

MARIANA CARRARA CAFÊU

**Estudo químico e avaliação biológica dos fungos
endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes*
isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Regina
Araújo.

Araraquara

2007

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Oscar e Idalina, duas pessoas maravilhosas que sempre estiveram presentes, apoiando e me fortalecendo em todos os momentos. São meus exemplos de vida, que prezam humildade e respeito ao próximo. Os mais preciosos amigos e conselheiros. Não tenho palavras para agradecê-los.

Aos meus irmãos (Gustavo e Gabriel) e cunhadas (Beatriz e Cristina) que sempre estiveram ao meu lado, participando de cada momento de desafio e alegria durante esta trajetória. Aos meus queridinhos pimpolhos, Gabrielzinho e Maria Beatriz, que chegaram trazendo mais felicidade a nossa família e um novo sentido a minha vida.

Ao meu querido Kleber pelo amor, constante incentivo e companheirismo. Conhecê-lo me fez uma pessoa melhor, amá-lo me faz uma pessoa muito feliz.

À querida Profa. Ângela, a qual serei eternamente grata pelos ensinamentos de química e de vida. Sua dedicação e entusiasmo tornaram possível a realização deste trabalho e foram fundamentais para minha formação.

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” (Charles Chaplin).

A Deus, pela presença constante iluminando minha vida, orientando meus caminhos e me dando sabedoria para seguir sempre Seus preceitos.

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

À Profa. Dra. Ângela R. Araújo pela orientação e grandes ensinamentos. Obrigada pela tranquilidade e segurança que sempre me transmitiu, amizade e dedicação em todos estes anos.

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

Aos docentes do Departamento de Química Orgânica: Vanderlan S. Bolzani, Márcia Nasser Lopes, Maysa Furlan, Alberto J. Cavalheiro, Lucia M. X. Lopes, Dulce H. Siqueira, Wagner Vilegas, Lourdes Campaner dos Santos, Ian Castro-Gamboa e Isabele Nascimento pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Henrique Trevisan, pela valiosa contribuição neste trabalho e colaboração na revisão desta tese.

Às Professoras Márcia N. Lopes e Lourdes Campaner que participaram do meu exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

Ao Dr. Nivaldo Borallo pela realização dos inúmeros espectros, amizade e por estar sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos.

Ao Dr. Alberto Alécio por ser tão prestativo, não medindo esforços para colaborar com o trabalho científico.

Aos meus grandes amigos Dr. Geraldo H. Silva e Dr. Helder L. Teles, ex-colegas de grupo e competentes profissionais. O Geraldo me mostrando o lado bom da vida e o Helder sempre disposto a ajudar e a ensinar. Obrigada pelas inúmeras dicas, discussões pertinentes e ensinamentos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos amigos de grupo: Ioanis Leptokarydis, Lisinéia Zanardi, Camila Martins e Alana pela amizade, convivência e colaboração dentro e fora do laboratório.

À Adriana e Luis Octávio, pela grande amizade em todos estes anos. Parece que foi ontem que nos conhecemos naquela aula de Química Orgânica Avançada, que era seguida de tardes intermináveis na biblioteca, estudando e nos divertindo muito.

Aos integrantes da "mesa do almoço" e da torcida da Copa de 2006: Adriana Lopes, Luis Octávio Regasini, Débora Baldoqui, Luciana Ávila, Andréa Nastri, João Marcos, Marcelo Telascreea, Lidiane Gaspareto, Simone, Ana Cristina Leite, Vânia Formeton e Silvia. As "pérolas" e risadas ficarão guardadas pra sempre, como lembranças de um velho e bom tempo. Obrigada pela amizade de vocês!

A todos os amigos do departamento, que ainda estão ou já passaram por lá: Carenina Vidoti, Daniara, Karin Bandeira, Fernanda Garcia, Amanda Danuelo, Marcos Pivato, Cláudio Viegas, Guilherme Zucolo, Cristiano, Fernando Continguiba, Otavio Fausino, Ana Lucia, Andréa Morandim, Viviane Candida, Amélia, Jonas Mota, Hosana, Douglas Pichi, Aline, André, Gisele Baraldi, Marcos Batista, Patrícia Pauleti, Marcos, Wanessa, Magela, Sara, Aristeu Tininis e a todos que passaram por este grupo, pelos momentos de alegria compartilhados que fizeram a rotina do laboratório ainda mais agradável. As festinhas de defesa e de final de ano, reuniões de grupo e congressos serão para sempre lembradas.

Às amigas da primeira república em Araraquara: Mayra Borceda, Margarete Batistote, Karin Bandeira e Tamara Calvo. Obrigada pelo apoio nas horas mais difíceis, amizade e por todos os momentos desfrutados com alegria.

À Dani Pereira, uma grande amiga, por estar sempre pronta a ajudar e principalmente a me escutar. Obrigada pela amizade incondicional e cumplicidade durante estes 3 anos. Estendo meu agradecimento ao Jefferson que sempre esteve perto, participando de cada momento.

Ao Prof. Isidro G. Collado e Profa. Josefina Aleu (Fini) da Universidad de Cadiz (Espanha) por terem me recebido no grupo de pesquisa com tanto carinho e hospitalidade. Aos amigos Marienca, Cristina, Gabriela, Jacinto, Daniel e Alejandra por todo apoio e amizade.

Às secretárias da Pós-Graduação - Sandra, Patrícia e Célia - por serem atenciosas e gentis.

Às funcionárias da Biblioteca, pela dedicação e disposição em ajudar.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro.

“Meditai se só as nações fortes podem fazer ciência ou se é a ciência que as fazem fortes.”
(Oswaldo Cruz)

“A sabedoria não se transmite. É preciso que a gente mesmo a descubra depois de uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar. Porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas.” (Proust)

RESUMO

Este trabalho descreve a triagem de 21 fungos endofíticos associados a espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica. Os extratos brutos fornecidos por estes fungos foram avaliados quimicamente (CLAE e RMN¹H) e submetidos a bioensaios para avaliação da potencialidade antifúngica, antioxidante e anticolinesterásica, onde se mostraram promissores. Após esta triagem, os fungos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes*, associados a *Casearia sylvestris*, foram selecionados para o estudo químico/biológico. Estes fungos foram cultivados nos meios líquido (MDB) e sólido (milho) para obtenção dos extratos brutos. O extrato bruto de *Xylaria* sp. em milho foi submetido a fracionamento cromatográfico e levou ao isolamento da griseofulvina, 7-desclorogriseofulvina e citocalasina B, enquanto que o extrato obtido do meio líquido conduziu ao isolamento da citocalasina D, citocalasina C e 5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-diidroisocumarina. Após fracionamento do extrato bruto do endófito *C. crassipes* no meio líquido MDB foram isoladas 8 substâncias da classe de dicetopiperazinas, N-(2-feniletil)acetamida, tirosol e as substâncias inéditas 1-hidroxi-1-feniletil-tirosol e (6-metil-3-(feniletóxi)-1,4-dioxan-2-il)metanol. Algumas substâncias puras foram submetidas à bioensaios e apresentaram potencial bioatividade frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e nos ensaios antioxidante e anticolinesterásico. As citocalasinas D e B isoladas durante este trabalho e outras 5 citocalasinas isoladas anteriormente foram submetidas à avaliação da citotoxicidade utilizando linhagens de células de adenocarcinoma murino e se mostraram muito ativas. Os fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *C. crassipes* foram utilizados em biotransformação do substrato 4-etilciclohexanona. Este experimento foi realizado através do cultivo destes microrganismos na presença do substrato no modo estático e sob agitação, sendo realizadas extrações após cinco e dez dias de cultivo. Foram obtidos quatro produtos resultantes da biotransformação da 4-etilciclohexanona. As estruturas de todos os metabólitos foram determinadas por métodos espectrométricos e comparação com a literatura.

Palavras chaves: endofítico; *Xylaria* sp.; *Colletotrichum crassipes*.

ABSTRACT

This work describes the screening of 21 endophytic fungi from plant species from Cerrado and Atlantic Forest. The crude extracts produced by these fungi after fermentation in potato dextrose broth (PDB) were evaluated by HPLC, ¹HNMR and potential biological activities: antifungal, antioxidant and anticholinesterasic. After screening, the extracts of *Xylaria* sp. and *Colletotrichum crassipes*, isolated from *Casearia sylvestris*, were selected, based on the chemical/biological results. These endophytic fungi were cultivated in PDB and corn for crude extract preparation. The crude corn extract of *Xylaria* sp. led to isolation of griseofulvin, 7-dechlorogriseofulvin and cytochalasin B while the crude PDB extract led to isolation of cytochalasin C, cytochalasin D and 5-carboxy-6-hidroxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin. The crude PDB extract of *Colletotrichum crassipes* led to isolation of eight diketopiperazines, N-(2-phenylethyl)acetamide, tyrosol, 1-hidroxy-1-phenylethyl-tyrosol and (6-methyl-3-(phenethyloxy)-1,4-dioxan-2-yl)methanol. The some of them pure compounds showed potential antifungal activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaeropermium*, antioxidant and anticholinesterasic activities. The Cytochalasins D and B, isolated in this work, and other five cytochalasins produced by *Xylaria* sp.1 showed potential activity for cytotoxic activity against adenocarcinomatous murine cells. The fungi *Xylaria* sp. and *C. crassipes* were evaluated as biocatalysts for biotransformation of 4-ethylcyclohexanone. Four biotransformation products were isolated. Their structures were established by spectroscopic methods, including the application of bidimensional NMR techniques and comparison with published data.

Keywords: endophytic fungus; *Xylaria* sp.; *Colletotrichum crassipes*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cromatograma preparativo de CSY-03/Milho/AcOEt/C-18/7.	48
Figura 2	Cromatograma preparativo de CSY-02/MDB/C-18/4.	52
Figura 3	Cromatograma preparativo de CSY-02/MDB/C-18/6.	53
Figura 4	Cromatograma preparativo de CSY-02/PDB/C-18/7.	53
Figura 5	Cromatograma preparativo de CSY-02/MDB/C-18/5.	54
Figura 6	Placas contendo os extratos brutos a λ 366 nm.	65
Figura 7	Placas cromatográficas contendo os extratos brutos reveladas com DPPH.	65
Figura 8	Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos evidenciada em cromatoplasmas.	66
Figura 9	Espectro de RMN de ^1H de <u>1</u> (CDCl_3 , 500 MHz).	140
Figura 10	Espectro de RMN de ^{13}C de <u>1</u> (CDCl_3 , 125 MHz).	141
Figura 11	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>1</u> (CDCl_3 , 125 MHz).	142
Figura 12	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>1</u> (CDCl_3 , 125 MHz).	143
Figura 13	Espectro de Massas de <u>1</u> (ESI-EM +120V).	144
Figura 14	Espectro de RMN de ^1H de <u>3</u> (CDCl_3 , 500 MHz).	145
Figura 15	Espectro de Massas de <u>3</u> (ESI-EM +120V).	146
Figura 16	Espectro de Massas de <u>6</u> (ESI-EM -120V).	147
Figura 17	Espectro de RMN de ^{13}C de <u>6</u> ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).	148
Figura 18	Espectro de RMN de ^1H de <u>6</u> ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	149
Figura 19	Espectro de RMN de ^1H ampliado de <u>6</u> ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).	149

Figura 20	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>6</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	150
Figura 21	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>6</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	151
Figura 22	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>6</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	152
Figura 23	Espectro de Massas de <u>5</u> (ESI-EM +120V).	153
Figura 24	Espectro de RMN de ¹ H de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	154
Figura 25	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	154
Figura 26	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	155
Figura 27	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	155
Figura 28	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	156
Figura 29	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	157
Figura 30	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	158
Figura 31	Mapa de contorno ampliado <i>g</i> HMBC de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	158
Figura 32	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>5</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	159
Figura 33	Espectro de Massas de <u>2</u> (ESI-EM +120V).	160
Figura 34	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>2</u> (CDCl ₃ , 125 MHz).	161
Figura 35	Espectro de DEPT 135° de <u>2</u> (CDCl ₃ , 125 MHz).	161
Figura 36	Espectro de RMN de ¹ H de <u>2</u> (CDCl ₃ , 500 MHz).	162
Figura 37	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>2</u> (CDCl ₃ , 500 MHz).	162
Figura 38	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>2</u> (CDCl ₃ , 500 MHz).	163
Figura 39	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>2</u> (CDCl ₃ , 125 MHz).	164

Figura 40	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>2</u> (CDCl ₃ , 125 MHz).	165
Figura 41	Espectro de RMN de ¹ H de <u>4</u> (CDCl ₃ , 500 MHz).	166
Figura 42	Espectro de Massas de <u>4</u> (ESI-EM +120V).	167
Figura 43	Espectro de RMN de ¹ H de <u>12</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	168
Figura 44	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>12</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	168
Figura 45	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>12</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	169
Figura 46	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>12</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	170
Figura 47	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>12</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	171
Figura 48	Espectro de Massas de <u>12</u> (ESI-EM +120V).	172
Figura 49	Espectro de RMN de ¹ H de <u>17</u> (CDCl ₃ , 500 MHz).	173
Figura 50	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>17</u> (CDCl ₃ , 500 MHz).	174
Figura 51	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>17</u> (CDCl ₃ , 125 MHz).	175
Figura 52	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>17</u> (CDCl ₃ , 125 MHz).	176
Figura 53	Espectro de Massas de <u>17</u> (ESI-EM +120V).	177
Figura 54	Espectro de Massas de <u>18</u> (ESI-EM +120V).	178
Figura 55	Espectro de RMN de ¹ H de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	179
Figura 56	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	179
Figura 57	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	180
Figura 58	Mapa de contorno ampliado <i>g</i> HMBC de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	181
Figura 59	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	182

Figura 60	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	183
Figura 61	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>18</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	184
Figura 62	Espectro de Massas de <u>13</u> (ESI-EM +120V).	185
Figura 63	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	186
Figura 64	Espectro de RMN de ¹ H de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	187
Figura 65	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	188
Figura 66	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	189
Figura 67	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	190
Figura 68	Espectro de TOCSY-1D de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	191
Figura 69	Espectro de TOCSY-1D de <u>13</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	191
Figura 70	Espectro de RMN de ¹ H de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	192
Figura 71	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	192
Figura 72	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	193
Figura 73	Espectro de DEPT 135° de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	194
Figura 74	Espectro de DEPT 90° de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	194
Figura 75	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	195
Figura 76	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	196
Figura 77	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	197
Figura 78	Espectro de NOESY-1D de <u>10</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	198
Figura 79	Espectro de Massas de <u>10</u> (ESI-EM +120V).	199

Figura 80	Espectro de RMN de ^1H de <u>11</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	200
Figura 81	Espectro de RMN de ^1H ampliado de <u>11</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	200
Figura 82	Espectro de RMN de ^{13}C de <u>11</u> (DMSO- d_6 , 125 MHz).	201
Figura 83	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>11</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	202
Figura 84	Espectro de NOESY-1D de <u>11</u> (DMSO- d_6).	203
Figura 85	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>11</u> (DMSO- d_6 , 125 MHz).	204
Figura 86	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>11</u> (DMSO- d_6 , 125 MHz).	205
Figura 87	Espectro de Massas de <u>11</u> (ESI-EM +120V).	206
Figura 88	Espectro de RMN de ^1H de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	207
Figura 89	Espectro de RMN de ^1H ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	207
Figura 90	Espectro de RMN de ^1H ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	208
Figura 91	Espectro de RMN de ^1H ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	208
Figura 92	Espectro de RMN de ^{13}C de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 125 MHz).	209
Figura 93	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 125 MHz).	210
Figura 94	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 125 MHz).	211
Figura 95	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	212
Figura 96	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	213
Figura 97	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- d_6 , 500 MHz).	213

Figura 98	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	214
Figura 99	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	215
Figura 100	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	215
Figura 101	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	216
Figura 102	Espectro de NOESY-1D de <u>7</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	216
Figura 103	Espectro de NOESY-1D de <u>8</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	217
Figura 104	Espectro de NOESY-1D de <u>9</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	217
Figura 105	Espectro de Massas de <u>7</u> / <u>8</u> / <u>9</u> (ESI-EM +120V).	218
Figura 106	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	219
Figura 107	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	220
Figura 108	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	220
Figura 109	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	221
Figura 110	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	222
Figura 111	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	223
Figura 112	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	224
Figura 113	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	225
Figura 114	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	226

Figura 115	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	227
Figura 116	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	228
Figura 117	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>15</u> / <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	229
Figura 118	Espectro de NOESY-1D de <u>15</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	230
Figura 119	Espectro de NOESY-1D de <u>16</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	230
Figura 120	Espectro de Massas de <u>15</u> / <u>16</u> (ESI-EM +120V).	231
Figura 121	Espectro de RMN de ¹ H de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	232
Figura 122	Espectro de RMN de ¹ H ampliado de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	232
Figura 123	Espectro de RMN de ¹³ C de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	233
Figura 124	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	234
Figura 125	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC ampliado de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	235
Figura 126	Espectro de <i>g</i> COSY de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	236
Figura 127	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	237
Figura 128	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	238
Figura 129	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	239
Figura 130	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC ampliado de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	239
Figura 131	Espectro de NOESY-1D de <u>14</u> (DMSO- <i>d</i> ₆).	240
Figura 132	Ensaio de Bioautografia.	113
Figura 133	Cromatoplaça do bioensaio anticolinesterásico.	115
Figura 134	Resultado em cromatoplaça do ensaio antioxidante com DPPH.	116

Figura 135	Espectro de RMN de ^1H de B-1 (CDCl_3 , 500 MHz).	241
Figura 136	Espectro de RMN de ^1H ampliado de B-1 (CDCl_3 , 500 MHz).	241
Figura 137	Espectro de Infravermelho de B-1 .	242
Figura 138	Espectro de RMN de ^1H de B-3 (CDCl_3 , 500 MHz).	243
Figura 139	Espectro de RMN de ^1H ampliado de B-3 (CDCl_3 , 500 MHz).	243
Figura 140	Espectro de Infravermelho de B-3 .	244
Figura 141	Espectro de <i>g</i> COSY de B-3 (CDCl_3 , 500 MHz).	245
Figura 142	Espectro de RMN de ^1H da 4-etilciclohexanona (CDCl_3 , 500 MHz).	246
Figura 143	Espectro de RMN de ^1H de B-4 (CDCl_3 , 500 MHz).	247
Figura 144	Espectro de RMN de ^1H ampliado de B-4 (CDCl_3 , 500 MHz).	248
Figura 145	Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de B-4 (CDCl_3 , 125 MHz).	249
Figura 146	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de B-4 (CDCl_3 , 125 MHz).	250
Figura 147	Espectro de RMN de ^{13}C de B-4 (CDCl_3 , 125 MHz).	251
Figura 148	Espectro de <i>g</i> COSY de B-4 (CDCl_3 , 500 MHz).	252
Figura 149	Espectro de <i>g</i> COSY ampliado de B-4 (CDCl_3 , 500 MHz).	253

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Ilustração das etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos.	42
Esquema 2	Metodologia de obtenção e triagem dos extratos brutos para avaliação do perfil químico e da bioatividade em potencial.	43
Esquema 3	Fracionamento do extrato bruto CSY-03/Milho/AcOEt.	48
Esquema 4	Fracionamento do extrato bruto MDB de CSY-02.	51
Esquema 5	Citocalasinas produzidas por <i>Xylaria</i> sp.1 e <i>Xylaria</i> sp.	57
Esquema 6	Ensaio <i>in vitro</i> das citocalasinas utilizando linhagens de células de adenocarcinoma murino.	58
Esquema 7	Rota biossintética da griseofulvina.	75
Esquema 8	Rota biossintética das citocalasinas B, C e D.	86
Esquema 9	Formação da ligação peptídica.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Triagem química dos fungos endofíticos associados a espécies do Cerrado.	63
Tabela 2	Resultado da avaliação antifúngica dos extratos brutos.	68
Tabela 3	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de <u>1</u> (δ em ppm e J em Hz).	72
Tabela 4	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de <u>3</u> (δ em ppm e J em Hz).	74
Tabela 5	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>6</u> (δ em ppm e J em Hz).	77
Tabela 6	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>5</u> (δ em ppm e J em Hz).	80

Tabela 7	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de <u>2</u> (δ_{H} em ppm e J em Hz).	82
Tabela 8	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <u>4</u> (δ_{H} em ppm e J em Hz).	84
Tabela 9	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>12</u> (δ em ppm e J em Hz).	89
Tabela 10	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de <u>17</u> (δ em ppm e J em Hz).	90
Tabela 11	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) da substância <u>18</u> (δ em ppm e J em Hz).	92
Tabela 12	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>13</u> (δ em ppm e J em Hz).	94
Tabela 13	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>10</u> (δ em ppm e J em Hz).	96
Tabela 14	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>11</u> (δ em ppm e J em Hz).	98
Tabela 15	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>7</u> (δ em ppm e J em Hz).	100
Tabela 16	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>8</u> (δ em ppm e J em Hz).	102
Tabela 17	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>9</u> (δ em ppm e J em Hz).	104
Tabela 18	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>15</u> (δ em ppm e J em Hz).	106
Tabela 19	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>16</u> (δ em ppm e J em Hz).	107
Tabela 20	Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) de <u>14</u> (δ em ppm e J em Hz).	109

Tabela 21	Determinação da quantidade mínima inibitória das substâncias puras (em μg).	114
Tabela 22	Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i> das citocalasinas em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).	118
Tabela 23	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de B-1 (δ em ppm e J em Hz).	121
Tabela 24	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de B-3 (δ em ppm e J em Hz).	123
Tabela 25	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de B-4 (δ em ppm e J em Hz).	124

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
$^{2,3}J$	Acoplamento a duas ou três ligações
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	Rotação ótica
$[\text{M}]^+$	Íon molecular
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
C-18	Sílica gel de fase reversa tipo C-18
MeOH	Metanol
H_2O	Água
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
gCOSY	<i>"gradient"</i> - Correlated Spectroscopy
d	Dubleto
DAD	Detector com arranjo de diodos
dd	Duplo dubleto
dl	Dubleto largo
m	Multiplete

<i>q</i>	Quadrupleteo
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleteo
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleteo
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ESI-EM	Espectrometria de massas - Ionização por Electrospray
Fig.	Figura
Fr.	Fração
<i>g</i> HMBC	" <i>gradient</i> -Heteronuclear Multiple Bond Correlation"
<i>g</i> HMQC	" <i>gradient</i> -Heteronuclear Multiple Quantum Coherence"
J	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
MHz / Hz	Megahertz / Hertz
nm	Nanômetros
p./pág.	Página
BDA	Batata dextrose e ágar
MDB	Meio de dextrose e batata
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultra Violeta - Visível
DEPT	"Distortionless enhancement by polarization transfer"
min	Minutos
ppm	Parte por milhão
Subst.	Substância
TOCSY	"Total correlation spectroscopy"
PBS	"Phosphate buffer saline"
Hex.	Hexano
NOESY	"Nuclear overhauser effect spectroscopy"
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Fungos: uma visão geral	24
1.2 Fungos endofíticos	25
1.2.1 <i>A diversidade metabólica dos fungos endofíticos</i>	27
1.3 Espécie vegetal hospedeira	29
1.4 Fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i>	31
1.4.1 Fungo <i>Xylaria sp.</i>	31
1.4.2 Fungo <i>Colletotrichum crassipes</i>	32
1.5 Fungos e biotransformação	34
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS	37
3.1 Meios para cultivo dos microrganismos	38
3.2 Solventes	38
3.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	38
3.4 Cromatografia em coluna	38
3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	38
3.6 Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN de ^1H e ^{13}C)	39
3.7 Outros equipamentos	39
4 PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1 Triagem químico/biológica de fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado	41
4.1.1 <i>Seleção e obtenção das espécies vegetais</i>	41

4.1.2 Isolamento das cepas fúngicas	41
4.1.3 Classificação das linhagens fúngicas	42
4.1.4 Cultivo em meio líquido dos endófitos, obtenção e triagem dos extratos brutos	42
4.1.5 Avaliação da atividade antioxidante	43
4.1.6 Avaliação da atividade antifúngica*	44
4.1.7 Avaliação da atividade anticolinesterásica*	44
4.2 Estudo químico dos extratos brutos selecionados pela triagem (CSY-02 e CSY-03)	46
4.2.1 Obtenção dos extratos brutos de <u>Colletotrichum crassipes</u> (CSY-02) e <u>Xylaria sp.</u> (CSY-03), isolados da espécie vegetal <u>Casearia sylvestris</u> .	46
4.2.2 Fracionamento dos extratos brutos	47
4.2.2.1 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de <u>Xylaria sp.</u> (CSY-03) em milho	47
4.2.2.2 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de <u>Xylaria sp.</u> (CSY-03) em MDB	48
4.2.2.3 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de <u>Colletotrichum crassipes</u> (CSY-02) em MDB	50
4.2.3 Bioensaios realizados para as substâncias puras	55
4.3 Avaliação da citotoxicidade de citocalasinas utilizando linhagens de células de adenocarcinoma murino	56
4.4 Biotransformação utilizando os fungos endofíticos <u>Colletotrichum crassipes</u> e <u>Xylaria sp.</u>	59
4.4.1 Biotransformação por <u>Xylaria sp.</u>	59
4.4.2 Biotransformação por <u>Colletotrichum crassipes</u>	60
4.4.3 Fracionamento por cromatografia em coluna	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Resultados da triagem química dos fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado	63
5.1.1 Resultado dos bioensaios realizados com os extratos brutos	64
5.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas	70

5.2.1 Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <u>Xylaria sp.</u> (CSY-03)	70
5.2.1.1 - Identificação estrutural da substância <u>1</u>	71
5.2.1.2 - Identificação estrutural da substância <u>3</u>	73
5.2.1.3 Identificação estrutural da substância <u>6</u>	76
5.2.1.4 Identificação estrutural da substância <u>5</u>	78
5.2.1.5 Identificação estrutural da substância <u>2</u>	81
5.2.1.6 Identificação estrutural da substância <u>4</u>	83
5.2.2 Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <u>Colletotrichum crassipes</u> (CSY-02)	87
5.2.2.1 Identificação estrutural da substância <u>12</u>	88
5.2.2.2 Identificação estrutural da substância <u>17</u>	89
5.2.2.3 Identificação estrutural da substância <u>18</u>	91
5.2.2.4 Identificação estrutural da substância <u>13</u>	93
5.2.2.5 Identificação estrutural da substância <u>10</u>	95
5.2.2.6 Identificação estrutural da substância <u>11</u>	97
5.2.2.7 Identificação estrutural da substância <u>7</u>	99
5.2.2.8 Identificação estrutural da substância <u>8</u>	101
5.2.2.9 Identificação estrutural da substância <u>9</u>	103
5.2.2.10 Identificação estrutural da substância <u>15</u>	105
5.2.2.11 Identificação estrutural da substância <u>16</u>	106
5.2.2.12 Identificação estrutural da substância <u>14</u>	108
5.3 Resultados dos bioensaios realizados com as substâncias puras	113
5.4 Resultado da avaliação citotóxica de citocalasinas contra cepas celulares de adenocarcinoma (mama e pulmão) murino	117
5.5 Resultados da biotransformação utilizando os fungos endofíticos <u>Colletotrichum crassipes</u> e <u>Xylaria sp.</u>	119
5.5.1 Biotransformação da 4-etilciclohexanona por <u>Colletotrichum crassipes</u>	119
5.5.2 Biotransformação de 4-etilciclohexanona por <u>Xylaria sp.</u>	122
6 CONCLUSÃO	125
7 REFERÊNCIAS	128
Anexos	1

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais são explorados há muitos anos e as plantas sempre representaram a principal fonte natural de compostos usados na medicina popular (STROBEL et al., 2004). Entre os exemplos de fármacos obtidos a partir de fontes vegetais destacam-se alguns utilizados até o presente e de uso disperso pelos continentes como, por exemplo: aspirina, codeína, digitoxina e eugenol. Além destes, pode-se ainda destacar o psolarem, uma cumarina isolada de *Psorelea corylifolia* (empregada no tratamento de vitiligo), e a podofilotoxina, isolada de *Podophylum peltatum*, que possui dois derivados semi-sintéticos: o etoposideo (empregado no tratamento de câncer de testículo e certos tipos de câncer de pulmão) e o teniposide (que tem emprego no tratamento de leucemia). Uma descoberta de fármacos de fonte vegetal muito significativa foi a dos alcalóides da Vinca (*Catharanthus roseus*), vincristina e vimblastina, utilizadas em diversos tratamentos de câncer (DAVID et al., 2004).

Entre os 520 novos fármacos aprovados entre 1983 e 1994, 39% são produtos naturais ou derivados de produtos naturais, predominando na área de antibacterianos e antitumorais (CRAGG et al., 1997; CRAGG et al., 2006). Dos fármacos produzidos a partir de 1995, 244 estruturas químicas têm sido utilizadas como protótipos, sendo que destas 83% são provenientes de fontes naturais (animais, plantas e microrganismos) e 17% são provenientes de síntese química ou de observações das atividades biológicas de compostos existentes (FURTADO, 2004).

Contribuindo para a grande riqueza e importância dos produtos naturais, os microrganismos também começaram a ser investigados como fonte de princípios bioativos. Os fungos passaram a ser estudados quimicamente após a descoberta da penicilina por Fleming e Chain (1930), um poderoso antibiótico produzido por *Penicillium notatum* (STROBEL et al., 2004). A descoberta deste importante agente bioativo evidenciou os fungos como uma fonte natural rica e promissora na busca por novos metabólitos e marcou o início de investigações químicas/biológicas nesta classe de microrganismos.

1.1 Fungos: uma visão geral

Os fungos são organismos quimiorganotróficos, cujo corpo pode ser unicelular (leveduriforme) ou pluricelular (micélio) (SILVA, 2005). Típicos de ambientes úmidos, encontram-se distribuídos em habitats diversos: água, solo, ar, sobre partículas em suspensão ou ainda como parasitas de plantas e animais. São organismos que comumente prosperam em ambientes competitivos, mantendo relações simbióticas (mutualismo ou comensalismo), tróficas (predação e parasitismo) e de competição (por território e alimento) com outros organismos do ecossistema (AZEVEDO, 1998).

Com relação à ocorrência e biodiversidade, os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a terra, perdendo apenas para os insetos. Estimativas sugerem que há aproximadamente 1,5 milhões de espécies diferentes de fungos, sendo que menos de 5% foram descritas (HAWKSWORTH, 1991; HAWKSWORTH, 2001).

Entre as propriedades dos fungos é importante ressaltar que apresentam grande capacidade de produzir moléculas bioativas. São conhecidos pela produção de substâncias altamente tóxicas para mamíferos (micotoxinas), sendo algumas consideradas carcinogênicas potentes. Tais substâncias incluem aflatoxinas, ocratoxinas, citreoviridinas, tricotecenos e fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos tremorgênicos (MILLER; TRENHOLM, 1991). Entretanto, esta classe de microrganismo também é responsável pela produção de uma gama de metabólitos bioativos com aplicação terapêutica. Dentre os medicamentos de maior repercussão para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos β -lactâmicos das classes das penicilinas e cefalosporinas, como os exemplos mais conhecidos de produtos de fungos. Estes antibióticos ainda são os mais usados no mundo, devido à eficácia e a bem estabelecida produção em larga escala. Outros exemplos incluem a mevinolina (Mevacor[®] = lovastatina), um agente redutor de colesterol detentor de um mercado mundial em torno de 1 bilhão de dólares anuais, ciclosporinas (MASUREKAR, 1992), bleomicinas, daunorubicinas e análogos (agentes antitumorais), avermectina B (anti-helmíntico) e alcalóides ergot (CAFEU, 2005). Metabólitos produzidos por fungos também são alvos de pesquisas envolvendo a busca por novos agentes anticolinesterásicos. As arisugacinas (produzidas por fungos de solo

denominados WK-4164 e FO-4259) apresentaram perfil promissor como anticolinesterásicas (VIEGAS et al., 2004). Estes microrganismos ainda se destacam produtores de agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas) (GARDNER; MCCOY, 1992).

Além da alta capacidade de produção metabólica, os fungos apresentam vantagens sobre outras fontes naturais, uma vez que são recursos renováveis e a produção em larga escala dos metabólitos bioativos pode ser realizada usando a tecnologia existente (variação do meio e otimização das condições de cultivo). Por exemplo, a manipulação na cultura produtora de penicilina resultou em um aumento de 6000 vezes na produção (DEMAIN, 2000). Assim, apesar das etapas muitas vezes não serem facilmente otimizadas, metabólitos promissores isolados de fungos podem ser acessíveis em escala prática através da aplicação da biotecnologia. Outro aspecto relevante dos fungos é com relação à conservação ambiental, uma vez que requerem uma única e pequena remoção do ambiente natural (BILLS, 1995).

Uma das estratégias na busca por agentes potencialmente bioativos é guiar-se por organismos que vivem em associações, tais como fungo-fungo, fungo-inseto e fungo-planta (endofíticos).

1.2 Fungos endofíticos

São fungos que vivem nos tecidos internos das espécies vegetais por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (CLAY, 1988). As infecções destes microrganismos ocorrem através das raízes, estômatos ou lesões (CARROL, 1988) e estes também podem habitar a planta por toda a vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 a 100 diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo que até cinco podem ser específicos ao hospedeiro (são chamados de espécies dominantes) (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). Esta especificidade sugere que seja qual for a taxa de extinção das espécies de plantas, a taxa de extinção das espécies de fungos endofíticos é muito maior. Assim, tem-se constatado uma urgente necessidade em se estudar a química dos endófitos, temendo-se a perda da biodiversidade.

As interações entre fungos endofíticos e plantas ainda não são muito bem compreendidas mas sabe-se que podem ser simbióticas (mutualismo ou comensalismo) ou tróficas (parasitismo) (SOUZA et al., 2004). Nas interações mutualísticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos que podem conferir diversas vantagens à planta, como por exemplo, a diminuição do ataque de insetos e o aumento da tolerância ao stress ambiental (ARAUJO, 1996; RODRIGUES et al., 1996). Também podem produzir metabólitos que não interferem no metabolismo do vegetal, para autodefesa contra outros microrganismos (comensalismo). Um exemplo de relação de parasitismo é a infecção das folhas de *Hymenaea courbaril* por *Pestalotia subcuticularis*. Quando sementes de *H. courbaril* infectadas pelo fungo são semeadas, este permanece dormente até a planta se tornar adulta. Após este período, o fungo produz fitotoxinas e mata a planta (SILVA, 2005). Um fator que se deve levar em consideração é que durante a relação fungo/planta pode ocorrer transição de um estado simbiótico a trófico, devido a condições de stress ambiental. Assim sendo, o endofítico passaria a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

Nos diversos grupos de fungos filamentosos, a literatura tem relatado poucos estudos químicos baseados em observações ecológicas, principalmente relacionadas com o "habitat"; no entanto, quando são realizadas, têm conduzido ao isolamento de substâncias com as mais diversas bioatividades (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). Sendo assim, tais observações podem e devem ser usadas como um meio racional e útil para a busca de princípios ativos.

Em um programa de triagem de produtos naturais oriundos de fungos foi verificado que os endofíticos constituem o grupo mais produtivo quimicamente entre os fungos filamentosos, apresentando uma produção de metabólitos secundários 73% superior a outros fungos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). A alta produtividade dos endofíticos pode ser explicada pela teoria ecológica que prediz que existem dois fatores chaves para promover a diversidade metabólica em organismos: alto nível de "stress" ambiental e intensas interações com outros organismos. Organismos submetidos a um ou ambos os fatores são mais prováveis de produzirem metabólitos secundários biologicamente ativos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994).

Além das observações ecológicas, a busca de metabólitos secundários em fungos endofíticos poderia ser direcionada pela quimiotaxonomia, no entanto, a escassez de informações desta natureza dificulta o uso desta importante ferramenta na busca de compostos bioativos.

1.2.1 A diversidade metabólica dos fungos endofíticos

Existem relatos de um possível “aprendizado” dos organismos associados em produzirem as mesmas classes de substâncias que os hospedeiros. Este fenômeno ecológico tem sido interpretado como sendo uma “transferência genética horizontal”, que pode ser originada por troca de material genético dos organismos associados (planta e fungos) durante o processo de penetração no hospedeiro (ROHR, 1997).

Nos anos 90 do século passado, estudos realizados por Stierle et al. (1993) despertaram ainda mais o interesse biotecnológico para o imenso potencial dos microrganismos endofíticos, pois ficou evidenciado que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* é capaz de produzir um complexo diterpenóide, o taxol, que é um agente antitumoral de alto valor no mercado internacional. Trabalhos posteriores também mostraram que outro fungo endofítico, *Pestalotiopsis microspora*, isolado de *T. wallachiana* também produz taxol (STROBEL et al., 1996). Com as evidências de que fungos endofíticos podem também produzir o taxol visualizou-se um novo processo, talvez mais eficiente e menos dispendioso, para a produção deste importante fármaco.

Outros produtos potencialmente bioativos produzidos pelos fungos endofíticos merecem destaque, como os antitumorais citocalasina E (**A**) (WAGENAR et al., 2000), pestalotiopsis A (**B**) (PULICI et al., 1996), ácido torriânico (**C**) e ácido oregânico (**D**) (LEE et al., 1996); geniculol (**E**) e citocalasina F (**F**) são caracterizadas pela bioatividade algicida (KONIG et al., 1999); citosporona D (**G**) (BRADY et al., 2000), fomopsolida A (**H**) e ácido coletotrico (**I**) (ZOU et al., 2000) se destacam pela atividade antibacteriana; leucinostatina A (**J**) (STROBEL et al., 1997), criptocandina (**K**), e criptocina (**L**) (LI et al., 2000) apresentam

atividade antifúngica. Estes metabólitos estão apresentados na **Ilustração 1**.

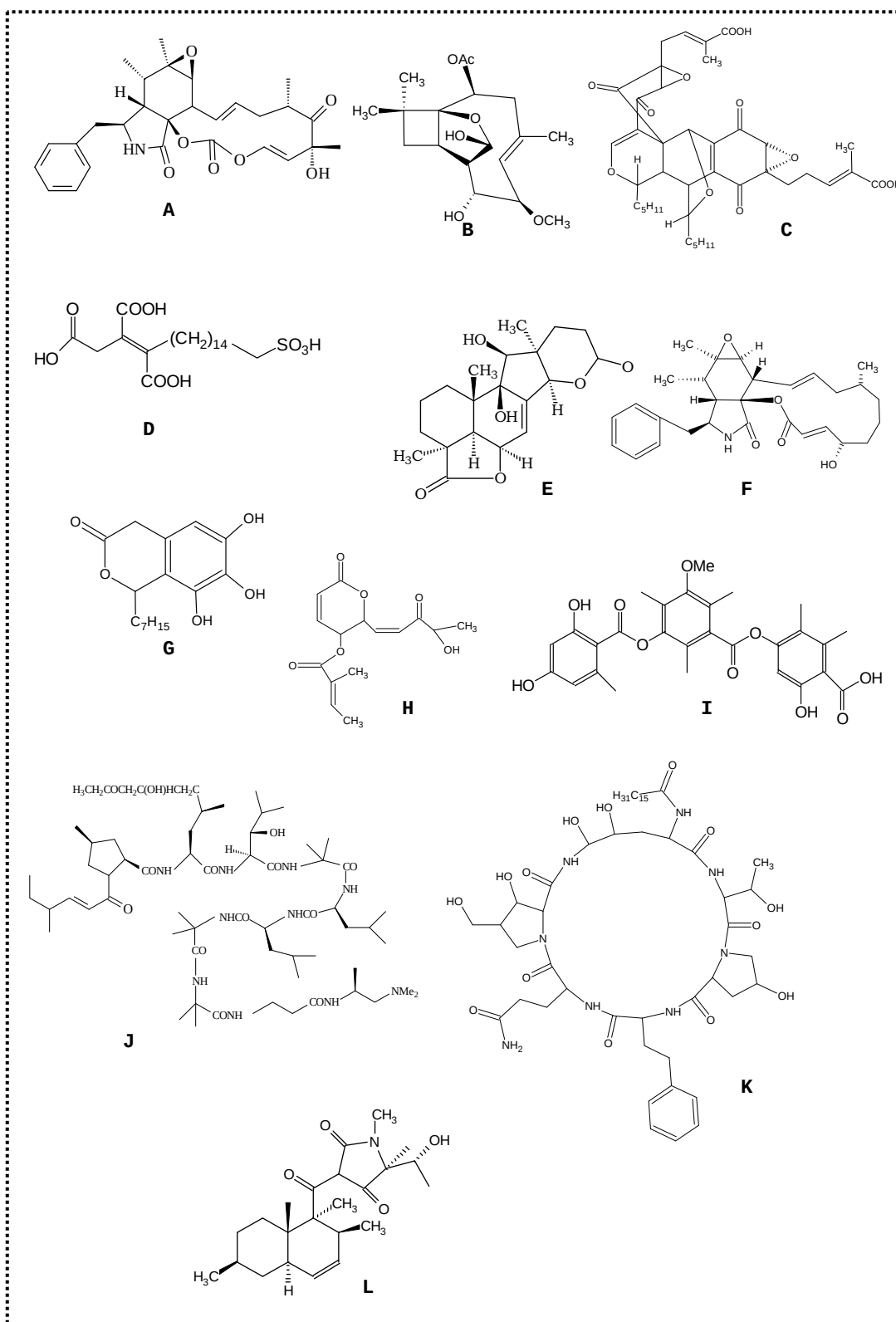


Ilustração 1 - Substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos

A necessidade da descoberta de novos fármacos com ação terapêutica requer otimização contínua e intensificou-se nos últimos anos devido ao desenvolvimento da resistência de alguns microrganismos patógenos, tais como *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Tuberculosis* e *Streptococcus*, à fármacos existentes. Além disso, a busca por novos agentes antimicóticos tem se tornado cada vez mais necessária devido ao desenvolvimento de doenças fúngicas na população humana, como resultado de um sistema imunológico comprometido (STROBEL, et al., 2004). Fármacos mais eficientes para o tratamento de doenças como malária, leishmaniose e tripanomíase, causadas por protozoários parasitas, também são necessárias (STROBEL, 2002). Na última década, o estudo do envolvimento do estresse oxidativo na patofisiologia de diversas doenças crônicas, como as cardiovasculares e o câncer, e da artrite reumatóide (doença degenerativa do envelhecimento), indica que substâncias antioxidantes desempenham papel fundamental na prevenção destas patologias (PIETTE, 1991). O câncer é uma doença que atinge milhares de pessoas em todo o mundo e medicamentos mais eficientes e menos agressivos são extremamente necessários.

Desse modo, a primordial necessidade por novos metabólitos bioativos deve induzir às investigações em fontes promissoras, como os fungos endofíticos, uma vez que estes apresentam capacidade de produção metabólica com grande diversidade estrutural e com largo espectro de bioatividades.

Para o estudo químico destes endófitos deve-se primeiramente selecionar a espécie vegetal hospedeira.

1.3 Espécie vegetal hospedeira

A seleção racional da espécie vegetal hospedeira garante melhores oportunidades no isolamento de fungos endofíticos de novos gêneros e espécies. Devido ao enorme número de espécies de plantas no mundo, algumas estratégias na seleção da planta podem ser utilizadas na busca por endofíticos bioativos (STROBEL, et al., 2004), tais como:

- ❖ plantas com história etnobotânica que relata o uso e a aplicação específica de partes do vegetal;
- ❖ plantas endêmicas que ocupam solos mais antigos e

❖ plantas nativas de áreas com grande biodiversidade.

A planta selecionada para o isolamento de endofíticos foi a *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), popularmente conhecida como “guaçatonga”, “cafezeiro do mato”, “chá de bugre”, “erva de bugre” e “língua de lagarto” (LORENZI, 1992):



Esta espécie vegetal tem ampla distribuição na América Tropical, especialmente no Brasil, ocorrendo em todo o território, inclusive em Cerrado e Mata Atlântica (LORENZI, 1992).

Casearia sylvestris é uma planta medicinal utilizada por índios, caboclos e populações tradicionais e está incluída na “fitoterapia popular”. Na medicina indígena da região amazônica as folhas, cascas e raízes desta planta são utilizadas como antitérmico de uso externo ou interno (JUNGES et al., 1985). Agricultores do Estado do Rio Grande do Sul faziam uso empírico do “chá de bugre” como abortivo e para retirar a placenta (pós parto) de animais (JUNGES et al., 1985). Há relatos do uso de preparados de folhas de *C. sylvestris* na medicina popular como anestésico local, antidiarréico, antiofídico, anti-reumático, anti-séptico, antiulceroso e cicatrizante. A raiz desta espécie vegetal também apresenta propriedades depurativa e anestésica (JUNGES et al., 1985; CORREA, 1975).

Estudos fitoquímicos das folhas de *C. sylvestris* evidenciaram a presença de flavonóides, saponinas, óleo essencial (SCAVONE et al., 1979) e o extrato bruto apresentou atividades antiulcerosa (SERTIÉ et al., 2000), antiofídico, antiinflamatória e antitumoral (CARVALHO et al., 1998), demonstrando a grande importância desta espécie na busca de metabólitos bioativos.

A atribuição da responsabilidade pela ação farmacológica às substâncias só foi estabelecida em *C. sylvestris* no caso da atividade antitumoral. Pesquisadores japoneses isolaram diterpenos

clerodânicos, os quais foram denominados casearinas A-F, com atividade antitumoral. Itokawa et al. (1989) obtiveram uma patente relacionada à ação apresentada por esses diterpenos e em estudos posteriores, Morita et al. (1991) isolaram as casearinas denominadas G-R, também com atividade citotóxica. Três novos diterpenos clerodânicos foram isolados das folhas e dos caules de *C. sylvestris* por Oberlies et al. (2002), denominados casearvestrinas A, B e C, e estes apresentaram atividade antitumoral e antifúngica.

Dentro do grupo de pesquisa NuBBE (IQ-UNESP - Araraquara) Carvalho et al. (1998) isolou três casearinas inéditas das folhas de *C. sylvestris* (G, S e T) que também apresentaram atividade antitumoral potencial. Uma pesquisa realizada pelo professor Dr. Alberto José Cavaleiro, com folhas de *C. sylvestris* resultou em uma patente, a qual foi depositada em 18/12/2003 (DEINPI 006358) registrando processos de obtenção de extratos e frações ativas para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gástricos.

A potencialidade biológica apresentada por *Casearia sylvestris*, as fortes evidências de que microrganismos endofíticos produzam as mesmas substâncias, ou derivados com maior bioatividade que a planta hospedeira e os dados obtidos durante a triagem realizada, justificam a escolha dos fungos associados a esta espécie vegetal para o estudo químico/biológico desta tese de doutorado. Foram selecionados dois fungos endofíticos isolados de *C. sylvestris* para o estudo químico, *Colletotrichum crassipes* e *Xylaria* sp.

1.4 Fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris*

1.4.1 Fungo *Xylaria* sp.



O fungo *Xylaria* sp. pertence à ordem Xylariales e família Xylariaceae. A família Xylariaceae possui cerca de 40 gêneros e o número exato de espécies da família ainda não pôde ser determinado,

devido à grande dificuldade na classificação e a falta de coleções modernas de espécies tropicais; porém, com base em revisões são descritas 431 espécies (HAWKSWORTH, 1991). Os estudos com fungos de regiões tropicais a partir do final dos anos 90 têm revelado um grande número de espécies desta família (SILVA, 2005) que comumente vivem saprofiticamente (alimentam-se de organismos em decomposição) (HAWKSWORTH, 1991; HAWKSWORTH, 2001).

O gênero *Xylaria* possui 100 espécies já descritas, mas estima-se que possa chegar a 500 (WHALLEY, 1997). Os fungos deste gênero são encontrados como saprófitas, fitoparasitas e endofíticos. Os relatos de *Xylaria* como endofíticos ocorreram nos últimos anos com a intensificação dos estudos com plantas tropicais (BAYMAN et al., 1998). Espécies endofíticas de *Xylaria* foram encontradas em palmas, orquídeas e bromélias, entre outras (BAYMAN et al., 1998). Os membros da família Xylariaceae constituem o grupo taxonômico com maior frequência de isolamento entre as espécies endofíticas isoladas de plantas tropicais (RODRIGUES, 1994).

Uma diversidade de metabólitos secundários já foi produzida por fungos do gênero *Xylaria*, tais como: sesquiterpenóides eremofilanos (SINGH et al., 1999), xylarenal A (SMITH et al., 2002), xylocetal A (LIN et al., 2001), multiploide A (BOONPHONG et al., 2001), citocalasinas e epoxicitocalasinas (DAGNE et al., 1994), entre outros. Todos estes metabólitos apresentam algum tipo de bioatividade tais como, antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica, evidenciando a potencialidade destes fungos na produção de substâncias bioativas.

1.4.2 Fungo *Colletotrichum crassipes*



O gênero *Colletotrichum* é membro da família Philacoraceae. Tradicionalmente, características morfológicas como tamanho e forma de conídios são utilizados para taxonomia de *Colletotrichum*.

Entretanto, a caracterização baseada unicamente em critérios morfológicos pode não ser suficiente, devido à grande variabilidade destas características para alguns fungos deste gênero. Outros critérios adotados são: cultivo dos fungos em diferentes temperaturas, sensibilidade a fungicidas e diferenças fisiológicas quanto à capacidade de utilização de diferentes substratos (TOZZE et al., 2006). Espécies deste gênero estão envolvidas em infecções de plantas, sendo que algumas compreendem os patógenos mais destrutivos de espécies vegetais, incluindo cereais, legumes, frutas e vegetais. Plantações de morangos são, particularmente, mais suscetíveis a doenças causadas por estes microrganismos (COLLADO et al., 2003).

Há relatos de fungos do gênero *Colletotrichum* como endofíticos e estes são reconhecidamente produtores de uma gama de metabólitos secundários bioativos. Alguns exemplos são o ácido colletotrico, produzido por *C. gloesporioides*, associado à espécie vegetal *Artemisia mongólica*, que apresentou bioatividade contra as linhagens de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (ZOU et al., 2000); da cultura de *Colletotrichum* sp., isolado de *Artemisia annua*, foram isolados diversos metabólitos tais como ergosterol, 3-oxo-ergost-4-ene, 3-indol-ácido acético, 6-isoprenilindol-3-ácido carboxílico, 3 β ,5 α -diidroxio-6 β -acetóxi-ergosta-7,22-dieno e 3 β ,5 α ,6 β -triidroxiergosta-7,22-dieno que apresentaram bioatividade antimicrobiana e antifúngica contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Rhizoctonia cerealis* (LU et al., 2000); há relatos da produção de C-6 e C-8 metil-flavonol pelo fungo endofítico *C. dematium* f.sp. *epilobii* isolado de *Epilobium angustifolium* (ABOUZAID et al., 1997); do fungo *C. gloesporoides*, isolado de *Cryptocaria mandiocanna*, foram isoladas as substâncias 4-hidroxi-6-deoxicitalona e 4,8-dihidroxi- α -tetralona que apresentaram potencial bioatividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporoides* e *C. sphaerospermum* (INACIO et al., 2006). Outros metabólitos secundários também foram produzidos por fungos *Colletotrichum* ssp. como aspergillomarasmina A e B, gloesporona, ferricrocina, uracila e lumichroma (INACIO et al., 2006). Estes dados revelam a potencialidade dos fungos do gênero *Colletotrichum* na produção de substâncias com esqueleto químico diverso, além de

bioativas, justificando a escolha de um fungo deste gênero para o estudo químico nesta tese de doutorado.

1.5 Fungos e biotransformação

Os diversos relatos de produção metabólica de fungos pertencentes aos gêneros *Xylaria* e *Colletotrichum* revelam que estes microrganismos são constituídos de um eficiente sistema enzimático. Este fato despertou o interesse em realizar uma avaliação preliminar da capacidade dos endófitos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* em experimentos de biotransformação, possibilitando a identificação de classes de enzimas associadas a estes microrganismos.

A biotransformação pode ser resumidamente definida como sendo a utilização de sistemas biológicos (microrganismos ou enzimas isoladas) capazes de provocar transformações químicas em compostos que não são seus substratos naturais (COLLADO et al., 2001).

Fungos, leveduras e bactérias são utilizados há algum tempo em transformações biológicas de compostos orgânicos. Recentemente, o uso destes microrganismos ou de seus sistemas enzimáticos isolados se expandiu e tem conduzido a reações estereoespecíficas e estereoseletivas de grande importância em síntese assimétrica de moléculas com atividades biológicas relevantes (COLLADO et al., 2003).

Várias espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* foram relatadas por Collado et al (2003), como sendo utilizadas em biotransformações, com interesse em aplicações industriais e sintéticas. Várias classes químicas de compostos orgânicos foram submetidas a este processo para avaliar a capacidade de biotransformação do microrganismo como, por exemplo, as fitoalexinas (antibióticos produzidos pelas plantas em resposta à infecção por micróbios) maackiaine e medicarpine. Diversos terpenóides acíclicos, saturados acíclicos, insaturados acíclicos, monoterpenóides, sesquiterpenos e esteróides também se mostraram suscetíveis a sofrerem modificações no esqueleto químico por ação de microrganismos (COLLADO et al., 2003).

O estudo químico preliminar da potencialidade dos fungos endofíticos como biotransformadores pode contribuir com dados para a literatura, ainda tão escassa para este nicho de microrganismos.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o estudo químico e biológico dos extratos brutos fornecidos pelos fungos endofíticos *Colletotrichum crassipes* e *Xylaria* sp., associados a espécie vegetal *Casearia sylvestris*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Realizar triagem química (CLAE-DAD e RMN de ^1H) e biológica (ensaio antifúngico, anticolinesterásico e antioxidante) dos extratos brutos produzidos por 21 linhagens de fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado.
- ❖ Preservação e manutenção das 21 linhagens fúngicas.
- ❖ Selecionar as linhagens fúngicas para estudo químico/biológico.
- ❖ Cultivar em larga escala os fungos selecionados (CSY-02 e CSY-03), nos meios líquido (PDB) e sólido (Milho), para obtenção dos extratos brutos.
- ❖ Isolamento e elucidação e/ou identificação estrutural dos metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, respectivamente.
- ❖ Submeter as substâncias puras isoladas aos ensaios para avaliação do potencial antifúngico, antioxidante e anticolinesterásico.
- ❖ Avaliação preliminar do potencial enzimático dos fungos endofíticos em experimento de biotransformação.
- ❖ Contribuir para o conhecimento da química dos fungos endofíticos despertando o interesse para futuros estudos envolvendo a interação entre microrganismos-plantas.

3 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS

3.1 Meios para cultivo dos microrganismos

- ❖ Meios de cultura sólidos:

BDA – Batata Dextrose Agar (Sigma): 39g/L de água.

Milho descascado “canjica” (Yoki): 90g em 75 mL de água.

- ❖ Meio de cultura líquido:

MDB – Meio de Dextrose e batata (DIFCO): 24g/L de água.

3.2 Solventes

- ❖ Deuterados: CDCl_3 e $\text{DMSO-}d_6$ (Merck, Aldrich e Fluka).
- ❖ Não-deuterados: Merck, J.T. Backer, Synth e Mallinckrodt.

3.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Sílica gel 60PF-254 (Merck) suspendida em água destilada na proporção 1:2 (m/v) foi aplicada em placa de vidro 20 X 20 cm obtendo-se 0,25 mm de espessura. Foi utilizado espalhador “Quickfit” para espalhar a sílica de forma homogênea na placa. Após preparo, as placas foram mantidas em repouso por 4 horas e ativadas em estufa a 110°C por 1 hora. As revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (UV 254 e 366 nm), nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento ou exposição a iodo sublimado.

3.4 Cromatografia em coluna

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

Fases estacionárias: sílica C-18 (40-63 μm ; Merck) e sílica gel fase normal (0,035-0,070 mm; ACROS ORGANICS).

3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE no modo analítico foram realizadas em equipamento ProStar da Varian acoplado ao detetor ProStar 330 de arranjos de diodos. Foi utilizada a coluna analítica Phenomenex sílica C-18 (250 x 4,60mm; 5 μm).

No modo preparativo, as análises por CLAE foram realizadas em equipamento ProStar da Varian acoplado ao detetor ProStar UV, utilizando a coluna Phenomenex sílica C-18 (250 x 21,20mm; 10 μ m).

3.6 Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500 operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e em 125 MHz para o núcleo de ^{13}C (Campo magnético 11,4 T). Foi utilizado TMS como referência interna.

3.7 Outros equipamentos

Evaporador rotatório - Buchi

Balança analítica - Mettler Toledo AG 245

Autoclave vertical - Quimis Aparelhos Científicos Ltda

Câmara de fluxo laminar - NUAIRE II, A/B3

Incubadora rotatória ("shaker") - Marconi

Espectrômetro de Massas tipo quadrupolo (Quattro - LC, Micromass)

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Triagem químico/biológica de fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado

4.1.1 Seleção e obtenção das espécies vegetais

Foram selecionadas e coletadas as seguintes espécies vegetais do Cerrado do Estado de São Paulo: *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae), *Alibertia sessilis* (Rubiaceae), *Arrabidaea samydoides* (Bignoneaceae), *Casearia semidecandra* (Flacourtiaceae), *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), *Senna spectabilis* (Leguminoseae), *Cupania vernalis* (Sapindaceae), *Psychotria marcgravii* (Rubiaceae), *Piper aduncum* (Piperaceae), *Prunus mirtifolia* (Rosaceae), *Rudgea viburnioides* (Rubiaceae), *Styrax ferrugineus* (Styracaceae), *Tocoyena formosa* (Rubiaceae), *Ocotea corymbosa* (Lauraceae), *Xylopia aromatica* (Annonaceae) e *Virola sebifera* (Miristicaceae). As espécies vegetais foram coletadas na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu com exceção da *S. spectabilis*, *Piper aduncum* e *Xylopia aromática* que foram coletadas em Araraquara, SP.

As exsiccatas encontram-se devidamente classificadas e depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

4.1.2 Isolamento das cepas fúngicas

Folhas saudáveis das espécies vegetais coletadas foram lavadas com água e sabão e esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 minutos) e em etanol 70% (1 minuto), seguida de lavagem com água estéril (10 minutos) e secagem (MAIER et al., 1997). Após o processo de esterilização, as folhas foram cortadas e incubadas em placas de Petri contendo BDA e o antibiótico sulfato de antamicina (50 µg/mL), para evitar o crescimento bacteriano. Repiques utilizando outras placas de Petri contendo BDA foram realizados sucessivamente e resultaram em 95 linhagens fúngicas puras, as quais foram preservadas em frascos com água esterilizados (SILVA, 2005), conforme pode ser visualizado no **Esquema 1**.



Esquema 1 - Ilustração das etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos.

Das linhagens isoladas, 59 foram triadas química/biologicamente por Geraldo H. Silva e Helder L. Teles (SILVA, 2005) e 9 foram triadas pela aluna de mestrado Renata Sordi (SORDI, 2006).

As 21 cepas restantes, codificadas como **ALG-02, ALG-03, ALG-a, PL-03, PL-04, PL-05, PL-07, CSY-01, CSY-02, CSY-03, CSY-04, CSY-05, PAJ-11, PR-03, RUV-01, RUV-04, RUV-06, RUV-08, CB10-3, CB14-4 e TF-01**, foram cultivadas em pequena escala no meio líquido MDB e os respectivos extratos brutos foram triados químico/biologicamente durante a realização do trabalho experimental desta tese de doutoramento.

4.1.3 Classificação das linhagens fúngicas

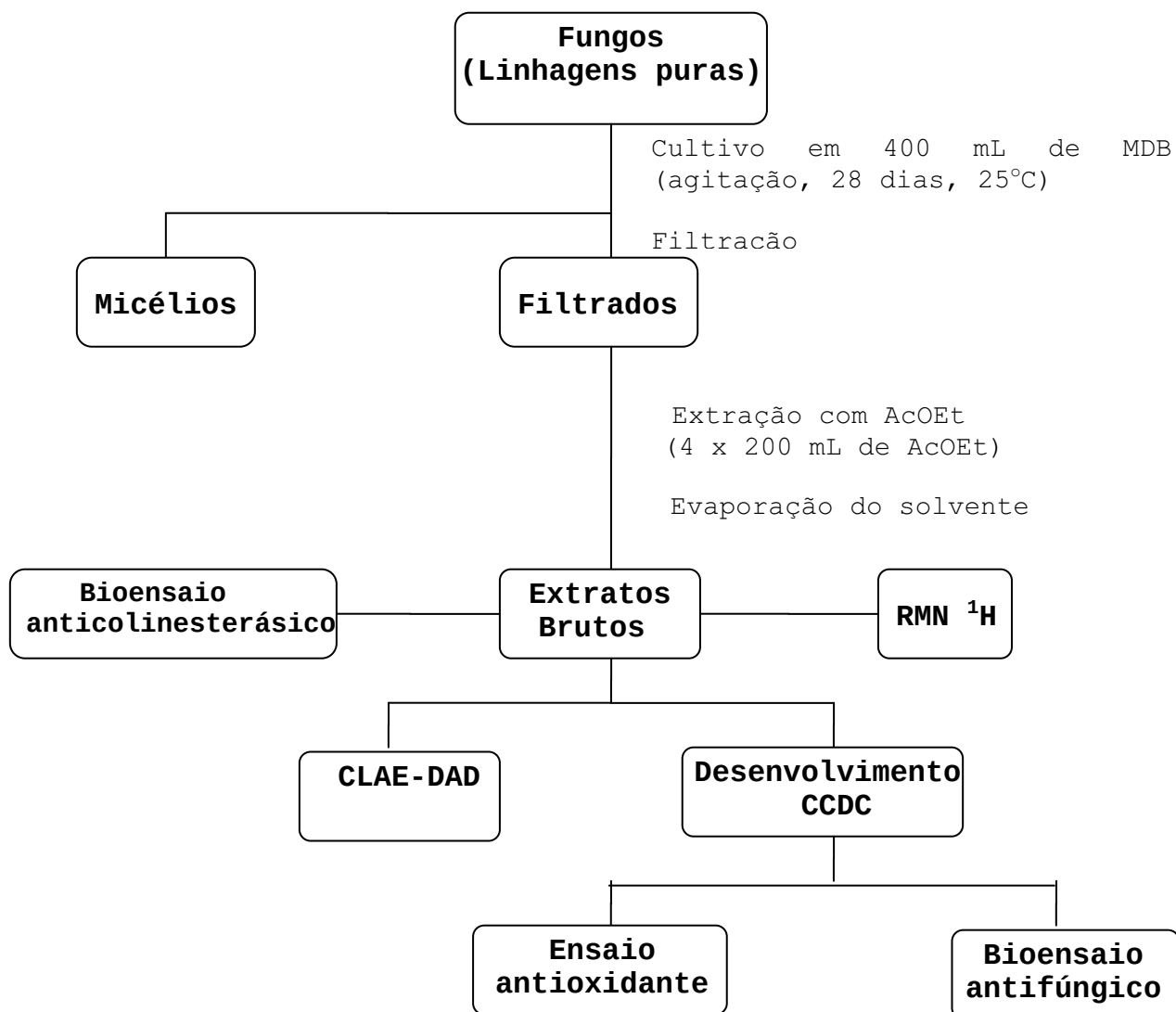
As 21 linhagens fúngicas foram enviadas para classificação para o Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

4.1.4 Cultivo em meio líquido dos endófitos, obtenção e triagem dos extratos brutos

As linhagens puras foram cultivadas em pequena escala para obtenção dos extratos brutos.

Placas de Petri contendo o meio de cultivo BDA foram autoclavadas e em seguida os fungos foram inoculados. Após 7 dias foi realizado o inóculo dos fungos em meio líquido MDB (400 mL), previamente esterilizados em autoclave, sendo mantidos em incubadora rotatória a 120 rpm, sob temperatura controlada (25°C), por 28 dias.

Os extratos brutos obtidos foram triados através de análise por CLAE-DAD, RMN de ^1H e bioensaios, conforme apresentado no **Esquema 2**.



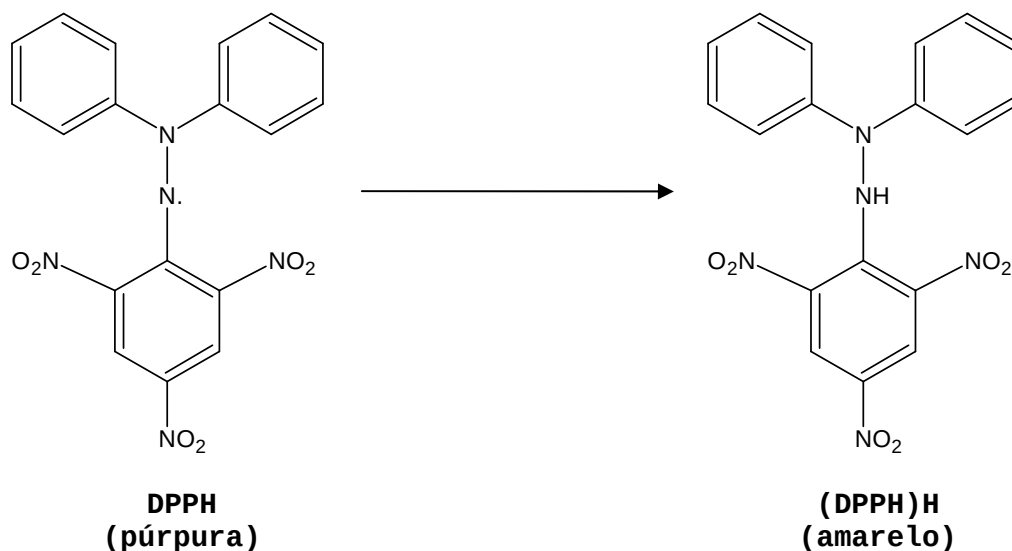
Esquema 2 - Metodologia de obtenção e triagem dos extratos brutos para avaliação do perfil químico e da bioatividade em potencial.

4.1.5 Avaliação da atividade antioxidante

Os extratos brutos foram analisados quanto à atividade antioxidante frente ao composto difenilpicrilhidrazina (DPPH) utilizando o método por cromatoplaça.

Esta atividade foi observada quando o DPPH foi reduzido após reação com os compostos antioxidantes presentes nos extratos (SIMÕES-PIRES et al., 2005). Para esta análise, foram aplicados 400 μg de cada extrato sobre a cromatoplaça de sílica gel (fase normal)

e, em seguida, esta placa foi eluída com AcOEt/MeOH (7:3). As cromatoplasmas foram reveladas com solução metanólica 0,2% de DPPH e a atividade antioxidante foi evidenciada com a presença de manchas brancas ou amarelas, decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração púrpura de fundo.



4.1.6 Avaliação da atividade antifúngica*

Os extratos brutos foram submetidos à técnica de *Bioautografia para detecção de atividade fungitóxica através da nebulização de suspensões dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos/mL em solução de glicose e sais) em placas de CCDC contendo 200 µg dos extratos previamente eluídos com AcOEt/MeOH (7:3). As placas foram incubadas em câmara úmida a 25°C por 48 horas e ausência de luz (HOMANS; FUCHS, 1970). Decorrido o período de incubação, o fungo revelador cresceu por toda a placa exceto nas regiões onde se encontravam as substâncias ativas inibindo o crescimento do fungo, em comparação com o padrão positivo nistatina (10, 5,0 e 1,0 µg).

*Ensaio realizado no Instituto de Botânica de São Paulo - Seção de Fisiologia Vegetal - sob orientação da Dra. Maria Claudia Marx Young.

4.1.7 Avaliação da atividade anticolinesterásica*

Os extratos brutos foram submetidos à constatação da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002), utilizando cromatoplasas. Foram aplicados 200 µg de cada extrato (ou 60 µg de substâncias puras) em uma cromatoplasa de sílica gel 60F254 (0,2 mm, Merck) e 1 µg do padrão positivo (galantamina). A placa foi eluída com AcOEt/MeOH (7:3) e, em seguida, borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (Solução A). A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a solução D.

A coloração roxa apareceu em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de manchas brancas (indicação de inibição da reação enzimática) sobre um fundo de coloração roxa indicou inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados foram observados e fotografados em câmera fotográfica Epson.

- ❖ Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9), a solução estoque será armazenada a 4 °C, no momento do uso será adicionado 0,1% de albumina de soro bovino fração V.
- ❖ Solução B: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol.
- ❖ Solução C: 400 mg do sal "Fast Blue" B em 160 mL de água destilada.
- ❖ Solução D: mistura de 10 mL da solução B + 40 mL da solução C.

*Ensaio realizado no Instituto de Botânica de São Paulo - Seção de Fisiologia Vegetal - sob orientação da Dra. Maria Claudia Marx Young.

4.2 Estudo químico dos extratos brutos selecionados pela triagem (CSY-02 e CSY-03)

4.2.1 Obtenção dos extratos brutos de *Colletotrichum crassipes* (CSY-02) e *Xylaria* sp. (CSY-03), isolados da espécie vegetal *Casearia sylvestris*

Os fungos endofíticos CSY-02 e CSY-03, classificados pelo Dr. Ludwig H. Pfenning foram cultivados em meio líquido (MDB) e meio sólido (milho).

❖ Cultivo em meio sólido (Milho):

Para o cultivo em milho foram utilizados 2 frascos (para cada fungo) de Erlenmeyers (500 mL) contendo em cada um 90 g de milho descascado (Yoki) e 75 mL de água. Estes meios foram autoclavados quatro vezes (quatro dias) por 40 minutos à temperatura de 121°C. Após resfriamento, dois frascos de meio foram inoculados com *Xylaria* sp. e os outros dois frascos com *C. crassipes*. Os meios inoculados foram incubados a 24°C, no modo estático, por 28 dias. Após este período as culturas sólidas foram trituradas, extraídas com metanol (6 x 150 mL) e após a filtração e evaporação do solvente orgânico foram obtidos os extratos brutos metanólicos:

CSY-02 (Milho): 10,48 g

CSY-03 (Milho): 5,82 g

Utilizando as mesmas condições de cultivo acima descritas, também foi obtido o extrato bruto do milho (Branco), sem a inoculação de micélio, com o objetivo de realizar uma comparação para identificar os possíveis interferentes do meio extraídos com o solvente orgânico.

Branco-Milho: 1,92 g

❖ Cultivo em meio líquido (MDB):

Os fungos CSY-02 (*C. crassipes*) e CSY-03 (*Xylaria* sp.) foram repicados para placas de Petri contendo BDA e incubados por sete dias. Após este período foram inoculados em 400 mL de meio de cultivo MDB e mantidos em incubadora rotatória ("shaker") sob temperatura controlada (24°C) por 28 dias. Em seguida os caldos fermentados foram separados dos micélios por filtração e submetidos

à partição líquido/líquido com acetato de etila (5x 250 mL). O solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotatório, fornecendo os extratos brutos:

CSY-02 (MDB): 18,8 mg

CSY-03 (MDB): 180,0 mg

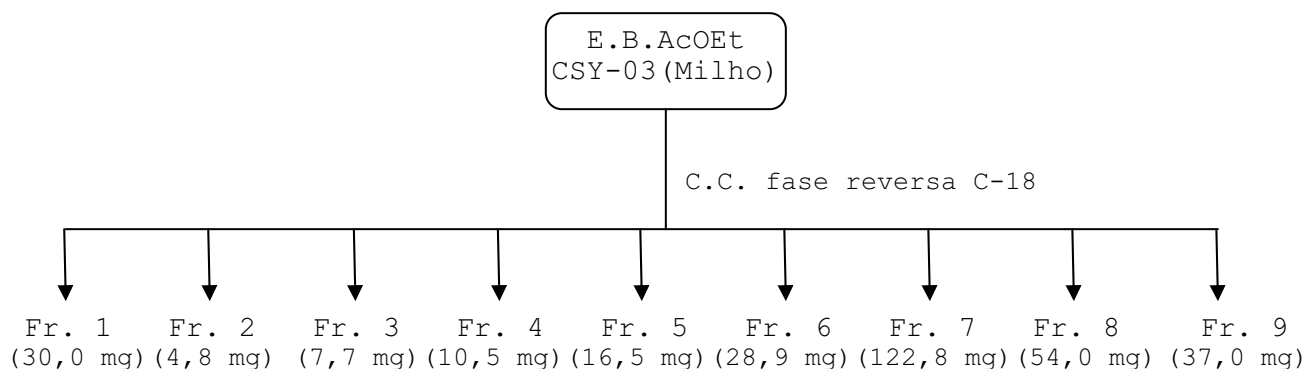
4.2.2 Fracionamento dos extratos brutos

4.2.2.1 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de *Xylaria* sp. (CSY-03) em milho

O extrato foi submetido a um pré-tratamento utilizando uma coluna com sílica de fase reversa C-18 e sistema de eluição MeOH/H₂O (95:5). O extrato bruto CSY-03 (Milho) foi analisado por CLAE-DAD utilizando como fase estacionária sílica C-18 e sistema de eluição H₂O/ACN em forma de gradiente (5-100% ACN em 40 minutos e 10 minutos de ACN 100%), com fluxo de 1,0 mL/min, monitorado por um detector UV "Diodo-Array" em 221 nm. Este extrato também foi submetido à análise de RMN de ¹H e após comparação com o espectro obtido para o branco, fez-se necessário uma pré-purificação deste extrato bruto.

O extrato bruto CSY-03 Milho (5,82 g) foi submetido a uma partição com acetato de etila (4x 50 mL) para remover os interferentes mais polares possivelmente extraídos do meio de cultivo (milho). Após a evaporação do solvente esta metodologia resultou no extrato bruto codificado como CSY-03/Milho/AcOEt com massa de 1,32 g, o qual foi submetido ao fracionamento para isolamento de metabólitos.

O extrato bruto CSY-03/Milho/AcOEt foi submetido a cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica de fase reversa C-18 como fase estacionária, sendo o diâmetro da coluna de 3,0 cm e a altura da fase estacionária 17 cm. Foram coletadas 10 frações* de 130 mL utilizando o sistema de eluição H₂O/MeOH (95:5 v/v) à MeOH 100%. As frações (1-9) foram primeiramente analisadas em relação ao grau de pureza pela técnica CCDC, algumas foram reunidas e, em seguida, submetidas a outras técnicas cromatográficas.



*Fr.10: limpeza da coluna (100% MeOH seguido de 100% AcOEt): 890,0 mg

Esquema 3 - Fracionamento do extrato bruto CSY-03/Milho/AcOEt.

A fração 7 foi submetida à CLAE modo preparativo utilizando coluna preparativa de sílica de fase reversa C-18, sistema de eluição MeOH/H₂O (55:45 v/v), fluxo de 12,0 mL/min e λ 221 nm e resultou no isolamento de 2 metabólitos, **1** (4,9 mg) e **2** (7,1 mg). O cromatograma indicando os tempos de retenção de cada substância está apresentado na **Figura 1**.

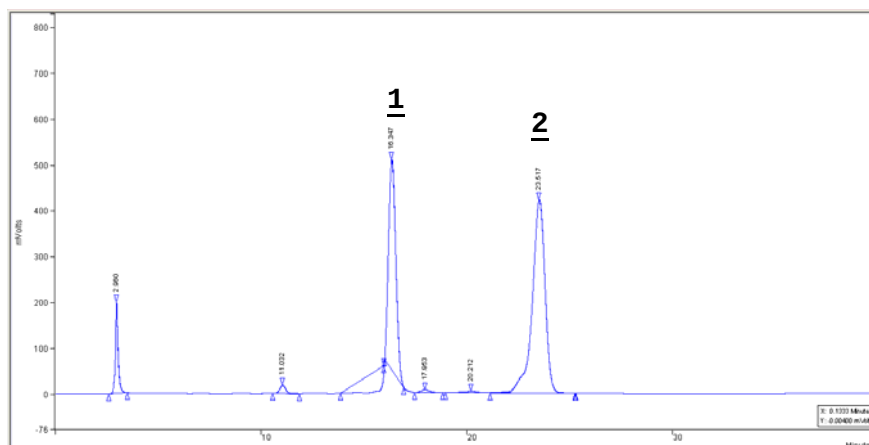


Figura 1 - Cromatograma preparativo de CSY-03/Milho/AcOEt/C-18/7.

A fração 8 também foi submetida à CLAE modo preparativo utilizando coluna preparativa de sílica de fase reversa C-18, sistema de eluição MeOH/H₂O (50:50 v/v), fluxo de 19,0 mL/min e λ 221 nm e resultou no isolamento do metabólito **3** (11,2 mg), com tempo de retenção de 22 minutos.

4.2.2.2 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de *Xylaria* sp. (CSY-03) em MDB

O extrato bruto CSY-03-MDB (180,0 mg) foi submetido a fracionamento por cromatografia em coluna utilizando sílica gel de fase normal como fase estacionária, sendo o diâmetro da coluna 2,0 cm e a altura da fase estacionária 12 cm. A eluição foi realizada com os solventes hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade: Hex/AcOEt (8:2); Hex/AcOEt (7:3); Hex/AcOEt (6:4); Hex/AcOEt (5:5); Hex/AcOEt (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3); AcOEt/MeOH (5:5) e MeOH 100%, sendo coletados aproximadamente 3 x o volume morto da coluna (3 x 19,0 mL = 57 mL) para cada sistema de eluição, em frascos de 10 mL, resultando em 54 frações.

As frações foram triadas por CCDC e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas, resultando em 10 sub-frações (Sub-fração A-J).

A sub-fração E (10,0 mg), obtida na eluição com AcOEt 100% resultou no isolamento na substância **4** (3,0 mg), após purificação em micro-coluna (diâmetro: 0,5 cm; altura da fase estacionária: 4,0 cm) sílica gel utilizando como eluente Hex/AcOEt (1:9).

Da sub-fração F (AcOEt/MeOH 7:3 v/v) foi isolada a substância **5** (4,5 mg). Esta sub-fração apresentou mais de uma mancha em CCDC indicando a presença de outros metabólitos. A sub-fração foi submetida à técnica de RMN de ^1H onde foi evidenciado que havia uma substância majoritária (**5**) que poderia ser identificada mesmo em mistura com outros metabólitos.

A substância **6** (3,0 mg) foi isolada da sub-fração I (MeOH 100%). Esta substância se mostrou como uma mancha única em CCDC. As demais frações obtidas na coluna utilizando metanol 100% como eluente foram reunidas (Sub-fração J - 18,0 mg) e não apresentaram, por CCDC, a mancha referente a **6**.

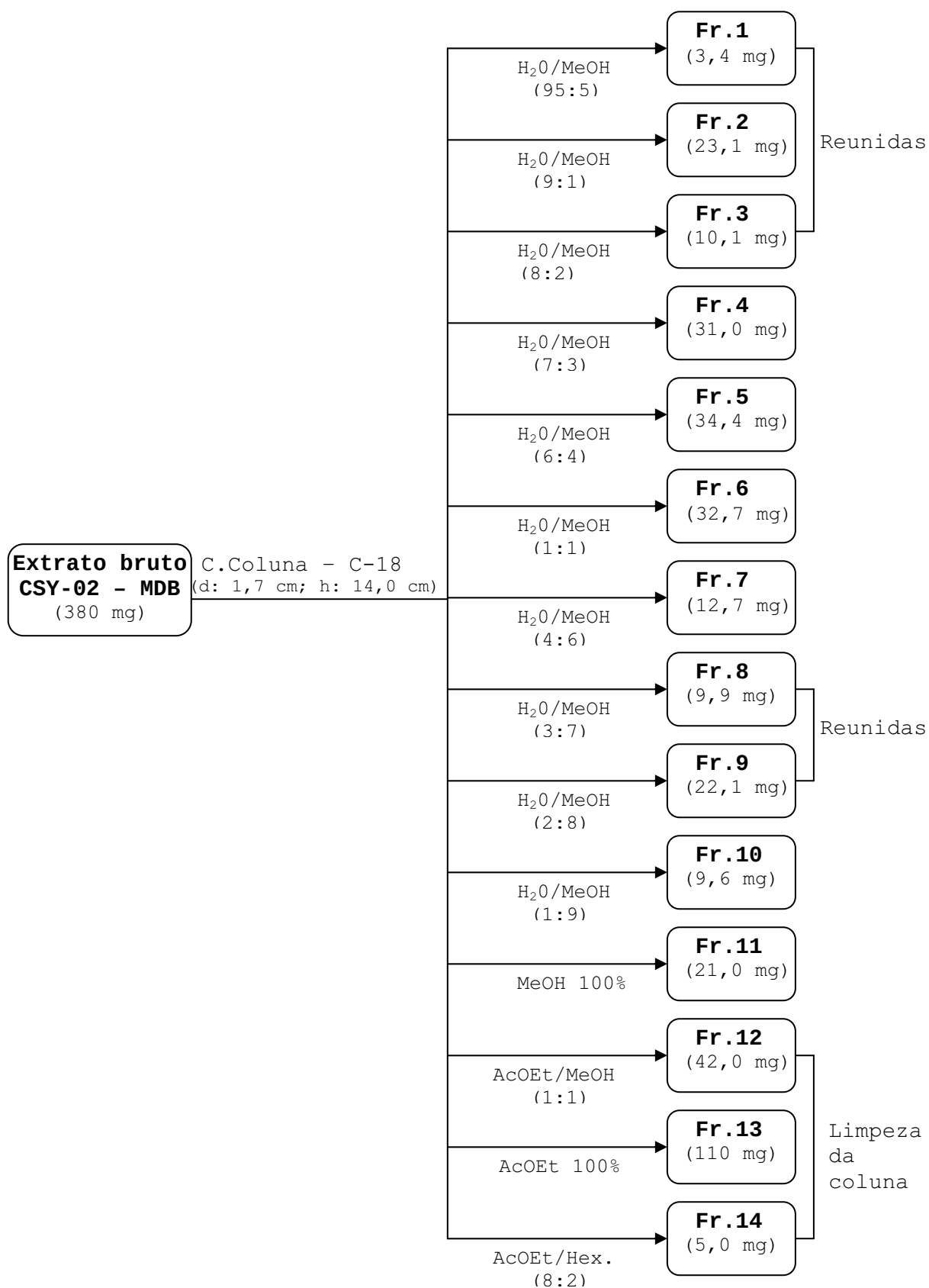
Da fração G (eluída com AcOEt/MeOH 7:3) foram isolados dois metabólitos, **T-1** (4,0 mg) e **T-2** (4,5 mg), ainda não identificados.

As demais sub-frações foram avaliadas por CCDC e RMN de ^1H e não foram estudadas quimicamente por se apresentaram na forma de mistura de vários metabólitos em uma massa pequena, tornando inviável a separação.

4.2.2.3 Fracionamento do extrato bruto obtido após cultivo de *Colletotrichum crassipes* (CSY-02) em MDB

O fungo *C. crassipes* (CSY-02) foi cultivado em MDB, conforme descrito no item 4.2.1, mas em larga escala (6,0 L) visando a obtenção de uma massa maior de extrato para viabilizar o fracionamento. Após 28 dias de cultivo sob agitação, o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt, fornecendo o extrato bruto (380,0 mg).

O extrato foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão utilizando sílica de fase reversa C-18 como fase estacionária. Foram coletadas 14 frações de 50 mL e utilizou-se sistema de eluição H₂O/MeOH (95:5 v/v) a MeOH (100%), finalizando com AcOEt/MeOH (1:1 v/v) e 100% AcOEt. As frações foram analisadas por CLAE-DAD (modo gradiente, 5 a 100% acetonitrila, 40 minutos, em coluna de sílica de fase reversa C-18, modo analítico), CCDC e por RMN de ¹H que permitiram agrupar algumas frações, conforme apresentado no **Esquema 4**.



Esquema 4 - Fracionamento do extrato bruto MDB de CSY-02.

As frações CSY-02/MDB/C-18/**4** (31 mg), CSY-02/MDB/C-18/**5** (34,4 mg), CSY-02/MDB/C-18/**6** (32,7 mg) e CSY-02/MDB/C-18/**7** (12,7 mg) apresentaram espectros de RMN de ^1H com sinais por toda largura espectral e cromatogramas com picos resolvidos, o que conduziu ao isolamento dos constituintes por CLAE-modo preparativo.

A fração CSY-02/MDB/C-18/**4** foi submetida à CLAE modo preparativo utilizando coluna preparativa de sílica de fase reversa C-18, sistema de eluição isocrático ACN/H₂O (10:90 v/v), fluxo de 10,0 mL/min, 50 minutos e λ 214 nm. Esta separação resultou em 8 sub-frações que estão delimitadas pelo tempo de retenção e apresentadas no cromatograma da Figura 2. A sub-fração CSY-02/PDB/C-18/4/HPLC-6(19'-24') (7,0 mg) foi analisada por técnicas espectrométricas uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C e por ESI-MS (modo positivo), resultando na identificação estrutural (em mistura) das substâncias **7**, **8** e **9**. A análise dos espectros da sub-fração CSY-02/MDB/C-18/4/HPLC-7(24'-28') (4,0mg) evidenciou a presença das mesmas substâncias (**7** e **8**) encontradas na sub-fração anterior.

