

DENISE RICOY ROPERO

Detecção *in silico* e caracterização estrutural dos constituintes micromoleculares majoritários do fungo endofítico *Phomopsis stipata* isolado das folhas de *Styrax camporum* Pohl (Styracaceae) usando CLAE-DAD/EMAR e CG-MS

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Co-orientadora: Profa. Dra. Ângela Regina Araújo

ARARAQUARA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

R784d	<p>Ropero, Denise Ricoy</p> <p>Detecção <i>in silico</i> e caracterização estrutural dos constituintes micromoleculares majoritários do fungo endofítico <i>Phomopsis stipata</i> isolado de folhas de <i>Styrax camporum</i> Pohl (Styracaceae) usando CLAE-DAD/EMAR e CG-EM / Denise Ricoy Ropero. – Araraquara : [s.n], 2009</p> <p>112 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Ian Castro-Gamboa Co-orientador: Ângela Regina Araújo</p> <p>1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. CLAE. I. Título.</p>
-------	---

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

DADOS CURRICULARES

Nome: Denise Ricoy Ropero

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP

Instituto de Química - Departamento de Química Orgânica - NuBBE

Rua: Professor Francisco Degni s/n. Jd. Quitandinha, CEP 14.800-900

Telefone: (16) 3301-6785

E-mail: drropero@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado em Química

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP

Local: Araraquara, SP

Curso: Química

Período: 2003-2006

Disciplinas Cursadas

- Química Orgânica Avançada

Ministrado por: Ian Castro-Gamboa e Wagner Vilegas (IQ – UNESP - Araraquara)

1° Semestre – 2007 – 12 créditos

Conceito final: B

- Métodos Espectrométricos I

Ministrado por: Wagner Vilegas (IQ – UNESP – Araraquara)

1° Semestre – 2007 – 12 créditos

Conceito final: A

- Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais
Ministrado por: Alberto J. Cavalheiro (IQ – UNESP – Araraquara)

2º Semestre – 2007 – 12 créditos

Conceito final: A

- Tópico Especial: Espectrometria de Massas
Mnistrado por:

1º Semestre – 2008 – 3 créditos

Conceito final: A

Participações em Congressos

- Participação do “**1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual meeting on micomolecular evolution, Systematics and Ecology**”, 2007, São Pedro.
- Participação da “**31a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**”, 2008, Águas de Lindóia.
- Participação como comissão organizadora do “**III Workshop do NuBBE – Conservação e uso sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e da Mata Atlântica**”, 2008, Araraquara.
- Participação como comissão organizadora do “**VI Simpósio &Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP e III Reunião do BIOprospectA**”, 2008, Araraquara.

Apresentação de Trabalhos em Eventos

- CASTRO-GAMBOA, I. ; PAULETTI, Patricia Mendonça ; Queiroz M.M.F. ; de Matos A. T ; Roperro, D.R. ; SILVA, Dulce Helena Siqueira da ; BOLZANI, Vanderlan da Silva . Characterization and detection of major micromolecular constituents from species of Cerrado and Atlantic forest using HPLC/HRMS/DAD combined with in silico techniques. In: 1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual meeting on micromolecular evolution, Systematics and Ecology, 2007, São Pedro. Proceeding of the 1st Brazilian Conferencs on Natural Products and XXVII Annual meeting on micomolecular evolution, Systematics and Ecology, 2007. p. BOSA-5.

- CASTRO-GAMBOA, I ; ZUCARELLI, M. E. ; PAULETTI, Patricia Mendonça ; Ropero, D.R. ; de Matos A. T ; SILVA, Dulce Helena Siqueira da ; CASTRO, O. ; BOLZANI, Vanderlan da Silva . Characterization and detection of major micromolecular constituents from species of Brazilian Cerrado and Atlantic rainforest using in silico and hyphenated techniques. In: 7th join meeting AFERP, ASP, GA, PSE and SIF: Natural Products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical intereset, 2008, Atenas. 7th join meeting AFERP, ASP, GA, PSE and SIF: Natural Products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical intereset, 2008.
- ROPERO, D. R. ; ARAÚJO, A. R. ; ALÉCIO, A. C ; OLIVEIRA, J. E. ; FLUMIGNAN, D. L. ; BOLZANI, V. S. ; CASTRO-GAMBOA, I. . Detecção in silico dos constituintes micromoleculares majoritários presentes no fungo endofítico *Phomopsis stipata* isolado das folhas de *Styrax camporum* Pohl (Styracaceae) usando CG-EM. Águas de Lindóia. 2008.
- QUEIROZ, M. M. F. ; de Matos, A. T. S. ; ROPERO, D. R. ; PAULETTI, P. M. ; SILVA, D. H. S. da ; BOLZANI, V. S. ; CASTRO-GAMBOA, I. . Detection and characterization of major micromolecular constituents from species of cerrado and atlantic rainforest using HPLC/HRMS/DAD combined with in silico technique: the case of *Strychnos brasiliensis*. 2007.

Artigo Publicado em Periódico

CASTRO-GAMBOA, I ; PAULETTI, Patricia Mendonça ; ZUCARELLI, M. E. ; de Matos A. T ; Ropero, D.R. ; SILVA, Dulce Helena Siqueira da ; BOLZANI, Vanderlan da Silva . Characterization and detection of major micromolecular constituents from species of Brazilian Cerrado and Atlantic rainforest using in silico and hyphenated techniques. *Planta Medica* (Stuttgart), v. 74, p. 1168-1169, 2008.

Outros

Estágio Docência na Disciplina Métodos Analíticos em Química Orgânica I

Oferecida ao Bacharelado em Química Tecnológica

2° Semestre – 2007 – 4 créditos

Conceito final: A

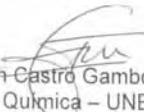
Palestra na escola – palestra realizada em uma escola estadual no município de Jaú, divulgando o curso de Química e o Instituto de Química – UNESP/Araraquara

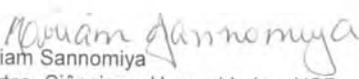
DENISE RICOY ROPERO

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

Araraquara, 17 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA


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


Profª Drª Miriam Sannomiya
Escola de Artes, Ciências e Humanidade – USP,


Profª Drª Luce Maria Brandão Torres
Instituto de Botânica – IBT, São Paulo
São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Lucrécia e Pepe, que me ensinaram a viver com dignidade. À eles, que se deram por inteiro e, renunciaram de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus! Sou o que sou às custas de seus sacrifícios. Sejam, estas palavras a expressão de meu infinito amor e imensa gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo.

Aos meus pais, Pepe e Lucrécia e às minhas irmãs, Viviane e Milena, por todo amor, carinho, incentivo, paciência, apoio, compreensão, enfim... por tudo!

Aos meus sobrinhos, Danilo e Ramon, pelos momentos de alegria e descontração.

Ao Prof. Dr. Ian Castro, pela amizade, orientação, paciência, liberdade e contribuições na estruturação deste trabalho e orientações na condução da pesquisa. Muito obrigada!

À Profa. Ângela, por ter acreditado no meu potencial.

Ao Marcos Marçal, companheiro de bancada e análises, pela amizade, sugestões, discussões e tornar mais divertidas as horas ao lado do HPLC.

Aos colegas de bancada Rose, Patrícia, Alice e Fausto, pela amizade e companheirismo.

Aos demais colegas de pós-graduação e IC do NuBBE, sempre presentes e dispostos a ajudar.

Às minhas amigas Fabrícia, Audy, Jeane, Rê, Fer Frezarin, Kellen, Déia, Julie e Iolanda, por todos os momentos desfrutados. Pelas horas de descontração e pelas lágrimas derramadas. Vocês foram peças indispensáveis nos melhores anos da minha vida.

À todos os meus amigos, em especial Marcão, Frodo, João, Paraíba e Alê, por sempre me mostrarem os melhores atalhos. Valeu pela força!

Aos técnicos de laboratório: Abertinho, Nivaldo e Tomaz, pela disponibilidade e atenção.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que colaboraram muito para o meu crescimento profissional.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pg.
Dedicatória.....	8
Agradecimentos.....	9
Sumário.....	10
Lista de Figuras.....	14
Lista de Esquemas.....	20
Lista de Tabelas.....	21
Abreviaturas.....	22
Resumo.....	24
Abstract.....	26
1.1 - Fungos: uma visão geral.....	28
1.2 - Fungos endofíticos.....	31
1.3 - A família Styracaceae.....	34
1.4 - O gênero <i>Styrax</i>	34
1.5 - <i>Styrax camporum</i> (Styracaceae).....	35
1.6 - Fungos da família Diaphorthales.....	35
1.7 - Gênero <i>Phomopsis</i>	36
1.8 - A espécie <i>Phomopsis stipata</i>	37

1.9 - Técnicas hífenadas e <i>desreplicação</i>	39
2 – Objetivos.....	43
3 - Metodologia experimental.....	44
3.1 - Meios para cultivo dos microorganismos.....	44
3.2 – Solventes.....	44
3.3 - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	44
3.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
3.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução.....	45
3.6 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas.....	45
3.7 - Colunas cromatográficas para CLAE.....	45
3.8 - Espectrômetro de Massas de Baixa Resolução.....	46
3.9 - Espectrômetro de Massas de Alta Resolução.....	46
3.10 – Equipamentos.....	46
3.11 - Seleção, coleta e classificação do material vegetal.....	47
3.12 - Isolamento do fungo endofítico.....	47
3.13 - Cultivos dos endofíticos.....	49
3.14 - Preparo, extração e análises das amostras.....	50
3.14.1 - Cultivo de <i>Phomopsis stipata</i> em meio sólido – Milho.....	50
3.14.2 - Cultivo de <i>Phomopsis stipata</i> em meio líquido – Extrato de Malte.....	52

3.14.3 - Cultivo de <i>Phomopsis stipata</i> em meio líquido – MDB.....	54
3.15 - Extratos DCM.....	55
3.16 - Extratos AcOEt.....	55
3.17 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos brutos de <i>P. stipata</i>	57
3.18 – Avaliação do potencial com propriedades de inibição da polimerização de heme dos extratos brutos de <i>P. stipata</i>	58
4- Resultados e discussões.....	59
4.1 - Cultivos dos fungos endofíticos.....	59
4.2 – Análise dos metabólitos presentes em MDC.....	62
4.3 – Análise dos metabólitos presentes em PDC.....	70
4.4 – O extrato EAC.....	78
4.5 - Análise dos metabólitos presentes em EAC.....	81
4.6 – O extrato EAE.....	88
4.7 - Análise dos metabólitos presentes em EAE.....	90
4.8 - Detecção <i>in silico</i> – EM/EM.....	95
4.9 - Detecção <i>in silico</i> dos metabólitos do endofítico em MDB.....	97
4.10 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos brutos de <i>P. stipata</i>	100
4.11 - Avaliação do potencial com propriedades de inibição da polimerização de heme dos extratos brutos de <i>P. stipata</i>	101
5 – Conclusões e perspectivas.....	103

Referências..... 105

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1: Estruturas fúngicas importantes na classificação do Filo Ascomycota.....	36
Figura 2: Bioatividade antifúngica, antioxidante e antibacteriana <i>in vitro</i> dos fungos isolados de <i>Styrax camporum</i>	49
Figura 3: Fases de crescimento do fungo <i>Phomopsis stipata</i> a.) inoculação do fungo. b.) 7 dias de cultivo. c.) 12 dias de cultivo. d.) 14 dias de cultivo.....	50
Figura 4: Cultivo de <i>P. stipata</i> em milho.....	51
Figura 5: Cultivo de <i>P. stipata</i> em extrato de malte.....	53
Figura 6: Cultivo de <i>P. stipata</i> em MDB.....	55
Figura 7: Redução do reagente DPPH.....	57
Figura 8: Perfil cromatográfico comparativo dos extratos EAE, EAC, MAC e PDB (λ – 254 nm – gradiente exploratório).....	59
Figura 9: Perfil cromatográfico comparativo dos extratos EAE, EAC, MAC e PDB (λ - 300 nm – gradiente exploratório).....	60
Figura 10: Comparação entre os extratos EAE e EAC (λ – 300 nm - gradiente exploratório).....	61
Figura 11: TIC comparativo dos extratos EAE (vermelho) e EAC (azul).....	61
Figura 12: Cromatograma gasoso do extrato MDC – temperaturas programadas: 50 °C (3 min) – 50-295 °C (6 °C/min) – 295 °C (15 min).....	62
Figura 13: Fragmentograma do íon <i>m/z</i> 268 observado a 12,75 min.....	63

Figura 14: Proposta de fragmentação para os íons m/z : 71, 57 e 43 no derivado γ -lactônico.....	64
Figura 15: EM no tempo de retenção 26,8 min.....	64
Figura 16: Espectro de massas do ácido <i>n</i> -hexadecanóico (NIST).....	65
Figura 17: Substância detectada no tempo de retenção 26,8 min – ácido <i>n</i> -hexadecanóico.....	65
Figura 18: Proposta de fragmentação para o ácido <i>n</i> -hexadecanóico.....	65
Figura 19: EM no tempo de retenção 29,4 min.....	66
Figura 20: Espectro de massas do ácido 16-octadecenóico.....	66
Figura 21: Substância detectada no tempo de retenção 29,4 min – ácido 16-octadecenóico.....	66
Figura 22: Proposta de fragmentação para o ácido 16-octadecenóico.....	67
Figura 23: EM no tempo de retenção 32,7 min.....	67
Figura 24: Espectro de massas do di-hexanoato de 2-etil-hexila.....	67
Figura 25: Substância detectada no tempo de retenção 32,7 min – di-hexanoato de 2-etil-hexila.....	68
Figura 26: Proposta de fragmentação para o di-hexanoato de 2-etil-hexila.....	68
Figura 27: EM no tempo de retenção 34 min.....	69
Figura 28: Espectro de massas do hexadecanoato de iso-propilodiol.....	69
Figura 29: Substância detectada no tempo de retenção 34 min – hexadecanoato de iso-propilodiol.....	69
Figura 30: Proposta de fragmentação para o hexadecanoato de iso-propilodiol...	70

Figura 31: Cromatograma gasoso do extrato PDC – temperaturas programadas: 50 °C (3 min) – 50-295 °C (6 °C/min) – 295 °C (15 min).....	71
Figura 32: EM no tempo de retenção 22,5 min.....	71
Figura 33: Espectro de massas do ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona.....	72
Figura 34: Substância detectada no tempo de retenção 22,5 min – ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona.....	72
Figura 35: Proposta de fragmentação para o íon m/z 139.....	72
Figura 36: Proposta de fragmentação para o íon m/z 98.....	73
Figura 37: Proposta de fragmentação para o íon m/z 71.....	73
Figura 38: EM no tempo de retenção 24,2 min.....	73
Figura 39: Espectro de massas do hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometila.....	74
Figura 40: Substância detectada no tempo de retenção 24,2 min – hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometila.....	74
Figura 41: Proposta de fragmentação para o íon m/z 154.....	75
Figura 42: Proposta de fragmentação para o íon m/z 70.....	75
Figura 43: EM no tempo de retenção 31,1 min.....	76
Figura 44: Espectro de massas do hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzila.....	76
Figura 45: Substância detectada no tempo de retenção 31,1 min – hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzila.....	76
Figura 46: Proposta de fragmentação para o íon m/z 153.....	77
Figura 47: Proposta de fragmentação para o íon m/z 125.....	77

Figura 48: Proposta de fragmentação para o íon m/z 91.....	78
Figura 49: Cromatograma do extrato EAC (254 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH.....	79
Figura 50: Cromatograma do extrato EAC (300 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH.....	80
Figura 51: Comparação entre os TIC positivo (preto) e negativo (vermelho).....	81
Figura 52: Espectro de massas EAC no tempo de retenção 19,3 min (modo positivo).....	82
Figura 53: Substâncias prováveis para o tempo de retenção 19,3 min.....	82
Figura 54: Desidratação proposta para 10 por dissociação na fonte.....	83
Figura 55: Espectro de massas EAC no tempo de retenção de 19,6 min (modo negativo).....	84
Figura 56: Proposta da ruptura do dímero 10	84
Figura 57: Espectro de massas EAC no tempo de retenção 17,7 min (modo positivo).....	85
Figura 58: Espectro de massas EAC no tempo de retenção 17,7 min (modo negativo).....	86
Figura 59: Substâncias detectadas no tempo de retenção 17,7 min.....	86
Figura 60: Proposta de dimerização para 11	87
Figura 61: Proposta de dimerização para 12	87

Figura 62: Cromatograma do extrato EAE (254 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH.....	88
Figura 63: Cromatograma do extrato EAE (300 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH.....	89
Figura 64: Comparação entre os TIC positivo (vermelho) e negativo (preto).....	89
Figura 65: Espectro de massas EAE no tempo de retenção 11,3 min (modo positivo).....	90
Figura 66: Espectro de massas EAE no tempo de retenção de 11,3 min (modo negativo).....	91
Figura 67: Substância detectada no tempo de retenção 11,3 min.....	91
Figura 68: Proposta de formação do dímero e do trímero de 13	92
Figura 69: Espectro de massas EAE no tempo de retenção 14,3 min (modo positivo).....	93
Figura 70: Espectro de massas EAE no tempo de retenção de 14,4 min (modo negativo).....	94
Figura 71: Substância detectada no tempo de retenção 14,4 min.....	94
Figura 72: Proposta de dimerização de 14	95
Figura 73: EM/EM do aduto – $[M+H]^+$ - 213.....	95
Figura 74: Equilíbrio ceto/enólico.....	96
Figura 75: Proposta de fragmentação para o íon m/z 157.....	96

Figura 76: Proposta de fragmentação para o íon m/z 141.....	97
Figura 77: Cromatograma em gradiente exploratório do extrato PDB (290 nm).....	97
Figura 78: TIC positivo do extrato PDB.....	98
Figura 79: TIC negativo do extrato PDB.....	98
Figura 80: Espectro de massas PDB no tempo de retenção 17,748 min.....	99
Figura 81: Koniginina detectada no tempo de retenção 17,748 min.....	99
Figura 82: Espectro de massas de PDB no tempo de retenção 22,881 min.....	100
Figura 83: Koniginina detectada no tempo de retenção 22,881 min.....	100

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção das cepas fúngicas.....	48
Esquema 2: Cultivo do <i>P. stipata</i> em milho.....	51
Esquema 3: Cultivo de <i>P. stipata</i> em extrato de malte.....	53
Esquema 4: Cultivo de <i>P. stipata</i> em MDB.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do teste de inibição da polimerização do heme..... 101

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA – Batata Dextrose Ágar

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

DAD – Detector de arranjo de diodos

DCM – Diclorometano

DNP – Dictionary of Natural Products

EAC – Extrato Bruto AcOEt de *P. stipata* (extrato de malte - estático)

EAE – Extrato Bruto AcOEt de *P. stipata* (extrato de malte - agitação)

EDC – Extrato Bruto DCM de *P. stipata* (extrato de malte - estático)

EDE – Extrato Bruto DCM de *P. stipata* (extrato de malte - agitação)

EB – Extrato Bruto

EM – Espectrometria de Massas

Ext. M – Extrato de Malte

HAc – Ácido acético

Hex – Hexano

MAC – Extrato Bruto AcOEt de *P. stipata* (milho)

MCC – Óleo insolúvel em MeOH de MAC

MDB – Meio de Batata Dextrose

MDC – Extrato Bruto DCM de *P. stipata* (milho)

ML – Rearranjo de McLafferty

PDB – Extrato Bruto AcOEt de *P. stipata* (MDB)

PDC – Extrato Bruto DCM de *P. stipata* (MDB)

RDA – Retro Diels-Alder

SC-04 – *Styrax Camporum* - 04

SDBS – Sulfonato de dodecilbenzeno

TIC – Contagem total de íons

UV – Ultravioleta

Resumo

No trabalho foi abordado o estudo de extratos do fungo *Phomopsis stipata* cultivado em diferentes meios de cultura na implementação da metodologia *in silico* utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução conjugados com a base de dados do dicionário de produtos naturais (<http://dnp.chemnetbase.com>). Foi realizada a comparação da diversidade na produção metabólica do fungo endofítico quando cultivado em diferentes meios de cultura comerciais e em cereal (milho), através do perfil cromatográfico, assim como avaliação das atividades antioxidante e propriedades de inibição da polimerização do heme. Nos extratos diclorometânicos foram identificadas oito substâncias. No extrato diclorometânico do fungo endofítico, crescido em milho, cinco substâncias foram detectadas, sendo elas: **1-** derivado γ -lactônico; **2-** ácido *n*-hexadecanóico; **3-** ácido 16-octadecanóico; **4-** di-hexanoato de 2-etilhexila e **5-** hexadecanoato de iso-propilodiol. E, para o extrato diclorometânico de *P. stipata*, crescido em meio batata dextrose, três substâncias foram detectadas, dentre elas: **6-** ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona; **7-** hexahidropirrolol [1,2-*a*] pirazina-1,4-diona-3-benzil e **8-** hexahidropirrolol [1,2-*a*] pirazina-1,4-diona-3-isometil. O emprego de CLAE-DAD-EM e espectrometria de massas *tandem* possibilitou a identificação, diretamente a partir dos extratos brutos do fungo, de seis substâncias que já foram relatadas para outras espécies do gênero *Phomopsis* e duas substâncias já antes identificadas na espécie *Phomopsis stipata*, totalizando oito substâncias detectadas. Para o extrato acetato de etila, crescido em extrato de malte, no modo estático, três substâncias foram detectadas, sendo elas: **10-** phomopsidina; **11-** phomopsilactona e **12-** phomosina A. No extrato acetato de etila, crescido em extrato de malte, sob agitação, três substâncias foram detectadas, **13-** convolvulol; **14-** phomosina C e **15-** phomopironol foi identificado por EM/EM. Duas konigininas (**16** e **17**) já isoladas para esta espécie foram detectadas no extrato acetato de etila, crescido no meio batata dextrose. Os testes antioxidantes apresentaram resultados negativos para todos os extratos. No teste de inibição da polimerização do heme, os extratos de acetato de etila, crescido com extrato de malte, no modo estático; o extrato diclorometânico, crescido em

extrato de malte, sob agitação e o extrato diclorometânico crescido em meio batata dextrose se destacaram por apresentarem porcentagem maiores quando comparadas ao padrão quinina.

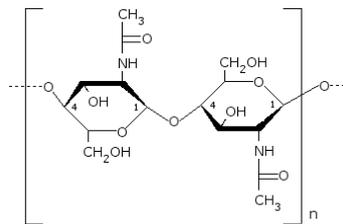
Abstract

This work shows the study of extracts of the fungus *Phomopsis stipata* grown in different culture broths in the implementation of *in silico* methods using gas chromatography coupled to mass spectrometry and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer for high resolution, combined with the database dictionary of natural products (<http://dnp.chemnetbase.com>). A comparison of diversity in the metabolic production of endophytic fungus when grown in different culture broths and cereal (corn) by the chromatographic profile was made, as well as assessment of activities of antioxidant properties and inhibition of heme polymerization. In dichloromethane extracts eight substances were identified. In dichloromethane extract of the endophytic fungus, grown in corn, five substances were detected, which were: **1-** γ -lactone derivative; **2-** *n*-hexadecanoic acid; **3-** 16-octadecenoic acid; **4-** hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester and **5-** hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester. And for the dichloromethane extract of *P. stipata*, grown on potato dextrose broth, three substances were detected, among them: **6-** 2-hydroxy-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-enone; **7-** pirrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) and **8-** pirrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl). The use of HPLC-DAD-MS and tandem mass spectrometry enabled the identification, directly from crude extracts of the fungus, of six substances that have been reported for other species of *Phomopsis* and two substances already identified in species *Phomopsis stipata*, totaling eight substances detected. To the ethyl acetate extract, grown in malt extract, in static mode, three substances were detected, which were: **10-** phomopsidin; **11-** phomopsilactone and **12-** phomosin. To the ethyl acetate extract, grown in malt extract, by shaking, three substances were detected, which were: **13-** convolvulol; **14-** phomopsin C and the **15-** phomopironol was identified by MS/MS. Two koniginins (**16** and **17**) were identified already isolated for this species were detected in the ethyl acetate extract, grown on potato dextrose broth. The antioxidant tests showed negative results for all extracts. In the test of inhibition of heme polymerization, the extracts of ethyl acetate, grown with malt extract, in static mode, the dichloromethane extract, grown

in malt extract, dichloromethane extract by shaking and grown on potato dextrose broth stood out by presenting percent higher when compared to the standard quinine.

1.1 - Fungos: uma visão geral

Os fungos, também chamados de bolores, mofos ou cogumelos, estão presentes em muitas das nossas atividades diárias. Eles são tão importantes que hoje constituem um reino à parte, lado a lado com os reinos vegetal e animal. Fica difícil definir os fungos tal é a sua diversidade. No entanto, eles possuem algumas características em comum que os distinguem dos outros seres vivos. Em geral, eles apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rijas, ricas em quitina (1), o mesmo material que reveste insetos; têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e, portanto, necessitam de material orgânico para viver, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são por eles produzidas e que degradam produtos como, por exemplo, celulose e amido (ARAÚJO, 2008).



(1) Quitina

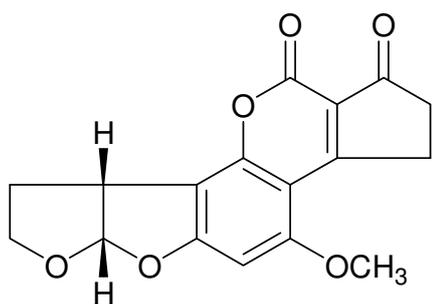
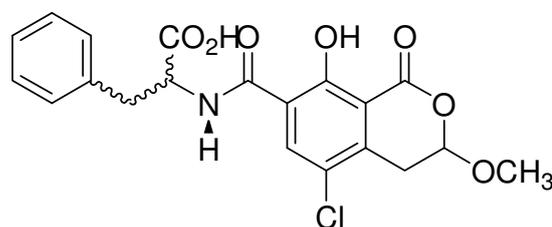
O reino dos fungos é um dos mais numerosos. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos disseminadas. Isso é muito mais do que todas as espécies vegetais e animais somados, excluindo-se os insetos. Desses, apenas 69.000 espécies foram descritas até hoje, o que representa menos de 5% das possíveis existentes (HAWKSWORTH, 2001). Se entre esses cinco por cento de espécies, já existem muitas de grande importância, como as que entram na fabricação de ácidos orgânicos, de fármacos, de alimentos, incluindo bebidas e inúmeros outros produtos, a projeção de resultados através da descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico, é promissora (ARAÚJO, 2008).

Historicamente, dentre todos os microorganismos estudados, os fungos Ascomycetos são indicados como produtores de metabólitos secundários mais prolíficos. São também apontados como fundamentais para a saúde e prosperidade de todo o ecossistema terrestre e, essenciais para sua sustentabilidade e biodiversidade (GUNATILAKA, 2006).

