UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio Mesquita Filho"

Instituto de Química de Araraquara

NuBBE "***Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisilogia de Produtos Naturais***"

Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Schizophyllum commune* isolado de *Alchornea glandulosa*

Carolina Rabal Biasetto

Departamento de Química Orgânica

Araraquara

2011

CAROLINA RABAL BIASETTO

Avaliação Química e Biológica do Fungo Endofítico *Schizophyllum commune* Isolado de *Alchornea glandulosa*

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Biasetto, Carolina Rabal
B579a Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Schizophyllum commune* isolado de *Alchornea glandulosa* / Carolina Rabal Biasetto. – Araraquara : [s.n], 2011
144 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Produtos naturais. 2. Fungo endofítico.
3. *Schizophyllum commune*. 4. *Alchornea glandulosa*.
5. Metabólitos secundários. I. Título.

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

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Carolina Rabal Biasetto

Filiação: Antonio Carlos Biasetto e Maria Cecília Rabal Biasetto

Nascimento: 17/04/1986 - Tabatinga-SP-Brasil.

Endereço Profissional

NuBBE "***Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisilogia de Produtos Naturais***"
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"- UNESP, Araraquara - SP.
Endereço eletrônico: carolinarabal@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

2008

Graduação: Licenciatura em Química

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

2009-2011

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

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

Dissertação: Avaliação Química e Biológica do Fungo Endofítico *Schizophyllum commune* Isolado de *Alchornea glandulosa.*

Orientadora: Profª. Drª. Angela Regina Araujo

Bolsa: FAPESP

Produção Bibliográfica

Trabalhos recentes publicados em anais de eventos

a) BIASETTO, C. R.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; ARAUJO, A. R. Dicetopiperazinas produzidas pelo endófito *Schizophyllum commune* isolado de *Alchornea glandulosa*. In: SIMCRO, 2010, Campos do Jordão-SP.

b) BORGES, F. M.; ARAUJO, A. R.; ZANARDI, L. M.; BIASETTO, C. R. Atividade antioxidante dos metabólitos produzidos pelo fungo endofítico MC-8R associado à *Michelia champaca.* In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp (XXII CIC), 2010, Araraquara-SP.

c) BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Trichothecenes from endophytic fungus *Myrothecium gramineum* associated with *Senna spectabilis*. In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and the XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro-SP.

d) BIASETTO, C. R.; LISBOA, H. C.; ARAUJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; TREVISAN, H. C. Prospecção enzimática em fungos endofíticos associados às plantas do Cerrado e Mata Atlântica. In: 17º. Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti", 2009, Araraquara-SP.

e) RUFINO, M. P.; BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; CAFÊU, M. C.; SORDI, R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; ARAUJO. A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; PEREIRA, J. O. Antifungal, antioxidant and anticholinesterasic activities of crude extracts from endophytic fungi. In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and the XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro-SP.

f) PELLEGRINI, M. M.; CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Prospecção química do fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* isolado de *Alchornea glandulosa*. In: 17º. Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti", 2009, Araraquara-SP.

g) BORGES, F. M.; BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; ARAUJO, A. R. Estudo Químico do fungo endifítico MC-8R isolado de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). In: 17º. Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti", 2009, Araraquara-SP.

Participações em Reuniões Científicas

a) IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO 2010), 2010, Campos do Jordão-SP.
b) Biota Fapesp International Workshop on Metabolomics in The Context of Systems Biology: A Rational Approach to Search for Lead Molecules from Nature, 2010, São Paulo (FAPESP)-SP.
c) 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and the XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009, São Pedro (Hotel Fazenda Fonte Colina Verde)-SP.
d) 17º. Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti", 2009, Araraquara (Faculdade de Odontologia - UNESP-)-SP.
e) IV Workshop do NuBBE, 2009, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.
f) Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia, 2009, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.
g) VII Evento de Educação em Química (EVEQ), com o tema: "Materiais Didáticos: suas aplicações e avaliações", 2009, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.

Participações em cursos de curta duração

a) Participação no curso de curta duração intitulado: **"Química no Livro Didático: ensino de química para ampliar consciências"** (Carga horária: 6h), na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara-UNESP, 2009, SP, Brasil.

Participações em curso de longa duração

Participação no curso financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pelo CBAB/CABBIO (Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia), intitulado:

"Biotecnologia de Fungos Endofíticos Isolados de Plantas da Amazônia para Obtenção de Precursores de Fármacos" (Carga horária: 92h), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil, 2009.

I Escola de Inverno de Separações, de 19-23 de julho de 2010 (08h00 às 17h30) no Instituto de Química UNICAMP- Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo, Campinas-SP.

Organizações de Eventos

a) Membro da Comissão Organizadora do 17º. "Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti", 2009, Faculdade de Odontologia de Araraquara- SP.
b) Membro da Comissão Organizadora do VII Evento de Educação em Química (EVEQ), com o tema: "Materiais Didáticos: suas aplicações e avaliações", 2009, Instituto de Química de Araraquara- SP.

CAROLINA RABAL BIASETTO

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

Araraquara, 21 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Angela Regina Araujo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

Drª Vera Lúcia Garcia Rehder
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP, Campinas

Aos meus queridos pais, Antonio e Maria Cecília.

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

À minha querida orientadora Profa. Dra. Angela R. Araujo.

Pela amizade, paciência, competência, dedicação e pelo imenso carinho e respeito com seus alunos. Suas inúmeras qualidades contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal. Se hoje tivesse que escolher um novo (a) orientador (a) e começar tudo de novo, sem dúvidas escolheria a senhora. A senhora e sua família sempre estarão em meu coração.

Ao meu querido orientador de Iniciação Científica, Prof. Dr. Henrique C. Trevisan (in memorian) pelos seus ensinamentos, carisma e entusiasmo pela pesquisa, que despertou o interesse pela pesquisa em na área de ciências.

Ao meu querido e eterno namorado Vinicius.

Pelo amor, constante incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada pelo imenso auxílio na elaboração desta dissertação. Obrigada por tudo. Amá-lo me faz uma pessoa muito feliz.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, pelo amor e carinho incondicional em todos os dias da minha vida. Muito obrigada pelas inúmeras renuncias que vocês fizeram para me proporcionar sempre o melhor. Mesmo com tantos obstáculos em nossas vidas pais, vocês conseguiram com muita garra, paciência e solidariedade superá-los e esses ensinamentos eu levarei para o resto da minha vida. Quero agradecer a minha querida avó, Matilde (*in memorian*) pela sabedoria e exemplo de força.

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

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

Aos amigos de república: Juliana Castro, Lucy, Fernandinho e Sara pela amizade, pelo apoio e pelas inúmeras conversas e risadas durante esta trajetória.

Aos meus amigos do coração: Mônica e Ederson, pelas conversas e pela grande amizade.

Aos meus amigos do coração: Daniara e Marco, Adriana, Paty, Jorge, Fabiana, Guilhermina, Luis Otávio, Alessandra que me auxiliou inúmeras vezes no laboratório.

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

Aos meus companheiros de academia: Elaine, Marcos (Harry), Naira e Luciano, pela grande amizade.

À minhas amigas que mesmo à distância, são as minhas eternas grandes amigas, Carol Factore (the best) e Aline Bozelli, pela amizade sincera e especial, essa que superou os limites de amizade e tornou-se laços de família.

À minha sogra Maria José, ao meu sogro Donizete e a minha querida cunhada Camila, pelo carinho e apoio nesta trajetória.

Aos amigos de grupo: Néia, Juzinha, Vanessa, João, Miller, Lucimar, Andressa, Fernandinho e Thomas pela amizade, discussões, cumplicidade e pelos agradáveis e deliciosos jantares de grupo na casa da Profa. Angela.

Em especial quero agradecer a Lisinéia (Néia) por tudo, pela amizade, pela paciência, pela experiência e pelos ensinamentos de química orgânica, pois sem a Néia esta dissertação de mestrado não se concluíria.

Ao Miller (nosso analítico) e a Jupy Holzbach pela grande amizade, pelo apoio, pelos incansáveis estudos de orgânica avançada, pelas discussões e conselhos sobre os erros e acertos da nossa pesquisa e vida pessoal.

Aos meus eternos amigos: Camila Cotrim, Ju Castro, Higor e Elaine, pela grande amizade, que carregarei comigo para o resto da vida. São amigos inesquecíveis, amigos leais, especiais, esforçados. Admiro vocês. Queria estar sempre perto de vocês.

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

Ao Dr. Alberto C. Alécio, pela amizade e constante colaboração.

À Luciana Poleze pela paciência e ensinamentos em HPLC.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e à mestranda Fernanda Figueiró (Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto-Departamento de Química-USP), e a todos os membros do grupo pela realização de espectros de massas, pela agradável recepção e colaboração de todos.

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

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara, em especial a Dona Maria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

“Não fique triste quando ninguém notar o que fez de bom. Afinal... O sol faz um enorme espetáculo ao nascer, e mesmo assim, a maioria de nós continuamos dormindo”.

Charles Chaplin

“O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você”.

Mário Quintana

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

Charles Chaplin

RESUMO

O projeto proposto tem como objetivo principal a obtenção de substâncias bioativas a partir do estudo químico/biológico do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Schizophyllum commune,* este isolado das folhas de *Alchornea glandulosa*. Este endófito foi cultivado em pequena escala em diferentes meios de cultura líquidos (MBD, YM, Extrato de Malte, Nutrient, Czapek) e sólidos (Arroz e Milho) fornecendo os respectivos extratos brutos. Nestes avaliou-se a produção metabólica em CCDC, CLAE-DAD e RMN de ^{1}H e foram submetidos à bioensaios para avaliar a potencialidade antifúngica, antioxidante e anticolinesterásica, onde estes extratos demonstraram ser promissores. O endófito *S. commune* cultivado em MBD (escala ampliada) a 25 ^{o}C, sob agitação por 28 dias, forneceu o extrato bruto AcOEt após separação do caldo e micélio por filtração a vácuo e evaporação do solvente. O extrato obtido em escala ampliada foi fracionado em coluna de sílica gel de fase reversa (C18), resultando em oito frações (*S.co*-F1-*S.co*-F8), que foram avaliadas quanto o seu perfil cromatográfico e químico em CLAE-DAD e RMN de ^{1}H, respectivamente. A fração *S.co*-F1 após sucessivos fracionamentos cromatográficos resultou no isolamento de duas substâncias puras como a *ciclo*(L-Pro-L-Val) (**1**) e a uracila (**2**) e quatro substâncias identificadas em mistura por LC-MS e RMN de ^{1}H 1D e 2D como a *ciclo*(Pro-Tyr) (**3**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**4**), *Rel.ciclo*(Pro-Phe) (**5**) e a *Rel.ciclo*(Pro-Ile) (**6**). O extrato bruto em YM pequena escala foi analisado em RMN de ^{1}H 1D e 2D e neste identificou-se o ácido *trans*-cinâmico (**7**). O extrato bruto em milho (CH_3CN) (peq. escala) foi fracionado e resultou no isolamento de duas substâncias puras como N-(4-hidroxifeniletil) acetamida (**8**) e a N-(2-feniletil) acetamida (**9**). Analisando os diferentes extratos brutos (peq. escala) e o MBD (escala ampliada) por espectrometria de massas pode-se observar a presença das dicetopiperazinas **1, 3, 5** e **6.** Os extratos brutos e as frações apresentaram resultados promissores aos ensaios biológicos. Destaca-se as substâncias **7**, **8** e **9** por apresentar potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Palavras-chave: Fungo endofítico. *Schizophyllum commune*. *Alchornea glandulosa*. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The project proposed has as main objective to obtain bioactive substances from the study of chemical/biological of crude extract produced by the endophytic fungus *Schizophyllum commune*, isolated from the leaves of the *Alchornea glandulosa*. This endophyte was cultivated in a small scale in differents liquid culture medias (PBD, YM, Malte Extract, Nutrient, Czapek) and solids (Rice and Corn) providing the respectives crude extracts. The metabolic production of the extracts was evaluated in CCDC, HPLC-DAD and ^{1}H NMR and the extracts were subjected to bioassays to evaluation the antifungal, antioxidant and anticholinesterasic potential, where these extracts showed promise. The endophyte *S. commune* cultivated on PDB (large scale) at 25 ^{o}C under agitation for 28 days, provided the EtOAc extract after the separation of the broth and mycelia by vacuum filtration and evaporation of the solvent. The extract obtained on a large scale was fractionated on a column of silica gel reversed phase (C18), resulting in eight fractions (*S.co*-F1-*S.co*-F8), which were evaluated for their chemical (^{1}H NMR) and chromatographic profile (HPLC-DAD). After successives chromatographic fractionations of the fraction *S.co*-F1 was isolated two pure substances as cyclo (L-Pro-L-Val) (**1**) and uracil (**2**) and four substances as cyclo (Pro-Tyr) (**3**), *p*-hydroxybenzoic acid (**4**), *Rel*.ciclo (Pro-Phe) (**5**) and *Rel*.ciclo (Pro-Ile) (**6**) were identified in mixture by LC-MS and ^{1}H NMR 1D and 2D. The YM crude extract in small scale was analyzed in ^{1}H NMR 1D and 2D and was identified the *trans*-cinnamic acid (**7**). The corn crude extract (CH_3CN) (small scale) was fractionated and resulted in the isolation of two pure substances such as N-(4-hidroxifeniletil) acetamide (**8**) and N-(2-phenylethyl) acetamide (**9**). Analyzing the different crude extracts (small scale) and PDB (large scale) by mass spectrometry observed the presence of diketopiperazines **1**, **3**, **5** and **6**. The extracts and fractions showed promising results for biological assays. It is noteworthy substances **7**, **8** and **9** have the potential to inhibit the enzyme acetylcholinesterase.

Keywords: Endophytic fungi. *Schizophyllum commune*. *Alchornea glandulosa*. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de *Schizophyllum commune* cultivado em MBD em placa de Petri. ... 31

Figura 2. Estruturas de derivados indólicos isolados de *S. commune*, indigotina (A); indirubina (B); isatina (C) e triptantrina (D). ... 32

Figura 3. Estrutura da schizopyllana. ... 33

Figura 4. *Alchornea glandulosa* (a), frutos (b) e folhas (c). ... 34

Figura 5. Substâncias isoladas da espécie *Alchornea glandulosa*. ... 36

Figura 6. Biossíntese do ácido *trans*-cinâmico (**a**) e do ácido p-cumárico (**b**). ... 40

Figura 7. Esquema do isolamento do endófito *S. commune*. ... 46

Figura 8. Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em diferentes meios líquidos. ... 47

Figura 9. Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em meios sólidos. ... 48

Figura 10. Fracionamento do extrato bruto AcOEt produzido por *S. commune* em MBD. ... 50

Figura 11. Metodologia de fracionamento de *S.co*-F1. ... 51

Figura 12. Metodologia de fracionamento de *S.co*-F1.1 e obtenção das substâncias produzidas por *S. commune* em MBD (escala ampliada). ... 52

Figura 13. Metodologia de fracionamento e obtenção das substâncias produzidas por *S. commune* em milho (CH_3CN). ... 53

Figura 14. Fracionamento e obtenção das substâncias produzidas por *S. commune* em arroz (CH_3CN). ... 53

Figura 15. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em MBD (peq. escala). ... 58

Figura 16. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em YM (peq. escala). ... 58

Figura 17. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Nutrient (peq. escala). ... 59

Figura 18. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Czapek (peq. escala). ... 59

Figura 19. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Malte (peq. escala). ... 60

Figura 20. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Arroz CH_3CN (peq. escala). 60
Figura 21. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Milho CH_3CN (peq. escala) 61
Figura 22. Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos de *S. commune* em diferentes meios de cultivo (peq. escala) (a) Arroz CH_3CN; (b) Milho CH_3CN; (c) Czapek; (d) Ext. Malte; (e) Nutrient; (f) MBD e (g) YM. 61
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em MBD peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz). 62
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em YM peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz). 63
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em Nutrient peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz). 63
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em Czapek peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz). 64
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em Ext. Malte peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz). 64
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em Arroz CH_3CN peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz)..... 65
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em Milho CH_3CN peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz)..... 65
Figura 30. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em MBD (escala ampliada). 66
Figura 31. Cromatograma em gradiente exploratório do Ext. MBD em λ = 315 nm. .. 67
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em MBD escala ampliada (DMSO-d_6, 300 MHz)..... 67
Figura 33. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *S. commune.* 69
Figura 34. Estrutura da substância **1** (*ciclo*(L-Pro-L-Val)). 70
Figura 35. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **1**. 71
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz). 72
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz). 73
Figura 38. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz). 74
Figura 39. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz). 74

Figura 40. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz). 75
Figura 41. Fragmentação da substância **1**..... 75
Figura 42. Cromatograma da substância **1**. 76
Figura 43. Curvas de UV da substância **1**. 76
Figura 44. Estrutura da substância **2** (uracila). 77
Figura 45. Principais correlações de *g*HMBC da substância **2**. 77
Figura 46. Cromatograma da substância **2**. 78
Figura 47. Curvas de UV da substância **2**. 78
Figura 48. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (DMSO-d_6, 500 MHz). 79
Figura 49. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **2** (DMSO-d_6, 500 MHz). 80
Figura 50. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **2** (DMSO-d_6, 500 MHz). 80
Figura 51. Estrutura da substância **3** (*ciclo*(Pro-Tyr)). 81
Figura 52. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **3**. 82
Figura 53. Estrutura da substância **4** (ácido *p*-hidroxibenzoico). 83
Figura 54. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **4**. 84
Figura 55. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz)..... 85
Figura 56. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz)..... 86
Figura 57. Mapa de contorno de *g*HMQC das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz). 87
Figura 58. Mapa de contorno de *g*HMBC das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz). 88
Figura 59. Mapa de contorno de *g*COSY das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz). 88
Figura 60. Fragmentação da substância **3**..... 89
Figura 61. Fragmentação da substância **4**..... 89
Figura 62. Estrutura da substância **5** (*Rel.ciclo*(Pro-Phe)). 90
Figura 63. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **5**. 91
Figura 64. Estrutura da substância **6** (*Rel.ciclo*(Pro-Ile). 92
Figura 65. Espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz). 94
Figura 66. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz)..... 95
Figura 67. Mapa de contorno de *g*HMQC das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz). 96

Figura 68. Mapa de contorno de *g*HMBC das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz). 96
Figura 69. Mapa de contorno de *g*COSY das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz). 97
Figura 70. Espectro de NOESY-1D da substância **5** (DMSO-d_6, 500 MHz). 98
Figura 71. Espectro de NOESY-1D da substância **6** (DMSO-d_6, 500 MHz). 98
Figura 72. Molécula protonada ($[M+H]^+$) e aduto de sódio ($[M+Na]^+$) da substância **5**. 99
Figura 73. Molécula protonada ($[M+H]^+$) e aduto de sódio ($[M+Na]^+$) da substância **6**. 99
Figura 74. Fragmentação da substância **5**..... 100
Figura 75. Fragmentação da substância **6**..... 100
Figura 76. Estrutura da substância **7** (ácido *trans*-cinâmico). 101
Figura 77. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **7**. 102
Figura 78. Cromatograma e curvas de UV da substância **7**. 102
Figura 79. Espectro de RMN de ^1H da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz). 103
Figura 80. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz). 104
Figura 81. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz). ... 105
Figura 82. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz). ... 105
Figura 83. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz). 106
Figura 84. Fragmentação da substância **7**..... 106
Figura 85. Estrutura da substância **8** (N-(4-hidroxifeniletil) acetamida). 107
Figura 86. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **8**. 108
Figura 87. Cromatograma e curvas de UV da substância **8**. 108
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz). 109
Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz). 110
Figura 90. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz). ... 111
Figura 91. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz). ... 111
Figura 92. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz). 112
Figura 93. Fragmentação da substância **8**..... 112
Figura 94. Estrutura da substância **9** (N-(2-feniletil) acetamida). 113
Figura 95. Curvas de UV da substância **9**. 114
Figura 96. Espectro de RMN de ^1H da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz). 115
Figura 97. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz)..... 116

Figura 98. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz)..... 117
Figura 99. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz)..... 117
Figura 100. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz)..... 118
Figura 101. Fragmentação da substância **9**..... 118
Figura 102. Espectro de massas por ID do Ext. bruto em MBD (escala ampliada).... 119
Figura 103. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 196,9 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada). 120
Figura 104. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 261,3 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada). 120
Figura 105. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,5 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada). 120
Figura 106. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,5 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada). 121
Figura 107. Espectro de massas por ID do Ext. bruto em MBD (pequena escala). 121
Figura 108. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 196,8 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala). 122
Figura 109. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,4 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala). 122
Figura 110. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 244,9 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala). 122
Figura 111. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 260,6 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala). 123
Figura 112. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 197,0 $[M+H]^+$ em YM (peq. escala). 123
Figura 113. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,3 $[M+H]^+$ em YM (peq. escala). 123
Figura 114. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,0 $[M+H]^+$ em YM (peq. escala). 124
Figura 115. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 197,3 $[M+H]^+$ em Nutrient (peq. escala). 124
Figura 116. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,0 $[M+H]^+$ em Nutrient (peq. escala). 124
Figura 117. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,2 $[M+H]^+$ em Nutrient (peq. escala). 125

Figura 118. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 197,7 $[M+H]^+$ em Ext. Malte (peq. escala). 125
Figura 119. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,1 $[M+H]^+$ em Ext. Malte (peq. escala). 125
Figura 120. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,8 $[M+H]^+$ em Ext. Malte (peq. escala). 126
Figura 121. Esquema da reação envolvida no ensaio com DPPH. 127
Figura 122. Avaliação qualitativa do potencial antioxidante dos extratos brutos (peq. escala) e do extrato em MBD em escala ampliada com DPPH. 128
Figura 123. Gráfico da concentração do extrato em MBD em escala ampliada e dos extratos (peq. escala) versus % de seqüestro de DPPH. 129
Figura 124. Cromatoplacas dos extratos brutos em (a) 254 nm e (b) 366 nm. 130
Figura 125. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos (peq. escala) e do extrato em MBD em escala ampliada. 130
Figura 126. Avaliação da atividade anticolinesterásica das frações (item 3.3.4). 131
Figura 127. Cromatoplacas dos extratos brutos em (a) 254 nm e (b) 366 nm. 134
Figura 128. Avaliação do potencial dos extratos brutos contra *C. Cladosporioides* (a) e contra *C. sphaerospermum* (b). 134
Figura 129. Avaliação do potencial das frações (item 3.3.4) contra *C. Cladosporioides* (a) e contra *C. sphaerospermum* (b). 135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo endofítico *S. commune*. 43
Tabela 2. Equipamentos para o desenvolvimento do projeto. 45
Tabela 3. Massa dos extratos brutos em diferentes meios de cultivo de *S. commune*... 49
Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **1** (δ em ppm e J em Hz). 71
Tabela 5. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **2** (δ em ppm e J em Hz). 78
Tabela 6. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **3** (δ em ppm e J em Hz). 82
Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **4** (δ em ppm e J em Hz). 84
Tabela 8. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **5** (δ em ppm e J em Hz). 91
Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **6** (δ em ppm e J em Hz). 93
Tabela 10. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **7** (δ em ppm e J em Hz). 102
Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **8** (δ em ppm e J em Hz). 108
Tabela 12. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C ($CDCl_3$, 500 MHz) de **9** (δ em ppm e J em Hz). 114
Tabela 13. Avaliação da % de seqüestro de DPPH dos extratos brutos. 129
Tabela 14. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos brutos..... 132
Tabela 15. Avaliação da atividade tripanocida das frações do Ext. bruto em MBD de *S. commune*. 132
Tabela 16. Avaliação do potencial dos extratos brutos contra patógenos humanos.... 133
Tabela 17. Avaliação da atividade das frações em MBD de *S. commune* contra patógenos humanos. 133
Tabela 18. Avaliação do potencial dos extratos brutos contra fitopatógenos..... 135
Tabela 19. Avaliação do potencial das frações contra fitopatógenos. 136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Enzima Acetilcolinesterase
Ar.	Arroz
CH_3CN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
$CHCl_3$	Clorofórmio
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH_3OH	Metanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Efeciência
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EM	Extrato de Malte
ESI-EM	Espectrometria de massas – Ionização por electrospray
Ext.	Extrato
grad.	Gradiente
HPLC	High-performance liquid chromatography
H_2O	Água
Hex.	Hexano
*g*HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
*g*HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
LC-MS	Chromatography Liquid-Spectrometry Mass
MBD	Meio de Batata e Dextrose

MeOH	Metanol
MHz/Hz	Megahertz / Hertz
min.	Minutos
nm	Nanômetro
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
pág.	Página
PDA	Potato-Dextrose-Agar
Peq.	pequena
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Rotações por minuto
Sub	Substância
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Time of Flight (Tempo de vôo)
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
YM	Yeast Medium

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
$[\alpha]_D$	Rotação Óptica
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M-H]^-$	Molécula desprotonada
$[M+Na]^+$	Aduto de sódio
J	Constante de acoplamento
s	Singleto
sl	Singleto Largo
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dquint	Duplo quinteto
m	Multipleto
m/z	Relação massa-carga
t	Tripleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 26
1.1 Produtos Naturais 26
1.2 Fungos: uma visão geral 27
1.3 Fungos Endofíticos 28
1.4 *Schizophyllum commune* 31
1.5 Espécie vegetal hospedeira: *Alchornea glandulosa* 34
1.6 Interação fungo endofítico-planta hospedeira 37
1.7 Dicetopiperazinas 39
1.8 Ácido *trans*-cinâmico 40
1.9 Desreplicação 41
2. OBJETIVOS GERAIS 42
2.1 Objetivos Específicos 42
3. MATERIAIS E MÉTODOS 43
3.1 Materiais 43
3.1.1 Meios de cultivo do micro-organismo 43
3.1.2 Solventes 43
3.1.3 Cromatografia em Coluna 43
3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) 44
3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) 44
3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ^{1}H e ^{13}C) 44
3.1.7 Espectrometria de Massas 45
3.1.8 Análise de rotação óptica $[\alpha]^{D}_{25}$ 45
3.1.9 Equipamentos 45
3.2 Métodos 46
3.2.1 Obtenção da cepa fúngica 46
3.2.2 Cultivo do fungo endofítico Schizophyllum commune em diferentes meios de cultivo 47
3.2.3 Obtenção do extrato bruto de S. commune em MBD em escala ampliada 49
3.2.4 Fracionamento do extrato bruto MBD (escala ampliada) 50

3.2.5 Fracionamento da fração S.co-F1 ..... *51*
*3.2.6 Fracionamento da S.co-F1.1 e identificação das substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**.* *52*
*3.2.7 Fracionamento do extrato bruto em milho (CH_3CN) e arroz (CH_3CN) (pequena escala) e isolamento das substâncias **8** e **9*** *53*
3.2.8 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos, frações e substâncias puras produzidas por S. commune *54*
3.2.8.1 Ensaio qualitativo com 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).... *54*
3.2.8.2 Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH *54*
3.2.8.3 Avaliação da atividade antifúngica[1] *54*
3.2.8.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica[1] *55*
3.2.8.5 Avaliação da atividade tripanocida[3] *55*
3.2.8.6 Avaliação da atividade antifúngica humana[4] *55*

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 57
4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos em meios de cultura líquidos e sólidos (peq. escala) de *S. commune*..... 57
4.1.1 Perfil Cromatagráfico dos extratos brutos (peq. escala) em CLAE-DAD *57*
4.1.2 Perfil químico dos extratos brutos (peq. escala) em RMN de ^1H *62*
4.2 Avaliação do perfil químico do extrato bruto de *S. commune* em MBD em escala ampliada (Ext. MBD)..... 66
4.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *S. commune*..... 68
*4.3.1 Identificação estrutural da substância **1*** *70*
*4.3.2 Elucidação estrutural da substância **2*** *77*
*4.3.3 Identificação estrutural das substâncias **3** e **4***..... *81*
*4.3.3.1 Elucidação estrutural da substância **3** (S.co-F1.1.1.38)*..... *81*
*4.3.3.2 Elucidação estrutural da substância **4** (S.co-F1.1.1.38)*..... *83*
*4.3.4 Identificação estrutural das substâncias **5** e **6***..... *90*
*4.3.4.1 Elucidação estrutural da substância **5** (S.co-F1.1.9)*..... *90*
*4.3.4.2 Elucidação estrutural da substância **6** (S.co-F1.1.9)*..... *92*
*4.3.5 Elucidação estrutural da substância **7*** *101*
*4.3.6 Elucidação estrutural da substância **8*** *107*
*4.3.7 Elucidação estrutural da substância **9*** *113*
4.4 Identificação de dicetopiperazinas nos extratos brutos em pequena e escala ampliada produzidas por *S. commune*..... 119

4.4.1 MBD (escala ampliada) *119*
4.4.2 MBD (pequena escala) *121*
4.4.2.1 MBD (peq. escala) - inserção direta (ID) *121*
4.4.2.2 MBD (peq. escala) MS-MS *122*
4.4.3 YM (pequena escala) *123*
4.4.4 Nutrient (pequena escala) *124*
4.4.5 Ext. de Malte (pequena escala) *125*
4.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos, frações e substâncias produzidas por *S. commune* **127**
4.5.1 Ensaio Antioxidante (DPPH qualitativo) *127*
4.5.2 Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH *128*
4.5.3 Ensaio Anticolinesterásico *130*
4.5.4 Ensaio Tripanocida *131*
4.5.5 Ensaio Antifúngico *132*
4.5.5.1 Ensaio contra patógenos Humanos *133*
4.5.5.2 Ensaio contra fitopatogênicos *134*
5. CONCLUSÕES **137**
REFERÊNCIAS **139**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Produtos naturais são bioprodutos obtidos de micro-organismos, plantas e animais. Estes são explorados há muitos anos e as plantas têm representado a principal fonte natural de compostos usados na medicina (BUTLER, 2008; STROBEL et al., 2004). Os produtos naturais têm inspirado químicos e médicos há milênios (MONZOTE, 2010). A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, como por exemplo, utilização na China de indirubinas no tratamento de leucemias (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009), em cosméticos (pintura do corpo e cabelos) e no controle de pragas.

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

No Brasil, as plantas têm sido os organismos vivos mais investigados como fontes de produtos naturais, no entanto, micro-organismos juntamente com os animais, insetos e organismos marinhos têm mostrado ser uma fonte rica de substâncias bioativas. A origem de 30.000 produtos naturais bioativos descritos, pode ser dividida entre animais (13%), bactérias (33%), fungos (26%) e plantas (27%) (KINGHORN, 2001, apud ZANARDI, 2006). A identificação de numerosos produtos naturais de origem microbiana representa a potencialidade de novas classes de agentes antibacterianos com mecanismo de ação únicos e com propriedades que são diferentes das drogas utilizadas atualmente (LAM, 2007). Entre 2001 e 2005, 23 novas drogas derivadas de produtos naturais foram introduzidas para o tratamento de doenças como infecções bacterianas e fúngicas, câncer, diabetes, mal de Alzheimer, doenças genéticas entre outras. (LAM, 2007). Mais de 100 novos produtos estão em desenvolvimento clínico, principalmente como agentes anti-câncer e anti-infecciosos (HARVEY, 2008).

Os micro-organismos, em especial os fungos são reconhecidos como fontes de novos produtos naturais bioativos com aplicações na medicina (anticancerígeno, antibióticos, antifúngicos humanos), na agricultura (controle biológico de pragas) e na indústria (agente biotecnológico) (GUO et al., 2008). Estes fatos têm despertado a atenção de indústrias e pesquisadores para a busca de novos princípios ativos produzidos por micro-organismos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

1.2 Fungos: uma visão geral

Os fungos não são capazes de realizar fotossíntese, sendo assim seres heterotróficos, ou seja, adquirem seus nutrientes no meio ambiente inserido, parasitando outros organismos vivos ou pela decomposição de matéria orgânica. Os fungos podem infectar diferentes hospedeiros, levando-os à morte ou desenvolvendo uma relação simbiótica com o seu hospedeiro (MAUSETH, 2003; SCHARDL, 2004**)**

Os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a Terra, estimados em 1,5 milhões de espécies diferentes, sendo que apenas 69 mil foram descritas (menos de 5%) (HAWKSWORTH, 2001). Destes, dos que foram estudados do ponto de vista químico e biológico, foram isolados uma grande variedade de micromoléculas bioativas, que incluem desde substâncias tóxicas como aflatoxinas, ocratoxinas e citreoviridinas a fármacos com aplicação terapêutica (GUNATILAKA, 2006; MILLER; TRENHOLM, 1991). Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos β-lactâmicos das classes de penicilina e cefalosporina, como os exemplos mais conhecidos de produtos de fungos.

Outras substâncias de grande relevância como medicamentos incluem o imunossupressivo ciclosporina A e agentes redutores de colesterol como a mevinolina (Mevacor® = lovastatina) (DEMAIN, 2000). Substâncias isoladas de fungos são empregadas também no combate de pragas, que consomem um grande percentual da produção agrícola mundial, calculado em bilhões de dólares em prejuízos. Esses metabólitos atuam como agroquímicos naturais, como por exemplo, os alcaloides indólicos, derivados de pirrolizidinas, quinazolinas e criptocina (antimicótico), que são inibidores de fitopatógenos (insetos, fungos, herbívoros) (ZHANG; SONG; TAN, 2006**).**

A microbiologia é uma das maiores participantes na indústria global (DEMAIN, 2000), e a busca por substâncias produzidas por micro-organismos (especialmente fungos) com aplicação na indústria, na medicina e na agricultura pode ser mais eficiente com a utilização de novos programas de triagem.

Várias vantagens são observadas quanto à utilização de fungos na obtenção de produtos naturais bioativos, em relação a outras fontes naturais, pois são recursos renováveis e a sua produção em escala ampliada pode ser realizada usando a tecnologia existente, como variação do meio e otimização das condições de cultivo. Como exemplo, a manipulação no meio de cultura do *Penicillium notatum*, resultou em um aumento de 6000 vezes na produção da penicilina (DEMAIN, 2000). Outra vantagem está relacionada com a conservação ambiental uma vez que requerem uma única e pequena remoção do ambiente natural (BILLS, 1995).

Devido às condições simples para o crescimento dos fungos (temperatura ~ 25 ^{O}C, pH ligeiramente ácido, condições aeróbicas ou anaeróbicas) (ALCANO, 1994), estes são encontrados em diferentes lugares, como na água, solo, ar, animais e plantas (HAWKSWORTH, 2001), sendo divididos em vários grupos, tais como:, micoparasitas, de água doce, marinhos, termofílicos, filoplanos, parasitas de nematoides, epifíticos, endofíticos, entre outros.

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 a degradação do meio ambiente, intensificaram as pesquisas por novas drogas mais eficazes (GUO et al., 2008).

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

1.3 Fungos Endofíticos

Estudos com plantas realizados até 2003 evidenciaram que estas poderiam alojar um número incontável de micro-organismos, entre estes, destacam-se os endofíticos (bactérias, fungos, vírus) (STROBEL; DAISY, 2003).

Micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre

estes e fitopatógenos. Entretanto, os estudos sobre este nicho de micro-organismos intensificaram somente a partir da década de 70, quando foi verificada sua capacidade de proteger seus hospedeiros contra insetos-pragas, outros micro-organismos patógenos e herbívoros (ovinos e bovinos).

Fungos endofíticos (endon= no interior; phyton= planta) são micro-organismos que colonizam assintomaticamente o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos vegetais como as folhas, caule, frutos, sementes e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (AZEVEDO, 1998; GUNATILAKA, 2006; RODRIGUEZ et al., 2008; TAN; ZOU, 2001).

Normalmente, os fungos endofíticos penetram nas plantas por aberturas naturais (estômatos e hidatódios), feridas, também pela produção de enzimas que facilitam sua penetração, entretanto, uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos são as raízes (AZEVEDO, 1998).

Os fungos endofíticos se diferenciam dos micro-organismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintos do micro-organismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Assim, um endófito, que vive no interior de uma planta de acordo com as condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente (AZEVEDO, 1998). Assim, a natureza da associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros varia de parasitismo ou antagonismo a neutro ou simbiótico (CARROL, 1988; SAIKKONEN et al., 1998).

Nos anos 90, estudos realizados por Stierle et al., (1993) despertaram ainda mais o interesse biotecnológico para o imenso potencial dos micro-organismos endofíticos, pois constatou-se que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae,* isolado da *Taxus brevifolia,* produz um complexo diterpenoide, o taxol, que é um agente antitumoral de alto valor comercial. Trabalhos posteriores também mostraram que outros fungos endofíticos como, *Pestalotiopsis microspora*, isolado de *T. wallachianae,* (STROBEL; DAISY, 2003)*, o Fusarium solani,* isolado de *Taxus chinensis* (LIU et al., 2009) e *Botryodiplodia theobromae* Pat., isolado de *Morinda citrifolia* Linn.(PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010) também produzem taxol. Com as evidências de que fungos endofíticos podem também produzir o taxol visualizou-se um novo processo, talvez mais eficiente e menos dispendioso, para a produção deste importante fármaco.

Outros produtos potencialmente bioativos produzidos por fungos endofíticos merecem destaque, como os anticancerígenos: derivados de antracenediona (ZHANG et al., 2010), (22-oxa-(12)-citocalasinas (PRITI et al., 2009), a citosporona D (BRADY et al., 2000), fomopsolida A e o ácido coletótrico (TAN; ZOU, 2001) pela atividade antibacteriana; leucinostatina A (STROBEL; TORCZYNSKI; BOLLON, 1997), criptocandina (STROBEL; DAISY, 2003) e criptocina (LI; STROBEL; HARPER, 2000) se destacam pela atividade antifúngica. Um poderoso agente antifúngico que também merece destaque é a griseofulvina, utilizada na medicina, em animais domésticos, na agricultura (MANN, 1994) e empregada comercialmente nos medicamentos Fulcin® (Zeneca) e Sporostatin® (Shering Plough) (LACAZ, 1975). Pesquisas mais recentes relatam outros compostos com atividades promissoras como a antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006) e a 10-hidroxicamptotecina (SHWETA et al., 2010), poderosos agentes antineoplásicos, isolado dos fungos endofíticos *Pleospora* sp e *Fusarium solani*, respectivamente; o subglutinol A e B, um agente imunossupressor, produzido pelo endófito *Fusarium subglutinans* (GUO et al., 2008) e o ácido rizotônico (ZHANG; SONG; TAN, 2006), com atividade contra a bactéria *Helicobacter pylori*, esta causadora de gastrites, úlceras gástricas e até tumores gástricos.

Com estes dados, os fungos endofíticos têm despertado cada vez mais, o interesse de pesquisadores e indústrias farmacêuticas, pois estudos até 2002 indicaram que 51 % das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos são inéditas (STROBEL, 2002).

A necessidade pela busca de novos fármacos e a constatação da biodiversidade metabólica apresentada pelos fungos endofíticos, instiga o estudo deste nicho de micro-organismos associados a espécies vegetais do Cerrado e Mata atlântica.

1.4 *Schizophyllum commune*

Figura 1. Foto de *Schizophyllum commune* cultivado em MBD em placa de Petri.

Schizophyllum commune ("white rot" - podridão branca) é um fungo filamentoso pertencente à classe dos Basidiomicetos. Os micélios desta classe de fungos consistem de ramificações, compostos por hifas septadas com perfurações transversais. A principal característica que distingui os Basidiomicetos dos demais grupos de fungos é a presença de basídio, sendo sua reprodução geralmente por basídioesporos (INGOLD, 1961).

Os Basidiomicetos compreendem o segundo maior grupo de fungos, com aproximadamente 13000 espécies, sendo considerado o melhor degradador de celulose, crescendo muitas vezes em madeira morta ou liteira, ambientes ricos em celulose. (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008). A este grupo pertencem à maioria das espécies notáveis encontradas nos campos e florestas como cogumelos de chapéu, cogumelos comestíveis, ferrugem, mas também contém muitos micro-fungos e outros que são parasitas de plantas (INGOLD, 1961).

Schizophyllum commune é um fungo não-patogênico, no entanto foi registrado em 1989 um caso de alergia broncopulmonar causado por este fungo (KAMEI et al., 1994). Deste isolou-se pigmentos como indigotina (A), indirubina (B), isatina (C), triptantrina (D) (Figura 2) e um composto alaranjado inédito, designado schizocommunina (HOSOE et al., 1999). Isolou-se também um polissacarídeo denominado schizopyllana (Figura 3), que tem atraído a atenção de indústrias farmacêuticas por apresentar atividades imunomodulatórias, antineoplásicas e antivirais mais potentes que as glucanas (KUMARI; SURVASE; SINGHAL; 2008). Uma enzima xenolítica denominada endo- β-1,4-xilanases responsável pela hidrólise da xilana, o

maior polissacarídeo presente nas paredes das células vegetais, também foi isolada deste fungo. Esta hidrólise é muito importante em processos biotecnológicos como fonte de carbono em fermentações industriais, pois melhora qualidade nutricional, a digestibilidade de forragens para ruminantes e facilita a compostagem (KOLENOVÁ; VRSANSKÁ; BIELY, 2005).

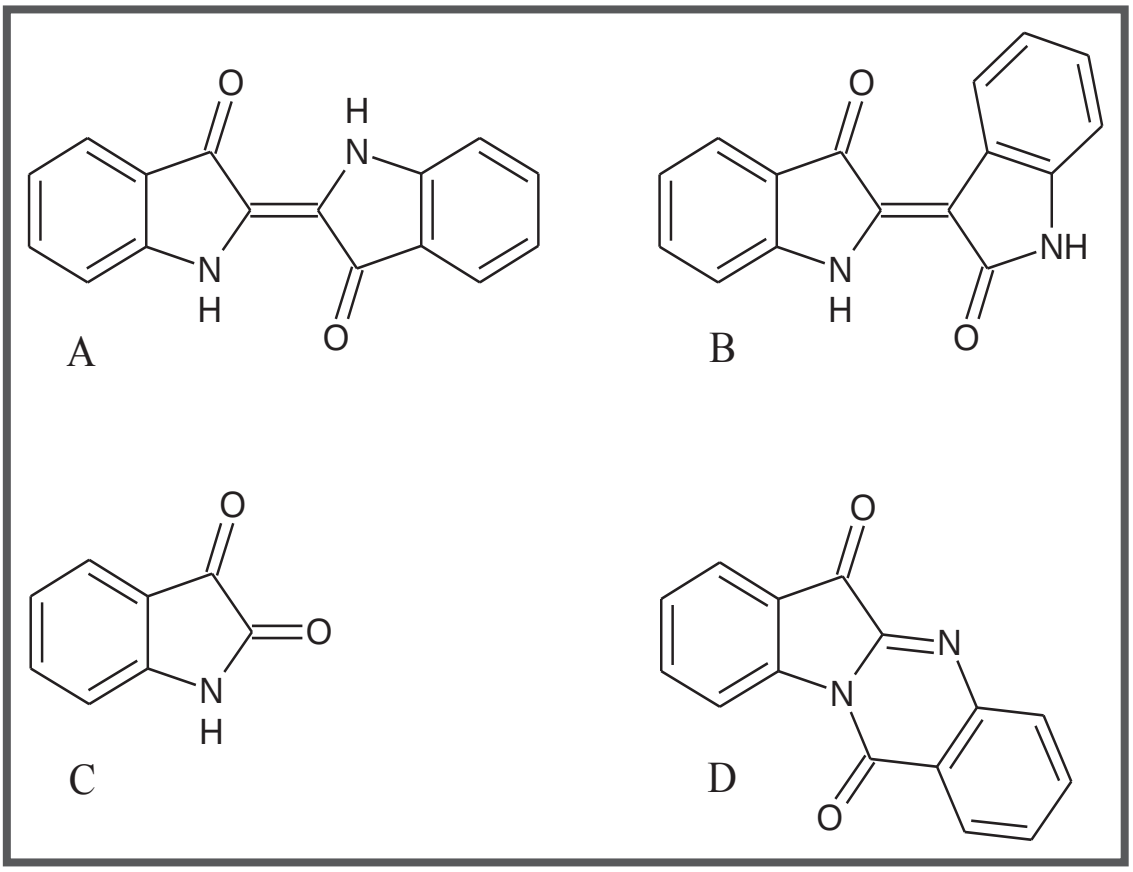


Figura 2. Estruturas de derivados indólicos isolados de *S. commune*, indigotina (A); indirubina (B); isatina (C) e triptantrina (D).

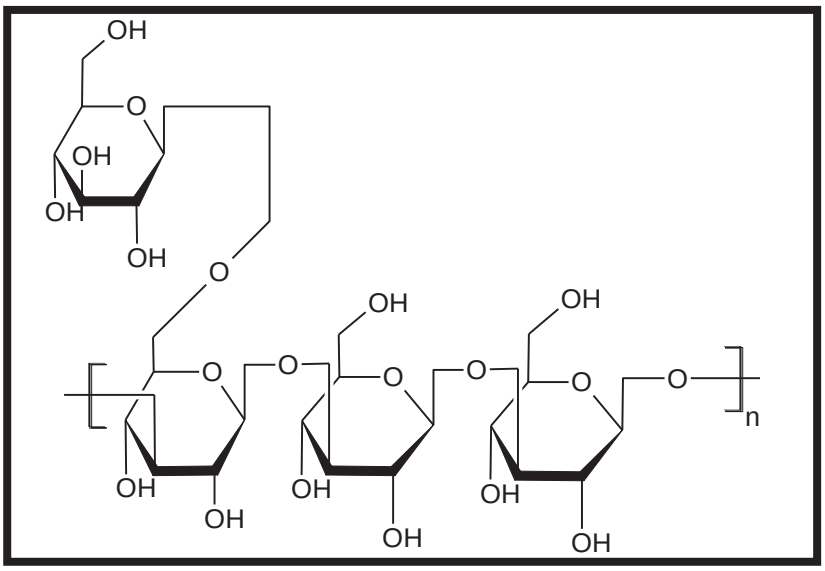


Figura 3. Estrutura da schizopyllana.

Estudos realizados até 2006 têm demonstrado que fungos "white rot" são capazes de degradar corantes sintéticos (ASGHER et al., 2006), compostos recalcitrantes como xenobióticos e ligninas, pela presença de enzimas ligninóliticas extracelulares (ASGHER et al., 2008). A degradação de ligninas e celulose conduz à queda das folhas durante o outono, que desencadeia o retorno de nutrientes ao solo, para o crescimento de outros vegetais e da própria espécie hospedeira.

Estudos realizados recentemente demonstram a capacidade de *S. commune* em converter derivados de ácido *trans*-cinâmico em fenóis úteis (vanilina, ácido vanilínico). *S. commune* possui potencial para liberar e metabolizar derivados de ácido *trans*-cinâmico esterificados ou étereficados (atividade antibiótica, potencial antioxidante, capacidade de absorver raios ultravioletas) para as células das paredes vegetais. É esperado que este fungo converta os derivados de ácido *trans*-cinâmico independentemente das células de paredes vegetais (NIMURA, TSUJIYAMA, UENO, 2010).

Considerando que o fungo *S. commune* é descrito como um degradador do corante amarelo ouro, um subproduto de indústria têxtil, (ASGHER et al., 2008) e capaz de converter derivados do ácido *trans*-cinâmico, surge a questão, teria *S. commune* endofítico, uma função ecológica na espécie vegetal hospedeira? Talvez degradando subprodutos prejudiciais à espécie vegetal?

Estas e outras questões instigam o estudo químico e biológico, objetivando obter dados que direcionem para a compreensão da relação endófito-hospedeiro.

1.5 Espécie vegetal hospedeira: *Alchornea glandulosa*

Figura 4. *Alchornea glandulosa* (a), frutos (b) e folhas (c).

Alchornea glandulosa Poepp. & Endl. (sinonímia: *Alchornea irucurama* Casar), é uma espécie da família Euphorbiaceae e conhecida popularmente como tapiá, tanheiro-de-folha-longa, maria-mole, tamanqueiro e "amor seco". É uma árvore, de caule tortuoso, que ocorre em florestas ciliares do Brasil (CORRÊA, 1984 apud COGENERO, 2003). A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 290 gêneros e 7500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e na África. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação. Espécies do gênero *Alchornea* têm sido usadas popularmente como agentes antidiarreico, anti-inflamatório, antirreumático, no tratamento de lepra e de doenças cutâneas (CONEGERO et al., 2003).

Os estudos químicos efetuados com espécies do gênero *Alchornea* descrevem o isolamento de alcaloides hexaidroimidazo-pirimidínicos e guanidínicos, como principais constituintes, além de triterpenos, flavonoides e outros compostos fenólicos. O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa* resultou no isolamento do alcaloide guanidínico N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina (A) (agente anticancerígeno), da mistura dos esteroides sitosterol (B) e estigmasterol (C), loliolida (D) (atividades repelente, inibidora de germinação, imunossupressiva e citotóxica contra carcinoma humano de nasofaringe (KB) e leucemia linfoide (P388), e a

corilagina (E) (Figura 5) (CONEGERO, 2003). Destaca-se o alcaloide pteroginidina (F) (Figura 5) com atividade antiangiogênica e anti-inflamatória, apresentando potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais direcionados ao processo inflamatório e angiogênico (LOPES et al., 2009).

Estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e substâncias isoladas desta espécie vegetal revelaram atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarreica, bem como citotóxica contra células cancerígenas Hep-G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e A-431 (carcinoma epidermoide) e atividade antiproliferativa contra células cancerígenas. Outras substâncias foram isoladas da *Alchornea glandulosa* como o ácido gálico (G), galato de metila (H), amentoflavona (I) e outras com atividade antiulcerogênica (CALVO et al., 2007).

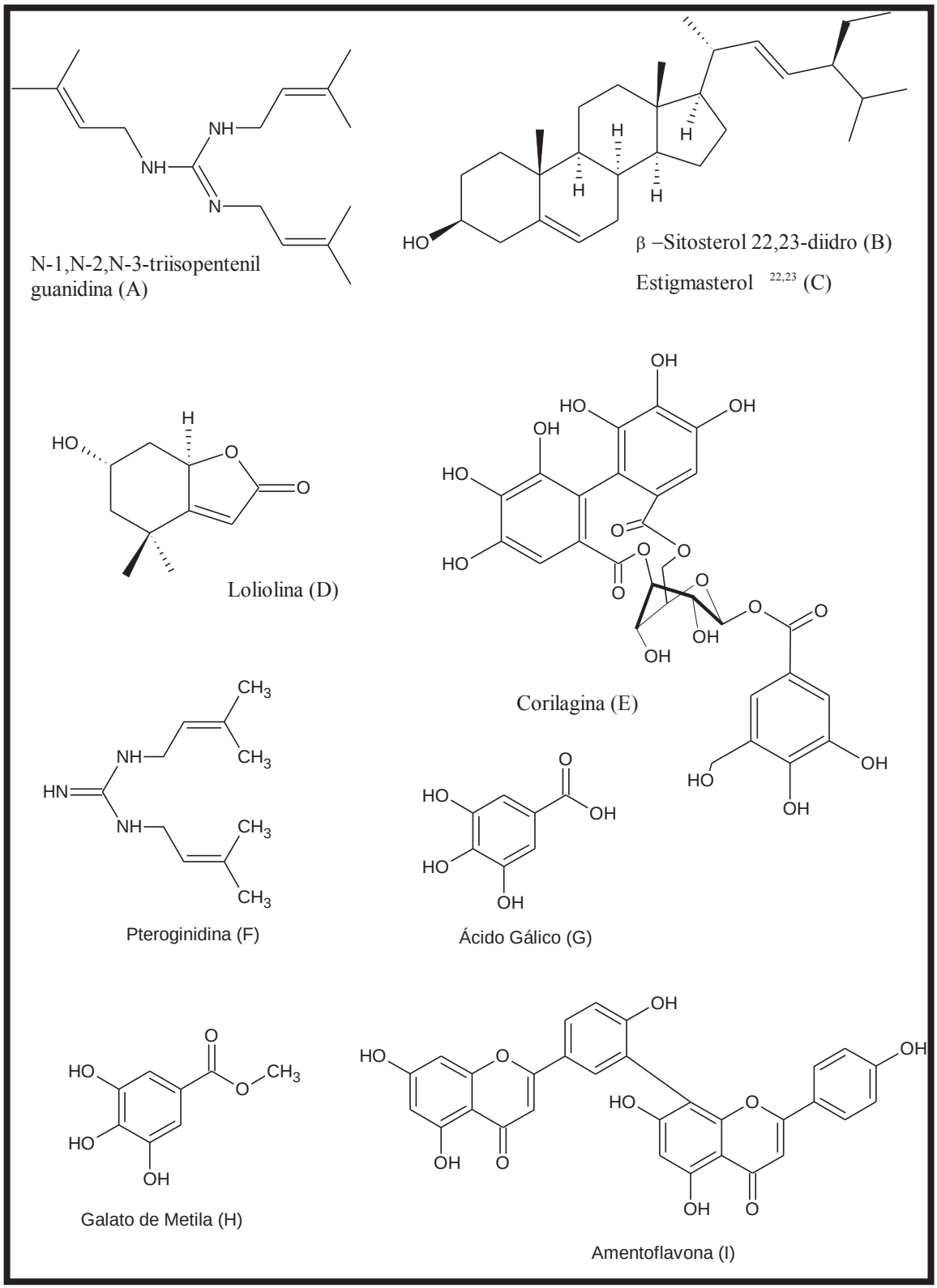


Figura 5. Substâncias isoladas da espécie *Alchornea glandulosa*.

