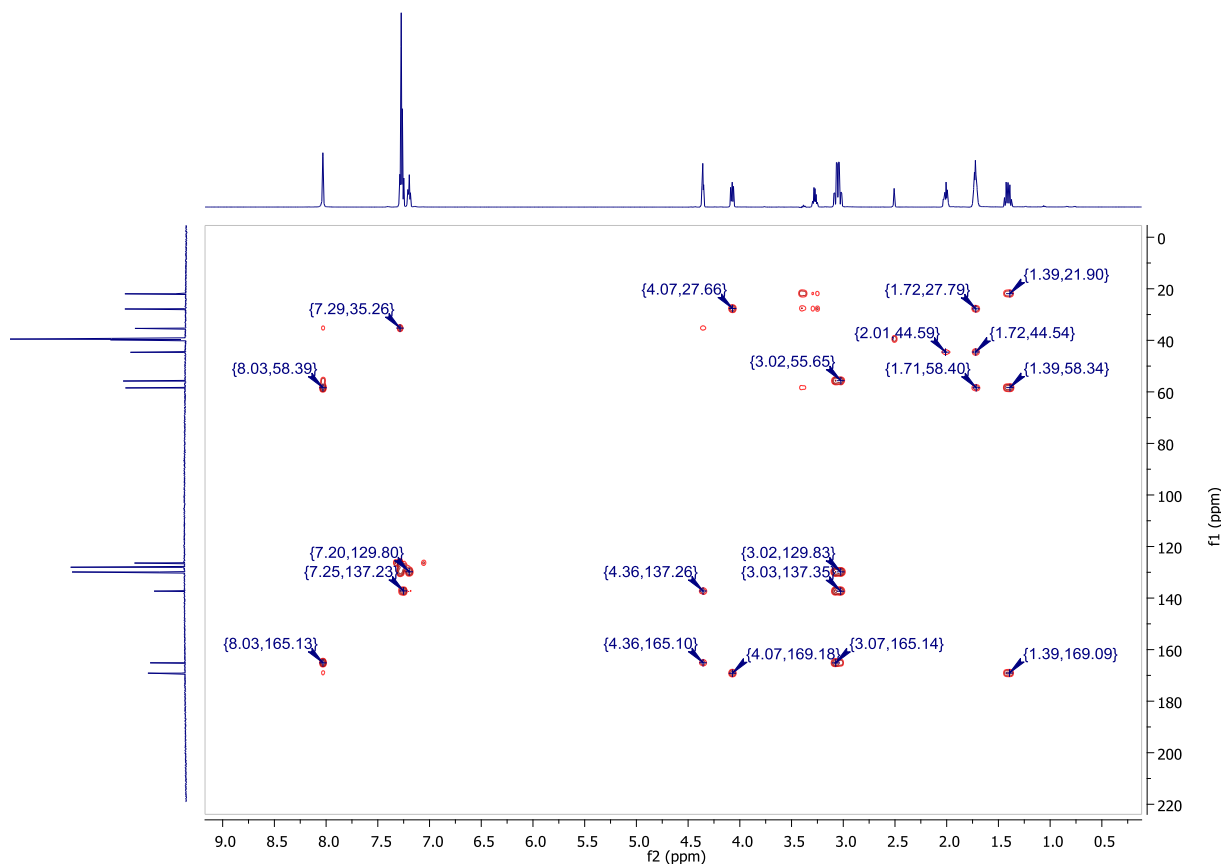


Figura 25- Mapa de contorno COSY da substância F3-13S2 (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).



**Figura 26-** Mapa de contorno HMBC da substância F3-13S2 (DMSO- $d_6$ ; 600 e 150 MHz).

O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular com  $m/z$  245,128.  $[M+H]^+$  (Apêndices 1 e 2) para as duas substâncias, sugerindo a fórmula molecular  $C_{14}H_{16}O_2N_2$ , e comprovando a proposta estrutural da ciclo Pro-Phe.

A diferença acentuada de deslocamento químico para H-6, bem como diferenças adicionais nos deslocamentos químicos de diversos hidrogênios e carbonos, com destaque para H-3, H-4, H-7, H-8, H-9 e H-10 e seus respectivos sinais de RMN de  $^{13}C$  (Tabela 1), e ainda o isolamento por CLAE com diferentes tempos de retenção, evidenciam que se trata de um par de diastereoisômeros, em virtude da presença de dois carbonos estereogênicos nestas substâncias (C-3 e C-6).

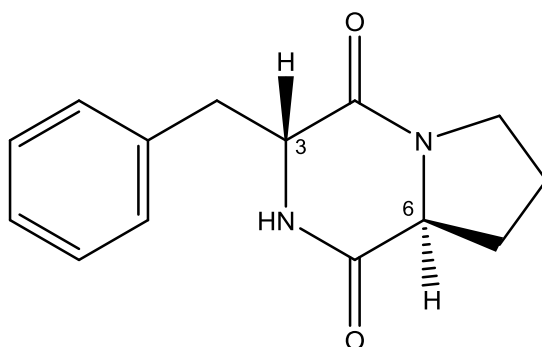
Experimentos de NOESY foram realizados a fim de sustentar essa afirmação, ao observarmos as configurações relativas dos carbonos estereogênicos. O NOESY 1D da substância F3-13 S1 não respondeu satisfatoriamente esta pergunta, pois o H-10 em  $\delta_H$  2.90 que acopla com H-3 ( $\delta_H$  4.36)- um dos centro quirais- possui um valor muito próximo ao H-6 que corresponde ao segundo centro quiral, o que mostrou a necessidade de se realizar o experimento NOESY 2D (Figura 29) .



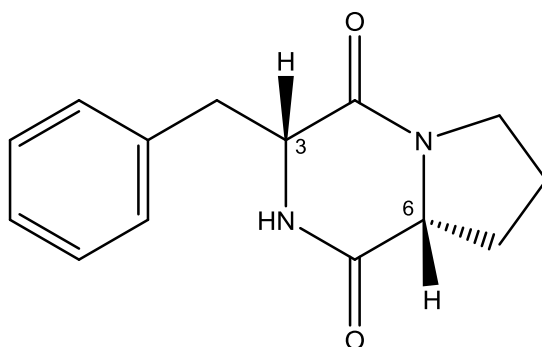
O experimento de NOESY 2D demonstrou que H-3 ( $\delta_H$  4.00) não acopla com H-6 ( $\delta_H$  2.94), ou seja, não estão suficientemente próximos e portanto não devem estar no mesmo lado do plano. No entanto, pode-se verificar, por meio dos acoplamentos observados, que H-3 está próximo a H-10  $\delta_H$  2.89, H-4  $\delta_H$  8.20 e H-7  $\delta_H$  1.90 (Figuras 29 e 30).

O experimento NOESY 1D realizado com a substância F3-13 S2 mostrou que H-6  $\delta_H$  4.07 e H-3  $\delta_H$  4.26 estão no mesmo lado do plano, assim como os hidrogênios H-10  $\delta_H$  3.07, H-4  $\delta_H$  8.03 e hidrogênios aromáticos  $\delta_H$  7.27 (Figura 28 e 31).

Assim, as substâncias F3-13S1 e F3-13S2 diferem pela geometria espacial em um dos seus dois centros quirais, confirmando que se trata de um par de diastereoisômeros (Figura 27 e 28). A maior blindagem de H-6 ( $\delta_H$  2.94) na substância F3-13S1 pode estar associada à sua localização na região espacial do cone de proteção da carbonila em C-7. Os experimentos de dicroísmo circular para ambas as substâncias serão realizados e devem confirmar a determinação estrutural para este par de diastereoisômeros.



**Figura 27-** Configuração relativa proposta pelo NOESY 2D para substância F3-13S1.



**Figura 28-** Configuração relativa proposta pelo NOESY 1D para substância F3-13S2.

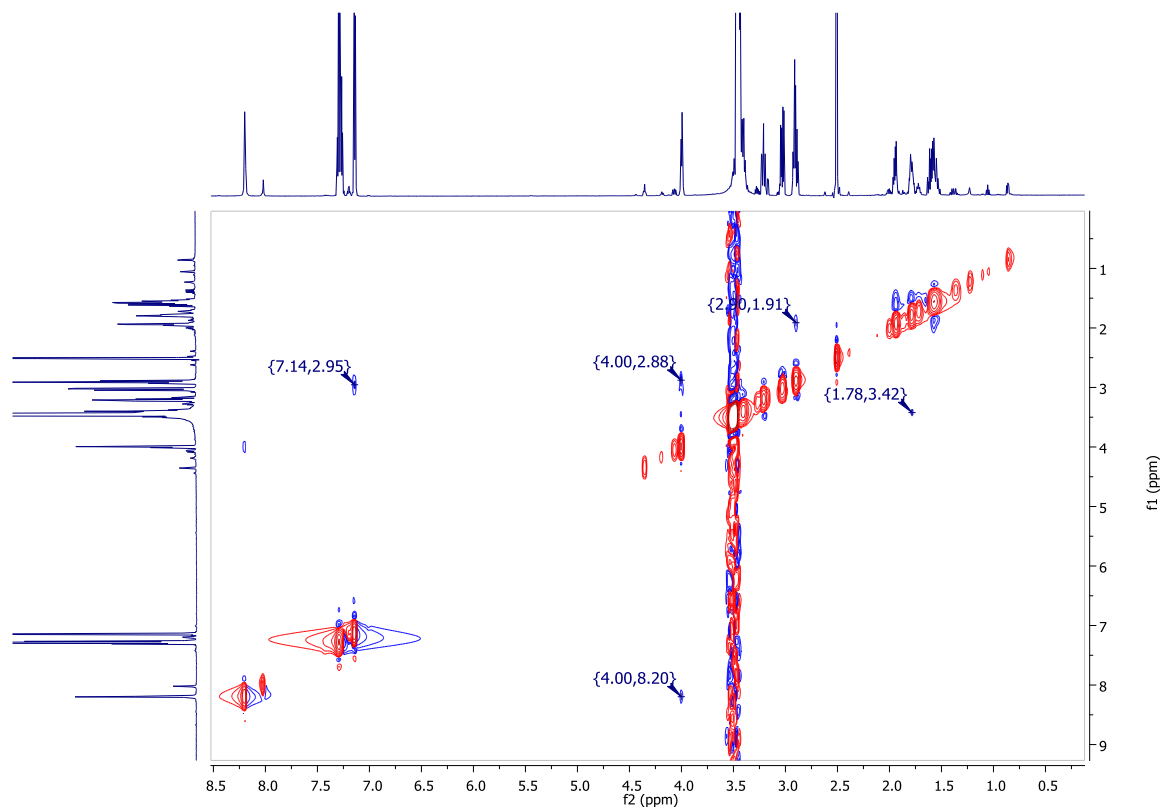


Figura 29- Espectro de NOESY 2D da substância F3-13S1 (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).

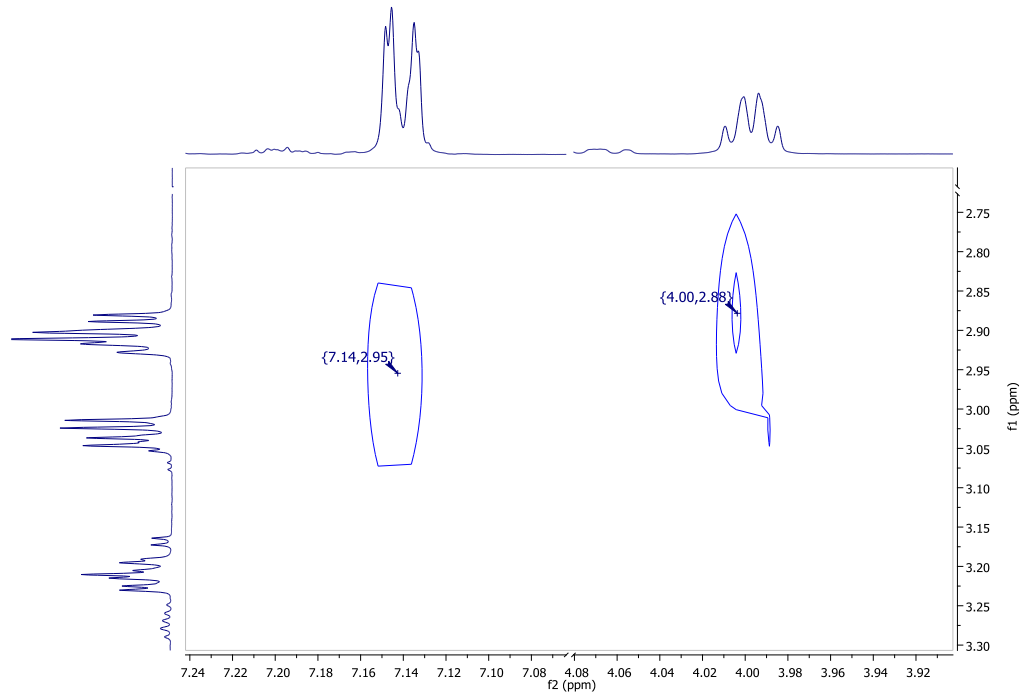
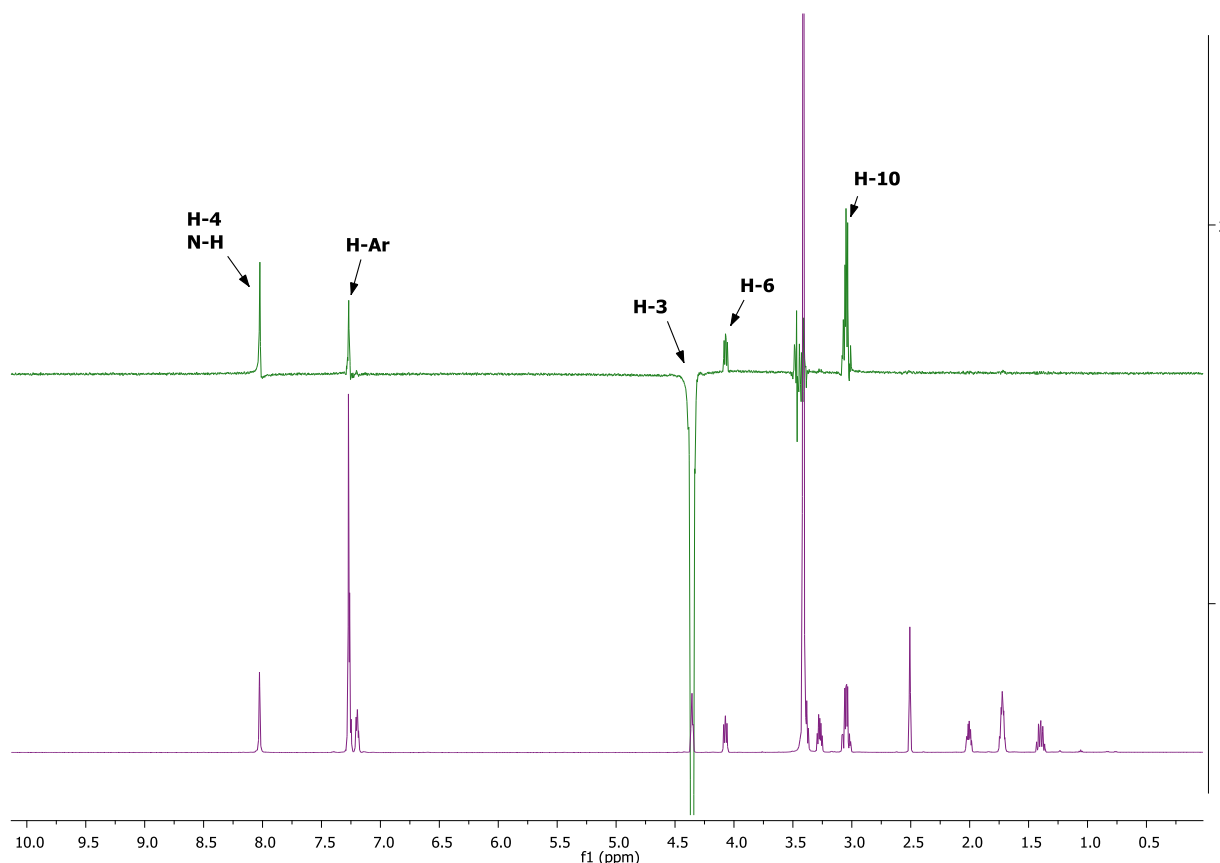


Figura 30- Expansão do espectro de NOESY 2D da substância F3-13S1 (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).

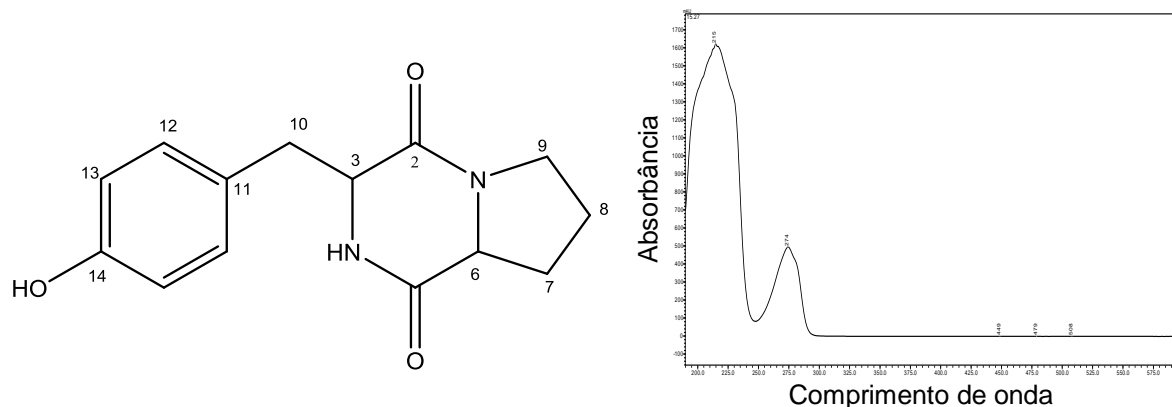


**Figura 31-** Espectro de NOESY 1D da substância F3-13S2 (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).

Fdhila e colaboradores (2003) testaram a atividade antibacteriana de três diferentes estereoisômeros da ciclo-(Pro-Phe). Estas substâncias exibiram forte atividade inibitória frente a *Vibrio anguillarum*, uma bactéria patogênica de peixes causadora da vibriose, doença com alta mortalidade principalmente na fase larva. Vale ressaltar que as substâncias apresentaram diferentes valores de concentração mínima inibitória (MIC) 0,03  $\mu\text{g/mL}$  (ciclo(D)-Pro-(D)-Phe), 0,1  $\mu\text{g/mL}$  (ciclo(D)-Pro-(L)-Phe) e 0,13  $\mu\text{g/mL}$  (ciclo(L)-Pro-(D)-Phe), todos menores do que o MCI da Oxitetracilina (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) antibiótico utilizado como padrão.

