



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Química



VANESSA MARA CHAPLA

Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da
Senna spectabilis

Araraquara

2010

VANESSA MARA CHAPLA

Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis*

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

Orientadora: Prof. Dr^a Angela Regina Araujo

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

C464e Chapla, Vanessa Mara
Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp.
isolado da *Senna spectabilis* / Vanessa Mara Chapla. - Araraquara :
[s.n], 2010
174 f. : il.

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

1. Produtos naturais. 2. Atividade antifúngica. 3. Fungos
endofíticos. 4. Anticolinesterásica. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
. Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais:

Nome: Vanessa Mara Chapla

Data de Nascimento: 28 de outubro de 1985

Naturalidade: Marechal Cândido Rondon - PR

Nacionalidade: Brasileira

Documento de Identidade: RG 8.215.181-8

Estado civil: Solteira

CNH: AB

Endereço para Correspondência:

Av. Antônio Gea Bernard, 57 - Bairro: Jardim Vitória- CEP: 14.800-430

Araraquara - SP

e-mail: vanichapla@yahoo.com.br

Formação Acadêmica:

(1) **Mestrado em Química** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química – Araraquara – SP (2008 - 2010).

(2) **Graduação em Bacharelado em Química** - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Toledo – PR (2003 - 2007).

Bolsas Concedidas

(1) **Bolsista de Mestrado** – CAPES (2003-2010)

Título do projeto: Avaliação química e biológica do fungo endofítico Cs-c (2) isolado da *Senna spectabilis*.

Orientação: Angela Regina Araujo

Trabalhos Apresentados em Congressos

- (1) CHAPLA, V. M.; ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; LOPES, M. N.; SILVA, D. H. S.; ARAUJO, A. R. Diketopiperazines from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus in *Senna spectabilis*. In: II Brazilian Conference on Natural Products, 2009, São Pedro.
- (2) CHAPLA, V. M.; ZANARDI, L. M.; LOPES, M. N.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Metabólitos tóxicos produzidos por *Phomopsis* sp., um fungo endofítico associado a *Senna spectabilis*. In: 17-Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.
- (3) PELLEGRINI, M. M.; CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Prospecção Química do fungo endofítico *Nigrospora shaerica* isolado de *Alchornea glandulosa*. 17-Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.
- (4) CHAPLA, V. M.; ARAUJO, A. R.; ZANARDI, L. M.; LOPES, M. N.; CÂMARA, M. P. S.; BOLZONI, V. S.; SILVA, D.H.S. Citocalasinas produzidas pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Cassia spectabilis*. In: 31ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.
- (5) CHAPLA, V. M.; OLGUIN, C. F. A.; BRAUN, G.; CORNELIUS T. F. M. Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato hexânico da parte aérea da macrófita *Eichhornia crassipes*. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo.
- (6) CHAPLA, V. M.; OLGUIN, C. F. A.; BRAUN, G. Avaliação da atividade citotóxica e antimicrobiana do extrato da parte aérea da macrófita *Eichhornia crassipes*. In: XV Encontro de Química da Região Sul, 2007, Ponta Grossa.
- (7) CHAPLA, V. M.; SILVA, C.; CAMPOS, S. D. Substituição e modificação do cimento odontológico a base de fosfato de zinco. In: XV Encontro de Química da Região Sul, 2007, Ponta Grossa.
- (8) CHAPLA, V. M.; OLGUIN, C. F. A. Investigação Fitoquímica do Extrato Hexânico da parte aérea da *Eichhornia crassipes*. In: XVI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2007, Maringá.
- (9) CHAPLA, V. M.; OLGUIN, C. F. A.; FOLLMANN, H. D. M.; NUNES, D.; SONE, A. P.; HAMERSKI, L. Toxicidade frente à *Artemia salina* e germinação de *Lactuca sativa* com os extratos fracionados da parte aérea da *Eichhornia crassipes*. In: XIII Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis.

Demais tipos de produção técnica

CHAPLA, V. M. Palestra Intitulada: Avaliação Química e biológica do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Senna spectabilis*. In: IV Workshop NuBBE, 2009, Araraquara.

Atividades extracurriculares

Participou da comissão organizadora do I Encontro Paranaense de Estudantes de Química e de VIII Semana Acadêmica, realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Campus de Toledo, totalizando 20 horas.

Estágio docente em Química Orgânica Experimental II - UNESP (março de 2009 a junho de 2009);

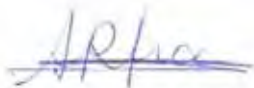
Iniciação Científica (IC) voluntária concedida pela PICV/UNIOESTE/PRPPG.

VANESSA MARA CHAPLA

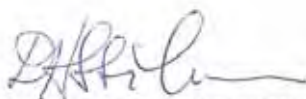
Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química

Araraquara, 04 de março de 2010.

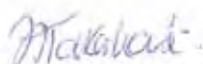
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª ANGELA REGINA ARAUJO (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª JACQUELINE APARECIDA TAKAHASHI
Instituto de Ciências Exatas – UFMG, Belo Horizonte

*Aos meus queridos pais,
Sirlei, Tati, Angélica.
À Prof. Dr^a Angela R. Araujo*

AGRADECIMENTOS

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

A prof. Angela pela dedicação, compreensão, carinho, amizade, muito obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

A prof. Márcia Nasser Lopes pela orientação e amizade.

A prof. Lúcia M. Xavier Lopes e a Sílvia N. López que participaram do exame de qualificação, e contribuíram para este trabalho.

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

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

A todos os funcionários do IQ da Unesp. Principalmente funcionários da biblioteca e secretaria por sua dedicação e disposição em ajudar.

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

Ao Alberto Alécio, por ser tão prestativo, sempre estando presente quando precisava de ajuda.

A Luciana Polese pelos seus ensinamentos em CLAE.

Ao Thomaz pelos espectros de massas, pelas discussões e dúvidas esclarecidas.

A Maria Cláudia pela realização dos ensaios biológicos.

A Luciana, Mariana e Stela que me abrigaram quando cheguei aqui, pelo incentivo e amizade, amo vocês.

Aos queridos amigos, Cristiana, Lú, Adriana, Néia, Cláudio Rodrigo, Alessandra, Jupe, Maike, Donni, Aline, Andrea, Juliana pela maravilhosa convivência, e as churrascadas lá em casa.

A super "irmã" Néia, que sempre esteve presente e pude contar, este trabalho não seria o mesmo sem você!! Você é muito especial, te adoro!!!

Aos irmãos de coração Camila, Carolina, Miller, João, Mari, Fernandinho, Thomas, Juliana e Lucimar pela convivência dentro e fora do laboratório.

A todos os amigos do Departamento de Química Orgânica em especial aos do NuBBE, pela convivência e amizade e que de uma maneira ou de outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho (não vou citar nomes, para não correr o risco de esquecer alguém). Valeu pessoal!!!! foi muito bom conviver com vocês nesses dois anos.

A Conceição que me apoiou deste a graduação e me incentivou vir pra cá.

A minha família, mesmo que de longe sempre me apoiou. Pai, Mãe, Sirlei, Tati, Angélica e ao mais novo membro Chicão. Amo essa família buscapé!!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Á CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo financiamento.

“Não me vejo feito fera, Muito menos anjo
Eu quem faço o meu destino, Traço os meus planos
Sei que meu sexto sentido, Não vai me trair...

Troco o riso pelo pranto, Em qualquer negócio
Sei que tem olhos do medo, No fundo do poço
Estou sempre maquiado, Quando vou sorrir...

As leis dos meus olhos São feitas por mim
Até na mesma mão, Os dedos não são iguais
Tem loucos,
Que se olham no espelho, E se acham normais
Ninguém ganha o jogo, Sem ter ambição
Não se apaga o fogo, Com fogo na mão
Os gritos no silêncio, Não assustam
Corações Animais...

Eu me escondo num segredo, Sem qualquer mistério
Aqui se faz, aqui se paga
Pode acreditar...”

(Zé Ramalho)

RESUMO

Micro-organismos endofíticos habitam os espaços intra e intercelular de um hospedeiro, durante todo ou parte de seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes. Esses micro-organismos são considerados uma fonte importante para a produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, antitumoral, entre outras. Este trabalho descreve o estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. associado à espécie vegetal do cerrado *Senna spectabilis*. *Phomopsis* sp. foi cultivado em diferentes meios de cultura para avaliar a variação metabólica em relação a composição dos nutrientes. Foram usados 5 meios líquidos comerciais (MBD, YM, Extrato de Malte, Nutrient e Czapek) e 2 meios sólidos (Milho e Arroz). Os extratos brutos Acetato e Acetonitrila obtidos foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos e por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , e submetidos aos ensaios para a avaliação da potencialidade antifúngica, antioxidante e anticolinesterásica. Os resultados evidenciaram extratos com uma variação metabólica intensa e potencialmente bioativos. Destes, os meios MDB e Milho foram selecionados para obtenção dos extratos brutos em escala ampliada. O extrato bruto acetato obtido em MDB foi submetido a fracionamento cromatográfico e levou à identificação da uracila (**1**), ácido nitropropanóico (**2**), citocalasina H (**3**), tirosol (**4**), *ciclo*(L-Pro-L-Leu), (**5**), *ciclo*(L-Pro-L-Ile) (**6**), *ciclo*(L-Pro-L-Val) (**7**), *ciclo*(L-Pro-L-Tyr) (**8**) e *ciclo*(L-Pro-L-Phe) (**9**). Este é o primeiro relato de dicetopiperazinas obtidos de fungos do gênero *Phomopsis*. Esta classe de substâncias apresenta inúmeras bioatividades, principalmente antimicrobiana. O extrato bruto acetonitrila obtido de milho conduziu ao isolamento da citocalasina H (**3**), citocalasina J (**10**), alternariol monometil éter (**11**), alternariol (**12**) e 2-hidroxi-alternariol (**13**), sendo o último, relatado pela primeira vez como produto natural e com os dados de RMN não descritos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, atividade antifúngica, anticolinesterásica, *Phomopsis* sp., *Senna spectabilis*

ABSTRACT

Endophytic microorganisms inhabit the intra and intercellular spaces of a host, during all or part of their life cycle, without causing any apparent damage. Microorganisms are regarded as an important source for the production of secondary metabolites with antimicrobial, antitumoral actions, among others. This work describes the chemical and biological study of endophytic fungus *Phomopsis* sp. associated with plant species of Cerrado *Senna spectabilis*. *Phomopsis* sp. was cultivated in different culture media to assess the metabolic variation in relation to nutrient composition. Were used 5 commercial liquid media (PDB, YM, Malt extract, nutrient and Czapek) and 2 solid mediums (Corn and Rice). The acetate and acetonitrile crude extracts were evaluated by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and ¹H Nuclear Magnetic Resonance and subjected to assays for the evaluation of potential antifungal, antioxidant and anticholinesterase. The results showed extracts with an intense metabolic variation and potentially bioactive. From these, the mediums PDB and Corn were selected to obtain the crude extracts on a large scale. The crude acetate extract obtained in PDB was submitted to chromatographic separation and led to the identification of uracil (**1**), 3-nitropropionic acid (**2**), cytochalasin H (**3**), tyrosol (**4**), *cyclo* (L-Pro-L-Leu) (**5**), *cyclo* (L-Pro-L-Ile) (**6**), *cyclo* (L-Pro-L-Val) (**7**), *cyclo* (L-Pro-L-Tyr) (**8**) and *cyclo* (L-Pro-L-Phe) (**9**). This is the first report of diketopiperazines obtained from fungi of the *Phomopsis* genus. This class of substances shows many bioactivities, especially antimicrobial. The crude acetonitrile extract obtained from Corn led to the isolation of cytochalasin H (**3**), cytochalasin J (**10**), alternariol monomethyl ether (**11**), alternariol (**12**) and 2-hydroxy-alternariol (**13**), being the last one reported for the first time as a natural product and with NMR data not reported.

Keywords: Endophytic fungi, antifungal, anticholinesterase activities, *Phomopsis* sp., *Senna spectabilis*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Enzima Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
AME	Alternariol monometil éter
AOH	Alternariol
BDA	Batata Dextrose Ágar
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CHCl ₃	Clóroformio
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
Cs-c (2)	Fungo endofítico isolado de <i>Senna spectabilis</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EM	Extrato de Malte
ESI-EM	Espectrometria de massas – Ionização por electrospray
Ext.	Extrato
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
grad.	Gradiente
H ₂ O	Água
Hex.	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
MDB	Meio de Dextrose e Batata
Me	Metila
MeOH	Metanol
MHz/Hz	Megahertz / Hertz
min.	Minutos
nm	Nanômetro
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Nucleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
pág.	Página
PDA	Potato-Dextrose-Agar
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
Rf	Fator de Retenção
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Rotações por minuto
Sf	Subfração
TFA	Trifluoroácetico
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Time of Flight (Tempo de voo)
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
YM	Yeast Medium

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
$[\alpha]_D$	Rotação Óptica
$[M]^+$	Íon molecular
J	Constante de acoplamento
2J	Acoplamento a duas ligações
3J	Acoplamento a três ligações
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto Largo
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dquint</i>	Duplo quinteto
<i>m</i>	Multipleteo
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
<i>t</i>	Tripleteo

LISTA DE FIGURAS NO TEXTO

Figura 1 - Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos	25
Figura 2 - Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos	29
Figura 3 - a. colônia de <i>Phomopsis</i> após 25 dias; b. estroma; c. conídios	30
Figura 4 - <i>Senna spectabilis</i> . Fonte: Lorenzi, 1998	32
Figura 5 - Metabólitos secundários obtidos de <i>Senna spectabilis</i>	34
Figura 6 - Etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos	40
Figura 7 - Metodologia de obtenção dos extratos brutos em MDB	43
Figura 8 - Metodologia de fracionamento do extrato bruto AcOEt produzido em MDB por <i>Phomopsis</i> sp.	44
Figura 9 - Metodologia de obtenção do extrato bruto para isolamento de metabólitos	45
Figura 10 - Metodologia do fracionamento do extrato bruto Milho-ACN produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	46
Figura 11 - Cromatograma preparativo de Cs-c(2) Milho-ACN (18-20)	47
Figura 12 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em MDB produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	52
Figura 13 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por <i>Phomopsis</i> sp.	52
Figura 14 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em YM produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	53
Figura 15 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em EM produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	54
Figura 16 - Cromatogramas em grad. exploratório do extrato bruto em Nutrient produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	54
Figura 17 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em Czapek ACN produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	55
Figura 18 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em Milho ACN produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	56
Figura 19 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em Arroz ACN produzido por <i>Phomopsis</i> sp.	57
Figura 20 - Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos produzidos por <i>Phomopsis</i> sp.	60
Figura 21 - Resultados da potencial antioxidante dos extratos brutos crescidos nos diferentes meios	61

Figura 22 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as frações do extrato bruto MDB	63
Figura 23 - Cromatograma analítico da Fração 01 para obtenção dos espectros UV da substância 01	66
Figura 24 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 01	66
Figura 25 - Principais correlações observadas em RMN - 2D para 03 (Figura 51, pág. 129)	69
Figura 26 - Principais correlações observadas em RMN 1D e 2D para 05	73
Figura 27 - Principais correlações observadas em RMN para 08	79
Figura 28 - Aminoácidos precursores das dicetopiperazinas	83
Figura 29 - Rota biossintética das citocalasinas B, D e H	88
Figura 30 - Rota biossintética do alternariol	95
Figura 31 - Bioensaio por bioautografia para as substâncias puras	96
Figura 32 - Cromatoplaça do ensaio anticolinesterásico	96
Figura 33 - Limite de detecção no ensaio anticolinesterásico para a Citocalasina H e <i>Ciclo(L-Pro-L-Leu)</i>	97
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em MDB	112
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em YM	113
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em EM	114
Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em Nutrient	115
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto AcOEt em Czapek	116
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto ACN em Czapek	117
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto ACN em Milho	118
Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto ACN em Arroz	119
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H de 01 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz)	120
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H de 02 e 04 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz)	121
Figura 44 - Espectro de COSY ampliado ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) de 02 e 04	122
Figura 45 - Espectro do experimento HMBC ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) de 02 e 04	123
Figura 46 - Espectro de massas de 03 (ESI-EM, modo positivo)	124
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H de 03 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz)	125
Figura 48 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H de 03 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz)	126
Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C de 03 ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz)	127
Figura 50 - Mapa de contorno HMQC de 03 ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz)	128

Figura 51 - Mapa de contornos HMBC de 03 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	129
Figura 52 - Espectro de RMN de ¹ H de 05 e 06 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	130
Figura 53 - Espectro de COSY de 05 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	131
Figura 54 - Mapa de contornos HMBC de 05 e 06 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	132
Figura 55 - Mapa de contorno HMBC ampliado de 05 e 06 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	133
Figura 56 - Mapas de contorno de HMQC de 05 e 06 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	134
Figura 57 - Espectros de NOESY de 05 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	135
Figura 58 - Espectro de massas de 05 (ESI-EM, modo positivo)	136
Figura 59 - Espectro de NOESY – 1D de 06 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	137
Figura 60 - Espectro de massas de 06 e 07 (ESI-EM, modo positivo)	138
Figura 61 - Mapa de contorno HMQC de 07 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	139
Figura 62 - Mapa de contorno HMBC ampliado de 07 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	140
Figura 63 - Espectro de RMN de ¹ H de 07 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	141
Figura 64 - Espectro de NOESY-1D de 07 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	142
Figura 65 - Espectro de massas de 07 (ESI-EM, modo positivo)	143
Figura 66 - Mapa de contorno HMQC de 07 e 08 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	144
Figura 67 - Espectro de RMN de ¹³ C de 07 e 08 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	145
Figura 68 - Espectro de RMN de ¹ H de 07 e 08 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	146
Figura 69 - Espectro de COSY ampliado de 07 e 08 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	147
Figura 70 - Espectro de NOESY-1D de 08 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	148
Figura 71 - Mapa de contorno HMBC de 07 e 08 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	149
Figura 72 - Espectro de massas de 07 e 08 (ESI-EM, modo positivo)	150
Figura 73 - Espectro de RMN de ¹ H de 09 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	151
Figura 74 - Espectro de RMN de ¹³ C de 09 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz)	152
Figura 75 - Espectro de NOESY – 1D de 09 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	153
Figura 76 - Espectro de massas de 09 (ESI-EM, modo positivo)	154
Figura 77 - Espectro de massas de 10 (ESI-EM, modo positivo)	155
Figura 78 - Espectro de RMN de ¹³ C de 10 (CDCl ₃ , 125 MHz)	156
Figura 79 - Espectro de RMN de ¹ H de 10 (CDCl ₃ , 500 MHz)	157
Figura 80 - Espectro de RMN de ¹ H de 10 ampliado (CDCl ₃ , 500 MHz)	158
Figura 81 - Mapa de contorno HMBC de 10 (CDCl ₃ , 125 MHz)	159
Figura 82 - Espectro de COSY e ampliado de 10 (CDCl ₃ , 125 MHz)	160
Figura 83 - Espectro de RMN de ¹ H de 11 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	161
Figura 84 - Espectro de RMN de ¹³ C de 11 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz)	162

Figura 85 - Espectro de massas de 11 (ESI-EM, modo negativo)	163
Figura 86 - Espectro de NOESY -1D de 11 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	164
Figura 87 - Espectro de RMN de ¹ H de 12 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	165
Figura 88 - Espectro de RMN de ¹³ C de 12 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	166
Figura 89 - Mapa de Contorno de HMBC de 12 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	167
Figura 90 - Mapa de Contorno de HMBC ampliado de 12 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	168
Figura 91 - Espectro de massas de 12 (ESI-EM, modo negativo)	169
Figura 92 - Espectro de RMN de ¹ H de 13 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	170
Figura 93 - Espectro de COSY de 13 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	171
Figura 94 - Mapa de Contorno de HMBC de 13 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	172
Figura 95 - Espectro de NOESY-1D de 13 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	173
Figura 96 - Espectro de massas de 13 (ESI-EM, modo negativo)	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa dos extratos brutos obtidos dos diferentes meios de cultivo de <i>Phomopsis</i> sp.	42
Tabela 2 - Resultados da avaliação antifúngica dos extratos produzidos por <i>Phomopsis</i> sp.	58
Tabela 3 - Resultado da atividade antifúngica das frações do extrato bruto	62
Tabela 4 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as frações do extrato bruto MDB	63
Tabela 5 - Resultados obtidos para as frações, Rf obtido das manchas amarelas	64
Tabela 6 - Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) e ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) de 02 (δ em ppm)	68
Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 , de 03 (δ em ppm e J em Hz)	70
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500MHz) de 04 (δ em ppm e J)	72
Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 , de 05 (δ em ppm e J em Hz)	74
Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 de 06 (δ em ppm e J em Hz)	75
Tabela 11 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 de 07 (δ em ppm e J em Hz)	77
Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 , de 08 (δ em ppm e J em Hz)	80
Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 , de 09 (δ em ppm e J em Hz)	81
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H (500Mz) e ^{13}C (125Mz) de 10 (DMSO- d_6 , δ em ppm e J em Hz)	86
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , e HMBC (DMSO- d_6) de 11 (δ em ppm e J em Hz)	90
Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H (500MZ) e ^{13}C (125MZ) em DMSO- d_6 , de 12 (δ em ppm)	92
Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6) de 13 (δ em ppm e J em Hz)	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Fungos: uma visão geral	24
1.2	Micro-organismos endofíticos	26
1.3	Diversidade metabólica de fungos endofíticos	27
1.4	Gênero <i>Phomopsis</i>	30
1.5	Espécie vegetal hospedeira	31
1.6	OBJETIVOS	35
2	PARTE EXPERIMENTAL	
2.1	Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas	37
2.2	Seleção e classificação do material vegetal	39
2.3	Isolamento das cepas fúngicas*	39
2.4	Classificação da linhagem fúngica	40
2.5	Cultivo de <i>Phomopsis</i> sp. em diferentes meios de cultivo e obtenção dos extratos brutos	41
2.5.1	Cultivo de <i>Phomopsis</i> sp. nos meios líquidos	41
2.5.2	Cultivo de <i>Phomopsis</i> sp. nos meios sólidos	41
2.6	Cultivo de <i>Phomopsis</i> sp. em escala ampliada	42
2.7	Fracionamento do extrato bruto produzido por <i>Phomopsis</i> sp. em MDB	43
2.8	Cultivo de <i>Phomopsis</i> sp. em escala ampliada em milho e obtenção do extrato bruto	45
2.9	Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de <i>Phomopsis</i> sp. em milho	46
2.10	Avaliação da atividade antifúngica*	48
2.11	Avaliação da atividade anticolinesterásica*	48
2.12	Avaliação da atividade potencial antioxidante	49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1	Avaliação da produção metabólica do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. em diferentes meios de cultura	51
3.1.1	Cultivo em MDB	52
3.1.2	Cultivo em YM	53
3.1.3	Cultivo em Extrato de Malte (EM)	53
3.1.4	Cultivo em Nutrient	54

3.1.5	Cultivo em Czapek	55
3.1.6	Cultivo em Milho	56
3.1.7	Cultivo em Arroz	57
3.2	Resultados dos ensaios biológicos realizados com os extratos brutos dos diferentes meios de cultivo	58
3.2.1	Atividade Antifúngica	58
3.2.2	Atividade Anticolinesterásica	59
3.2.3	Atividade Antioxidante	60
3.3	Resultados dos ensaios biológicos realizados com as frações obtidos do fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em MDB	62
3.3.1	Atividade antifúngica	62
3.3.2	Atividade Anticolinesterásica	63
3.3.3	Potencial antioxidante	64
3.4	Determinação estrutural das substâncias isoladas	65
3.4.1	Identificação estrutural da substância 01 (Uracila)	66
3.4.2	Identificação estrutural da substância 02 (Ácido nitropropanóico)	67
3.4.3	Identificação estrutural da substância 03 (Citocalasina H)	68
3.4.4	Identificação estrutural da substância 04 (Tirosol)	71
3.4.5	Identificação estrutural da substância 05 (Ciclo-L-Pro-L-Leu)	72
3.4.6	Identificação estrutural da substância 06 (Ciclo-L-Pro-L-Ile)	74
3.4.7	Identificação estrutural da substância 07 (Ciclo-L-Pro-L-Val)	76
3.4.8	Identificação estrutural da substância 08 (Ciclo-L-Pro-L-Tyr)	78
3.4.9	Identificação estrutural da substância 09 (Ciclo-L-Pro-L-Phe)	80
3.4.10	Identificação estrutural da substância 10 (Citocalasina J)	84
3.4.11	Identificação estrutural da substância 11 (Alternariol monometil éter)	89
3.4.12	Identificação estrutural da substância 12 (Alternariol)	90
3.4.13	Identificação estrutural da substância 13 (2-hidroxi-Alternariol)	93
3.5	Resultados obtidos dos ensaios biológicos realizados com as substâncias puras	95
3.5.1	Atividade antifúngica	95
3.5.2	Atividade anticolinesterásica	96
4	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXOS	111

INTRODUÇÃO
E
OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

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

Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada. Muitos metabólitos secundários se firmaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos (BARREIRO; BOLZANI, 2009), entre os quais podemos citar a Aspirina[®] (ácido acetil salicílico) que é um derivado sintético da salicina obtida de *Salix Alba* (STROBEL et al., 2004), a codeína, e fármacos de fonte vegetal muito significantes foi a descoberta dos alcalóides da Vinca (*Catharanthus roseus*), vincristina e vimblastina, utilizadas em diversos tratamentos de câncer (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004).

A exploração e a utilização de fontes naturais como plantas, animais e micro-organismos é sabiamente conhecida pela humanidade há muitos anos, possuindo aplicações na medicina popular (STROBEL et al., 2004). As plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de produtos naturais, tais como a artemisina, útil no tratamento da malária; a camptotecina, originada de fungos; o peptídeo conotoxina MVIIA, isolado do caracol marinho *Conus magus* utilizado no tratamento de dor crônica severa, entre outros (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os produtos naturais são importantes fontes de produtos farmacêuticos (SCHULZ; BOYLE, 2005), pois a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir destes (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Entre 1981-2002, 50% dos novos produtos químicos registrados na FDA (United States Food and Drug Administration) como agentes anticancerígenos e hipertensivos são descritos como produtos naturais ou derivados deles (STROBEL et al., 2004), demonstrando a grande importância das pesquisas por novos produtos derivados de organismos vivos.

Como contribuintes para a importância dos produtos naturais, os micro-organismos também começaram a serem investigados como fonte de princípios bioativos, devido à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas.

1.1 Fungos: uma visão geral

Os fungos são organismos eucarióticos, têm parede celular rígida e podem ser uni ou multicelulares. São heterotróficos, aclorofilados, produzindo esporos, tendo o glicogênio como principal substância de reserva. Eles podem ser encontrados na forma filamentosa ou leveduriforme (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). A reprodução ocorre de forma assexuada ou sexuada. Os esporos são hialinos ou pigmentados, de parede fina ou espessa, haplóides ou diplóides.

Os fungos são o segundo maior grupo de espécie sobre a Terra, perdendo apenas para os insetos. Estimativas sugerem que existem cerca de 1,5 milhões de espécies diferentes de fungos, sendo que menos de 5% foram descritos (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos ocorrem de modo geral em três modos de vida, saprófitas, parasitismo e simbiótico. A maioria dos fungos filamentosos é terrestre, contudo exigem geralmente elevado nível de umidade, sendo alguns grupos aquáticos.

Os fungos são uma promissora fonte de produtos naturais bioativos, pois possuem uma alta capacidade de produção metabólica diversificada. Com a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, têm-se dado maior ênfase aos estudos de descoberta e aplicação dos metabólitos oriundos de micro-organismos (STROBEL et al., 2004).

Os fungos são conhecidos pela produção de substâncias altamente tóxicas para mamíferos, como as micotoxinas, algumas consideradas carcinogênicas potentes. Entre as micotoxinas incluem-se aflatoxinas (I), ocratoxinas (II), citreoviridinas (III), tricotecenos e fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos tremorgênicos (PINTO et al., 2002).

Devido à capacidade de produção de metabólitos bioativos por fungos, são relatados muitos medicamentos provenientes de substâncias produzidas por estes (SCHULZ; BOYLE, 2005). Os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas são os antibióticos penicilinas (IV) e cefalosporinas (V). Outros exemplos mais recentes são a mevinolina (VI), um agente redutor de colesterol, ciclosporinas e alcalóides ergot (VII) (PINTO et al., 2002).

As substâncias isoladas de fungos destacam-se também como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas) (PINTO et al., 2002).

Nos últimos anos, os micro-organismos receberam atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores em produtos naturais. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação e triagem na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu potencial em fornecerem novas substâncias químicas bioativas (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI, 2006).

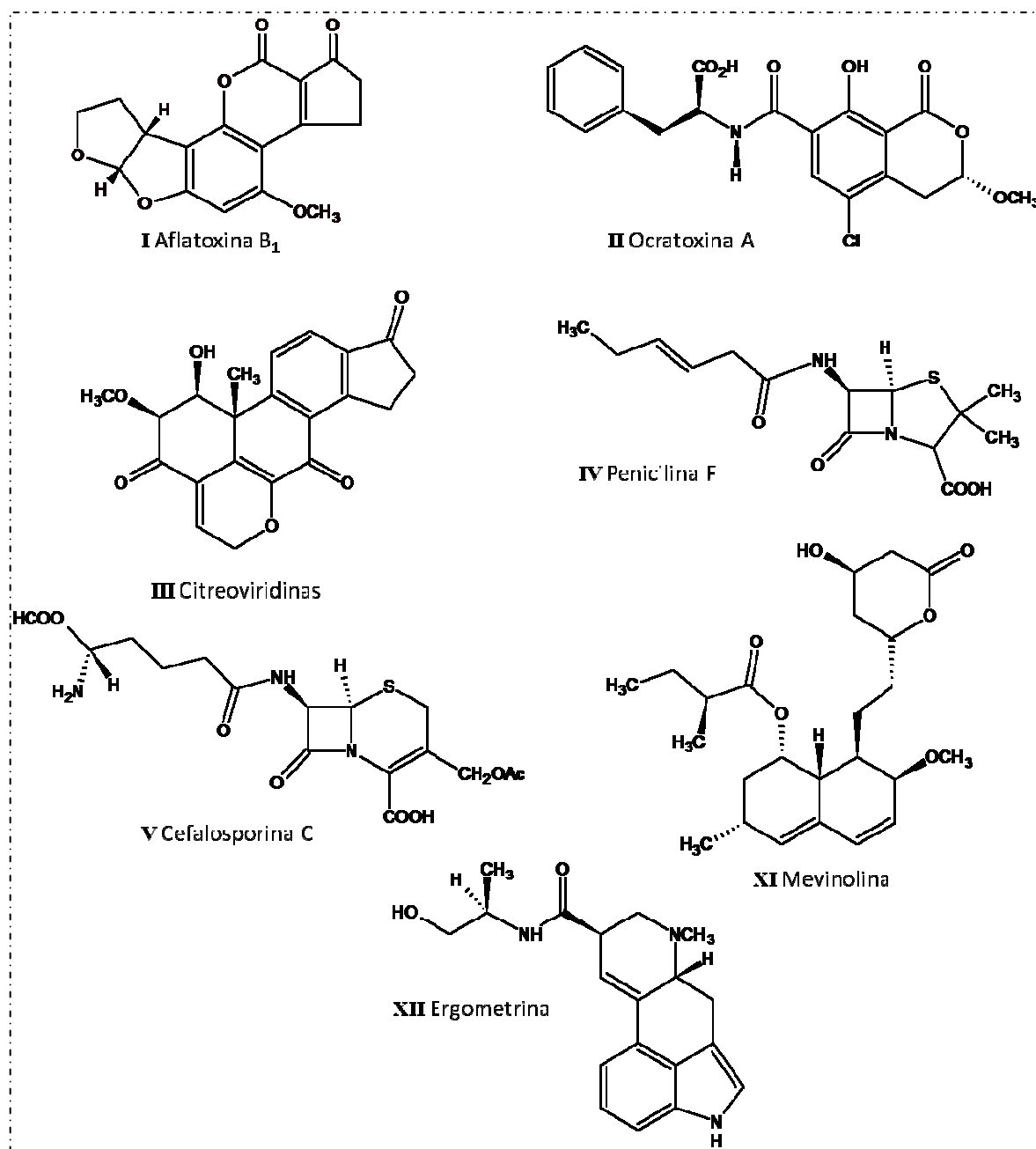


Figura 1- Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos

1.2 Micro-organismos endofíticos

A diversidade de micro-organismos existentes na terra é excepcional. Fungos e bactérias são encontrados habitando seres vivos, água, ar, solo, geleiras, vulcões entre outros, comprovando a versatilidade desses seres em se desenvolverem em habitat, por muitas vezes, inóspitos. Embora popularmente micro-organismos estejam associados a doenças, falta de higiene e matéria em decomposição, são muitas as espécies utilizadas na produção de fármacos, alimentos, enzimas, bebidas etc., visando o bem estar e saúde do homem. Dentre os micro-organismos considerados benéficos, pode-se citar os endofíticos, grupo que vem despertando um grande interesse de pesquisadores, por apresentar características de interesse, como por exemplo, a produção de antibióticos, hormônios e enzimas (MAKI, 2006).

Os fungos denominados de endofíticos são fungos que habitam os espaços inter e intracelulares dos tecidos de um hospedeiro vegetal, podem ser detectados em um momento particular associados aos tecidos aparentemente saudáveis de plantas hospedeiras. Estes podem permanecer em um hospedeiro por um período do seu ciclo de vida, onde as infecções ao hospedeiro ocorrem pelas raízes, estômatos ou lesões, mas também podem se instalar em uma planta por toda sua vida, onde a transmissão ocorre verticalmente, por meio de sementes do hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

O termo endofíticos originalmente foi descrito por De Bary e refere-se a qualquer organismo que vive nos tecidos das plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. A definição de Carroll descreve que fungos endófitos colonizam partes aéreas vivendo nos tecidos das plantas e não causam danos ao hospedeiro. Fungos patogênicos e micorrizas estão excluídos deste conceito. Petrini ainda incorporou a essa definição que os endófitos vivem parte ou toda sua vida nos tecidos do hospedeiro (REDLIN; CARRIS, 1997).

Os micro-organismos endofíticos podem influenciar em várias características expressas pela planta e desempenhar funções relevantes para a sanidade vegetal, pois atuam como agentes controladores de micro-organismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até na proteção da planta contra herbívoros. Todas as plantas já estudadas são habitadas por micro-organismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Cada espécie vegetal pode hospedar uma ou mais espécies de endófitos (STROBEL; DAISY, 2003). Em algumas plantas investigadas pôde-se notar a predominância de uma ou algumas espécies de endófitos, evidenciando a especificidade de algumas espécies de fungos com a espécie hospedeira. A especificidade de um endófito em relação a uma espécie vegetal

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

As interações dos fungos endofíticos com o hospedeiro ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que podem ser simbióticas (mutualismo e comensalismo) ou tróficas (parasitismo). Nas interações mutualísticas, os fungos são capazes de produzir metabólitos que podem conferir diversas vantagens às plantas, como resistência aos estresses bióticos e abióticos. Também podem produzir metabólitos que não interferem no metabolismo do vegetal, mas sim na defesa contra outros micro-organismos (comensalismo). Nessa associação, a planta hospedeira protege e alimenta o endófito, que em resposta produz metabólitos bioativos para aumentar o crescimento e competitividade do hospedeiro e protegê-lo contra herbívoros e fitopatógenos (GUNATILAKA, 2006).

O desequilíbrio da planta hospedeira pelo estresse ambiental afeta o comportamento de todos os integrantes da comunidade, dando condições para que os fungos oportunistas manifestem um potencial patológico ao hospedeiro, podendo induzir a transição de um estado simbiótico (mutualismo e comensalismo) a trófico (parasitismo), deste modo, o endófito passaria a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

1.3 Diversidade metabólica de fungos endofíticos

Em um programa de triagem de produtos naturais oriundos de fungos foi verificado que os endofíticos constituem o grupo mais produtivo quimicamente entre os fungos filamentosos, apresentando uma produção de diversidade metabólica 73% superior a outros fungos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). A alta produtividade destes fungos pode estar associada a dois fatores ecológicos, o alto nível de estresse ambiental e intensas interações com outros organismos. Micro-organismos que são submetidos a ambos os fatores possuem maior capacidade de produzir metabólitos secundários biologicamente ativos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; STROBEL; DAISY, 2003).

Durante as últimas duas décadas, mais de 100 micro-organismos endofíticos foram cultivados e submetidos a investigações para a caracterização química e avaliação biológica de um grande número de produtos naturais, os quais têm demonstrado novas estruturas químicas e atividades biológicas interessantes (GUNATILAKA, 2006). Segundo Schulz e Boyle (2005) aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem metabólitos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas.

Existem relatos também da produção de enzimas como uma característica expressa por fungos endofíticos. Uma vez que a planta é colonizada por um endófito, ocorre a resposta de defesa bioquímica induzida, com a produção de altos níveis de peroxidases, H_2O_2 , fenilalanina amônio liases (FAL), proantocianidinas e fenilpropanóides, como ocorre na colonização da planta com *Cladosporium fulvum*. Essa produção de enzimas em resposta à colonização do endófito pode ter um papel fundamental na limitação do crescimento do endófito e/ou patógeno e na virulência dos mesmos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Alguns autores sugerem que os fungos endofíticos produzam metabólitos similares ou igualmente presentes em suas plantas hospedeiras (ZHANG; SONG; TAN, 2006; GUNATILAKA, 2006), como o taxol (VIII), obtido tanto da planta medicinal *Taxus brevifolia*, como do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*; o taxol é utilizado para o tratamento de câncer de útero e mama (STROBEL et al., 2004). Isto indica uma possível coevolução dos fungos com a espécie hospedeira, onde os fungos tem se adaptado ao seu micro-ambiente por variação genética (ZHANG; SONG; TAN, 2006), ocorrendo uma transposição de genes entre a planta e fungo em uma verdadeira engenharia genética *in vivo* (AZEVEDO, 1998).

Alguns produtos potencialmente bioativos produzidos por fungos endofíticos merecem destaque, como a camptotecina (IX) isolada do fungo endofítico associado à *Nothapodytes foetida*, que apresentou atividade citotóxica em linhagens celulares de câncer humano *in vitro*, apresentando-se como um importante precursor na produção de drogas anticâncer (PURI et al., 2005). Outras substâncias com atividade antitumoral isoladas de fungos endofíticos são a citocalasina E (X) (WAGENAAR et al., 2000), pestalotiopsis A (XI) (PULICI; SAGAWARA; KOSHINO, 1996), ácido torriânico (XII) (LEE et al., 1996) e o ácido oregânico (XIII) (JAYASURIYA et al., 1996). A criptocina (XIV) (LI; STROBEL; HARPER, 2000), griseofulvina (XV) (CAFÊU et al., 2005) destacam-se pela atividade antifúngica, fomopsolida A (XVI) (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), citosporona D (XVII) (BRADY; CLAEDY, 2000) apresentam atividade antibacteriana. As estruturas destes metabólitos são apresentadas na **Figura 2** (pág. 29).

Os endófitos são um grupo de micro-organismos pouco estudados, que representam uma fonte rica de novos compostos químicos com potencial de exploração em uma grande variedade de áreas como médica, agrícola e industrial (STROBEL et al., 2004; GUO et al., 2008).

Com a capacidade dos fungos endofíticos em produzir metabólitos com potencial biológico, e a necessidade por novos metabólitos biologicamente ativos com ação terapêutica,

tem se tornado mais habitual a procura destes metabólitos em fontes promissoras, como os fungos endofíticos, uma vez que estes apresentam capacidade de produção metabólica com grande diversidade estrutural e com largo espectro de bioatividade.

Esta necessidade de descoberta de novos fármacos intensificou-se nos últimos anos devido ao desenvolvimento da resistência de alguns micro-organismos patógenos a fármacos existentes. Além disso, a busca por novos agentes antimicóticos têm se mostrado cada vez mais necessária devido ao desenvolvimento de doenças fúngicas na população humana, como resultado de um sistema imunológico comprometido.

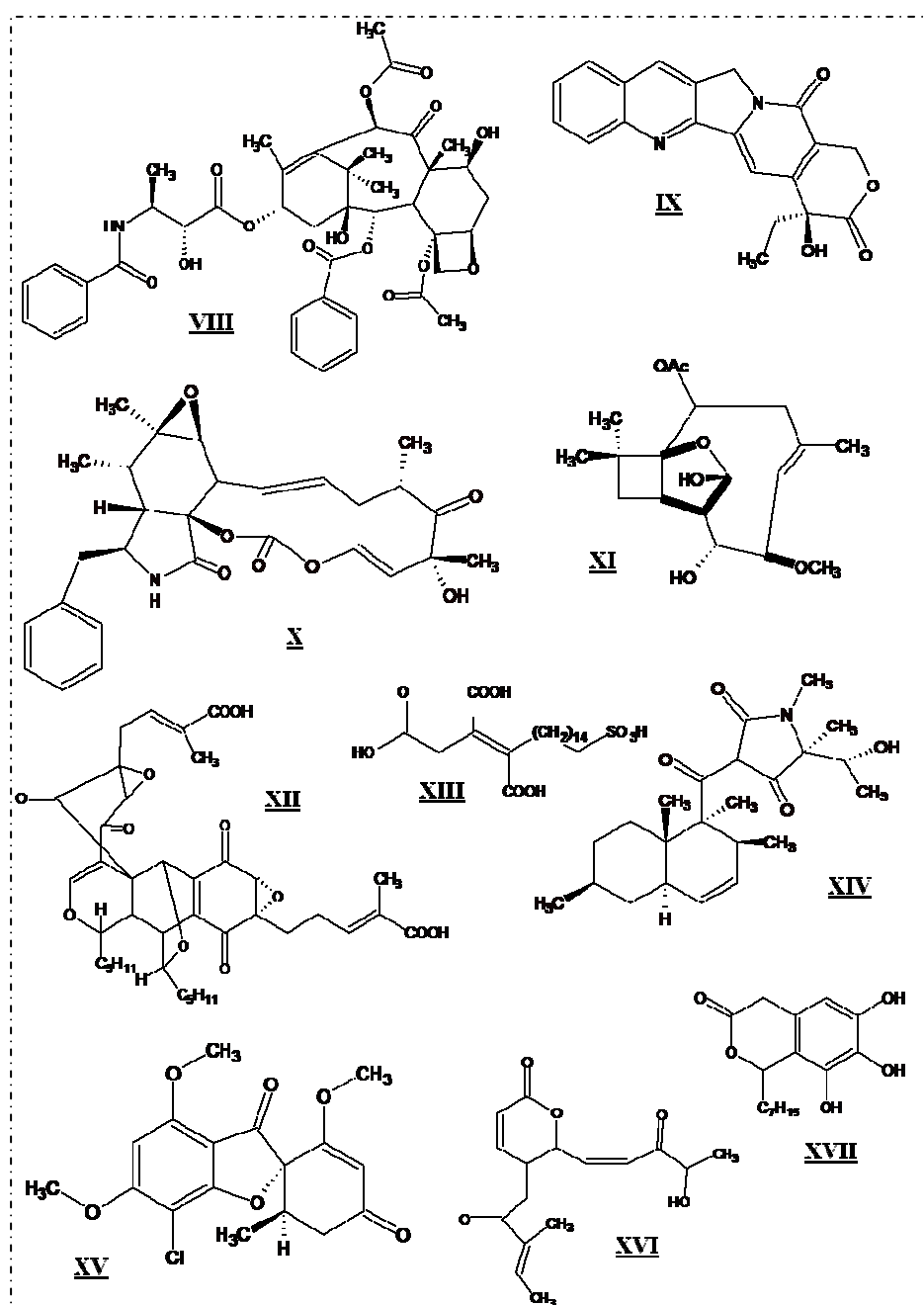


Figura 2 - Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos

1.4 Gênero *Phomopsis*

O gênero *Phomopsis* corresponde à forma mitospórica (anamorfa) do gênero *Diaphorthe* que é um ascomiceto da família *Diaphorthales*. Dentro do táxon de fungos mitospóricos, ele está na subdivisão *Coeleomyces* por produzir conídios (esporos assexuais) em cavidades constituídas por tecidos fúngicos do tipo picnídio que se formam embaixo do estroma (massa de hifas) (PFENNING, 2000). Fungos deste gênero produzem estroma geralmente indefinido, escasso e escuro; conidióforos e células conidiogênicas que formam a base e os lados do picnídio até o ostíolo (abertura no ápice do picnídio).

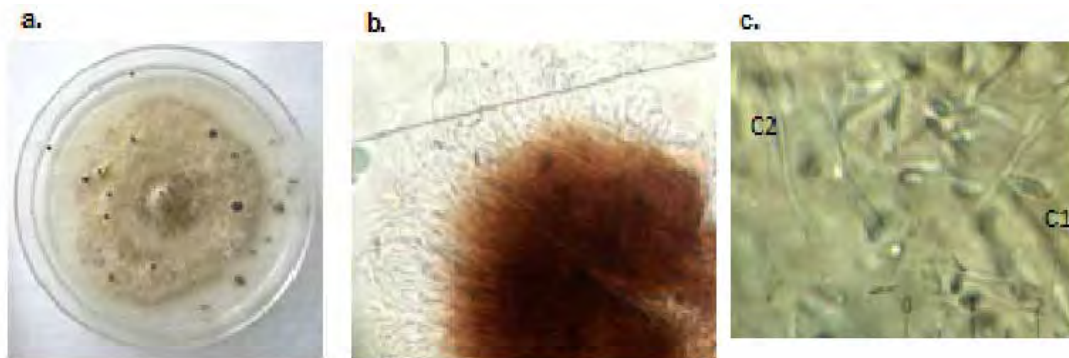


Figura 3 - a. colônia de *Phomopsis* após 25 dias; b. estroma; c. conídios.

Espécies de *Phomopsis* são comumente encontradas como patógenos e endófitos de plantas (MAKI, 2006). As plantas herbáceas comuns podem servir de hospedeiros alternativos para patógenos de culturas economicamente importantes, porém, os fungos do gênero *Phomopsis* ocorrem frequentemente como endófitos sem danos aparentes para o hospedeiro, mas em condições ideais podem tornarem-se patógenos com uma ação devastadora.

O gênero *Phomopsis* como patógeno é responsável por diversas doenças em muitas espécies vegetais, como por exemplo, causam queimaduras nas folhas de *Myracrodruon urundeuva* (ANJOS; CHARCHAR; GUIMARÃES, 2001), doença de cancro em plantações de chás em várias regiões do planeta (PONMURUGAN; BABY, 2008). *Phomopsis viticola* causa doença em plantações de uva, trazendo vários prejuízos (NITA et al., 2007).

Na agricultura, a fitopatogenicidade característica deste gênero está sendo usada no biocontrole de pragas, como no caso do fungo *Phomopsis amaranthicola*, que está sendo usado como bio-herbicida para *Amaranthus spp.*, uma erva daninha que afeta plantações de grãos em várias regiões do planeta (WYSS et al., 2004).

O gênero *Phomopsis* é conhecido por ser uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos de diversas estruturas, tais como xantonas, éteres diarilícos, citocalasinas, ácido convolvulânico e a micotoxina fomopsina A. Alguns dos compostos isolados de *Phomopsis* sp. apresentaram atividade citotóxica significativa, *in vitro*, antimalárica e antituberculose. No entanto, muitos destes compostos bioativos ainda estão sem aplicação devido a problemas com toxicidade (HUSSAIN et al., 2009).

Estudos realizados por Silva et al. (2006) com o fungo *Phomopsis cassiae* conduziram ao isolamento de dois novos policetídeos e cinco novos sesquiterpenos da classe dos cadinanos, sendo que algumas destas apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e também atividade citotóxica, *in vitro*, contra linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa). Deste modo, fica evidente a grande diversidade e potencialidade biológica deste gênero.

Este gênero é um importante grupo de fungos com potencial biotecnológico, devido à produção de diversos metabólitos secundários, entre os quais podemos incluir as micotoxinas que afetam o sistema nervoso de vertebrados (BILLS et al. 2002) e alcalóides com capacidade farmacológicas, tais como phomopsinas (DAÍ et al., 2005). Esses fatores evidenciam a grande importância deste gênero de fungos tanto na busca por novos metabólitos bioativos como a aplicabilidade na agricultura e biotecnologia.

1.5 Espécie vegetal hospedeira

A seleção da espécie hospedeira garante melhores oportunidades no isolamento de fungos endofíticos de novos gêneros e espécies. Devido ao enorme número de espécies de plantas no mundo, algumas estratégias de seleção podem ser utilizadas na busca por endofíticos bioativos (STROBEL et al., 2004), tais como: plantas com história etnobotânica que relata o uso e a aplicação específica de partes do vegetal; plantas endêmicas que ocupam solos mais antigos e plantas nativas de áreas com grande biodiversidade.

A espécie vegetal selecionada para o isolamento de fungos endofíticos foi a *Senna spectabilis* (**Figura 4**), conhecida popularmente como “são-joão”, “cássia-do-nordeste”, “canafístula-de-besouro” e “pau-de-ovelha”.

Característica do nordeste semi-árido (caatinga), mas também é comum no Cerrado do estado de São Paulo. Ocorre preferencialmente em solos mais profundos, bem drenados e de razoável fertilidade (LORENZI, 1998).

A árvore de *Senna spectabilis* é ornamental devido à beleza de suas flores amarelas. No Brasil, principalmente no estado de São Paulo, a árvore é utilizada na arborização de ruas (VIEGAS JUNIOR et al., 2004b). O período de floração ocorre durante os meses de dezembro–abril, já a maturação dos frutos ocorre nos meses de agosto–setembro (LORENZI, 1998).



Figura 4 - *Senna spectabilis*. Fonte: Lorenzi, 1998

Com o novo sistema de classificação taxonômica adotado para a família Leguminosae, várias espécies de *Cassia* foram incluídas no grupo *Senna*, outras continuaram como *Cassia* e algumas continuaram como sinônima de *Senna*. Esta família, uma das maiores dentre as Angiosperma, foi separada em três grupos distintos, as subfamílias Mimosaceae, Papilionaceae e Caesalpinaceae. Espécies de *Cassia*, juntamente com a sinônima *Senna* ou com aquelas que mudaram para o grupo *Senna* após o novo sistema de classificação taxonômica adotado, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (VEIGAS JUNIOR. et al., 2006).

Esta confusão taxonômica entre os dois gêneros é um problema para os estudos químicos e farmacológicos que o NuBBE está realizando com a espécie *Senna spectabilis*, erroneamente identificada em estudos anteriores como *Cassia spectabilis*, e *Cassia leptophilla*.

Ambos os gêneros são bastante estudados, devido à importância de seus usos na medicina popular, pois apresentam um amplo espectro de propriedades farmacológicas, especialmente associadas com potencial anti-inflamatório (RIBEIRO et al., 1999).

Na região norte, é bastante empregada em medicamentos caseiros, como é o caso da canafístula (*C. fistula*), utilizada como purgativo (MATOS, 2000). Bhakta et al. (1999)

relataram ainda o uso desta espécie no tratamento de infecções bacterianas, doenças de pele, reumatismo e desordens hepáticas. Recentemente, Ingkaninan et al. (2003) relataram a atividade inibidora de acetilcolinesterase no extrato preparado com raízes desta planta. Algumas espécies também são comumente usadas na África e em países da Ásia, principalmente na Índia e na China, como formulações da medicina tradicional para tratamento de diversas doenças, como alternativa à medicina convencional alopática (PIVATTO et al. 2005).

Diversas espécies de *Senna* foram relatadas por apresentarem muitos compostos fenólicos com atividades biológicas e farmacológicas, por exemplo, antimicrobianos, laxativa, antiulcerogênica, propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (VIEGAS JUNIOR et al., 2004b; PIVATTO et al. 2005).

Estudos fitoquímicos realizados com folhas e flores de *S. spectabilis* evidenciaram a presença de alcalóides piperidínicos bioativos (**Figura 5**) (VIEGAS JUNIOR et al., 2004b; VIEGAS JUNIOR et al., 2007; PIVATTO et al., 2005). Recentemente a citotoxicidade destes metabólitos foram descritas utilizando linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, indicando uma possível atividade antitumoral (VIEGAS JUNIOR et al., 2004b). Outros ensaios com esses alcalóides demonstraram atividade antinociceptiva significativa, e também apresentaram inibição da acetilcolinesterase (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995; ALEXANDRE-MOREIA et al., 2003; VIEGAS JUNIOR et al., 2008). Além disso, foi atribuído aos alcalóides piperidínicos atividade purgativa, antimicrobiana, e capacidade de inibição de superóxido (PIVATTO et al. 2005).

A potencialidade biológica apresentada por *Senna spectabilis* (VIEGAS JUNIOR et al., 2008), as fortes evidências de que micro-organismos endofíticos mimetizam a espécie hospedeira produzindo substâncias com igual ou maior bioatividade que estas (GUNATILAKA, 2006) e os dados obtidos durante a triagem realizada, justificam a escolha do fungo *Phomopsis* sp. associado a esta espécie vegetal para estudo químico/biológico deste trabalho.

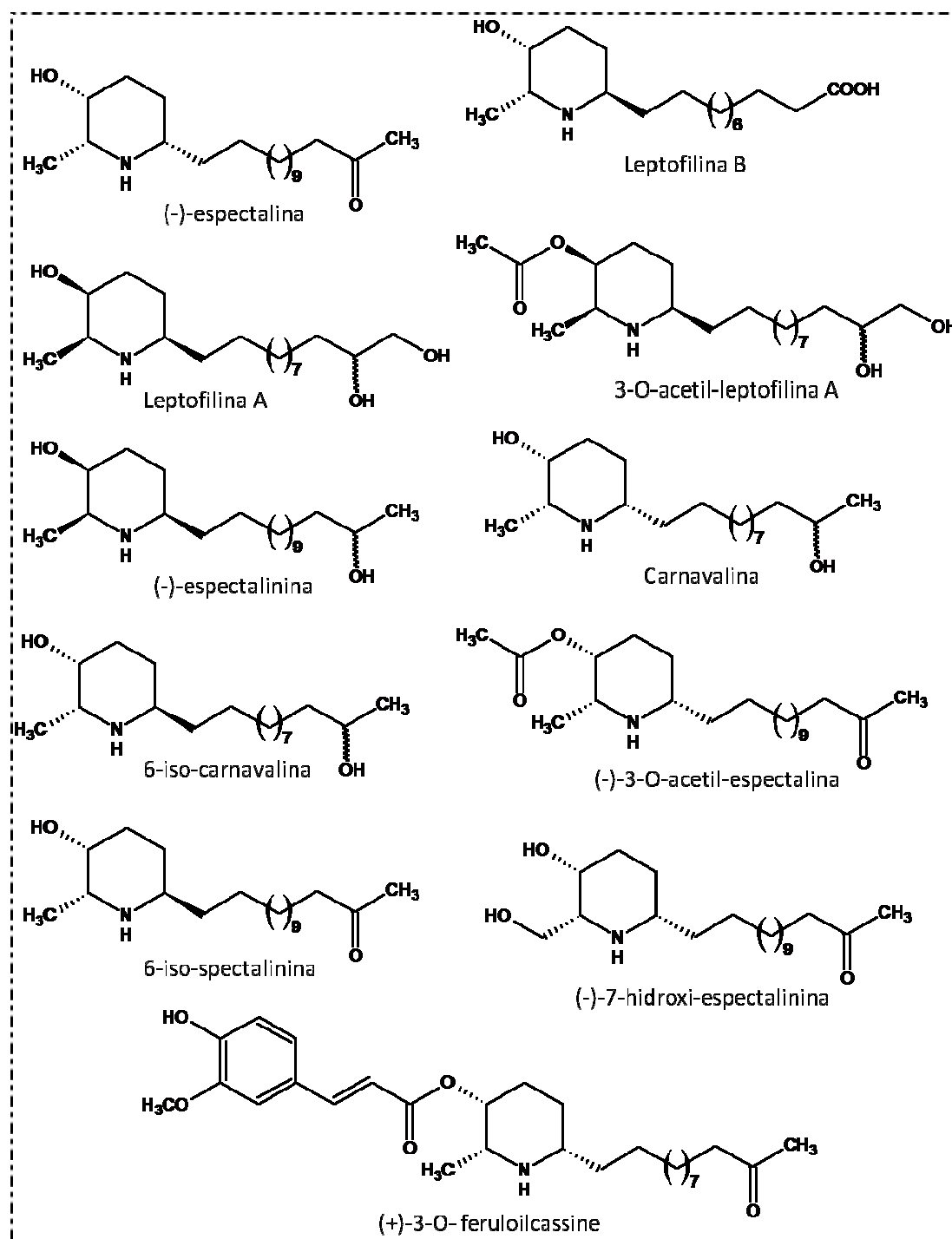


Figura 5 - Metabólitos secundários obtidos de *Senna spectabilis*

1.6 OBJETIVOS

- Cultivar *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis*, em pequena escala, nos meios líquidos comerciais e sólidos para obtenção dos extratos brutos e avaliação química e biológica.
 - Cultivar *Phomopsis* sp. em escala ampliada, para obtenção do extrato bruto.
 - Realizar isolamento identificação e determinação estrutural dos metabólitos secundários pelas técnicas cromatográficas e espectrométricas, respectivamente.
 - Submeter as substâncias isoladas aos ensaios para avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica.
-
-

DESENVOLVIMENTO

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas

Solventes

Deuterados: CDCl_3 e $\text{DMSO-}d_6$ (CIL e Acros).