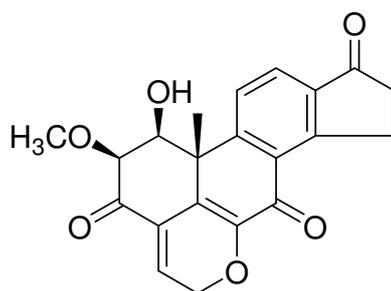
Uma das propriedades mais importantes dos microorganismos, em especial a dos fungos, está associada a sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas (PINTO et al., 2002).

Em particular no Brasil, país que possui a maior biodiversidade do mundo, a busca de novas espécies de fungos deverá produzir resultados extremamente interessantes do ponto de vista biotecnológico. Infelizmente para a maioria da população, eles são vistos como prejudiciais, uma imagem que é dada pelas poucas espécies dentro do reino que causam micoses do homem e animais ou as que são responsáveis por doenças em plantas cultivadas. Outros associam os fungos com os bolores ou mofos que invadem paredes úmidas das residências, artigos de couro ou ainda cobrem os alimentos, como frutas e grãos armazenados. De uma forma mais favorável, eles podem ser associados à culinária, como é o caso dos cogumelos de chapéu usados em sopas, pizzas e nos stroganoffs. Essa é a imagem que o grande público tem sobre os fungos (ARAÚJO, 2008).

Nos ambientes tropicais, os fungos constituem-se num sério problema no processo de armazenamento de alimentos, principalmente de cereais, devido à produção de micotoxinas que contaminam os alimentos e passam a ser um sério problema de saúde pública, algumas consideradas carcinogênicas potentes. Entre as micotoxinas, incluem-se aflatoxinas (2), ocratoxinas, relatado na literatura com um erro em sua estereoquímica (3), citreoviridinas (4), tricotecenos e fumonisinas (PINTO et al., 2002).

(2) Aflatoxina B₁

(3) Ocratoxina A

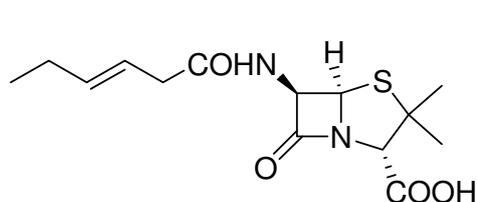


(4) Citreoviridinas

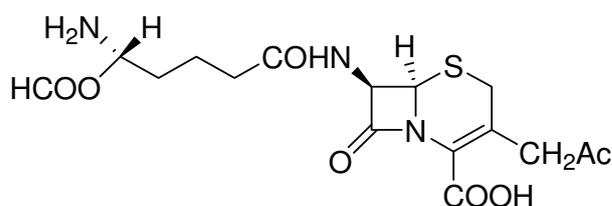
Importante ressaltar que os fungos são também responsáveis pela produção de antibióticos, de vitaminas, de esteróides, de ácido cítrico (GADD, 1999), medicamentos, balas e doces, de enzimas tipo celulases, quitinases, proteases, amilases e muitas outras de valor industrial, de etanol, usado como combustível nos automóveis, como solvente e desinfetante, ou ainda nas fermentações alcoólicas, produzindo bebidas como o vinho, a cerveja, o saquê e os destilados. Eles também entram na panificação, na fabricação e maturação de queijos, entre muitos outros produtos. Também de grande importância agrícola e ecológica, são eles que mantêm um equilíbrio, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microorganismos patogênicos, insetos-pragas da agricultura ou herbívoros. Devido à produção de grande quantidade e diversidade de metabólitos secundários, os fungos são considerados uma fonte valiosa de produtos com atividade farmacológica.

Fármacos importantes de uso clínico em várias patologias foram obtidos de fungos. Esta dicotomia de funções pode ser proveniente da grande diversidade

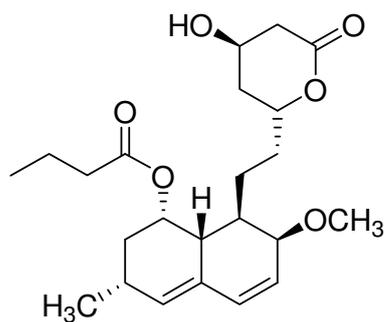
química que os fungos produzem. Dentre os medicamentos produzidos por fungos, destacam-se os antibióticos penicilinas (5) e cefalosporinas (6), de grande repercussão terapêutica para doenças infecciosas. A mevinolina (7), um agente redutor de colesterol, detentor de um mercado mundial em torno de U\$ 1 bilhão por ano, é um exemplo de substância com atividade farmacológica produzida a partir de metabólitos de fungos (MASUREKAR, 1992).



(5) Penicilina F



(6) Cefalosporina C



(7) Mevinolina

Devido à utilização indiscriminada e abusiva de antibióticos e antifúngicos, bem como o aumento de doenças fúngicas na população humana, resultaram na produção de um sistema imunológico comprometido, reforçando a necessidade de pesquisas em busca de novas drogas com ação terapêutica (STROBEL, et al., 2004). Deste modo, a necessidade por novos metabólitos bioativos tem conduzido a investigações por novas fontes de produtos naturais e a contínua otimização de metodologias, visando descobrir novas drogas com ação terapêutica, uma vez que estes metabólitos apresentam uma grande diversidade estrutural e com largo espectro de bioatividades.

Nos últimos anos, constata-se uma prioridade de pesquisa sobre a química dos fungos, temendo-se a perda da biodiversidade (PINTO et al., 2002). Muitas espécies ameaçadas de plantas superiores e insetos estão associadas com a flora específica dos fungos e, se estas perdas ocorrerem, poderão resultar no desaparecimento das espécies.

1.2 - Fungos endofíticos

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas, mas foi Bary, em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas (AZEVEDO, 1998).

No interior dos vegetais superiores, de modo geral, nas partes aéreas como folhas e caules, e também em raízes, investigados até o momento coabitam diversos microorganismos, denominados endofíticos. Uma vez instalados, o endófito pode habitar a planta por toda sua vida ou pelo menos durante um período do ciclo de vida da planta, sem causar danos aparentes, entretanto podem se tornar patogênicos quando estressados (ANTUNES et al., 2008). Muitas evidências sugerem que microorganismos que vivem associados a plantas, especialmente bactérias e fungos endofíticos, representam um enorme recurso de produtos naturais, como estruturas químicas que foram aperfeiçoadas por evoluções ecológicas e biológicas. Esses microorganismos podem influenciar várias características das plantas e conferir certos benefícios a este vegetal como, por exemplo, produção de antibióticos. Há alguns anos não se conhecia a grande potencialidade dos endofíticos, entretanto, este interesse vem aumentando com a descoberta recente de características como a produção de compostos biologicamente ativos, antibióticos, fungicidas e herbicidas (ARAÚJO, 2008).

Os microorganismos endofíticos foram considerados assintomáticos, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, até o final da década de 70. Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos,

imunossupressores, antitumorais e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003).

Os endófitos têm sido descritos como protetores contra o ataque de outros microorganismos, insetos e animais herbívoros, devido à produção de toxinas. Podem ainda produzir fitormônios, enzimas e outros compostos químicos, oferecendo vantagens à planta hospedeira, enquanto se desenvolvem em seu interior (ANTUNES et al., 2008). Os fungos endofíticos são de grande importância, pois representam uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente na medicina, mas também na fitopatologia e veterinária (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

Estudos sobre a potencialidade dos microorganismos endofíticos, principalmente os relacionados à descoberta de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica. Algumas plantas apresentando ação antimicrobiana poderiam ser hospedeiras de endófitos, que, por sua vez poderiam apresentar tais propriedades, sugerindo que na verdade o princípio ativo antimicrobiano pode ser produzido pelo microorganismo e não propriamente pelo vegetal, ou então que seus efeitos terapêuticos somente sejam constatados devido à estreita associação planta-hospedeiro. Um exemplo é o taxol, utilizado para o tratamento do câncer, presente tanto na planta medicinal *Taxus brevifolia*, como no fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1995).

Um dos maiores problemas no futuro da biologia dos endofíticos é a rápida diminuição das florestas tropicais, que representam a possível maior fonte para adquirir novos microorganismos e seus produtos. Levando em consideração que muitas associações planta-microorganismo são específicas de hospedeiro, quando uma espécie vegetal desaparece, também irá desaparecer um conjunto inteiro de endofíticos associados a ela (STROBEL et al., 2004).

Além do extrativismo predatório, outro fator igualmente importante na extinção dos endofíticos, porém mais silencioso, é a poluição atmosférica. Estudo recente em regiões praianas da Itália demonstrou que árvores atingidas pelo “spray” da água marinha contaminada com o detergente aniônico sintético SDBS

(dodecilbenzeno sulfonato) apresentaram uma colonização de endofíticos significativamente menor (63,8%) do que árvores controle das mesmas espécies não contaminadas (85,4%) (DANTI et al., 2002).

1.3 - A família *Styracaceae*

Styracaceae é composta por onze gêneros distribuídos na Europa, Ásia, trópicos e subtropicais americanos. São conhecidas cerca de 160 espécies nesta família, estando bem representadas no Brasil (PAULETTI et al., 2006). Em alguns gêneros de *Styracaceae*, na qual se inclui *Styrax*, predominam substâncias de natureza resinosa e balsâmica, que possuem o ácido benzóico como principal componente. Essas substâncias, muito usadas na medicina popular, foram denominadas como “benjoin”, “estoraque”, dentre outros. Há algumas décadas o “benjoin” está registrado na farmacopéia (REYNOLDS, 1996), sendo indicado como fitoterápico para casos de formigamento e bronquites devido às ações anti-séptica, cicatrizante, dentre outras (COIMBRA, 1958). Em geral, as espécies desta família caracterizam-se por apresentarem árvores pequenas ou arbustos campestres, bastante comuns nos estados centrais do Brasil, em regiões do Cerrado (RIZZINI; MORS, 1976).

1.4 - O gênero *Styrax*

O principal gênero de *Styracaceae* é *Styrax* com cerca de 60 espécies registradas (GILG, 1926). Algumas espécies destacam-se por apresentarem propriedades medicinais, sendo objetivo de amplos estudos, tais como: *S. aureae*, de ocorrência nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Alagoas, chamada de “estoraqueiro-do-Brasil” ou “benjoeiro” é uma árvore muito conhecida pela goma-resinosa que se obtém por incisão do caule. Seu bálsamo é usado na medicina popular para o tratamento de úlceras crônicas, blenorragia e leucorréia, sendo também indicado nos casos de tosse, dispnéia, rouquidão e como calmante (BALBACH, 1976).

As espécies *S. benjoin* e *S. tonkinensis*, originárias de Java, Sumatra, Tailândia e Tonkin, também fornecem resina balsâmica. A composição química da resina de *S. tonkinensis* é formada de ácido benzóico livre (23%), ácido cinâmico (3%), álcool coniferílico, benzoato de coniferila e vanilina. A resina de *S. benjoin* contém principalmente ácido cinâmico livre, pequeno teor de ácido benzóico, álcool coniferílico e cinamato de coniferila. Ambas são usadas no preparo de expectorantes balsâmicos e anti-sépticos das vias respiratórias, sendo também extremamente cicatrizantes (COSTA, 1968).

1.5 - *Styrax camporum* (Styracaceae)

Esta espécie vegetal ocorre nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná e predomina em regiões de cerrado (LORENZI, 1998). Amplamente utilizada em doenças gastroduodenais pela medicina popular teve seu potencial antiulcerativo e toxicidade avaliados, a partir de extratos brutos e frações sendo confirmada a sua eficiência no combate de úlceras (BACCHI, SERTIÉ, 1994). O potencial antiulcerativo de *S. camporum* foi atribuído à presença de taninos (substâncias com ação cicatrizante) (BACCHI et al., 1995). Os taninos possuem em suas estruturas grupos hidroxílicos fenólicos, conferindo-lhes uma forte ação antioxidante, e ação antiulcerogênica (LA CASA et al., 2000). Levantamento bibliográfico sobre a constituição química das espécies do gênero *Styrax* evidenciou a ocorrência de poucas classes de produtos naturais, predominando lignóides, triterpenos e saponinas (SORDI, 2007).

1.6 - Fungos da família Diaphorthales

A família Diaphorthales pertence ao filo Ascomycota, o qual apresenta micélio septado e septos simples contendo quitina nas paredes celulares. A principal característica que distingue os Ascomicetos de todos os outros fungos é a formação endogênica de meiosporos (Ascóporos) em uma estrutura chamada Asco. O Asco é uma estrutura com diversas formas de diferenciação e, junto com a morfologia dos

corpos de frutificação (Ascósporos, Ascoma) é de fundamental importância para a classificação dos táxons inferiores (Figura 1) (PFENNING, 2000).

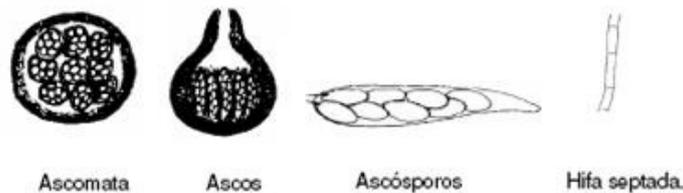


Figura 1: Estruturas fúngicas importantes na classificação do Filo Ascomycota

1.7 - Gênero *Phomopsis*

Fungos do gênero *Phomopsis* são encontrados como endófitos nos espaços intercelulares de tecidos de diversos vegetais.

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

As células conidiogênicas de *Phomopsis* são alongadas com um ápice limitado, fluorescente e compacto, a partir do qual o conídio se desenvolve. Em *Phomopsis* tipicamente se formam conídios α e β e dois glóbulos oleosos por conídio (FARR et al., 2002).

O gênero *Phomopsis* tem sido frequentemente isolado como endófito em uma grande variedade de plantas. Azevedo et al. (2000) apresentaram algumas plantas hospedeiras de onde já foram isoladas espécies de *Phomopsis*, entre elas, *Sabal bermudana*, *Trachycarpus fortunei*, *Cavendishia pubescens*, *Stylosanthes guianensis*, *Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*. Corrado e Rodrigues (2004)

isolaram endofíticos de *Phomopsis* das plantas medicinais *Spondias mombin* e *Aspidosperma tomentosum*.

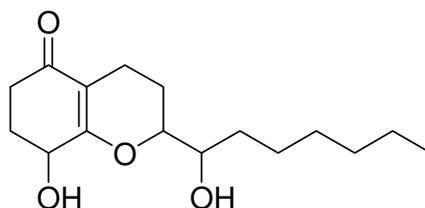
Alguns dos relatos citam o gênero *Phomopsis* como fitopatógeno isolado de *Citrus aurantium* (laranjeira), *C. nobilis* (tangerineira), *C. paradisi* (pomelo), *C. australis* (laranja), *C. sinensis* (laranja da china), *C. sp.* (citros), *Mangifera indica* (mangueira), *Glycine max* (soja), *Ficus carica* (figueira) e *Anacardium occidentale* (cajuzeiro) entre muitas outras plantas (CENARGEN; EMBRAPA, 2005).

O gênero *Phomopsis* é um importante grupo de fungos com potencial biotecnológico devido a produção de importantes metabólitos secundários bioativos de estruturas diversas. Entre eles incluem as micotoxinas, que afetam o sistema nervoso de vertebrados (BILLS, et al. 1995), alcalóides com capacidade farmacológicas, tais como phomopsinas (COCKRUM, PETERSON e EDGAR, 1994) e 2,4-diidroxí-5-6-dimetil benzoato de etila e phomopsilactona, produzidos por *Phomopsis cassiae* endofítico de *Cassia spectabilis* (SILVA et al, 2005).

Este gênero é conhecido por ser uma fonte rica em metabólitos secundários bioativos de estruturas diversas. Levantamento bibliográfico sobre as estruturas isoladas de *P. stipata* revela que, apesar do grande potencial deste gênero, os seus metabólitos ainda são pouco estudados (SORDI, 2007).

1.8 - A espécie *Phomopsis stipata*

Os extratos brutos de SC-04, produzidos por fungos *Phomopsis stipata* provenientes da espécie vegetal *Styrax camporum* apresentaram atividade anti – *M. tuberculosis* promissora (PRINCE, 2008). O fracionamento deste extrato por Sordi (2007), promoveu o isolamento de duas substâncias inéditas, que apresentam esqueletos carbônicos semelhantes aos das substâncias denominadas koningininas (9), produzidas por fungos do gênero *Trichoderma*. As koningininas, segundo Cutler et al. (1989, 1991, 1999), apresentam diversas atividades biológicas.

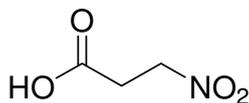


(9) Koninginina E

O cultivo de *Phomopsis stipata* em diversos meios de cultura (Ext.M, YM, Nutriente, Czapek e nos cereais milho e arroz) apresentou diferentes atividades antimicrobiana. O meio de cultura contendo milho favoreceu a produção de metabólitos secundários bioativos contra *M. tuberculosis*.

Sordi (2007) comparou a composição dos extratos brutos, produzidos por *Phomopsis stipata* em diferentes meios de cultura e verificou a maior quantidade de metabólitos secundários nos extratos originários do cultivo em caldo MDB e no meio com milho. Estes meios possibilitaram ao fungo produzir maior diversidade metabólica, bem como estimular a produção de metabólitos potencialmente bioativos. Sordi (2007) ainda verificou que apenas os extratos produzidos em cereais (milho e arroz) apresentaram atividade antifúngica, inibindo o crescimento das linhagens fúngicas fitopatogênicas (*Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*).

Há relatos da presença do (8) ácido 3 – nitropropiónico (SORDI, 2007). De acordo com Chomcheon (2005), a produção deste ácido é comum entre os fungos do gênero *Phomopsis*, o qual é um potente composto antibacteriano e também apresenta forte atividade contra *M. tuberculosis*.



(8) Ácido 3-nitropropiónico

1.9 - Técnicas hifenadas e *desrepliação*

O termo “técnicas hifenadas” se tornou popular em química analítica durante os anos 80 e vem sendo utilizado para denominar as técnicas acopladas (CROTTI et al., 2006b). Visando a obtenção de informações estruturais dos metabólitos de interesse a partir de misturas, surgiram os primeiros acoplamentos de um sistema de separação (como por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência ou a cromatografia gasosa) com os equipamentos utilizados exclusivamente na elucidação estrutural de substâncias (como por exemplo, a ressonância magnética nuclear ou a espectrometria de massas) (KITE et al., 2003) e (WILSON e BRINKMAN, 2003).

O acoplamento é, sem dúvida, vantajoso em relação ao processo clássico de isolamento e posterior elucidação estrutural (CROTTI et al., 2006b). Em geral, extratos brutos de plantas contém uma mistura complexa com dezenas ou centenas de metabólitos (MAURI e PIETTA, 2000) e (WOLFENDER et al., 2003) o que faz necessária uma detecção eficiente e caracterização rápida de produtos naturais, que são importantes regras para um suporte analítico nas pesquisas em produtos naturais. A identificação de um metabólito como último estágio de separação é uma estratégia chave para guiar um eficiente e seletivo procedimento de isolamento (WOLFENDER et al., 1994).

A comparação de cromatogramas, usados como impressões digitais, entre amostras autênticas e amostras desconhecidas, permite, a identificação de drogas e/ou procura de adulterações. Além do mais, em muitas aplicações pode ser necessário não apenas detectar, mas também identificar as substâncias nos extratos (WOLFENDER et al., 1994).

Os mais importantes avanços na análise de misturas complexas foram inicialmente obtidos após o desenvolvimento do acoplamento da cromatografia gasosa (CG) a detectores de espectrometria de massas (CG-EM), a qual atualmente é utilizada rotineiramente em muitas áreas, por exemplo, para a análise de óleos essenciais na indústria cosmética. Porém, esta técnica tem a grande limitação de apenas permitir a análise de substâncias termicamente estáveis, que podem ser volatilizadas intactas.

Na cromatografia líquida (CL) os primeiros sistemas hifenados ou de simples detecção foram o ultravioleta (UV), o infravermelho, o eletroquímico e a fluorescência. Porém, nenhum destes exemplos pode ser considerado uma técnica universal, mesmo tornando possível a análise de matrizes complexas não voláteis, constituídas de componentes de maior peso molecular (TATSIS et al., 2007).

A cromatografia líquida acoplada ao detector de ultravioleta estimulou o desenvolvimento de análises de misturas mais complexas com o desenvolvimento de detectores de arranjo de diodos (DAD – *diode array detector*), pois a presença de um cromóforo é um fator limitante para propiciar a detecção em ultravioleta. As principais razões para o sucesso inicial desse acoplamento foram: 1) vantagem da obtenção do espectro de UV e a separação das substâncias pelo sistema CL, fornecendo alguma informação estrutural, ainda que limitada; 2) o custo relativamente baixo da técnica em relação a outras técnicas hifenadas. Entretanto, a necessidade de se obter mais informações estruturais para cada componente de uma mistura complexa levou ao desenvolvimento das técnicas hifenadas modernas hoje disponíveis, tais como o acoplamento de CL com espectrometria de massas (CL-EM) e ressonância magnética nuclear (CL-RMN) (CROTTI et al., 2006b).

Nas técnicas hifenadas envolvendo espectrometria de massas, o espectrômetro de massas é acoplado em linha com um método de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), CG, cromatografia de fluido supercrítico ou eletroforese capilar. Após o processo de separação, o eluente da coluna CLAE, por exemplo, é dividido por um *splitter* localizado no final da coluna cromatográfica, direcionando parte do fluxo para a fonte de ionização do espectrômetro de massas, sendo que a outra parte do eluente pode ser direcionada a outro tipo de detector. Assim, o acoplamento entre CLAE e os detectores EM e DAD em paralelo resulta em uma das técnicas hifenadas mais utilizadas atualmente: CLAE-DAD-EM (CROTTI et al., 2006b).

Nos dias de hoje, uma das maiores aplicações das técnicas hifenadas na área de produtos naturais é na chamada *desreplicação* de misturas complexas, ou seja, para estabelecer quais já foram previamente identificados. De fato, nas últimas décadas as técnicas hifenadas têm se tornado a mais importante estratégia para a identificação e/ou confirmação de identidade de compostos químicos conhecidos. O *screening* químico utilizando técnicas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM e CLAE-EM-

RMN rapidamente fornece ampla informação estrutural, possibilitando, em muitos casos, a identificação inequívoca de compostos *on-line* e assim auxiliando na racionalização dos estudos fitoquímicos (MOLYNEUX; SCHIEBERLE, 2007). Com isso, fica claro que estas técnicas criaram possibilidades para o *screening* químico ou determinação do perfil metabólico dos componentes de extratos de produtos naturais, pois provêem um método rápido e confiável para a distinção entre compostos previamente identificados diretamente a partir de extratos vegetais brutos. Isso elimina, ou diminui muito, a necessidade do processo de isolamento e purificação de compostos já conhecidos, e direciona ao isolamento de constituintes apresentando características espectroscópicas novas, diferentes ou de interesse biológico (MOLYNEUX; SCHIEBERLE, 2007; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003).

A técnica mais associada com o processo de *desreplicação* usualmente consiste de um sistema CLAE-EM ou CLAE-DAD-EM, apesar de muitos estudos já utilizarem CLAE-RMN e, até mesmo CLAE-EM-RMN (CROTTI et al., 2006b). Na *desreplicação* de produtos naturais por CLAE-DAD-EM, os espectros de UV e dados de EM, como massas moleculares (acuradas no caso de analisadores que permitam alta resolução) e espectros de íons produto (no caso dos espectrômetros que permitam a fragmentação em célula de colisão e a realização de EM/EM) são usualmente utilizados em conjunto com informações quimiosistemáticas da espécie analisada e banco de dados de produtos naturais como Dictionary of Natural Products (DNP) (CORDELL; SHIN, 1999; CROTTI et al., 2006b; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003).

Entre as técnicas de ionização, a mais utilizada para o acoplamento com CLAE, devido à sua versatilidade, é a ESI (ionização por *electrospray*). ESI é um processo pelo qual, à pressão atmosférica, um campo elétrico intenso dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de um fino *spray* de gotas carregadas que, por evaporação, resultam em íons na fase gasosa (CROTTI et al., 2006a; FENN, 2003). Em ESI, a ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Brønsted-Lowry, ou seja, pela protonação ou desprotonação de moléculas (CECH; ENKE, 2001; CROTTI et al., 2006a). Assim, substâncias que apresentam grupos funcionais básicos (principalmente aminas, amidas, lactamas, ésteres e lactonas) podem ser melhor analisados no modo de ionização positiva, dada a maior facilidade com que esses grupos são protonados em solução. Inversamente, moléculas contendo

funções acídicas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, podem ser melhor analisados pelo modo de ionização negativa, no qual produzem as moléculas desprotonadas relativamente estáveis (CECH; ENKE, 2001; CROTTI, 2006a). ESI é um método muito brando, e pouca energia residual é retida pelo analito após a ionização, normalmente acarretando uma baixa fragmentação. Portanto, a reduzida transferência de energia para as moléculas é uma desvantagem desta técnica para estudos de elucidação estrutural. Para contornar essa desvantagem, foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM ou EMⁿ), na qual as moléculas podem ser fragmentadas.

Em uma análise EM/EM, um íon do primeiro estágio (chamado íon precursor) é selecionado e transferido para uma célula de colisão. A fragmentação do íon precursor se dá através de dissociação induzida por colisão (CID – *collision-induced dissociation*) utilizando um gás inerte (usualmente Ar, N₂ ou CO₂). Os íons resultantes (íons produto ou de segunda geração) são, de modo geral, altamente indicativos da estrutura do íon precursor. A identificação de compostos desconhecidos, combinando dados de massas moleculares exatas com os espectros de íons produto obtidos se torna então, possível. Isto se aplica especialmente para séries homólogas de compostos cuja relação estrutura-fragmentação é previamente conhecida (CROTTI et al., 2005; CROTTI et al., 2006 a; NIESSEN, 2000). Assim, certos aspectos dos analisadores de massas, como a capacidade de realizar experimento de EMⁿ (múltiplos estágios de isolamento do íon precursor e fragmentação por CID) e a capacidade de fornecer espectros em alta resolução e medição de massas acuradas são críticos para estudos com CLAE-EM e CLAE-EM/EM.

No trabalho foi abordado o estudo de extratos do fungo *Phomopsis stipata* cultivado em diferentes meios de cultivo na implementação da metodologia *in silico* utilizando CG-EM, CLAE-EMAR e EM/EM conjugados com a base de dados do dicionário de produtos naturais (<http://dnp.chemnetbase.com>).

2 - OBJETIVOS

- 1.- Desenvolver novas estratégias cromatográficas de seleção e triagem de novos produtos, a partir da implementação de técnicas hifenadas e de *desreplicação*.
- 2.- Produzir extratos brutos em larga escala de diferentes meios de cultivo do fungo endofítico *Phomopsis stipata*, codificado como SC-04 isolado das folhas de *Styrax camporum*;
- 3.- Implementar metodologias analíticas inovadoras nas técnicas espectrométricas e espectroscópicas mencionadas, que permitam determinar qualitativamente as micromoléculas bioativas produzidas pelo fungo endofítico *Phomopsis stipata* associado a *Styrax camporum*.
- 4.- Avaliar o potencial antioxidante e a inibição da polimerização do heme dos extratos brutos de *P. stipata*.

