

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

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

**Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados à
alga marinha *Padina gymnospora***

Vinicius Paschoalini Silva

Departamento de Química Orgânica

Araraquara

2012

VINICIUS PASCHOALINI SILVA

Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados à alga marinha
Padina gymnospora

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Nasser Lopes

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a	<p>Silva, Vinicius Paschoalini</p> <p>Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados à alga marinha <i>Padina gymnospora</i> / Vinicius Paschoalini Silva. – Araraquara : [s.n], 2012</p> <p>81 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Márcia Nasser Lopes</p> <p>1. Química orgânica. 2. Fungos endofíticos. 3. <i>Lasiodiplodia sp.</i> 4. Isocumarina. 5. Lactona. I. Título.</p>
-------	--

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Vinicius Paschoalini Silva

Filiação: Donizeti Aparecido Silva e Maria José Paschoalini Silva

Nascimento: 25/09/1985 – Santa Rosa de Viterbo-SP-Brasil.

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: vinicpascil@hotmail.com

Formação Acadêmica

2008

Graduação: Licenciatura em Química

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

2010-2012

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

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

Dissertação: Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados à alga marinha *Padina gymnospora*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Nasser Lopes

Bolsa: Cnpq

Produção Bibliográfica

Trabalhos recentes publicados em anais de eventos

- a) SILVA, V. P.; LOPES, M. N.; VALADÃO, I B; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S. Isocoumarins Produced by Endophytic Fungi Isolated from the Marine Algae *Padina gymnospora*. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM) and VII Meeting of the Latin America Society of Phytochemistry, 2011, Ouro Preto-MG.

Participações em Reuniões Científicas

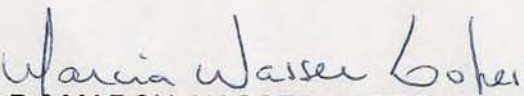
- a) 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP) and the XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM), 2011, Ouro Preto-MG.

VINICIUS PASCHOALINI SILVA


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

Araraquara, 17 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª MARCIA NASSER LOPES (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª ANGELA REGINA ARAUJO
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª ANA HELENA JANUÁRIO
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca - SP

À minha amada família.

Aos meus pais por seus exemplos de honestidade, respeito, solidariedade, perseverança e amor que servem de guia para a minha vida. Agradeço aos conselhos que recebi nos momentos de dúvidas e ao apoio nos momentos de decisão. À minha amada irmã Camila por seu amor e carinho. Vocês fazem parte de minha vida e sempre farão.

Amo vocês.

À minha orientadora Profa. Dra. Márcia Nasser Lopes.

Pelo acolhimento em um momento difícil, pela amizade, paciência, competência, dedicação e pelo respeito com seus alunos.

À Profa. Dra. Angela R. Araujo pelos seus ensinamentos, pela paciência e pelo auxílio nos momentos difíceis.

À meu amor Carolina

Você me faz uma pessoa melhor, me faz querer viver para você. É o sol de minhas manhãs e a lua de minhas noites. Obrigado pelo incentivo constante e ajuda por todo este tempo que estamos juntos.

Te amo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua infinita sabedoria e benevolência que irradia e nos protege em todos os momentos.

Aos amigos que conquistei durante esta jornada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica.

À minha sogra Maria Cecília e ao meu sogro Antonio pelo carinho e apoio nesta trajetória.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pela amizade e pela imensa colaboração com os espectros de RMN.

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.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

“Se tu não antigistes teu objetivo com êxito é porque o final ainda não chegou”.

Autor desconhecido

RESUMO

O projeto proposto tem como objetivo principal a obtenção de substâncias bioativas a partir do estudo químico/biológico dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos Pg-1, *Lasiodiplodia* sp. (Pg-2) e Pg-3, os quais foram isolados da alga parda *Padina gymnospora*. Estes endófitos foram cultivados em escala reduzida em meio de arroz (cultura sólida) fornecendo os respectivos extratos brutos. Nestes extratos avaliou-se a produção metabólica a partir das análises em CCDC, CLAE-DAD e RMN de ^1H e foram submetidos à bioensaios para avaliar a potencialidade antifúngica e anticolinesterásica, onde estes extratos demonstraram ser promissores. O endófito selecionado para estudos posteriores (*Lasiodiplodia* sp.) cultivado em arroz, forneceu o extrato bruto em acetonitrila. O extrato bruto em acetonitrila foi fracionado em coluna de sílica gel de fase normal, resultando em treze frações, as quais foram avaliadas quanto ao seu perfil cromatográfico e químico em CCDC e RMN de ^1H , respectivamente. O fracionamento realizado em cromatografia de coluna aberta, resultou no isolamento de uma substância pura a partir da fração *L. sp-Fr80:20*, sendo identificada como meleina (**1**). Isolou-se duas substâncias, lasiodiplodina (**2**) e des-*O*-metil-lasiodiplodina (**3**) por CCDC preparativa a partir da fração *L. sp-Fr70:30*. As substâncias foram elucidadas pela análise dos espectros de RMN de ^1H 1D e 2D, espectros de RMN de ^{13}C e pela espectrometria de massas (EM-ESI), sendo este o primeiro relato da identificação de isocumarinas e lactonas a partir de fungos endofíticos associados à alga marinha *Padina gymnospora*.

Palavras-chave: Fungo endofítico. *Lasiodiplodia* sp.. *Padina gymnospora*. Isocumarina. Lactona.

ABSTRACT

The project proposed has as main objective to obtain bioactive substances from the chemical/biological study of crude extracts produced by endophytic fungi Pg-1, *Lasiodiplodia* sp. (Pg-2) and Pg-3, isolated from brown seaweed *Padina gymnospora*. These endophytes were cultivated in a small scale in the middle of rice (solid culture) providing the respective crude extracts. In these extracts were evaluated the metabolic production by CCDC, HPLC-DAD and ^1H NMR analyzes and were submitted to bioassays to evaluation the antifungal and acetylcholinesterase potential, where these extracts showed promising. The endophyte selected for further studies (*Lasiodiplodia* sp.) was grown on rice, provided the acetone crude. The EtOAc crude was fractionated on a column of normal silica gel phase, resulting in thirteen fractions, which were evaluated for their chemical and chromatographic profile of CCDC and ^1H NMR, respectively. The fractionation carried out in an open column chromatography, resulted in the isolation of a pure substance from the fraction *L.sp*, Fr80:20, identified as mellein (**1**). Two compounds, lasiodiplodin (**2**) and des-*O*-methyllasiodiplodin (**3**) was isolated by preparative TLC assay from the fraction *L.sp*-Fr70:30. The products were elucidated by analyzing the NMR spectra ^1H 1D and 2D NMR spectra and ^{13}C by mass spectrometry (ESI-MS), and this is the first report of isocoumarins and lactones were isolated from endophytic fungi associated with seaweed *Padina gymnospora*.

Keywords: Endophytic fungi. *Lasiodiplodia* sp.. *Padina gymnospora*. Isocoumarin. Lactones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos isolados de alga parda (YANG et al., 2006)	24
Figura 2. <i>Padina gymnospora</i>	25
Figura 3. Lactonas isoladas do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	26
Figura 4. Metabólitos isolados do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	26
Figura 5. Proposta biossintética para a 6-hidroxi-meleina (Adaptado de KUROSAKI et al., 1989).....	27
Figura 6. Esquema de isolamento dos fungos endofíticos	32
Figura 7. Fluxograma de cultivo e obtenção dos Extratos brutos em meio sólido.....	33
Figura 8. Fracionamento do extrato acetonitrila produzido por <i>Lasiodiplodia</i> sp. em arroz.....	35
Figura 9. Cromatograma do extrato produzido por Pg-1 em diferentes comprimentos de ondas: (a) 254 nm, (b) 280 nm, (c) 300 nm, (d) 320 nm e (e) 340 nm	37
Figura 10. Cromatograma do extrato produzido por <i>L. sp</i> em diferentes comprimentos de ondas: (a) 254 nm, (b) 260,00 nm, (c) 270,00 nm, (d) 280,00 nm e (e) 300,00 nm	38
Figura 11. Cromatograma do extrato produzidos por Pg-3 em diferentes comprimentos de ondas: (a)254 nm, (b) 255,00 nm, (c) 260,00 nm, (d) 270,00 nm e (e) 290,00 nm ..	38
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto Pg-1 (CDCl ₃ , 500 MHz)	39
Figura 13. Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>Lasiodiplodia</i> sp. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	39
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto Pg-3 (CDCl ₃ , 500 MHz)	40
Figura 15. Cromatograma da fração acetonitrila do extrato Pg-1, λ = 254 nm.....	41
Figura 16. Cromatograma da fração acetonitrila do extrato <i>Lasiodiplodia</i> sp., λ = 254 nm	41
Figura 17. Cromatograma da fração acetonitrila do extrato Pg-3, λ = 254 nm.....	42
Figura 18. Cromatogramas das frações hexânicas dos extratos Pg-1 (a), <i>L. sp.</i> (b) e Pg-3 (c), λ = 254 nm	42
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H da partição acetonitrila de Pg-1 (CDCl ₃ , 500 MHz)	43
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H da partição acetonitrila de <i>L. sp</i> (CDCl ₃ , 500 MHz)	43

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H da partição acetonitrila de Pg-3 (CDCl_3 , 500 MHz)	44
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da partição hexânica Pg-1 (CDCl_3 , 500 MHz)	45
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da partição hexânica <i>L. sp</i> (CDCl_3 , 500 MHz)	45
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da partição hexânica Pg-3 (CDCl_3 , 500 MHz)	46
Figura 25. CCDC das frações obtidas: (1) <i>L. sp</i> -Fr 70:30, (2) <i>L. sp</i> -Fr 65:35, (3) <i>L. sp</i> -Fr 60:40, (4) <i>L. sp</i> -Fr 58:42, (5) <i>L. sp</i> -Fr 53:47, (6) <i>L. sp</i> -Fr 50:50, (7) <i>L. sp</i> -Fr 40:60 e (8) <i>L. sp</i> -Fr 30:70	47
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 80:20 (CDCl_3 , 500 MHz)	48
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 70:30 (CDCl_3 , 500 MHz)	48
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 65:35 (CDCl_3 , 500 Hz)	49
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 60:40 (CDCl_3 , 500 MHz)	49
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 58:42 (CDCl_3 , 500 MHz)	50
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 53:47 (CDCl_3 , 500 MHz)	50
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 50:50 (CDCl_3 , 500 MHz)	51
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 40:60 (CDCl_3 , 500 MHz)	51
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da fração <i>L. sp</i> -Fr 30:70 (CDCl_3 , 500 MHz)	52
Figura 35. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <i>Lasiodiplodia sp.</i>	53
Figura 36. Estrutura da substância 1 (meleina)	54
Figura 37. Principais correlações de <i>g</i> COSY e <i>g</i> HMBC da substância 1	55
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	57
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	57
Figura 40. Mapa de contorno de <i>g</i> HSCQ da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	58
Figura 41. Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	58
Figura 42. Espectro de <i>g</i> COSY da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	59
Figura 43. Espectros de massas da substância 1	60
Figura 44. Estrutura da substância 2 (lasiodiplodina)	61
Figura 45. Principais correlações de <i>g</i> HMBC da substância 2	62
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (DMSO, 500 MHz)	64
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (DMSO, 500 MHz)	64
Figura 48. Mapa de contorno de <i>g</i> HSCQ da substância 2 (DMSO, 500 MHz)	65
Figura 49. Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 2 (DMSO, 500 MHz)	65
Figura 50. Espectro de <i>g</i> COSY da substância 2 (DMSO, 500 MHz)	66
Figura 51. Espectros de massas substância 2	66

Figura 52. Estrutura da substância 3 (des- <i>O</i> -metil-lasiodiplodina).....	67
Figura 53. Principais correlações de gHMBC da substância 3	68
Figura 54. Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (DMSO, 500 MHz)	70
Figura 55. Espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 (DMSO,500 MHz).....	70
Figura 56. Mapa de contorno de gHSQC da substância 3 (DMSO,500 MHz)	71
Figura 57. Mapa de contorno de gHMBC da substância 3 (DMSO,500 MHz)	71
Figura 58. Espectro de gCOSY da substância 3 (DMSO,500 MHz)	72
Figura 59. Espectros de massas substância 3	73
Figura 60. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos	74
Figura 61. Avaliação do potencial dos extratos brutos frente ao <i>C. cladosporioides</i> ...	75
Figura 62. Avaliação do potencial dos extratos brutos frente ao <i>C. sphaerospermum</i> .	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.....	29
Tabela 2. Equipamentos para o desenvolvimento do projeto	30
Tabela 3. Massa dos extratos dos fungos endofíticos Pg-1, <i>L.sp</i> e Pg-3	34
Tabela 4. Dados de RMN 1D e 2D da substância 1 em CDCl ₃ (δ em ppm e J em Hz)	56
Tabela 5. Dados de RMN 1D e 2D da substância 2 em DMSO (δ em ppm e J em Hz)	63
Tabela 6. Dados de RMN 1D e 2D da substância 3 em DMSO (δ em ppm e J em Hz)	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Enzima Acetilcolinesterase
Ar.	Arroz
CH ₃ 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 ₃	Clorofórmio deuterado
CHCl ₃	Clorofórmio
CH ₃ OH	Metanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ESI-EM	Espectrometria de massas – Ionização por electrospray
Ext.	Extrato
grad.	Gradiente
HPLC	High-performance liquid chromatography
H ₂ O	Água
Hex.	Hexano
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
LC-MS	Chromatography Liquid-Spectrometry Mass
MBD	Meio de Batata e Dextrose
MeOH	Metanol
MHz/Hz	Megahertz / Hertz
min.	Minutos
nm	Nanômetro
NaClO	Hipoclorito de Sódio

NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
pág.	Página
PDA	Potato-Dextrose-Agar
ppm	Partes por milhão
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Rotações por minuto
Sub	Substância
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M-H]^-$	Molécula desprotonada
J	Constante de acoplamento
s	Singleto
sl	Singleto Largo
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
m	Multipleteo
m/z	Relação massa-carga
t	Tripleteo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Algas.....	20
1.2 Reino Fungi	21
1.3 Fungos Endofíticos	22
1.4 Metabólitos bioativos dos endófitos	23
1.5 <i>Padina gymnospora</i>	24
1.6 <i>Lasiodiplodia</i> sp.	25
1.7 Isocumarinas	26
2. OBJETIVOS GERAIS	28
2.1 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material	29
3.1.1 Meios de cultivo dos micro-organismos	29
3.1.2 Solventes	29
3.1.3 Cromatografia em Coluna.....	29
3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	29
3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	30
3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H) e Carbono (¹³ C).....	30
3.1.7 Espectrometria de Massas	30
3.1.8 Equipamentos.....	30
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Coleta e classificação do material algal	31
3.2.2 Obtenção da cepa fúngica	31
3.2.3 Repique dos fungos em BDA.....	32
3.2.4 Cultivo dos fungos endofíticos em meio sólido em escala reduzida.....	33
3.2.5 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos	33
3.2.6 Fracionamento da fase acetonitrila (CH ₃ CN) do endófito <i>Lasiodiplodia</i> sp... 34	
3.2.7 Avaliação do perfil químico das frações obtidas a partir do fracionamento da fase acetonitrila do fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp.	35

3.2.7.1 Avaliação por CCDC das frações	35
3.2.8 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos produzidos pelos endófitos	36
3.2.8.1 Avaliação da atividade antifúngica ¹	36
3.2.8.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica ¹	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos	37
4.2 Avaliação do perfil químico dos extratos após a partição Acetonitrila:Hexano	40
4.3 Coluna Cromatográfica (CC)	46
4.4 Avaliação do perfil químico das frações obtidas a partir do fracionamento da fase em acetonitrila do fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	46
4.4.1 CCDC das frações obtidas no fracionamento em coluna cromatográfica.....	46
4.4.2 RMN de ¹ H das frações.....	47
4.5 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>Lasiodiplodia</i> sp.	52
4.6 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos.....	74
4.6.1 Ensaio Anticolinesterásico	74
4.6.2 Ensaio Antifúngico.....	75
4.6.2.1 Ensaio frente a fitopatógenos.....	75
5. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos. Estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza e como exemplo podemos citar a morfina, o antibiótico penicilina e o anticancerígeno paclitaxel (Taxol®) (COSTA-LOTUFO et al., 2009; NEWMAN; CRAGG, 2007).

A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos por triagem de fontes naturais, tem levado a descoberta de substâncias com papel importante no tratamento de doenças humanas (SHU, 1998) e recentemente o interesse por descobertas de produtos naturais bioativos derivados de plantas aumentou, no entanto, a taxa de descoberta de novas substâncias bioativas está diminuindo (JOSEPH; PRIYA, 2011). Visando a descoberta de novas substâncias bioativas, há a necessidade de explorar novos nichos ecológicos, os quais se encontram em regiões menos exploradas e habitadas.

Dentro deste contexto, os organismos marinhos destacam-se como alternativas promissoras (COSTA-LOTUFO, et al. 2009; BARREIRO, 2009), devido sua grande diversidade e por constituírem uma fonte potencial de substâncias bioativas inéditas, as quais poderão vir a ser utilizadas como base para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.1 Algas

As algas são caracterizadas por serem organismos talófitos (raízes, caules e folhas estão ausentes) encontrados principalmente em ambientes aquáticos (marinho ou continental). Podem viver no interior de outros vegetais e de alguns animais; podem ser de vida livre ou se fixar sobre animais, vegetais, rochas e outros substratos; normalmente são capazes de produzir seu próprio alimento (autótrofas), mas, também incluem organismos saprófitos ou parasitas (heterótrofos); podem variar desde seres unicelulares com poucos μm de diâmetro até grandes organismos multicelulares como alguns gêneros de algas pardas com mais de 20 metros de comprimento. Muitas delas vivem nas superfícies oceânicas e são responsáveis pela produção de 70 a 80% de todo o oxigênio contido na atmosfera.

As algas marinhas apresentam formas e cores variadas devido aos pigmentos que mascaram a cor verde da clorofila, lhes conferindo colorações azuladas, avermelhadas, amarronzadas ou negras.

Mais de 3000 compostos foram isolados e caracterizados das principais classes de algas marinhas e esses incluem numerosos compostos bioativos. Entretanto as algas são ainda uma fonte inexplorada de fungos e conseqüentemente dos metabólitos produzidos por eles (BLUNT et al., 2012).

1.2 Reino Fungi

Os fungos estão entre os organismos mais importantes do mundo, devido ao seu papel vital nos ecossistemas, pelas suas atividades benéficas aos seres humanos e as suas interações com outros organismos (MUELLER; SCHMIT, 2007).

Os fungos são seres eucarióticos e heterotróficos, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme, forma de pseudomicélio ou constituírem hifas. Na natureza os fungos podem ocupar diversos nichos ecológicos como mares, florestas, vulcões, dentre outros.

O estudo sistemático dos fungos tem somente 250 anos de idade, mas esse grupo é conhecido desde a civilização egípcia, a qual considerava a fermentação como uma dádiva do Deus Osíris. Estimou-se a existência de cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo que destas apenas 90 mil espécies foram descritas (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos são importantes na produção de fármacos, no controle biológico de pragas e insetos na agricultura, na produção de bebidas fermentadas e queijos dos mais diversos tipos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Várias vantagens são observadas quanto à utilização de fungos na obtenção de produtos naturais bioativos em relação a outras fontes naturais, pois são recursos renováveis e a sua produção em escala ampliada pode ser realizada usando a tecnologia existente, como variação do meio e otimização das condições de cultivo. Outra vantagem está relacionada com a conservação ambiental uma vez que requerem uma única e pequena remoção do ambiente natural (BILLS, 1995).

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 endofíticos estão sendo vistos como a nova fonte de substâncias bioativas (STROBEL; DAISY, 2003; JOSEPH; PRIYA, 2011).

1.3 Fungos Endofíticos

Produtos naturais bioativos isolados de fungos endofíticos associados a plantas superiores, estão atraindo a atenção de químicos e biólogos devido ao aumento constante de publicações dedicadas à este tema nos últimos anos (113 artigos de pesquisa sobre metabólitos secundários de fungos endofíticos no período de 2008-2009, 69 em 2006-2007, 36 em 2004-2005, 14 em 2002 - 2003, e 18 em 2000-2001) (ALY et al., 2010).

Fungos endofíticos (endon= no interior; phyton= planta) são micro-organismos que colonizam assintomaticamente o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos vegetais como as folhas, caule, frutos, sementes e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (GUNATILAKA, 2006; RODRIGUEZ et al., 2008; TAN; ZOU, 2001). Azevedo e Araújo (2007) definem como micro-organismos endofíticos todos aqueles que são cultiváveis ou não e que habitam o interior de vegetais sem prejudicar o seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais.

Os endófitos são capazes de colonizar, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, o interior de tecidos vegetais sem causar danos à planta hospedeira. Esta interação fungo-planta pode ser resultante de processos co-evolutivos entre planta e patógeno. Normalmente, os endófitos penetram nas plantas por aberturas naturais (estômatos e hidatódios), feridas e também pela produção de enzimas hidrolíticas que facilitam sua penetração. Após a entrada na planta hospedeira, os endófitos podem colonizar os espaços inter ou intracelulares e em vasos condutores com xilema e floema (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

As interações estabelecidas pelos endófitos podem variar desde o mutualismo (endófito e planta hospedeira obtém vantagens) até o parasitismo (somente o endófito é beneficiado). Na associação mutualística o endófito recebe nutrientes e proteção da planta hospedeira, enquanto que a planta pode tornar-se mais resistente em ambientes com estresse abiótico e biótico (BAE et al., 2009). Alguns relatos sugerem um complexo sistema de comunicação envolvendo cruzamento de informações genéticas entre endófitos e seus hospedeiros durante a formação da associação. Então, alguns genes fúngicos que são preferencialmente expressos durante a associação podem ser responsáveis pela produção de enzimas que auxiliam no desenvolvimento do fungo. Além disso, os genes podem regular a produção de metabólitos secundários bioativos pelos endófitos e essas interações podem induzir a expressão de genes que conferem

resistência aos hospedeiros (BAILEY et al., 2006). Uma pesquisa com endófitos isolados da planta *Vinca minor*, identificou em uma linhagem isolada do caule, o alcaloide vincamina, um estimulante cerebral e vasodilatador, sendo este metabólito encontrado primeiramente no caule e folhas da planta hospedeira (YIN; SUN, 2011). Estes fatos evidenciam as interações endófito-hospedeiro e um possível cruzamento de informações genéticas entre os organismos envolvidos.

A utilização de micro-organismos como uma fonte de metabólitos secundários bioativos é uma estratégia interessante, pois esses micro-organismos habitam o interior de vegetais sem causar danos aparentes, envolvendo constantes interações endófito-hospedeiro, o que instiga o estudo biotecnológico deste nicho de micro-organismos associados às algas, além de, apresentar maior acessibilidade através da produção sustentável por fermentação (PROKSCH et al., 2010).

No ambiente marinho, os fungos endofíticos são geralmente encontrados hospedando esponjas e algas. Estes fungos são responsáveis por grande parte dos metabólitos inéditos descobertos (WANG, 2006) e têm sido objeto de investigações e demonstraram ser uma importante fonte de produtos naturais bioquimicamente ativos (EBEL, 2010; WIESE et al., 2011).

1.4 Metabólitos bioativos dos endófitos

Vários estudos já demonstraram que fungos endofíticos são capazes de produzir um número significativo de metabólitos secundários bioativos, que até agora eram conhecidos apenas a partir de seus hospedeiros. Este fato contribui para o crescente reconhecimento do potencial dos endófitos como fonte alternativa para a produção destes metabólitos. Os endófitos também são produtores prolíficos de metabólitos secundários com esqueletos único. Estes compostos são de interesse na medicina, na agricultura, dentre outras aplicações. Destacando-se que, as pesquisas sobre endófitos durante o período de 2008-2009 conduziram à descoberta de mais de 100 novos produtos naturais, enquanto que durante 7 anos (2000-2007), relatou-se quase o mesmo número de novos compostos, evidenciando a crescente importância de fungos endofíticos na bioprospecção nos últimos anos (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

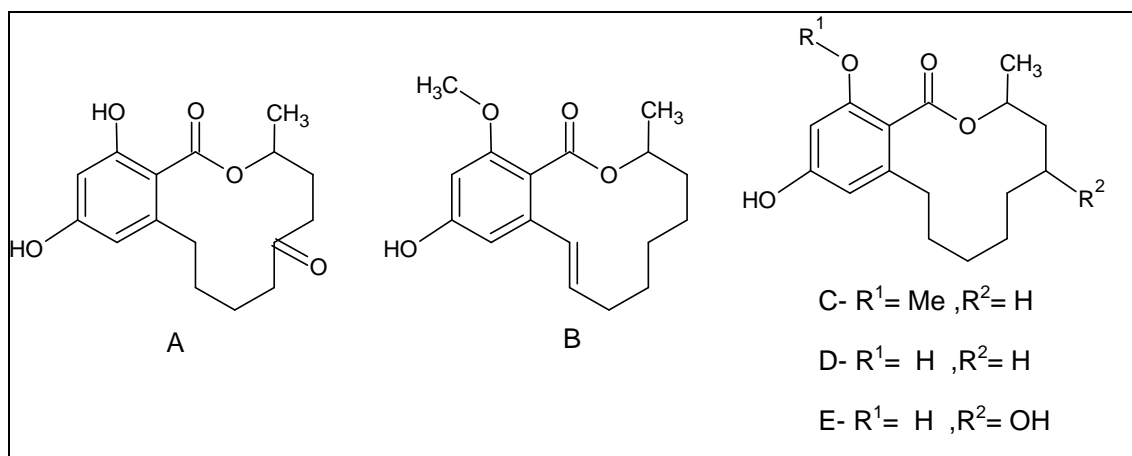
Os fungos associados a organismos marinhos estão se estabelecendo como uma fonte promissora na descoberta de moléculas inéditas e biologicamente ativas. No entanto, o potencial de fungos associado com macrorganismos marinhos, como esponjas e algas, tem sido pouco explorado. Em particular, os fungos endofíticos que vivem

dentro dos tecidos das algas, mostraram-se capazes de produzir produtos naturais, estruturalmente e biologicamente muito intrigantes (ELSEBAI et al., 2010).

A associação entre micro e macrorganismos é uma característica proeminente do ecossistema marinho, e em alguns casos a parte microbiana desta associação demonstrou ser responsável pela produção de metabólitos secundários (PIEL, 2009).

Estudos realizados com fungos endofíticos de *Sargassum* sp. (alga parda) do sul da China, possibilitou o isolamento de metabólitos secundários (Figura 1) como: 6-oxo-de-*O*-metil-lasiodiplodina (**A**) e (E)-9- eteno-lasiodiplodina (**B**), juntamente com três compostos conhecidos, lasiodiplodina (**C**), des-*O*-metil-lasiodiplodina (**D**), e 5-hidroxi-de-*O*-metil-lasiodiplodina (**E**). Lasiodiplodina e seus derivados são conhecidos por serem muito eficientes como inibidores da biossíntese de prostaglandina, e apresentarem atividade significativa antileucêmica e indutores de microtubérculos em batatas (YANG et al., 2006).

Figura 1. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos isolados de alga parda (YANG et al., 2006)



1.5 *Padina gymnospora*

A alga parda *Padina gymnospora* (Figura 2) pertence a divisão: Ochrophyta; classe: Phaeophyceae; ordem: Dictyotales; família: Dictyodaceae; gênero: *Padina* espécie: *gymnospora*, da qual foram isolados vários fungos endofíticos, dos quais alguns foram selecionados para o presente estudo.

As amostras da alga foram coletadas nos costões rochosos do litoral de Ubatuba, SP.