Não-deuterados: Merck, J.T. Baker, TEDIA e Quimis.

Cromatografia em camada delgada comparativa

Placas pré-prontas de sílica gel da marca SORBET Technologies (Sílica G TLC Plates W/UV 254; 200 μm 20 x 20 cm). As revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (UV 254 e 366 nm), nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento ou exposição ao iodo sublimado.

Cromatografia em coluna

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

Fases estacionárias: sílica C-18 (Merck), sílica gel fase normal (0,060-0,200 mm; ACROS Organics) e sílica gel flash (40-63 μm ; Silicycle).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE no modo analítico foram realizadas em equipamento ProStar da Varian acoplado ao detector ProStar 330 de arranjo de diodos. Foi utilizada a coluna analítica Gemini Phenomenex C-18 5 μm (25,0 cm x 4,6 mm).

No modo preparativo, as análises por CLAE foram realizadas em equipamento Shimadzu acoplado ao detector Ultravioleta SPD, utilizando uma coluna Phenyl (25,0 cm x 2,0 cm).

Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500 operando em 500 MHz para o núcleo de ^1H e em 125 MHz para o núcleo de ^{13}C (Campo magnético 11,4 T), e também em espectrômetro Bruker INOVA-300 operando em

300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C . Foi utilizado TMS como referência interna.

Espectrometria de massas

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro de alta resolução, ESI-TOF Espectrômetro de massas (Bruker Daltonics, Billerica). Condições do Experimento: Bomba de infusão, fluxo 250 $\mu\text{l/h}$, fase móvel para a solubilização: ACN 100% e modo de detecção positivo e negativo para as amostras.

Outros equipamentos

- Evaporador rotatório – Buchi;
- Balança analítica – Mettler Toledo;
- Autoclave vertical – Quimis Aparelhos Científicos Ltda;
- Câmara de Fluxo laminar vertical – Panchane;
- Incubadora Rotatória (“Shaker”) – Marconi.
- Polarímetro – Perkin Elmer modelo 341 LC

Isolamento do fungo endofítico:

Para a esterilização da superfície do caule foram utilizados soluções de NaClO 1% e etanol aquoso 70%, e também água estéril (MAIER et al., 1997). Para a esterilização do material de manuseio e dos meios de cultura preparados, utilizou-se autoclave na temperatura de 121 °C durante 20 minutos.

Cultivo dos fungos endofíticos:

Para o cultivo dos microrganismos foram utilizados os meios sólidos:

- ✓ BDA: Batata Dextrose Agar (Sigma[®]): 39 g/ 1L de água;
- ✓ Milho tipo canjica (Machiara[®]): 90 g/ 75 mL de água;
- ✓ Arroz parboilizado (Marcon[®]): 90 g/ 75 mL de água;

E os meios líquidos:

- ✓ Czapek-Dox Broth (DIFCO[®]) - fonte de nitrogênio inorgânico: Sacarose (30 g), NaNO_3 (3 g), $\text{Na}_2(\text{PO}_4)_3$ (1 g), MgSO_4 (0,5 g), KCl (0,5 g) e FeSO_4 (0,01g) / 1L de água;
- ✓ Extrato de Malte (Acumedia[®]): Extrato de malte (20 g) / 1L de água;

- ✓ MDB (Acumedia[®]) - Batata Dextrose Broth: Batata (4 g), Dextrose (20 g) / 1L de água;
- ✓ Nutrient (DIFCO[®]): Extrato de carne (3 g), peptona (5 g) / 1L de água;
- ✓ YM (Acumedia[®]): Extrato de levedura (3 g), extrato de malte (3 g), peptona (5 g) e dextrose (10 g) / 1L de água.

2.2 Seleção e classificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado da mesma espécie de *Senna spectabilis* obtida anteriormente para estudos fitoquímicos, e já geo-referenciadas, localizada nas proximidades do Instituto de Química da UNESP – Araraquara.

A classificação foi realizada por Inês Cordeiro do Instituto de Botânica. As exsiccatas estão depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo, e classificadas como SP 384109.

2.3 Isolamento das cepas fúngicas*

Folhas jovens e saudáveis da espécie vegetal foram coletadas e lavadas com água e sabão neutro e esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 min.), lavagem em água estéril e em etanol 70%, (1 min.) seguida de uma dupla lavagem com água estéril (10 min.) e secagem (MAIER et al., 1997). Após o processo de esterilização, as folhas e os caules foram cortados e incubados em placas de Petri contendo BDA e antibiótico sulfato de gentamicina (100 mg/mL), para evitar o crescimento bacteriano. Repiques utilizando outras placas de Petri contendo BDA foram realizados sucessivamente e resultaram na obtenção de 25 linhagens puras, as quais estão sendo preservados em frascos com água esterilizada (SILVA, 2005), conforme pode ser visualizado na **Figura 6** (pág. 40).

Foram isolados 12 linhagens fúngicas dos ramos de *S. spectabilis* e após análise dos dados obtidos da triagem química/biológica, foi escolhido o fungo *Phomopsis* sp. (Cs-c (2)) para a realização da parte experimental deste trabalho.

*Realizado pela Dra. Lisinéia M. Zanardi.

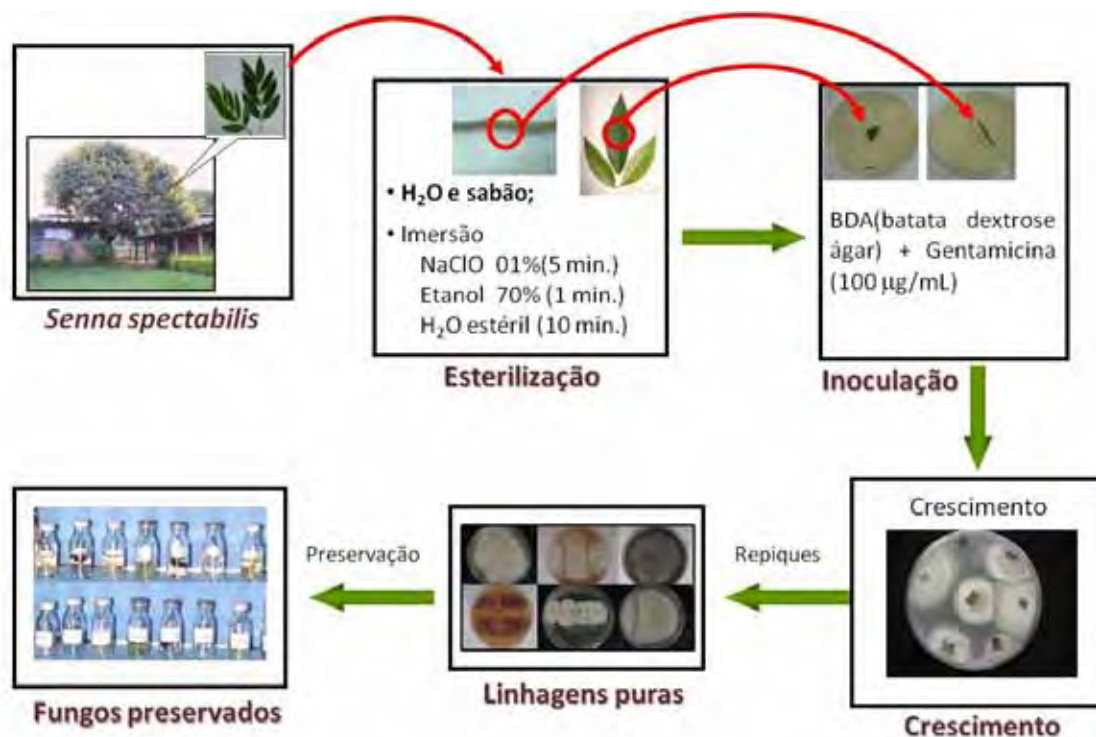


Figura 6 - Etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos

2.4 Classificação da linhagem fúngica

A linhagem fúngica Cs-c(2) foi enviada para identificação na Fundação André Tosello de Campinas-SP. A identificação foi baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados citados na literatura de referência.

A linhagem fúngica foi identificada como *Phomopsis* (Sacc.) Bubák.

Descrição: A cultura observada após 25 dias a 25°C e sob luz negra alternada apresentou micélio aéreo branco acinzentado com conidiomas esparsos do tipo estromático. Observou-se a presença de conidióforos hialinos com fiáides longas e em geral bifurcadas. Conídios hialinos asseptados dos tipos alfa e beta: elipsoidais e gutulados, medindo 6,8-10,0 x 1,7-2,3 µm, e filiformes retos ou curvados, de 25 a 28,5 µm.

Esclarece-se que o gênero *Phomopsis* carece de revisão bibliográfica. A ausência da fase teleomórfica em meio de cultura, principalmente quando isolado endofiticamente, torna a identificação em nível de espécie muito difícil (GOMES, 2008), havendo a necessidade de análises complementares como virulência, sorologia e sequenciamento ITS.

2.5 Cultivo de *Phomopsis* sp. em diferentes meios de cultivo e obtenção dos extratos brutos

2.5.1 Cultivo de *Phomopsis* sp. nos meios líquidos

Placas de Petri contendo o meio de cultivo BDA (esterilizado) foram inoculadas com o fungo *Phomopsis* sp. sob condições estéreis. Após sete dias de incubação a 26° C, foi realizado o inóculo dos fungos em meio líquido. Foram inoculados quatro frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 250 mL dos meios líquidos (Czapek, Extrato de Malte, MDB, Nutrient e YM) previamente esterilizados (autoclavados por 20 minutos a 121°C). O cultivo foi mantido em incubadora rotatória a 130 rpm, por 28 dias a 26°C. Após este período, o meio líquido aquoso foi separado do micélio por filtração e os filtrados, onde estão presentes os metabólitos secundários produzidos pelo fungo, foram submetidos à partição líquido/líquido 3 x com 500 mL de AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado em rota evaporador, fornecendo os respectivos extratos brutos (**Tabela 1**, pág. 42). O solvente foi devidamente rotulado e enviado para descarte.

Os extratos brutos foram submetidos a uma avaliação química, pelo perfil cromatográfico por CLAE-DAD em gradiente exploratório, utilizando como fase estacionária uma coluna analítica tipo Phenomenex (C-18) e eluição em gradiente de H₂O:CH₃OH (95:05 v/v a 0:100% em 40 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 min.), com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹; e por avaliação por RMN de ¹H.

Os extratos foram avaliados biologicamente pelos ensaios antifúngico, anticolinesterásico e antioxidante.

Para o extrato bruto obtido em Czapek foi realizada uma partição líquido/líquido com hexano e acetonitrila, objetivando a eliminação das substâncias graxas. Solubilizou-se o extrato bruto em ACN (30 mL) e realizou-se uma partição com 3 x hexano (15 mL). Após separação das fases, e evaporação do solvente, foram obtidos 12,0 mg de extrato bruto (Ext. ACN), que foi analisado por CLAE-DAD, RMN de ¹H e ensaios biológicos.

2.5.2 Cultivo de *Phomopsis* sp. nos meios sólidos

O isolado fúngico *Phomopsis* sp. foi repicado em placas de BDA (Batata Dextrose Ágar) para obtenção de massa micelar visando o cultivo em arroz e milho. Dois frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 g de milho (MACHIARA®) e 75 mL de água foram

autoclavados durante 20 minutos a 121° C, por um período de três dias consecutivos, a cada 24 horas. Após a esterilização do meio, *Phomopsis* sp. foi inoculado em milho e mantido no modo estático por 21 dias a 26° C.

Após este período, o meio sólido foi triturado (milho + massa micelar) e extraído 6 x 200 mL MeOH a cada 12 horas, filtrado e o solvente orgânico evaporado, fornecendo o extrato bruto metanólico (Ext. MeOH). Este foi solubilizado em acetonitrila (60 mL) e submetido a uma partição líquido/líquido 3 x com 30 mL hexano, objetivando a eliminação das graxas oriundas do milho. A fase hexânica foi descartada e a fase ACN teve o solvente eliminado, fornecendo o extrato bruto (Ext. ACN) (**Tabela 1**).

O cultivo de *Phomopsis* sp. em arroz foi realizado utilizando o mesmo procedimento que o descrito para milho.

Paralelamente, foi realizado o branco do milho e arroz, exatamente como descrito acima, porém sem inoculação do micélio. Tal procedimento foi adotado com o objetivo de realizar uma comparação para identificar os possíveis interferentes do meio extraídos com o solvente orgânico.

Os solventes orgânicos foram devidamente separados, rotulados e enviados para descarte.

Tabela 1 - Massa dos extratos brutos obtidos dos diferentes meios de cultivo de *Phomopsis* sp.

	MDB	YM	EM	Nutriente	Czapek	Arroz ACN	Milho ACN
Massa obtida (mg)	27,7	36,2	14,0	22,2	12,0	80,2	86,6

2.6 Cultivo de *Phomopsis* sp. em escala ampliada

Phomopsis sp. foi cultivado em meio líquido MDB em escala ampliada para obtenção do extrato bruto (**Figura 7**, pág 43). O crescimento foi realizado em dois modos para comparação da produção metabólica.

A produção metabólica foi avaliada por RMN de ¹H e CLAE-DAD em gradiente exploratório utilizando uma coluna analítica Phenomenex de C18 e eluição por gradiente H₂O:CH₃OH (95:05 v/v) até 100% de metanol em 40 minutos, e permaneceu por mais 10 min nesta condição, em um fluxo de 1 mL.min⁻¹.

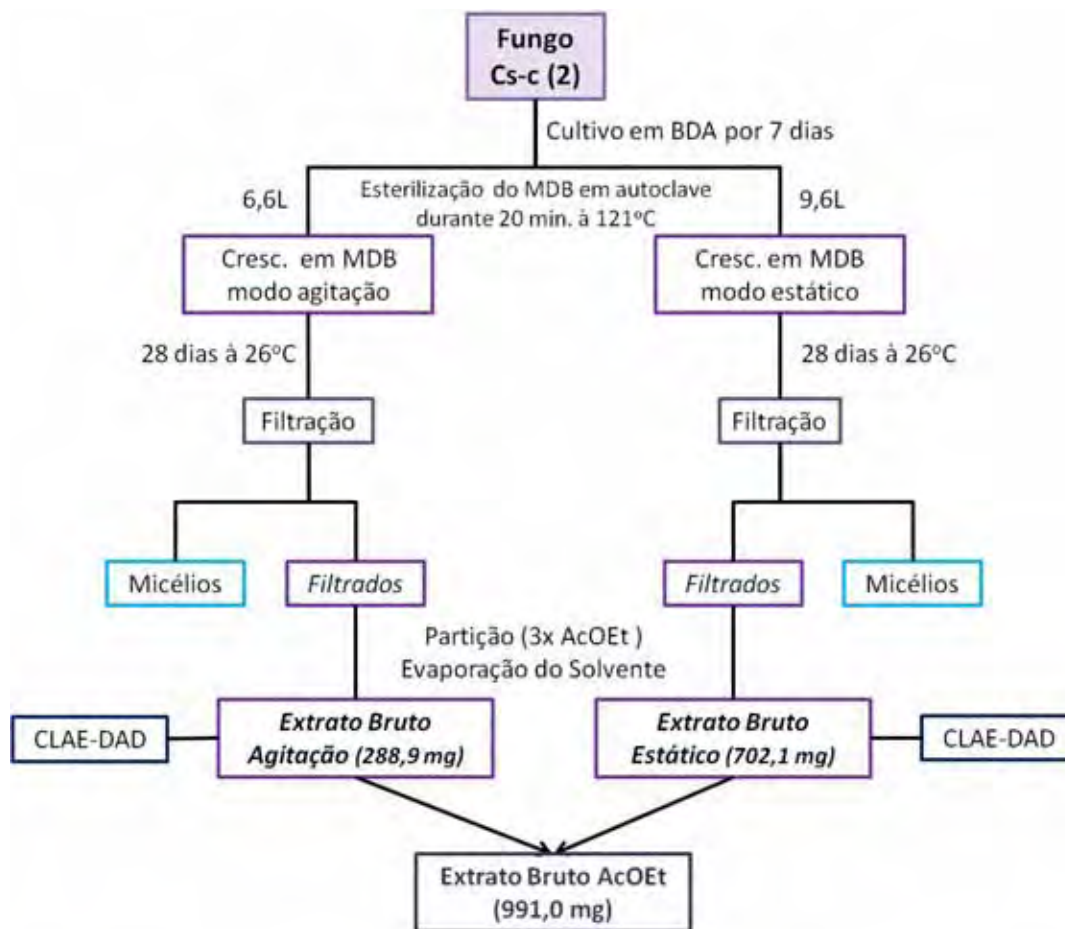


Figura 7 - Metodologia de obtenção dos extratos brutos em MDB

2.7 Fracionamento do extrato bruto produzido por *Phomopsis* sp. em MDB

Após realizar uma triagem química dos extratos brutos AcOEt estes foram juntados e a seguir o extrato bruto AcOEt foi submetido a cromatografia em coluna sob pressão (Figura 8, pág. 44).

A substância **01** foi avaliada pelo comprimento de absorção máxima, utilizando análise em CLAE com coluna Phenomenex Luna C18 (5 μ m, 250 x 4,60 mm) e gradiente exploratório de 5% B- 100% B (60 minutos) em um fluxo de 1 mL. min⁻¹ e λ =254 nm; Solvente A: água acidificada com 0,05% ácido trifluoroacético (TFA); Solvente B: metanol 0,05% TFA.

Paralelamente foi realizado o branco MDB seguindo a mesma metodologia sem a inoculação do fungo endofítico no meio de cultivo.

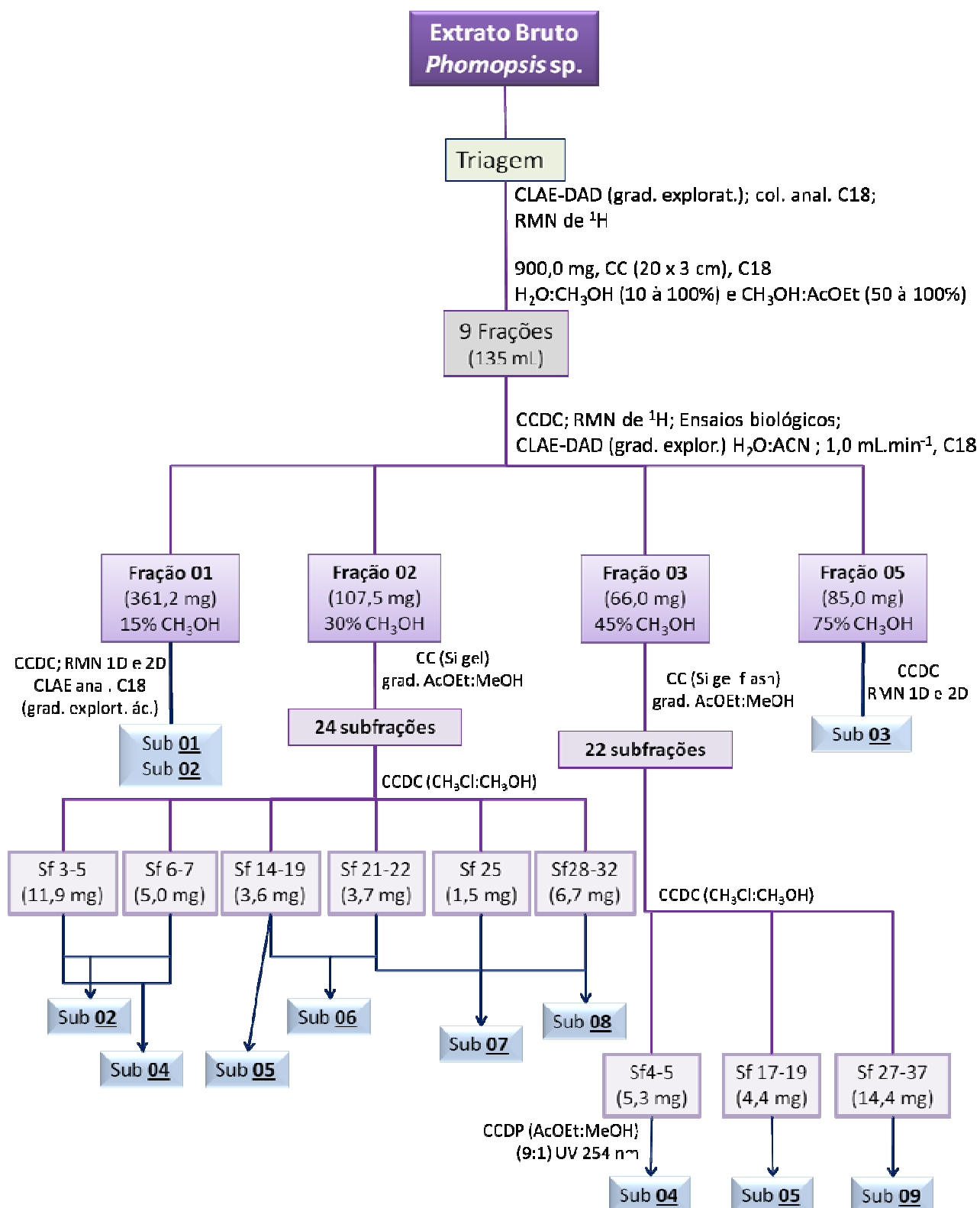


Figura 8 - Metodologia de fracionamento do extrato bruto AcOEt produzido em MDB por *Phomopsis sp.*

2.8 Cultivo de *Phomopsis* sp. em escala ampliada em milho e obtenção do extrato bruto

O isolado fúngico *Phomopsis* sp. foi repicado em placas de BDA para obtenção de massa micelar visando o cultivo em escala ampliada em milho (**Figura 9**).

O extrato Milho ACN foi submetido ao fracionamento para isolamento de metabólitos. Os solventes orgânicos foram devidamente separados, rotulados e enviados para descarte.

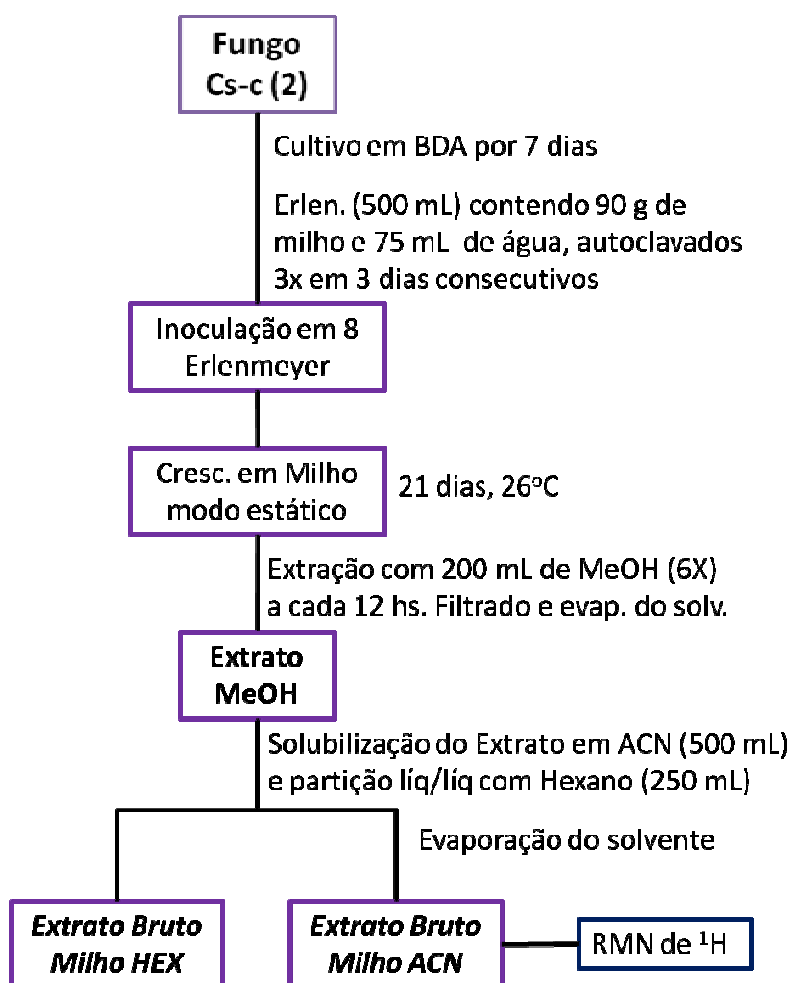


Figura 9 - Metodologia de obtenção do extrato bruto para isolamento de metabólitos

2.9 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de *Phomopsis* sp. em milho

O extrato bruto Cs-c(2) Milho-ACN (2,90 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica para obtenção dos metabólitos produzidos por *Phomopsis* sp. (Figura 10).

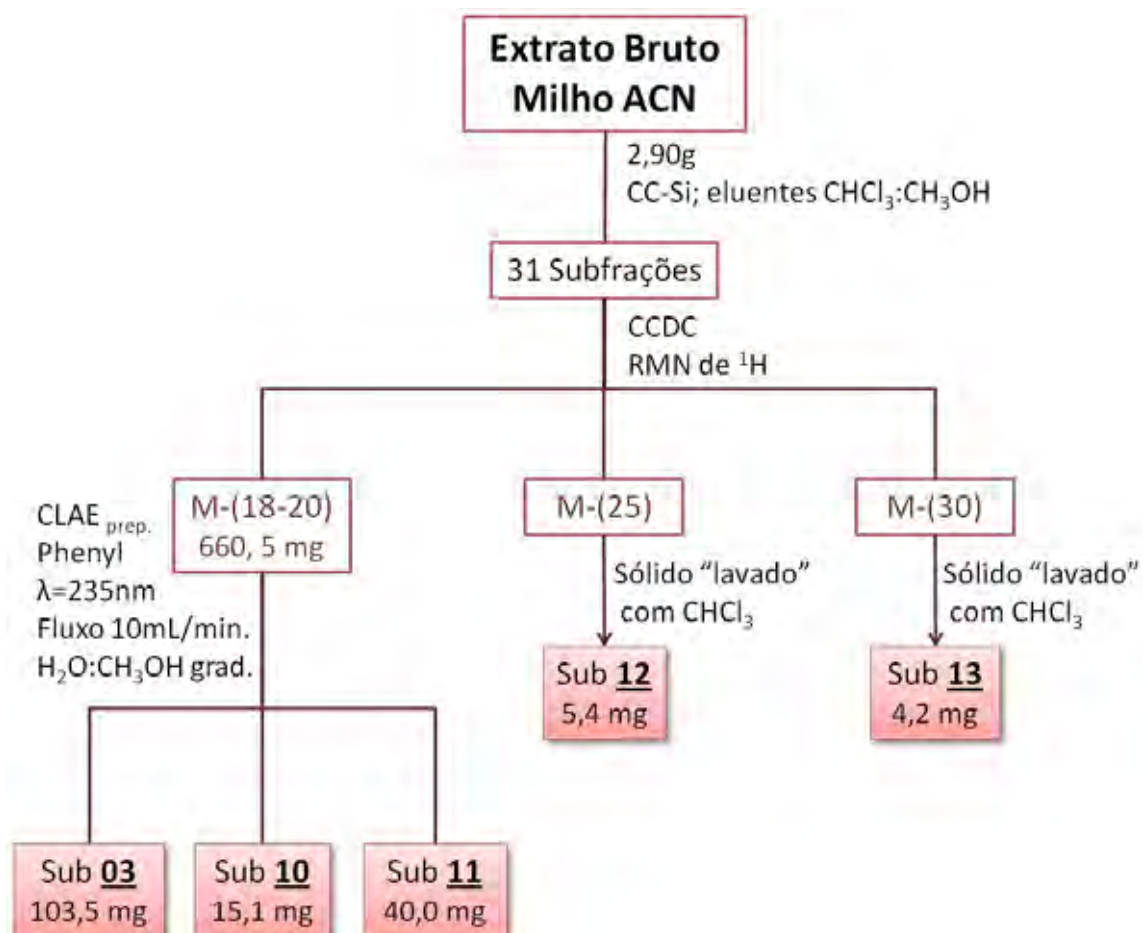


Figura 10 - Metodologia do fracionamento do extrato bruto Milho-ACN produzido por *Phomopsis* sp.

A fração M-(18-20) foi submetida à CLAE modo preparativo utilizando uma coluna preparativa Phenyl (25 cm x 2 cm), sistema de eluição H₂O:CH₃OH (60:40 v/v até 0:100% em 40 minutos e mais 10 minutos em 0:100%) foram coletados 10 picos, resultando no isolamento e identificação de 3 metabólitos (Figura 10). O cromatograma indicando o tempo de retenção de cada substância está apresentado na Figura 11.

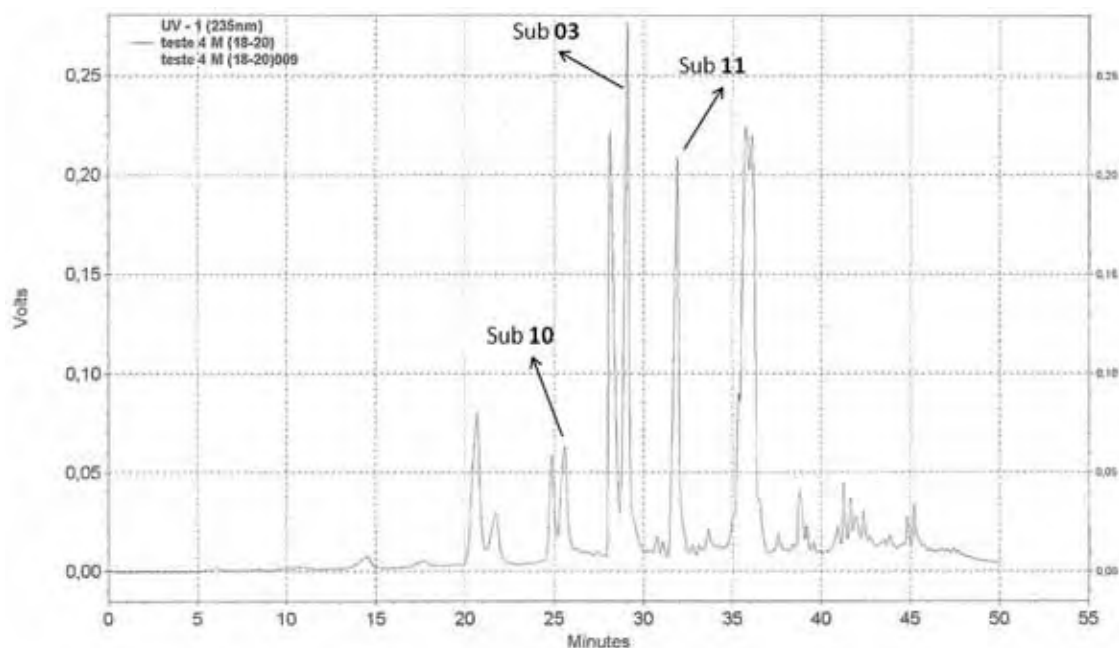


Figura 11- Cromatograma preparativo de Cs-c(2) Milho-ACN (18-20)

Todas as substâncias identificadas/isoladas ou frações delas foram submetidas à análise em CLAE-DAD em coluna analítica do tipo Phenomenex de sílica de fase reversa C18 utilizando um sistema de eluição gradiente exploratório 5% MeOH até 100% em 40 minutos e mais 10 minutos nesta condição, em comparação com os extratos Brancos obtidos, para verificar a procedência das substâncias, para provar que os metabólitos identificados foram realmente produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. não sendo extraídos do meio de cultivo.

2.10 Avaliação da atividade antifúngica*

A atividade antifúngica foi determinada pela técnica de bioautografia para detecção da atividade fungitóxica, pela nebulização dos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos.mL⁻¹ em solução de glicose e sais) em placas do CCDC contendo 200 µg dos extratos de interesse, previamente eluídos com CHCl₃:CH₃OH (9:1). As placas foram incubadas a 25° C por 48 horas, verificando a presença de halos de inibição do crescimento dos fungos, em comparação com o padrão positivo nistatina (10 µg).

2.11 Avaliação da atividade anticolinesterásica*

Os extratos de interesse foram submetidos à constatação da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002), utilizando cromatoplas. Foram aplicados 100 µg dos extratos de interesse em uma cromatoplasca de sílica gel. A placa foi eluída com CHCl₃:CH₃OH (9:1) e, em seguida, borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (Solução A), após foi incubada em câmara úmida fechada, a 37°C por 2 minutos, e em seguida borrifada com uma solução D. foi utilizado o padrão fisostigmina.

As substâncias que apresentaram atividade anticolinesterásica sofreram uma reação enzimática, onde foi observado o aparecimento de manchas brancas, em comparação com o fundo de coloração roxa da placa; estas manchas brancas são proporcionais à inibição da enzima acetilcolinesterase.

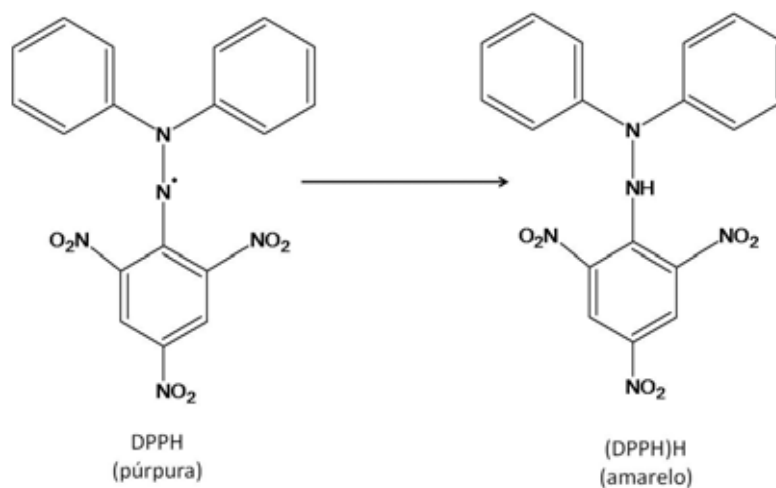
- Solução A: Acetilcolinesterase dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7,9), a solução estoque foi armazenada a 4°C e no momento do uso foi adicionado 0,1% de albumina de soro bovino.
- Solução B: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol;
- Solução C: 400 mg do sal “Fast Blue” B em 160 mL de água destilada;
- Solução D: mistura contendo 10 mL da solução B mais 40 mL da solução C.

*Ensaio biológico realizado pela Dr^a. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

2.12 Avaliação da atividade potencial antioxidante

Os extratos brutos foram avaliados quanto à reatividade com difenilpicrilhidrazina (DPPH) utilizando o método por cromatoplaça (SIMÕES-PIRES et al., 2005).

Esta atividade é observada quando ocorre redução do DPPH com os compostos antioxidantes presentes nos extratos. Os extratos foram aplicados em placa de sílica (CCDC) e eluídos com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1). As cromatoplaças foram borrifadas com uma solução metanólica 0,2% de DPPH, depois de deixadas sob a luz solar durante 1 hora. O potencial antioxidante foi evidenciado pela presença de manchas brancas, decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração roxa do fundo.



RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da produção metabólica do fungo endofítico *Phomopsis* sp. em diferentes meios de cultura

De todos os organismos vivos, os micro-organismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Os homens e outros animais requerem certos tipos de nutrientes complexos contendo carbono, enquanto os micro-organismos nem sempre. Alguns micro-organismos podem crescer com poucos nutrientes inorgânicos como sua única exigência nutricional, enquanto outros se assemelham aos organismos superiores na sua necessidade de nutrientes orgânicos complexos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

O cultivo de micro-organismos em laboratório requer meios de cultura apropriados, os quais têm a função de simular ou até melhorar o ambiente natural destes.

É importante salientar que as características fisiológicas de um micro-organismo em cultura, podem não ser as mesmas que as do seu crescimento na natureza. As culturas puras em laboratório crescem muito bem, porque normalmente têm uma abundância de nutrientes e não há competição com outros micro-organismos pelo alimento em disponibilidade (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). A produção de metabólitos secundários pelos fungos depende intrinsecamente das condições utilizadas para seu crescimento e desenvolvimento.

O cultivo do fungo em placas de Petri foi realizado somente em BDA, pois este fungo se desenvolve satisfatoriamente neste meio e, portanto, testes com outros meios de cultura foram desnecessários.

Visando verificar a produção de diferentes metabólitos secundários por *Phomopsis* sp., em diferentes meios de cultivo, foram selecionados cinco meios comerciais líquidos e dois meios sólidos (Cereais). De acordo com a definição da literatura o meio líquido Czapek é classificado como “quimicamente definido”, e os outros meios (Nutrient, MDB, YM, Extrato de Malte, Arroz e Milho) podem ser classificados como “complexos”.

As condições para o cultivo dos endofíticos (meio de cultura líquido, tempo de incubação de 28 dias em incubadora rotatória e ambiente climatizado a 26 °C) foram adotadas com base nos resultados obtidos com o estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2005).

Os cromatogramas dos extratos (obtidos via CLAE-DAD em gradiente exploratório) foram estudados pela comparação do tempo de retenção e espectros de UV de cada pico cromatográfico.

3.1.1 Cultivo em MDB

Os cromatogramas em gradiente exploratório (**Figura 12**) para o extrato bruto em MDB apresentou vários picos com diferentes absorbâncias e tempos de retenção (TR) variados, sugerindo uma polaridade de média a alta para os metabólitos produzidos pelo fungo (devido aos solventes utilizados pág. 41), sugerindo a ocorrência de diversidade metabólica para o fungo. As curvas de UV observadas na **Figura 13** apresentam a diversidade de metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis* sp.

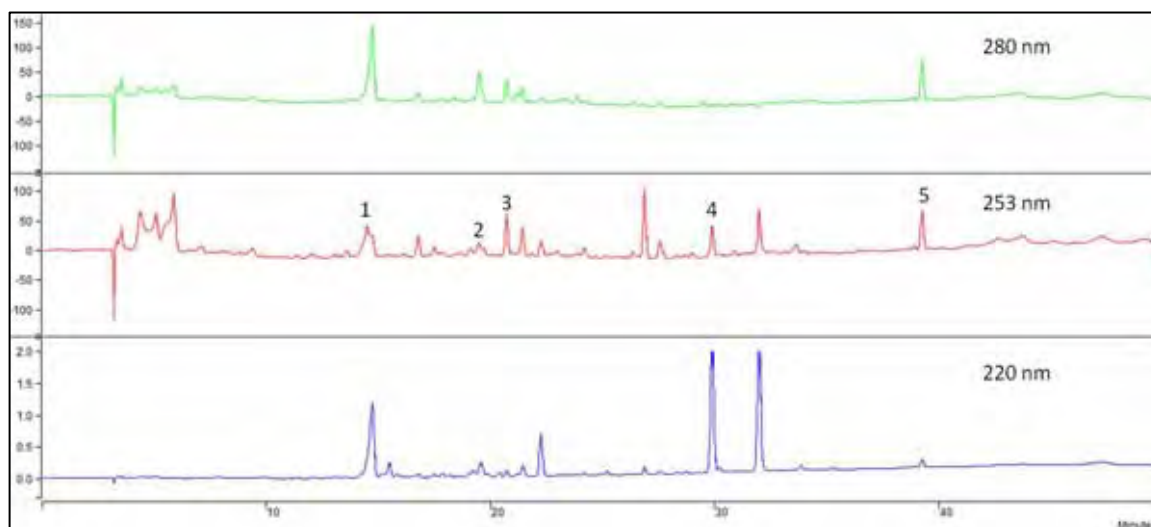


Figura 12 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em MDB produzido por *Phomopsis* sp.

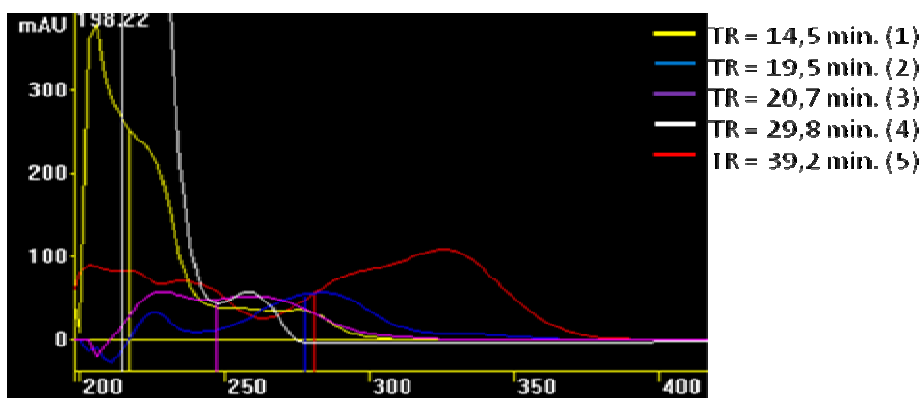


Figura 13 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por *Phomopsis* sp.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 34**, pág. 112) apresentou sinais em toda a largura espectral (0,5 a 8 ppm) evidenciando a presença de substâncias aromáticas por apresentar sinais com deslocamento químico em ~ 8 ppm, hidrogênios olefinicos, carbinólicos e metílicos.

3.1.2 Cultivo em YM

Comparando-se os cromatogramas obtidos do cultivo de *Phomopsis* sp. em MDB (**Figura 12**, pág. 52) e YM (**Figura 14**) observou-se uma produção metabólica semelhante, apenas com alguns picos adicionais em YM.

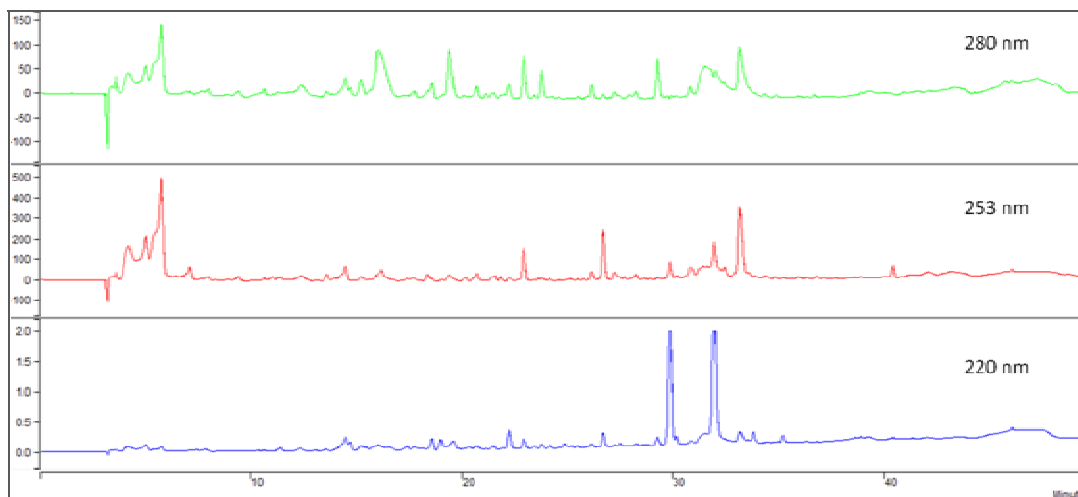


Figura 14 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em YM produzido por *Phomopsis* sp.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 35**, pág. 113) evidenciou um extrato rico com sinais por toda largura espectral (δ_{H} 0,5 a 8 ppm), indicando a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, carbinólicos, olefínicos e aromáticos. Comparando-se este espectro com o obtido em MDB, observaram-se poucos sinais diferentes, demonstrando um perfil químico bem semelhante.

3.1.3 Cultivo em Extrato de Malte (EM)

Os cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em EM (**Figura 15**) apresentaram diversos picos com diferentes absorvâncias e tempos de retenção. Em comparação aos cromatogramas do extrato bruto em MDB foram observados alguns picos com o mesmo tempo de retenção, demonstrando um perfil químico semelhante.

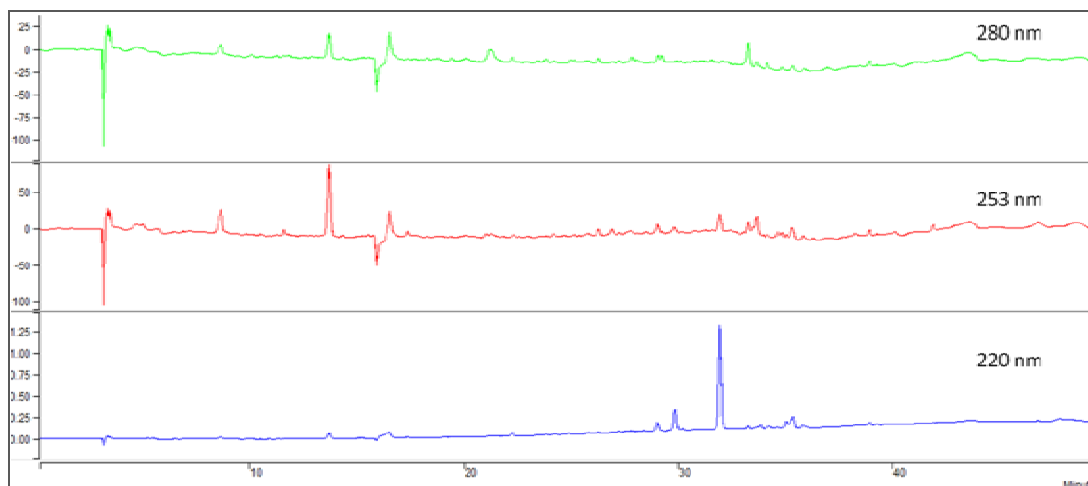


Figura 15 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em EM produzido por *Phomopsis* sp.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 36**, pág. 114) do extrato bruto em EM produzido pelo *Phomopsis* sp. apresentou sinais em uma ampla faixa espectral (0,7 a 8 ppm), evidenciando uma rica produção metabólica. Em comparação com o espectro de RMN de ^1H do extrato bruto em MDB, foram observados apenas alguns sinais não compatíveis, demonstrando um perfil químico semelhante.

3.1.4 Cultivo em Nutrient

As observações feitas para o extrato bruto em EM são equivalentes ao extrato bruto em Nutrient (**Figura 16**), sendo esses dois diferentes. Comparando-se os cromatogramas em Nutrient com o em MDB foram observados apenas alguns picos com o mesmo tempo de retenção, demonstrando um perfil químico similar.

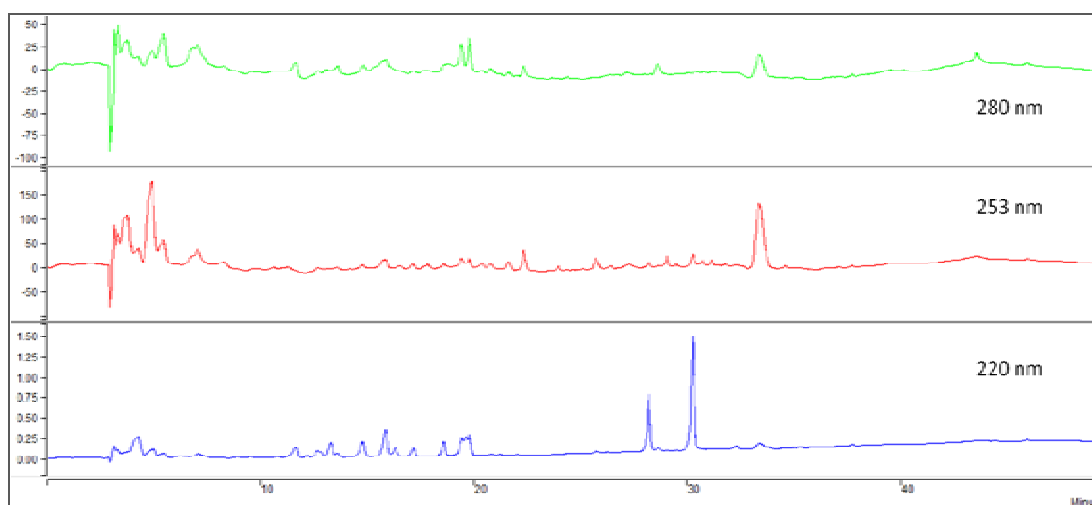


Figura 16 - Cromatogramas em grad. exploratório do extrato bruto em Nutrient produzido por *Phomopsis* sp.

O espectro de RMN de ^1H do extrato em Nutrient (**Figura 37**, pág. 115) apresentou sinais em uma larga faixa do espectro (0,5 a 8 ppm) evidenciando a presença de substâncias aromáticas por apresentar sinais com deslocamento químico em ~ 8 ppm, sinais de hidrogênios olefinicos, carbinólicos e metílicos. Comparando-se este com o espectro de RMN de ^1H do extrato em MDB (**Figura 34**, pág. 112) apresentaram-se como perfil químico semelhante.

3.1.5 Cultivo em Czapek:

A análise prévia do espectro de RMN de ^1H do extrato AcOEt (**Figura 38**, pág. 116) produzido por *Phomopsis* sp. em Czapek revelou a produção de graxas em grande quantidade que impediram a visualização dos demais constituintes do extrato, portanto submeteu-se este extrato a uma partição hexano/acetoneitrila para retirada destes (pág. 41).

O espectro de RMN de ^1H do extrato bruto da fração ACN (**Figura 39**, pág. 117) mostrou redução significativa dos sinais característicos das graxas, indicando que a partição hexânica foi eficiente. O espectro apresentou vários sinais evidenciando uma rica produção de metabólitos, foram observados sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, carbinólicos, olefinicos, aromáticos aldeídos e/ou fenólicos.

O cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto ACN (**Figura 17**) apresentou poucos constituintes que absorvem radiação UV, pois são observados poucos picos.

Comparando-se o cromatograma deste extrato com o extrato bruto obtido em MDB (**Figura 12**, pág. 52), observa-se a não equivalência de sinais, evidenciando que o metabolismo do fungo nestes dois meios seja diferente.

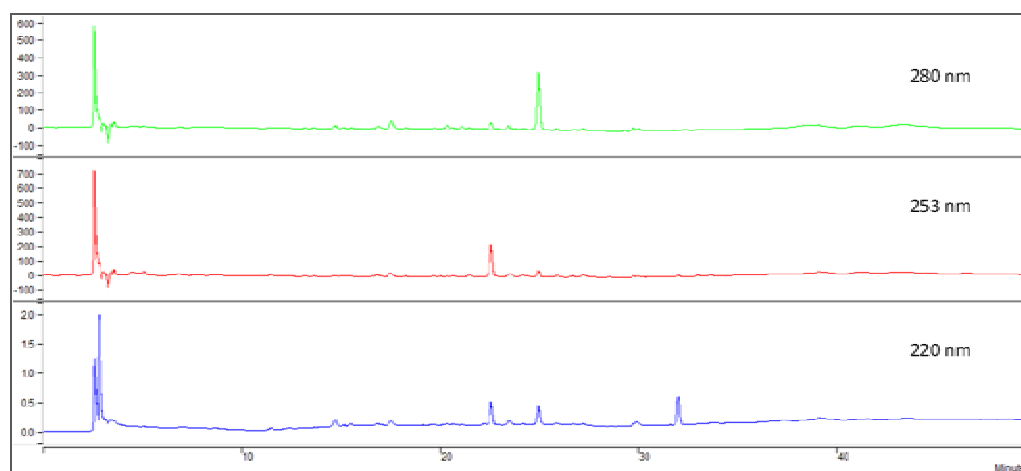


Figura 17 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em Czapek produzido por *Phomopsis* sp.

3.1.6 Cultivo em Milho

O cromatograma em gradiente exploratório do extrato em milho ACN (**Figura 18**) apresentou poucos picos, evidenciando poucas substâncias que absorvem radiação UV. Este cromatograma apresentou também diferentes absorções em relação ao extrato bruto MDB e aos demais meios comerciais líquidos.

Análise das curvas de UV dos sinais presentes no cromatograma do extrato bruto ACN revelou que a variedade dos sinais corresponde somente aos metabólitos secretados pelo fungo, uma vez que o cromatograma do extrato ACN (branco) apresentou picos não coincidentes com os do extrato bruto ACN.

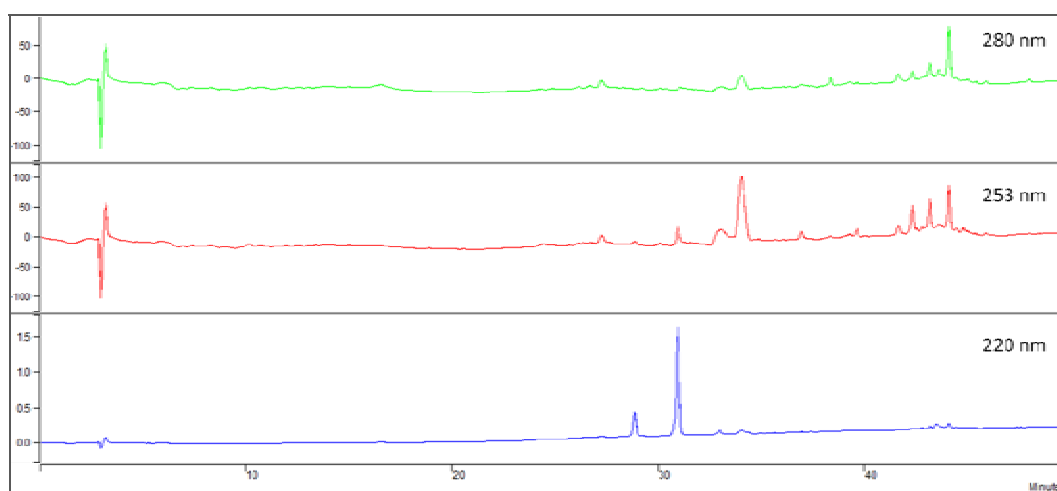


Figura 18 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em Milho ACN produzido por *Phomopsis* sp.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 40**, pág. 118) apresentou sinais em uma vasta largura espectral (0,5 a 8 ppm) evidenciando a presença de substâncias aromáticas, sinais de hidrogênios olefinicos, carbinólicos e metílicos. Em comparação com o espectro de RMN de ^1H do meio em MDB (**Figura 34**, pág. 112) foi observado que os meios apresentam diferença na produção metabólica.

3.1.7 Cultivo em Arroz

As observações feitas para o crescimento em milho são equivalentes ao arroz, sendo que estes dois meios apresentaram perfis químicos semelhantes.

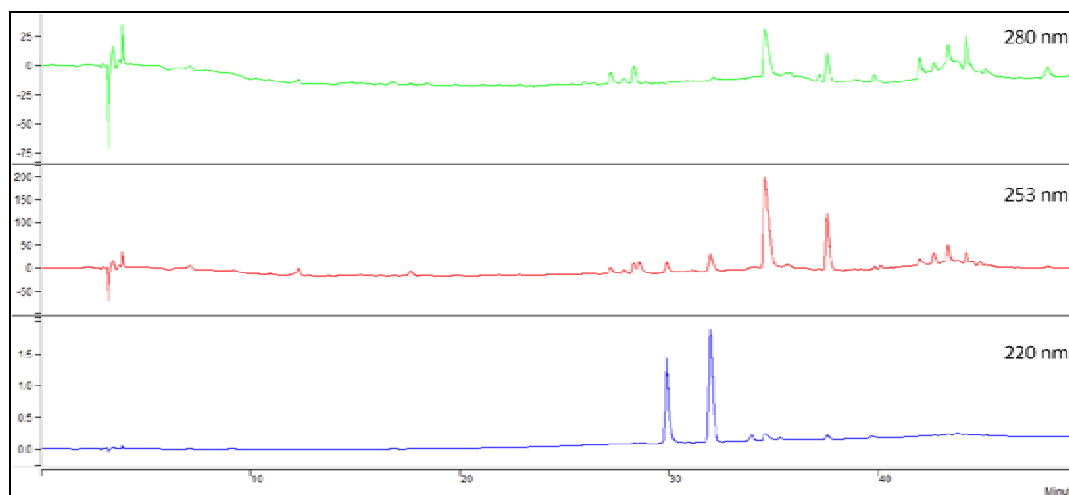


Figura 19 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto em Arroz ACN produzido por *Phomopsis* sp.

O espectro de RMN de ^1H de Arroz ACN (**Figura 41**, pág. 119) apresentou sinais em toda a largura espectral (0,5 a 8 ppm) evidenciando a presença de hidrogênios aromáticos, olefinicos, carbinólicos e metílicos.

De modo geral, *Phomopsis* sp. desenvolveu-se rapidamente nos diferentes meios de cultura, demonstrando fácil adaptação (Fase Lag), uma vez que não foram usadas técnicas de pré-crescimento.

Na análise detalhada dos cromatogramas obtidos dos extratos brutos em MDB, Czapek, EM, Nutrient, YM, Milho e Arroz foi possível observar uma variação na produção metabólica, pois picos com diferentes tempos de retenção nos diversos cromatogramas foram detectados, uma vez que estes foram obtidos utilizando-se a mesma massa dos extratos brutos. Esta observação nos permitiu concluir, que o perfil metabólico é dependente da composição dos nutrientes disponíveis no meio de cultura.

