



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Química



Fernando Monteiro Borges

**Perfil metabólico por RMN de ^1H e avaliação citotóxica do fungo endofítico
Colletotrichum gloeosporioides isolado de *Eugenia jambolana*, em diferentes
meios de cultivo**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

Araraquara
2014

DADOS CURRICULARES

FERANANDO MONTEIRO BORGES

1. Dados Pessoais

Nascimento: 04 de janeiro de 1985

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo-SP

Filiação: João Batista Borges

Mércia Monteiro Borges

Estado Civil: Solteiro

Profissão: Química

Documento de Identidade: 34.275.058-6 SSP

Cadastro de Pessoa Física: 342.345.678-76

Endereço: Avenida Itápolis, 2169.

Bairro Bela Vista

Araraquara-SP

CEP: 14800-040

E-mail: fernandomborges@yahoo.com.br

2. Formação Acadêmica/ Titulação

2.1. Graduação

1. Licenciatura em Química - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” concluído em 24 de janeiro de 2011.

3. Produção Bibliográfica

3.1. Resumos apresentados em congressos

BORGES, F.M.; ZANARDI, L. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS, ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DO FUNGO ENDOFÍTICO DE MICHELIA CHAMPACA. 2009. São José do Rio Preto-SP.

BORGES, F.M.; ZANARDI, L. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO Mc-8R ISOLADO DE MICHELIA CHAMPACA L.(MAGNOLIACEAE). 2009. Araraquara-SP.

BORGES, F. M.; BIZELLI, M. H. S. S.; CAPELA, M. V.; CAPELA, J. M. V.; TANAKA, J. S.; BARROZO, S. Informatica Para a Terceira Idade. 2005. Águas de Lindóia-SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Angela pela confiança em aceitar me orientar e pela paciência (e não foi pouca) em passar todo o conhecimento necessário na difícil tarefa de formar.

Agradeço a galera da micosse, Gígi, Carol, Blosson, Juzinha, Miller, Thomaz, João, Vanessa, Alana e em especial a Néia, foi muito mais fácil realizar este trabalho ao lado de pessoas como vocês e as confraternizações (com peru) ficam na memória.

Agradeço a meus professores que me guiaram neste caminho que tanto sonhei e graças a eles tornei real, em especial aos professores Alberto José Cavalcheiro, Ian Castro Gamboa, Lourdes Campaner dos Santos e Wagner Vilegas todos extremamente solícitos nesta Pós-Graduação e a Professora Marian da graduação um exemplo a ser seguido.

Agradeço aos meus irmãos de república Batata, Batatinha, Caracol, Cebinho, Dimitrí, Ditinho, Escuridão, Samambaia, Troll, Zed, Zoinho foi um aprendizado absurdo conviver com vocês.

Jú, Sara, Aline, Carol e Kauby não poderia deixar de agradecer também pelos anos de convivência.

Agradeço aos amigos do IQ que de alguma maneira contribuíram nestes anos, por toda ajuda, amizade e paciência em todos os momentos que necessitei Flávio, Cláudia, Mari, Cadu, Suzy, Dany, Gí, Amauri, Doni, Luizinho, Renatinho.

Agradeço a todos os funcionários do IQ, em especial ao João, Ju, Marília, Nivaldo, Albertinho, Marquinho, Zilda, Rogério.

Agradeço a minha querida família pelo apoio incondicional e exemplo, meus pais João e Mércia, as minhas amadas tia Fátima, Carol, vó Ana e Genny, meu vô Luiz que sempre estará nos meus pensamentos, aos meus irmãos Marcos e Anny, mesmo estando longe a tanto tempo sempre sinto vocês comigo.

E principalmente a quem me atura todos os dias, Lucy e todas as crianças... Amo muito todos vocês

*“Wisdom doesn't automatically come with old age. Nothing does -
-- except wrinkles. It's true, some wines improves with age. But
only if the grapes were good in the first place”*

*“The best index to a person's character is how he treats people
who can't do him any good, and how he treats people who can't
fight back.”*

Abigail Van Buren

RESUMO

Borges, F. M. **Perfil metabólico por RMN de ^1H e avaliação citotóxica do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Eugenia jambolana*, em diferentes meios de cultivo.** 2014. Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química de Araraquara - UNESP.

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam assintomaticamente o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos vegetais como as folhas, caule, frutos, sementes e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, e são transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro. Estes exibem interações ecológicas específicas em seu habitat que tem sido pouco exploradas como estratégia para a descoberta de novos produtos naturais bioativos. Entre as várias modificações de meios de cultivo para estimular rotas biossintéticas silenciosas e aumentar a produção metabólica, a técnica OSMAC (One Strain Many Compounds) foi empregada neste trabalho. *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Eugenia jambolana* foi cultivado em dois meios de cultivo sólidos (arroz e milho) e cinco líquidos (Czapek, Malte, Nutrient, PDB e YM), na presença e ausência de rede de polietileno como suporte sólido, objetivando avaliar a variação na produção de metabólitos secundários. Com a variação dos meios de cultivo, foi possível observar grande variação metabólica em todos os meios, o que foi constatado pelas análises por RMN de ^1H e CLAE/DAD. Para o cultivo em extrato de malte na presença do suporte sólido (rede de polietileno) foi observado um aumento de massa de aproximadamente 275% no cultivo. Os extratos EjC(05)Arroz, EjC(05)YmSR, EjC(05)MaltSR e EjC(05)MaltCR, mostraram potencial antitumoral contra as linhagens OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon humano) e SF-295 (glioblastoma humano). Avaliação de todos os extratos brutos permitiu selecionar o extrato EjC(05)MaltCR para a desreplicação das substâncias produzida, sendo possível identificar as dicetopiperazinas Ciclo Prolina-Valina e Ciclo Prolina-Leucina/Isoleucina.

Palavras-chaves: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Eugenia jambolana*, atividade antitumoral, OSMAC, fungo endofítico.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that asymptotically colonize the interior of plants, being found in plant organs such as leaves, stems, fruits, seeds and roots, the plant may dwell for a lifetime, and are transmitted in some cases, for future generations through seed host. These exhibit specific ecological interactions in its habitat that has been little explored as a strategy for the discovery of new bioactive natural products. Among the various modifications of culture media to stimulate and increase silent biosynthetic pathways and metabolic production, OSMAC (One Strain Many Compounds) technique was used in this work. *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Eugenia jambolana* was grown in two different kind of media: two nutrient solids (rice and maize) and five nutrient liquids (Czapek, Malte, Nutrient, PDB and YM) in the presence and absence of polyethylene as a solid support network, to evaluate the variation in the production of secondary metabolites. With the change of the culture media, we observed high metabolic variation in all media, which was corroborated by analysis by ^1H NMR and HPLC-DAD. For cultivation in malt extract in the presence of the solid support network (polyethylene) was observed a mass increase of approximately 275% in cultivation. The extracts EjC(05)Arroz, EjC(05)YmSR, EjC(05)MaltSR and EjC(05)MaltCR showed antitumor potential against OVCAR (ovarian carcinoma), HCT -116 (human colon) strains and SF- 295 (human glioblastoma). Evaluation of all crude extracts allowed select the EjC(05)MaltCR for dereplication of substances produced, making it possible to identify the diketopiperazines Cycle Proline-Valine and Cycle Proline-Leucine/Isoleucine.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Eugenia jambolana*, antitumor activity, OSMAC, endophytic fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antibióticos e inibidores de colesterol obtidos de fungos.	19
Figura 2. Metabólitos bioativos isolados de fungos endofíticos.	23
Figura 3. Rubromicinas isoladas por BODE et al.	25
Figura 4. Isolamento de substâncias em pH 7,3.	25
Figura 5. Curva de crescimento dos microrganismos com (Vermelho) e sem auxílio (Preto).	26
Figura 6. Estruturas de compostos com atividade anticâncer utilizados comercialmente.	29
Figura 7. Manga com a doença antracnose.	31
Figura 8. Substâncias produzidas por <i>C. gloeosporioides</i>	32
Figura 9. Dicotopiperazinas produzidas por fungos endofíticos e isoladas em nosso grupo de pesquisa.	35
Figura 10. Obtenção do fungo endofítico <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	41
Figura 11. Esquema da obtenção do extrato bruto nos meios sólidos.	43
Figura 12. Esquema da obtenção do extrato bruto nos meios líquidos.	44
Figura 13. Esquema da obtenção do extrato bruto nos meios líquidos.	46
Figura 14. Fluxograma do fracionamento de EjC(05)MaltCR.	48
Figura 15. Fluxograma do fracionamento de EjC(05)MaltCR-03.	49
Figura 16. Fluxograma do fracionamento de EjC(05)ACN.	50
Figura 17. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato bruto EjC(05)Arroz em λ 230nm.	54
Figura 18. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato bruto EjC(05)Milho em λ 230nm.	54
Figura 19. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)Arroz.	55
Figura 20. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)Milho.	55
Figura 21. Cromatograma do gradiente exploratório do branco de Czapek (Azul) extrato EjC(05)CzaCR (Vermelho) e EjC(05)CzaSR (Preto) em λ 220 nm.	56
Figura 22. Zoom dos cromatogramas do gradiente exploratório do branco de Czapek (Azul) extrato EjC(05)CzaCR (Vermelho) e EjC(05)CzaSR (Preto) em λ 220 nm.	56
Figura 23. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)CzaCR.	57
Figura 24. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)CzaSR.	57
Figura 25. Cromatograma do gradiente exploratório dos extratos bruto EjC(05)MaltCR (Vermelho), EjC(05)MaltSR (preto) e extrato de malte (Azul) em λ 290nm.	58
Figura 26. Cromatograma do gradiente exploratório dos extratos bruto EjC(05)MaltCR (Vermelho), EjC(05)MaltSR (preto) e extrato de malte (Azul) em λ 290nm.	59
Figura 27. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)MaltCR.	60
Figura 28. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)MaltSR.	60
Figura 29. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato EjC(05)NutriCR (Vermelho), EjC(05)NutriSR (Preto) e extrato de Nutrient (Azul) em λ 220nm.	61

Figura 30. Extrato de UV dos picos em 3,30min., 7,90min., 22,15min. e 22,34 min. no extrato de Nutrient.....	62
Figura 31. Extrato de UV dos picos em 3,30min., 7,90min., 22,15min. e 22,34 min. no extrato EjC(05)NutriCR.	62
Figura 32. Extrato de UV dos picos em 3,30min., 7,90min., 22,15min. e 22,34 min. no extrato EjC(05)NutriSR.....	62
Figura 33. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)NutriCR.....	63
Figura 34. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)NutriSR.	63
Figura 35. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato EjC(05)PdbCR (Vermelho), EjC(05)PdbSR (Preto) e extrato de batata (Azul) em λ 240nm.	64
Figura 36. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)PdbCR.	65
Figura 37. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)PdbSR.	65
Figura 38. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato bruto EjC(05)YmCR (Vermelho), EjC(05)YmSR (Preto) e Extrato de YM (Azul) em λ 220nm.....	66
Figura 39. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)YmCR.	67
Figura 40. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)YmSR.	67
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)Arroz (CDCl_3 , 500MHz).	69
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)Milho (CDCl_3 , 500MHz).	69
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)CzaCR (Vermelho) e EjC(05)CzaSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).....	71
Figura 44. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)MaltCR (Vermelho) e EjC(05)MaltSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).	73
Figura 45. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)PdbCR (Vermelho) e EjC(05)PdbSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz.	75
Figura 46. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)NutriCR (Vermelho) e EjC(05)NutriSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz.....	77
Figura 47. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)YmCR (Vermelho) e EjC(05)YmSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).	79
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1.....	82
Figura 49. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância 1.....	83
Figura 50. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância 1.	84
Figura 51. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl_3) da substância 1.	85
Figura 52. Estruturas correspondentes com a massa da fração EjC(05)ACN01-07 em EMAR.....	86
Figura 53. Espectro de massas de alta resolução de EjC(05)MaltCR em T=15,07 min.	87
Figura 54. Provável formula molecular segundo a base de dados.....	88
Figura 55. Fragmentação do íon m/z 197,2.	88
Figura 56. Proposta de fragmentação Via 1 da dicetopiperazina Ciclo Prolina-Valina.	89
Figura 57. Proposta de fragmentação Via 2 da dicetopiperazina Ciclo Prolina-Valina.	90

Figura 58. Proposta de fragmentação Via 3 da dicetopiperazina Ciclo Prolina-Valina.	90
Figura 59. Formação do dímero entre duas dicetopiperazinas ciclo Prolina-Valina.	91
Figura 60. Espectro de massas de alta resolução de EjC(05)MaltCR em T=19,20 min.	92
Figura 61. Provável formula molecular segundo a base de dados.	92
Figura 62. Fragmentação do íon m/z 211,1.	93
Figura 63. Proposta de fragmentação via 1 da dicetopiperazina ciclo Prolina-Leucina	94
Figura 64. Proposta de fragmentação via 2 da dicetopiperazina ciclo Prolina-Leucina	95
Figura 65. Proposta de fragmentação via 3 da dicetopiperazina ciclo Prolina-Leucina	95
Figura 66. Formação do dímero entre duas dicetopiperazinas ciclo Prolina-Leucina.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos endofítico e as respectivas espécie hospedeiras que produzem taxol.....	28
Tabela 2. Composição dos meios de cultivo.	37
Tabela 3. Equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.....	40
Tabela 4. Massa dos extratos brutos e codificação dos extratos.	45
Tabela 5. Condições do fracionamento de EjC(05)ACN01.	51
Tabela 6. Análise da atividade antitumoral dos extratos.	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

°C:	Grau Celsius
λ :	Lambda (comprimento de onda)
ACN:	Acetonitrila
AcOEt:	Acetato de Etila
CDCl ₃ :	Clorofórmio deuterado
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Performance
COSY:	<i>Correlation spectroscopy</i>
DAD:	Detector de Arranjo de Diodo
DNP:	<i>Dictionary of Natural Products</i>
EMBRAPA:	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
EMAR:	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
EjC(05)Arroz:	Extrato bruto Arroz
EjC(05)CzaCR:	Extrato bruto Czapek com Rede
EjC(05)CzaSR:	Extrato bruto Czapek sem Rede
EjC(05)MaltCR:	Extrato bruto Malte com Rede
EjC(05)MaltSR:	Extrato bruto Malte sem Rede
EjC(05)Milho:	Extrato bruto Milho
EjC(05)NutriCR:	Extrato bruto Nutrient com Rede
EjC(05)NutriSR:	Extrato bruto Nutrient sem Rede
EjC(05)PdbCR:	Extrato bruto PDB com Rede
EjC(05)PdbSR:	Extrato bruto PDB sem Rede
EjC(05)YmCR:	Extrato bruto YM com Rede
EjC(05)YmSR:	Extrato bruto YM sem Rede
g:	Grama
Hex:	Hexano
HMBC:	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC:	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
kg:	Quilograma
L:	Litro
MeOH:	Metanol
MS:	<i>Mass spectrometry</i>

MS/MS:	<i>Mass spectrometry/mass spectrometry</i>
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
<i>m/z</i> :	Relação massa carga
OMS:	Organização Mundial de Saúde
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i>
PDA:	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB:	<i>Potato Dextrose Broth</i>
RMN:	Ressonância magnética nuclear
RMN DE ¹ H:	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN DE ¹³ C:	Ressonância magnética nuclear de carbono
YM:	<i>Yeast and Molds</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
Mudanças sociais e impacto na saúde.	17
Produtos naturais.....	17
Fungos: uma visão geral.....	20
Fungos Endofíticos	21
OSMAC.....	23
Fungos endofítico e atividade antitumoral	27
A espécie vegetal hospedeira: <i>Eugenia jambolana</i>	29
Colletotrichum gloeosporioides.....	31
Desreplicação	33
Dicetopiperazinas	34
OBJETIVOS GERAIS.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS:.....	37
Materiais:	37
Meios de cultivo	37
Solventes	38
Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	38
Cromatografia Líquida de Baixa Eficiência.....	38
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD).....	39
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo acoplado a Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (CLAE-DAD-EMAR).39	
Espectrometria de massas.....	39
Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono treze (RMN de ^1H e ^{13}C).....	40
Outros Equipamentos.....	40
Métodos	40
Seleção e coleta da espécie vegetal	40
Obtenção do endófito*	41
Identificação do fungo endofítico.....	42
Cultivo em escala reduzida	42
Cultivo em escala ampliada	46

Avaliação Química	46
FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO OBTIDO EM EXTRATO DE MALTE EjC(05)MaltCR	48
FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE EjC(05)MaltCR03	48
FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE EjC(05)MaltCR03-03a05	49
FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO OBTIDO EM EXTRATO DE MALTE EjC(05)ACN.....	50
FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE EJC(05)ACN01.....	50
Avaliação da atividade biológica	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos de <i>C. gloeosporioides</i>	54
Análise por CLAE-DAD dos extratos brutos.....	54
ANÁLISE POR RMN DE ¹ H DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	68
Avaliação citotóxica dos extratos brutos obtidos de <i>C.gloeosporioides</i>	80
Ensaio Antitumoral	80
Seleção do meio de cultivo	81
ESTUDOS DA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1	81
ESTUDOS DE DESREPLICAÇÃO DA FRAÇÃO EjC(05)ACN01-07	86
RESULTADO DOS EXPERIMENTOS HPLC-DAD-HRMS.....	87
SUBSTÂNCIA 2	87
SUBSTÂNCIA 3	92
CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS.....	98

INTRODUÇÃO

Mudanças sociais e impacto na saúde.

Entre 2002 e 2012, a sociedade brasileira passou por mudanças que produziram impactos significativos sobre as condições de vida da população, fatores como a má alimentação e o sedentarismo exemplificam estas mudanças. Segundo dados do IBGE no Brasil o excesso de peso em homens adultos entre 20 e 24 anos saltou de 18,5% para 50,1% e entre as mulheres foi de 28,7% para 48%, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% nas mulheres nesta idade são considerados obesos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

Esta mudança no modo de vida alterou significativamente o quadro de enfermidades que assolam a população, percebe-se que no Brasil a partir de 1960 as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a maior causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e neoplasias. Deste modo o câncer ganhou uma importância maior nas últimas décadas, tornando-se um problema de saúde pública, tanto em âmbito nacional como internacional.

A estimativa da OMS (organização mundial da saúde) para 2030 é de 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer, e o maior efeito deste aumento incidirá em países de média e baixa renda. Devido a estas estimativas a prevenção e controle do câncer tornou-se foco de grande atenção da ciência, pois não haverá recursos para diagnóstico e tratamento, ocasionando a morte prematura de muitas pessoas, com consequência devastadora no aspecto socioeconômico. Para evitar esta catástrofe investe-se cada vez mais na busca de novos tratamentos e medicamentos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013).

Produtos naturais

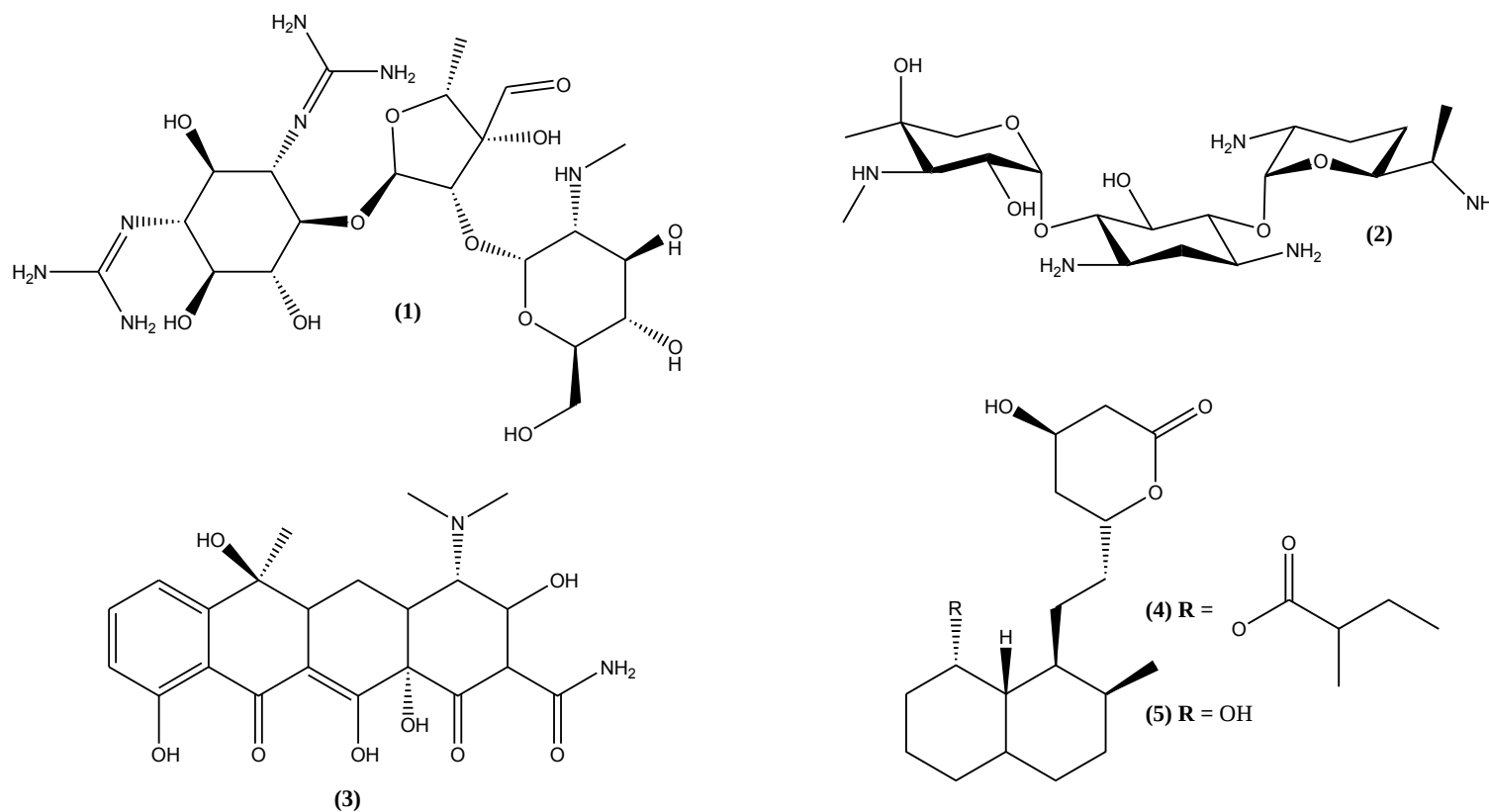
Substâncias que apresentam algum tipo de atividade biológica e são derivadas de fontes naturais como plantas, animais e microrganismos são definidos como produtos naturais e tem sido utilizados pela humanidade desde tempos remotos (BAKER et al., 2007)

Historicamente empresas farmacêuticas utilizavam extratos de plantas para produzir agentes terapêuticos, mas com o avanço dos antibióticos dos últimos 60 anos, drogas purificadas se tornaram mais usuais. Produtos naturais tem sido a maior fonte de diversidade química como precursores para descoberta de fármacos úteis para a humanidade do último século (DAVIES, 1999). Muitos produtos naturais ou derivados sintéticos de produtos naturais obtidos de plantas e microrganismos foram desenvolvido para tratamento clínico de doenças em quase todas as áreas terapêuticas (NEWMAN; CRAGG, 2012).

No campo medicinal, podemos destacar as plantas como uma grande fonte de medicamentos, conhecidos como medicina herbal, medicina botânica ou fito medicina, onde utiliza-se sementes, frutos, cascas, raízes ou flores para fins medicinais, com a vantagem dos efeitos colaterais serem mais brandos. Há muito tempo praticada por todas as civilizações o consumo de ervas tem conduzido a um aumento significativo nas pesquisas que mostram o valor desta medicina em tratamentos e prevenção de doenças (ANG-LEE; MOSS, 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS) listou 21.000 plantas que são utilizadas para fins medicinais ao redor do mundo (PATEL, 2012).

O grande avanço na descoberta de produtos naturais, principalmente de fungos, ocorreu após a produção em escala ampliada da penicilina durante a segunda guerra mundial, quando as indústrias farmacêuticas intensificaram suas pesquisas para descoberta de novos antibióticos (BAKER et al., 2007).

A descoberta de estreptomicina (1), gentamicina (2), tetraciclina (3) entre outros antibióticos estimulou a indústria farmacêutica a desenvolver grandes pesquisas e programas para descoberta de novos produtos naturais, principalmente utilizando-se técnicas baseadas na otimização da fermentação microbiológica. Pesquisas de novos fármacos não ocorreram somente para os antibióticos, como exemplo, em 1970 ocorreu a descoberta de compactina (4) e mevinolina (5) inibidores de colesterol que até hoje são utilizados clinicamente (Figura 01) e rendem bilhões de dólares para a indústria farmacêutica (BAKER et al, 2007).

Figura 1. Antibióticos e inibidores de colesterol obtidos de fungos.

(1) Estreptomicina

(2) Gentamicina

(3) Tetraciclina

(4) Compactina

(5) Mevinolina

Fungos: uma visão geral

Com o aumento da população mundial com doenças como câncer, AIDS, infecções respiratórias, doenças provocadas por protozoários, fungos e bactérias resistentes a medicamentos usuais, aliado ao fato inegável da crescente expansão da degradação do meio ambiente e da perda da biodiversidade, intensificaram-se as pesquisas por novas drogas mais eficazes (GUO, et. al, 2008). Dentro deste contexto, os fungos destacam-se como uma fonte promissora na produção de substâncias potencialmente bioativas e, portanto candidatas a novos fármacos.

Dentre os organismos, os fungos constituem o segundo maior grupo sobre a terra, estimados em 1,5 milhões de espécies diferentes, sendo que apenas 69 mil foram descritas (menos de 5%) (HAWKSWORTH, 2001). Destacam-se por produzirem uma extensa variedade de metabólitos secundários, com amplo campo de aplicações.

O potencial dos fungos na produção de metabólitos bioativos começou a ser explorado com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, isolado de *Penicillium notatum*, que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Eles são uma vasta fonte de substâncias utilizadas como protótipos nas indústrias farmacêuticas, agroquímicas, de cosméticos e comidas (TAKAHASHI et al. 2012). Importantes fármacos de amplo uso clínico foram obtidos a partir de fungos demonstrando seu valor econômico. Recentemente, muitas substâncias com outras atividades farmacológicas foram produzidas a partir de metabólitos de fungos. Um exemplo notável é a mevinolina (Mevacor®), um agente redutor de colesterol, detentor de um mercado em torno de \$ 1 bilhão de dólares anuais (DEMAIN, 2000).

Os fungos apresentam vantagens sobre outras fontes naturais, pois são recursos renováveis e a produção em escala ampliada, bem como a obtenção de diversos metabólitos bioativos pode ser realizada usando as tecnologias existentes, como variação de meio e a otimização dos parâmetros de condições de cultivo. Um exemplo é a possibilidade de criar uma grande variedade de metabólitos secundários de uma única linhagem pela alteração sistemática dos seus parâmetros de crescimento, metodologia esta conhecida como OSMAC (One Strain Many Compounds). Outra vantagem está relacionada com a conservação ambiental, uma vez que requer uma única e pequena remoção do ambiente natural (BILLS, 1995, GUNATILAKA, 2006).

O meio de cultivo utilizado para o crescimento dos microrganismos é um fator importante na produção de metabólitos secundários, pois como são encontrados nos mais diversos habitat tais como solo, água, animais, plantas e organismo humano apresentam exigências nutricionais e físicas diferentes, resultando também numa variação dos metabólitos produzidos quando submetidos a diferentes meio de cultura (NOZAKI, 2004).

Devido às condições relativamente simples requeridas para o crescimento, os fungos são encontrados em diferentes ecossistemas, desde que haja matéria orgânica disponível (HAWKSWORTH, 2001). São denominados segundo seu habitat ou hospedeiro, como coprófilos, micoparasitas, de água doce, marinhos, termofílicos, epifíticos, extremófilos e endofíticos, entre outros.

Até o momento a descoberta de produtos naturais proveniente do universo microbiano apresenta-se praticamente inexplorada (KUSARI; SPITELLER, 2011) e dentro deste contexto os fungos endofíticos são vistos atualmente como uma nova fonte de substâncias bioativas.

Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem sistematicamente no interior de plantas, habitando de modo geral, suas partes aéreas como folhas e caules, podendo também estar presente nas raízes. Com a evolução das espécies, estes se especializaram em invadir espaços celulares dos tecidos vegetais, através das raízes do hospedeiro e aberturas naturais como estômatos e feridas causadas por choques mecânicos, insetos e fungos patogênicos. Uma vez instalado, o endófito pode habitar a planta por toda sua vida, sendo transmitido, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (AZEVEDO, 2010).

Dois tipos principais de interações simbióticas (planta-fungo) são observados:

- Mutualismo, a planta fornece nutriente e água para o fungo que em contrapartida produz substâncias de defesa que protegem a planta contra insetos, animais ou patógenos;
- Antagonismo, mudanças dentro do hospedeiro, causadas pela presença ou ausência de fatores de estresse, tais como baixa umidade e quantidade reduzida de nutrientes, entre outros, poderá induzir a transição do estado de mutualismo a

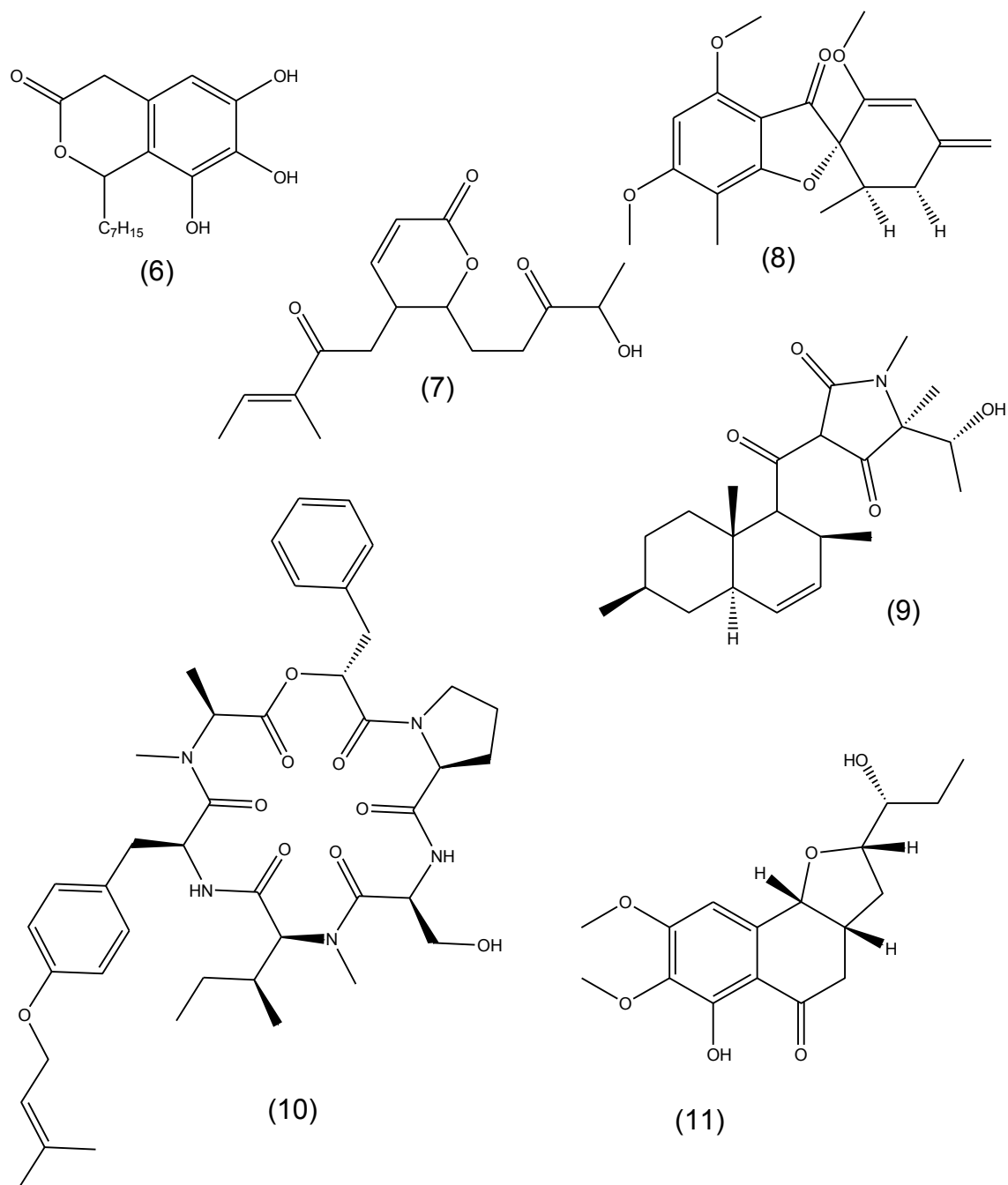
antagonismo, passando o endofítico a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro (CARROLL, 1988).

