

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

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

Isabella Barros Valadão

**Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos Associados
com a Alga Vermelha *Dichotomaria marginata* (Galaxauraceae)**

Araraquara

2012

ISABELLA BARROS VALADÃO

Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos Associados com a Alga
Vermelha *Dichotomaria marginata* (Galaxauraceae)

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

Orientadora: Prof^a. Dra Márcia Nasser Lopes

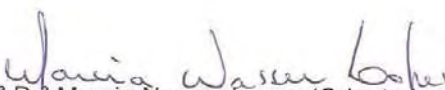
Araraquara
2012

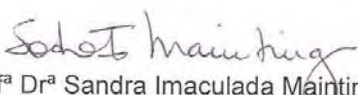
ISABELLA BARROS VALADÃO

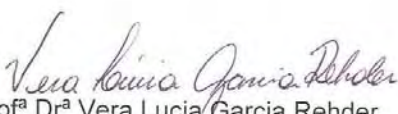
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 10 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Marcia Nasser Lopes (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Sandra Imaculada Maintinguer
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Vera Lucia Garcia Rehder
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –
UNICAMP, Paulínia

FICHA CATALOGRÁFICA

Valadão, Isabella Barros

V136e Estudo químico e biológico de fungos endofíticos
associados com a alga vermelha *Dichotomaria marginata*
(Galaxauraceae) / Isabella Barros Valadão. –
Araraquara : [s.n], 2012

62 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Marcia Nasser Lopes

1. Química orgânica. 2. Metabólitos secundários.
3. Antraquinonas. 4. Hypoxylon sp. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Isabella Barros Valadão

Filiação: João Valadão Filho e Maria Tereza Barros Valadão

Nascimento: 26/02/1985 – Ipatinga - MG – Brasil.

Endereço Profissional

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

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: isavaladao@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

2009

Graduação: Bacharel em Bioquímica

Instituição: Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa – MG.

2010-2012

Mestrado: Química, Área de Concentração – Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP – Instituto de Química de Araraquara – SP.

Dissertação: Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos Associados com a Alga Vermelha *Dichotomaria marginata* (Galaxauraceae).

Orietadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Nasser Lopes

Participação em Reuniões Científicas

3RD Brazilian Conference on Natural Products (3RD BCPN) – Ouro Preto-MG, Brazil. Oct.29 – Nov.2/2011.

Aos meus pais, João Valadão e Maria Tereza.

Que mesmo longe estiveram sempre presentes, apoiando e incentivando minhas escolhas. Por todo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades, por iluminar meu caminho guiando meus passos.

Aos meus pais, João e Maria Tereza, por todo amor e carinho, aos meus irmãos Júlia e Guilherme pelo companheirismo e incentivo.

À Vovó Mariinha pelo carinho e orações.

À minha orientadora Profa. Dra. Márcia, pelos ensinamentos, orientação e pela oportunidade de aprendizado.

À todos os companheiros e amigos do NUBBE, por dividirem risos preocupações e conhecimento, em especial ao João, Vinícius, Carol, Renato, Rute, Paula, Dani, Gabriel.

Aos amigos da “micose” pelos agradáveis momentos de comilança, pela troca de conhecimento e pela amizade.

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

Aos meus amigos do Grupo Escoteiro Araraquara “José Luiz Torquato”, em especial à Tropa Caiapós, por serem uma família querida, um porto seguro, um forte aperto de canhoto.

Aos meus amigos queridos Gustavo e Zamira que mesmo à distância sempre estiveram presente dando força para vencer mais esta etapa.

Aos amigos Carol, Vi, Teresinha e Rute pelas intermináveis discussões, conselhos, cumplicidade e amizade, vocês estarão guardados para sempre no coração

À linda família Isabel, Luiz, Clarice e Carina, por me acolherem sempre que precisei, por deliciosos momentos de risos, pelas conversas, conselhos e eterna amizade.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pelos ensinamentos, conversas e pelos espectros de RMN.

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

À Luciana Poleze pelos ensinamentos em HPLC.