### 3.3 Identificação estrutural da substância F4-2

A substância F4-2, presente na fração AT-07 F4, foi identificada por análise dos espectros de massas, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC, bem como comparação com dados da literatura (SUGYAMA et al., 2009), como a 2,5-dicetopiperazina ciclo-(Pro-Tyr) (Figura 32).



**Figura 32-** Estrutura e espectro no UV-Vis da substância F4-2 (2,5-dicetopiperazina ciclo-(Pro-Tyr)).

É possível observar bandas de absorção em 274 e 215 nm no espectro de UV-Vis da substância F4-2 (Figura 32). O máximo de uma absorção secundária de um anel aromático de 6 membros ocorre em aproximadamente 255 nm. Quando adicionamos um substituinte OH ao anel, o novo cromóforo passa a absorver em aproximadamente 270 nm, devido ao par de elétrons livres do grupo OH, que aumenta a extensão da conjugação do sistema  $\pi$  causando um deslocamento batocrômico (PAVIA et al., 2012).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz da substância F4-2 (Figura 34) mostrou dois sinais com multiplicidade característica de anel *para*-disubstituído em  $\delta_{\text{H}}$  7.04 ( $J_{12,13} = 8.5$  Hz; 2H, H-12 e H-16) e  $\delta_{\text{H}}$  6.70 ( $J_{13,12} = 8.5$  Hz; 2H, H-13 e H-15), um tripleto de dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  4.36 ( $J_{3,10} = 4.9$  Hz e  $J_{3,6} = 1.9$  Hz; 1H, H-3) e dois dubletos de dubletos dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_{\text{H}}$  3.03 e 3.09 ( $J_{10,10} = 14.2$  Hz e  $J_{10,3} = 4.9$  Hz; 2H, H-10), indicando a presença de uma unidade do aminoácido tirosina (PUOPOLO et al., 2014). O mapa de contorno COSY permitiu observar as correlações em  $^3J$  dos H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  4.05)  $\leftrightarrow$  H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2.10 e 1.23)  $\leftrightarrow$  H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  1.81)  $\leftrightarrow$  H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  3.55 e 3.35) correspondente ao anel prolina (Figura 37 e 33).

O experimento HOMODEC permitiu confirmar o acoplamento entre H-3 e H-6. Ao irradiarmos o H-6, os dois núcleos se desacoplam e o H-3 deixa de ser um tripleto de dubleto e passa a ser um tripleto; em contrapartida, ao irradiarmos H-3, o sinal de H-6 deixa de ser um duplo duplo dupleto e passa a ser um duplo dubleto (Figura 39).

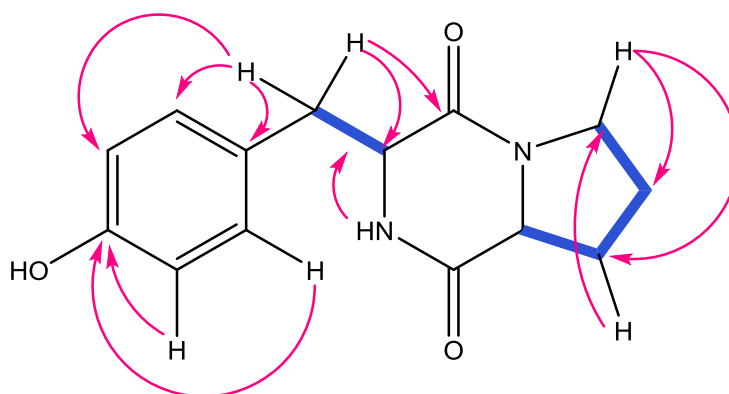
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou 12 sinais (Figura 35), sendo quatro sinais na região de H aromáticos com  $\delta_{\text{C}}$  157,7, indicando uma substituição por grupo eletronegativo (OH), capaz de desblindar este carbono, que foi atribuído a C-14; em  $\delta_{\text{C}}$  132.1, atribuído a C-12 e C-16, e em  $\delta_{\text{C}}$  116.2, atribuído aos carbonos C-13, C-15, pois

estes estão mais blindados pelo grupo OH que doa elétrons por ressonância para a posição *orto*, e em  $\delta_c$  127.6, atribuído a C-11. Dois sinais na região de carbonila, em  $\delta_c$  167.0 e 170.8, foram atribuídos as carbonilas da amida C-2 e C-5, respectivamente. A atribuição foi corroborada pelo mapa de contorno HMBC que mostrou a correlação de H-10 com C-2 e C-3 (Figuras 33 e 38). Foram observados ainda dois sinais para carbonos em  $\delta_c$  57.9 (C-3) e 60.1 (C-6), região característica de carbonos metínicos ligados a nitrogênio.

A interpretação do mapa de contorno HSQC (Figura 36) juntamente com as integrações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu a atribuição dos sinais para 4 carbonos metilênicos em  $\delta_c$  45,8 (C-9), 37,7 (C-10), 29,4 (C-7) e 22,7 (C-8), bem como dos carbonos metínicos aos sinais em  $\delta_c$  57.9 (C-3) e 60.1 (C-6).

A análise dos dados obtidos de ESI-EM no modo negativo, evidenciou o pico do íon molecular em  $m/z$  259,1088  $[\text{M-H}]^-$ , confirmando a proposta estrutural a partir dos espectros de RMN, com a hidroxila como substituinte do anel aromático e fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$  (Apêndice 3).

A configuração relativa de H-3 e H-6 foi determinada a partir do espectro de NOESY-1D (Figura 40) ao irradiarmos o sinal de H-3 ( $\delta_H$  4.36), que mostrou correlação espacial com H-6 ( $\delta_H$  4.05), indicando que estes hidrogênios encontram-se do mesmo lado da molécula.



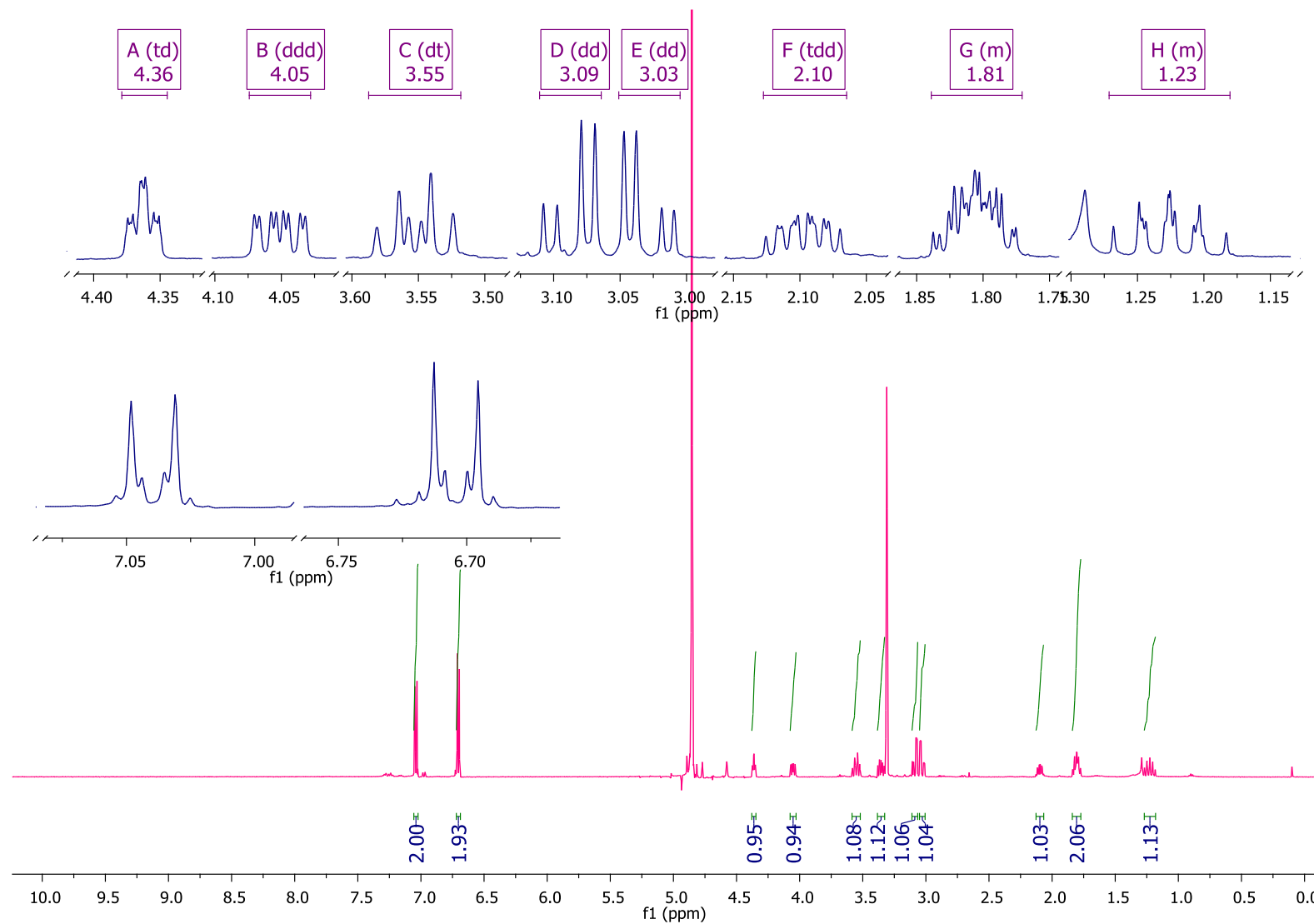
**Figura 33-** Correlações de HMBC (→) e COSY (—) observadas para a substância F4-2.

Puopollo e colaboradores (2014) descreveram atividade tóxica para a substância 2,5 dicetopiperazina (Pro-Tyr) contra *Phytophthora infestans* e *Plasmopara viticola*, patógenos de plantas, o primeiro sendo patógeno principalmente de tomate e batata, culturas de importância econômica, destacando a relevância desta atividade.

Kumar e colaboradores (2013) também descreveram atividade tóxica contra seis diferentes fungos patógenos de plantas, com destaque para atividade antifúngica contra *Penicillium expansum*, patógeno de maçãs e laranjas.

**Tabela 2-** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e HMBC (MeOH-*d*4, 500 e 125 MHz) da substância F4-2.

Nº	HSQC		mult.	Correlações via HMBC
	$\delta\text{H}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta\text{C}$		
2		166.7	C	
3	4.36 (td; $^3J=5.1$ ; $^5J=1.9$ )	57.9	CH	
5		170.8	C	
6	4.05 (ddd; $^3J=10.9$ ; $^5J=1.9$ ; $^3J=6.3$ )	60.1	CH	
7	2.10 (m)	29.4	CH <sub>2</sub>	C-9
	1.23 (m)			
8	1.81(m)	22.7	CH <sub>2</sub>	
9	3.55 (dt; $^2J=11.9$ ; $^3J=8.4$ )	45.8	CH <sub>2</sub>	C-8, C-7
	3.35 (m)			
10	3.09 (dd; $^2J=14.2$ ; $^3J=5.15$ )	37.7	CH <sub>2</sub>	C-3, C-11, C-12, C-2
	3.03 (dd; $^2J=14.2$ ; $^3J=4.65$ )			
11		127.6	C	
12 e 16	7.04 (m)	132.1	CH	C-10, C-16, C-14
13 e 15	6.70 (m)	116.1	CH	C-15, C-11, C-14
14		157.7	C	



**Figura 34-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F4-2 ( $\text{MeOH-}d_4$ , 500 MHz).

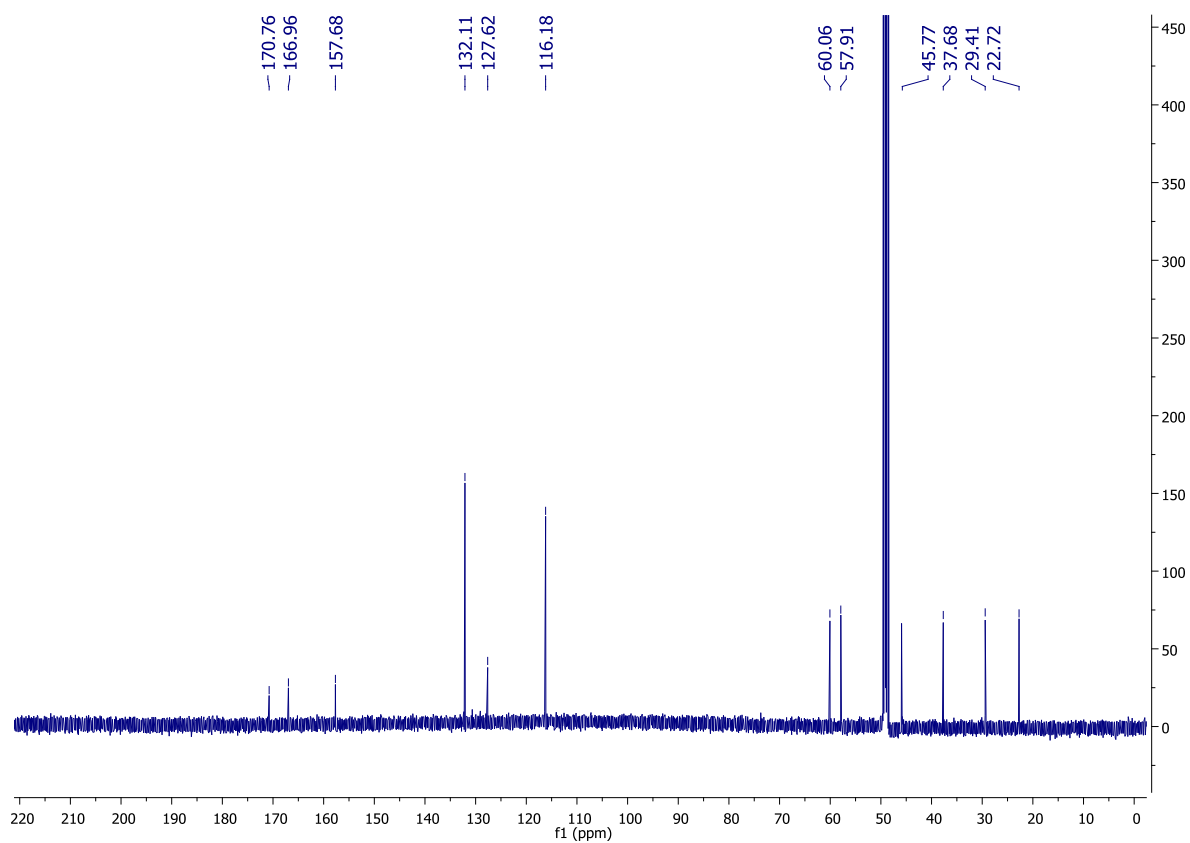


Figura 35- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância F4-2 (MeOH- $d_4$ , 125 MHz).

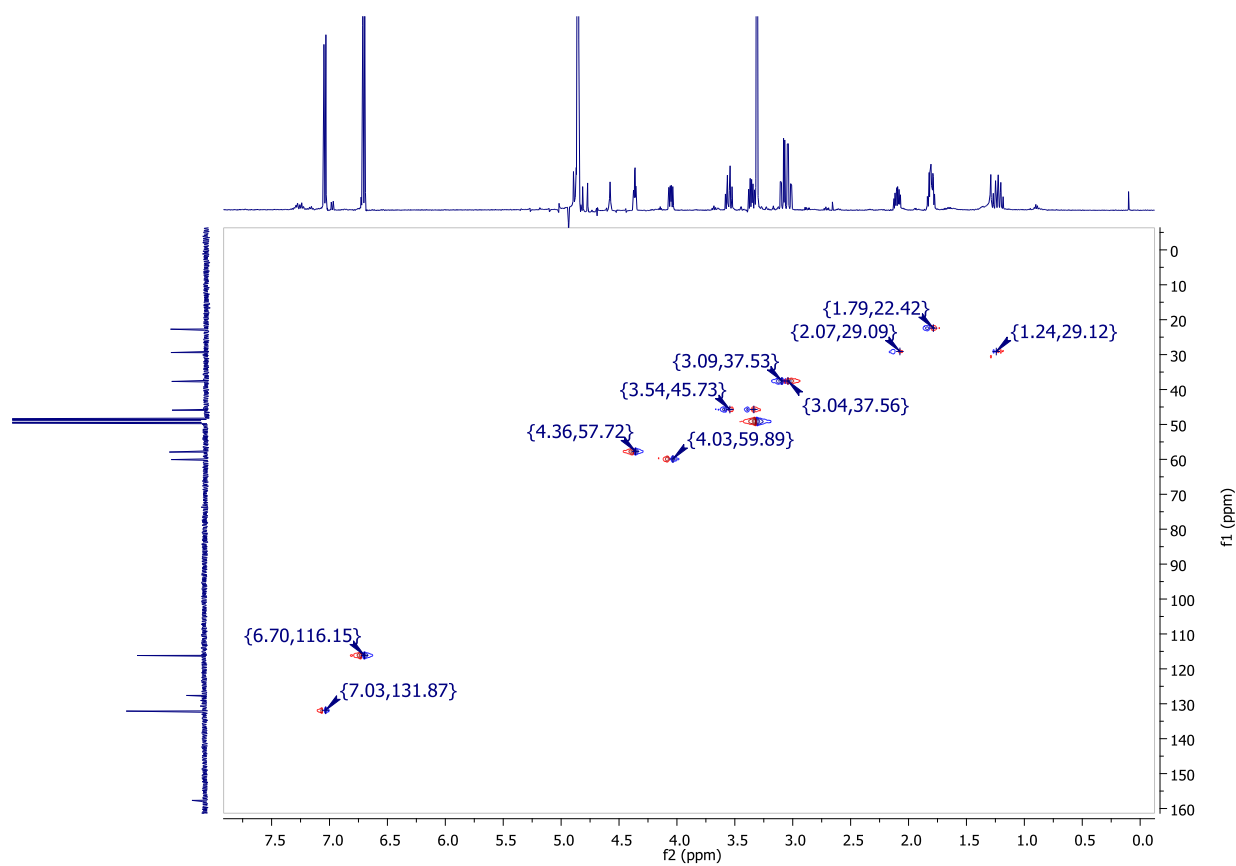


Figura 36- Mapa de contorno HSQC da substância F4-2 (MeOH- $d_4$ ; 500 e 125 MHz).