Tendo em vista a potencialidade biológica apresentada pelas substâncias isoladas de *A. glandulosa* e das fortes evidências de que micro-organismos endofíticos produzam as mesmas substâncias, ou derivados com maior bioatividade que a planta hospedeira, motivou-se o estudo do potencial biológico do fungo endofítico *Schizophyllum commune* associado à espécie vegetal *A. glandulosa*.

1.6 Interação fungo endofítico-planta hospedeira

Fungos endofíticos estão em constante interação com a planta hospedeira e são considerados excelentes fontes de produtos naturais bioativos, uma vez que podem ocupar nichos biológicos únicos e crescem em diversos ecossistemas (SCHULZ et al., 2002).

Estima-se que a interação fungo endofítico-planta hospedeira iniciou-se há milhões de anos atrás, quando surgiram pela primeira vez as plantas superiores no planeta (STROBEL; DAISY, 2003). Evidências da associação endofíticos-planta foram descobertas em tecidos fossilizados de caule e folhas. Como resultado deste longo período de associações, é possível imaginar que alguns destes fungos endofíticos podem ter desenvolvidos mecanismos genéticos que permitiram a transposição horizontal de genes entre si e com as plantas superiores e vice-versa. E isso permitirá um rápido e confiável mecanismo para o endofítico se adaptar a condições de estresse e talvez obter uma maior compatibilidade com a planta hospedeira, além de habilitar certos endofiticos a biosintetizar alguns compostos originalmente associados a sua planta hospedeira (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Por estas razões, pode se dizer que as interações planta-fungo envolvem, mecanismos bioquímicos, resultando na produção de hormônios de crescimento, substâncias que a protege contra insetos, patógenos e herbívoros (STROBEL; DAISY, 2003).

No caso da associação simbiótica os endófitos são beneficiados pelos nutrientes fornecidos pelo hospedeiro enquanto a planta recebe proteção contra pragas, insetos e herbivorias, devido aos metabólitos secundários sintetizados pelos fungos endofíticos (GIMENÉZ et al., 2007). Como exemplo desta associação, observou-se que plantas infectadas por fungos endofíticos podem apresentar maior taxa de crescimento e área foliar além de um aumento do número de perfilhos, em comparação com plantas não infectadas (BULTMAN; BELL, 2003).

Como citado, os fungos endofiticos podem influenciar direta ou indiretamente na fisiologia da planta hospedeira, reduzindo ou prevenindo o stress. Em plantas sensíveis

a seca, os fungos endofiticos, além de armazenarem e secretarem açúcar e álcool, também reduz a transpiração das folhas, evitando assim o stress da planta (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

A visão mutualística da interação fungo endofítico-planta tem sido associada à endofíticos de gramíneas de regiões temperadas. Esta visão foi sustentada principalmente por estudos com endofíticos do gênero *Neotyphodium,* os quais infectam gramíneas, protegendo-as contras herbívoros pela produção de alcaloides (BULTMAN; BELL, 2003). A simbiose entre gramíneas e *Neotyphodium*, considerada mutualística proporcionam benefícios para ambas as partes. No entanto, este dogma de interação mutualística entre fungos endofiticos e plantas está sendo questionado, pois a adaptação em seu hospedeiro não depende somente da presença do endofítico, mas também do genótipo da planta e do endófito, de vários fatores abióticos e de outras espécies que interagem com o hospedeiro diretamente ou indiretamente (FAETH, 2002; MULLER; KRAUSS, 2005). Pode-se citar algumas razões do questionamento deste dogma como conflitos entre o hospedeiro e a reprodução dos fungos endofíticos, os custos energéticos de abrigar o endófito e a supressão do sistema imunológico do hospedeiro para que o endófito sobreviva e com isso aumente a suscetibilidade a outros fungos patógenos. Estes fatores podem desestabilizar a simbiose e conduzir mudanças na reprodução do fungo e do hospedeiro e nas interações endófito-planta (SAIKKONEN et al., 2004).

Outros autores propuseram que a colonização assintomática é uma balança de antagonismo, onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta. Esta balança é dinâmica e pode ser alterada sob condições de stress do hospedeiro ou alterações fisiológicas em um dos organismos envolvidos (SCHULZ et al., 2005).

Há propostas que a relação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira é bem mais complexa. Um fungo endofítico, por exemplo, pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um micro-organismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por um determinado período, causando ou não danos à mesma. Sendo assim, interações mutualísticas entre fungos invasores e a planta hospedeira são descritas como um balanço, sobre controle ambiental, fisiológico e genético, que resulta nos benefícios de adaptabilidade para ambos os parceiros (AZEVEDO, 1998; SAIKKONEN et al. 2004).

O endófito *Schizophyllum commune* foi selecionado para estudos por algumas razões. Durante o desenvolvimento do projeto de iniciação científica da mestranda, foi detectado neste endófito a presença de enzimas por métodos HTS. Ensaios biológicos preliminares foram realizados com o extrato bruto em MBD deste endófito e estes ensaios apresentaram resultados significativos. Com vários estudos fitoquímicos realizados com a planta hospedeira *Alchornea glandulosa* pelo Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara, optou-se por um de seus inúmeros endófitos para o estudo químico e biológico com o objetivo de tentar estabelecer uma relação endófito-planta hospedeira.

1.7 Dicetopiperazinas

As dicetopiperazinas são conhecidas há mais de um século, mas os estudos sobre esta classe de substâncias intensificaram somente quando começaram a relatar a potencialidade biológica destas substâncias. Algumas das mais importantes atividades biológicas desta classe estão relacionadas com as alterações em funções cardiovasculares e coagulação do sangue. Também apresentam atividades como antitumoral, antiviral, antifúngica, antibacteriana, agentes antihiperglicêmico, afinidades receptoras dos canais de cálcio e serotoninérgico (MARTINS; CARVALHO, 2007).

As dicetopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, comumente biosintetizados a partir de dois ou mais aminoácidos por diferentes organismos como mamíferos, leveduras terrestres, líquens, fungos, bactérias e actinomicetos marinhos (ADAMCZESKI; REED; REWS; 1995). Estes compostos apresentam um esqueleto comum quiral, rígido e funcionalizado, diferenciando-se pelas estruturas dos substituintes da cadeia lateral de cada aminoácido. Com isso, as dicetopiperazinas são estruturas privilegiadas, pois possuem a capacidade de se ligarem a uma grande variedade de receptores com alta afinidade, resultando em uma gama de atividades biológicas. A partir dessas observações, as dicetopiperazinas são consideradas ideais para o desenvolvimento racional de novos agentes terapêuticos e amplia-se as perspectivas para a descoberta de novos compostos pela química combinatória (MARTINS; CARVALHO, 2007).

1.8 Ácido *trans*-cinâmico

A L-fenilalanina e *L*-tirosina são precursores de um grande número de produtos naturais. Em plantas, frequentemente o primeiro passo da via biossíntética é a transdesaminação da L-fenilalanina, catalisada pela PAL, resultando no ácido *trans*-cinâmico (Figura 6) e no caso da tirosina, obtêm-se o ácido *p*-cumárico (DEWICK, 2009). Esta reação é de fundamental importância, uma vez que o ácido *trans*-cinâmico é responsável pela formação de uma gama de metabólitos secundários (CAMARGO, 2008).

É importante ressaltar que o isolamento do ácido *trans*-cinâmico, reforça o isolamento e identificação das substâncias *Rel.ciclo*(Pro-Phe) (**5**) e N-(2-feniletil) acetamida (**9**), as quais tiveram como precursor a L-fenilalanina.

As substâncias c*iclo*(Pro-Tyr) (**3**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**4**) e N-(4-hidroxifeniletil) acetamida (**8**) tiveram como precurssor a tirosina na via biossíntética.

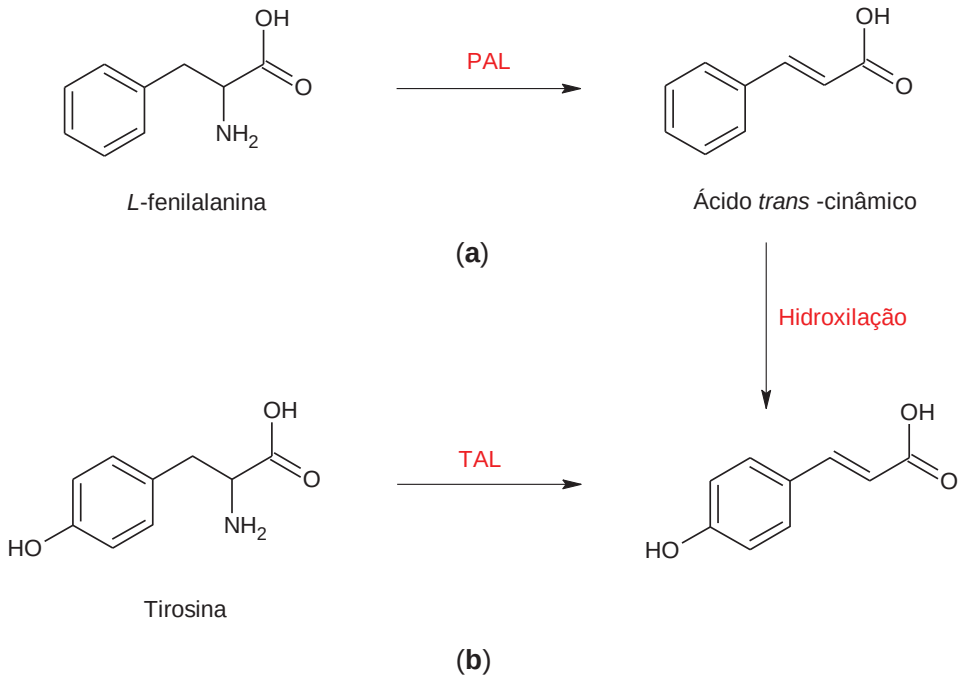


Figura 6. Biossíntese do ácido *trans*-cinâmico (**a**) e do ácido p-cumárico (**b**).

1.9 Desreplicação

Os produtos naturais continuam a desempenhar um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos compostos (LANG et al., 2008). A rápida identificação de compostos conhecidos a partir de extratos de produtos naturais, ou seja, a desreplicação é uma etapa fundamental na descoberta de uma droga. Estratégias de desreplicação utilizam técnicas analíticas e banco de dados buscando determinar um composto ativo o mais rápido possível no processo de descoberta de um composto. Isso evita desperdícios com amostras sem potencial biológico e permite que os recursos sejam focados para o desenvolvimento de novas drogas (SASHIDHARA; ROSAIAH, 2007).

O método de desreplicação baseado no uso de LC-MS e LCMS/MS é muito sensível e fornece informações estruturais, as quais são analisadas em bancos de dados. A desvantagem deste método é a presença de íons interferentes que ioniza com mais facilidade que o componente de interesse e conduz a um falso composto (LANG et al., 2008).

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi o estudo químico/biológico dos extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico *Schizophyllum commune,* isolado de *Alchornea glandulosa*.

2.1 Objetivos Específicos

1. Cultivo do fungo endofítico *S. commune* em meio sólido BDA (Batata Dextrose Ágar), para inoculação em meios de cultivo líquido e sólido;
2. Cultivo de *S. commune* em escala ampliada no meio líquido MBD (batata dextrose);
3. Cultivo de *S. commune* em pequena escala nos meios líquidos (600,0 mL) (Czapek, Extrato de malte, Nutrient e YM), e sólidos (180,0 g) (arroz e milho) para obtenção dos extratos brutos;
4. Análise do perfil químico dos extratos brutos em pequena e escala ampliada e das frações por técnicas cromatográficas (CLAE-DAD) e espectrométricas (RMN de ^{1}H);
5. Avaliação das atividades: antioxidante, anticolinesterásica, tripanocida, antifúngica humana e contra fitopatógenos dos extratos brutos em pequena e escala ampliada;
6. Fracionamento do extrato bruto obtido em MBD a partir da escala ampliada de *S. commune*;
7. Isolamento e identificação estrutural das substâncias produzidas por *S. commune* em MBD, YM, Milho e Arroz;
8. Avaliação da atividade anticolinesterásica nas substâncias puras;
9. Detecção de dicetopiperazinas nos diferentes meios de cultivo em pequena escala por espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Meios de cultivo do micro-organismo

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo endofítico *S. commune*.

Meios de Cultura	***Tipo***	***[ ]g L^{-1}***	***Composição***	***Fabricante***
MBD	Líquido	24	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	Acumedia
Czapek	Líquido	35	Sacarose (30g), $NaNO_3$ (3g), $Na_2(PO_4)_3$ (1g), $MgSO_4$ (0,5g), KCl (0,5g), $FeSO_4$ (0,01g)	Difco
Ext. de Malte	Líquido	20	Extrato de malte (20 g)	Acumedia
Nutrient	Líquido	8,0	Extrato de carne (3 g), peptona (5 g)	Difco
YM	Líquido	21	Extrato de levedura (3 g), extrato de malte (3 g), peptona (5 g) e dextrose (10 g)	Difco
BDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), Ágar (15g)	Acumedia
Milho	Sólido	-	90,0 g em 75,0 mL de água Milli-Q	Machiara
Arroz	Sólido	-	90,0 g em 75,0 mL de água Milli-Q	Seninha

3.1.2 Solventes

Para a obtenção dos extratos brutos em pequena e escala ampliada e também para os fracionamentos, separações cromatográficas em coluna e em CLAE, foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol P.A. e analítico, clorofórmio e acetonitrila das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt, QHEMIS e MTEDIA. Em análises em RMN de ^{1}H e ^{13}C utilizou-se os solventes DMSO e $CHCl_3$ deuterado (Aldrich).

3.1.3 Cromatografia em Coluna

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

3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foi utilizada sílica gel 60 G F_{254} (Merck). As placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placa de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente, através da utilização de espalhador Quickfitt®. Após a preparação das placas essas foram deixadas em repouso por cerca de 6 horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 120 ^{o}C por 120 minutos. As cromatoplacas foram reveladas pela exposição à luz ultravioleta (254 e 366 nm) e nebulização com anisaldeído seguida de aquecimento a 120 ^{o}C até o surgimento de colorações correspondentes às substâncias presentes na amostra.

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

As análises por CLAE-DAD analítico e preparativo foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaiseificador DGU-$20A_3$ e injetor automático Shimadzu SIL-20A. O tratamento dos dados foi obtido através de um microcomputador com processador Intel ® Celeron ®, utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Gemini com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μm) e uma coluna semi-preparativa Phenomenex Luna, sílica C-18 (150 x 21,20mm; 5 μm).

O fracionamento cromatográfico de *S.co*-F1.1.2 por CLAE no modo preparativo foi realizado em equipamento Varian ProStar acoplado ao detector ProStar UV-Vis, utilizando a coluna semi-preparativa Phenomenex Luna, sílica C-18 (150 x 21,20mm; 5 μm).

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

Os espectros de RMN de ^{1}H unidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-300, operando a 300 MHz para o núcleo de ^{1}H e TMS como referência interna. Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D e 2D e de NOESY 1D foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500, operando a 500 MHz para o núcleo de ^{1}H e a 125 MHz para o núcleo de ^{13}C e TMS como referência interna.

3.1.7 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta e baixa resolução foram obtidos em um espectrômetro do UltrOTOF$_Q$ - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas Varian LC 1200L com injetor automático, triplo-quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o controle do equipamento, aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software *Varian MS Wokstation 6.8*.

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

3.1.8 Análise de rotação óptica $[\alpha]^D_{25}$

Os valores de rotação óptica foram obtidos em polarímetro JASCO P-1020, com lâmpada de sódio, cela de 1,0 mL e software Jasco Spectra Manager.

3.1.9 Equipamentos

Tabela 2. Equipamentos para o desenvolvimento do projeto.

Equipamentos	***Fabricante***
Incubadora Rotatória (“shaker”)	Marconi
Autoclave vertical	Quimis Aparelhos Científicos Ltda
Câmara de fluxo laminar	NUEIRE II, A/B3
Milli-Q	Millipore
Rotaevaporador	BUCHI
Balança analítica	Mettler Toledo AG 245

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção da cepa fúngica

O fungo *Schizophyllum commune* foi isolado das folhas saudáveis de *Alchornea glandulosa,* durante o trabalho de doutorado de Geraldo H. Silva (2005). As folhas foram lavadas com água e sabão, esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 minutos) e em etanol (70%) (1 minuto), seguida de dupla lavagem com água estéril (10 minutos) e posterior de acordo com a literatura (MAIER et al., 1997). Após o processo de esterilização, as folhas foram seccionadas assepticamente (3 a 4) e incubadas em placas de Petri contendo os seguintes meios esterilizados em autoclave: batata-dextrose-ágar (BDA), extrato de malte ágar e ágar água. Após esta esterilização, o antibiótico sulfato de gentamicina (100 µg mL^{-1}) foi adicionado aos meios de cultivos para inibir o crescimento bacteriano. O crescimento do fungo foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção da linhagem pura, que foi preservada em "slants" (frascos com água estéril contendo o fungo em meio sólido MDA), lacrados e mantidos a temperatura ambiente (Figura 7).

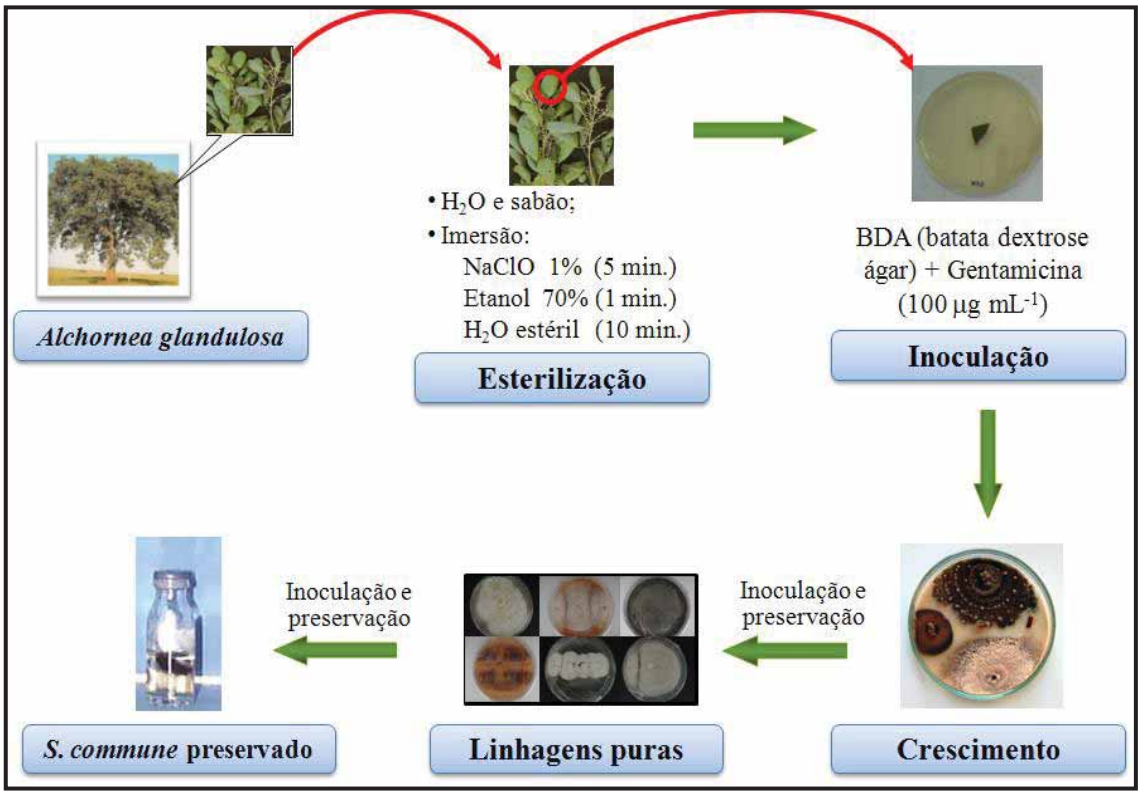


Figura 7. Esquema do isolamento do endófito *S. commune*.

Após o isolamento, o fungo endofítico *Schizophyllum commune* (inicialmente codificado AlG-02) foi identificado por biologia molecular pelo CPQBA (Centro

Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/UNICAMP) e está depositado na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/Car.

3.2.2 Cultivo do fungo endofítico Schizophyllum commune em diferentes meios de cultivo

O endófito *S. commune* primeiramente foi cultivado em BDA (placas de Petri) e posteriormente incubado em cinco meios líquidos diferentes (Figura 8) e dois meios sólidos (Figura 9) para obtenção dos extratos brutos em pequena escala.

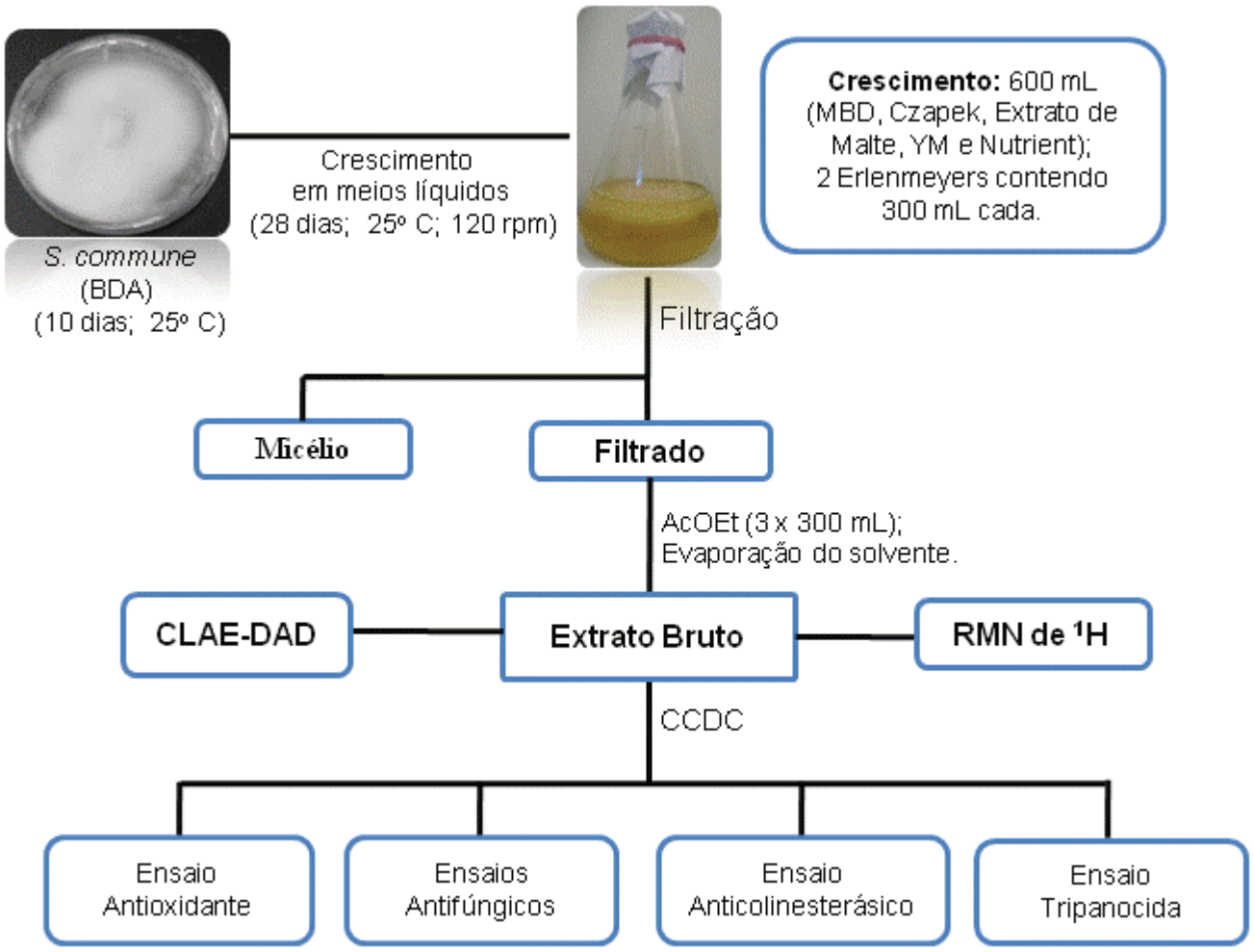


Figura 8. Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em diferentes meios líquidos.

Pela análise em RMN de ^{1}H e ^{13}C, uni e bidimensional e por espectrometria de massas foi possível identificar no extrato bruto (peq. escala) em YM o ácido *trans*-cinâmico (**7**).

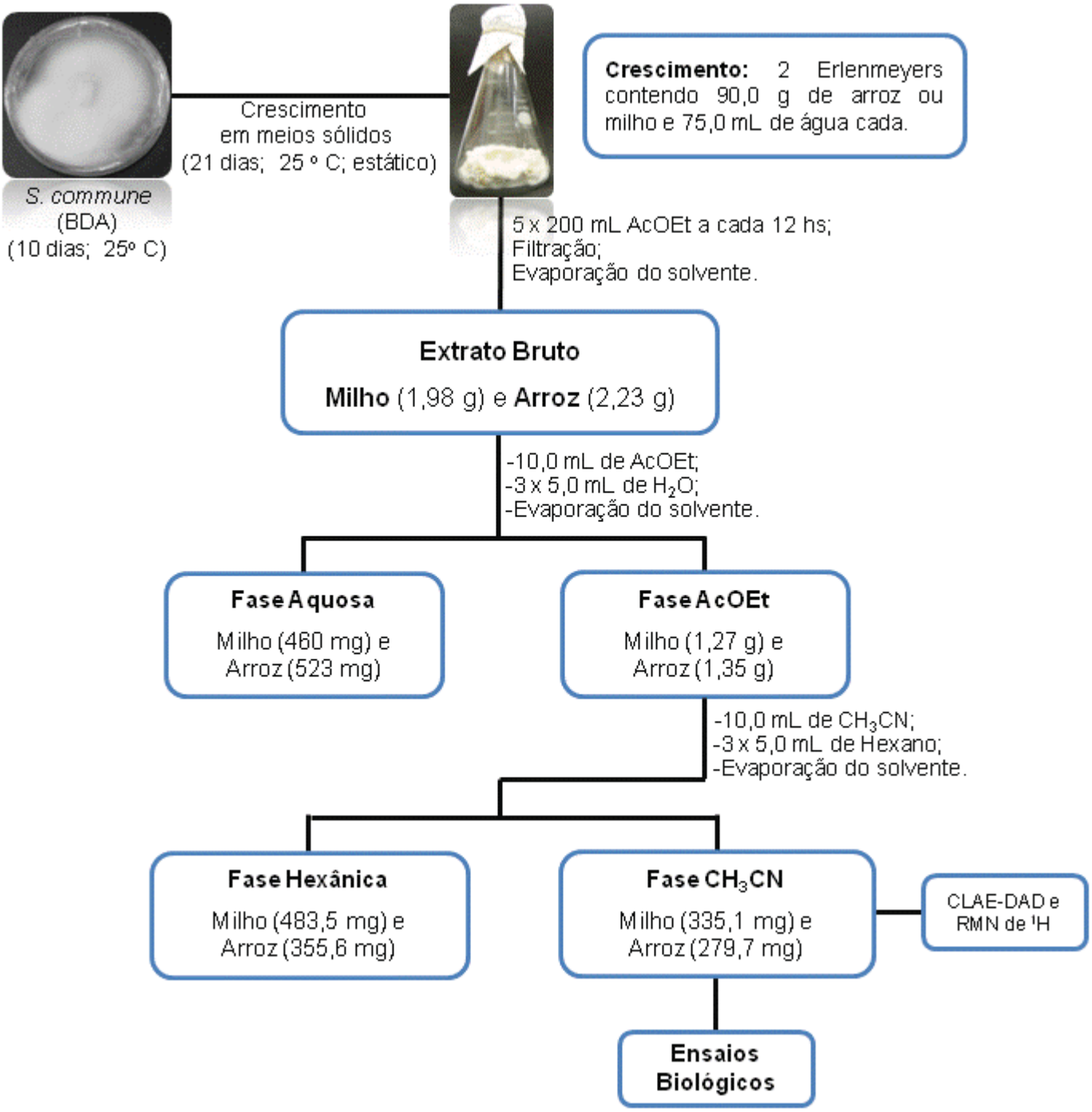


Figura 9. Esquema de cultivo e obtenção dos Ext. brutos em meios sólidos.

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos e sólidos em pequena escala foram submetidos aos ensaios biológicos e à análise em RMN de ^{1}H e CLAE-DAD em gradiente exploratório. Antes das análises por CLAE-DAD as amostras foram solubilizadas em MeOH:H_2O (95:05) e submetidas a um "clean up" utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 μm). Após este

procedimento, as amostras (1,5 mg mL^{-1}) foram armazenadas em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica Gemini Phenomenex tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 30,0 μL e eluição em gradiente exploratório H_2O:MeOH (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., num fluxo de 1,0 mL min^{-1} e λ inicial de 254 nm até 800 nm.

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

Tabela 3. Massa dos extratos brutos em diferentes meios de cultivo de *S. commune*.

Meios de Cultivo	**MBD**	**YM**	**Nutrient**	**Czapek**	**Ext. Malte**	**Milho**	**Arroz**
Massa obtida (mg)	49,2	54,0	26,7	26,5	38,2	335,1	279,7

3.2.3 Obtenção do extrato bruto de S. commune em MBD em escala ampliada

Para obtenção do extrato bruto em escala ampliada, o fungo endofítico foi cultivado em 52 frascos de Erlenmeyers (500 mL), totalizando 15,6 L de meio de cultura MBD, seguindo o mesmo protocolo utilizado para o crescimento em diferentes meios em pequena escala (Figura 8), exceto a incubação em meio líquido que foi realizada em modo estático ao contrário de agitação.

Após 28 dias de incubação o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração à vácuo e submetido a partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 0,5 L). O solvente foi evaporado fornecendo 960 mg de extrato bruto. Paralelamente foi realizado o branco em MBD seguindo a mesma metodologia sem a inoculação do fungo endofítico. Os solventes recolhidos foram reutilizados nesta extração e após o término desta foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-

residuos.pdf. O extrato AcOEt foi submetido a análise do perfil químico em RMN de ^{1}H e em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.

3.2.4 Fracionamento do extrato bruto MBD (escala ampliada)

A análise do cromatograma em CLAE-DAD do extrato bruto em escala ampliada em MBD permitiu realizar um fracionamento deste extrato por cromatografia em coluna (31 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro) sob pressão, utilizando como fase estacionária 60 g de sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (Figura 10), resultando em 8 frações (180,0 mL cada).

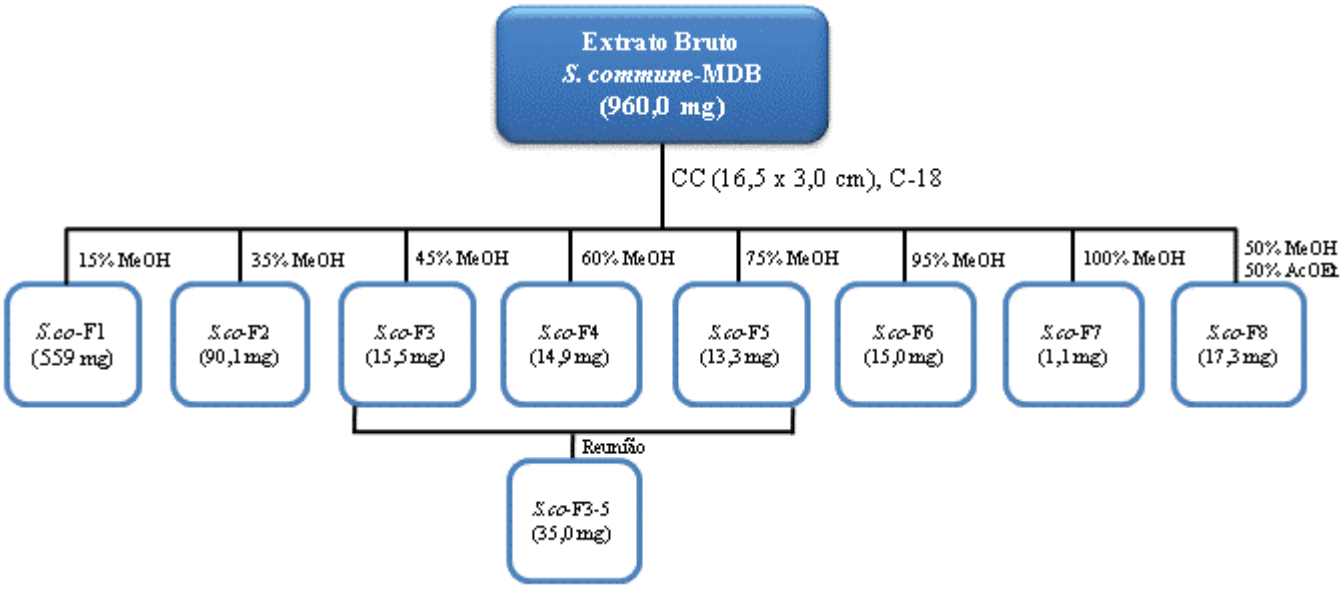


Figura 10. Fracionamento do extrato bruto AcOEt produzido por *S. commune* em MBD.

As frações obtidas foram submetidas a análise em RMN de ^{1}H e em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Após esta análise, realizou-se sucessivos fracionamentos a partir da *S.co*-F1 (Figura 11 e 12).

3.2.5 Fracionamento da fração S.co-F1

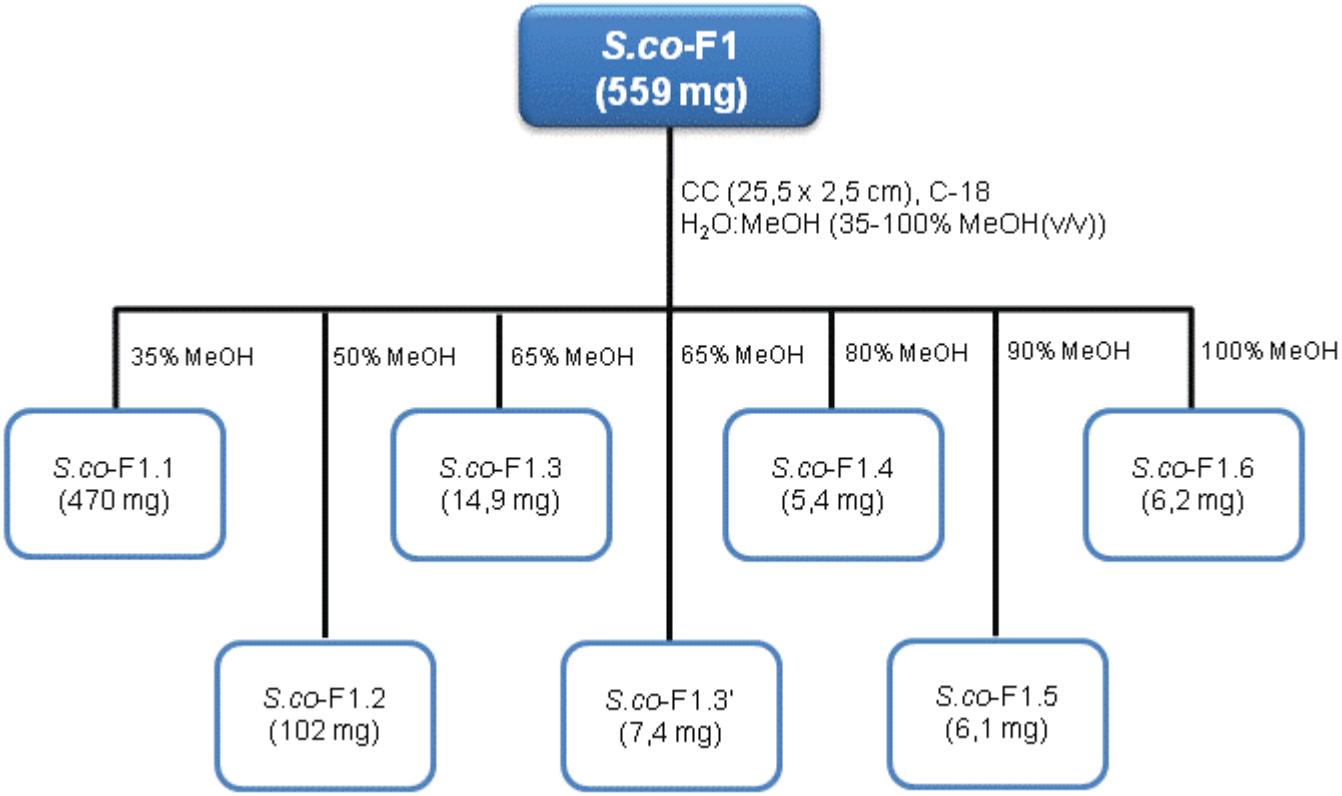


Figura 11. Metodologia de fracionamento de *S.co*-F1.

3.2.6 Fracionamento da S.co-F1.1 e identificação das substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**

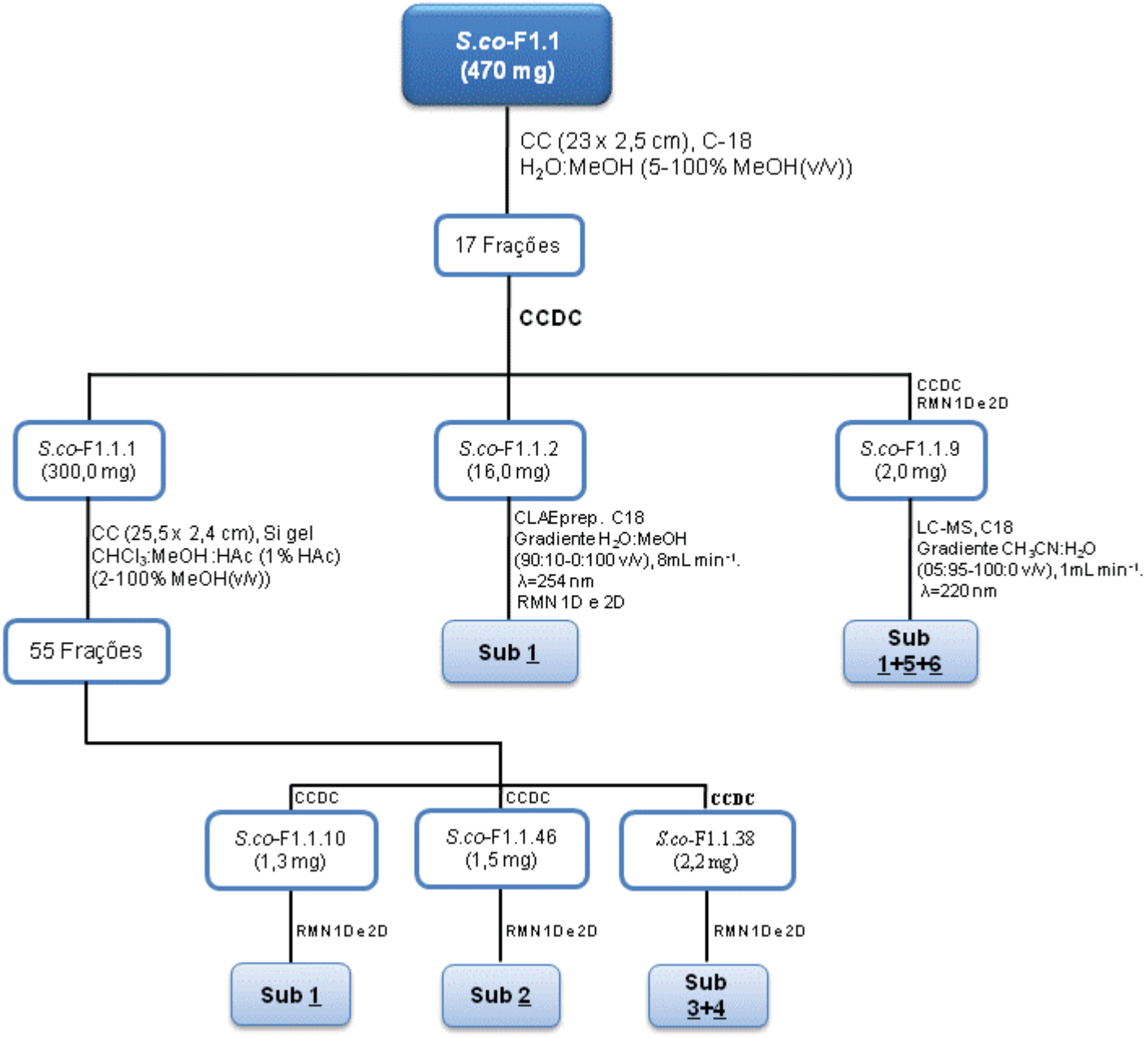


Figura 12. Metodologia de fracionamento de *S.co*-F1.1 e obtenção das substâncias produzidas por *S. commune* em MBD (escala ampliada).

*3.2.7 Fracionamento do extrato bruto em milho (CH_3CN) e arroz (CH_3CN) (pequena escala) e isolamento das substâncias **8** e **9***

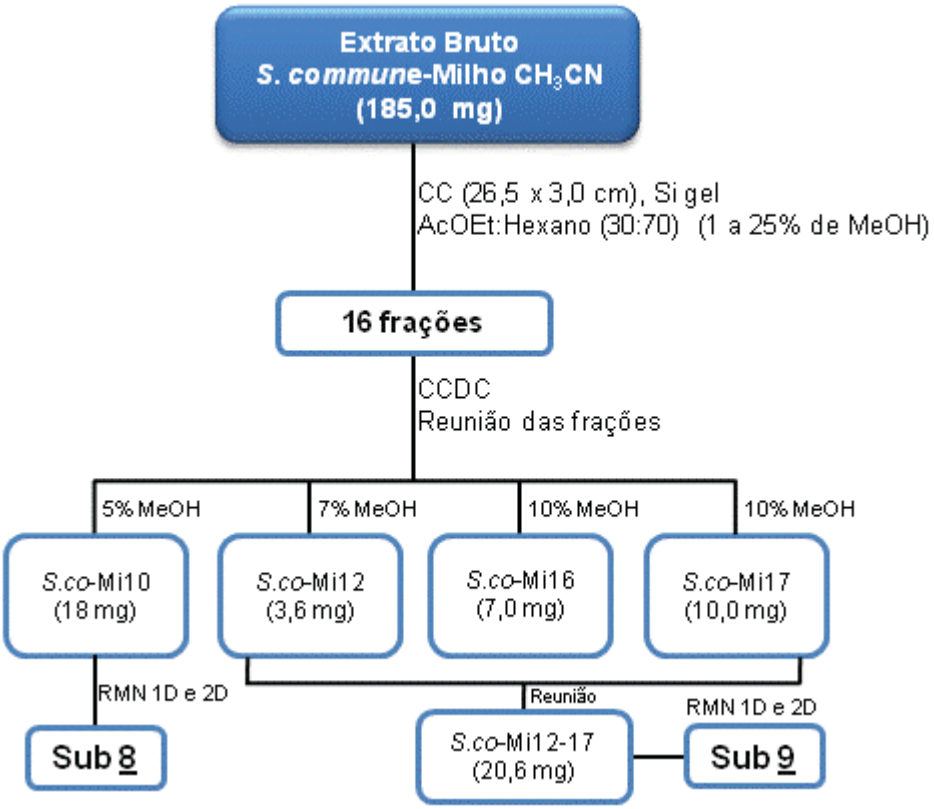


Figura 13. Metodologia de fracionamento e obtenção das substâncias produzidas por *S. commune* em milho (CH_3CN).

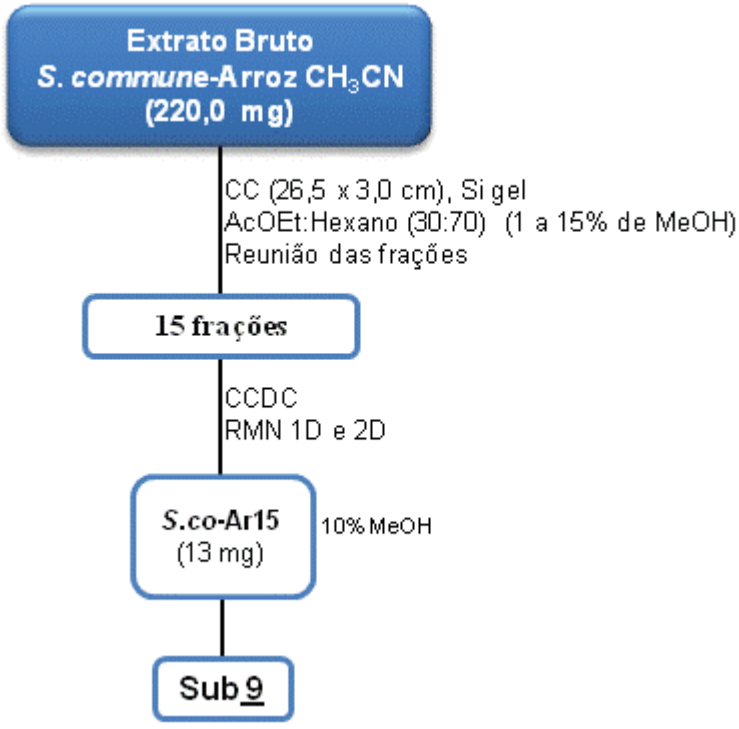


Figura 14. Fracionamento e obtenção das substâncias produzidas por *S. commune* em arroz (CH_3CN).

3.2.8 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos, frações e substâncias puras produzidas por S. commune

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

Os extratos brutos em pequena escala e o extrato em escala ampliada em MBD foram eluídos com $CHCl_3$:MeOH (88:12), exceto o extrato em arroz, milho e malte utilizou Hexano:AcOEt (70:30) em placas de sílica (CCDC) e nestas cromatoplacas foi nebulizado uma solução púrpura 0,2% de DPPH em metanol (SIMOES-PIRES et al., 2005). As placas cromatográficas foram observadas após meia hora de exposição à luz natural. O aparecimento de manchas brancas, evidencia a presença de substâncias com propriedades antioxidantes.

3.2.8.2 Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH

Adicionou-se nas microplacas de 96 poços: 200 μL de DPPH (4 mg mL^{-1} em MeOH) e 100 μL das amostras em 7 concentrações diferentes. Controle positivo: 200 μL de DPPH e 100 μL do antioxidante padrão (quercetina ou rutina). Controle negativo: 200 μL de DPPH e 100 μL de solvente. A microplaca foi mantida por 30 minutos sob ausência de luz. A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado pela leitura da absorbância em λ = 517 nm. (PAULETTI et al., 2003).

3.2.8.3 Avaliação da atividade antifúngica[1]

Os extratos brutos (40μg μL^{-1}) e as frações (20 μg μL^{-1}) foram eluídas em CCDC, sendo $CHCl_3$:MeOH (88:12) para os extratos brutos em meio líquido, Hexano:AcOEt (70:30) para os extratos em meios sólidos e para as frações e sub-frações $CHCl_3$:MeOH (85:15). As cromatoplacas foram nebulizadas com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de $5x10^7$ esporos mL^{-1}, em solução de glicose e sais). As placas foram incubadas a 25º C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (1 μg).

3.2.8.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica[1]

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos (20µg 1µL^{-1}), das frações (10µg 1µL^{-1}) e das substâncias puras (50 µg µL^{-1}) em placas de sílica gel com eluentes adequados. Nestas cromatoplacas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, em seguida foram incubadas em câmera úmida fechada a 37ºC por 20 minutos e após este período borrifou-se uma solução C[2]. Como padrão positivo utilizou-se o composto fisostigmina a 0,05 µg mL^{-1} (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

[1]Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.
[2]Solução C contém 10 mL da solução A e 40 mL da solução B. Solução A: 250mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada.

3.2.8.5 Avaliação da atividade tripanocida[3]

Neste ensaio foi utilizado cepas Y na forma epimastigota de *T. cruzi*, sendo estas cultivadas em meio de triptose (LIT) suplementado com 10% de soro bovino fetal a 28°C. Dissolveu-se os extratos e as frações em DMSO e posteriormente foram adicionados em placa de cultura de tecidos (TPP) de 96 poços em diferentes concentrações. *T. cruzi* (1x10^7 parasitas mL^{-1}) foi adicionado em cada cavidade e a mesma quantidade de meio LIT foi adicionado em poços controles, mantendo-se as placas a 28 °C por 72h. Posteriormente adicionou-se em cada poço 10 µL de uma solução MTT-PMS (3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol bromide) 2,5 mg mL^{-1} e as placas foram incubadas por 75 min sob ausência de luz a 28°C. Adicionou-se à solução anterior uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (100 µL) e estas foram mantidas em temperatura ambiente sob ausência de luz por 30 min. Ao final do período, as leituras foram obtidas em termos de absorbância em 595 nm. Os valores de IC_{50} das amostras e do controle positivo (benzonidazol) foram determinados.

[3]Ensaio biológico realizado pela Dr[a]. Regina Cicarelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, SP.

3.2.8.6 Avaliação da atividade antifúngica humana[4]

Este ensaio foi realizado no Departamento de Análises Clínicas/Laboratório de Micologia Clínica, UNESP-Araraquara, sob supervisão da Dra. Maria José M. Giannini. Avaliou-se os extratos brutos e as frações contra os fungos *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. A atividade antifúngica foi ensaiada seguindo a metodologia descrita no documento M27-A2 do

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com algumas modificações. O meio utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina e ácido morfolinopropanosulfônico 0,165 M (pH: 7,0) acrescido com 2% glicose.

As amostras foram preparadas em DMSO a 250 μg mL^{-1}. A suspensão das células foram preparadas em solução salina 0,85% e inoculadas em placa de microtubos previamente acrescida com as amostras diluídas entre 250 μg mL^{-1}e 0,48 μg mL^{-1}. As placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24 h para o gênero *Cândida* e 48 h para o gênero *Cryptococcus*. Os controles positivos utilizados foram as drogas antifúngicas anfotericina B e fluconazol e calculadas quanto a sua potência segundo os documentos do CLSI.

