

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
**“Júlio de Mesquita Filho”**

Instituto de Química

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

**Avaliação química e biológica do fungo endofítico  
*Colletotrichum* sp. isolado de *Senna spectabilis***

Miller Pulito Rufino  
Departamento de Química Orgânica

Araraquara

2011

MILLER PULITO RUFINO

Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Colletotrichum* sp.  
isolado de *Senna spectabilis*

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 Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto Cavalheiro

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R926a | <p>Rufino, Miller Pulito</p> <p>Avaliação química e biológica do fungo endofítico<br/><i>Colletotrichum</i> sp. isolado de <i>Senna spectabilis</i> / Miller<br/>Pulito Rufino. – Araraquara : [s.n], 2011<br/>104 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,<br/>Instituto de Química<br/>Orientador: Angela Regina Araújo<br/>Coorientador: Alberto José Cavaleiro</p> <p>1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos.<br/>3. Dicetopiperazinas. I. Título.</p> |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados Pessoais**

**Nome:** Miller Pulito Rufino

**Filiação:** Aparecida Edna Pulito e Jorge Elias Rufino

**Nascimento:** 08/06/1987 – Itapuí – SP

### **Endereço Profissional**

Cempec – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados. IQ/UNESP

Endereço: Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha – Araraquara/SP

CEP: 14800-900

Endereço eletrônico: milleritapui@iq.unesp.br

### **Formação Acadêmica**

#### **2008**

Graduação: Bacharel em Química.

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de 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 *Colletotrichum* sp. isolado de *Senna spectabilis*.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Regina Araujo

Bolsa: CNPq

## **Produção Bibliográfica**

### **Trabalhos recentes publicados em anais de eventos**

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.

### **Participações em Reuniões Científicas**

- a) 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.
- b) 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.
- c) 17º. Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti”, 2009, Araraquara (Faculdade de Odontologia - UNESP)-SP.
- d) IV Workshop do NuBBE, 2009, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.
- e) Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia, 2009, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.

### **Participações em curso de longa duração**

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**

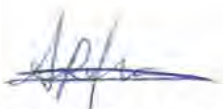
Membro da Comissão Organizadora do 17º. "Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti", 2009, Faculdade de Odontologia de Araraquara- SP.

MILLER PULITO RUFINO

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

Araraquara, 19 de agosto de 2011.

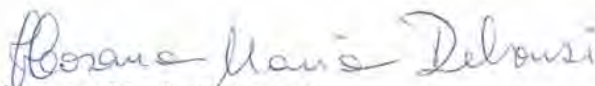
BANCA EXAMINADORA



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



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



Profª Drª Hosana Maria Deboni  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

Dedico este trabalho à minha querida mãe Edna, que sempre me incentivou e foi exemplo de luta e superação nos desafios da vida.

À minha querida namorada Daniele, pelo amor, companheirismo e constante incentivo na elaboração desse trabalho. Te amo!

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Angela R. Araújo. Pela orientação através dos tortuosos caminhos da Química, que tanto ensinou com paciência, dedicação e competência. E também pela incansável orientação na vida, que aconselhou e acolheu nos momentos difíceis.

À minha família que sempre me apoiou e contribuiu, cada um do seu jeito e com o que podia, para que tudo fosse possível. Obrigado, Salete e Pedro (*in memorian*), Ana e Nei, Sueli e Du, Alemão e Sueli, Rafael, Murilo e João Ricardo.

À minha namorada Daniele, que sempre esteve ao meu lado dando forças nos momentos difíceis e também nos felizes. Obrigado pelo incentivo, amor e paciência!

À minha querida avó Helena (*in memorian*) que foi o exemplo maior de vida, ensinando sempre a ser humilde.

Aos amigos de república: Bruno, Chico, Ian, Tchu Tche, Paulo e Thomas, pelas conversas, informações, experiências, risadas e apoio. Obrigado a todos que ainda estão e os que passaram.

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

Aos amigos: Harry (Marcos), Nathalie e Poliana pela grande amizade.

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

À Néia, em especial, por dedicar seu tempo à ensinar como vencer os obstáculos da química orgânica. Muito obrigado mesmo, sem você essa dissertação não seria possível.

À Carol, que sempre esteve junto, desde o início, auxiliando de todas as formas possíveis. Obrigado pela paciência, amizade, conselhos, dedicação, incentivo, estudos de química orgânica avançada, métodos espectrométricos, bioensaios, congressos, painéis, relatórios e tudo mais. Será sempre minha irmã do coração.

À turma de química orgânica avançada de 2009 em especial ao Wellington e a Jú Holzbach, pela amizade, pelos incansáveis estudos na biblioteca, e pelos momentos de descontração necessários.

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.

Às funcionárias da biblioteca e da pós-graduação pela dedicação e competência.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

*“Levar tombos não é nada. O problema é não ter forças para  
levantar-se depois.”*

***João Roberto Gretz***

*“Cada dia sabemos mais e entendemos menos”*

***Albert Einstein***

## RESUMO

O presente trabalho objetivou a identificação dos metabólitos secundários, em especial a classe das dicetopiperazinas, produzidos pelo fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado dos caules de *Senna spectabilis*. O fungo foi cultivado em diversos meios líquidos (MDB, YM, Extrato de Malte, Nutrient e Czapek) fornecendo os respectivos extratos brutos. Estes extratos foram submetidos à CCDC, CLAE-DAD e RMN  $^1\text{H}$  para avaliação da produção metabólica e a bioensaios para avaliar a potencialidade antifúngica e anticolinesterásica. Os resultados obtidos indicaram o meio de MDB como o melhor meio para cultivo do endófito em escala ampliada, cujo extrato obtido foi fracionado por cromatografia em coluna. As 12 frações obtidas foram submetidas a CLAE-DAD e RMN  $^1\text{H}$ , sendo escolhida a Fração 01 para refractionamento. A partir das subfrações foram identificadas 3 dicetopiperazinas (*ciclo*(Pro-Val), *ciclo*(Pro-Phe) e *ciclo*(Pro-Tyr)). A Fração 01 também foi submetida à desreplicação utilizando a técnica de simulação de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com o auxílio do software MestreNova<sup>®</sup>, e posteriormente à espectrometria de massas, o que possibilitou a identificação de 5 dicetopiperazinas (*ciclo*(Pro-Ala), *ciclo*(Pro-Ile) ou *ciclo*(Pro-Leu), *ciclo*(Val-Phe), *ciclo*(Pro-Pro) e *ciclo*(Hyp-Ile)) e da uracila.

**Palavras-chave:** fungo endofítico. *Colletotrichum* sp. *Senna spectabilis*. dicetopiperazinas.

## ABSTRACT

This study aimed to identify the secondary metabolites, in particular the class of diketopiperazines produced by the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. isolated from stems of *Senna spectabilis*. The fungus was cultivated in different liquid culture media (PDB, YM, Malt Extract, Nutrient and Czapek) providing the respective crude extracts. These extracts were submitted to CCDC, HPLC-DAD and  $^1\text{H}$  NMR for metabolic production and evaluation of bioassays to assess the potential antifungal activity and acetylcholinesterase inhibition. The results indicate the PDB as the best medium for the endophyte growth on a large scale, whose extract was fractionated by column chromatography. The 12 fractions were obtained and subjected to HPLC-DAD and  $^1\text{H}$  NMR. The Fraction 1 was again subjected to fractionation by column chromatography and was identified 3 diketopiperazine (cyclo(Pro-Val), cyclo(Pro-Phe) and cyclo(Pro-Tyr)). The Fraction 01 also underwent dereplication using the simulation technique of  $^1\text{H}$  NMR spectrum with the aid of software MestreNova<sup>®</sup>, and later to mass spectrometry, which enabled the identification of 5 diketopiperazines (cyclo(Pro-Ala), cyclo(Ile-Pro) or cyclo(Leu-Pro), cyclo(Val-Phe), cyclo(Pro-Pro) and cyclo(Hyp-Ile)) and uracil.

**Keywords:** endophytic fungi. *Colletotrichum* sp. *Senna spectabilis*. diketopiperazines.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos. ....                                                                                                       | 25 |
| <b>Figura 2.</b> <i>Colletotrichum</i> sp. ....                                                                                                                                        | 27 |
| <b>Figura 3.</b> Manga com antracnose. ....                                                                                                                                            | 27 |
| <b>Figura 4.</b> Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero <i>Colletotrichum</i> . ....                                                                                  | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero <i>Colletotrichum</i> (cont.). ....                                                                           | 30 |
| <b>Figura 6.</b> Dicetopiperazinas isoladas no grupo de trabalho. ....                                                                                                                 | 31 |
| <b>Figura 7:</b> <i>Senna spectabilis</i> . Fonte: Lorenzi, 1998. ....                                                                                                                 | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema do isolamento do endófito <i>Colletotrichum</i> sp. ....                                                                                                      | 42 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema de cultivo do <i>Colletotrichum</i> sp. em escala reduzida. ....                                                                                              | 43 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema de obtenção dos Extratos brutos em diferentes meios líquidos. ....                                                                                           | 44 |
| <b>Figura 11.</b> Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em MDB em escala ampliada. ....                                                 | 46 |
| <b>Figura 12.</b> Fracionamento cromatográfico da Fração 1. ....                                                                                                                       | 48 |
| <b>Figura 13.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a $\lambda = 235$ nm do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em Czapek. ....   | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em Czapek ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz). ....                               | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a $\lambda = 235$ nm do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em Nutrient. .... | 55 |
| <b>Figura 16.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em Nutrient ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz). ....                             | 55 |
| <b>Figura 17.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a $\lambda = 235$ nm do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em YM. ....       | 57 |
| <b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em YM ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz). ....                                   | 58 |

|                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a $\lambda = 235$ nm do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em Extrato de Malte. ....                                                        | 59 |
| <b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em Malte (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....                                                                                                       | 60 |
| <b>Figura 21.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a $\lambda = 235$ nm do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em MDB. ....                                                                     | 61 |
| <b>Figura 22.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em MDB (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) .....                                                                                                        | 62 |
| <b>Figura 23.</b> Atividade antifúngica dos extratos bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. evidenciado em cromatoplaça, onde: (A) 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek; 5 – YM; 6 – Nutrient; (B) 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek. .... | 63 |
| <b>Figura 24.</b> Atividade anticolinesterásica dos extratos bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. evidenciado em cromatoplaça, onde: 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek; 5 – YM; 6 – Nutrient; P - Fisostigmina.....                            | 65 |
| <b>Figura 25.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 01006 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)....                                                                                                                                                         | 70 |
| <b>Figura 26.</b> Molécula da <i>ciclo</i> (Pro-Val) com as correlações observadas em gHMBC.....                                                                                                                                                      | 72 |
| <b>Figura 27.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 01016 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)....                                                                                                                                                         | 73 |
| <b>Figura 28.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) com o espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 01016.....                                                                                                    | 75 |
| <b>Figura 29.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) com o espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 01016.....                                                                                                    | 76 |
| <b>Figura 30.</b> Substâncias encontradas nas frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de MDB com cromatografia em coluna. ....                                                                                                              | 78 |
| <b>Figura 31.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) com o espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 1.....                                                                                                        | 79 |
| <b>Figura 32.</b> Espectro de Massas da Fração 1 (ESI-ToF). ....                                                                                                                                                                                      | 80 |
| <b>Figura 33.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 1 (A) e 1' (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.....                                                                          | 88 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 34.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 2 (A) e 3 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.....   | 88 |
| <b>Figura 35.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 4 (A) e 5 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.....   | 89 |
| <b>Figura 36.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 6 (A) e 7 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.....   | 89 |
| <b>Figura 37.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 8 (A) e 9 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.....   | 89 |
| <b>Figura 38.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 10 (A) e 11 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa..... | 90 |
| <b>Figura 39.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm da fração 12 da cromatografia em coluna de fase reversa. ....                | 90 |
| <b>Figura 40.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 1 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 91 |
| <b>Figura 41.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 4 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 91 |
| <b>Figura 42.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 5 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 92 |
| <b>Figura 43.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 6 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 92 |
| <b>Figura 44.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 7 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 93 |
| <b>Figura 45.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 8 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 93 |
| <b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração 9 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....                                                                                   | 94 |
| <b>Figura 47.</b> Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da fração 01006 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz). ....                                                                               | 94 |
| <b>Figura 48.</b> Mapa de contorno $g\text{HMQC}$ 01006 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).....                                                                                          | 95 |
| <b>Figura 49.</b> Espectro de Massas da fração 01006 (ESI-ToF).....                                                                                                           | 96 |
| <b>Figura 50.</b> Cromatograma em gradiente exploratório obtido por LC-MS, monitorado à 254 nm da fração 01006.....                                                           | 98 |
| <b>Figura 51.</b> Espectro de UV da banda em 5,5 min da LC-MS, monitorado à 254 nm. ....                                                                                      | 98 |

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 52.</b> Espectro de UV da banda em 10,8 min da LC-MS, monitorado à 254 nm. ....                                                          | 98  |
| <b>Figura 53.</b> Espectro de Massas da fração 01016 (ESI-ToF).....                                                                                | 99  |
| <b>Figura 54.</b> Espectro de Massas da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (ESI-ToF).....                                                                      | 100 |
| <b>Figura 55.</b> Espectro de Massas da <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) (ESI-ToF).....                                                                      | 101 |
| <b>Figura 56.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Pro-Val) (ESI-ToF). ....                           | 102 |
| <b>Figura 57.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (ESI-ToF). ....                           | 102 |
| <b>Figura 58.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Pro-Ala) (ESI-ToF). ....                           | 103 |
| <b>Figura 59.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Pro-Ile) ou <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (ESI-ToF). .... | 103 |
| <b>Figura 60.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Val-Phe) (ESI-ToF). ....                           | 104 |
| <b>Figura 61.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) (ESI-ToF). ....                           | 104 |
| <b>Figura 62.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Pro-Pro) (ESI-ToF).....                            | 105 |
| <b>Figura 63.</b> Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da <i>ciclo</i> (Hyp-Ile) (ESI-ToF).....                            | 105 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Meios de cultivo para o fungo endofítico <i>Colletotrichum</i> sp. ....                            | 38 |
| <b>Tabela 2.</b> Outros equipamentos utilizados no decorrer do projeto.....                                         | 40 |
| <b>Tabela 3.</b> Relação entre produção de extrato por quantidade de meio de cultivo. ....                          | 52 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultado da atividade antifúngica dos extratos brutos de <i>Colletotrichum</i> sp.....            | 63 |
| <b>Tabela 5.</b> Resultado da atividade tripanocida dos extratos brutos de <i>Colletotrichum</i> sp.....            | 65 |
| <b>Tabela 6.</b> Resultado da atividade antifúngica humana dos extratos brutos de <i>Colletotrichum</i> sp.....     | 66 |
| <b>Tabela 7.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 Mhz) e gHMQC da <i>ciclo</i> (Pro-Val)..... | 71 |
| <b>Tabela 8.</b> Substâncias identificadas na Fração 1.....                                                         | 81 |

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

|                             |                                                       |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|
| AChE                        | Enzima acetilcolinesterase                            |
| AcOEt                       | Acetato de etila                                      |
| Ala                         | Alanina                                               |
| BDA                         | Batata dextrose ágar                                  |
| C18                         | Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano      |
| CC                          | Cromatografia em coluna                               |
| CCDC                        | Cromatografia em camada delgada comparativa           |
| CHCl <sub>3</sub>           | Clorofórmio ou Triclorometano                         |
| CH <sub>3</sub> OH          | Metanol                                               |
| CLAE                        | Cromatografia líquida de alta eficiência              |
| COSY                        | Correlation Spectroscopy                              |
| DAD                         | Detector de arranjo de diodo                          |
| DMSO                        | Dimetilsulfóxido                                      |
| DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> | Dimetilsulfóxido deuterado                            |
| EM                          | Especrometria de massas                               |
| ESI-EM                      | Espectrometria de massas – Ionização por Electrospray |
| Ext.                        | Extrato                                               |
| <i>g</i> HMBC               | Gradient heteronuclear multiple bond coherence        |
| <i>g</i> HMQC               | Gradient heteronuclear multiple quantum coherence     |
| H <sub>2</sub> O            | Água                                                  |
| Hyp                         | Hidroxiprolina                                        |
| Ile                         | Isoleucina                                            |
| IQ/Ar                       | Instituto de Química de Araraquara                    |
| Leu                         | Leucina                                               |
| MDB                         | Meio de Dextrose e Batata                             |
| MDB LE                      | Meio de Dextrose e Batata em escala ampliada          |
| mg/g                        | miligramas / grama                                    |
| MHz/Hz                      | Megahertz / hertz                                     |
| mL                          | mililitros                                            |
| NaClO                       | Hipoclorito de sódio                                  |
| nm                          | nanômetro                                             |

|                        |                                             |
|------------------------|---------------------------------------------|
| NOESY                  | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy      |
| Phe                    | Fenilalanina                                |
| ppm                    | Partes por milhão                           |
| Pro                    | Prolina                                     |
| RMN de $^1\text{H}$    | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| RMN de $^{13}\text{C}$ | Ressonância magnética nuclear de carbono 13 |
| TMS                    | Tetrametilsilano                            |
| Tyr                    | Tirosina                                    |
| Uv                     | Ultravioleta                                |
| Val                    | Valina                                      |
| YM                     | Yeast Medium                                |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| $\delta$     | Deslocamento químico     |
| $\lambda$    | Comprimento de onda      |
| $\mu$        | Micro                    |
| $[\alpha]_D$ | Rotação Óptica           |
| $[M+H]^+$    | Molécula protonada       |
| $[M-H]^-$    | Molécula desprotonada    |
| $[M+Na]^+$   | Aduto de sódio           |
| $[M+K]^+$    | Aduto de potássio        |
| $J$          | Constante de acoplamento |
| $s$          | Singleto                 |
| $s/$         | Singleto Largo           |
| $d$          | Dubleto                  |
| $m$          | Multiplete               |
| $m/z$        | Relação massa-carga      |
| $t$          | Triplete                 |

# SUMÁRIO

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                 | <b>23</b> |
| 1.1 <i>Colletotrichum</i> sp.                                                                                                        | 26        |
| 1.2 Dicetopiperazinas.                                                                                                               | 30        |
| 1.3 A Espécie vegetal hospedeira: <i>Senna spectabilis</i> .                                                                         | 32        |
| 1.4 <i>Colletotrichum</i> sp. e Desreplicação.                                                                                       | 33        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                                                  | <b>37</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                        | <b>38</b> |
| <b>3.1 Materiais.</b>                                                                                                                | <b>38</b> |
| 3.1.1 Meios de cultivo.                                                                                                              | 38        |
| 3.1.2 Solventes.                                                                                                                     | 38        |
| 3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).                                                                            | 38        |
| 3.1.4 Cromatografia em coluna.                                                                                                       | 39        |
| 3.1.5 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detector De Arranjo De Diodo (CLAE-DAD).                                          | 39        |
| 3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ).                                | 40        |
| 3.1.7 Espectrometria de Massas.                                                                                                      | 40        |
| 3.1.8 Outros equipamentos.                                                                                                           | 40        |
| <b>3.2 Métodos</b>                                                                                                                   | <b>41</b> |
| 3.2.1 Obtenção das cepas fúngicas.                                                                                                   | 41        |
| 3.2.2 Cultivo do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em escala reduzida em diferentes meios de cultivo e a obtenção dos extratos brutos. | 42        |
| 3.2.3 Cultivo do <i>Colletotrichum</i> sp. em escala ampliada e obtenção do extrato bruto.                                           | 45        |
| 3.2.4 Fracionamento do extrato bruto obtido em escala ampliada.                                                                      | 45        |
| 3.2.5 Fracionamento da Fração 1 obtida do fracionamento do extrato bruto de escala ampliada.                                         | 47        |
| 3.2.6 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos de <i>Colletotrichum</i> sp.                                           | 48        |
| 3.2.6.1 Avaliação da atividade antifúngica.                                                                                          | 48        |
| 3.2.6.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica.                                                                                  | 49        |
| 3.2.6.3 Avaliação da atividade tripanocida.                                                                                          | 49        |

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.6.4 Avaliação da atividade antifúngica humana.                                                                    | 50        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>                                                                                     | <b>51</b> |
| <b>4.1 Avaliação dos extratos brutos obtidos em diferentes meios de cultivo do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.</b>    | <b>51</b> |
| 4.1.1 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em Czapek.                                                | 53        |
| 4.1.2 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em Nutrient.                                              | 54        |
| 4.1.3 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em YM.                                                    | 57        |
| 4.1.4 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em Extrato. de Malte.                                     | 59        |
| 4.1.5 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em MDB.                                                   | 61        |
| <b>4.2 Avaliação das atividades biológicas dos extratos do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.</b>                        | <b>63</b> |
| 4.2.1 Avaliação da atividade antifúngica.                                                                             | 63        |
| 4.2.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica.                                                                     | 64        |
| 4.2.3 Avaliação da atividade tripanocida.                                                                             | 65        |
| 4.2.4 Avaliação da atividade antifúngica humana.                                                                      | 66        |
| <b>4.3 Aspectos gerais do cultivo do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em escala reduzida.</b>                          | <b>67</b> |
| <b>4.4 Avaliação do extrato bruto obtidos em MDB do cultivo em escala ampliada do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.</b> | <b>68</b> |
| 4.4.1 Separação dos constituintes da Fração 1.                                                                        | 69        |
| 4.4.2 Fração 01006.                                                                                                   | 69        |
| 4.4.3 Fração 01016.                                                                                                   | 72        |
| 4.4.4 Desreplicação da Fração 01016.                                                                                  | 74        |
| <b>4.5 Desreplicação nas frações obtidas do extrato bruto obtido de MDB.</b>                                          | <b>76</b> |
| 4.5.1 Confirmação das dicetopiperazinas na Fração 1.                                                                  | 79        |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>                                                                                                  | <b>81</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                    | <b>83</b> |
| <b>ANEXOS</b>                                                                                                         | <b>87</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

A intensificação do processo de degradação ambiental, perda da biodiversidade e deterioração de terras e águas é um problema enfrentado pelo mundo atual, esses problemas geram um ambiente mais favorável ao surgimento e proliferação de novas doenças. Este fato, aliado à crescente resistência dos patógenos aos medicamentos existentes, cria a necessidade de medicamentos mais eficientes para o combate e prevenção de doenças existentes. Nesse contexto a comunidade científica é instigada a pesquisar e encontrar novas fontes de substâncias bioativas para a produção e desenvolvimento de novos fármacos.

Na última década, um nicho que se mostrou muito promissor na produção de substâncias inéditas e com as mais variadas aplicações biológicas é o dos fungos endofíticos.

Por definição, fungos endofíticos são micro-organismos que vivem nos espaços intra e intercelulares dos tecidos vegetais sem causar efeitos adversos aparentes à planta hospedeira. Alguns destes endófitos podem estar envolvidos em uma relação hospedeiro-endófito produzindo substâncias bioativas (STROBEL et al., 2004).

Das aproximadas trezentas mil espécies de plantas superiores existentes na terra, cada uma, é hospedeira de um ou mais endófitos (STROBEL et al., 2004). Fungos endofíticos podem estar em interações variadas e variáveis com seus hospedeiros, incluindo o mutualismo, comensalismo e também patogenicidade latente, onde podem afetar significativamente diferentes graus de desempenho do hospedeiro. Em alguns casos, podem aumentar a capacidade das plantas de tolerar estresses abióticos e bióticos (KRINGS et al., 2009).

Em cultura, fora do tecido do seu hospedeiro, fungos endofíticos também são conhecidos por produzirem uma série de importantes metabólitos secundários como policetídeos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, esteroides, etc, que possuem as mais variadas atividades biológicas como agentes de controle biológico, antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antidiabéticos e compostos imunossupressores (PRITI et al., 2009).

Um grande número de espécies de endófitos já foram isolados de diversas plantas, bem como uma diversidade de moléculas bioativas (SCHULZ et al., 2002). Como exemplo pode-se citar *Seimatoantlerium tepuiense*, *S. nepalense* e *Taxomyces andreanae*, que produzem paclitaxel (taxol) **(1)**, um anticancerígeno utilizado no tratamento de câncer de ovário e mama (PRITI et al., 2009); dos extratos brutos produzidos por *Curvularia* sp. isolado de *Ocotea corymbosa* foram isolados dois novos derivados de benzopiranos, (2'S)-2-(propan-2'-ol)-5-hidroxi-benzopiran-4-ona **(2)** e 2,3-dihidro-2-metil-benzopirano-4,5-diol **(3)**, sendo que um deles inibiu eficientemente o crescimento de células cancerígenas de mama (TELES et al., 2005); *Fusarium solani*, isolado de *Apodytes dimidiata* produz camptotecina **(4)** e 10-hidroxycamptotecina **(5)**, duas poderosas substâncias anticâncer (SHWETA et al., 2010). Outras substâncias com atividade antitumoral isoladas de fungos endofíticos são a citocalasina E **(6)** (WAGENAAR et al., 2000), pestalotiopsis A **(7)** (PULICI et al., 1996), ácido torriânico **(8)** (LEE et al., 1996) e o ácido oregânico **(9)** (JAYASURIYA et al., 1996). A criptocina **(10)** (LI; STROBEL; HARPER, 2000), griseofulvina **(11)** (CAFÊU et al., 2005) se destacam pela atividade antifúngica, fomopsolida A **(12)** (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), citosporona D **(13)** (BRADY; CLARDY, 2000) apresentam atividade antibacteriana. Inúmeras substâncias, como isocumarinas, xantonas, quinonas, terpenoides e citocalasinas já foram isoladas de extratos brutos obtidos do cultivo de fungos endofíticos (SCHULZ et al., 2002).

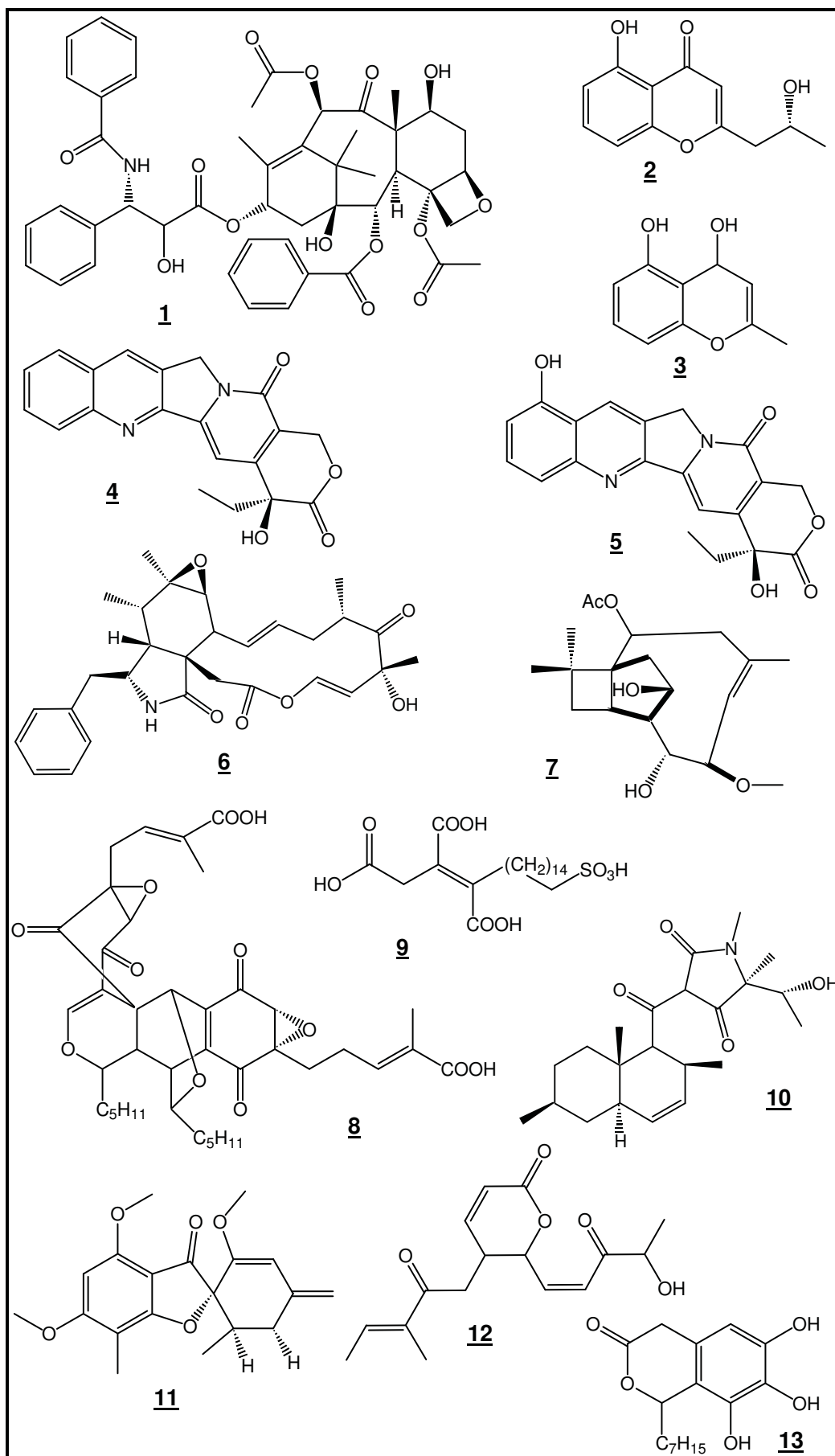


**Figura 1.** Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.

Assim, podemos notar que muitos endófitos foram estudados quanto a sua produção metabólica, no entanto, todos estes estudos representam apenas um pequeno número de espécies vegetais que foram estudadas em relação a sua biologia endofítica, o que mostra a urgente necessidade em se estudar este nicho de micro-organismos. Este fato evidencia, a possibilidade de encontrar novos e interessantes micro-organismos numa grande variedade de plantas e ecossistemas.