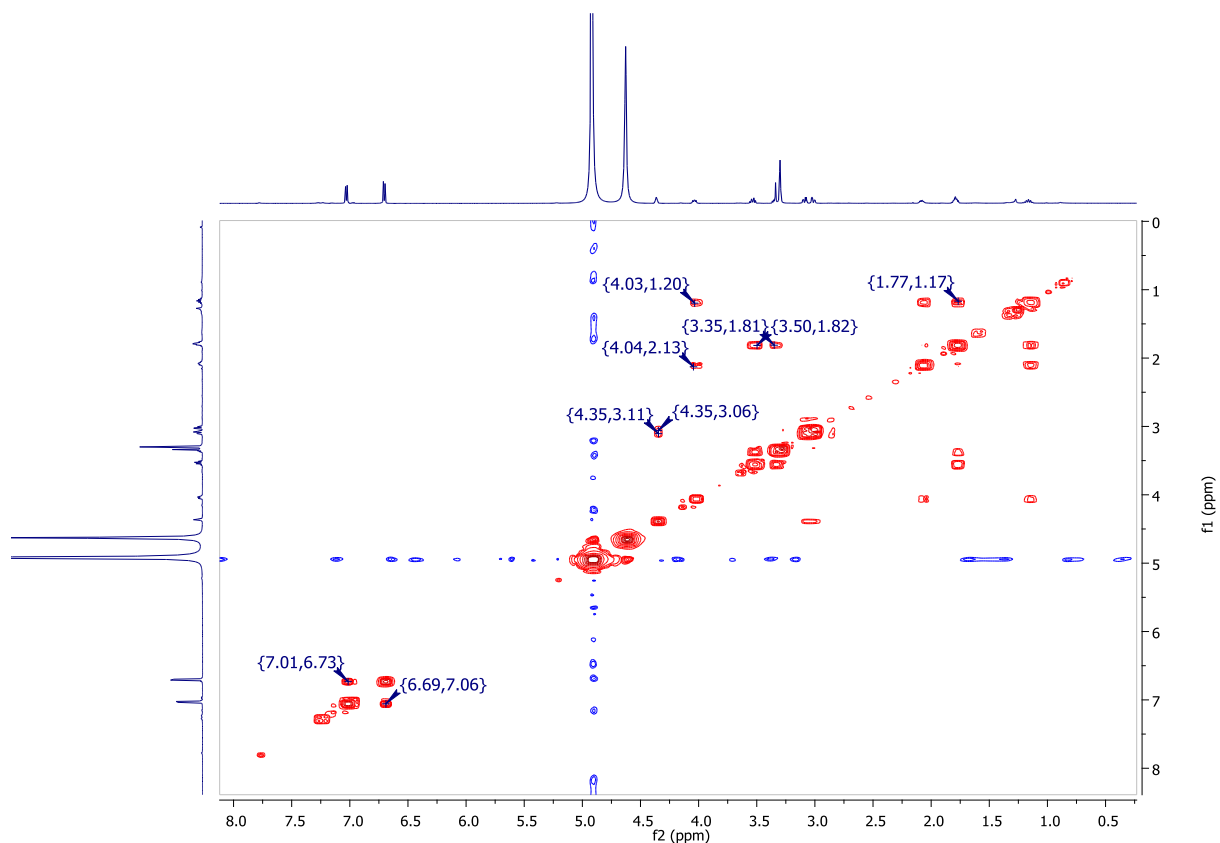


Figura 37- Mapa de contorno COSY da substância F4-2 (MeOH- $d_4$ ; 500 e 125 MHz)

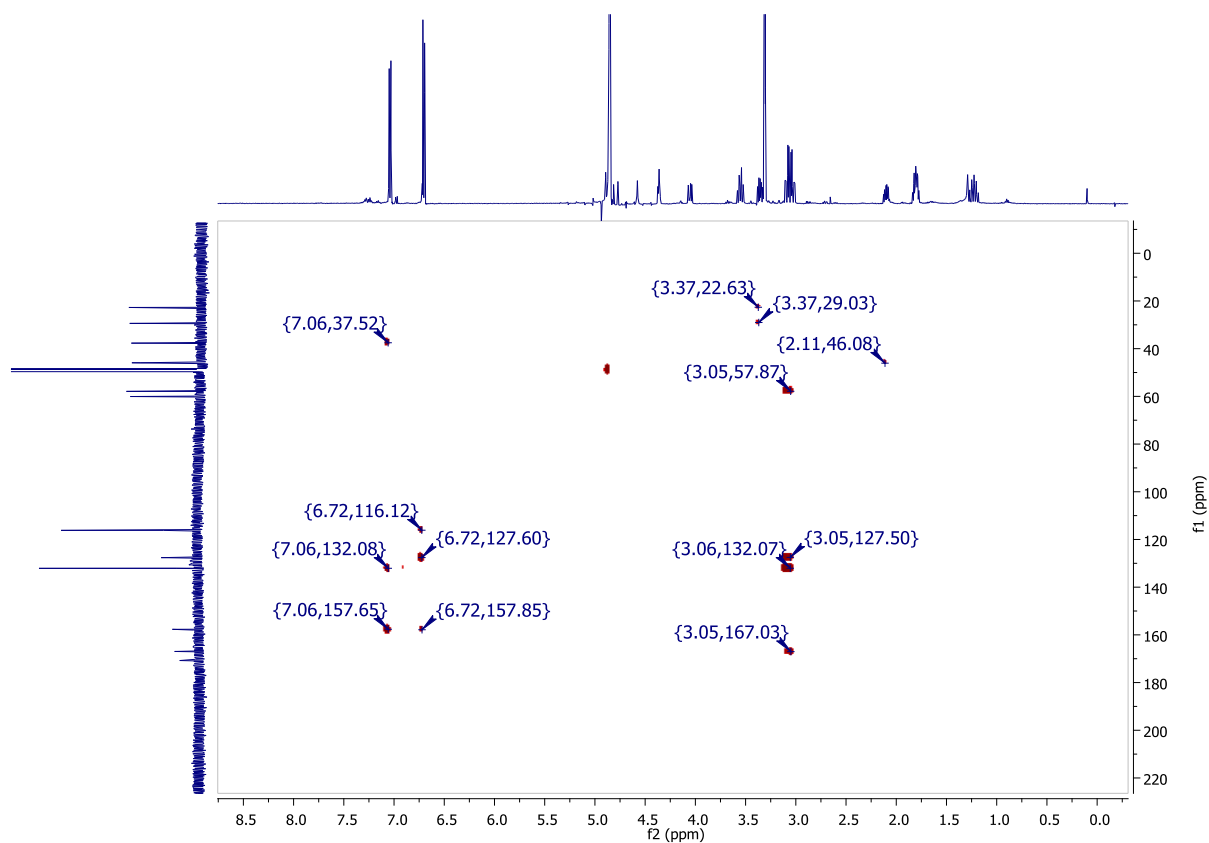
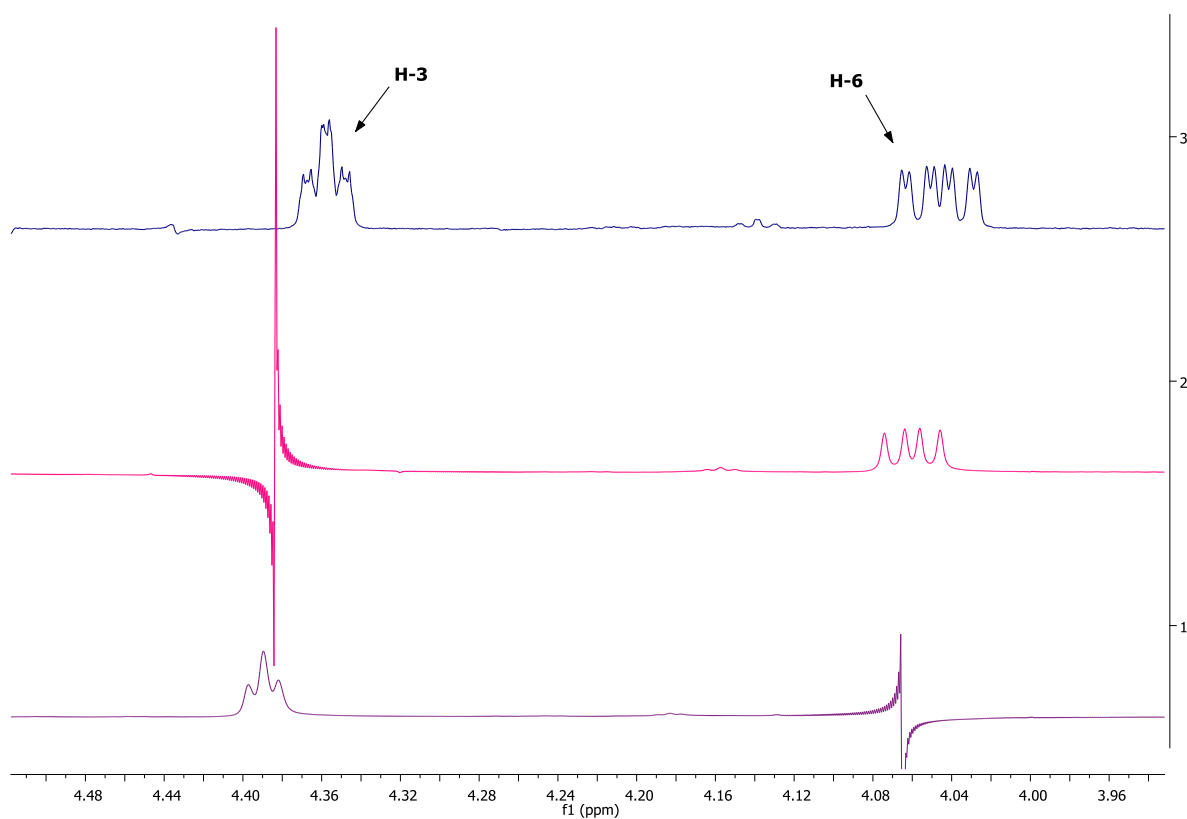
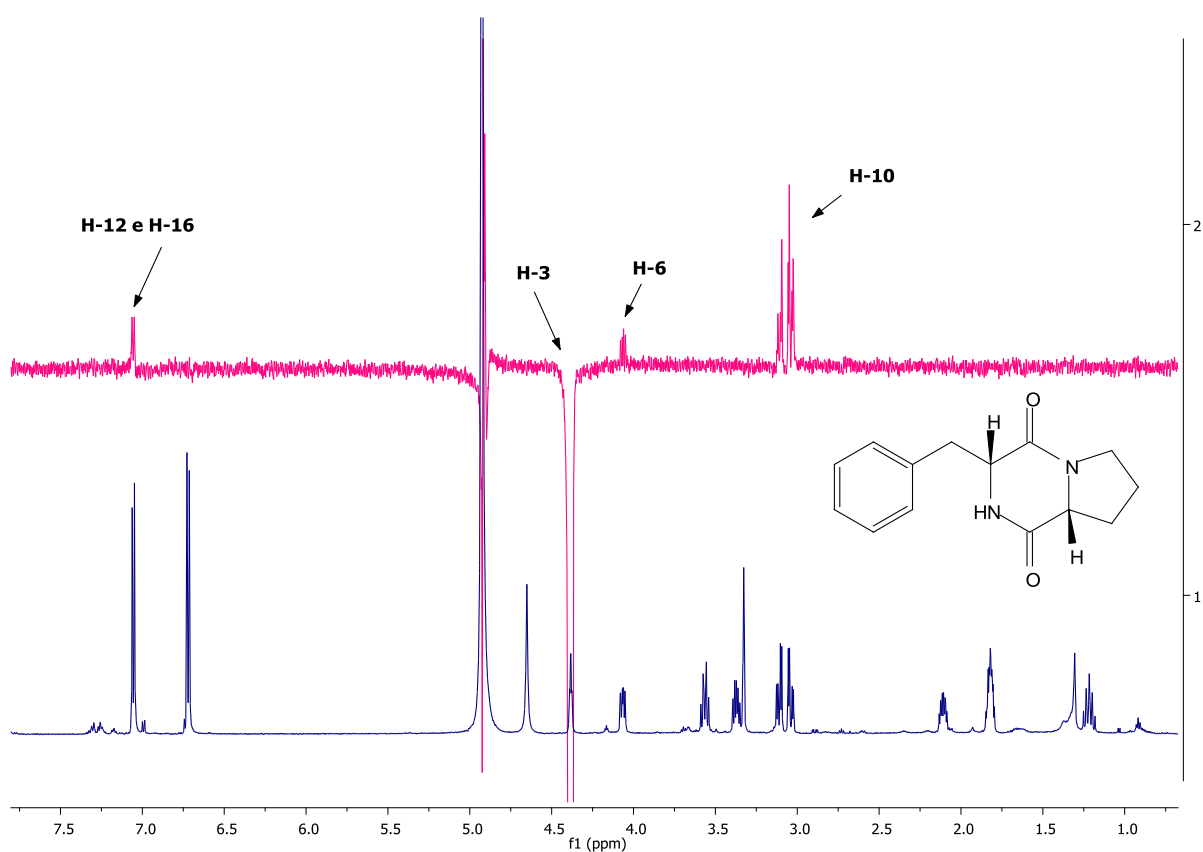


Figura 38- Mapa de contorno HMBC da substância F4-2 (MeOH- $d_4$ ; 500 e 125 MHz).



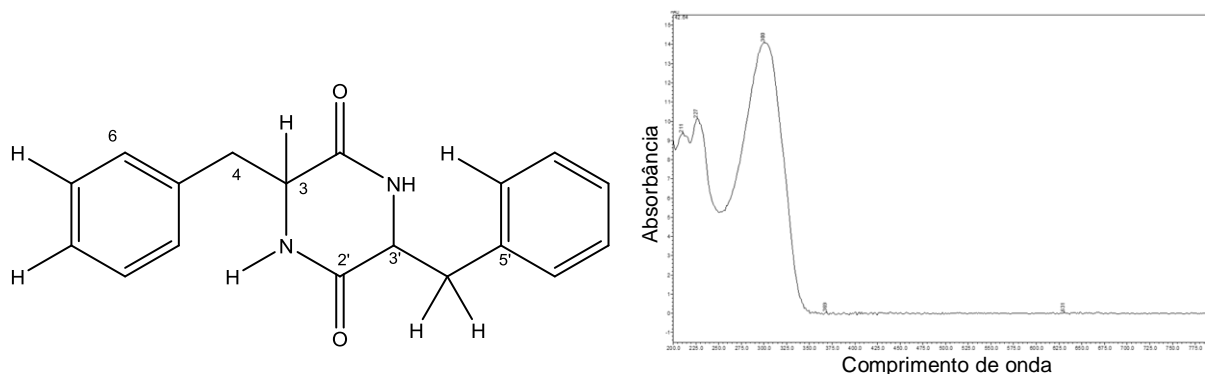
**Figura 39-** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (3), HOMODEC com irradiação em  $\delta_{\text{H}}$  4.36 (2), HOMODEC com irradiação em  $\delta_{\text{H}}$  4.05 (3) ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 MHz).



**Figura 40-** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F4-2 (1) e NOESY 1D - irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  4.36 (2) ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 MHz).

### 3.4 Identificação estrutural da substância F4-10

A análise dos espectros de massas, RMN de  $^1\text{H}$ , e mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC permitiu identificar a substância F4-10 como a dicetopiperazina ciclo-(Phe-Phe). A comparação com dados descritos na literatura (FENG-WU, 2012) corroborou a identificação desta substância.

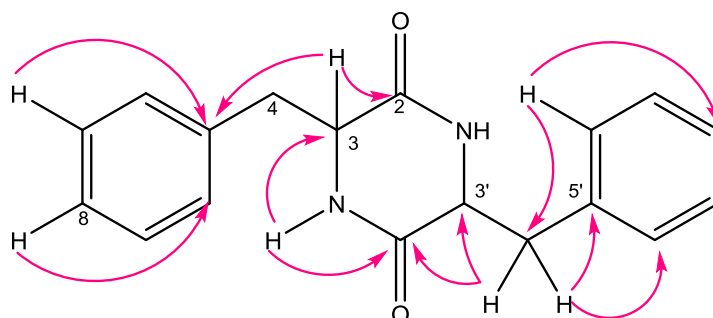


**Figura 41-** Estrutura e espectro no UV-Vis da substância F4-10, ciclo-(Phe-Phe).

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e mapas de contorno HSQC e HMBC permitiu atribuir os sinais para os hidrogênios e carbonos desta substância (Tabela 2). Foram observados sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3.96 ( $J_{2,\text{N-H}} = 8.4$  Hz e  $J_{2,3} = 4.8$  Hz, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  55.4 H-3) e 7.95, que mostraram acoplamento entre si no experimento COSY, e com o sinal de carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  166.4 no experimento HSQC, sendo compatíveis com um anel dicetopiperazínico (Figura 23 e 24).

Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7.21 (2H,  $\delta_{\text{C}}$  126.8, H-8 e H-8'), 7.28 (4H,  $\delta_{\text{C}}$  128.4, H-7, H-7', H-9 e H-9') e 7.03 (2H,  $\delta_{\text{C}}$  130.1, H-6, H-6', H-10 e H-10') (Tabela 2 e Figura 22), próximos e com multiplicidades pouco resolvidas, indicam um anel aromático monossustituído. As correlações observadas nos experimentos COSY e HMBC (Figura 24 e 25) permitiram estabelecer a ligação deste ao anel dicetopiperazínico através do C metilênico ( $\delta_{\text{C}}$  39.4, H-4) com hidrogênios diastereotópicos com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2.22 e 2.56 (Figura 22).