[4]Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria José Soares Mendes Giannini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, SP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos em meios de cultura líquidos e sólidos (peq. escala) de *S. commune*

Com o objetivo de verificar a produção de diferentes metabólitos secundários por *S. commune*, em diferentes meios de cultivo, foram selecionados cinco meios líquidos comerciais e dois meios sólidos (arroz e milho). De acordo com a definição da literatura o meio líquido Czapek é classificado como "quimicamente definido", e os outros meios (Nutrient, MBD, YM, Extrato de Malte, Arroz e Milho) podem ser classificados como "complexos". Os extratos brutos obtidos conforme a metodologia (3.2.2) foram submetidos às análises em CLAE-$DAD_{analítico}$ e RMN de ^{1}H.

4.1.1 Perfil Cromatagráfico dos extratos brutos (peq. escala) em CLAE-DAD

Os cromatogramas dos extratos brutos em pequena escala em MBD (49,2 mg) (Figura 15), YM (54,0 mg) (Figura 16), Nutrient (26,7 mg) (Figura 17), Czapek (26,5 mg) (Figura 18) e Ext. Malte (38,2 mg) (Figura 19), utilizando gradiente exploratório (CLAE-DAD) apresentaram além de picos com diferentes absorbâncias, vários picos com polaridades variando de média a alta, e boa resolução cromatográfica. Analisou-se os cromatogramas do extrato bruto em arroz CH_3CN (279,7 mg) (Figura 20) e milho CH_3CN (335,1 mg) (Figura 21) e constatou-se a presença de inúmeros picos variando de baixa a alta polaridade, com absorbâncias e tempos de retenção distintos dos cromatogramas dos demais meios comerciais líquidos, sugerindo a produção de metabólitos secundários diferentes. Pode-se observar a variação metabólica dos diferentes meios de cultivo em λ = 254 nm (Figura 22), no qual os e extratos brutos apresentam uma quantidade significativa de picos por todo o cromatograma.

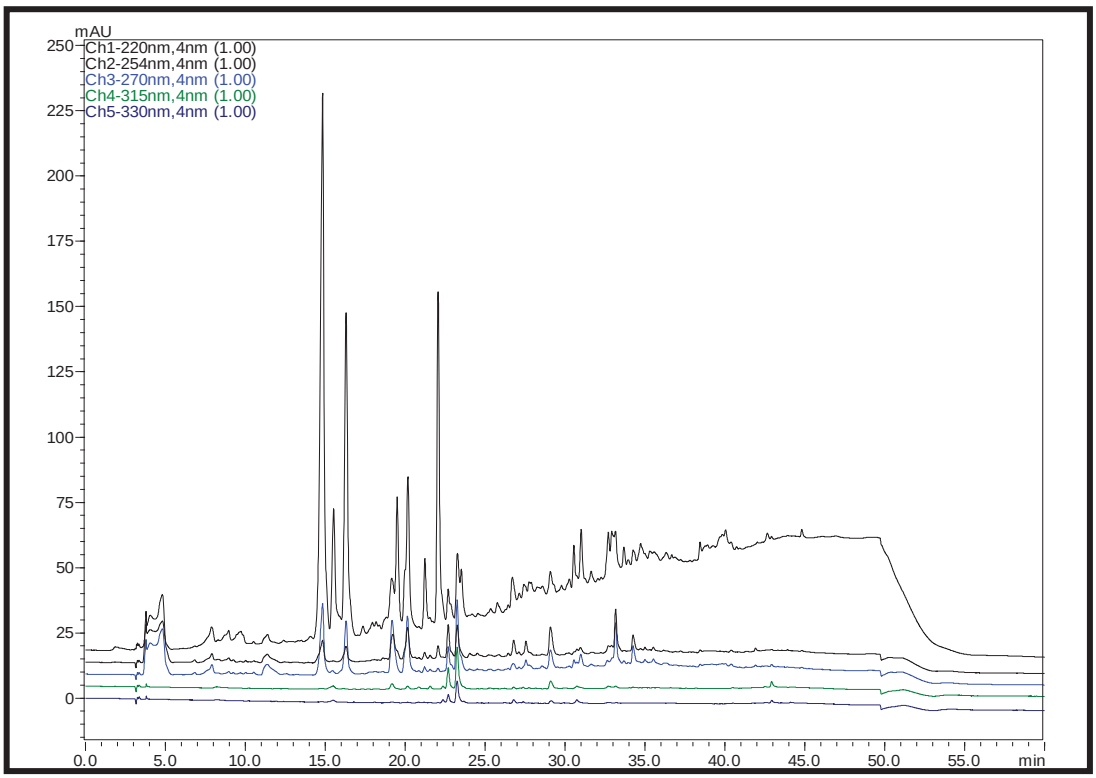


Figura 15. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em MBD (peq. escala).

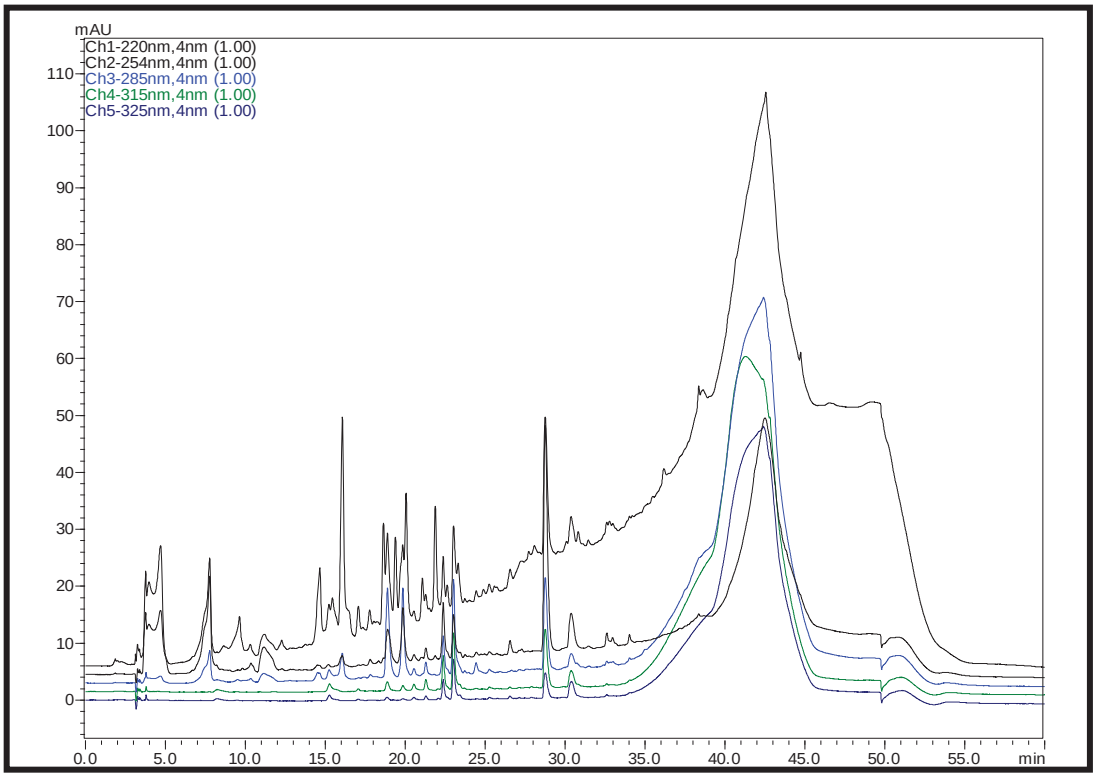


Figura 16. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em YM (peq. escala).

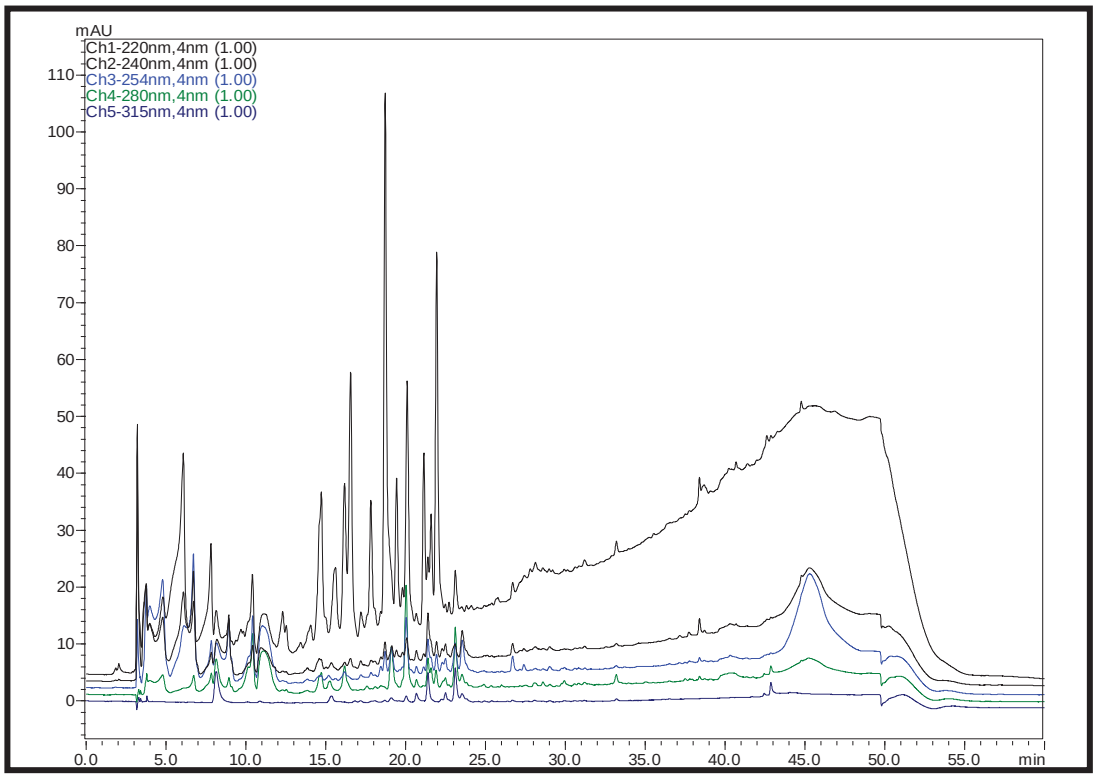


Figura 17. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Nutrient (peq. escala).

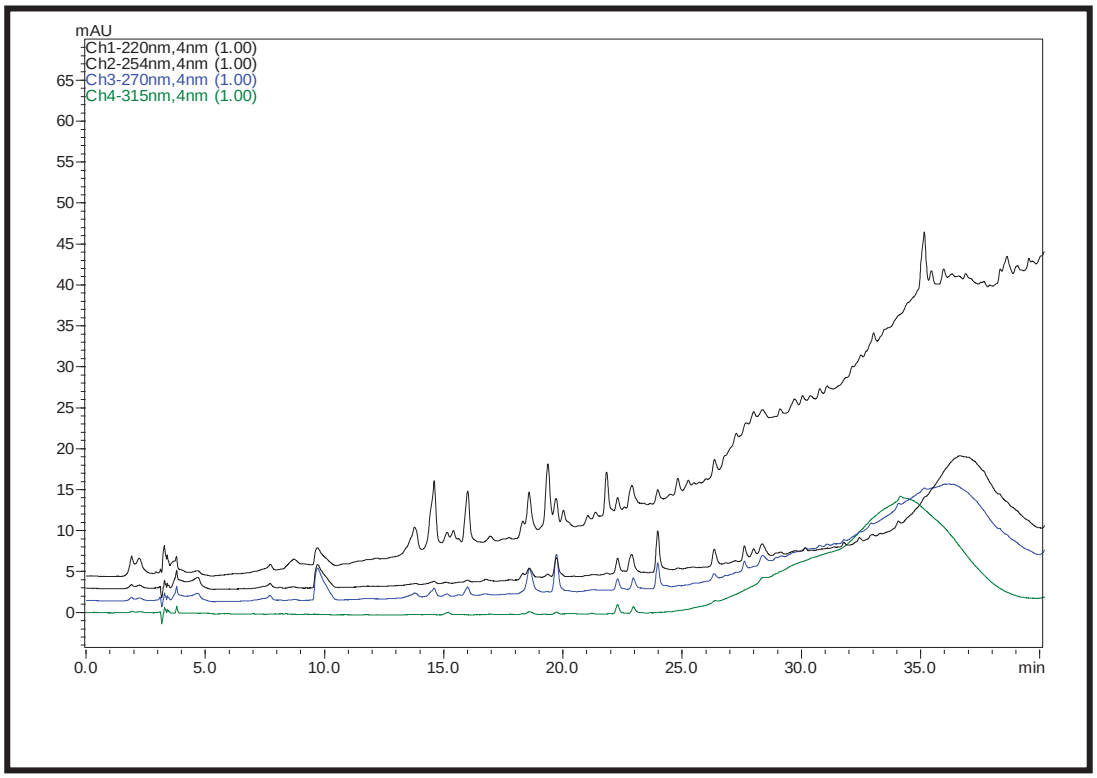


Figura 18. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Czapek (peq. escala).

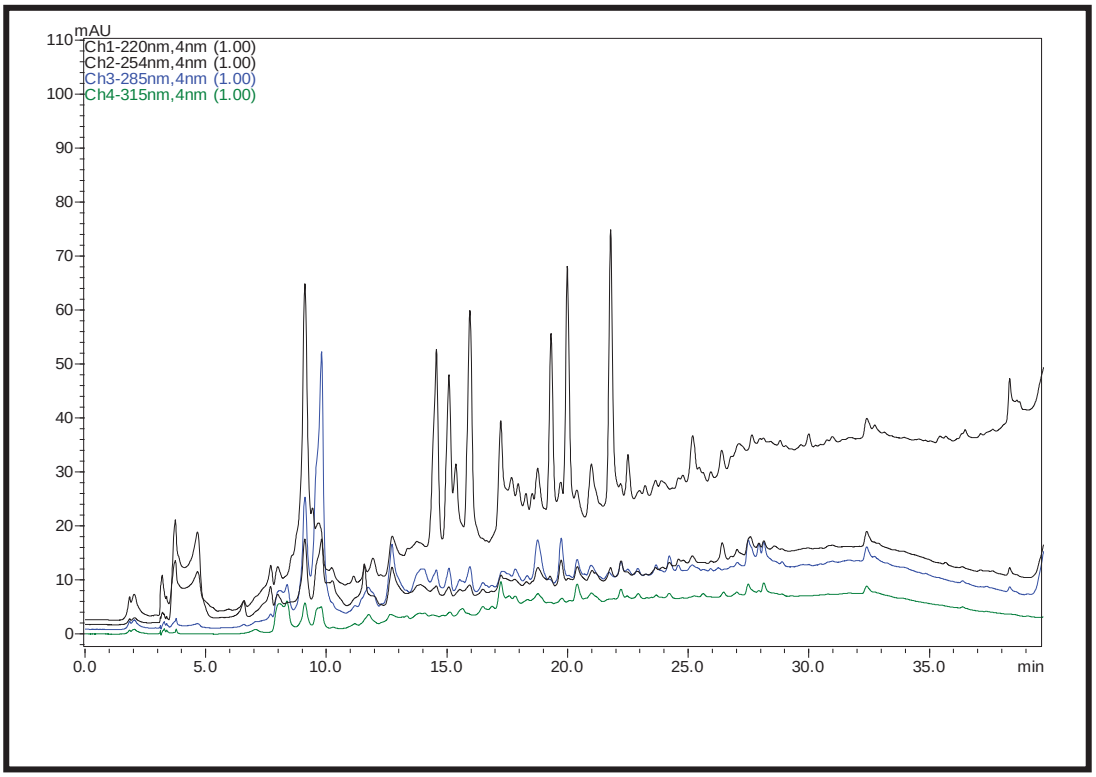


Figura 19. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Malte (peq. escala).

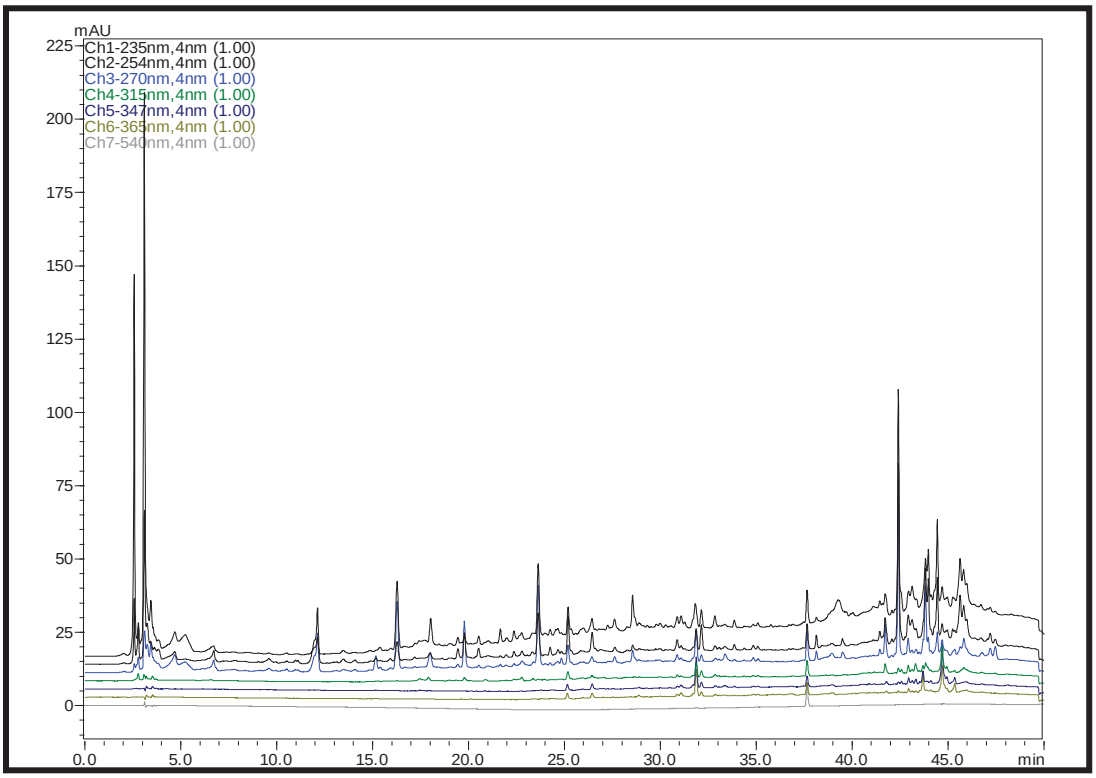


Figura 20. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Arroz CH_3CN (peq. escala).

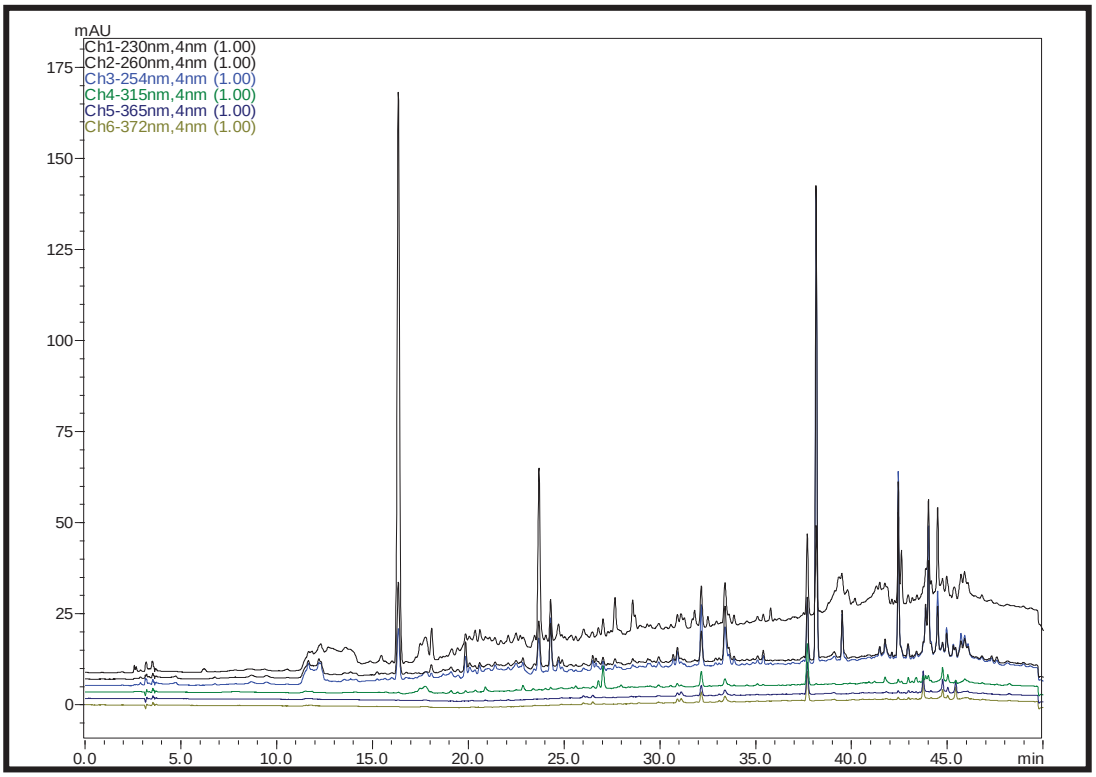


Figura 21. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em Milho CH_3CN (peq. escala)

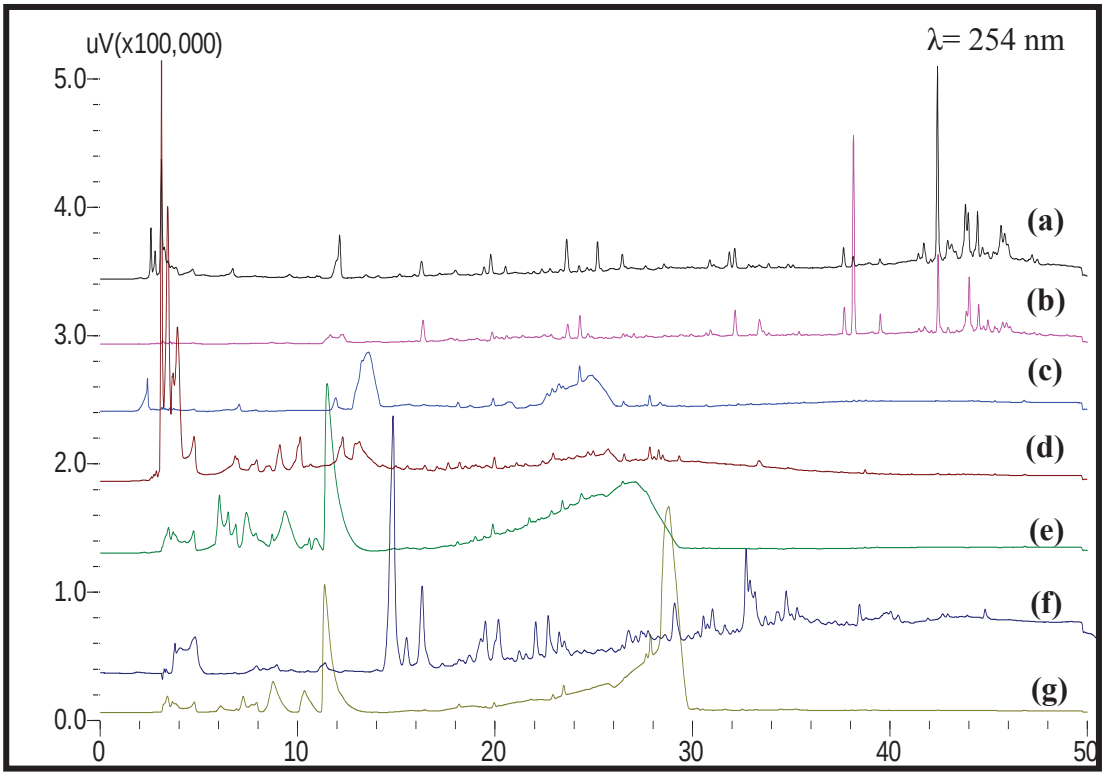


Figura 22. Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos de *S. commune* em diferentes meios de cultivo (peq. escala) (a) Arroz CH_3CN; (b) Milho CH_3CN; (c) Czapek; (d) Ext. Malte; (e) Nutrient; (f) MBD e (g) YM.

4.1.2 Perfil químico dos extratos brutos (peq. escala) em RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29) destes extratos brutos corroboraram com a análise em CLAE-DAD, evidenciando sinais de δ_H 0,8 até aproximadamente δ_H 8,0 e apresentando hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Observou-se também, uma região complexa de aromáticos, sugerindo várias classes de substâncias aromáticas e evidenciando a diversidade metabólica destes extratos.

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

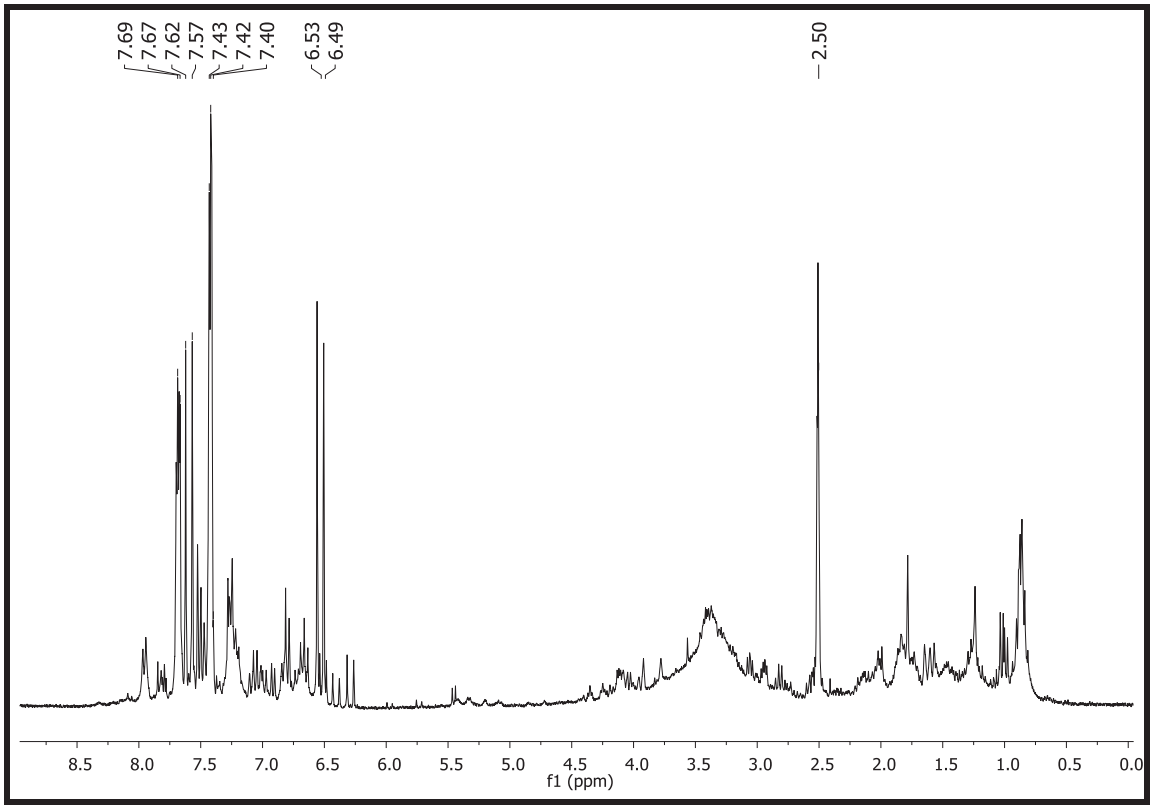


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *S. commune* em MBD peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

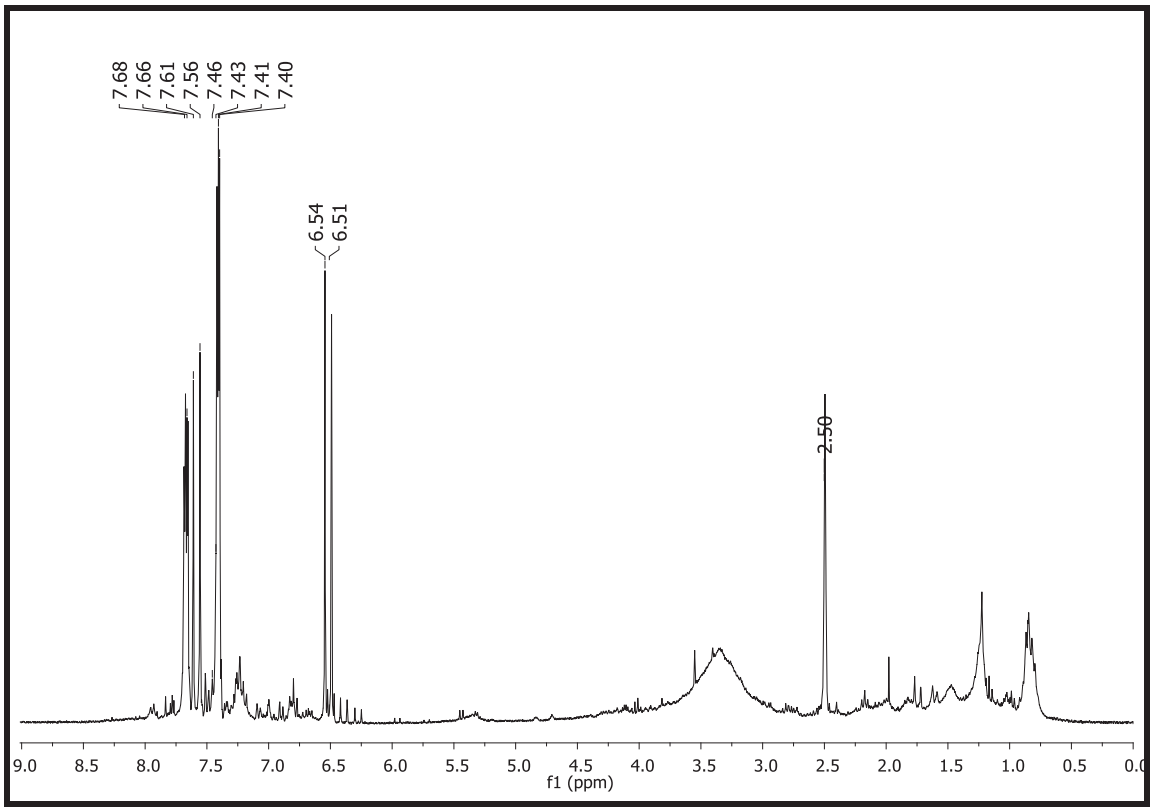


Figura 24. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em YM peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

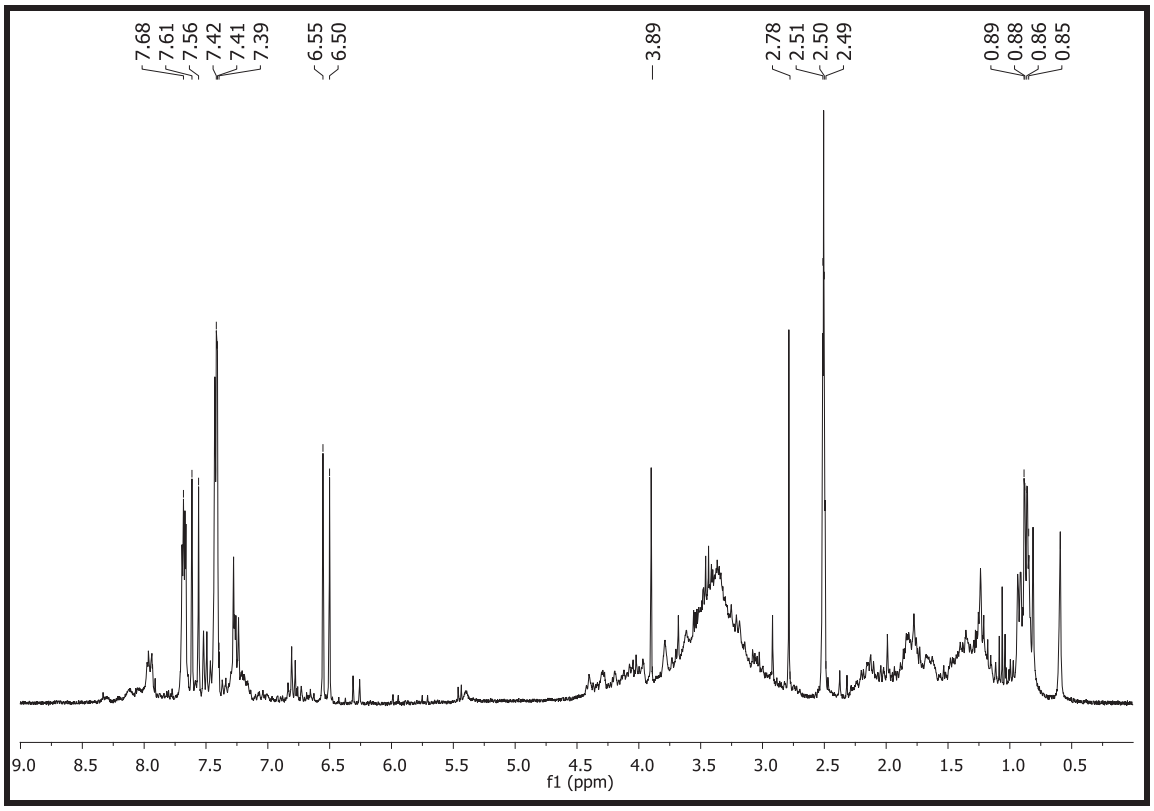


Figura 25. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em Nutrient peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

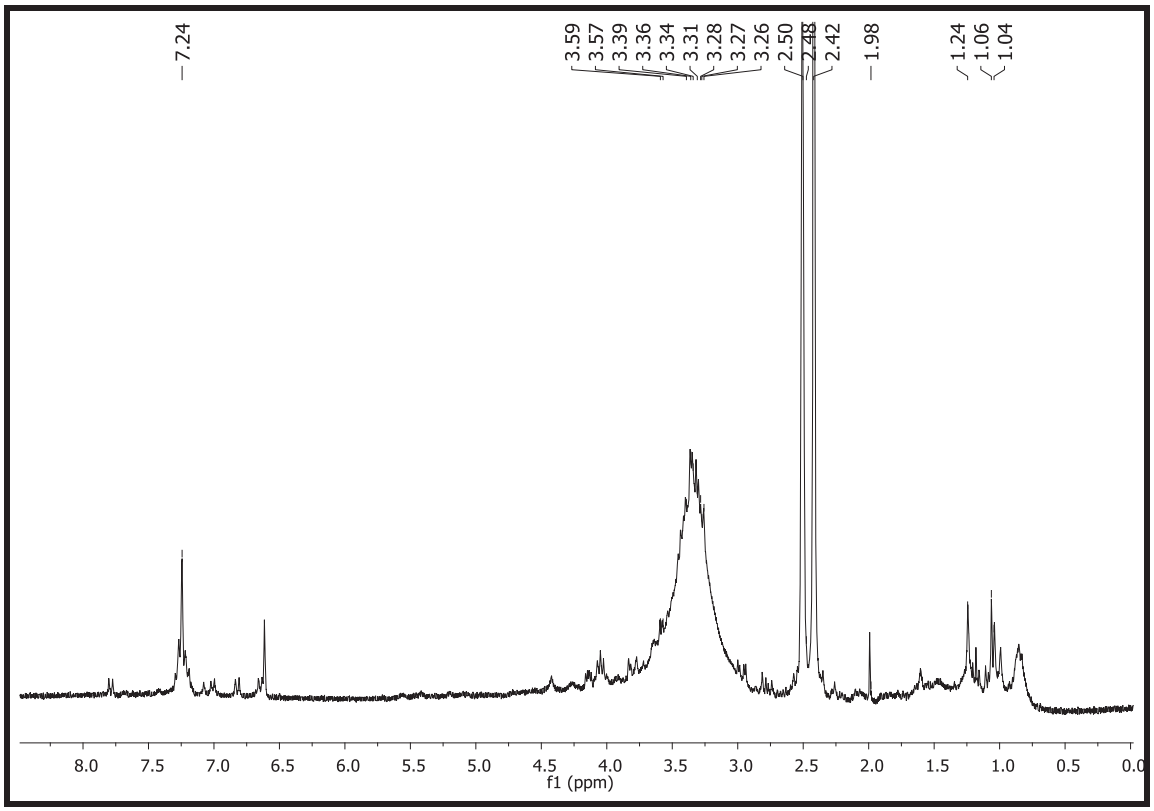


Figura 26. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em Czapek peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

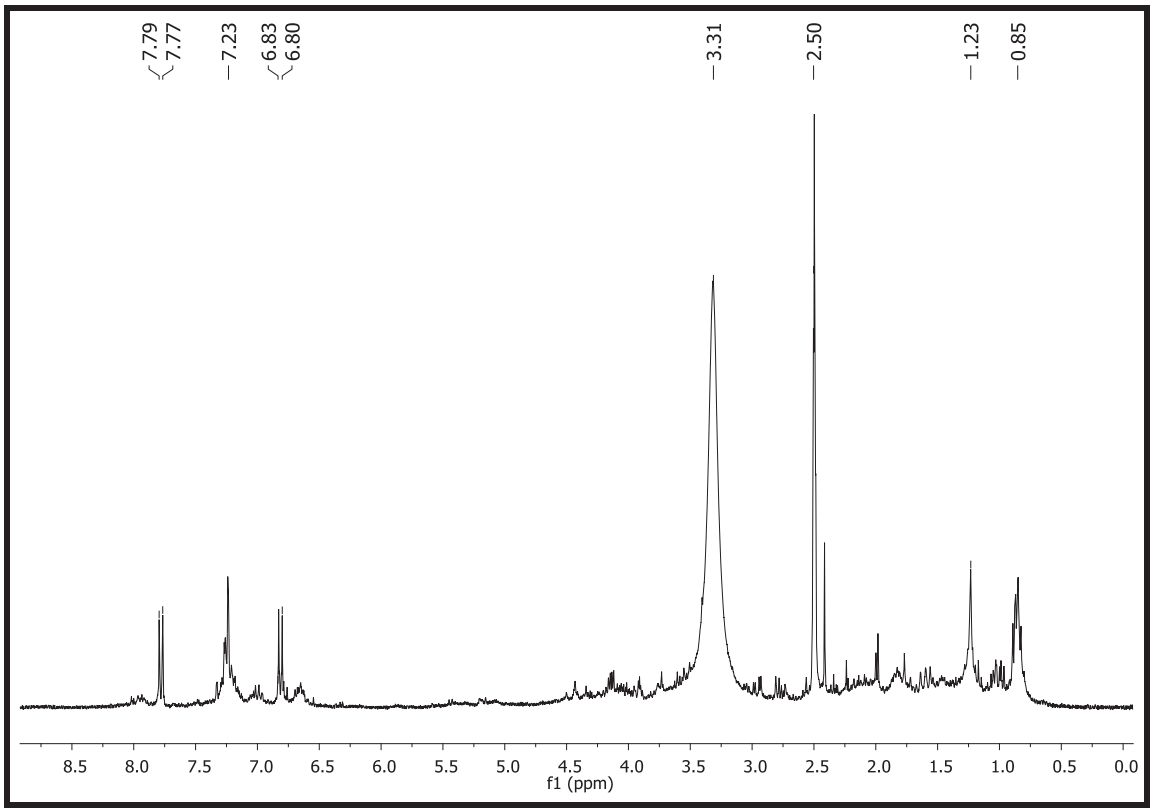


Figura 27. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em Ext. Malte peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

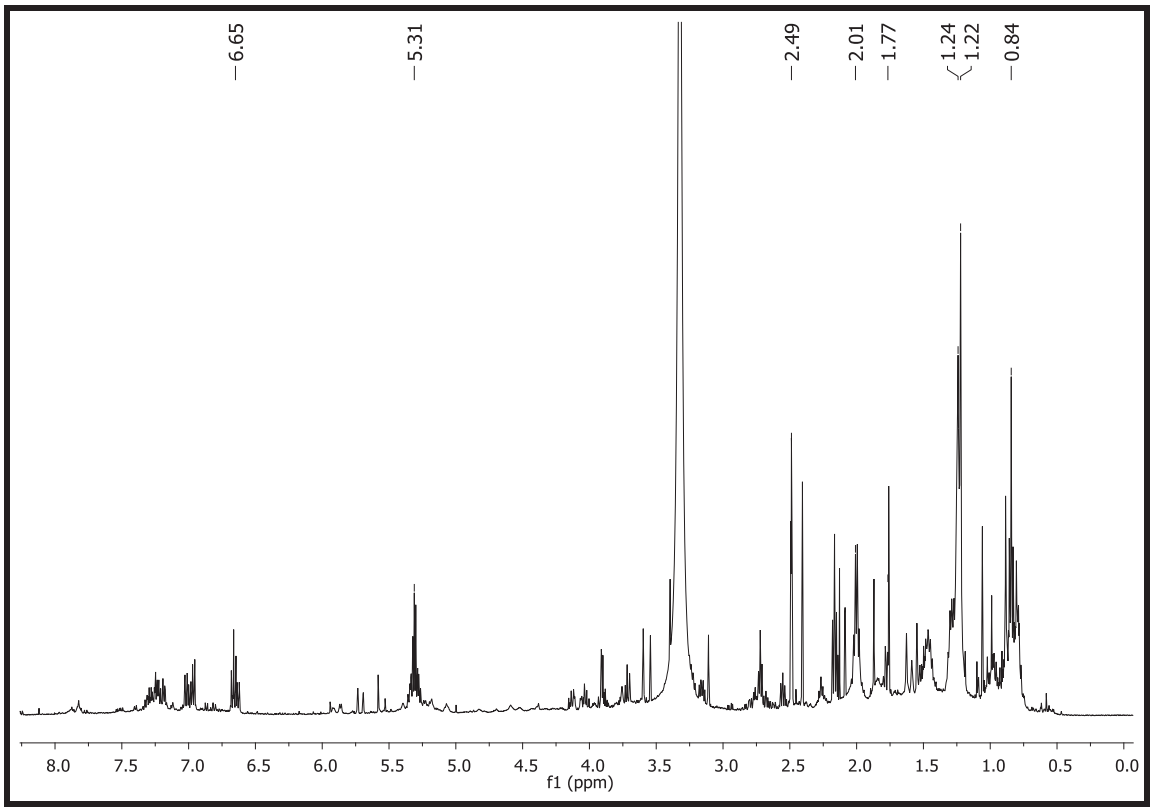


Figura 28. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em Arroz CH_3CN peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

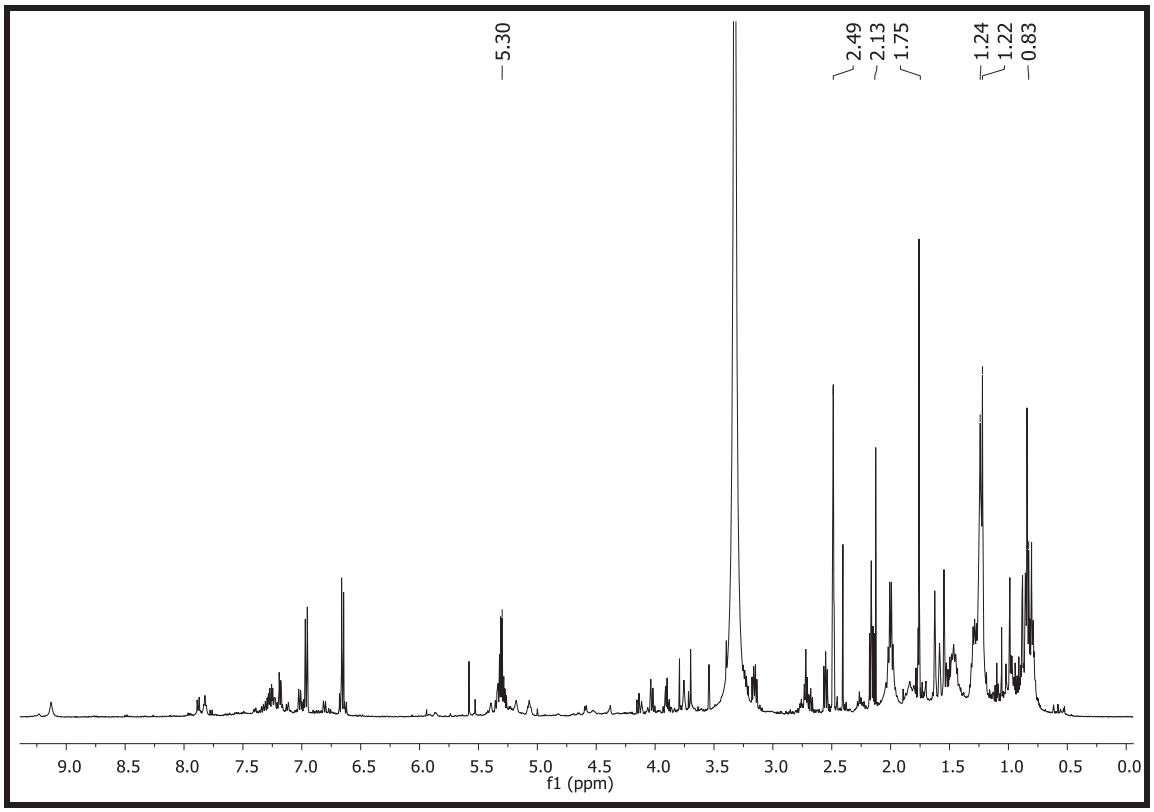


Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em Milho CH_3CN peq. escala (DMSO-d_6, 300 MHz).

4.2 Avaliação do perfil químico do extrato bruto de *S. commune* em MBD em escala ampliada (Ext. MBD)

O meio de cultivo MBD foi selecionado para o crescimento do fungo endofitico *S. commune* em escala ampliada, pois o extrato bruto (peq. escala) em MBD já havia sido submetido a ensaios biológicos pelo Dr. Geraldo H. Silva (Instituto de Química de Araraquara) e pela Dra. Dra. Flávia C. M. Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP), evidenciando ser um prolífico produtor de metabólitos bioativos.

Após a obtenção do extrato bruto em MBD (960,0 mg), este foi submetido à análise em CLAE-DAD, e o cromatograma (Figura 30) em diferentes comprimentos de onda apresentaram inúmeros picos com intensidades e polaridades variando de média a alta, reproduzindo o observado para o cultivo em pequena escala.

Uma análise minuciosa de todos os cromatogramas do extrato bruto em MBD, em diferentes comprimentos de onda, utilizando o software LC- Solution permitiu selecionar o λ= 315 nm (Figura 31) para estabelecer condições de gradientes de eluição para o desenvolvimento da CC utilizando C-18.

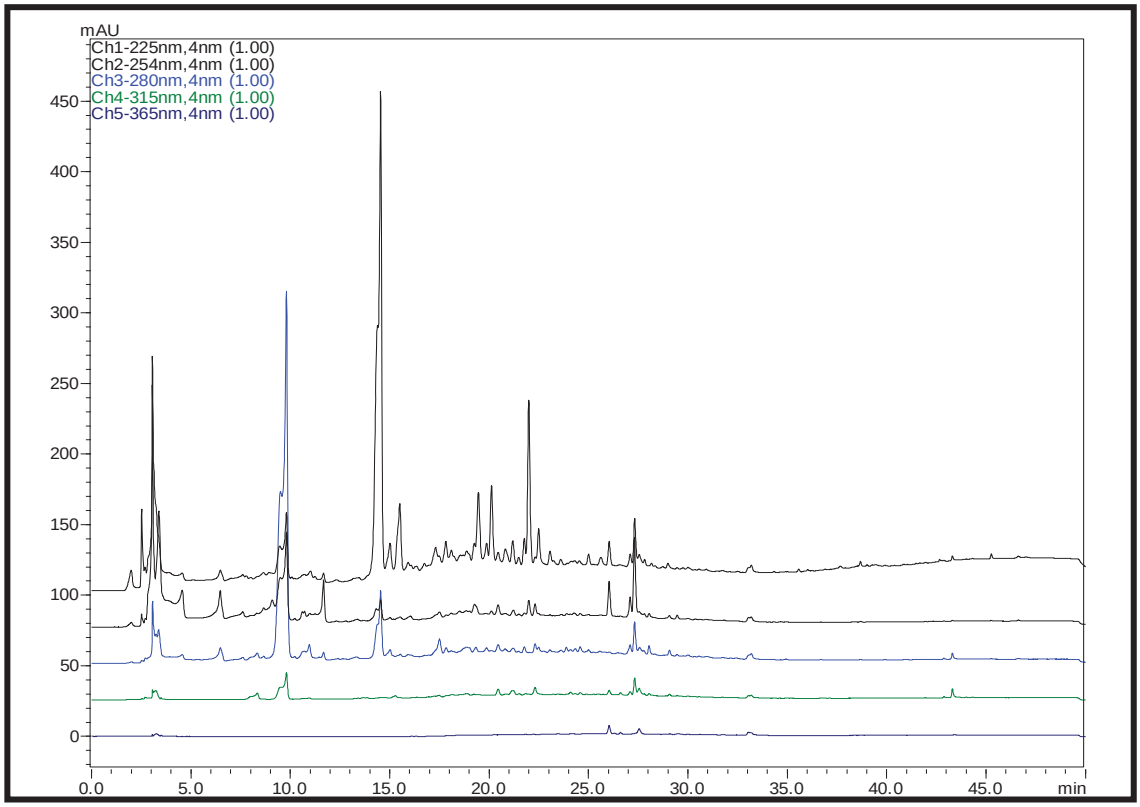


Figura 30. Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto de *S. commune* em MBD (escala ampliada).

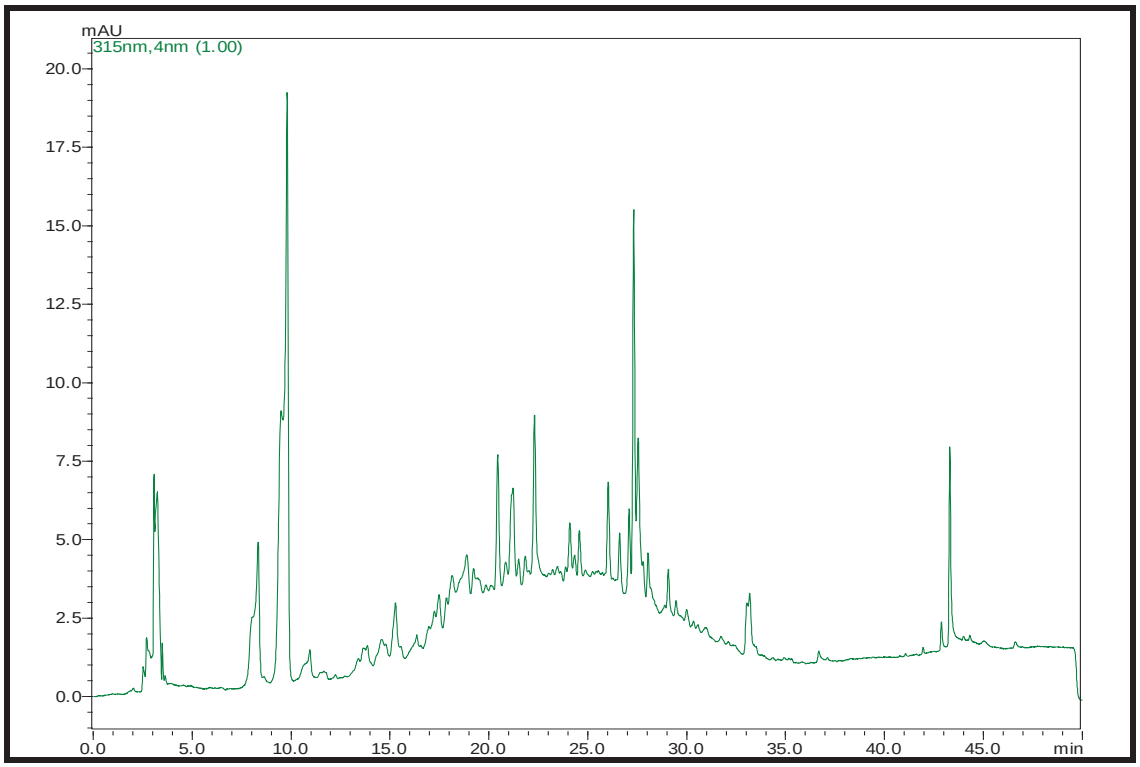


Figura 31. Cromatograma em gradiente exploratório do Ext. MBD em λ = 315 nm.