3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 - Meios para cultivo dos microorganismos

Phomopsis stipata foi cultivado em meios de cultura sólido e líquido a temperatura controlada (25 °C) e, para os meios líquidos, foram utilizadas incubadoras rotatórias.

Meios de cultura sólidos: BDA – Batata Dextrose Ágar (Sigma): 39g/L de água; Milho – Milho tipo canjica (YOKI)

Meios de cultura líquidos: MDB – Batata Dextrose (DIFCO): 24 g/L de água; EM – Extrato de Malte (DIFCO): 20 g/L de água

3.2 - Solventes

Merck, J. T. Backer, Synth e Mallinckrodt (P.A. e grau HPLC)

3.3 - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Cromatógrafo a gás Shimadzu QP – 5000, injetor automático 5000 (280 °C), detector por ionização eletrônica (70 eV) no modo positivo (350 °C), gás carreador He, coluna DB5-MS (30m) com vazão de 1 ml/min (20 °C). Os dados foram adquiridos no CEMPEQC sob supervisão do Prof. José Eduardo de Oliveira, no IQ-UNESP.

3.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A otimização dos métodos foram realizadas utilizando um sistema CLAE acoplado a um detector de arranjo de diodos (sistema CLAE-DAD). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20AT, equipado com um detector UV-

DAD modelo CBM20A e injetor automático modelo SIL-20A, controlados pelo software LC-Solution.

3.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Foi utilizado um sistema CLAE acoplado a um detector de UV-DAD e a um espectrômetro de massas (sistemas CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM). Assim, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A, acoplado a um detector UV-DAD (CBM20A, Shimadzu) e a um espectrômetro de massas UltrOTof (Bruker Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo QqToF (analisadores tipo quadrupolo e tempo de voo em sequência).

3.6 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Waters[®], modelo Alliance 2695, acoplados a três detectores: um espectrofotométrico UV-Visível, marca Waters[®], modelo 2996 de arranjo de fotodiodos (“Photodiode Array Detector”), um de espalhamento de luz evaporativo (Evaporative Light Scattering Detector), marca Waters[®], modelo 2424 e um espectrômetro de massas, marca Waters[®], modelo ZQ 2000. Os dados foram adquiridos no laboratório do Prof. Roberto Berlinck, no IQSC-USP.

3.7 - Colunas cromatográficas para CLAE

Coluna Monolítica C18 (Phenomenex - modelo Onyx Monolithic C18), com dimensões de 100 x 4,6 mm

Coluna para CLAE Synergi Hydro-RP, com dimensões de 4µm X 2mm X 250mm

3.8 - Espectrômetro de Massas de Baixa Resolução

Os EM, íons precursores e produto foram adquiridos em modo positivo e em unidade de massa de baixa resolução em um espectrômetro de massas Quattro-LC (Micromass) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisadores quadrupolo-quadrupolo. Os dados foram adquiridos na central analítica do departamento de Química Analítica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

3.9 - Espectrômetro de Massas de Alta Resolução

Espectrômetro de massas UltrOTof (Bruker Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo QqToF (analisadores tipo quadrupolo e tempo de voo em sequencia).

3.10 - Equipamentos

Balança Analítica: Mettler Toledo AG 245;

Autoclave Vertical: Quimis Aparelhos Científicos Ltda.;

Evaporador Rotatório: As soluções foram concentradas em evaporador rotatório da Buchi (rotavapor R-114 e waterbath B-840);

Incubadora Rotatória (“Shaker”): Para o cultivo dos fungos endófitos utilizou-se incubadoras rotatórias dos fabricantes Marconi e Tecnal;

Câmara de Fluxo Laminar: Nueire II, A/B3.

3.11 - Seleção, coleta e classificação do material vegetal

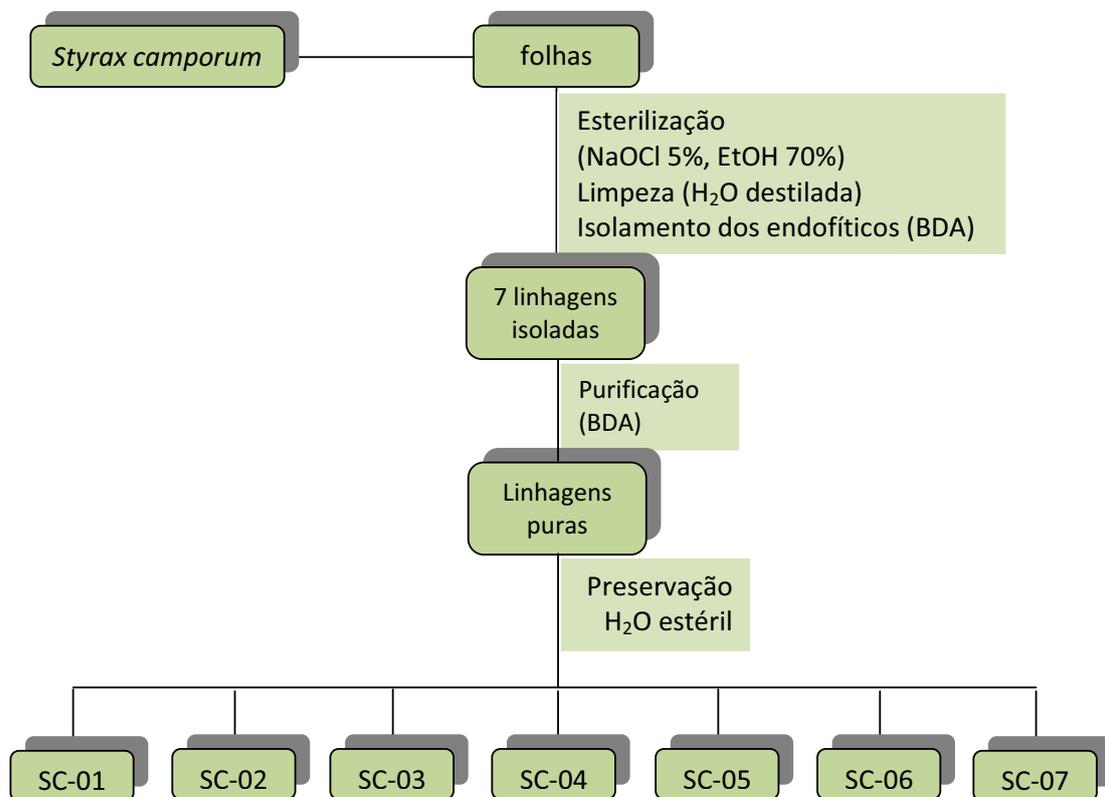
A espécie vegetal *Styrax camporum* foi coletada na região do Cerrado na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, fazenda Campininha/São Paulo, cujos estudos fitoquímicos foram desenvolvidos no NuBBE, e resultaram no isolamento de metabólitos secundários potencialmente antifúngicos, antioxidantes ou anticancerígenos (PAULETTI, et al., 2006). As exsiccatas dos materiais vegetais estão classificadas e depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo.

3.12 - Isolamento do fungo endofítico

As folhas coletadas foram cortadas, e esterilizadas, de acordo com a literatura (MAIER et al., 1997) por imersão em NaClO (1%) por 5 minutos e em etanol 70% por 1 minuto, lavagem 2 vezes em água estéril (10 min) e a seguir 3 a 4 pedaços de folhas 2 x 2 cm foram colocados em placa de Petri (100 mm) contendo meio de cultura sólido BDA (batata dextrose ágar), extrato de malte ágar (EMA) e água ágar (AA), todos contendo Sulfato de Gentamicina (100 µg/mL) para evitar o crescimento de bactérias. A última água de lavagem foi colocada em placa de Petri contendo meio de cultura sólido para verificação da presença de contaminação. As placas foram incubadas a 25 °C durante 3 – 10 dias e, o crescimento dos fungos, foi monitorado diariamente. Logo que os fungos iniciaram o seu crescimento nas placas, pequenos fragmentos de ágar, contendo pontas de hifas de cada fungo, foram transferidos para placas com BDA ou EMA. As culturas impuras foram repicadas sucessivamente até obtenção dos isolados puros. A pureza dos isolados foi determinada pela aparência uniforme nas placas com os meios próprios. Após período de incubação de 7 dias as linhagens obtidas foram separadas, purificadas e preservadas em água estéril. Obtiveram-se 7 colônias puras que receberam os seguintes códigos: SC-01, SC-02, SC-03, SC-04, SC-05, SC-06 e SC-07 (Esquema 1). A sigla SC refere-se ao nome da espécie vegetal (*Styrax camporum*), e o número refere-se à sequência de isolamento. O processo de isolamento e preservação das cepas fúngicas foi realizada pelo Prof. Geraldo Humberto Silva.

Depois de considerados puros, os isolados foram repicados para frascos de 10 mL contendo água estéril, em seguida lacrados e mantidos a temperatura ambiente para a preservação. O fungo endofítico *P. stipata* foi classificado pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning, da Universidade Federal de Lavras, e está depositado como material testemunha SC-04 nas micotecas do Departamento de Química Orgânica/IQAr – SP e do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – MG.

Esquema 1: Obtenção das cepas fúngicas



O fungo escolhido para o desenvolvimento do trabalho foi o SC-04, pelos resultados dos testes de bioatividade *in vitro* (Figura 2) (SORDI, 2007).

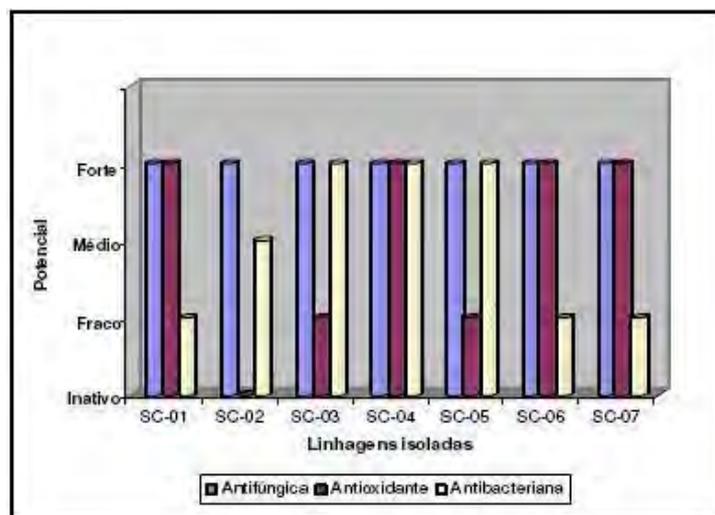


Figura 2: Bioatividade antifúngica, antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos fungos isolados de *Styrox camporum*

3.13 - Cultivos dos endofíticos

Os microorganismos SC-04 preservados em água estéril foram inoculados em meio sólido BDA e monitorados até que suas hifas atingissem 2-3 cm de diâmetro (Figura 3). As linhagens foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme da colônia nas placas.

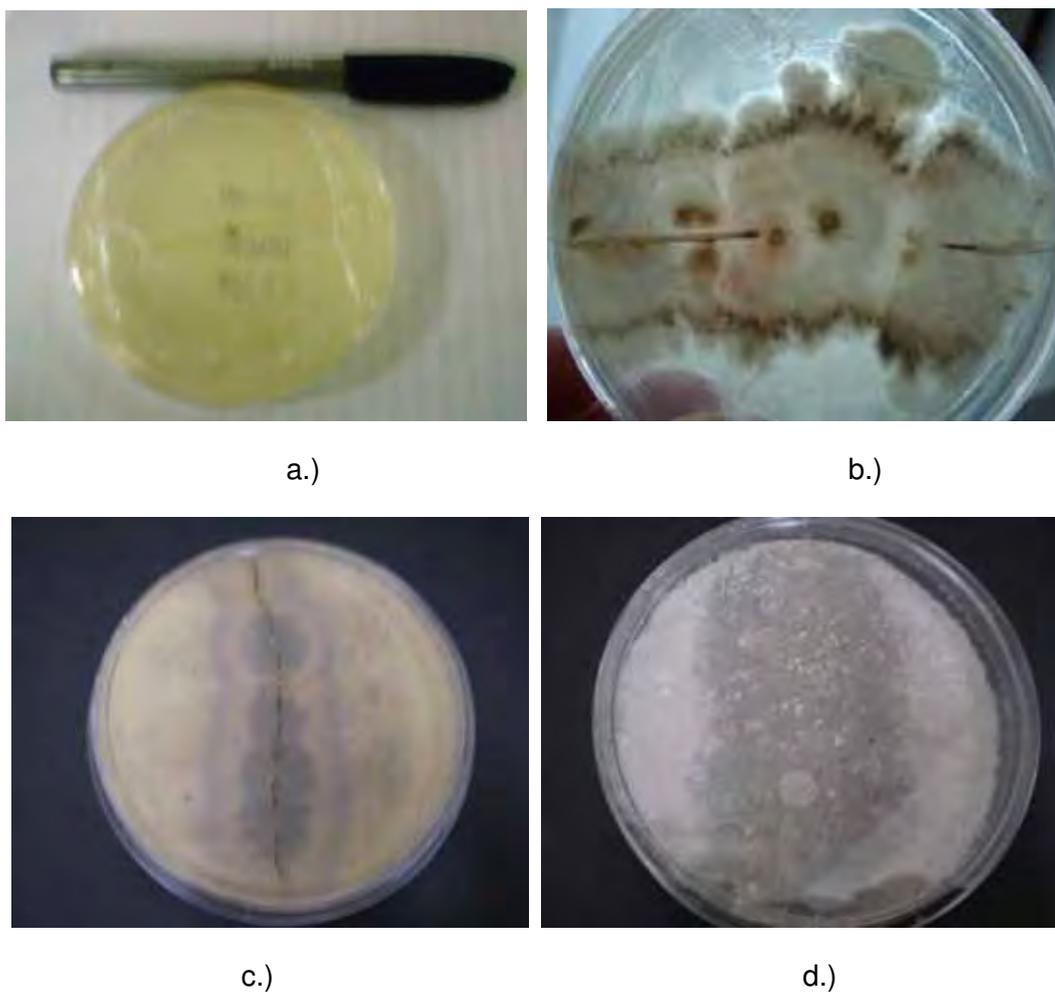


Figura 3: Fases de crescimento do fungo *Phomopsis stipata* a.) inoculação do fungo. b.) 7 dias de cultivo. c.) 12 dias de cultivo. d.) 14 dias de cultivo

3.14 - Preparo, extração e análises das amostras

3.14.1 - Cultivo de *Phomopsis stipata* em meio sólido – Milho

O cultivo de *P. stipata* foi realizado utilizando-se 75 g de milho. A cada recipiente, contendo o meio de cultura não cozido, foram adicionados 80 mL de água estéril e estes foram autoclavados a 121 °C por 20 min, (3x) em um intervalo de 72 horas. O fungo endófito foi inoculado no meio de cultura cozido e já resfriado (Figura 4). Após o período de incubação de 23 dias, procedeu-se à

extração dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos utilizando-se três porções de 400 mL de DCM para cada recipiente com agitações periódicas. Após a extração com DCM, iniciou-se uma extração com AcOEt utilizando-se três porções de 400 mL (Esquema 2). Os solventes orgânicos foram evaporados em evaporador rotatório, fornecendo os extratos brutos MDC (1.330,0 mg), MAC (1.700,5 mg) e MCC (173,1670 mg). O extrato MCC refere-se a um óleo do extrato MAC (AcOEt) insolúvel em MeOH.

Esquema 2: Cultivo do *P. stipata* em milho

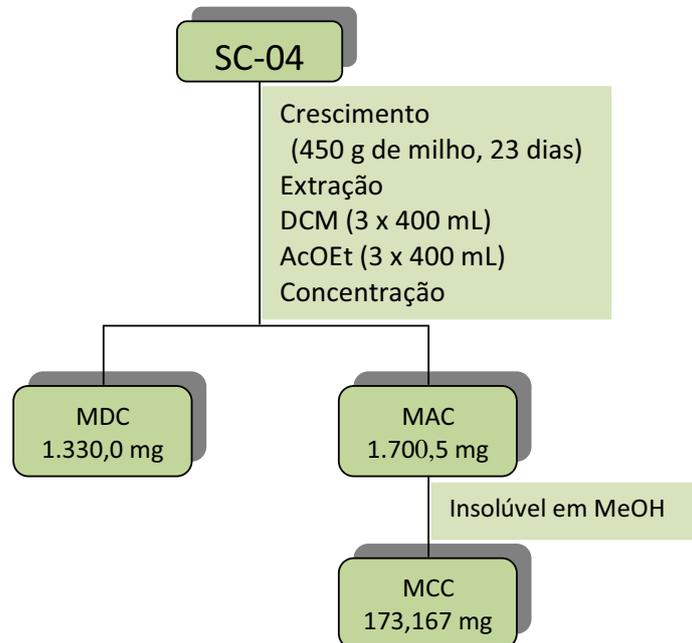


Figura 4: Cultivo de *P. stipata* em milho

3.14.2 - Cultivo de *Phomopsis stipata* em meio líquido – Extrato de Malte

O cultivo do endofítico em extrato de malte foi realizado utilizando-se 20 g/L do extrato de malte. A cada recipiente, contendo o meio de cultura, foram adicionados 200 mL de água estéril e estes foram autoclavados a 121 °C por 20 min (3x) em um intervalo de 72 horas. O fungo endofítico foi inoculado no meio de cultura já resfriado (Figura 5). Os extratos foram separados, sendo 22 recipientes, sob temperatura controlada (25 °C), em modo estático e 11 recipientes mantidos em incubadora rotatória sob temperatura controlada (25 °C). Após o período de incubação de 28 dias, procedeu-se a extração dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos utilizando-se três porções de 100 mL de DCM para cada recipiente com agitações periódicas. Após a extração com DCM, iniciou-se uma extração com AcOEt utilizando-se três porções de 100 mL (Esquema 3). Os solventes orgânicos foram evaporados em evaporador rotatório, fornecendo os extratos brutos EAC (2.384,8 mg), EAE (204,4 mg), EDC (131,5 mg) e EDE (122,4 mg).

Esquema 3: Cultivo de *P. stipata* em extrato de malte

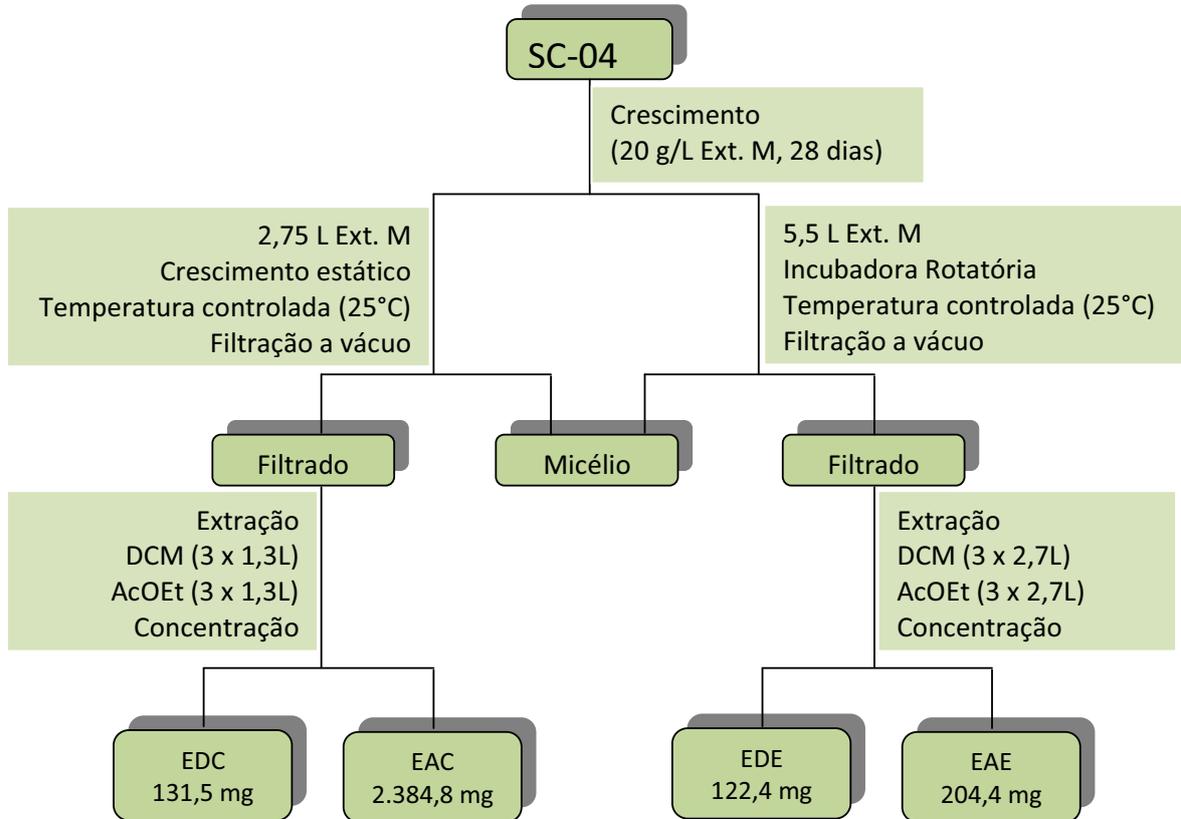
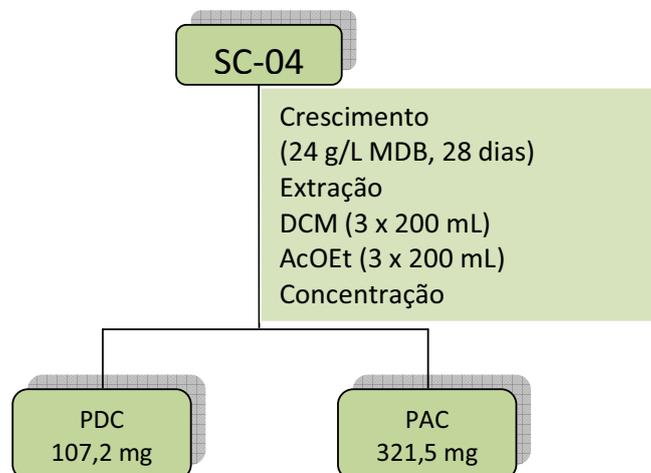


Figura 5: Cultivo de *P. stipata* em extrato de malte

3.14.3 - Cultivo de *Phomopsis stipata* em meio líquido – MDB

O cultivo do endofítico em extrato de malte foi realizado utilizando-se 24 g/L do meio batata dextrose. A cada recipiente, contendo o meio de cultura, foram adicionados 200 mL de água estéril e estes foram autoclavados a 121 °C por 20 min (3x) em um intervalo de 72 horas. O fungo endofítico foi inoculado no meio de cultura já resfriado (Figura 6). Após o período de incubação de 28 dias, procedeu-se a extração dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos utilizando-se três porções de 200 mL de DCM para cada recipiente com agitações periódicas. Após a extração com DCM, iniciou-se uma extração com AcOEt utilizando-se três porções de 200 mL (Esquema 4). Os solventes orgânicos foram evaporados em evaporador rotatório, fornecendo os extratos brutos PDC (107,2 mg) e PAC (321,5 mg).

Esquema 4: Cultivo de *P. stipata* em MDB



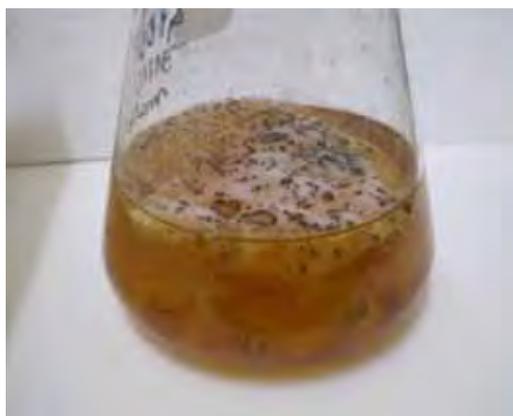


Figura 6: Cultivo de *P. stipata* em MDB

3.15 - Extratos DCM

Para os extratos brutos DCM, devido a alta lipofilicidade e volatilidade, selecionou-se a técnica CG/EM como ferramenta para a análise dos metabólitos majoritários. Foi utilizado um cromatógrafo a gás e temperaturas programadas: 50 °C (3 min) – 50-295 °C (6 °C/min) – 295 °C (15 min).

A partir do cromatograma, as bandas foram selecionadas e seus EM foram gerados. As massas moleculares de baixa resolução encontradas para cada íon majoritário foram comparadas com os dados apresentados na base de dados do DNP e com as bases de dados Willey e Nist, do software *CG Solution*.

3.16 - Extratos AcOEt

Os extratos brutos AcOEt foram submetidos a CLAE-DAD, em gradiente exploratório e testados em diferentes métodos em busca de uma melhor separação. O fluxo utilizado em cada análise foi de 3 mL/min e temperatura de 40°C. As amostras foram preparadas diluindo-se 5,0 mg de resíduo seco em 1 mL de metanol/água ultra pura, distribuídas na mesma proporção da condição inicial da corrida cromatográfica, seguidas de filtração em membrana de PTFE (Sartorius AG, Alemanha) com porosidade de 0,20 µm. Os volumes injetados foram de 20 µl e os

cromatogramas foram observados em 254 nm com detector de arranjo de diodos (DAD).

As análises por CLAE-DAD-EM (CLAE acoplada a DAD e a espectrometria de massas como detectores, em paralelo) e CLAE-DAD-EM/EM, foram realizadas utilizando-se as mesmas condições cromatográficas já descritas. As amostras a serem analisadas também foram preparadas do mesmo modo.

O eluente da coluna foi dividido através de um *splitter* numa proporção 3:1, sendo o fluxo maior direcionado ao DAD e o restante ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas na região de UV gerados pelo DAD foram registrados em 254 nm. Os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre m/z 50 e m/z 1000 e as análises foram feitas no modo de ionização positivo e negativo. Após as análises de CLAE-DAD-EM, as relações m/z e os tempos de retenção obtidos para as bandas cromatográficas de interesse foram submetidos a uma segunda ionização por CLAE-DAD-EM/EM. Ou seja, para a obtenção de espectros de íons produto (EM/EM) a partir de íons precursores desejados foi informado ao software do espectrômetro de massas o m/z de cada íon precursor que deveria ser fragmentado e seu respectivo tempo de retenção.

Os picos cromatográficos foram detectados com base no espectro de massas obtidos para os íons precursores que poderiam ser ânions formados pela perda de H^+ ou adutos aniônicos com Cl^- ou CH_3COO^- , entre outros, ou ainda cátions pela perda de H^+ ou adutos catiônicos com Na^+ ou K^+ , entre outros. Estes dados foram gerados a partir de análises tanto no modo de ionização positiva quanto negativa.