Estudos revelam uma vasta diversidade de espécies de fungos existentes subcuticularmente nos tecidos de muitos tipos de plantas saudáveis (CARROLL, 1988), sendo que qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 e 100 diferentes espécies de fungos endofítico, das quais no mínimo dois são específicas de cada hospedeiro (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). Esta especificidade assegura que novas espécies de fungos serão encontradas se novas espécies de plantas forem estudadas e ressalta uma questão importante, visto que a taxa de extinção das espécies de fungos endofítico será sempre superior à das espécies de plantas.

Desde sua descoberta em 1866, quando os fungos endofítico foram definidos como assintomáticos, as pesquisas têm proporcionado significativas alterações no conceito destes microrganismos, sedimentando-se o conhecimento sobre seu potencial na produção de fármacos, toxinas, fatores de crescimento e muitos outros produtos de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 2010).

Um trabalho realizado por SCHULZ et al. (2002), demonstrou que dos 135 metabólitos isolados de fungos, os endofíticos obtiveram uma produção de substâncias com novas estruturas 51% maior que dos isolados do solo. A alta produtividade dos fungos em relação aos demais organismos é explicada pela teoria ecológica, que prediz que o estresse ambiental e as interações com outros microrganismos são os dois fatores chaves para a promoção desta diversidade metabólica. Os fungos endofíticos também estão sendo reconhecidos como potenciais produtores de enzimas entre as quais podemos citar as que degradam carboidratos. A capacidade destes organismos de produzir enzimas associadas ao ataque das paredes celulares, em razão da necessidade de colonização do hospedeiro já foi estabelecida (GARCIA-GARRIDO et al., 2000).

Um grande número de espécies de endófitos já foram isolados de diversas plantas, bem como uma diversidade de moléculas bioativas (SCHULZ et al. 2002) (Figura 02), entre elas podemos citar a citosporona D (6) (BRANDY; CLARDY, 2000) e fomopsolida A (7) (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993) apresentam atividade antibacteriana; griseofulvina (8) (MANN, 1994) e criptocina (9) (LI; STROBEL; HARPER, 2000) se destacam pela atividade antifúngica, pulularia A (10) (ISAKA, et al., 2007) e 11-hidroximonocerina (11) (SAPPAPAN et al., 2008) como antimalárico.

Figura 2. Metabólitos bioativos isolados de fungos endofíticos.

(6) Citosporona D
(9) Criptocina

(7) Fomopsolida A
(10) Pulularia A

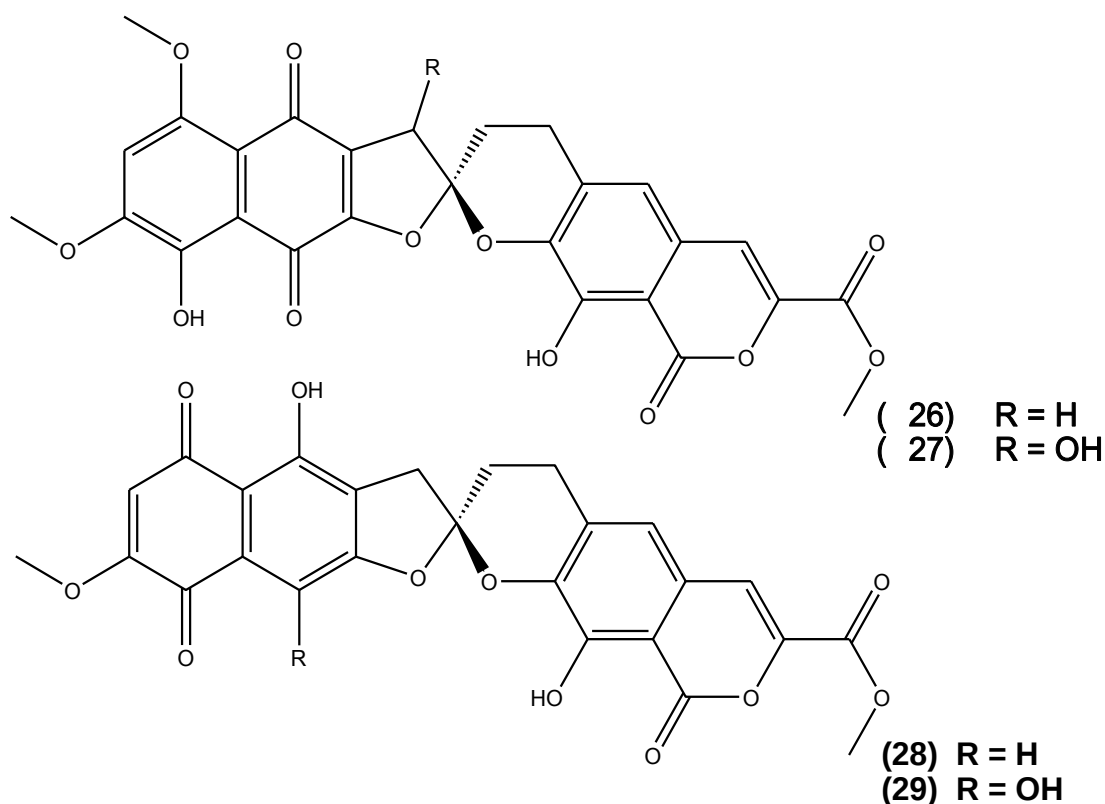
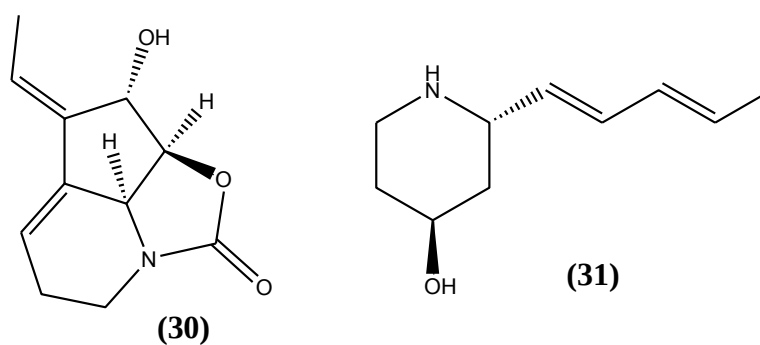
(8) Griseofulvina
(11) 11-hidroximonocerina

OSMAC

OSMAC é uma técnica utilizada para variar a produção metabólica de microrganismos onde uma pequena modificação no meio de cultivo pode alterar completamente a produção metabólica. BODE et al., (2002) relataram o uso desta técnica no cultivo de apenas seis microrganismos resultando em mais de 100 metabólitos de 25 diferentes classes estruturais .

Altas concentrações de glicose, fosfato ou amônia geralmente são consideradas como repressor do metabolismo secundário e muitos exemplos do metabolismo em meios com baixas concentrações destes compostos são descritos na literatura (MASUMA; TANAKA; OMURA, 1983; MASSUMA et al., 1986; OMURA et al., 1982). Porém ao contrário dessas observações, altas concentrações de fosfato podem induzir a produção de alguns metabólitos (AOKI et al., 1976; GOTOH et al., 1982; SHIMADA et al., 1986). Até mesmo aminoácidos são descritos como potenciais indutores de metabólitos secundários, essas contradições tornam cada vez mais aleatório a busca para a otimização do meio de cultivo. Em geral a variação de parâmetros para induzir a produção de compostos desconhecidos é muito similar, porem a variação com o objetivo de aumentar a produção de um composto desejado é muito mais aleatória (BODE et al., 2002).

Em trabalho realizado por BODE et al (2002) demonstrou que em um cultivo de *Aspergillus ochraceus* antes da técnica OSMAC ser implementada, somente o metabólito aspinoneno foi determinado e considerado o metabólito principal, produzindo cerca de 8 mg L⁻¹. Com o auxílio da técnica OSMAC foi possível, com o cultivo do mesmo microrganismo, o isolamento de outros 15 compostos com a produção de até 94 mg L⁻¹. Neste mesmo trabalho, utilizando a mesma técnica, foi possível observar que no cultivo de *Streptomyces sp.* a produção de quatro rubromicinas (Figura 03, substâncias 26, 27, 28 e 29) só era possível em pH levemente ácido. Quando cultivado em pH 7,3 houve o isolamento de duas novas substâncias (Figura 04, substâncias 30 e 31) e as rubromicinas foram apenas detectadas, e quando foi cultivado em pH 8,2 as rubromicinas não foram nem detectadas.

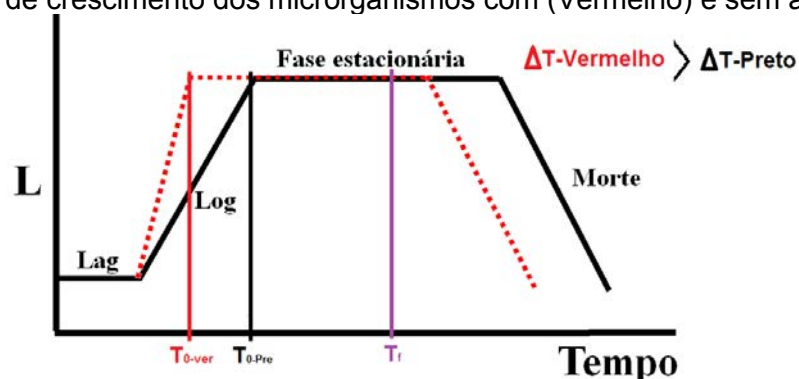
Figura 3. Rubromicinas isoladas por BODE et al.**Figura 4.** Isolamento de substâncias em pH 7,3.

Deste modo, fica claro que enquanto não compreendermos o complexo entrelaçamento dos metabólitos secundários e suas regulações, todas as variações são permitidas para a busca de novos produtos naturais e resultados inesperados certamente ocorrerão.

Outro fator que devemos levar em consideração é que a produção dos metabólitos secundários ocorrem no início da fase estacionária da curva de crescimento do microrganismos e a biotransformação no final dela, podemos

observar na Figura 05 dois exemplos (vermelho e preto) de curva de crescimento do mesmo fungo no mesmo meio. Se por um determinado motivo o fungo crescer mais rápido (curva em vermelho) ele atingirá a fase estacionária primeiro e consequentemente terá mais tempo para produzir e biotransformar os metabólitos secundários no mesmo intervalo de tempo, sendo mais um fator para a variação na produção metabólica.

Figura 5. Curva de crescimento dos microrganismos com (Vermelho) e sem auxílio (Preto).



Com estes relatos e o conhecimento de que a produção metabólica de microrganismos pode ser estimulada pela variação dos meios de cultivo, parâmetros de cultivo ou ativação de genes silenciosos, *C. gloeosporioides*, foi cultivado em diferentes meios na presença e ausência de suporte sólido, objetivando a avaliação da variação metabólica assim como a produção de substâncias com potencial citotóxico frente às linhas de células cancerígenas, OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano).

Fungos endofítico e atividade antitumoral

O alto valor agregado dos medicamentos com atividade anticancerígena, que varia de um a 3,5 milhões de dólares por quilo, a alta demanda, considerando que o câncer é a doença que mais mata ao redor do mundo (mais de 6.000.000 de novos casos relatados todos os anos) (CHANDRA, S. 2012) fez com que plantas como *Podophyllum hexandrum* conhecida pela produção de *Podophyllotoxin* (utilizada como precursor na síntese de importantes drogas anticâncer como etoposídeo e teniposídeo), tem uma longa fase de crescimento e pobre frutificação entrasse na lista de plantas ameaçadas de extinção (MAJUMDER; JHA, 2009).

Em alguns casos, os fungos associados a plantas conseguem produzir o mesmo metabólito bioativo, sendo que um dos melhores exemplos foi a descoberta do fito-hormônio giberelina produzido por *Fusarium fujikuroi*, no início dos anos 30 que também é produzido por quase todas as plantas (KHARWAR et al., 2008). Outro exemplo importante foi a descoberta de que os endofitos *Alternaria* sp. e *Fusarium oxysporum* isolados do floema de *Catharanthus roseus*, também produzem os alcalóides Vinblastina e Vincristina, isolados da mesma espécie vegetal e são as substâncias mais utilizadas no tratamento de linfoma e leucemia, respectivamente (BARNETT et al., 1978).

O Taxol foi a primeira droga anticâncer a alcançar a marca de um bilhão de dólares, sendo amplamente utilizado no tratamento clínico avançado, progressivo e refratário de câncer de ovário (MCGUIRE et al., 1989; EINZIG et al., 1991; MARKMAN, 1991). Considerando que a quantidade de taxol extraída da casca de *Taxus brevifolia* é limitada (0.01-0.05 %) (WHEELER et al., 1992), a planta não ser abundantemente encontrada na natureza (CRAGG et al., 1993), seu crescimento ser lento, levando décadas para o crescimento dos galhos em algumas polegadas e a retirada da casca resultar na morte da planta (KWAK et al., 1995) outras fontes deste metabólito devem ser exploradas.

O primeiro fungo produtor de taxol *Taxomyces andranae* foi isolado em 1993 (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993) e em vários outros fungos foi observada a produção de taxol (Tabela 01).

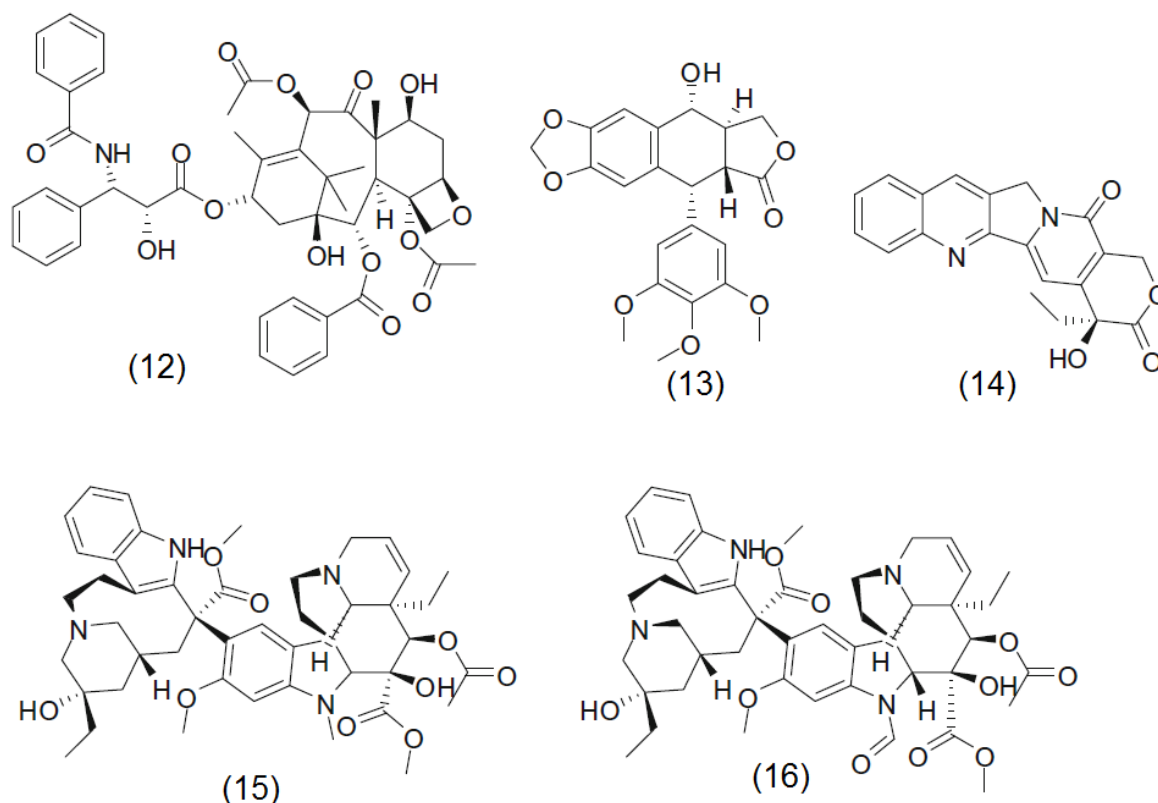
Tabela 1. Fungos endofítico e as respectivas espécie hospedeiras que produzem taxol.

Hospedeiro	Fungo endofítico	Quantidade produzida (µg/L)	Referencias
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces andreanae</i>	0,024-0,05	Stierle et al. (1993)
<i>Taxus wallichiana</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0,06-0,07	Strobel et al. (1996)
<i>Taxodium distichum</i>	<i>P. microspora</i>	0,05-1,49	Li et al. (1996)
<i>Wollemia nobilis</i>	<i>Pestalotiopsis guepini</i>	0,17	Strobel et al. (1997)
<i>Torreya grandifolia</i>	<i>Pericinia sp.</i>	0,03-0,83	Li et al. (1998)
<i>Ginko biloba</i>	<i>Alternaria sp.</i>	0,12-0,26	Kim et al. (1999)
	<i>Tubercularia sp.</i>	185,4	Wang et al. (1999)
<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Didymostilbe sp.</i>	8-15	Wang and Tang (2011)
	<i>Ozonium sp.</i>	-	Wei et al. (2010)
	<i>Ozonium sp.</i>	4-18	Guo et al (2006)
<i>Taxus chinensis</i>	<i>Fusarium solani</i> , Tax-3	163,35	Deng et al. (2009)
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	478	Kumaran et al (2010)
<i>Taxus globosa</i>	<i>Nigrospora sp.</i>	0,142-0,221	Ruiz-Sanchez et al. (2010)
<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	<i>Botrydiplodia theobromae</i> Pat.	-	Pandi et al. (2010)
<i>M. citrifolia</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	245	Pandi et al. (2011)
<i>Aloe vera</i>	<i>Phoma species</i>	73,66	Immaculate nancy Rebecca et al. (2011)
<i>Capsicum annuum</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>	687	Kumaran et al. (2011)
<i>Taxux x media</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	Zhang et al. (2011)
<i>Plant debris</i>	<i>Pestalotiopsis malicola</i>	186	Bi et al. (2011)
<i>Taxuz baccata</i>	<i>Gliocladium sp.</i>	0,00835	Sreekanth et al. (2011)
<i>Justicia gendarussa</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	163,4	Gangadevi e Muthumary (2008)

Fonte: Chandra, S. 2012

Além do taxol (12) existem outros metabólitos secundários que são utilizados clinicamente no combate ao câncer como a podofilotoxina (13), camptotecina (14), vimblastina (15) e vincristina (16). Estes fármacos possuem produção relatada por fungos endofíticos (Figura 06) (CHANDRA, 2012).

Figura 6. Estruturas de compostos com atividade anticâncer utilizados comercialmente.



A espécie vegetal hospedeira: *Eugenia jambolana*.

Eugenia jambolana conhecida popularmente como Jambolão pertence à classe *Myrtaceae*, pode atingir 10 metros de altura. Sua copa possui folhagem abundante. Seus ramos possuem coloração acinzentada-claro com fissuras escuras e cicatrizes foliares aparentes. Apresenta folhas simples, opostas e elípticas. Inflorescência com numerosas flores pequenas hermafrodita de cor creme, planta originariamente da Índia e sudeste asiático que se espalhou amplamente pelo Brasil, seus frutos maduros tem sabor adstringente (ZHANG; LIN, 2009), de formato oval, numa coloração entre roxo a preto quando maduro, com uma grande semente roxa medindo de 2 a 3 cm (GORDON et al., 2011).

Na medicina popular, o suco do fruto verde é usado para preparar vinagre considerado um medicamento estomacal, carminativo e diurético e o suco dos frutos maduros é utilizado como adstringente, diurético e antidiabético. Na indústria alimentícia o fruto maduro é usado para fazer conservas, sucos e geléias. Os frutos são comestíveis e seus extratos apresentam forte atividade antioxidante devido à presença de vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas (BANERJEE; DAGUPTA; DE, 2004).

No extrato de sementes foram descritas atividades como hipoglicemia, anti-inflamatória, antibacteriana, anti-HIV e antidiarreica. Pesquisadores relataram que as sementes contêm vários princípios ativos, como flavonóides, ácido gálico, ácido elágico e taninos (RAVI; RAJASEKARA; SUBRAMANIAN, 2005). Estudos mostram que a adição do extrato etanólico das sementes de *Eugenia jambolana* na alimentação de ratos com diabetes na concentração de 100 mg/kg de peso corporal diminuiu significativamente os níveis de glucose no sangue, uréia no sangue e colesterol, aumentou a tolerância a glucose (PATEL et al., 2012). O extrato etanólico também se mostrou eficaz no combate ao *Trypanosoma cruzi*, parasita que é o responsável pela doença de Chagas, uma doença negligenciada que atinge cerca de 18 milhões de pessoas nas Américas (SANTOS, 2012), atualmente o tratamento desta doença consiste principalmente na administração de nifurtimox e benzonidazole que possui uma taxa de cura entre 50-70% na fase aguda e menos de 20% na fase crônica (DIAS; DESSOY, 2009).

O estudo realizado por DAMETTO (2010) com os frutos permitiu a identificação das antocianinas delfinidina-diglicosídeo, cianidina-diglicosídeo, petunidina-diglicosídeo, malvidina-diglicosídeo, delfinidina-glicosídeo, cianidina-glicosídeo, petunidina-glicosídeo e malvidina-glicosídeo. Estudos preliminares com os extratos e frações de *E. jambolana* mostraram que esta espécie apresenta elevada ação sequestradora de radicais livres e quimiopreventiva, atividade antimalárica, antifúngica contra patógenos-humanos e anticolinesterásica.

Tendo em vista a potencialidade biológica apresentada pelas substâncias isoladas de *Eugenia jambolana* e das fortes evidências de que microrganismos endofíticos podem produzir as mesmas substâncias ou derivados com maior bioatividade que a planta hospedeira, fomos motivados ao estudo do potencial metabólico e citotóxico do fungo endofítico *C. gloeosporioides* associado com a espécie vegetal *E. Jambolana*.

Colletotrichum gloeosporioides

O fungo endofítico *C. gloeosporioides* (telemorfo *Glomerella cingulata*) é amplamente conhecido como patógeno, causando a doença Antracnose (Figura 07), uma das doenças mais frequentes e responsáveis pelas maiores perdas econômicas em áreas produtoras de manga no mundo. *C. gloeosporioides* encontra-se também, como patógeno de outras espécies frutíferas como a goiabeira, mamoeiro, cajuzeiro, jaqueira, certas anonáceas como pinha, biriba, cherimólia, condessa e frutíferas do grupo das Spondias como cajazeira, cajarana, seriguela, umbu e embuguela (BATISTA, 2010).

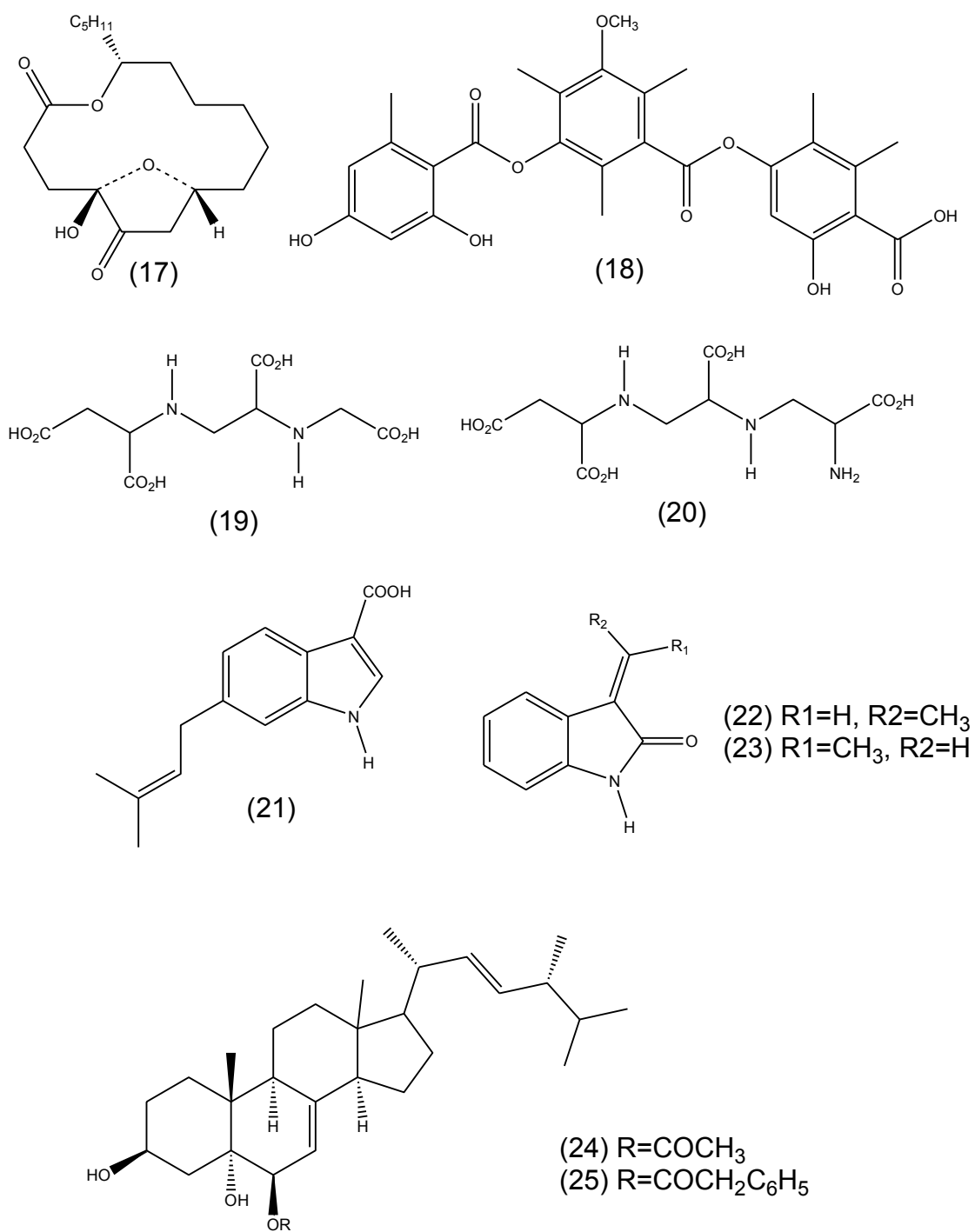
Figura 7. Manga com a doença antracnose.



Fonte Embrapa

Existem também relatos deste fungo como endofítico em sintrofia (modo de vida onde ambos são beneficiados, porém podem coexistir na ausência do outro) com a planta (ZOU et al., 2000).

C. gloeosporioides tem sido muito estudado em relação a prevenção e controle deste fungo como patógeno de frutas, no entanto estudos químicos são escassos apesar da potencialidade biológica das poucas substâncias relacionadas com seu metabolismo secundário, como gloeosporona (17), ácido colletotrico (18), aspergilomarasmina A (19) e B (20), ácido 6-isopropenilindol-3-carboxílico (21), (E)-3-etildieno-1,3-diidroindol-2-ona (22), (Z)-3-etildieno-1,3-diidroindol-2-ona (23), 3 β ,5 α -diidroxi-6 β -acetoxiergosta-7,22-dieno (24) e 3 β ,5 α -diidroxi-6 β -fenilacetiliergosta-7,22-dieno (25) (Figura 08) (GARCÍA-PAJÓN; COLLADO 2003).

Figura 8. Substâncias produzidas por *C. gloeosporioides*.

Desreplicação

Nas últimas décadas, técnicas hifenadas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM, CLAE-EM-RMN e CG-EM se tornaram muito importantes para a detecção de substâncias em extratos brutos, pois além de ser uma forma rápida de identificação evita o reisolamento de substâncias conhecidas e consequentemente a replicação de trabalho, economizando tempo e recursos como solventes, guiando-nos ao isolamento de novos constituintes (NG et al., 2009).

Microrganismos normalmente produzem extratos extremamente complexos com centenas de metabólitos secundários (WOLFENDER et al., 2003) necessitando assim de uma primeira triagem para a identificação de substâncias conhecidas guiando-nos ao isolamento de novas substâncias ou substâncias bioativas.

A técnica hifenada mais utilizada para a desreplicação é CLAE-EM ou CLAE-DAD-EM, apesar de já existirem alguns estudos utilizando CLAE-RMN ou CLAE-EM-RMN.

Normalmente, a amostra é analisada por espectrometria de massas para obter a massa molecular relativa e depois por MS/MS para obter informações estruturais pela fragmentação do íon molecular e examinado os íons fragmentados (HERBERT; JOHNSTONE, 2003), tornando possível a identificação ou a determinação estrutural das substâncias.

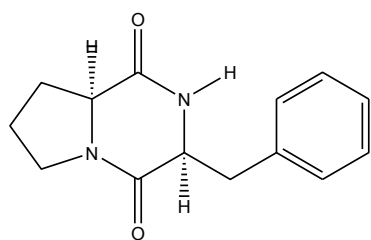
Dicetopiperazinas

As dicetopiperazinas fazem parte do grupo dos peptídeos, sendo os menores peptídeos cíclicos e formados pela junção de dois ou mais aminoácidos, podem ser sintetizadas por mamíferos, fungos ou bactérias (ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995). Apresentam estrutura rígida, quiral e funcionalizada, diferenciando-se uns dos outros pelos aminoácidos precursores. Com isso as dicetopiperazinas possuem a capacidade de se ligarem a uma grande variedade de receptores podendo assim exercer diferentes atividades biológicas (MARTINS; CARVALHO, 2007).