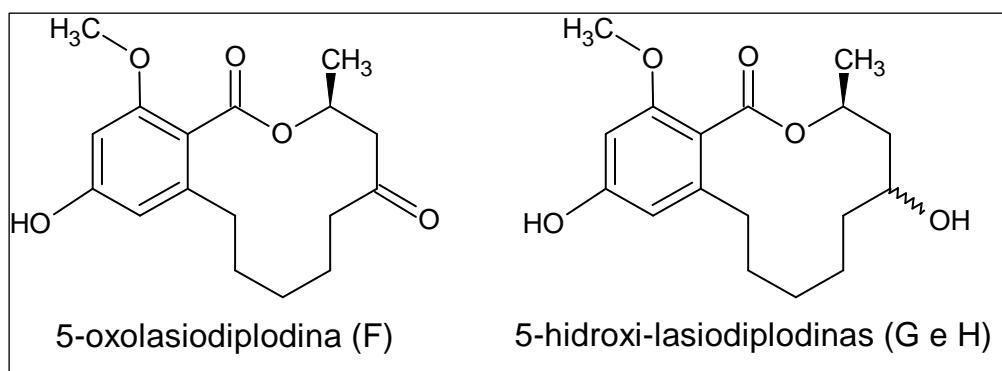
Figura 2. *Padina gymnospora*

A alga parda *Padina gymnospora* tem sido estudada ao longo dos anos e algumas substâncias isoladas desta alga, como os fucanos (polissacarídeos), apresentam atividade antiinflamatória e anticoagulante (MARQUES et al., 2012; SILVA et al., 2005). A *P. gymnospora*, assim como outras espécies de algas parda, vem sendo estudada por sua capacidade de reter metais pesados, e fornecer um espectro da contaminação por diversos metais (AMADO FILHO et al., 2008; KAREZ; PEREIRA, 1995).

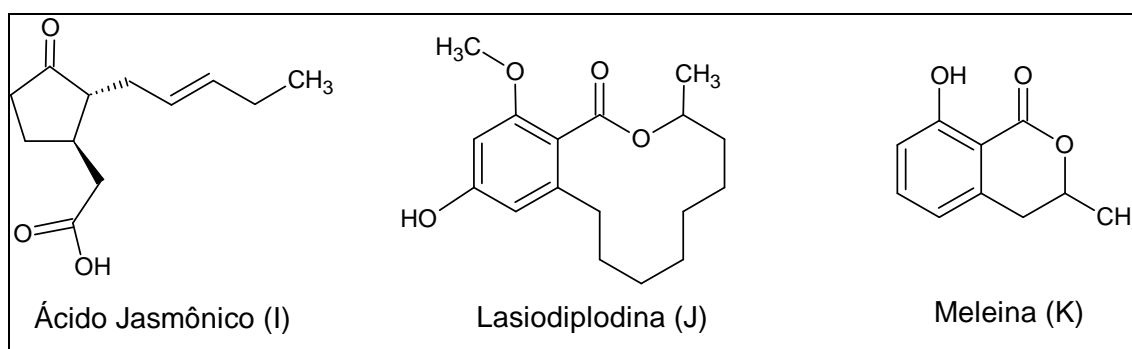
1.6 *Lasiodiplodia* sp.

Um dos fungos do gênero *Lasiodiplodia* mais relatado na literatura é o *Lasiodiplodia theobromae*. Esta espécie é relatada como sendo um micro-organismo cosmopolita com uma distribuição mundial nos trópicos e subtropicais, e colonizam uma faixa de 500 hospedeiros conhecidos. Este fungo é considerado um patógeno podendo causar diferentes sintomas nas plantas infectadas, incluindo cancos nos ramos, caules e raízes, e lesões nos caules, folhas, frutos e sementes, além de causar a morte de mudas e enxertos. A sua capacidade de infectar os frutos coloca-o entre os patógenos mais agressivos para as sementes, causando problemas na pós-colheita (BEZERRA DE BARROS, 2011).

Matsuura e colaboradores isolaram do fungo *Lasiodiplodia theobromae* 3 lactonas de 12 membros (Figura 3) a 5-oxolasiodiplodina (**F**), (5S) 5-hidroxi-lasiodiplodina (**G**) e (5R) 5-hidroxi-lasiodiplodina (**H**) (MATSUURA et al., 1998).

Figura 3. Lactonas isoladas do fungo *Lasiodiplodia theobromae*

ALDRIDGE e colaboradores isolaram metabólitos como o ácido jasmônico (**I**), lasiodiplodina (**J**) e meleina (**K**) (Figura 4) de meios de cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* (ALDRIDGE et al., 1971).

Figura 4. Metabólitos isolados do fungo *Lasiodiplodia theobromae*

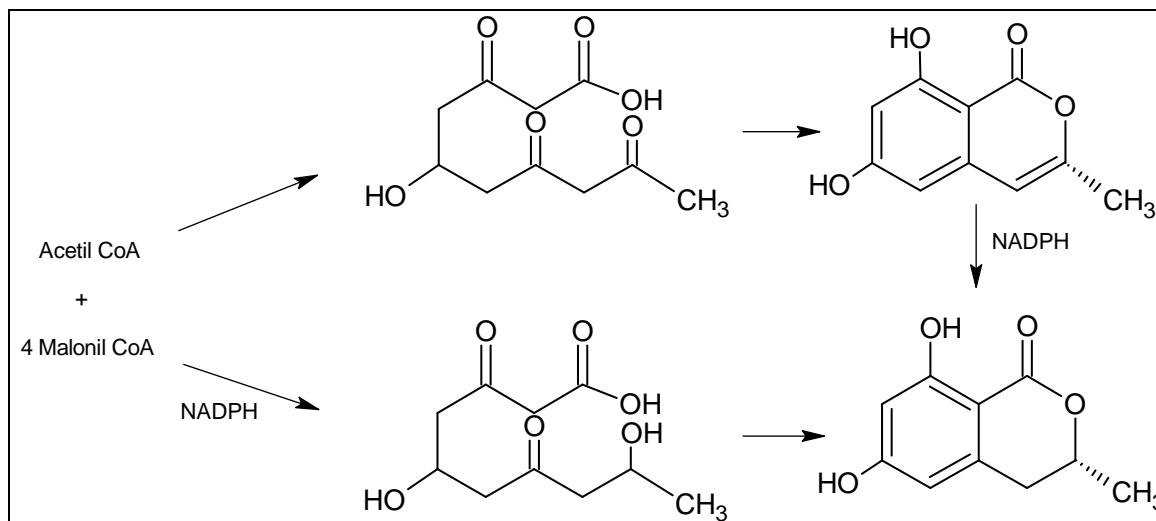
1.7 Isocumarinas

As isocumarinas ocorrem em uma ampla gama de organismos além das plantas, incluindo bactérias, fungos e líquens (KUTSCHERA et al., 2003). Esta classe de substância apresenta diversas atividades biológicas, como inibidores de proteases, antimicrobiana, antialérgica e antimalárica (ÖSCAN; SAHIN; BALCI, 2007). Sabe-se que estas substâncias são policetídeos, por tanto, obedecem a rota biossintética do acetato. A síntese da 6-hidroxi-meleina pode ser observada na Figura 5 (KUROSAKI et al., 1989).

Estudos comprovam que algumas isocumarinas, como a meleina, são precursores para diversos derivados, os quais apresentam atividades antifúngicas, antimicrobiana e inseticida. Estudos realizados por HEYNEKAMP (2006) relatou que

isocumarinas estão sendo testadas no tratamento de câncer, onde devem atuar como inibidoras no crescimento de células anticancerígenas.

Figura 5. Proposta biossintética para a 6-hidroxi-meleina (Adaptado de KUROSAKI et al., 1989)



2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi o estudo químico/biológico dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos Pg-1, *Lasiodiplodia* sp. (Pg-2) e Pg-3, isolados da alga marinha *Padina gymnospora* e o isolamento de substâncias bioativas.

2.1 Objetivos Específicos

1. Análise do perfil químico dos extratos brutos e das frações por técnicas cromatográficas (CLAE-DAD) e espectrométricas (RMN de ^1H);
2. Avaliação das atividades: anticolinesterásica e antifúngica frente aos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* nos extratos brutos;
3. Seleção do extrato bruto do endófito mais promissor e estudo químico e biológico do mesmo;
4. Isolamento e identificação estrutural das substâncias produzidas por *Lasiodiplodia* sp..

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Meios de cultivo dos micro-organismos

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos

<i>Meios de</i> Cultura	Tipo	[g L⁻¹	Composição	Fabricante
BDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), Ágar (15g)	Acumedia
Arroz	Sólido	-	90,0 g em 75,0 mL de água Milli-Q	Sanno

3.1.2 Solventes

Para a obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e escala ampliada e também para os fracionamentos, separações cromatográficas em coluna e em CLAE, foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol P.A. e analítico e acetonitrila das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt, QHEMIS e MTEDIA. Em análises em RMN de ¹H e ¹³C utilizou-se os solventes DMSO e CHCl₃ deuterado (Aldrich).

3.1.3 Cromatografia em Coluna

No fracionamento cromatográfico em coluna aberta foram utilizadas colunas de vidro de diferentes diâmetros internos e comprimentos. A fase estacionária utilizada foi: sílica gel de fase normal (0,060-0,200 mm, 6 µm 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 F₂₅₄ (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 Quickfitt[®]. 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 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 analítico foram realizadas no equipamento Varian ProStar com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Varian PDA Detector) e injetor manual. Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm).

3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500, operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e a 125 MHz para o núcleo de ^{13}C e TMS como referência interna.

3.1.7 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um espectrômetro LCQ Fleet (Thermo scientific), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), nitrogênio como gás nebulizador e software X Calibur para a aquisição e tratamento dos dados.

3.1.8 Equipamentos

Tabela 2. Equipamentos para o desenvolvimento do projeto

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

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta e classificação do material algal

Algas pardas da espécie *Padina gymnospora* foram coletadas, em setembro de 2008, nas encostas rochosas da Praia de Fortaleza, Ubatuba - SP, Brasil. As algas foram coletadas e identificadas pela Dra. Nair Sumiê Yokoya, bióloga pesquisadora do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt) – Brasil e a exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica.

3.2.2 Obtenção da cepa fúngica

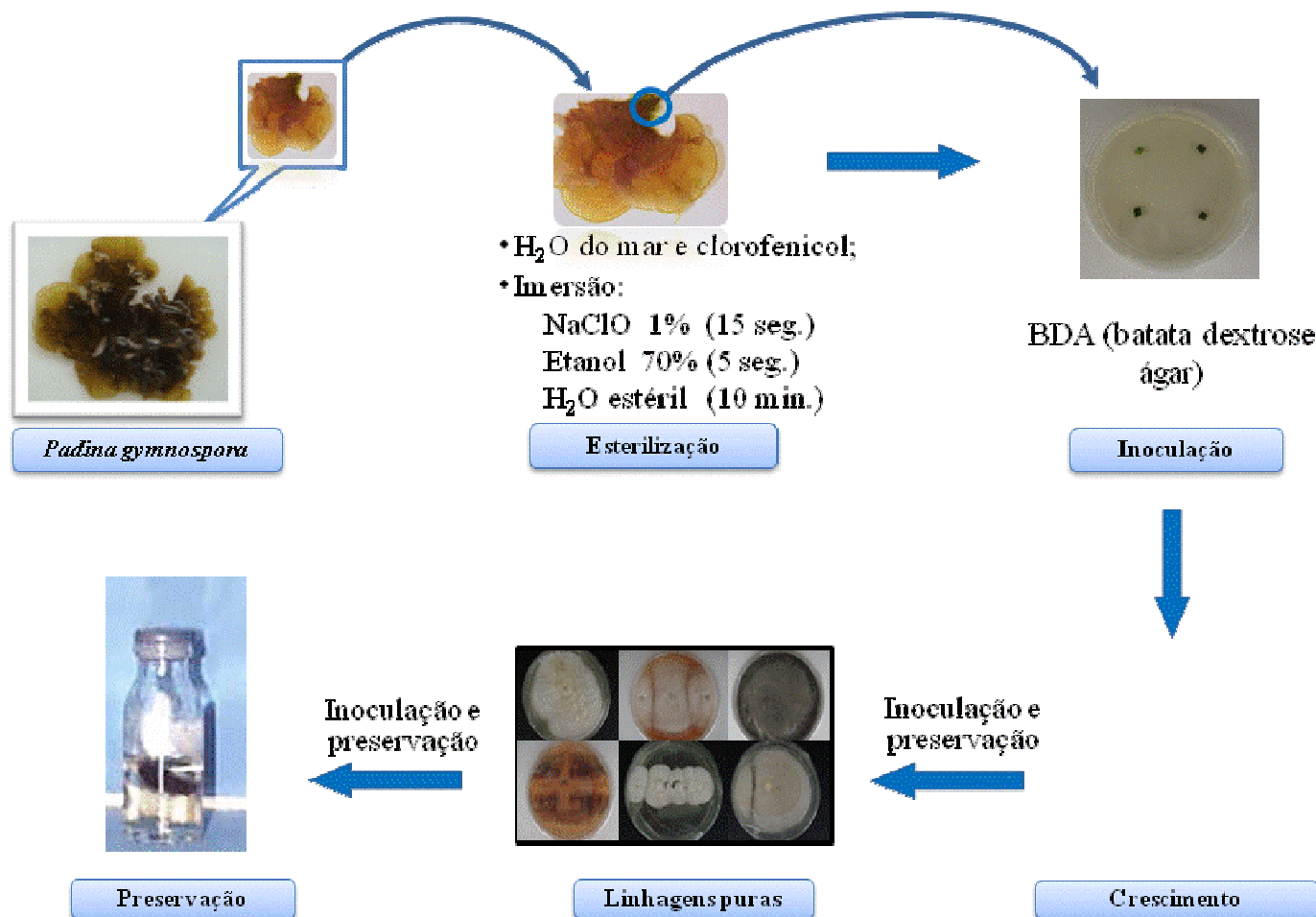
O material algal foi lavado em água do mar para remover contaminantes (areia, crustáceos) e estocado em frascos de vidro com água do mar filtrada, esterilizada por autoclavagem e suplementada com 200 mg L⁻¹ de cloranfenicol (2 frascos por espécie). Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara-UNESP.

O material contido em cada frasco foi esterilizado superficialmente em câmara asséptica por incubação em etanol 70% por 5 segundos, seguido de incubação em hipoclorito de sódio por 15 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.

Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água da última lavagem foi inoculada em BDA. As amostras esterilizadas foram fragmentadas com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis e transferidas para placas de Petri em meio BDA (3-5 fragmentos por placa).

As placas de Petri contendo os inóculos foram mantidas sob a temperatura de 25°C por 40 dias, com observações diárias para verificar o crescimento de microorganismos. Fragmentos com sinais de crescimento fúngico foram transferidos para novas placas contendo BDA, para o isolamento das linhagens. Após o isolamento das linhagens fúngicas, estas foram preservadas em “slants” (frascos com água estéril contendo o fungo em meio sólido BDA), lacrados e mantidos a temperatura de 4° C (Figura 6).

Figura 6. Esquema de isolamento dos fungos endofíticos



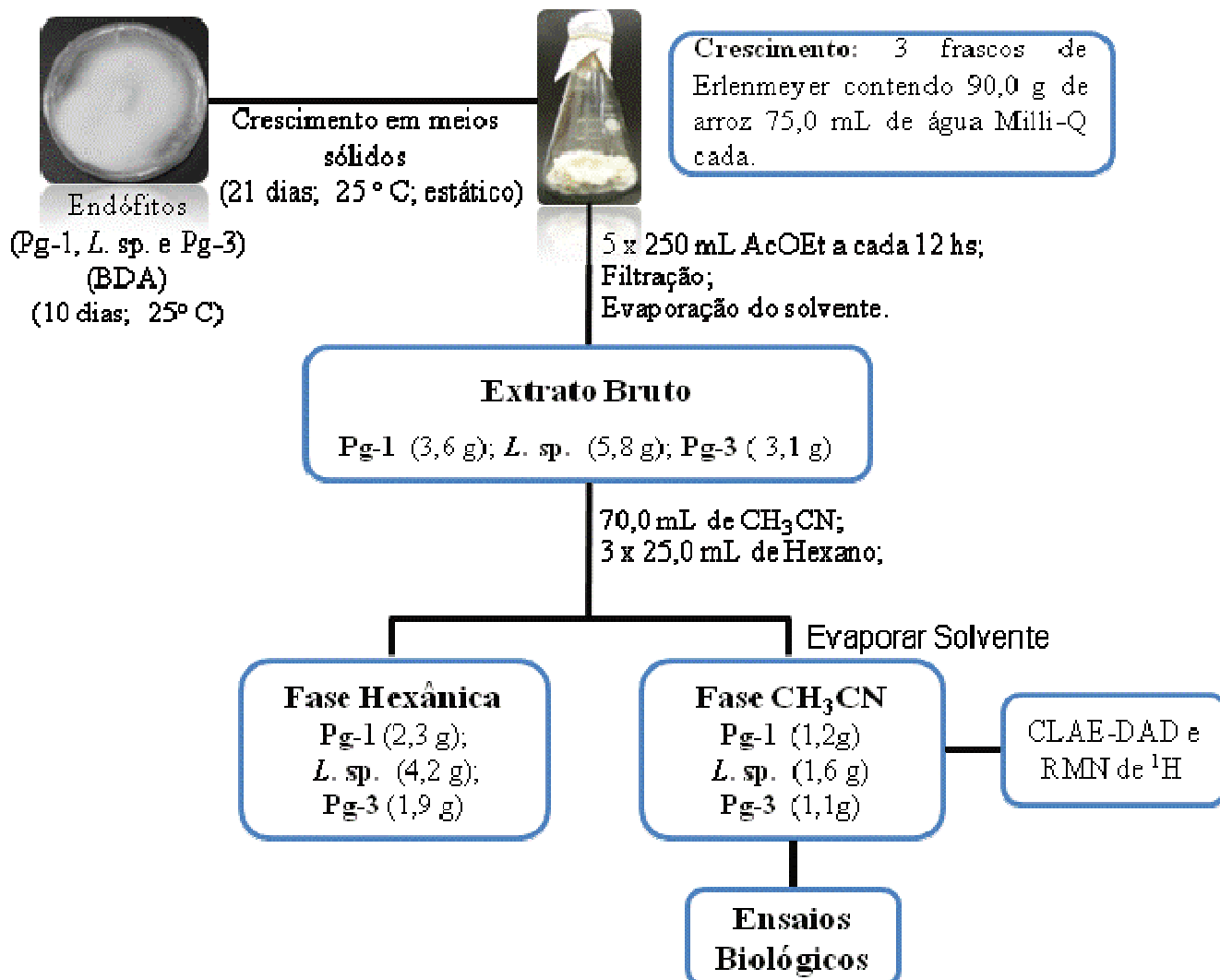
Após o isolamento dos endófitos realizado pela Dra. Lisinéia Maria Zanardi, o fungo *Lasiodiplodia* sp. (inicialmente codificado como Pg-2) foi identificado por biologia molecular pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/UNICAMP) e está depositado na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/Ar.

3.2.3 Repique dos fungos em BDA

Os fungos preservados em *slants* foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, previamente esterilizados em autoclave (121°C por 20 minutos), e incubados por 7 dias a 25°C. Este processo foi realizado em capela de fluxo laminar para evitar contaminação do ambiente externo.

3.2.4 Cultivo dos fungos endofíticos em meio sólido em escala reduzida

Figura 7. Fluxograma de cultivo e obtenção dos Extratos brutos em meio sólido



3.2.5 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos

Os extratos brutos obtidos antes e após o particionamento com CH₃CN:Hexano foram submetidos à análise por Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio (RMN de ¹H) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) em gradiente exploratório.

O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 20,0 µL e eluição em gradiente exploratório H₂O:MeOH (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 minutos,

permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, num fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e λ inicial de 254 nm até 500 nm.

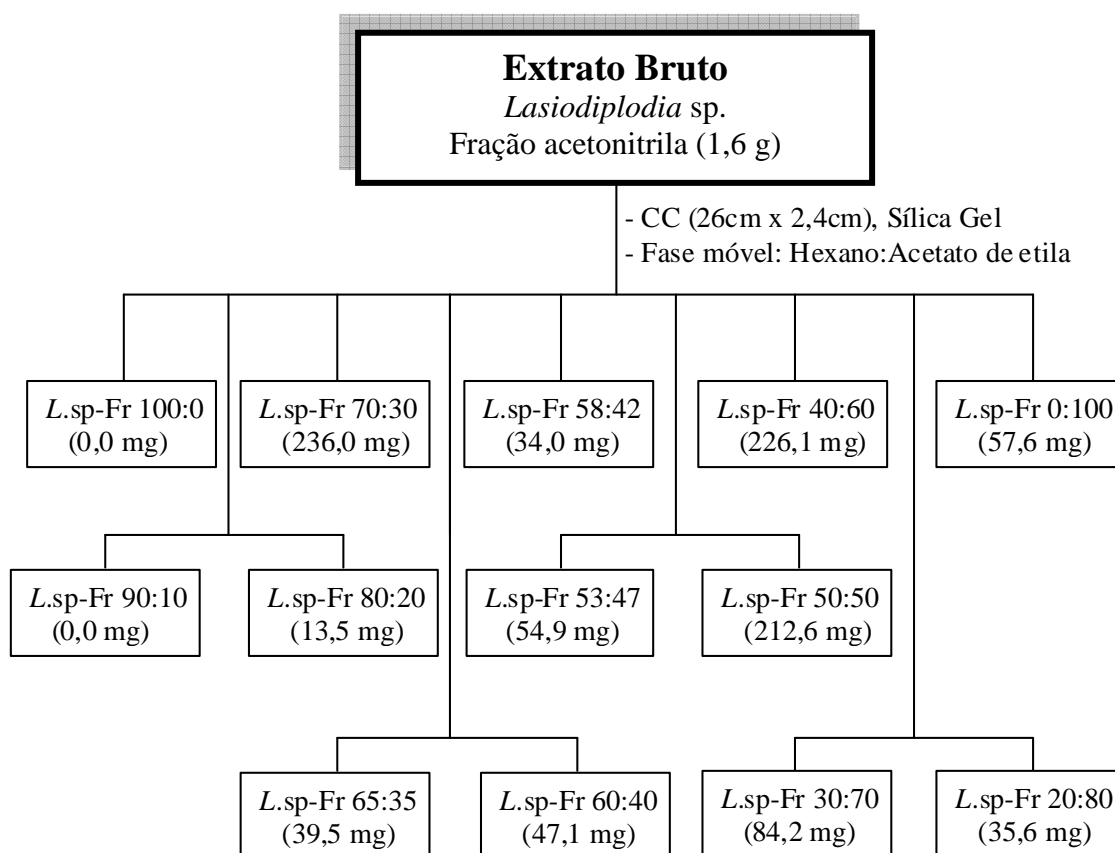
Os solventes orgânicos foram eliminados utilizando evaporador rotatório, fornecendo os respectivos extratos brutos (Tabela 3). Os solventes recuperados foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados à recuperação ou descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf.

Tabela 3. Massa dos extratos dos fungos endofíticos Pg-1, *L.sp* e Pg-3

Fungos endofíticos	Pg-1	<i>L.sp</i>	Pg-3
Massa obtida do extrato bruto (g)	3,6	5,8	3,1
Massa obtida após o particionamento CH₃CN (g)	1,2	1,6	1,1
Massa obtida após o particionamento Hexano (g)	2,3	4,2	1,9

3.2.6 Fracionamento da fase acetonitrila (CH₃CN) do endófito *Lasiodiplodia sp.*

A análise do cromatograma em CLAE-DAD do extrato bruto da fase CH₃CN do endófito *Lasiodiplodia sp.* (Figura 16, pag. 41) permitiu realizar um fracionamento deste extrato por cromatográfica em coluna (Figura 8), utilizando sílica gel de fase normal (0,060-0,200 mm, 6 nm de diâmetro de poro, ACROS organics) como fase estacionária e como fase móvel, foram utilizados os solventes hexano e acetato de etila em várias proporções (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 65:35, 60:40, 58:52, 53:47, 50/50, 40:60, 30:70, 20:80 e 0:100).

Figura 8. Fracionamento do extrato acetoneitrila produzido por *Lasiodiplodia* sp. em arroz

As frações obtidas, as quais resultaram em uma massa total de 1,05 g, foram analisadas posteriormente por CCDC e RMN de ^1H para verificar a pureza das frações obtidas para posterior elucidação da(s) substância(s).

3.2.7 Avaliação do perfil químico das frações obtidas a partir do fracionamento da fase acetoneitrila do fungo *Lasiodiplodia* sp.

3.2.7.1 Avaliação por CCDC das frações

As frações obtidas foram analisadas por CCDC analítica de sílica gel, as quais foram eluídas com uma solução de hexano:acetato de etila em uma proporção de 70:30 e posteriormente reveladas com anisaldeído.

Após a análise por CCDC analítica, foi realizada a separação de duas manchas de coloração laranja por CCDC preparativa, correspondente a fração *L.sp-Fr70:30*, o

que resultou na separação de duas substâncias, *L.sp-Fr70:30 F-1* (Sub.2) e *L. sp-Fr70:30 F-2* (Sub.3).

3.2.8 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos produzidos pelos endófitos

3.2.8.1 Avaliação da atividade antifúngica¹

Os extratos brutos ($40\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) foram eluídos em CCDC utilizando Hexano:AcOEt (70:30). As cromatoplasmas foram nebulizadas com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos mL^{-1} , em solução de glicose e sais). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina ($5 \mu\text{g}$).

3.2.8.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica¹

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos ($20\mu\text{g } 1\mu\text{L}^{-1}$) em placas de sílica gel com eluentes adequados. Nestas cromatoplasmas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, em seguida foram incubadas em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos e após este período borrifou-se uma solução C². Como padrão positivo utilizou-se o composto fisostigmina a $0,05 \mu\text{g } \text{mL}^{-1}$ (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

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

²Solução C contém 10 mL da solução A e 40 mL da solução B. Solução A: 250mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos

Os cromatogramas obtidos pela análise dos extratos brutos produzidos por Pg-1 (Figura 9), *Lasiodiplodia* sp. (Pg-2) (Figura 10, pag. 38) e Pg-3 (Figura 11, pag. 38) em meio de arroz, utilizando CLAE-DAD em gradiente exploratório, apresentaram sinais com diferentes absorvâncias, a partir dos quais observou-se a presença de substâncias com polaridade baixa (Figura 10), média (Figura 9, 10 e 11) e alta (Figura 11), além de uma boa resolução cromatográfica, apesar da intensidade dos sinais serem baixa.

O cromatograma do extrato produzido por *Lasiodiplodia* sp. (Pg-2) (Figura 10) apresentou maior quantidade de sinais, comparado com os outros cromatogramas (Figura 9 e 11), a partir do qual, pode-se concluir que há um maior número de substâncias no extrato *L.* sp. (Pg-2).