A utilização para cada um dos tipos de dados obtidos e o procedimento para a identificação dos picos ocorreu conforme a necessidade e as informações disponíveis na literatura, e foi conduzida principalmente com base nos resultados de estudos anteriores de *P. stipata* (SORDI, 2007), outras espécies do gênero *Phomopsis* ou ainda por fungos endofíticos.

O seguinte gradiente foi utilizado para as injeções: 3% de MeOH como condição inicial da corrida, permanecendo por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH para o re-equilíbrio da coluna.

Na detecção *in silico*, a análise dos dados obtidos por CLAE-DAD-EM foi realizada utilizando o *software* Bruker Data Analysis versão 3.2 conjugada com a base de dados do dicionário de produtos naturais (<http://dnp.chemnetbase.com>). Na análise foi constatada uma série de metabólitos já isolados em outras espécies de *Phomopsis* (88 substâncias).

As massas de alta resolução das micromoléculas detectadas foram contrastadas com os dados do dicionário de produtos naturais, apenas das moléculas isoladas do gênero *Phomopsis*, ou de fungos endofíticos (endophy*) fornecendo uma série de micromoléculas passíveis de serem encontradas nos extratos estudados.

3.17 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos brutos de *P. stipata*

Os extratos obtidos foram analisados quanto à atividade antioxidante frente ao composto 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH). Quando o radical DPPH, em presença de um antioxidante doador de hidrogênio, passa à sua forma reduzida DPPH-H, o seu elétron desemparelhado deixa de estar em conjugação com os grupos arilas. Nesta forma, o DPPH-H sofre um decréscimo da absorvidade molar em 517 nm e a coloração da solução muda de púrpura para amarela (Figura 7). O resultado é observado por uma curva de concentração da amostra antioxidante pela % ΔA (CARDOSO et al., 2004).

Os testes foram realizados pela bolsista Scheila C.G. Skrzek.

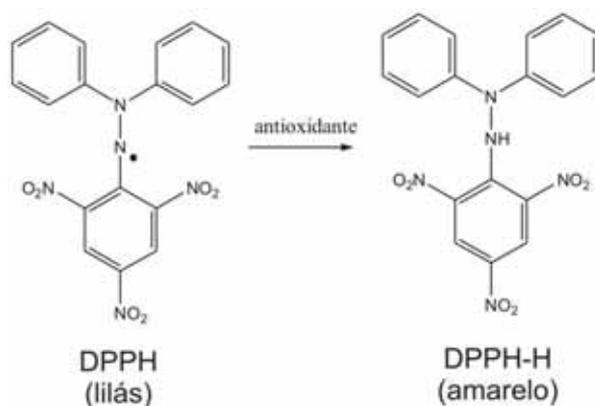


Figura 7: Redução do reagente DPPH

3.18 – Avaliação do potencial com propriedades de inibição da polimerização de heme dos extratos brutos de *P. stipata*

O teste para inibição da polimerização do heme baseia-se na hipótese da presença, no *Plasmodium falciparum*, agente infectante da doença, de uma enzima capaz de polimerizar a hematina livre que se forma no processo de fagocitose realizada pelo parasita na célula infectada. Essa hematina livre, altamente oxidante é capaz de promover a lise da parede celular matando a célula e, por consequência, o parasita. A polimerização do heme livre pelo parasita, forma o pigmento malárico conhecido como hemozoína (EGAN et al, 1994; DORN et al, 1998). O ensaio busca matrizes capazes de impedir a polimerização da hematina e assim possibilitar a morte seletiva do *Plasmodium* (TEKWANI e WALKER, 2005).

Os testes foram realizados pela bolsista Scheila C.G. Skrzek

4- Resultados e discussões

4.1 - Cultivos dos fungos endofíticos

Os perfis cromatográficos dos extratos **EAE** (extrato de malte crescido sob agitação – fração AcOEt), **EAC** (extrato de malte em modo estático – fração AcOEt), **MAC** (milho extração com AcOEt) e **PDB** (MDB – fração AcOEt) foram comparados (Figura 8) e apresentam bandas cromatográficas distintas, devido a diferença dos meios de cultura utilizados para o crescimento do fungo endofítico, evidenciando que a alteração na composição dos meios de cultura provoca variação no metabolismo do fungo.

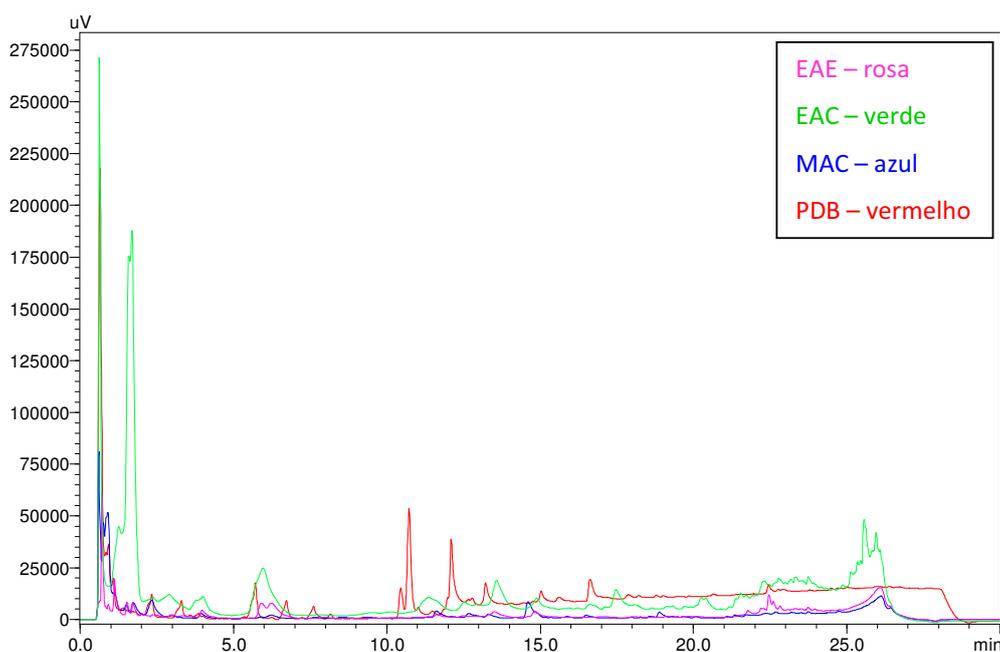


Figura 8: Perfil cromatográfico comparativo dos extratos **EAE**, **EAC**, **MAC** e **PDB** (λ – 254 nm – gradiente exploratório)

O comprimento de onda 300 nm (Figura 9) foi selecionado, por sua maior intensidade das bandas cromatográficas quando comparadas a λ 254 nm, permitindo uma melhor seleção das substâncias de interesse.

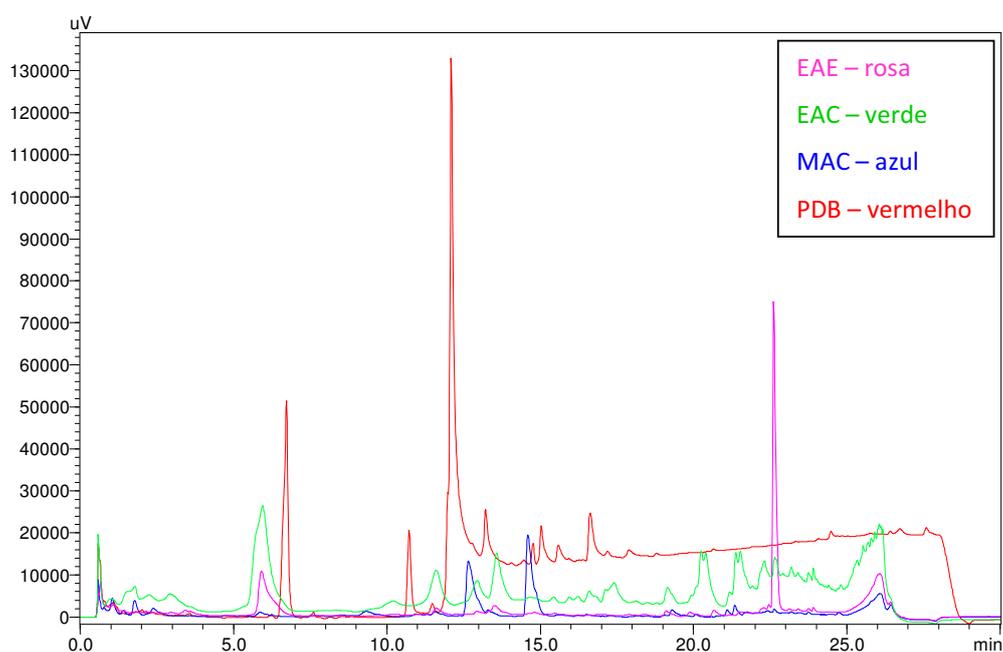


Figura 9: Perfil cromatográfico comparativo dos extratos **EAE**, **EAC**, **MAC** e **PDB** (λ - 300 nm – gradiente exploratório)

A comparação entre os cromatogramas em que o meio de cultura utilizado para o crescimento dos fungos foi o mesmo e apenas o modo de crescimento foi alterado (modo estático e sob agitação), o EAC (modo estático) apresentou uma maior riqueza de substâncias com grupos cromóforos com absorção em 300 nm, revelando uma maior produção de metabólitos quando comparada a EAE (sob agitação) (Figura 10). Porém, ao analisarmos os dois TIC dos extratos (Figura 11), o EAE evidenciou uma maior quantidade de íons, apresentando assim um número maior de metabólitos, destacando-se pela ausência de cromóforos.

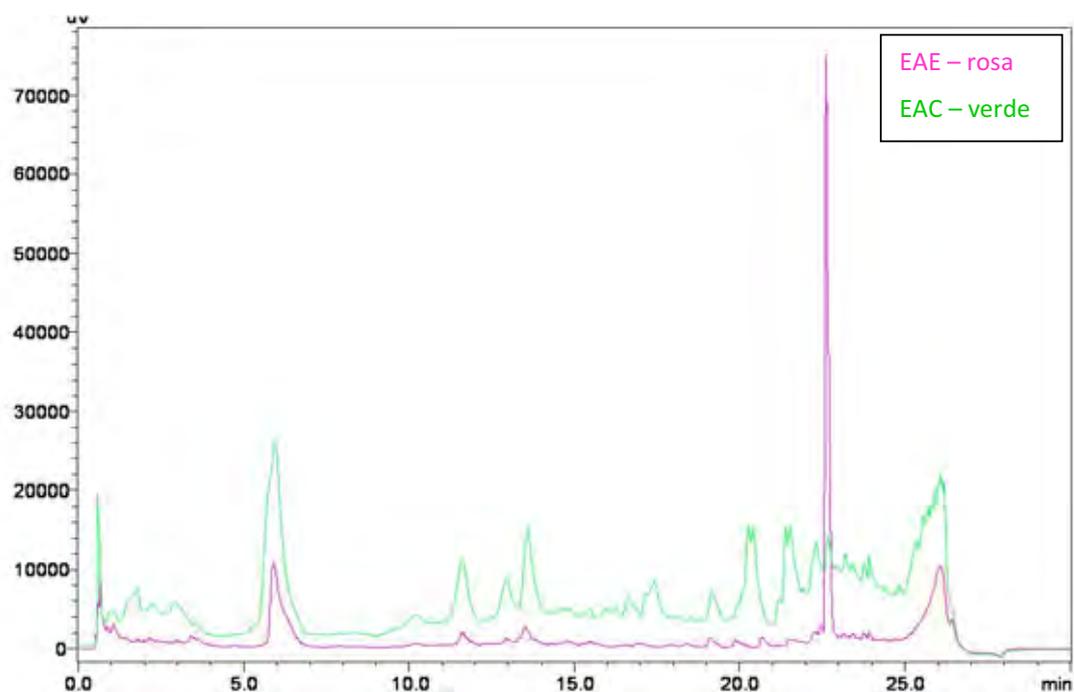


Figura 10: Comparação entre os extratos EAE e EAC (λ – 300 nm - gradiente exploratório)

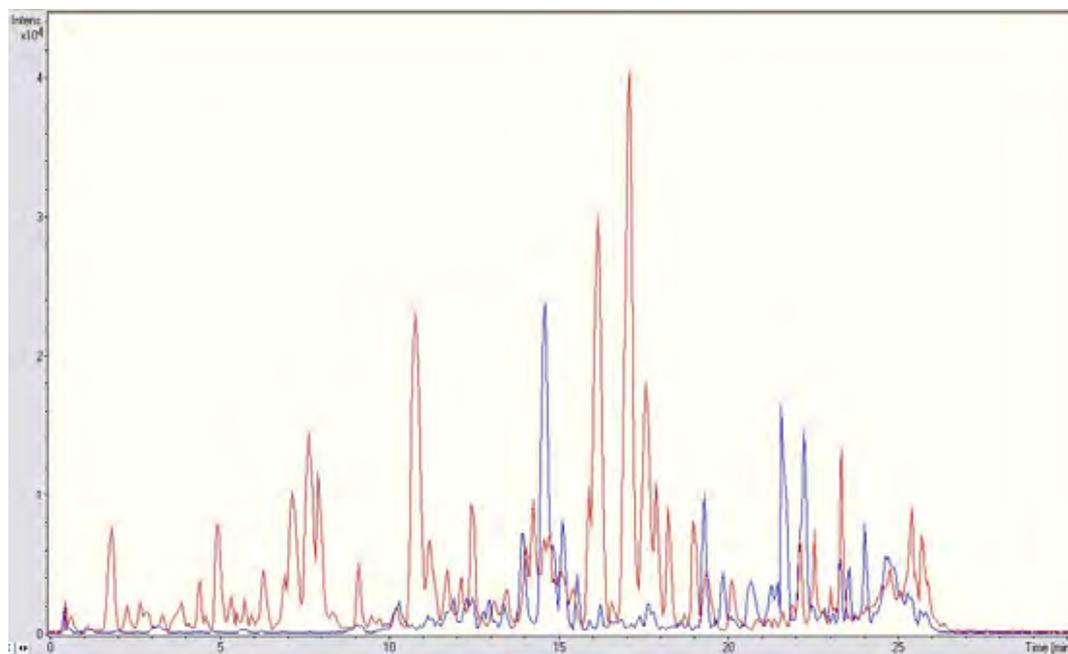


Figura 11: TIC comparativo dos extratos EAE (vermelho) e EAC (azul)

4.2 – Análise dos metabólitos presentes em MDC

O extrato diclorometânico cultivado em milho (MDC) de *P. stipata* (2,5 mg) foi analisado via CG-EM, gerando o cromatograma da figura 12. Quando o espectro de massas das bandas cromatográficas majoritárias, foi comparado às bases de dados (NIST e WILLEY) do programa *GC-MS Postrum Analysis*, as substâncias foram detectadas, nos seguintes tempos de retenção: **1**- 12,75 min – derivado γ -lactônico; **2**- 26,8 min – ácido *n*-hexadecanóico; **3**- 29,4 min – ácido 16-octadecenóico, **4**- 32,7 min – di-hexanoato de 2-etil-hexila e **5**- 34 min – hexadecanoato de iso-propil.

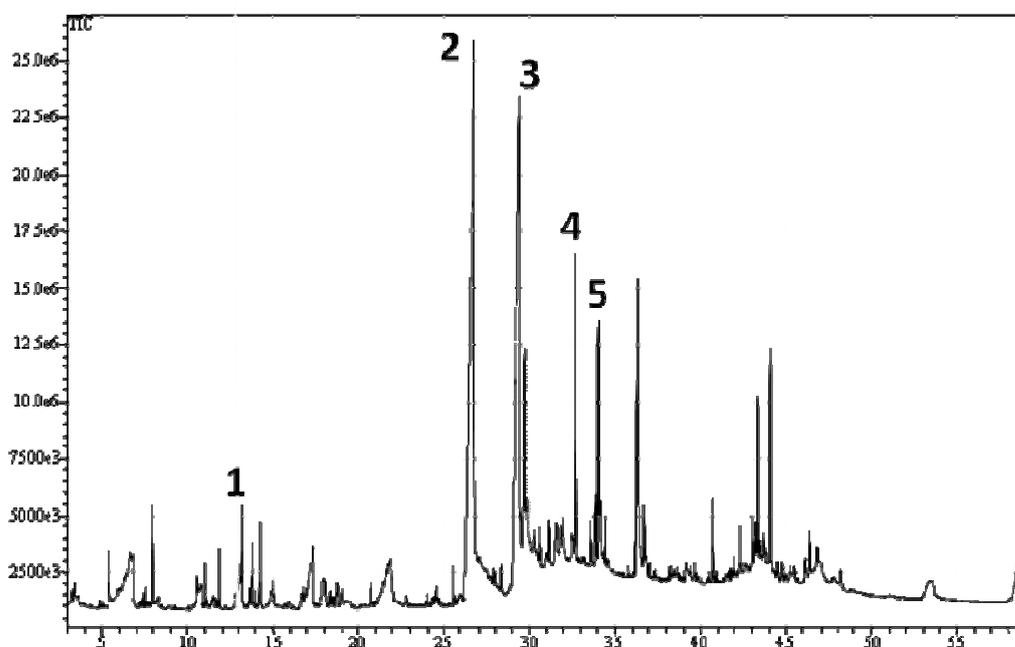


Figura 12: Cromatograma gasoso do extrato MDC – temperaturas programadas: 50 °C (3 min) – 50-295 °C (6 °C/min) – 295 °C (15 min)

A massa molecular detectada foi de m/z 268, onde o seu espectro de massas (Figura 13) refere-se a **1**- derivado γ -lactônico.

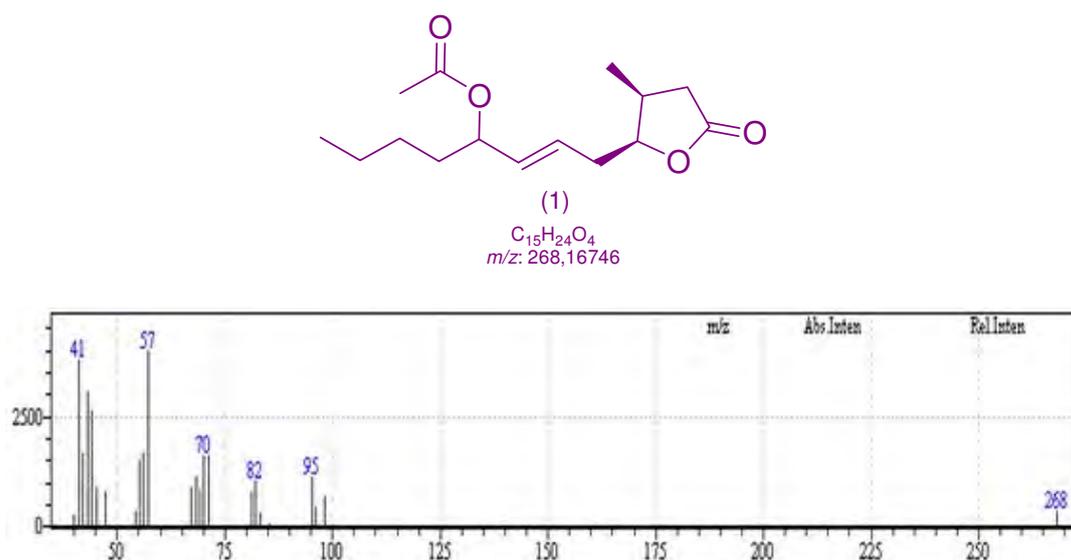


Figura 13: Fragmentograma do íon m/z 268 observado a 12,75 min

Para o derivado γ -lactônico foi possível estabelecer um padrão de fragmentação que justifica a presença dos íons: m/z 71, 57 e 43 (Figura 14). Para o íon m/z 43 foi proposta a formação de um íon acílio. O íon m/z 57 foi justificado pela quebra do íon butílio e uma transferência 1,2 hidreto, formando um carbocátion secundário mais estável. Para o íon m/z 71 foi proposta uma quebra da cadeia alquílica seguida de uma contração do anel γ -lactônico, com perda de CO. Através desta abordagem podemos sugerir a presença deste derivado no extrato de MDC.

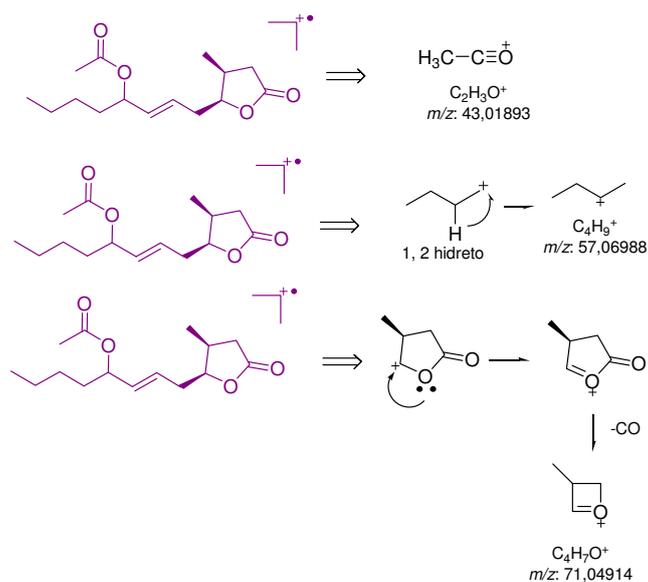


Figura 14: Proposta de fragmentação para os íons m/z : 71, 57 e 43 no derivado γ -lactônico

O espectro de massas no tempo de retenção 26,8 min (Figura 15), quando comparado com a base de dados NIST, mostrou uma similaridade com o espectro de massas do ácido *n*-hexadecanóico (Figura 16). A substância detectada para este tempo de retenção, foi **2-** ácido *n*-hexadecanóico, com m/z 256 (Figura 17).

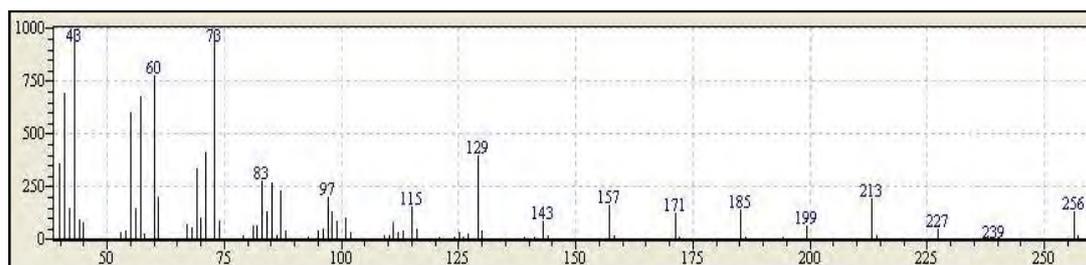


Figura 15: EM no tempo de retenção 26,8 min

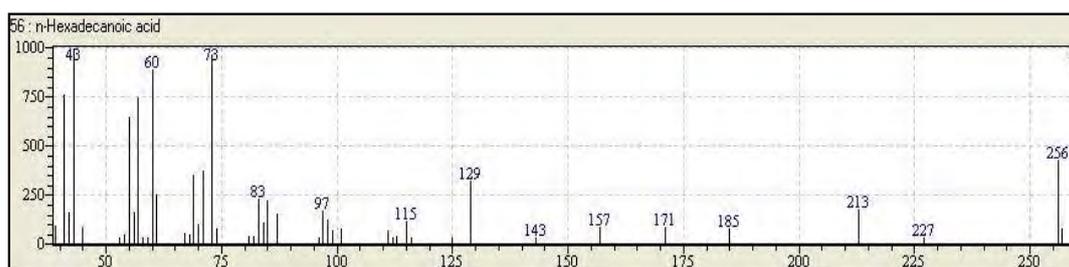


Figura 16: Espectro de massas do ácido *n*-hexadecanóico (NIST)

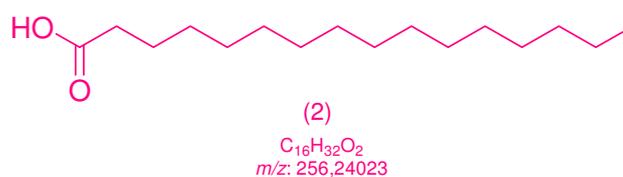


Figura 17: Substância detectada no tempo de retenção 26,8 min – ácido *n*-hexadecanóico

Alguns fragmentos (73, 129 e 213) foram propostos (Figura 18). Os íons formados foram produtos de quebras da cadeia alifática.

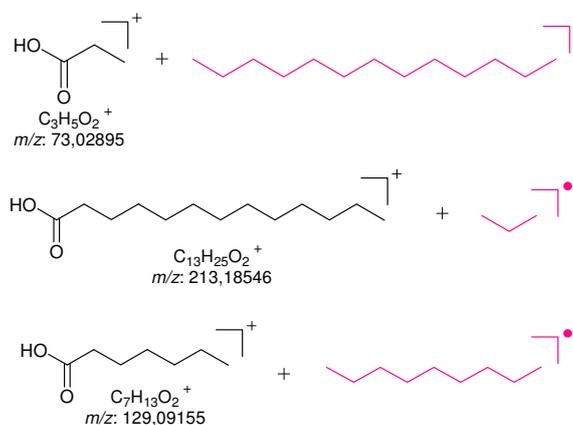


Figura 18: Proposta de fragmentação para o ácido *n*-hexadecanóico

Assim como mostrado acima, os demais espectros de massas dos tempos de retenção citados foram comparados às bases de dados NIST ou WILLEY. No tempo de retenção 29,4 min o espectro de massas (Figura 19) mostrou-se semelhante ao

espectro de massas (Figura 20) da substância com m/z 282, **3**- ácido 16-octadecenóico (Figura 21).