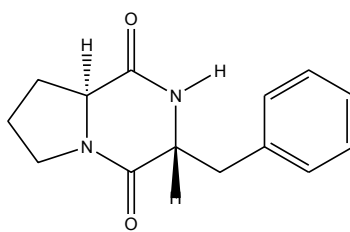
Estas substâncias possuem diversas atividades biológicas, como por exemplo, alteração nas funções cardiovasculares, coagulação do sangue, antitumorais, antifúngica, antiviral, antibacteriana, agentes antihiperglicêmico, afinidade receptora nos canais do cálcio e serotoninérgico (MARTINS; CARVALHO, 2007).

As dicetopiperazinas já foram relatadas em nosso grupo de pesquisa (Figura 09), onde CAFÊU (2007) relatou oito dicetopiperazinas (32 a 39) (26 a 33) sintetizadas por *Colletotrichum crassipes*, LEPTOKARYDIS (2008) isolou duas (35 e 41) de *C. gloeosporioides*. Foram observadas também por CHAPLA (2010) sendo o primeiro caso no gênero *Phomopsis* (32, 35, 40 e 41). Além de BIASETTO (2011) em *Schizophyllum commune* (41), RUFINO (2011) em *Colletotrichum sp.* e SOMENSI (2012) em *Phomopsis stipata*.

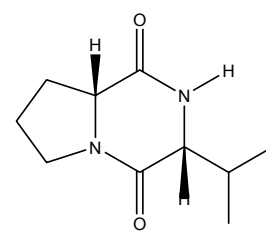
Figura 9. Diketopiperazinas produzidas por fungos endofíticos e isoladas em nosso grupo de pesquisa.



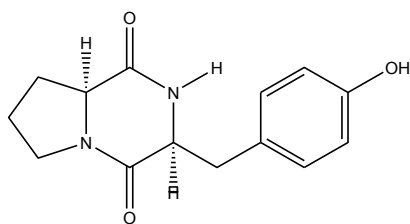
Ciclo (S-Pro-S-Phe) (32)



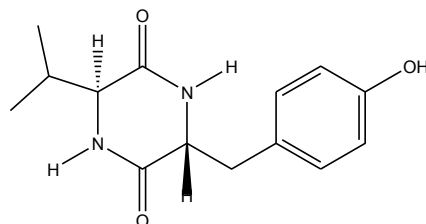
Ciclo (S-Pro-R-Phe) (33)



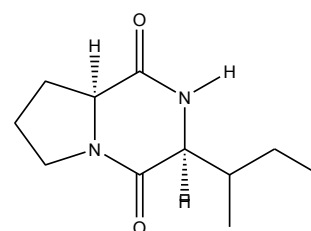
Ciclo (R-Pro-R-Val) (34)



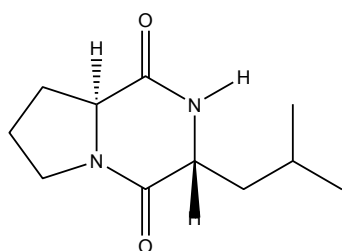
Ciclo (S-Pro-S-Tyr) (35)



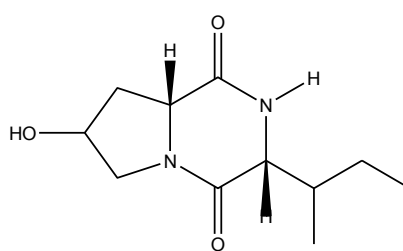
Ciclo (S-Val-R-Tyr) (36)



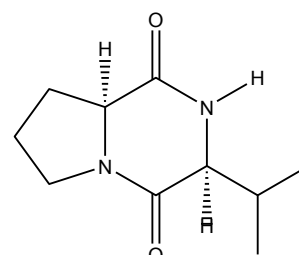
Ciclo (S-Pro-S-Ile) (37)



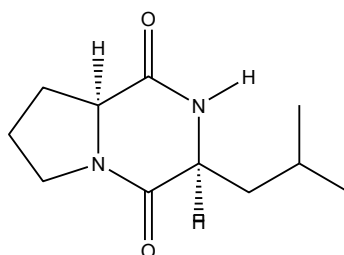
Ciclo (S-Pro-R-Leu) (38)



Ciclo (R-Hyp-R-Ile) (39)



Ciclo (S-Pro-S-Val) (40)



Ciclo (S-Pro-S-Leu) (41)

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial citotóxico de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes meios de cultivo, e traçar o perfil químico destes extratos.

Objetivos específicos

- Cultivar o fungo endofítico *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultivo;
- Avaliar o potencial citotóxico dos extratos obtidos nos diferentes meios de cultivo;
- Avaliar o perfil químico por RMN de ^1H dos extratos;
- Cultivar o endófito em escala ampliada no meio mais promissor;
- Isolamento ou identificação estrutural dos metabólitos secundários.

MATERIAIS E MÉTODOS:**Materiais:****Meios de cultivo**

A composição dos meios de cultivo podem ser observada na Tabela 02.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo.

Meio de Cultivo	tipo	[]g L ⁻¹	composição	Fabricante
Czapek*	Líquido	35	Sacarose (30g), Nitrato de Sódio (3g), Fosfato de Potássio (0,5g), Sulfato de Magnésio (0,5g), Cloreto de Potássio (0,5g), Sulfato de Ferro (0,01g)	---
Extrato de Malte	Líquido	20	Extrato de Malte (20g)	Acumedia
Batata** (PDB)	Líquido	273	Caldo da infusão de batata inglesa	---
Nutrient	Líquido	8	Extrato de carne (3,0 g), peptona (5,0 g)	Difco
Extrato de levedura (YM)	Líquido	21	Extrato de levedura (3,0 g), extrato de malte (3,0 g), peptona (5,0 g) e dextrose (10 g)	Difco
Milho	Sólido	1200	90 g de milho tipo canjica em 75,0 mL de água ultrapura	Machiara
Arroz	Sólido	1200	90 g de arroz parabolizado em 75,0 mL de água ultrapura	Rosalito
Batata dextrose Ágar (PDA)	Sólido	39	Fécula de batata (4,0 g), dextrose (20,0 g) e Ágar (15,0 g)	Acumedia

*Para o preparo do meio de cultivo Czapek, adicionou-se todos os componentes em 1 litro de água ultrapura e agitou-se até completa dissolução.

** Para o preparo do meio de cultivo PDB, foram fervidos a 100°C, durante 20 minutos, 600 g de batata inglesa cortada em cubos com casca em 1 L de água ultrapura. Filtrou-se com gaze e acrescentou-se H₂O até completar o volume de 2,2 L.

Solventes

Para obtenção dos extratos brutos e fracionamento cromatográfico foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol, acetonitrila, ácido fórmico, diclorometano, isopropanol e clorofórmio das seguintes marcas, Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt, QHEMIS, MTEDIA e Panreac, além de água ultrapura.

Nas análises em RMN foram utilizados CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$ ambos da marca (Aldrich).

Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foi utilizada sílica gel 60 G F₂₅₄ (Merck). As placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada, na proporção de 1:2 (m/v), sobre placa de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente, através da utilização de espalhador Quickfitt®. Após a preparação foram deixadas em repouso por 6 horas a temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 120 °C por 120 minutos. Também foram utilizadas placas pré-prontas de sílica gel da marca SORBET Technologies (Sílica G TLC Plates W/UV 254; 200 µm 20 x 20 cm).

As revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (UV 254 e 366 nm), exposição ao iodo sublimado ou solução de anisaldeído com posterior aquecimento.

Cromatografia Líquida de Baixa Eficiência

O fracionamento cromatográfico de EjC(05)MaltCR e EjC(05)ACN ocorreu em coluna aberta, foi utilizada uma coluna de vidro com 4,0 cm de diâmetro interno e 45 cm de altura, de EjC(05)ACN01 e EjC(05)ACN02 foi utilizada uma coluna de vidro com 1,4 cm de diâmetro interno e 15 cm de altura, como fase estacionária foi utilizada sílica gel de fase reversa do tipo octadecil-silano (C-18) com tamanho de partícula entre 40 e 75 µm (200 x 400 *mesh*) da marca SORBENT *Technologies*.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD no modo analítico foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A₃ e injetor automático Shimadzu SIL-20A. O tratamento dos dados obtidos foi através de um microcomputador com processador Intel® Celeron®, utilizando o software Shimadzu LC Solution (versão 1.23 SP1). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadecil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5µm).

As análises por CLAE no modo preparativo foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A) com injetor e coletor manual. O tratamento dos dados obtidos foi através do mesmo computador citado anteriormente. Foram utilizadas uma coluna preparativa Phenomenex Gemini com sílica tipo octadecil silano (C-18) (250 x 21,20 mm; 5 µm) e uma coluna preparativa Phenomenex Luna com sílica tipo octadecil silano (C-18) (150 x 21,20 mm; 5 µm).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo acoplado a Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (CLAE-DAD-EMAR).

As análises por CLAE-DAD-EMAR no modo analítico foram realizadas no equipamento micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer da empresa Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, utilizando como padrão interno de calibração uma solução de NA-TFA a 10mgml⁻¹. Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadecil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm).

Espectrometria de massas

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos com o equipamento LCQ Fleet da Thermo Analítica, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por fluxo contínuo (FIA) na concentração de 20 ppm. A amostra foi analisada no modo ionização por eletrospray (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³, MSⁿ) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O programa Xcalibur versão 1.0 (Thermo Finigan®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

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

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-300 utilizando como referência interna o TMS e operando na frequência de 300 MHz para o núcleo de ^1H e 75 MHz para ^{13}C .

Outros Equipamentos

Os outros equipamentos utilizados neste trabalho podem se observados na Tabela 03.

Tabela 3. Equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

Equipamentos	Fabricante	Modelo
Autoclave vertical	Phoenix Luferco	AV-137
Câmara de fluxo laminar	Pachane	PA 310
Milli-Q	Millipore	Direct 8
Rotaevaporador	BUCHI	Rotavapor 114
Balança analítica	Mettler Toledo	AG 245

Métodos

Seleção e coleta da espécie vegetal

Folhas e caules saudáveis de *E. jambolana* foram coletadas na cidade de Araraquara-SP, em abril e dezembro de 2010 pela doutoranda Vanessa Mara Chapla. Para isolamento dos fungos endofíticos, foi selecionada a mesma espécime utilizada para o estudo fitoquímico em andamento, pelo grupo da Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva.

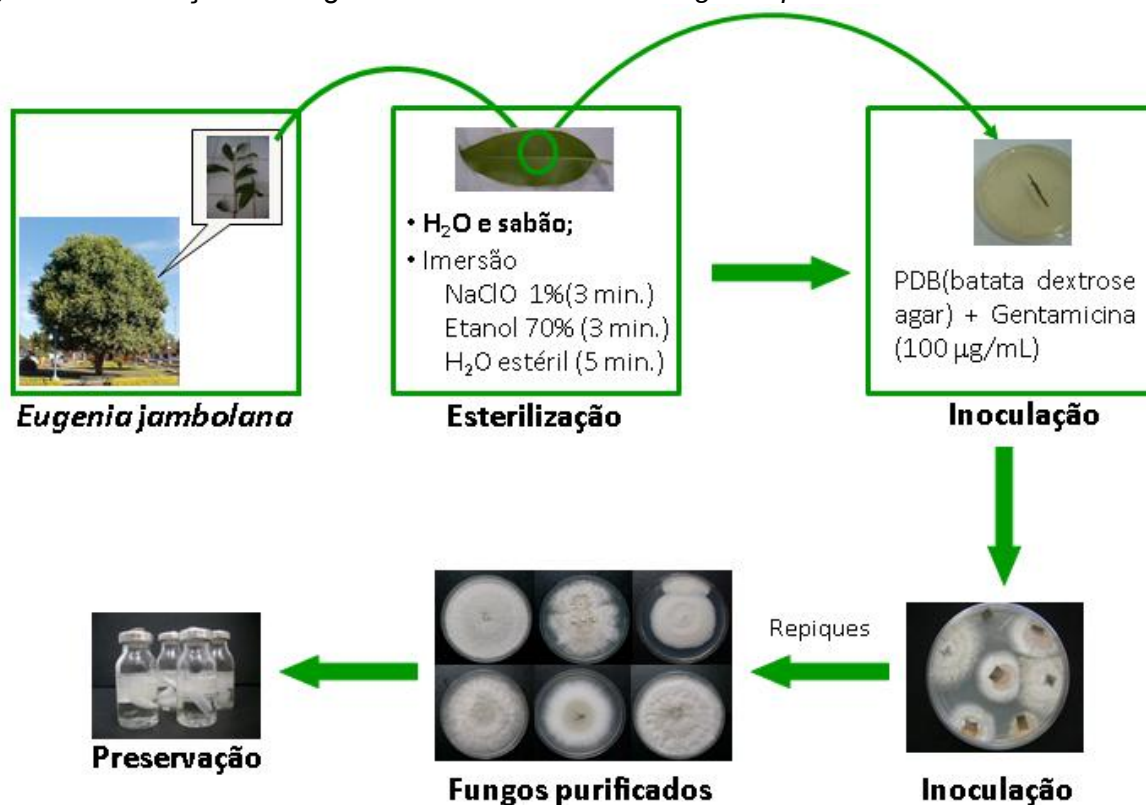
A identificação da espécie vegetal foi realizada por Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo e codificado como SP 384109.

Obtenção do endófito*

Folhas, caules e frutos jovens e saudáveis foram selecionados para o isolamento dos endófitos seguindo o procedimento: a superfície do material foi lavada com água corrente e sabão neutro, e esterilizada por imersão em uma solução de NaClO 1% (1 minuto), etanol aquoso 70% (1 minuto), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (5 minutos) e posterior secagem. A seguir, pedaços de folha e caule foram seccionadas assepticamente (3 a 4 de 0,5 cm) e inoculadas em placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose e Agar), ao qual foi adicionado, após esterilização em autoclave, antibiótico sulfato de gentamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para evitar o crescimento de bactérias.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em frascos com água esterilizada (MAIER et al., 1997) e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP (Figura 10).

Figura 10. Obtenção do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*.



*Processo realizado pela Doutoranda Vanessa Mara Chapla.

Identificação do fungo endofítico

Após o isolamento, o fungo *C. gloeosporioides* (codificado como EjC(05) de acordo com a espécie vegetal e do organismo em que foi coletado sendo Ej = *Eugenia jambolana*, C= caule, 05 foi o quinto fungo isolado do material vegetal) foi identificado por sequenciamento genético pela empresa GENOTYPING BIOTECNOLOGIA LTDA – PROSPECTA e está depositado na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/CAr.

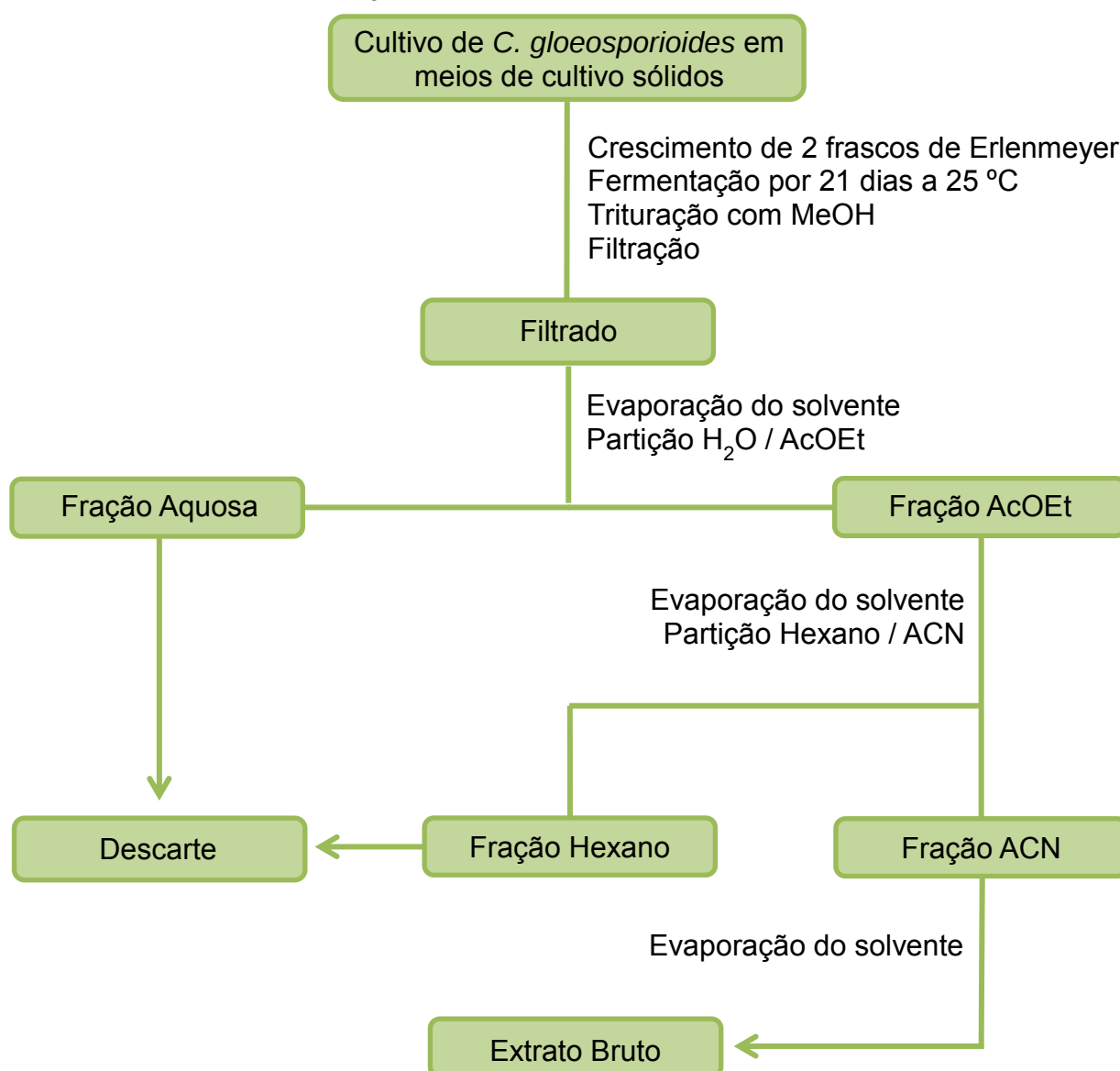
Cultivo em escala reduzida

O endófito *C. gloeosporioides* foi cultivado em placas de Petri contendo PDA durante 7 dias a temperatura de 25 °C e posteriormente repicado em frascos de Erlenmyer contendo o meio de cultivo.

Meio de cultivo sólido

Os meios de cultivo sólido (arroz e milho) foram autoclavados três vezes durante 40 minutos a 121°C com intervalos de 24 horas entre cada sessão. Após o resfriamento, em cada meio foi adicionado 1/3 da placa de Petri contendo o fungo *C. gloeosporioides*. (Figura 11). Na Tabela 04 página 42 é mostrada a massa obtida de cada cultivo e sua respectiva codificação.

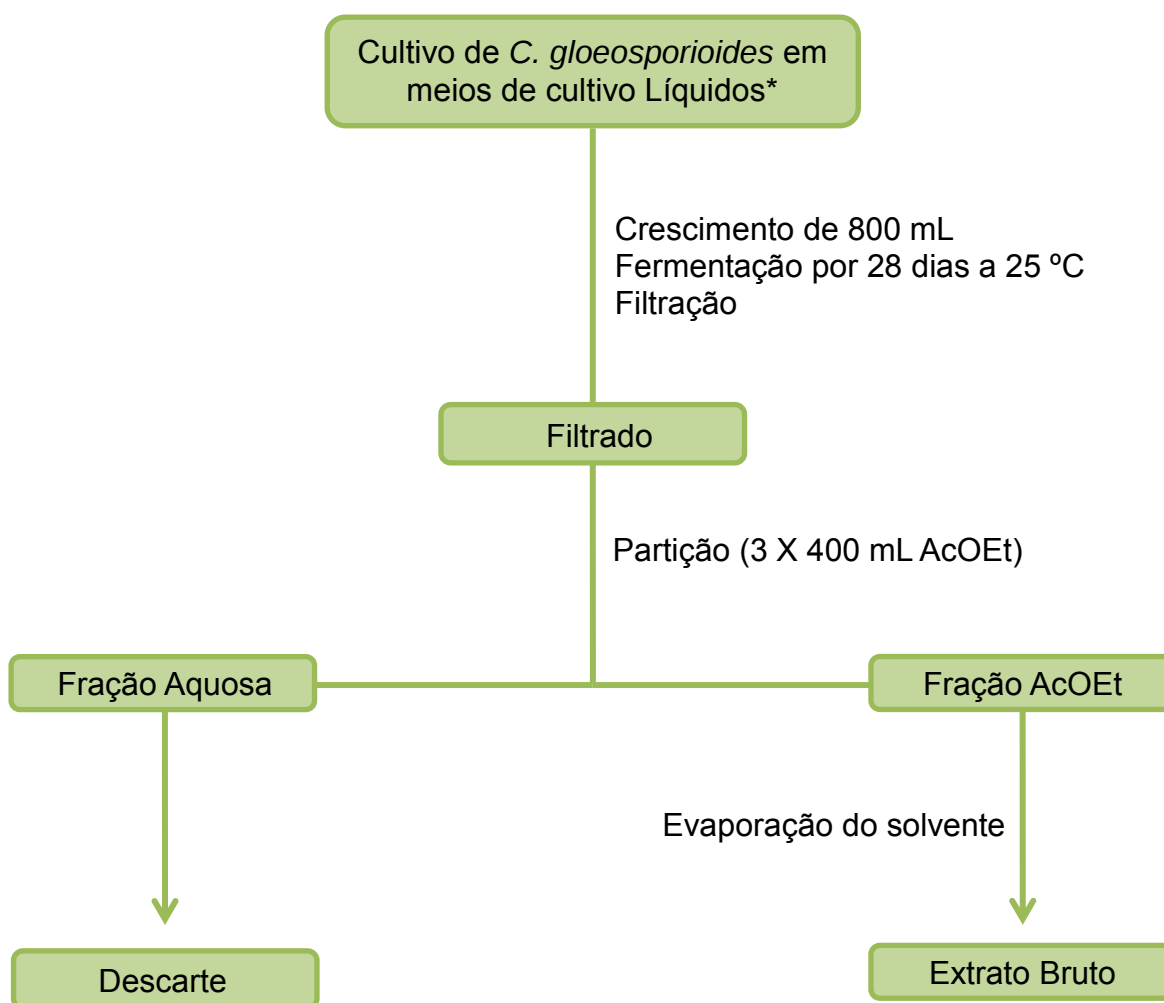
Figura 11. Esquema da obtenção do extrato bruto nos meios sólidos.



Meio de cultivo líquido

Os meios de cultivo líquidos (Czapek, PDB, Extrato de Malte, Nutrient e YM) foram autoclavados por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento em cada meio foram adicionados 1/3 da placa de Petri contendo o endófito (Figura 12).

Figura 12. Esquema da obtenção do extrato bruto nos meios líquidos.



*Os meios cultivo líquidos (Czapek, PDB, Extrato de Malte, Nutrient e YM) foram separados em dois grupos, o primeiro onde houve a adição de um suporte sólido (rede de polietileno) para o auxílio do crescimento deste microrganismo e um segundo grupo onde não houve esta adição.

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

Tabela 4. Massa dos extratos brutos e codificação dos extratos.

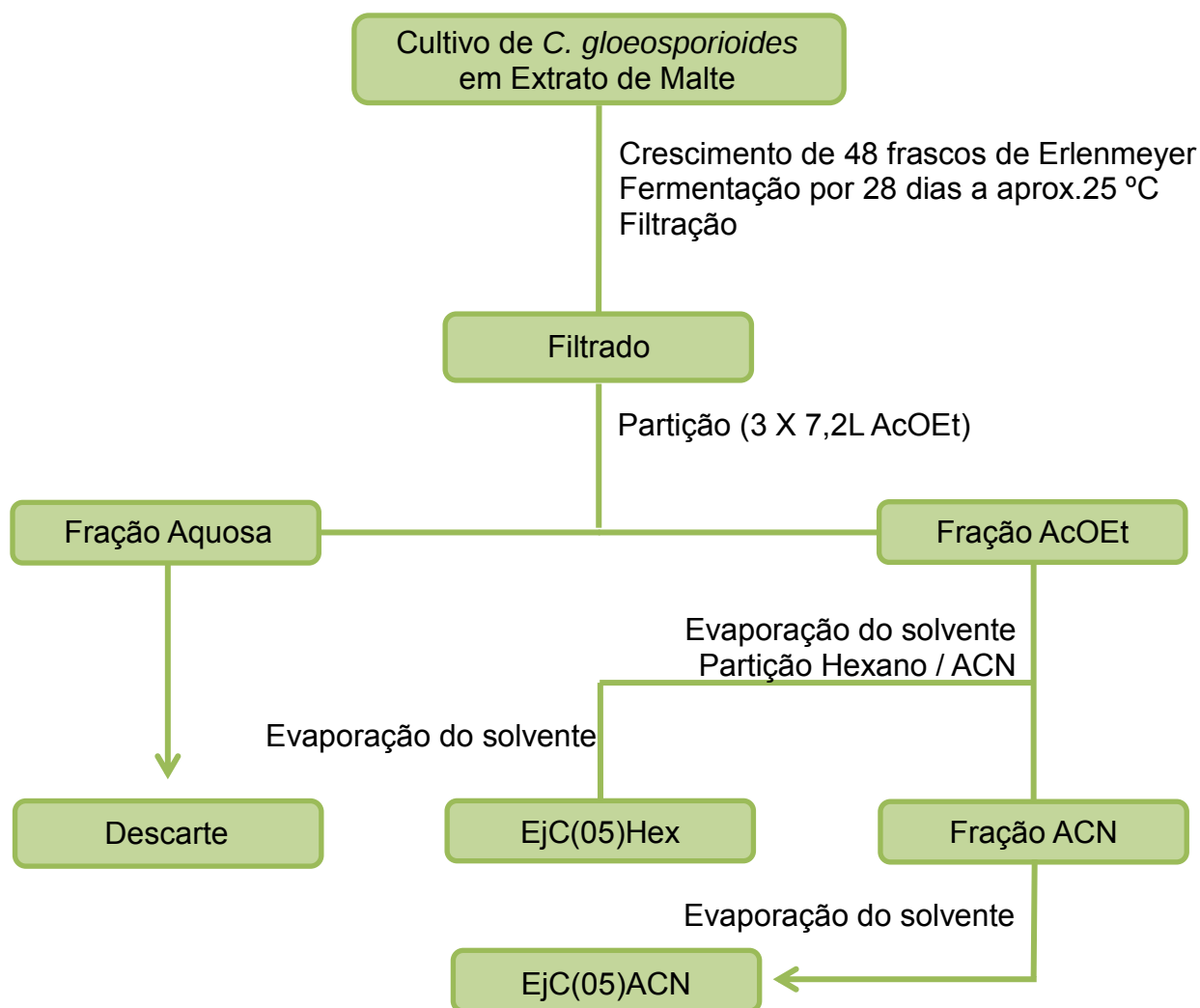
Meio de Cultivo	Suporte sólido	Massa em mg	Código
Arroz	Não	168,4	EjC(05)Arroz
Milho	Não	205,3	EjC(05)Milho
Czapek	Sim	85,0	EjC(05)CzaCR
	Não	63,6	EjC(05)CzaSR
EM	Sim	475,6	EjC(05)MaltCR
	Não	173,3	EjC(05)MaltSR
Nutri	Sim	20,1	EjC(05)NutriCR
	Não	24,9	EjC(05)NutriSR
PDB	Sim	15,6	EjC(05)PdbCR
	Não	15,2	EjC(05)PdbSR
YM	Sim	10,9	EjC(05)YmCR
	Não	11,0	EjC(05)YmSR

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos e sólido foram submetidos aos ensaios para avaliação química por RMN de ^1H e CLAE-DAD e do potencial citotóxico.

Cultivo em escala ampliada

O endófito *C. gloeosporioides* foi inoculado em placas de Petri contendo PDA e cultivado por 7 dias a temperatura ambiente. A seguir foi repicado em 48 frascos de Erlenmyer contendo 300 mL de Extrato de Malte (20 g L^{-1}), por um período de 28 dias, sob modo estático e temperatura aproximada de 25°C . A seguir, foi realizada uma filtração a pressão reduzida para separar o micélio do caldo e este foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt foi reciclado utilizando um evaporador rotatório durante as extrações), do mesmo modo como foi feito em escala reduzida. Após este procedimento o extrato obtido foi solubilizado em acetonitrila e particionado com hexano, fornecendo os extratos EjC(05)ACN e EjC(05)Hex (Figura 13).

Figura 13. Esquema da obtenção do extrato bruto nos meios líquidos.



Avaliação Química

Análise cromatográfica CLAE-DAD

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos e sólidos foram submetidos à CLAE-DAD utilizando gradiente exploratório. Os extratos foram preparados na concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e submetidos ao “Clean up” por solubilização em MeOH/H₂O (95:5) e eluição em cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 μm). A seguir 30 μL foram submetidos a gradiente exploratório utilizando coluna analítica de fase reversa Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μm) e eluídos com H₂O/MeOH (95:5) até (0:100) em 40 min., permanecendo por 10 min. nesta condição, com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando detector UV-DAD operando entre $\lambda = 200 \text{ nm}$ a 800 nm .

Os cromatogramas dos extratos brutos foram selecionados em λ diferentes objetivando a avaliação da produção metabólica, não necessariamente na coprodução das substâncias.