O espectro de massas (ESI-EM) em modo positivo da substância F4-10 apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  295,1444  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , indicando que a molécula é simétrica e apresenta fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  (Apêndice 4).



**Figura 42-** Correlações de HMBC (→) e COSY (—) para a substância F4-10.

Lan e colaboradores (2016) isolaram a ciclo-(Phe-Phe) do fungo marinho *Pseudallescheria boydii* e descreveram atividade citotóxica frente a linhagem Sf9 do inseto-praga *Spodoptera frugiperda*, indicando o potencial inseticida desta substância.

FENG-WU (2012) também isolou esta substância do fungo *Guignardia* sp., endofítico associado à macroalga *Undaria pinnatifida*. A atividade antifúngica frente a linhagens de fungos patógenos humanos *Microsporium canis*, *Tricophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosom*, e a atividade citotóxica, frente a linhagem KB (câncer epidermóide nasofaríngeo humano) foram avaliadas. No entanto, esta substância não se mostrou ativa para as atividades testadas.

**Tabela 3-** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e dos mapas de contorno HSQC e HMBC (DMSO- $d_6$  600 e 150 MHz) da substância F4-10

Nº	HSQC			Correlações via HMBC
	$\delta\text{H}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta\text{C}$	Mult.	
2 e 2'		166.4	C	
3 e 3'	3.96 2H	55.4	CH	C-1 C-4
4 e 4'	2.22 2H (dd; $^2J= 13.6$ ; $^3J= 6.2$ Hz) 2.56 2H (dd; $^2J= 13.6$ ; $^3J= 4.8$ Hz)	39.4	CH <sub>2</sub>	C-1 C-2 C-4 C-5
5		136.7	C	
6, 6', 10 e 10'	7.03 4H	130.0	CH	C-3 C-7
7, 7', 9 e 9'	7.28 4H	128.4	CH	C-4
8 e 8'	7.21 2H	126.8	CH	C-5
N-H	7.95 (s)			C-1 C-2

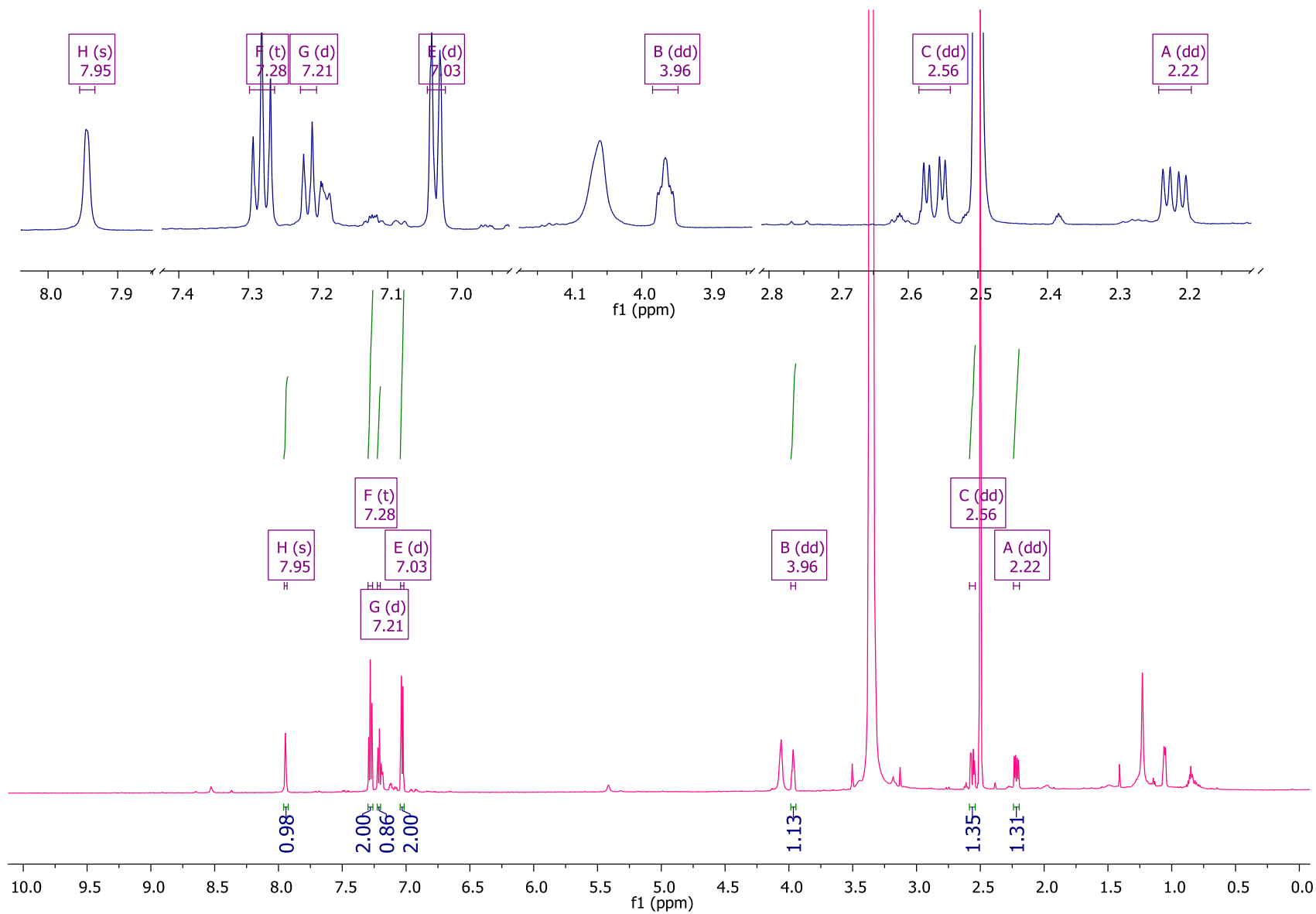


Figura 43- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F4-10 (DMSO- $d_6$ , 600 MHz).

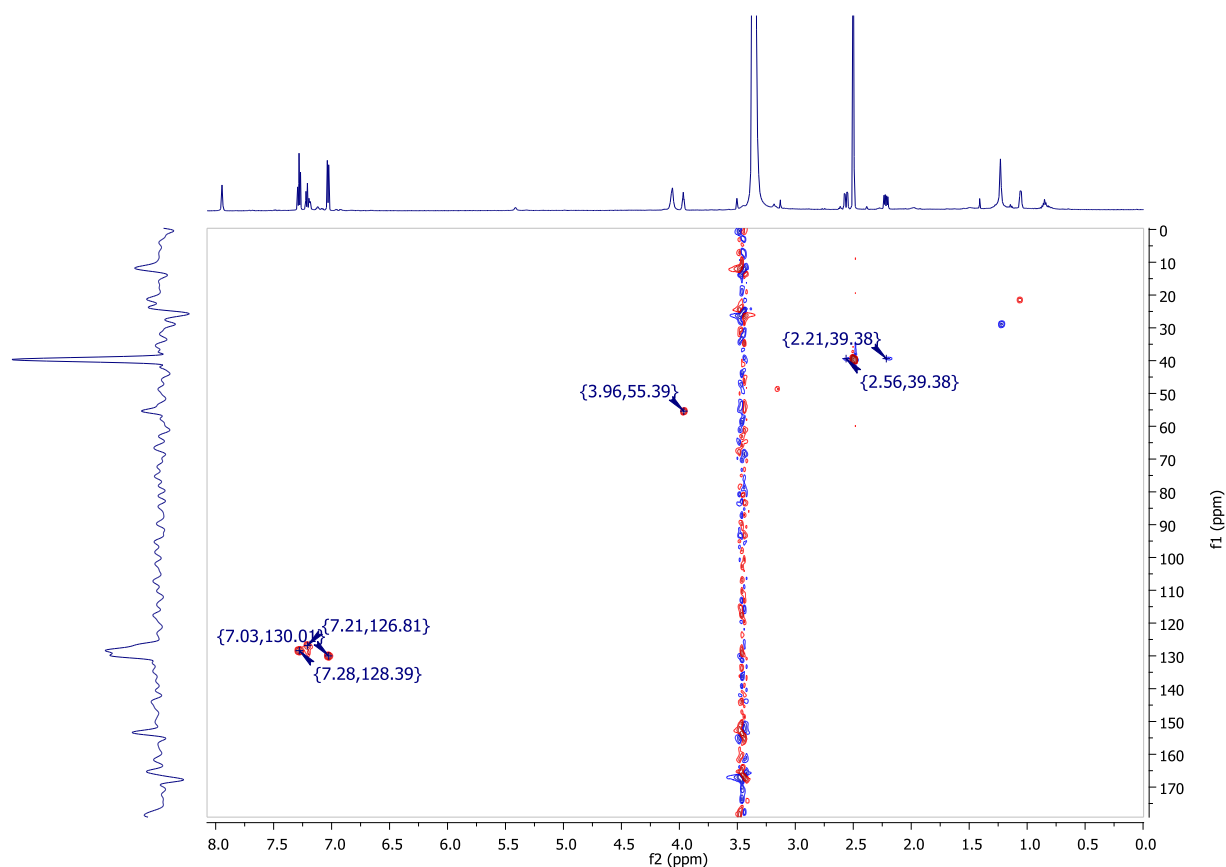


Figura 44- Mapa de contorno HSQC da substância F4-10 (DMSO- $d_6$ ; 600 e 150 MHz).

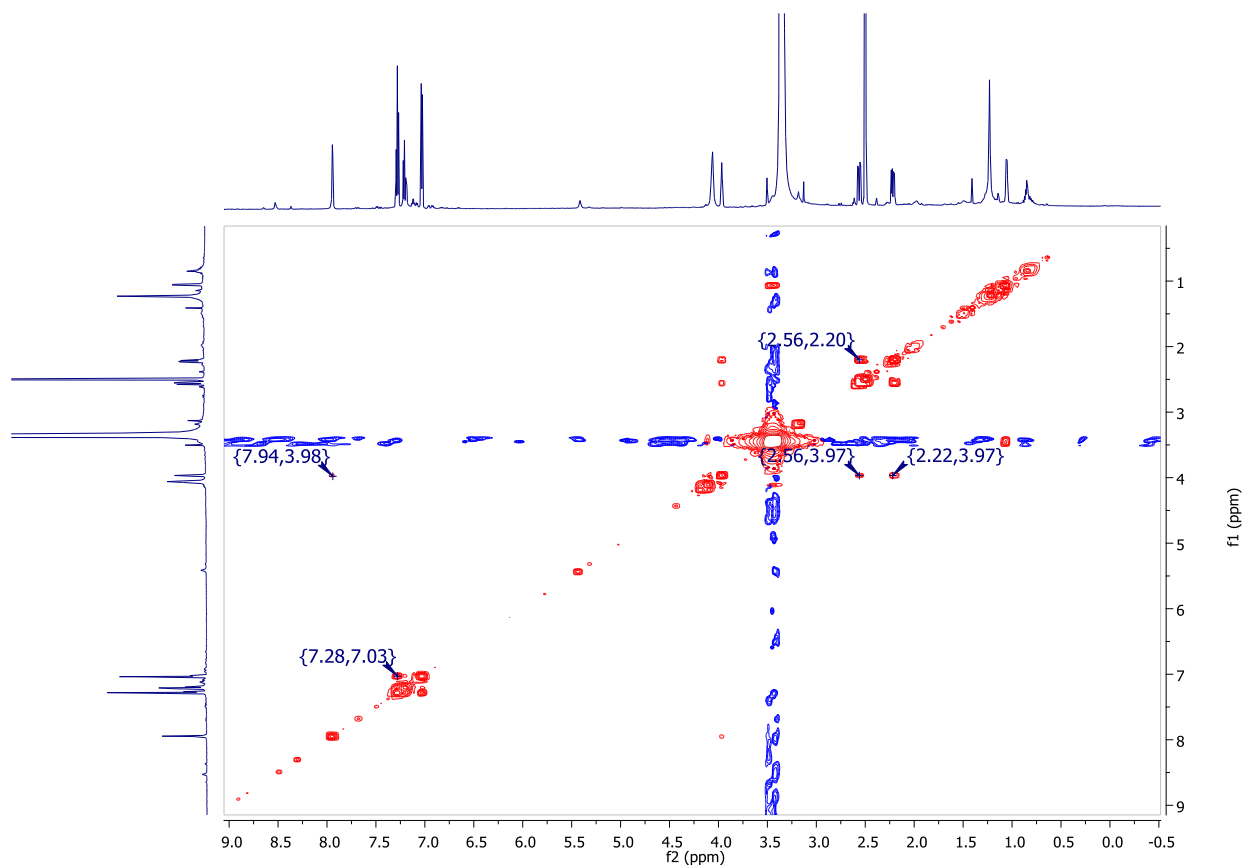
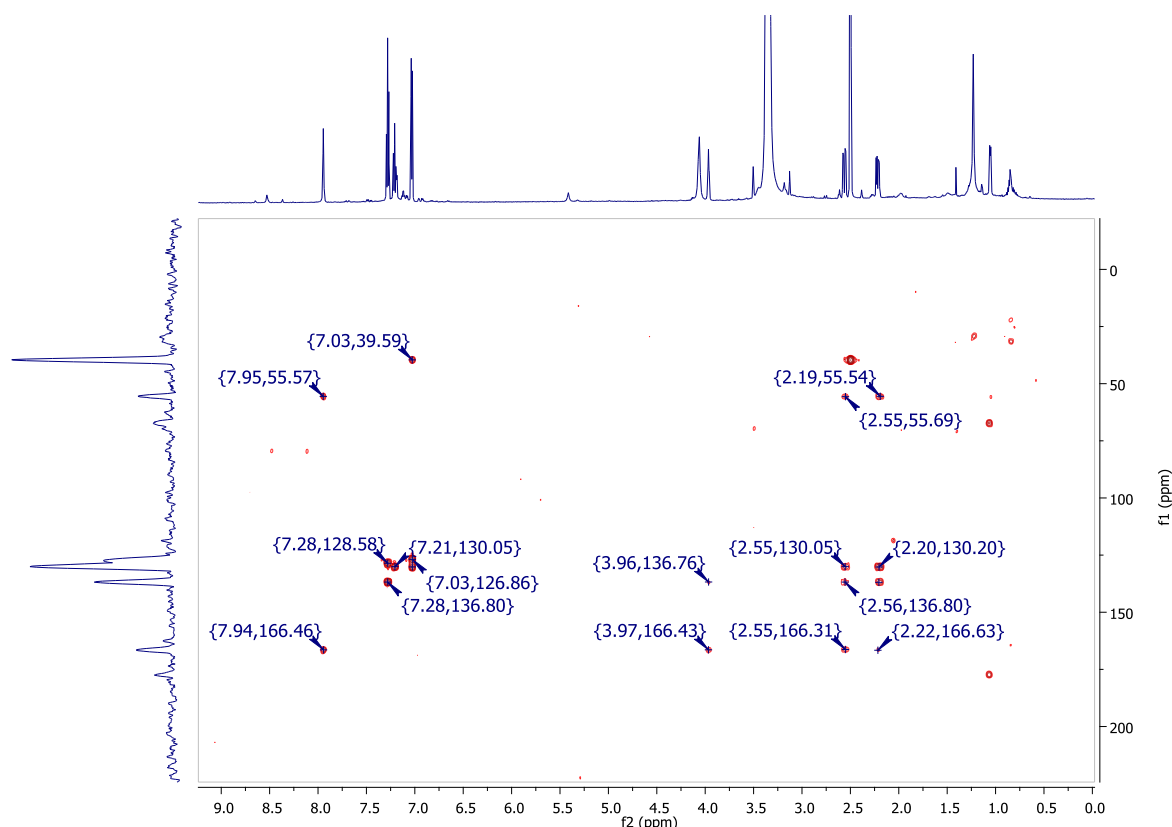


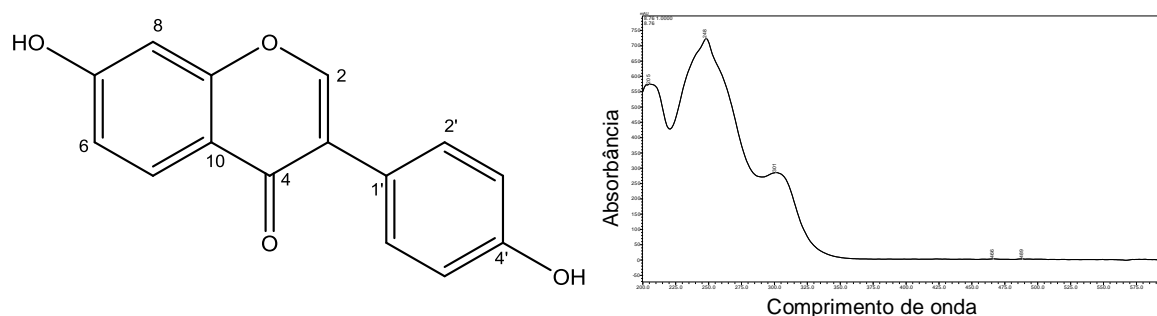
Figura 45- Mapa de contorno COSY da substância F4-10 (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).



**Figura 46-** Mapa de contorno HMBC da substância F4-10 (DMSO- $d_6$ ; 600 e 150 MHz).

### 3.5 Elucidação estrutural da substância F6-9

Utilizando métodos espectrométricos e espectroscópicos, além de comparação com dados já descritos na literatura, foi possível identificar a substância F6-9 como a isoflavona daidzeína ou 7-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4-cromanona. O espectro de absorção no UV (Figura 47) apresenta bandas com  $\lambda_{\max}$  em 248 e 301 nm, característico de uma estrutura de isoflavona (KALE ; LADDHA, 2012) sendo a banda I em 301 nm correspondente ao anel B e a banda II em 248 nm correspondente ao anel A.