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

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

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

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal a obtenção de substâncias bioativas a partir do estudo químico/biológico do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Hypoxylon* sp., isolado dos talos da alga vermelha *Dichotomaria marginata*. Este fungo foi cultivado em meio sólido (arroz) fornecendo o extrato bruto em AcOEt, após maceração, filtração a vácuo e evaporação do solvente. Neste avaliou-se a produção metabólica em CCDC, CLAE-DAD e RMN de ^1H e foi submetido a bioensaios para avaliar a seu potencial antifúngico *in vitro* contra patógenos humanos e fitopatógenos, onde demonstrou ser promissor. Fracionamento em coluna de sílica gel de fase reversa (C-18) resultou no isolamento de três substâncias da classe das antraquinonas: 1,5-dimetoxi-2,6-dihidroxi-antraquinona, 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona, 1,2,5,6-tetrametoxi-antraquinona, sendo este o primeiro relato de antraquinonas isoladas do fungo *Hypoxylon* sp.. O extrato bruto do fungo endofítico *Hypoxylon* sp. apresentou moderada atividade antifúngica frente ao patógeno humano *Cryptococcus neoformans* e frente ao fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum*. Os resultados do trabalho reforçam a importância do estudo de microrganismo como fonte de metabolitos secundários.

Palavras-chave: Fungo endofítico. *Hypoxylon* sp. *Dichotomaria marginata*. Metabólitos secundários. Antraquinonas.

ABSTRACT

The present work main objective is to obtain bioactive substances from the chemical/biological study of crude extract produced by the endophytic fungus *Hypoxylon* sp., isolated from the stems of the seaweed *Dichotomaria marginata*. This endophyte was cultivated in solid medium (rice) providing the crude extract in AcOEt, after vacuum filtration and solvent evaporation. The metabolic production of this extracts was evaluated in CCDC, HPLC-DAD and ¹H-NMR and the extracts were subjected to bioassays to evaluate the antifungal potential against human pathogens and phytopathogens, which proved to be promising. The crude extract was fractionated on a column of silica gel reverse phase (C-18) resulting in the isolation of three substances, *1,5-dimethoxy-2,6-dihydroxy-anthraquinone*, *1,5,6-trimethoxy-2-hydroxy-anthraquinone*, *1,2,5,6-tetramethoxy-anthraquinone*. This was the first report of isolated anthraquinones from *Hypoxylon* sp. The crude extract of endophytic fungus *Hypoxylon* sp. showed moderate antifungal activity against the human pathogen *Cryptococcus neoformans* and against the phytopathogens *Cladosporium sphaerospermum*. The results of the study reinforce the importance of the study of microorganisms as a source of secondary metabolites.