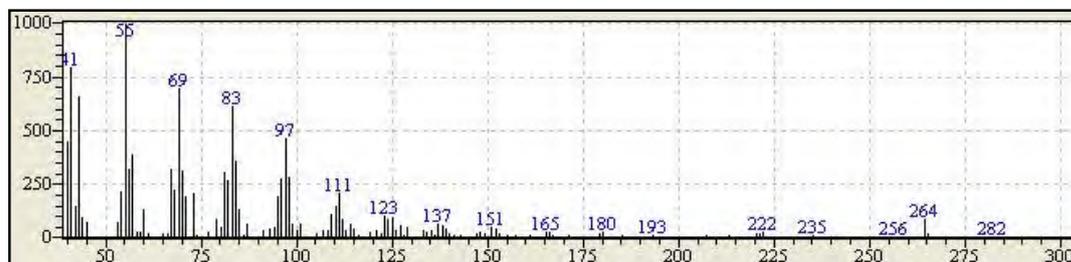


Figura 19: EM no tempo de retenção 29,4 min

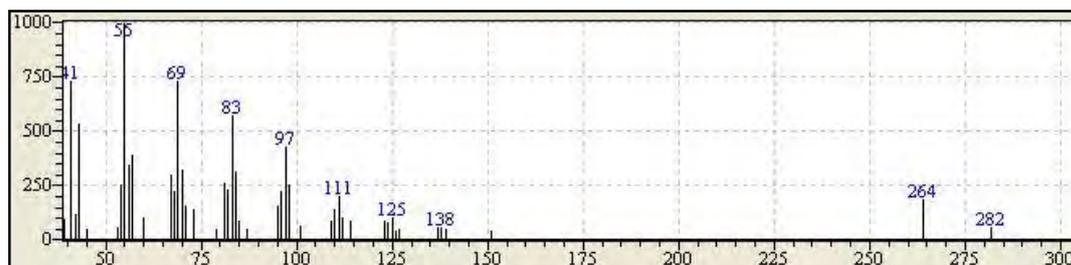


Figura 20: Espectro de massas do ácido 16-octadecenóico

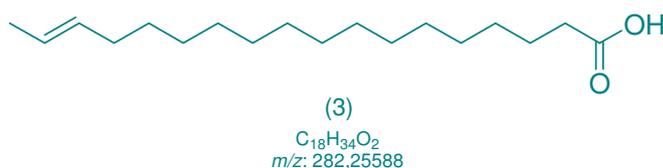


Figura 21: Substância detectada no tempo de retenção 29,4 min – ácido 16-octadecenóico

Alguns de seus fragmentos foram propostos por quebras na cadeia alifática (Figura 22).

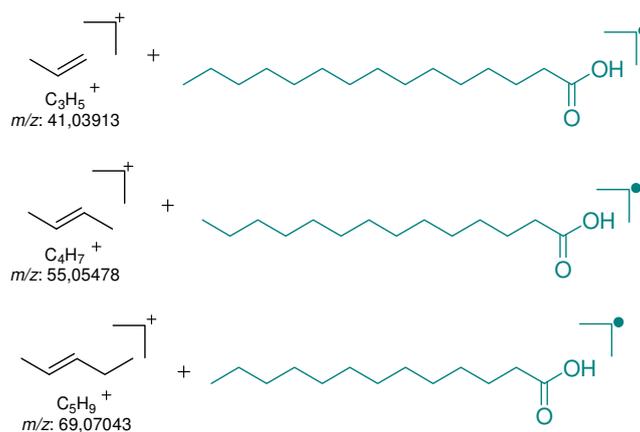


Figura 22: Proposta de fragmentação para o ácido 16-octadecênico

No tempo de retenção 32,7 min, o espectro de massas (Figura 23) foi contrastado com a base de dados NIST e apresentou uma similaridade com o espectro de massas de 4- di-hexanoato de 2-etil-hexila. (Figura 24-25).

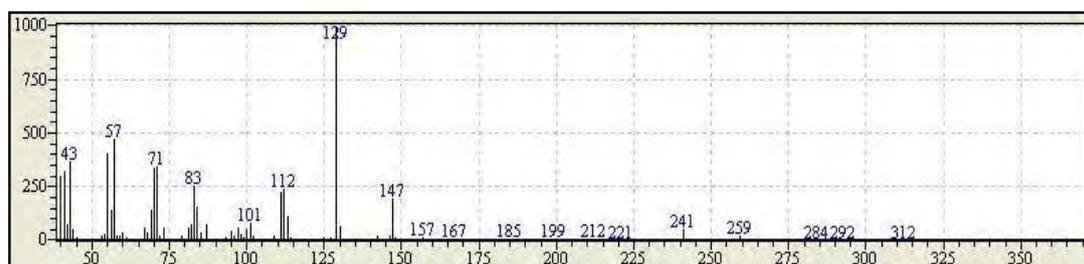


Figura 23: EM no tempo de retenção 32,7 min

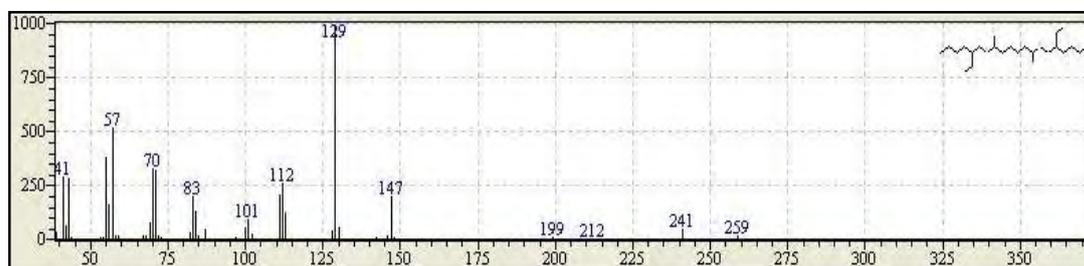


Figura 24: Espectro de massas do di-hexanoato de 2-etil-hexila

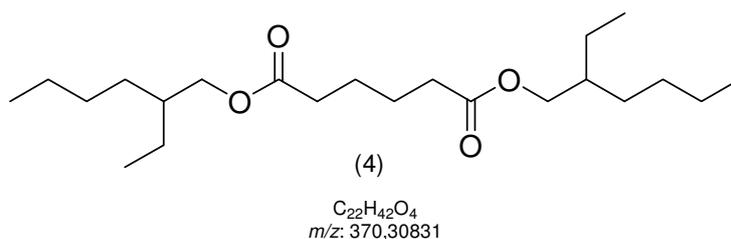


Figura 25: Substância detectada no tempo de retenção 32,7 min – di-hexanoato de 2-etil-hexila

Alguns dos fragmentos (57, 129 e 241) foram propostos (Figura 26). O íon m/z 57 foi justificado pela quebra do íon butílio seguida de transferência 1,2 hidreto, formando o carbocátion secundário mais estável. O íon m/z 129 foi justificado pela quebra de um éster. Para o íon m/z 241 foi proposta a formação de um íon acílio, como intermediário com subsequente perda de CO (McLAFERTY, 1980)..

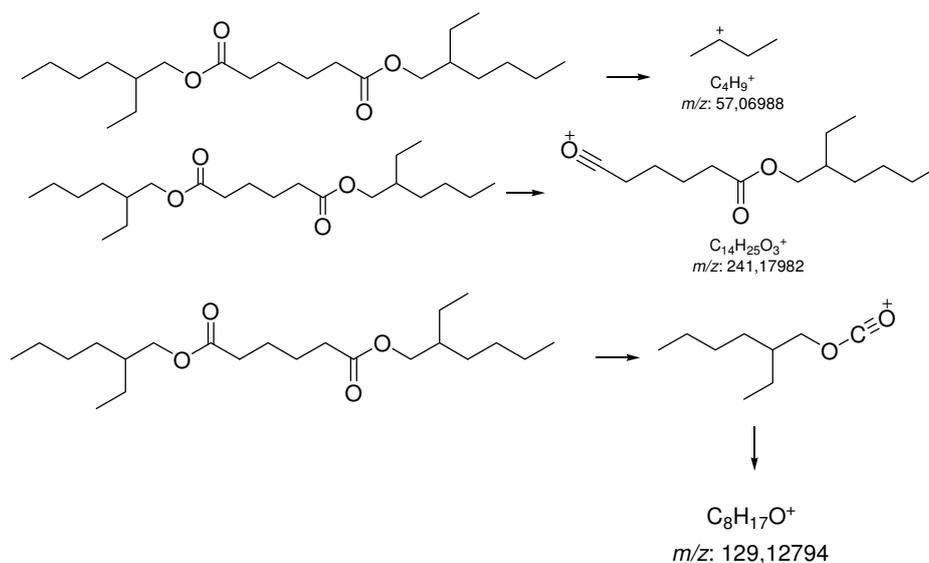


Figura 26: Proposta de fragmentação para o di-hexanoato de 2-etil-hexila

No tempo de retenção 34 min o espectro de massas (Figura 27) mostrou-se semelhante ao espectro de massas (Figura 28) da substância com m/z 330, 5-hexadecanoato de iso-propilodiol(Figura 29).

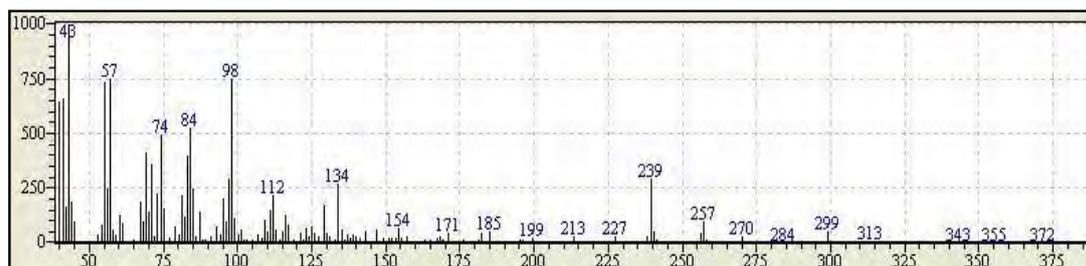


Figura 27: EM no tempo de retenção 34 min

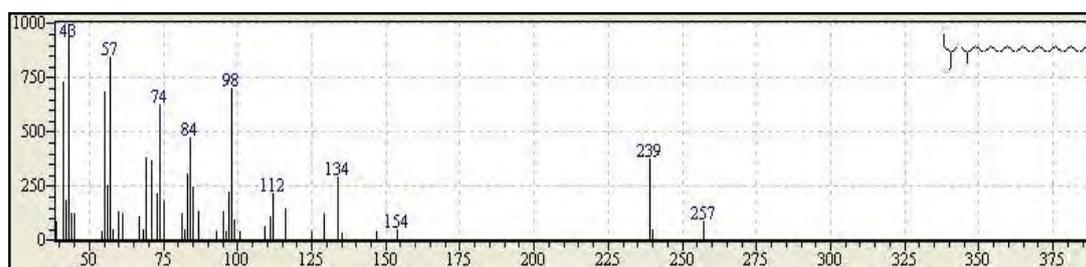


Figura 28: Espectro de massas do hexadecanoato de iso-propilidol

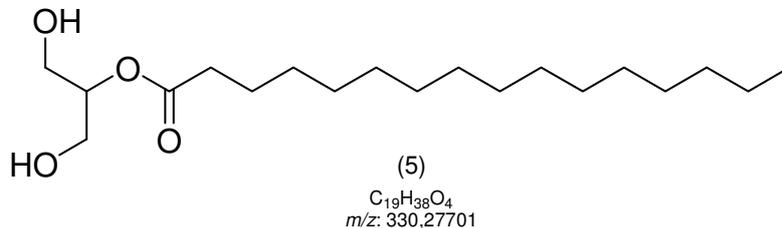


Figura 29: Substância detectada no tempo de retenção 34 min – hexadecanoato de iso-propilidol

Para o hexadecanoato de iso-propilidol foi possível estabelecer um padrão de fragmentação que justifica os íons: m/z 239, 134, 74 e 57 (Figura 30). Para o íon m/z 239 foi proposta a formação de um íon acílio. O íon m/z 134 foi justificado através de um rearranjo de McLafferty. Para o íon m/z 74 foi proposto também um rearranjo de McLafferty. O íon m/z 57 foi justificado pela quebra do íon butílio e uma transferência 1,2 hidreto, formando um carbocátion secundário mais estável.

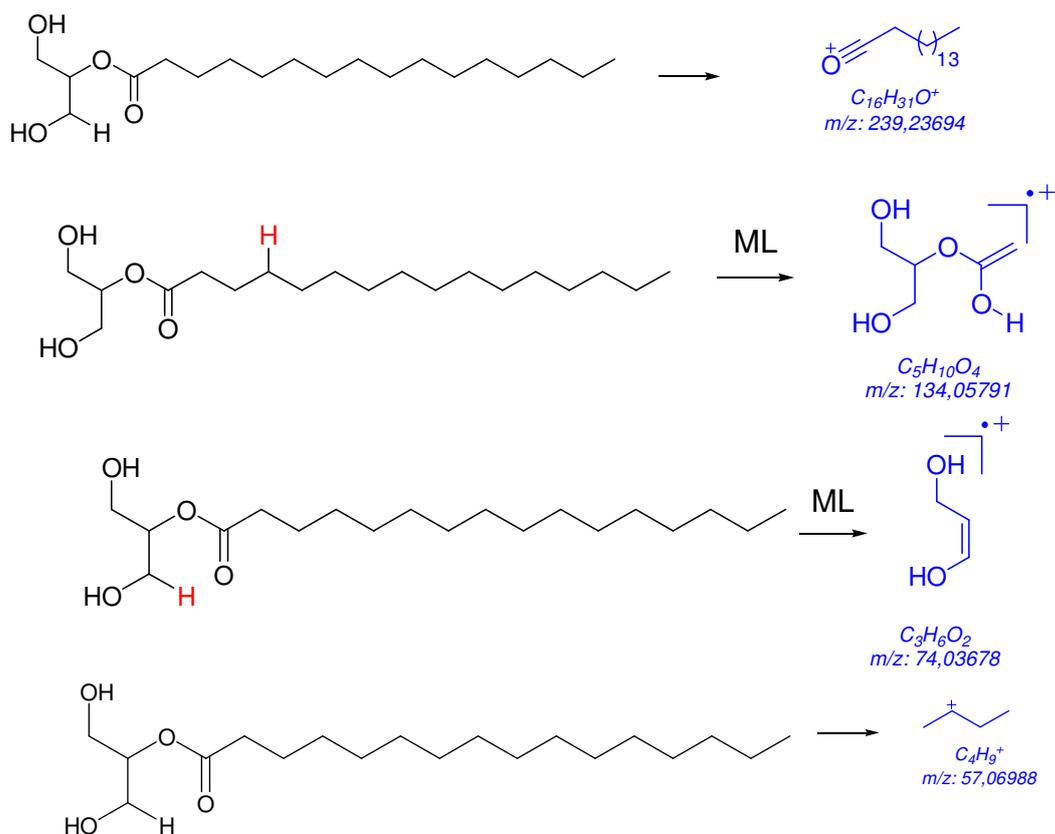


Figura 30: Proposta de fragmentação para o hexadecanoato de iso-propilidolol

4.3 – Análise dos metabólitos presentes em PDC

O extrato diclorometânico cultivado em MDB (PDC) de *P. stipata* (2,5 mg) foi analisado via CG-EM, gerando o cromatograma da figura 31. Quando o espectro de massas gerado é comparado às bases de dados (NIST e WILLEY) do programa *GC-MS Postrum Analysis*, as substâncias detectadas, nos seguintes tempos de retenção, foram: **6-** 22,5 min – ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona; **7-** 24,2 min hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzil e **8-** 31,1 min – hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometil.

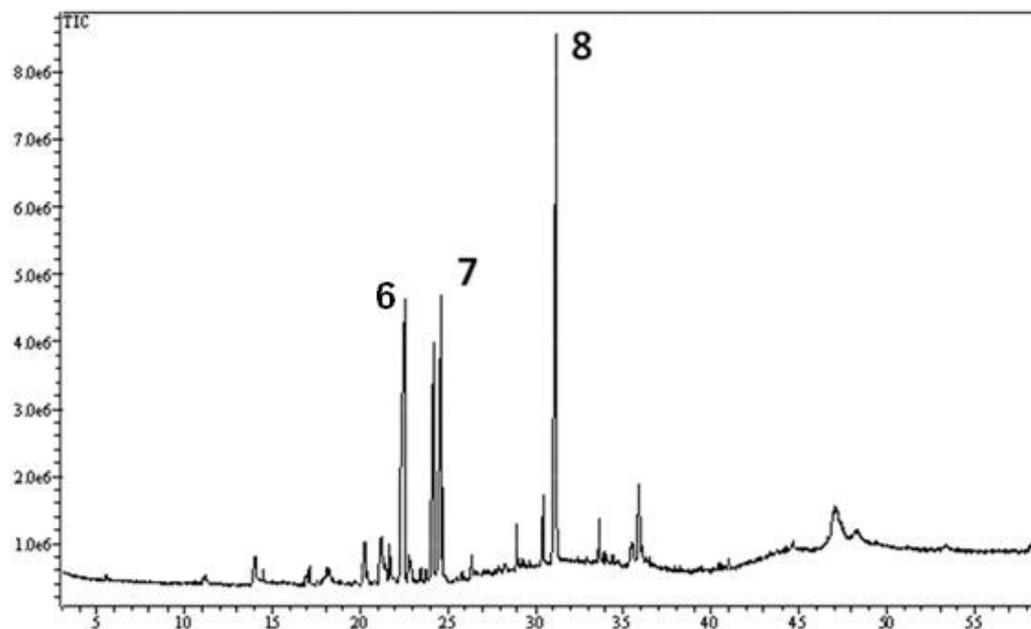


Figura 31: Cromatograma gasoso do extrato PDC – temperaturas programadas: 50 °C (3 min) – 50-295 °C (6 °C/min) – 295 °C (15 min)

Assim como nos outros extratos brutos, os espectros de massas dos tempos de retenção citados foram comparados às bases de dados NIST ou WILLEY. No tempo de retenção 22,5 min o espectro de massas (Figura 32) mostrou-se semelhante ao espectro de massas (Figura 33) da substância com m/z 154, **6-ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona** (Figura 34).

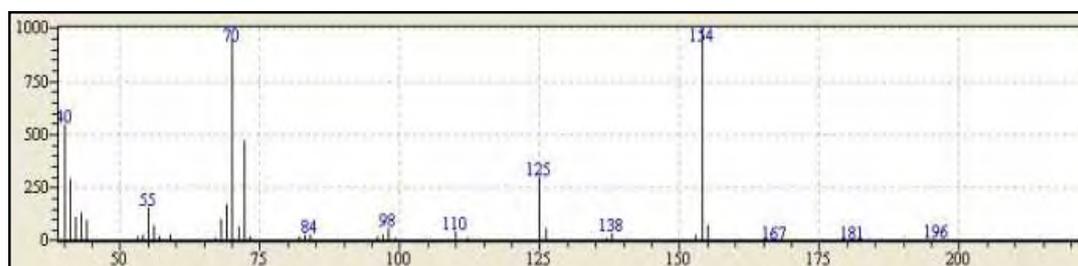


Figura 32: EM no tempo de retenção 22,5 min

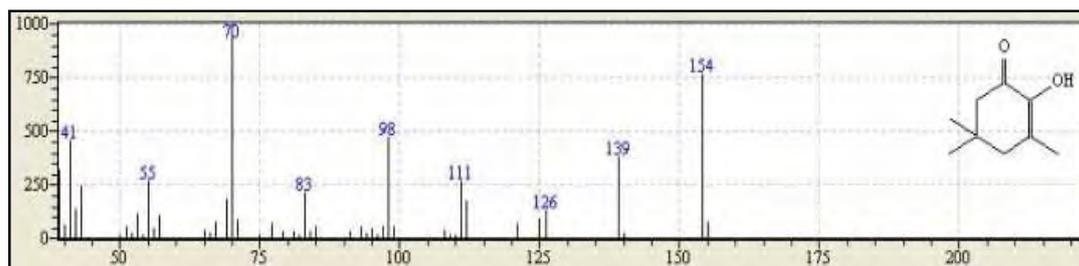


Figura 33: Espectro de massas do ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona

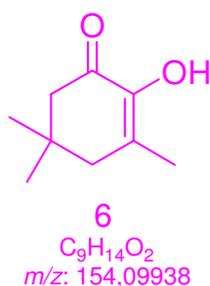


Figura 34: Substância detectada no tempo de retenção 22,5 min – ciclohexen-2-ol-3,5,5-trimetil-ona

Para a substância acima foi possível estabelecer um padrão de fragmentação que justifica os íons: m/z 139, 98 e 71 (Figura 35). O íon m/z 139 foi justificado pela perda de uma metila (Figura 36). Uma retro-Diels-Alder foi proposta, justificando o íon m/z 98 (Figura 37). Para o íon m/z 71, um rearranjo de McLafferty seguido da formação de um íon acílio (BOWIE, 1965).

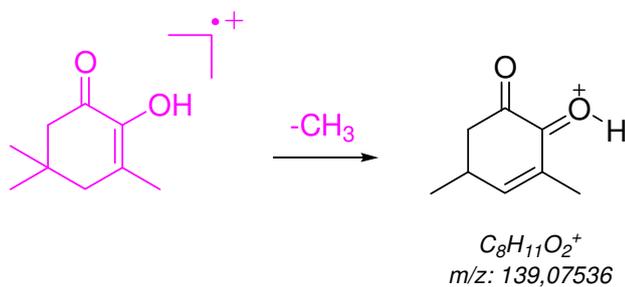


Figura 35: Proposta de fragmentação para o íon m/z 139

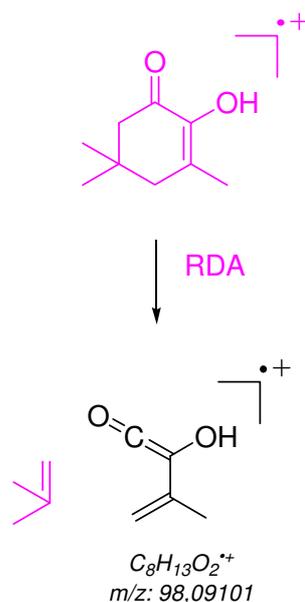


Figura 36: Proposta de fragmentação para o íon m/z 98

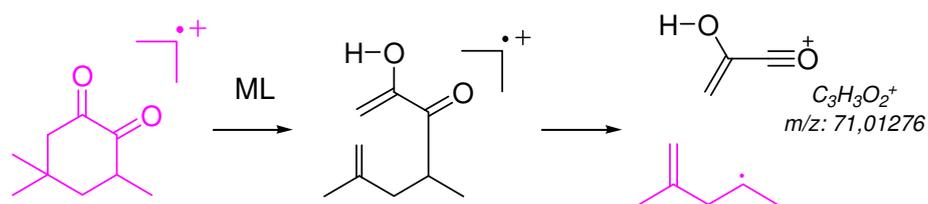


Figura 37: Proposta de fragmentação para o íon m/z 71

No tempo de retenção 24,2 min o espectro de massas (Figura 38) mostrou-se semelhante ao espectro de massas (Figura 39) da substância com m/z 210, 7-hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometila. (Figura 40).

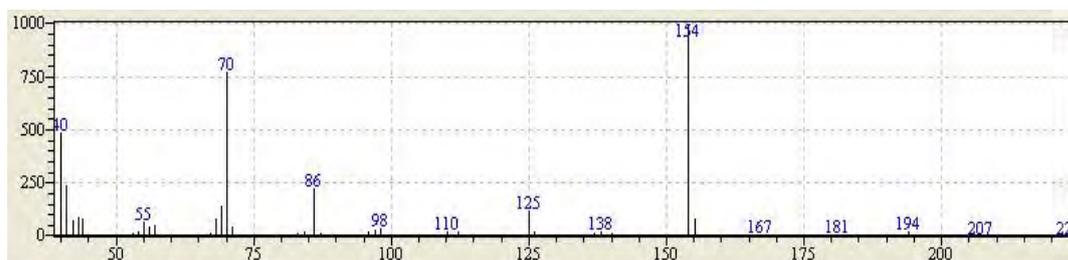


Figura 38: EM no tempo de retenção 24,2 min

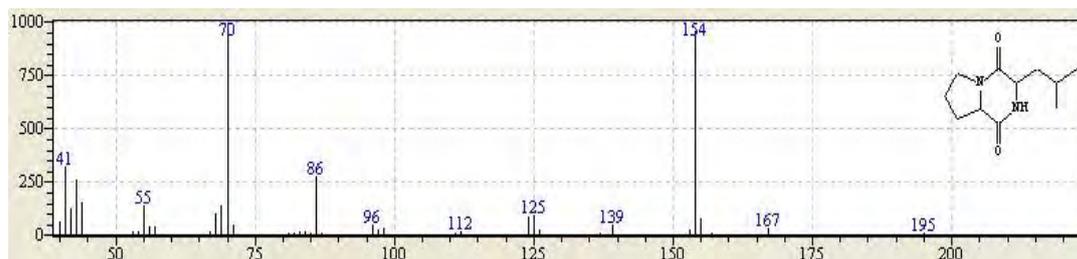


Figura 39: Espectro de massas do hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometila

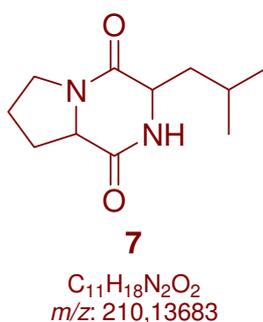


Figura 40: Substância detectada no tempo de retenção 24,2 min – hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometila

Para a substância hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-isometila foi possível estabelecer um padrão de fragmentação que justifica os íons: m/z 154 e 70. Através do Rearranjo de McLafferty, ocorreu a formação do íon pirazinônio, com m/z 154 (Figura 41). A partir do íon m/z 154 encontrado, ocorreu uma contração de anel seguida de perda de CO e formação de um íon pirrólio (Figura 42).

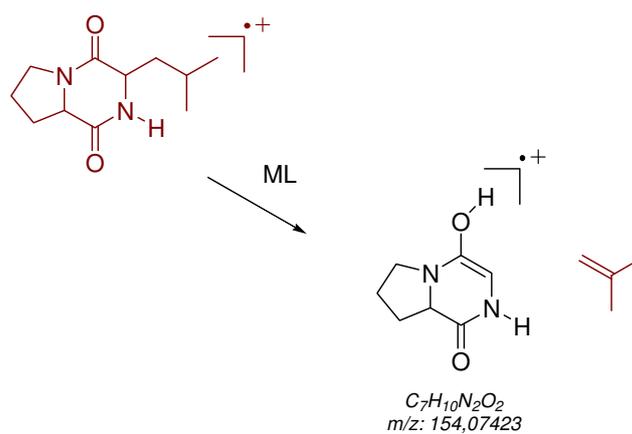


Figura 41: Proposta de fragmentação para o íon m/z 154

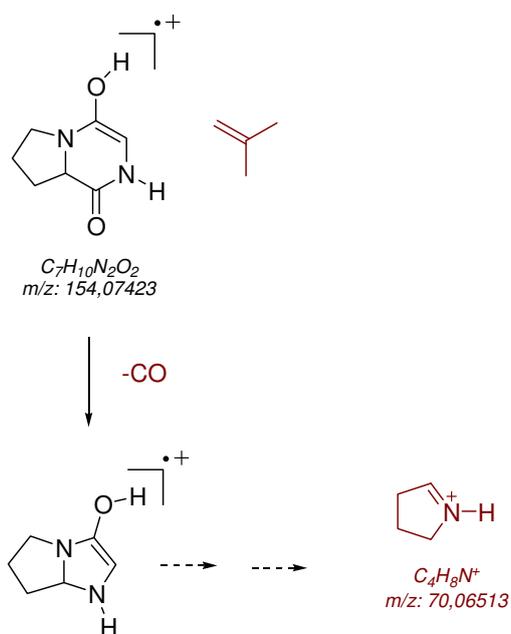


Figura 42: Proposta de fragmentação para o íon m/z 70

No tempo de retenção 31,1 min o espectro de massas (Figura 43) mostrou-se semelhante ao espectro de massas (Figura 44) da substância com m/z 244, **8-hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzila** (Figura 45).