Diversos gêneros de fungos foram isolados de diversas plantas dos mais variados ecossistemas, dentre os gêneros, podemos citar: *Phomopsis* sp., *Sporormiella* sp., *Penicillium* sp., *Xylaria* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., entre outros. O presente trabalho tem como objetivo o estudo do fungo endofítico *Colletotrichum* sp., isolado dos caules de *Senna spectabilis*.

### **1.1 *Colletotrichum* sp.**

O gênero *Colletotrichum* é membro da subdivisão Deuteromycotinia da ordem Melanconidiales e família Philacoraceae.

Normalmente características morfológicas como tamanho e forma de conídeos são utilizados para sua taxonomia. Porém, devido a grande variabilidade destas características, a caracterização baseada apenas em aspectos morfológicos, pode não ser suficiente, então, outros critérios são adotados, como cultivo dos fungos em diferentes temperaturas, sensibilidade a fungicidas e diferenças fisiológicas quanto a capacidade de utilização de diferentes substratos (TOZZE et al., 2006 apud CAFÊU 2007).



**Figura 2.** *Colletotrichum* sp.

Os fungos endófitos do gênero *Colletotrichum* são pouco estudados quanto ao seu metabolismo secundário, porém são economicamente conhecidos por serem patógenos, causando diversas doenças em cereais, legumes, vegetais, frutas e plantas ornamentais. Mas principalmente por causar a antracnose, encontrada no mundo todo. Essa doença é caracterizada por lesões ovais necróticas de cor escura em folhas e frutos (Figura 3).



**Figura 3.** Manga com antracnose.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* podem desenvolver diversos modos de vida, podendo atuar como fungos endofíticos, epifíticos, patógenos de plantas e eventualmente como patógenos humanos. Espécies de *Colletotrichum* foram encontradas como habitantes assintomáticos (endófitos) de tecidos de plantas, como exemplos temos cepas de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* isoladas de folhas e pseudocaules saudáveis de banana (*Musa acuminata*), gengibre (*Alpinia malaccensis*), *Eupatorium thymifolia* e gengibre selvagem (*Amomum siamense*), além de ter sido isolado como endófito de doze diferentes árvores da reserva florestal Iwokrama da Guiana (HYDE et al.,

2009). Estudos conduzidos por RODRIGUEZ E REDMAN (2008) mostram que os fungos do gênero *Colletotrichum* podem estar associados com plantas atuando como mutualistas assim como parasitas, dependendo do genótipo do hospedeiro. Esta observação indica que espécies de fungos pertencentes a este gênero podem fornecer resultados promissores quando submetidos a estudos químicos e biológicos, uma vez que para a adaptação a diversos ambientes e modos de vida, eles desenvolvem uma gama de mecanismos para produção de substâncias que controlam o habitat onde estão instalados.

Diversos estudos foram conduzidos a fim de se determinar os metabólitos secundários de *Colletotrichum* e como se pode observar a seguir, os fungos do gênero *Colletotrichum* são capazes de sintetizar substâncias das mais diversas classes químicas.

GARCÍA-PAJÓN e COLLADO (2003) realizaram uma revisão bibliográfica sobre o gênero *Colletotrichum*, onde aspergillomarasmina A (**14**) e B (**15**), gloeosporona (**16**) e ácido colletotrico (**17**) foram isoladas de *C. gloeosporioides*, outros metabólitos também foram isolados como ferricrocina (**18**), uracila (**19**) e lumichroma (**20**) (INÁCIO et al., 2006). Seguindo a revisão, podemos encontrar, colletopyrona (**21**), colletoclorinas A, B, C e D (**22**, **23**, **24**, **25**) e estruturas similares as colletoclorinas sem o átomo de cloro, nomeadas colletorinas A (**26**) e C (**27**) produzidas por *C. nicotianae*, colletodiol (**28**), colletocetol (**29**) e colletol (**30**) produzidos por *C. capsici* (Figura 4). Mais recentemente fusarentina 6,7-dimetil éter (**31**), fusarentina 6-metil éter (**32**) e monocerina (**33**) e colletotrialida (**34**) foram isoladas de um *Colletotrichum* sp., endófito de *Piper ornatum*. (Figura 5) (TIANPANICH et al., 2011).

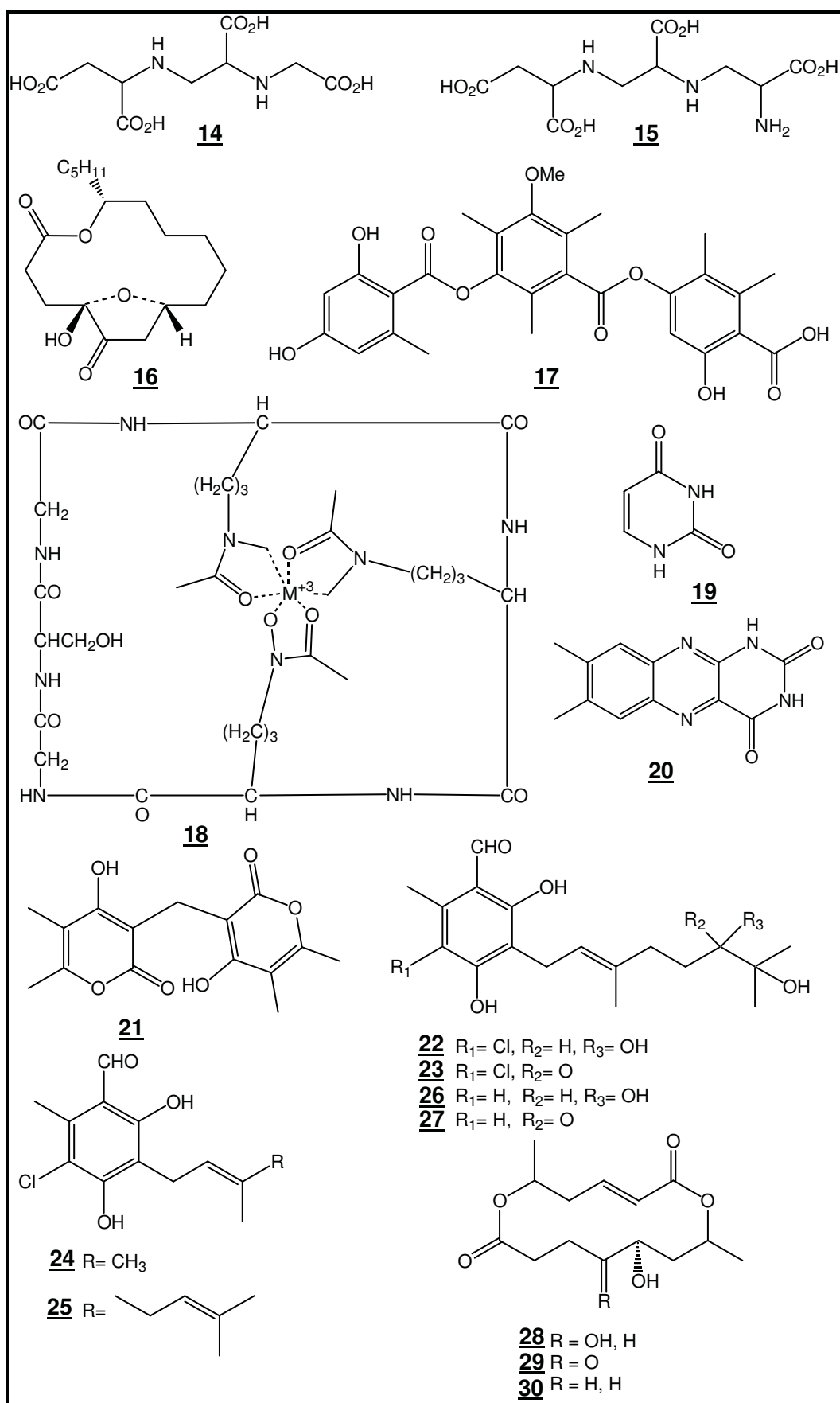


**Figura 4.** Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Colletotrichum*.

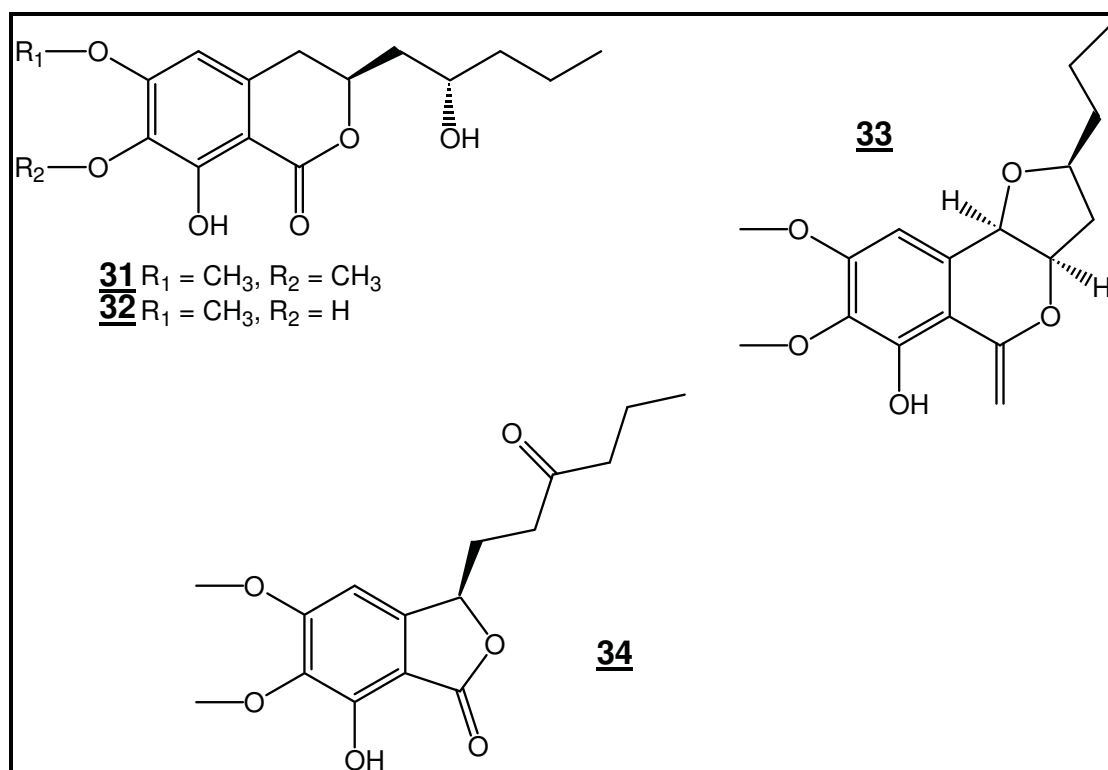


**Figura 5.** Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Colletotrichum* (cont.).

## 1.2 Dicetopiperazinas.

Uma classe de substâncias em particular, as dicetopiperazinas, também são produzidas pelo gênero *Colletotrichum*. As dicetopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, comumente biossintetizados 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 quirais, rígido e funcionalizado, diferenciando-se uma das outras pelas estruturas dos substituintes da cadeia lateral de cada aminoácido. Com isso, as dicetopiperazinas são estruturas importantes, pois possuem a capacidade de se ligarem a uma grande variedade de receptores com alta afinidade, gerando assim diversas atividades biológicas (MARTINS; CARVALHO, 2007).

Este tipo de substância constitui uma importante classe de produtos naturais com as mais variadas e interessantes atividades biológicas, incluindo antibióticos, antitumorais, modulador de enzimas, receptores e mediadores bioquímicos (MEHDI-BEN AMEUR et al., 2004; CAMPO et al., 2009). Também existem relatos de outras atividades como alterações em funções cardiovasculares e coagulação do sangue (MARTINS; CARVALHO, 2007).

Estas substâncias merecem atenção especial, pois já foram relatadas no histórico do grupo de pesquisa, onde CAFÊU (2007) relatou 8 dicetopiperazinas (Figura 6, 35-42) produzidas por *Colletotrichum crassipes* e LEPTOKARYDIS (2008) isolou duas dicetopiperazinas (Figura 6, 38 e 43) de *Colletotrichum gloeosporioides*. Além de também serem observadas pela primeira vez no gênero *Phomopsis* sp. por CHAPLA (2010). Dentro desse histórico, foi dada uma atenção maior para as dicetopiperazinas encontradas nesse trabalho, pois há uma conexão entre as dicetopiperazinas e o gênero *Colletotrichum* verificadas no grupo de pesquisa.

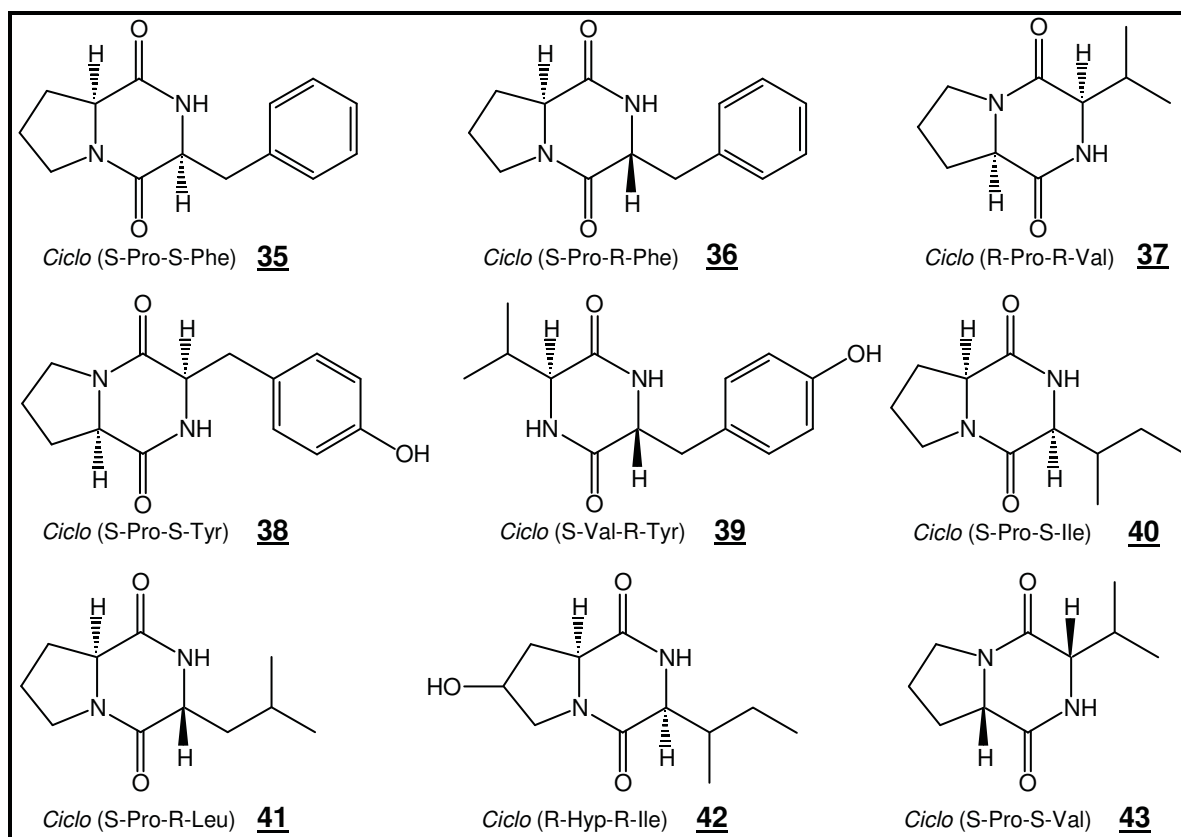


**Figura 6.** Dicetopiperazinas isoladas no grupo de trabalho.

### **1.3 A espécie vegetal hospedeira: *Senna spectabilis*.**

Outro fator importante na pesquisa de micro-organismos endofíticos é seleção da espécie vegetal hospedeira que deve ser criteriosa, sendo importante utilizar bons fundamentos, como informações etnobotânicas da planta, selecionar espécies que vivem em ambientes submetidas a “stress” biótico e abiótico, assim como eficientes e criteriosos métodos de isolamento.

Com a enorme biodiversidade vegetal do planeta, estratégias criativas devem ser usadas para restringir rapidamente a busca de endófitos exibindo grande bioatividade. Uma boa estratégia é utilizar os passos a seguir:

1. Plantas a partir de cenários ambientais únicos, especialmente aqueles com uma biologia incomum.

2. Plantas que têm uma história etnobotânica (uso pelos povos indígenas), que está relacionada com determinadas utilizações ou aplicações de interesse farmacológico. Estas plantas são escolhidas, quer por contacto direto com as populações locais ou através da literatura local. Em última análise, pode-se saber que os poderes de cura da origem botânica, de fato, pode não ter nada a ver com os produtos naturais da planta, mas com o endófito (que habitam a planta) (STROBEL et al., 2004).

3. As plantas que são endêmicas também são mais propensas a apresentar endófitos desconhecidos e com potencial bioativo.

4. Plantas que crescem em áreas de grande biodiversidade também têm a perspectiva de grande biodiversidade de endófitos.

As plantas de um cenário distinto do ambiente são consideradas fontes promissoras de novos endófitos e também de novos metabólitos, assim também são as plantas com uma biologia incomum. Como exemplo, a planta *Rhyncholacis penicillata* coletada de um sistema de rios no nordeste da Venezuela, vive em águas turbulentas, um ambiente onde a planta está sujeita a constantes lesões, mas apesar disso, a população de plantas parece sempre saudável e em constante crescimento, o que acontece possivelmente devido a associação com endófitos. Esse procedimento leva a escolhas mais promissoras para o estudo de endófitos. (STROBEL et al., 2004)

Além de que há hipóteses de que os endófitos podem mimetizar o metabolismo secundário de seus hospedeiros (PRITI et al., 2009), idéia

primeiramente defendida por Stierle e colaboradores (1993) que isolou o Taxol do extrato de *Taxomyces andreanae* isolado previamente da planta *Taxus brevifolia*.

Utilizando esses procedimentos e por razões a seguir apresentadas, a planta *Senna spectabilis* foi escolhida para isolamento de endófitos, e dentre esses endófitos o gênero *Colletotrichum* foi escolhido por haver raros estudos químicos do mesmo.

A espécie vegetal *Senna spectabilis* (Fabaceae) é uma espécie arbórea que ocorre no cerrado brasileiro. As plantas do gênero *Senna* apresentam propriedades farmacológicas que têm sido usadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de resfriados, como laxativo e purgativo. Revisões bibliográficas demonstraram que foram isoladas mais de 350 metabólitos secundários de diversas classes de substâncias de mais de 30 espécies, e além do estudo químico, propriedades etnofarmacológicas e algumas propriedades farmacológicas já foram validadas para vários extratos (SILVA, 2005).



**Figura 7:** *Senna spectabilis*. Fonte: Lorenzi, 1998.

#### **1.4 *Colletotrichum* sp. e desreplicação.**

Além desses incentivos para a investigação dos metabólitos secundários, foi realizado pela Dr. Lizinéia M. Zanardi, uma análise do perfil químico de fungos isolados de *Senna Spectabilis* onde, coletou-se a espécie

vegetal nas proximidades do IQ/Ar e após condições adequadas de isolamento e purificação, obteve-se 14 linhagens puras de fungos endofíticos. Estas foram cultivadas em MDB por 28 dias, sob aeração e agitação, a temperatura ambiente. Após o cultivo, extratos brutos das 14 linhagens foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$ , CLAE-DAD, atividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, atividades antioxidante e inibidora da enzima acetilcolinesterase. O perfil químico destes microrganismos evidenciou uma grande diversidade metabólica e os ensaios biológicos mostraram que 90% dos fungos endofíticos de *S. spectabilis* apresentam atividade antifúngica e 100% antioxidante e anticolinesterásica. Sendo assim, a linhagem de *Colletotrichum* sp., codificada como Cs-c(16) foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, pois além de apresentar uma excelente produção metabólica, evidenciada por CCDC, RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD, produziu uma substância com uma excepcional atividade anticolinesterásica.

O fungo *Colletotrichum* sp., endófito de *Senna spectabilis* foi o alvo deste trabalho, visando obter mais informações sobre a interação fungo-planta, e seu papel biológico. Mas, para se chegar às conclusões satisfatórias, tratando-se de um fungo tão complexo em sua produção metabólica, novas estratégias de pesquisa devem ser adotadas com o intuito de evitar o gasto excessivo de recursos laboratoriais como solventes, reagentes e economizar tempo, um fator muito importante na pesquisa.

Em geral, micro-organismos produzem extratos brutos muito complexos com dezenas ou centenas de metabolitos secundários (WOLFENDER et al., 2003) o que faz necessária uma detecção eficiente e caracterização rápida dessas substâncias. Nesse contexto, técnicas hífenadas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM e CLAE-EM-RMN são utilizadas na chamada desreplicação de misturas complexas para estabelecer quais já foram previamente identificadas.

De fato, nas últimas décadas as técnicas hífenadas tem se tornado a mais importante estratégia para a identificação ou confirmação de identidade de compostos químicos conhecidos. O *screening* químico utilizando técnicas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM e CLAE-EM-RMN rapidamente nos fornece uma ampla informação estrutural, possibilitando, em muitos casos, a identificação inequívoca de compostos *on-line* assim auxiliando na racionalização dos estudos fitoquímicos (MOLYNEUX; SCHIEBERLE, 2007).

Deste modo constata-se que estas técnicas criaram possibilidades para o *screening* químico ou determinação do perfil metabólico dos componentes de extratos de produtos naturais, pois provêem um método rápido e confiável para a distinção entre compostos previamente identificados diretamente a partir de extratos brutos. Isso elimina, ou diminui muito, a necessidade do processo de isolamento e purificação de compostos já conhecidos, e direciona ao isolamento de constituintes apresentando características espectroscópicas novas, diferentes ou de interesse biológico (NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)

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

Por isso é necessário adotar novas estratégias para a identificação das substâncias produzidas pelo fungo, e assim, optou-se por utilizar um método de desreplicação, ou seja, a identificação rápida em mistura dos compostos já conhecidos. Para isso, adotou-se um método de desreplicação ainda em fase inicial, onde foi utilizado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e também o programa MestRe Nova® versão 6.0.2-5475, para processamento de espectros de RMN. O programa possui ferramentas que permitem a simulação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de moléculas conhecidas e também a correção de deslocamentos químicos dos hidrogênios a partir de dados reais, e assim, possibilita sua posterior projeção em espectros reais, fornecendo assim um meio de comparação de dados. O programa possibilita a inserção dos mais variados parâmetros para a projeção dos espectros, aliado a possibilidade de correção dos dados a partir de dados da literatura, nos fornece um modelo muito confiável dos espectros das moléculas projetadas.

Assim sendo, a técnica de desreplicação se encaixa perfeitamente no trabalho desenvolvido como uma importante ferramenta de auxílio na identificação das substâncias produzidas.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo a identificação dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp. através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas com o auxílio da desreplicação para correlação das técnicas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais.

##### 3.1.1 Meios de cultivo.

**Tabela 1.** Meios de cultivo para o fungo endofítico *Colletotrichum* sp.

| Meios de Cultura | Tipo    | [ g L <sup>-1</sup> | Composição                                                                                                                                                    | Fabricante |
|------------------|---------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| MDB              | Líquido | 24                  | Fécula de batata (4g), dextrose (20g)                                                                                                                         | Acumedia   |
| Czapek           | Líquido | 35                  | Sacarose (30g), NaNO <sub>3</sub> (3g), Na <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (1g), MgSO <sub>4</sub> (0,5g), KCl (0,5g), FeSO <sub>4</sub> (0,01g) | Difco      |
| Extrato 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   |

##### 3.1.2 Solventes.

Na obtenção dos extratos brutos em escala pequena e ampliada, para os fracionamentos, separações cromatográficas em coluna e CLAE, foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol P.A., clorofórmio e acetonitrila das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt, QHEMIS e MTEDIA. Em análises em RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C utilizou-se DMSO-*d*<sub>6</sub> (Aldrich).

##### 3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

Nos ensaios de CCDC foi utilizado sílica gel 60 G F<sub>254</sub> (Merck) suspensas 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®. Também foram utilizadas placas pré-prontas de sílica gel da marca SORBET Technologies (Sílica G TLC Plates W/UV 254; 200 µm 20 x 20 cm). As revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (UV 254 e 366 nm), nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento ou exposição ao iodo sublimado.

#### *3.1.4 Cromatografia em coluna.*

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna aberta, sob pressão ou sob pressão reduzida, foram utilizadas colunas de vidro de diversos comprimentos e diâmetros internos. As fases estacionárias usadas foram: sílica gel de fase reversa do tipo C-18 (Merck), sílica gel (0,060 – 0,200 mm; 6 nm) (Merk) e sílica gel (Merk – Silicagel H seg. Stahl, 10-40 µm).

#### *3.1.5 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detector De Arranjo De Diodo (CLAE-DAD).*

As análises por CLAE-DAD no modo analítico foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A<sub>3</sub> 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).

### 3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ).

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

### 3.1.7 Espectrometria de Massas.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro do UltrOToF<sub>Q</sub> - ESI-ToF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As análises foram realizadas no espectrômetro de massas Varian LC 1200L com seringa de infusão, 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 Workstation 6.8*.

### 3.1.8 Outros equipamentos.

**Tabela 2.** Outros equipamentos utilizados no decorrer do projeto.

| <b><i>Equipamentos</i></b> | <b><i>Fabricante</i></b>          |
|----------------------------|-----------------------------------|
| 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 das cepas fúngicas.

O fungo *Colletotrichum* sp. foi isolado de caules saudáveis de *Senna spectabilis*, cujo material vegetal foi coletado do mesmo espécime de *Senna spectabilis* obtida anteriormente para estudos fitoquímicos, e já georeferenciadas, localizada nas proximidades do Instituto de Química da Unesp – Araraquara. A classificação da espécie vegetal foi realizada pela Inês Cordeiro do Instituto de Botânica. As exsicatas estão depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo, e classificadas como SP 384109.

O isolamento do fungo endofítico foi realizado pela Dr. Lisinéia M. Zanardi. Caules saudáveis da espécie vegetal *Senna spectabilis* foram lavados com água e sabão, e em seguida esterilizados por imersão em NaClO 1% (5 minutos), em etanol 70% (1 minuto) e posteriormente em água estéril (10 minutos). Após o processo de esterilização, os caules foram cortados e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Meio de batata dextrose e ágar (SIGMA): 39 g L<sup>-1</sup>) e antibiótico sulfato de gentamicina (100 µg mL<sup>-1</sup>), para evitar o crescimento bacteriano. Repiques sucessivos em BDA resultaram em diversas linhagens fúngicas puras (Figura 8), e uma destas, codificada como Cs-c (16).

Após o isolamento a linhagem fúngica Cs-c (16) foi identificada como *Colletotrichum* sp. por Marcos P. S. Câmara, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

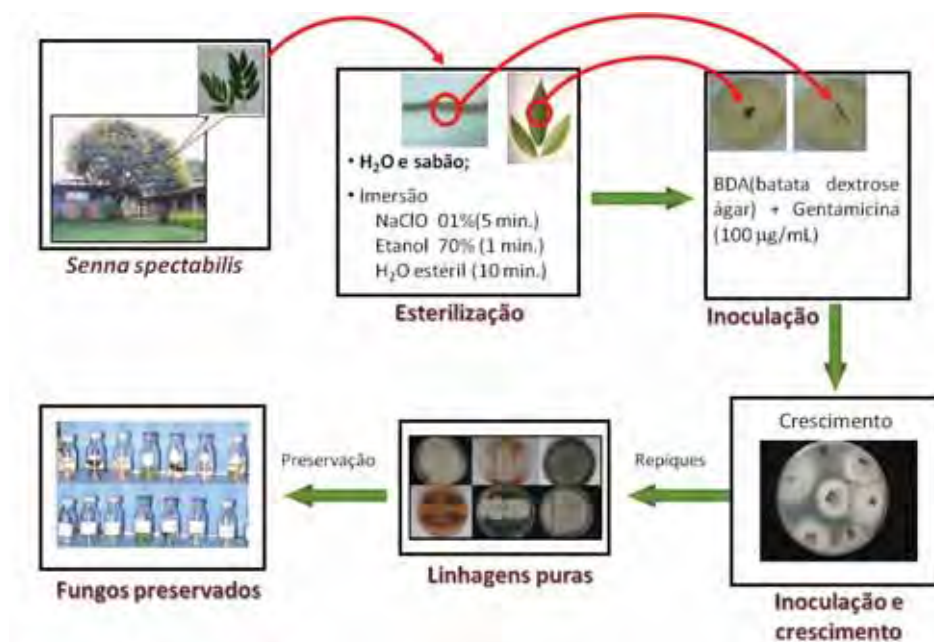
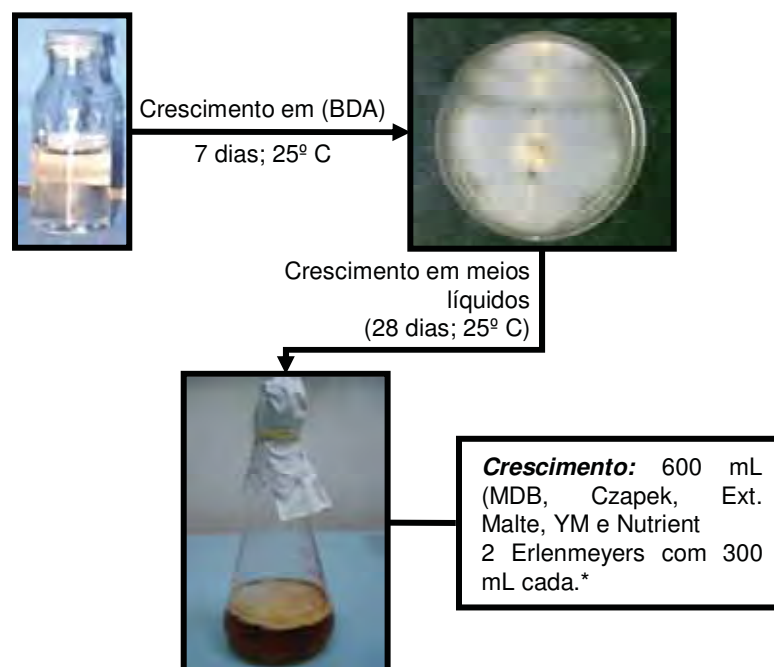


**Figura 8.** Esquema do isolamento do endófito *Colletotrichum* sp.

### 3.2.2 Cultivo do fungo *Colletotrichum* sp. em escala reduzida em diferentes meios de cultivo e a obtenção dos extratos brutos.