Keywords: Endophytic Fungi. *Hypoxylon* sp.. *Dichotomaria marginata*.
Secondary metabolites. Anthraquinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da ficoeritrina.....	16
Figura 2 -Foto da <i>Dichotomaria marginata</i>	16
Figura 3 - Estrutura química dos derivados oxigenados de desmosterol	17
Figura 4 – Estrutura química das azofilonas isoladas de <i>Hypoxylon multiforme</i>	18
Figura 5 – Estrutura química das daldionas isoladas de <i>Hypoxylon truncatum</i>	19
Figura 6 – Estruturas dos compostos voláteis isolados de <i>Hypoxylon sp.</i>	19
Figura 7 – Estruturas química das principais quinonas: A- 1,4-benzoquinona; B- 1,4-naftoquinona; C- 9,10-antraquinona.....	20
Figura 8 – Estruturas das saliquinonas isoladas do caldo fermentado do actinomiceto marinho <i>Slinispora arenicola</i>	20
Figura 9 – Estruturas das antraquinonas isoladas de <i>Micromonospora rhodorangea</i>	21
Figura 10 – Estrutura química da 1- metil-2-(3'-metil-but-2'-enoloxi)-antraquinona.	21
Figura 11- Estrutura química dos derivados de antraquinonas isoldadas do fungo marinho <i>Fusarim sp.</i>	22
Figura 12 - Esquema do isolamento dos fungos endofíticos da <i>Dichotomaria marginata</i>	25
Figura 13 - Fluxograma da partição líquido/líquido do extrato bruto dos fungos Dm-1, Dm-2 e Dm-3.	26
Figura 14 – Foto da cromatografia em coluna sob pressão reduzida	29
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato em CH_3CN do fungo Dm-1.....	30
Figura 16 - Perfil CLAE-DAD do extrato em CH_3CN do fungo Dm-1.....	31
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H do extrato em CH_3CN do fungo Dm-2.....	31
Figura 18 - Perfil CLAE-DAD do extrato em CH_3CN do fungo Dm-2.....	32
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do extrato em CH_3CN do fungo Dm-3.....	32
Figura 20 - Perfil CLAE-DAD do extrato em CH_3CN do fungo Dm-3.....	33
Figura 21 - Frações obtidas da coluna de bancada sob pressão reduzida do extrato acetonitrílico do fungo Dm-3.....	34
Figura 22 - Fracionamento do extrato bruto CH_3CN do fungo Dm-3.	35
Figura 23 – Estrutura química da substância 1, 1,5-dimetoxi-2,6dihidroxi-antraquinona.....	36
Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H da substância 1 ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz).....	37
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz).....	38
Figura 26 – Principais correlações de $g\text{HMBC}$ da substância 1.	39
Figura 27 – Mapa de contorno de $g\text{HMBC}$ da substância 1 ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz).....	40
Figura 28 – Espectro de ultravioleta da substância 1.....	41
Figura 29 – Cromatograma em CLAE-DAD da substância 1.....	42
Figura 30 – Espectro de absorção no infravermelho da substância 1 (KBr).....	42
Figura 31 - Estrutura da substância 2, 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona.	43
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H da substância 2 ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz).....	44
Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz).....	45
Figura 34 - Principais correlações de $g\text{HMBC}$ da substância 2.	46
Figura 35 – Espectro de $g\text{NOESY}$ 1D de 7 + 13 irradiado em δ 3,80 ($\text{DMSO}-d_6$, 7,0T).	46
Figura 36 - Mapa de contorno de $g\text{HMBC}$ da substância 2 ($\text{DMSO}-d_6$, 500MHz).	47
Figura 37 - Espectro de ultravioleta da substância 2.....	48
Figura 38 - Cromatograma em CLAE-DAD da substância 2.	49
Figura 39 - Estrutura da substância 3, 1,2,5,6-tetrametoxi-9,10-antraquinona.	49

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	50
Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	51
Figura 42 - Principais correlações de $g\text{HMBC}$ da substância 3.	52
Figura 43 – Mapa de contorno de $g\text{HMBC}$ da substância 3 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	53
Figura 44 - Espectro de $g\text{NOESY}$ 1D de 3 + 13 irradiado em δ 3,80 (DMSO- d_6 , 7,0T).	54
Figura 45 - Espectro de absorção no infravermelho da substância 3 (KBr).....	54
Figura 46 - Espectro de ultravioleta da substância 3.....	55
Figura 47 - Cromatograma em CLAE-DAD da substância 3.	56
Figura 48 - Avaliação do potencial dos extratos brutos contra <i>C. Cladosporioides</i> (a) e contra <i>C. sphaerospermum</i> (b).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fracionamento em cromatografia em coluna do extrato bruto do fungo Dm-3.	34
Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 500MHz) da sub, 1 (δ em ppm e J em Hz)	41
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 500MHz) de 02 (δ em ppm e J em Hz).....	48
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 500MHz) da subs. 3 (δ em ppm e J em Hz).....	55
Tabela 5 - Atividade antifúngica dos extratos Dm-1, Dm-2 e Dm-3	56
Tabela 6 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) da substância 1 em três linhagens tumorais testados. Valores são média $\pm$ DPM.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH ₃ CN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
grad.	Gradiente
H ₂ O	Água
Hex.	Hexano
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
gHMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IR	Infravermelho
MHz/Hz	Megahertz / Hertz
min.	Minutos
nm	Nanômetro
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
ppm	Partes por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Rotações por minuto
Sub	Substância
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
IC	Concentração inibitória