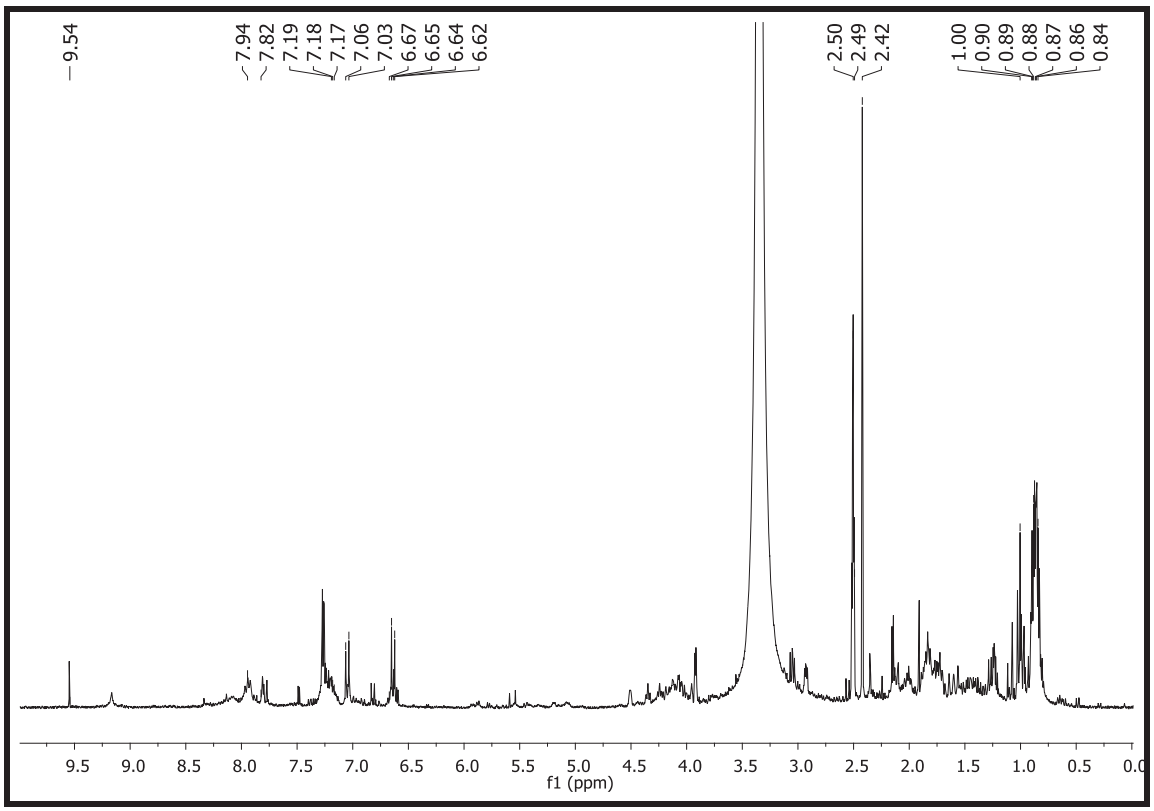


Figura 32. Espectro de RMN de ^{1}H do extrato bruto de *S. commune* em MBD escala ampliada (DMSO-d_6, 300 MHz).

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 32) obtido do extrato bruto de *S. commune* em MBD escala ampliada observou-se sinais que são comuns quando comparado ao crescimento em MBD pequena escala (Figura 23, p. 62), porém detectou-se uma variação na intensidade dos sinais. Os espectros de RMN de ^{1}H apresentaram sinais por toda faixa espectral variando de δ_H 0,8 a δ_H 10,0, evidenciando um extrato promissor na produção de metabólitos secundários.

4.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *S. commune*

O estudo químico dos extratos produzidos pelo endófito *S. commune* resultou na identificação de 9 compostos: *ciclo*(L-Pro-L-Val) (**1**), uracila (**2**) *ciclo*(Pro-Tyr) (**3**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**4**), *Rel.ciclo*(Pro-Phe) (**5**), *Rel.ciclo*(Pro-Ile) (**6**), ácido *trans*-cinâmico (**7**), N-(4-hidroxifeniletil) acetamida (**8**) e a N-(2-feniletil) acetamida (**9**) (Figura 33). As substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6** são provenientes dos fracionamentos do extrato bruto em escala ampliada em MBD. A substância **7** foi identificada no extrato bruto em YM (peq. escala) e **8** e **9** foram isoladas dos fracionamentos dos extratos brutos em Milho e Arroz (peq. escala).

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

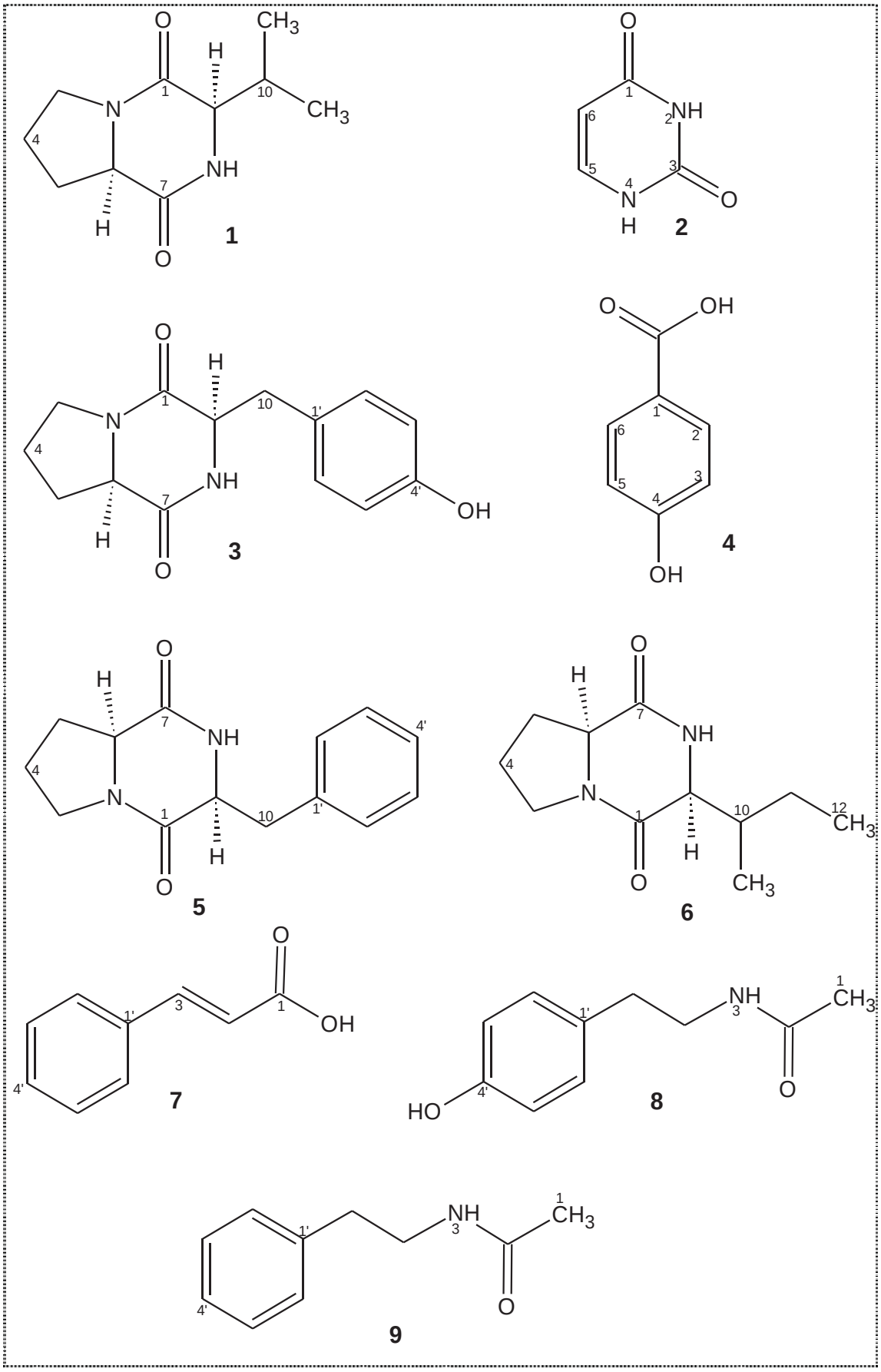


Figura 33. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *S. commune.*

4.3.1 Identificação estrutural da substância **1**

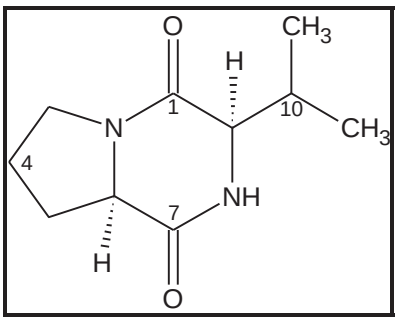


Figura 34. Estrutura da substância **1** (*ciclo*(L-Pro-L-Val)).

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H (Figura 36) e ^{13}C (Figura 37) permitiu detectar a presença de hidrogênios em δ_H 4,11 (*t; J*=7,0 Hz; δ_C 58,2), δ_H 3,91 (*sl*; δ_C 59,4), e de duas carbonilas em δ_C 165,2 e δ_C 170,2, que são sinais característicos de anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou três sinais na forma de multipletos (δ3,38/3,35;1,75/1,88 e 2,11/2,15) referentes aos hidrogênios metilênicos (H-3, H-4 e H-5), confirmado pelas correlações em *g*COSY (Figura 40). Estes dados indicaram a presença de resíduo do aminoácido Prolina na estrutura (FDHILA et al., 2003).

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou dois dubletos em δ_H 0,85 (*d*, 3H, J=6,5Hz) e δ_H 1,01 (*d*, 3H, J=7,0Hz) e um multipleto em δ_H 2,34 (*m*, 1H) que foram atribuídos aos hidrogênios H-11, H-12 e H-10, respectivamente. No espectro de *g*COSY foram observadas correlações entre os hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) com o hidrogênio metínico δ_H 2,34 (H-10, δ_C 27,7), evidenciando uma unidade isopropila e indicando o aminoácido Valina como uma das unidades da substância **1**.

A ausência de correlação em *g*HMQC (Figura 38) para o sinal em δ_H 7,93 sugeriu tratar-se de um N-H. As correlações a longa distância observadas em *g*HMBC (Figura 39) de δ_H 7,93 com os carbonos em $\delta_{C\text{-}6}$ 58,2 e $\delta_{C\text{-}1}$ 165,2, permitiram atribuir este sinal ao NH-8. As principais correlações de *g*HMBC e *g*COSY estão representadas na Figura 35. A substância submetida a análise por ESI-EM(+)20V no modo positivo, evidenciou a molécula protonada de *m/z* 197,08 $[M+H]^+$, e o principal fragmento foi *m/z* 169,17 $[M+H-28]^+$ (Figura 41). Análise detalhada de todos os dados espectroscópicos permitiu propor para a substância **1** uma dicetopiperazina constituída pelos aminoácidos Prolina (Pro) e Valina (Val). Comparando-se os dados espectroscópicos (Tabela 4) de **1** com a literatura (FDHILA, et al., 2003; TAKAYA et

al., 2007) confirmou-se a substância proposta como sendo a *ciclo*(L-Pro-L-Val). A configuração absoluta de **1** foi atribuída comparando-se o valor de $[\alpha]_D$ – 157,47º (*c* 0,16, MeOH, T= 25,7 °C) obtido com a literatura (TAKAYA et al., 2007). O cromatograma e as curvas de UV (Figura 42 e 43) da substância **1** estão compatíveis com a estrutura da *ciclo*(L-Pro-L-Val).

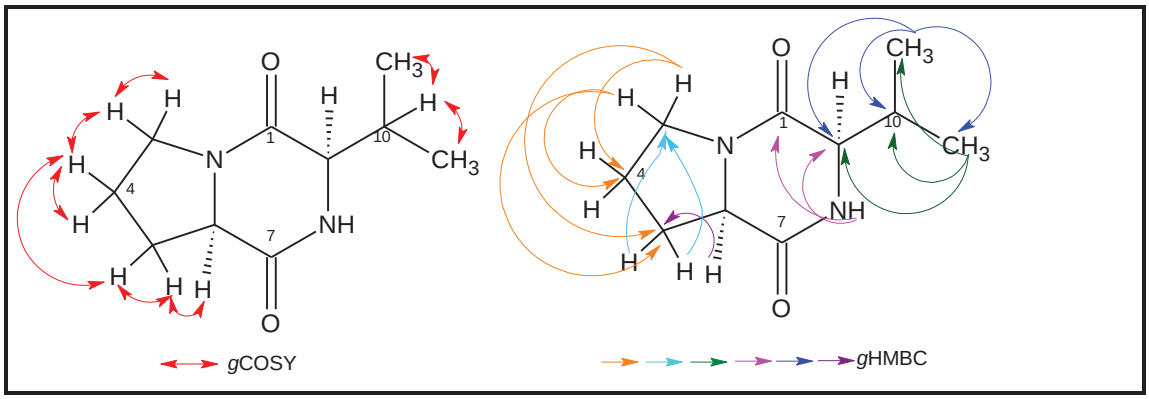


Figura 35. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **1**.

Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **1** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	165,2
3	3,38/3,35 (m)	44,6
4	1,75/1,88 (m)	22,0
5	2,11/2,15 (m)	27,8
6	4,11 (t)	58,2
7	-	170,2
8	7,93	-
9	3,91 (*sl*)	59,4
10	2,34 (*dquint*; 2,5 e 7,0)	27,7
11	0,85 (*d*;6,5)	16,3
12	1,01(*d*;7,0)	18,3

Esta substância é descrita na literatura como fitotóxica e bioherbicida em potencial. Apresentou atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, atividade moderada contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (LEPTOKARYDIS, 2008) e atividade antioxidante (TAKAYA et al., 2007).

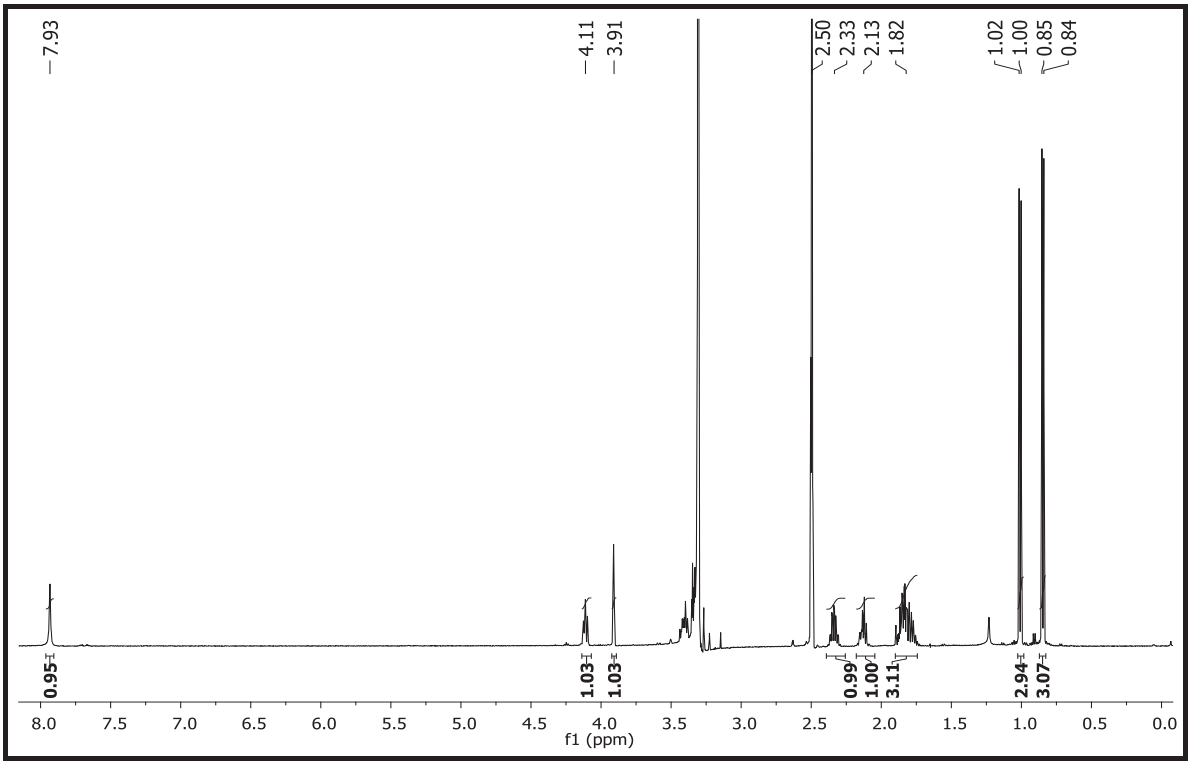


Figura 36. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz).

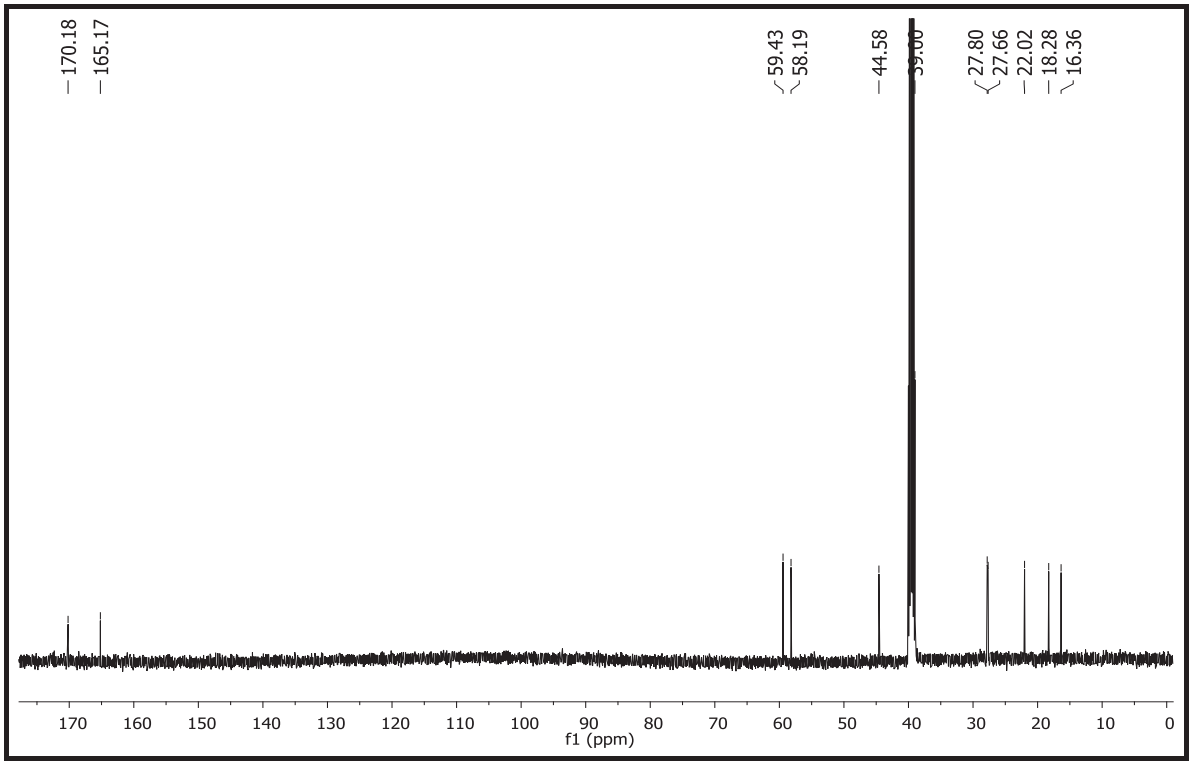


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz).

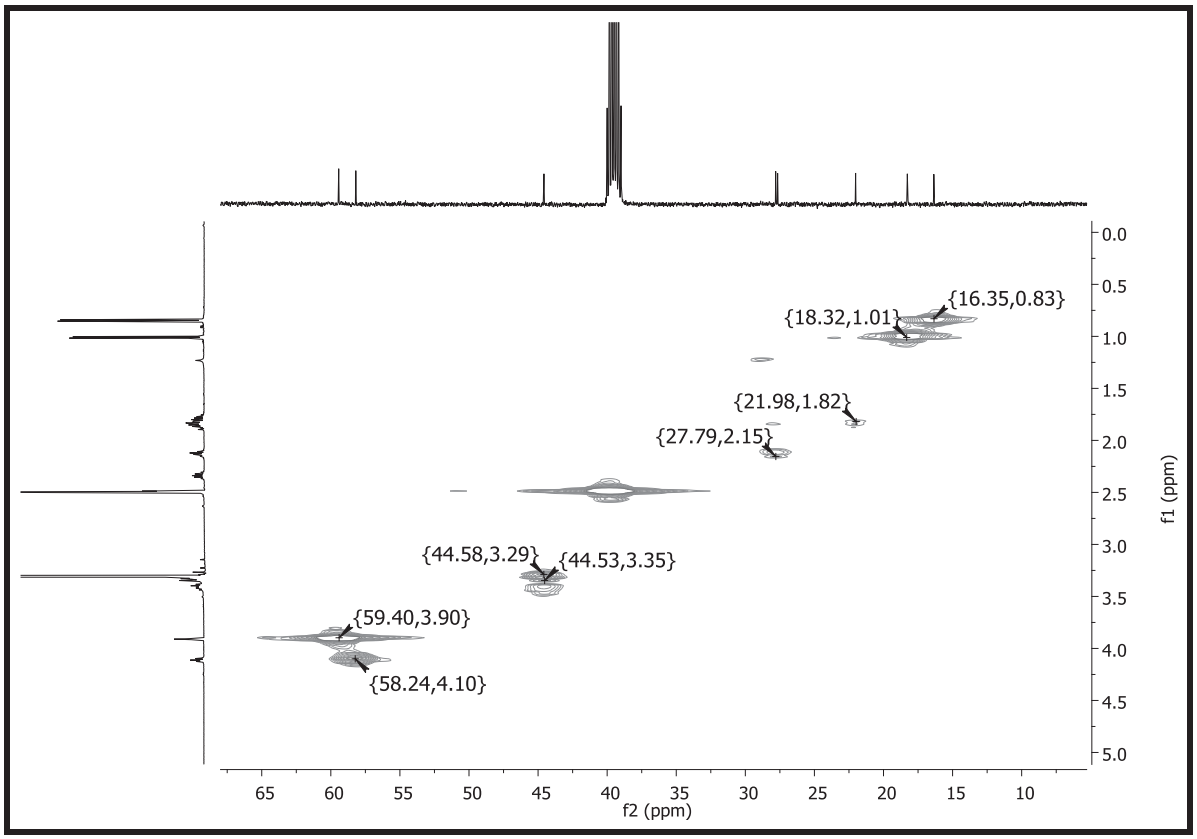


Figura 38. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz).

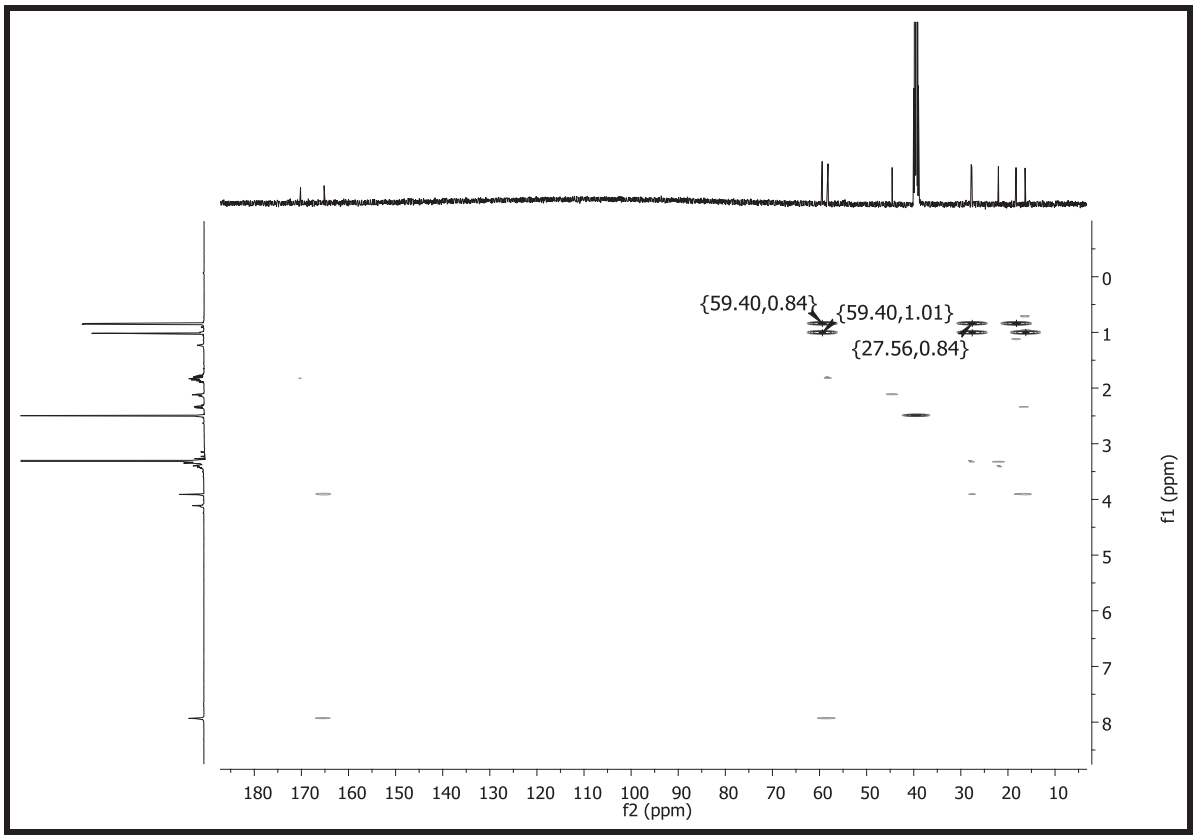


Figura 39. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz).

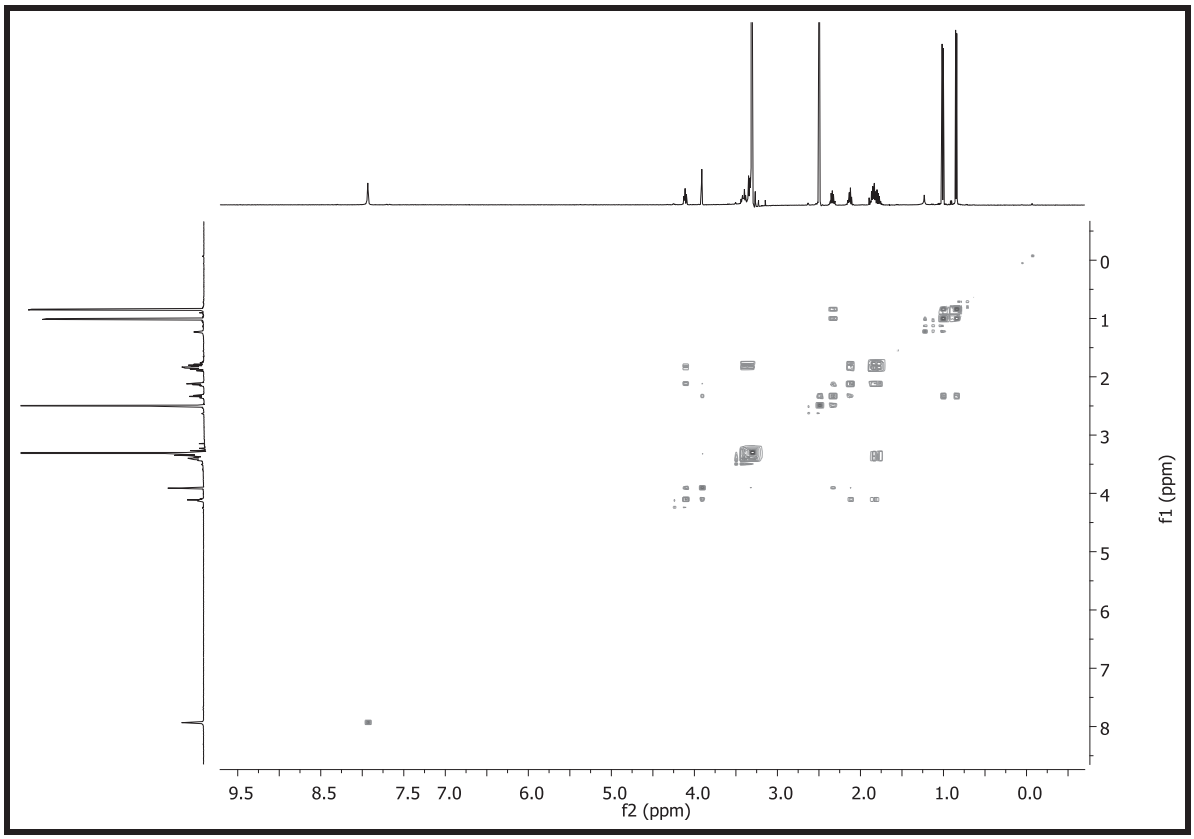


Figura 40. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **1** (DMSO-d_6, 500 MHz).

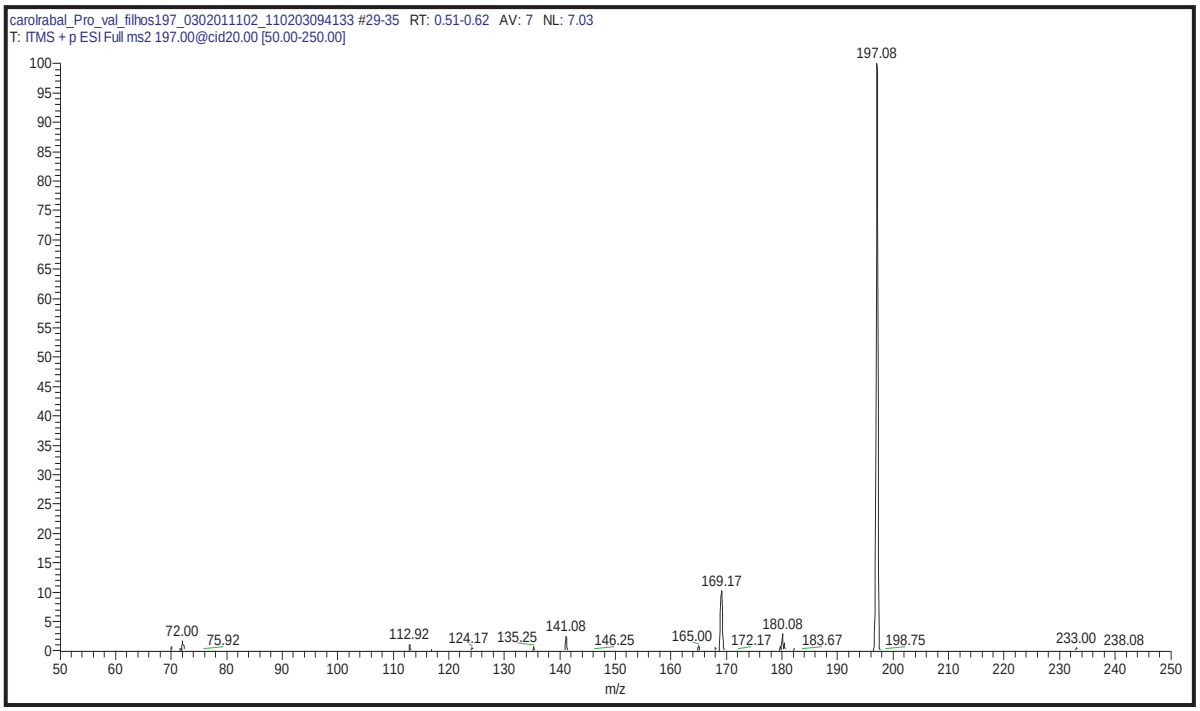


Figura 41. Fragmentação da substância **1**.

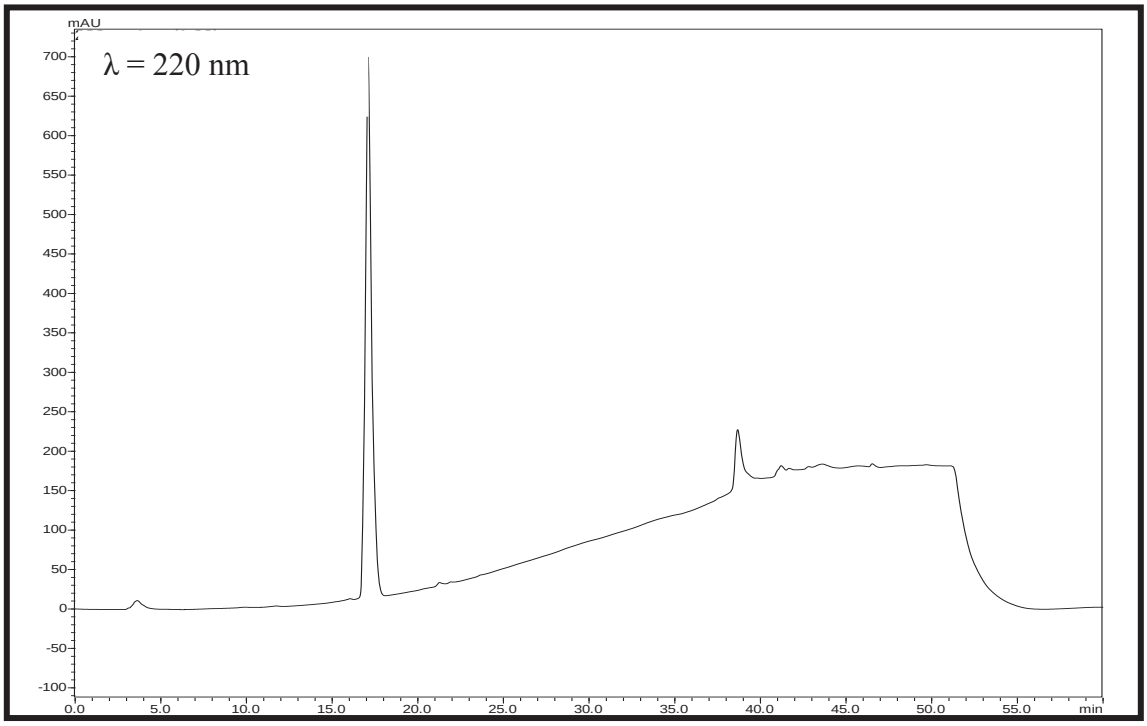


Figura 42. Cromatograma da substância **1**.

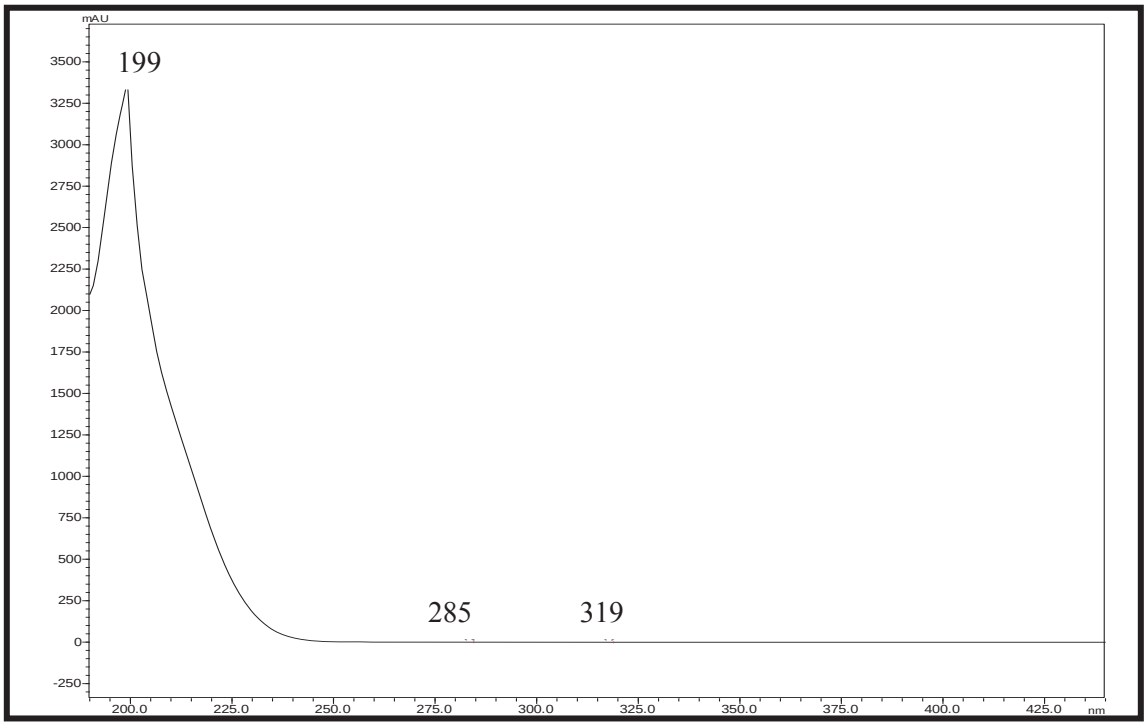


Figura 43. Curvas de UV da substância **1**.

4.3.2 Elucidação estrutural da substância **2**

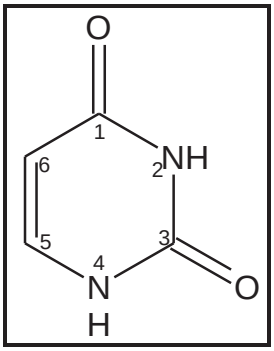


Figura 44. Estrutura da substância **2** (uracila).

A análise do espectro de RMN de ^{1}H de **2** (Figura 48), dos mapas de contorno dos experimentos bidimensionais *g*HMQC (Figura 49) e *g*HMBC (Figura 50) permitiu detectar a presença de hidrogênios em δ_H 5,43 (*d*, J=7,5 Hz, δ_C 100, 1H) e 7,36 (*d*, J=7,5 Hz, δ_C 142, 1H), sendo estes atribuídos a uma posição α e β de uma carbonila α,β-insaturada, com constantes de acoplamento característicos de uma ligação *cis*. Foram observados ainda sinais em δ_H 10,77 e 10,97 (*s*, 1H), atribuídos aos hidrogênios ligados a nitrogênios. As principais correlações de *g*HMBC estão representadas na Figura 45.

O cromatograma e as curvas de UV (Figura 46 e Figura 47) da substância **2** estão compatíveis com a estrutura da uracila.

A comparação desses valores com os descritos na literatura (MARINHO; MARINHO; FILHO, 2007), permitiram identificar a substância **2** como a uracila (Figura 44).

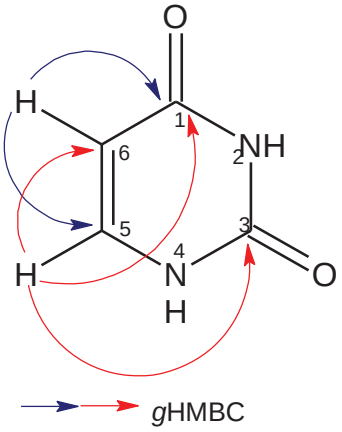


Figura 45. Principais correlações de *g*HMBC da substância **2**.

Tabela 5. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **2** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC
1	-	164
2	10,77 (s)	-
3	-	151
4	10,97 (s)	-
5	7,36 (d;7,5)	142
6	5,43 (d;7,5)	100

A uracila e seus derivados, componentes do material genético, desempenham um papel fundamental em processos biológicos. A importância da uracila tem sido reportada por inúmeras publicações. Há interesse na bioquímica e na farmacologia da uracila 5-substituída. Como exemplo, 5-fluoruracila é utilizado no tratamento de tumores de cabeça, pescoço e mama e exibe também atividade antibacteriana (PALAFOX et al., 2010).

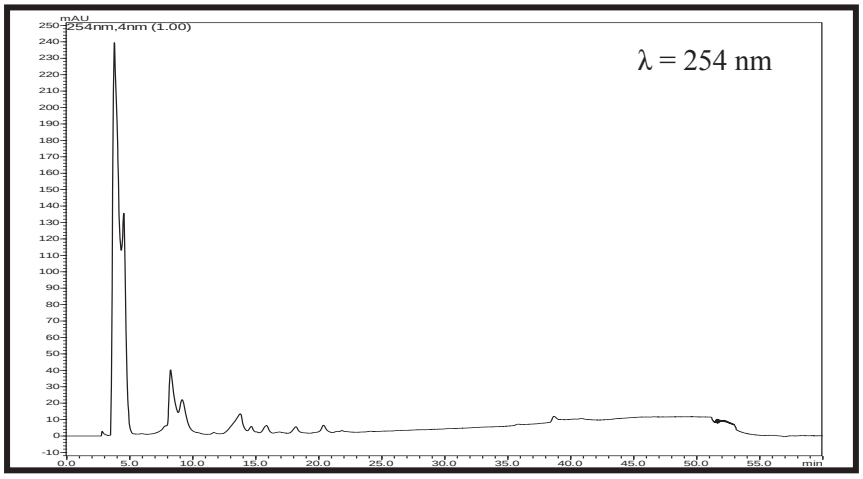


Figura 46. Cromatograma da substância **2**.

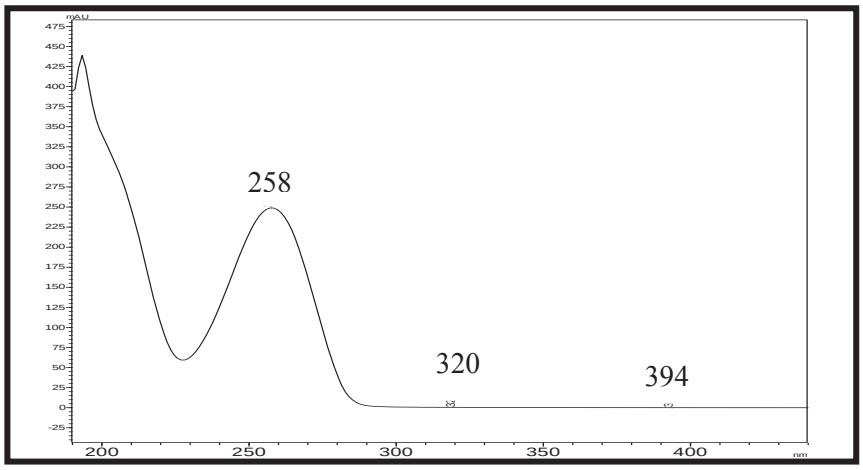


Figura 47. Curvas de UV da substância **2**.

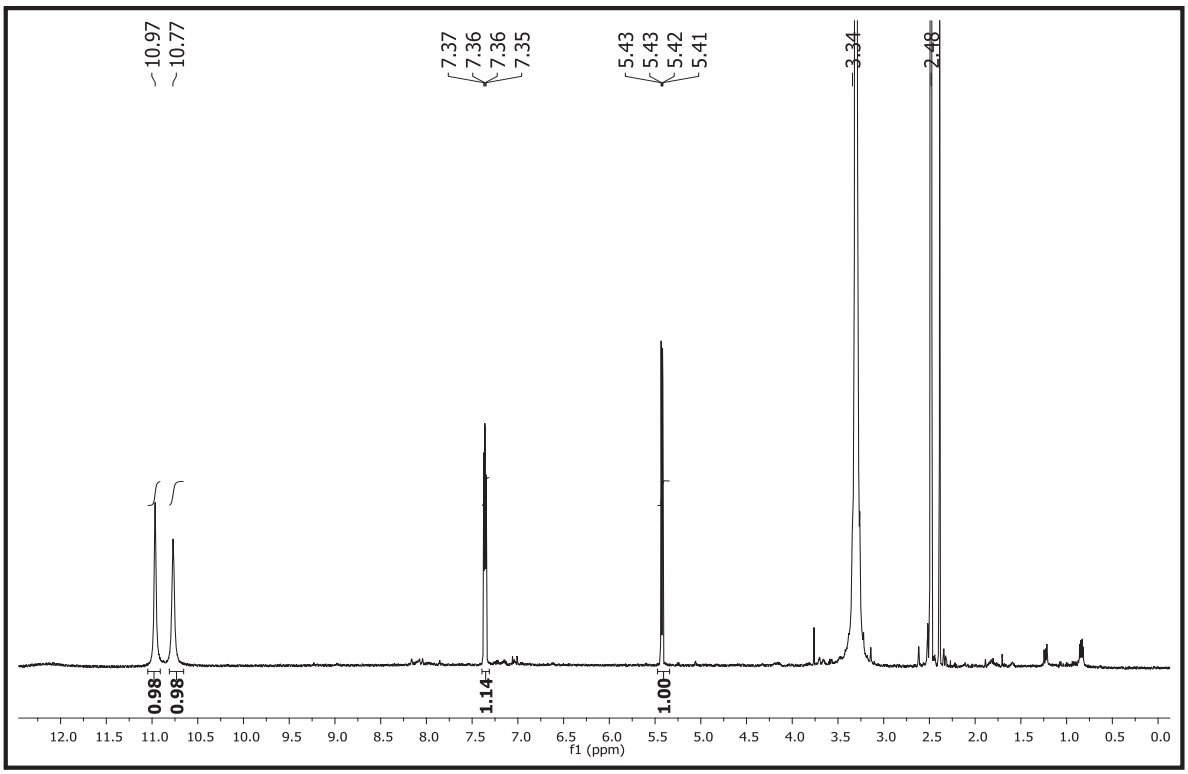


Figura 48. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (DMSO-d_6, 500 MHz).

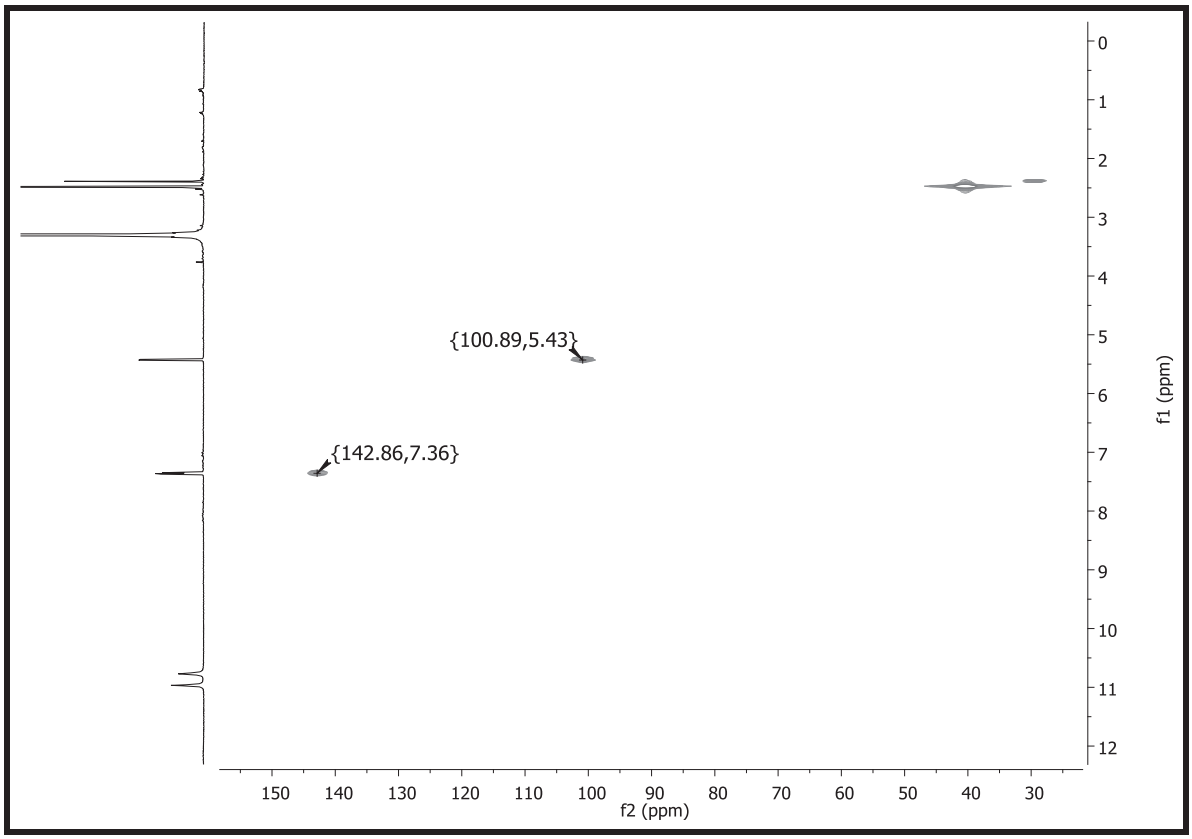


Figura 49. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **2** (DMSO-d_6, 500 MHz).

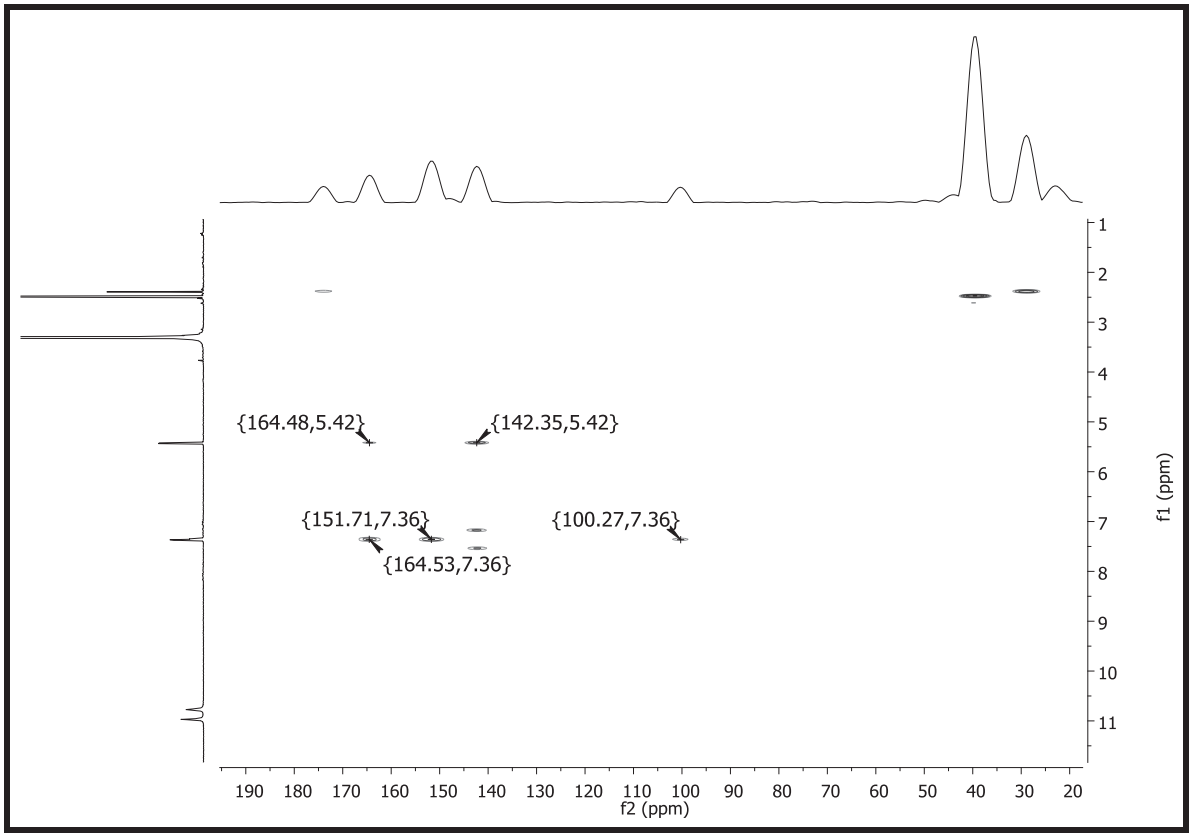


Figura 50. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **2** (DMSO-d_6, 500 MHz).

