

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Instituto de Química de Araraquara

NuBBE “*Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais*”

Maiara Stefanini Borges

Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo  
endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)

Araraquara  
2016

MAIARA STEFANINI BORGES

Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B732e Borges, Maiara Stefanini  
Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um  
fungo endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) /  
Maiara Stefanini Borges – Araraquara-SP : [s.n], 2016  
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Angela Regina Araujo

1. Fungos endofíticos. 2. Ressonância magnética nuclear.  
3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Metabólitos.  
5. Plantas-compostos bioativos. I. Título.

## MAIARA STEFANINI BORGES

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

Araraquara, 09 de março de 2016.

### BANCA EXAMINADORA



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



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabele Rodrigues Nascimento  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Helena Januário  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas / UNIFRAN / Franca - SP

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados Pessoais**

**Nome:** Maiara Stefanini Borges

**e- mail:** borges.maiara26@gmail.com

### **Endereço Profissional**

NuBBE “*Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais*”  
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara - Universidade  
Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: borges.maiara26@gmail.com

### **Formação Acadêmica**

**2013**

Graduação: Licenciatura em Química

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de  
Química de Araraquara- SP.

**2014-2016**

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de  
Química de Araraquara- SP.

Dissertação: Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de  
*Eugenia Jambolana* Lam. (Myrtaceae)

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Bolsa: CAPES

### **Produção Bibliográfica**

#### **Trabalhos recentes publicados em anais de eventos**

- a) BORGES, M. S.; da SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Taninos condensados de *Astronium fraxinifolium*”. In: 57º Jornada Farmacêutica da UNESP, 2010, Araraquara-SP.

- b) BORGES, M. S.; da SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Determinação do perfil químico do extrato aquoso das folhas de *Astronium graveolens* (ANACARDIACEAE)”. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010 (1ª etapa), Araraquara-SP.
- c) BORGES, M. S.; BRAHIM, G. T.; SOUZA, L. P.; da SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Isolamento e identificação de substâncias polares das folhas de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae)” In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis-SC.
- d) BORGES, M. S.; SOUZA, L. P.; da SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae).” In: XIX Jornadas de Jovens Investigadores, 2011, Universidad Nacional del Este, Ciudad del Este-Paraguai.
- e) BORGES, M. S.; SOUZA, L. P.; da SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Desenvolvimento e aplicação de metodologias cromatográficas para análise e comparação de extratos padronizados de *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae).” In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011 (1ª etapa), Araraquara- SP
- f) SOUZA, L. P.; BORGES, M. S.; DA SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Validation of CLAE-PAD method for the determination of phenolic compounds in *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae).” In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto- MG.
- g) BORGES, M. S.; SOUZA, L. P.; da SILVA, V. C.; VILEGAS, W. “Otimização do preparo de amostra para quantificação de galotaninos em *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae).” In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012, Araraquara-SP.
- h) BORGES, M. S.; SOLCIA, R. B.; BEVILAQUA, D. Thiosulphate oxidation by strains of *Acidithiobacillusferrooxidans* and *Acidithiobacillusthiooxidans*. In: 20<sup>th</sup> International Biohydrometallurgy Symposium, outubro 2013, Chile.
- i) BORGES, M. S.; SOLCIA, R. B.; BEVILAQUA, D. Obtenção de consórcios microbianos oxidantes de enxofre a partir do lodo anaeróbico proveniente de uma Estação de Tratamento de Efluentes. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2013 (1ª etapa), Araraquara-SP.
- j) BORGES, M. S.; CHAPLA, V. M.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; YOUNG, M. C. M. Prospecting secondary metabolites in *Saccharicola* sp. an endophytic fungus from *Eugenia jambolana*. In: 5nd Brazilian Conference on Natural Products (5nd BCNP), 2015, Atibaia-SP.

### **Participações em Reuniões Científicas**

- a) 1<sup>st</sup> UNESP NMR Symposium- Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research, 2014, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.
- b) First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for metabolomics (13 a 14 de Março de 2015- FCFarRibeirão Preto (Universidade de São Paulo- USP)-SP.

### **Organizações de Eventos**

- (a) Membro da comissão organizadora da XXXIX Semana da Química, tema: “Tendências e Aplicações de uma Ciência Multifacetada.” 2009, no Instituto de Química de Araraquara-SP.
- (b) Membro da comissão organizadora do VIII Evento de Educação em Química, tema: “Os Instrumentos de Avaliação no Ensino de Química”, 2010, no Instituto de Química de Araraquara-SP.
- (c) Membro da comissão organizadora do IX Evento de Educação em Química; tema: “Linguagem no Ensino de Química”, 2011, no Instituto de Química, de Araraquara-SP.
- (d) Membro da comissão organizadora do X Evento de Educação em Química; tema: “Química como ferramenta interdisciplinar” 2012, no Instituto de Química de Araraquara-SP.

### **Atividades extracurriculares**

- (a) Estágio Docência: Disciplina - Química I- Turma Engenharia Química. Realizado no período de 02/03/2015 a 04/07/2015 - no Instituto de Química de Araraquara-SP.

*Aos meus queridos pais, Iracídio e Silvia.*

*Seus exemplos de honestidade, respeito, solidariedade, perseverança e amor que servem de guia para a minha vida. Se hoje escrevo esta dissertação de mestrado, é que em todos os momentos da minha vida, recebi o apoio e o incentivo para que me tornasse uma pessoa com qualidades e habilidades tanto profissional quanto pessoal.*

*Ao meu querido marido Flávio.*

*Pelo amor, incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada pelo imenso apoio durante a execução desse trabalho, e por estar sempre presente nos momentos bons e ruins da minha vida. Obrigada por tudo. Amá-lo me faz uma pessoa muito feliz.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, pelo amor, paciência, sacrifício e inúmeras renúncias que vocês tiveram que fazer para me proporcionar uma educação melhor e de qualidade. Mais do que a educação formal que vocês me ofereceram e que sempre se esforçaram para que fosse a melhor, a formação humana foi o que de mais importante vocês fizeram por mim. Eu só posso retribuir tentando ser o melhor filha que pais como vocês merecem ter. Sou e serei eternamente grata por tudo que dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho.

Ao meu amor Flávio, pelo amor, carinho, incentivo e paciência em todos os momentos.

À minha eterna orientadora Profa. Dra. Angela, pela amizade, pelas incontáveis conversas, ensinamentos. Obrigada pela oportunidade em participar de um grupo tão maravilhoso como o dos fungos endofíticos.

Aos amigos da Faculdade em especial minhas amigas: Aninha, Natalia, Leonice, Nathália, Carol, Andressa, Josi e Renatinha pela amizade, pelo apoio e pelas inúmeras conversas e risadas durante esta trajetória. Admiro vocês. Queria estar sempre perto de vocês.

Aos meus amigos do coração e colegas de Laboratório: Rafa, Viviane, Tony, Júlia, Luiz Paulo, Alexander, Lilian, Alene, Rebeca, Afif, Daniel, Amauri, Victor, Paty, Vinicius, Gabriel, Carina, que me auxiliaram inúmeras vezes no laboratório seja nos experimentos ou nas dúvidas em geral e me proporcionaram momentos bons e divertidos nessa jornada.

Ao meu eterno grupo de Fitoquímica: Professora Lourdes, Wagner, Viviane e aos companheiros de jornada Aninha, Felipe, Leonardo, Marcelo Amorim, Marcelo Tangerina, Weslei, Pedrinho, Claudinha, vocês fazem parte na minha jornada até aqui e fizeram eu amar ainda mais os produtos naturais, agradeço pela amizade, pelas risadas e pelos ensinamentos.

Aos amigos, professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade e pelos espectros de RMN.

Ao João, pela amizade, constante colaboração e pelas análises no massas.

À Juliana Rodrigues pela amizade, paciência e ensinamentos em CLAE.

Às funcionárias da biblioteca e da pós-graduação pela dedicação, competência e por serem sempre prestativas.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

✓ A Profa. Dra. Maria Cláudia Young e Prof. Diego Veras Wilke pelos ensaios biológicos.

A CAPES pelas bolsas concedidas e a FAPESP pelos financiamentos

*“Nosso grande medo não é o de que sejamos incapazes.  
Nosso maior medo é que sejamos poderosos além da medida. É nossa luz,  
não nossa escuridão, que mais nos amedronta.  
Nos perguntamos: "Quem sou eu para ser brilhante, atraente, talentoso e  
incrível?" Na verdade, quem é você para não ser tudo isso?  
Bancar o pequeno não ajuda o mundo. Não há nada de brilhante em  
encolher-se para que as outras pessoas não se sintam inseguras em torno  
de você.  
E à medida que deixamos nossa própria luz brilhar, inconscientemente  
damos às outras pessoas permissão para fazer o mesmo.”*

***Nelson Mandela***

## RESUMO

Micro-organismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas sem causar, aparentemente, danos a seus hospedeiros. Fungos endofíticos representam um importante grupo de fungos com potencial fármaco e biotecnológico e podem ser isolados de diversas plantas medicinais. A espécie vegetal *Eugenia jambolana* Lam. tem sido intensamente explorada química e biologicamente devido a seus usos populares e por apresentar diversas atividades biológicas. Logo, o estudo de fungos endofíticos, associados a esse espécie vegetal, apresenta-se como uma estratégia promissora na obtenção e identificação de substâncias potencialmente bioativas. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação química do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* Lam. Este endófito foi cultivado em pequena escala nos meio de cultura líquido (MDB) e sólido (Milho) e em escala ampliada no meio Czapek. O caldo foi separado dos micélios após 28 dias (meios líquidos) e 21 dias (meio sólido) por filtração e o filtrado foi submetido à partição líquido/líquido com AcOEt fornecendo, após a evaporação do solvente, os respectivos extratos brutos. Os extratos foram avaliados frente a produção metabólica por CCDC, CLAE-DAD e RMN de <sup>1</sup>H e também avaliados frente aos ensaios biológicos. Portanto para os extratos MDB, Milho Fr.CH<sub>3</sub>CN, Milho Fr. aquosa e Milho Fr.Hexânica, foram realizados ensaios antifúngico, antioxidante e anticolinesterásico, onde estes extratos demonstraram ser promissores. O extrato obtido em escala ampliada (Czapek) foi fracionado em cartucho SPE (extração em fase sólida), resultando em seis frações (Ss.C.Fr1- Ss.C.Fr6). Do estudo da fração Ss.C.Fr1 foi possível o isolamento de uma substância o Ácido fusárico (**1**) e a fração Ss.C.Fr3 resultou no isolamento de 6,7 dihidroxi-4,6 dimetil octanoato de metila (**2**), substância inédita. O extrato obtido em escala reduzida (Milho Fr.CH<sub>3</sub>CN) foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel de fase reversa (C18), resultando em oito frações (Ss.M. CH<sub>3</sub>CN Fr1 - Ss.M. CH<sub>3</sub>CN Fr8). O estudo da fração Ss.M. CH<sub>3</sub>CN Fr5 resultou no isolamento da substância 4-hidroximeleina (**3**). O estudo da fração Milho Fr.Aquosa-XAD resultou no isolamento de duas substâncias Timidina (**4**) e Adenosina (**5**). Portanto, o estudo químico com o fungo endofítico *Saccharicola* sp. resultou no isolamento de cinco substâncias puras. Sendo assim, este trabalho visou isolar substâncias potencialmente bioativas através da investigação dos extratos e frações de *Saccharicola* sp..

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

## ABSTRACT

Endophytic microorganisms, often bacteria and fungi systematically live within the plant without apparent harm their hosts. Endophytic fungi represent an important group of fungi with biotechnological potential and may be isolated from various medicinal plants. The plant species *Eugenia jambolana* Lam. has been intensively explored chemically and biologically due to its popular uses and it has several biological activities. Thus, the study of endophytic fungi associated with this plant species, presents itself as a promising strategy in obtaining or identifying potentially bioactive substances. Within this context, this study aimed to evaluate the chemical endophytic fungus *Saccharicola* sp. isolated from *Eugenia jambolana* Lam., encoded as Ej-c04. This endophyte was cultivated on a small scale to a liquid culture medium PDB solid Corn and enlarged scale for the Czapek medium. The broth was separated from the mycelium after 28 days (liquid media) and 21 days (solid medium) by filtration and the filtrate was subjected to liquid / liquid partition with ethyl acetate providing after evaporation of the solvent, their crude extracts. The extracts were evaluated against metabolic production by TLC, CLAE-DAD and <sup>1</sup>H NMR also evaluated and compared to the bioassay. So for MDB extracts, Fr.CH<sub>3</sub>CN Corn, aqueous Fr. Corn and Corn Fr.Hexânica, tests were performed antifungal, antioxidant and anticholinesterase where these extracts have shown promise. The extract obtained in enlarged scale (Czapek) was fractionated on SPE cartridge (solid phase extraction), resulting in six fractions (Ss.C.Fr1- Ss.C.Fr6). From Ss.C.Fr1 fraction was possible to isolate a substance fusaric acid (1) and Ss.C.Fr3 fraction resulted in the isolation of (2E, 4E) - 6,7 dihydroxy-4,6-dimethyl octanoate (2) novel substance. The extract obtained in small scale (Corn Fr.CH<sub>3</sub>CN) was subjected to fractionation column of silica gel reversed phase (C18) resulting in eight fractions (Ss.M. CH<sub>3</sub>CN- Fr1 - CH<sub>3</sub>CN Ss.M. Fr8). The study fraction Ss.M. CH<sub>3</sub>CN Fr5 resulted in the isolation of 4-hidroximeleina substance (3). The study of fraction Corn Fr. Aqueous -XAD resulted in the isolation of two substances Thymidine (4), adenosine (5). Therefore the chemical study of the endophytic fungus *Saccharicola* sp. resulted in the isolation of five pure substances Thus, this study aimed to isolate potentially bioactive substances through the investigation of extracts and fractions of *Saccharicola* sp..

**Keywords:** Endophytic fungi. *Eugenia jambolana* Lam. *Saccharicola* sp. Secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Exemplo de metabólitos secundários produzidos por fungos. ....	26
<b>Figura 2</b> - Exemplo de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos....	30
<b>Figura 3</b> - <i>Eugenia jambolana</i> Lam.....	31
<b>Figura 4</b> - Substâncias isoladas da espécie <i>Eugenia jambolana</i> . ....	33
<b>Figura 5</b> - Foto de <i>Saccharicola</i> sp. cultivado em MDB em placa de Petri. ....	33
<b>Figura 6</b> - Substâncias isolados de <i>Saccharicola</i> sp.....	34
<b>Figura 7</b> - Esquema do isolamento do endófito <i>Saccharicola</i> sp. ....	40
<b>Figura 8</b> - Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em diferentes meios líquidos. ....	42
<b>Figura 9</b> - Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em meio sólido (Milho). ...	43
<b>Figura 10</b> - Fracionamento do extrato bruto AcOEt produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em Czapek e isolamento das substâncias <b>1</b> , <b>2</b> .....	45
<b>Figura 11</b> - Fracionamento do extrato bruto produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em Milho fr. CH <sub>3</sub> CN e isolamento da substância <b>3</b> .....	46
<b>Figura 12</b> - Metodologia de fracionamento do Ext. bruto Milho fr. Aquosa- fr. metanólica e obtenção das substâncias <b>4</b> e <b>5</b> .....	47
<b>Figura 13</b> - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em MDB (peq. escala). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex <sup>®</sup> Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Schimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> . ....	51
<b>Figura 14</b> - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em Czapek (escala ampliada). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex <sup>®</sup> Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Schimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> . ....	51
<b>Figura 15</b> - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por <i>Saccharicola</i> sp. Milho fr. CH <sub>3</sub> CN em (peq. escala). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex <sup>®</sup> Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Schimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> . ....	52

<b>Figura 16</b> - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por <i>Saccharicola</i> sp. em Milho fr. aquosa (peq. escala). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> .....	52
<b>Figura 17</b> - Cromatogramas comparativos em gradiente exploratório dos extratos brutos de <i>Saccharicola</i> sp. nos meios de cultura líquidos e sólidos. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> λ = 254 nm.....	53
<b>Figura 18</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>Saccharicola</i> sp. em MDB peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz).....	54
<b>Figura 19</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do branco em MDB peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz).....	54
<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>Saccharicola</i> sp. em Czapek escala ampliada (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz).....	55
<b>Figura 21</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do branco em Czapek peq. escala (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	55
<b>Figura 22</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>Saccharicola</i> sp. em Milho fr. CH <sub>3</sub> CN peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz).....	56
<b>Figura 23</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do branco em Milho fr. CH <sub>3</sub> CN peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz). .....	56
<b>Figura 24</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>Saccharicola</i> sp. em Milho fr. Aquosa peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz).....	57
<b>Figura 25</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do branco em Milho fr. aquosa peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz). .....	57
<b>Figura 26</b> - Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância sequestradora de radicais livres usando o reagente de DPPH. ....	58
<b>Figura 27</b> - Avaliação qualitativa do potencial antioxidante dos extratos brutos com DPPH. ....	59
<b>Figura 28</b> - CCDC dos extrato bruto obtido de <i>Saccharicola</i> sp. condição cromatográfica (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH <sub>3</sub> Cl:MeOH extratos (3 e 4)). .....	60

<b>Figura 29</b> - Avaliação do potencial dos extratos contra <i>C. Cladosporioides</i> e contra <i>C. Sphaerospermum</i> .....	61
<b>Figura 30</b> - Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos. condição cromatográfica (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH <sub>3</sub> Cl:MeOH extratos (3 e 4))......	62
<b>Figura 31</b> - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg mL <sup>-1</sup> .....	63
<b>Figura 32</b> - Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp.....	65
<b>Figura 33</b> - Estrutura da substância <b>1</b> (Ácido fusárico).....	66
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600 MHz).....	68
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 150 MHz).....	69
<b>Figura 36</b> - Espectro de TOCSY-1D da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	70
<b>Figura 37</b> - Mapa de contorno de COSY da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz). ....	70
<b>Figura 38</b> - Mapa de contorno de HSQC da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz). ....	71
<b>Figura 39</b> . Mapa de contorno de HMBC da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	71
<b>Figura 40</b> - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância <b>1</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	72
<b>Figura 41</b> - Cromatograma da substância <b>1</b> . Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm.....	72
<b>Figura 42</b> - Curvas de UV da substância <b>1</b> . ....	73
<b>Figura 43</b> – Espectro de ESI-EM (+) da molécula protonada m/z 180,1018 ([M+H <sup>+</sup> ] da substância <b>1</b> . ....	73
<b>Figura 44</b> - Estrutura da substância <b>2</b> ( <i>2E</i> , <i>4E</i> ) 6,7 dihidroxi- 4,6 dimetil octanoato de metila.....	74
<b>Figura 45</b> - Estrutura do análogo 2a. ....	75
<b>Figura 46</b> - Principais correlações de COSY e HMBC da substância <b>2</b> .....	75
<b>Figura 47</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>2</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz) .....	77
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>2</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600 MHz .....	78
<b>Figura 49</b> . Mapa de contorno de HSQC da substância <b>2</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	79
<b>Figura 50</b> . Espectro de NOESY 1D da substância <b>2</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600 MHz.....	79
<b>Figura 51</b> - Mapa de contorno de COSY da substância <b>2</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz). ....	80
<b>Figura 52</b> - Mapa de contorno de HMBC da substância <b>2</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz). ....	80

<b>Figura 53</b> - Cromatograma da substância <b>2</b> . Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm.....	81
<b>Figura 54</b> - Curvas de UV da substância <b>2</b> .....	81
<b>Figura 55</b> - Espectro de ESI-EM (+) referente ao aduto de sódio m/z 237,1098 ([M+Na] <sup>+</sup> ) da substância <b>2</b> .....	81
<b>Figura 56</b> - Estrutura da substância <b>3</b> (4-hidroximeleina).....	82
<b>Figura 57</b> - Estrutura Parcial A da substância <b>3</b> .....	83
<b>Figura 58</b> . Principais correlações de COSY e HMBC da substância <b>3</b> .....	84
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>3</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	85
<b>Figura 60</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>3</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600MHz).....	86
<b>Figura 61</b> - Mapa de contorno de COSY da substância <b>3</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz). ....	87
<b>Figura 62</b> . Mapa de contorno de HMBC da substância <b>3</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	87
<b>Figura 63</b> - Espectro de TOCSY-1D da substância <b>3</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz).....	88
<b>Figura 64</b> - Espectro de ESI-EM (+) da molécula protonada m/z 195, 0650 ([M+H] <sup>+</sup> ) e o aduto de sódio m/z 217,0470 ([M+Na] <sup>+</sup> ) da substância <b>3</b> . ....	88
<b>Figura 65</b> . Mapa de contorno de HSQC da substância <b>3</b> (Metanol-d <sub>4</sub> , 600MHz). ....	89
<b>Figura 66</b> - Cromatograma da substância <b>3</b> . Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm.....	89
<b>Figura 67</b> - Curvas de UV da substância <b>3</b> .....	90
<b>Figura 68</b> - Estrutura da substância <b>4</b> (Timidina).....	90
<b>Figura 69</b> - Principais correlações de HMBC da substância <b>4</b> .....	91
<b>Figura 70</b> . Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>4</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 600MHz). ....	93
<b>Figura 72</b> - Mapa de contorno de COSY da substância <b>4</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 600MHz). ....	95
<b>Figura 73</b> . Mapa de contorno de HMBC da substância <b>4</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 600MHz). ....	95
<b>Figura 74</b> - Mapa de contorno de HSQC da substância <b>4</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 600MHz). ....	96
<b>Figura 75</b> - Cromatograma da substância <b>4</b> . Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm.....	96
<b>Figura 76</b> - Curvas de UV da substância <b>4</b> .....	97

<b>Figura 77</b> - Espectro de ESI-EM (+) da molécula protonada m/z 243,0974 ([M+H] <sup>+</sup> ) da substância <b>4</b> .....	97
<b>Figura 78</b> - Estrutura da substância <b>5</b> (Adenosina). .....	98
<b>Figura 79</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>5</b> (D <sub>2</sub> O, 600MHz). .....	100
<b>Figura 80</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>5</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 600MHz).....	101
<b>Figura 81</b> . Mapa de contorno de HMBC da substância <b>5</b> (D <sub>2</sub> O, 600MHz). .....	102
<b>Figura 82</b> - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância <b>5</b> (D <sub>2</sub> O, 600MHz).....	102
<b>Figura 83</b> - Espectro de TOCSY-1D da substância <b>5</b> (D <sub>2</sub> O, 600MHz).....	103
<b>Figura 84</b> - Mapa de contorno de HSQC da substância <b>5</b> (D <sub>2</sub> O, 600MHz). .....	103
<b>Figura 85</b> - Mapa de contorno de COSY da substância <b>5</b> (D <sub>2</sub> O, 600MHz). .....	104
<b>Figura 86</b> - Cromatograma da substância <b>5</b> . Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm.....	104
<b>Figura 87</b> - Curva de UV da substância <b>5</b> .....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp.....	36
<b>Tabela 2</b> - Equipamentos utilizados na execução do trabalho.....	39
<b>Tabela 3</b> - Massa dos extratos brutos em diferentes meios de cultivo de <i>Saccharicola</i> sp.....	43
<b>Tabela 4</b> - Fator de Retenção das substâncias que apresentaram inibição no crescimento dos fungos fitopatógenos (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH <sub>3</sub> Cl:MeOH extratos (3 e 4)).....	61
<b>Tabela 5</b> - Fator de Retenção das substâncias que apresentaram inibição da enzima acetilcolinesterase (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH <sub>3</sub> Cl:MeOH extratos (3 e 4)).....	62
<b>Tabela 6</b> - Cálculo da CI <sub>50</sub> para o extrato Milho fr. CH <sub>3</sub> CN. ....	63
<b>Tabela 7</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (Metanol-d <sub>4</sub> , 600 MHz) de <b>1</b> (δ em ppm e J em Hz). ....	67
<b>Tabela 8</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (Metanol-d <sub>4</sub> , 600 MHz) de <b>2</b> (δ em ppm e J em Hz). ....	76
<b>Tabela 9</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (Metanol-d <sub>4</sub> , 600 MHz) de <b>3</b> (δ em ppm e J em Hz). ....	84
<b>Tabela 10</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 600 MHz) de <b>4</b> (δ em ppm e J em Hz). ....	92
<b>Tabela 11</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, 600 MHz) de <b>5</b> (δ em ppm e J em Hz). ....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AChE	Enzima Acetilcolinesterase
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
D <sub>2</sub> O	Óxido de Deutério
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
ESI (+)	Espectrometria de massas – Ionização por electrospray
Ext.	Extrato
grad.	Gradiente
H <sub>2</sub> O	Água
Hex.	Hexano
HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IC50	Inibição de crescimento celular em 50%
ESI (+)	Chromatography Liquid-Spectrometry Mass
MDB	Meio de Batata e Dextrose
MeOH	Metanol
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
pág.	Página

PDA	Potato-Dextrose-Agar
Peq.	pequena
ppm	Partes por milhão
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Rotações por minuto
Sub	Substância
SPE	Solid Phase Extraction
Ss.C.Fr	<i>Saccharicola</i> sp. Czapek. Fração
Ss.M.CH <sub>3</sub> CN.Fr	<i>Saccharicola</i> sp. Milho. Acetonitrila. Fração
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of Flight (Tempo de voo)
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
[M+H] <sup>+</sup>	Molécula protonada
[M+Na] <sup>+</sup>	Aduto de sódio
<i>J</i>	Constante de acoplamento
s	Singleto
sl	Singleto Largo
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
Hz	Hertz
min.	Minutos
m	Multipleto
nm	Nanômetro
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
t	Tripleto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Produtos Naturais.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Fungos: uma visão geral .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Fungos Endofíticos .....</b>	<b>26</b>
1.3.1 Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos .....	28
<b>1.4 Espécie vegetal hospedeira: <i>Eugenia jambolana</i> Lam. ....</b>	<b>31</b>
<b>1.5 <i>Saccharicola</i> sp.....</b>	<b>33</b>
<b>2 OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Meios de cultivo do micro-organismo .....	36
3.1.2 Solventes	36
3.1.3 Cromatografia em Coluna.....	36
3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) .....	36
3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	37
3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Extração em Fase Sólida - Tubo de transferência (CLAE-SPE-TT). ....	38
3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C) .	38
3.1.8 Espectrometria de Massas.....	38
3.1.9 Equipamentos .....	39
<b>3.2 Métodos .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Obtenção da cepa fúngica .....	39
3.2.2 Obtenção dos extratos brutos produzidos por <i>Saccharicola</i> sp. em diferentes meios de cultivo líquido.....	40
3.2.3 Obtenção dos extratos brutos produzidos por <i>Saccharicola</i> sp. em meio sólido (milho) em escala reduzida. ....	42
3.2.4 Fracionamento do extrato bruto Czapek (escala ampliada).....	43
3.2.5 Fracionamento do extrato bruto milho Fr. CH <sub>3</sub> CN.....	45
3.2.6 Fracionamento do extrato bruto milho fr.Aquosa.....	46

3.2.7.1 Ensaio qualitativo com 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) .....	48
3.2.7.2 Avaliação da atividade antifúngica <sup>1</sup> .....	48
3.2.7.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica <sup>1</sup> .....	48
3.2.7.4 Avaliação da atividade antitumoral (citotóxicidade) <sup>2</sup> .....	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos em meios de cultura líquidos e sólidos de <i>Saccharicola</i> sp.....</b>	<b>50</b>
4.1.1 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos produzidos por <i>Saccharicola</i> sp. por CLAE-DAD.....	50
4.1.2 Perfil químico dos extratos brutos de <i>Saccharicola</i> sp. por RMN de <sup>1</sup> H.....	53
4.2.1 Ensaio Antioxidante (DPPH qualitativo).....	58
4.2.2 Ensaio Antifúngico utilizando os fungos fitopatogenos <i>C. cladosporioide</i> e <i>C. sphaerospermum</i> .....	59
4.2.2.1 Ensaio contra fitopatogênos .....	60
4.2.3 Ensaio Anticolinesterásico .....	61
4.2.4 Ensaio citotóxico .....	62
<b>4.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>Saccharicola</i> sp. ....</b>	<b>64</b>
4.3.1 Elucidação estrutural da substância 1 .....	66
4.3.2 Identificação estrutural da substância 2 .....	74
4.3.5 Identificação estrutural da substância 4 .....	90
4.3.6 Identificação estrutural da substância 5 .....	98
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Produtos Naturais

O estudo de produtos naturais (PN) constitui um dos mais importantes campos da ciência e a análise de compostos orgânicos e inorgânicos em PN tem ganhado considerável interesse nos últimos anos (ZHU et al 2013; THOLL et al, 2006; STASHENKO, 2008).

O termo "produtos naturais" é utilizado para definir metabólitos primários e secundários produzidos por um organismo, que na maioria dos casos funcionam como mecanismos de defesa contra herbívoros, micro-organismos, insetos e plantas concorrentes. Uma variedade de produtos naturais, principalmente a partir de fontes vegetais, tem sido usado por milhares de anos por uma fração significativa da população, e ainda são usados na área da saúde em muitos países ou regiões do mundo (MAJEED et al., 2012).

De acordo com a literatura, cerca de 50% dos fármacos de uso clínico colocado no mercado nos últimos 30 anos são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de PN. Para o tratamento do câncer e de doenças infecciosas, mais de 60% dos fármacos provêm de produtos naturais ou análogos sintéticos, o que evidencia o sucesso da química de PN e sua associação com síntese na descoberta de fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; GIDDINGS, 2013).

A habilidade da natureza em biossintetizar um conjunto excepcional de entidades químicas (EQ) torna a química de produtos naturais um constante reservatório para a descoberta de novos compostos, com potencial de exploração sem paralelos (HALABALAKI et al., 2014). Desde o final do século XIX até os dias atuais, gerações de pesquisadores aplicam esforços voltados à investigação de milhares de moléculas produzidas por organismos vivos, encorajando a sociedade ao uso de vários PN em diferentes frentes de aplicação (FIRN & JONES 2003). Dentro desse contexto os micro-organismos vêm representando uma prolífica fonte de novos compostos bioativos, em especial os fungos que são reconhecidos como fontes de novas substâncias com aplicações na medicina (anticancerígeno, antibióticos, antifúngicos humanos), na agricultura (controle biológico de pragas) e na indústria (agente biotecnológico) (GUO et al., 2008). Este fato têm despertado a atenção de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas para a busca de novos princípios ativos produzidos por micro-organismos.

Sendo assim, entre as fontes estabelecidas de produtos naturais, microrganismos provaram ser candidatos promissores para a produção de novas substâncias, bem como medicamentos comercializáveis (CRAGG; NEWMAN, 2013; DEMAINE, 2014).

### 1.2 Fungos: uma visão geral

Os fungos são um grupo grande, diverso e amplamente disseminado de microrganismos, bolores, cogumelos e leveduras. Aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram descritas, estimando-se a possibilidade de existirem até 1,5 milhões de espécies. Os fungos formam um grupo filogeneticamente distinto de outros organismos, são quimiorganotróficos, geralmente apresentando exigências nutricionais simples, sendo a maioria aeróbia (MADIGAN et al, 2010).

Em geral, os fungos podem se apresentar na forma de duas unidades morfológicas básicas: a leveduriforme e a hifa. Têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e, portanto necessitam de material orgânico para sobreviver, sendo a sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são produzidas por eles e degradam produtos como, celulose e amido. (AZEVEDO, 2010).

Representam um conjunto de organismos eucarióticos e são considerados como um grupo particularmente versátil. A capacidade de absorver e crescer em muitos substratos e de convertê-los em metabólitos secundários importantes é digno de nota. Essa capacidade metabólica versátil, tem atraído o interesse para os fungos em vista da sua aplicação potencial na química de produtos naturais (MORETTI; SARROCO, 2016).

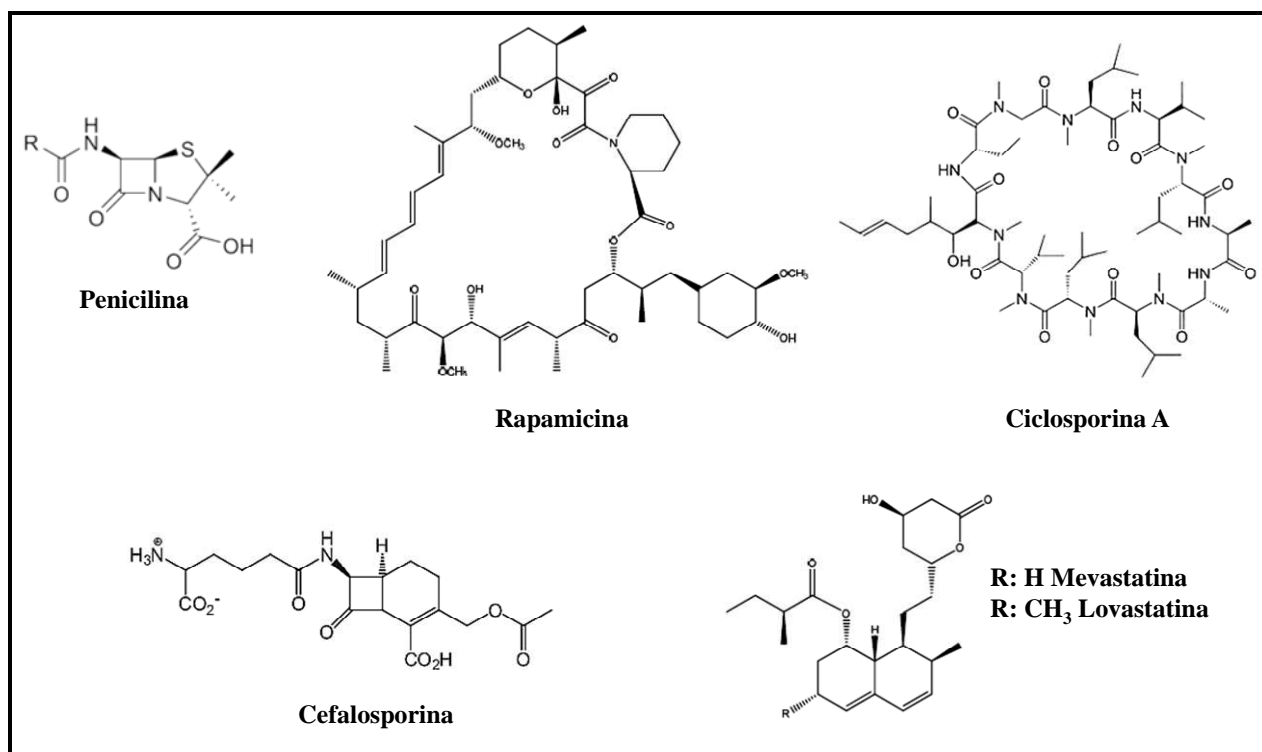
Alguns fungos são explorados pela indústria farmacêutica (humana e veterinária) e alimentícia devido ao potencial de produção de substâncias bioativas. Alguns são úteis na ciência como modelos eucariontes para o estudo da processos celulares, moleculares e genéticos (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*). Muitos oferecem prazer gustativo, seja diretamente (cogumelos comestíveis, trufas) ou indiretamente (pão, queijo, bebidas alcoólicas). Certos grupos de fungos são, intrigantemente, especializados e têm a capacidade de reter os nemotóides, formar relações simbióticas (líquens), nutrir ou proteger plantas (micorrizas e endofíticos).

A descoberta acidental da penicilina, por Fleming em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, levou a um acréscimo aos estudos investigativos dos fungos como fontes de produtos naturais (STROBEL et al., 2004). A partir do estudo químico destes organismos, ocorreu um grande avanço nas áreas dos antibióticos, imunossuppressores e medicamentos antineoplásicos. Alguns fármacos bem conhecidos e derivados de fungos são

os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossuppressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros (Figura 1).

Até o momento a descoberta de produtos naturais provenientes do universo microbiano apresenta-se praticamente inexplorada (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; KUSARI; SPITELLER, 2011) e dentro deste contexto os fungos em particular os endofíticos estão sendo vistos como a nova fonte de substâncias uteis na agricultura, indústria alimentícia e farmacêutica. (STROBEL; DAISY, 2003).

**Figura 1** - Exemplo de metabólitos secundários produzidos por fungos.



Fonte: Bertrand et al. (2014, p. 1182) e Valli et al. (2012, p. 2278)

### 1.3 Fungos Endofíticos

Os micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) que os definiu como todos os micro-organismos (incluindo fungos, bactérias, cianobactérias, e actinomicetos) que residem dentro dos tecidos vegetais.

Os endofíticos representam uma pequena fração de cerca de 100.000 espécies de fungos conhecidos. Estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem na terra, cada uma hospede no interior de seus tecidos um ou mais fungos endofíticos (CHOWDHARY et al., 2012).

Endofitismo é assim, uma associação única de custo/benefício, planta/micróbico definido por “localização” (não função), que é transitória, assintomática, e é estabelecido inteiramente dentro dos tecidos da planta hospedeira sem causar qualquer prejuízo aparente (KUSARI et al., 2012).

Os endófitos estão associados às raízes, caules, folhas, flores, frutos de plantas. Eles se diferenciam dos micro-organismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. Distinguem-se dos micro-organismos epifíticos, que residem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Logo, um endófito, coloniza o interior de uma espécie hospedeira de acordo com as condições ambientais e o próprio estado fisiológico da planta podendo ser considerado um patógeno latente. Assim, a natureza da associação entre os fungos endofíticos e seus hospedeiros varia de parasitismo ou antagonismo a comensalismo ou simbiose (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010). Sendo que a associação simbiótica é a relação que confere vantagens para ambos os organismos.

Nas associações simbióticas o endófito acaba produzindo ou induzindo a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros micro-organismos. Por outro lado eles são capazes de sequestrar os metabólitos produzidos pelas plantas que irão atuar como defesa química, ou produzi-los em resposta à pressão exercida por outros micro-organismos endofíticos ou fitopatogênicos ou até mesmo por predadores (KAUL, 2012; CHANDRA, 2012). Dois tipos principais de interações simbióticas (planta-fungo) são observados: relações mutualísticas e antagonísticas.

As relações mutualísticas são as que garantem a sobrevivência do fungo pela absorção de alimentos fornecidos pela planta, e do hospedeiro pela proteção contra insetos, animais ou patógenos, garantida por substâncias de defesa produzidas pelos endófitos. Já as antagonísticas são as que ocorrem um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta. Esta balança é dinâmica e pode ser alterada sob condições de stress do hospedeiro ou alterações fisiológicas em um dos organismos envolvidos (SCHULZ et al., 2005).

Há propostas que a relação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira é bem mais complexa. Um fungo endofítico, por exemplo, pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um micro-organismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por um determinado período, causando ou não danos à mesma.

Em geral, os micro-organismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endofíticos são as raízes; a emergência de raízes secundárias laterais sempre é acompanhada por uma “ferida”, que serve de entrada para os micro-organismos. O próprio crescimento das raízes, penetrando o solo, gera abrasões que facilitam a entrada de germes (MELO; AZEVEDO, 1998).

A infecção também pode ocorrer verticalmente, pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida. O modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não-sistêmica) essa interação tende ser antagônica. Uma vez no hospedeiro, o endófito permanece geralmente em um estado latente por toda sua vida, ou por um período prolongado até que as condições ambientais lhe sejam favoráveis. Neste caso, o endófito pode assumir uma função de patogênica (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

A presença dos endofitos pode alterar o metabolismo de muitas plantas. Alguns endofitos produzem enzimas, como as celulasas e ligninases que auxiliam na degradação das folhas, hormônios de plantas, metabólitos secundários, ou até mesmo melhorar a fotossíntese (SANCHEZ- AZEFEIFA et al., 2012).

Nas últimas décadas, os fungos endofíticos têm atraído especial atenção no setor da agricultura e na indústria, particularmente alimentícia e farmacêutica por muitas razões, mas, em especial por terem sido isolados de, praticamente, todas as espécies de plantas estudadas, como, musgos, samambaias, coníferas, angiospermas, gramíneas, palmeiras, e uma variedade de dicotiledôneas (ARNOLD, 2007).

Dentro deste contexto novos micro-organismos endofíticos podem ser encontrados dentre as milhares de plantas nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se portanto numa fonte rica, de diversidade genética e, possivelmente, de novos produtos naturais

### *1.3.1 Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos*

Metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos, isolados a partir de plantas superiores, são um grande foco de pesquisa de produtos naturais. De particular interesse são os fungos endofíticos, que são capazes de sobreviver em condições extremas, como seca, salinidade, calor ou a frio, e com uma variedade de organismos concorrentes, que vivem em

seus ambientes naturais. Variações químicas são necessárias, entre outros, para que estes organismos possam obter benefícios evolutivos.