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Algas.....	15
1.2. Fungos Endofíticos.....	17
1.3. <i>Hypoxylon</i> sp.....	18
1.4. Quinonas.....	20
2. OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.1. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Coleta e classificação do material algal.....	24
3.2. Isolamento dos fungos endofíticos.....	24
3.3. Obtenção do extrato bruto da cultura de fungos.....	25
3.4. Partição líquido/líquido dos extratos brutos.....	26
3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana para fungos: "Hole Plate".....	27
3.6. Avaliação da atividade antifúngica frente à fitopatogenos.....	28
3.7. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	28
3.8. Fracionamento do extrato acetonitrílico do fungo <i>Hypoxylon</i> sp.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1. Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos pelos fungos Dm-1, Dm-2 e Dm-330.....	30
4.2. Fracionamento do extrato acetonitrílico do fungo <i>Hypoxylon</i> sp.....	33
4.3. Identificação estrutural das substâncias produzidas pelo fungo <i>Hypoxylon</i> sp.....	35
4.3.1. Elucidação estrutural da substância 1	36
4.3.2. Elucidação estrutural da substância 2	43
4.3.3. Elucidação estrutural da substância 3	49
4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana para fungos: "Hole plate".....	56
4.5. Avaliação da atividade antifúngica frente à fitopatogenos.....	57
4.6. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	58
5. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

Mares e oceanos ocupam mais de dois terços da superfície da Terra e abrigam vários grupos de organismos vivos. O ecossistema marinho apresenta grande extensão e enorme diversidade biológica, com potencial biotecnológico associado.

Os produtos naturais têm sido utilizados como matéria prima em muitas áreas da pesquisa. Os metabolitos secundários, produzidos por plantas, algas e microrganismos, são utilizados como modelos para a síntese ou na sua forma natural em muitos processos de inovação tecnológica, um deles, a produção de fármacos (COSTA-LOTUFO, 2009).

Os microrganismos marinhos, principalmente fungos associados às algas, apresentam grande importância na pesquisa de novos produtos naturais, não apenas pela diversidade química, mas principalmente pela sustentabilidade associada à produção de matéria prima em larga escala através de processos fermentativos. Em 2009 foram descritos na literatura 1011 novos compostos isolados de organismos marinhos e em 2010 foram descritos 1003 novos compostos (BLUNT, 2012), destacando assim a importância do estudo das algas e microrganismos associados a elas.

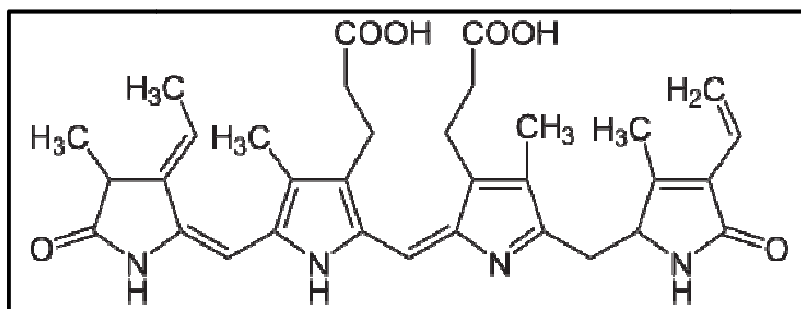
1.1. Algas

O termo alga refere a diversos vegetais fotossintetizantes, pertencentes a reinos distintos (monera, protista e plantae), tendo em comum apenas o fato de serem organismos talófitos (ausência de raiz, caule, folhas, flores e frutos).

As algas são capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes. São encontradas em água doce, mares ou sobre solos úmidos, retirando seus nutrientes do meio onde vivem (VIDOTTI, 2004).

As Rodofíceas, conhecidas como algas vermelhas, quase exclusivamente pluricelulares e marinhas, vivem fixadas em substratos (rochas, cascos de navios). O pigmento responsável pela coloração avermelhada é a ficoeritrina (Figura 1), uma proteína da família das ficobiliproteínas. Em sua maioria armazenam amido como fonte de reserva.