Análise cromatográfica CLAE-EMAR

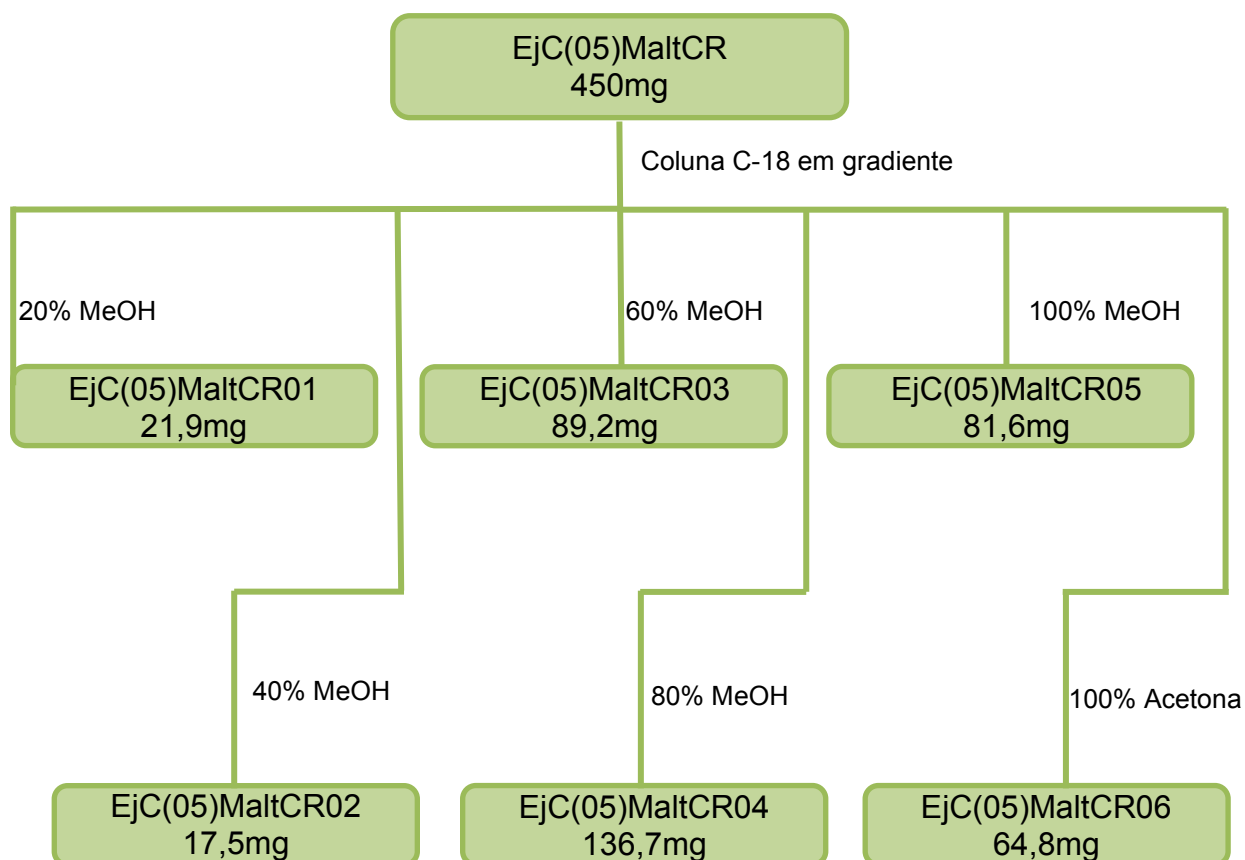
Os extratos EjC(05)MaltCR, EjC(05)MaltSR, EjC(05)YmCR e EjC(05)YmSR foram submetidos a CLAE-DAD-EMAR utilizando gradiente exploratório. O extrato foi preparado na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e submetidos ao “Clean up” por solubilização em MeOH/H₂O (95:5) e eluição em cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 μm). A seguir 30 μL foram submetidos CLAE em gradiente exploratório utilizando coluna analítica de fase reversa Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μm) e eluídos com H₂O/MeOH (95:5) até (0:100) em 40 min., permanecendo por 10 min. nesta condição, com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando detector UV-EMAR operando entre λ 200 e 400 nm.

FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO OBTIDO EM EXTRATO DE MALTE EjC(05)MaltCR

O extrato EjC(05)MaltCR foi fracionado em uma coluna cromatográfica (30 cm de altura e 4 cm de diâmetro interno), utilizando como fase estacionária 226 g de Sílica do tipo octadesil silano (C-18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (Figura 14), fornecendo 6 frações de 380,0 mL.

As frações obtidas deste fracionamento foram submetidas a análises por cromatografia em camada delgada comparativa, usando uma série de eluentes e reveladores e RMN de ^1H .

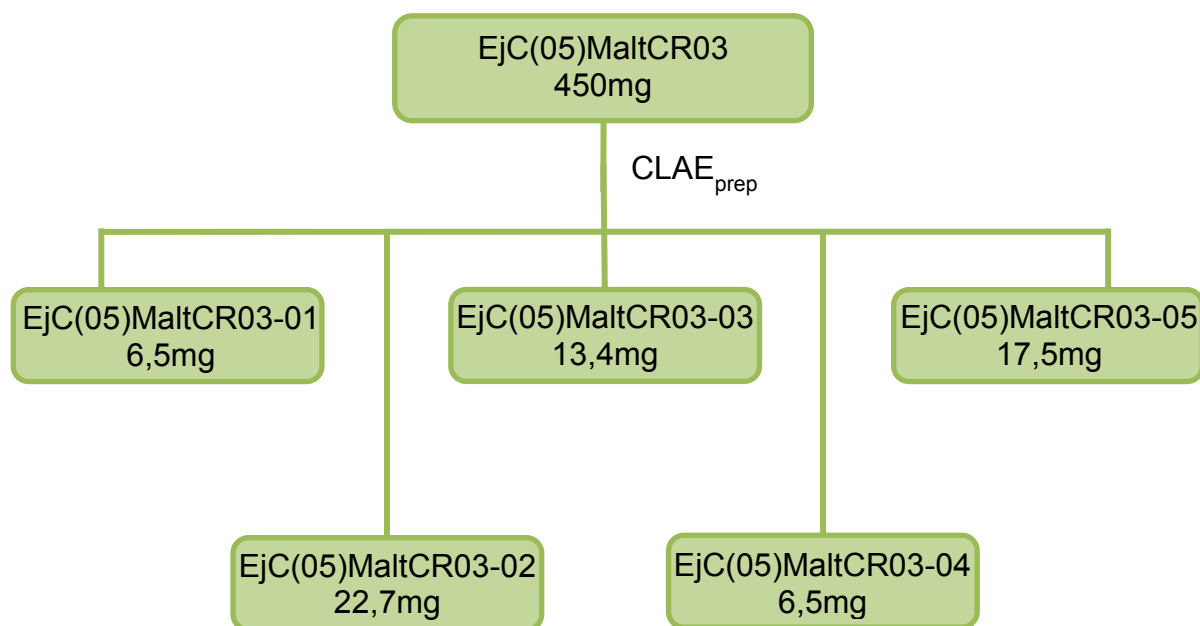
Figura 14. Fluxograma do fracionamento de EjC(05)MaltCR.



FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE EjC(05)MaltCR03

A fração EjC(05)MaltCR03 foi submetida a outro fracionamento dando origem a 5 sub frações (Figura 15), utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE_{prep.}) e como fase estacionária uma coluna Phenomenex Luna (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μ m) no modo isocrático MeOH/H₂O (65:35) por 15 min. e vazão de 10 mL min⁻¹, em λ 254.

Figura 15. Fluxograma do fracionamento de EjC(05)MaltCR-03.



As 5 sub frações foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ¹H, por terem um perfil muito semelhante as três últimas foram reagrupadas dando origem a fração EjC(05)MaltCR03-03 a 05 e novamente fracionada.

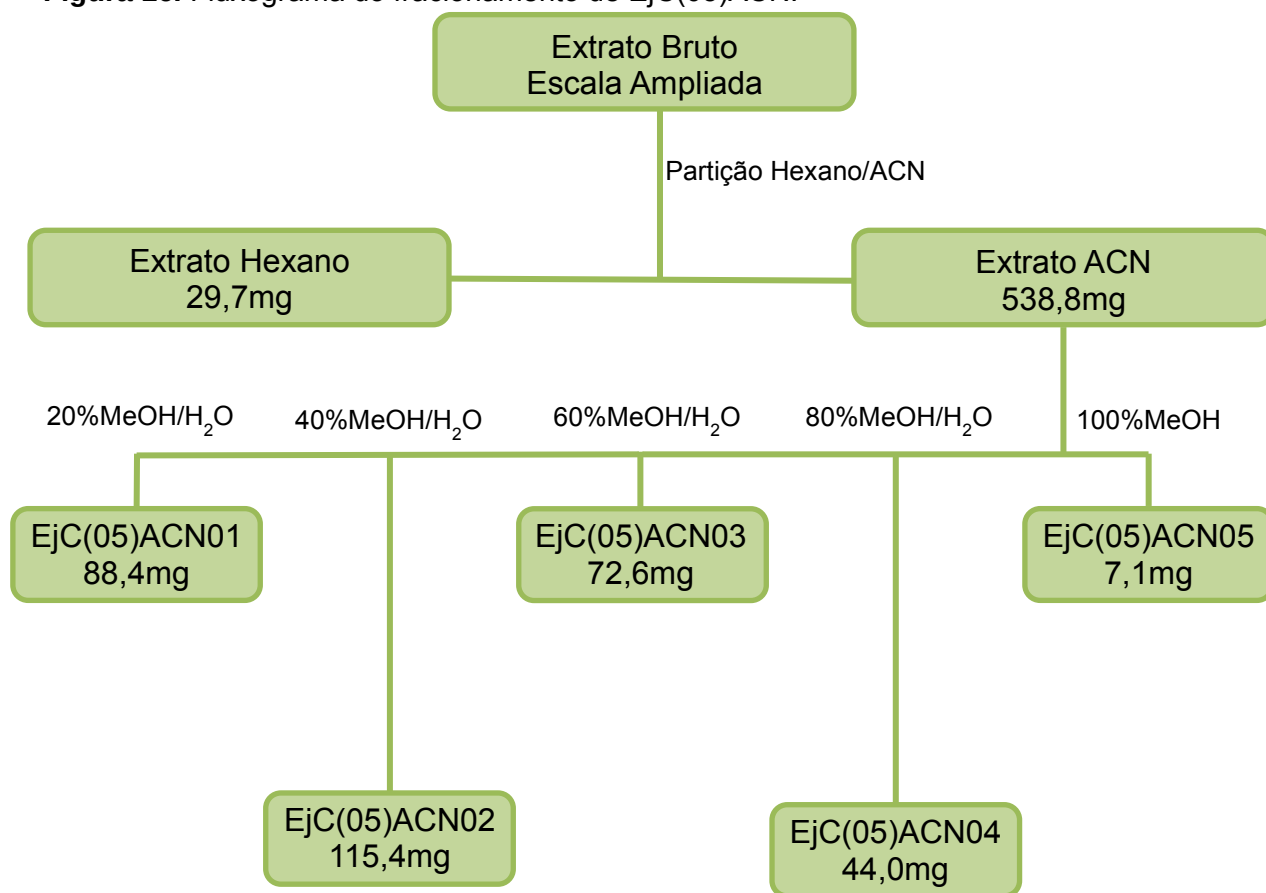
FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE EjC(05)MaltCR03-03a05

A fração EjC(05)MaltCR03-03a05 foi submetida à novo fracionamento dando origem a 9 sub frações, utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE_{prep.}) e como fase estacionária uma coluna Phenomenex Gemini (C-18) (150 x 4,60 mm; 5 μ m) no modo isocrático MeOH/H₂O (50:50) por 15 min. e vazão de 10 mL min⁻¹, em λ 254. E todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H e foi possível observar que a fração EjC(05)MaltCR03-03a05-03 apresentava-se pura, e recebeu o número 1.

FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO OBTIDO EM EXTRATO DE MALTE EjC(05)ACN

O extrato EjC(05)ACN foi fracionado em uma coluna cromatográfica (25cm de altura e 4cm de diâmetro interno), utilizando como fase estacionária 193 g de Sílica do tipo octadesil silano (C-18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente, fornecendo 5 frações de 320,0 mL (Figura 16).

Figura 16. Fluxograma do fracionamento de EjC(05)ACN.



FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE EJC(05)ACN01

A fração EJC(05)ACN01 foi fracionado em uma coluna cromatográfica (10cm de altura e 1,4cm de diâmetro interno), utilizando como fase estacionária 7 g de Sílica do tipo octadesil silano (C-18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente de 30 mL, mostrado na Tabela 05.

Tabela 5. Condições do fracionamento de EJC(05)ACN01.

Eluente	% MeOH/H ₂ O	Código da Fração	Massa (mg)
1	5	EJC(05)ACN01-01	3,1
		EJC(05)ACN01-02	2,9
2	7	EJC(05)ACN01-03	1,9
		EJC(05)ACN01-04	3,9
3	9	EJC(05)ACN01-05	4,5
		EJC(05)ACN01-06	5,2
4	11	EJC(05)ACN01-07	3,8
		EJC(05)ACN01-08	3,7
5	13	EJC(05)ACN01-09	2,6
		EJC(05)ACN01-10	2,1
6	15	EJC(05)ACN01-11	2,0
		EJC(05)ACN01-12	2,4
7	17	EJC(05)ACN01-13	1,7
		EJC(05)ACN01-14	1,9
8	20	EJC(05)ACN01-15	2,1
		EJC(05)ACN01-16	2,1
9	30	EJC(05)ACN01-17	4,7
		EJC(05)ACN01-18	1,9
		EJC(05)ACN01-19	4,4
10	100	EJC(05)ACN01-20	12,2
		EJC(05)ACN01-21	9,0
		EJC(05)ACN01-22	2,3

Avaliação da atividade biológica

Ensaio Antitumoral

Os ensaios antitumorais foram desenvolvidos no Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.

Este ensaio é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Somente os extratos que apresentarem valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais são considerados ativos, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 10 mg/mL.

Os extratos brutos foram testados em duplicata. Os valores dos resultados e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *C. gloeosporioides* em dois meios sólidos (arroz e milho) e cinco meios líquidos (Czapek, Extrato de Malte, Nutrient, PDB e YM) utilizando rede de polietileno como suporte sólido foi baseado no fato de *C. gloeosporioides* ser um filamentoso e crescer por meio de hifas. Na ausência de um suporte sólido, as hifas crescem se enovelando e retardando que o microrganismo se instale em toda a extensão do meio de cultivo, deste modo alterando a produção metabólica.

Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos de *C. gloeosporioides*.

Análise por CLAE-DAD dos extratos brutos.

AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.

CULTIVO EM ARROZ E MILHO

Para efeito de comparação todas as amostras foram preparadas na mesma concentração, nas mesmas condições cromatográficas, com injeções consecutivas.

Os extratos EjC(05)Arroz (Figura 17) e EjC(05)Milho (Figura 18) apresentaram grande variedade metabólica principalmente na região de media polaridade.

Quando observamos a variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)Arroz (Figura 19) nota-se que todos os picos aparecem em maior amplitude em comprimento de ondas mais baixo, a única exceção é o pico em 30 min., que tem melhor resolução em 230nm. Em EjC(05)Milho (Figura 20) os picos também aparecem predominantemente em comprimentos de ondas mais baixos.

Figura 17. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato bruto EjC(05)Arroz em λ 230nm.

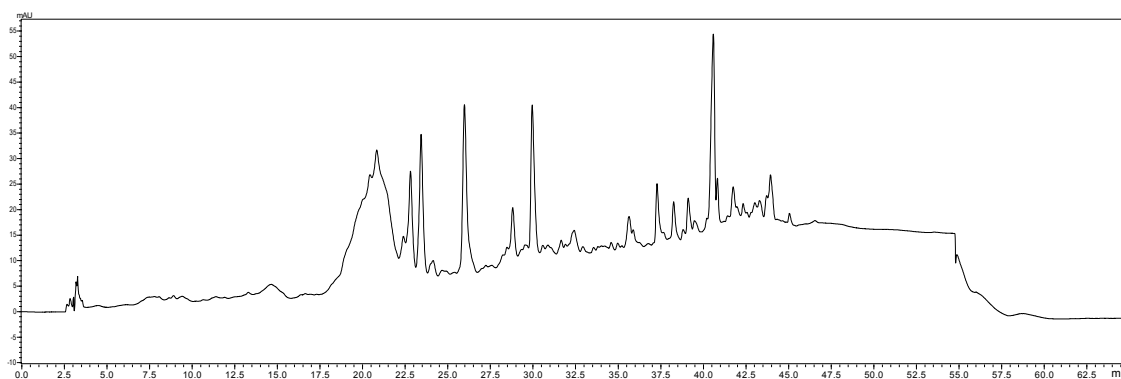


Figura 18. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato bruto EjC(05)Milho em λ 230nm.

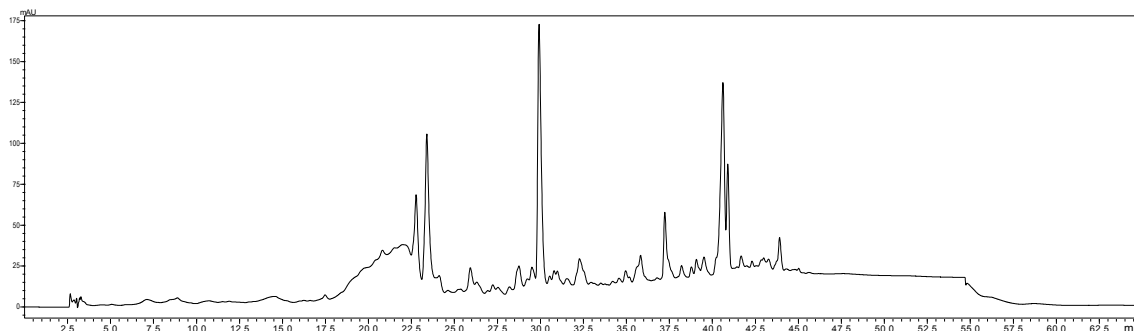
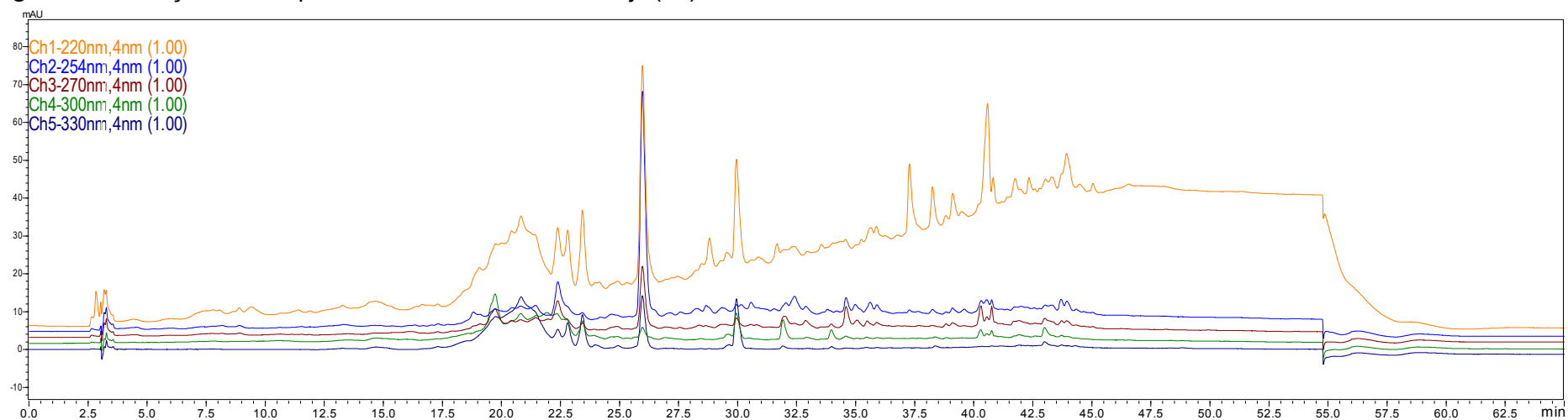
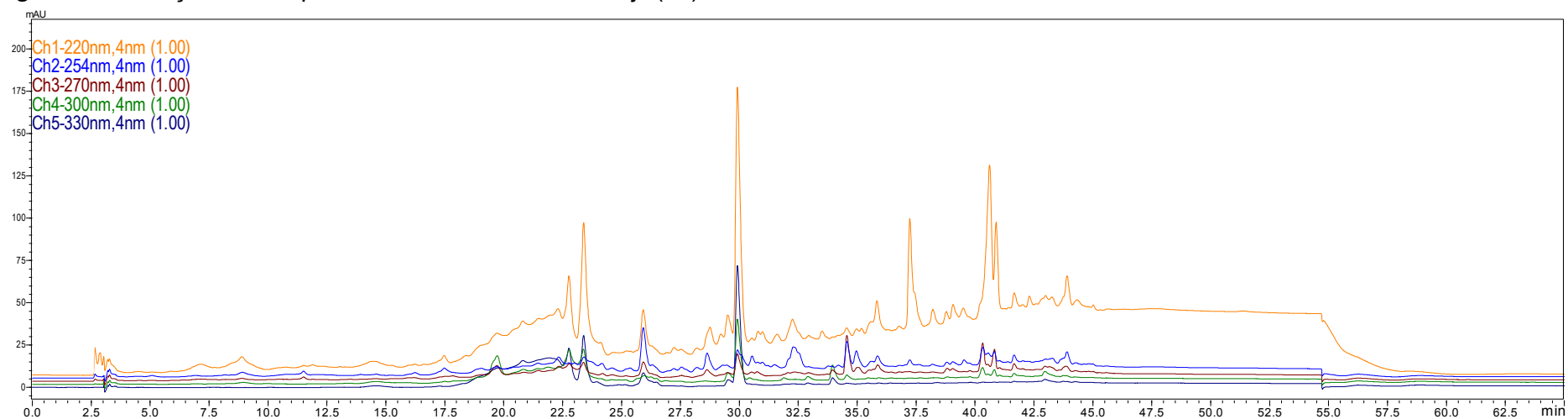


Figura 19. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)Arroz.**Figura 20.** Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)Milho.

CULTIVO EM CZAPEK NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

Quando comparamos os cromatogramas dos extratos brutos com o branco (Figura 21), percebemos que os picos, que no branco, aparecem em grande amplitude quase desaparecem nos extratos, indicando que quase todo o meio de cultivo foi utilizado na metabolização do microrganismo. Ao ampliarmos os cromatogramas (figura 22) observamos poucas diferenças entre o extrato EjC(05)CzaCR e EjC(05)CzaSR, sendo que as principais diferenças se referem a quantidade de cada metabólito produzido. No tempo de retenção de 15,5 min. observamos que o meio de cultivo com suporte sólido produziu cerca de duas vezes a mais, em contrapartida as substâncias referentes aos tempos de retenção em 30,5 min. e 37,0 min. observamos maior produção na ausência de suporte sólido.

Figura 21. Cromatograma do gradiente exploratório do branco de Czapek (Azul) extrato EjC(05)CzaCR (Vermelho) e EjC(05)CzaSR (Preto) em λ 220 nm.

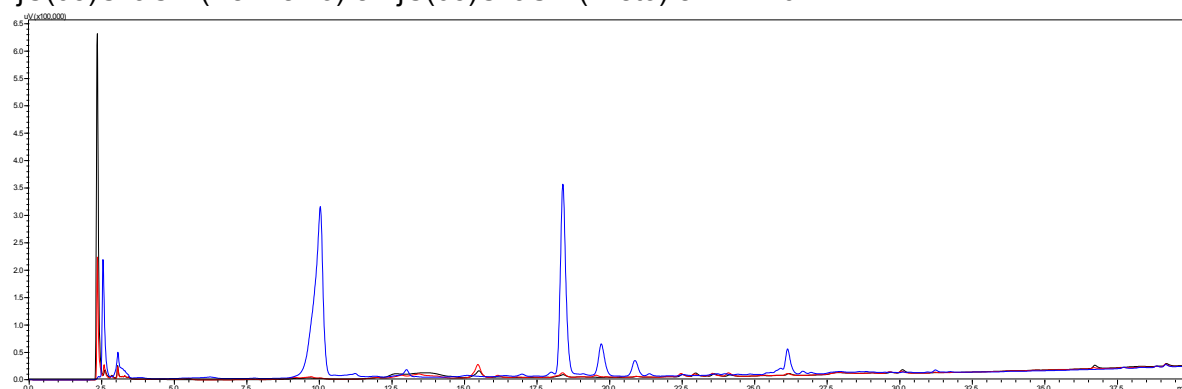
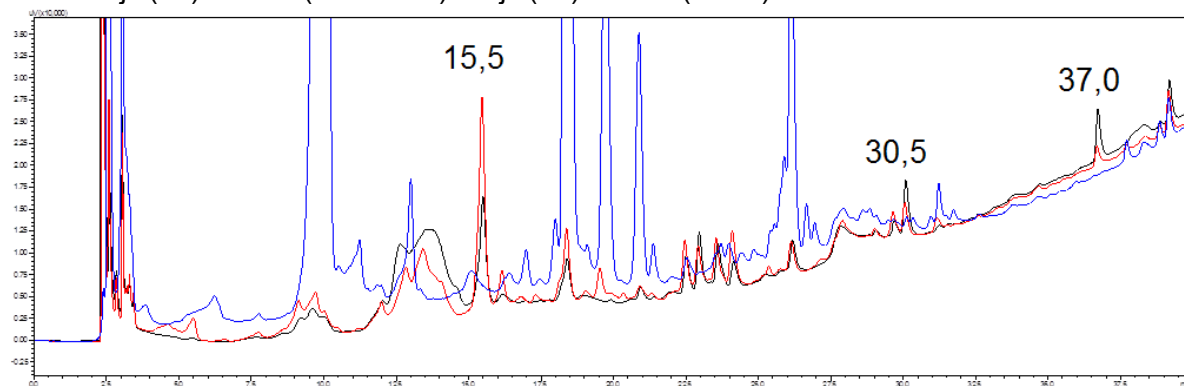
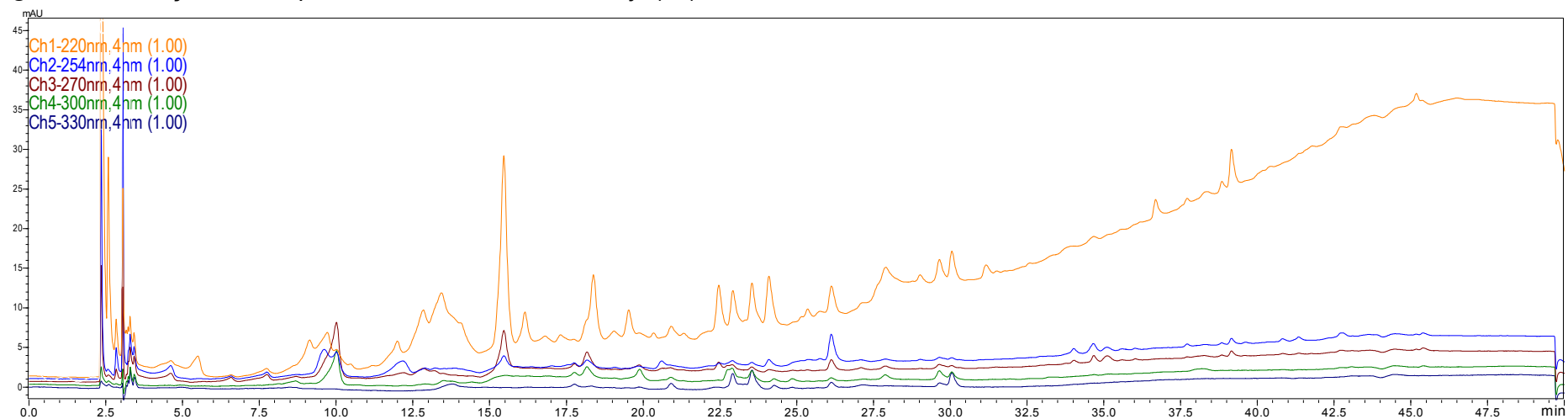
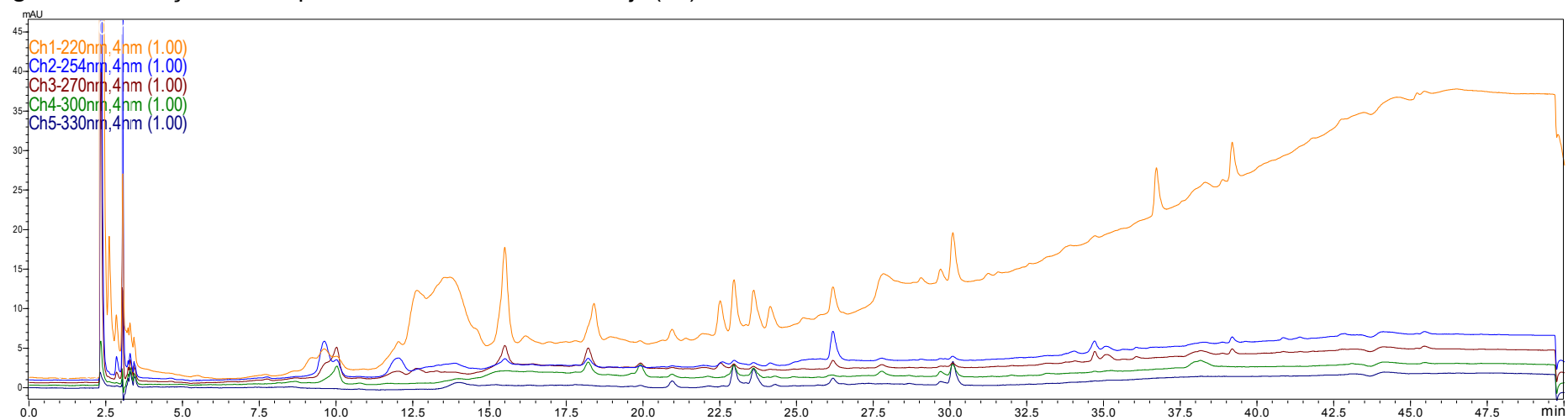


Figura 22. Zoom dos cromatogramas do gradiente exploratório do branco de Czapek (Azul) extrato EjC(05)CzaCR (Vermelho) e EjC(05)CzaSR (Preto) em λ 220 nm.



Quando comparamos os picos variando o comprimento de onda observamos que tanto no extrato EjC(05)CzaCR (Figura 23) quanto em EjC(05)CzaSR (Figura 24) os sinais diminuem com o aumento em λ , indicando pobres grupos cromóforos.

Figura 23. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)CzaCR.**Figura 24.** Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)CzaSR.

CULTIVO EM EXTRATO DE MALTE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

Análise dos cromatogramas dos extratos EjC(05)MaltCR, EjC(05)MaltSR e extrato de malte (Figura 25) podemos perceber a baixa resolução cromatográfica, com várias regiões com “morros” e poucos picos, que podem ser explicados pela coeluição de substâncias ou vasta diversidade metabólica. A importante observação nestes cromatogramas foi a grande diferença do pico em 26,5 min., que no primeiro caso tem uma intensidade 11 vezes superior a do segundo, indicando maior produção muito maior deste metabólito. Quando ampliamos os cromatogramas (Figura 26) é possível observar alguns outros sinais interessantes, como por exemplo o pico em 13,5 min. que só é observado no extrato EjC(05)MaltSR. Uma possível explicação a ausência desta substância no meio de cultivo EjC(05)MaltCR é que como o fungo se desenvolve mais rápido com o auxílio do suporte sólido este microrganismo pode ter biotransformado essa substância.

Figura 25. Cromatograma do gradiente exploratório dos extratos bruto EjC(05)MaltCR (Vermelho), EjC(05)MaltSR (preto) e extrato de malte (Azul) em λ 290nm.