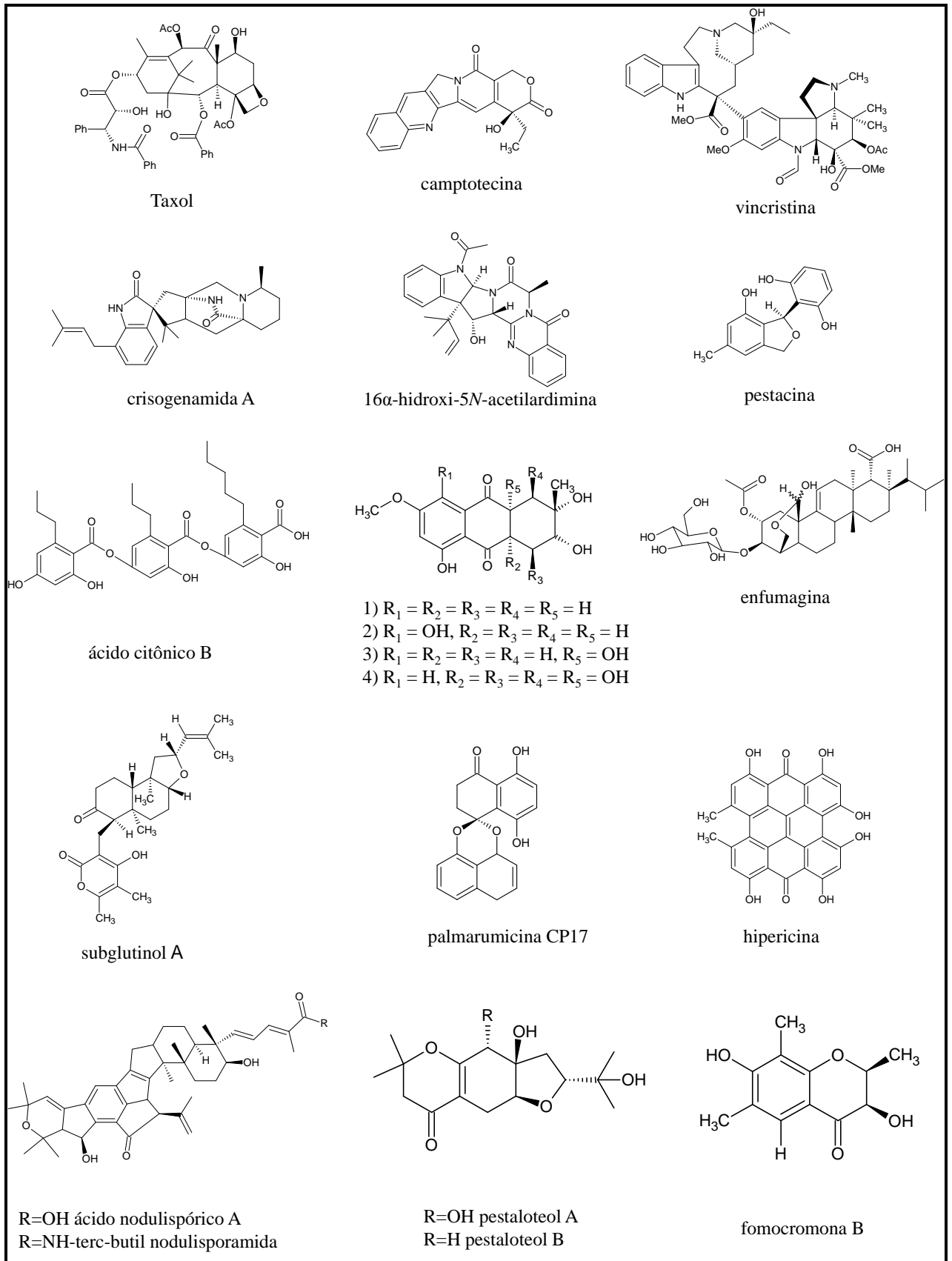
A produção metabólica varia de acordo com o meio de cultivo em que o microrganismo está inoculado, de modo que a diferença dos tipos de nutrientes presentes em cada meio altera a eficiência das vias do metabolismo e resulta na produção de diferentes substâncias (KHARWAR et al., 2011). Essas vias biossintéticas ainda não se apresentam completamente definidas, mas estudos verificam a produção de alcaloides, esteroides, cromonas, isocumarinas, quinonas, lignanas, compostos fenólicos, terpenoides, xantonas, benzopiranonas, entre outros (KAUL et al., 2012; ZHANG et al., 2006; KHARWAR et al., 2011).

Estudos demonstram que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas (ARNOLD, 2007; JALGAONWALA et al., 2011; ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011, ALY et al., 2010; GREVE et al., 2010). Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol<sup>®</sup>, um importante fármaco anticancerígeno, pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância.

Apesar de poucos estudos químicos dos fungos endofíticos, foi isolado um número considerável de substâncias com atividade biológica, como por exemplo, com atividade antiparasitária, a palmarumicina CP17 (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; ONDEYKA et al., 1997), com atividade neuroprotetiva; a crisogenamida A, (ALY et al., 2010), antioxidante; a pestacina (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAM, 2011), propriedades imunossupressoras; a subglutinol A (STROBEL; DAISY, 2003), antiviral; ácido citônico B (STROBEL; DAISY, 2003; GUO et al., 2000). Foram relatos também substâncias com atividade anticolinesterásica; 16 $\alpha$ -hidroxi-5N-acetilardimina (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011), antineoplásicos, as antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006), citotóxica como o taxol, camptotecina, vincristina e podofilotoxina (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; ALY et al., 2010) antifúngica; a fomocromona B (AHMED, 2011), e por fim, antibióticos; pestaloteol A e antidepressivos, como a hipericina (KUSARI, 2011) (Figura 2).

Estas evidências têm atraído a atenção dos químicos de produtos naturais e de biólogos, conforme indicado pelo aumento constante de publicações dedicadas a este tema nos últimos anos.

Figura 2 - Exemplo de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.



#### 1.4 Espécie vegetal hospedeira: *Eugenia jambolana* Lam.

Figura 3 - *Eugenia jambolana* Lam



Fonte: próprio autor

A família Myrtaceae compreende cerca de 75 gêneros e 3.000 espécies. Apresenta ampla distribuição, ocorrendo, preferencialmente, nas zonas tropicais e subtropicais, e é considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira em função da larga ocorrência de espécies comestíveis e/ou usadas na medicina tradicional.

*Syzygium cumini* (*S. cumini*) (L.) Skeels é um das melhores espécie conhecida e é muito frequentemente cultivada. Os sinônimos de *S. cumini* são *Eugenia jambolana* Lam., *Myrtus cumini* Linn., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Calyptranthes jambolana* Willd., *Eugenia cumini* (Linn.) Druce. and *Eugenia caryophyllifolia* Lam.(AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). Conhecida no Brasil como jabolão (Figura 3) (BALIGA et al., 2011), é conhecida também como cereja, jalão, kambol, jambú, azeitona-do-nordeste, ameixa roxa, murta, baga de freira, guapê, jambuí, azeitona-da-terra, entre outros nomes (VIZZOTO; FETER, 2009; VASI; AUSTIN, 2009), sendo uma grande árvore perene nativa da Índia. No entanto, hoje essas árvores são encontradas crescendo em todo subcontinente asiático, África Oriental, América do Sul, Madagascar e também naturalizada para as regiões mais quentes do Estados Unidos da América (Flórida e Havaí) (LI et al., 2009). É de grande interesse pelas aplicações medicinais sendo usada na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, e acidente vascular cerebral.

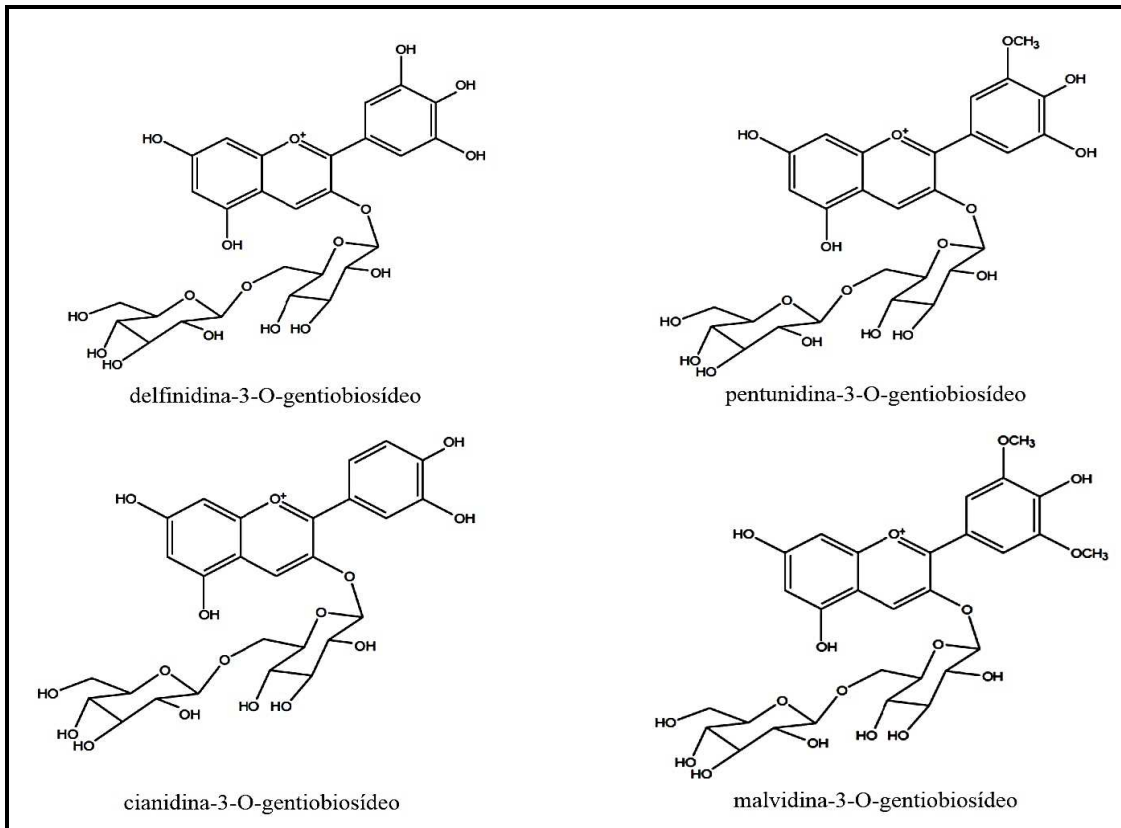
*Eugenia jambolana* é utilizada em outros tratamentos, a casca é carminativo, digestiva, antidiabética, anti-helmíntica e antibacteriana. As folhas possuem propriedade

antibacteriana e são usadas para reforçar dentes e gengivas. As folhas têm sido também extensivamente usadas para tratar diabetes, constipação, febre, gastropatia e dermopatia (SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

No caule é reportado a presença de friedelina, friedelina-3- $\alpha$ -ol, ácido betulínico,  $\beta$ -sistosterol,  $\beta$ -sistosterol-*D*-glicosídeo, kaempferol, kaempferol-3-glicosídeo, ácido gálico, ácido elágico, galotanino, elagitanino, quercetina e miricetina (BALIGA et al., 2011; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

Os frutos são comestíveis e utilizados como adstringente, estomáquico, diurético e antidiabético (TIMBOLA et al., 2002). Extratos do fruto apresentaram forte atividade antioxidante devido à presença de vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas (BANERJEE; DASGUPTA, 2005).

Estudo realizado por Dametto (2010) com os frutos de *E. jabolana* permitiu a identificação de antocianinas mono e diglicolisadas nos extratos brutos do fruto maduro de *E. jabolana*: delfinidina-diglicosídeo, cianidina-diglicosídeo, petunidina-diglicosídeo, malvidina-diglicosídeo, delfinidina-glicosídeo, cianidina-glicosídeo, petunidina-glicosídeo e malvidina-glicosídeo. Estudos preliminares com os extratos e frações dos frutos e folhas de *E. jabolana* mostraram que esta espécie apresenta elevada ação sequestradora de radicais livres e quimiopreventiva, atividade antimalárica, antifúngica contra patógenos-humanos e anticolinesterásica.

**Figura 4** - Substâncias isoladas da espécie *Eugenia jambolana*.

Fonte: Dametto (2010)

### 1.5 *Saccharicola* sp.

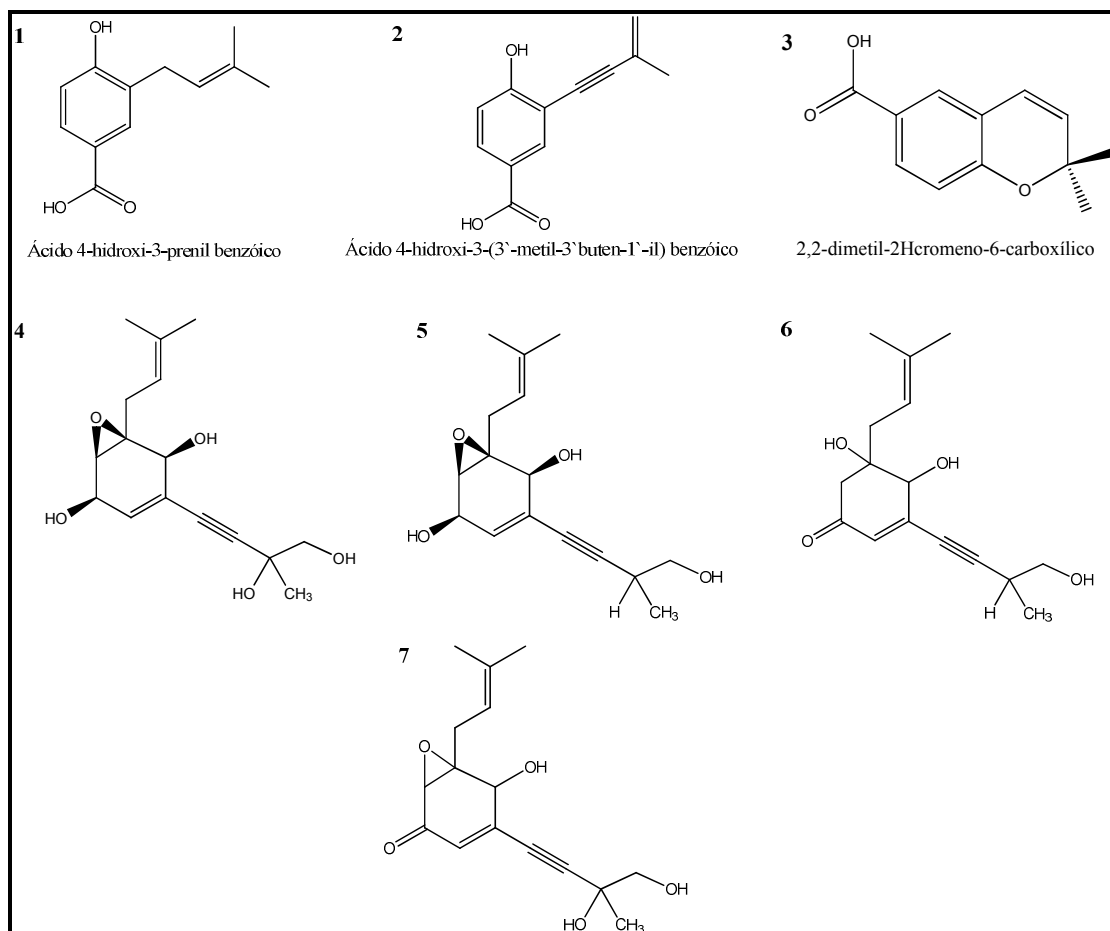
**Figura 5** - Foto de *Saccharicola* sp. cultivado em MDB em placa de Petri.

Fonte: próprio autor

*Saccharicola* é um gênero de fungo pertencente à família Massarinaceae. Esse gênero surgiu para re-classificar duas espécies fitopatogênas encontradas em cana-de-açúcar, *Leptosphaeria bicolor* e *Leptosphaeria taiwanensis*, como *Saccharicola bicolor* e *Saccharicola taiwanensis*, respectivamente (ERIKSSON; HAWKSWORTH, 2003).

Não haviam relatos na literatura de estudos químicos com esse fungo endofítico até os estudos realizados pela Dr. Vanessa Mara Chapla no seu projeto de doutorado. Portanto de estudos prévios realizados por ela com o extrato Czapek, produzido pelo fungo endofítico *Saccharicola* sp., foram isoladas sete substâncias numeradas de **1-7** (Figura 6), sendo que as substâncias **4-7** são ciclohexanóis oxigenados inéditos (CHAPLA, 2013). Os compostos **4-7** são inéditos e pertencem a classe dos cicloexanóis oxigenados, contendo epóxidos, esses compostos têm sido isolados de bactérias, fungos, moluscos e plantas superiores. Estes têm estimulado diversos trabalhos de síntese devido às atividades, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e fitotóxica, relatadas (JIANG et al., 2009; BARROS; MAYCOK; VENTURA, 2000). Tais resultados nos indicaram a necessidade do re-cultivo deste micro-organismo, pois os extratos produzidos por *Saccharicola* sp. demonstram-se interessantes devido a várias atividades biológicas apresentadas, como também observando o perfil químico dos extratos foi possível notar uma produção metabólica bastante versátil e produção de substâncias com várias atividades biológicas (CHAPLA, 2013).

**Figura 6** - Substâncias isolados de *Saccharicola* sp.



Fonte: CHAPLA (2013)

## 2 OBJETIVOS GERAIS

Prospecção química e biológica dos extratos produzidos por *Saccharicola* sp., isolado de *Eugenia Jambolana*.

### 2.1 Objetivos Específicos

1. Cultivo do fungo endofítico *Saccharicola* sp. em meio sólido BDA (Batata Dextrose Ágar), para inoculação em meios de cultivo líquido e sólido;
2. Cultivo de *Saccharicola* sp. em escala ampliada no meio líquido Czapek;
3. Cultivo de *Saccharicola* sp. em pequena escala nos meios líquido (2700,0 mL) (MDB), e sólido (90,0 g) (milho) para obtenção dos extratos brutos;
4. Análise e comparação do perfil químico dos extratos brutos obtidos em pequena e escala ampliada por técnicas cromatográficas (CLAE-DAD) e espectrométricas (RMN de  $^1\text{H}$ );
5. Avaliação dos extratos brutos (escalas pequena e ampliada) frente às atividades antioxidante, anticolinesterásica, citotóxica e antifúngica contra fitopatógenos ;
6. Fracionamento dos extratos brutos obtidos em Czapek e Milho (escala ampliada e reduzida) de *Saccharicola* sp.;
7. Isolamento e identificação ou determinação estrutural das substâncias produzidas por *Saccharicola* sp.;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Meios de cultivo do micro-organismo

**Tabela 1** - Meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo endofítico *Saccharicola* sp.

<i>Meios de Cultura</i>	<i>Tipo</i>	<i>[ g L<sup>-1</sup></i>	<i>Composição</i>	<i>Fabricante</i>
<b>MDB</b>	Líquido	24	Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g)	Acumedia
<b>Czapek</b>	Líquido	35	Sacarose (30 g), NaNO <sub>3</sub> (3 g), Na <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (1 g), MgSO <sub>4</sub> (0,5 g), KCl (0,5 g), FeSO <sub>4</sub> (0,01 g)	Acumedia
<b>BDA</b>	Sólido	39	Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g), Ágar (15 g)	Acumedia
<b>Milho (canjica)</b>	Sólido	-	90,0 g em 75,0 mL de água Milli-Q	Machiara

Fonte: próprio autor

##### 3.1.2 Solventes

Para a obtenção dos extratos brutos em pequena e escala ampliada e também para os fracionamentos, separações cromatográficas em coluna e em CLAE, foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol P.A, clorofórmio e acetonitrila das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt, QHEMIS e MTEDIA. Em análises em RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C utilizou-se os solventes DMSO, D<sub>2</sub>O, MeOH e CHCl<sub>3</sub> deuterados (Aldrich).

##### 3.1.3 Cromatografia em Coluna

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna aberta ou sob pressão, foram utilizadas colunas de vidro de diferentes comprimentos e diâmetros internos. As fases estacionárias utilizadas foram: sílica gel C-18 (Merck) e sílica gel de fase normal (0,060-0,200 mm, 6 nm de diâmetro de poro, ACROS organics).

##### 3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foi utilizada sílica gel 60 G F<sub>254</sub> (Merck). As placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placa de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente, através da utilização de espalhador Quickfit<sup>®</sup>. Após a preparação das placas essas

foram deixadas em repouso por cerca de 6 horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 120 °C por 120 minutos. As cromatoplasmas foram reveladas pela exposição à luz ultravioleta (254 e 366 nm) e nebulização com anisaldeído 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seguida de aquecimento a 120 °C até o surgimento de colorações correspondentes às substâncias presentes na amostra.

### *3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)*

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em dois equipamentos Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD):

- Analítico: duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A<sub>3</sub>, comunicadora CBM-20<sup>a</sup>, injetor automático SIL-20<sup>a</sup>, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno modelo CTO-20A.

- Analítico e Preparativo: duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático (modo analítico) SIL-10AF, detector de arranjos de diodos SPD-M20A.

O tratamento dos dados foi obtido utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

Foram utilizadas colunas C-18 Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico e coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10.00 mm; 5 µm; 100Å) no modo semi-preparativo. Para as análises em modo analítico, as amostras (3,5 mg) foram solubilizadas em 1mL de solução MeOH:H<sub>2</sub>O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplados em membrana Millipore® (0,2 µm). Para as análises em modo preparativo, as amostras também foram solubilizadas em solução MeOH:H<sub>2</sub>O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18, posteriormente, foram secas e diluídas em solução de MeOH:H<sub>2</sub>O de mesma polaridade que o início da corrida, e com um volume necessário para as amostras apresentarem uma concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Antes da injeção as amostras foram devidamente filtradas em membranas PTFE (0,22 µm). Cada injeção foi de 200 µL.

### 3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Extração em Fase Sólida - Tubo de transferência (CLAE-SPE-TT).

O sistema hifenado CLAE-SPE-TT (High Performance Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction - Transfer Tube) é composto por um extrator de fase sólida (SPE) como interface entre um CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução) e um transferidor e preparador automático de amostras de RMN (TT). A interface (Bruker) opera no modo stop-flow, utilizado o programa Hystar SPE para as medidas de CLAE, o trapeamento dos sinais selecionados, a transferência para cartuchos SPE e o preparo de amostras para tubos de RMN de maneira totalmente automatizada. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 µm). Após este procedimento, as amostras (10 mg mL<sup>-1</sup>) foram armazenadas em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise em LC-SPE-TT foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 30,0 µL e eluição em gradiente exploratório H<sub>2</sub>O:MeOH (90:10 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min.

### 3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C)

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram realizados em dois espectrômetros, Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,0 T e Bruker Ascend III 600 com campo magnético de 14,1 T. O TMS foi utilizado como referência interna. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados, CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), DMSO-d<sub>6</sub> ou CD<sub>3</sub>OD (Sigma-Aldrich), de acordo com suas solubilidades.

### 3.1.8 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo UltrOTOFG (ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics), operando no modo positivo. Os espectros de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massas Varian LC 1200L com injetor automático, triplo-quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

Para o controle do equipamento, aquisição e processamento dos dados será utilizado o software *Varian MS Workstation 6.8*.

### 3.1.9 Equipamentos

**Tabela 2** - Equipamentos utilizados na execução do trabalho.

<i>Equipamentos</i>	<i>Fabricante</i>
Autoclave vertical	Quimis Aparelhos Científicos Ltda
Câmara de vazão laminar	NUEIRE II, A/B3
Milli-Q	Millipore
Rotaevaporador	BUCHI
Balança analítica	Mettler Toledo AG 245

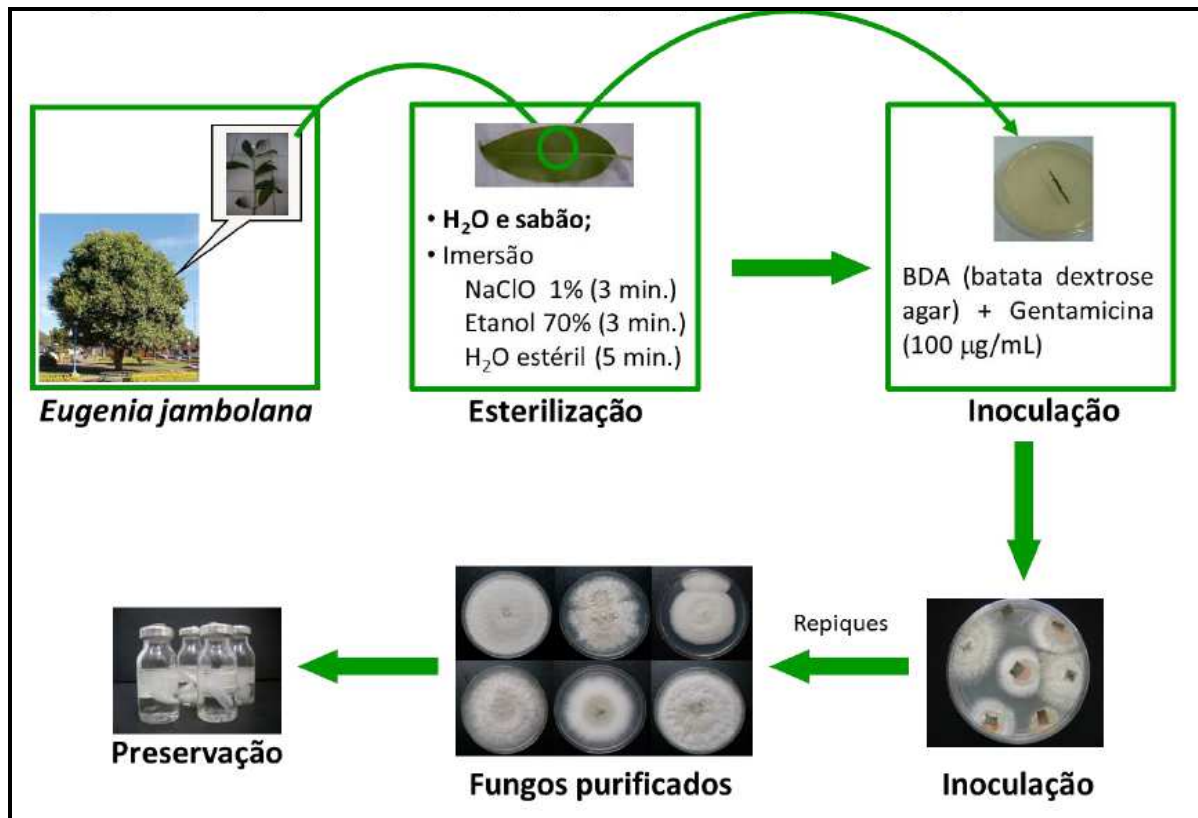
Fonte: próprio autor

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Obtenção da cepa fúngica

O fungo *Saccharicola* sp. foi isolado dos caules saudáveis de *Eugenia jambolana*\*. O procedimento de isolamento do endófito (Figura 7) iniciou-se com a lavagem da superfície do material vegetal com água e sabão, e esterilização por imersão em NaClO 1% (5 min.) e em etanol 70% (1 min.), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (10 min.) e posterior secagem (SILVA, 2005). Após o processo de esterilização, o caule foi seccionado assepticamente (3 a 4 de 0,5cm) e incubados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA) estéril. Após a esterilização em autoclave, foi adicionado o antibiótico sulfato de gentamicina ao meio de cultivo para inibir o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras. As linhagens foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme nas placas com os meios próprios, sendo posteriormente preservadas em slants contendo água estéril (método Castelani). Deste processo o fungo endofítico identificado como *Saccharicola* sp. foi isolado.

\*Realizado durante o trabalho de doutorado pela Dra Vanessa Mara Chapla.

**Figura 7** - Esquema do isolamento do endófito *Saccharicola* sp.

Fonte: Chapla (2013, p. 66)

O endófito *Saccharicola* sp. foi codificado como Ej-c4 no qual Ej significa a espécie vegetal *Eugenia jambolana*, c, significa o órgão do qual realizou-se o isolamento sendo neste caso o caule e o número 4 significa o ordem de isolamento dos endófitos.

### 3.2.2 Obtenção dos extratos brutos produzidos por *Saccharicola* sp. em diferentes meios de cultivo líquido.

O endófito *Saccharicola* sp. preservado em “slants” foi repicado em placas de Petri contendo PDA e incubado por 10 dias a 25 °C. A seguir, aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado nos meios líquidos (Czapek e MDB).

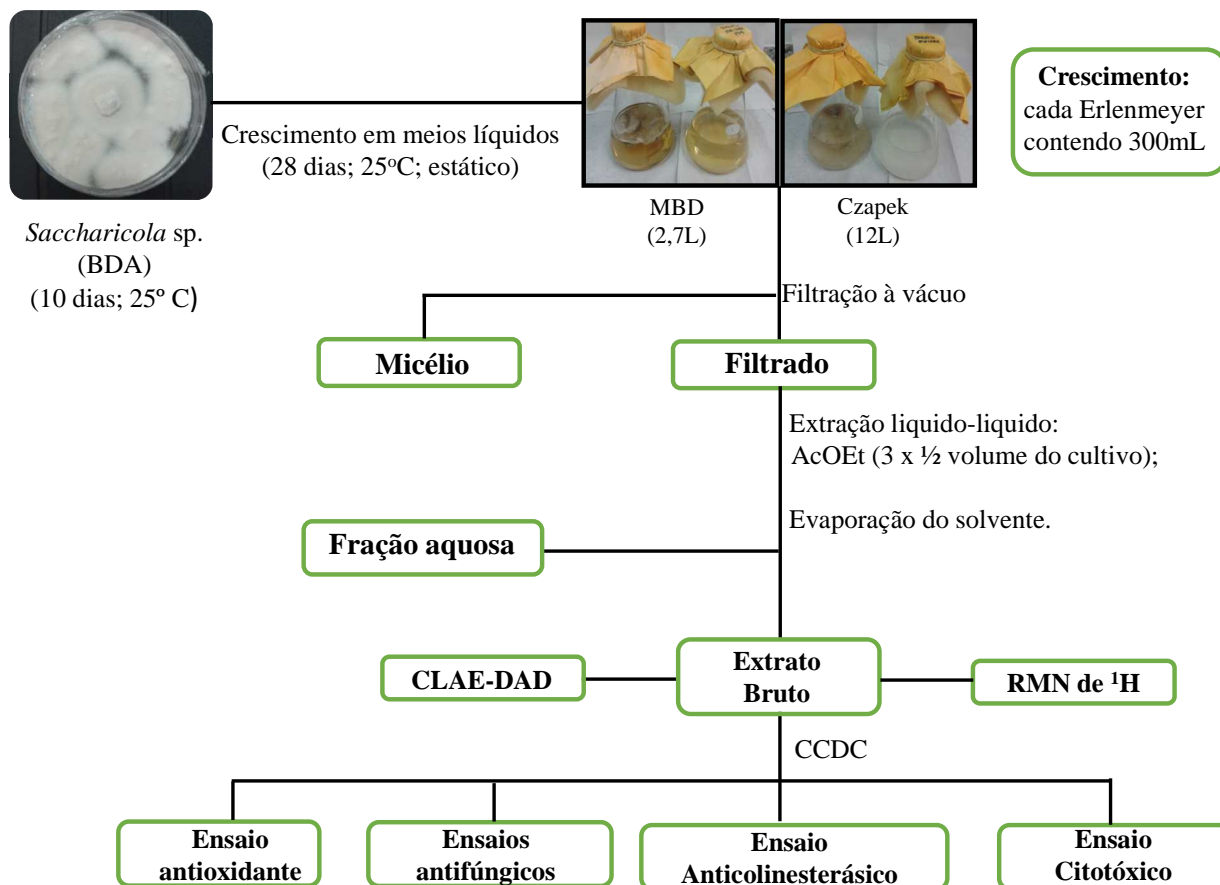
Para obtenção do extrato bruto em escala ampliada (meio Czapek) e reduzida (meio MDB), *Saccharicola* sp. foi cultivado em 40 frascos de Erlenmeyer (500 mL) 300mL em cada frasco, totalizando 12L de meio de cultura Czapek, e em 9 frascos de meio MDB (500 mL) 300mL em cada frasco, totalizando 2,7L de meio.

Após 28 dias de incubação no modo estático a 25°C, o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração à vácuo e submetido a partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 0,5

L). O solvente foi evaporado utilizando evaporador rotatório fornecendo 350 mg de extrato bruto Czapek e 163,5 mg de extrato MDB (Figura 8, Tabela 3). Paralelamente foi realizado o branco dos dois meios seguindo a mesma metodologia sem a inoculação de *Saccharicola* sp.

Os solventes recolhidos foram reutilizados nesta extração e após o término desta foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: <http://www.iq.unesp.br/Home/NormaseRegulamentos/normas-residuos.pdf>.

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos foram submetidos aos ensaios biológicos e à análise em RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD em gradiente exploratório. Antes das análises por CLAE-DAD as amostras foram solubilizadas em MeOH:H<sub>2</sub>O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore<sup>®</sup> (0,2  $\mu\text{m}$ ). Após este procedimento, as amostras (1,5 mg mL<sup>-1</sup>) foram armazenadas em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 30,0  $\mu\text{L}$  e eluição em gradiente exploratório H<sub>2</sub>O:MeOH (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., num vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e  $\lambda$  inicial de 254 nm até 800 nm.

**Figura 8** - Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em diferentes meios líquidos.

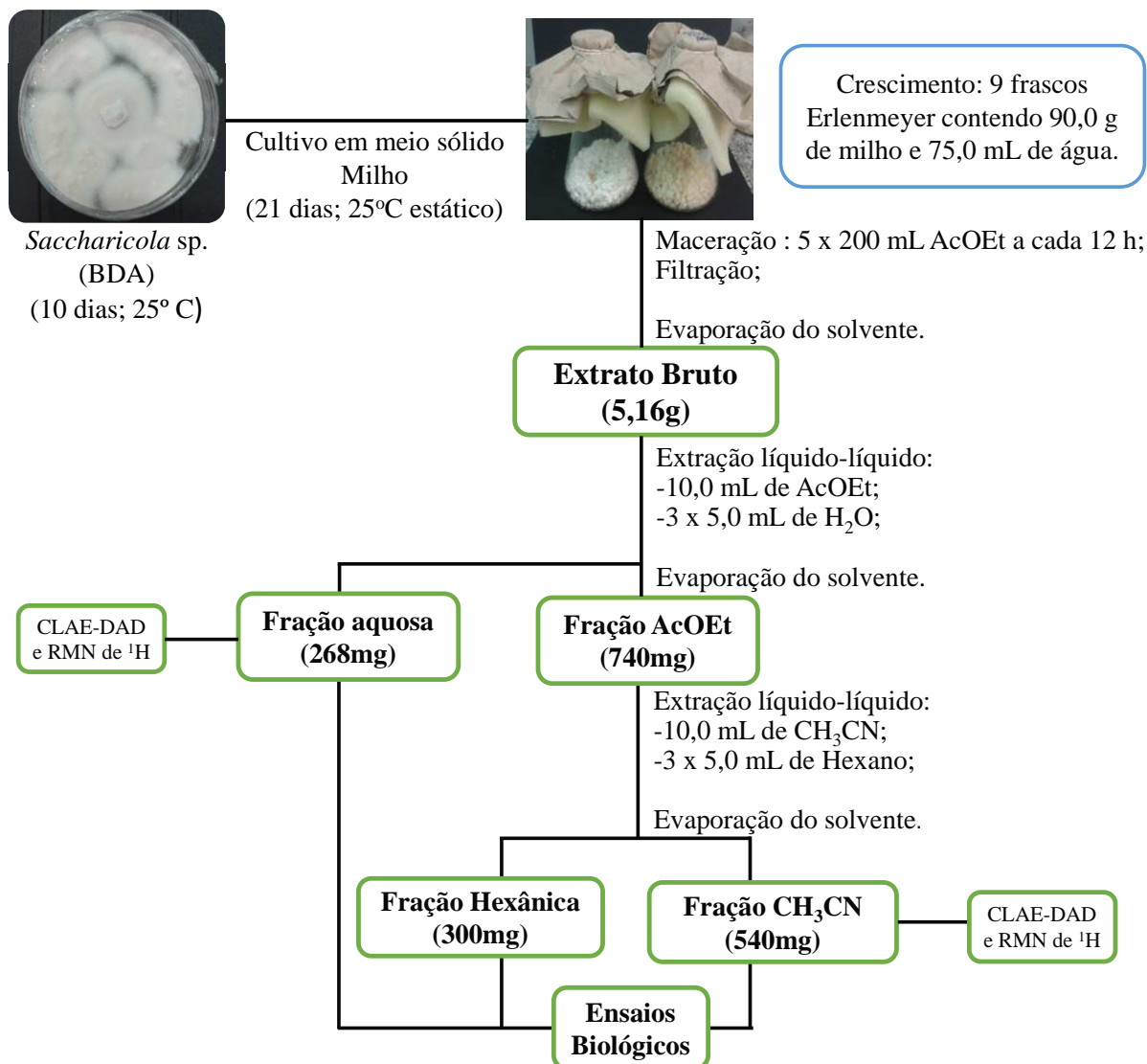
Fonte: próprio autor

### 3.2.3 Obtenção dos extratos brutos produzidos por *Saccharicola sp.* em meio sólido (milho) em escala reduzida.

Para obtenção do extrato bruto, em escala reduzida, no meio de cultivo milho, o fungo endofítico foi cultivado em frascos de Erlenmeyer (500,0 mL), contendo 90g de milho e 75,0 mL de água deionizada (9 frascos de Erlenmeyer). O meio foi previamente autoclavado durante três dias consecutivos, em intervalos de 24h a 121°C, por 20 minutos. A metodologia de extração está descrita na Figura 9 e os rendimentos dos extratos brutos segue na Tabela 3.

Todos os extratos brutos obtidos em meio sólido (Figura 9) em pequena escala foram submetidos aos ensaios biológicos e os extratos Milho fr. CH<sub>3</sub>CN, fr. Aquosa à análise em RMN de <sup>1</sup>H e CLAE-DAD em gradiente exploratório como descrito no item 3.2.2.

**Figura 9** - Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em meio sólido (Milho).



Fonte: próprio autor

**Tabela 3** - Massa dos extratos brutos em diferentes meios de cultivo de *Saccharicola* sp.

Meios de Cultivo	MDB	Czapek	Milho fr. CH <sub>3</sub> CN	Milho fr. aquosa	Milho fr. Hex
Massa obtida (mg)	163,5	350	540	268	300

Fonte: próprio autor

### 3.2.4 Fracionamento do extrato bruto Czapek (escala ampliada)

O extrato bruto AcOEt, obtidos do fungo *Saccharicola* sp., em Czapek (250 mg) foi submetido a fracionamento (Figura 10) utilizando cartucho de SPE (extração em fase sólida), como fase estacionária sílica de fase reversa C18 (1000 mg 6 mL<sup>-1</sup>, CHROMABOND®) e

como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente de H<sub>2</sub>O:MeOH (20-100%) e MeOH:AcOEt (50%).

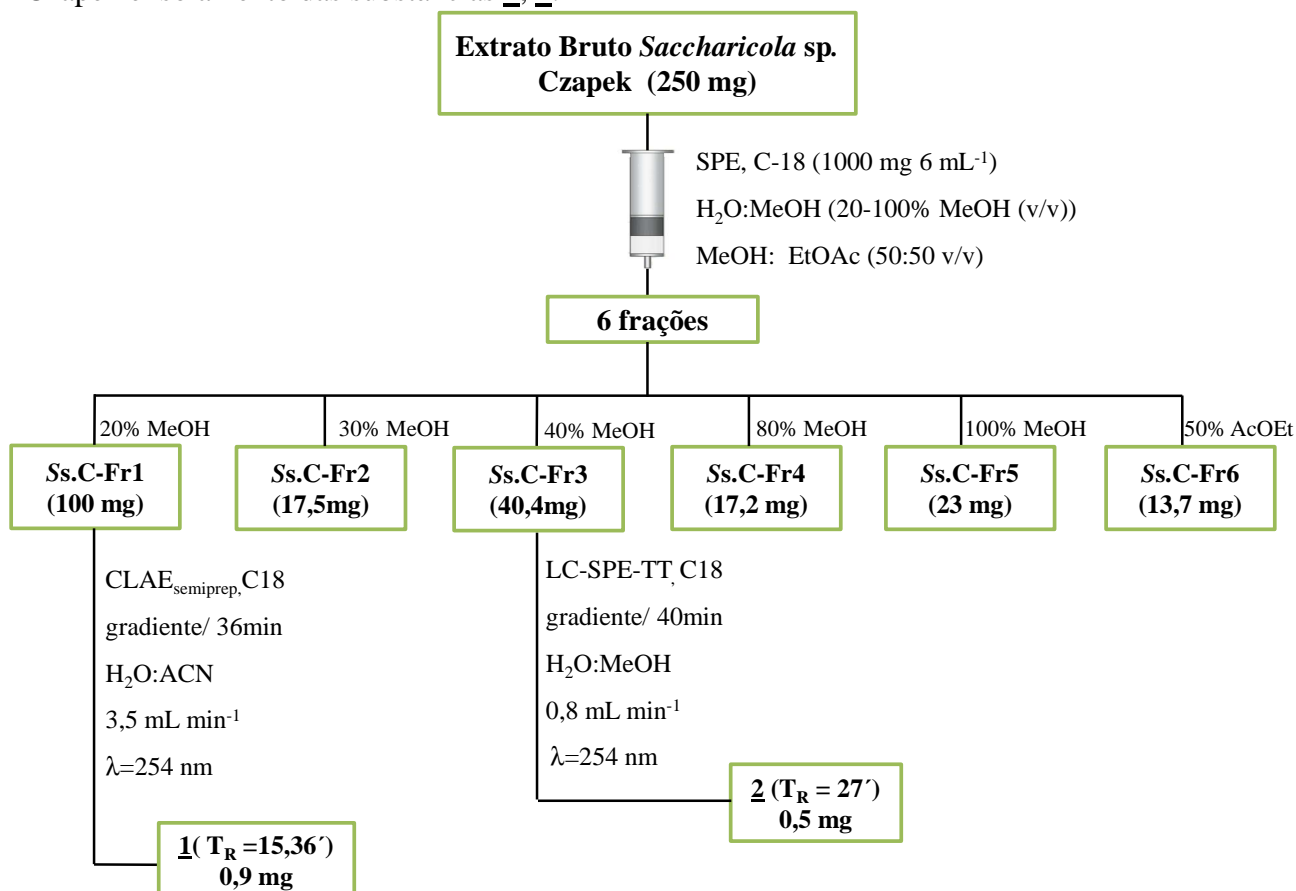
Para o fracionamento foram realizadas duas injeções de 125 mg aproximadamente, do extrato bruto, previamente solubilizada em um pequeno volume de solução (~1 mL MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 v/v) e aplicado nos cartuchos de SPE (obedecendo o limite de carga estabelecido pelo fabricante do suporte ou 1 mg para cada 10 mg de fase estacionária). Resultando em 6 frações (Ss.C-fr1 a Ss.C-fr6; 180,0 mL cada) como descrito na Figura 9. As frações obtidas foram submetidas a análise em RMN de <sup>1</sup>H e em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.