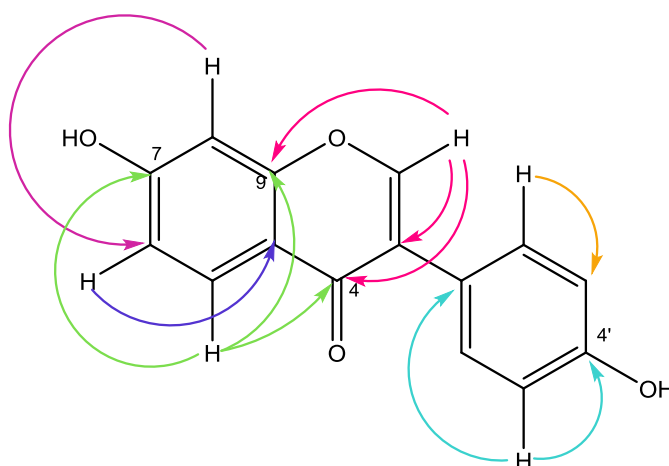


**Figura 47-** Estrutura e espectro de UV-Vis da substância daidzeína F6-9.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 49) de F6-9 apresentou um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  8.02 ( $J_{5,6} = 8.9$  Hz; 1H, H-5) acoplado em *orto* com o duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6.89 ( $J_{6,5} = 8.9$  Hz e  $J_{6,8} = 2.3$ ; 1H, H-6), que por sua vez, acopla em *meta* com o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6.78 ( $J_{8,5} = 2.3$  Hz; 1H, H-8), caracterizando um anel trissubstituído. Observou-se ainda sinais com multiplicidade característica de anel *para*-dissubstituído em  $\delta_{\text{H}}$  7.37 ( $J_{2',3'} = 8.7$ ; 2H, H-2' e H-6',) e  $\delta_{\text{H}}$  6.84 ( $J_{3',2'} = 8.7$  Hz, H-3' e H-5'), além de um simpleto integrando para 1H em  $\delta_{\text{H}}$  8.11, atribuído ao H-2, desblindada por efeito indutivo do oxigênio diretamente ligado, e por ressonância, pelo grupo carbonila em  $\beta$ .

A partir do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e do mapa de contorno HSQC (Figura 49 e 50), foi possível observar os deslocamentos dos carbonos hidrogenados C-2, C-5, C-6, C-8, C-2', C-6', C-3' e C-5' (Tabela 4). Essas informações juntamente com as correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 51) evidenciaram 7 carbonos quaternários: um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  178.1 característico de carbonila, atribuído a C-4; um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  166.7, desblindado pela hidroxila e atribuído ao C-7 pela correlação com H-5; um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  158.5, atribuído ao C-4' pela correlação com H-2' e H-3'; um sinal em 160,0, desblindado pelo O em  $\alpha$ , com correlações com H-2 e H-5, atribuído ao C-9; um sinal para C-10 em  $\delta_{\text{C}}$  117.3, correlacionando com H-6; além de um sinal para C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  125.5, apresentando correlação com o H-2 e H-2', e um sinal para C-1' em 124.1, correlacionando com o H-3' (Figura 48).

A análise dos dados obtidos de ESI-EM, modo negativo, evidenciou o pico do íon molecular em  $m/z$  253,0503  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , confirmando a proposta estrutural, com hidroxilas como substituintes dos anéis aromáticos e fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$  (Apêndice 5).



**Figura 48-** Correlações de HMBC da substância F6-9.



A atividade anticâncer da daidzeína já foi descrita na literatura com relato de atividade contra câncer de bexiga (SU et al., 2006), próstata (CAO et al., 2006), mama (CONSTATINOU et al., 2005), pâncreas (GUO et al., 2004a), colón (GUO et al., 2004b) e neuroblastoma (LO et al., 2007).

A atividade antimicrobiana da daidzeína foi testada por Medina (2016), que isolou essa substância anteriormente, a partir das linhagens fúngicas *Sarocladium strictum* e *Hypoxylon* sp.. A substância apresentou fraca atividade frente ao *Staphylococcus aureus* pelo ensaio de difusão em disco de papel (MEDINA, 2016).

**Tabela 4-** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e mapa de contorno HSQC e HMBC (MeOH- $d_4$  600 e 150 MHz) da substância F6-9.

Nº	HSQC			Correlações via HMBC
	$\delta\text{H}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta\text{C}$	Mult.	
2	8.11 1H (s)	154.3	CH	C-3, C-4, C-9
3	-	125.5	C	
4	-	178.1	C	
5	8.02 1H (d; $J^{\beta}=8.9$ )	128.1	CH	C-4, C-7, C-9
6	6.89 1H (dd; $J^{\beta}=8.9$ ; $J^{\alpha}=2.3$ )	117.3	CH	C-8, C-10
7	-	166.6	C	
8	6.78 1H(d; $J^{\alpha}=2.3$ )	103.1	CH	
9	-	160.0	C	
10	-	117.3	C	
1'	-	124.1	C	
2' e 6'	7,37 2H (dd; $J^{\beta}=8.7$ ; $J^{\alpha}=2.1$ )	131.2	CH	C-6', C-3, C-4'
3 e 5	6.84 2H (dd; $J^{\beta}=8.7$ ; $J^{\alpha}=2.1$ )	116.0	CH	C-1', C-5', C-4'
4'	-	158.5	C	

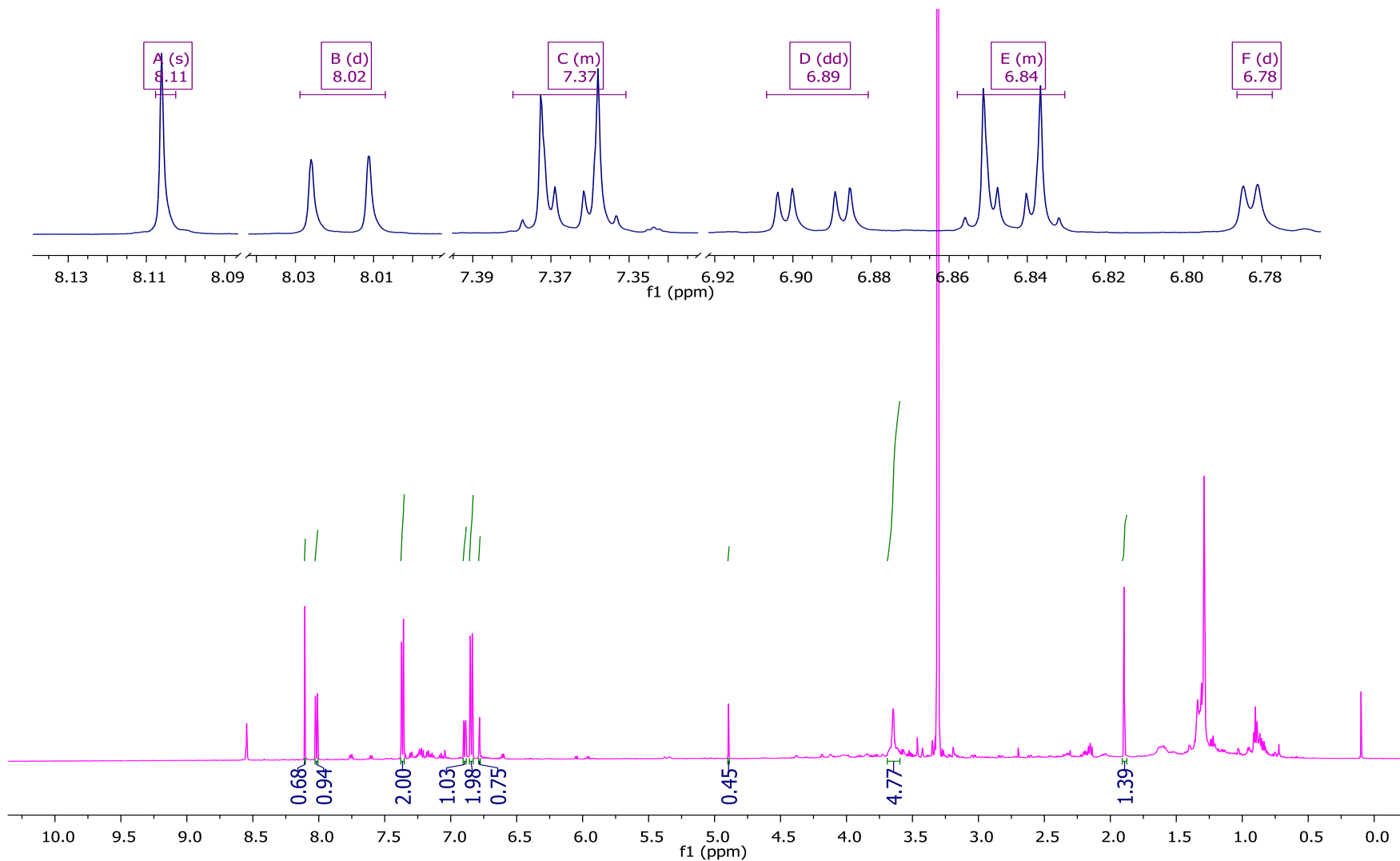


Figura 49- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância F6-9 (MeOH-*d*<sub>4</sub>; 600 MHz).

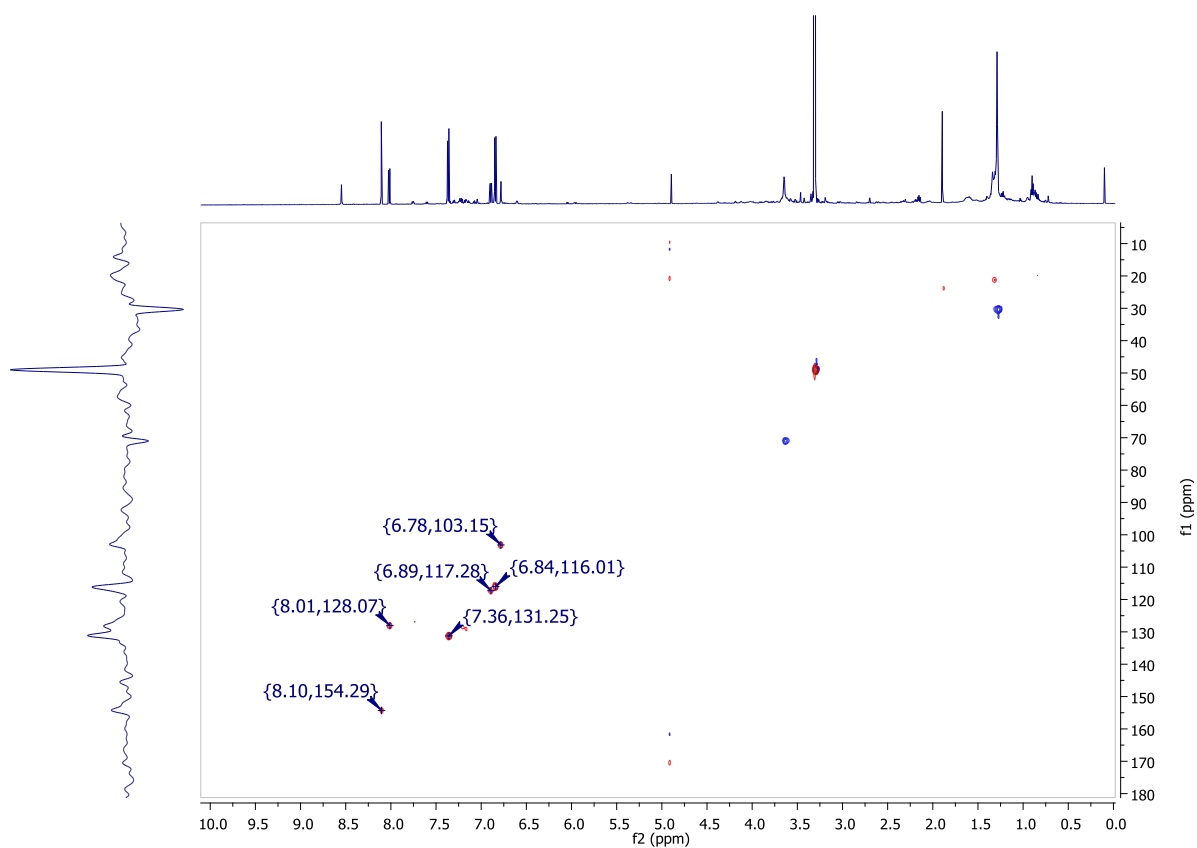


Figura 50- Mapa de contorno HSQC da substância F6-9 (MeOH- $d_4$ ; 600 e 150 MHz).

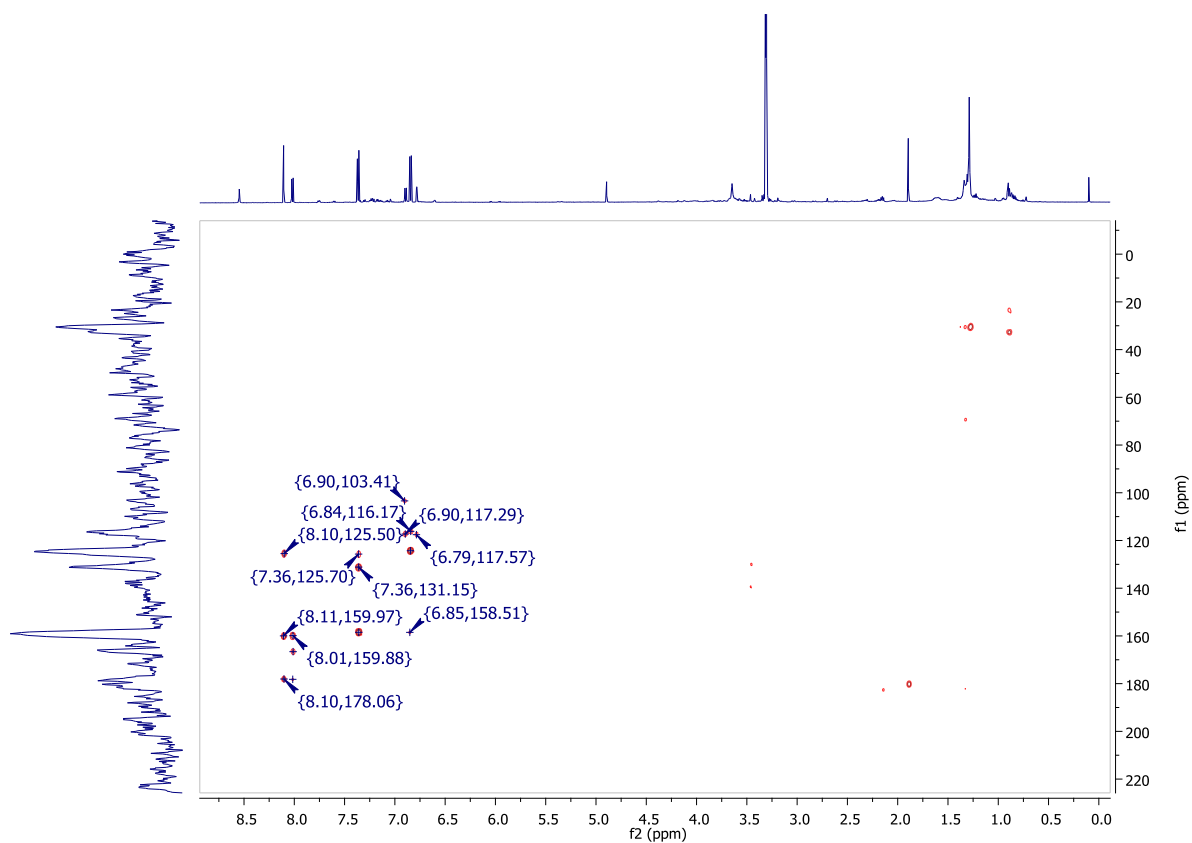
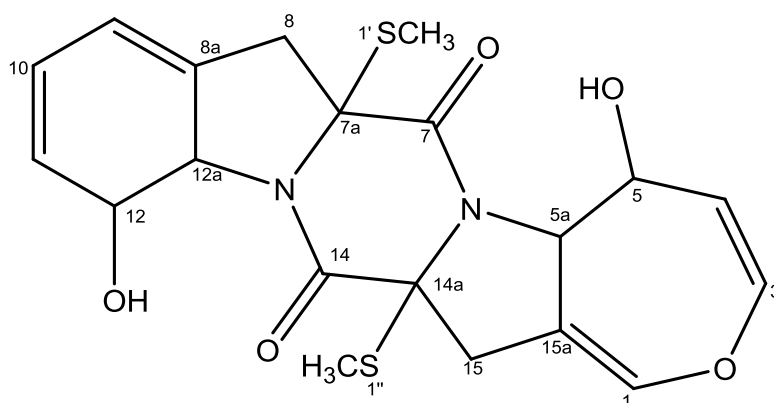


Figura 51- Mapa de contorno HMBC da substância F6-9 (MeOH- $d_4$ ; 600 e 150 MHz).

### 3.6 Elucidação estrutural da substância F6-15

A substância F6-15 foi identificada como uma ditiodicetopiperazina. Os dados do espectro de massas da substância foram utilizados como filtro na base de dados AntiMarin. A substância F6-15 foi identificada com base na comparação de seus dados de UV, RMN de  $^1\text{H}$  e deslocamentos de carbono (Tabela 5) com os dados relatados na literatura (CHINWORRUNGSEE et al., 2006) como uma das propostas indicada pelo banco de dados.



**Figura 52-** Estrutura da substância F6-15.

A análise do UV da substância apresenta uma banda de absorção em 204 nm, decorrente do grupo cromóforo com duas ligações duplas conjugadas, condizente com a banda de absorção descrita na literatura.