Figura 9. Cromatograma do extrato produzido por Pg-1 em diferentes comprimentos de ondas: (a) 254 nm, (b) 280 nm, (c) 300 nm, (d) 320 nm e (e) 340 nm

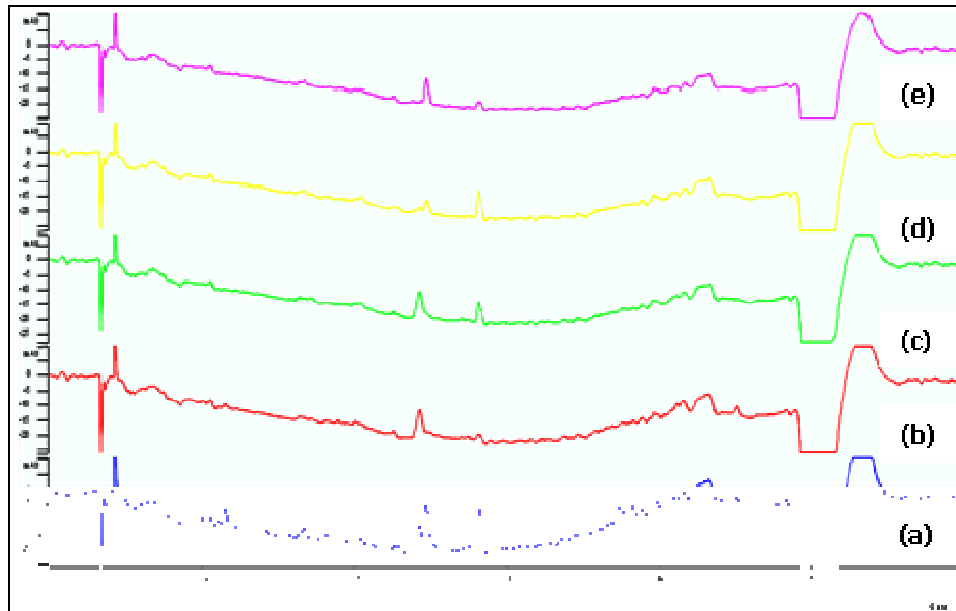


Figura 10. Cromatograma do extrato produzido por *L. sp* em diferentes comprimentos de ondas: (a) 254 nm, (b) 260,00 nm, (c) 270,00 nm, (d) 280,00 nm e (e) 300,00 nm

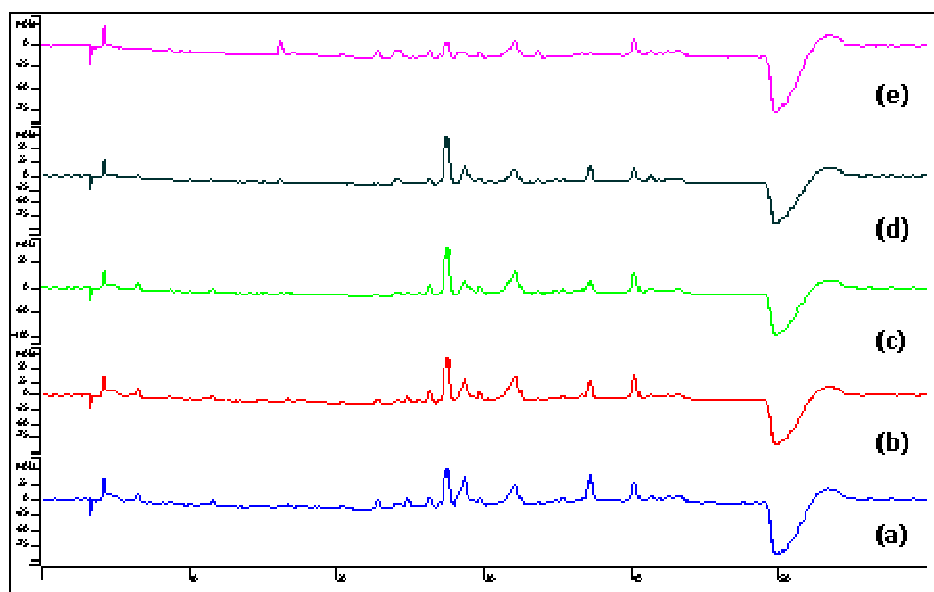
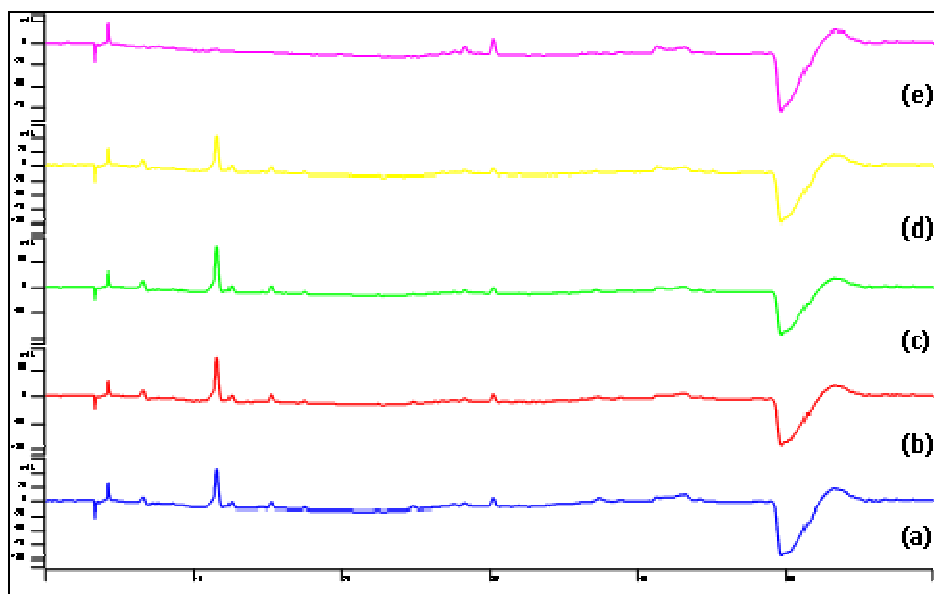


Figura 11. Cromatograma do extrato produzidos por Pg-3 em diferentes comprimentos de ondas: (a)254 nm, (b) 255,00 nm, (c) 260,00 nm, (d) 270,00 nm e (e) 290,00 nm



Os espectros de RMN de ^1H (Figuras 12, 13 e 14, pag. 39 e 40) dos extratos brutos evidenciam sinais de δ_{H} 0,8 até aproximadamente δ_{H} 7,5 ppm e a análise em CLAE-DAD, permite afirmar a presença de substâncias com maior polaridade, de média polaridade e substâncias menos polares.

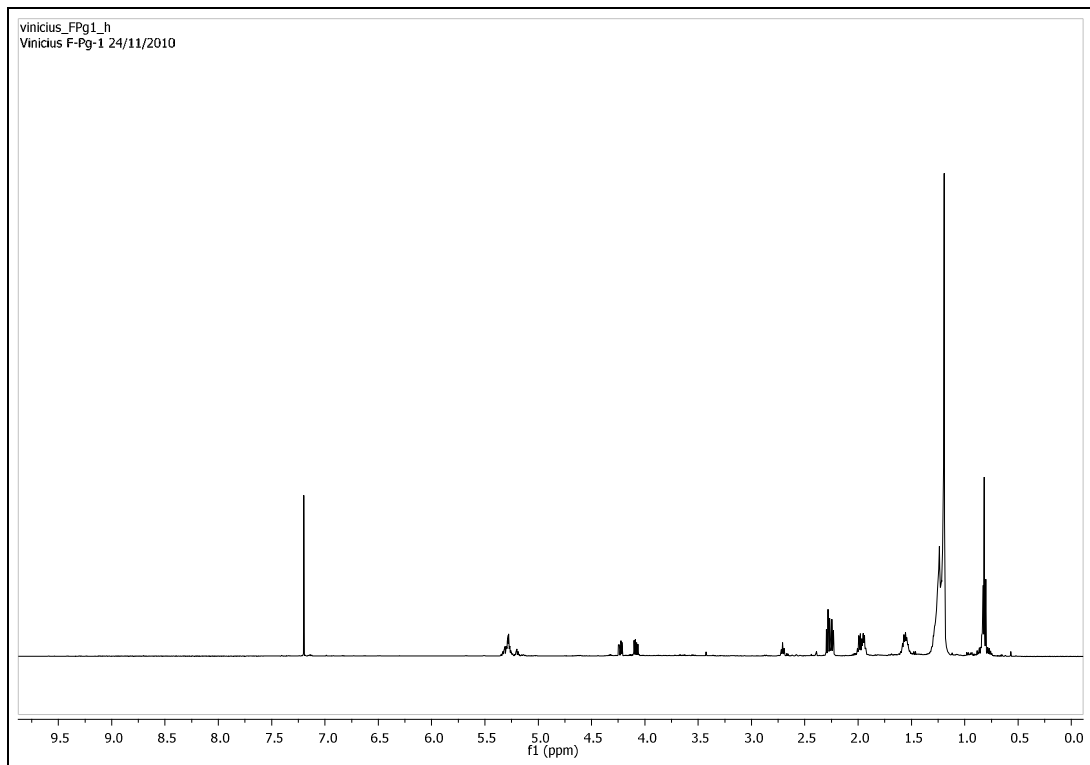
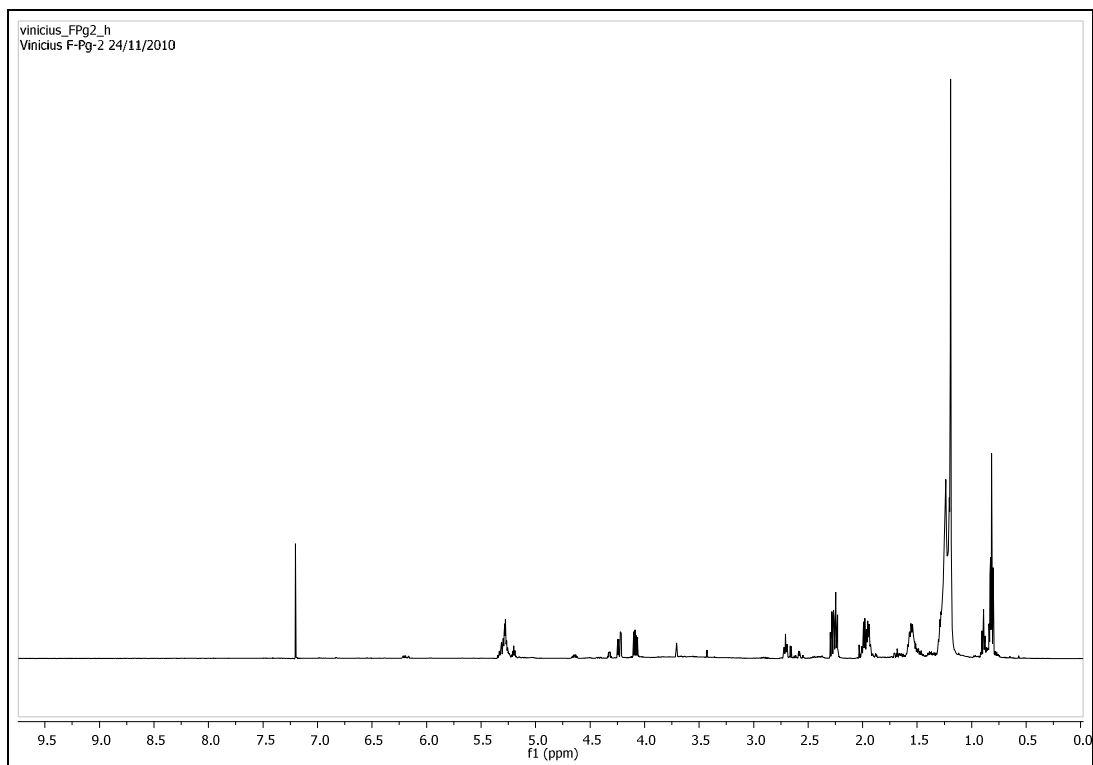
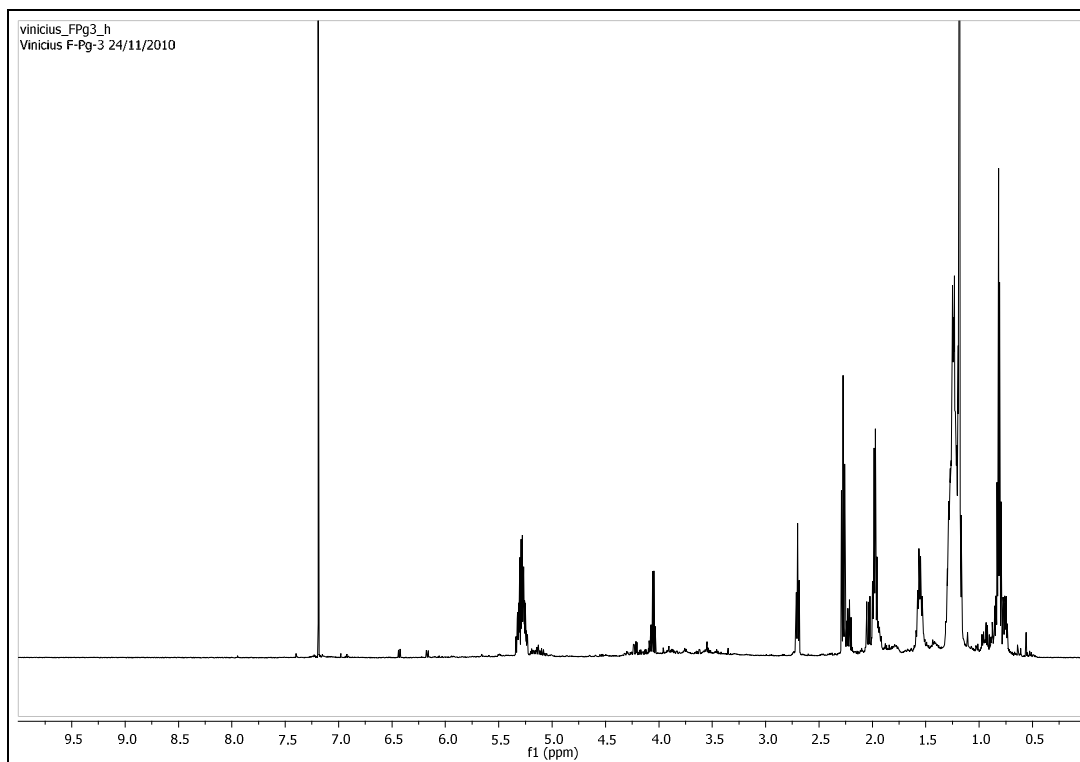
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto Pg-1 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 13.** Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *Lasiodiplodia* sp. (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 14. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto Pg-3 (CDCl_3 , 500 MHz)

A análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 12, 13 e 14) sugere a presença de substâncias alifáticas (δ entre 0,8 e 1,5) e aromáticas (δ entre 6,2 e 8,0), que podem possuir hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

4.2 Avaliação do perfil químico dos extratos após a partição Acetonitrila:Hexano

Os extratos brutos foram particionados com acetonitrila:hexano com a finalidade de remover substâncias de caráter graxo provenientes do meio de cultivo. Após a obtenção dos extratos em acetonitrila e hexânicos, estes foram submetidos à análise em CLAE-DAD (Figuras 15, 16, 17 e 18, pag. 41 e 42) e em RMN de ^1H (Figuras 19, 20, 21, 22, 23, e 24, pag. 43 a 46).

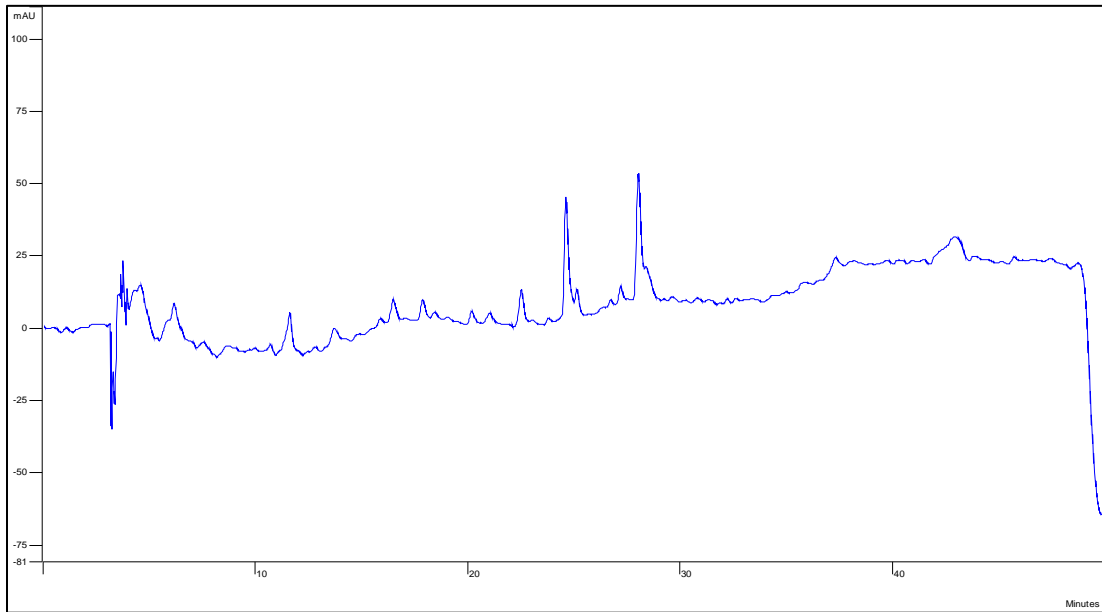
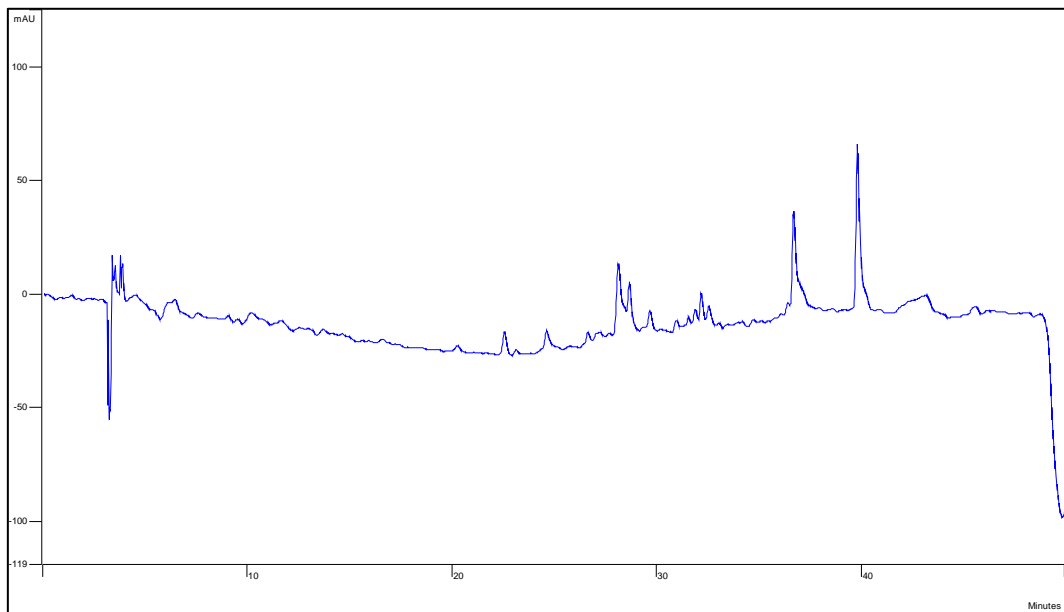
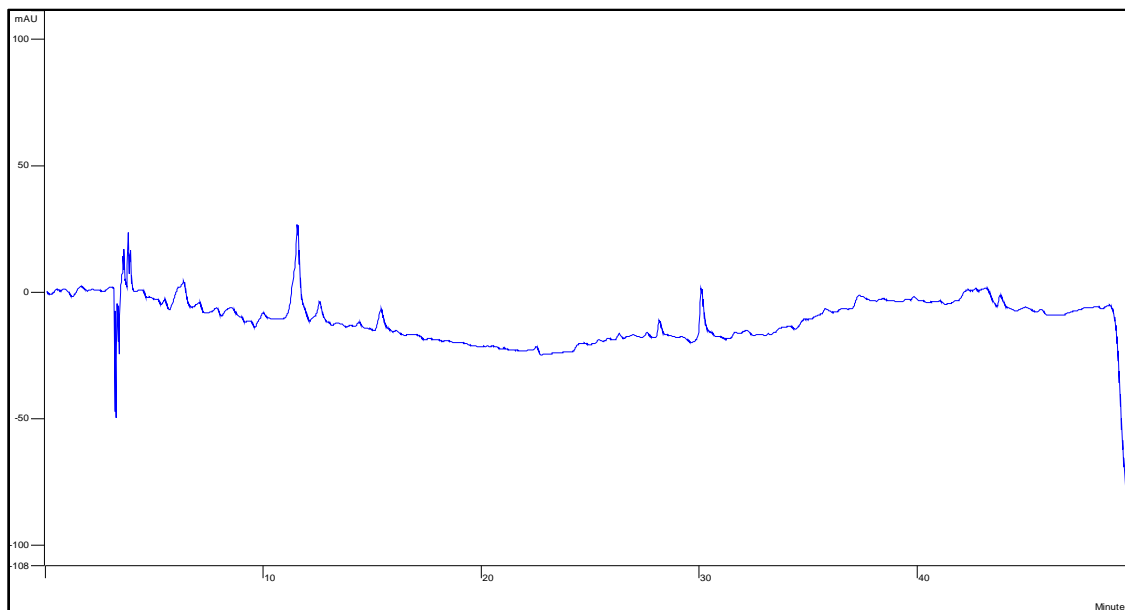
Figura 15. Cromatograma da fração acetonitrila do extrato Pg-1, $\lambda = 254$ nm**Figura 16.** Cromatograma da fração acetonitrila do extrato *Lasiodiplodia* sp., $\lambda = 254$ nm

Figura 17. Cromatograma da fração acetonitrila do extrato Pg-3, $\lambda = 254$ nm

Após a partição foi observado o aumento na intensidade dos sinais nos cromatogramas das frações em acetonitrila, assim como a observação de novas bandas cromatográfica (Figura 15, pag. 41) comparado com os cromatogramas antes da partição (Figura 9, pag. 37).

Nas análises dos cromatogramas das partições hexânicas não foram observados sinais (Figura 18), sugerindo que não há substâncias que absorvem em $\lambda = 254$ nm.

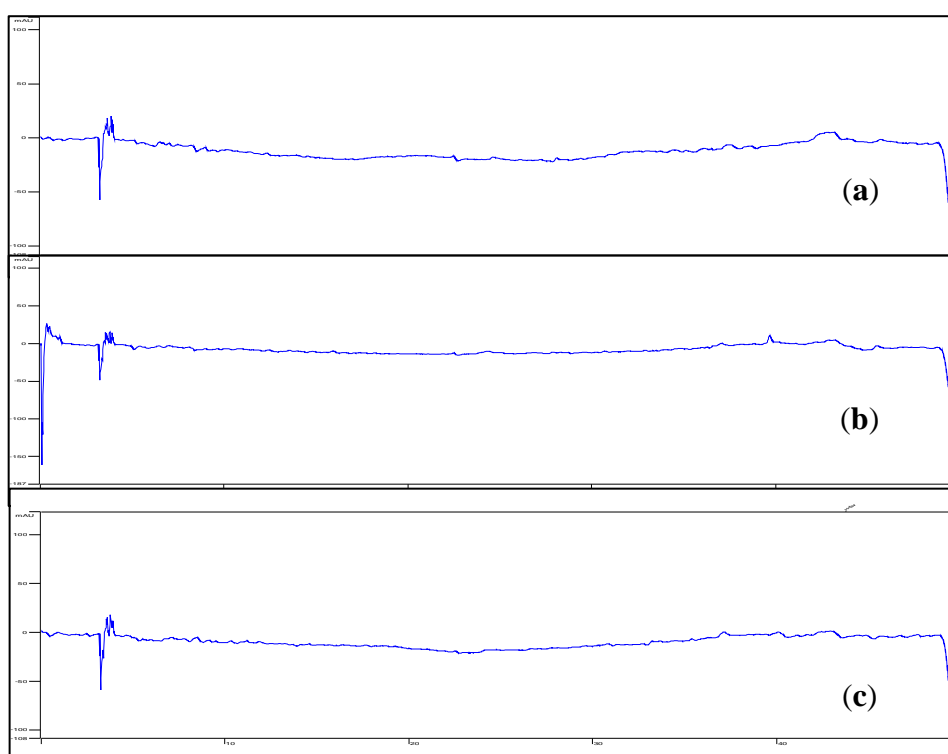
Figura 18. Cromatogramas das frações hexânicas dos extratos Pg-1 (a), *L. sp.* (b) e Pg-3 (c), $\lambda = 254$ nm

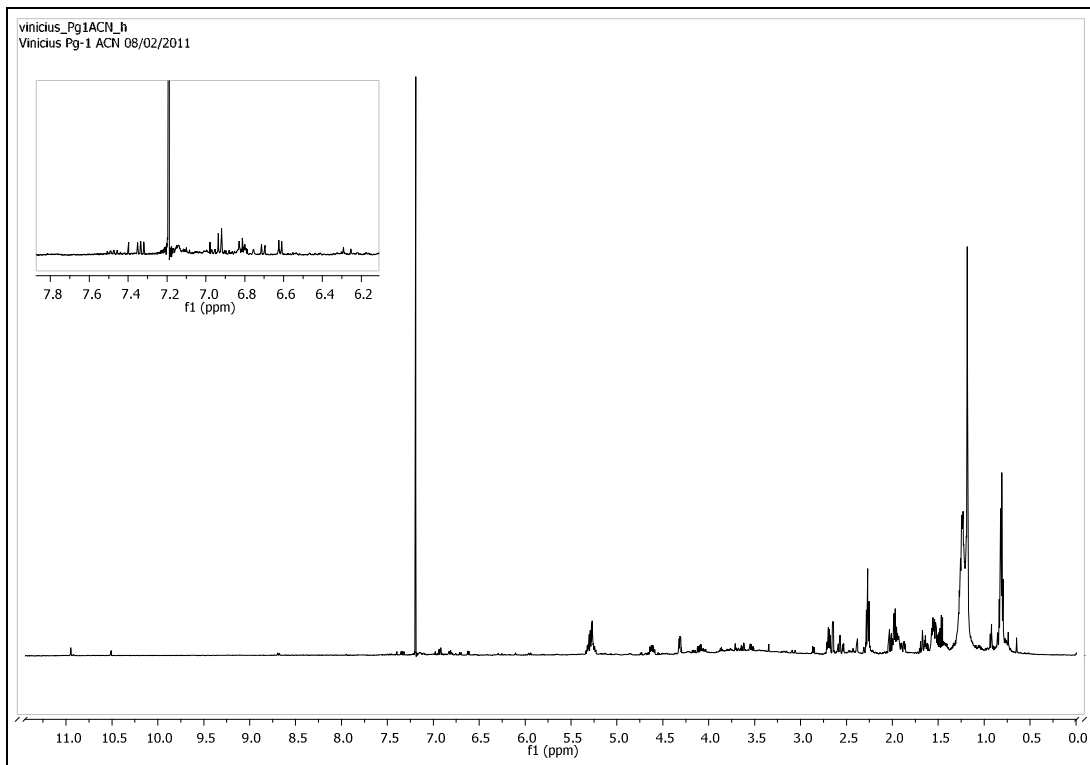
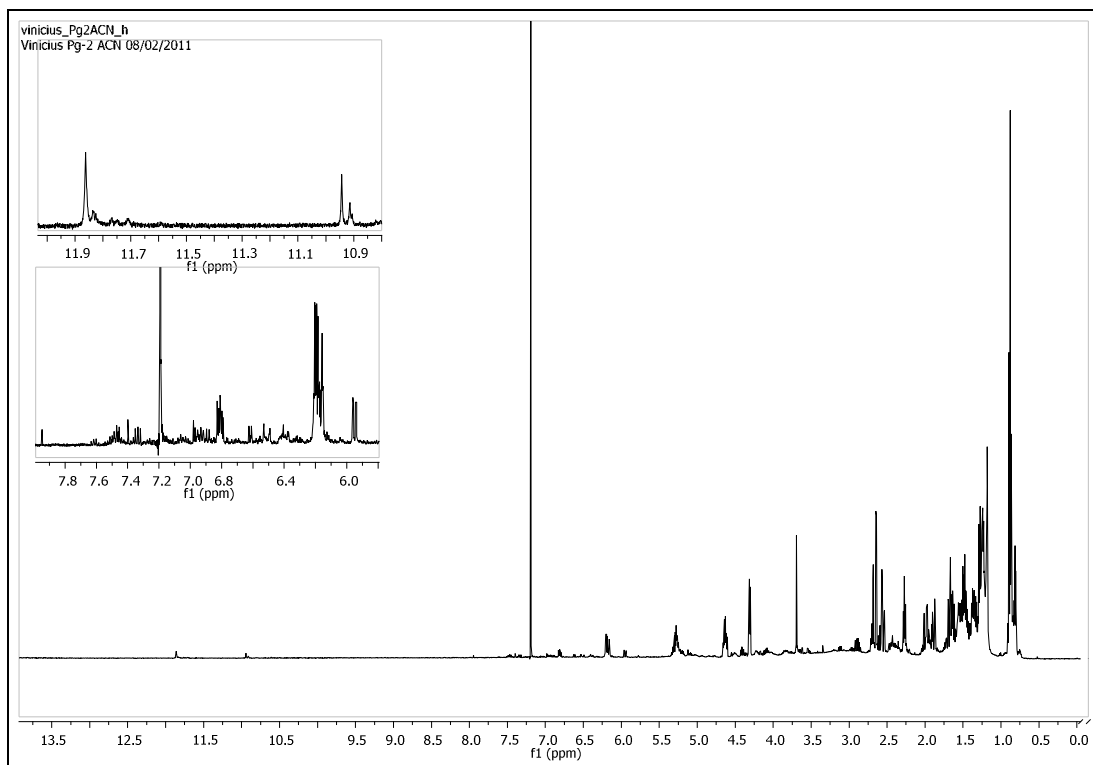
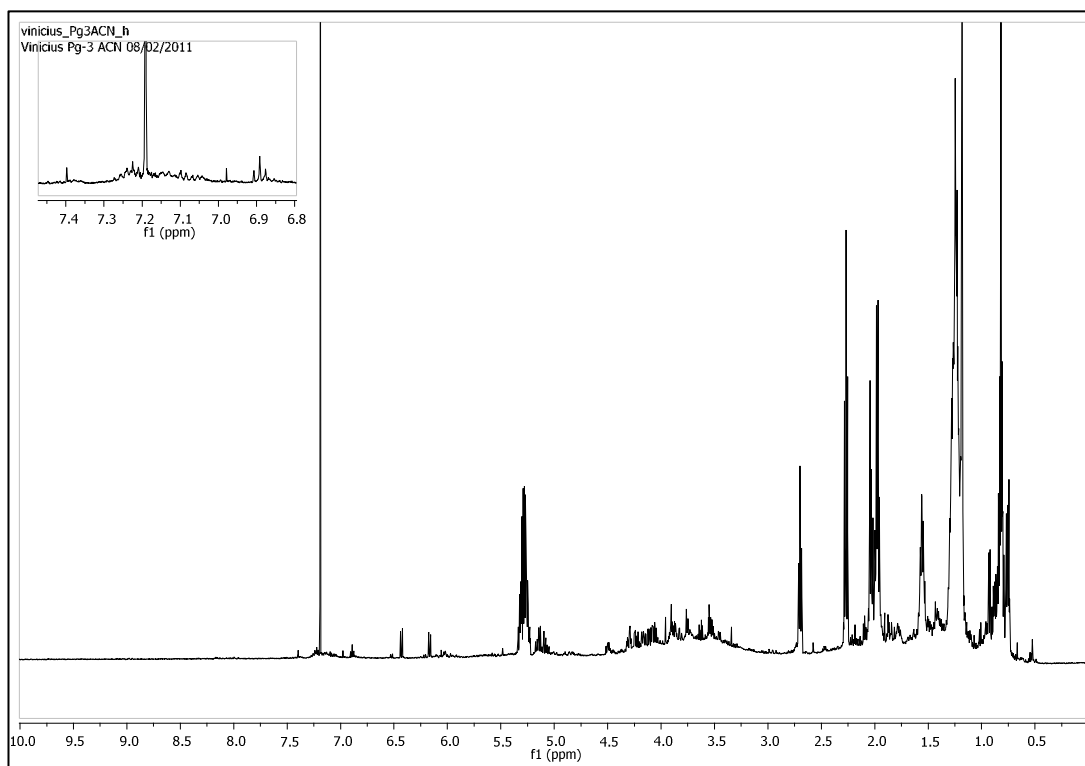
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da partição acetoneitrila de Pg-1 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 20.** Espectro de RMN de ^1H da partição acetoneitrila de *L. sp* (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H da partição acetoneitrila de Pg-3 (CDCl_3 , 500 MHz)

Os espectros de RMN de ^1H das partições acetoneitrílicas (Figuras 19, 20 e 21) apresentam maior intensidade dos sinais, comparados aos espectros dos extratos brutos (Figuras 12, 13 e 14, pag. 39 e 40), devido à remoção de grande parte dos ácidos graxos, que resultavam em sinais muito intensos ($\delta=0,80-1,80$) (Figuras 12, 13 e 14), além de, ser possível a visualização de outros sinais (Figura 19 e 20) nos deslocamentos $\delta=10,50$ e $\delta=10,94$ (Figura 19) e $\delta=10,94$ e $\delta=11,85$ (Figura 20), podendo ser hidrogênios de aldeído ou fenólicos.