Para efeito de comparação, todos os espectros de RMN de ^1H foram registrados com a mesma massa de extrato bruto, cuidadosamente interpretados e corroboraram com os dados obtidos da análise em CLAE-DAD, evidenciando uma produção metabólica variada, com sinais abrangendo toda largura espectral, no entanto algumas diferenças foram observadas, como na intensidade e na sobreposição de alguns sinais.

Comparando-se o rendimento (em massa) na produção de extratos em todos os cultivos de *Phomopsis* sp., observou-se que, quando cultivado em cereais (arroz e milho), o endófito produz maior massa de extrato do que em meios líquido comerciais (**Tabela 1**, pág. 42). Entre os meios de cultura líquidos, YM proporcionou maior rendimento em massa de extrato bruto.

3.2 Resultados dos ensaios biológicos realizados com os extratos brutos dos diferentes meios de cultivo

3.2.1 Atividade Antifúngica

Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente. Tal fato tem incentivado pesquisas que busquem novas substâncias antifúngicas de origem natural (CARDOSO, 2003). Considerando esta necessidade e a ecologia química relacionada com os fungos endofíticos que habitam ambientes propícios ao ataque de fitopatógenos, foi realizada uma triagem com os extratos brutos produzidos por *Phomopsis* sp.

A atividade antifúngica foi determinada por bioautografia pela nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Após a revelação da cromatoplaca (contendo os extratos) com a solução fúngica, foi observada a inibição do crescimento do fungo em vários extratos, indicando a atividade antifúngica potencial. O padrão utilizado para comparação foi a nistatina (10 µg).

Os resultados obtidos deste bioensaios estão presentes na **Tabela 2**.

Tabela 2- Resultados da avaliação antifúngica dos extratos produzidos por *Phomopsis* sp.

Extrato Bruto	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
MDB	***	**
YM	***	**
EM	**	*
Nutrient	*	*
Czapek	*	*
Milho	*	-
Arroz	**	-

*** Potencial forte/ ** Potencial médio/ * Potencial fraco

Os resultados da avaliação deste bioensaio evidenciaram a maioria dos extratos brutos como potencialmente antifúngicos. Todos os extratos apresentaram inibição do crescimento do fungo *C. cladosporioides*, no entanto para *C. sphaerospermum* os extratos Milho ACN e Arroz ACN não apresentaram atividade antifúngica.

Os dados podem estar diretamente relacionados à ecologia química, onde estes micro-organismos produzem substâncias bioativas para autodefesa contra outros micro-organismos fitopatógenos e em situações de “stress” ambiental, confirmando, deste modo, que os fungos associados a espécies vegetais são promissoras fontes na busca por novos metabólitos secundários bioativos.

3.2.2 Atividade Anticolinesterásica

O mal de Alzheimer ou doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva do sistema nervoso central, que atinge principalmente a população idosa. Como os principais sintomas são o comprometimento da memória, da coordenação motora, além da perda da capacidade cognitiva e demência. Os fármacos atualmente utilizados no tratamento são principalmente inibidores da enzima acetilcolinesterase, por apresentarem melhores resultados no controle da doença (VIEGAS JUNIOR et al., 2004a). Alguns exemplos desses fármacos são a tricina, fisistigmina e a galantamina, que é de origem natural (CARDOSO, 2003).

Estima-se que cerca de 4 milhões de pessoas possuam essa doença e que sua incidência duplique a cada 5 anos, após os 65 anos de idade. Estimativas sugerem que este grupo aumente e possa atingir aproximadamente 19 milhões de indivíduos no ano de 2050, dos quais metade poderá desenvolver a doença de Alzheimer (VIEGAS JUNIOR et al., 2004a). Desta forma é de extrema necessidade a busca por novos fármacos para o tratamento desta doença.

A avaliação da atividade anticolinesterásica em potencial dos extratos brutos foi realizada segundo a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002) por cromatoplaca. Após a eluição dos extratos e o borrifamento das soluções, a coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de manchas brancas (indicação de inibição da reação enzimática) em alguns extratos, sobre um fundo de coloração roxa, indicou que houve inibição da enzima acetilcolinesterase.

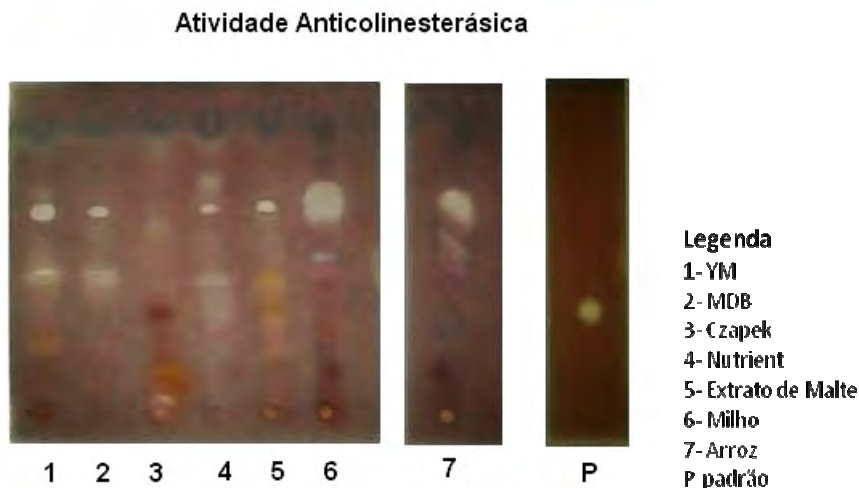


Figura 20 - Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos produzidos por *Phomopsis* sp.

Este ensaio é qualitativo e é definido através do halo branco em fundo roxo, para atividade inibitória positiva. De acordo com o observado na **Figura 20** todos os extratos apresentaram atividade positiva neste ensaio. Este resultado evidencia a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade anticolinesterásica.

3.2.3 Atividade Antioxidante

Nos últimos anos, inúmeras evidências têm indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUSA et al., 2007).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase, uma enzima que catalisa a conversão do superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são ricas na ingestão desses alimentos. Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos.

Ensaio rápidos e baratos utilizando β -caroteno e 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) foram desenvolvidos com intuito de detectar a presença de substâncias potencialmente antioxidantes em extratos brutos.

A avaliação qualitativa dos extratos por cromatoplaça em sílica gel, revelada com solução metanólica do radical DPPH, sugeriu que para todos os extratos há existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH.

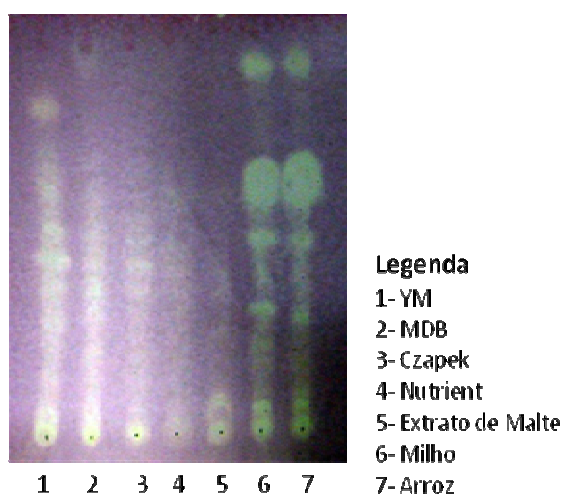


Figura 21 - Resultados da potencial antioxidante dos extratos brutos crescidos nos diferentes meios

Esta triagem foi realizada com o objetivo de, após avaliar a potencialidade biológica e o perfil químico de cada extrato produzido pelo fungo *Phomopsis* sp., selecionar um extrato para cultivo em escala ampliada. Desse modo, foram selecionados 2 meios de cultivo, um líquido, o MDB, e um meio sólido, o milho. Estes extratos apresentaram espectros de RMN de ^1H com sinais por uma larga faixa espectral evidenciando uma alta e diversa produção metabólica, além de se mostrarem potencialmente bioativos nos ensaios realizados.

3.3 Resultados dos ensaios biológicos realizados com as frações obtidos do fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em MDB

Todas as frações obtidas do fracionamento inicial do extrato bruto AcOEt (**Figura 8**, pág. 44) foram monitoradas aos ensaios de atividade antifúngica, anticolinesterásica e antioxidante, para monitorar a bioatividade inicialmente observada no extrato bruto.

3.3.1 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada pela técnica de bioautografia, utilizando um sistema de eluição $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1), após a nebulização dos esporos dos fungos fitopatogênicos e incubação, os halos de inibição foram determinados.

Os resultados (**Tabela 3**) sugerem um potencial antifúngico para as frações do extrato, pois as frações 5, 6, 7 e 8 apresentaram fraca atividade contra os dois fungos, já as frações 1, 2, 3 e 9 mostraram-se inativas contra os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, a fração 4 apresentou uma fraca atividade contra o *C. sphaerospermum*

Tabela 3 -Resultado da atividade antifúngica das frações do extrato bruto

Amostra	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Rf	<i>Cladosporium phaerospermum</i>	Rf
Fração 01	-		-	
Fração 02	-		-	
Fração 03	-		-	
Fração 04	-		*	0,52
Fração 05	**	0,85	*	0,87
Fração 06	*	0,84	*	0,82
Fração 07	*	0,78	*	0,72
Fração 08	*	0,83	*	0,82
Fração 09	-		-	

*** Potencial forte/ ** Potencial médio/ * Potencial fraco

Esses resultados são promissores, pois evidenciam que o fungo endofítico isolado possa exercer um papel ecológico na espécie hospedeira, onde pode produzir substâncias bioativas para autodefesa contra outros micro-organismos fitopatogênicos. Confirmando deste modo que os endófitos são promissoras fontes na busca por novos metabólitos bioativos.

3.3.2 Atividade Anticolinesterásica

A avaliação da atividade anticolinesterásica em potencial para as frações foi realizada seguindo-se a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002) para cromatografia em camada delgada fina, utilizando um sistema de eluição de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1). O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática) indicou há inibição da enzima acetilcolinesterase.

Os resultados mostraram prolíficos (**Figura 22, Tabela 4**), pois exceção feita à fração 1, todas as frações apresentaram atividade anticolinesterásica.

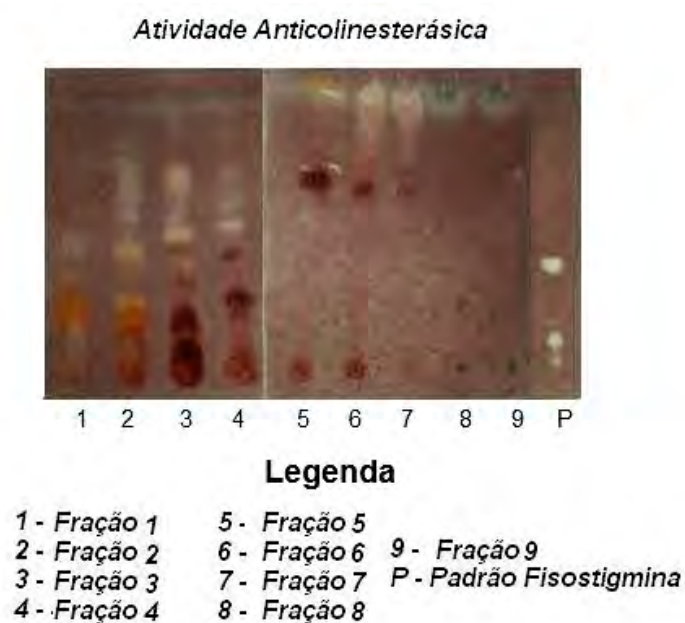


Figura 22 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as frações do extrato bruto MDB

Tabela 4 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as frações do extrato bruto MDB

Amostra	Rf
Fração 01	-
Fração 02	0,64/0,52/0,40
Fração 03	0,64/0,46
Fração 04	0,71/0,48
Fração 05	0,96
Fração 06	0,91
Fração 07	0,90
Fração 08	0,92
Fração 09	0,92
Padrão	0,35

Esta atividade evidencia a capacidade de este fungo produzir metabólitos com atividade anticolinesterásica, demonstrando a importância da procura de substâncias bioativas em fontes promissoras como os fungos endofíticos.

3.3.3 Potencial antioxidante

Este ensaio consiste em um método fácil e rápido para avaliar a atividade antiradicalar de diversos antioxidantes presentes nos extratos.

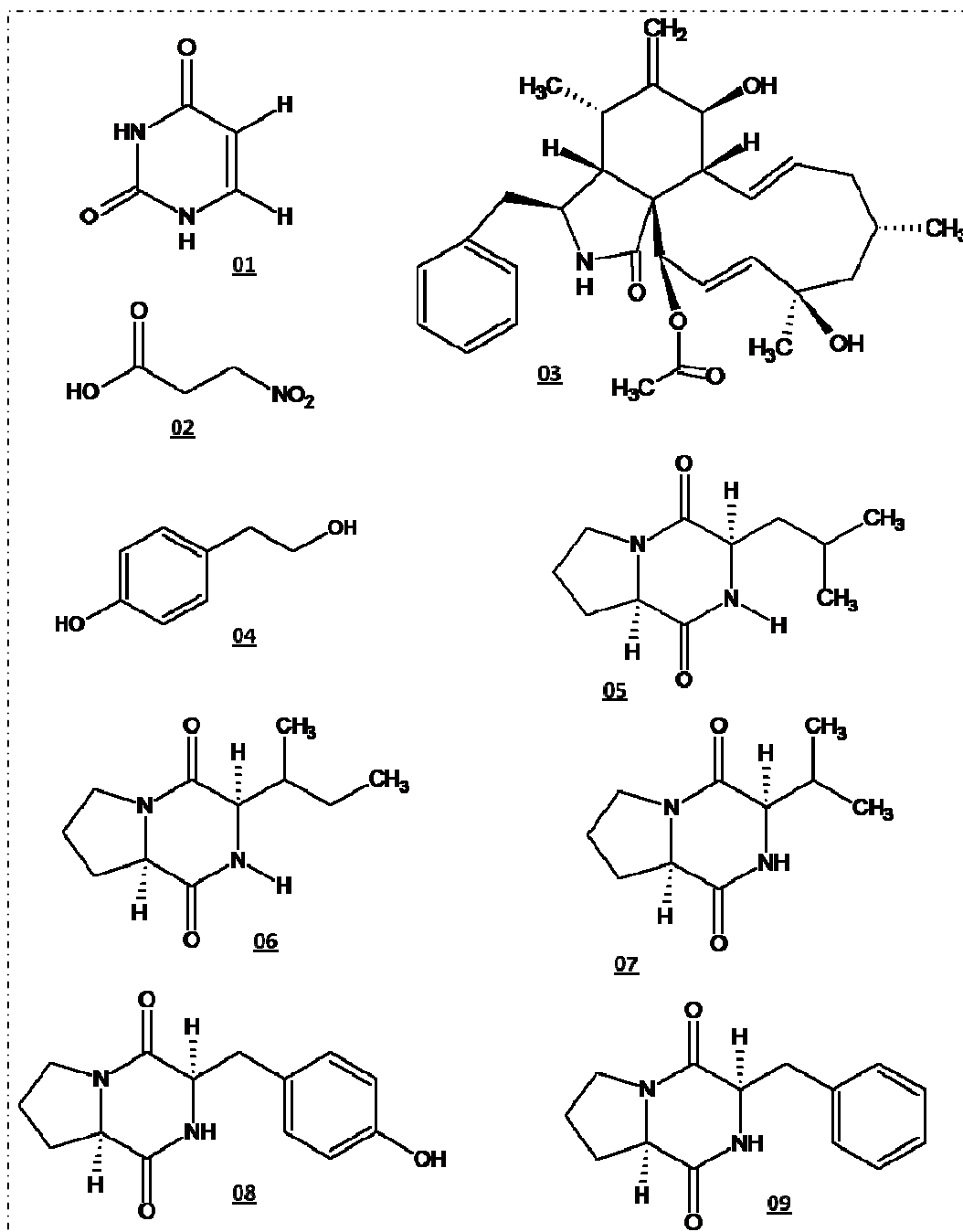
A avaliação qualitativa das frações por cromatoplaça em sílica gel, revelada com solução metanólica do radical DPPH, sugeriu para todas as frações com exceção das Frações 6 e 9, a existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH (**Tabela 5**), isso evidencia a grande capacidade deste fungo em produzir metabólitos com propriedades antioxidantes.

Tabela 5 - Resultados obtidos para as frações, Rf obtido das manchas amarelas

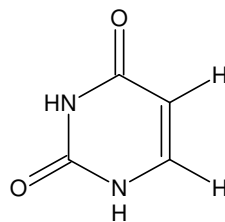
Amostra	Rf
Fração 01	0,53/0,48/0,34
Fração 02	0,53/0,48/0,20/0,06
Fração 03	0,53/0,48/0,24/0,16/0,09/0,06
Fração 04	0,04
Fração 05	0,23
Fração 06	-
Fração 07	0,64
Fração 08	0,09/0,92
Fração 09	-

3.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas

Substâncias produzidas pelo fungo *Phomopsis* sp. cultivado em MDB.



3.4.1 Identificação estrutural da substância **01** (Uracila)



Mesmo esta substância estando em mistura, optou-se pela determinação estrutural. A identificação da substância **01** foi realizada com base na análise do espectro de RMN de ^1H e comparação com a literatura (LEPTOKARYDIS, 2008; BLICHARSKA; KUPKA, 2002).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 42, pág. 120) apresentou sinais com grande diferença no deslocamento químico em δ_{H} 5,45 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H) e 7,37 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H), sendo estes atribuídos a uma posição α e β de uma carbonila α,β -insaturada, com constantes de acoplamento características de uma ligação *cis*. Foram observados ainda os sinais em δ_{H} 10,8 e 10,9 (*s*, 1H), atribuídos aos hidrogênios ligados aos nitrogênios.

O cromatograma e as curvas de UV da substância **01** (Figura 23 e Figura 24) foram comparados com a literatura e os valores encontrados foram compatíveis com a estrutura proposta.

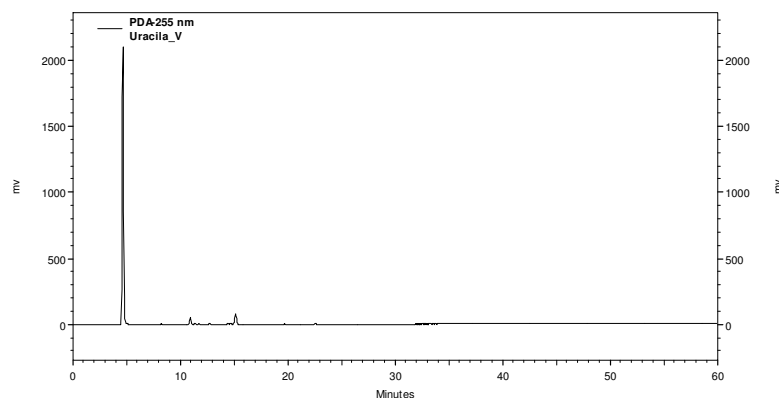


Figura 23 - Cromatograma analítico da Fração **01** para obtenção dos espectros UV da substância **01**

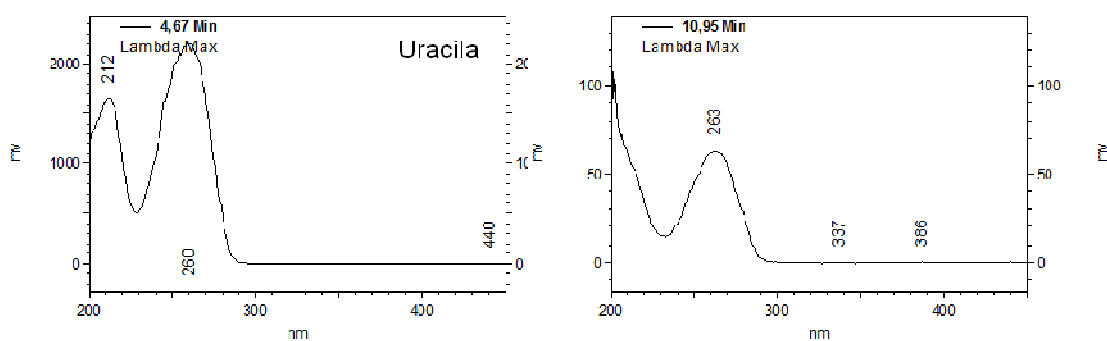
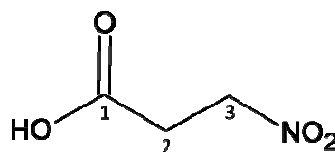


Figura 24 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **01**

Pela análise dos dados espectrais com as curvas de UV comparando-se estes com a literatura (LEPTOKARYDIS, 2008; BLICHARSKA; KUPKA, 2002) foi possível identificar a substância **01** como sendo a Uracila.

Existe uma vasta literatura sobre atividades biológicas da uracila, mas sempre associada a outras moléculas como açúcares, aminoácidos, proteínas etc.

3.4.2 Identificação estrutural da substância **02** (Ácido nitropropanóico)



A identificação estrutural de **02** foi realizada em mistura, pelas técnicas de RMN de ^1H ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com a literatura (CHOMCHEOM et al., 2005).

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 6, e Figura 43, pág. 121) apresentou sinais em δ_{H} 4,70 (t, 2H, J=6,0 Hz, δ_{C} 70,2) e um sinal em δ_{H} 2,88 (t, 2H, J=6,0 Hz, δ_{C} 30,4). A análise do experimento em COSY demonstrou a correlação entre esses dois sinais de hidrogênios (Figura 44, pág. 122).

O espectro de HMBC (Figura 45, pág. 123) mostrou a presença dos carbonos δ_{C} 70,2 e 30,4 ppm, que foram correlacionados com os respectivos hidrogênios em HMQC, e um carbono de um grupo carboxílico δ_{C} 171,4.

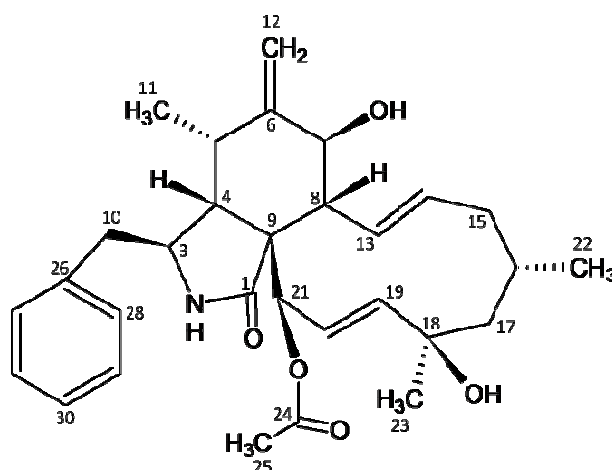
Analisando os dados espectrais e comparando-os com a literatura foi possível identificar a substância **02** como o ácido nitropropanóico.

Este metabólito já foi isolado de fungo endofítico *Phomopsis* sp. associado as espécies vegetais *Urobotrya siamensis* e a *Mesua ferrea*, tendo apresentado alta atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*, é também conhecido como um potente agente neurotóxico (CHOMCHEON et al., 2005; ELSASSER et al., 2005). Schwarz et al. (2004) relatou que este metabólito possui propriedades nematocidas, pois apresentou atividade contra o parasita nematóide *Meloidogyne incognita* com valores de DL_{50} de 12,5-15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e atividade contra o saprófita *Caenorhabditis elegans*, sendo esta cinco vezes menor.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) e ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) de **02** (δ em ppm)

	δ_{C}	δ_{H}
1	171,4	-
2	30,4	2,88 (t, J=6,0 Hz)
3	70,2	4,70 (t, J=6,0 Hz)

3.4.3 Identificação estrutural da substância **03** (Citocalasina H)



A substância **03** foi submetida a RMN de ^1H , ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas. O espectro de massas (**Figura 46**, pág. 124) obtido em alta resolução (ESI-EM) foi observado o íon m/z 494,2861 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e o pico indicando a formação do aduto ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) em m/z 516,2759. Estes dados aliados à literatura (IZAWA et al., 1989) e ao experimento de RMN de ^{13}C , permitiram sugerir para **03** a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_5$.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figura 47** a **Figura 49**, pág. 125) indicou a presença de duas carbonilas sendo uma de éster e a outra de amida (δ_{C} 170,0 e 173,9) um anel benzênico monossustituído, quatro metilas (δ_{H} 0,40; 0,96; 1,16; e 2,24) sendo dois dubletos, um singlete atribuído a um $-\text{CH}_3$ carbinólico e um $-\text{CH}_3$ acetato. Foram observados ainda três carbonos carbinólicos em δ_{C} 70,5; 72,2 e 76,6. Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos seus respectivos carbonos com base na análise do experimento de HMQC (**Figura 50**, pág. 128). Os sinais em 5,54 (*dd*, J=15,0 e 5,0 Hz, δ_{C} 128,7; 1H) e 5,10 (*m*, δ_{C} 134,5; 1H), 5,39 (*d*, J=16,0 Hz, δ_{C} 138,0; 1H) e 5,68 (*dd*, J=16,0 e 1,5 Hz, δ_{C} 125,3; 1H), característicos de hidrogênios olefínicos foram atribuídos a H-13 e H-14, H-19 e H-20, respectivamente. A geometria das ligações duplas Δ^{13-14} e Δ^{19-20} foi definida

como *trans* pela análise da constante de acoplamento de 15,0 Hz e 16,0 Hz respectivamente, entre os hidrogênios.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais em δ_{H} 3,63 (*d*, 1H, $J=10$ Hz) e 5,31 (*s*, 1H) atribuídos aos hidrogênios carbinólicos H-7 e H-21, respectivamente. A constante de acoplamento de 10 Hz sugere um ângulo de aproximadamente 180° entre H-7 e H-8.

Os hidrogênios δ_{H} 4,81 (*s*) e 5,06 (*s*) foram atribuídos a um metileno terminal. A análise dos espectros de HMBC mostrou as correlações de longa distância de H-11 \leftrightarrow C-6 e H-12 \leftrightarrow C-7, permitindo fixar a posição desta ligação dupla em $\Delta^{6,12}$.

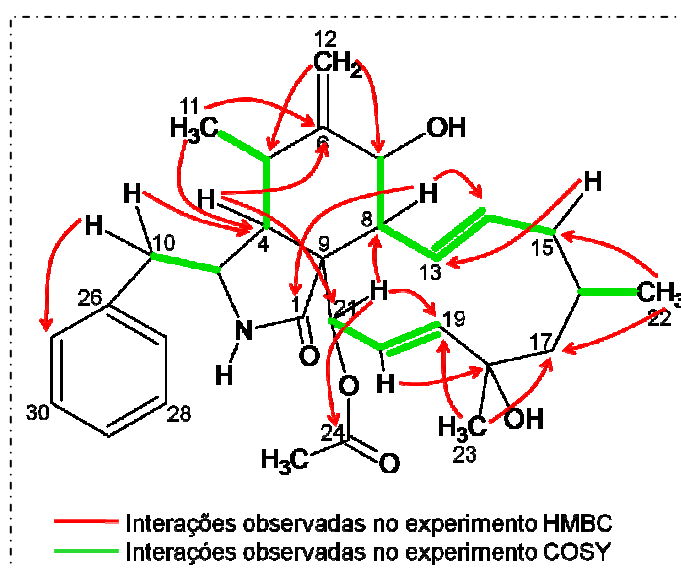


Figura 25 - Principais correlações observadas em RMN - 2D para **03** (Figura 51, pág. 129)

A configuração relativa e absoluta de **03** foi determinada por comparação dos valores dos deslocamentos em RMN de ^1H , ^{13}C e constantes de acoplamentos com dados da literatura (IZAWA et al., 1989), os espectros de NOESY – 1D e 2D foram também analisados e a rotação óptica apresentou um valor de $[\alpha]_{\text{D}} + 16$, coerente com a literatura.

A análise dos dados espectrométricos e em comparação com a literatura (IZAWA et al., 1989, ONDEYKA et al., 1992, TAO et al., 2008) nos permitiu identificar a substância **03** como a Citocalasina H.

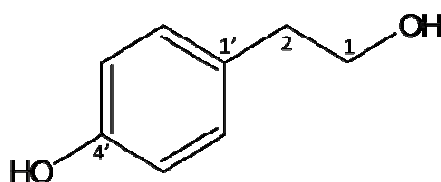
Esse metabólito é bastante conhecido por apresentar atividade fitotóxica, tendo inibindo o crescimento e floração de plantas de tabaco. Bottalico et al. (1990) relatam a inibição do crescimento de mudas de tomate e a toxicidade da citocalasina H contra larvas de *Artemia salina*.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$, de **03** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_{C}	δ_{H}
1	173,9	-
2	NH	7,99 (s, 1H)
3	52,7	3,11 (s, 1H)
4	47,7	2,00 (t, 2,5; 1H)
5	31,6	2,51 (m, 1H)
6	151,0	-
7	70,5	3,63 (d, 10,0; 1H)
8	46,1	2,76 (t, 10,0; 1H)
9	51,8	-
10	43,9	2,57 (m, 1H)
		2,83 (dd, 5,0; 13,0; 1H)
11	12,9	0,40 (d, 6,5; 3H)
12	111,3	4,81 (s, 1H)
		5,06 (s, 1H)
13	128,7	5,54 (dd, 5,0; 15,0; 1H)
14	134,5	5,10 (m, 1H)
15	42,9	1,9 (m, 2H)
16	27,7	1,71 (m, 1H)
17	53,8	1,63 (m)
		1,41 (dd, 2,0; 13,0; 1H)
18	72,2	-
19	138,0	5,39 (dd, 1,5; 16; 1H)
20	125,3	5,68 (dd, 1,5; 16; 1H)
21	76,6	5,31 (s, 1H)
22	26,1	0,96 (d, 6,5; 3H)
23	30,8	1,16 (s, 3H)
24	170,0	-
25	20,5	2,24 (s, 3H)
26	137,3	-
27/31	129,6	7,16 (d, 2H)
28/30	128,3	7,30 (dd, 2H)
29	126,4	7,24 (t, 1H)

As citocalasinas exibem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo, atividade antibiótica, antitumoral, inibição da protease HIV-1, e atividade fitotóxica. As citocalasinas são amplamente utilizadas como sondas biológicas, mas a sua aplicação terapêutica tem sido limitada devido à sua alta toxicidade (WAGENAAR et al., 2000).

3.4.4 Identificação estrutural da substância **04** (Tirosol)



A substância **04** foi identificada por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais; essas técnicas evidenciaram que esta substância encontrava-se em mistura com outros metabólitos, no entanto com identificação viável.

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 8, e Figura 43, pág. 121) apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,97 (*d*, 2H, $J=8,0$ Hz) e 6,64 (*d*, 2H, $J=8,0$ Hz), evidenciando um sistema aromático com um acoplamento *orto*, o que sugeriu a presença de anel aromático *para*-disubstituído. O espectro de HMBC (Figura 45, pág. 123) demonstrou um carbono oxiquaternário (δ_{C} 155,9) indicando um dos substituintes como sendo o -OH.

No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais em δ_{H} 2,60 (δ_{C} 38,2; *t*, 2H, $J=7,5\text{Hz}$, H-2) e 3,50 (δ_{C} 62,6; *t*, 2H, $J=7,5$ Hz, H-1), que mostraram correlação por COSY (Figura 44, pág. 122), e que associados aos valores dos deslocamentos químicos em RMN sugeriram um grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ benzílico. Estes dados sugeriram este grupo como o outro substituinte do anel aromático.

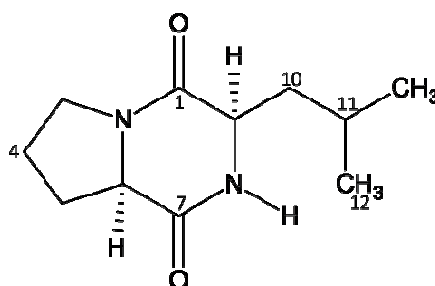
A análise dos dados espectroscópicos e comparação com a literatura (CHRISTOPHORIDOU; DAIS, 2009) permitiram identificar a substância **04** como o álcool *p*-hidroxi-fenil-etílico (tirosol), um sinalizador (quorum-sensing) (GUIMARÃES et al., 2009) produzido por uma variedade de micro-organismos, incluindo o fungo *Xylaria longipes* isolado do estômato de *Epichloe typhina* (SUMARAH et al., 2008).

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500MHz) de **04** (δ em ppm e J)

	δ_{C}	δ_{H}
1	62,6	3,50 (t, 7,5 Hz)
2	38,2	2,60 (t, 7,5 Hz)
1'	130,0	-
2' e 6'	129,6	6,97 (d, 8,0 Hz)
3' e 5'	115,0	6,64 (d, 8,0 Hz)
4'	155,9	-

O tirosol é um conhecido composto fenólico com propriedades antioxidantes, presente no vinho e azeite, é produzido por fungos terrestres, apresenta atividade antifúngica contra *Lagenidium callinectes*, um fungo que contamina embriões de *Homarus americanus*, dificultando ou até mesmo impedindo seu crescimento, e contra *Gibberella pulicaris* (GUIMARÃES et al., 2009; GIL-TURNES; FENICAL, 1992).

3.4.5 Identificação estrutural da substância **05** (Ciclo-L-Pro-L-Leu)



A substância **05** foi identificada por RMN de ^1H uni e bidimensionais e por espectrometria de massas. Esta substância foi identificada nas frações 02 e 03.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 52**, pág. 130) pode-se observar a presença de dois dubletos em δ_{H} 0,86 (d, 3H, J=6,5 Hz, δ_{C} 22,0) e δ_{H} 0,85 (d, 3H, J=6,5 Hz, δ_{C} 21,2), indicando a presença de duas metilas. As correlações observadas em COSY (**Figura 53**, pág. 131) de δ_{H} 0,86 (H-12)/ δ_{H} 0,85 (Me-11) \leftrightarrow δ_{H} 1,84 (H-11) \leftrightarrow δ_{H} 1,35 e 1,74 (H-10a e H-10b) \leftrightarrow δ_{H} 3,99 (H-9) permitiram sugerir uma unidade do aminoácido Leucina (Leu) como um dos componentes de **05**. Os dois dubletos em δ_{H} 0,86 e 0,85 permitiram distinguir entre leucina e Isoleucina, uma vez que o último apresentaria um dubleto e um triplete.

A presença de três sinais na forma de multipletos (δ_{H} 1,80, 2,20, 3,34) referentes a hidrogênios metilênicos indicaram a presença de resíduo do aminoácido Prolina na estrutura de **05** (FDHILA et al., 2003). As correlações observadas por COSY entre H-3 (δ_{H} 3,33/3,36)

\leftrightarrow H-4 (δ_{H} 1,80-1,93) \leftrightarrow H-5 (δ_{H} 2,22-1,80) confirmaram essa sugestão. O tripleto observado em δ_{H} 4,17 (t, H-6, 1H, $J=8,0$ Hz, $\delta_{\text{C-6}}$ 58,5) foi atribuído ao H-6. Este hidrogênio mostrou correlação ${}^2\text{J}$ visualizada nos mapas de contornos do experimento HMBC (**Figura 26** e **Figura 54**, pág. 132) com C-5 (δ_{C} 28,0).

O hidrogênio com δ_{H} 7,95 (s) foi atribuído ao NH-8, pois não apresentou correlação direta em HMQC (**Figura 56**, pag. 134) e foram observadas correlações ${}^3\text{J}$ em HMBC com C-6 (δ_{C} 58,5) e C-1 (δ_{C} 166,2).

O sinal em δ_{C} 166,2 foi atribuído ao C-1 devido às correlações observadas no experimento de HMBC com H-10/H-9.

A configuração relativa de **05** foi atribuída com base nas interações observadas em NOESY-1D (**Figura 57**, pág. 135) pela interação especial entre H-6 \leftrightarrow H-9, sugerindo que estes hidrogênios encontrem-se no mesmo plano da molécula.

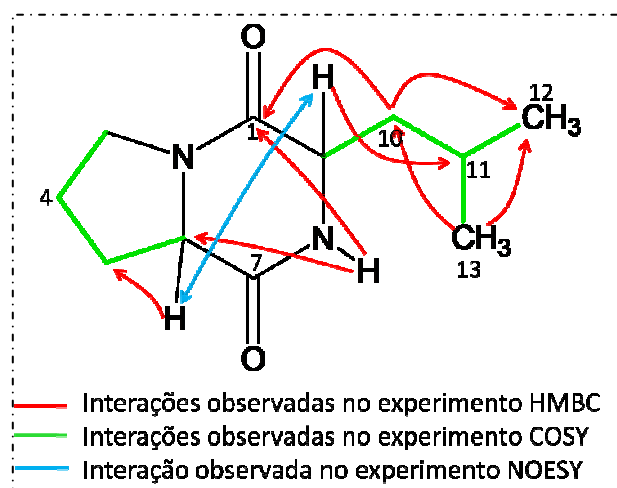


Figura 26 - Principais correlações observadas em RMN 1D e 2D para **05**

O espectro de massas de alta resolução (ESI-EM, modo positivo) (**Figura 58**, pág. 136) apresentou o íon molecular precursor da molécula protonada em m/z 211,1477 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e do íon produto em m/z 233,1296 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), sendo esses coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$.

A configuração absoluta da substância foi determinada pela comparação da rotação óptica que apresentou um valor de $[\alpha]_{\text{D}} - 60,0^\circ$ com a literatura (JAYATILAKE et al., 1996; SETO et al., 2005).

A análise espectrométrica e a comparação com os dados da literatura (FURTADO et al., 2005; CAFÊU, 2007) permitiram identificar a estrutura proposta como *ciclo*(L-Pro-L-Leu).

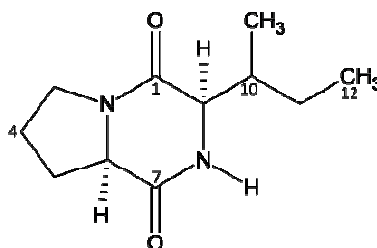
Este metabólito foi isolado do fungo *Aspergillus fumigatus*, e também de uma bactéria associada ao molusco *Pecten maximus*, apresentando potente atividade antibiótica contra o *Vibrio anguillarum* (FDHILA et al., 2003), e atividade antifúngica contra *Cladosporium phlei* (SETO et al., 2005), o que evidenciou a potencialidade biológica desta substância.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 , de **05** (δ em ppm e J em Hz)

	^1H	^{13}C
1	-	166,2
3	3,33/3,36 (m)	44,5
4	1,80 (m)	23,0
5	2,22/1,80 (m)	28,0
6	4, 17 (t, 8,0)	58,5
7	-	*
8	7,95 (s)	N
9	3,99 (t, 6,5)	53,0
10	1,35 (m)	37,5
	1,74 (m)	
11	1,86 (m)	24,0
12	0,85 (d, 6,5)	21,2
13	0,86 (d, 6,5)	22,0

*não identificado

3.4.6 Identificação estrutural da substância **06** (Ciclo-L-Pro-L-Ile)



A principal diferença desta substância quando comparada com a anterior (**05**) foi observada no espectro de RMN de ^1H , na região de hidrogênio metílicos (**Figura 52**, pág. 130). Sinais em δ_{H} 0,81 (t, 3H, J=7,0 Hz) e δ_{H} 0,96 (d, 3H, J=7,0 Hz) indicaram a presença de um resíduo aminoácido Isoleucina (Ile), ao invés de Leucina como na substância **05**. A presença do resíduo prolina (Pro) foi identificada pela presença dos sinais na forma de multipletos (δ_{H} 1,7-3,40) referentes aos hidrogênios metilênicos (FDHILA et al., 2003), e através das correlações por COSY entre estes sinais. Pela análise detalhada dos mapas de

contorno em HMQC (**Figura 56**, pág. 134) e HMBC (**Figura 54**, pág. 132) foi possível atribuir a estrutura planar para **06**.

A análise do espectro de massas (**Figura 60**, pág. 138) de alta resolução (ESI-EM, modo positivo) evidenciou o íon precursor da molécula protonada em m/z 211,1494 ($[M+H]^+$), e dos íon produto m/z 233,1316 ($[M+Na]^+$) e m/z 249,1249 ($[M+K]^+$) que estão coerentes com a estrutura proposta, o que associado aos dados de RMN evidenciou a fórmula molecular de $C_{11}H_{18}O_2N_2$.

A determinação da configuração relativa foi realizada pela análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 59**, pág. 137) onde foi observada a interação espacial entre H-6 e H-9, colocando-os no mesmo plano da molécula.

A comparação destes dados espectrais com os descritos na literatura (FDHILA et al., 2003; ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995; JAYATILAKE et al., 1996), confirmam a estrutura proposta para a substância **06** como sendo *ciclo* (L-Pro-L-Ile), a configuração L foi atribuída pois, os aminoácidos mais comuns na natureza produzidos por micro-organismos são os aminoácidos de configuração L.

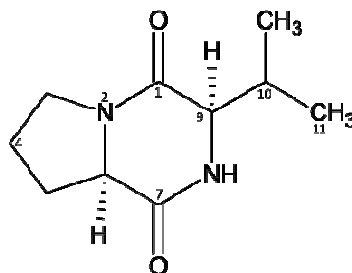
Este metabólito já foi relatado dos micro-organismos *Calyx cf. podatypa* (esponja marinha) (ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995) e de bactérias marinhas associadas a *Pecten maximus* (molusco) (FDHILA et al., 2003) tendo apresentado potente atividade antibiótica contra o *Vibrio anguillarum*. Também já foi isolada de plantas como a *Portulaca oleracea* e encontrada em alimentos (XING et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e 1H (500MHz) em DMSO- d_6 de **06** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_H	δ_C
1	-	165,0
3	3,30 (m)	44,5
4	1,80 (m)	22,6
5	1,83 (m)/2,22 (m)	27,8
6	4,09 (t, 7,5)	58,3
7	-	*
8	7,90 (s)	N
9	3,94 (sl)	59,0
10	2,10 (m)	34,6
11	1,32 (m)	23,6
12	0,81 (t, 7,0)	12,4
Me-10	0,96 (d, 7,0)	15,0

* Não identificado

3.4.7 Identificação estrutural da substância **07** (Ciclo-L-Pro-L-Val)



A substância **07** foi submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H uni e bidimensionais, e os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbonos pela análise de HMQC (**Figura 61**, pág. 139) e HMBC (**Figura 62**, pág. 140).

A análise dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 63**, pág. 141) uni e bidimensionais permitiu notar a presença dos hidrogênios em δ_{H} 4,10 (δ_{C} 58,2; *t*, $J=7,5\text{Hz}$, H-6) δ_{H} 3,90 (δ_{C} 59,2; *sl*, H-9) e uma carbonila em δ_{C} 165,2, que são característicos de anel dicetopiperazínico.

Os multipletos (δ_{H} 1,8-3,5) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos observados nos experimentos de RMN de ^1H , o que aliados aos deslocamentos químicos em RMN de ^{13}C e as correlações em COSY entre H-3 \leftrightarrow H-4 \leftrightarrow H-5, indicaram a presença do resíduo do aminoácido Prolina na estrutura (FDHILA et al., 2003).

O espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos em δ_{H} 0,85 (*d*, 3H, $J=6,5\text{Hz}$) e δ_{H} 1,01 (*d*, 3H, $J=7,5\text{Hz}$) e um duplo quinteto em δ_{H} 2,33 (*dquint*, 1H) que foram atribuídos aos hidrogênios H-11, H-12 e H-10, respectivamente. No espectro de COSY (**Figura 69**, pág. 147) foram observadas correlações entre os hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) com o hidrogênio metínico δ_{H} 2,33 (H-10, δ_{C} 27,2), evidenciando uma unidade isopropila e indicando o aminoácido Valina como uma das unidades da substância **07**.

A ausência de correlação em HMQC para o sinal em δ_{H} 7,91 sugeriu que este estivesse ligado ao átomo de nitrogênio. As correlações de longa distância observadas em HMBC de δ_{H} 7,91 com os carbonos em $\delta_{\text{C}-6}$ 58,2 e $\delta_{\text{C}-1}$ 165,2 permitiram atribuir este sinal ao NH-8.

Baseando-se nos dados espectroscópicos e nas correlações observadas nos experimentos uni e bidimensionais, foi proposto para a substância **07** uma dicetopiperazina constituída pelos aminoácidos Prolina (Pro) e Valina (Val).

A configuração relativa de **07** foi realizada pela análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 64**, pág. 142) onde foi observada interação especial entre os hidrogênios H-6 (δ_{H} 4,10) e H-9 (δ_{H} 3,90), colocando-os no mesmo plano espacial da molécula. A configuração absoluta foi atribuída comparando-se o valor de $[\alpha]_{\text{D}}$ - 45,6° obtido com a literatura (TAKAYA et al., 2007).

Os valores espectroscópicos obtidos em comparação com a literatura (JAYATILAKE et al., 1996; TAKAYA et al., 2007) confirmaram a proposta indicando ser a substância *ciclo(L-Pro-L-Val)*.

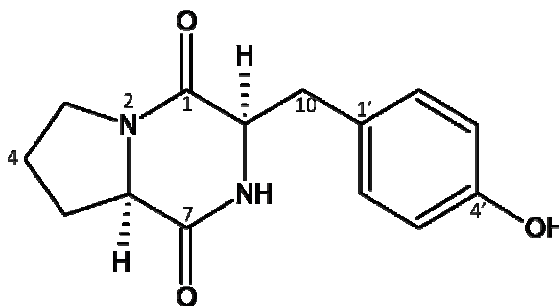
Tabela 11- Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de **07** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_{H}	δ_{C}
1	-	165,2
3	3,40/3,30 (<i>m</i>)	44,6
4	1,83 (<i>m</i>)	21,9
5	2,12 (<i>m</i>)	27,6
6	4,10 (<i>t</i>)	58,2
7	-	*
8	7,91	N
9	3,90 (<i>sl</i>)	59,2
10	2,33 (<i>dquint</i> , 3,0 e 7,0)	27,2
11	0,85 (<i>d</i> , 6,5)	16,6
12	1,01 (<i>d</i> , 7,5)	18,4

O espectro de massas de alta resolução (ESI-EM, modo positivo) (**Figura 65**, pág. 143) foi obtido para confirmação da estrutura proposta. Picos do íon precursor da molécula protonada em m/z 197,1302 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e do íon produto em m/z 219,1121 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$.

Esta substância é descrita na literatura como fitotóxica e bio-herbicida em potencial. Apresentou atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, moderada atividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (LEPTOKARYDIS, 2008), e atividade antioxidante (TAKAYA et al., 2007). Há relatos da produção deste metabólito pelos fungos *Colletotrichum gloesporioides* e por outros fungos deste gênero (COLLADO; GÁRCIA-PAJÓN, 2003). Este metabólito já foi isolado de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (JAYATILAKE et al., 1996), *Halobacillus litoralis* (YANG et al., 2002), *Aspergillus fumigatus* (FURTADO et al., 2005), *Chromocleista* sp., entre outros (PARK et al., 2006).

3.4.8 Identificação estrutural da substância **08** (Ciclo-L-Pro-L-Tyr)



A análise dos espectros de HMQC de **08** permitiu atribuir os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono (**Figura 66**, pág. 144).

O espectro de RMN de ^{13}C onde foi visualizados deslocamentos em δ_{C} 165,1 e 168,8, sugerindo duas unidades de amidas CONH (**Figura 67**, pág. 145), o que aliado aos deslocamentos químicos de RMN de ^1H em δ_{H} 4,04 (*dd*, $J=8,0$ e $7,0$ Hz, 1H; δ_{C} 58,4) e 4,24 (*t*, $J=5,0$ Hz, 1H; δ_{C} 55,9) conduziram a presença de um anel dicetopiperazínico (JAYATILAKE et al., 1996).

O espectro de RMN de ^1H de **08** (**Figura 68**, pág. 146) apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,04 (*d*; $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 6,63 (*d*; $J=8,5$ Hz) indicando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído. Foram observados ainda a presença de três multipletos em δ_{H} 3,40 (*m*, δ_{C} 45,5, 2H), δ_{H} 1,70 (*m*, δ_{C} 21,8, 2H) e δ_{H} 2,0 (*m*, δ_{C} 27,8, 2H).

A presença do deslocamento químico em δ_{C} 155,8 indicou a presença de um grupo –OH ligado ao anel aromático evidenciando a presença de resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr). Por análise dos espectros obtidos em COSY (**Figura 69**, pág. 147) foi possível observar correlações entre os hidrogênios benzílicos H-10 \leftrightarrow H-9 (δ_{H} 2,92 e 4,24), corroborando para a presença da unidade Tyr.

Considerando que os H-10a e H-11b são diastereotópicos, a multiplicidade esperada seria dois duplos dubletos, no entanto, no espectro de RMN de ^1H foi observado apenas um tripleto (*t*), evidenciando que há livre rotação do resíduo tirosina, ou seja, o valor de deslocamento químico refere-se a média de H-10a e H-10b. Tal fato é suportado pela observação em HMQC de apenas um sinal de hidrogênio para H-10a e H-10b.

Análise detalhada dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC, COSY e HMBC (**Figuras 66-71**) evidenciaram, assim como em **05**, **06** e **07**, a presença de resíduo do aminoácido Prolina (Pro) nesta substância.

O sinal em δ_{H} 7,83 no experimento de RMN de ^1H foi atribuído ao NH-8, uma vez que não apresentou correlação direta com átomo de carbono em HMQC e mostrou correlação a longa distância em HMBC com C-6 (δ_{C} 58,4) e C-1 (δ_{C} 165,1) (**Figura 27**).

A configuração relativa de **08** foi atribuída com base na interação espacial observada no experimento NOESY-1D (**Figura 70**, pág. 148) entre H-6 (δ_H 4,04) e H-9 (δ_H 4,24), colocando-os no mesmo plano da molécula. Esta observação foi corroborada por comparação com a literatura (CAFÊU, 2007).

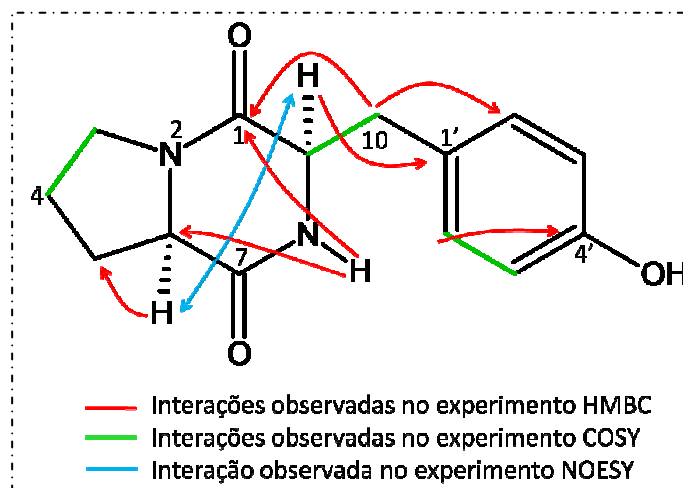


Figura 27- Principais correlações observadas em RMN para **08**

O espectro de massas de alta resolução (ESI-MS, modo positivo) foi obtido para confirmação da estrutura proposta (**Figura 72**, pág. 150). Íons em m/z 261,1300 ($[M+H]^+$) e m/z 283,1128 ($[M+Na]^+$) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$.

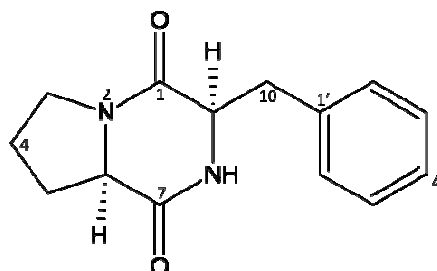
Os dados espectrais foram comparados com a literatura (JAYATILAKE et al., 1996; CAFÊU, 2005; KAMIKAWA et al., 1980) e permitiram identificar a substância **08** como *ciclo(L-Pro-L-Tyr)*. Os aminoácidos mais comuns na natureza são os de configuração L, contudo WANG; MUELLER; CLARDY (1999) e FDHILA et al. (2003) relatam dicetopiperazinas derivados de aminoácidos de configuração D.

Esta substância é relatada como metabólito de diversos fungos e bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria associada à esponja marinha *Isodictya seteira* (JAYATILAKE, et al., 1996), e também foi isolada por nosso grupo, de *Colletotrichum crassipes* um fungo endofítico isolado de *Casearia sylvestris*, uma espécie endêmica de regiões de Cerrado e Mata Atlântica brasileira (CAFÊU, 2007).

Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em DMSO- d_6 , de **08** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_{H}	δ_{C}
1	-	165,1
3	3,40 (m)	45,5
4	1,70 (m)	21,8
5	2,0 (m)	27,8
6	4,04 (dd, 8,0 e 7,0)	58,4
7	-	168,8
8	7,83 (s)	N
9	4,24 (t, 5,0)	55,9
10	2,92 (t, 5,0)	34,7
1'	-	127,1
2' e 6'	7,04 (d, 8,5)	130,8
3' e 5'	6,63 (d, 8,5)	114,7
4'	-	155,8

3.4.9 Identificação estrutural da substância **09** (Ciclo-L-Pro-L-Phe)



A substância **09** foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , e espectrometria de massas.

No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais em δ_{H} 4,06 (δ_{C} 58,4; dd, 7,5 e 5,0 Hz, 1H) e δ_{H} 4,34 (δ_{C} 55,7; t, 5,0 Hz, 1H), que aliados aos deslocamentos químicos observados em RMN de ^{13}C em δ_{C} 168,9 e 165,0, indicaram grupos CONH, sugerindo a presença de um anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 73**, pág. 151) apresentou na região de alifáticos, multipletos em δ_{H} 3,39, δ_{H} 3,25, δ_{H} 1,72 e δ_{H} 1,42 os dois últimos integrando para dois hidrogênios cada, sugerindo uma unidade Prolina (Pro) na estrutura da substância **09**. Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_{H} 7,26 (d; 1H; δ_{C} 129,7), 7,24 (dd; 2H; δ_{C} 127,9) e δ_{H} 7,25 (dd; 2H; δ_{C} 126,3) evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído, e dois duplos dubletos em 3,02 (1H, dd, 15,2; 5,5 Hz) e 3,05 (1H, dd, 15,2;

5,5 Hz), sugerindo uma unidade Fenilalanina (Phe) como o outro aminoácido presente na estrutura de **09**.

Nos espectros e RMN de ^{13}C (**Figura 74**, pág. 152) foram observados quatro carbonos metilênicos, sendo um benzílico, cinco metínicos, um quaternário aromático, corroborando com a estrutura proposta.

A configuração relativa de **09** foi realizada com base nas interações espaciais observadas no experimento de NOESY-1D, (**Figura 75**, pág. 153) entre H-6 e H-9, posicionando-os no mesmo plano da molécula, como já relatado por CHEN et al. (2009).

Os dados espectrais foram comparados com a literatura (SETO et al., 2005; CAFÊU, 2007; ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995) e permitiram identificar a substância **09** como *ciclo(L-Pro-L-Phe)*, a configuração absoluta foi atribuída comparando-se o valor de $[\alpha]_{\text{D}} - 40,5^\circ$ com a literatura.

O espectro de massas de alta resolução (ESI-MS, modo positivo) foi obtido para confirmação da estrutura proposta (**Figura 76**, pág. 154). Íons em m/z 245,1323 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), m/z 267,1150 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) e m/z 283,1098 ($[\text{M}+\text{K}]^+$) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$.

Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C (125MHz) e ^1H (500MHz) em $\text{DMSO}-d_6$, de **09** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_{H}	δ_{C}
1	-	168,9
3	3,25/3,39 (<i>m</i>)	44,5
4	1,72 (<i>m</i>)	21,8
5	1,42 (<i>m</i>)	27,7
6	4,06 (<i>dd</i> , 5,0 e 7,0)	58,4
7	-	165,0
8	7,93 (<i>s</i>)	N
9	4,34 (<i>t</i> , 5,0)	55,7
10	3,02 (<i>dd</i> , 5,5 e 15,2)	35,3
	3,05 (<i>dd</i> , 5,5 e 15,2)	
1'	-	137,2
2' e 6'	7,26 (<i>d</i>)	129,7
3' e 5'	7,24 (<i>dd</i>)	127,9
4'	7,25 (<i>dd</i>)	126,3

Este metabólito foi isolado do fungo marinho *Cladosporium* sp. associado a um esponja, tendo apresentado atividade antibacteriana contra as bactérias *Loktanella*

hongkongensis, *Micrococcus lutes* e *Ruegeria* sp. (QI et al., 2009), inibiu o crescimento do fungo patogênico *Cladosporium phlei* e da bactéria *Vibrio anguillarum* (SETO et al., 2005, FDHILA et al., 2003).

As dicetopiperazinas são substâncias bioativas comumente produzidos por fungos deuteromicetos, ascomicetos e basidiomicetos (WANG; MUELLER; CLARDY, 1999) tais como *Penicillium* sp., *P. verrucosum*, *P. griseofulvum*, *P. janczewskii*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium chlamydosporum*, *Gliocladium virens*, *Rhodotorula pilimanae*, *Phoma lingan*, *Streptomyces* sp., *Thielavia minor*, *Emericella striata*, entre outros (GUIMARÃES, 2006). Fungos do gênero *Colletotrichum*, como *C. gloesporioides*, também são produtores de dicetopiperazinas (COLLADO; GARCÍA-PAJÓN, 2003).