*4.3.3 Identificação estrutural das substâncias **3** e **4***

As substâncias **3** e **4** foram identificadas em mistura na fração *S-co*-F1.1.1.38, uma vez que a separação se mostrou inviável devido à pequena quantidade de amostra.

*4.3.3.1 Elucidação estrutural da substância **3** (S.co-F1.1.1.38)*

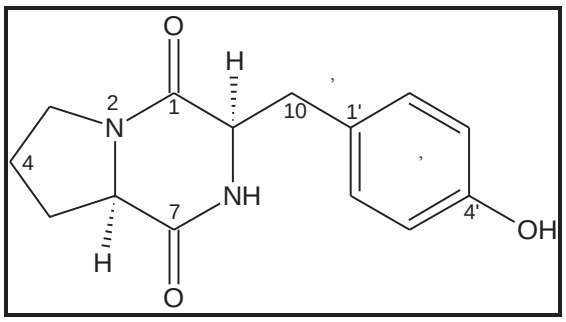


Figura 51. Estrutura da substância **3** (*ciclo*(Pro-Tyr)).

A análise do conjunto dos espectros de RMN de ^{1}H (Figura 55 e 56) e dos mapas de contorno dos experimentos de *g*HMQC (Figura 57) e *g*HMBC (Figura 58) permitiu visualizar a presença de hidrogênios e seus respectivos carbonos (Tabela 6) em δ_H 4,04 (*t*, J=5,0 Hz, 1H; δ_C 58,1), δ_H 4,23 (*t*, J=5,0 Hz, 1H; δ_C 55,7), e de duas carbonilas em δ_C 164,9 e δ_C 168,0, indicando sinais característicos de anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou dois dubletos em δ_H 7,04 (*d*; J=6,5 Hz) e δ_H 6,63 (*d*; J=6,5 Hz) indicando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído. Foram observados ainda a presença de três multipletos em δ_H 3,39-3,41 (*m*, δ_C 44,2, 2H), δ_H 1,70-1,73 (*m*, δ_C 21,6, 2H) e δ_H 2,10-2,15 (*m*, δ_C 27,6, 2H). A presença do deslocamento químico em δ_C 155,6 indicou a presença de um grupo –OH ligado ao anel aromático sugerindo a presença de resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr). Analisando o experimento de *g*COSY (Figura 59) foi possível observar correlações entre os hidrogênios benzílicos H-10↔H-9 (δ_H 2,92 e 4,23), confirmando a presença da unidade Tyr. Considerando que os H-10a e H-10b são diastereotópicos, a multiplicidade esperada seria dois duplos dubletos, no entanto, no espectro de RMN de ^{1}H foi observado apenas um tripleto (*t*), evidenciando que há livre rotação do resíduo tirosina, ou seja, o valor de deslocamento químico refere-se a média de H-10a e H-10b. Este fato é suportado pela observação em *g*HMQC de apenas um sinal de hidrogênio para H-10a e H-10b.

O sinal em δ_H 7,82 no experimento de RMN de ^1H foi atribuído ao NH-8, uma vez que não apresentou correlação direta com átomo de carbono em *g*HMQC e mostrou correlação a longa distância em *g*HMBC com C-6 (δ_C 58,1) e C-1 (δ_C 164,9). As principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC estão representadas na Figura 52. A análise dos dados obtidos ESI-EM(+)27V (Figura 60), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada de *m/z* 261,20 $[M+H]^+$, e os principais fragmentos *m/z* 233,11 $[M+H-28]^+$ e *m/z* 136,14 $[M+H-125]^+$, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de $C_{14}H_{16}O_3N_2$.

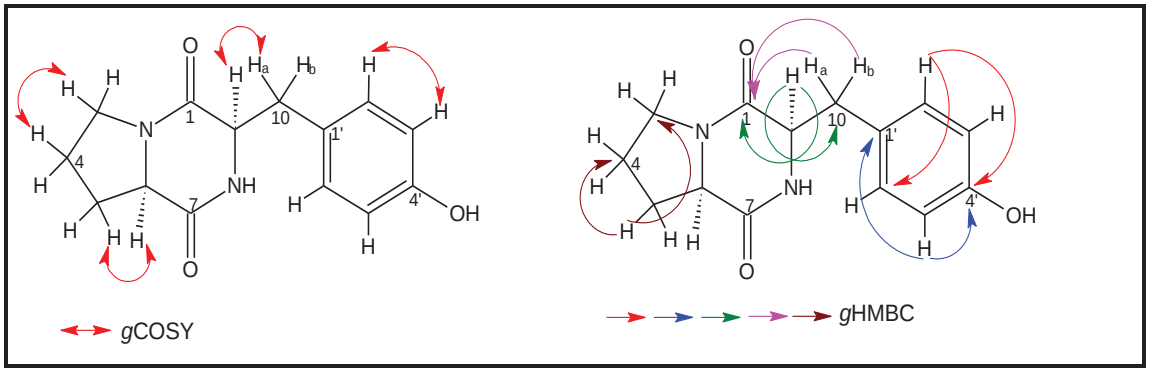


Figura 52. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **3**.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **3** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	164,9
3	3,39/3,41 (m)	44,2
4	1,70/1,73 (m)	21,6
5	2,10/2,15 (m)	27,6
6	4,04 (t; 5,0)	58,1
7	-	168,0
8	7,82	-
9	4,23 (*t;* 5,0)	55,7
10	2,92 (*t*; 5,0)	34,4
1'	-	126,8
2' e 6'	7,04 (*d*; 6,5)	130,6
3'e 5'	6,63 (*d*; 6,5)	114,6
4'	-	155,6

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (JAYATILAKE, et al., 1996) permitiram identificar a substância como *ciclo*(Pro-Tyr) **(3)**. Considerando que esta substância encontra-se em mistura, a rotação ótica não foi realizada.

Esta substância é relatada como metabólito de diversos fungos e bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria associada à esponja marinha *Isodictya setifera* (JAYATILAKE, et al., 1996). Também foi isolada por uma aluna do nosso grupo de pesquisa, de *Colletotrichum crassipes,* um fungo endófito em *Casearia sylvestris,* uma espécie endêmica de regiões de Cerrado e Mata Atlântica brasileira (CAFÊU, 2007).

*4.3.3.2 Elucidação estrutural da substância **4** (S.co-F1.1.1.38)*

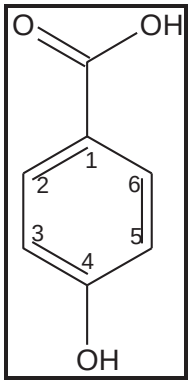


Figura 53. Estrutura da substância **4** (ácido *p*-hidroxibenzoico).

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H (Figura 55 e 56) e dos mapas de contorno dos experimentos de *g*HMQC (Figura 57) e *g*HMBC (Figura 58) permitiu detectar a presença de hidrogênios e seus respectivos carbonos (Tabela 7) em δ_H 7,77 (*dd,* J= 8,8 Hz, 2H; δ_C 130,8), δ_H 6,80 (*dd,* J= 8,8 Hz, 2H; δ_C 114,6), característico de anel para-substituído.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um sinal em δ_C 161,3, o que associado aos espectros de RMN de ^{1}H sugeriu um carbono fenólico. Analisando o experimento de *g*HMBC visualizou-se um carbono em δ_C 167,0, podendo ser um sinal de carbonila de amida ou de ácido carboxílico. O experimento de *g*COSY (Figura 59) evidenciou correlações entre os hidrogênios aromáticos H-2↔H-3 e H-5↔H-6 (δ_H 7,77 e 6,80), respectivamente, confirmando a presença do anel aromático *para*-substituído. Os dados conduziram a proposta de duas substâncias: 4-hidroxibenzamida e ácido *p*-hidroxibenzoico. Os dados obtidos em ESI-EM(-)20V (Figura 61), no modo negativo, evidenciaram a molécula desprotonada de *m/z* 137,10 $[M-H]^-$, e o principal fragmento

m/z 93,18 $[M-H-44]^-$, que é referente a perda da molécula neutra CO_2, confirmando a presença do grupo carboxílico, que associado aos dados de RMN 1D e 2D permitiu propor a fórmula molecular de $C_7H_7O_2N$. As principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC estão representadas na Figura 54.

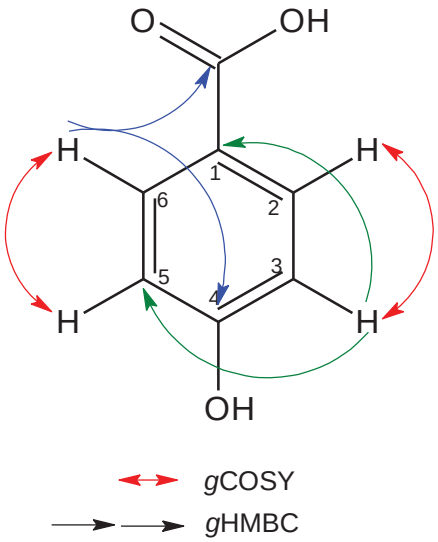


Figura 54. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **4**.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **4** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC
1	-	121,2
2 e 6	7,77 (d; 8,8)	130,8
3 e 5	6,80 (d; 8,8)	114,6
4	-	161,3
7	-	167,0

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (NOGUEIRA, 2010) permitiram identificar a substância como ácido *p*-hidroxibenzoico **(4)**.

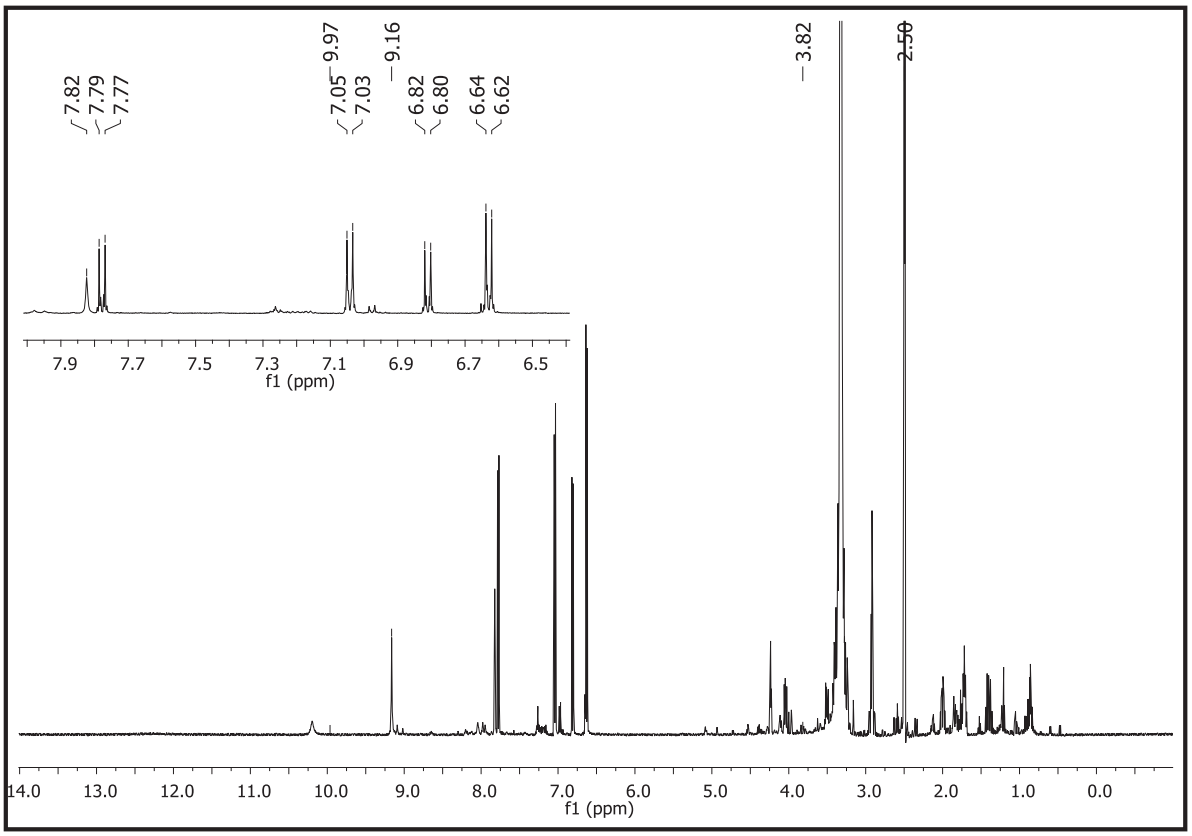


Figura 55. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz).

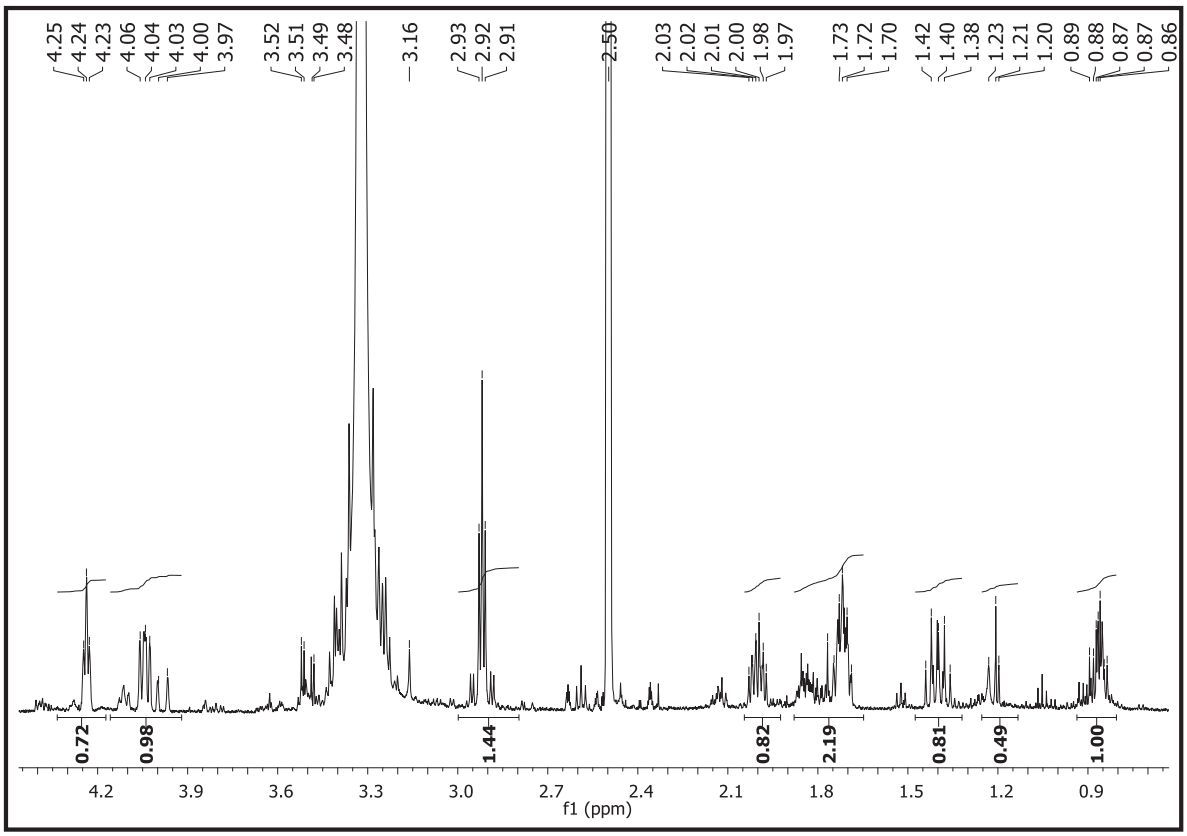


Figura 56. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz).

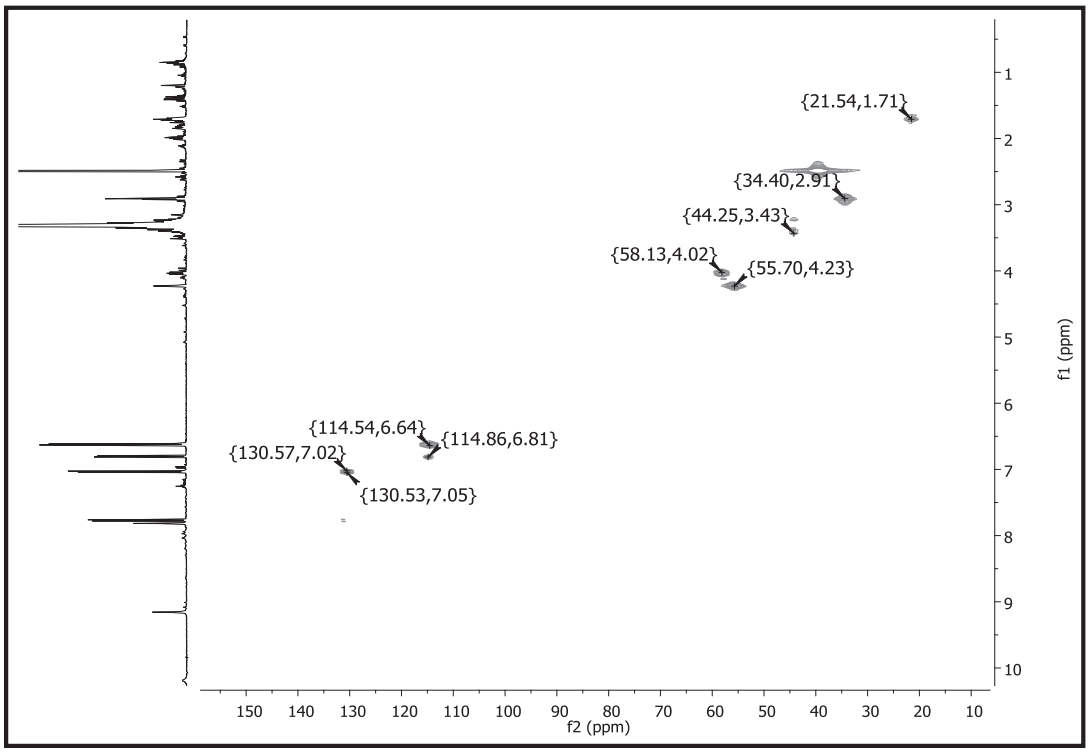


Figura 57. Mapa de contorno de *g*HMQC das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz).

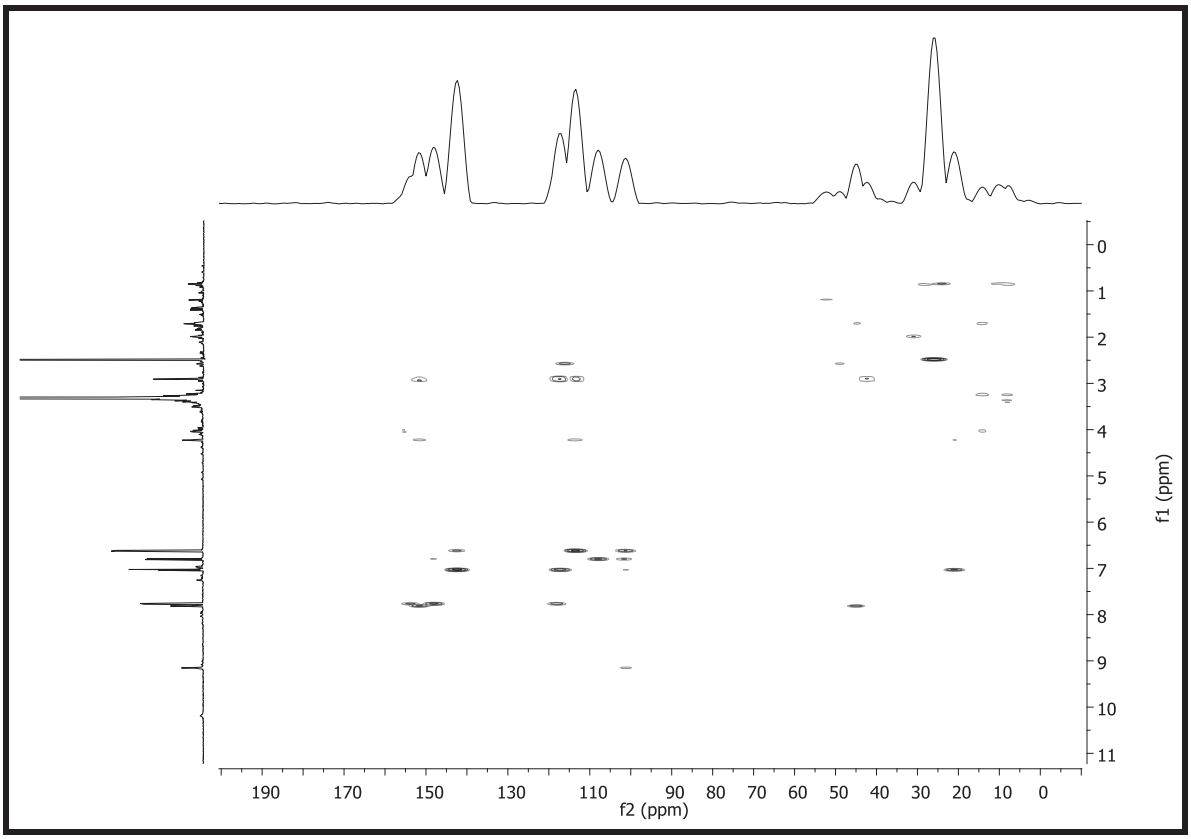


Figura 58. Mapa de contorno de *g*HMBC das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz).

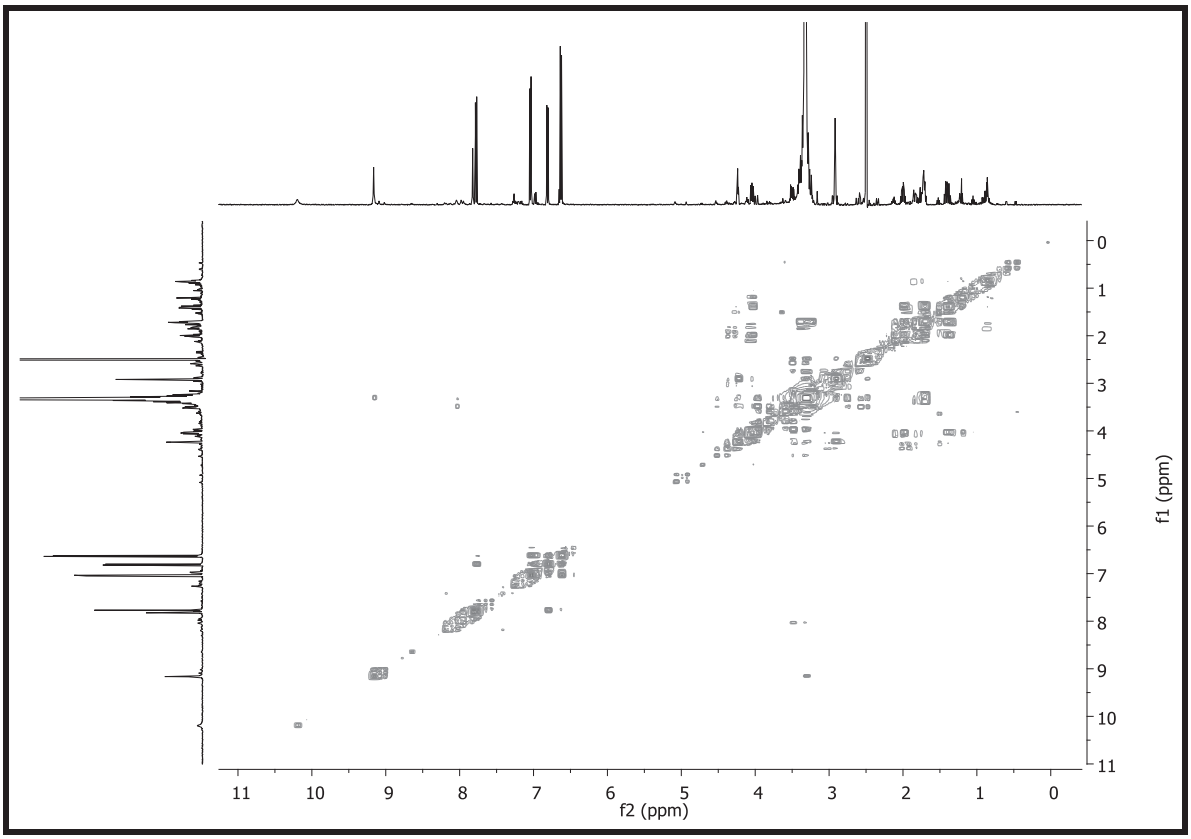


Figura 59. Mapa de contorno de *g*COSY das substâncias **3** e **4** (DMSO-d_6, 500 MHz).

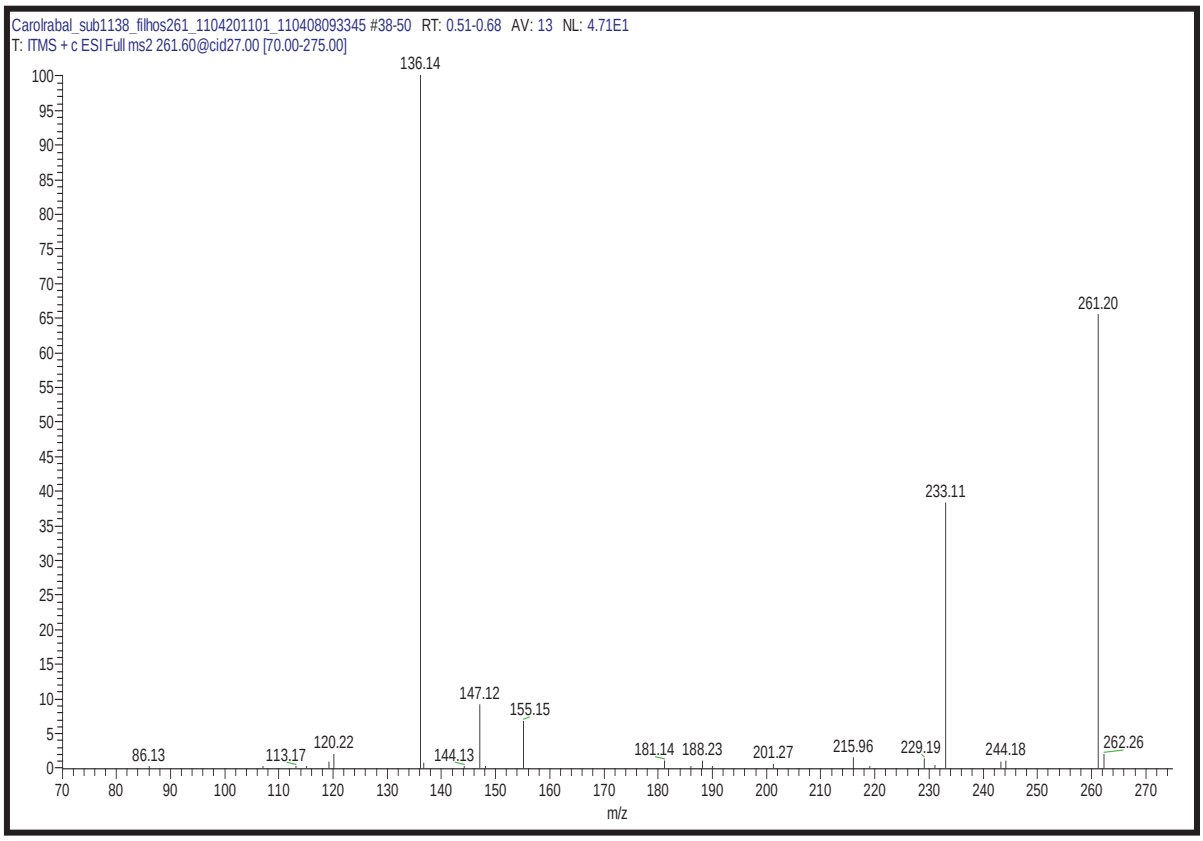


Figura 60. Fragmentação da substância **3**.

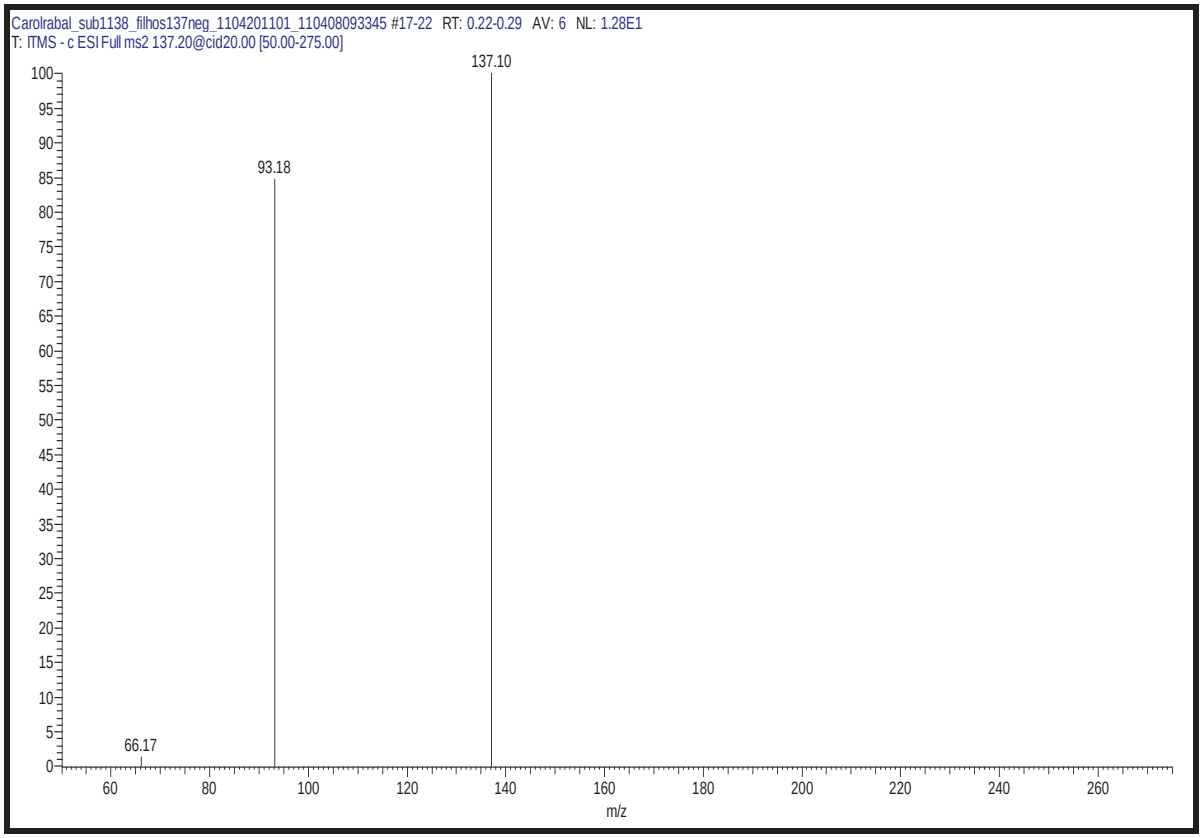


Figura 61. Fragmentação da substância **4**.

*4.3.4 Identificação estrutural das substâncias **5** e **6***

As substâncias **5** e **6** foram identificadas em mistura na fração *S-co*-F1.1.9, uma vez que a separação se mostrou inviável devido à pequena quantidade de amostra. Ressaltando que a substância **1** foi identificada novamente na fração *S-co*-F1.1.9 pela análise dos dados obtidos por RMN de ^{1}H uni e bidimensionais associados à técnica de LC-MS.

*4.3.4.1 Elucidação estrutural da substância **5** (S.co-F1.1.9)*

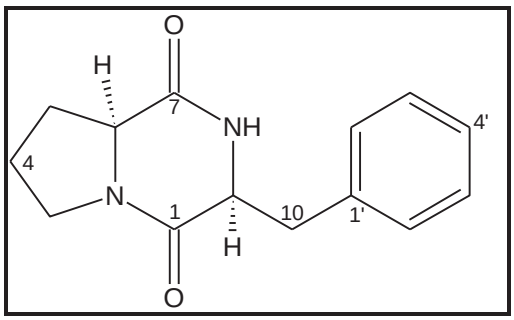


Figura 62. Estrutura da substância **5** (*Rel.ciclo*(Pro-Phe)).

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H (Figura 65 e 66) e dos mapas de contorno dos experimentos *g*HMQC (Figura 67) e *g*HMBC (Figura 68) permitiu detectar a presença de hidrogênios em δ_H 4,08 (*t*; δ_C 57,9), δ_H 4,34 (*t;* δ_C 55,4) e de duas carbonilas em δ_C 168,0 e δ_C 164,9 (Tabela 8), característicos de anel dicetopiperazínico.

Os multipletos visualizados em δ_H 3,32/3,40, δ_H 1,70-1,87 e δ_H 2,10/2,13 são característicos de hidrogênio metilênicos, sugerindo a presença da unidade Prolina (Pro), o que foi confirmado pelas correlações observadas no experimento *g*COSY (Figura 69), H-3↔H-4↔H-5↔H-6 e pela comparação com a literatura (CAFÊU, 2007; FDHILA et al., 2003). Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_H 7,26 (*d*; 1H; δ_C 129,2), 7,24 (*dd*; 2H; δ_C 127,6) e δ_H 7,19 (*dd*; 2H; δ_C 126,2) evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossubstituído, e dois duplos dubletos em 3,02 (*dd,* 1H, 4,5Hz e 13,0 Hz) e 3,07 (*dd*, 1H 5,0 Hz e 13,0 Hz), sugerindo uma unidade Fenilalanina (Phe) como o outro aminoácido constituindo a estrutura de **5**. As principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC estão representadas na Figura 63.

A estereoquímica relativa **5** foi definida com base nas interações espaciais observadas entre H-6 e H-9 no experimento de NOESY-1D (Figura 70), posicionando-os no mesmo plano da molécula.

A análise dos dados obtidos por LC-MS (Figura 72), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada de *m/z* 245,1300 $[M+H]^+$, e do aduto de sódio de *m/z* 267,1189 ($[M+Na]^+$). A análise dos dados obtidos ESI-EM(+)25V (Figura 74), no modo positivo, confirmou a molécula protonada de *m/z* 245,18 $[M+H]^+$, e os principais fragmentos *m/z* 217,16 $[M+H-28]^+$ e *m/z* 120,11 $[M+H-125]^+$, o que associado aos dados de RMN 1D e 2D permitiu propor a fórmula molecular de $C_{14}H_{16}O_2N_2$.

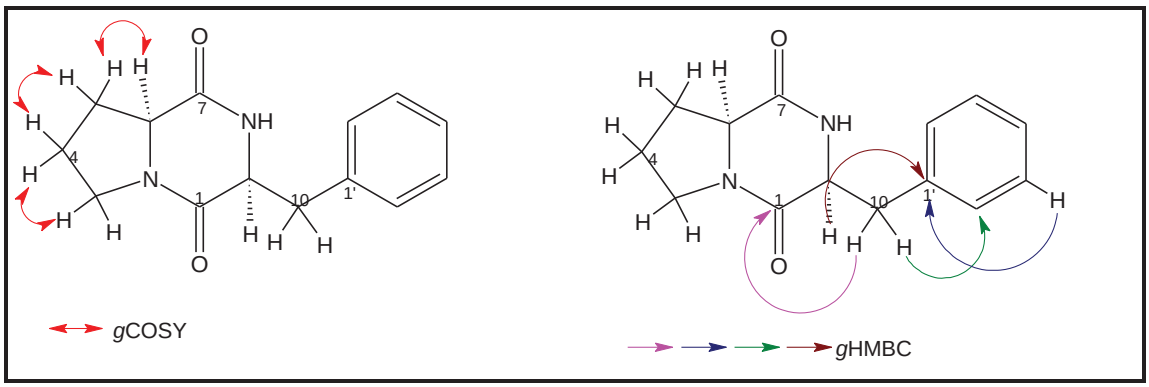


Figura 63. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **5**.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **5** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	168,0
3	3,32 (m)/3,40 (*m*)	44,5
4	1,70/1,87 (*m*)	21,8
5	2,10/2,13 (*m*)	27,4
6	4,08 (*t*)	57,9
7	-	164,9
8	7,95	-
9	4,34 (*t*; 5,0)	55,4
10	3,02 (*dd*; 4,5 e 13,0) 3,07 (dd; 5,0 e 13,0)	35,0
1'	-	137,1
2' e 6'	7,26 (*d*)	129,2
3'e 5'	7,24 (*dd*)	127,6
4'	7,19 (*dd*)	126,2

Os dados espectrais foram comparados com a literatura (WANG et al., 2010) e permitiram identificar a substância **5** como *Rel.ciclo*(Pro-Phe). Considerando que esta substância encontra-se em mistura, a rotação ótica não foi realizada.

*4.3.4.2 Elucidação estrutural da substância **6** (S.co-F1.1.9)*

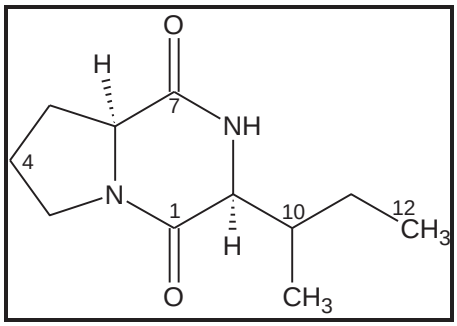


Figura 64. Estrutura da substância **6** (*Rel.ciclo*(Pro-Ile).

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 65 e 66) pode-se observar sinais em δ_H 0,82 (*t*, 3H, J=7,5 Hz, δ_C 12,1) e δ_H 0,97 (*d*, 3H, J=7,0 Hz, δ_C 14,8) (Tabela 9), o que associado às análises detalhadas de todos os espetros de RMN, indicaram a presença de um resíduo do aminoácido Isoleucina (Ile). A presença de multipletos em (δ_H 3,32, δ_H 1,70/1,87 e δ_H 2,10/2,13) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos do resíduo Prolina (Pro) (FDHILA et al., 2003).

Analise dos experimentos de *g*HMQC (Figura 67) e *g*HMBC (Figura 68), aliados aos dados discutidos acima, permitiu propor para a substância **6** uma dicetopiperazina formada pelas unidades Prolina e Isoleucina.

A configuração relativa de **6** foi proposta com base no experimento de NOESY-1D (Figura 71), onde irradiou-se H-6 e H-9, e observou-se interações espaciais entre estes, posicionado-os no mesmo plano da molécula.

A análise dos dados obtidos por LC-MS (Figura 73), no modo positivo, evidenciou a molécula protonada em *m/z* 211,1457 $[M+H]^+$, e do aduto de sódio em *m/z* 233,1569 ($[M+Na]^+$). A análise dos dados obtidos ESI-EM(+)25V (Figura 75), no modo positivo, confirmou a molécula protonada de *m/z* 211,20 $[M+H]^+$, e os principais fragmentos *m/z* 183,18 $[M+H-28]^+$ e *m/z* 155,19 $[M+H-56]^+$, o que associado aos dados de RMN 1D e 2D permitiu propor a fórmula molecular de $C_{11}H_{18}O_2N_2$.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **6** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	166,4
3	3,32 (*m*)	44,5
4	1,70/1,87 (*m*)	21,9
5	2,10/2,13 (*m*)	27,4
6	4,18 (*t;* 8,0)	58,1
7	-	165,2
8	7,92 (*sl*)	-
9	3,95 (*sl*)	58,9
10	2,02 (*m*)	*
11	1,34 (*m*)	28,6
12	0,82 (*t*; 7,5)	22,0
Me-10	0,97 (*d*; 7,0)	14,6

*Sinal não observado.

A comparação destes dados espectrais com os descritos na literatura (FDHILA et al., 2003), confirmam a estrutura proposta para a substância **6** como sendo *Rel.ciclo*(Pro-Ile).

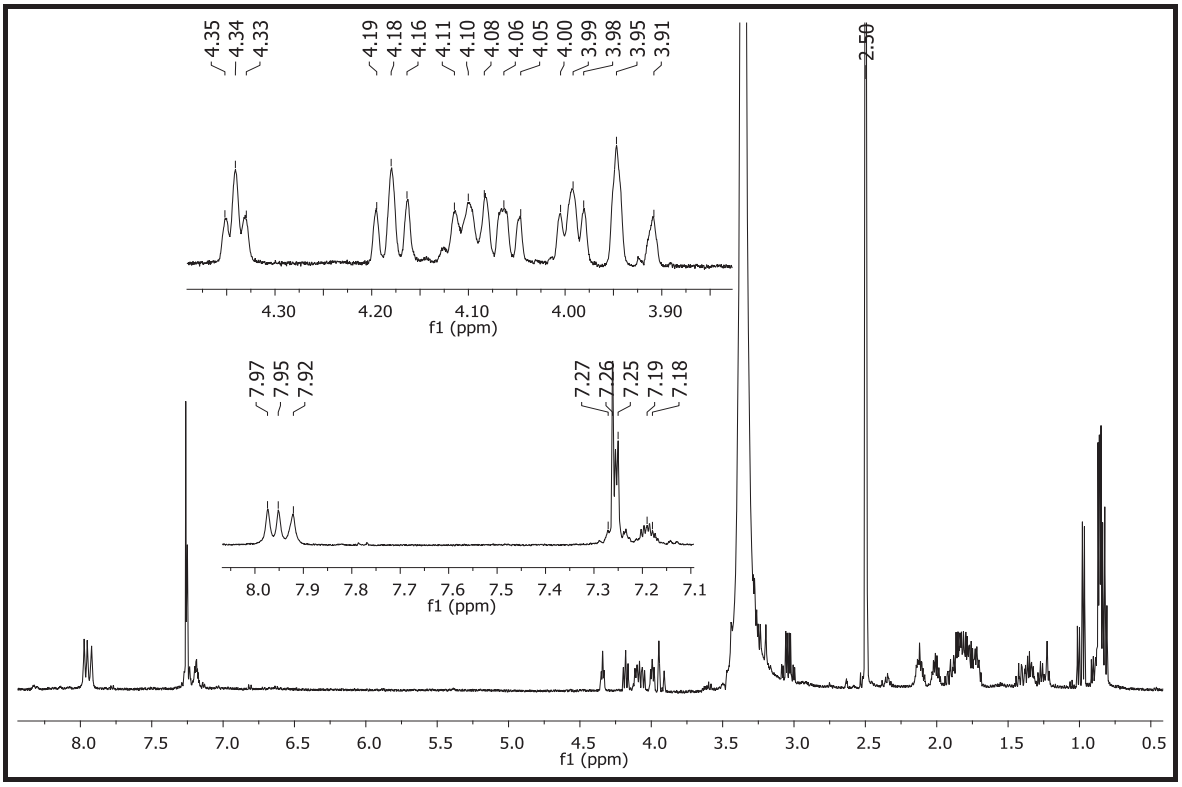


Figura 65. Espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz).

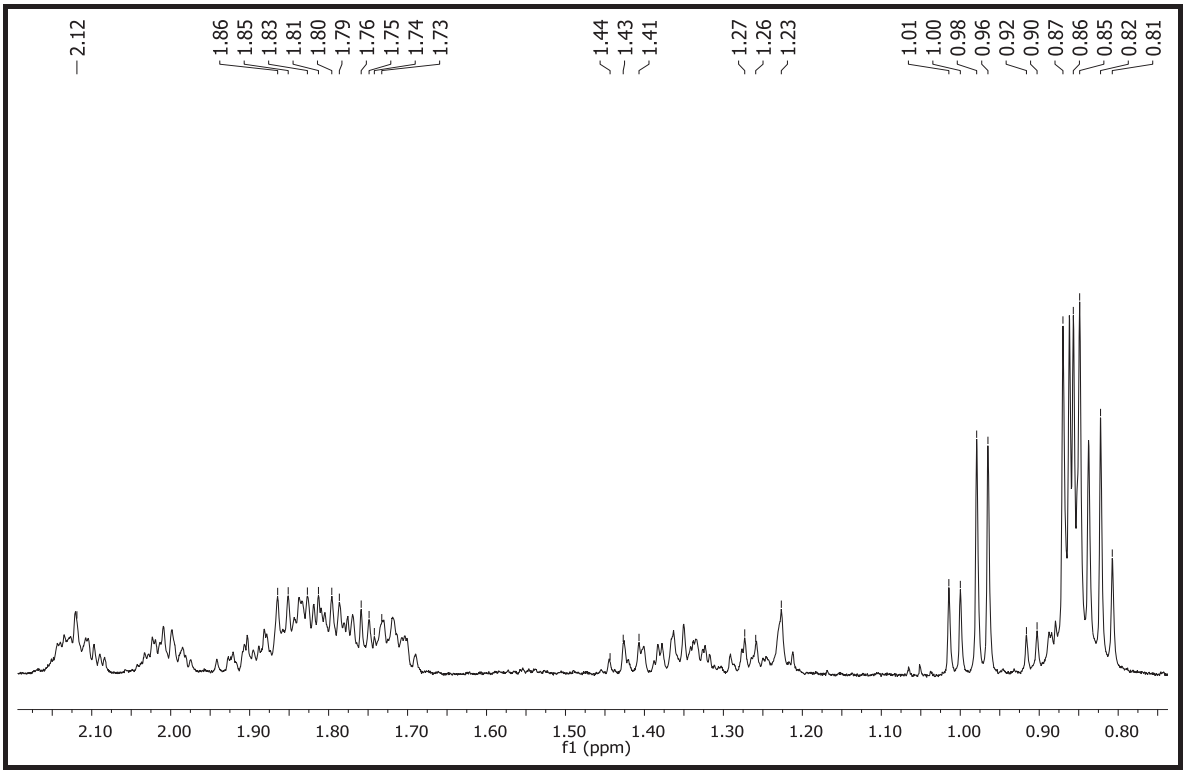


Figura 66. Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz).

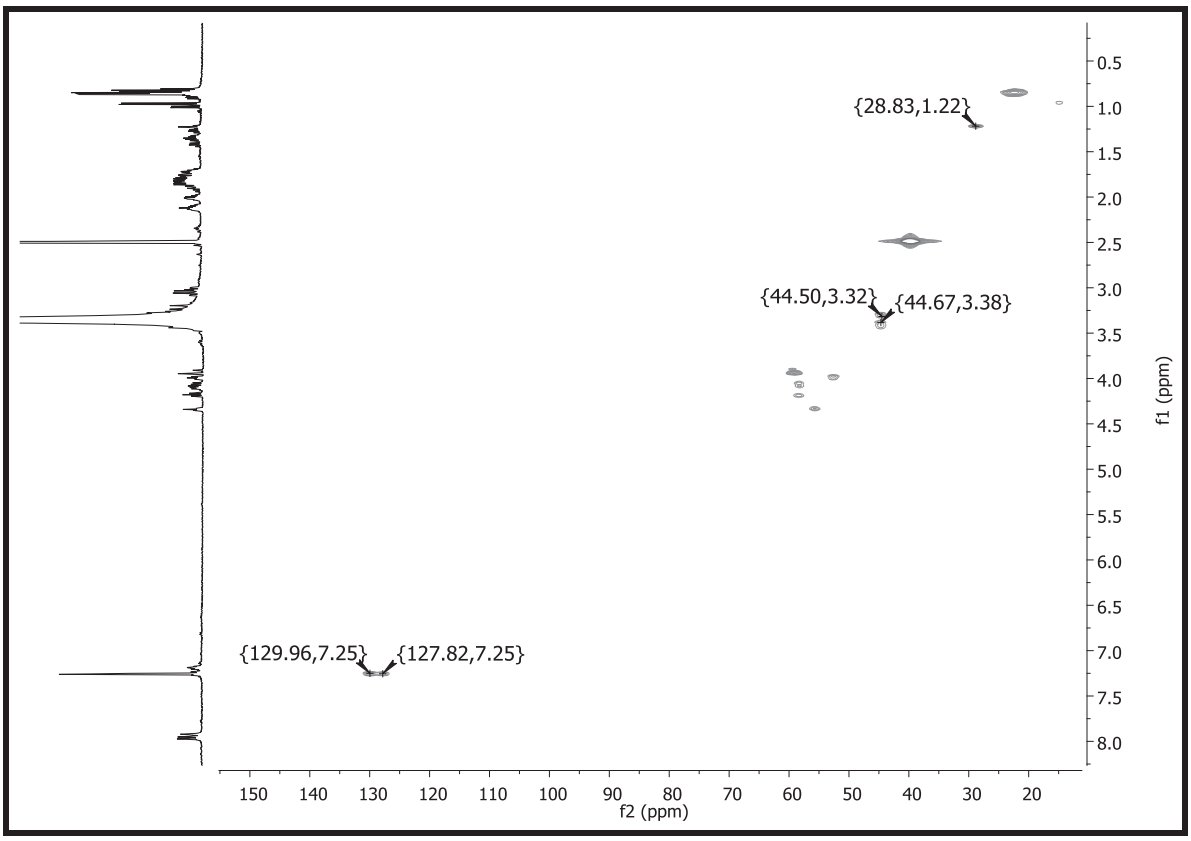


Figura 67. Mapa de contorno de *g*HMQC das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz).

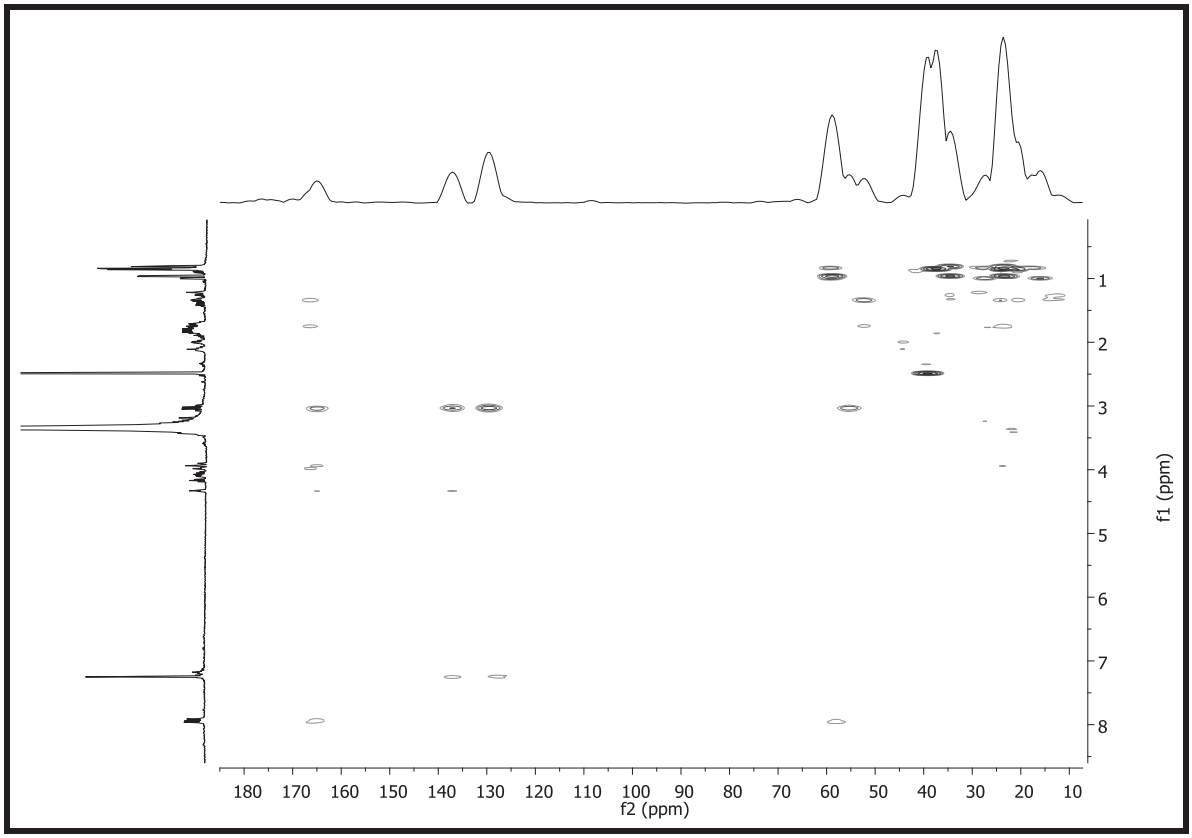


Figura 68. Mapa de contorno de *g*HMBC das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz).