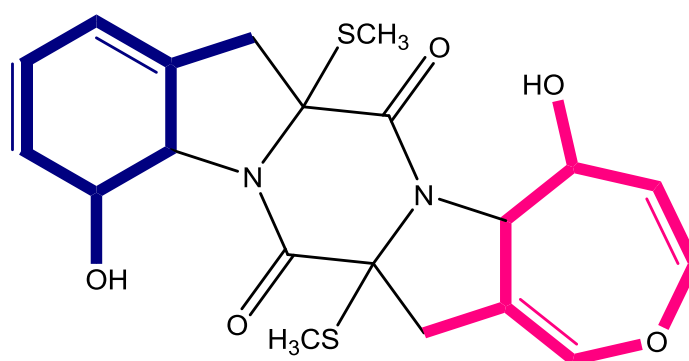
A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 55) indicou a presença de 6 hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6.71 (s, 1H, H-1), 6.30 (dd,  $J_{3,4}=8.2$  e  $J=2.4$  Hz, 1H, H-3), 4.81 (dd,  $J_{4,3}=8.2$  e  $J_{4,5a}=2.0$  Hz, 1H, H-4), 5.95 (m, 1H, H-9), 5.89 (m, 1H, H-10) e 5.63 (d,  $J=9.8$  Hz, 1H, H-11); dois hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  3.05 (m, 2H, H-15) e 2.95 (d,  $J_{8,8}=15.5$ , 2H, H-8); duas metilas em  $\delta_{\text{H}}$  2.14 (s, 3H, H-1') e 2.20 (s, 3H, H-1''); quatro hidrogênios em carbonos  $\alpha$  a átomos eletronegativos, sendo dois hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$  4.72 e 4.74) atribuídos a carbonos ligados a átomos de nitrogênio e dois hidrogênios atribuídos a carbonos com hidroxila ( $\delta_{\text{H}}$  4.40 e 4.60). Também foi possível observar os dois hidrogênios das hidroxilas em  $\delta_{\text{H}}$  5.30, atribuído a hidroxila na posição 5 pela acoplamento com o H-5 no mapa de contorno COSY (Figura 57), e 5.38, atribuído a hidroxila

na posição 12 pela correlação com os H-12 e H-11 no mapa de contorno HMBC (Figura 58).

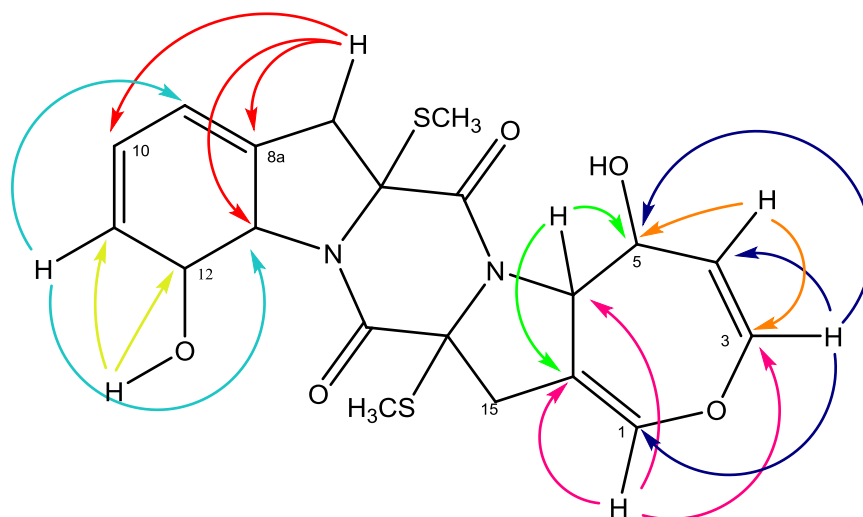
Os experimentos de TOCSY 1D (Figura 53, 59 e 60) confirmam os dois sistemas de spins da molécula, juntamente com o COSY, além de auxiliarem na atribuição dos hidrogênios H-15 e H-8.

O espectro de massas apresentou picos em  $m/z = 435.1035 [M+H]^+$  e  $457.0856 [M+Na]^+$ , confirmando a proposta estrutural com fórmula molecular  $C_{20}H_{22}N_2S_2$

A substância F6-15 foi anteriormente isolada por Chinworrungsee e colaboradores (2006) do fungo *Menisporopsis theobromae* e sua atividade antibacteriana foi testada frente a *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da maioria dos casos de tuberculose. A substância apresentou alto potencial antibacteriano com MIC= 7,14  $\mu$ M, em comparação aos compostos sulfato de canabina (MIC=3.43-8.58  $\mu$ M) e isoniazida (MIC=0.29-0.66  $\mu$ M) usados como referência. A atividades antimalárica e citotóxica frente as linhagens de células humanas de câncer de mama KB), pulmão (NCI-H187) e pele (BC-1) também foram testas, mas a substância apresentou baixa atividade. Relatos na literatura descrevem as tiodicetopiperazinas como uma classe de substâncias com alto potencial biológico (WELCH, WILLIAMS, 2014).



**Figura 53-** Sistemas de spins observados pelos experimentos de TOCSY da substância F6-15



**Figura 54-** Correlações observadas no HMBC da substância F6-15

**Tabela 5-** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e dos mapas de contorno HSQC e HMBC ( $\text{MeOH-}d_4$  600 e 150 MHz) da substância F6-15 e dados da literatura

Nº	F6-15 DMSO- $d_6$		Literatura $\text{CDCl}_3$		Correlações via HMBC	COSY
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$		
1	6.71	136.7	6.58	138.1	C-3 C-5a C-15a	
3	6.30	137.7	6.25	138.0	C-1 C-4 C-5	H-4
4	4.81	114.1	4.95	110.9	C-3 C-5a	H-3
5	4.40	71.1	4.71	72.7		
5a	4.72	62.7	4.87	64.0	C-5 C-15a	
7	-	*	-	166.7		
7a	-	73.9		73.5		
8	2.95 3.05	38.0	2.98 3.03	38.7	C-8a C-10 C-12a	
8a	-	134.1		131.2		
9	5.95	119.0	5.99	120.7		
10	5.89	123.4	5.93	123.0		H-11
11	5.63	130.4	5.79	130.6	C-9 C-12a	H-10
12	4.60	73.8	4.94	74.5		
12a	4.74	68.1	4.89	68.9		
14	-	*	-	167.3		
14a	-	69.24	-	68.9		
15	3.05	38.2	3.10 3.04	38.3		
15a	-	110.0	-	107.8		
1'	2.14	14.0	2.27	15.0		
1''	2.20	13.9	2.31	14.9		
OH 5	5.30	-	*	-		H-5
OH 12	5.38	-	*	-	C-11 C-12	

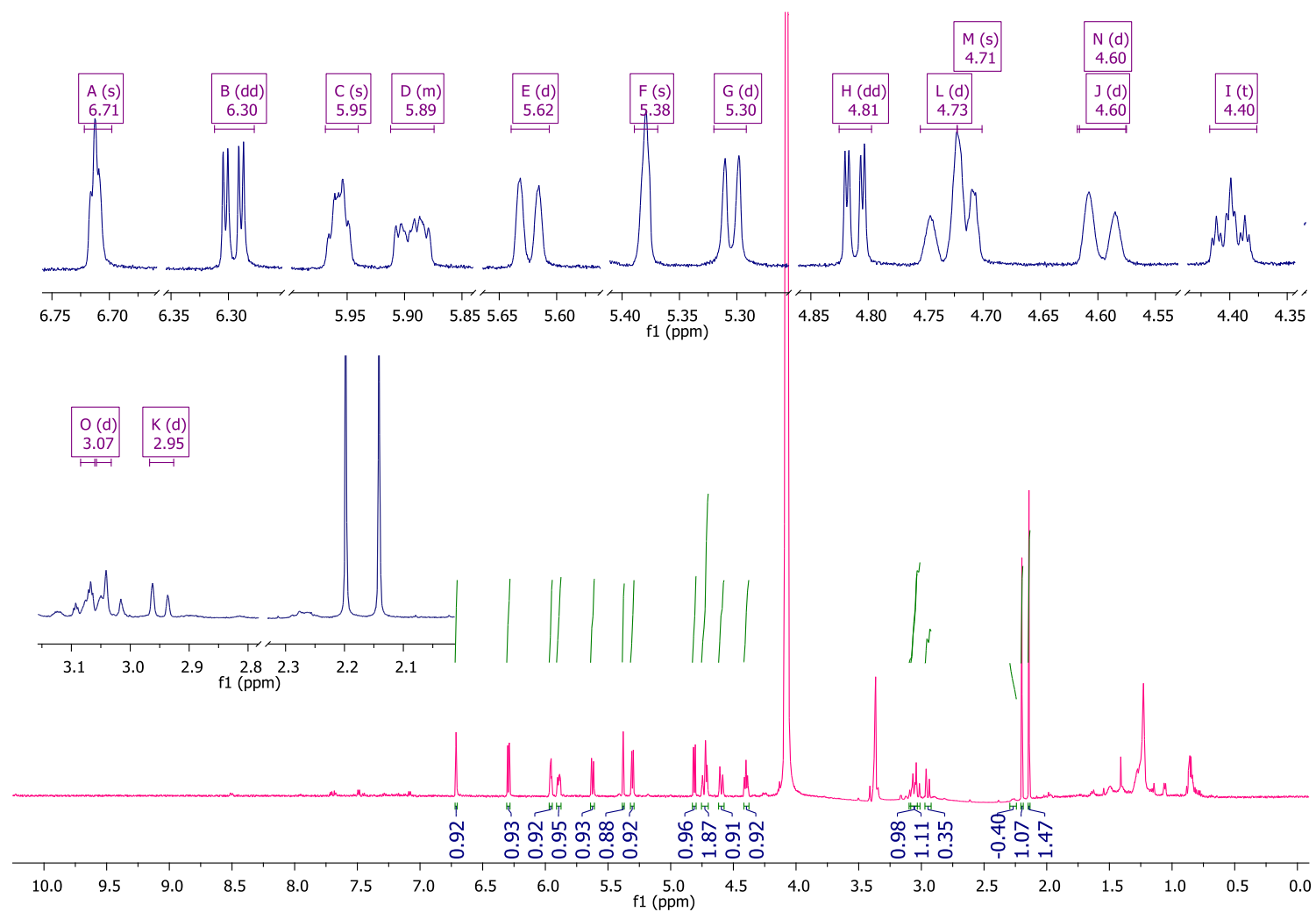


Figura 55- Espectro de RMN de H da substância F6-15 ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz)



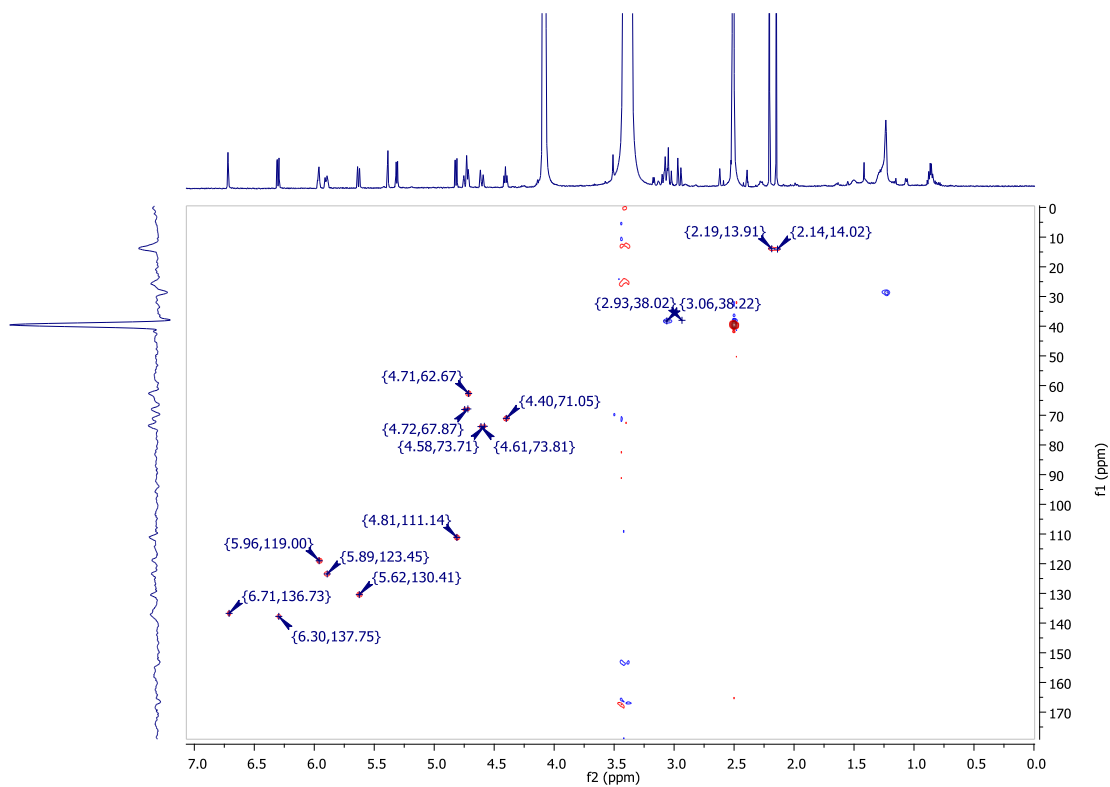


Figura 56- Mapa de contorno HSQC da substância F6-15 (DMSO- $d_6$ , 600 e 150 MHz)

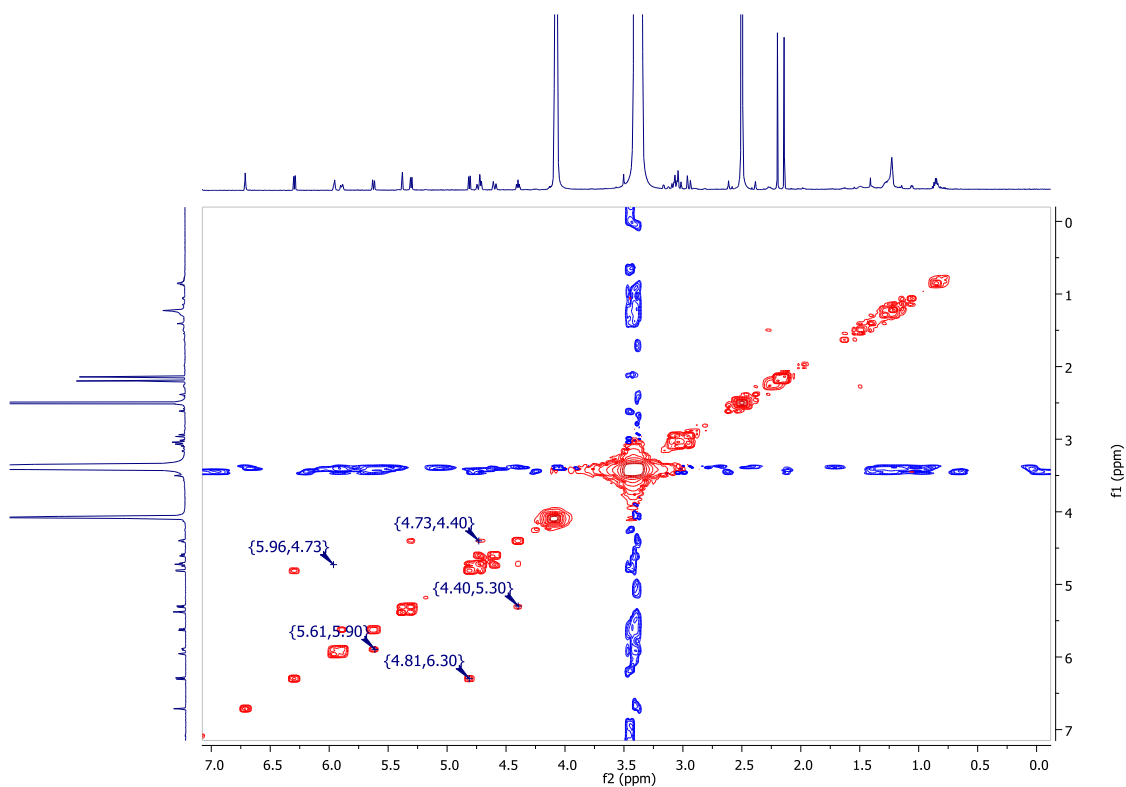


Figura 57- Mapa de contorno COSY da substância F6-15 (DMSO- $d_6$ , 600 e 150 MHz)

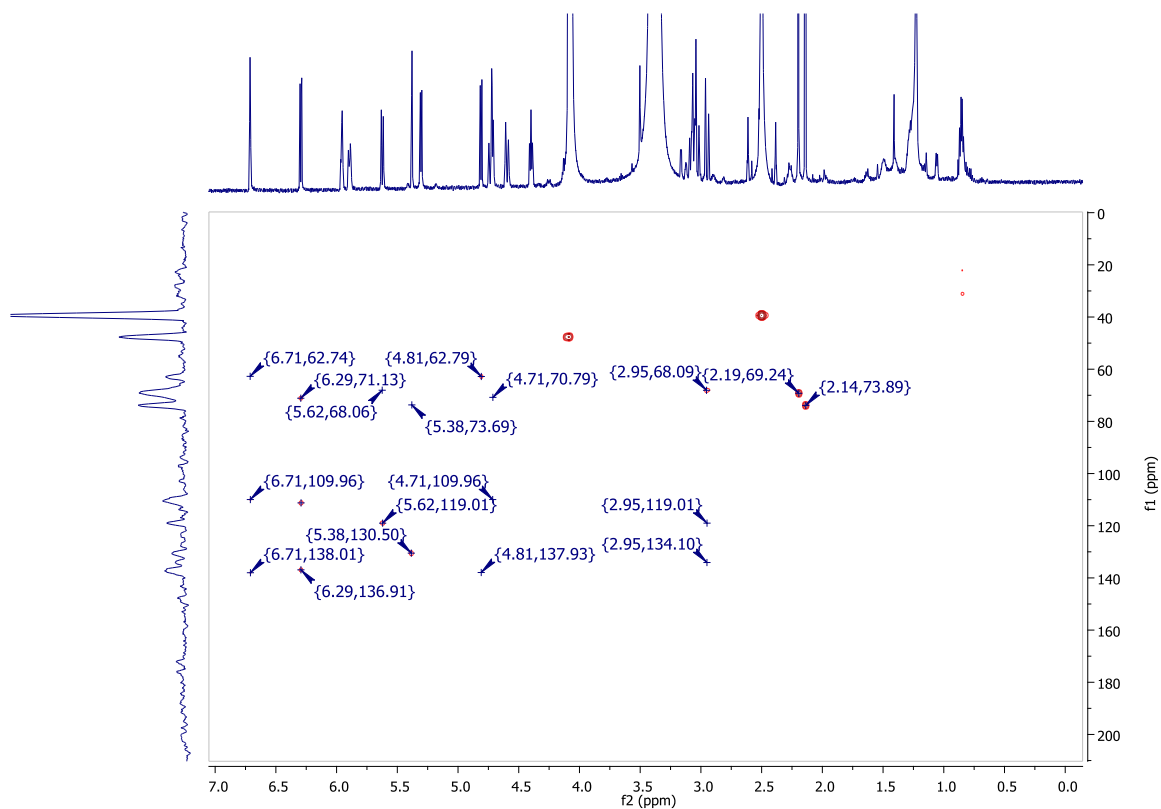


Figura 58- Mapa de contorno HMBC da substância F6-15 (DMSO- $d_6$ , 600 e 150 MHz)

