

PATRÍCIA CARDOSO

**Detecção *in silico* e caracterização estrutural dos
constituintes micromoleculares majoritários do
fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*
isolado de folhas de *Garcinia xanthochymus*
usando HPLC-DAD-HRMS e GC-MS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Nasser Lopes

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

C268d	<p>Cardoso, Patrícia</p> <p>Detecção <i>in silico</i> e caracterização dos constituintes micromoleculares majoritários do fungo endofítico <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolado de folhas de <i>Garcinia xanthochymus</i> usando HPLC-DAD-HRMS e GC-MS/ Patrícia Cardoso. – Araraquara : [s.n], 2010 119 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Ian Castro-Gamboa Co-orientador: Márcia Nasser Lopes</p> <p>1. Química orgânica. 2. Fungos endofíticos. 3. Técnicas hífenadas. I. Título.</p>
-------	---

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

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

Nome: Patrícia Cardoso

Nascimento: 08/06/1984

Nacionalidade: Brasileira

Endereço Profissional: Rua Professor Francisco Degni, s/n, Quitandinha,
CEP: 14800-900, Araraquara – SP

Formação:

Graduação em Química pelo Instituto de Química – UNESP-Araraquara
concluído em 12/2007

Pós-graduação – Mestrado em Química pelo Instituto de Química – UNESP-
Araraquara concluído em 03/2010

Trabalhos apresentados na forma de painéis:

Cardoso, P. et al. “Detecção dos constituintes lipofílicos majoritários de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sac., fungo endofítico de *Garcinia xanthoxymus* (Clusiaceae) -

32ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química “Químicos para uma
potencia emergente”, 2009, Fortaleza - CE

Cardoso, P.; Lopes, M. N.; Araújo, A. R.; Silva, D.H.S. ; Bolzani, V.; Castro-
Gamboa, I. Characterization of main micromolecular constituents from
Colletotrichum gloeosporioides, endophytic fungi isolated from *Garcinia
xanthochymus* (clusiaceae) – 2º BCNP, 2009 São Pedro – SP

Cardoso, P.; Hokka, C. O.; Araújo, M. L.; Freitas, T. "Manutenção da
Capacidade produtiva de *Streptomyces clavuligerus*, XV CIC Ufscar- São
Carlos – SP, 2007".

Moura, A. C.; Silva, C. S.; Milaré, T.; Cardoso, P.; Schiavetto, M. G.; Giroto, G.; Rocha, Z. M.; Oliveira, L. A. A.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. "A Reciclagem do papel como ferramenta para o ensino de química e formação de cidadania". XII ENEQ Encontro Nacional de Ensino em Química, 2004.

Milaré, T.; Moura, A. C.; Capana, A. S.; Medeiros, J. B.; Cardoso, P.; Marques, R. N.; Oliveira, L. A.; Oliveira, O. M. M. "A química no ensino fundamental como proposta do eixo temático, "Tecnologia e Sociedade" dos Parâmetros Curriculares Nacionais".) XII ENEQ Encontro Nacional de Ensino em Química, 2004.

Cardoso, P.; Moura, A.C.; Boni, T. C.; Capana, A. S.; Schiavetto, M. G.; Medeiros, J. B.; Oliveira, L. A. A.; Marques R. N.; Oliveira, O. M. M. "Experimentação: Uma ferramenta no ensino de ligações químicas". XII ENEQ Encontro Nacional de Ensino em Química, 2004.

Trabalhos apresentados na forma oral:

Freitas, T.; Cardoso, P.; Araújo, M. L. G.; Hokka, C. O. "Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064 através de mutagênese clássica para a otimização da produção de ácido clavulânico." **2º Workshop de Biologia Molecular e Identificação de Biomoléculas**, 2007.

Freitas, T. L.; Hernandez, I. L. C.; Salvato, F.; Cardoso, P.; Araújo, M. L. G.; Hokka, C. O. "Produção de Ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* submetido a tratamento mutagênico com metil metano sulfonato." **Sinaferm XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2007.

Participação em eventos científicos:

Participação da comissão organizadora e participante do "III Workshop do NuBBE – Conservação e uso sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e da Mata Atlântica", 2008, Araraquara.

Participação da comissão organizadora e participante do “**VI Simpósio & Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP e III Reunião do BIOprospectA**”.

CARDOSO, P. Comissão Organizadora XXXVII Semana da Química “**As contribuições das novas tecnologias para a qualidade de vida**”, 2007, Araraquara.

CARDOSO, P. Comissão Organizadora XXXVI Semana da Química “**Ciência, tecnologia e sociedade- a busca do conhecimento**”, 2006, Araraquara.

Formação complementar

- | | |
|--------------------|--|
| 2003 - 2003 | Curso de curta duração.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2003 - 2003 | Curso de curta duração.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2003 - 2003 | Curso de curta duração.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2004 - 2004 | Curso de curta duração em Visualizando conceitos químicos em sala de aula: o.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2004 - 2004 | Curso de curta duração em A Abelha e o Ensino da Química.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Brasil. |
| 2005 - 2005 | Curso de curta duração em História da Ciência.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2005 - 2005 | Reciclagem.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2005 - 2005 | Curso de curta duração em Introdução a cosmetologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2005 - 2005 | Curso de curta duração.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil. |
| 2006 - 2006 | Curso de curta duração.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, |

Brasil.

2007 - 2007

Curso de curta duração.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo,
Brasil.

Idiomas

Inglês

Compreende: Razoavelmente, Fala: Razoavelmente, Escreve:
Razoavelmente, Lê: Razoavelmente.

PATRICIA CARDOSO


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

Araraquara, 18 de junho de 2010.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Iain Castro-Gamboa (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Patricia Mendonça Pauletti
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca

Dedico esta dissertação em especial à minha mãe Maria, as minhas irmãs Camila e Adriane, a Junior, e a minha família por todo o apoio, ajuda e incentivo que me deram para que eu pudesse chegar ate aqui.

Dedico também ao Professor Ian pelo incentivo e a confiança depositada nestes anos de trabalho, em que acreditou em minha capacidade.

AGRADEÇO....

... Primeiramente a Deus por todas as coisas e pessoas que Ele colocou durante essa jornada para que, mesmo nas situações difíceis, eu encontrasse o caminho correto.

... À minha família, ao Júnior, pelo apoio, incentivo e insistência para que eu terminasse meu trabalho sem desanimar.

... Ao Professor Ian, meu orientador, que ensinou o que precisava ser ensinado e guiou o que eu precisava buscar sozinha, além dos momentos de descontração, carisma e simpatia.

... À Prof.^a Márcia Nasser pela coorientação, ajuda no período em que o professor Ian esteve ausente.

... Aos colegas de laboratório por todo auxílio, em especial a Lisinéia pela atenção e paciência.

... Às minhas amigas Daniara e Rosilene por estarem sempre do meu lado me apoiando e ajudando nos momentos de alegria ou tristeza.

... Aos funcionários Albertinho e Nivaldo, pela ajuda na realização de experimentos e interpretação de espectros.

... A todos os funcionários do IQ pelo atendimento, informação e ajuda durante todo o período que estive na instituição.

... Ao CNPQ pela bolsa concedida

*Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo
teve início de outra maneira, mas já tantos sonhos se realizaram que não
temos o direito de duvidar de nenhum.*

Monteiro Lobato

RESUMO

O fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Garcinia xanthochymus*, foi cultivado em pequena escala nos meios líquidos, (400 mL) MDB, Extrato de Malte, YM, Czapek e em meio sólido (150 g) de milho tipo canjica, a 28°C, em regime estático. Após triagem por ensaios biológicos, e análise por ¹H RMN e HPLC-DAD, os meios de milho e extrato de malte foram selecionados para o estudo químico, sendo cultivados em larga escala. As matrizes brutas foram submetidas a estratégias de separação e de desreplificação utilizando as técnicas hífenadas: cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas de alta resolução, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e também a ressonância magnética nuclear, sendo a detecção dos constituintes majoritários realizada *in silico*, através do uso de bases de dados públicas e pertencentes ao NuBBE. Os experimentos realizados permitiram a detecção de 14 substâncias: 6 por CG-MS (extrato DCM de milho) – dihexadecanoato de glicerila (1); trioctadec-9-enoato de glicerila (2); *sn*1', 2' octadeca-9,12-dienoato de glicerila (3); *sn*1',3' octadeca-9,12-dienoato de glicerila (4); ácido 6,11-hexadecanóico (5); geranilinalol (6); e 7 por HPLC-DAD-HRMS: colletodiol (7); fischerina (8); sambutoxina (9); micosporina-glicina (10); ciperina (11); micosporina serina (12); arginomicina (13) e aspergillomarasmina B (14). Os compostos 2, 3 e 4, majoritários na matriz bruta foram isolados. Os metabolitos detectados por HPLC-DAD-HRMS (7-10) foram também detectados por ¹H RMN.

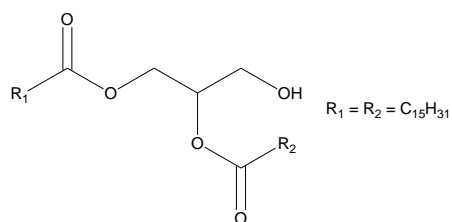
Palavras-chave: Fungos endofíticos. *C. gloeosporioides*. Técnicas hífenadas. Elucidação *in situ*.

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides, an endophytic fungi isolated from *Garcinia xanthochymus*, was initially cultivated on the following liquid media (400 mL): MDB, YM, Czapek and static solid medium (150 g) using bleached corn at 28 °C. After careful screening using bioassays, ¹H NMR and HPLC-DAD, the corn and malt extract were selected for further studies and large-scale growth. The crude matrixes were submitted to several separation strategies using dereplication and hyphenated techniques such as high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD), high resolution mass spectrometry (HRMS), gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) as well as nuclear magnetic resonance (NMR). Most of the detected molecules were achieved using an *in silico* approach towards the data mining of public and NuBBE's databases. This approach lead us to detect 14 substances; 6 by means of CG-MS (dichloromethane extract from corn's media): glyceril dihexadecanoate (**1**); glyceril trioctadec-9-enoate (**2**); *sn1*`, 2` glyceril octadec-9,12-dienoate (**3**); *sn1*`, 3` gliceryl octadec-9,12-dienoate (**4**); 6,11-hexadecanóic acid (**5**); geranyl linalool (**6**); and 7 by means of HPLC-DAD-HRMS: colletodiol (**7**); fischerin (**8**); sambutoxin (**9**); micosporin glycin (**10**); cyperin (**11**); micosporin serin (**12**); arginomicin (**13**) e aspergillomarasmin B (**14**). Compounds **2**, **3** and **4**, been the most abundant in the matrix, were isolated and individually characterized. Compounds **7-10** were also confirmed using ¹H NMR by means of *in situ* elucidation.

Keywords: Endophytic fungi. *Colletotrichum gloeosporioides*. Hyphenated techniques. *In situ* elucidation.

LISTA DE SUBSTÂNCIAS DETECTADAS/ELUCIDADAS



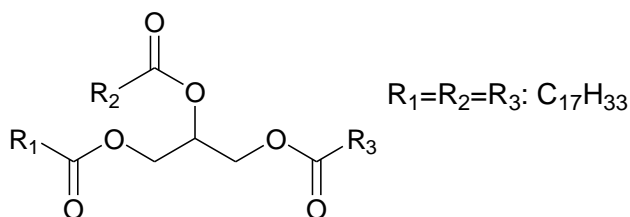
Substância 1

$C_{35}H_{68}O_5$

m/z 568,5067

Pg. 69

Dihexadecanoato de glicerila



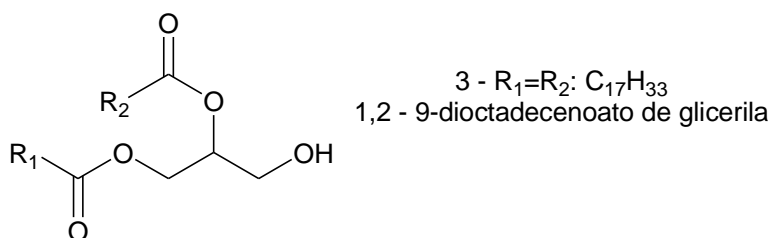
Substância 2

$C_{57}H_{104}O_6$

m/z 884,7833

Pg. 71

Trioctadec-9-enoato de glicerila



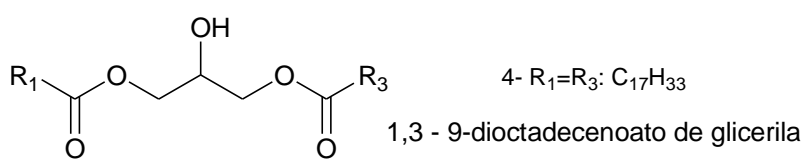
Substância 3

$C_{39}H_{72}O_5$

m/z 620,5380

Pg. 72

Dioctadeca-9,12-dienoato de glicerila



Substância 4

$C_{39}H_{72}O_5$

m/z 620,5380

Pg. 72

Dioctadeca-9,12-dienoato de glicerila



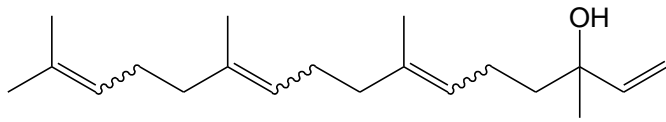
6,11 - hexadecadienol

Substância 5

$C_{16}H_{32}O_2$

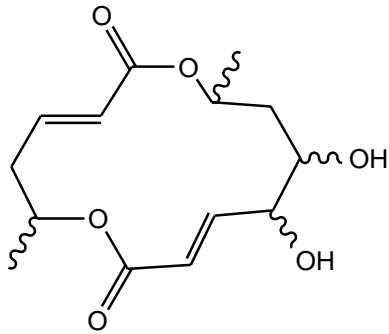
m/z 280, 2042

Pg. 74



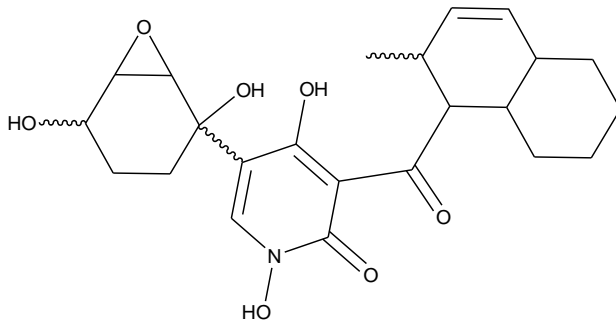
Geranillinalol

Substância 6
 $C_{21}H_{34}O$
 m/z 290,2610
Pg. 75



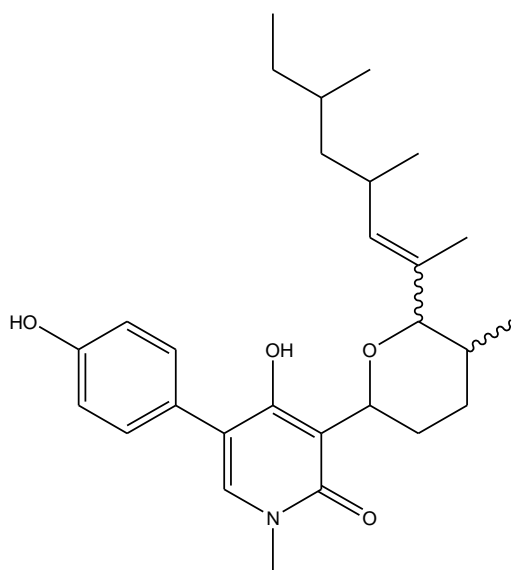
Colletodiol

Substância 7
 $C_{14}H_{20}O_6$
 m/z 284,1260
Pg. 86



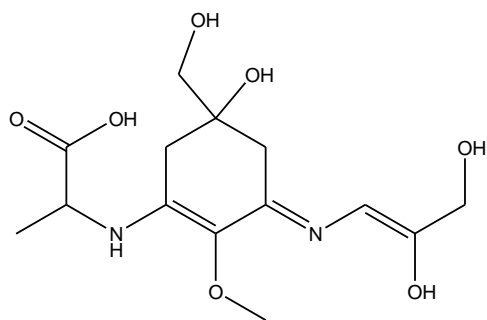
Fischerina

Substância 8
 $C_{23}H_{30}NO_7$
 m/z 431,1944
Pg. 89



Sambutoxina

Substância 9
 $C_{28}H_{36}NO_4$
 m/z 453,2879
Pg. 92



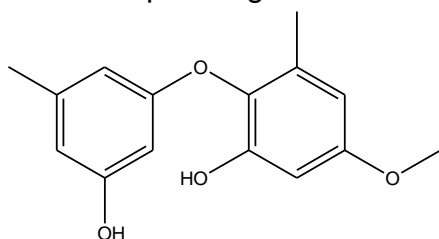
Micosporina-glicina

Substância 10

$C_{22}H_{36}N_2O_7$

m/z 330,1427

Pg. 95



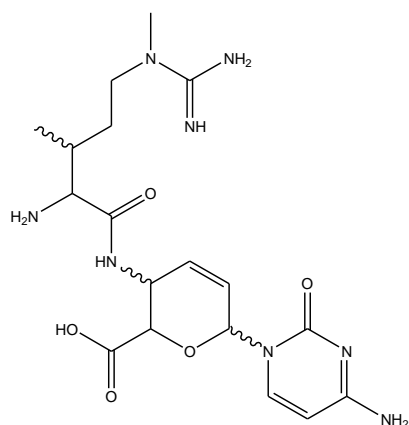
Ciperina

Substância 11

$C_{15}H_{16}O_4$

m/z 260,1049

Pg. 98



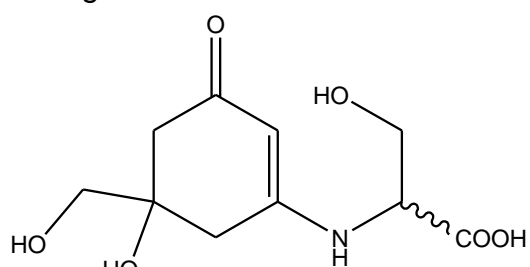
Arginomicina

Substância 12

$C_{18}H_{28}N_8O_5$

m/z 436,2183

Pg. 100



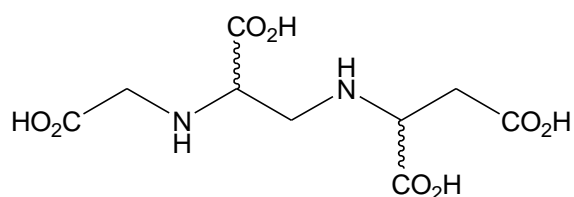
Micosporina-serina

Substância 13

$C_{18}H_{28}N_8O_5$

m/z 275,1005

Pg. 102



Aspergillomarasmina B

Substância 14

$C_{18}H_{28}N_8O_5$

m/z 278,0750

Pg. 103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	a) Estrutura do Taxol; b) A espécie vegetal <i>Taxus brevifolia</i>	29
Figura 2-	Foto ilustrativa de espécies do gênero <i>Colletotrichum</i>	29
Figura 3-	a-Superfície da colônia <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , após 15 dias; b. detalhe das massas de conídios de coloração salmão (sob lupa). Microscopia óptica: c. conídios – fase assexuada (x 1000)	30
Figura 4-	Metabólitos secundários encontrados para <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	31
Figura 5-	Foto ilustrativa de <i>Garcinia xanthochymus</i>	32
Figura 6-	Crescimentos de <i>C. gloeosporioides</i> em grande escala nos meios de malte e milho	44
Figura 7-	Cromatogramas a 276 nm das frações Fr1 a Fr40 do extrato ECMiB	50
Figura 8-	Redução do reagente DPPH	53
Figura 9-	Comparação dos cromatogramas do extrato de DCM dos diversos meios de cultura com e sem o fungo (controle).	59
Figura 10-	Comparação dos cromatogramas do extrato de AcOEt dos diversos meios de cultura com e sem o fungo (controle).	59
Figura 11-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto DCM de <i>C. gloeosporioides</i> em Czapek (CDCl_3 , 500 MHz).	60
Figura 12-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de <i>C. gloeosporioides</i> em Czapek (DMSO-d_6 , 500 MHz).	61
Figura 13-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto dcm de <i>C. gloeosporioides</i> em extr. Malte (CDCl_3 , 500 MHz).	62
Figura 14-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de <i>C. gloeosporioides</i> em Extr. de malte (DMSO-d_6 , 500 MHz).	62
Figura 15-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de <i>C. gloeosporioides</i> em milho (CDCl_3 , 500 MHz).	63
Figura 16-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de <i>C. gloeosporioides</i> em milho (DMSO-d_6 , 500 MHz).	64
Figura 17-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de <i>C. gloeosporioides</i> em PDB(CDCl_3 , 500 MHz).	65
Figura 18-	Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de <i>C.</i>	

<i>gloeosporioides</i> emPDB (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	65
Figura 19- Espectro de ¹ H RMN do extrato bruto DCM de <i>C. gloeosporioides</i> em YM (CDCl ₃ , 500 MHz).	66
Figura 20- Espectro de ¹ H RMN do extrato bruto DCM de <i>C. gloeosporioides</i> em YM (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	67
Figura 21- TIC positivo de GC-MS de ECMiA (vermelho); ECMiB (preto); EAMiA (azul) E EAMB(marron).	68
Figura 22- Expansão do TIC positivo de ECMiA.	69
Figura 23- Espectro de massas GC-MS. de 1: tempo de retenção: 65,17 minutos.	69
Figura 24- Substância 1: Dihexadecanoato de Glicerila.	69
Figura 25- Proposta de fragmentação para <i>m/z</i> 239 e 98.	70
Figura 26- Proposta de fragmentação para <i>m/z</i> 43 e 57.	70
Figura 27- Composto no tempo de retenção 67, 548 min.	70
Figura 28- a-Espectro de massas do derivado do ácido octadecenóico obtido na base de dados NIST 21; b) estrutura de 2 .	71
Figura 29- Proposta de fragmentação para os íons <i>m/z</i> 73.	71
Figura 30- Proposta de fragmentação para os íons <i>m/z</i> 43, 55 e 265.	71
Figura 31- Espectro de massas obtido por GC-MS no tempo de retenção 67,92 minutos.	72
Figura 32- Espectro de massas, da base de dados NIST 21 para o composto 9-dioctadecenoato de glicerila.	72
Figura 33- Substância detectada 9-dioctadecenoato de glicerila.	72
Figura 34 - Proposta de fragmentação para os íons <i>m/z</i> 43, 55, 57 e 98.	73
Figura 35- Espectro de massas GC-MS obtido para o composto no tempo de retenção 67,7 minutos.	73
Figura 36- Espectro de massas, detectado na base Willey 229 de 5: 6,11-hexadecadienol.	74
Figura 37- Estrutura de 5 .	74
Figura 38- Proposta de fragmentação dos fragmentos <i>m/z</i> 44.55 e 82 do	

6,11- hexadecadienol.	74
Figura 39- Composto no tempo de retenção 73,79 min.	75
Figura 40- a) Espectro de massas do geraniil-linalol, obtido na base de dados Willey 229; b) estrutura de 6: geraniil-linalol.	75
Figura 41- Proposta de fragmentação para o íon m/z 69,0.	75
Figura 42- Estrutura atribuída para a substância 2 .	76
Figura 43- Estrutura atribuída para as substâncias 3 e 4 .	78
Figura 44- Comparação entre os TIC positivo e negativo do extrato EAMiB.	80
Figura 45- Espectro de ^1H RMN do extrato bruto de acetato de etila -EAMiB.	81
Figura 46- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 6.5 a 11.0 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	82
Figura 47- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 6.5 a 7.5 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	82
Figura 48- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 5.3 a 6.3 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	83
Figura 49- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 2.8 a 4.9 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	83
Figura 50 Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 1.96 a 2.39 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	84
Figura 51- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 2.8 a 4.9 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	84
Figura 52- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 1.22 a 1.62 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	85
Figura 53- Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 2.8 a 4.9 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.	85
Figura 54 Espectro de massas EAMiB, modo positivo, no tempo de retenção 8,1 min.	86
Figura 55- Espectro de massas EAMiB, modo negativo, no tempo de retenção 8,1 min.	86
Figura 56- Substância provável para o tempo de retenção 8,1 minutos.	86
Figura 57- Espectro de massas MS/MS de m/z 307.	86

Figura 58- Proposta de fragmentação para formação dos íons: m/z 289 e 273 adutos com Na^+ .	87
Figura 59- Espectro de massas de EAMiB, modo positivo, no tempo de retenção 9,8 minutos.	87
Figura 60- Espectro de massas de EAMiB, modo negativo, no tempo de retenção 9,8 minutos.	88
Figura 61- Substância provável para o tempo de retenção 9,8 minutos.	89
Figura 62- Espectro de massas MS/MS do íon m/z 432, 2814.	89
Figura 63- Proposta de fragmentação para formação do íon m/z 415; 416; 257; 283 e 178.	89
Figura 64- Espectro de massas de EAMiB, modo positivo, no tempo de retenção 11.0 minutos.	90
Figura 65- Espectro de massas de EAMiB, modo negativo, no tempo de retenção 11.0 minutos.	92
Figura 66- Substância provável para o tempo de retenção 11,0 minutos.	92
Figura 67- Espectro de massas MS/MS de 8 .	92
Figura 68- Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 314e m/z 237.	92
Figura 69- Proposta de fragmentação para a formação do íon m/z 360.	93
Figura 70- Espectro de massas de EAMiB, no modo positivo, no tempo de retenção 23,7 minutos.	93
Figura 71- Espectro de massas de EAMiB, no modo negativo, no tempo de retenção 23,7 minutos.	94
Figura 72- Substância provável para o tempo de retenção 11,0 minutos.	95
Figura 73- Espectro de massas MS/MS de m/z 353, 2285.	95
Figura 74- Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 307 e m/z 335 (aduto com Na^+).	95
Figura 75- Comparação entre o espectro de massas de EAMB no modo positivo (azul) e no modo negativo (vermelho).	96
Figura 76- Espectro de massas de EAMB, modo positivo, no tempo de retenção 3,8 minutos.	97
Figura 77- Espectro de massas de EAMB, modo negativo, no tempo de retenção	

3,8 minutos.	98
Figura 787-Substância 11 detectada no tempo de retenção 3,8 minutos.	98
Figura 79- Espectro de massas MS/MS de m/z 261, 1298.	98
Figura 80- Proposta de fragmentação para formação de m/z 153, 0546.	99
Figura 81- Espectro de massas de EAMB, modo positivo, no tempo de retenção 10,5 minutos.	99
Figura 82- Espectro de massas de EAMB, modo negativo, no tempo de retenção 10,5 minutos.	99
Figura 83- Substância 12 detectada no tempo de retenção 10,5 minutos.	100
Figura 84- Espectro de massas MS/MS de 437.2348.	100
Figura 85- Proposta de fragmentação para formação de m/z 420, 1989.	100
Figura 86- Espectro de massas de EAMB, modo positivo, no tempo de retenção 19,4 minutos.	101
Figura 87- Espectro de massas de EAMB, modo negativo, no tempo de retenção 19,4 minutos.	101
Figura 88- Substância detectada no tempo de retenção 19,4 minutos.	101
Figura 89- Espectro de massas MS/MS de m/z 276, 1229 (aduto com H^+).	102
Figura 90- Proposta de fragmentação para a formação de m/z 245.7937 (aduto com H^+).	102
Figura 91- Espectro de massas de EAMB, modo positivo, no tempo de retenção 23,9 minutos.	102
Figura 92- Espectro de massas de EAMB, modo negativo, no tempo de retenção 23,9 minutos.	103
Figura 93- Substância detectada a 23,9 minutos.	103
Figura 94- Espectro de massas MS/MS de m/z 301, 1442.	103
Figura 95- Gráfico de % de seqüestro do radical DPPH em função da concentração	104
Figura 96- Gráfico da concentração x % de seqüestro do radical DPPH.	104
Figura 97- Gráfico da % de inibição da polimerização do heme (hematina).	106
Figura 98- Resultado do teste de inibição da polimerização do heme (hematina).	106
Figura 99- nsaio de bioautografia com os extratos produzidos por <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes meios de cultura.	109

Figura 100-Ensaio de bioautografia com os extratos produzidos por <i>C. gloeosporioides</i> em Malte e Milho.	109
Figura 101-Ensaio de atividade anticolinesterásica com os extratos produzidos por <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes meios de cultura.	111
Figura 102-Ensaio de atividade anticolinesterásica com os extratos produzidos por <i>C. gloeosporioides</i> em Malte e Milho.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Exemplos de interações entre endofito/hospedeiro.	28
Tabela 02 - Meios de cultura: composição e especificações.	42
Tabela 03 - Extratos brutos obtidos, em pequena escala, dos diversos meios de cultura.	45
Tabela 04- Condição cromatográfica para as amostras EAMiB e EAMB.	47
Tabela 05- Condição cromatográfica para as amostras EAMiB e EAMB.	48
Tabela 06- Frações obtidas no fracionamento do extrato bruto ECMiB em larga escala.	48
Tabela 07- Condição cromatográfica para as amostras EAMiB e EAMB.	51
Tabela 08- Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 2 (CDCl_3).	76
Tabela 09- Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substâncias 3 e 4 (CDCl_3).	79
Tabela 10- Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substâncias 7 : comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB.	87
Tabela 11- Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substâncias 8 : comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB.	90
Tabela 12- Dados de rmn de ^{13}C (125 mhz) das substância 9 : comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB.	93
Tabela 13- Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substância 10 : comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB.	96
Tabela 14- Resultado do ensaio de atividade antifungica frente a espécies de <i>C. paraplois</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> (diferentes meios de cultura).	107
Tabela 15- Resultado do ensaio de atividade antifungica frente a espécies de <i>C. paraplois</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> (malte e milho).	108
Tabela 16- Ensaio de atividade antifungica e valores de RF (malte e milho)	110
Tabela 17- Ensaio de atividade tripanocida: % de parasitas mortos (diferentes meios de cultura).	110
Tabela 18- Ensaio de atividade tripanocida: % de parasitas mortos (malte e milho)	111

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01-	Isolamento das cepas fúngicas.	41
Esquema 02-	Crescimento, em pequena escala, de <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes meios de cultura.	43
Esquema 03-	Crescimento de <i>C. gloeosporioides</i> em grande escala nos meios de cultura de malte e milho.	43
Esquema 04-	Cultivo de gx.01 em diversos meios de cultura, obtenção do extrato bruto em pequena escala e verificação do perfil químico/biológico.	45
Esquema 05-	Cultivo de gx.01 em diversos meios de cultura, obtenção do extrato bruto em grande escala (malte e milho) e verificação do perfil químico/biológico.	46
Esquema 06-	Fracionamento em ccde fase normal si do extrato bruto diclorometânico de milho - ECMiB.	49

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
2J	Acoplamento a duas ligações
3J	Acoplamento a três ligações
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micra
$[M]^+$	Íon molecular
AA	Agar Água
AcOEt	Acetato de etila
PDA	Batata dextrose Agar
c	Concentração
C-18	Sílica de fase reversa tipo octadesil silano
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
$gCOSY$	Gradient Correlated Spectroscopy
d	Dubleto
DAD	Detector de arranjo de fotodiodo
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
$dddd$	Duplo duplo duplo dubleto
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ESI-EM	Espectro de Massas- Electrospray Ionization

Ext. M	Extrato de Malte
Fr.	Fração
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHMQC	Gradient Heteronuclear Quantum Correlation
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
PDB	(Potato dextrose Agar)
Me	Metila
MeOH	Metanol
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
nm	Nanômetro
Pág.	Página
ppm	Parte por milhão
Prep.	Preparativo
<i>q</i>	Quarteto
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete
UV-Vis	Ultravioleta visível
YM	Yeast Medium

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1. Microrganismos endofíticos: uma visão geral	28
1.2. O Gênero <i>Colletotrichum</i>	29
1.3. A espécie <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	30
1.4. A espécie vegetal hospedeira: <i>Garcinia xanthochymus</i>	32
1.5. Técnicas de desreplicação	32
1.5.1. GC-MS e GC-MS/MS	33
1.5.2. LC-HRMS e LC-HRMS/MS	35
2. OBJETIVOS	36
3. Materiais e Métodos	37
3.1. Equipamentos	37
3.2. Solventes	40
3.3. Isolamento e triagem do endofíticos de <i>Garcinia xanthochymus</i>	40
3.3.1. Obtenção e classificação das cepas fúngicas	40
3.4. Cultivo dos microrganismos	41
3.4.1. Meio de cultura sólido	42
3.4.2. Meio de cultura líquido	42
3.4.3. Cultivo em pequena escala	42
3.4.4. Cultivo em grande escala	43
3.4.5. Cultivo dos meios controle-brancos	44
3.5. Obtenção dos extratos	44
3.5.1. Cultivo em pequena escala	44
3.5.2. Cultivo em grande escala	46
3.6. Preparo e análise dos extratos	46
3.6.1. Análise via cromatografia líquida de fase reversa	46
3.6.2. Análise via cromatografia líquida de fase normal	47
3.6.3. Separação cromatográfica do extrato bruto ECMiB	48
3.6.4. Análises via RMN	50
3.7. Detecção <i>in silico</i> dos constituintes majoritários	51
3.7.1. Análise via HPLC-DAD-RHMS	51
3.7.2. Análise via GC-MS	52
3.7.3. Análise via ¹ H RMN	53
3.8. Ensaios Biológicos	53

3.8.1. Ensaio de atividade antioxidante	53
3.8.2. Ensaio de atividade de inibição de polimerização do Heme (hematina)	54
3.8.3. Ensaio de atividade antifúngica	55
3.8.3.1. Atividade antifúngica contraespécies de <i>Candida albicans</i> , <i>C. paraploisis</i> , <i>C. krusei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	55
3.8.3.2. Atividade antifúngica contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>C. cladosporioides</i>	55
3.8.4. Atividade tripanocida <i>in vitro</i>	56
3.8.5. Ensaio de atividade anticolinesterásica	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Resultados da triagem realizada com os meios de cultura	58
4.1.1. Análise cromatográfica dos diferentes meios de cultura	58
4.1.2. Análise dos extratos brutos por ¹ H RMN	60
4.1.3. Análise para triagem biológica dos diversos meios de cultivo	67
4.2. Resultados dos experimentos com GC-MS	68
4.2.1. Análise e detecção <i>in silico</i> de ECMiB	69
4.2.2. Elucidação estrutural dos metabolitos isolados de ECMiB	76
4.3. Resultados dos experimentos com LC-DAD-HRMS, LC-DAD-HRMS/MS, ¹ H RMN e análise <i>in silico</i>	79
4.3.1. Detecção <i>in silico</i> de micromoléculas presentes em EAMiB	80
4.3.2. Detecção <i>in silico</i> de micromoléculas presentes em EAMB	97
4.4. Resultado dos ensaios biológicos	104
4.4.1. Ensaio de atividade antioxidante	104
4.4.2. Ensaio de atividade de inibição de polimerização do Heme (hematina)	105
4.4.3. Ensaio de atividade antifúngica	107
4.4.3.1. Atividade antifúngica contraespécies de <i>Candida albicans</i> , <i>C. paraploisis</i> , <i>C. krusei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	109
4.4.3.2. Atividade antifúngica contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>C. cladosporioides</i>	110
4.4.4. Ensaio de atividade tripanocida	111
4.4.5. Ensaio de atividade anticolinesterásica	112
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	113
REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microrganismos endofíticos: uma visão geral

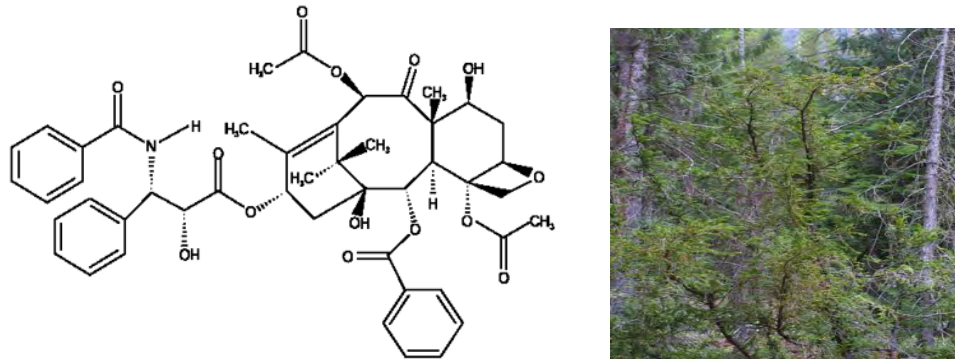
Os endófitos, em sua maioria fungos e bactérias, são comumente encontrados associados com animais e vegetais marinhos, insetos e vegetais terrestres (PUPO et al., 2006) Esses organismos são encontrados em folhas, raízes e caules e podem crescer dentro de seus hospedeiros sem causar danos aparentes (SCHULTZ et al, 2002). Microrganismos endofíticos têm chamado atenção nas últimas décadas devido, principalmente, ao reconhecimento da capacidade desses organismos em proteger seus hospedeiros contra insetos, patógenos e animais herbívoros. Também tem se tornado claro que a interação entre endófito-planta pode influenciar algumas características das plantas tais como a proteção em situações de estresse (por. ex. a falta ou excesso de água que pode prejudicar o desenvolvimento do microrganismo). Estas interações são muito complexas e podem ser expressas como mutualísticas (fator positivo para a planta hospedeira e negativo para insetos), neutras ou até mesmo antagônicas. Alguns exemplos dessas interações estão relacionados na tabela 1 (AZEVEDO et al., 2000; GALLO, M.B. C., 2008).

Tabela 1: Exemplos de interações entre endófito/hospedeiro

Endófito	Hospedeiro	Interação	Referência
<i>Rhizoctonia parkeri</i>	<i>Quercus</i> sp.	inseticida	<i>Sherwood-Pike et al., 1986</i>
<i>Phyllosticta</i> sp e <i>Hormonema dematioides</i>	<i>C. fumiferana</i>	inseticida	<i>Calhoun et al., 1992</i>
<i>Phomopsis oblonga</i>	<i>Physocnemum brevilineum</i>	inseticida	<i>Webber, 1981</i>
<i>Cytospora</i> sp.	<i>Conocarpus erecta</i> L.	antibacteriana	Brady et al., 2000
<i>Epichloë typhina</i>	<i>F. arundinacea</i>	contra herbívoros	Bacon et al., 1977
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Lolium</i> spp.	contra herbívoros	White & Cole, 1985
<i>Acremonium lolli</i>	<i>Blissus leucopterus hirtus</i>	inseticida e contra animais domésticos	Latch et al., 1985

Quanto ao aspecto econômico, a busca por novos fármacos, potencialmente bioativos, oriundos de fontes naturais, tem estimulado a pesquisa com esses microrganismos devido, principalmente, ao descobrimento de novas espécies microbianas isoladas de plantas tropicais (RODRIGUES AND PETRINI, 1997; STROBEL, 2003) e de compostos inéditos com alta atividade biológica (AZEVEDO et al., 2000, TAN AND ZOU, 2001; GUNATILAKA, 2006; ZHANG et al., 2006).