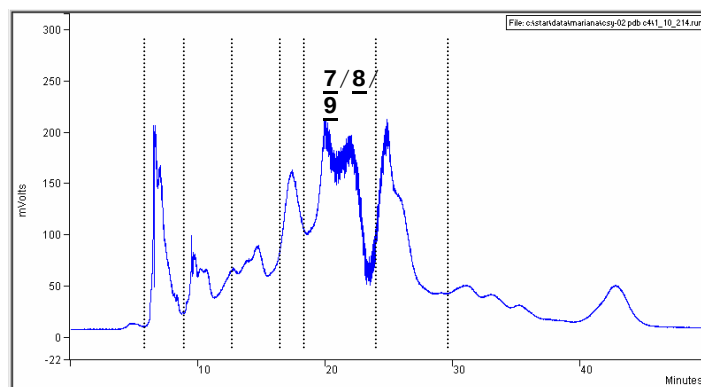


Figura 2 - Cromatograma preparativo de CSY-02/MDB/C-18/4.

A fração CSY-02/MDB/C-18/**6** (32,7 mg) foi submetida à CLAE modo preparativo utilizando coluna preparativa de sílica de fase reversa C-18, sistema de eluição isocrático ACN/H₂O (17:83 v/v), fluxo de 20,0 mL/min, 50 minutos e λ 214 nm. Esta separação resultou em 10 sub-frações, as quais estão especificadas no cromatograma apresentado na Figura 3. As sub-frações CSY-02/MDB/C-18/6/HPLC-6(17'-21') (10,0 mg), CSY-02/MDB/C-18/6/HPLC-4(13'-15') (2,9 mg) e

CSY-02/MDB/C-18/6/HPLC-8(26'-30') (3,3 mg) conduziram ao isolamento dos metabólitos **10**, **11** e **12**, respectivamente.

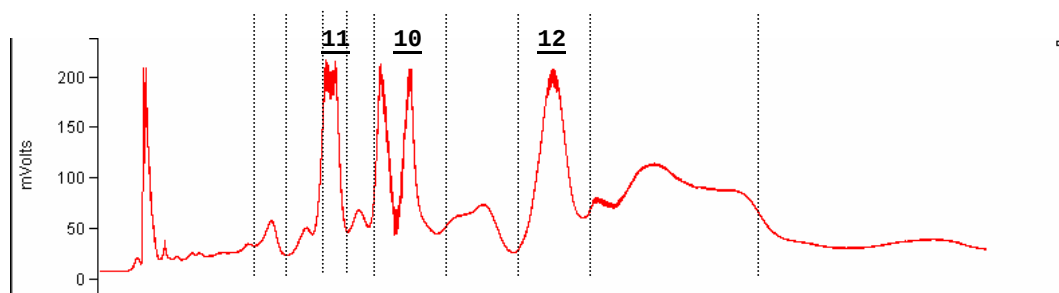


Figura 3 - Cromatograma preparativo de CSY-02/MDB/C-18/6.

A fração CSY-02/MDB/C-18/7 (15,0 mg) foi submetida à CLAE modo preparativo utilizando coluna preparativa de sílica de fase reversa C-18, sistema de eluição isocrático ACN/H₂O (20:80 v/v), fluxo de 15,0 mL/min, 50 minutos e λ 214 nm. Esta separação resultou em 6 sub-frações, conforme apresentado no cromatograma da Figura 4. As sub-frações foram analisadas por CCDC e RMN de ¹H e a sub-fração CSY-02/MDB/C-18/7/HPLC-4(30'-36') (2,0 mg) resultou no isolamento da substância **13**.

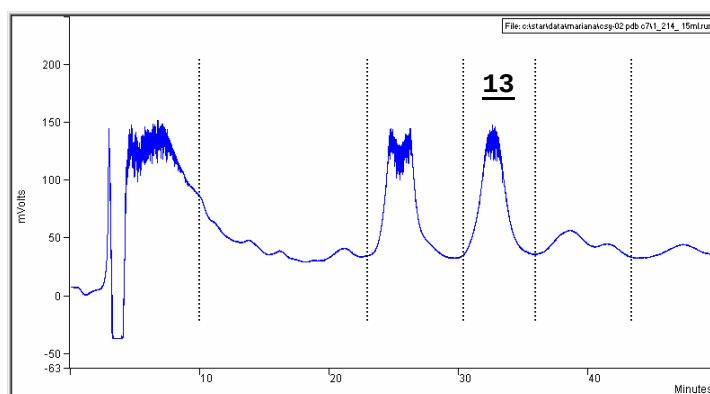


Figura 4 - Cromatograma preparativo de CSY-02/PDB/C-18/7.

A fração CSY-02/MDB/C-18/5 (34,4 mg) foi submetida à CLAE modo preparativo, utilizando coluna preparativa de sílica de fase reversa C-18, sistema de eluição isocrático ACN/H₂O (12:82 v/v), fluxo de 16,0 mL/min, 50 minutos e λ 214 nm. Esta separação resultou em 9 sub-frações, conforme apresentado no cromatograma da Figura 5. A sub-fração CSY-02/MDB/C-18/5/HPLC-5(19'-27') (8,1 mg) foi analisada por CCDC e RMN de ¹H e foi possível observar uma mistura de metabólitos, sendo um majoritário identificado como sendo a

substância **14**. A sub-fração CSY-02/PDB/C-18/5/HPLC-6 (27'-30') (4,3 mg) foi submetida a análise por RMN de ^1H e CCDC, permitindo identificar os metabólitos **15** e **16**.

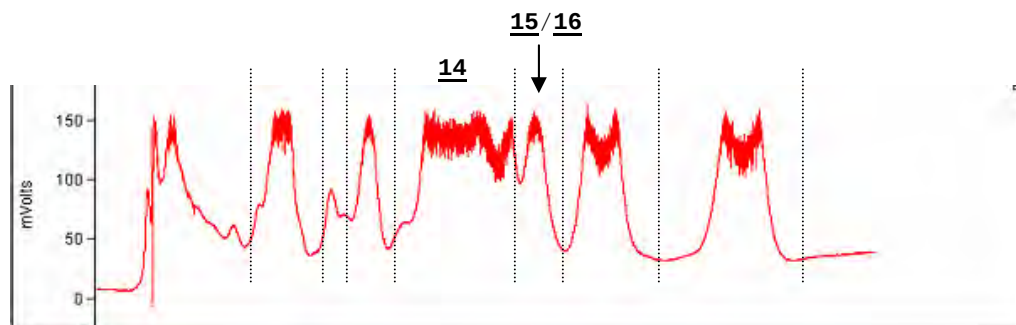


Figura 5 - Cromatograma preparativo de CSY-02/MDB/C-18/5.

As demais frações: 1-2-3 (Reunidas), 8-9 (Reunidas), 10 e 11 foram avaliadas por CCDC e foi constatado que apresentavam uma grande mistura de metabólitos. Ainda por CCDC e RMN de ^1H foi observado que algumas destas frações apresentavam os mesmos metabólitos já isolados anteriormente, acima descritos, justificando o não fracionamento destas amostras.

❖ Outros metabólitos produzidos por *Colletotrichum crassipes* durante experimento de Biotransformação:

O fungo *C. crassipes* foi utilizado em um experimento de Biotransformação, conforme detalhado no item 4.4.2, pág. 60. Durante este estudo foi obtido o extrato bruto deste fungo, também cultivado em MDB, o qual foi submetido à cromatografia em coluna utilizando sílica gel de fase normal como fase estacionária e sistema de eluição realizado com os solventes hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade: Hex/AcOEt (8:2); Hex/AcOEt (7:3); Hex/AcOEt (6:4); Hex/AcOEt (5:5); Hex/AcOEt (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (3:7); AcOEt/MeOH (5:5) e MeOH 100%. Este procedimento, detalhado no item 4.4.2, foi utilizado objetivando a separação dos produtos da biotransformação. Entretanto, através deste procedimento cromatográfico, foi possível isolar duas substâncias provenientes do metabolismo secundário do fungo:

-Substância **17** (2,5 mg): isolada utilizando o sistema de eluição Hex/AcOEt (3:7 v/v).

-Substância **18** (3,0 mg): isolada utilizando o sistema de eluição Hex/AcOEt (5:5 v/v).

Ambas as substâncias foram isoladas do extrato obtido sob condição de agitação. Estas substâncias foram submetidas à técnica de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional) para identificação estrutural.

4.2.3 Bioensaios realizados para as substâncias puras

As seguintes substâncias isoladas, que não estavam em mistura com outros metabólitos e que apresentaram massa suficiente, foram submetidas aos bioensaios:

❖ Atividade antifúngica

As substâncias **1**, **2**, **5**, **6**, **10** e **12** foram submetidas à avaliação da atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

A descrição do método está apresentada no item 4.1.6 (pág. 44). As substâncias foram avaliadas a 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg.

❖ Atividade anticolinesterásica

As substâncias **1**, **2**, **5**, **6**, **10** e **12** foram submetidas à avaliação da atividade anticolinesterásica, de acordo com o método descrito em 4.1.7 (pág. 44). Após aplicação das substâncias, a cromatoplaça foi eluída utilizando sistema de solvente: AcOEt/MeOH (8:2).

❖ Atividade antioxidante

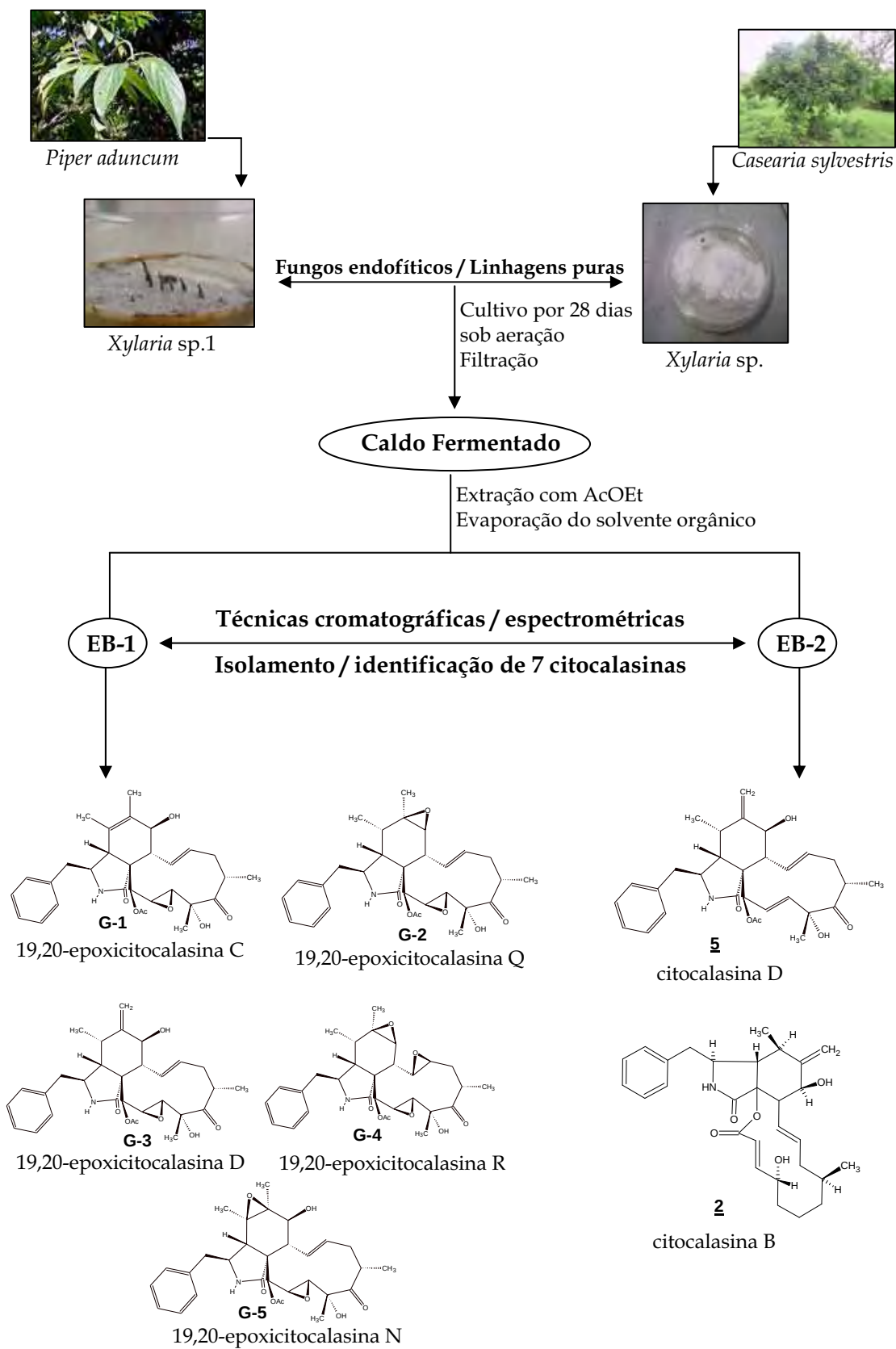
As substâncias **1**, **2**, **4**, **5**, **6**, **10**, **11**, **12**, **13**, **T-1**, **T-2** e **18** foram submetidas a avaliação da atividade antioxidante em potencial utilizando cromatoplaças e DPPH (ensaio descrito no item 4.1.5, pág. 43). O padrão utilizado para comparação foi a rutina (1mg/mL). AS substâncias foram aplicadas na mesma concentração utilizada para o padrão.

4.3 Avaliação da citotoxicidade de citocalasinas utilizando linhagens de células de adenocarcinoma murino

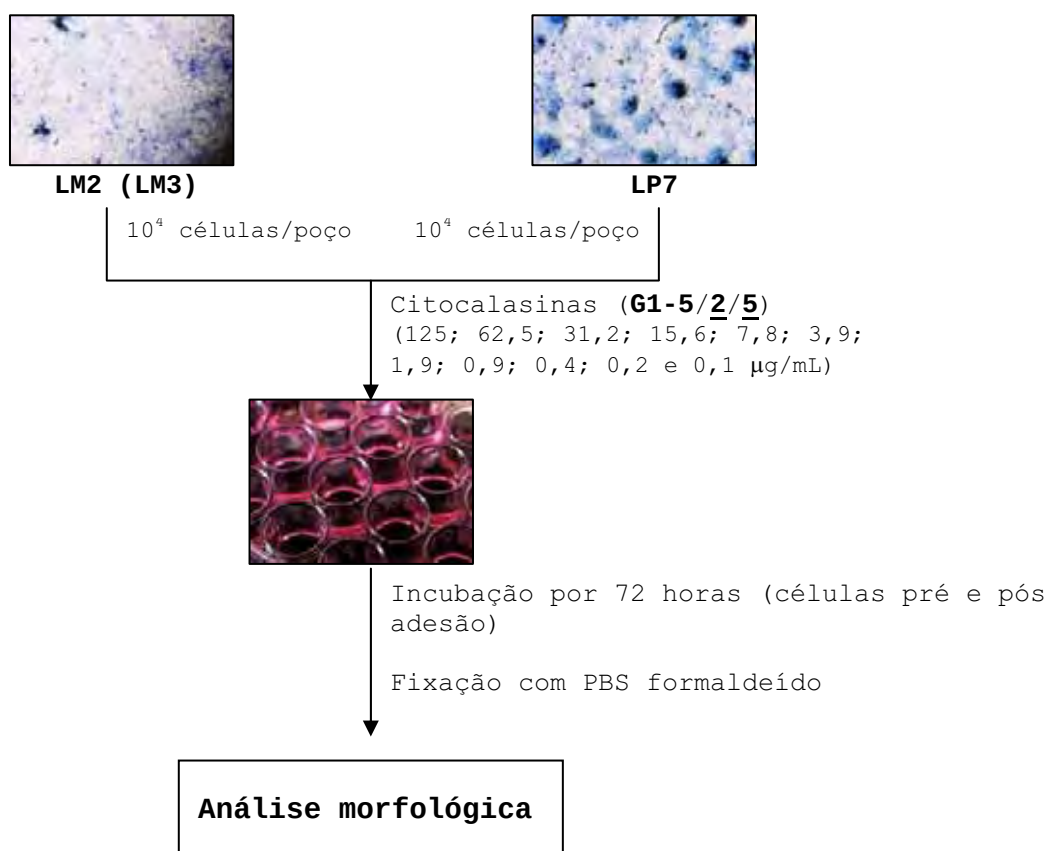
Os fungos endofíticos *Xylaria* sp.1 e *Xylaria* sp.2, isolados de *Piper aduncum* (Piperaceae), foram estudados quimicamente pelo Dr. Geraldo H. Silva e resultou no isolamento de diversas substâncias puras, entre elas, as 19,20-epoxicitocalasina C, Q, D, R e N (**G-1 a G-5**). O estudo químico do extrato produzido por *Xylaria* sp., isolado de folhas saudáveis de *Casearia sylvestris* resultou no isolamento de diversas substâncias, entre elas as citocalasinas B (**2**) e D (**5**). A metodologia de obtenção destas citocalasinas está apresentada no Esquema 5, pág. 57.

Estas 7 substâncias foram submetidas a ensaios *in vitro** para avaliação da atividade citotóxica em 2 linhagens de células mamárias de adenocarcinoma murino (LM2 E LM3) e em uma linhagem de adenocarcinoma murino de pulmão (LP7). Aproximadamente 10⁴ células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços e foram adicionadas concentrações diferentes de cada substância (125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,9; 0,9; 0,4; 0,2 e 0,1 µg/mL) nas condições de pré e pós adesão das células na superfície dos poços. As células foram incubadas por 72 horas, fixadas com PBS-formaldeído e após a análise morfológica foi possível observar a inibição do crescimento das 3 linhagens celulares resultantes da citotoxicidade das citocalasinas (**Esquema 6**).

*Ensaio realizado sob a orientação do Dr. Lucas L. Colombo (Instituto de Oncologia Angel H. Roffo, Buenos Aires/Argentina) e em colaboração com a Profa. Dra. Iracilda Z. Carlos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara/SP).



Esquema 5 - Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp.1 e *Xylaria* sp.



Esquema 6 - Ensaio *in vitro* das citocalasinas utilizando linhagens de células de adenocarcinoma murino.

4.4 Biotransformação utilizando os fungos endofíticos *Colletotrichum crassipes* e *Xylaria* sp.

O produto utilizado na biotransformação foi a 4-etilciclohexanona (97%, Aldrich, d:0,916).

4.4.1 Biotransformação por *Xylaria* sp.

O fungo endofítico *Xylaria* sp. foi cultivado em placas de Petri contendo meio sólido BDA, por aproximadamente 10 dias. Em seguida, os micélios foram inoculados em 12 frascos (500 ml) contendo 150 ml do meio de cultivo MDB, previamente esterilizado em autoclave. Estes frascos foram incubados por 3 dias, a 25°C, sob agitação a 180 rpm (em "Shaker") e então foram adicionados 150ppm de 4-etilciclohexanona em 10 frascos. Erlenmeyers sem adição do substrato foram utilizados como "branco" (2 frascos com 150 ml de meio de cultivo). A fermentação foi realizada por mais 5 e 10 dias, e após esse tempo foram realizadas as extrações (5 frascos de cultivo com o substrato totalizando em 750 mL de meio e 1 frasco de 150 ml de branco na primeira extração de 5 dias e o restante na extração de 10 dias). A extração consistiu na filtração para separar o micélio do caldo fermentado, seguida de partição líquido/líquido entre o caldo fermentado e solvente orgânico acetato de etila. O mesmo procedimento foi realizado com os "brancos" e após concentração em rotaevaporador, resultou nos extratos brutos. Esse mesmo experimento com *Xylaria* sp. e o substrato 4-etilciclohexanona também foi realizado na condição de cultivo estático.

Massa dos extratos obtidos após cultivo de *Xylaria* sp. com o substrato 4-etilciclohexanona (cada extrato refere-se a 750 ml de meio de cultivo, enquanto que os brancos são referentes a 150 ml):

03-1E-P1-A: 143,4 mg

03-1E-Branco-A(P1): 23,9 mg

03-2E-P1-A: 246,1 mg

03-2E-Branco-A(P1): 31,2 mg

03-1E-P1-Est: 121,1 mg

03-1E-Branco-Est(P1): 6,7 mg

03-2E-P1-Est: 166,1 mg

03-2E-Branco-Est(P1): 14,5 mg

Onde:

03: *Xylaria* sp.

1E/2E: Extração após 5/10 dias de cultivo

P1: Substrato 1 (4-etilciclohexanona)

A/Est: cultivo sob Agitação/Estático

4.4.2 Biotransformação por *Colletotrichum crassipes*

Na biotransformação com *C. crassipes* foi utilizada a mesma metodologia experimental descrita para *Xylaria* sp. Os tempos de fermentação e extração, concentração do substrato e cultivos em agitação e modo estático foram seguidos, como anteriormente relatados.

Massa dos extratos obtidos após cultivo de *C. crassipes* com o substrato 4-etilciclohexanona (cada extrato refere-se a 750 ml de meio de cultivo, enquanto que os brancos são referentes a 150 ml):

02-1E-P1-A: 92,0 mg

02-1E-Branco-A(P1): 6,0 mg

02-2E-P1-A: 65,4 mg

02-2E-Branco-A(P1): 3,9 mg

02-1E-P1-Est: 98,9 mg

02-1E-Branco-Est(P1): 3,2 mg

02-2E-P1-Est: 90,0 mg

02-2E-Branco-Est(P1): 2,35 mg

Onde:

02: *Colletotrichum crassipes*

1E/2E: Extração após 5/10 dias de cultivo

P1: Substrato 1 (4-etilciclohexanona)

A/Est: cultivo sob Agitação/Estático

4.4.3 Fracionamento por cromatografia em coluna

Os extratos 03-1E-P1-A, 03-1E-P1-Est, 02-1E-P1-A e 02-1E-P1-Est foram submetidos a fracionamento por cromatografia em coluna. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para os 4 extratos que consistiu em uma coluna de sílica de fase normal, como fase estacionária, e eluição com solventes hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade: Hex/AcOEt (8:2); Hex/AcOEt (7:3); Hex/AcOEt (6:4); Hex/AcOEt (5:5); Hex/AcOEt (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (5:5) e MeOH 100%. Para cada sistema de eluição foram coletados 3 x o volume morto da coluna, em frascos de 5 mL. A seguir estão apresentadas as características das colunas utilizadas para cada extrato:

- 03-1E-P1-A: d: 1,5 cm; h(fase estacionária): 24 cm.
- 03-1E-P1-Est: d: 1,5 cm; h(fase estacionária): 21 cm.
- 02-1E-P1-A: d: 1,5 cm; h(fase estacionária): 18 cm.
- 02-1E-P1-Est: d: 1,5 cm; h(fase estacionária): 19 cm.

Os produtos de biotransformação foram eluídos no início da coluna por serem menos polares. Outros metabólitos fúngicos também foram isolados por este método, conforme relatado no item 4.2.2.3 (pág. 54). A pureza das substâncias bem como o perfil de cada amostra foi previamente analisada por CCDC, seguido de técnica de RMN de ^1H .

As seguintes substâncias foram obtidas, após fracionamento cromatográfico dos extratos, como produtos de biotransformação:

- ❖ **B-1** (3,0 mg): isolada do extrato 02-1E-P1-Est utilizando o sistema de eluição Hex/AcOEt (6:4).
- ❖ **B-2** (3,8 mg): isolada dos extratos 02-1E-P1-A e 02-1E-P1-Est utilizando o mesmo sistema de eluição Hex/AcOEt (5:5).
- ❖ **B-3** (3,5 mg): isolada dos extratos 03-1E-P1-Est e 03-1E-P1-A utilizando o mesmo sistema de eluição Hex/AcOEt (5:5).
- ❖ **B-4** (4,5 mg): isolada no extrato 03-1E-P1-A utilizando o sistema de eluição Hex/AcOEt (4:6).

As substâncias **B-1**, **B-2**, **B-3** e **B-4** foram identificadas através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e IV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados da triagem química dos fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado

Na tabela 1 estão apresentadas as espécies vegetais, os fungos endofíticos isolados de cada espécie e a massa dos extratos brutos obtidos no cultivo em pequena escala (400 mL de meio líquido MDB).

Tabela 1 - Triagem química dos fungos endofíticos associados a espécies do Cerrado.

Espécie Vegetal	Excicata	Fungo	Massa do Extrato
			Bruto (mg)
<i>Alibertia macrophylla</i>	SP 370.915	Pl-03	24,0
<i>Alibertia macrophylla</i>	SP 370.915	Pl-04	54,0
<i>Alibertia macrophylla</i>	SP 370.915	Pl-05	86,3
<i>Alibertia macrophylla</i>	SP 370.915	Pl-07	45,3
<i>Rudgea viburnioides</i>	SP-196941	Ruv-01	183,3
<i>Rudgea viburnioides</i>	SP-196941	Ruv-04	150,2
<i>Rudgea viburnioides</i>	SP-196941	Ruv-06	12,5
<i>Rudgea viburnioides</i>	SP-196941	Ruv-08	232,0
<i>Cryptocarya mandioccana</i>	CB-353	CB10-3	27,3
<i>Cryptocarya mandioccana</i>	CB-353	CB14-4	110,0
<i>Alchornea glandulosa</i>	CORD-2003	Alg-a	39,9
<i>Alchornea glandulosa</i>	CORD-2003	Alg-02	26,3
<i>Alchornea glandulosa</i>	CORD-2003	Alg-03	67,3
<i>Prunus myrtifolia</i>	MORAES-52	Pr-03	154,8
<i>Tocoyena formosa</i>	SP-1787979	Tf-01	29,6
<i>Ocotea corymbosa</i>	MCMY-1314	PAJ-11	209,9
<i>Casearia sylvestris</i>	AGS-103	CSY-01	39,2
<i>Casearia sylvestris</i>	AGS-103	CSY-02	18,8
<i>Casearia sylvestris</i>	AGS-103	CSY-03	223,0
<i>Casearia sylvestris</i>	AGS-103	CSY-04	363,0
<i>Casearia sylvestris</i>	AGS-103	CSY-05	45,0

A classificação das linhagens está sendo realizada pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning (Universidade Federal de Lavras), colaborador neste projeto. Até o momento, apenas as seguintes linhagens foram identificadas:

- ❖ CSY-02: *Colletotrichum crassipes*
- ❖ CSY-03: *Xylaria* sp.
- ❖ PR-03: *Xylaria* sp.3
- ❖ PAJ-11: *Xylaria* sp.1
- ❖ RUV-08: *Xylaria* sp.4
- ❖ RUV-01: *Xylaria* sp.2

5.1.1 Resultado dos bioensaios realizados com os extratos brutos

Atividade antioxidante:

Considerando a relação observada entre a etiologia de diversas doenças incluindo inflamações, câncer e o próprio processo de envelhecimento sob a ação de radicais livres em excesso no organismo, um grande interesse na descoberta de novos antioxidantes de origem natural vem aumentando (CARDOSO, 2003). Ensaio rápidos e baratos utilizando β -caroteno e 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) foram desenvolvidos com intuito de detectar a presença de potenciais antioxidantes em extratos brutos.

No ensaio realizado com DPPH utilizando cromatoplasas, a propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar ao DPPH (reação com quebra homolítica), estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura através de ressonância.

No ensaio, os extratos brutos foram aplicados na cromatoplasa sendo: (1) RUV-01; (2) RUV-04; (3) RUV-06; (4) RUV-08; (5) PL-03; (6) PL-04; (7) PL-05; (8) PL-07; (9) CSY-01; (10) CSY-02; (11) CSY-03; (12) CSY-04; (13) CSY-05; (14) CB10-3; (15) CB14-4; (16) PAJ-11; (17) TF-01; (18) PR-03; (19) ALG-a; (20) ALG-02 e (21) ALG-03.

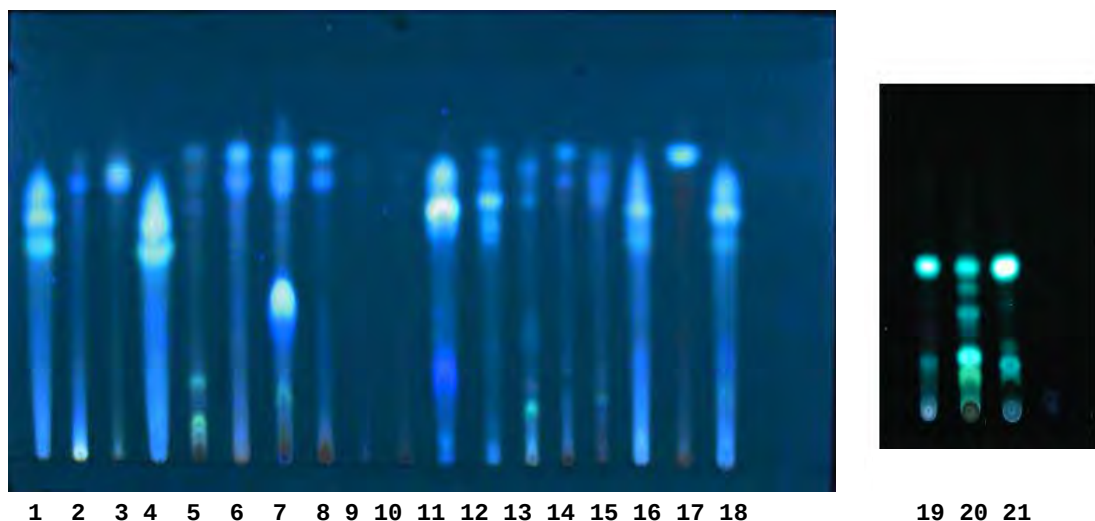


Figura 6 - Placas contendo os extratos brutos a λ 366nm.

Após revelação com solução de DPPH foi possível observar a presença de metabólitos potencialmente antioxidantes em diversos extratos, como pode ser notado na Figura 7. O padrão utilizado para comparação foi a rutina.

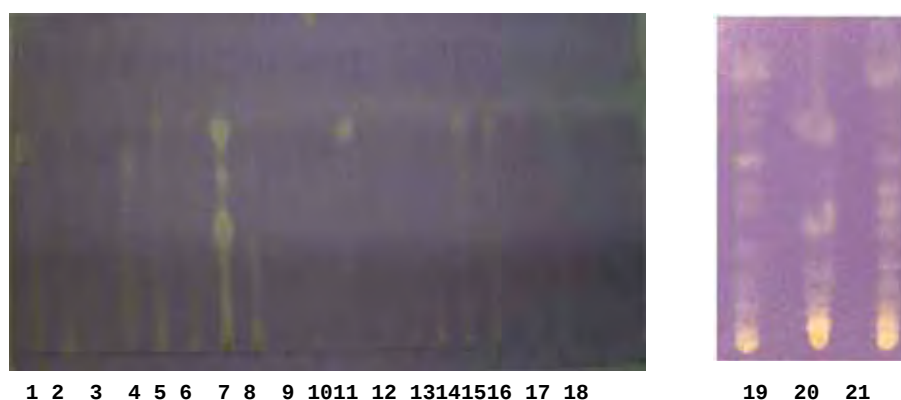


Figura 7 - Placas cromatográficas contendo os extratos brutos reveladas com DPPH.

Através da análise deste ensaio qualitativo foi possível observar que a maioria dos extratos brutos, obtidos de fungos endofíticos, apresenta potencialidade antioxidante. Este dado reflete a necessidade do estudo químico deste nicho de fungos para a busca de novos metabólitos bioativos.

Atividade anticolinesterásica:

O mal de Alzheimer ou doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva do sistema nervoso central, que atinge principalmente a população idosa. Esta doença produz um impedimento gradual das funções cognitivas, sendo a perda da memória recente a principal característica clínica no estágio inicial da doença. Os fármacos atualmente utilizados no tratamento são principalmente inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Alguns exemplos destes fármacos são a tacrina, a fisostigmina e a galantamina, que é de origem natural (CARDOSO, 2003). Dado este fato, é de extrema necessidade a busca por novos fármacos para o tratamento de DA. Extratos brutos obtidos de fontes naturais são fontes promissoras de substâncias bioativas, justificando o ensaio preliminar realizado com 21 extratos brutos produzidos por fungos endofíticos.

A avaliação da atividade anticolinesterásica em potencial dos extratos brutos foi realizada seguindo-se a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002) para cromatografia em camada delgada fina. Após a eluição da cromatoplaça, a coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática) em alguns extratos, sobre um fundo de coloração roxa, indicou que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Na Figura 8, considerar: (1) RUV-01; (2) RUV-04; (3) RUV-06; (4) RUV-08; (5) PL-03; (6) PL-04; (7) PL-05; (8) PL-07; (9) CSY-01; (10) CSY-02; (11) CSY-03; (12) CSY-04; (13) CSY-05; (14) CB10-3; (15) CB14-4; (16) PAJ-11; (17) TF-01; (18) PR-03; (19) ALG-a; (20) ALG-02; (21) ALG-03 e **P** (padrão galantamina).

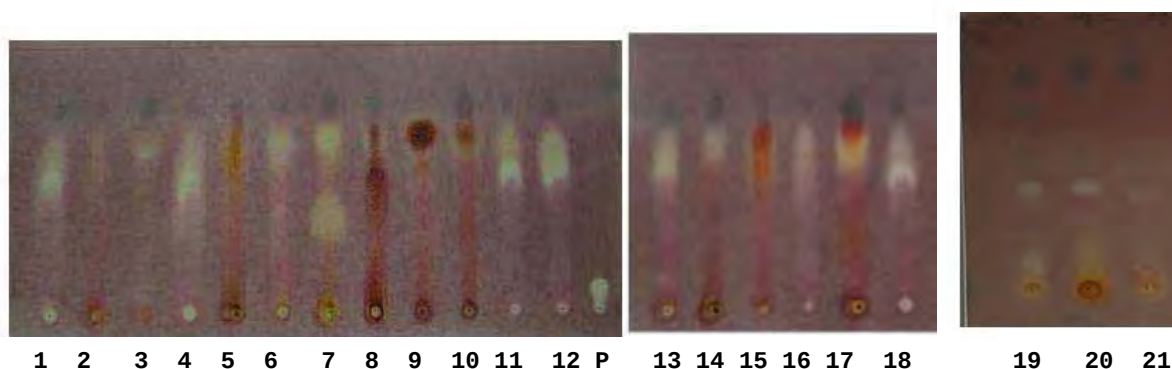


Figura 8 - Atividade anticolinesterásica dos extratos brutos evidenciada em cromatoplaças.

Este ensaio anticolinesterásico realizado CCDC é qualitativo e é definido através do halo branco em fundo roxo, para atividade inibitória positiva. De acordo com o observado na cromatoplaca da Figura 8 apenas os extratos PL-03 (5), CSY-01 (9) e CB 14-4 (15) não apresentaram atividade positiva neste bioensaio. Este resultado evidencia a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade anticolinesterásica.

Atividade antifúngica:

Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente. Tal fato tem incentivado pesquisas que busquem novas substâncias antifúngicas de origem natural (CARDOSO, 2003). Considerando esta necessidade e a ecologia química relacionada com os fungos endofíticos que habitam ambiente hostil, foi realizada uma triagem com 21 extratos brutos produzidos por endófitos.

A atividade antifúngica em potencial dos extratos brutos foi avaliada frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, utilizando o método da Bioautografia. Após a revelação da cromatoplaca (contendo os extratos) com a solução fúngica, foi observada a inibição do crescimento do fungo em vários extratos, indicando a atividade antifúngica potencial. O padrão utilizado para comparação foi a nistatina (10 µg).

Os resultados obtidos neste bioensaio estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da avaliação antifúngica dos extratos brutos.

Fungo	Ensaio Antifúngico	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
Pl-03	***	***
Pl-04	**	***
Pl-05	***	***
Pl-07	*	**
RUV-01	—	**
RUV-04	—	**
RUV-06	***	***
RUV-08	—	*
CB10-3	—	**
CB14-4	*	**
ALG-A	***	***
ALG-02	***	***
ALG-03	—	*
PR-03	—	*
TF-01	—	**
PAJ-11	*	**
CSY-01	***	***
CSY-02	***	***
CSY-03	***	***
CSY-04	***	***
CSY-05	**	**

*** potencial forte/ **potencial médio/ *potencial fraco

Os resultados deste bioensaio evidenciam a maioria dos extratos brutos como potencialmente antifúngicos. Este dado pode estar diretamente relacionado à ecologia química onde estes microrganismos produzem substâncias bioativas para autodefesa contra outros microrganismos fitopatógenos e em situações de "stress ambiental". Estes dados confirmam o quão promissores são os fungos associados a espécies vegetais do Cerrado na busca por novos metabólitos secundários bioativos.

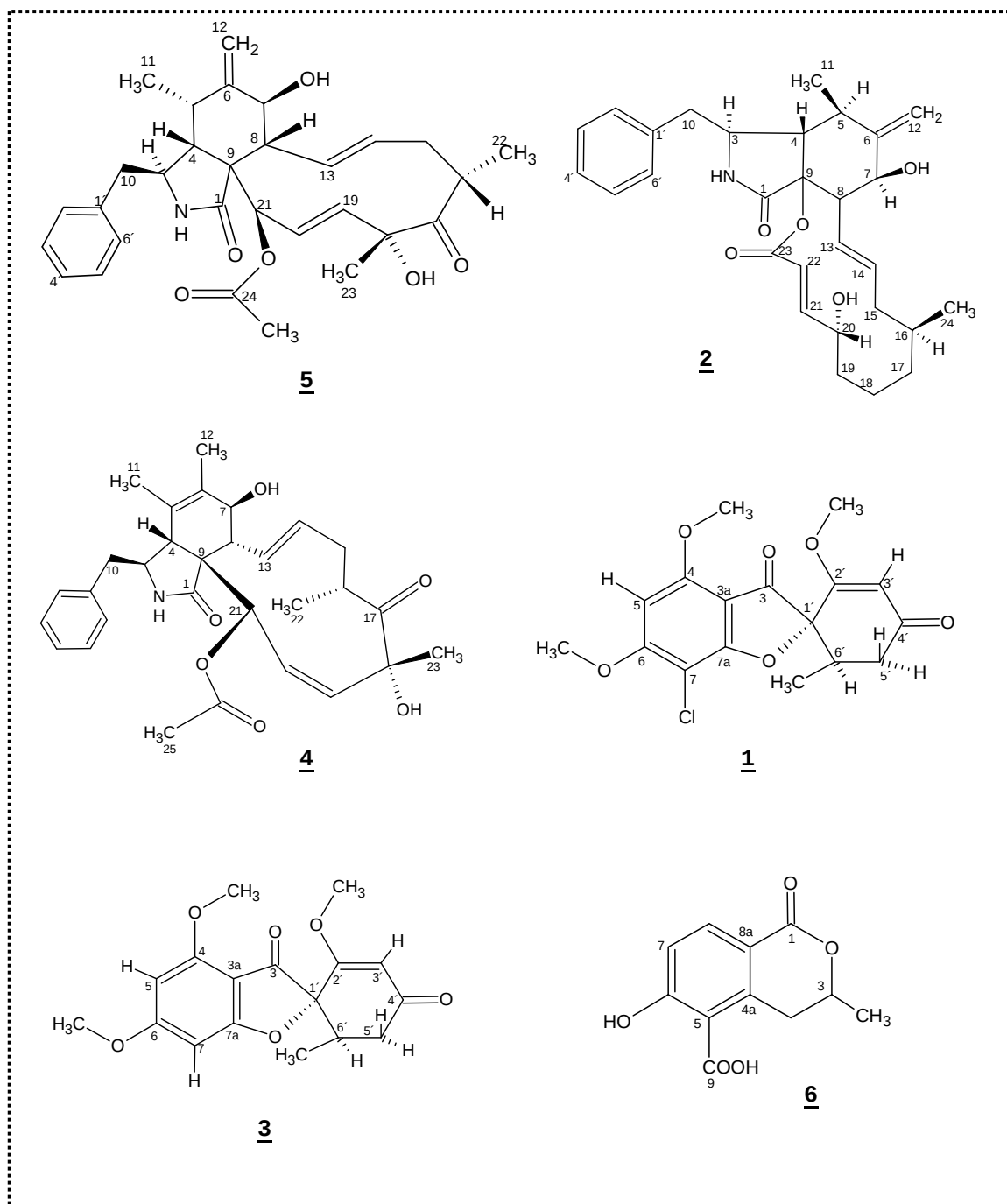
Os ensaios biológicos dos extratos brutos ALG-A, ALG-02 e ALG-03 foram realizados pela aluna de iniciação científica Claudia

Cristina Ramos. Os extratos codificados como PL-03, PL-04, PL-05 e PL-07 estão sendo estudados quimicamente pela aluna de doutorado Camila Martins.

Esta triagem foi realizada com o objetivo de, após analisar a potencialidade biológica e o perfil químico de cada extrato, selecionar extratos para o estudo químico no desenvolvimento desta tese de doutoramento. Desse modo, foram selecionados 2 fungos endofíticos (**CSY-02** e **CSY-03**) isolados da espécie vegetal *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) para ser realizado o estudo químico/biológico. Estes extratos apresentaram espectros de RMN de ^1H com sinais por toda a faixa espectral evidenciando uma alta e diversa produção metabólica, além de se mostrarem potencialmente bioativos nos bioensaios realizados.

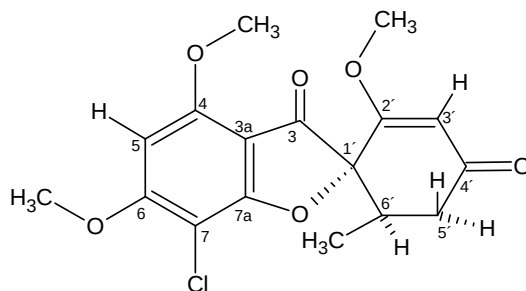
5.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas

5.2.1 Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Xylaria* sp. (CSY-03)



As substâncias **T1** e **T2**, produzidas por *Xylaria* sp., se encontram em fase de elucidação estrutural.

5.2.1.1 - Identificação estrutural da substância 1



A identificação estrutural da substância 1 foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e massas e comparação com os dados da literatura (CAFEU et al., 2005; PARK et al., 2005).

O espectro de RMN de ^1H (**Tabela 3; Figura 9**) apresentou sinais característicos de metoxilas em δ_{H} 3,96, 3,90 e 3,55, um sinal em δ_{H} 5,47 atribuído ao hidrogênio olefínico e um sinal na região de hidrogênio aromático (δ_{H} 6,06) indicando um anel aromático pentassubstituído.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 3; Figura 10**) mostrou a presença de 17 átomos de carbono sendo atribuídos a seis aromáticos (δ_{C} 164,6; 89,5; 157,7; 97,3; 105,2 e 169,5), dois carbonos sp^2 de uma enona (δ_{C} 170,8 e 104,8), duas carbonilas conjugadas (δ_{C} 192,4 e 197,0), três metoxilas (δ_{C} 56,9; 56,4 e 56,6), uma metila em δ_{C} 14,2, um metino em δ_{C} 36,4, um carbono metilênico em δ_{C} 40,1 e um carbono quaternário em δ_{C} 90,7.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono após análise detalhada do mapa de contorno *g*HMQC (**Figura 11**). Por *g*HMBC (**Figura 12**) foram observadas as seguintes correlações a longa distância (J_{CH}): δ_{H} 3,90 (6-OCH₃) com δ_{C} 157,7 (C-6); δ_{H} 3,96 (4-OCH₃) com δ_{C} 164,6 (C-4); δ_{H} 6,06 (H-5) com δ_{C} 97,3 (C-7), 157,7 (C-6), 164,6 (C-4) e 192,4 (C-3); δ_{H} 3,55 (2'-OCH₃) com δ_{C} 170,8 (C-2'); δ_{H} 5,47 (H-3') com δ_{C} 170,8 e 197,0 (C-4'); δ_{H} 2,35 (H-5a') com δ_{C} 197,0 e 104,8 (C-3'); δ_{H} 0,89 (6'-CH₃) com δ_{C} 36,4 (C-6'), 40,1 (C-5') e 90,7 (C-1').

Através da análise dos dados espectrais aliada aos dados da literatura (CAFEU et al., 2005) foi possível identificar a substância 1 como sendo griseofulvina.

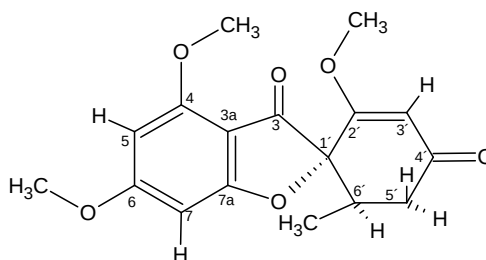
O espectro de massas obtido por ESI-EM(+)120V (**Figura 13**) apresentou picos em m/z 353,0837 $[M+H]^+$, m/z 375,0659 $[M+Na]^+$ e m/z 391,0378 $([M+K]^+)$, coerentes com a fórmula molecular $C_{17}H_{17}ClO_6$.

Tabela 3 – Dados de RMN de 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) e ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de **1** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	1H	^{13}C
4	–	164,6
5	6,06 (s)	89,5
6	–	157,7
7	–	97,3
3a	–	105,2
7a	–	169,5
4-OCH ₃	3,96 (s)	56,9
6-OCH ₃	3,90 (s)	56,4
2'-OCH ₃	3,55 (s)	56,6
3	–	192,4
1'	–	90,7
2'	–	170,8
3'	5,47 (s)	104,8
4'	–	197,0
5a'	2,35 (dd; 16,5 e 5,0)	40,1
5b'	2,95 (dd; 16,5 e 13,5)	
6'	2,75 (m)	36,4
6'-CH ₃	0,89 (d; 6,5)	14,2

A griseofulvina é um metabólito produzido por várias espécies de fungos e é utilizada, atualmente, como um poderoso antifúngico na medicina, em animais domésticos e como fungicida para agricultura (MANN, 1994). É empregada comercialmente nos medicamentos Fulcin® (Zeneca) e Sporostatin® (Shering Plough) e o seu mecanismo de ação é pela inibição da mitose celular fúngica, impedindo a divisão celular. Este agente fungicida apresenta atividade *in vitro* contra várias espécies de *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* (PEREA et al., 2001).

5.2.1.2 - Identificação estrutural da substância **3**



A substância **3** foi submetida à técnica de RMN de ^1H e ^{13}C e a espectrometria de massas. O espectro de RMN de ^1H mostrou vários sinais de intensidades diferentes indicando tratar-se de uma mistura de metabólitos. Entretanto, a análise detalhada do espectro e comparação com a literatura (CAFEU, 2005) permitiu identificar a substância majoritária.

O espectro de RMN de ^1H (**Tabela 4; Figura 14**) apresentou um perfil semelhante ao da substância identificada como griseofulvina (**1**) tendo como principal diferença a presença de sinais em δ_{H} 6,15 (*d*, $J=2$ Hz) e δ_{H} 5,97 (*d*, $J=2$ Hz) indicando um padrão de substituição *meta*, em um anel aromático tetrassubstituído. Outros sinais referentes aos demais hidrogênios também foram observados: singletos em δ_{H} 5,47, 3,83, 3,82 e 3,55 indicando a presença de um hidrogênio olefínico; três metoxilas, sendo duas aromáticas e uma sobre sistema insaturado; dubleto em δ_{H} 0,89 (6,5 Hz) e um multiplete em δ_{H} 2,70, indicativo da presença de uma metila e um metínico, respectivamente.

Esses dados amparados pelos descritos na literatura (CAFEU, 2005; PARK et al., 2005) evidenciaram a substância **3** como 7-desclorogriseofulvina. Por tratar-se de uma substância com dados estruturais completos descritos na literatura, os espectros de ^{13}C e outros experimentos bidimensionais de RMN não foram realizados.

O espectro de massas obtido por ESI-EM(+)120V (**Figura 15**) apresentou picos em m/z 319,1219 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 341,1039 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e m/z 357,0778 $[\text{M}+\text{K}]^+$, coerentes com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **3** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H	^{13}C
	(CAFEU et al., 2005)	(CAFEU et al., 2005)
4	–	159,1
5	6,15 (<i>d</i> ; 2,0)	88,6
6	–	170,4
7	5,97 (<i>d</i> ; 2,0)	93,3
3a	–	104,4
7a	–	176,1
4-OCH ₃	3,83 (<i>s</i>)	56,1
6-OCH ₃	3,82 (<i>s</i>)	56,1
2'-OCH ₃	3,55 (<i>s</i>)	56,6
3	–	192,4
1'	–	89,9
2'	–	171,3
3'	5,47 (<i>s</i>)	104,8
4'	–	107,3
5a'	2,35 (<i>dd</i> ; 17,0 e 5,0)	40,1
5b'	3,00 (<i>dd</i> ; 17,0 e 13,0)	
6'	2,70 (<i>m</i>)	36,6
6'-CH ₃	0,90 (<i>d</i> ; 6,5)	14,2

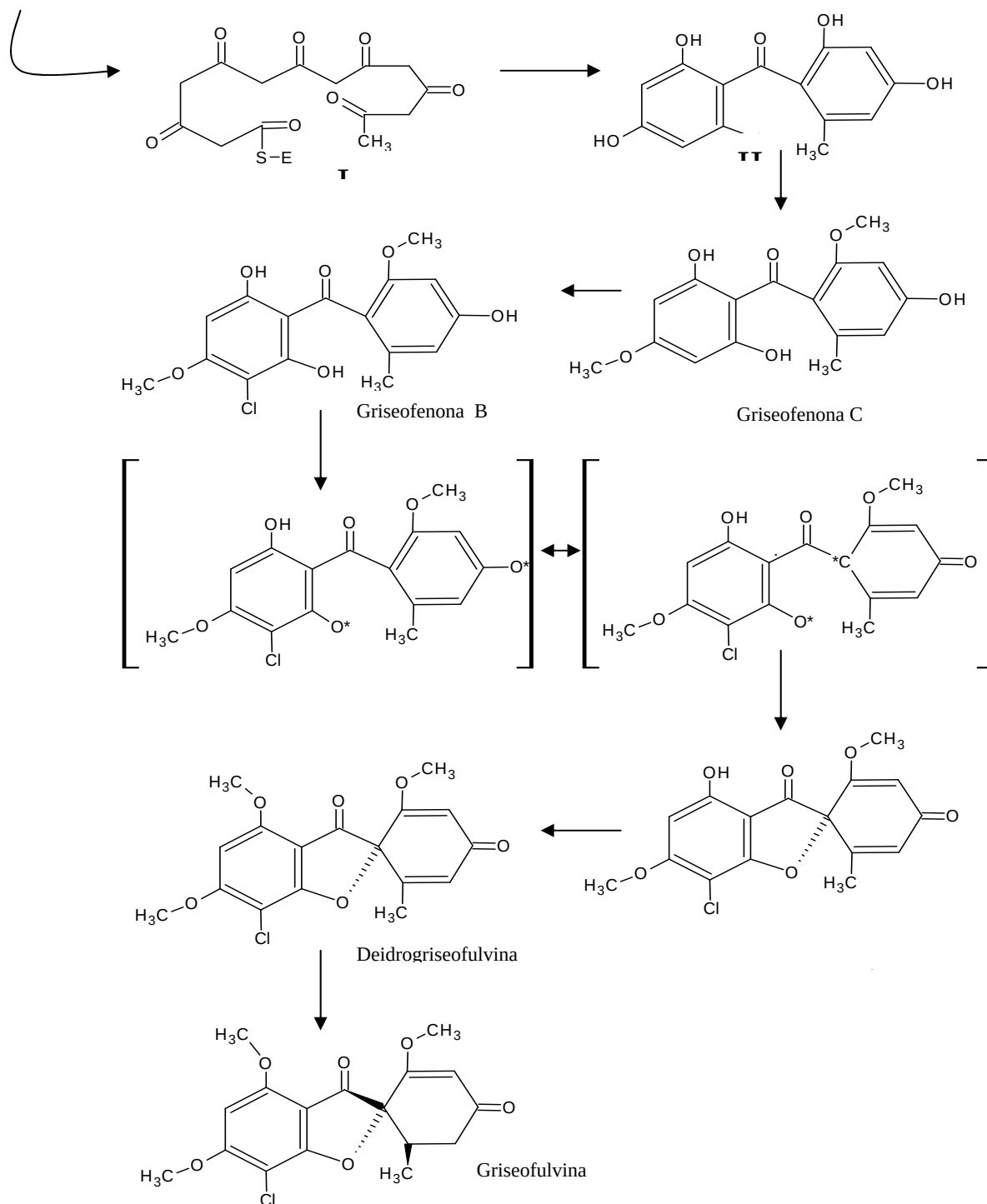
A griseofulvina é produzida por vários fungos como *Penicillium griseofulvum*, *P. janczewskii* (MACMILLAN, 1953), *P. patulum*, enquanto que o seu derivado 7-desclorogriseofulvina já foi produzido por *P. griseofulvum*, *P. janczewskii*, *Coriolus vernicipes*, *Aspergillus versicolor* (TURNER, ALDRIDGE, 1983).

Na biossíntese da griseofulvina o ácido polioxo **I** cicliza e resulta no derivado da benzofenona **II**, que em seguida, é metilado e clorado. O ataque pela enzima fenol oxidase ou peroxidase resulta em um bi-radical que é o intermediário “chave” para o fechamento do anel O-heterocíclico (LUCKNER, 1990).

A via biossintética da griseofulvina (LUCKNER, 1990) está ilustrada no Esquema 7.

$\text{CH}_3\text{-CO-CoA} +$

$6 \text{ COOH-CH}_2\text{-CO-CoA}$



Esquema 7 - Rota biossintética da griseofulvina

5.2.1.3 Identificação estrutural da substância **6**

A substância **6** foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e Massas (**Figura 16**) os quais evidenciaram que esta substância se encontra em mistura com outros metabólitos, no entanto com identificação estrutural viável em mistura.

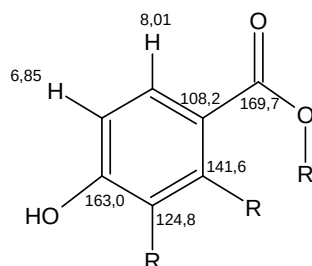
O espectro de RMN^{13}C (**Figura 17**, pág. 148; **Tabela 5**) registrou seis átomos de carbono na região de aromáticos, um metileno supostamente benzílico, um carbono metínico carbinólico e uma metila. Foi observada também, uma carbonila em δ_{C} 169,7 indicando a presença de um éster.

Os espectros de RMN^1H (**Figura 18**, pág. 149) e *g*HMQC de **6** apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,95 (*d*, $J=8,5$ Hz, 1H, δ_{C} 114,7) e δ_{H} 8,01 (*d*, $J=8,5$ Hz, 1H, δ_{C} 138,2), evidenciando um acoplamento *orto*, o que sugeriu a presença de anel aromático tetrasubstituído com dois substituintes, um doador e outro retirador de elétrons.

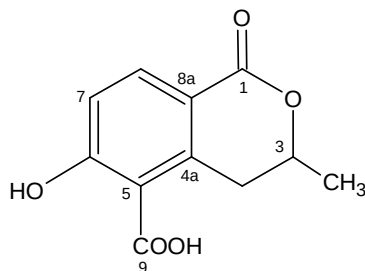
No espectro de RMN^1H , foram observados ainda, sinais em δ_{H} 2,92 (*dd*, 12,0 e 18,0 Hz, δ_{C} 32,8), δ_{H} 3,95 (*dl*, 15,0 Hz, δ_{C} 32,8) atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-4 α e H-4 β , além de um multiplete em δ_{H} 4,70 (*m*, δ_{C} 75,4, 1H) e um dubleto em δ_{H} 1,42 (*d*, 6,0Hz) conferidos aos hidrogênios carbinólico H-3 e a H_3C -3, respectivamente.

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono, foi realizada após avaliação das interações a curta distância 1J , no experimento bidimensional *g*HMQC (**Figura 20**, pag. 150).

As correlações observadas a longa distância em *g*HMBC (**Figura 21**) entre H-8 $\leftrightarrow$ C-1/C-6/C-4a e H-7 $\leftrightarrow$ C-8a/C-5 permitiram sugerir a sub-estrutura A para a substância **6**, com esqueleto de uma isocumarina:



No experimento de *g*COSY (**Figura 22**) as correlações observadas entre H-4 α $\leftrightarrow$ H-4 β $\leftrightarrow$ H-3, corroboraram para a estrutura proposta de uma isocumarina, e apesar de não termos observado correlações a curta e longa distância em *g*HMBC, foi atribuído à substância **6** a estrutura da 5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina.



A presença de um grupo carboxila ligado ao C-5 foi sugerida após análise do espectro de massas e consulta à literatura (ANDERSON et al., 1983).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **6** (δ em ppm e *J* em Hz).

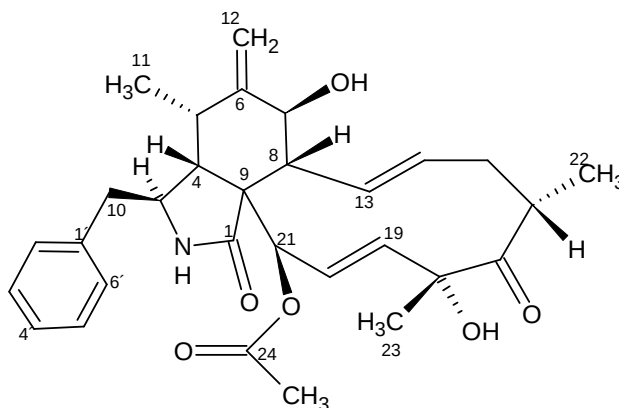
Posição	^1H	^{13}C
1	–	169,7
3	4,70 (<i>m</i>)	75,4
4 α	2,92 (<i>dd</i> ; 12,0 e 18,0)	32,8
4 β	3,95 (<i>dl</i> ; 15,0)	
4a	–	141,6
5	–	124,8
6	–	163,0
7	6,85 (<i>d</i> ; 8,5)	114,7
8	8,01 (<i>d</i> ; 8,5)	138,2
8a	–	108,2
9	–	*
Me-3	1,42 (<i>d</i> ; 6,0)	20,3

*Sinal não observado.

O espectro de massas obtido por ESI-EM(-)120V (**Figura 16**, pág. 147) apresentou pico em *m/z* 221,0472 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100%), confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

Em uma busca na literatura foi observado que não há relato desta substância como produto natural, apenas como produto obtido em uma reação com 5-formilmeleína (ANDERSON et al., 1983). Este trabalho ainda relata a produção de uma série de derivados de diidroisocumarinas por fungos pertencentes à família Xylariaceae. Para a substância **6** são apresentados apenas os dados de RMN¹H não existindo, até o momento, os dados de ¹³C e bidimensionais deste metabólito na literatura.

5.2.1.4 Identificação estrutural da substância **5**



A substância **5** foi submetida à RMN de ¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas. O espectro de massas obtido por EM-ES(+),120V (**Figura 23**, pág. 153) apresentou o pico base m/z 530,2575 (100%), indicando a formação do aduto $[M+Na]^+$, além de picos em m/z 508,2742 ($[M+H]^+$) e m/z 546,2334 ($[M+K]^+$). Estes dados aliados à literatura (MACCOTTA et al., 1993) e ao experimento de RMN de ¹³C, permitiram sugerir para **5** a fórmula molecular C₃₀H₃₇NO₆.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C indicou a presença três carbonilas, sendo uma de cetona (δ_c 209,9) e duas de éster e/ou amida (δ_c 169,9 e 173,5), um anel benzênico monossustituído, quatro metilas (δ_H 0,38, 1,03, 1,37 e 2,26) e três carbonos carbinólicos (δ_c 70,1, 76,4 e 77,4). Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base na análise do espectro de gHMQC (**Figura 29**, pág. 157). Os sinais apresentados em δ_H 5,40, δ_H 5,08, δ_H 5,13 e δ_H 5,83 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-13, C-14, C-19 e C-20, respectivamente. A geometria das ligações duplas $\Delta^{13,14}$ e

$\Delta^{19,20}$ foi definida como *trans* através da análise da constante de acoplamento de 15,5 Hz entre estes hidrogênios.

Os sinais em δ_{H} 2,53 (*dd*, $J=13,0$ e $9,0$ Hz) e δ_{H} 2,80 (*dd*, $J=13,0$ e $5,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios benzílicos H-10_a e H-10_b através da correlação apresentada em *g*COSY com o hidrogênio em δ_{H} 3,11 (H-3). A correlação a longa distância 3J apresentada entre H-2' (δ_{H} 7,13) e o carbono em δ_{C} 43,6 (C-10), fixa a posição do grupo fenila em relação ao anel isoindolona.

Os hidrogênios observados em δ_{H} 4,79 (*s*) e 5,01 (*s*) foram atribuídos a um metileno terminal. A análise do espectro de *g*HMBC (**Figura 30**) mostrou as correlações a longa distância de H-11/C-6 e H-12/C-7, permitindo fixar a posição desta ligação dupla em $\Delta^{6,12}$.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais em δ_{H} 3,55 (*d*) e δ_{H} 5,25 (*t*; $J=2,5$ Hz), atribuídos aos hidrogênios carbinólicos H-7 e H-21, respectivamente. A constante de acoplamento de 2,5 Hz sugere um ângulo de ligação próximo de 90° entre H-20 e H-21.

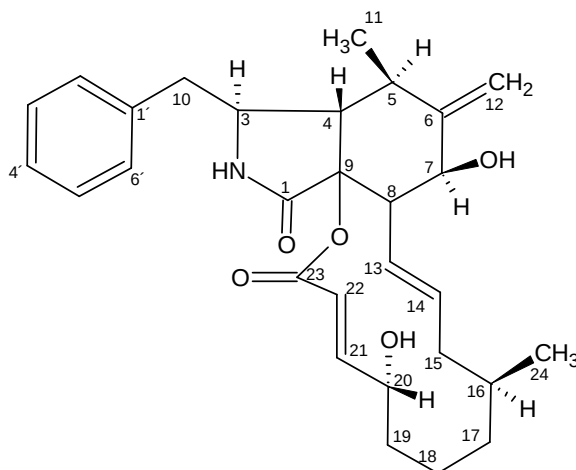
Análise dos dados espectrométricos e comparação com a literatura (ESPADA et al., 1997; MACCOTTA et al., 1993) permitiu identificar a substância **5** como Citocalasina D.

A configuração relativa de **5** foi determinada por comparação dos valores dos deslocamentos em RMN de ^1H , ^{13}C e constantes de acoplamentos com dados da literatura (ESPADA et al., 1997; SILVA, 2005).

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **5** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H	^{13}C
1	–	173,5
2	8,00 (s)	–
3	3,10	52,5
4	1,98 (dd; 2,5 e 5,5)	47,4
5	2,50 (m)	31,0
6	–	150,6
7	3,55	70,1
8	2,68 (t; 10,0)	46,1
9	–	53,1
10	2,53 (dd; 9,0 e 13,0) 2,80 (dd; 5,0 e 13,0)	43,6
11	0,38 (d; 7,0)	12,7
12	4,79 (s) / 5,01 (s)	111,4
13	5,40 (dd; 10,0 e 15,5)	130,7
14	5,08 (m)	126,9
15	1,90 (m) / 2,18 (m)	38,0
16	2,74 (m)	41,4
17	–	209,9
18	–	77,4
19	5,13 (d, 2,5)	126,9
20	5,83 (dd; 2,5 e 16,0)	132,1
21	5,25 (t; 2,5)	76,4
22	1,03 (d; 7,0)	19,2
23	1,37 (s)	24,5
24	–	169,9
25	2,26 (s)	20,4
1'	–	137,0
2'e 6'	7,13 (d; 7,5)	129,5
3'e 5'	7,29 (t; 7,5)	128,2
4'	7,21 (t; 7,5)	126,4

5.2.1.5 Identificação estrutural da substância 2



A substância 2 foi submetida à análise dos espectros de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional) e foi possível notar semelhança do perfil espectral com a substância 5 (Citocalasina D). O espectro de massas (**Figura 33**, pág. 160) apresentou o pico base m/z 502,2616 (100%), indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, além de picos em m/z 480,2770 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 518,2381 ($[\text{M}+\text{K}]^+$). Estes dados aliados ao espectro de RMN de ^{13}C , DEPT e à literatura (KONIG et al., 1999; GRAF et al., 1974) permitiram sugerir que 2 é uma substância da classe das citocalasinas com fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_5$.

Os espectros de DEPT e ^{13}C evidenciam a presença de 29 átomos de carbono, sendo duas carbonilas (éster e/ou amida), 6 carbonos aromáticos, 3 carbonos carbinólicos, 6 carbonos metilênicos, 2 carbonos metílicos, entre outros. Quando comparado ao espectro de RMN de ^{13}C de 5 (Citocalasina D) é possível notar que esta substância possui 2 metilas e uma carbonila a menos. No espectro de RMN de ^1H , a ausência de um sinal entre δ_{H} 2,10–2,30, referente ao deslocamento químico dos hidrogênios da metila do grupo acetato aliado a um δ_{C} 83,0 atribuído a C-9, conduz ao fato de que nesta substância ocorre uma ligação entre C-9 e um átomo de oxigênio. A correlação a longa distância observada em *g*HMBBC entre H-21 e a carbonila em δ_{C} 164,5 (C-23) confirma a posição do grupo acetato inserido no macrociclo.

Os hidrogênios em δ_{H} 5,96, 5,46, 7,05 e 5,90 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-13, C-14, C-21 e C-22, respectivamente. A geometria *trans* foi definida para as ligações duplas $\Delta^{13,14}$ e $\Delta^{21,22}$ pela análise da constante de acoplamento de 15,5 Hz entre estes

hidrogênios. O espectro de RMN de ^1H também apresentou sinal em δ 2,83 (*m*) atribuído aos hidrogênios benzílicos H-10a e H-10b, que mostram correlação em *g*COSY (**Figura 38**) com H-3 (δ_{H} 3,32). A correlação a longa distância 3J apresentada entre H-2' (δ_{H} 7,17) e o carbono em δ_{C} 44,2 (C-10), confirma a posição do grupo fenila em relação ao anel isoindolona.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **2** (δ_{H} em ppm e *J* em Hz).

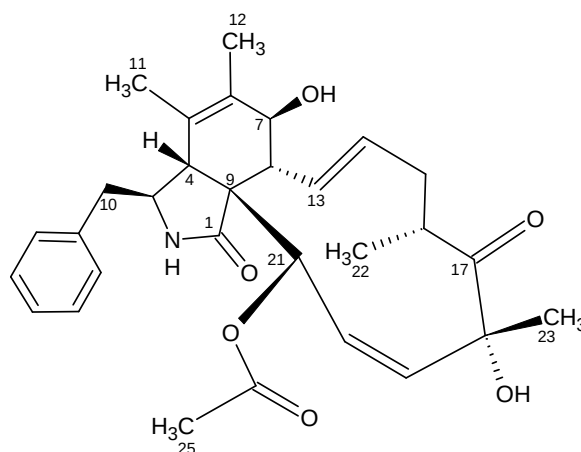
Posição	^1H	^{13}C
1	–	171,4
3	3,31 (<i>m</i>)	53,7
4	2,82 (<i>m</i>)	49,27
5	Não observado	31,8
6	–	148,4
7	3,90 (<i>d</i> ; 11,0)	69,0
8	3,32 (<i>m</i>)	49,25
9	–	83,0
10	2,83 (<i>m</i>)	44,2
11	1,10 (<i>d</i> ; 6,5)	14,2
12	5,17 (<i>s</i>)/5,40 (<i>s</i>)	114,6
13	5,96 (<i>dd</i> ; 11,0 e 15,0)	126,3
14	5,46 (<i>ddd</i> ; 3,5, 11,0 e 15,0)	138,1
15	1,75 (<i>m</i>)/2,12 (<i>m</i>)	41,7
16	1,33 (<i>m</i>)	33,0
17	1,68 (<i>m</i>)	35,0
18	*	20,2
19	1,69 (<i>m</i>)	34,9
20	4,52 (<i>m</i>)	70,8
21	7,05 (<i>dd</i> ; 5,5 e 15,5)	152,1
22	5,90 (<i>dd</i> ; 2,0 e 15,5)	119,2
23	–	164,5
24	0,90 (<i>d</i> ; 6,5)	20,3
1'	–	137,3
2'e 6'	7,17 (<i>d</i> ; 7,0)	129,1
3'e 5'	7,32 (<i>t</i> ; 7,0)	128,9
4'	7,25 (<i>t</i> ; 7,0)	127,1

*valor não observado

A análise dos dados espectrométricos de EM, RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e comparação com a literatura (KONIG et al., 1999; GRAF et al., 1974; CAFÊU, 2004) permitiu identificar a substância **2** como Citocalasina B.

A configuração relativa de **2** foi determinada por comparação dos valores dos deslocamentos em RMN de ^1H , ^{13}C , constantes de acoplamentos e comparação com dados da literatura (MACCOTTA et al., 1993; KONIG et al., 1999; ESPADA et al., 1997).

5.2.1.6 Identificação estrutural da substância **4**



A substância **4** foi submetida à técnica de RMN de ^1H e espectrometria de Massas.

O espectro de RMN de ^1H de **4** (Figura 41, pág. 166) apresentou um perfil muito semelhante ao da citocalasina D (subst. **5**), sendo que as diferenças observadas foram a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios geminais H-12a (δ_{H} 4,79, s)/H-12b (δ_{H} 5,01, s) e à metila da posição 11 em δ_{H} 0,38 (d). A presença de duas metilas sobre carbono sp^2 com deslocamento químico em δ_{H} 1,38 (s) e δ_{H} 1,61 (s) sugeriu a isomerização da ligação dupla $\Delta^{6,12}$ para $\Delta^{5,6}$, e estes valores foram atribuídos hidrogênios metílicos das posições 11 e 12.

O espectro de massas, obtido por ESI-EM(+)120V (Figura 42), apresentou o pico base m/z 530,2541 (100%), indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, além de picos em m/z 508,2724 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e m/z 546,2483 ($[\text{M}+\text{K}]^+$). Estes dados aliados às informações obtidas pelo espectro de RMN de ^1H e à literatura (ESPADA et al., 1997; SILVA, 2005) permitiu identificar a substância **4** como Citocalasina C.

Outros experimentos de RMN ^{13}C e bidimensionais não foram realizados devido à massa insuficiente desta amostra. Entretanto, por tratar-se de uma substância já relatada na literatura, foi possível identificar este metabólito amparado aos dados já descritos.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **4** (δ_{H} em ppm e J em Hz).

Posição	^1H δ_{H} da substância 4	^1H (ESPADA et al., 1997)
2	5,56 (s1)	5,56 (s1)
3	**	3,33 (dd, 8,2 e 6,7)
4	**	2,52 (s1)
7	3,70 (d1)	3,78 (d1; 9,8)
8	**	2,26 (dd, 10,2 e 9,8)
10	**	3,06 (dd, 13,5 e 6,0) 2,99 (dd, 13,5 e 9,1)
11	1,38 (s)	1,41 (s)
12	1,61 (s)	1,65 (s)
13	5,82 (m)	6,13 (dd, 15,7 e 10,2)
14	5,26 (m)	5,70 (ddd, 15,5, 9,9 e 5,8)
15	**	2,67 (ddd, 12,6, 10,1 e 10,0) 2,09 (m)
16	**	3,22 (ddq, 10,8, 6,7 e 1,2)
19	5,95 (dd, 2,5 e 15,5)	*
20	5,07 (dd, 2,5 e 15,5)	*
21	5,83 (s1)	5,74 (s1)
22	1,13 (d; 6,5)	1,18 (d; 6,7)
23	1,44 (s)	1,50 (s)
25	2,19 (s)	2,14 (s)
2' e 6'	7,30 (m)	7,31 (m)
3' e 5'	7,10 (m)	7,19 (m)
4'	7,20 (m)	7,25 (m)

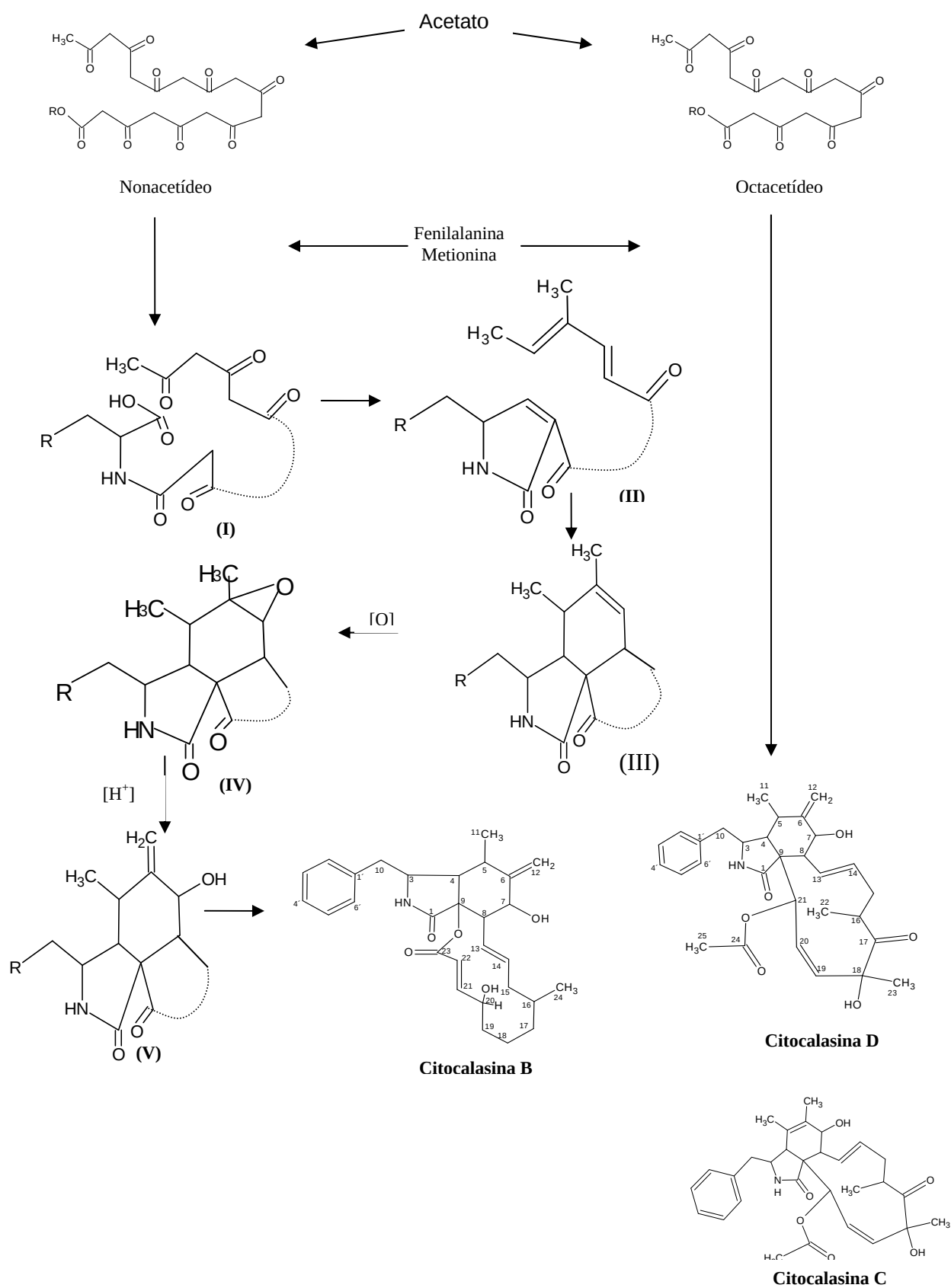
*Deslocamento não observado por tratar-se da 19,20-epoxicitocalasina C.

**Sinais não atribuídos.

As Citocalasinas (**2**, **4** e **5**) constituem um grupo de metabólitos naturais produzidos por diversas espécies de fungos, incluindo

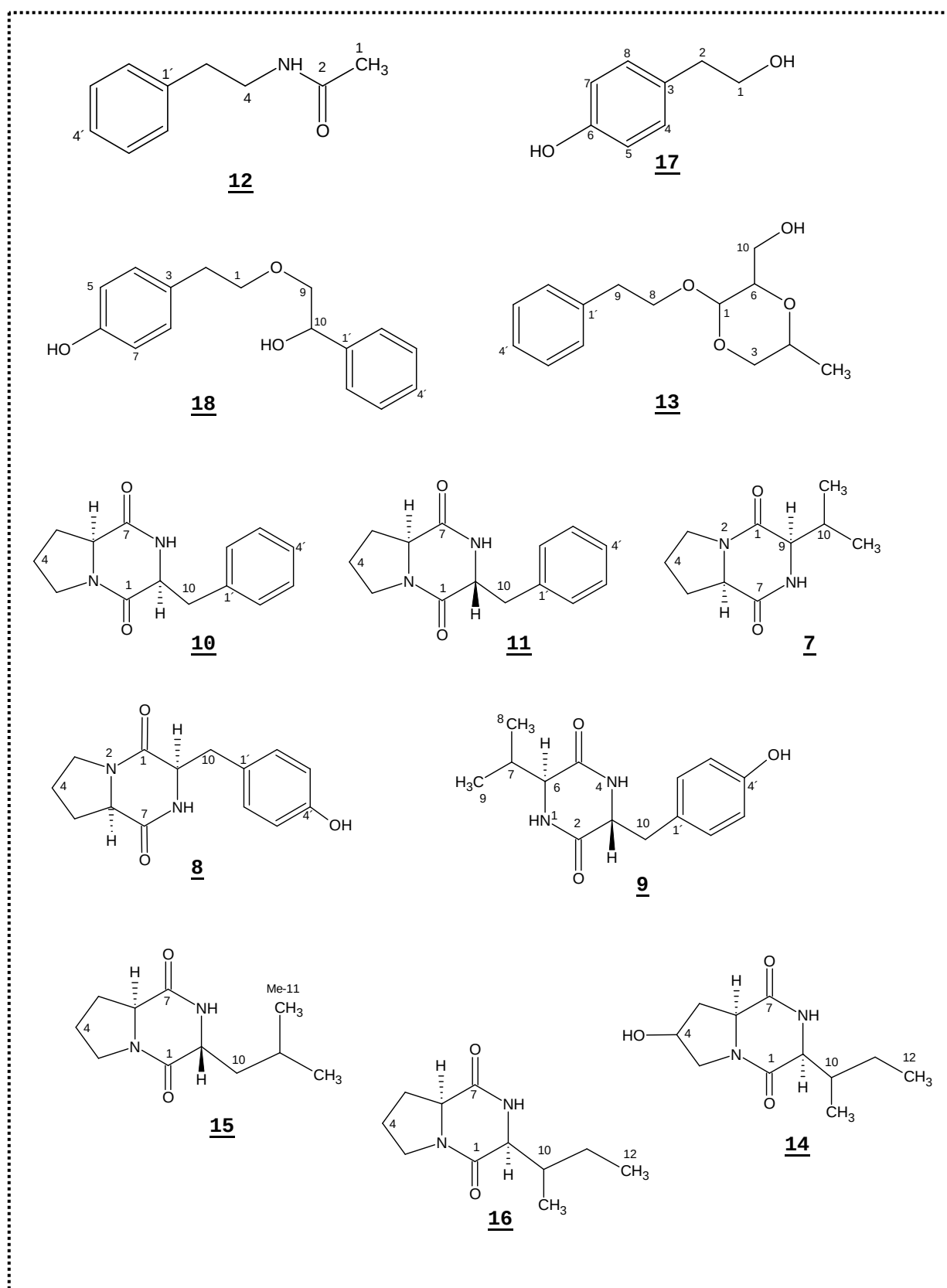
Helminthosporium sp., *Phoma* sp., *Xylaria* sp., *Hypoxylon* sp., *Zygosporium mansonii* e *Chalara* sp. Esta classe de metabólitos foi descoberta em 1966 e são conhecidas mais de 20 citocalasinas. Estruturalmente as citocalasinas são caracterizadas pela presença de um anel biciclo isoindolona, fundido a um macrociclo de 11 a 14 membros e pela presença de uma unidade fenil na posição 10.

A proposta biossintética mostra que a citocalasina B é formada a partir de uma unidade de fenilalanina, duas unidades de metionina e nove unidades de acetato e que as citocalasinas C e D apresentam uma unidade adicional de metionina (GRAF et al., 1974). Assim sendo, trata-se de uma via biossintética do acetato mista, uma vez que a fenilalanina é proveniente do metabolismo primário e, sendo este aminoácido um derivado do ácido shikímico, esta via pode ser chamada de acetato/shikimato. Na proposta de mecanismo, o derivado de policetídeo (nonacetídeo para a citocalasina B; octacetídeo para as citocalasinas C e D) se liga a fenilalanina através de uma conexão com a amida para formar o intermediário (**I**), que por processo de redução, dehidrogenação e condensação resulta no intermediário (**II**). O intermediário (**II**) pode sofrer uma reação de cicloadição para formar (**III**). A epoxidação da ligação dupla no intermediário (**III**) resulta no sistema de anel presente nas citocalasinas E, F, G, K, L e M e em Chaetoglobosinas A, C, F e K. Em condições levemente acídicas, o epóxido é transformado em álcool alílico (**V**) e resulta no tipo de anel presente nos outros tipos de citocalasinas (TURNER; ALDRIDGE, 1983). No caso da citocalasina B, sugere-se que a inserção do oxigênio entre os carbonos C-9 e C-23 ocorra por uma via enzimática do tipo *Baeyer-Villiger* e que o deoxafomina (**V**) seja um precursor direto uma vez que este possui o mesmo esqueleto carbônico e mesma configuração absoluta que a citocalasina B (ROBERT; TAMM, 1975). A proposta de rota biossintética para as citocalasinas B, C e D está ilustrada no Esquema 8, onde R corresponde ao benzeno.

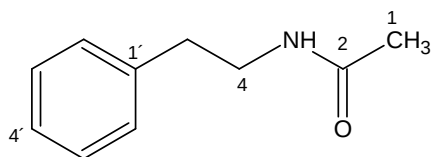


Esquema 8 - Rota biossintética das citocalasinas B, C e D.

5.2.2 Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Colletotrichum crassipes* (CSY-02)



5.2.2.1 Identificação estrutural da substância **12**



A substância **12** foi submetida à técnica de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e à espectroscopia de Massas.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 43**, pág. 168) e ^{13}C (**Figura 44**) evidenciaram a presença de uma carbonila, uma metila, dois grupos metilênicos, sendo um benzílico e o outro, devido ao δ_{C} em 40,1, foi posicionado α à um átomo de nitrogênio, e um anel aromático monossustituído.

O sinal em δ_{H} 1,77 (s, 3H) e a correlação a longa distância (^2J) observada entre esses hidrogênios e a carbonila em δ_{C} 168,9 permitiram sugerir a presença de um éster, que poderia ser uma amida ou um derivado do ácido carboxílico. A correlação observada a longa distância no espectro de *g*HMBC (**Figura 46**) entre H-4 (δ_{H} 3,24, δ_{C} 40,1) com δ_{C} 168,9 (C-2) e 139,4 (C-1'), permitiu inferir que a carbonila δ_{C} 168,9 tratava-se de uma carbonila de uma metil amida. A correlação observada em *g*COSY (**Figura 47**) entre H-4/H-5, aliado à correlação a longa distância em *g*HMBC entre H-4 $\leftrightarrow$ C-2/C-1' e comparação com dados da literatura (MASKEY et al., 2002) permitiram identificar a substância **12** como sendo N-(2-feniletil)acetamida.

Todos os deslocamentos químicos de ^1H foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono através da análise de *g*HMQC (**Figura 45**, pág. 169).

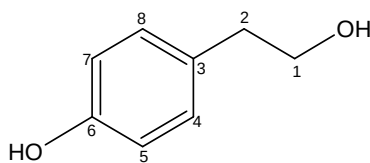
A estrutura proposta para esta substância foi confirmada após análise por ESI-EM(+)120V onde a presença dos íons em *m/z* 164,1160 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e *m/z* 186,0987 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) estão coerentes com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$ (**Figura 48**, pág. 172).

Esta substância já se encontra descrita na literatura, porém deve-se ressaltar que em estudo recente (MASKEY et al., 2002) foi evidenciado a potencial atividade antimicrobiana de diversas ariletilamidas. Este fato reforça a importância do estudo químico de extratos produzidos por endofíticos uma vez que estes vêm se mostrando promissores produtores de metabólitos bioativos.

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **12** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H	^{13}C
1	1,77 (1H, <i>s</i>)	22,5
2	–	168,9
3	7,87	–
4	3,24 (2H, <i>m</i>)	40,1
5	2,69 (2H, <i>t</i> ; 7,5)	35,1
1'	–	139,4
2' e 6'	7,20 (<i>d</i> ; 6,5)	128,5
3' e 5'	7,30 (<i>t</i> ; 6,5)	128,2
4'	7,18 (<i>t</i> ; 6,5)	125,9

5.2.2.2 Identificação estrutural da substância **17**



A substância **17** foi submetida às técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas. A análise destes espectros evidenciou que além da substância **17** também há outros metabólitos presentes em menor quantidade.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 49**, pág. 173) apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,02 (*d*; $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 6,71 (*d*; $J=8,5$ Hz), indicando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído, e dois tripletos em δ_{H} 2,73 ($J=6,5$ Hz, δ_{C} 38,0, H-2) e δ_{H} 3,75 ($J=6,5$ Hz, δ_{C} 64,0, H-1) evidenciando tratarem-se de metilenos benzílicos e carbinólicos, respectivamente. As constantes de acoplamento destes dois tripletos de 6,5 Hz sugerem que há acoplamento entre eles. Esta observação é corroborada pelas correlações observadas no mapa de contorno *g*COSY (**Figura 50**, pág. 174), entre H-1 e H-2.

O sinal em δ_{C} 154,5 observado no espectro de *g*HMBC (**Figura 51**) sugeriu a presença de uma hidroxila aromática, o que aliado aos valores dos deslocamentos químicos em RMN ^1H e ^{13}C (**Tabela 10**), indicou que a hidroxila está posicionada em *para* ao metileno benzílico.