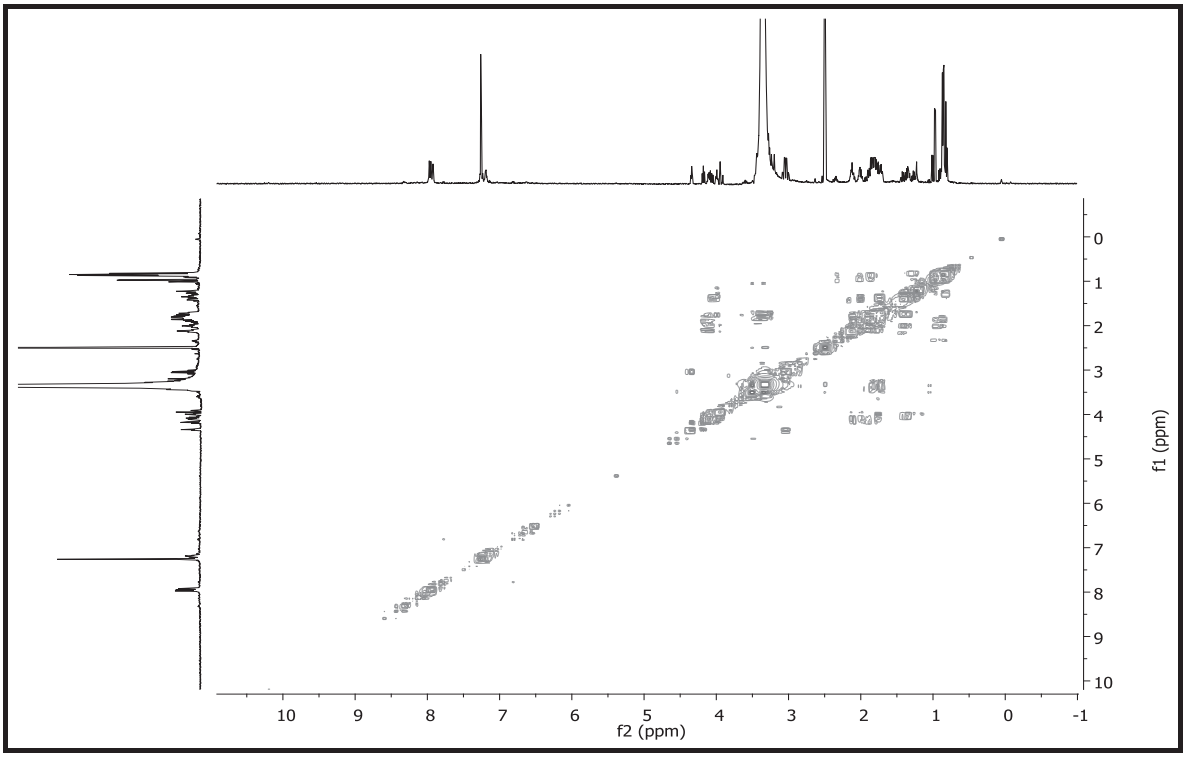


Figura 69. Mapa de contorno de *g*COSY das substâncias **5** e **6** (DMSO-d_6, 500 MHz).

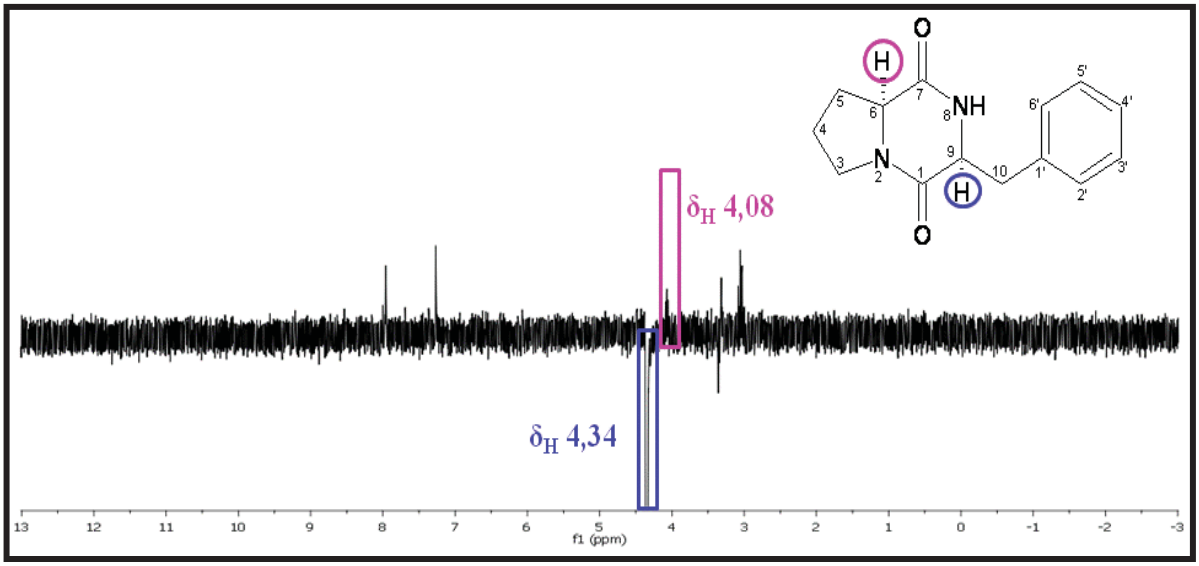


Figura 70. Espectro de NOESY-1D da substância **5** (DMSO-d_6, 500 MHz).

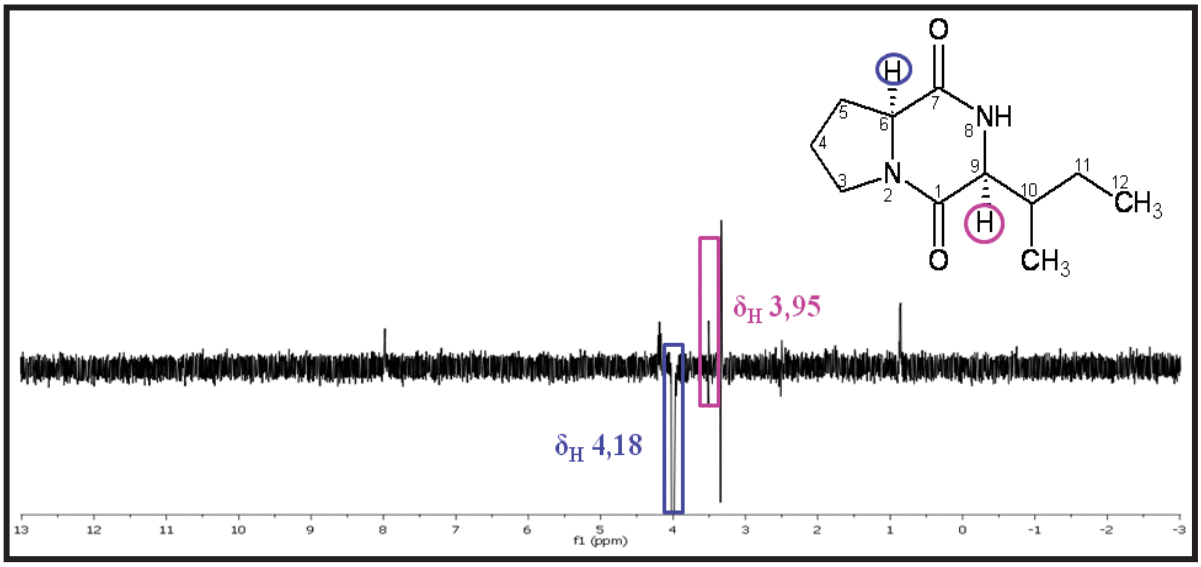


Figura 71. Espectro de NOESY-1D da substância **6** (DMSO-d_6, 500 MHz).

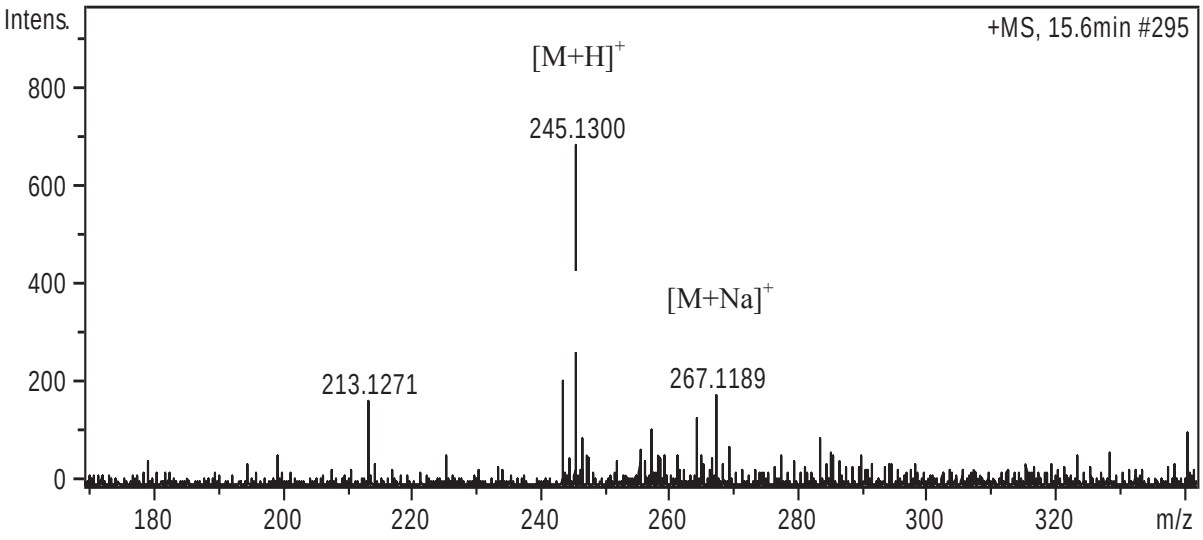


Figura 72. Molécula protonada ($[M+H]^+$) e aduto de sódio ($[M+Na]^+$) da substância **5**.

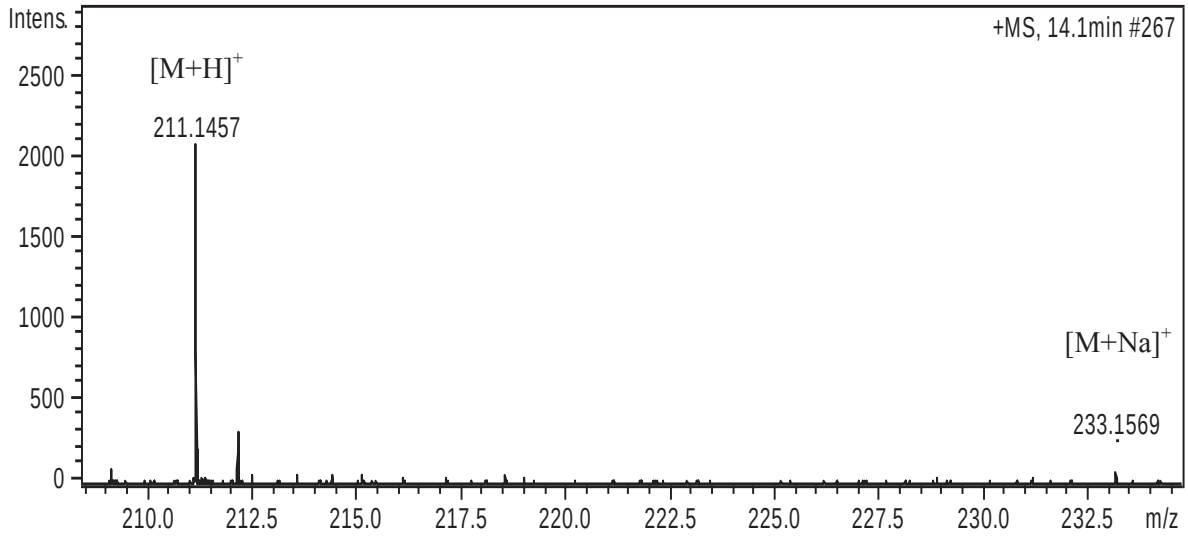


Figura 73. Molécula protonada ($[M+H]^+$) e aduto de sódio ($[M+Na]^+$) da substância **6**.

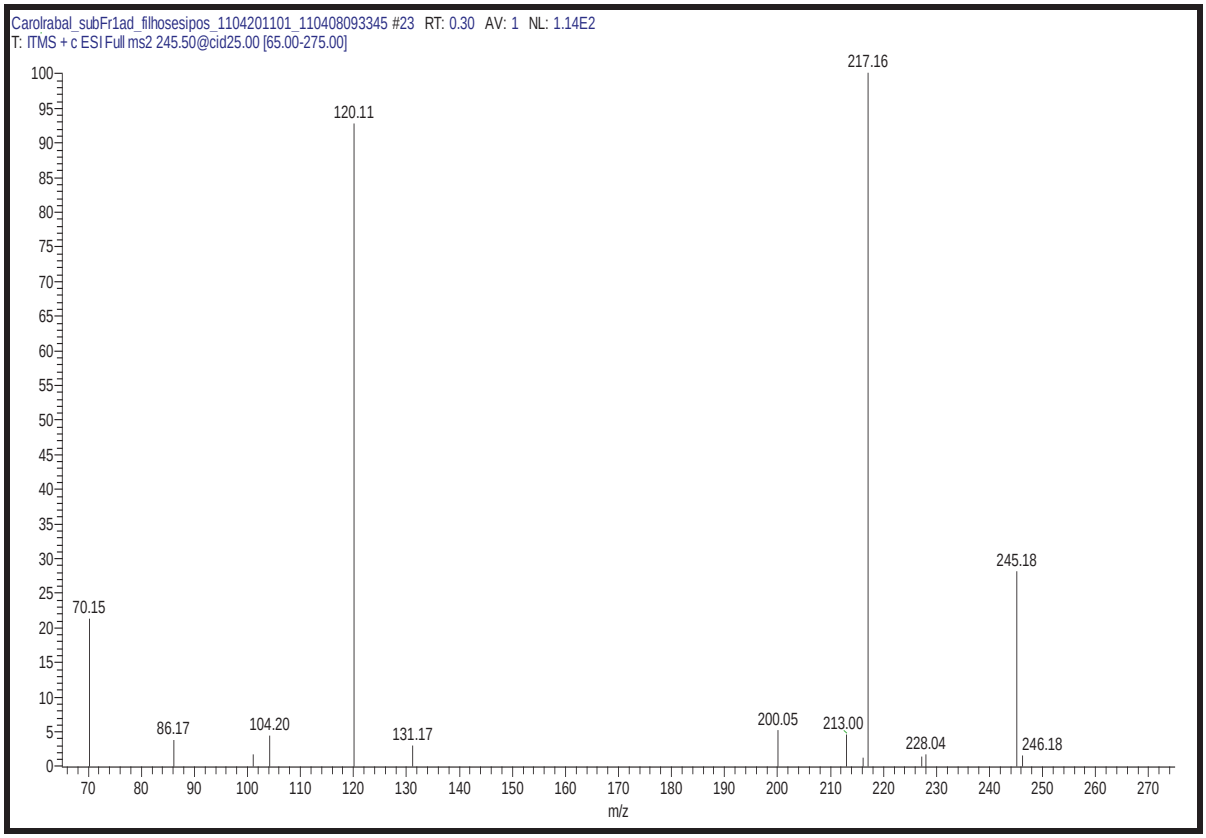


Figura 74. Fragmentação da substância **5**.

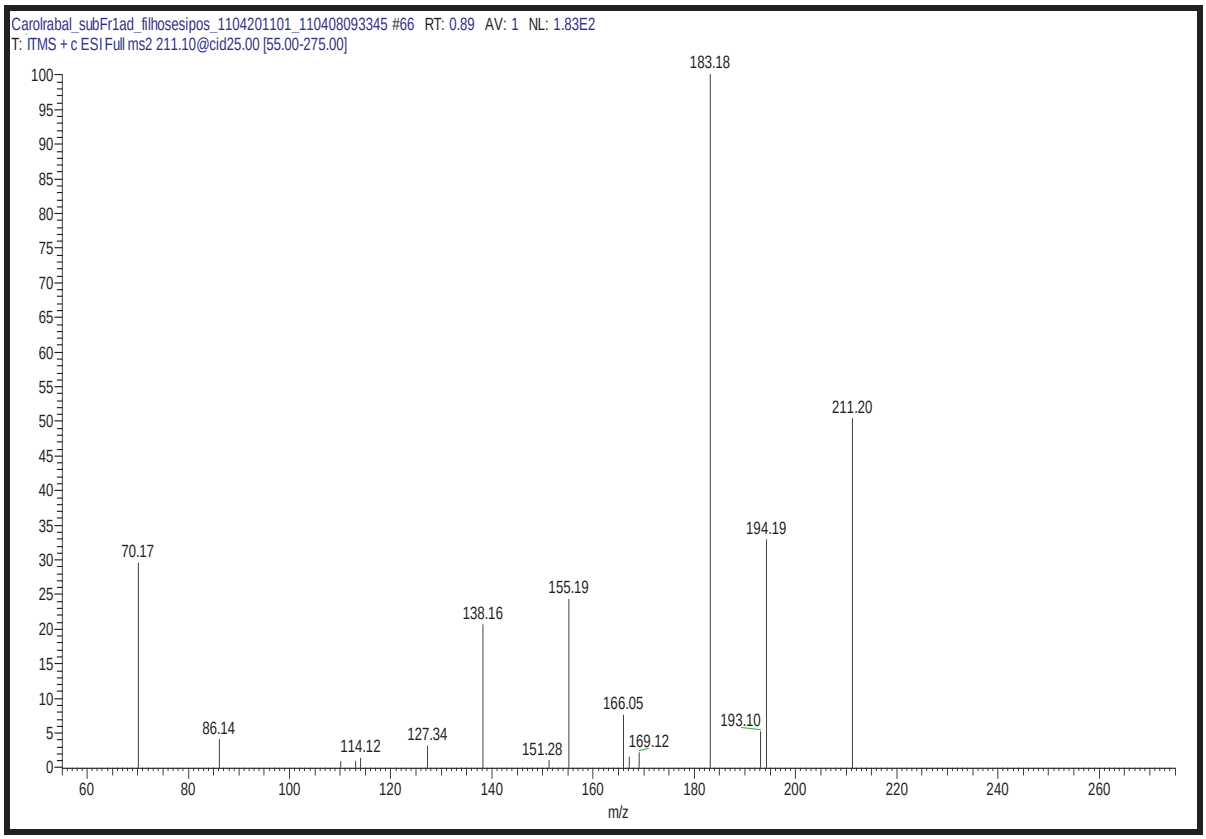


Figura 75. Fragmentação da substância **6**.

4.3.5 Elucidação estrutural da substância **7**

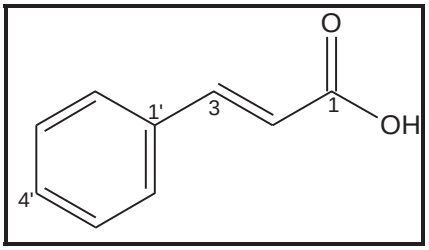


Figura 76. Estrutura da substância **7** (ácido *trans*-cinâmico).

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H (Figura 79) e ^{13}C (Figura 80) permitiu detectar a presença de hidrogênios na região de aromáticos em δ_H 7,40-7,43 (*m*; 1H; δ_C 130,2), 7,66-7,68 (*m*; 2H; δ_C 128,2) e δ_H 7,40-7,43 (*m*; 2H; δ_C 128,9) (Tabela 10), evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossubstituído. Foi observado também, um sistema de ligação dupla *trans*, confirmado pela constante de acoplamento entre H-2 (*d*; 16Hz) e H-3 (*d*; 16Hz).

Pelo espectro de RMN de ^{13}C, constatou-se a presença de uma carbonila em δ_C 167,5 se correlacionando por *g*HMBC (Figura 82) com os hidrogênios H-2 e H-3, sugerindo a presença de uma amida ou um ácido carboxílico. As principais correlações de *g*HMBC estão representadas na Figura 77.

O cromatograma e as curvas de UV da substância **7** (Figura 78) estão compatíveis com a estrutura do ácido *trans*-cinâmico.

A análise por injeção direta, no modo negativo (Figura 84), evidenciou a molécula desprotonada de *m/z* 147,2 ($[M-H]^-$) e os principais fragmentos obtidos (30,0 V) foram *m/z* 102,9 $[M-H-44]^-$, *m/z* 89,2 $[M-H-58]^-$ e *m/z* 76,8 $[M-H-70]^-$, confirmando a presença de um ácido carboxílico. Deste modo, a substância **7** foi identificada como o ácido *trans*-cinâmico (HANAI et al., 2001). A substância **7** apresentou potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.

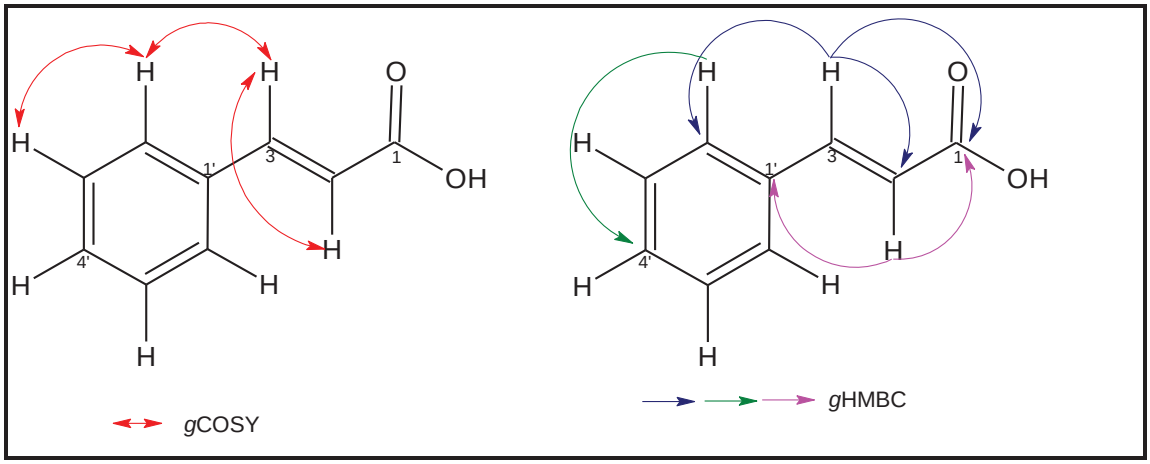


Figura 77. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância 7.

Tabela 10. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de 7 (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	167,5
2	6,52 (*d*; 16,0)	119,2
3	7,58 (*d*; 16,0)	143,8
1'	-	134,2
2' e 6'	7,66-7,68 (*m*)	128,2
3'e 5'	7,40-7,43 (*m*)	128,9
4'	7,40-7,43 (*m*)	130,2

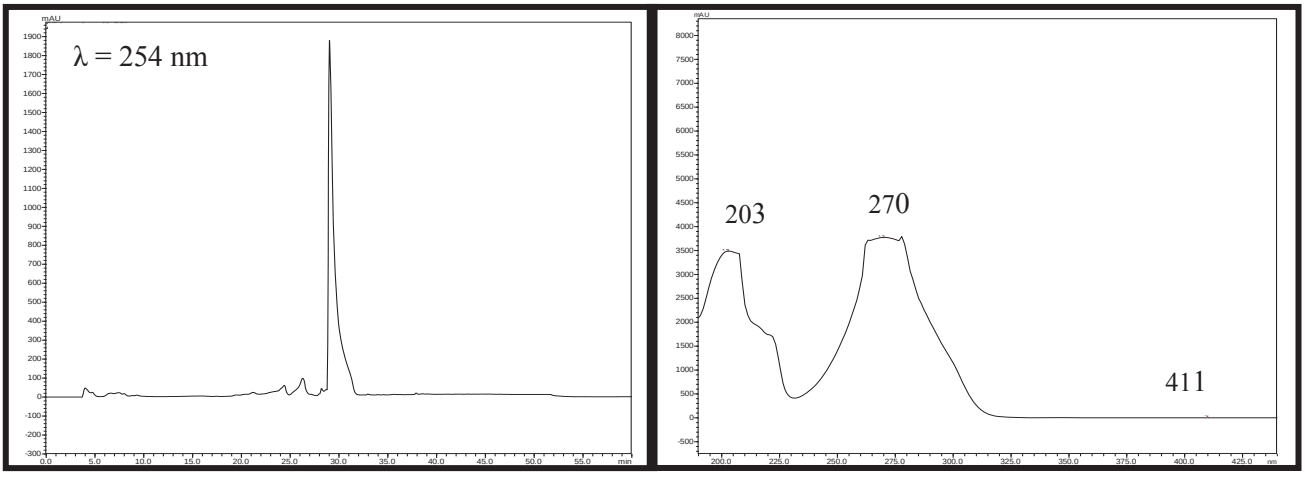


Figura 78. Cromatograma e curvas de UV da substância 7.

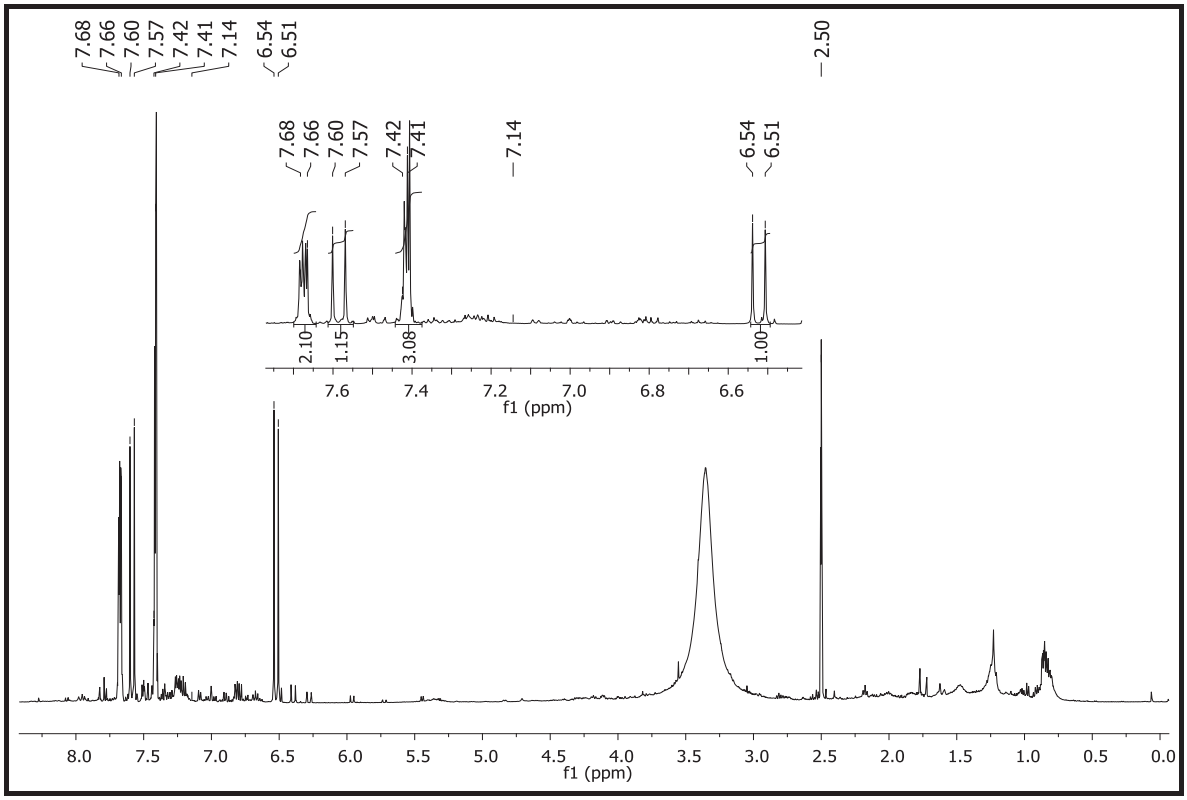


Figura 79. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz).

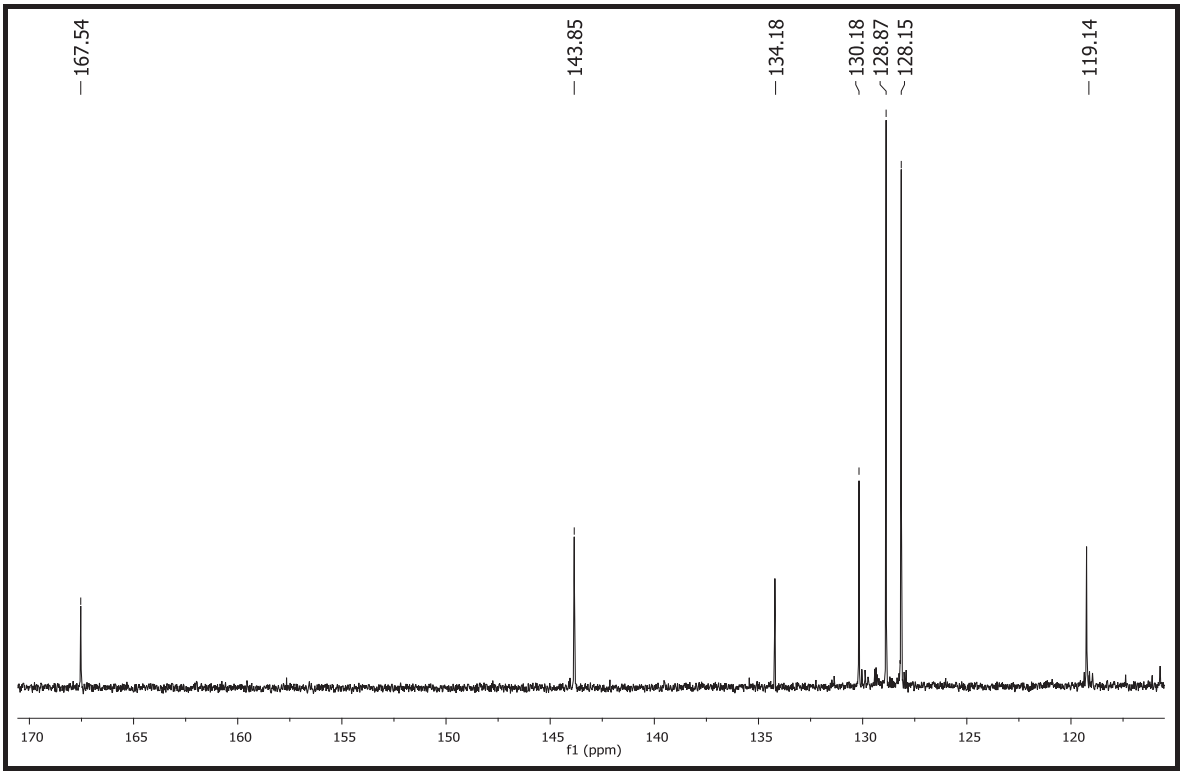


Figura 80. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz).

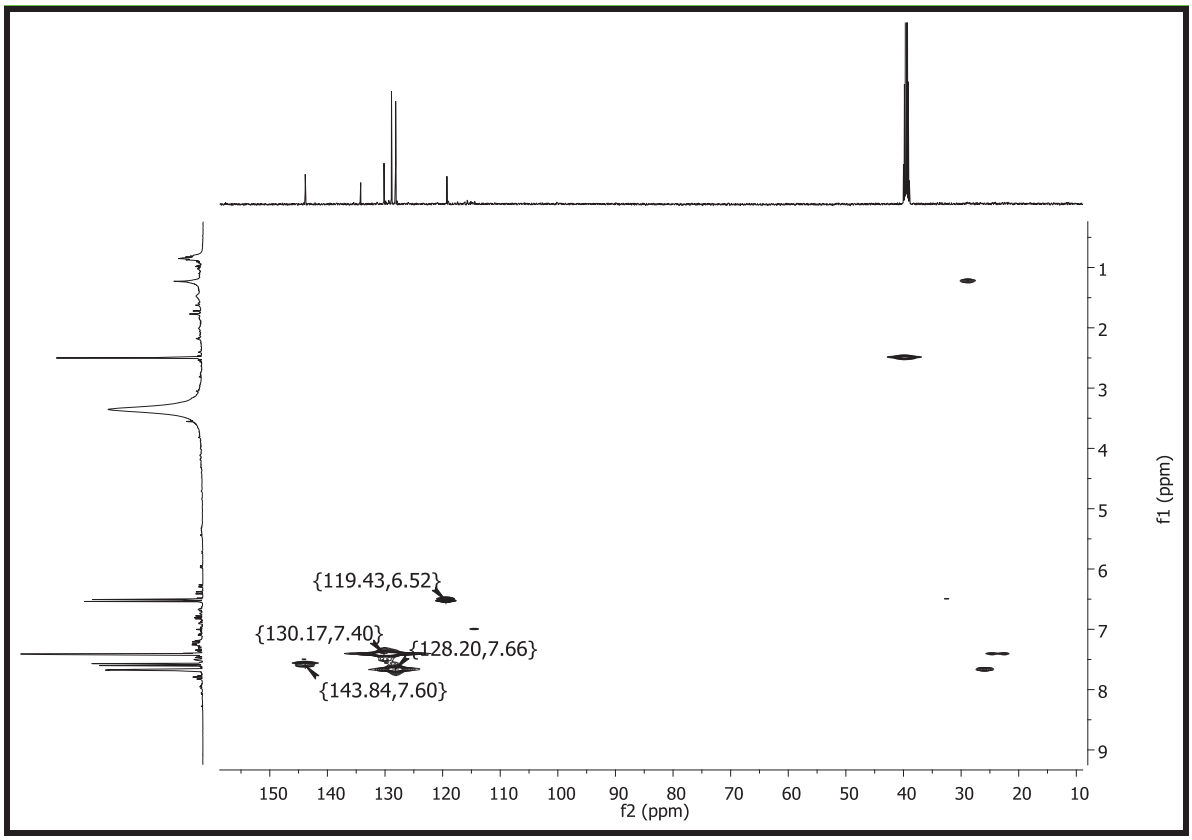


Figura 81. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz).

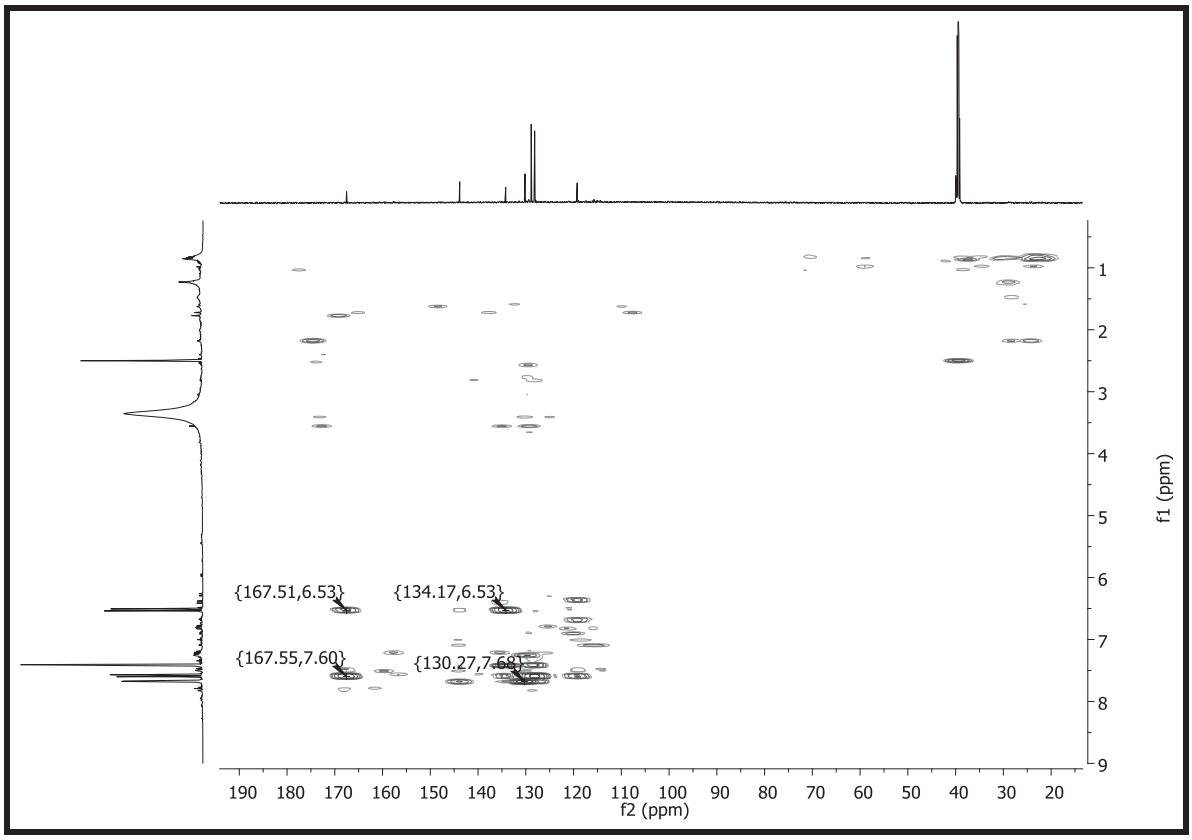


Figura 82. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz).

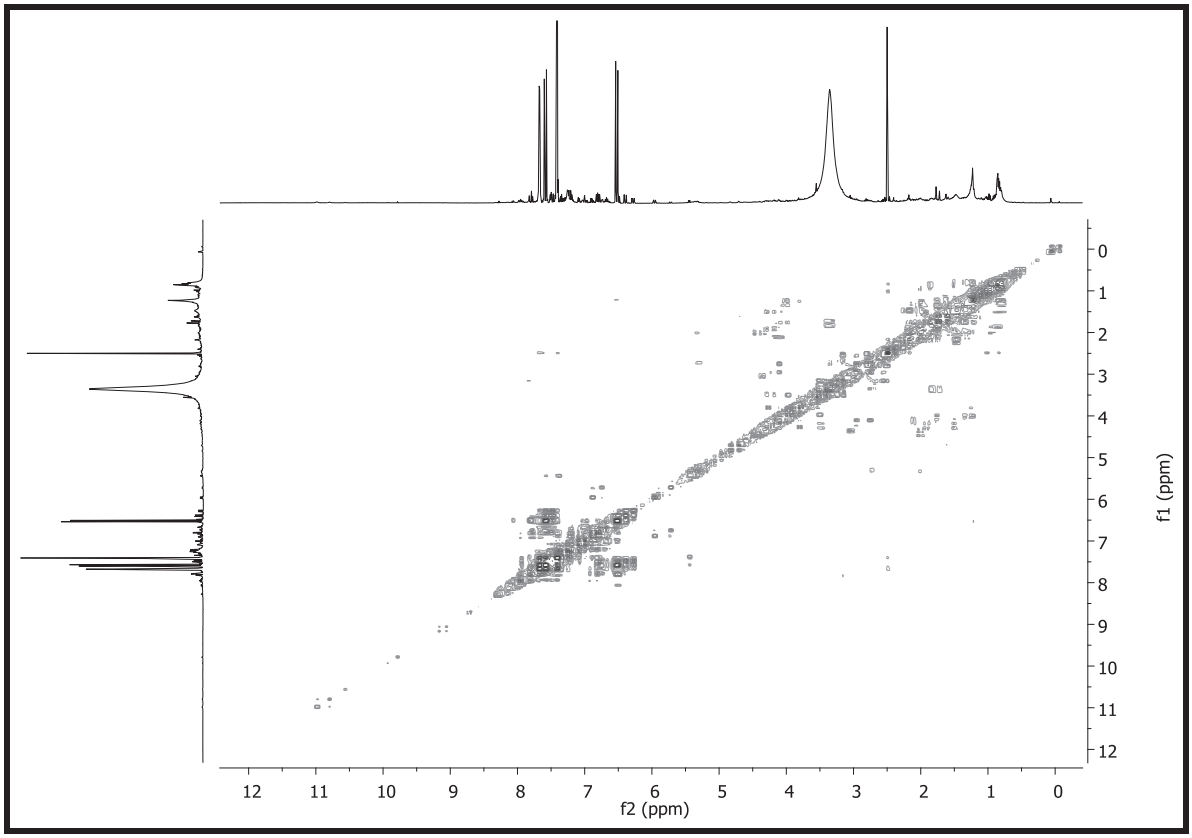


Figura 83. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **7** (DMSO-d_6, 500 MHz).

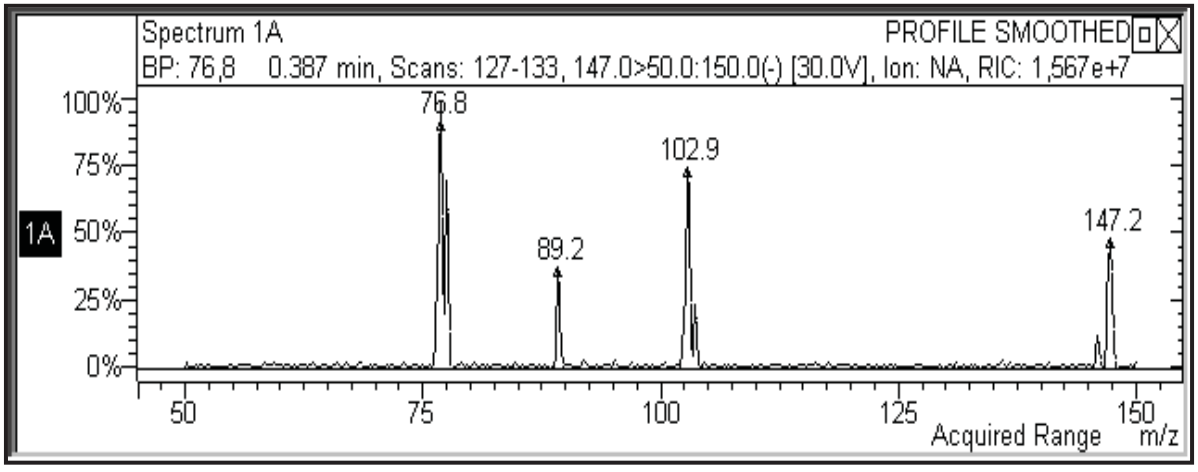


Figura 84. Fragmentação da substância **7**.

4.3.6 Elucidação estrutural da substância ***8***

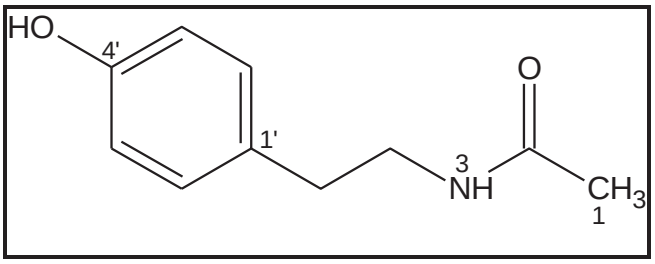


Figura 85. Estrutura da substância **8** (N-(4-hidroxifeniletil) acetamida).

Os espectros de RMN de ^{1}H (Figura 88) e ^{13}C (Figura 89) evidenciaram a presença de uma carbonila, uma metila, dois grupos metilênicos, sendo um benzílico e o outro ligado a nitrogênio, além de dois dubletos em δ_H 6,66 (*d*; *J*= 8,5 Hz) e δ_H 6,96 (*d*; *J*= 8,5 Hz) (Tabela 11) indicando um sistema típico de anel aromático *para* dissubstituído. O deslocamento químico em δ_C 155,5 indicou a presença de um grupo –OH ligado ao anel aromático.

Todos os deslocamentos químicos de ^{1}H foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono através da análise de *g*HMQC (Figura 90).

O singleto em δH 1,77 (3H, δc 22,4) se correlacionando por *g*HMBC com a carbonila em δ_C 169,0 sugeriu a presença de um éster. Um multipleto em 3,17 (2H) com δc 40,5, (que sugere um carbono ligado a nitrogênio) se correlacionando, também, com δ_C 169,0 permitiu sugerir a presença de uma amida. A conexão da unidade etilênica ao anel aromático, foi permitida pela correlação observada em *g*HMBC (Figura 91) de H-4 (δH 3,17) com δc 129,4 (C-1'). A correlação observada em *g*COSY (Figura 92) entre H-4/H-5, aliado à correlação em *g*HMBC entre H-4↔C-2/C-1' e a comparação com dados da literatura **(**LIN et al., 2008; CAFÊU, 2007) permitiram identificar a substância **8** como sendo N-(4-hidroxifeniletil)acetamida. As principais correlações de *g*HMBC estão representadas na Figura 86.

O cromatograma e as curvas de UV da substância **8** (Figura 87) estão compatíveis com a estrutura da (N-(4-hidroxifeniletil) acetamida).

A estrutura proposta para esta substância foi confirmada após análise por ESI-EM(+)20V onde há a presença da molécula protonada de *m/z* 180,06 ([M+H]+) e os principais fragmentos foram *m/z* 138,07 $[M+H-42]^{+}$, *m/z* 121,10 $[M+H-59]^{+}$ e ocorreu a perda da molécula neutra com *m/z* 17, o que confirma a presença de NH_3 na molécula (Figura 93).

A substância **8** apresentou potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Esta substância já se encontra descrita na literatura, porém deve-se ressaltar o potencial antimicrobiano de diversas ariletilamidas (MASKEY et al., 2002)

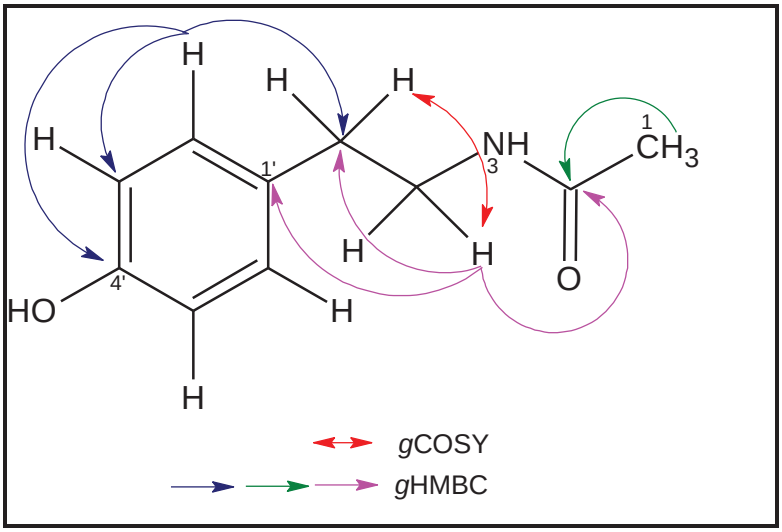


Figura 86. Principais correlações de *g*COSY e *g*HMBC da substância **8**.

Tabela 11. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6, 500 MHz) de **8** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	1,77 (*s*)	22,4
2	-	169,0
3	7,81 (*t*)	-
4	3,17 (*m*)	40,5
5	2,57 (*t*; 7,5)	34,4
1'	-	129,4
2' e 6'	6,96 (*d;* 8,5)	129,3
3'e 5'	6,66 (*d;* 8,5)	115,0
4'	-	155,5

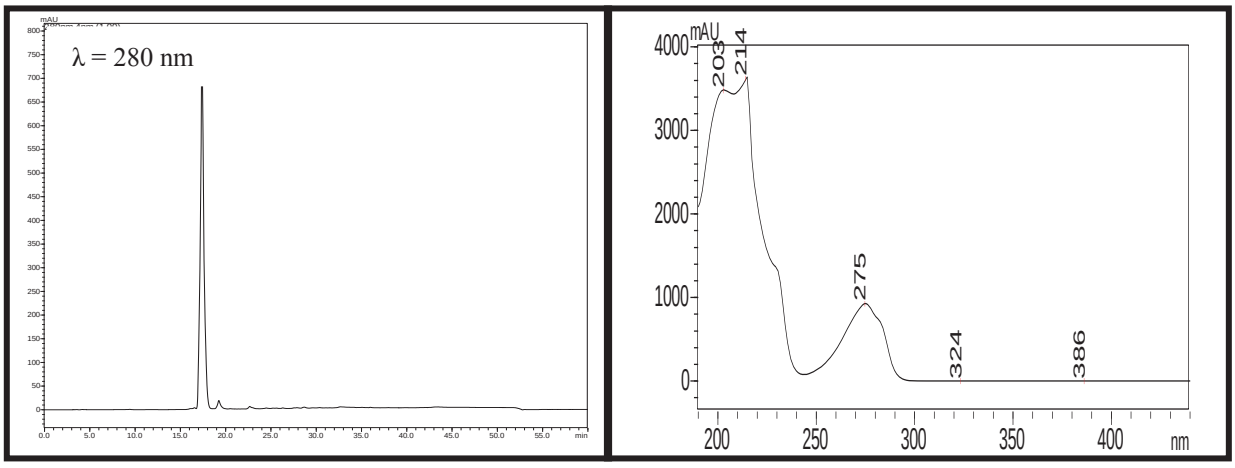


Figura 87. Cromatograma e curvas de UV da substância **8**.

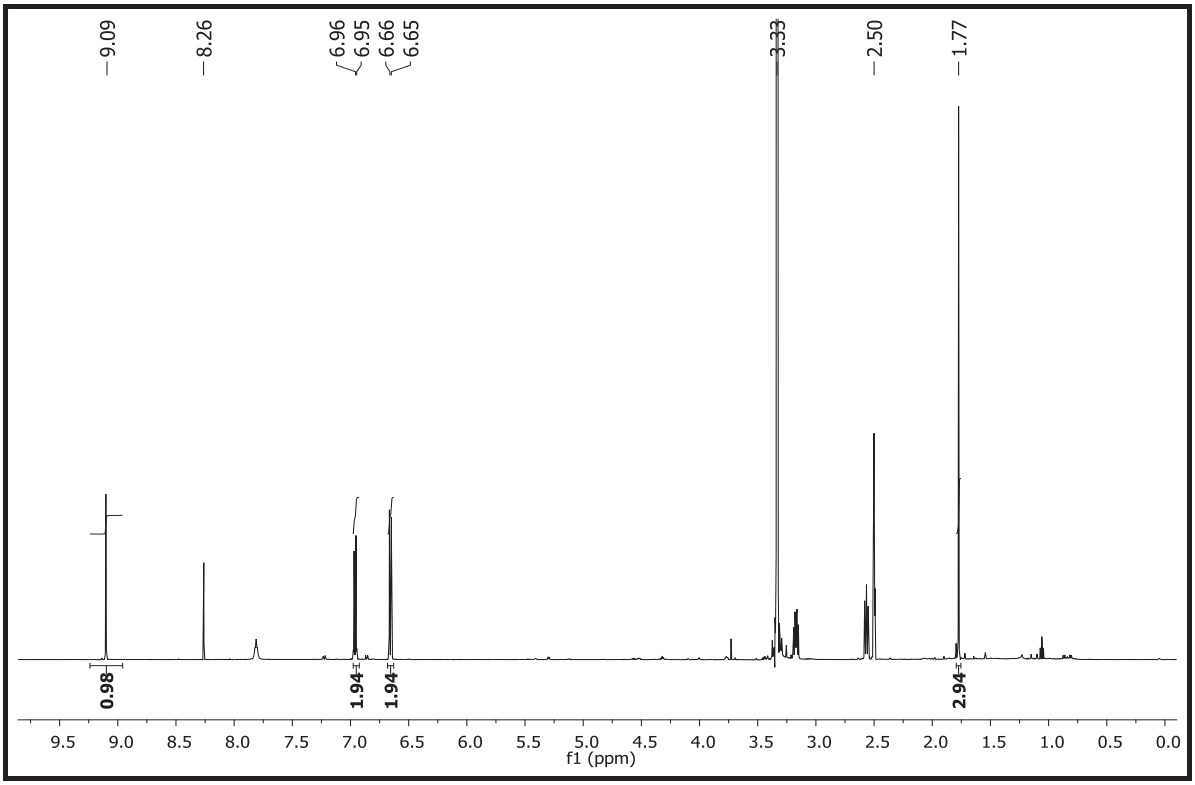


Figura 88. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz).