Após esta análise, realizou-se o estudo cromatográfico por CLAE-DAD das frações Ss.C-Fr1 e Ss.C-Fr3 para a elucidação de substâncias presentes.

**A fração Ss.C-Fr1 (100 mg):** após análise do perfil químico, foi submetida à separação por CLAE preparativo utilizando uma coluna Phenomenex Luna (250 x 10.00 mm; 5 µm; 100Å) no modo semi-preparativo e como eluente um gradiente de água:acetonitrila (90:10-0:100 v/v em 36 minutos) numa vazão de 3,5 mL min<sup>-1</sup> e λ=254 nm. Resultando no isolamento da substância **1** (Figura 10).

**A fração Ss.C-Fr3 (40,4 mg):** após análise do perfil químico, uma parte da fração (10mg) foi submetida à separação por CLAE utilizando a técnica de LC-SPE-TT e uma coluna Phenomenex Luna (250 x 10.00 mm; 5 µm; 100Å) no modo analítico e como eluente um gradiente de água:metanol (90:10-0:100 v/v em 36 minutos) numa vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e λ=254 nm. Resultando no isolamento da substância **2** (Figura 10).

**Figura 10** - Fracionamento do extrato bruto AcOEt produzido por *Saccharicola* sp. em Czapek e isolamento das substâncias **1**, **2**.



Fonte: próprio autor

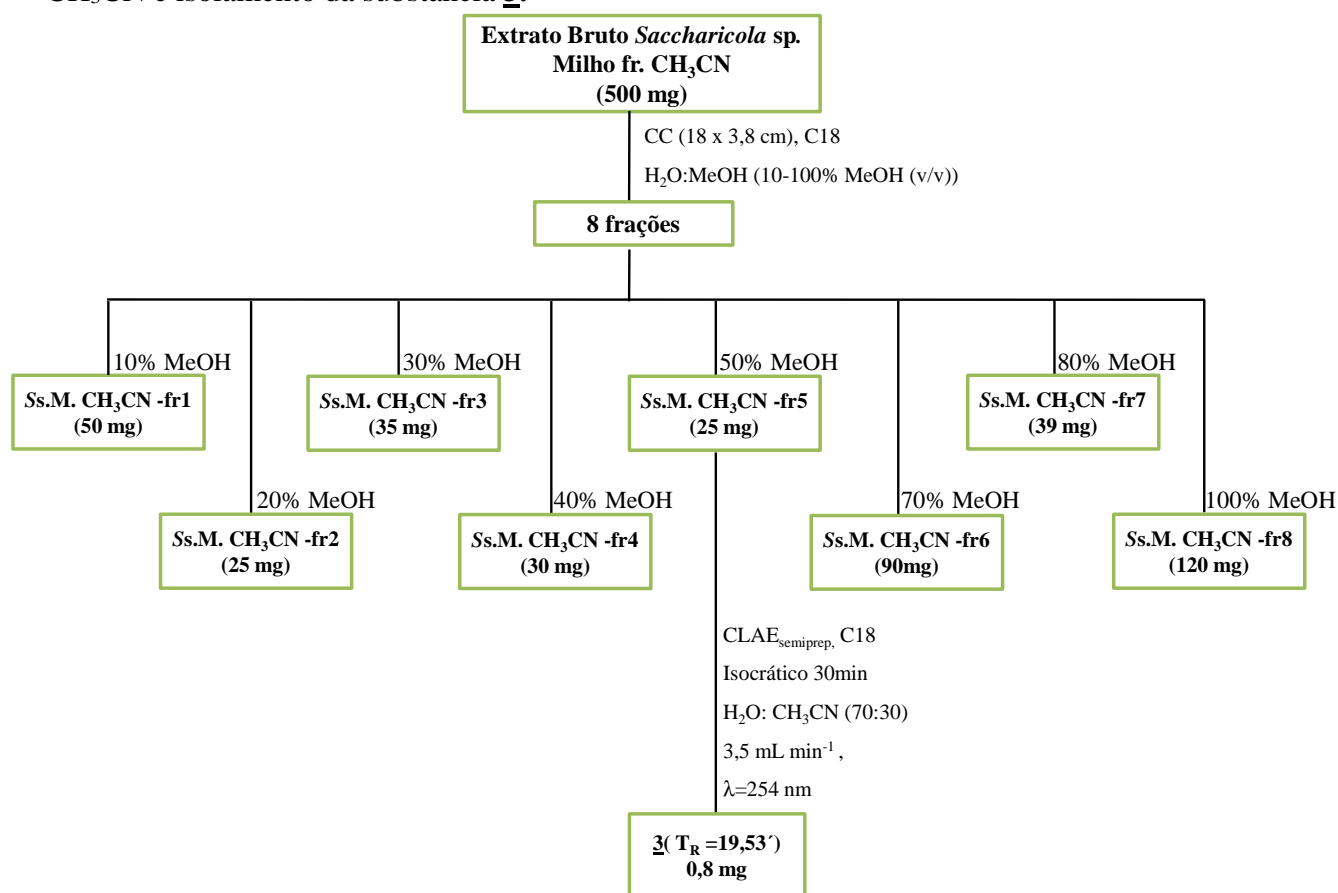
### 3.2.5 Fracionamento do extrato bruto milho Fr. CH<sub>3</sub>CN

A análise do perfil cromatográfico em CLAE-DAD do extrato bruto em escala reduzida em milho Fr. CH<sub>3</sub>CN (500mg) conduziu ao fracionamento deste extrato por cromatografia em coluna (18 cm de altura e 3,8 cm de diâmetro) sob pressão, utilizando como fase estacionária 95 g de sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (Figura 11), resultando em 8 frações (Ss.M. CH<sub>3</sub>CN -fr 1- Ss.M. CH<sub>3</sub>CN -fr 8) de 306,0 mL cada. Todas as frações por apresentaram potencial antioxidante como descrito no item 4.2.1, nos conduziram ao fracionamento cromatográfico objetivando o isolamento e determinação estrutural das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante apresentada nessas frações.

Após esta análise, realizou-se o estudo cromatográfico por CLAE-DAD da fração Ss.M. CH<sub>3</sub>CN -fr5 para a elucidação de substâncias presentes (Figura 11).

A fração **Ss.M. CH<sub>3</sub>CN-fr5 (25 mg)**: após análise do perfil químico, foi submetida à separação por CLAE preparativo utilizando uma coluna Phenomenex Luna (250 x 10.00 mm; 5 μm; 100Å) no modo semi-preparativo e como eluente um isocrático de água:acetonitrila (70:30-0:100 v/v em 30 minutos) numa vazão de 3,5 mL min<sup>-1</sup> e λ=254 nm. Resultando no isolamento da substância **3** (Figura 11).

**Figura 11** - Fracionamento do extrato bruto produzido por *Saccharicola* sp. em Milho fr. CH<sub>3</sub>CN e isolamento da substância **3**.



Fonte: próprio autor

### 3.2.6 Fracionamento do extrato bruto milho fr. Aquosa

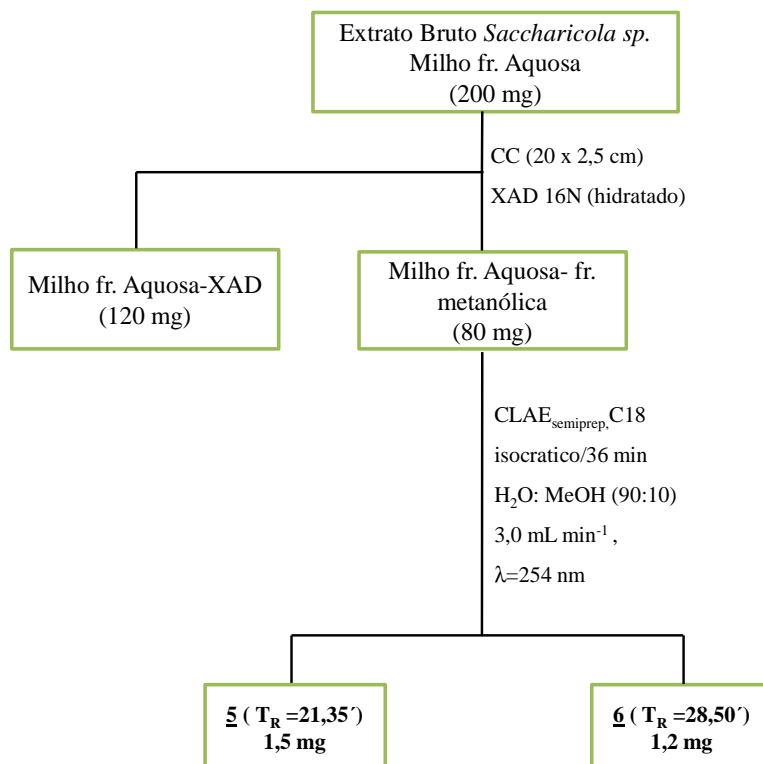
A análise do perfil RMN de <sup>1</sup>H evidenciou a necessidade de remoção de açúcares livres e outros compostos polares, antes do fracionamento do extrato bruto para a obtenção das substâncias presentes. Com isso 200 mg de extrato Milho fr. Aquosa foi diluída em 100% água e adicionada a uma coluna (20 x 2,5 cm) com 20 mg de Amberlite-XAD 16N, um adsorvente polimérico não iônico, hidratado com água destilada por um dia. Após a aplicação da amostra a coluna foi eluída duas vezes com 600mL de água destilada para a remoção dos

açúcares livres. Finalmente após a secagem da coluna foi realizada eluição com 300mL de metanol absoluto. A fração metanólica foi coletada, concentrada em rotaevaporador, fornecendo o respectivo extrato bruto Milho fr. Aquosa- fr. metanólica (80mg).

O extrato bruto milho fr. Aquosa- fr. metanólica após análise do perfil químico para identificação dos seus constituintes.

**O extrato bruto Milho fr. Aquosa- fr metanólica (80mg):** após análise do perfil químico, foi submetida à separação por CLAE preparativo utilizando uma coluna Phenomenex Luna (250 x 10.00 mm; 5 µm; 100Å) no modo semi-preparativo e como eluente um sistema isocrático de água:metanol (90:10 em 36 minutos) numa vazão de 3,5 mL min<sup>-1</sup> e λ=254 nm. Resultando no isolamento das substâncias **4** e **5** (Figura 12).

**Figura 12** - Metodologia de fracionamento do Ext. bruto Milho fr. Aquosa-fr. metanólica e obtenção das substâncias **4** e **5**.



Fonte: próprio autor

3.2.7 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e das substâncias produzidas por *Saccharicola* sp.

#### 3.2.7.1 Ensaio qualitativo com 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH)

O extrato bruto em pequena escala milho fr. CH<sub>3</sub>CN foi eluído com Hexano:AcOEt (70:30) em placas de sílica (CCDC) e nestas cromatoplasmas foi nebulizado uma solução púrpura 0,2% de DPPH em metanol (SIMOES-PIRES et al., 2005). As placas cromatográficas foram observadas após duas horas de exposição à luz artificial. O aparecimento de manchas brancas, evidencia a presença de substâncias com propriedades antioxidantes.

#### 3.2.7.2 Avaliação da atividade antifúngica<sup>1</sup>

Os extratos brutos (40 µg µL<sup>-1</sup>) foram eluídas em CCDC, sendo CHCl<sub>3</sub>:MeOH (85:15) para os extratos brutos Milho fr. Aquosa e MDB, Hexano:AcOEt (70:30) para os extratos brutos Milho fr. hexânica e Milho fr. CH<sub>3</sub>CN. As cromatoplasmas foram nebulizadas com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5x10<sup>7</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, em solução de glicose e sais). As placas foram incubadas a 25° C por 48 horas, na ausência de luz. Após este período verificou-se a presença de halos de inibição do crescimento dos fungos, em comparação com o padrão positivo nistatina (1 µg).

#### 3.2.7.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica<sup>1</sup>

Os extratos de interesse foram submetidos à constatação da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002), utilizando cromatoplasmas. Foram aplicados 100 µg dos extratos de interesse em uma cromatoplasma de sílica gel. A placa foi eluída com eluentes adequados (item 3.2.8) e, em seguida, borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (Solução A), após foi incubada em câmara úmida fechada, a 37°C por 2 minutos, e em seguida borrifada com uma solução D. Foi utilizado o padrão fisostigmina.

As substâncias que apresentaram atividade anticolinesterásica inibem a enzima acetilcolinesterásica, onde é observado o aparecimento de manchas brancas, em comparação com o fundo de coloração roxa da placa; estas manchas brancas são proporcionais à inibição da enzima acetilcolinesterase.

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

<sup>1</sup>Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

#### 3.2.7.4 Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)<sup>2</sup>

O ensaio se baseia na medida da absorbância do formazan formado após a metabolização do sal de MTT pelas células tumorais viáveis utilizando como controle positivo doxorrubicina (Mosmann, 1983).

Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e mama (MCF-7) cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino foram plaqueadas em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sal de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e a absorbância medida a 595 nm. A triagem inicial foi realizada utilizando duas concentrações das amostras para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento da célula tumoral (%GI). Para amostras que demonstraram inibição maior que 75%, o valor de  $CI_{50}$  é calculado por regressão não linear utilizando o GraphPadPrism 4.0 (Intuitive Software for Science).

<sup>2</sup>Ensaio realizado pela Dra. Evelyne Alves dos Santos no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha- Universidade Federal do Ceará.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos em meios de cultura líquidos e sólidos de *Saccharicola* sp.

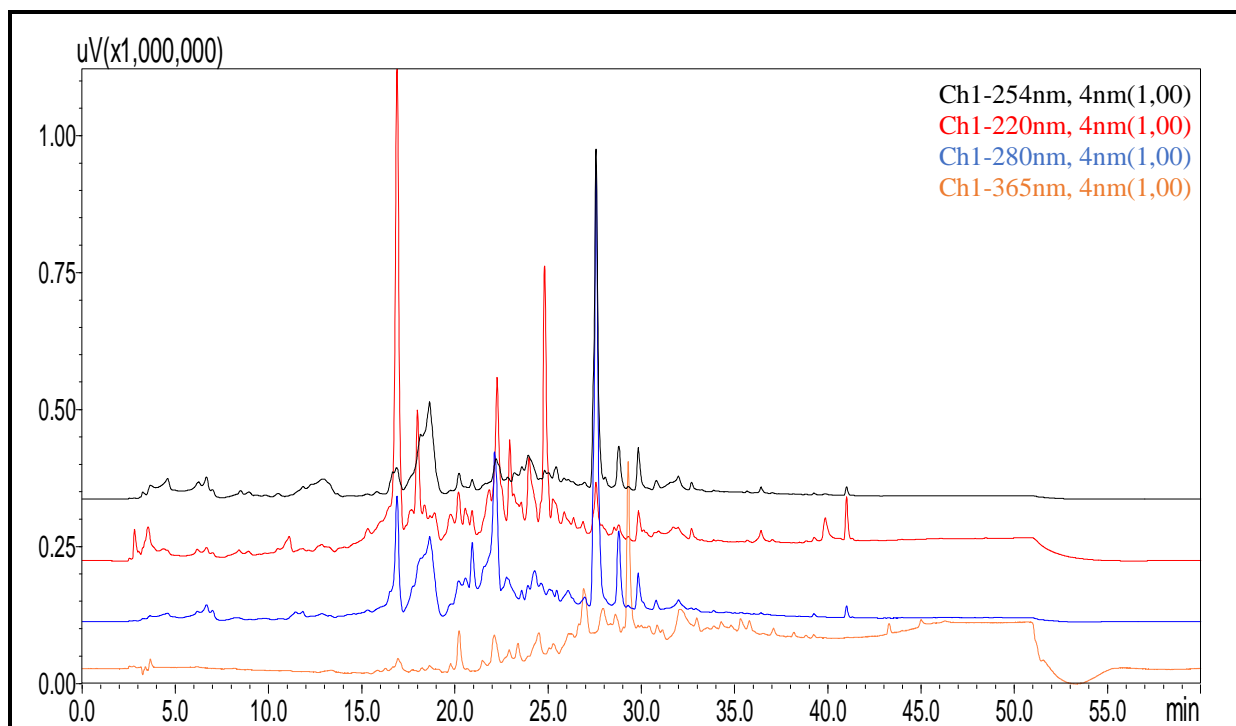
Com o objetivo de verificar a produção metabólica de *Saccharicola* sp., em diferentes meios de cultivo, foram selecionados dois meios líquidos comerciais (Czapek e MDB) e, um meio sólido (milho). De acordo com a definição da literatura o meio líquido Czapek é classificado como “quimicamente definido”, e os outros meios (MBD e Milho) podem ser classificados como “complexos”. Os extratos brutos obtidos conforme a metodologia (3.2.2 e 3.2.3) foram submetidos às análises em CLAE-DAD<sub>analítico</sub> e RMN de <sup>1</sup>H.

#### 4.1.1 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos produzidos por *Saccharicola* sp. por CLAE-DAD

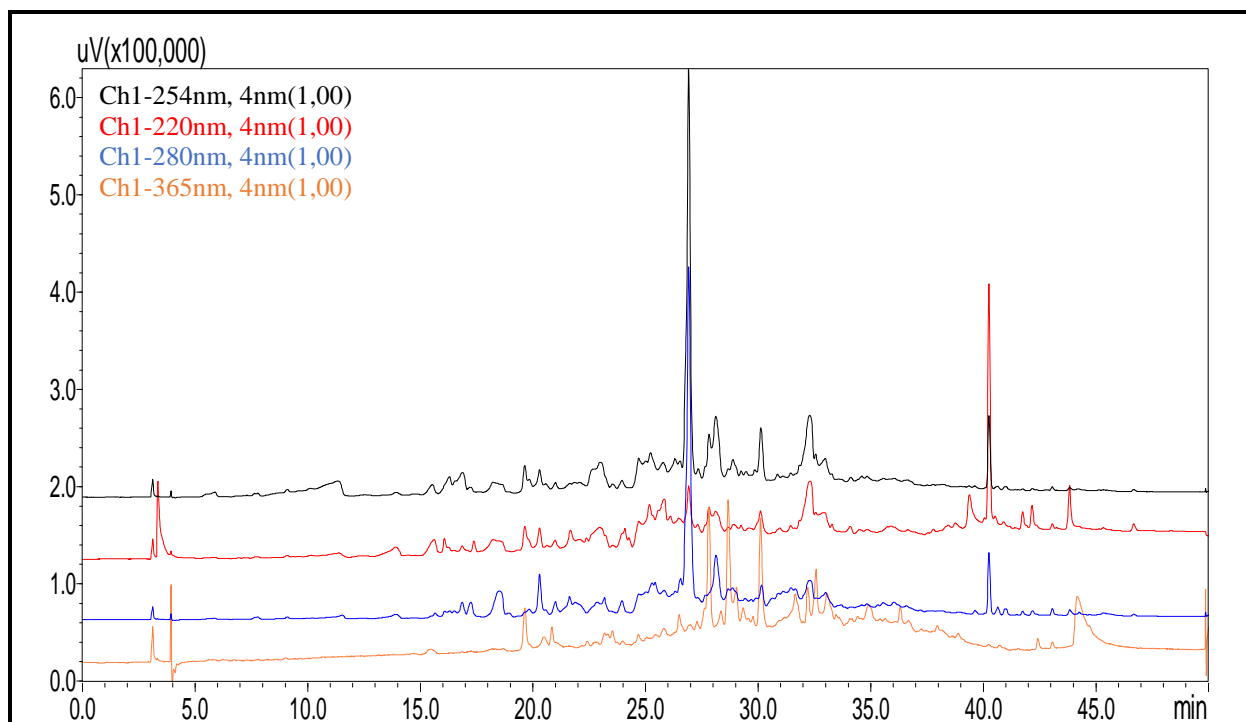
Os cromatogramas dos extratos brutos obtidos em MDB (163,5 mg) (Figura 13), Czapek (350 mg) (Figura 14), Milho fr. CH<sub>3</sub>CN (740 mg) (Figura 15), Milho fr. Aquosa (268 mg) (Figura 16), utilizando gradiente exploratório (CLAE-DAD) apresentaram além de substâncias com diferentes absorvâncias, várias substâncias com polaridades variando de média a alta, e boa resolução cromatográfica. Analisando-se com mais detalhes os cromatogramas dos extratos Milho fr. CH<sub>3</sub>CN e Milho fr. Aquosa, constatou-se a presença de inúmeras substâncias variando de baixa a alta polaridade, com absorvâncias e tempos de retenção distintos, evidenciando uma enorme diversidade metabólica.

Pôde-se observar a variação metabólica dos diferentes meios de cultivo em  $\lambda = 254$  nm (Figura 17), evidenciando uma quantidade significativa de picos por todo o cromatograma.

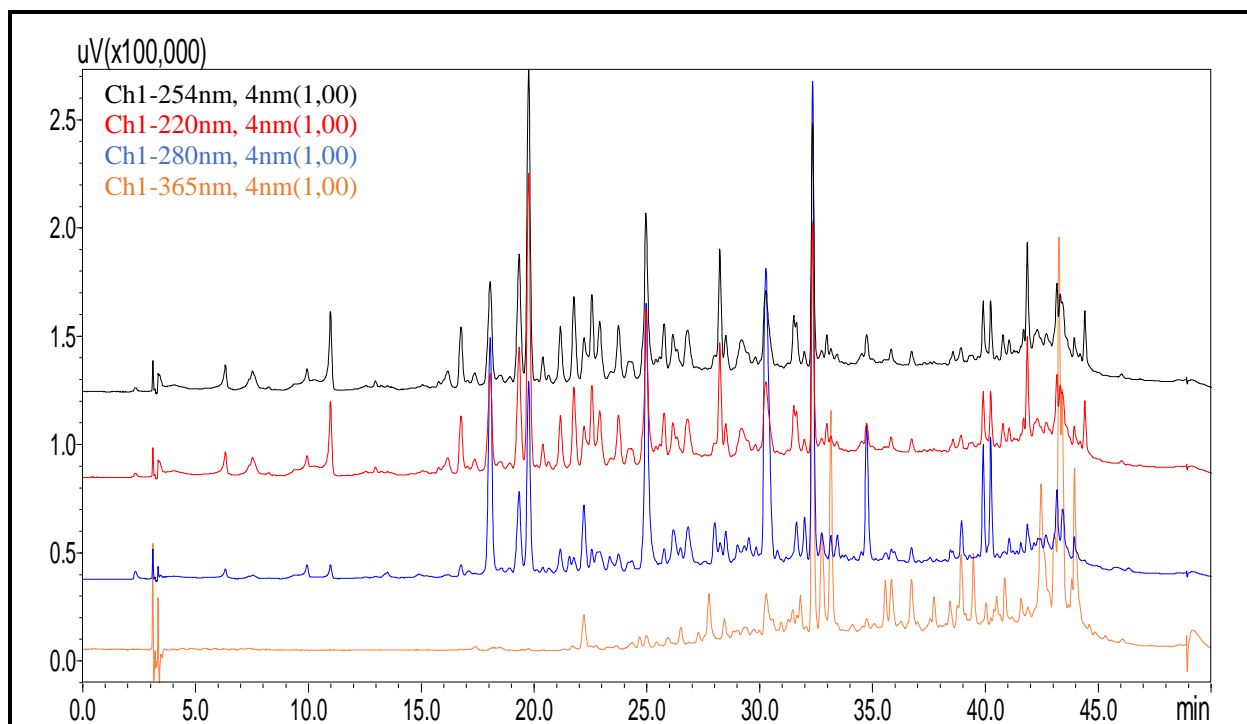
**Figura 13** - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por *Saccharicola* sp. em MDB (peq. escala). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



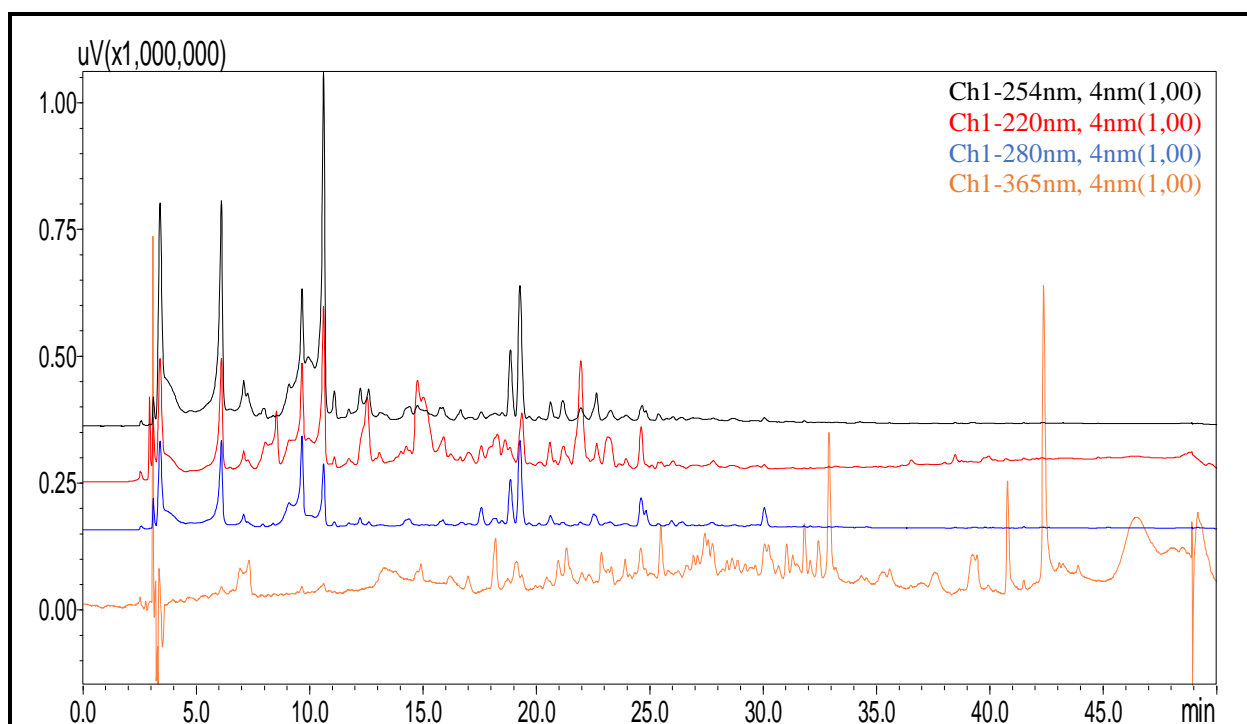
**Figura 14** - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por *Saccharicola* sp. em Czapek (escala ampliada). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



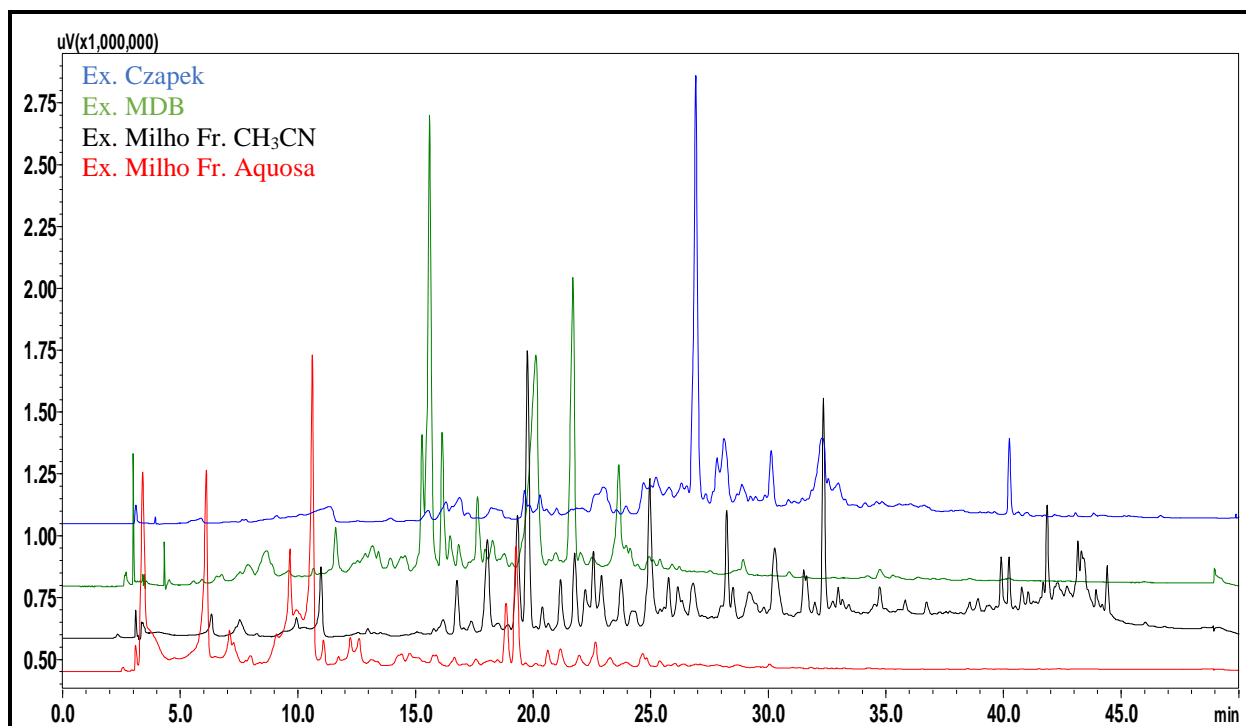
**Figura 15** - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por *Saccharicola* sp. Milho fr. CH<sub>3</sub>CN em (peq. escala). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura 16** - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por *Saccharicola* sp. em Milho fr. aquosa (peq. escala). Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura 17** - Cromatogramas comparativos em gradiente exploratório dos extratos brutos de *Saccharicola* sp. nos meios de cultura líquidos e sólidos. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> λ = 254 nm.

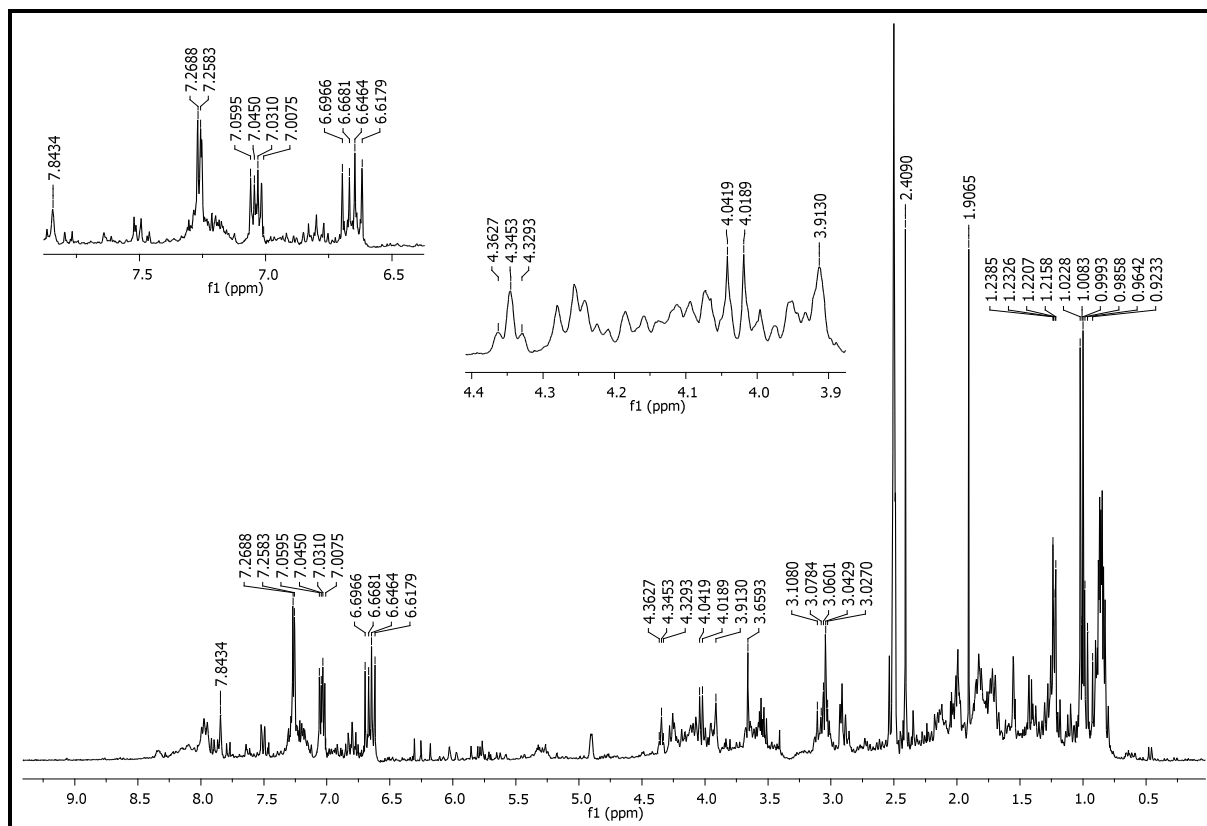


#### 4.1.2 Perfil químico dos extratos brutos de *Saccharicola* sp. por RMN de <sup>1</sup>H

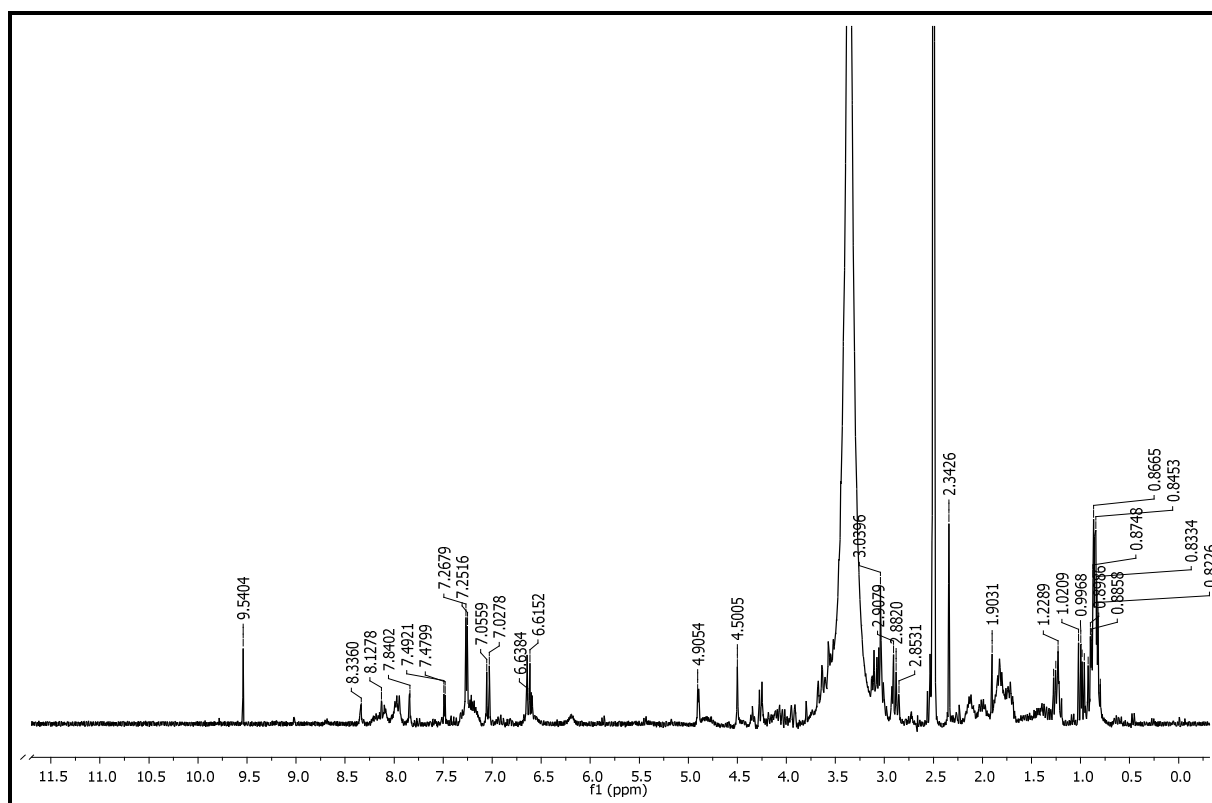
Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Figuras 18, 20, 22, 24) dos extratos brutos MDB, Czapek Milho fr. CH<sub>3</sub>CN, Milho fr. Aquosa em comparação com seus respectivos brancos (Figuras 19, 21, 23, 25) corroboraram com a análise em CLAE-DAD, evidenciando sinais de δ<sub>H</sub> 0,8 até aproximadamente δ<sub>H</sub> 8,0 e apresentando hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Observou-se também, uma região complexa de aromáticos, sugerindo várias classes de substâncias aromáticas e evidenciando a diversidade metabólica destes extratos.

Esta diversidade pode ser explicada pela presença de diferentes componentes nutricionais em cada meio de cultivo, fundamentais para o desenvolvimento do endófito e com isto possibilitando a produção dos metabólitos secundários.