O fungo endofítico *Colletotrichum* sp., previamente isolado e preservado em “slants” (frascos vedados contendo apenas água deionizada), foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e incubado por 7 dias à 25°C. Após esse período o fungo foi inoculado em 600 mL (divididos em dois frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL cada) de meios líquidos de crescimento (MDB - Meio de batata e dextrose (DIFCO), 24 g L<sup>-1</sup>; Extrato de Malte (Acumedia), 20 g L<sup>-1</sup>; YM® (DIFCO), 21 g L<sup>-1</sup>; Nutrient® (DIFCO), 8 g L<sup>-1</sup>; e Czapek® (DIFCO), 35 g L<sup>-1</sup>), para obtenção do extrato bruto em escala reduzida. Esse crescimento se processou durante 28 dias à uma temperatura de 25°C, no modo estático (Figura 9).



\*Por problemas de contaminação, apenas 300 mL de YM foi utilizado

**Figura 9.** Esquema de cultivo do *Colletotrichum* sp. em escala reduzida.

Após esse período o caldo foi separado do micélio por filtração à pressão reduzida e submetido a partição líquido-líquido utilizando acetato de etila (Merk) (3 x 300 mL). Apenas para o meio de cultivo YM foi utilizado um total de 300 mL de meio de cultura e para extração 3 x 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi submetida a um evaporador rotatório (BUCHI) fornecendo assim os extratos brutos de MDB, Ext. de Malte, YM, Nutrient e Czapek. Os extratos brutos foram submetidos à CCDC, onde vários sistemas de solvente foram utilizados para as eluições. Dos sistemas testados o que apresentou melhor resolução de separação foi o sistema clorofórmio-metanol 85/15% (V/V), possibilitando assim o envio dos extratos para os ensaios biológicos.

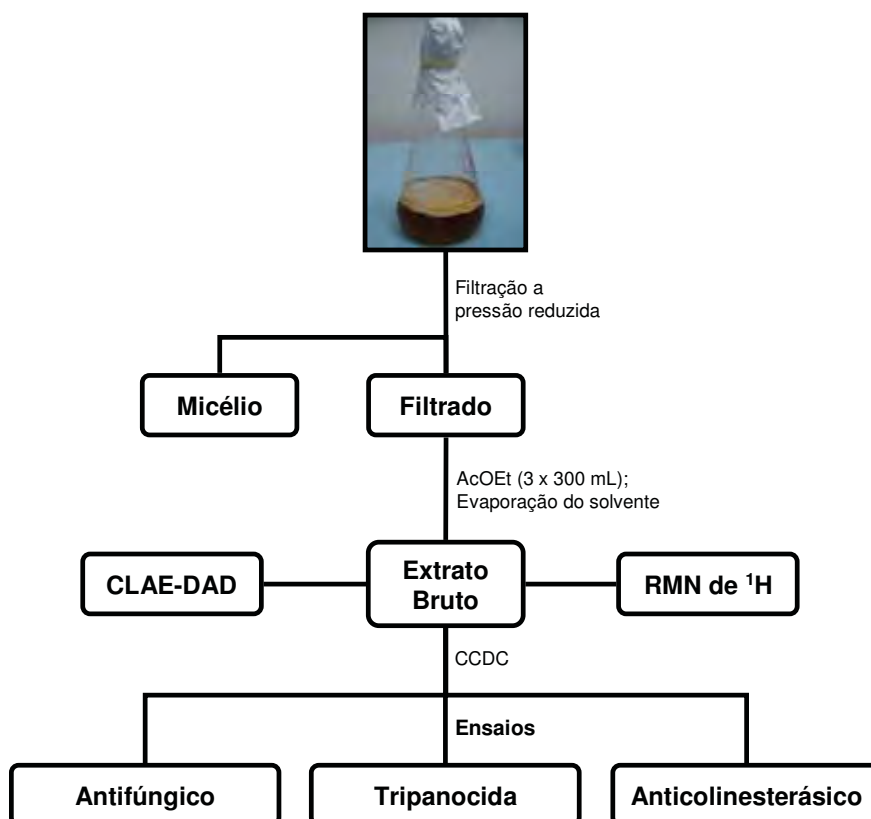


**Figura 10.** Esquema de obtenção dos Extratos brutos em diferentes meios líquidos.

Os extratos brutos obtidos foram submetidos às técnicas de CLAE-DAD utilizando gradiente exploratório e RMN de  $^1\text{H}$  utilizando os métodos a seguir apresentados. Os extratos foram submetidos a “Clean up” por solubilização em MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5), eluição em cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2  $\mu\text{m}$ ) para filtração. A seguir foram submetidos a gradiente exploratório utilizando coluna analítica de fase reversa Phenomenex Gemini com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) e eluídos com H<sub>2</sub>O/MeOH (Merk) (95:5) até (0:100) em 40 min., permanecendo 10 min. nesta condição, com fluxo de 1,0 mL/min., utilizando detector UV-DAD operando inicialmente a  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Para os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foi utilizado um espectrômetro Varian AS-500-OXFORD, operando a 500 MHz, utilizando TMS como referência interna e DMSO-*d*<sub>6</sub> como solvente para as amostras.

### *3.2.3 Cultivo do Colletotrichum sp. em escala ampliada e obtenção do extrato bruto.*

O cultivo em escala ampliada que se processou em MDB foi realizado seguindo o mesmo método que em escala reduzida (Figura 10). *Colletotrichum* sp. foi cultivado em 40 frascos de Erlenmeyer, totalizando 12 L de meio líquido de MDB ( $24 \text{ g L}^{-1}$ ), por um período de 28 dias, sob estático e temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C}$ . A seguir, realizou-se uma filtração a pressão reduzida para separar o micélio do caldo e este foi submetido a uma partição líquido-líquido com 3 x 6 L de acetato de etila (o AcOEt foi reciclado utilizando um evaporador rotatório durante as extrações).

### *3.2.4 Fracionamento do extrato bruto obtido em escala ampliada.*

Foram obtidos 1,4 gramas de extrato bruto que foi fracionado utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC). O extrato foi aplicado em coluna de 4 cm de diâmetro e 23 cm de altura, sob pressão, utilizando 180 g de sílica de fase reversa C18 (Merck) como fase estacionária e sistema de eluição com polaridade decrescente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  com incrementos iniciais de 5% de MeOH, 10% até MeOH 100% como fase móvel, como descreve a Figura 11.

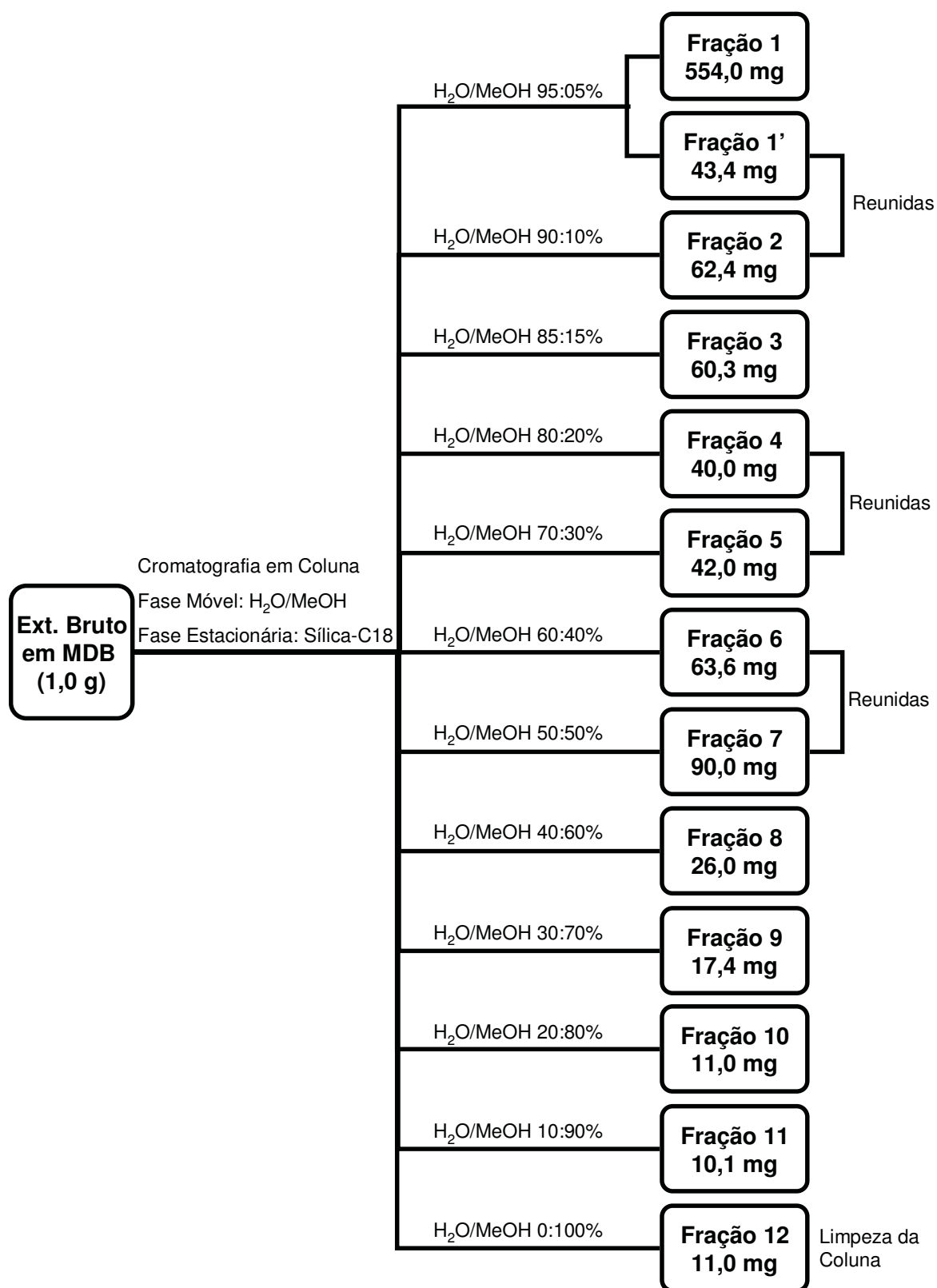


**Figura 11.** Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em MDB em escala ampliada.

Obteve-se 12 frações, as quais foram analisadas por CCDC (item 3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).), CLAE-DAD (item

3.1.5 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detector De Arranjo De Diodo (CLAE-DAD).) e RMN de  $^1\text{H}$  (item 3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ )).

*3.2.5 Fracionamento da Fração 1 obtida do fracionamento do extrato bruto de escala ampliada.*

A Fração 1 (500 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de 2,4 cm de diâmetro e 24,5 cm de altura, sob pressão utilizando 60 g de sílica gel (0,060 – 0,200 mm; 6 nm) (Merk) como fase estacionária e sistema de eluição com polaridade crescente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  96:4 com incrementos iniciais de 2% de MeOH até 30% e posteriormente incrementos maiores de MeOH até MeOH 100% para limpeza da coluna.

Foram obtidas 100 frações (10 mL cada) codificadas de Fr 01001 até Fr 01100, que foram analisadas por CCDC (item 3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)). Esta avaliação nos permitiu reagrupar algumas frações, a Figura 12 mostra as frações mais promissoras e o agrupamento de frações, também foram realizados experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  seguindo o item 3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ )..

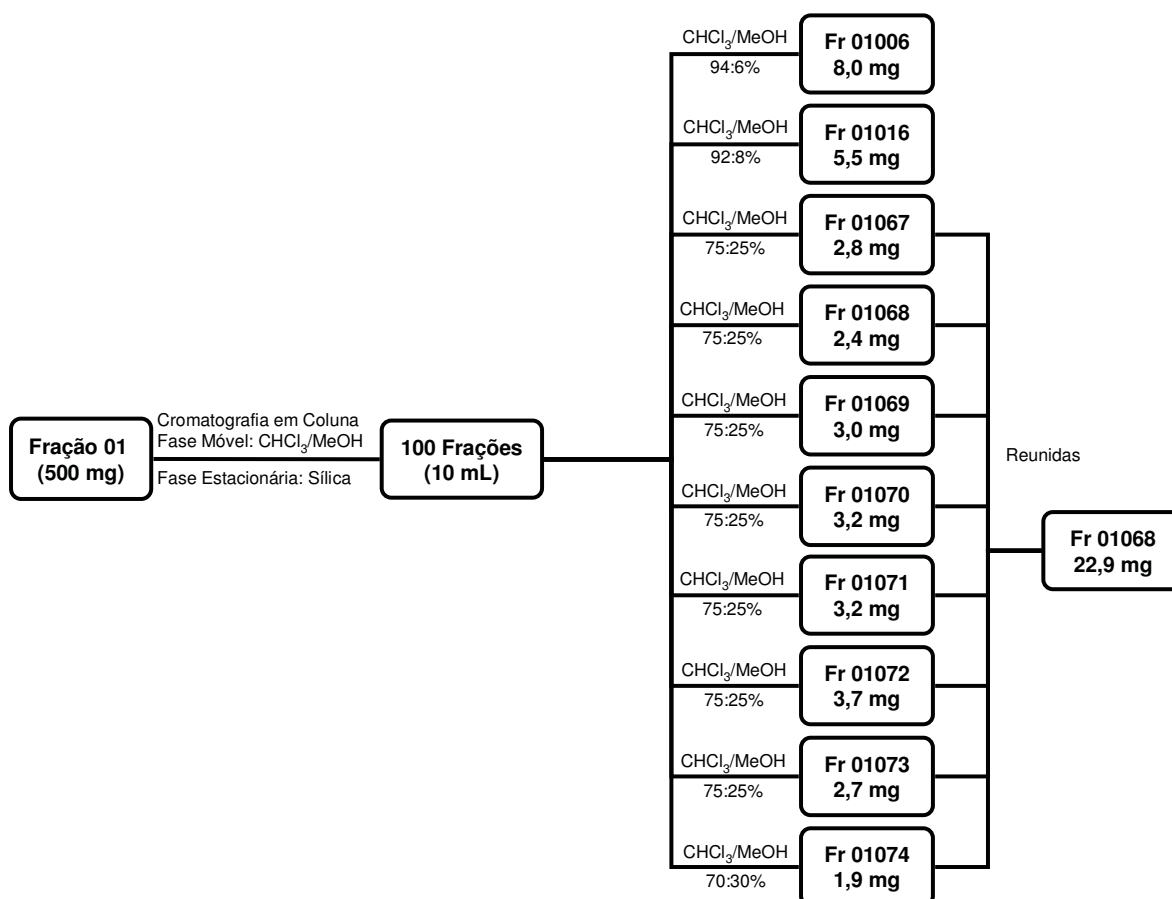


**Figura 12.** Fracionamento cromatográfico da Fração 1.

### 3.2.6 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos de *Colletotrichum* sp.

#### 3.2.6.1 Avaliação da atividade antifúngica.

Os extratos brutos ( $400\mu\text{g } 10\mu\text{L}^{-1}$ ) foram eluídos em CCDC, sendo  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (85:15) a fase móvel e sílica a fase estacionária. As cromatoplasmas foram nebulizadas com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* (Figura 23 A) e *Cladosporium sphaerospermum* (Figura 23 B) (concentração de  $5 \times 10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , em solução de glicose e sais). As placas foram incubadas a  $25^\circ \text{C}$  por 48 horas, na ausência de luz. Após este período verificou-se a presença de halos de inibição do crescimento dos fungos, em comparação com o padrão positivo nistatina ( $1\mu\text{g}$ ).

\*Ensaio biológico realizado pela Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

### 3.2.6.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica.

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos ( $200\mu\text{g } 10\mu\text{L}^{-1}$ ) em placas de sílica gel com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (85:15) como fase móvel. Nestas cromatoplasas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, em seguida foram incubadas em câmara úmida fechada a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos e após este período borrifou-se uma solução  $\text{C}^1$ . Como padrão positivo utilizou-se o composto fisostigmina a  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

<sup>1</sup> Solução C contém 10 mL da solução A mais 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.

\*Ensaio biológico realizado pela Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

### 3.2.6.3 Avaliação da atividade tripanocida.

Neste ensaio foram utilizadas cepas Y na forma epimastigota de *T. cruzi*, sendo estas cultivadas em meio de triptose (LIT) suplementado com 10% de soro bovino fetal a  $28^\circ\text{C}$ . Dissolveram-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* ( $1 \times 10^7$  parasitas  $\text{mL}^{-1}$ ) foi adicionado em cada cavidade e a mesma quantidade de meio LIT foi adicionado em poços controles, mantendo-se as placas a  $28^\circ\text{C}$  por 72h. Posteriormente adicionou-se em cada poço  $10 \mu\text{L}$  de uma solução MTT-PMS (3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol bromide)  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  e as placas foram incubadas por 75 min sob ausência de luz a  $28^\circ\text{C}$ . Adicionou-se à solução anterior uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% ( $100 \mu\text{L}$ ) 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  $\text{IC}_{50}$  das amostras e do controle positivo (benzonidazol) foram determinados.

\*Ensaio biológico realizado pela Dr<sup>a</sup>. Regina Cicarelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, SP.

#### 3.2.6.4 Avaliação da atividade antifúngica humana.

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<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup> e 0,48 µg mL<sup>-1</sup>. 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.

\*Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria J. M. Giannini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, SP.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### ***4.1 Avaliação dos extratos brutos obtidos em diferentes meios de cultivo do fungo Colletotrichum sp.***

A obtenção dos extratos brutos foi realizada de acordo com o item 3.2.2 Cultivo do fungo *Colletotrichum sp.* em escala reduzida em diferentes meios de cultivo e a obtenção dos extratos brutos. e o solvente acetato de etila foi selecionado, pois apresenta polaridade intermediária, é imiscível com água e garante a separação de uma vasta classe de substâncias, desde as pouco polares até as de mais elevada polaridade, garantindo assim a prospecção das substâncias de interesse (metabólitos secundários). Apenas para o meio de cultivo YM foi utilizado um total de 300 mL de meio de cultura e para extração 3 x 150 mL de acetato de etila, pois por problemas de contaminação, apenas metade do volume de meio foi utilizado.

Após a evaporação do solvente foram obtidos os extratos brutos de MDB (86,0 mg), Extrato de Malte (84,2 mg), YM (16,4 mg), Nutrient (14,7 mg) e Czapek (70,0 mg).

Para uma melhor compreensão dos dados, foi estabelecida uma relação entre a quantidade de meio de cultivo e a quantidade de extrato bruto produzido pelo fungo, dados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Relação entre produção de extrato por quantidade de meio de cultivo.

| Meio     | Quant. de meio p/<br>600 mL (g) | Massa de<br>extrato (mg) | Massa Extrato/Meio<br>de cultivo (mg g <sup>-1</sup> ) |
|----------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|
| MDB      | 14,4                            | 86,0                     | 5,97                                                   |
| Malte    | 12                              | 84,2                     | 7,02                                                   |
| YM*      | 6,3                             | 16,4                     | 2,60                                                   |
| Nutrient | 4,8                             | 14,7                     | 3,06                                                   |
| Czapek   | 21                              | 70,0                     | 3,33                                                   |

\*para o meio de YM foi utilizado apenas 300 mL, portanto a quantidade de meio é relativamente inferior.

Os extratos brutos foram submetidos à CCDC para avaliar a produção metabólica, através do triângulo de seletividade de solventes de Snyder, vários sistemas de solventes foram utilizados para as eluições e dos sistemas testados o que apresentou melhor resolução de separação foi o sistema clorofórmio-metanol 85-15% (V/V), evidenciando que o meio de MDB foi o que apresentou maior variação metabólica em relação aos outros meios.

Esse resultado foi confirmado submetendo os extratos à técnica CLAE-DAD e também experimentos de RMN de <sup>1</sup>H. Os resultados obtidos para os diferentes meios de cultivo são apresentados a seguir:

#### 4.1.1 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em Czapek.

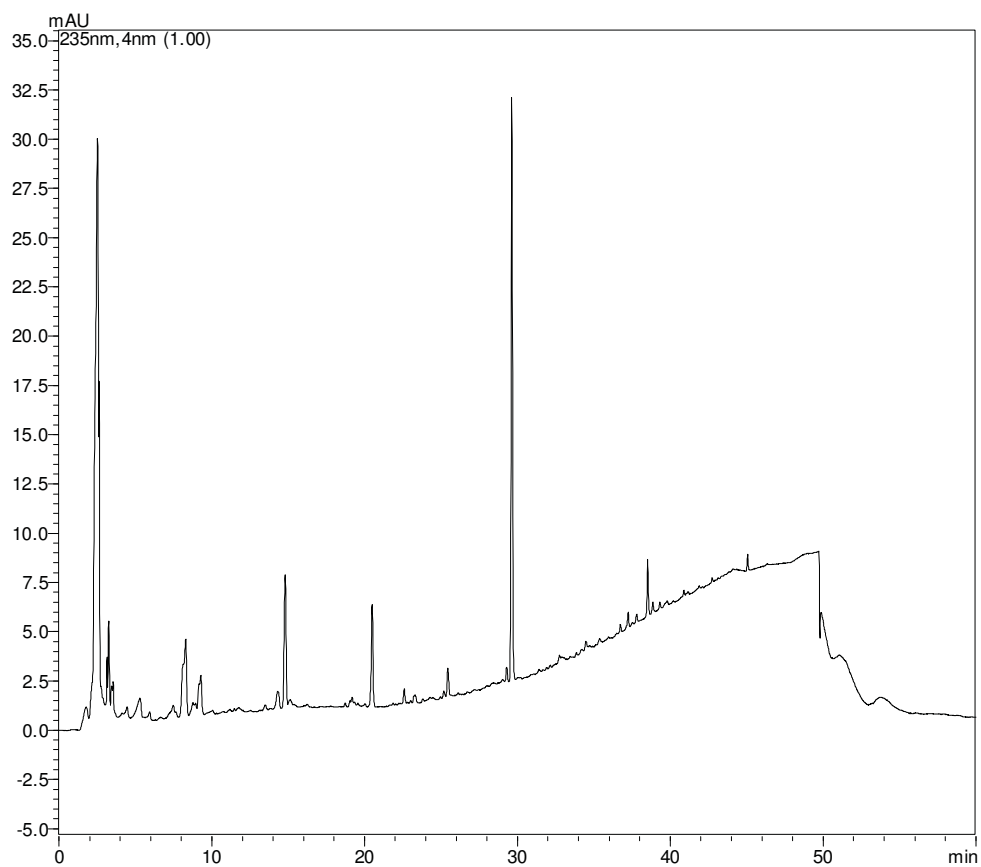


**Figura 13.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Czapek.

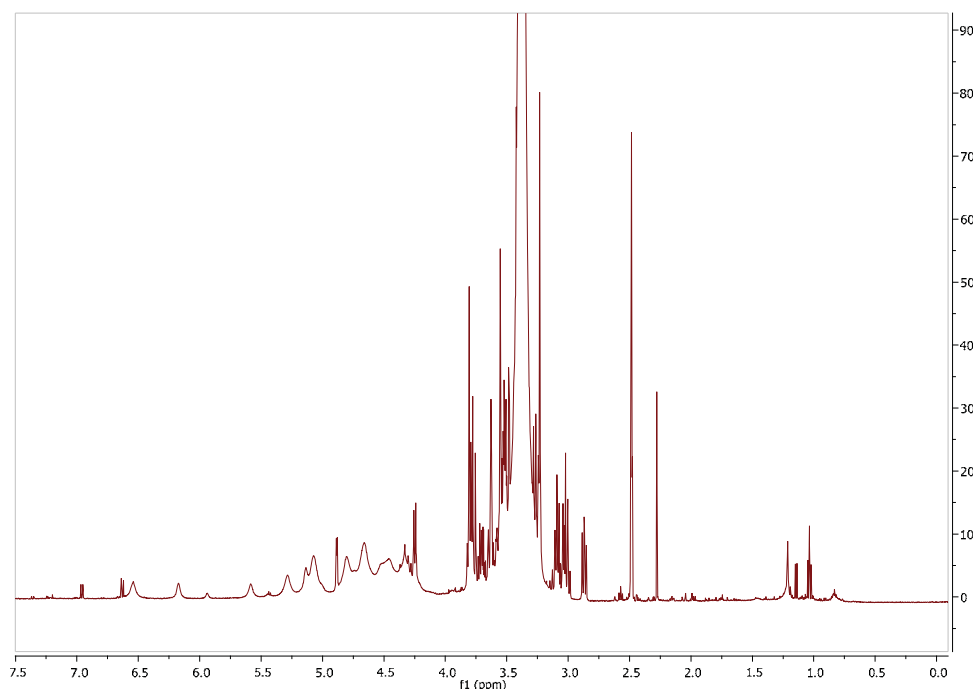


**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Czapek (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

A técnica de CLAE (Figura 13. Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Czapek) mostrou a presença de substâncias de alta à média polaridade, porém a produção metabólica nesse meio foi baixa, mas de quantidade intermediária, uma vez que a relação massa de extrato/meio de cultivo foi de  $3,33 \text{ mg g}^{-1}$  e o cromatograma apresentou poucas bandas de baixa a média absorvância.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Czapek (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).) apresentou sinais intensos na região dos hidrogênios, com poucos sinais em campo alto e baixo do espectro, o que indica uma baixa produção metabólica nesse meio.