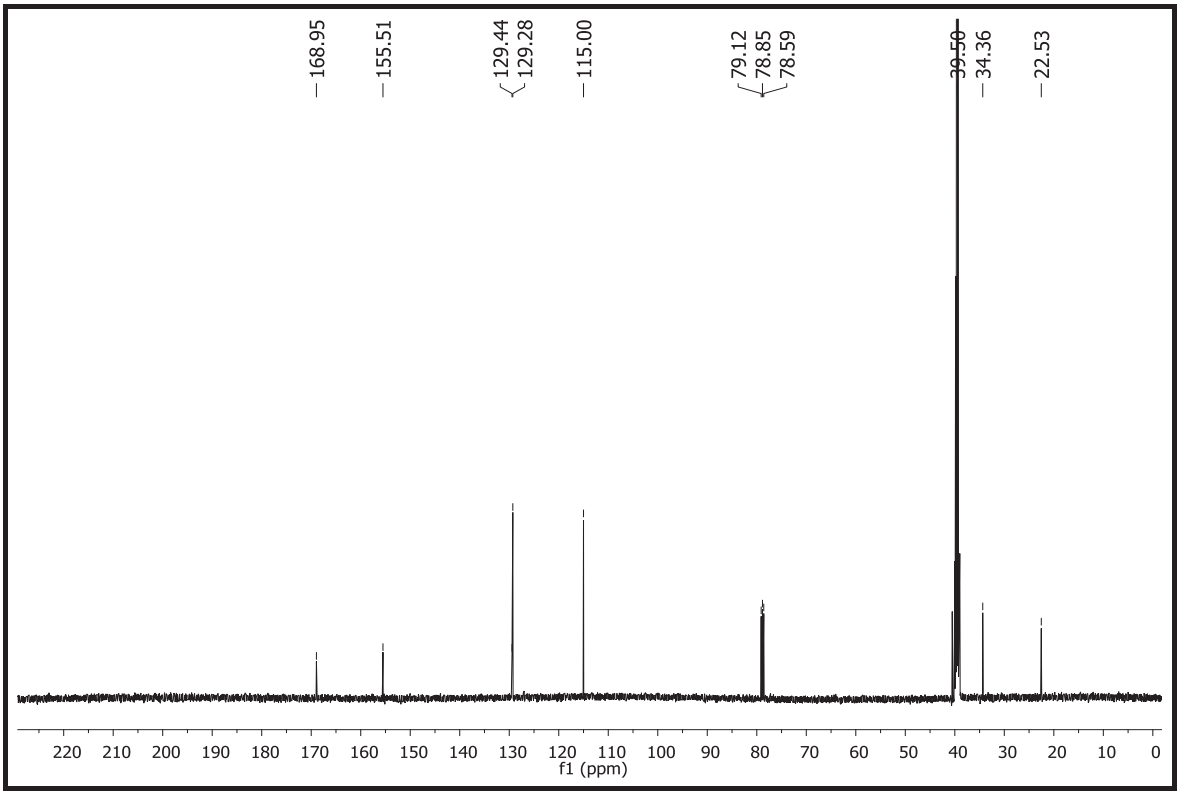


Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz).

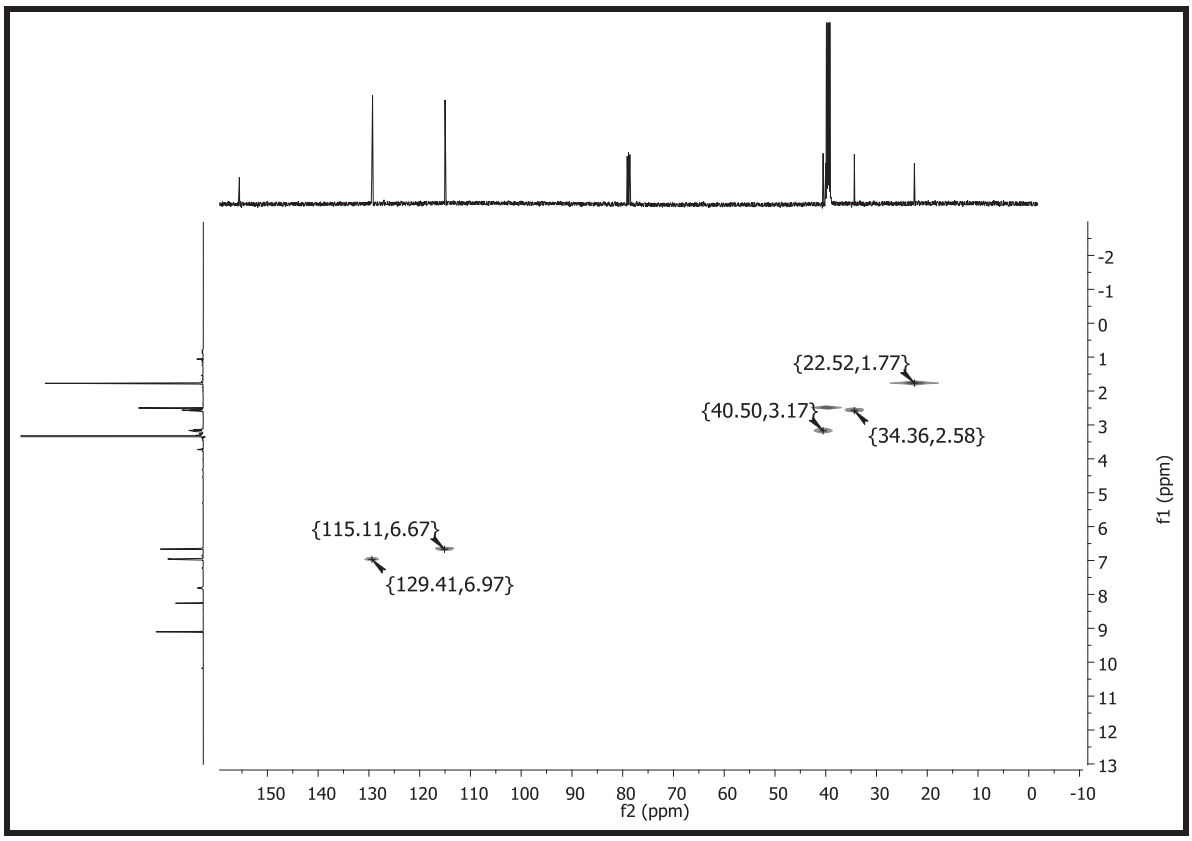


Figura 90. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz).

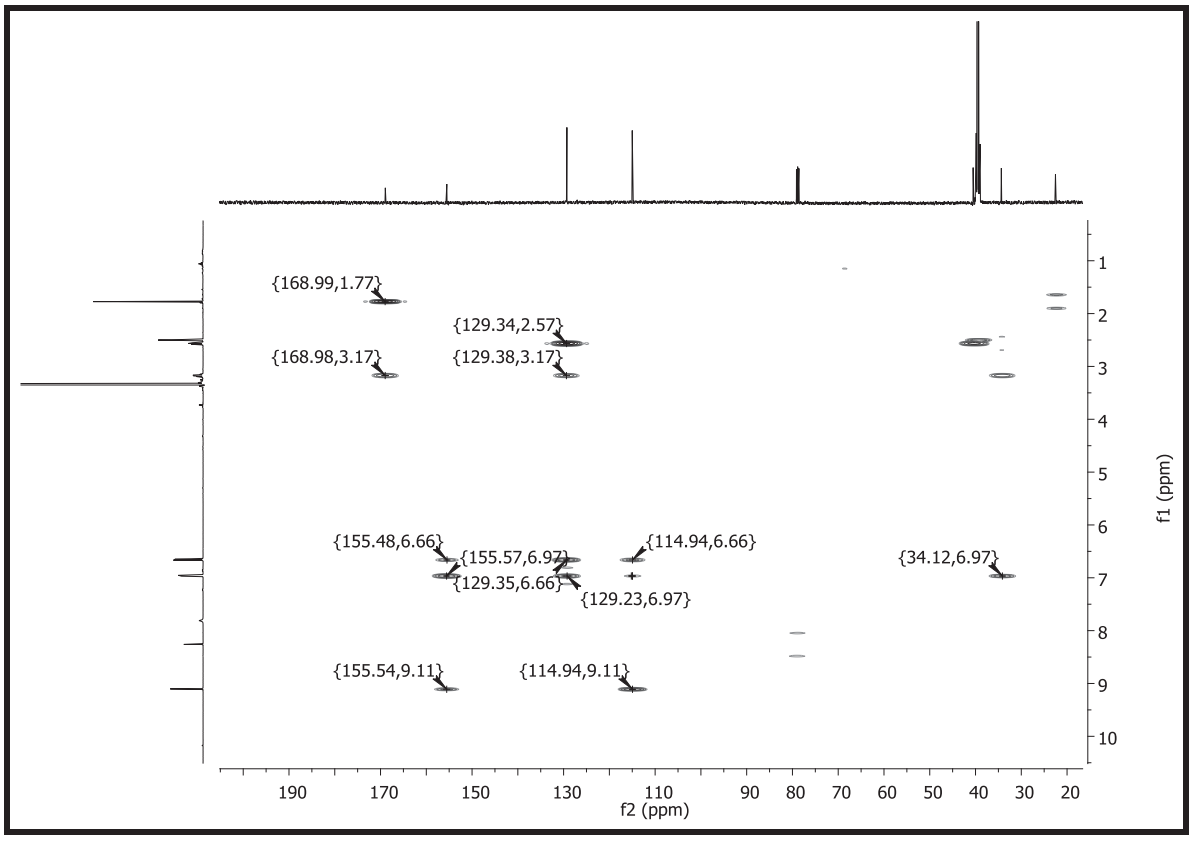


Figura 91. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz).

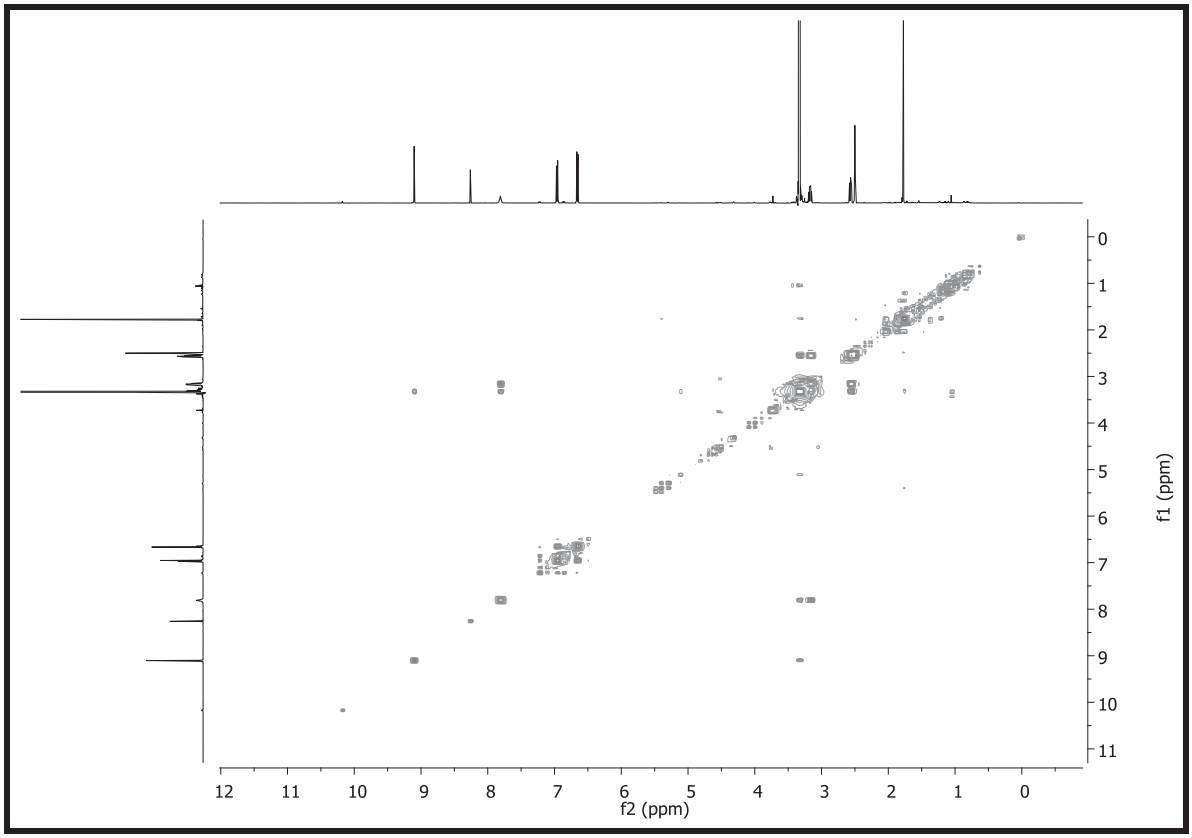


Figura 92. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **8** (DMSO-d_6, 500 MHz).

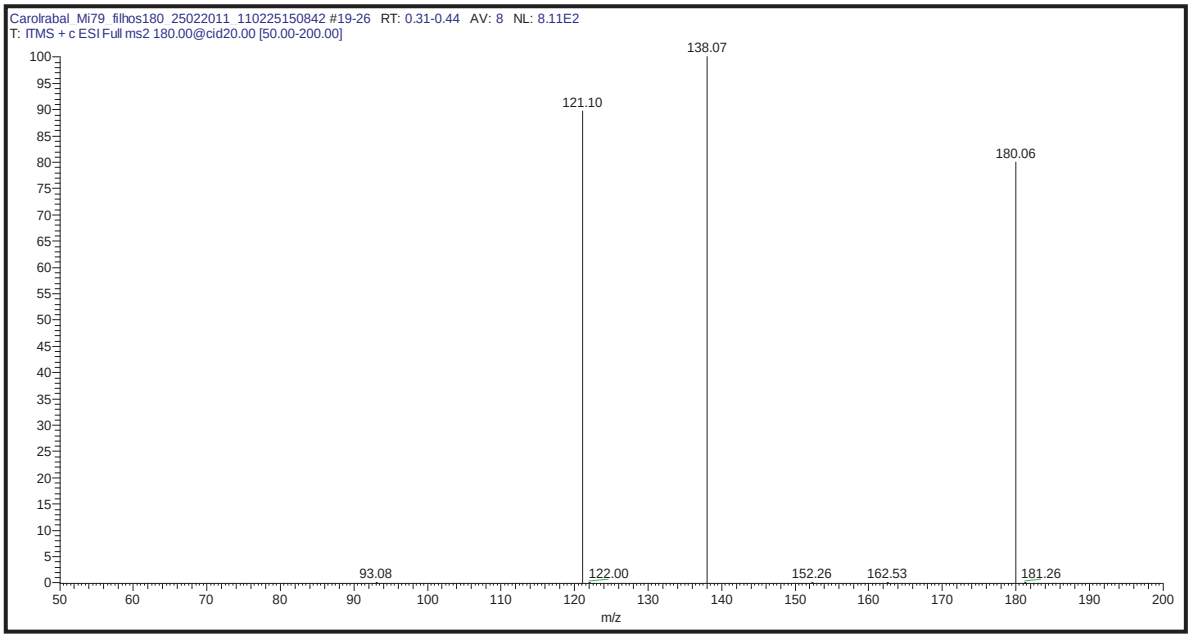


Figura 93. Fragmentação da substância **8**.

4.3.7 Elucidação estrutural da substância **9**

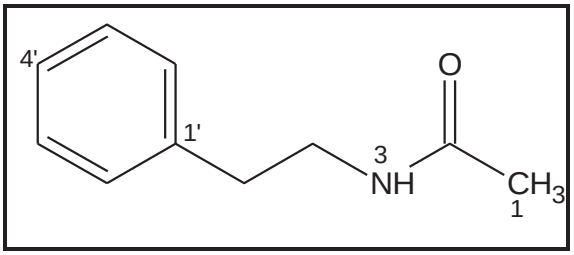


Figura 94. Estrutura da substância **9** (N-(2-feniletil) acetamida).

Os espectros de RMN de ^{1}H (Figura 96) e ^{13}C (Figura 97) evidenciaram a presença de uma carbonila, uma metila, dois grupos metilênicos, sendo um benzílico e o outro α à uma átomo de nitrogênio devido ao seu δ_C 40,5 ppm.

Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_H 7,17 (*t*; 1H; δ_C 126,5), 7,25 (*t*; 2H; δ_C 128,6) e δ_H 7,13 (*d*; 2H; δ_C 128,7) (Tabela 12) evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossubstituído. Estes sinais mostraram-se muito parecidos aos da substância **8**, sendo que as principais diferenças observadas, foram os hidrogênios aromáticos, evidenciando um anel *mono* ao invés de dissubstituído.

Todos os deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono através da análise de *g*HMQC (Figura 98).

As correlações observadas em *g*HMBC (Figura 99) de H-1/H-4↔C-2 (170,2) e H-4↔ C-1' (138,8) associado às correlações observadas em *g*COSY (Figura 100) entre H-4/H-5 e a comparação com dados da literatura **(**MASKEY et al., 2002; CAFÊU, 2007) permitiram identificar a substância **9** como sendo N-(2-feniletil)acetamida.

As curvas de UV da substância **9** (Figura 95) estão compatíveis com a estrutura da (N-(2-feniletil) acetamida).

A estrutura proposta para esta substância foi confirmada após análise por ESI-EM(+)20V onde há a presença da molécula protonada de *m/z* 164,08 ($[M+H]^+$) e o principal fragmento foi *m/z* 122,08 $[M+H-42]^+$ (Figura 101), o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular $C_{10}H_{12}NO$.

A substância **9** apresentou potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase. Esta substância já se encontra descrita na literatura, porém deve-se ressaltar o potencial antimicrobiano de diversas ariletilamidas (MASKEY et al., 2002).

Tabela 12. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C ($CDCl_3$, 500 MHz) de **9** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	1,87 (*s*)	23,2
2	-	170,2
3	*	-
4	3,45 (*m*)	40,7
5	2,75 (*t*; 7,0)	35,6
1'	-	138,8
2' e 6'	7,13 (*d;* 7,4)	128,7
3'e 5'	7,25 (*t;* 7,4)	128,6
4'	7,17 (*t;* 7,4)	126,5

*Sinal não observado.

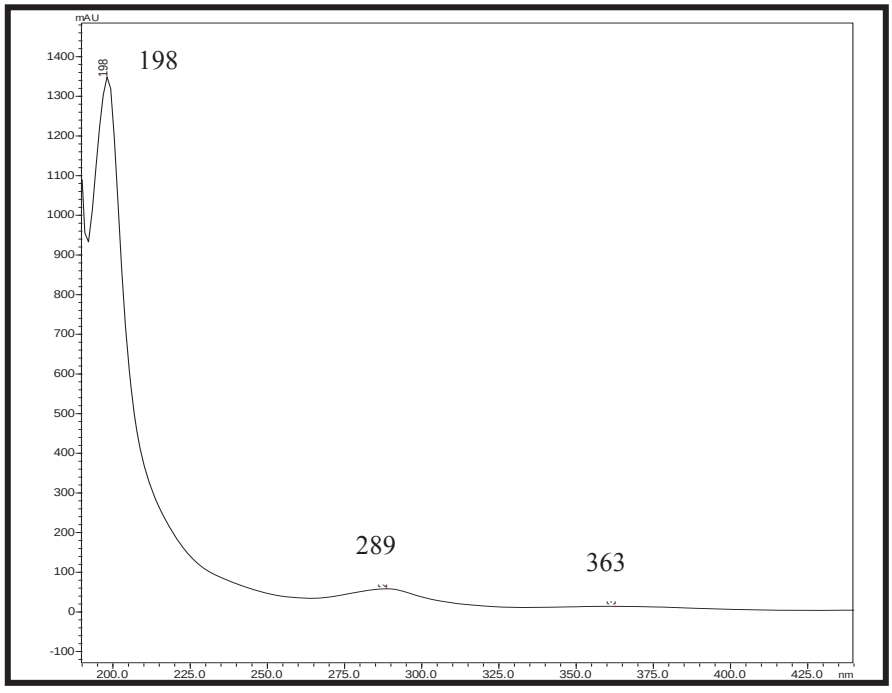


Figura 95. Curvas de UV da substância **9**.

.

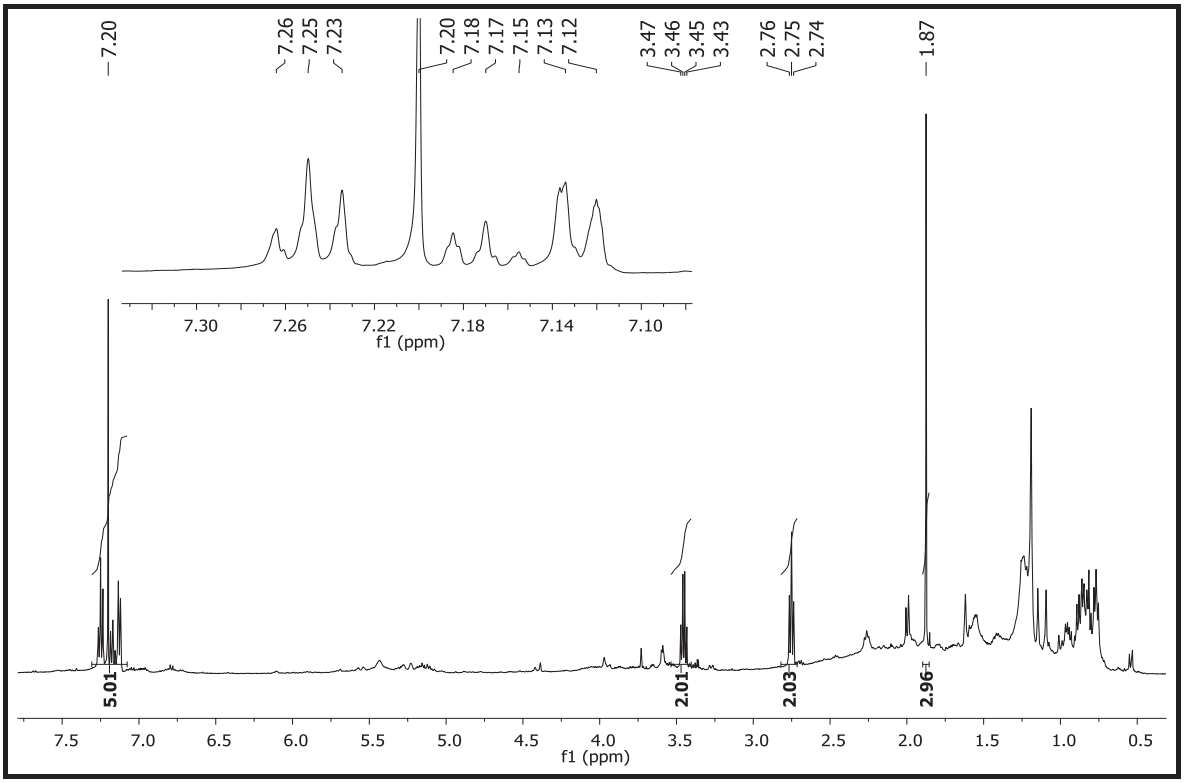


Figura 96. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz).

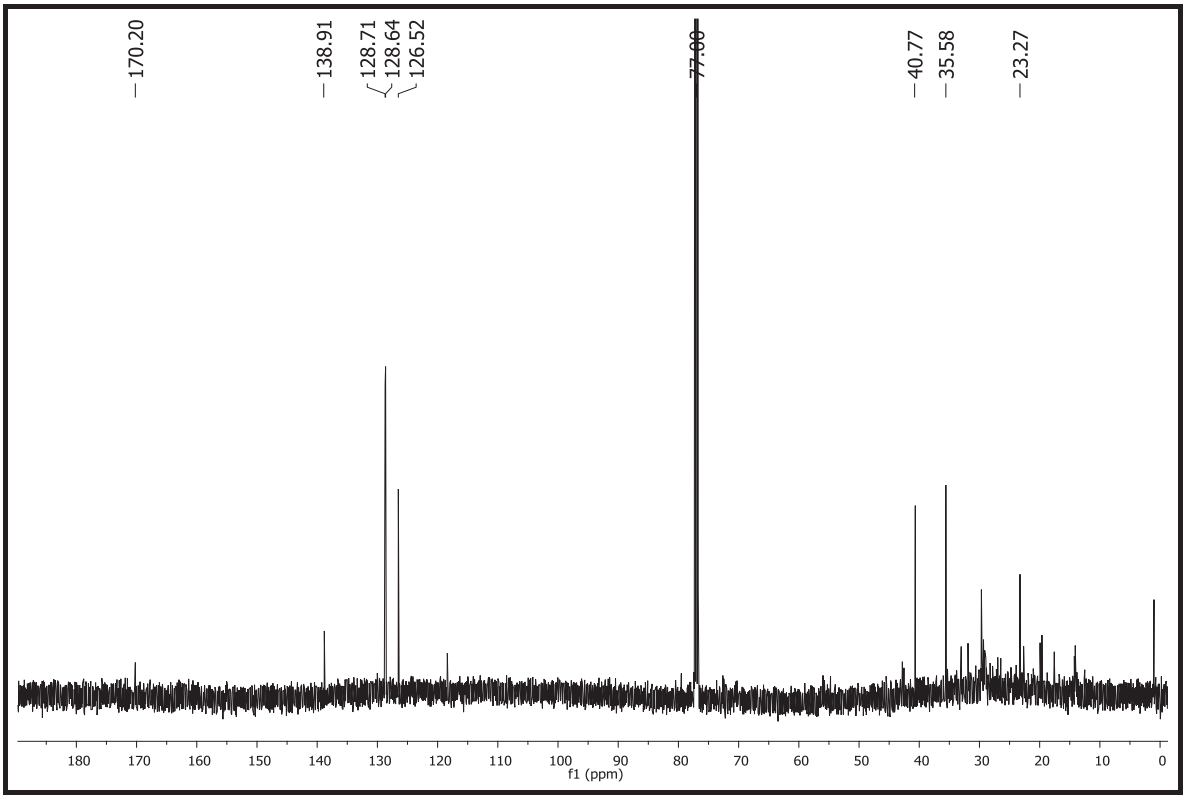


Figura 97. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz).

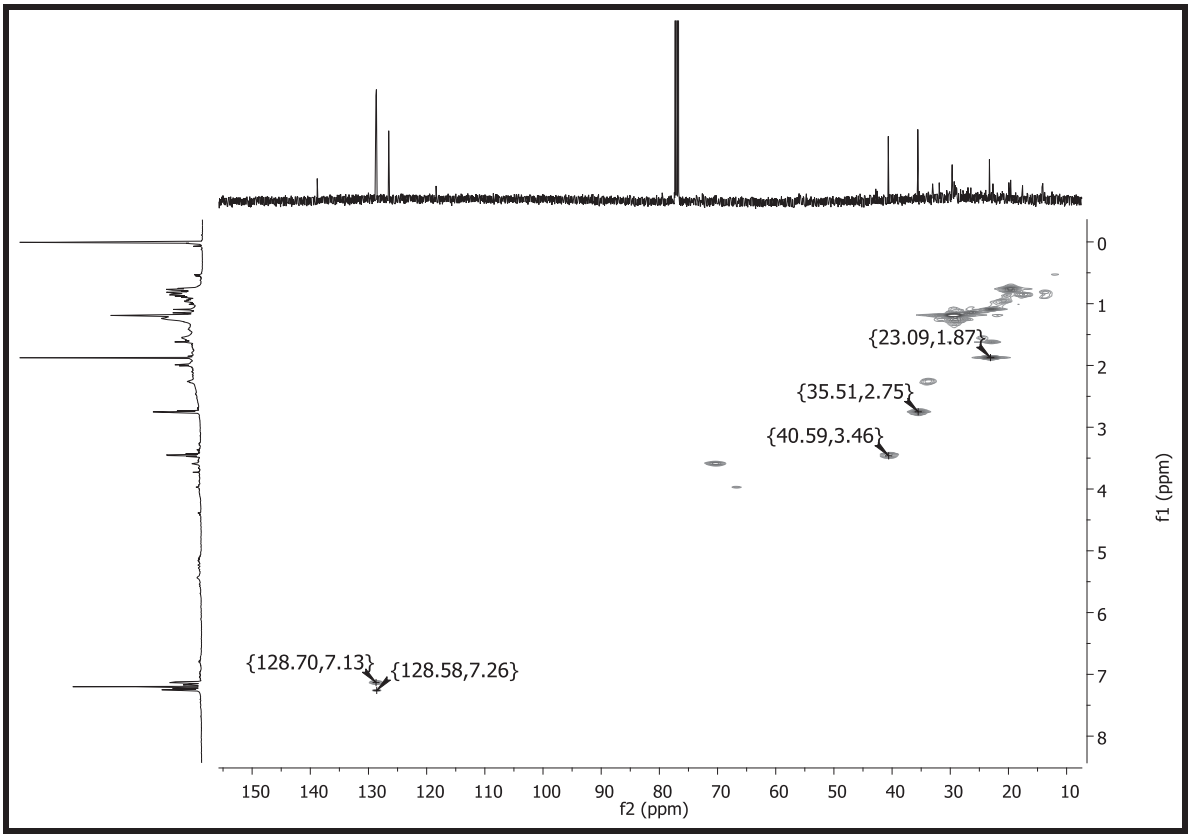


Figura 98. Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz).

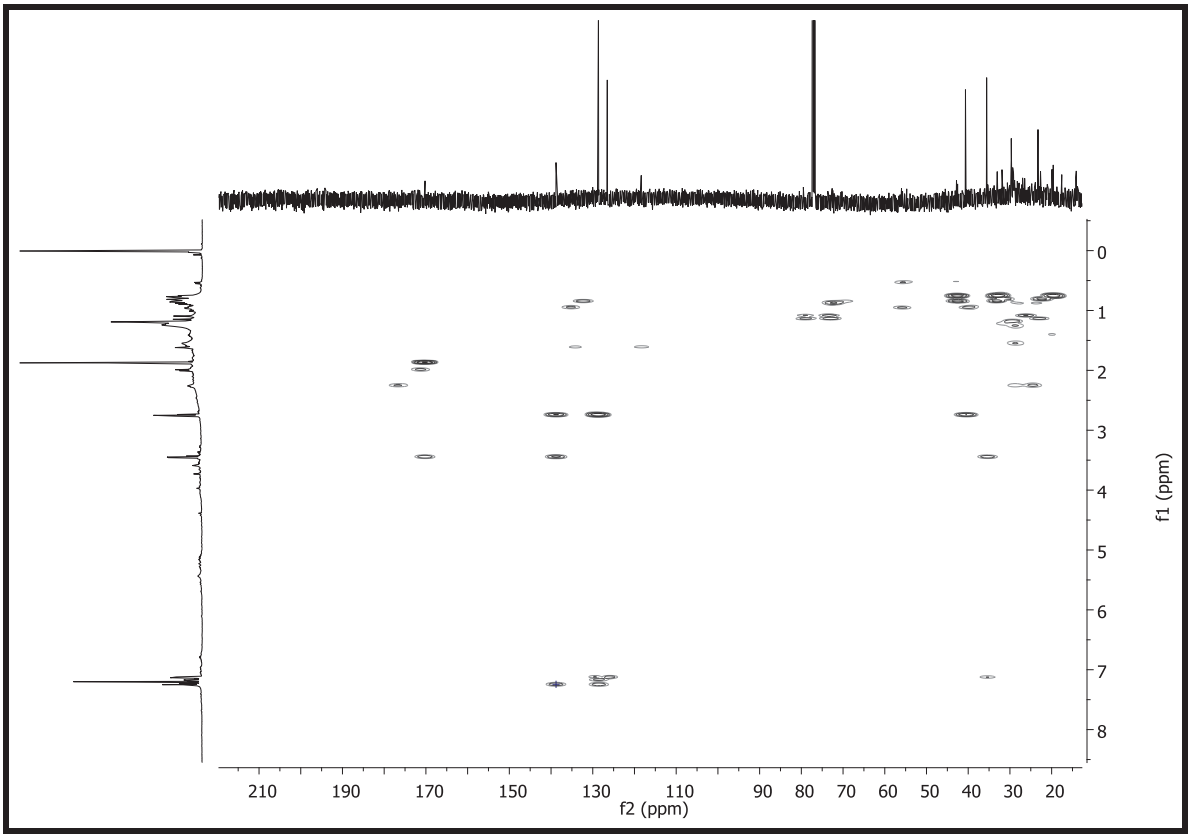


Figura 99. Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz).

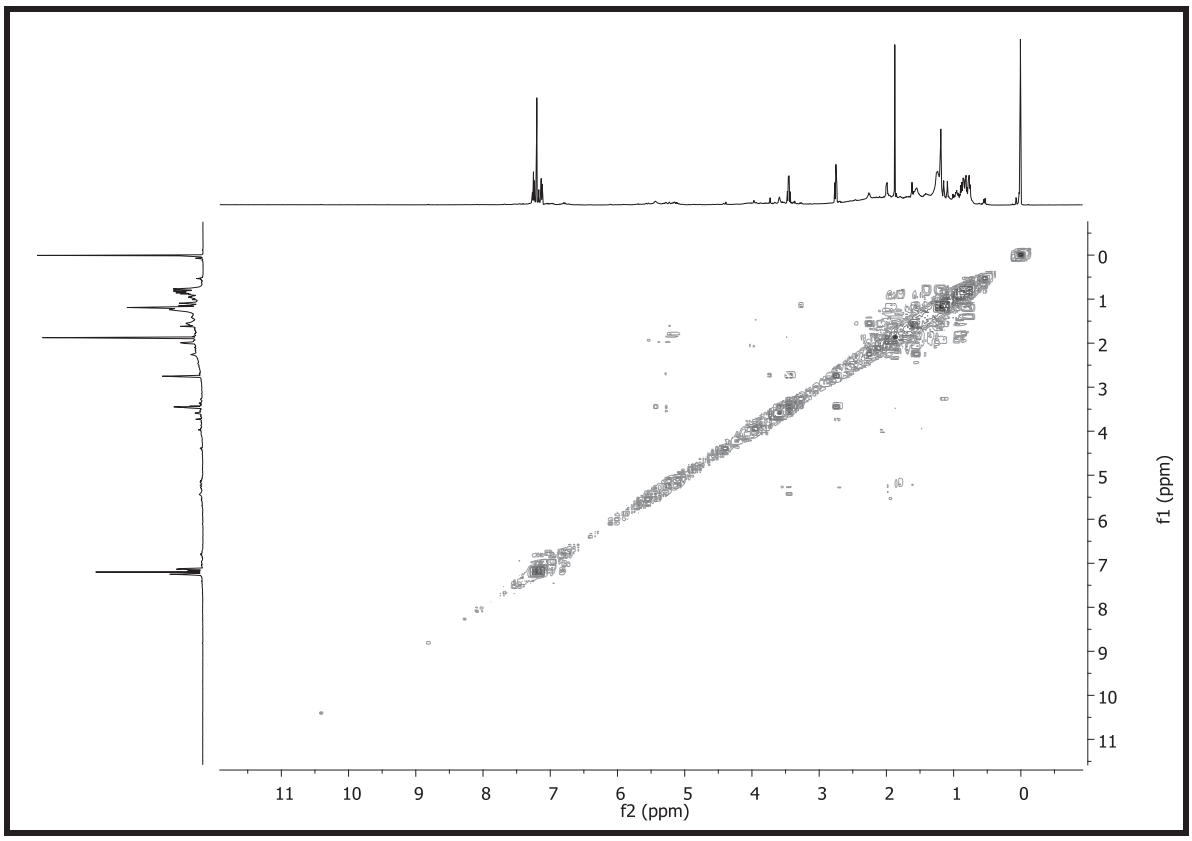


Figura 100. Mapa de contorno de *g*COSY da substância **9** ($CDCl_3$, 500 MHz).

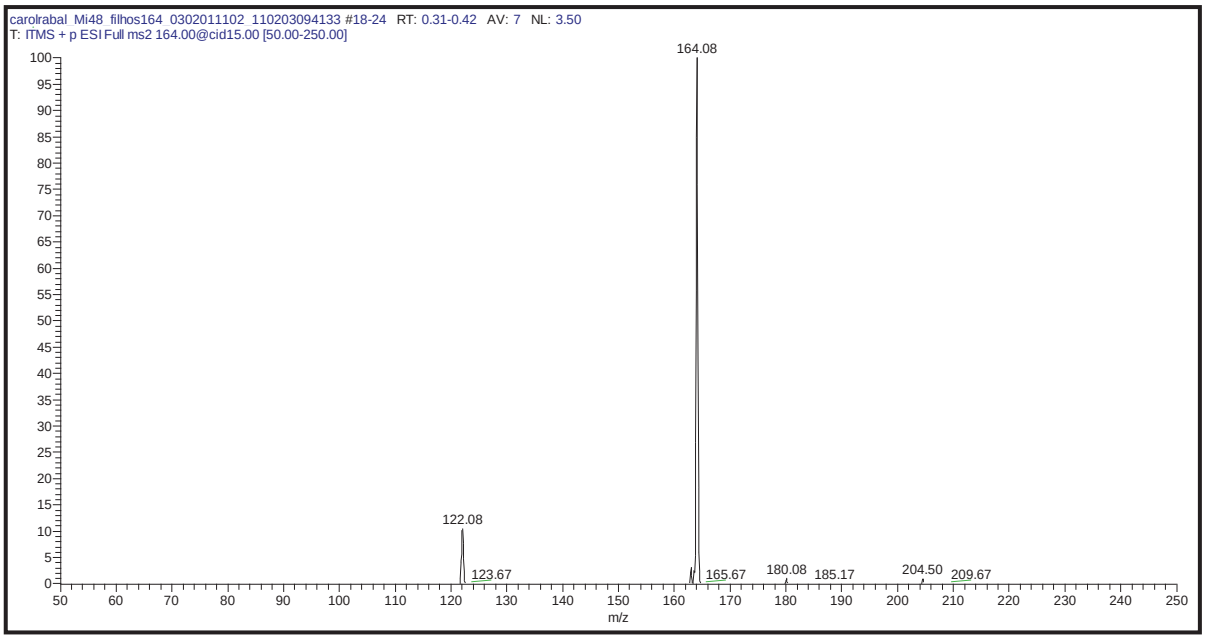


Figura 101. Fragmentação da substância **9**.

4.4 Identificação de dicetopiperazinas nos extratos brutos em pequena e escala ampliada produzidas por *S. commune*.

O estudo químico do extrato bruto produzido por *S. commune* em MBD nos conduziu ao isolamento de dicetopiperazinas, entre outras substâncias. Considerando que o meio de cultivo influencia a produção metabólica de micro-organismos, nos propusemos ao estudo por espectrometria de massas dos extratos obtidos em MBD, YM, Nutrient, Extrato de Malte, Czapek, Milho e Arroz, objetivando comparar a possível produção de dicetopiperazinas em outros meios de cultivo.

4.4.1 MBD (escala ampliada)

Objetivando estabelecer condições para a identificação de dicetopiperazinas por MS-MS, o extrato bruto em MBD (escala ampliada), do qual isolou-se dicetopiperazinas foi submetido inicialmente à análise por inserção direta (ID) sob modo positivo (Figura 102). Observou-se a presença das dicetopiperazinas protonadas: *ciclo*(L-Pro-L-Val) (**1**) de *m/z* 197,5 $[M+H]^+$, *ciclo*(Pro-Tyr) (**3**) de *m/z* 261,4 $[M+H]^+$, *Rel.ciclo*(Pro-Phe) (**5**) de *m/z* 245,5 $[M+H]^+$ e *Rel.ciclo*(Pro-Ile) (**6**) de *m/z* 211,5 $[M+H]^+$.

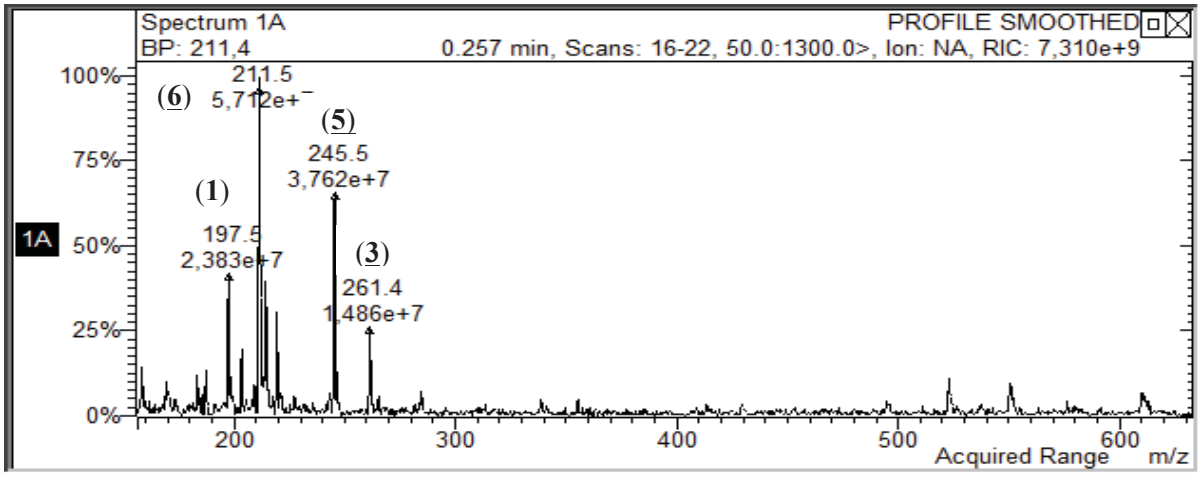


Figura 102. Espectro de massas por ID do Ext. bruto em MBD (escala ampliada).

Após a aquisição das informações referentes às moléculas protonadas por inserção direta, realizou-se os experimentos de MS-MS (Figura 103, 104 105 e 106).

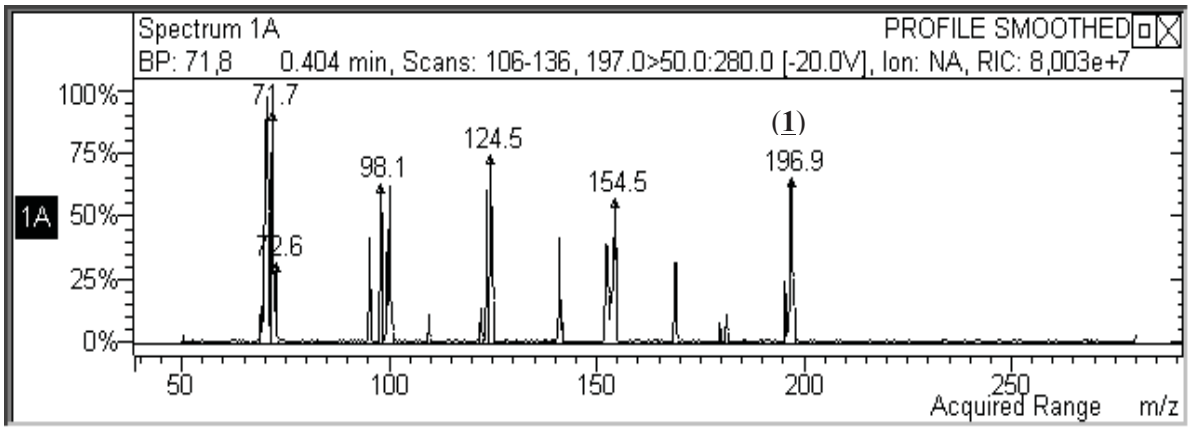


Figura 103. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 196,9 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada).

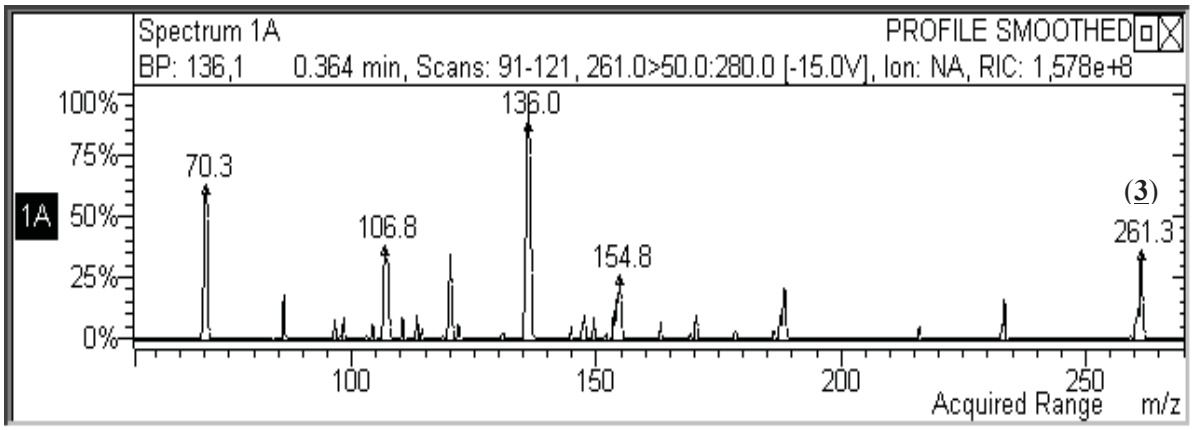


Figura 104. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 261,3 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada).

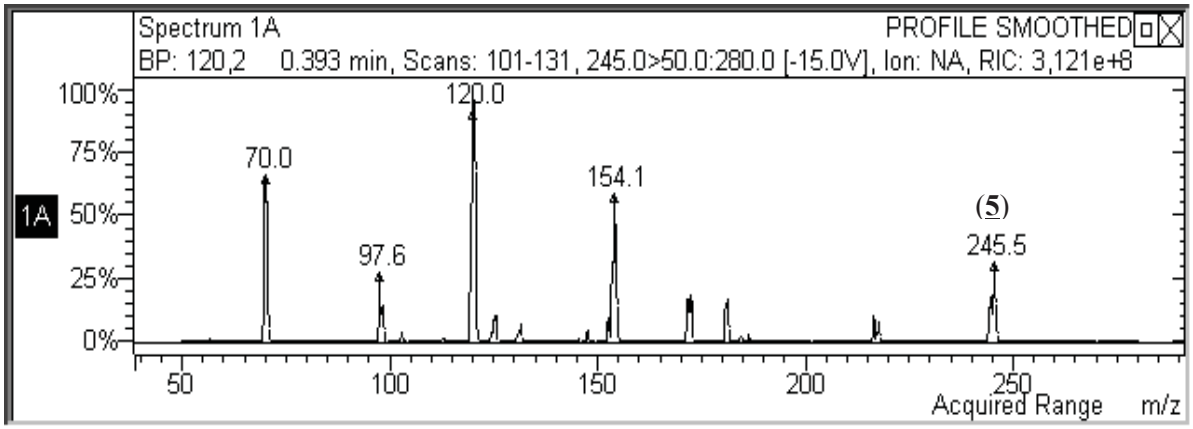


Figura 105. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,5 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada).

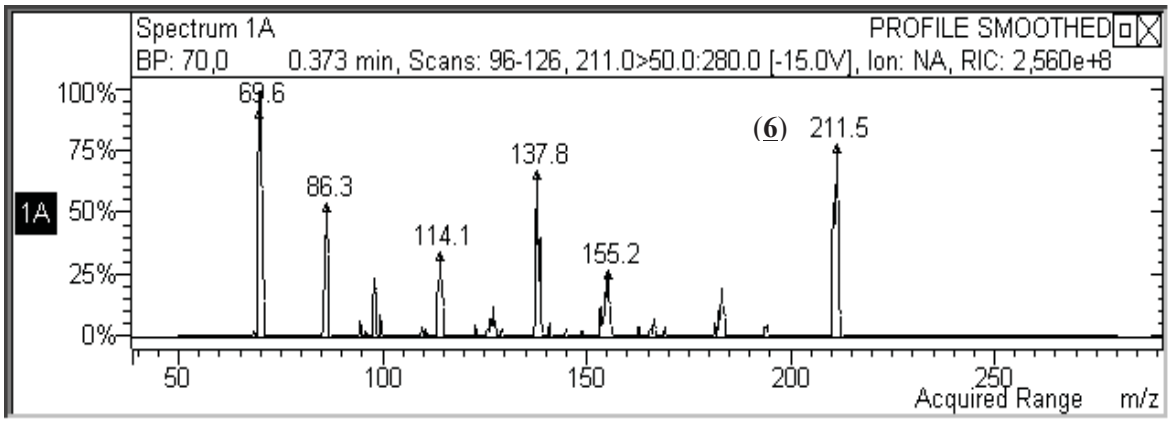


Figura 106. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,5 $[M+H]^+$ presente no Ext. bruto em MBD (escala ampliada).

Observou-se no experimento MS-MS a fragmentação das dicetopiperazinas que corroboram com a fragmentação característica obtida das dicetopiperazinas isoladas ou identificadas em mistura. Ressaltando que a energia de colisão selecionada para a dicetopiperazina *m/z* 196,9 $[M+H]^+$ foi de 20 V e para as demais foi de 15 V.

4.4.2 MBD (pequena escala)

4.4.2.1 MBD (peq. escala) - inserção direta (ID)

O extrato bruto em MBD (peq. escala) foi submetido à análise por inserção direta (ID) sob modo positivo (Figura 107) e observou-se a presença das dicetopiperazinas protonadas: *ciclo*(L-Pro-L-Val) (**1**) de *m/z* 197,5 $[M+H]^+$, *ciclo*(Pro-Tyr) (**3**) de *m/z* 261,4 $[M+H]^+$, *Rel.ciclo*(Pro-Phe) (**5**) de *m/z* 245,5 $[M+H]^+$ e *Rel.ciclo*(Pro-Ile) (**6**) de *m/z* 211,5 $[M+H]^+$.

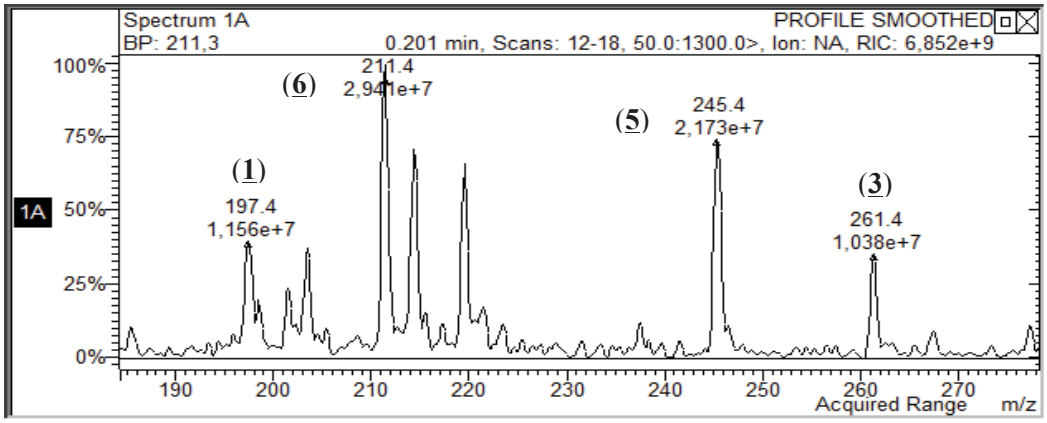


Figura 107. Espectro de massas por ID do Ext. bruto em MBD (pequena escala).