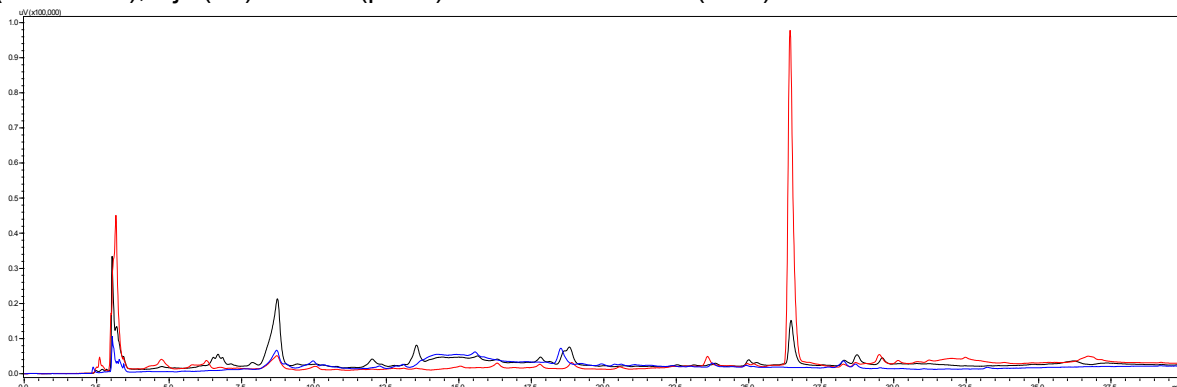
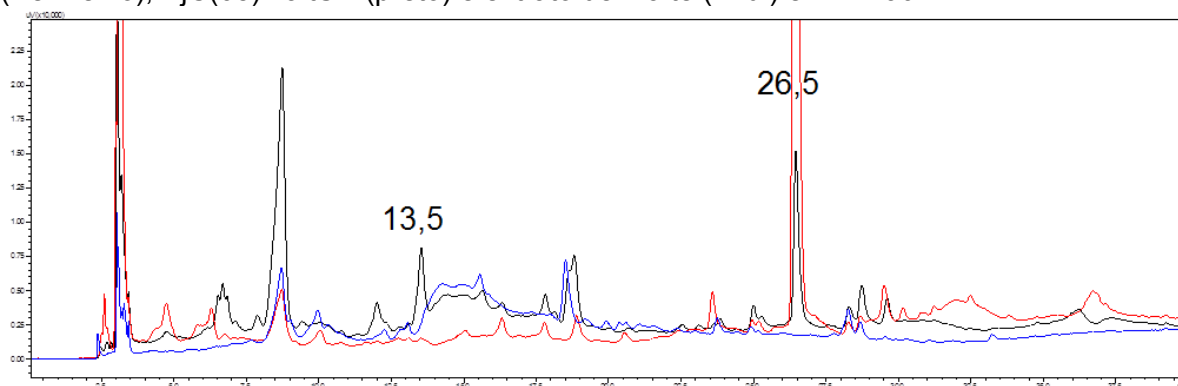
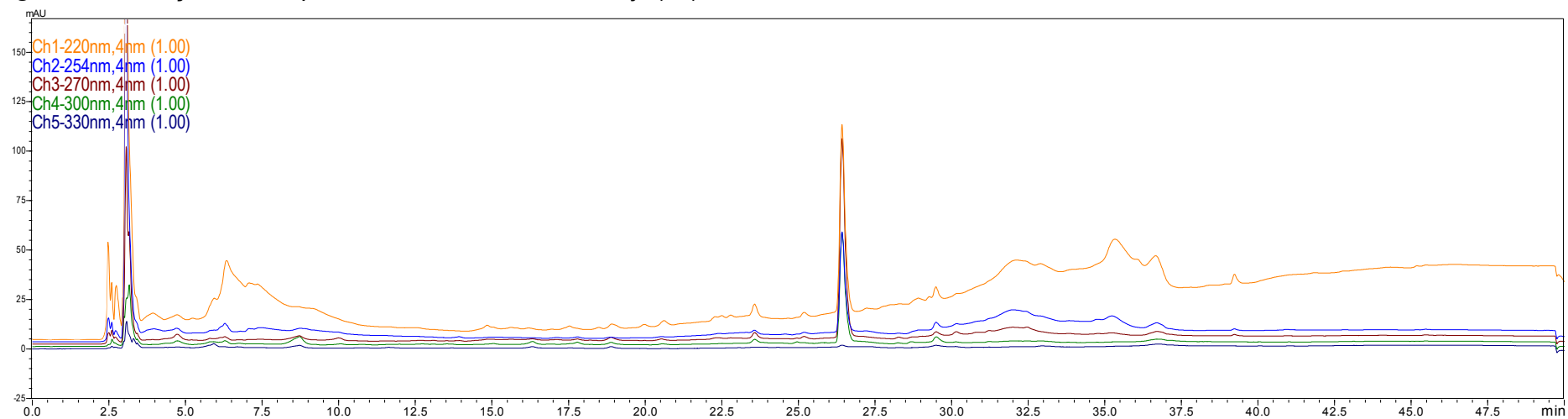
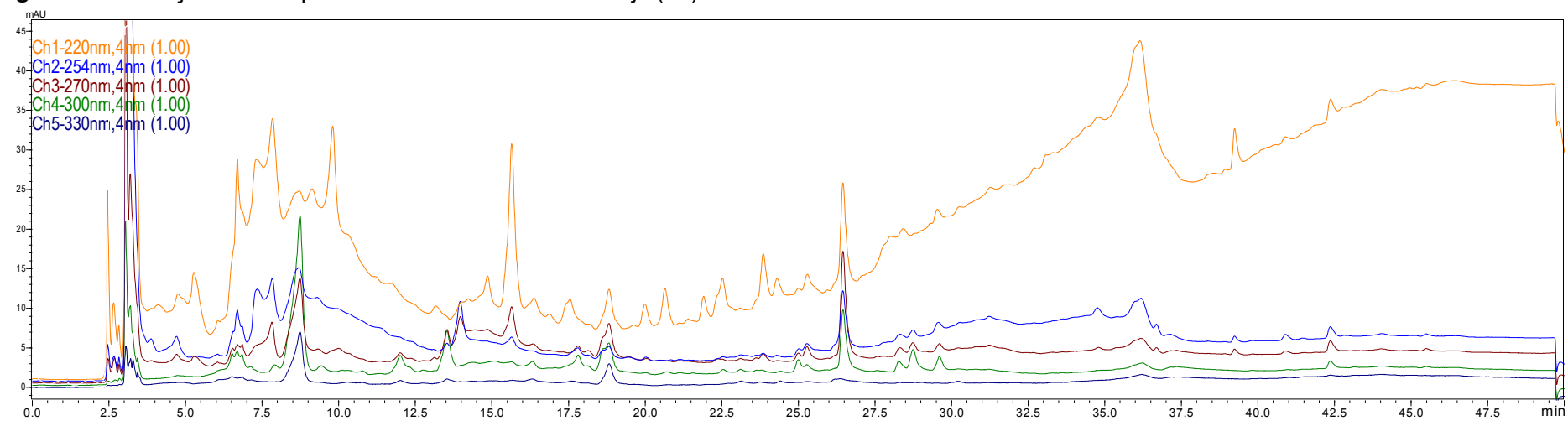


Figura 26. Cromatograma do gradiente exploratório dos extratos bruto EjC(05)MaltCR (Vermelho), EjC(05)MaltSR (preto) e extrato de malte (Azul) em λ 290nm.



Ao analisarmos o comportamento dos picos com a variação do comprimento de onda em EjC(05)MaltCR (Figura 27) observamos que a baixa resolução é independente do λ , pois em todos os comprimentos de onda a resolução é baixa e os picos de baixa amplitude. Já em EjC(05)MaltSR (Figura 28) a resolução é um pouco melhor em λ mais baixos, apresentando maior quantidade de picos.

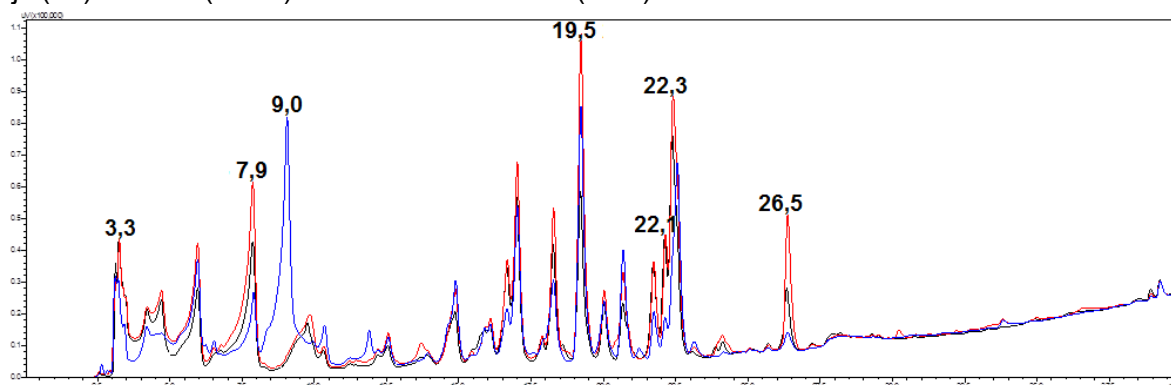
Figura 27. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)MaltCR.**Figura 28.** Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)MaltSR.

CULTIVO EM NUTRIENT NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

Quando comparamos os cromatogramas dos extratos EjC(05)NutriCR e EjC(05)NutriSR com o extrato de Nutrient (branco) (Figura 29) podemos observar que o pico em 9,0 min. foi completamente consumido, o restante do cromatograma aparentemente é o mesmo, nos indicando que não houve produção de nenhuma substância pelo fungo, porem quando analisamos os espectros de UV dos picos nos tempos de retenção 3,30 min., 7,90 min., 22,15 min. e 22,34 min. do extrato de Nutrient (Figura 30), EjC(05)NutriCR (Figura 31) e EjC(05)NutriSR (Figura 32) observamos que nos meios fermentados as substâncias não são as mesmas encontradas no branco provando que houve produção metabólica do fungo neste meio.

Quando comparamos os picos dos extratos fermentados percebemos um perfil semelhante, novamente a maior diferença é a intensidade do pico em 19,5 min. e 26,5 min., onde ambos em EjC(05)NutriCR tem intensidade duas vezes superior a EjC(05)NutriSR, indicando uma maior quantidade deste metabólito. Outro fator a se destacar é que os metabólitos principais estão na região de alta e média polaridade com a quase completa ausência de picos na região mais apolar.

Figura 29. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato EjC(05)NutriCR (Vermelho), EjC(05)NutriSR (Preto) e extrato de Nutrient (Azul) em λ 220nm.



Ao analisaarmos o comportamento dos picos com a variação do comprimento de onda tanto em EjC(05)NutriCR (Figura 33) quanto em EjC(05)NutriSR (Figura 34) a grande quantidade de sinais em λ baixo desaparecem com o seu aumento, indicando pobres grupos cromóforos.

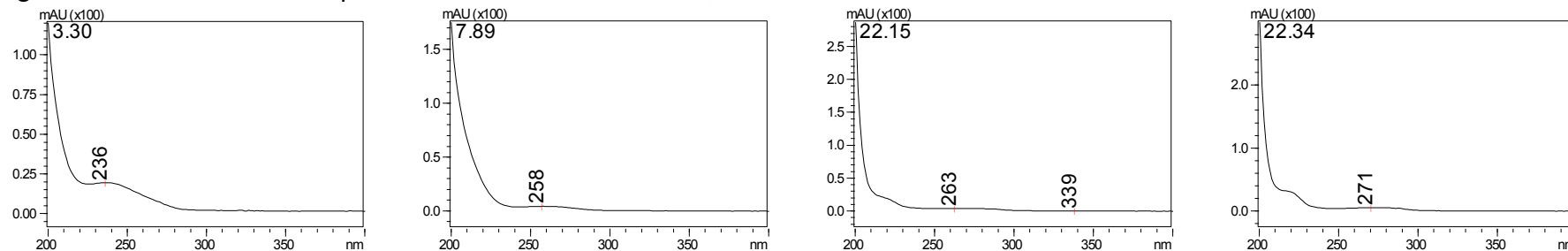
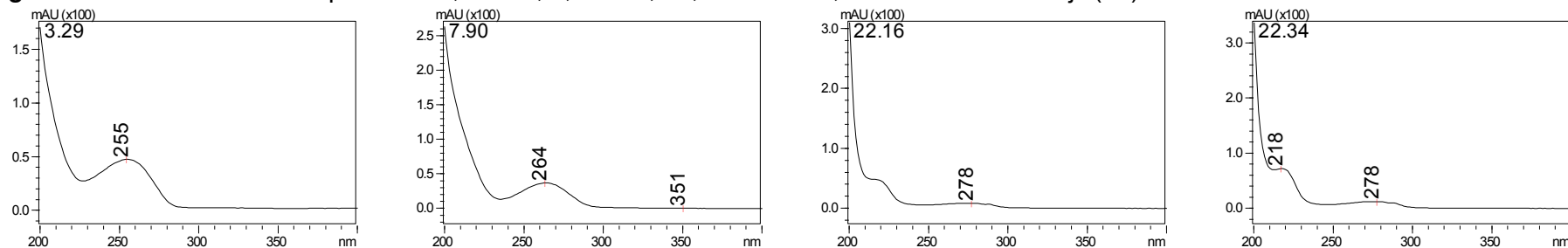
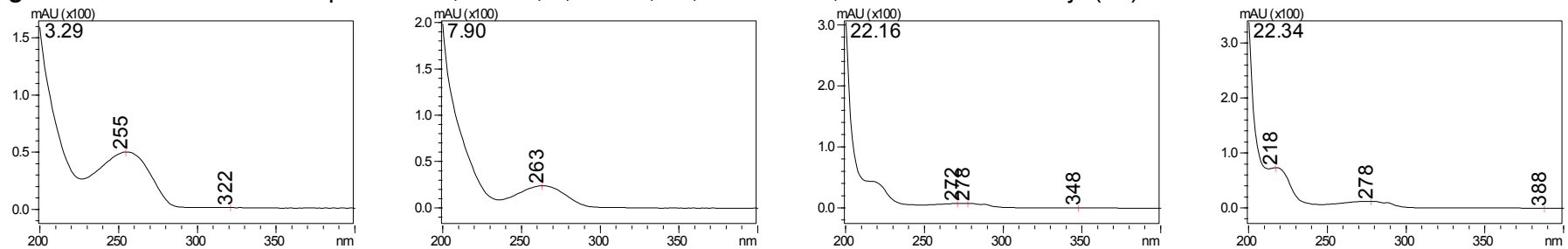
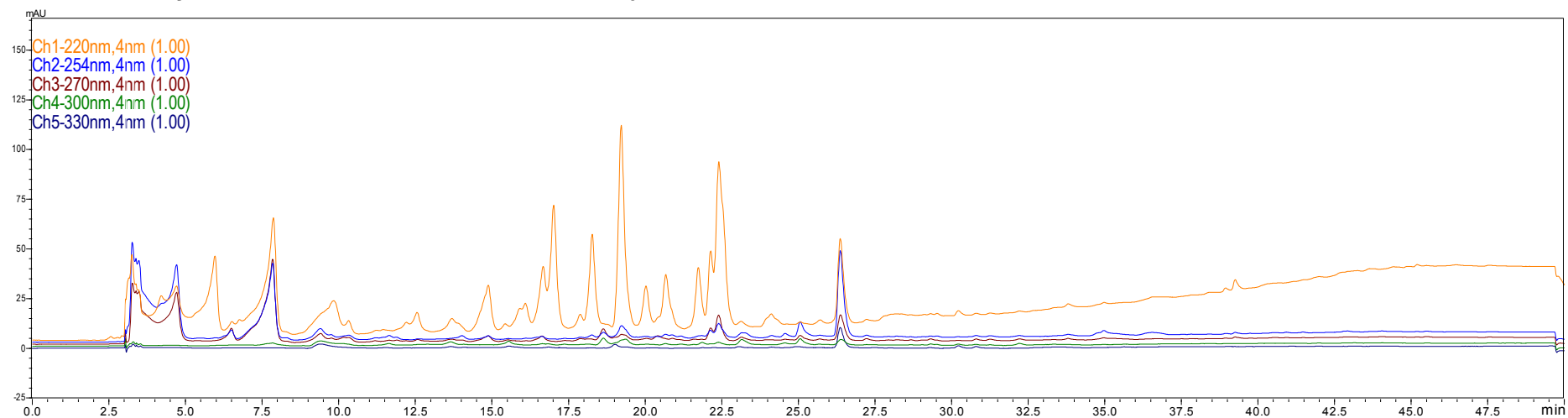
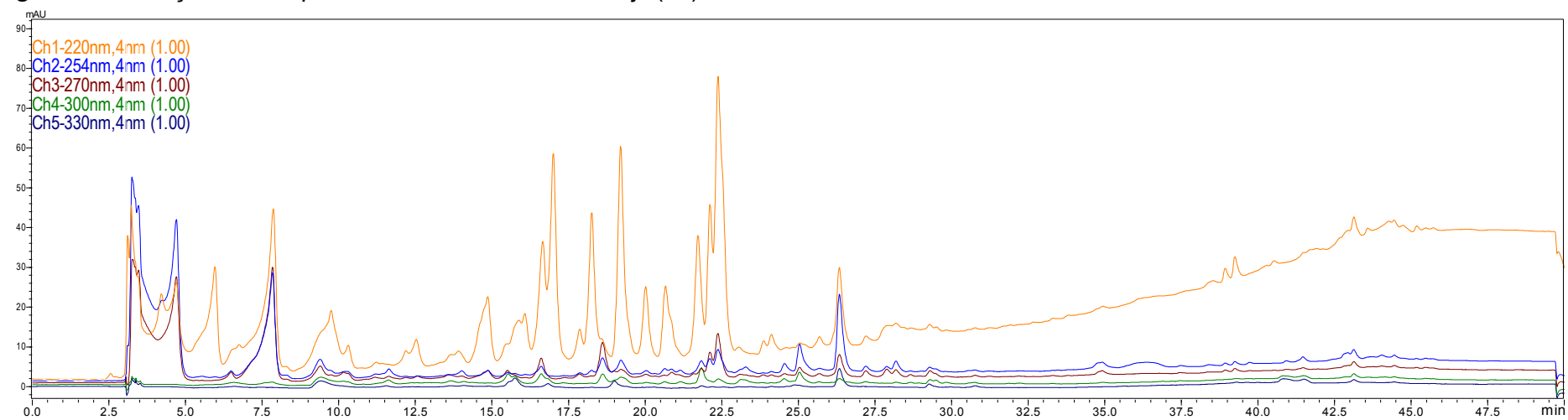
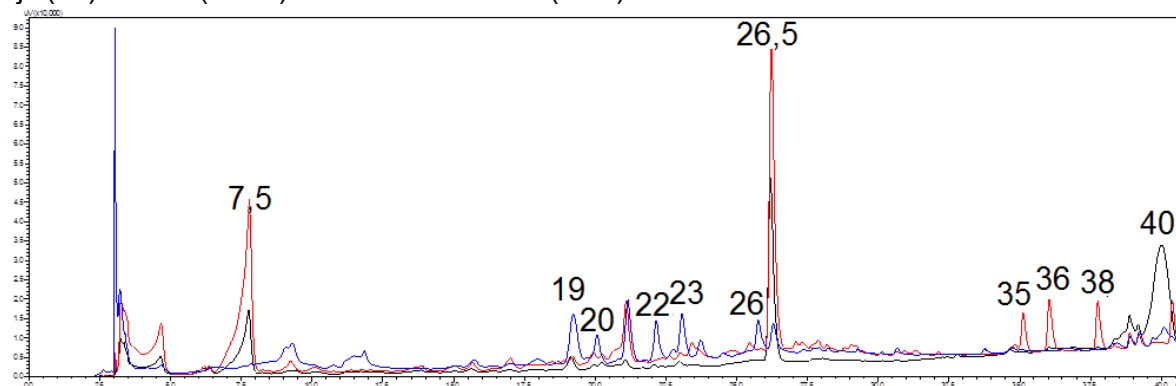
Figura 30. Extrato de UV dos picos em 3,30min., 7,90min., 22,15min. e 22,34 min. no extrato de Nutrient.**Figura 31.** Extrato de UV dos picos em 3,30min., 7,90min., 22,15min. e 22,34 min. no extrato EjC(05)NutriCR.**Figura 32.** Extrato de UV dos picos em 3,30min., 7,90min., 22,15min. e 22,34 min. no extrato EjC(05)NutriSR.

Figura 33. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)NutriCR.**Figura 34.** Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)NutriSR.

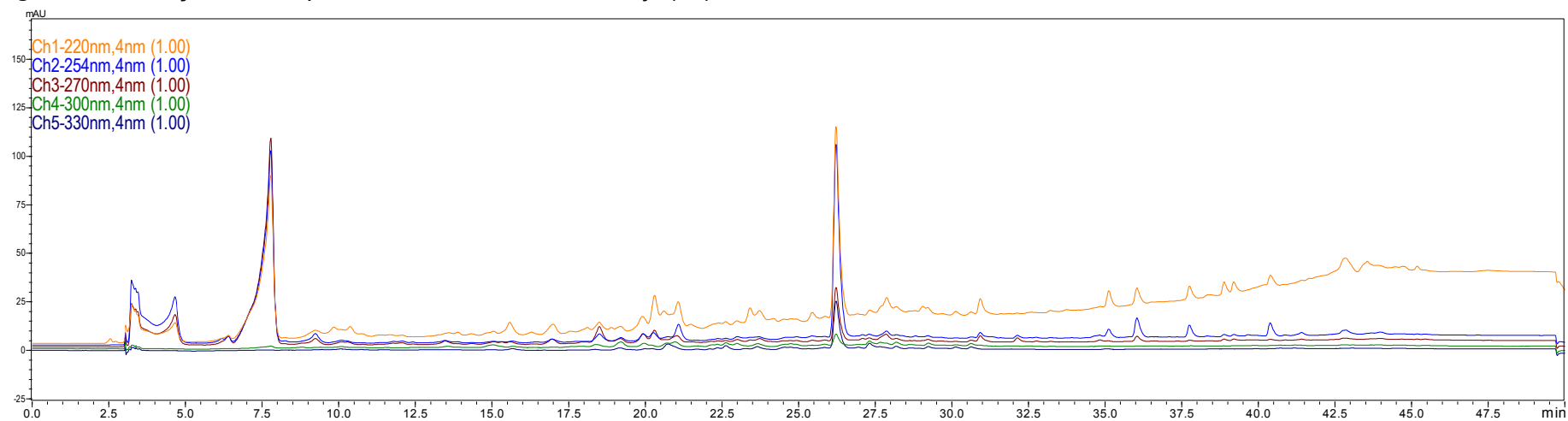
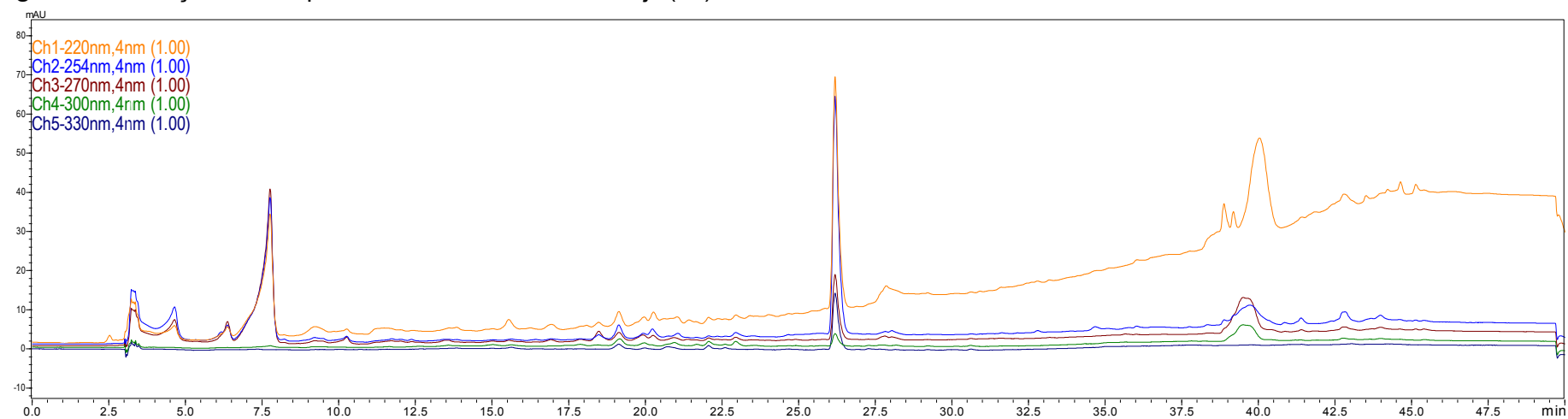
CULTIVO EM PDB NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

Ao compararmos os cromatogramas dos extratos EjC(05)PdbCR e EjC(05)PdbSR com o extrato de batata (Figura 35) podemos observar que várias substâncias como por exemplo os picos em 19,0 min, 20,0 min., 22,0 min., 23,0 min. e 26,0 min. foram consumidos se não em sua totalidade pelo menos parcialmente para o desenvolvimento do endófito. Quando comparamos os dois extratos fermentados observamos um perfil bem similar, onde existem duas diferenças significantes, a intensidade dos picos na região de alta e média polaridade é sempre superior no meio com rede, chegando a ser superior a duas vezes nos picos 7,5 min. e 26,5 min. indicando uma maior quantidade destes metabólitos, na região mais apolar podemos observar que os picos em 35,0 min., 36,0 min. e 38,0 min. só aparecem no extrato com suporte, em contrapartida no pico em 40,0 min. o extrato sem rede apresenta intensidade muito maior.

Figura 35. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato EjC(05)PdbCR (Vermelho), EjC(05)PdbSR (Preto) e extrato de batata (Azul) em λ 240nm.



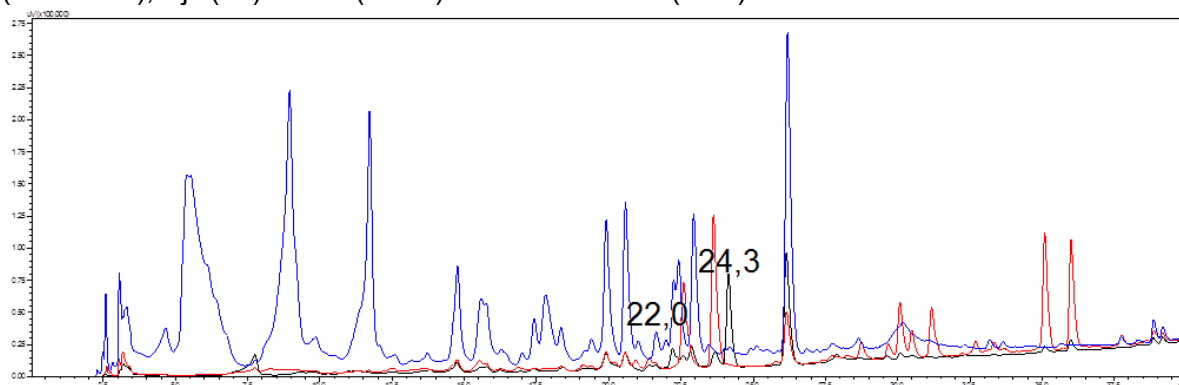
Ao analisarmos o comportamento dos picos com a variação do comprimento de onda tanto em EjC(05)PdbCR (Figura 36) quanto em EjC(05)NutriSR (Figura 37) existe uma ligeira variação na quantidade de sinais, permanecendo praticamente na mesma amplitude, exceção feita somente aos picos até 7,5 min., que desaparece em λ maiores.

Figura 36. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)PdbCR.**Figura 37.** Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)PdbSR.

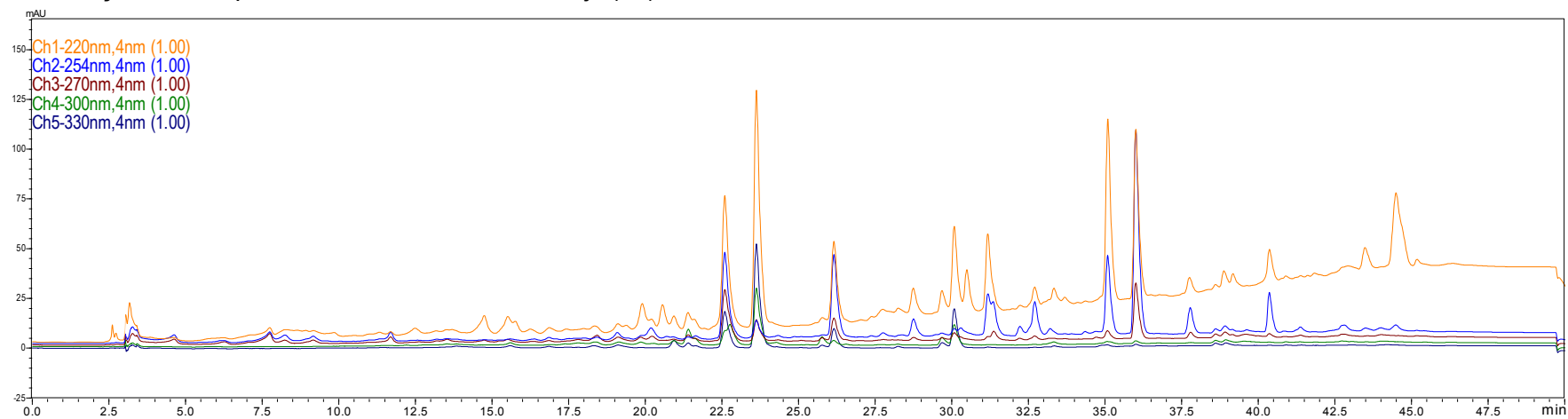
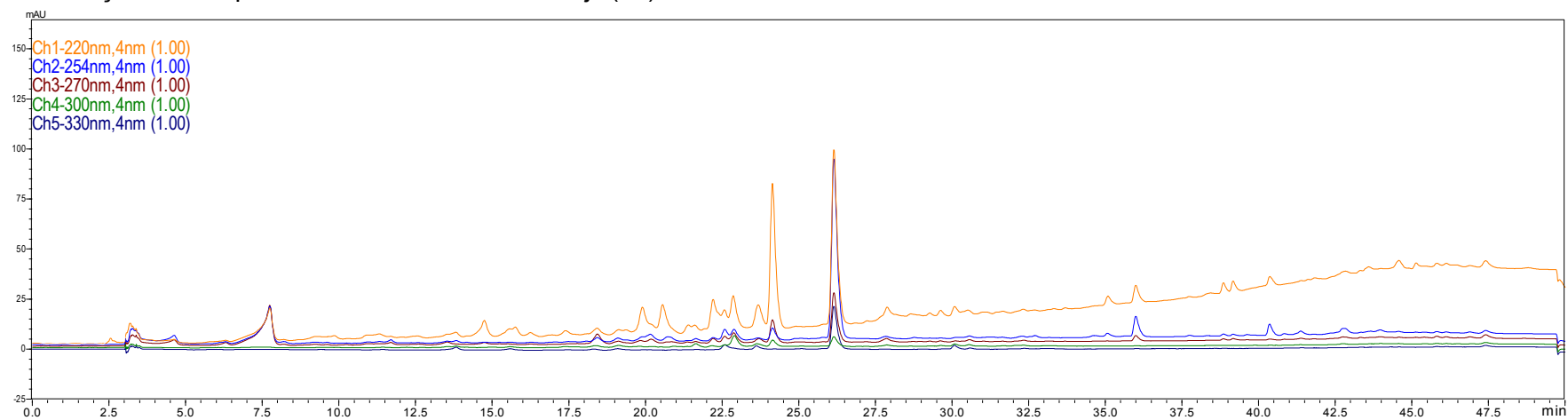
CULTIVO EM YM NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

Na comparação dos cromatogramas entre os extratos EjC(05)YmCR e EjC(05)YmSR com o extrato de YM (Figura 38) observamos que toda fonte nutricional presente no meio de cultivo YM até 22,0min. foi utilizada pelo endófito na produção metabólica, levando a quase eliminação destas substâncias. O endófito consumiu substâncias de alta e média polaridade e produziu, majoritariamente, metabólitos secundários de media a baixa polaridade. Quando comparamos os extratos fermentados podemos observar grande variedade metabólica, onde o fungo que foi auxiliado pelo suporte sólido produziu substâncias em maior quantidade em quase todo cromatograma, sendo a única exceção observada em 24,3min.