Apesar de não ter sido observado correlações no experimento de *g*HMBC de H-1 e/ou H-2 com os carbonos aromáticos ou *vice-versa*, foi possível atribuir para a substância **17** à estrutura do tirosol.

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **17** (δ em ppm e *J* em Hz).

	^1H	^1H	$^{13}\text{C}^*$	^{13}C
	Substância 17	(CHEN et al., 2004)	Substância 17	(CHEN et al., 2004)
1	3,75 (<i>t</i> ; 6,5)	3,51 (<i>t</i> ; 6,5)	64,0	62,6
2	2,73 (<i>t</i> ; 6,5)	2,59 (<i>t</i> ; 6,5)	38,0	38,3
3	–	–	131,0	129,7
4;8	7,02 (<i>d</i> ; 8,5)	6,98 (<i>d</i> ; 8,5)	130,2	129,6
5;7	6,71 (<i>d</i> ; 8,5)	6,65 (<i>d</i> ; 8,5)	116,0	114,9
6	–	–	154,5	155,5
OH	–	9,14	–	–

*Os valores aproximados dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C foram obtidos por *g*HMQC e *g*HMBC.

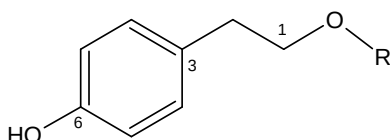
O espectro de massas obtido por ESI-EM(+)120V (**Figura 53**) apresentou picos em *m/z* 161,0591 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e *m/z* 177,0600 $[\text{M}+\text{K}]^+$ coerentes com a fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$ e comparação com os dados da literatura (CHEN et al., 2004; GUIMARÃES, 2006) permitiram assegurar tratar-se do tirosol.

O tirosol já foi relatado como metabólito secundário produzido pelos fungos endofíticos *Phomopsis oblonga* e *Ceratocystis fimbriata* (GUIMARÃES, 2006), entretanto este é o primeiro relato da produção por *Colletotrichum crassipes*. Há relato do tirosol como sendo uma molécula “quorum-sensing” (sinalizadora) com importantes implicações na dinâmica do crescimento e morfogênese de *Candida albicans*, além de ser um agente antifúngico em potencial (GUIMARÃES, 2006).

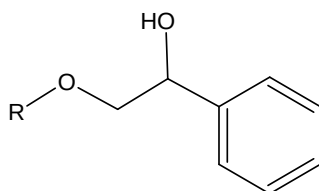
5.2.2.3 Identificação estrutural da substância **18**

A substância **18** foi submetida à espectrometria de massas com a técnica ESI-EM(+) (**Figura 54**, pág. 178) e apresentou pico em m/z 281,1731 indicando a formação do aduto $[M+Na]^+$. A massa calculada 281,1154 e a análise dos espectros de RMN¹³C permitiram atribuir a fórmula molecular C₁₆H₁₈O₃ para a substância **18**.

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 55**) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos e evidenciou a presença de 2 anéis isolados na estrutura, sendo um *mono* (anel B) e outro *para*-disubstituído (anel A). Os valores dos deslocamentos químicos observados em RMN ¹H e ¹³C (**Tabela 11**) para o anel A permitiram propor que este é *para*-substituído por uma hidroxila. Esta afirmação foi corroborada pela correlação a longa distância (³J) observada entre a hidroxila fenólica δ_H 9,03 ↔ C-5 e de H-4 ↔ C-6/C-2 em gHMBC (**Figura 57**). Esta ultima correlação também evidenciou um hidrogênio benzílico em δ_H 2,59 (δ_{C-2} 38,0). A correlação observada em gCOSY (**Figura 59**) entre H-2 ↔ H-1, evidenciaram o carbono carbinólico δ_C 62,4 e permitiram propor a estrutura parcial A para a substância **18**.



Os espectros de RMN ¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) que evidenciaram o anel aromático monosubstituído, também mostraram uma correlação à longa distância de H-10 ↔ C-1'/C-9 e do hidrogênio da hidroxila em C-10 com C-1'. Estas informações permitiram propor a estrutura parcial B:



Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos através da análise do espectro de *g*HMQC (Figura 61, pág. 184) e os dados estão apresentados na Tabela 11.

A conexão entre as estruturas parciais A e B não foi visualizada pelo experimento de *g*HMBC, mas foi proposta em função dos valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio, das integrações dos hidrogênios e corroborada pelo espectro de massas. A substância foi identificada como 1-hidroxi-1-feniletil-tirosol.

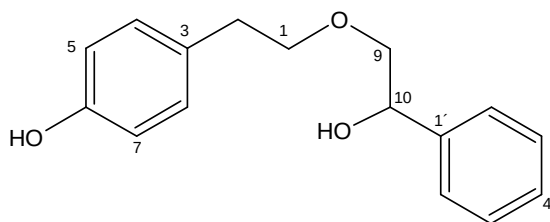


Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) da substância **18** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H	^{13}C
1	3,52 (<i>m</i>)	62,4
2	2,59 (<i>t</i> ; 7,5)	38,0
3	–	129,0
4 e 8	6,98 (<i>d</i> ; 8,5)	129,4
5 e 7	6,63 (<i>d</i> ; 8,5)	115,0
6	–	155,0
9	4,52 (<i>m</i>) / 4,60 (<i>t</i> ; 6,0)	73,6
10	3,42 (<i>t</i> ; 6,0)	67,2
1'	–	143,0
2' e 6'	7,22 (<i>d</i> ; 6,5)	126,8
3' e 5'	7,28 (<i>t</i> ; 6,5)	126,6
4'	7,33 (<i>t</i> ; 6,5)	126,0

Após busca na base de dados “SciFinder” não foi possível encontrar dados sobre a estrutura proposta, indicando que esta substância seja inédita na literatura.

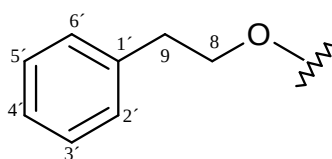
5.2.2.4 Identificação estrutural da substância **13**

A substância **13** foi submetida à espectrometria de massas com a técnica ESI-EM(+) (**Figura 62**, pág. 185), e apresentou o pico base m/z 291,1328 (100%) indicando a formação do aduto $[M+K]^+$. A massa para $[M+K]^+$ foi calculada 291,0999, o que com auxílio dos espectros de RMN¹³C e DEPT permitiu atribuir a fórmula molecular C₁₄H₂₀O₄ para a substância **13**.

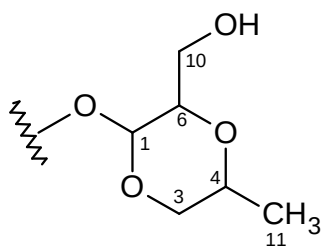
O espectro de RMN de ¹³C (**Figura 63; Tabela 12**) apresentou 14 sinais que foram atribuídos a uma metila alifática, a três carbonos metilênicos sendo dois carbinólicos e um benzílico, três carbonos metínicos carbinólicos e seis carbonos sp² relativos a um anel aromático monosubstituído.

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 64; Tabela 12**) mostrou sinais de hidrogênios correspondentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e aromáticos. Todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono pela de análise detalhada do espectro de gHMQC (**Figura 65**, pág. 188).

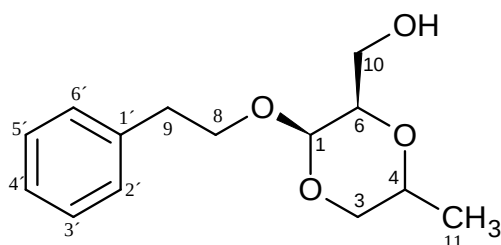
O substituinte ligado ao anel aromático foi determinado pela correlação à longa distância ³J, observada em gHMBC (**Figura 66**) entre H-2' (δ_H 7,23, *d*, 7,0 Hz, 1H) ↔ C-9 (δ_C 35,4), corroborando pelo carbono benzílico sugerido pelos espectros de RMN¹³C e ¹H. No experimento de gCOSY (**Figura 67**) as correlações observadas entre H-8 ↔ H-9, permitiram propor a estrutura parcial A para a substância **13**:



A observação de um dubleto δ_H 4,55 (*d*, 1,0 Hz, δ_C 99,8, 1H) no espectro de RMN¹H sugeriu um carbono dioxigenado, e a constante de acoplamento do hidrogênio ligado a este sugeriu que tratava-se de um carbono de um ciclo com uma relação *cis* com o hidrogênio vizinho. As correlações observadas no experimento de gHMBC entre H-1 ↔ C-6/C-10 e de H-11 ↔ C-4/C-3, permitiram propor a estrutura parcial B para a substância **13**:



A conexão entre as estruturas parciais A e B foi realizada com base na interação a longa distância 3J observada no experimento de *g*HMBC entre $H-1 \leftrightarrow C-8$, o que aliado ao experimento de TOCSY-1D (**Figuras 68-69**), permitiram propor a seguinte estrutura para a substância em questão:



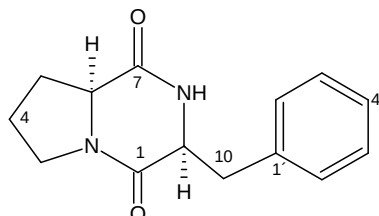
A configuração relativa de C-1 e C-6 foi estabelecida com base na constante de acoplamento de 1,0 Hz entre estes dois hidrogênios. A substância foi identificada como (6-metil-3-(feniletóxi)-1,4-dioxan-2-il)metanol.

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

Posição	1H	^{13}C
1	4,55 (<i>d</i> ; 1,0)	99,8
3	3,15	71,9
4	3,26	68,3
6	3,52	70,4
8	3,57 (<i>m</i>) / 3,73 (<i>m</i>)	67,2
9	2,80 (<i>t</i> ; 6,5)	35,4
10	3,36	70,6
11	1,08 (<i>d</i> ; 6,5)	17,7
1'	–	138,9
2' e 6'	7,23 (<i>d</i> ; 7,0)	128,6
3' e 5'	7,27 (<i>t</i> ; 7,0)	128,1
4'	7,18 (<i>t</i> ; 7,0)	125,9

Após busca na base de dados "SciFinder" não foi possível encontrar dados sobre a estrutura proposta, indicando que esta substância seja inédita na literatura.

5.2.2.5 Identificação estrutural da substância **10**



A substância **10** foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, e espectrometria de massas.

O espectro de RMN de ^1H (**Figuras 70**, pág. 192) apresentou na região de alifáticos, três multipletos em δ_{H} 3,25, δ_{H} 1,72 e δ_{H} 1,42 integrando para dois hidrogênios cada. Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_{H} 7,26 (*d*; 1H; δ_{C} 29,7), 7,23 (*dd*; 2H; δ_{C} 127,8) e δ_{H} 7,26 (*dd*; 2H; δ_{C} 126,2) além de dois duplos dubletos em 3,02 (1H, *dd*, 14,0; 5,0 Hz) e 3,08 (1H, *dd*, 14,0; 5,0 Hz), evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído. Foram observados ainda, dois sinais tripletos em 4,07 (δ_{C} 58,3; *t*, 8,5Hz, 1H) e 4,34 (δ_{C} 55,6; *t*, 5,0 Hz, 1H).

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT (135° e 90°) (**Figuras 72-74**) foram observados quatro carbonos metilênicos, sendo um benzílico, cinco metínicos, um quaternário aromático e duas carbonilas em δ_{C} 168,9 e 164,9. Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos pela análise detalhada dos experimentos de *g*HMQC.

Análise dos experimentos *g*HMBC (Figura 76) mostrou correlação a longa distância dos tripletos em 4,07 (δ_{C} 58,3) e 4,34 (δ_{C} 55,6) com os carbonos em 164,9 e 168,9, respectivamente. Esta informação é muito importante e permitiu identificar esta substância como pertencente à classe das dicetopiperazinas, que são substâncias normalmente formadas pela condensação de dois ou mais aminoácidos (FDHILA et al., 2003; JAYATILAKE et al., 1996).

Os três multipletos visualizados em δ_{H} 3,25, δ_{H} 1,72 e δ_{H} 1,42 são característicos dos hidrogênios metilênicos e pelas correlações

observadas nos experimentos de *g*COSY (**Figura 77**), entre H-3↔H-4↔H-5↔H-6, foi possível atribuí-los a uma unidade do aminoácido prolina. Esta suposição foi confirmada por comparação com a literatura (FDHILA et al., 2003).

A presença de um anel benzílico observado em RMN¹H associado à correlação a longa distância ³*J*, observada no experimento gHMBC, entre H-10_a/H-10_b↔C-2'/C-6'/C-1/C-2, permitiu definir o segundo aminoácido como sendo fenilalanina. No experimento de *g*COSY (**Figura 77**) foi possível observar a correlação entre H-10_a/H-10_b/H-9, autenticando a presença deste aminoácido.

A configuração relativa de **10** foi realizada com base nas interações espaciais observadas, no experimento de NOESY-1D, (**Figura 78**) entre H-6 e H-9, posicionando-os no mesmo plano da molécula, como já relatado por FDHILA et al., 2003.

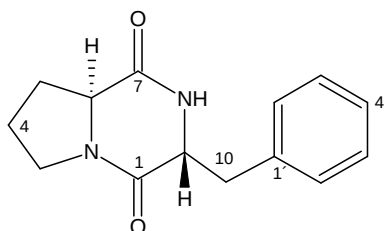
O espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS, modo positivo) foi obtido para confirmação da estrutura proposta (**Figura 79**, pág. 199). Íons em *m/z* 245,13 ([M+H]⁺) e *m/z* 267,11 ([M+Na]⁺) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular C₁₄H₁₆N₂O₂.

Tabela 13 - Dados de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) e ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) de **10** (δ em ppm e *J* em Hz).

Posição	¹ H	¹³ C
1	–	168,9
3	3,25 (<i>m</i>) / 3,39 (<i>m</i>)	44,5
4	1,72 (2H, <i>m</i>)	21,8
5	1,42 (<i>m</i>) / 2,01 (<i>m</i>)	27,6
6	4,07 (<i>t</i> ; 8,5)	58,3
7	–	164,9
8	7,93	–
9	4,34 (<i>t</i> ; 5,0)	55,6
10	3,02 (<i>dd</i> ; 5,0 e 14,0) 3,08 (<i>dd</i> ; 5,0 e 14,0)	35,2
1'	–	137,2
2' e 6'	7,26 (<i>d</i>)	129,7
3' e 5'	7,23 (<i>dd</i>)	127,8
4'	7,26 (<i>dd</i>)	126,2

Os dados espectrais foram comparados com a literatura (SETO et al., 2005; FDHILA et al., 2003) e permitiram identificar a substância **10** como *Rel.ciclo*(S-Pro-S-Phe). A comparação dos dados espectrais com os relatados na literatura sugere que a substância seja constituída dos aminoácidos L, sendo estes os encontrados na natureza (com valores de rotação ótica negativo). Entretanto, FDHILA et al. relatam metabólitos dicetopiperazínicos com sinais de rotação ótica opostos, indicando a presença dos menos comuns enantiômeros DD.

5.2.2.6 Identificação estrutural da substância **11**



A substância **11** foi submetida à RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas. A análise dos espectros permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos com os obtidos para **10**, diferindo apenas nos dados dos hidrogênios metínicos alifáticos.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 80-82**, pág. 200) indicaram a presença de um anel aromático monossustituído, duas carbonilas (δ_{C} 164,6 e 168,2, dois sinais de carbonos metínicos (δ_{C} 57,1 e 57,9) e quatro carbonos metilênicos sendo que um deles em δ_{C} 44,5 ligado ao átomo de nitrogênio, característico de substâncias dicetopiperazínicas. Também foi observada a presença de um carbono benzílico (δ_{C} 40,0), o que sugeriu a presença da subunidade fenilalanina (Phe).

Detalhada análise dos experimentos de gCOSY (**Figura 83**) evidenciou correlações entre os multipletos em $\delta_{\text{H}-3\text{a}}$ 3,20 $\leftrightarrow$ $\delta_{\text{H}-3\text{b}}$ 3,42 $\leftrightarrow$ $\delta_{\text{H}-4}$ 1,79 $\leftrightarrow$ $\delta_{\text{H}-5\text{a}}$ 1,59 $\leftrightarrow$ $\delta_{\text{H}-5\text{b}}$ 1,96, indicando a presença de uma unidade de prolina (Pro).

Considerando que análise detalhada dos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais conduziram a mesma estrutura que **10**, e que

nos experimentos de NOESY-1D (**Figura 84**) não foram observadas correlações espaciais entre H-6 (δ_H 2,94) e H-9 (δ_H 3,99), propomos que estes hidrogênios encontram-se em planos opostos da molécula.

Esta sugestão é corroborada pelo valor encontrado para o deslocamento químico de H-6 em 2,94 (uma região mais protegida em RMN¹H), diferente dos valores esperados entre δ_H 3,90-4,30 (JAYATILAKE et al., 1996). Este fato pode ser explicado pelo efeito de proteção que o anel aromático causa neste hidrogênio. Estas evidências aliadas aos dados da literatura (WANG; MUELLER; CLARDY, 1999) permitiram identificar **11** como sendo o ciclo *Rel.ciclo*(S-Pro-R-Phe), um estereoisômero de **10**.

O espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS, modo positivo) foi obtido para confirmação da estrutura proposta (**Figura 87**). Íons em m/z 245,1361 ($[M+H]^+$) e m/z 267,1186 ($[M+Na]^+$) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular C₁₄H₁₆N₂O₂.

Tabela 14 - Dados de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) e ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) de **11** (δ em ppm e J em Hz).

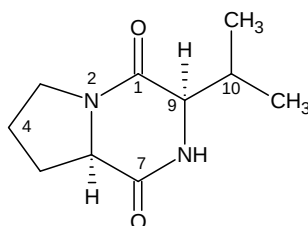
Posição	¹ H	¹³ C
1	-	168,2
3	3,20 (<i>m</i>)/3,42 (<i>m</i>)	44,5
4	1,79 (<i>m</i>)	21,2
5	1,59 (<i>m</i>)/1,96 (<i>m</i>)	28,4
6	2,94 (<i>t</i> ; 8,5)	57,1
7	-	164,6
8	8,12 (<i>d</i> , 4,0)	-
9	3,99 (<i>td</i> ; 10,0 e 5,0)	57,9
10	2,89 (<i>dd</i> ; 5,0 e 13,5)/3,02 (<i>dd</i> ; 6,0 e 13,5)	40,0
1'	-	136,0
2'e 6'	7,14 (<i>d</i> ; 7,5)	129,7
3'e 5'	7,29 (<i>dd</i>)	128,1
4'	7,27 (<i>dd</i>)	126,7

As substâncias **10** e **11** foram previamente relatadas como metabólitos de fungos do gênero *Colletotrichum* entre outros fungos, como *Trydiomyces formicarum* associado a uma espécie de formiga *Cyphomyrmex minutus* (WANG; MUELLER; CLARDY, 1999). Estas substâncias

foram descritas como possuidoras de atividade antifúngica contra *Candida* 406.

As substâncias **7**, **8** e **9**, que serão discutidas a seguir, foram identificadas em mistura uma vez que a separação se mostrou inviável devido à pequena quantidade de amostra.

5.2.2.7 Identificação estrutural da substância **7**



A substância **7** foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) e os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono pela análise de gHMQC (**Figuras 93-94**, pág. 210-211).

A análise dos espectros de RMN¹H e ¹³C permitiu notar a presença dos hidrogênios em δ_H 4,11 (δ_C 58,1; *t*; *J*=8,0 Hz) e δ_H 3,91 (δ_C 59,4; *sl*), e de duas carbonilas em δ_C 165,1 e δ 170,1. Estes sinais são característicos de anel dicetopiperazínico.

A presença de três sinais na forma de multipletos (3,46/3,30; 1,84 e 2,14) referentes aos hidrogênios metilênicos observados nos experimentos de RMN¹H, aliado às correlações em gCOSY entre H-3↔H-4↔H-5, indicaram a presença de resíduo do aminoácido Prolina na estrutura (FDHILA et al., 2003).

O espectro de RMN¹H (**Figuras 88-91; Tabela 15**), apresentou dubletos em δ_H 0,85 (*d*, *J*=7,0 Hz, 3H) e δ_H 1,01 (*d*, *J*=7,0 Hz, 3H) que foram atribuídos aos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) e um multiplete em 2,34 (*m*, 1H) que foi atribuído a H-10. O espectro de gCOSY (**Figuras 95-97**) mostrou correlações dos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) com um hidrogênio metínico em δ_H 2,34 (*m*, H-10; δ_C 27,5), e evidenciou uma unidade isopropila, indicando o aminoácido valina como um dos componentes da substância **7**.

A ausência de correlação em *g*HMQC (**Figura 93**) para o sinal em δ_H 7,91, evidenciou que este esteja ligado ao átomo de nitrogênio ou oxigênio. As correlações a longa distância observadas em *g*HMBC de δ_H 7,91 com os carbonos em δ_{C-6} 58,1 e δ_{C-7} 165,1, permitiram atribuir este deslocamento químico ao NH-8.

Baseado nos dados espectroscópicos e nas correlações observadas, nos experimentos uni e bidimensionais, foi proposto que a substância **7** é uma dicetopiperazina constituída pelos aminoácidos Prolina (Pro) e Valina (Val).

A configuração relativa de **7** foi realizada pela análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 102**, pág. 216) onde foi observada interação espacial entre os hidrogênios em H-9 (δ_H 3,91) e H-6 (δ_H 4,11), colocando-os no mesmo plano espacial da molécula. Comparação destes valores com a literatura (FDHILA et al., 2003) confirmam esta proposta indicando ser a substância *Rel.ciclo*(R-Pro-R-Val).

O espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS, modo positivo) (**Figura 105**) foi obtido para confirmação da estrutura indicada. Íons em m/z 197,1382 ($[M+H]^+$) e m/z 219,1201 ($[M+Na]^+$) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular $C_{10}H_{16}N_2O_2$.

Tabela 15 - Dados de RMN de 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **7** (δ em ppm e J em Hz).

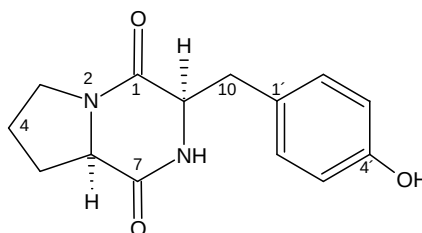
Posição	1H	^{13}C
1	–	170,1
3	3,46 (<i>m</i>)/3,30*	44,5
4	1,84 (<i>m</i>)	21,7
5	2,14 (<i>m</i>)	27,7
6	4,11 (<i>t</i> ; 8,0)	58,1
7	–	165,0
8	7,91	–
9	3,91 (<i>sl</i>)	59,4
10	2,34 (<i>dsept.</i> ; 2,5 e 7,0)	27,5
11-CH ₃	0,85 (<i>d</i> ; 7,0)	16,3
12-CH ₃	1,01 (<i>d</i> ; 7,0)	18,1

*Sob DMSO

Há relato (COLLADO; GARCÍA-PAJÓN, 2003) da produção deste metabólito pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* e por outros

fungos deste gênero, entretanto não há nenhum estudo químico de *C. crassipes* descrito. Esta substância é relatada como fitotóxica e como um bioherbicida em potencial.

5.2.2.8 Identificação estrutural da substância **8**



A análise dos espectros de *g*HMQC de **8** permitiu atribuir os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono (**Figuras 93-94**, pág. 210-211).

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais em δ_c 164,9 e 170,1, indicando grupos CONH (**Figura 92**), o que aliado aos deslocamentos químicos de RMN¹H em δ_H 4,04 (*t*, *J*=8,2 Hz, 1H; δ_c 58,3) e 4,23 (*t*, *J*=5,0Hz, 1H; δ_c 55,9) conduziram a presença de um anel dicetopiperazínico (JAYATILAKE et al., 1996).

O espectro de RMN¹H (**Figuras 88-91**) apresentou dois dubletos em δ_H 7,04 (*d*; *J*=8,5 Hz) e δ_H 6,63 (*d*; *J*=8,5 Hz) indicando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído. A presença do deslocamento químico em δ_c 155,8 indicou a presença de um grupo -OH ligado ao anel aromático evidenciando a presença de resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr). Por *g*COSY (**Figuras 95-97**) foi possível observar correlações entre os hidrogênios benzílicos H-10 $\leftrightarrow$ H-9 (δ_H 2,93 e 4,23), corroborando para a presença da unidade Tyr. Considerando que os H-10 são diastereotópicos, a multiplicidade esperada seria dois duplos dubletos, no entanto, no espectro de RMN¹H foi observado apenas 1 duplo dubleto (*dd*) evidenciando que há livre rotação do resíduo tirosina, ou seja, o valor de deslocamento químico refere-se a média de H-10a e H-10b. Tal fato é suportado pela observação em *g*HMQC de apenas um sinal de carbono para H-10_a e H-10_b.

Análise detalhada dos experimentos de RMN¹H, ¹³C, *g*HMQC, *g*COSY e *g*HMBC (**Figuras 98-101**) evidenciaram assim como em **10**, **11** e **7**, a presença de resíduo do aminoácido Prolina (Pro) nesta molécula.

O sinal em δ_{H} 7,79 no experimento de RMN¹H foi atribuído ao N-H8, uma vez que não apresentou correlação direta com átomo de carbono em *g*HMQC e mostra correlação a longa distância em *g*HMBC com C-6 (δ_{C} 58,3) e C-1 (δ_{C} 164,9).

A configuração relativa de **8** foi auferida com base na interação espacial observada no experimento NOESY-1D (**Figura 103**) entre H-6 (δ_{H} 4,04) e H-9 (δ_{H} 4,23), colocando-os no mesmo plano da molécula. Esta observação foi corroborada por comparação com a literatura.

O espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS, modo positivo) foi obtido para confirmação da estrutura proposta (**Figura 105**). Íons em *m/z* 261,1329 ([M+H]⁺) e *m/z* 283,1143 ([M+Na]⁺) estão coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular C₁₄H₁₆N₂O₃.

Tabela 16 - Dados de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) e ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) de **8** (δ em ppm e *J* em Hz).

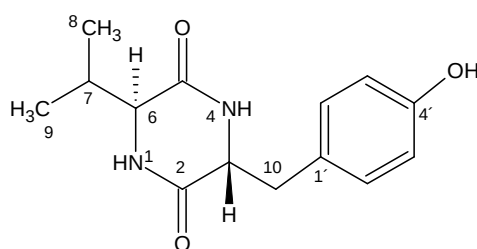
Posição	¹ H	¹³ C
1	–	164,9
3	3,42 (<i>m</i>)	44,2
4	1,77 (<i>m</i>)	21,4
5	2,15 (<i>m</i>)	28,1
6	4,04 (<i>t</i> ; 8,2)	58,3
7	–	168,7
8	7,79	–
9	4,23 (<i>t</i> ; 5,0)	55,9
10	2,93 (<i>dd</i> ; 5,0 e 8,5)	34,6
1'	–	126,9
2' e 6'	7,04 (<i>d</i> ; 8,5)	130,6
3' e 5'	6,63 (<i>d</i> ; 8,5)	114,7
4'	–	155,8

Os dados espectrais foram comparados com a literatura (JAYATILAKE et al., 1996) e permitiram identificar a substância **8** como *Rel.ciclo(S-Pro-S-Tyr)*. O fato de esta substância estar em mistura com outros metabólitos não permite a realização da medida de rotação óptica que possibilitaria confirmar que a substância é

formada pelos aminoácidos L, conforme indicado por JAYATILAKE et al., com $[\alpha]_D -126,1^\circ$.

Esta substância é relatada como metabólito de diversos fungos e bactérias como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria associada à esponja marinha *Isodictya setifera* (JAYATILAKE et al., 1996).

5.2.2.9 Identificação estrutural da substância **9**



O espectro de RMN¹H mostrou a presença de 2 substâncias distintas com o sistema de anel aromático *para*-dissubstituído. Uma dessas substâncias foi identificada como a substância **8**, descrita acima.

A outra substância, **9**, também apresentou um perfil espectroscópico característico de dicetopiperazina. O espectro de RMN¹H (**Figuras 88-91**, pág. 207) evidenciou dubletos característicos de metilas alifáticas δ_H 0,89 (δ_C 21,9; *d*; *J*=6,5 Hz) e δ_H 0,91 (δ_C 18,9; *d*; *J*=7,0 Hz) indicando a presença do aminoácido valina (Val) como um dos aminoácidos componentes de **9**. Os hidrogênios aromáticos em δ_H 6,90 (*d*; *J*=8,5 Hz, 2H) e δ_H 6,67 (*d*; *J*=8,5 Hz, 2H) e o deslocamento químico em δ_C 156,3 (indicando a presença de um grupo -OH ligado ao anel aromático) conduziram à presença do resíduo de tirosina (Tyr) como o outro aminoácido da molécula. Estes dados, permitiram sugerir para **9** a estrutura planar de ciclo(Val-Tyr).

Comparando-se os dados de RMN¹H de **9** (**Tabela 17**) com os da literatura para *cis*-ciclo(L-Val-L-Tyr) (STARK; HOFMANN, 2005), observa-se uma significativa diferença de deslocamento químico para H-8, H-9 e H-6. Esta diferença sugere que em **9**, H-6 encontra-se posicionado no cone de proteção da carbonila e em *cis*-ciclo(L-Val-L-Tyr) as H₃C-8 e H₃C-9 é que se encontram neste cone de proteção. Esta

observação permite sugerir que **9** trata-se de *Rel.ciclo(S-Val-R-Tyr)*, um estereoisômero de *cis-ciclo(L-Val-L-Tyr)*.

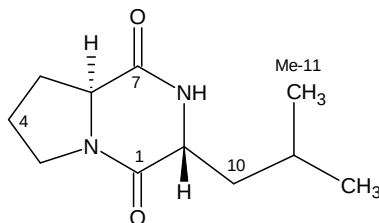
A análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 104**) não mostra interação espacial entre H-6 (δ_H 3,40) e H-3 (4,23), confirmando **9** como sendo o isômero *trans* de *cis-ciclo(L-Val-L-Tyr)*.

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **9** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H	^1H (STARK et al., 2005)	^{13}C
1	*	7,85 (s)	-
2	-	-	168,5
3	4,23 (t)	4,10 (m)	55,9
4	*	7,95 (s)	-
5	-	-	165,0
6	3,40 (m)	3,51 (m)	62,5
7	2,00 (m)	1,74 (m)	*
8	0,89 (d; 6,5)	0,37 (d; 7,0)	21,9
9	0,91 (d; 7,0)	0,69 (d; 7,0)	18,9
10	2,96 (m)	2,77 (dd; 4,8 e 13,8) 3,01 (dd; 4,5 e 13,8)	38,6
1'	-	-	126,9
2'e 6'	6,90 (d; 8,5)	6,96 (d; 8,4)	130,6
3'e 5'	6,67 (d; 8,5)	6,62 (d; 8,4)	115,0
4'	-	-	156,3

*Deslocamento químico não observado

A análise dos espectros de RMN ^1H da fração CSY-02/MDB/C-18/5/HPLC-6 evidenciou sinais em δ_H 3,50-4,20 e RMN ^{13}C em δ_C 165-170 e δ_C 55-59 sugerindo a presença de substâncias dicetopiperazínicas. Pela comparação dos dados espectrais desta fração com os descritos na literatura (FDHILA et al., 2003; ADAMCZESKI et al., 1995), foi possível identificar as 2 substâncias na mistura (**15** e **16**), diferenciando-as através da integração dos sinais no espectro de RMN ^1H .

5.2.2.10 Identificação estrutural da substância **15**

No espectro de RMN¹H (**Figuras 106-108**, pág. 219-220) pode-se observar a presença de 2 dubletos em δ_{H} 0,91 ($J = 6,5\text{Hz}$, 3H) e 0,88 ($J = 6,5\text{Hz}$, 3H), indicando a presença de 2 metilas. As correlações observadas em *g*COSY (**Figuras 109-11**) de δ_{H} 0,88 (H-12)/ δ_{H} 0,91 (Me-11) $\leftrightarrow$ δ_{H} 1,71 (H-11) $\leftrightarrow$ δ_{H} 1,57 e 1,45 (H-10a e H-10b) $\leftrightarrow$ δ_{H} 3,61 (H-9) permitiram sugerir a presença de uma unidade do aminoácido Leucina (Leu) como um dos componentes de **15**. Os dois dubletos em δ_{H} 0,91 e 0,88 permitem distinguir entre leucina e isoleucina, uma vez que a última apresentaria um dubleto e um triplete.

O hidrogênio com δ_{H} 8,30 foi atribuído ao N-H₈ devido a falta de correlação direta em *g*HMQC (**Figuras 113-114**) e às correlações observadas a longa distância em *g*HMBC (**Figuras 115-117**, pág. 227-229) com C-6 (δ_{C} 57,3) e C-7 (δ_{C} 166,0).

A presença de três sinais na forma de multipletos (δ_{H} 1,6-3,5), referentes à hidrogênios metilênicos, indicam a presença de resíduo do aminoácido Prolina na estrutura (FDHILA et al., 2003). As correlações observadas por *g*COSY entre H-3a (δ_{H} 3,43)/H-4a (δ_{H} 1,80) $\leftrightarrow$ H-4a e H-4b (δ_{H} 1,80 $\leftrightarrow$ 1,85)/H-5a (δ_{H} 2,14) confirmam esta sugestão. À posição 6 foi atribuído o hidrogênio com deslocamento químico em 4,16 (δ_{C} 57,3). Este hidrogênio mostra correlação à longa distância com C-5 (δ_{C} 28,4) e C-1 (δ_{C} 168,7), conforme pode ser observado na análise do espectro de *g*HMBC (**Figura 117**).

A análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 118**) não mostra interação espacial entre H-6 e H-9, sugerindo que estes hidrogênios não estão do mesmo plano da molécula.

A comparação dos dados espectrais de **15** com os da literatura (ADAMCZESKI et al., 1995) e a presença de íons em m/z 211,1531 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) no espectro de massas (**Figura 120**, pág. 231), suportam a estrutura proposta.

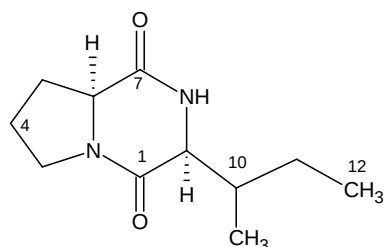
Este metabólito é relatado como produto de outros microrganismos tais como a esponja marinha *Calyx cf. podatypa* (ADAMCZESKI et al., 1995) e uma bactéria associada ao molusco *Pecten maximus* (FDHILA et al., 2003). Segundo FDHILA et al., a dicetopiperazina ciclo(D-Pro-D-Leu) apresenta potente atividade antibiótica frente a *Vibrio anguillarum*, o que evidencia a potencialidade biológica dessa classe de substâncias.

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **15** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H	^{13}C
1	-	168,7
3	3,30*/3,43	44,9
4	1,80 (m)/1,85 (m)	21,7
5	2,14 (m)/1,79 (m)	28,4
6	4,16 (t; 8,0)	57,3
7	-	166,0
8	8,30	-
9	3,61 (dt; 5,0 e 9,0)	55,2
10	1,45(ddd; 6,0, 9,0 14,0)/ 1,57(ddd; 6,0, 9,0 14,0)	42,1
11	1,71 (m)	23,8
12	0,88 (d; 6,5)	21,5
Me-11	0,91 (d; 6,5)	22,7

*sob DMSO

5.2.2.11 Identificação estrutural da substância **16**



A principal diferença desta substância quando comparada com a anterior (**15**) pode ser observada no espectro de RMN ^1H , na região de hidrogênios metílicos (**Figuras 106-108**). Sinais em δ_{H} 0,82 (t, 7,0

Hz) e δ_{H} 0,97 (*d*, 7,0 Hz) indicam a presença do resíduo de aminoácido Isoleucina (Ile), ao invés de Leucina como na substância **15**. A presença do resíduo de aminoácido Prolina (Pro) foi identificada pela presença de sinais na forma de multipletos (δ_{H} 1,6-3,5), referentes aos hidrogênios metilênicos, (FDHILA et al., 2003) e através das correlações entre estes sinais. Pela análise detalhada dos mapas de contorno no experimento de *g*HMQC (**Figuras 113-114**) e *g*HMBC (**Figuras 115-117**) foi possível atribuir a estrutura planar para **16**.

A análise do espectro de Massas (**Figura 120**) de **16** evidencia íon m/z 211,1531 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), coerente com a estrutura proposta $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$.

A determinação da configuração relativa de **16** foi realizada pela análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 119**, pág. 230), onde foi observada a interação espacial entre H-6 e H-9, colocando-os no mesmo plano da molécula.

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **16** (δ em ppm e *J* em Hz).

Posição	^1H	^{13}C
1	–	169,9
3	3,30	44,5
4	1,80 (<i>m</i>)	21,9
5	1,80 (<i>m</i>) / 2,14 (<i>m</i>)	27,8
6	4,10 (<i>t</i> ; 7,5)	58,1
7	–	165,1
8	7,90	–
9	3,95 (<i>sl</i>)	59,1
10	*	34,8
11	1,30 (<i>m</i>)	23,82
12	0,83 (<i>t</i> ; 7,0)	12,1
Me-10	0,97 (<i>d</i> ; 7,0)	14,8

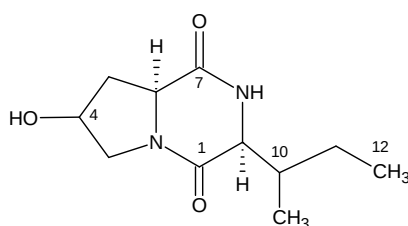
*Sinal não observado.

A comparação destes dados espectrais com os descritos na literatura (FDHILA et al., 2003; ADAMCZESKI et al., 1995), confirmam a estrutura proposta para a substância **16** como sendo *Rel.ciclo*(S-Pro-S-Ile). Está sendo considerada a presença de resíduos de

aminoácidos de configuração L por serem mais abundantes na natureza, entretanto FDHILA et al., 2003 relata a mesma substância com aminoácidos de configuração D, apresentando $[\alpha]_D^{25} = +168,1^\circ$ (c 0,13, EtOH). O fato de esta substância estar em mistura impede a realização de medida de rotação óptica, não permitindo definir a configuração destes aminoácidos, e por isso está denominada com uma nomenclatura relativa (*Rel.*).

Este metabólito também já foi relatado como produto dos microrganismos *Calyx cf. podatypa* (esponja marinha) (ADAMCZESKI et al., 1995) e *Pecten maximus* (bactéria associada ao molusco) (FDHILA et al., 2003). Segundo FDHILA et al., a dicetopiperazina ciclo(D-Pro-D-Ile) apresenta potente atividade antibiótica frente a *Vibrio anguillarum*, evidenciando a potencialidade desta classe de metabólitos naturais.

5.2.2.12 Identificação estrutural da substância **14**



A substância **14** foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) e os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono pela análise de gHMQC (**Figuras 124-125**, pág. 234-235).

A identificação desta substância como pertencente à classe das dicetopiperazinas foi baseada na presença de deslocamentos químicos de RMN¹³C característicos de grupo carbonila de amidas (δ_C 165-170) e sinais de RMN¹H, entre δ_H 3,90-4,40, de aminoácidos (FDHILA et al., 2003; JAYATILAKE et al., 1996). Pela análise do espectro de Massas é possível observar a presença de pelo menos 3 dicetopiperazinas, sendo duas delas já descritas anteriormente. Íons em m/z 211,1556 ($[M+H]^+$) e m/z 283,1181 ($[M+K]^+$) evidenciam a presença do ciclo(L-Pro-L-Ile) (**16**) e ciclo(L-Pro-L-Phe) (**11**), respectivamente.

O espectro de RMN¹H mostra, na região de hidrogênios metílicos, sinais em 0,82 (*t*) e 0,98 (*d*) que são característicos de resíduo do aminoácido Isoleucina (Ile). As correlações observadas por *g*COSY (**Figuras 126-127**) de H-10↔H-11↔H-12 confirmam a presença da Isoleucina. A correlação a longa distância ³*J* observada por *g*HMBC (**Figuras 128-130**) de H-9 (δ_{H} 3,94, δ_{C} 59,1)↔C-10↔C-11, posiciona corretamente este hidrogênio no anel dicetopiperazínico. O deslocamento químico em δ_{H} 4,10 foi atribuído ao H-6 uma vez que este mostra correlação com H-5a/H-5b (δ_{H} 1,82/2,12; δ_{C} 27,8), conforme pode ser visualizado por *g*COSY (**Figura 126**, pág. 236).

O deslocamento químico em δ_{H} 7,91 foi atribuído ao -NH₈. As correlações observadas em *g*HMBC entre H-8 ↔C-1 (δ_{C} 165,2) e C-6 (58,1), confirmam esta atribuição.

Sinais de hidrogênios metilênicos entre δ_{H} 1,4-3,7 indicam a presença de resíduo do aminoácido Prolina na estrutura (FDHILA et al., 2003), sugerindo a presença deste aminoácido na estrutura. A correlação observada por *g*COSY entre H-5a (δ_{H} 1,82) com um hidrogênio em δ_{H} 3,40 (*m*; atribuído ao carbono em δ_{C} 72,2) sugere a presença do resíduo de Hidroxiprolina (Hyp), se distinguindo da prolina apenas pela presença de um carbono carbinólico.

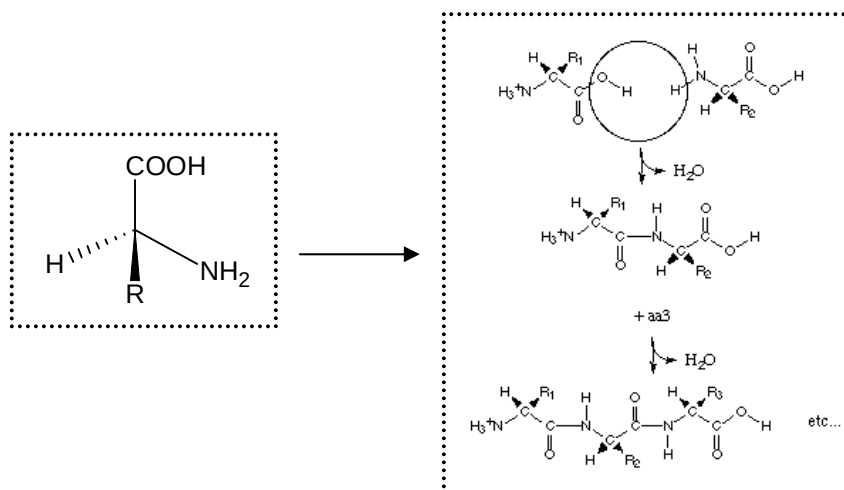
Tabela 20 - Dados de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) e ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz) de **14** (δ em ppm e *J* em Hz).

Posição	¹ H	¹³ C
1	–	165,2
3	3,32 (<i>m</i>)/3,42 (<i>m</i>)	44,5
4	3,42 (<i>m</i>)	72,2
5	1,82 (<i>m</i>)/2,12 (<i>m</i>)	27,8
6	4,10 (<i>t</i> ; 7,5)	58,1
7	–	169,7??
8	7,91	–
9	3,94 (<i>sl</i>)	59,1
10	2,02 (<i>m</i>)	34,8
11	1,35 (<i>m</i>)	23,8
12	0,82 (<i>t</i> ; 7,5)	12,1
10-Me	0,98 (<i>d</i> ; 7,0)	14,9

A análise do espectro de NOESY-1D (**Figura 131**, pág. 240) mostra interação espacial entre H-6 e H-9, posicionando-os no mesmo plano da molécula. A substância foi identificada como *Rel.ciclo*(R-Hyp-R-Ile).

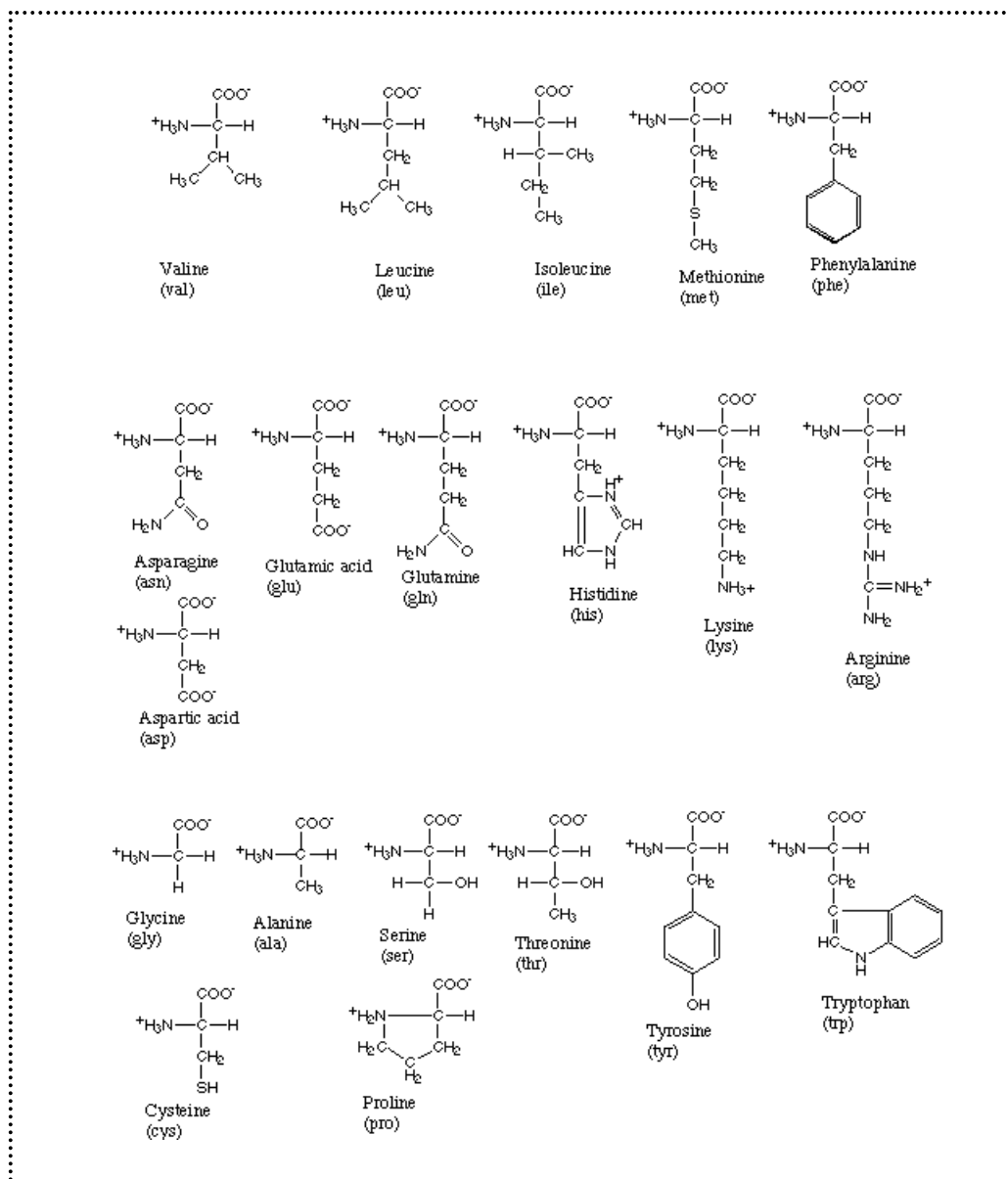
As últimas 8 substâncias descritas são dicetopiperazinas, compostos bioativos comumente produzidos por fungos deuteromicetous, ascomicetous e basidiomicetous (WANG; MUELLER; CLARDY, 1999) tais como *Penicillium* sp., *P. verrucosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium chlamydosporum*, *Gliocladium virens*, *Rhodotorula pilimanae*, *Phoma lingan*, *Streptomyces* sp., *Penicilium janczewskii*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium griseofulvum*, *Thielavia minor*, *Emericella striata*, entre outros (GUIMARÃES, 2006). Fungos do gênero *Colletotrichum*, como *C. gloesporioides*, também são produtores de substâncias dicetopiperazínicas (COLLADO; GARCÍA-PAJÓN, 2003). Há descrito na literatura diversas atividades biológicas para esta classe de substância, sendo que as propriedades antifúngicas e citotóxicas são as mais encontradas.

Mais de 40 substâncias dicetopiperazínicas estão listadas como metabólitos de fungos e a mais freqüente biossíntese envolve a condensação de dois ou três aminoácidos como precursores (GUIMARÃES, 2006). Estruturalmente, os aminoácidos apresentam um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amino e a um átomo de hidrogênio. O quarto substituinte é uma cadeia (grupo R) específica para cada aminoácido. Os aminoácidos se ligam uns aos outros através da ligação peptídica estabelecida entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente, formando a cadeia.



Esquema 9 - Formação da ligação peptídica.

Aminoácidos:



Há relatos da produção de alcalóides dicetopiperazínicos por fungos terrestres, marinhos (LI et al., 2004) e recentemente por fungos endofíticos (SETO et al., 2005). O fungo endofítico *Epichloe typhina* produziu ciclo(L-Pro-L-Leu) e ciclo(L-Pro-L-Phe) e estas substâncias demonstraram atividade antifúngica contra *Cladosporium phlei*, consistentes com dados previamente relatados (SETO et al., 2005). No trabalho, SETO relata que grande quantidade da substância ciclo(L-Pro-L-Phe) induz a morte de *C. phlei*, entretanto, baixa dose desta dicetopiperazina é estimulante para *C. phlei* produzir Phleichrome, uma substância inibitória de *E. thyphina*.

Desse modo, as dicetopiperazinas são de grande interesse devido ao amplo espectro de atividades farmacológicas e neste trabalho foram identificadas 8 substâncias desta classe produzidas pelo fungo endofítico *Colletotrichum crassipes*. Há relatos da produção destas substâncias no gênero *Colletotrichum*, entretanto não há relato de estudo químico do extrato de *C. crassipes*.

5.3 Resultados dos bioensaios realizados com as substâncias puras

❖ Atividade antifúngica

As substâncias que apresentaram massa suficiente e não se encontravam em mistura com outros metabólitos, foram enviadas para o bioensaio por Bioautografia contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (item 4.1.6, pág. 44).

Na Figura 132 estão ilustradas as cromatoplacas onde foram realizados os bioensaios com as substâncias e os 2 fungos fitopatógenos. Para as substâncias que apresentaram atividade em 100 µg foi realizada a determinação da quantidade mínima inibitória conforme apresentado na Figura 132. O padrão utilizado foi a Nistatina que apresenta forte atividade em 1 µg.

Na legenda deve-se considerar:

- A: Griseofulvina (1)
- B: Citocalasina B (2)
- C: Citocalasina D (5)
- D: *Rel.ciclo*(S-Pro-S-Phe) (10)
- E: N-(2-feniletil)acetamida (12)
- F: 5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-diidroisocumarina (6)

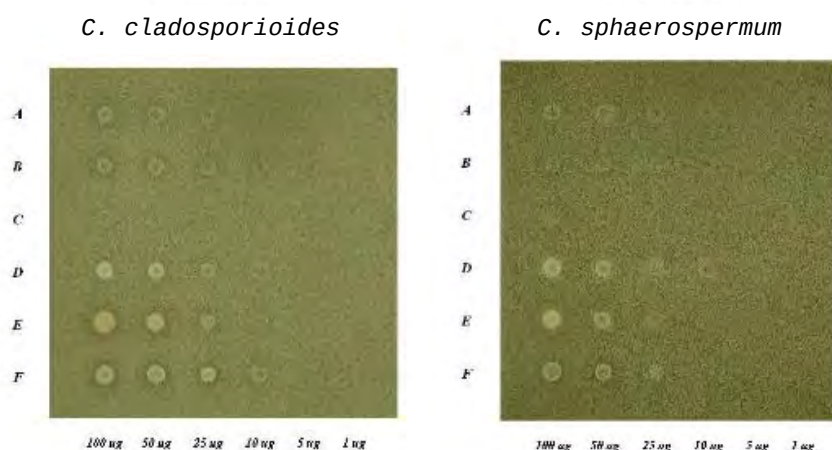


Figura 132 - Ensaio de Bioautografia.

Na Tabela 21 está apresentado o potencial antifúngico de cada substância avaliada, contra os dois fungos fitopatógenos.

Tabela 21 - Determinação da quantidade mínima inibitória das substâncias puras (em µg).

Substâncias	<i>Cladosporium cladosporioides</i>						<i>Cladosporium sphaerospermum</i>					
	100	50	25	10	5	1	100	50	25	10	5	1
<u>1</u>	*	*	*	i	i	i	*	*	*	i	i	i
<u>2</u>	*	*	*	*	i	i	*	i	i	i	i	i
<u>5</u>	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
<u>10</u>	***	**	*	*	i	i	*	*	*	i	i	i
<u>12</u>	***	**	*	i	i	i	**	*	i	i	i	i
<u>6</u>	**	**	**	*	i	i	*	*	*	i	i	i
Nistatina	***						***					

*atividade fraca / **atividade média / ***atividade forte

As substâncias **10** e **12** que apresentaram atividades mais fortes já foram relatadas anteriormente como antifúngicas (COLLADO et al., 2003).

Estes dados sugerem uma possível simbiose entre fungos endofíticos e espécies vegetais onde estes microrganismos podem produzir metabólitos antifúngicos como auto defesa e em defesa da planta contra outros microrganismos fitopatógenos.

❖ Atividade anticolinesterásica

As mesmas substâncias que foram enviadas ao bioensaio antifúngico também foram submetidas ao ensaio para determinar a atividade anticolinesterásica.

O método utilizado foi descrito no item 4.1.7, pág. 44. Manchas brancas na cromatoplaça são evidências de atividade anticolinesterásica em potencial.

Na Figura 133 está ilustrado a cromatoplaça com as substâncias aplicadas, juntamente com o padrão positivo Galantamina.



Figura 133 - Cromatoplaça do bioensaio anticolinesterásico.

Este é um bioensaio qualitativo onde se é possível apenas indicar quais das substâncias analisadas são promissoras como anticolinesterásicas. Das 6 substâncias analisadas, apenas 3 mostraram atividade positiva:

- Citocalasina B (2): mancha branca no Rf 0,45.
- Citocalasina D (5): mancha branca no Rf 0,52.
- Rel.ciclo*(S-Pro-S-Phe) (10): mancha branca no Rf 0,07.

❖ Atividade antioxidante

O ensaio para avaliar a potencialidade antioxidante das substâncias isoladas foi realizado conforme descrito em 4.1.5. Este ensaio consiste em um método fácil e rápido para avaliar a atividade anti-radicalar de diversos antioxidantes. Manchas brancas ou levemente amareladas na cromatoplaças são indícios de substâncias potencialmente antioxidantes. O mecanismo de reação entre o oxidante e o DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante. Alguns compostos reduzem rapidamente as moléculas de DPPH, porém, a grande maioria dos antioxidantes reage lentamente o que sugere um mecanismo de reação mais complexo (CARDOSO, 2003). Estudo de cinética de reação entre antioxidantes e DPPH que levem a um melhor entendimento do mecanismo de reação envolvendo este radical e substâncias antioxidantes vêm sendo estudados (BONDET et al., 1997).

Neste bioensaio apenas as substâncias puras (que não foram identificadas em mistura com outros metabólitos) foram avaliadas.

Na Figura 134 está apresentado uma cromatoplaca revelada com DPPH, onde pode-se notar a presença de substâncias potencialmente antioxidantes. O padrão utilizado foi a rutina (P) na mesma concentração das demais substâncias (1 mg/mL).



Figura 134 - Resultado em cromatoplaca do ensaio antioxidante com DPPH.

É possível observar através das manchas na cromatoplaca que as substâncias 1, 2, 10, T2, 18 e 4 são potencialmente antioxidantes.

A análise dos resultados dos bioensaios com as substâncias puras está coerente com a atividade encontrada para os extratos obtidos dos fungos CSY-02 (*C. crassipes*) e CSY-03 (*Xylaria* sp.).

5.4 Resultado da avaliação citotóxica de citocalasinas contra cepas celulares de adenocarcinoma (mama e pulmão) murino

As citocalasinas têm sido muito utilizadas em pesquisas biológicas devido à atividade característica de ação citostática em culturas de células, porém sua aplicação terapêutica é limitada por sua toxicidade (WAGENAAR et al., 2000).

Considerando estes dados referentes à citotoxicidade das citocalasinas aliados a oportunidade de testá-las em linhagens de células de adenocarcinoma (mama e pulmão) murino, as 7 citocalasinas isoladas pelo nosso grupo de pesquisa foram avaliadas (teste realizado em colaboração com o Dr. Lucas Colombo - Médico e Pesquisador do Instituto de Oncologia de Buenos Aires/AR).

De modo a avaliar a potencialidade citotóxica dos metabólitos **G1-5**, **2** e **5**, foram realizados experimentos de pré e pós adesão das células nas placas de culturas. Deve ser considerado que na condição de pós adesão a ação da droga é dificultada, uma vez que as células encontram-se extremamente unidas e aderidas no fundo da placa.

Foram utilizadas duas linhagens de adenocarcinoma de mama murino (LM2 e LM3) e uma de adenocarcinoma murino de pulmão (LP7).

As sete substâncias foram avaliadas em diferentes concentrações (125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,9; 0,9; 0,4; 0,2 e 0,1 µg/mL), resultantes das diluições realizadas. A análise morfológica das linhagens celulares permitiu avaliar qual a concentração mínima da substância que atua nas cepas LM2, LM3 e LP7. Ou seja, considerou-se como concentração mínima a última diluição, sendo que a partir da próxima as células já estavam semelhantes à placa controle (não sofrendo mais influência das citocalasinas).

Na Tabela 22 estão ilustrados os resultados obtidos após a análise morfológica das placas contendo as linhagens celulares de adenocarcinoma e as substâncias **G1-5**, **2** e **5**.

Tabela 22 - Análise da citotoxicidade *in vitro* das citocalasinas em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).

Substâncias	LM2	LM2	LM3	LM3	LP7	LP7
	Pré adesão	Pós adesão	Pré adesão	Pós adesão	Pré adesão	Pós adesão
G-1	*	*	*	*	*	*
G-2	*	*	*	*	0,1	*
G-3	*	*	*	*	*	*
G-4	0,1	0,2	*	*	0,4	0,2
G-5	0,4	0,9	0,1	*	0,4	0,4
<u>5</u>	*	*	*	*	*	*
<u>2</u>	0,2	0,4	0,1	0,2	0,4	0,2

*Substâncias citotóxicas em concentração abaixo de 0,1 $\mu\text{g/mL}$

Esses resultados evidenciam a potencialidade citotóxica desta classe de metabólitos, sendo que algumas se apresentaram como citotóxicas mesmo em concentrações muito baixas. Esse é um ensaio preliminar na busca por novos metabólitos que possam atuar na cura do câncer, entretanto outros estudos são necessários para definir o mecanismo de ação dessas substâncias e explorar sua aplicação no controle desta doença.

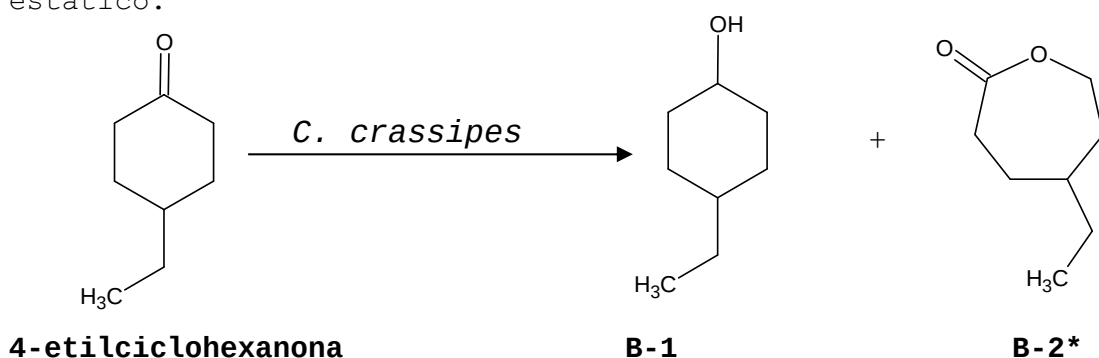
5.5 Resultados da biotransformação utilizando os fungos endofíticos *Colletotrichum crassipes* e *Xylaria* sp.

Todos os extratos brutos e brancos obtidos durante o cultivo dos endófitos, nas extrações após 5 e 10 dias, foram submetidos à análise de RMN de ^1H . Os dados espectrais revelaram que os extratos obtidos após 10 dias de cultivo (2E) eram semelhantes aos obtidos na primeira extração (1E). Sendo assim, apenas os extratos brutos 1E foram fracionados por cromatografia em coluna.

Os extratos obtidos após cultivo por 5 dias (1E) sob agitação (A) e modo estático (Est) foram fracionados. Algumas substâncias foram produzidas nas duas condições enquanto que outras foram encontradas apenas no modo estático ou no modo de agitação.

5.5.1 Biotransformação da 4-etilciclohexanona por *Colletotrichum crassipes*

Os produtos de biotransformação foram obtidos após cultivo do fungo *C. crassipes* em PDB, por 5 dias, na presença do substrato 4-etilciclohexanona. O cultivo foi realizado sob agitação e em modo estático. Os extratos brutos foram submetidos à cromatografia em coluna, resultando no isolamento de 2 produtos de biotransformação e em outros metabólitos secundários que estão em fase de identificação estrutural. Os produtos da biotransformação (**B-1** e **B-2**) foram identificados através de análise dos dados espectrométricos de RMN de ^1H , uni e bidimensionais, Infra-Vermelho e comparação com dados da literatura (PORTO, 2002; De CONTI et al., 2001). Vale ressaltar que o produto **B-2** foi encontrado nos 2 extratos brutos enquanto que **B-1** foi isolado apenas do extrato bruto obtido em cultivo no modo estático.



*estrutura não confirmada

O produto **B-1** é resultado da redução da cetona (substrato de partida). A redução de substratos não naturais por microrganismos ocorre com a enzima desidrogenase e pode levar à produção de álcoois enantiomericamente puros pois a enzima pode transferir estereosseletivamente o íon hidreto pela face *Re* ou face *Si* da cetona (PORTO, 2002). Durante este trabalho não foi realizado um estudo sobre a enantiosseletividade da reação envolvida, uma vez que o objetivo era apenas identificar as enzimas presentes nos endófitos selecionados.

Vários estudos envolvendo ciclohexanonas estão descritos na literatura (De CONTI et al., 2001; KEPPLER et al., 2005). De acordo com Miyazawa et al. (2000), o estudo da biotransformação da 4-metilciclohexanona pelos fungos *Pseudomonas ovalis*, *Aspergillus rapens* e *Chlorella pyrenoidosa*, resultou nos álcoois correspondentes *cis* e *trans*, com baixa estereosseletividade. Em 2000 foi relatado o primeiro estudo da redução de 4-etilciclohexanona por microrganismos (MIYAZAWA et al., 2000).

Segundo MIYAZAWA et al. (2000), o principal metabólito obtido da biotransformação de 4-metilciclohexanona por 10 fungos antracnoses foi o *trans*-4-metilciclohexanol. A biotransformação da 4-etilciclohexanona por *Colletotrichum lagenarium*, *C. dematium*, *C. trifolii*, *C. atramentarium*, *C. fragariae*, *C. lindemuthianum-1*, *C. lindemuthianum-3* e *C. lindemuthianum-13* também teve como produto principal o *trans*-4-etilciclohexanol, enquanto que o produto *cis*-4-metilciclohexanol foi obtido pelos fungos *Glomerella cingulata* e *C. graminicola*.

O produto **B-1** foi identificado como 4-etilciclohexanol através da análise dos dados espectrométricos e comparação com a literatura. Seguindo as informações descritas na literatura (DE CONTI et al., 2001), os álcoois *cis* e *trans* podem ser distinguidos pelo sinal -CHOH no espectro de RMN de ^1H uma vez que a forma *cis* é caracterizada por um quintuplete na região de δ_{H} 4,0 ppm enquanto que os correspondentes álcoois *trans* apresentam um triplete de triplete na região de δ_{H} 3,3-3,5 ppm. O espectro de RMN de ^1H de **B-1** (Figuras 135 e 136, pág. 241) evidencia a presença de um triplete de triplete (*tt*) em δ_{H} 3,53 ppm ($J = 10,8$ e $4,4$ Hz) conduzindo ao isômero *trans*. Os espectros de RMN de ^1H e Infra-Vermelho de *trans*-4-

etilciclohexanol (**B-1**) estão ilustrados nas figuras 135-137 e os dados estão apresentados na **Tabela 23**.

Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **B-1** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H
1	3,53 (<i>tt</i> ; 10,8 e 4,4)
2a/6a	1,96 (<i>dl</i> ; 13,2)
2b/6b	1,27 (<i>m</i>)
3a/5a	1,74 (<i>dl</i> ; 13,2)
3b/5b	1,23 (<i>m</i>)
4	1,10 (<i>m</i>)
CH_2 -7	1,18 (<i>m</i>)
CH_3 -8	0,86 (<i>t</i> ; 7,6)

O produto **B-2** foi obtido por biotransformação da cetona pelo fungo *C. crassipes*, quando cultivado em modo estático e sob agitação. A análise dos espectros de RMN de ^1H , uni e bidimensionais, e comparação com os dados da literatura (PORTO, 2002; KEPPLER et al., 2005) conduziram a estrutura de uma lactona. Entretanto, esta substância se encontra em fase final de determinação estrutural.

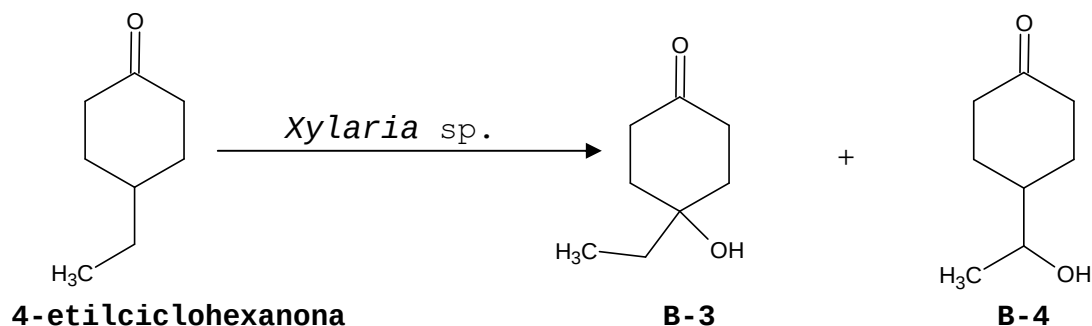
Há vários relatos na literatura sobre biotransformação de ciclohexanonas em que lactonas foram obtidas como produto de uma reação de oxidação de Baeyer-Villiger (KEPPLER et al., 2005; MIHOVILOVIC et al., 2001; KAYSER et al., 2006). Oxidações Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas ou lineares para as correspondentes lactonas ou ésteres é uma reação importante que tem sido usada por químicos a mais de um século (KAYSER et al., 2006). Nas últimas décadas foram obtidas lactonas quirais por biocatálise com bons excessos enantioméricos, mas esta metodologia apresenta como limitação a identificação de novos microrganismos com monooxigenases enantiosseletivas (PORTO, 2002). Nos últimos anos, Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMOs) de vários microrganismos vêm demonstrando serem potenciais biocatalisadores para oxidações e sulfoxidações em muitos substratos (KAYSER et al., 2006).

Em recente publicação, Keppler e colaboradores (2005) relata a biotransformação da cetona 4-metil-ciclohexanona por 9 linhagens de fungos *Aspergillus*, em que os produtos majoritários são o álcool e a

lactona. O enantiômero (*R*) da lactona foi formado preferencialmente com um excesso enantiomérico de 99% e o álcool correspondente obtido foi o isômero *trans* (100%).

5.5.2 Biotransformação de 4-etilciclohexanona por *Xylaria* sp.

Xylaria sp. foi cultivado sob agitação e em modo estático na presença de 4-etilciclohexanona, por 5 e 10 dias. Os fracionamentos dos extratos brutos obtidos na primeira extração resultaram no isolamento dos produtos **B-3** e **B-4**, os quais não foram encontrados nos extratos obtidos no cultivo de *C. crassipes*.

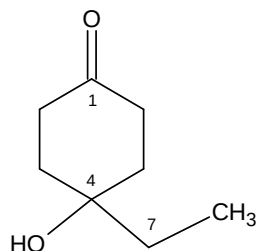


O produto **B-3** foi submetido à análise dos espectros de RMN de ^1H e IV (**Figuras 138-140**, pág. 243-244), os quais permitiram identificá-lo como 4-hidroxi-etilciclohexanona.

Através da análise do espectro de IV foi possível observar a presença do grupo carbonila ($\nu_{\text{máx}}$ 1708cm^{-1}), uma banda em $\nu_{\text{máx}}$ 3417cm^{-1} indicando a presença de uma hidroxila na molécula e outra em $\nu_{\text{máx}}$ 1136cm^{-1} indicando a presença de um álcool terciário. A análise do espectro de RMN de ^1H revelou a ausência de um sinal (*m*) referente ao hidrogênio na posição 4 do composto de partida (4-etilciclohexanona, **Figura 142**, pág. 246) evidenciando esta molécula como um produto de hidroxilação. Na Tabela 24 estão apresentados os dados espectrais de 4-hidroxi-etilciclohexanona (**B-3**).

Tabela 24 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **B-3** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	^1H
1	-
2a/6a	2,71 (<i>ddd</i> ; 14,0, 14,0 e 6,4)
2b/6b	2,23 (<i>m</i>)
3a/5a	1,77 (<i>ddd</i> ; 14,0, 14,0 e 6,4)
3b/5b	1,93 (<i>m</i>)
CH_2 -7	1,60 (<i>q</i> ; 7,6)
CH_3 -8	0,96 (<i>t</i> ; 7,6)



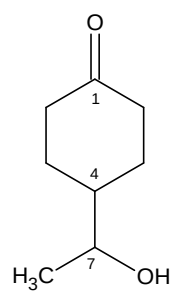
Diferentemente do que foi observado para *C.crassipes*, *Xylaria* sp. não biotransformou o substrato empregado em lactona ou álcool mas sim, em um produto resultante de hidroxilação. Esta é mais uma evidência da versatilidade das monoxigenases presentes em fungos.

Em uma revisão na literatura (SciFinder) de experimentos envolvendo **B-3**, foram encontrados poucos relatos desta substância (MIHOVILOVIC et al., 2001; KAYSER et al., 2006), entretanto, em nenhuma destas publicações, este produto aparece como resultado final de uma biotransformação. Esta substância (bem como seus derivados) já foi relatada como sendo o substrato de partida de estudo de biotransformação empregando outros fungos, resultando na produção de lactonas (MIHOVILOVIC et al., 2001). Este fato conduz à possibilidade do produto **B-3** isolado ser apenas um intermediário da biotransformação por *Xylaria* sp., e que não impediria que este endófito também viesse a produzir a lactona, como produto da biotransformação. Portanto, se **B-3** pode ser convertido em uma lactona, a utilização de outras condições de cultivo como, por exemplo, o número de dias de incubação, pode ser decisivo na produção destes metabólitos. Portanto, outros experimentos devem ser realizados antes de afirmar que *Xylaria* sp. não biotransforma a 4-etilciclohexanona na correspondente lactona.

A substância **B-4** foi submetida à técnica de RMN de ^1H e ^{13}C onde foi possível identificá-la como sendo um produto resultante de uma hidroxilação na posição 7. As correlações observadas em *g*COSY (**Figuras 148-149**) entre um hidrogênio carbinólico em δ_{H} 3,73 (*m*) ($\text{H}-7$) com os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,25 (*d*, $J=6,0$ Hz) e também

com o hidrogênio em δ_{H} 1,75 (H-4), estão coerentes com a estrutura proposta. A análise detalhada dos espectros (**Figuras 143-149**, pág. 247-253) permitiu identificar a substância **B-4** como sendo 7-hidroxi-4-etilciclohexanona.

Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **B-4** (δ em ppm e J em Hz).

	Posição	^1H	^{13}C
	1	–	211,0
	2	2,35 (<i>m</i>)	40,4
	3	2,03 (<i>m</i>)	28,4
	4	1,75 (<i>m</i>)	43,2
	5	*	27,9
	6	2,40	40,5
	7	3,73 (<i>m</i>)	70,7
	8	1,25 (<i>d</i> ; 6,0)	21

*Sinal não observado

6 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu dar continuidade aos estudos com fungos endofíticos de espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica, contribuindo com mais 21 linhagens para a micoteca. Os dados químicos e biológicos destas linhagens, cultivadas em pequena escala, evidenciaram estes microrganismos como uma fonte promissora de substâncias potencialmente bioativas.

O estudo químico dos extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico CSY-03 (*Xylaria* sp.) resultou no isolamento das substâncias: citocalasinas C, D e B, griseofulvina (antimicótico comercial), 7-desclorogriseofulvina, 5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-diidroisocumarina e duas substâncias da classe dos terpenos que estão em fase de determinação estrutural. Este endófito foi cultivado em meios diferentes (sólido e líquido) e constatou-se a houve variação da produção metabólica em função do meio utilizado. Este fato evidencia a influência do meio de cultivo sobre a produção de substâncias por *Xylaria* sp.

O fungo endofítico CSY-02, classificado como *Colletotrichum crassipes*, produziu uma gama de metabólitos, sendo 8 substâncias dicetopiperazínicas, tirosol e duas substâncias (1-hidroxi-1-feniletil-tirosol e (6-metil-3-(feniletóxi)-1,4-dioxan-2-il)metanol), ainda não relatadas. A produção de substâncias previamente relatadas como antifúngicas sugere que este microrganismo exerce uma função ecológica na espécie hospedeira, uma vez que é capaz de produzir substâncias tóxicas a outros microrganismos que são fitopatogênicos ou que vivem em competição. Esta constatação é suportada pela atividade antifúngica em potencial contra os fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* que algumas substâncias isoladas apresentaram.

Este trabalho indicou que as substâncias 19,20-epoxicitocalasinas C, Q, D, R e N (**G1-5**) e citocalasinas D e B (**5 e 2**) são citotóxicas para as linhagens de adenocarcinoma murino (mama e pulmão) testadas *in vitro*. Entretanto, outros estudos são necessários para definir os mecanismos de citotoxicidade destas substâncias e explorar a sua aplicação na prevenção e controle de câncer.

Os resultados obtidos são relevantes pois evidenciam os fungos endofíticos como uma fonte de substâncias inéditas e com grande complexidade estrutural, justificando a necessidade do estudo químico desta classe de microrganismos. Deve-se ressaltar que durante este trabalho foram isoladas substâncias de interesse comercial, como por ex. a griseofulvina, além de citocalasinas que possuem alto valor agregado. Esta observação é condizente com a teoria ecológica, a qual prediz que microrganismos que vivem sob alto nível de "stress" ambiental e intensas e freqüentes interações com outros microrganismos apresentam alta diversidade metabólica.

Considerando esta potencialidade dos fungos endofíticos e os relatos de enzimas presentes nesses microrganismos, foi realizado o estudo da habilidade de biotransformação desses fungos. O potencial biocatalítico dos fungos endofíticos *Colletotrichum crassipes* e *Xylaria* sp. foi avaliado e revelou-os como fontes de enzimas para bio redução de cetonas, hidroxilação e reações de Baeyer-Villiger.

O estudo químico de fungos endofíticos é recente e tem revelado estes microrganismos como promissores na busca por novos e potenciais metabólitos secundários bioativos. Este trabalho também abordou a capacidade enzimática deste nicho de fungos, representados por *C. crassipes* e *Xylaria* sp., e evidenciou que estes microrganismos são também promissores em estudos envolvendo biotransformação.

7 REFERÊNCIAS

- ABOU-ZAID, M.; DUMAS, M.; CHAURET, D.; WATSON, A.; THOMPSON, D. C-methyl-flavonols from the fungus *Colletotrichum dematium* f.sp. *epilobii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 957-961, 1997.
- ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, *Calyx* cf. *podatypa*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.
- ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family Xylariaceae. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, v. 9, p. 2185-92, 1983.
- ARAUJO, W. L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. 1996. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.
- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.
- BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BAEZ-ORTIZ, Z. E.; LODGE, D. J. Distribution and dispersal Xylaria endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, v. 102, n. 1, p. 944-948, 1998.
- BILLS, G. F. Analyses of microfungal diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. S33-S41, 1995.
- BONDET, V.; WILLIAMS-BRAND, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm-Wissu Technology**, v. 30, n. 7, p. 609-615, 1997.
- BOONPHONG, S.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; PITTAYAKHAJONWUT, D.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria* multiplex. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 7, p. 965-967, 2001.
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.

CAFÊU, M. C. **Substâncias bioativas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii***. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* dc. Prodr. (Rubiaceae)**. 2003. 224 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 5048-5052, 2004.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v. 69, p. 10-16, 1988.

COLLADO, I. G.; ALEU, J. Biotransformations by Botrytis species. **Journal of Molecular Catálisis B: Enzymatic**, v. 13, p. 77-93, 2001.

COLLADO, I. G.; GARCÍA-PAJON, C. M.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Biotransformations by *Colletotrichum* species. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, p. 1229-1239, 2003.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, 1975. p. 514-516.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1/3, p. 52-60, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 488-498, 2006.

DAGNE, E.; GUNATILAKA, A. A. L.; ASMELLASH, S.; ABATE, D.; KINGSTON, D. G. I.; HOFMANN, G. A.; JOHNSON, R. K. New citotoxic cytochalasins from *Xylaria obovata*. **Tetrahedron**, v. 50, n. 19, p. 5615-5620, 1994.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9/10, p. 71-76, 2004.

DE CONTI, R. M.; PORTO, A. L. M.; AUGUSTO, J.; RODRIGUES, R.; MORAN, P. J. S.; MANFIO, G. P.; MARSAIOLI, A. J. Microbial reduction of cyclohexanones. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 233-236, 2001.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. cap. 3, p. 49-80.

ESPADA, A.; RIVERA-SAGREDO, A.; FUENTE, J. M.; HUESO-RODRIGUEZ, J. A.; ELSON, S. W. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6485-6492, 1997.

FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, 2003.

FURTADO, N. A. J. C. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus***. 2004. 293 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GARDNER, W. A.; MCCOY, C. W. Inseticides and hebicides. In: FINKELSTEIN D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 335-359.

GRAF, W.; ROBERT, J. L.; VEDERAS, J. C.; TAMM, C. Biosynthesis of cytochalasans .3. C-13-NMR of cytochalasin B (Phomin) and cytochalasin D - incorporation of [1-C-13] and [2-C-13] sodium acetate. **Helvetica Chimica Acta**, v. 57, n. 6, p. 1801-1815, 1974.

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

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity-magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.

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

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

INACIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAUJO, A. R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloesporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocaria mandiocanna* Nees (lauryaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 11, p. 822-824, 2006.

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

JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonóides de *Casearia sylvestris* (erva de bugre). **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 95-101, 1985.

KAYSER, M. M.; CLOUTHIER, C. M. New bioorganic reagents: evolved cyclohexanone monooxygenase- why is it more selective? **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 8424-8430, 2006.

KEPPLER, A. F.; PORTO, A. L. M.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H. Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 967-975, 2005.

KIRIN BREWERY (Japan). H. Itokawa. **Isolation of diterpenes as antitumoral agents from plants.** JP 01149779 [89.149.779] (Cl. C07D307/92), 05 dec. 1987, 12 jun. 1989.

KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAGER, S.; SCHULZ, B. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 155-157, 1999.

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

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

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

LIN, Y. C.; WU, X. Y.; FENG, S. A.; JIANG, G. C.; LUO, J. H.; ZHOU, S. N.; VRIJMOED, L. L. P.; JONES, E. B. G.; KROHN, K.; STEINGROVER, K.; ZSILA, F. Five unique compounds: Xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the south China sea coast. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 6252-6256, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum Ltda, 1992. 115 p.

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

LUCKNER, M. **Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals**. 3rd ed. Germany: VEB Gustav Fisher Verlag Jena, 1990. 563 p.

MACCOTTA, A.; VALENSIN, G.; GAGGELLI, N.; GAGGELLI, E. The conformation of cytochalasin D in DMSO solution from H-1 and C-13 NMR relaxation rates. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2**, p. 729-732, 1993.

MACCMILLAN, J. Griseofulvin: 7-Dechlorogriseofulvin. **Journal of Chemical Society**, p. 1697-1702, 1953.

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

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York: Oxford University Press, 1994. 92 p.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.

MASKEY, R. P.; ASOLKAR, R. N.; KAPAUN, E.; WAGNER-DOBLER, I.; LAATSCH, H. Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 7, p. 643-649, 2002.

MASUREKAR, P. S. Therapeutic metabolites. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 241-301.

MIHOVILOVIC, M. D.; CHEN, G.; WANG, S.; KYTE, B.; ROCHON, F.; KAYSER, M. M.; STEWART, J. D. Asymmetric Baeyer-Villiger oxidations of 4-mono and 4,4-disubstituted cyclohexanones by whole cells of engineered *Escherichia coli*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, p. 733-738, 2001.

MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. Minnesota: Eagan Press, 1991. 552 p.

MIYAZAWA, M.; OKAMURA, S.; YAMAGUCHI, M.; KAMEOKA, H. Biological stereoselective reduction of 4-methylcyclohexanone and 4-ethylcyclohexanone by antracnose fungi. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 75, p. 143-146, 2000.

MORITA H.; KAKAYAMA, M.; KOJIMA, M.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n.3, p. 693-697, 1991.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FANRSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twings of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

PARK, J. H.; CHOI, G. L.; LEE, H. B.; KIM, K. M.; JUNG, H. S.; LEE, S. W.; JANG, K. S.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. Griseofulvin from *Xylaria* sp strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 112-117, 2005.

PEREA, S.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G. Comparison of in vitro activities of voriconazoles and established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, 2001.

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

PIETTE, J. Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 11, n. 3/4, p. 241-260, 1991.

PORTO, A. L. M. **Isolamento e seleção de microrganismos brasileiros para reações de biocatálise e produção de metabólitos**. 2002. 391 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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

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

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm Euterpe-Oleraceae. **Mycologia**, v. 86, n. 3, p. 376-385, 1994.

RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* and *B. Humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 905-909, 1996.

ROHR, J. Biosynthesis of taxol. **Angewandte Chemie - International Edition English**, v. 36, n. 20, p. 2190-2195, 1997.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R. A. P. S. Guaçatonga (*Casearia sylvestris*): aspectos botânicos da plantas, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 73-81, 1979.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

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

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

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

SIMTH, C. J.; MORIN, N. R.; BILLS, G. F.; DOMBROWSKI, A. W.; SALITURO, G. M.; SMITH, S. K.; ZHAO, A.; MACNEIL, D. J. Novel sesquiterpenoids from the fermentation of *Xylaria persicaria* are selective ligands for the NPYY5 receptor. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 14, p. 5001-5004, 2002.

SINGH, S. B.; ZINK, D.; POLISHOOK, J.; VALENTINO, D.; SHAFIEE, A.; SILVERMAN, K.; FELOCK, P.; TERAN, A.; VILLELA, D.; HAZUDA, D. J.; LINGHAM, R. B. Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrases inhibitor integric acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 50, p. 8775-8779, 1999.

SORDI, R. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico XIA-04 isolado das folhas de *Xylopia aromática* (Annonaceae)**. 2004. 106 f. Monografia (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUES, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

STARK, T.; HOFMANN, T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7222-7231, 2005.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, 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.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; TORCZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. – a lecinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). **Plant Science**, v. 128, p. 97-108, 1997.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R. *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology-UK**, p. 440, 1996.

TOZZE, H. J. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA, N. S. J. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Suma Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.

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

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

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

WHALLEY, A. J. S. Fungi tropics. In: HYDE, K. D. **Biodiversity of tropical microfungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 265-293.