#### 4.1.2 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em Nutrient.

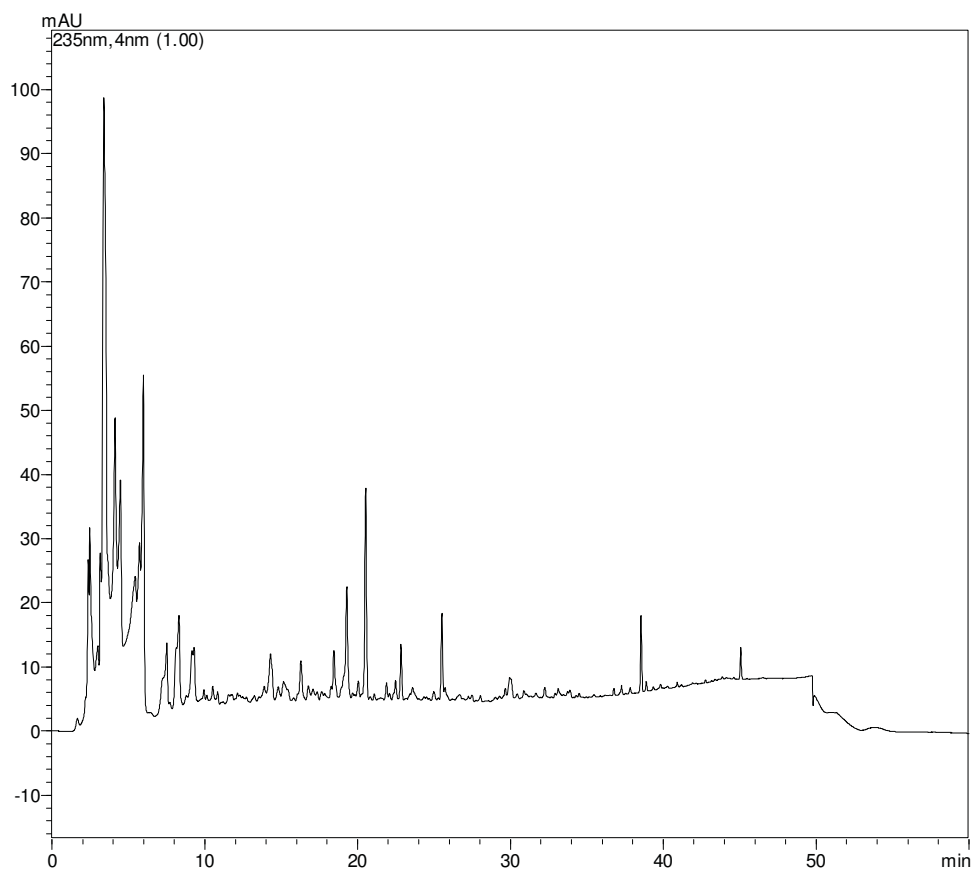


**Figura 15.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Nutrient.

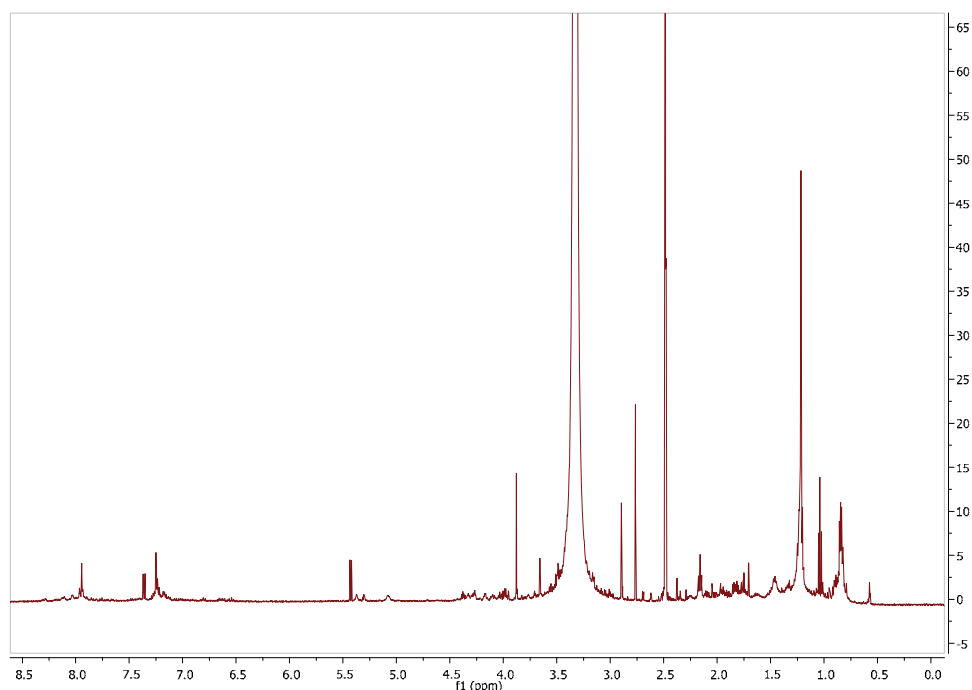


**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Nutrient ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

A técnica de CLAE (Figura 15. Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Nutrient), para este meio de cultivo, evidenciou um cromatograma com bandas muito polares e de baixa a média absorvância. A massa produzida foi intermediária, uma vez que a relação massa de extrato/meio de cultivo foi de  $3,06 \text{ mg g}^{-1}$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 16. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Nutrient (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)) apresentou vários sinais ao longo da faixa espectral, porém, de baixa intensidade, o que indica uma produção metabólica variada, porém de baixa quantidade.

Em uma análise detalhada do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 16) visualiza-se a presença da uracila com os sinais em 5,45 (d,  $J=7,5\text{Hz}$ , 1H) e 7,37 (d,  $J=7,5\text{Hz}$ , 1H) além de um singleto em 7,89 (s, 1H). 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).

#### 4.1.3 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em YM.

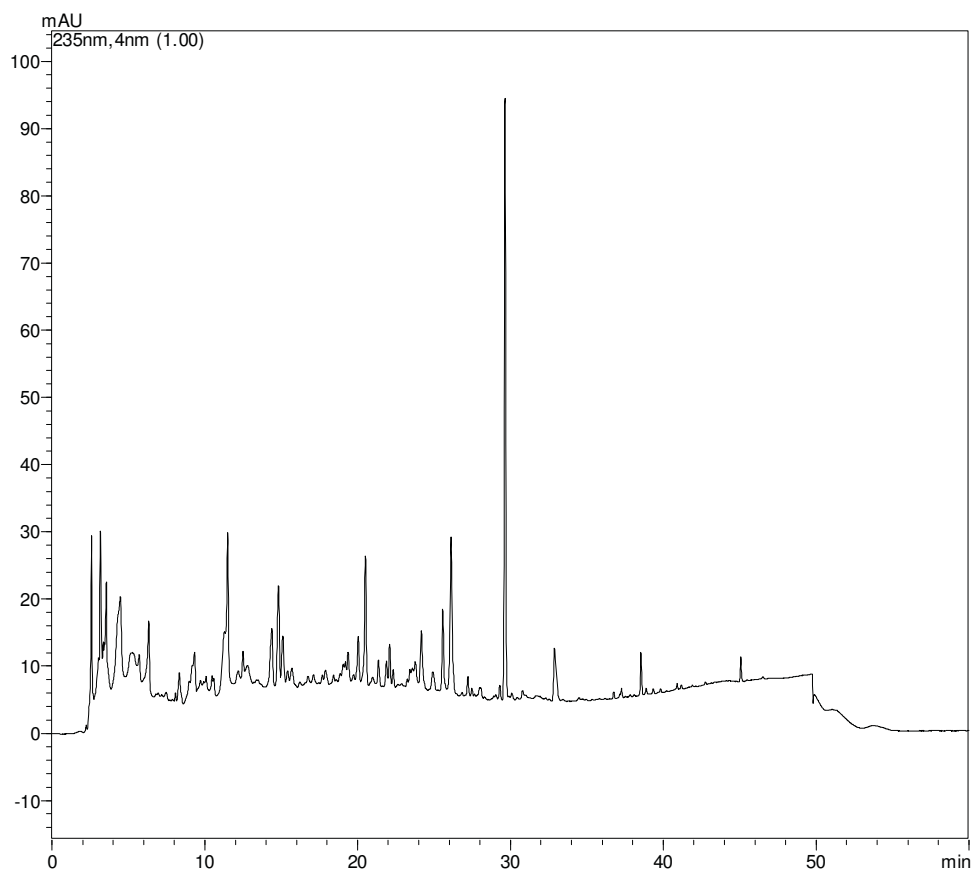


**Figura 17.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em YM.

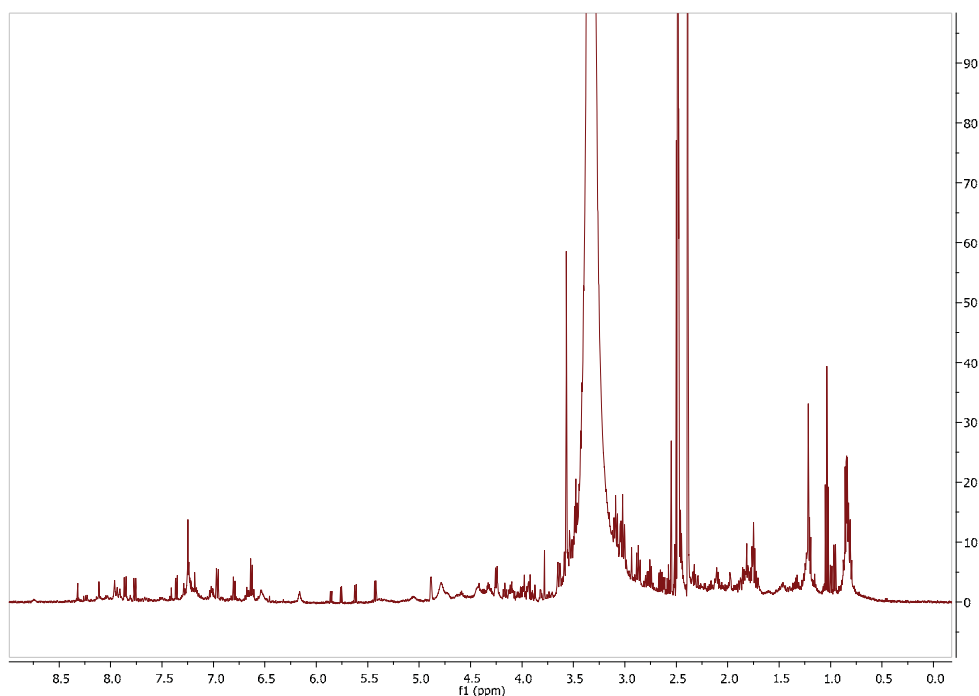


**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em YM (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

A técnica de CLAE (Figura 17. Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em YM) mostrou a presença de substâncias de alta à média polaridade, porém quantidade de extrato produzido nesse meio foi pobre, uma vez que a relação massa de extrato/meio de cultivo foi de  $2,60 \text{ mg g}^{-1}$ , ficando abaixo da produção dos outros meios, entretanto a produção metabólica foi mais variada em relação aos meios Czapek e Nutrient, já que o cromatograma apresentou várias bandas em toda faixa de tempo de retenção mas com intensidades de baixa a média absorbância.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em YM (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)) apresentou vários sinais ao longo da faixa espectral (0,7 a 8,5 ppm) com sinais de hidrogênios olefínicos, carbinólicos e metílicos, indicando uma excelente produção metabólica.

#### 4.1.4 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em Extrato. de Malte.

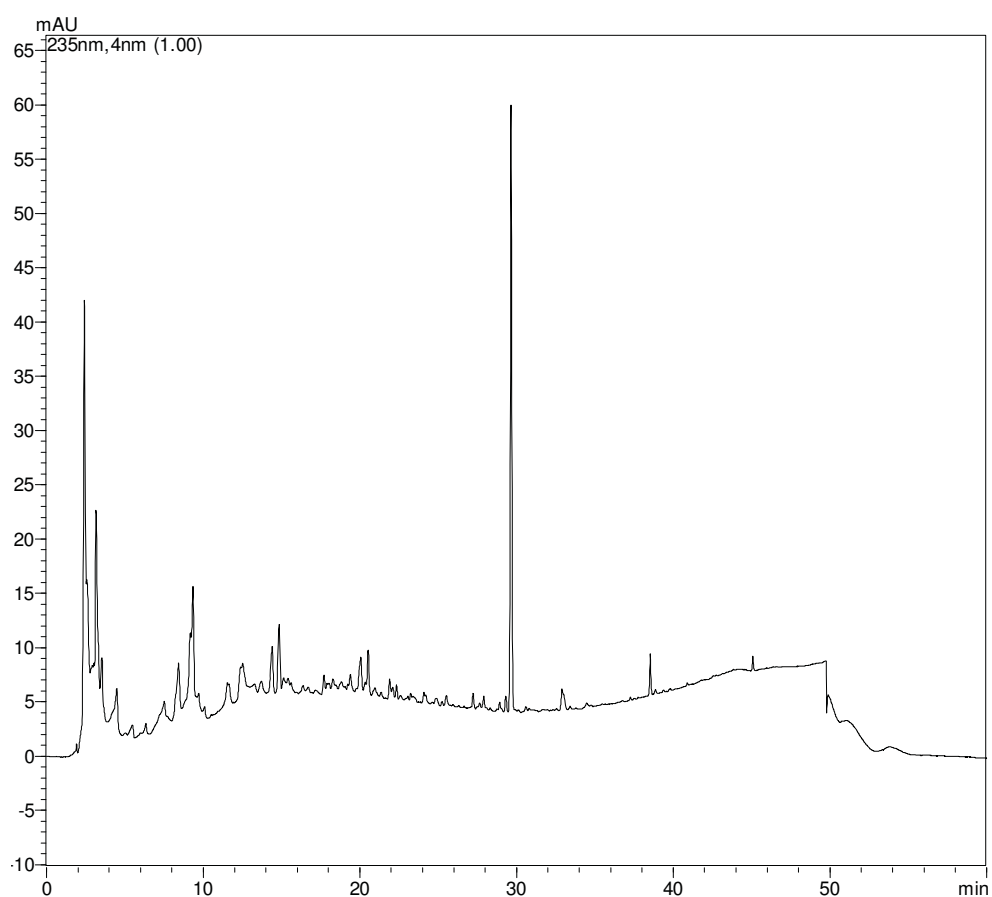


**Figura 19.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Extrato de Malte.

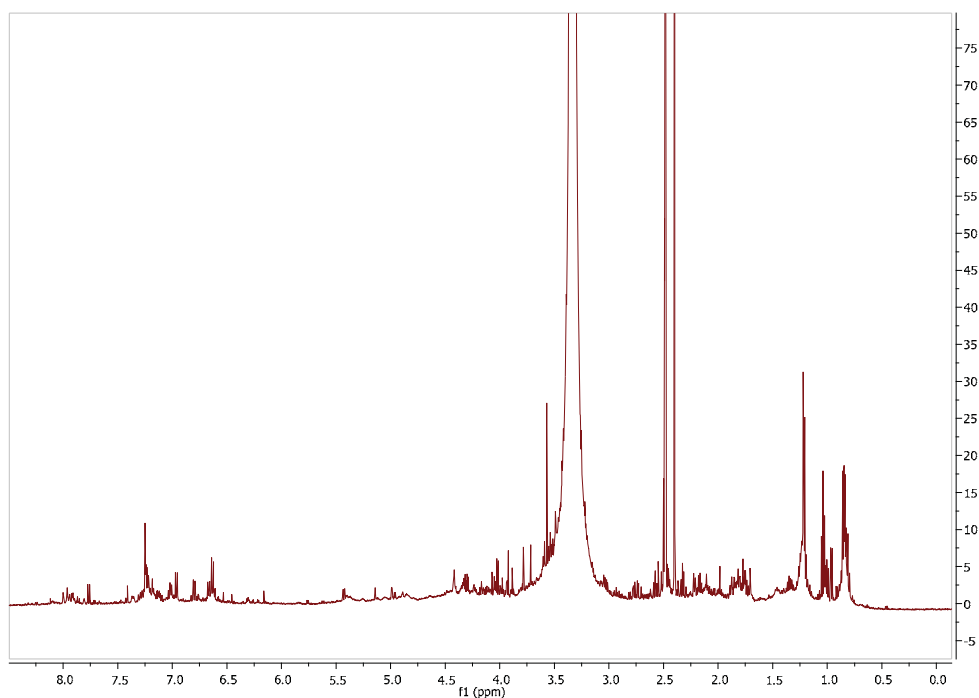


**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Malte (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

A técnica de CLAE (Figura 19. Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Extrato de Malte) mostrou a presença de substâncias de alta à média polaridade, a quantidade de extrato nesse meio foi boa quando comparada aos outros meios, uma vez que a relação massa de extrato/meio de cultivo foi de  $7,02 \text{ mg g}^{-1}$ . O cromatograma apresentou bandas de baixa a média absorvância em toda faixa de tempo de retenção.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em Malte (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)) apresentou vários sinais ao longo da faixa espectral (0,7 a 8,5 ppm) e sinais de hidrogênios olefínicos, carbinólicos e metílicos, indicando uma produção metabólica variada.

#### 4.1.5 Avaliação do extrato bruto obtido a partir do cultivo em MDB.

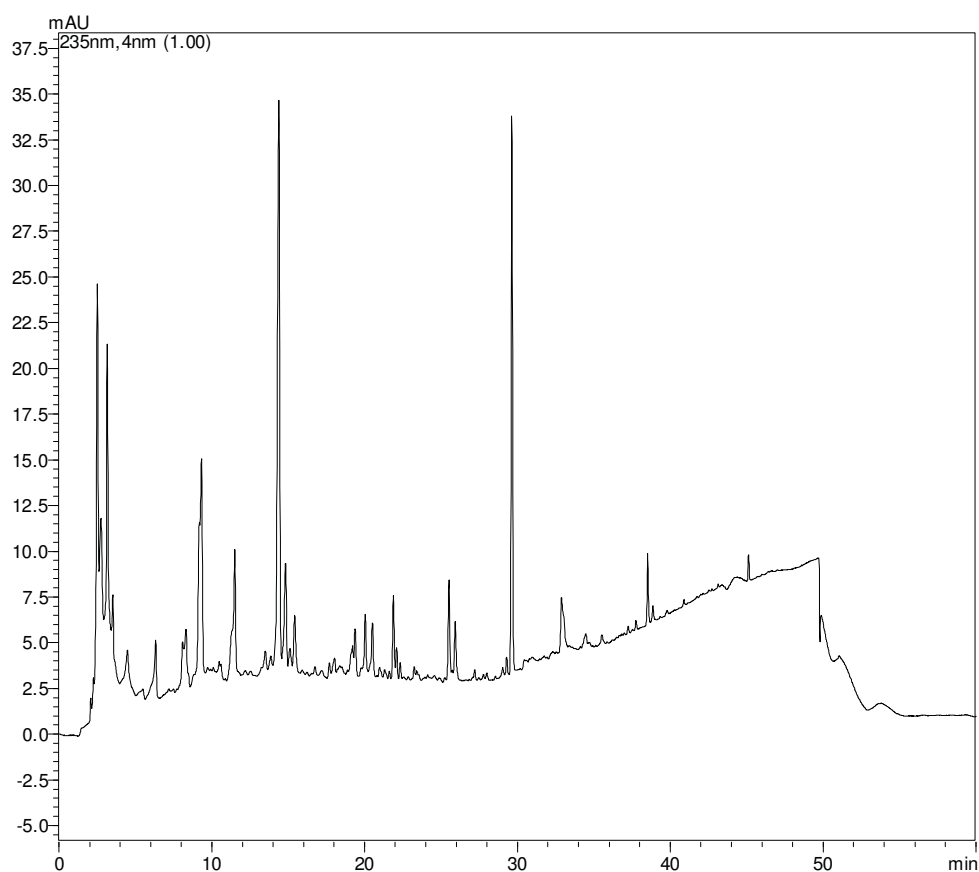


**Figura 21.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em MDB.

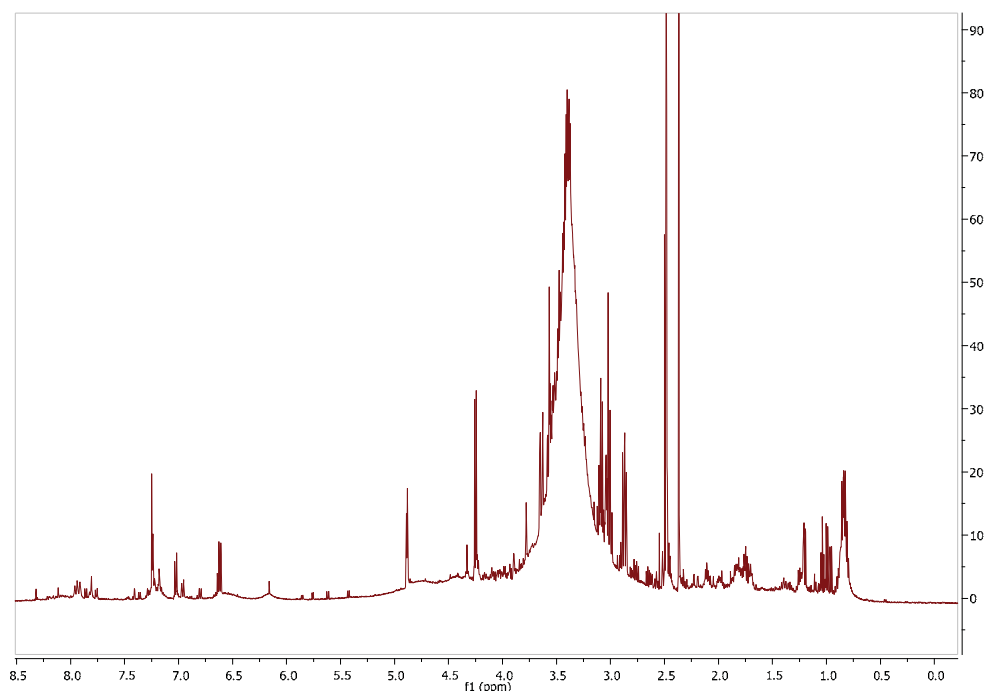


**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em MDB (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

A técnica de CLAE (Figura 21. Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a  $\lambda = 235$  nm do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em MDB.) mostrou a presença de substâncias de alta à média polaridade, a quantidade de extrato nesse meio foi boa quando comparada aos outros meios, uma vez que a relação massa de extrato/meio de cultivo foi de  $5,97 \text{ mg g}^{-1}$ . A produção metabólica foi variada já que o cromatograma apresentou várias bandas em toda faixa de tempo de retenção, porém com intensidades de baixa a média absorvância.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 22. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. cultivado em MDB (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)) apresentou vários sinais ao longo da faixa espectral (0,7 a 8,5 ppm) e apresentou perfil semelhante ao espectro de YM, apenas com alguns sinais diferentes. Apresentou também, sinais de hidrogênios olefinicos, carbinólicos e metílicos, indicando uma produção metabólica variada.

## 4.2 Avaliação das atividades biológicas dos extratos do fungo *Colletotrichum* sp.

Foram realizados testes biológicos com os extratos brutos com o objetivo de avaliar a potencialidade das substâncias presentes nos extratos quanto ao seu potencial biológico. Os ensaios e seus resultados são apresentados a seguir.

### 4.2.1 Avaliação da atividade antifúngica.

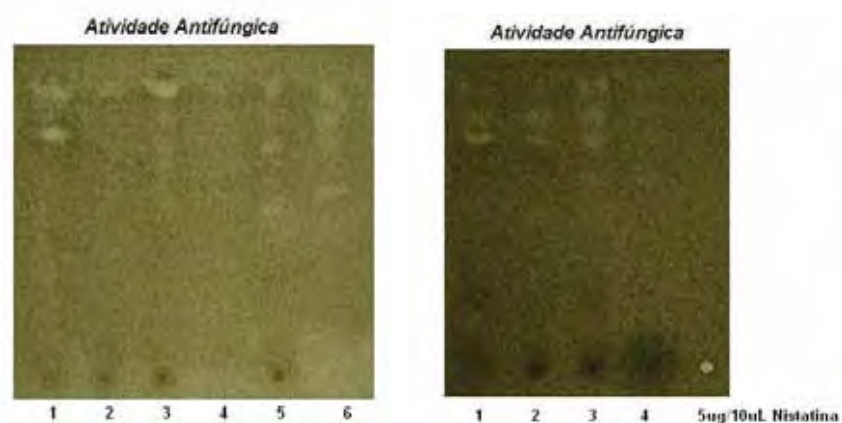


**Figura 23.** Atividade antifúngica dos extratos bruto de *Colletotrichum* sp. evidenciado em cromatoplaça, onde: (A) 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek; 5 – YM; 6 – Nutrient; (B) 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek.

**Tabela 4.** Resultado da atividade antifúngica dos extratos brutos de *Colletotrichum* sp.

| Extrato  | Ensaio Antifúngico        |                          |
|----------|---------------------------|--------------------------|
|          | <i>C. cladosporioides</i> | <i>C. sphaerospermum</i> |
| MDB LE   | */**                      | *                        |
| MDB      | *                         | */*                      |
| MALTE    | **/*                      | **                       |
| CZAPEK   | -                         | -                        |
| YM       | */*                       | -                        |
| NUTRIENT | */**/*                    | -                        |

\*\*potencial médio; \*potencial fraco; \*/\* indica mais de uma região de inibição

Os resultados obtidos evidenciam que a maioria dos extratos possui substâncias com atividade antifúngica fraca. Este dado pode estar diretamente relacionado com o ambiente ao qual este fungo pertence, pois estes micro-organismos podem produzir substâncias para defesa contra outros micro-organismos fitopatógenos ou mesmo em resposta a “stress ambiental” sofrido pela planta.

#### 4.2.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica.

A doença de Alzheimer é uma doença que ocorre em pessoas de idade mais avançada, é progressiva, neurodegenerativa e eventualmente fatal, que vem aumentando na população com o aumento da expectativa de vida. Atualmente inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem a base das novas drogas disponíveis para o tratamento desta doença. (VIEGAS *et. al.* 2005). VIEGAS *et al.* (2005), isolou alcalóides piperidínicos, de *Senna spectabilis*, que apresentaram significativa inibição da enzima acetilcolinesterase. Partindo do princípio que os fungos endófitos mimetizam os metabólitos de seu hospedeiro (PRITI *et al.*, 2009), esse ensaio se torna particularmente importante, pois pode nos fornecer dados sobre a interação fungo-planta.

O aparecimento de manchas brancas (indicação da inibição da reação enzimática) sobre um fundo de coloração roxa indicou inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados foram observados e fotografados e são mostrados na Figura 24. Atividade anticolinesterásica dos extratos bruto de *Colletotrichum* sp. evidenciado em cromatoplaca, onde: 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek; 5 – YM; 6 – Nutrient; P - Fisostigmina..



**Figura 24.** Atividade anticolinesterásica dos extratos bruto de *Colletotrichum* sp. evidenciado em cromatoplaça, onde: 1 – MDB LE; 2 – MDB; 3 – Malte; 4 – Czapek; 5 – YM; 6 – Nutrient; P - Fisostigmina.

Este tipo de ensaio é qualitativo, e a presença de halos brancos, indica inibição da atividade, então, de acordo com o observado na cromatoplaça, todos os extratos apresentaram atividade. Este resultado evidencia a potencialidade do fungo *Colletotrichum* sp. na produção de metabólitos com atividade anticolinesterásica.

#### 4.2.3 Avaliação da atividade tripanocida.

**Tabela 5.** Resultado da atividade tripanocida dos extratos brutos de *Colletotrichum* sp.

| Atividade Tripanocida |                  |
|-----------------------|------------------|
| Extrato               | IC <sub>50</sub> |
| MDB LE                | >500             |
| MDB                   | >500             |
| MALTE                 | >500             |
| CZAPEK                | >500             |
| YM                    | >500             |

\* não foi realizado o teste para o extrato de Nutrient por não conter massa suficiente

Em comparação com o controle positivo (benzonidazol, IC<sub>50</sub>= 9 µg mL<sup>-1</sup>) os resultados obtidos na Tabela 5 para os extratos não foram significativos,

evidenciando que os metabólitos produzidos pelo fungo não apresentam quaisquer atividade tripanocida.

#### 4.2.4 Avaliação da atividade antifúngica humana.

**Tabela 6.** Resultado da atividade antifúngica humana dos extratos brutos de *Colletotrichum* sp.

| Atividade Antifúngica Humana** |                         |                       |                             |                                |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Extrato                        | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida krusei</i> | <i>Candida parapsilosis</i> | <i>Cryptococcus neoformans</i> |
| MDB LE                         | 125                     | 125                   | 125                         | 62,5                           |
| MDB                            | 250                     | 250                   | 250                         | 250                            |
| MALTE                          | 250                     | >250                  | >250                        | 250                            |
| CZAPEK                         | 250                     | 250                   | >250                        | 250                            |
| YM                             | 125                     | 125                   | 250                         | 125                            |
| NUTRIENT                       | 62,5                    | -                     | -                           | 125                            |

\*os valores são referentes a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

\*\*padrão utilizado: Fluconazol, CIM =  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$

Analisando a Tabela 6, concluímos que em relação ao padrão utilizado, os extratos brutos apresentaram baixa ou nenhuma atividade antifúngica humana. Porém, tratando-se de extratos brutos, devemos dar atenção para o extrato de Nutrient que apresentou maior atividade contra *Candida albicans* e o extrato de MDB LE que apresentou maior atividade contra *Cryptococcus neoformans* em relação aos outros extratos, o que indica a presença de substâncias com potencial antifúngico, uma vez que essas substâncias podem estar em quantidades pequenas na massa de extrato enviado para os ensaios.

### **4.3 Aspectos gerais do cultivo do fungo *Colletotrichum* sp. em escala reduzida.**

Tendo por base apenas a quantidade de formação de micélio nas diferentes culturas, é de se esperar que nos diferentes meios, a massa de extrato seria a mesma, uma vez que o crescimento do fungo foi semelhante em todos os meios.

No entanto, utilizando desde técnicas sofisticadas como CLAE-DAD, RMN de  $^1\text{H}$  à simples como CCDC, notamos que houve significativa variação metabólica entre os meios e comparando-os, notamos que os meios de MDB e YM foram mais promissores na variação metabólica enquanto os meios de extrato de Malte e MDB tiveram melhor rendimento quanto a relação massa de extrato/meio de cultivo. Tais observações podem ser associadas ao fato de que a presença de diferentes componentes nutricionais, fundamentais para o crescimento do endófito, em cada meio, possibilitam a produção de diferentes metabólitos secundários.

Nos ensaios biológicos, notou-se que os extratos apresentaram as mais variadas atividades, tendo destaque para a anticolinesterásica, onde todos os extratos foram ativos, mas esse tipo de atividade envolve mecanismos complexos e muitos ainda desconhecidos, portanto nada se pode afirmar com segurança. Os ensaios com extratos brutos fornecem apenas um guia para a prospecção de novas substâncias, e assim que isoladas, podemos ter mais informações para relacionar o papel biológico do fungo e o porquê dessas substâncias apresentarem tais atividades.

Considerando todos os resultados obtidos, sugerimos que o meio de cultivo MDB (talvez por ser de origem natural e ser mais complexo) mostrou-se mais promissor para o cultivo do fungo *Colletotrichum* sp.

#### ***4.4 Avaliação do extrato bruto obtidos em MDB do cultivo em escala ampliada do fungo Colletotrichum sp.***

Com os resultados obtidos no cultivo em escala reduzida, o meio de MDB foi selecionado para cultivo em escala ampliada com o objetivo de se obter massa suficiente de extrato bruto para isolamento, determinação estrutural e avaliação da atividade biológica das substâncias isoladas.

Foram obtidos 1,4 gramas de extrato bruto, massa um pouco inferior aos 2 gramas esperados pelas projeções do cultivo em escala reduzida, isso pode ter ocorrido devido a perdas no processo de extração. Este extrato foi fracionado utilizando a técnica de cromatografia em coluna conforme item 3.2.4 Fracionamento do extrato bruto obtido em escala ampliada. o método foi usado para pré-fracionar o extrato em “faixas” de polaridade e facilitar o isolamento das substâncias.