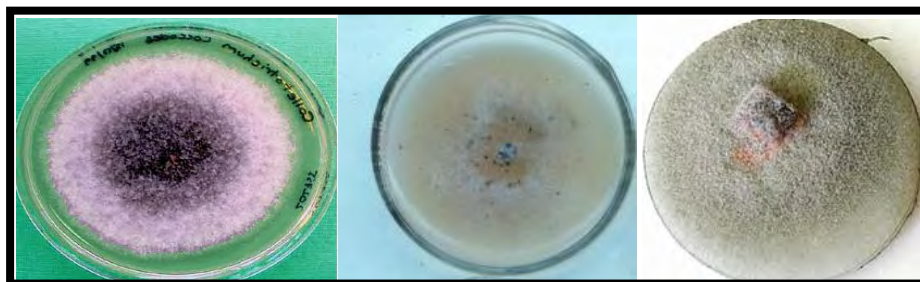
Dentre os microrganismos endofíticos, os fungos são os mais frequentemente isolados e representam uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente na medicina, mas também na fitopatologia e veterinária (STROBEL, 2003). Dentre essa extensa variedade de metabólitos secundários isolados destacam-se antitumorais, antioxidantes, antifúngicos, antivirais, inseticidas e antibióticos. Um exemplo de composto ativo é o taxol, um diterpenoide utilizado no tratamento de câncer de útero que pode ser encontrado tanto na planta medicinal *Taxus brevifolia*, como no fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1993). (figura 1)



<http://www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/t/wtabr2-wp42574.jpg>

Figura 1: a) Estrutura do Taxol; b) A espécie vegetal *Taxus brevifolia*

1.2. O Gênero *Colletotrichum*



http://www.google.com.br/images?hl=ptBR&gbv=2&tbs=isch:1&aq=f&aqi=g3&oq=&gs_rfai=&q=colletotrichum

Figura 2: Foto ilustrativa de espécies do gênero *Colletotrichum*

Nesse gênero encontram-se grande número de fitopatógenos que parasitam uma ampla variedade de hospedeiros e que possuem diversidade quanto à maneira de invasão dos tecidos vegetais. (ZOU et al., 2000)

Os fungos deste gênero caracterizam-se pela formação de estruturas denominadas acérvulos, em forma de disco achatado, sub-epidérmico, com espinhos ou setas, conidióforos simples e alongado, conídios hialinos unicelulares, geralmente em forma de bastonete, que permanecem nos acérvulos aderidos por uma massa mucilaginosa de polissacarídeos, solúveis em água. Apesar destes esporos não serem estruturas de resistência, os micélios do fungo, podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo em, sementes, restos culturais ou, infecções latentes em frutos. Têm crescimento rápido em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (PDA), formando colônias concêntricas, de coloração verde-oliva à marrom, podendo ocorrer a formação ou não de setores.

1.3. A espécie *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.). Sacc (teleomorfo *Glomerella cingulata*) é um parasita que produz hifas, unicelulares, ovóides a oblongas, ligeiramente curvo ou conídios em forma de sino, 10/15 μm de comprimento e 5-7 μm de largura. A massa de conídios pode ter coloração rósea ou salmão. (ZOU et al., 2000) (figura 3)

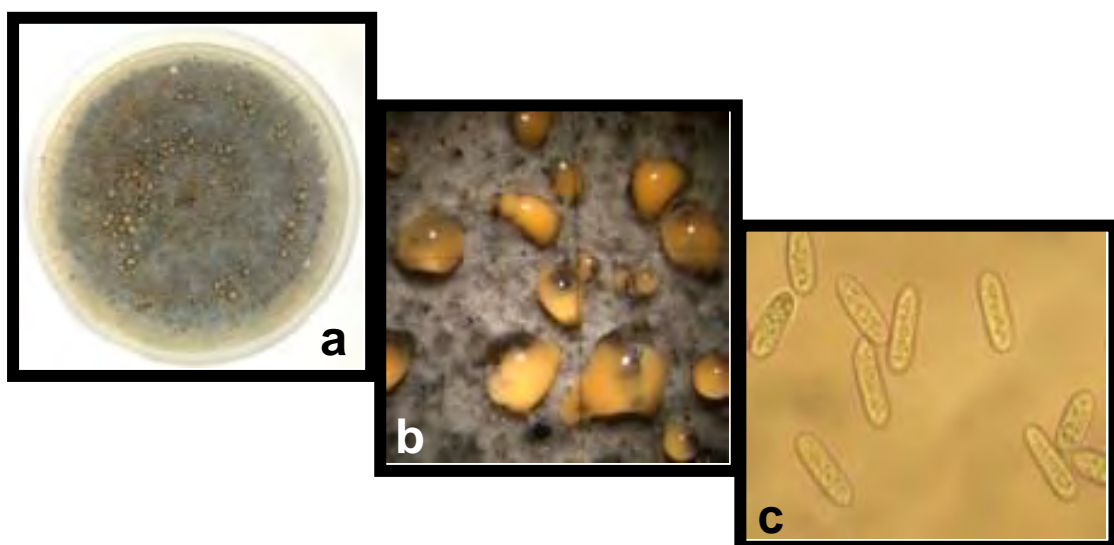


Figura 3: a. Superfície da colônia *Colletotrichum gloeosporioides*, após 15 dias; b. detalhe das massas de conídios de coloração salmão (sob lupa). Microscopia óptica: c. conídios – fase assexuada (x 1000).

Esta espécie é a principal agente causador da antracnose, doença que caracteriza por manchas marrons nas folhas e frutos. *C. gloeosporioides* é encontrado em diversos tipos de hospedeiro incluindo cereais, frutos e legumes. Apesar de sua alta fitopatogenicidade, este endófito apresenta grande quantidade de metabolitos secundários potencialmente bioativos de estruturas diversas, tais como ácido colletotrico (1) (ZOU et al., 2000), gloeosporona (2) (MEYER et al., 1983), 3 β ,5 α -diidroxi-6 β -acetoxi ergosta-7,22-dieno (3), 3 β ,5 α -diidroxi-6 β -fenilacetil ergosta-7,22-dieno (4) (LU et al., 2000), ácido 6-isopropenilindol-3-carboxílico (5) (GARCIA-PAJÓN AND COLLADO, 2003), aspergillomarasmina A (6) e B (7) (BALLIO et al., 1969; BOUSQUET et al., 1971), (*E*)-3-etildieno-1,3-diidroindol-2-ona (8), (*Z*)-3-etildieno-1,3-diidroindol-2-ona (9) (TSURUSHIMA et al., 1995) (figura 4).

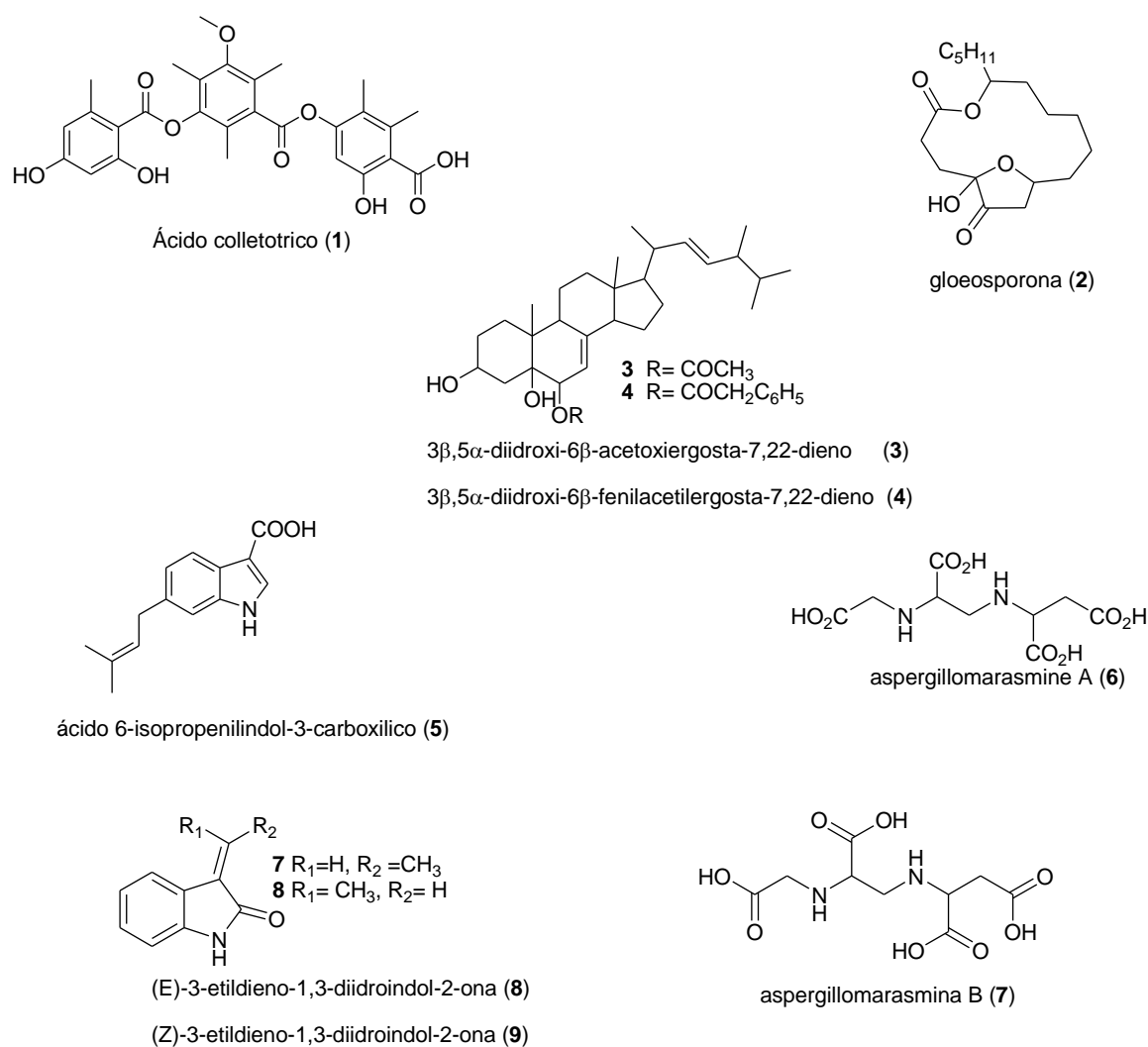


Figura 4: Metabólitos isolados de *C. gloeosporioides*

1.4. A espécie vegetal hospedeira: *Garcinia xanthochymus*



Figura 5: Foto ilustrativa de *Garcinia xanthochymus*

As plantas medicinais do gênero *Garcinia*, que pertencem à família Clusiaceae, sinonímia de Guttiferae, contêm cerca de 200 espécies confinadas nos trópicos como árvores ou arbustos, raramente epífitos, das quais 21 espécies encontram-se na China. (ZHONG, 2008). As espécies de *Garcinia*, constituem uma fonte rica de metabólitos secundários fenólicos, especialmente xantonas (PERES et al., 2000; PERES et al., 1996; BENNETT E LEE, 1989; HAY et al., 2004), além de benzofenonas, biflavonoides e depsidonas (Ito et al., 2003) que possuem interessantes atividades biológicas: antimalárico, antibacteriana e citotóxica.

Garcinia xanthochymus, comumente conhecida por *Camboja*, é nativa do nordeste da Tailândia e Mianmar. As árvores de aproximadamente 8 a 10 metros possuem folhas verdes escuras e sua fruta é amarela com polpa suculenta e ácida, possui diâmetro de 6 a 7 cm e duas sementes e são muito utilizados na medicina popular contra diarreia e disenteria.

1.5. Técnicas de desreplicação

A identificação do perfil metabolômico de uma matriz bruta é uma tarefa difícil de realizar, uma vez que esta possui diversidade quanto à estrutura de seus componentes e, com isso, exige eficiência nos métodos de triagem e

racionalização frente aos procedimentos de isolamento dos compostos presentes no extrato. Nesse contexto o desenvolvimento de metodologias rápidas de detecção e identificação da matriz bruta se faz necessária, dispensando o exaustivo trabalho de isolamento que muitas vezes leva a compostos já conhecidos. Para isso o uso de técnicas hífenadas associadas a metodologias de desreplicação fornece muita informação prévia a respeito dos constituintes antes mesmo do seu isolamento. (RODRIGUES et al., 2006)

As metodologias de desreplicação referem-se à detecção e análise de um composto por meio de comparações com bases de dados internas e/ou comerciais que contém informações relacionadas à estrutura, propriedades espectroscópicas e físicas de metabólitos, promovendo à identificação de compostos conhecidos e/ou inéditos e assim, proporcionando ferramentas de racionalização analítica quanto ao procedimento de isolamento das micromoléculas pertencentes à matriz bruta.

Esta metodologia é comumente associada à utilização de técnicas hífenadas. Este termo refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas cromatográficas e espectroscópicas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida do que as técnicas convencionais (KITE et al., 2003). Um exemplo comum é o acoplamento do espectrômetro de massas (MS) a técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) ou eletroforese capilar (CE). Também são conhecidas como hífenadas (ou acopladas) a combinação de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com HPLC e também o uso de detector de arranjo de diodos (DAD) e UV-vis (UV) associados à cromatografia líquida (LC) (PHAM et al., 2005).

A grande vantagem das técnicas hífenadas sob as técnicas espectroscópicas sem hífenação está na pouca quantidade de amostra que é necessária durante a análise. A seguir estão relacionados os principais acoplamentos utilizados atualmente.

1.5.1. GC-MS e GC-MS/MS

Os mais importantes avanços na análise de misturas complexas foram inicialmente obtidos após o desenvolvimento do acoplamento da cromatografia gasosa (GC) a detectores de espectrometria de massas (GC-

MS), os quais atualmente são utilizados rotineiramente em muitas áreas, por exemplo, na identificação de óleos essenciais na indústria cosmética. É uma ferramenta útil na identificação de compostos de origem natural graças à disponibilidade de bibliotecas espectrais, com o detector de massas operando sob condições de impacto de elétrons, e a possibilidade de quantificação através do uso de padrão interno (RODRIGUES et al., 2006).

A principal dificuldade do acoplamento entre GC e MS foi em consequência da introdução de um composto à pressão atmosférica (proveniente da separação cromatográfica) dentro de um sistema a alto vácuo. Para contornar esse problema, diferentes interfaces foram desenvolvidas. A produção de interfaces para o acoplamento GC-MS exigiu que uma série de requisitos fosse levada em consideração tais como: a redução do fluxo da coluna cromatográfica para manutenção do vácuo, a separação seletiva do analito, o gás de arraste e, a manutenção da separação cromatográfica. Nesse momento, o surgimento de colunas capilares foi responsável pelo sucesso da hibridação GC-MS, em razão da redução significativa do fluxo (1 – 2 mL/min) em relação às colunas empacotadas (30 – 60 mL/min), além do aumento significativo do poder de resolução da cromatografia gasosa em relação à líquida (RODRIGUES et al., 2006).

Dentre as técnicas de ionização, as mais utilizadas em GC-MS são:

- Impacto de elétrons (EI) em que as moléculas da amostra, vindas do sistema cromatográfico, entram na fonte de íons e são ionizadas pela colisão com os elétrons gerados num filamento de tungstênio ou rênio. Essa colisão leva à fragmentação e ionização das moléculas da amostra;
- Ionização química (CI) em que as moléculas do analito são ionizadas indiretamente, através de reações com os íons de um gás reagente (metano, isobutano, amônia ou água). Essa técnica representa uma ionização mais branda, já que a energia envolvida na colisão é pequena, promovendo menor fragmentação do analito e maior abundância dos íons moleculares. (RODRIGUES et al, 2006)

Porém, esta técnica tem a grande limitação de apenas permitir a análise de compostos termicamente estáveis, que podem ser volatilizados de maneira intacta.

1.5.2. LC-DAD-HRMS E LC-DAD-HRMS/MS

O LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS constituem metodologias muito sensíveis de análise e fornecem informações de massa molecular, de alta ou baixa resolução, que podem ser facilmente comparados com dados alocados em bases de dados comerciais (dicionário de produtos naturais: www.chemnetbase.com, Antibase, Marinlit, etc). (FREDENHAGEN et al., 2005).

Entre as técnicas de ionização, a mais utilizada para o acoplamento com HPLC, devido à sua versatilidade, é a ESI (ionização por *electrospray*) (MATHIS and McCORD, 2004). ESI é um processo pelo qual, à pressão atmosférica, um campo elétrico intenso dispersa uma amostra líquida em um gás, que possui a forma de um fino *spray* de gotas carregadas que, por evaporação, resultam em íons na fase gasosa (CROTTI et al., 2006a; FENN, 2003). Esta técnica constitui um método brando, na qual pouca energia residual é retida pelo analito após a ionização, acarretando uma baixa fragmentação. Portanto, a reduzida transferência de energia para as moléculas é uma desvantagem desta técnica para estudos de elucidação estrutural. A fim de contornar essa desvantagem, foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MSⁿ), na qual as moléculas podem ser fragmentadas (WILLIAMS and BURINSKY, 2001).

A análise MS/MS constitui selecionar um íon do primeiro estágio (chamado íon precursor) e transferi-lo para uma célula de colisão. A fragmentação do íon precursor se dá através de dissociação induzida por colisão (CID – *collision-induced dissociation*) utilizando um gás inerte (usualmente Ar, N₂ ou CO₂). Os íons resultantes (íons filhos ou de segunda geração) são indicativos da estrutura do íon precursor, tornando possível a identificação de compostos desconhecidos.

2. OBJETIVOS

1. Obtenção do perfil metabólico presente nos extratos do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* codificado como GX-01 isolado das folhas *Garcinia xanthochymus*. na abordagem racional do planejamento experimental, seleção, purificação e elucidação estrutural de micromoléculas com algum potencial bioativo.
2. Produção em larga escala dos extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico *C. gloeosporioides* associado a *G. xanthochymus*
3. Desenvolvimento de novas estratégias cromatográficas de seleção e triagem de metabolitos, a partir do uso de técnicas hífenadas e de *desreplicação*.
4. Fortalecimento da nossa base de dados, enriquecendo mapas metabolômicos em construção e contribuindo no entendimento da produção metabólica de micromoléculas com potenciais atividades farmacológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS

EVAPORADOR ROTATÓRIO: Todas as soluções geradas nesse projeto foram concentradas em evaporador rotatório marca Büchi (rotavapor R-114 e waterbath B-480) a pressão reduzida.

BALANÇA ANALÍTICA: Os meios de cultura e as amostras foram pesados em balança analítica Mettler Toledo AG 245.

AUTOCLAVE VERTICAL: A esterilização dos meios de cultura e o descarte do material microbiológico foram realizados em autoclave Quimis Aparelhos Científicos Ltda.

CÂMARA DE FLUXO LAMINAR: O repique, isolamento e inoculação do microrganismo foram realizados em câmara estéril NUAIRE II, A/B3

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN): Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados no Espectrômetro Bruker AC 200-F 4.7 T operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e 125 MHz para o núcleo de ^{13}C . Experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian Inova 500 11.7 T operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e em 125 MHz para o núcleo de ^{13}C . Foi utilizado TMS como referência interna.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC): as cromatoplasmas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 PF254, com indicador de fluorescência em água destilada, na proporção de 1:2 (p:v) sobre placas de vidro, obtendo-se 25 mm de espessura de

adsorvente através da utilização de espalhador Quickfitt[®]. Após a preparação das cromatoplasmas, estas foram ativadas em estufa por 30 minutos.

A revelação das cromatoplasmas foi realizada por meio de um ou mais dos métodos físicos e químicos descritos abaixo:

(A) Os comprimentos de onda, na luz ultravioleta, selecionados para expor as placas foram aqueles presentes na lâmpada utilizada para esse fim: 254 e 365 nm.

(B) Solução de anisaldeído: 5,0 mL de solução de anisaldeído (0,5 mL de anisaldeído + 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado + 85,0 mL de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada a 8°C. Para a revelação de cromatoplasmas, borrifaram-se pequenas alíquotas e então, estas foram colocadas em estufas a 120°C.

(C) Cromatografia em coluna de fase normal (CC-FN) em que foi utilizado como fase estacionária sílica-gel 60-230 µm (Merck).

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC): Os cromatogramas foram obtidos nos aparelhos:

- Cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10 AD com detector UV-Diodo Array Shimadzu SPD-M20 A VP e auto-injetor Shimadzu modelo SIL-10 e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Shimadzu CLASS-LC10 versão 1.64A –Modo analítico- gradiente exploratório.
- Cromatógrafo preparativo Shimadzu modelo LC-10 AS com detector UV-VIS Shimadzu modelo SPD-10 A.

SUPORTE CROMATOGRÁFICO: Foram utilizadas as colunas cromatográficas analíticas a seguir descritas:

- Phenomenex C18 Onyx monolítica, ODS, 100 x 4,60 mm, (mesoporos 13 nm e macroporos 2 µm.)
- Phenomenex Si fase normal Onyx Monolithic Si, com dimensões de 100 x 4,6 mm, 2 µm.

Coluna cromatográfica semi-preparativa:

- Phenomenex C18 Onyx monolítica, ODS, dimensões de 100 x 10 mm.

Coluna cromatográfica para GC:

- DB-1 30 m x 0,25 mm filme: 0,1 mm

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-DAD-HRMS):

As análises em HPLC-DAD-HRMS e HPLC-DAD-HRMS/MS foram realizadas na USP-RP em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo Class Vp 20 equipado com duas bombas de solvente (LC-20AD), detector por arranjo de diodos (SPD-M20A) e sistema controlador (CBM-20A). Este cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas da marca Bruker Daltonics (Billerica, MA), modelo UltrOTof-Q, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador por tempo de vôle, operando nos modos negativo e positivo. As amostras foram injetadas utilizando um injetor Rheodyne, modelo 7125 equipado com um loop de 20 μL . Como calibração interna foi usada uma solução de NA-TFA a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

- Cromatógrafo a gás Shimadzu CG 17 A e EM: DP 5050 A, detector por impacto eletrônico 70 eV no modo positivo, volume de injeção de 1 μL (split 1:20), gás de arraste He (1 mL/min .), temperaturas programadas: 50 $^{\circ}\text{C}$ (3 min.) - 50 a 295 $^{\circ}\text{C}$ (2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.) – 295 $^{\circ}\text{C}$ (20min), injetor: 280 $^{\circ}\text{C}$, interface: 300 $^{\circ}\text{C}$ e tempo de corrida total 80 min.

ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – ^1H RMN

As matrizes selecionadas para análise foram submetidas, inicialmente, ao protocolo estabelecido por Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2007), utilizando uma solução de 1 mg/mL do extrato dissolvido em MeOD. 10 μL da solução foram transferidos para um tubo capilar (1 mm x 100 mm, Norell Inc.) e analisado por RMN (Avance II Bruker, 14,0 T, com sonda criogênica de 5 mm).

A aquisição de dados no canal de hidrogênio foi realizada por meio da sequência de pulso DIPSI-2 (SHAKA et al., 1988). Os dados obtidos foram processados utilizando a interface NMRPipe (DELAGLIO et al, 1995).

3.2. SOLVENTES

Os solventes utilizados para o preparo de amostras (análises de RMN) foram DMSO- d_6 e $CDCl_3$ e, como referência interna TMS.

Para as extrações dos extratos brutos e análise via HPLC foram utilizados solventes da marca JT Baker[®].

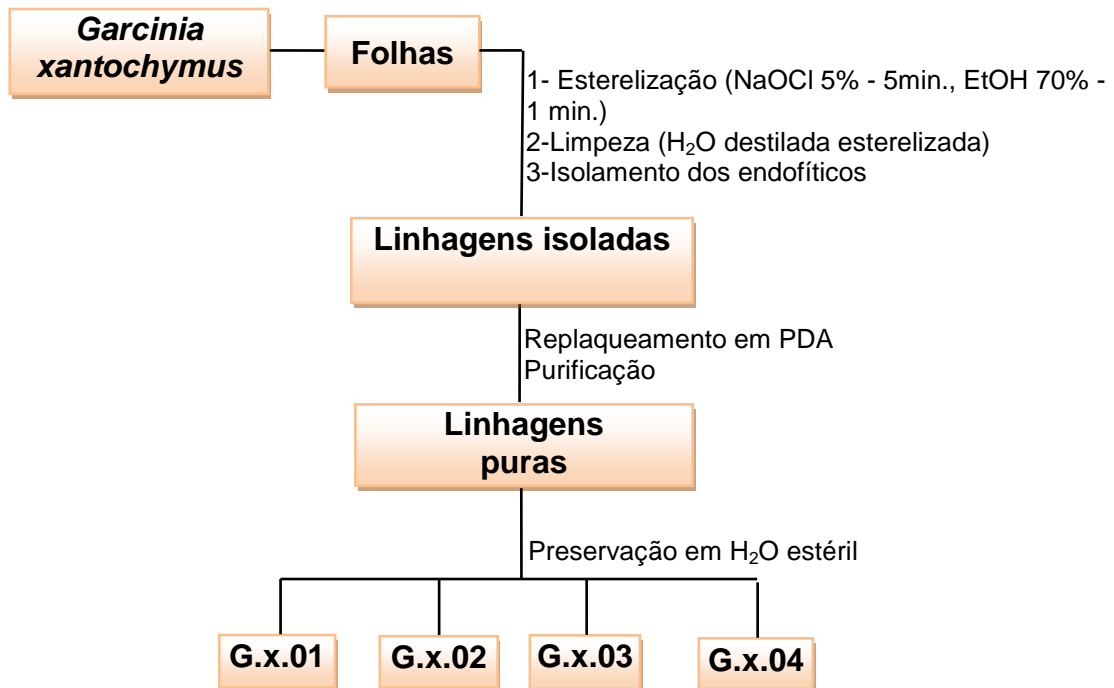
3.3. ISOLAMENTO E TRIAGEM DOS ENDOFÍTICOS DE *Garcinia xanthochymus*

3.3.1. Obtenção e classificação das cepas fúngicas.

A espécie vegetal *Garcinia xanthochymus* foi coletada nas dependências do Campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaboticabal e identificada pelo professor Antonio Baldo Geraldo Martins chefe do Departamento de Produção Vegetal, FCAV.

O material botânico (folhas) foi processado no prazo de 24 horas após a coleta, seguindo o protocolo estabelecido pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), tendo sido lavado em banhos subsequentes de água corrente, detergente neutro e, imerso em uma solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 min., seguido de imersão em etanol 70% por 1 min., finalizando com uma dupla lavagem com água ultra pura estéril. Esse processo foi aplicado por 10 minutos para a retirada de epifíticos superficiais. O controle da assepsia foi feito retirando a alíquota de 50 μ L da segunda água de lavagem e inoculando-a em placa de Petri contendo o meio de cultura PDA (Batata Dextrose Agar). As folhas estéreis foram seccionadas em pequenos pedaços (2 x 2 cm), inoculadas em placa de Petri com o meio de cultura sólido PDA e sulfato de gentamicina (100 μ g/mL), sendo incubadas a 28 °C por 15 dias. O monitoramento do crescimento dos fungos foi realizado

diariamente e ao atingir de 1 a 2 cm de diâmetro, as hifas foram repicadas e re-plaqueadas até o isolamento da linhagem pura. As linhagens obtidas foram preservadas em frascos de vidro penicilina devidamente vedados contendo água ultra pura estéril e armazenadas, na micoteca do NuBBE, à temperatura ambiente e, ao abrigo da luz. (Esquema 1).



Esquema 1: Isolamento das cepas fúngicas

Dentre os endofíticos isolados, foi selecionada a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc, código G.x.01, principalmente por apresentar um desenvolvimento rápido no meio de cultura PDA. O endofítico foi identificado pela Fundação André Tosello.

3.4. CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

C. gloeosporioides (Penz.) Sacc foi cultivado, em pequena e grande escala, em diferentes meios de cultura líquidos e sólidos a temperatura controlada (28 °C), durante 28 dias em regime estático.

3.4.1. Meio de cultura sólido

O cultivo em meio sólido utilizado para repique do endófito foi o meio de batata dextrose Agar (PDA). Para o crescimento do microrganismo, um dos meios utilizados foi meio de cultura de milho (tipo canjica marca comercial Yoki). (tabela 2)

3.4.2. Meio de cultura líquido

O cultivo em meio líquido foi utilizado para crescimento e produção de metabolitos de *C. gloeosporioides*. Os meios utilizados estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Meios de cultura: composição e especificações

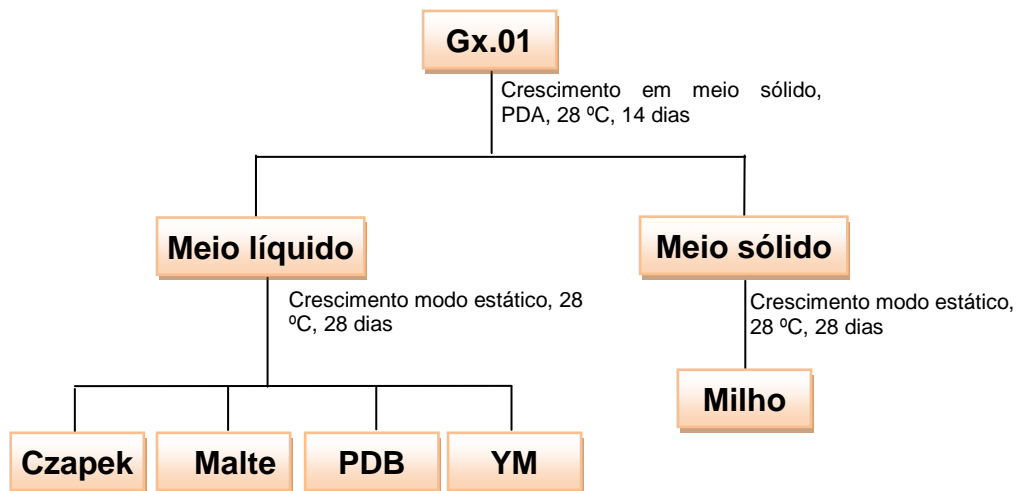
Meio de cultura	Composição	Conc. (g.L ⁻¹)	Especificação	Fabricante
Czapek	Sacarose (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	35	Base para cultivo de fungos e bactérias capazes de utilizar Nitrogênio inorgânico	DIFCO
Malte	Extrato de Malte	20	Base para cultivo de fungos e bactérias	ACUMEDIA
Milho	Milho tipo canjica	875		YOKI
PDB	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	24	Base para cultivo de Leveduras e fungos	ACUMEDIA
PDA	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), Agar (15g)	39	Base para cultivo de leveduras e fungos	SIGMA
YM	Extrato de levedura (3g), extrato de malte (3g), peptona (5g), dextrose (10g)	21	Base para cultivo de leveduras, fungos e outros microrganismos acidúricos	DIFCO

3.4.3. Cultivo em pequena escala

O cultivo em pequena escala foi feito com 400 mL para os meios líquidos e 150 g para o meio sólido. (Esquema 2)

A todos os meios líquidos, foram adicionados 250 mL de água ultra pura seguida de esterilização em autoclave a 120 °C de 15 minutos, sendo apenas para o milho realizado o seguinte procedimento: em 75 g de meio não cozido

foi adicionado 80 mL de água ultra pura e autoclavados (20 °C, 20 min.) por três vezes em um intervalo de 72 horas.

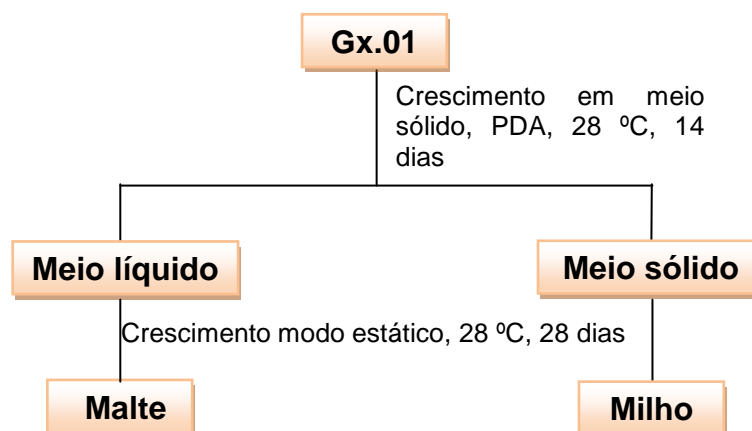


Esquema 2: Crescimento, em pequena escala, de *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultura.

3.4.4. Cultivo em grande escala

Para o meio da cultura sólida de milho foi utilizado 600 g que foram distribuídos em oito erlenmeyers de 500 mL (75 g cada). Enquanto que para o meio líquido de extrato de malte, o endófito foi inoculado em 5,750 L (23 frascos) do meio. (Esquema 3, figura 4)

O processo de esterilização dos meios foi realizado conforme procedimento descrito para cultivo em pequena escala.



Esquema 3: Crescimento de *C. gloeosporioides*, em grande escala, nos meios de cultura de malte e milho.



Figura 6: Crescimento de *C. gloeosporioides* em grande escala nos meios de malte e milho

3.4.5. Cultivo dos meios controle – brancos

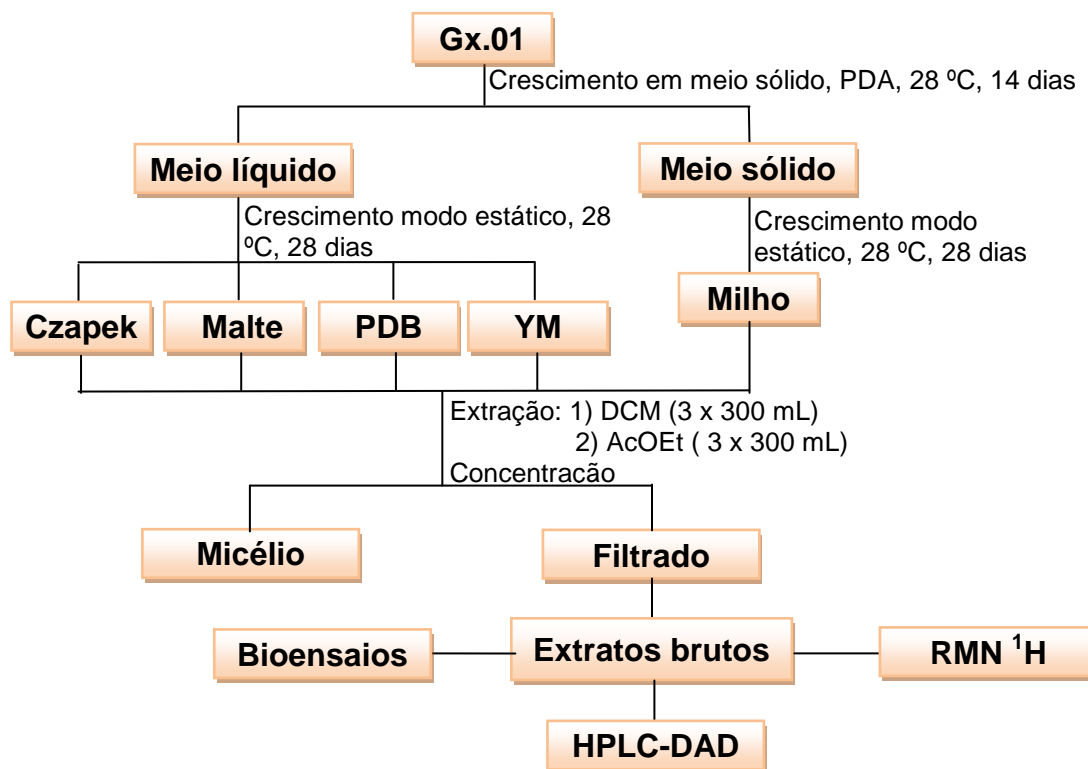
Foi feito um controle dos metabólitos produzidos pelo fungo, utilizando-se para isso as mesmas condições de cultivo (28 °C, 28 dias, regime estático) para os diferentes meios de cultura, porém sem a presença de *C. gloeosporioides*.

3.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

3.5.1. Cultivo em pequena escala

Ao final do período de incubação (crescimento em meio líquido e sólido), as suspensões micelares foram submetidas à filtração, separando-se os micélios dos filtrados. Os filtrados, contendo os metabólitos secretados pelos fungos e os brancos, foram submetidos a partição líquido-líquido inicialmente com diclorometano (DCM), aplicando três porções de 200 mL. Em seguida a extração com DCM, iniciou-se uma extração com Acetato de Etila (AcOEt)

utilizando-se três porções de 200 mL de AcOEt (esquema 3) na extração. Os solventes orgânicos foram destilados em evaporador rotatório a vácuo, fornecendo os extratos discriminados na tabela 3.



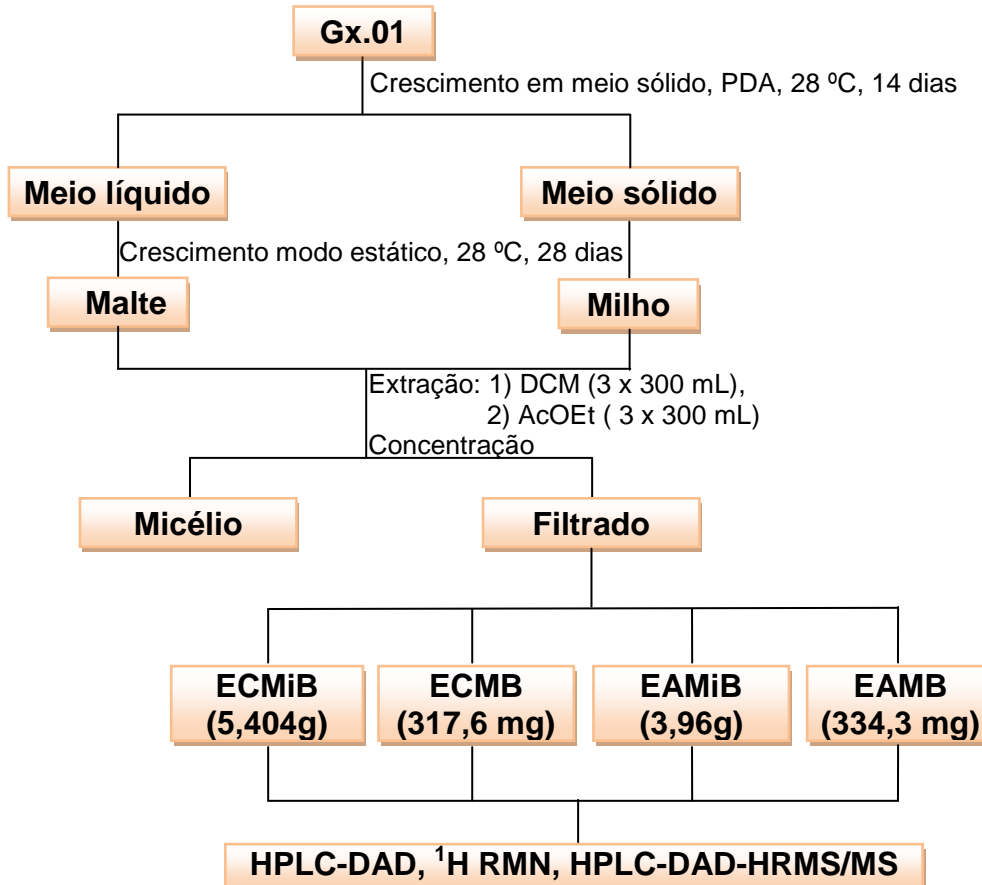
Esquema 4: Cultivo de Gx.01 em diversos meios de cultura, obtenção do extrato bruto em pequena escala e verificação do perfil químico/biológico.

Tabela 3: Extratos brutos obtidos, em pequena escala, dos diversos meios de cultura

Meio de cultura		Massa extrato (mg)		Código Extrato	
		DCM	AcOEt	DCM	AcOEt
Czapek	Com fungo	30,1	30,0	ECCA	EACA
	Sem fungo	26,9	14,9	ECC-controle	EAC-controle
Malte	Com fungo	174,6	303,6	ECMA	EAMA
	Sem fungo	49,3	47,3	ECM-controle	EAM-controle
Milho	Com fungo	2.005	450,0	ECMiA	EAMiA
	Sem fungo	344,9	118,5	ECMi-controle	EAMi-controle
PDB	Com fungo	13,4	36,7	ECPA	EAPA
	Sem fungo	25,5	13,8	ECP-controle	EAP-controle
YM	Com fungo	34,7	36,7	ECYA	EAYA
	Sem fungo	50,7	27,6	ECY-controle	EAY-controle

3.5.2. Cultivo em grande escala

Os extratos, em grande escala, foram obtidos de acordo com o procedimento descrito para pequena escala, utilizando-se extração líquido-líquido com DCM, seguido de extração com AcOEt (esquema 5).



Esquema 5: Cultivo de Gx.01 em diversos meios de cultura, obtenção do extrato bruto em pequena escala e verificação do perfil químico/biológico.