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

Anexos

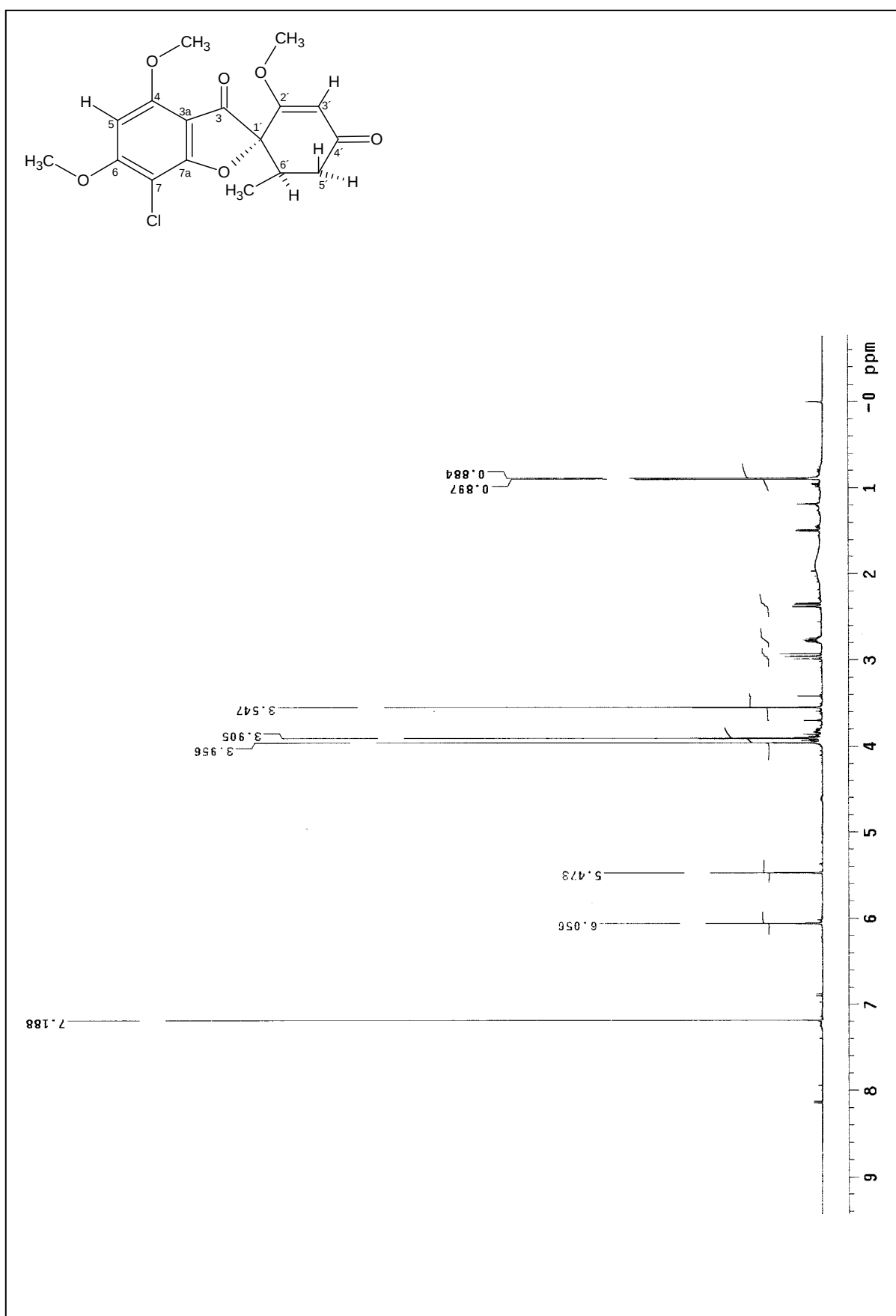


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H de **1** (CDCl_3 , 500 MHz).

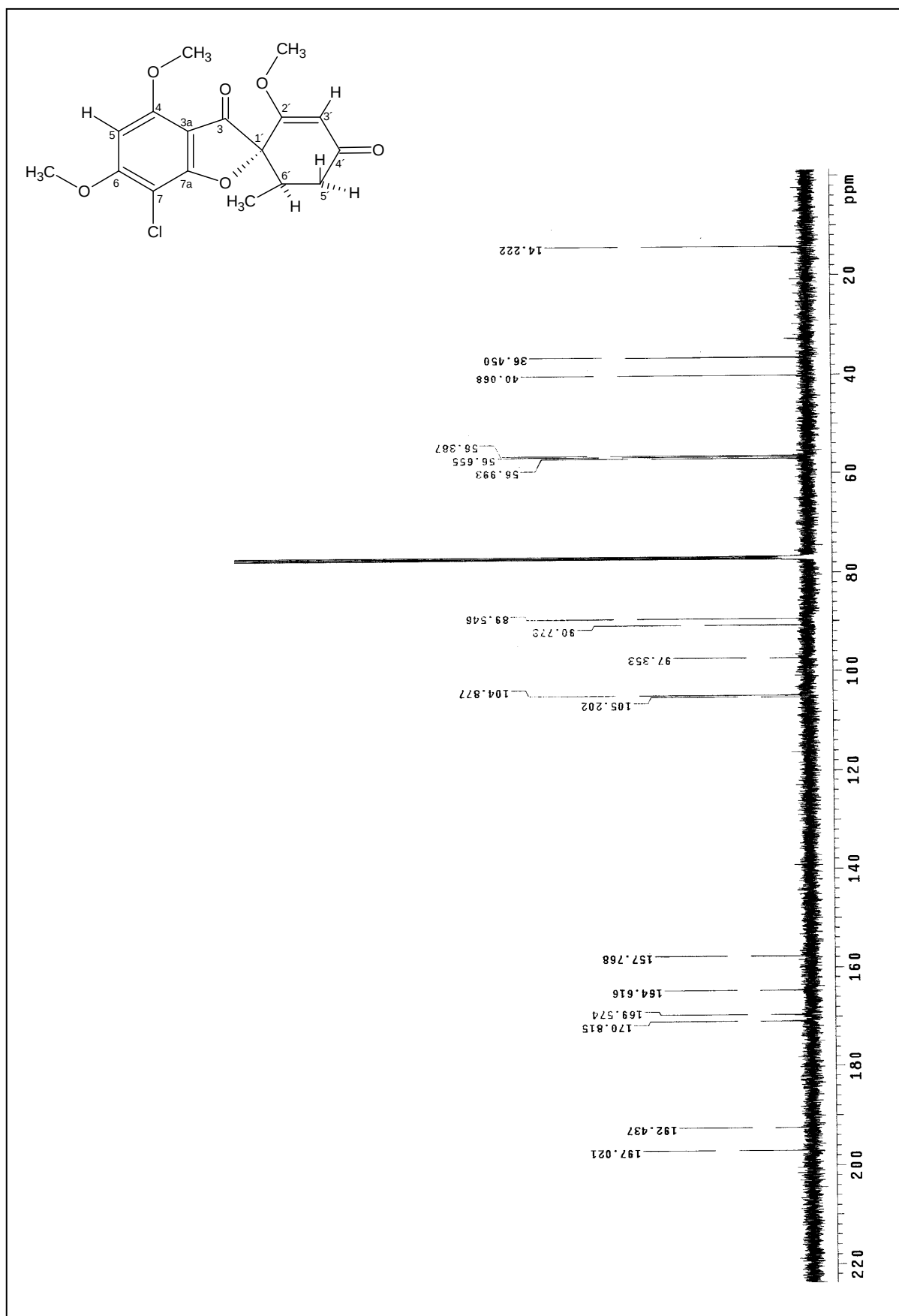


Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (CDCl₃, 125 MHz).

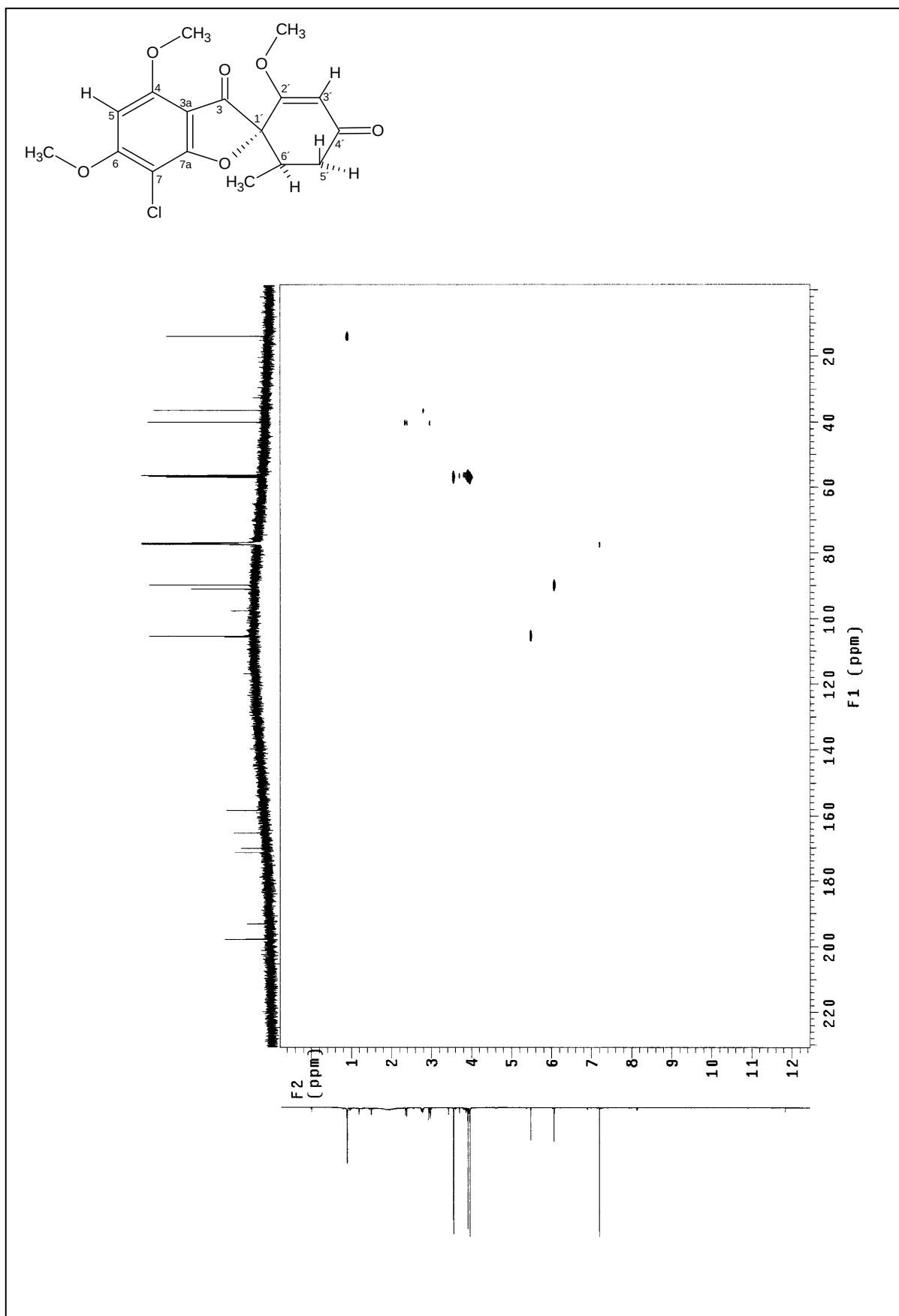


Figura 11 - Mapa de contorno gHMBC de **1** (CDCl₃, 125 MHz).

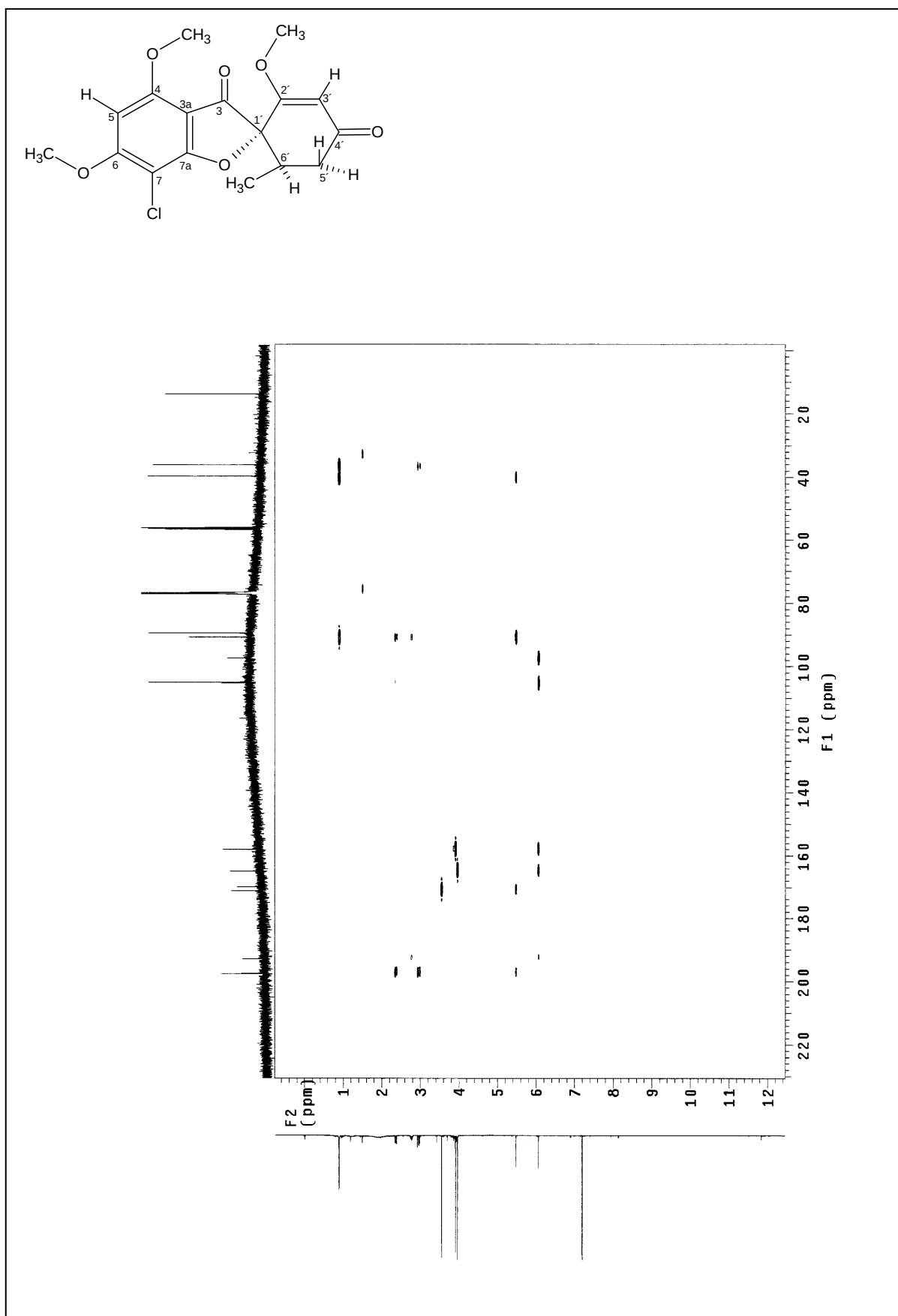


Figura 12 - Mapa de contorno g HMBC de **1** (CDCl_3 , 125 MHz).

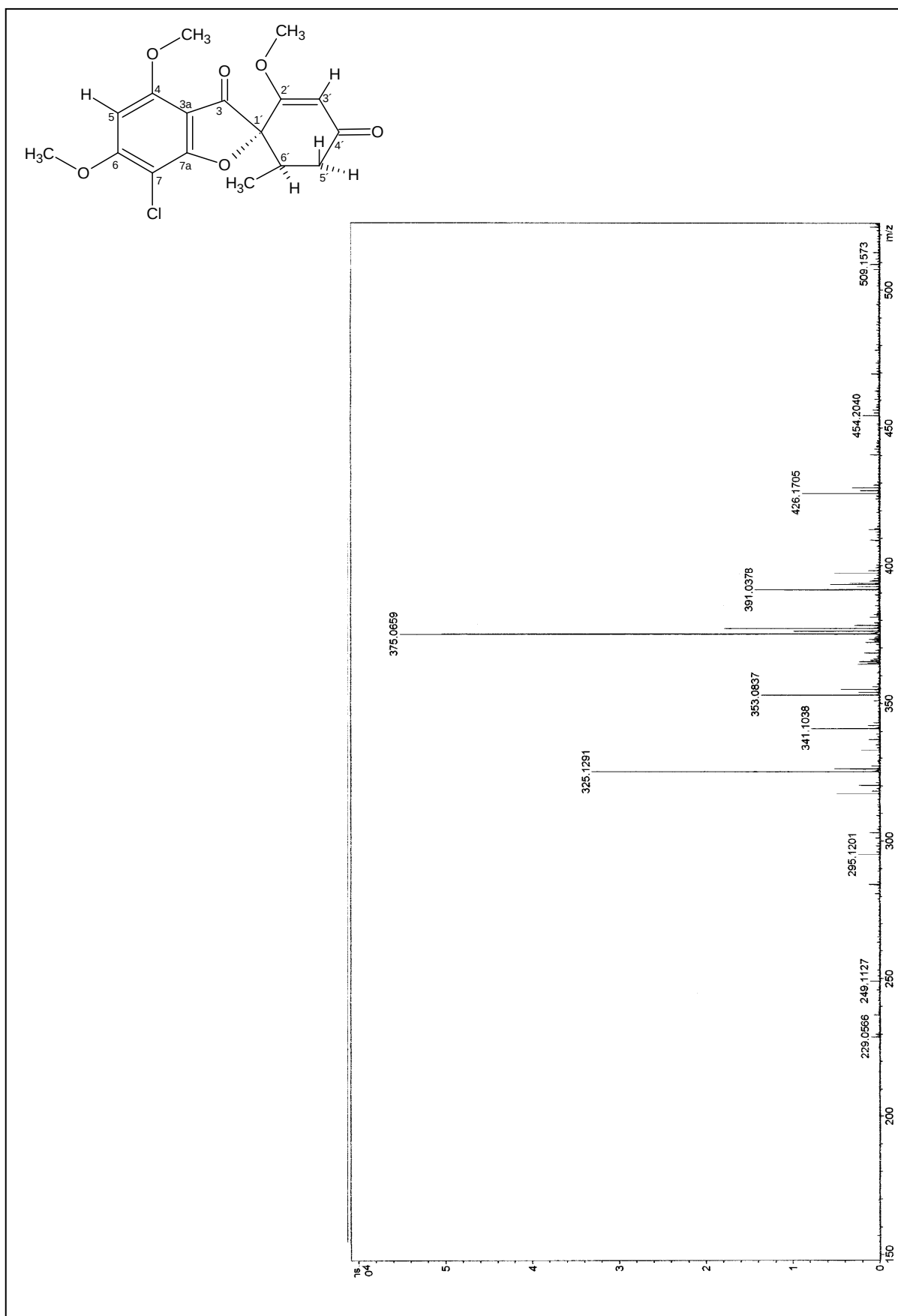


Figura 13 - Espectro de Massas de **1** (ESI-EM +120V).

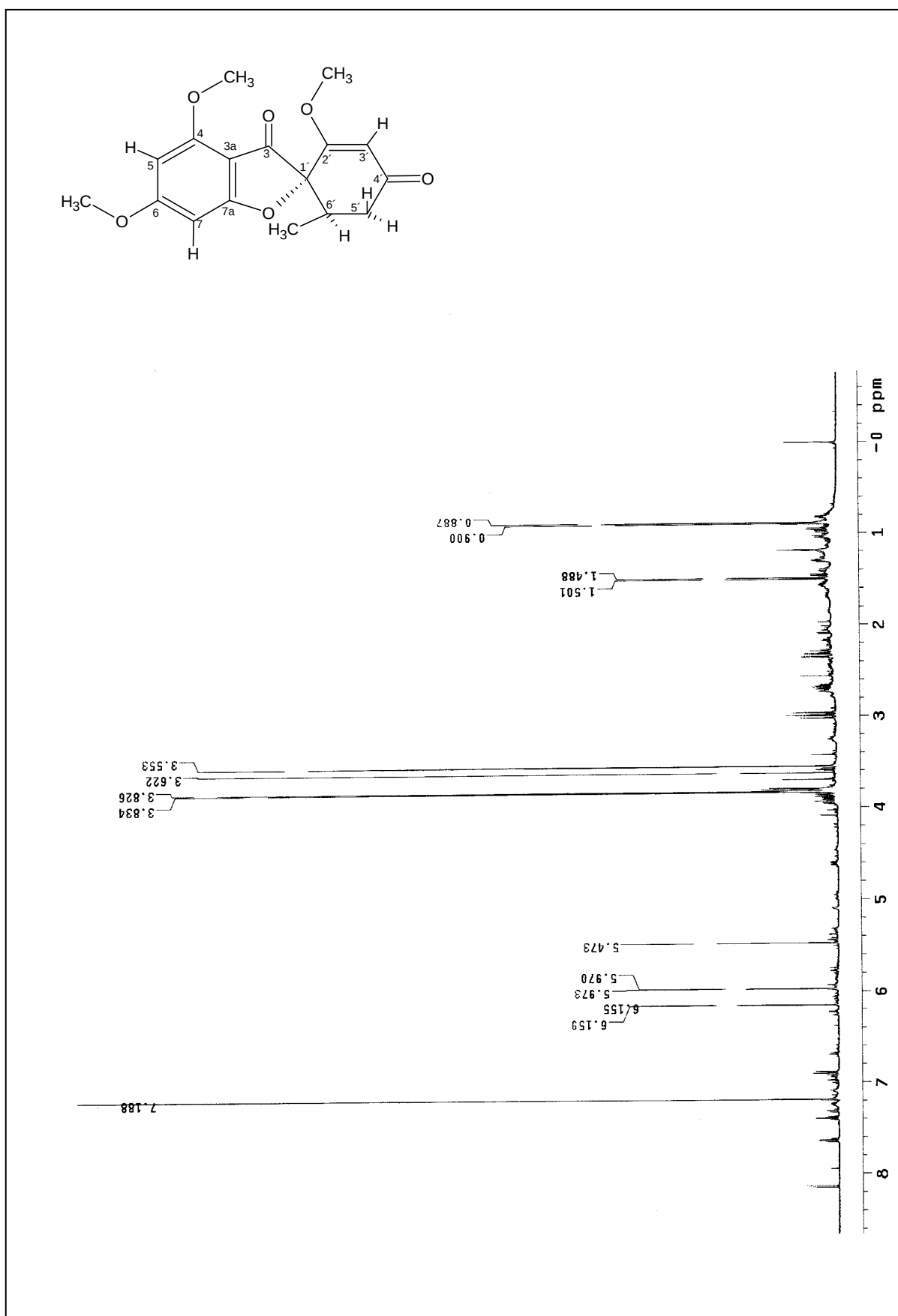


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H de **3** (CDCl_3 , 500 MHz).

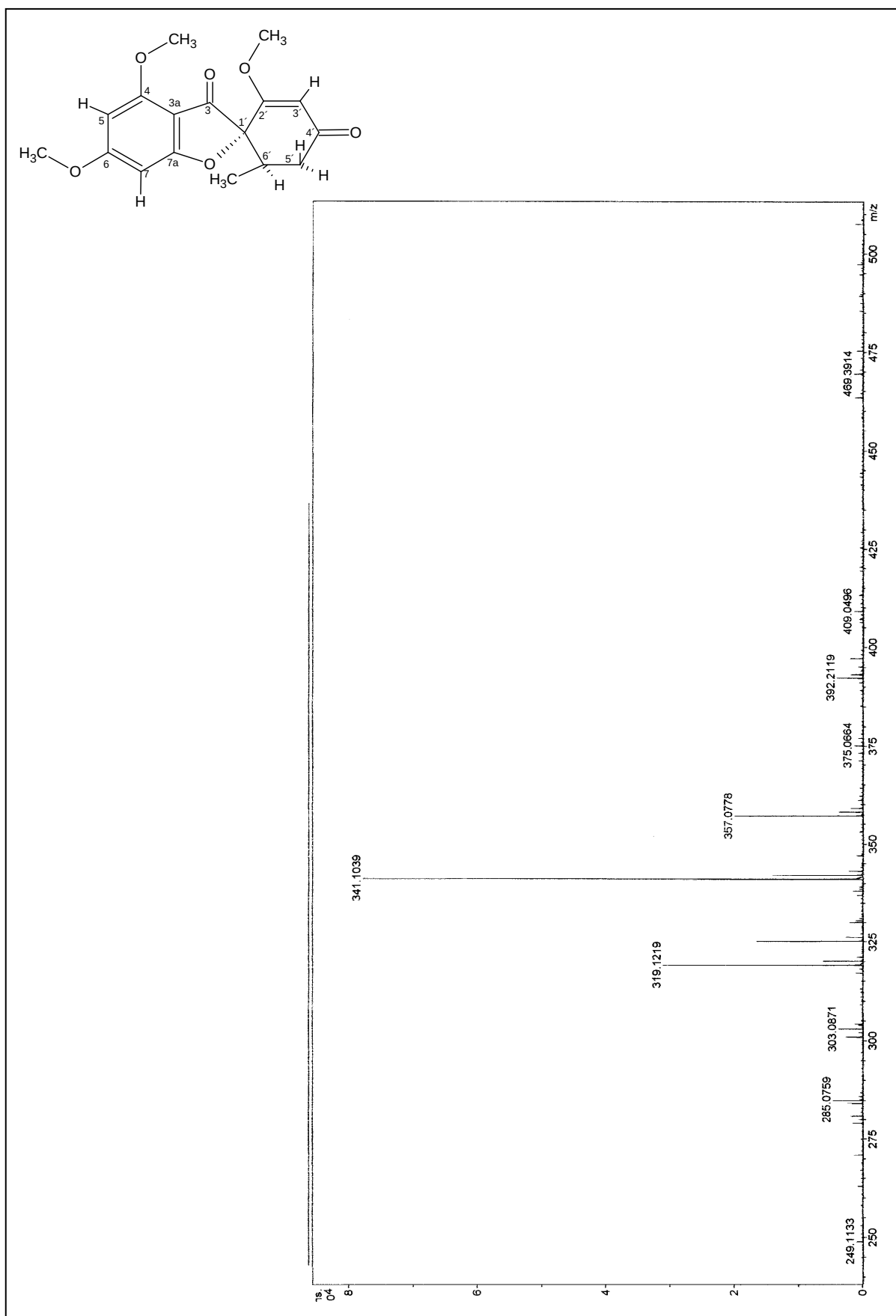


Figura 15 - Espectro de Massas de **3** (ESI-EM +120V) .

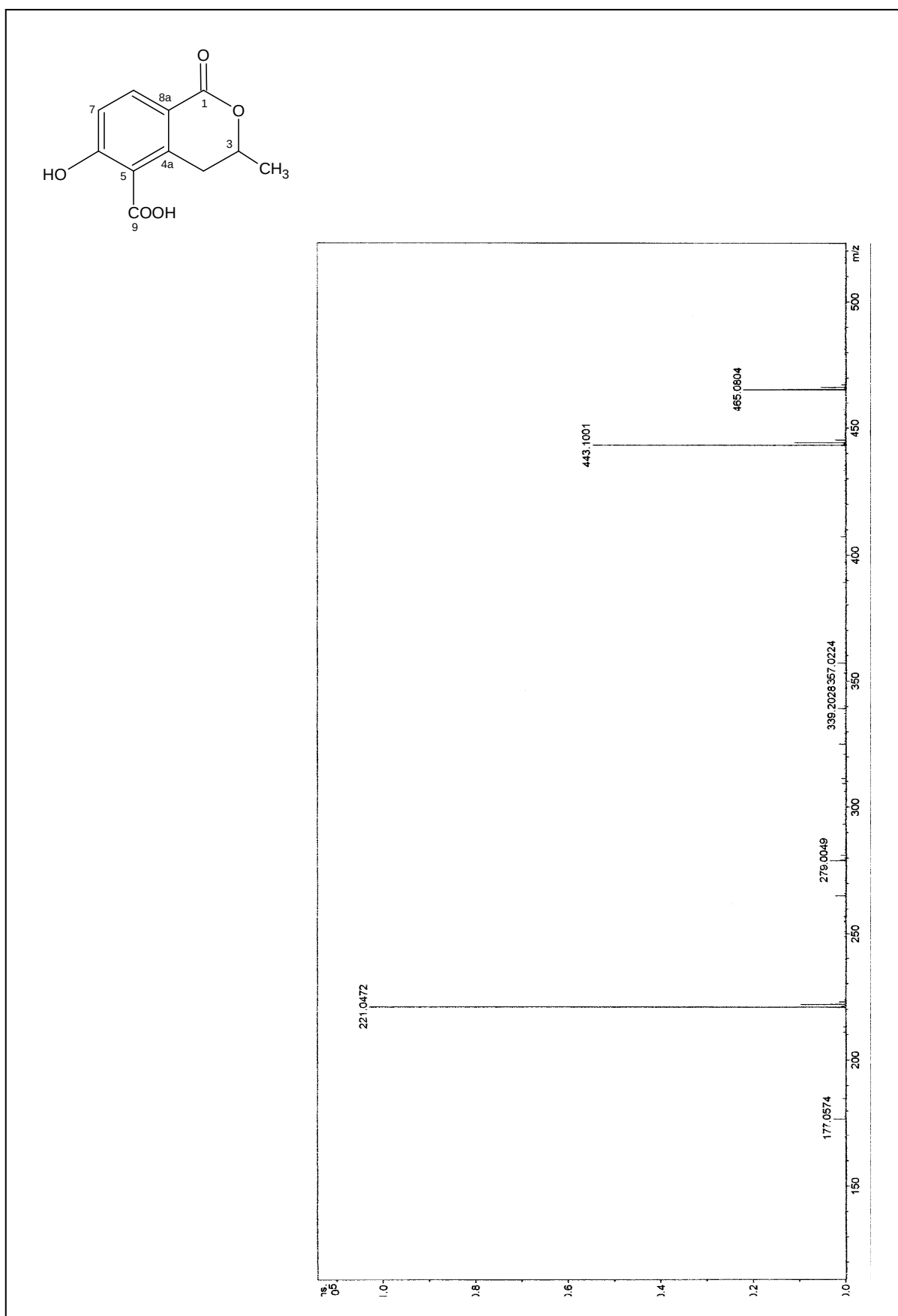


Figura 16 - Espectro de Massas de **6** (ESI-EM -120V).

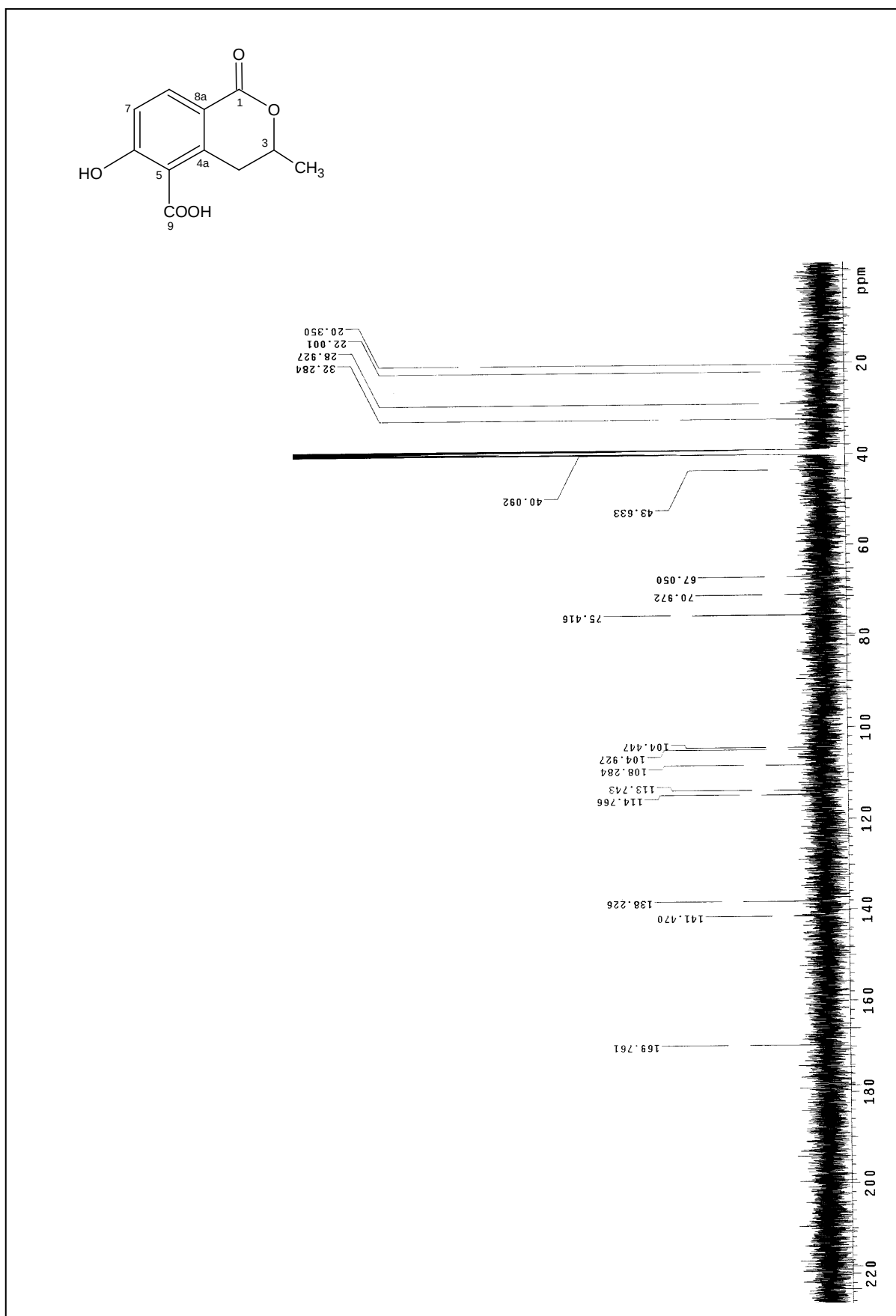


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C de **6** ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

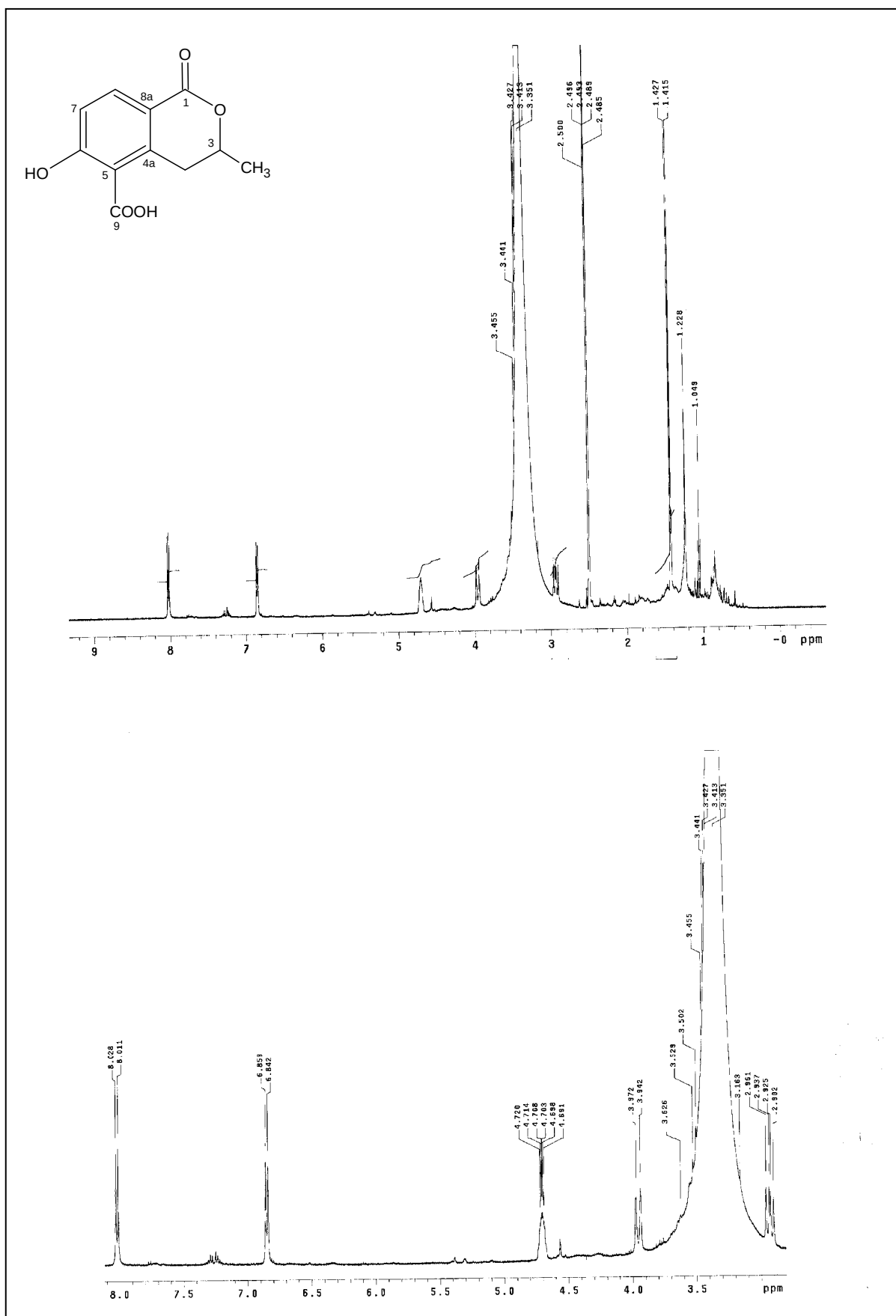


Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H de **6** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **6** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

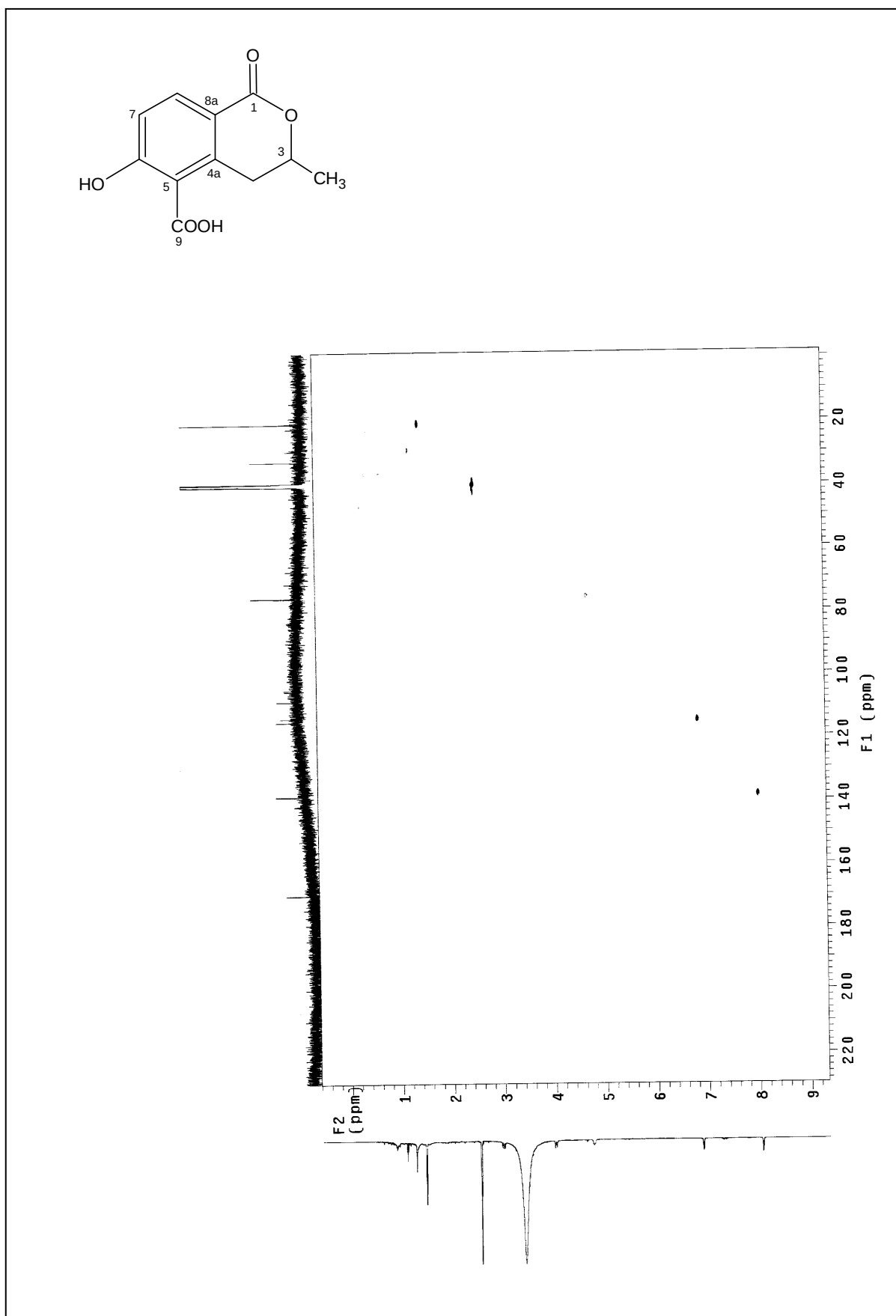


Figura 20 - Mapa de contorno *g*HMQC de **6** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

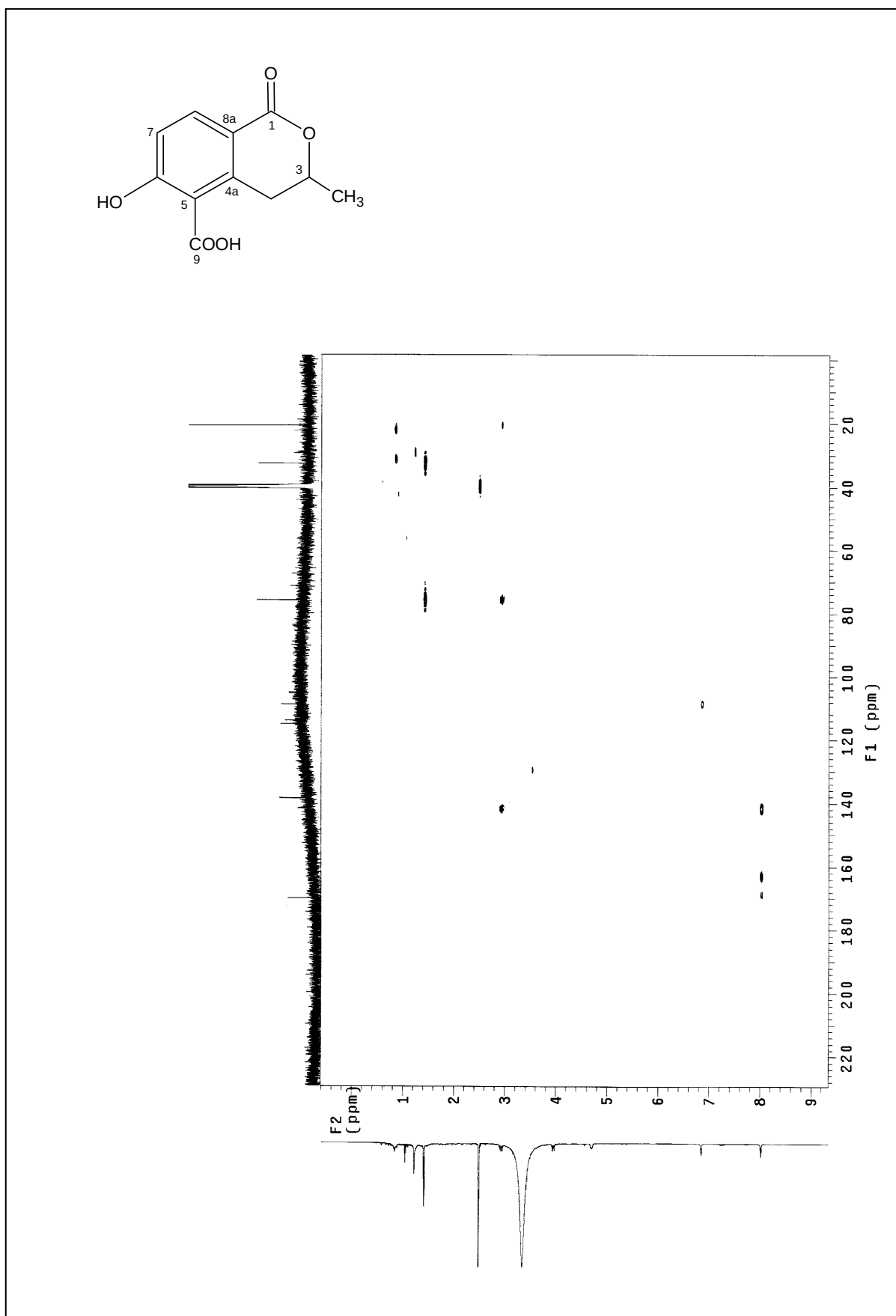


Figura 21 - Mapa de contorno g HMBC de **6** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

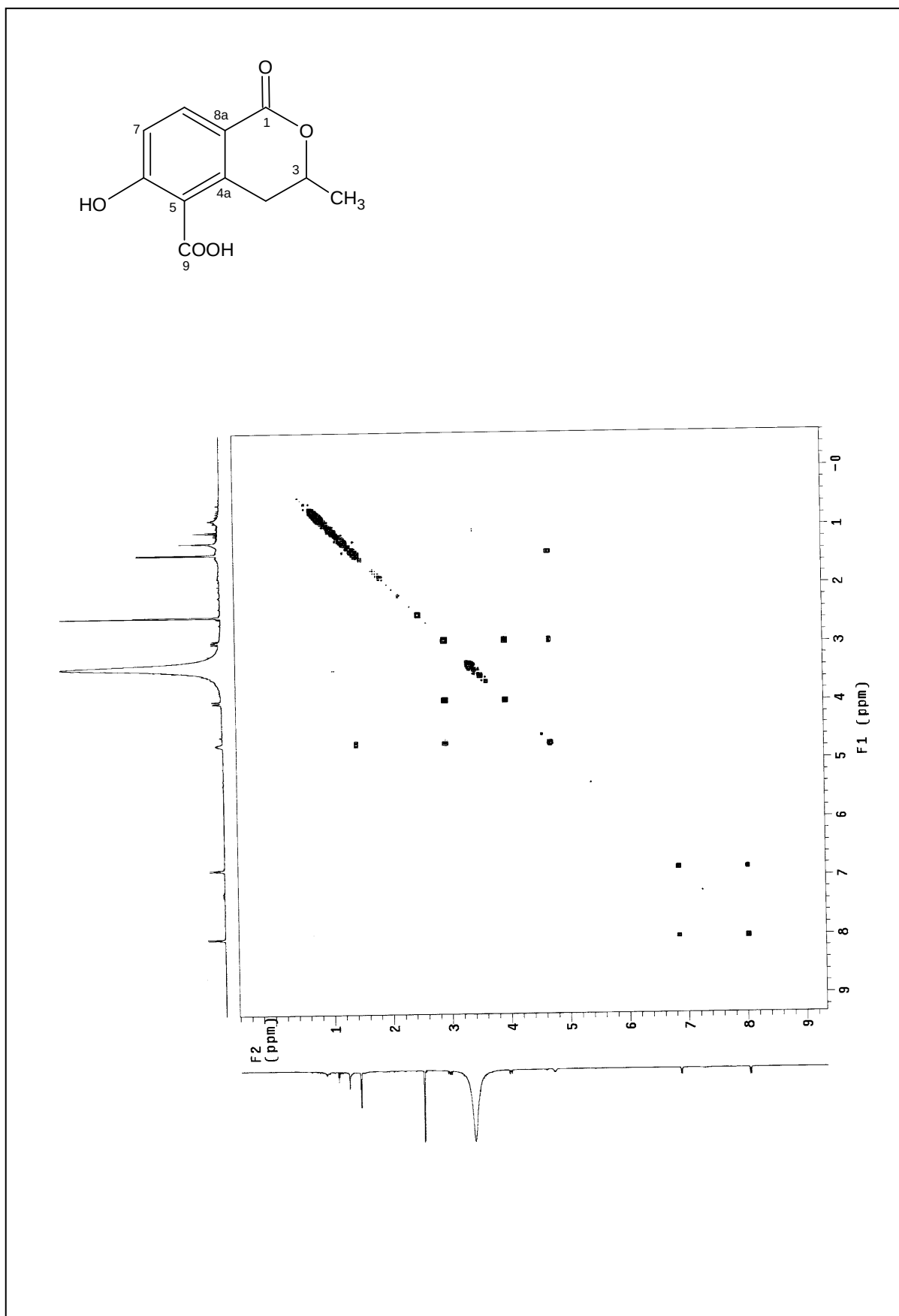


Figura 22 - Espectro de $g\text{COSY}$ de **6** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

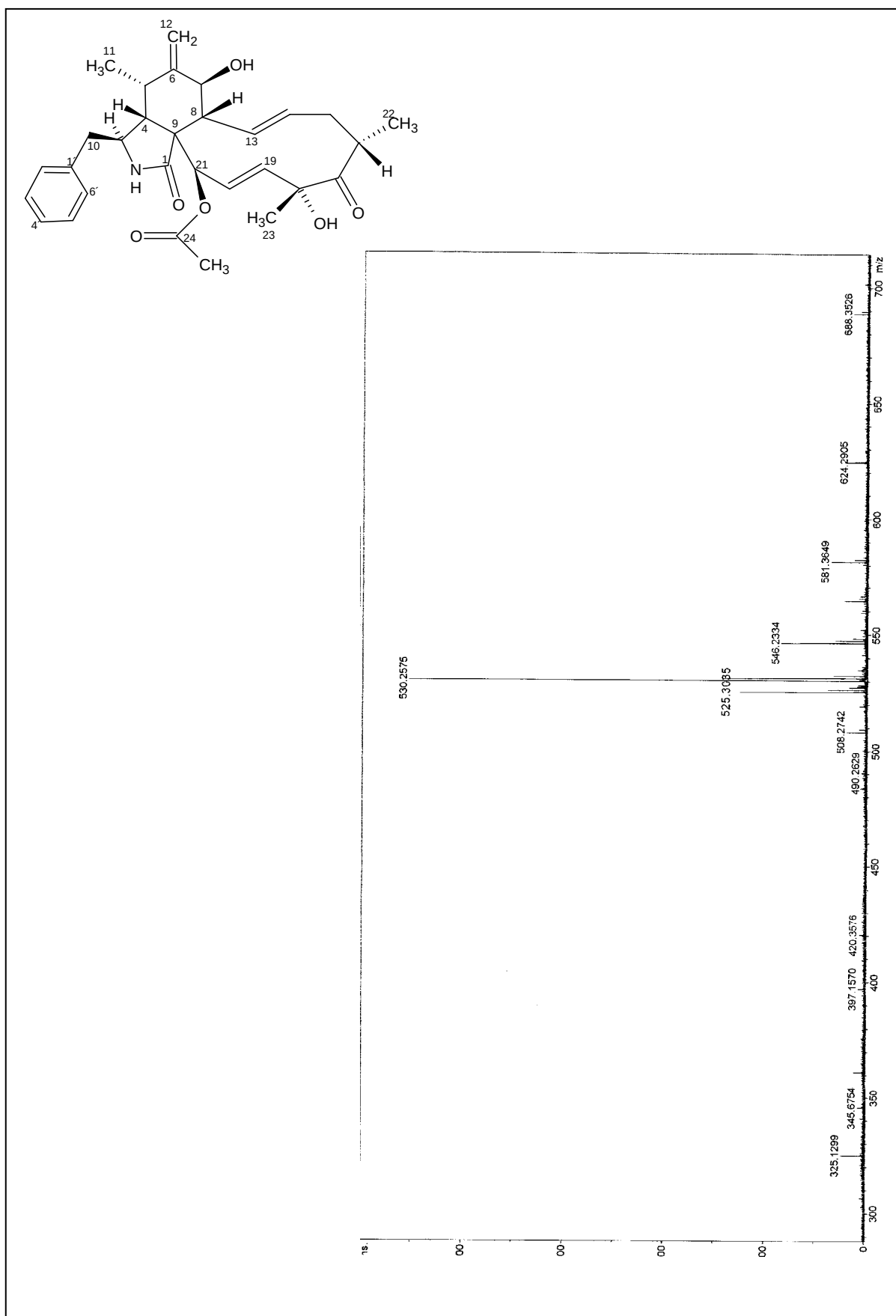


Figura 23 - Espectro de Massas de **5** (ESI-EM +120V).

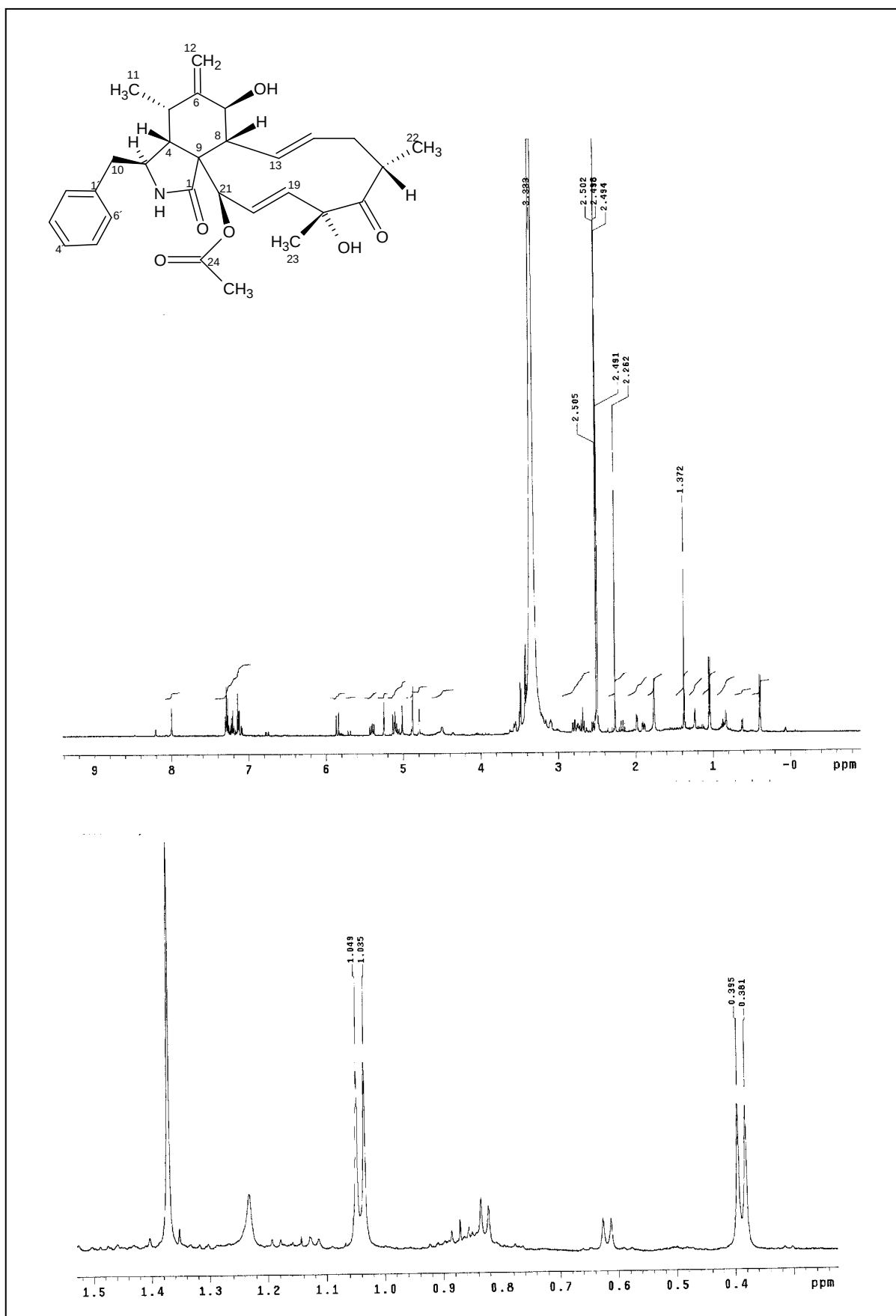


Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H de **5** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **5** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

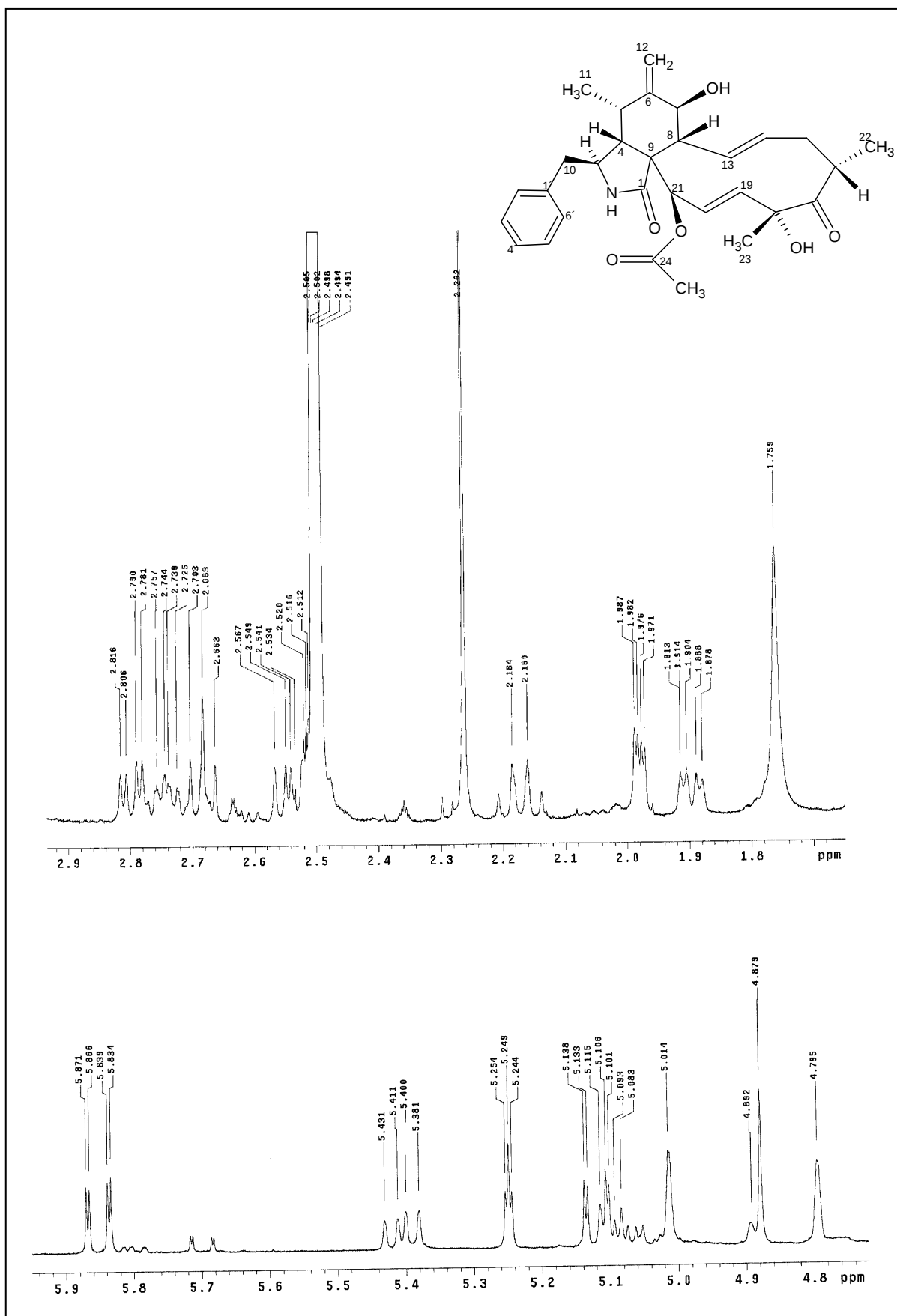


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **5** (DMSO- d_6 , 500 MHz).
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **5** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

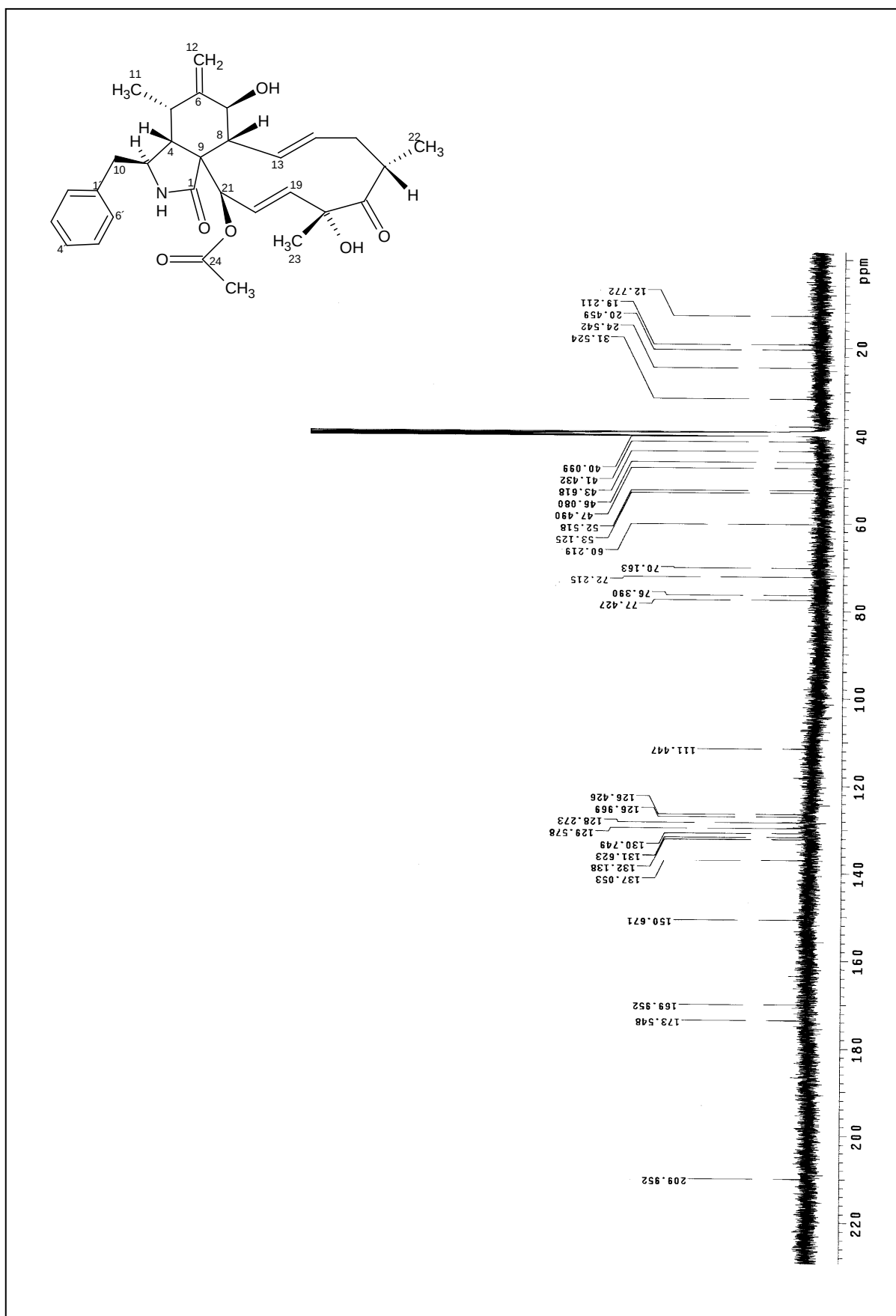


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C de **5** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

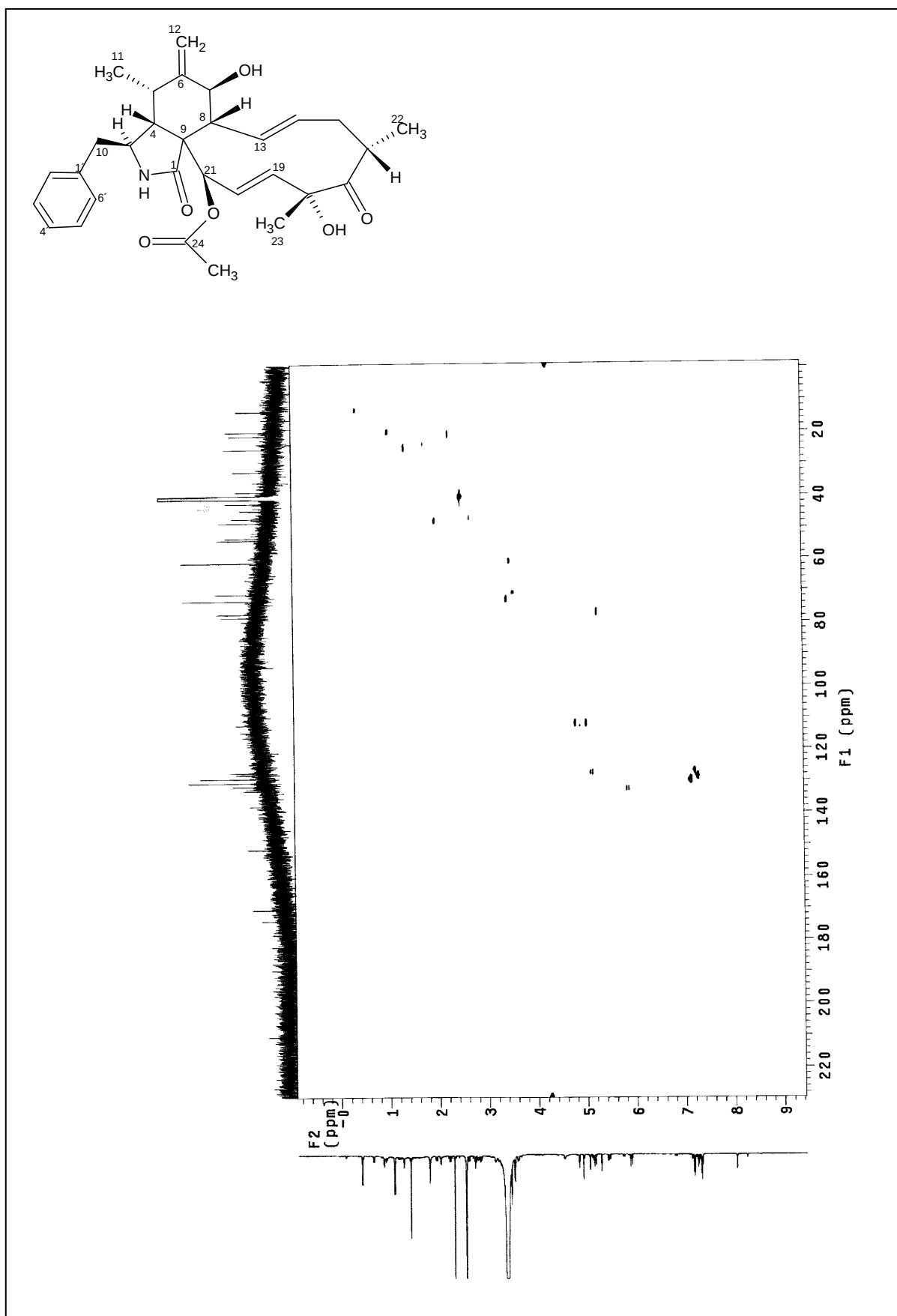


Figura 29 - Mapa de contorno g HMQC de **5** ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

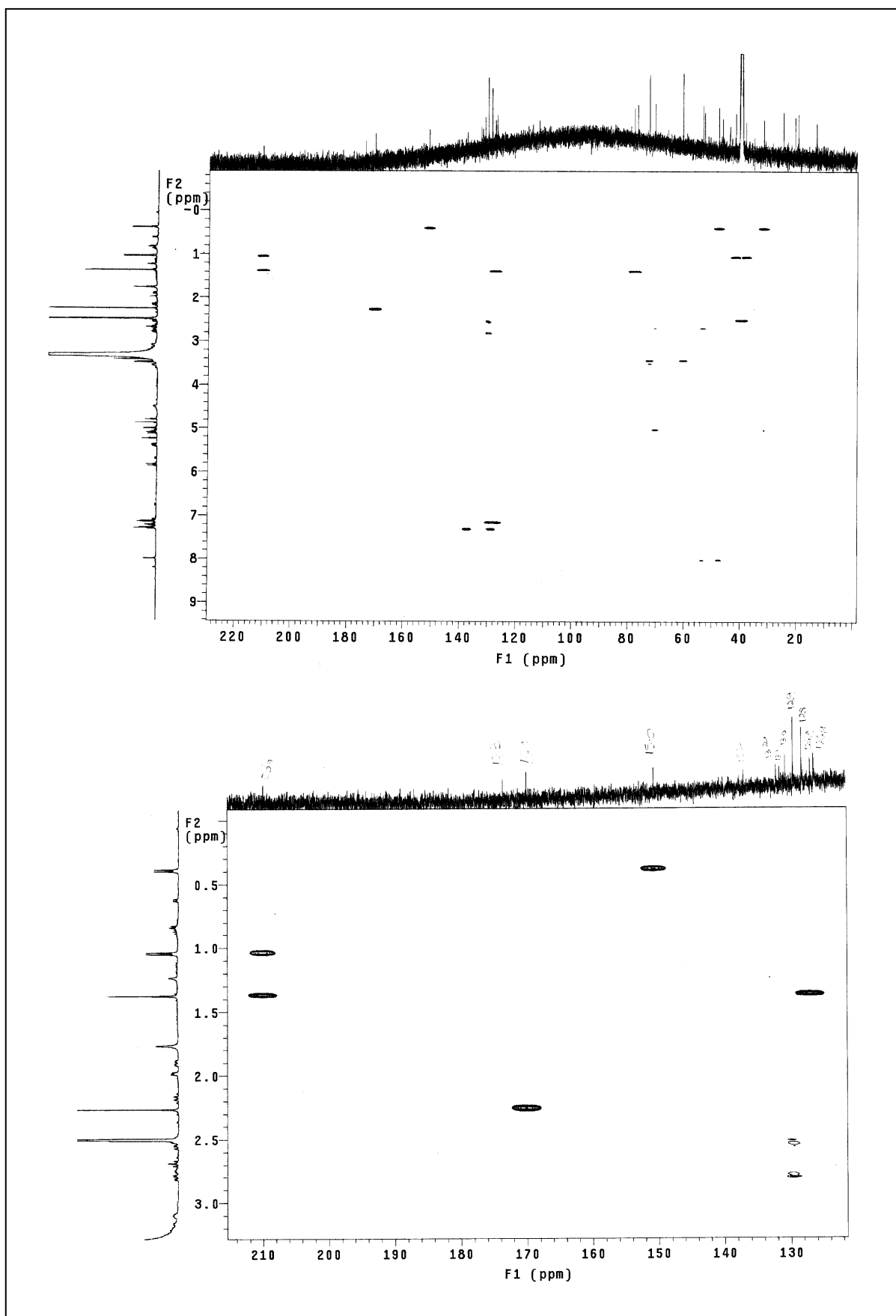


Figura 30 - Mapa de contorno *g*HMBC de **5** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

Figura 31 - Mapa de contorno ampliado *g*HMBC de **5** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

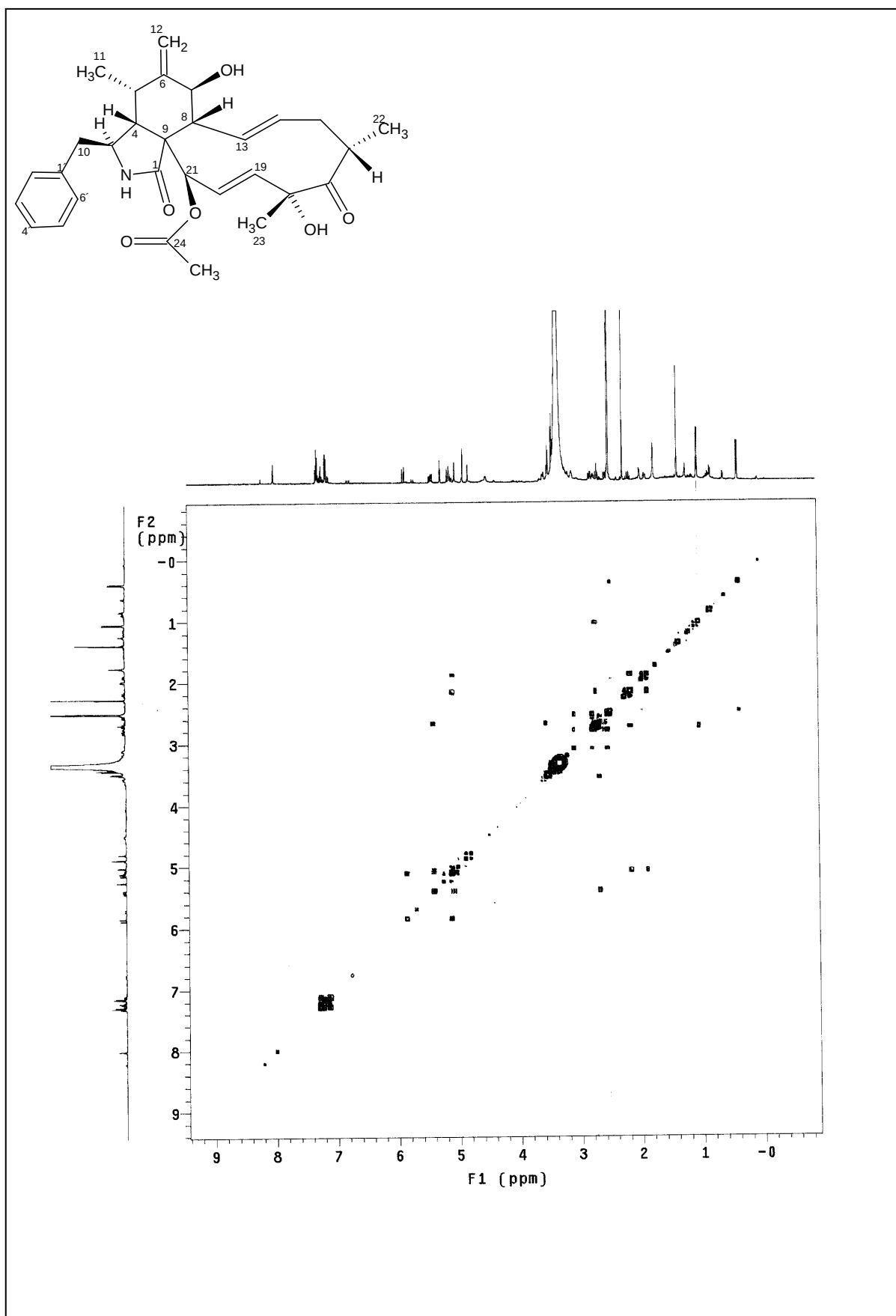


Figura 32 - Espectro de $g\text{COSY}$ de **5** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

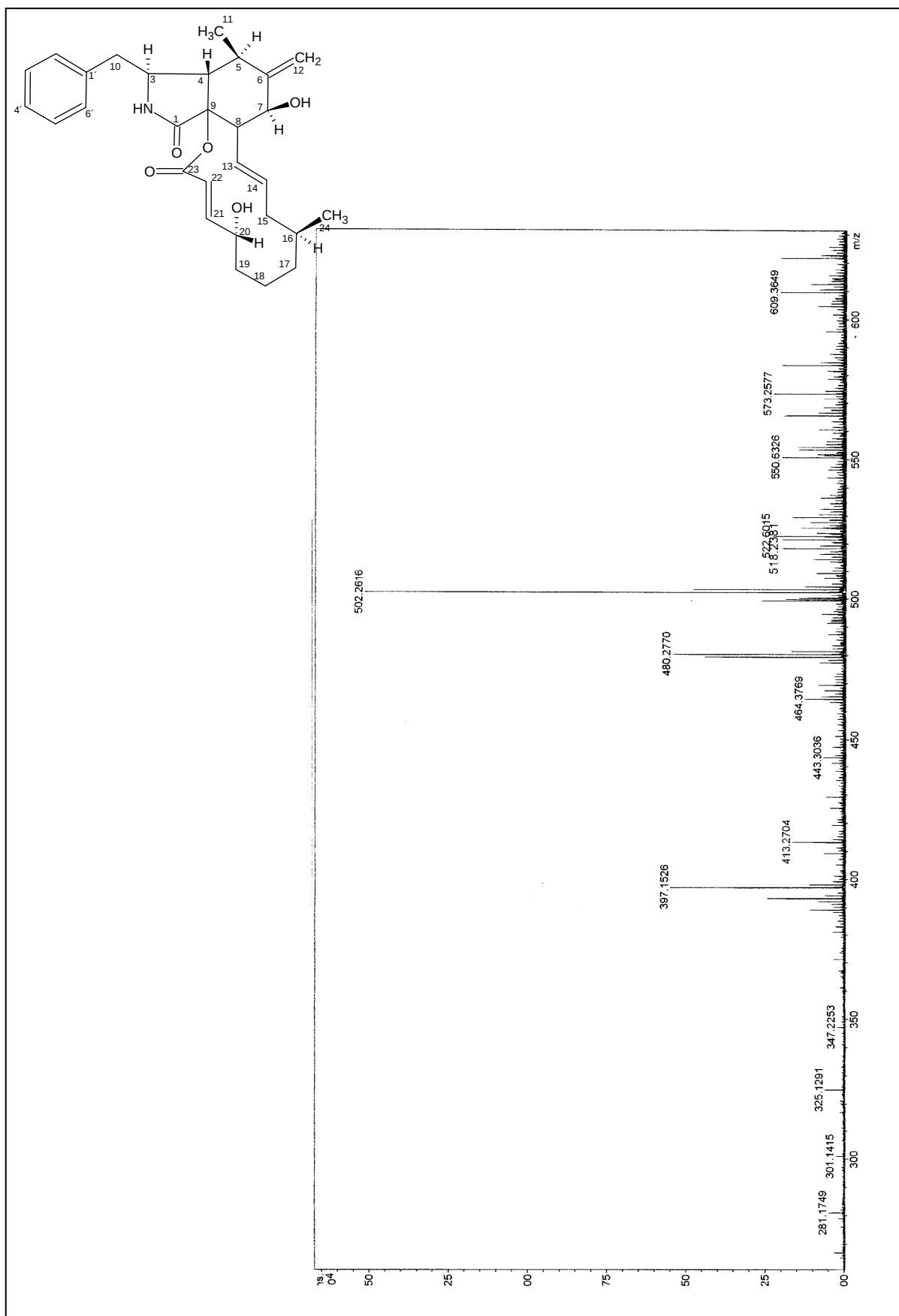
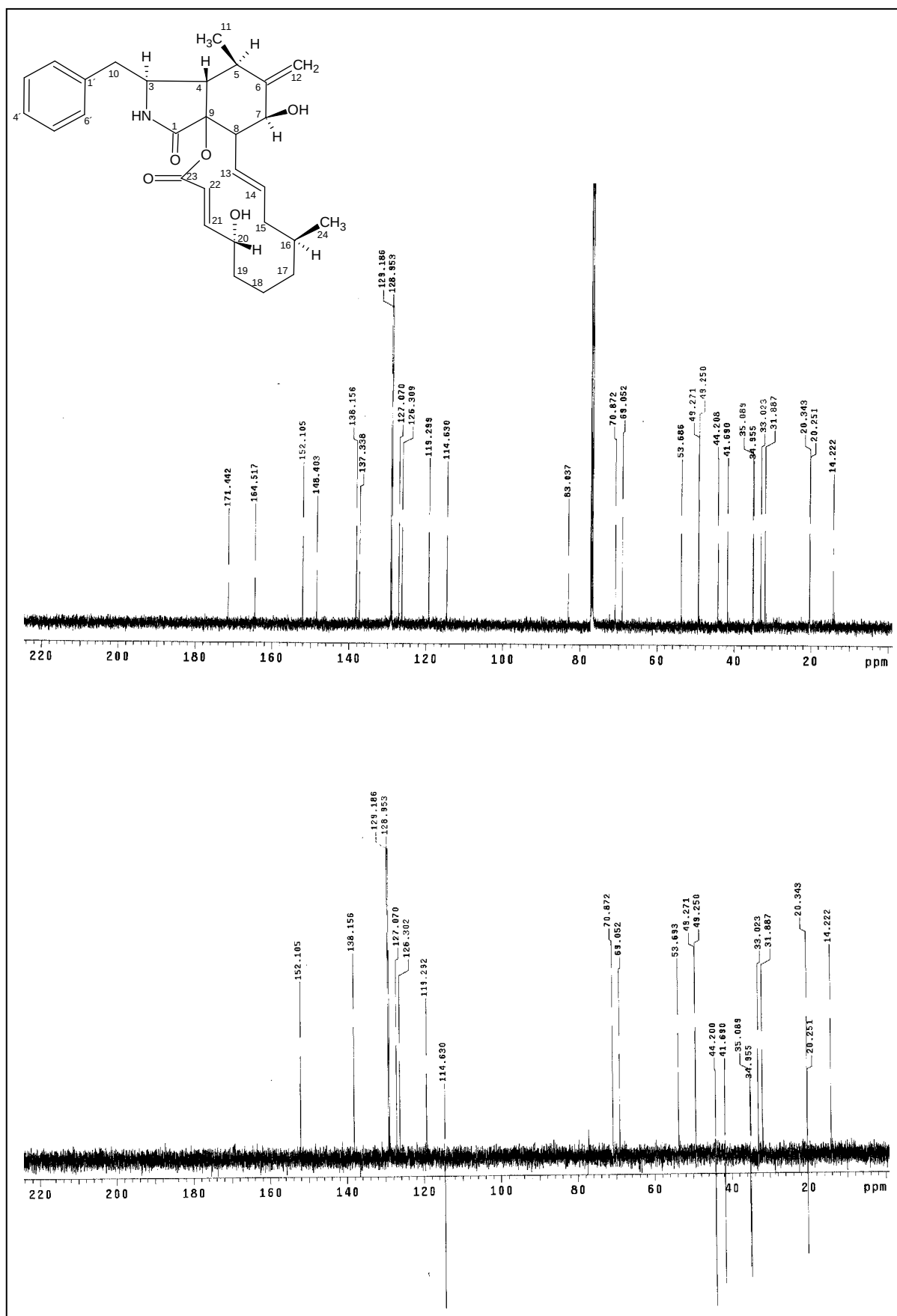


Figura 33 - Espectro de Massas de **2** (ESI-EM +120V).



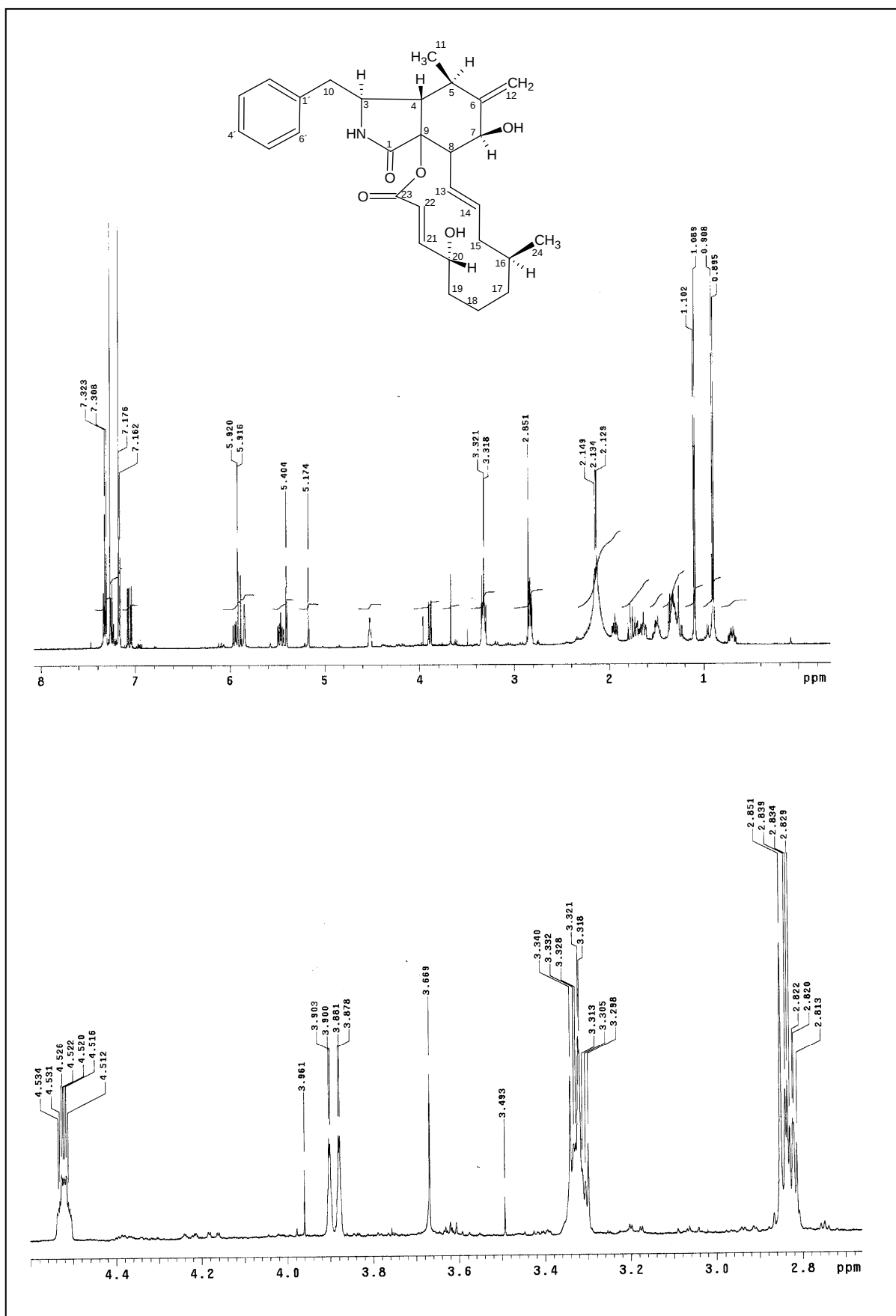


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H de **2** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **2** (CDCl_3 , 500 MHz).