Obteve-se 12 frações (Figura 11), as quais foram analisadas por CCDC utilizando uma série de eluentes e anisaldeído como revelador para avaliar o grau de pureza, e posteriormente analisadas por CLAE-DAD. Os cromatogramas obtidos (Figura 33 à Figura 39) apresentaram boa resolução e mostraram uma boa distribuição quanto à polaridade das substâncias nas frações. Considerando os cromatogramas, as placas de CCDC e também a massa de cada fração, realizaram-se experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , para avaliação dos constituintes das frações mais promissoras para o isolamento dos metabólitos. De posse desses dados, as frações 1'-2, 4-5 e 6-7 foram reunidas, dando origem a três frações distintas.

Os espectros (Figura 40 à Figura 46) apresentaram boa distribuição de sinais, o que indicou várias classes de substâncias, deste modo foram realizados experimentos de CLAE semi-preparativo. No entanto, a separação otimizada por CLAE no modo analítico não foi reproduzida após inúmeras tentativas, deste modo, optamos por CC para a separação dos constituintes da da Fração 1.

#### *4.4.1 Separação dos constituintes da Fração 1.*

A Fração 1 (500 mg) foi submetida a cromatografia em coluna seguindo o item 3.2.4 Fracionamento do extrato bruto obtido em escala ampliada., a escolha da fase móvel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  foi realizada visando mimetizar o comportamento dos resultados obtidos em CCDC, onde vários sistemas de eluição com vários solventes foram utilizados, e o que apresentou melhor separação e resolução foi  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . Foram obtidas 100 frações (10 mL cada) codificadas de Fr 01001 até Fr 01100, que foram analisadas por CCDC utilizando uma série de eluentes e anisaldeído como revelador, como ensaio preliminar para avaliar a pureza das frações. Esta avaliação nos permitiu reagrupar as frações, como mostrado na Figura 12. Fracionamento cromatográfico da Fração 1., e realizar experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ . Algumas frações apresentaram resultados promissores, ou seja, vários sinais correspondentes a metilas, metilenos, hidrogênios aromáticos, entre outros, o que sugere uma ampla classe de substâncias. As frações 01006 (8,0 mg), 01016 (5,5 mg) e a junção das frações 01067-01074 (renomeadas para Fr 01068, 22,9 mg) foram as que tiveram resultados mais significativos

#### *4.4.2 Fração 01006.*

A fração 01006 (8,0 mg) apresentou-se com aspecto cristalino após a evaporação do solvente, e por experimentos de CCDC, observou-se, a presença de apenas uma mancha sendo então submetida a experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 25) e Espectrometria de Massas (Figura 49).

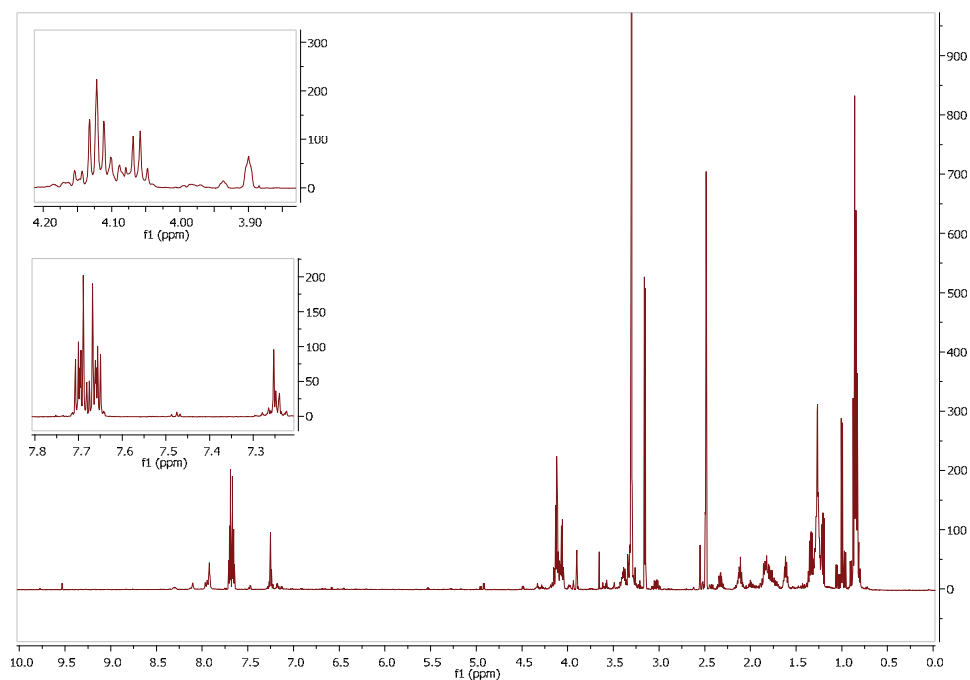


**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 01006 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)

A análise da Figura 25 mostrou um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  4,10, e dois singletos largos em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 e em  $\delta_{\text{H}}$  7,92. A análise de experimentos de gHMBC (Figura 47) mostrou a correlação a longa distância do singlete largo  $\delta_{\text{H}}$  3,90 ( $\delta_{\text{C}}$  60,1) com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  165,0 e que o singlete largo  $\delta_{\text{H}}$  7,92 não apresentou correlação nos experimentos de gHMQC (Figura 48), o que indica que está ligado a átomos de nitrogênio ou oxigênio, o que nos sugere a presença de um núcleo dicetopiperazínico.

A partir dos experimentos de gHMBC e gHMQC, foi possível identificar em mistura a *ciclo*(Pro-Val). O experimento de correlação a curta distância permitiu correlacionar os sinais dos hidrogênios aos sinais de carbono, como mostra a Tabela 7.

**Tabela 7.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 Mhz) e gHMQC da *ciclo*(Pro-Val).

| Posição           | $^1\text{H}$ (ppm e $J$ em Hz) | $^{13}\text{C}$ (ppm) |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1                 | -                              | 165                   |
| 3                 | 3,41 ( $m$ ) / 3,30*           | 45,3                  |
| 4                 | 1,83 ( $m$ )                   | 22,7                  |
| 5                 | 2,11 ( $m$ )                   | 28,5                  |
| 6                 | 4,10 ( $t$ ; 5,3)              | 58,7                  |
| 7                 | -                              | 163                   |
| 8                 | 7,92                           | -                     |
| 9                 | 3,90 ( $s$ )                   | 60,1                  |
| 10                | 2,32 ( $m$ )                   | 28,2                  |
| 11- $\text{CH}_3$ | 0,83 ( $d$ ; 7,0)              | 16,9                  |
| 12- $\text{CH}_3$ | 1,00 ( $d$ ; 7,0)              | 18,8                  |

\*sob água do solvente

Os dados de gHMBC (Figura 47), nos mostraram as seguintes correlações: os multipletos  $\delta_{\text{H}}$  3,41 (45,3); 1,83 (22,7) e 2,11 (28,5) mostraram correlações entre si, além de correlacionarem com o  $\delta_{\text{H}}$  4,10 (58,7), permitindo assim identificar o núcleo do aminoácido prolina na molécula. Já os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,00 (18,8) e 0,83 (16,9) apresentaram correlação entre si, com o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  2,32 (28,2) e também com o singletto largo em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (60,1), permitindo assim identificar o núcleo do aminoácido valina. Esses dois núcleos puderam ser atribuídos a mesma molécula a partir das seguintes observações efetuadas nos experimentos: o singletto em  $\delta_{\text{H}}$  7,92 correlaciona-se com a carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  165,0 e também com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  58,7 (4,10), que por sua vez faz parte do núcleo prolina, já o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 se correlaciona com a mesma carbonila que o singletto em  $\delta_{\text{H}}$  7,92, e este hidrogênio faz parte do núcleo valina. O espectro de massas da fração (Figura 49) apresentou picos do íon precursor da molécula protonada em  $m/z$  197,1280 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) e do íon produto em  $m/z$  219,1101 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), coerentes com a estrutura proposta, confirmando a fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ . Estes dados permitiram atribuir à substância em questão, a *ciclo*(Pro-Val). Todas as interações observadas no experimento de gHMBC são mostradas na Figura 26.

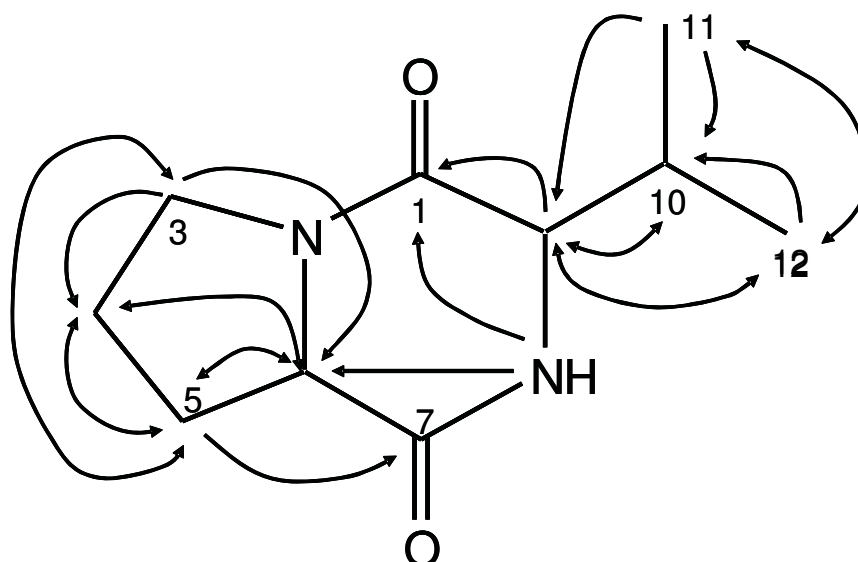


**Figura 26.** Molécula da *ciclo*(Pro-Val) com as correlações observadas em gHMBC

#### 4.4.3 Fração 01016.

A fração 01016 (5,5 mg) apresentou-se com aspecto cristalino após a evaporação da fase móvel, no entanto as análises por CCDC evidenciaram a presença de 3 manchas distintas. Esta observação aliada a pequena massa obtida nos conduziu a realização de um experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27) e de Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (LC-MS) (Figura 50) objetivando-se identificar as substâncias em mistura.

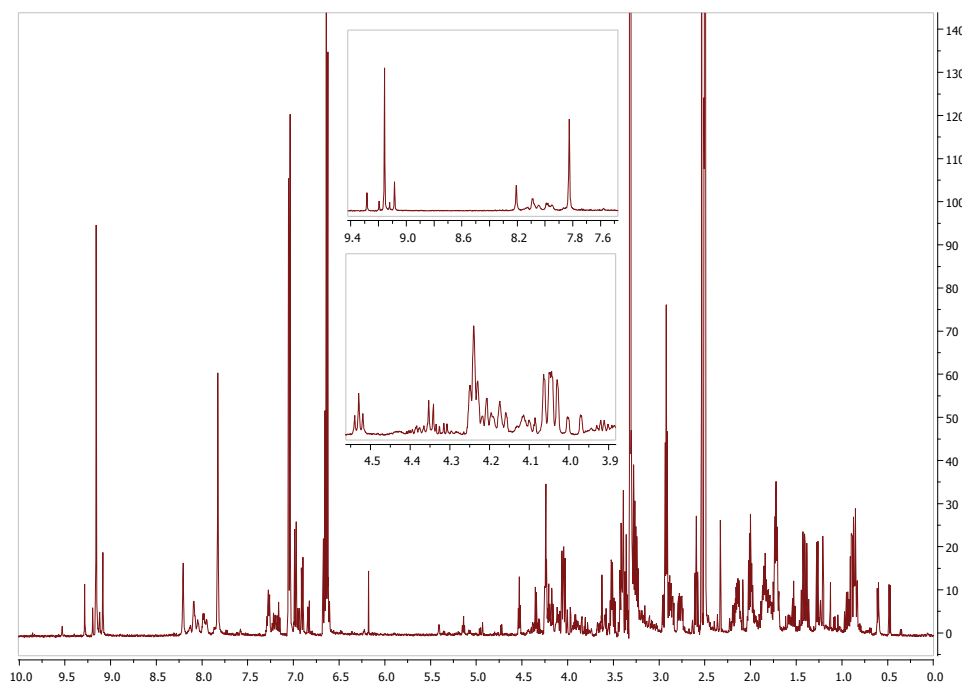


**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 01016 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27) da mistura evidenciou singletos largos na região de  $\delta_{\text{H}}$  7,8 a 8,1 ppm, além de sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  4,0 a  $\delta_{\text{H}}$  4,3, o que nos deram indícios de sistemas dicetopiperazínicos.

Os dados de LC-MS evidenciaram substâncias com tempos de retenção em 5,5 min e 10,8 min e com padrão de fragmentação de dicetopiperazinas idênticos à literatura (CAFÊU, 2007).

A substância que eluiu em 5,5 min apresentou picos do íon precursor da molécula protonada de  $m/z$  245,0982 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), do íon produto de  $m/z$  267,0806 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) e do íon produto em  $m/z$  283,0550 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ), apresentando espectro de massas (Figura 54) idêntico ao da literatura para a *ciclo*(Pro-Phe) (STARK, HOFMANN, 2005) além de que a análise detalhada da Figura 27 permitiu observar três mutipletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,40 ,  $\delta_{\text{H}}$  1,72 e  $\delta_{\text{H}}$  3,25, mesmos sinais observados por CAFÊU, 2007. Por não apresentar grupos cromóforos que absorvem radiação magnética na região analisada pelo detector, o espectro de absorbância de UV monitorado à  $\lambda = 254$  nm (Figura 51) não apresentou dados significativos. Estes dados corroboraram para confirmar que a substância em questão é *ciclo*(Pro-Phe) (Figura 30 (**47**)). Considerando que a substância encontra-se em mistura, a configuração relativa não foi determinada.

A substância que eluíu em 10,8 min apresentou espectro de massas com picos do íon precursor da molécula protonada de  $m/z$  261,1256 ( $[M+H]^+$ ) e do íon produto de  $m/z$  283,1079 ( $[M+Na]^+$ ), apresentando espectro de massas (Figura 55) idêntico ao da literatura para a *ciclo*(Pro-Tyr) (STARK, HOFMANN, 2005).

A análise detalhada do experimento de RMN de  $^1H$  (Figura 27) evidenciou dois tripletos em  $\delta_H$  4,05 e  $\delta_H$  4,24 e dois dubletos na região de sistemas aromáticos,  $\delta_H$  6,63 e  $\delta_H$  7,05. Para esta molécula, espectro de absorvância de UV monitorado à  $\lambda = 254$  nm (Figura 52) apresentou máximo de absorvância em  $\lambda = 225$  nm, esse fato é esperado uma vez que a molécula apresenta diversos grupos cromóforos, como anel aromático e carbonilas. Essas observações permitiram propor para a substância com tempo de retenção 10,8 min a estrutura da *ciclo*(Pro-Tyr) (Figura 30 **(48)**), mas também não sendo possível a determinação de sua configuração absoluta por se encontrar em mistura

#### 4.4.4 Desreplicação da Fração 01016.

Para complementarmos as informações obtidas acerca das substâncias presentes na fração 01016, foi utilizado o software MestRe Nova®, versão 6.0.2-5475, para processamento de espectros de RMN.

O programa possui ferramentas que permitem a simulação de espectros de RMN de  $^1H$  de moléculas conhecidas e sua posterior projeção em espectros reais, fornecendo assim um meio de comparação de dados. Utilizando esta possibilidade, foi possível realizar a simulação do espectro da *ciclo*(Pro-Phe) e os valores de deslocamento químico dos hidrogênios foram corrigidos a partir de dados obtidos por CAFÊU (2007). Deste modo o espectro foi projetado com o espectro real da fração 01016 (Figura 27) fornecendo a Figura 28, que pela comparação dos sinais (tripletos, multipletos, etc.) e deslocamentos químicos dos hidrogênios, permitiu a afirmação de que a *ciclo*(Pro-Phe) está presente na fração 01016. Esta ferramenta se mostrou muito útil, uma vez que acrescenta mais dados de que a *ciclo*(Pro-Phe) (Figura 30 **(47)**) está presente na fração, pois a simulação do espectro da molécula e sua correção com valores reais fornecem dados consistentes para tal afirmação.

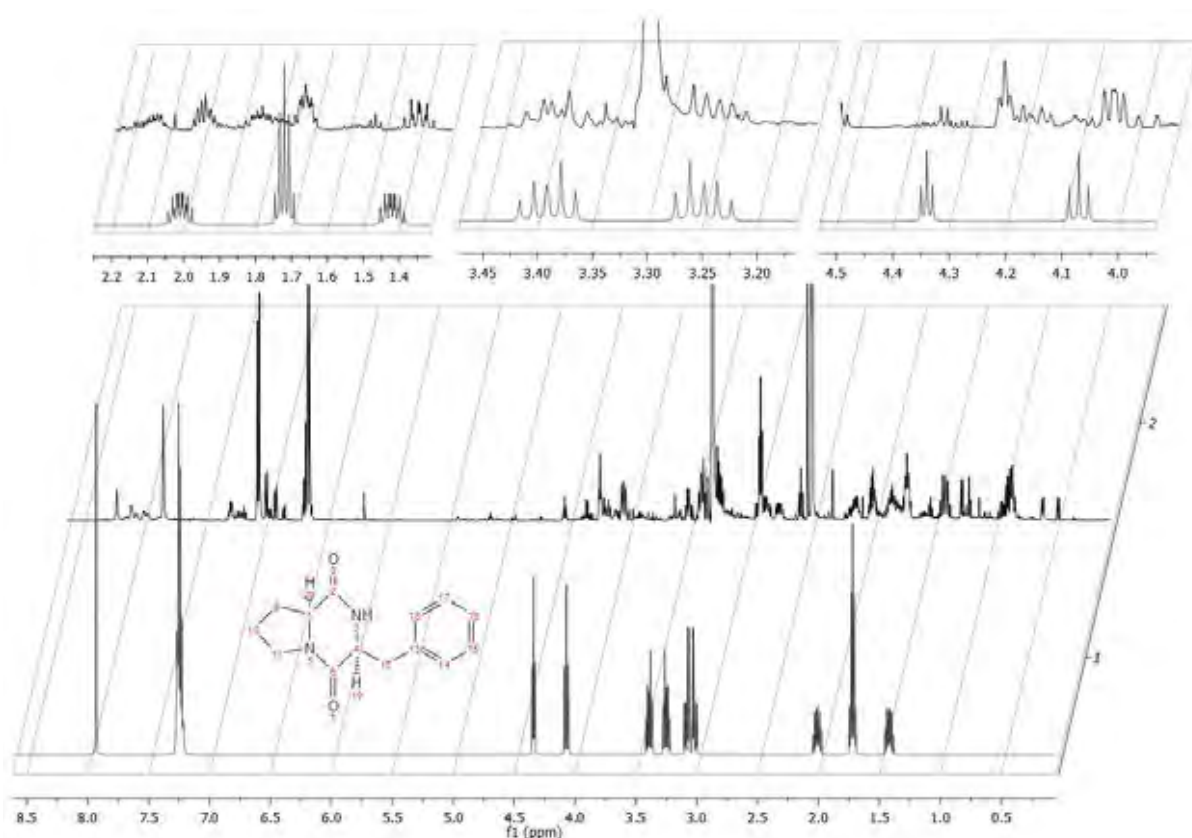


**Figura 28.** Projeção do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *ciclo*(Pro-Phe) com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 01016.

O mesmo tratamento realizado na *ciclo*(Pro-Phe) com o programa Mestre Nova® foi realizado para a *ciclo*(Pro-Tyr) (Figura 30 (**48**)), e os deslocamentos químicos de hidrogênio também foram corrigidos a partir de dados obtidos por Cafêu (2007), fornecendo a Figura 29, que permitiu, por comparação dos sinais (tripletos, multipletos, etc.) e deslocamentos químicos dos hidrogênios, a afirmação de que a *ciclo*(Pro-Tyr) está presente na fração 01016.

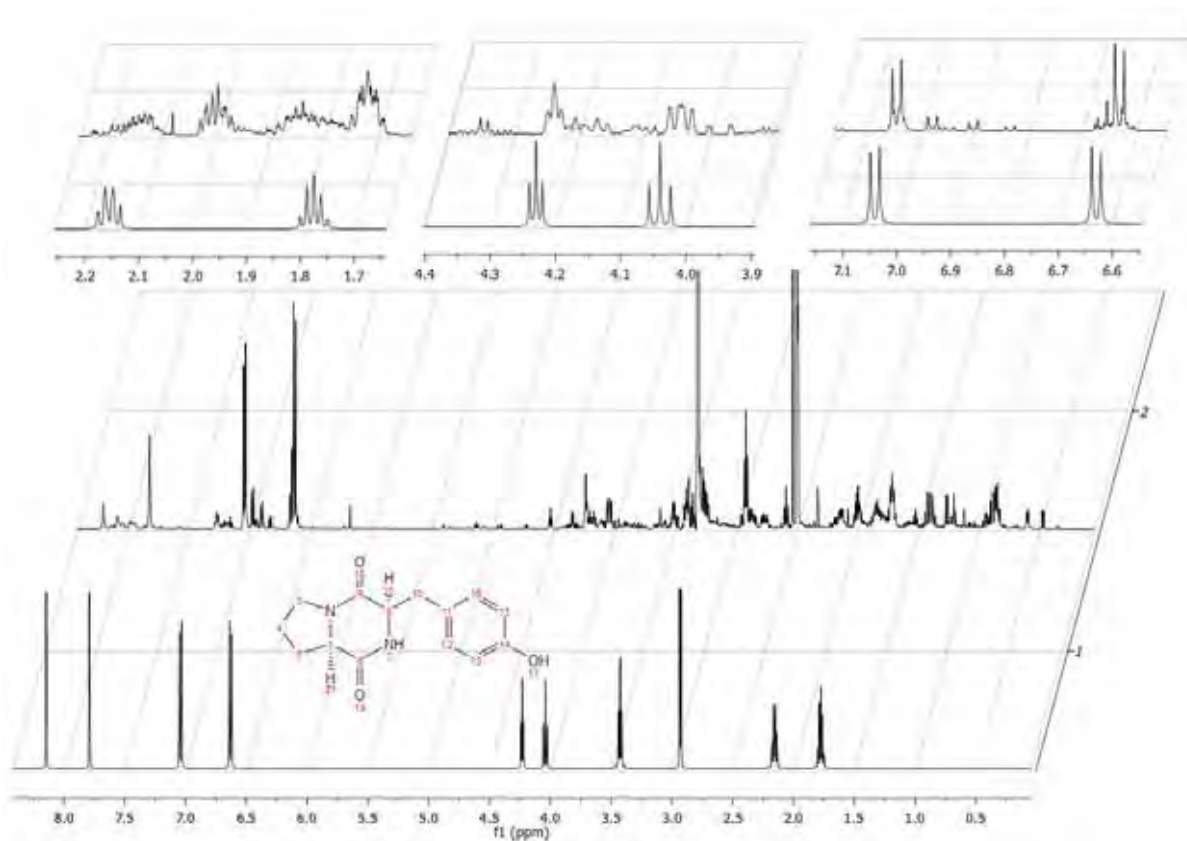


**Figura 29.** Projeção do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *ciclo(Pro-Tyr)* com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 01016.

#### **4.5 Desrepliação nas frações obtidas do extrato bruto obtido de MDB.**

Para a desrepliação foi utilizado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos e o programa MestRe Nova<sup>®</sup> versão 6.0.2-5475, para processamento de espectros de RMN. O programa possui ferramentas que permitem a simulação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de moléculas conhecidas e também a correção de deslocamentos químicos dos hidrogênios a partir de dados reais, e assim, possibilita sua posterior projeção em espectros reais, fornecendo um meio de comparação de dados. O programa possibilita a inserção dos mais variados parâmetros para a projeção dos espectros, aliado a possibilidade de correção dos dados a partir de dados da literatura, nos fornece um modelo muito confiável dos espectros das moléculas projetadas.

Utilizando essa ferramenta, foi realizada a projeção de algumas substâncias nos espectros das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto de MDB (Escala ampliada).

Considerando que dicetopiperazinas foram isoladas em mistura e que as frações a serem submetidas à técnica de desreplicação apresentavam perfil desta classe de substâncias, estas foram projetadas.

Outro fator que levou a essa escolha dessa classe foi o fato de que Cafêu (2007), isolou 8 dicetopiperazinas do fungo *Colletotrichum crassipes*, mesmo gênero que o fungo desse trabalho, porém isolados de plantas diferentes.

Para a Fração 1 foram encontradas 5 dicetopiperazinas, sendo elas a *ciclo*(Pro-Val) **(44)**, *ciclo*(Pro-Ala) **(45)**, *ciclo*(Hyp-Ile) **(45)**, *ciclo*(Pro-Phe) **(46)** e a *ciclo*(Pro-Tyr) **(48)** além da Uracila **(19)**, mostradas na Figura 30.

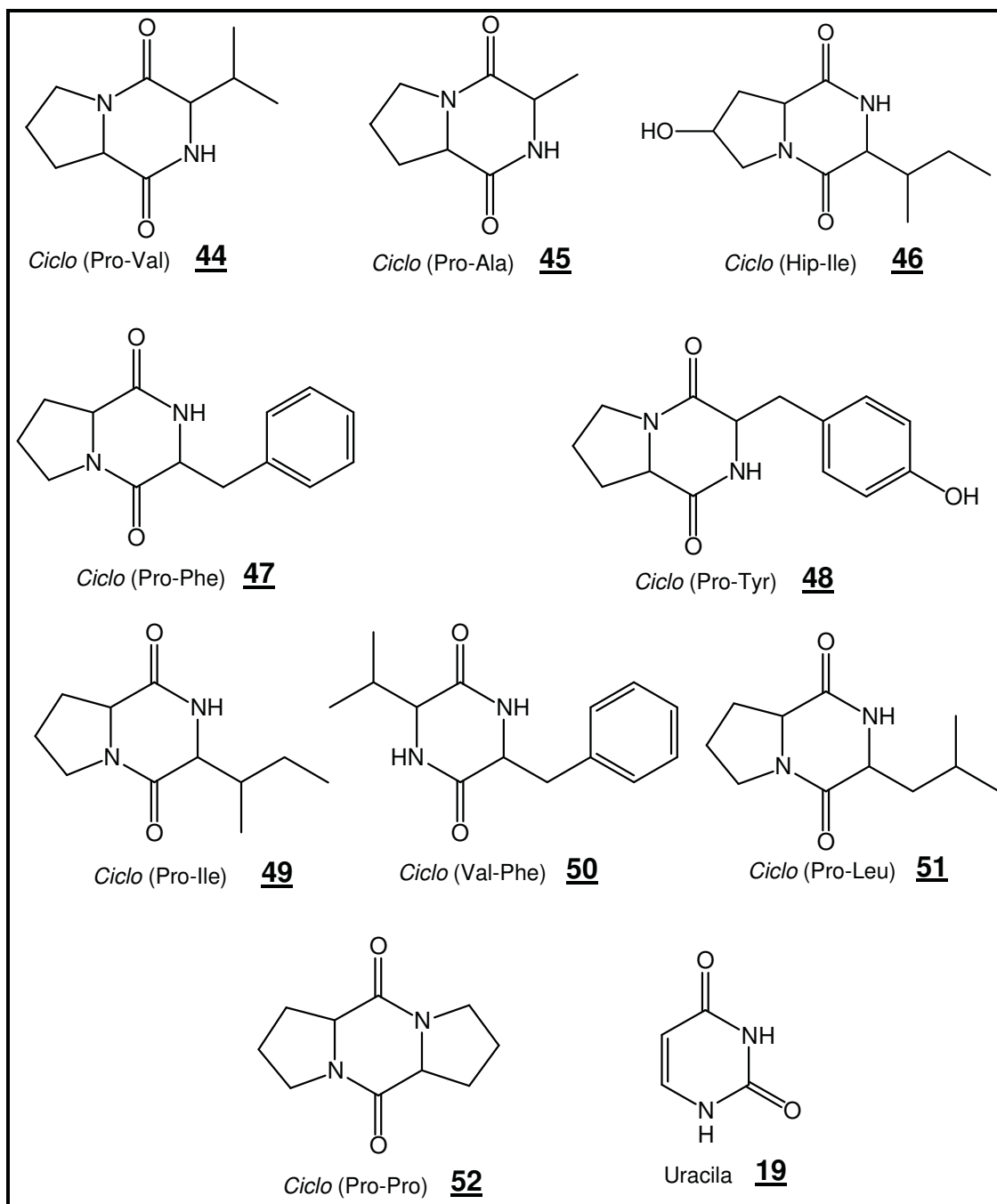


**Figura 30.** Substâncias encontradas nas frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de MDB com cromatografia em coluna.

Esse método de projeção não confirma a presença da substância, uma vez que há uma mistura de substâncias e não podemos atribuir determinado sinal à substância. Este tipo de projeção, para as dicetopiperazinas, indica as possíveis cadeias laterais, nesse caso, os aminoácidos de que as dicetopiperazinas derivam. Assim, temos um guia para o posterior isolamento ou não dessas substâncias. O método de comparação é exemplificado pela

Figura 31, onde é projetado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *ciclo*(Pro-Leu) no espectro da Fração 1.