3.5. PREPARO E ANÁLISE DOS EXTRATOS

3.6.1 Análises via cromatografia líquida de fase reversa

Para eliminação de interferentes apolares (material graxo) a amostra foi submetida à extração em fase sólida (EFS) em cartucho preenchido com sílica quimicamente derivatizada com grupos octadecilsilano (C-18). Inicialmente o adsorvente foi ativado com MeOH puro (2-3 mL) e, posteriormente equilibrado com o eluente escolhido, MeOH/H₂O, (2-3 mL). As

amostras foram preparadas diluindo-se 5,0 mg de resíduo seco em 1 mL de MeOH/H₂O (1:1) ultra pura. O armazenamento da amostra foi em frascos para HPLC. A limpeza do cartucho foi feita com MeOH puro e depois com DCM.

A fase móvel utilizada foi uma mistura dos solventes: água ultra pura (bomba A) com 0,1% de ácido acético e MeOH (bomba B). O gradiente exploratório foi otimizado a fim de se obter uma melhor separação das bandas cromatográficas. As melhores condições estão relacionadas na tabela 4. O fluxo utilizado em cada análise foi de 3 mL/min, volume de injeção 20 µL. Os cromatogramas foram registrados em 276 nm, porém programando o detector de arranjo de diodos (DAD) para fazer uma varredura de 190 a 800 nm.

Tabela 4: Condição cromatográfica para as amostras EAMiB e EAMB.

Condição	
Tempo (min)	% MEOH (bomba B)
0	5
18	35
25	70
28	100
30	100
32	5
35	5

3.6.2. Análise via cromatografia líquida de fase normal

Os extratos DCM, foram preparados diluindo-se 5,0 mg de resíduo seco em 1 mL de Hex/AcOEt (9:1) seguidas de extração em cartucho de sílica (60-230 µm). Após a extração, as amostras foram armazenadas em recipientes para HPLC. Como fase móvel optou-se por uma mistura dos solventes: *n*-hexano 95% (bomba B) e AcOEt HPLC (bomba A). O gradiente exploratório foi otimizado para se obter uma melhor separação das bandas cromatográficas sendo descrito na tabela 5. O fluxo utilizado foi de 3 mL/min, volume de injeção de 20 µL e o detector de arranjo de diodos (DAD) foi programado para fazer uma varredura de 190 a 800 nm, no qual o comprimento de onda de 280 nm apresentou melhor separação das bandas cromatográficas.

Tabela 5: Condição cromatográfica para todos os extratos brutos.

Condição	
Tempo (min.)	% Hexano (bomba B)
0	100
30	90
35	100

3.6.3. Separação cromatográfica do extrato bruto ECMiB

O extrato bruto (1,00 g) obtido em larga escala foi submetido à CC de fase normal (Si, 10 X 3,5 cm) sob pressão reduzida, utilizando como fase móvel o sistema Hex/AcOEt em gradiente: 9:1; 8:2; 7:3; 5:5, 100% e em seguida MeOH/AcOEt 1:1 a 100% (Esquema 6). O fracionamento resultou em 48 frações (Tabela 6) após evaporação do solvente.

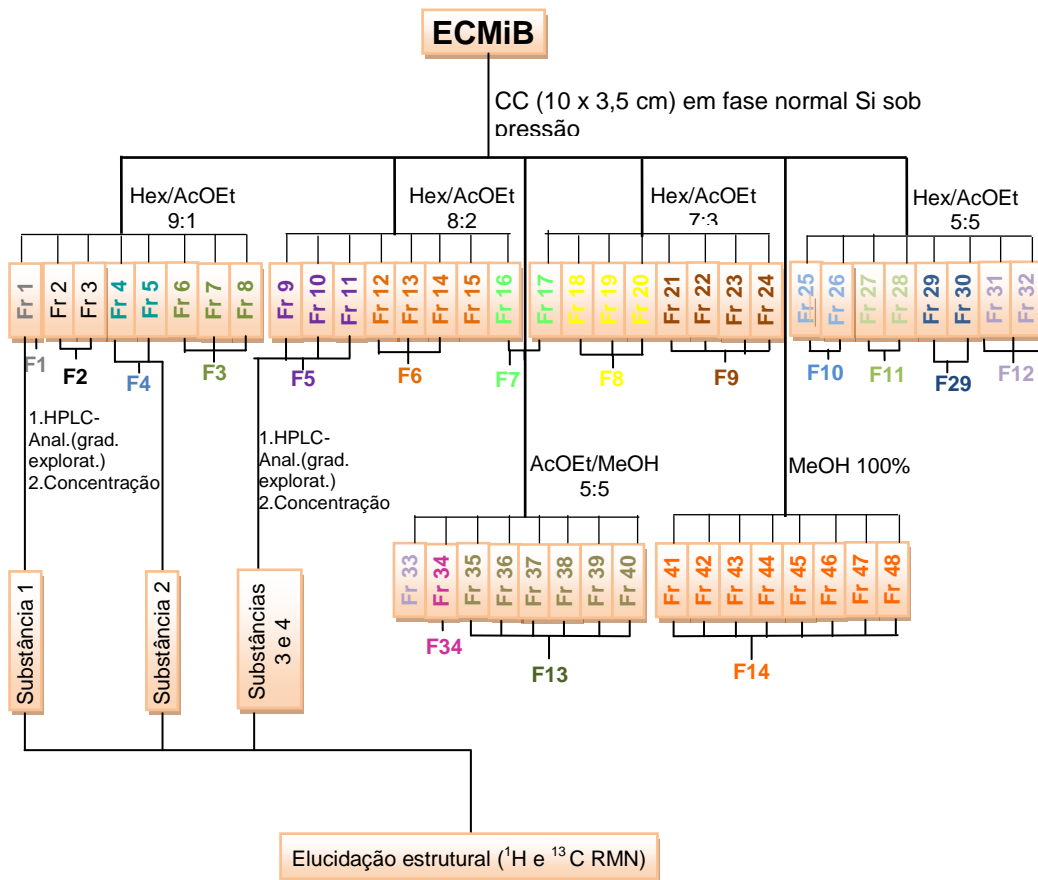
Tabela 6: Frações obtidas no fracionamento do extrato bruto ECMiB em larga escala.

Código amostra	Gradiente	Massa(mg)	Código amostra	Gradiente	Massa(mg)
Fr 1	9:1 Hex/AcOEt	45,0	Fr 25	5:5 Hex/AcOEt	0,90
Fr 2	9:1 Hex/AcOEt	12,3	Fr 26	5:5 Hex/AcOEt	1,2
Fr 3	9:1 Hex/AcOEt	6,72	Fr 27	5:5 Hex/AcOEt	0,36
Fr 4	9:1 Hex/AcOEt	18,8	Fr 28	5:5 Hex/AcOEt	0,48
Fr 5	9:1 Hex/AcOEt	53,0	Fr 29	5:5 Hex/AcOEt	0,33
Fr 6	9:1 Hex/AcOEt	1,2	Fr 30	5:5 Hex/AcOEt	1,24
Fr 7	9:1 Hex/AcOEt	1,1	Fr 31	5:5 Hex/AcOEt	0,96
Fr 8	9:1 Hex/AcOEt	5,4	Fr 32	5:5 Hex/AcOEt	0,60
Fr 9	8:2 Hex/AcOEt	61,9	Fr 33	100% AcOEt/MeOH	5,9
Fr 10	8:2 Hex/AcOEt	55,0	Fr 34	100% AcOEt/MeOH	9,8
Fr 11	8:2 Hex/AcOEt	0,22	Fr 35	100% AcOEt	1,0
Fr 12	8:2 Hex/AcOEt	0,63	Fr 36	5:5 AcOEt/MeOH	2,2
Fr 13	8:2 Hex/AcOEt	3,0	Fr 37	5:5 AcOEt/MeOH	1,2
Fr 14	8:2 Hex/AcOEt	0,93	Fr 38	5:5 AcOEt/MeOH	1,3
Fr 15	8:2 Hex/AcOEt	0,71	Fr 39	5:5 AcOEt/MeOH	3,3
Fr 16	8:2 Hex/AcOEt	0,81	Fr 40	5:5 AcOEt/MeOH	3,4
Fr 17	7:3 Hex/AcOEt	0,36	Fr 41	100% MeOH	2,1
Fr 18	7:3 Hex/AcOEt	0,43	Fr 42	100% MeOH	9,8
Fr 19	7:3 Hex/AcOEt	0,87	Fr 43	100% MeOH	3,6

Fr 20	7:3 Hex/AcOEt	0,73	Fr 44	100% MeOH	2,4
Fr 21	7:3 Hex/AcOEt	0,69	Fr 45	100% MeOH	1,5
Fr 22	7:3 Hex/AcOEt	0,12	Fr 46	100% MeOH	3,7
Fr 23	7:3 Hex/AcOEt	0,64	Fr 47	100% MeOH	8,1
Fr 24	7:3 Hex/AcOEt	0,22	Fr 48	100% MeOH	0,42

As frações obtidas foram submetidas a HPLC-DAD de fase normal em gradiente exploratório utilizando a mistura de solventes Hex/AcOEt de 100:0 a 90:10 em 30 min permanecendo 10 mim em Hex 100% com fluxo de 3,0 mL/min. a 276 nm. (Fig. 7, pg.39).

As amostras que apresentaram mesmo perfil cromatográfico foram reunidas, restando então às frações codificadas como F1(Fr1); F2 (Fr2+Fr3); F4(fr4+Fr5); F3 (Fr 6,7 e 8); F5 (Fr 9,10 e 11); F6 (Fr12, 13,14 e 15); F7 (Fr 16 e 17); F8 (Fr 18,19 e 20); F9 (Fr 21,22; 23 e 24); F10 (Fr 25 e 26); F11(Fr 27 e 28); F12 (31,32 e 33); F13 (Fr 35,36, 37, 38,39 e 40); F14 (Fr 41 a 48); F29 (Fr 29,30) e F34 (Fr 34) (Esquema 6).



Esquema 6: Fracionamento em CC de fase normal Si do extrato bruto diclorometânico de milho - ECMiB.

O perfil cromatográfico obtido proporcionou a escolha das frações a serem analisadas via ^1H RMN.

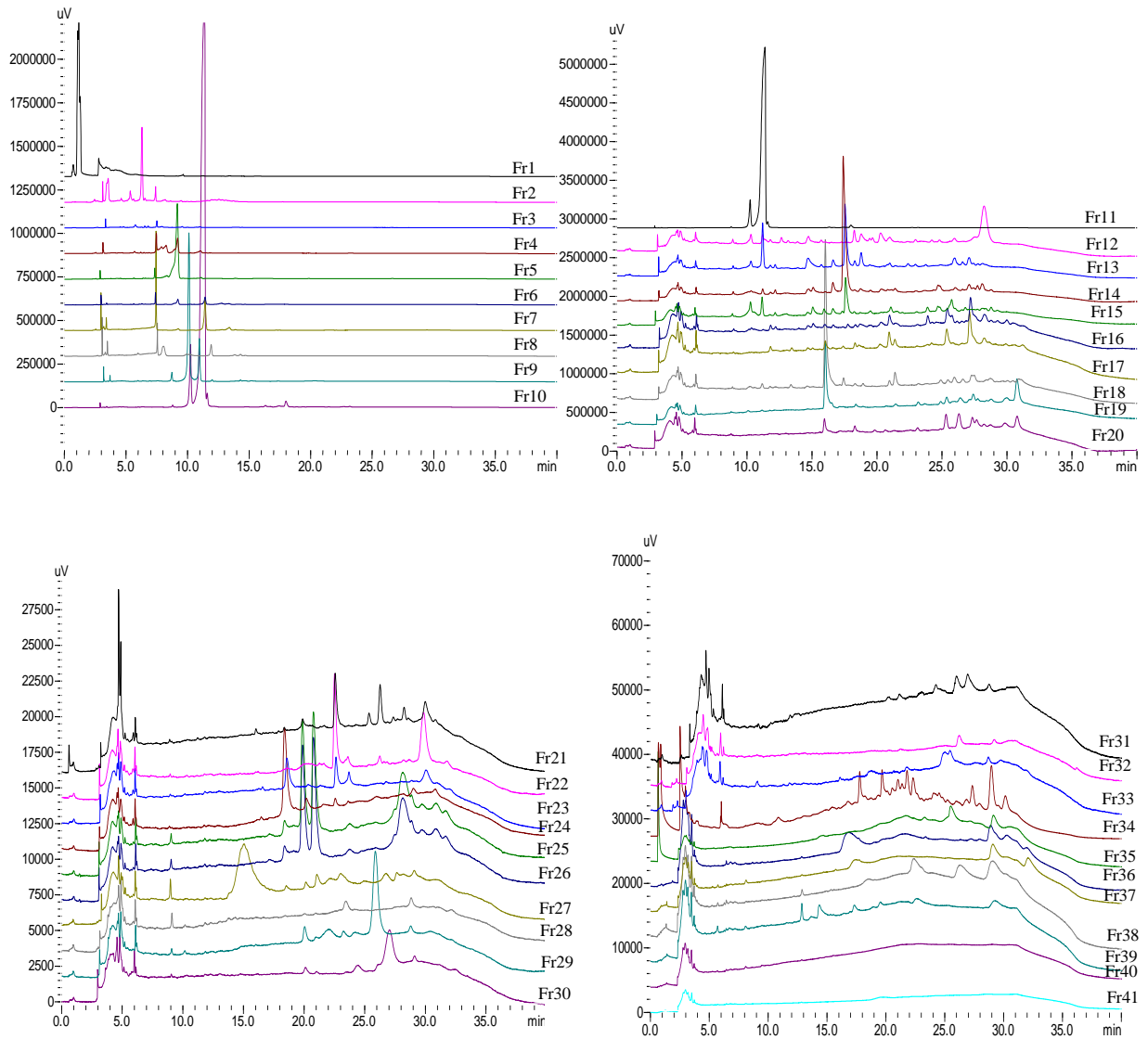


Figura 7: Cromatogramas a 276 nm das frações Fr1 a Fr41 do extrato ECMiB.

Após análise dos cromatogramas e dos rendimentos em massa selecionou-se as frações Fr1, Fr4, Fr5, Fr29 e Fr10 para análise via ^1H RMN, resultando na identificação das substâncias 1, 2, 3,4. (figuras: 24, 28 e 33).

3.6.4. Análises via RMN

As amostras (10,0 mg) foram diluídas em 0,6 mL de solvente deuterado (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ ou D_2O) e em seguida, as soluções foram filtradas em

algodão e armazenadas em tubos (5 mm 500MHz, Kontes) para análise por RMN.

3.7. DETECÇÃO *IN SILICO* DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS

3.7.1. Análise via HPLC-DAD-HRMS

As análises por HPLC-DAD-HRMS e HPLC-DAD-HRMS/MS dos extratos EAMiB e EAMB foram realizadas utilizando-se as mesmas condições de preparo já descritas e as condições cromatográficas otimizadas:

Tabela 7: Condição cromatográfica para as amostras EAMiB e EAMB.

Amostra	Condição	
	Tempo (min)	MEOH (%)
EAMiB	0	5
	18	35
	25	70
	28	100
	30	100
	32	5
	35	5
EAMB	0	5
	20	35
	25	100
	28	100
	31	5
	34	5

O eluente da coluna foi dividido através de um *splitter* numa proporção 4:1, sendo o fluxo maior direcionado ao DAD e o restante ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas na região de UV gerados pelo DAD foram registrados em 276 nm, (comprimento de onda que apresentou a melhor absorção para as bandas cromatográficas evidenciadas). Os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre m/z 50 e m/z 1000 e as

análises foram feitas tanto no modo de ionização positivo como negativo. As relações m/z e os tempos de retenção obtidos para das bandas cromatográficas de interesse, presentes no TIC (Total Ion Chromatogram) foram submetidas a uma segunda ionização por HPLC-DAD-HRMS/MS, através de experimentos tandem. Para a obtenção de espectros de íons produto (MS/MS) a partir de íons precursores desejados foi selecionado o m/z de cada íon precursor, assim com a energia necessária para a sua total fragmentação.

Foram analisadas todas as possibilidades para a formação dos íons precursores que poderiam ser cátions formados pela formação de adutos catiônicos (modo de ionização positiva) com H^+ , Na^+ ou K^+ , entre outros, ou ainda ânions (modo de ionização negativa) formados pela perda de H^+ ou adutos aniônicos com Cl^- ou CH_3COO^- , entre outros.

Para a detecção *in silico*, a análise dos dados obtidos por HPLC-DAD-HRMS foi realizada utilizando o *software* Bruker Data Analysis versão 3.2 conjugada com a base de dados do dicionário de produtos naturais (DNP; www.chemnetbase.com). A análise foi conduzida principalmente com base nos resultados de estudos fitoquímicos anteriores de *C. gloeosporioides*, de outras espécies do gênero *Colletotrichum*, num total de 51 substâncias descritas, ou ainda por fungos endofíticos (fungi e fungus). Isto permitiu detectar uma série de micromoléculas passíveis de serem encontradas nos extratos estudados.

3.7.2. Análise via GC-MS

Os extratos brutos ECMiA, ECMiB, ECMA e ECMB, devido à sua grande lipofilicidade e volatilidade, foram analisados por CG/EM para a análise inicial dos metabólitos majoritários. Os dados obtidos com esta técnica foram comparados com a base de dados do *software* do programa *GC-MS Postrun Analysis*, NIST 21 e WILLEY 229. A comparação foi realizada com base na porcentagem de semelhança dos espectros de massas contidas nas bases virtuais com os espectros obtidos com os extratos brutos de diclorometano de *C. gloeosporioides*, aceitando porcentagem de semelhança acima de 90% de similaridade (Hit rate).

3.7.3. Análise via ^1H RMN

Os deslocamentos químicos foram simulados para ^1H utilizando HOSE (Hierarchically Ordered Spherical Description of Environment), e também o algoritmo Mnova ver. 6.0.2-5475 através do Modgraph NMR Predict.

3.8. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.8.1. Ensaio de atividade antioxidante

O ensaio de atividade antioxidante, *in vitro*, é realizado através da determinação da porcentagem de sequestro de radicais livres da molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (figura 8).

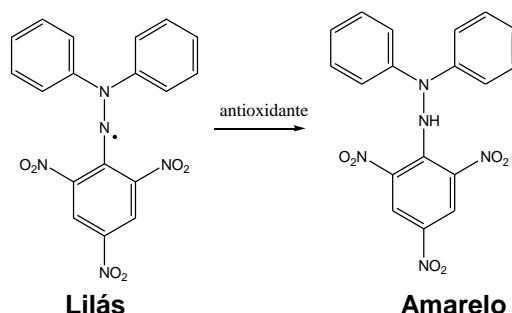


Figura 8: Redução do reagente DPPH

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados a amostra: 200 μL de DPPH (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol) e 100 μL de amostra em diversas diluições (66,7; 33,3; 10,0; 6,67; 3,33; 2,67; 1,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Controle positivo: 200 μL de DPPH e 100 μL de antioxidante padrão. Controle negativo: 200 μL de DPPH e 100 μL de solvente. A placa foi mantida por 30 minutos no escuro. A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado foi determinada através da absorbância a 517 nm e expresso em % de sequestro do radical livre estável DPPH.

$$\% = \frac{(\text{absorbância do CONTROLE-DPPH} - \text{absorbância da AMOSTRA ou PADRÃO}) \cdot 100}{\text{Absorbância do CONTROLE-DPPH}}$$

3.8.2. Ensaio de atividade de inibição de polimerização do Heme (atividade antimalárica)

O teste para inibição da polimerização do heme (hemoglobina) baseia-se na hipótese da presença no *Plasmodium falciparum*, agente infectante da doença, de uma enzima capaz de polimerizar a hematina livre que se forma no processo de fagocitose realizada pelo parasita na célula infectada. Essa hematina livre, altamente oxidante, é capaz de promover a lise da parede celular matando a célula e, por consequência, o parasita. A polimerização do heme livre pelo parasita, forma o pigmento malárico conhecido como hemozoína (EGAN *et al*, 1994; DORN *et al*, 1998). O ensaio busca matriz capaz de impedir a polimerização da hematina e assim possibilitar a morte seletiva do *Plasmodium*.

Os extratos, 50 µL a concentração 2,5 mg/mL; DMSO (50 µL) para os controles, com 100 µL de heme (6,4 mM de heme dissolvida em 0,2 N NaOH, 4,16 mg em 1000 µL, preparada 60 minutos antes da execução do ensaio, incubada a 37 °C e protegida da luz), 200 µL de AcONa 0,5 M e 50 µL de CH₃CO₂H foram dissolvidos em DMSO e incubados em microtubos de 1,5 mL por 24 horas a 37°C. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 10 min. e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado duas vezes, com 400 µL de DMSO e 400 µL de metanol, e dissolvido em 1000 µL de NaOH 0,1 M. Alíquotas de 20 µL da β-hematina dissolvida foram transferidas para uma placa de 96 poços junto com 180 µL de NaOH 0,1 M, e as amostras foram lidas a 405 nm no leitor de microplacas. Quinina e cloroquina foram utilizados como controle positivo. Os dados foram expressos em porcentagem de inibição da polimerização do heme e calculados pelo programa KC4 pelo emprego da fórmula a seguir. As análises foram feitas sempre em triplicata para o cálculo do desvio padrão.

$$\% \text{ inibição da formação de } \beta\text{-hematina} = (A_{\text{controle +}} - A_{\text{amostra}}) * 100 / A_{\text{controle +}}$$

3.8.3. Ensaio de atividade antifúngica

3.8.3.1. Atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Candida*

Os extratos foram preparados em DMSO e colocados em microplacas contendo meio RPMI 1640 com L-glutamina em pH 7,0 e 0,165 mol.L⁻¹ ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) suplementado com 2% de glicose, até a concentração dos extratos de 250 µg/mL. A suspensão de células foi preparada em sol. salina 0,85% com densidade ótica 0,5 padrão McFarland e diluídas 1:100 em RPMI até concentração final de 1 × 10⁴ a 5 × 10⁴ unidades de colônias por mL (CFU.mL⁻¹). Esta solução foi inoculada nas microplacas contendo os extratos em concentrações de 250 µg/mL a 0,4µg/mL. As placas foram incubadas com agitação a 37°C por 24 h para espécies de *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*. O controle utilizado foi anfotericina B diluída em DMSO, no intervalo de concentração de 0,03 a 16 µg/mL. O CIM (concentração inibitória mínima), para o controle, foi a concentração mais baixa que inibiu completamente o crescimento dos fungos. CIM foi definido como a concentração mínima que inibe qualquer crescimento fúngico visível. Os resultados foram analisados em espectrofotômetro.

3.8.3.2. Atividade antifúngica contra *Cladasporium shaerospermum* e *C. cladosporioides*

O ensaio para avaliação do potencial antifúngico foi realizado com os fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Foram utilizadas placas preparadas para CCDC da Merck. Para a solução estoque foi utilizado glicose e sais inorgânicos. A solução foi autoclavada a 120 °C, por 20 min.

Os extratos brutos (2,0 mg/mL, 30 °C) foram submetidos a cromatografia em camada delgada com sistemas de solventes apropriados. Após desenvolvimento da cromatografia e completa evaporação do solvente, as cromatoplasmas foram nebulizadas com a suspensão de esporos do fungo *C.*

cladosporioides e *C. sphaerospermum* e incubadas em câmara úmida a 25 °C, no escuro, por 48 horas, segundo método de Homans & Fuchs, 1970.

3.8.3.3. Atividade tripanocida *in vitro*

Os experimentos foram realizados com a forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*. As cepas foram incubadas a 28 °C, em meio de LIT (liver-infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino, colhidas durante a fase exponencial de crescimento (7-dias de formação de cultura). Os compostos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO), em seguida foram transferidos para uma placa de 96 poços (TPP) com diferentes concentrações finais. *T. cruzi* (1×10^7 parasitas / mL) foram adicionados a cada poço, sendo a mesma quantidade de meio LIT adicionado aos poços controles. Estas placas foram mantidas a 28 ° C por 72 h. Após este período de incubação, alíquota de 10 µL (2,5 mg / mL) de solução de 3-(4,5 dimetil--2-il) -2,5-difenil-brometo de tetrazolium-phenazinemethosulfate (MTT-PMS) foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 75 minutos no escuro a 28 ° C. Uma solução de 10% (100 µL) de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado à solução anterior e mantida a temperatura ambiente no escuro por 30 min.

A absorbância das amostras foi lida em 595 nm. Os valores de IC₅₀ foram determinados por análise de regressão linear após um período de 72 h de incubação. Os valores de IC₅₀ de compostos e do controle positivo benzonidazol foram determinados. Para a análise estatística do método foi empregada a metodologia de Muelas-Serrano et al., 2000.

3.8.4. Ensaio de atividade Anticolinesterásica

A atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase foi feita baseada no método de Ellman (RHEE et al., 2003).

O ensaio consiste na hidrólise do substrato acetilcolina pela enzima resultando no produto tiocolina que reage com o reagente de Ellman (DTNB)

sendo os produtos obtidos: 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e 5-tio-2-nitrobenzoato que podem ser detectados no comprimento de onda de 405 nm.

Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados: 25 μ L de 15 mM ATCI em água, 125 μ L de 3 mM DTNB tamponado com a solução tampão C, 50 μ L da solução de tampão B, 25 μ L de amostra (10 mg/mL em MEOH diluída dez vezes com o tampão A para atingir a concentração final de 1 mg/mL). As soluções obtidas foram observadas em λ 405 nm num período de 13 s cada leitura sendo o procedimento repetido por oito vezes. A proporção das reações foi calculada em software *Microplate Manager* versão 4.0 (Laboratórios Bio-Rad).

A hidrólise espontânea do substrato é detectada por qualquer aumento no valor da absorbância. A correção foi feita por subtração da proporção da reação antes de adicionar a enzima e a proporção depois de adicionar a enzima. A porcentagem de inibição foi calculada comparando-se as razões das amostras do branco (10% MEOH em solução tampão) e do padrão galantamina em MeOH, sendo adotada as concentrações: 5, 3, 1 mM; 300; 100; 25; 10; 2,5; 1; e 0,1 μ M.

Reagentes:

Tampão A: 50 mM tris-HCl, pH 8,0.

Tampão B: 50 mM tris-HCl pH 8,0; contendo 0,1% de albumina bovina(BSA).

Tampão C: 50 mM tris-HCl, pH 8,0; contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

Reagente de Ellman: 5,5-Ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Substrato: iodeto de acetiltiocolina (ATCI), Sigma (St. Louis, MO, USA) dissolvido em de água Millipore até concentração de 15 mM.

Enzima: Acetilcolinesterase da enguia elétrica (tipo Vis liofilizado, 292 U/mg, 394 U/mg) da Sigma (St. Louis, MO, USA). A enzima liofilizada foi dissolvida no tampão A obtendo assim a solução estoque com concentração de 1000 U/mL, e posteriormente diluídos no tampão B até a concentração de 0,22 U/mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da triagem realizada com os meios de cultura

Considerando que *C. gloeosporioides* apresenta um grande quantidade de metabolitos bioativos, e associado ao fato de que a produção metabólica de microrganismos é dependente do meio de cultivo, o endofítico foi cultivado, em pequena escala, utilizando diferentes meios de cultura para uma avaliação metabólica e assim selecionar o meio ótimo para a produção em grande escala dos metabolitos de interesse. Um branco (meio de cultura sem a inoculação de micélio), para todos os meios cultivados foi realizado com o objetivo de comparar e, identificar os possíveis interferentes do meio extraídos com o solvente orgânico.

A linhagem de *C. gloeosporioides* isolada e preservada em *slants* foi repicada para placas de Petri contendo meio de cultura sólido PDA e foram incubadas por 14 dias, após este período, as cepas obtidas foram então inoculadas nos diferentes meios de cultivo descritos na seção materiais e métodos (pag. 41).

4.1.1. Análise cromatográfica dos diferentes meios de cultura

Os extratos brutos de DCM e AcOEt e seus brancos foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência. Para os extratos lipofílicos provenientes da partição líquido-líquido com DCM foi utilizado o modo de eluição normal, enquanto que para os extratos de AcOEt, devido a sua característica mais polar, foi selecionado o modo reverso de eluição.

A análise dos cromatogramas dos extratos obtidos de Czapek, Ext. Malte; milho, PDB e YM, revelaram a presença de metabolitos de baixa, alta e média polaridade, como pode ser observado nas figuras 9 (extratos DCM, cromatografia de fase normal) e 10 (extratos AcOEt, cromatografia de fase reversa).

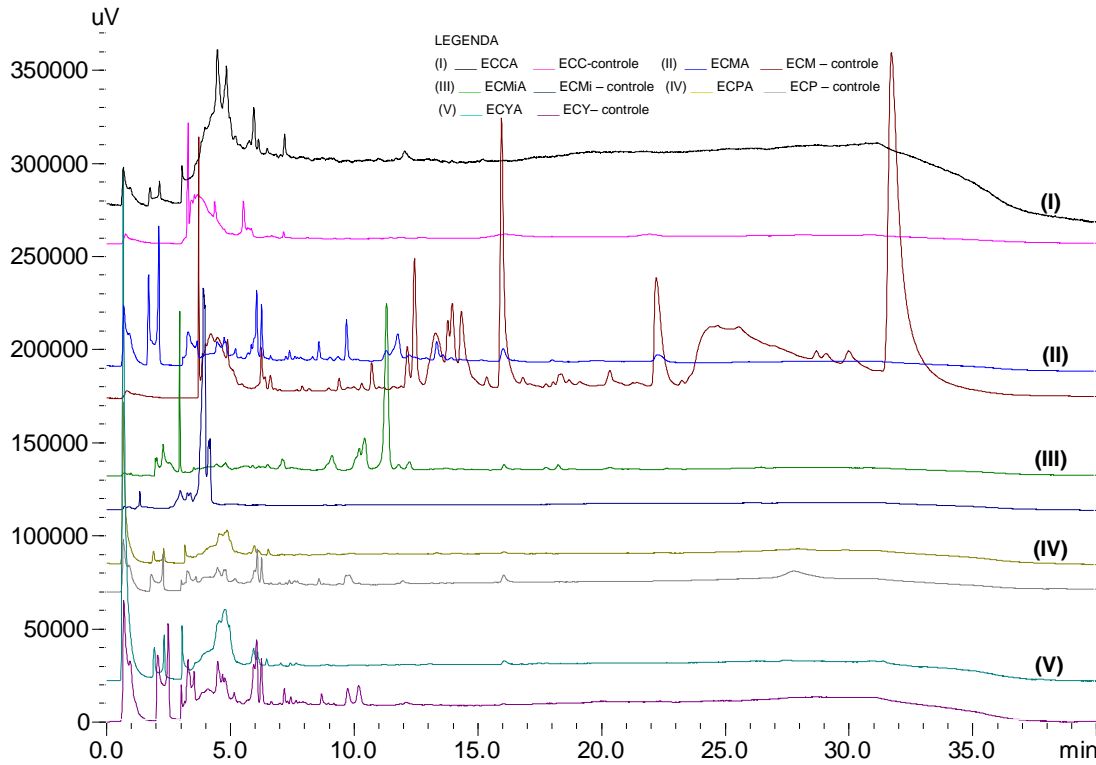


Figura 9: Comparação dos cromatogramas do extrato de DCM dos diversos meios de cultura com e sem o fungo (controle).

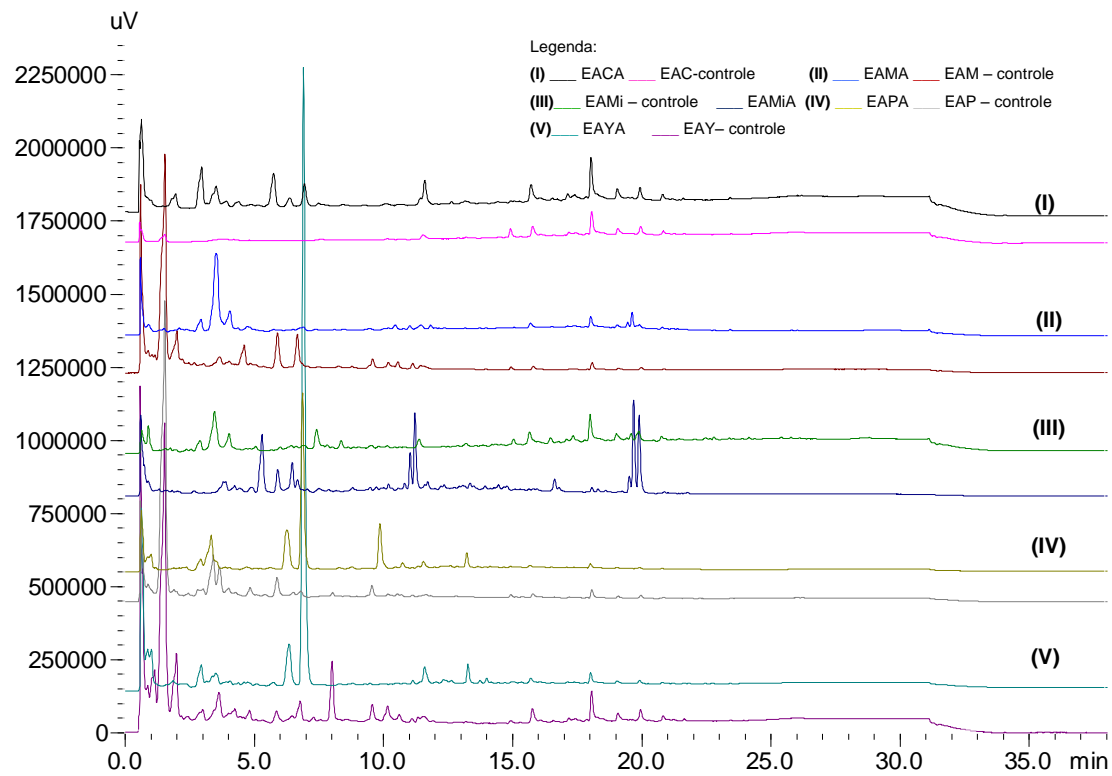


Figura 10: Comparação dos cromatogramas do extrato de AcOEt dos diversos meios de cultura com e sem o fungo (controle).

Através da comparação dos cromatogramas dos cultivos com fungo e sem fungo, observamos que poucas bandas correspondentes a metabólitos produzidos pelo fungo coincidem com bandas de menor intensidade com o meio de cultura sem o fungo. Com isso é possível determinar, com exclusividade, os metabólitos apenas produzidos pelo endófito.

4.1.2. Análise dos extratos brutos por ^1H RMN

Meio Czapek

A extração dos metabólitos, produzidos com o meio de cultura de Czapek, com DCM resultou em um extrato bruto com massa de 30,1 mg e a extração com AcOEt uma massa de 30,0 mg.

Os espectros de ^1H RMN de ambos os extratos: DCM (figura 11) e AcOEt (figura 12), evidenciaram apenas sinais nas regiões de hidrogênios olefínicos e carbinólicos, sem a presença de hidrogênios aromáticos.

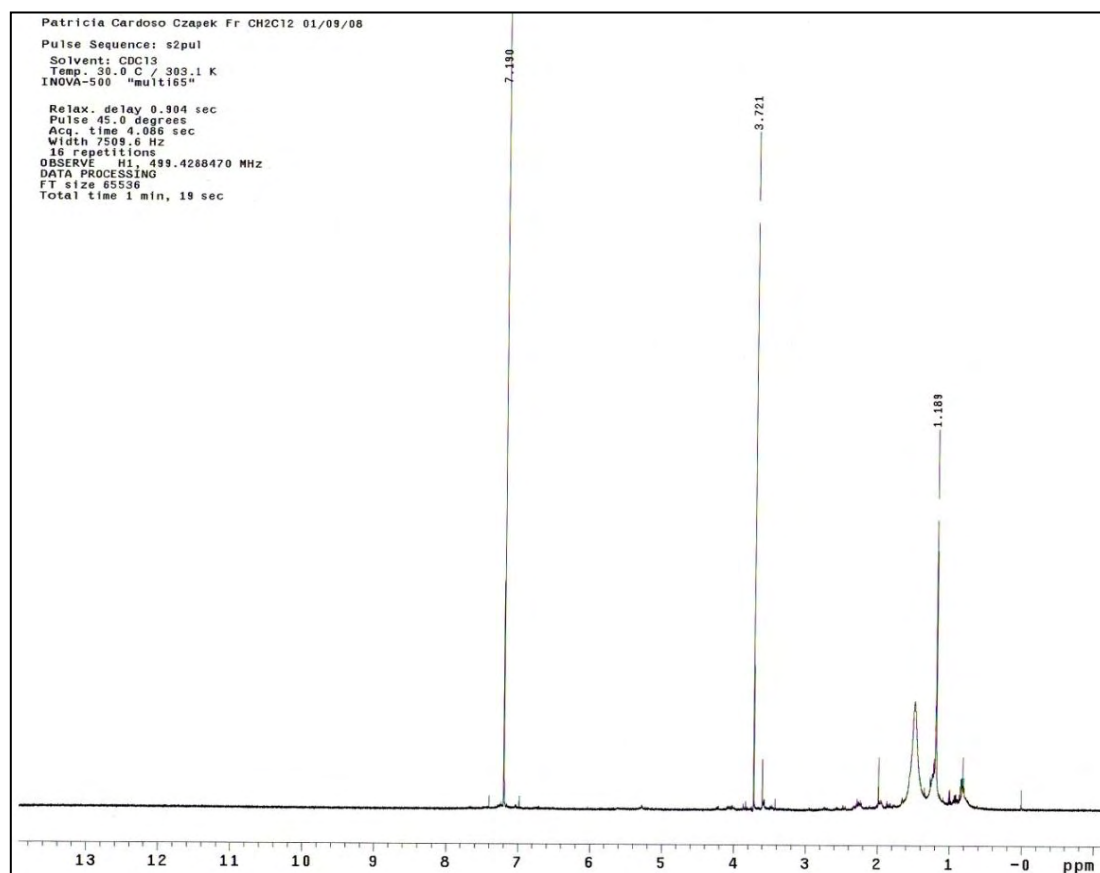


Figura 11: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto DCM de *C. gloeosporioides* em Czapek (CDCl_3 , 500 MHz).

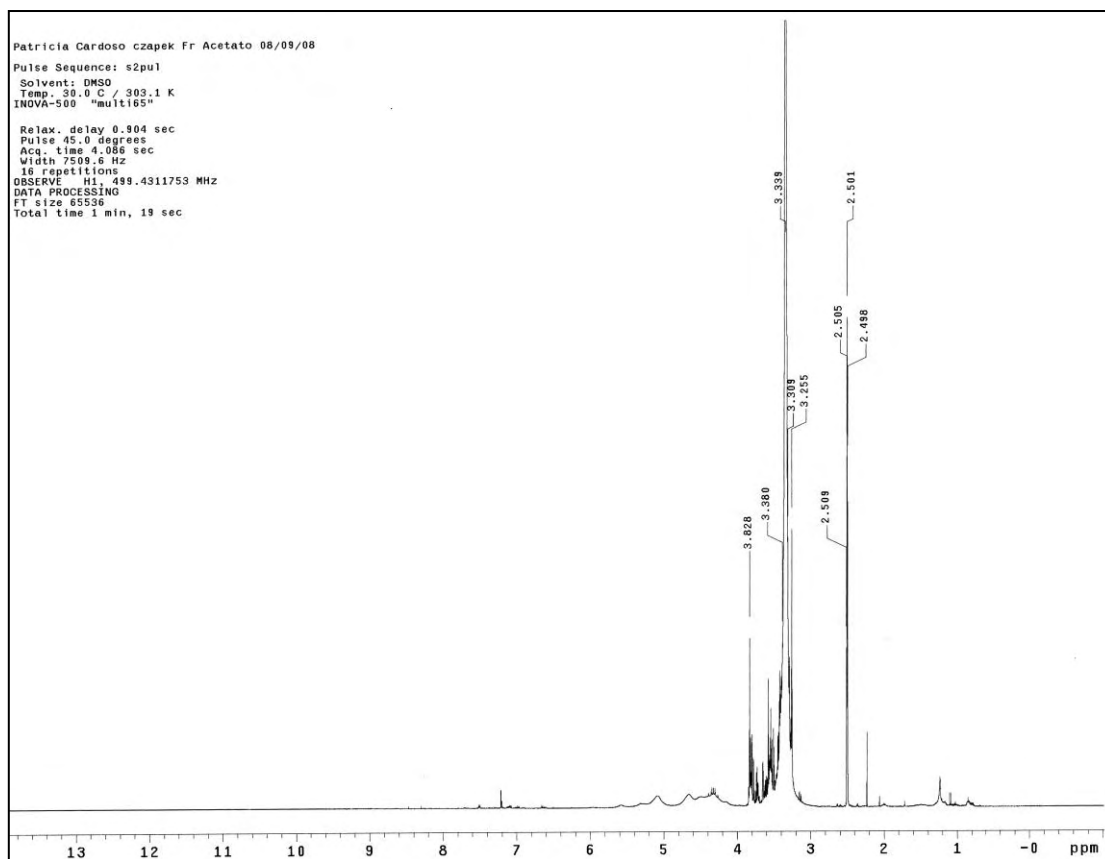


Figura 12: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de *C. gloeosporioides* em Czapek (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Meio Extr. Malte

A massa obtida para o extrato DCM foi de 49,3 mg e para AcOEt 47,3 mg. Os espectros de ^1H RMN (figuras 13 e 14) mostram extratos muito ricos na produção metabólica, quando comparado com o extrato do meio Czapek, apresentando sinais por toda a região espectral, indicando a presença de hidrogênios metílicos, carbinólicos, olefínicos, aromáticos, de aldeído e/ou fenólicos.