Figura 38. Cromatograma do gradiente exploratório do extrato bruto EjC(05)YmCR (Vermelho), EjC(05)YmSR (Preto) e Extrato de YM (Azul) em λ 220nm.



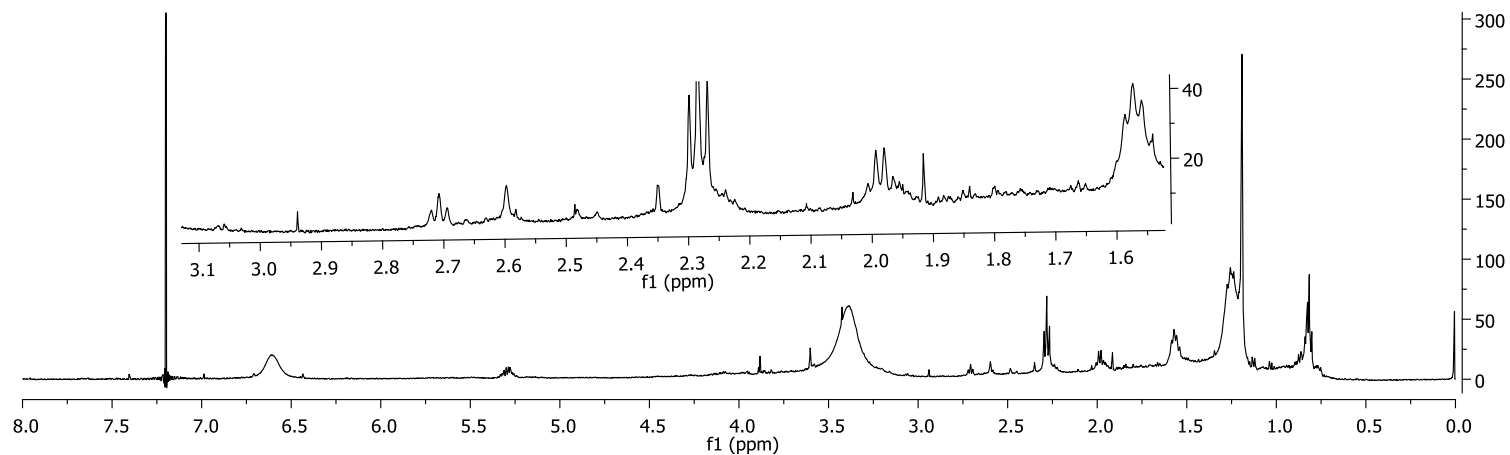
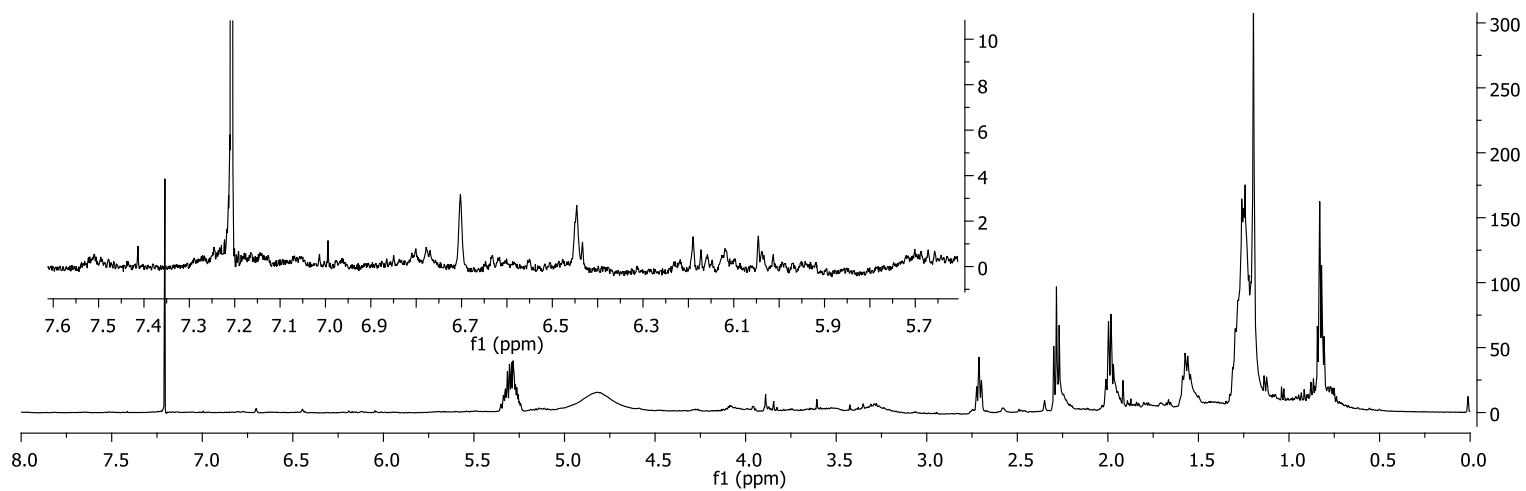
Quando analisarmos o comportamento dos picos com a variação do comprimento em EjC(05)YmCR (Figura 39) observamos a rica produção metabólica deste extrato, com picos por toda extensão do cromatograma em todos λ analisados, quando analisamos EjC(05)NutriSR (Figura 40) observamos uma produção metabólica mais discreta, com poucos picos quando comparados ao extrato com rede e principalmente em λ menores.

Figura 39. Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)YmCR.**Figura 40.** Variação do comprimento de onda no extrato EjC(05)YmSR.

ANÁLISE POR RMN DE ^1H DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.

CULTIVO EM ARROZ E MILHO

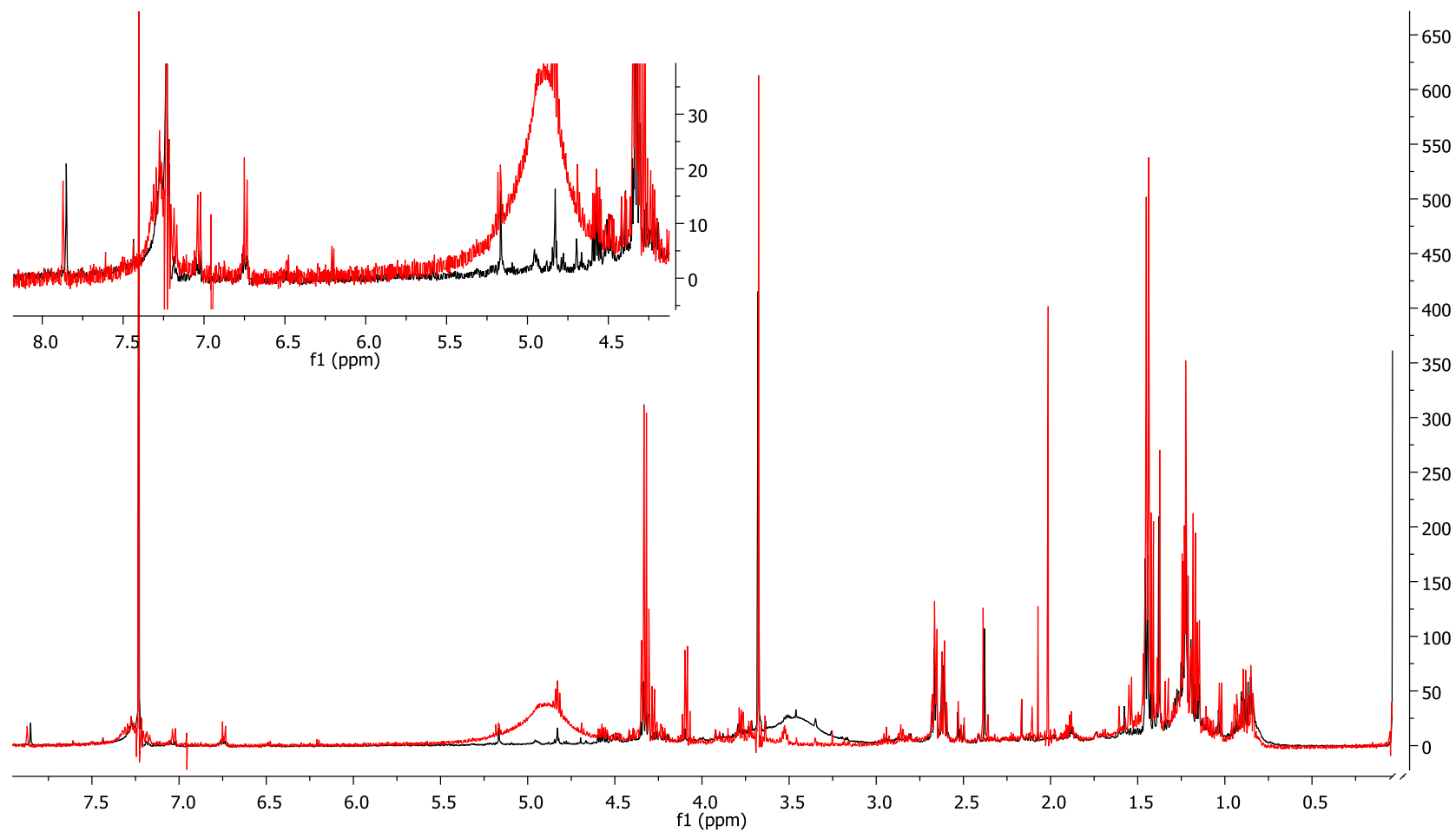
O espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)Arroz (Figura 41) e EjC(05)Milho (Figura 42) apresentaram algumas semelhanças, com os principais sinais variando de δ_{H} 0,7 a δ_{H} 3,5 indicando substâncias de cadeias longas, com a presença de, possivelmente, açúcares. No segundo espectro observa-se a presença de hidrogênios de origem aromática.

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)Arroz (CDCl_3 , 500MHz).**Figura 42.** Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)Milho (CDCl_3 , 500MHz).

CULTIVO EM CZAPEK NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

O espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)CzaCR e EjC(05)CzaSR (Figura 43) apresentaram-se semelhantes, com sinais por toda largura espectral, evidenciando diferentes grupos de substâncias. É possível verificar metoxilas possivelmente aromáticas, metilas sobre carbonos sp^3 , metilas de acetatos em aproximadamente 2,0 ppm, inúmeros sinais, possivelmente, α a carbonilas e hidrogênios carbinólicos, sugerindo uma série de metabólitos secundários que podem variar de aromáticos a alifáticos. Analisando cuidadosamente os sinais atribuídos a singletos e as respectivas intensidades, podemos sugerir que várias substâncias são produzidas.

Figura 43. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)CzaCR (Vermelho) e EjC(05)CzaSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).

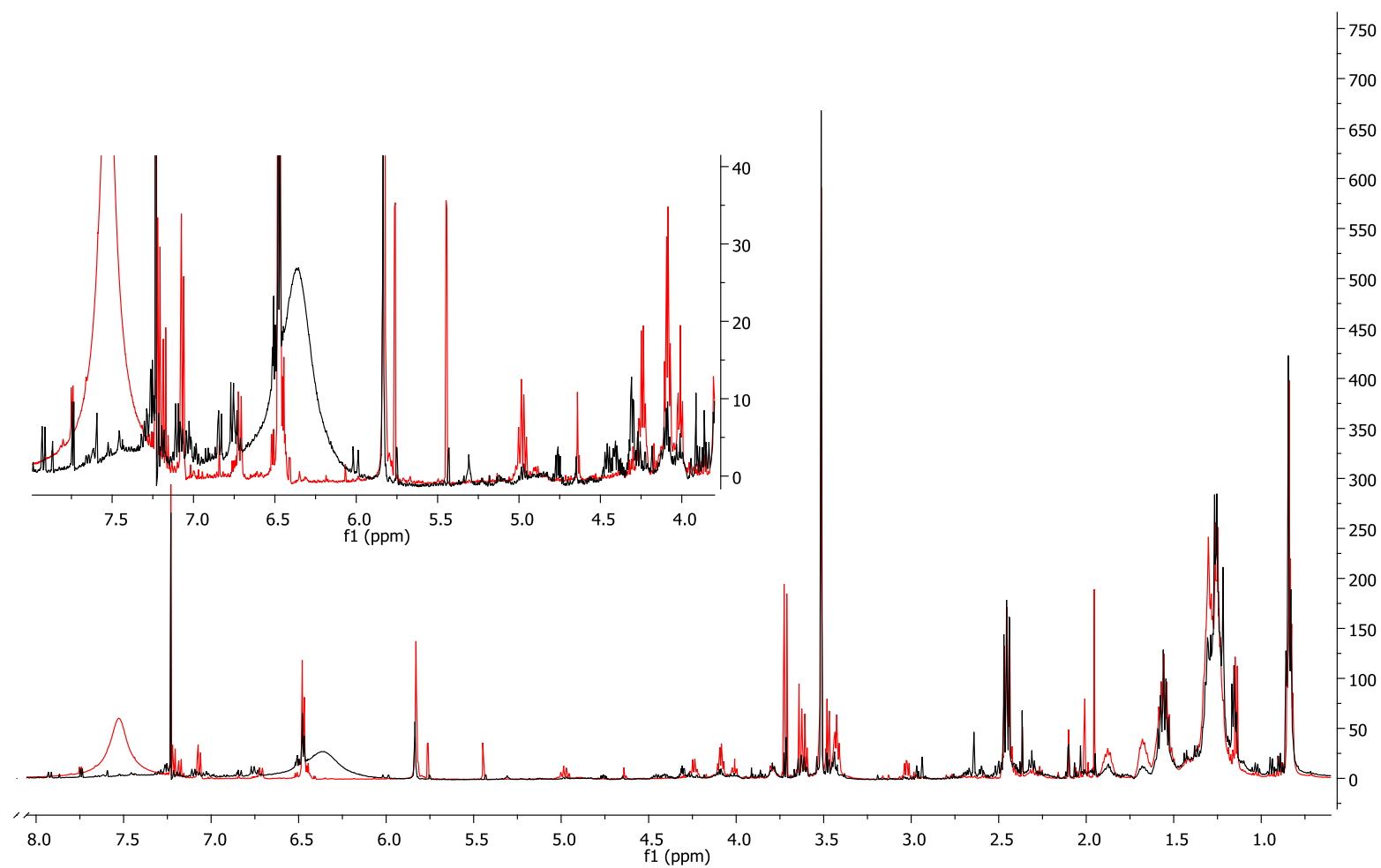


CULTIVO EM EXTRATO DE MALTE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

Ao analisarmos os meios fermentados EjC(05)MaltCR e EjC(05)MaltSR (Figura 44) observa-se uma variação na produção metabólica com sinais por toda largura espectral. É interessante notar, a resolução do espectro, com sinais muito bem resolvidos e com muitas substâncias de caráter aromático, sugerindo uma grande variedade metabólica. O grande numero de hidrogênios carbinólicos observados sugere a produção de substâncias polares.

Adicionalmente inúmeros sinais na região de 5,0 ppm sugerem hidrogênios olefínicos.

Figura 44. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)MaltCR (Vermelho) e EjC(05)MaltSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).

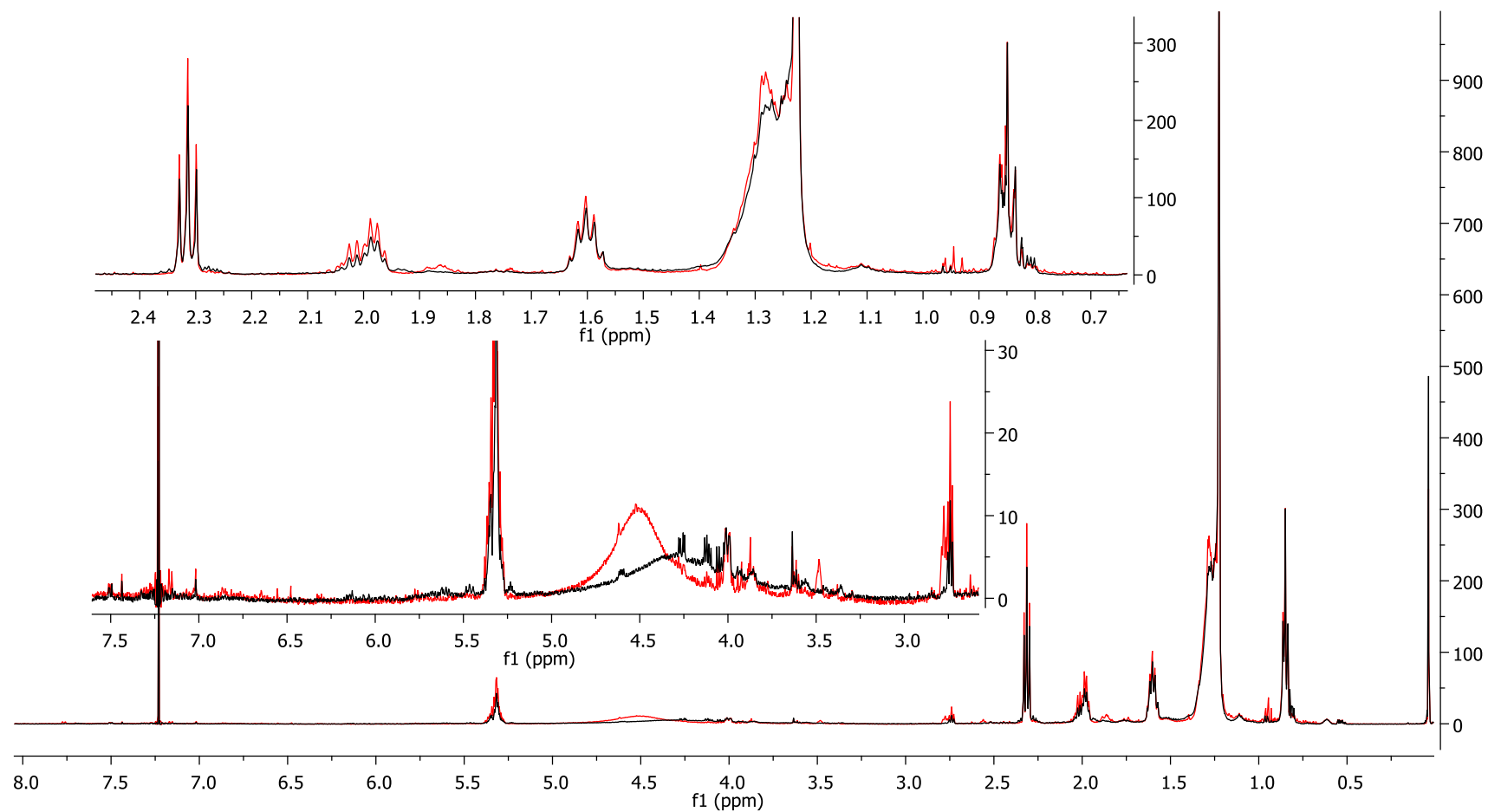


CULTIVO EM PDB NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

O espectro de RMN de ^1H dos dois extratos (Figura 45) mostrou predominância de substâncias alifáticas, evidenciando cadeias metilênicas longas e sinais de hidrogênios olefínicos, sugerindo que neste meio o fungo produza ácidos graxos insaturados de cadeia longa. O tripleto em 2,2 ppm sugere hidrogênios vizinhos a grupos carboxílicos. Esta é uma observação interessante pois sugere que este microrganismo possa ser produtor de substâncias precursoras de biodiesel.

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que ácidos graxos insaturados de cadeia longa quando submetidos à bioensaio com *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch) apresentaram atividade promissora quando comparadas à atividade da isoniazida (CAFÊU, 2007), sugerindo que *C. gloeosporioides* seja um promissor produtos de substâncias com atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis*.

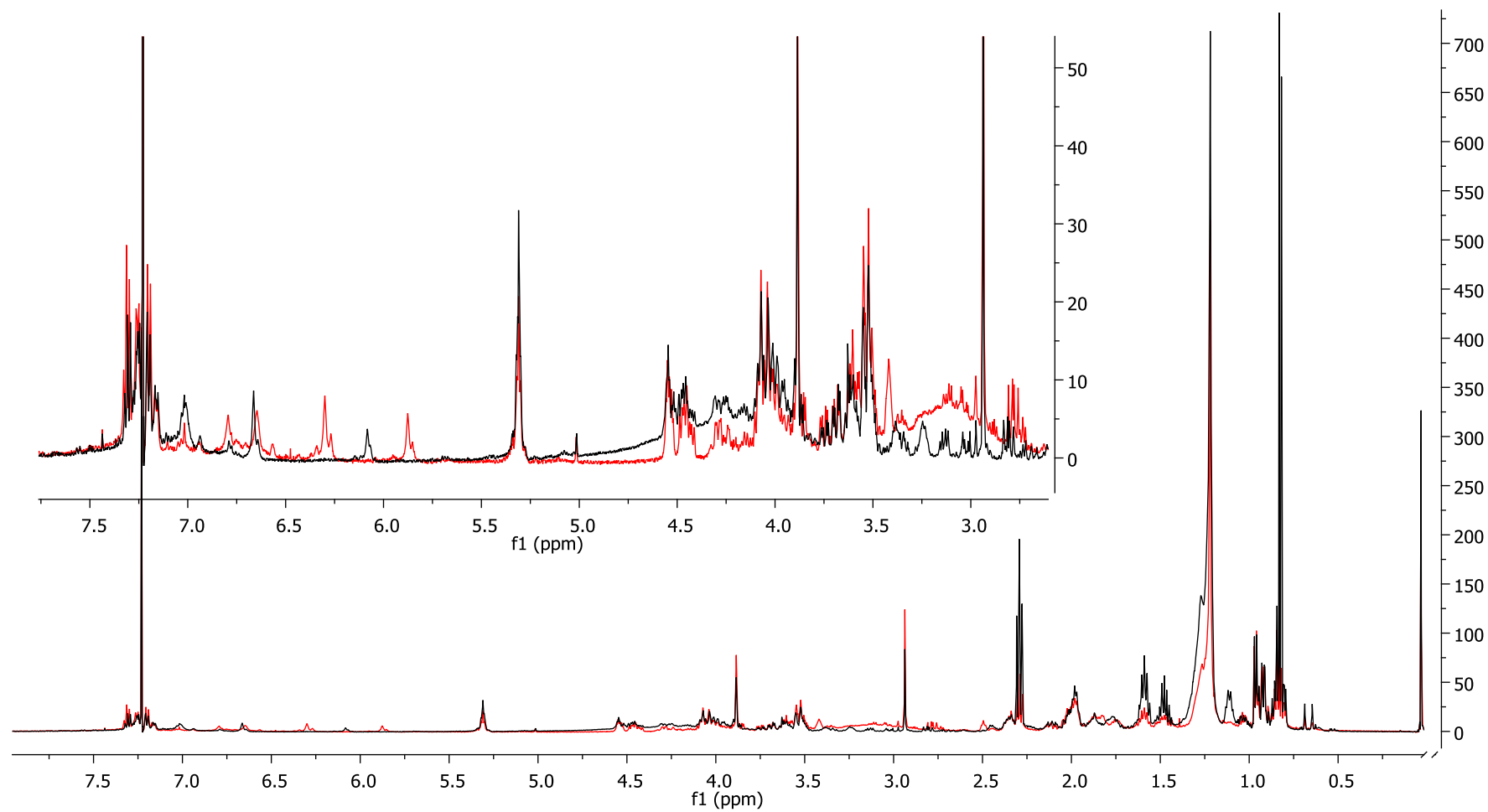
Figura 45. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)PdbCR (Vermelho) e EjC(05)PdbSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).



CULTIVO EM NUTRIENT NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

O espectro de RMN de ^1H do extrato bruto EjC(05)NutriCR e EjC(05)NutriSR (Figura 46) apresentaram-se muito parecidos, com sinais variando por toda largura espectral. Observa-se uma região muito densa com substâncias de caráter aromático, hidrogênios alifáticos, carbinólicos e muitos hidrogênios na região de metilenos sugerindo substância, possivelmente com cadeias alifáticas extensas.

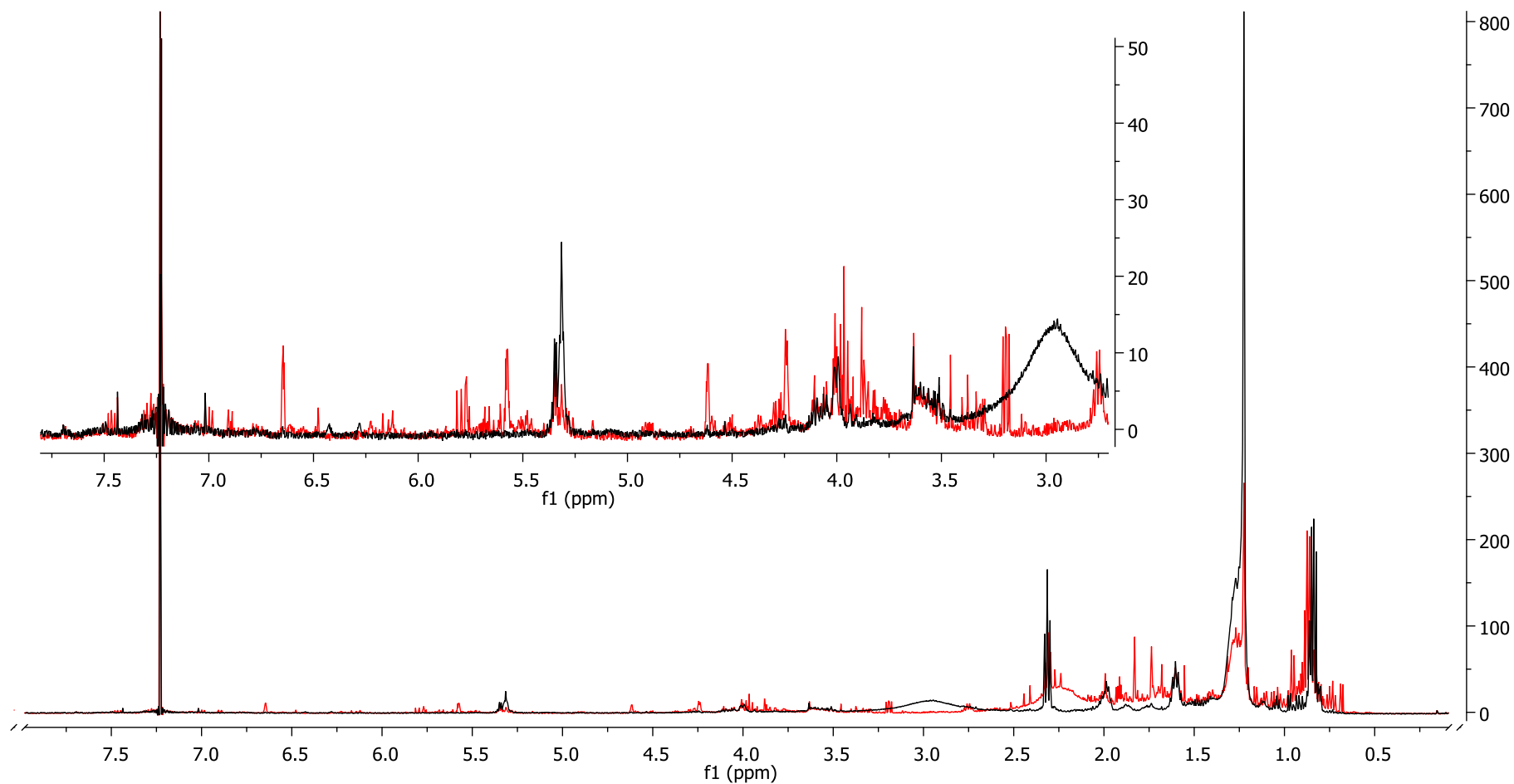
Figura 46. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)NutriCR (Vermelho) e EjC(05)NutriSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz.



CULTIVO EM YM NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE REDE DE POLIETILENO

O espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)YmCR e EjC(05)YmSR (Figura 47) apresentaram-se muito diferentes, sendo que no primeiro caso observa-se sinais por toda largura espectral e no segundo poucos sinais e sugerindo substâncias de caráter alifático, possivelmente ácidos graxos insaturados. Inúmeros sinais na região de hidrogênios olefínicos são observados na presença de rede de polietileno.

Figura 47. Espectro de RMN ^1H do extrato bruto EjC(05)YmCR (Vermelho) e EjC(05)YmSR (Preto) (CDCl_3 , 500MHz).



Avaliação citotóxica dos extratos brutos obtidos de *C.gloeosporioides*.**Ensaio Antitumoral**

A atividade citotóxica de todas as amostras está apresentada na Tabela 07 com seus respectivos percentuais de inibição. Somente as substâncias que apresentarem valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 6. Análise da atividade antitumoral dos extratos.

Identificação	HCT-116	SD	OVCAR 8	SD	SF-295	SD
	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
EjC(05)ARROZ	93,71%	4,39%	92,56%	19,40%	72,29%	16,44%
EjC(05)MILHO	5,56%	1,48%	23,89%	1,06%	26,26%	0,84%
EjC(05)CzaCR	19,74%	0,16%	40,70%	6,68%	13,74%	2,47%
EjC(05)CzaSR	6,23%	7,08%	35,10%	1,98%	3,93%	6,02%
EjC(05)MaltCR	100,23%	0,00%	91,15%	1,98%	100,00%	0,00%
EjC(05)MaltSR	97,20%	1,65%	60,84%	4,90%	86,17%	0,54%
EjC(05)NutriCR	27,14%	1,40%	45,68%	3,18%	28,03%	2,95%
EjC(05)NutriSR	8,21%	1,48%	38,23%	0,57%	1,63%	0,12%
EjC(05)PdbCR	8,85%	0,41%	17,95%	4,64%	4,63%	2,11%
EjC(05)PdbSR	1,75%	0,25%	20,20%	7,82%	7,10%	1,75%
EjC(05)YmCR	38,44%	1,07%	45,53%	1,62%	23,10%	0,90%
EjC(05)YmSR	98,66%	1,07%	75,55%	4,75%	76,04%	1,14%

Como podemos observar os extratos EjC(05)Arroz, EjC(05)YmSR, EjC(05)MaltSR e EjC(05)MaltCR foram os extratos que apresentaram potencial atividade antitumoral, este ultimo apresentando os melhores resultados.

Podemos observar que a houve uma grande variação metabólica dependendo do meio de cultivo, o que confirma que a produção metabólica de um microrganismo é diretamente influenciada pelos nutrientes, sugerindo que alguns possam ativar ou inibir vias metabólicas, fazendo com que o fungo produza ou deixe de produzir determinados metabólitos.

Quando avaliamos a produção no mesmo meio de cultivo com apenas a variação do suporte sólido obtivemos resultados completamente variados. Como o crescimento com suporte sólido é mais rápido, os nutrientes do meio são utilizados

mais rapidamente, permitindo que o fungo possa biotransformar seus metabólitos secundários.