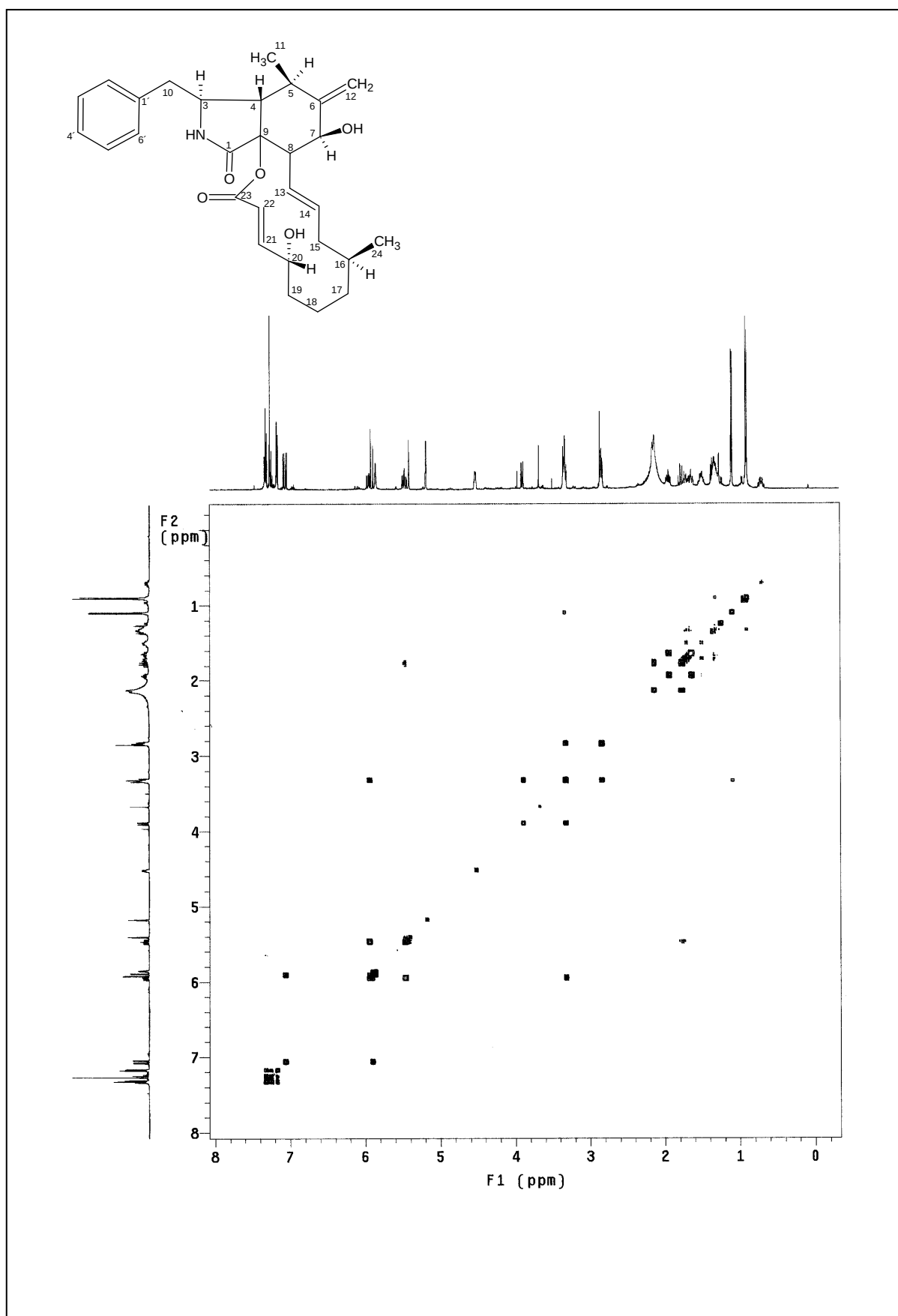


Figura 38 - Espectro de *g*COSY de **2** (CDCl₃, 500 MHz).

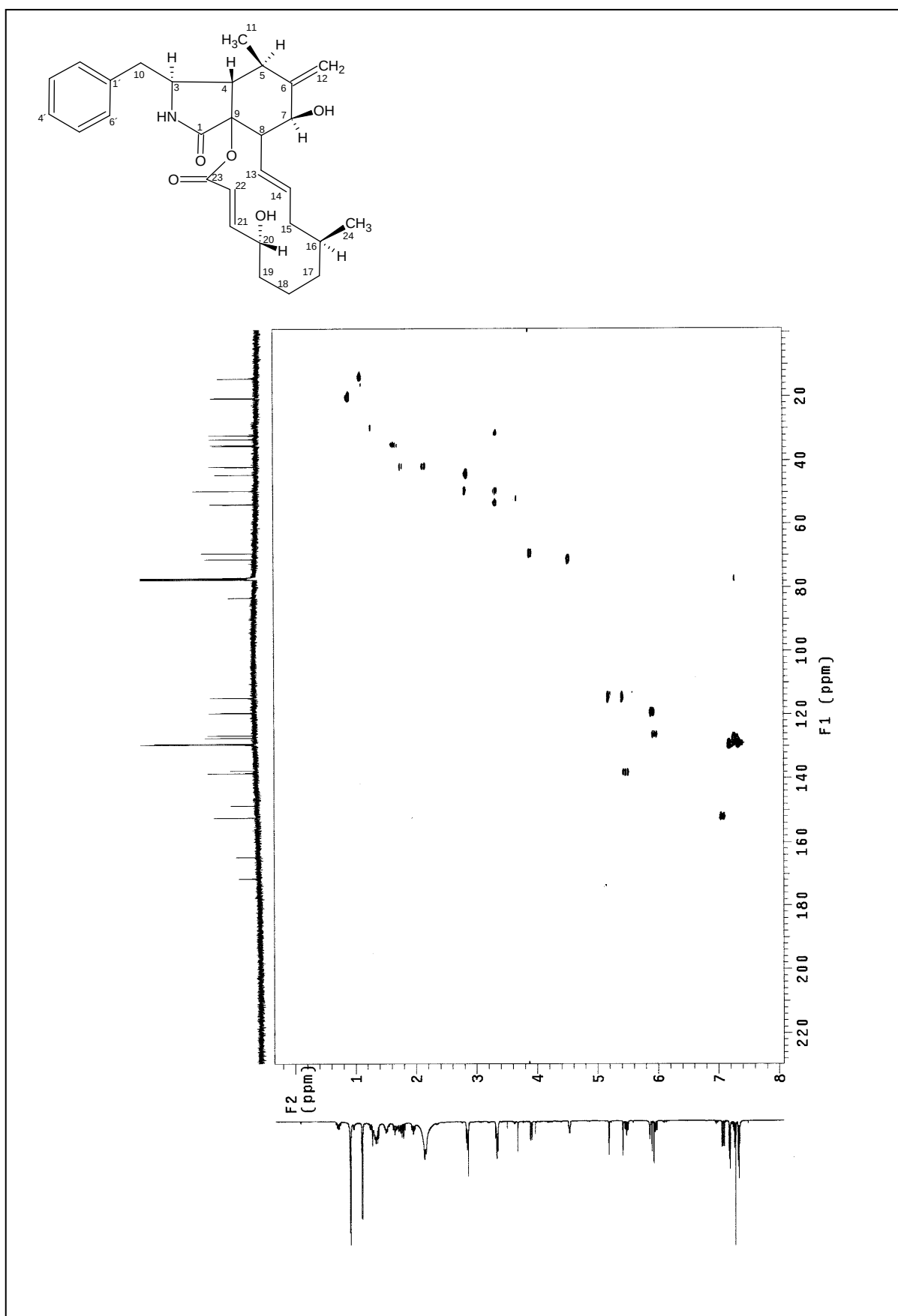


Figura 39 - Mapa de contorno g HMQC de **2** (CDCl_3 , 125 MHz).

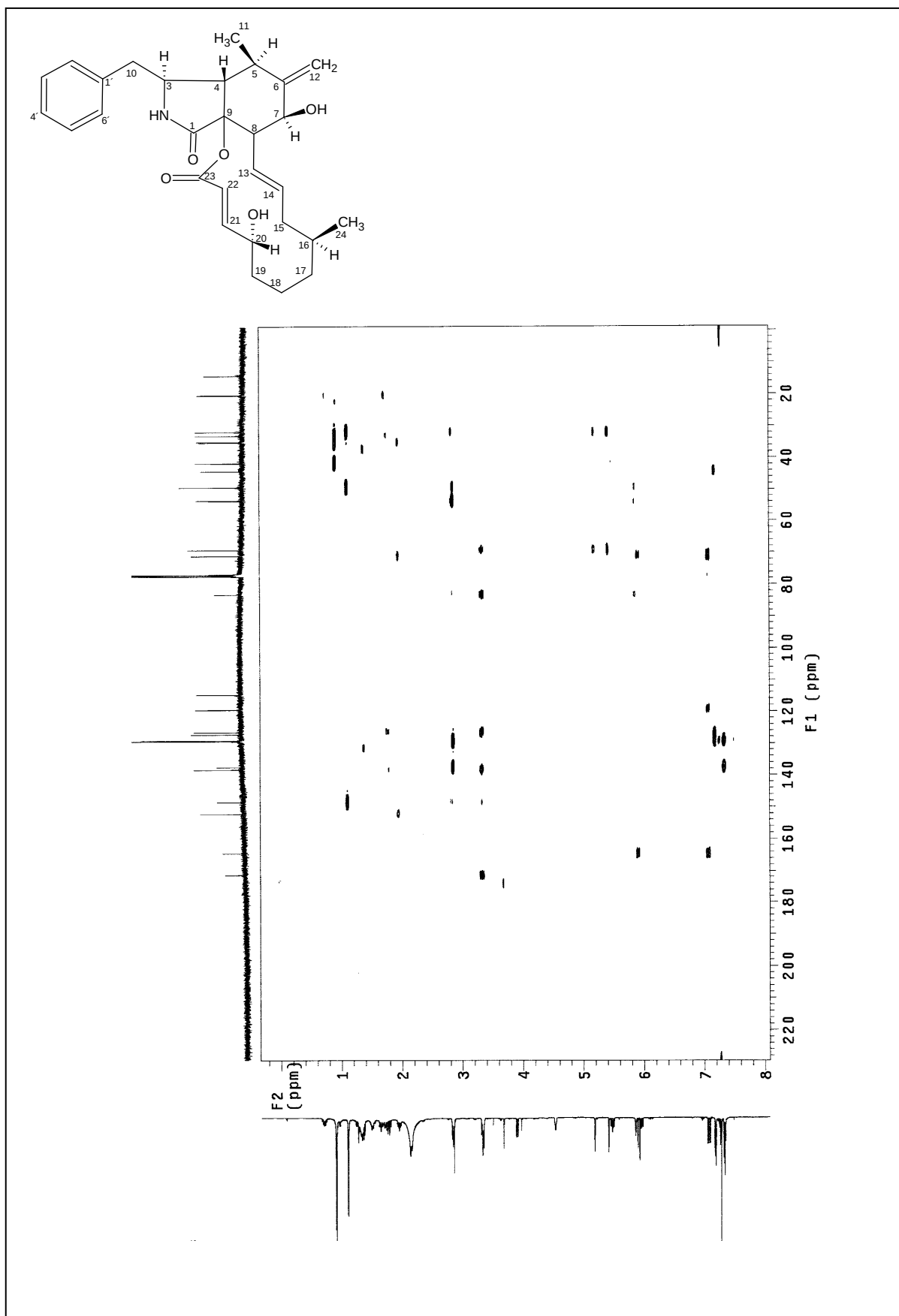


Figura 40 - Mapa de contorno g HMBC de **2** (CDCl_3 , 125 MHz).

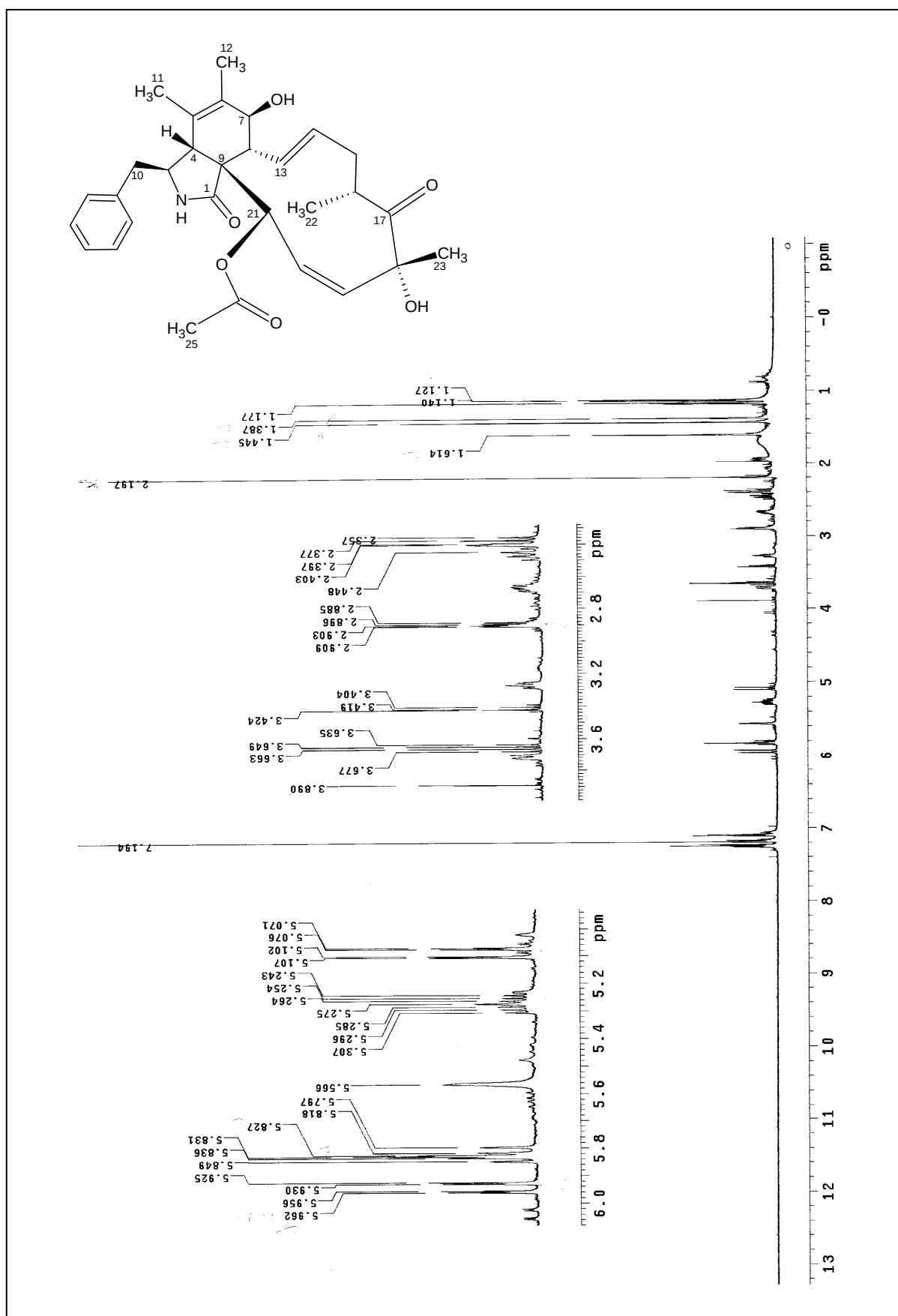


Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H de **4** (CDCl₃, 500 MHz).

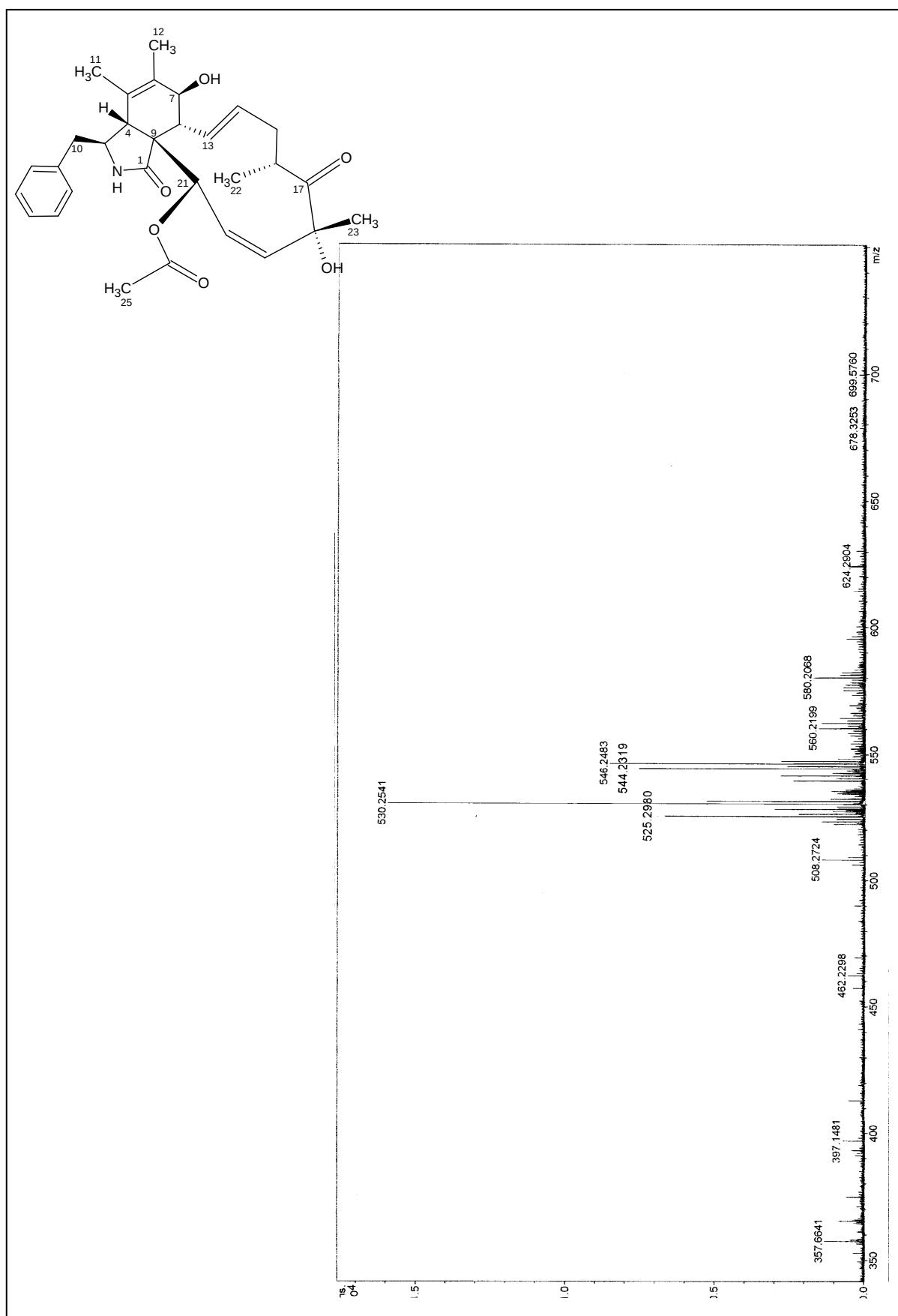


Figura 42 - Espectro de Massas de **4** (ESI-EM +120V).

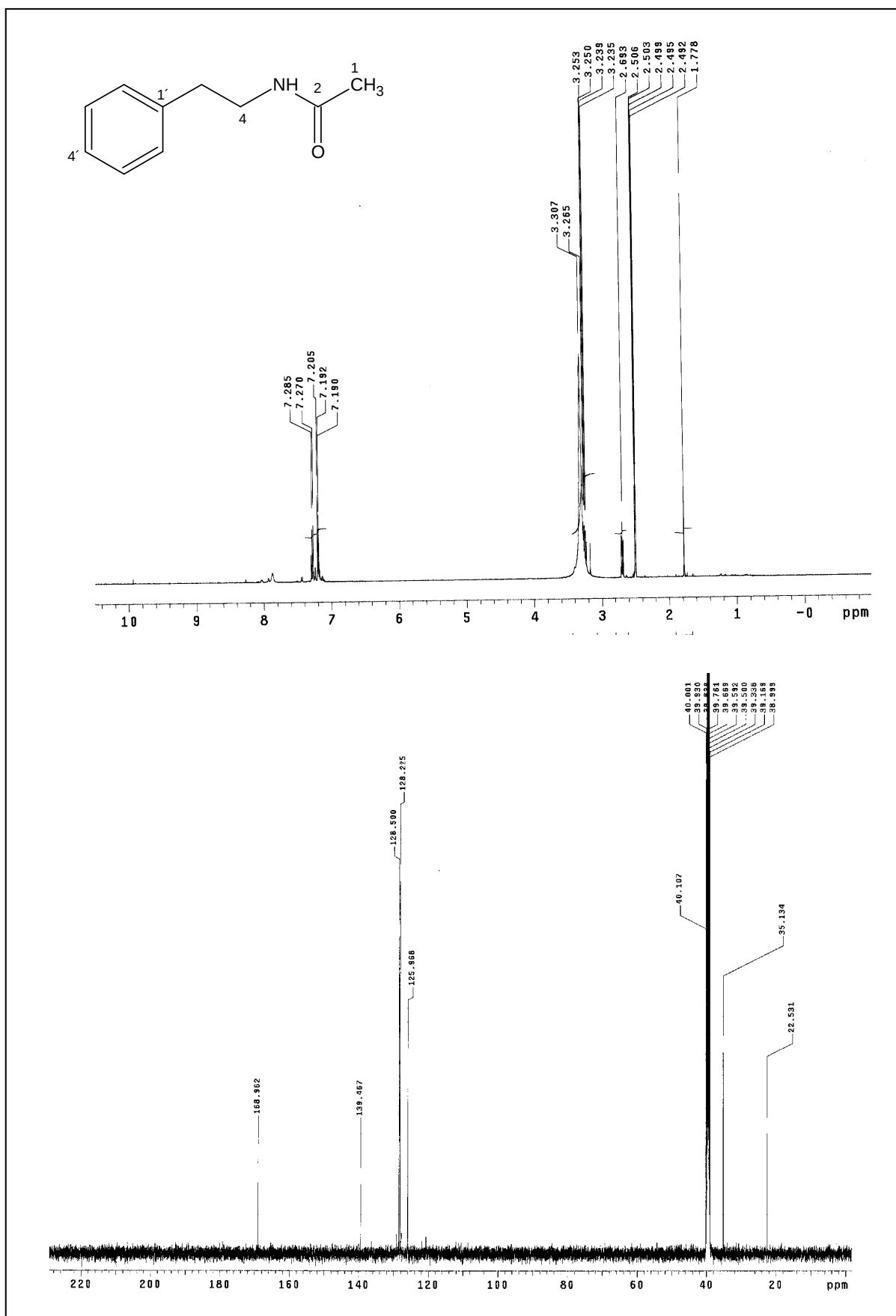


Figura 43 - Espectro de RMN de ¹H de **12** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

Figura 44 - Espectro de RMN de ¹³C de **12** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

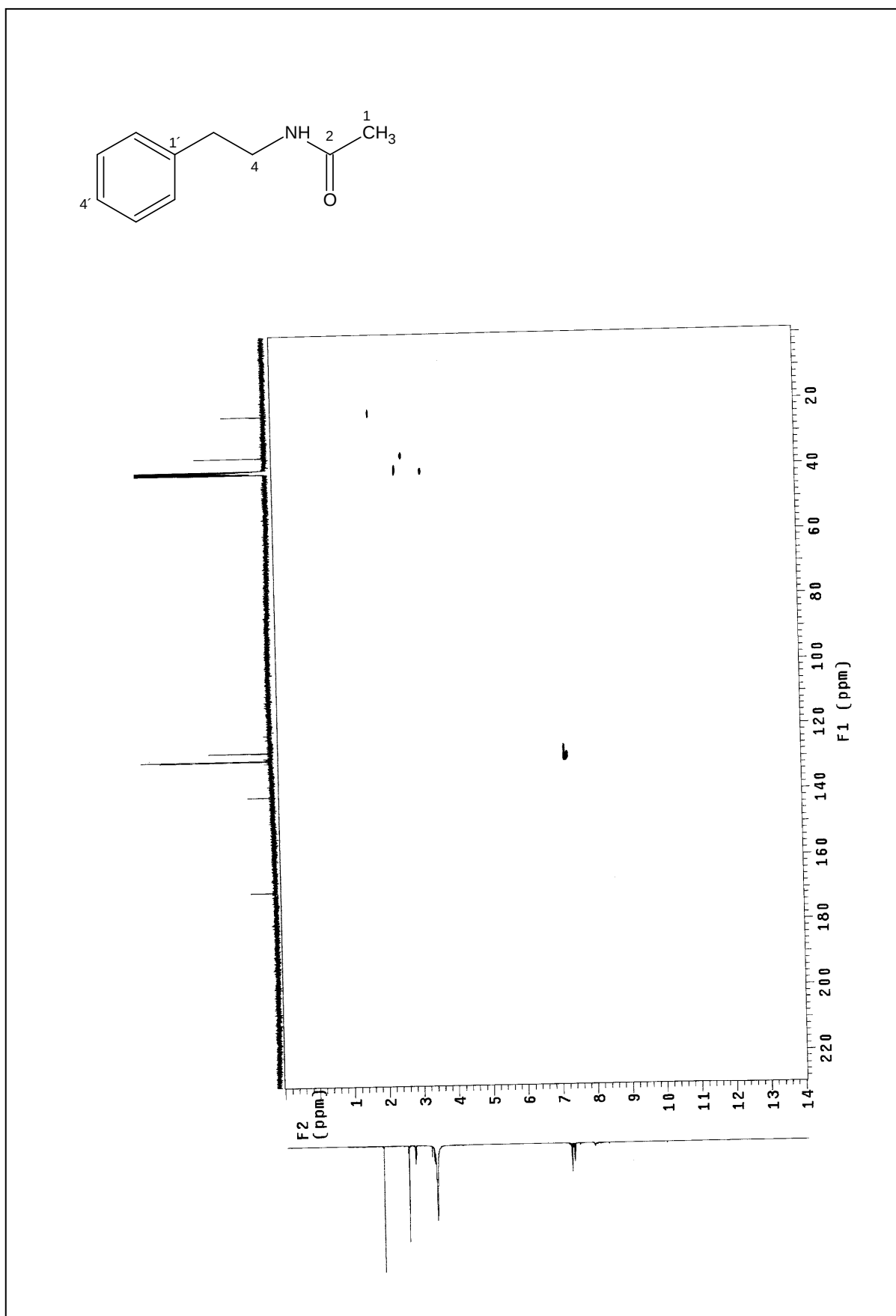


Figura 45 - Mapa de contorno *g*HMQC de **12** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

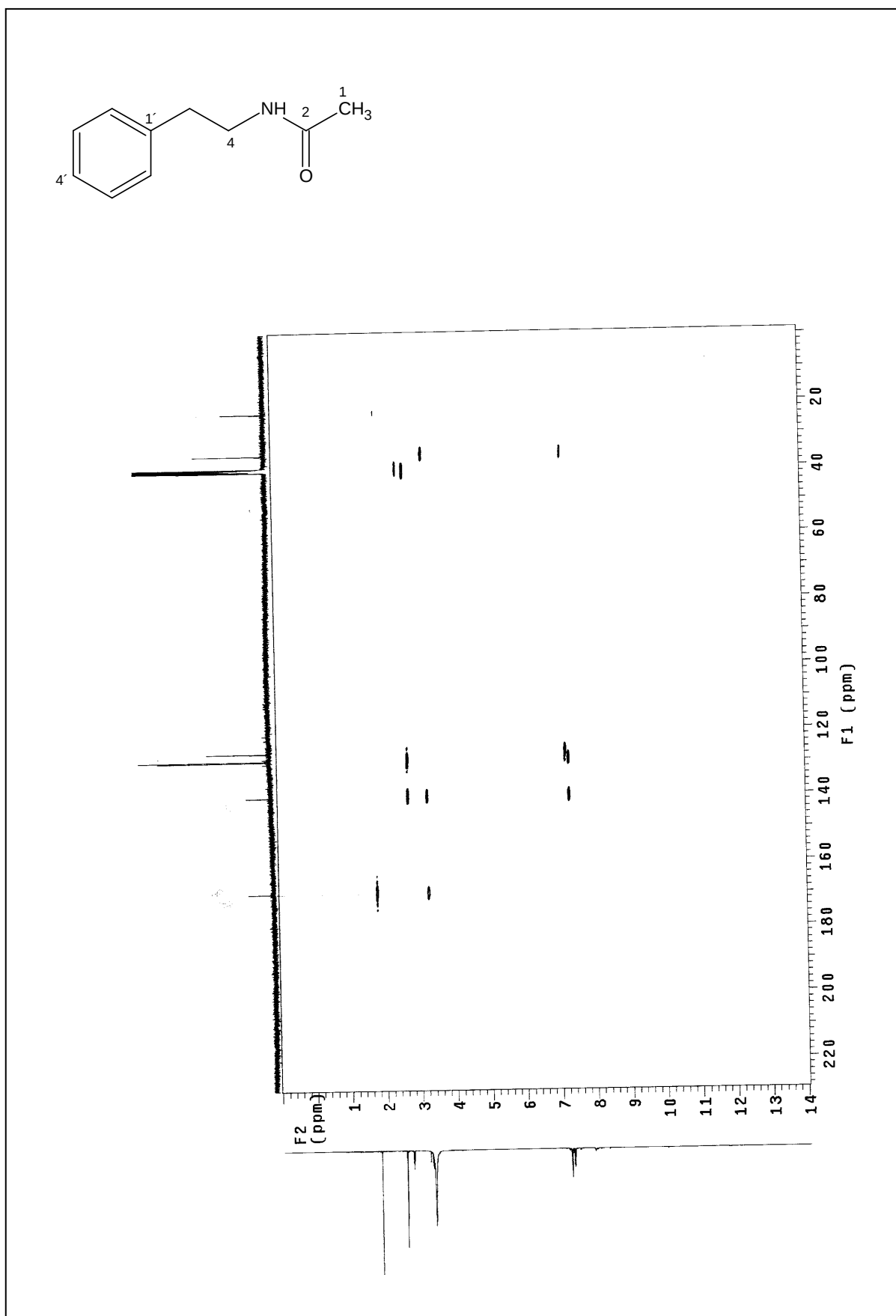


Figura 46 - Mapa de contorno *g*HMBC de **12** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

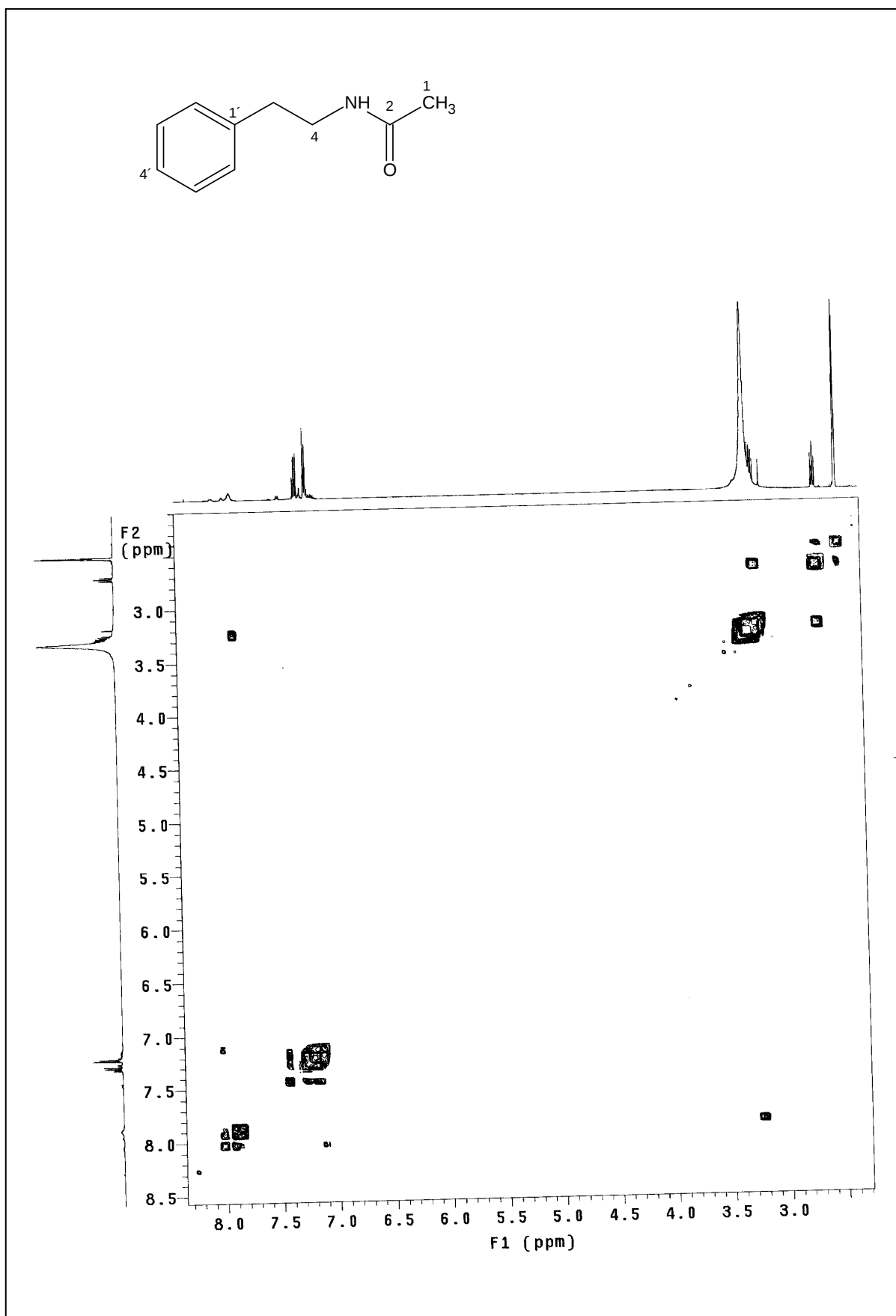


Figura 47 - Espectro de *g*COSY de **12** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

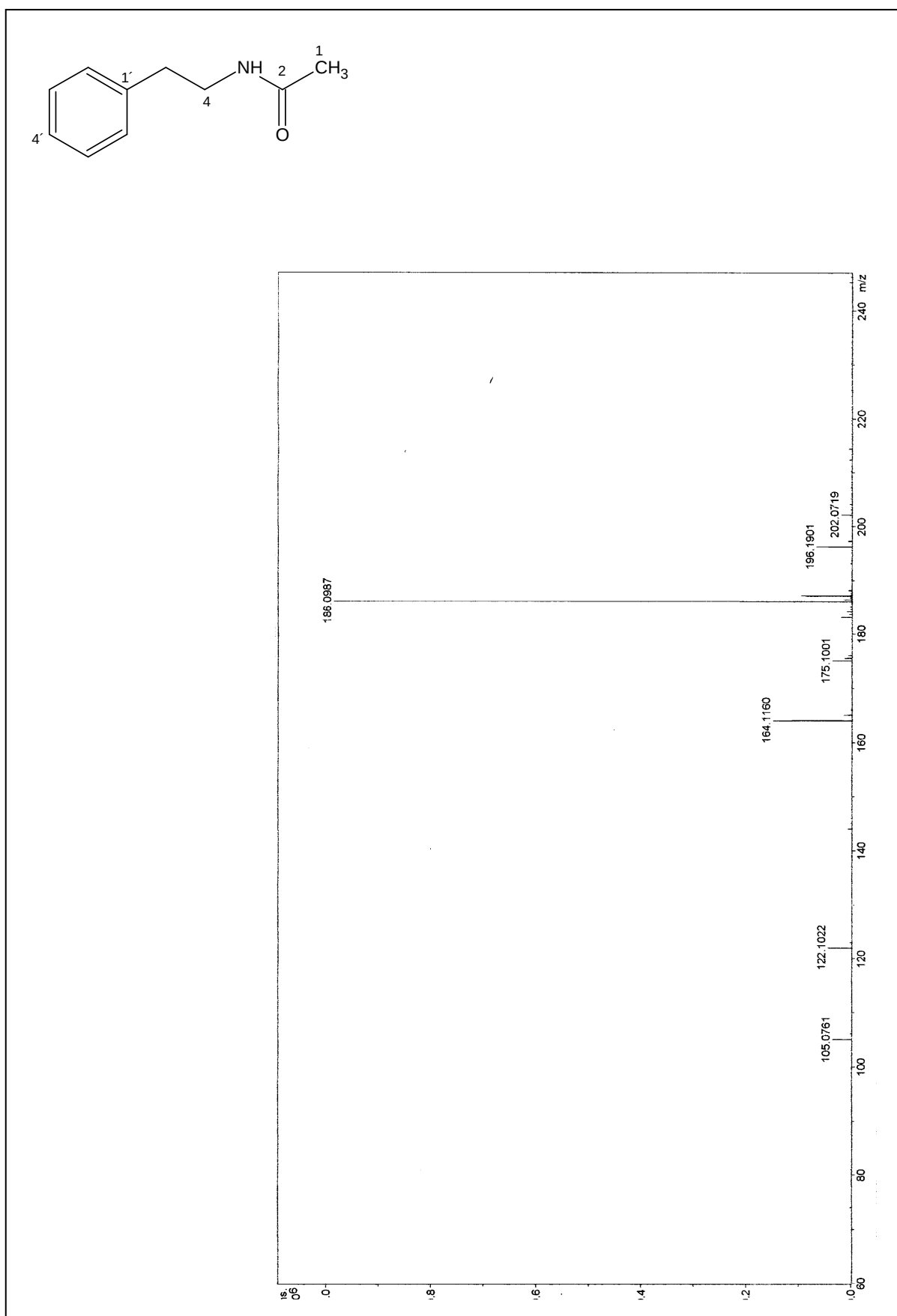


Figura 48 - Espectro de Massas de **12** (ESI-EM +120V).

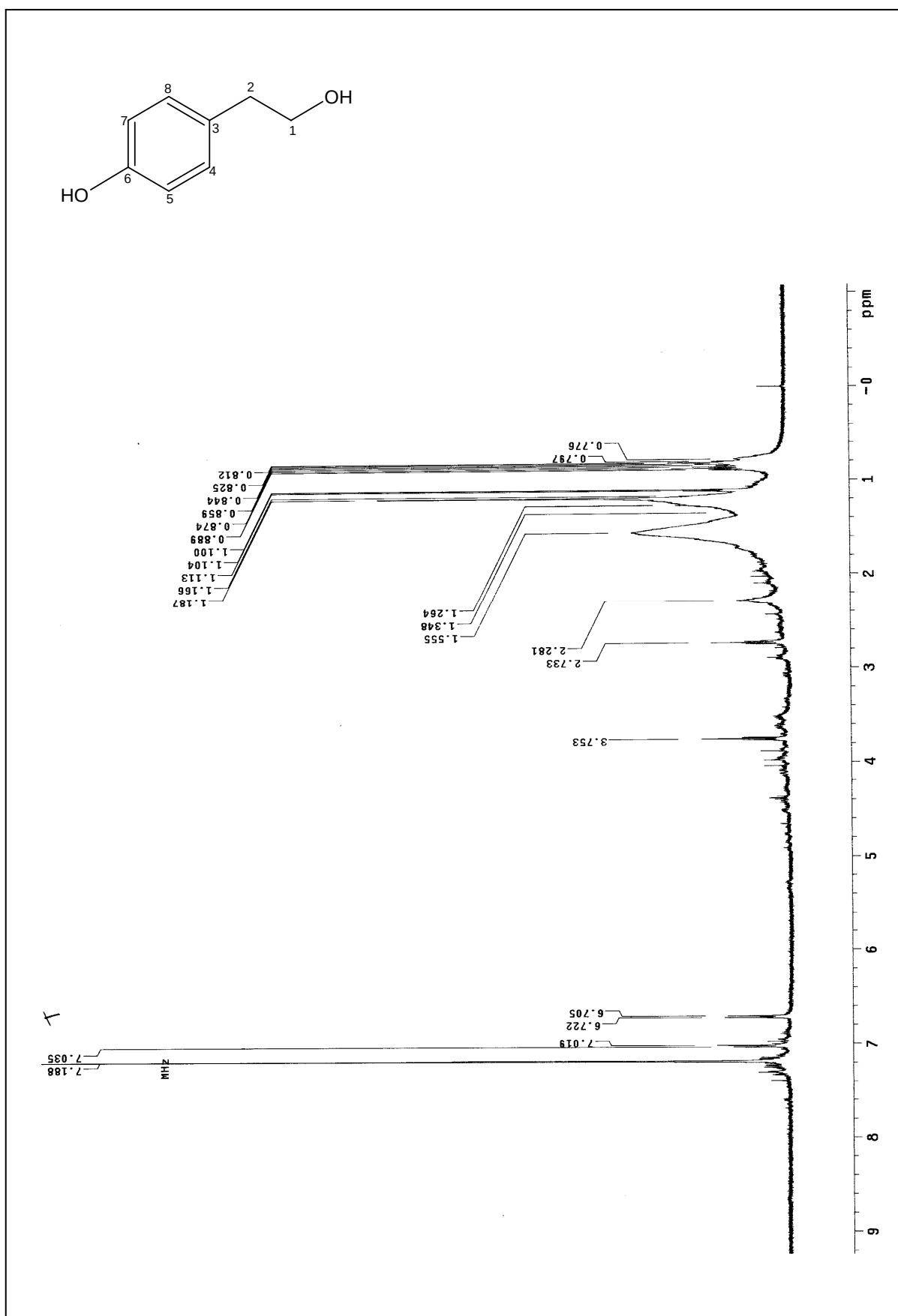


Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H de **17** (CDCl_3 , 500 MHz).

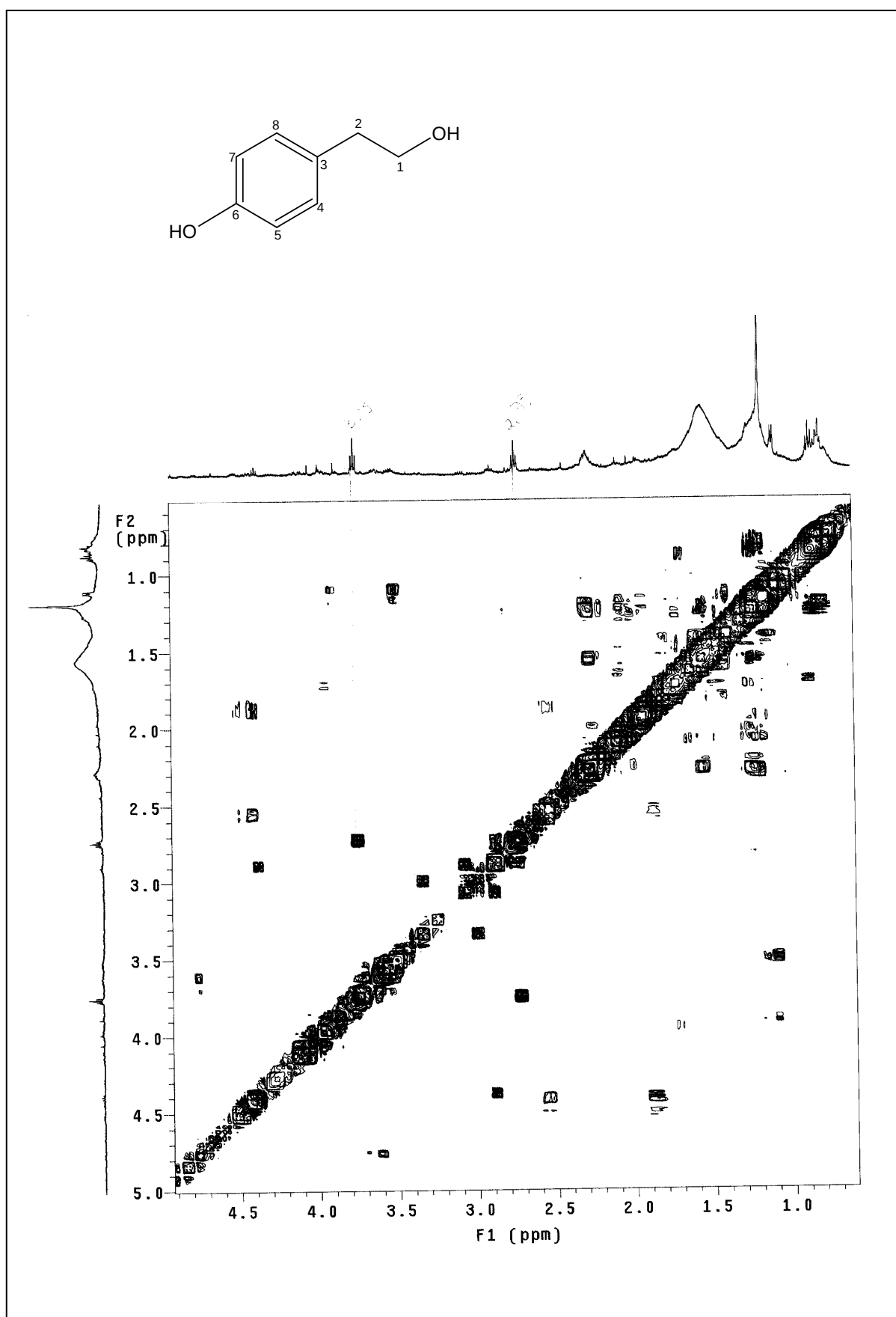


Figura 50 - Espectro de *g*COSY ampliado de **17** (CDCl₃, 500 MHz).

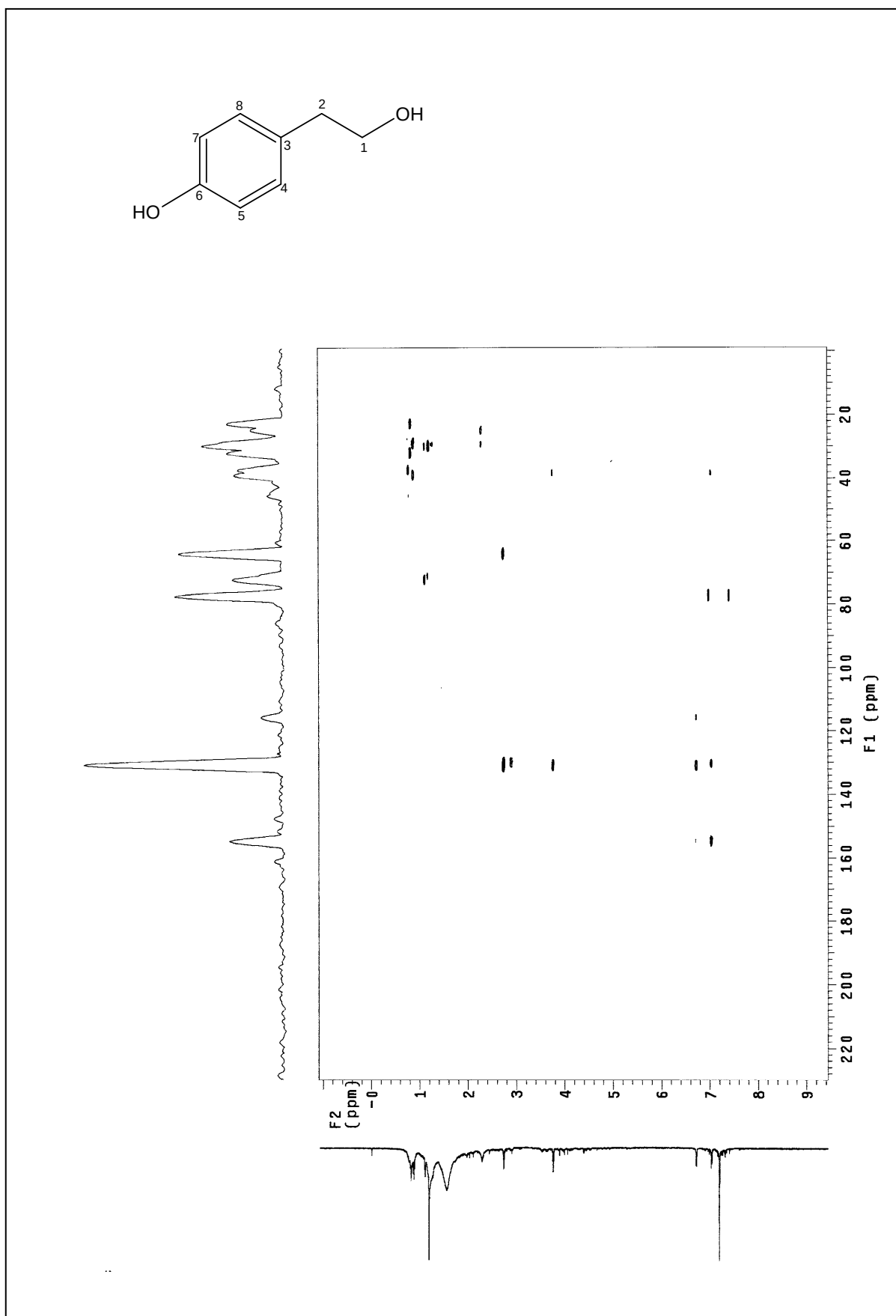
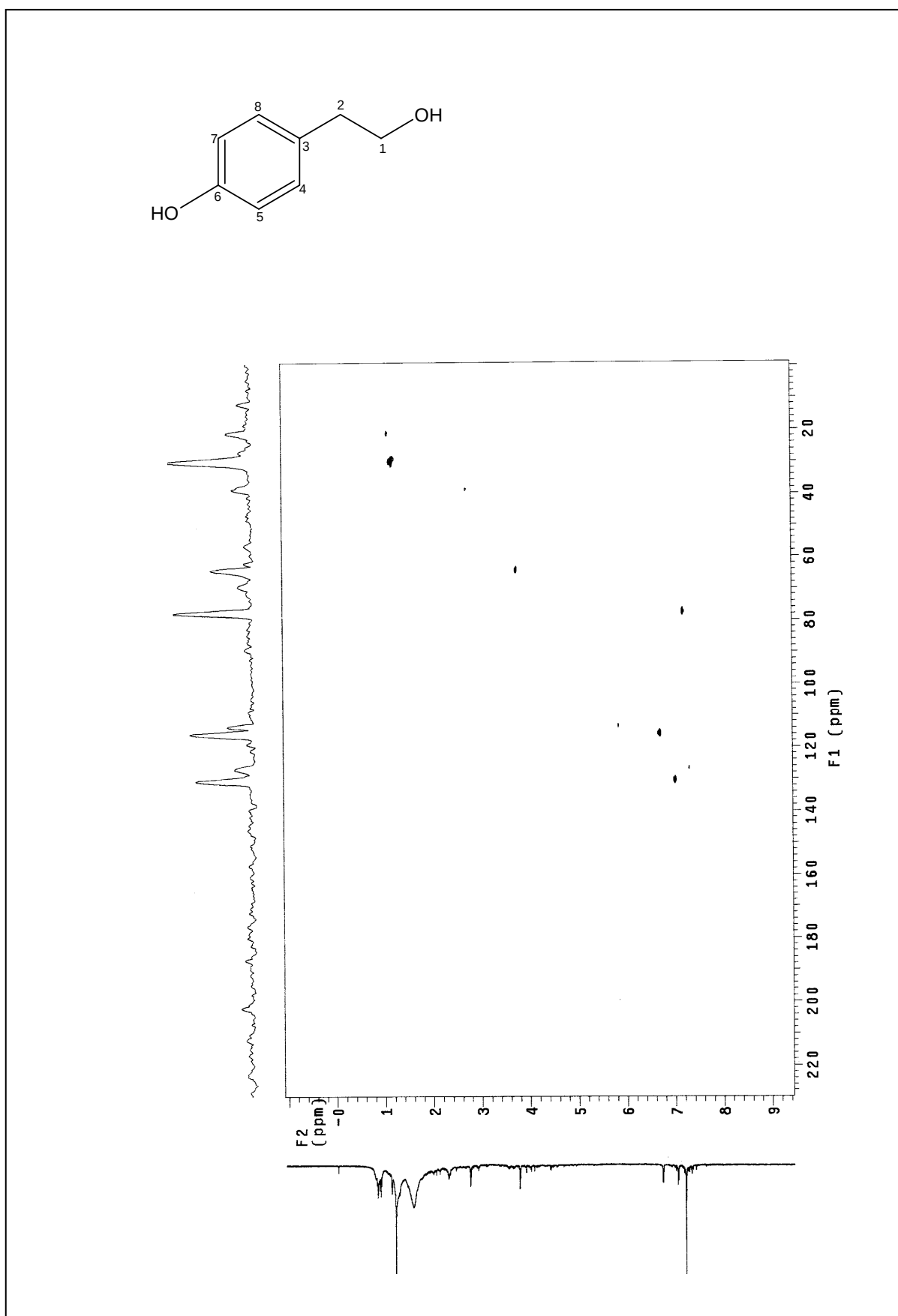


Figura 51 - Mapa de contorno g HMBC de **17** (CDCl_3 , 125 MHz).



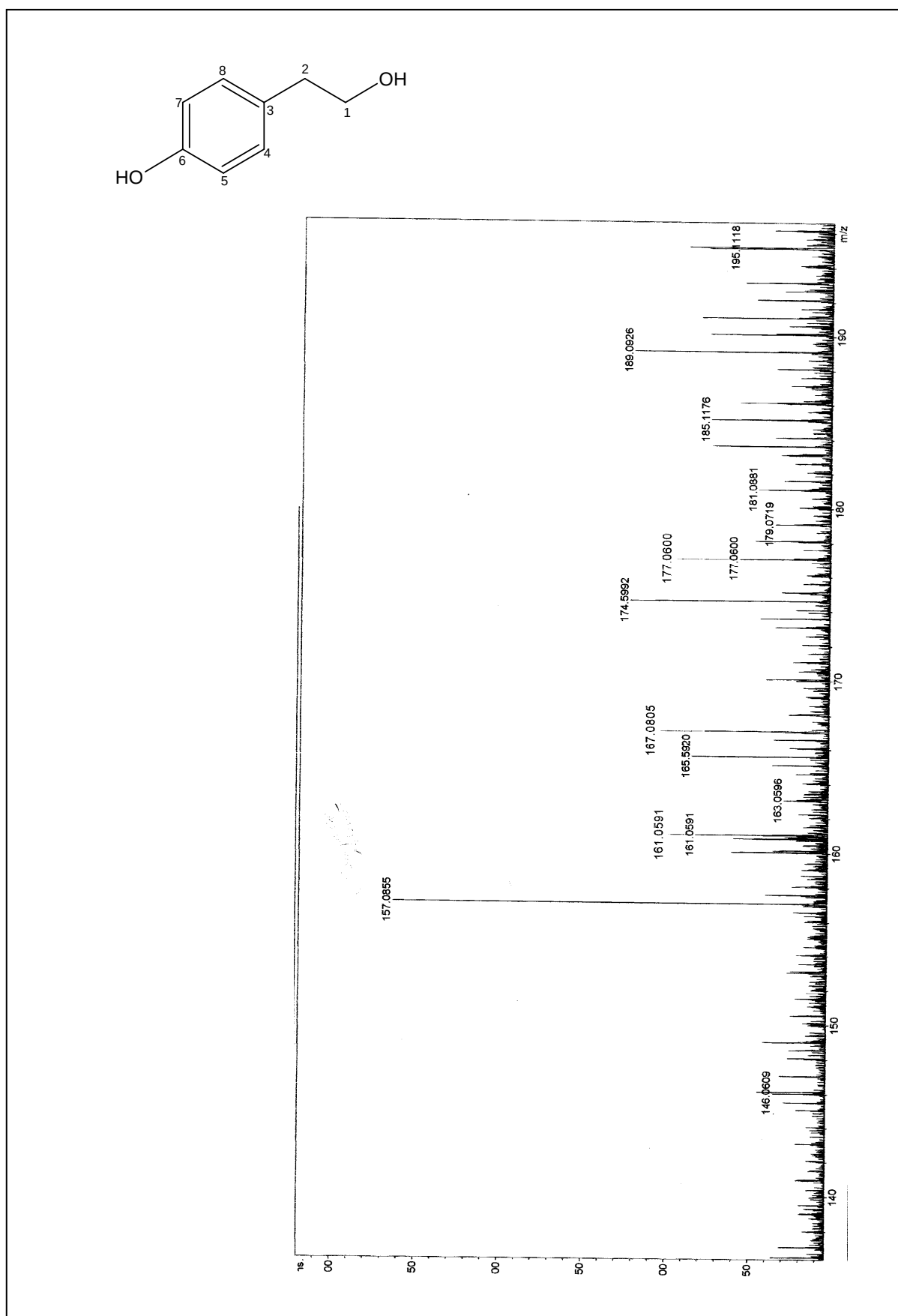


Figura 53 - Espectro de Massas de **17** (ESI-EM +120V).

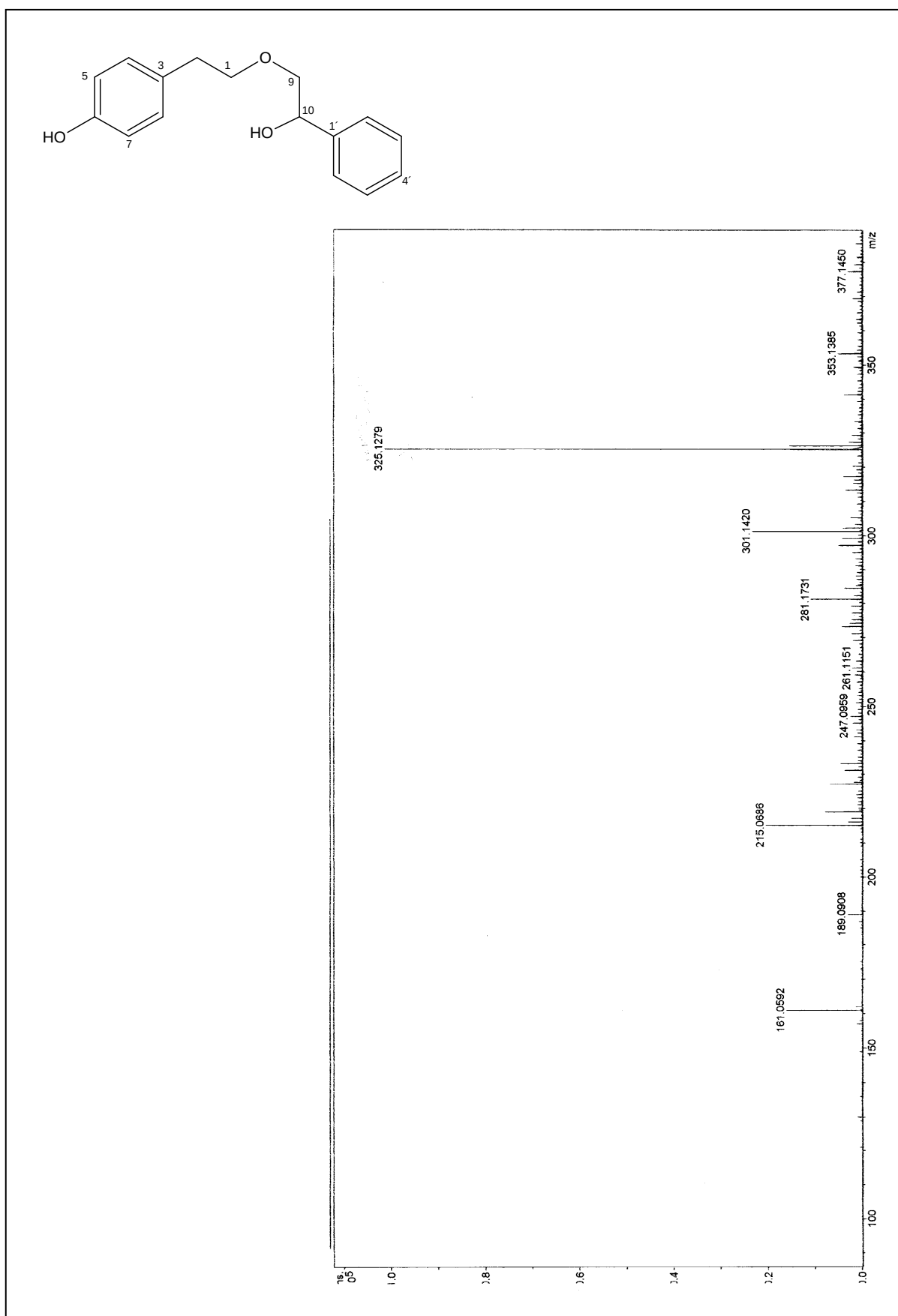


Figura 54 - Espectro de Massas de **18** (ESI-EM +120V).

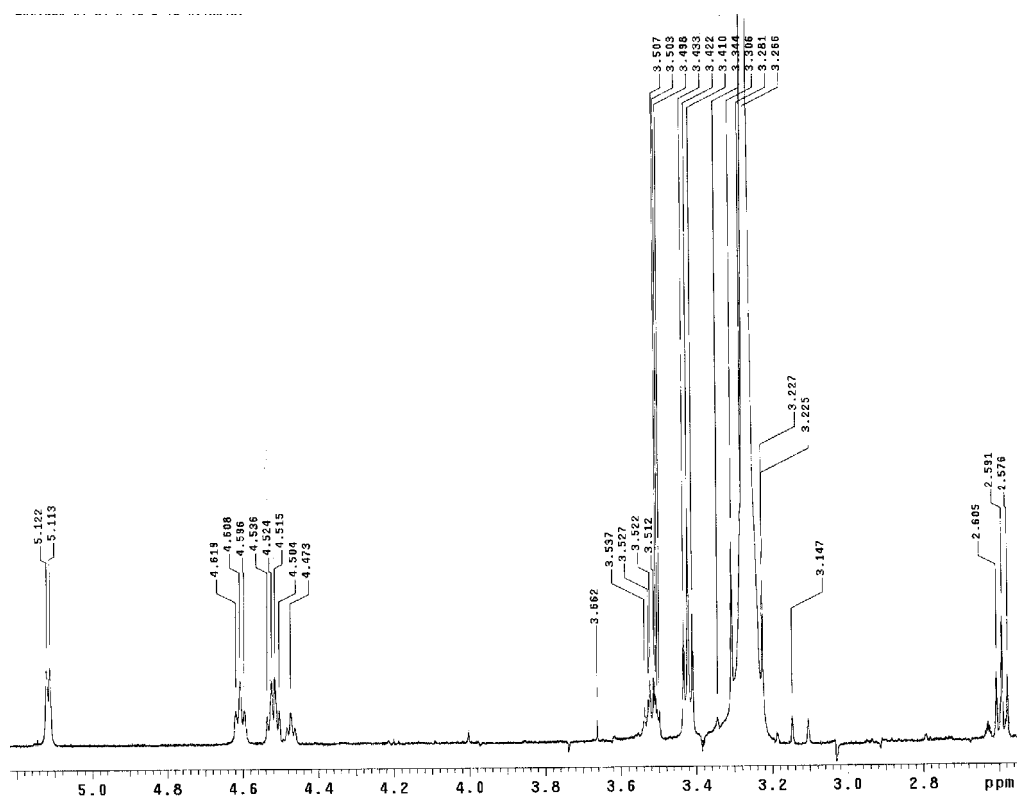
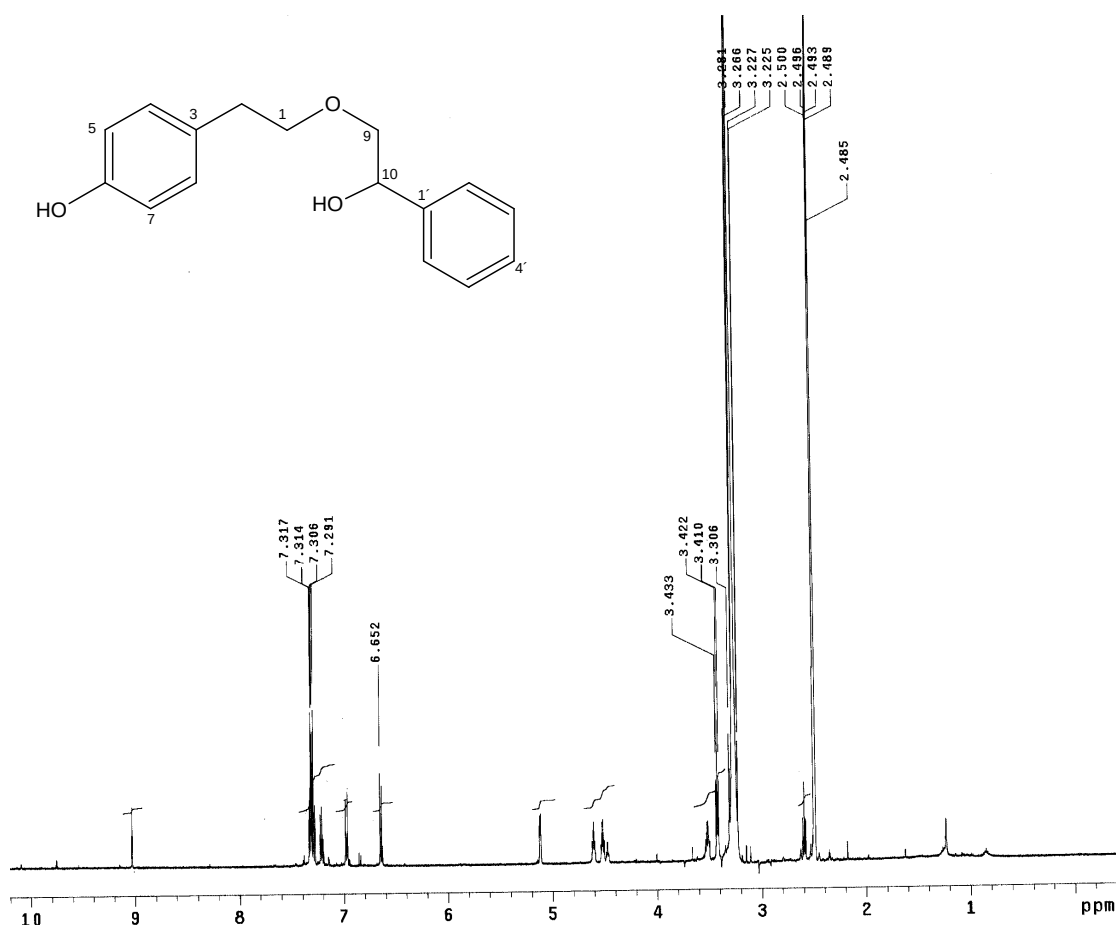


Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **18** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

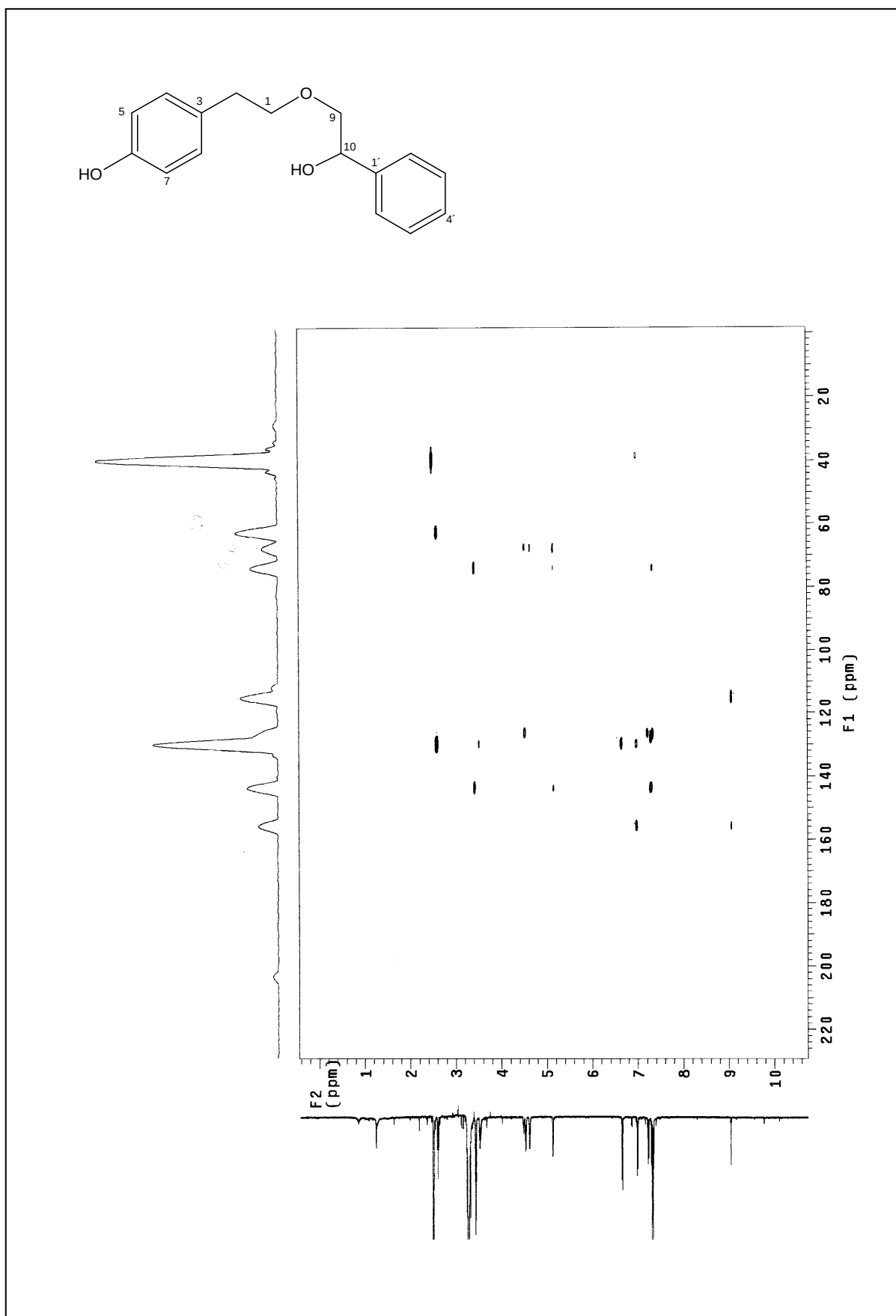


Figura 57 - Mapa de contorno *g*HMBC de **18** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

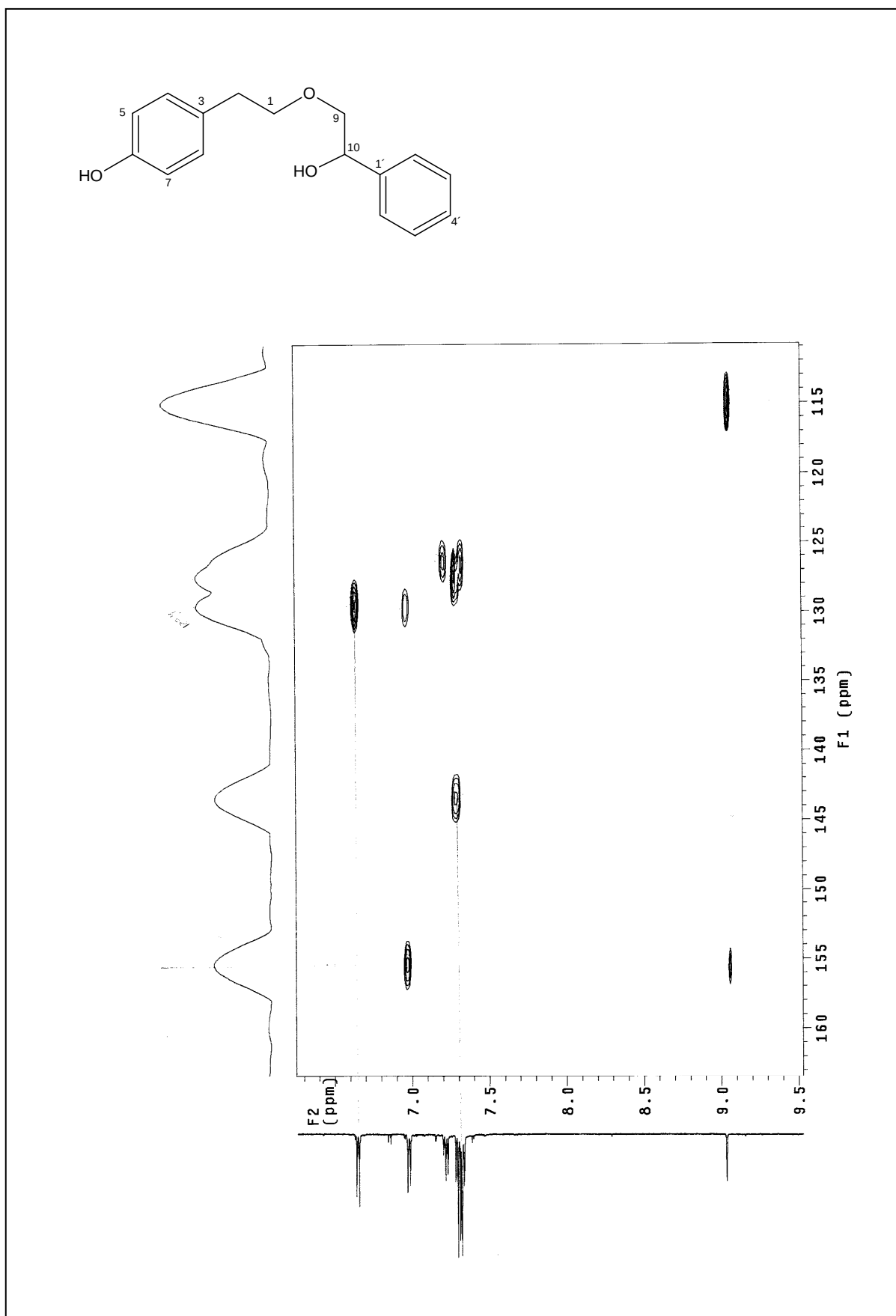


Figura 58 - Mapa de contorno ampliado *g*HMBC de **18** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

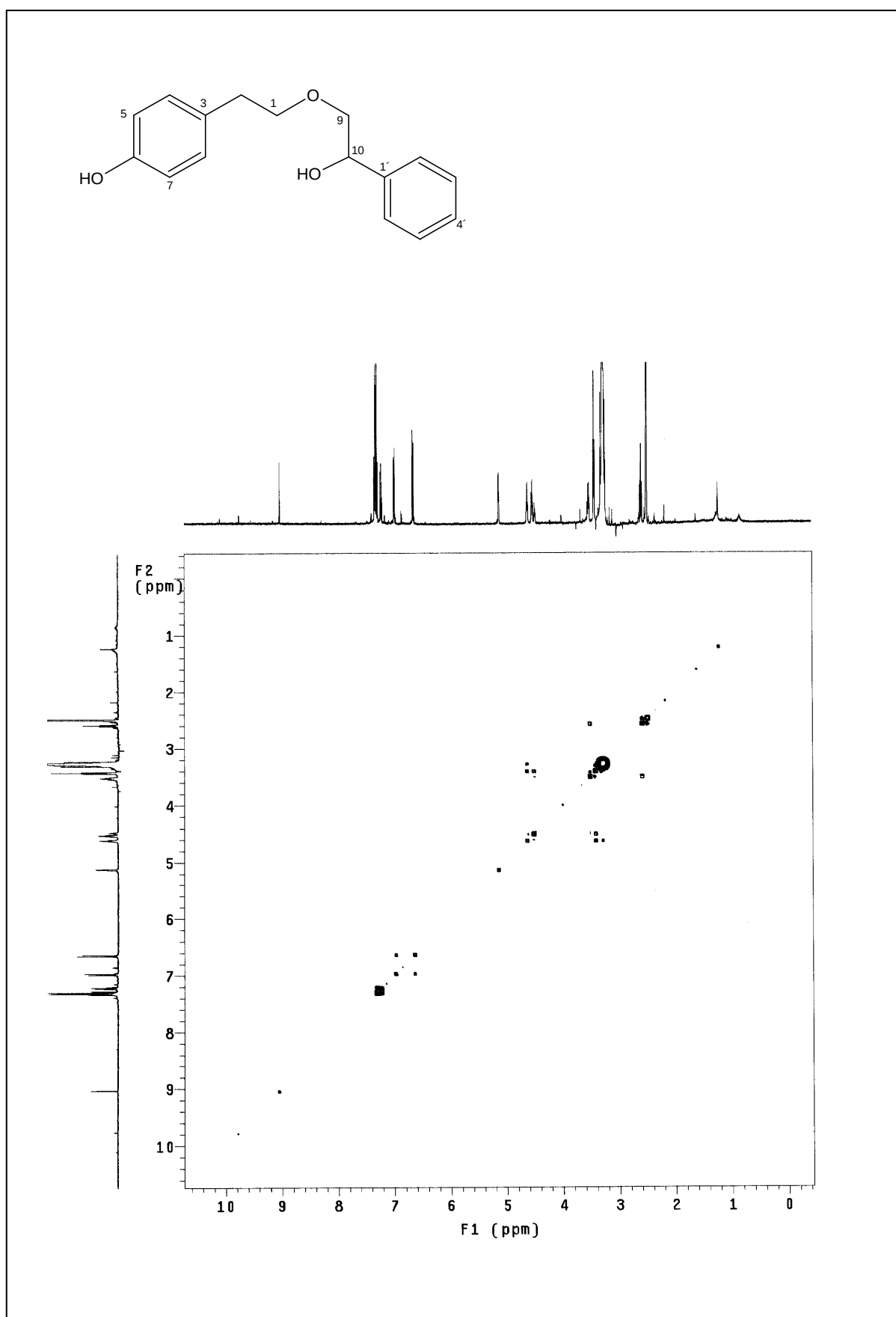


Figura 59 - Espectro de $g\text{COSY}$ de **18** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

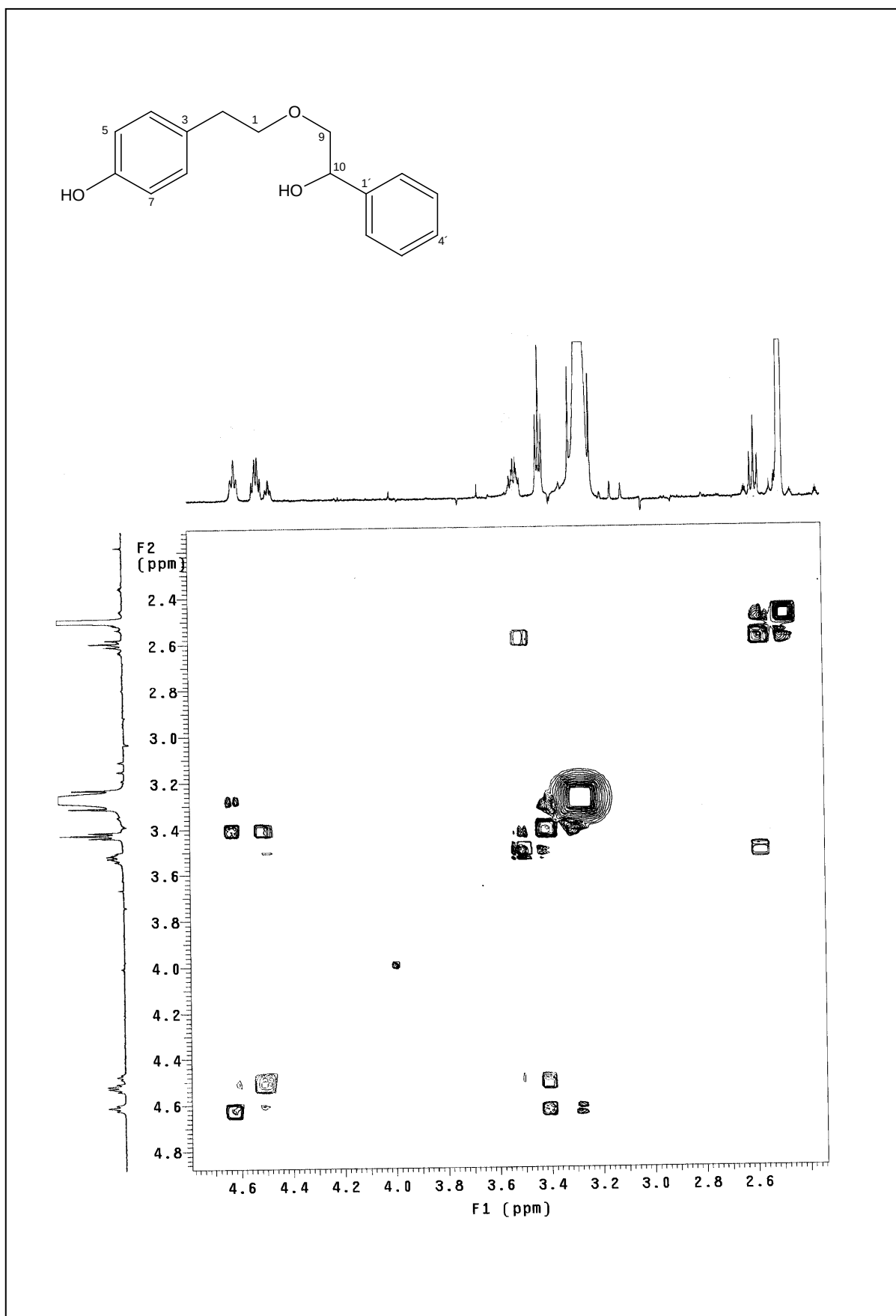


Figura 60 - Espectro de $g\text{COSY}$ ampliado de **18** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

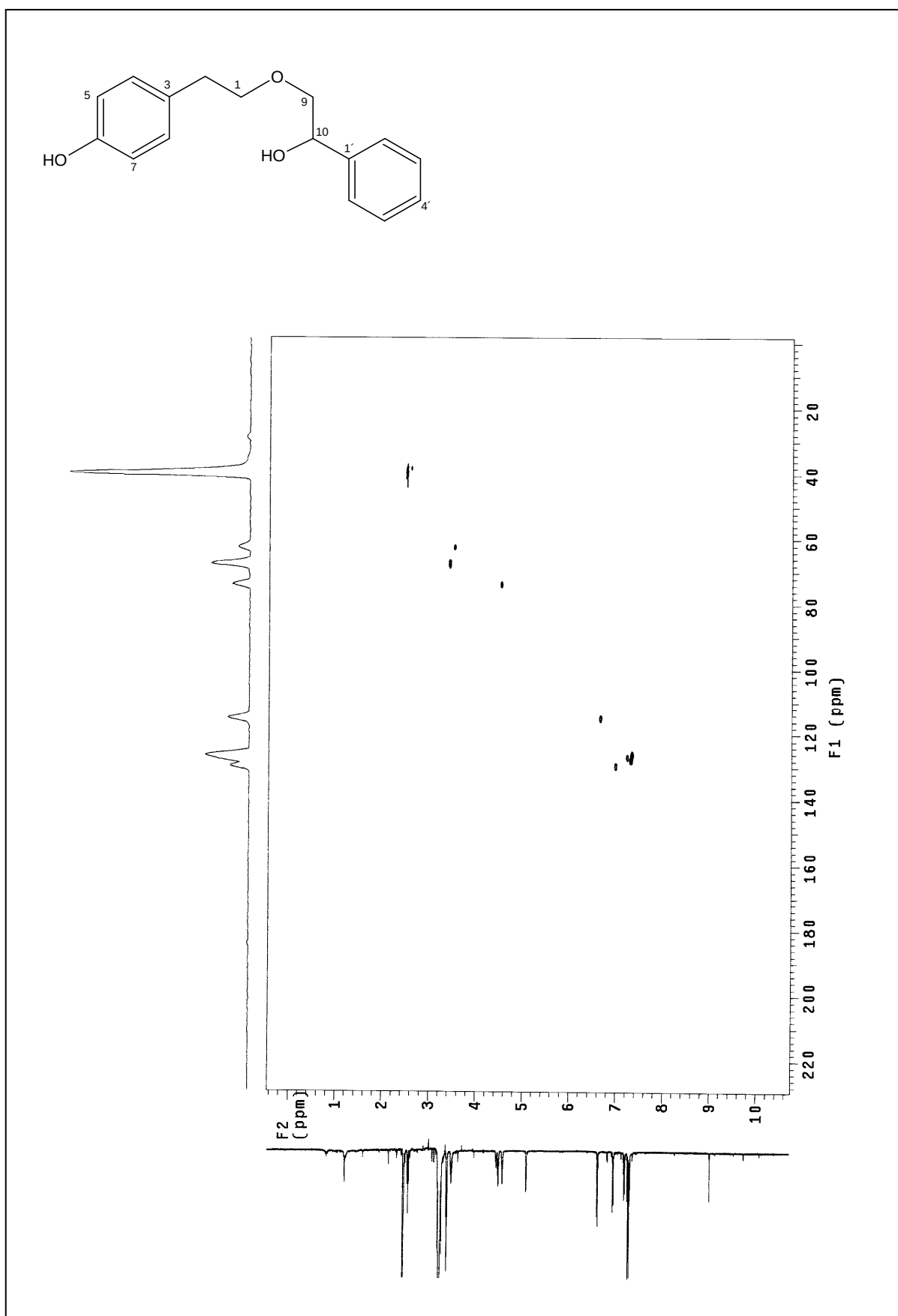


Figura 61 - Mapa de contorno *g*HMQC de **18** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

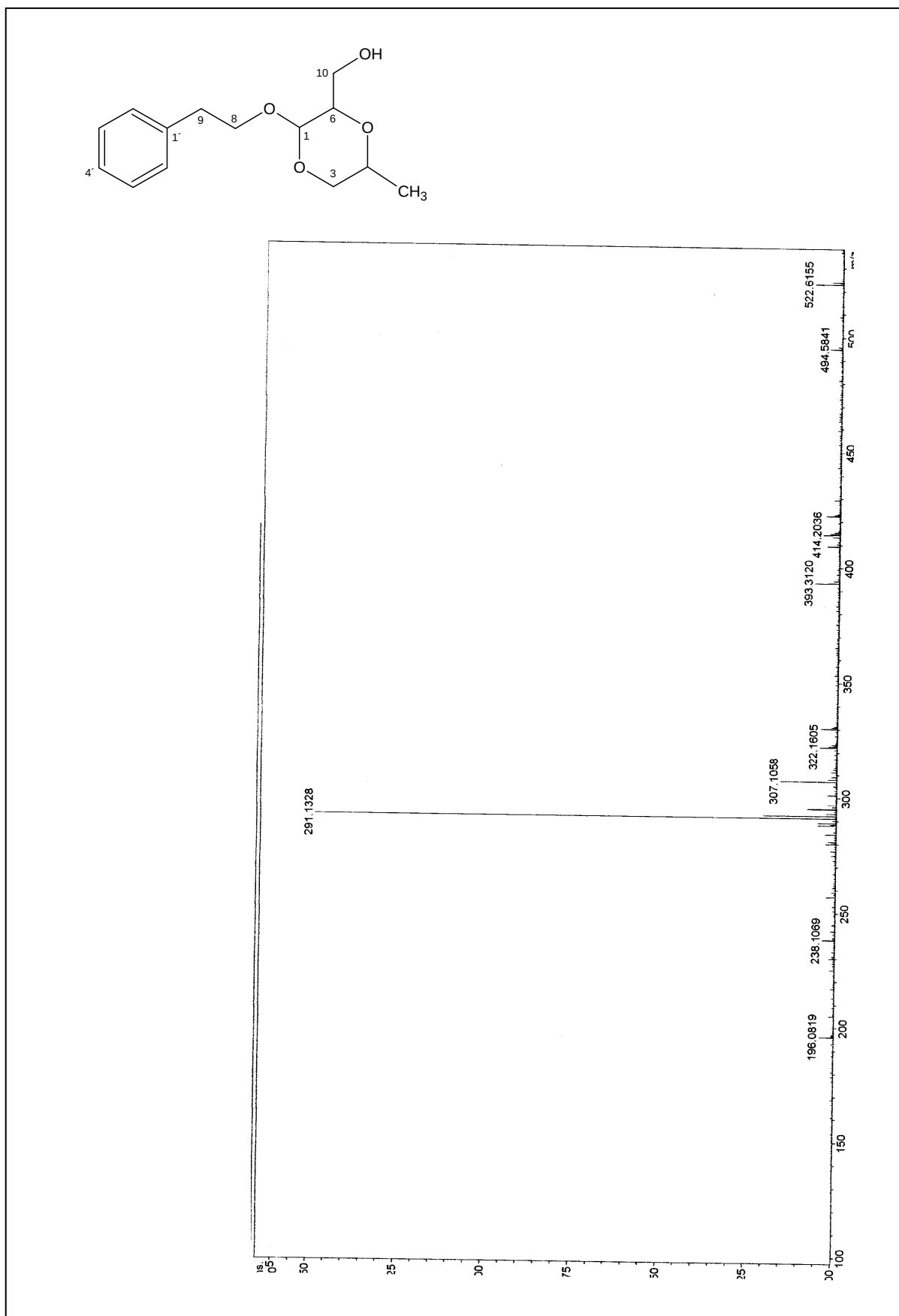


Figura 62 - Espectro de Massas de **13** (ESI-EM +120V).