Os espectros apresentam picos com deslocamento característico de grupos aromáticos (δ ente 6,5 e 8,0) para as partições acetoneitrila.

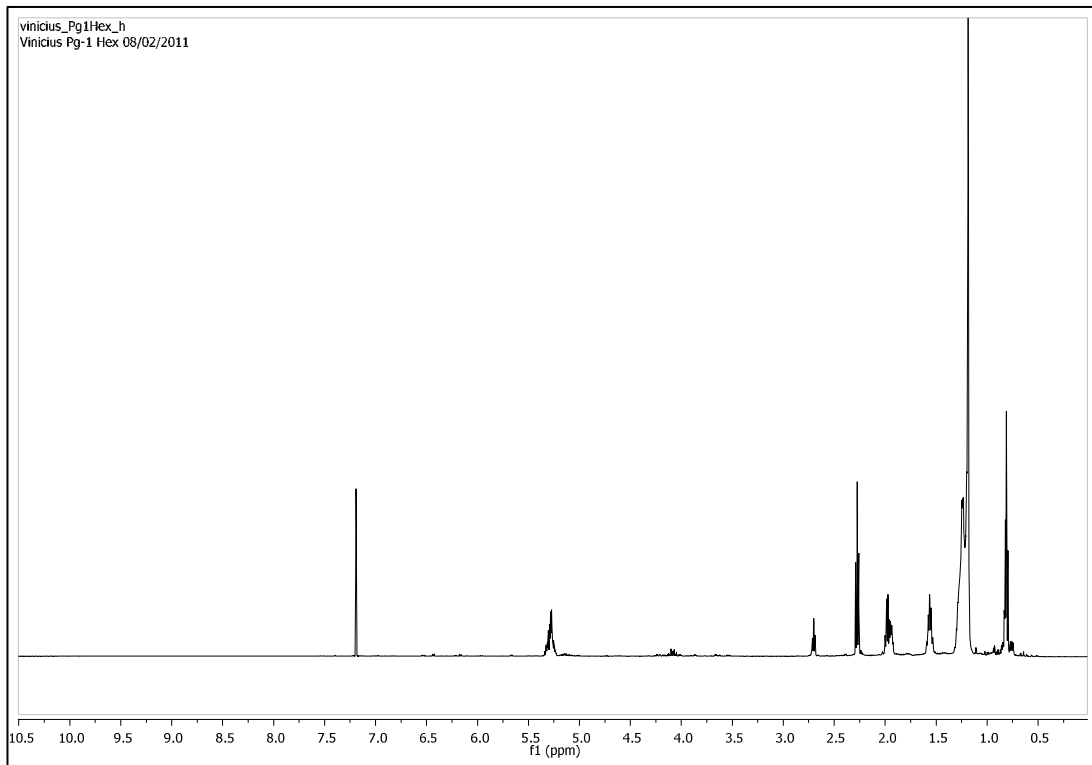
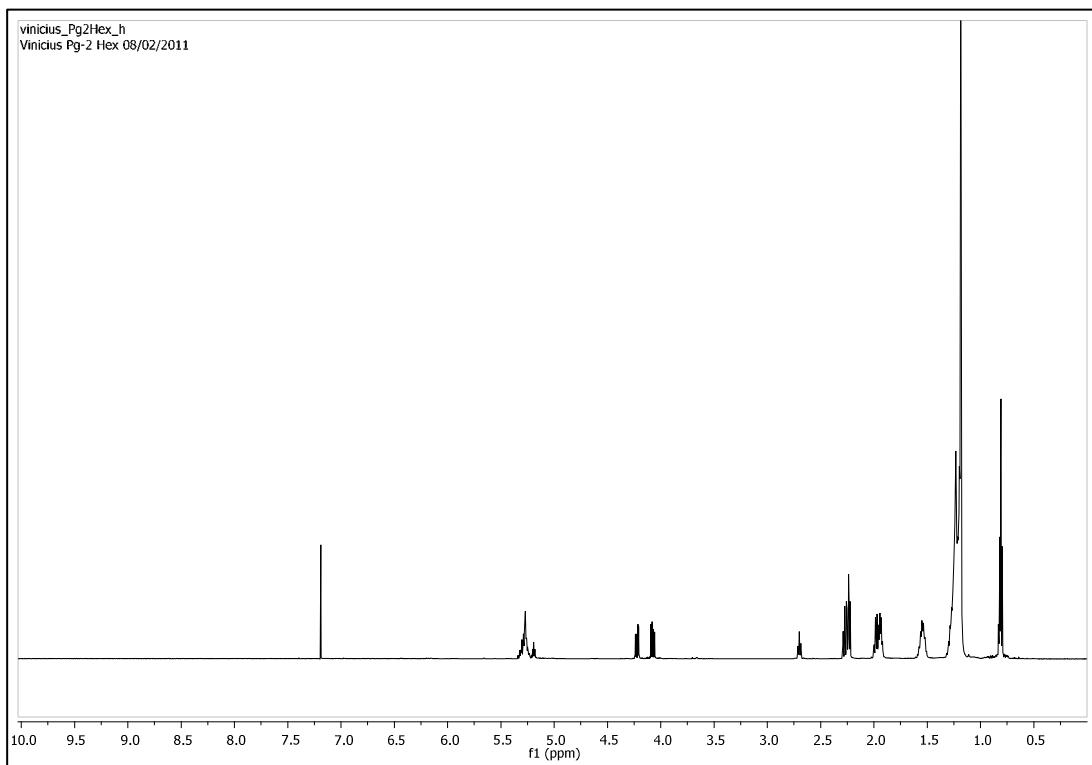
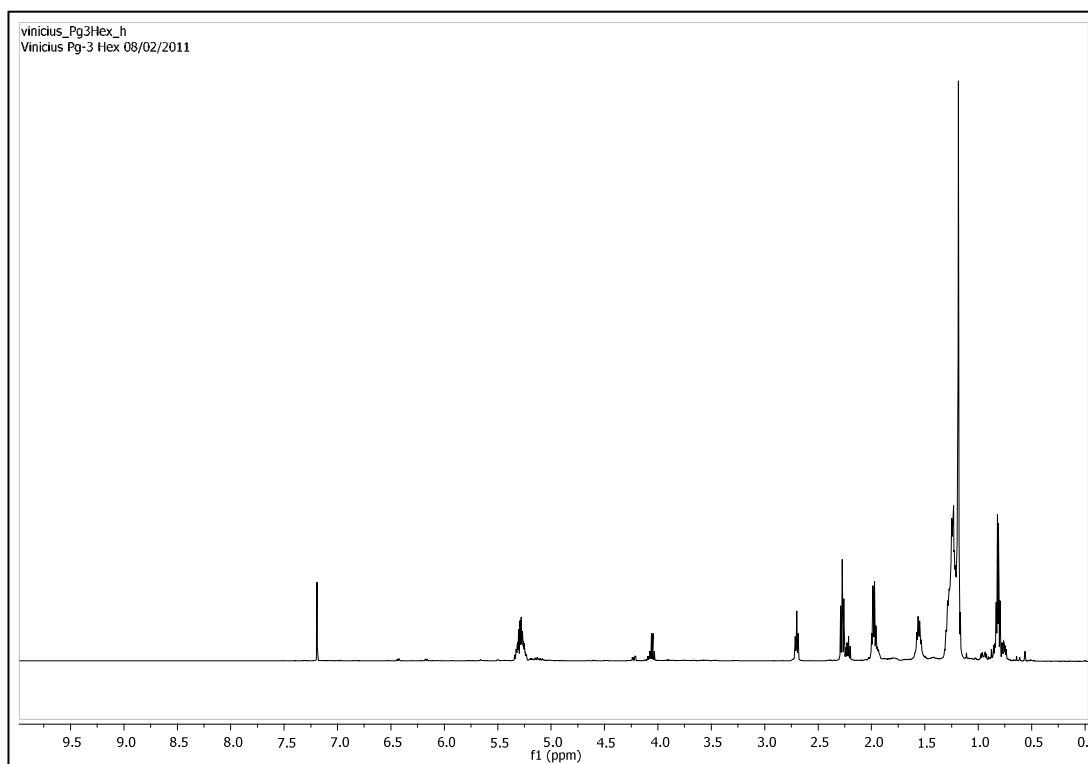
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da partição hexânica Pg-1 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 23.** Espectro de RMN de ^1H da partição hexânica *L. sp* (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da partição hexânica Pg-3 (CDCl_3 , 500 MHz)

Os espectros da partição hexânica (Figura 22, 23 e 24), aparentam ter a mesma classe de substâncias, uma vez que, os deslocamentos químicos são muito semelhantes.

4.3 Coluna Cromatográfica (CC)

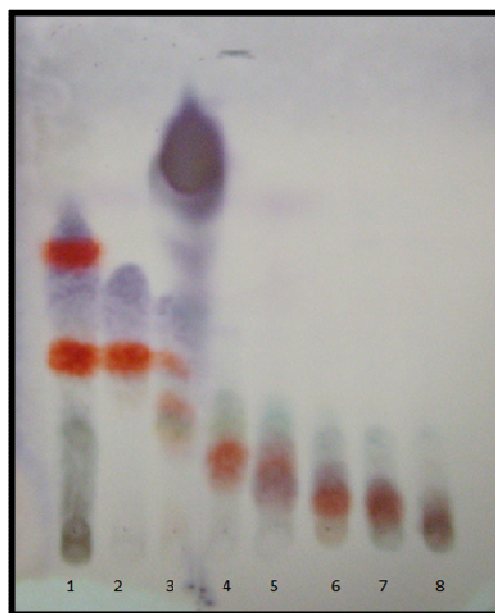
Dentre os extratos da partição acetonitrila, foi escolhido o extrato produzido por *Lasiodiplodia* sp. por apresentar um perfil cromatográfico promissor (Figura 16) e espectro de RMN de ^1H (Figura 20) onde o deslocamento dos hidrogênios é amplo, variando de $\delta=0,8$ a $\delta=11,9$.

4.4 Avaliação do perfil químico das frações obtidas a partir do fracionamento da fase em acetonitrila do fungo *Lasiodiplodia* sp.

4.4.1 CCDC das frações obtidas no fracionamento em coluna cromatográfica

As frações obtidas foram analisadas por CCDC de sílica gel (Figura 25), as quais foram eluídas com uma solução de hexano:acetato de etila em uma proporção de 70:30 e posteriormente reveladas com anisaldeído.

Figura 25. CCDC das frações obtidas: (1) *L. sp-Fr 70:30*, (2) *L. sp-Fr 65:35*, (3) *L. sp-Fr 60:40*, (4) *L. sp-Fr 58:42*, (5) *L. sp-Fr 53:47*, (6) *L. sp-Fr 50:50*, (7) *L. sp-Fr 40:60* e (8) *L. sp-Fr 30:70*



Posteriormente à análise por CCDC, foi realizada a separação das duas manchas de coloração laranja observadas na fração *L.sp-Fr70:30* por cromatografia de camada delgada preparativa, resultando na separação de duas substâncias, *L.sp-Fr70:30 F-1* (Sub.2 com 19,2g) e *L. sp-Fr70:30 F-2* (Sub.3 com 23,7 g).

4.4.2 RMN de ^1H das frações

Subsequentemente ao fracionamento da fase acetonitrílica do extrato do fungo *Lasiodiplodia sp.*, foram realizadas as análises de RMN de ^1H das frações obtidas (Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34), onde pode-se observar a separação parcial das substâncias nas diferentes eluições, comparando os deslocamentos dos picos de hidrogênios entre os espectros.

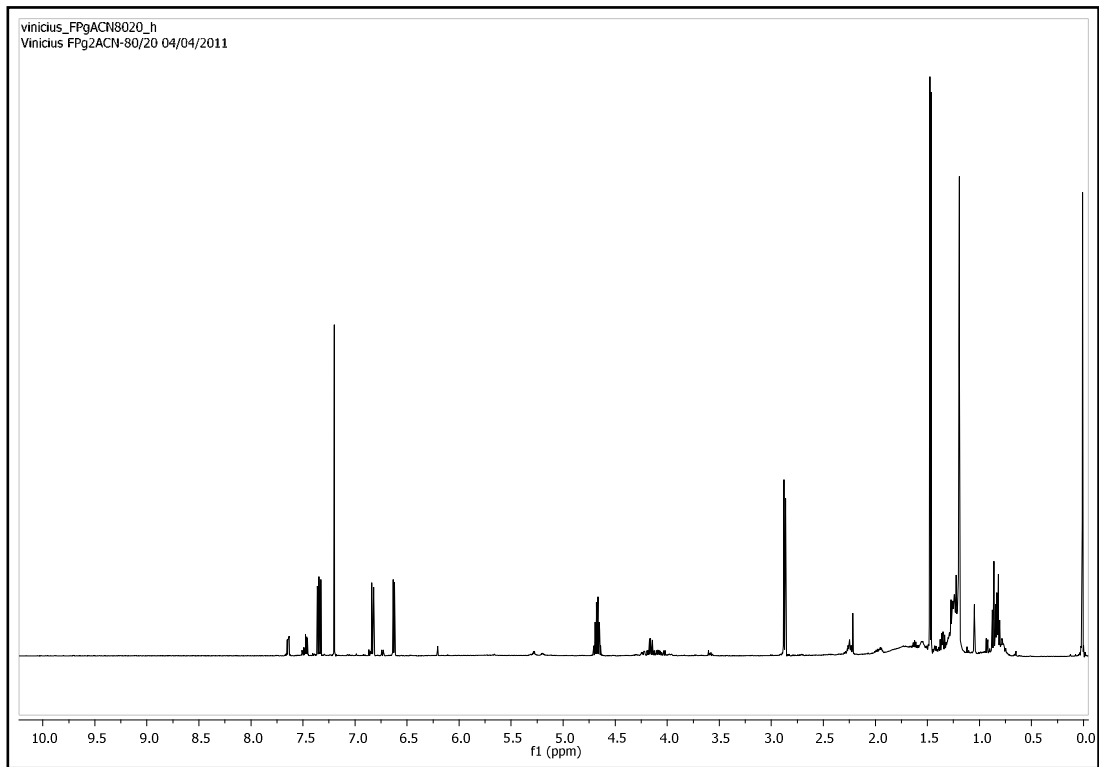
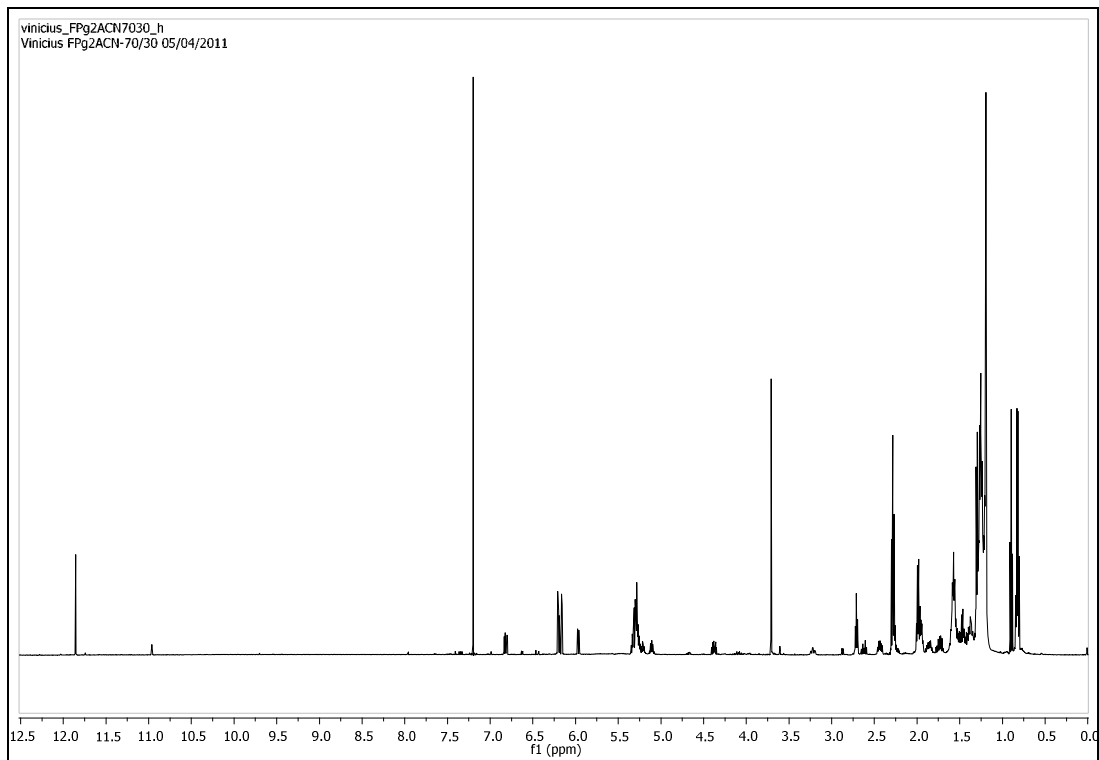
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 80:20 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 27.** Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 70:30 (CDCl_3 , 500 MHz)

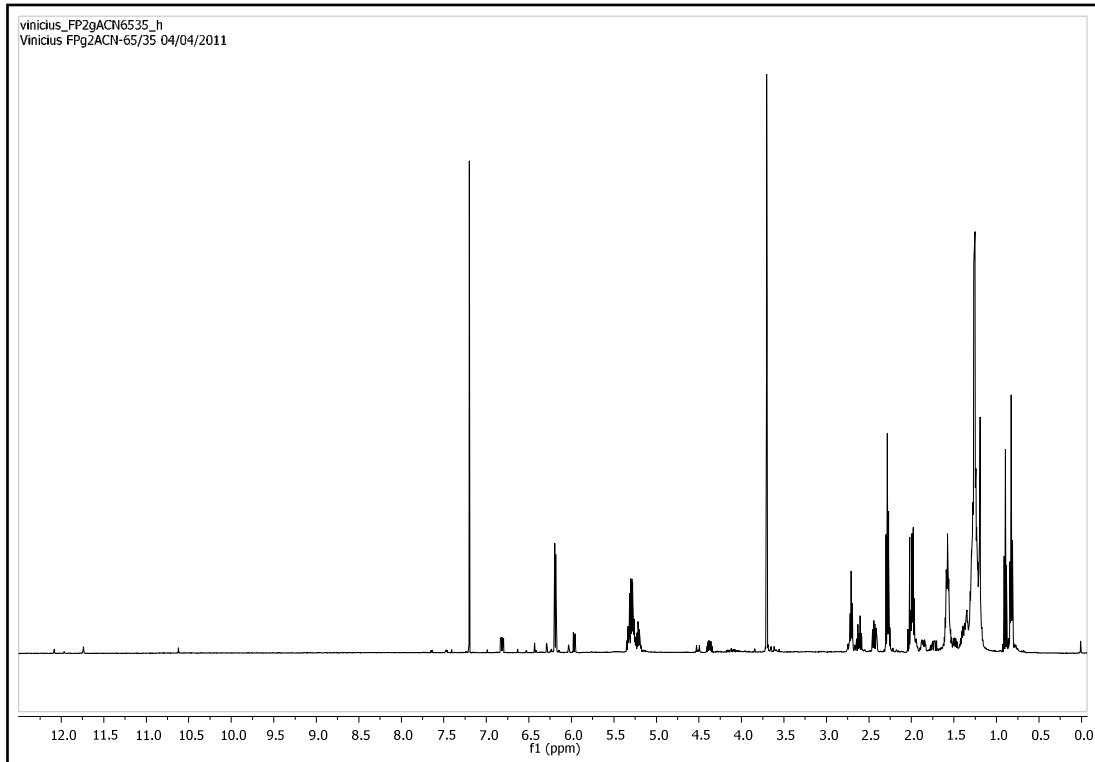
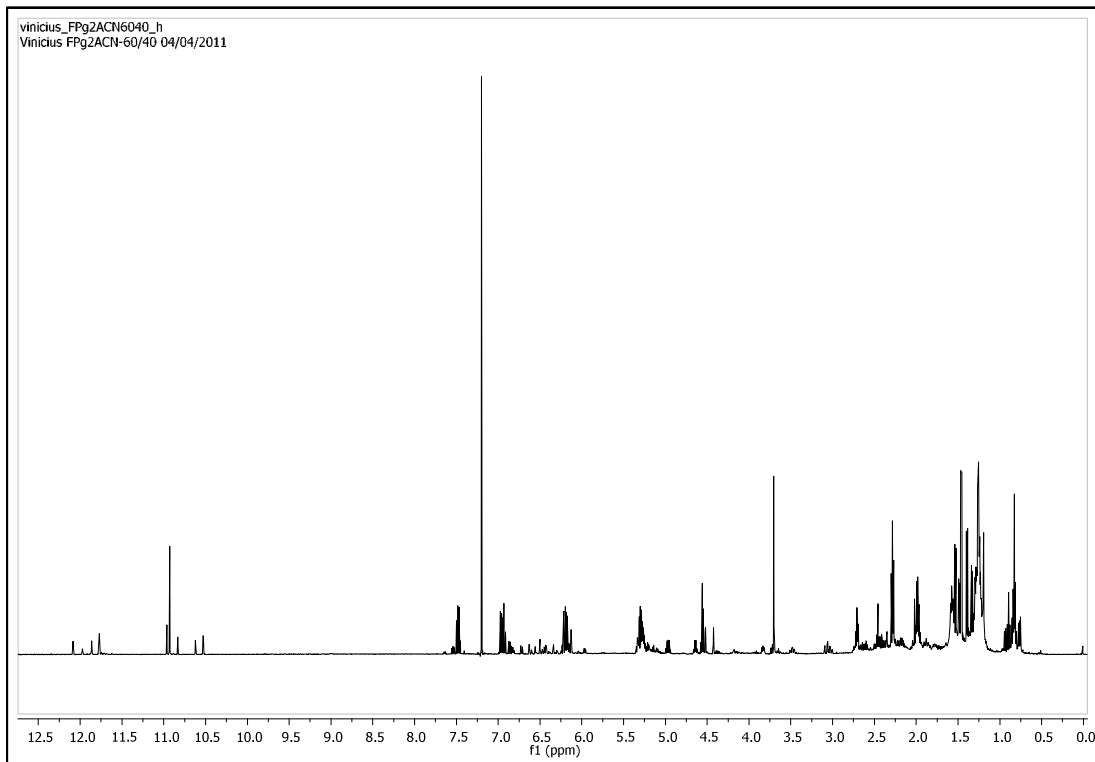
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp-Fr 65:35* (CDCl_3 , 500 Hz)**Figura 29.** Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp-Fr 60:40* (CDCl_3 , 500 MHz)