Neste ensaio, entre os meios obtidos com e sem suporte, essa biotransformação pode ter gerado alguma substância mais potente. Tal suposição é baseada no fato que EjC(05)MaltCR apresentou um maior potencial anticancerígeno quando comparado com EjC(05)MaltSR), ou então, consumir o metabólito ativo diminuindo sua concentração e consequentemente a potencia do extrato que é o caso de EjC(05)YmCR quando comparado a EjC(05)YmSR.

Seleção do meio de cultivo

Levando em consideração que EjC(05)MaltCR apresentou sinais em praticamente toda extensão do espectro de RMN de ^1H , maior atividade contra as linhagens cancerígenas testadas e ainda que produziu maior massa, em quantidade suficiente para fracionamento, isolamento para elucidação ou determinação estrutural, optamos por trabalhar com esse extrato.

ESTUDOS DA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1

Analises detalhadas dos espectros de RMN de ^1H (Figura 48) Cosy (Figura 49), HMBC (Figura 50) e HMQC (Figura 51) sugeriram uma substância aromática, dois carbonos metilênicos olefinicos com hibridização sp^2 e constante de acoplamento para hidrogênios em uma relação cis em 5,70 e 5,38 com constante de acoplamento de 3,5Hz. Adicionalmente foi verificada a presença de um grupo acetato e metóxido ligados ao anel aromático, no entanto devido a ausência de outras correlações em COSY, HMBC e HMQC a determinação estrutural desta substância não foi concluída. Entretanto utilizando-se a base de dados DNP realizou-se uma busca hifenando-se as funções orgânicas com os valores de massas obtidos no CLAE-EMAR aceitando-se um erro de até 30 ppm, não houve nenhum retorno na pesquisa, o que sugere tratar-se de um substância inédita na literatura. Deste modo esforços serão empreendidos para o reisolamento desta substância com posterior determinação estrutural e avaliação da atividade biológica e a verificação se esta substância é a responsável pela atividade citotóxica observada no extrato bruto.

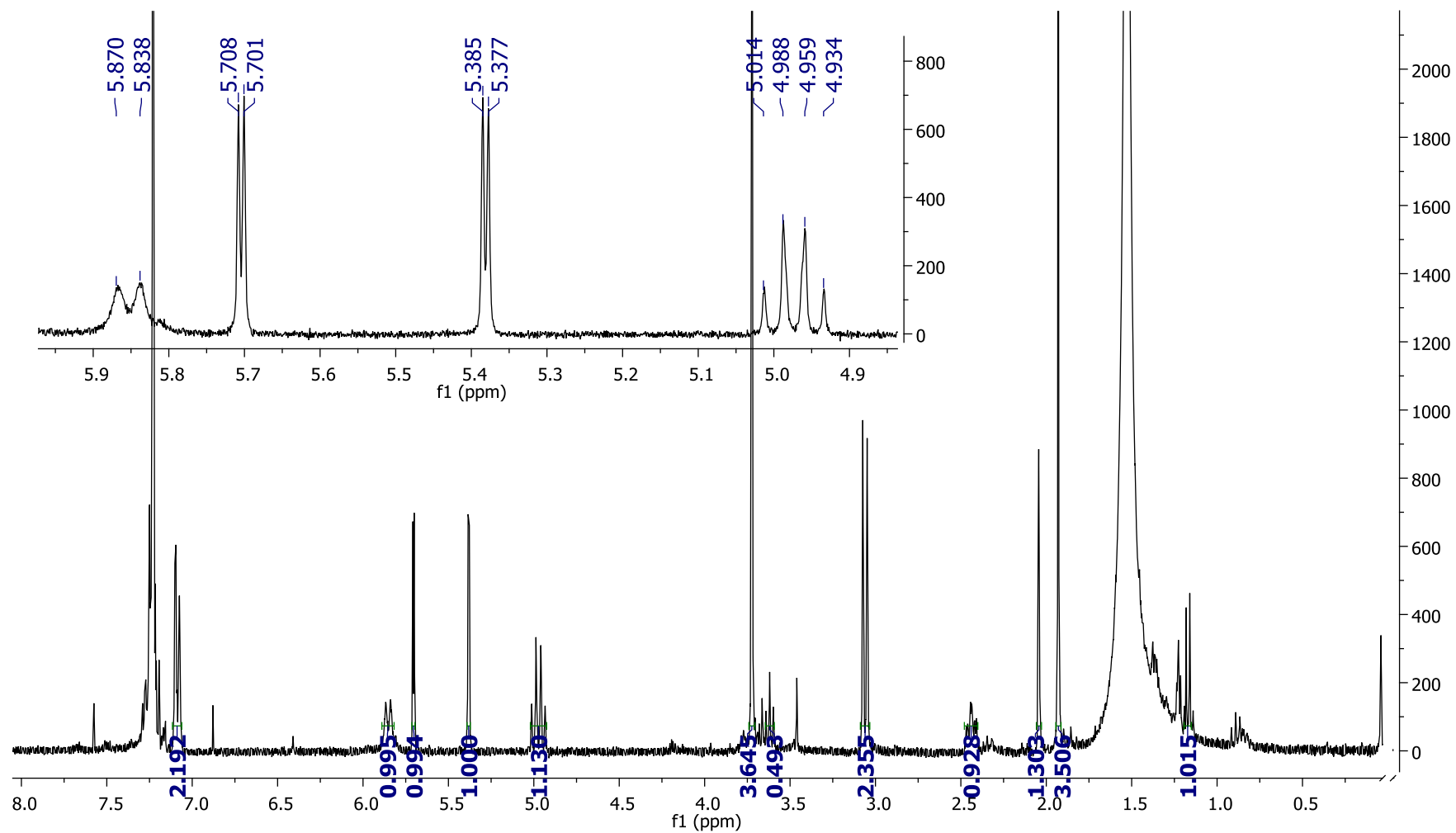
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

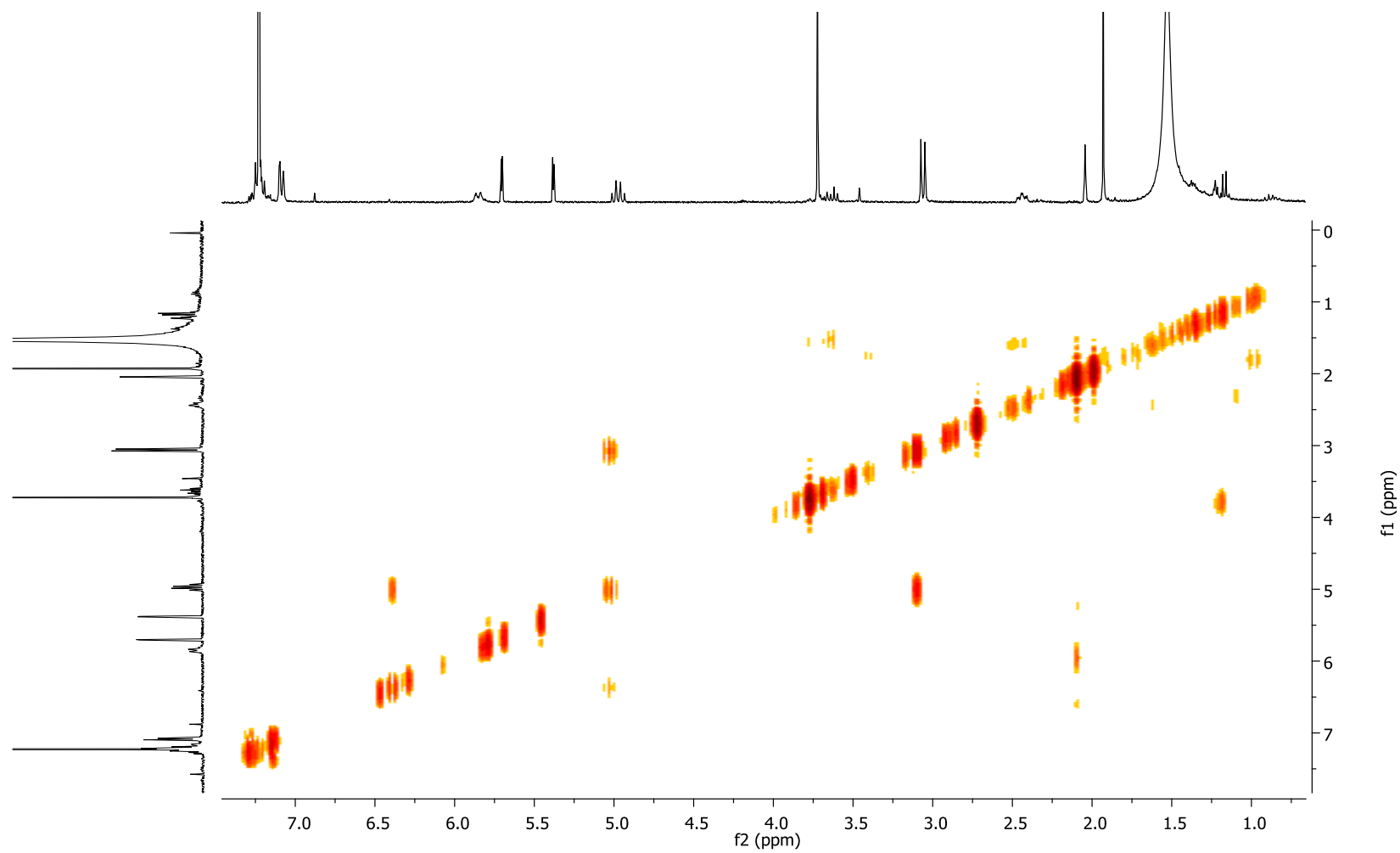
Figura 49. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl₃) da substância **1**.

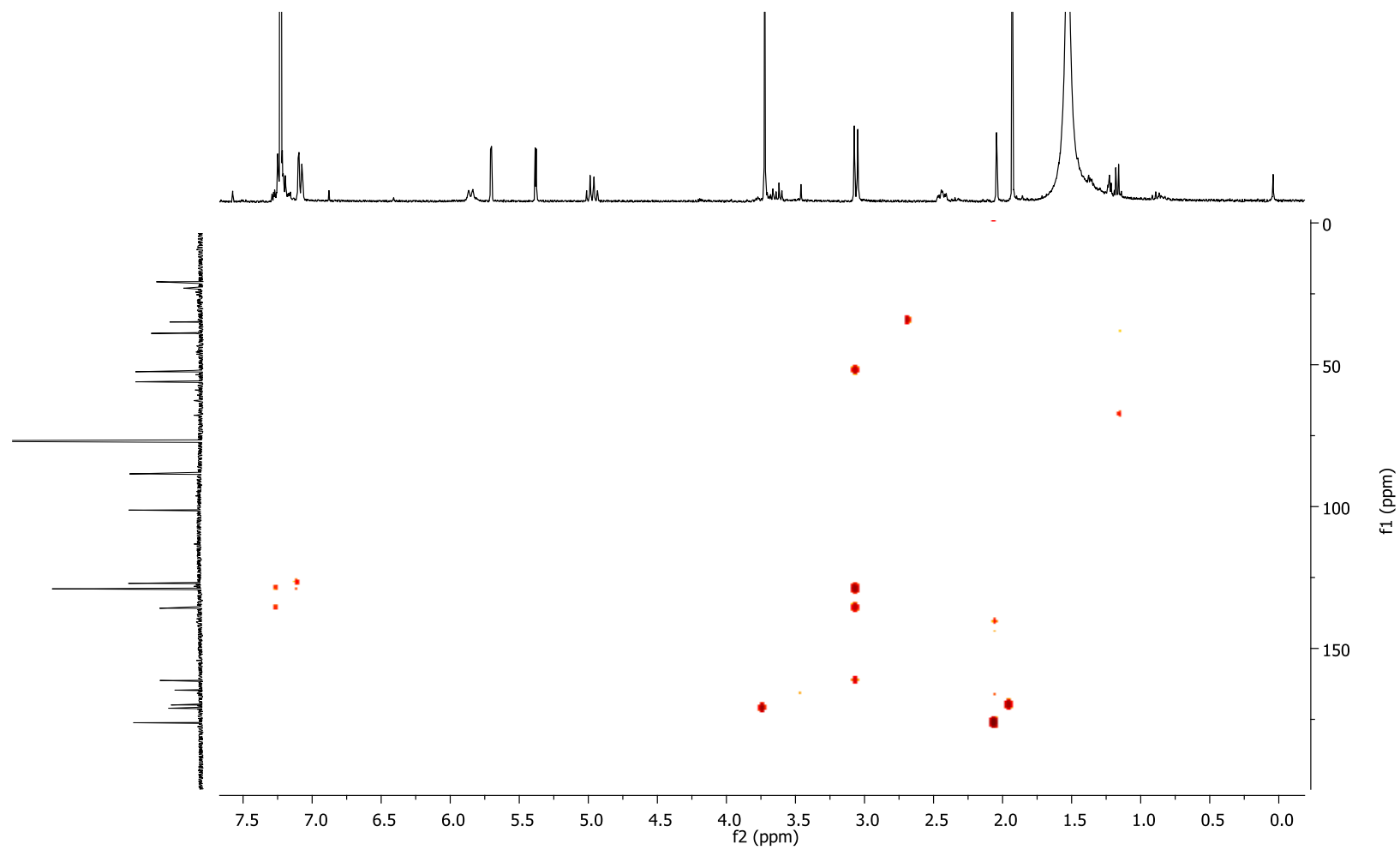
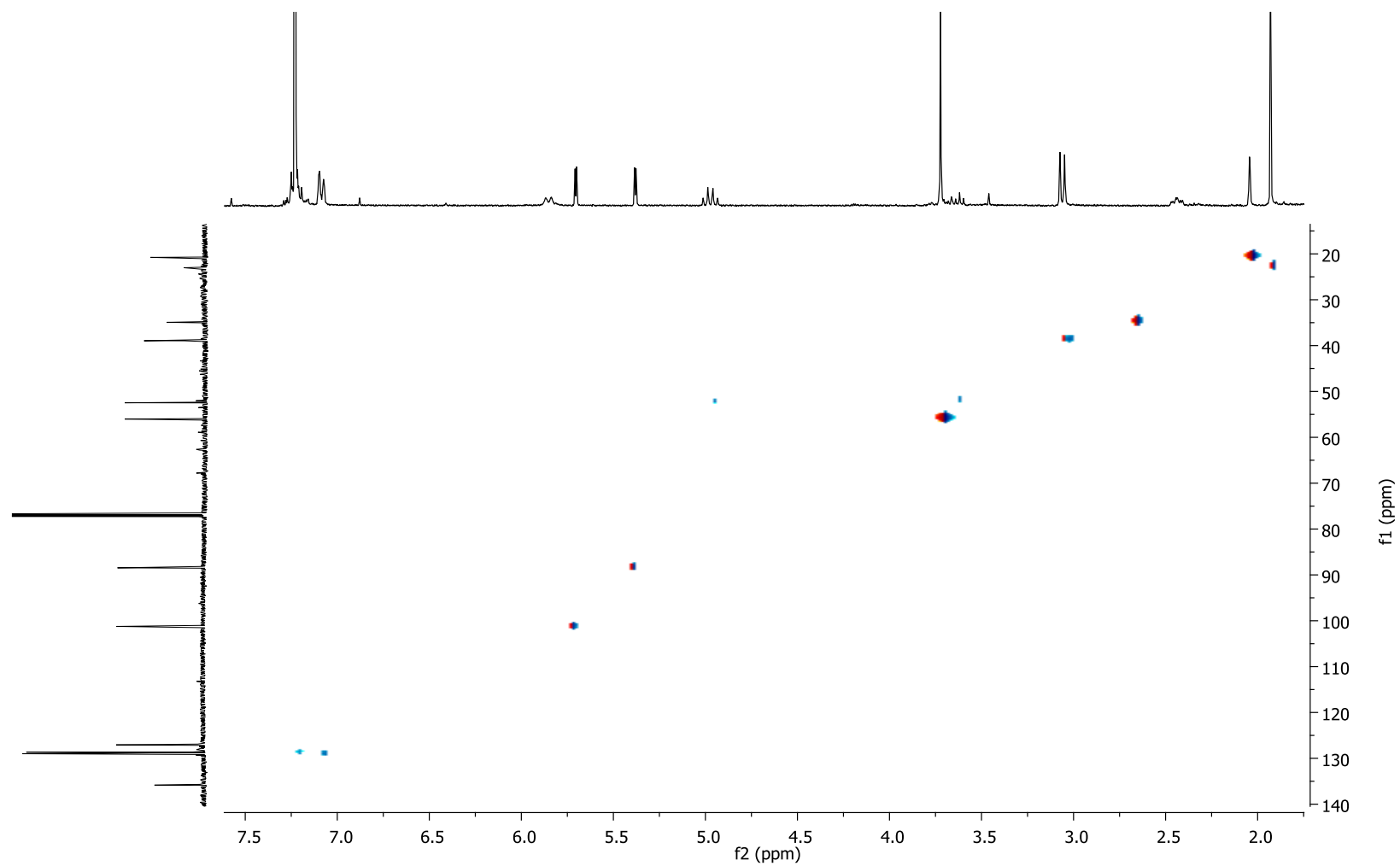
Figura 50. Espectro de HMBC (500 MHz, CDCl₃) da substância **1**.

Figura 51. Espectro de HMQC (500 MHz, CDCl₃) da substância 1.

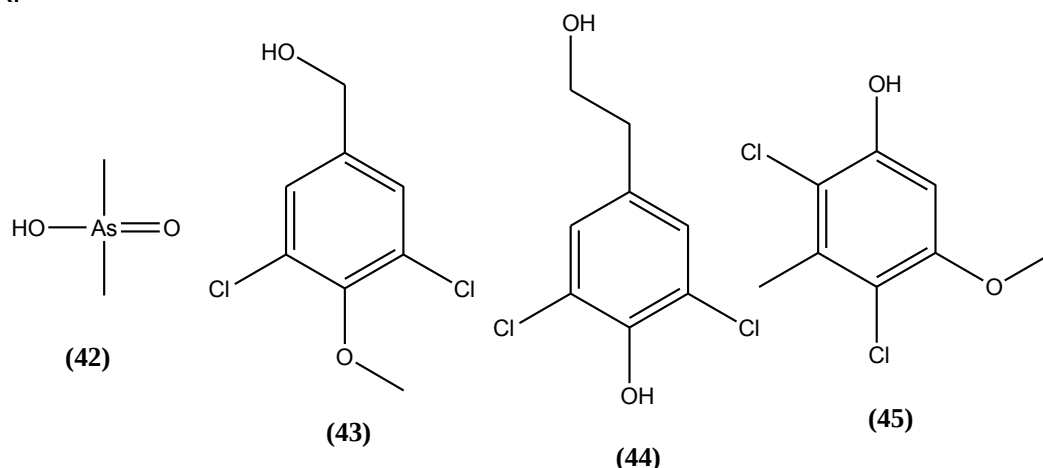
ESTUDOS DE DESREPLICAÇÃO DA FRAÇÃO EjC(05)ACN01-07

A fração EjC(05)ACN01-07 obtida do fracionamento do extrato bruto ACN produzido por *C. gloeosporioides* foi submetida à técnica de desreplicação utilizando CLAE-EMAR, objetivando uma avaliação dos metabólitos secundários produzidos em micro escala. Os resultados obtidos foram analisados utilizando a base de dados DNP aceitando-se um erro de até 30 ppm. Neste estudo observamos que o ácido dimetilarsênico (42), 3,5-Dicloro-4-metoxibenzil álcool (43), 3,5-Dicloro-4-hidroxibenzenoetanol (44) e 2,4-Dicloro-5-methoxi-3-metilfenol (45) (Figura 52), poderiam corresponder ao peso molecular encontrado.

O estudo evidenciou que apesar de não encontrarmos sinais equivalentes a estas estruturas no experimento de RMN de ¹H, a substância 43 é descrita como um metabólito secundário produzido pelo fungo *Agaricus macrosporus* o qual tem sido utilizada na bio-remediação de solos contaminados com metais pesados (SICHUAN UNIVERSITY, 2007).

A substância 44 foi reportada como metabólito secundário produzido pelo fungo *Leptoxylum fumago*, interessante um microrganismo produtor de halo metabolitos utilizando as enzimas cloroperoxidases. Substâncias orgânicas cloradas têm despertado enorme interesse devido a capacidade de serem utilizadas como antibióticos (FRANSSEN; POSTHUMUS; VAN DER PLAS, 1988).

Figura 52. Estruturas correspondentes com a massa da fração EjC(05)ACN01-07 em EMAR.



RESULTADO DOS EXPERIMENTOS HPLC-DAD-HRMS

Os extratos brutos EjC(05)MaltCR, EjC(05)MaltSR, EjC(05)YmCR e EjC(05)YmSR foram submetidos a experimento utilizando a técnica hifenada HPLC-DAD-HRMS no modo positivo. Com o auxílio da base de dados do software DATA-ANALYSIS 4.0 a análise resultou na identificação de duas substâncias.

SUBSTÂNCIA 2

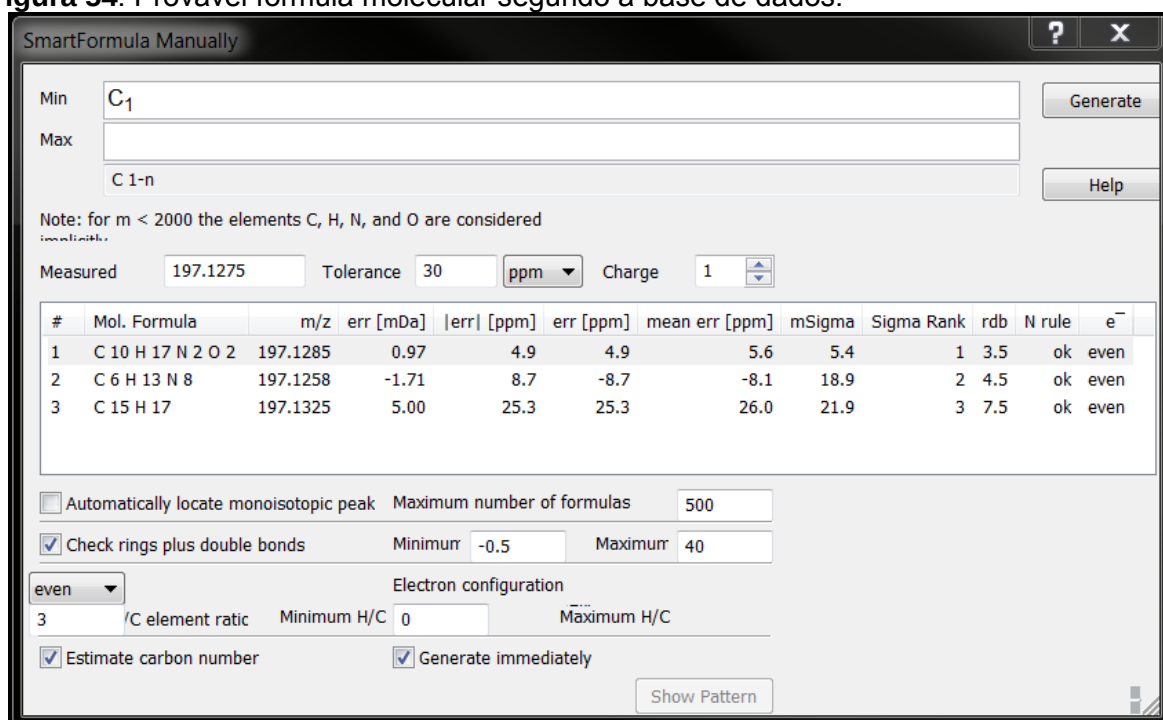
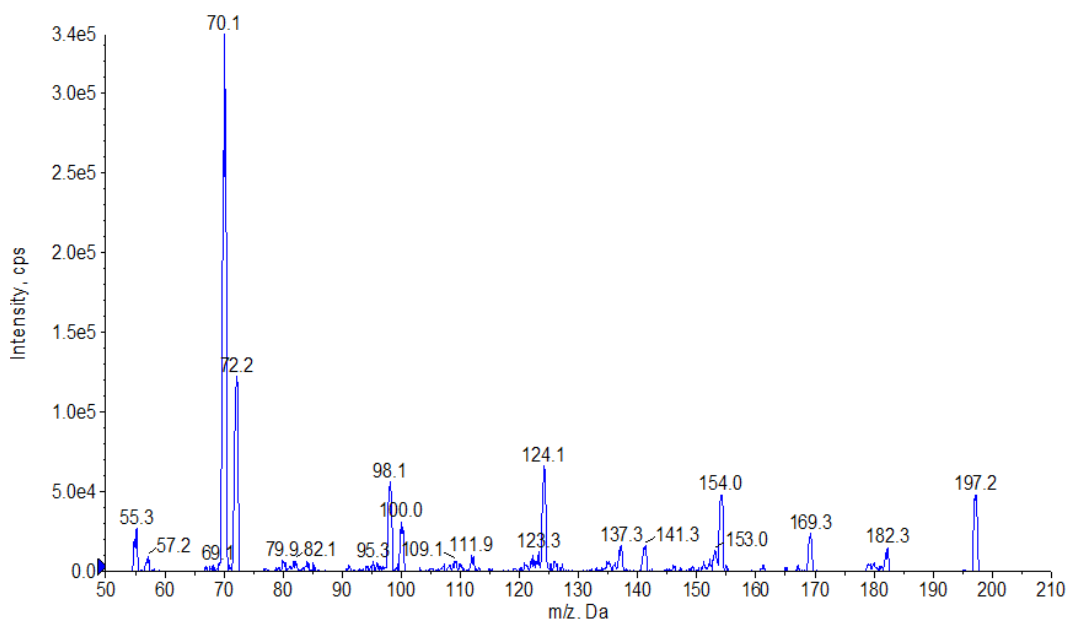
HPLC-DAD-HRMS e MS/MS

O espectro de massas de alta resolução de EjC(05)MaltCR apresentou um pico em 15,07 min. no modo positivo com as relações m/z 197,1275, 219,1093, 235,0935 e 415,2284 (Figura 53), permitindo atribuir à 415,2284 $2M+Na^+$, à 235,0935 $M+K^+$, à 219,1093 $M+Na^+$ e à 197,1275 $M+H^+$. Consultando a base de dados do software observou-se que a fórmula molecular mais provável para m/z 197,1275 seria $C_{10}H_{16}N_2O_2$ (Figura 54).

Para a determinação estrutural desta substância foi realizada a inserção direta da amostra no espectrômetro de massas e realizados os experimentos de ms/ms (Figura 55).

Figura 53. Espectro de massas de alta resolução de EjC(05)MaltCR em T=15,07 min.



Figura 54. Provável fórmula molecular segundo a base de dados.**Figura 55.** Fragmentação do íon m/z 197,2.

Podemos sugerir o processo de fragmentação por três vias:

- Primeira via (Figura 56), o íon m/z 197,2 perde CO duas vezes, onde a primeira da origem ao íon m/z 169,3 e a segunda ao íon m/z 141,3 que por sua vez perde NH₃ originando o íon m/z 124,1.
- Segunda via (Figura 57), o íon m/z 197,2 sofre uma fissão no anel central originando o íon m/z 100,0, que perde CO e dá origem o íon m/z 72,2.
- Terceira via (Figura 58), o íon m/z 197,2 sofre uma fissão no anel central gerando o íon m/z 98,1 que após perder CO origina o íon m/z 70.