Dicetopiperazinas constituem uma importante classe de produtos naturais com diversas e interessantes atividades biológicas, incluindo antibióticos, imunossuppressores, antitumorais, modulador de enzimas, receptores e mediadores bioquímicos (MEHDI-BEN AMEUR et al., 2004; CAMPO et al. 2009). Na literatura as atividades biológicas mais encontradas para esta classe são as propriedades antifúngicas e citotóxicas. Estas são associadas à defesa contra fungos competidores ou fitopatógenos (WANG; MUELLER; CLARDY, 1999).

Mais de 40 substâncias dicetopiperazínicas estão listadas como metabólitos de fungos e a mais frequente biossíntese envolve a condensação de dois ou três aminoácidos como precursores (GUIMARÃES, 2006). Os aminoácidos se ligam por ligações peptídicas estabelecidas entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente, formando a cadeia.

Na **Figura 28** podem ser observados os aminoácidos precursores das dicetopiperazinas identificadas neste trabalho.

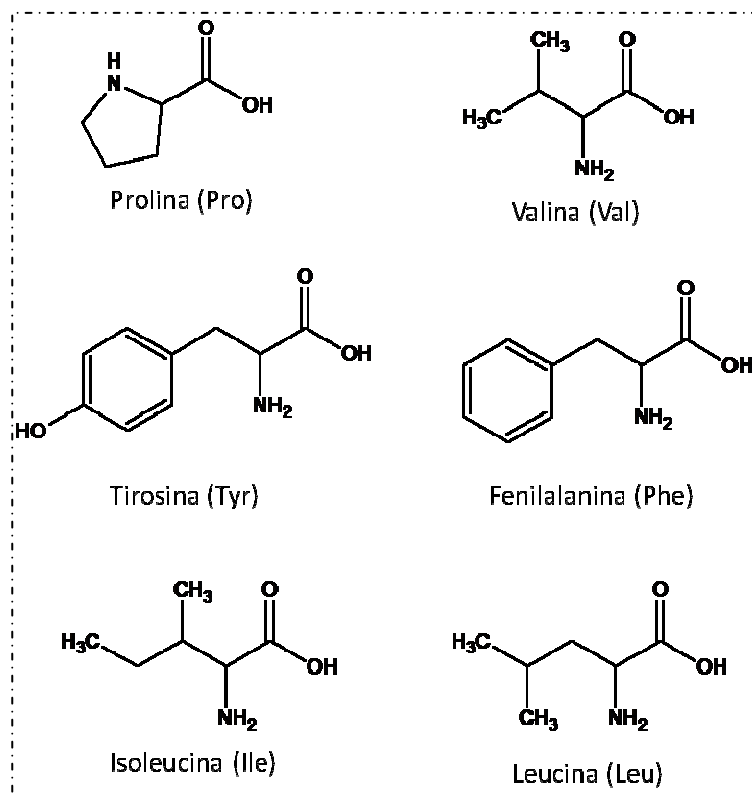
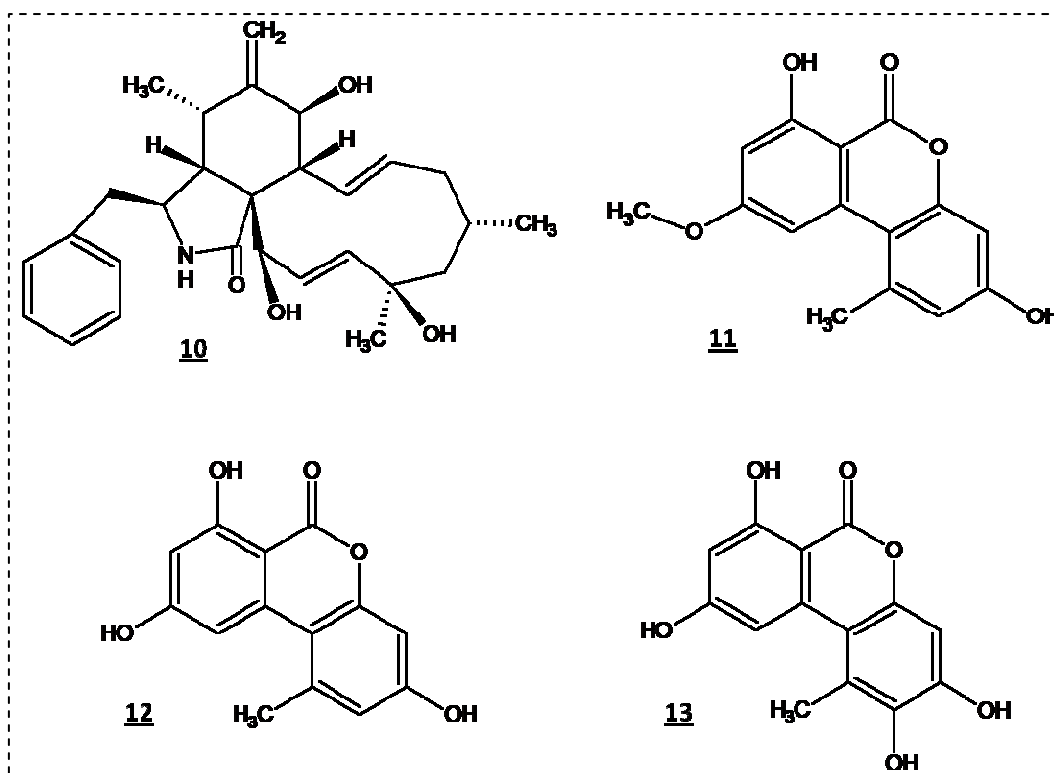


Figura 28 - Aminoácidos precursores das dicetopiperazinas

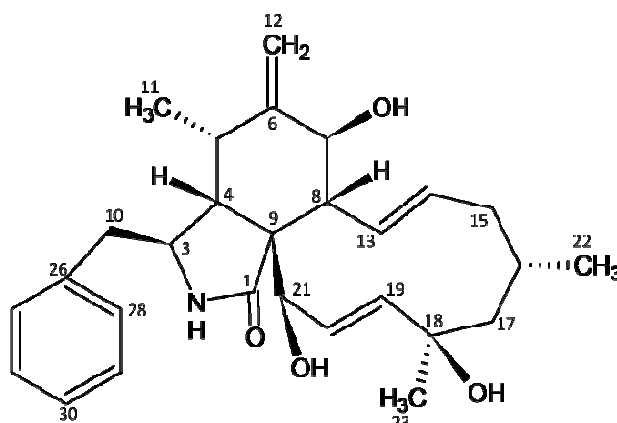
Há relatos da produção de alcalóides dicetopiperazínicos por fungos terrestres, marinhos (LI et al., 2004) e recentemente por fungos endofíticos (SETO et al., 2005). O fungo endofítico *Epichloe typhina* produziu *ciclo(L-Pro-L-Leu)* e *ciclo(L-Pro-L-Phe)*; estas substâncias demonstraram atividade antifúngica contra *Cladosporium phlei*, consistentes com dados previamente relatados (SETO et al., 2005).

Desse modo, as dicetopiperazinas são de grande interesse devido ao amplo espectro de atividades farmacológicas (CAMPO et al., 2009; LI et al., 2004), neste trabalho foram identificadas 5 substâncias desta classe produzidas pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. Este é o primeiro relato da produção de substâncias desta classe em fungos do gênero *Phomopsis*.

Substâncias produzidas pelo fungo *Phomopsis* sp. cultivado em Milho.



3.4.10 Identificação estrutural da substância 10 (Citocalasina J)



A substância **10** foi submetida à análise do espectro de massas e análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, e foi possível notar semelhança do perfil espectral com a substância **03** (Citocalasina H).

O espectro de massas (**Figura 77**, pág. 155) apresentou o pico em m/z 474,2676, indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, além do pico em m/z 452,2851 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Estes dados aliados ao espectro de RMN de ^{13}C e à literatura (IZAWA et al., 1989) permitiram

sugerir que **10** trata-se de uma substância da classe das citocalasinas com fórmula molecular $C_{28}H_{37}NO_4$.

Os espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 78**, pág. 156) evidenciam a presença de 28 átomos de carbono, sendo uma carbonila (amida), seis carbonos aromáticos, três carbonos carbinólicos, seis carbonos metilênicos, três carbonos metílicos, entre outros. Quando comparado ao espectro de RMN de ^{13}C de **03** (Citocalasina H) foi possível notar que esta substância possui uma metila e uma carbonila a menos.

No espectro de RMN de 1H (**Figura 79 e 80**, pág. 157), a ausência de um singlete na região de δ_H 2,10–2,30, evidencia a ausência de um acetato, no entanto o singlete em δ_H 5,48 (δ_C 76,7) sugere tratar-se de uma citocalasina hidroxilada em C-21.

O espectro de RMN de 1H apresentou sinais metílicos em δ_H 1,06 (*d*, 6,5Hz), δ_H 1,13 (*d*, 6,5Hz) e δ_H 1,38 (*s*), sinais de carbonos olefínicos e sinais característicos de um anel aromático monossustituído.

Os hidrogênios em δ_H 5,74, δ_H 5,34, δ_H 5,75 e δ_H 6,06 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-13, C-14, C-19 e C-20, respectivamente. A geometria *trans* foi definida para a ligação dupla $\Delta^{21,22}$ pela análise da constante de acoplamento de 16,5 Hz entre estes hidrogênios. O espectro de RMN de 1H também apresentou sinal em δ_H 2,93 e 2,60 (*dd*, 3,5 e 13,0Hz) atribuído aos hidrogênios benzílicos H-10a e H-10b.

O hidrogênio na posição 8 foi observado pelas correlações observadas em COSY de δ_H 2,90 \leftrightarrow δ_H 3,80 (H-7)/ δ_H 5,74 (H-13), evidenciando a ligação entre os ciclos.

Após análise dos dados espectrométricos e comparação com a literatura (IZAWA et al., 1989) foi possível identificar a substância **10** como a Citocalasina J. O valor de $[\alpha]_D + 49,1$ corrobora com a estrutura proposta. Este metabólito já foi isolado do fungo endofítico *Endothia gyrosa* (XU et al., 2009) e também isolado do gênero *Phomopsis* sp. (IZAWA et al., 1989). Bottalico et al. (1990) relatou a toxicidade da citocalasina J contra as larvas de *Artemia salina*, e inibição do crescimento de mudas de tomate.

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H (500Mz) e ^{13}C (125Mz) de **10** (DMSO- d_6 , δ em ppm e J em Hz)

	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	-	175,6	-
2	-	N	-
3	3,30 (m)	53,8	-
4	2,63 (m)	50,3	C-1
5	2,92 (m)	32,9	-
6	-	148,5	-
7	3,80 (d, 10,5)	69,9	-
8	2,92 (m)	45,9	C-1
9	-	52,9	-
10	2,93 (dd, 3,5 e 13,0)	45,6	C-26/C-27
	2,60 (dd, 3,5 e 13,0)		C-26/C-27
11	1,13 (d, 6,5)	14,0	C-4/C-5/C-6
12	5,35 (s)	113,7	C-5/C-7
	5,13 (s)		C-5/C-7
13	5,74 (m)	127,8	-
14	5,34 (m)	137,9	-
15	2,02 (d, 3,5)	42,7	C-14
	2,03 (d, 5,0)		-
16	1,80 (m)	28,5	-
17	1,92 (dd, 3,0 e 14,5)	53,8	-
	1,58 (dd, 3,0 e 14,5)		-
18	-	74,5	-
19	5,75 (dd)	137,0	-
20	6,06 (dd, 3,0 e 16,5)	131,2	C-13/C-21
21	5,48 (s)	76,7	C-4/C-9
22	1,06 (d, 6,5)	26,5	C-15/C-16/C-17
23	1,38 (s)	31,2	C-17/C-18/C-19
24	-	137,6	-
25/27	7,09 (d, 7,5)	129,1	C-10
26/28	7,60 (t, 12,0)	128,8	-
29	7,19 (m)	127,1	-

As citocalasinas são estruturalmente complexas e potentes biologicamente, sendo produzidas por diversos gêneros de fungos, como *Ascochyta* sp., *Aspergillus* sp., *Hymenoscyphus* sp., *Hypoxylon* sp., *Phomopsis* sp., *Turbercularia* sp., *Xylaria* sp.,

Zygosporium sp., entre outros. Essas substâncias foram consideradas promissoras fontes de drogas para o tratamento de diversos tipos de câncer, pois já foram relatados inúmeros efeitos citotóxicos dessa classe (XU et al., 2009). Esse efeito está associado à inibição de movimentos celulares como a mobilidade e divisão celular, causando mudanças na forma celular (IZAWA et al., 1989).

Estruturalmente, as citocalasinas são caracterizadas pela presença de um anel biciclo isoindolona (característica invariável), fundido a um macrociclo de 11 a 14 membros, e pela presença de uma unidade fenil na posição 10. Podem conter diferentes grupos substituídos, geralmente metilas, metilenos, hidroxilas, e epóxidos são os mais comuns (BENO et al., 1977).

A proposta biossintética mostra que a citocalasina B é formada a partir de uma unidade de fenilalanina, ligada a nove unidades de acetato, e a duas unidades de metionina e que as citocalasinas C e D apresentam uma unidade adicional de metionina (ROBERT; TAMM, 1975). Assim sendo, trata-se de uma via biossintética do acetato mista, uma vez que a fenilalanina é proveniente do metabolismo primário e, sendo este aminoácido um derivado do ácido shikímico, esta via pode ser chamada de acetato/shikimato.

Na proposta de mecanismo, o derivado de policetídeo (nonacetídeo para a citocalasina B; octacetídeo para as citocalasinas D H e J) liga-se à fenilalanina através de uma conexão com a amida para formar o intermediário **I** que, por processo de redução, de-hidrogenação e condensação, resulta no intermediário **II**. O intermediário **II** pode sofrer uma reação de cicloadição para formar **III**. A epoxidação da ligação dupla no intermediário **III** resulta no sistema de anel presente nas citocalasinas E, F, G, K, L e M e em Chaetoglobosinas A, C, F e K. Em condições levemente acídicas, o epóxido é transformado em álcool alílico (**V**) e resulta no tipo de anel presente nos outros tipos de citocalasinas (TURNER; ALDRIDGE, 1983). No caso da citocalasina B, sugere-se que a inserção do oxigênio entre os carbonos C-9 e C-23 ocorra por uma via enzimática do tipo *Baeyer-Villiger* e que o deoxafomina (**V**) seja um precursor direto, uma vez que este possui o mesmo esqueleto carbônico e mesma configuração absoluta que a citocalasina B. A redução na posição 17 da citocalasina D resulta na Citocalasina H (ROBERT; TAMM, 1975). A proposta de rota biossintética para as citocalasinas B D e H está ilustrada na **Figura 29**, onde R corresponde ao benzeno.

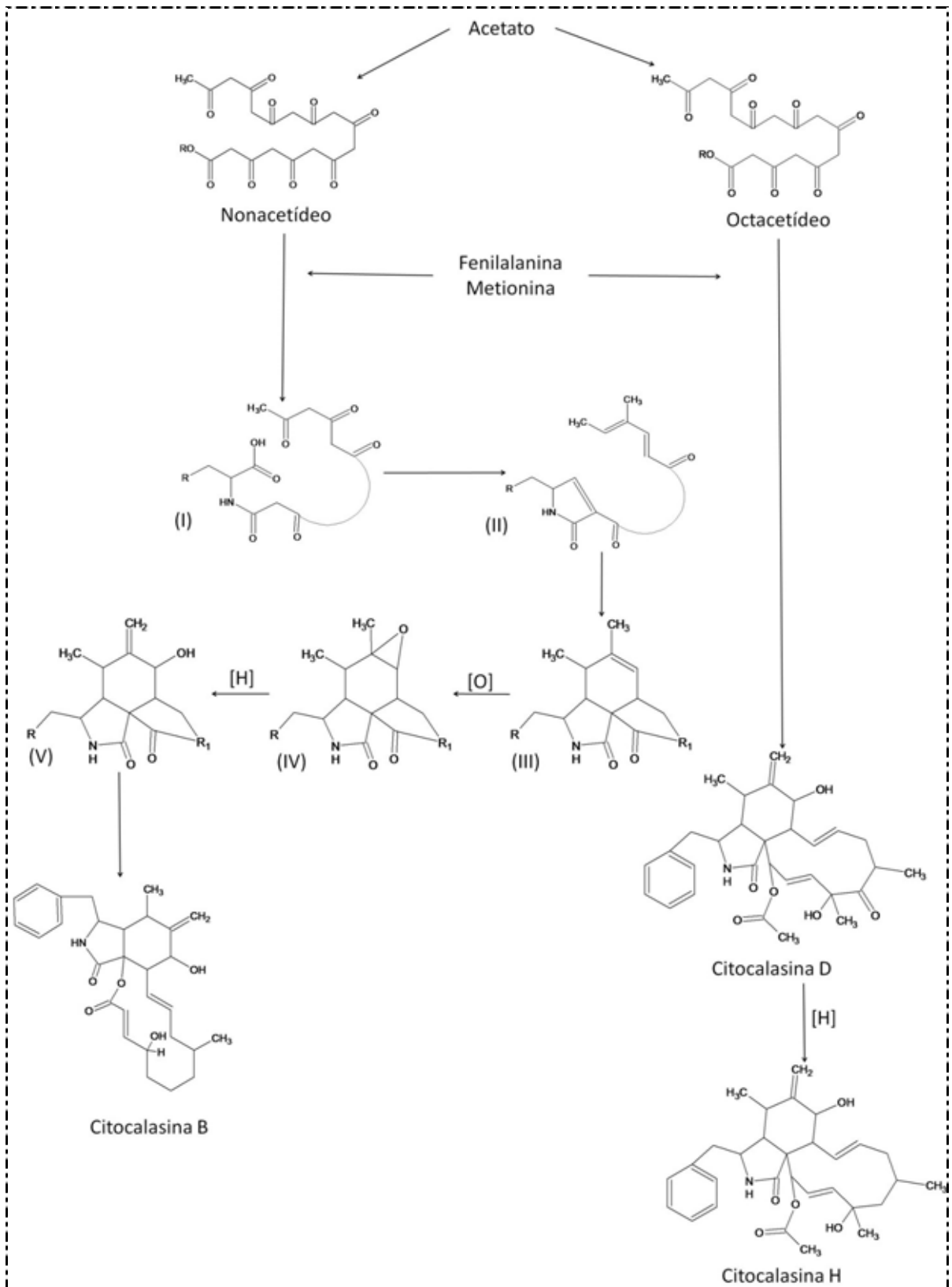
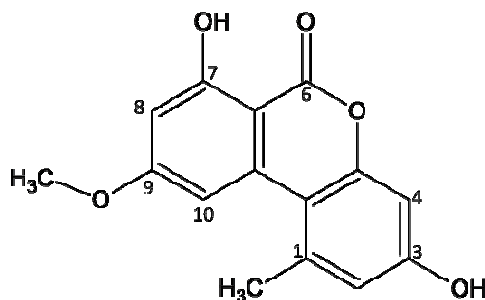


Figura 29 - Rota biosintética das citocalasinas B, D e H

3.4.11 Identificação estrutural da substância **11** (*Alternariol monometil éter*)



A substância **11** foi submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 83**, pág. 161) apresentou sinais em δ_{H} 6,62 (*d*, 2,0Hz), δ_{H} 7,23 (*d*, 2,0Hz), δ_{H} 6,65 (*d*, 2,5 Hz) e δ_{H} 6,72 (*d*, 2,5 Hz), evidenciando dois sistemas aromáticos de acoplamento *meta*, sugerindo dois anéis aromáticos tetrassubstituídos. Foi observado também um sinal em δ_{H} 2,75 (*s*), atribuído a uma metila benzílica, um sinal em δ_{H} 3,92 (*s*) a uma metoxila aromática.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 84**, pág. 162) apresentou sinais de doze carbonos, e incluindo uma metila aromática, além de um sinal em δ_{C} 166,6 característicos de uma carbonila de éster conjugado.

O espectro de massas obtido em alta resolução (ESI-EM, modo negativo) (**Figura 85**, pág. 163) apresentou o íon em m/z 271,0497 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) o que, associado aos dados de RMN de ^{13}C , permitiu estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

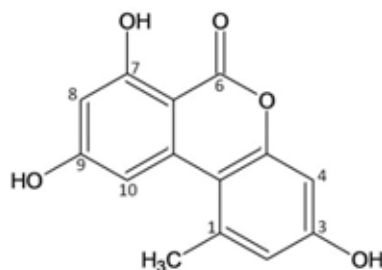
A posição da metoxila foi atribuída pela análise dos espectros de NOESY-1D (**Figura 86**, pág. 164), onde foi observado a correlação entre δ_{H} 3,92 \leftrightarrow δ_{H} 6,62/7,23 evidenciando que a metoxila esta ligada em C-9. Esses dados associados a um detalhado levantamento bibliográfico, permitiram atribuir à substância **11** a estrutura do alternariol monometil éter (AME) (TAN et al., 2008; GU, 2009).

Esse metabólito está associado principalmente a fungos patogênicos, sendo conhecido por ser tóxico a muitas espécies de animais e apresentar propriedades mutagênicas e genotóxicas (OSTRY, 2008).

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , e HMBC (DMSO- d_6) de **11** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_{H}	δ_{C}
1	-	138,4
2	6,72 (<i>d</i> , 2,5)	101,6
3	-	158,6
4	6,65 (<i>d</i> , 2,5)	117,6
5	-	152,6
6	-	166,6
6a	-	98,5
7	-	164,1
8	6,62 (<i>d</i> , 2,0)	99,2
9	-	164,6
10	7,23 (<i>d</i> , 2,0)	103,4
10a	-	137,8
10b	-	108,8
Me-C1	2,75 (<i>s</i>)	24,9
OMe-C9	3,92 (<i>s</i>)	55,8

3.4.12 Identificação estrutural da substância **12** (*Alternariol*)



A substância **12** apresentou um perfil espectral praticamente idêntico a **11**, diferente apenas na ausência da metoxila aromática, sugerindo a mesma classe de substâncias e, foi identificada pelas análises de RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensionais e espectrometria de massas.

O espectro de massas de alta resolução (ESI-EM, modo negativo) (**Figura 91**, pág. 169) apresentou íon molecular em m/z 257,0206 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), que permitiu estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

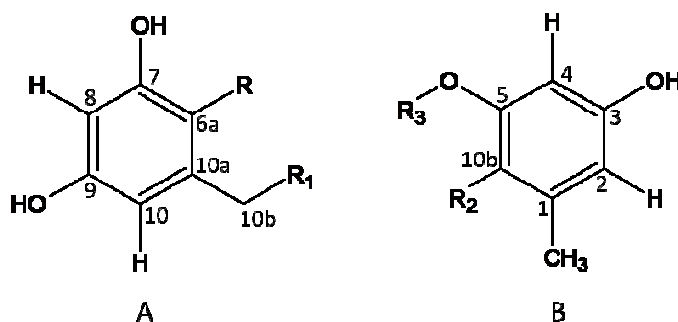
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 87**, pág. 165) apresentou sinais em δ_{H} 6,35 (*d*, $J=2,5\text{Hz}$; δ_{C} 100,9); 6,62 (*d*, $J=2,5\text{Hz}$, δ_{C} 101,6); 6,70 (*d*, $J=2,5\text{Hz}$, δ_{C} 117,5) e 7,22 (*d*, $J=2,5\text{Hz}$, δ_{C} 104,4), evidenciando um acoplamento *meta*, o que sugeriu a presença de dois

anéis aromáticos tetrassubstituídos. Foi observado ainda um singlete em 2,70 (s, δ_C 25,2, 3H), sugerindo a presença de uma metila aromática.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 88**, pág. 166) apresentou 12 sinais na região de aromáticos, sugerindo dois anéis benzílicos, uma metila benzílica, e um sinal em δ_C 164,7 que foi atribuído a uma carbonila pela comparação com a literatura (GU, 2009).

Os hidrogênios foram atribuídos aos seus respectivos carbonos pelos mapas de contorno do experimento HMQC.

As correlações observadas a longa distância em HMBC (**Figura 89** e **Figura 90**, pág. 167) entre H-8 \leftrightarrow C-10/C-6a e H-10 \leftrightarrow C-6a/C-8/C-9 /C-10b permitiram atribuir a estrutura A para a substância **12**, e as correlações entre H-2 \leftrightarrow C-10b/C-4/C-Me o H-4 \leftrightarrow C-2/C-3/C-5 e H-Me \leftrightarrow C-1/C-2/C10b permitiram atribuir a estrutura B para a substância **12**.



Com essas correlações observadas foi atribuída a esta substância a estrutura do alternariol. A presença de um grupo carboxila localizada no carbono 6 foi sugerida pelo espectro de massas e consulta a literatura (GU, 2009; ALY et al., 2008).

O alternariol é uma micotoxina conhecida, frequentemente encontrado em produtos alimentares contaminados com *Alternaria alternata*. O consumo destes alimentos foi associado a uma maior incidência de câncer de esôfago (PFEIFFER et al., 2007).

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H (500MZ) e ^{13}C (125MZ) em $\text{DMSO-}d_6$, de **12** (δ em ppm)

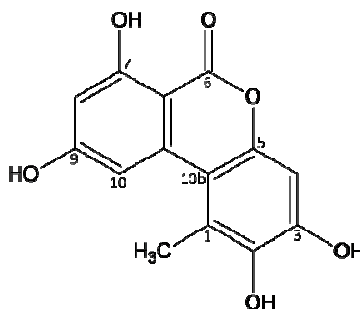
	δ_{H}	δ_{C}
1	-	138,3
2	6,70 (<i>d</i> , 2,5Hz)	117,5
3	-	158,4
4	6,62 (<i>d</i> , 2,5Hz)	101,6
5	-	152,6
6	-	164,1
6a	-	97,3
7	-	164,7
8	6,35 (<i>d</i> , 2,5Hz)	100,9
9	-	165,6
10	7,22 (<i>d</i> , 2,5Hz)	104,4
10a	-	138,1
10b	-	108,9
Me-C1	2,70 (<i>s</i>)	25,2

Essas duas últimas substâncias são descritas como micotoxinas da classe do alternariol. A presença destas micotoxinas em ambientes naturais, bem como em gêneros alimentícios, é descrito como um problema na agricultura. De acordo com FAO (Food and Agriculture Organization), aproximadamente 25% dos alimentos colhidos no mundo são contaminados com micotoxinas. Nos últimos anos tem se dado maior atenção à presença de micotoxinas da espécie *Alternaria*, principalmente porque alguns desses metabólitos secundários como o alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) são tóxicos a humanos e animais (MAGNANI et al., 2007) e são responsáveis por estragarem grãos, frutas e vegetais (WATANABE et al., 2007).

As micotoxinas AOH e AME são mutagênicas em bactérias e células de mamíferos. O AME causa mudanças na mucosa do esôfago de ratos. Suspeita-se que esses metabólitos estejam associados ao câncer de esôfago humano (WATANABE et al., 2007).

Essas micotoxinas já foram isoladas do gênero *Phomopsis* (DAI et al., 2005), sendo o isolamento dessas bastante interessante, pois sugerem que devam estar exercendo um papel ecológico na espécie hospedeira, possivelmente protegendo-a contra possíveis predadores.

3.4.13 Identificação estrutural da substância **13** (2-hidroxi-Alternariol)



A substância **13** foi submetida a análise de RMN de ^1H uni e bidimensionais e espectrometria de massas.

A diferença do espectro de RMN de ^1H (**Figura 92**, pág. 170) desta substância para o da substância **12** (**Figura 87**, pág. 165) foi apenas o desaparecimento de um sinal na região aromática, evidenciando tratar-se de um derivado do alternariol.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamentos em 7,26 (*d*, $J=2,0\text{Hz}$;) e 6,34 (*d*, $J=2,0\text{Hz}$;) evidenciando um sistema aromático com acoplamento *meta*, sugerindo um anel tetrassubstituído. A análise do espectro em COSY (**Figura 93**, pág. 171) demonstrou correlação entre esses dois hidrogênios.

No espectro de RMN de ^1H foi observado ainda um singlete em δ_{H} 6,68 sugerindo um segundo anel aromático na estrutura da substância **13**, e uma metila em δ_{H} 2,58 (*s*, δ_{C} 18,8), que, pelo deslocamento químico, foi atribuída a uma metila aromática.

As correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 94**, pág. 172) entre H-8 \leftrightarrow C-6a/C-7/C-10; H-10 \leftrightarrow C-6a/C-8/C-9 e H-4 \leftrightarrow C-2/C-3/C-10b reforçam a substância **13** como sendo um derivado do alternariol.

O espectro de massas de alta resolução (ESI-MS, modo negativo) (**Figura 96**, pág. 174) apresentou o íon em m/z 273,0363 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) que, em conjunto com os dados de RMN de ^{13}C permitiu estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$. Com estas observações e através da comparação dos dados com a literatura sugeriu-se tratar-se de um produto de oxidação do alternariol (PFEIFFER et al., 2007; ALY et al., 2008).

A posição da oxidação foi atribuída pela análise dos espectros em NOESY (**Figura 95**, pág. 173) onde foi observada apenas a correlação do hidrogênio δ_{H} 7,26 com a metila em δ_{H} 2,58.

Essa substância é relatada apenas como produto de oxidação do alternariol, o 2-hidroxi-alternariol (PFEIFFER et al., 2007). Tanahashi et al. (2003) isolou de *Graphis cognata* derivados oxidados do alternariol (grafislactonas), tendo ele sugerindo que esses derivados possam ser biossintetizados a partir do alternariol ou do alternariol monometil éter,

uma vez que estes foram isolados da mesma fração. Não foram encontrados relatos do metabólito **13** como produto de micro-organismos, e nem dados de RMN disponíveis foram encontrados. Este é o primeiro relato de **13** como produto natural.

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) de **13** (δ em ppm e J em Hz)

	δ_{H}	δ_{C}
1	-	122,0
2	-	148,2
3	-	144,8
4	6,68 (s)	110,6
5	-	*
6	-	*
6a	-	97,4
7	-	164,4
8	6,34 (d, 2,5Hz)	100,5
9	-	165,0
10	7,26 (d, 2,5Hz)	104,1
10a	-	*
10b	-	141,4
Me-C1	2,58 (s)	18,8

* Carbonos não identificados.

As curvas no UV das substâncias identificadas neste trabalho foram comparadas com os seus respectivos extratos brutos branco, evidenciando que as mesmas foram produzidas pelo fungo endofítico e não isoladas do próprio meio de cultivo.

A biossíntese de compostos fenólicos produzidos por micro-organismos é derivada de condensações de unidades de acetato, envolvendo oxidações, reduções, descarboxilações etc. (ABELL et al., 1982). A síntese do alternariol já é bastante conhecida, a rota biossintética (**Figura 30**) mostra a condensação de sete unidades de acetato (THOMAS, 1961; ZHANG, et al., 2007).

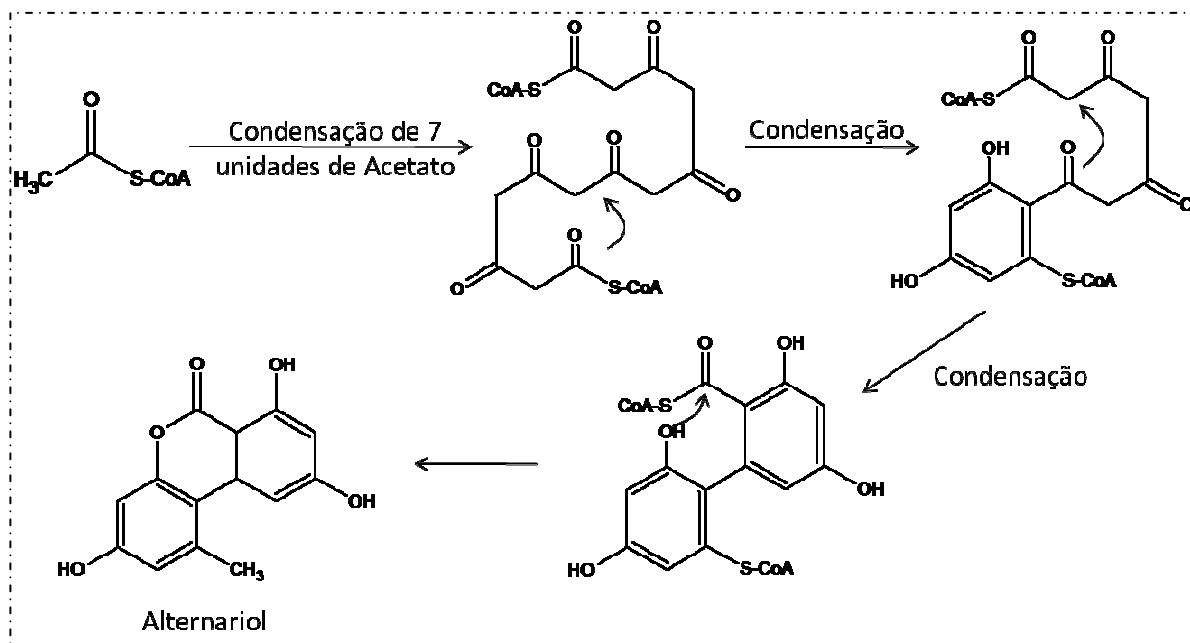


Figura 30 - Rota biossintética do alternariol

3.5 Resultados obtidos dos ensaios biológicos realizados com as substâncias puras

3.5.1 Atividade antifúngica

As substâncias que apresentaram massa suficiente e não estavam em mistura com outros metabólitos, foram submetidas aos bioensaios por bioautografia contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (item 2.10, pág. 48).

Na **figura 31** estão ilustrados as cromatoplacas onde foram realizados os bioensaios com as substâncias puras e os dois fungos fitopatogênicos.

Apenas a Citocalasina H apresentou atividade antifúngica contra o fungo *C. cladosporioides* com limite de detecção de 25 μg .

Essa atividade pode estar associada a uma simbiose entre o fungo endofítico e a espécie hospedeira, onde esses micro-organismos possam produzir metabólitos antifúngicos para sua autodefesa e para defesa da planta contra outros micro-organismos fitopatogênicos.

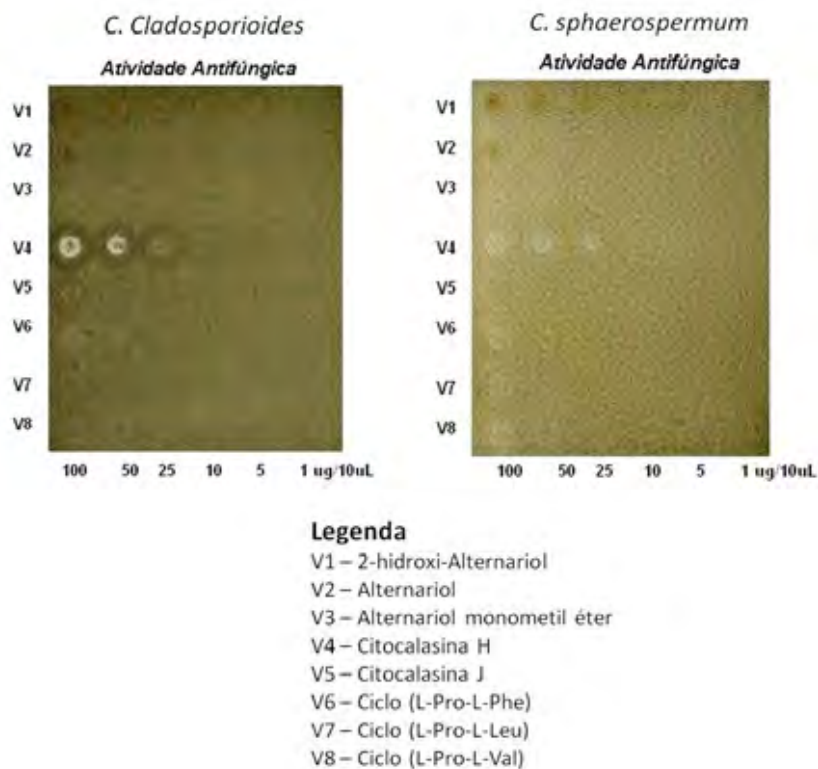


Figura 31 – Bioensaio por bioautografia para as substâncias puras

3.5.2 Atividade anticolinesterásica

As mesmas substâncias que foram enviadas ao bioensaio antifúngico também foram submetidas para avaliação da atividade anticolinesterásica.

O método utilizado está descrito no item 2.11 pág. 48. Manchas brancas na cromatoplaca são evidências de atividade anticolinesterásica em potencial.

Na **figura 32** está ilustrada a cromatoplaca obtida do ensaio anticolinesterásico.



Figura 32 – Cromatoplaca do ensaio anticolinesterásico

Para as substâncias que apresentaram atividade positiva para 100 μg foi realizado o ensaio de limite de detecção (**Figura 33**).

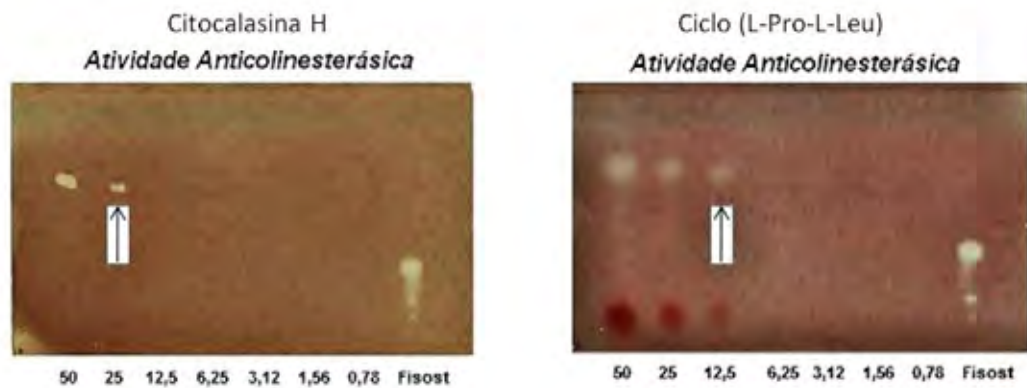


Figura 33 - Limite de detecção no ensaio anticolinesterásico para a Citocalasina H e *Ciclo*(L-Pro-L-Leu)

O limite de detecção obtido para a Citocalasina H foi de 25 μg e para a dicetopiperazina *ciclo*(L-Pro-L-Leu) foi de 12,5 μg . Essas foram as únicas substâncias testadas que apresentaram atividade anticolinesterásica, evidenciando a potencialidade bioativa desses metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis* sp.

CONCLUSÕES

E

REFERÊNCIAS

4 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu dar continuidade aos estudos com fungos endofíticos de espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica. Os dados químicos e biológicos desta linhagem, cultivada em pequena escala, evidenciaram este micro-organismo como uma fonte promissora de substâncias potencialmente bioativas.

Com o cultivo e obtenção dos extratos brutos nos diferentes meios de cultivo e pela análise dos espectros de RMN de ^1H e dos cromatogramas por CLAE-DAD, notou-se uma variação na produção metabólica de *Phomopsis* sp., quando mudou-se o meio de cultivo, confirmando a dependência da produção dos metabólitos com a composição dos nutrientes no meio. Os extratos obtidos dos meios sólidos apresentaram um rendimento em massa maior que os meios líquidos comerciais.

Observamos também que o fungo endofítico *Phomopsis* sp. é um excelente produtor de metabólitos potencialmente bioativos. Os estudos da produção e isolamento dos metabólitos produzidos por *Phomopsis* sp, conduziu ao isolamento/identificação de 13 substâncias. As substâncias identificadas da classe de dicetopiperazinas não são descritas neste gênero, sendo este o primeiro relato. No entanto, apresentam uma grande variedade de bioatividade, principalmente antimicrobiana, o que pode estar envolvido com a ecologia química da espécie vegetal, na proteção desta contra possíveis patógenos.

As micotoxinas identificadas da classe do alternariol já foram relatadas no gênero *Phomopsis* e são descritas por apresentarem atividade mutagênica e genotóxica. O isolamento dessas micotoxinas é bastante interessante, pois sugerem que exerçam um papel ecológico na espécie hospedeira, possivelmente protegendo-a contra possíveis predadores.

As demais substâncias identificadas são conhecidas e descritas por apresentarem potencialidades biológicas, como antifúngicas, antitumorais, antibacterianas, entre outras.

Os resultados encontrados até o momento reforçam a suposição das interações ecológicas entre estes micro-organismos e as espécies vegetais, devido à potencialidade biológica descrita para as substâncias isoladas/identificadas.

REFERÊNCIAS

- ABELL, C.; GARSON, M. J.; LEEPER, F. J.; STAUNTON, J. Biosynthesis of the fungal metabolites alternariol, mullein, rubrofusarin, and 6-methylsalicylic acid from CD₃CO₂H. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 17, p. 1011-1013, 1982.
- ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and know diketopiperazines from the caribbean sponge, *Calyx* CF. *Podatyda*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR., C.; MARANDA, A. L. P.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Antinoceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795-799, 2003.
- ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; INDRIANI, I. D.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHACHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H. PROKSCH, P.; EBEL, R. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in Its host plant *Polygonum senegalense*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 972-980, 2008.
- ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; GUIMARÃES, D. P. Ocorrência de queima das folhas causadas por *Phomopsis* sp. em Aroeira no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 3, 640-650, 2001.
- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BENO, M. A.; COX, R. H.; WELLS, J. M.; COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; CHRISTOPH, G. G. Structure of a new [11] cytochalasin, cytochalasin H or kodo-cytochalasin-1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 12, p. 4123-4130, 1977.
- BHAKTA, T.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, S. C.; MAITY, T. K.; PAL, M.; SAHA, B. P. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cassia fistula* leaf extract. **Journal Ethnopharmacology**, v. 66, p. 277-282, 1999.
-
-

- BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical Mycology: Micromycetes**, v. 2, p. 165-194, 2002.
- BLICHARSKA, B.; KUPKA, T. Theoretical DFT and experimental NMR studies on uracil and 5-fluorouracil. **Journal of Molecular Structure**, v. 613, p. 153-166, 2002.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929-5934, 1995.
- BOTTALICO, A.; CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; RANDAZZO, G.; VURRO, M. Cytochalasins: structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 93-96, 1990.
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.
- CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris***. 2007. 252 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENING, L. H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CAMPO, V. L.; MARTINS, M. B.; SILVA, C. H. T. P.; CARVALHO, I. Novel and facile solution-phase synthesis of 2,5-diketopiperazines and *O*-glycosylated analogs. **Tetrahedron**, v. 65, p. 5343-5349, 2009.
- CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* dc. Prodr.(Rubiaceae)**. 2003. 224 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- CHEN, M. Z.; DEWIS, M. L.; KRAUT, K.; MERRITT, D.; REIBER, L.; TRINNAMAN, L.; COSTA, N. C. 2,5-Diketopiperazines (cyclo dipeptides) in Beef: identification, synthesis, and sensory evaluation. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 100-105, 2009.
- CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic Acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1103-1105, 2005.
-
-

-
- CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive by high resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 283-292, 2009.
- COLLADO, I. G.; GARCIA-PAJÓN, C. M.; HERMANDEZ-GALAN, R. Biotransformations by *Colletotrium* species. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, p. 1229-1239, 2003.
- DAÍ, J.; KROHN, K.; FLORKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biaryl ethers, Phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 23, p. 5100-5105, 2005.
- DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9/10, p. 71-76, 2004.
- DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potencial of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potencial**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. Cap. 3, p. 49-80.
- ELSASSER, B.; KROHN, K.; FLORKE, U.; ROOT, N.; AUT, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S.; KURTÁN, T. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of Phomoxanthone A. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 21, p. 4563-4570, 2005.
- FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHES, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.
- FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1448-1253, 2005.
- GIL-TURNES, M. S.; FENICAL, W. Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. **The Biological Bulletin**, v. 182, p. 105-108, 1992.
- GOMES, R. R. **Phomopsis spp. Endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa***. 2008. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
-

GU, W. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1677-1683, 2009.

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

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 188-194, 2009.

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

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HUSSIAN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTÁN, T.; KROHN, K. New Biactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus Azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 5, p. 749-756, 2009.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 261-264, 2003.

IZAWA, Y.; HIROSE, T.; SHIMIZU, T.; KOYAMA, K.; NATORI, S. Six new 10-phenyl-(11)cyclochalasans, cyclochalasins N-S from *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 45, n. 8, p. 2323-2335, 1989.

JAYASURIYA, H.; BILLS, G. F.; CASCALES, C.; ZINK, D. L.; GOETZ, M. A.; JENKINS, R. G.; SILVERMAN, K. C.; LINGHAM, R. B.; SINGH, S. B. Oreganic acid: a potent novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from an endophytic fungus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 17, p. 2081-2084, 1996.

JAYATILAKE, G. S.; THORNTON, M. P.; LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E.; BAKER, B. J. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 293-296, 1996.

KAMIKAWA, T.; HIGUCHI, F.; TANIGUCHI, M.; ASAKA, Y. Toxic metabolites of an unidentified filamentous fungus isolated from *Zinnia* Leaves. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 691-692, 1980.

LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 3232-3233, 1996.

LEPTOKARYDIS, I. H. **Busca de substâncias bioativas em fungos associados com a espécie *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae)**. 2008. 262 f. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

LI, J. Y.; STROBEL, G.; HARPER, J. K. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Organic Letters**, v. 2, n. 6, p. 767-770, 2000.

LI, Y.; LI, X.; KIM, S.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; RHO, J. R.; SON, B. S. Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 3, p. 375-376, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 1, p. 167.

MAGNANI, R.; SOUZA, G. D.; RODRIGUES FILHO, E. Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of Tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of alternaril brown spot. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4980-4986, 2007.

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

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de Cacaú *Theobroma cacao* L.** 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Setor de Agronomia, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

-
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.
- MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária/UFC, 2000. 344 p.
- MEHDI-BEN AMEUR, R.; MELLOULI, L.; CHABCHOUB, F.; FOTSO, S.; BEJAR, S. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolated *streptomyces* sp. us 24 strain. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 5, 2004.
- NITA, M.; ELLIS, M. A.; WILSON, L. L.; MADDEN, L. V. Evaluation of the curative and protectant activity of fungicides and fungicide–adjuvant mixtures on Phomopsis cane and leaf spot of grape: a controlled environment study. **Crop Protection**, v. 26, p. 1377-1384, 2007.
- ONDEYKA, J.; HENSENS, O. D.; ZINK, D.; BALL, R.; LINGHAM, R. B.; BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; GOETZ, M. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease, II. Isolation and structure. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 5, p. 679-685, 1992.
- OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-188, 2008.
- PARK, Y. C.; GUNASEKERA, S. P.; LOPEZ, J. V.; MCCARTHY, P. J.; WRIGHT, A. E. Metabolites from the Marine-derived fungus *Chromoclesista* sp. isolated from a deep-water sediment sample collected in the Gulf of Mexico. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 580-584, 2006.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, n. 29, 2002.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, p. 146-170; 290-329.
- PENMURUGAN, P.; BABY, U. I. Estimation of different cellular compounds from the mycelium of *Phomopsis theae*, causal agent of Phomopsis canker disease of tea. **Journal of Phytopathology**, v. 156, p. 358-361, 2008.
-

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves springer**. New York: Springer-Verlag, 1991. Cap. 9, p. 179-197.

PFEIFFER, E.; SCHEBB, N. L.; PODLECH, J.; METZLER, M. Novel oxidative *in vitro* metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 307-316, 2007.

PFENNING, L. H. **Introdução à micologia**. Lavras: Ed. UFLA, 2000. 38 p.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and coomabolites. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

PULICI, M.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H. Pestalotiopsis A and B: new caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus brevifolia*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 2122-2124, 1996.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

QI, S.; XU, Y.; XIONG, H.; QIAN, P.; ZHANG, S. Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp. F14. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 399-406, 2009.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants-systematics, ecology and evolution**. 2nd ed. Minnesota: APS Press, 1997. 223 p.

RIBEIRO, J. E. L. da S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; BRITO, J. M. de; SOUZA, M. A. D. de; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. da C.; SILVA, C. F. da; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1999. 800 p.

ROBERT, J.; TAMM, C. Biosynthesis of cytochalasans. Part 5. The incorporation of deoxaphomim into cytochalasin B (Phomin)¹. **Helvetica Chimica Acta**, v. 58, n. 8, p. 2501-2504, 1975.

SCHAWARZ, M.; KÖPCKE, B.; WEBER, R. W. S.; STERNER, O.; ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2239-2245, 2004.

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

SETO, Y.; KOGAMI, Y.; SHIMANUKI, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Production of phleichrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperadines of *Epichloe typhina*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1515-1519, 2005.

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

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Cardinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, na endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 307-314, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of prolific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D. Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1393-1398, 2008.

TAKAYA, Y.; FURUKAWA, T.; MIURA, S.; AKUTAGAWA, Y.; HOTTA, Y.; ISHIKAWA, N.; NIWA, M. Antioxidant constituents in distillation residue of Awamori Spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 75-79, 2007.

TAN, N.; TAO, Y.; PAN, J.; WANG, S.; XU, F.; SHE, Z.; LIN, Y.; JONES, E. B. G. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus no. 2240. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 3, p. 296-300, 2008.

TANAHASHI, T.; TAKENAKA, Y.; NAGAKURA, N.; HAMADA, N. 6H-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one derivatives from the cultured lichen mycobionts of *Graphis* spp. and their biosynthetic origin. **Phytochemistry**, v. 62, p. 71-75, 2003.

TAO, Y.; ZENG, X.; MOU, C.; LI, J.; CAI, X.; SHE, Z.; ZHOU, S.; LIN, Y. ¹H and ¹³C NMR assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 501-505, 2008.

THOMAS, R. Studies in the biosynthesis of Fungal metabolites. 2. The biosynthesis of Alternariol and its relation to other fungal phenols. **Biochemical Journal**, v. 78, p. 748-758, 1961.

TURNER, W. H.; ALDRIDGE, D. C. **Fungul Metubolites II**. London: Academic Press, 1983. p. 459-466.

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

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004a.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 27, p. 908-910, 2004b.

VIEGAS JUNIOR, C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.; MIRANDA, A. L. P. Antinociceptive profile of 2,3,6-trisubstituted piperidine alkaloids: 3-*O*-Acetyl-spectraline and semi-synthetic derivates of (-)-spectaline. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 407-412, 2008.

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MORREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.

WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutes*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1999.

WATANABE, I.; KAKISHIMA, M.; ADACHI, Y.; NAKAJIMA, H. Potential mycotoxin productivity of *Alternaria alternata* isolated from garden trees. **Mycotoxins**, v. 57, n. 1, p. 3-9, 2007.

WYSS, G. S.; CHARUDATTAN, R.; ROSSKOPF, E. N.; LITTELL, R. C. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a biocontrol agent for *Amaranthus* spp. **European Weed Research Society**, v. 44, p. 469-482, 2004.

XING, J.; YANG, Z.; BEIBEI, L.; XIANG, L. Rapid screening for cyclo-dopa and diketopiperazine alkaloids in crude extracts of *Portulaca oleracea* L. using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1415-1422, 2008.

XU, S.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; SHEN, Y.; DING, H.; TAN, R. X. Cytotoxic cytochalasin metabolites of endophytic *Endothia gyrosa*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 739-745, 2009.

YANG, L.; TAN, R.; WANG, Q.; HUANG, W.; YIN, Y. Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 6545-6548, 2002.

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

ZHANG, W.; WILKE, B. I.; ZHAN, J.; WATANABE, K.; BODDY, C. N.; TANG, Y. A new mechanism for benzopyrone formation in aromatic poliketide biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 30, p. 9304-9305, 2007.