Figura 1 - Estrutura química da ficoeritrina.



Nesse grupo de algas vermelhas se encontra a família Galaxauraceae, amplamente distribuída pelo mundo, em oceanos de águas quentes e tropicais (LEE, 1989).

Dichotomaria marginata (J. Ellis & Solander) (Figura 2) pertence à família Galaxauraceae tendo sua filogenia apresentada a baixo:

- Domínio – Eukaryota
- Reino – Plantae
- Filo – Rhodophyta
- Classe – Florideophyceae
- Ordem – Nemaliales
- Família – Galaxauraceae
- Gênero – *Dichotomaria*

Cresce isoladamente em rochas, no nível da maré baixa. Conhecida também como *Corallina marginata*, *Galaxaura marginata* (GUIRY, 2011).

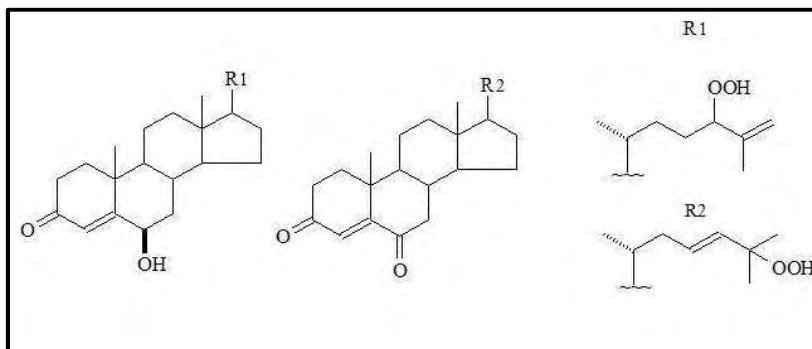
Figura 2 -Foto da *Dichotomaria marginata*.



Fonte: Arquivo pessoal Prof. Dr. Márcia Nasser

Estudos com a *G. marginata* evidenciou a presença de derivados oxigenados de desmosterol (Figura 3), os quais apresentaram atividades antitumoral (SHEU, 1997). O extrato apolar de *G. marginata* apresentou atividade anti-inflamatória (ROZAS, 2007).

Figura 3 - Estrutura química dos derivados oxigenados de desmosterol.



Fonte: Sheu; (1997, p. 900)

1.2. Fungos Endofíticos

Os fungos são microrganismos de *habitat* diverso e possuem um importante papel ecológico, possuindo o status de decompositores. A maioria vive em *habitat* terrestre, no solo ou em matéria vegetal morta. Poucos são patogênicos ao homem e aos animais. Apesar de conhecidos há muito tempo, o estudo dos fungos era escasso. Nos últimos anos, porém, com o aumento de seu potencial econômico e biotecnológico, estes estudos têm avançado. Pelas suas características de serem quimiorganotróficos e geralmente apresentarem exigências nutricionais simples, além de suportarem uma faixa de stress térmico e hidrogeniônico alto, os fungos representam grande potencial industrial para alimentação, produção de fármacos e fermentação (MADIGAN, 2010).

Fungos endofíticos colonizam assintomaticamente o interior de plantas, sem causar danos, habitando de modo geral, suas partes aéreas como folhas e caules, podendo também estar presentes nas raízes, produzem um amplo conjunto de metabólitos secundários com atividade biológica desconhecida, bem como um restrito conjunto de substâncias bioativas, transformando-os em uma importante fonte a ser explorada na busca de metabólitos potencialmente ativos (GUNATILAKA, 2006).

A produção de metabolitos secundários pelos endófitos nas relações de simbiose, além de proteger as plantas contra predadores, aumenta o crescimento e enraizamento da planta hospedeira e sua resistência a estresses. Esses metabólitos podem possuir diversas atividades farmacológicas de grande interesse industrial e biotecnológico como: antibiótico, antitumoral e antioxidante.