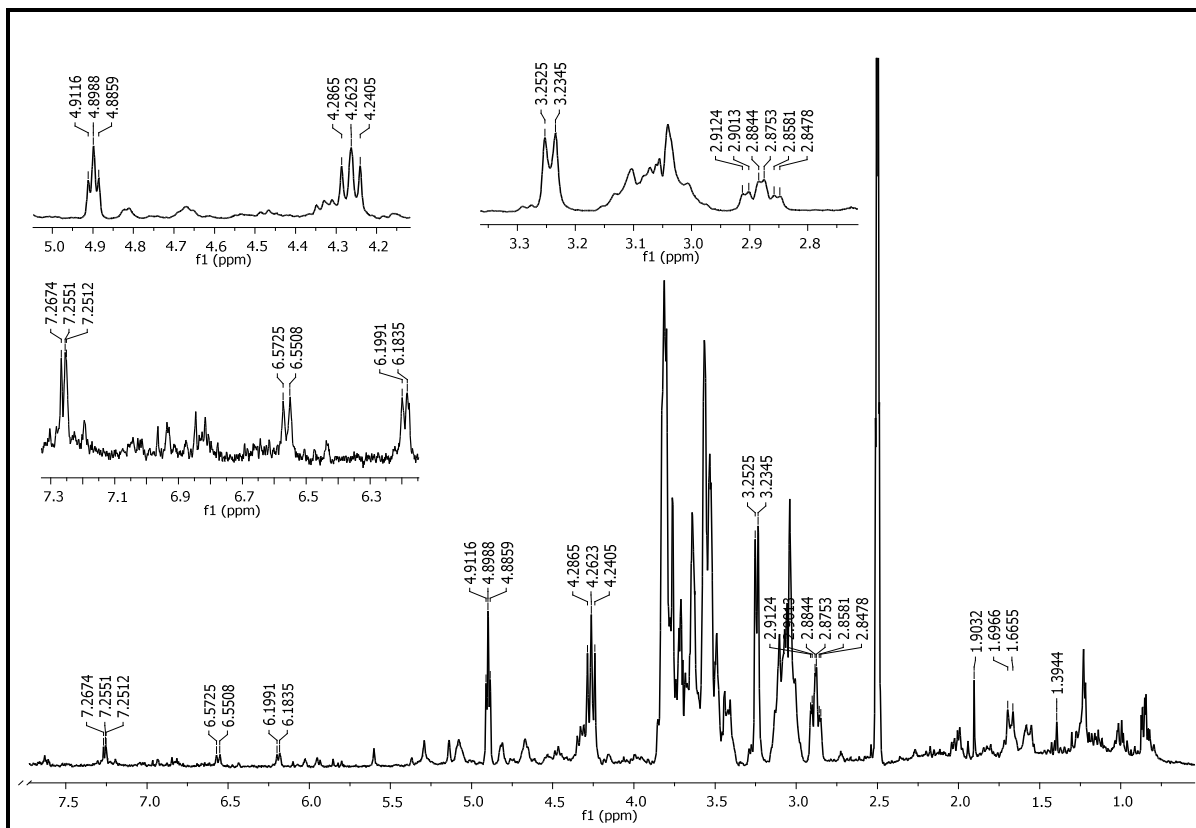
**Figura 18** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Saccharicola* sp. em MDB peq. escala (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



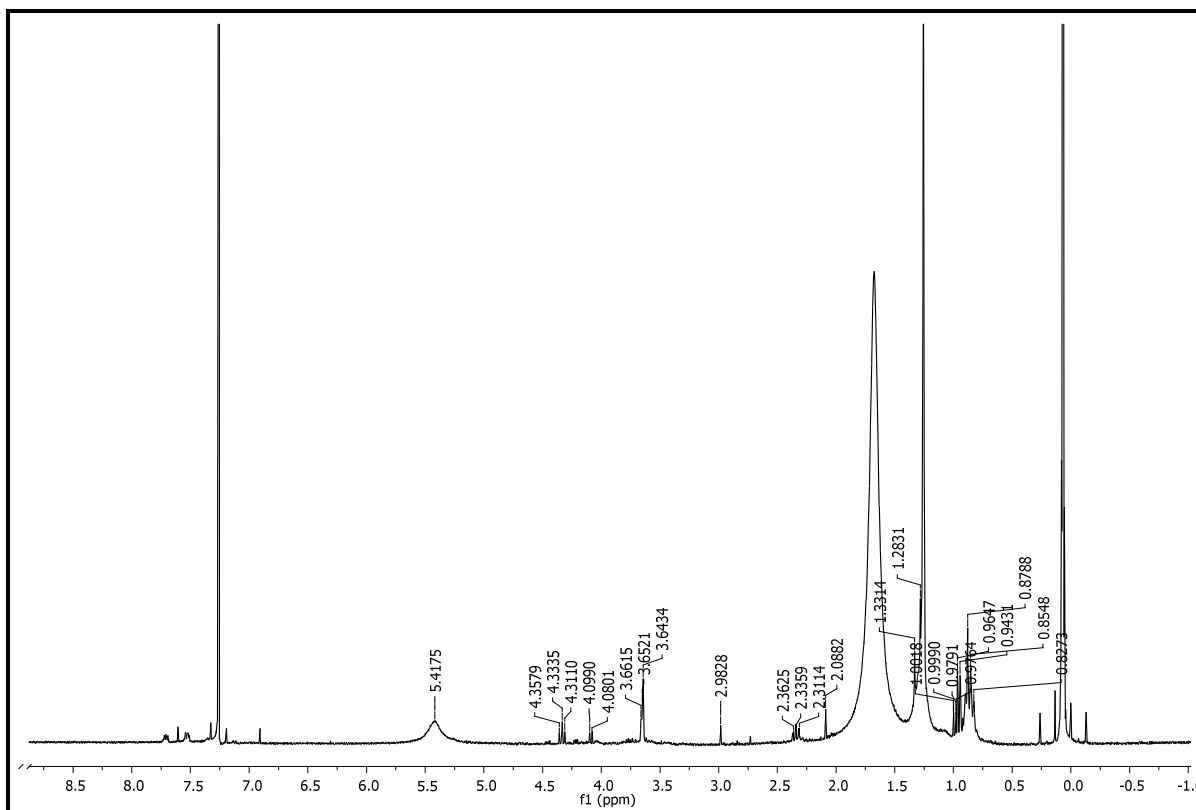
**Figura 19** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do branco em MDB peq. escala (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



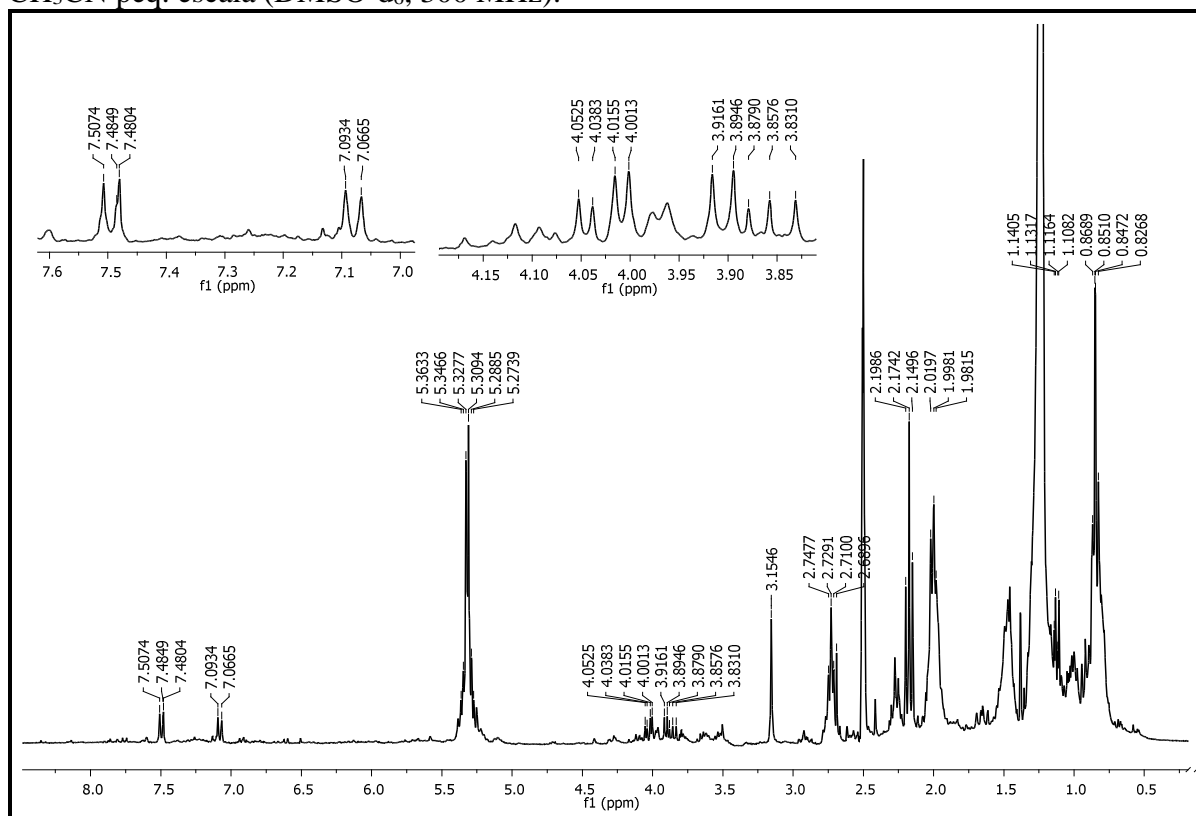
**Figura 20** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Saccharicola* sp. em Czapek escala ampliada (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



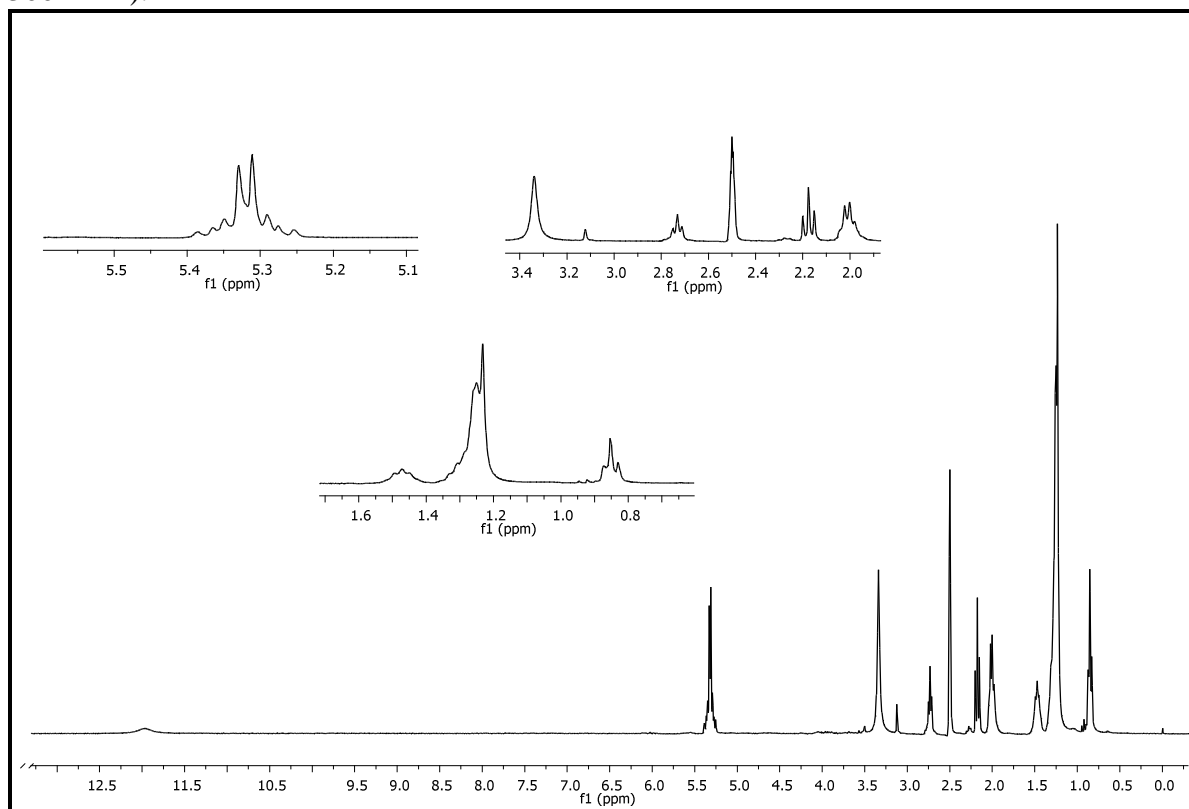
**Figura 21** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do branco em Czapek peq. escala (CDCl $_3$ , 300 MHz).



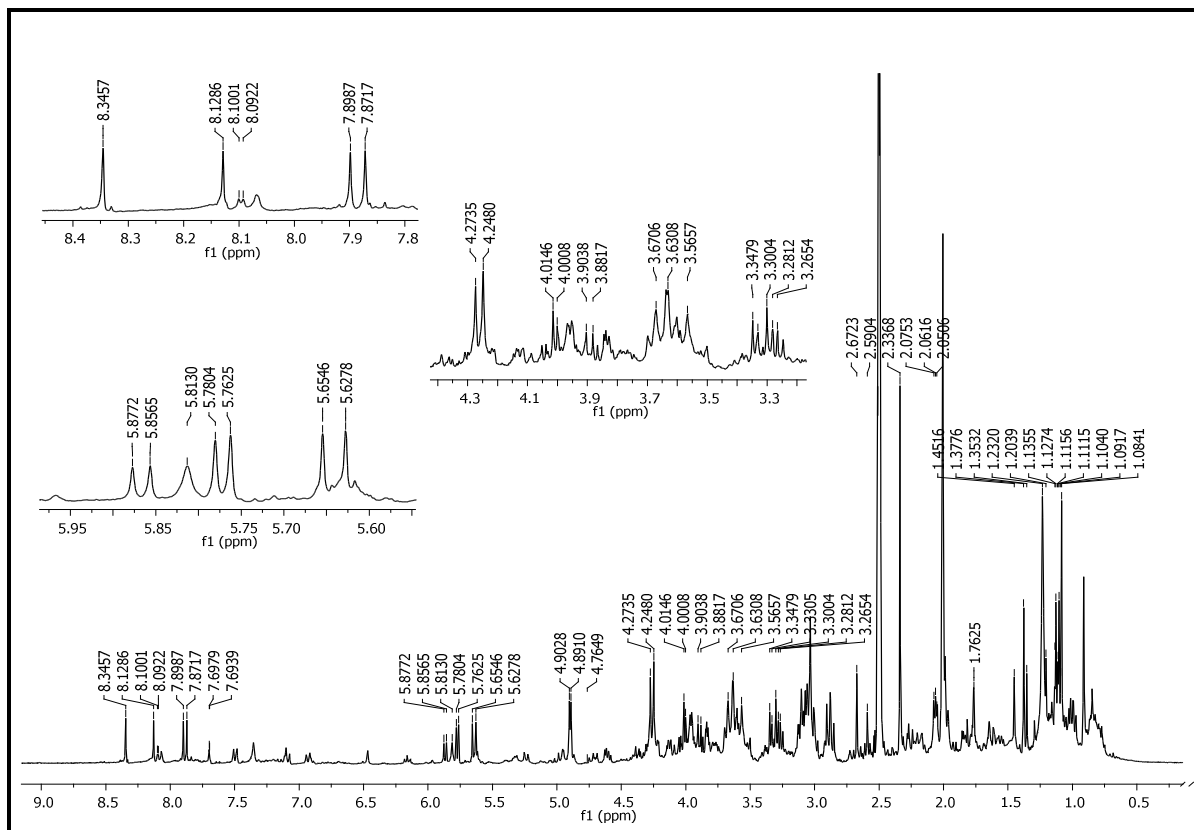
**Figura 22** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Saccharicola* sp. em Milho fr.  $\text{CH}_3\text{CN}$  peq. escala (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



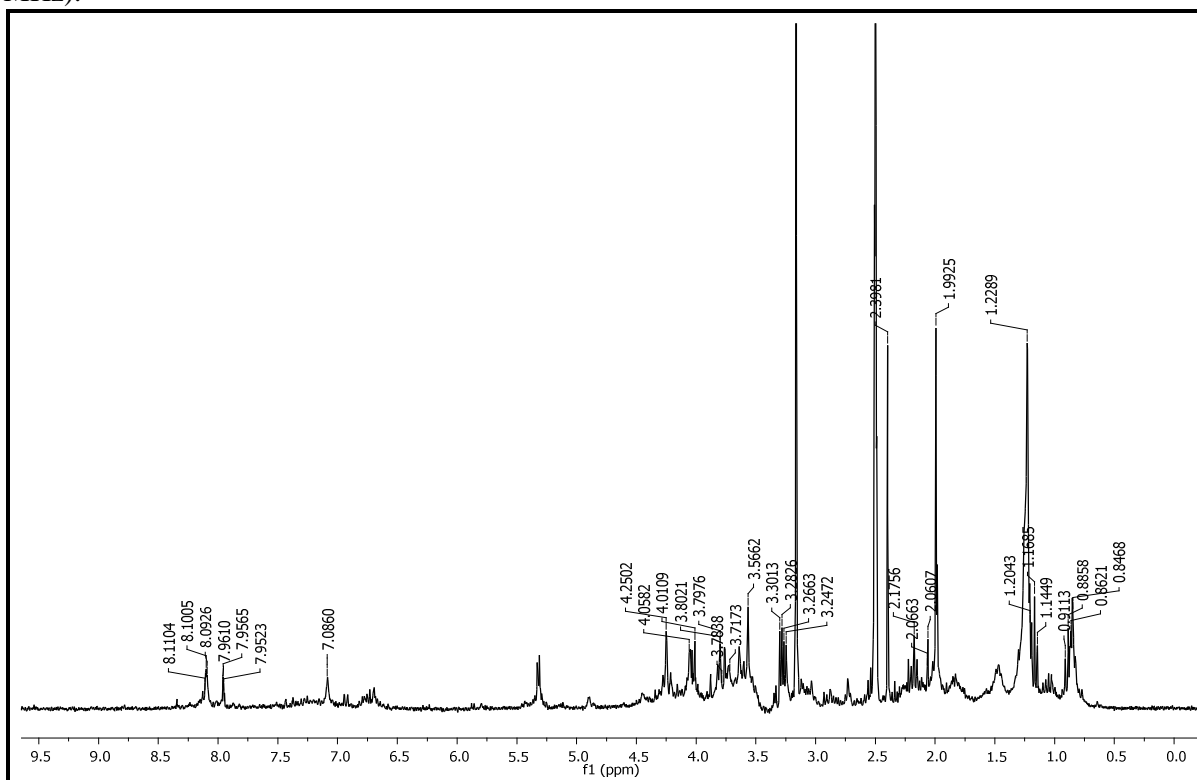
**Figura 23** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do branco em Milho fr.  $\text{CH}_3\text{CN}$  peq. escala (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 24** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Saccharicola* sp. em Milho fr. Aquosa peq. escala (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 25** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do branco em Milho fr. aquosa peq. escala (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



4.2 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos produzidas por *Saccharicola* sp.

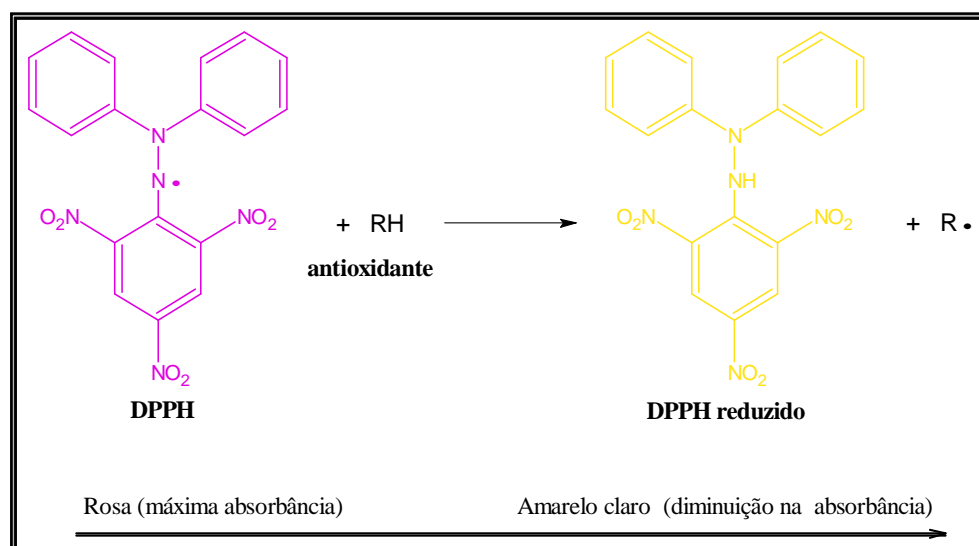
## 4.2.1 Ensaio Antioxidante (DPPH qualitativo)

As frações do extrato de Milho fr. CH<sub>3</sub>CN foram avaliadas quanto à reatividade com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) utilizando o método por cromatoplaça (SIMÕES et al., 2005).

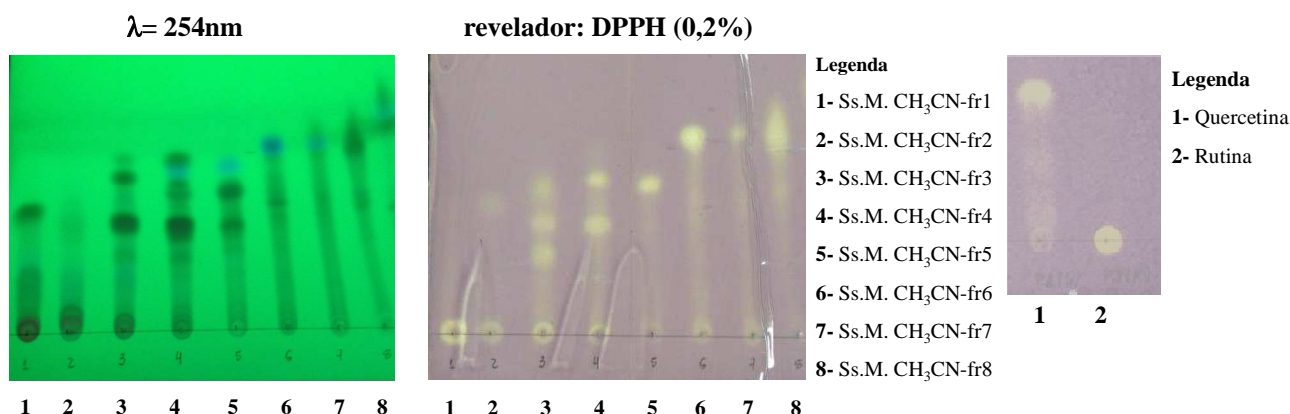
O teste para avaliar o potencial antioxidante dessas frações baseou-se na descoloração de uma solução violeta composta por radicais estáveis DPPH• quando há a presença de substâncias que podem transferir elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração violeta (Figura 27) (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006).

Análise cuidadosa da cromatoplaça obtida evidenciou o potencial antioxidante pela presença de manchas brancas amareladas, decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração roxa do fundo.

**Figura 26** - Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância sequestradora de radicais livres usando o reagente de DPPH.



Todas as frações apresentaram substâncias com potencial antioxidante, evidenciando a potencialidade biológica e nos conduziram ao fracionamento cromatográfico como descrito no item 3.2.5, objetivando o isolamento e determinação estrutural das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante apresentada na Figura 23.

**Figura 27** - Avaliação qualitativa do potencial antioxidante dos extratos brutos com DPPH.

Fonte: próprio autor

#### 4.2.2 Ensaio Antifúngico utilizando os fungos fitopatogenos *C. cladosporioide* e *C. sphaerospermum*

O aumento de micoses oportunistas e a necessidade de novos agentes antifúngicos na agricultura têm estimulado a busca de novos metabólitos secundários com atividade antifúngica. Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente (CARDOSO, 2003).

As práticas agrícolas dependem de um amplo uso de defensivos agrícolas, bactericidas e fungicidas. No cenário atual, com a alta demanda por produtos orgânicos, indicando a preferência do consumidor para a redução do uso de produtos químicos, fica evidente a necessidade de se desenvolver estratégias sustentáveis inovadoras para a proteção das culturas, que não dependam de modificação genética e/ou substâncias químicas nocivas (KANCHISWAMY; MALNOY; MAFFEL, 2015).

Os micro-organismos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência. A produção de compostos, como os antibióticos, sugere que os endófitos podem controlar doenças de plantas (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAM, 2011).

Em alguns casos, nematoides podem ser controlados por endófitos, como o fungo *Fusarium oxysporum* que produz metabólitos contra o nematoide *Meloidogyne incognita*. Os fungos endofíticos produzem alcaloides que podem apresentar atividade inseticida e

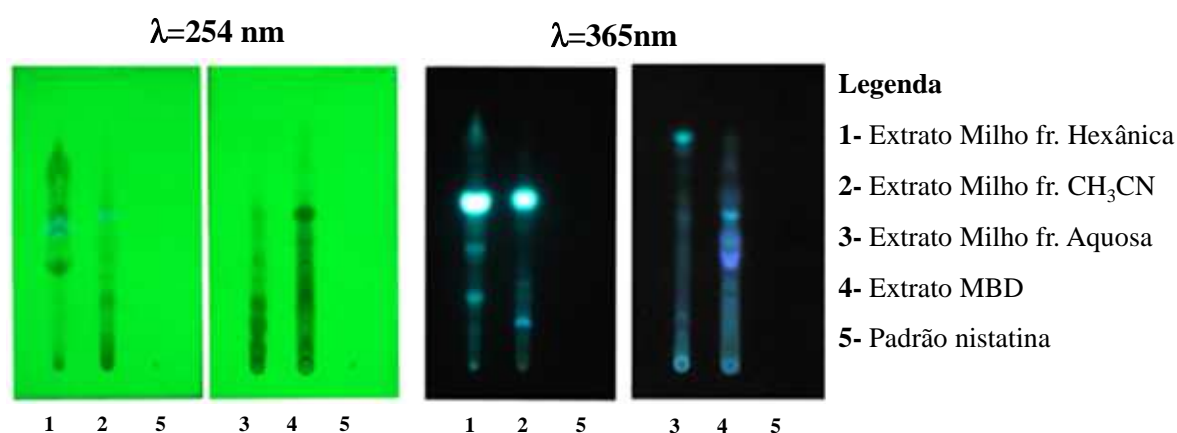
nematicida, protegendo a planta destes patógenos (MELO; AZEVEDO, 1998, AZEVEDO; ESPOSITO, 2010).

Neste contexto, os endófitos são importantes candidatos ao controle de fitopatógenos, principalmente pelo fato de colonizarem um nicho ecológico semelhante ao ocupado pelos mesmos (ARAÚJO et al., 2010).

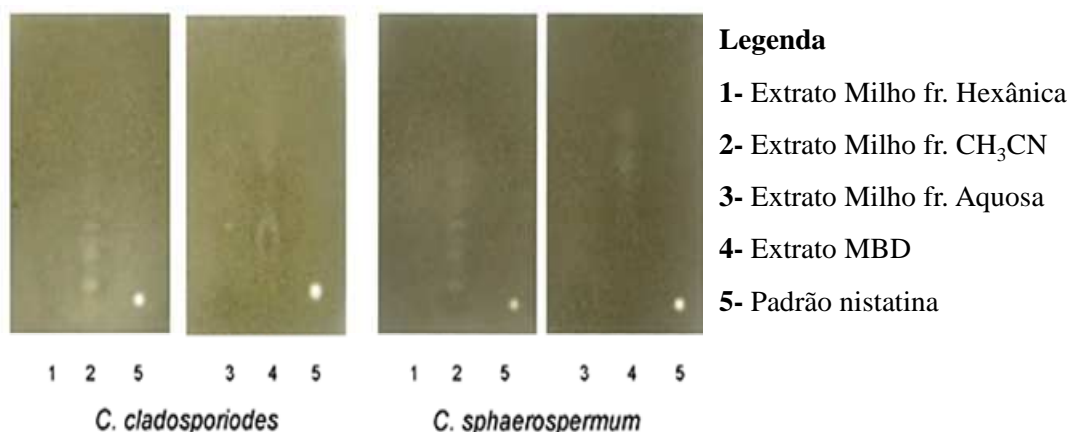
#### 4.2.2.1 Ensaio contra fitopatógenos

A atividade antifúngica foi determinada por bioautografia pela nebulização dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Após a revelação da cromatoplaça (contendo os extratos) com a solução fúngica, foi observada a inibição do crescimento do fungo *C. cladosporioides* em todos os extratos, indicando a atividade antifúngica potencial para esse fungo. Com relação ao fungo *C. sphaerospermum* foi observado atividade para os extratos Milho fr. CH<sub>3</sub>CN e MDB. Os extratos Milho fr. Hexânica e Milho fr. Aquosa, demonstraram-se inativos. O padrão utilizado para comparação foi a nistatina (1 µg). As condições cromatográficas e os resultados obtidos deste bioensaio estão presentes nas Figuras (28 e 29) e na Tabela 4.

**Figura 28** - CCDC dos extrato bruto obtido de *Saccharicola* sp. condição cromatográfica (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH<sub>3</sub>Cl:MeOH extratos (3 e 4)).



**Figura 29** - Avaliação do potencial dos extratos contra *C. Cladosporioides* e contra *C. Sphaerospermum*.



**Tabela 4** - Fator de Retenção das substâncias que apresentaram inibição no crescimento dos fungos fitopatogênicos (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH<sub>3</sub>Cl:MeOH extratos (3 e 4))

Amostras	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
Milho fr. Hexânica	0,14*	i
Milho fr. CH <sub>3</sub> CN	0,03-0,07**; 1,5-1,2**; 2,7*	0,03-0,07*; 1,5-1,2*; 2,7*
Milho fr. Aquosa	0,29*	i
MDB	0,25-0,31*; 0,49-0,65*	0,49-0,54*; 0,6-0,65*
Padrão	origem ***	origem***

\* atividade fraca, \*\* atividade média, \*\*\* atividade forte, i = inativo

#### 4.2.3 Ensaio Anticolinesterásico

A doença de Alzheimer é uma doença que ocorre em pessoas de idade mais avançada, sendo progressiva, neurodegenerativa e eventualmente fatal, que vem aumentando na população com o aumento da expectativa de vida. Atualmente inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem a base das novas drogas disponíveis para o tratamento desta doença. (VIEGAS *et. al.* 2005).

Então visto o potencial dos fungos endofíticos para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase realizou-se o ensaio bioautográfico (CCDC) para os extratos brutos. O aparecimento de halos brancos na cromatoplaça em fundo marrom (Figura 30), comparando-se com o controle positivo (fisostigmina), indicaram que todos os extratos, com exceção do extrato MDB, apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

mesmo que em baixa intensidade (Tabela 5). Este resultado evidencia a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos com potencial anticolinesterásico.

**Figura 30** - Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos. condição cromatográfica (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH<sub>3</sub>Cl:MeOH extratos (3 e 4)).



**Tabela 5** - Fator de Retenção das substâncias que apresentaram inibição da enzima acetilcolinesterase (sílica gel – Hex:AcOEt (7:3) extratos (1 e 2) e CH<sub>3</sub>Cl:MeOH extratos (3 e 4))

Amostras (extratos)	Anticolinesterásico
Milho fr. Hex	0,44-0,53***
Milho fr. CH <sub>3</sub> CN	0,03-0,05*; 0,35-0,4*; 0,44-0,54***
Milho fr. aquosa	0,058-0,12
MDB	i
Padrão	origem***

\* atividade fraca, \*\* atividade média, \*\*\* atividade forte, i = inativo.

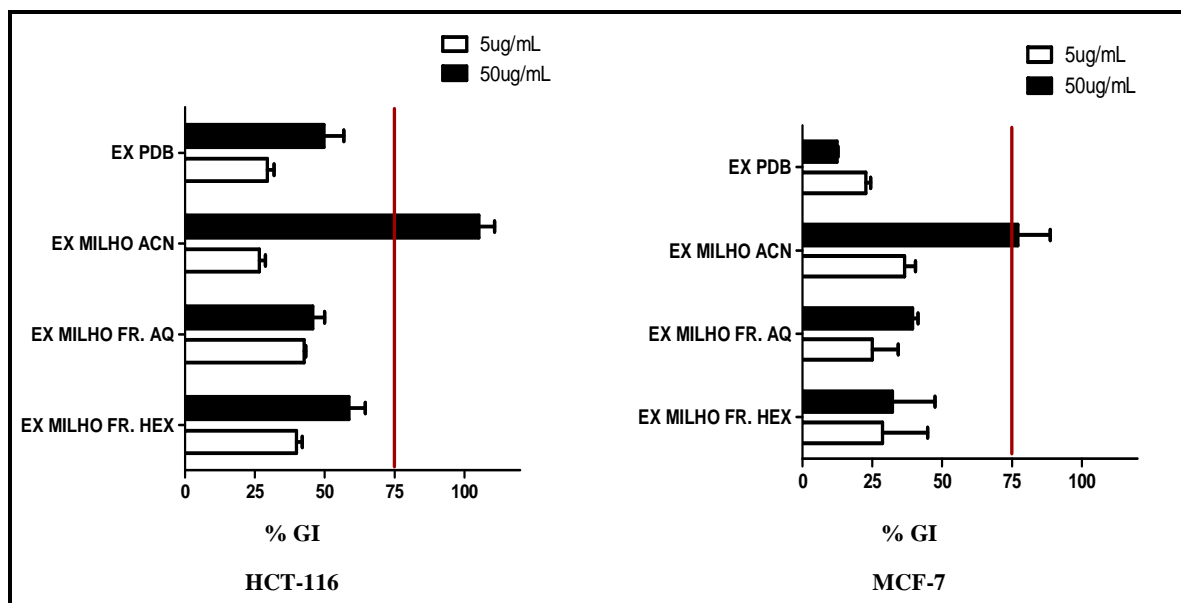
#### 4.2.4 Ensaio citotóxico

A procura por produtos naturais com potencial anticâncer tem levado à descoberta e desenvolvimento de diversos fármacos anticancerígenos (como, a vimblastina, vincristina, taxol, etc.) e a descoberta de novas drogas anticancerígenas pode ser um dos principais objetivos dos produtos naturais e química medicinal para auxiliar no tratamento da doença (CHANDRA, 2012).

De acordo com os resultados apresentados (Figura 31), o extrato Milho fr. CH<sub>3</sub>CN apresentou citotoxicidade para as linhagens de HCT-116 (linhagem cancerígena de cólon) e

MCF (linhagem cancerígena de mama) com  $CI_{50}$  variando na faixa de 4,0 a 6,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $>50\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 6).

**Figura 31** - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Tabela 6** - Cálculo da  $CI_{50}$  para o extrato Milho fr.  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	HCT-116	MCF-7
Milho fr. ACN	4.03 2.6 - 6.3	> 50

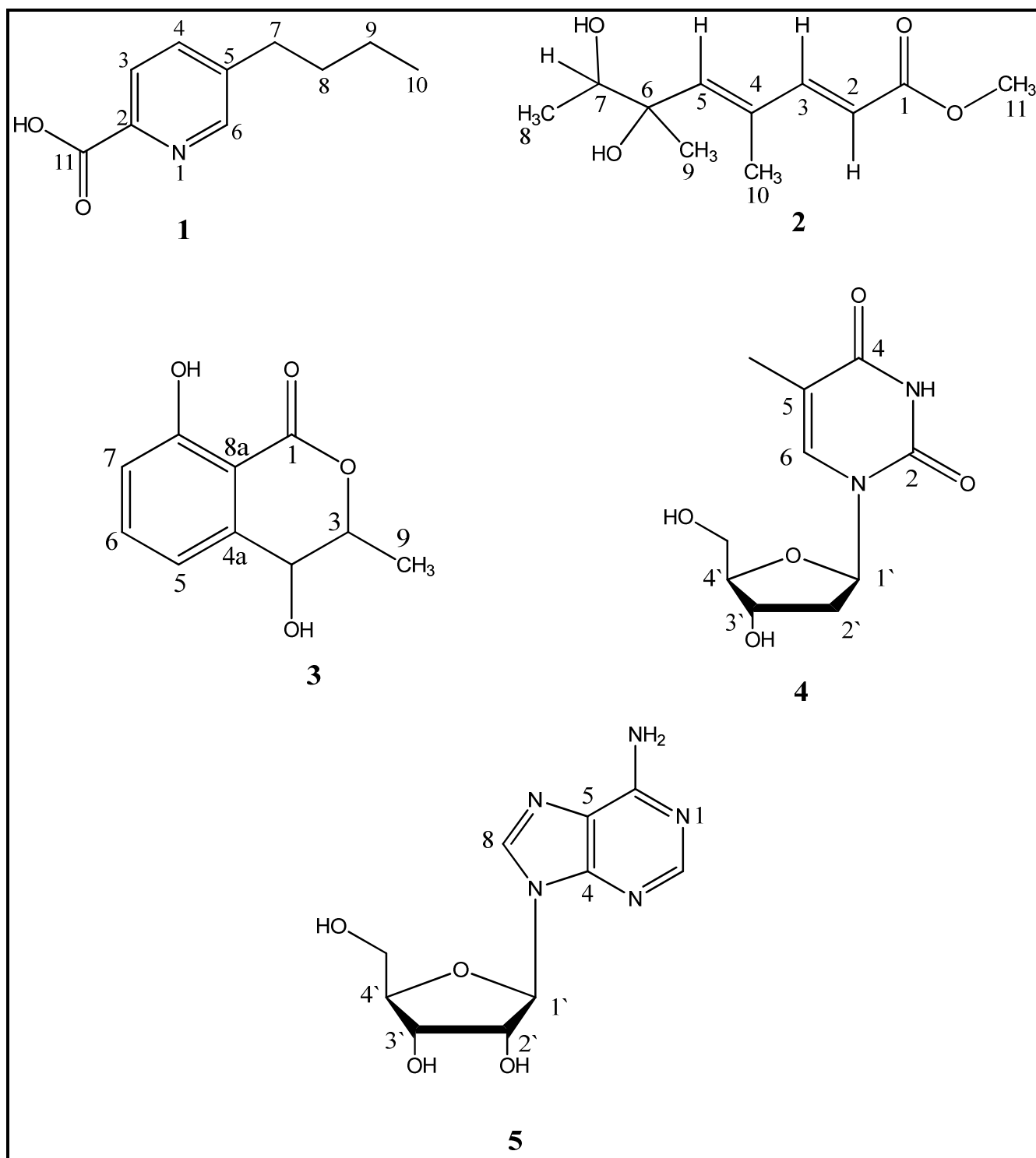
Controle positivo: doxorubicina

### 4.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *Saccharicola* sp.

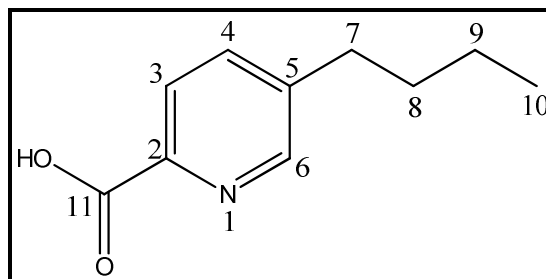
O estudo químico dos extratos produzidos pelo endófito *Saccharicola* sp. resultou na identificação de 5 substâncias (Figura 32): Ácido fusárico (**1**), 6,7 dihidroxi- 4,6 dimetil octanoato (**2**) substância inédita na literatura, 4-hidroximeleina (**3**), Timidina (**4**), Adenosina (**5**). As substâncias **1**, **2**, são provenientes dos fracionamentos do extrato bruto em escala ampliada em Czapek, a substância **3** foi isolada do extrato bruto em Milho fr. CH<sub>3</sub>CN (peq. escala) e **4** e **5** foram isoladas do extrato bruto em Milho fr. Aquosa-XAD.

A determinação estrutural das substâncias foi efetuada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C uni- e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY- 1D) e EM, e comparação com a literatura.

Figura 32 - Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Saccharicola* sp.



Fonte: próprio autor

4.3.1 Elucidação estrutural da substância **1****Figura 33** - Estrutura da substância **1** (Ácido fusárico).

A substância **1** foi isolada como um sólido amarelado, da fração 1 do extrato Czapek.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 34) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 35) apresentaram sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,96 (*t*;  $J=7,4$  Hz; 3H,  $\delta_{\text{C}}$  13,7),  $\delta_{\text{H}}$  1,36 (*m*; 2H,  $\delta_{\text{C}}$  22,9),  $\delta_{\text{H}}$  1,66 (*m*; 2H,  $\delta_{\text{C}}$  34,1) e  $\delta_{\text{H}}$  2,77 (*t*; 7,30 Hz, 2H,  $\delta_{\text{C}}$  33,4), os quais se correlacionam em um mesmo sistema de spin em TOCSY-1D (Figura 36) e COSY (Figura 37). Este sistema, claramente, indicou um grupo butil isolado e ligado a um  $\text{C}_{\text{sp}^2}$  de um sistema aromático, o que foi confirmado pelos valores dos deslocamentos químicos em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , (Tabela 7).

Adicionalmente, os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  evidenciaram sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,93 (*d*;  $J=7,5$  Hz, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  139,8),  $\delta_{\text{H}}$  8,11 (*d*;  $J=7,5$  Hz; 1H,  $\delta_{\text{C}}$  125,8) e  $\delta_{\text{H}}$  8,51 (*s*; 1H,  $\delta_{\text{C}}$  148,8), sugerindo a presença de um sistema aromático trissubstituído. Porém os valores de deslocamentos químicos observados para esses sinais sugeriram tratar-se de um anel piridinico ao invés de benzênico.

Baseando nos dados espectroscópicos e nas correlações observadas em HMBC (Figura. 40) foi proposto a substância **1** como sendo o ácido fusárico. Apesar da ausência do sinal da carboxila nos experimentos bidimensionais, provavelmente devido ao tempo de relaxação, os valores dos deslocamentos químicos do anel piridinico nos permitem inferir a presença da mesma.

Análise da substância **1** por CLAE-DAD (Figura 41) seguida por comparação do *Tr* e espectro no UV (Figura 42) (bandas em  $\lambda= 225$  e 271 nm).

A análise dos dados obtidos por ESI-EM (+) (Figura 43), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada em  $m/z$  180,1018 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), sugerindo a presença de nitrogênio na molécula reforçando a suposição de um anel piridinico. Estas informações corroboram com os dados de RMN 1D e 2D permitindo atribuir para a substância **1** a fórmula molecular de  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ . Esses dados corroboram com os dados encontrados na literatura, evidenciando que essa substância trata-se do ácido fusárico (SONG, et al., 2001, MAGAN; OLSEN, 2004).

**Tabela 7** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Metanol- $d_4$ , 600 MHz) de **1** ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

Posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	144,3
3	8,11( <i>d</i> ; 7,5)	125,8
4	7,93( <i>d</i> ; 7,5)	139,8
5	-	*
6	8,51( <i>s</i> )	148,8
7	2,77( <i>t</i> )	33,4
8	1,66( <i>m</i> )	34,1
9	1,39( <i>m</i> )	22,9
10	0,96( <i>t</i> ; 7,40)	13,7
11	*	*

\*não observado

O ácido fusárico é, provavelmente, uma das micotoxinas mais distribuídas na natureza sendo produzida pela maioria das espécies do gênero *Fusarium*.