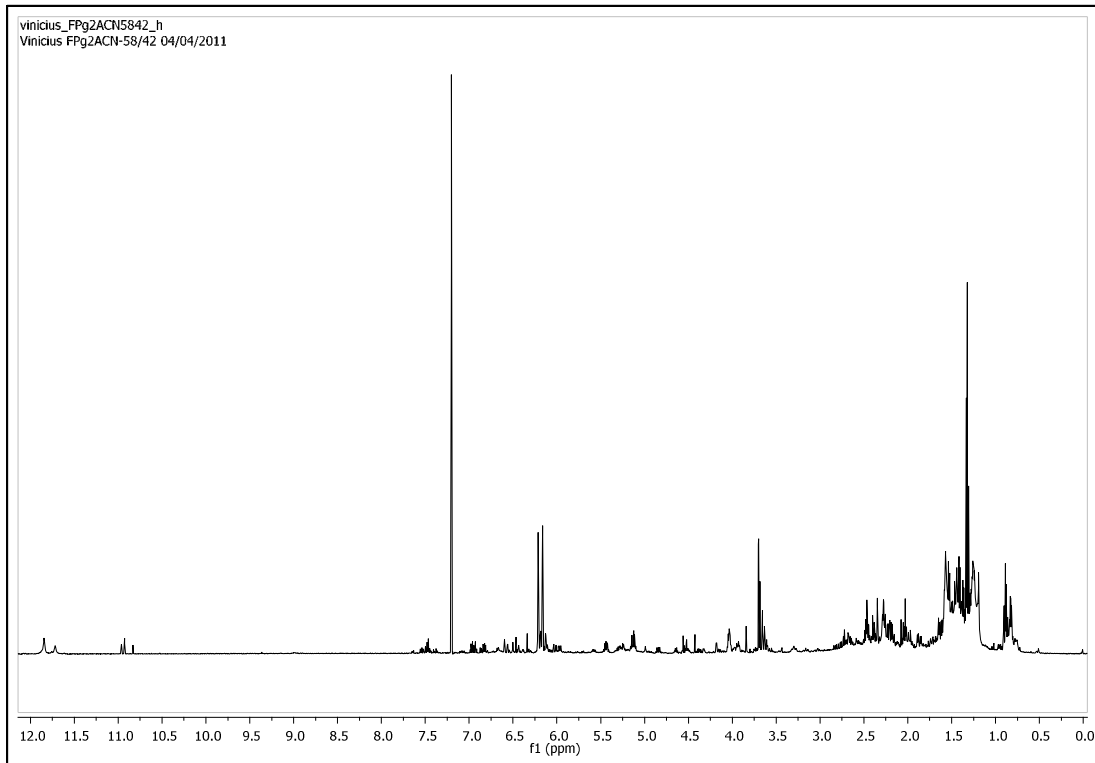
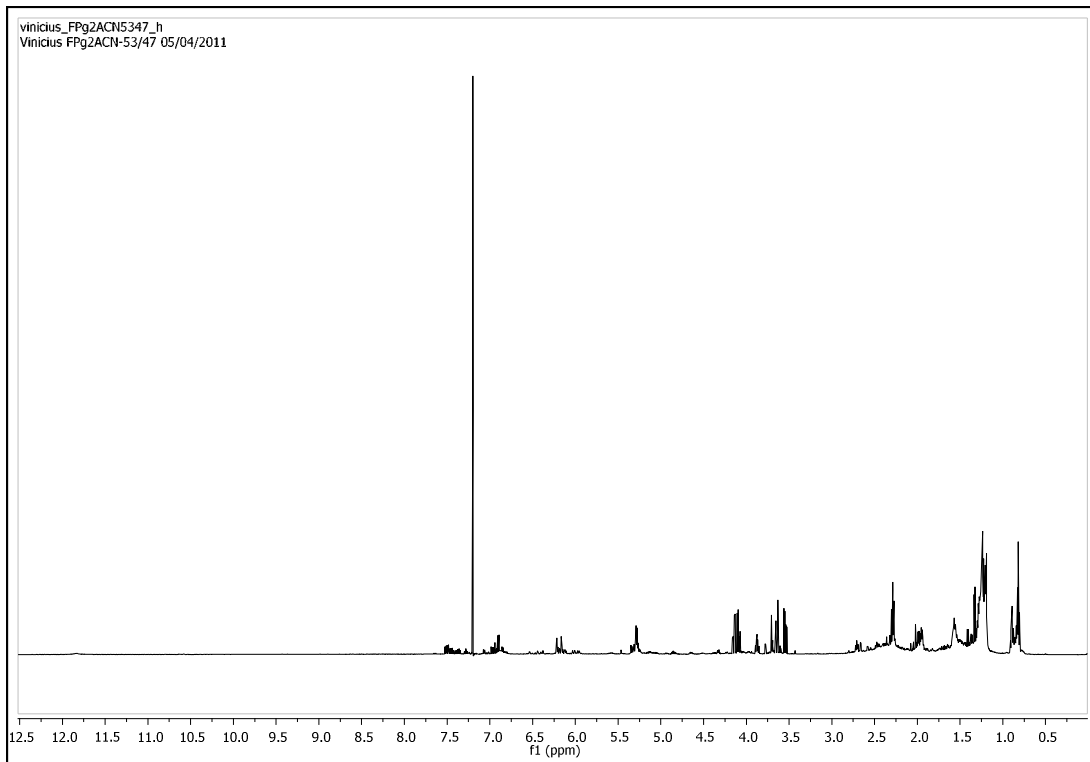
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 58:42 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 31.** Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 53:47 (CDCl_3 , 500 MHz)

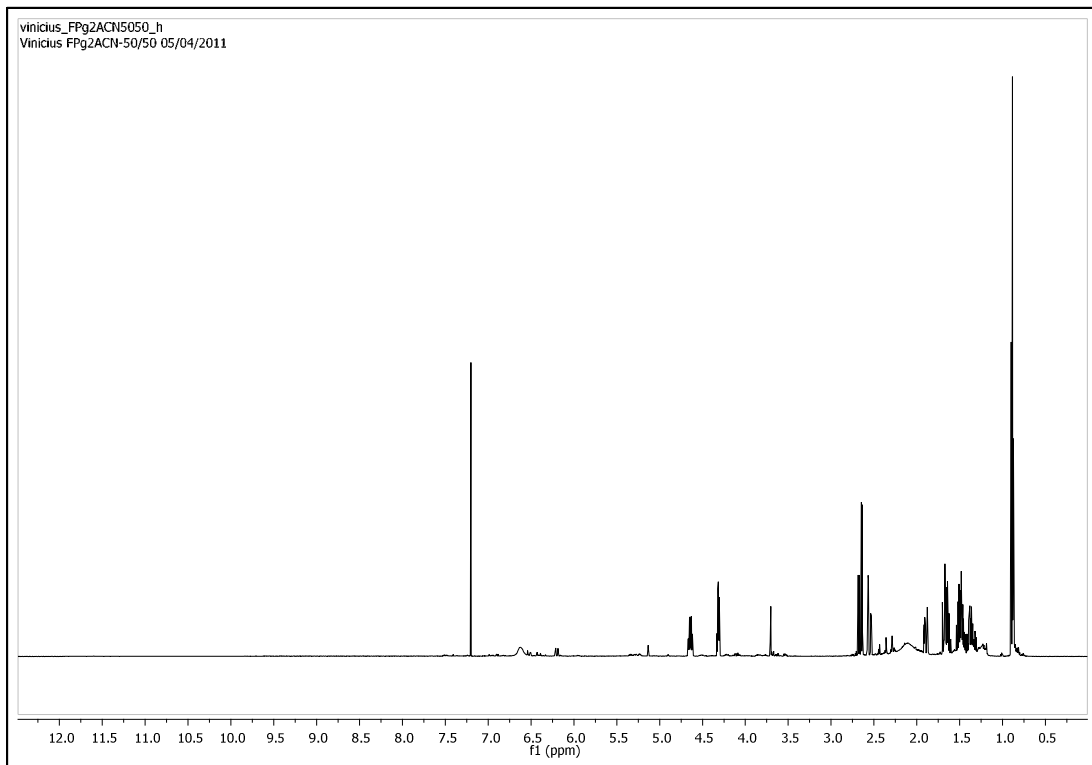
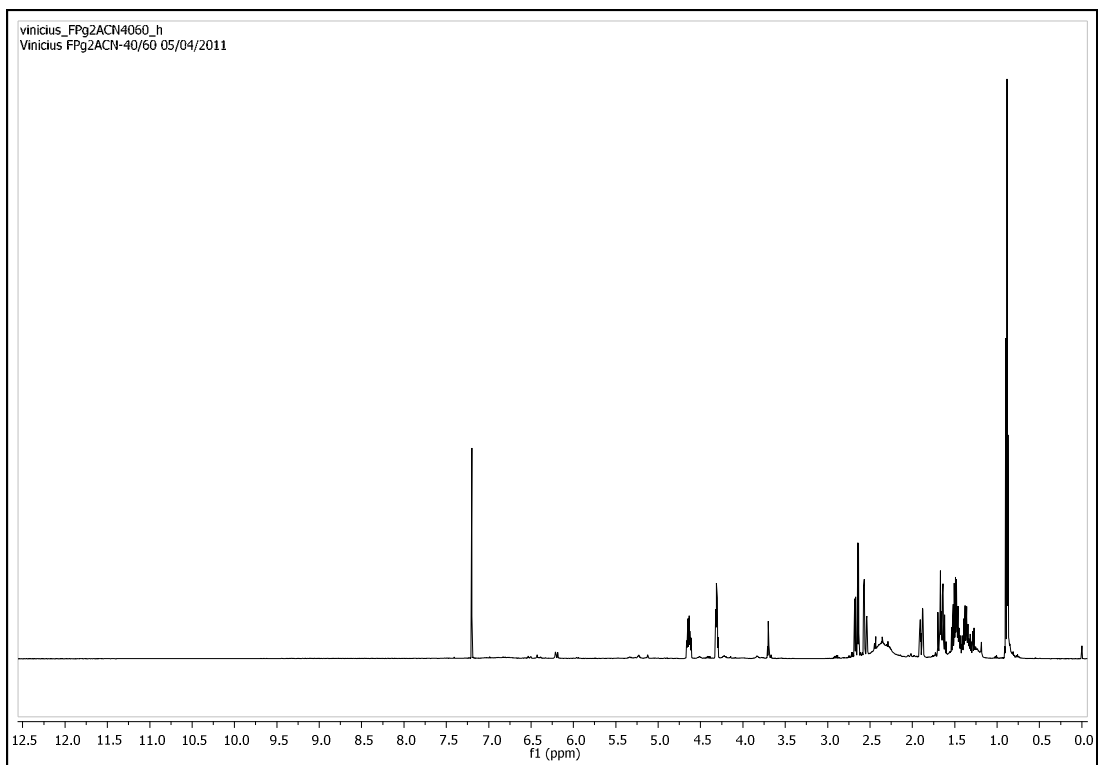
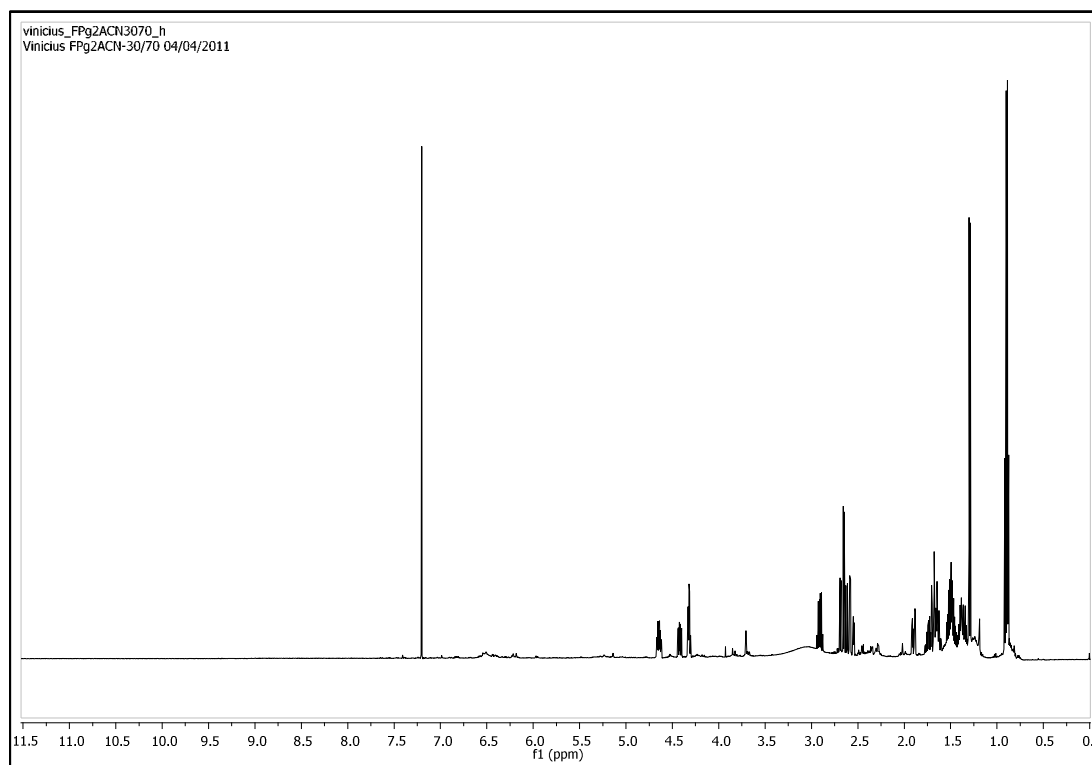
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 50:50 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 33.** Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 40:60 (CDCl_3 , 500 MHz)

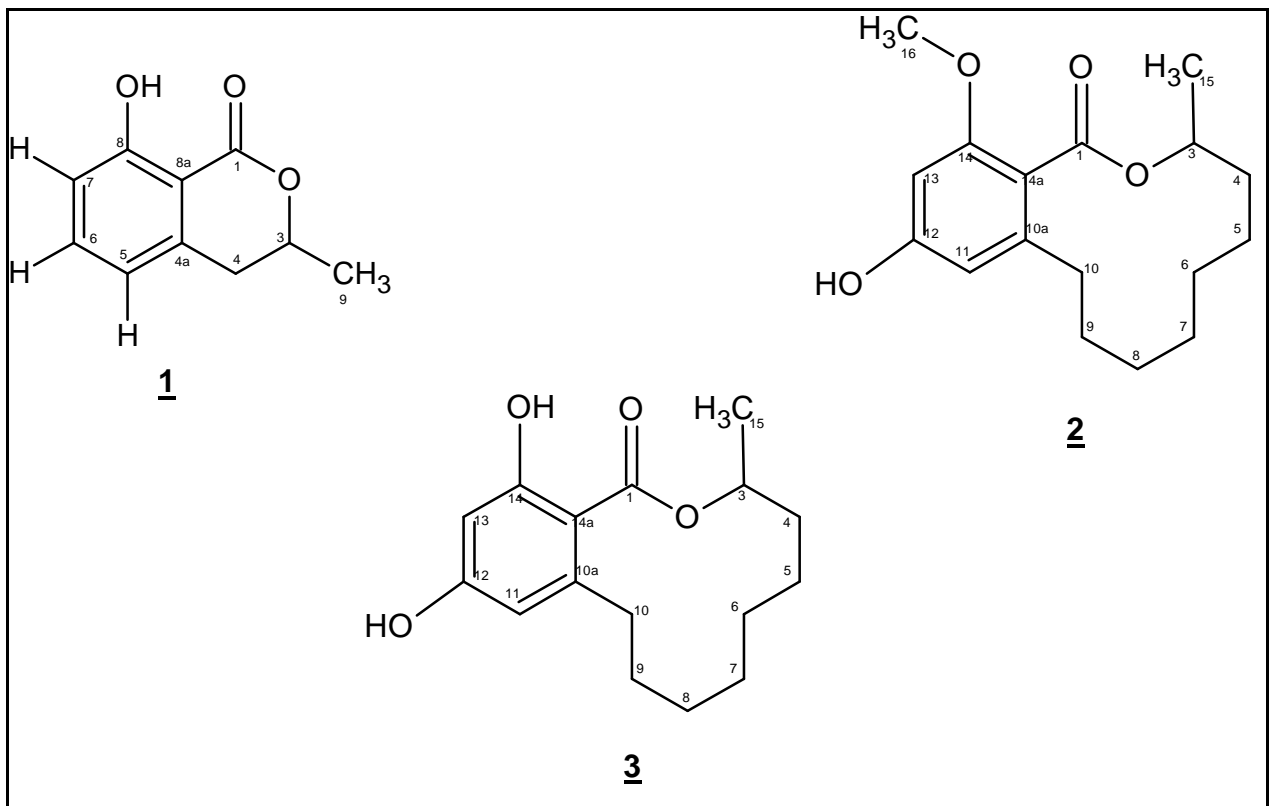
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da fração *L. sp*-Fr 30:70 (CDCl_3 , 500 MHz)

A análise dos espectros de RMN de ^1H permite a observação do desaparecimento gradual dos sinais de hidrogênio entre δ_{H} 12,0 e δ_{H} 5,0, confirmando a separação das substâncias no fracionamento realizado.

4.5 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *Lasiodiplodia sp.*

O estudo químico do extrato em arroz produzido pelo endófito *Lasiodiplodia sp.* resultou na identificação de 3 compostos: meleina (**1**), lasiodiplodina (**2**) e des-*O*-metil-lasiodiplodina (**3**) (Figura 35).

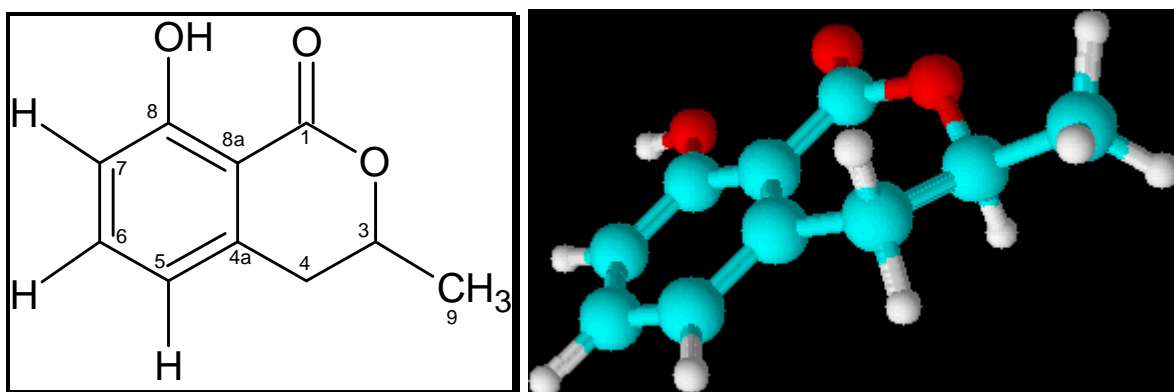
A determinação estrutural dos compostos foi efetuada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensionais (*g*HMQC, *g*HMBC e *g*COSY) e EM, e pela comparação desses dados com aqueles disponibilizados na literatura.

Figura 35. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp.

4.5.1 Substância 1

A substância 1 (Figura 36), isolada da fração *L. sp*-Fr80:20, foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectros de massas, os quais evidenciaram tratar-se de uma substância em mistura, no entanto com identificação estrutural viável.

Figura 36. Estrutura da substância 1 (meleina)



No espectro de RMN de ^1H (Figura 38, Tabela 4) da substância 1 foram observados, na região de aromáticos, um dubleto em δ_{H} 6,82 (*d*; $J=8,5$ Hz; 1H; δ_{C} 116,2) e dois duplos dubletos, um em δ_{H} 6,62 (*dd*; $J=7,0$; 0,5 Hz; 1H; δ_{C} 117,9) e o outro em δ_{H} 7,34 (*dd*; $J=7,0$; 8,5 Hz; 1H; δ_{C} 136,1), evidenciando um sistema aromático trissubstituído. Também foram observados dois dubletos em δ_{H} 1,46 (*d*; 6,0 Hz; 3H; δ_{C} 20,7) e δ_{H} 2,86 (*d*; 7,0 Hz; 2H; δ_{C} 34,6) e um multipletto em δ_{H} 4,67 (*m*; 1H; δ_{C} 76,0) característicos de hidrogênios de metila, benzílicos e carbinólicos, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39, Tabela 4) foram observados sinais de seis átomos de carbono na região dos aromáticos, sendo um deles com deslocamento em δ_{C} 162,2 (C-8) sugerindo um carbono hidroxilado. O carbono observado em δ_{C} 169,9 (C-1) foi atribuído a uma carbonila característica de um grupamento éster (lactona). Adicionalmente, os sinais observados em δ_{C} 76,0 (C-3), δ_{C} 34,6 (C-4) e δ_{C} 20,7 (C-9), sugeriram a presença de carbonos carbinólico; benzílico e uma metila, respectivamente.

Estes sinais associados aos observados no mapa de contorno do experimento *gHSQC* (Figura 40, Tabela 4) nos permitiram atribuir todos os átomos de carbono aos respectivos hidrogênios e sugerir para a substância 1 a estrutura de uma isocumarina.

As correlações observadas a longa distância (Figura 37) nos mapas de contorno dos experimentos de *g*HMBC (Figura 41, Tabela 4) entre H-5↔C-7/C-8^a/C-4^a, de H-6↔C-8/C-4^a e de H-7↔C-5/C-8^a, associados às correlações observadas no espectro de *g*COSY (Figura 42, Tabela 4) de H-3↔H-4 e H-3↔H-9, nos permitiram confirmar a estrutura proposta da isocumarina denominada meleina (**1**).

A análise dos dados obtidos ESI-EM(+)_{20V} (Figura 43), em modo positivo, evidenciou a molécula protonada com *m/z* 180,06 [M+H]⁺, mas era esperado a molécula protonada de *m/z* 179 [M+H]⁺. Essa diferença pode ser atribuída a troca de um hidrogênio por um deutério, pois a amostra esteve em contato com CDCl₃. Estes dados associados aos de RMN permitiu propor a fórmula molecular de C₁₀H₁₀O₃.

Figura 37. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **1**

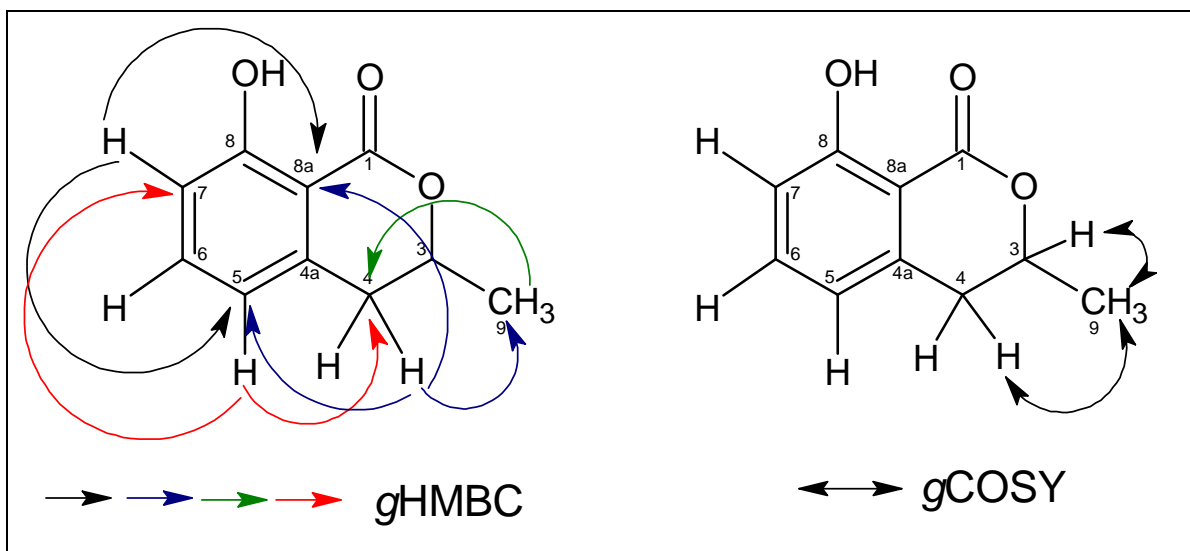


Tabela 4. Dados de RMN 1D e 2D da substância **1** em CDCl₃ (δ em ppm e J em Hz)

	$H_{\delta}(m,J, Hz)$	$gHMQC(\delta)$	$gHMBC(\delta)$	$gCOSY$
1	---	169,9	---	---
3	4,67 (<i>m</i>)	76,0	*	H-4; H-9
4	2,86 (<i>d</i>) 7,0	34,6	C-4 ^a ; C-5; C-8 ^a ; C-3; C-9	H-3
4 ^a	---	139,1	---	---
5	6,62 (<i>d,d</i>) 7,0; 0,5	117,9	C-7; C-8 ^a ; C-4	H-6
6	7,34(<i>d,d</i>) 7,0; 8,5	136,1	C-8; C-4 ^a	H-7; H-5
7	6,82 (<i>d</i>) 8,5	116,2	C-5; C-8 ^a	H-6
8	---	162,2	---	---
8 ^a	---	108,3	---	---
9	1,46 (<i>d</i>) 6,0	20,7	C-4; C-3	H-3

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (DIMITRIADIS; GILL; HARTE, 1997) permitiram identificar a substância **1** como sendo a meleina, sendo este o primeiro relato do isolamento da meleina em fungos endofíticos isolados da alga *Padina gymnospora*.

A meleina pertence à classe das isocumarinas, a qual já foi relatada de diferentes fungos endofíticos como *Prumnopitys andina* (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005) *Plectophomella* sp, *Pezicula lívida*, *Cryptosporiopsis malicorticis* (KROHN et al. 1997) e *Botryosphaeria rhodina* (RUKACHAISIRIKUL et al. 2009), possui diversas atividades biológicas associadas como citotóxica (CHENG et al., 2012), antibacteriana, fitotóxica, atividade contra protease do vírus da hepatite C (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005) e antifúngica (ZHAO et al., 2012).

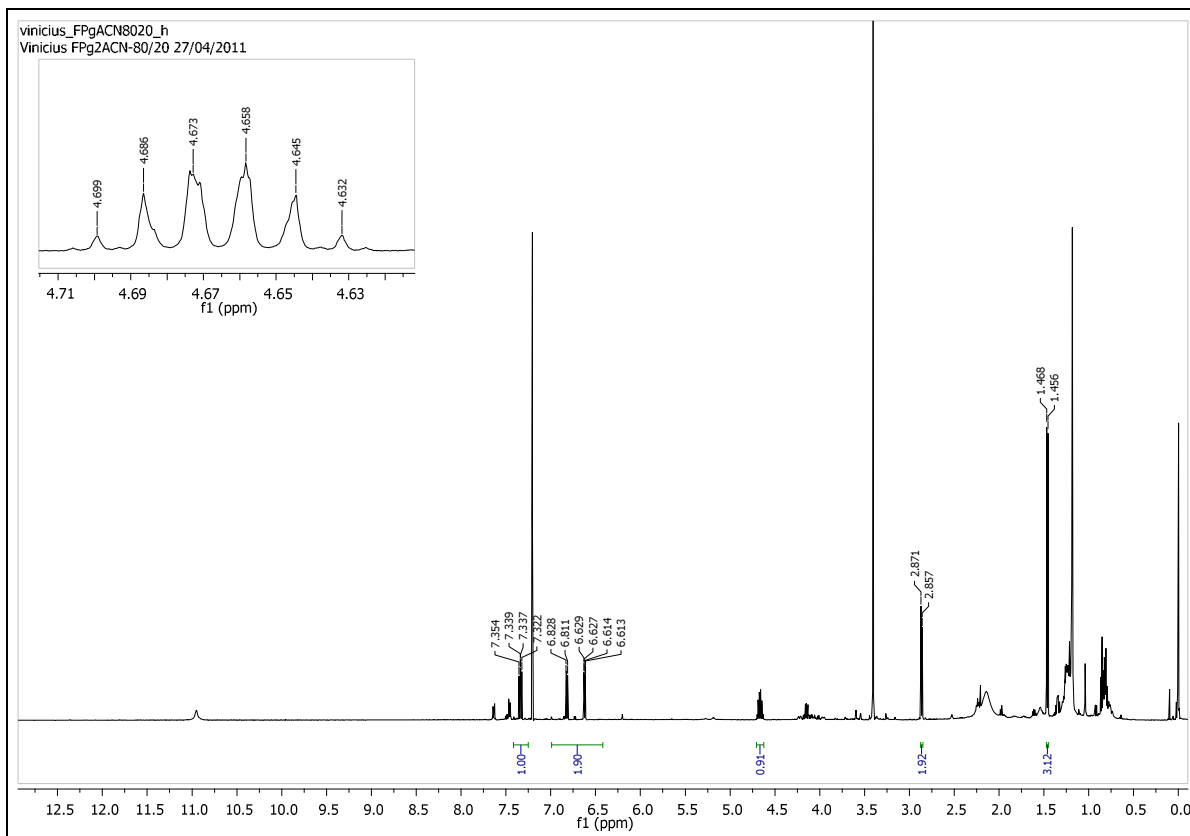
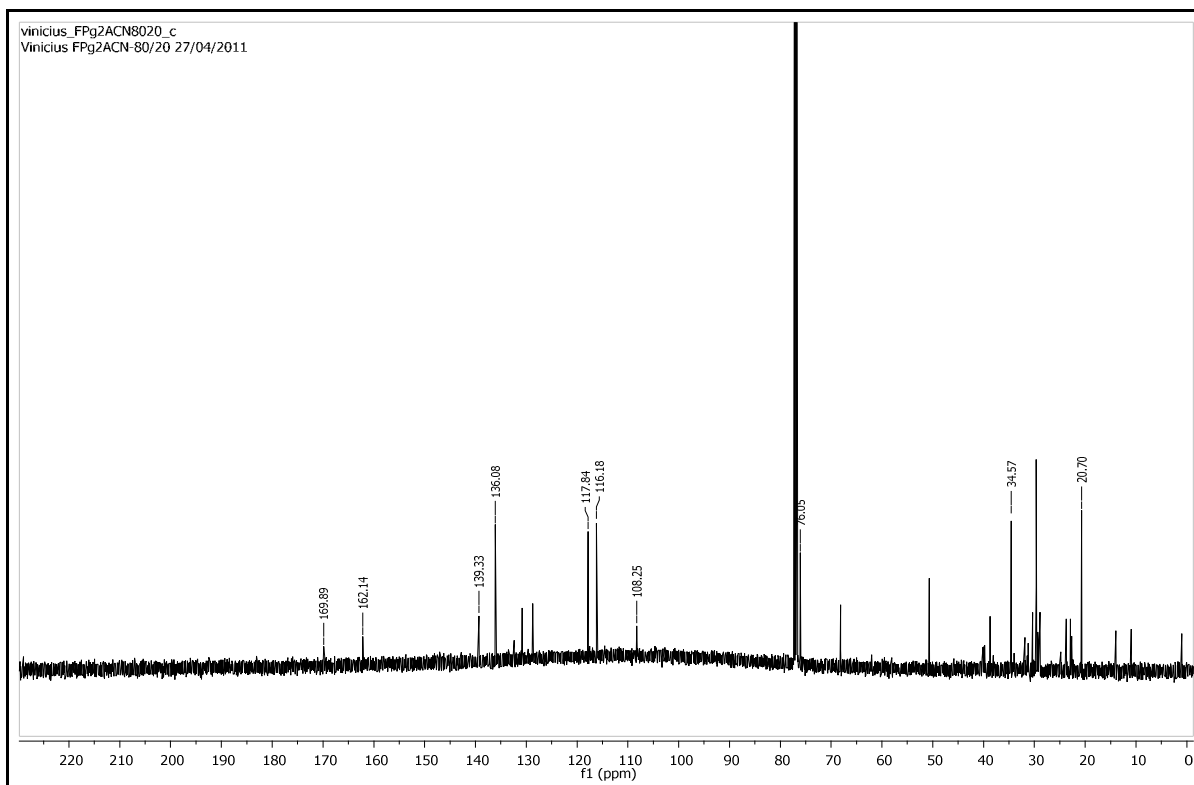
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 39.** Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (CDCl_3 , 500 MHz)