Anexos

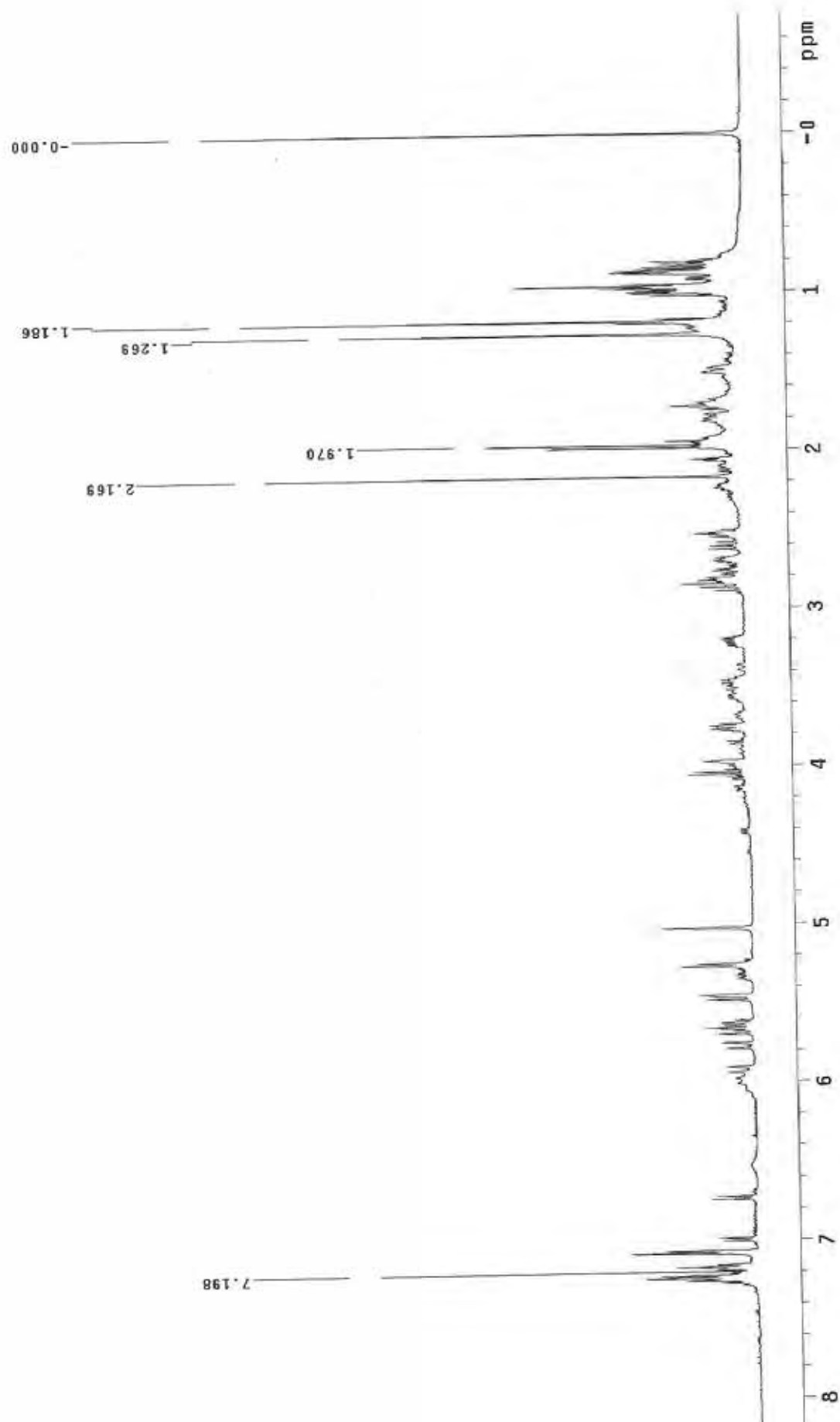


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em MDB

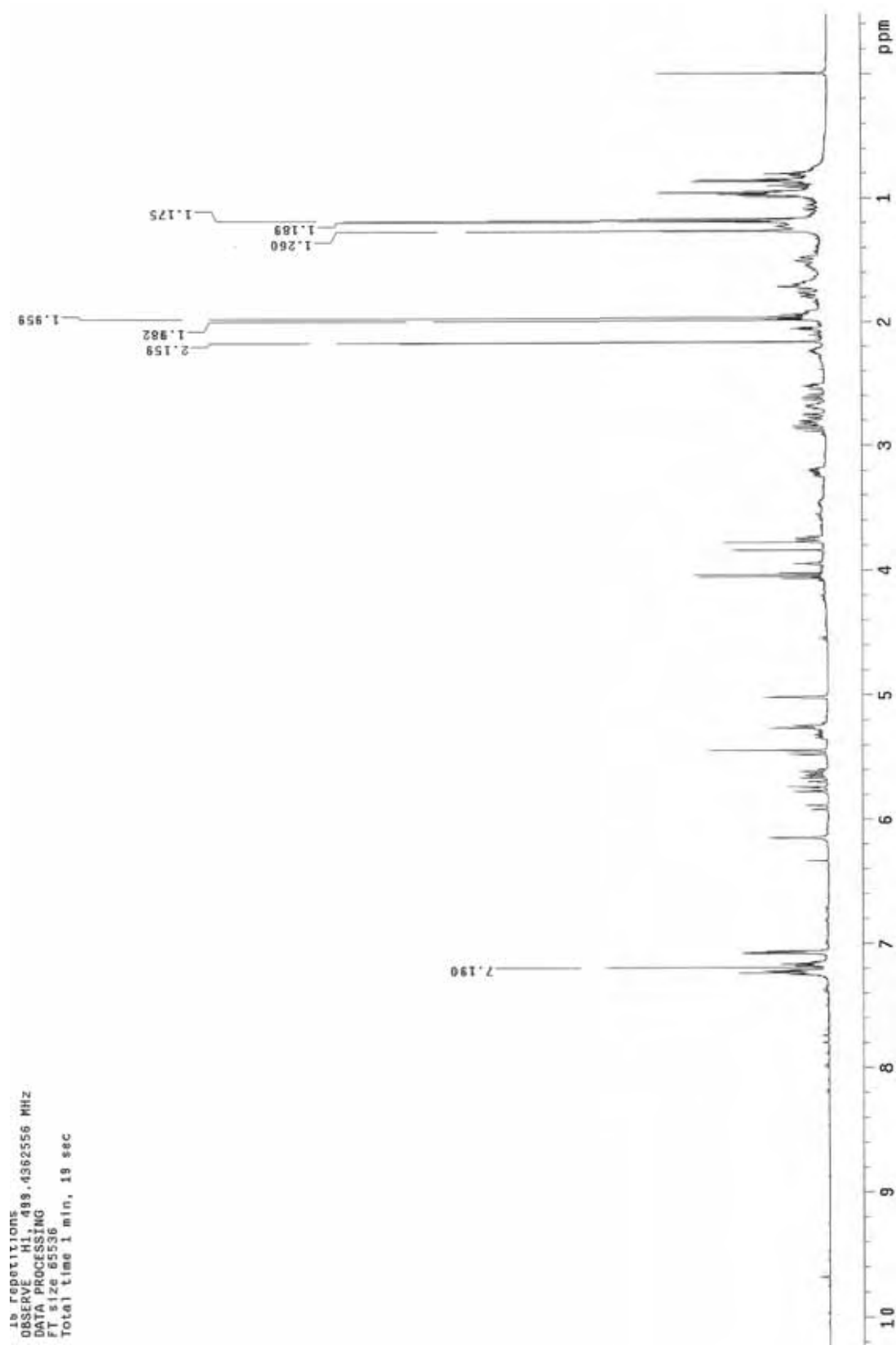


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em YM

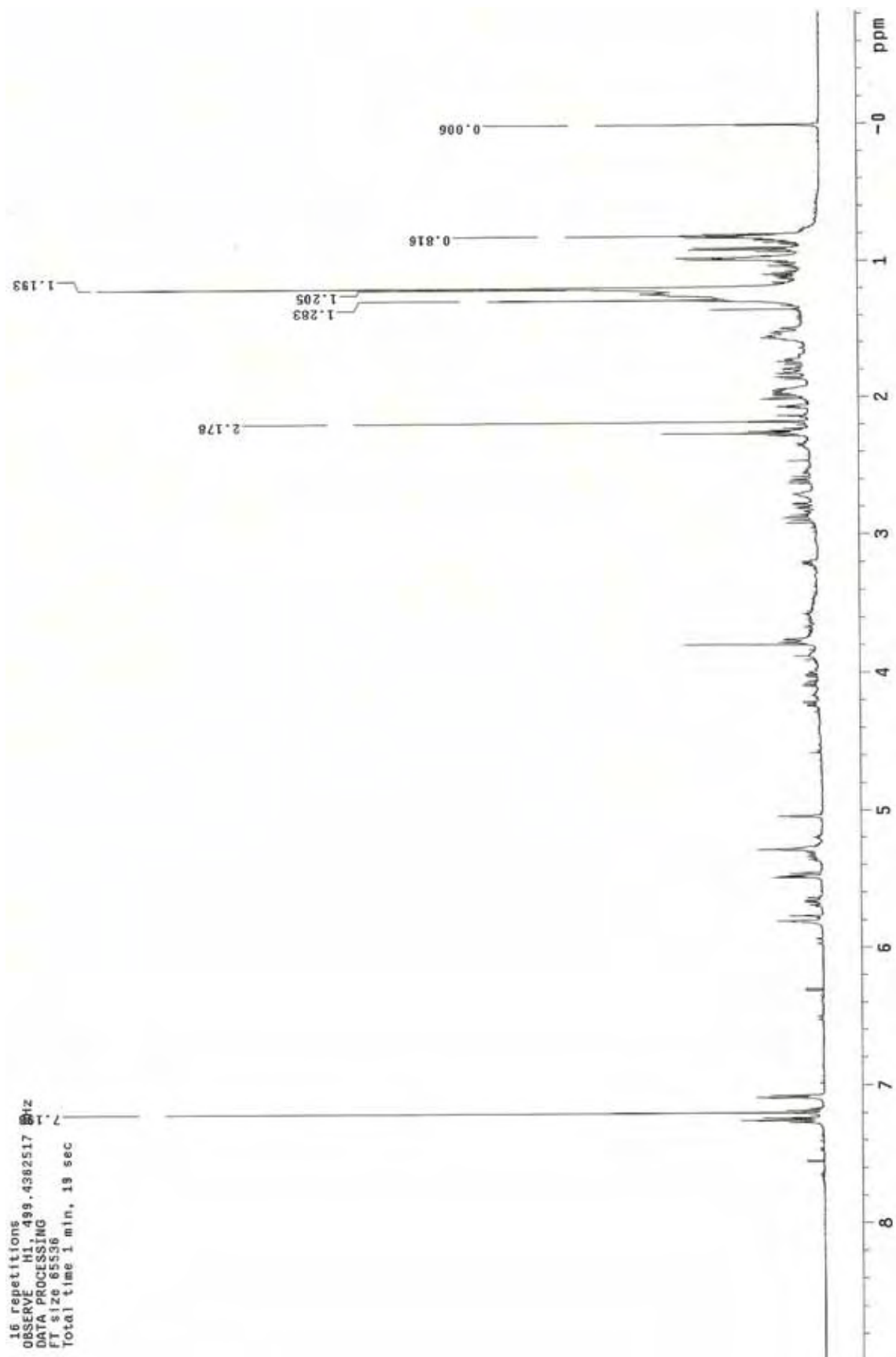


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em EM

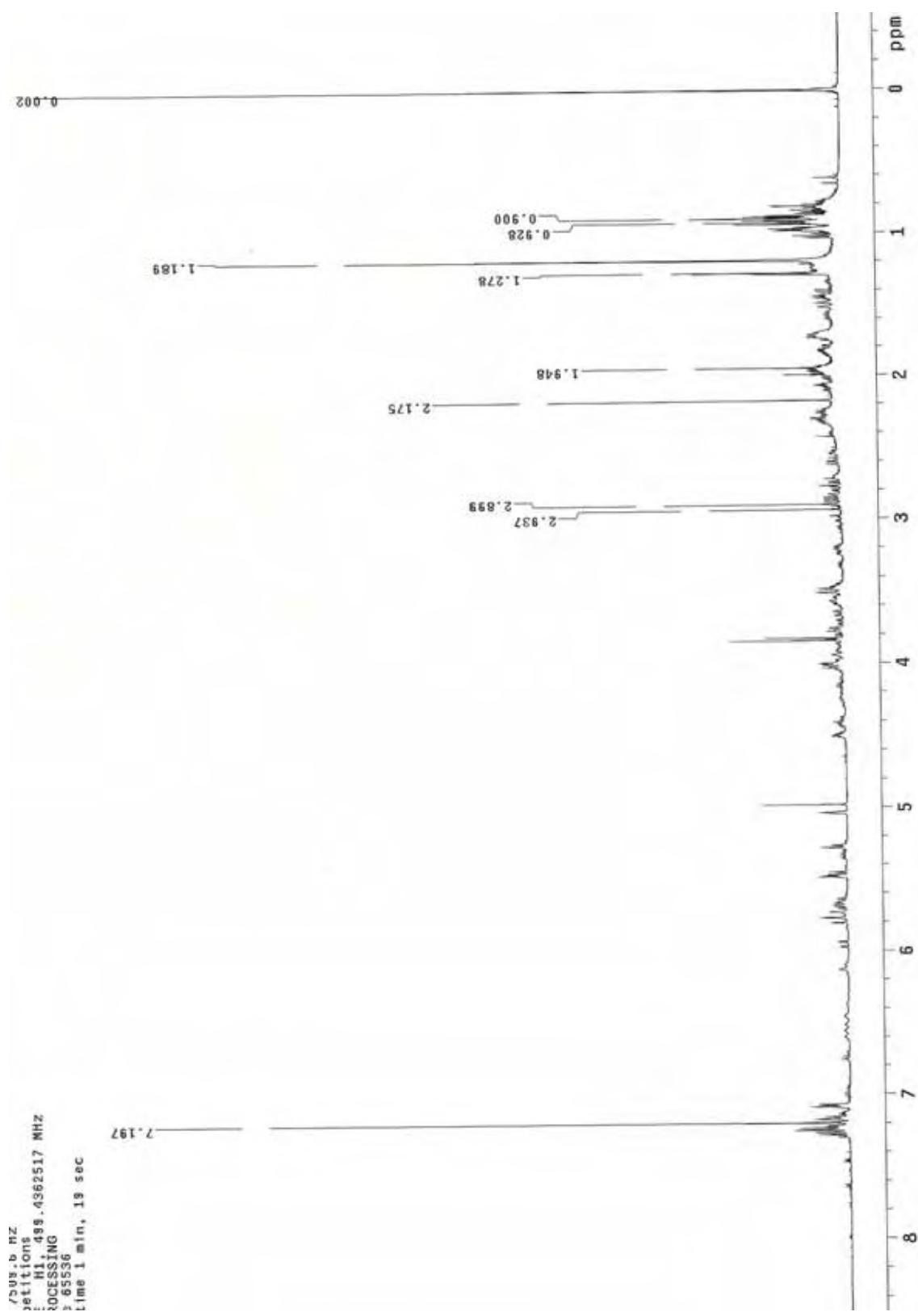


Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto em Nutriente

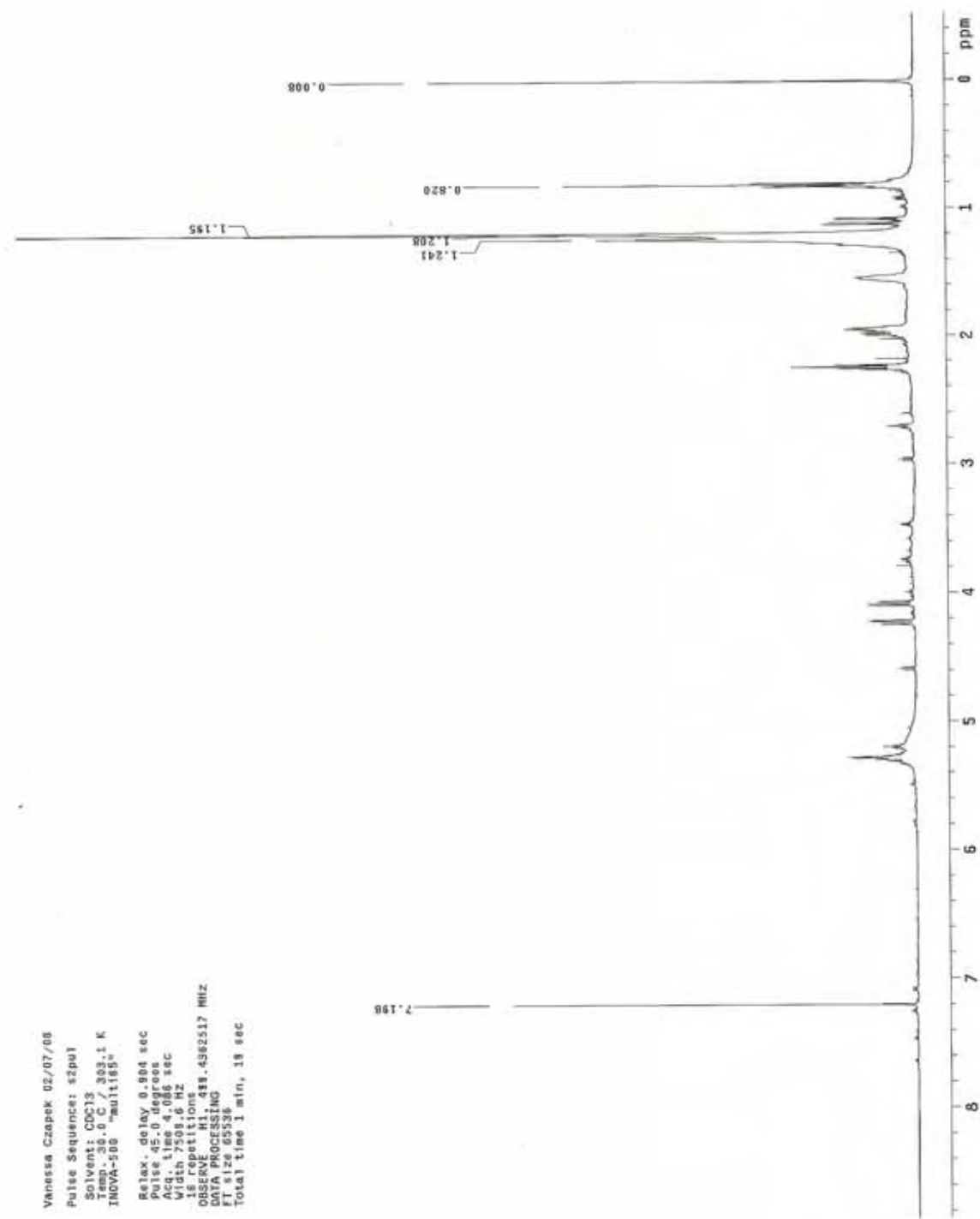


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto AcOEt em Czapek

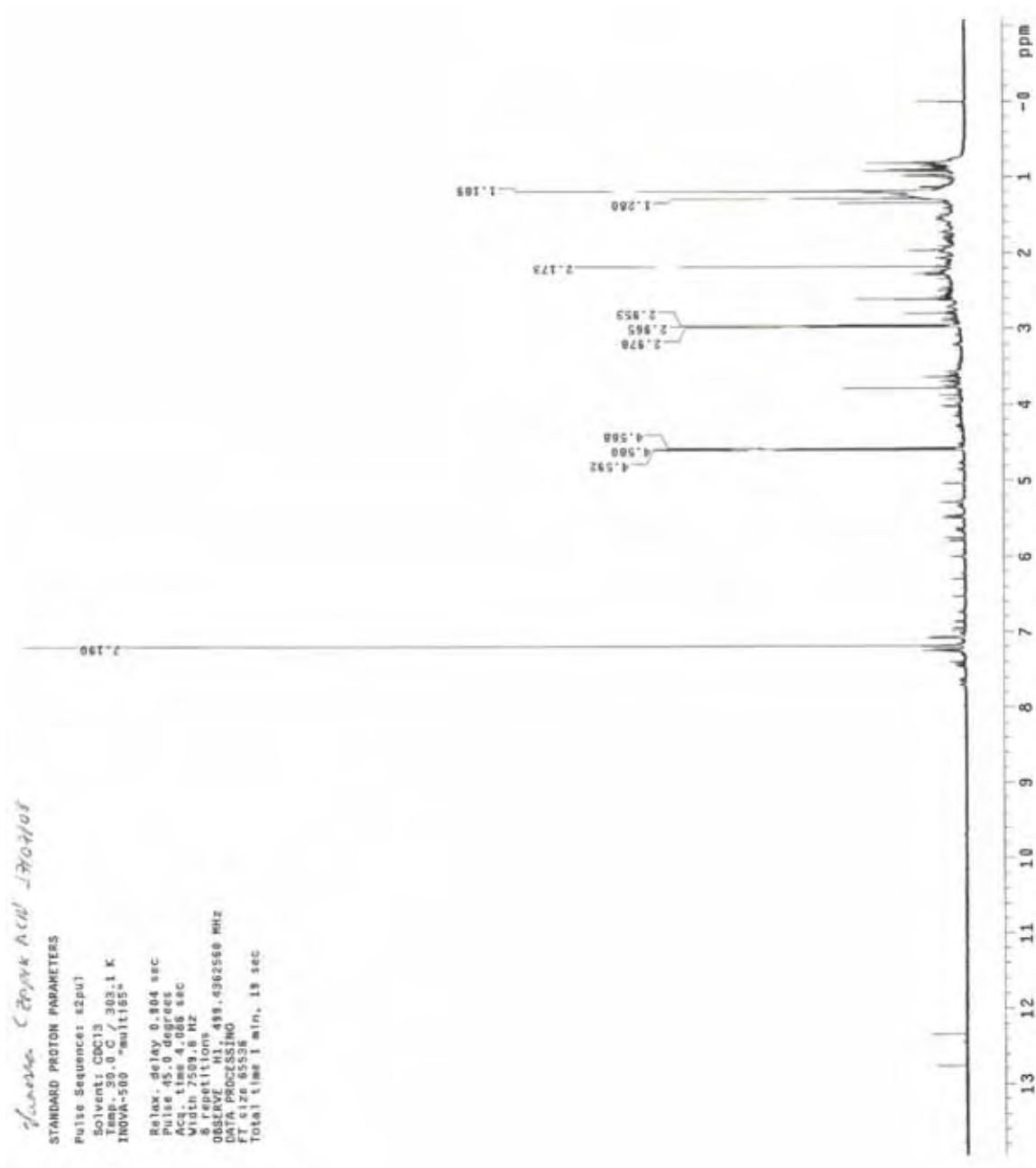


Figura 39 - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz) do extrato bruto ACN em Czapek

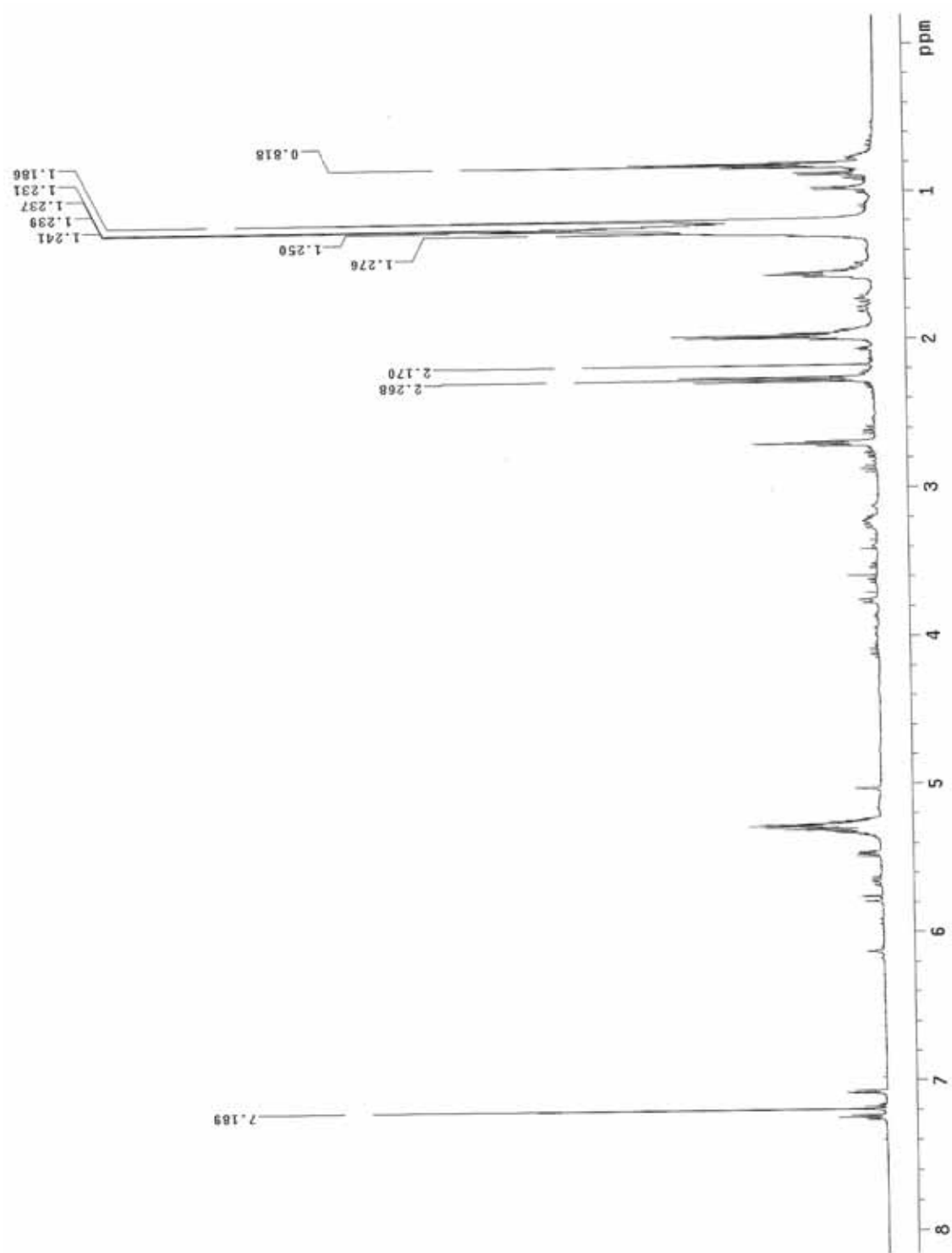


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do extrato bruto ACN em Milho

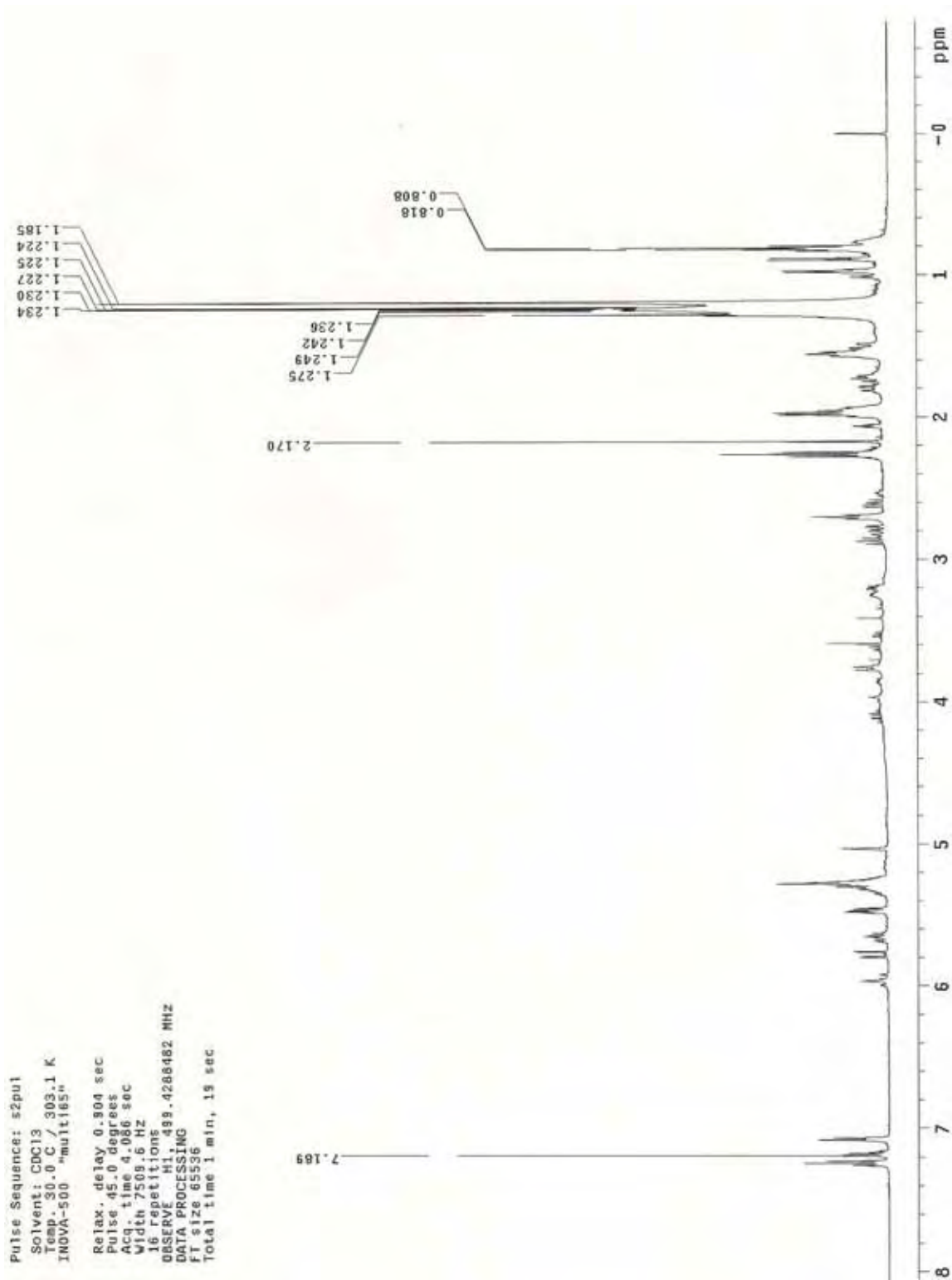


Figura 41 - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz) do extrato bruto ACN em Arroz

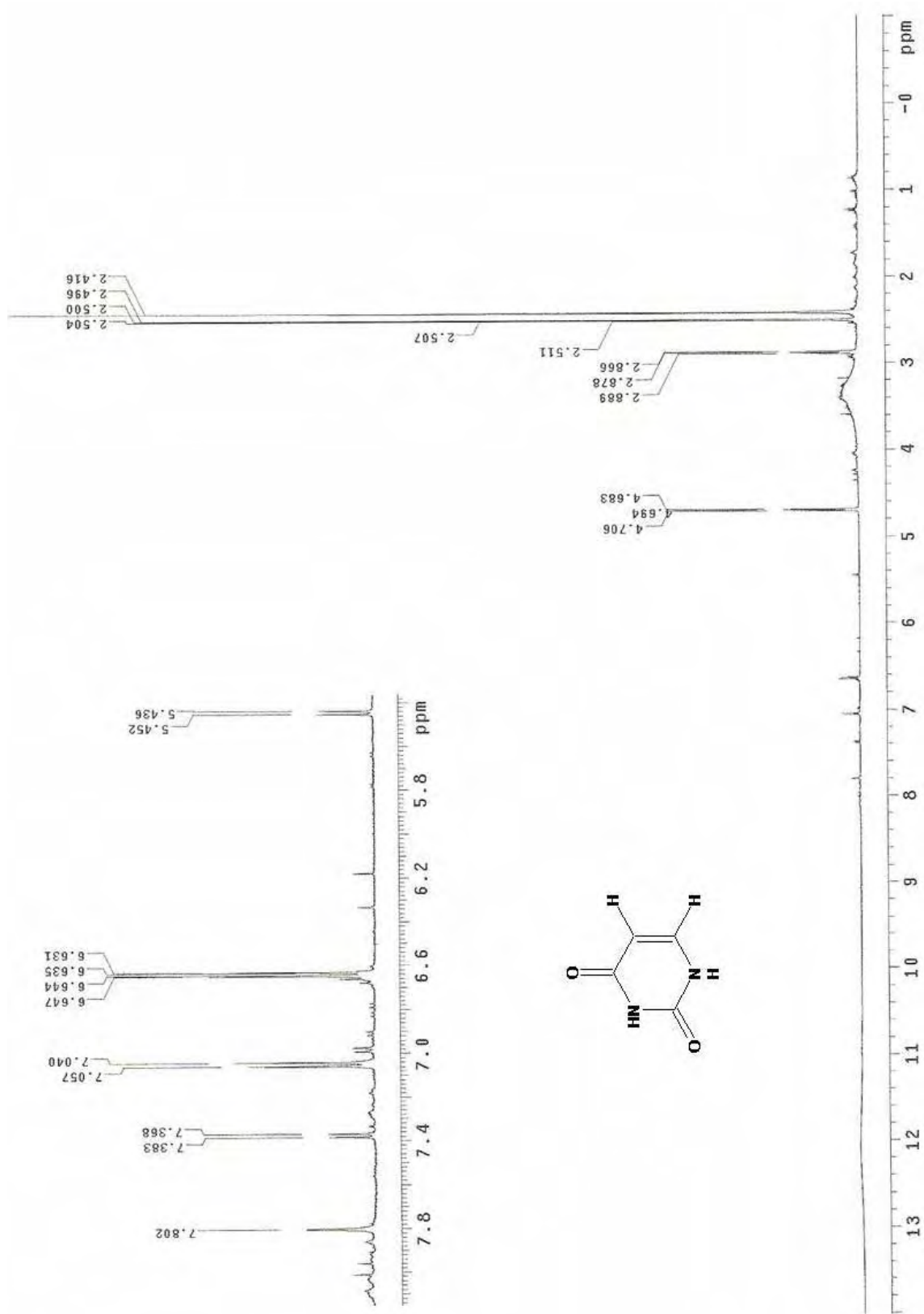


Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H de **01** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)

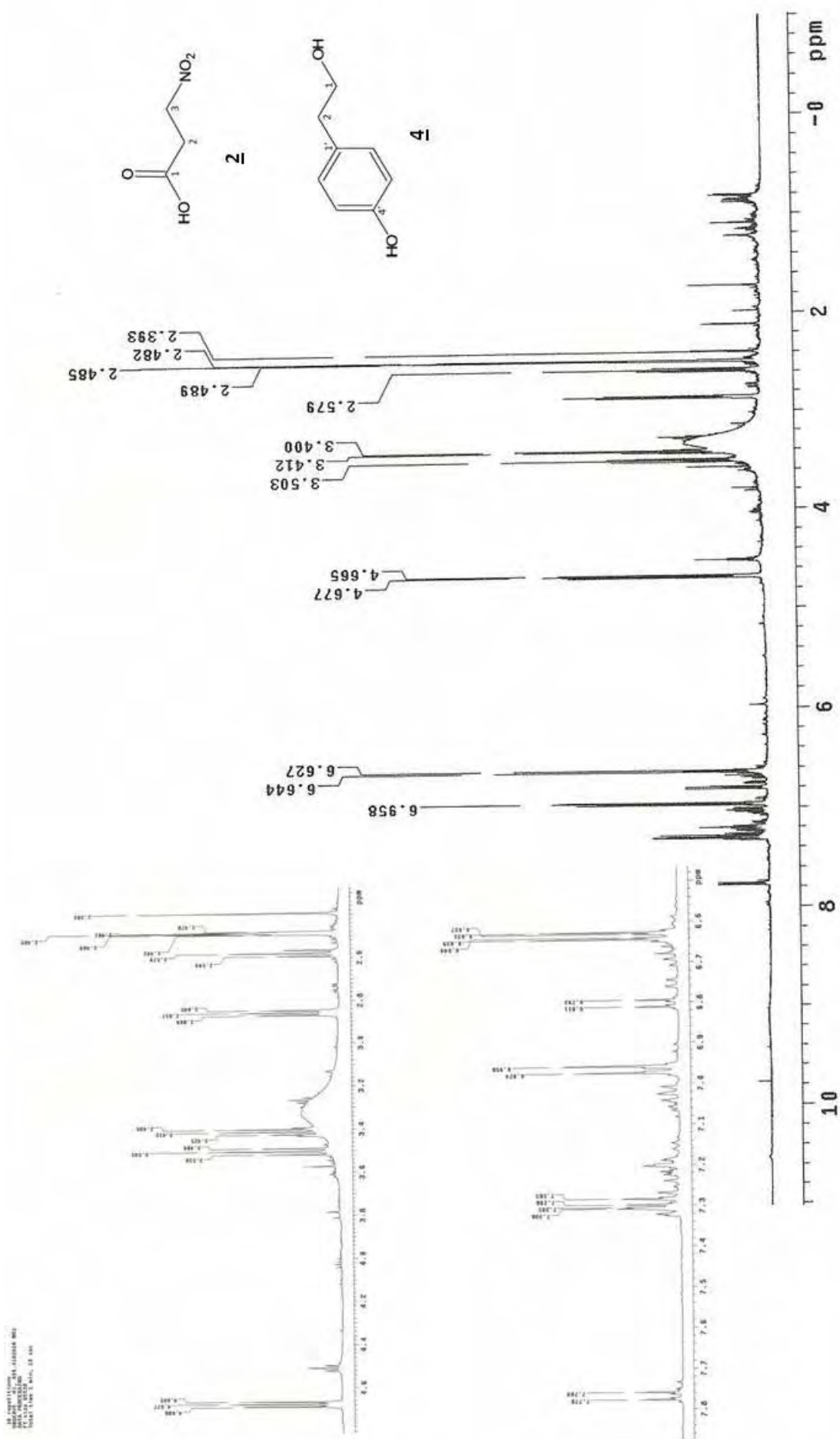


Figura 43 - Espectro de RMN de ¹H de **02** e **04** (DMSO-d₆, 500 MHz)

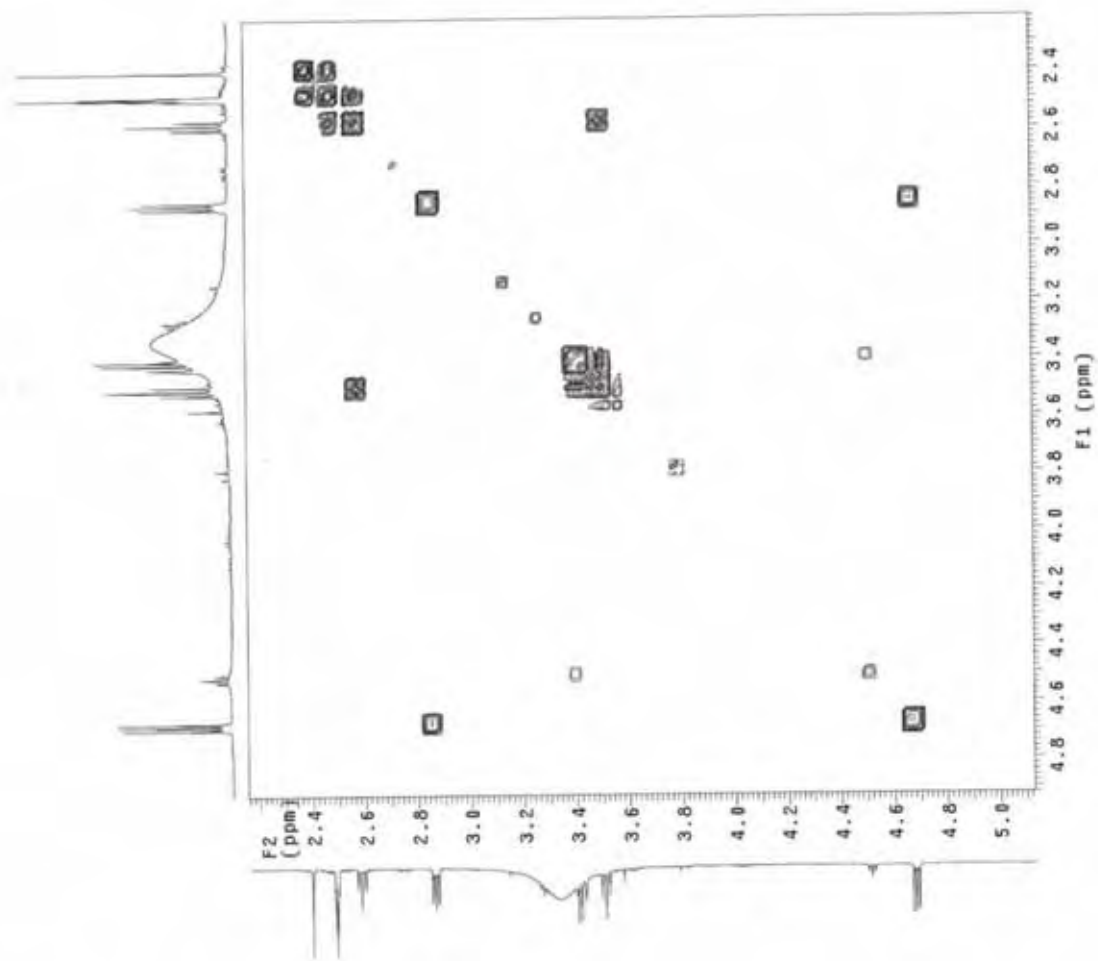


Figura 44 - Espectro de COSY ampliado (DMSO-*d*₆, 500 MHz) de **02** e **04**

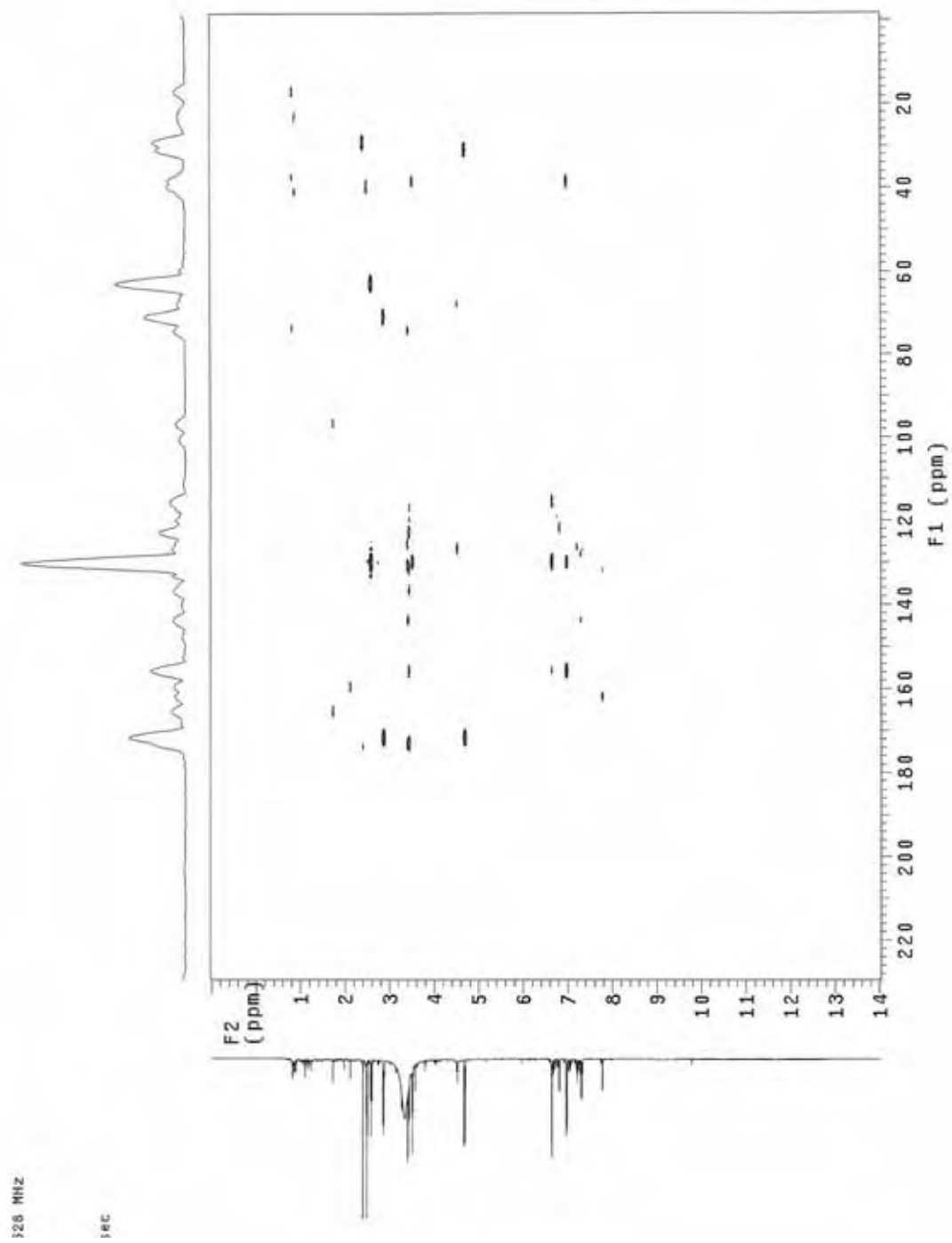


Figura 45 - Espectro do experimento HMBC (DMSO- d_6 , 500 MHz) de **02** e **04**

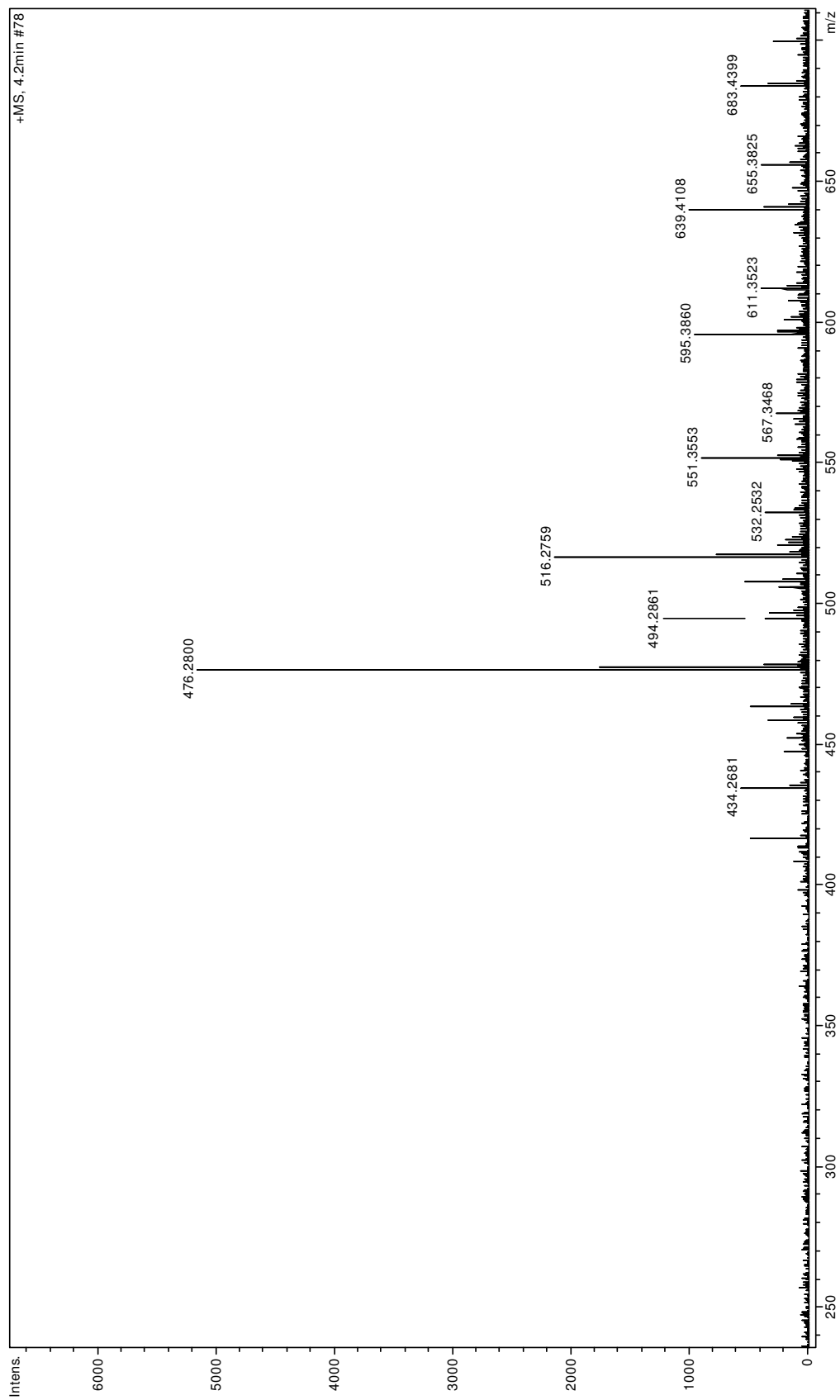


Figura 46 - Espectro de massas de **03** (ESI-EM, modo positivo)

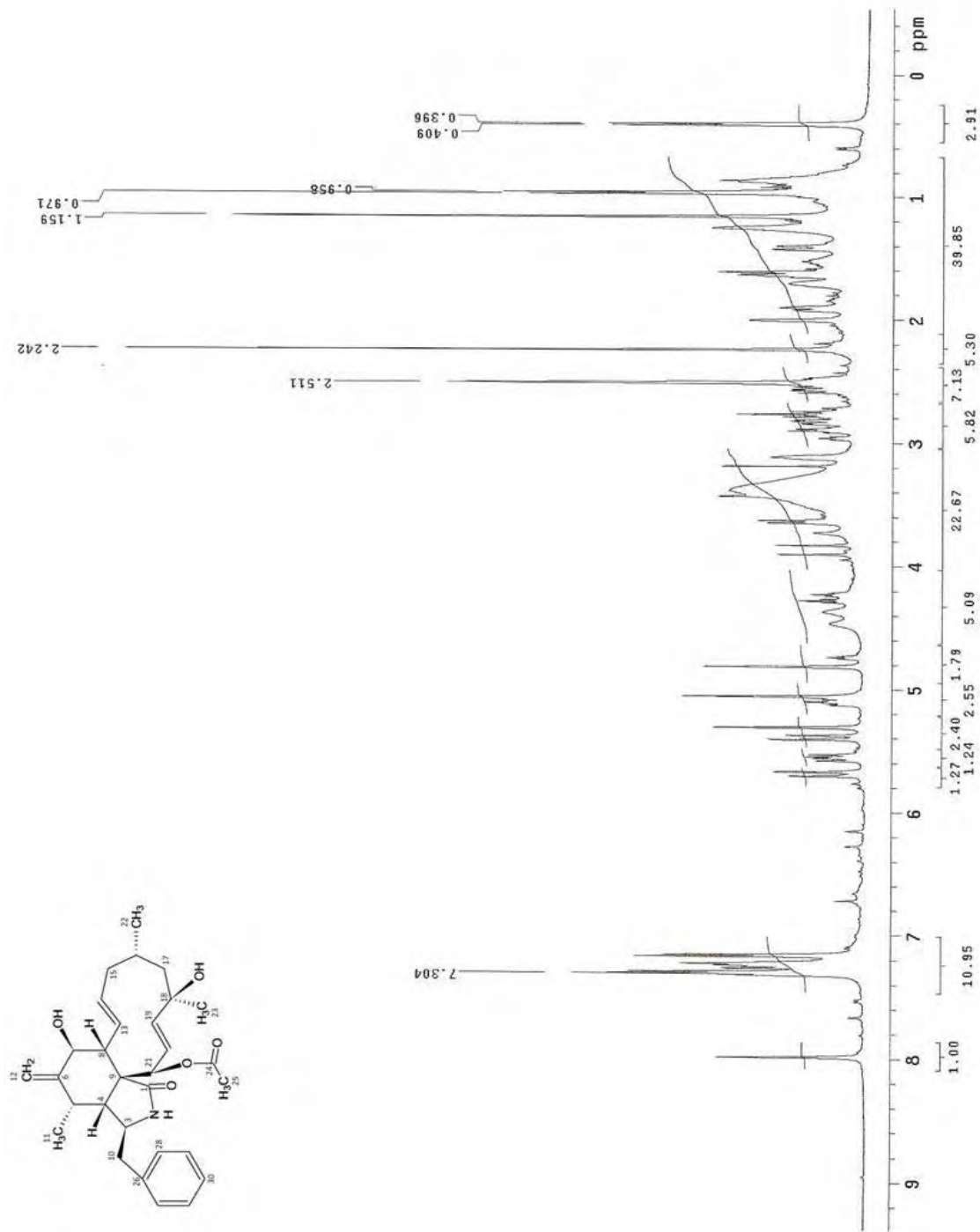


Figura 47 - Espectro de RMN de ¹H de **03** (DMSO-*d*₆, 500 MHz)

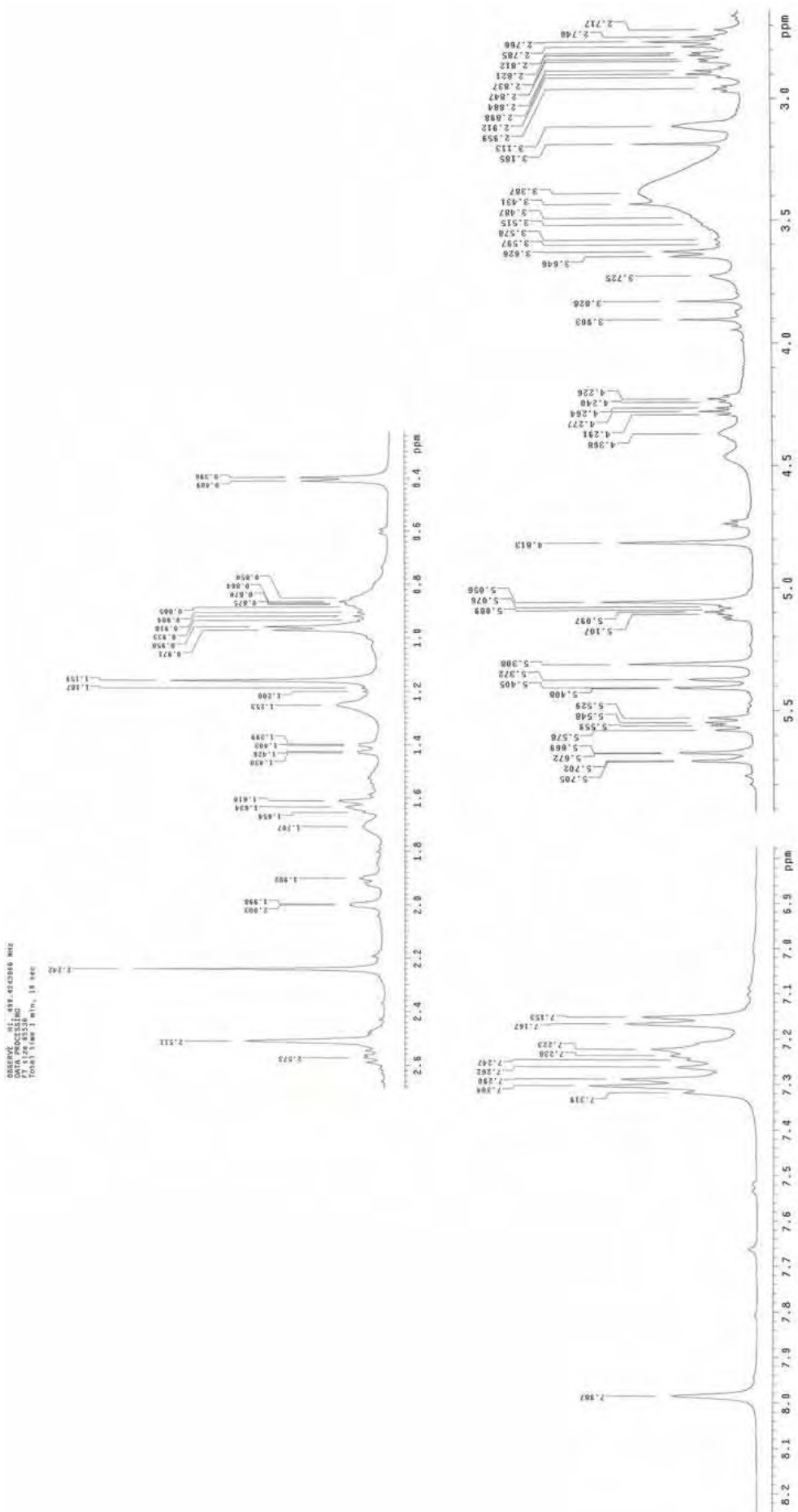


Figura 48 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H de **03** (DMSO- d_6 , 500 MHz)

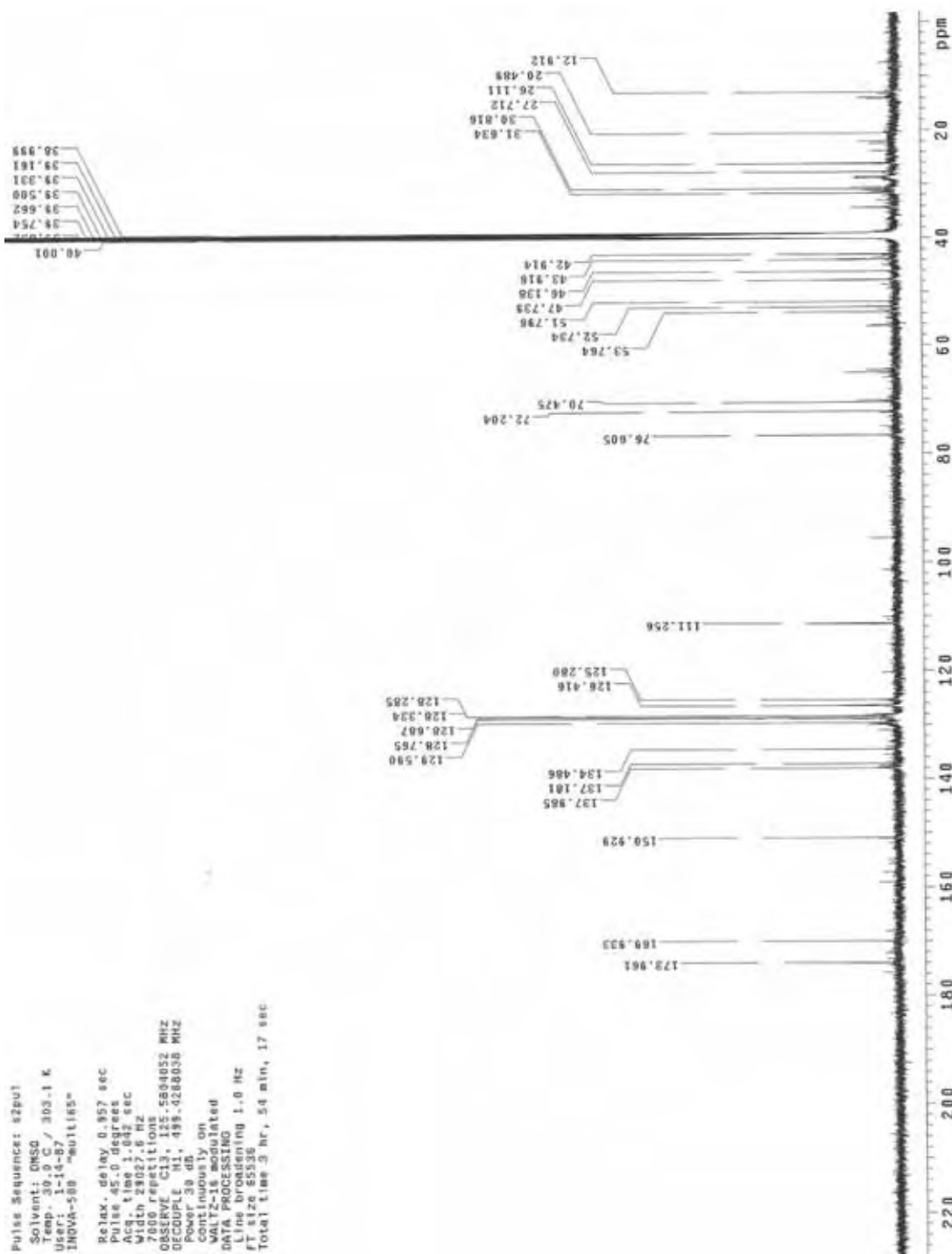


Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C de **03** (DMSO- d_6 , 125 MHz)