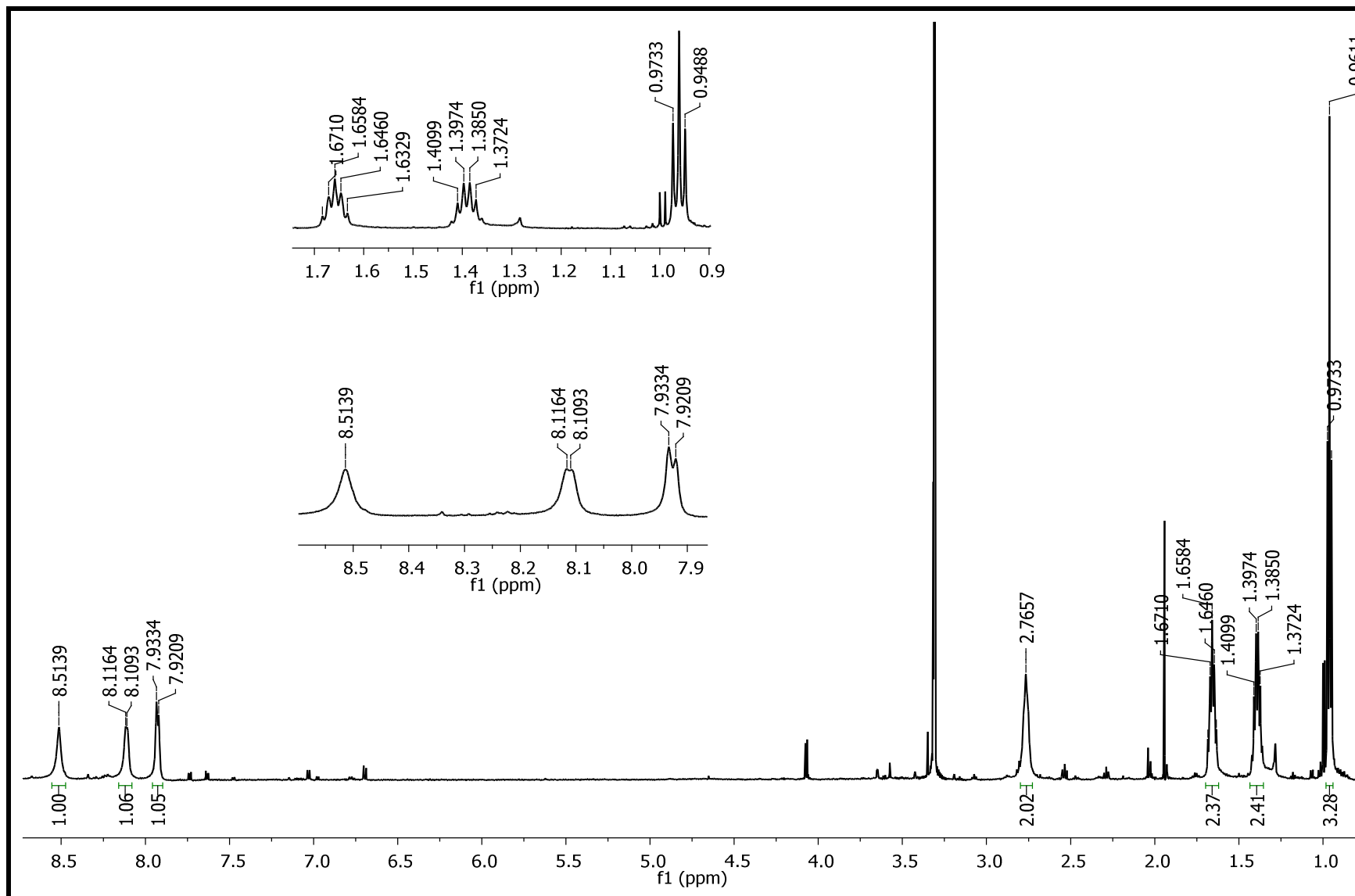
Embora menos importantes que os principais tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, micotoxinas fusarianas, têm sido encontradas com elevada frequência em cereais, participando, principalmente, da cadeia alimentar de aves. O ácido fusárico, por exemplo, interfere no consumo alimentar de aves, agindo na utilização do triptofano pelo cérebro, além de atuar sinergisticamente, aumentando a toxicidade de outras micotoxinas (MACARI; FURLAN; GONZALES, 1994).

Em baixas concentrações, o ácido fusárico induz a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a ativação de proteínas que regulam a morte celular programada e de outros elementos de resposta de hipersensibilidade em plantas. Isto indica que a toxina em níveis reduzidos pode induzir resposta de defesa na célula vegetal (SAMADI & BEHBOODI, 2006).

De acordo com Sigma Aldrich, 1 grama de ácido fusárico corresponde a 1600 reais. Demonstrando o alto valor agregado para essa micotoxina.

Não há relatos na literatura da presença de ácido fusárico em extratos produzidos por *Saccharicola* sp.

Figura 34 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1** (Metanol- $d_4$ , 600 MHz).



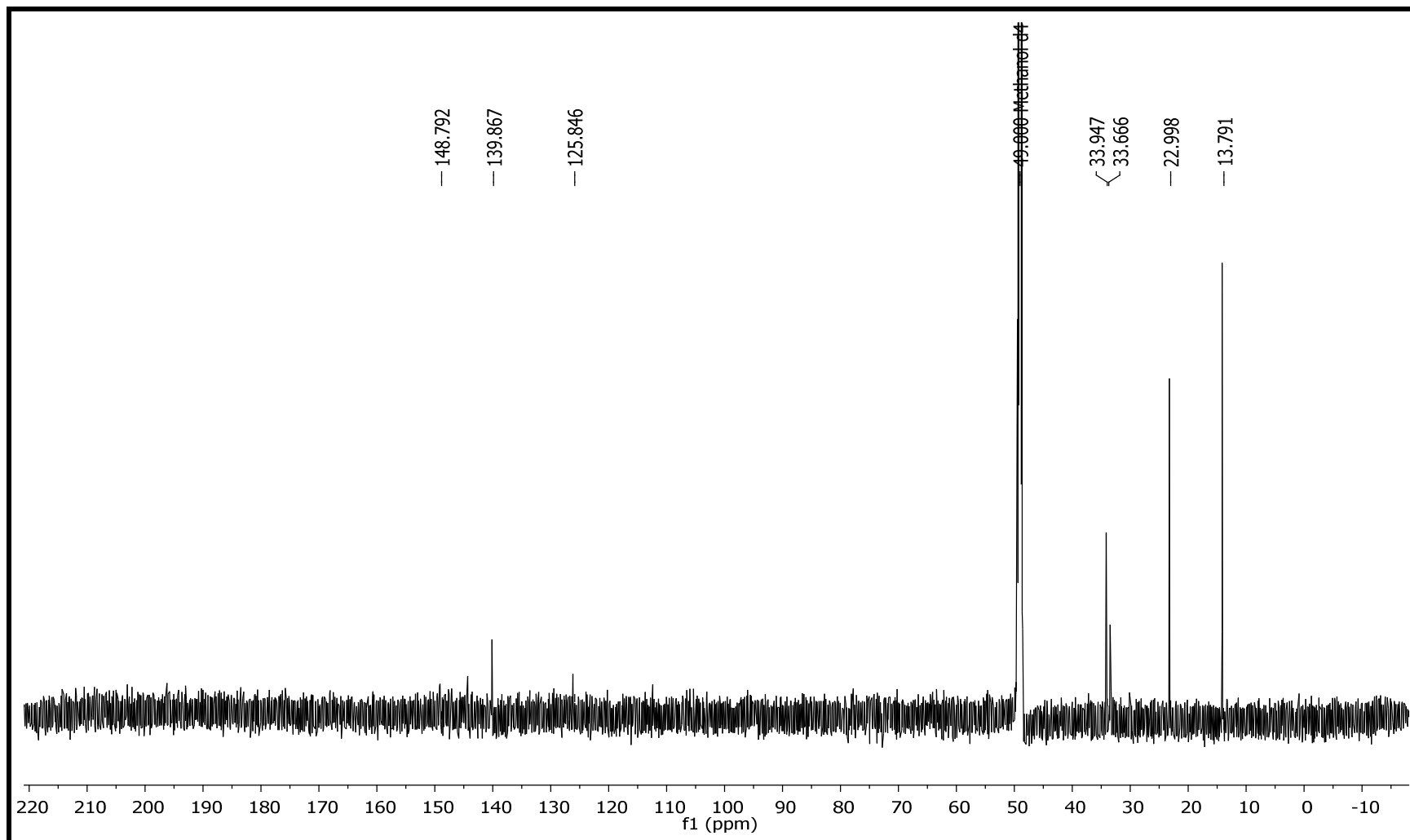
**Figura 35** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **1** (Metanol- $d_4$ , 150 MHz).

Figura 36 - Espectro de TOCSY-1D da substância **1** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).

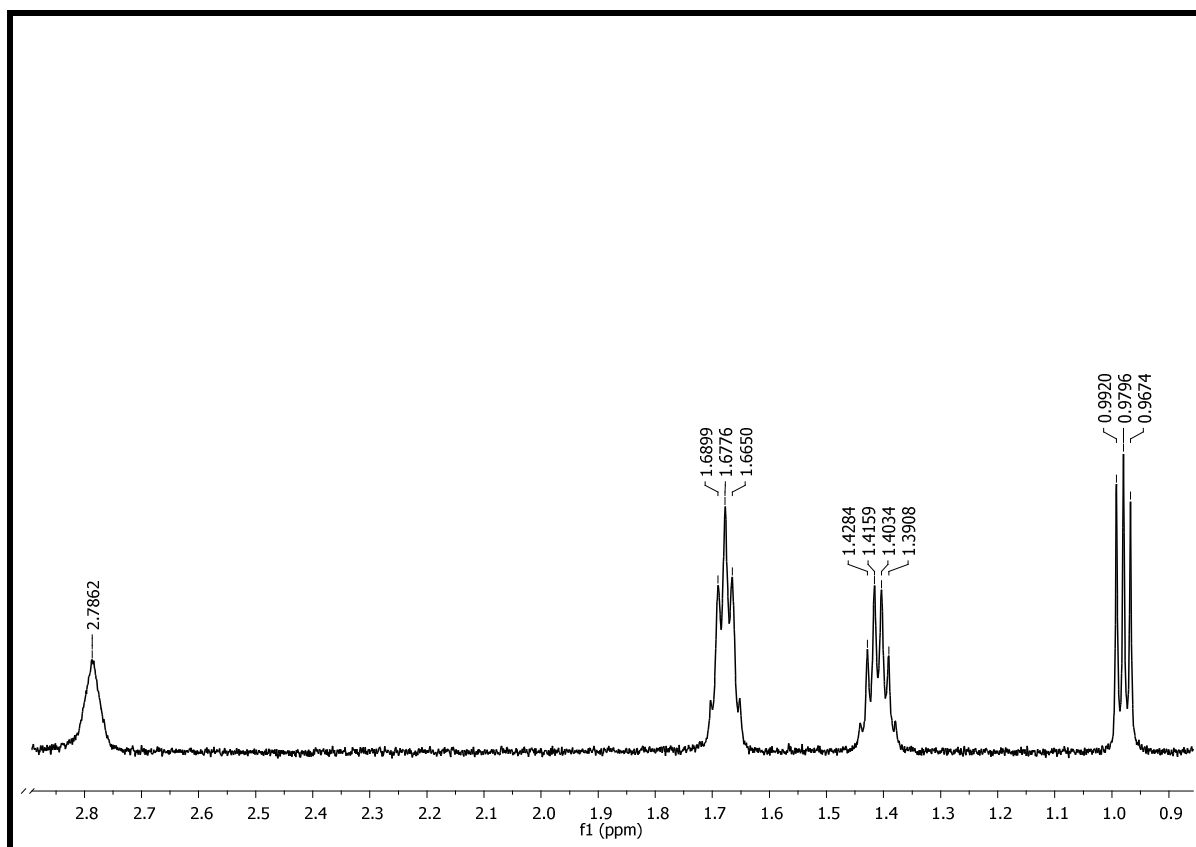


Figura 37 - Mapa de contorno de COSY da substância **1** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).

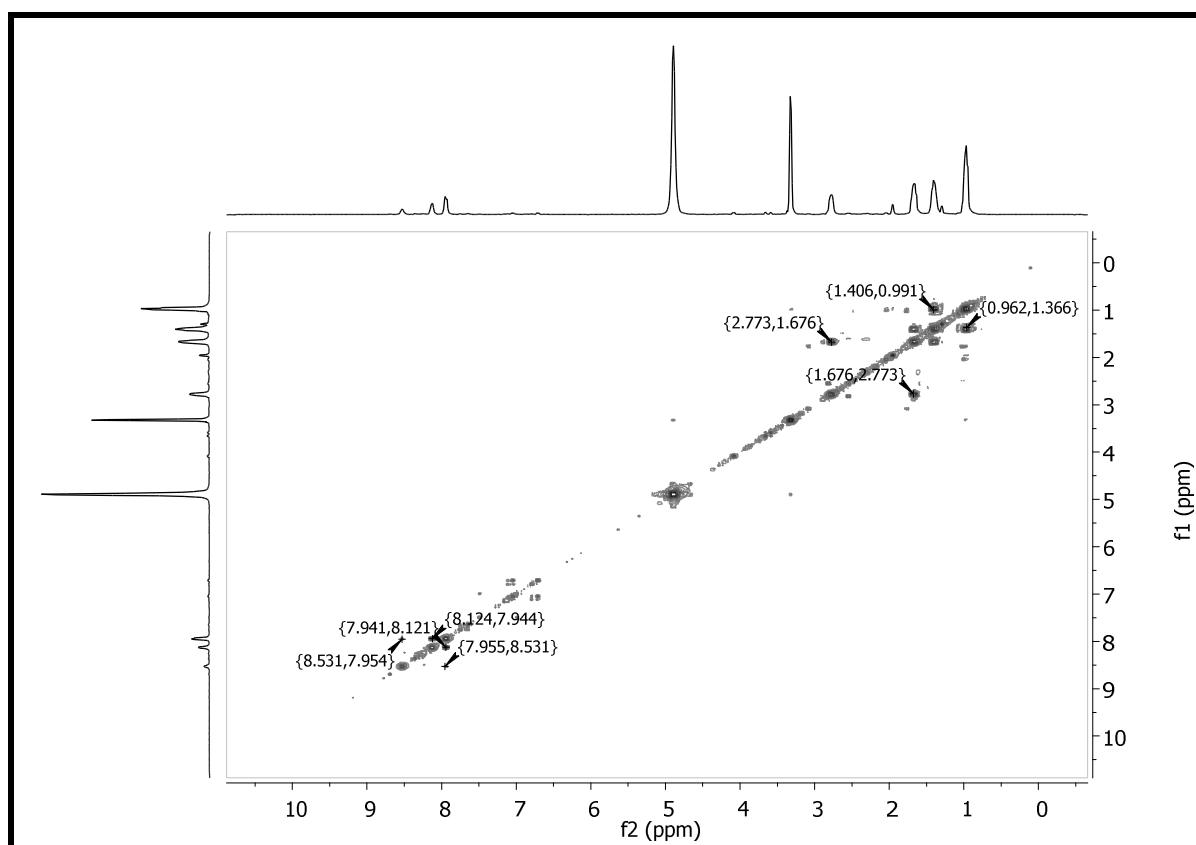


Figura 38 - Mapa de contorno de HSQC da substância **1** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).

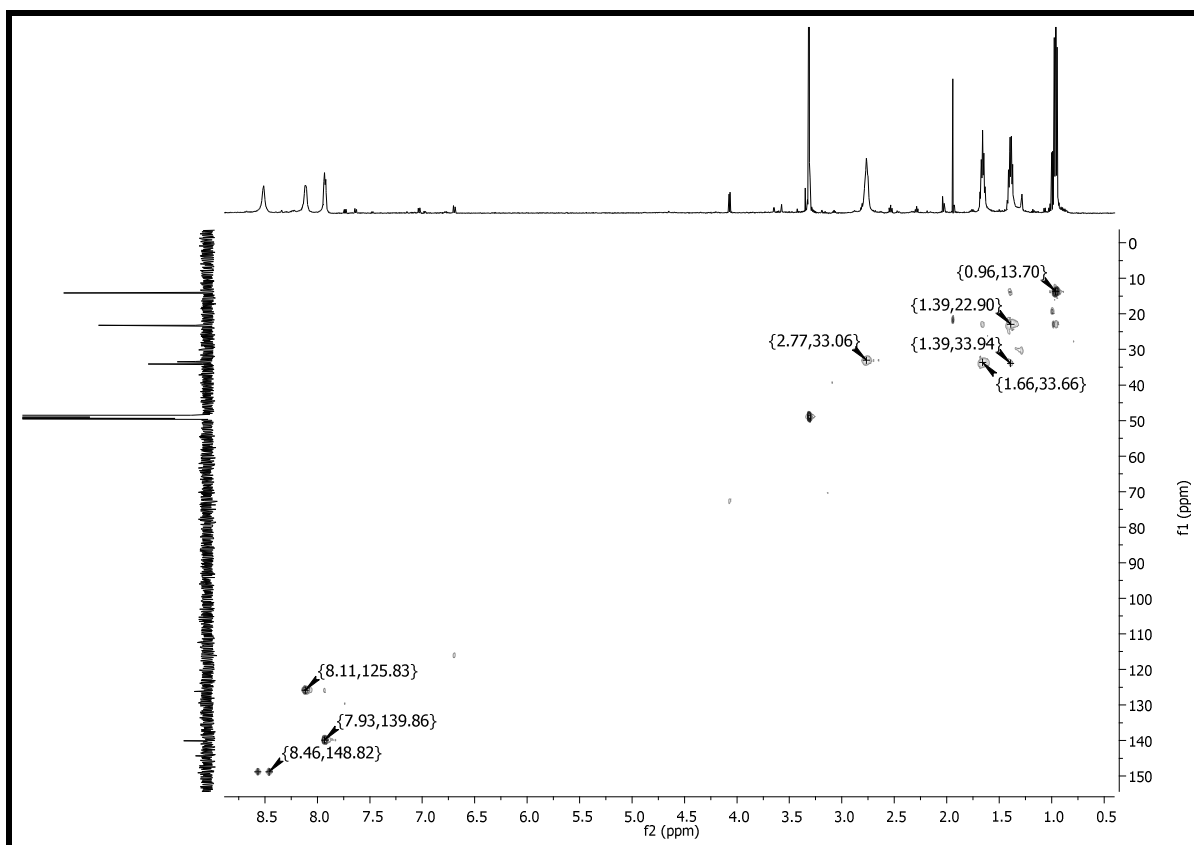
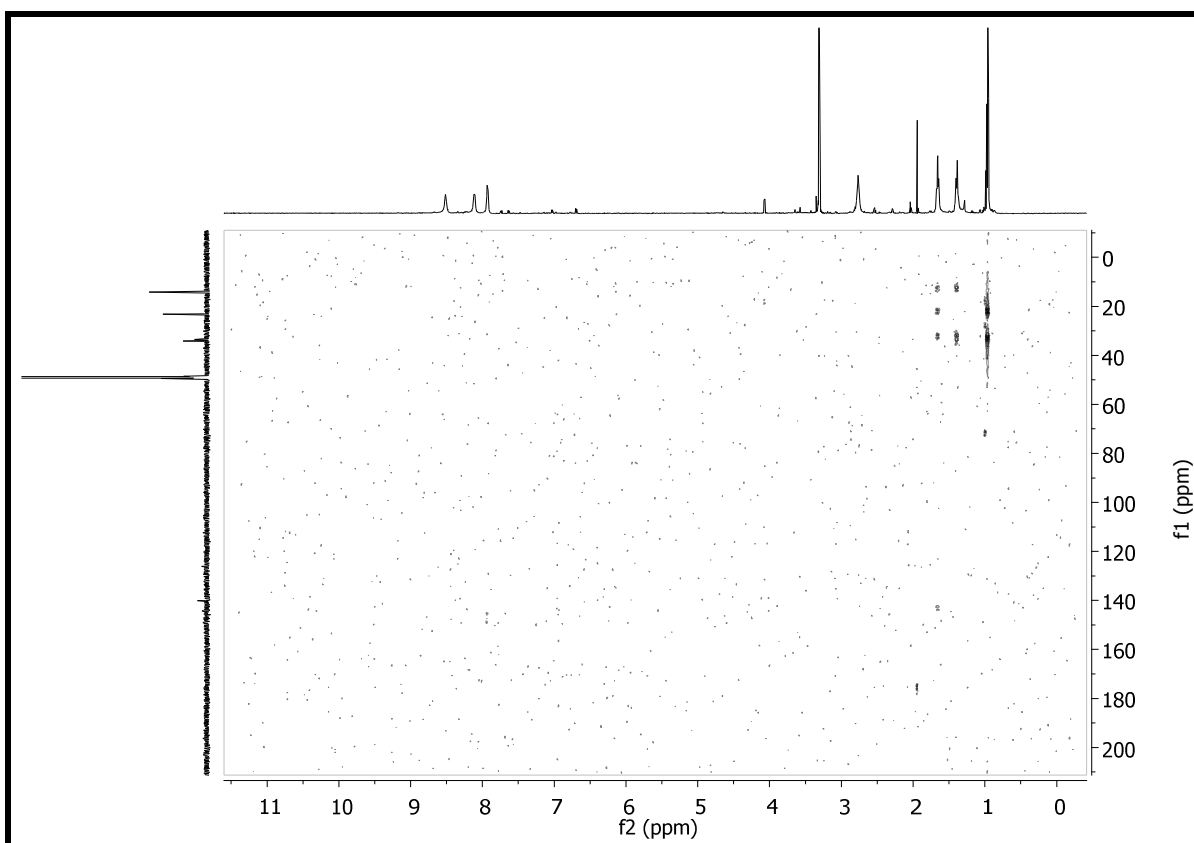


Figura 39. Mapa de contorno de HMBC da substância **1** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).



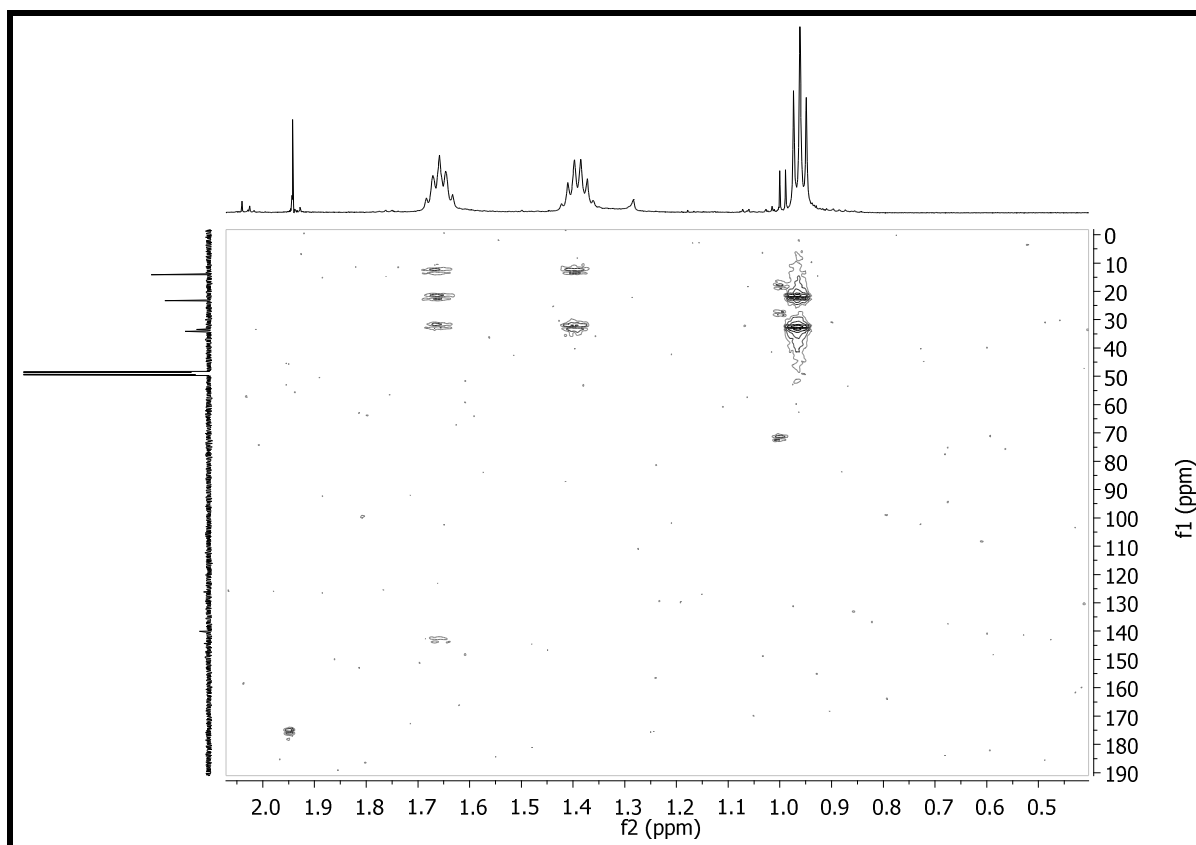
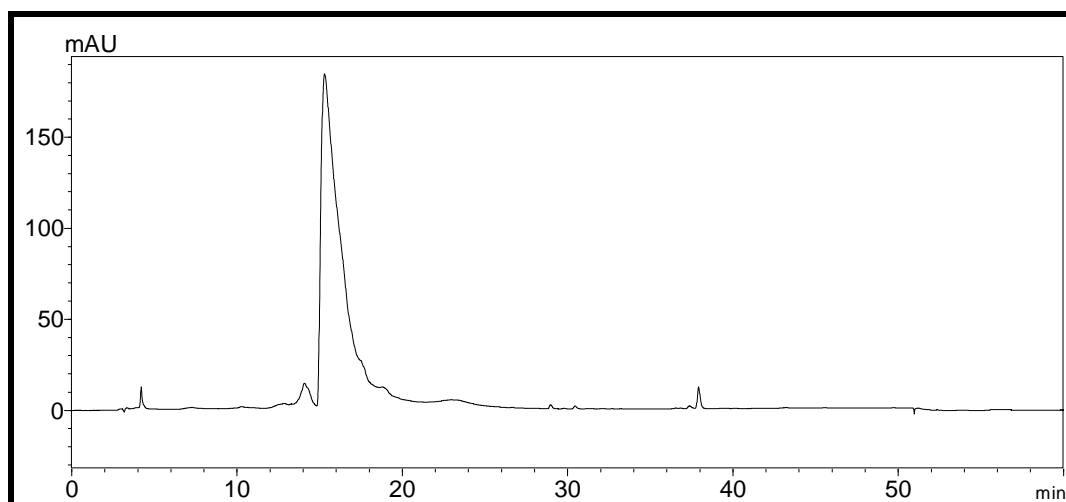
**Figura 40** - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância **1** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).**Figura 41** - Cromatograma da substância **1**. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm.

Figura 42 - Curvas de UV da substância 1.

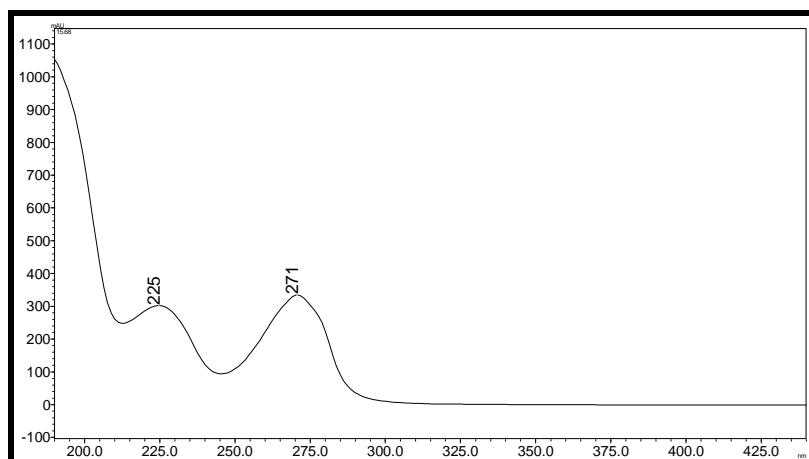
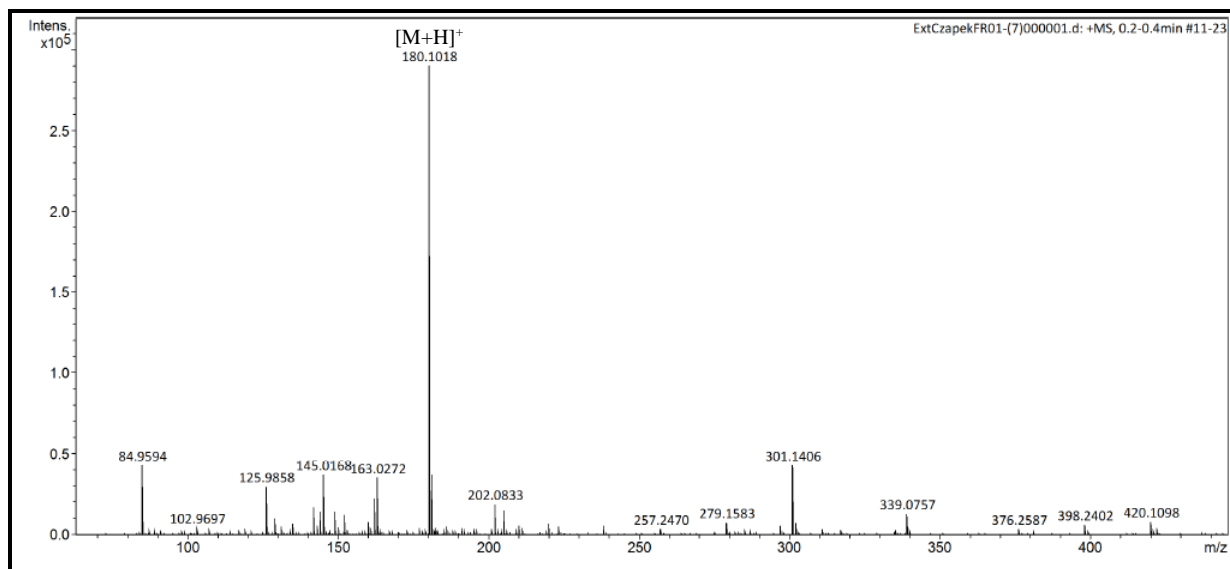
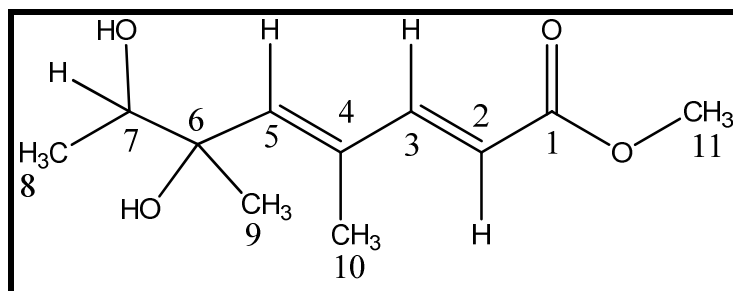


Figura 43 – Espectro de ESI-EM (+) da molécula protonada  $m/z$  180,1018 ( $[M+H]^+$ ) da substância 1.



4.3.2 Identificação estrutural da substância 2**Figura 44** - Estrutura da substância 2 ( *2E, 4E* ) 6,7 dihidroxi- 4,6 dimetil octanoato de metila.

A substância 2 foi isolada como um óleo amarelado, da fração 3 do extrato Czapek, utilizando a técnica de LC-SPE-TT.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 47) e dos mapas de contorno dos experimentos HSQC (Figura 49) permitiram visualizar a presença de hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  5,89 (*d*,  $J=15,7$  Hz, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  116,6) e 7,32 (*d*,  $J=15,7$  Hz, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  152,6), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3 de uma ligação dupla com configuração *E*, baseando-nos na constante de acoplamento. Também foram observados um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,00 (*s*, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  145,7) e um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  2,07 (*s*, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  13,3) os quais foram atribuídos a um hidrogênio olefínico (H-5) e a uma metila ligada a um  $\text{C}_{\text{sp}^2}$  (H-10). Estas informações nos permitiram visualizar um sistema de uma carbonila  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  insaturada, a qual foi atribuída a um éster metílico em função do sinal observado em  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (*s*, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  52,1).

A geometria da ligação dupla em  $\Delta^{4,5}$  foi determinada com base no espectro NOESY (Figura 50) que confirmou a correlação de vizinhança entre um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,00 e o dubleto  $\delta_{\text{H}}$  7,32 corroborando com a confirmação de uma ligação dupla com configuração *E*.

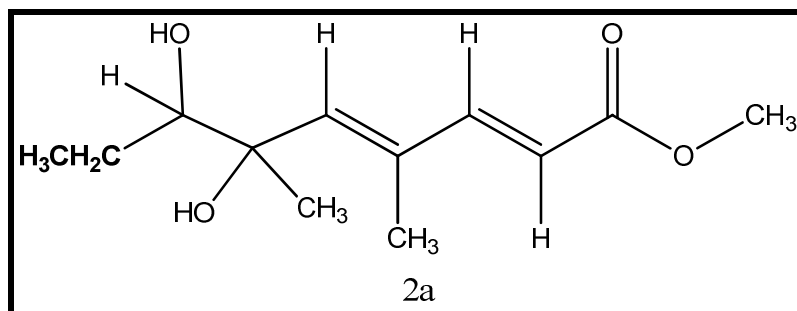
Adicionalmente, foi observado um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,66 (*q*,  $J=6,4$  Hz, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  75,1) conferido ao hidrogênio carbinólico H-7, o que somado a presença de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,15 (*d*,  $J=6,4$  Hz, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  17,7), evidenciou uma metila carbinólica em carbono metínico carbinólico. Um sinal observado em  $\delta_{\text{H}}$  1,33 (*s*, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  24,7) indicou a presença de outra metila (H-9) ligada a um carbono carbinólico  $\text{C}_6$ .

Todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono pela interpretação do experimento bidimensional HSQC (Figura 49).

Estas informações aliadas às observadas nos experimentos de COSY (Figura 51), HMBC (Figura 52) nos permitiram atribuir para a substância em questão como sendo (*2E, 4E*) 6,7 dihidroxi- 4,6 dimetil octanoato de metila. 2.

Levantamento bibliográfico realizado no SciFinder e no Dictionary of Natural Products sugeriu tratar-se de uma substância inédita, sendo encontrado apenas um homólogo codificado **2a** obtido por síntese (FORBES; PATTENDEN,1991).

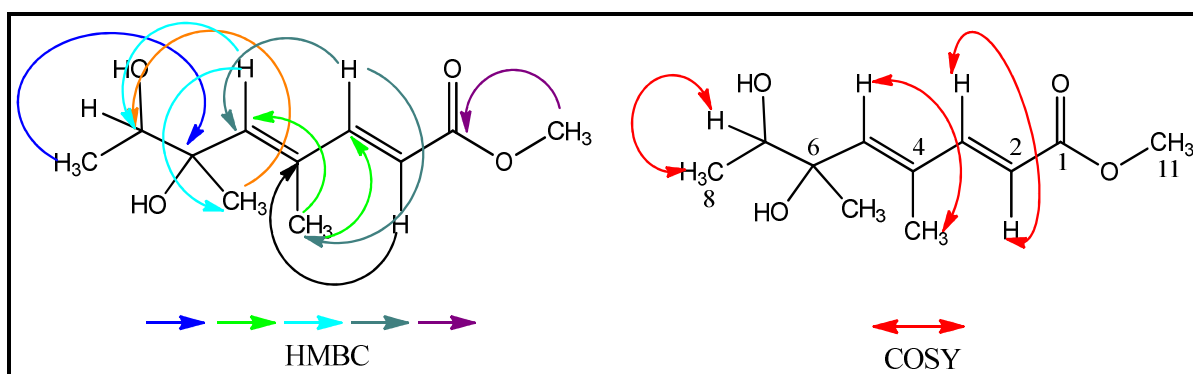
Figura 45 - Estrutura do análogo **2a**.



Análise da substância **2** por CLAE-DAD indicou  $T_r = 27'$  (Figura 53) e espectro no UV (Figura 54) com  $\lambda_{\max}$  de 264nm.

A análise dos dados obtidos por ESI (+) (Figura 55), no modo positivo, evidenciou a molécula com  $m/z$  237,1098 referindo-se ao íon aduto ( $[M+Na]^+$ ), que estão coerentes com a  $m/z$  proposta para uma substância semelhante segundo a literatura (FORBES; PATTENDEN,1991). Os estudos realizados por RMN 1 e 2 D discutidos acima, corroboraram para a fórmula molecular de  $C_{11}H_{18}O_4$ .

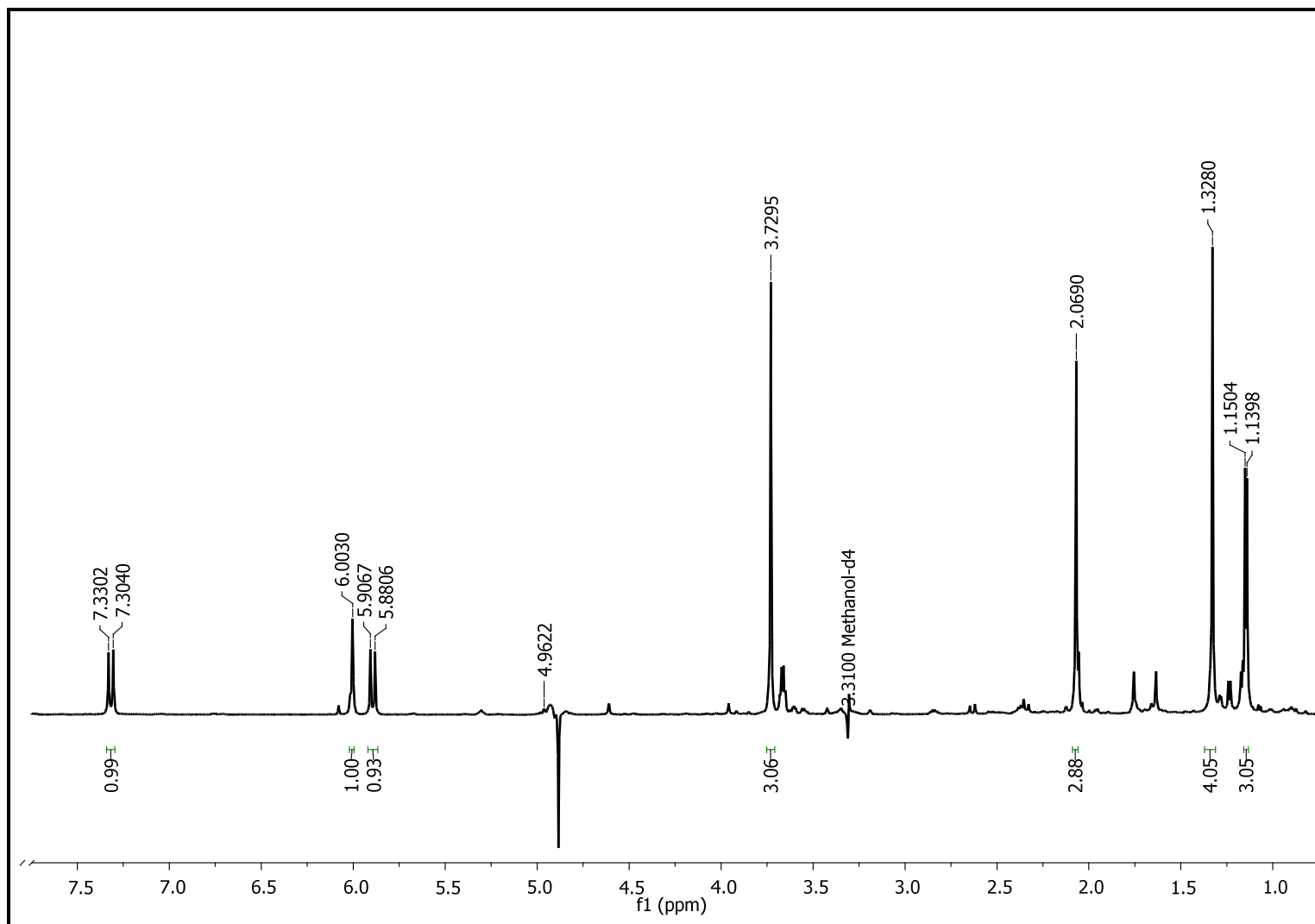
Figura 46 - Principais correlações de COSY e HMBC da substância **2**.