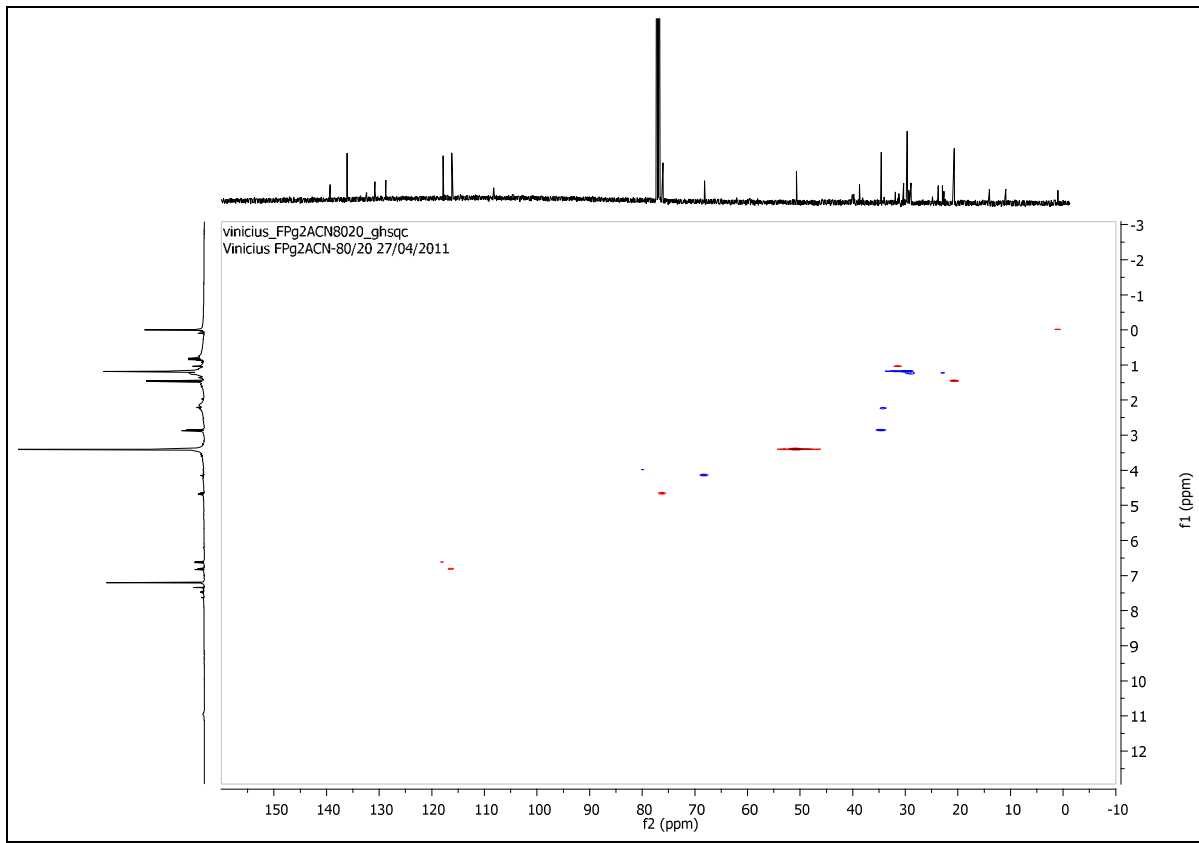
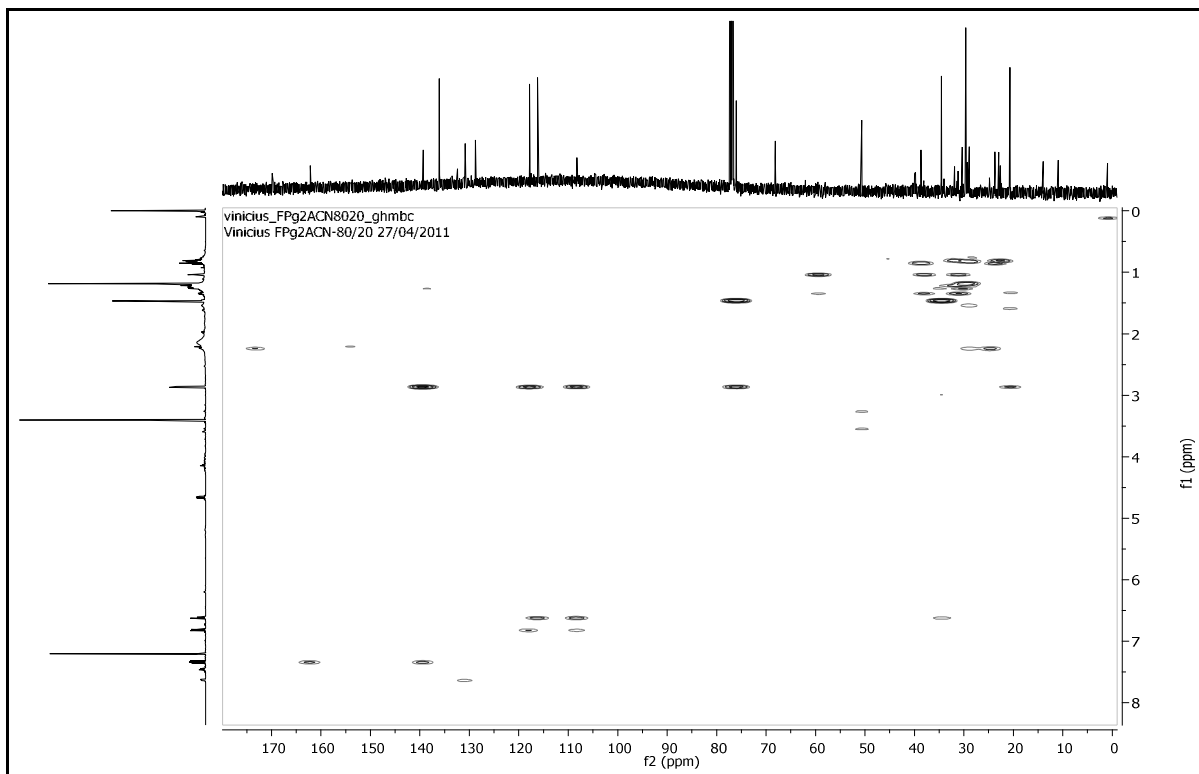
Figura 40. Mapa de contorno de gHSQC da substância **1** (CDCl₃, 500 MHz)**Figura 41.** Mapa de contorno de gHMBC da substância **1** (CDCl₃, 500 MHz)

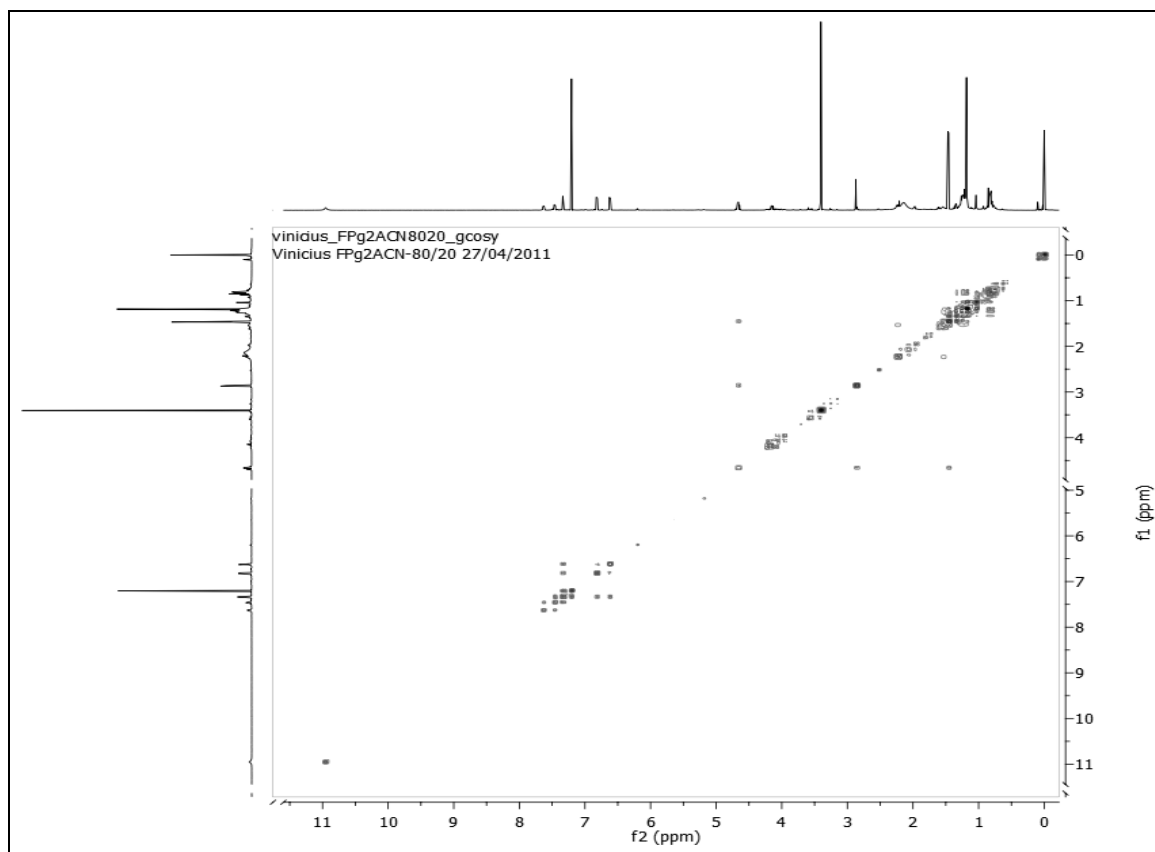
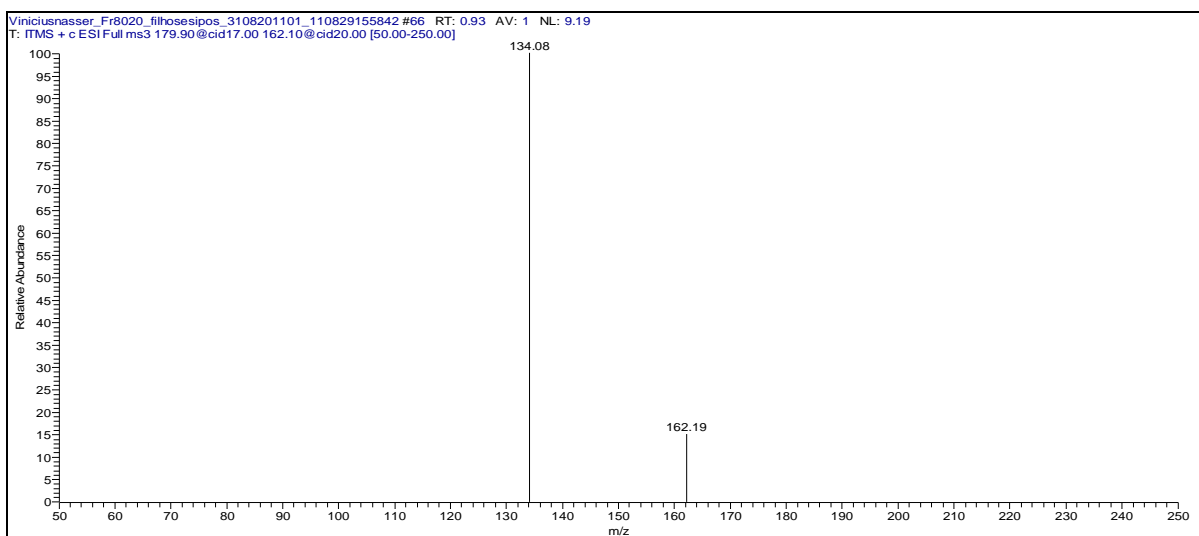
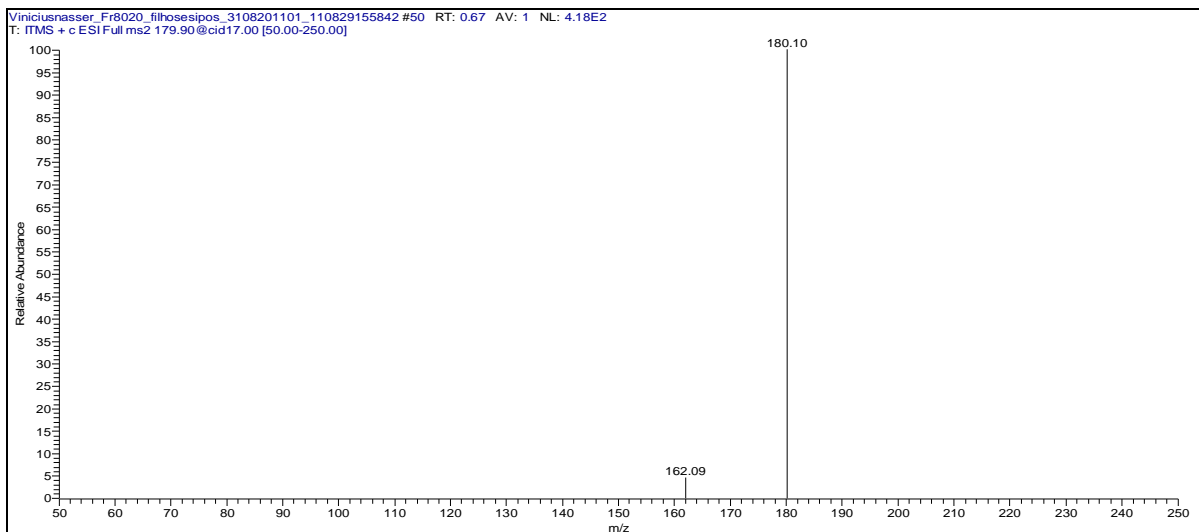
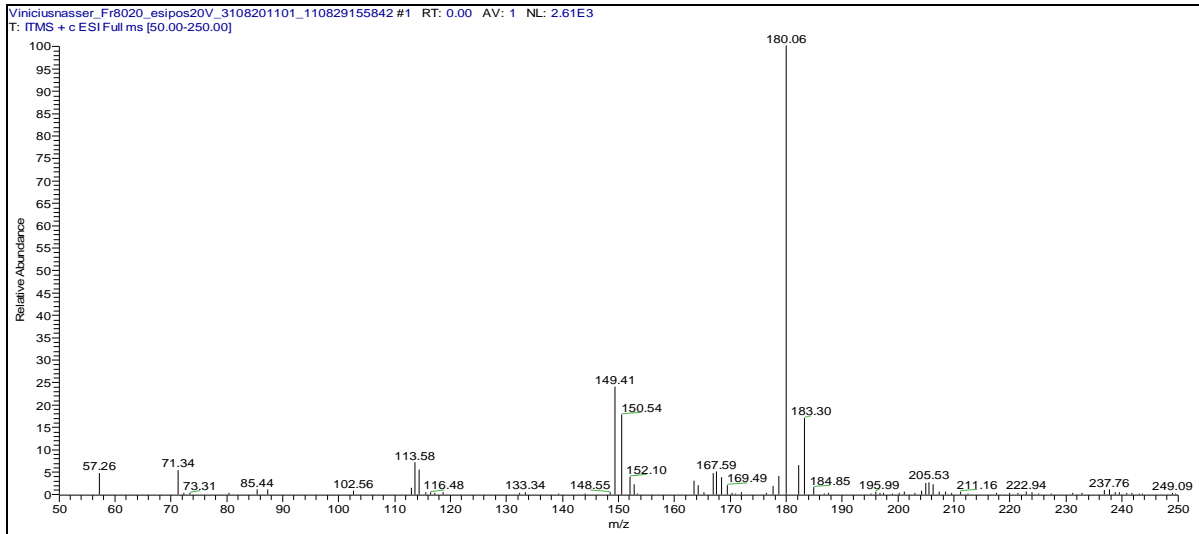
Figura 42. Espectro de gCOSY da substância **1** (CDCl₃, 500 MHz)

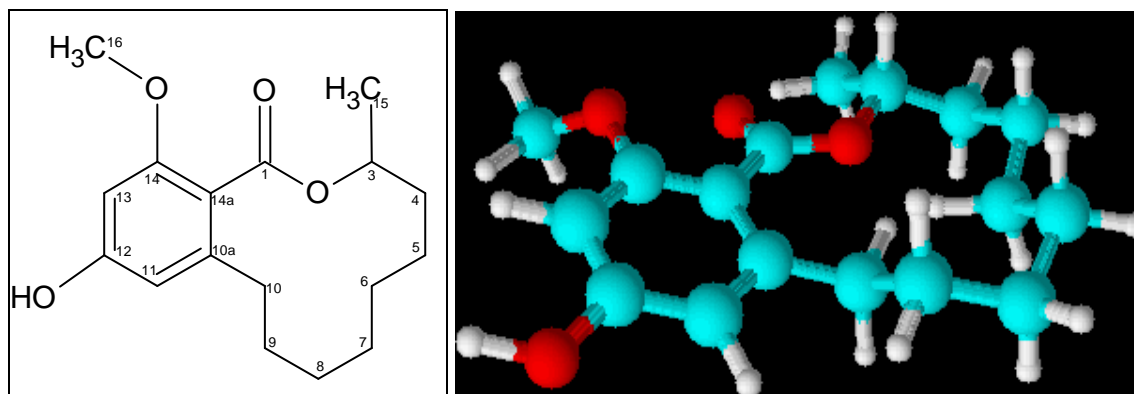
Figura 43. Espectros de massas da substância 1



4.5.2 Substância 2

A substância 2 (Figura 44), isolada da fração *L.sp-Fr70:30 F-1* por cromatografia em camada delgada preparativa, foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas.

Figura 44. Estrutura da substância 2 (lasiodiplodina)



A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 46, Tabela 5) associada a do mapa de contorno do experimento de gHSQC (Figura 48, Tabela 5) nos permitiram observar dois dubletos em δ_{H} 6,28 (*d*; $J=2,0$ Hz; 1H; δ_{C} 97,1) e em δ_{H} 6,21 (*d*; $J=2,0$ Hz; 1H; δ_{C} 108,1), evidenciando um sistema aromático tetrassubstituído com hidrogênios acoplados em *meta*, que foram atribuídos à H-13 e H-11. Adicionalmente foram observados uma metila em δ_{H} 3,66 (*s*; 3H; δ_{C} 55,7), um dubleto em δ_{H} 1,20 (*d*; 6,5 Hz; 3H; δ_{C} 19,3) e um multipletto em δ_{H} 5,03 (*m*; 1H; δ_{C} ; 71,1), característicos de uma metoxila aromática, de uma metila e um hidrogênio carbinólico, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 47, Tabela 5) foram observados sinais de seis átomos de carbono na região dos aromáticos, sendo que os sinais em δ_{C} 159,5 (C-12) e 157,4 (C-14) evidenciam um sistema aromático com carbonos oxigenados posicionados em relação *meta*. Os carbonos observados em δ_{C} 167,9 (C-1), δ_{C} 71,1 (C-3), 19,3 (C-15) e em δ_{C} 55,7 (C-16), sugerem a presença de uma lactona conjugada com o sistema aromático, um carbono carbinólico, uma metila e uma metoxila aromática, respectivamente, corroborando para as observações em RMN de ^1H mostradas acima. Adicionalmente foram observados sete $-\text{CH}_2$ em δ_{C} 20,7; 24,0; 24,9; 26,2; 29,6; 29,8 e 31,8 sugerindo uma cadeia alifática.

As correlações a longa distância (Figura 45) observadas nos mapas de contorno do experimento de gHMBC (Figura 49, Tabela 5) entre H-11 \leftrightarrow C-10, H-15 \leftrightarrow C-3/C-4,

associado ao experimento de *g*COSY onde foi possível visualizar um sistema acoplado de $-\text{CH}_2$, nos sugeriram uma lactona de 12 membros da classe do ácido orselínico.

As correlações observadas no espectro de *g*COSY (Figura 50, Tabela 5) entre $\text{H-3} \leftrightarrow \text{H-15}$, $\text{H-3} \leftrightarrow \text{H-5}$, $\text{H-4} \leftrightarrow \text{H-5}$, $\text{H-11} \leftrightarrow \text{H-13}$, $\text{H-13} \leftrightarrow \text{H-11}$, reforçam a estrutura proposta.

A análise dos dados obtidos ESI-EM(+) 20V (Figura 51), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada com m/z 293 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e alguns de seus fragmentos. Estes dados associados aos de RMN 1 e 2D permitiram propor a fórmula molecular de $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$.

Figura 45. Principais correlações de *g*HMBC da substância 2

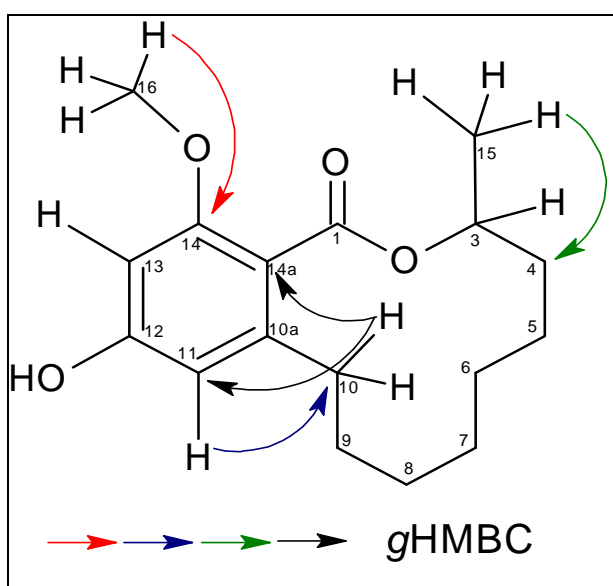


Tabela 5. Dados de RMN 1D e 2D da substância **2** em DMSO (δ em ppm e J em Hz)

	$H_\delta(m,J)$	$gHMOC(\delta)$	$gHMBC(\delta)$	$gCOSY$
1	---	167,9	---	---
3	5,03 (m)	71,1	*	H-5; H-15
4	1,81 (m)	31,8	*	H-5
5	1,52 (m)	29,8	*	H-3; H-4; H-8; H-15
6	1,33 (m)	26,2	*	H-15
7	1,34(m)	24,0	*	*
8	1,17 (m)	24,9	*	H-5
9	1,32 (m)	20,7	*	*
10	2,48 (m)	29,6	C-5; C-9; C-10 ^a ; C-14 ^a ; C-11	*
	2,38 (m)	29,6	C-5; C-9; C-10 ^a ; C-14 ^a ; C-11	*
10 ^a	---	141,7	---	---
11	6,21 (d) 2,0 Hz	108,1	C-12; C-14 ^a ; C-13; C-10	H-13
12	---	159,5	---	---
13	6,28 (d) 2,0 Hz	97,1	C-12; C-14; C-14 ^a ; C-11	H-11
14	---	157,4	---	---
14 ^a	---	115,7	---	---
15	1,20 (d) 6,5 Hz	19,3	C-4; C-3	H- 5; H-3
16	3,66 (s)	55,7	C-14	*

*não observado

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (BRASHER; SCHULTE, 1996) permitiram identificar a substância **2** como sendo a lasiodiplodina, sendo este o primeiro relato do isolamento da lasiodiplodina em fungos endofíticos isolados da alga marinha *Padina gymnospora*.

A lasiodiplodina é relatada na literatura por apresentar atividade antileucêmica (LEE et al., 1982) e atividade citotóxica frente as linhagens KB (câncer de pele), BC1 (câncer de mama) e NCI-H187 (câncer de pulmão) (BUAYAIRAKSA et al., 2011).