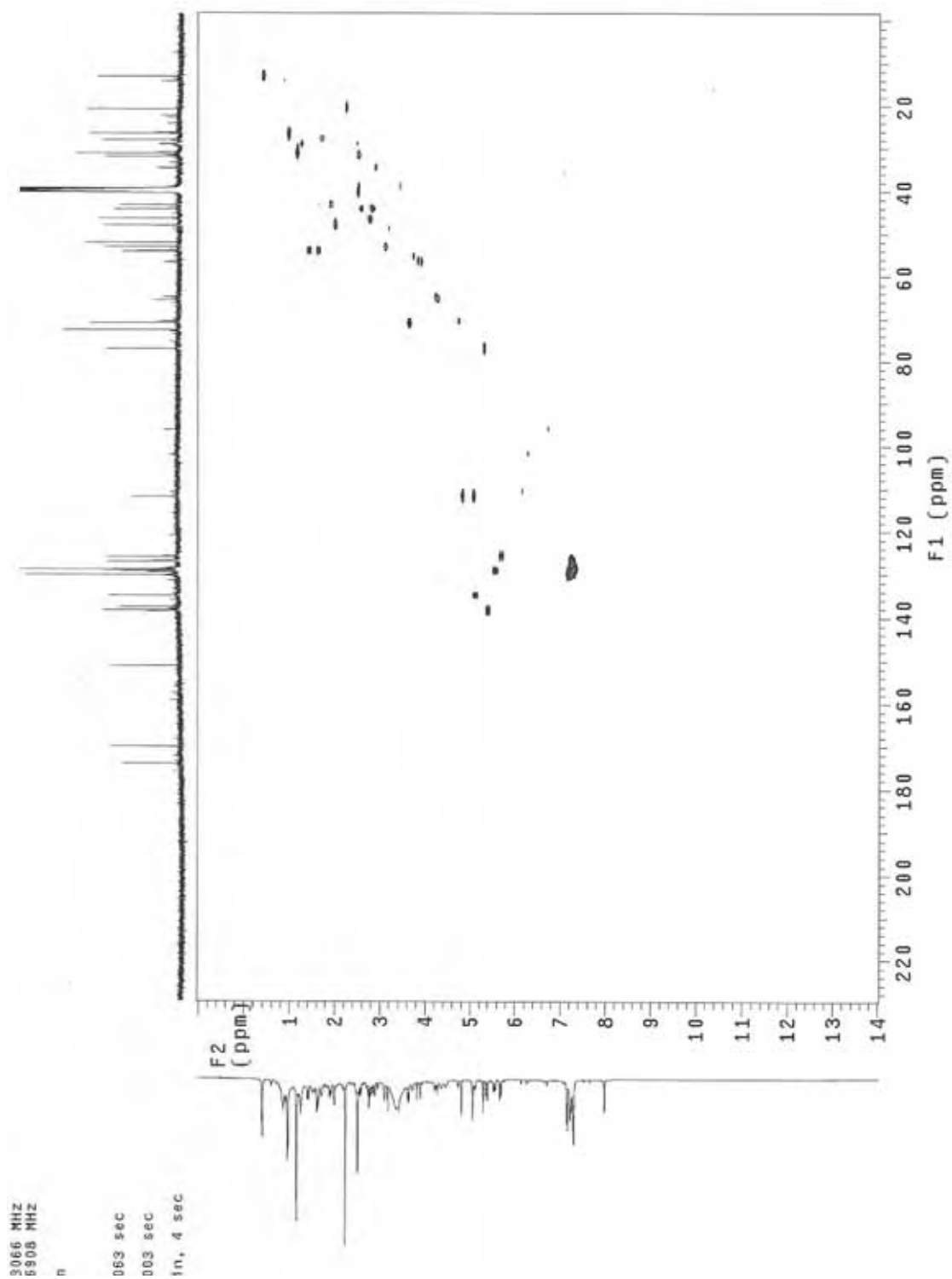


Figura 50 - Mapa de contorno HMQC de **03** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

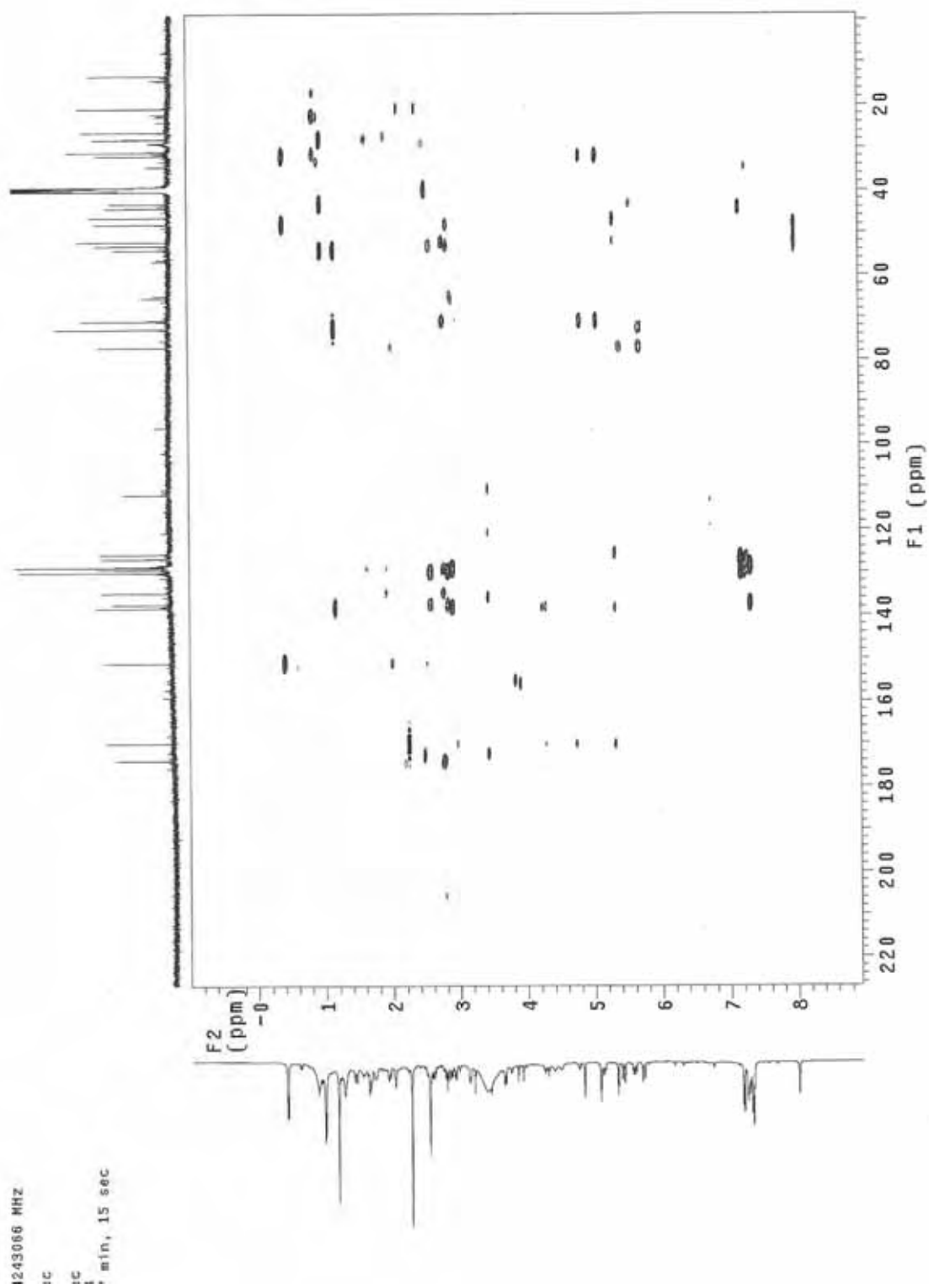


Figura 51 - Mapa de contorno HMBC de **03** (DMSO- d_6 , 125 MHz)

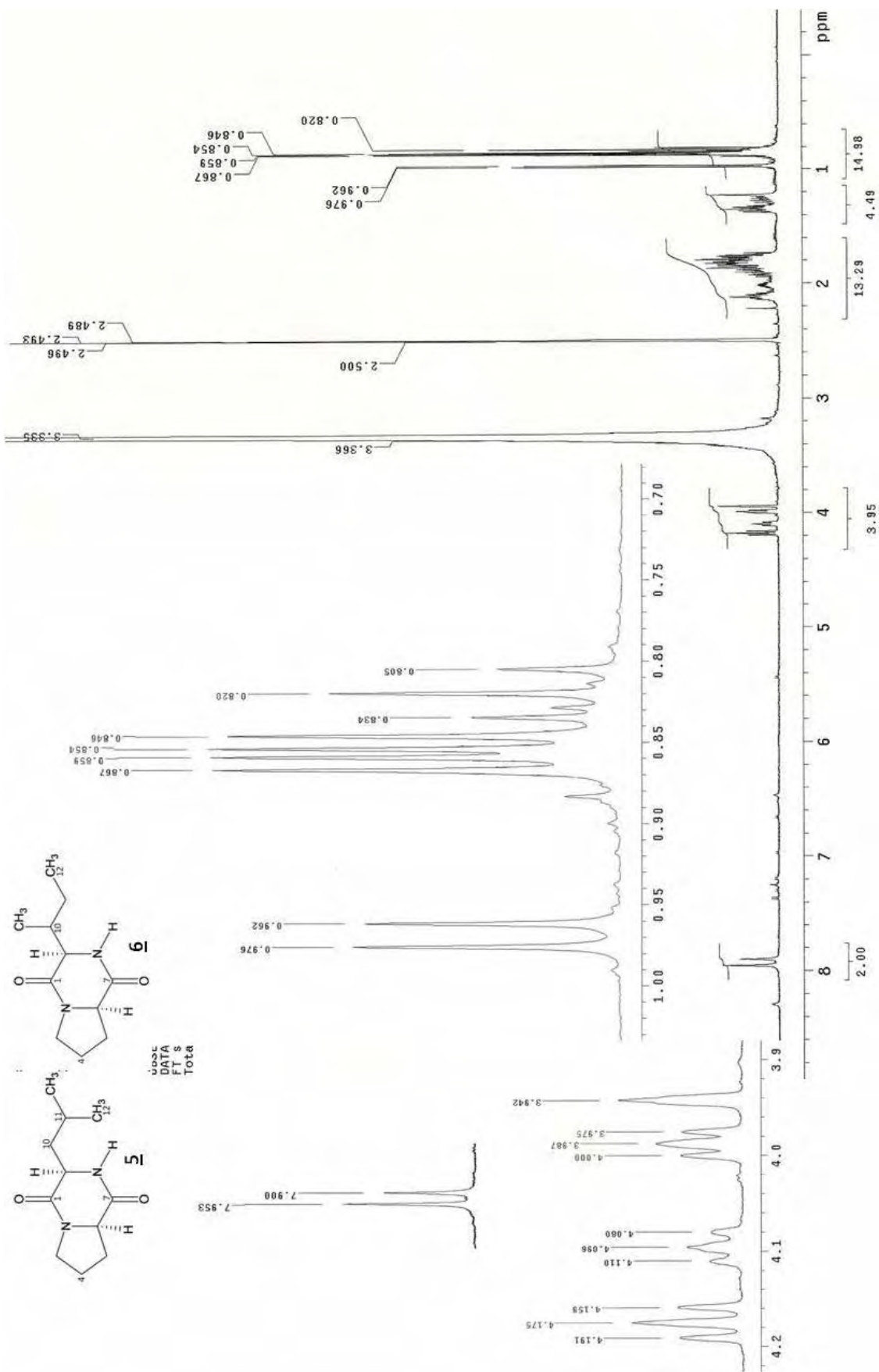


Figura 52 - Espectro de RMN de ¹H de **05** e **06** (DMSO-d₆, 500 MHz)

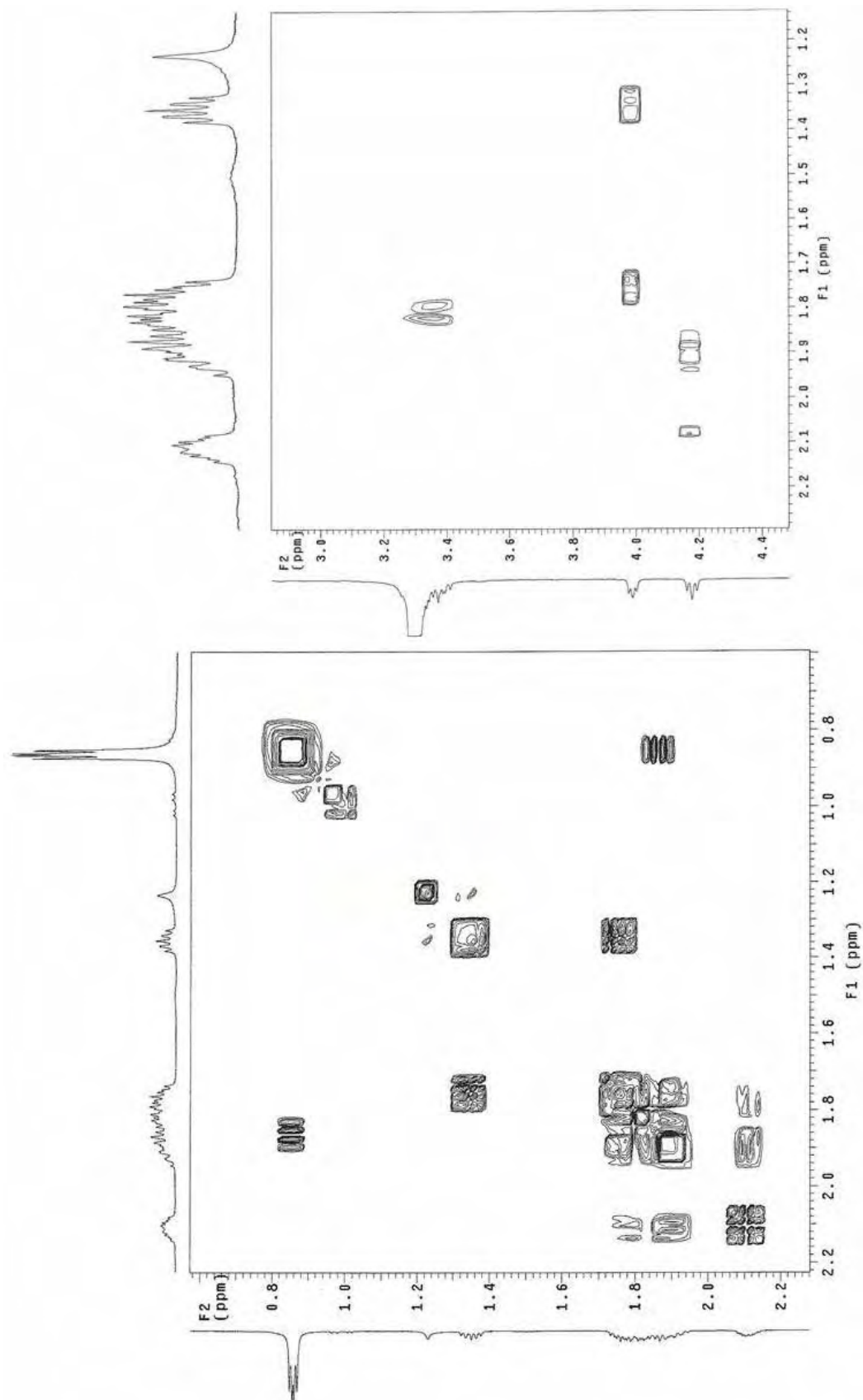


Figura 53 - Espectro de COSY de **05** (DMSO-*d*₆, 500 MHz)

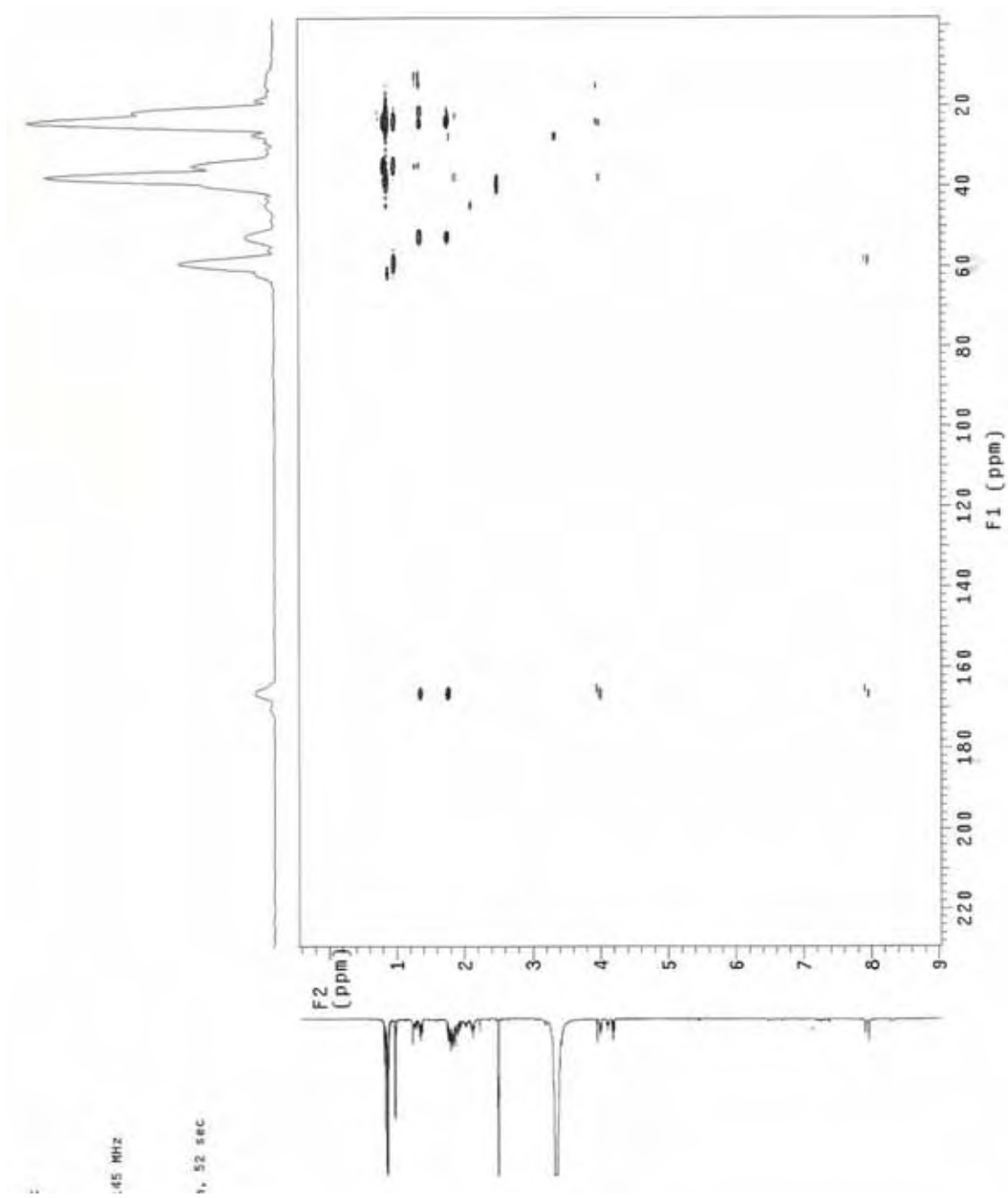


Figura 54 - Mapa de contorno HMBC de **05** e **06** ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)

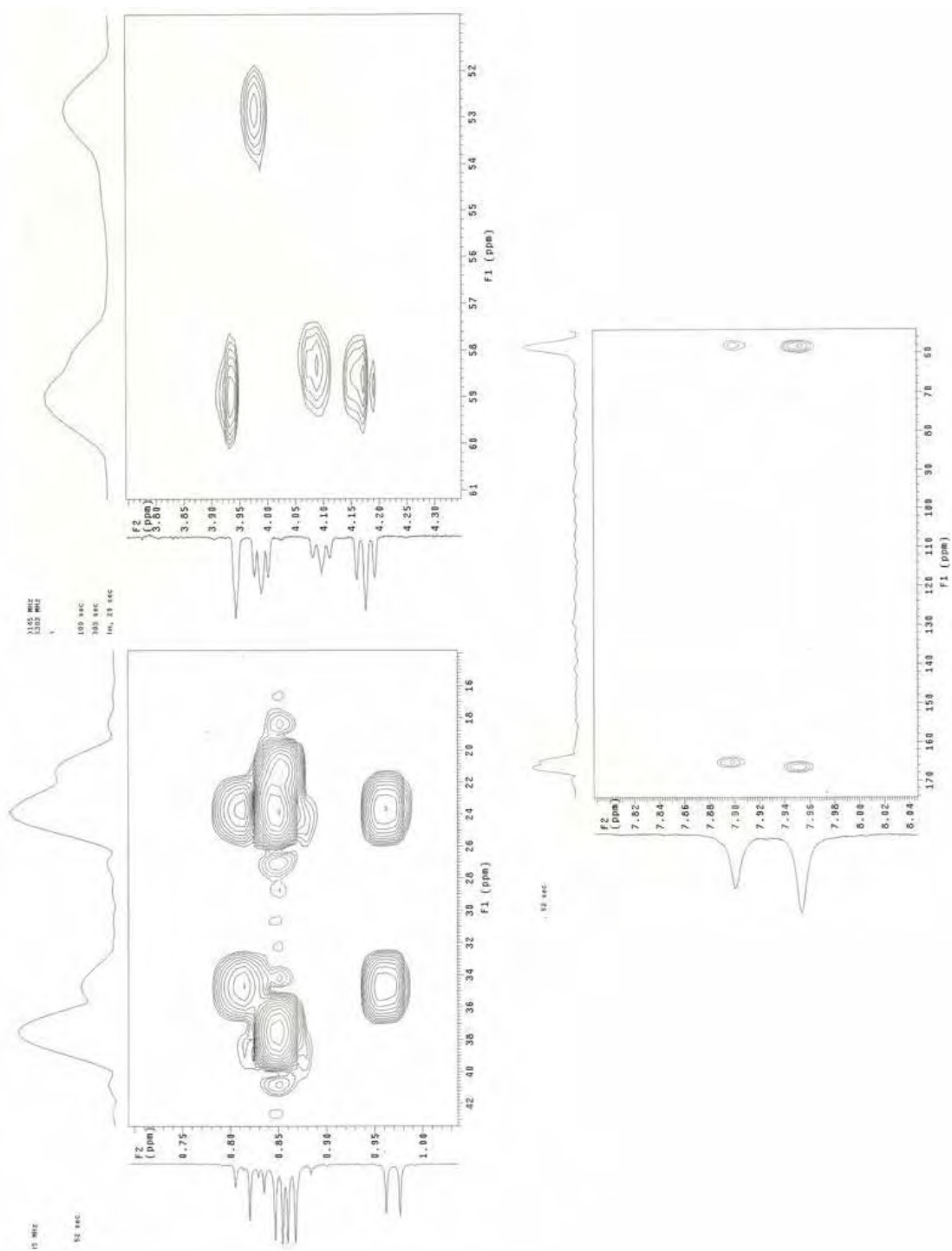


Figura 55 - Mapa de contorno HMBC ampliado de **05** e **06** ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz)

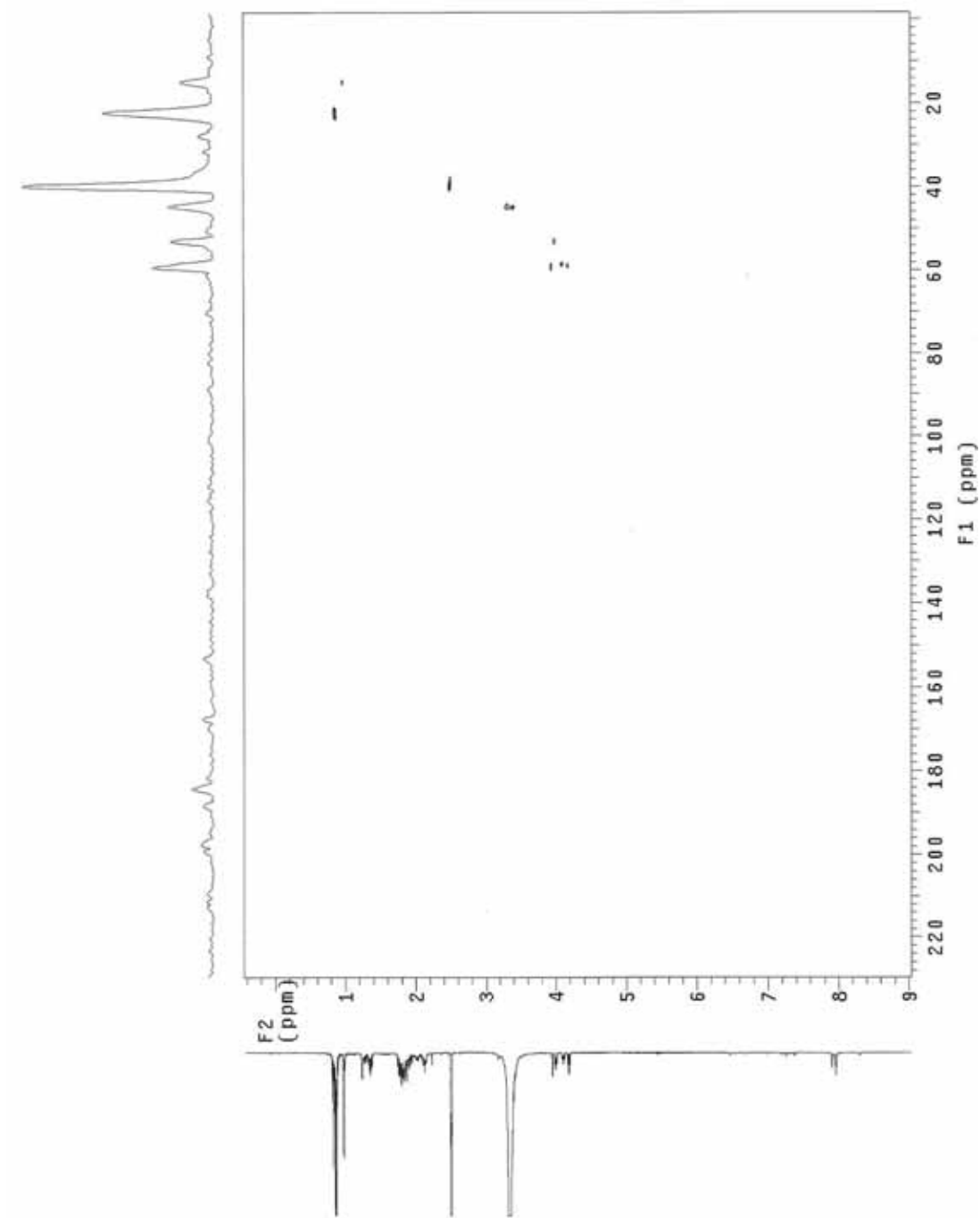


Figura 56 - Mapas de contorno de HMQC de **05** e **06** ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)

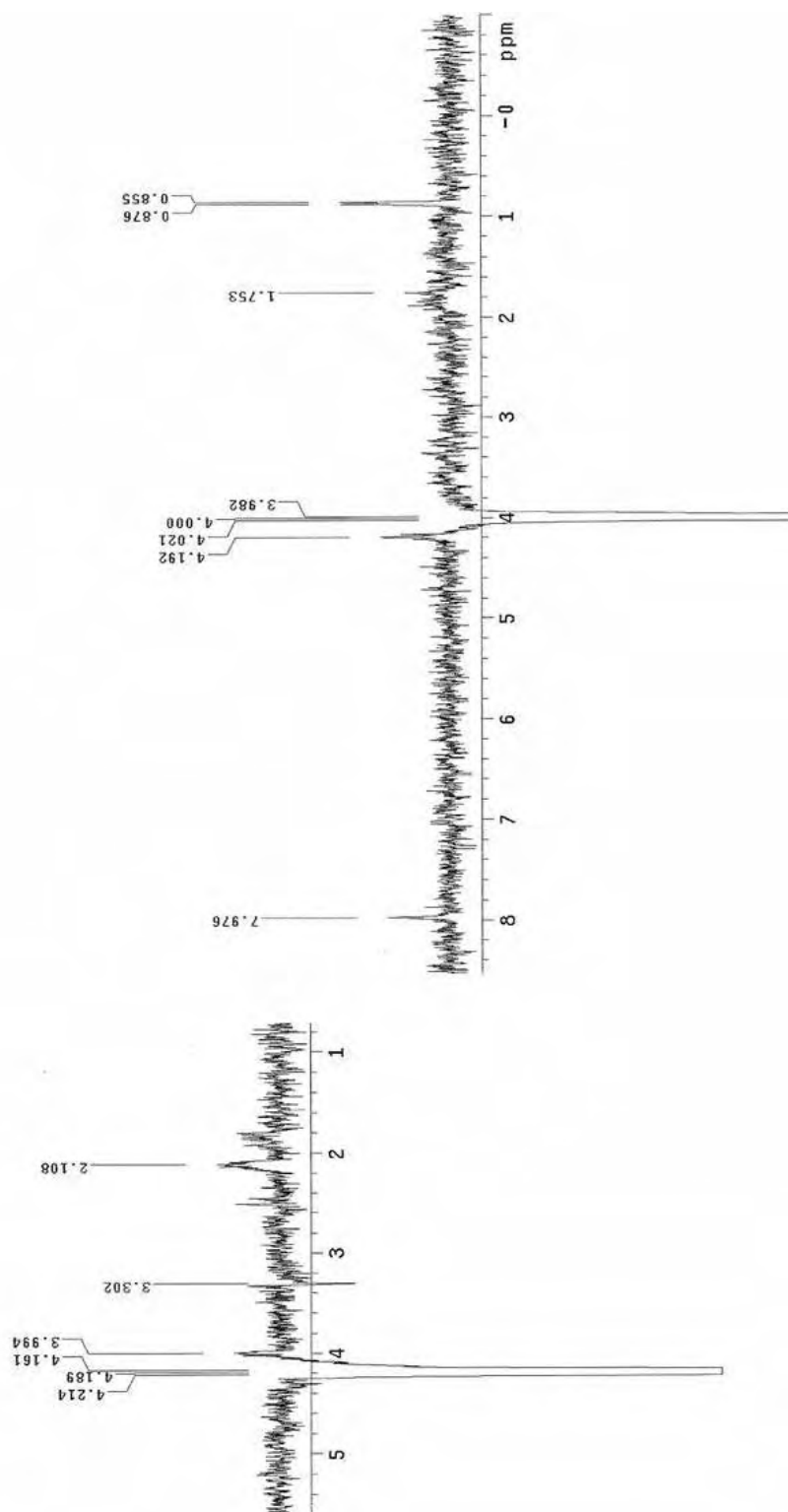


Figura 57 - Espectros de NOESY de **05** (DMSO-*d*₆, 300 MHz)

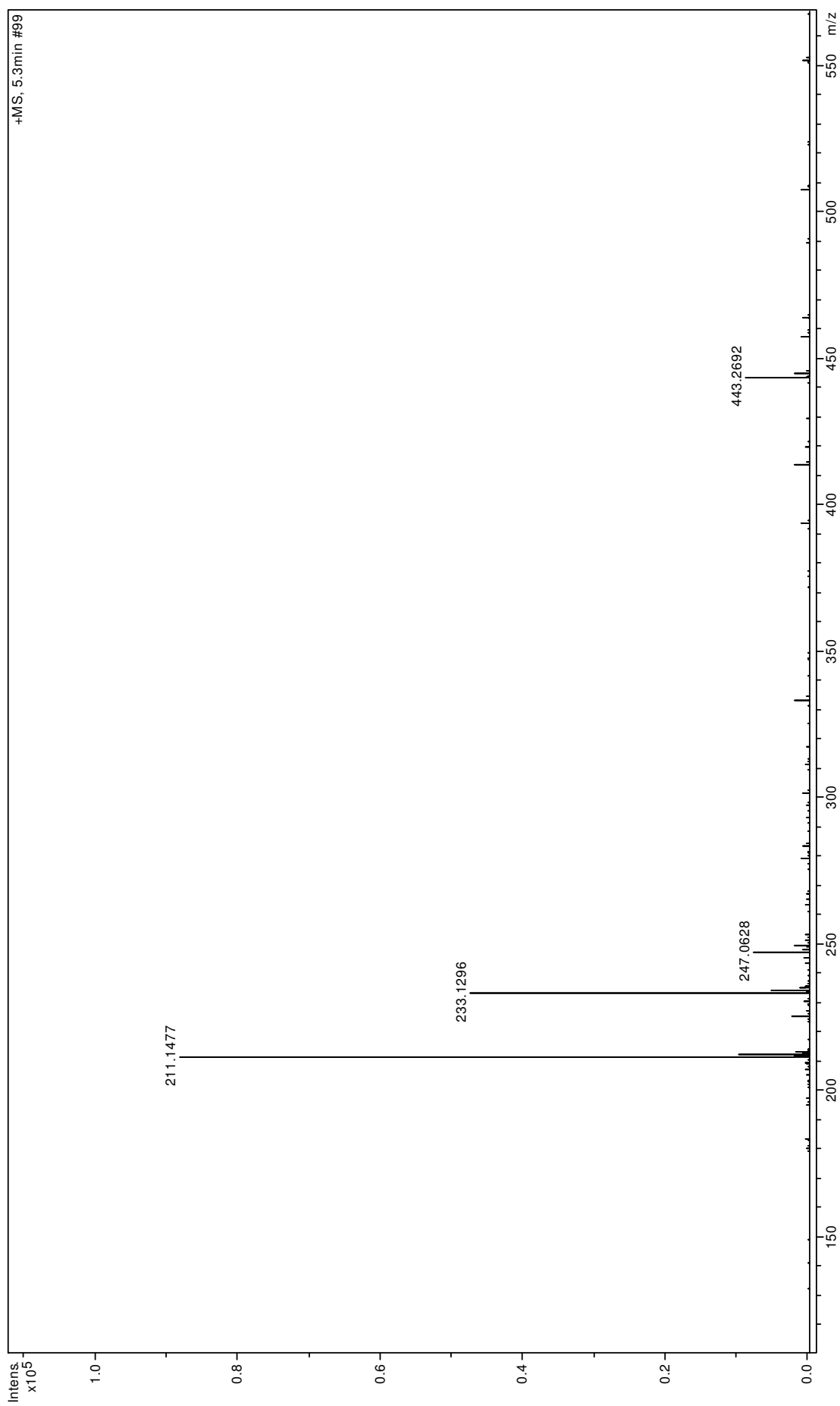


Figura 58 - Espectro de massas de **05** (ESI-EM, modo positivo)

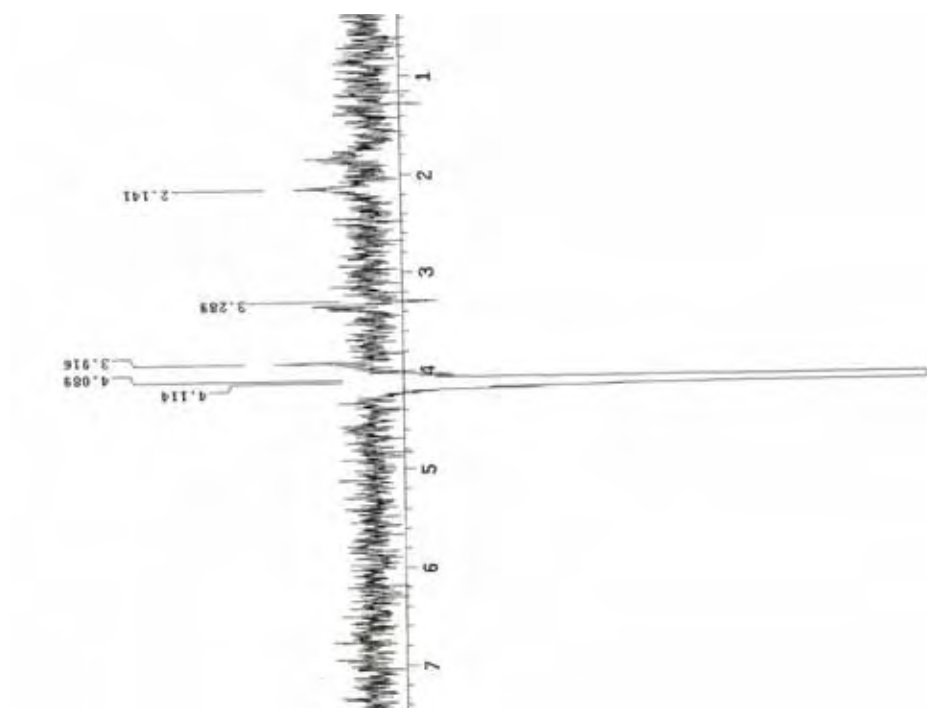


Figura 59 - Espectro de NOESY – 1D de **06** (DMSO- d_6 , 300 MHz)

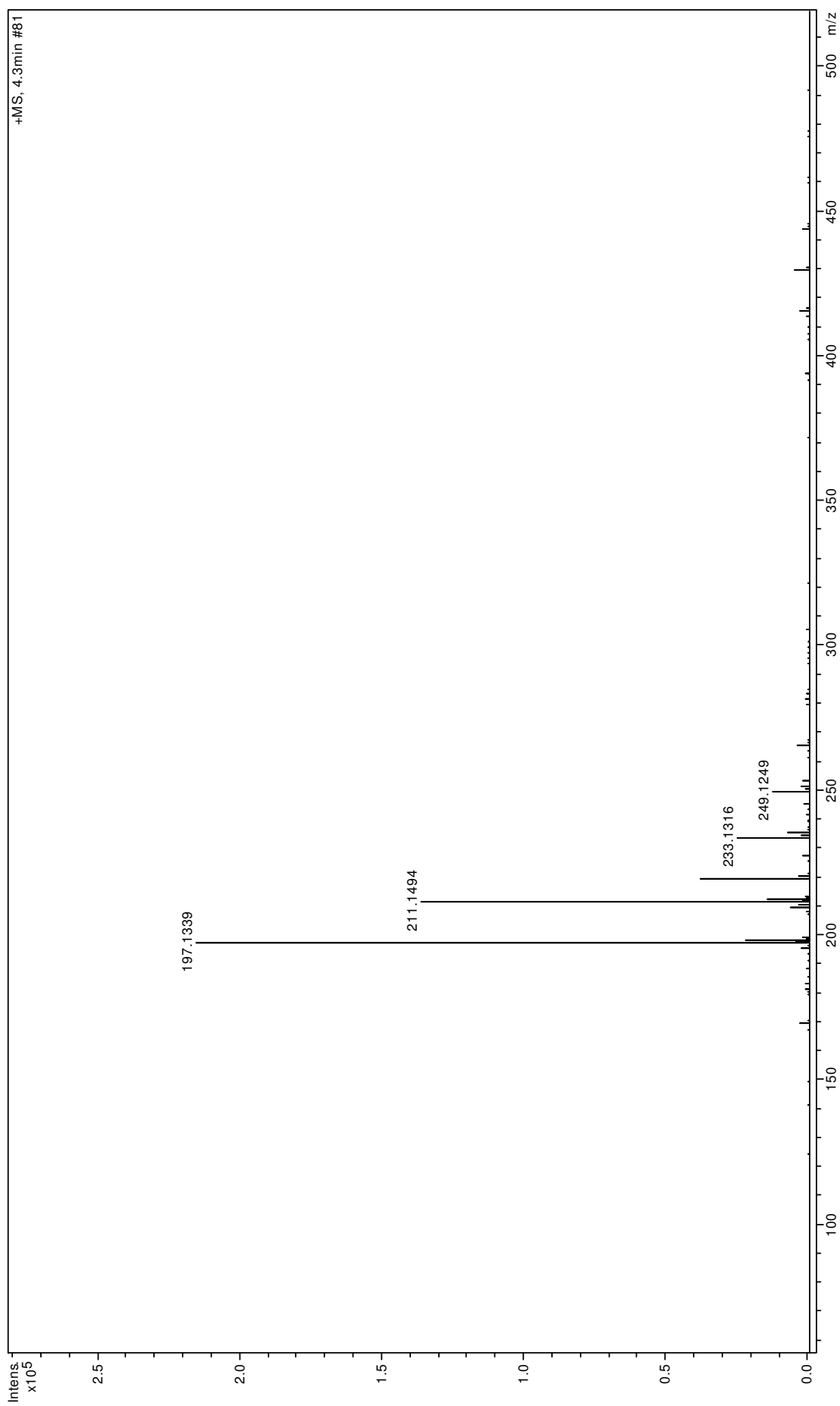


Figura 60 - Espectro de massas de **06** e **07** (ESI-EM, modo positivo)

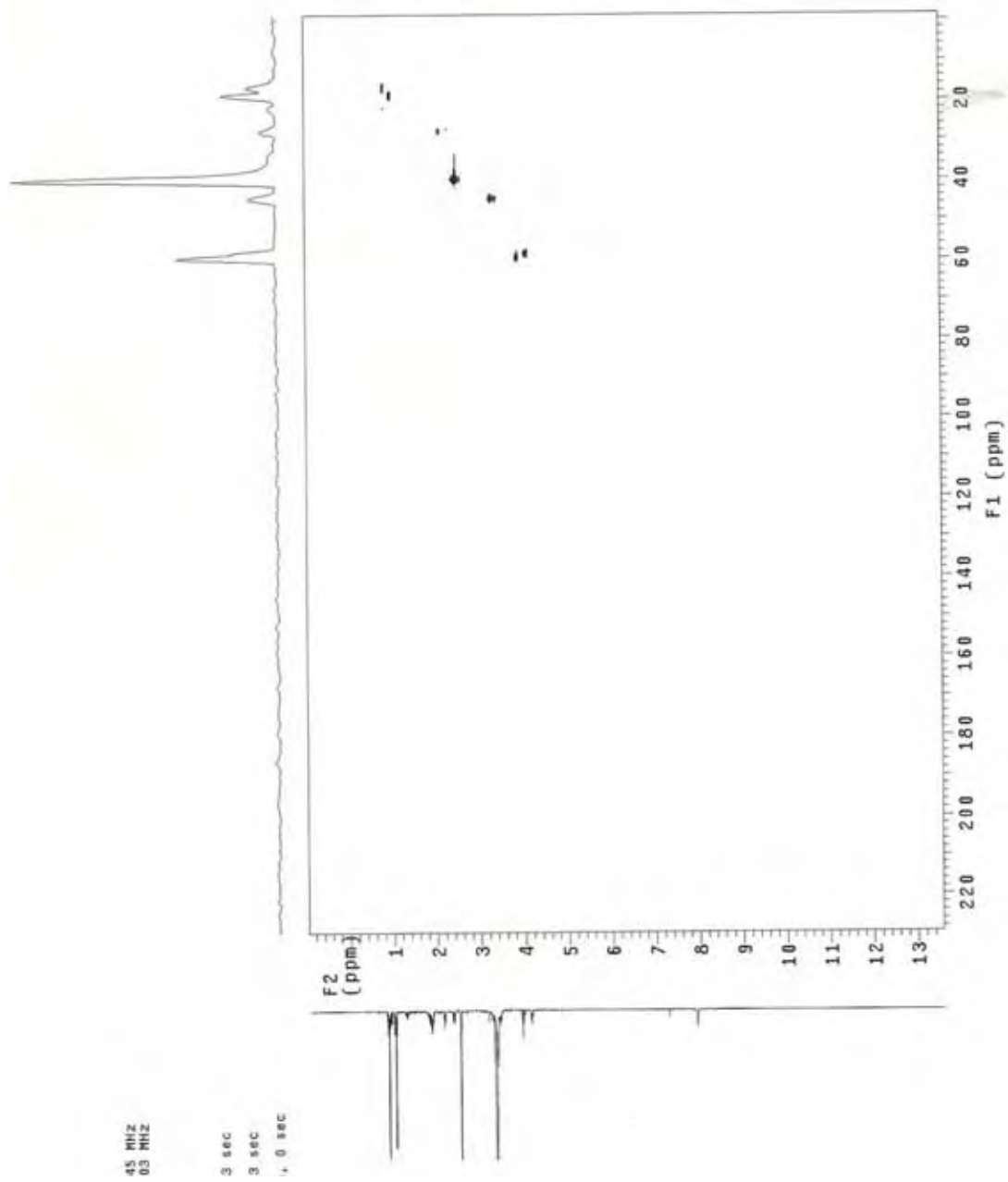


Figura 61 - Mapa de contorno HMQC de **07** (DMSO- d_6 , 125 MHz)

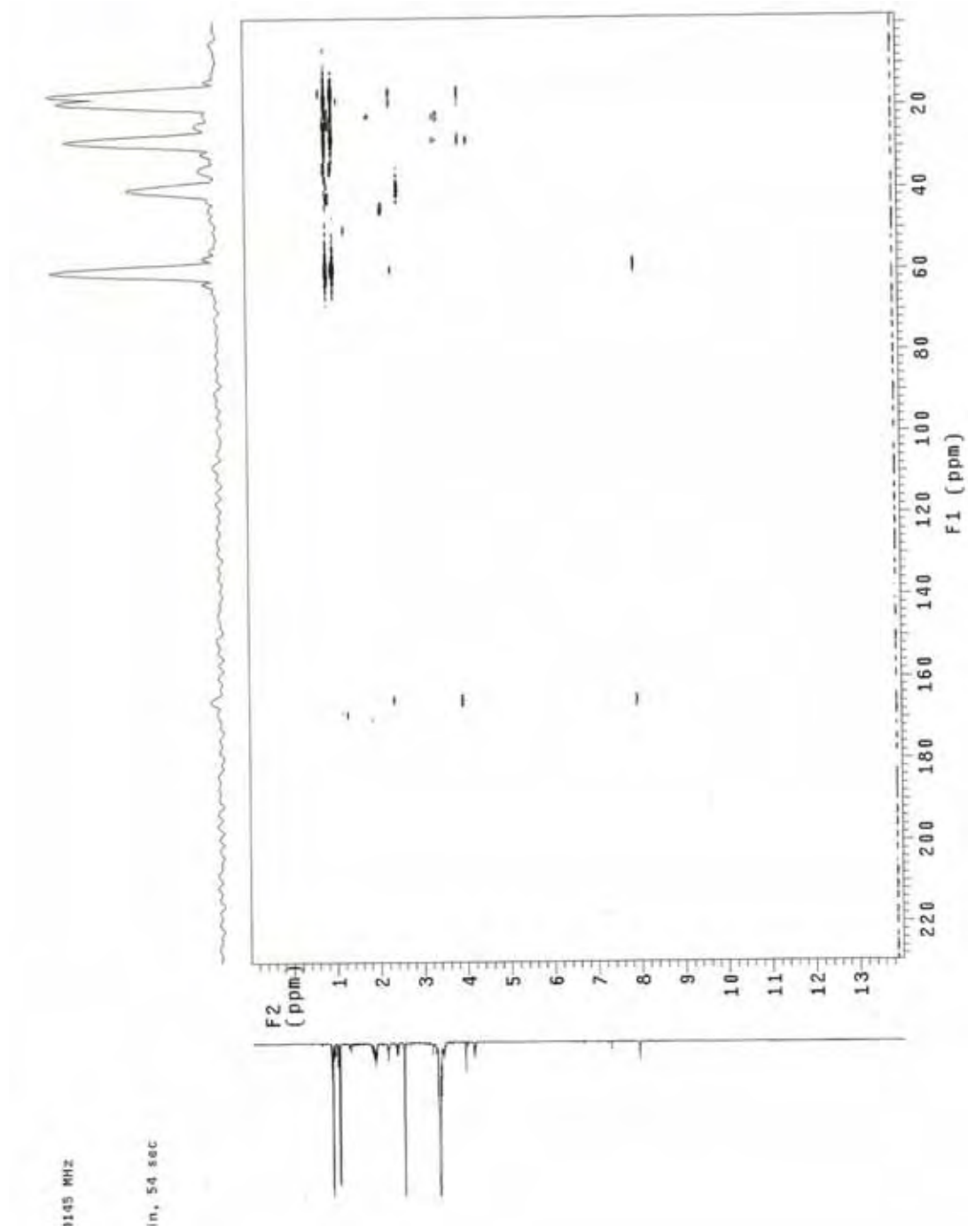


Figura 62 - Mapa de contorno HMBC ampliado de **07** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

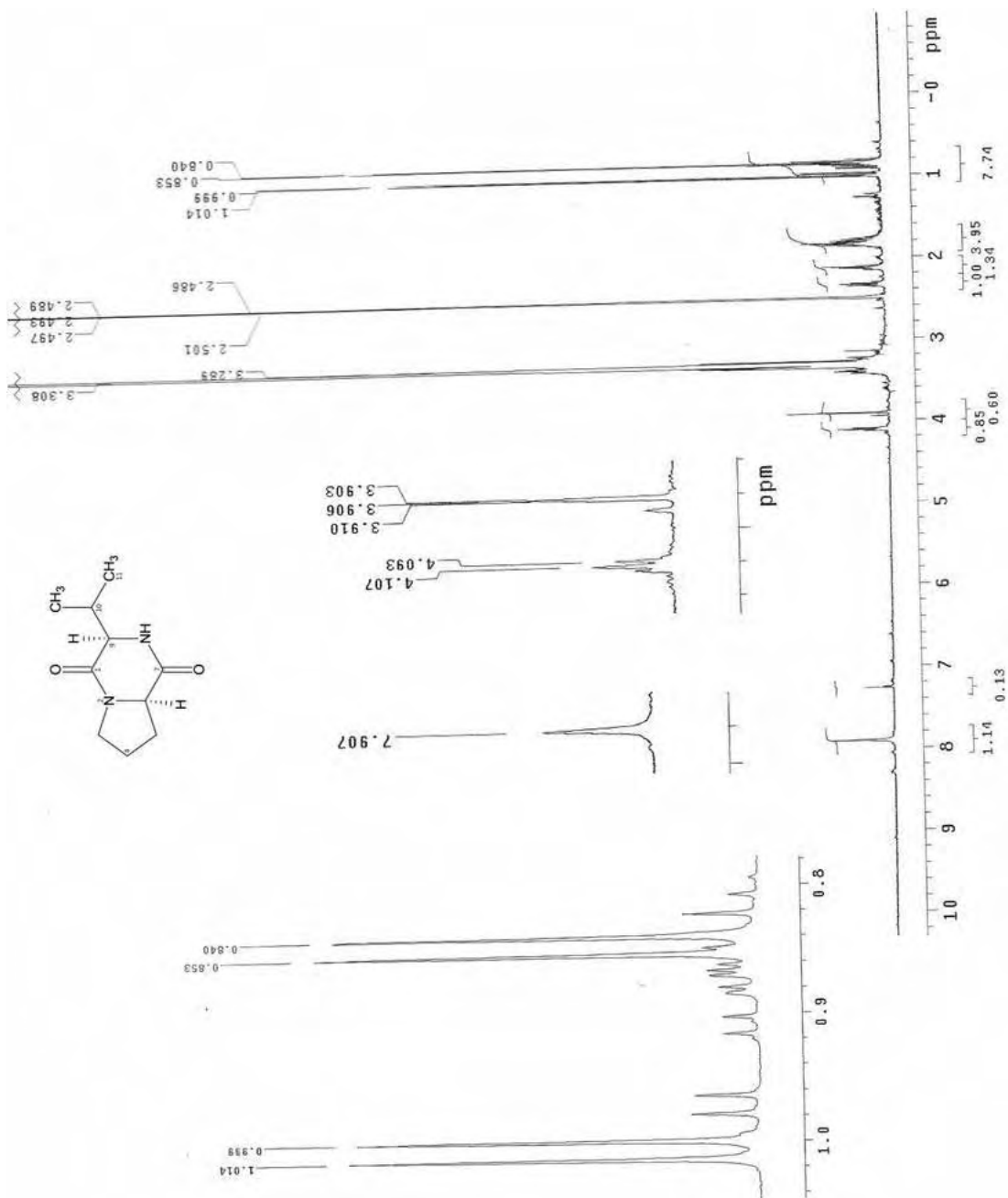


Figura 63 - Espectro de RMN de ¹H de **67** (DMSO-d₆, 500 MHz)

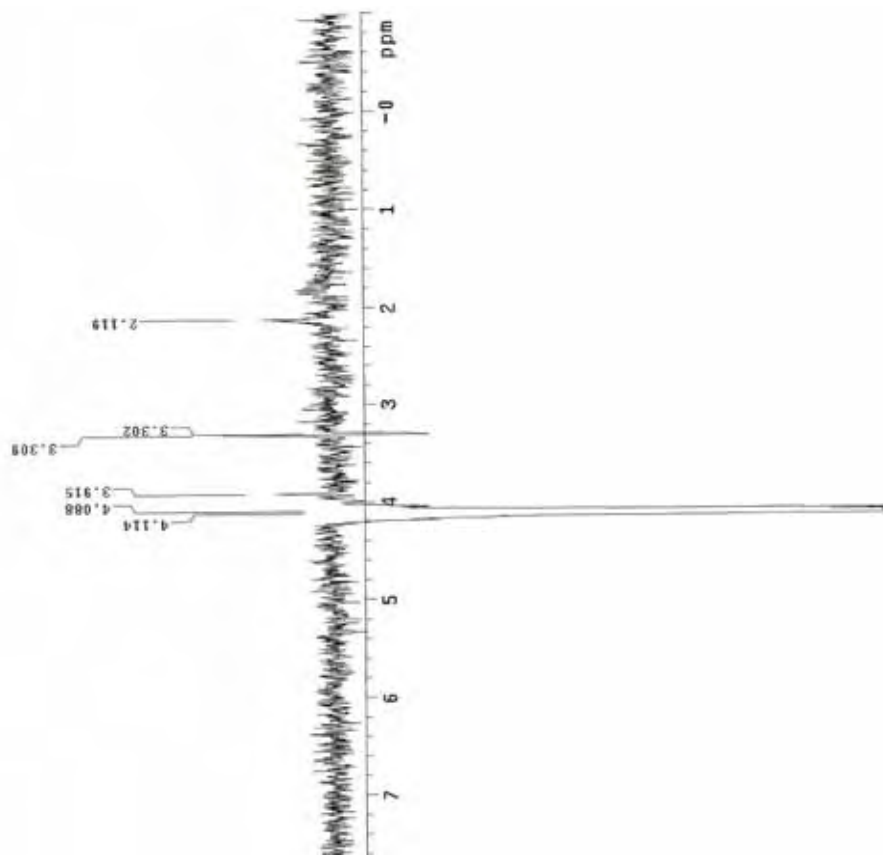


Figura 64 - Espectro de NOESY-1D de **07** (DMSO-*d*₆, 300 MHz)

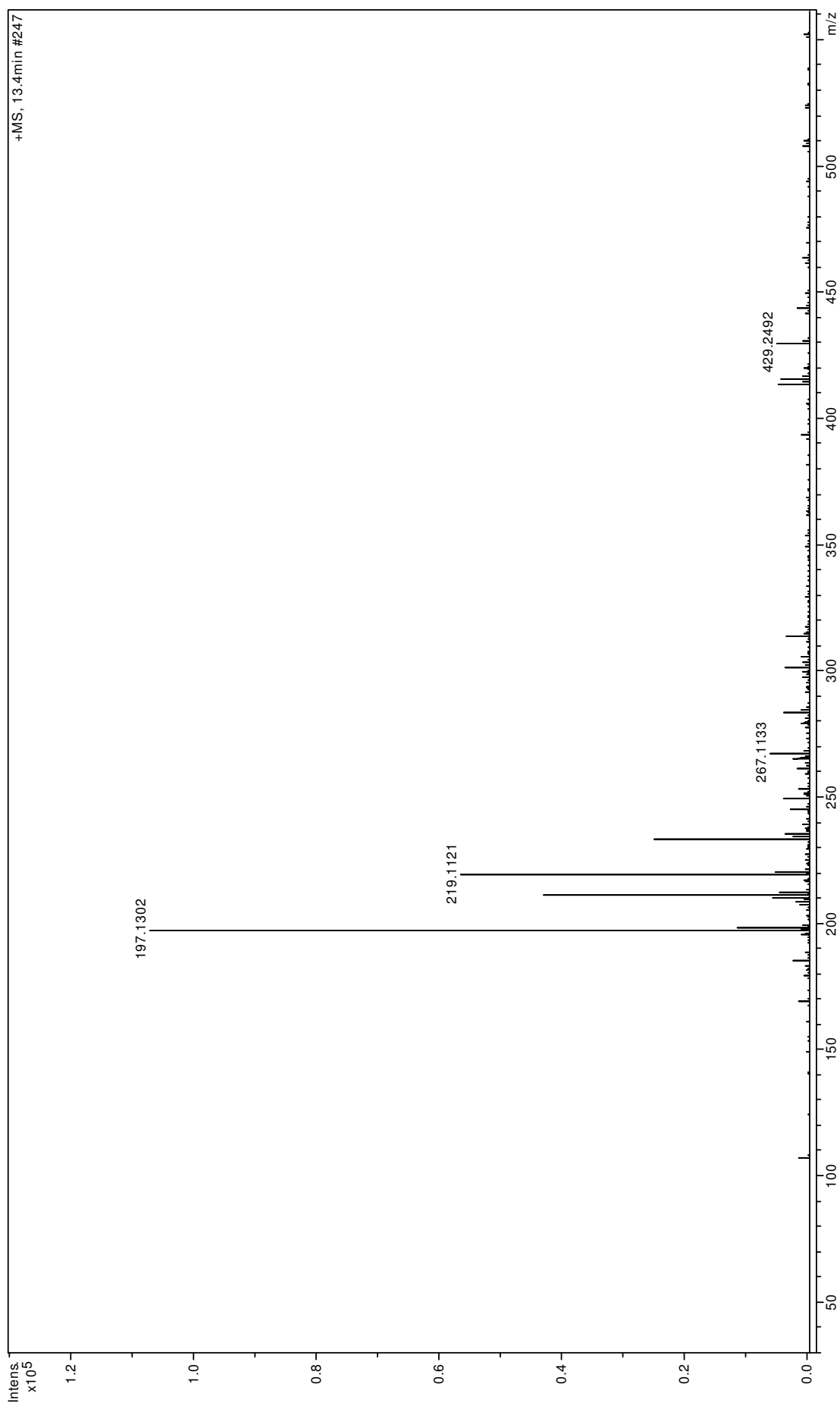


Figura 65 - Espectro de massas de **07** (ESI-EM, modo positivo)