**Tabela 8** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Metanol- $d_4$ , 600 MHz) de **2** ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

Posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	*
<b>2</b>	5,89( <i>d</i> ; 15,7)	116,6
<b>3</b>	7,32( <i>d</i> ; 15,7)	152,6
<b>4</b>	-	136,2
<b>5</b>	6,0( <i>s</i> )	145,7
<b>6</b>	-	76,9
<b>7</b>	3,66( <i>q</i> ; 6,4)	75,1
<b>8</b>	1,15( <i>d</i> ; 6,4)	17,7
<b>9</b>	1,33 ( <i>s</i> )	24,7
<b>10</b>	2,07 ( <i>s</i> )	13,3
<b>11</b>	3,77( <i>s</i> )	52,1

\*não observado

Figura 47 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2** (Metanol- $d_4$ , 600MHz)

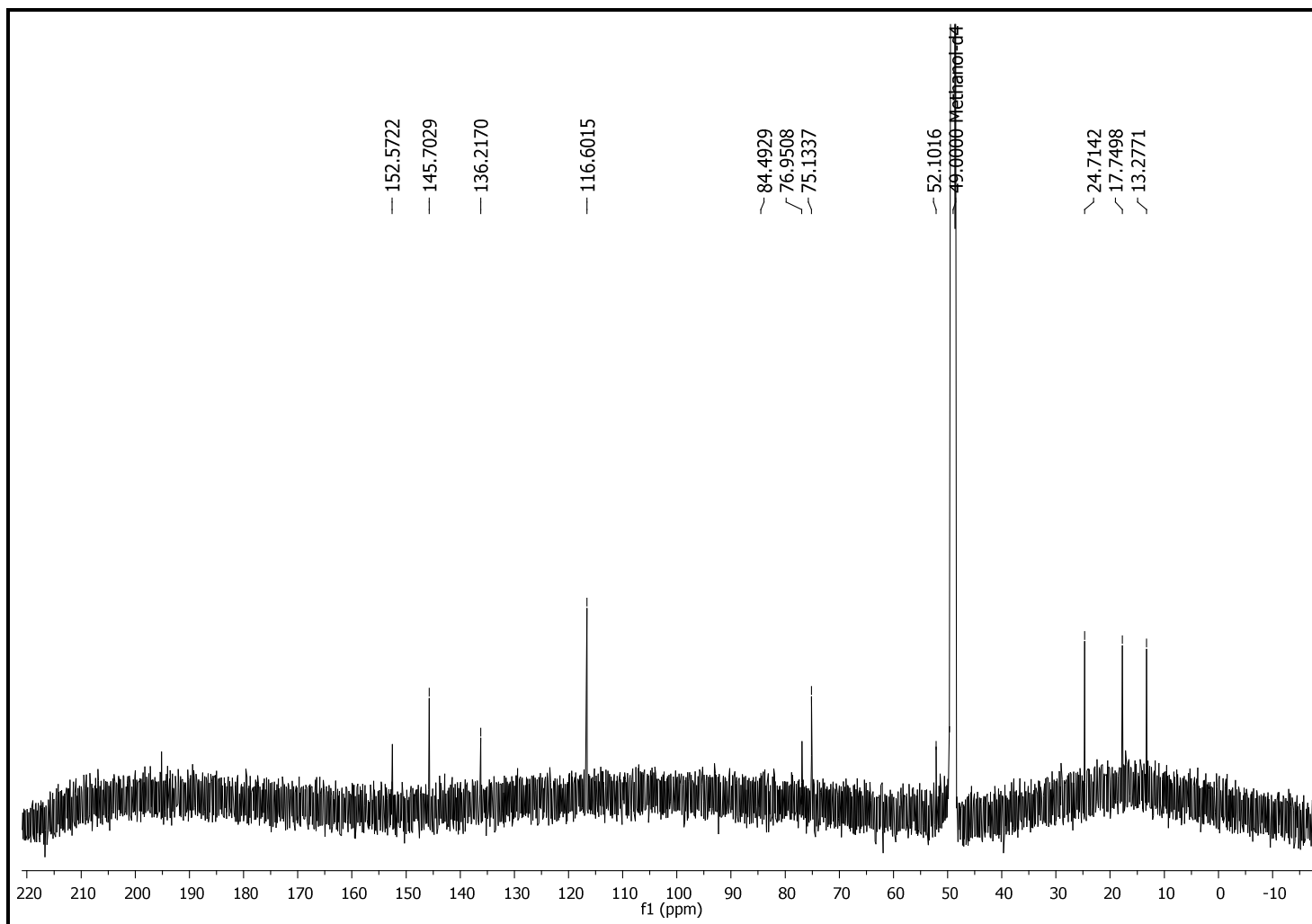
**Figura 48** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2** (Metanol- $\text{d}_4$ , 600 MHz)

Figura 49. Mapa de contorno de HSQC da substância **2** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).

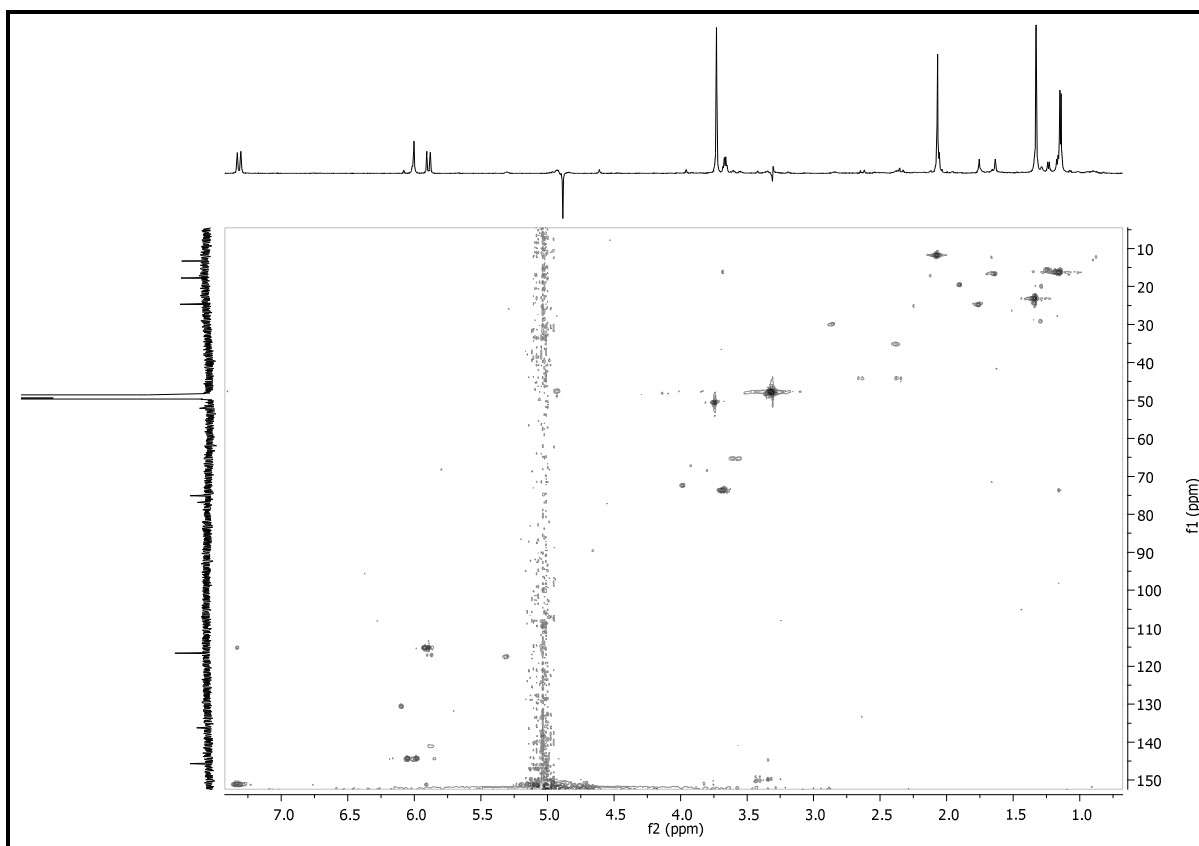


Figura 50. Espectro de NOESY 1D da substância **2** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600 MHz)

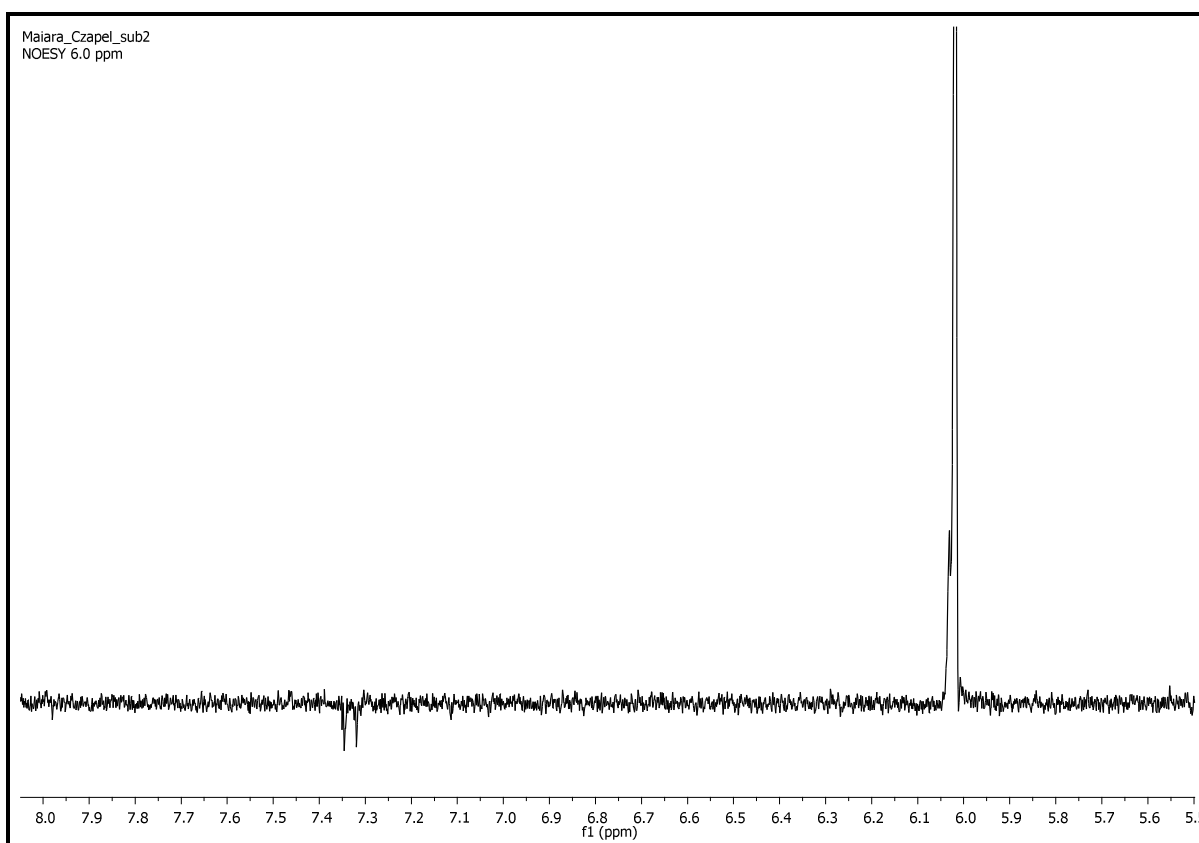


Figura 51 - Mapa de contorno de COSY da substância **2** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).

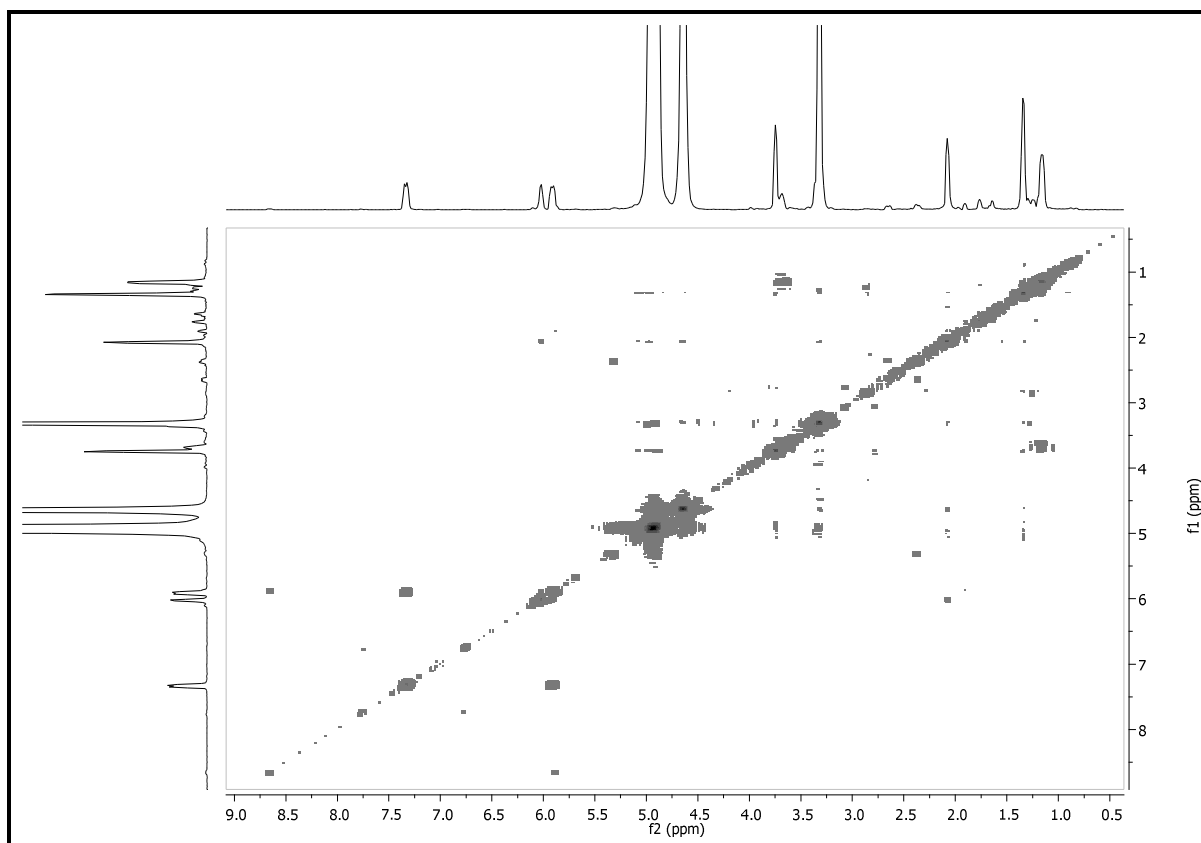
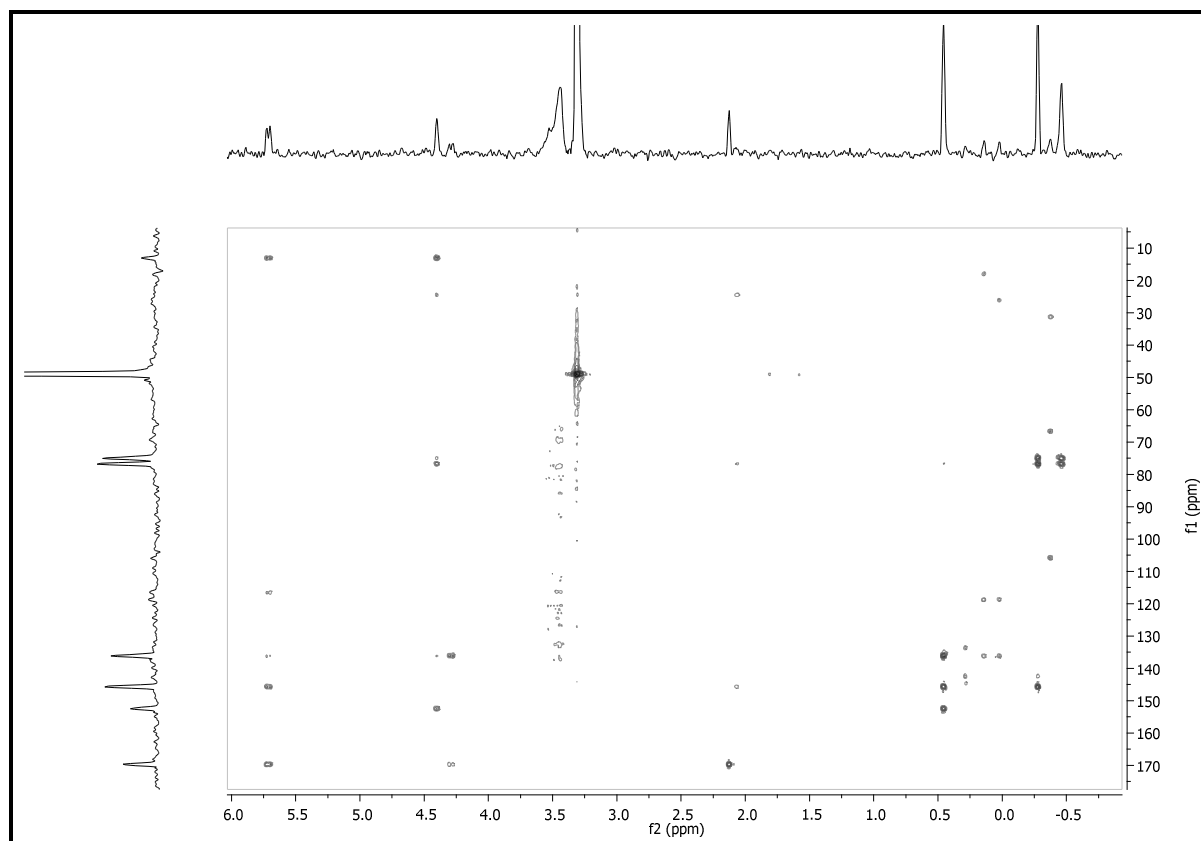
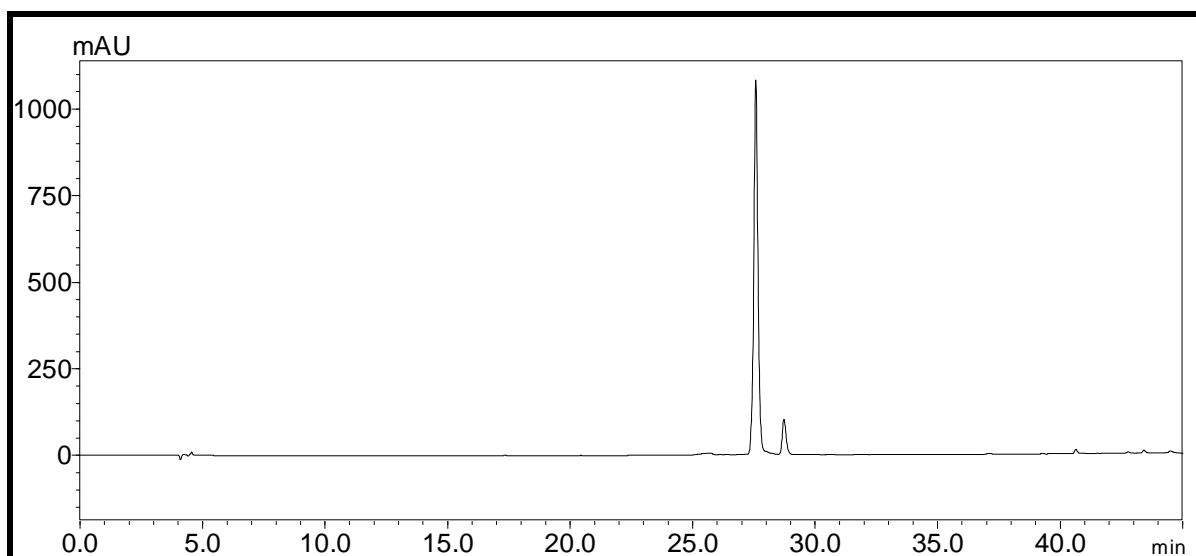


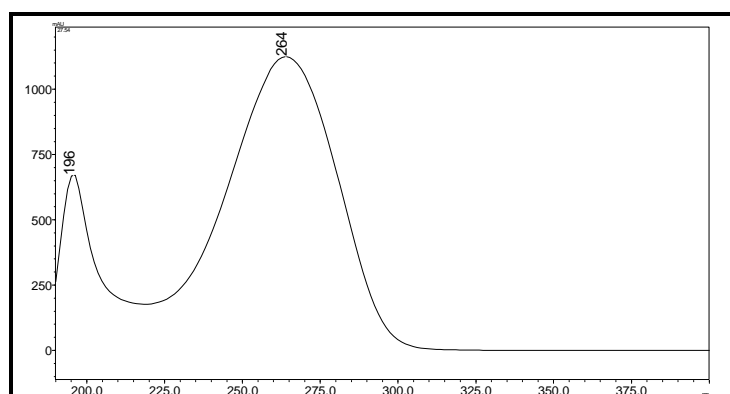
Figura 52 - Mapa de contorno de HMBC da substância **2** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).



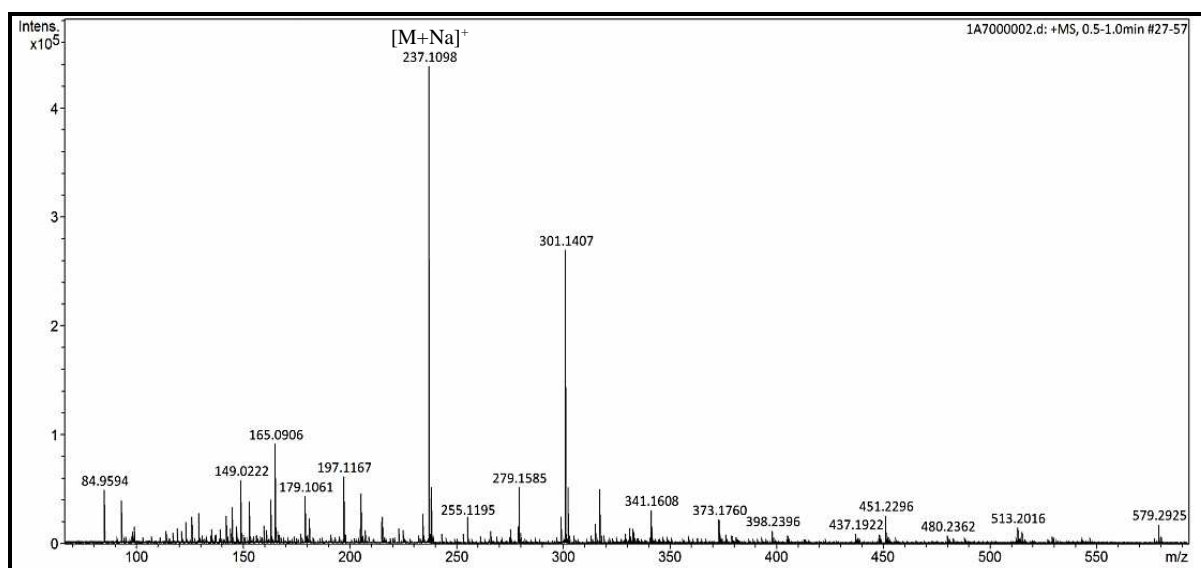
**Figura 53** - Cromatograma da substância **2**. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm.

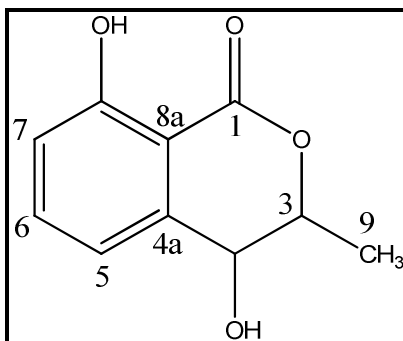


**Figura 54** - Curvas de UV da substância **2**.



**Figura 55** - Espectro de ESI-EM (+) referente ao aduto de sódio m/z 237,1098 ([M+Na]<sup>+</sup>) da substância **2**.



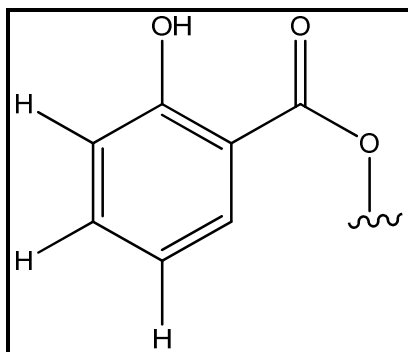
4.3.3 Identificação estrutural da substância **3****Figura 56** - Estrutura da substância **3** (4-hidroximeleína).

A substância **3** foi isolada como um sólido de coloração branca da fração 5 do extrato milho fr. ACN.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 59) mostrou um sistema aromático com dois duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,94 (*dd*,  $J= 8,0$  e  $1,0$  Hz,  $1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  116, 4),  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (*dt*,  $J= 8,0$  e  $1,0$  Hz,  $1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  116, 5) e um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,58 (*dd*,  $J= 8,0$  e  $7,5$  Hz,  $1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  136,5), evidenciando um anel aromático trissubstituído devido a observação da multiplicidade e constante de acoplamento desses sinais.

Observou-se também um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,47 (*d*,  $J= 6,5\text{Hz}$ ,  $3\text{H}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  17,1), característico de metila sobre carbono carbinólico (H-9). Estas informações foram obtidas com os experimentos de RMN realizados em metanol- $\text{d}_4$ .

Considerando que algumas regiões deste espectro ficaram sobrepostas com a água presente no metanol deuterado optamos por refazer o experimento de RMN em  $\text{CDCl}_3$  (Figura 60). Neste caso foi observado o aparecimento de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  10,9 evidenciando a presença de uma hidroxila fenólica quelando com uma carbonila. Estas observações nos permitiram sugerir que a substância em questão apresenta uma estrutura parcial mostrada abaixo.

**Figura 57** - Estrutura Parcial A da substância **3**.

No experimento de COSY (Figura 61) foi possível observar as correlações entre hidrogênio metínico carbinólico (H-3) em  $\delta_H$  4,60 (*m*,  $\delta_C$  81,0), com os hidrogênios metílicos (H-9) em  $\delta_H$  1,47 (*d*, 3H,  $\delta_C$  17,1) e oxibenzílico (H-4) em  $\delta_H$  4,55 (*m*, 1H,  $\delta_C$  68,0), permitindo estabelecer a sub- unidade  $\alpha$ -metil- hidroxi para a substância **3**. Esta observação foi confirmada pelas correlações observadas no experimento de HMBC (Figura 62) de H-9 com C-3/C-4 e de H-5 com o C-1( $\delta_C$  176,2), sendo este último valor atribuído a carbonila de lactona.

No experimento de TOCSY 1D (Figura 63) foi observada a correlação entre o dubleto em  $\delta_H$  1,47 com um multiplete em  $\delta_H$  4,60 a 4,55. A esta região muito complexa, foram atribuídos os hidrogênios carbinólicos H-3 e H-4.

A análise dos dados obtidos por ESI-EM (+) (Figura 64), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada com  $m/z$  195,0650 ( $[M+H]^+$ ) e em  $m/z$  217,0470 relativo ao íon aduto ( $[M+Na]^+$ ) o que associado aos dados de RMN de  $^1H$  e HSQC (Figura 65) evidenciaram a fórmula molecular de  $C_{10}H_{10}O_4$ .

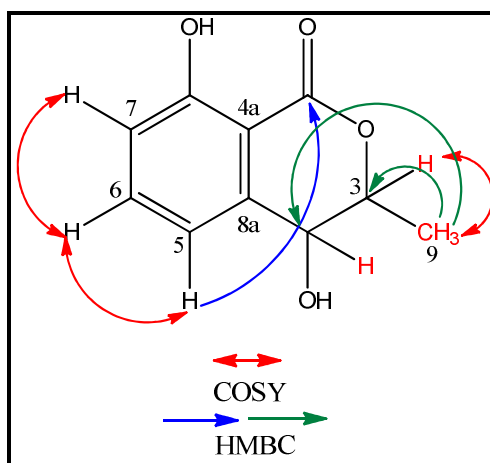
Com estas informações aliadas ao dados de EM (Figura 64) de alta resolução em comparação com os dados da literatura (OLIVEIRA, 2009), permitiram sugerir que a substância **3** trata-se da isocumarina 4-hidroximeleina. Devido à complexidade dos hidrogênios carbinólicos impedindo a leitura das constantes de acoplamento de H-3 e H-4, ficamos impossibilitados de propor a estereoquímica relativa dos carbonos C-3 e C-4.

Foi realizada a análise da substância **3** por CLAE-DAD (Figura 66) evidenciando um  $Tr=$  19,53' e espectro no UV com bandas em 209, 245 e 312 nm (Figura 67), o que ratificou a proposta da estrutura de **3** com o espectro de UV característico de isocumarinas.

A substância **3** pertence à classe das isocumarinas, que são encontradas em uma grande variedade de organismos, como bactérias, líquens e fungos, sendo relatadas de diferentes espécies e gêneros de fungos endofíticos (OLIVEIRA, 2009; CHAPLA;

BIASETO; ARAUJO, 2013). As isocumarinas são metabólitos secundários estruturalmente semelhantes às cumarinas, possuindo como diferença um anel lactônico invertido. Essa classe de substâncias pode apresentar diversas atividades biológicas, como inibição de proteases, antimicrobiana, antialérgica, antimaláricos, reguladores de crescimento, entre outros (OLIVEIRA, 2009; KROHN et al., 1997).

**Figura 58.** Principais correlações de COSY e HMBC da substância **3**.

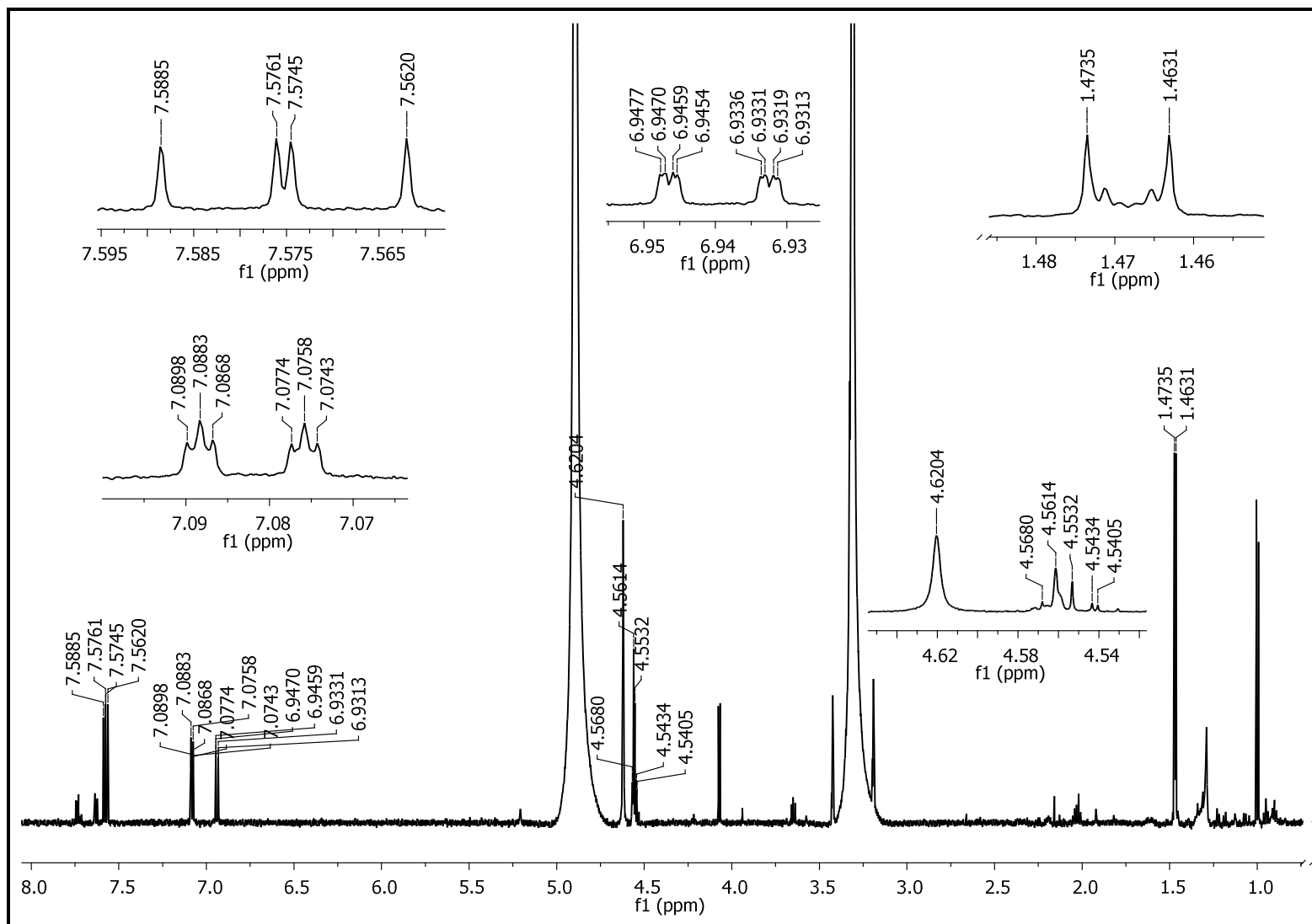


**Tabela 9** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Metanol- $d_4$ , 600 MHz) de **3** ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

Posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	176,2
2	-	-
3	4,55( <i>m</i> )	81
4	4,60( <i>m</i> )	68
4 <sup>a</sup>	*	*
5	7,08( <i>dt</i> ; 8,0; 1,0)	116,5
6	7,58( <i>dd</i> ; 8,4; 7,5)	136,5
7	6,94( <i>dd</i> ; 8,4; 1,0)	116,4
8	-	*
8 <sup>a</sup>	*	*
9	1,47( <i>d</i> ; 6,5)	17,1
10	4,62( <i>s</i> )	-

\*não observado

Figura 59 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** (Metanol- $d_4$ , 600MHz)



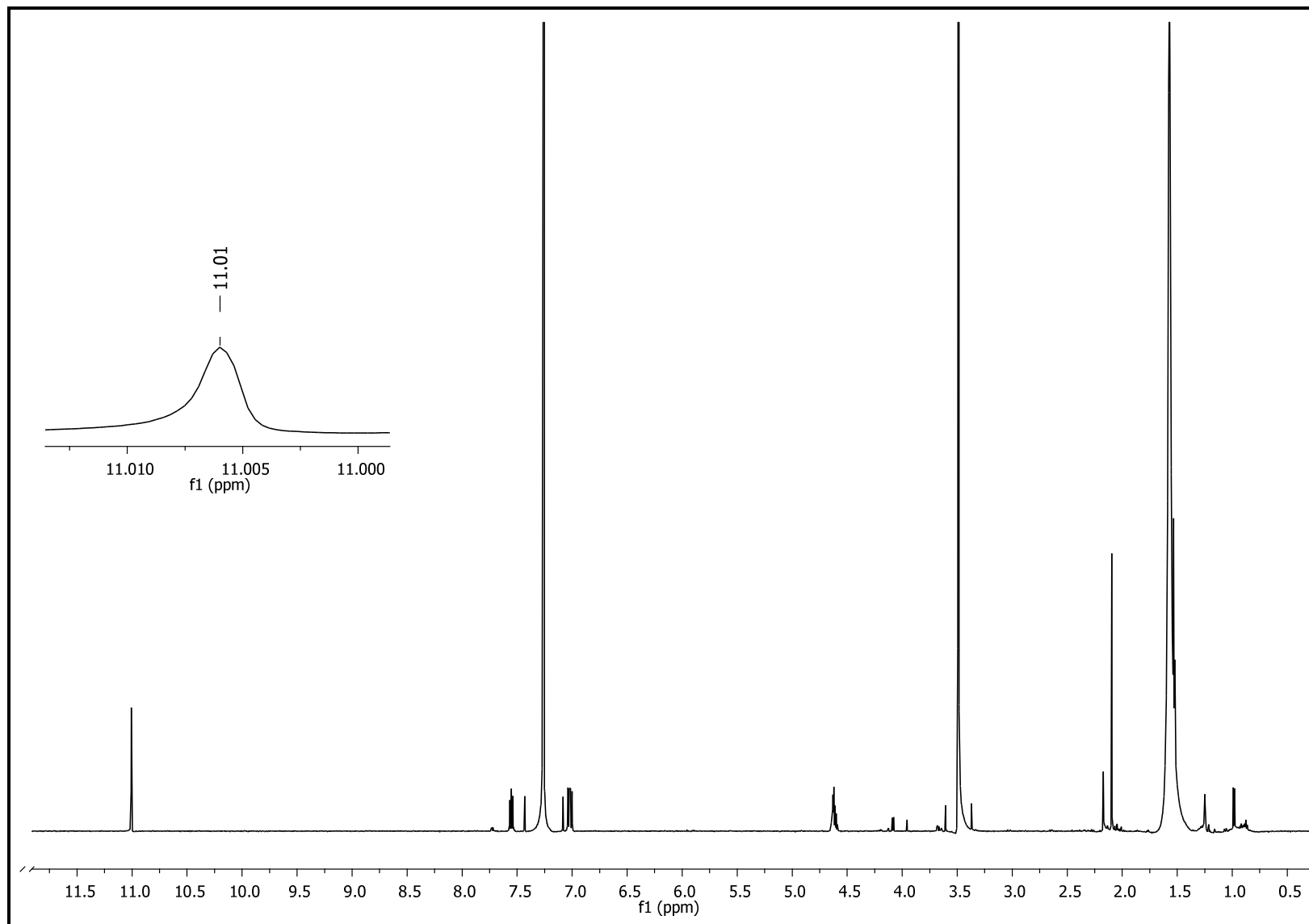
**Figura 60** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz)

Figura 61 - Mapa de contorno de COSY da substância **3** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).