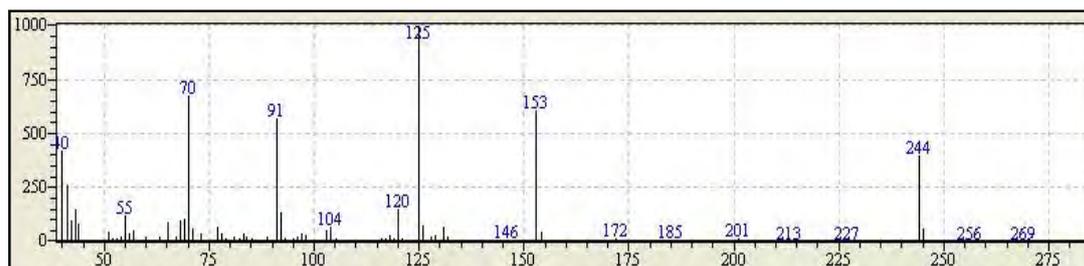


Figura 43: EM no tempo de retenção 31,1 min

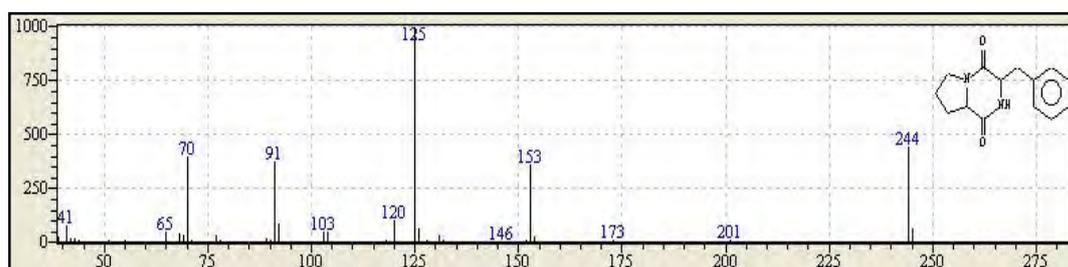


Figura 44: Espectro de massas do hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzila

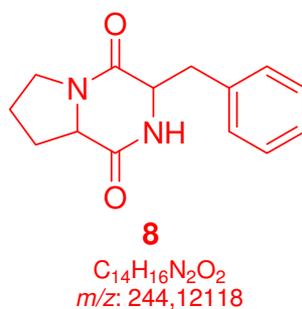


Figura 45: Substância detectada no tempo de retenção 31,1 min – hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzila

O padrão de fragmentação que justifica os íons *m/z* 153, 125 e 91 foi estabelecido para a substância hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona-3-benzila. Ocorreu uma quebra homolítica e clivagem benzílica para a formação do íon pirazínio justificando o íon *m/z* 153 (Figura 46). A partir do íon pirazínio, houve uma

contração do anel e perda de CO e o íon m/z 125 foi justificado (Figura 47). Para o íon m/z 91, uma quebra levou a formação do íon tropílio (Figura 48).

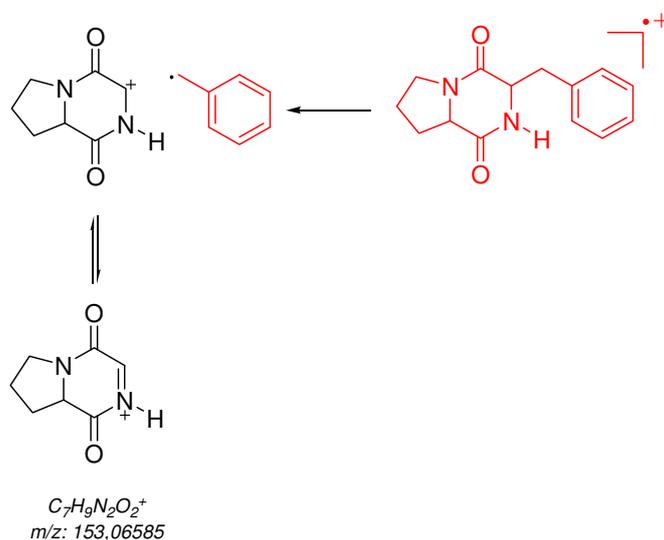


Figura 46: Proposta de fragmentação para o íon m/z 153

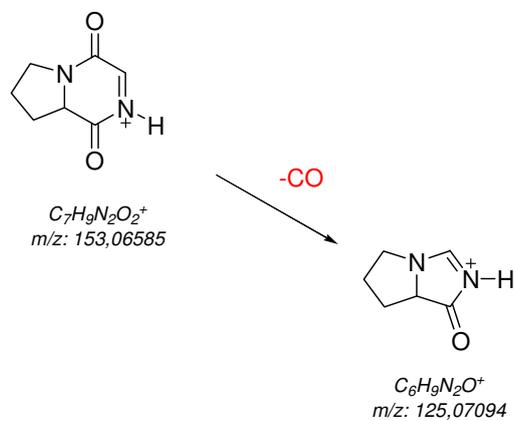


Figura 47: Proposta de fragmentação para o íon m/z 125

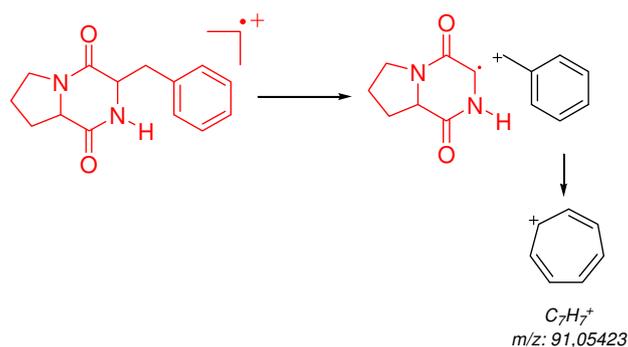


Figura 48: Proposta de fragmentação para o íon m/z 91

4.4 – O extrato EAC

Para análise do extrato EAC, pertencente ao extrato do fungo de *P. stipata* crescido em extrato de malte em modo estático (fração acetato de etila), foi selecionada a cromatografia líquida de alta eficiência. O cromatograma não apresentou bandas intensas quando observadas a 254 nm (Figura 49), o que revela, provavelmente, a ausência de cromóforos que absorvem nesse comprimento de onda. No comprimento de onda de 300 nm (Figura 50), algumas bandas, relativas à substâncias que absorvem no comprimento de onda observado, foram mais intensas. O gênero *Phomopsis* contém quimiotipos cuja característica principal é a ausência de grupos cromofóricos. Esses dados corroboram com o uso da base de dados do dicionário de produtos naturais (DNP).

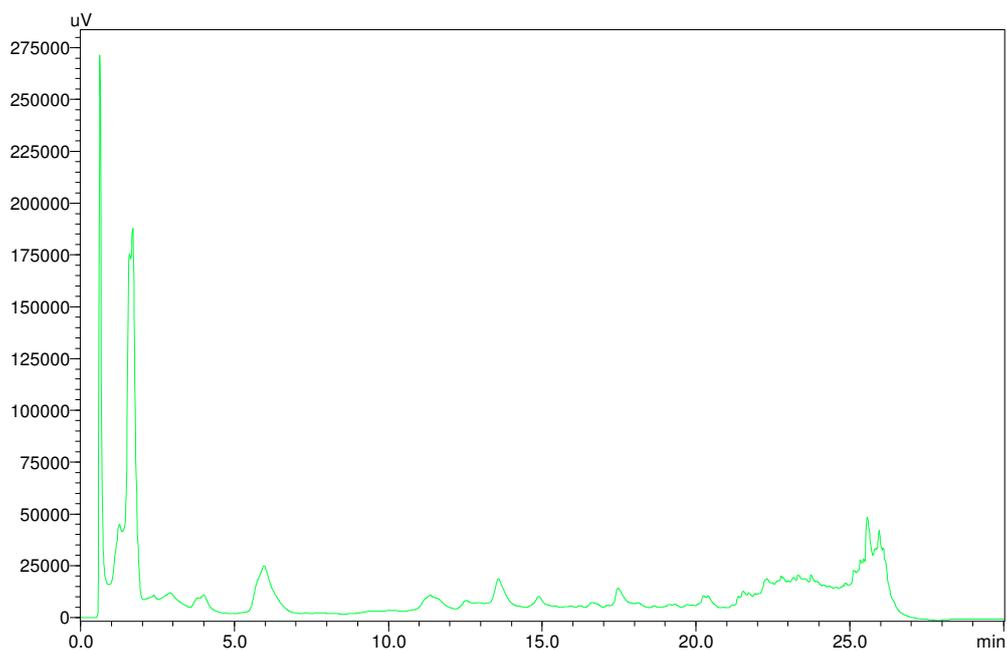


Figura 49: Cromatograma do extrato EAC (254 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH

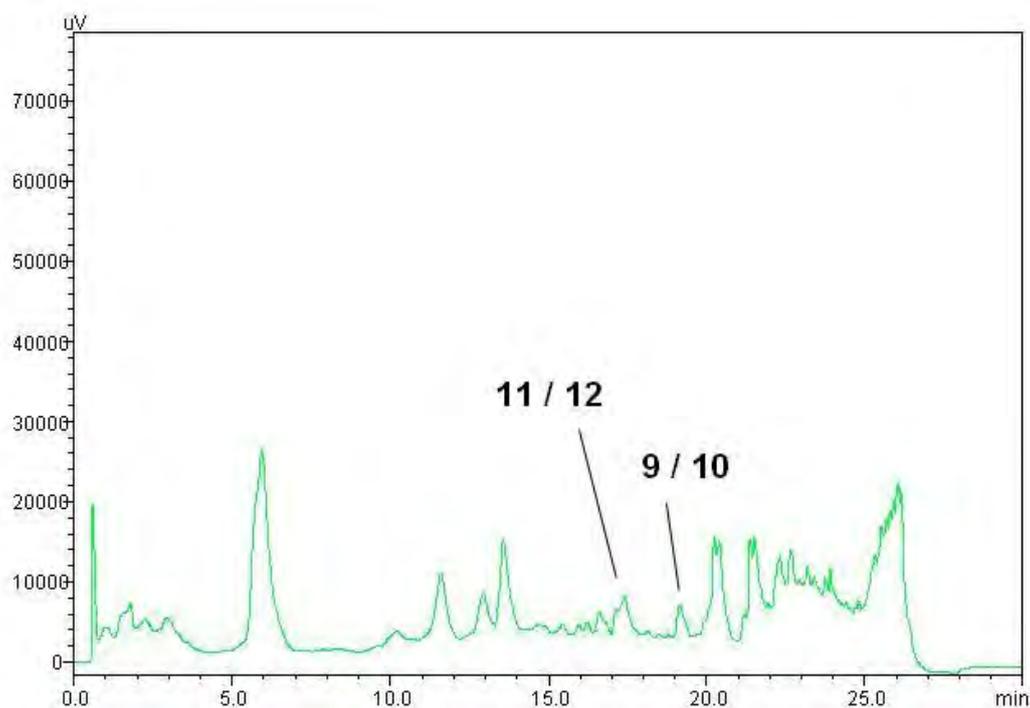


Figura 50: Cromatograma do extrato EAC (300 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH

Nos cromatogramas totais de íons (TIC) realizados tanto no modo positivo como no negativo, podem ser observadas uma maior quantidade de bandas. Aquelas mais intensas foram escolhidas para a geração dos seus respectivos fragmentogramas. A presença de uma intensidade maior de íons no modo positivo pode ser justificada pelas condições cromatográficas usadas durante a análise. A presença de ácido na fase móvel proporciona um favorecimento de espécies catiônicas (LOPES, et al, 2006) (Figura 51).

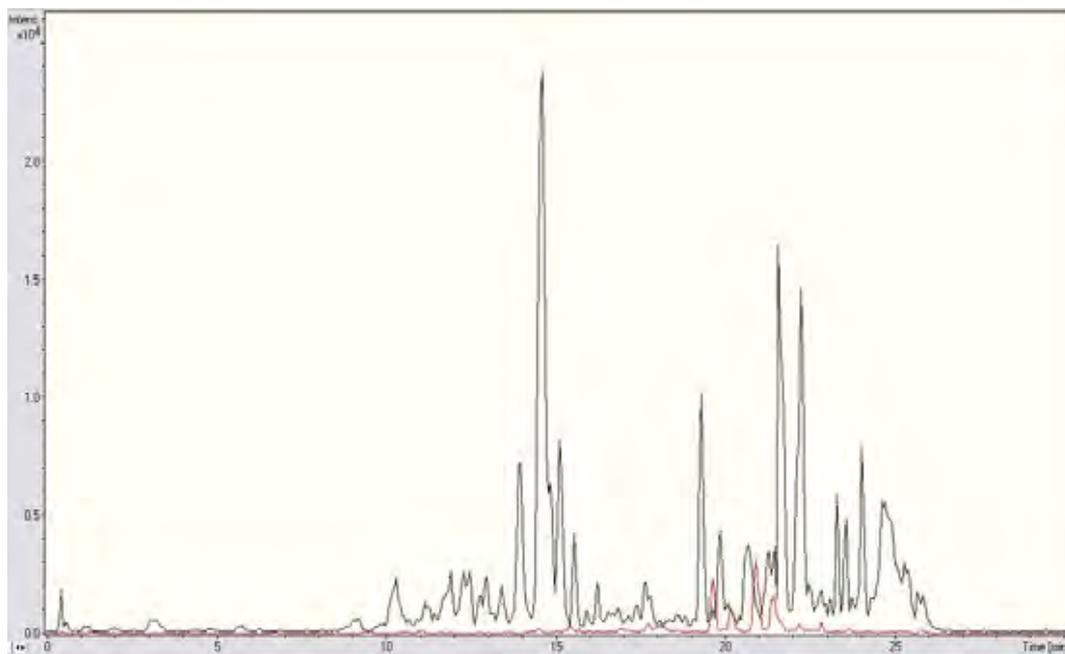


Figura 51: Comparação entre os TIC positivo (preto) e negativo (vermelho)

4.5 - Análise dos metabólitos presentes em EAC

Iniciamos a análise dos íons majoritários fazendo um cruzamento dos dados de massa de alta resolução com aqueles compilados da base de dados do dicionário de produtos naturais (DNP), exclusivamente para o gênero *Phomopsis*. A análise de cada molécula detectada será relatada a seguir:

TEMPO DE RETENÇÃO – 19,3 min

O fragmentograma, referente à banda observada a 19,3 min, (Figura 52) apresentou um pico base com relação m/z : 331,28258. Após análise *in silico* concluímos que essa massa é compatível com um aduto $[M+H]^+$.

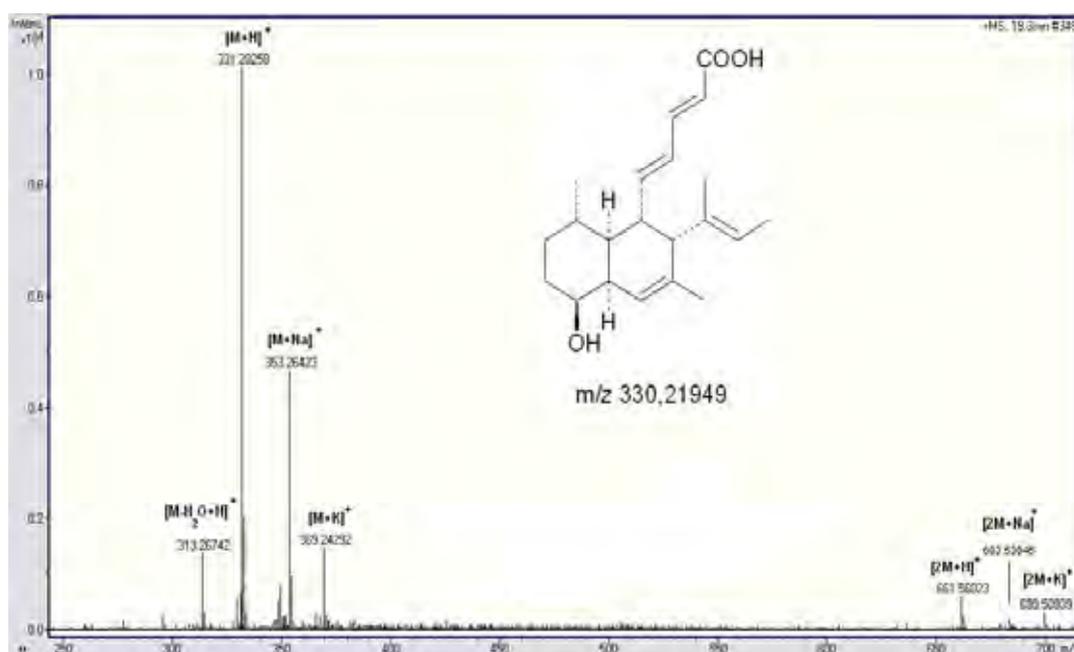


Figura 52: Espectro de massas EAC no tempo de retenção 19,3 min (modo positivo)

A presença de outros íons de abundância menor com relação m/z : 353,26423 e 369,24292, referentes à formação de adutos $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, respectivamente, confirmam a fórmula estrutural para as nossas moléculas como $[C_{18}H_{18}O_6 + H]^+$, **9**- phomosina G - 330,11034 ou $[C_{21}H_{30}O_3 + H]^+$, **10**- phomopsidina 330,21949 (Figura 53).

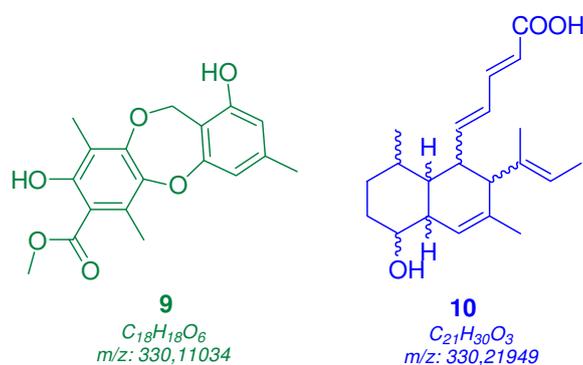


Figura 53: Substâncias prováveis para o tempo de retenção 19,3 min

A presença de um íon a 313,26742 $[M-H_2O+H]^+$, indica a desidratação de **9** ou **10**, por mecanismos de dissociação na fonte. A desidratação de moléculas por este mecanismo é um forte indicativo de grupos funcionais como alcoóis secundários ou terciários (BUNTON, 1957). Dentre as propostas obtidas pela análise *in silico*, podemos descartar a molécula **9** cuja característica estrutural não favorece este tipo de reação. A proposta de desidratação para **10** pode ser observada da figura 54.

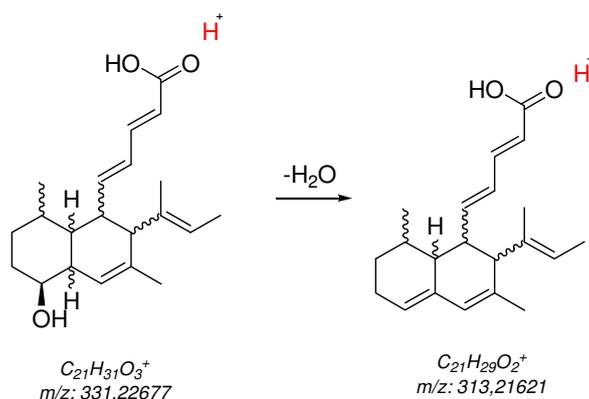


Figura 54: Desidratação proposta para **10** por dissociação na fonte

A presença de íons de intensidade menor em: 661,56023, 683,53845 e 699,50939 sugerem a presença de dímeros $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$ e $[2M+K]^+$, respectivamente, substâncias ainda não relatadas neste gênero.

A análise da nossa proposta no fragmentograma gerado no modo negativo (Figura 55) revelou um íon de $m/z: 329,23754$, indicando a formação do aduto $[M-H]^-$, assim como um íon menos intenso a $m/z: 659,02976$, característico do dímero $[2M-H]^-$.

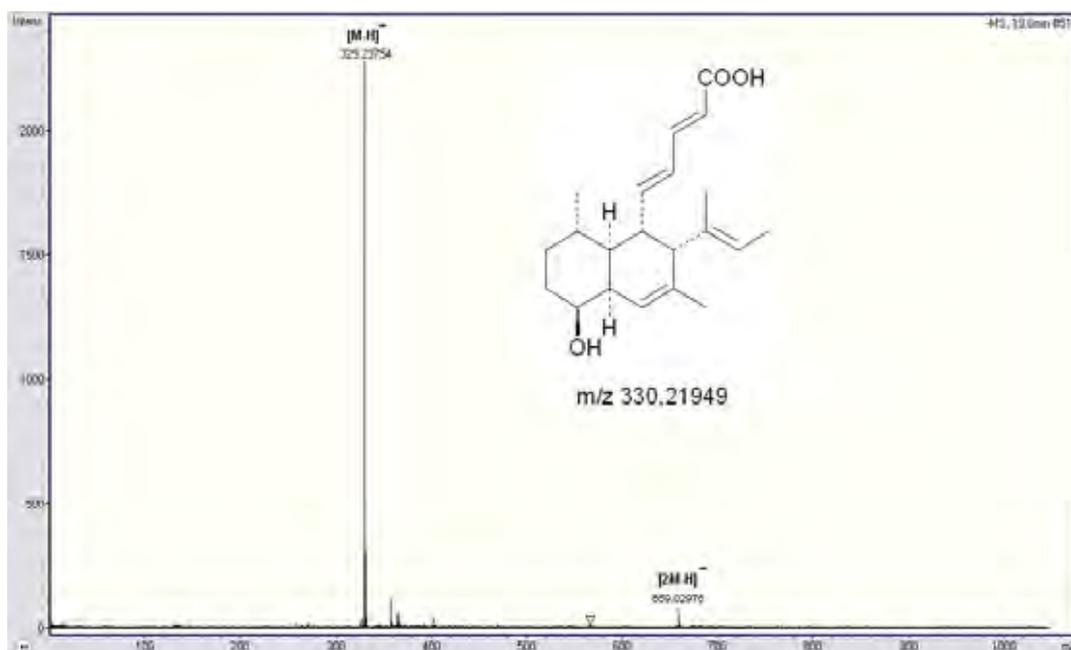


Figura 55: Espectro de massas EAC no tempo de retenção de 19,6 min (modo negativo)

O dímero proposto teria, na sua junção, uma função semelhante a um hemiacetal que facilmente sofreria ruptura para originar os monômeros mais populosos (Figura 56) (KANOJIYA; YADAV, 2008).

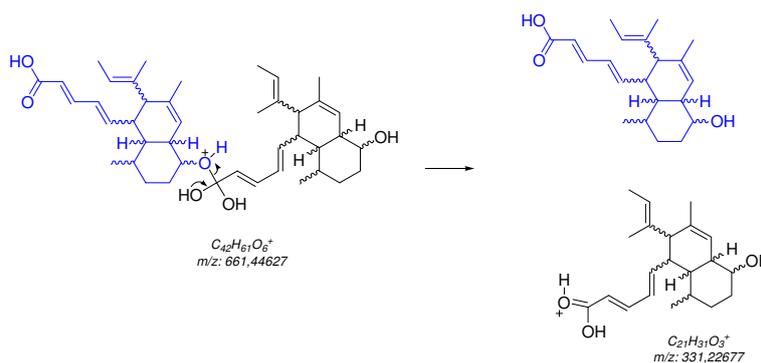


Figura 56: Proposta da ruptura do dímero 10

TEMPO DE RETENÇÃO – 17,7 min

O tempo de retenção 17,7 min, no modo positivo (Figura 57), apresentou o pico base m/z 249,13648, indicando a formação do aduto $[M'+H]^+$ e um pico menos intenso em 519,33348 característico do dímero $[2M'+Na]^+$. Na análise do espectro de massas, outros íons com relação m/z 347,27764; 369,26139 e 385,23100, referentes aos adutos $[M''+H]^+$, $[M''+Na]^+$ e $[M''+K]^+$, sugeriram a presença de outra molécula. O íon m/z 693,48302 é característico desse novo dímero $[2M''+H]^+$.

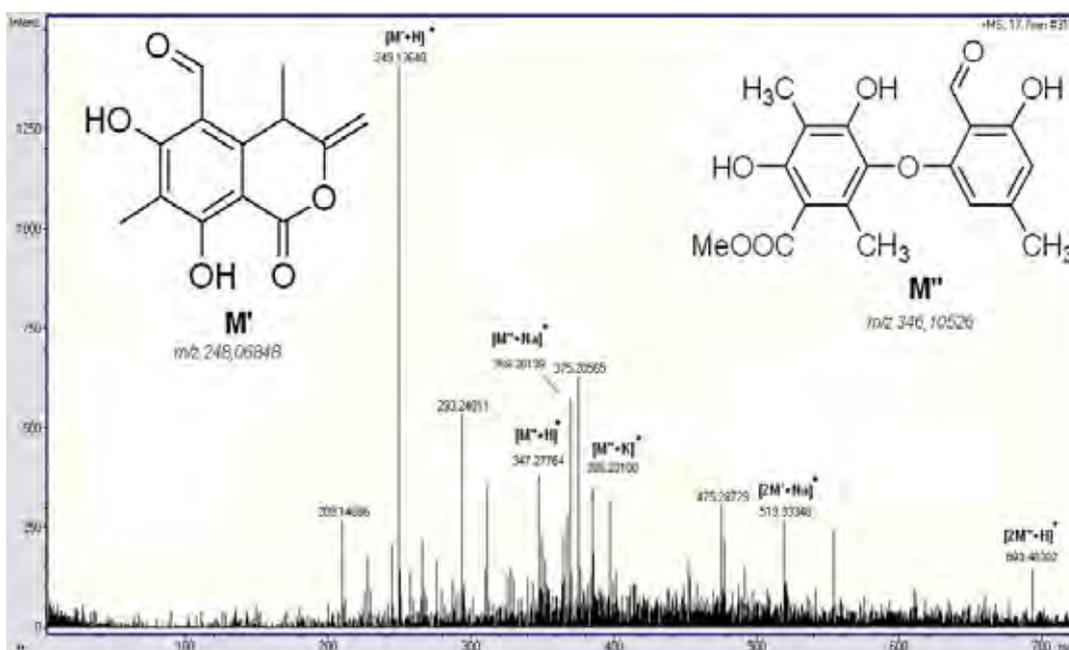


Figura 57: Espectro de massas EAC no tempo de retenção 17,7 min (modo positivo)

No modo negativo o fragmentograma foi gerado no tempo de retenção de 17,7 min (Figura 58) e o pico base encontrado foi 345,23060, referente ao aduto $[M''-H]^-$.