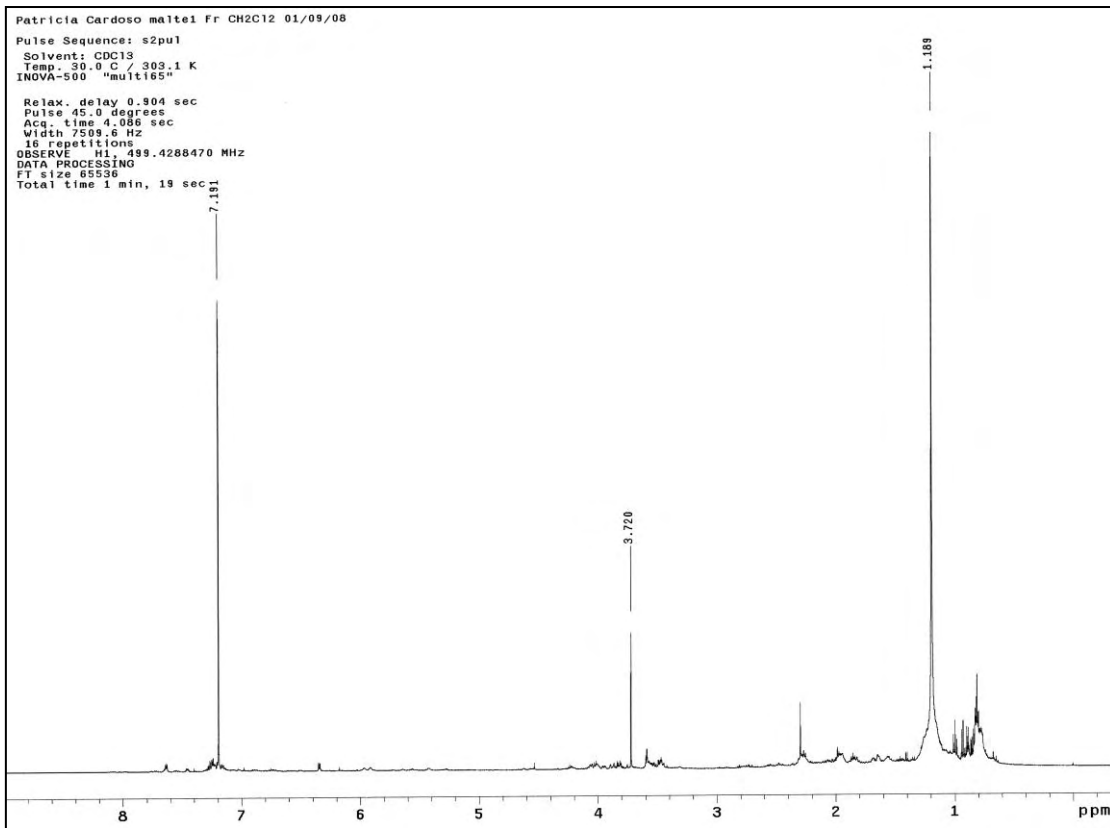


Figura 13: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto DCM de *C. gloeosporioides* em Extr. malte (CDCl_3 , 500 MHz).

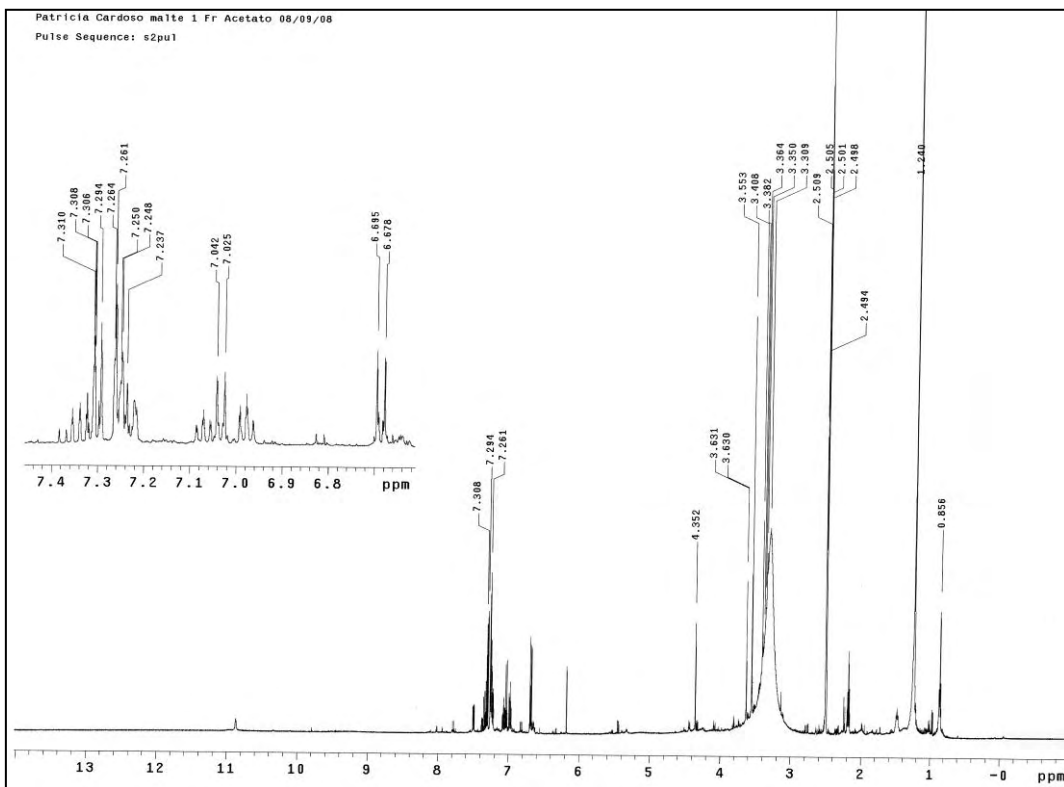


Figura 14: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de *C. gloeosporioides* em Extr. de malte ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

Meio Milho

Este meio, comparado com os demais, apresentou maior massa de extratos brutos: DCM 2,005 mg e AcOEt 450,0mg. Os espectros de ^1H RMN (figuras 15 e 16) mostram, assim como o meio de Extr. de malte, extratos ricos em produção metabólica, com sinais distribuídos ao longo de toda a região espectral para o extrato AcOEt e sinais olefínicos para o extrato DCM.

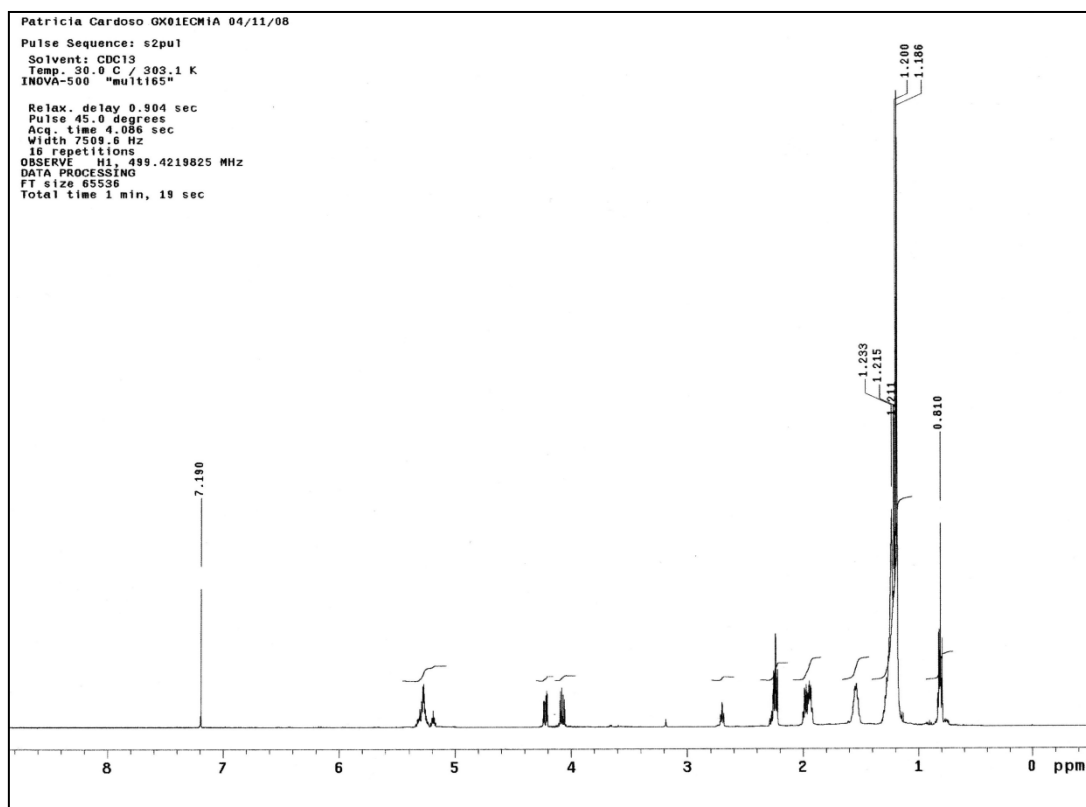


Figura 15: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto DCM de *C. gloeosporioides* em milho (CDCl_3 , 500 MHz).

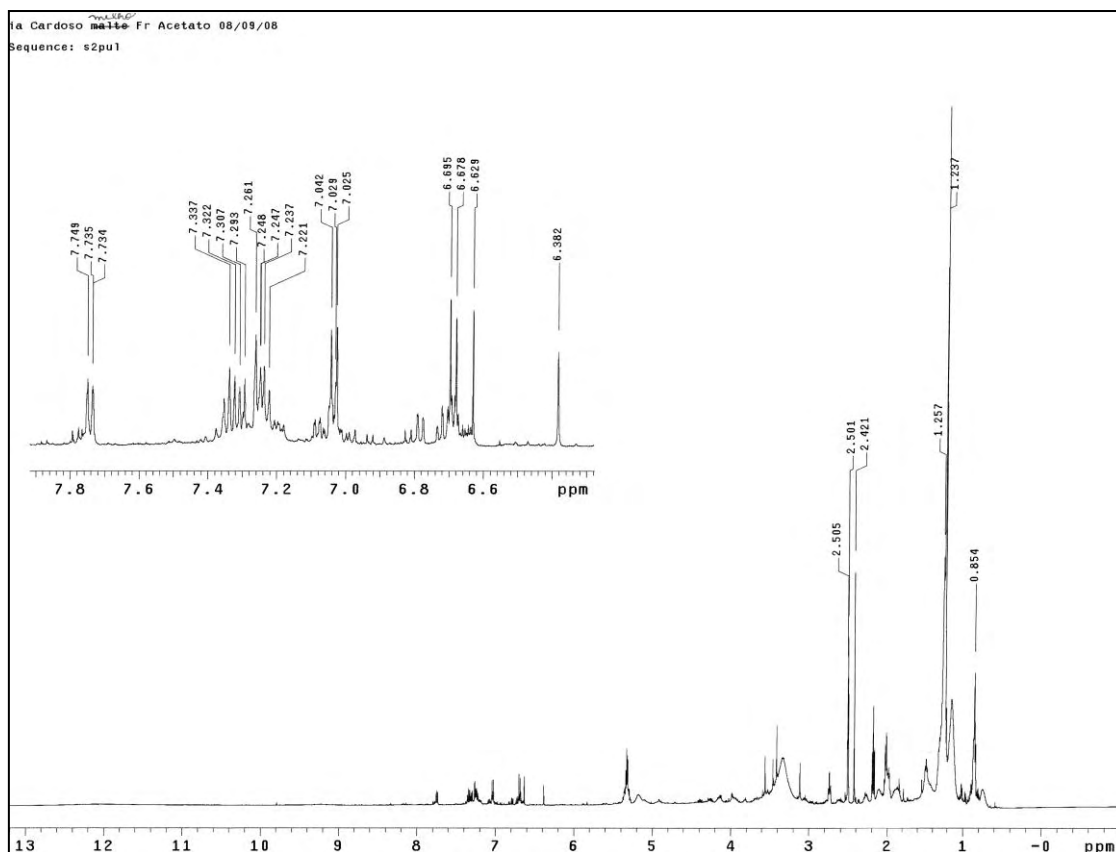


Figura 16: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de *C. gloeosporioides* em milho (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Meio PDB

A massa para os extratos obtidos nesse meio de cultivo foi de 13,4 mg para extrato DCM e 36,7 mg.

O espectro ^1H RMN dos extratos mostram muitos sinais na região aromática em ambos os extratos de AcOEt e DCM (Figuras 17 e 18). Porém ambos apresentaram pouca massa de extrato bruto quando comparados aos meios extr. de malte e milho.

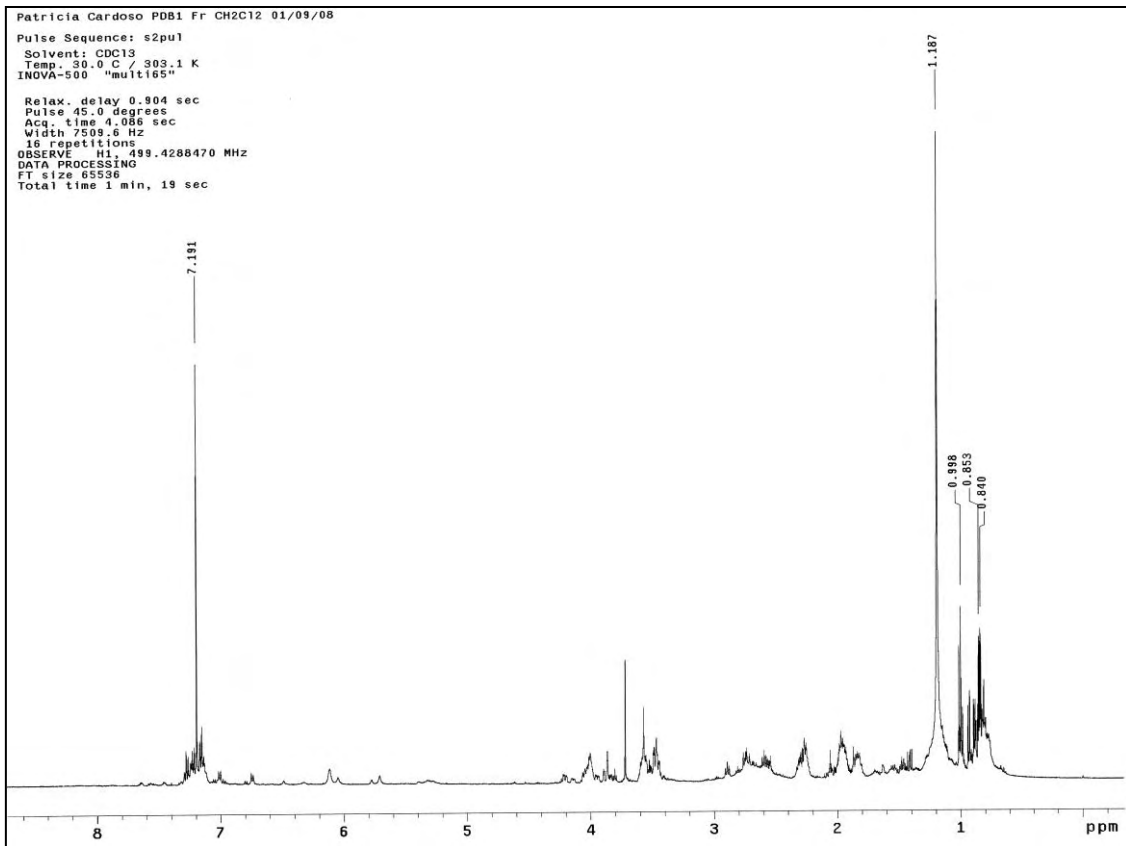


Figura 17: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto DCM de *C. gloeosporioides* em PDB (CDCl_3 , 500 MHz).

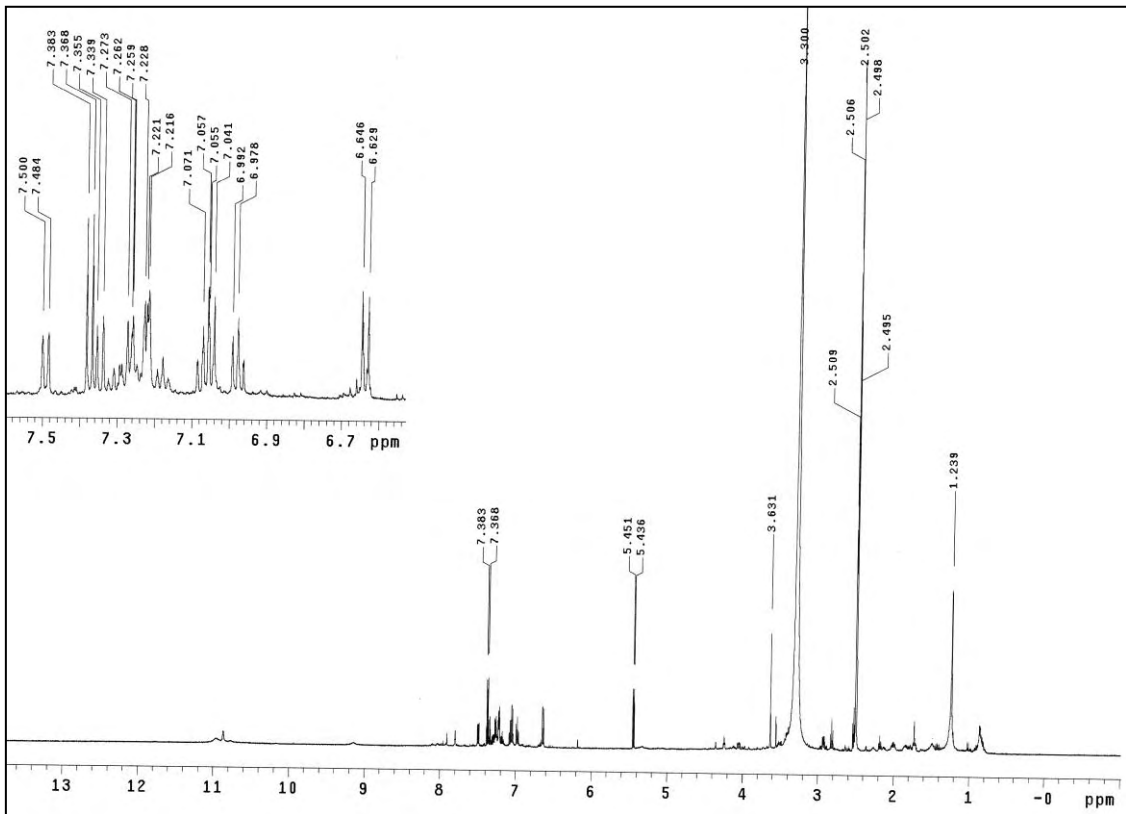


Figura 18: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de *C. gloeosporioides* em PDB ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

Meio YM

A extração dos metabólitos com DCM resultou em um extrato bruto com massa de 34,7 mg e a extração com AcOEt uma massa de 36,7 mg para o meio de cultura de YM.

Os espectros de ^1H RMN de ambos os extratos DCM (figura 19) e AcOEt (figura 20), evidenciaram sinais muito parecido com o meio PDB, com sinais nas regiões de hidrogênios aromáticos, olefínicos, carbinólicos e, alifáticos.

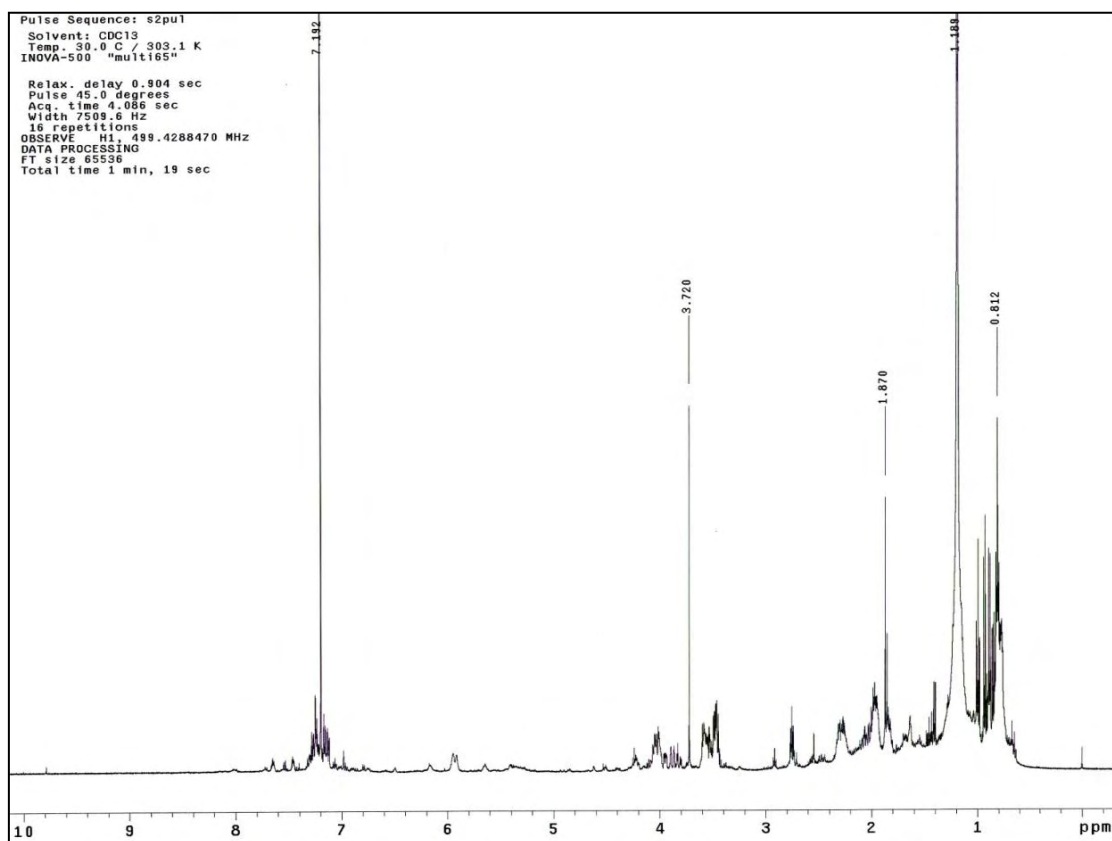


Figura 19: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto DCM de *C. gloeosporioides* em YM (CDCl_3 , 500 MHz).

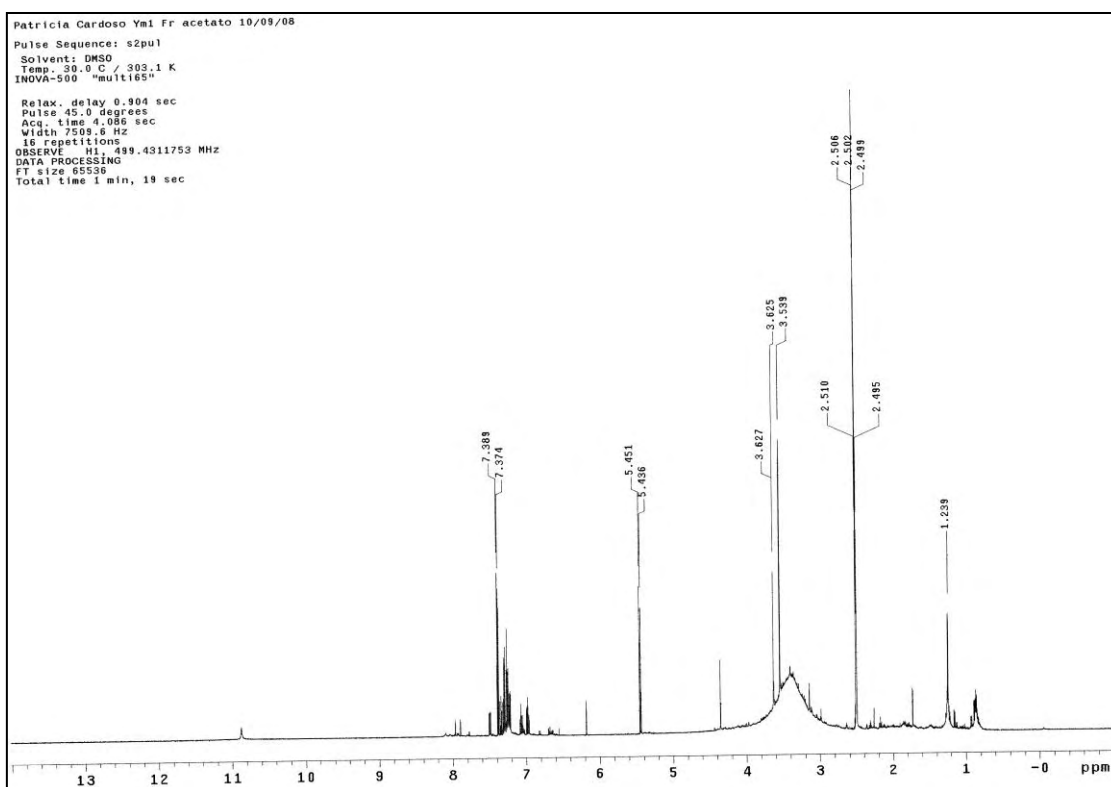


Figura 20: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto AcOEt de *C. gloeosporioides* em YM (DMSO- d_6 , 500 MHz).

4.1.3. Análise para triagem biológica dos diversos meios de cultivo

O perfil biológico do endofítico *C. gloeosporioides* foi avaliado quanto ao potencial antioxidante, potencial inibitório para a polimerização do heme, acetilcolinesterásico antifúngico frente a fitopatógenos e patógenos humanos, e atividade tripanocida. Os resultados destes ensaios estão relacionados nas figuras: 95, 97, 101, 99 e tabelas 15 e 17, respectivamente.

Após análise dos extratos através dos cromatogramas em fase normal e fase reversa, espectros de ^1H RMN e perfil biológico, foram diagnosticados que os meios de cultura de Malte e de Milho seriam os mais promissores dentre a triagem realizada e foram submetidos à produção em larga escala para facilitar os procedimentos de separação.

4.2. Resultados dos experimentos com GC-MS

O TIC positivo do GC forneceu a massa molecular de baixa resolução de cada íon majoritário e ao contrapor os TIC dos extratos (figura 21), podemos verificar que ECMiA e ECMiB são similares, também como ECMA e ECMB apresentam perfil próximos, uma vez que para obter as amostras foram mantidas as mesmas condições de cultivo e extração, porém em períodos diferentes, tal fato demonstra a reprodutibilidade do perfil micromolecular quando são aplicadas as mesmas condições de crescimento ao fungo.

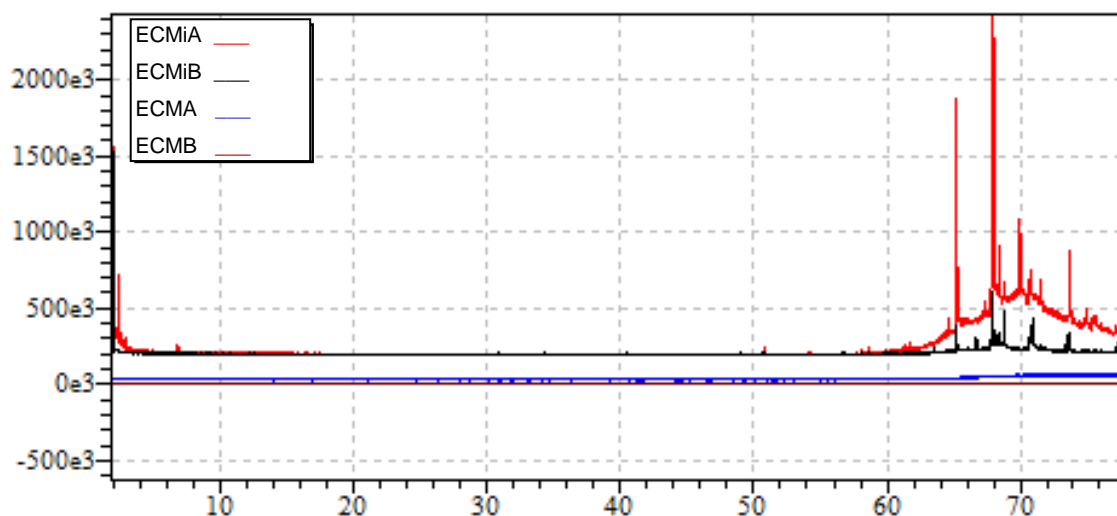


Figura 21: TIC positivo de GC-MS de ECMiA (vermelho), ECMiB (preto), ECMA (azul) e ECMB (marron).

Ao comparar os cromatogramas obtidos com a rampa de temperaturas programadas: 50 °C (3 min) - 50 a 295 °C (5 °C/min) – 295 °C (20min), injetor: 280 °C, interface: 300 °C e tempo de corrida total 80 min, dos extratos de AcOEt (ECMiA e ECMiB) e de DCM (ECMA e ECMB), podemos observar bandas cromatográficas diferentes entre os meios de milho e extrato de malte, indicando a presença de componentes termoestáveis no primeiro e nenhum no segundo meio de cultura. O espectro de massas das bandas cromatográficas majoritárias foi comparado com os dados espectroscópicos das bases de dados (NIST 21 e WILLEY 229) do programa *GC-MS Postrun Analysis* e DPN (www.chemnetbase.com), restringindo-se a busca para “fungi”, sendo seis substâncias do ECMiA e ECMiB foram detectadas nos seguintes tempos de retenção: (1) 65,17; (2) e (3) 67,54; (4) 67,92 (5) 69,98 e (6) 73,7 minutos. (figura 22).

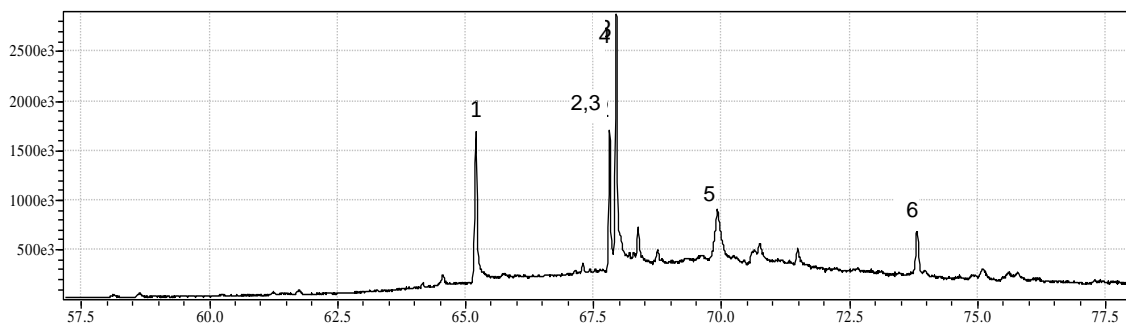


Figura 22: Expansão do TIC positivo de ECMiB.

4.2.1. Análise e detecção *in silico* de ECMiB

A análise do pico 1 (tempo de retenção 65,17 minutos) mostra o espectro de massas abaixo (figura 23).

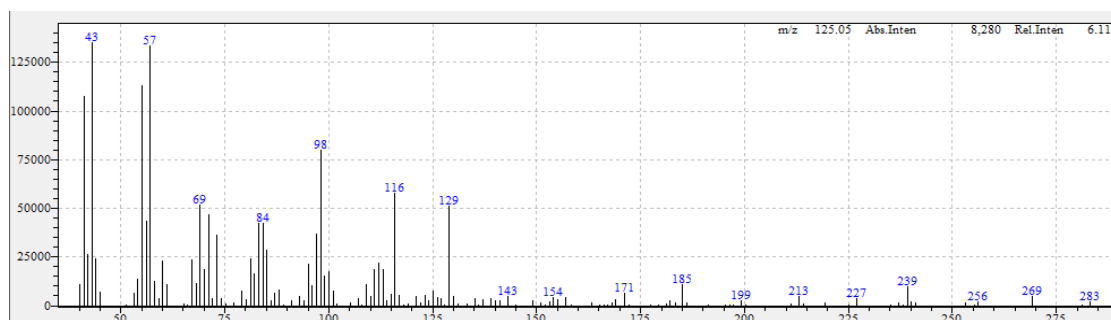


Figura 23: Espectro de massas GC-MSde 1: tempo de retenção: 65,17 minutos.

Este espectro foi contraposto com as bases de dados do programa (Willey 229 e NIST 21) e observamos similaridade (90%) com o dihexadecanoato de glicerila (1). (figura 24).

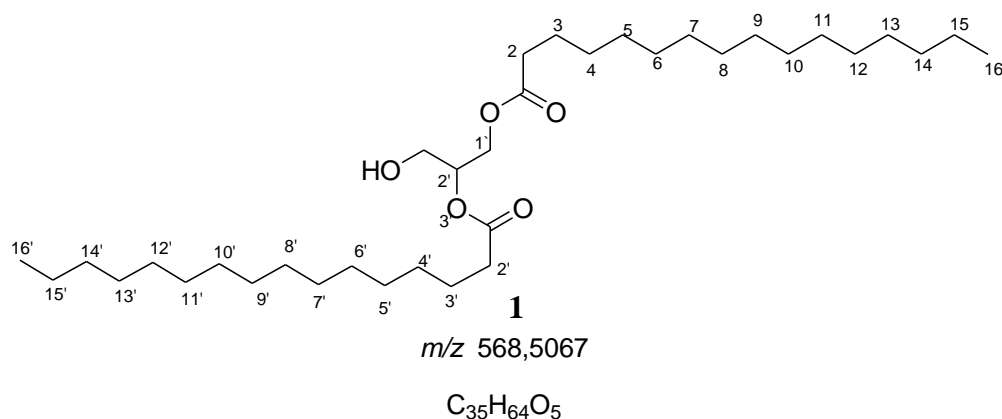


Figura 24: Dihexadecanoato de glicerila.

Alguns fragmentos (43, 57 e 239) foram propostos (Figura 25).

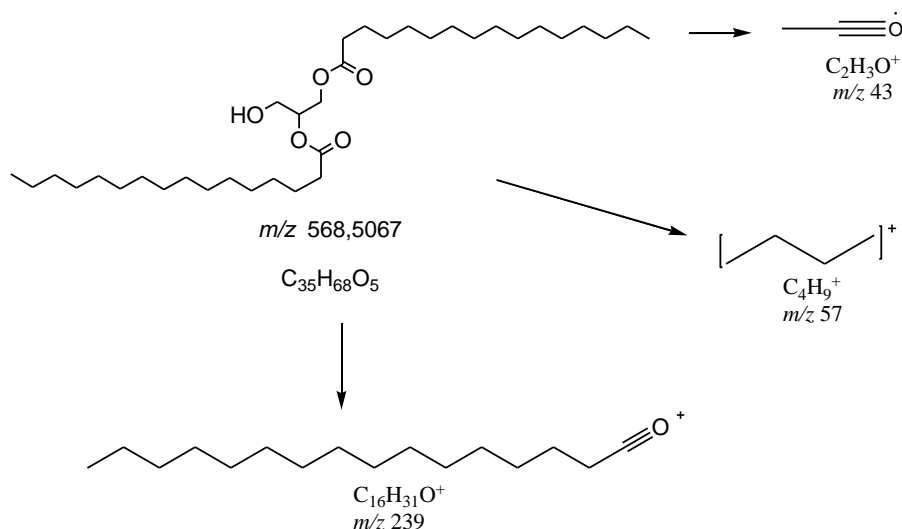


Figura 25: Proposta de fragmentação para m/z 239; 57 e 43.

O íon m/z 57 é resultado de quebra da cadeia alifática. Já os íons em m/z 43 e 239 são resultado da formação do íon acílio estável.

O pico no tempo de retenção 67, 548 min. (figura 26) foi detectado na base de dados NIST 21 como sendo um éster graxo derivado do glicerol com provável cadeia carbônica C18:1 (Figura 28). O espectro de massas encontrado na base de dados (95% similaridade) está apresentado na figura 27.

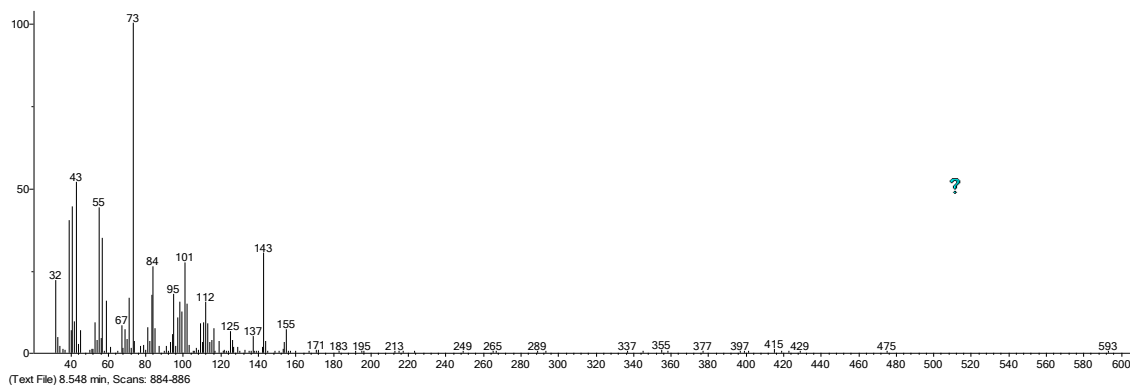


Figura 26: Composto no tempo de retenção 67,548 min.

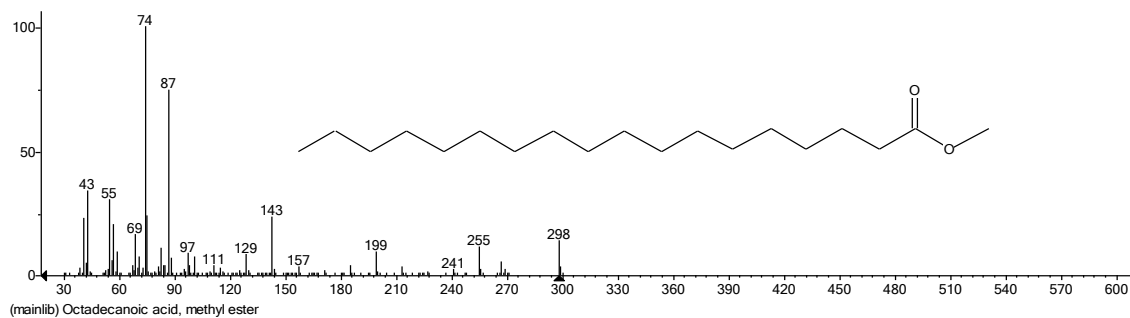


Figura 27: Espectro de massas do derivado do ácido octadecênico, obtido na base de dados NIST 21

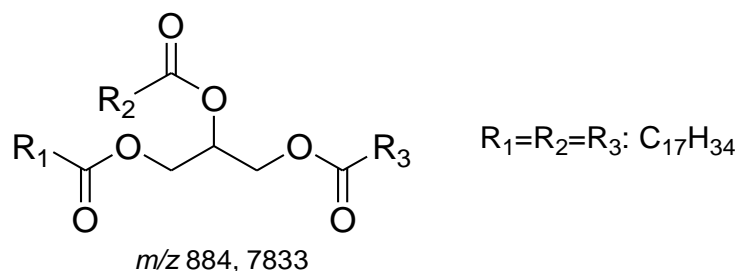


Figura 28: Estrutura da substância 2.