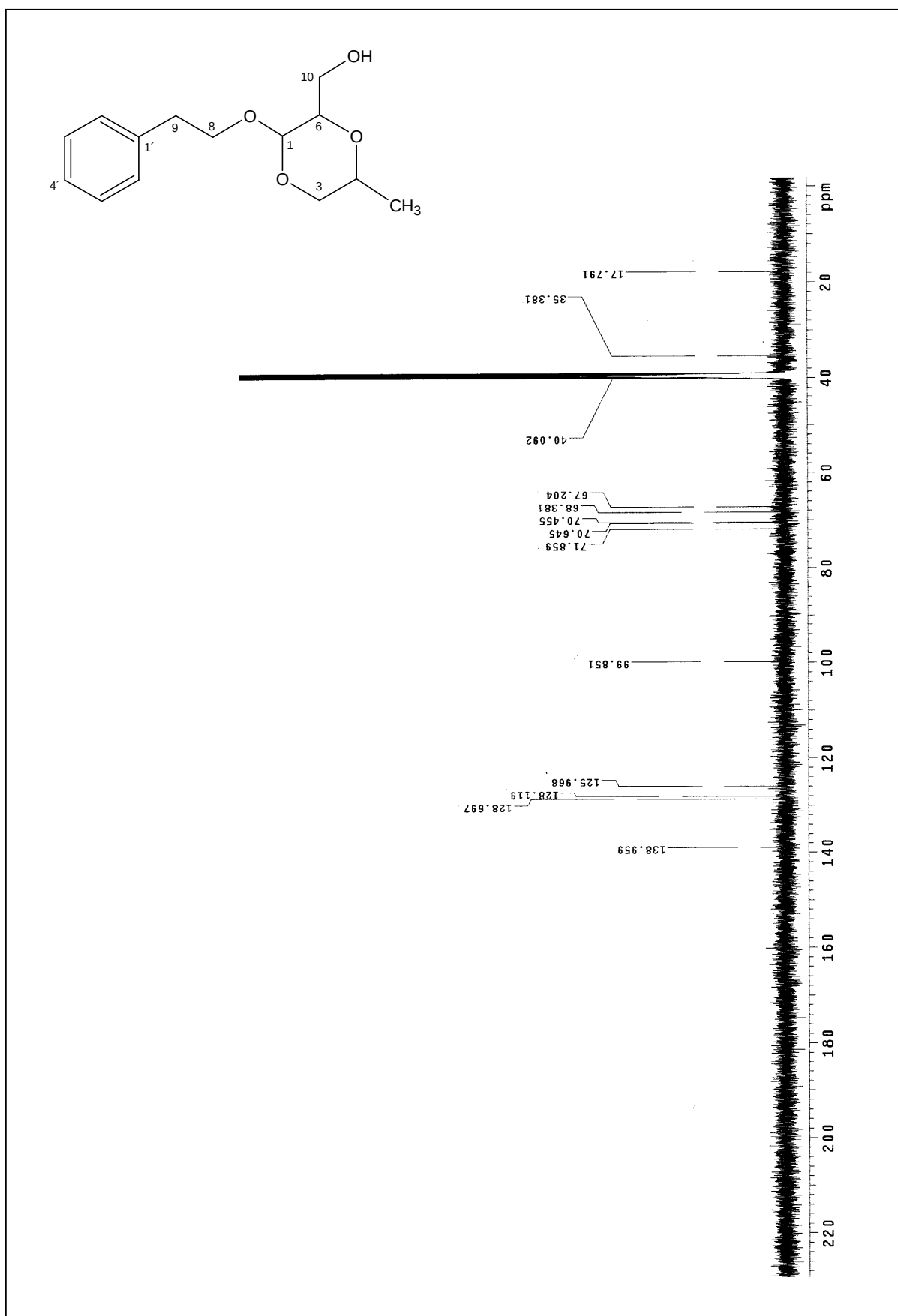


Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C de **13** ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

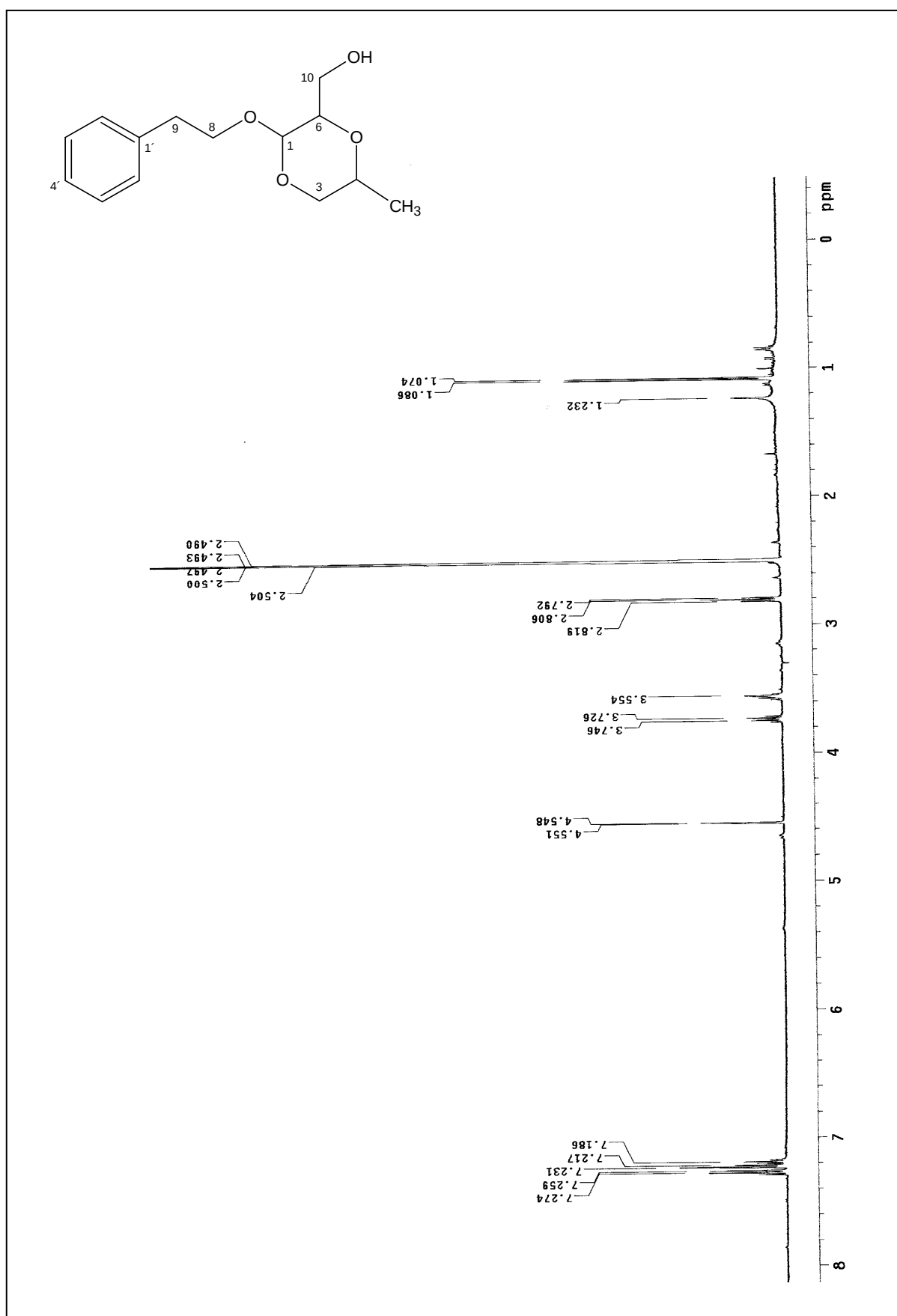


Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H de **13** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

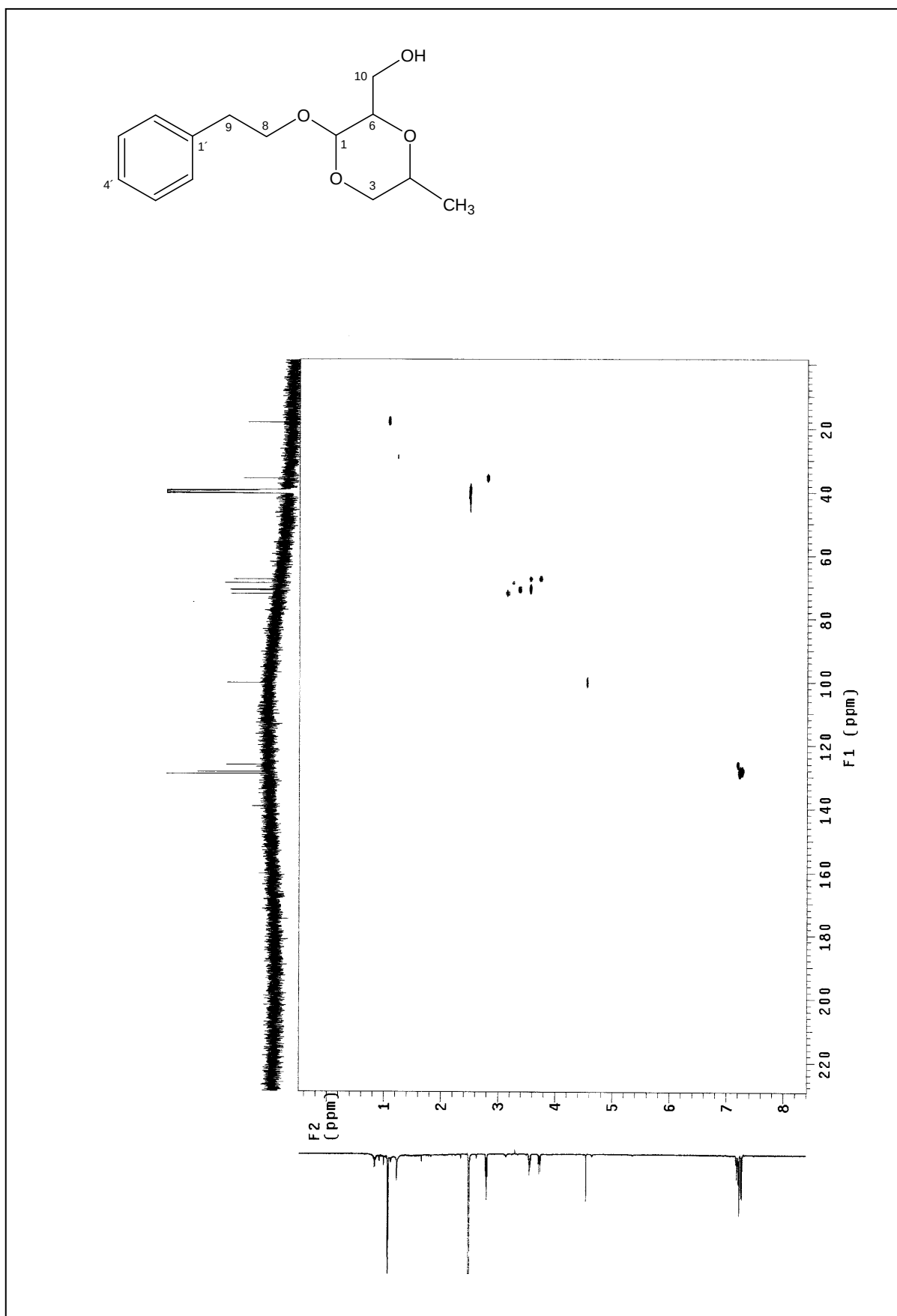


Figura 65 - Mapa de contorno gHMBC de **13** ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

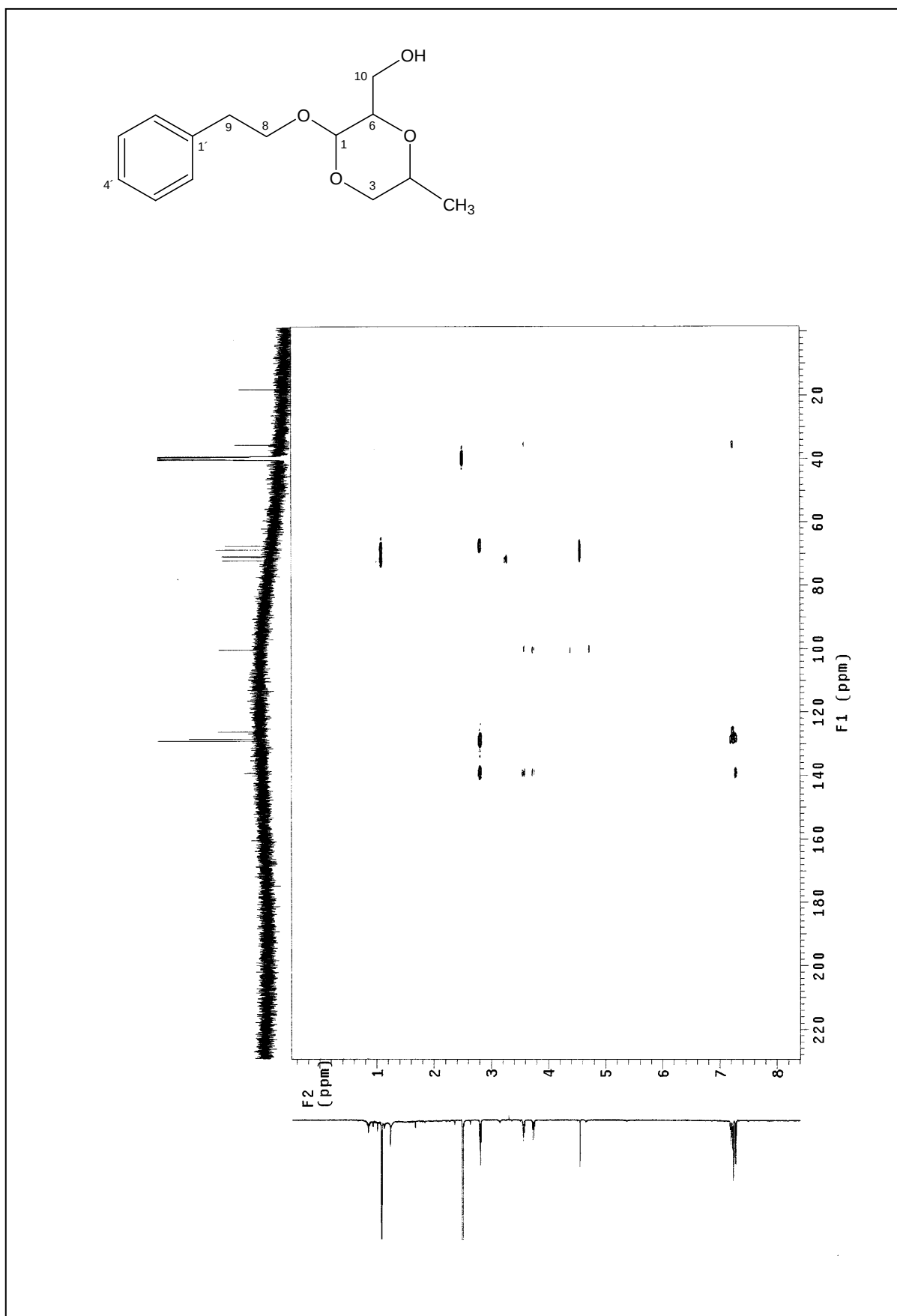


Figura 66 - Mapa de contorno *g*HMBC de **13** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

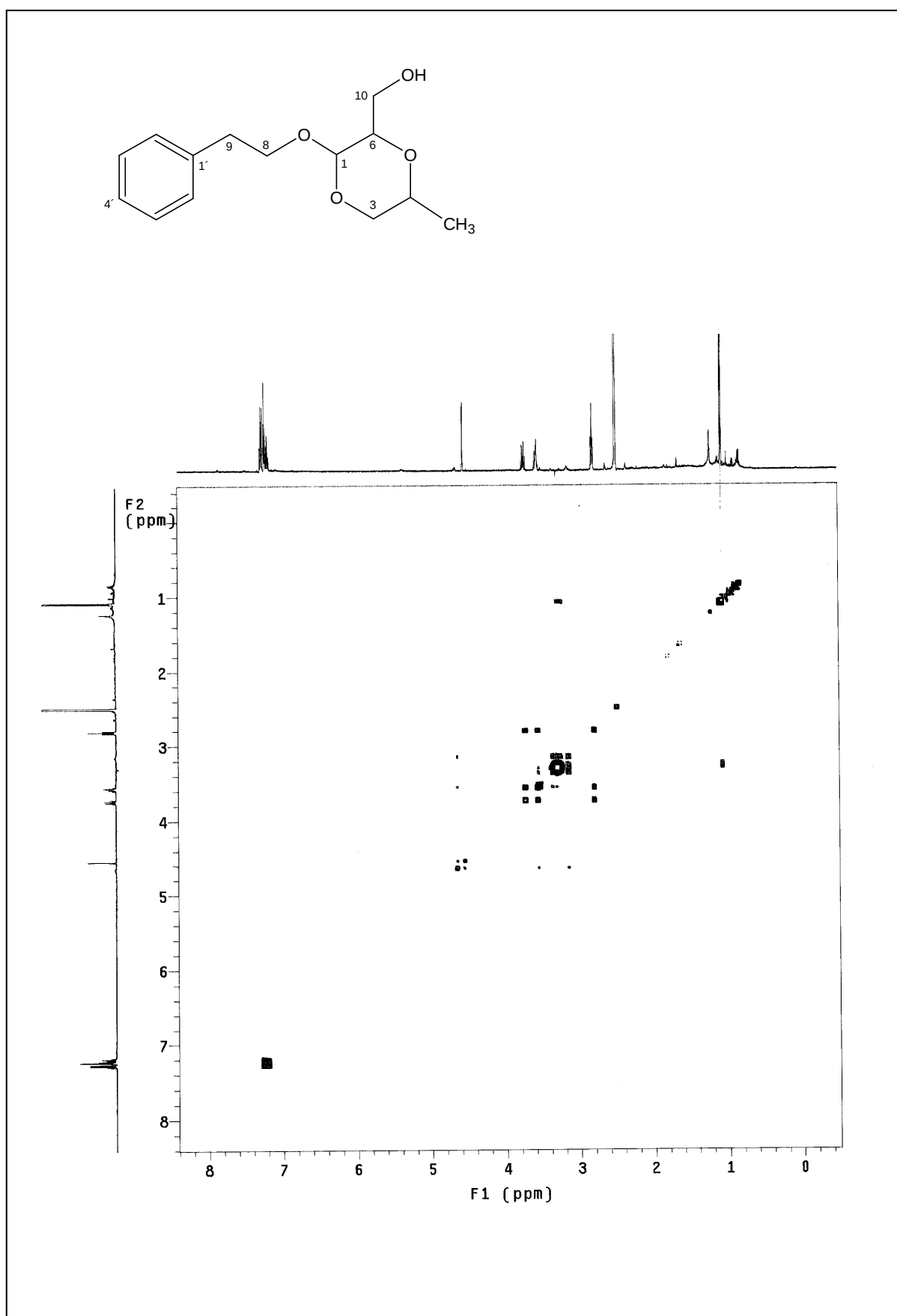


Figura 67 - Espectro de *g*COSY de **13** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

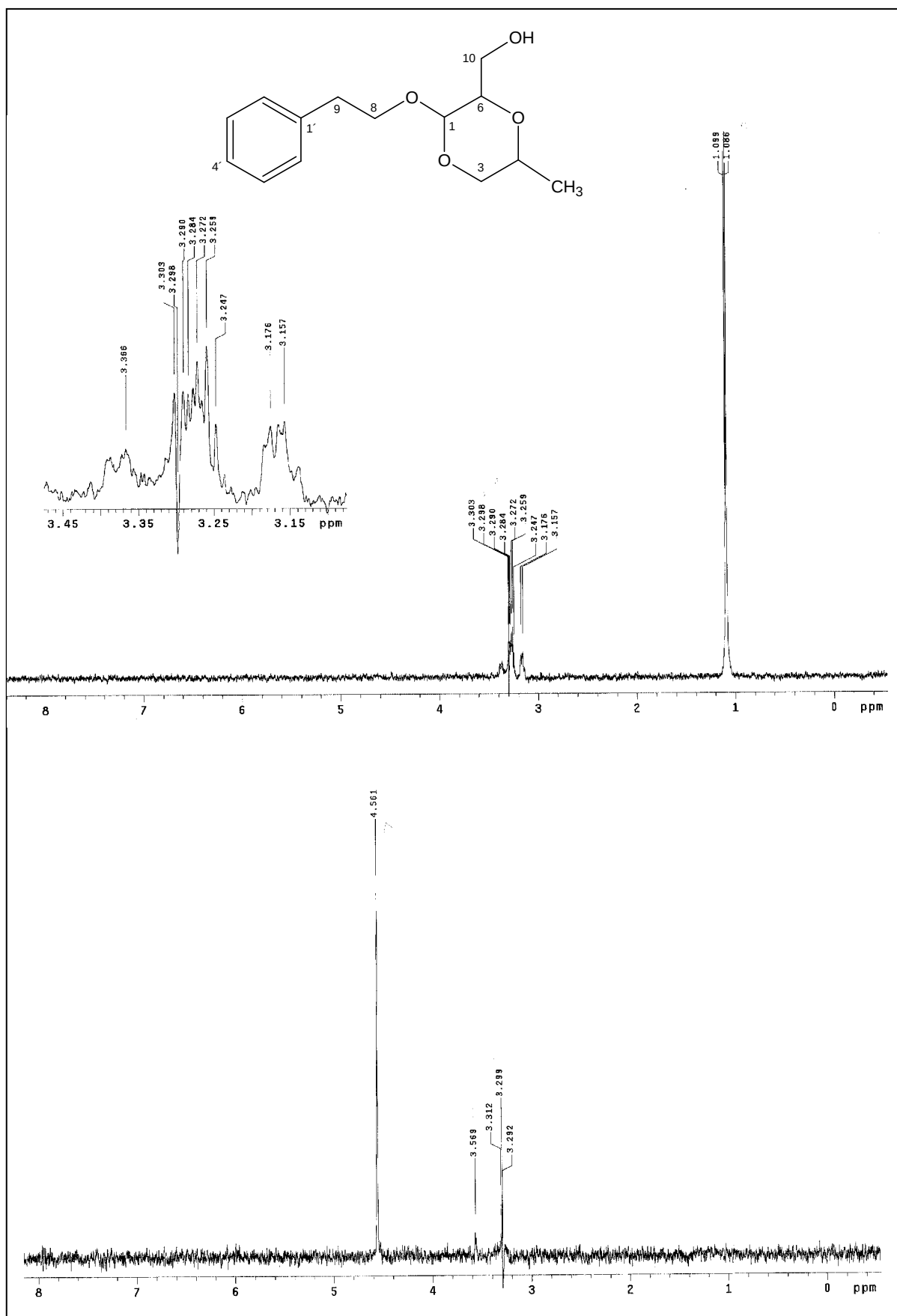


Figura 68 - Espectro de TOCSY-1D de **13** (DMSO-*d*₆).

Figura 69 - Espectro de TOCSY-1D de **13** (DMSO-*d*₆).

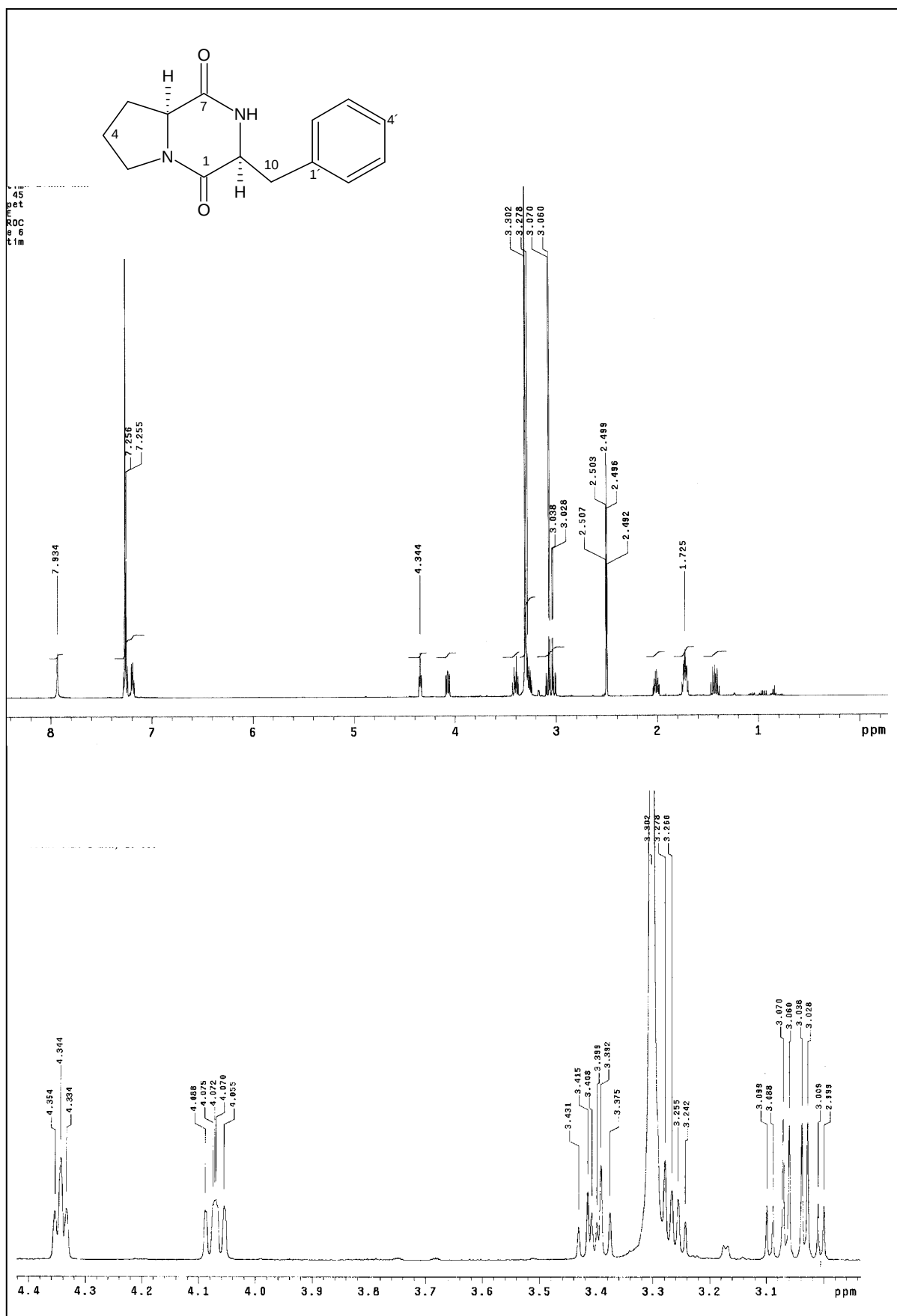


Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H de **10** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **10** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

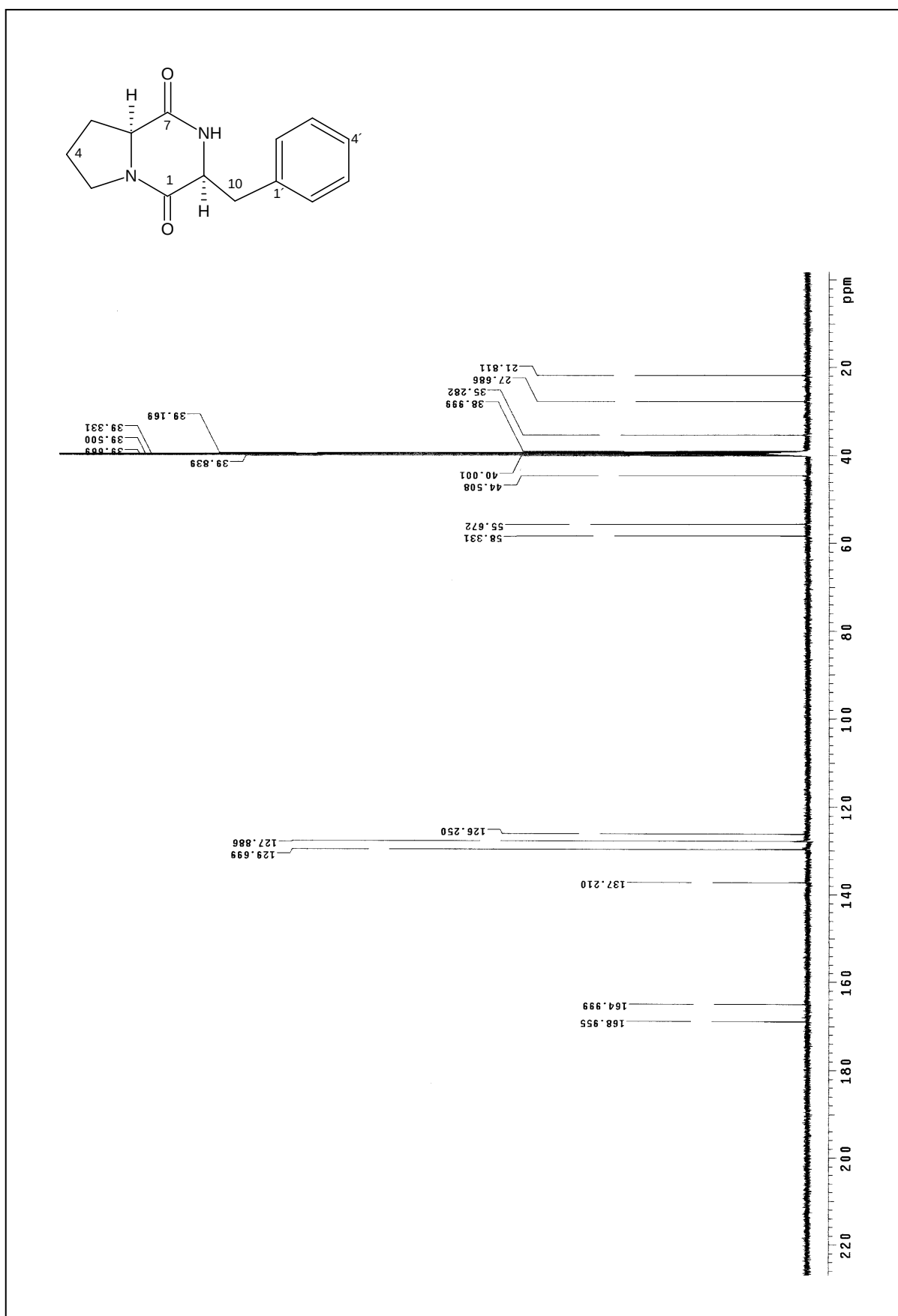


Figura 72 - Espectro de RMN de ¹³C de **10** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

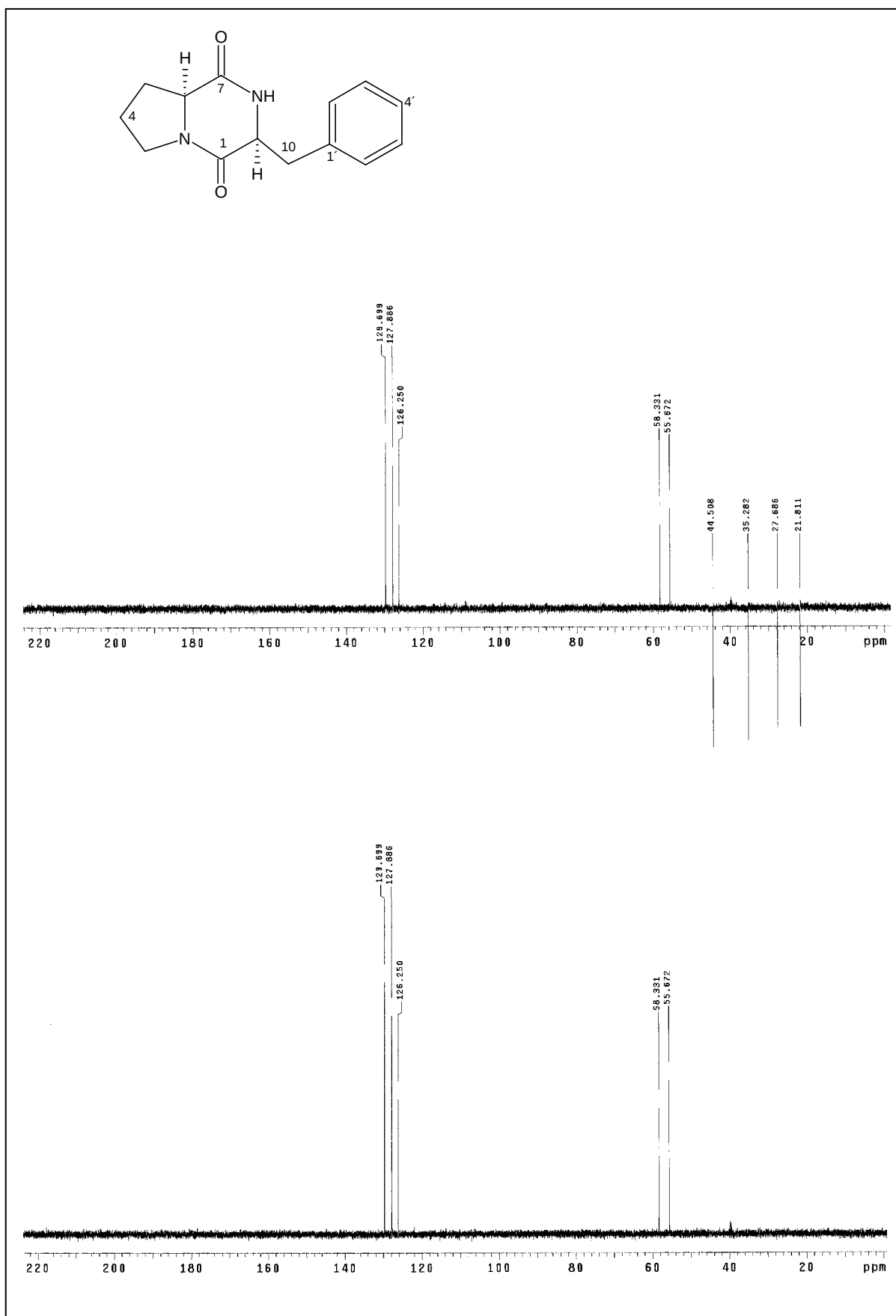


Figura 73 - Espectro de DEPT 135° de **10** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

Figura 74 - Espectro de DEPT 90° de **10** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

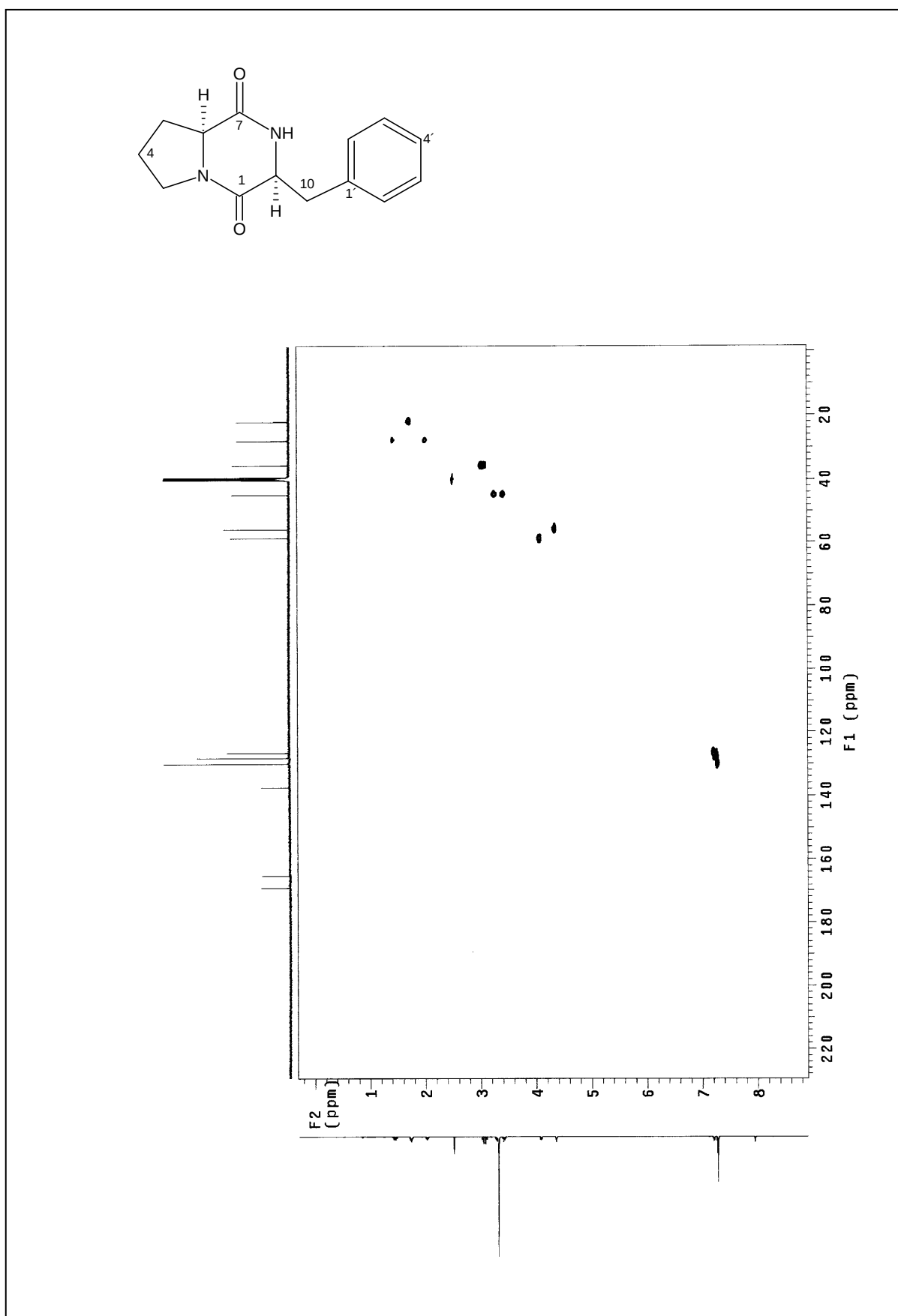


Figura 75 - Mapa de contorno *g*HMQC de **10** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

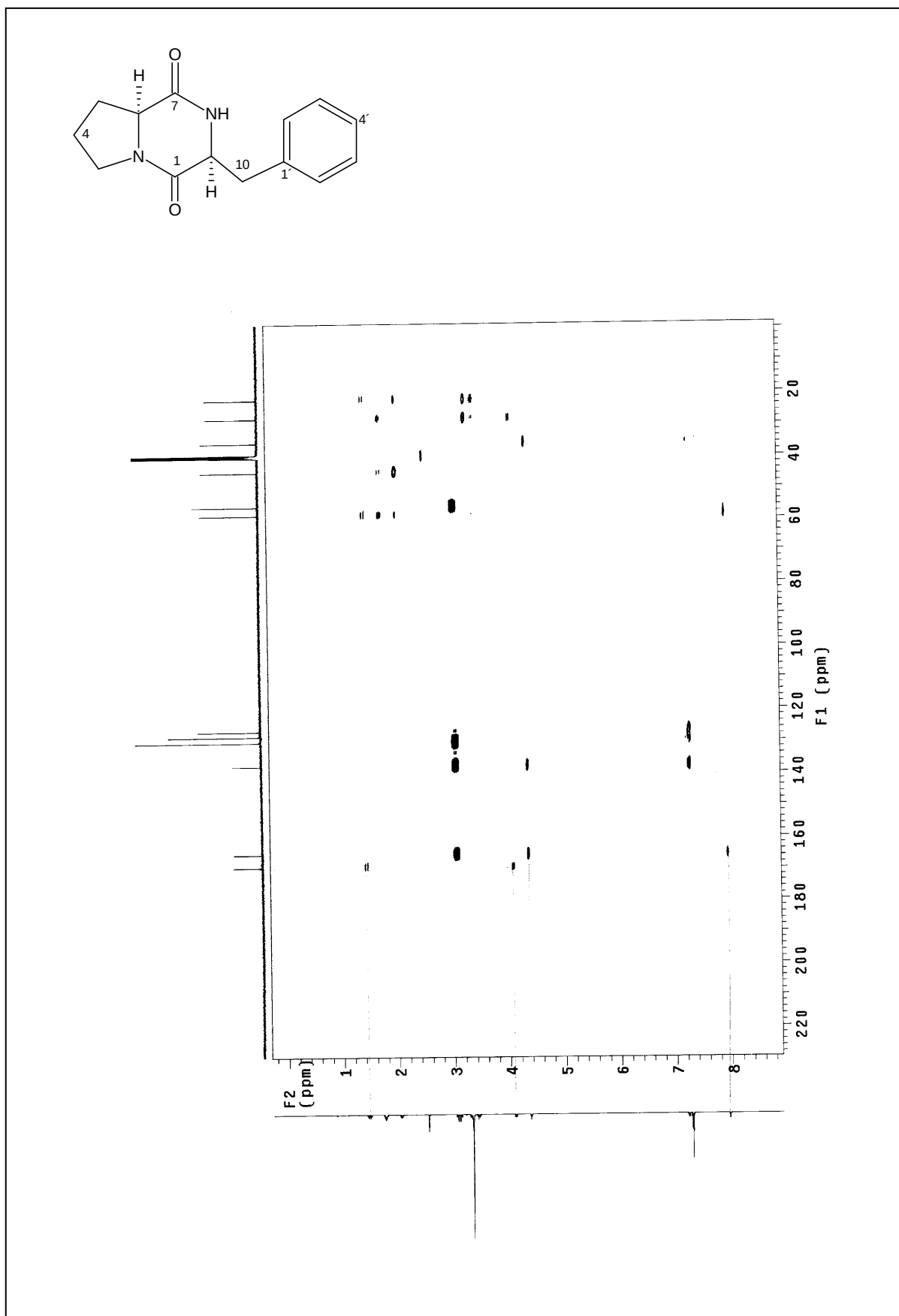


Figura 76 - Mapa de contorno g HMBC de **10** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

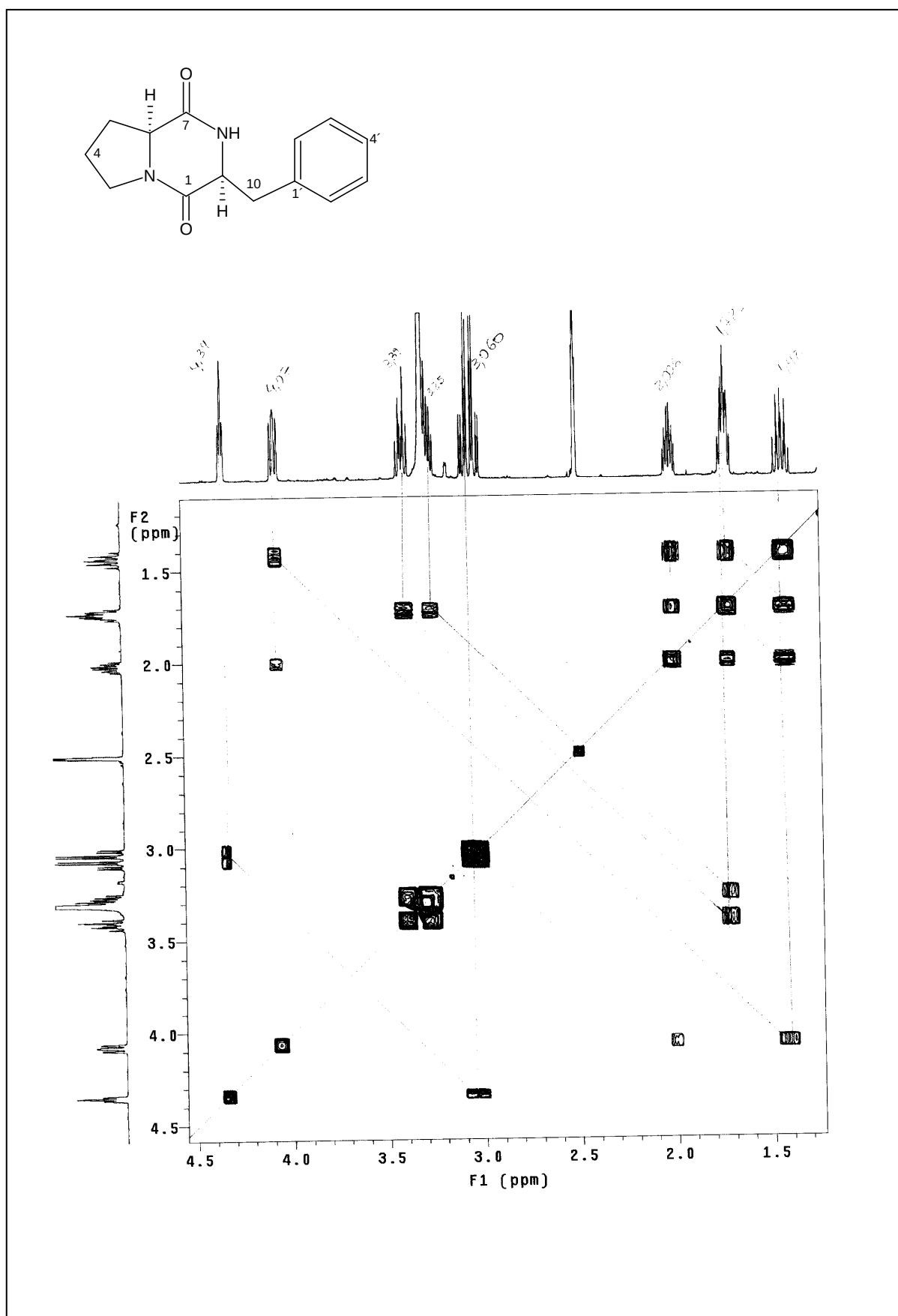


Figura 77 - Espectro de gCOSY de **10** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

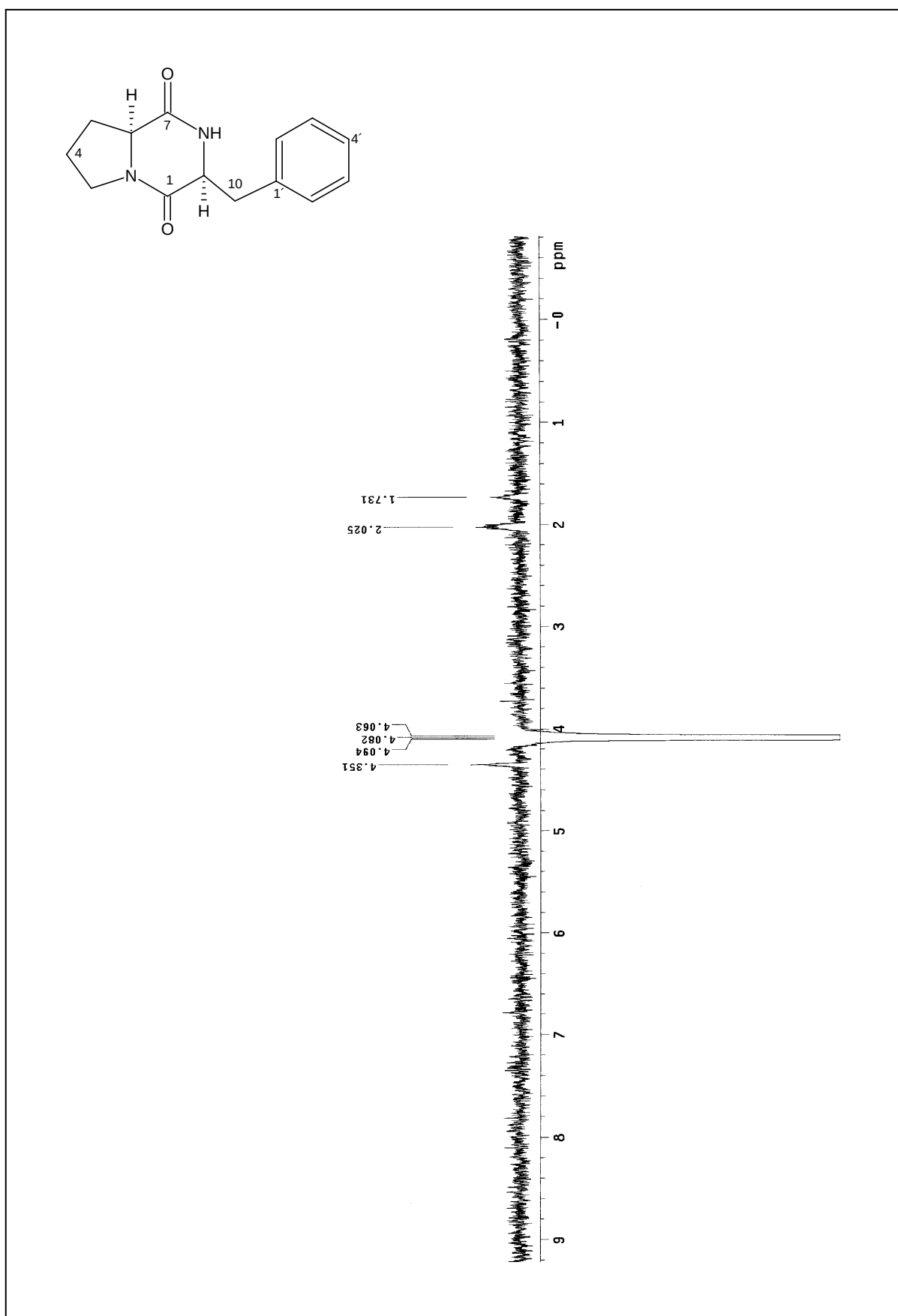


Figura 78 - Espectro de NOESY-1D de **10** (DMSO- d_6).

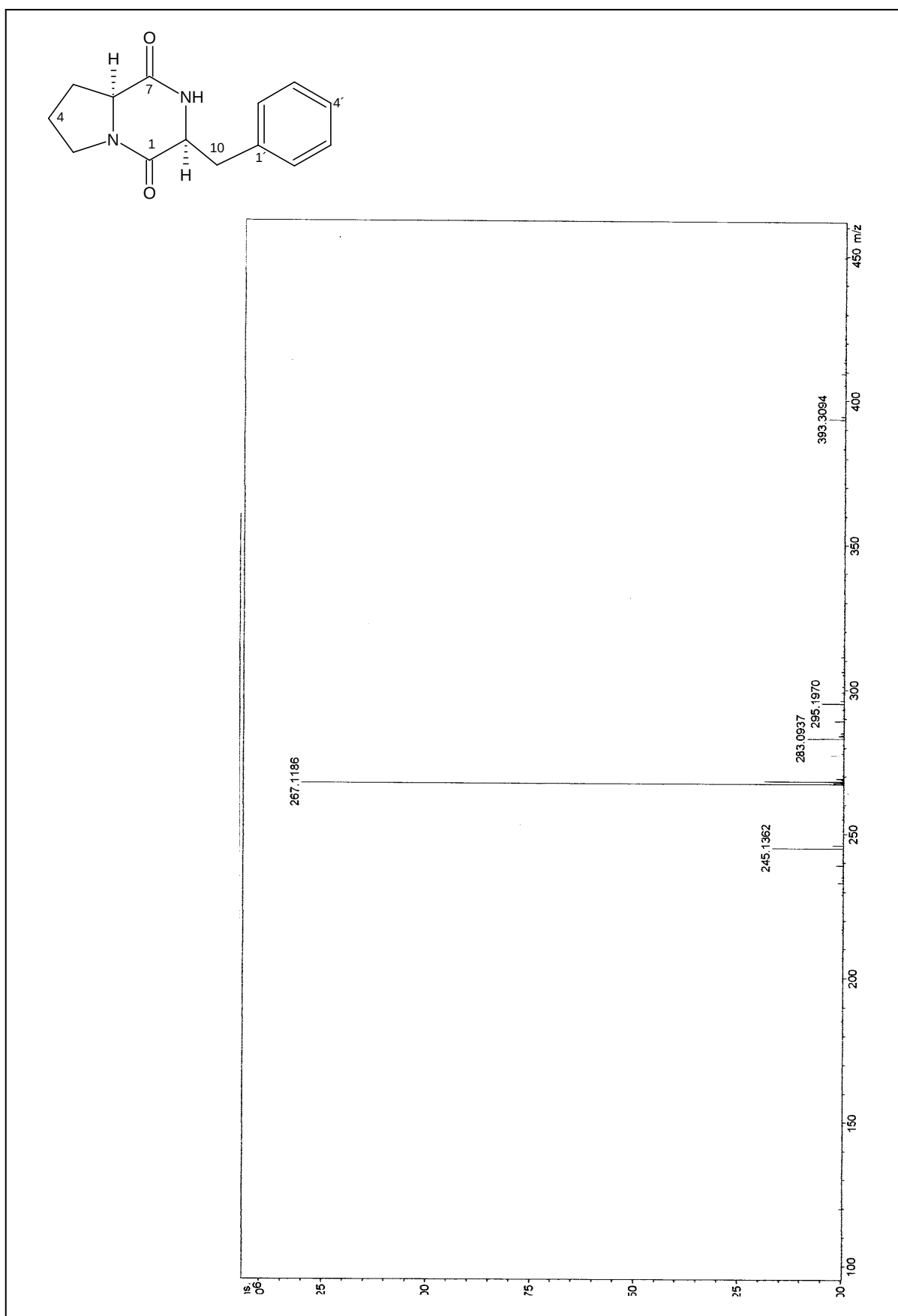


Figura 79 - Espectro de Massas de **10** (ESI-EM +120V).

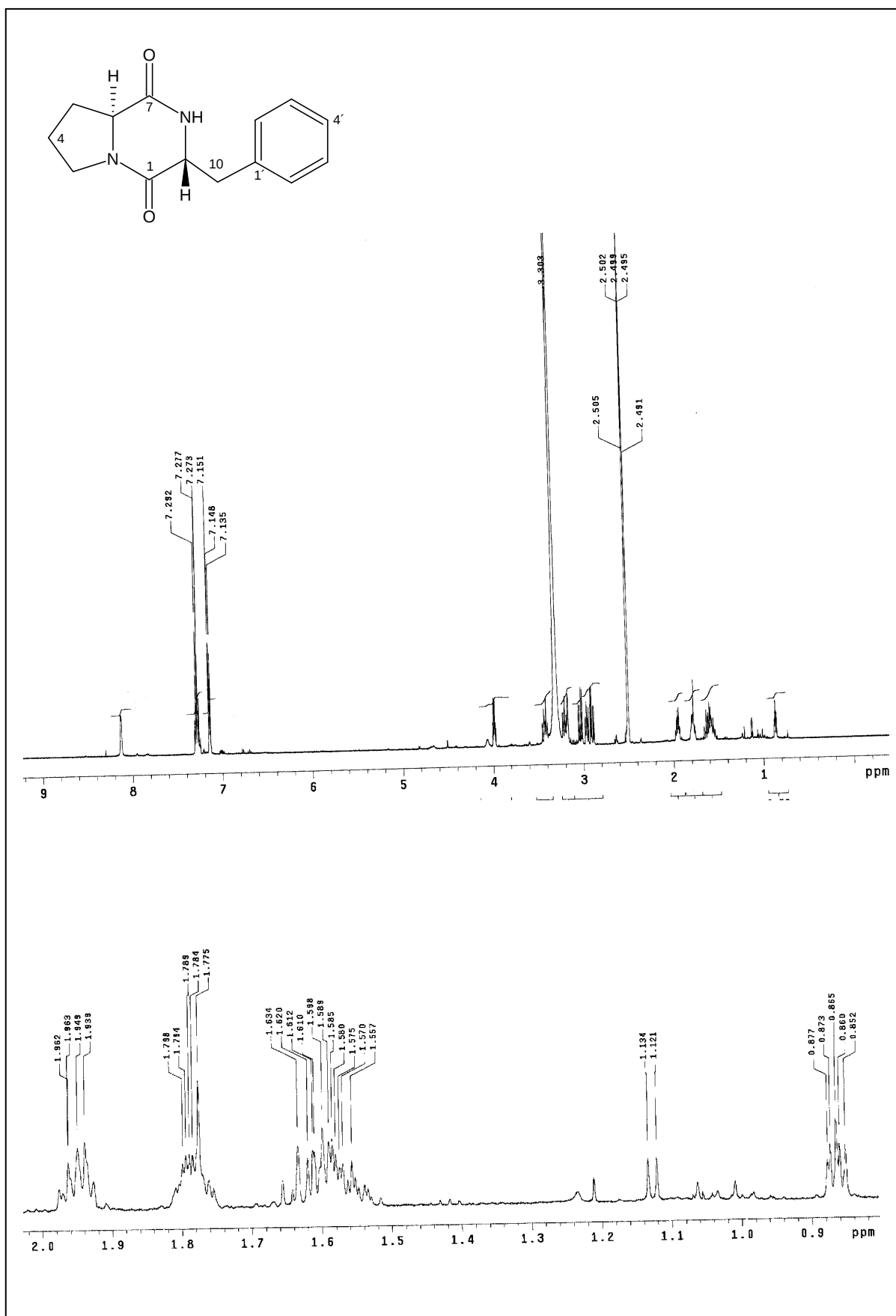


Figura 80 - Espectro de RMN de ^1H de **11** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 81 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **11** (DMSO- d_6 , 500 MHz).



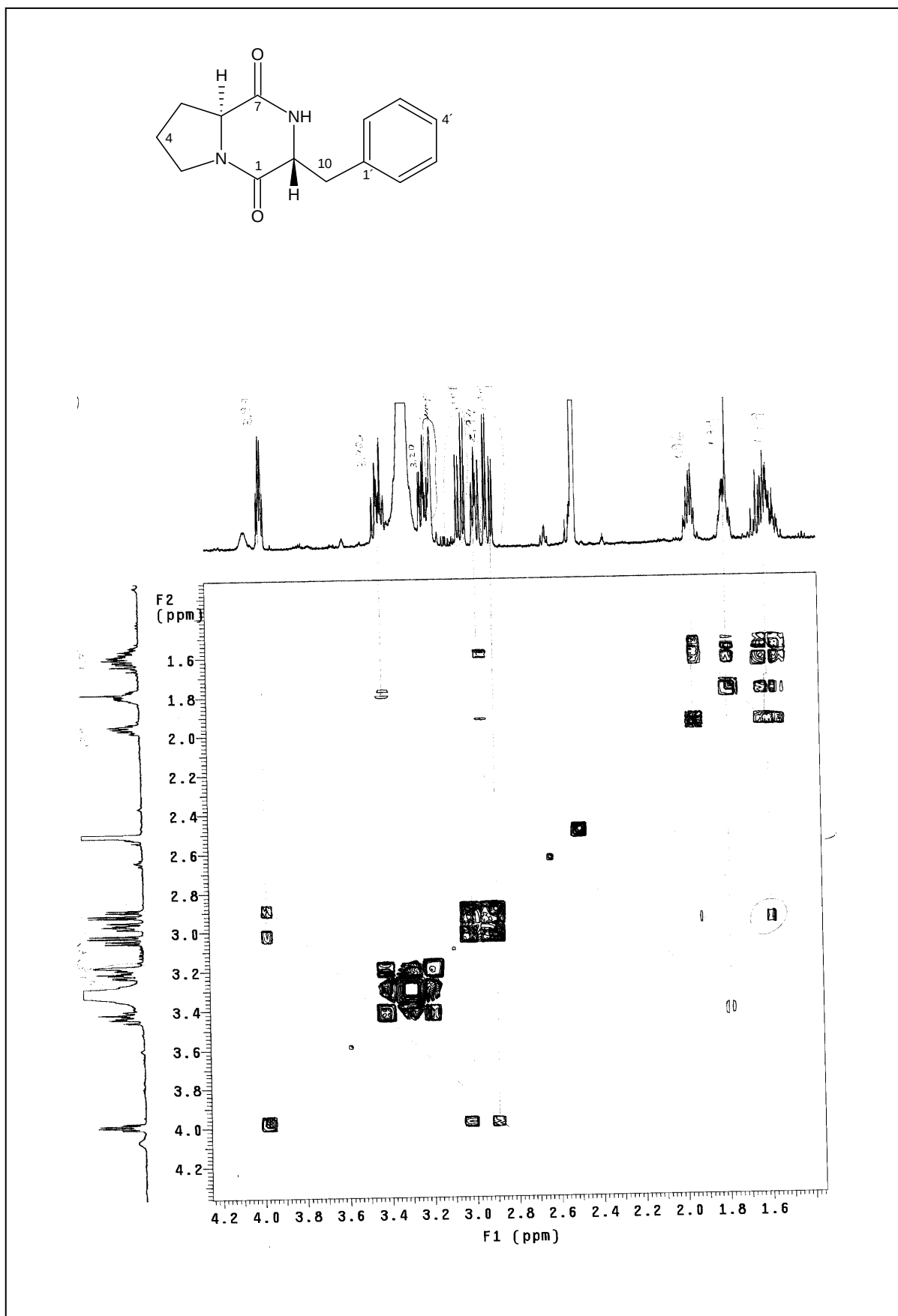


Figura 83 - Espectro de $g\text{COSY}$ ampliado de **11** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

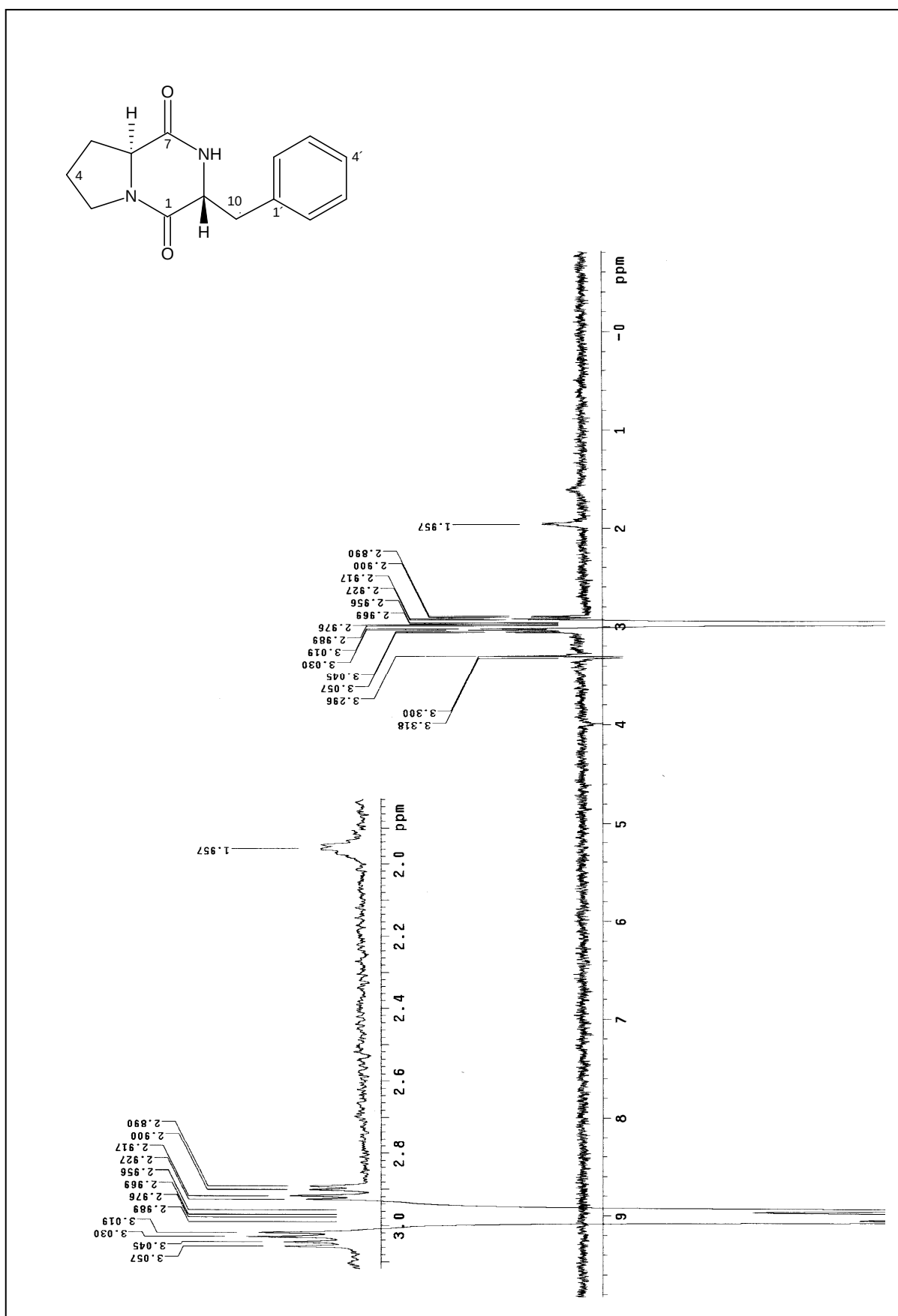


Figura 84 - Espectro de NOESY-1D de **11** (DMSO- d_6).

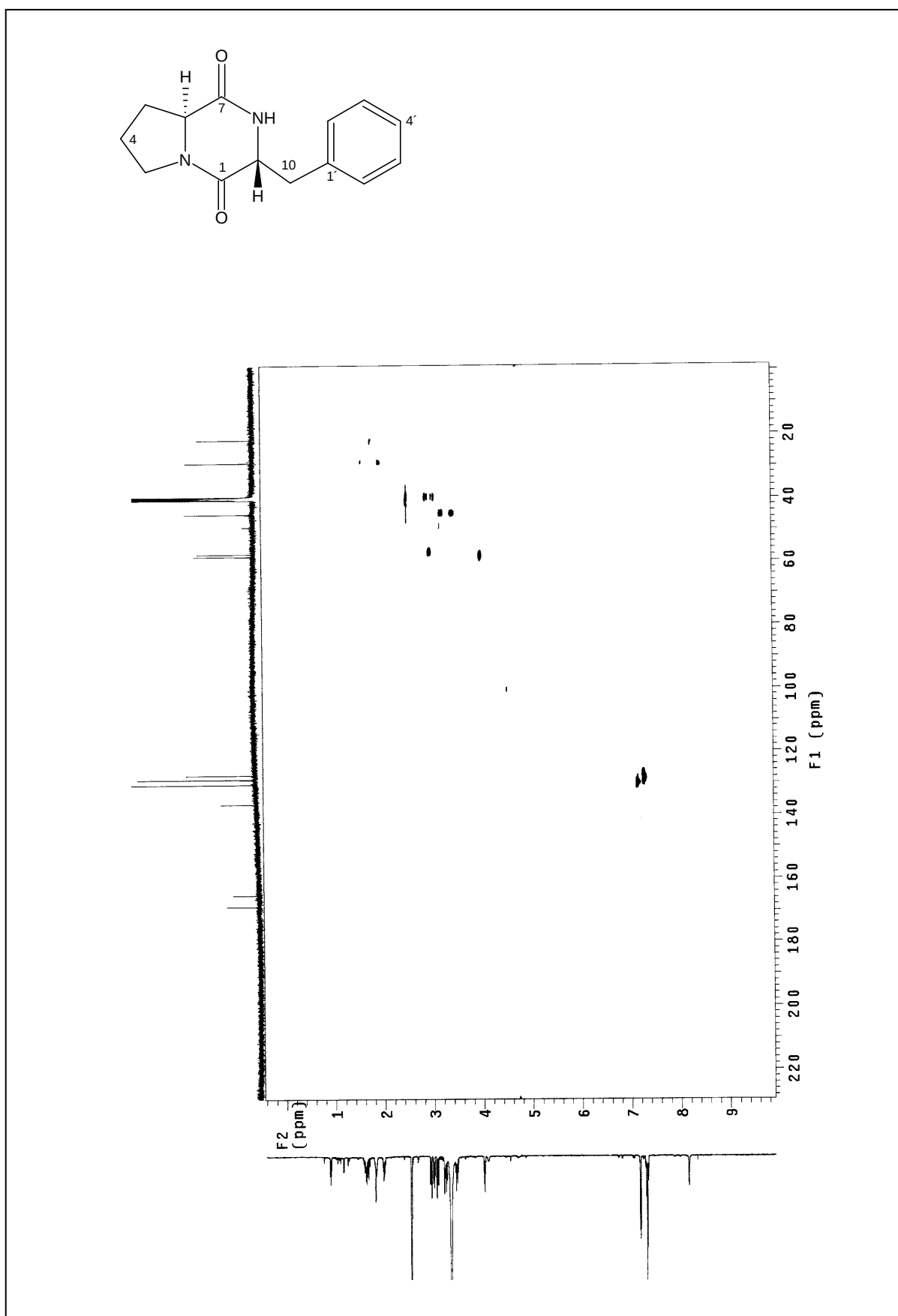


Figura 85 - Mapa de contorno *g*HMQC de **11** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

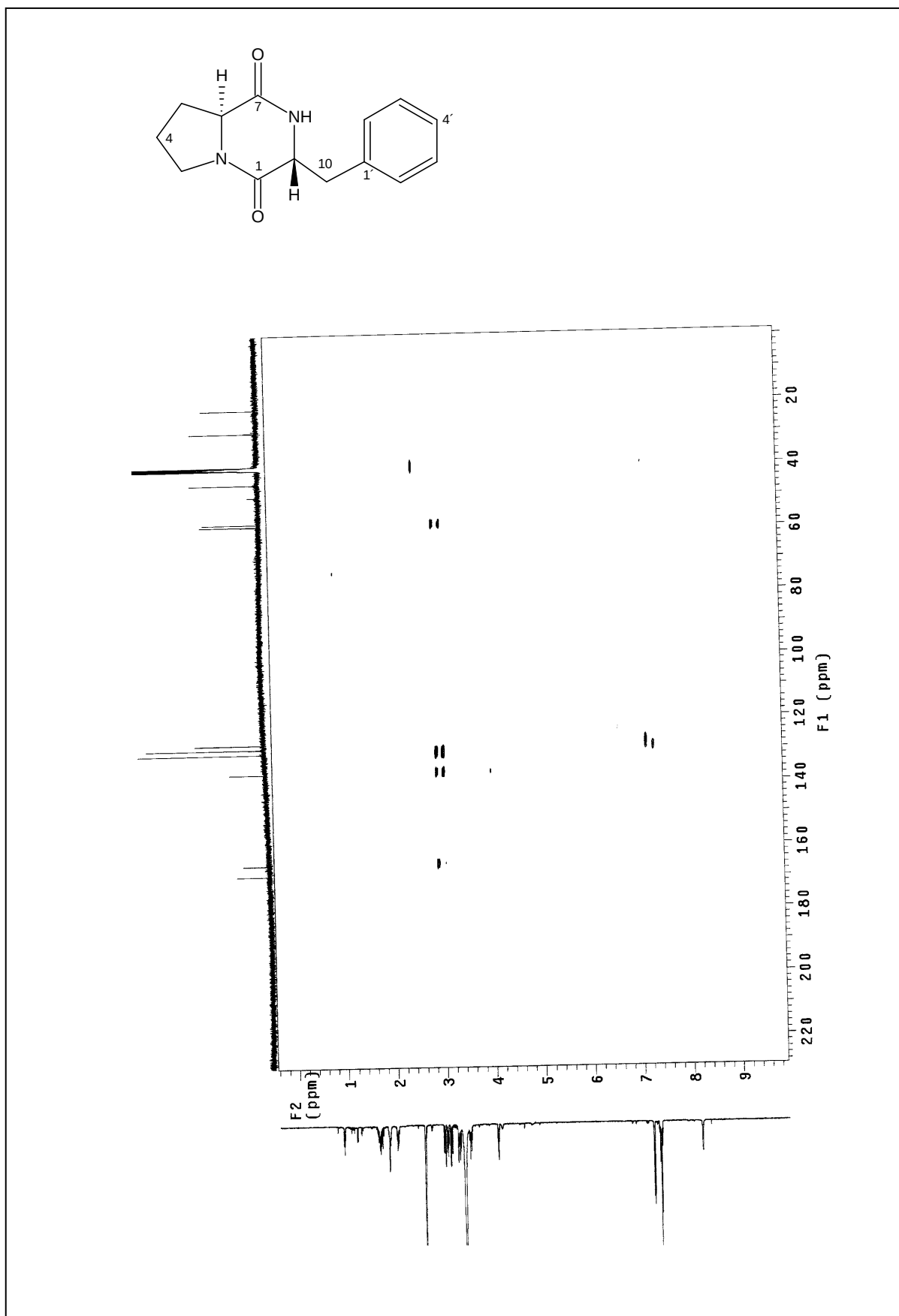


Figura 86 - Mapa de contorno *g*HMBC de **11** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

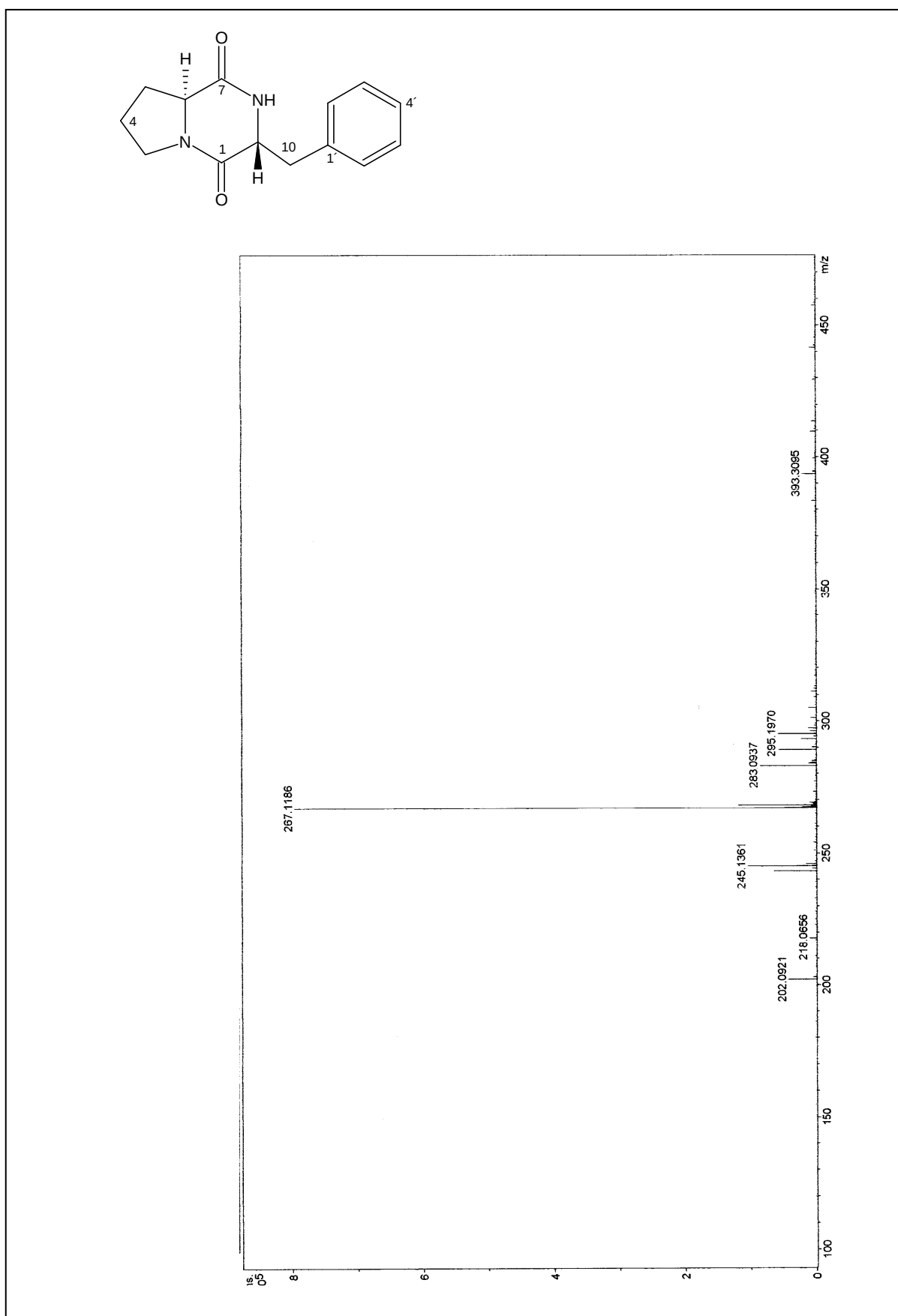


Figura 87 - Espectro de Massas de **11** (ESI-EM +120V).

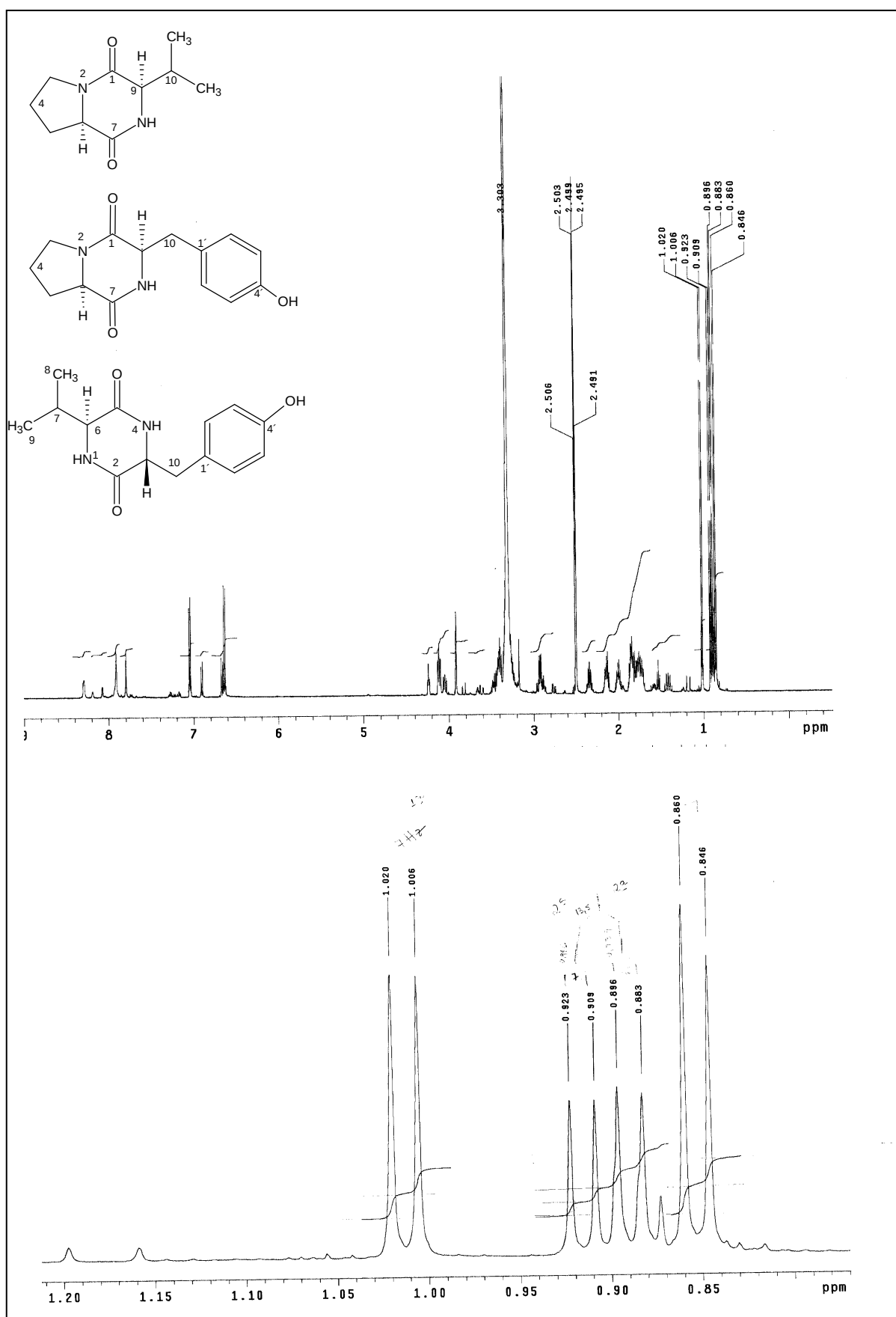


Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H de **7** / **8** / **9** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 89 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **7** / **8** / **9** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

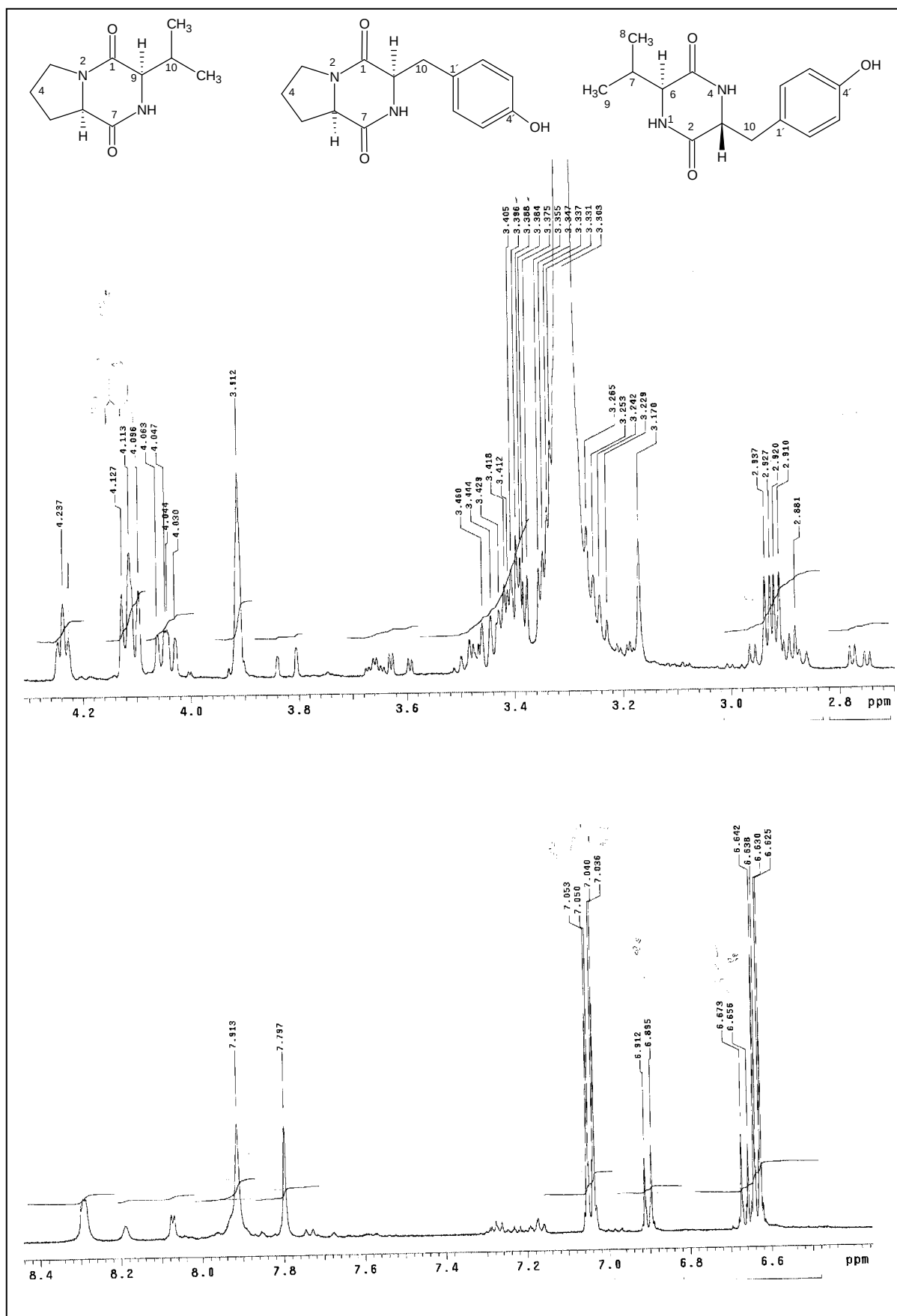


Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **7** / **8** / **9** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz).
Figura 91 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **7** / **8** / **9** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz).