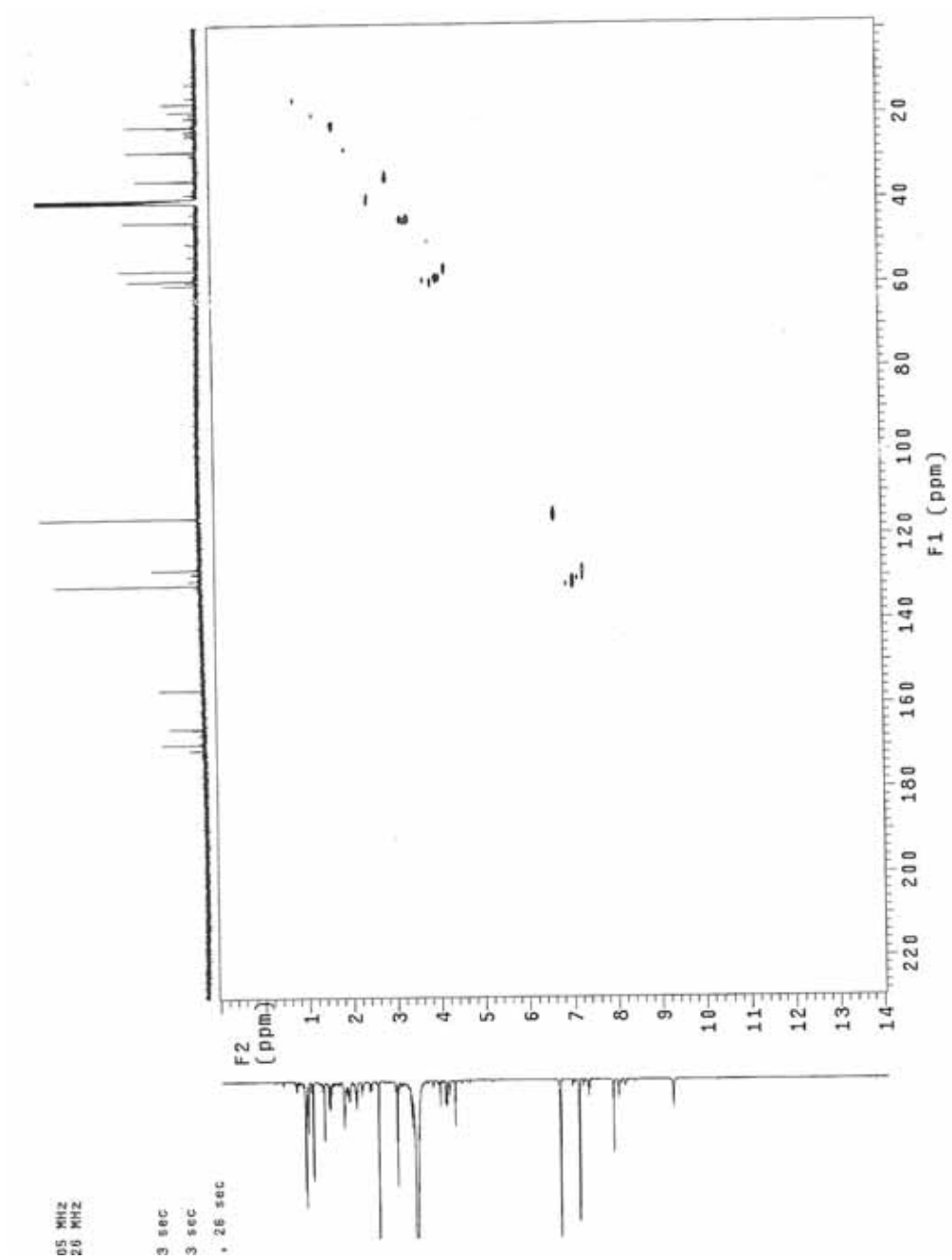


Figura 66 - Mapa de contorno HMQC de **07** e **08** (DMSO- d_6 , 125 MHz)

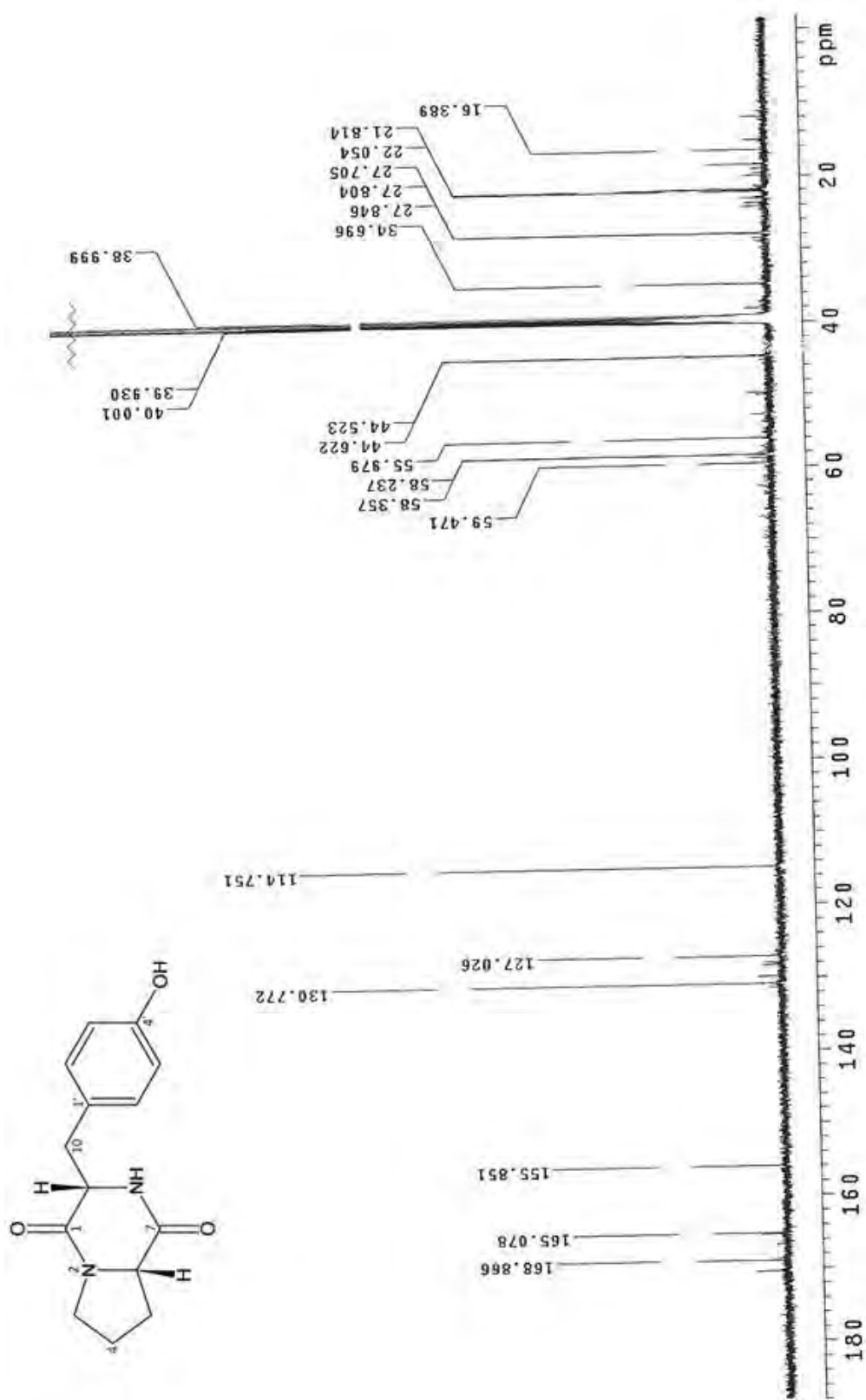


Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C de **07** e **08** ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)

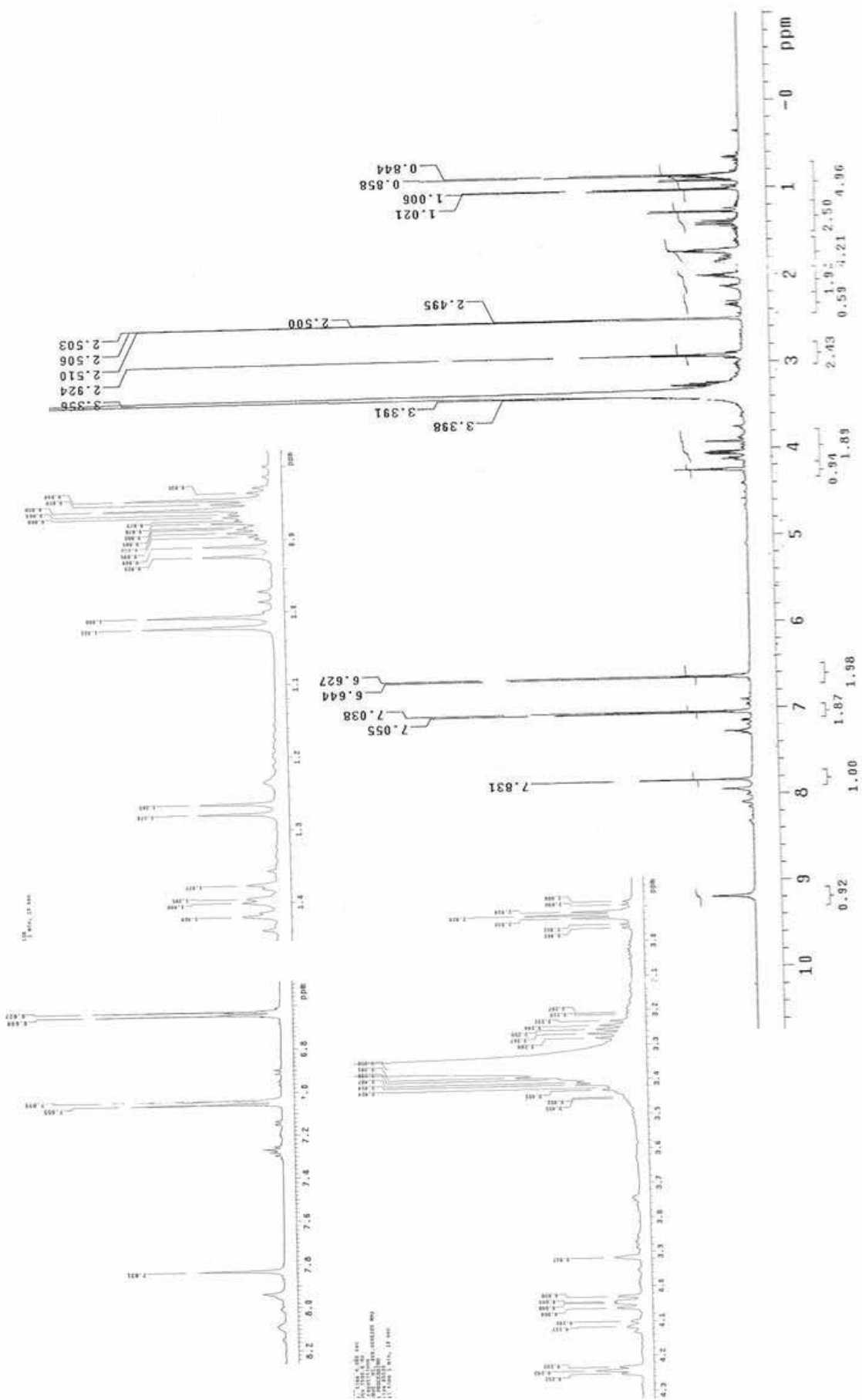


Figura 68 - Espectro de RMN de ¹H de **07** e **08** (DMSO-*d*₆, 500 MHz)

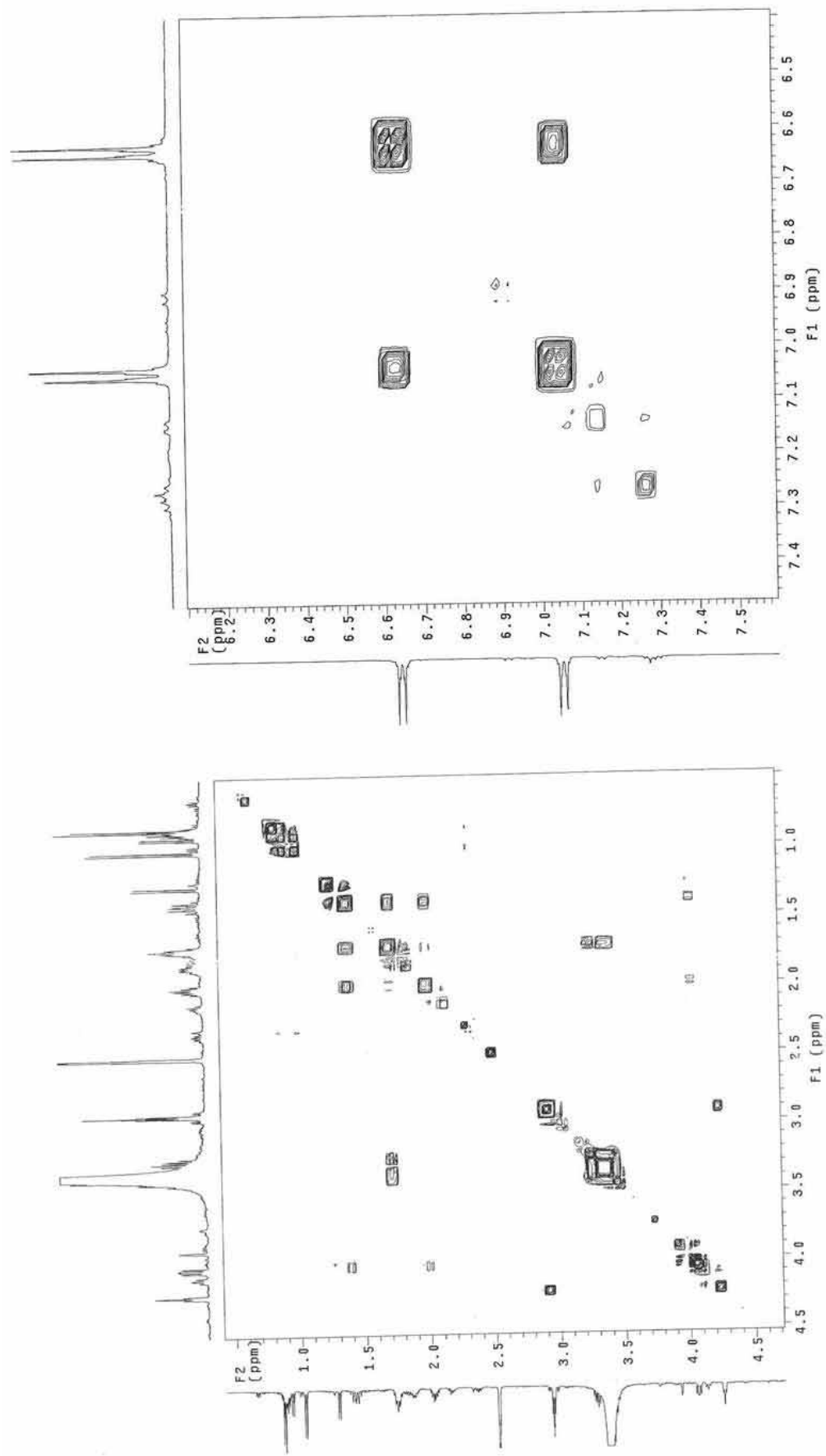


Figura 69 - Espectro de COSY ampliado de **07** e **08** (DMSO-*d*₆, 500 MHz)

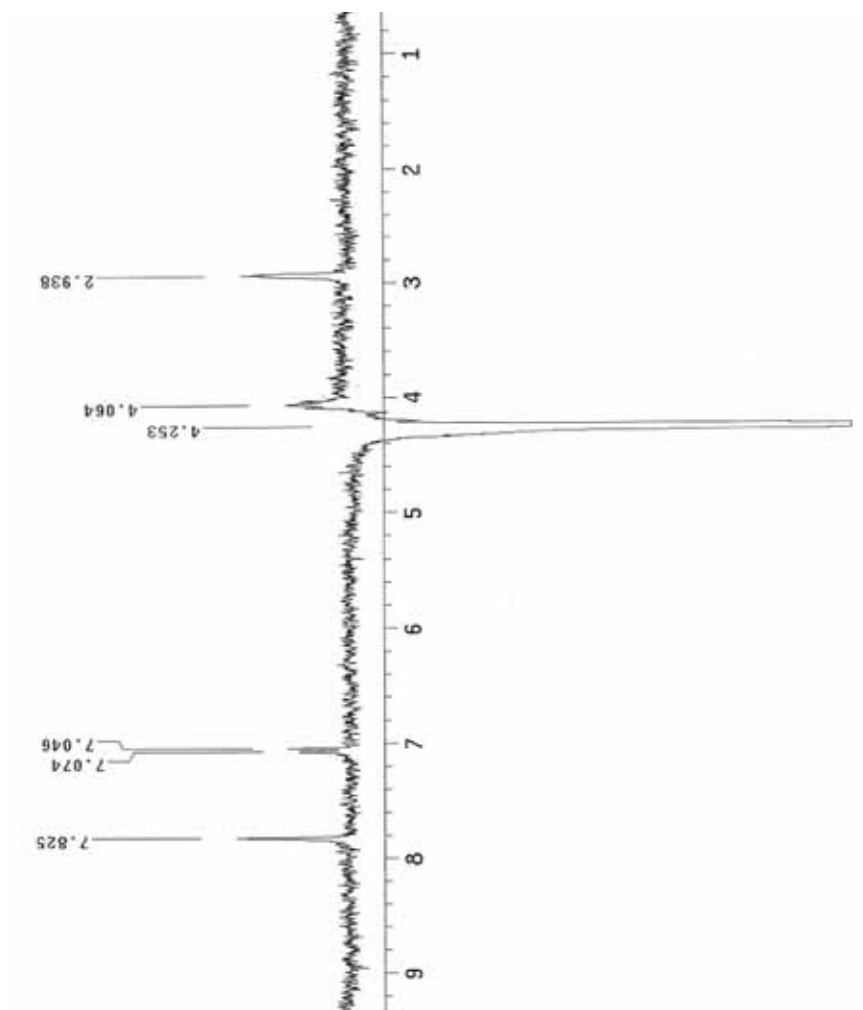


Figura 70 - Espectro de NOESY-1D de **08** (DMSO-*d*₆, 300 MHz)

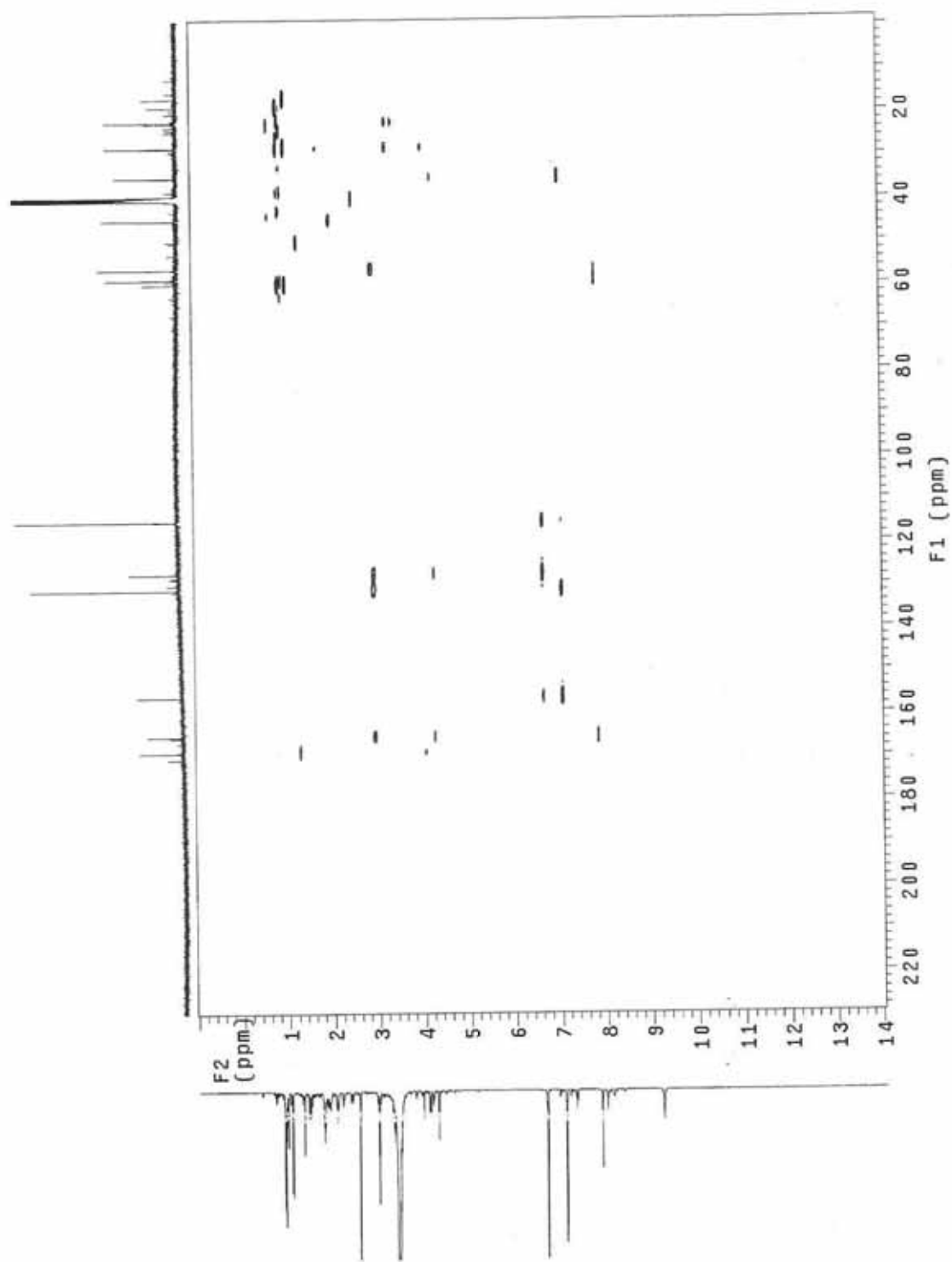


Figura 71 - Mapa de contorno HMBC de **07** e **08** ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)

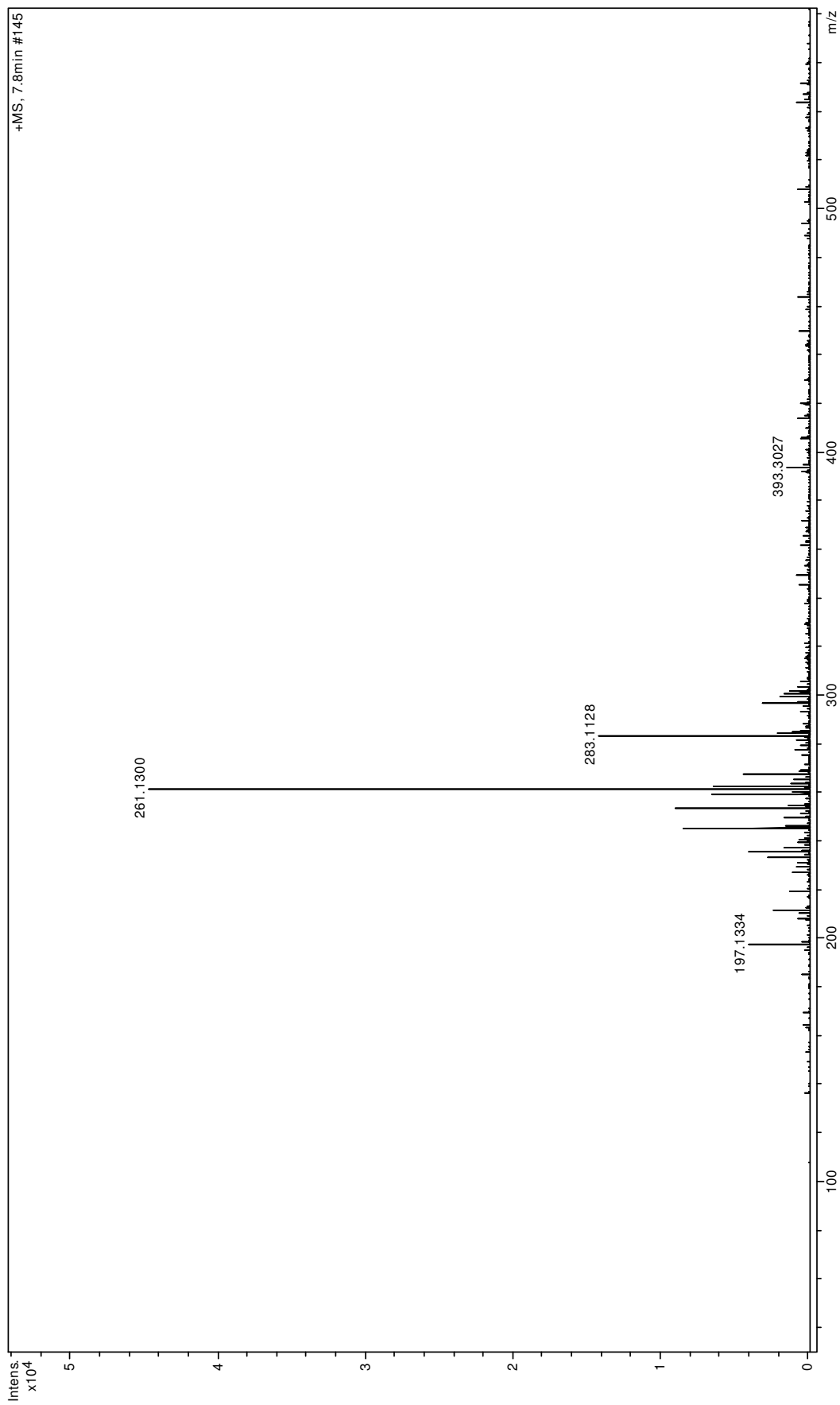


Figura 72 - Espectro de massas de **07** e **08** (ESI-EM, modo positivo)

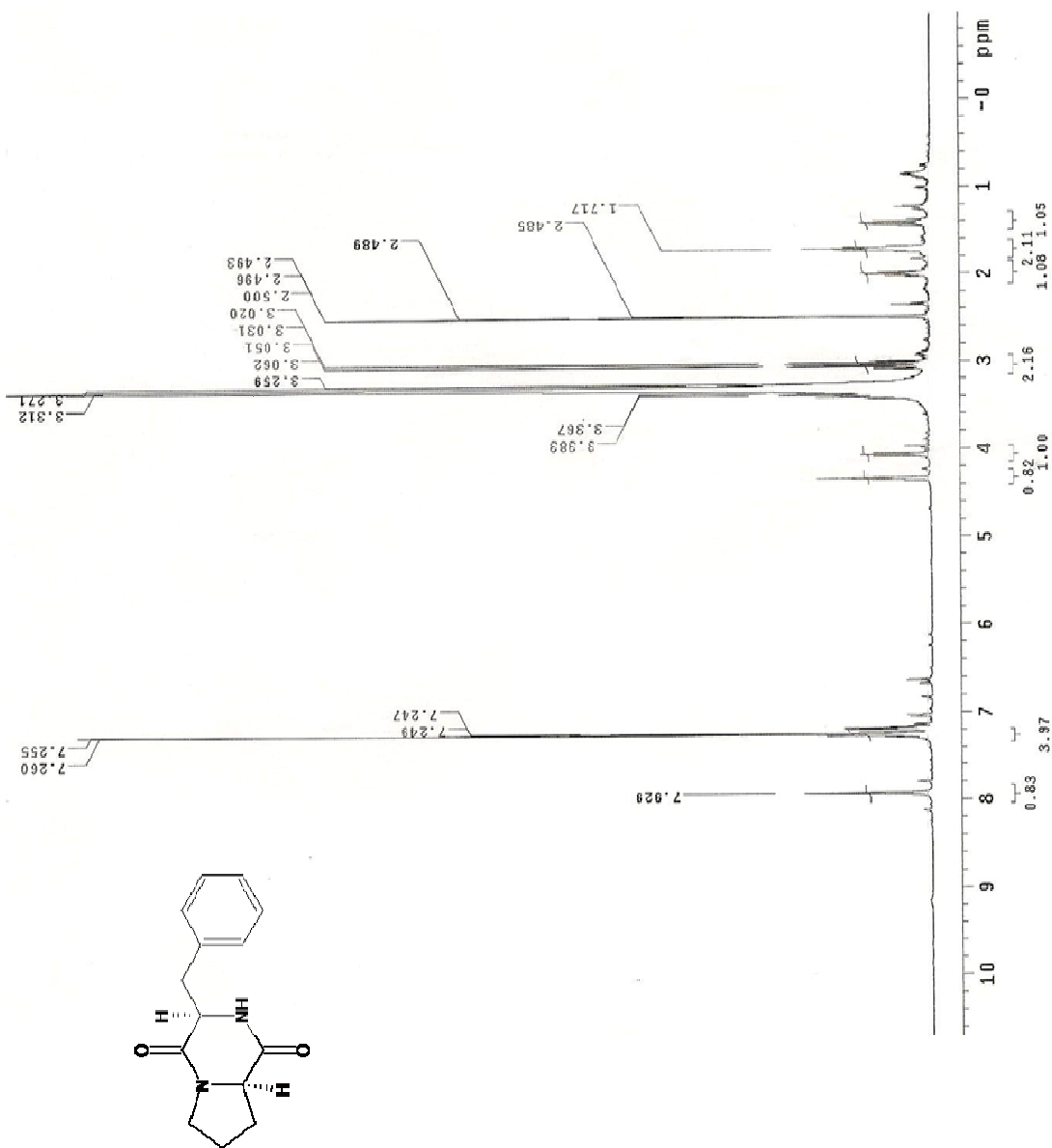


Figura 73 - Espectro de RMN de ¹H de **09** (DMSO-d₆, 500 MHz)

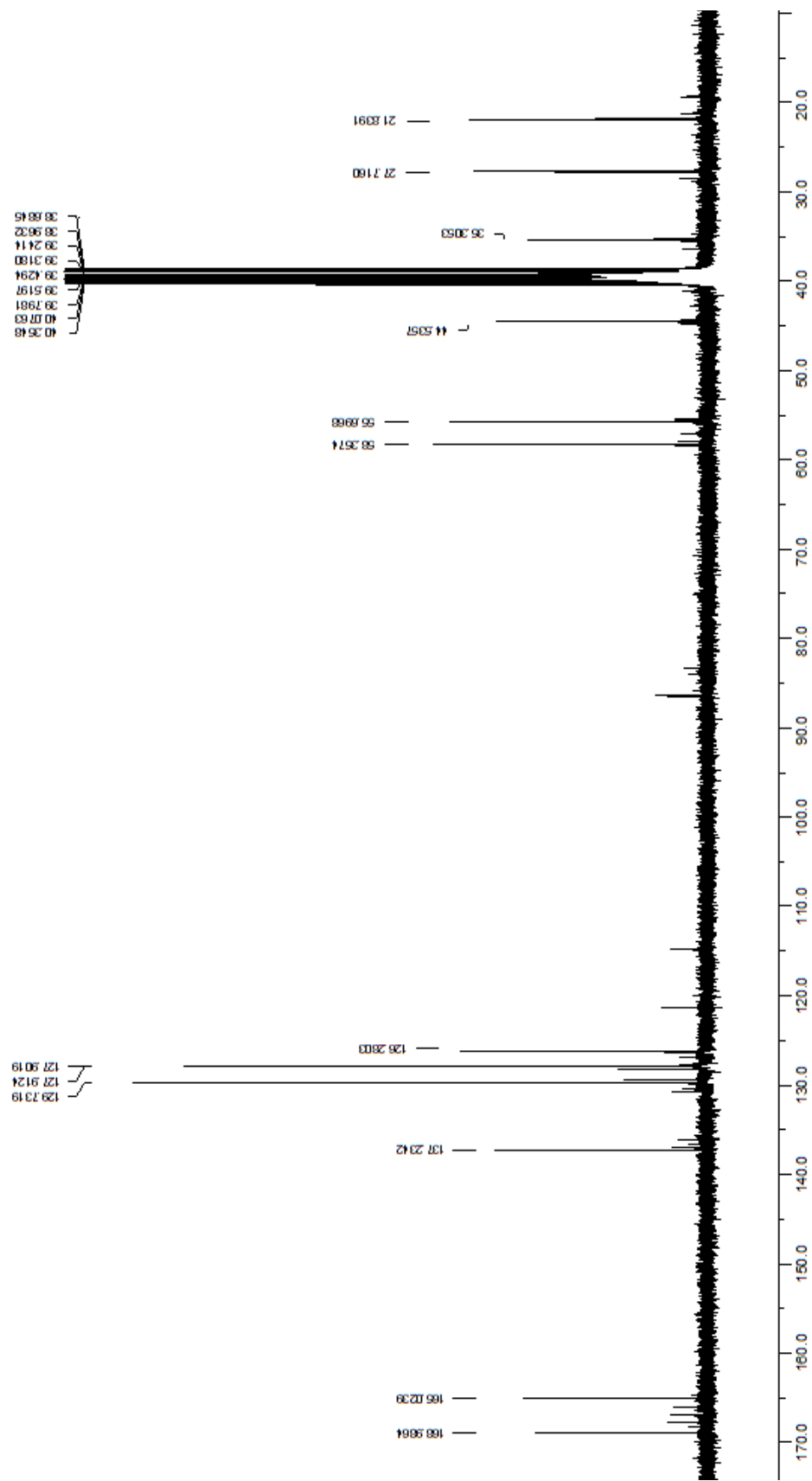


Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C de **09** ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz)

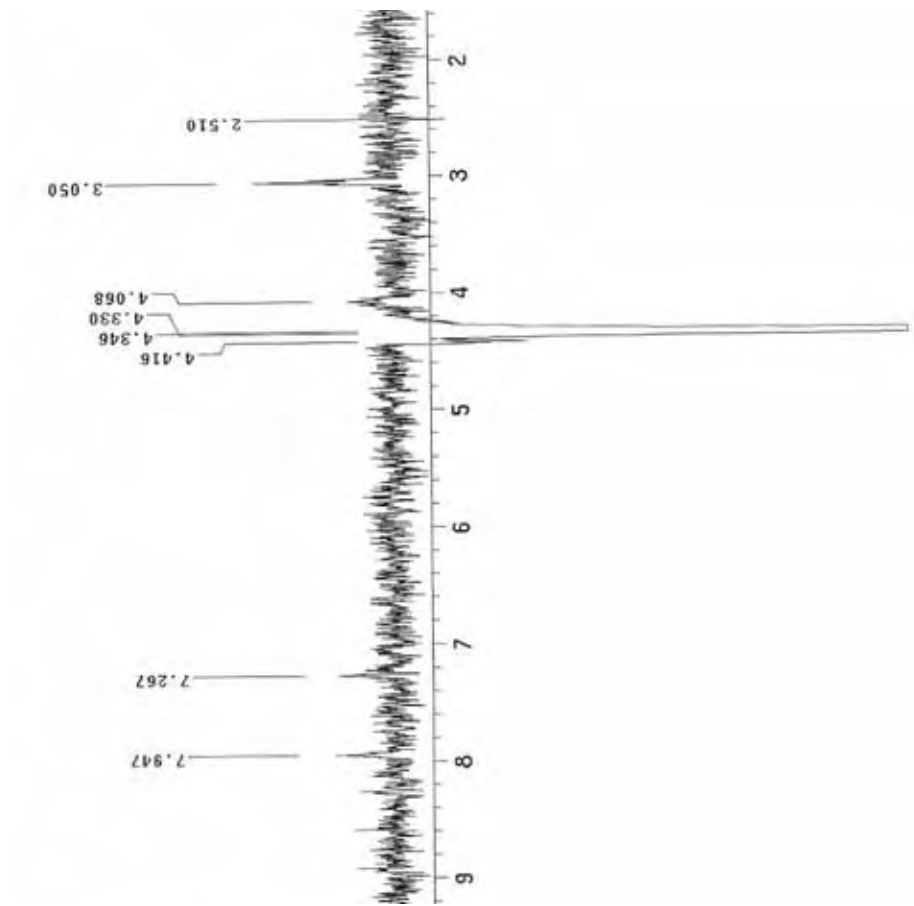


Figura 75 - Espectro de NOESY – 1D de **09** (DMSO-*d*₆, 300 MHz)

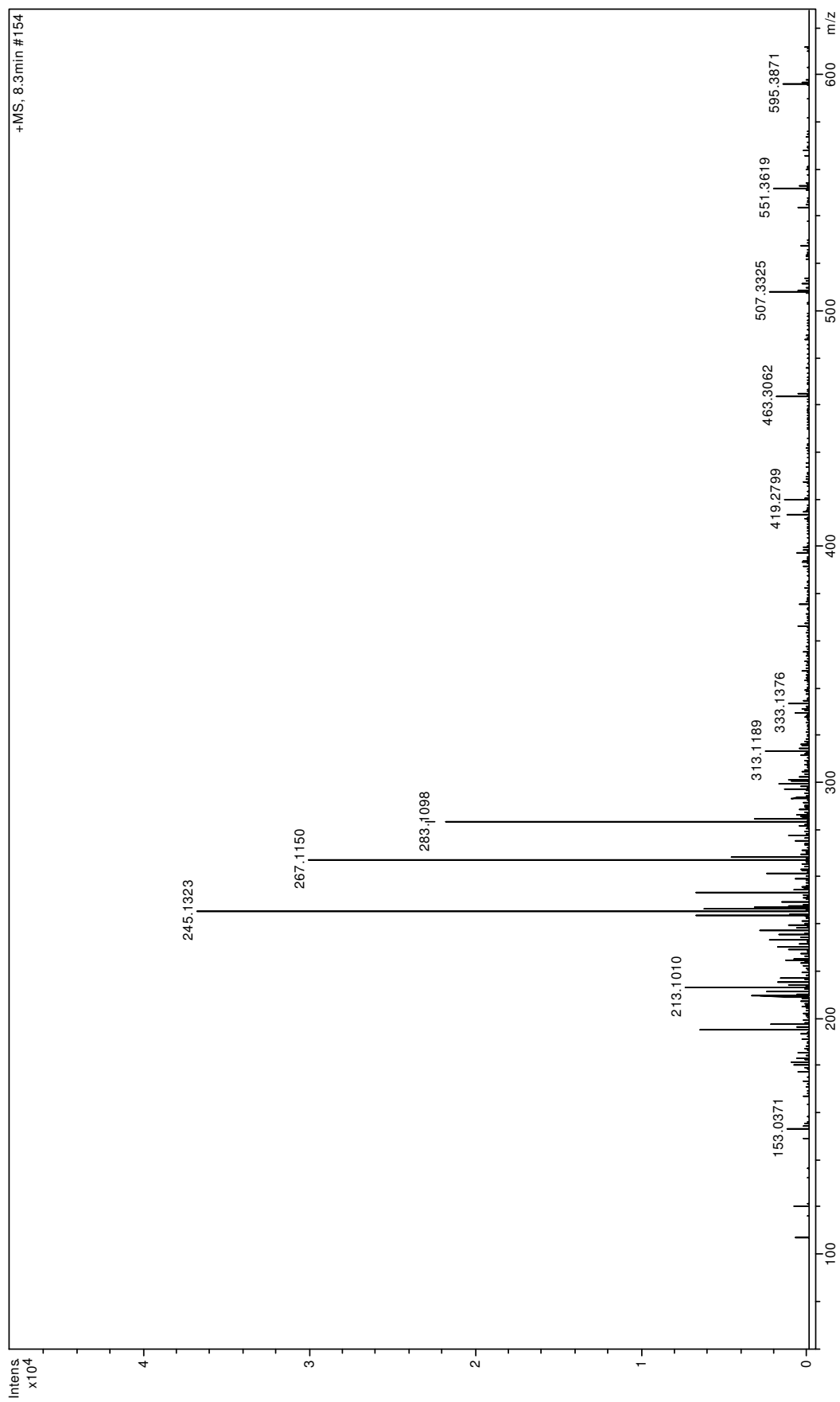


Figura 76 - Espectro de massas de **09** (ESI-EM, modo positivo)

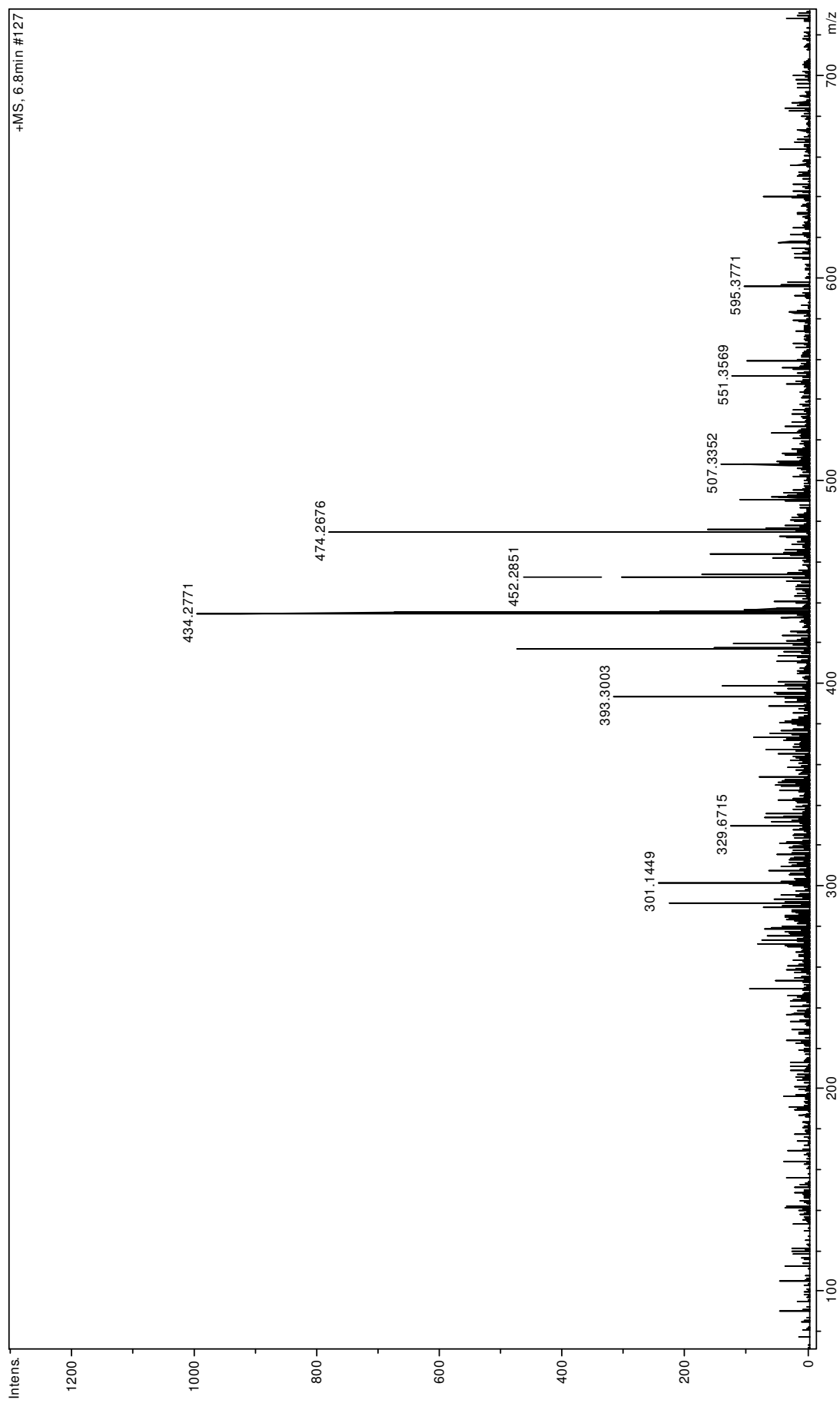


Figura 77 - Espectro de massas de **10** (ESI-EM, modo positivo)

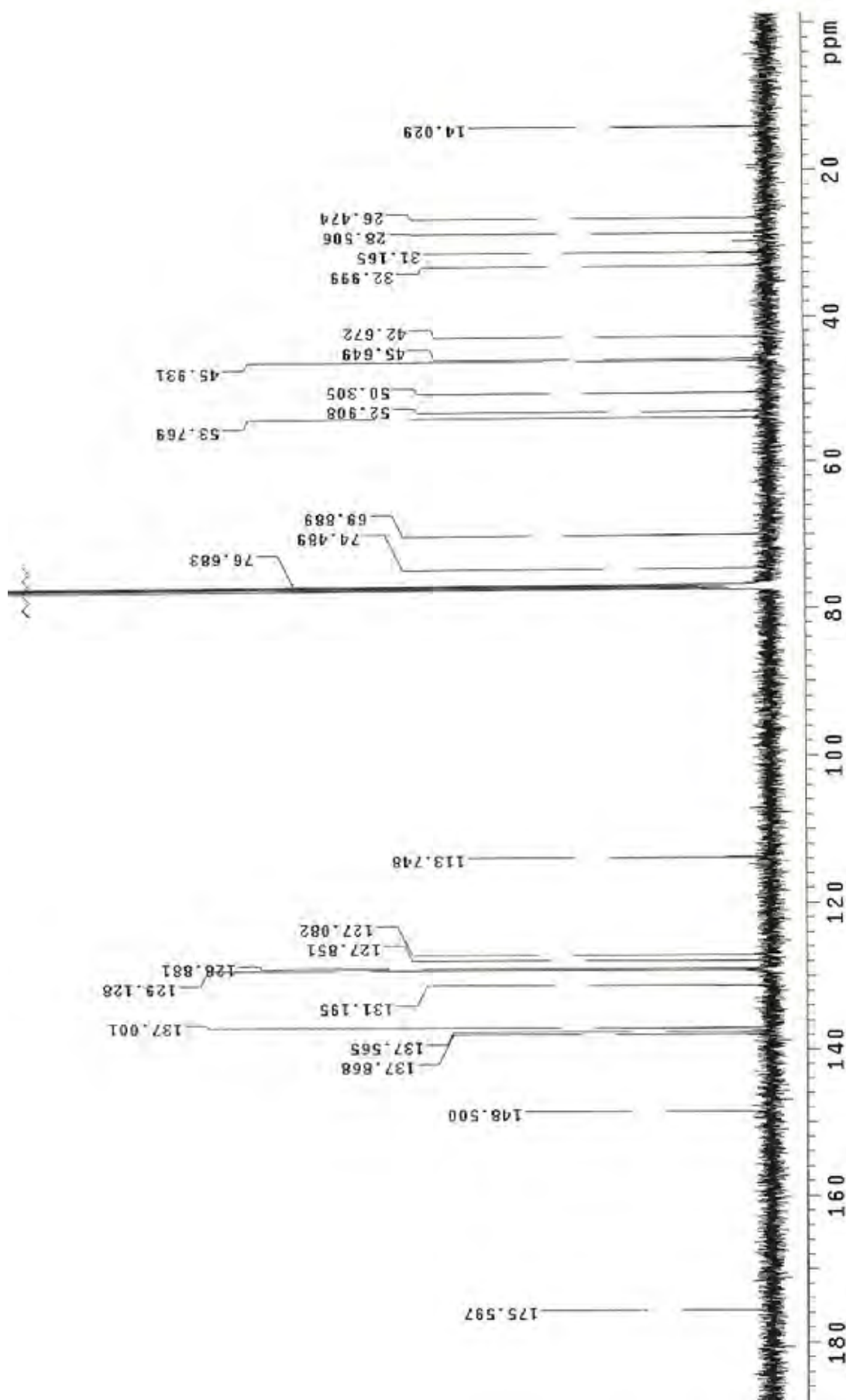


Figura 78 - Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (CDCl_3 , 125 MHz)

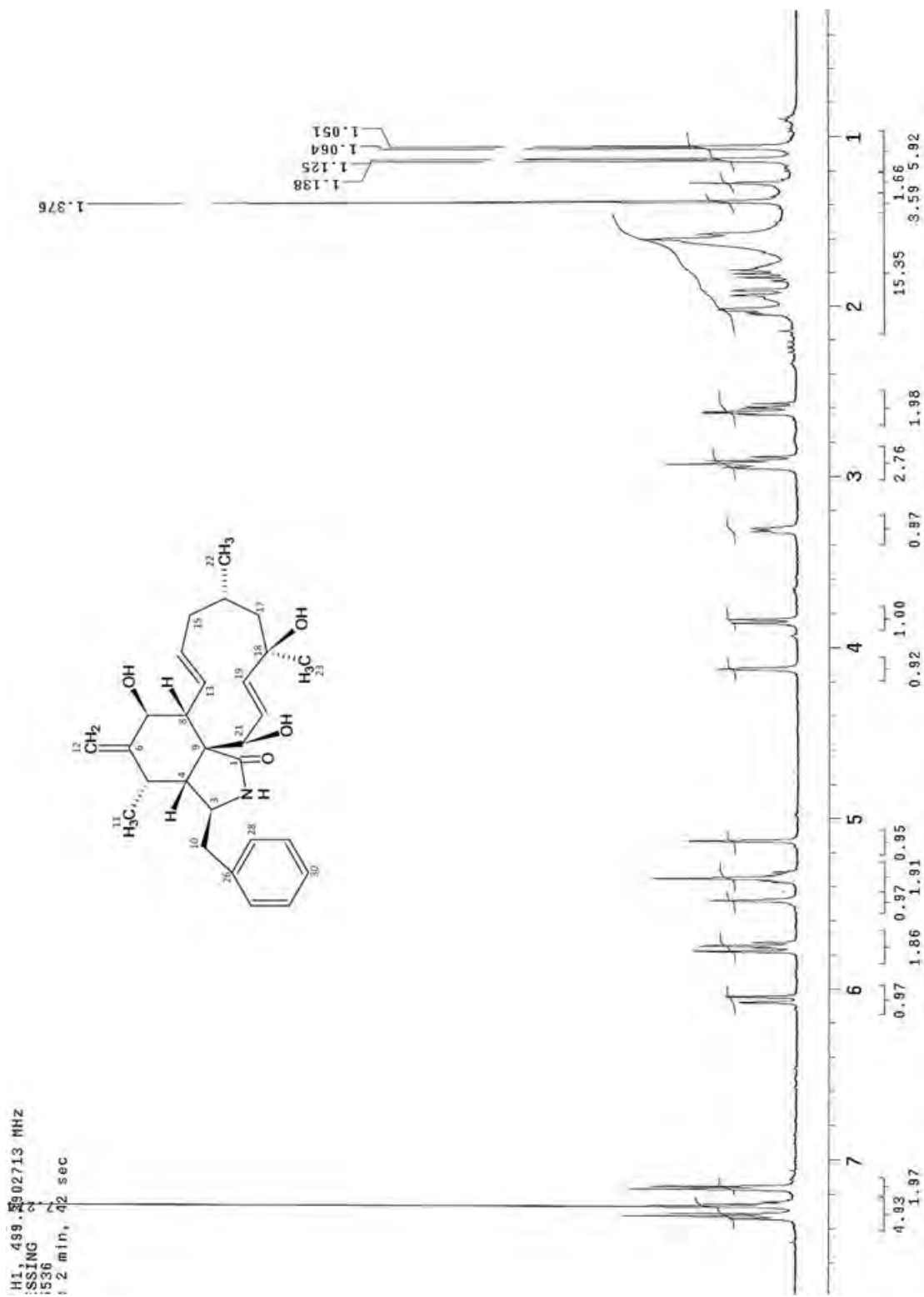


Figura 79 - Espectro de RMN de ^1H de **10** (CDCl_3 , 500 MHz)

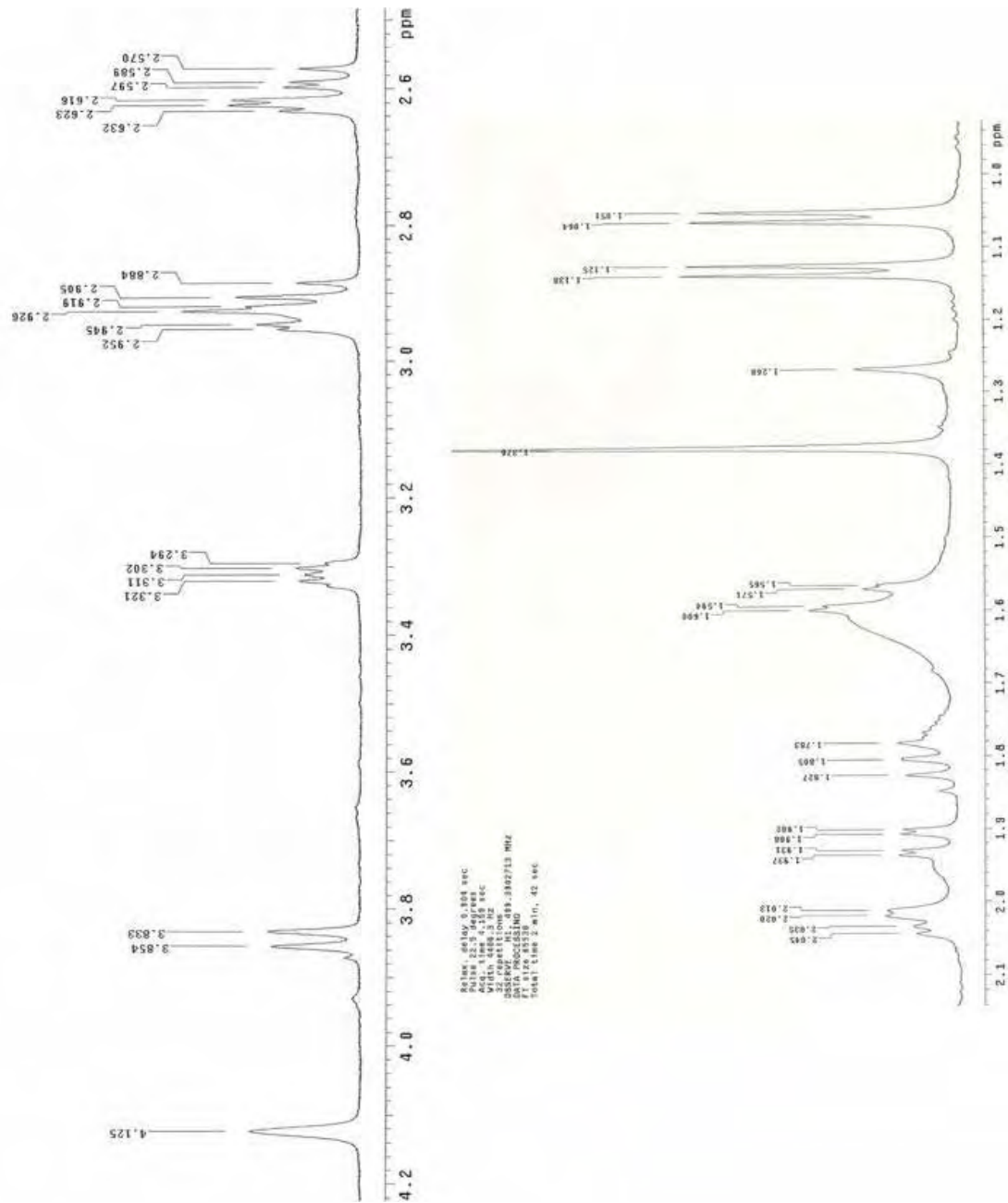


Figura 80 - Espectro de RMN de ¹H de **10** ampliado (CDCl₃, 500 MHz)

713 MHz

c

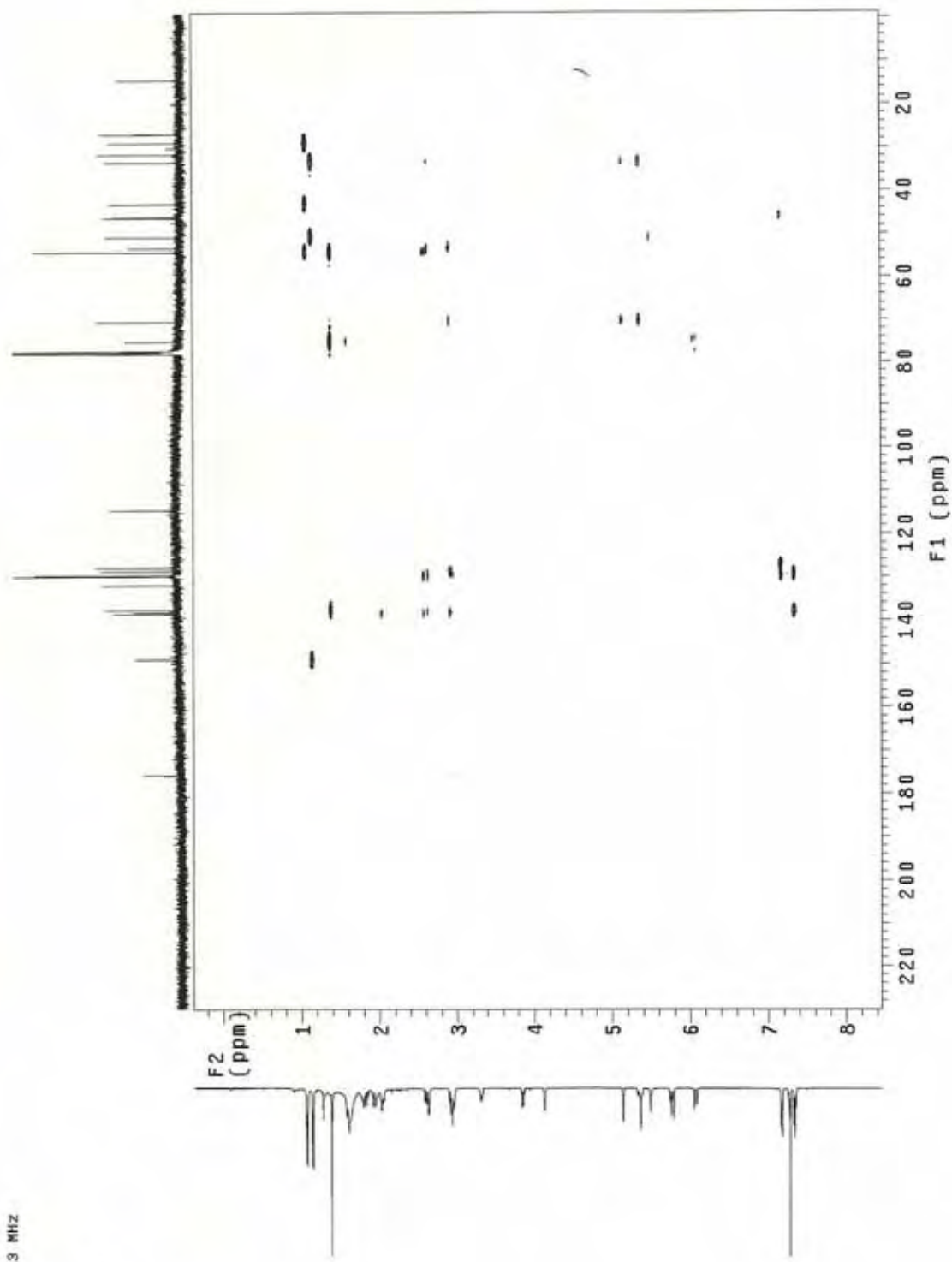


Figura 81 - Mapa de contorno HMBC de **10** (CDCl_3 , 125 MHz)