A formação dos principais fragmentos encontrados no espectro de massas (figura 26) m/z 43, 55, 57, 73 e 265 foi proposta e está descrita nas figuras 29 e 30.

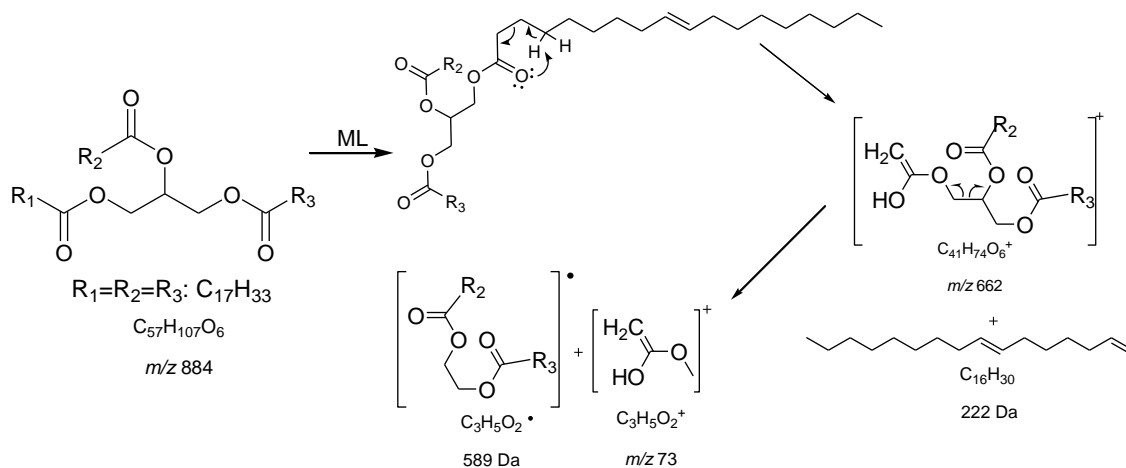


Figura 29: Proposta de fragmentação para os íons m/z 73.

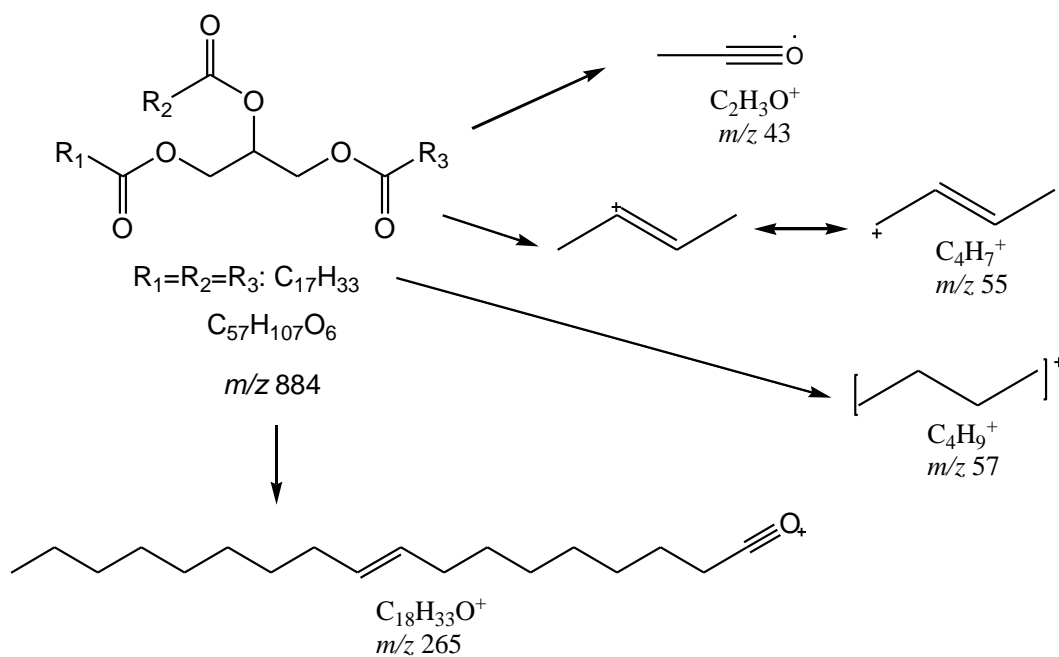


Figura 30: Proposta de fragmentação para os íons m/z 43, 55, 57 e 265.

O íon base m/z 73 é resultado de um rearranjo Mc Lafferty seguido de migração de próton. Os fragmentos m/z 55 e 57 são formados a partir de quebra da cadeia alifática e formação do carbocátion alílico mais estável, respectivamente. A formação do íon acílio justifica os fragmentos em m/z 43 e 265.

O espectro de massas do pico 3, tempo de retenção 67,92 minutos (figura 31), foi comparado com a base de dados NIST 21 e mostrou similaridade (92%) com octadec-9,12-dienoato de glicerila (figuras 32 e 33).

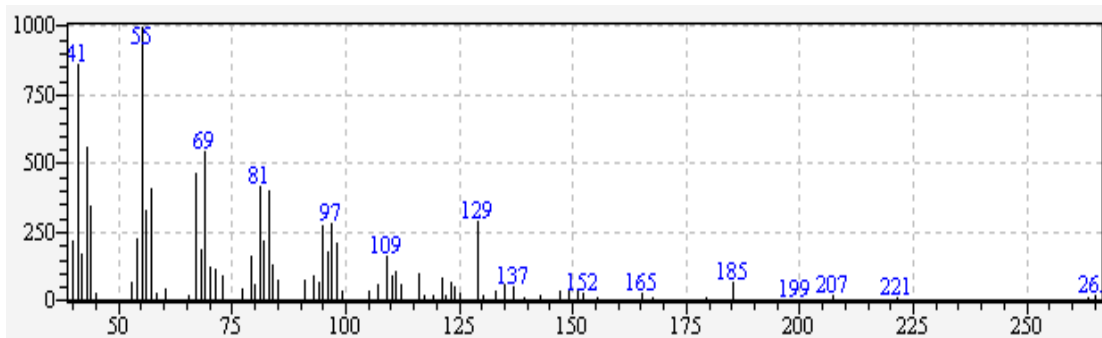


Figura 31: Espectro de massas, obtido pro GC-MS, no tempo de retenção 67,92 minutos.

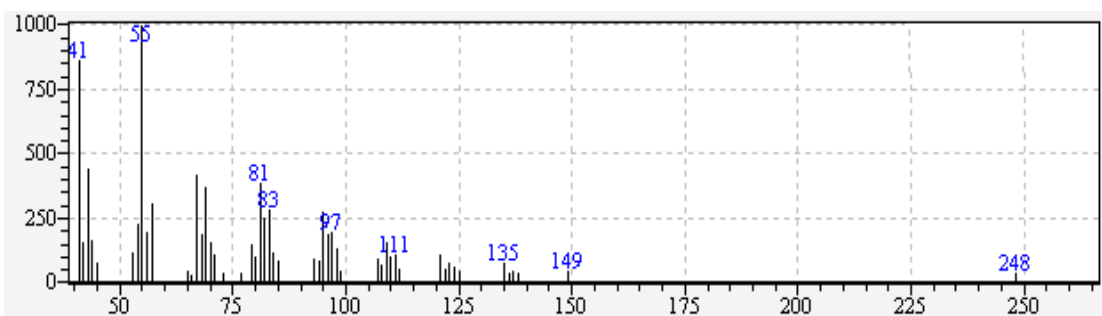


Figura 32: Espectro de massas, da base de dados NIST 21 para o composto octadeca-9,12-dienoato de glicerila.

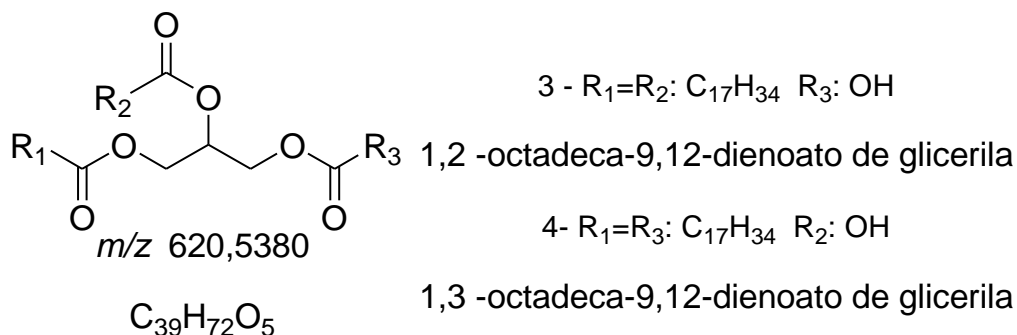


Figura 33: Substâncias detectadas 1,2 e 1,3 octadeca-9,12-dienoato de glicerila.

Alguns fragmentos (m/z 43; 55; 57 e 98) foram propostos e estão relacionados na figura 34.

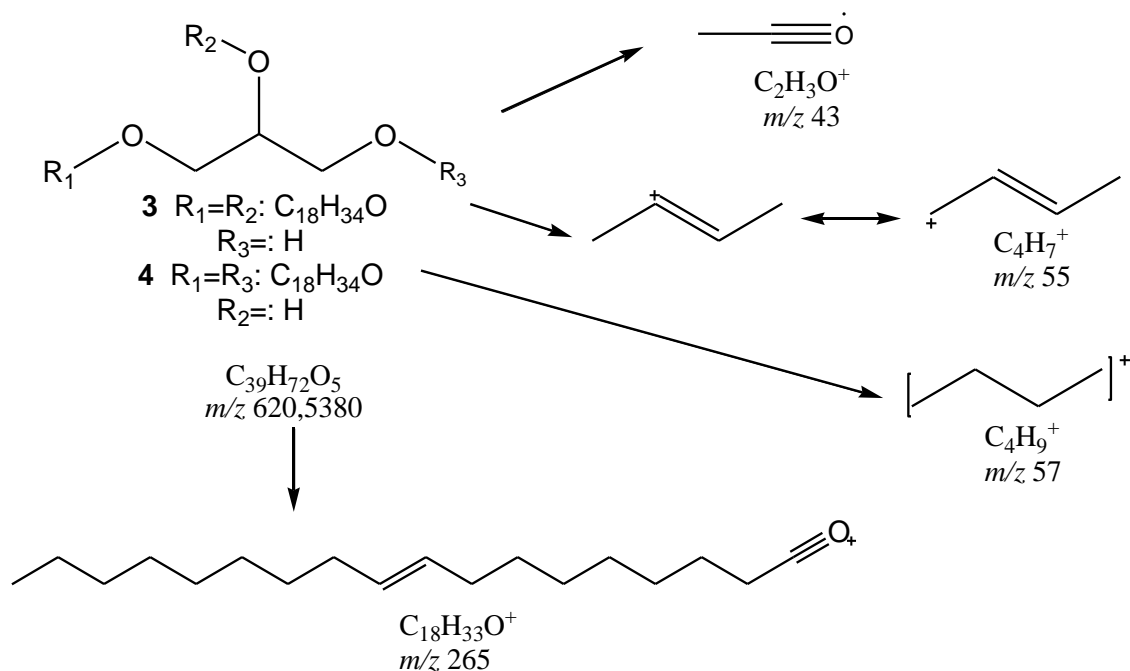


Figura 34: Proposta de fragmentação para os fragmentos m/z 43; 55; 57 e 265.

O fragmento m/z 55 é resultado da formação do carbocátion alílico estável, enquanto que o íon m/z 57 é gerado a partir da quebra da cadeia alifática e os fragmentos m/z 43 e 265 são derivados da formação do íon acílio estável.

No tempo de retenção 69,97, pico 4, foi obtido o espectro de massas relacionado na figura 35.

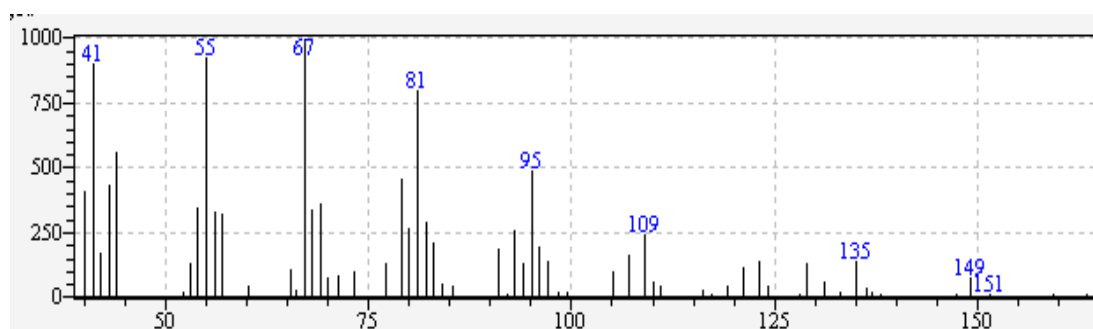


Figura 35: Espectro de massas. CG-EM, obtido para o composto no tempo de retenção 67,7 minutos.

O composto foi comparado com espectros de massas descritos na base de dados Willey 229 (figura 36) e mostrou similaridade (89%) com o **5** (figura 37).

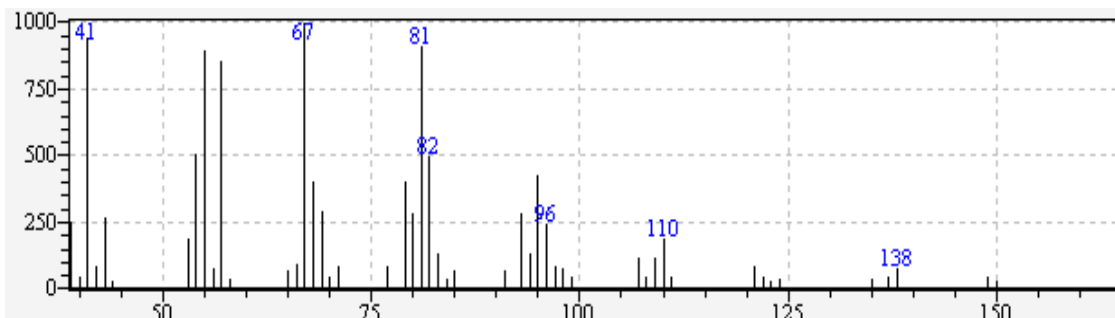
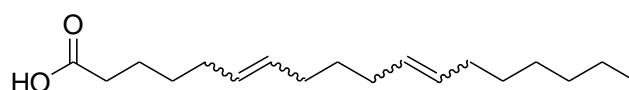


Figura 36: Espectro de massas, detectado na base Willey 229 de **5**: 6,11-hexadecadienol;



5

m/z 280,2402

$C_{18}H_{32}O_2$

6,11-hexadecadienol

Figura 37: Estrutura de **5**.

Foi feita proposta de fragmentação para os íons: 41 55 e 69 da substância detectada. (figura 38).

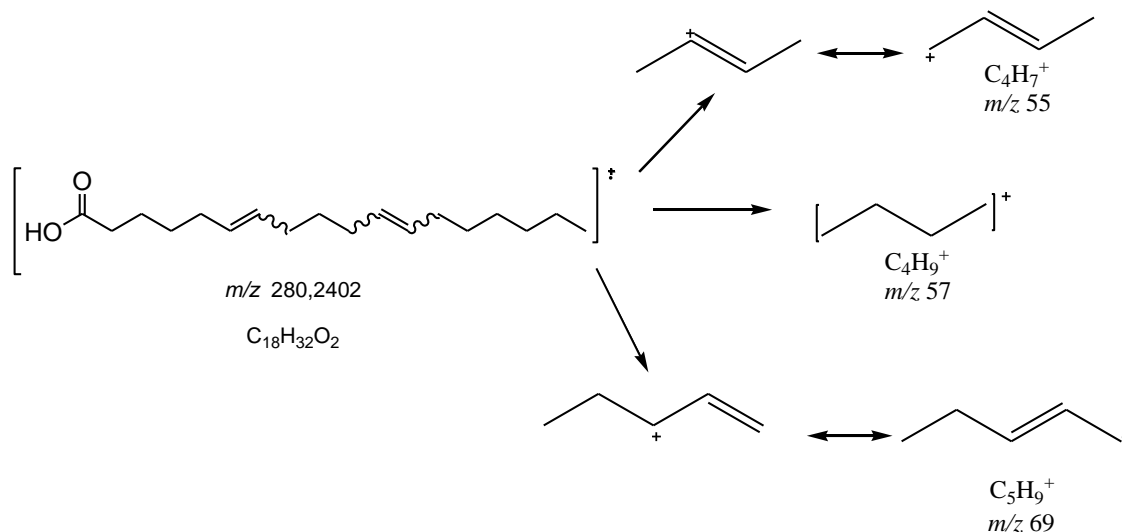


Figura 38: Proposta de fragmentação dos fragmentos 55, 57 e 69 do 6,11-hexadecadienol.

O íon formado m/z 57 é resultado de quebra da cadeia alifática. Os íons m/z 55 e m/z 69, com assistência da dupla ligação, formam um carbocátion alílico mais estável.

O composto no tempo de retenção 73,79 min., pico 6 (figura 39) quando comparado com a base de dados Willey 229 mostrou similaridade (94%) com o espectro de massas do geranyl-linalol (figura 40).

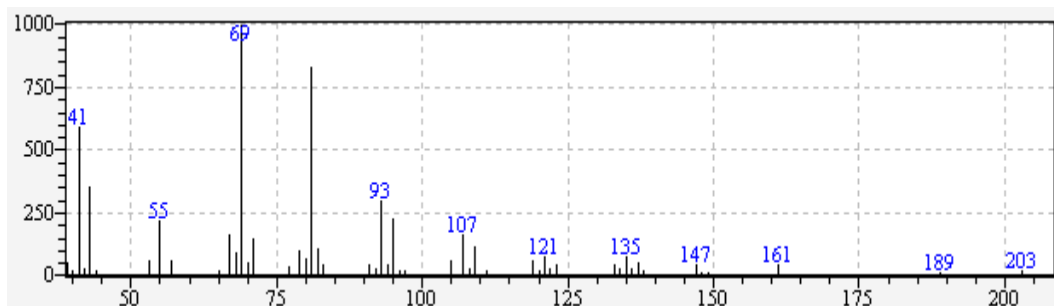
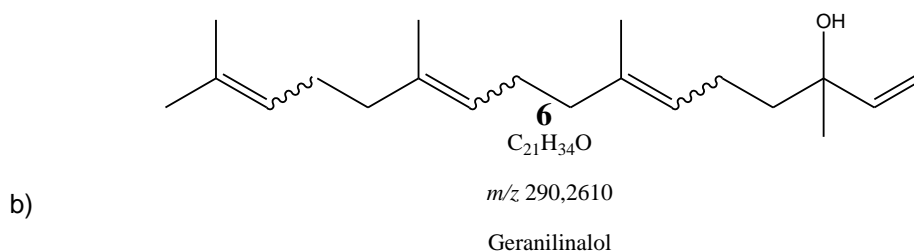
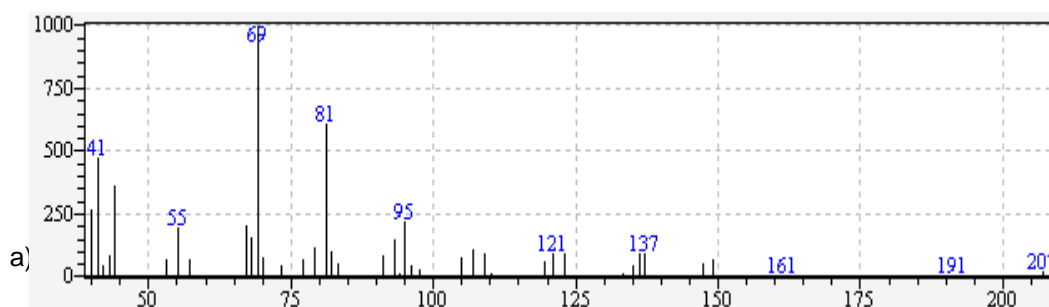


Figura 39: Composto no tempo de retenção 73,79 min.



b)

Figura 40: a) Espectro de massas do geranyl-linalol, obtido na base de dados Willey 229; b) estrutura de **6**: geranyl-linalol.

O fragmento, *m/z* 69, proposto está relacionado na figura 41. O íon formado *m/z* 69 sofre um rearranjo para formar o carbocátion alílico mais estável.

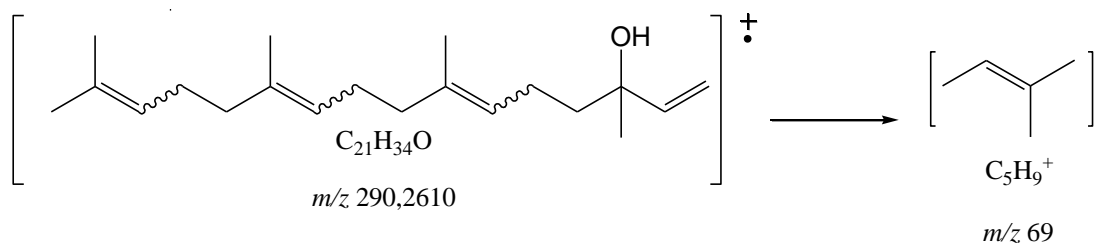


Figura 41: Proposta de fragmentação para o íon *m/z* 69,0.

Os extratos de ECMA e ECMB, obtidos do extrato de malte, não forneceram íons detectáveis no CG-EM.

4.2.2. Elucidação estrutural do metabolitos isolados de ECMiB

As substâncias **2** (Tabela 08, pg. 65) **3** e **4** (Tabela 09, pg. 67) foram submetidas às técnicas espectroscópicas para elucidação estrutural, destacando-se RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (*g*COSY, *g*HMBC, *g*HMQC, etc).

Determinação estrutural da substância 2

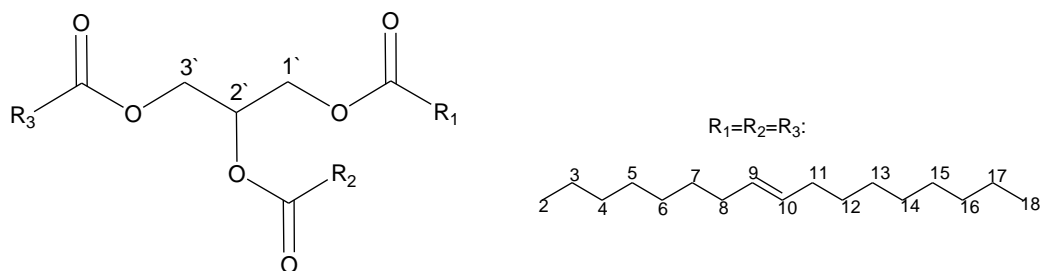


Figura 42: Estrutura atribuída para a substância **2**.

O espectro de RMN ^{13}C com auxílio do DEPT indicou a presença de cinquenta e sete carbonos, sendo três da unidade glicerol (δ_{C} 68,9 posição *sn* 2'; 62,1, posição *sn* 1', 3'), três carbonilas (δ_{C} 173,2 *sn* 1', 3'; 172,8; *sn* 2'), três metílicos (δ_{C} 14,0), 42 metilênicos (δ_{C} 22,6 a 34,1) e seis olefínicos (δ_{C} 129,0; 129,6; 129,9 e 130,0).

Os experimentos de ^1H RMN evidenciaram a presença de um tripleto em δ_{H} 0,81 (δ_{C} 14,0, *t*), dois duplos dubletos em δ_{H} 4,06 (δ_{C} 62,1; *dd*) e δ_{H} 4,21 (δ_{C} 62,1; *dd*), um tripleto em δ_{H} 1,54 (δ_{C} 24,8; *t*), multipletos em 1,19 (δ_{C} 22,6, *m*); 1,24 (δ_{C} 29,0 a 31,9, *m*); 5,18 (δ_{C} 68,9, *m*) e 5,26 (δ_{C} 129,0; 129,6; 129,9 e 130,0; *m*).

Os dados dos experimentos de RMN de ^{13}C e ^1H foram comparados com a literatura, uma vez que o perfil dos espectros foi identificado como sendo pertencentes à classe dos derivados graxos do glicerol, previamente detectados *in silico* pela técnica CG-MS. Os dados encontrados e comparados estão relacionados na tabela 8.

Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **2** (CDCl_3).

Carbono	Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	S. Simova et al., 2003	L. Retief et al., 2009
C1	1	173,2	173,2	173,2
	2	172,8	172,8	172,8
	3	173,2	173,2	173,2

C2	1	34,0	33,9	34,2
	2	34,1	34,1	34,0
	3	34,0	33,9	34,2
C3	1	24,8	24,8	24,8
	2	24,8	24,8	24,9
	3	24,8	24,8	24,8
C4	1	29,1	29,0	29,1
	2	29,0	29,0	29,0
	3	29,1	29,0	29,1
C5	1	29,1	29,1	29,2
	2	29,2	29,1	29,2
	3	29,1	29,1	29,2
C6	1	29,0	29,0	29,1
	2	29,1	29,1	29,1
	3	29,0	29,0	29,1
C7	1	29,6	29,6	29,7
	2	29,6	29,6	29,7
	3	29,6	29,6	29,7
C8	1	27,1	27,1	27,1
	2	27,1	27,1	27,1
	3	27,1	27,1	27,1
C9	1	129,7	129,6	129,7
	2	129,6	129,6	129,6
	3	129,7	129,6	129,7
C10	1	129,9	129,9	130,0
	2	130,0	129,9	130,0
	3	129,9	129,9	130,0
C11	1	27,2	27,1	27,2
	2	27,2	27,1	27,2
	3	27,2	27,1	27,2
C12	1	29,7	29,7	29,7
	2	29,6	29,7	29,7
	3	29,7	29,7	29,7
C13	1	29,3	29,3	29,3
	2	29,3	29,3	29,3
	3	29,3	29,3	29,3
C14	1	29,5	29,5	29,5
	2	29,4	29,5	29,5
	3	29,5	29,5	29,5
C15	1	29,3	29,3	29,3
	2	29,3	29,3	29,3
	3	29,3	29,3	29,3
C16	1	31,8	31,8	31,9
	2	31,9	31,8	31,9
	3	31,8	31,8	31,9

C17	1	22,6	22,6	22,7
	2	22,6	22,6	22,7
	3	22,6	22,6	22,7
C18	1	14,0	14,0	14,1
	2	14,0	14,0	14,1
	3	14,0	14,0	14,1
CHO	Grupo	68,9	68,8	68,9
CH₂O	glicerila	62,1	62,0	62,1

Determinação estrutural das substâncias 3 e 4

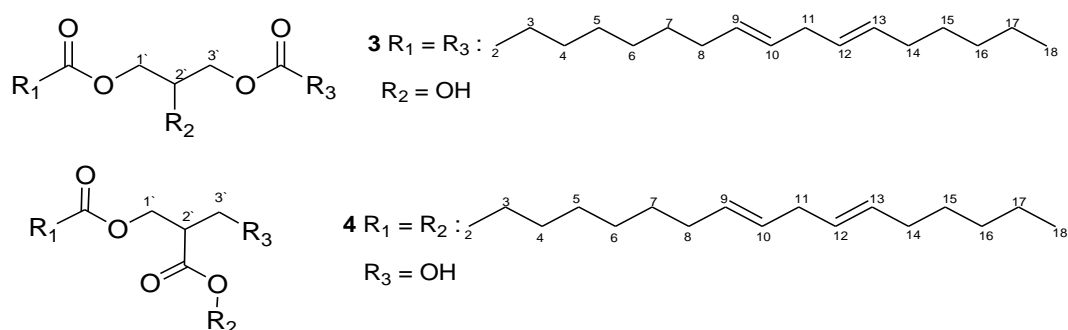


Figura 43: Estrutura atribuída para as substâncias **3** e **4** (mistura de isômeros).

Os dados de RMN de ^{13}C e ^1H encontrados para a fração F5, resultou na identificação das substâncias **3** e **4**, uma mistura de isômeros posicionais, derivados graxos do glicerol. O composto elucidado foi identificado como sendo uma mistura *sn* 1,2 e *sn* 1,3 do octadeca-9,12-dienoato de glicerila. O banco de dados do programa CG-MS, havia sugerido similaridade com este composto. Entretanto a base de dados do programa não sugere uma mistura. O espectro de RMN ^{13}C , mostra a presença de trinta e nove carbonos, sendo três da unidade glicerol (substância **3**: δ_{C} 68,9 posição *sn* 2`; 62,1; posição *sn* 1`, 3`; substância **4** δ_{C} 70,6 posição *sn* 3`; 65,0, posição *sn* 1`, 2`), 2 carbonilas (substância **3**: δ_{C} 172,8 *sn* 1`, 3`; substância **4** δ_{C} 173,1; *Sn* 1` 2`), 2 metílicos (substância **3**: δ_{C} 14,0 e substância **4** δ_{C} 14,0), 24 metilênicos (substância **3**: δ_{C} 22,5 a 34,1 substância **4**: δ_{C} 22,6 a 34,1) e 8 olefínicos (substância **3** δ_{C} 127,8; 128,0; 129,9 e 130,2; substância **4** δ_{C} : 127,9; 128,0; 129,7, e 130,2).

Estes dados foram comparados com a literatura, onde foi possível identificar e correlacionar as posições dos carbonos referentes a substância **3** e a substância **4**, como apresentado na tabela 9.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substâncias **3** e **4** (CDCl_3).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		Soon Ng, 2000	
	Substância 3	Substância 4	Posição 1,3	Posição 1,2
1	172,8	173,1	172,8	173,5 (<i>sn</i> 1 [°]) 173,3 (<i>sn</i> 3 [°])
2	34,1	34,1	34,1	34,1 (<i>sn</i> 1 [°]) 34,2 (<i>sn</i> 3 [°])
3	24,8	24,8	24,8	24,9
4	29,0	29,0	29,0	29,1
5	29,2	29,2	29,2	
6	29,1	29,1	29,1	
7	29,6	29,6	29,6	29,7
8	27,2	27,2	27,2	27,6
9	129,9	129,7	129,9	130,0
10	128,0	128,0	128,0	128,1
11	25,6	25,6	25,6	26,6
12	127,8	127,9	127,9	127,9
13	130,2	130,2	130,1	130,2
14	27,2	27,2	27,2	27,2
15	29,3	29,3	29,3	29,1
16	31,5	31,8	31,5	31,5
17	22,5	22,6	22,5	22,6
18	14,0	14,0	14,0	14,0
CHO	68,9 (<i>sn</i> 1 [°] , 3 [°])	70,6 (<i>sn</i> , 2 [°])	68,9 (<i>sn</i> 1 [°] , 3 [°])	72,1 (<i>sn</i> , 2 [°])
CH ₂ O	65,0 (<i>sn</i> 2 [°])	62,1 (<i>sn</i> 1 [°] , 3 [°])	65,0 (<i>sn</i> 2 [°])	62,1; 61,4 (<i>sn</i> 1 [°] 3 [°])

4.3. Resultados dos experimentos com LC-DAD-HRMS, LC-DAD-HRMS/MS, ^1H RMN e análise *in silico*

Os extratos de AcOEt provenientes dos cultivos em milho (EAMiB) e em malte (EAMB) foram submetidos a experimentos utilizando como recurso a técnica hifenada LC-DAD-HRMS, sendo estes realizados tanto no modo positivo como no negativo. A análise *in silico* promoveu a detecção de treze substâncias. Também foi realizado o experimento de ^1H RMN, no extrato EAMiB, comparando-se os dados obtidos do extrato real e aqueles fornecidos pelo simulador.

4.3.1. Detecção *in silico* de micromoléculas presentes em EAMiB

- Análise via LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Nos cromatogramas de íons totais (TIC) de EAMiB realizados (figura 44), podem ser observadas várias bandas, sendo a o TIC positivo o que apresenta uma maior quantidade. Aquelas mais intensas foram escolhidas para a geração dos seus respectivos espectro de massas.

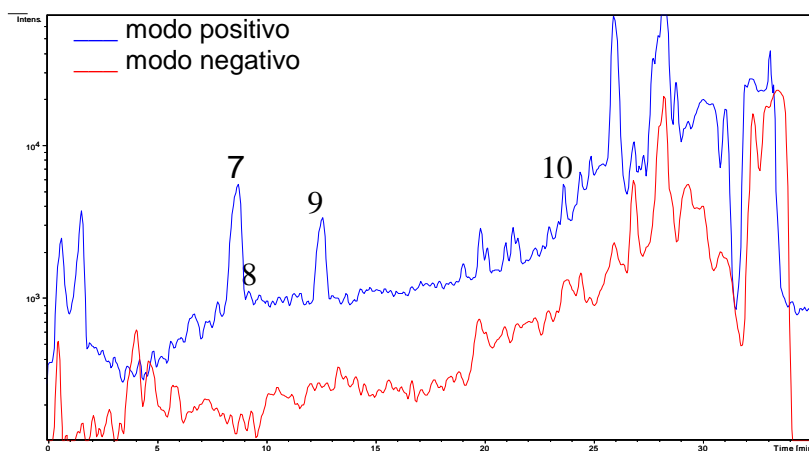


Figura 44: Comparação entre os TIC positivo e negativo do extrato EAMiB.

A presença de uma intensidade maior de íons no modo positivo pode ser justificada pelas condições cromatográficas usadas durante a análise, isto é, a presença de ácido na fase móvel proporciona um favorecimento de espécies catiônicas (LOPES et al., 2006).

- Análise via ^1H RMN

O espectro de ressonância magnética nuclear foi realizado como uma técnica confirmatória dos compostos já detectados com a espectrometria de massas de alta resolução. Nesse experimento podemos visualizar sinais relacionados aos metabolitos (figuras 46-53), inclusive das substâncias presentes nesta amostra (EAMiB) em pequena quantidade como os derivados graxos: octadeca-9,12-dienoato de glicerila; dihexadecanoato de glicerila e 6,11-ácido hexadecanóico. Esses compostos foram detectados por CG-MS no extrato ECMiB (extrato bruto diclorometânico) mas, devido à falta de

seletividade no processo de extração, também podem ser visualizados nesse extrato uma vez que são os componentes majoritários produzidos pelo endofítico *C. gloeosporioides*. Dessa análise podemos concluir que além dos constituintes majoritário já descritos, é possível detectar a presença dos derivados piridônicos fischerina e sambutoxina, assim como duas micosporinas: micosporina-serina, micosporina-glicina, o aminoácido aspergillomarasmina B, a ciperina, a arginomicina e a lactona macrocíclica coletodiol.

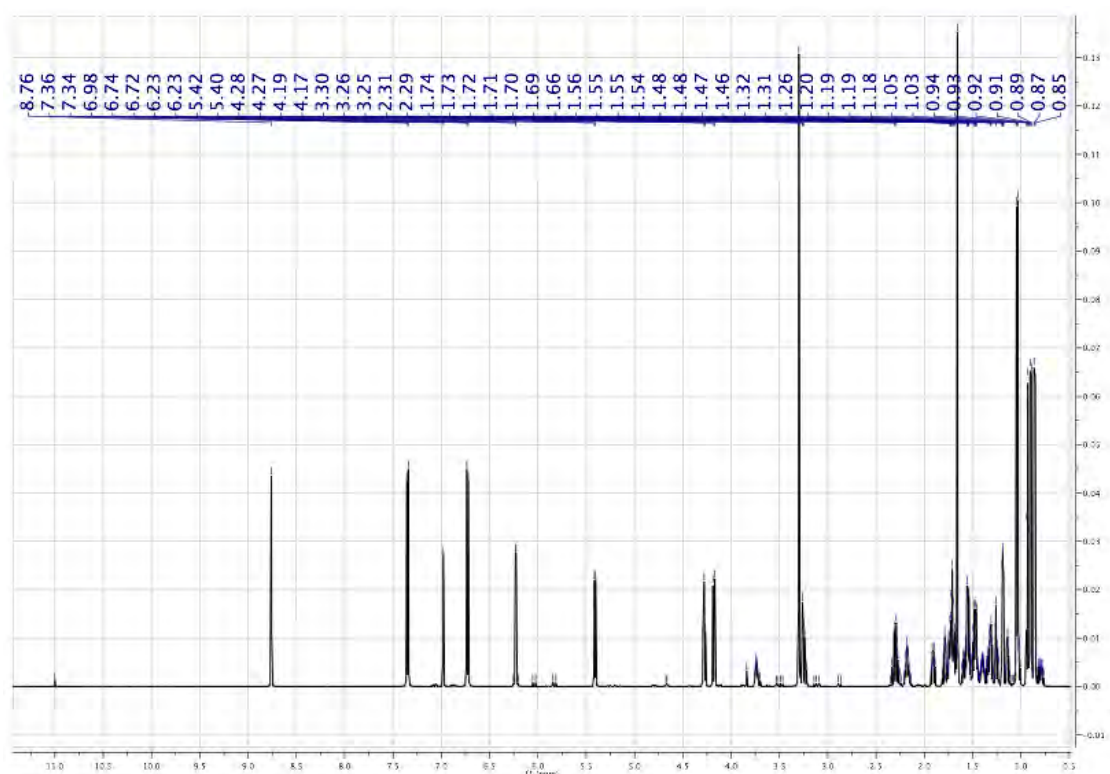


Figura 45: Espectro de ^1H RMN do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Abaixo, nas figuras 46 a 53, segue as expansões referentes ao perfil obtido do extrato EAMiB.