Uma grande vantagem da pesquisa com fungos endofíticos, na busca de substâncias bioativas, fundamenta-se na possibilidade de produção em larga escala da substância alvo, através de processos fermentativos. Modificações no meio de cultura, otimização das condições fisiológicas de crescimento e manipulações genéticas, podem levar ao aumento da produção do princípio ativo de interesse.

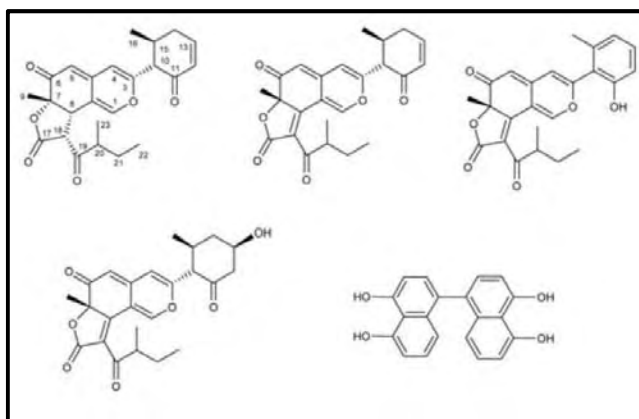
Neste contexto, pretende-se contribuir para o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico dos microrganismos marinhos, em especial dos fungos endofíticos isolados da alga vermelha *Dichotomaria marginata* (Galaxauraceae).

1.3. *Hypoxylon* sp.

Hypoxylon sp. pertencente ao gênero *Hypoxylon* da família Xylariaceae, sendo uma das famílias mais comuns encontradas no filo Ascomycota, apresenta micélio septado e septos simples contendo quitina nas paredes celulares.

Quang e colaboradores isolaram azafilonas (Figura 4) dos fungos *H. multiforme* (QUANG, 2005), *H. fuscum* (QUANG, 2004), *H. cohaerens* (QUANG, 2005), as azofilonas apresentaram atividades antioxidante (QUANG, 2004) e atividade antimicrobiana (QUANG, 2005).

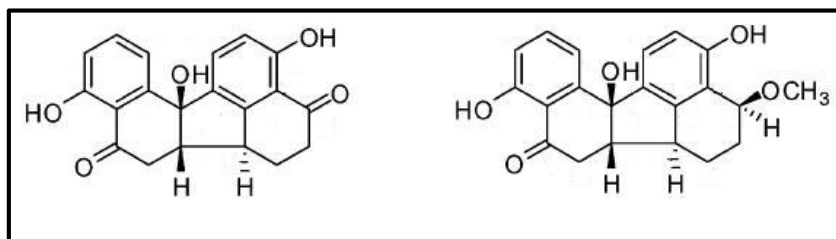
Figura 4 – Estrutura química das azofilonas isoladas de *Hypoxylon multiforme*.



Fonte: Quang (2005a, p. 1060)

Gu e colaboradores isolaram daldionas (Figura 5) com atividade citotóxica de *H. truncatum*, endofítico da planta *Artemisia annua* (GU, 2007).

Figura 5 – Estrutura química das daldionas isoladas de *Hypoxylon truncatum*.



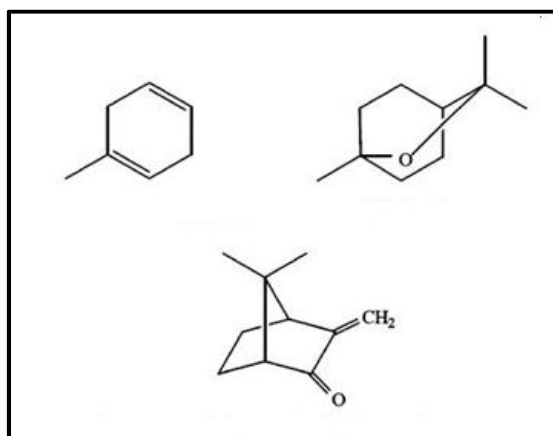
Fonte: Gu (2007, p.114)

Schlingmann e colaboradores isolaram poliésteres com atividades antifúngica do fungo marinho *H. oceanicum* (SCHLINGMANN, 2002).