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H da substância **2** (DMSO, 500 MHz)

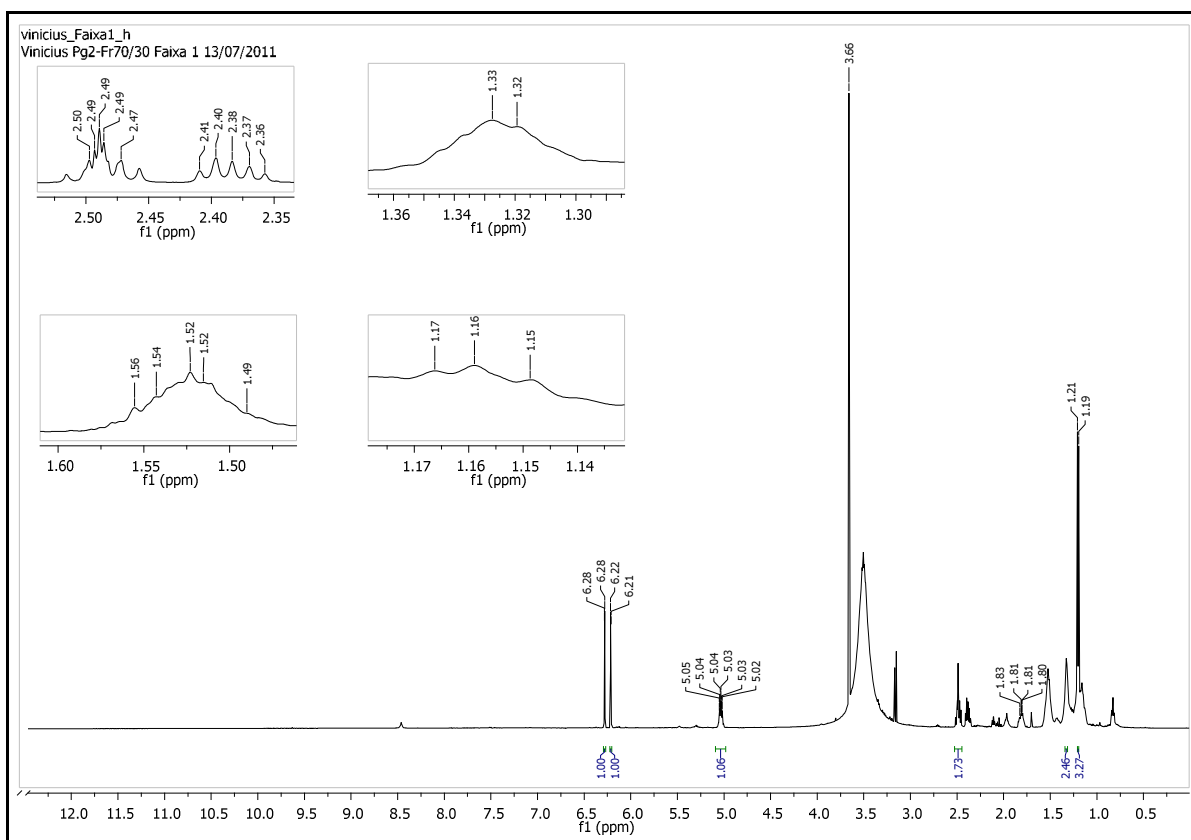


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **2** (DMSO, 500 MHz)

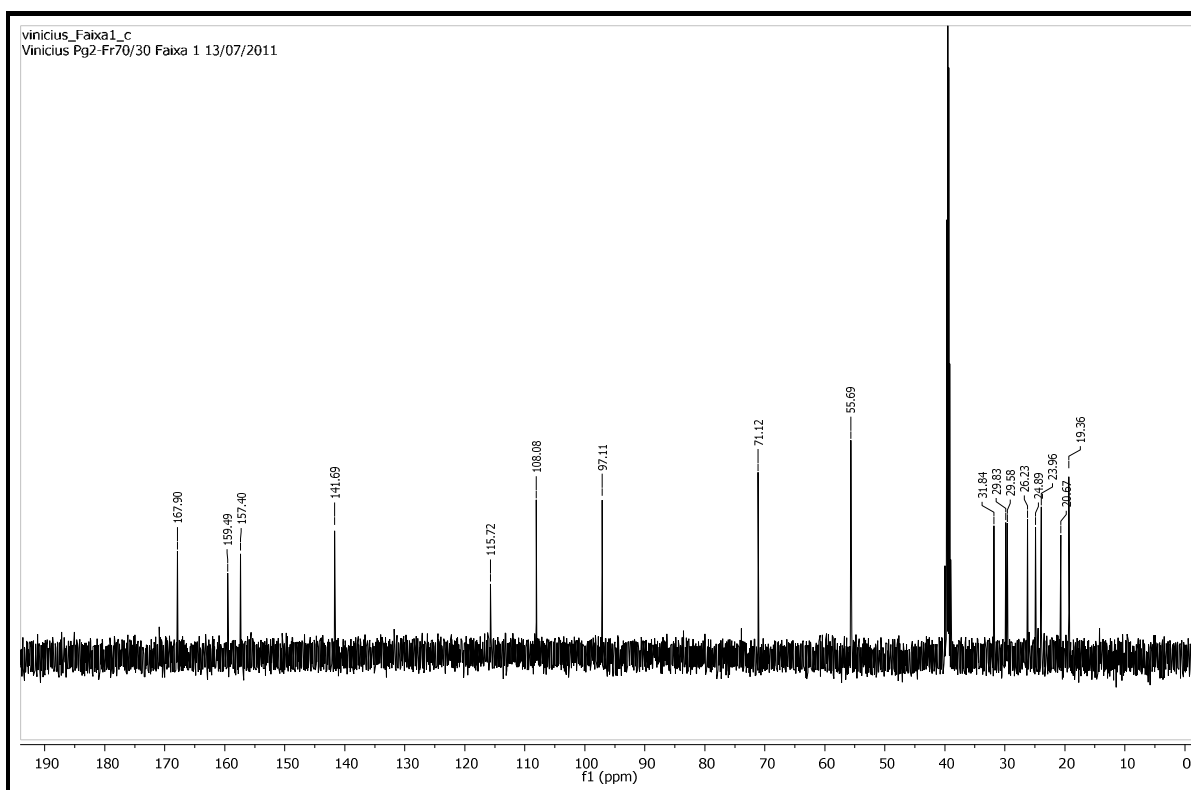


Figura 48. Mapa de contorno de gHSQC da substância **2** (DMSO,500 MHz)

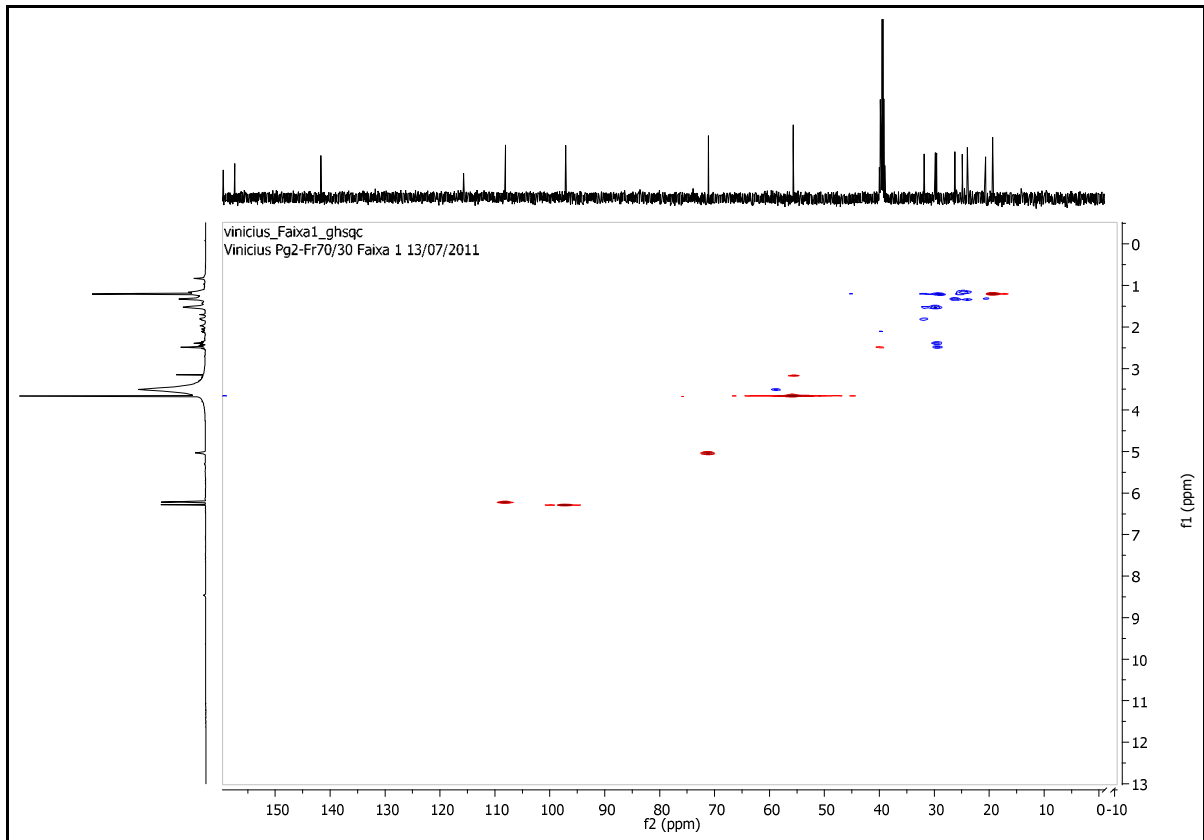


Figura 49. Mapa de contorno de gHMBC da substância **2** (DMSO,500 MHz)

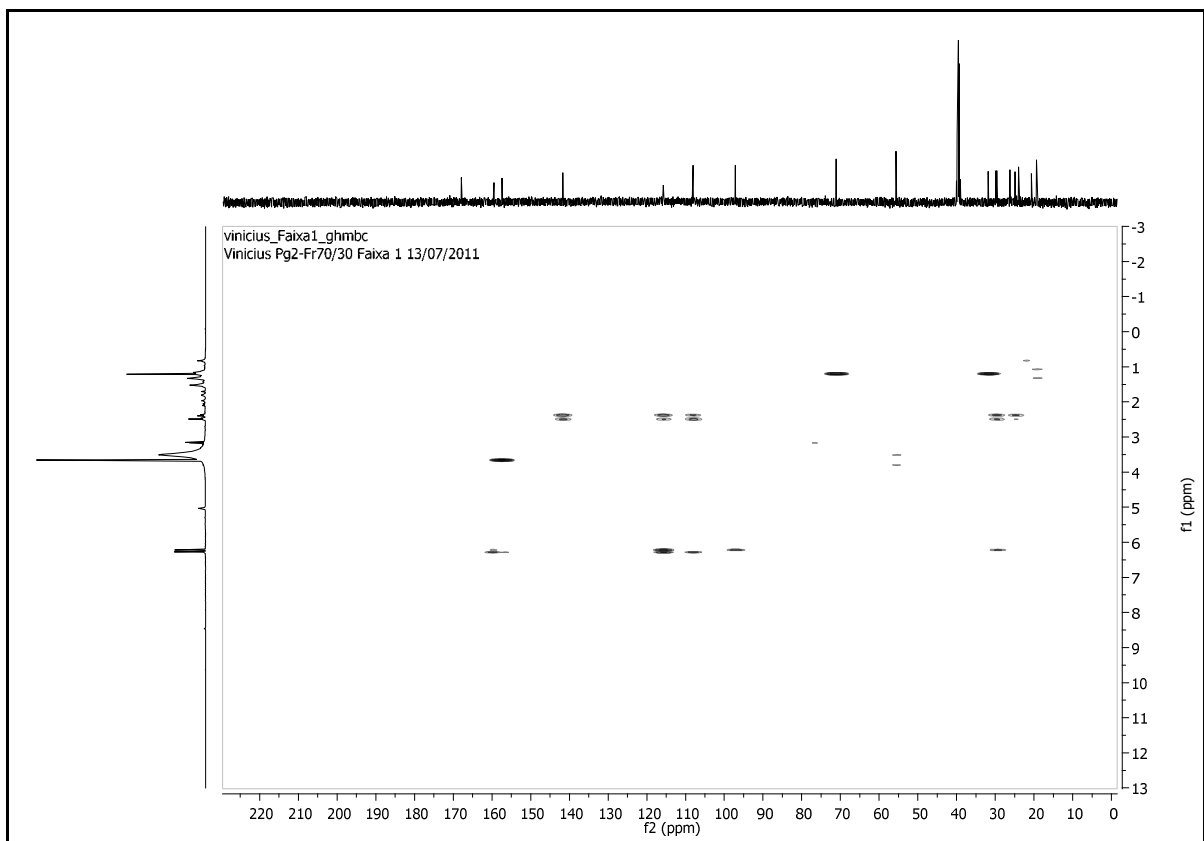


Figura 50. Espectro de gCOSY da substância 2 (DMSO, 500 MHz)

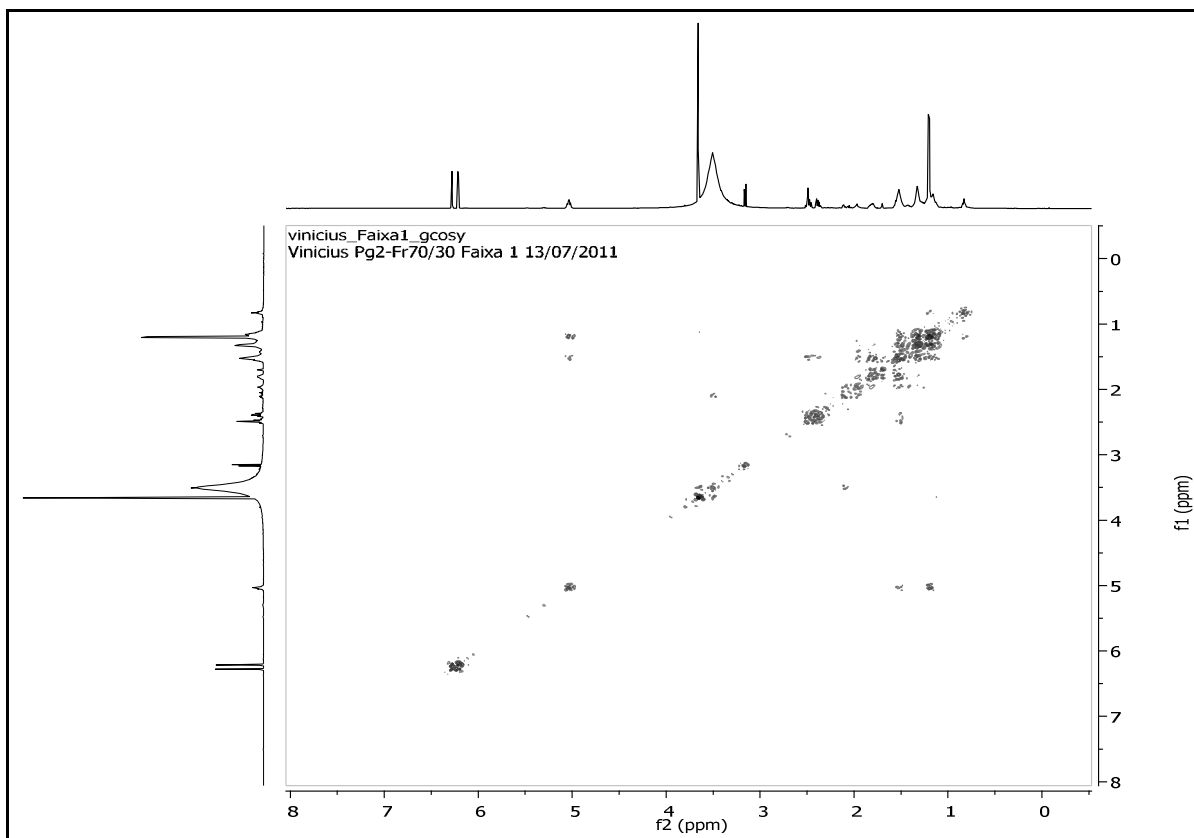
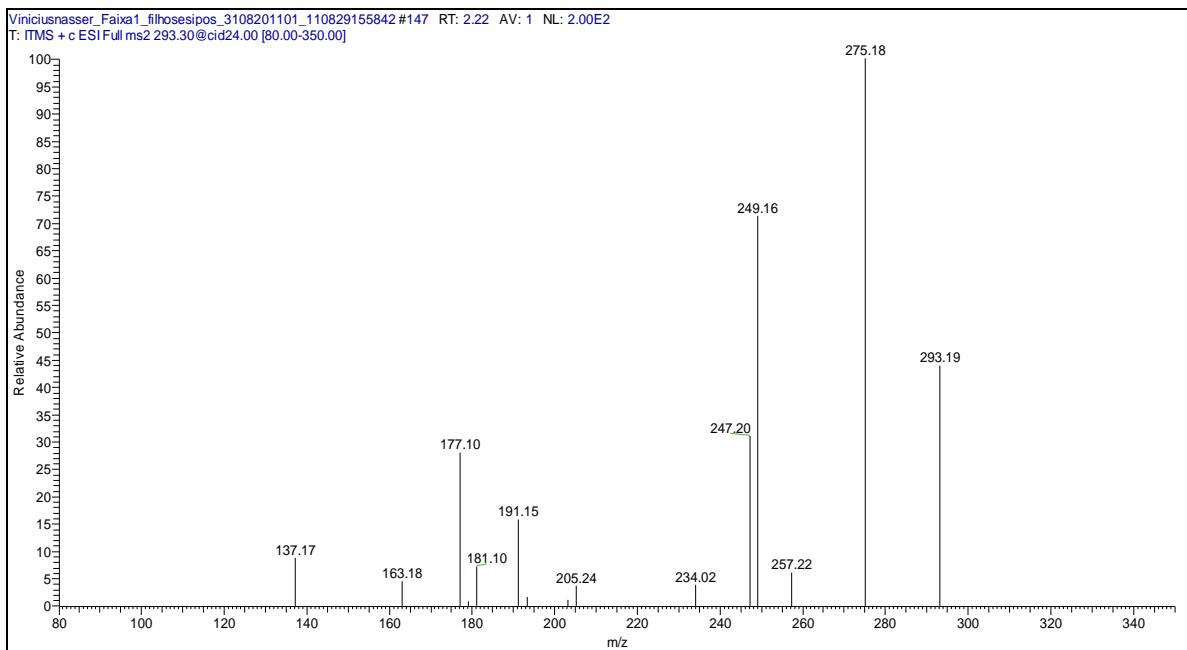


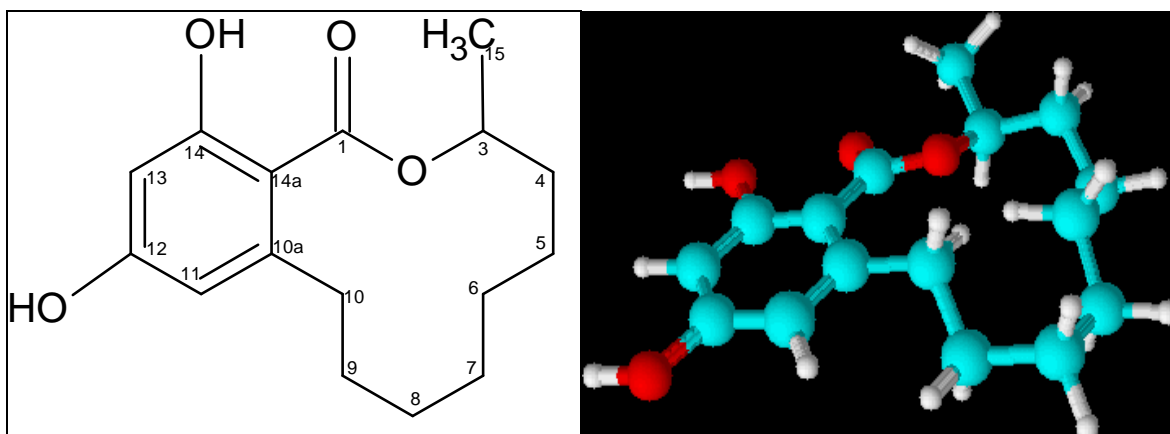
Figura 51. Espectros de massas substância 2



4.5.3 Substância 3

A substância **3** (Figura 52), isolada da fração *L.sp-Fr70:30 F-2* por cromatografia de camada delgada preparativa e foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectros de massas.

Figura 52. Estrutura da substância **3** (des-*O*-metil-lasiodiplodina)



No espectro de RMN de ^1H (Figura 54, Tabela 6) e gHSQC (Figura 56, Tabela 6) foram observados dois dubletos em δ_{H} 6,14 (*d*; $J=2,0$ Hz; 1H; δ_{C} 100,6) e em δ_{H} 6,12 (*d*; $J=2,5$ Hz; 1H; δ_{C} 109,0), evidenciando um sistema aromático tetrassubstituído com hidrogênios acoplados em *meta*, atribuídos às posições 13 e 11 respectivamente, os quais tiveram suas correlações observadas no mapa de contorno gHMBC (Figura 56). No espectro de RMN de ^1H , foram observados ainda, multipletos em δ_{H} 2,45 e 2,75 (*m*; 2H; δ_{C} 31,2, H-10); δ_{H} 5,04 (*m*; 1H; δ_{C} ; 72,6, H-3); um dubleto em δ_{H} 1,23 (*d*; 6,5 Hz; 3H; δ_{C} 19,6, H-15), que foram atribuídos aos hidrogênios benzílico, carbinólico e à metila em C-3, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 55, Tabela 6) foram observados sinais de seis átomos de carbono na região dos aromáticos, sendo que dois deles apresentam deslocamentos em δ_{C} 160,1 (C-12) e δ_{C} 161,0 (C-14) indicando dois carbonos hidroxilados; um carbono com deslocamento em δ_{C} 169,8 (C-1), referente a um carbono carbonílico característico de um éster; um carbono com deslocamento em δ_{C} 72,6 (C-3). Adicionalmente foram observados sete $-\text{CH}_2$ em δ_{C} 22,3, 22,4, 25,0, 25,8, 30,2, 31,1 e 31,2 sugerindo uma cadeia alifática.

As correlações a longa distância (Figura 53) observadas nos mapas de contorno de experimento de gHMBC (Figura 57, Tabela 6) entre H-11↔C-10, H-10↔C-14^a, H-15↔C-4 e H-5↔C-3, associado ao experimento de gCOSY onde foi possível visualizar um sistema acoplado de -CH₂, nos sugeriram uma lactona de 12 membros.

As correlações observadas no espectro de gCOSY (Figura 58, Tabela 6) entre H-3↔H-15, H-3↔H-5 e H-5↔H-6, reforçam a estrutura proposta.

A análise dos dados obtidos ESI-EM(-)20V (Figura 59), em modo negativo, evidenciou a molécula desprotonada com m/z 277 [M-H]⁻ e alguns de seus fragmentos. Estes dados associados aos de RMN 1 e 2D permitiram propor a fórmula molecular de C₁₆H₂₂O₄.

Figura 53. Principais correlações de gHMBC da substância **3**

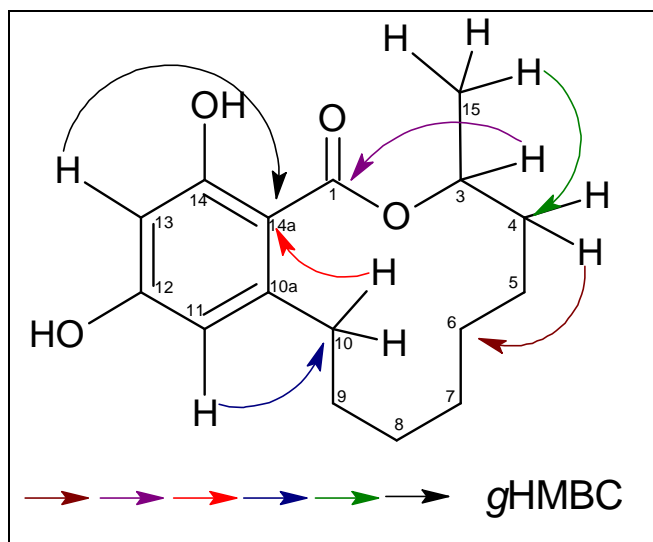


Tabela 6. Dados de RMN 1D e 2D da substância **3** em DMSO (δ em ppm e J em Hz)

	$H_\delta(m,J)$	$gHMQC(\delta)$	$gHMBC(\delta)$	$gCOSY$
1	---	169,8	---	---
3	5,04 (<i>m</i>)	72,6	C-1; C-6	H-15; H-5(1,68)
4	1,50 (<i>m</i>)	30,2	C-6	*
5	1,68 (<i>m</i>)	31,1	C-3; C-7	H-3
	1,78 (<i>m</i>)	31,1	C-3; C-7	H-6
6	1,35 (<i>m</i>)	22,4	*	H-5(1,78)
7	1,43 (<i>m</i>)	25,0	*	*
8	1,30 (<i>m</i>)	25,8	C-6	*
9	1,20 (<i>m</i>)	22,3	*	*
10	2,45 (<i>m</i>)	31,2	C-10 ^a ; C-11; C-4	*
	2,75 (<i>m</i>)	31,2	C-10 ^a ; C-11; C-4; C-8	*
10 ^a	---	145,0	---	---
11	6,12 (<i>d</i>) 2,5	109,2	C-13; C-10	---
12	---	160,1	---	---
13	6,14 (<i>d</i>) 2,5	100,6	C-1; C-14; C-14 ^a	---
14	---	161,0	---	---
14 ^a	---	109,0	---	---
15	1,23 (<i>d</i>) 6,5	19,6	C-3; C-4	H-3

*não observado

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (CAMBIE et al., 1991) permitiram identificar a substância **3** como sendo a des-*O*-metil-lasiodiplodina, sendo este o primeiro relato do isolamento da des-*O*-metil-lasiodiplodina em fungos endofíticos isolados da alga marinha *Padina gymnospora*.

A substância **3** é relatada na literatura por apresentar atividade citotóxica frente as linhagens KB (câncer de pele), BC1 (câncer de mama) e NCI-H187 (câncer de pulmão) (BUAYAIRAKSA et al., 2011).

Figura 54. Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (DMSO, 500 MHz)

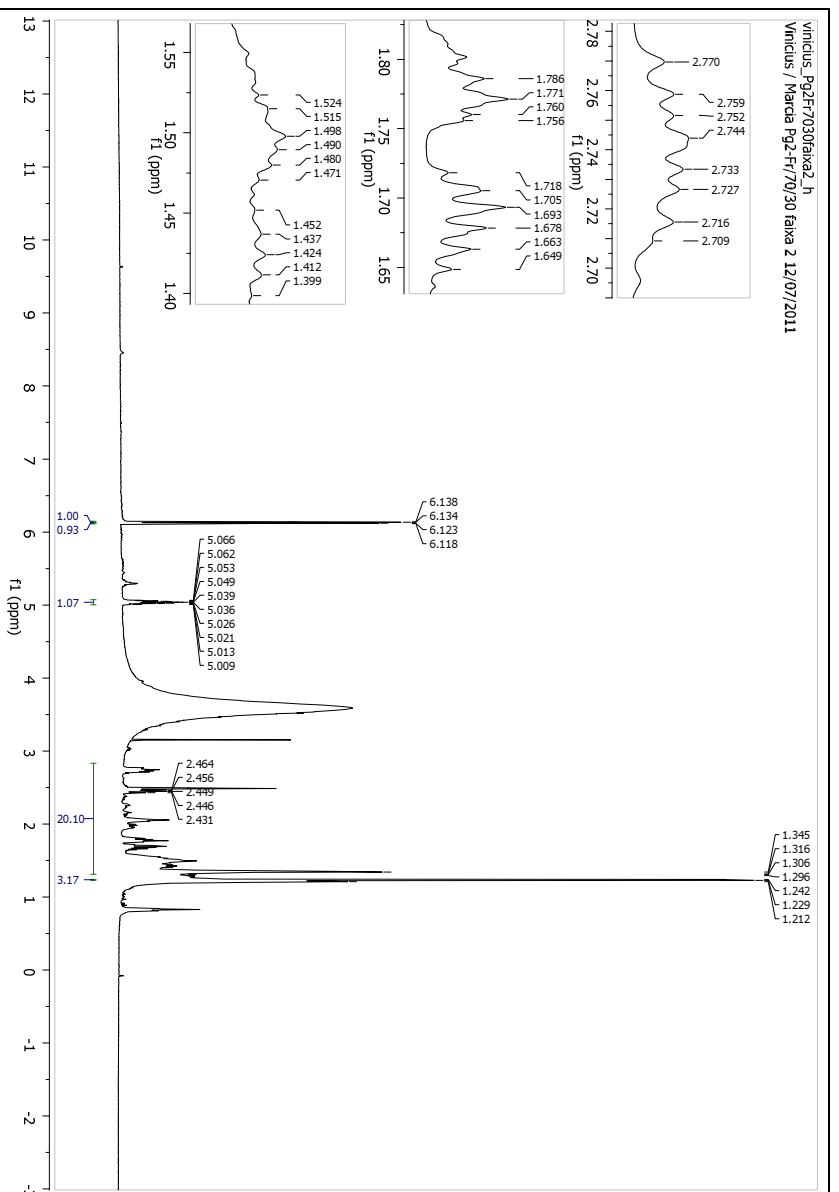


Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **3** (DMSO, 500 MHz)

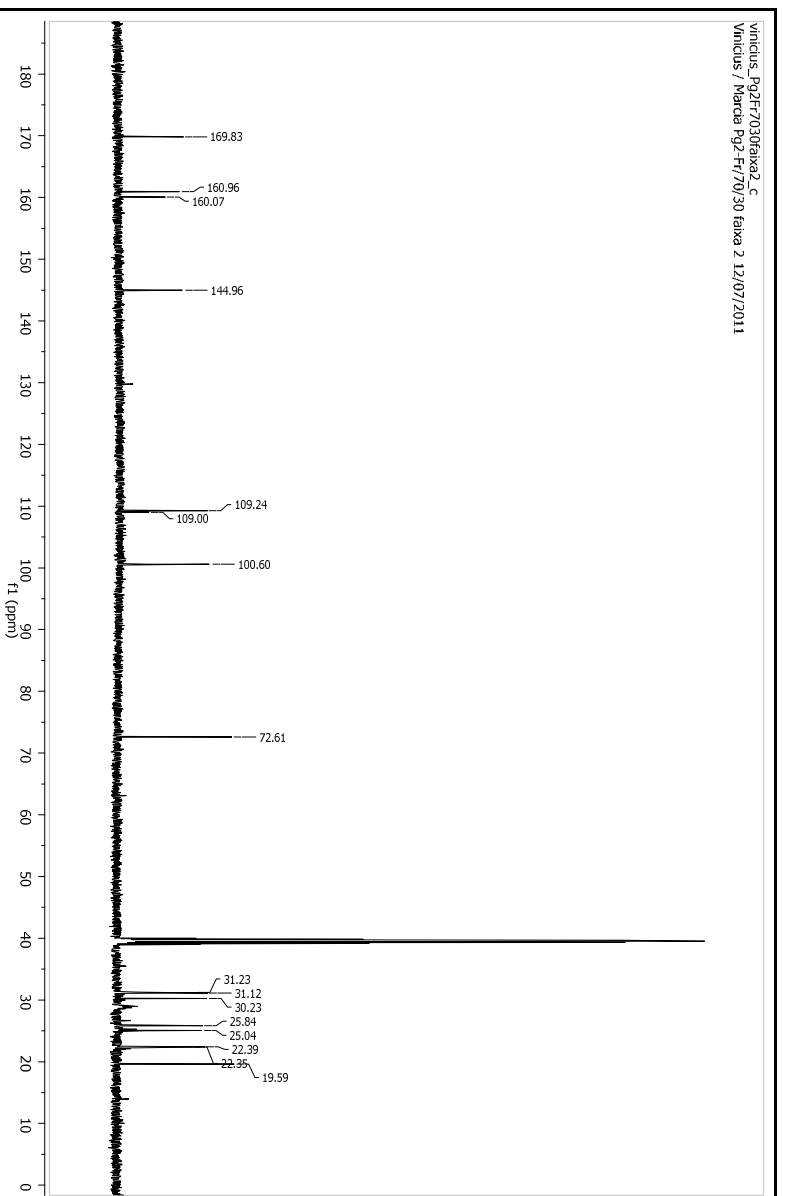


Figura 56. Mapa de contorno de gHSQC da substância **3** (DMSO, 500 MHz)