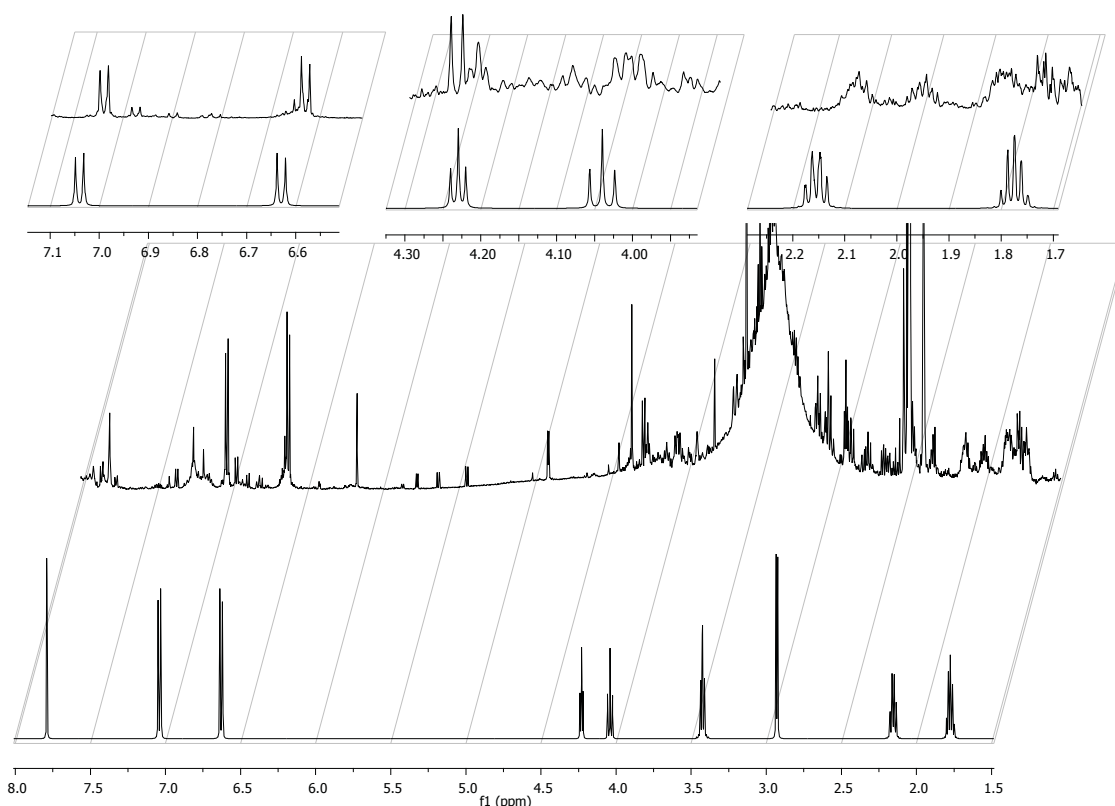


**Figura 31.** Projeção do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *ciclo*(Pro-Tyr) com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 1.

O mesmo procedimento foi realizado para a Fração 4 e 5 e foram encontradas 4 dicetopiperazinas, sendo elas a *ciclo*(Pro-Val) (**44**), *ciclo*(Pro-Ile) (**49**), *ciclo*(Hyp-Ile) (**46**) e a *ciclo*(Pro-Phe) (**47**) (Figura 30). Foi utilizado o mesmo método de comparação aplicado na Fração 1.

Na Fração 6 e 7 foram encontradas 2 dicetopiperazinas, a *ciclo*(Pro-Phe) (**47**) e a *ciclo*(Pro-Tyr) (**48**), utilizando o mesmo método de comparação.

#### 4.5.1 Confirmação das dicetopiperazinas na Fração 1.

Visando a confirmação das dicetopiperazinas encontradas na Fração 1, efetuou-se um experimento de Espectrometria de Massas para identificar os íons produtos das dicetopiperazinas. O espectro foi obtido a partir da injeção

direta da Fração 1, no modo de ionização positiva, obtendo o espectro de massas apresentado na Figura 32.

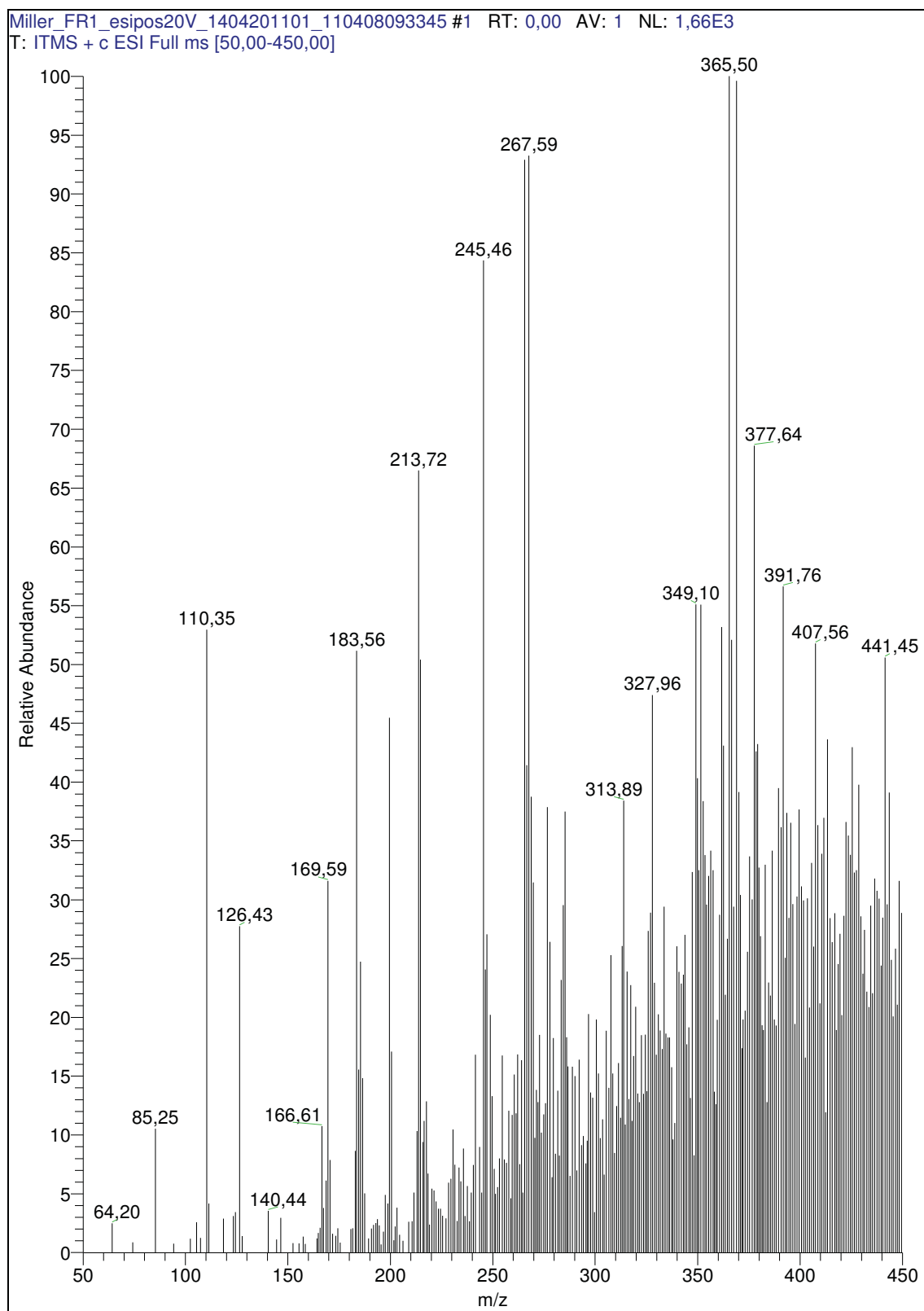


**Figura 32.** Espectro de Massas da Fração 1 (ESI-ToF).

A análise do espectro de massas aliada a técnica de projeção de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , permitiu a identificação de 8 dicetopiperazinas e a uracila, apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Substâncias identificadas na Fração 1.

| Substância                                                                      | $([\text{M}+\text{H}]^+) \text{ m/z}$ | $([\text{M}+\text{Na}]^+) \text{ m/z}$ | Espectro  |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|-----------|
| <i>ciclo</i> (Pro-Val) ( <b>44</b> )                                            | 197,44                                | 219,69                                 | Figura 56 |
| <i>ciclo</i> (Pro-Phe) ( <b>47</b> )                                            | 245,21                                | 267,66                                 | Figura 57 |
| <i>ciclo</i> (Pro-Ala) ( <b>45</b> )                                            | 169,38                                | 191,63                                 | Figura 58 |
| <i>ciclo</i> (Pro-Ile) ( <b>49</b> ) ou<br><i>ciclo</i> (Pro-Leu) ( <b>51</b> ) | 211,28                                | 233,06                                 | Figura 59 |
| <i>ciclo</i> (Val-Phe) ( <b>50</b> )                                            | 247,32                                | 269,67                                 | Figura 60 |
| <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) ( <b>48</b> )                                            | 261,27                                | 283,33                                 | Figura 61 |
| <i>ciclo</i> (Pro-Pro) ( <b>52</b> )                                            | 195,11                                | 217,17                                 | Figura 62 |
| <i>ciclo</i> (Hyp-Ile) ( <b>46</b> )                                            | 227,23                                | 249,51                                 | Figura 63 |
| Uracila ( <b>19</b> )                                                           | 110,35                                |                                        | Figura 32 |

## 5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu um melhor conhecimento do fungo *Colletotrichum* sp. e através de diversas técnicas espectroscópicas e cromatográficas pode-se concluir que este endófito é um produtor de inúmeras substâncias, porém em pequena quantidade, o que dificultou o isolamento e identificação das mesmas.

Nos ensaios biológicos, notou-se que os extratos apresentaram as mais variadas atividades, com destaque para a atividade anticolinesterásica, onde todos os extratos foram ativos, mas esse tipo de atividade envolve mecanismos complexos e muitos ainda desconhecidos.

O uso de técnicas inovadoras no desenvolvimento da desreplicação permitiu a identificação de dicetopiperazinas produzidas por *Colletotrichum* sp. Este método se mostrou satisfatório uma vez que as dicetopiperazinas foram identificadas em mistura complexa e com o auxílio da espectrometria de

massas puderam ser identificadas 8 dicetopiperazinas sem a necessidade de isolamento das mesmas. É conhecido que as dicetopiperazinas possuem as mais variadas e interessantes atividades biológicas, incluindo antibióticos, antitumorais, modulador de enzimas, receptores e mediadores bioquímicos, o que indica uma interação ecológica muito acentuada entre a planta e seu endófito, gerando assim importantes interações tróficas.

A produção de elevado número de substâncias em baixas concentrações reforça a idéia de interação fungo-planta, uma vez que esses metabólitos devem fazer parte de um sistema complexo entre os mesmos.

## REFERÊNCIAS

ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and know diketopiperazines from the Caribbean sponge, Calyx CF. Podatyda. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos 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.

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

CAMPO, V. L.; MARTINS, M. B.; SILVA, C. H. T. P.; CARVALHO, I. Novel and facile solution-phase synthesis of 2,5-diketopiperazines and O-glycosylated analogs. **Tetrahedron**, v. 65, n. 27, p. 5343-5349, 2009.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006.

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

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009.

INÁCIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENING, L. H.; ARAUJO, A. R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 11, p. 822-824, 2006.

JAYASURIYA, H.; BILLS, G. F.; CASCALES, C.; ZINK, D. L.; GOETZ, M. A.; JENKINS, R. G.; SILVERMAN, K. C.; LINGHAM, R. B.; SINGH, S. B. Organic acid: a potent novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from an endophytic fungus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 17, p. 2081-2084, 1996.

KRINGS, M.; DOTZLER, N.; TAYLOR, T. N.; GALTIER, J. A Late Pennsylvanian fungal leaf endophyte from Grand-Croix, France. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 156, p. 449-453, 2009.

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

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

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.

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

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

MEHDI-BEN AMEUR, R.; MELLOULI, L.; CHABCHOUB, F.; FOTSO, S.; BEJAR, S. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolated *streptomyces* sp. us 24 strain. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 5, p. 510-513, 2004.

MOLYNEUX, R. J.; SCHIEBERLE, P. Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4625-4629, 2007.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

PALAFOX, M. A.; TARDAJOSA, G.; GUERRERO-MARTÍNEZ, A.; VATS, J. K.; HUBERT, J.; RASTOGI, V. K. Relationships observed in the structure and spectra of uracil and its 5-substituted derivatives. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 75, p. 1261-126, 2010.

- PRITI, V.; RAMESHA, B. T.; SINGH, S.; RAVIKANTH, G.; GANESHAIAH, K. N.; SURYANARAYANAN, T. S.; SHAANKER, R. U. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, 2009.
- PULICI, M.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H. Pestalotiopsis A and B: new caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus bervifolia*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 2122-2124, 1996.
- PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.
- RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1109-1114, 2008.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **British Mycological Society**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; KUMAR, P. M.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; SHAANKER, R. U. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) 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.
- STARK, T.; HOFMANN, T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 7222-7231, 2005.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.
- STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- TELES, H. L.; SILVA, G. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, J. O.; COSTA NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R. Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 2363-2367, 2005.

- TIANPANICH, K.; PRACHYA, S.; WIYAKRUTTA, S.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTA KOOP, P. Radical scavenging and antioxidant activities of isocoumarins and a phthalide from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 79-81, 2011.
- TOZZE, H. J. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA, N. S. J. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Suma Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S. B.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184-4190, 2005.
- WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.
- WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural identification of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437-455, 2003.
- ZANARDI, L. M. **Prospecção química em *Phomopsis cassiae*, um fungo endofítico isolado de *Senna spectabilis***. 2006. 147 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

## **ANEXOS**

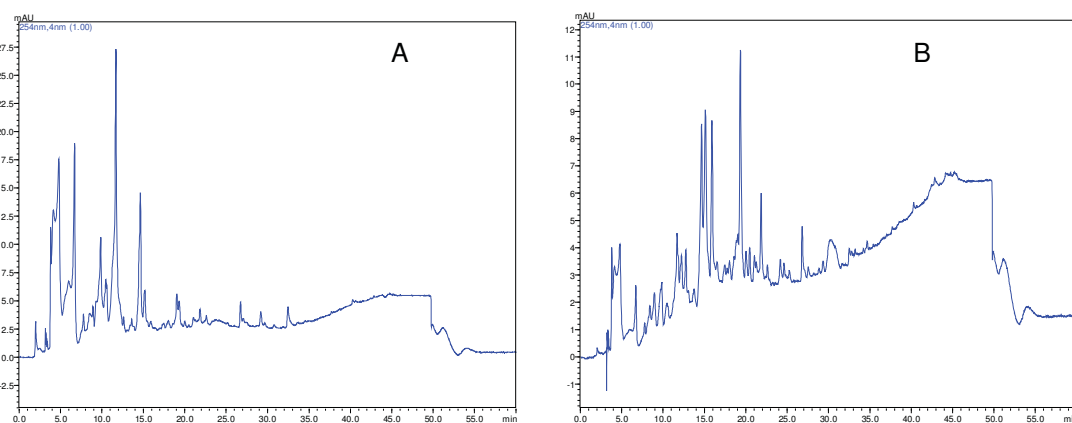


**Figura 33.** Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 1 (A) e 1' (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.

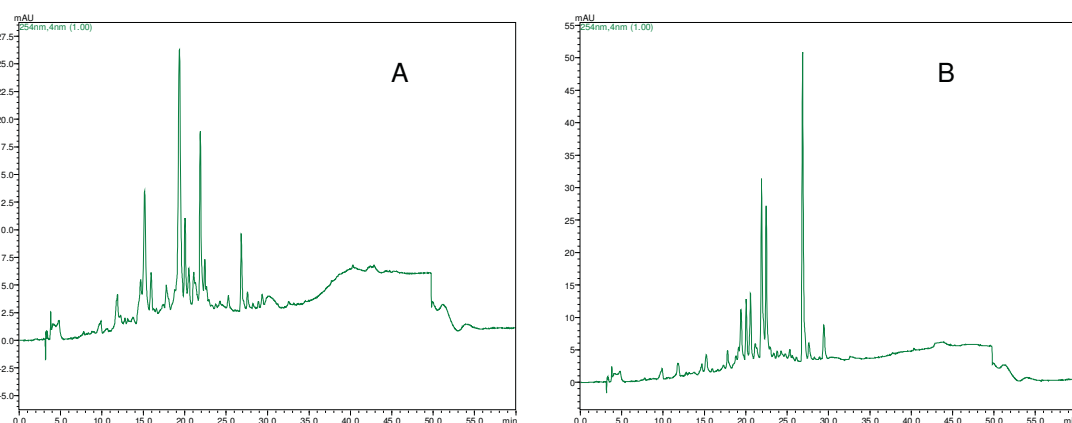


**Figura 34.** Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 2 (A) e 3 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.

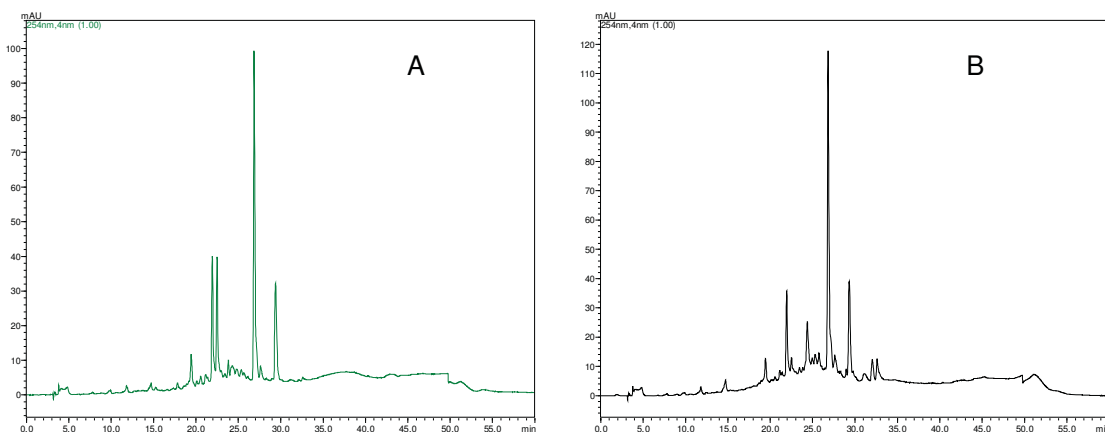


**Figura 35.** Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 4 (A) e 5 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.

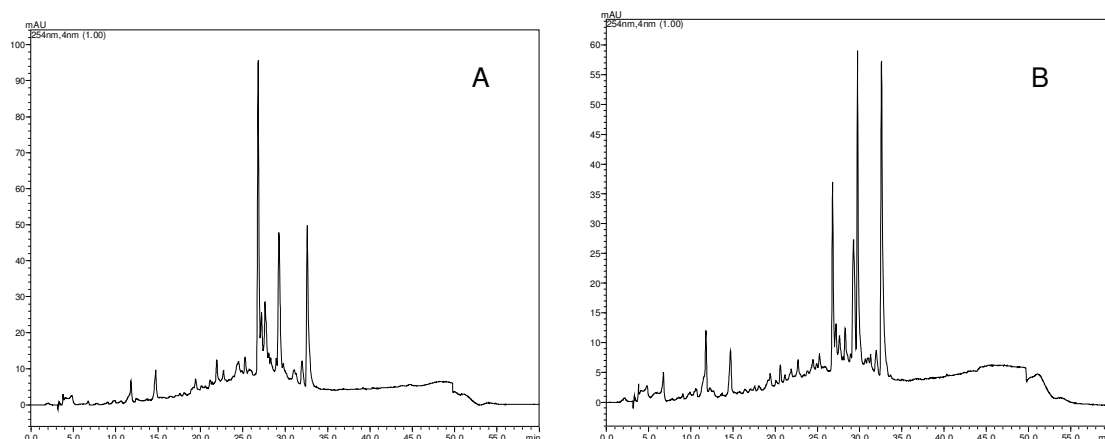


**Figura 36.** Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 6 (A) e 7 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.

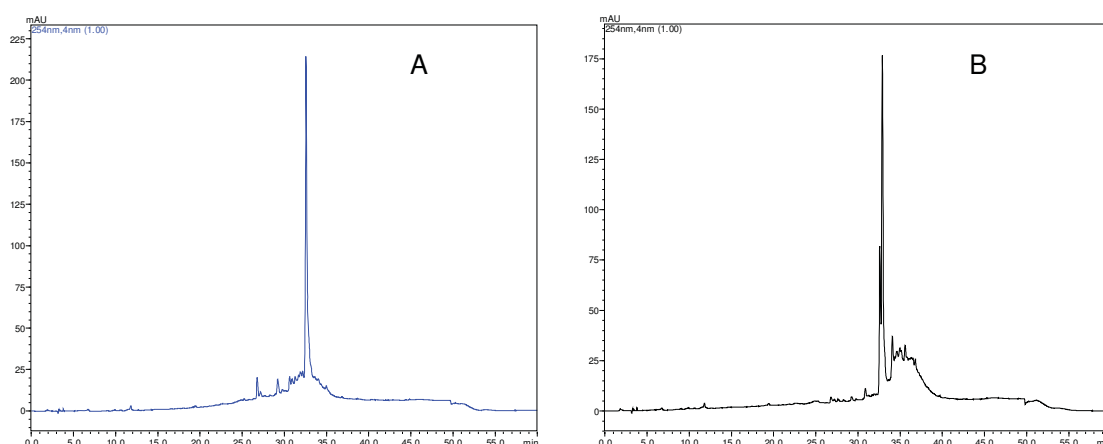


**Figura 37.** Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 8 (A) e 9 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.

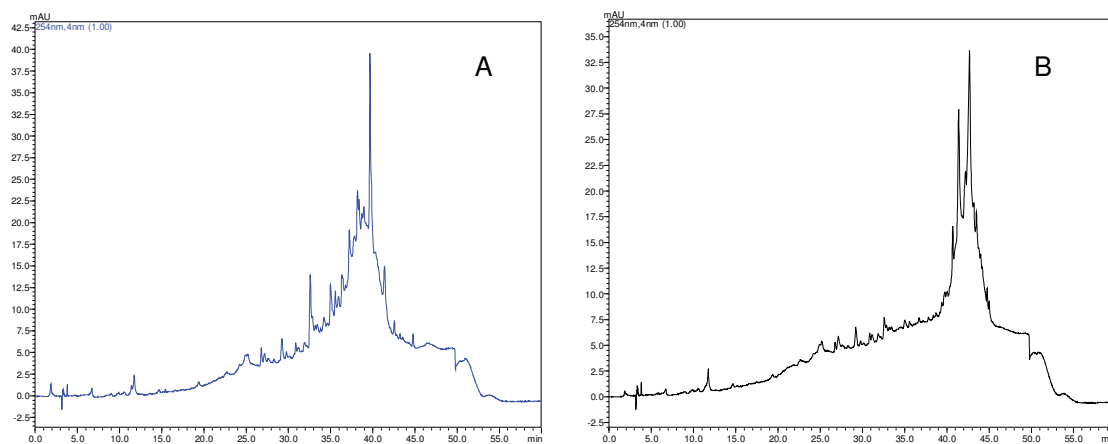


**Figura 38.** Cromatogramas em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm das frações 10 (A) e 11 (B) da cromatografia em coluna de fase reversa.

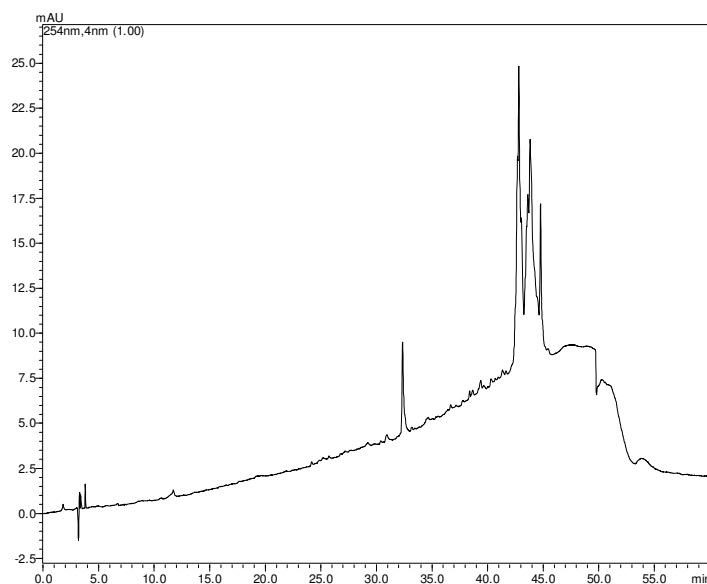


**Figura 39.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por CLAE-DAD monitorado a 254 nm da fração 12 da cromatografia em coluna de fase reversa.

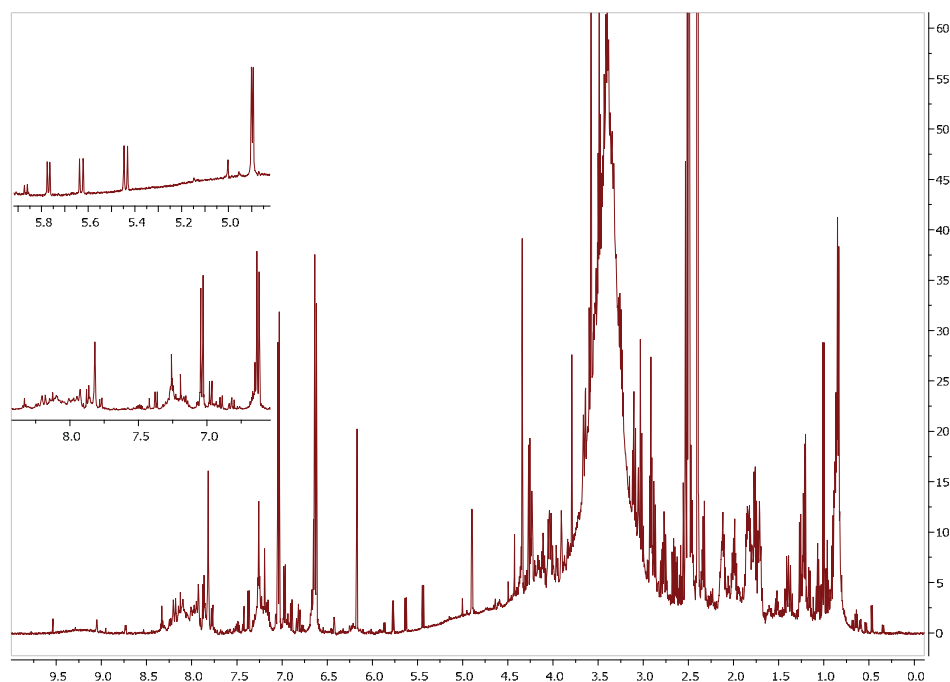


**Figura 40.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 1 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

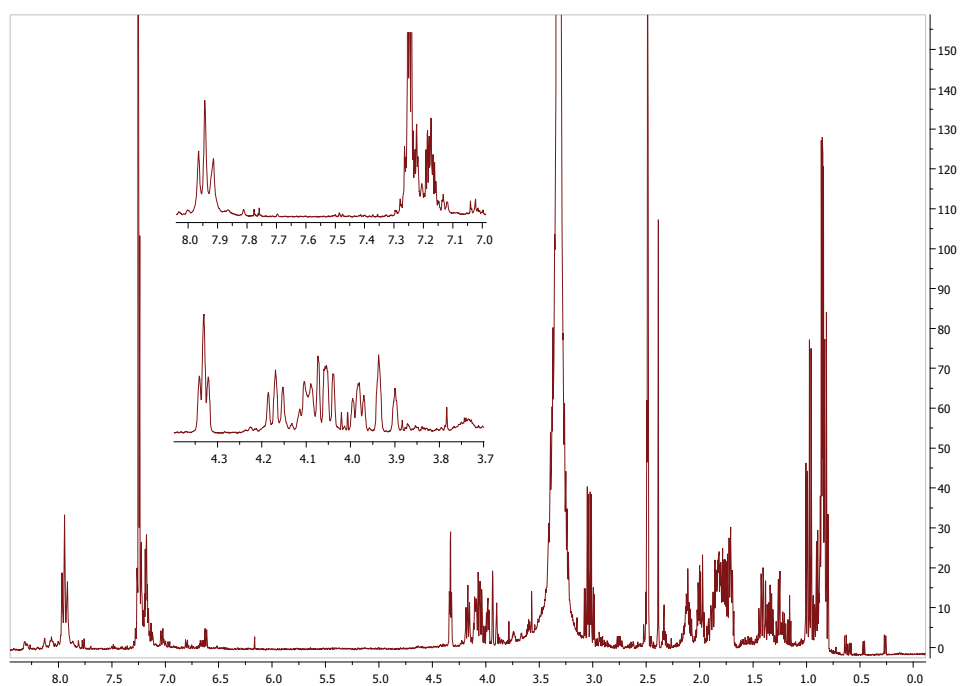


**Figura 41.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 4 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