LÆSSØE e colaboradores isolaram do fungo *H. aeruginosum*, derivados do ácido leparico. (LÆSSØE, 2010).

Tomscheck e colaboradores isolaram do fungo *Hypoxylon* sp. endofítico de *Persea indica* compostos voláteis (Figura 6). (TOMSHECK, 2010).

Figura 6 – Estruturas dos compostos voláteis isolados de *Hypoxylon* sp.



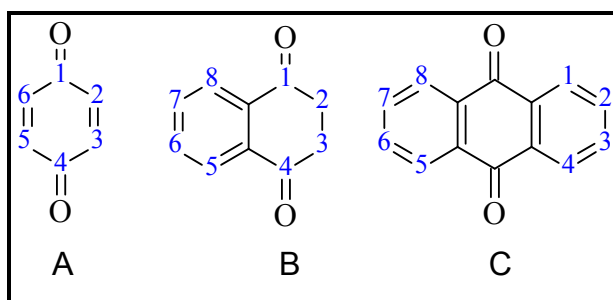
Fonte: Tomscheck (2010, p.911).

1.4. Quinonas

Quinonas são compostos orgânicos dos quais sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C.

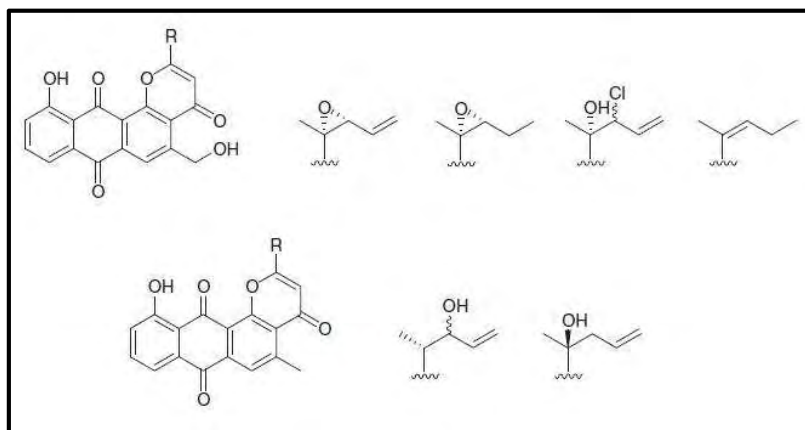
Em função do tipo de ciclo no qual o sistema de ligação duplas e cetonas conjugadas está inserido, tem-se os três grupos principais de quinonas: benzo-, nafto- e antraquinonas (Figuras 7A, 7B e 7C, respectivamente).

Figura 7 – Estruturas química das principais quinonas: A- 1,4-benzoquinona; B- 1,4-naftoquinona; C- 9,10-antraquinona



Antraquinonas da classe das antraquinonas- γ -pirona, as saliquinonas, foram isoladas por Murphy e colaboradores do caldo fermentado pelo actinomiceto marinho *Salinispora arenicola* (strain CNS-325) (Figura 8) (MURPHY, 2010).

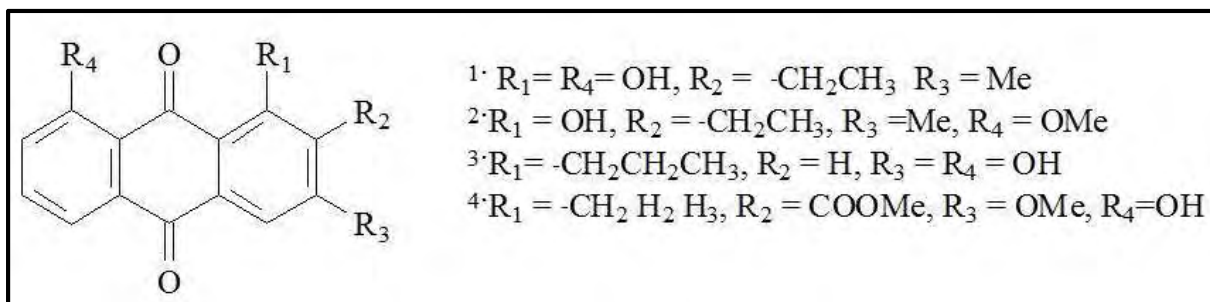
Figura 8 – Estruturas das saliquinonas isoladas do caldo fermentado do actinomiceto marinho *Salinispora arenicola*.