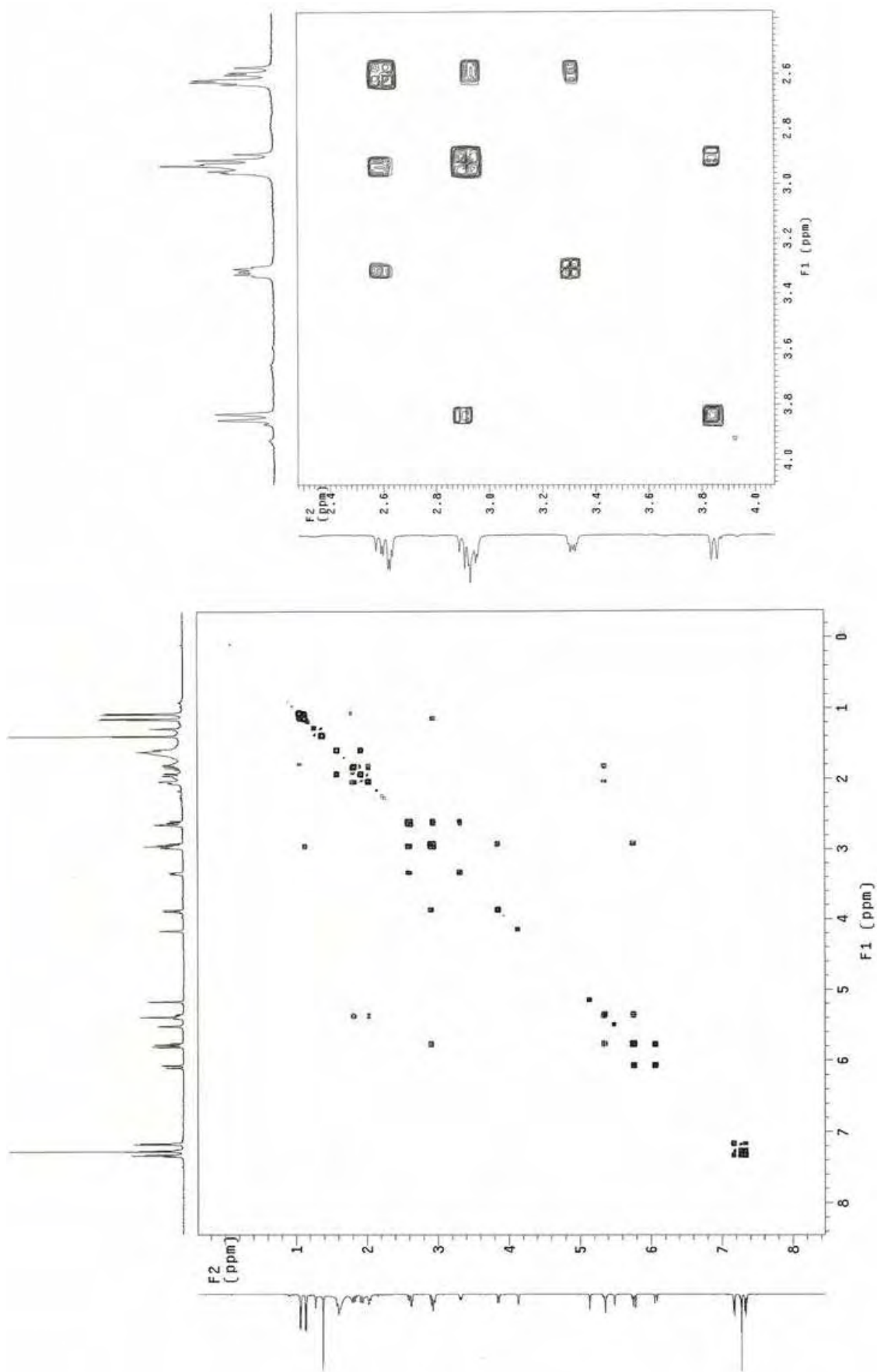


Figura 82 - Espectro de COSY e ampliado de **10** (CDCl_3 , 125 MHz)

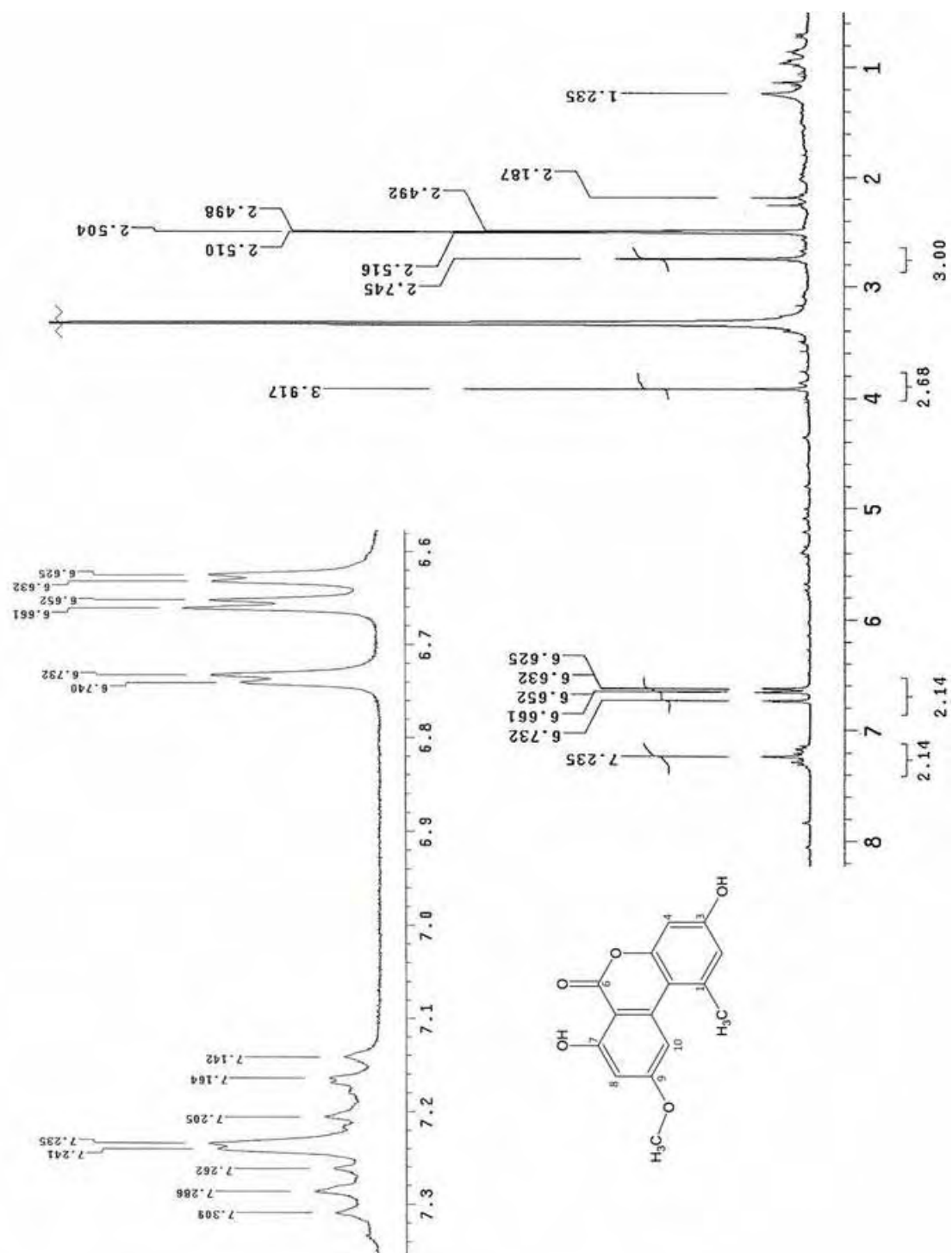


Figura 83 - Espectro de RMN de ^1H de **11** ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz)

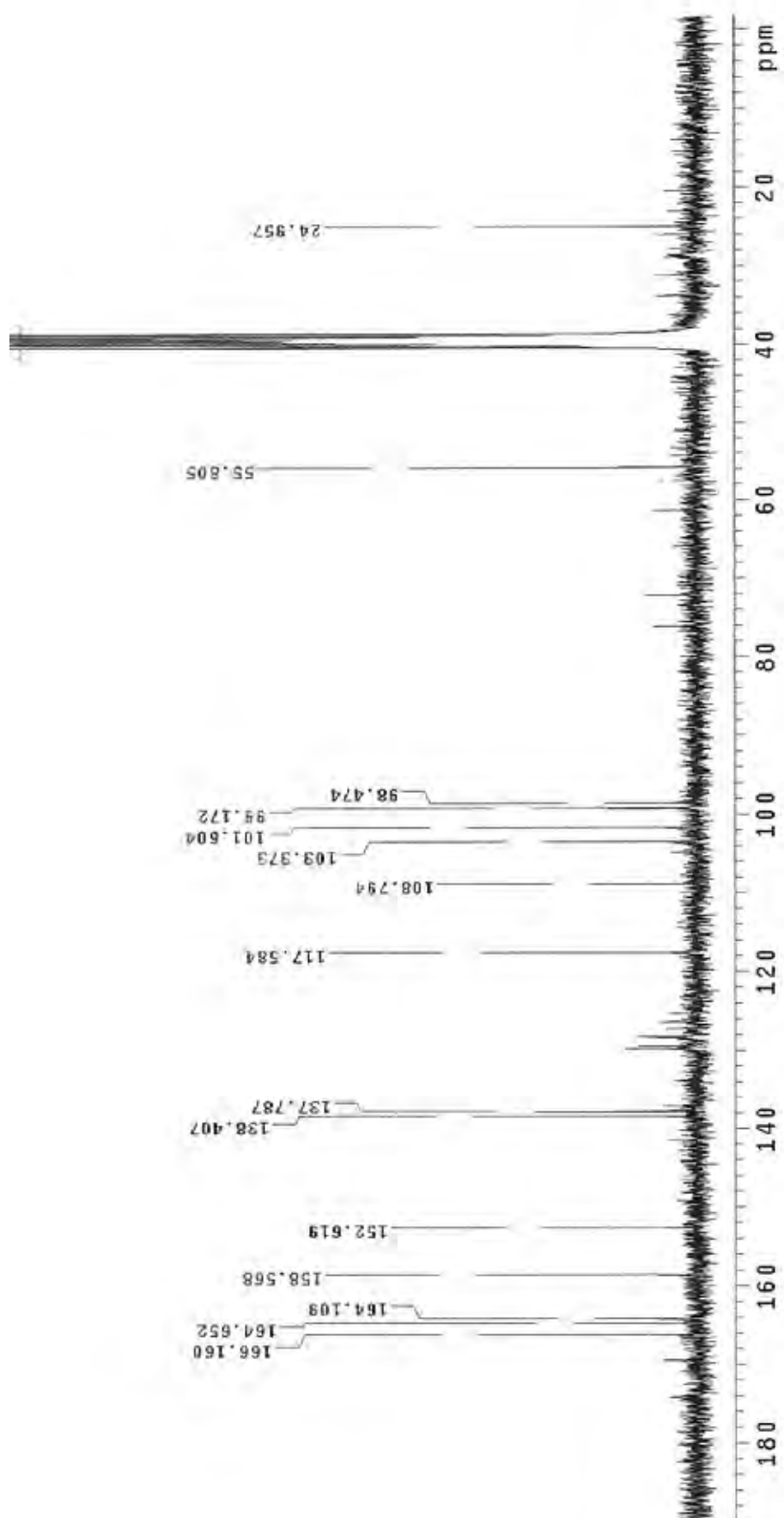


Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C de **11** ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz)

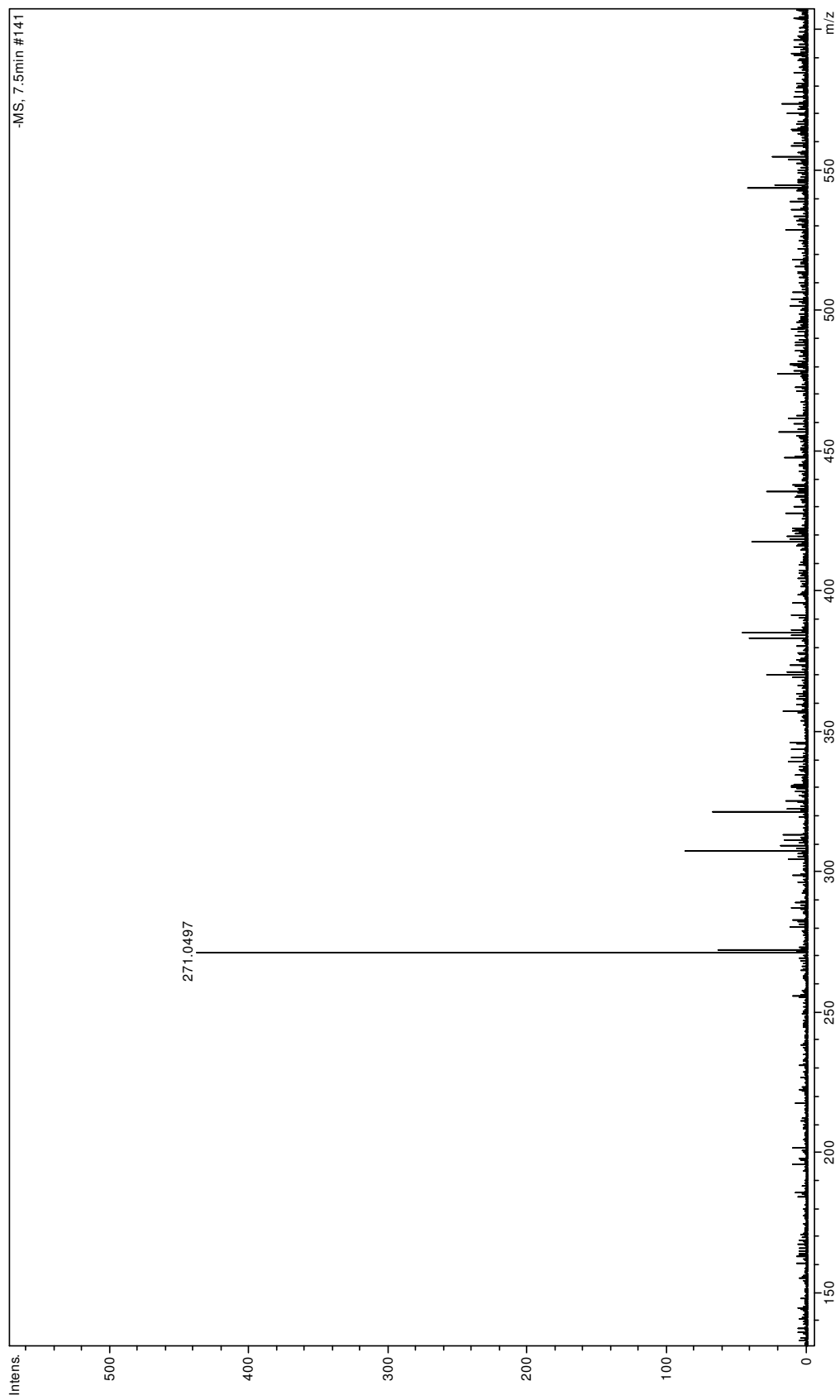


Figura 85 - Espectro de massas de **11** (ESI-EM, modo negativo)

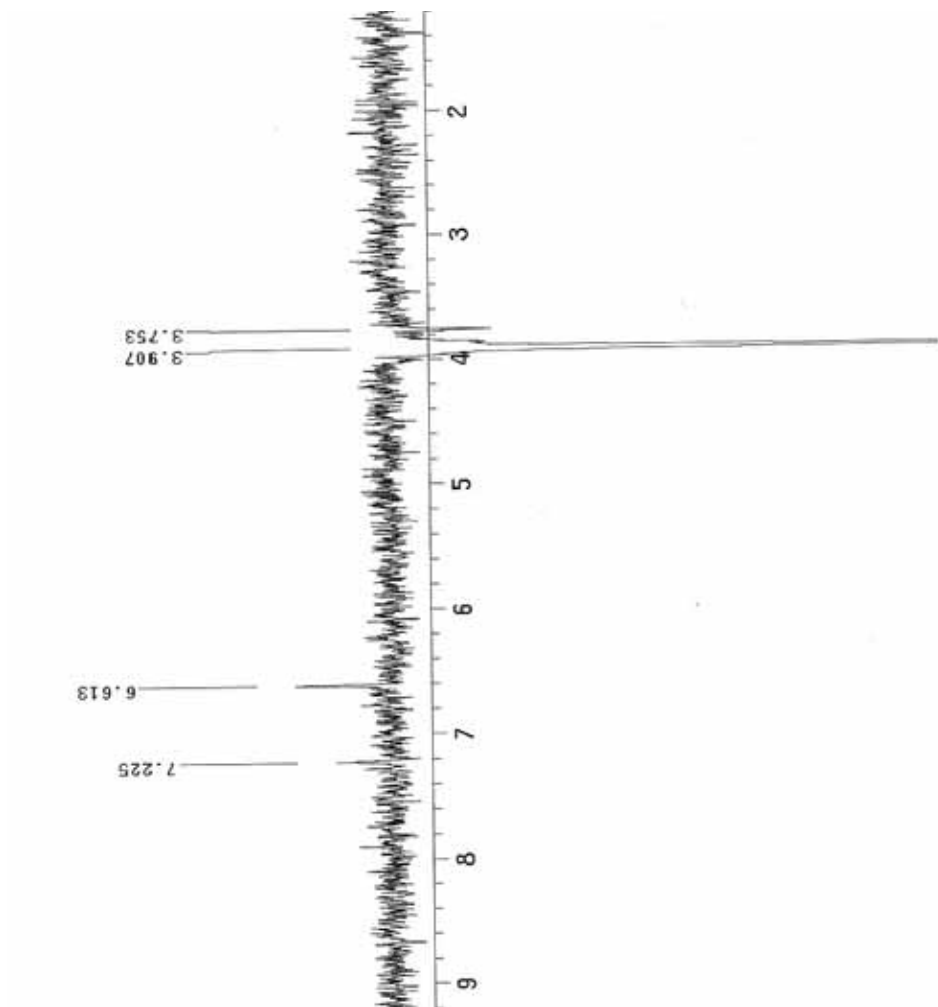


Figura 86 - Espectro de NOESY -1D de **11** (DMSO-*d*₆, 300 MHz)

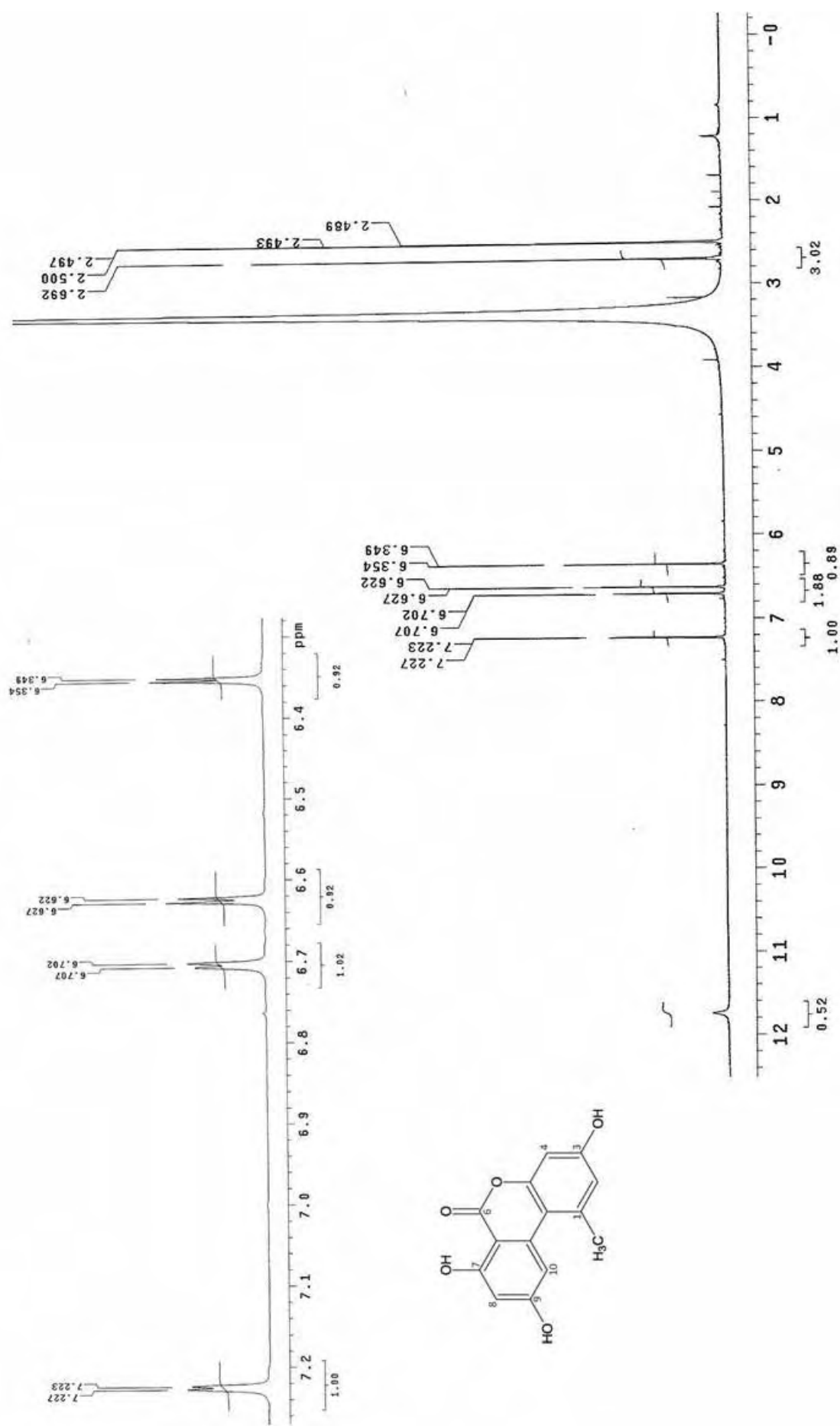


Figura 87 - Espectro de RMN de ^1H de **12** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)

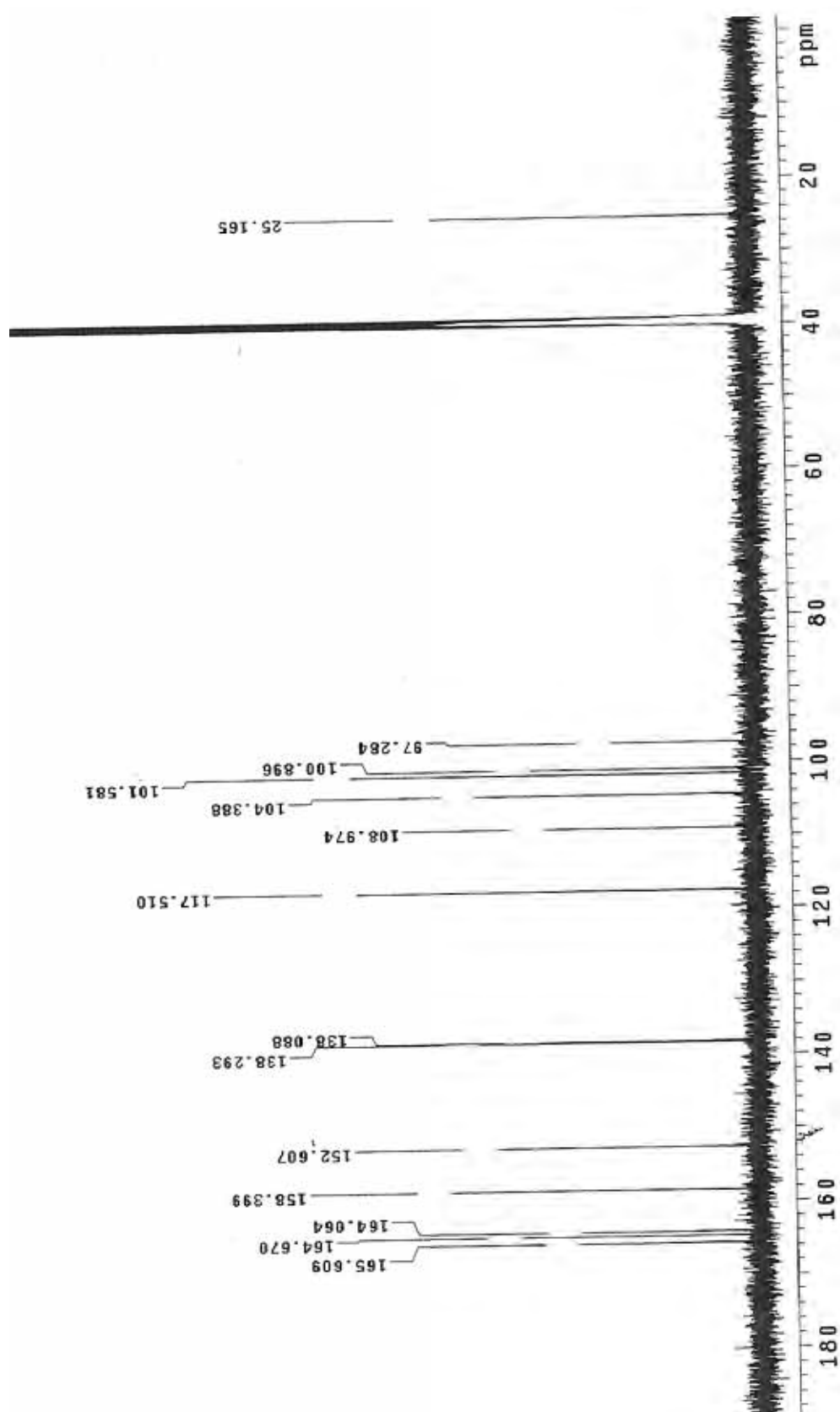


Figura 88 - Espectro de RMN de ^{13}C de **12** ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)

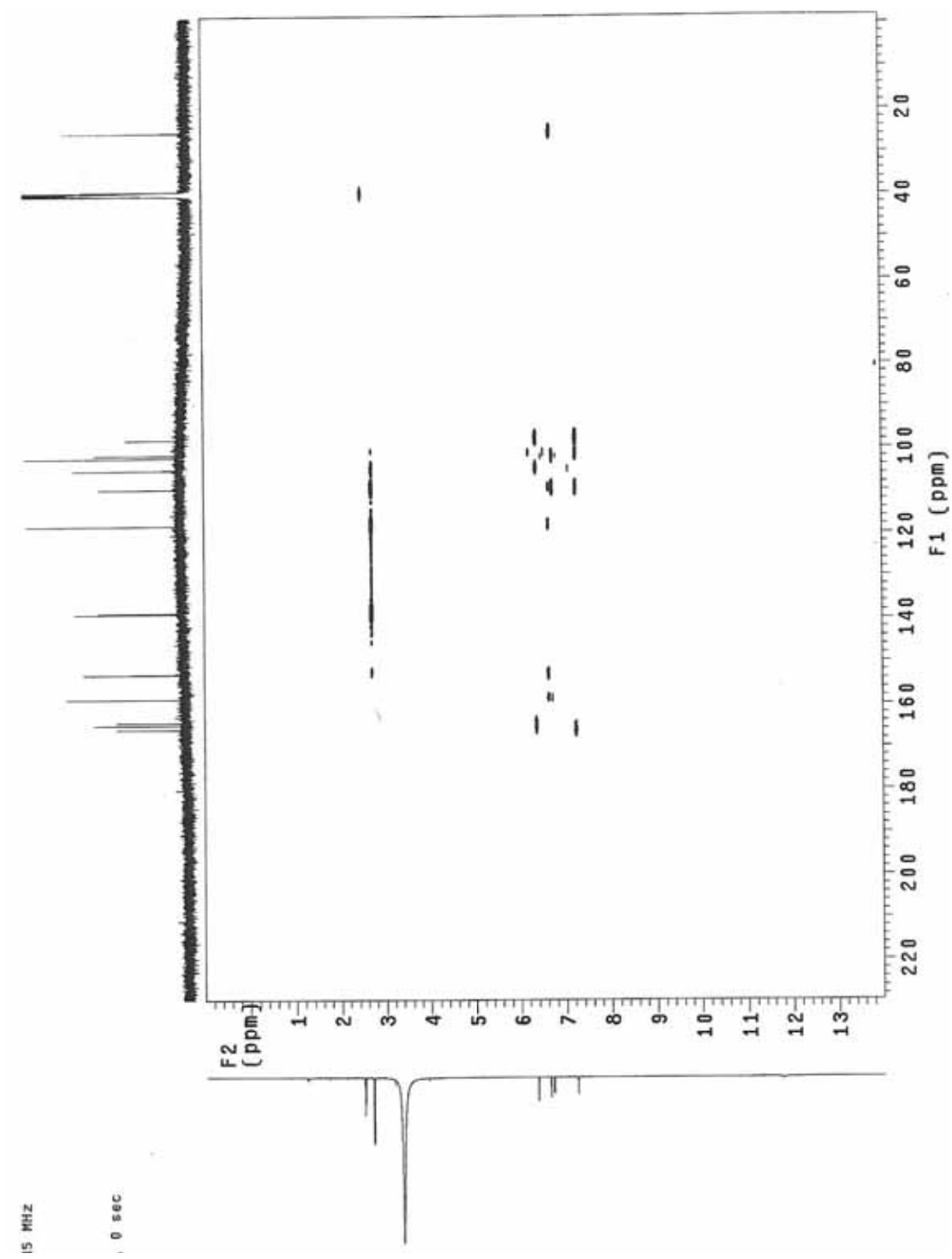


Figura 89 - Mapa de Contorno de HMBC de **12** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

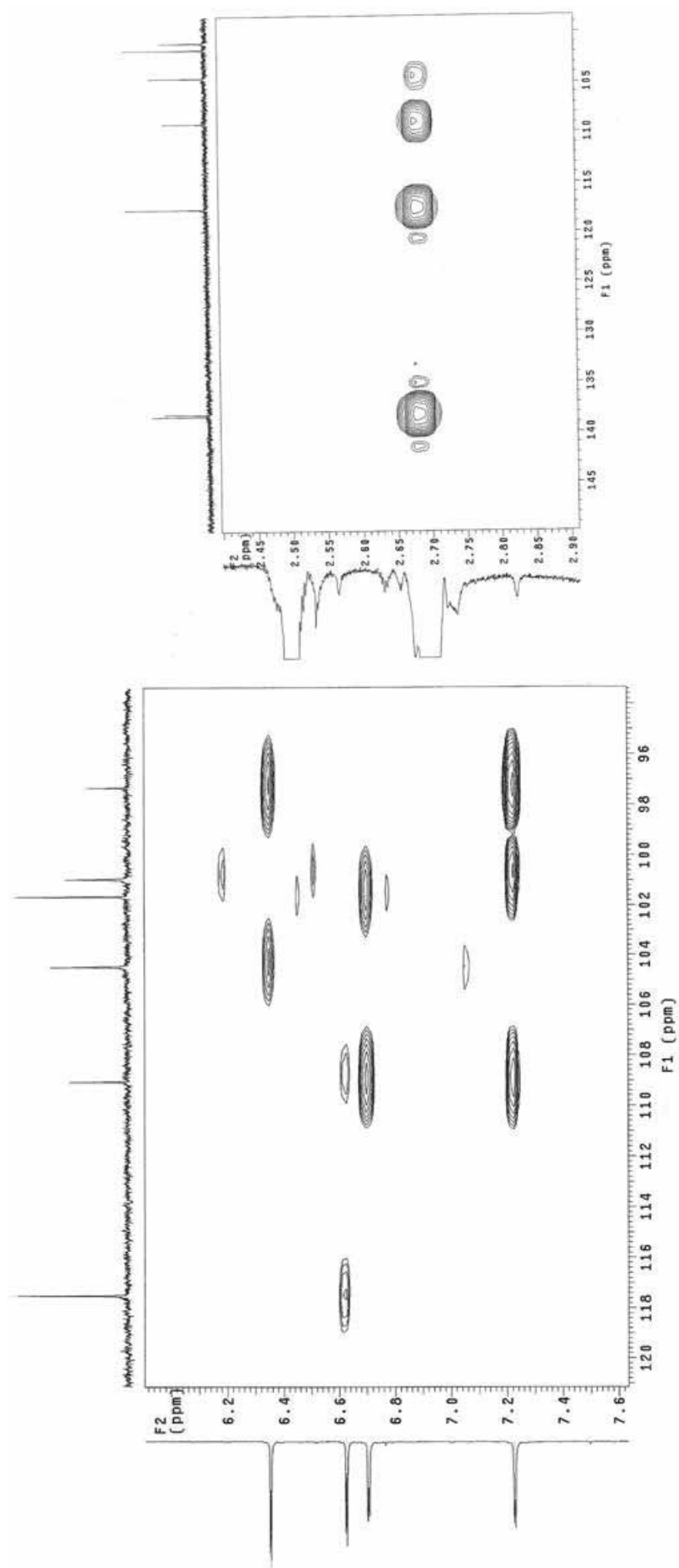


Figura 90 - Mapa de Contorno de HMBC ampliado de **12** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

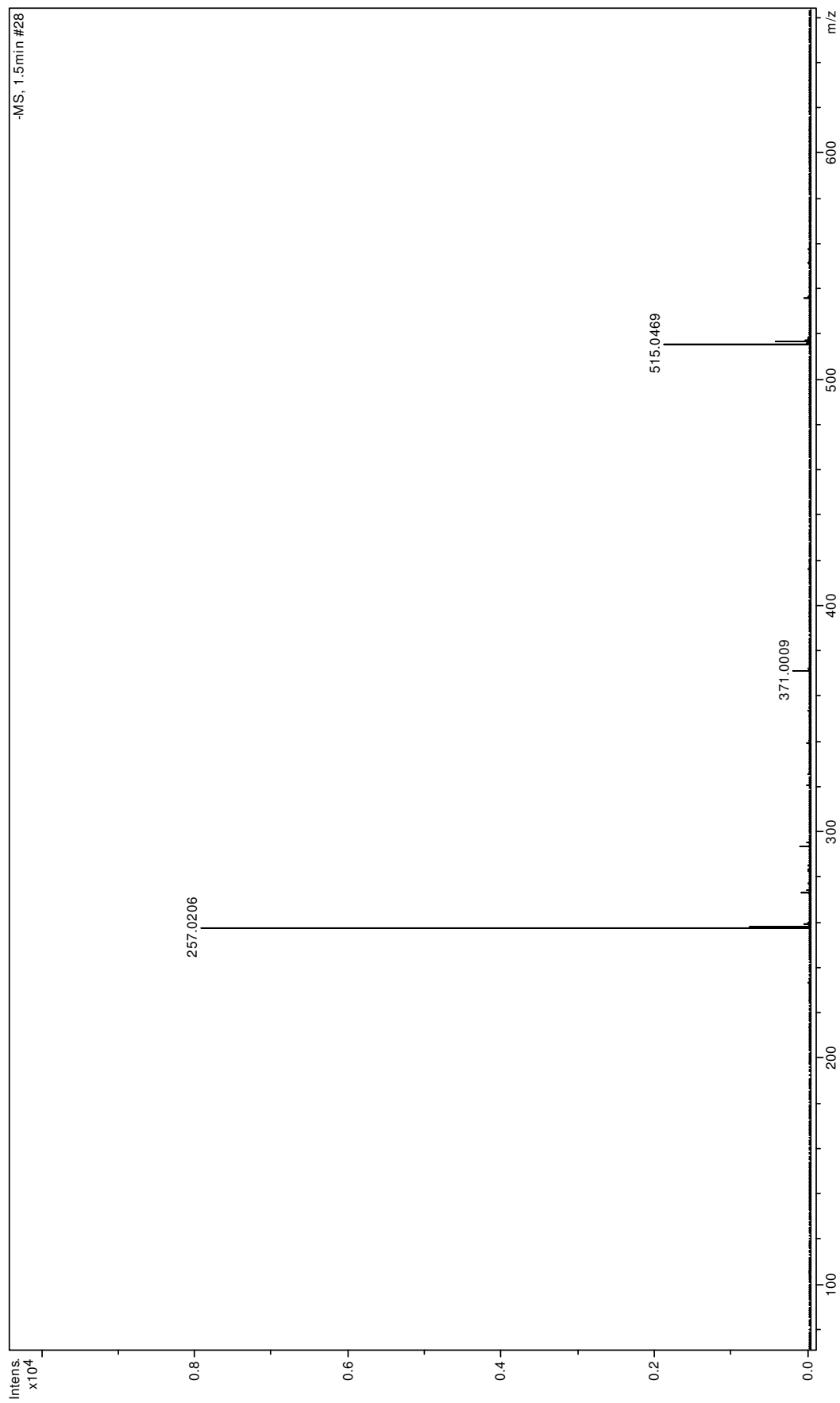


Figura 91 - Espectro de massas de **12** (ESI-EM, modo negativo)

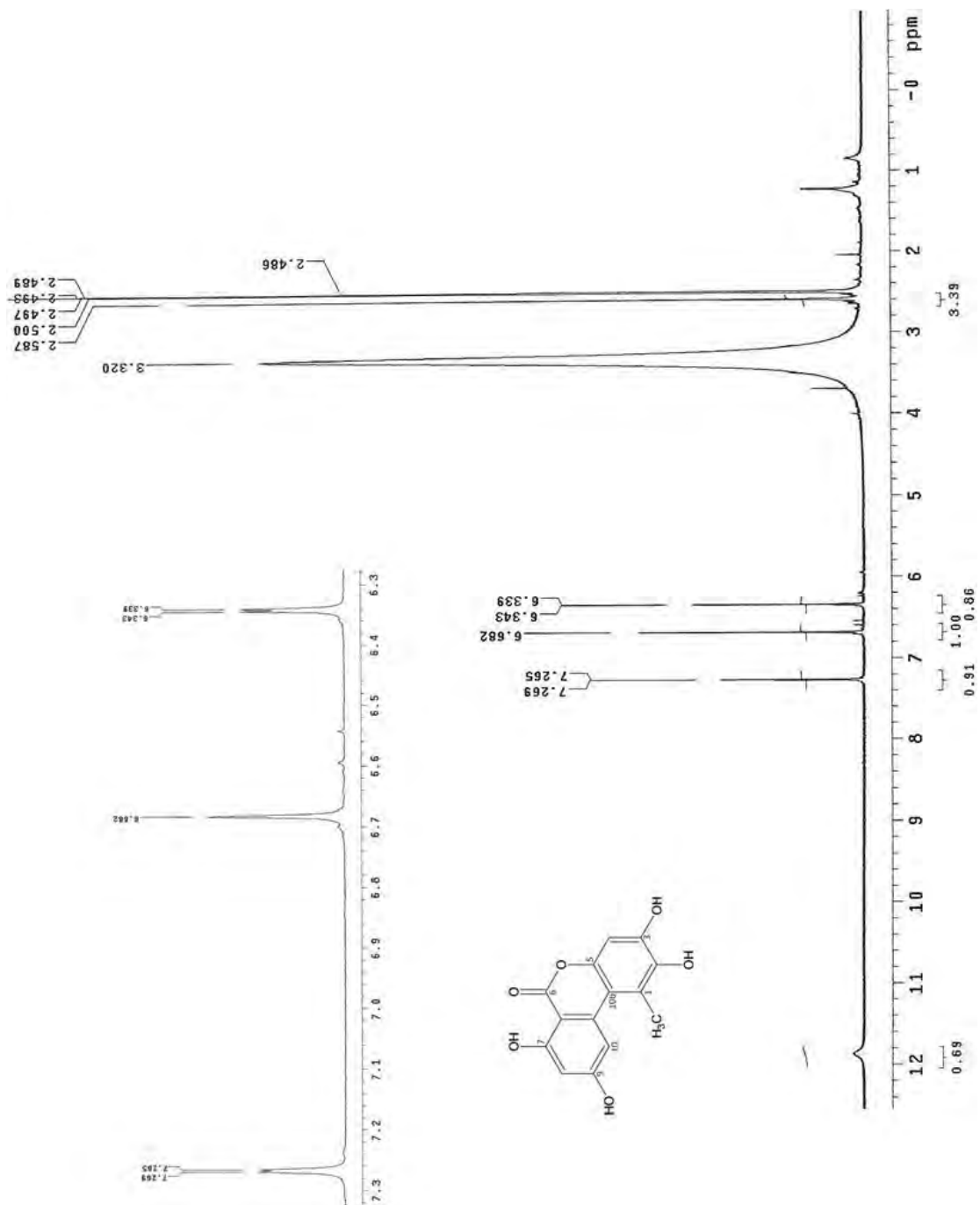


Figura 92 - Espectro de RMN de ^1H de **13** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)

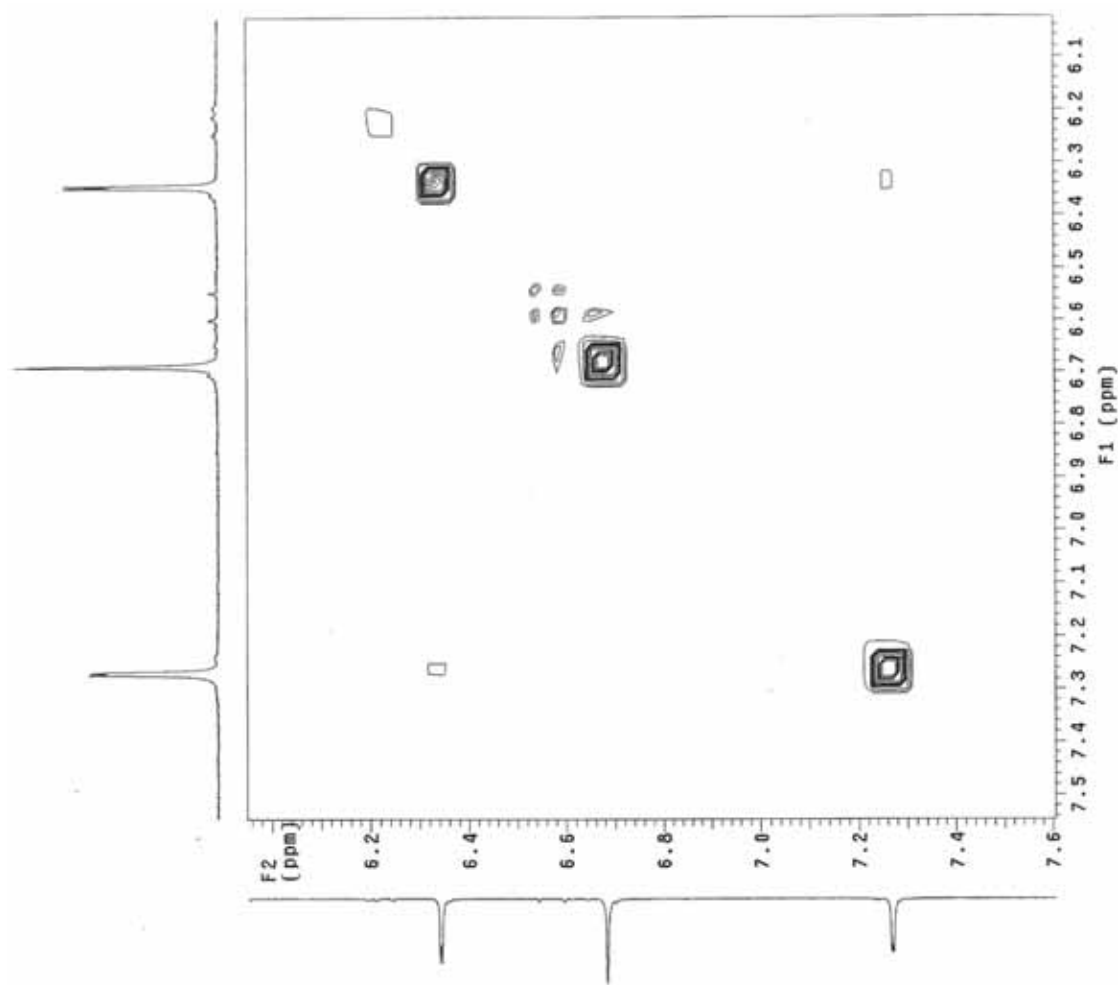


Figura 93 - Espectro de COSY de **13** (DMSO-*d*₆, 500 MHz)

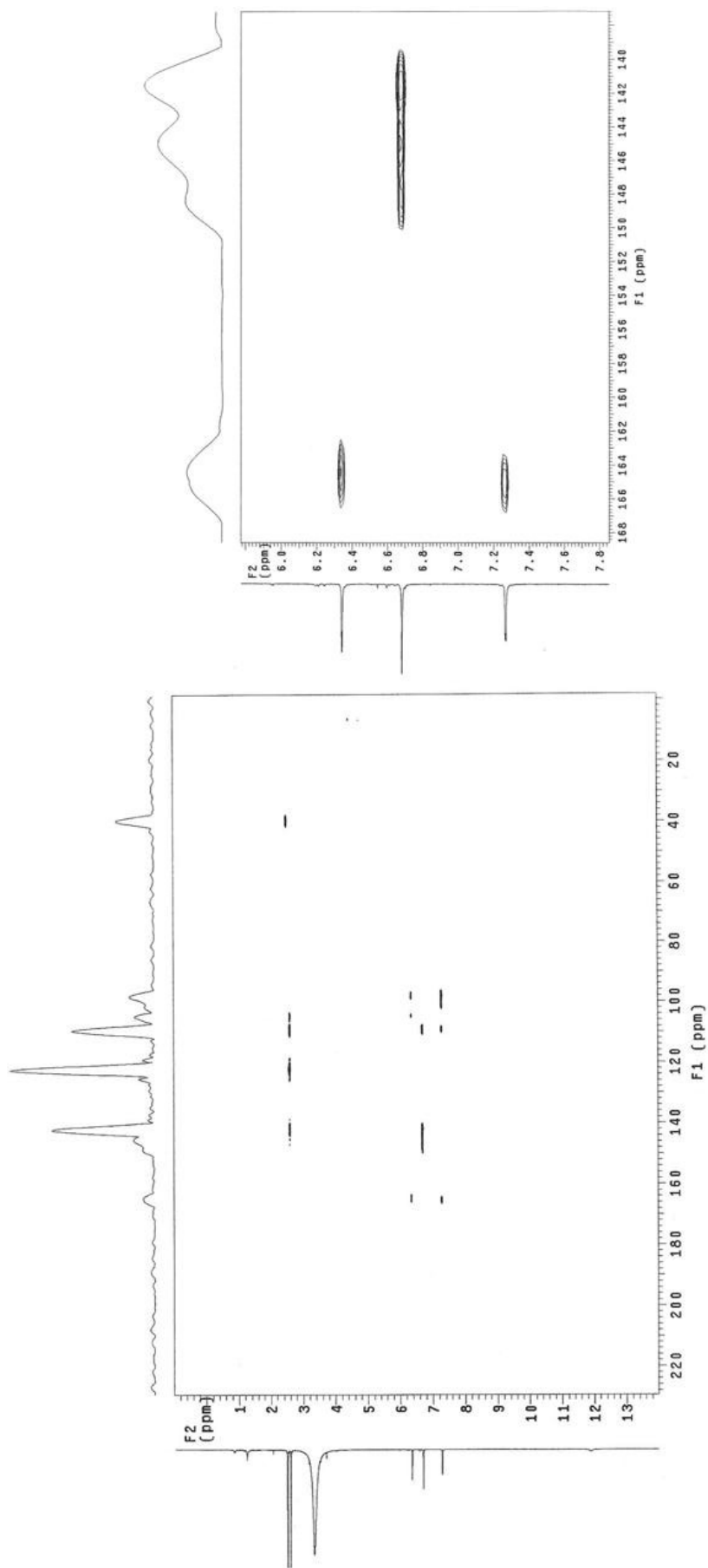


Figura 94 - Mapa de Contorno de HMBC de **13** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

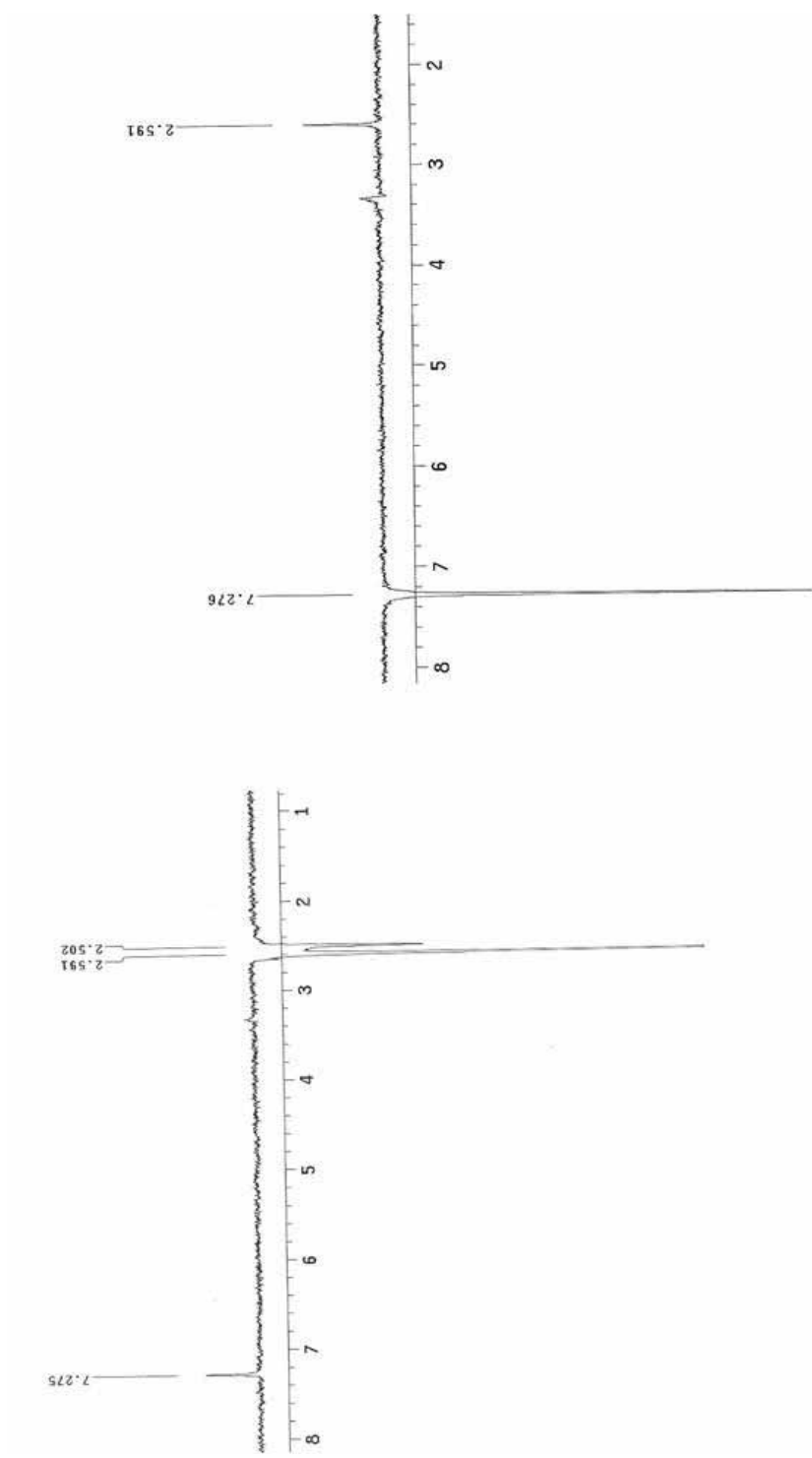


Figura 95 - Espectro de NOESY-1D de **13** (DMSO-*d*₆, 300 MHz)

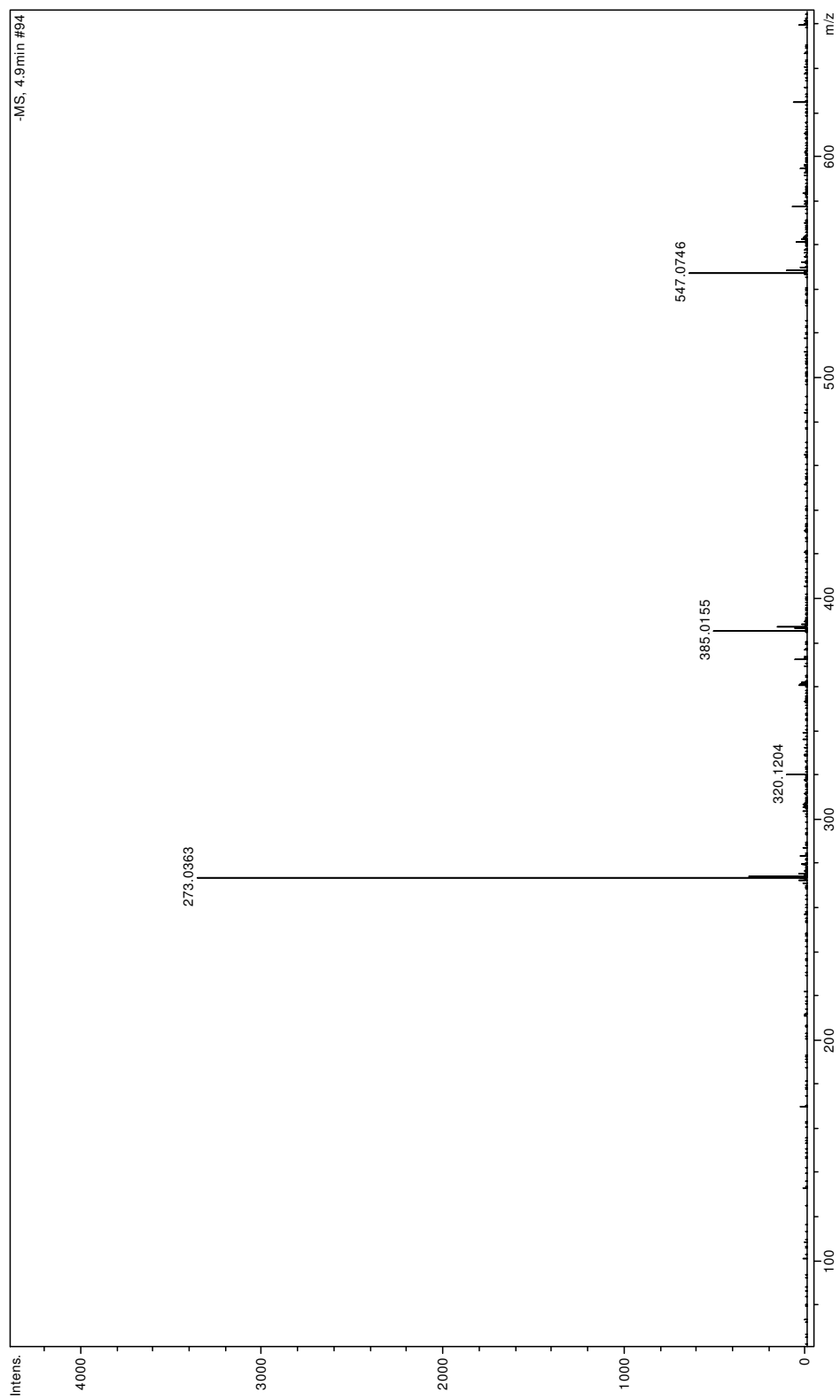


Figura 96 - Espectro de massas de **13** (ESI-EM, modo negativo)