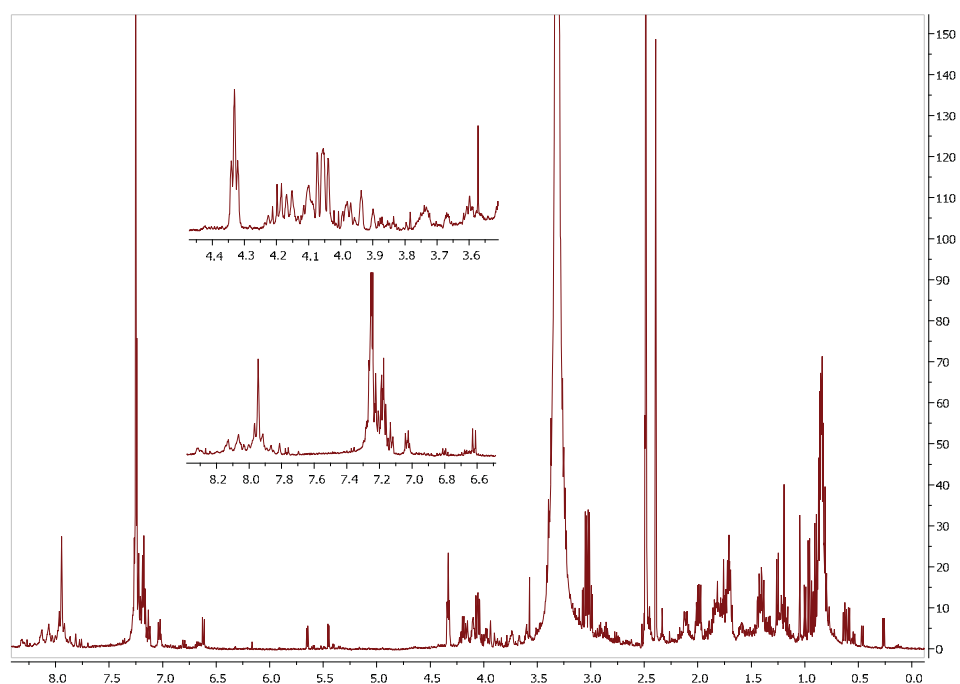


**Figura 42.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 5 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

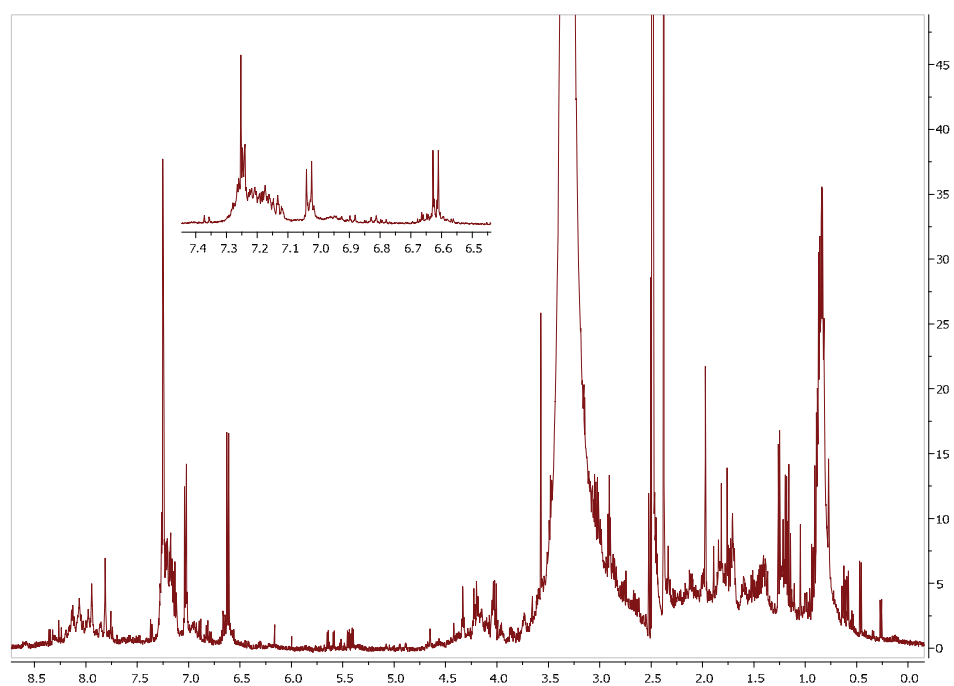


**Figura 43.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 6 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

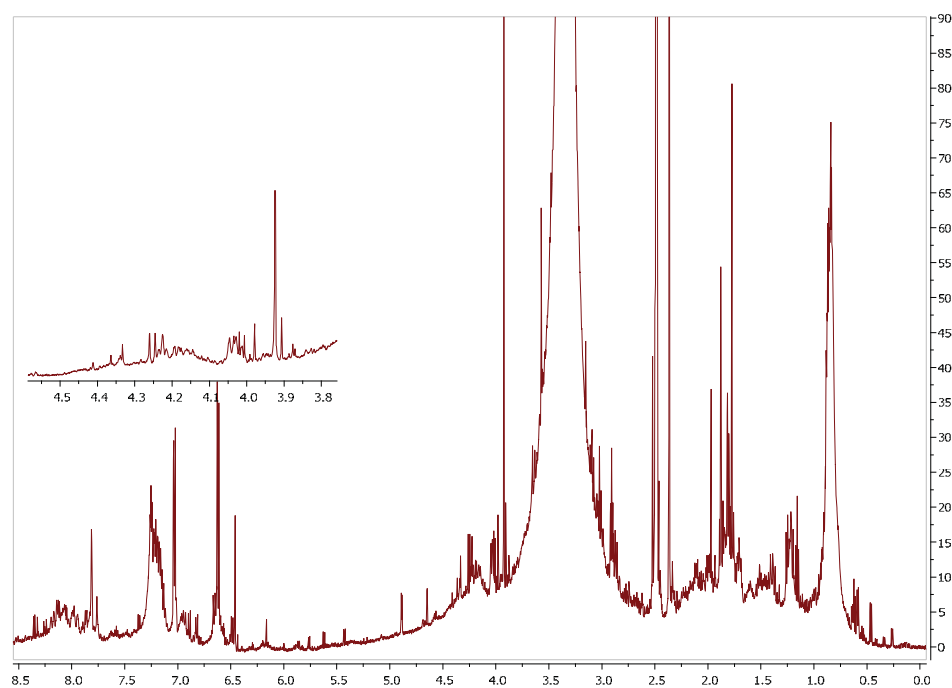


**Figura 44.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 7 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

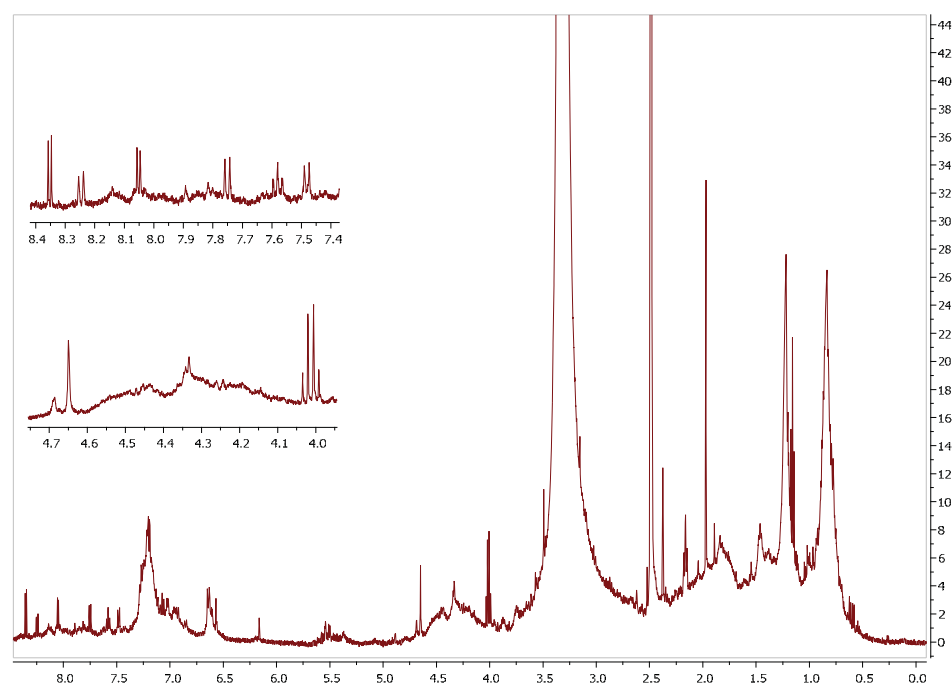


**Figura 45.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 8 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

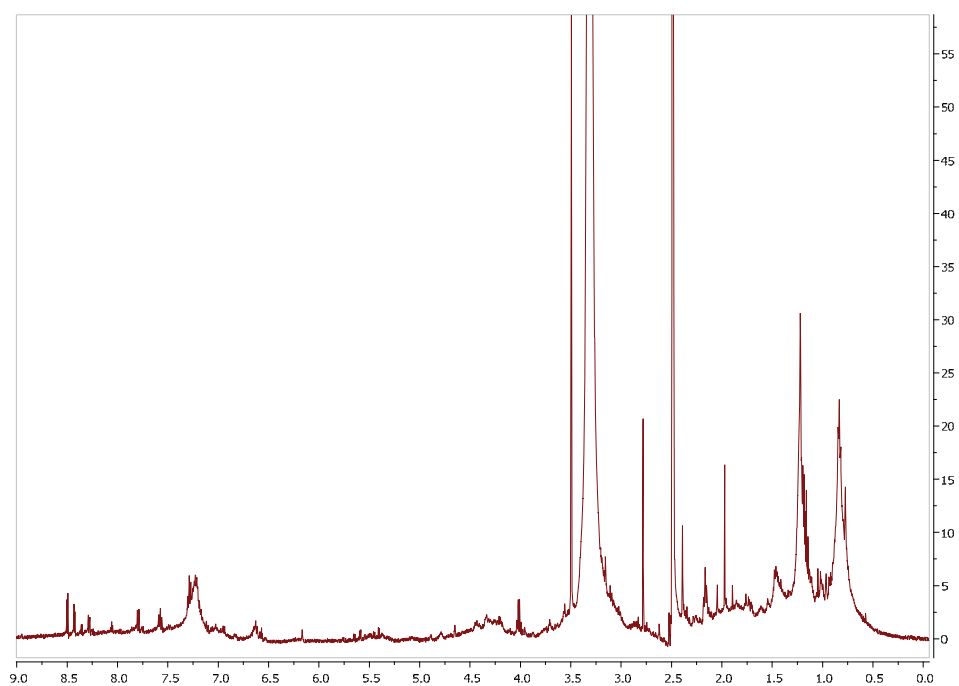


**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração 9 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

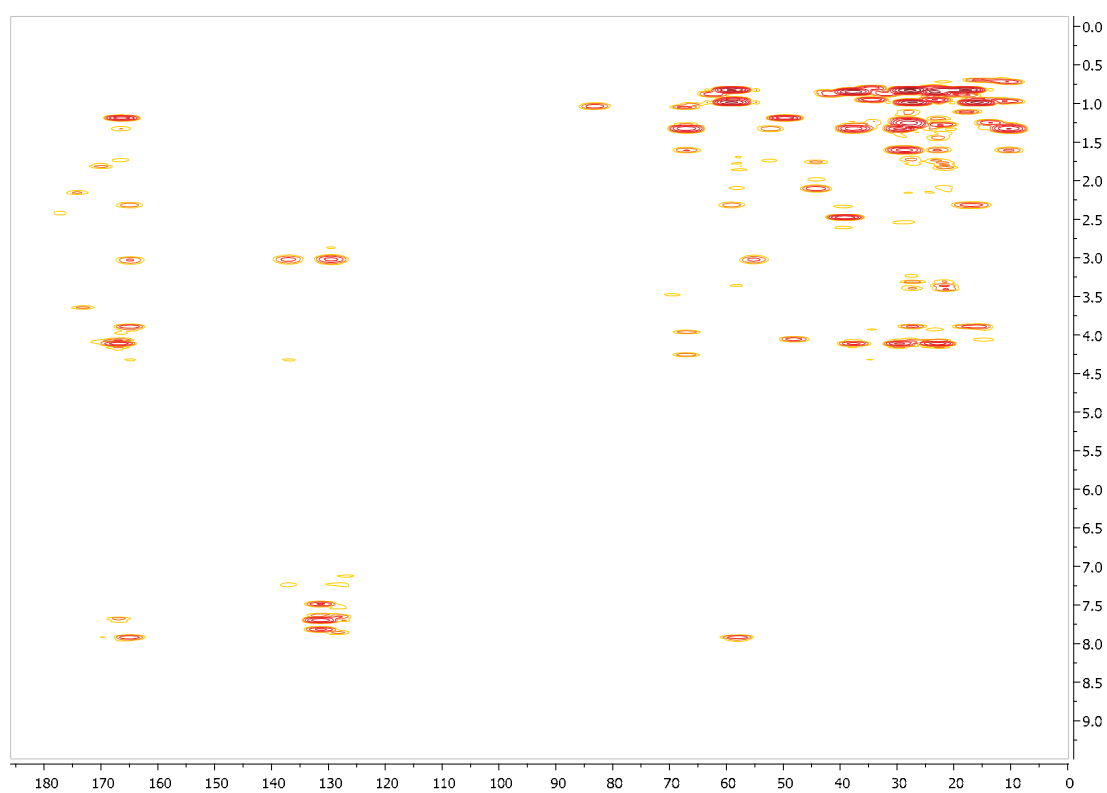


**Figura 47.** Mapa de contorno gHMBC da fração 01006 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz).

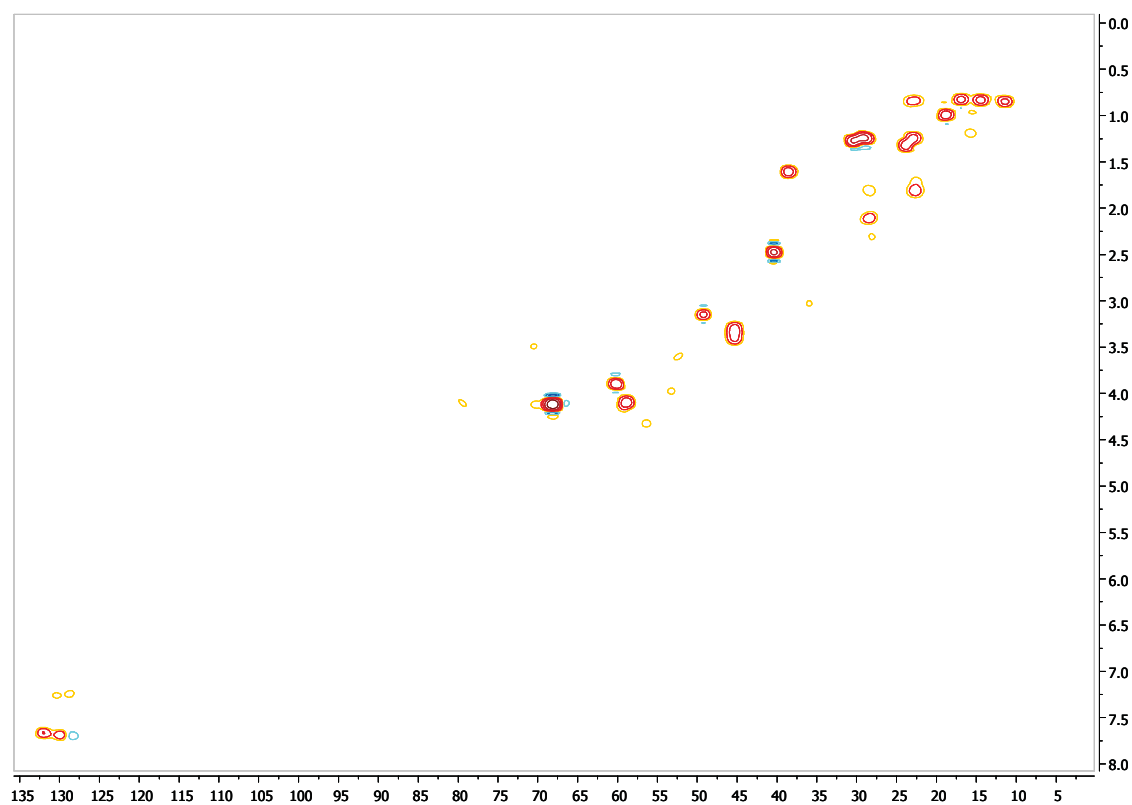


**Figura 48.** Mapa de contorno gHMQC 01006 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz).

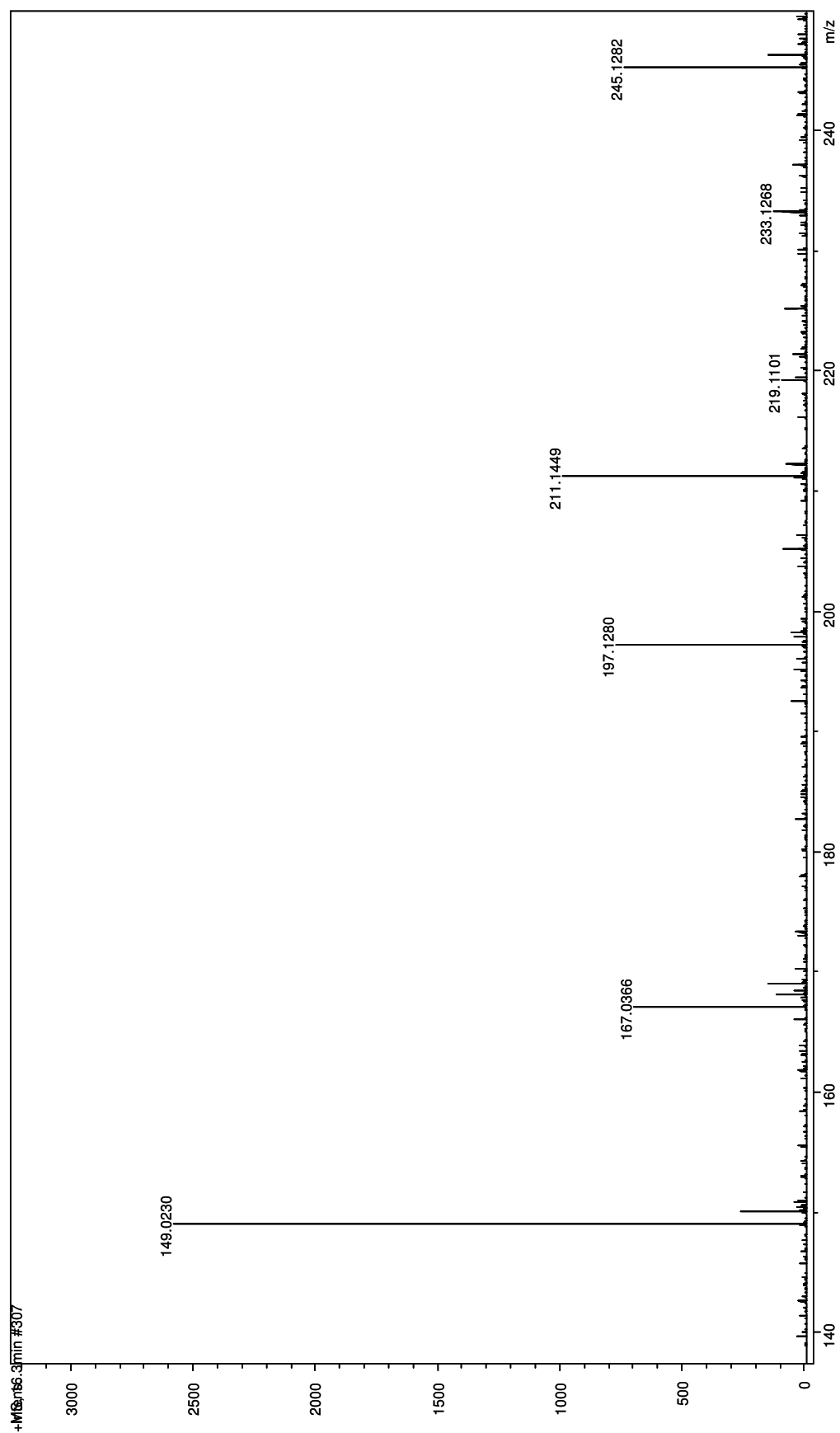


Figura 49. Espectro de Massas da fração 01006 (ESI-ToF).