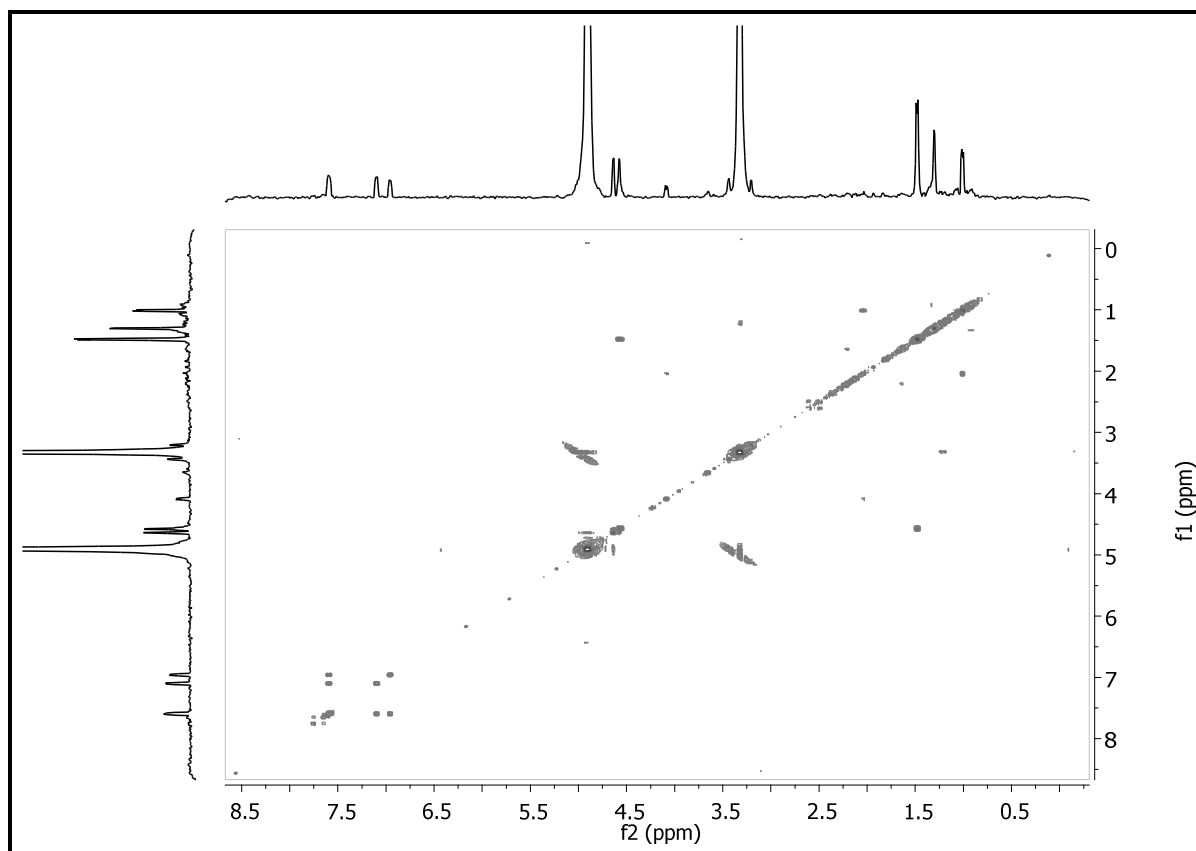
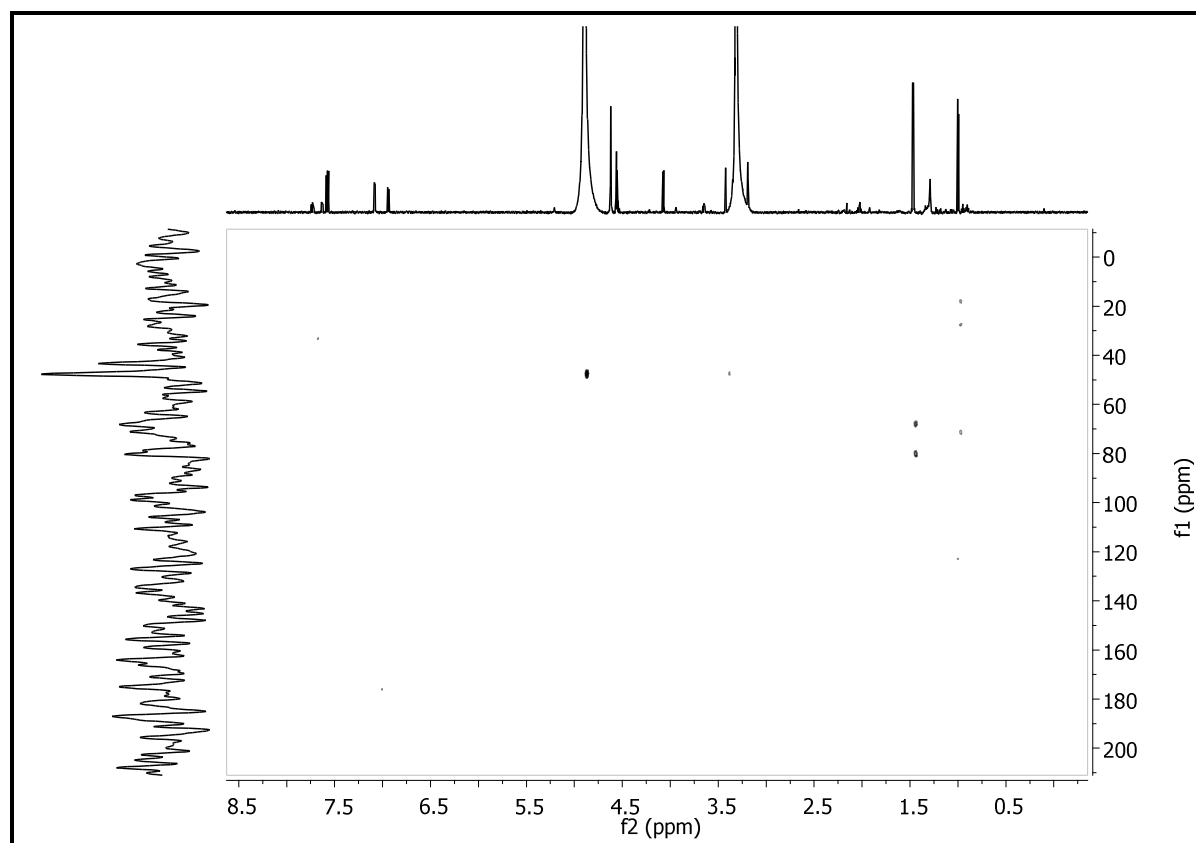
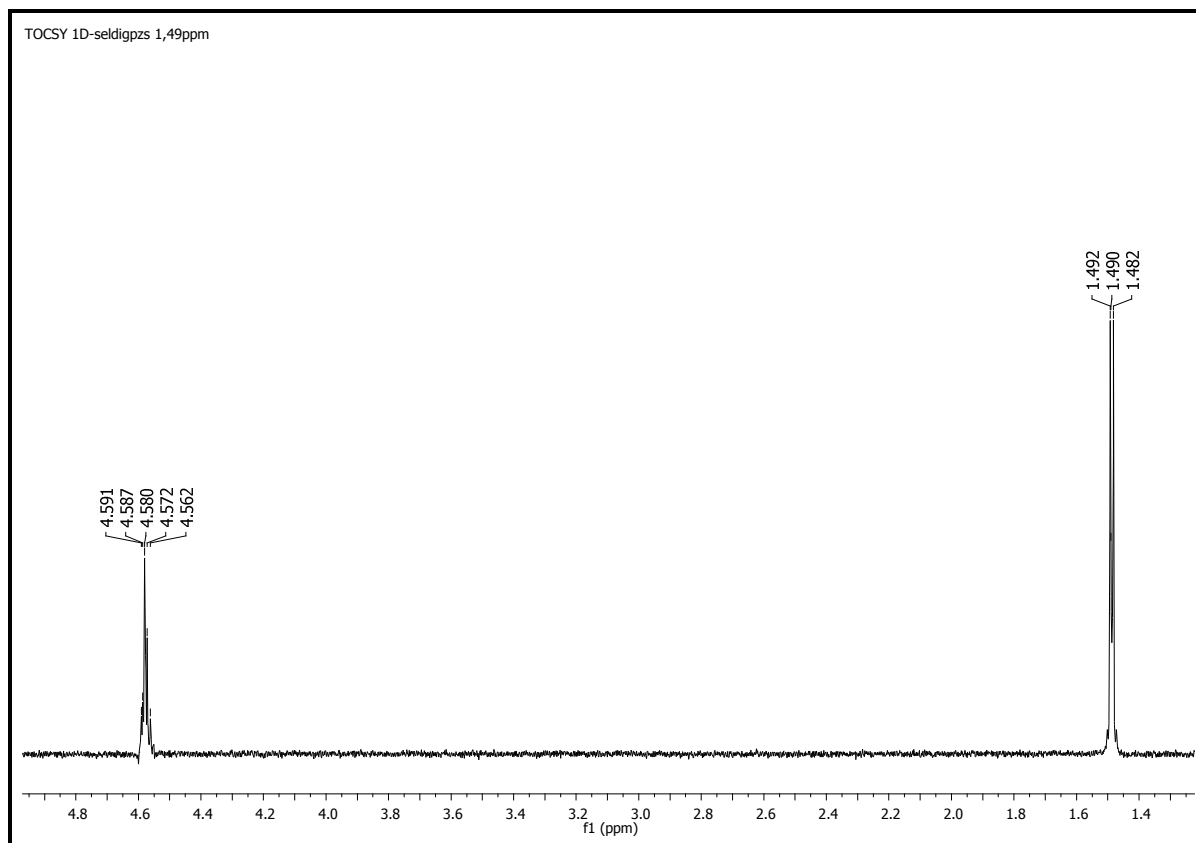
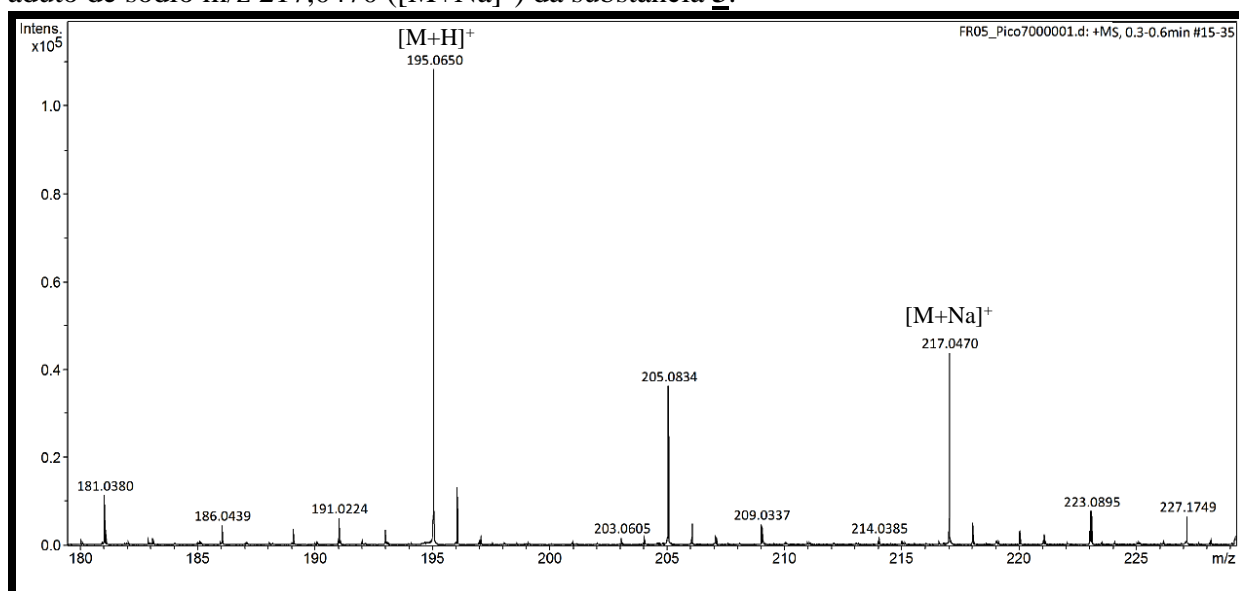


Figura 62. Mapa de contorno de HMBC da substância **3** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).



**Figura 63** - Espectro de TOCSY-1D da substância **3** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).**Figura 64** - Espectro de ESI-EM (+) da molécula protonada  $m/z$  195, 0650 ( $[M+H]^+$ ) e o aduto de sódio  $m/z$  217,0470 ( $[M+Na]^+$ ) da substância **3**.

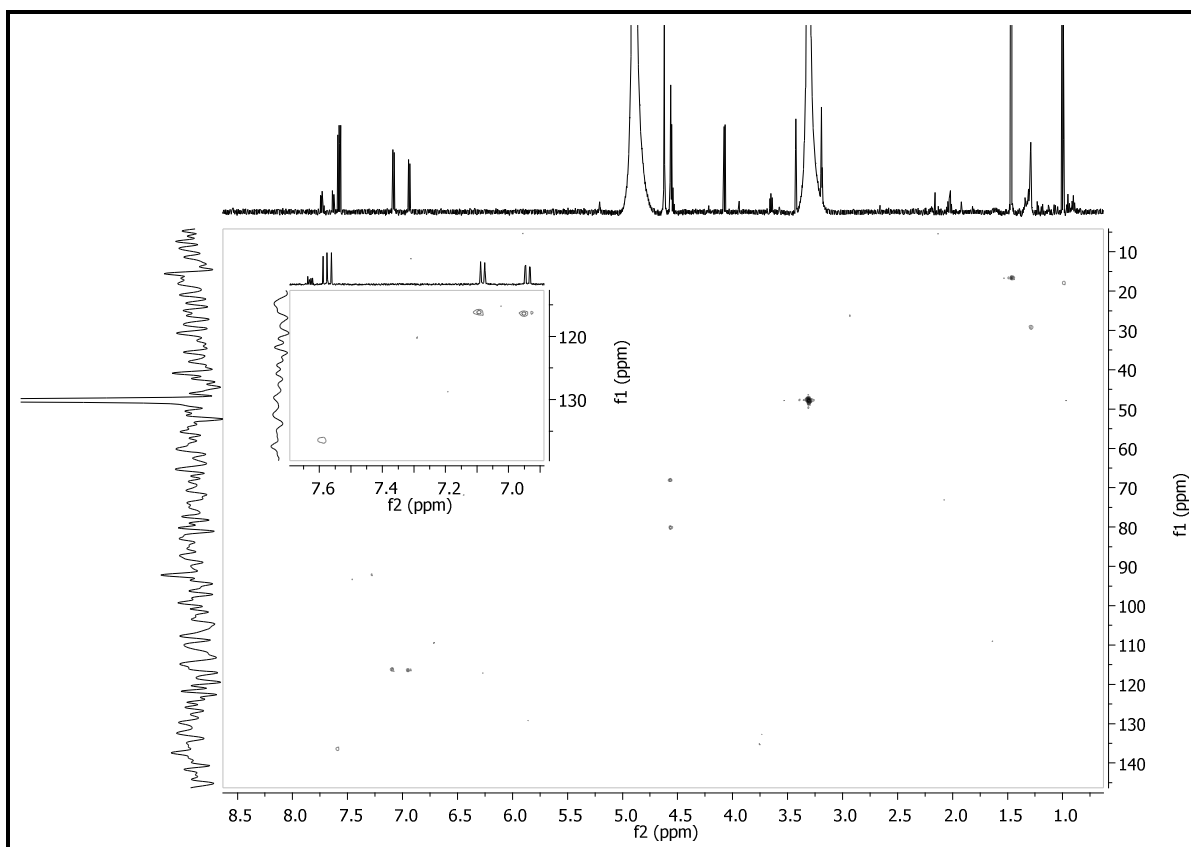
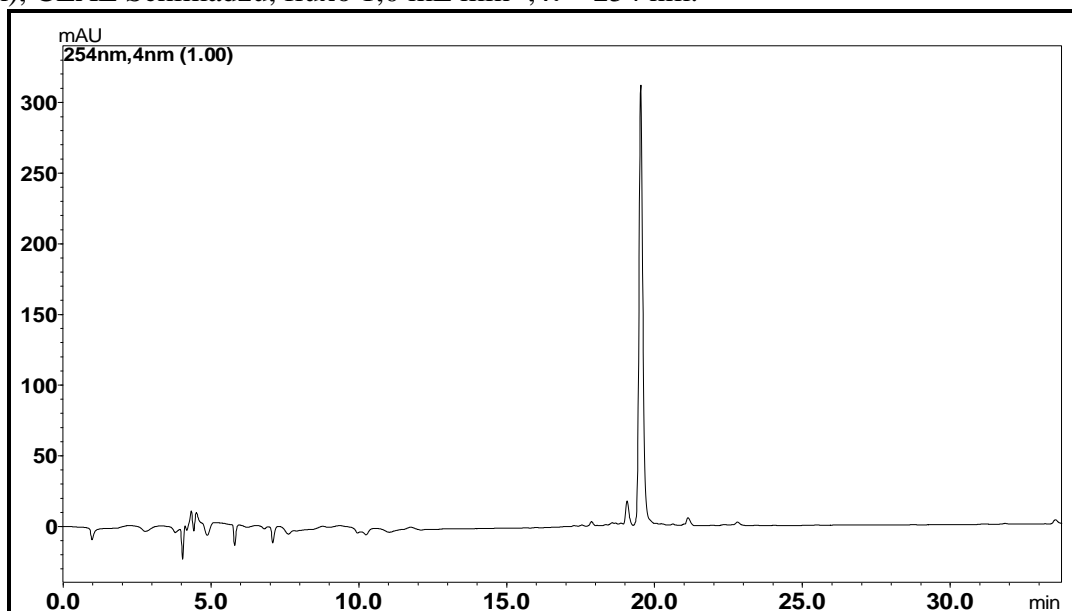
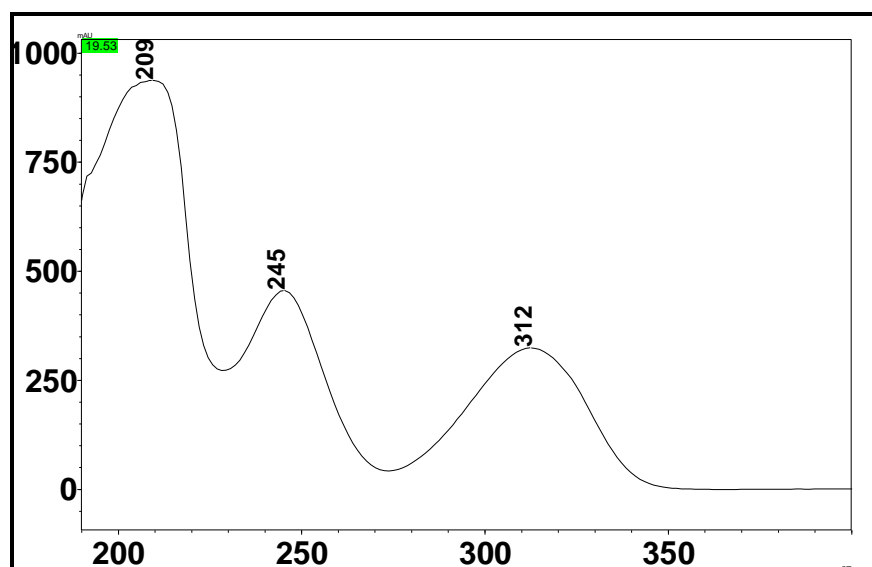
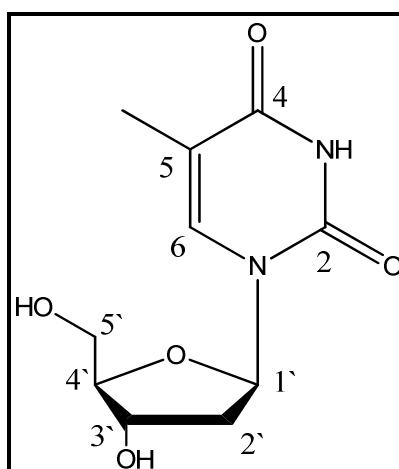
**Figura 65.** Mapa de contorno de HSQC da substância **3** (Metanol-d<sub>4</sub>, 600MHz).**Figura 66** - Cromatograma da substância **3**. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm.

Figura 67 - Curvas de UV da substância **3**.

#### 4.3.5 Identificação estrutural da substância **4**

Figura 68 - Estrutura da substância **4** (Timidina)

A substância **4** foi isolada como um sólido de coloração branca do Ext. bruto Milho fr. Aquosa-fr. metanólica.

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-d}_6$  (Figura 70) da substância **4** foi possível observar dois dubletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  7,69 (*d*;  $J=1,0$ ; 1H,  $\delta_{\text{C}}$  136,6) e outro em  $\delta_{\text{H}}$  1,77 (*d*,  $J=1,00$  Hz, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  12,5) sendo que estes apresentam correlação no experimento de COSY (Figura 72). A constante de acoplamento observada entre estes dois sinais evidenciou acoplamento alílico entre uma metila e um hidrogênio vinílico. A correlação observada em HMBC (Figura 73) de  $\text{H}_3\text{C-5} \leftrightarrow \text{C-4/C-5/C-6}$  sugeriu a presença de uma base nitrogenada, no

caso 5-metilpirimidina, o que foi reforçado pelos valores dos deslocamentos químicos em RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (obtido do HSQC e HMBC).

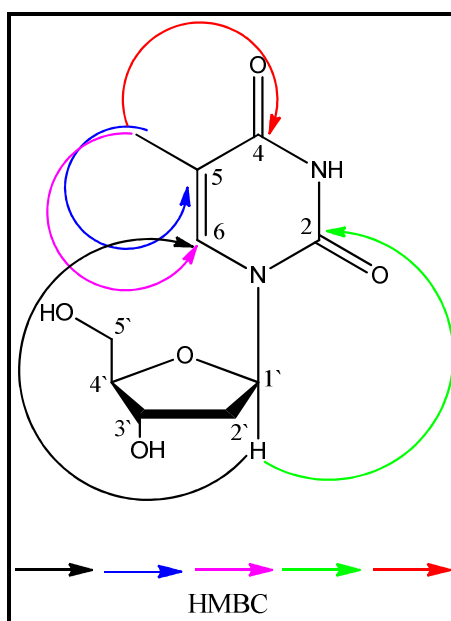
Pelo experimento de COSY (Figura 72) foram visualizadas as interações  $\text{H-1}' \leftrightarrow \text{H-2}' \leftrightarrow \text{H-3}' \leftrightarrow \text{H-4}' \leftrightarrow \text{H5}'$ , que adicionado aos experimentos de HMBC e HSQC (Figura 72 e Figura 73) evidenciaram, claramente, uma unidade de deoxi-ribose.

O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,16 (*dd*;  $J=7,6; 6,2$ ; 1H,  $\delta_{\text{C}}$  83,8) foi atribuído ao hidrogênio anomérico de uma unidade de deoxi-ribose. A correlação desse hidrogênio com os carbonos C-2/ C-6 nos permitiu atribuir para a substância **4** como sendo a Timidina (Figura 68).

Foi realizada a análise da substância **4** por CLAE-DAD (Figura 75) evidenciando um  $T_r= 10,53'$  e espectro no UV (Figura 76) com bandas em 203, 263 e 323 nm.

A análise dos dados obtidos por ESI- EM (+) (Figura 77), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada com  $m/z$  243,0974 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) o que associado aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC evidenciaram a fórmula molecular de  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ . Todos esses dados corroboram com os dados obtidos na literatura (GATLIN; DAVIS, 1962, JONES et al., 1970)

**Figura 69** - Principais correlações de HMBC da substância **4**.



**Tabela 10** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) de **4** ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

Posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	150,6
4	-	164,3
5	-	109,6
6	7,69 ( <i>d</i> ; 1,0)	136,6
1`	6,16 ( <i>dd</i> ; 7,6; 6,2)	83,8
2`	2,06 ( <i>m</i> )	40,0
3`	4,23 ( <i>m</i> )	70,5
4`	3,75 ( <i>m</i> )	87,5
5`	3,56 ( <i>m</i> )	61,8
5-CH <sub>3</sub>	1,77 ( <i>d</i> ; 1,0)	12,5
2-NH	11, 27( <i>sl</i> )	-
3`OH	5,04( <i>t</i> )	-
5`OH	5,25( <i>d</i> )	-

\*não observado

Os nucleosídeos e nucleotídeos já foram isolados de algas, principalmente algas pardas (CAO, 2014) e em algumas algas vermelhas, como *Gymnogongrus flabelliformis* Harv. (YUAN, 2008b) e *Pyropia perforata* (SU, 1962). Adicionalmente existem relatos da produção por *Penicillium* sp. (YUAN et al., 2014).

Os nucleosídeos e seus análogos possuem diversas atividades biológicas, como anticancerígena, anti-agregação plaquetária e antioxidante, além de desempenharem funções de regulação e modulação de processos fisiológicos em nosso organismo (CAO, 2014; IYÚ, 2011; SENANAYAKE et al., 2011; SPANOU, 2007).

Figura 70. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** (DMSO- $d_6$ , 600MHz).

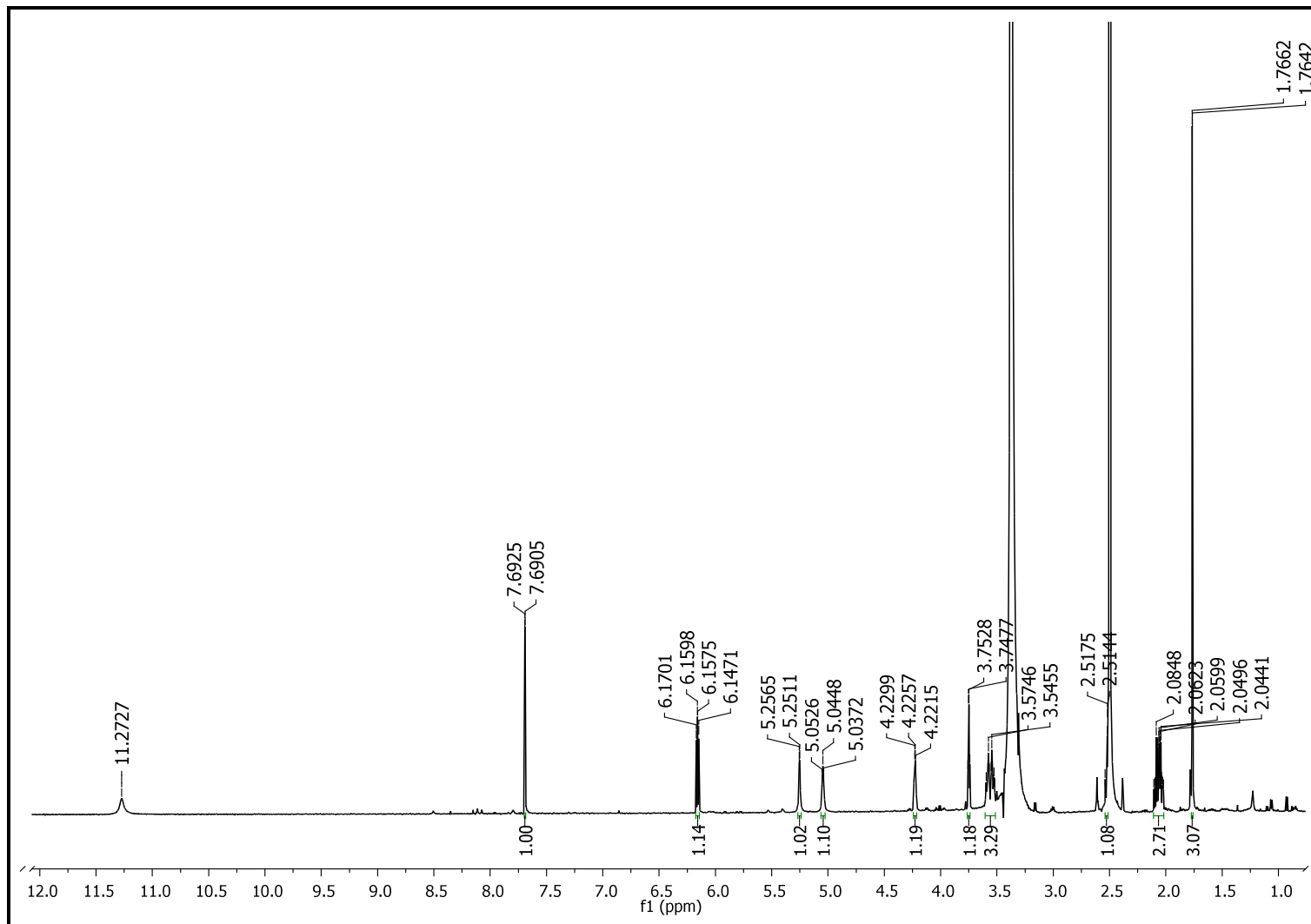


Figura 71 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz).

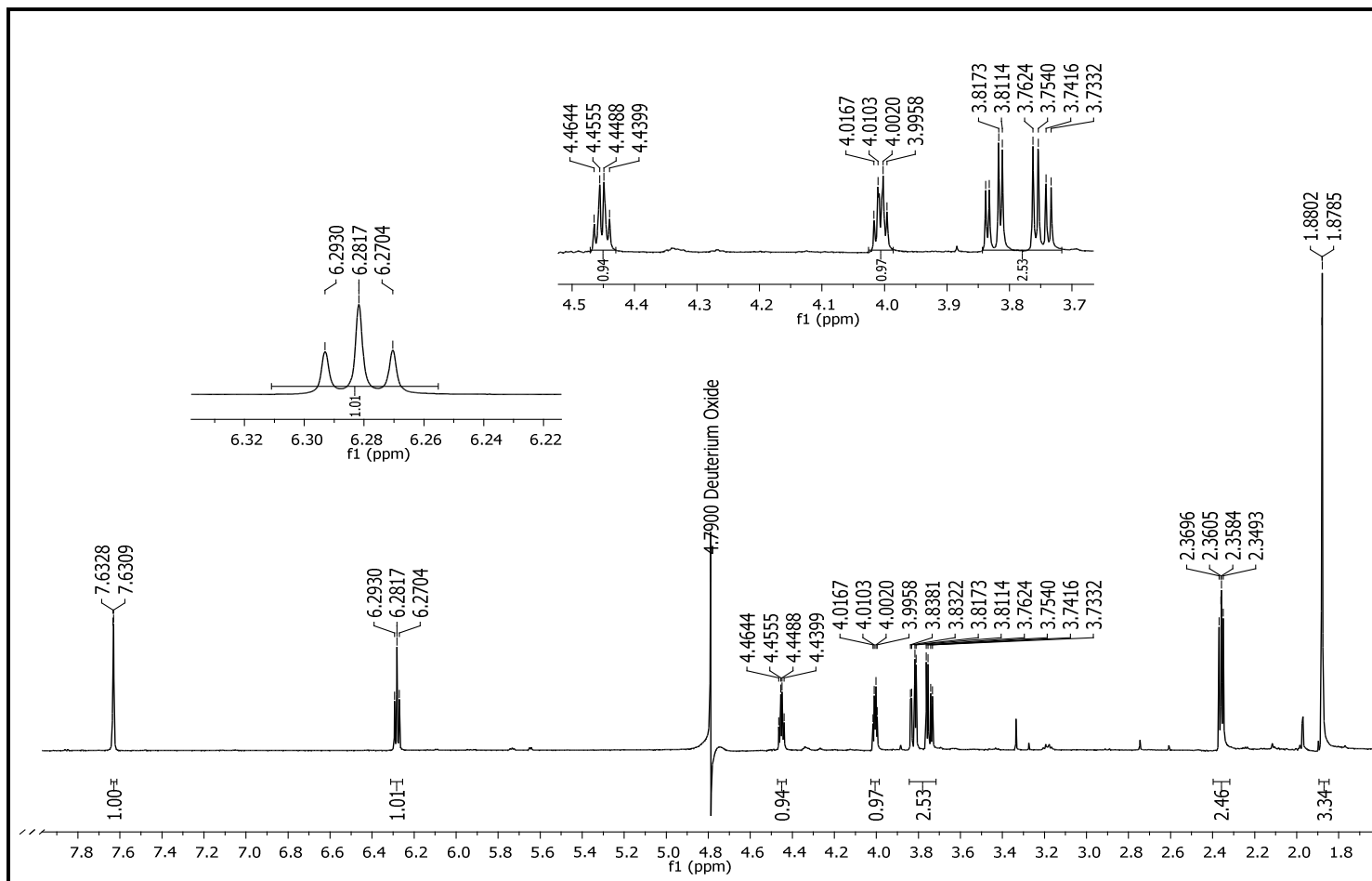


Figura 72 - Mapa de contorno de COSY da substância **4** (DMSO-d<sub>6</sub>, 600MHz).

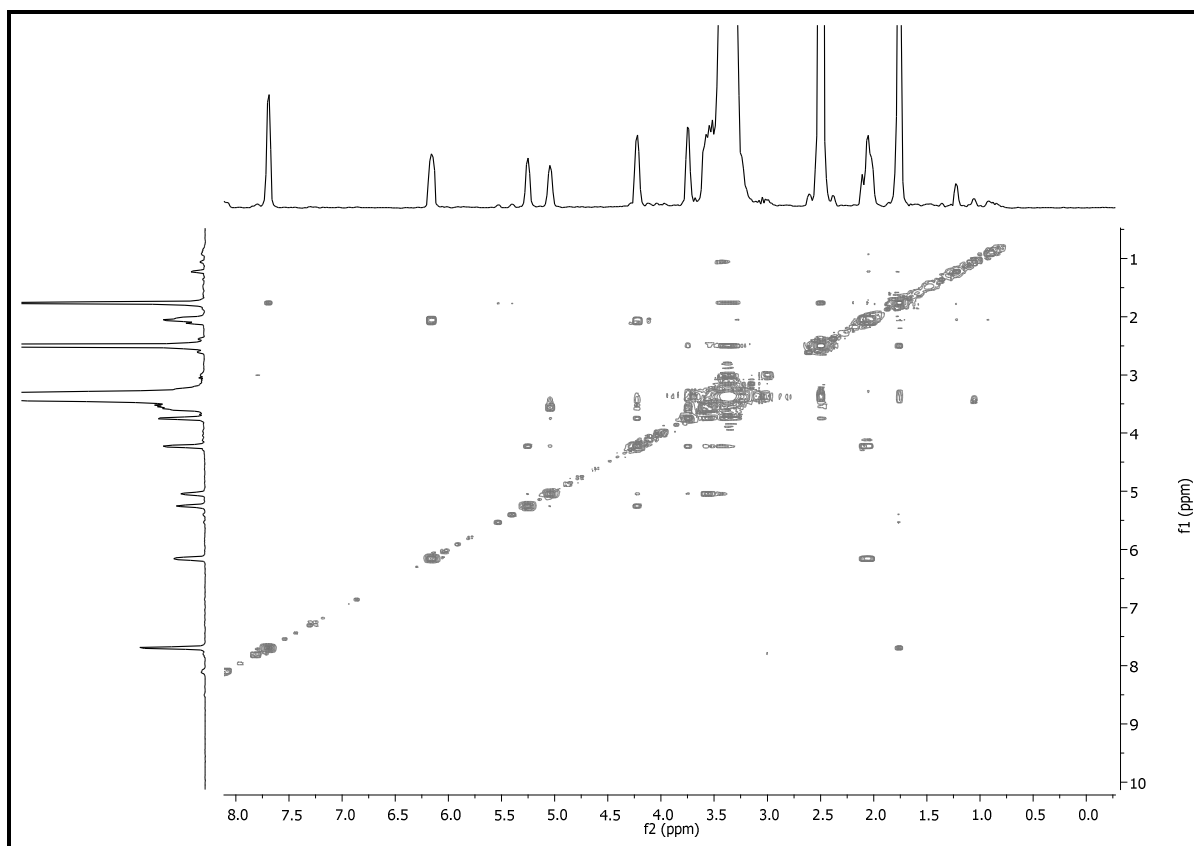
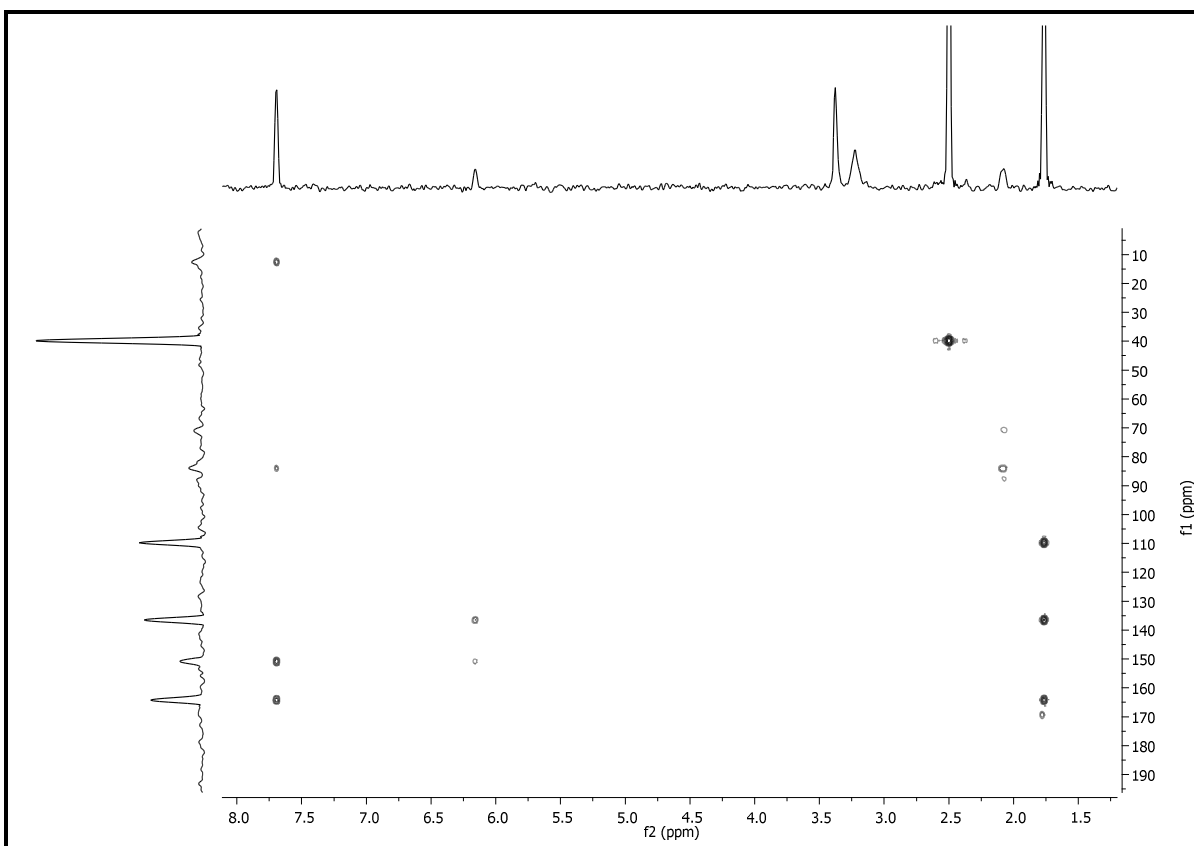


Figura 73. Mapa de contorno de HMBC da substância **4** (DMSO-d<sub>6</sub>, 600MHz).



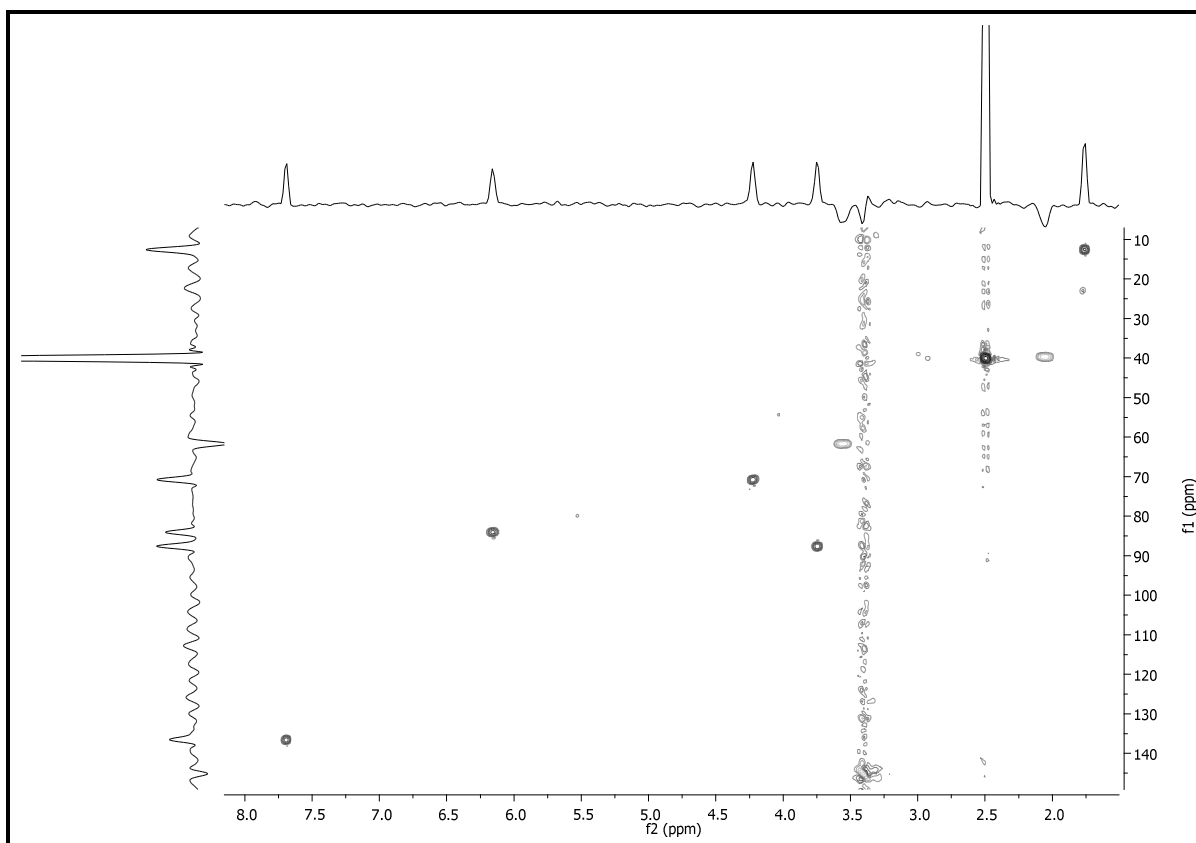
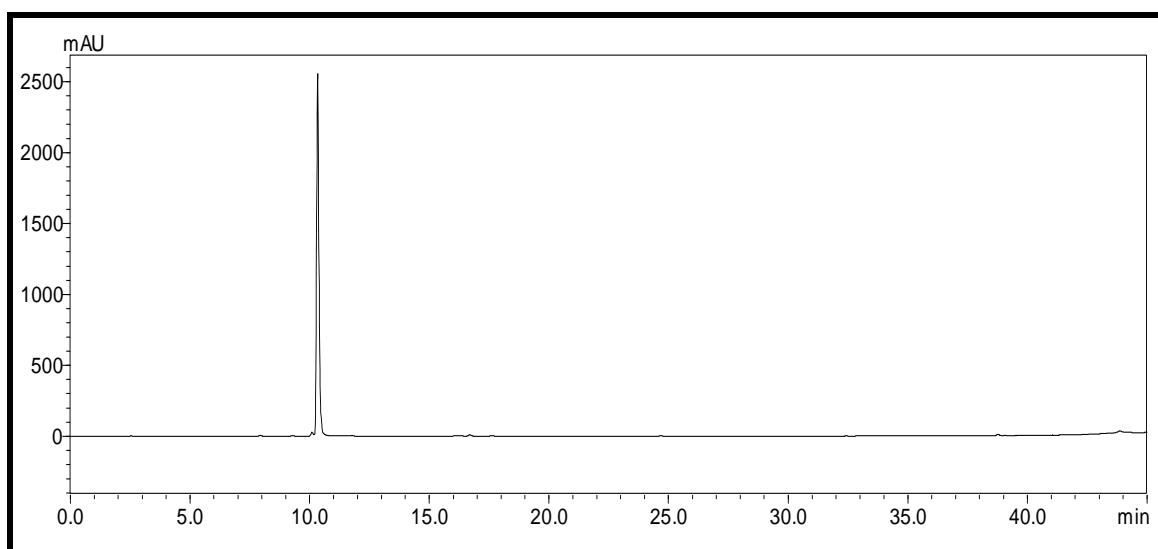
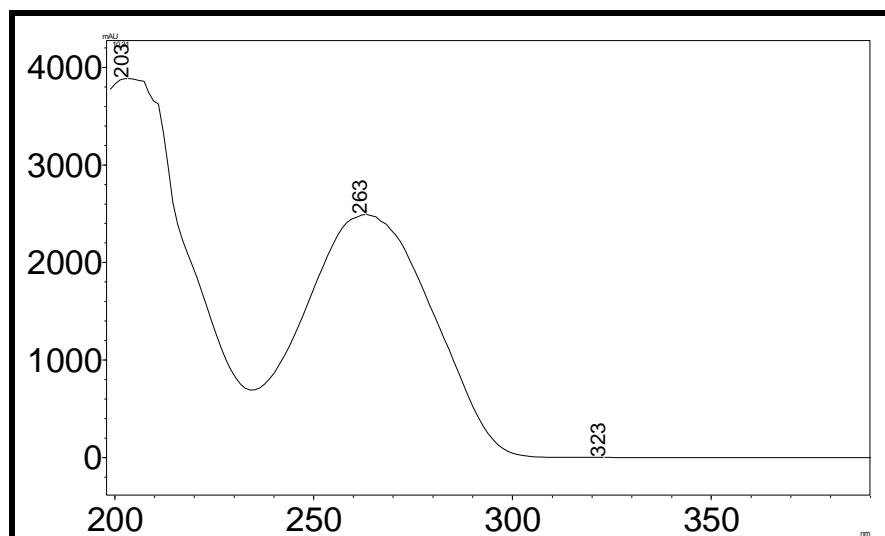
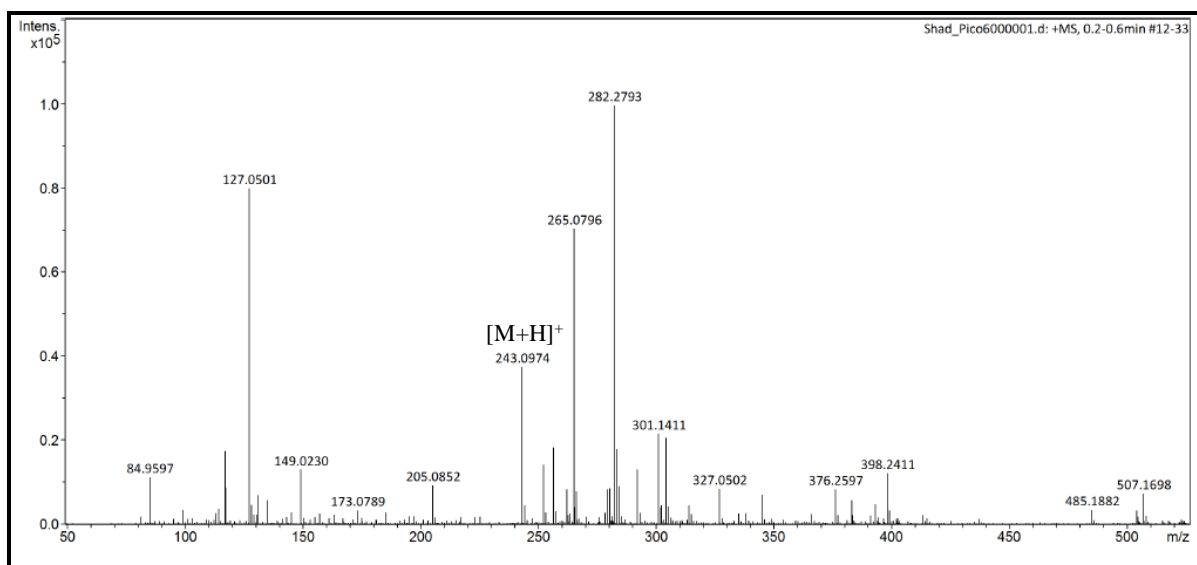
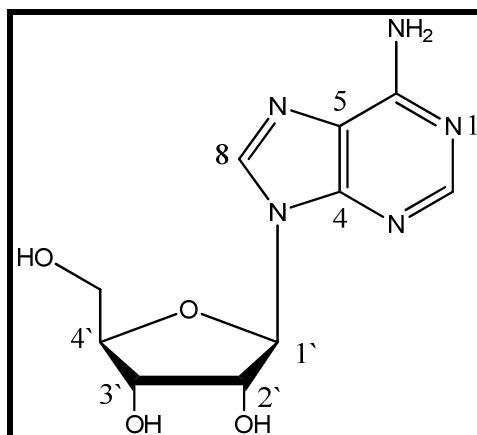
**Figura 74** - Mapa de contorno de HSQC da substância **4** (DMSO-d<sub>6</sub>, 600MHz).**Figura 75** - Cromatograma da substância **4**. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex® Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm.