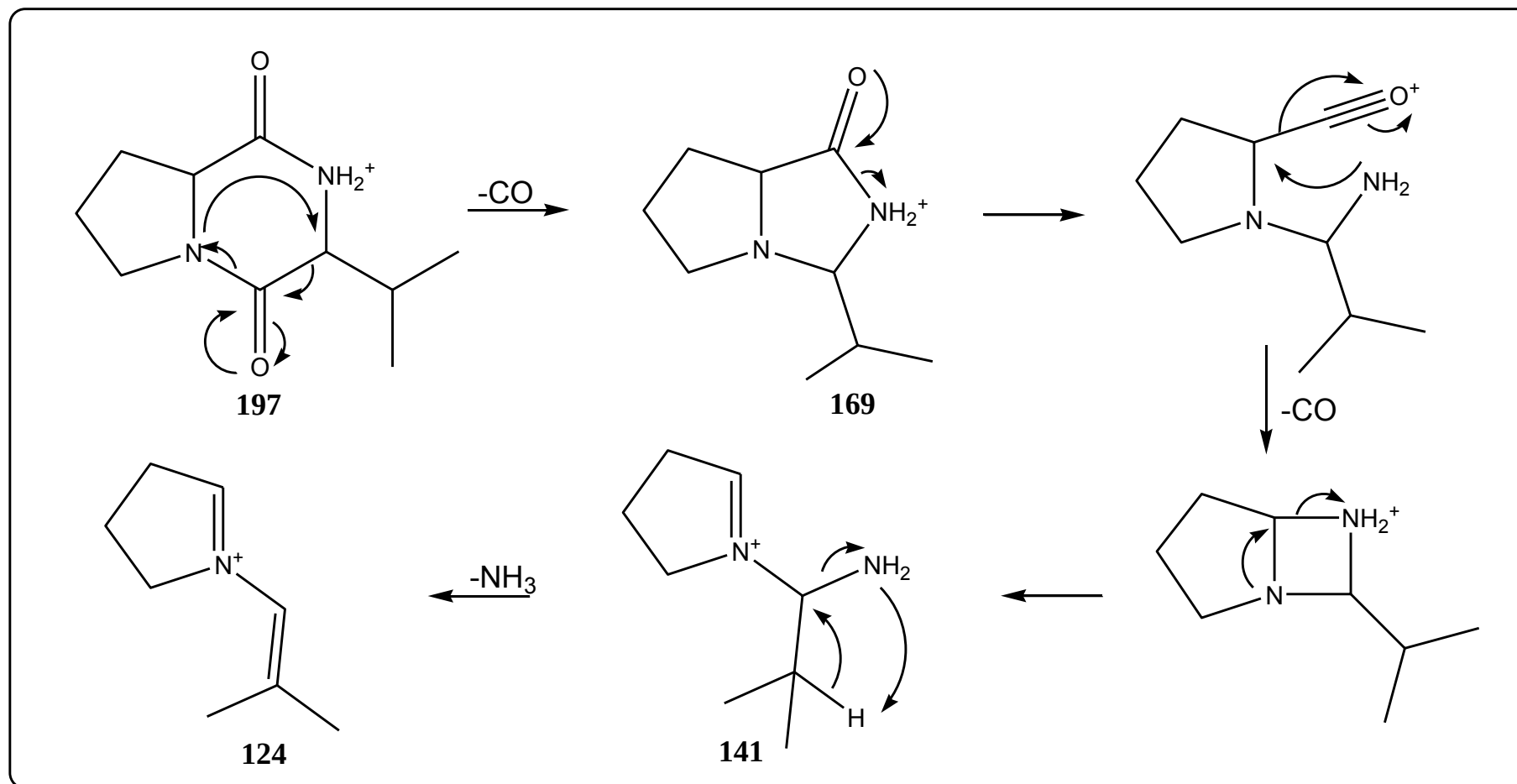
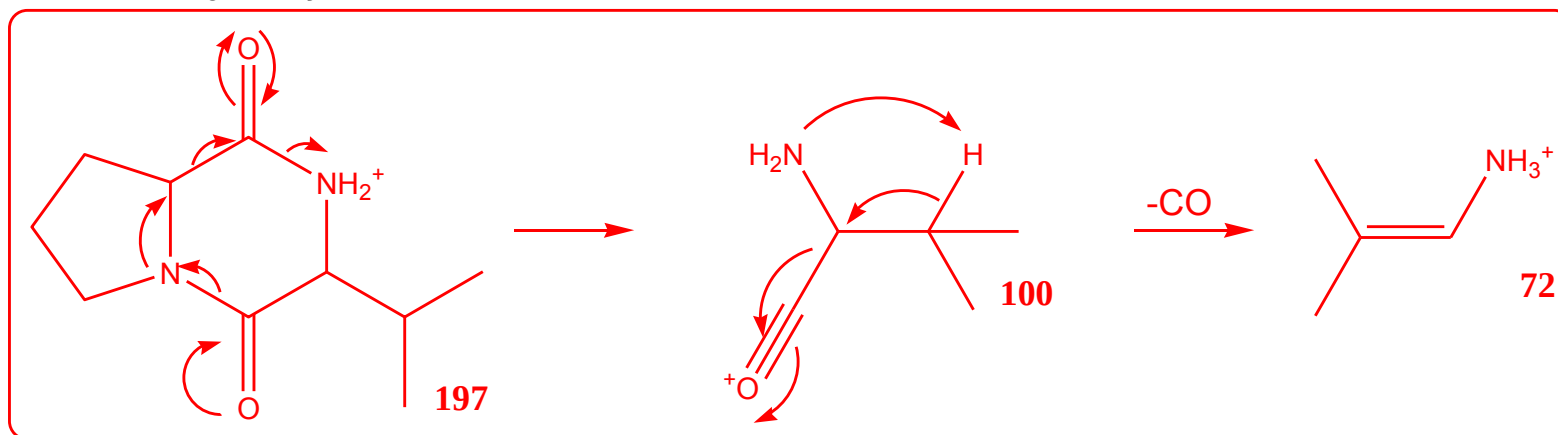
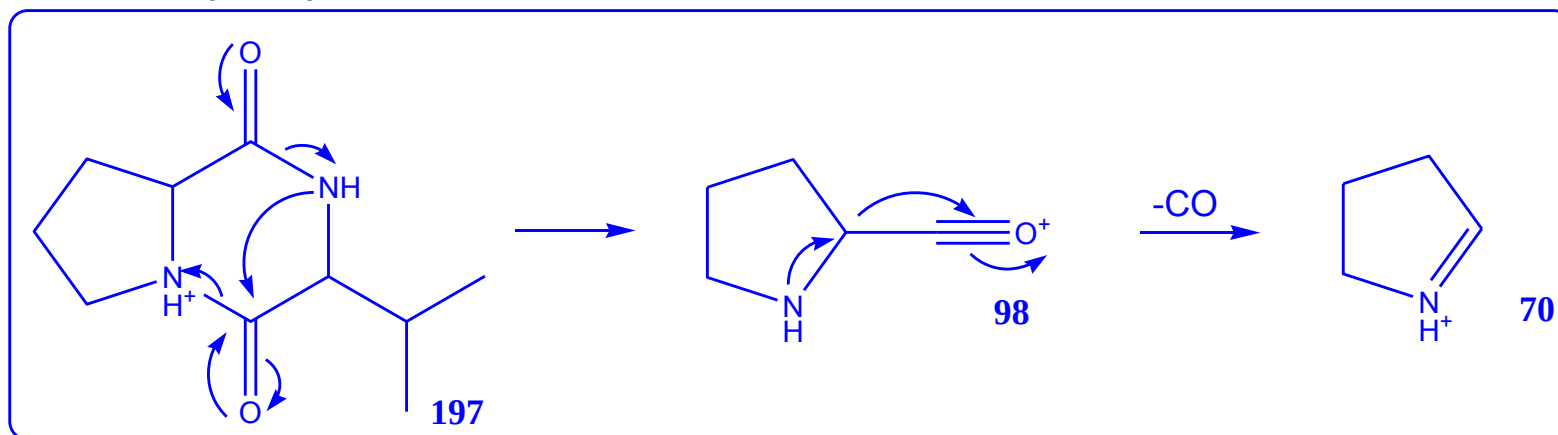
Figura 56. Proposta de fragmentação Via 1 da dicetopiperazina Ciclo Prolina-Valina.

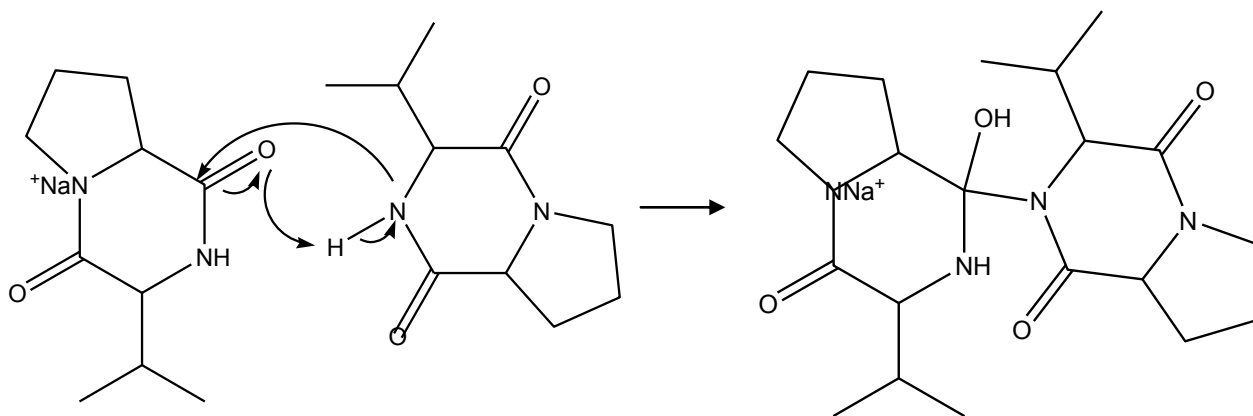
Figura 57. Proposta de fragmentação Via 2 da dicetopiperazina Ciclo Prolina-Valina.**Figura 58.** Proposta de fragmentação Via 3 da dicetopiperazina Ciclo Prolina-Valina.

Os fragmentos observados nos permitem comprovar que a substância **2**, trata-se da dicetopiperazina *ciclo* Prolina-Valina.

Apesar de não ser possível estabelecer a configuração absoluta da molécula por esta substância estar em mistura impossibilitando a realização da rotação ótica e os sinais não RMN de ^1H estarem cobertos pelos sinais de outras moléculas, podemos sugerir que se trate de Ciclo (R-Pro-R-Val) já isolada por CAFÊU (2007) sintetizadas por *Colletotrichum crassipes*.

A formação do dímero atribuída ao valor de m/z 415,2284 pode ser estabelecida através da reação entre a função amina e a carbonila (Figura 59).

Figura 59. Formação do dímero entre duas dicetopiperazinas ciclo Prolina-Valina.



SUBSTÂNCIA 3

HPLC-DAD-HRMS e MS/MS

O espectro de massas de alta resolução do extrato EjC(05)MaltCR apresentou um pico em 19,20 min no modo positivo com as relações m/z 211,1429; 233,1249, e 443,2593. Podemos atribuir à 443,2593 $2M+Na^+$, à 233,1249 $M+Na^+$ e à 211,1429 $M+H^+$ (Figura 60). Consultando a base de dados do software observou-se que a fórmula molecular mais provável para esta razão seria $C_{11}H_{19}N_2O_2$ (Figura 61).

Para a determinação estrutural desta substância foi realizada a inserção direta da amostra no espectrômetro de massas e realizados os experimentos de ms/ms (Figura 62).

Figura 60. Espectro de massas de alta resolução de EjC(05)MaltCR em $T=19,20$ min.

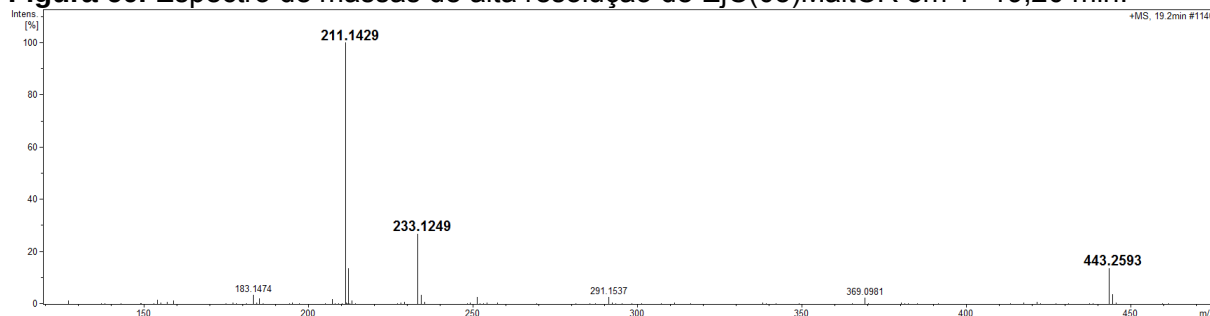


Figura 61. Provável fórmula molecular segundo a base de dados.

SmartFormula Manually

Min: Max:

Note: for $m < 2000$ the elements C, H, N, and O are considered possible.

Measured: Tolerance: Charge:

#	Mol. Formula	m/z	err [mDa]	err [ppm]	err [ppm]	mean err [ppm]	mSigma	Sigma Rank	rdB	N rule	e^-
1	C 11 H 19 N 2 O 2	211.1441	1.21	5.7	5.7	6.1	6.6	1	3.5	ok	even
2	C 7 H 15 N 8	211.1414	-1.48	7.0	-7.0	-6.8	20.2	2	4.5	ok	even
3	C 16 H 19	211.1481	5.23	24.8	24.8	25.1	20.4	3	7.5	ok	even

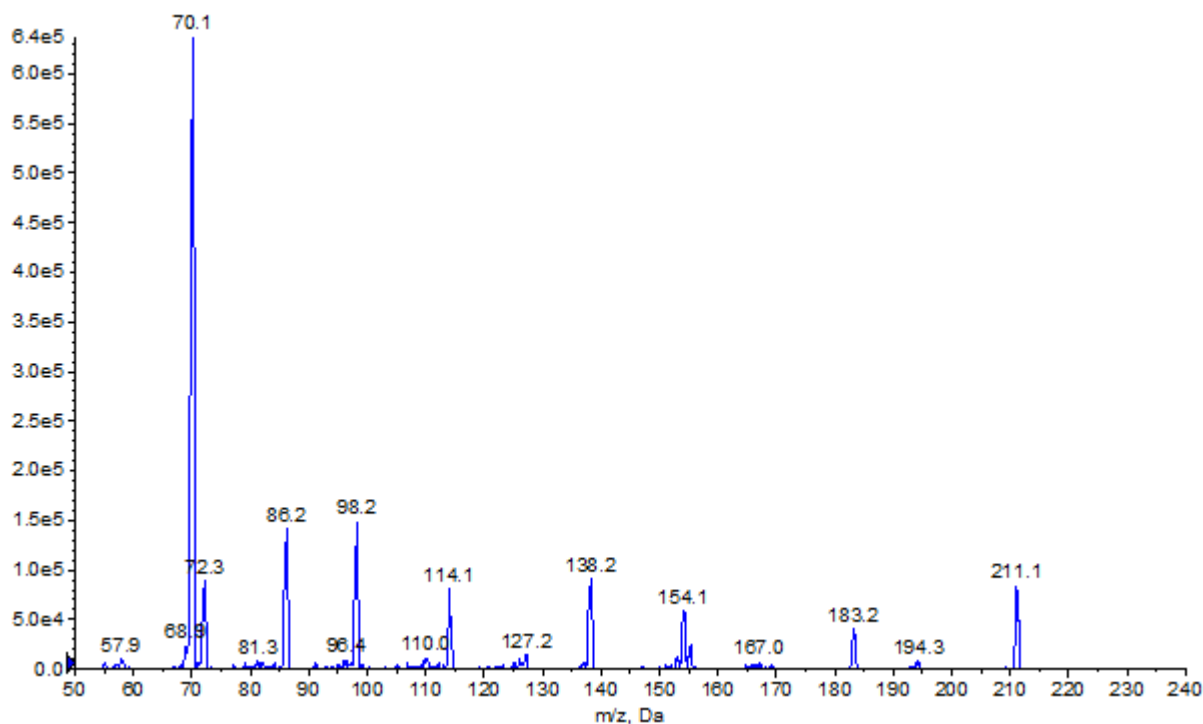
☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:

☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:

Electron configuration

Minimum H/C: Maximum H/C:

☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

Figura 62. Fragmentação do íon m/z 211,1.

Podemos sugerir o processo de fragmentação por três vias:

- Primeira via (Figura 63), o íon m/z 211,1 perde CO duas vezes, onde a primeira da origem ao íon m/z 183,2 e a segunda ao íon m/z 155 que por sua vez perde NH_3 originando o íon m/z 138,2.
- Segunda via (Figura 64), onde o íon m/z 211,1 sofre uma fissão no anel central originando o íon m/z 114,1, que perdendo CO origina o íon m/z 86,2.
- Terceira via (Figura 65), o íon m/z 211,1 sofre uma fissão no anel central gerando o íon m/z 98,2 que após perder CO origina o íon m/z 70,1.

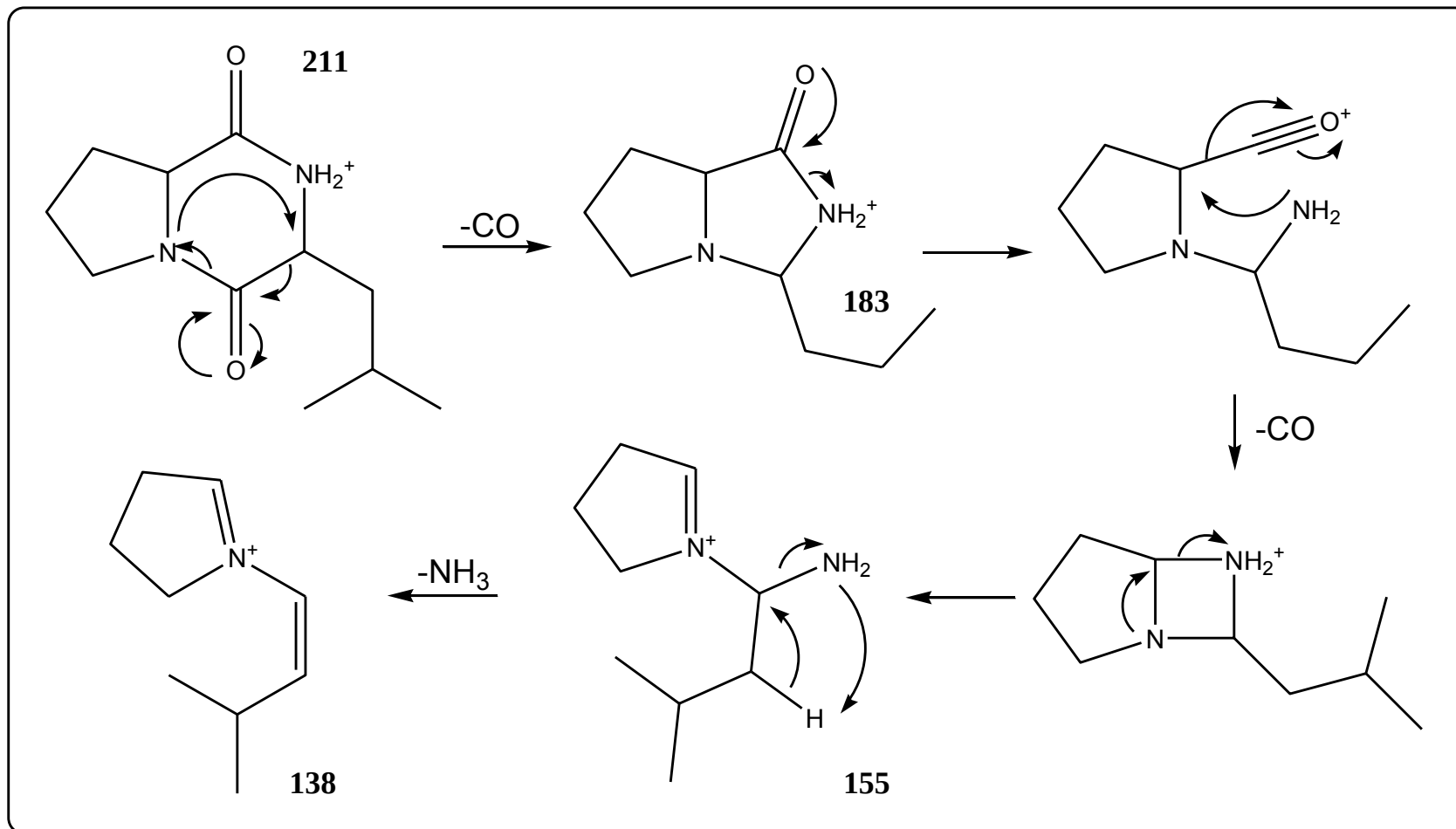
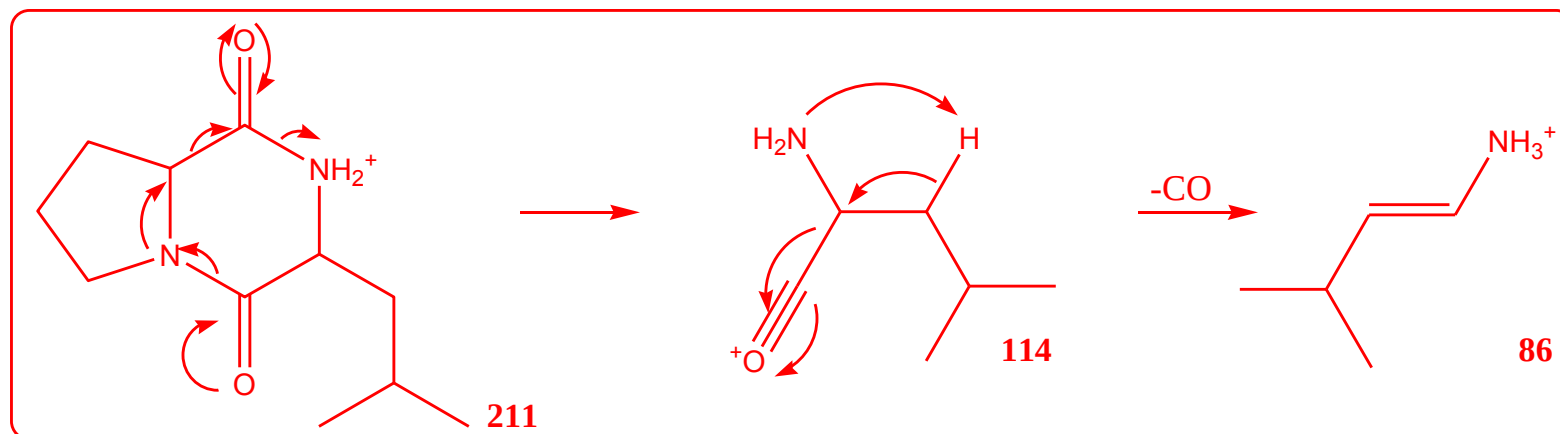
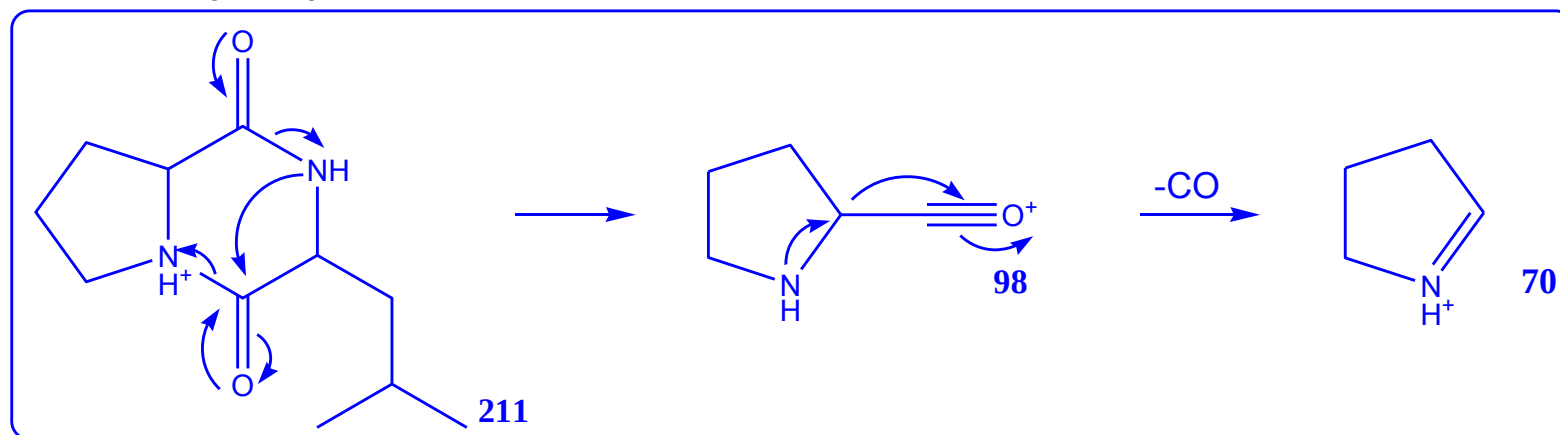
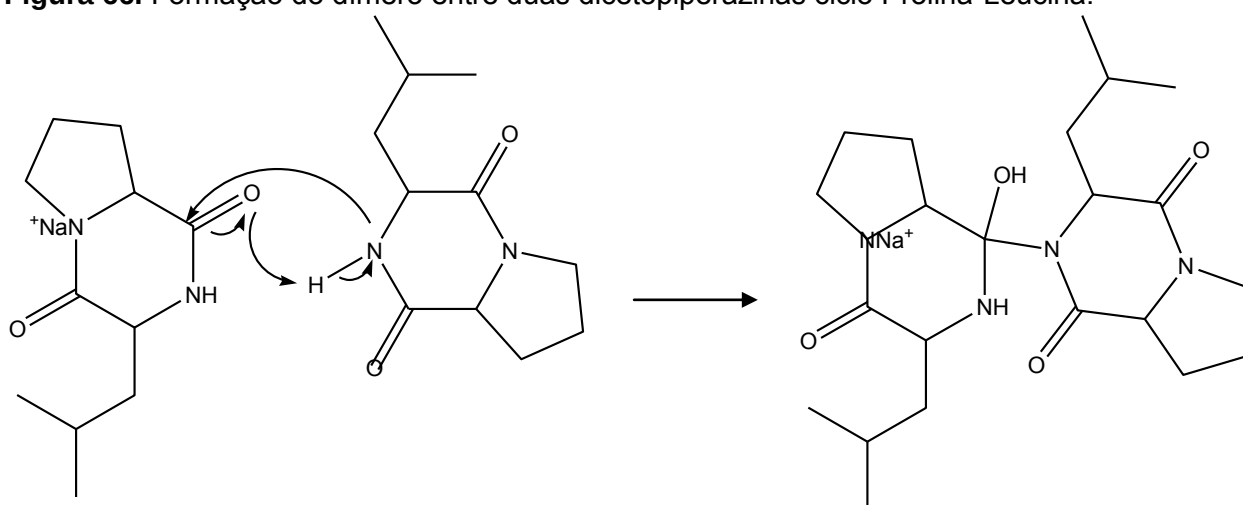
Figura 63. Proposta de fragmentação via 1 da dicetopiperazina ciclo Prolina-Leucina

Figura 64. Proposta de fragmentação via 2 da dicetopiperazina ciclo Prolina-Leucina**Figura 65.** Proposta de fragmentação via 3 da dicetopiperazina ciclo Prolina-Leucina

Estes dados nos apontam duas possibilidades, podendo ser a dicetopiperazina Prolina-Leucina ou Prolina-Isoleucina não podemos definir qual das duas ou se são ambas as substâncias, pelo fato desta se encontrar em mistura e os sinais RMN de ^1H estarem encobertos pelos sinais de outras moléculas.

A formação do dímero atribuída ao valor de m/z 443,2599 pode ser estabelecida através da reação entre a função amina e a carbonila (Figura 66).

Figura 66. Formação do dímero entre duas dicetopiperazinas ciclo Prolina-Leucina.



As dicetopiperazinas são substâncias com grande potencial biológico sendo ativas contra uma série de microrganismos fitopatógenos e patógenos à humanos. São descritas bioatividades contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, inibidora contra a enzima acetilcolinesterase e antioxidante, indicando a possibilidade de seu papel ecológico no interior da espécie vegetal.

CONCLUSÕES

A prospecção química e avaliação da atividade antitumoral realizada com *C. gloeosporioides* permitiram fazer algumas conclusões que são descritas a seguir:

No cultivo de *C. gloeosporioides* a utilização do suporte sólido indicou a eficácia do procedimento apenas em Extrato de Malte, onde se verificou um aumento em massa de aproximadamente 275%. No caso do cultivo em Czapeck o aumento foi de 33,6% e nos outros meios líquidos a variação se encontra dentro do erro experimental.

C. gloeosporioides é um fungo altamente produtivo apresentando enorme diversidade de metabólitos secundários, produtor de dicetopiperazinas e que produz muitas substâncias ainda não descritas para o gênero e possivelmente inéditas na literatura.

Este estudo permitiu identificar *C. gloeosporioides* como um excelente produtor de substâncias com potencial citotóxico contra as linhagens OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon humano) e SF-295 (glioblastoma humano), nos meios de cultivo em arroz, YM e Extrato de Malte.

As observações feitas neste trabalho evidenciam que *C. gloeosporioides* possui um papel importante nas interações ecológicas existentes entre os hospedeiros e os possíveis patógenos, evidenciando a necessidade de continuidade dos trabalhos com este microrganismo.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and know diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx CF. Podatyda*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 201-208, 1995.
- ANG-LEE, M. K.; MOSS, J.; YUAN, C. Herbal medicines and perioperative care. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 2, p. 208-216, 2000.
- AOKI, T. et al. Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. **Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 492-500, 1976.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010.
- BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2004.
- BARNETT, C. J. et al. Structure-activity relations hips of dimeric Catharanthus alkaloids. 1. Deacetylvinblastine amide (vindesine) sulfate. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 88-96, 1978.
- BATISTA, D. da C. **Cultivo da mangueira: doenças**. 2. ed. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Sistemas de produção, 2). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/doencas.htm>. Acesso em: 19 dez. 2013.
- BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular. Basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 4, p. 14-19, 1996.
- BIASETTO, C. R. **Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Schizophyllum commune* isolado de *Alchornea glandulosa***. 2011. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- BILLS, G. F. Analyses of microfungal diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 51, p. 33-41, 1995.
- BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.
- CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria sp.* e *Colletotrichum crassipes* isolado de *Casearina sylvestris***. 2007. 252 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves - from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 47-59, 2012.

CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo *Phomopsis sp.* isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CRAGG, G. M. et al. The taxol supply crisis. New NCI policies of novel natural product anticancer for handling the large-scale production and anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1657-1668, 1993.

DAMETTO, A. C. **Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)**. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DAVIES, J. In praise of antibiotics. **ASM News**, v. 65, p. 304-310, 1999.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. **Biotechnology**, v. 26, p. 49-80, 1994.

EINZIG, A. I.; WIERNIK, P. H.; SCHWARTZ, E. L. Taxol: a new agent active in melanoma and ovarian cancer. **Cancer Treatment and Research**, v. 58, p. 89-100, 1991.

FRANSSEN, M. C. R.; POSTHUMUS, M. A.; VAN DER PLAS, H. C. New halometabolites from *Caldariomyces Fumago*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 1093-1096, 1988.

GARCIA-GARRIDO, J. M. et al. Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1443-1448, 2000.

GARCIA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 426-431, 2003.

GORDON, A. et al. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7688-7699, 2011.

GOTOH, T. et al. Studies on a new immunoactive peptide, FK-156. I. Taxonomy of the producing strains. **Journal of Antibiotics**, v. 35, p. 1280-1285, 1982.

GUNATILAKA, A. A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, B. et al. Bioactivity natural products from endophytes: a review. **Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-142, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HERBERT, C.; JOHNSTONE, R. **Mass spectrometry basics**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014. **Notícias**, 27 nov. 2013. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso em: 10 dez. 2013.

KHARWAR, R. N. et al. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Current Science**, v. 95, p. 228-233, 2008.

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

KWAK, S. S. et al. Taxol content in the seeds of *Taxus* SPP. **Phytochemistry**, v. 40, p. 29-32, 1995.

LEPTOKARYDIS, I. H. **Busca de substâncias bioativas em fungos associados com a espécie *Michelia champaca* (Magnoliaceae)**. 2008. 262 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

MAIER, W. et al. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the *Poaceae*. **Planta**, v. 202, n. 1, p. 36-42, 1997.

MAJUMDER, A.; JHA, S. Biotechnological approaches for the production of potential anticancer leads podophyllotoxin and paclitaxel: an overview. **Journal of Biosciences**, v. 1, p. 46-69, 2009.

MARKMAN, M. Taxol: an important new drug in the management of epithelial ovarian cancer. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 64, p. 583-590, 1991.

MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, p. 9923-9932, 2007.

MASSUMA, R.; TANAKA, Y.; OMURA, S. Bioconversion and biosynthesis of macrolide antibiotics. XXVII. Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. **Journal of Fermentation Technology**, v. 61, p. 607-614, 1983.

MASSUMA, R. et al. Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 1557-1564, 1986.

McGUIRE, W. P. et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 4, p. 273-279, 1989.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NG, J. et al. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptide. **Natural Methods**, v. 6, n. 8, p. 596-599, 2009.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 429-432, 2004.

OMURA, S. et al. OM-704 A, a new antibiotic active against gram-positive bacteria produced by *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 35, p. 1425-1429, 1982.

PATEL, P. et al. Antidiabetic herbal drugs a review. **Pharmacophore**, v. 3, p. 18-29, 2012.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1433-1439, 2005.

RUFINO, M. P. **Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado de *Senna spectabilis***. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SANTOS, K. A. dos. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 66-70, 2012.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **British Mycological Society**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SHIMADA, N. et al. Oxetanocin a novel nucleoside from bactéria. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 1623-1625, 1986.

SICHUAN UNIVERSITY (China). H. Xu; H. She; H. Cao; K. Chen; J. Ji; P. Song. **Mushroom repairing technology of heavy metal polluted soil**. CN 101088644-A, 17 July 2007, 19 Dec. 2007.

SOMENSI, A. **Desreplicação dos metabolites secundários produzidos por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax camporum* (Styracaceae)**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

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

TAKAHASHI, J. A. et al. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungus. **Phytochemistry**, v. 12, p. 773-789, 2012.

WHEELER, N. C. et al. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 432-440, 1992.

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

ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 2301-2309, 2009.

ZOU, W. X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.