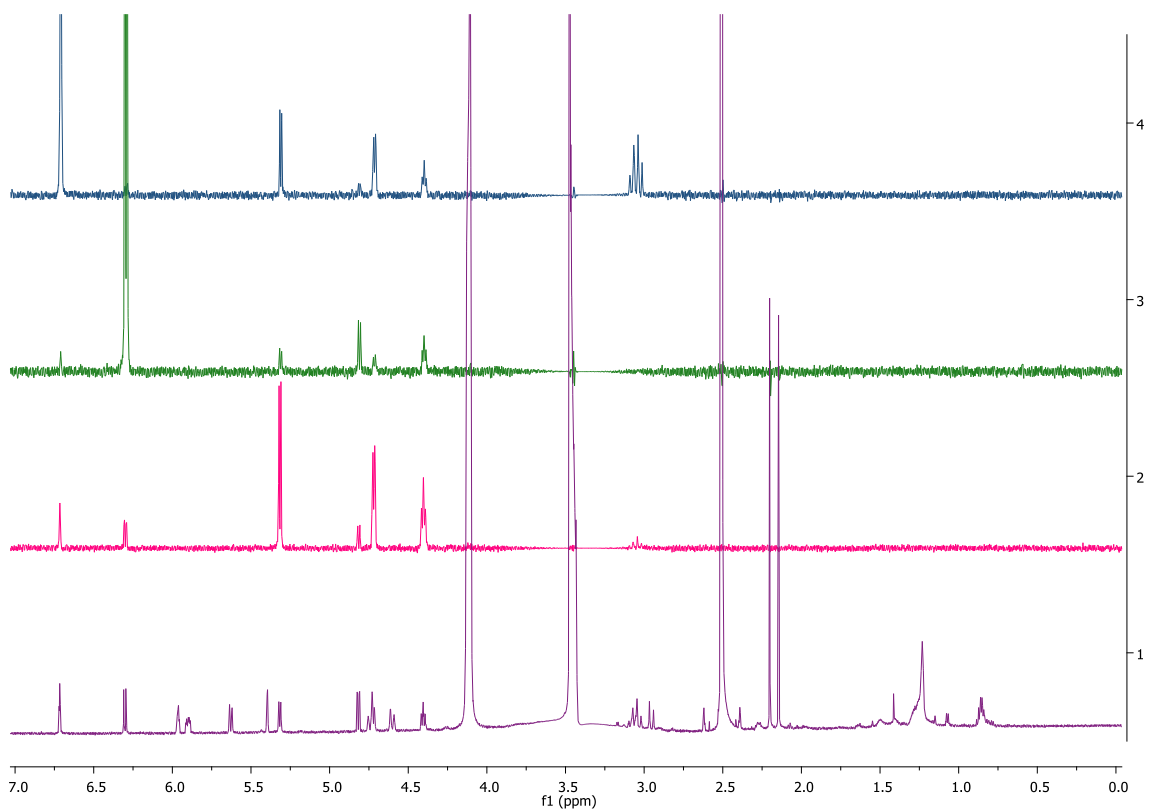
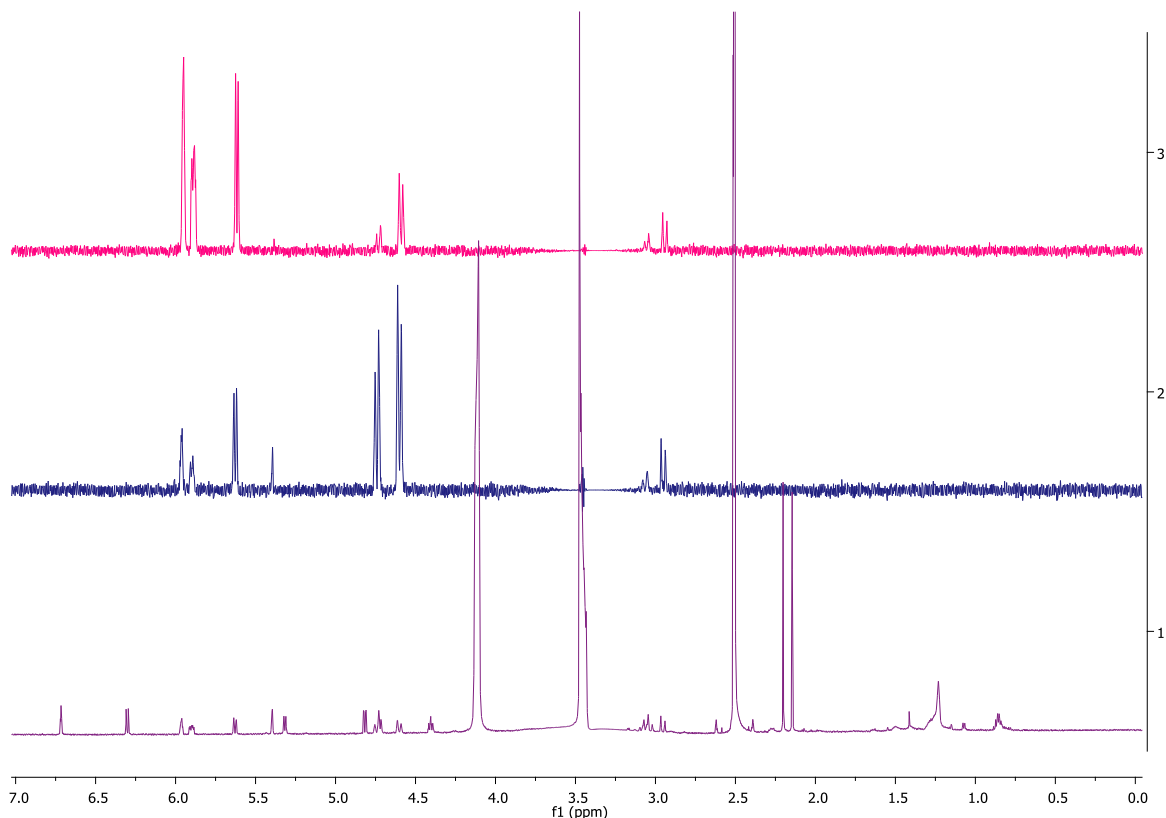


Figura 59- Espectro de TOCSY irradiado no H-1 (4  $\delta$ H 6.71) , H-3 (3  $\delta$ H 6.30), H-5 (2  $\delta$ H 4.40) e RMN de  $^1$ H (1) da substância F6-15.



**Figura 60-** Espectro de TOCSY irradiado no H-11 (3  $\delta$ H 5.63), H-12 (2  $\delta$ H 4.60) e RMN de  $^1$ H (1) da substância F6-15.

### 3.7 Atividade anticolinesterásica

O ensaio anticolinesterásico foi realizado on-flow com as enzimas acetilcolinesterase humana (AChE-hu) e de enguia elétrica (AChE-ee) e os resultados expressos em porcentagem de inibição enzimática (Tabela 5).

A fração AT-07 F4 demonstrou forte atividade anticolinesterásica frente às enzimas de enguia elétrica (90,25%) com valor bem próximo ao padrão Tacrina (95,3%). No entanto, demonstrou-se fraca na inibição da enzima acetilcolinesterásica humana, com apenas 3,78 % de inibição.

As frações At-07 F5 e F6 demonstraram porcentagens de atividade similares frente às duas enzimas, porém com valores bem inferiores ao padrão. Contudo, vale ressaltar que a avaliação de frações (mistura de substâncias) e em comparação com a atividade determinada para o padrão (substância pura) pode indicar que as substâncias presentes nessas frações podem ter atividade anticolinesterásica maior que o mostrado no teste para suas frações.

**Tabela 6-** Atividade anticolinesterásica do extrato e frações do fungo AT-07.

<b>Amostras</b>	<b>% inibição ICER-AChE ee</b>	<b>% inibição ICER-AChE hu</b>
AT 07	23,80	2,44
AT 07 -F1	0	4,57
AT 07 -F2	0	6,10
AT 07 -F3	6,44	2,70
AT 07 -F4	90,25	3,78
AT 07 -F5	16,54	17,45
AT 07 -F6	26,63	19,65
Tacrina*	95,3	83,7

ICER-AChE-ee: com a enzima Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*; ICER-AChE-hu: com a enzima Acetilcolinesterase de eritrócitos humanos;

#### 4 Conclusão:

A linhagem estudada do fungo *Microascus intricatus*, isolado da alga marinha vermelha *Asparagopsis taxiformis* mostrou quimiodiversidade atrativa ao analisarmos seu perfil químico por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e Ressonância Magnética Nuclear.

Através de fracionamento cromatográfico empregando CC, CCD e CLAE foi possível isolar cinco substâncias, que foram identificadas a partir de análises espectrométricas e espectroscópicas, sendo elas quatro dicetopiperazinas, a ciclo-(Pro-Tir), ciclo-(Phe-Phe) e um par de diastereoisômeros da ciclo-(Pro-Phe), bem como a isoflavona, daidzeína. Essas substâncias possuem atividades biológicas já descritas na literatura, agregando valor a esta linhagem do fungo *Microascus intricatus* como fonte de substâncias bioativas.

A fração AT-07 F4, obtida do extrato da cultura do fungo em estudo, apresentou boa atividade anticolinesterásica frente à enzima de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) ao compararmos com o padrão tacrina. No entanto, esta atividade não foi observada para as outras frações do mesmo extrato, assim como no ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase de eritrócitos humanos.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam o potencial químico e biológico do fungo *Microascus intricatus* e contribuem para o desenvolvimento da pesquisa na área de Produtos Naturais de micro-organismos marinhos, com destaque para a pesquisa de bioprospecção. Além disso, reforça o potencial dos fungos endofíticos, assim como do nicho de micro-organismos e do ambiente marinho, com destaque para a importância das relações ecológicas, bem como fundamenta a valorização e utilização sustentável não só da espécie fúngica, mas também a conservação do habitat do seu substrato, representado pelas algas marinhas.

## Referências

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n.1, p. 55-59, 2015.
- AKELLO, J. et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 34-42, 2007.
- ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.
- BAE, H. et al. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARRETOS, J. J. **Plantas medicinais: saberes tradicionais**. Bahia: Solisluna, 2014.
- BEYONDSRING PHARMACEUTICALS. **NSCLC and neutropenia prevention**. New York. Disponível em: <<http://www.beyondspringpharma.com/en/plinabulin/lead-indication/>>. Acesso em: 05 fev. 2017.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 116-211, 2015.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 382-431, Mar. 2016.
- BORTHWICK, A. D. 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. **Chemical Reviews**, v. 122, p. 3641-3716, 2012.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.
- CAO, F.; JIN, T. Y.; ZHOU, Y. F. Inhibitory effect of isoflavones on prostate cancer cells and PTEN gene. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 19, p. 35-41, 2006.
- CHAPLA, V. M. et al. Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, p. 6597-6608, 2014.
- CHINWORRUNGSEE, M. et al. Bioactive compounds from the seed fungus *Menisporopsis theobromae* BBC 3975. **Journal Natural Products**, v. 69, p. 1404-1410, 2006.

CONSTANTINO, A. I. et al. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 647-654, 2005.

COTA, B. B. et al. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, p. 177-182, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p. 3670-3695, June 2013.

DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. Isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6928-6937, Nov. 2010.

ELSEBAI, M. F. et al. HLE-inhibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereal*. **Journal Natural Products**, v. 74, p. 2282-2285, 2011a.

ELSEBAI, M. F. et al. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereal*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 802-808, 2011b.

FDHILA, F. et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.

FENG-WU, W. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 1, p. 72-76, 2012.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products-a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 382-391, 2003.

FUJIMOTO, H. et al. Immunomodulatory constituents from an Ascomycete, *Microascus tardifaciens*. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 10, p. 1426-1432, 1999.

GAO, S. et al. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, p. 59-70, 2011.

GROTHAUS, P. G.; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1781-1791, 2010.

GUO, J. M. et al. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. **World Journal Gastroenterology**, v. 10, p. 860-863, 2004a.

GUO, J. M. et al. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1641-1646, 2004b.

HOLLER, U. et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 104, p. 1354-1365, 2000.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163-173, 2008.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 468-482, 2011.

ISAKA, M. et al. Eremophilane-type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. **Journal Natural Products**, v. 73, p. 683-687, 2010.

KALE, M. S.; LADDHA, K. S. Isolation, characterization and quantification of Isoflavone in *Momordica dioica* Roxb. Ex Wild (Cucurbitaceae) fruits. **International Journal of Applied Research in Natural Products**. v. 5, n. 4, p. 28-36, 2012.

KAUL, S.; SUMBALI, G. Keratinophilic fungi from poultry farm soils of Jammu, India. **Mycologist**, v.14, n. 2, p. 89-91, 2000.

KUMAR, N. et al. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 355-364, 2013.

LAN, W. et al. Secondary metabolites with chemical diversity from the marine-derived fungus *Pseudallescheria boydii* F19-1 and their cytotoxic activity. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 76206-76213, 2016.

LIN, A. et al. Two new 5-Hydroxy-2-pyrone derivatives isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus flavus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 4, p. 245-249, 2008.

LO, F. H.; MAK, N. K.; LEUNG, K. N. Studies on the anti-tumor activities of the soy isoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 61, p. 591-595, 2007.

MARÍN, P.; PALMERO, D.; JURADO, M. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. **International Dairy Journal**, v. 36, p. 89-94, 2014.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, p. 189-199, jul/dez, 2007.

MAS, V. et al. Identification of selective inhibitors of VHSV from biased combinatorial libraries of N,N-disubstituted 2,5-piperazinediones. **Antiviral Research**, v. 72, p. 107-115, 2006.

MEDINA, R. P. **Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos**. 2016. 430 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.



MITSUI-SAITOH, K. et al. Protective effects of cyclo(L-Leu-L-Tyr) against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 335-342, 2011.

MOHAMMEDI, I. et al. Fatal *Microascus trigonosporus* (anamorph *Scopulariopsis*) pneumonia in a bone marrow transplant recipient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 215-217, 2004.

MORAES, J. F. et al. Bioprospecção de micro-organismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, p. 27-34, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, 2015.  
doi:10.3389/fchem.2015.00034.

OLIVEIRA, A. L. L.; FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, 2012.

O'NEILL, P. M.; POSNER, G. H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2945-2964, 2004.

OSTERHAGE, C. et al. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **Journal Organic Chemistry**, v. 65, p. 6412-6417, 2000.

QIAO, M. et al. Steroids and an oxylipin from an algicolous isolate of *Aspergillus flavus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 366-369, 2011.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução a espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage, 2012. 692 p.

PINTO, F. C. L. et al. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011.

POMMIER, Y. DNA sequence- and structure-selective alkylation of Guanine N2 in the dna minor groove by Ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Biochemistry**, v. 35, n. 41, p. 13303-13309, 1996.

PROKSCH, P. et al. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 475-489, 2010.

PUOPOLO, G. et al. *Lysobacter capsici* AZ78 produces cyclo(L-Pro-L-Tyr), a 2,5-diketopiperazine with toxic activity against sporangia of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 1168-1180, 2014.

PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006.

RAMASAMY, K. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of malaysian endophytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 640-643, 2010.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 290-344, 2011.

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States). W. Fenical; P. R. Jensen; X. C. Cheng. **Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof**. US6069146, 12 Nov. 1998, 30 May 2000.

SIQUEIRA, V. M. et al. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, p. 89-95, 2011.

SU, S. J.; YEH, T. M.; LEI, H. Y. Chow NH the potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 230-236, 2006.

SUGYAMA, Y. et al. Indole derivatives from a marine sponge-derived yeast as DPPH radical scavengers. **Journal Natural Products**, v. 72, p. 2069-2071, 2009.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9-19, 2009.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Clinical trials.gov**. Rockville, Nov. 2012. Disponível em:  
<<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=trabectedin&Search=Search>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

VERVOORT, H. C.; DRASKOVIC, M.; CREWS, P. Histone deacetylase inhibitors as a tool to up-regulate new fungal biosynthetic products: isolation of EGM-556, a cyclodepsipeptide, from *Microascus* sp. **Organic Letters**, v. 13, n. 3, p. 410-413, 2011.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WELCH, T. R.; WILLIAMS, R. M. Epidithiodioxopiperazin: occurrences, synthesis and biogenesis. **Natural Products Reports**, v. 31, p. 1336-1404, 2014.

WHITE, E. G. **Mensagens escolhidas**. Tatuí: Casa Publicadora Brasileira, 2008. v. 2, 293 p.

XUE, H. et al. Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an endophytic fungus of *Cephalotaxus mannii*. **Records Natural Products**, v. 6, n. 1, p. 28-34, 2012.

YU, C. et al. Potent inhibitors of cysteine protease from the marine fungus *Microascus longirostris*. **The Journal Antibiotics**, v. 42, n. 4, p. 395-397, 1995.

YU, C. et al. Scopularides A and B, cyclodepsipeptides from a marine sponge-derived fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*. **Journal Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1054-1054, 2008.

ZAO, S. et al. Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1559-1562, 2002.

ZHANG, B. et al. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 284, p. 974-977, May 1999.