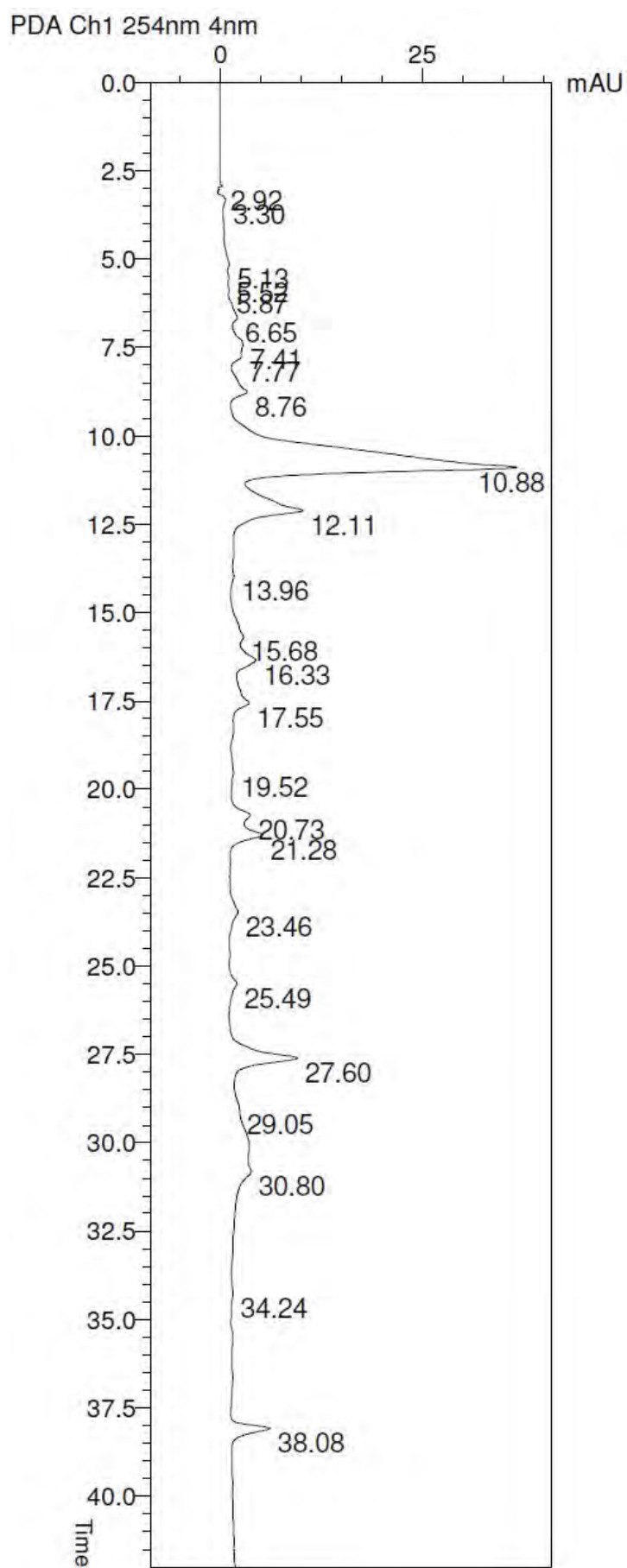


**Figura 50.** Cromatograma em gradiente exploratório obtido por LC-MS, monitorado à 254 nm da fração 01006.

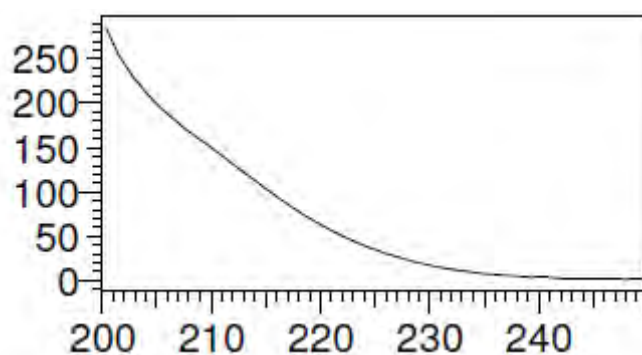


**Figura 51.** Espectro de UV da banda em 5,5 min da LC-MS, monitorado à 254 nm.

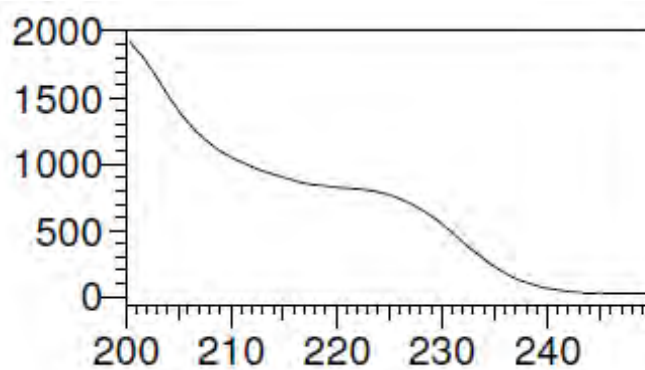


**Figura 52.** Espectro de UV da banda em 10,8 min da LC-MS, monitorado à 254 nm.

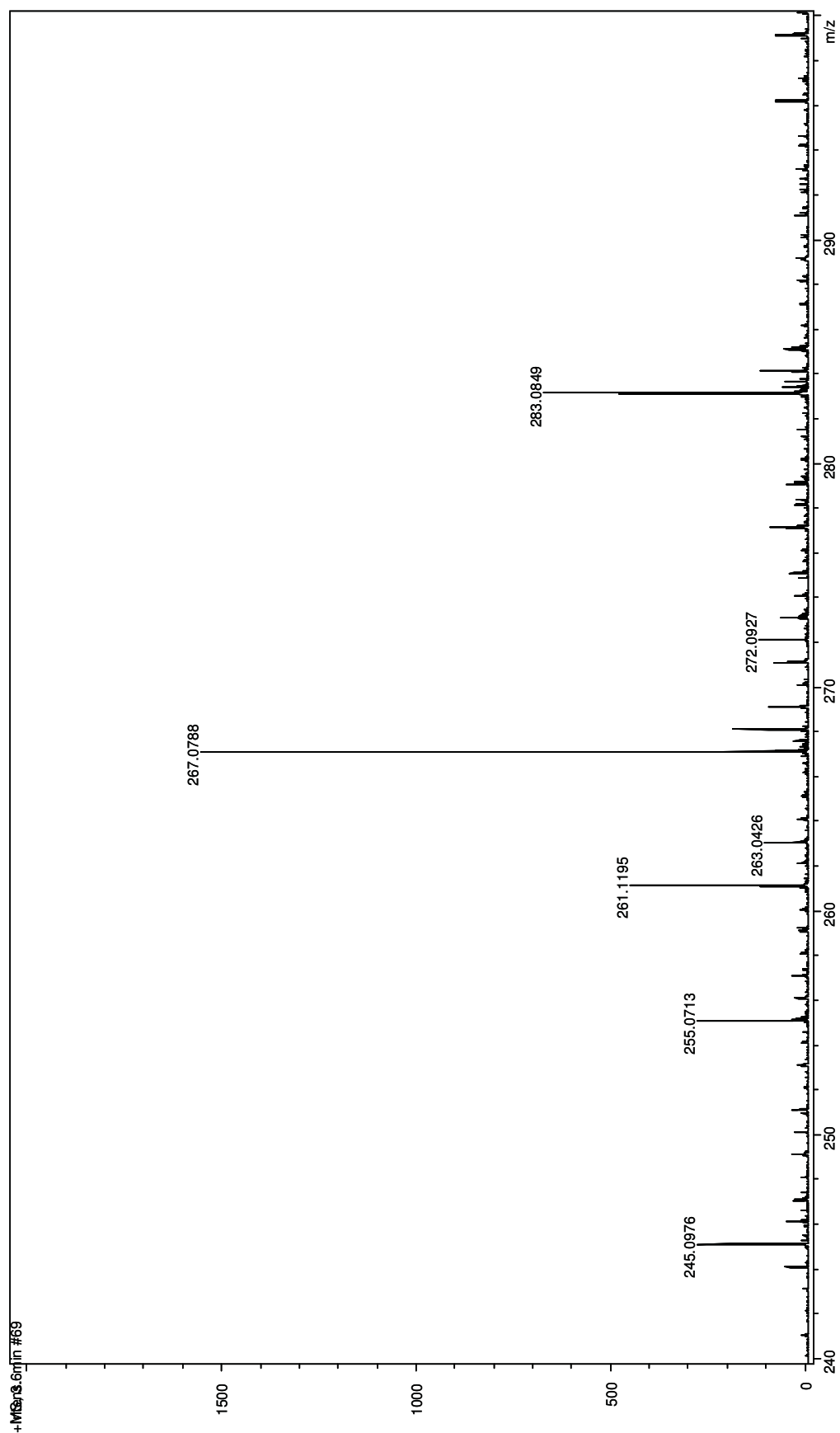


**Figura 53.** Espectro de Massas da fração 01016 (ESI-ToF).

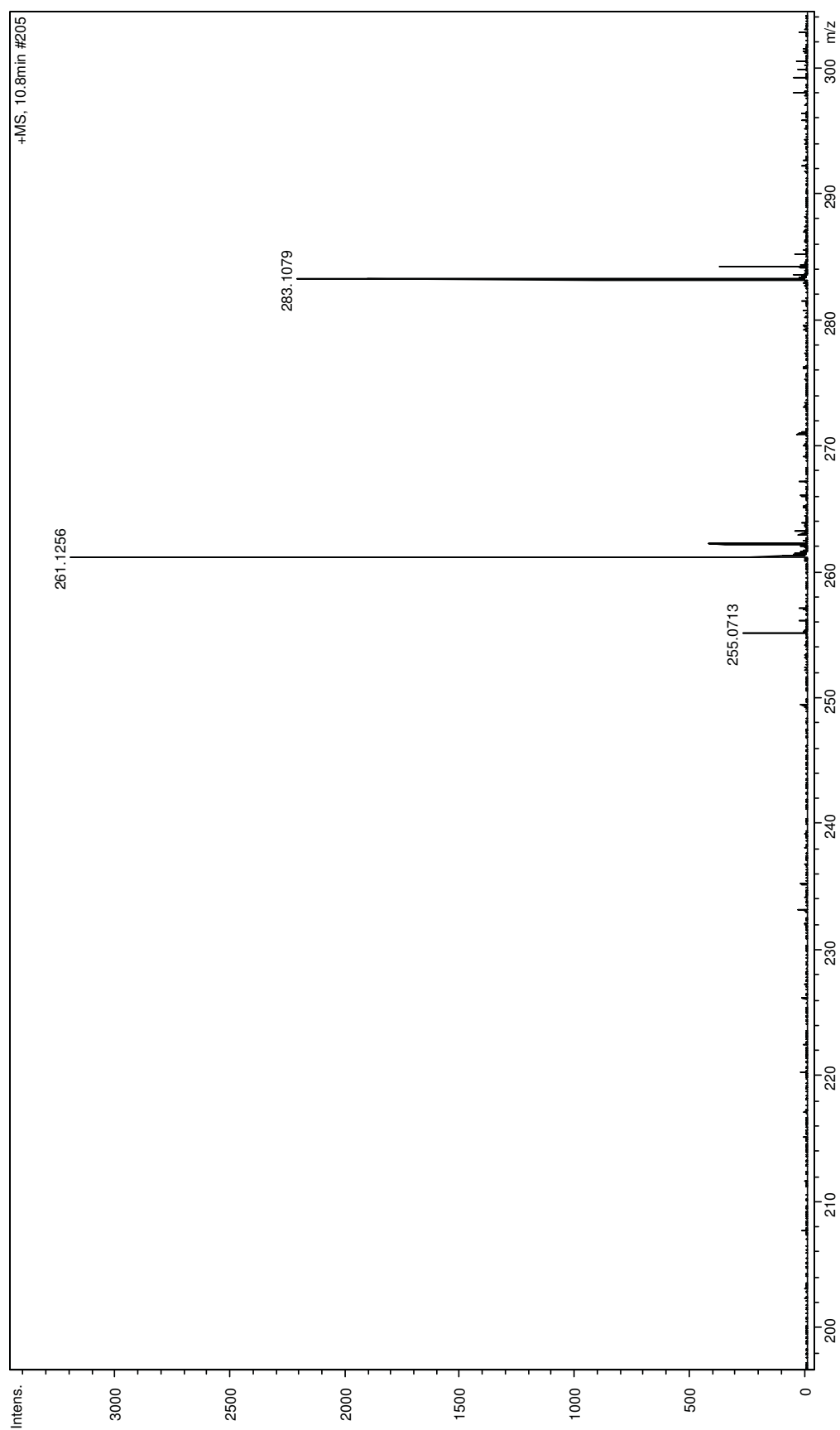


**Figura 54.** Espectro de Massas da *ciclo*(Pro-Phe) (ESI-ToF).

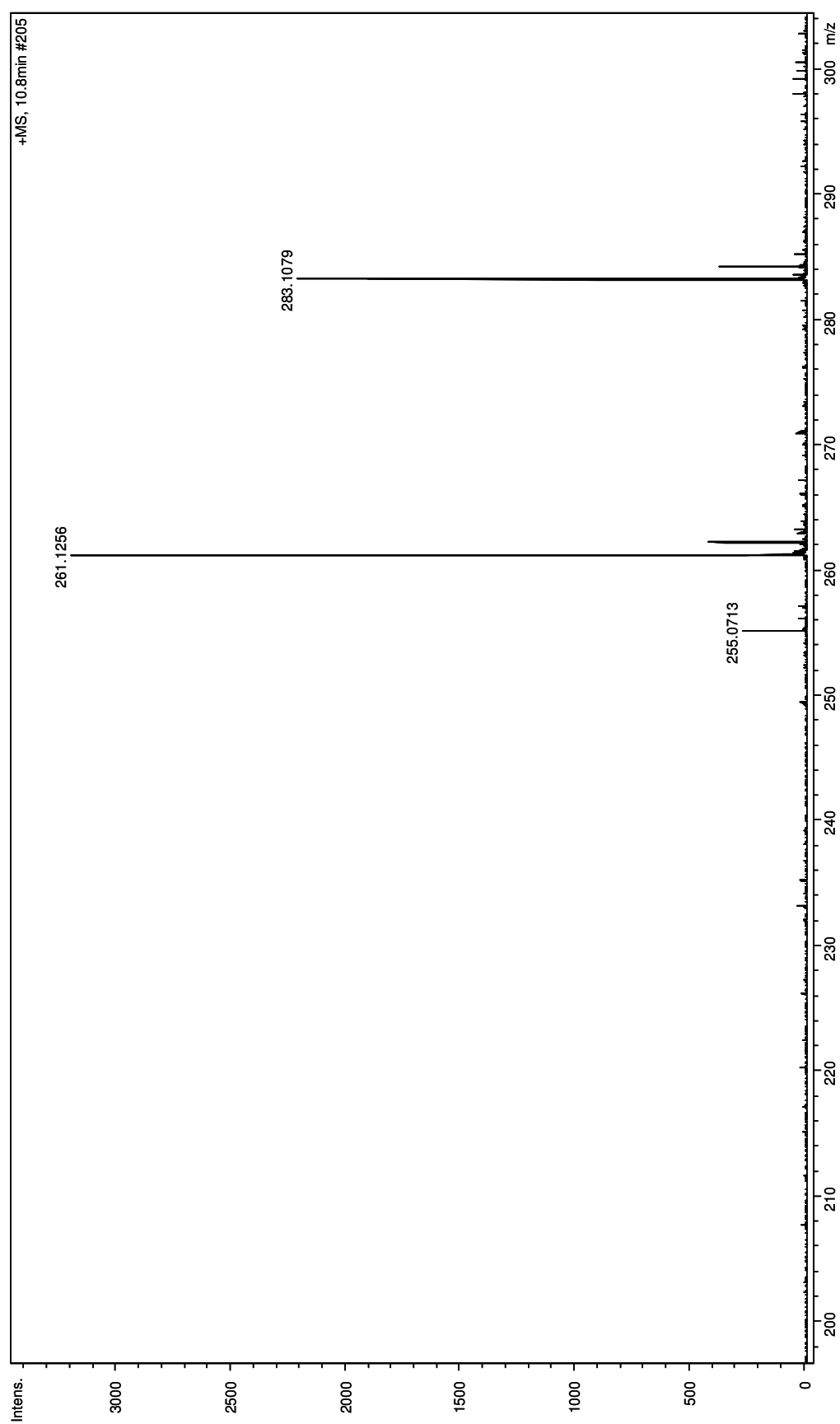


**Figura 55.** Espectro de Massas da *ciclo*(Pro-Tyr) (ESI-ToF).

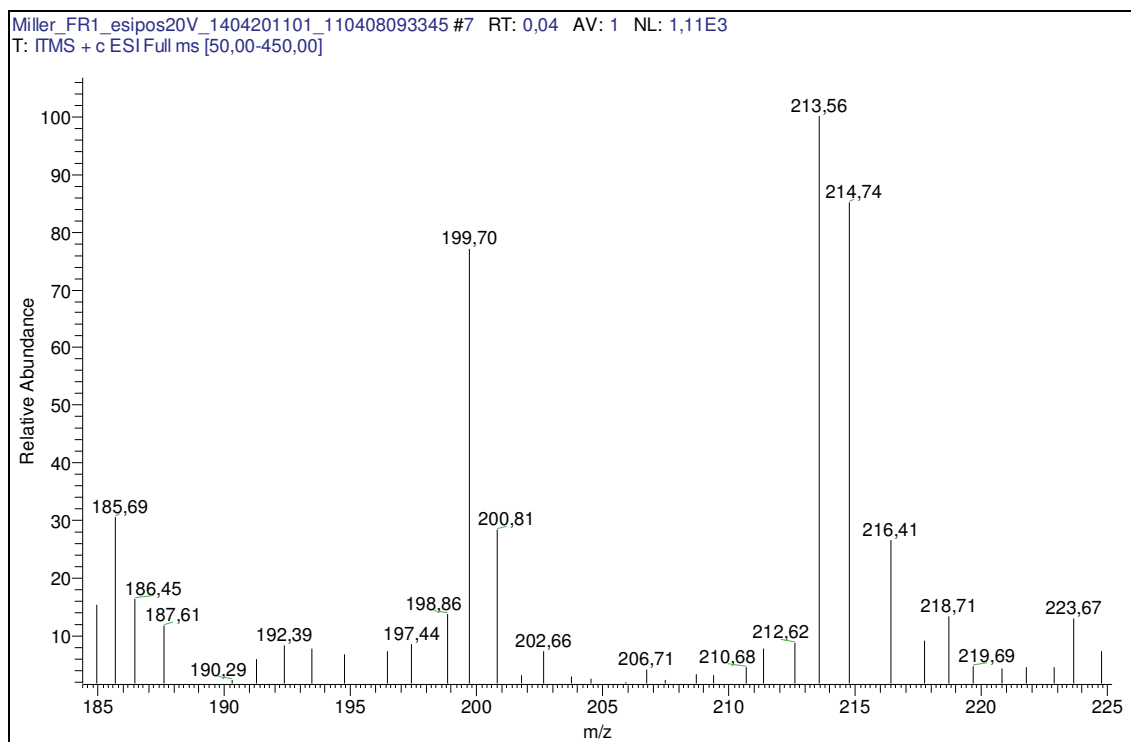


**Figura 56.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo*(Pro-Val) (ESI-ToF).

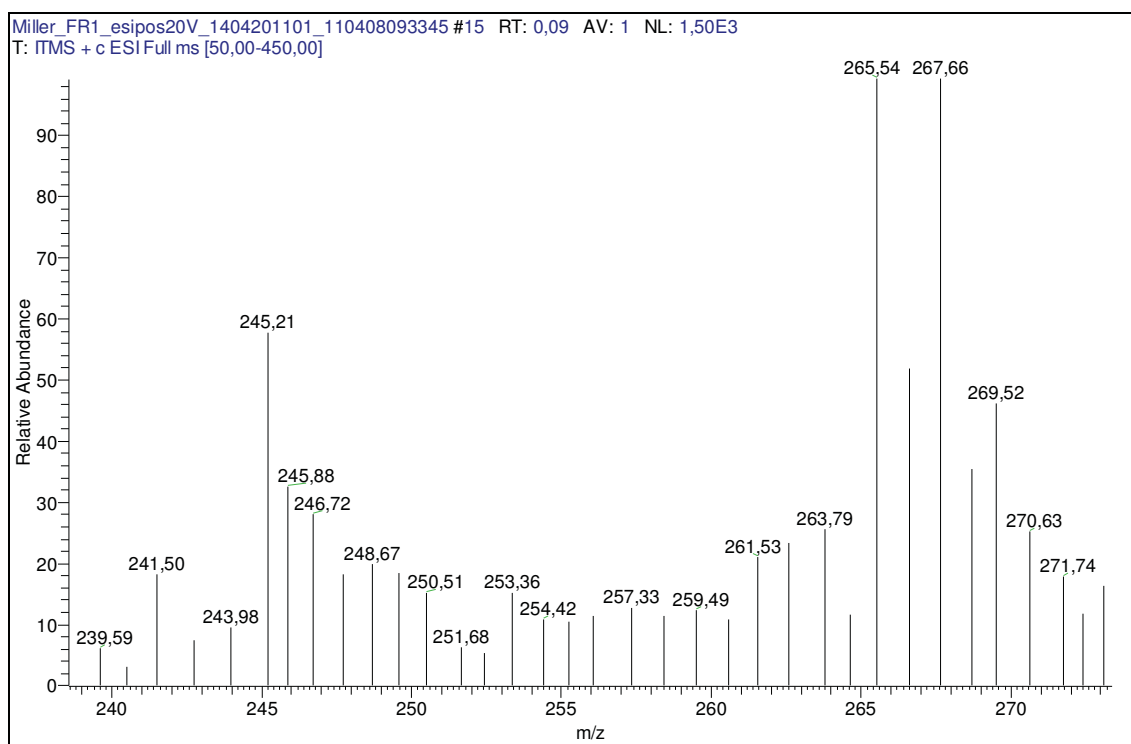


**Figura 57.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo*(Pro-Phe) (ESI-ToF).

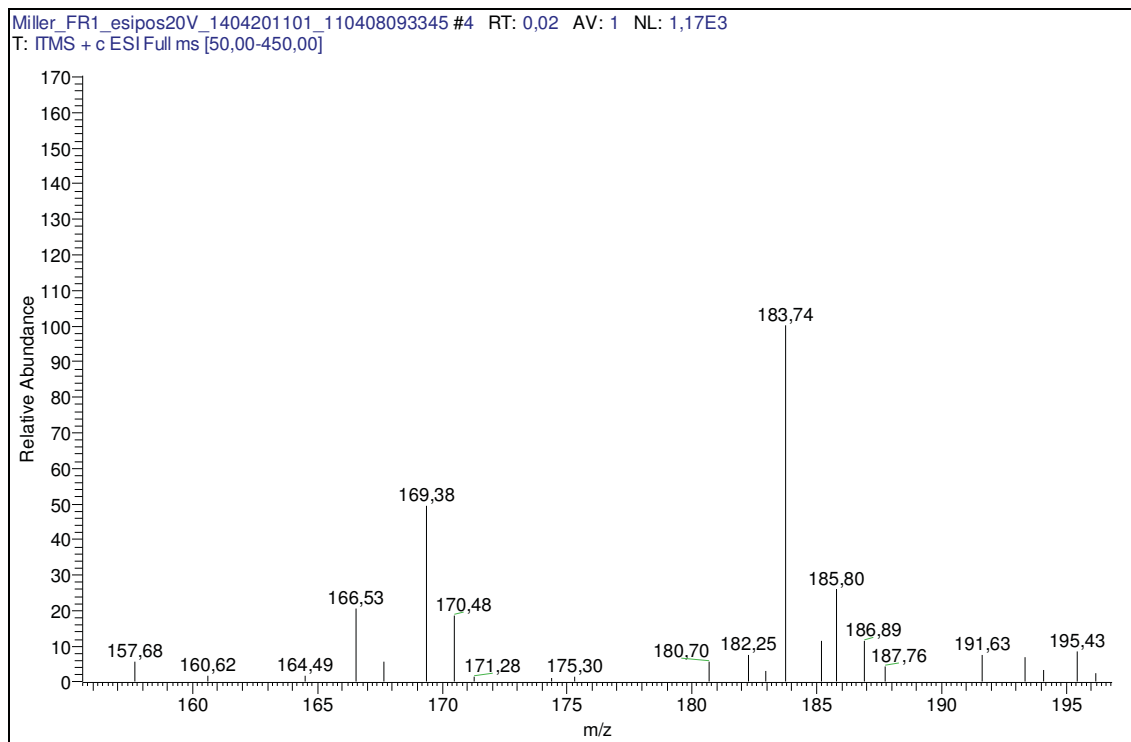


**Figura 58.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo*(Pro-Ala) (ESI-ToF).

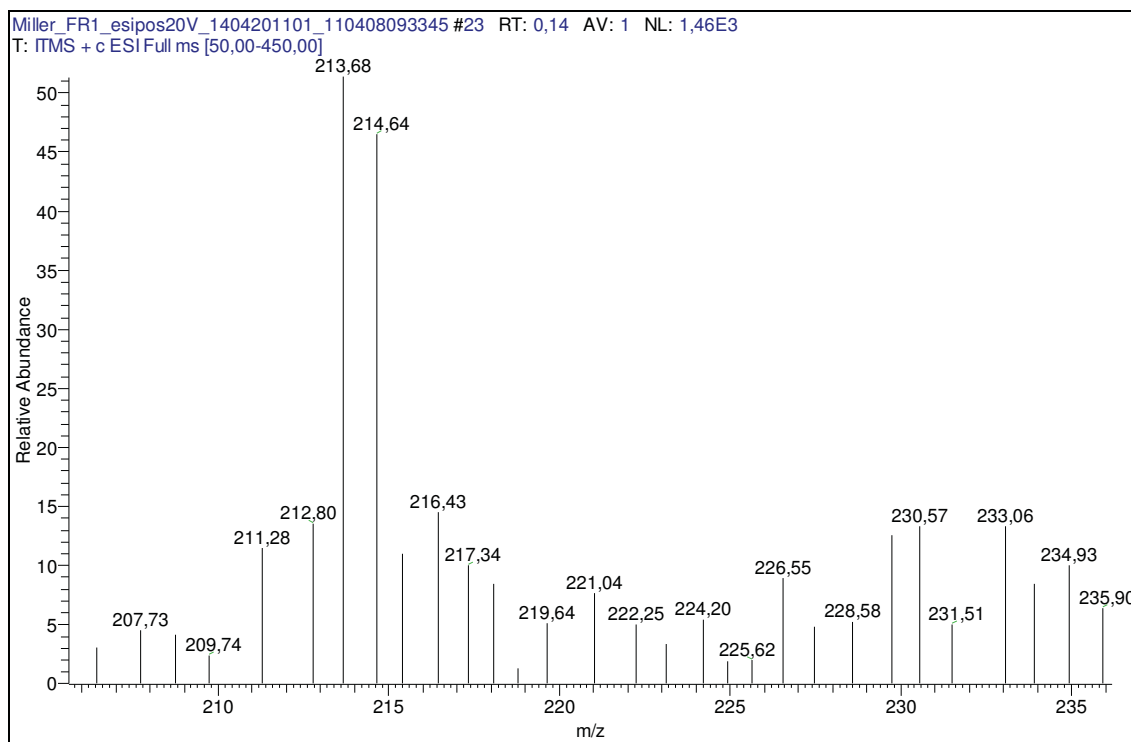


**Figura 59.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo*(Pro-Ile) ou *ciclo*(Pro-Leu) (ESI-ToF).

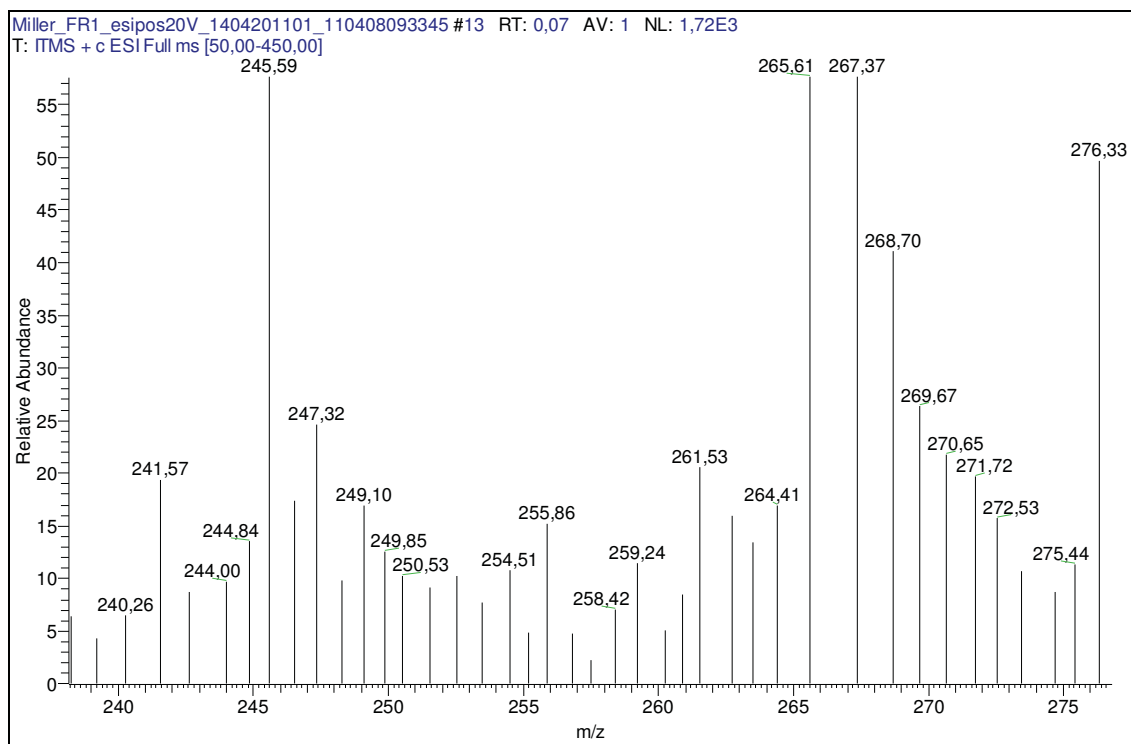


**Figura 60.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo(Val-Phe)* (ESI-ToF).

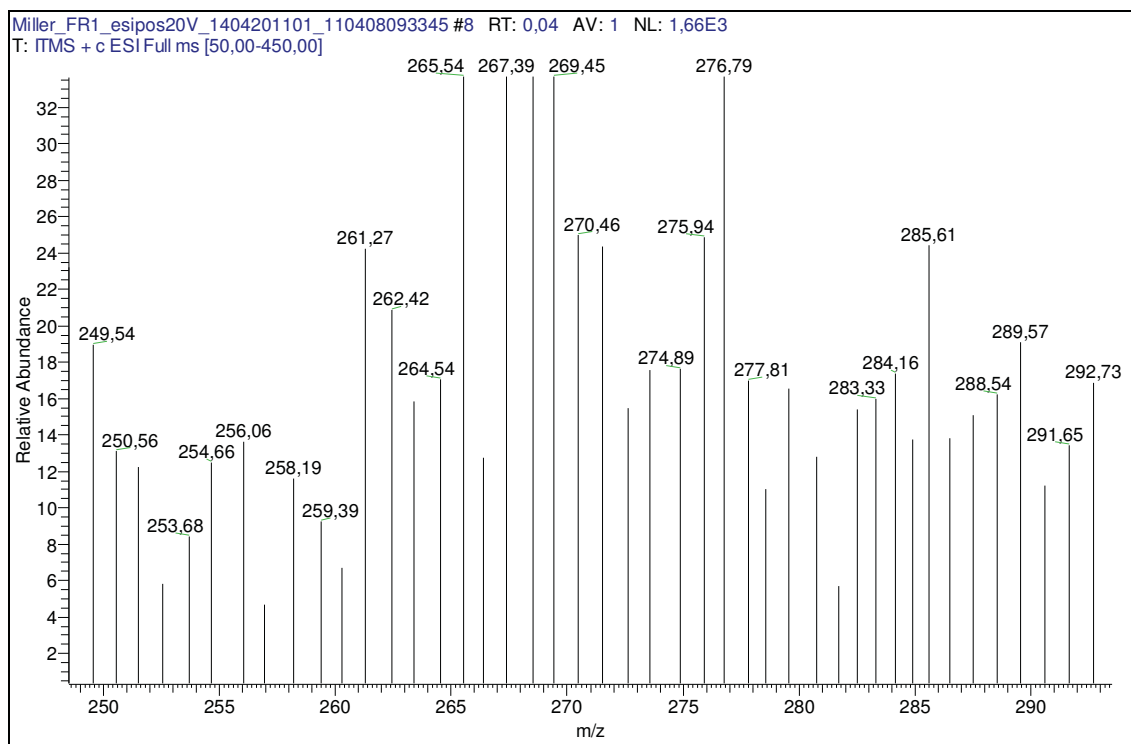


**Figura 61.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo(Pro-Tyr)* (ESI-ToF).

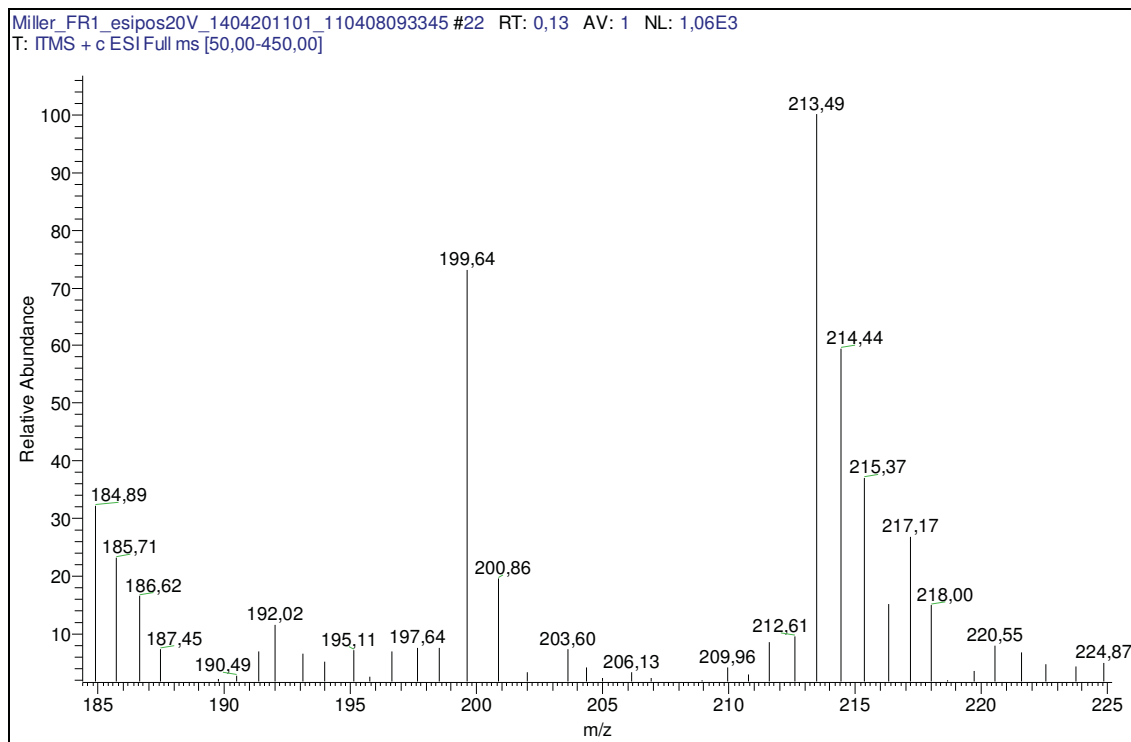


**Figura 62.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo(Pro-Pro)* (ESI-ToF).

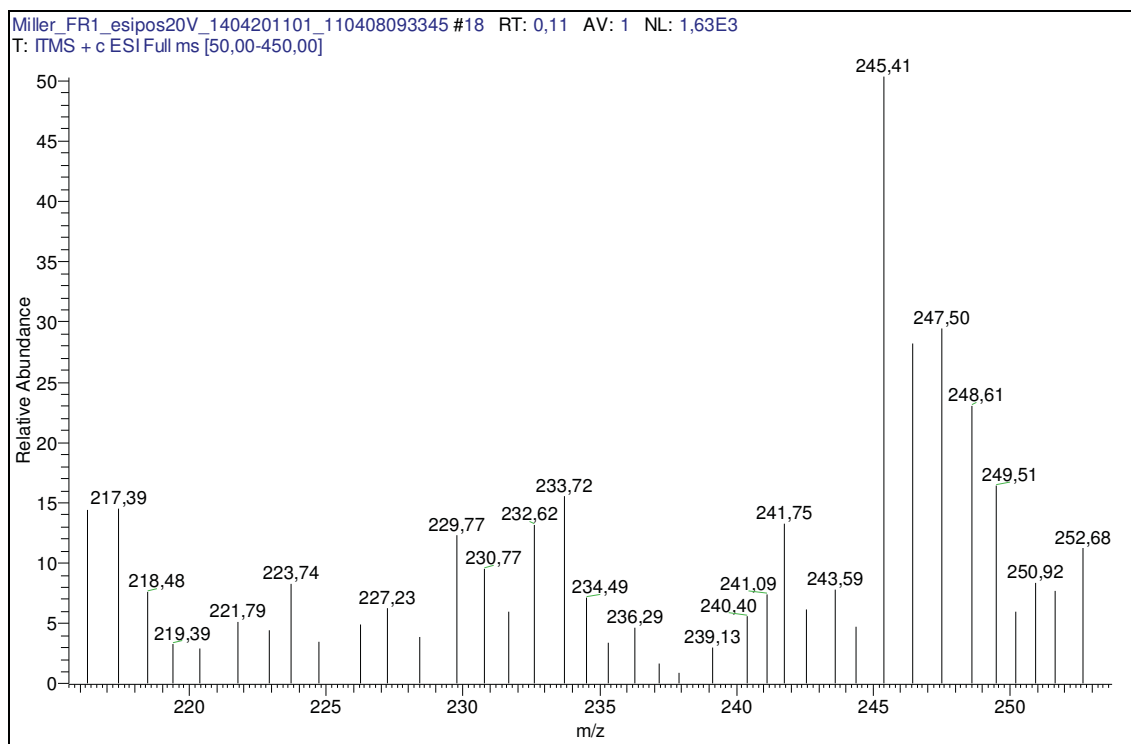


**Figura 63.** Espectro de Massas da Fração 1 evidenciando os íons produtos da *ciclo(Hyp-Ile)* (ESI-ToF).