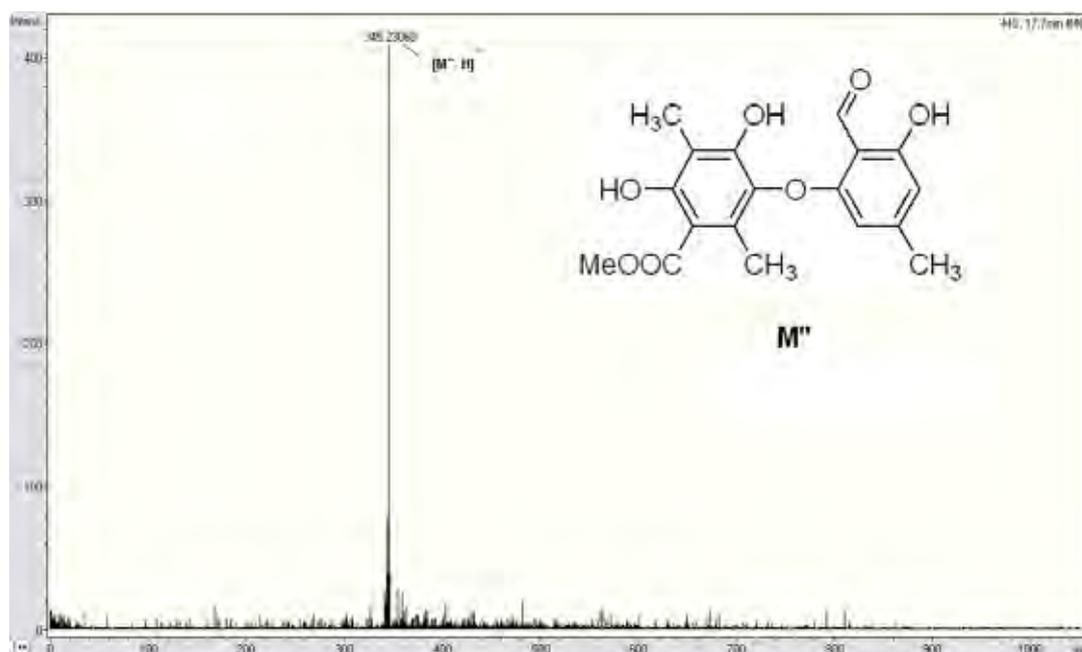


Figura 58: Espectro de massas EAC no tempo de retenção 17,7 min (modo negativo)

Para o modo negativo, o íon m/z : 247,12082 não foi encontrado, provavelmente porque as características estruturais de M'' não permitem a sua fácil anionização. No DPN, foi encontrada **11**, uma molécula de massa 248,06848, confirmando sua fórmula estrutural como $[C_{13}H_{12}O_5+H]^+$, a phomopsilactona e **12** com m/z : 346,10526 confirmando a fórmula estrutural como $[C_{18}H_{18}O_7+H]^+$, a phomosina A (Figura 59).

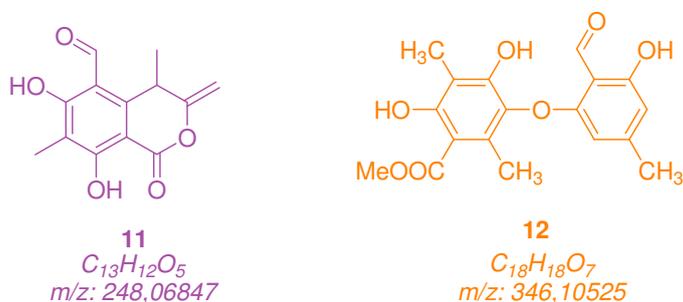


Figura 59: Substâncias detectadas no tempo de retenção 17,7 min

A ruptura do dímero M' poderia ser através de uma função hemiacetálica (Figura 60). Devido a sua labilidade, a ruptura poderia ocorrer em condições ácidas. Devido a instabilidade do hemiacetal, o pico característico a m/z : 519,33348 é pouco intenso.

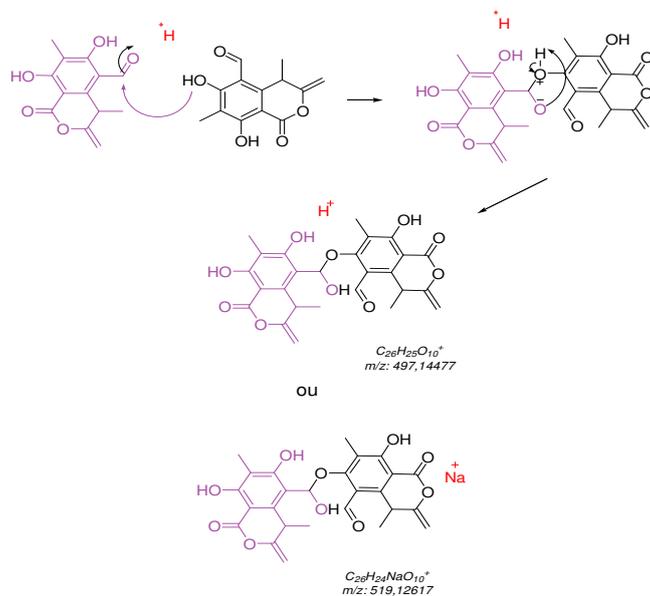


Figura 60: Proposta de dimerização para 11

Para a dimerização de M'', assim como em M', também foi proposta a formação de um hemiacetal (Figura 61).

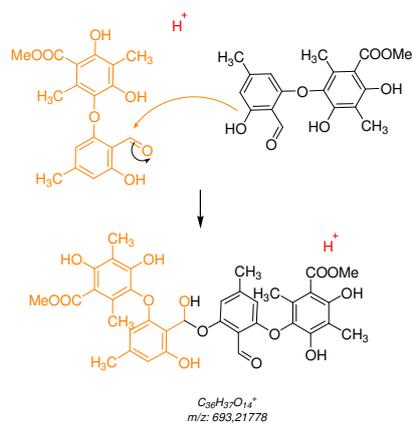


Figura 61: Proposta de dimerização de 12

4.6 – O extrato EAE

Para o extrato EAE (Figura 62), extrato do fungo *P. stipata* crescido em extrato de malte e sob agitação – fração acetato de etila, a cromatografia líquida de alta eficiência foi selecionada. O cromatograma apresentou uma boa resolução nas bandas detectadas. Como visto anteriormente, não há forte absorbância de compostos a 254 nm, característica de alguns quimiotipos já relatados para o gênero *Phomopsis* pelo DNP. Uma maior absorção ocorre no comprimento de onda 300 nm, caracterizando um maior número de substâncias que absorvem nesse comprimento de onda (Figura 63). Nos TIC's, modo positivo e negativo, uma maior abundância de íons foi encontrada e, os mais intensos foram escolhidos para a geração dos seus respectivos fragmentogramas. Compararam-se os TIC's e as bandas do modo positivo se apresentaram mais intensas, devido à presença de ácido na fase aquosa que favoreceu a formação de adutos positivos (Figura 64).

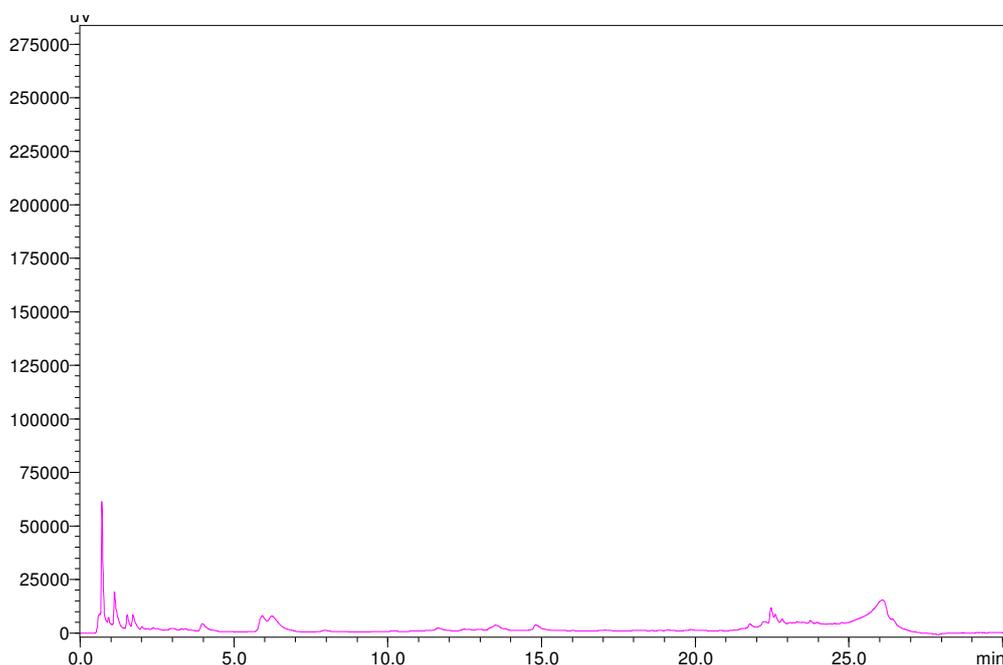


Figura 62: Cromatograma do extrato EAE (254 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH

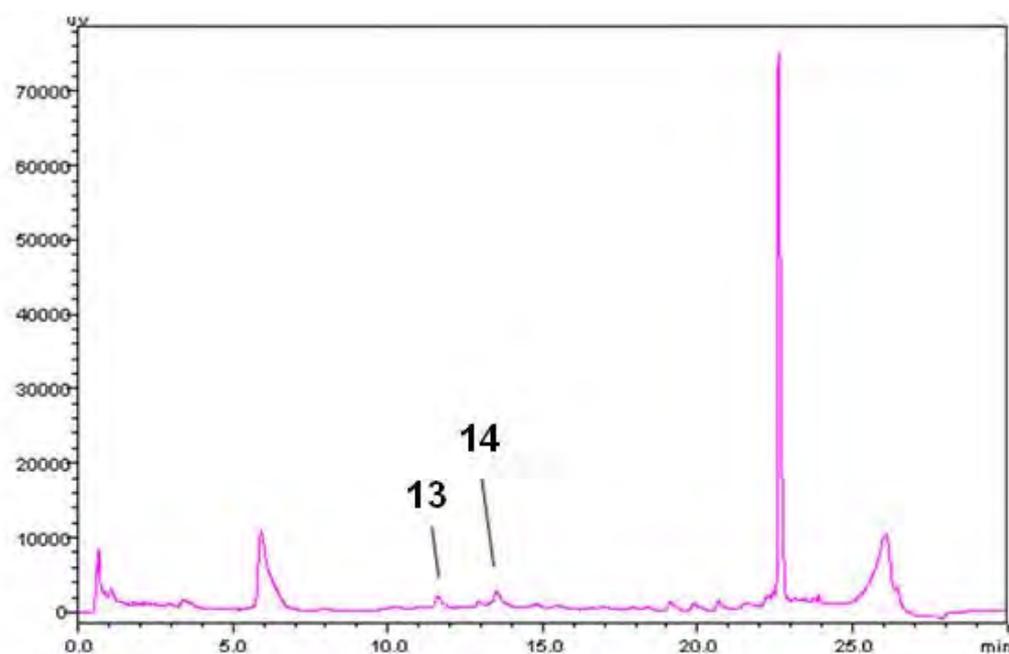


Figura 63: Cromatograma do extrato EAE (300 nm) – gradiente: 3% de MeOH como condição inicial, por 7 minutos; 7-20 minutos, 3-30% MeOH; 20-25 minutos, 30-100% MeOH; 25-27 minutos, retorno a condição inicial de 3% de MeOH; 27-30 minutos permanecendo em 3% de MeOH

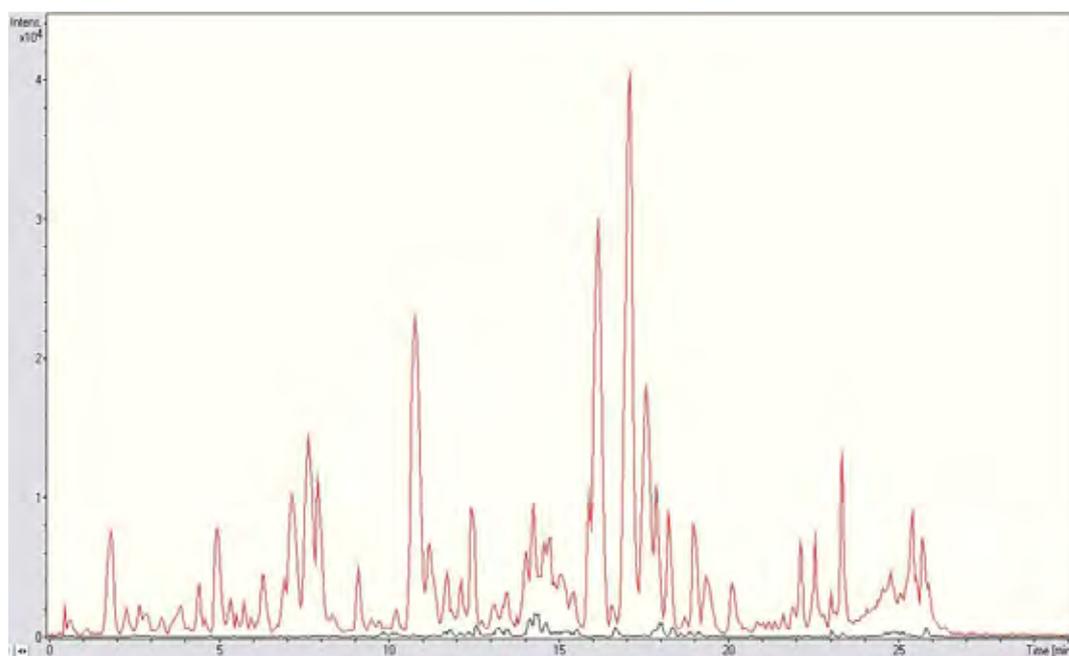


Figura 64: Comparação entre os TIC positivo (vermelho) e negativo (preto)

4.7 - Análise dos metabólitos presentes em EAE

Iniciamos a análise dos íons majoritários fazendo um cruzamento dos dados de massa de alta resolução com aqueles compilados da base de dados do dicionário de produtos naturais (DNP), exclusivamente para o gênero *Phomopsis*. A análise de cada molécula detectada será relatada a seguir:

TEMPO DE RETENÇÃO – 11,3 min

O tempo de retenção 11,3 min, no modo positivo (Figura 65), apresentou o pico base m/z 209,18017, indicando a formação do aduto cationizado com próton $[M+H]^+$ e o pico em 231,16532, indicando a formação do aduto cationizado com Na^+ $[M+Na]^+$. Os picos em 439,33600 e 647,49824, indicam a formação do dímero e trímero $[2M+Na]^+$ e $[3M+Na]^+$ (KANOJIYA; YADAV, .2008).

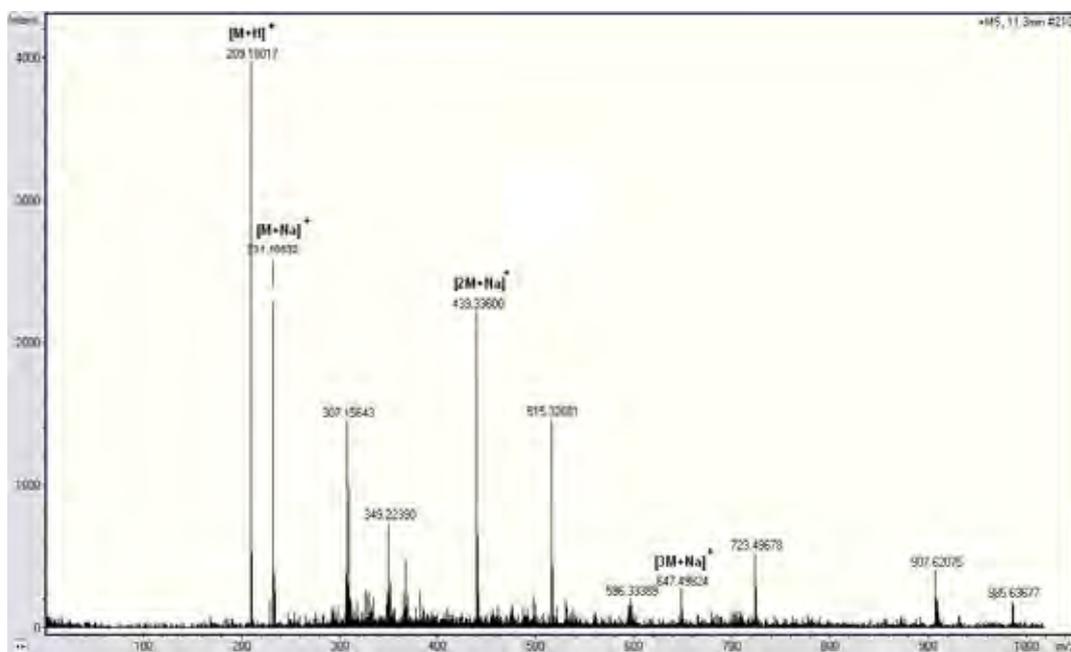


Figura 65: Espectro de massas EAE no tempo de retenção 11,3 min (modo positivo)

No modo negativo foi gerado o fragmentograma também para o tempo de retenção de 11,3 min (Figura 66), e o pico base encontrado foi 207,15608, indicando a formação do aduto $[M - H]^-$.

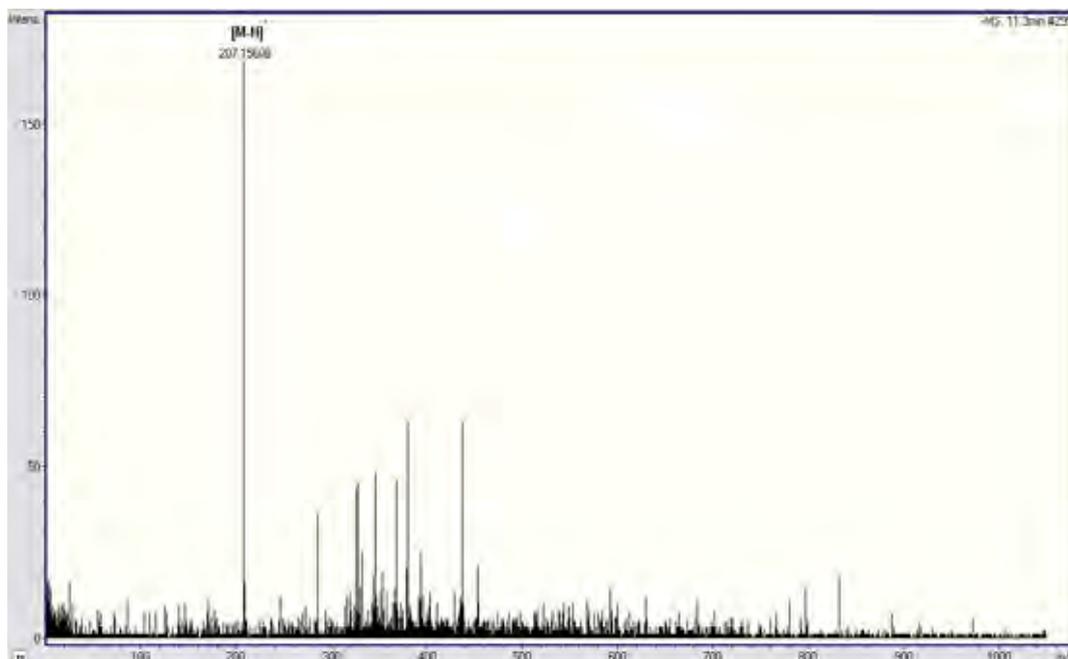


Figura 66: Espectro de massas EAE no tempo de retenção de 11,3 min (modo negativo)

Quando a base do DNP foi consultado, obtivemos a fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_4$, compatível com a molécula **13** convolvulol, 208,07356 (Figura 67).

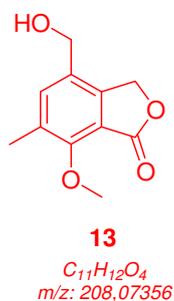


Figura 67: Substância detectada no tempo de retenção 11,3 min

A proposta de ruptura para o dímero e trímero, assim como em **11**, poderia ser através de uma função hemiacetal, que, em condições ácidas ocorre mais facilmente. Na figura 68 é proposta a formação do dímero e do trímero.

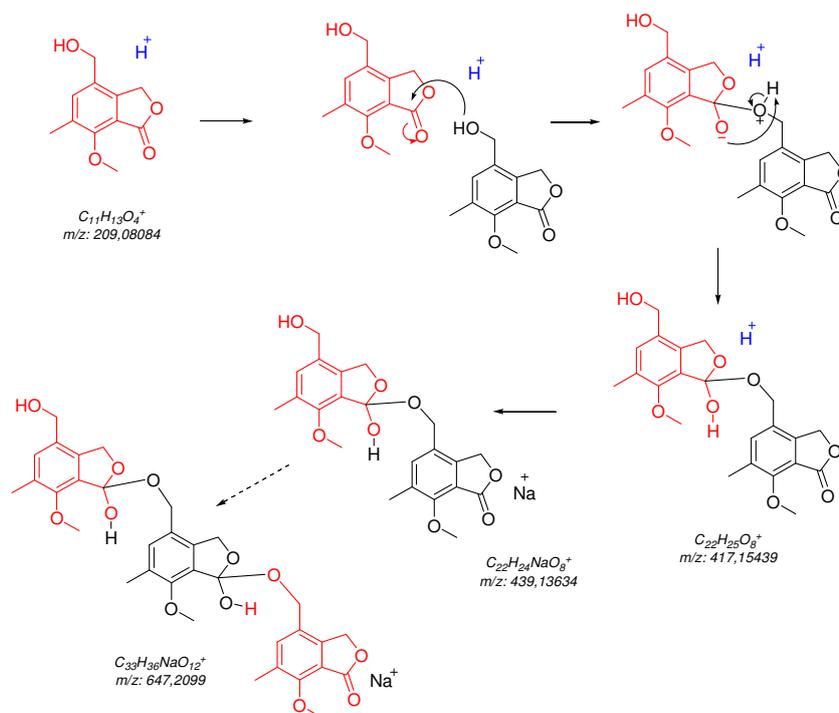


Figura 68: Proposta de formação do dímero e do trímero de **13**

TEMPO DE RETENÇÃO – 14,3 min

O tempo de retenção 14,3 min, no modo positivo (Figura 69), apresentou o pico base m/z 333,28917, indicando a formação do aduto $[M+H]^+$, e os íons em 355,27267 e 371,24752, referentes à formação dos adutos $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, respectivamente. Os picos em 665,56310 e 687,55143, indicam a formação dos dímeros $[2M+H]^+$ e $[2M+Na]^+$.

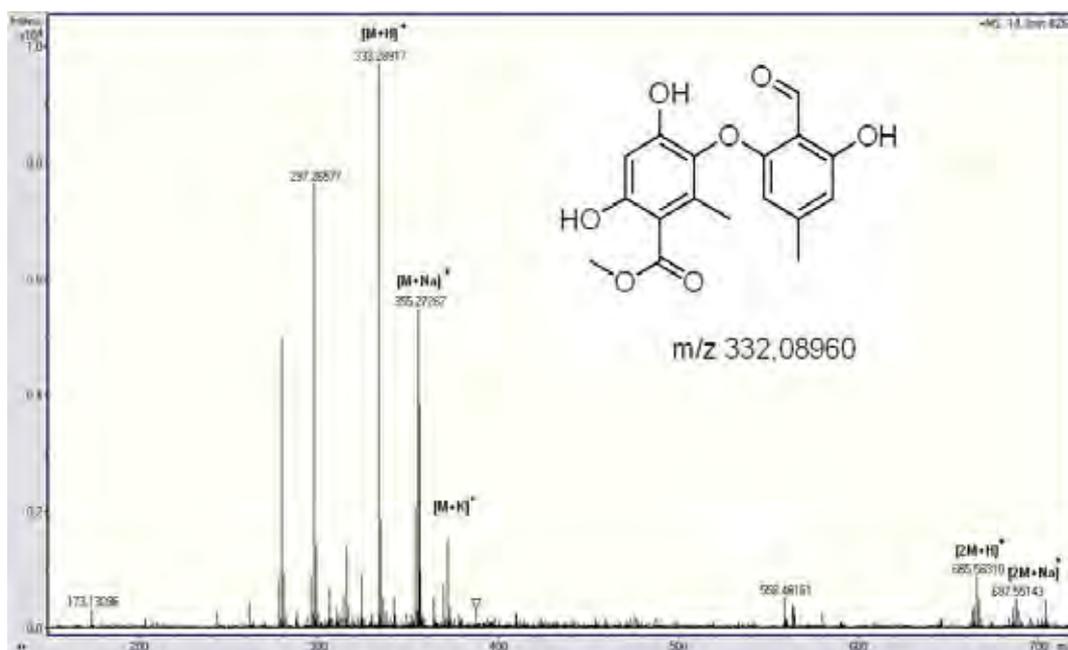


Figura 69: Espectro de massas EAE no tempo de retenção 14,3 min (modo positivo)

No modo negativo foi gerado o EM para o tempo de retenção de 14,4 min (Figura 70), e o pico base encontrado foi de relação m/z : 331,25434, indicando a formação do aduto $[M-H]^-$.

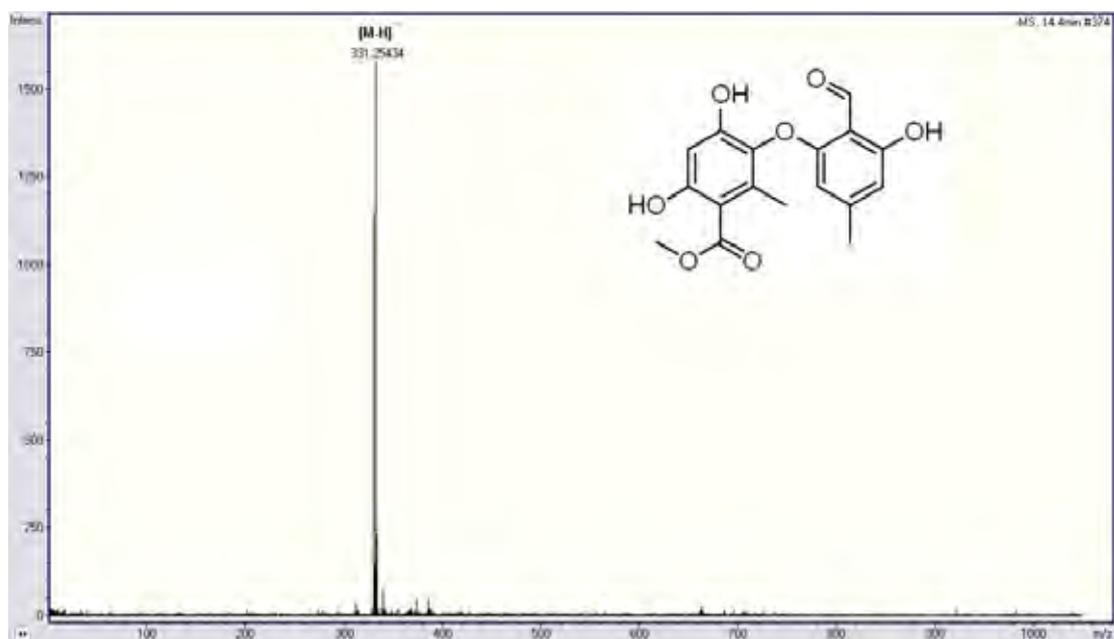


Figura 70: Espectro de massas EAE no tempo de retenção de 14,4 min (modo negativo)

Consultando o DNP, a molécula detectada foi **14**, com uma relação m/z : 332,08961; a phomosina C (Figura 71).