4.4.2.2 MBD (peq. escala) MS-MS

O extrato bruto em MBD (pequena escala) foi submetido à análise MS-MS sob modo positivo aplicando 15 V de energia de colisão (Figura 108, 109, 110 e 111). Observou-se a presença e as fragmentações características das dicetopiperazinas (**1**, **6**, **5** e **3**) protonadas.

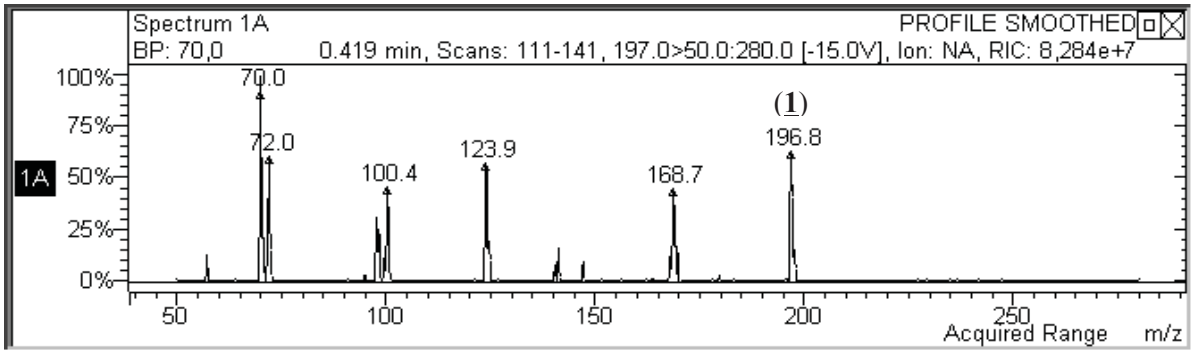


Figura 108. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 196,8 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala).

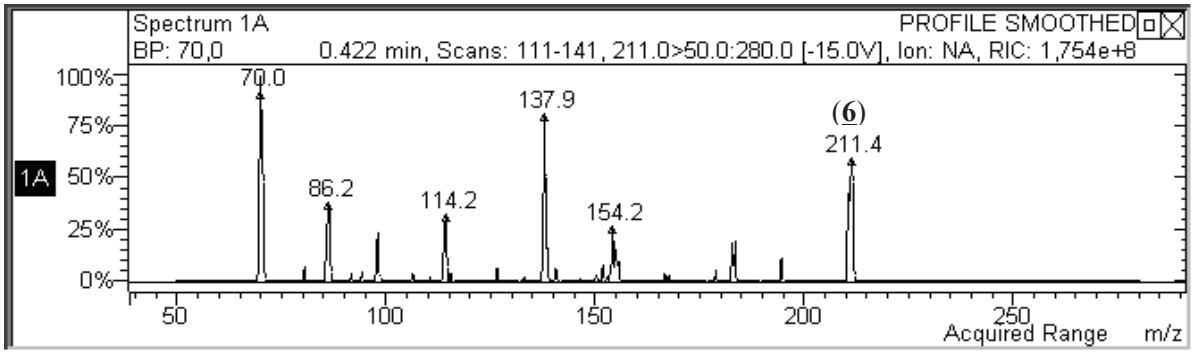


Figura 109. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,4 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala).

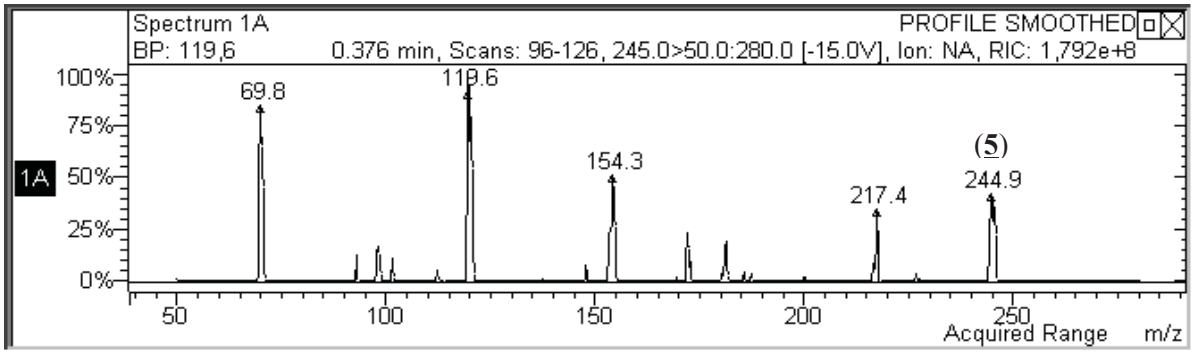


Figura 110. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 244,9 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala).

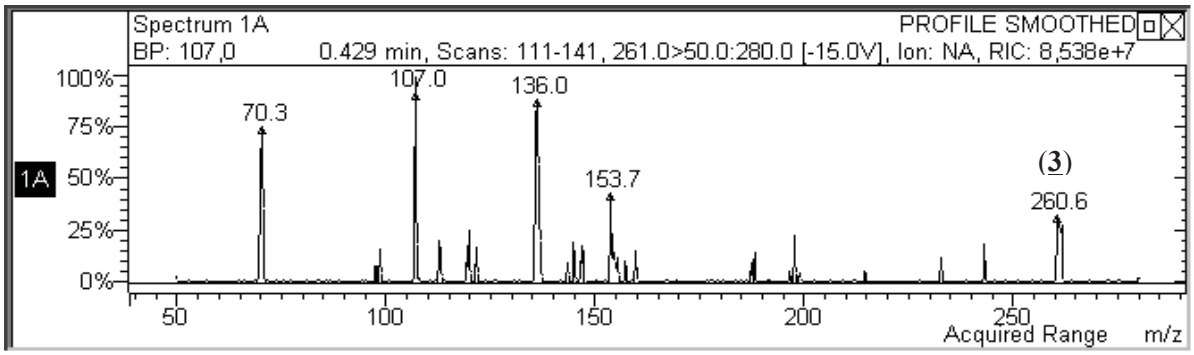


Figura 111. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 260,6 $[M+H]^+$ em MBD (peq. escala).

4.4.3 YM (pequena escala)

O extrato bruto em YM (pequena escala) foi submetido à análise MS-MS sob modo positivo aplicando 15 V de energia de colisão (Figura 112, 113 e 114). Observou-se a presença e as fragmentações características das dicetopiperazinas (**1**, **6** e **5**) protonadas.

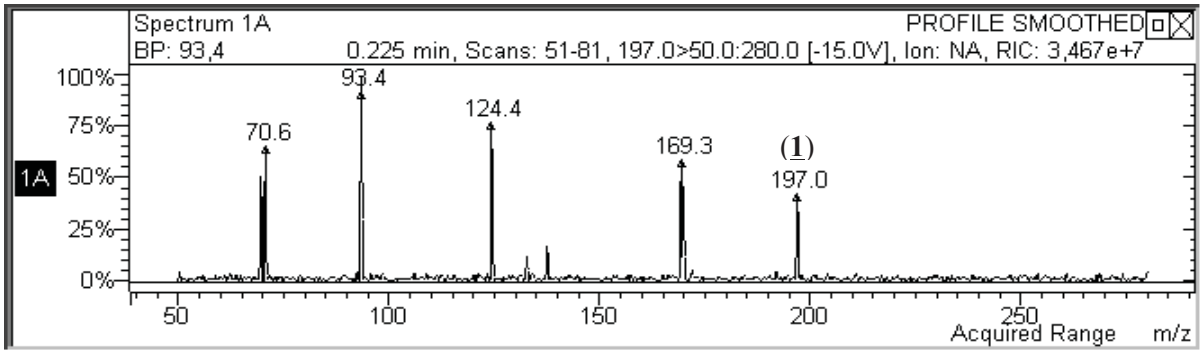


Figura 112. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 197,0 $[M+H]^+$ em YM (peq. escala).

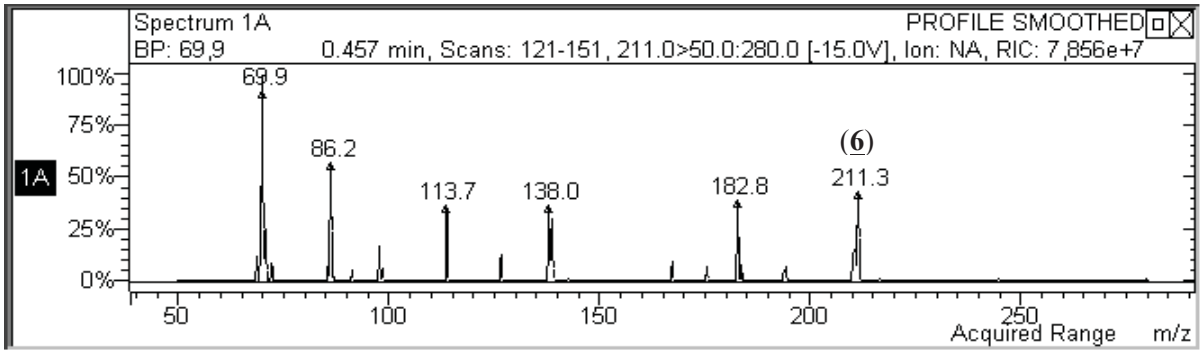


Figura 113. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,3 $[M+H]^+$ em YM (peq. escala).

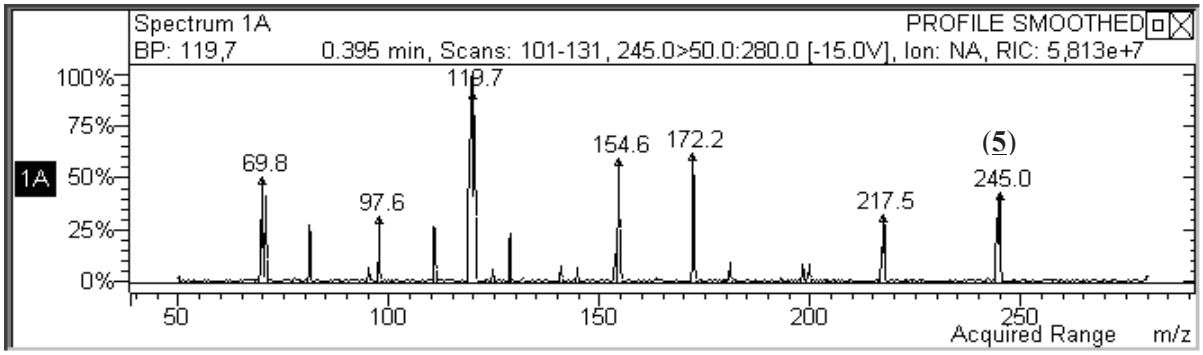


Figura 114. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,0 $[M+H]^+$ em YM (peq. escala).

4.4.4 Nutrient (pequena escala)

O extrato bruto em Nutrient (pequena escala) foi submetido à análise MS-MS sob modo positivo aplicando 15 V de energia de colisão (Figura 115, 116 e 117). Observou-se a presença e as fragmentações características das dicetopiperazinas (**1**, **6** e **5**) protonadas.

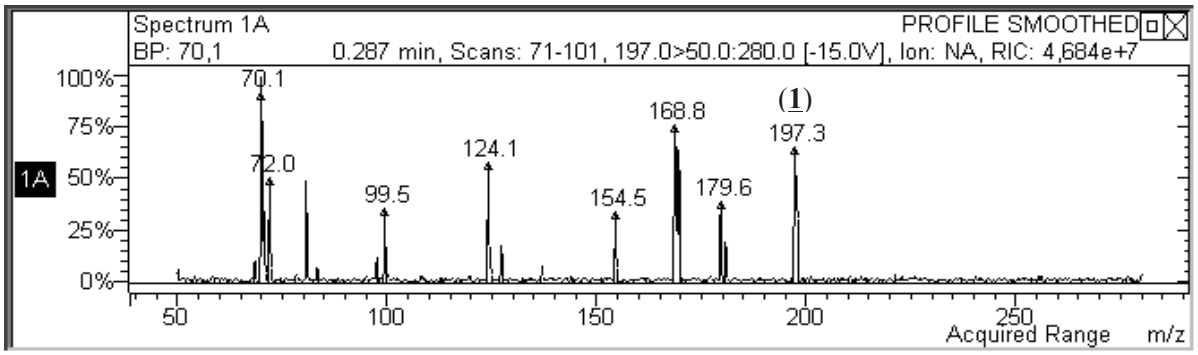


Figura 115. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 197,3 $[M+H]^+$ em Nutrient (peq. escala).

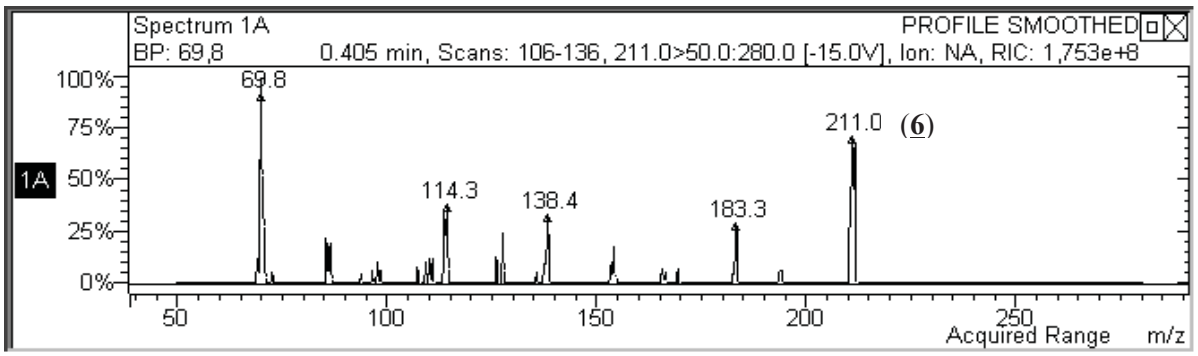


Figura 116. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,0 $[M+H]^+$ em Nutrient (peq. escala).

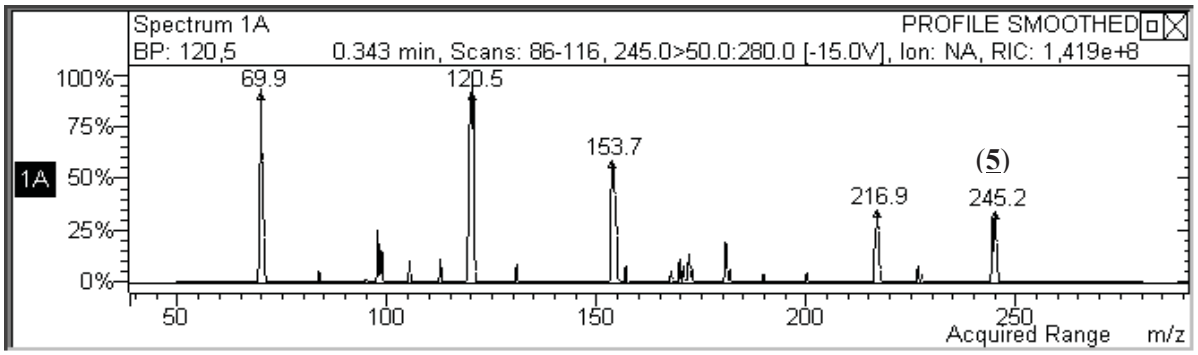


Figura 117. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,2 $[M+H]^+$ em Nutrient (peq. escala).

4.4.5 Ext. de Malte (pequena escala)

O extrato bruto em Malte (pequena escala) foi submetido à análise MS-MS sob modo positivo aplicando 15 V de energia de colisão (Figura 118, 119 e 120). Observou-se a presença e as fragmentações características das dicetopiperazinas (**1**, **6** e **5**) protonadas.

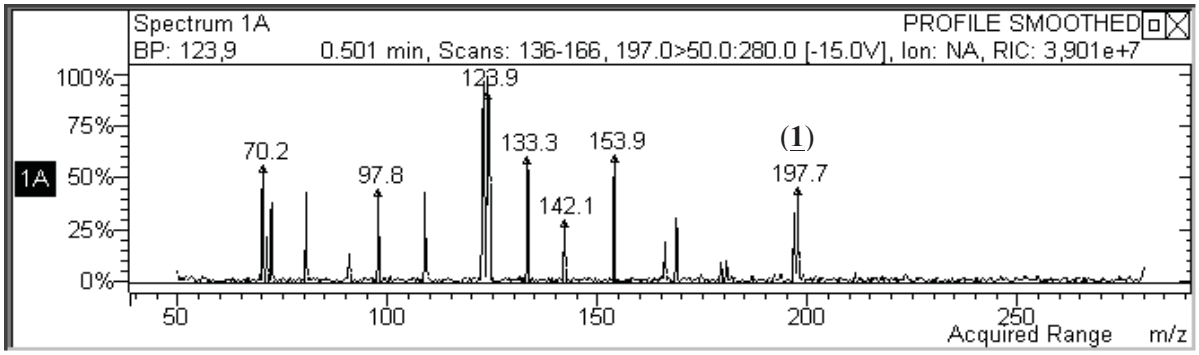


Figura 118. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 197,7 $[M+H]^+$ em Ext. Malte (peq. escala).

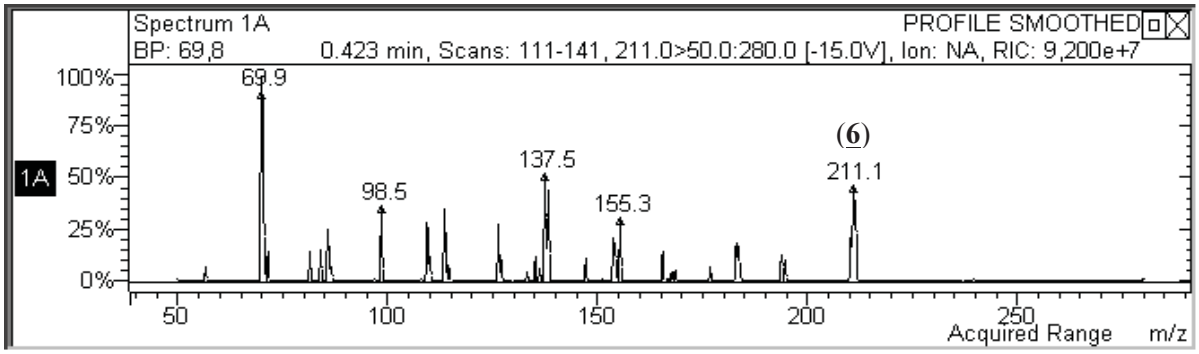


Figura 119. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 211,1 $[M+H]^+$ em Ext. Malte (peq. escala).

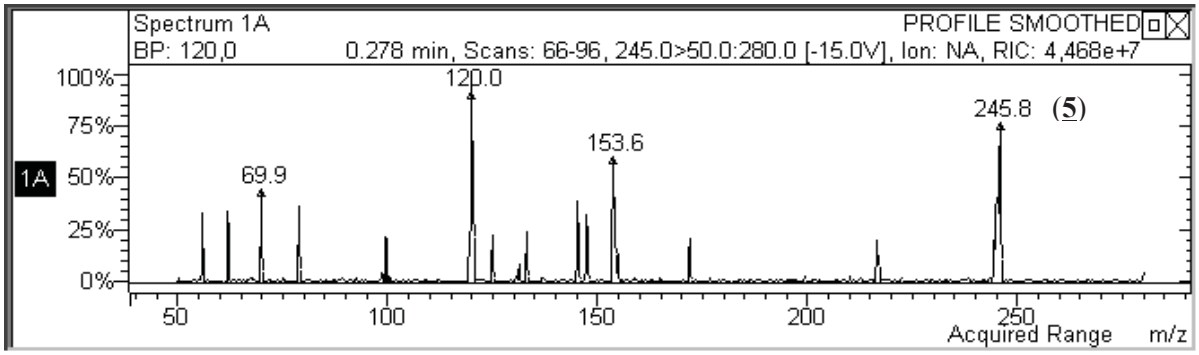


Figura 120. Espectro de massas (MS-MS) de *m/z* 245,8 $[M+H]^+$ em Ext. Malte (peq. escala).

Nos extratos brutos em pequena escala em Czapek, Arroz (CH_3CN) e Milho (CH_3CN) não foram identificados as dicetopiperazinas pela espectrometria de massas. Este fato pode ser atribuído a ausência de proteínas ou seus constituintes fundamentais, os aminoácidos, nestes meios de cultivo, os quais são os precursores da síntese das dicetopiperazinas.

4.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos, frações e substâncias produzidas por *S. commune*.

4.5.1 Ensaio Antioxidante (DPPH qualitativo)

O teste para avaliar o potencial antioxidante tanto dos extratos brutos em pequena e escala ampliada consiste na descoloração de uma solução violeta composta por radicais estáveis DPPH• quando há a presença de substâncias que podem transferir elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração violeta (Figura 121) (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006).

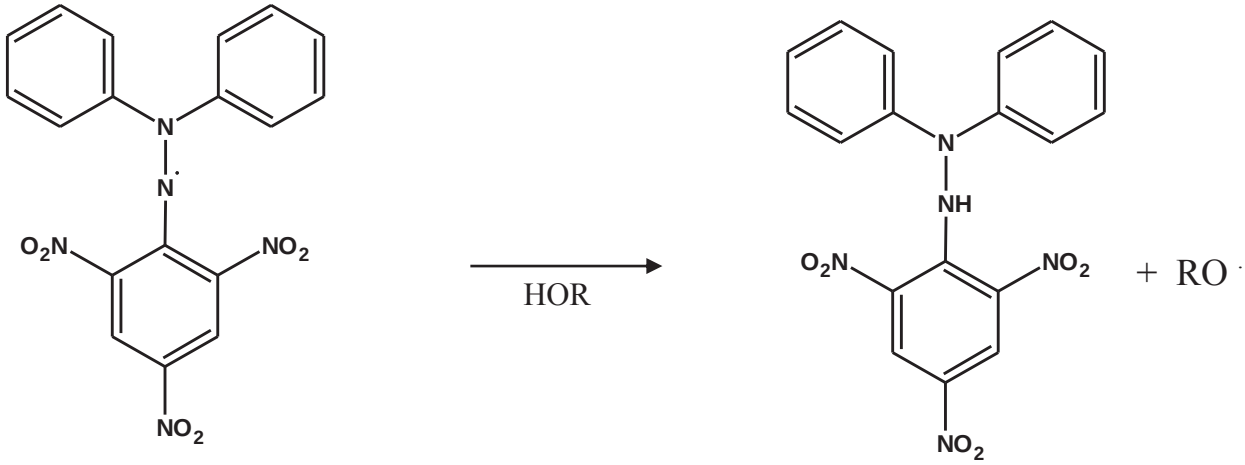


Figura 121. Esquema da reação envolvida no ensaio com DPPH.

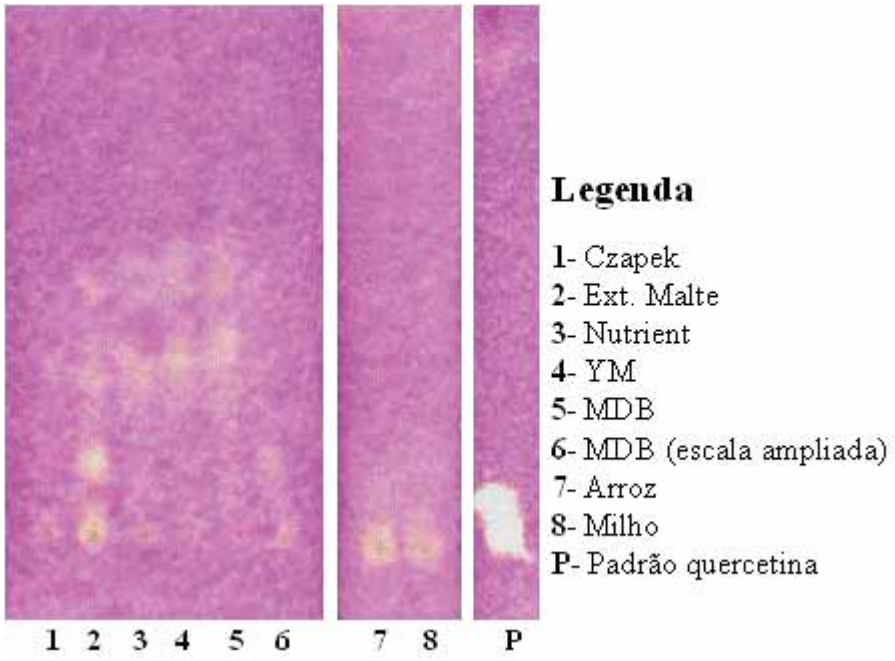


Figura 122. Avaliação qualitativa do potencial antioxidante dos extratos brutos (peq. escala) e do extrato em MBD em escala ampliada com DPPH.

A avaliação qualitativa dos extratos foi realizada em cromatoplacas de sílica gel e revelada com solução metanólica do radical DPPH, indicando que todos os extratos (Figura 122) apresentam substâncias com potencial antioxidante, evidenciado pela presença de manchas amareladas sobre fundo violeta, resultantes da redução do radical DPPH.

4.5.2 Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH

O extrato bruto MBD em escala ampliada não apresentou atividade significativa de seqüestro do radical DPPH. Analisando os resultados dos extratos brutos em pequena escala, observou-se que os extratos em milho e arroz apresentaram uma taxa de seqüestro de DPPH acima dos outros extratos brutos (peq. escala), destacando apenas o extrato de Malte com uma significativa taxa de seqüestro de DPPH de 68,36% e um IC_{50}= 28,7 μg mL^{-1}, quando comparado com o IC_{50}= 7,49 μg mL^{-1} do padrão quercetina (Figura 123 e Tabela 13).

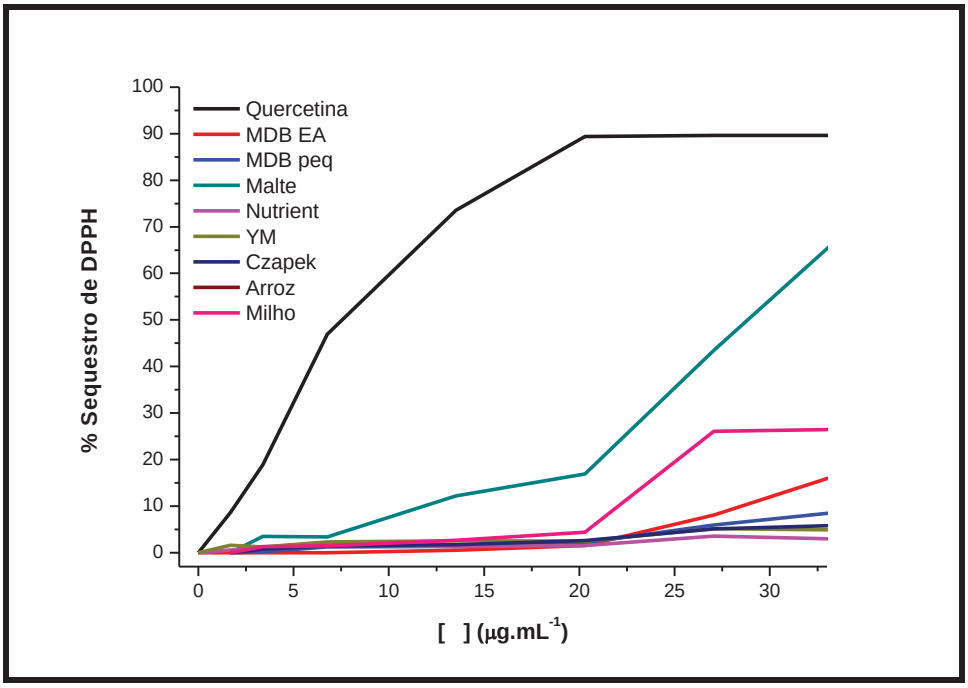


Figura 123. Gráfico da concentração do extrato em MBD em escala ampliada e dos extratos (peq. escala) versus % de seqüestro de DPPH.

Tabela 13. Avaliação da % de seqüestro de DPPH dos extratos brutos.

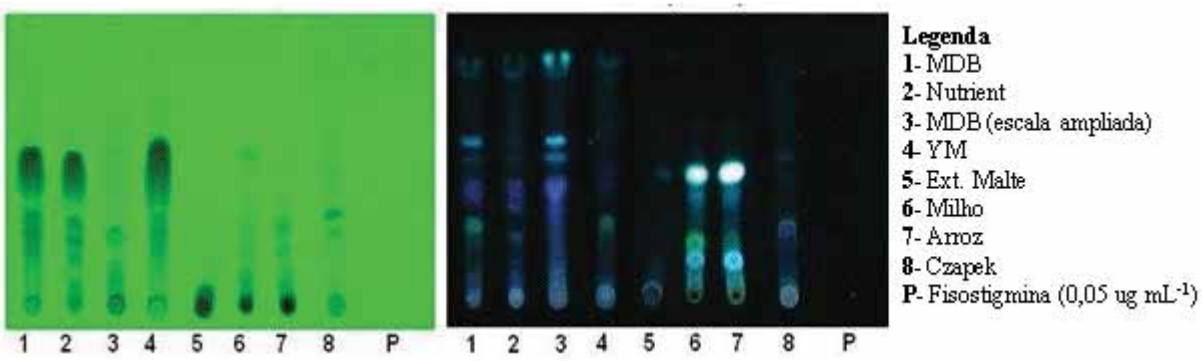
Amostras	**CI_{50} (µg mL^{-1})**
MBD (escala ampliada)	n*
MBD peq	
Extrato de Malte	28,7
Nutrient	n*
YM	n*
Czapek	n*
Arroz	n*
Milho	n*
Quercetina	7,49

* não apresentaram atividade significativa.

4.5.3 Ensaio Anticolinesterásico

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

Então visto o potencial das plantas para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase realizou-se o ensaio bioautográfico (CCDC) para os extratos brutos (Figura 124 e 125), para as frações (Figura 126) do extrato bruto em MBD e para as substâncias **7**, **8** e **9**. Este método possibilita uma resposta rápida quanto à atividade e a localização desta atividade em matrizes complexas (MARSTON; KISSLING; KOSTETTMANN, 2002).



(a) $\lambda = 254$ nm (b) $\lambda = 366$ nm

Figura 124. Cromatoplacas dos extratos brutos em (a) 254 nm e (b) 366 nm.

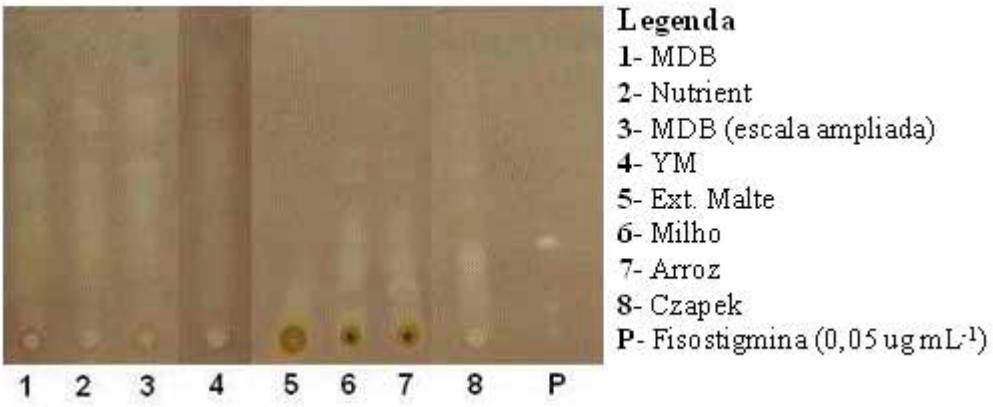


Figura 125. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos (peq. escala) e do extrato em MBD em escala ampliada.

Conclui-se que o aparecimento de halos brancos nesta cromatoplaca em fundo roxo (Figura 125), comparando-se com o controle positivo (fisostigmina), indicam que todos os extratos brutos apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase mesmo que em baixa intensidade.

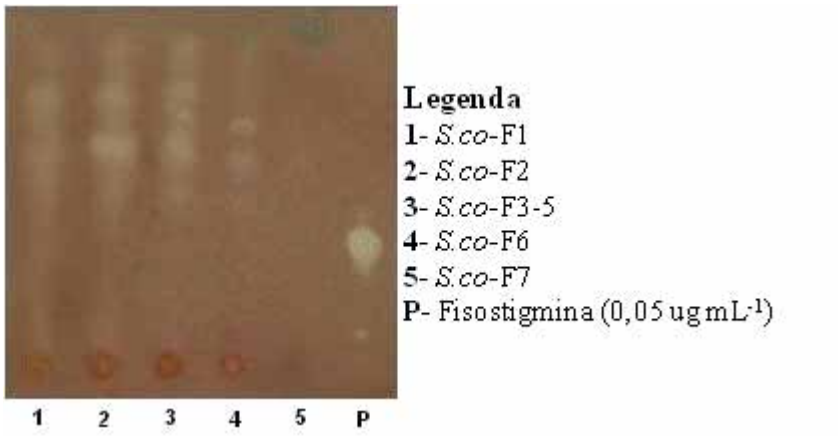


Figura 126. Avaliação da atividade anticolinesterásica das frações (item 3.3.4).

Os resultados indicam que todas as frações, exceto a *S.co*-F6 possui constituintes capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase.

As substâncias **7**, **8** e **9** apresentaram potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.

4.5.4 Ensaio Tripanocida

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um protozoário parasita transmitido aos mamíferos por insetos sugadores de sangue. Infecções provocadas pelo *T. cruzi*, conhecida como doença de Chagas representam o maior problema da saúde pública em países endêmicos localizados na América do Sul e na América Central (UCHIYAMA, 2009). Estes dados incentivam a busca por novos produtos naturais para que esta situação seja solucionada ou pelo menos controlada.

Este ensaio foi realizado tanto para os extratos brutos (Tabela 14) quanto para as frações (Tabela 15) do extrato bruto em MBD de *S. commune*.

Tabela 14. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos brutos.

Amostras	CI_{50} (µg mL^{-1})
MBD	>500
Nutrient	249
Ext. Malte	>500
YM	419
Czapek	>500
Milho	45,7
Arroz	41,0
MBD (escala ampliada)	>500

Analisando-se os resultados obtidos para os diferentes meios de cultivo (pequena escala) e o MBD (escala ampliada) (Tabela 14), comparando-se com o controle positivo (benzonidazol, IC_{50}= 9 µg mL^{-1}) e considerando que as amostras são extratos brutos, conclui-se que os extratos brutos obtidos em meios sólidos (arroz e milho) apresentaram IC_{50} satisfatório.

Tabela 15. Avaliação da atividade tripanocida das frações do Ext. bruto em MBD de *S. commune*.

Amostras*	CI_{50} (µg mL^{-1})
S.co-F1	>500
S.co-F2	>500
S.co-F3-5	202
S.co-F6	-
S.co-F7	>500

* Frações provenientes da partição do extrato AcOEt, demonstrada na Figura 10 da p. 50.

Os resultados obtidos para as frações não foram promissores, corroborando com o resultado obtido para o extrato bruto em MBD em escala ampliada (>500 µg mL^{-1}).

4.5.5 Ensaio Antifúngico

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

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

4.5.5.1 Ensaio contra patógenos Humanos

Este ensaio foi realizado tanto para os extratos brutos (Tabela 16) quanto para as frações (Tabela 17) do extrato bruto em MBD de *S. commune*.

Tabela 16. Avaliação do potencial dos extratos brutos contra patógenos humanos.

Amostras	CIM (µg mL^{-1})			
	Candida albicans	*Candida krusei*	*Candida parapsilosis*	*Cryptococcus neoformans*
MBD	125	250	250	125
Nutrient	125	125	250	125
Ext. Malte	250	250	250	250
YM	250	250	250	250
Czapek	125	250	250	250
Milho	125	125	250	125
Arroz	125	250	250	62,5
MBD (escala ampliada)	250	250	250	125

Analisando-se os resultados obtidos para os diferentes meios de cultivo (pequena escala) e o MBD (escala ampliada) (Tabela 16) e comparando-se com o controle positivo (fluconazol, CIM= 16 µg mL^{-1}) conclui-se que os extratos brutos apresentaram atividade inibitória baixa contra o fungo *Candida parapsilosis*, moderada para *Candida albicans, Candida krusei e para Cryptococcus neoformans,* destacando-se uma alta atividade para o extrato bruto em arroz contra *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 17. Avaliação da atividade das frações em MBD de *S. commune* contra patógenos humanos.

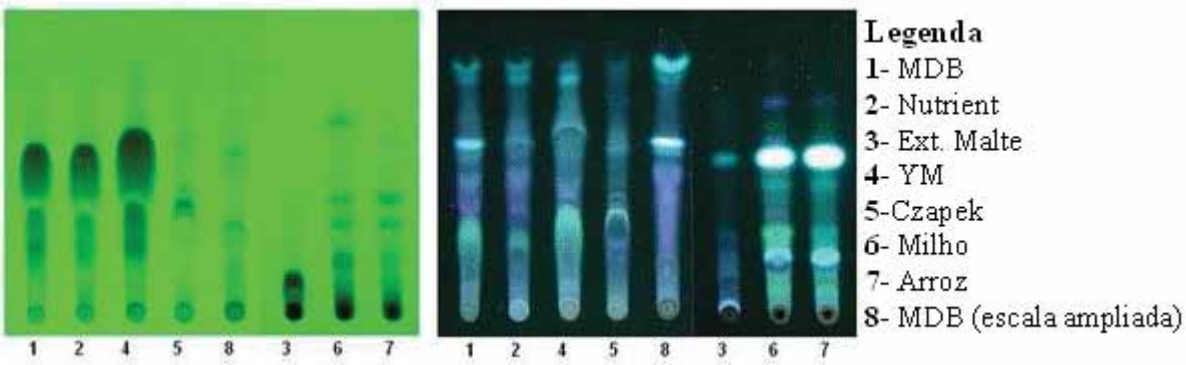
Amostras*	CIM (µg mL^{-1})			
	Candida albicans	*Candida krusei*	*Candida parapsilosis*	*Cryptococcus neoformans*
S.co-F1	250	250	250	250
S.co-F2	250	250	250	250
S.co-F3-5	125	250	250	250
S.co-F6	125	>250	>250	250
S.co-F7	125	>250	>250	125

* Frações provenientes da partição do extrato AcOEt, demonstrada na Figura 10 da p. 50.

As frações apresentaram baixa atividade inibitória contra *Candida krusei, Candida parapsilosis e Cryptococcus neoformans,* e atividade intermediária contra *Candida albicans* (fluconazol, CIM= 16 µg mL^{-1}).

4.5.5.2 Ensaio contra fitopatogênicos

A detecção do potencial antifúngico por bioautografia em CCDC (Figura 127) com nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides e Cladosporium sphaerospermum* (Figura 128) foi observado pela formação de halos de inibição do crescimento dos fitopatógenos em todos os extratos brutos, em comparação com o padrão positivo nistatina (1μg).



(a) λ = 254 nm (b) λ = 366 nm

Figura 127. Cromatoplacas dos extratos brutos em (a) 254 nm e (b) 366 nm.

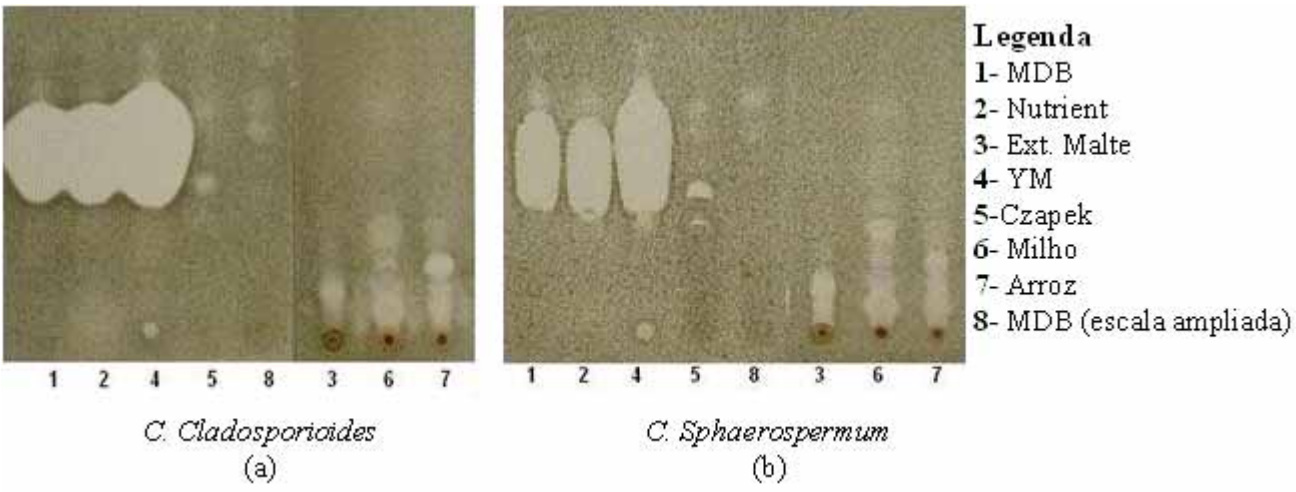


Figura 128. Avaliação do potencial dos extratos brutos contra *C. Cladosporioides* (a) e contra *C. sphaerospermum* (b).

Tabela 18. Avaliação do potencial dos extratos brutos contra fitopatógenos.

Amostras	*C. cladosporioides*	*C. sphaerospermum*
MBD	***	*/***
Nutrient	***	*/***
Ext. Malte	***	***/***/***
YM	*/***/**	*/***/*/**
Czapek	*/*	*/***/**
Milho	*/*/***/***	*/*/***/***/***
Arroz	***/**/***	***/***/***/***
MBD (escala ampliada)	*/*	*

***Potencial alto/**Potencial intermediário/*Potencial baixo

Os extratos apresentaram desde baixo até alto potencial contra os fitopatógenos ensaiados (Tabela 18), corroborando com a variação metabólica de cada meio de cultivo. Destacando-se os extratos provenientes dos meios sólidos como prolíficos produtores de compostos bioativos contra os fitopatógenos ensaiados.

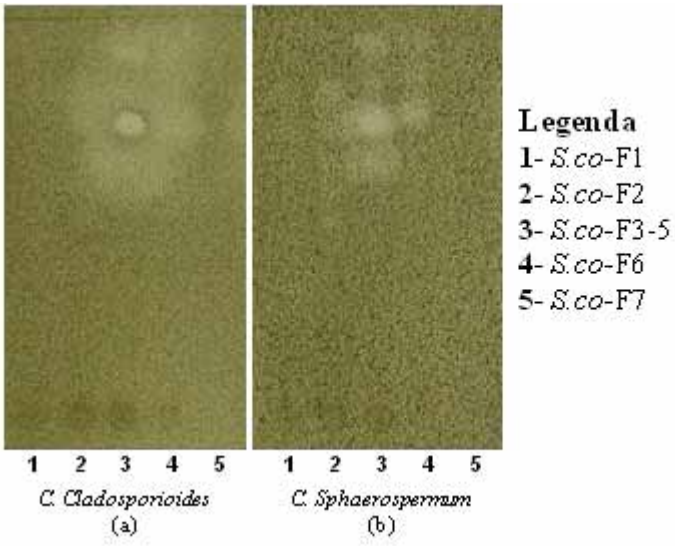


Figura 129. Avaliação do potencial das frações (item 3.3.4) contra *C. Cladosporioides* (a) e contra *C. sphaerospermum* (b).

Tabela 19. Avaliação do potencial das frações contra fitopatógenos.

Amostras*	*C. cladosporioides*	*C. sphaerospermum*
S.co-F1	-	-
S.co-F2	-	-
S.co-F3-5	*/***	*/**/*
S.co-F6	-	*
S.co-F7	-	-

***Potencial alto/**Potencial intermediário/*Potencial baixo

* Frações provenientes da partição do extrato AcOEt, demonstrada na Figura 10 da p. 50.

Nas frações obtidas do fracionamento do extrato bruto MBD (escala ampliada) detectou-se a inibição do crescimento dos fitopatógenos ensaiados apenas na *S.co*-F3-5 (Figura 129).

5. CONCLUSÕES

O trabalho realizado com o endófito *S. commune* isolado das folhas saudáveis de *Alchornea glandulosa*, permitiu a avaliação da potencialidade do extrato bruto em pequena e escala ampliada na produção de metabólitos secundários. O meio de cultivo líquido MBD selecionado apresentou uma produção metabólica muito rica e com um perfil químico promissor analisado em CLAE-DAD e RMN de^{1}H. As análises em CLAE-DAD e os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos brutos em cinco meios líquidos comerciais e dois meios sólidos (arroz e milho), evidenciou que a produção metabólica de *S. commune* depende da composição nutritiva em cada meio cultivo. Embora os meios de cultivo líquido evidenciassem uma rica produção metabólica, os meios de cultura sólidos renderam massa de extrato bruto bem maior que os demais meios.

Os consecutivos fracionamentos cromatográficos do extrato bruto cultivado em escala ampliada em MBD conduziu ao isolamento de duas substâncias puras como a *ciclo*(L-Pro-L-Val) (**1**) e a uracila (**2**) e quatro substâncias identificadas em mistura como a *ciclo*(Pro-Tyr) (**3**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**4**), *Rel.ciclo*(Pro-Phe) (**5**) e a *Rel.ciclo*(Pro-Ile) (**6**). Sendo este o primeiro relato de identificação e isolamento de dicetopiperazinas em fungo endofítico do gênero *Schizophyllum*. A utilização da técnica de RMN de ^{1}H uni e bidimensional associada à técnica hifenada de LC-MS permitiu a identificação e determinação estrutural das dicetopiperazinas **5**, **6** e novamente da substância **1**.

O extrato bruto YM (pequena escala) foi particionado e obteve-se uma substância pura como o ácido *trans*-cinâmico (**7**), sendo este o primeiro relato da produção deste composto pelo endófito *S. commune*. O extrato bruto em milho CH_3CN (peq. escala) foi fracionado e resultou no isolamento de duas substâncias puras como N-(4-hidroxifeniletil) acetamida (**8**) e a N-(2-feniletil) acetamida (**9**). E do extrato bruto em arroz CH_3CN (peq. escala) reisolou-se a substância **9**.

Analisando os diferentes extratos brutos em pequena escala e o MBD (escala ampliada) por espectrometria de massas pode-se observar a presença das dicetopiperazinas **1, 3, 5** e **6,** indicando este endófito como um prolífico produtor da classe das dicetopiperazinas mesmo com a variação dos nutrientes dos meios de cultivo.

Os extratos brutos e as frações apresentaram resultados promissores aos ensaios biológicos. Destaca-se o ácido *trans*-cinâmico (**7**), aN-(4-hidroxifeniletil) acetamida (**8**) e a N-(2-feniletil) acetamida (**9**) por apresentar potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.

As dicetopiperazinas identificadas apresentam atividades bioherbicida, inibidora da enzima acetilcolinesterase, antioxidante e atividade moderada contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum,* indicando uma possível interação ecológica entre este micro-organismo e a planta hospedeira protegendo-a contra possíveis fitopatógenos.

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

REFERÊNCIAS

ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, calyx cf. Podatypa. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201 - 208, 1995.

ALCANO, I. E. **Fundamentals of microbiology**. 4th ed. Redwood City: Benjamin Cummings, 1994. p. 421-450.

ASGHER, M. et. al. Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 89-93, 2006.

ASGHER, M. et. al. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 89-193, 2008.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. Cap. 4, p. 116-137.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 501-521, 2008.

BILLS, G. F. Analysis of microfungal diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. S33-S41, 1995.

BRADY, S. F. et. al. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v. 2, n. 25, p. 4043-4046, 2000.

BULTMAN, T. L.; BELL, G. D. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. **OIKOS**, v. 103, p.182-190, 2003.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural of Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica os fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris*.** 2007. 252 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CALVO, T. R. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira-prospecção químico-farmacológica em plantas superiores**: *Alchornea glandulosa, Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). 2007. 216 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CAMARGO, K. F. B. **Variabilidade intraespecífica de estirilpironas em quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana***: avaliação da produção em diferentes órgãos e em extratos enzimáticos. 2008. 245 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

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

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

COLEMAN, J. J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against Candida albicans. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n.3, p. 321-332, 2010.

CONEGERO, L. S. et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

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

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In:_____ . **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 3rd ed. London: John Wiley & Sons. 2009. Cap. 4, p. 137-152.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **OIKOS**, v. 98, p. 25-36, 2002.

FDHILA, F. et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.

GIMÉNEZ, C. et al. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Current Organic Chemistry**, v. 11, p. 707-720, 2007.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

HANAI, K. et.al. A comparative vibrational and NMR study of *cis*-cinnamic acid polymorphs and *trans*-cinnamic acid. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 57, p. 513-519, 2001.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

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

HOSOE, T. et al. Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus S*chizophyllum commune.* **Mycopathologia**, v. 146, p. 9-12, 1999.

INGOLD, C. T. **The biology of fungi**. London: Hutchinson Educational, 1961. Cap. 4, p. 70-99.

JAYATILAKE, G. S. et. al. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 293-296, 1996.

KAMEI, K. et al. Allergic bronchopulmonary mycosis caused by the basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 305-309, Mar. 1994.

KOLENOVÁ, K.; VRSANSKÁ, M.; BIELY, P. Purification and characterization of two minor endo-β-1,4-xylanases of *Schizophyllum commune*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 903-910, 2005.

KUMARI, M.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1036-1043, 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.

LACAZ, C. S. **Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1975. p. 24.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **TRENDS in Microbiology**, v.15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LANG, G. et al. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

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

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

LIN, Z. J. et al. GPR12 selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. asociated with *Cistanches deserticola*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 9, p. 1108-1114, 2008.

LIU, K. et al. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1171-1177, 2009.

LOPES, F. C. M. et al. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 15, 2009.

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

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

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES, E. F. Chemical components of *Penicillium sp*, an endophytic fungus from *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, p. 189-199, 2007.

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

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

MASKEY, R. P. et al. Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 7, p. 643-649, 2002.

MAUSETH, J. D. **Botany**: an introduction to plant biology. 3. ed. Boston: James and Bartlett Publishers, 2003. p. 582-610.

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

MONZOTE, L. Screening of natural products to drug discovery. **Recent Progress in Medicinal Plants**, v. 29, p. 61-68, 2010.

MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 450-456, 2005.

NIMURA, Y.; TSUJIYAMA, S.; UENO, M. Bioconversion of cinnamic acid derivatives by *Schizophyllum commune.* **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 56, p. 381-387, 2010.

NOGUEIRA, C. R. **Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* manso**: **compostos nitrados**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PALAFOX, M. A. et al. Relationships observed in the structure and spectra of uracil and its 5-substituted derivatives. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 75, p. 1261-126, 2010.

PANDI, M.; MANIKANDAN, R.; MUTHUMARY, J. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7,12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 48-53, 2010.

PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products,** v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.

PRITI, V. et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, Ago. 2009.

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

SAIKKONEN, K. et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAIKKONEN, K. et al. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, June 2004.

SASHIDHARA, K. V.; ROSAIAH, J. N. Various dereplication strategies using LC-MS for rapid natural product lead identification and drug discovery. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 2, p. 193-202, 2007.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. L.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 315-340, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

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

SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of Fusarium solani, from Apodytes dimidiata E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.

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

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 307-314, 2005.

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

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

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

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

STROBEL, G. A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

TAKAYA, Y. et al. Antioxidant constituents in distillation residue of Awamori Spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 75-79, 2007.

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

UCHIYAMA, N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Health Science**, v. 55, n. 1, p. 31-39, 2009.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, G. et al. Two diketopiperazine cyclo(Pro-Phe) isomers from marine bacteria *Bacillus Subtilis* Sp. 13-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 583-585, 2010.

ZANARDI, L. M. **Prospecção química em *Phomopsis cassiae,* um fungo endofítico isolado de *Senna spectabilis*.** 2006. 143 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHANG, J. Y. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1469-1481, 2010.