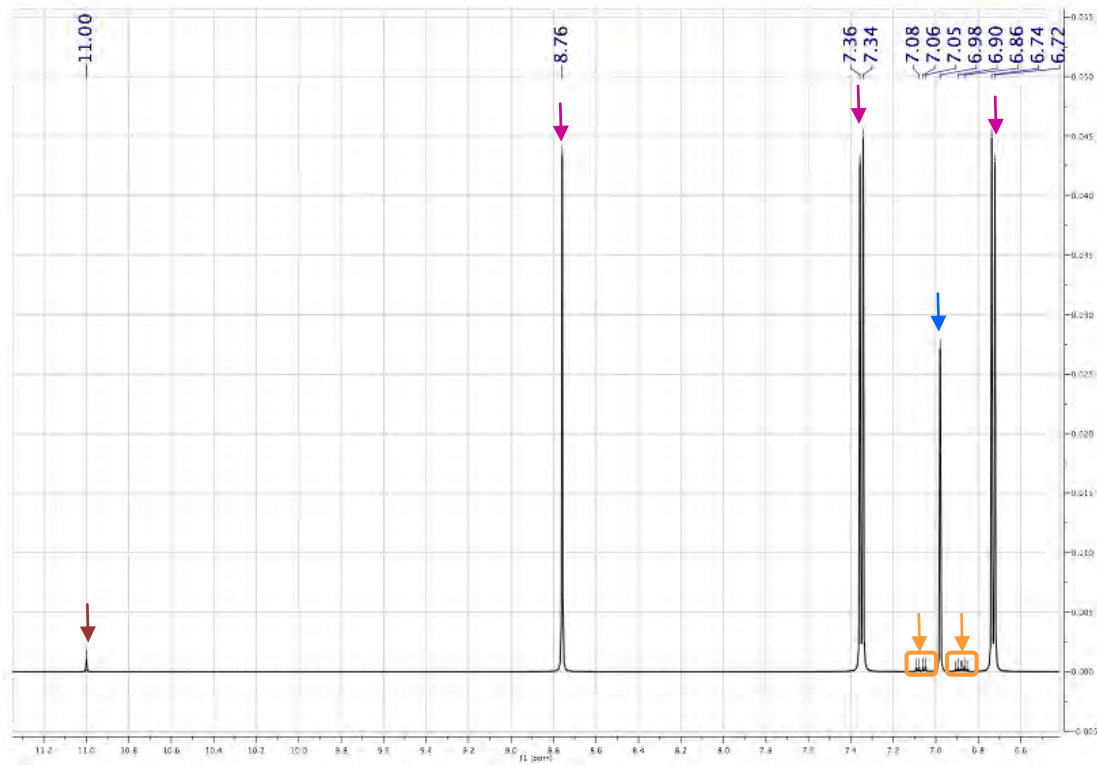


Figura 46: Expansão do espectro de ¹H RMN: região δ H 6.5 a 11.0 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micosporina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micosporina serina	Sambutoxina

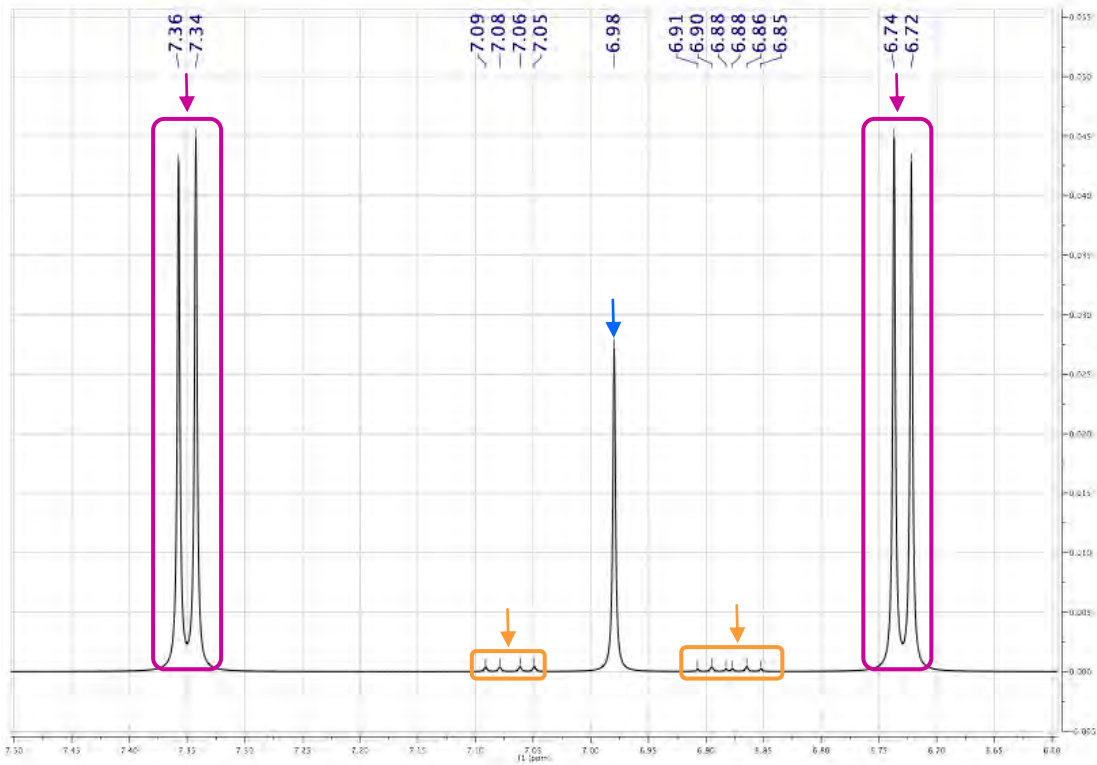


Figura 47: Expansão do espectro de ¹H RMN: região δ H 6.5 a 7.5 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micosporina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micosporina serina	Sambutoxina

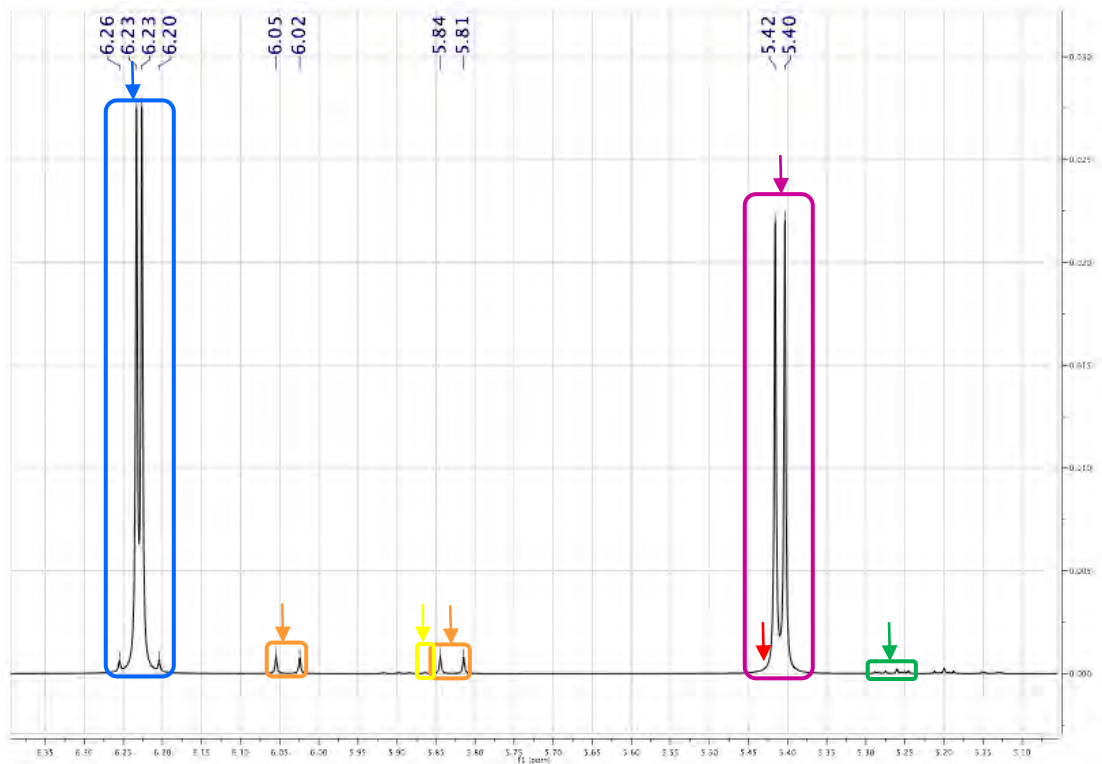


Figura 48: Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 5.3 a 6.3 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micospolina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micospolina serina	Sambutoxina

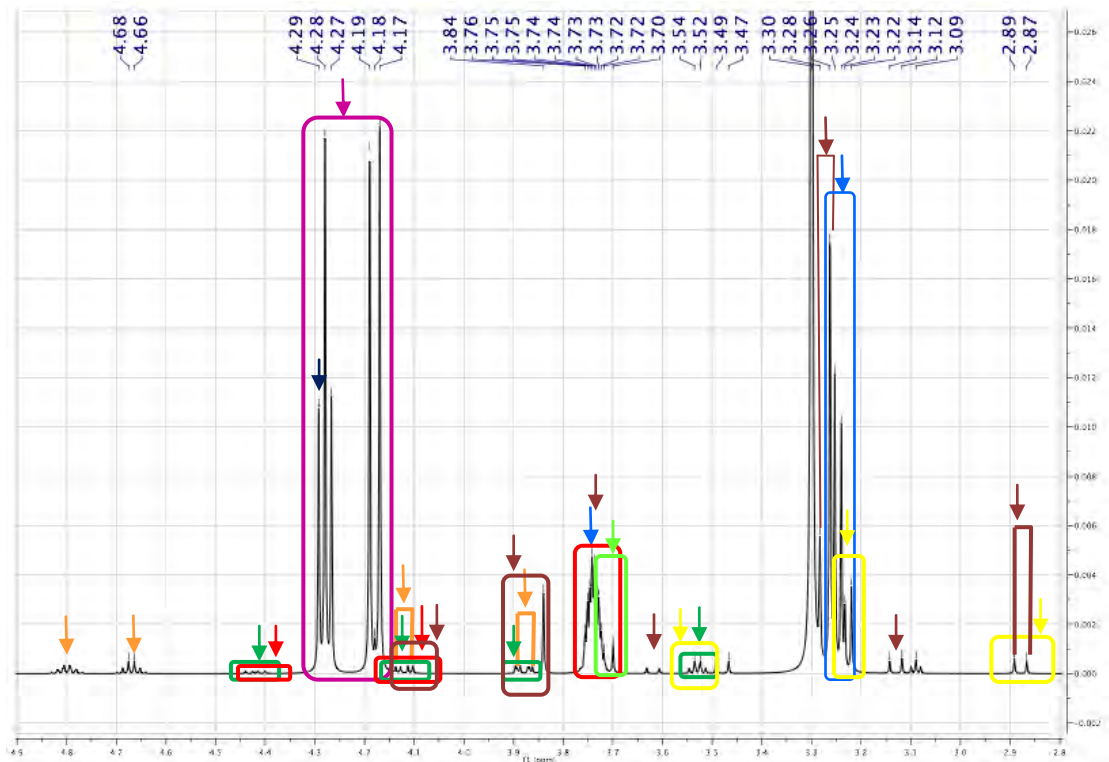


Figura 49: Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 2.8 a 4.9 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micospolina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micospolina serina	Sambutoxina

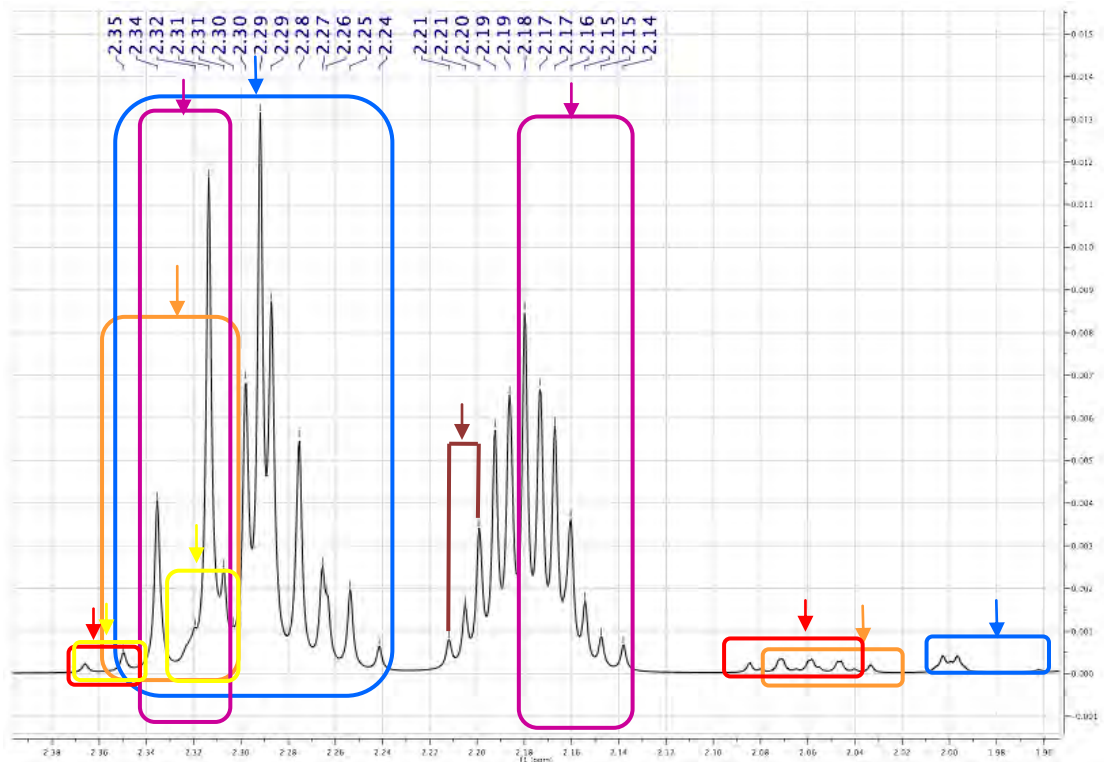


Figura 50: Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 1.96 a 2.39 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micospolina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micospolina serina	Sambutoxina

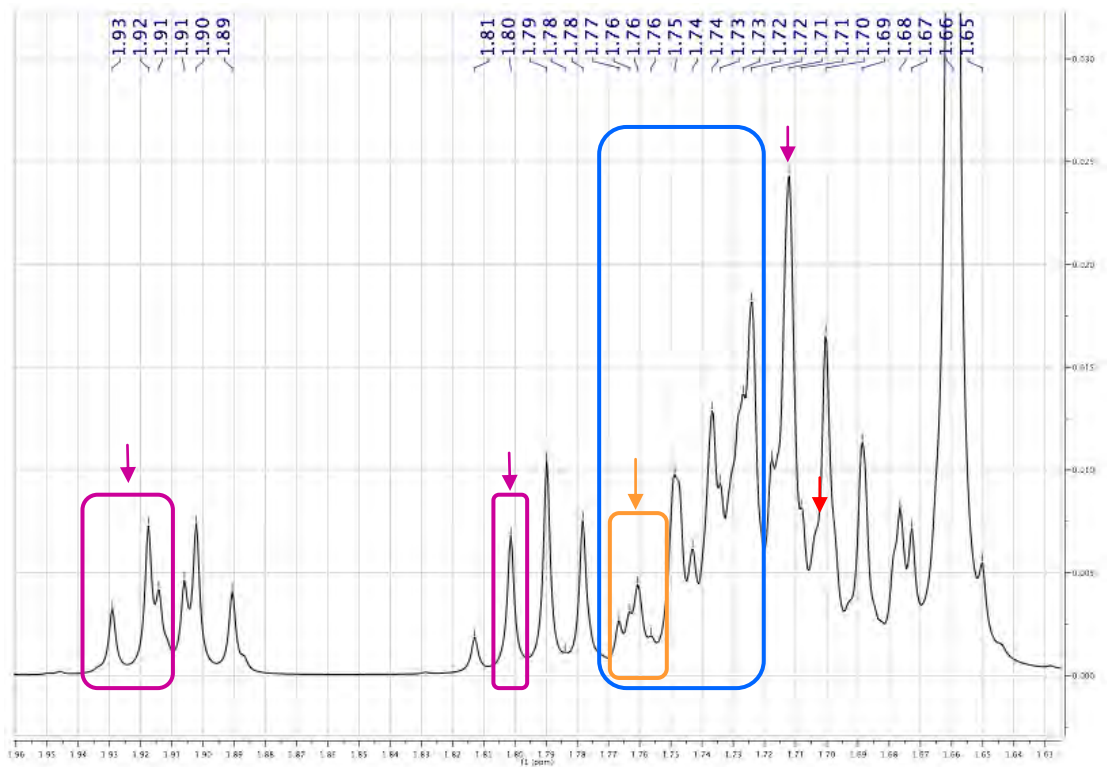


Figura 51: Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 2.8 a 4.9 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micospolina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micospolina serina	Sambutoxina

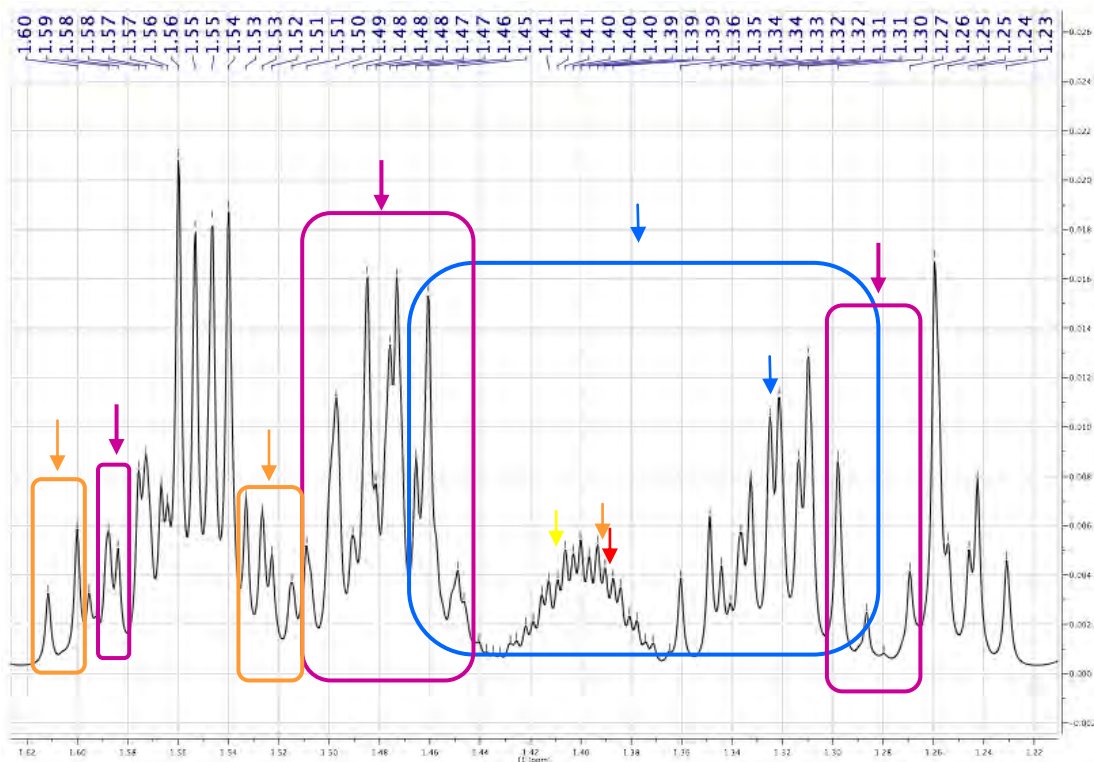


Figura 52: Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 1.22 a 1.62 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micosporina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micosporina serina	Sambutoxina

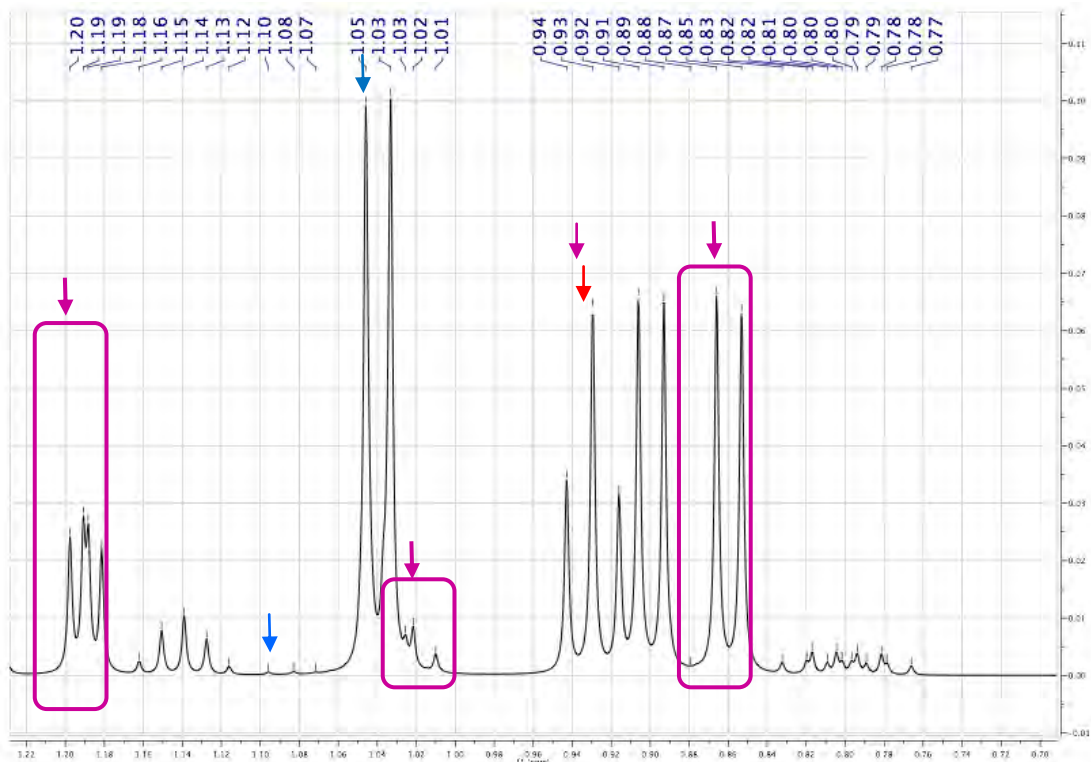


Figura 53: Expansão do espectro de ^1H RMN: região δ H 2.8 a 4.9 ppm do extrato bruto de acetato de etila – EAMiB.

Legenda:

Octadeca-9,12-dienoato de glicerila	Fischerina	micosporina-glicina	Colletodiol
Dihexadecanoato de glicerila	Ac. hexadecadienoico	micosporina serina	Sambutoxina

Substância 7

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 8,1 minutos

O espectro de massas a 8,1 min. (figuras 54 e 55) apresentou, no modo positivo, um pico base com relação m/z : 307,1137 e no modo negativo, um pico base m/z 283,1476. Após análise *in silico*, concluímos que essa massa é compatível com adutos $[M+Na]^+$ e $[M-H]^-$ e a substância detectada foi a bis lactona macrocíclica colletodiol (figura 56), isolada previamente de *Colletotrichum capsick* (MacMILLAN, J. et al., 1973; SOLLADIE, G. et al.,

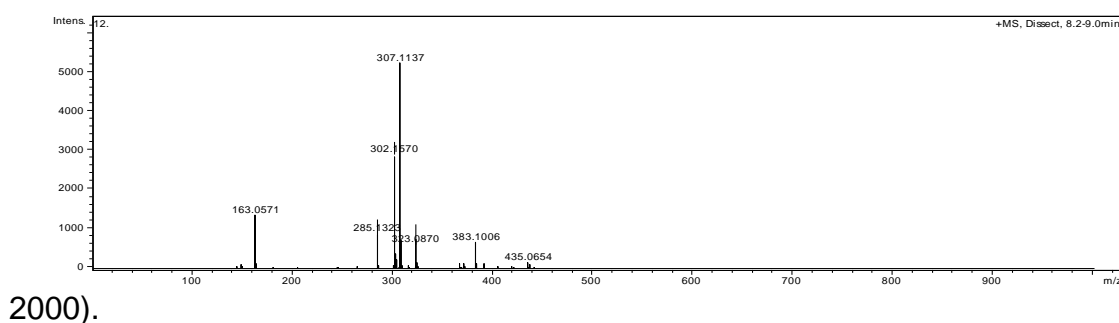


Figura 54: Espectro de massas EAMiB no tempo de retenção 8,1 min. (modo positivo).

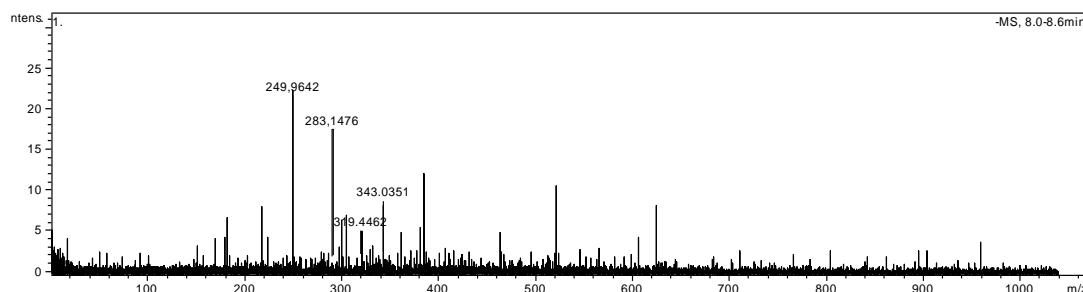
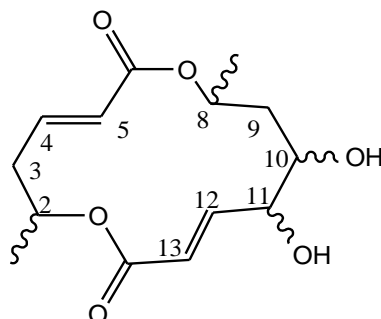


Figura 55: Espectro de massas EAMiB no tempo de retenção 8,1 min. (modo negativo).



7

284,1260 Da

colletodiol

Figura 56: Substância provável para o tempo de retenção 8,1 minutos.

O íon m/z 307,1137, no modo positivo, foi submetido ao experimento MS/MS (figura 57).

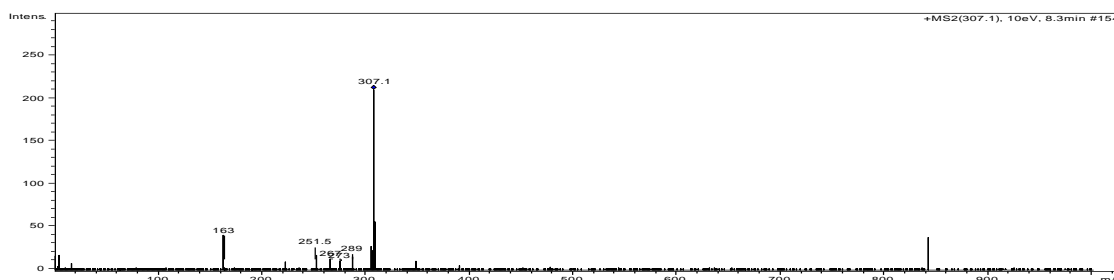


Figura 57: Espectro de massas MS/MS de m/z 307.

Algumas propostas de fragmentação para os íons formados foi realizada e está descrita na figura 58.

Uma desidratação é observada, uma vez que no espectro de massas MS/MS temos os íons m/z 289, resultado da formação do aduto $[M - H_2O + Na]^+$, e m/z 267, aduto formado $[M - H_2O + H]^+$.

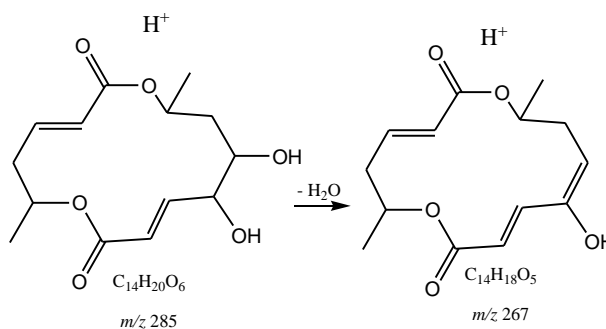


Figura 58: Proposta de fragmentação para formação dos íons: m/z 267 aduto com H^+ .

- 1H RMN

A substância **7**, previamente identificada como colletodiol, teve seus dados de 1H RMN, simulados através do programa MNOVA. Os sinais referentes aos deslocamentos de hidrogênio encontrados foram comparados com a matriz bruta real EAMiB (Tabela 10).

Tabela 10: Dados de 1H RMN da substância **7**- Comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB

	Simulador Mnova	EAMiB- bruto	MacMillan et al., 1973
Posição	δ 1H (ppm) (multiplicidade; J)	δ 1H (ppm)	δ 1H (ppm) (multiplicidade; J)
2	4,8 (<i>m</i> ; 12,54)	4,78	5,32 (<i>ddq</i> ; 3,1; 11,1; 6,4)
3a	2,31 (<i>m</i> ; 12,61)	2,3	2,52 (<i>dddd</i> ; 1,3; 3,1; 4,6; 12,6)
3b	2,06(<i>m</i> ; 12,6)	2,06	2,24 (12,6; 11,1)
4	7,02 (<i>dd</i> ; 6,21)	6,85	6,72 (<i>ddd</i> ; 4,9; 11,1; 15,6)
5	5,83(<i>d</i> ,14,96)	5,81	5,73 (<i>brd</i> ; 15,6)

8	4,67 (m; 10,86)	4,65	5,18 (ddq; 2,0; 4,5; 6,7)
8	1,6 (d; 5,6)	1,59	1,37 (d; 6,3)
9	1,51 (dd; 4,67)	1,51	1,50(ddd; 2,0; 5,0; 15,8)
	1,76(t; 12,5)	1,76	2,02(ddd;1,6; 4,5; 15,8)
10	3,53 (m; 8,89)	3,51	3,67(ddd; 1,6; 5,9; 9,0)
11	4,18 (q; 6,20)	4,13	4,08 (ddd; 1,2; 5,6; 9,0)
12	7,07 (q; 6,21)	7,05	6,74(dd; 5,6; 15,7)
13	6,04 (d; 15,17)	6,02	6,14 (dd; 1,2; 15,7)
			1,36 (d; 6,7)
OH			2,6 (br s)

Nas expansões do espectro de ^1H RMN (figuras 46 a 53), observamos duplos dubletos na região de δ 6,02 e 7,05 e duplo duplo dubleto em 6,85 e um dubleto em 5,81 ppm referentes aos H nas posições 13, 12, 4 e 5, respectivamente.

A comparação dos resultados obtidos com os experimentos de ^1H RMN e massas, com dados relatados na literatura para essa substância, nos permite, através da detecção *in silico*, verificar a existência do colletodiol no extrato bruto de acetato de etila de milho (EAMiB).

Substância 8

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 9,8 minutos

O tempo de retenção 9,8 min.(figuras 59 e 60) mostrou, no modo positivo, um m/z 432,2814, aduto $[\text{M}+\text{H}]$ e no modo negativo um m/z 430,3605 e a substância detectada foi identificada como sendo o derivado piridônico fischerina (figura 61), anteriormente relatada para o endofítico *Neosartorya fischeri* var. *fischeri* (FUJIMOTO et al, 1993).

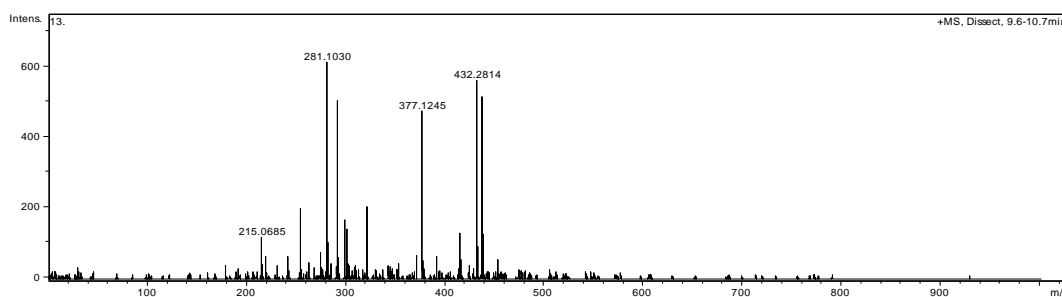


Figura 59: Espectro de massas de EAMiB, modo positivo, no tempo de retenção 9,8 minutos.

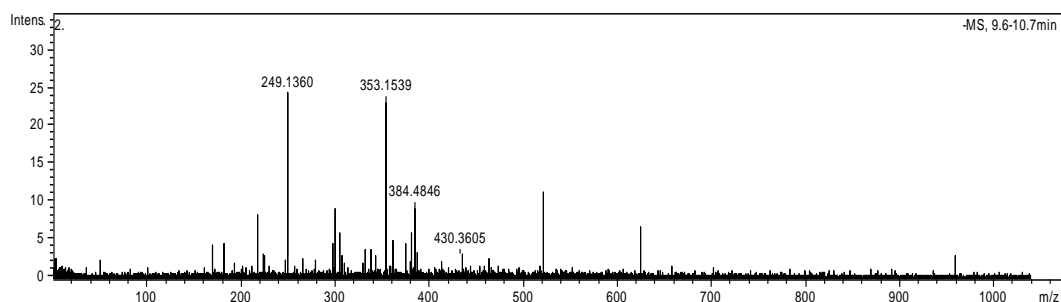
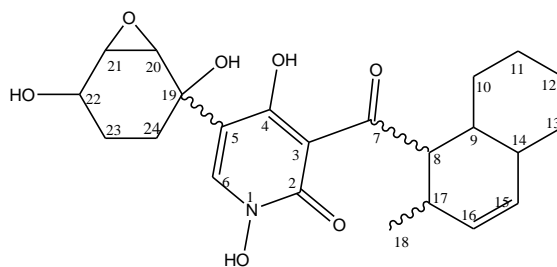


Figura 60: Espectro de massas de EAMiB, modo negativo, no tempo de retenção 9,8 minutos.



8

431,1944 Da

Fischerina

Figura 61: Substância provável para o tempo de retenção 9,8 minutos.

Com o intuito da confirmação desta molécula, selecionamos o íon $[M+H]$ m/z 432,2814, no modo positivo, para a realização do experimento MS/MS (Figura 62).

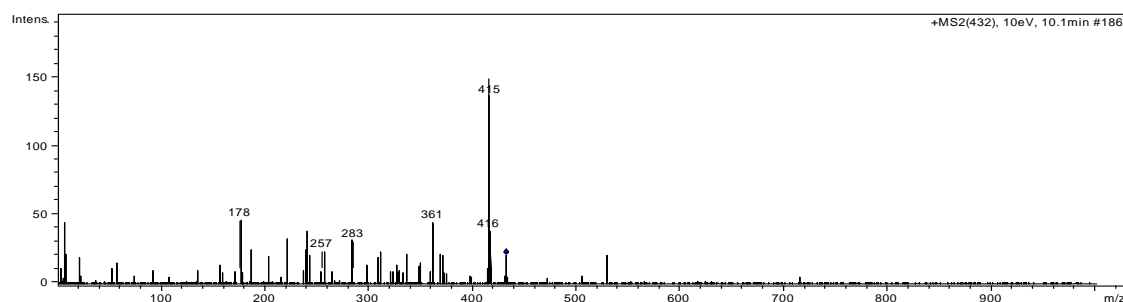


Figura 62: Espectro de massas MS/MS do íon m/z 432,2814.

A partir da fragmentação, obtivemos o íon m/z 415 produto da abertura do epóxido seguido de uma desidratação. Os íons em m/z 257 e 416, são gerados a partir do intermediário m/z 434, resultado da abertura do anel epóxido, e são provenientes de quebra da cadeia seguido de uma desidratação, respectivamente. Já os íons m/z 178, 283 são gerados a partir da quebra da cadeia do íon molecular m/z 432,2814 (figura 63).

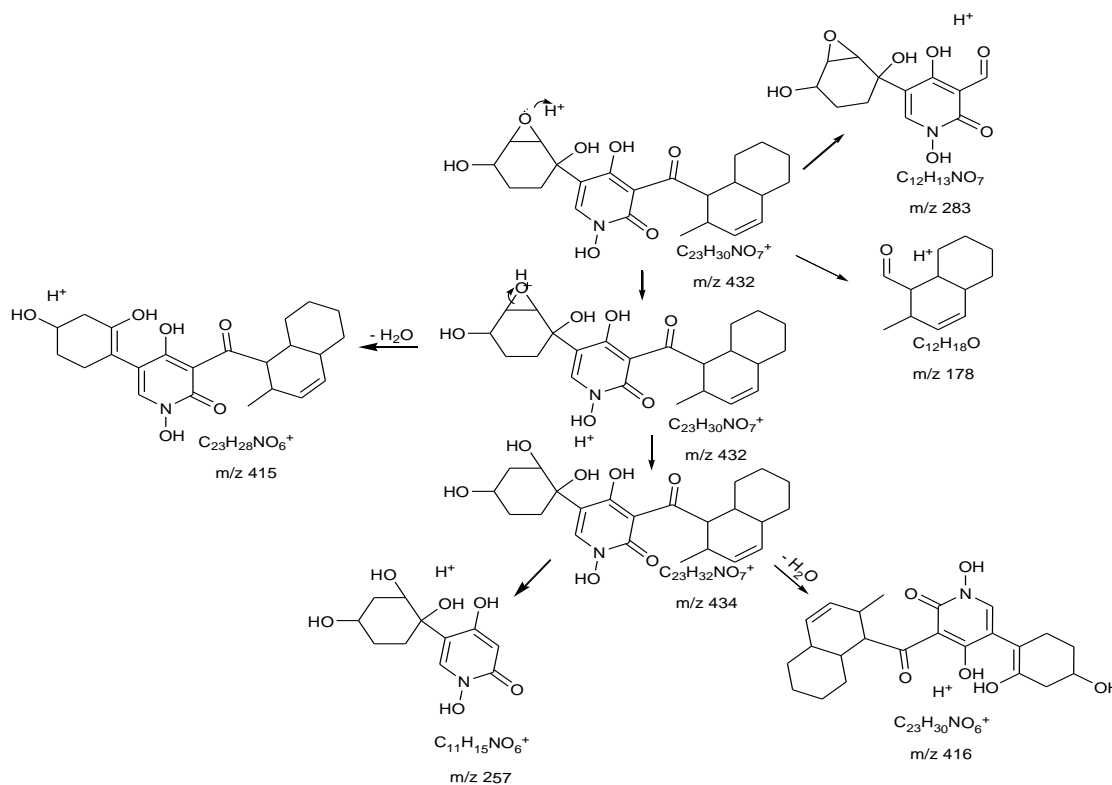


Figura 63: Proposta de fragmentação para formação do íon m/z 415; 416; 257; 283 e 178.

- ^1H RMN

O composto **8** detectado como sendo a Fischerina, foi também identificado na matriz bruta, EAMiB, através do experimento de ^1H RMN, fazendo-se a comparação dos δ ^1H (ppm) fornecidos pelo simulador MestreNova com os da mistura bruta (Tabela 11).

Tabela 11: Dados de ^1H RMN da substância **8** - Comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB.

	Simulador Mnova	Lee et al., 1996	EAMiB- bruto
Posição	δ ^1H (mult.; J, Hz)	δ ^1H (mult.; J, Hz)	δ ^1H (ppm)
6	6,98 (s)	8,00 (s)	no
7			no
8	2,31 (m)	4,43 (dd; 11,5; 6,0)	no
9	1,40 (m)	1,55 (qd; 11,5; 2,0)	no
10a	1,42	1,91 (dq; 12,0; 2,0)	no
10b	1,97	0,88	
11a	1,76 (m)	1,73	
11b	1,45	1,02 (qd, 12,0; 3,0)	no
12a	1,85 (m)	1,48	no
12b	1,34 (m)		

13a	1,32 (m)	1,73	
13b	2,01	0,78	no
14	2,23	1,82	no
15	6,24 (s)	5,38 (BR d. 9,5)	no
16	6,24 (s)	5,58 (ddd; 9,5; 4,0; 2,0)	no
17	2,28 (m)	2,83	no
18		0,80 (d; 7,5)	no
20	3,27 (t)	3,63 (d; 3,5)	no
21	3,24b(d)	3,40 (dd; 3,5; 3,0)	
22	3,74 (m)	4,10 (td; 7,5; 3,0)	
23a	1,72 (m)	1,82	
23b	1,47 (m)	1,34	
24a	1,72 (m)	2,22 (ddd; 14,0; 9,0; 2,5)	
24b	1,47 (m)	1,67	

*NO: Não observado devido à baixa quantidade dessa molécula no extrato. Porém é possível observar a presença dela nas figuras (46 a 53) especificamente as absorções relativas aos hidrogênios olefínicos e aromático.

Substância 9

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 11,0 minutos

No tempo de retenção 11,0 min., modo positivo, foi verificado que um aduto com Na⁺ foi formado originando o íon *m/z* 476, 3093 (figura 64). No modo negativo, não foi possível identificar íons condizentes com o íon molecular detectado no modo positivo.

Ao consultar a base de dados DPN foi encontrado a micotoxina hemorrágica sambutoxina outro derivado piridônico isolado inicialmente de *Fusarium sambucinum* (KIM AND LEE, 1994; WILLIAMS AND TURSKE, 2000) (figura 66).

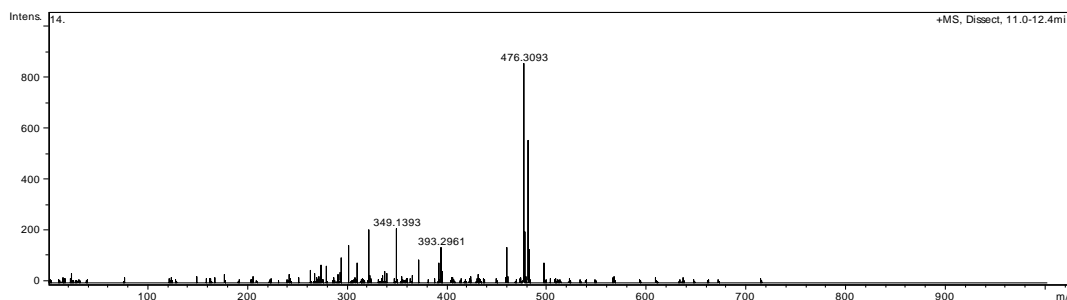


Figura 64: Espectro de massas de EAMiB, modo positivo, no tempo de retenção 11.0 minutos.