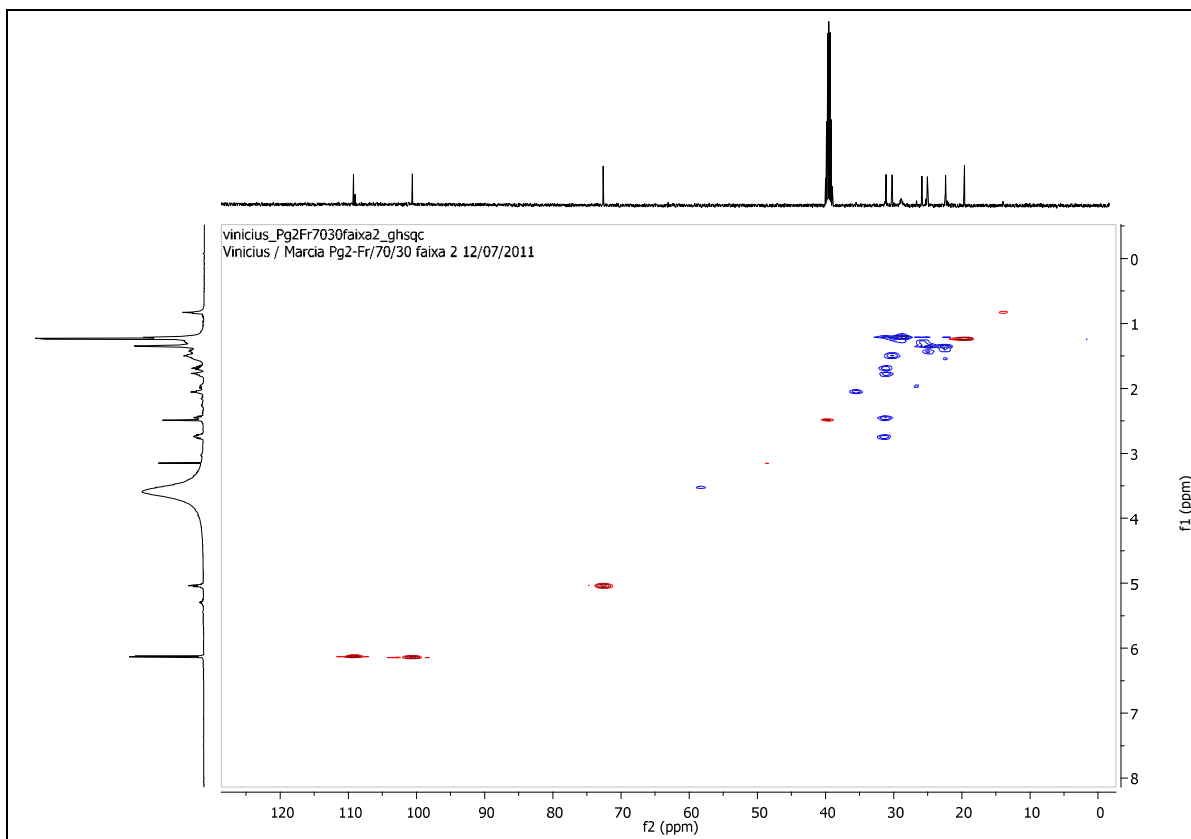


Figura 57. Mapa de contorno de gHMBC da substância **3** (DMSO, 500 MHz)

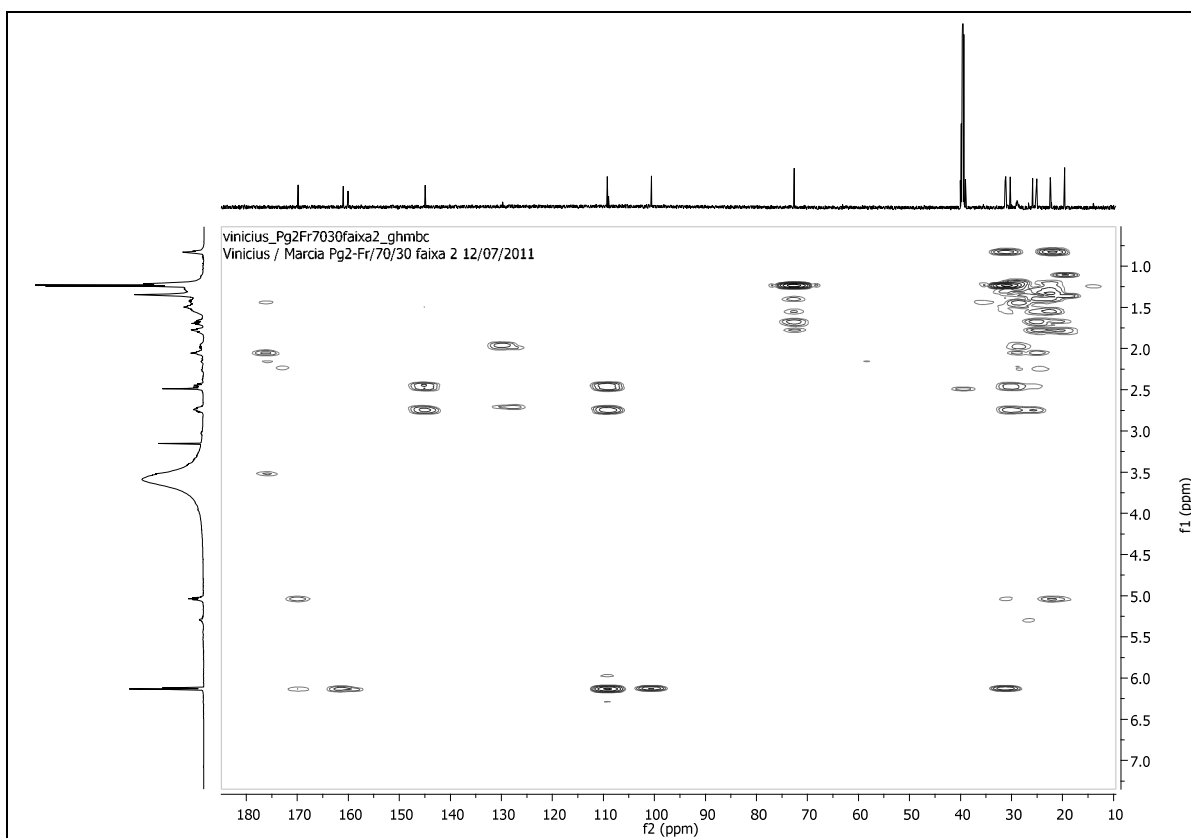


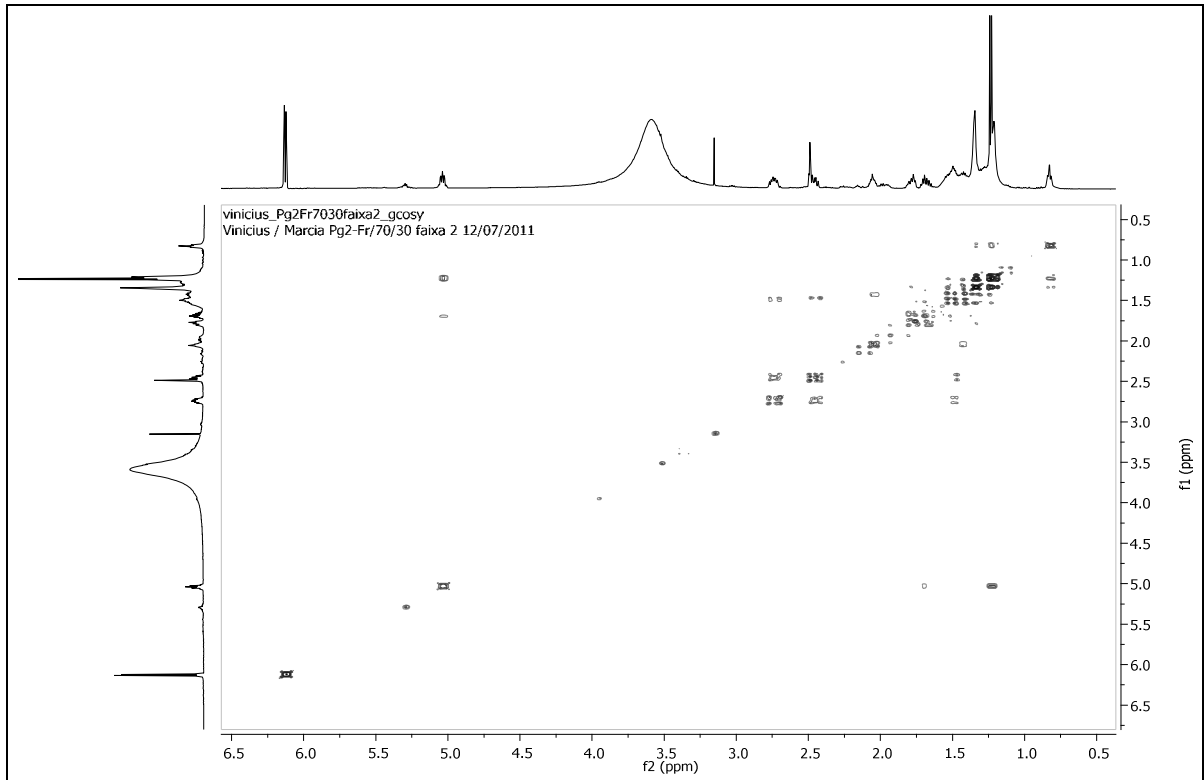
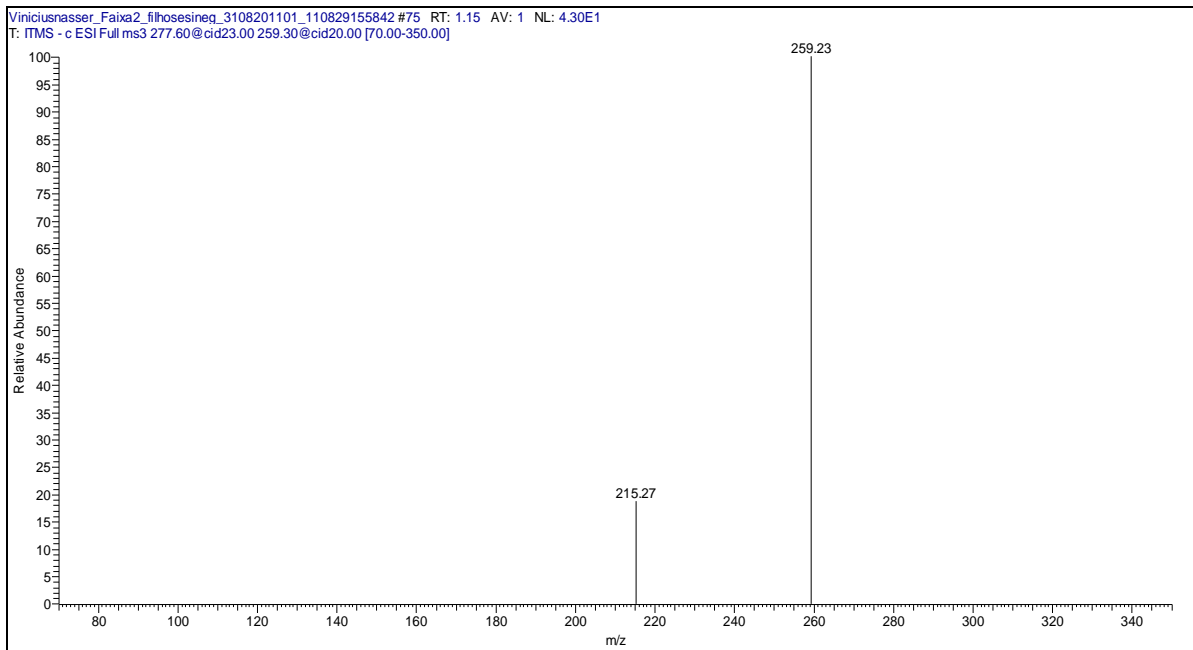
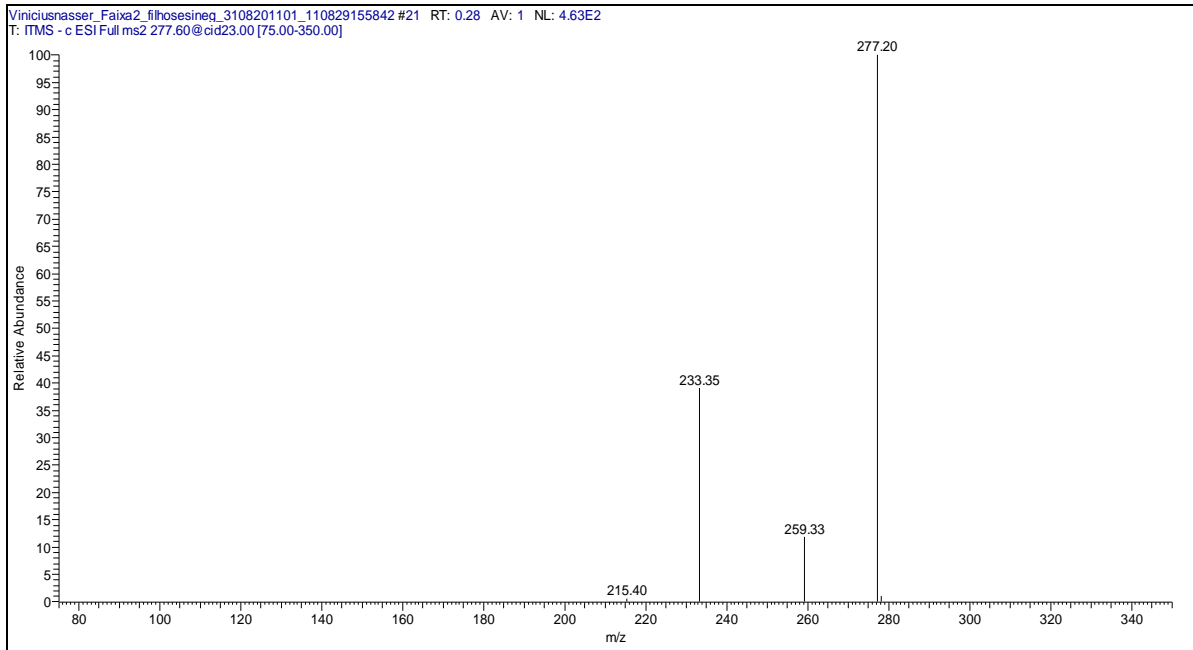
Figura 58. Espectro de gCOSY da substância **3** (DMSO, 500 MHz)

Figura 59. Espectros de massas substância **3**

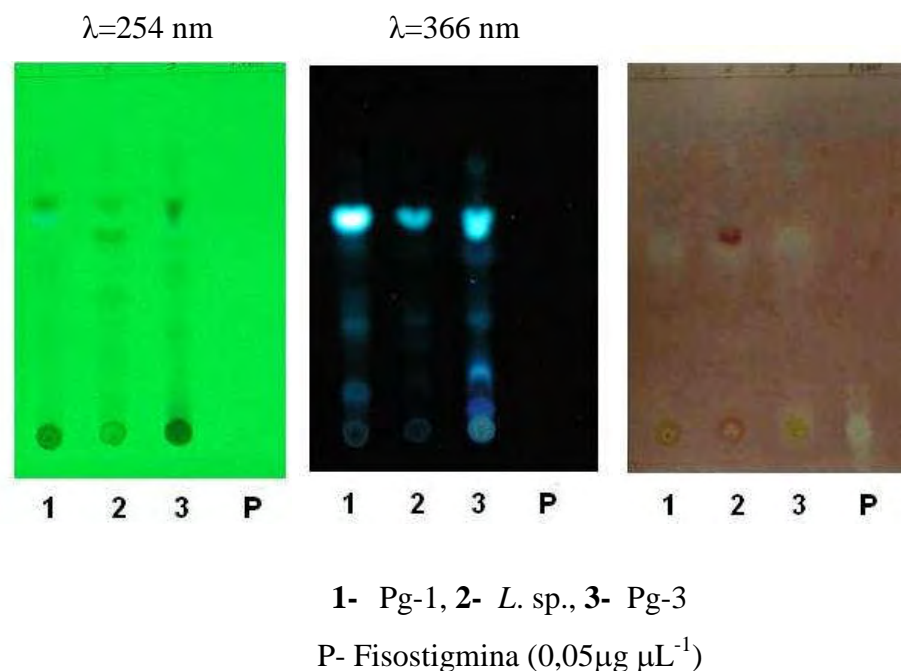
4.6 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos

4.6.1 Ensaio Anticolinesterásico

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demências senis. Atualmente inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem a base das novas drogas disponíveis para o tratamento desta doença. A fisostigmina, de origem natural, é um excelente inibidor da acetilcolinesterase, mas possui absorção insatisfatória pelo intestino humano. Recentemente a galantamina, isolada de plantas da família Amaryllidaceae foi aprovada pela Áustria, Suíça e Suécia para tratar esta doença. Estas drogas atuam na deficiência do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses do córtex cerebral.

O ensaio por bioautografia (CCDC) para os extratos brutos (Figura 60) possibilita uma resposta rápida quanto à atividade e a localização desta atividade em matrizes complexas (MARSTON; KISSLING; KOSTETTMANN, 2002).

Figura 60. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos



Conclui-se que o aparecimento de halos brancos na cromatoplaça de fundo roxo, comparando-se com o controle positivo (fisostigmina), indica que todos os extratos brutos apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

4.6.2 Ensaio Antifúngico

Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente (CARDOSO, 2003).

Fungicidas utilizados no controle de doenças na agricultura, além de serem nocivos ao meio ambiente, são prejudiciais a saúde humana. Infecções fúngicas são as principais causas de morbidade e mortalidade e isso tem incentivado pesquisas na busca de novas substâncias antifúngicas de origem natural (COLEMAN et al., 2010).

4.6.2.1 Ensaio frente a fitopatógenos

A detecção do potencial antifúngico, por bioautografia em CCDC com nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* (Figura 62) e *Cladosporium sphaerospermum* (Figura 62), foi observado pela formação de halos de inibição do crescimento dos fitopatógenos em todos os extratos brutos, em comparação com o padrão positivo nistatina (5 μ g).

Figura 61. Avaliação do potencial dos extratos brutos frente ao *C. cladosporioides*

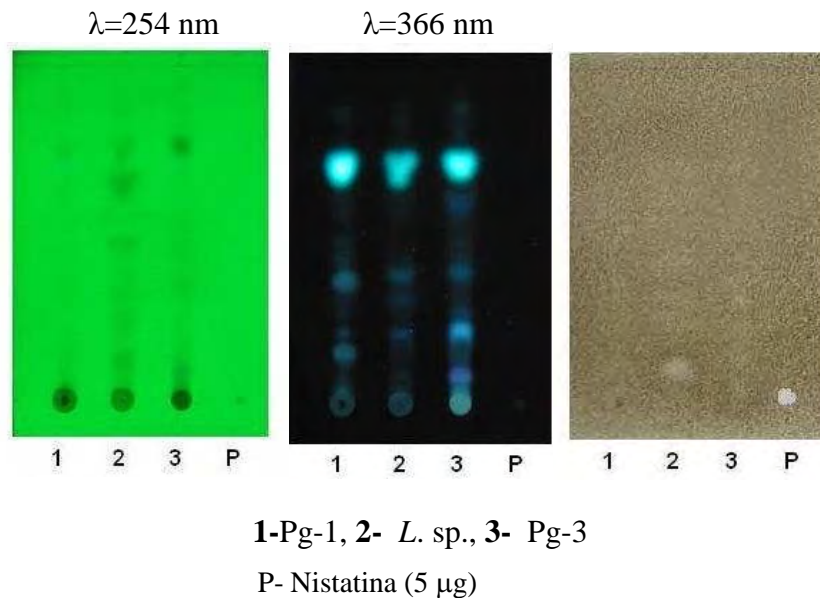
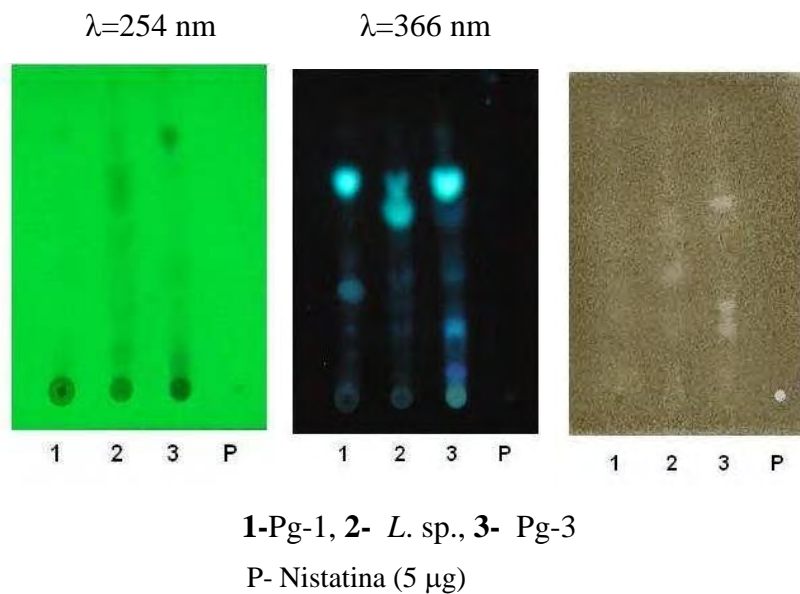


Figura 62. Avaliação do potencial dos extratos brutos frente ao *C. sphaerospermum*

O extrato bruto do fungo Pg-1 não apresentou atividade antifúngica frente aos fitopatógenos testados. O extrato bruto do fungo *Lasiodiplodia* sp. (*L. sp.*) apresentou atividade antifúngica frente aos dois fitopatógenos, como pode ser observado nas Figuras 61 e 62 e o extrato bruto do fungo Pg-3 apresentou atividade apenas contra o fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum* como pode ser observado na Figura 62.

5. CONCLUSÕES

O trabalho realizado com os endófitos Pg-1, *Lasiodiplodia* sp. e Pg-3 isolados da alga marinha *Padina gymnospora*, permitiu a avaliação da potencialidade dos extratos brutos em escala reduzida na produção de metabólitos secundários. Os extratos, obtidos em meio de arroz, apresentaram uma rica produção metabólica e um perfil químico promissor, analisado em CLAE-DAD e RMN de ^1H .

A realização dos fracionamentos cromatográficos do extrato bruto acetoneitrílico, produzido pelo endófito *Lasiodiplodia* sp. cultivado em arroz, conduziu ao isolamento de três substâncias: meleina (**1**), lasiodiplodina (**2**) e des-*O*-metil-lasiodiplodina (**3**). Sendo este o primeiro relato de identificação de isocumarina e lactonas em fungos endofíticos associados à alga marinha *Padina gymnospora*.

Os extratos brutos apresentaram resultados promissores aos ensaios biológicos.

A isocumarina identificada apresenta atividades como citotóxica, antibacteriana, antifúngica e atividade contra protease do vírus da hepatite.

Lasiodiplodina e seus derivados são conhecidos por apresentarem atividade citotóxica, por serem muito eficientes como inibidores da biossíntese de prostaglandina e indutores de microtubérculos em batatas.

Estes resultados reforçam a potencialidade destes micro-organismos como fontes de metabólitos secundários e colaborando ecologicamente com a compreensão da interação endofítico e sua alga hospedeira.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, D. C. et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal Chemistry Society C**, n. 9, p. 1623-1627, 1971.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, 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, p. 1-16, 2010.
- AMADO FILHO, G. M. et al. Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos bay, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 95-100, 2008.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 189-207.
- BAE, H. et al. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 3279-3295, 2009.
- BAILEY, B. A. et al. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, p. 1449-1464, 2006.
- BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BEZERRA DE BARROS, I. et al. Phytochemical and antifungal activity of anthraquinones and root and leaf extracts of *Coccoloba mollis* on phytopathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 535-541, 2011.
- BILLS, G. F. Analyses of microfungus diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. S33-41, 1995.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 2, p. 144-222, 2012.
- BRASHER, F.; SCHULTE, B. Enantiodivergent synthesis of both enantiomers of the macrocyclic lactone lasiodiplodin. **Journal Chemical Society**, v. 1, p. 2619-2622, 1996.
- BUAYAIRAKSA, M. et al. Cytotoxic lasiodiplodin derivatives from the fungus *Syncephalastrum racemosum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 12, p. 2037-2041, 2011.
- CAMBIE, R. C. et al. Ent-14[S],16 β ,17-trihydroxyatisan-3-one and further constituents from *Euphorbia fidjiana*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 287-292, 1991.

- CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* dc. Prodr.(Rubiaceae)**. 2003. 224 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- CHENG, M. et al. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon squamulosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 219-223, 2012.
- COLEMAN, J. J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 3, p. 321-332, 2010.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectiva. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.
- DIMITRIADIS, C.; GILL, M.; HARTE, M. F. The first stereospecific approach to both enantiomers of mellein. **Tetrahedron**, v. 8, n. 13, p. 2153-2158, 1997.
- EBEL, R. Terpenes from marine-derived fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2340-2368, 2010.
- ELSEBAI, M. F. et al. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereal*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 802-808, 2011.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 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, n. 3, p. 509-526, 2006.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.
- HEYNEKAMP, J. J. et al. Uncharged isocoumarin-based inhibitors of urokinase-type plasminogen activator. **MBC Chemical Biology**, v. 6, n. 1, 2006.
- JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. Bioactive compounds from entophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 1, v. 3, p. 291-309, 2011.
- KAREZ, C. S.; PEREIRA, R. C. Metal contents in polyphenolic fractions extracted from the brown alga *Padina gymnospora*. **Botanica Marina**, v. 38, p. 151-155, 1995.
- KROHN, K. et al. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 313-320, 1997.
- KUROSAKI, F.; KIZAWA, Y.; NISHI, A. Derailment product in NADPH-dependent synthesis of a dihydroisocoumarin 6-hydroxymellein by elicitor-treated carrot cell extracts. **European Journal of Biochemical**, v. 185, p. 85-89, 1989.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

KUTSCHERA, G. L. et al. Synthesis of side chain substituted 3-butylisocoumarins and absolute configuration of natural isocoumarins from *Artemisia dracuncululus*. **Monatshefte fur Chemie**, v.134, n. 9, p. 1195-1206, 2003.

LEE, K. H. et al. Lasiodiplodin, a potent antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1119-1121, 1982.

MARQUES, C. T. et al. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 115-122, 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.

MATSUURA, H. et al. Three lasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 579-584, 1998.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 1-5, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70. p. 461-477, 2007.

ÖSCAN, S.; SAHIN, E.; BALCI, M. The synthesis of unusual isocoumarin derivatives: the chemistry of homophthalic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 2151-2154, 2007.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Products Report**, v. 26, p. 338-362, 2009.

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

RODRIGUEZ, R. J. et al. Review: fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, p. 314-330, 2009.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. **Tetrahedron**, v. 65, p. 10590-10595, 2009.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 27-32, 2005.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, T. M. A. et al. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 523-533, 2005.

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

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 545-551, 2006.

WIESE, J. et al. Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine Sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. **Marine Drugs**, v. 9, p. 561-585, 2011.

YANG, R. et al. Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZF36) from the South China Sea and their antimicrobial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4205-4208, 2006.

YIN, H.; SUN, Y. H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 802-805, 2011.

ZHAO, J. H. et al. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2107-2112, 2012.