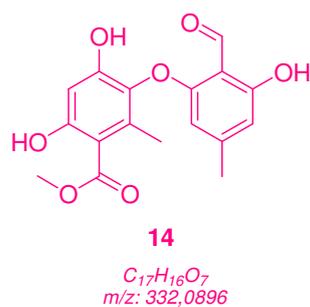


Figura 71: Substância detectada no tempo de retenção 14,4 min

A junção do dímero **14** foi estabelecida através de uma função hemiacetálica entre os monômeros (Figura 72).

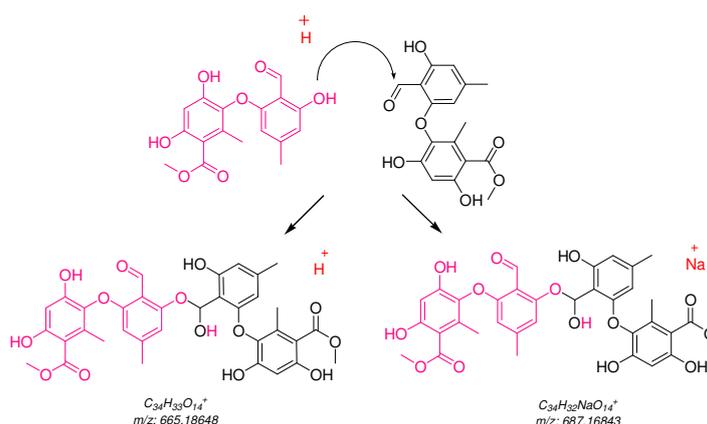


Figura 72: Proposta de dimerização de **14**

4.8 - Detecção *in silico* – EM/EM

Para a obtenção de espectros de íons produto (EM/EM) a partir de íons precursores desejados foi informado ao software do espectrômetro de massas o m/z de cada íon precursor que deveria ser fragmentado.

O íon escolhido para a fragmentação EM/EM no extrato EAE foi $[M+H]^+$ - 213,81 (Figura 73).

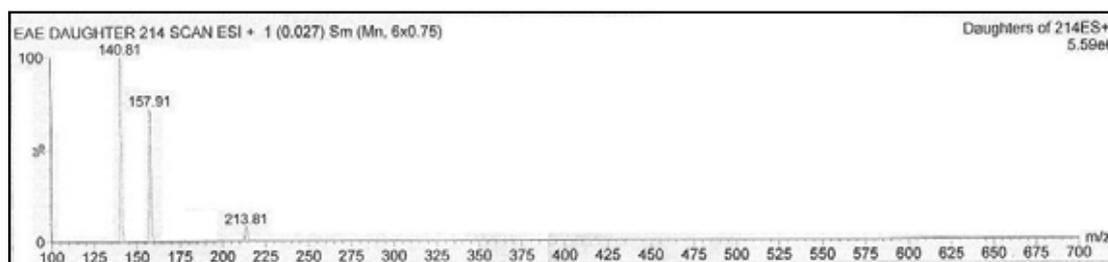


Figura 73: EM/EM do aduto – $[M+H]^+$ - 213

Foi feita uma proposta de fragmentação para os íons. O pico em 213,81 indicou a formação do aduto cationizado com H^+ $[M+H]^+$. A substância detectada foi **15 phomopironol** e possui um enol com m/z 212. Por ser um isômero constitucional pode se apresentar nas formas ceto ou enólica (Figura 74).

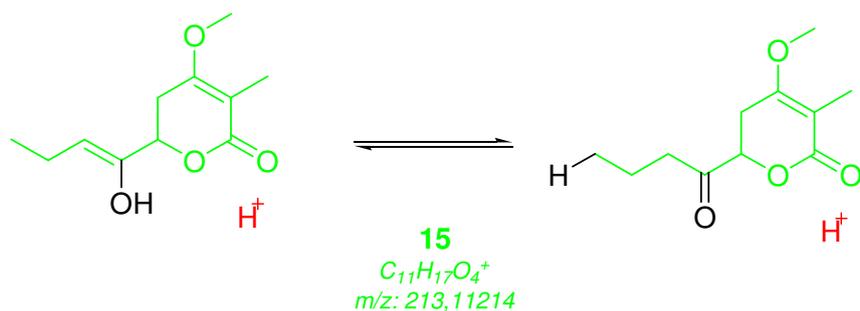


Figura 74: Equilíbrio ceto/enólico

Em sua forma ceto, o rearranjo de McLafferty gerou um íon m/z 185,08, que também pode estar em sua forma ceto ou enólica e, uma contração do anel, seguida pela perda de CO gerou o íon m/z 157,09 (Figura 75).

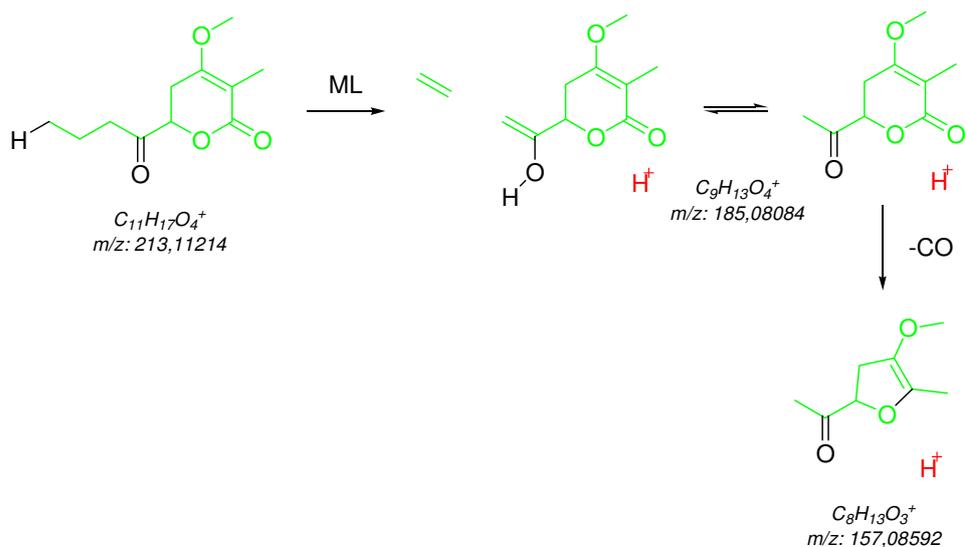


Figura 75: Proposta de fragmentação para o íon m/z 157

Ainda na forma ceto, para justificar o íon m/z 141,81 a proposta de fragmentação foi uma quebra homolítica (Figura 76).

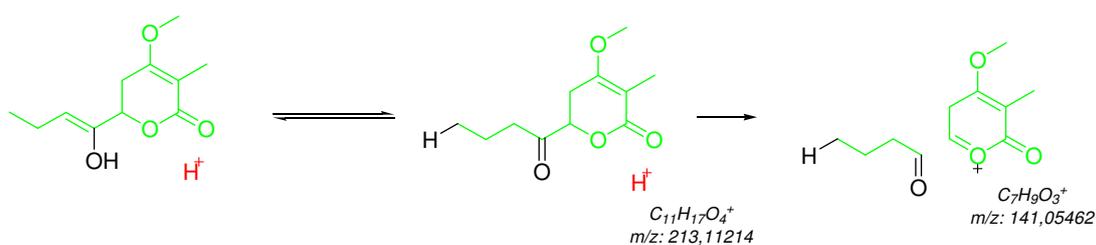


Figura 76: Proposta de fragmentação para o íon m/z 141

4.9 - Detecção *in silico* dos metabólitos do endofítico em MDB

O cromatograma do extrato PDB (cultivo em MDB) (Figura 77) apresentou uma boa resolução nas bandas detectadas no comprimento de onda 290 nm. Não há forte absorbância dos compostos no comprimento de onda de 254 nm devido, provavelmente, a pouca quantidade de cromóforos nesse comprimento de onda, característica de alguns quimiotipos já relatados para o gênero *Phomopsis* na base do DNP. No TIC do modo positivo (Figura 78), uma maior quantidade de bandas foram registradas, evidenciando uma maior diversidade de íons quando comparada ao TIC no modo negativo (Figura 79). A justificativa para tal é a presença do ácido na fase móvel proporcionando um favorecimento de espécies catiônicas.

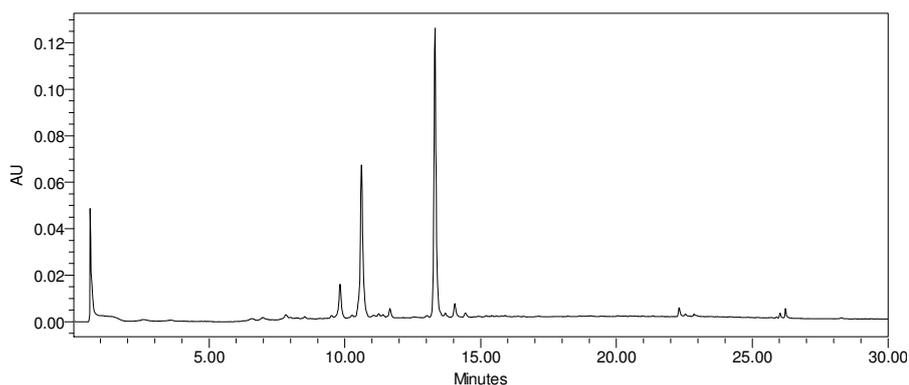


Figura 77: Cromatograma em gradiente exploratório do PDB (290 nm)

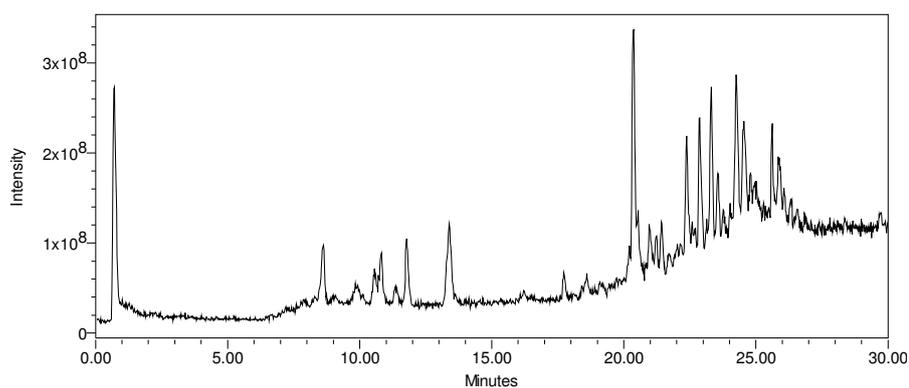


Figura 78: TIC positivo do PDB

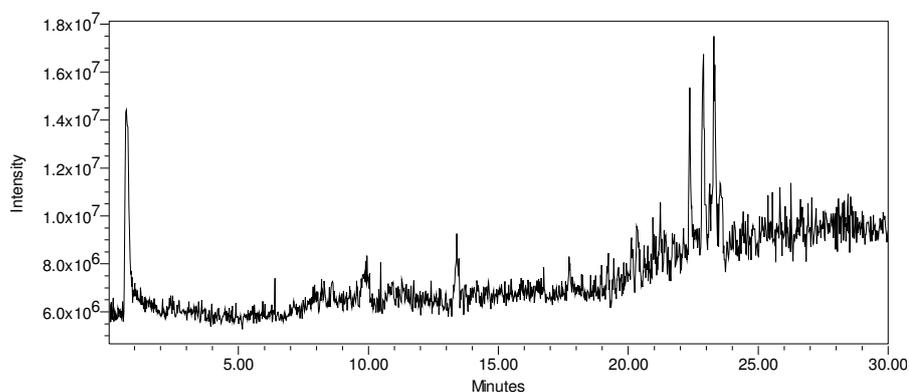


Figura 79: TIC negativo do PDB

No espectro de massas do modo positivo (Figura 80), os picos m/z 211,4 e m/z 233,1 indicam a presença dos adutos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. No tempo de retenção 17,748 min, foi detectada uma substância já isolada por Sordi (2007), **16**, uma koniginina (Figura 81).

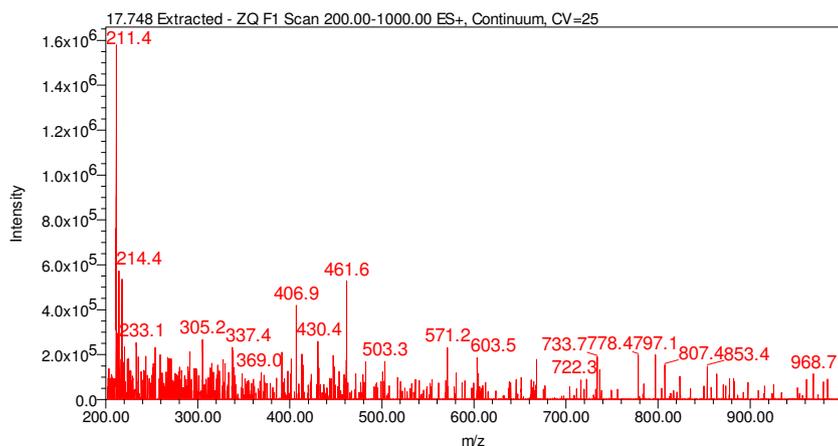


Figura 80: Espectro de massas PDB no tempo de retenção 17,748 min

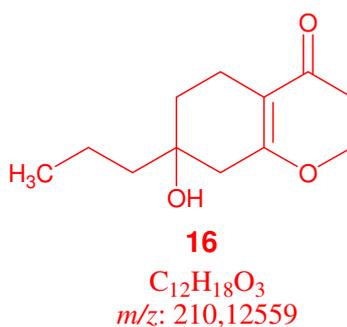


Figura 81: Koniginina detectada no tempo de retenção 17,748 min

No espectro de massas do modo positivo (Figura 82), o pico m/z 351,6 indica a presença do aduto $[M+Na]^+$. No tempo de retenção 22,881 min, uma outra substância detectada já foi isolada por Sordi (2007), **17**, outra koniginina (Figura 83).

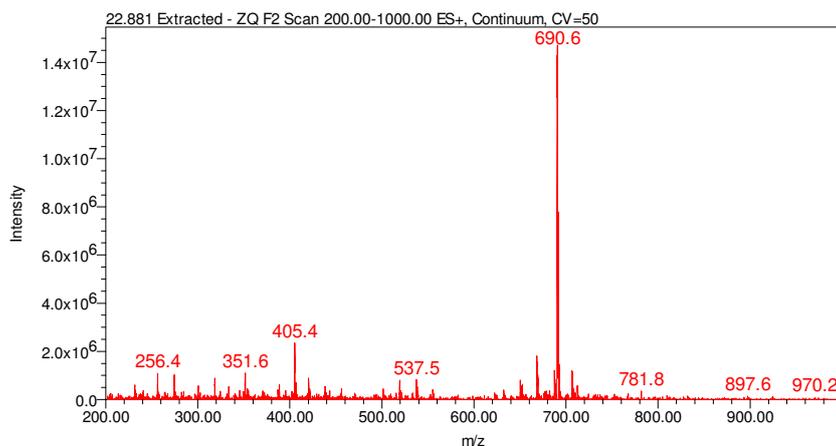


Figura 82: Espectro de massas de PDB no tempo de retenção 22,881 min

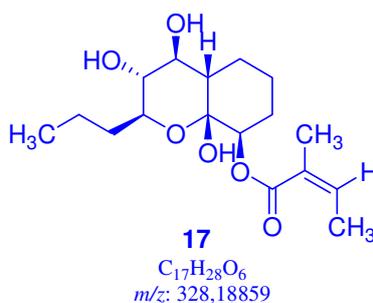


Figura 83: Koniginina detectada no tempo de retenção 22,881 min

4.10 – Avaliação do potencial antioxidante dos extratos brutos de *P. stipata*

Em todos os extratos foram realizados os testes para avaliar a atividade antioxidante. A propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar (reação com quebra homolítica), estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância, sendo esse modelo geralmente observado em estruturas fenólicas. Os resultados neste ensaio constataam a natureza estrutural dos quimiotipos acumulados em *P. stipata*; todos eles apresentando baixa concentração de grupos cromóforos ou ainda não

apresentam características estruturais que possam promover alguma atividade antioxidante.

4.11 - Avaliação do potencial com propriedades de inibição da polimerização de heme dos extratos brutos de *P. stipata*

Os resultados do teste de inibição da polimerização do heme se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Resultado do teste de inibição da polimerização do heme

Amostra	% inibição de polimerização
EAC	67,82 ± 1
EAE	31,59 ± 1
ECE	75,21 ± 0
ECC	54,21 ± 2
MAC	48,30 ± 2
MCC	44,60 ± 3
MDC	47,12 ± 1
PCA	62,52 ± 2
PDA	51,27 ± 3
Cloroquina	92,05 ± 0
Quinina	61,03 ± 3

Os resultados dos extratos: EAC, ECE e PCA quando comparados ao padrão quinina, foram muito satisfatórios apresentando valores de porcentagem de inibição da polimerização do heme superior ao padrão e, portanto, promissores.

5 – Conclusões e perspectivas

Quando comparamos os diferentes meios de cultivo do fungo endófito *P. stipata*, foram observados diferentes perfis cromatográficos, existindo pequenas semelhanças quantitativas e qualitativas, evidenciando que a alteração na composição dos meios de cultura provoca variação no metabolismo do fungo e, portanto, a produção de micromoléculas.

A utilização de técnicas hifenadas foi viável e mostrou-se eficiente na detecção dos constituintes majoritários micromoleculares presentes nos extratos escolhidos: AcOEt e DCM de *P. stipata*.

Nos extratos diclorometânicos, através do uso da técnica CG-EM, foram identificadas nove substâncias. No extrato MDC, cinco substâncias foram detectadas, sendo elas: um derivado gamalactônico; *n*-hexadecanóico; ácido 16-octadecanóico; di-hexanoato de 2-etil hexila e hexadecanoato de iso-propilodiol. Para o extrato ECC foi possível detectar o ftalato de butila. Para o extrato PDC, três substâncias foram detectadas, dentre elas: ciclohexen-2-ol-3,5,5-metil-ona; hexahidropirrolol [1,2-*a*] pirazina-1,4 diona 3 benzil e hexahidropirrolol [1,2-*a*] pirazina-1,4 diona 3 isometila. Todas essas substâncias foram elucidadas fazendo uso de mecanismos racionais que justificassem os íons majoritários apresentados no espectros de massas por impacto de elétrons. O uso de técnicas mais sofisticadas, como CG-EM-EM permitirão uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos durante a produção dos íons filhos.

O emprego de CLAE-DAD-EM e a técnica tandem EM/EM, possibilitou a identificação dos compostos majoritários de interesse, diretamente a partir dos extratos brutos do fungo. Desses seis substâncias já foram relatadas para outras espécies do gênero *Phomopsis* e duas substâncias já antes identificadas na espécie *Phomopsis stipata*, totalizando oito substâncias detectadas. Para o extrato EAC, três substâncias foram detectadas, sendo elas: uma phomopsidina, uma phomopsilactona e a phomosina A. No extrato EAE, duas substâncias foram detectadas, sendo convolvulol e phomosina C. Ainda no extrato EAE, um phomopironol foi identificado por EM/EM. Duas konigininas já isoladas para esta espécie foram detectadas no extrato PDB.

Os dímeros e trímeros evidenciados nos extratos EAE e EAC não poderiam ter sido detectados por abordagens clássicas de separação, talvez seja por isso que apenas os monômeros sejam relatados no gênero.

A utilização das técnicas hífenadas CG-EM, CLAE-DAD-EM e EM/EM para a identificação de metabólitos secundários diretamente nos extratos, sem a necessidade de seu isolamento, foi uma abordagem adequada para a análise de matrizes complexas, além de fornecer um método rápido para a detecção de moléculas em matrizes com baixa quantidade de amostra.

Quando comparados ao padrão (quinina), três extratos se destacaram na inibição da polimerização de heme, sendo eles EAC, ECE e PCA. Futuros estudos e pesquisas para poder detectar os compostos responsáveis por essa atividade, tornam-se perspectivas promissoras do trabalho.

Referências

- ANTUNES, P. M.; MILLER, J.; CARVALHO, L. M.; KLIRONOMOS, J. N.; NEWMAN, J. A. Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. **Functional Ecology**, v. 22, p. 912-918, 2008.
- ARAÚJO, W. L. **Genética e melhoramento dos fungos na biotecnologia**. Disponível em:<<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm>>. Acesso em: 18 nov. 2008.
- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, Apr. 2000.
- BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 60, n. 1, p. 118-120, 1994.
- BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A. ; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, p. 204-207, 1995.
- BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 4. ed. São Paulo: EDEL, 1976. v. 1, p. 396.
- BILLS, G. F. Analyses of microfungual diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p.S33-S41, 1995.
- BOWIE, J. H. Electron impact studies. **Journal of Chemistry**, v. 19, p. 1619-1626, 1966.

BUNTON, C. A.; LLEWELYN, D. R. Tracer studies on alcohols. II. The exchange of oxygen – 18 between sec-butyl alcohol and water. **Journal of Chemical Society**, p. 3402-3407, 1957.

CARDOSO, C. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; EPIFANIO, R. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; LIMA, J. A.; BOLZANI, V. S. Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1882-1885, 2004.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 362-387, 2001.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Banco de dados on line**. Disponível em: <<http://icewall2.cenargen.embrapa.br:84/micweb/michtml/fgbd01.asp#P>>. Acesso em: 9 maio 2005.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi is a 3-NPA in some produced by endophytes? **Journal Natural Products**, v. 68, n. 7, p. 1103-1105, 2005.

COCKRUM, P. A.; PETTERSON, D. S.; EDGAR, J. A. Identification of novel *Phomopsis* in Lupin seed extracts. In: DORLING, P. R. **Agricultural, phytochemical and ecological aspects: plant-associated toxins**. Wallingford: CAB, 1994. p. 232-237.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 74.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 157-160, 2004.

CORDELL, G. A.; SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural products extracts. **Pure Applied Chemistry**, v. 71, p. 1089-1094, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1968. v. 1, p. 738-739.

CROTTI, A. E. M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometric of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **Journal Mass Spectrometry**, v. 40, p. 1030-1034, 2005.

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

CROTTI, A. E. M.; CAROLO, C. A.; GOBBO NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular height compounds. In: TAFT, C. A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Kerala: Reserch Signpost, 2006b. p. 99-141.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; ARRENDALE, R. E.; COLE, P. D.; COX, R. D. Koninginin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2604-2611, 1989.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; YAGEN, B.; ARRENDALE, R. F.; JACYNO, J. M.; COLE, P. D.; COX, R. H. Koninginin B: a biologically active congener of koninginin A from *Trichoderma koningii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 977-980, 1991.

CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J.; ROSS, S. A.; EL SAYED, K.; DUGAN, F. M.; BARTLETT, M. G.; HILL, A. A.; HILL, R. A.; PARKER, S. R. Koninginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 137-139, 1999.

DANTI, R.; SIEBER, T. N.; SANGUINETI, G.; RADDI, P.; DI LONARDO, V. Decline in diversity and abundance of endophytic fungi in twigs of *Fagus sylvatica* L. after

experimental long-term exposure to sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS) aerosol. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 696-702, 2002.

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

EGAN, T. J.; ROSS, D. C.; ADAMS, P. A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). **FEBS Letter**, v. 352, p. 54–57, 1994.

FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y.; PUTNAM, M. L. A new species of *Phomopsis* causing twig dieback of *Vaccinium vitis-idaea* (lingonberry). **Mycological Research**, v. 106, n. 6, p. 745-752, 2002.

FENN, J. B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie**, v. 42, n. 33, p. 3871-3894, 2003.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation physiology and biogeochemical process. **Advances in Microbial Physiology**, v. 41, p. 47-92, 1999.

GILG, E. **Botanica aplicada a la farmacia**. 6. ed. Buenos Aires: Labor, 1926. p. 437-438.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 506-526, 2006.

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

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1985. p. 219-221.

KANOJIYA, S.; YADAV, P. P. Fragmentation patterns of newly isolated cassane butenolide diterpenes and differentiation of stereoisomer by tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, p. 1413-1420, 2008.

KITE, G. C.; VEITECH, N. C.; GRAYER, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. The use of hiphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 813 - 843, 2003.

LA CASA, S.; VILLEGAS, I.; LA LASTRA, A. de; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação de cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. p. 332.

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

MASUREKAR, P. S. Therapeutic metabolites. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. (Ed.). **Biotechnology of filamentous fungi**: technology and products. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 241.

MAURI, P.; PIETTA, P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 61-68, 2000.

McLAFERTY, F. W. **Interpretation of mass spectra**. 3rd ed. Mill Valley: University Science Books, 1980.

- MOLYNEUX, R. J.; SCHIEBERLE, P. Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4625-4629, 2007.
- NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.
- NIESSEN, W. M. A. LC-MS in quantitative analysis. **Reviews Analytical Chemistry**, v. 19, p. 289-301, 2000.
- PAULETTI, P. M.; TELES, H. L.; SILVA, D. H. S.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S. The Styracaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 576-590, 2006.
- PFENNING, L. H. **Introdução a micologia**. Lavras: Ed. UFLA, 2000. p. 38.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.
- PRINCE, K. A. **Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de metabólicos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- REYNOLDS, J. E. F. **Martindale**: the extra pharmacopeia. 31 st ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 1756.
- RIZZINI, C. T.; MORS, B. W. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, 1976. p. 42.
- SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. Associados com espécies vegetais de Cerrado**. 2005. 306 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

- SORDI, R. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados das folhas de *Styrax camporum* Pohl (Styracaceae)**. 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.
- STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, n. 1, p. 214-216, 1993.
- STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 1, p. 535-544, 2003.
- STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002.
- TATSIS, C. E.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. Identification of the major constituents of the *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**, v. 68, p. 383-393, 2007.

TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A. Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for *in vitro* hemozoin formation assay.

Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, v. 8, p. 63, 2005.

WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. T. Hyphenation and hypernation. The practice and prospects of multiple hyphenation. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 325-356, 2003.

WOLFENDER, J. L.; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry in phytochemical analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 5, p. 153 -182, 1994.

WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural identification of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437-455, 2003.