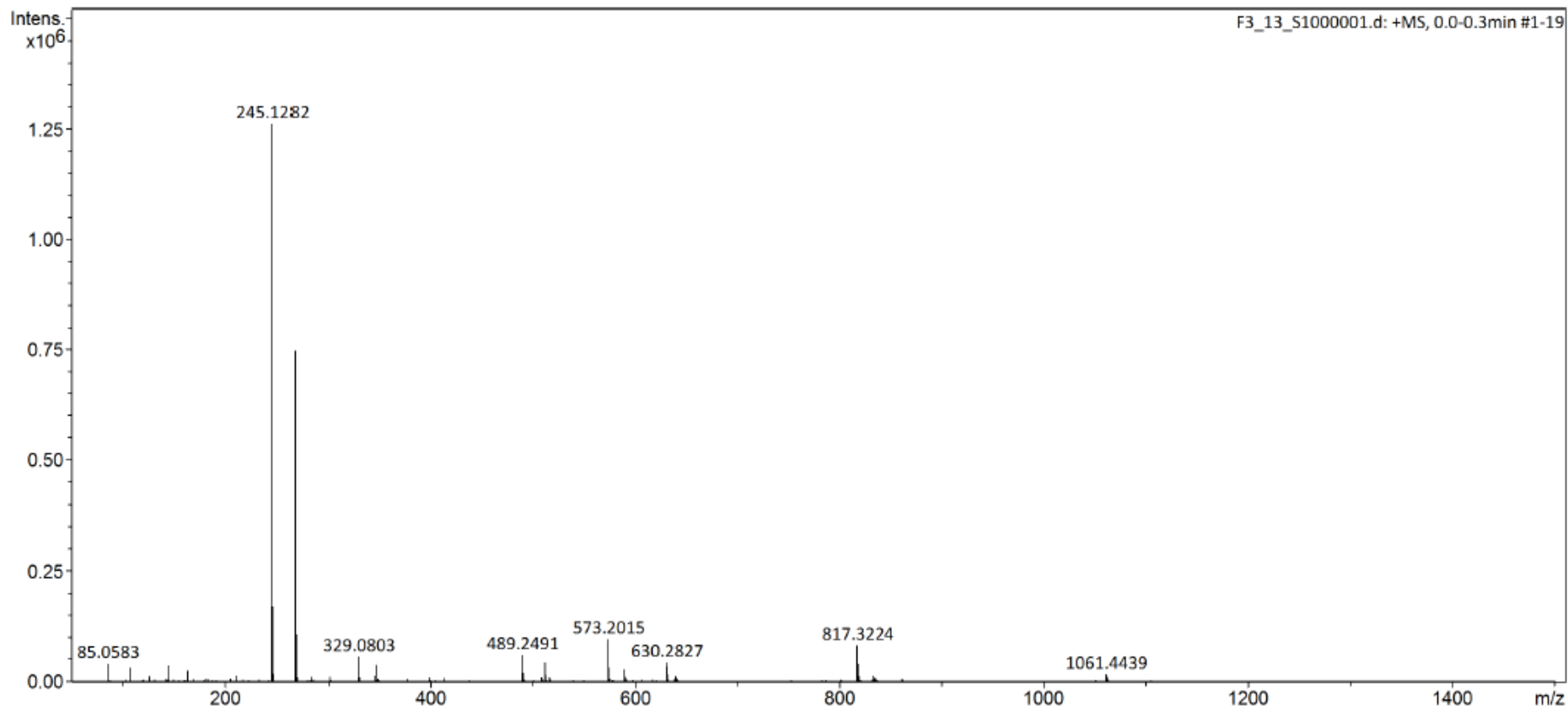
ZHANG, Y. et al. A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 951-953, 2007.

ZHANG, Y. et al. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy. **Marine Drugs**, v. 7, p. 97-112, 2009.

## APÊNDICE 1- Espectro de massas da substância F3-13S1

### Acquisition Parameter

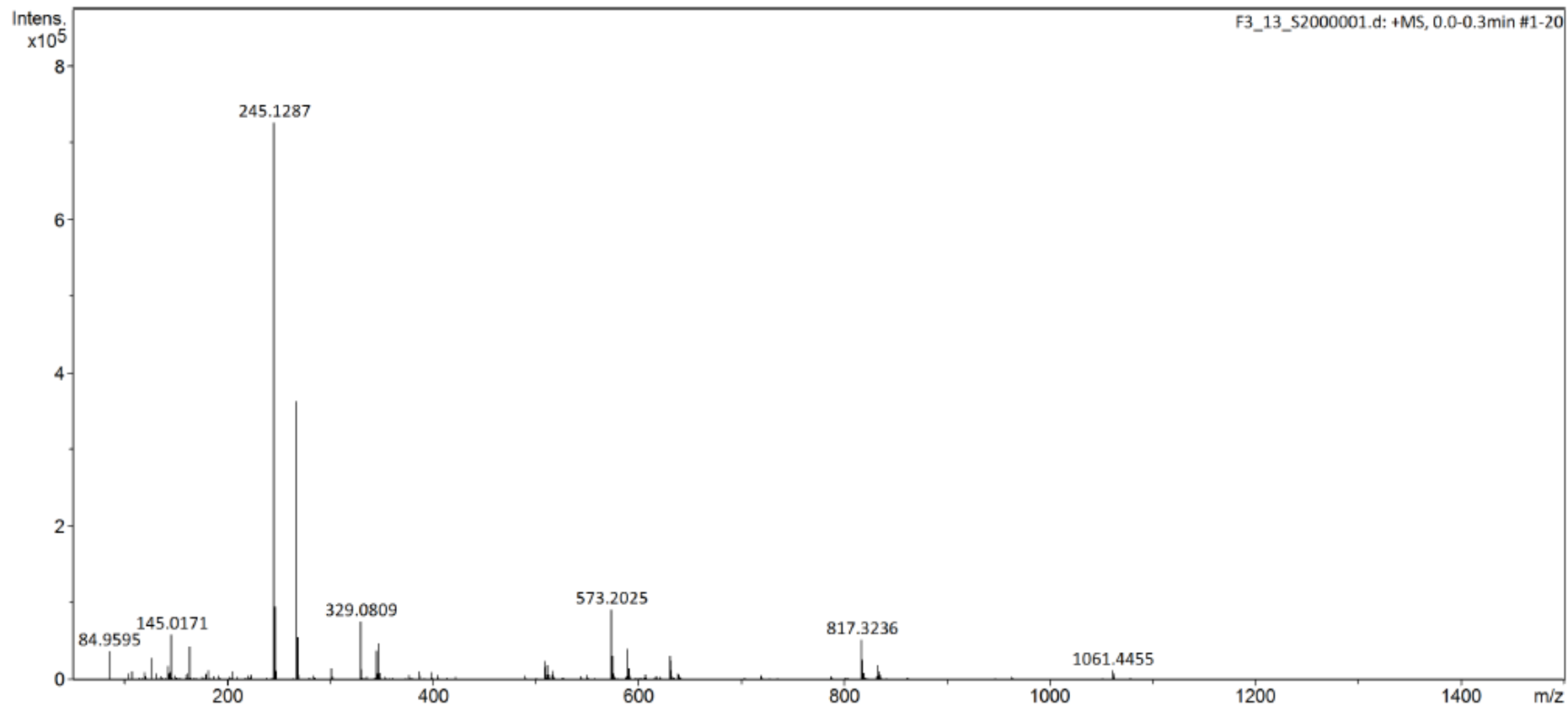
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	3800 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



## APÊNDICE 2- Espectro de massas da substância F3-13S2

### Acquisition Parameter

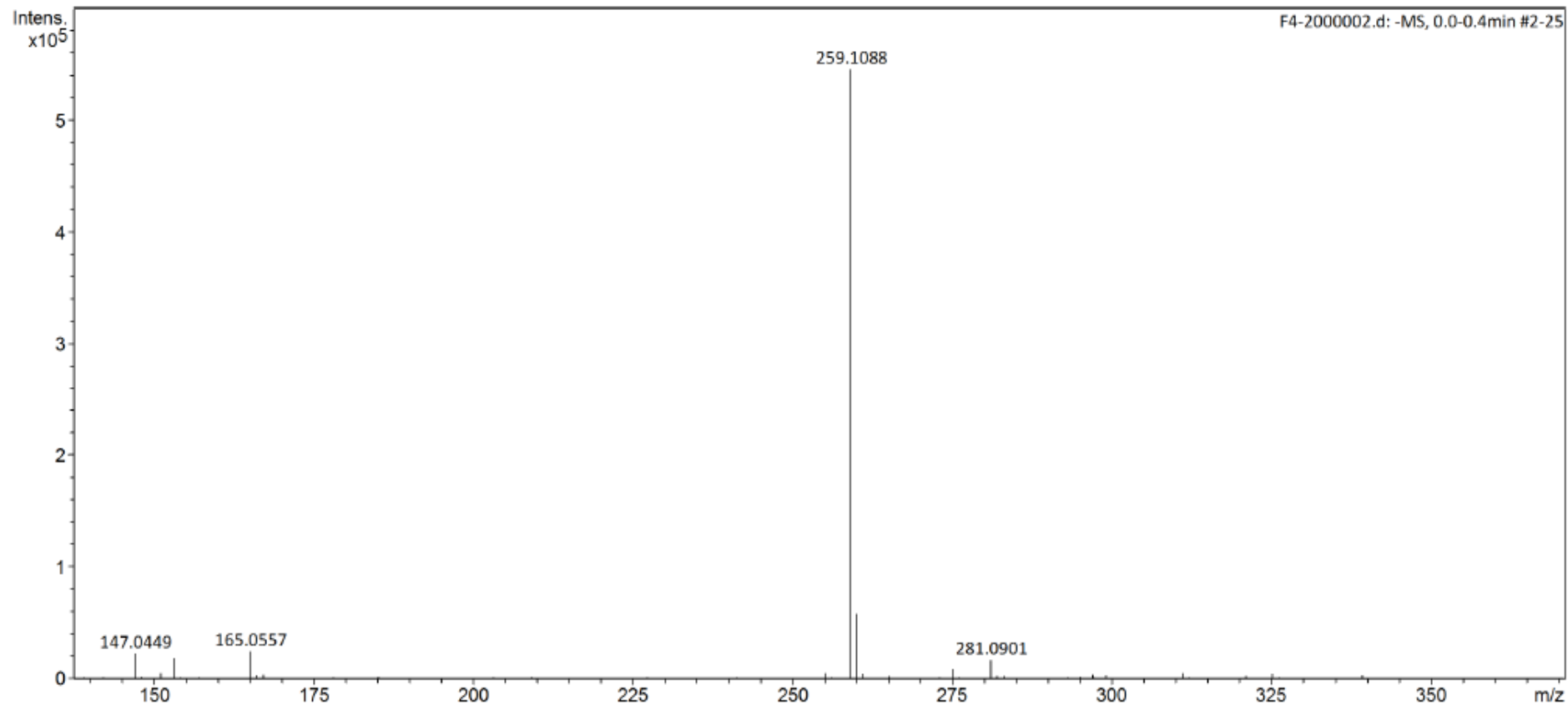
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	3800 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



### APÊNDICE 3- Espectro de massas da substância F4-2

#### Acquisition Parameter

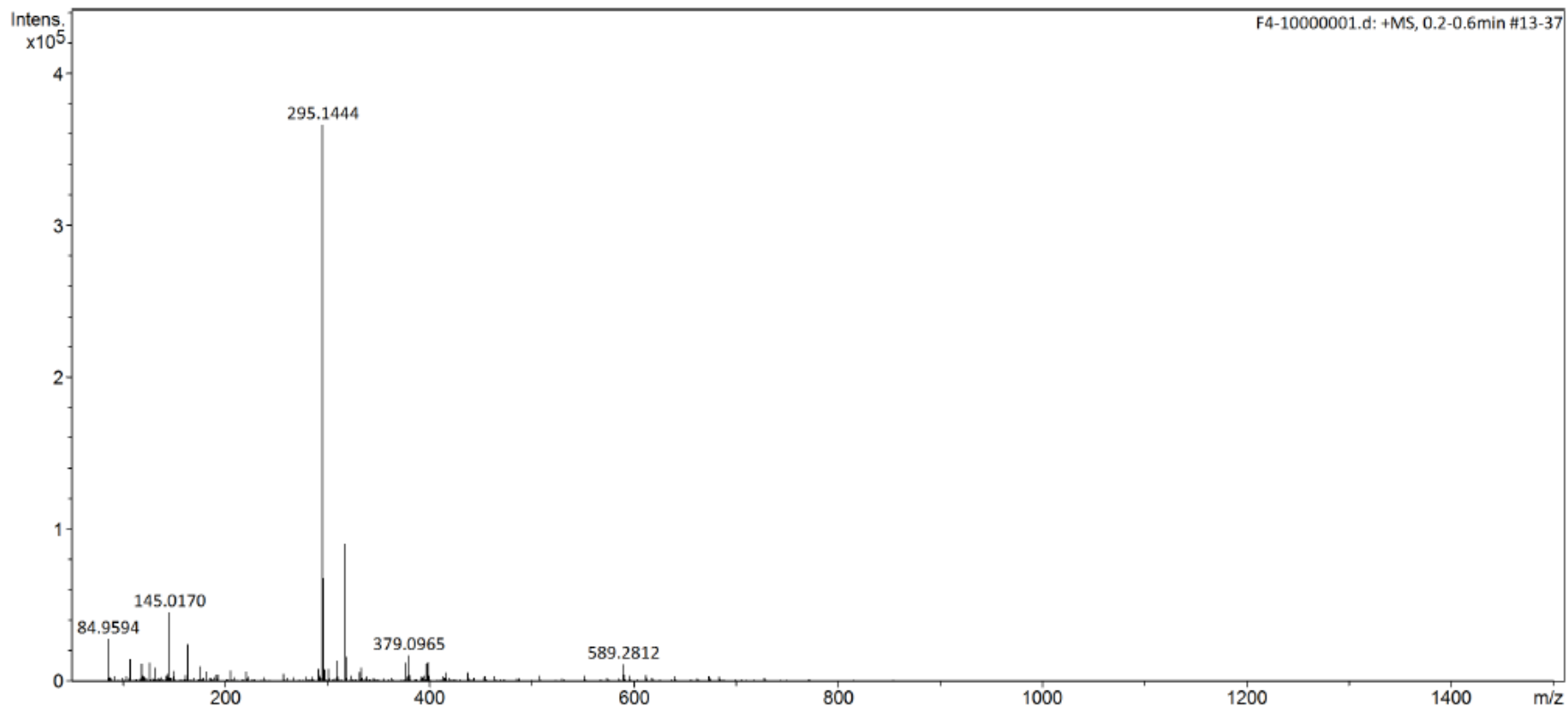
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



## APÊNDICE 4- Espectro de massas da substância F4-10

### Acquisition Parameter

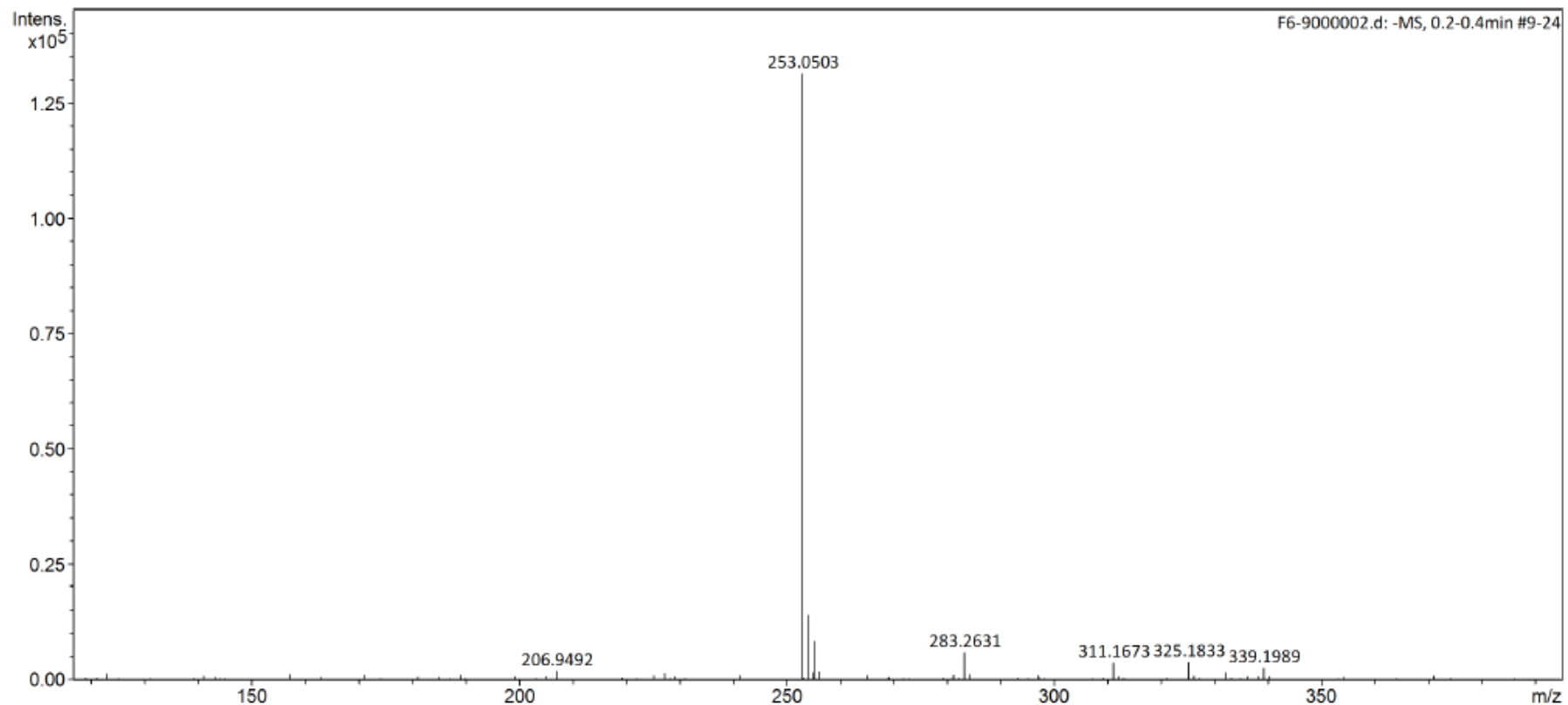
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



## APÊNDICE 5-: Espectro de massas da substância F6-9

### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C





## Apêndice 6- Espectro de massas da substância F6-15

### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