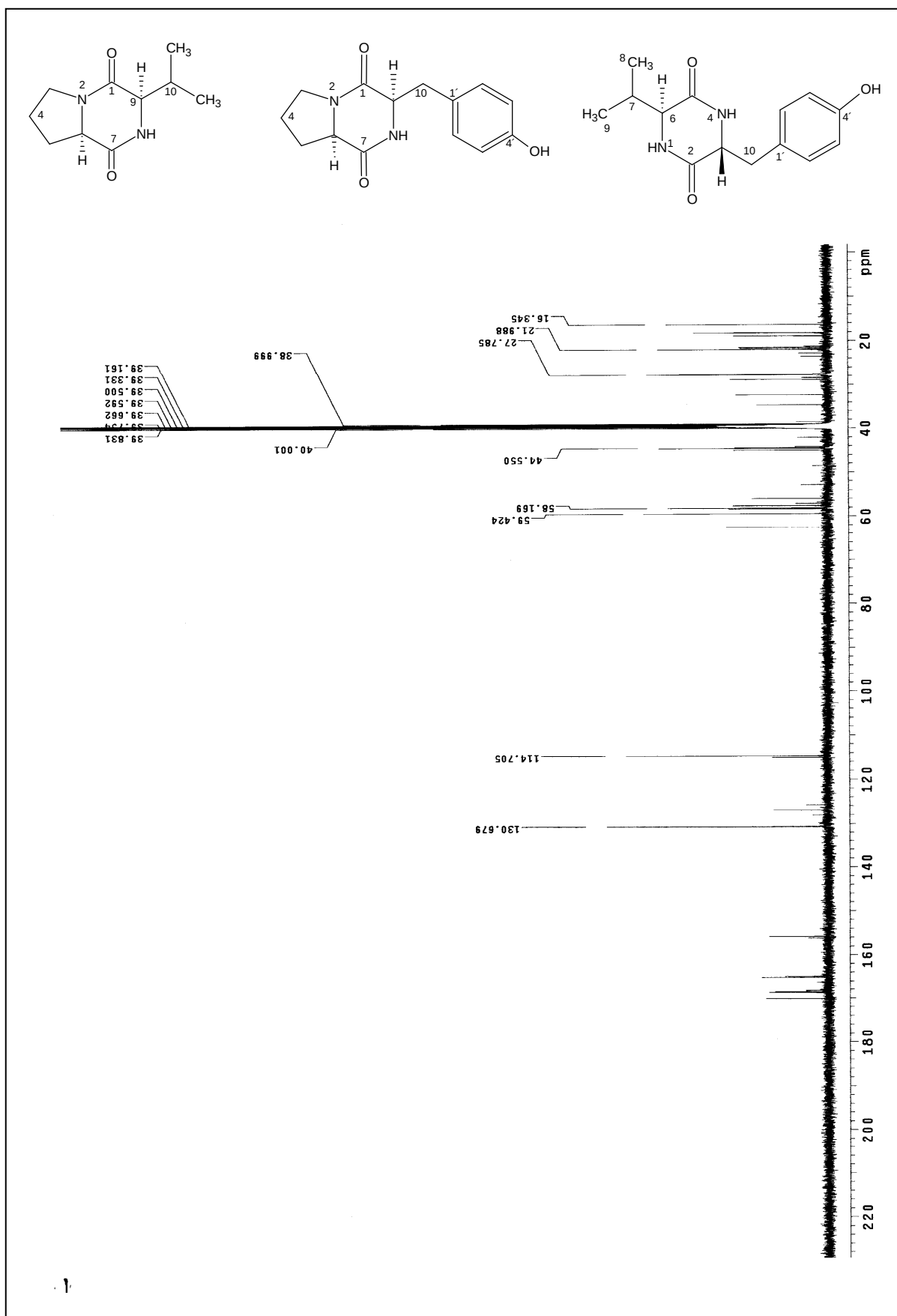


Figura 92 - Espectro de RMN de ^{13}C de 7 / 8 / 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

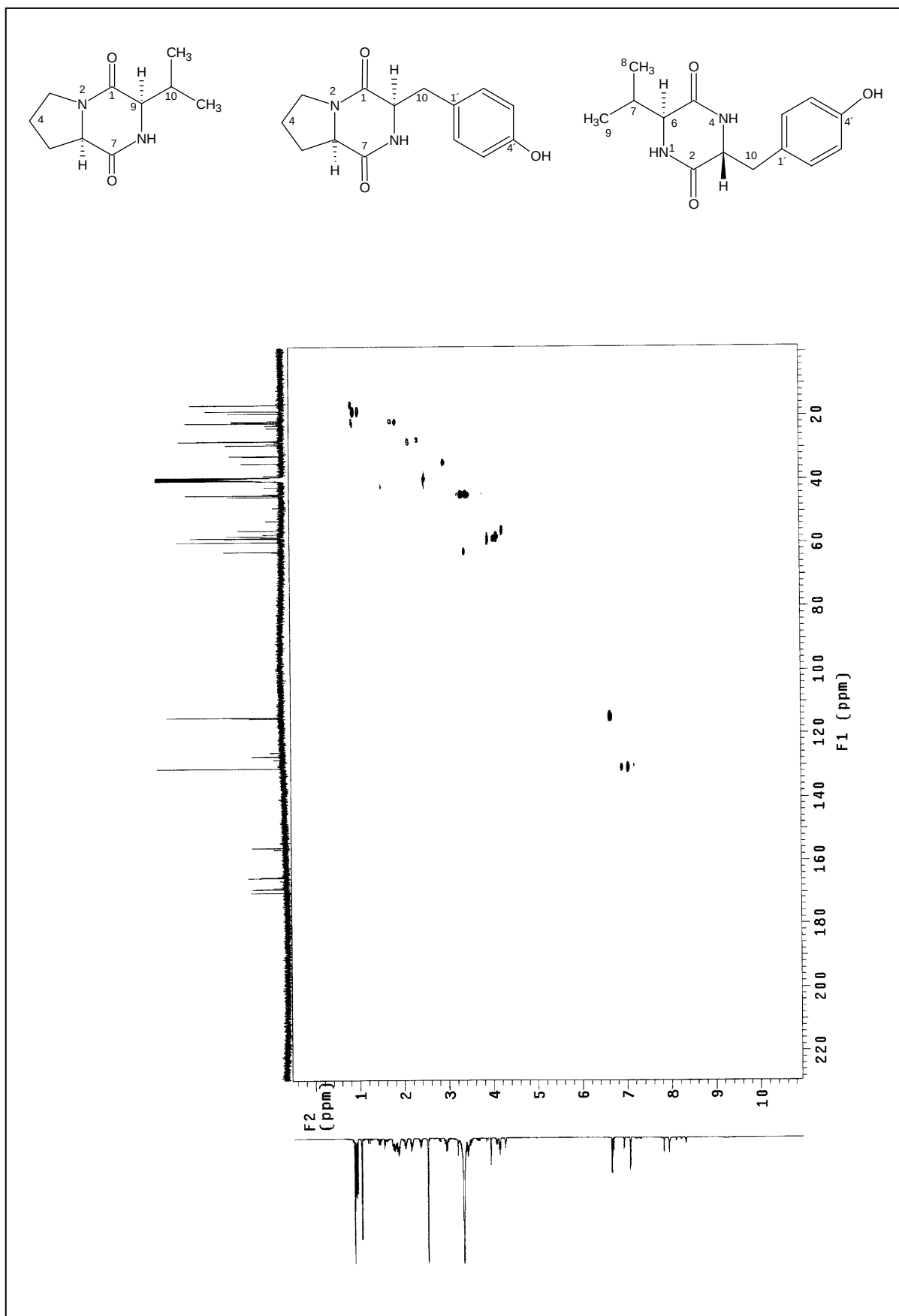


Figura 93 – Mapa de contorno g HMQC de **7** / **8** / **9** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

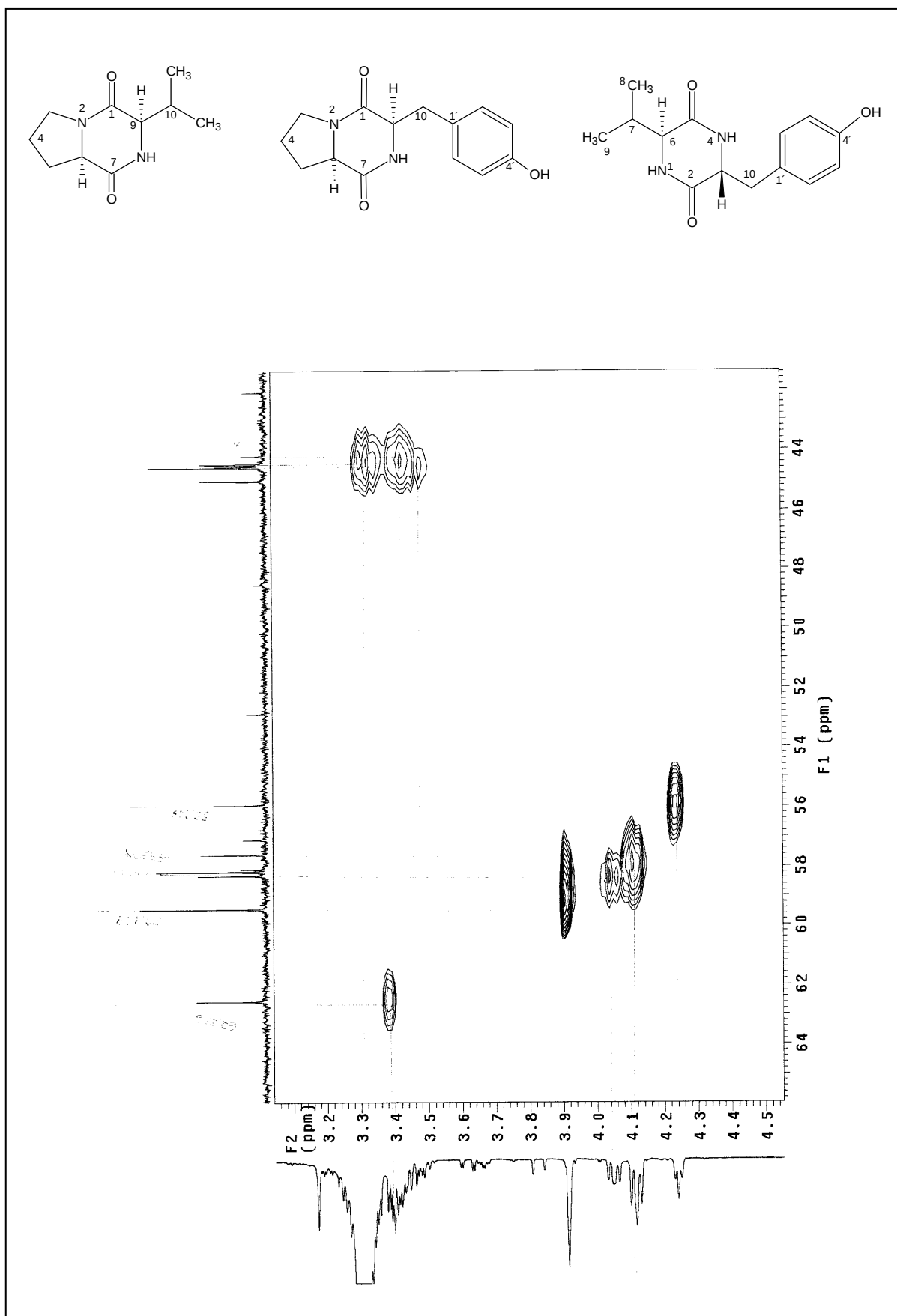


Figura 94 – Mapa de contorno $g\text{HMQC}$ ampliado de 7 / 8 / 9 ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

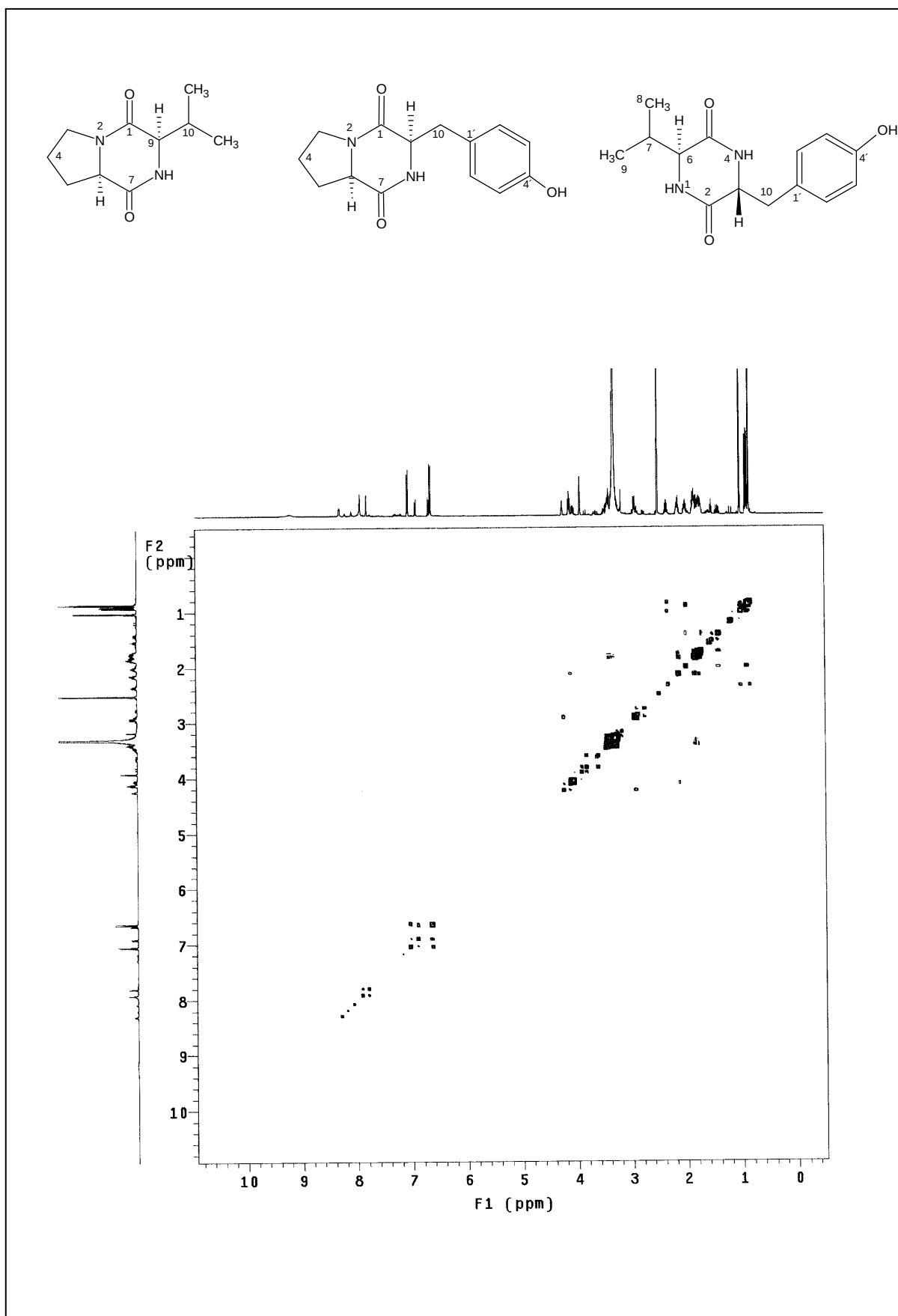


Figura 95 - Espectro de *g*COSY de 7 / 8 / 9 (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

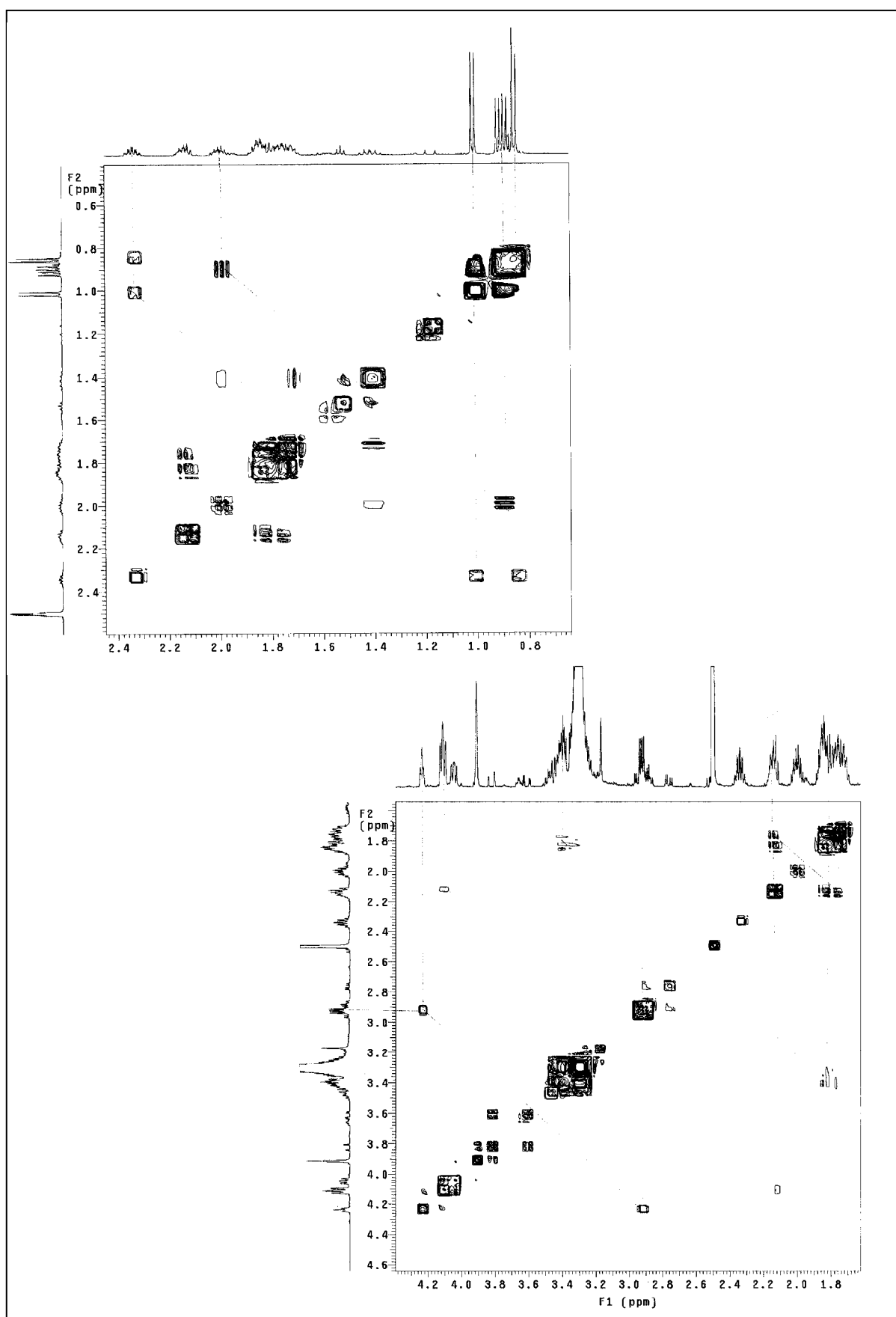


Figura 96 - Espectro de *g*COSY ampliado de 7 / 8 / 9 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 97 - Espectro de *g*COSY ampliado de 7 / 8 / 9 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 98 – Mapa de contorno g_{HMBC} de 7 / 8 / 9 (DMSO- d_6 , 125 MHz).

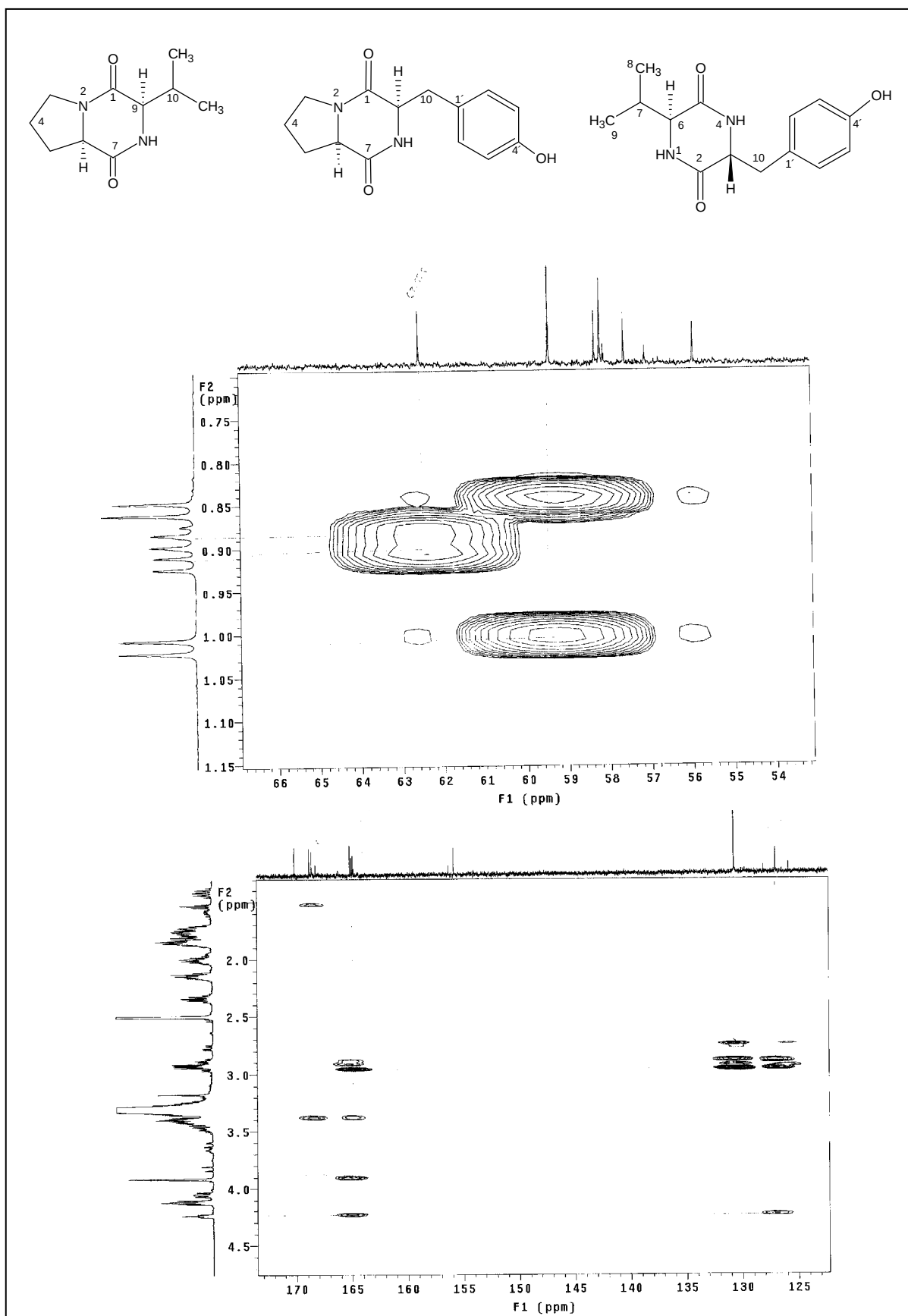


Figura 99 - Mapa de contorno gHMBC ampliado de 7 / 8 / 9 (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

Figura 100 - Mapa de contorno gHMBC ampliado de 7 / 8 / 9 (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

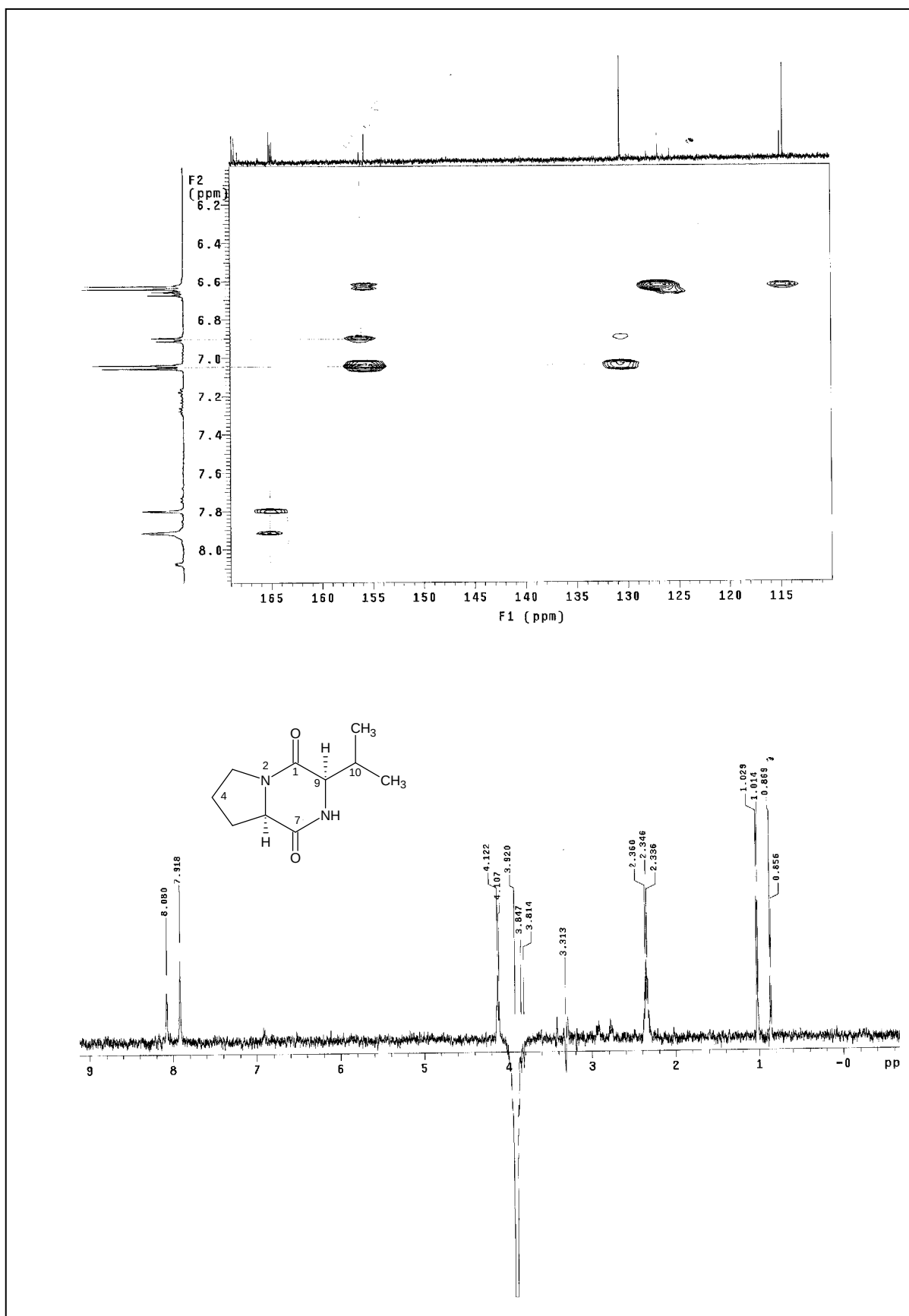


Figura 101 - Mapa de contorno *g*HMBC ampliado de **7** / **8** / **9** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

Figura 102 - Espectro de NOESY-1D de **7** (DMSO-*d*₆).

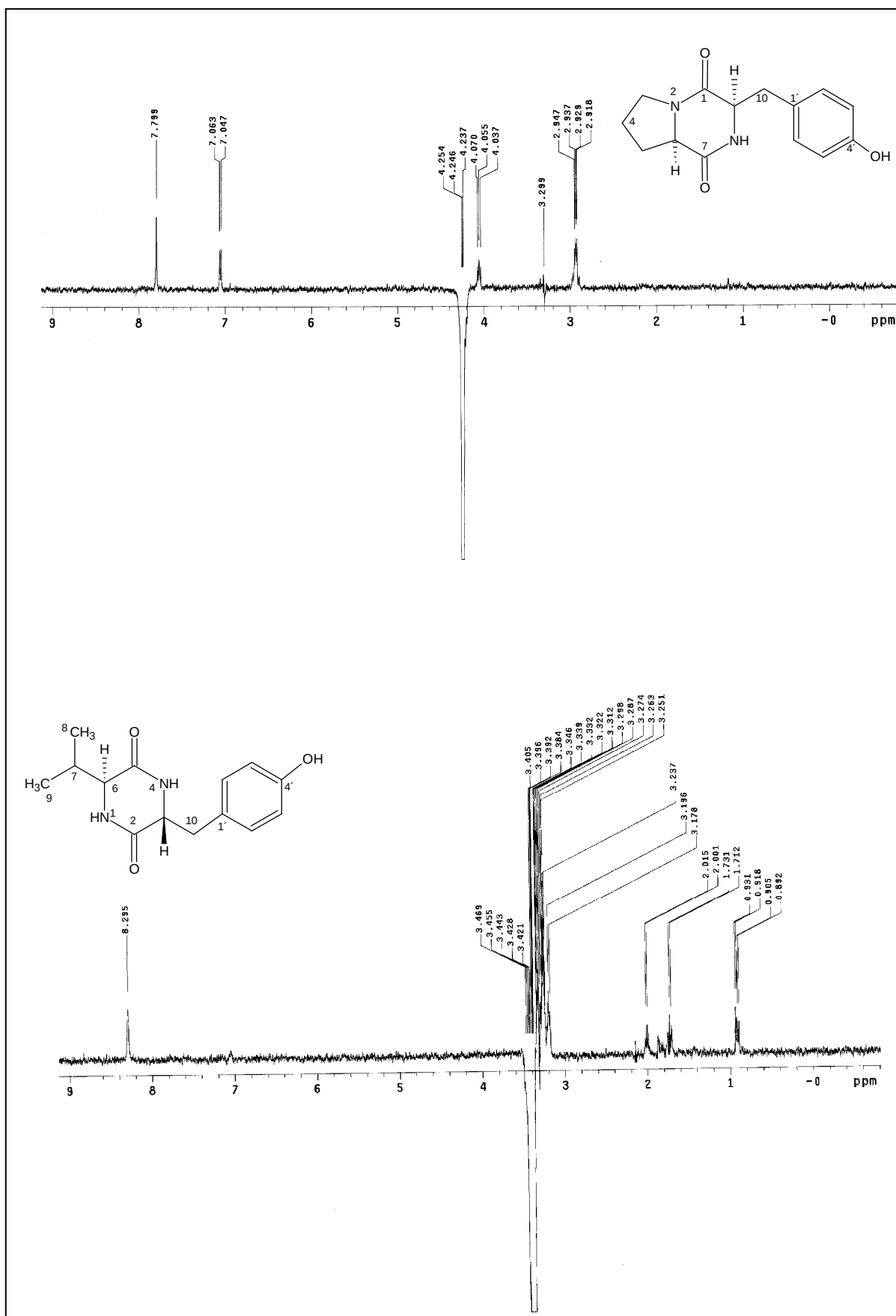


Figura 103 - Espectro de NOESY-1D de **8** (DMSO- d_6).

Figura 104 - Espectro de NOESY-1D de **9** (DMSO- d_6).

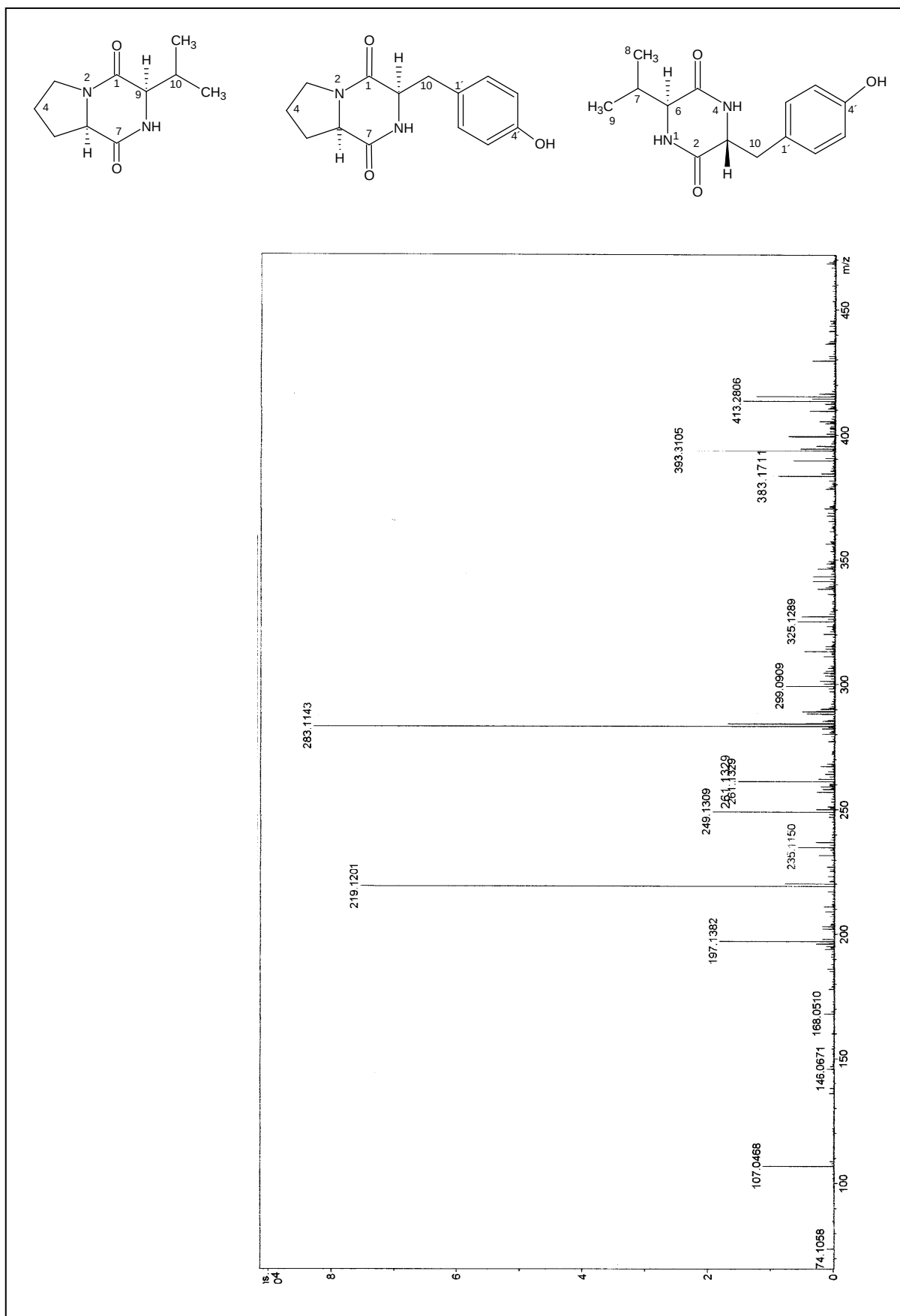
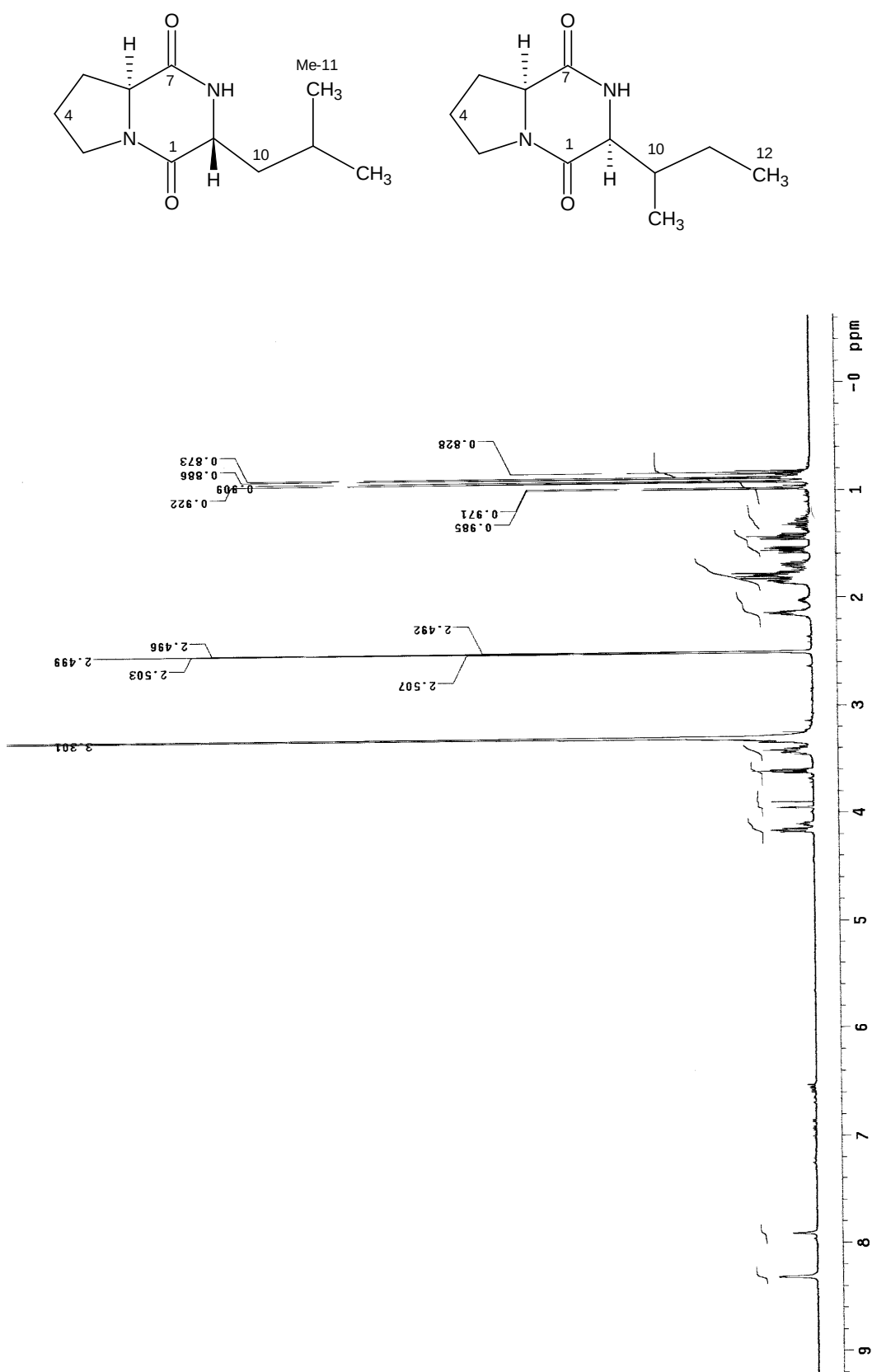


Figura 105 - Espectro de Massas de **7** / **8** / **9** (ESI-EM +120V).



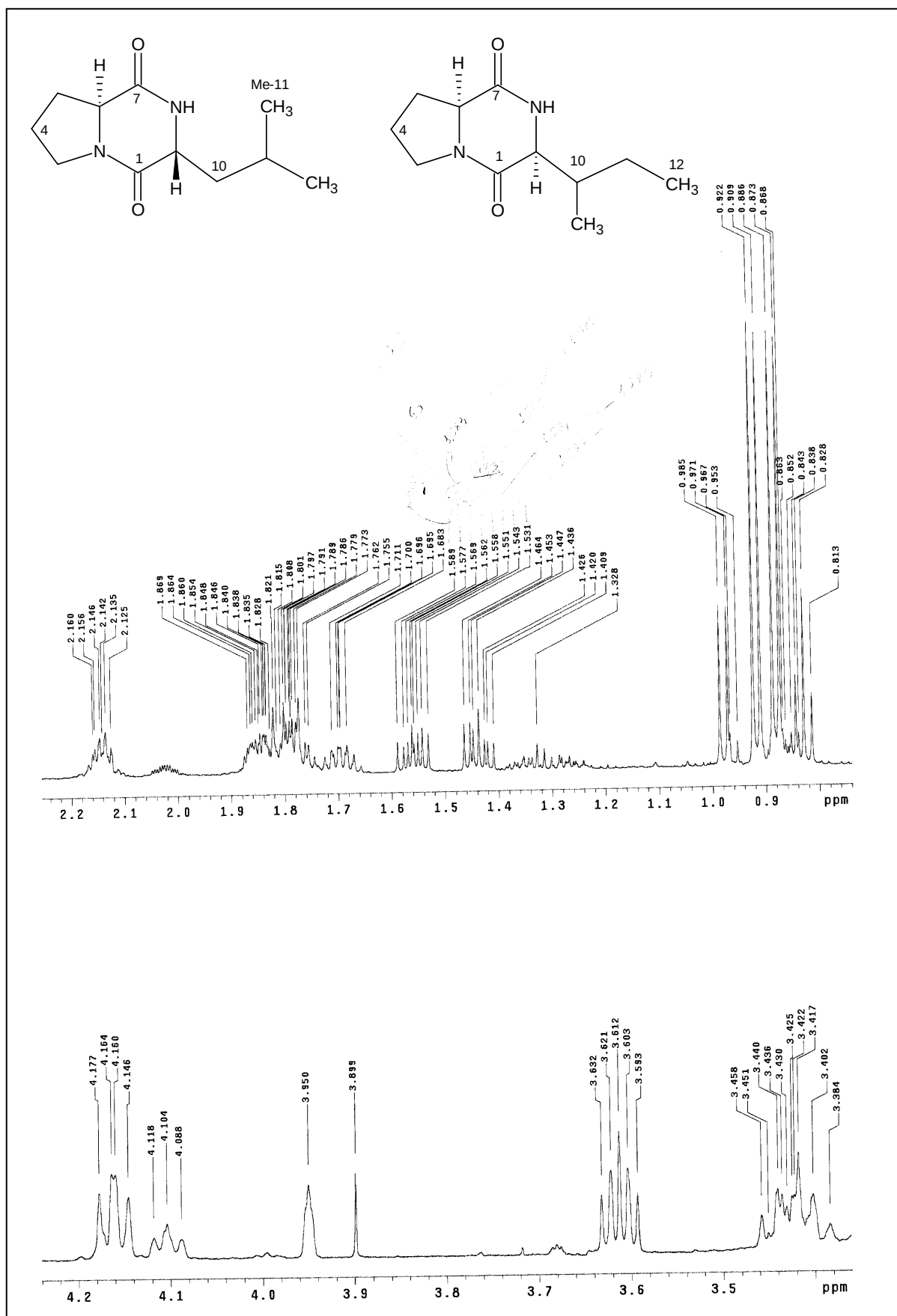


Figura 107 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de 15 / 16 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 108 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de 15 / 16 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

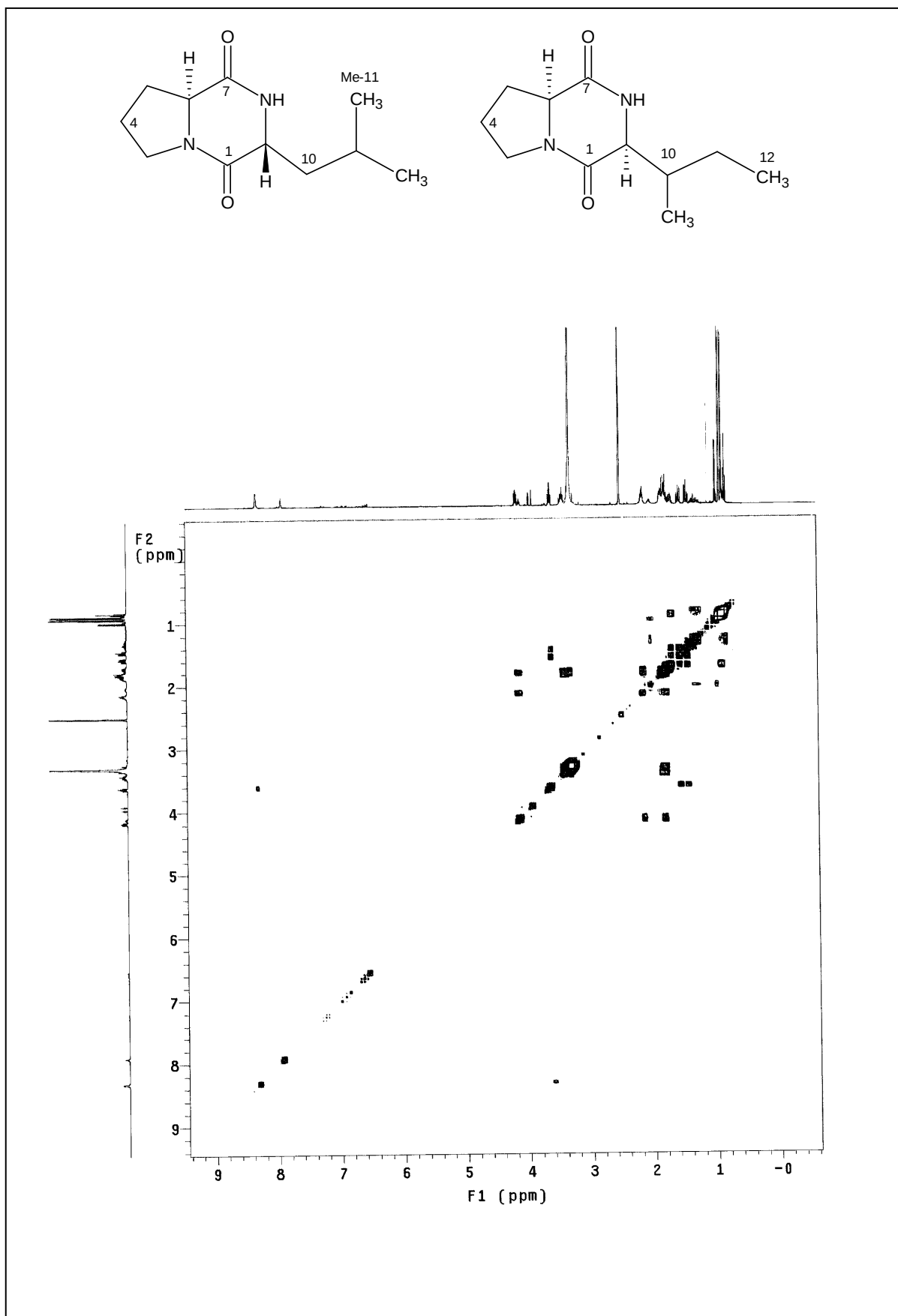


Figura 109 – Espectro de *g*COSY de **15** / **16** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

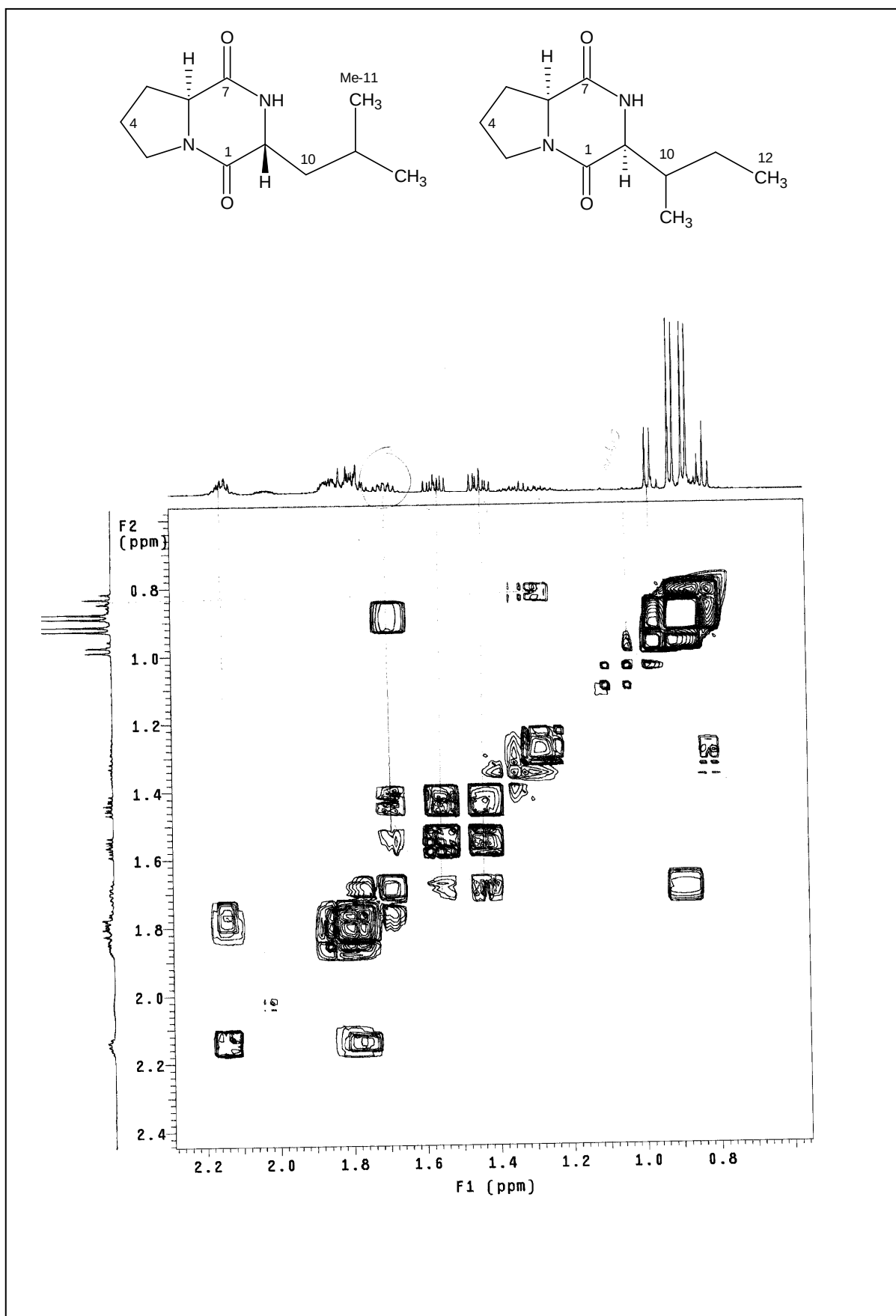


Figura 110 – Espectro de $g\text{COSY}$ ampliado de **15** / **16** ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).

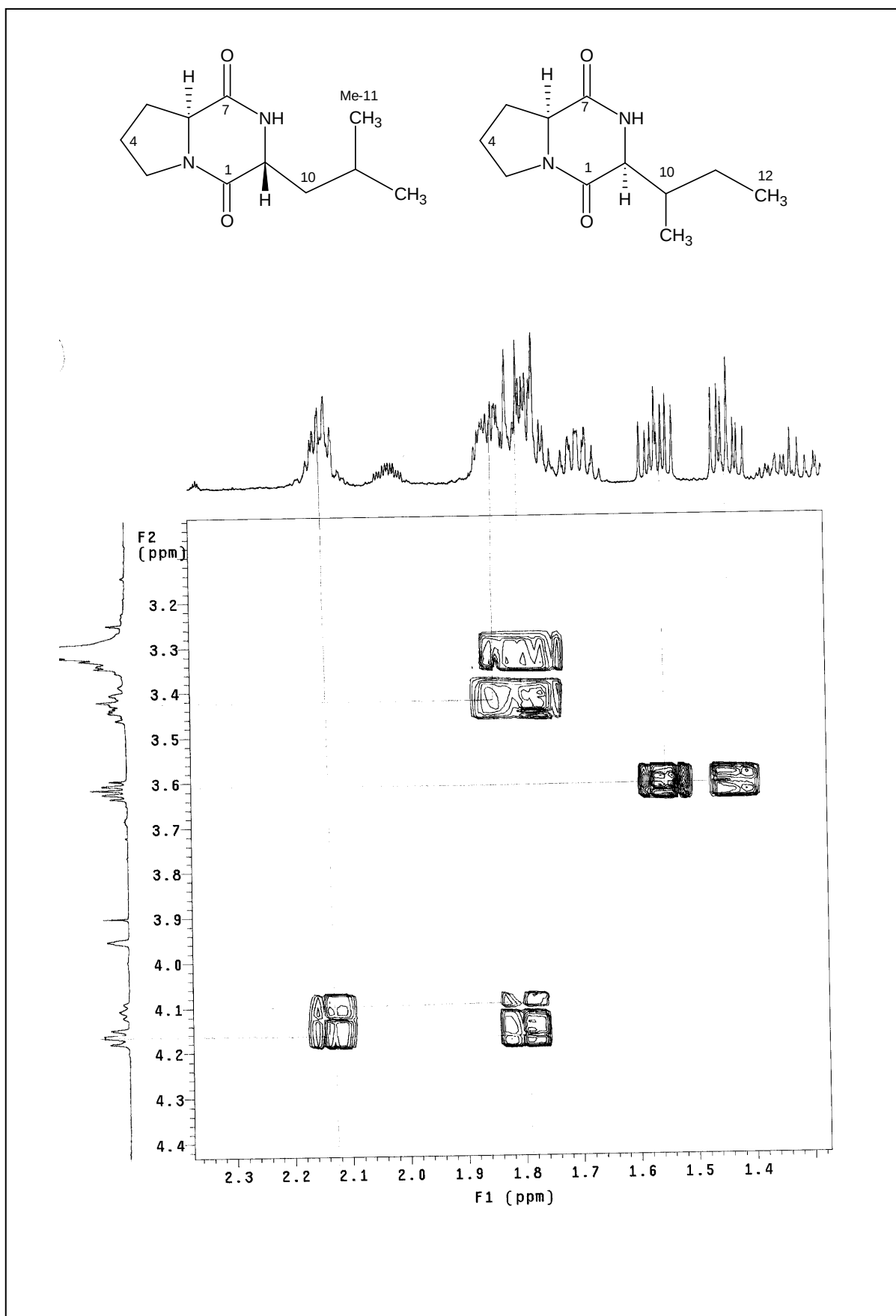


Figura 111 - Espectro de g COSY ampliado de **15** / **16** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

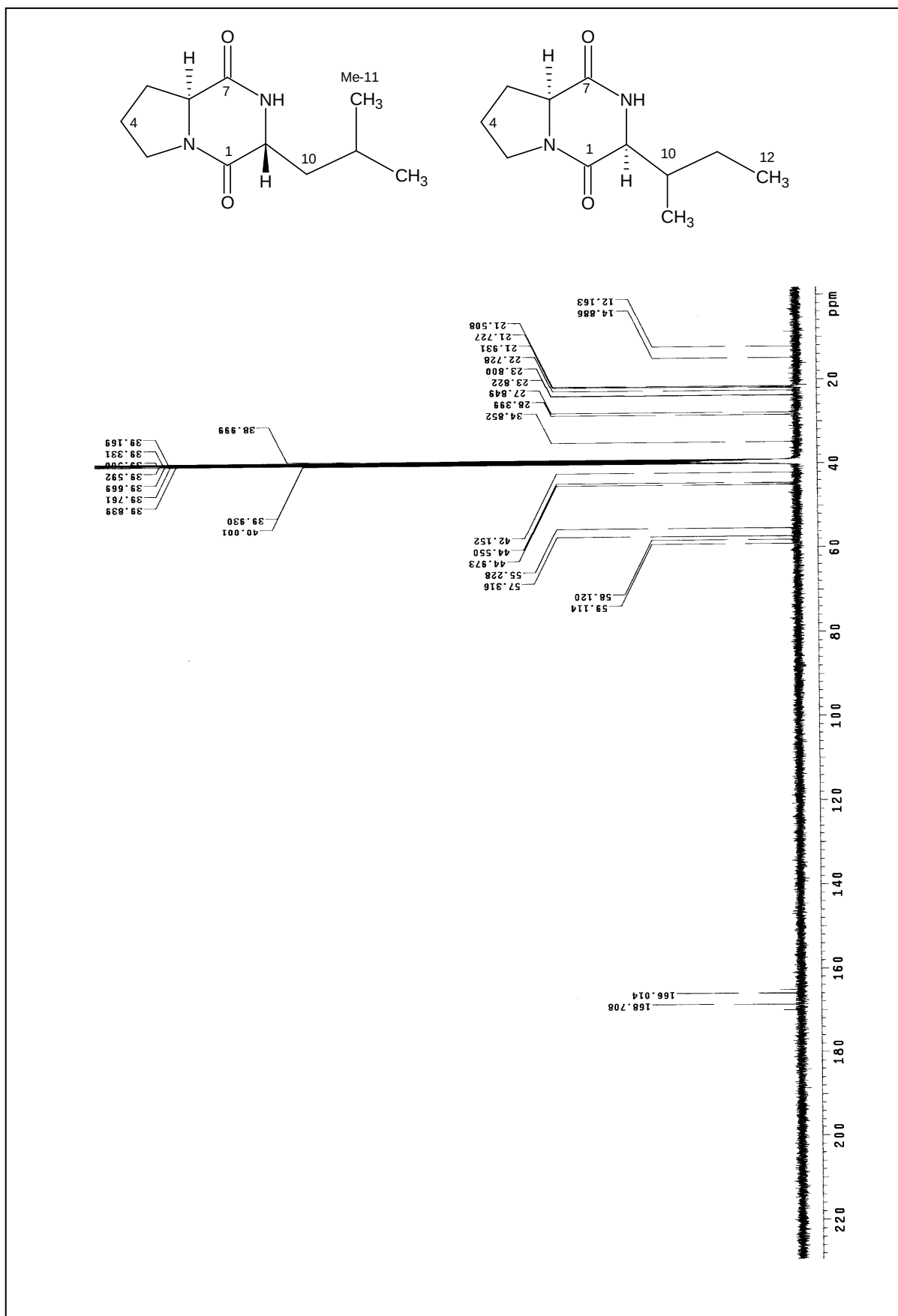


Figura 112 - Espectro de RMN de ^{13}C de **15** / **16** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

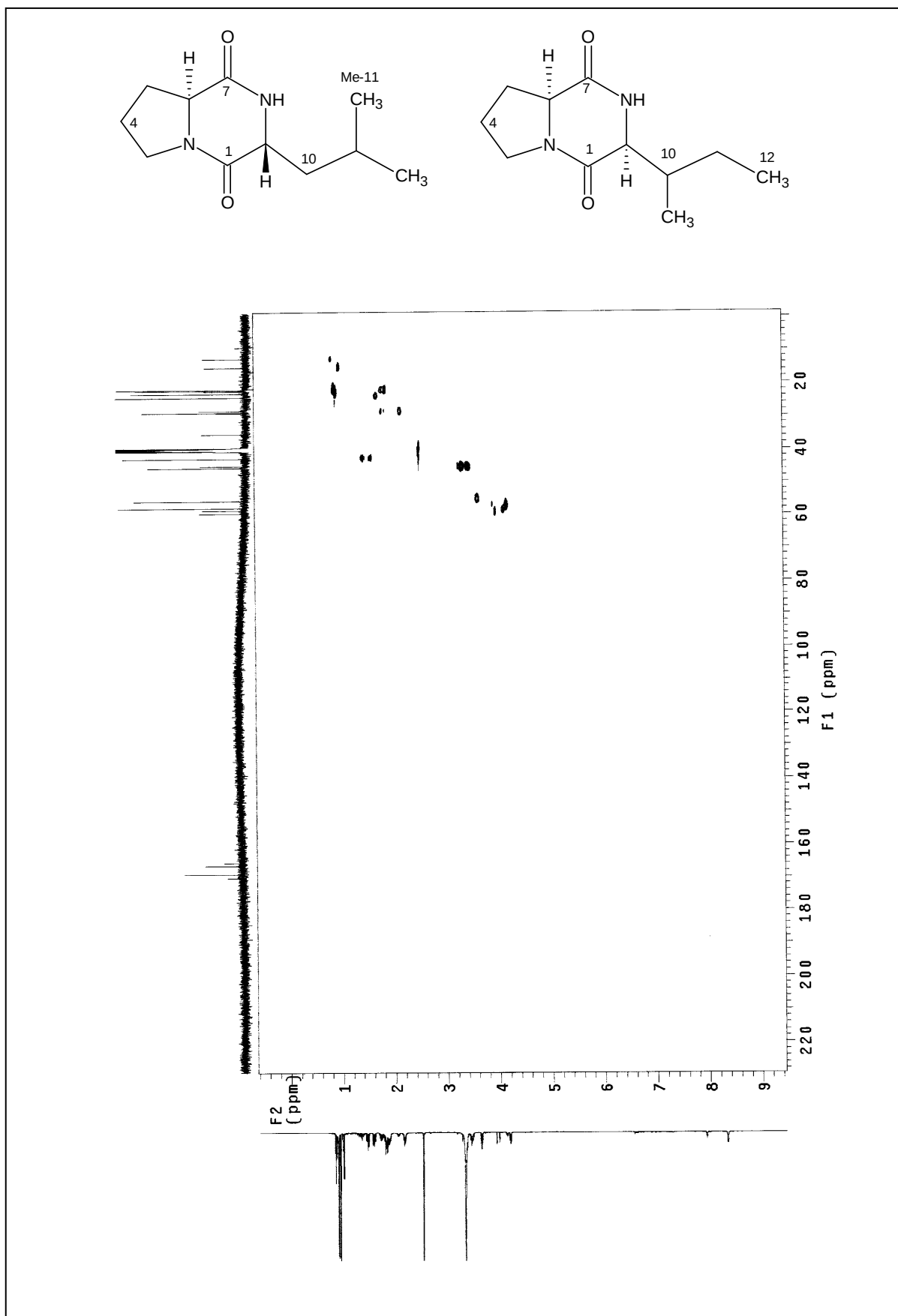


Figura 113 - Mapa de contorno $gHMBC$ de 15 / 16 ($DMSO-d_6$, 125 MHz).

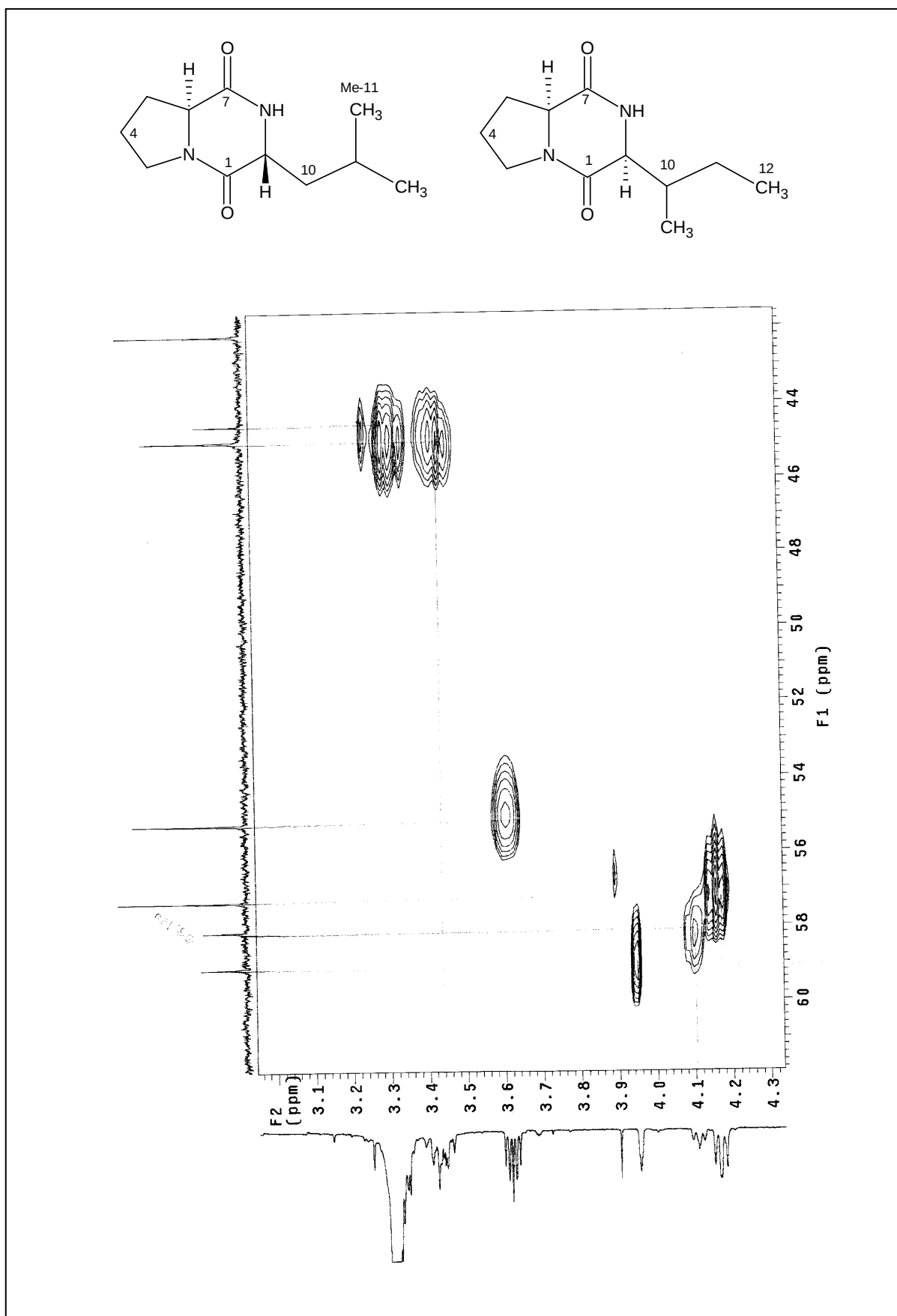


Figura 114 - Mapa de contorno $gHMBC$ ampliado de **15** / **16** ($DMSO-d_6$, 125 MHz).

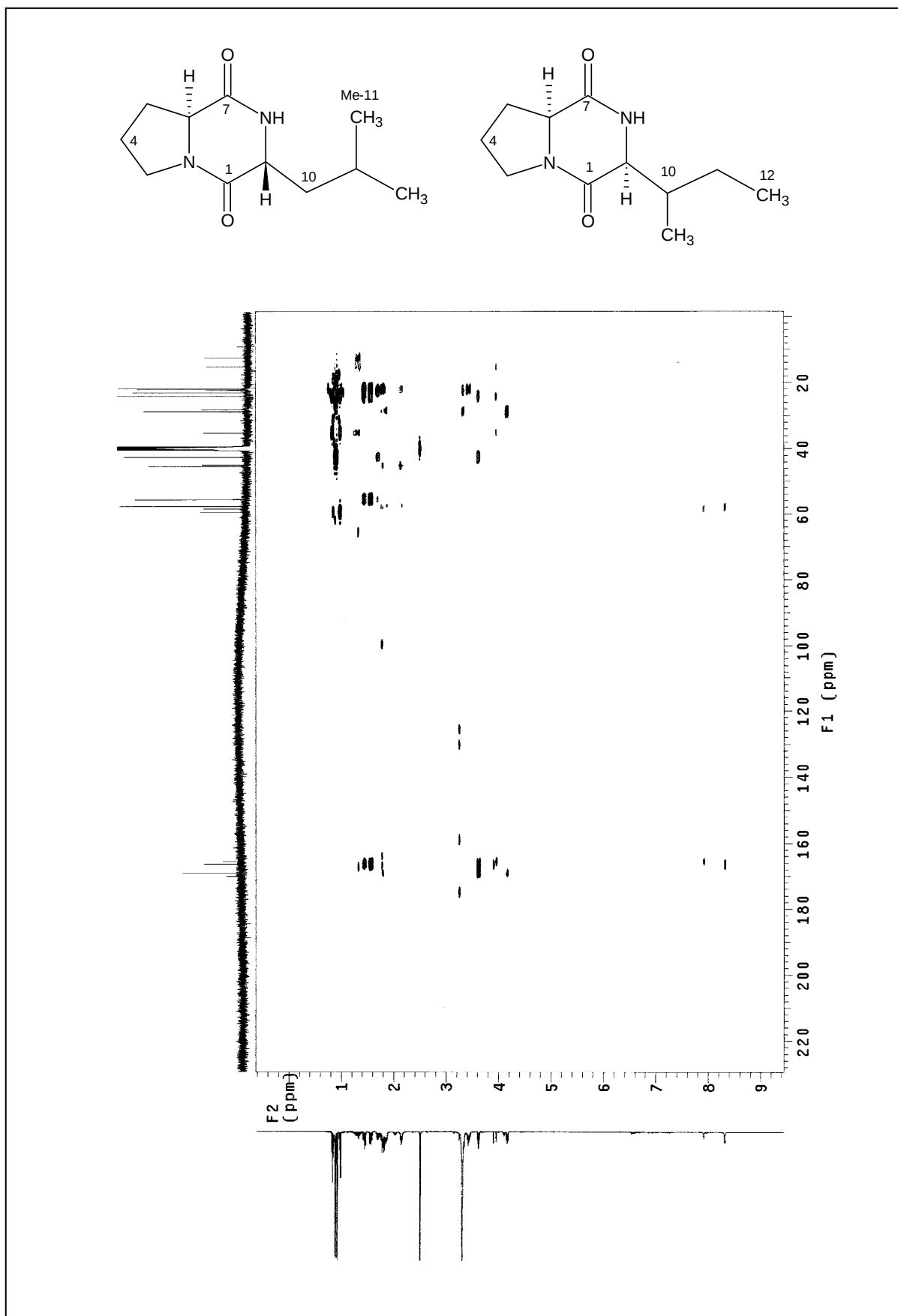


Figura 115 - Mapa de contorno $gHMBC$ de **15** / **16** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

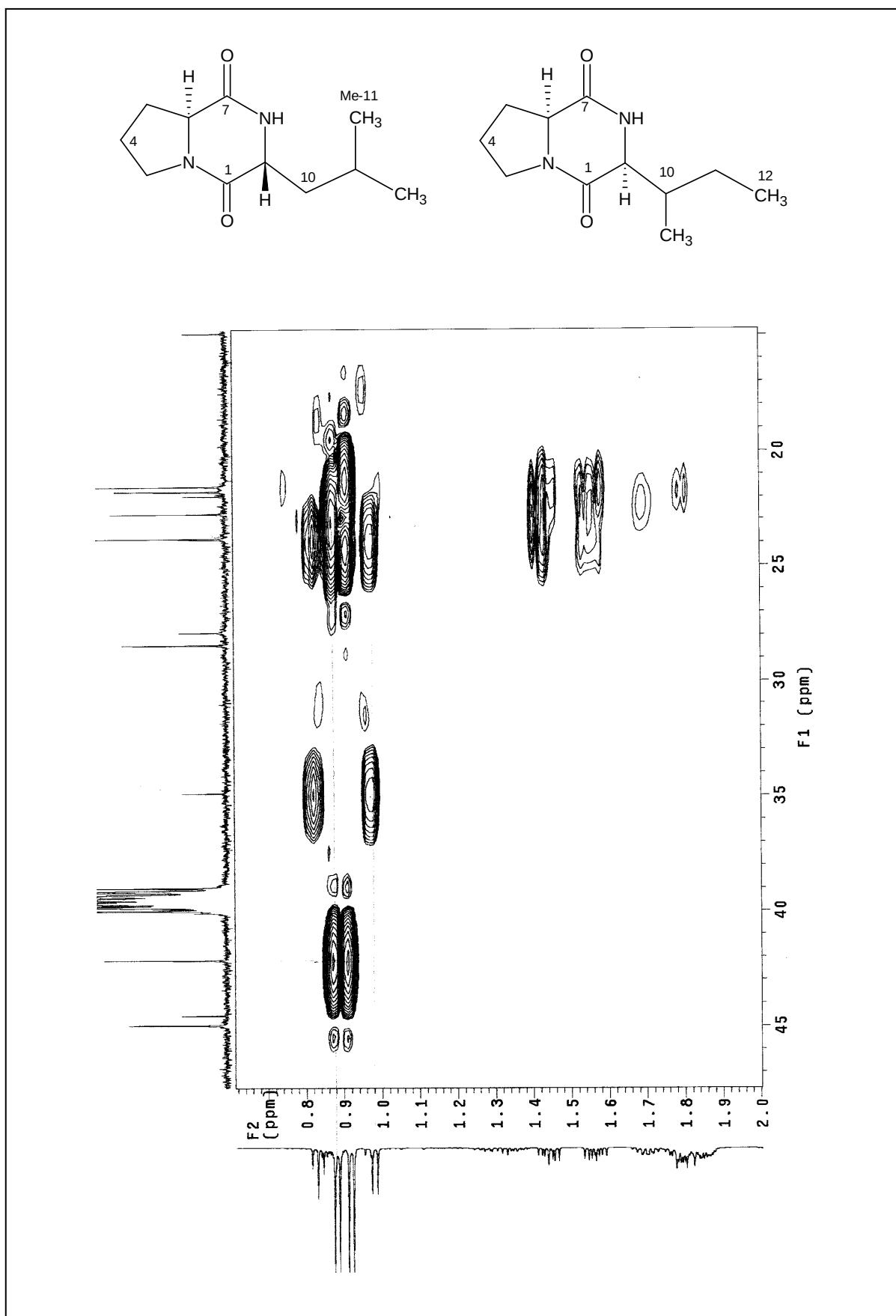


Figura 116 - Mapa de contorno g HMBC ampliado de **15** / **16** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

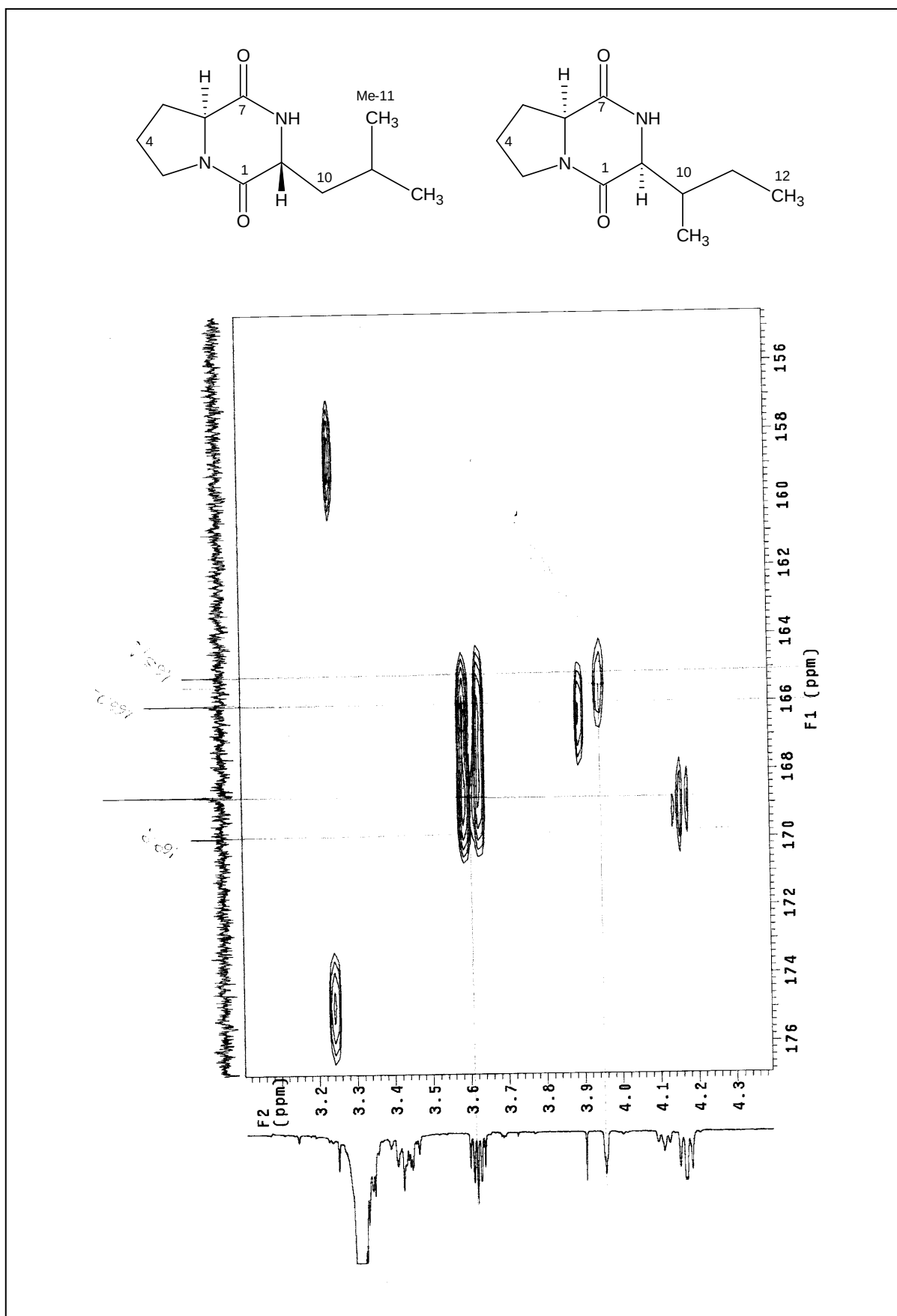
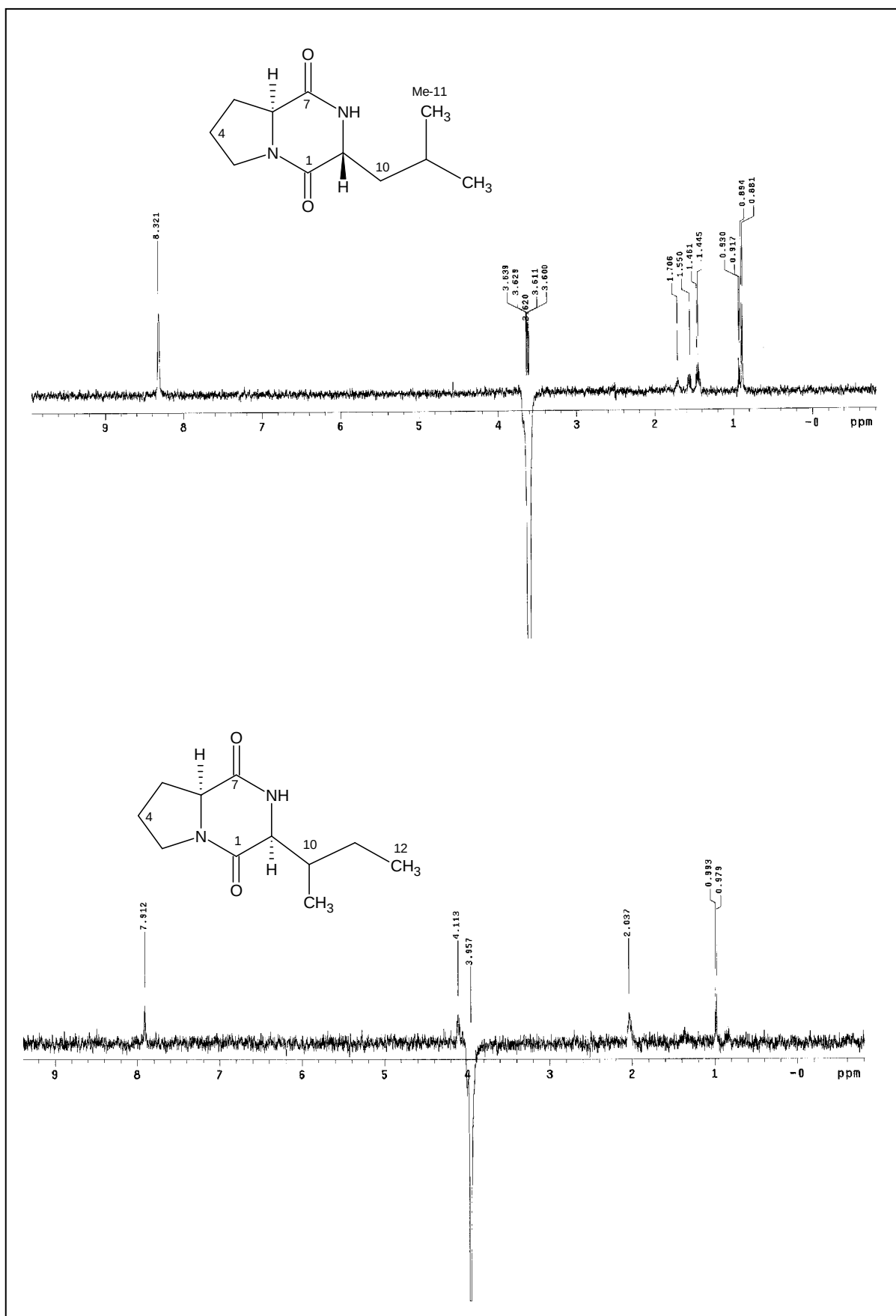


Figura 117 - Mapa de contorno g HMBC ampliado de **15** / **16** (DMSO- d_6 , 125 MHz).



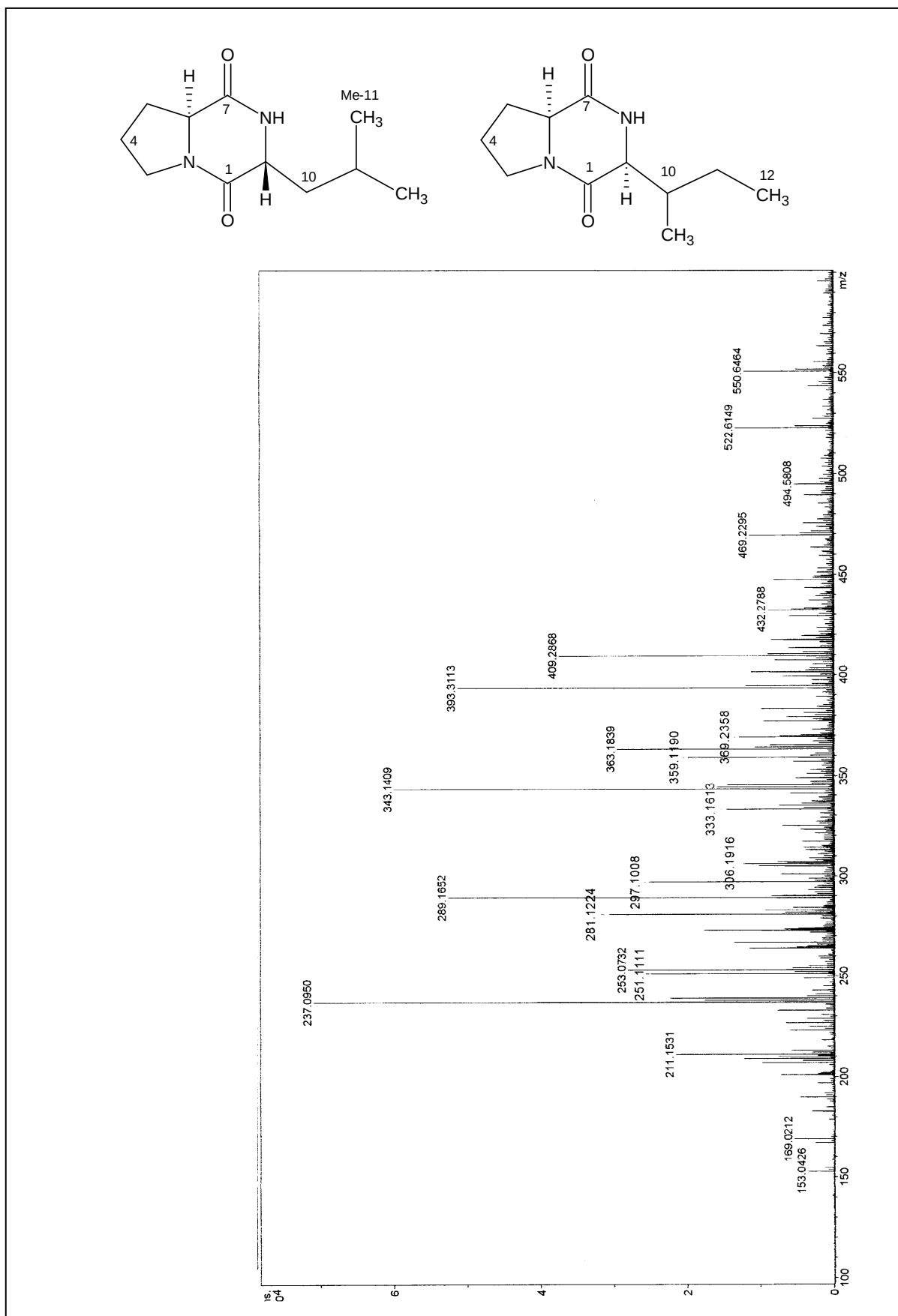


Figura 120 - Espectro de Massas de **15** / **16** (ESI-EM +120V).