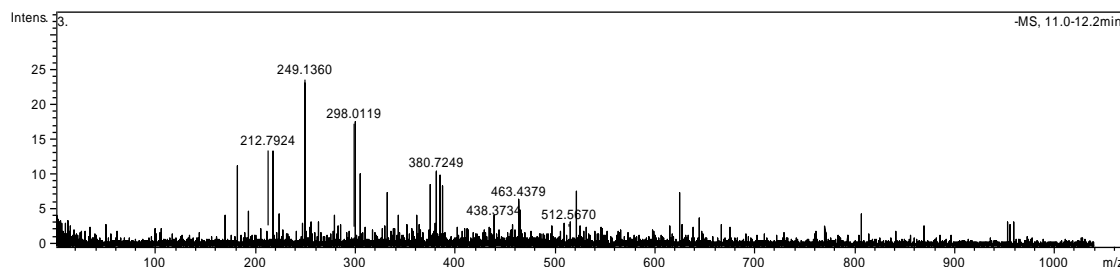
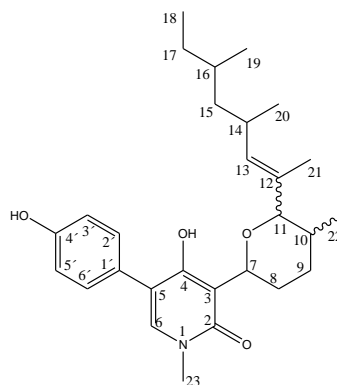


Figura 65: Espectro de massas de EAMiB, modo negativo, no tempo de retenção 11.0 minutos.



9

453,2879 Da

sambutoxina

Figura 66: Substância provável para o tempo de retenção 11,0 minutos.

O experimento MS/MS selecionando o íon m/z 476.3093, gerou, principalmente, os fragmentos: m/z 237 (aduto com H^+) e 314 (aduto com H^+). (figura 67)

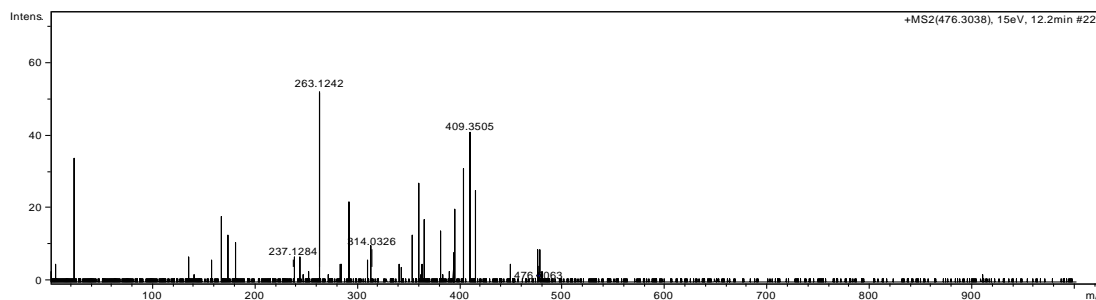


Figura 67: Espectro de massas MS/MS de **9**.

A proposta de fragmentação para os íon m/z 314; 237 e 360 estão relacionados nas figuras 68 e 69, respectivamente.

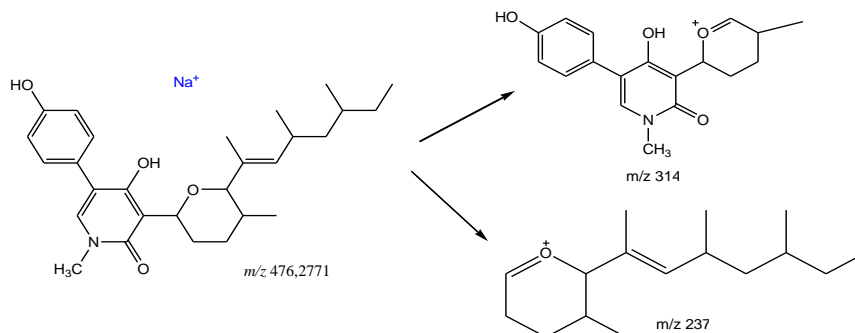


Figura 68: Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 314 e m/z 237.

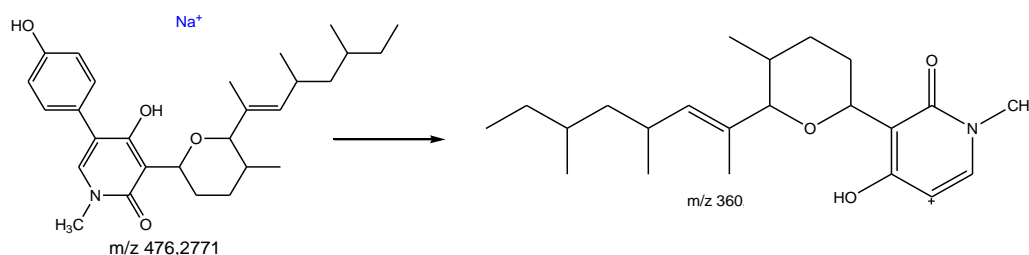


Figura 69: Proposta de fragmentação para a formação do íon m/z 360.

- $^1\text{H RMN}$

A substância Sambutoxina detectada por LC-MS foi submetida ao experimento de $^1\text{H RMN}$, sendo os dados obtidos, através do simulador e do extrato bruto real EAMiB (Tabela 12), interpolados e cruzados com a espectrometria de massas, confirmando a presença deste composto na matriz.

Tabela 12: Dados de $^1\text{H RMN}$ da substância **9** - Comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB

	Simulador Mnova	EAMiB - bruto	KIM et al., 1995)	Erro relativo(ppm)
Posição	δ ^1H (ppm)(mult.; J)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)(mult.; J)	
4-OH			10,3 (s)	
6			5,03(dd; 11,3; 2)	
7	4,28 (t; 6,84)	4,28	5,03 (dd; 12,7;3,1)	0,15
8a	1,48 (dd; 2,1)	1,48	1,60(qd; 12,7; 3,1)	0,08
8b			2,07 (dq; 13,4; 2,3)	
9a	1,58 (dd; 12,04)	1,55	1,41(qd; 12,7; 3,4)	-0,12
9b	1,33 (dd; 3,39)	1,3	1,90 (dq; 13,4; 3,1)	0,30
10	1,73 (m)	1,73	1,67(m)	-0,04
11	4,18 (d; 10,26)	4,17	3,51 (d; 13,4)	-0,19
13	5,41 (d; 6,19)	5,4	5,17 (d; 9,3)	-0,05

14	2,18 (m)	2,18	2,44 (m)	0,11
15a			1,02 (m)	
15b	1,19 (d; 7,39)	1,19	1,18 (m)	-0,01
16	1,4 (q, 14,07)	1,41	1,29 (m)	-0,09
17a			1,02 (m)	
17b			1,29 (m)	
18	0,93 (t; 6,7)	0,92	0,81 (d; 7,0)	-0,15
19	0,86 (d; 5,36)	0,85	0,81 (d; 6,6)	-0,06
20	1,04 (d; 6,41)	1,04	0,88 (d; 6,6)	-0,28
21	1,66 (s)	1,66	1,62 (s)	-0,02
22	0,9 (d; 6,53)	0,89	0,71 (d; 6,6)	-0,27
23	3,3 (s)	3,3	3,53 (s)	0,07
1'				
2'	7,35 (d; 7,48)	7,34	7,25 (d; 8,6)	-0,01
3'	6,65 (d; 7,48)	6,72	6,90 (d; 8,6)	0,04
4a'				
4b'				
5'	6,65 (d; 7,48)	6,72	6,90 (d; 8,6)	0,04
6'	7,35 (d; 7,48)	7,34	7,25 (d; 8,6)	-0,01

Os sinais δ ^1H (ppm) para a sambutoxina estão muito evidentes na matriz EAMiB, como podemos observar nas figuras de 46 a 53, pg. 82-85.

Substância 10

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 23,7 minutos

No tempo de retenção 23,7 min. foi encontrada a massa 353,2285 (figura 70), resultado da formação de aduto com Na^+ ; m/z 331,1949 um aduto formado com H^+ , sendo a substância detectada um fotoprotetor natural pertencente a classe das micosporinas, a micosporina-glicina, já relatada para a espécie *Euhalothece sp.*, uma cianobactéria associada a líquens (VOLKMANN et al., 2006) (figura 72).

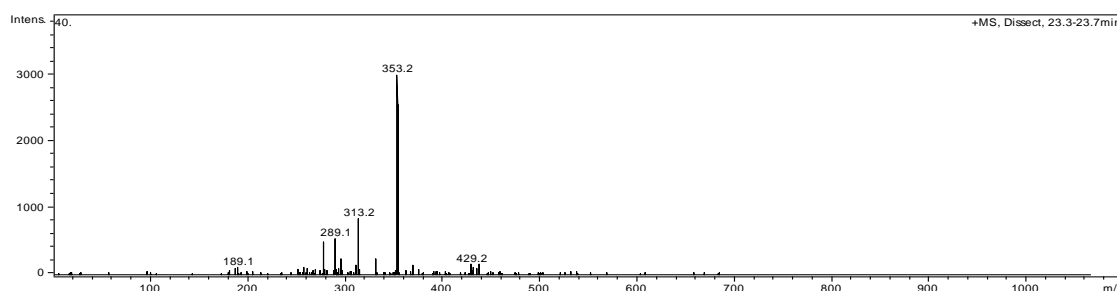


Figura 70: Espectro de massas no modo positivo, no tempo de retenção 23,7 minutos.

No espectro de massas, no modo negativo, encontramos o íon 329,2335, resultado do aduto $[M-H]^-$ (figura 71).

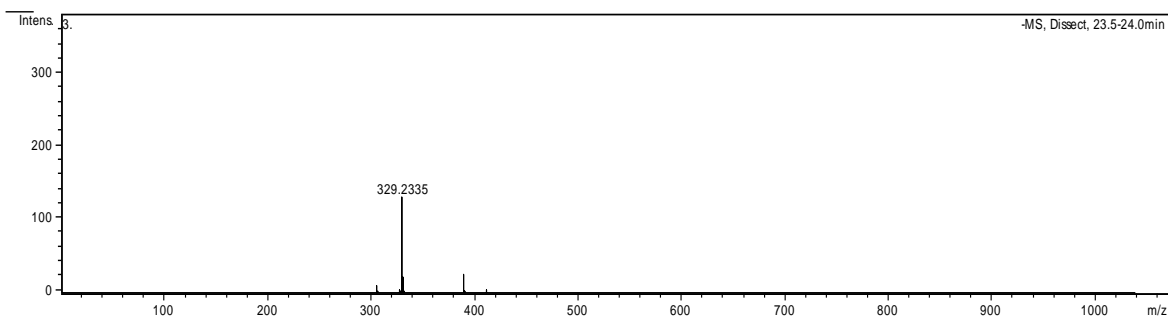
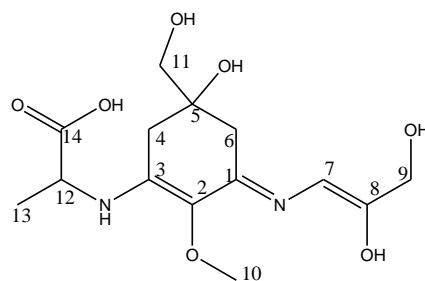


Figura 71: Espectro de massas no modo negativo, no tempo de retenção 23,7 minutos.



10

330,1427 Da

micosporina-2-glicina

Figura 72: Substância provável para o tempo de retenção 23,5 minutos

O íon m/z 353,2285 foi selecionado para fragmentação MS/MS, no modo positivo.(figura 73)

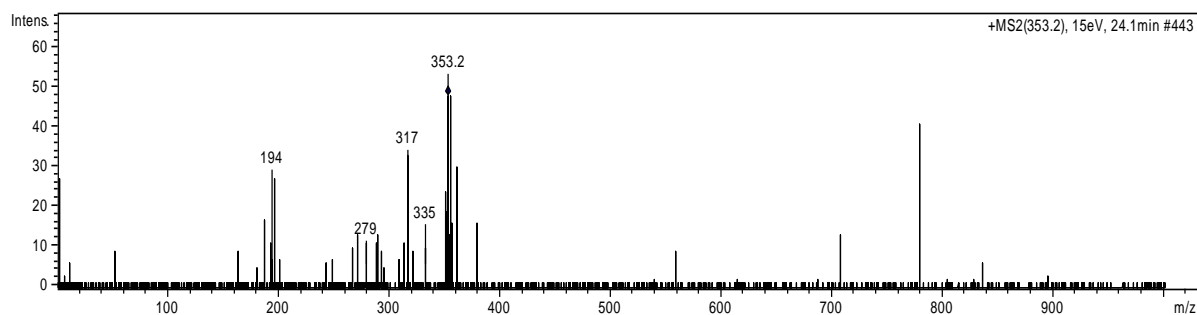


Figura 73: Espectro de massas MS/MS de m/z 353,2285, modo positivo

Uma retro-Diels-Alder justifica a formação de m/z 279 e uma desidratação forma o íon em m/z 335 (figura 74).

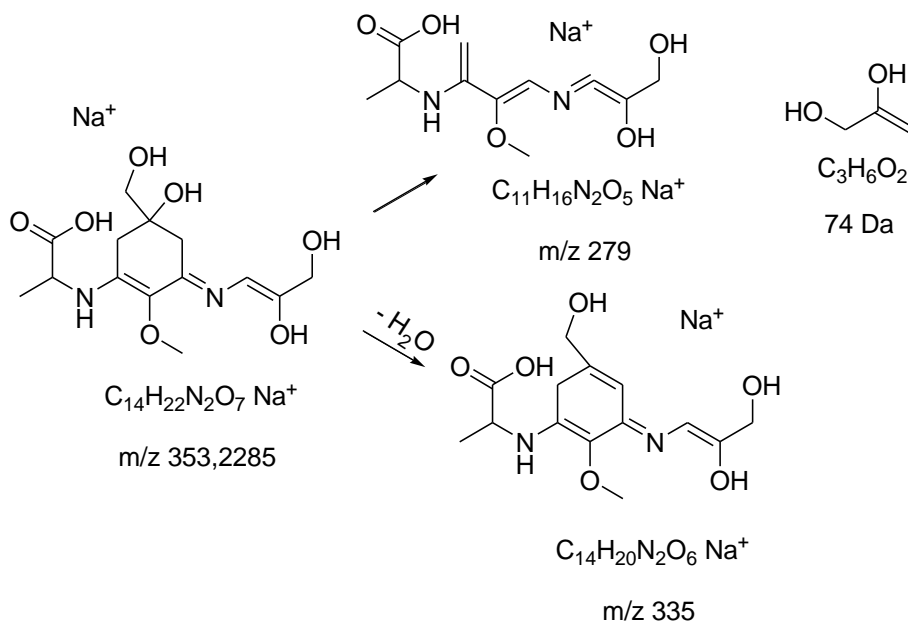


Figura 74: Proposta de fragmentação para a formação de m/z 279 (aduto com Na^+) e m/z 335 (aduto com sódio)

- ^1H RMN

Micosporina-glicina detectada por LC-MS pode ser também visualizada no espectro de ^1H RMN, figura 46-53; sendo os dados obtidos com o simulador e do extrato bruto real EAMiB (Tabela 13), interpolados e comparados com os dados de espectrometria de massas, confirmando a presença deste composto na matriz.

Tabela 13: Dados de ^1H RMN da substância **10** - Comparação entre o simulador e o extrato real EAMiB

	Simulador Mnova	EAMiB - bruto	Kedar et al. , 2002	Erro relativo
Posição	δ ^1H (ppm); mult.; J Hz	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm); mult.; J Hz	δ ^1H (ppm)
4a	2,31 (d; 12,4)	2,31	2,77 (d)	0,17
4b	2,41 (d; 12,4)	2,35		
6a	2,9 (d; 6,2)	2,87	2,86 (d)	-0,01
6b	2,52 (d; 12,39)			
7	5,74 (s)	5,85		
9	4,11 (s)	4,1	3,60 (s)	-0,14
10	3,74 (s)	3,7	3,68 (s)	-0,02
11a	3,25 (d; 12,4)	3,23		
11b	3,75 (d; 12,35)	3,72		
12	3,55 (dd; 6,2)	3,52	4,06 (s)	0,13

13	1,41 (d; 12,4)	1,41
OH	12,01 (s)	

Observamos através dos dados de RMN, os sinais característicos do grupos: OCH_3 em 3,74 (H10); $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ em 3,55 (H12) e $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ em 4,11 ppm (H9).

Os resultados no modo positivo, assim como o experimento de ^1H RMN e a compilação dos dados com a literatura, permitiram a detecção de 4 substâncias no extrato EAMiB.

No espectro de ^1H RMN (figuras 46 a 53), é possível visualizar sinais pouco intensos de algumas substâncias produzidas pelo endofítico, mas que foram detectadas, como metabolitos majoritários no extrato de acetato de etila do meio de cultura extrato de malte, EAMB, como veremos a seguir.

4.3.2. Detecção *in silico* de micromoléculas presentes em EAMB

O extrato EAMB apresenta boa quantidade de íons no TIC, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo. (figura 75).

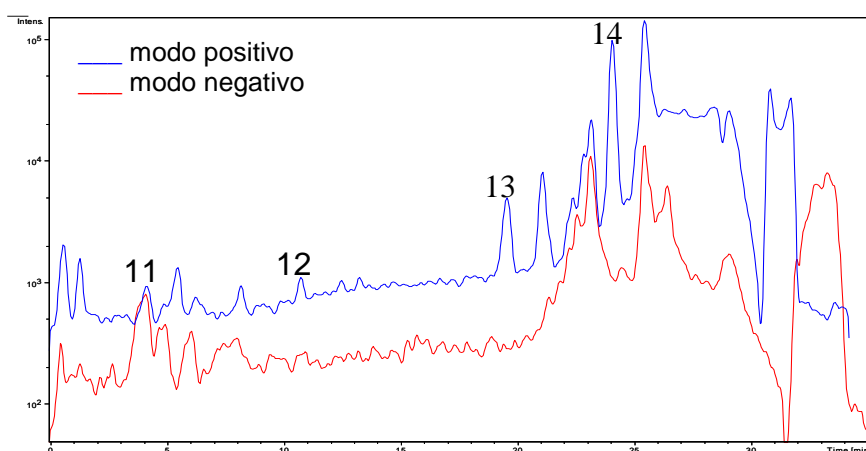


Figura 75: Comparação entre o espectro de massas de EAMB no modo positivo (azul) e no modo negativo (vermelho).

A análise *in silico* dos íons majoritários foi inicialmente realizada fazendo uma comparação dos dados de massa de alta resolução com aqueles compilados da base de dados DNP para o gênero *Colletotrichum*, e depois com endofíticos (fungi e fungus). A análise de cada molécula detectada está relatada a seguir.

Substância 11

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 3,8 minutos

No tempo de retenção 3,8 min. (figura 76), no modo positivo, encontramos m/z 261,1244 que é um aduto com H^+ e 283,1050 aduto com Na^+ . Já no modo negativo (figura 77) encontramos m/z 259,1619 resultado do aduto $[M-H]^-$. A ciperina (**11**) (figura 78), que possui atividade herbicida, foi identificada através da base de dados DNP, sendo anteriormente relatada para o patógeno *Cyperus rotundus* (DAYAN, 2008).

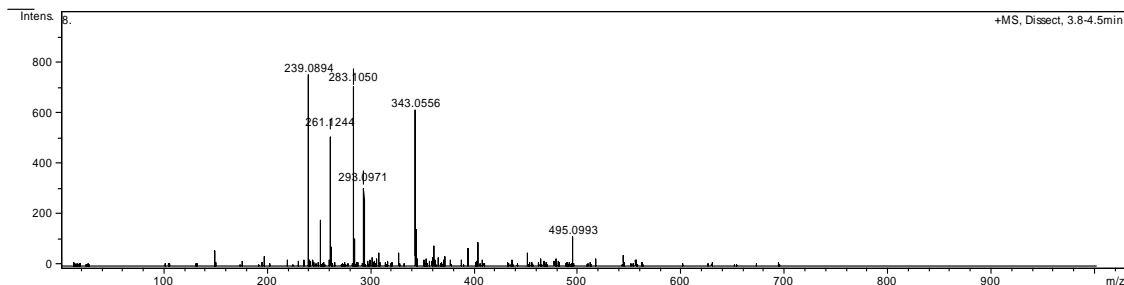


Figura 76: Espectro de massas de EAMB, modo positivo, no tempo de retenção 3,8 minutos.

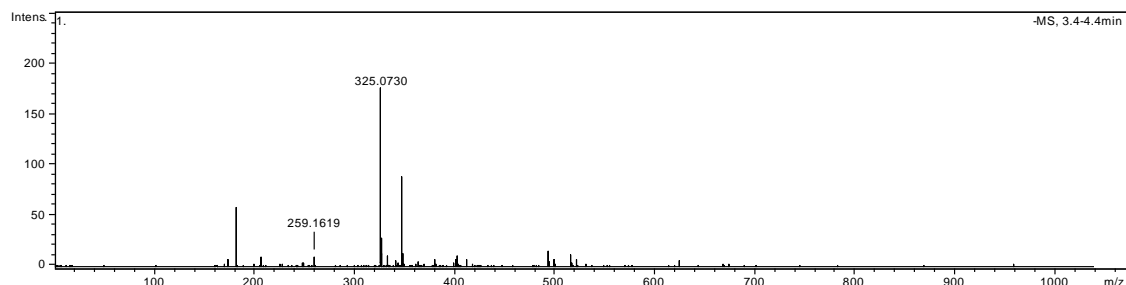
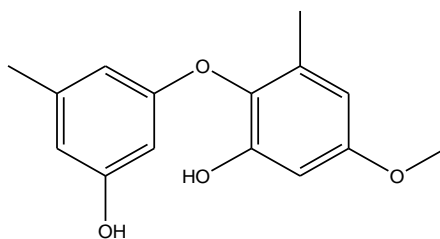


Figura 77: Espectro de massas de EAMB, modo negativo, no tempo de retenção 3,8 minutos.

**11**

260,1049 Da

ciperina

Figura 78: Substância 11 detectada no tempo de retenção 3,8 minutos.

O íon m/z 261,1298 foi selecionado para o experimento MS/MS (figura 79) e os fragmentos encontrados estão relacionados na figura 80.

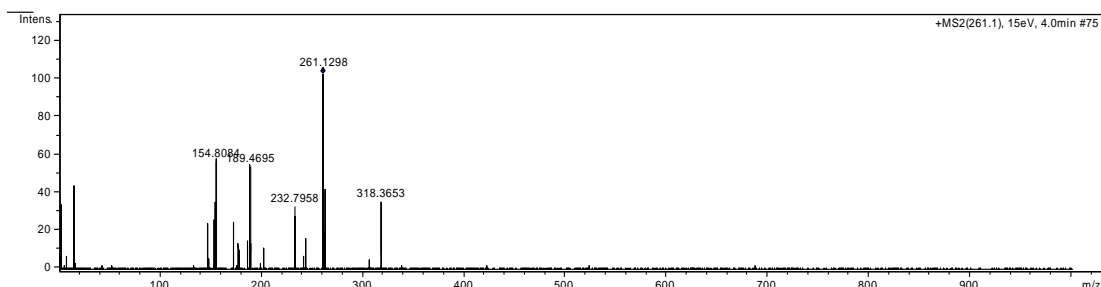


Figura 79: Espectro de massas MS/MS de m/z 261,1298.

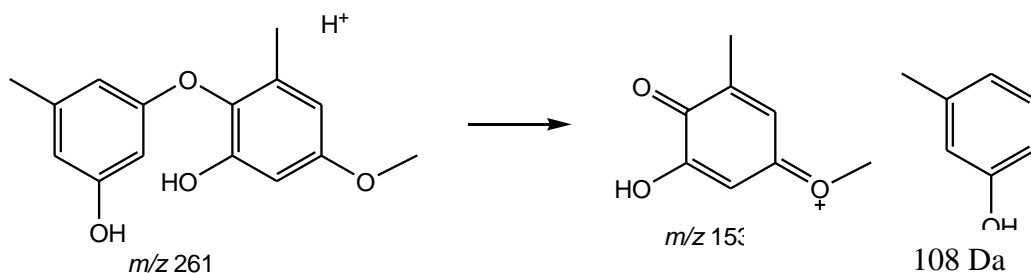


Figura 80: Proposta de fragmentação para formação de m/z 153,0546.

Substância 12

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 10,5 minutos

Em 10,5 min. foi encontrado a massa 437,2348, aduto com H^+ no modo positivo (figura 81). A substância de massa molecular $C_{18}H_{28}N_8O_5$ (figura 83) foi detectada através do DPN como sendo a arginomicina, um antibiotico que inibe o crescimento de bacterias gram-positivas e fungos, relatada para *Streptomyces arginensis* (ARGOUEDELIS, 1987).

No modo negativo (figura 82), não foi possível detectar íon com massa compatível com a identificada no modo positivo.

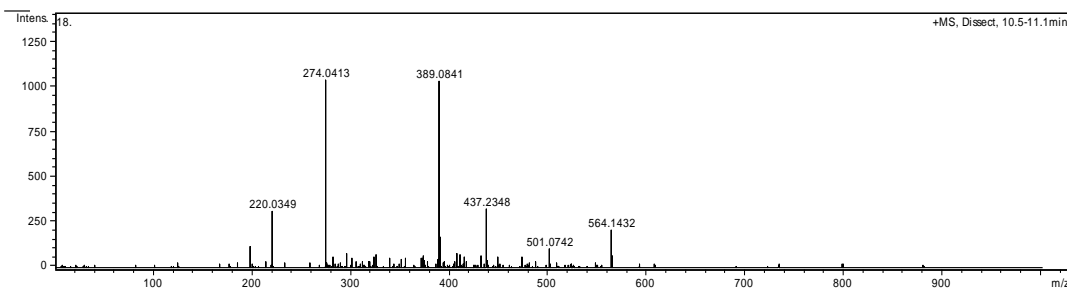


Figura 81: Espectro de massas de EAMB, modo positivo, no tempo de retenção 10,5 minutos.

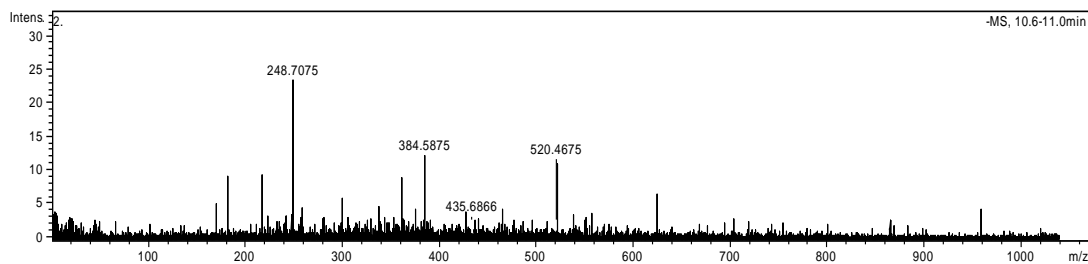
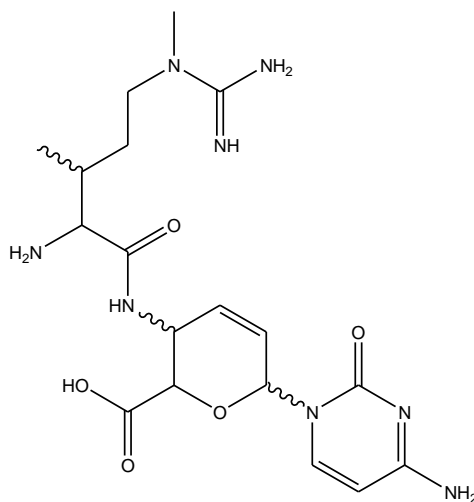


Figura 82: Espectro de massas de EAMB, modo negativo, no tempo de retenção 10,5 minutos.



12

436,2183 Da

arginomicina

Figura 83: Substância 12 detectada no tempo de retenção 10,5 minutos.

O íon selecionado para a fragmentação MS/MS foi o m/z 437,2348. (figura 84).

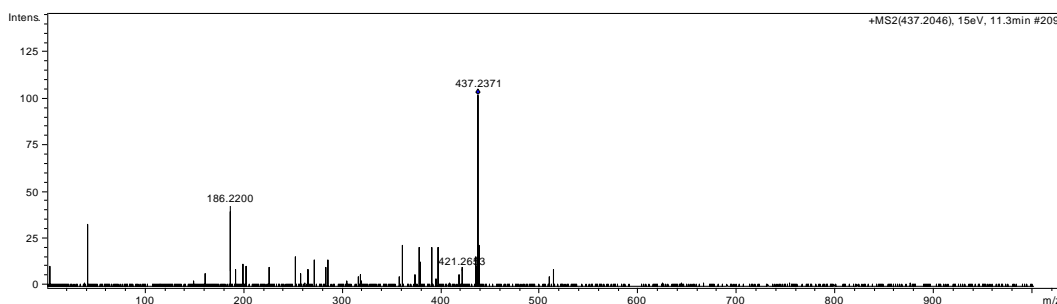


Figura 84: Espectro de massas MS/MS de 437,2348.

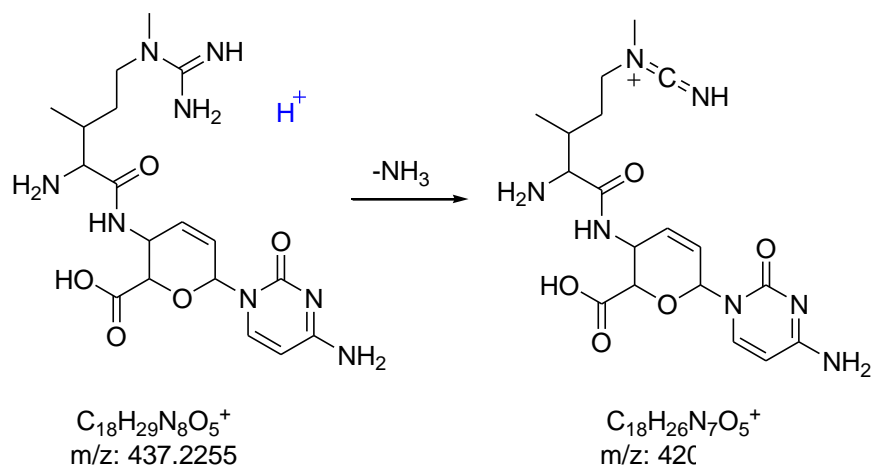


Figura 85: Proposta de fragmentação para formação de m/z 420.

Substância 13

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 19,4 minutos

O tempo de retenção 19,4 min. (figura 86), no modo positivo, apresentou o pico base m/z 276,1229 indicando formação de aduto cationizado com próton $[M+H]^+$. No modo negativo (figura 87), observamos um pequeno pico referente ao íon m/z 337, 6909, aduto com CH_3COO^- . Os dados foram compilados com a base de dados DPN e a substância com massa compatível a encontrada no espectro de massas, foi a micosporina-serina, metabolito fotoprotetor já relatada para o fungo *Stereum hirsutu* (SINGH et al., 2008) (figura 88).

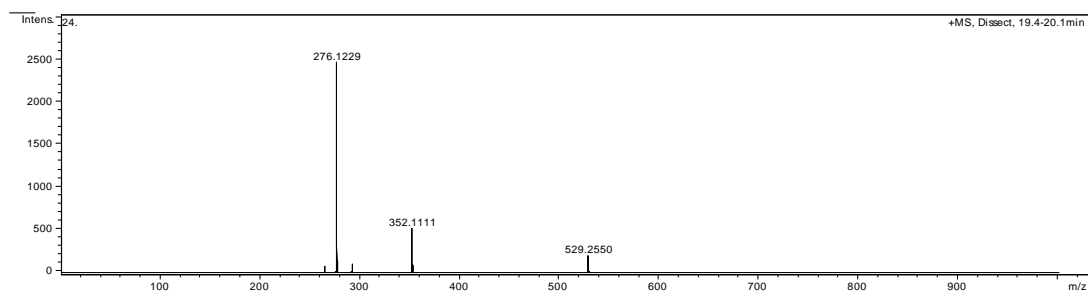


Figura 86: Espectro de massas de EAMB no tempo de retenção 19,4 minutos.

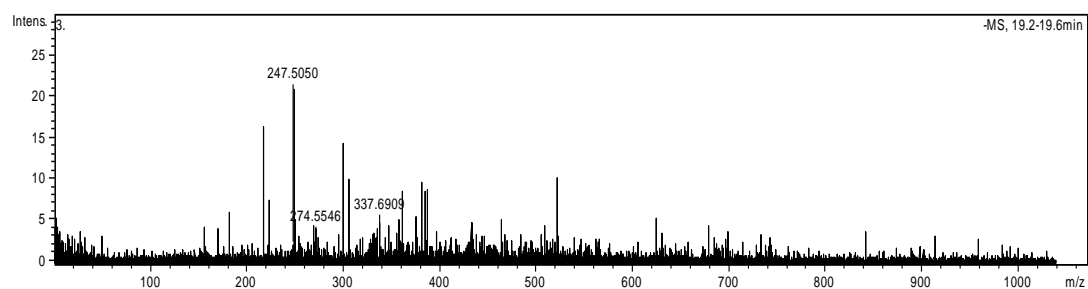


Figura 87: Espectro de massas de EAMB no tempo de retenção 19,4 minutos.

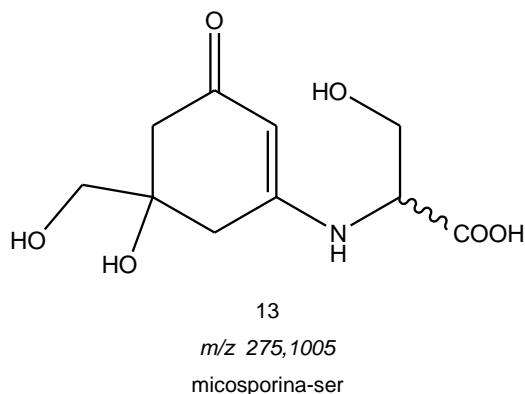


Figura 88: Substância detectada no tempo de retenção 19,4 minutos.

O íon selecionado para MS/MS foi o m/z 276,1229 (figura 89) e os fragmentos propostos estão relacionados na figura 90.

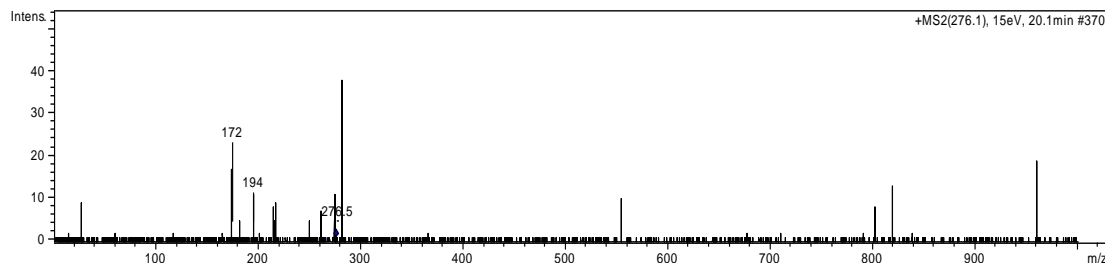


Figura 89: Espectro de massas MS/MS de m/z 276,1229 (aduto com H^+).

O fragmento em m/z 258 indica a formação de aduto catiônico de desidratação e uma retro-Diels-Alder foi proposta justificando o íon m/z 172 aduto com próton $[M+H]^+$ (figura 90).

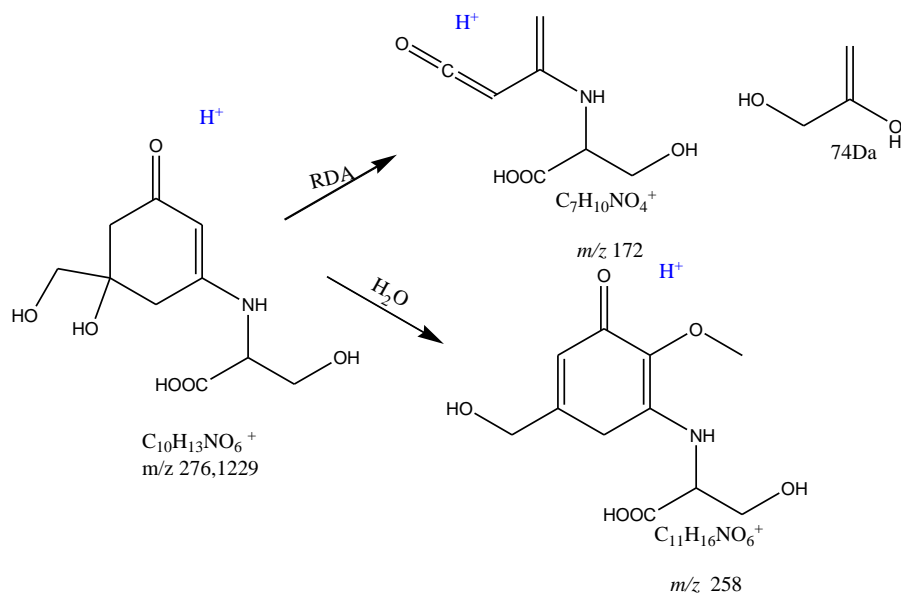


Figura 90: Proposta de fragmentação para a formação de m/z 258 (aduto com H^+) e m/z 172 (aduto com H^+).

Substância 14

- LC-DAD-HRMS e LC-DAD-HRMS/MS

Tempo de retenção 23,9 minutos

O fragmento com massa 301,1442 encontrado no tempo de retenção 23,9 min. mostra um aduto catiônico com Na^+ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e um dímero $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ formado em m/z 579,2985 (figura 91). No modo negativo (figura 92), não foi possível encontrar íon compatível com o encontrado no modo positivo.

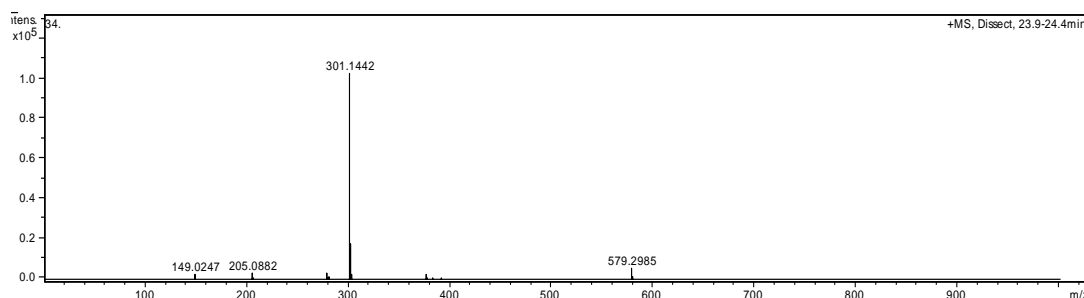


Figura 91: Espectro de massas de EAMB no modo positivo de m/z 301.1442 (aduto com Na^+).