Figura 76 - Curvas de UV da substância **4**.Figura 77 - Espectro de ESI-EM (+) da molécula protonada  $m/z$  243,0974 ( $[M+H]^+$ ) da substância **4**.

4.3.6 Identificação estrutural da substância 5**Figura 78** - Estrutura da substância 5 (Adenosina).

A substância 5 foi isolada como um sólido de coloração branca do Ext. bruto Milho fr. Aquosa-fr. metanólica.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  (Figura 79) da substância 5 apresentou dois singletos um em  $\delta_{\text{H}}$  8,29 (*s*; 1H,  $\delta_{\text{C}}$  140,3) e em  $\delta_{\text{H}}$  8,19 (*s*, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  152,4), que se correlacionam por HMBC (Figura 81) com C5/C-4, e com C-6/C-4, respectivamente. Devido aos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C2 e C8 em RMN de  $^1\text{H}$ , sugerimos a presença da uma base nitrogenada.

Somente para efeito de certificação da estrutura proposta para 5, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi realizado em  $\text{DMSO-d}_6$  (Figura 80). Neste caso os hidrogênios ligados ao oxigênio e nitrogênio foram visualizados. Reforçando a presença de uma base nitrogenada.

As correlações observadas por TOCSY-1D (Figura 83) entre os hidrogênios  $\text{H-1}' \leftrightarrow \text{H-2}' \leftrightarrow \text{H-3}' \leftrightarrow \text{H-4}' \leftrightarrow \text{H-5}'\text{a} \leftrightarrow \text{H-5}'\text{b}$  associado aos valores dos deslocamento químicos, multiplicidade e constantes de acoplamento corroboraram para a presença da ribose. Pela análise do experimento de HSQC (Figura 84) e COSY (Figura 85), visualizou-se uma unidade de ribose, o que foi confirmado pela presença do hidrogênio anomérico, dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,03 (*d*,  $J = 6,2$  Hz, 1H,  $\delta_{\text{C}}$  88,1).

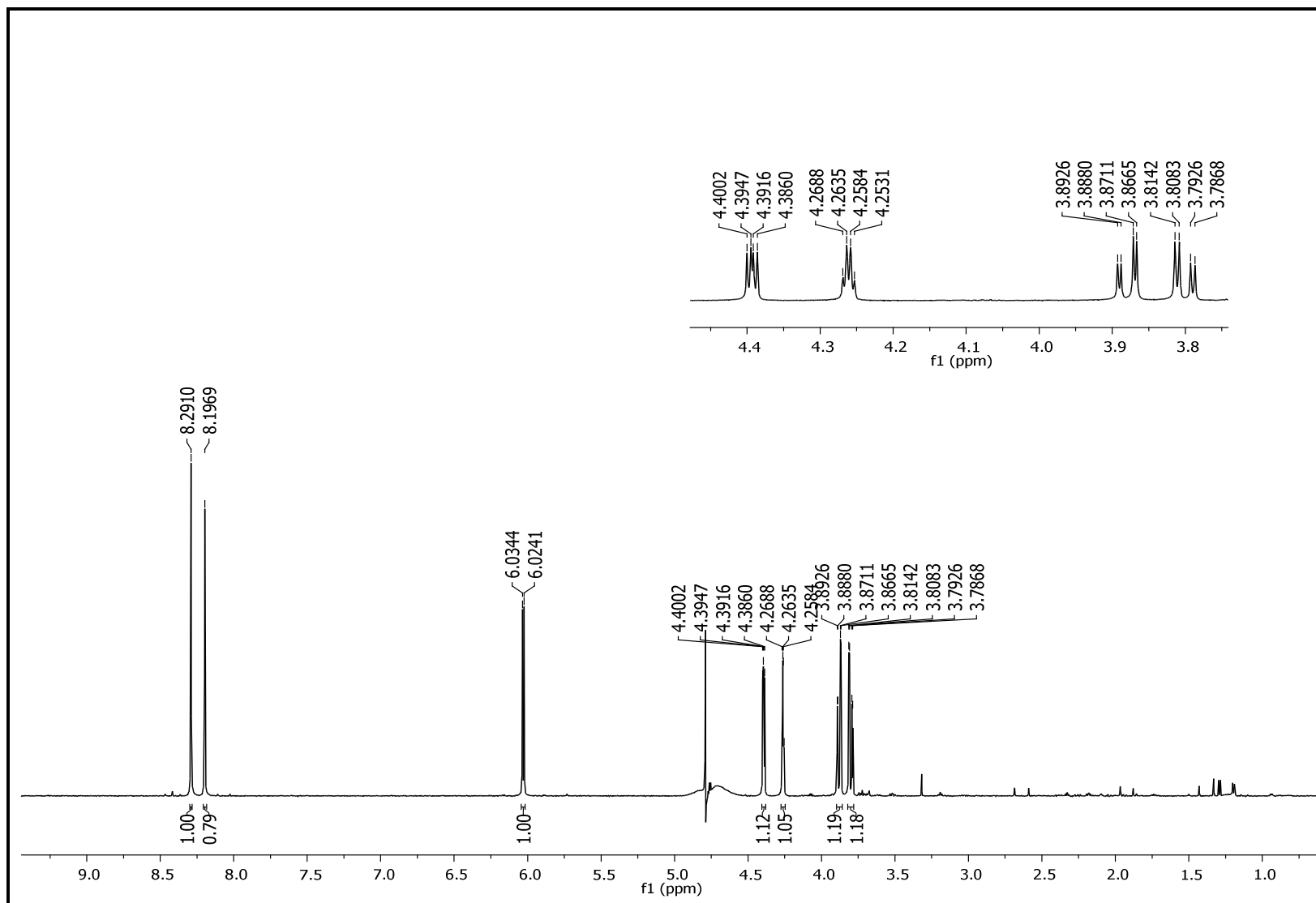
Foi realizada a análise da substância 5 por CLAE-DAD (Figura 86) evidenciando um  $T_r = 11,50'$  e espectro no UV (Figura 87) com banda em 258 nm.

As análises dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e comparações dos dados da literatura (YUAN et al., 2014; DOMONDON et al, 2004), bem como comparações com a substância anteriormente isolada, indicaram que a substância 5 tratava-se de outro nucleosídeo, a adenosina.

**Tabela 11** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) de **5** ( $\delta$  em ppm e J em Hz).

Posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>2</b>	8,19 (s)	152,4
<b>4</b>	-	148,5
<b>5</b>	-	118,9
<b>6</b>	-	155,6
<b>8</b>	8,29 (s)	140,3
<b>1'</b>	6,03 (d; 6,2)	88,1
<b>2'</b>	4,39(dd, 5,2; 3,2)	70,5
<b>3'</b>	*	73,5
<b>4'</b>	4,26 (dd, 6,2; 3,2)	85,8
<b>5'a</b>	3,88 (dd; 12,0; 2,8)	
<b>5'b</b>	3,80 (dd; 12,0; 3,5)	61,4

Figura 79 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz).



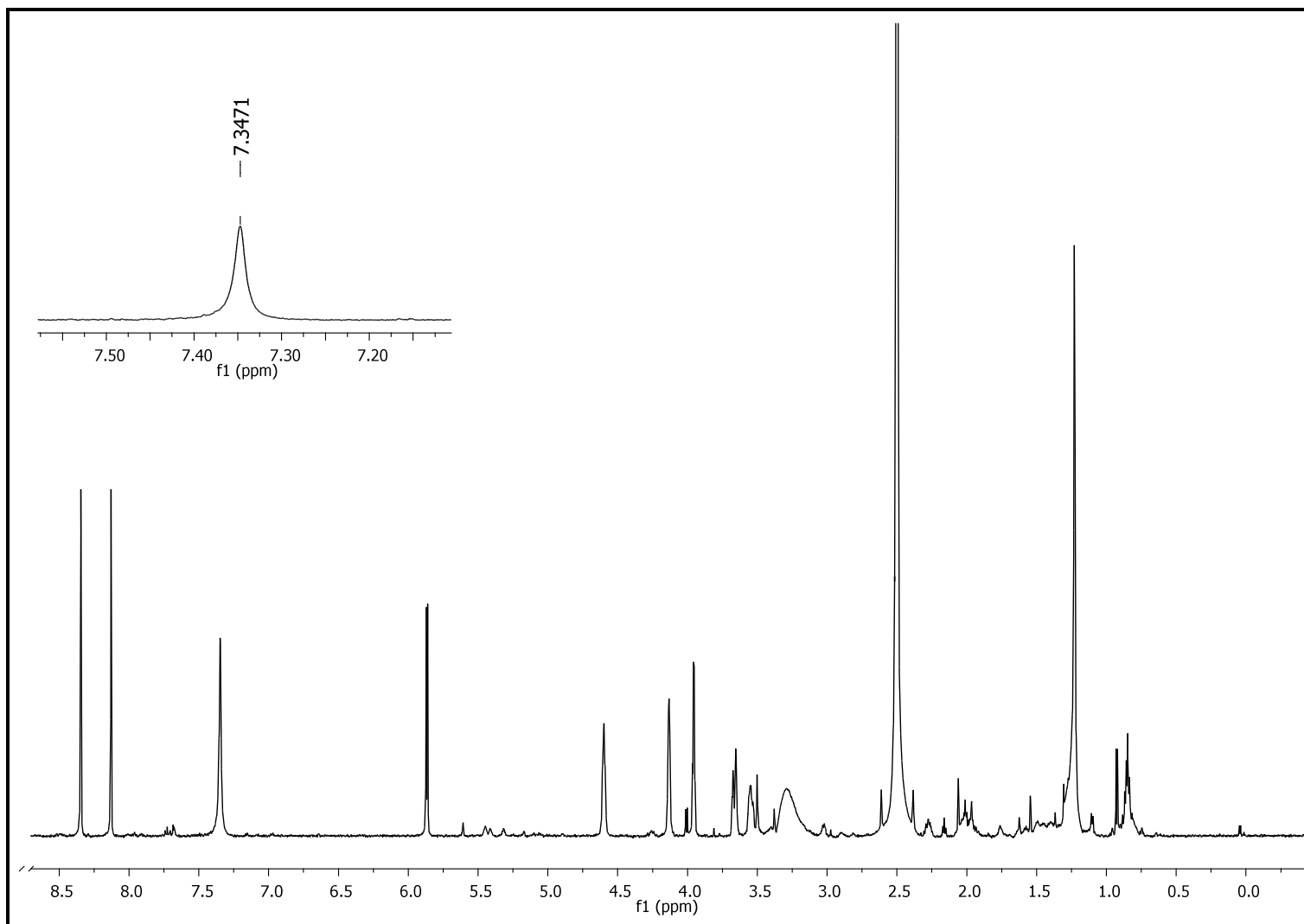
**Figura 80** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** (DMSO- $d_6$ , 600MHz)

Figura 81. Mapa de contorno de HMBC da substância 5 (D<sub>2</sub>O, 600MHz).

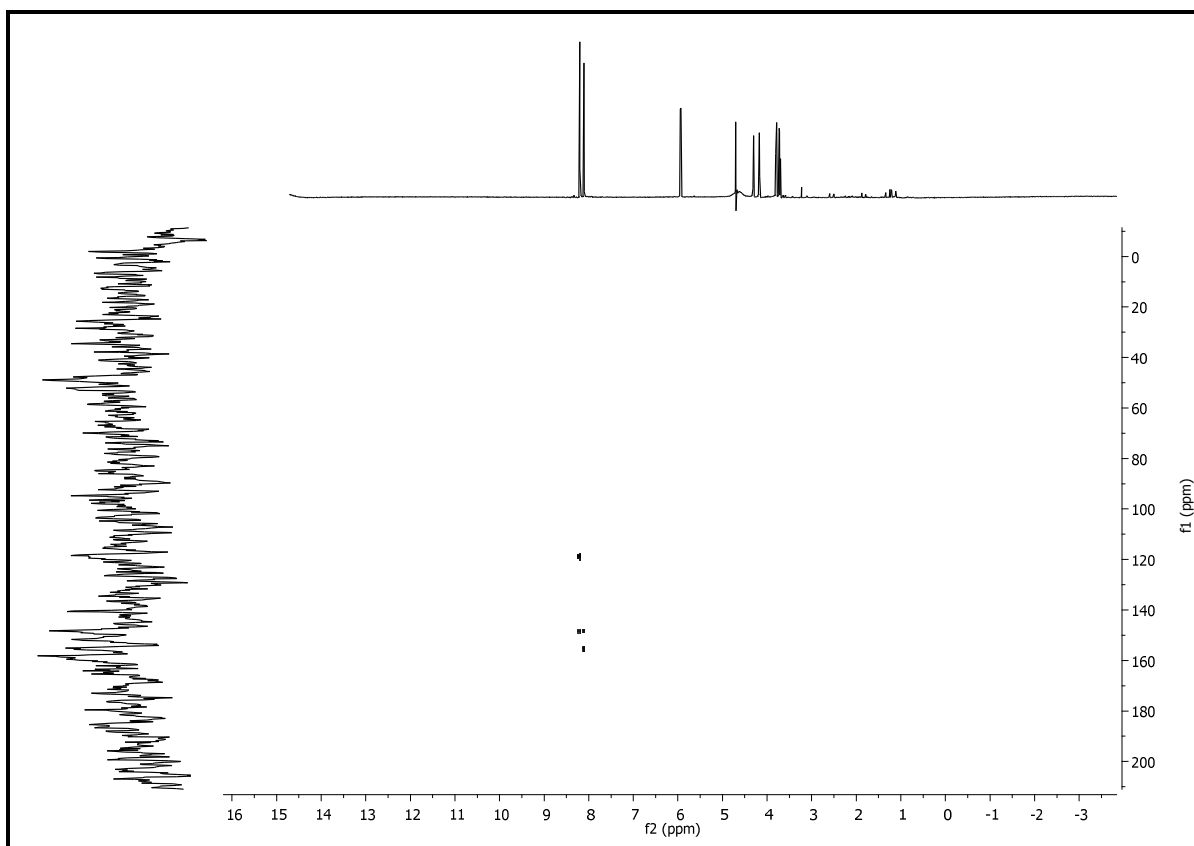


Figura 82 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 5 (D<sub>2</sub>O, 600MHz).

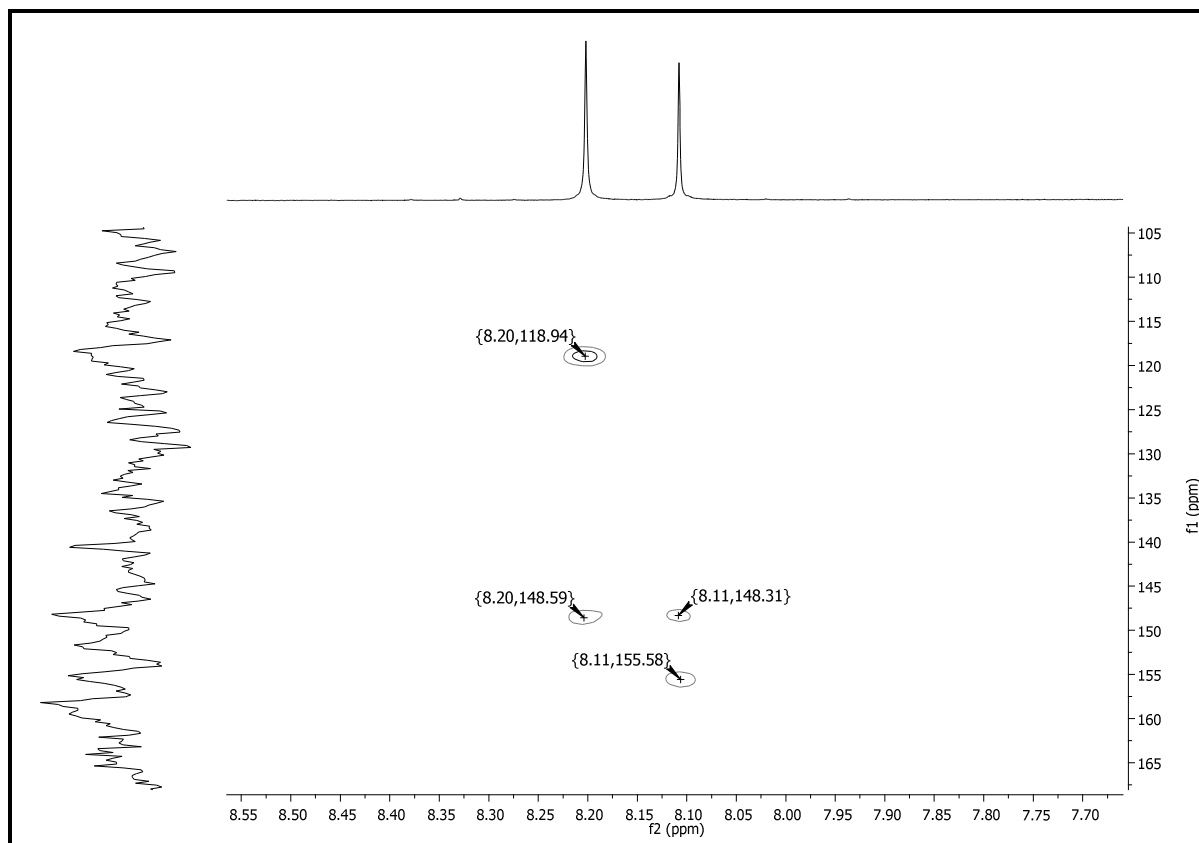


Figura 83 - Espectro de TOCSY-1D da substância **5** (D<sub>2</sub>O, 600MHz).

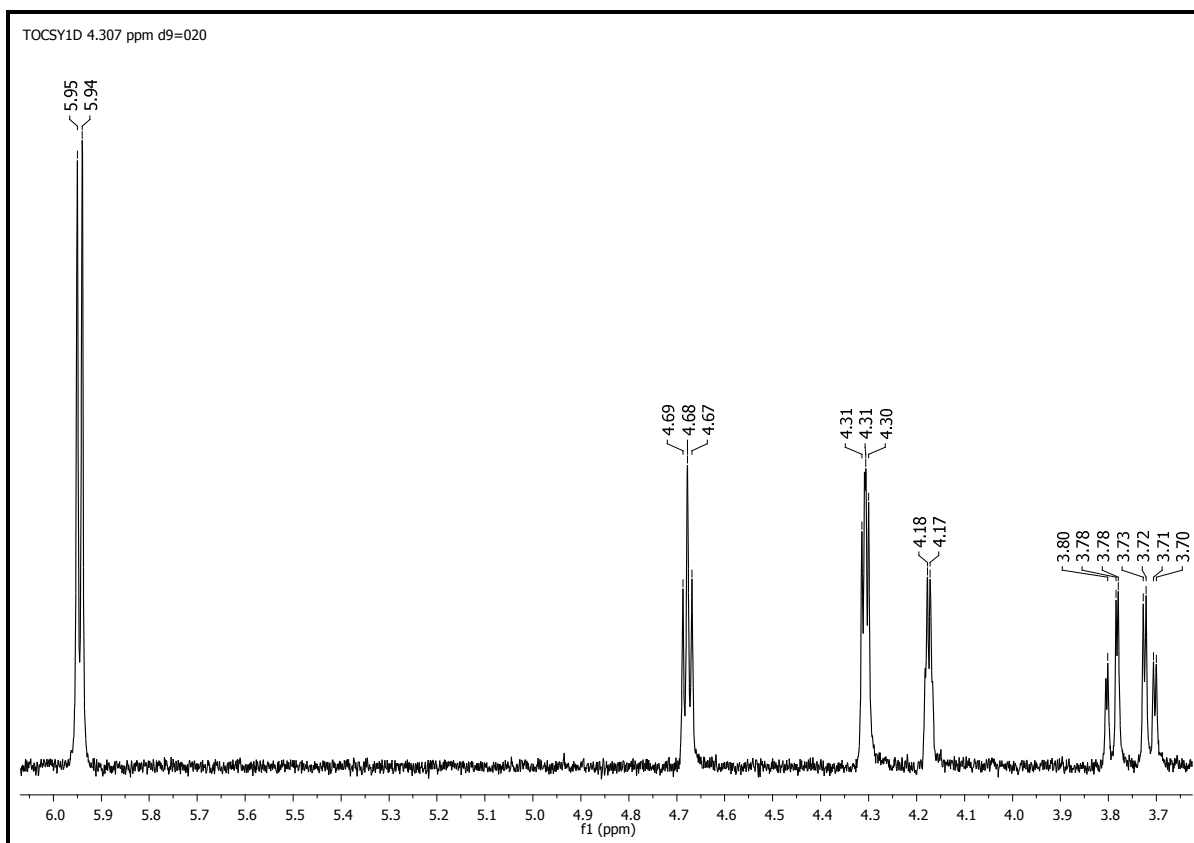
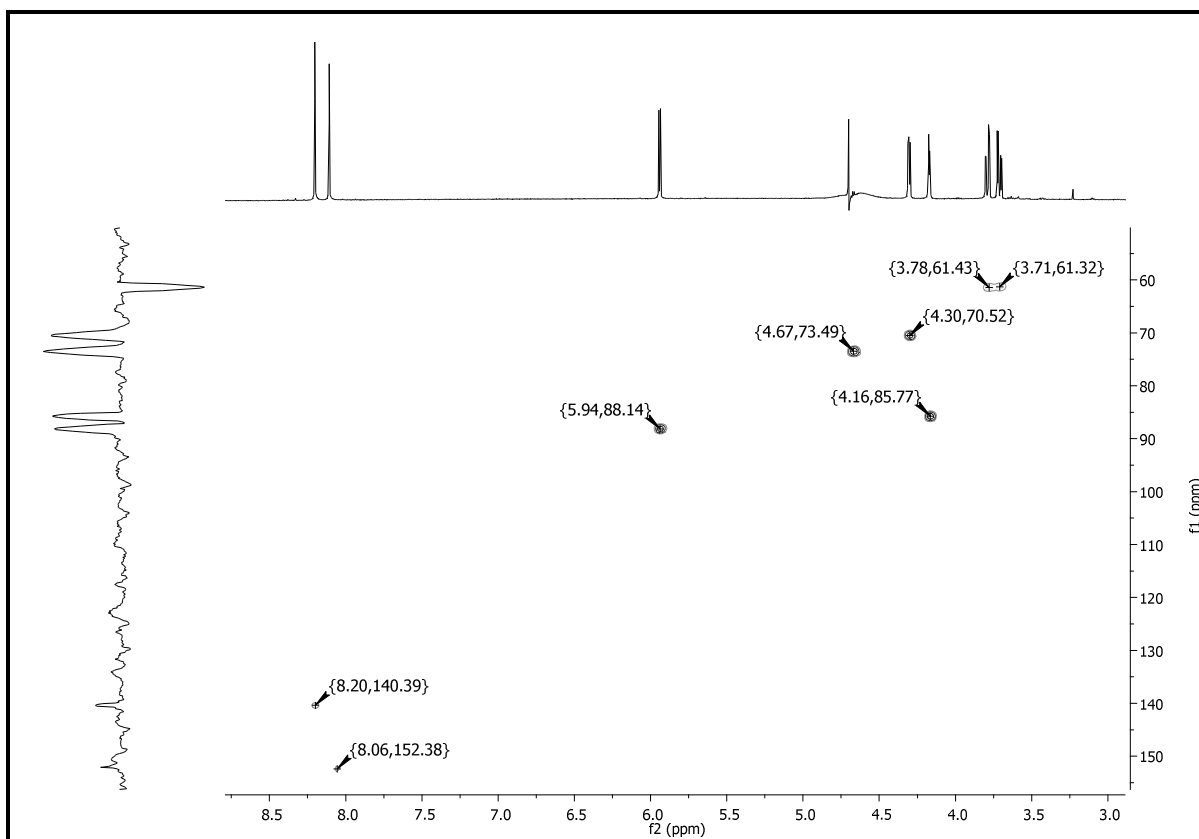


Figura 84 - Mapa de contorno de HSQC da substância **5** (D<sub>2</sub>O, 600MHz).



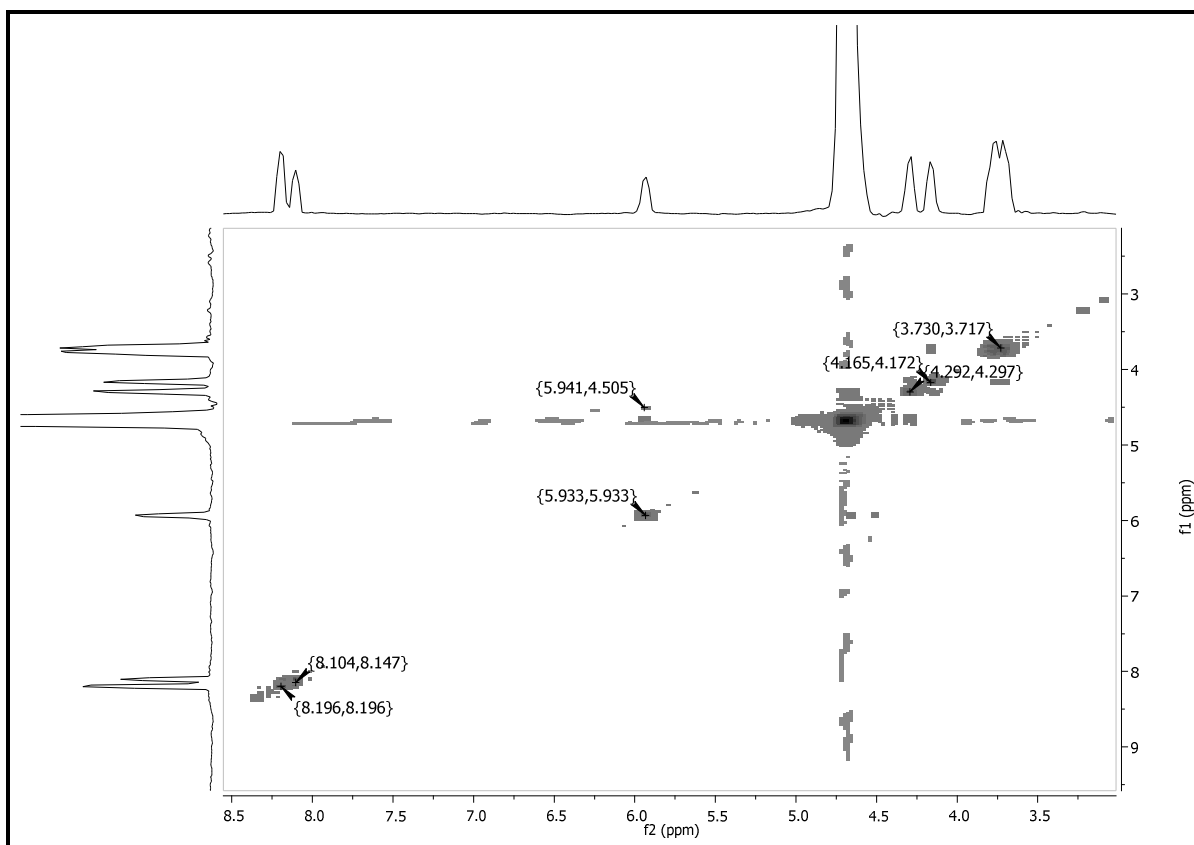
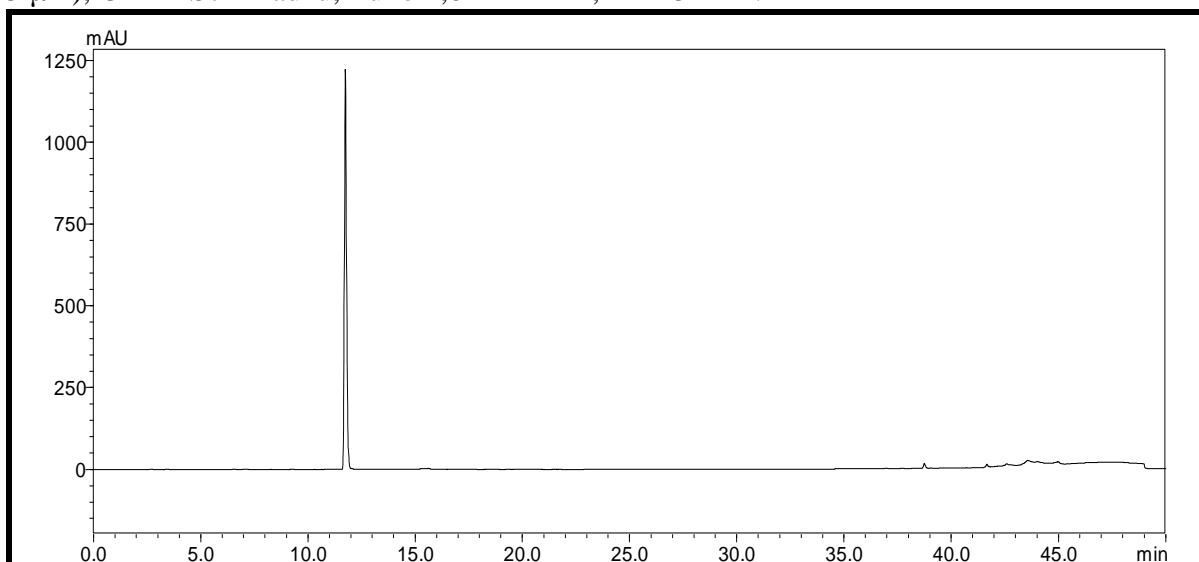
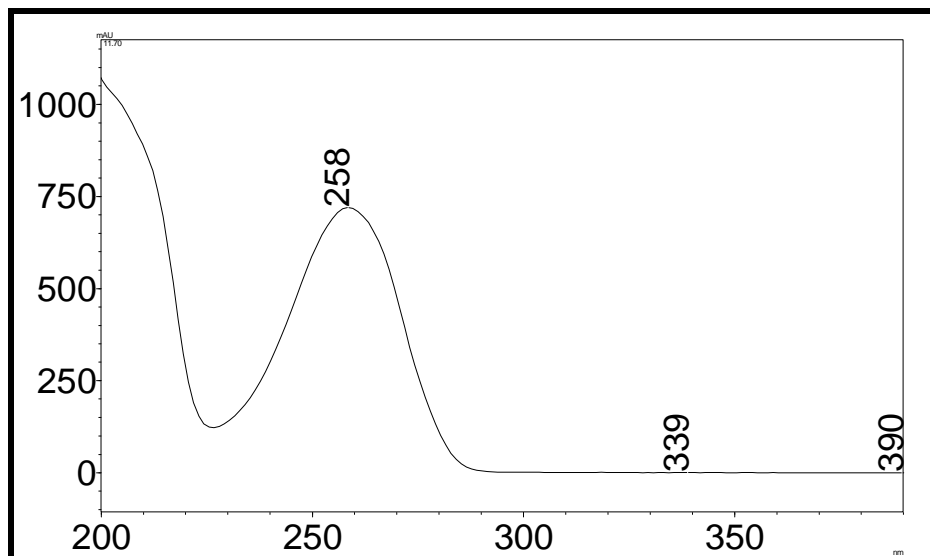
**Figura 85** - Mapa de contorno de COSY da substância **5** (D<sub>2</sub>O, 600MHz).**Figura 86** - Cromatograma da substância **5**. Condição cromatográfica: Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 40 min, coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna, sílica C-18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), CLAE Shimadzu, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm.

Figura 87 - Curva de UV da substância 5.



## 5 CONCLUSÕES

O trabalho realizado com o fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de caules saudáveis de *Eugenia jambolana*, permitiu uma avaliação da potencialidade do extrato bruto em pequena e escala ampliada na produção de metabólitos secundários.

Os extratos obtidos nos meios de cultivos líquidos (MDB e Czapek) e sólido (milho) selecionados apresentaram diversidade de produção metabólica o que foi verificado pelos sinais e picos observados em RMN e CLAE-DAD, respectivamente.

Foi constatado que o meio de cultura sólido rendeu massa de extrato bruto bem maior que os demais meios, o que pode ser explicado pela maior dificuldade do micro-organismo acessar os nutrientes e deste modo expressar maior número de enzimas as quais favorecem a produção de metabólitos secundários.

A avaliação da atividade biológica mostrou que o extrato Milho fr.CH<sub>3</sub>CN foi mais ativos em todos os ensaios testados, quando comparado aos demais meios.

Com relação a produção metabólica foram isoladas a 4-hidroximeina, o ácido fusárico, e os nucleosídeos timidina e adenosina que são responsáveis por inúmeras atividades biológicas sugerindo que este micro- organismo esteja exercendo um papel ecológico na espécie hospedeira, possivelmente, protegendo-a contra possíveis patógenos e stress abióticos.

Esses dados sugerem que o endófito *Saccharicola* sp., simbiote de *Eugenia jambolana* seja uma espécie interessante para futuros estudos sobre o metabolismo secundário, isolamento de protótipos farmacêuticos, e seu relevante papel ecológico no hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.
- ARAÚJO, W. L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Copiadora "Luiz de Queiroz", 2010. 167 p.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2/3, p. 51-66, 2007.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do sul: Educ, 2010. 638 p.
- BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.
- BARROS, M. T.; MAYCOCK, C. D.; VENTURA, M. R. The first synthesis of (-)-asperpentin and efficient syntheses of (+)-harveione, (+)-epiepopoformin and (-)-theobroxide. **Chemistry: A European Journal**, v. 6, n. 21, p. 3991-3996, 2000.
- BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- CAO, Y. et al. Rapid determination of nucleosides, nucleobases and free amino acids in brown seaweeds using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 675-686, 2014.
- CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* DC. prodr. (Rubiaceae)**. 2003. 564 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 47-59, 2012.

- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos uma nova fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- CHOWDHARY, K. et al. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 467-485, 2012.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.
- DAMETTO, A. C. **Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**. 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185-201, 2014.
- DOMONDON, D. L. et al.  $\beta$ -adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. **Phytochemistry**, v. 65, n. 2, p. 181-187, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ERIKSSON, O. E.; HAWKSWORTH, D. L. *Saccharicola*, a new genus for two *Leptosphaeria* species on sugar cane. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 426-433, 2003.
- FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products—a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 4, p. 382-391, 2003.
- FORBES, J. E.; PATTENDEN, G. Total synthesis of preaurovertin, putative biogenetic precursor of aurovertin. Biosynthetic interrelationships between the aurovertins, citreoviridinols and asteltoxin. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 8, p. 1959-1966, 1991.
- GATLIN, L.; DAVIS, J. C. Comparison of ribose and deoxyribose nucleosides by NMR and deductions regarding ribose and deoxyribose nucleic acids. I. Tautomeric form. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, p. 4464-4470, 1962.
- GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 4, p. 537-545, 2010.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

- GUO, B. et al. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hcmv protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 602-604, 2000.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HALABALAKI, M. et al. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 1-7, 2014.
- JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- JIANG, M.; ZHANG, L.; LIU, R.; DONG, Z.; LIU, J. Speciosins A-K, oxygenated cyclohexanoids from the Basidiomycete *Hexagonia speciosa*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1405-1409, 2009.
- JONES, A. J.; WINKLEY, M. W.; GRANT, D. M.; ROBINS, R. K. Carbon-13 nuclear magnetic resonance: naturally occurring nucleosides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 65, p. 27-30, 1970.
- KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00151.
- KAUL, S. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.
- KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Report**, v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011.
- KROHN, K et al. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 313-320, 1997.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Report**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.
- LI, L. et al. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 826-831, 2009.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal : FUNEP/UNESP, 1994. 296 p.

- MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 10. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010. 1019 p.
- MAGAN, N.; OLSEN, M. (Ed.). **Mycotoxins in food: detection and control**. Cambridge: Woodhead Pub.; Boca Raton: CRC Press, c2004. 471 p.
- MAJEED, R. et al. Bakuchiol derivatives as novel and potent cytotoxic agents: a report. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 55-67, 2012.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.
- MORETTI, A.; SARROCCO, S. Fungi. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Ed.). **The encyclopedia of food and health**. Oxford: Academic Press, c2016. p. 162-168.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- ONDEYKA, J. G. et al. Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, n. 38, p. 8809-8816, 1997.
- SAMADI, L.; BEHBOODI, B. S. Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome *c*, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Planta**, v. 225, n. 1, p. 223-234, 2006.
- SANCHEZ-AZEFEIFA, A. et al. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26, n. 2, p. 291-299, 2012.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SENANAYAKE, T. H.; WARREN, G.; VINOGRADOV, S. V. Novel anticancer polymeric conjugates of activated nucleoside analogues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, p. 1983-1993, 2011.
- 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.

- SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemistry Analysis**, v. 16, n. 5, p. 307-314, 2005.
- SPANOU, C. et al. Antioxidant activity of a series of fluorinated pyrano-nucleoside analogues of N4-benzoyl cytosine and N6-benzoyl adenine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, p. 695-704, 2007.
- SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 2084-2093, 2013.
- STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling flower scent for chromatographic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 2022-2031, 2008.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- THOLL, D. et al. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 540-560, 2006.
- TIMBOLA, A. K. et al. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 174-176, 2002.
- VALLI, M. et al. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.
- VASI, S.; AUSTIN, A. Antioxidant potential of *Eugenia Jambolana* Lam. seeds. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 894-898, 2009.
- VIEGAS JUNIOR, C. et al. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184-4190, 2005.
- VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. Jambolão: o poderoso antioxidante. **Cultivar**, maio 2009. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/noticias/artigo-jambolao-o-poderoso-antioxidante>>. Acesso em: 11 de fev. 2016.
- YUAN, Y. et al. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 4, p. 278-281, 2014.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.
- ZHU, F. et al. Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 794, p. 1-14, 2013.