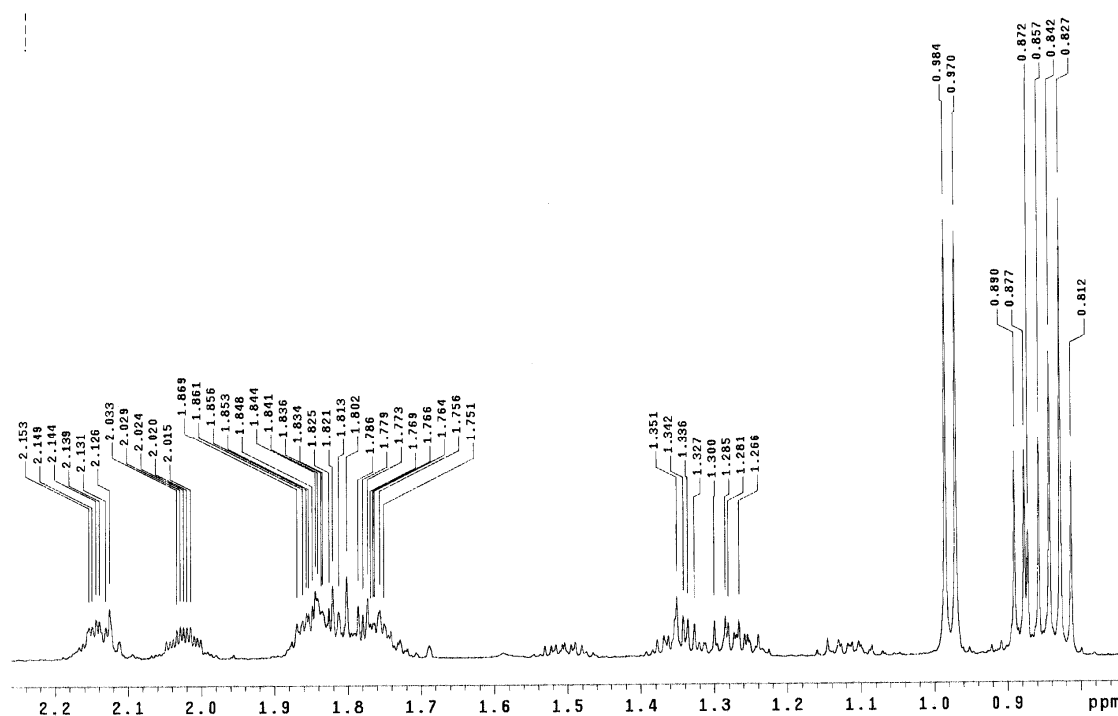
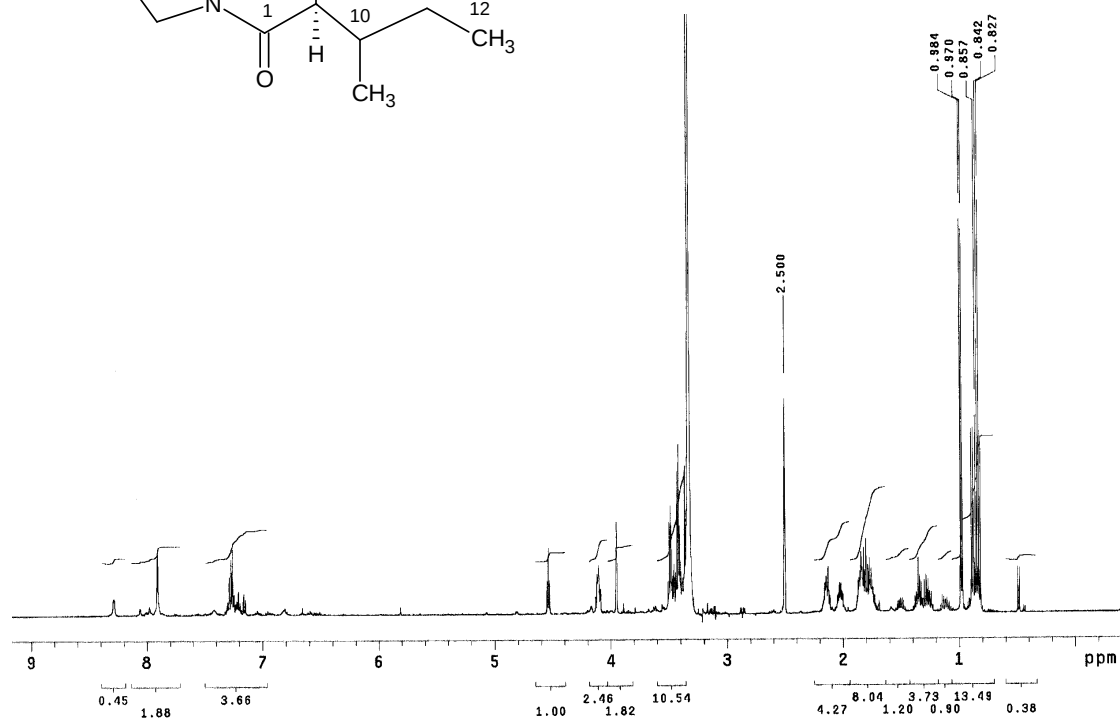


Figura 122 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **14** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

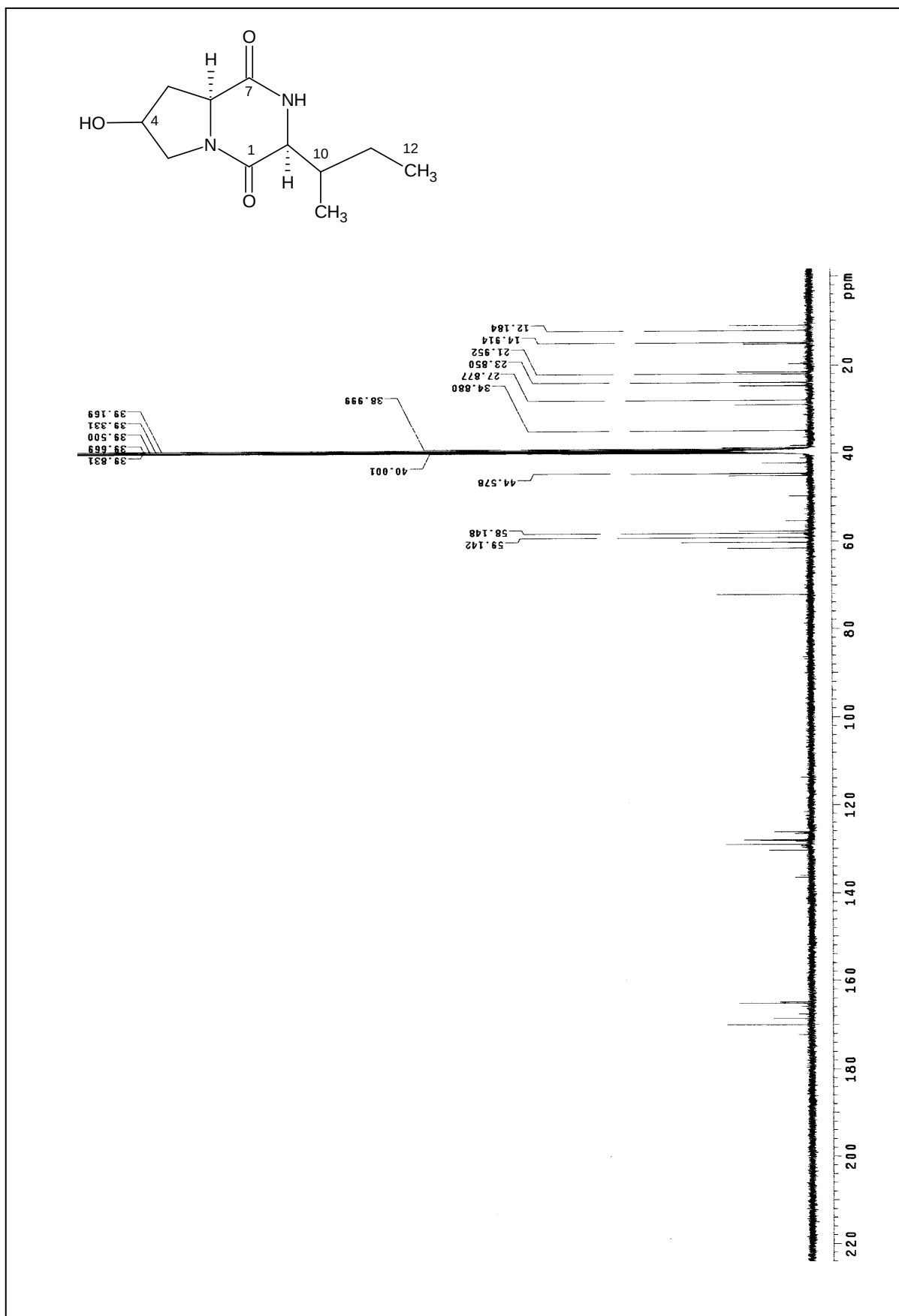


Figura 123 - Espectro de RMN de ^{13}C de **14** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

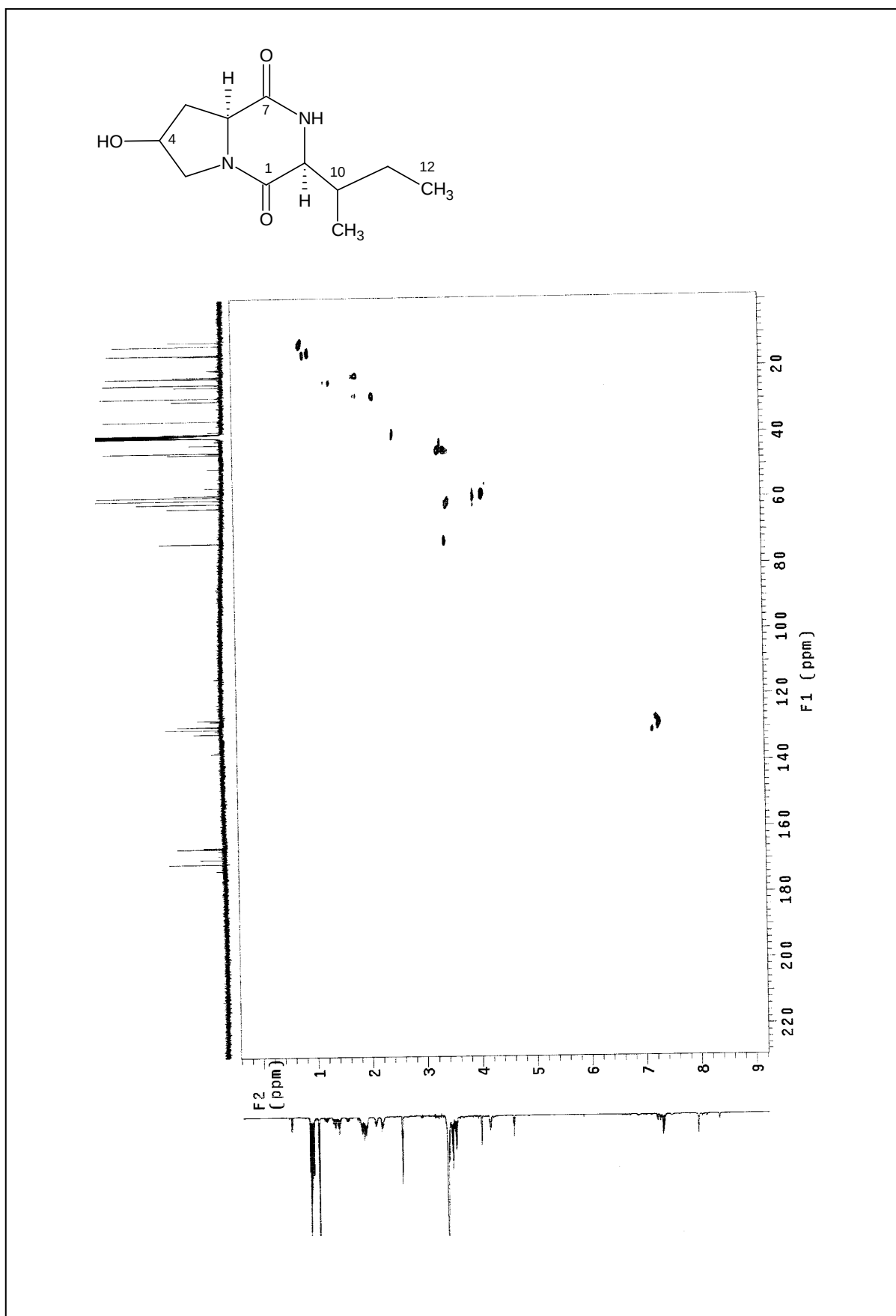


Figura 124 - Mapa de contorno gHMBC de **14** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

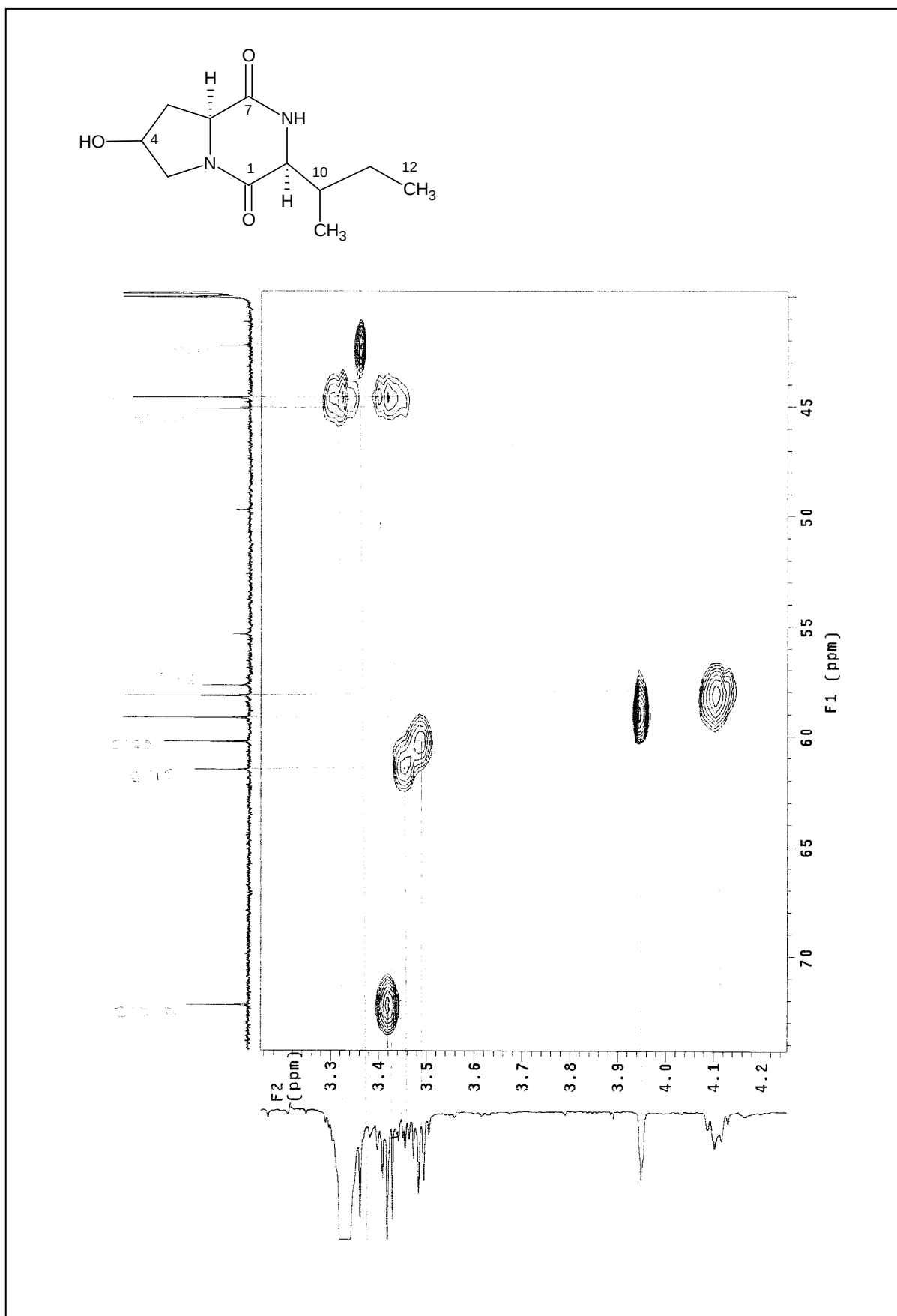


Figura 125 - Mapa de contorno *g*HMQC ampliado de **14** (DMSO-*d*₆, 125 MHz).

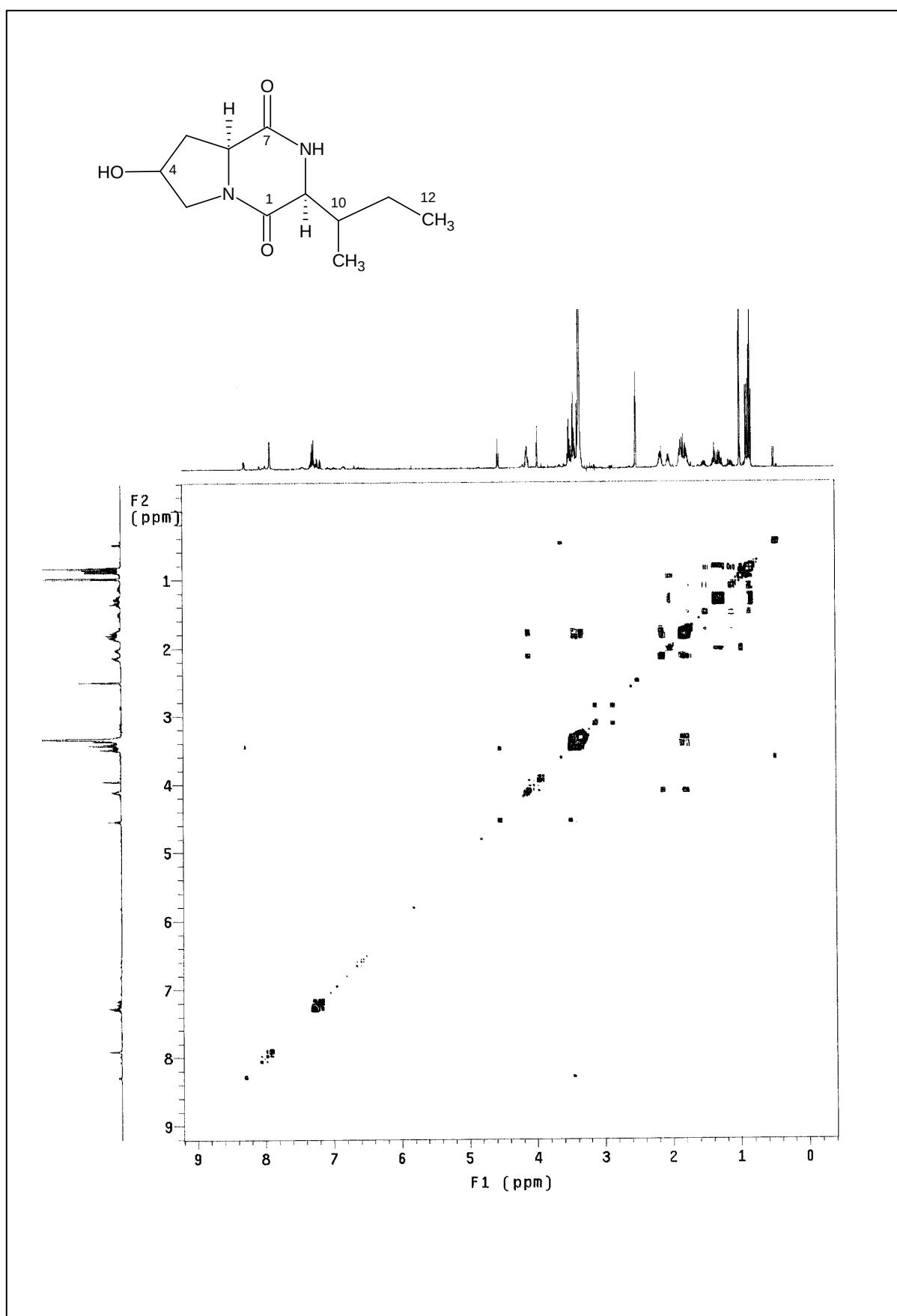


Figura 126 - Espectro de *g*COSY de **14** (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

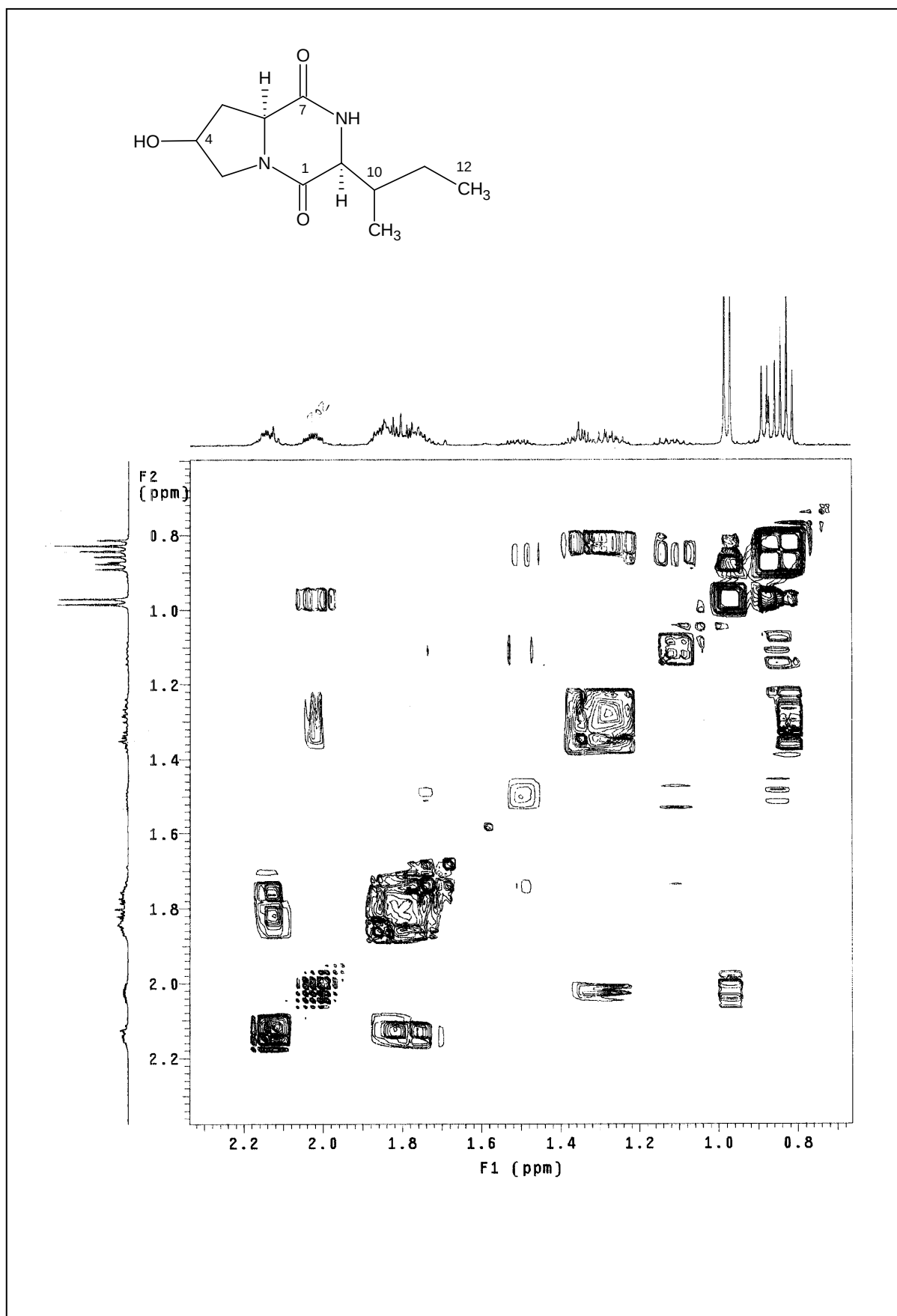


Figura 127 - Espectro de *g*COSY ampliado de **14** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

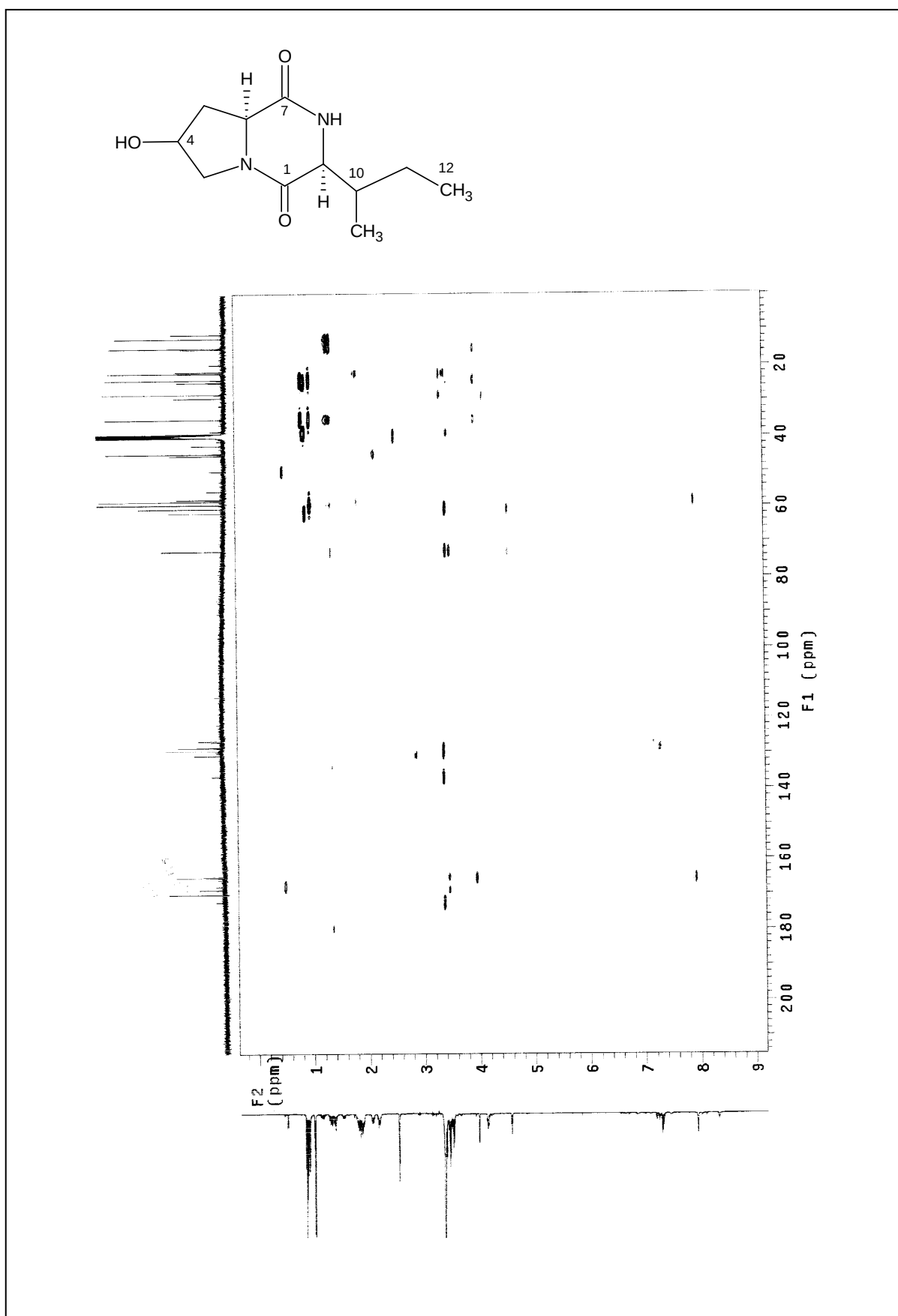


Figura 128 - Mapa de contorno g HMBC de **14** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

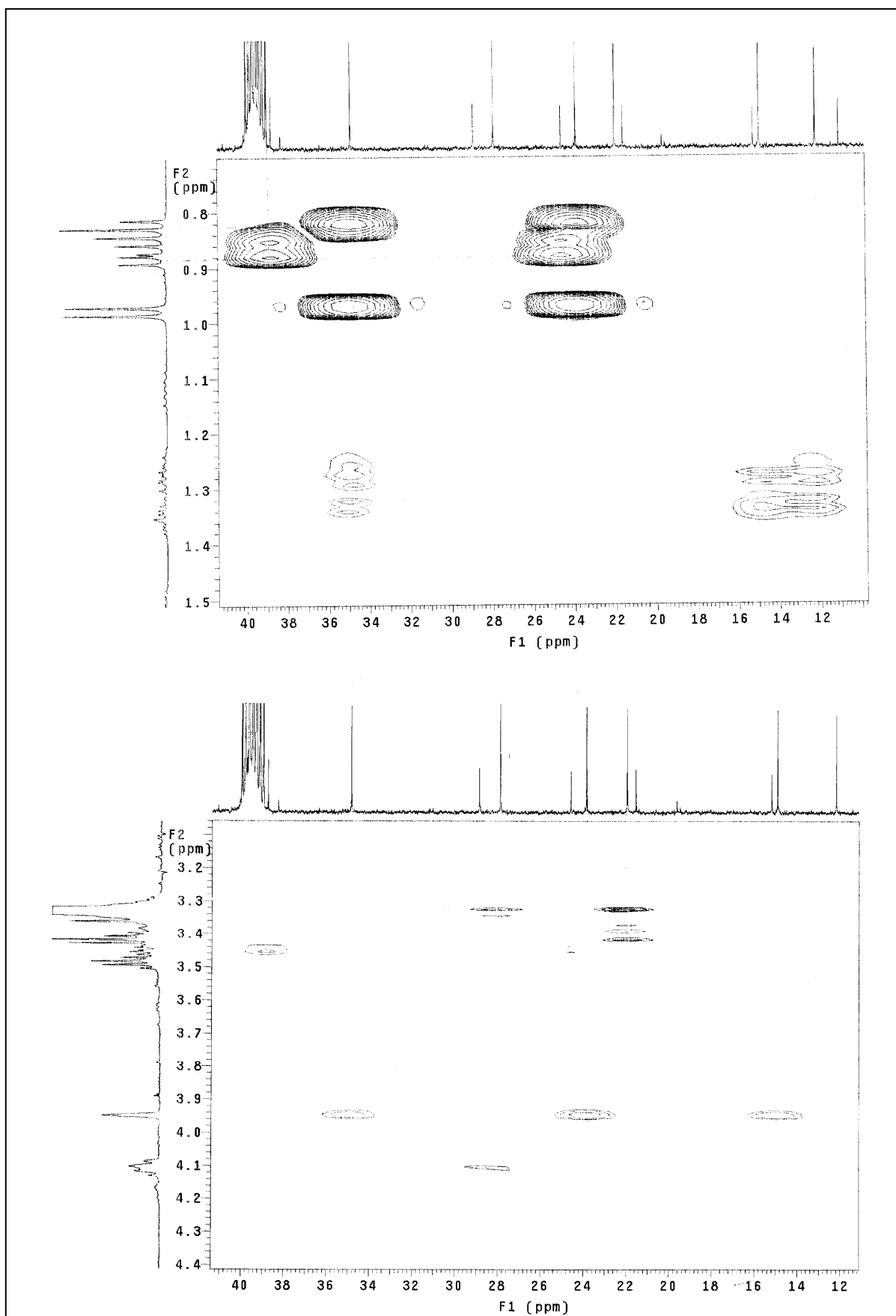


Figura 129 - Mapa de contorno gHMBC ampliado de **14** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

Figura 130 - Mapa de contorno gHMBC ampliado de **14** (DMSO- d_6 , 125 MHz).

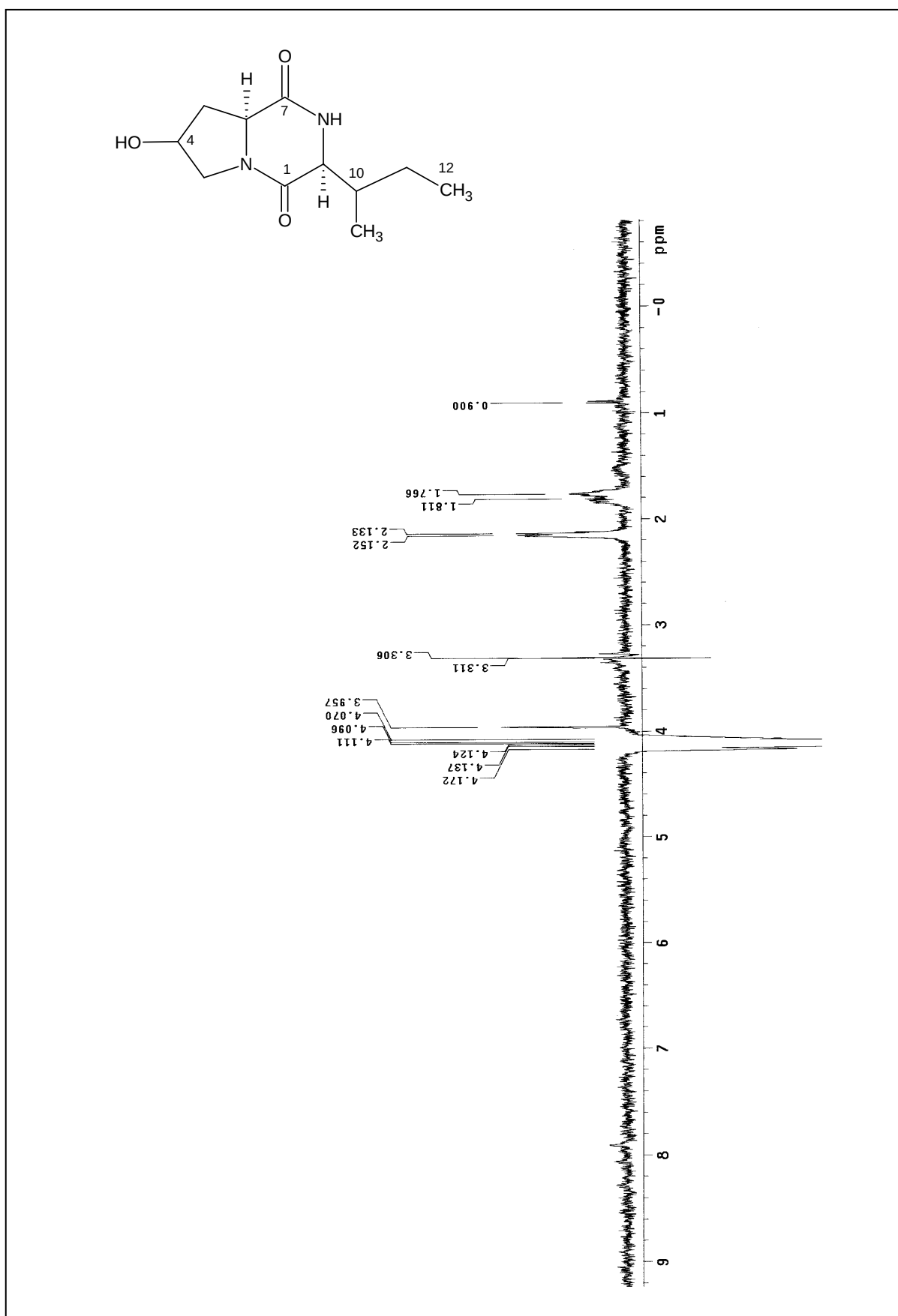


Figura 131 - Espectro de NOESY-1D de **14** (DMSO-*d*₆).

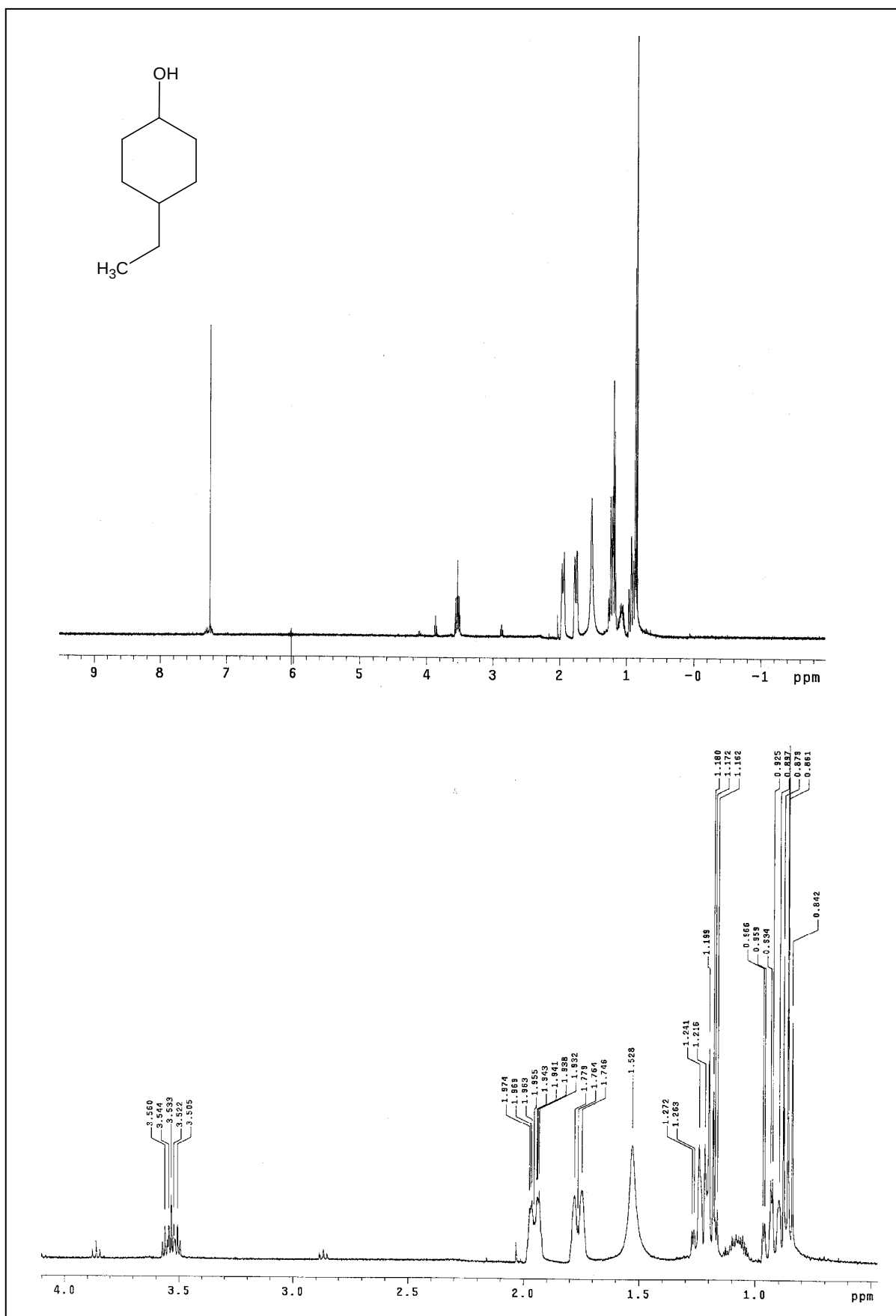


Figura 135 - Espectro de RMN de ^1H de **B-1** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 136 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **B-1** (CDCl_3 , 500 MHz).

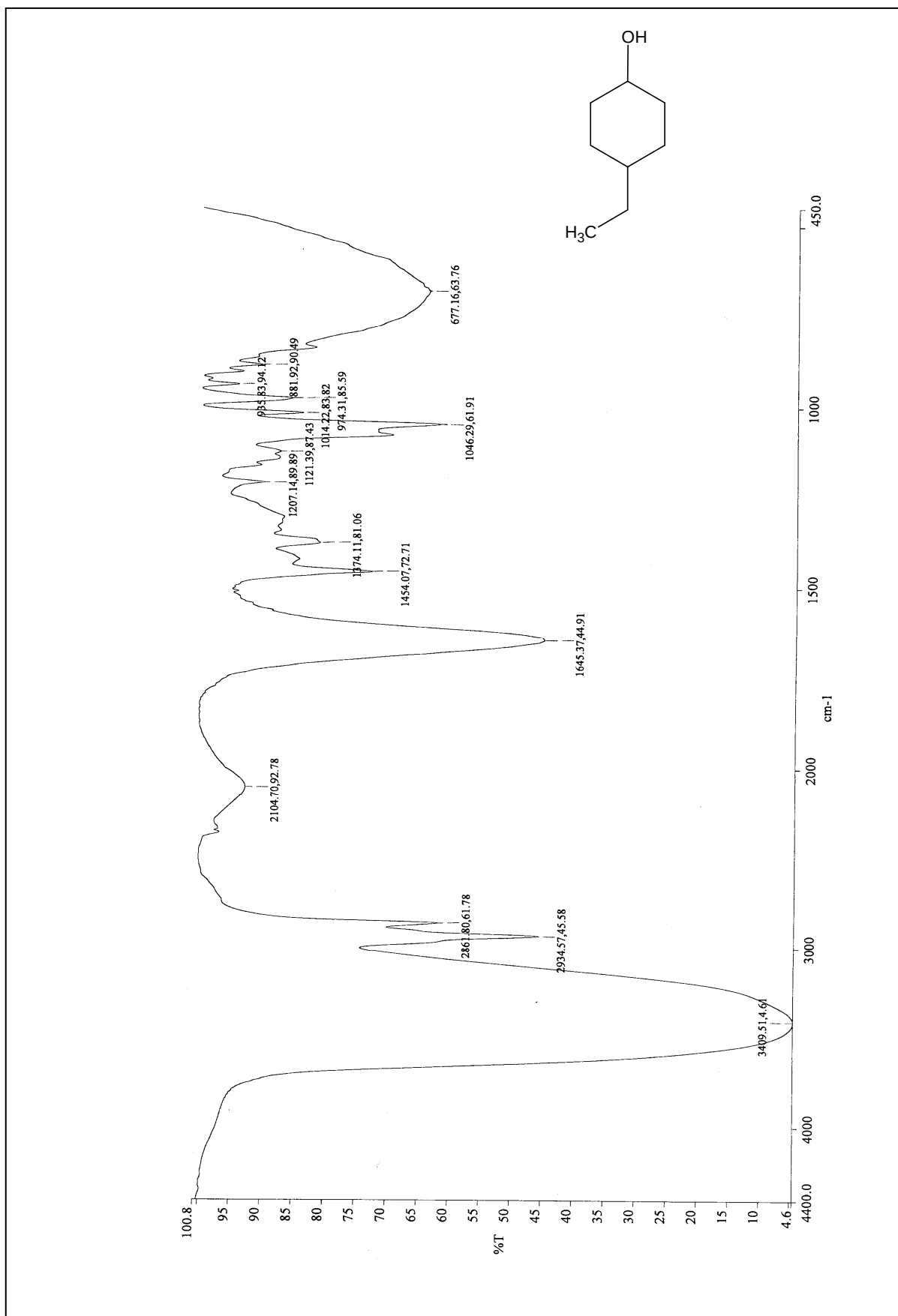


Figura 137 - Espectro de Infravermelho de B-1.

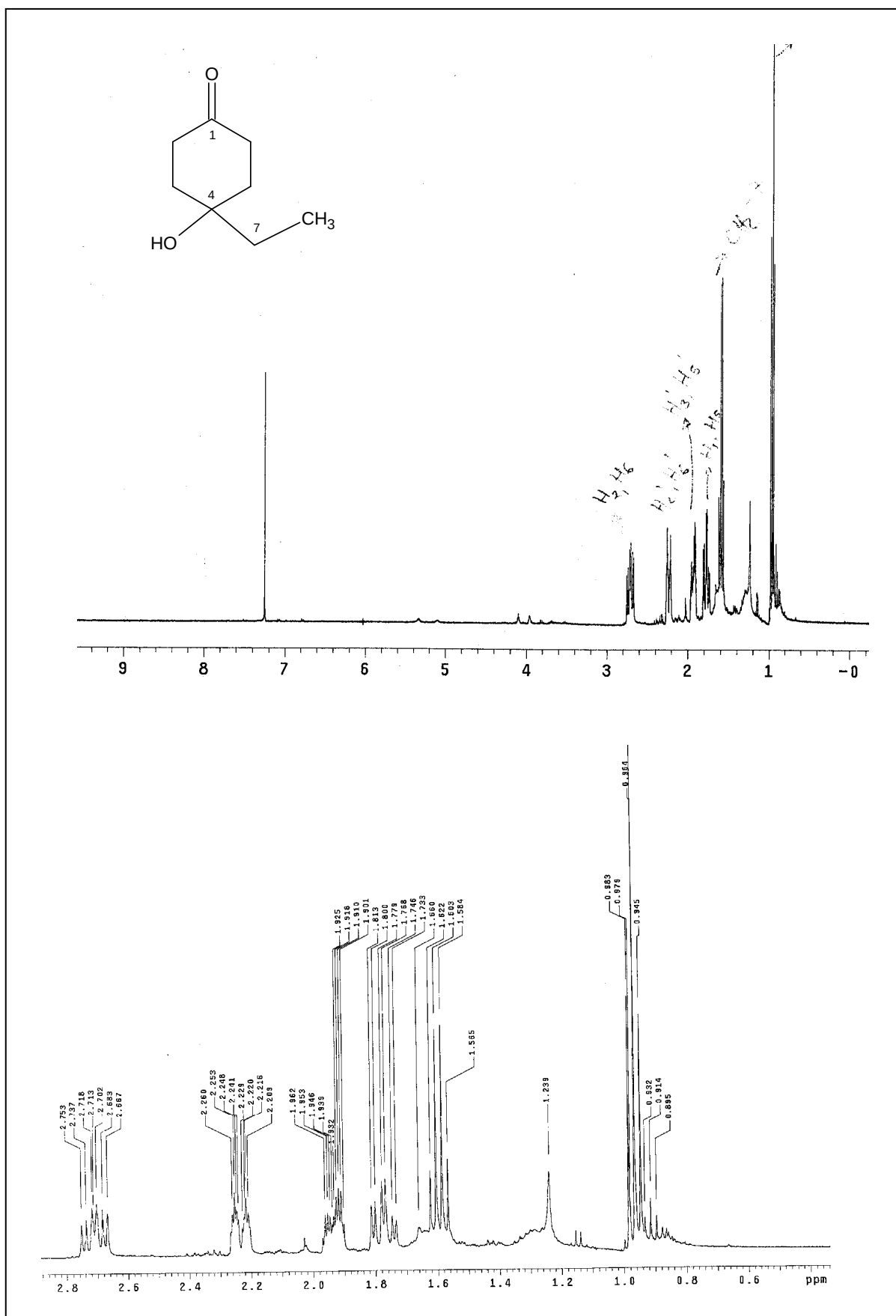


Figura 138 - Espectro de RMN de ^1H de **B-3** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 139 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **B-3** (CDCl_3 , 500 MHz).

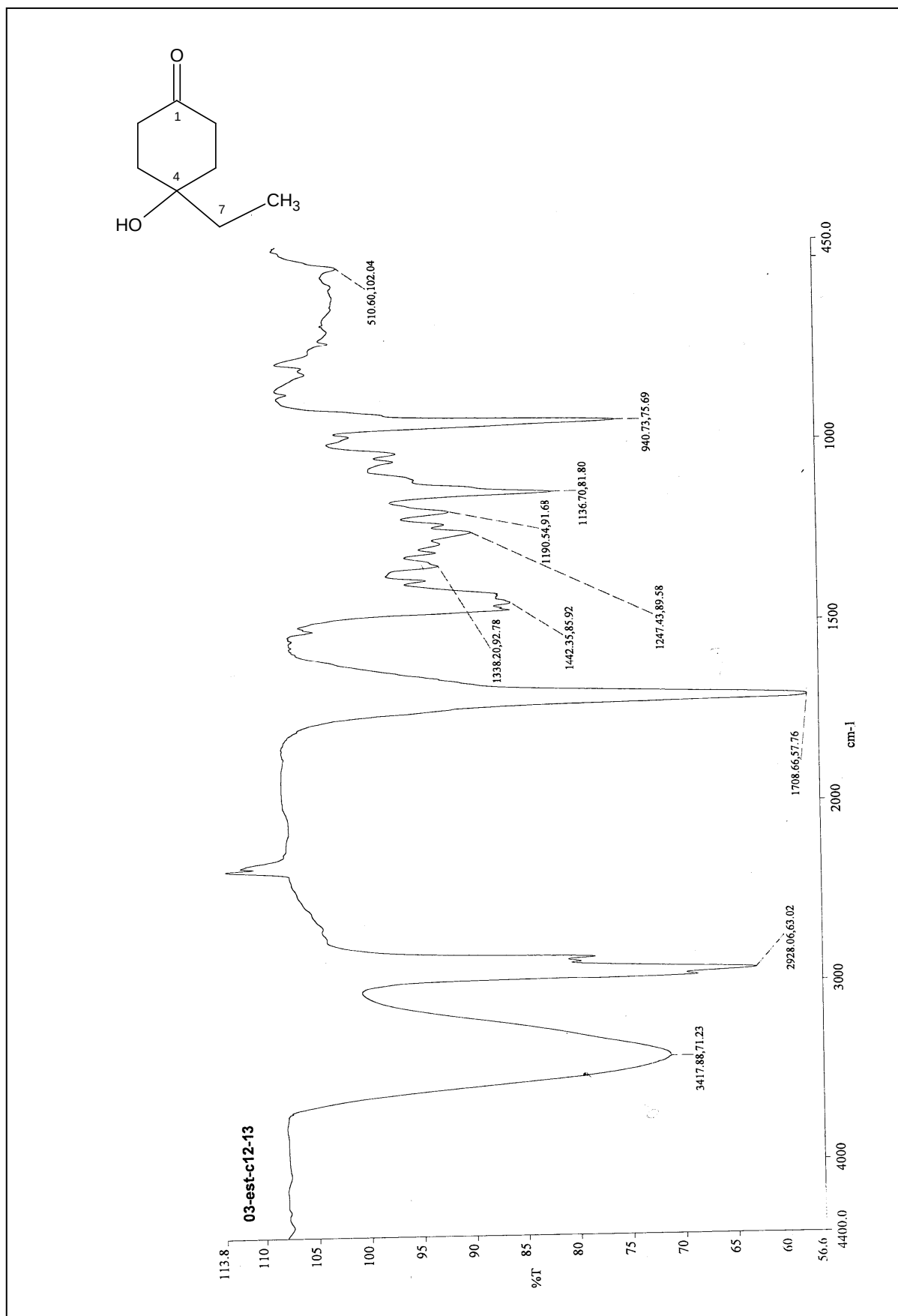


Figura 140 - Espectro de Infravermelho de B-3.

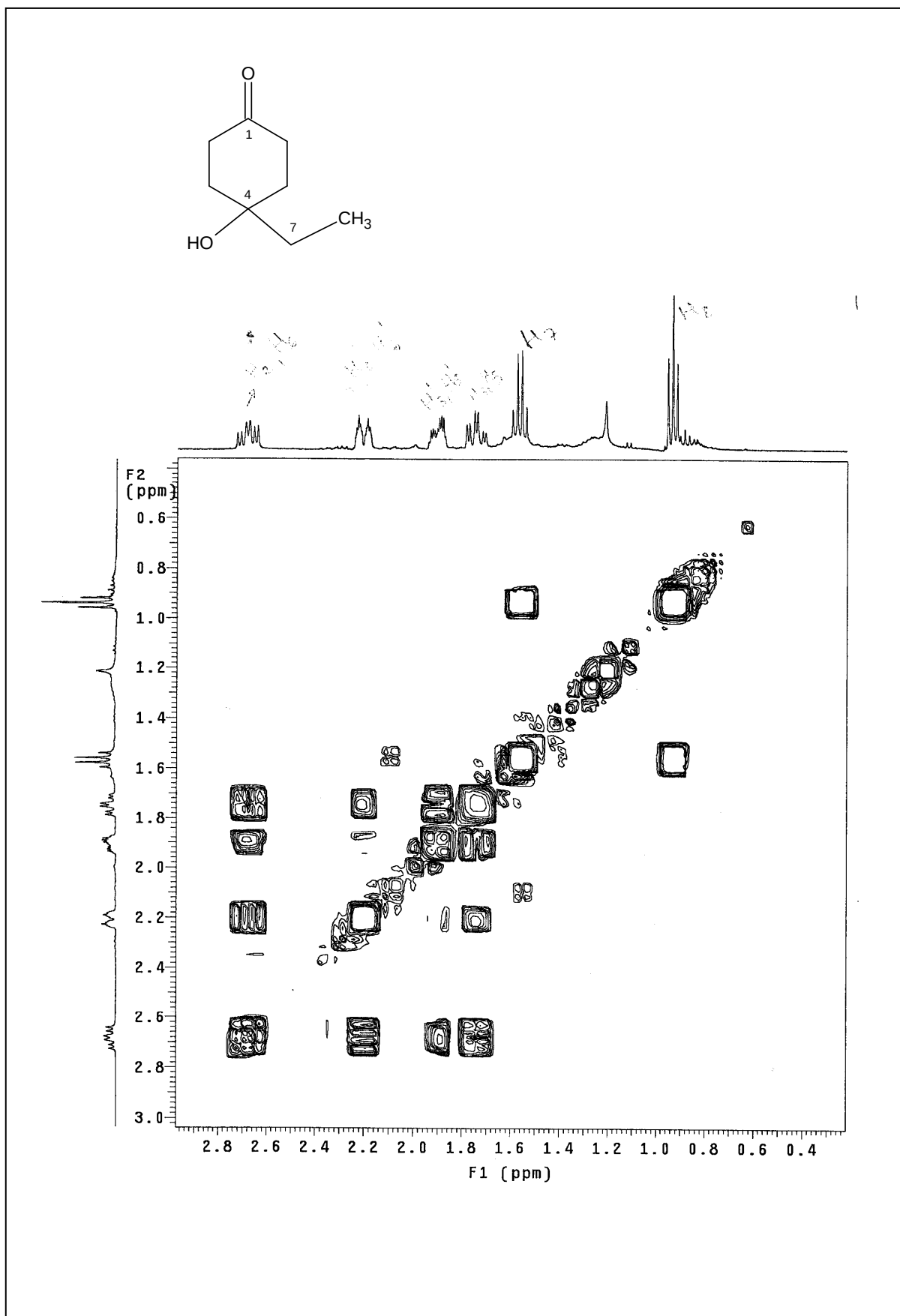


Figura 141 - Espectro de *g*COSY de **B-3** (CDCl₃, 500 MHz).

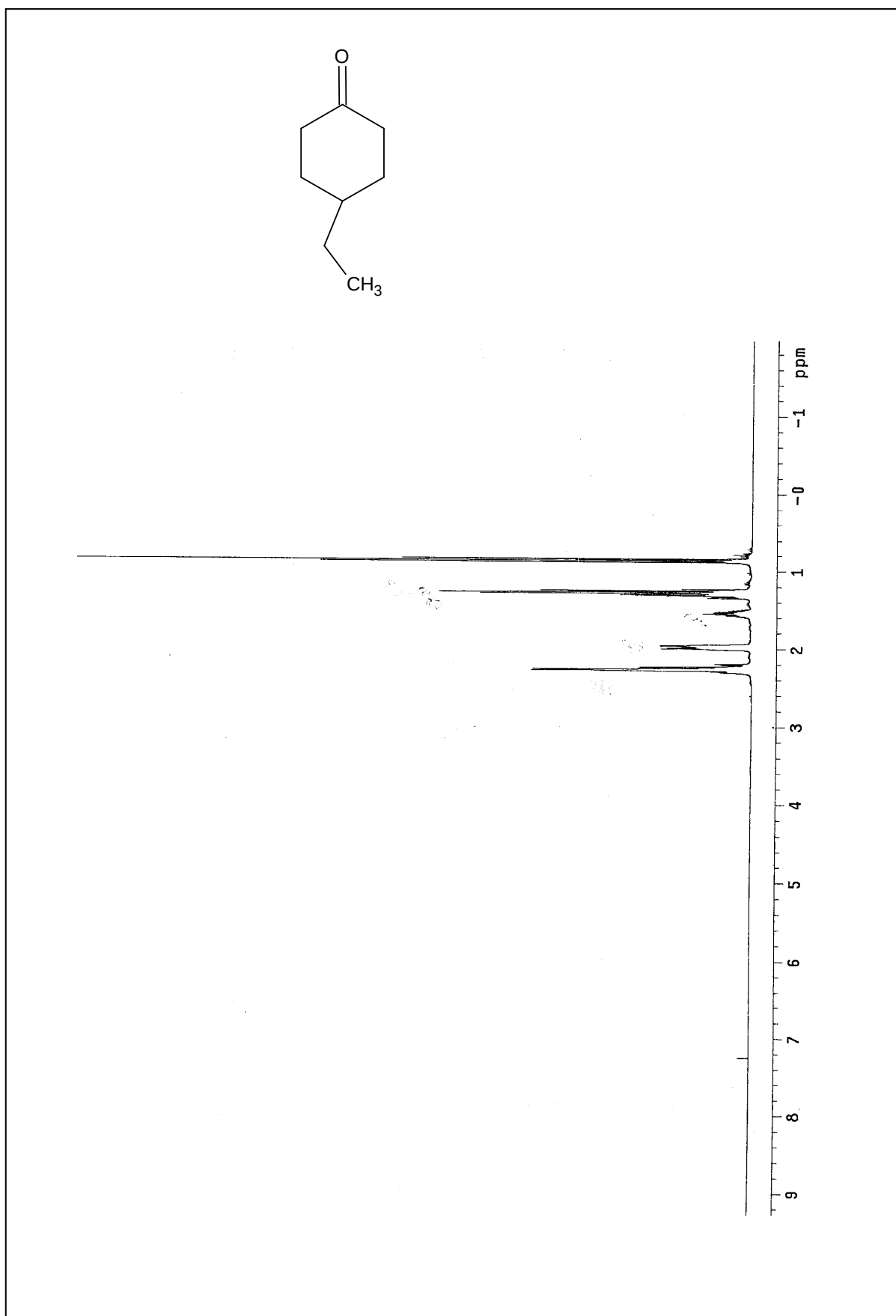


Figura 142 - Espectro de RMN de ^1H da 4-etilciclohexanona (CDCl_3 , 500 MHz).

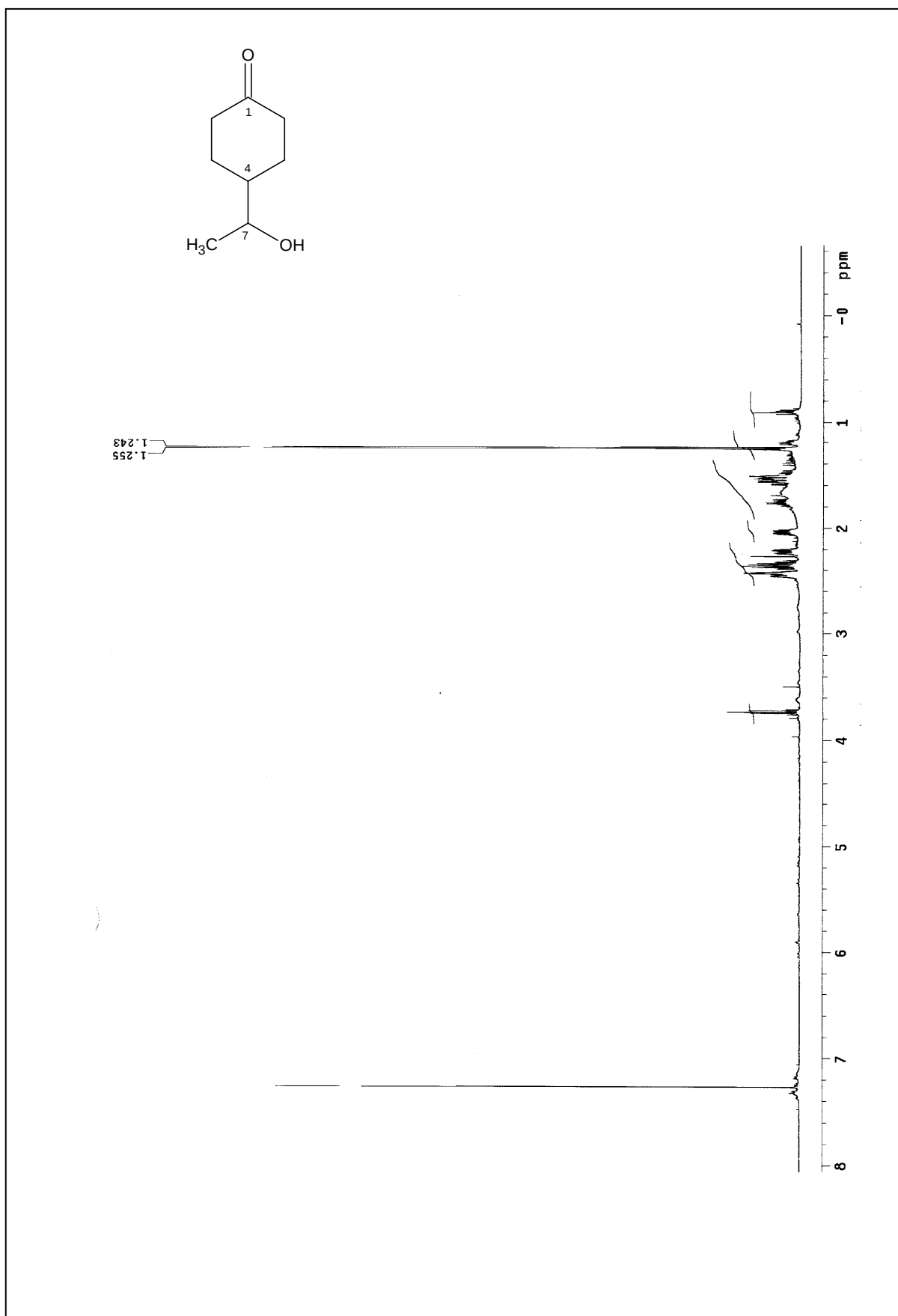


Figura 143 - Espectro de RMN de ¹H de **B-4** (CDCl₃, 500 MHz).

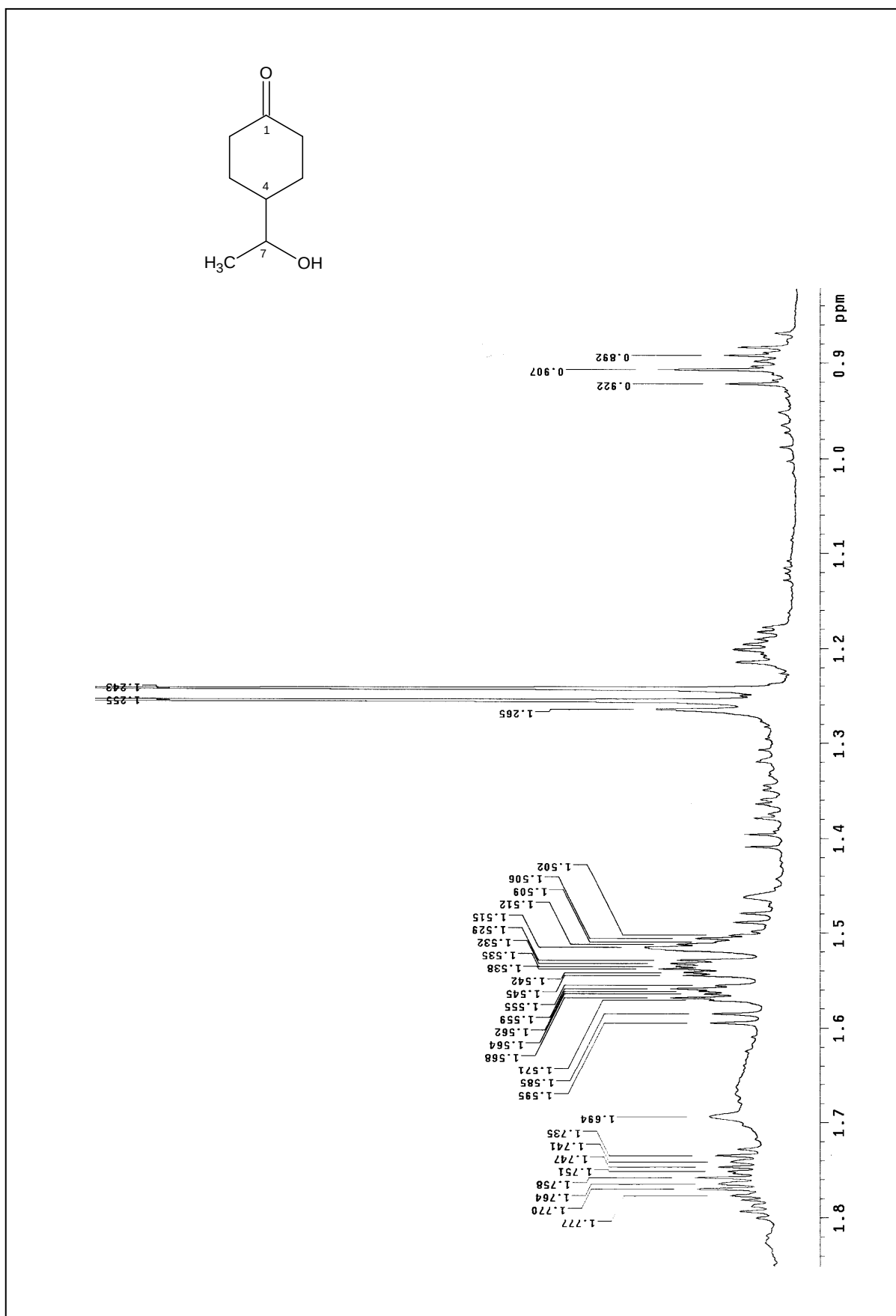


Figura 144 - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **B-4** (CDCl₃, 500 MHz).

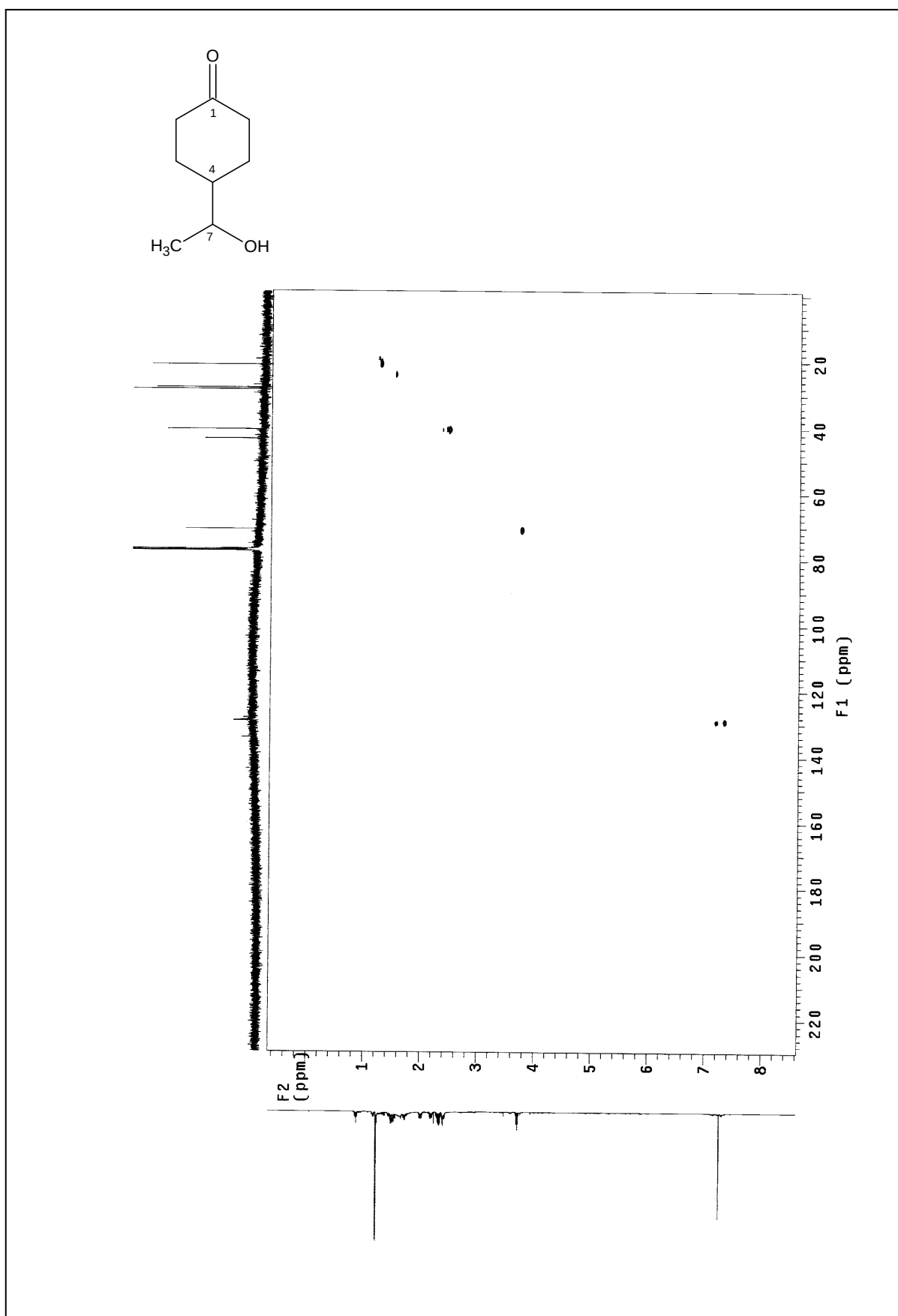


Figura 145 - Mapa de contorno gHMOC de **B-4** (CDCl₃, 125 MHz).

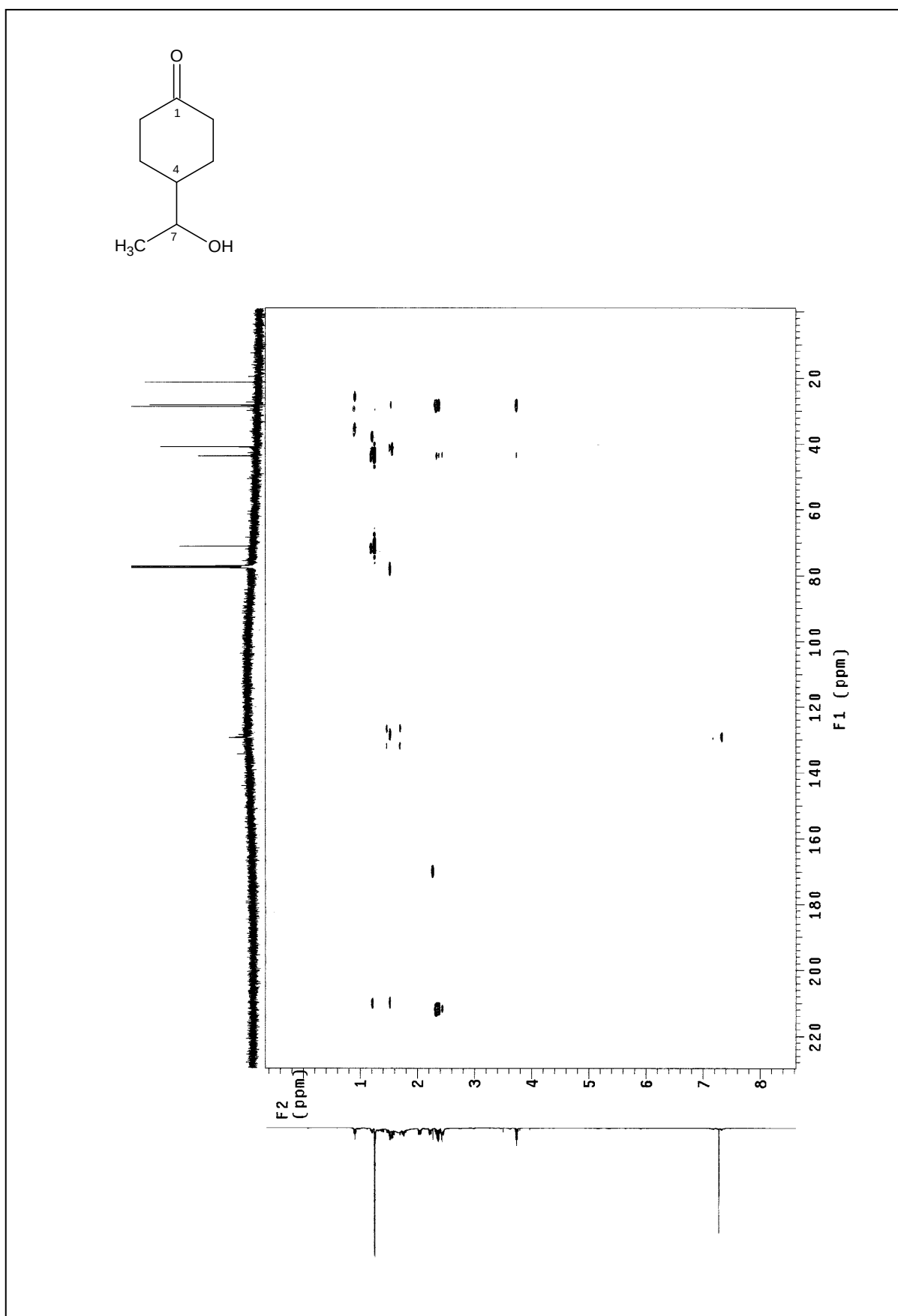


Figura 146 - Mapa de contorno g HMBC de **B-4** ($CDCl_3$, 125 MHz).

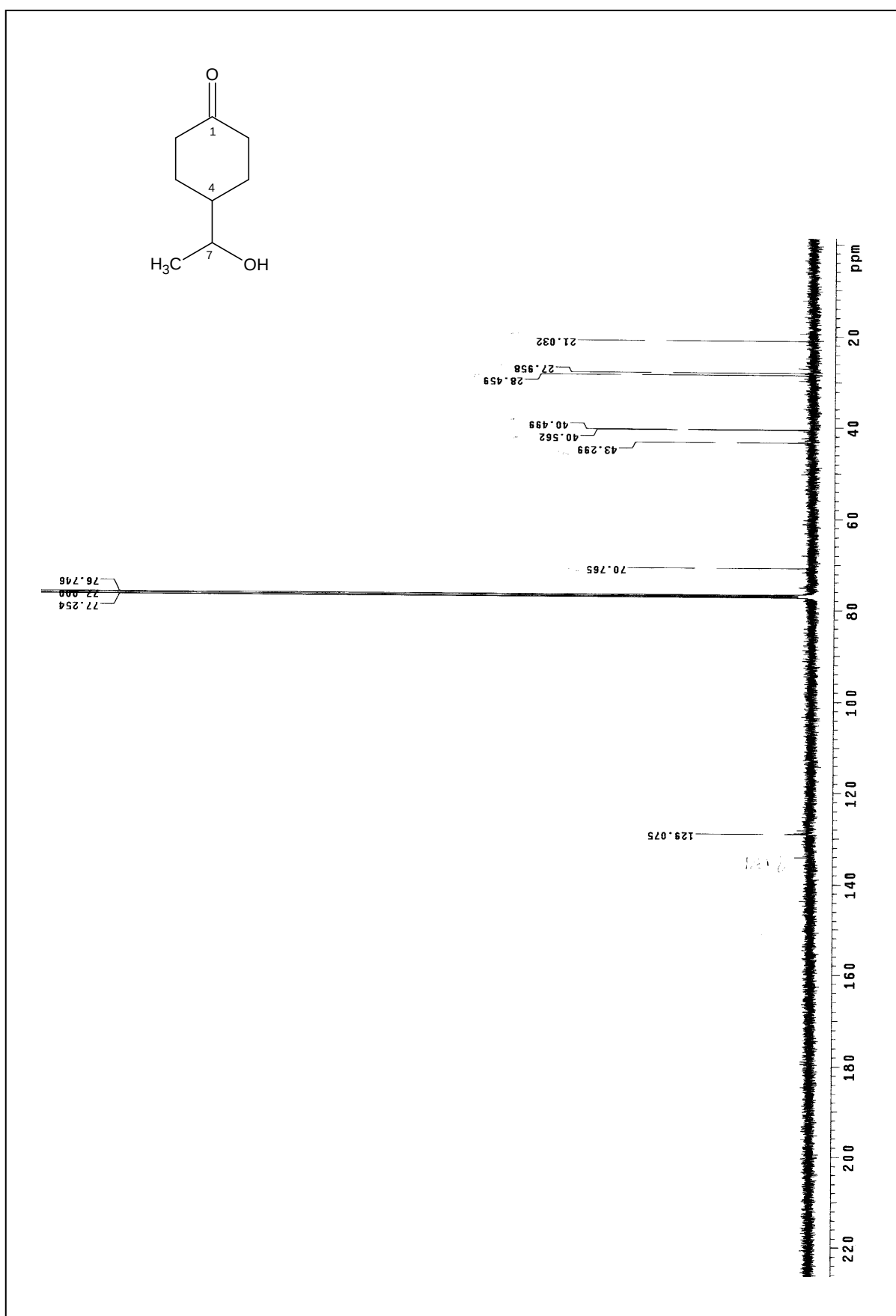


Figura 147 - Espectro de RMN de ^{13}C de **B-4** (CDCl₃, 125 MHz).

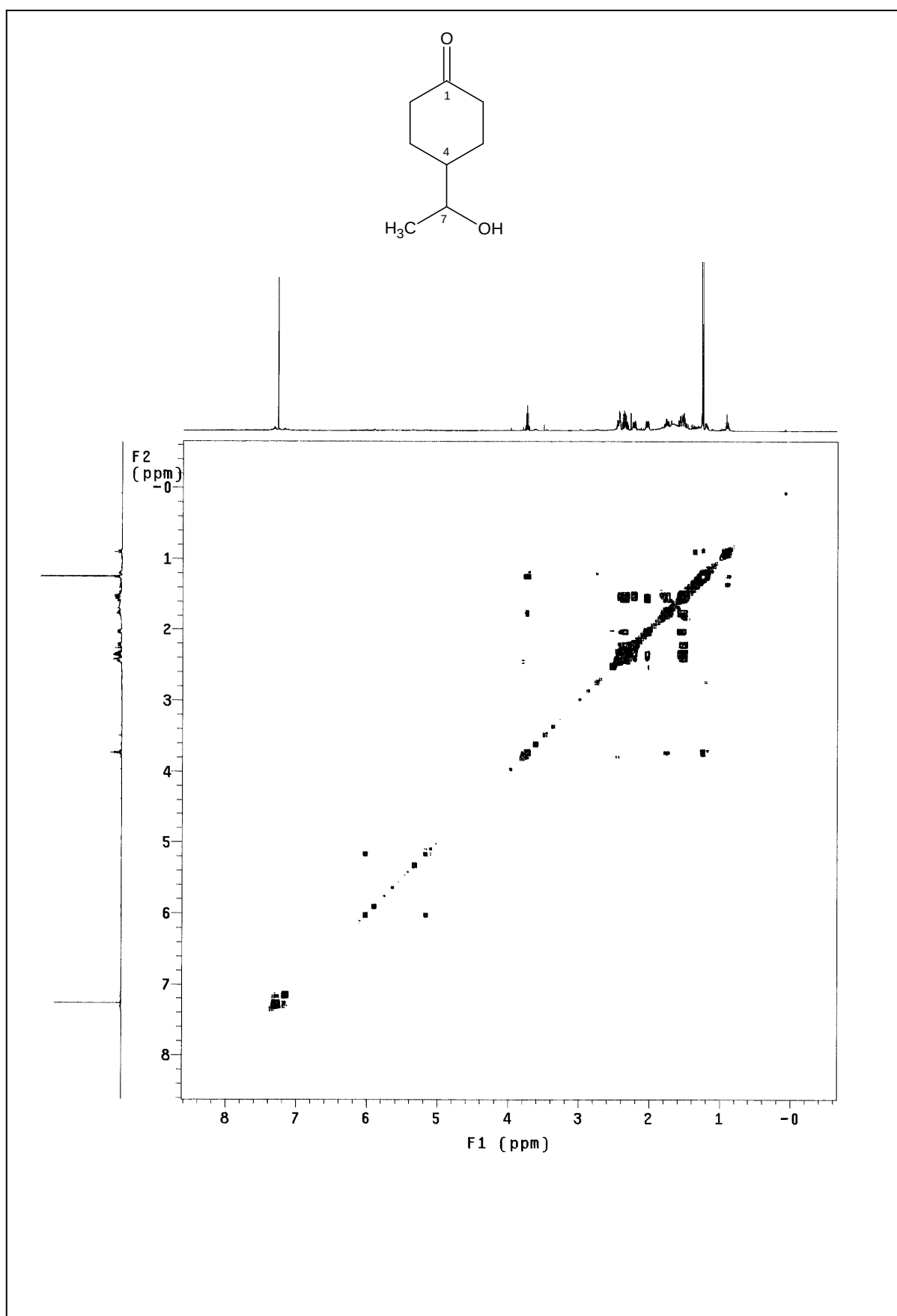


Figura 148 - Espectro de *g*COSY de **B-4** (CDCl_3 , 500 MHz).

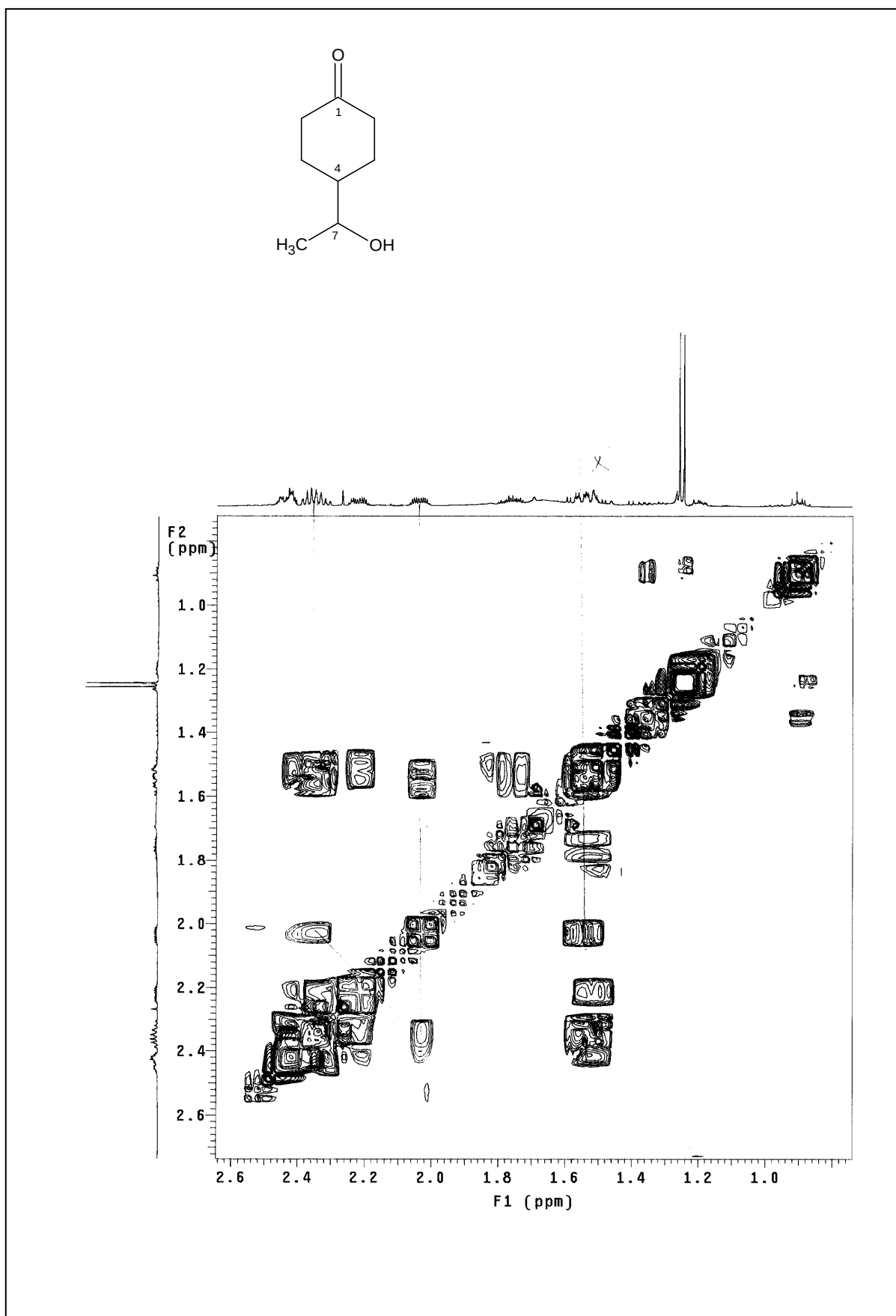


Figura 149 - Espectro de ^1H - ^1H gCOSY ampliado de **B-4** (CDCl_3 , 500 MHz).