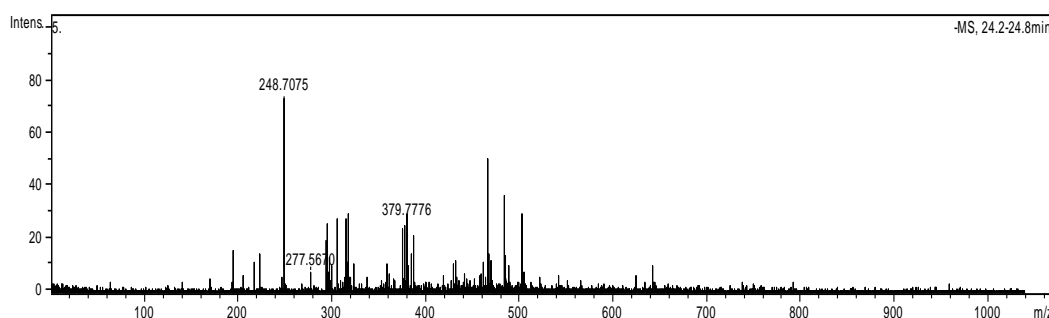
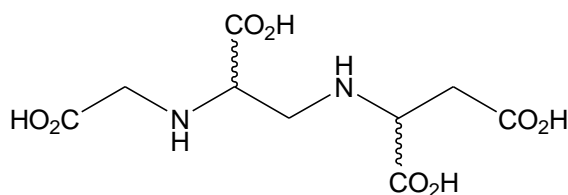


Figura 92: Espectro de massas de EAMB no modo negativo

Esta substância, um aminoácido, foi detectada como sendo aspergillomarasmin B, relatada para o endofito *C. gloeosporioides* (figura 93) (BALLIO et al, 1969; GARCIA PAJÓN and COLLADO, 2003).



14

278,0750 Da

aspergillomarasmine B

Figura 93: Substância detectada a 23,9 minutos.

O íon 301,1442 foi submetido a fragmentação MS/MS fornecendo o Espectro de massas mostrado na figura 94.

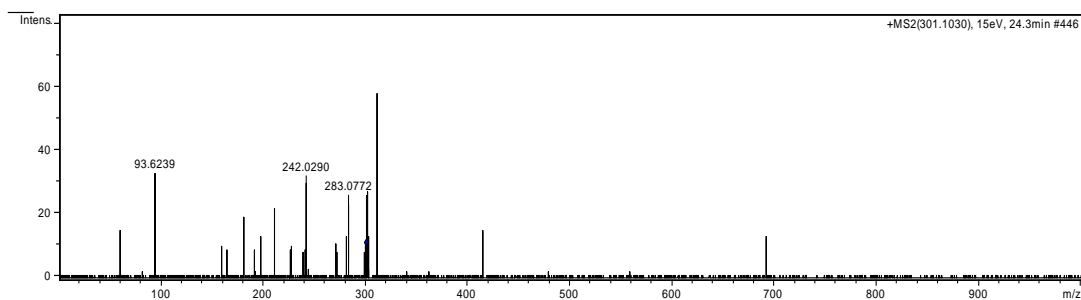


Figura 94: Espectro de massas MS/MS de 301,1442.

O fragmento em m/z 283, é resultado de uma perda de $[M-18 + Na]^+$ (SARPELEH, 2009).

4.4. Resultados dos ensaios biológicos

4.4.1. Ensaio de atividade antioxidante

-Extratos dos meios produzidos em pequena escala (Czapek, Ext. malte, milho, PDB e YM)

Os resultados, mostrados na figura 95, obtidos com esse ensaio, mostra que o endofítico, mesmo quando cultivado em meios diferentes, apresenta pouca atividade antioxidante, com valores abaixo do padrão utilizado: rutina.

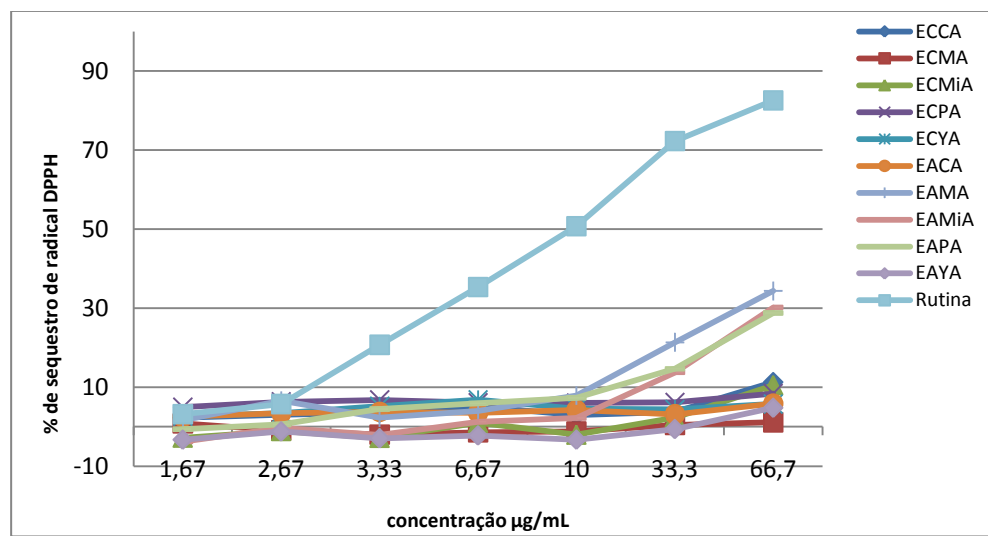


Figura 95: Gráfico de % de sequestro do radical DPPH em função da concentração

- Extratos dos meios produzidos em grande escala (Ext. malte e milho)

Como já verificado anteriormente na triagem de meios de cultivo, o microrganismo não produz metabolitos que contribuam para uma atividade antioxidante significativa, como pode ser verificado na figura 96. Este resultado é compatível com os dados das substâncias identificadas descritas anteriormente, já que as mesmas não apresentam atividade antioxidante, exceto as micosporinas que são fotoprotetores naturais.

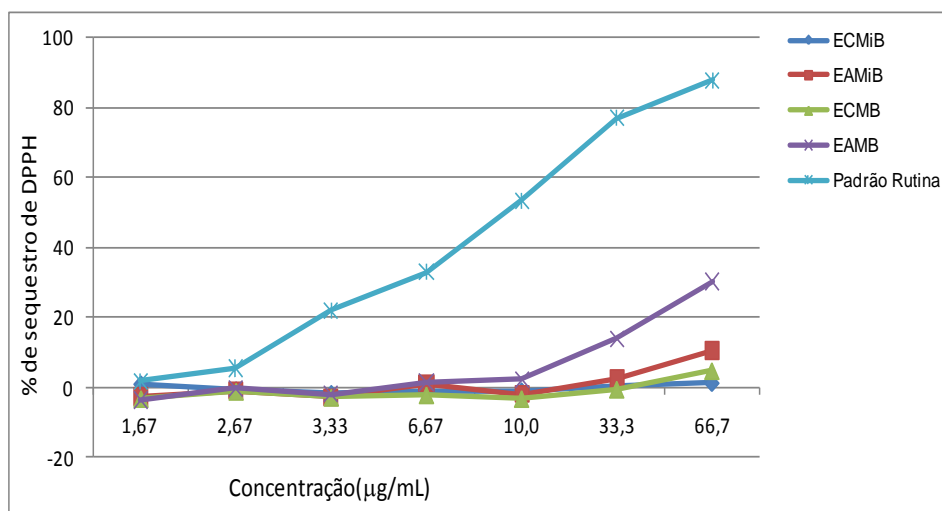


Figura 96: Gráfico da concentração x % de seqüestro do radical DPPH.

4.4.2. Ensaio de inibição da polimerização de heme (hematina) - antimalárico

Este ensaio consiste em detectar substâncias que seja capazes de inibir a reação de polimerização do heme, que é iniciada quando o parasita *Plasmodium sp.* está infectando as células da hemácias do sangue.

- Extratos dos meios produzidos em pequena escala (Czapek, Ext. malte, milho, PDB e YM)

Os resultados mais promissores encontrados foram para os meios de cultivo de malte e milho com valores de porcentagem de inibição de 85,229 para ECMA e 74,484 para EAMiA (Figura 97).

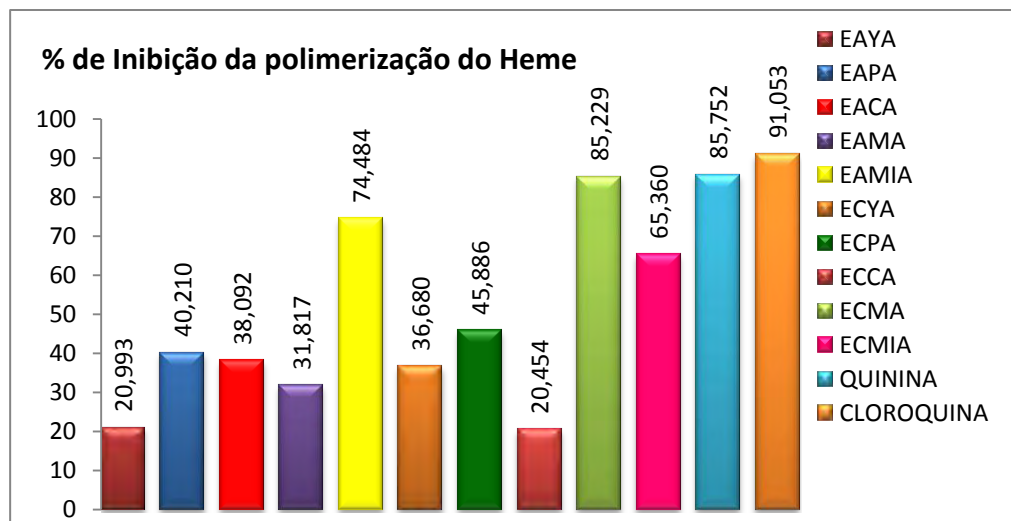


Figura 97: Gráfico da % de inibição da polimerização do heme

- Extratos dos meios produzidos em grande escala (Ext. malte e milho)

Os resultados dos extratos EAMiB, e ECMB quando comparados aos padrões quinina e cloroquina se mostram satisfatórios pois apresentam porcentagem de inibição próximos aos valores dos padrões utilizados. Entretanto os extratos EAMB e ECMiB, foram pouco satisfatórios apresentando valores de porcentagem de inibição da polimerização do heme inferior aos padrões.(Figura 98)

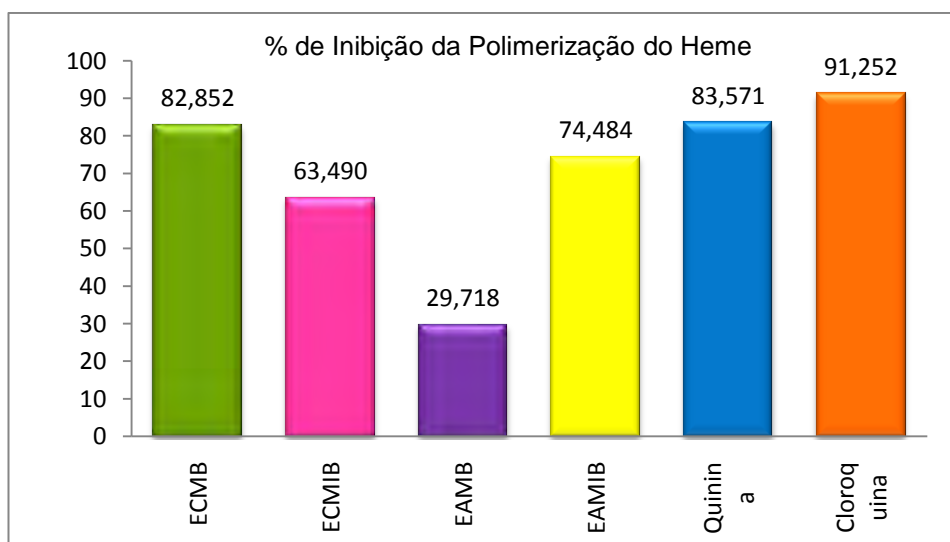


Figura 98: Resultado do teste de inibição da polimerização do heme.

Os resultados obtidos com este ensaio indicam a existência de prováveis substâncias inéditas nos meios de malte e milho, que possuam atividade de inibição de polimerização do heme, uma vez que as substâncias identificadas da detecção *in silico*, não apresentam relatos de atividade para este tipo de ensaio.

4.4.3. Ensaio de atividade antifúngica

4.4.3.1 Ensaio de atividade antifúngica frente a espécies de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*

Este ensaio consiste em detectar a concentração mínima inibitória (CIM) que inibe o crescimento das espécies patogênicas.

Valores < 75.0 µg/mL apresentam forte atividade antimicrobiana, de 75,0 a 150,0 µg/mL a atividade é considerada moderada, de 150,0 a 250,0 µg/mL a atividade é fraca e acima de 250 µg/mL é considerado inativo. (SCORZONI et al., 2007).

- Extratos dos meios produzidos em pequena escala (Czapek, Ext. malte, milho, PDB e YM)

A tabela 14 mostra que os extratos dos meios de cultura: Czapek (EACA e ECCA), PDB (EAPA e ECPA) e YM (EAYA e ECYA) apresentaram uma CIM satisfatória frente à *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis*, sendo que os extratos EACA, EAPA e EAYA também inibiram a espécie *Candida krusei*.

Tabela 14: Resultado do ensaio de atividade antifúngica frente a espécies de *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM(µg/mL)	CIM(µg/mL)	CIM(µg/mL)	CIM(µg/mL)
Gx01 - EACA	>250	>125	>125	>125
Gx01 - EAPA	>250	>125	>62,5	>125
Gx01 - EAYA	>250	>125	>125	>125
Gx01 - ECCA	>250	>250	>125	>125
Gx01 - ECPA	>250	>250	>125	>125
Gx01 - ECYA	>250	>125	>125	>125
GX01 - ECMiB	>250,0	>250,0	>250,0	>250,0
GX01 - ECMB	>250,0	>250,0	>250,0	>250,0

GX01 - EAMiB	>250,0	>250,0	>250,0	>250,0
GX01 - EAMB	>250,0	>250,0	>250,0	250,0

- Extratos dos meios produzidos em grande escala (Ext. malte e milho)

Como visto anteriormente, na triagem realizada em pequena escala, os meios de Ext. malte e milho não apresentaram atividade inibitória frente as linhagens patógenos testados. Os resultados estão descritos na tabela 15.

Tabela 15: Resultado do ensaio de atividade antifúngica frente a espécies de *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Extrato	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
GX01ECMiB	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL
GX01ECMB	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL
GX01EAMiB	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL
GX01EAMB	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	>250,0 µg/mL	250,0 µg/mL

O resultado do ensaio é coerente com as substâncias detectadas já que nenhuma das relatadas anteriormente possui atividade patogênica.

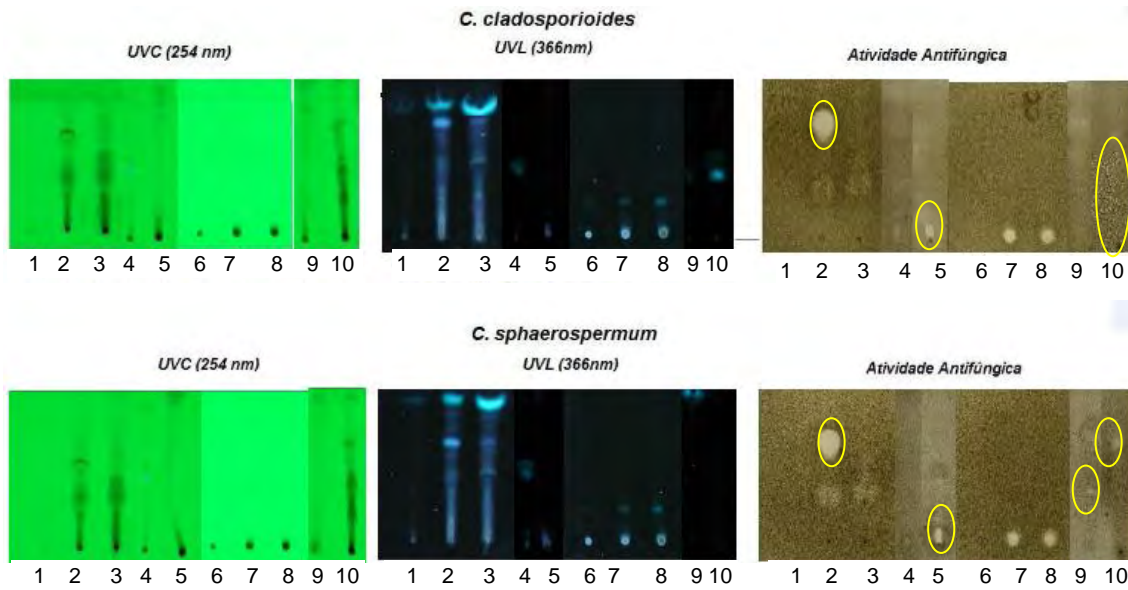
4.4.3.2. Ensaio de atividade antifúngica frente a espécies de *Cladasporium cladosporioides* e *Cladasporium sphaerospermum*

A bioautografia consiste da associação entre a cromatografia em camada delgada e um ensaio biológico *in situ*, permitindo localizar constituintes biologicamente ativos presentes em uma matriz complexa ou indicar o potencial biológico de substâncias puras. O método fundamenta-se na aplicação de um microrganismo sobre um cromatograma e incubação deste visando o aparecimento de possíveis zonas de inibição por constituintes ativos (HOMANS; FUCHS, 1970).

- Extratos dos meios produzidos em pequena escala (Czapek, Ext. malte, milho, PDB e YM)

O perfil biológico do endofítico quando cultivado em diferentes meios foi avaliado para verificação da atividade antifúngica, observando-se que apenas

os extratos produzidos em Extr. malte e milho inibiram o crescimento das linhagens utilizadas (Figura 99).



Legenda: 1 EACA 2 EAPA 3- EAYA 4- EAMiA 5- EAMA 6- ECCA 7 ECPA - 8 ECYA - 9- ECMiB - 10-ECMB

Figura 99: Ensaio de bioautografia com os extratos produzidos por *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultura.

- Extratos dos meios produzidos em grande escala (Ext. malte e milho)

Os resultados mostram atividade antifúngicos apenas de ECMB e EAMB, ambos oriundos do meio de cultura de malte (Figura 100; tabela 16).

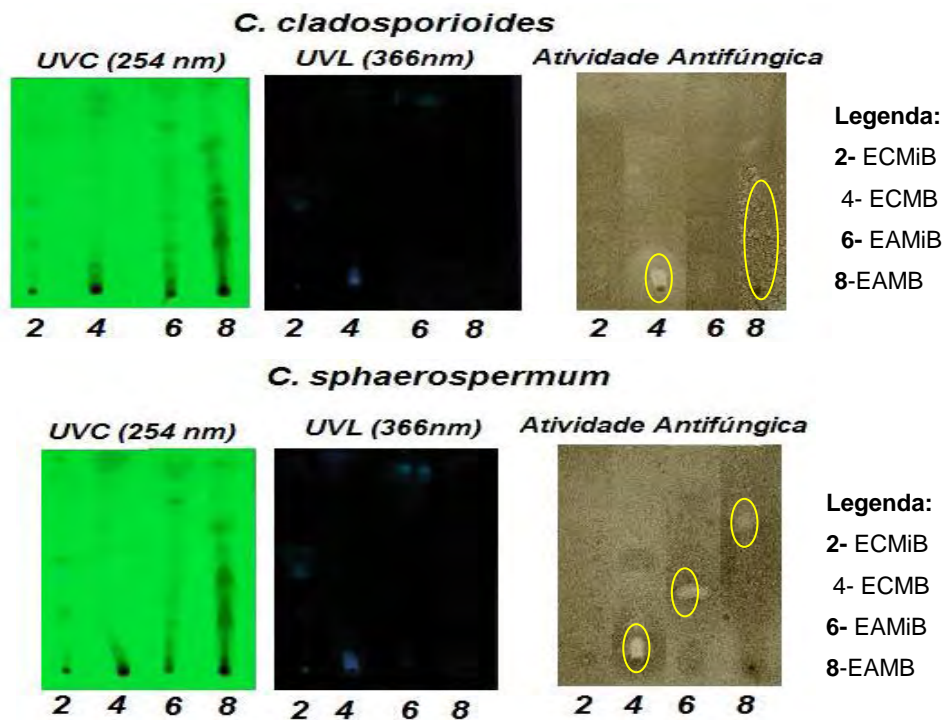


Figura 100: Ensaio de bioautografia com os extratos produzidos por *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultura.

Extratos dos meios produzidos em grande escala (Ext. malte e milho)

O ensaio foi novamente realizado com os extratos de malte e milho obtidos na produção em grande escala (tabela 18). Entretanto os extratos não mostraram nenhuma atividade de inibição do crescimento de *T. cruzi*.

Tabela 18: Ensaio de atividade tripanocida: % de parasitas mortos

% parasitas mortos								
µg/ml Amostra	500	400	300	200	100	50	25	IC50
EAMA	2	0	0	0	0	0	0	>500
EAMiA	47	43,5	26	24	18	2	0	>500
ECMiB	7,6	0	0	0	0	0	0	>500
ECMB	10	5,8	3,4	1	0	0	0	>500
Benzonidazol								42,7

4.4.5. Ensaio de atividade Anticolinesterásica

A inibição da enzima acetilcolinesterase é visualizada através da absorbância no comprimento de onda 595 nm, referente ao produto formado após reação de hidrólise da enzima acetilcolinesterase conforme procedimento experimental descrito na pag. 56.

- Extratos dos meios produzidos em pequena escala (Czapek, Ext. malte, milho, PDB e YM)

Todos os extratos foram testados quanto a atividade inibição da enzima acetilcolinesterase, o resultado do teste está na figura 101.

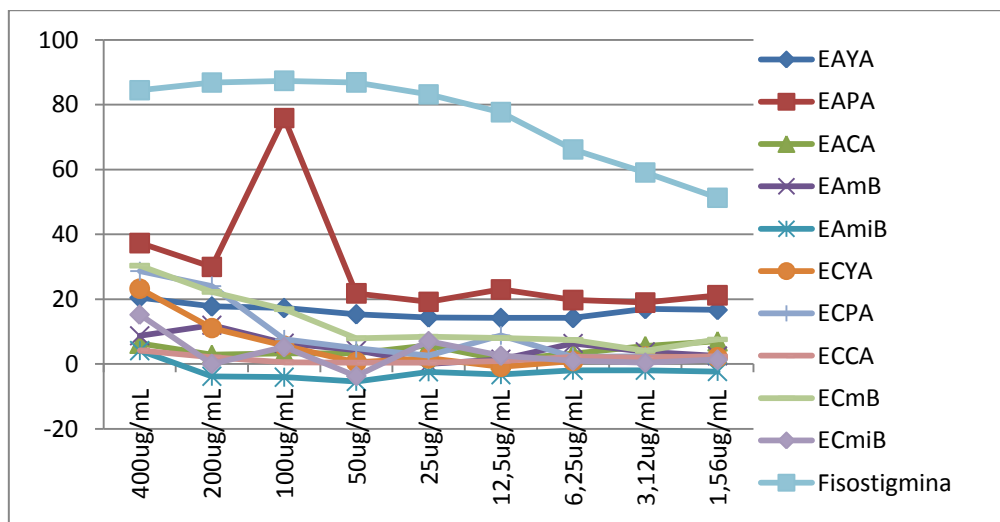


Figura 101: Ensaio de atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

O padrão utilizado no teste foi a fisostigmina e ao compara os resultados obtidos com os extratos, observamos que não há resultados promissores.

- Extratos dos meios produzidos em grande escala (Ext. malte e milho)

O ensaio foi realizado novamente com os extratos de malte e milho, como podemos observar na figura 102.

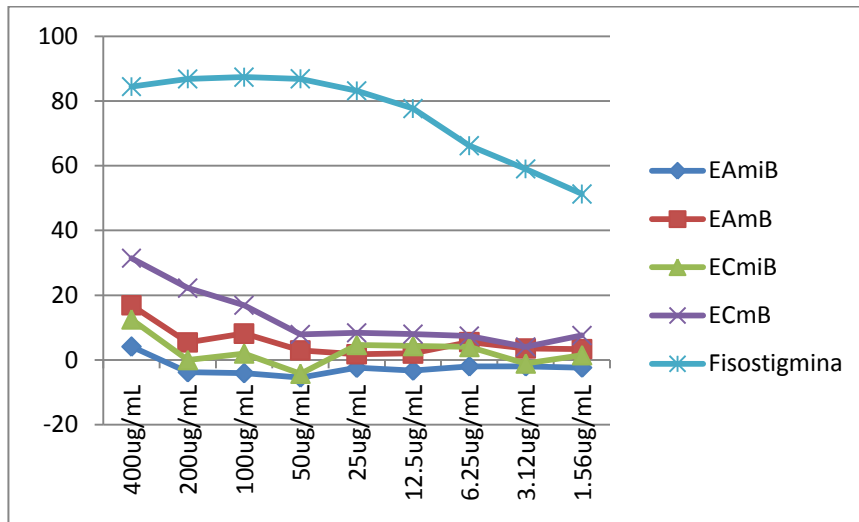


Figura 102: Ensaio de atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

Ambos os extratos diclorometânico e acetato de etila dos meios de extr. de malte e milho não mostraram nenhuma atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

O resultado deste ensaio é compatível com as moléculas detectadas através da identificação *in silico*, já que não há relatos na literatura para esta atividade com estes constituintes.

5. Conclusões e Perspectivas

Este projeto de mestrado revela a variedade estrutural dos componentes micromoleculares produzidos pelo fungo *C. gloeosporioides* assim como o desenvolvimento de métodos analíticos fazendo uso de técnicas espectroscópicas do estado da arte visando, não apenas a busca de compostos com atividade biológica mas, a racionalização experimental para a sua detecção e, se necessário, o seu isolamento seletivo.

A triagem realizada com diversos meios de cultura permitiu a comparação da produção metabólica de *C. gloeosporioides* revelando que ela é determinada pela composição do meio de cultivo. A comparação dos dados obtidos por HPLC-DAD, ^1H RMN e ensaios biológicos auxiliaram na seleção de dois meios de cultura: meio líquido de extrato de malte e meio sólido de milho. Ambos foram submetidos a produção em larga escala, sendo produção dos metabolitos produzidos pelo fungo caracterizada através de técnicas hifenadas, metodologias de desreplicação e ^1H RMN.

A utilização das técnicas hifenadas: cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas de alta resolução e, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, foram críticas na detecção dos constituintes majoritários micromoleculares presentes nos extratos escolhidos: AcOEt e DCM de *C. gloeosporioides* revelando a presença de metabolitos que, devido a baixa quantidade de muitos deles, seria inviável a sua purificação por meios clássicos de separação.

Os extratos DCM, ECMiB e ECMB, tiveram um rendimento, em massa, 3 vezes superior aos extratos de AcOEt. Por serem lipofílicos foram analisados via CG/MS, sendo detectados no extrato ECMiB e, através da análise *in silico*, 6 metabolitos: dihexadecanoato de glicerila (**1**), trioctadecenoato de glicerila (**2**), 1,2- octadeca-9,12-dienoato de glicerila (**3**); 1,3-octadeca-9,12-dienoato de glicerila (**4**); 6,11- ácido hexadecanoico (**5**) e geranilinalol (**6**). As substâncias **2**, **3** e **4**, constituintes majoritários do extrato, foram isoladas e elucidadas por ^1H e ^{13}C RMN, confirmando as informações reveladas por CG/MS. No extrato ECMB não foi possível detectar nenhum componente micromolecular, devido à baixa volatilidade apresentada.

Os extratos de AcOEt, EAMiB e EAMB, exibiram substâncias de alta a média polaridade e, após análise por HPLC/DAD/HRMS e técnicas tandem, foram detetados, em EAMiB: colletodiol (**7**), fischerina (**8**) e sambutoxina (**9**); de EAMB, ciperina (**10**), arginomicina (**11**), micosporina serina (**12**) e aspergillomarasmina B (**13**); dentre os quais três (**7**, **12** e **13**) já haviam sido relatados para o endofítico e os demais (**8**, **9**, **10** e **11**) encontrados em outros microrganismos porém, nunca relatados no gênero *Colletotrichum*. Esses extratos também foram analisados por ¹H RMN e os sinais referentes a todas as moléculas foram detectados na matriz bruta, confirmando a viabilidade e potencial da análise *in silico* associada a técnicas de detecção *in situ* por RMN.

As técnicas hífenadas abordadas neste trabalho permitiram a detecção dos constituintes majoritários da matriz bruta, excluindo a necessidade de isolamento destes compostos e fornecendo a rápida detecção de constituintes mesmo com pouca quantidade em massa.

O extrato ECMA, ECMB e, ambos os extratos diclorometano obtidos a partir do extr. de malte, mostraram resultados promissores quanto a atividade antifúngica frente a fitopatógenos assim como de inibição da polimerização do heme (quando comparado ao padrão quinina).

Referências

- ARGOUEDELIS, A. D.; BACZYNSKYJ, L.; KUO, M. T.; LABORDE, A. L.; SEBEK, O. K.; TRUESDELL, S. E.; SHILLIDAY, F. B. Arginomycin: production, isolation, characterization and structure. **Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 6, p. 750-760, 1987.
- ARPIN, N.; CURT, R.; FAVRE-BONVIN, J. Mycosporines: review and new data concerning their structure. **Revue de Mycologie**, v. 43, n. 3, 247-257, 1979.
- ARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; MacCHERONI, W. J. ; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electrononic Journal of Biotechnology**, v.3, p. 40-65, 2000.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; ROBINS, J. D.; LUTTRELL, E. S. Epichloë typhi from toxic tall fescue grasses. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 576-581, 1977.
- BALLIO, A.; BOTTALICO, A.; BUONOCORE, V; CARILLI, A.; DI VITTORIO, V.; GRANITI, A. Production and isolation of aspergillomarasmin b (lycomarasmic acid) from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (*Gloeosporium olivarum* Alm.) **Phytopathologia Mediterranea**, v. 8, n. 3, p. 187-196, 1969.
- BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthones from *Guttiferae*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 967, 1989.
- BORGES, W. S.; PUPO, M. T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 17, p. 929-934, 2006.
- BOUSQUET, J. F.; VEGH, I.; POUTEAU-THOUVENOT, M.; BARBIER, M. Isolation of aspergillomarasmin a from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides*, willow pathogens. **Annales de Phytopathologie**, v. 3, p. 407-408, 1971.

BRADY, S. F.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; CLARDY, J. Cytoskyrin A and B, new bioactive bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v. 2, p. 4047-4049, 2000.

BRADY, S. F.; WAGENAAR, M. M.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; CLARDY, J. The cytosporones, new octaketide cytotoxins isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v. 2, p. 4043-4046, 2000.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR337 a new pentakide antifungi agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.

CALHOUN, L. A.; FINDRLAY, J. A.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, v. 96, p. 281-286, 1992.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 44, n. 8 p. 9161-9169, 2008.

CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 283-292, 2009.

CROTTI, A. E. M.; VESSECHI, R. L.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DAYAN, F. E.; FERREIRA, D.; WANG, Y.; KHAN, I. A.; McINROY, J. A.; PAN, Z. A pathogenic fungi diphenyl ether phytotoxin targets plant enoyl (acyl carrier protein) reductase. **Plant Physiology**, v. 147, p.1062-1071, 2008.

DORN, A.; VIPPAGUNTA, S. R.; MATILE, H.; JAQUET, C.; VENNERTSTROM, J. L.; RIDLEY, R. G. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 727-736, 1998.

- EGAN, T. J.; ROSS, D. C.; ADAMS, P. A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). **FEBS Letter**, v. 352, p. 54-57, 1994.
- FAUCONNOT, L.; ROBERT, F.; VILLARD, R.; DIONISI, F. Chemical synthesis and NMR characterization of structured polyunsaturated triacylglycerols. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 139, p. 125-136, 2006.
- FEMENÍA-RÍOS, M.; PAJO, C. M. G.; HERNANDES-GALÁN, R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J. M.; COLLADO, I. G. Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioorganic And Medicinal Chemical Letters**, v. 16, p. 5836-5839, 2006.
- FENN, J. B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie**, v. 42, n. 33, p. 3871-3894, 2003.
- FREDENHAGEN, A.; DERRIEN, C.; GASSMANN, E. An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products different fragmentation patterns for $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ ions. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 385-391, 2005.
- FUJIMOTO, H.; IKEDA, M.; YAMAMOTO, K.; YAMAZAKI, M. Structure of fischerin, a new toxic metabolite from an ascomycete, *Neosartorya fischeri* var. *fischeri*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 8, p. 1268-1275, 1993.
- GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKAI, R.; BEZBARUAH, R. L.; TARUN, C. B. (Org.). **Microbial biotechnology**. New Delhi: New India Publishing, 2008. p. 139-168.
- GARCÍA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. **Natural Products**, v. 20, p. 426-431, 2003.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 506-526, 2006.

GUNSTONE, F. D. High Resolution ^{13}C NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. **Progress in Lipid Research**, v. 33, p. 19-28, 1994.

HAY, A. E.; AUMOND, M. C.; MALLET, S.; DUMONTET, V.; LITAUDON, M.; RONDEAU, D.; RCHOMME, P. Antioxidant xanthenes from *Garcinia vieillardii*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 707-709, 2004.

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

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; TAKAKURA, T.; RUANGRUNGSI, ENJO, N. F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Garcinia fusca*: structure elucidation of eight new xanthone and their cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 200-205, 2003.

JAROSZEWSKI, J. W. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 691-700, 2005.

KEDAR, L.; KASHMAN, Y.; OREN, A. Mycosporine-2-glycine is the major mycosporine-like amino acid in a unicellular cyanobacterium (*Euhalothece* sp.) isolated from a gypsum crust in a hypersaline saltern pond. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 233-237, 2002.

KIM, J.; LEE, Y. Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4380-4386, 1994.

KIM, J.; LEE, Y.; YU, S. Sambutoxin-producing isolates of *Fusarium* species and occurrence of sambutoxin in rotten potato tubers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3750-3751, 1995.

KIM, J.; LEE, Y.; TAMURA, H. I.; YOSHIZAWA, T. Sambutoxin : a new mycotoxin isolated from *Fusarium sambucinum*. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n.7, p. 1047-1050, 1995.

LATCH, G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infections of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, v. 107, p. 17-24, 1985.

LATCH, G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J.; GAYNOR, D. L. Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. **Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 129-132, 1985.

LATCH, G. C. M.; HUNT, W. F.; MUSGRAVE, D. R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. **Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 165-168, 1985.

LEWIS, R. J.; BERNSTEIN, M. A.; DUNCAN, S. J.; SLEIGH, C. J. A comparison of capillary-scale LC–NMR with alternative techniques: spectroscopic and practical considerations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 783-789, 2005.

LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67-73, 2000.

MATHIS, J. A.; McCORD, B. R. Gradient reversed-phase liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric method for the comparison of smokeless powders. **Journal of Chromatography**, v. 988, n. 1, p. 107-116, 2003.

MacMILLAN, J.; SIMPSON, T. J. Fungal products. Absolute stereochemistry of colletodiol and the structures of related metabolites of *Colletotrichum capsici*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, v. 14, p. 1487-1493, 1973.

MEYER, W. L.; SCHWEIZER, W. B.; BEERNDCK, A. K.; SCHEIFELE, W.; SEEBACH, D.; SCHREIBER, S. L.; KELLY, S. E. Revised structure of the fungal germination self-inhibitor gloeosporone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 70, n.2, 281-291, 1987.

MELLO, V. M.; OLIVEIRA, F. C. C.; FRAGA, W. G.; NASCIMENTO, C. J. do; SUAREZ, P. A. Z. Determination of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel samples obtained by esterification using ¹H-NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 1051-1054, 2008.

MOLYNEUX, R. J.; SCHIEBERLE, P. Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4625-4629, 2007.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTINEZ-DIAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of american plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 7, n. 1/2, p. 101-107, 2000.

NG, S. Quantitative analysis of partial acylglycerols and free fatty acids in palm oil by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 7, p. 749-755, 2000.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Trioxxygenated naturally occurring xanthonnes. **Phytochemistry**, v. 44, p. 191-214, 1996.

PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Tetraoxxygenated naturally occurring xanthonnes. **Phytochemistry**, v. 55, p. 683-710, 2000.

PHAM, L. H.; VATER, J.; ROTARD, W.; MUGGE, C. Magnetic resonance in chemistry. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 710-723, 2005.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: TAFT, C. A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, 2006. p. 51-78.

RODRIGUES, K. F. Fungal endophytes of palms. In: REDDIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi of grasses and woody plants**. St. Paul: APS Press, 1996. p. 121-132.

- RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista Multiciência**, v. 7, p. 7-14, 2006.
- RETIEF, L.; MCKENZIE J. M.; KOCHA, K. R. A novel approach to the rapid assignment of ^{13}C NMR spectra of major components of vegetable oils such as avocado, mango kernel and macadamia nut oils. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 47, p. 771-781, 2009.
- RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. A 915, p. 217-223, 2001.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p. 25-34, 2007.
- SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. Rhabdocline *parkeri* a ubiquitous foliar endophyte of Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, p. 1849-1855, 1986.
- SIDDIQUI, N.; SIM, J.; SILWOOD, C. J. L.; TOMS, H. A.; ILES, R.; GROOTVELD, M. Multicomponent analysis of encapsulated marine oil supplements using high-resolution ^1H and ^{13}C NMR techniques. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 12, p. 2406-2427, 2003.
- SILVA, A. F. C.; RODRIGUES, M. L.; FARIAS, S. E.; ALMEIDA, I. C.; PINTO, A. M. R.; BARRETO-BERGTERA, E. Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. **FEBS Letters**, v. 561, p.137-143, 2004.
- 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.

SIMOVA, S. I. G.; SPASSOV, S. L. Alternative NMR method for quantitative determination of acyl positional distribution in triacylglycerols and related compounds. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p.167-176, 2003.

SMITH, S. O.; KUSTANOVICH, I.; BHAMIDIPATI, S.; SALMON A.; HAMILTON, J. A. Interfacial conformation of dipalmitoylglycerol and dipalmitoylphosphatidylcholine in phospholipid bilayers. **Biochemistry**, v. 31, n. 4/6, p. 11660-11664, 1992.

SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; BRADY, S. F. Cytoskyrins and cytosporones produced by *Cytospora* sp. CR200: taxonomy. **Fermentation and Biological Activities**, v. 5, p. 71-84, 2007.

SOLLADIE, G.; GRESSOT, L.; COLOBERT, F. Enantioselective synthesis of the unsymmetrical bis (lactone)(-)-(3E,6R,9E,12S,14R)-colletol induced by chiral sulfoxides and an approach to (+)- colletodiol by asymmetric hydroxylation of an α , β -hydroxy lactone. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2, n. 357-364, 2000.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, n. 1, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 1, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

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

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TANG, H.; XIAOA, C.; WANGA, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 5157-5162, 2009.

- TSURUSHIMA, T.; UENO, T.; FUKAMI, H.; IRIE, H.; INOUE, M. Germination self-inhibitors from *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. jussiaea*. Faculty of commerce, Han-nan University, Matsubara. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 5, p. 652-657, 1995.
- VOLKMANN, M.; GORBUSHINA, A. A.; KEDAR, L.; OREN, A. Structure of euhalothece-362, a novel red-shiftedmycosporine-like amino acid, from a halophilic cyanobacterium(Euhalothece sp.). **FEMS Microbiological Letters**, v. 258, p. 50-54, 2006.
- WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; LACHAVANNE, J-B.; HOSTETTMANN, K. Identification of the polar constituents of Potamogeton species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSn and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside. **Phytochemistry**, v. 65, n.16, p. 2401-2410, 2004.
- WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v. 292, p. 449-451, 1981.
- WHITE, J. F.; COLE, G.Y. Endophyte-host associations in forage grasses. 1: distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, v. 77, p. 323-327, 1985.
- WILLIAMS, J. D.; WEINER, B. E.; ORMAND, J. R.; BRUNNER, J.; THORNQUEST, A. D. Jr.; BURINSKY, D. J. Automated molecular weight assignment of electrospray ionization mass spectra. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 24, p. 2446-2455, 2001.
- WILLIAMS, J. D.; BURINSKY, D. J. Mass spectrometric analysis of complex mixtures then and now: the impact of linking liquid chromatography and mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 212, p. 1-3, p. 111-133, 2001.
- WILLIAMS, D. R.; TURSKE, R. A. Construction of 4-Hydroxy-2-pyridinones. Total synthesis of (+)-sambutoxin. **Organic Letters**, v. 2, n. 20, p. 3217-3220, Aug. 2000.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHONG, F. F.; CHEN, Y.; YANG, G. Z. Chemical constituents from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (dpph) radical-scavenging activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1695-1703, 2008.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, T. Y.; ZHANG, G. X.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.