Fonte: Murphy, (2010, p.930)

Xeu e colaboradores isolaram do actiniomiceto *Micromonospora rhodorangea* quatro antraquinonas: 2-etil-1,8-dihidroxi-3-metilantraquinona (1), 2-etil-1-hidroxi-8-metoxi-3-metilantraquinona (2), 3,8-dihidroxi-1-propylantraquinona (3) e metil-8-hidroxi-3-metoxi-1-propilantraquinona-2-carboxilato (Figura 9) (XEU, 2009).

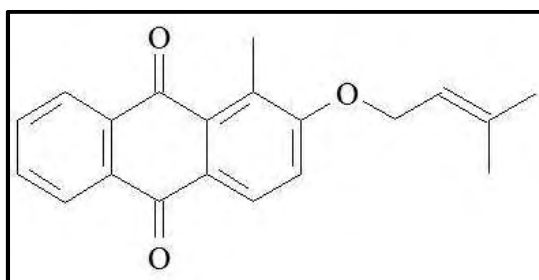
Figura 9 – Estruturas das antraquinonas isoladas de *Micromonospora rhodorangea*.



Fonte: Xeu (2009, p.535)

Mishra e colaboradores isolaram a antraquinona 1-metil-2-(3'-metil-but-2'-enoloxi)-antraquinona das sementes de *Aegle marmelos* Correa (Rutaceae) (Figura 10), esta antraquinona apresentou atividade antifúngica frente ao fungo *Candida albicans* (MISHRA, 2010).

Figura 10 – Estrutura química da 1- metil-2-(3'-metil-but-2'-enoloxi)-antraquinona.

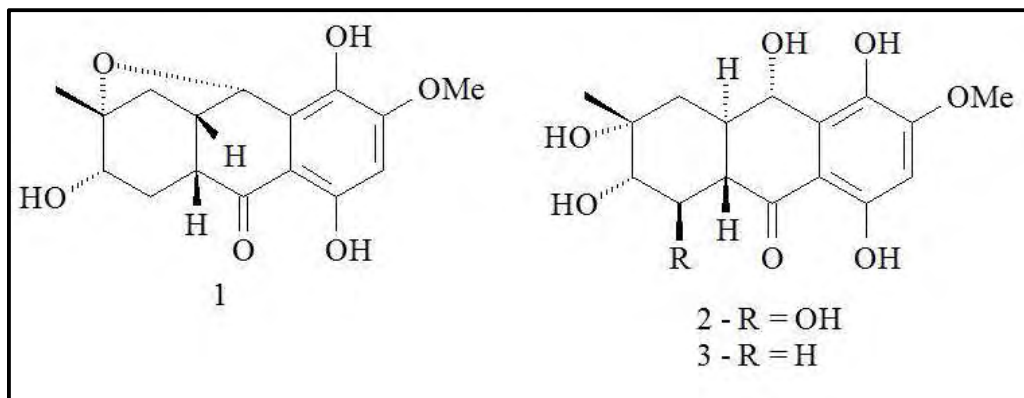


Fonte: Mishra (2010, p.105)

Chen e colaboradores isolaram do fungo marinho *Fusarium* sp. (No. ZH-210) derivados de antraquinonas: 1,4,6-trihidroxi-2-metoxi-7 α -metil-5 α ,6 α ,8 α ,9 α ,10 α -hexahidro-7,9-epoxyantracen-10-ona (1); 1,4,5,6,7,9-hexahidroxi-2-metoxi-7 α -metil-5 β ,6 α ,8 α ,8 β ,9 α ,10 α -hexahidroantracen-10-ona (2); 1,4,6,7,9-pentahidroxi-2-metoxi-7 α -

metil-5 α ,6 α ,8 α ,8 β ,9 α ,10 α -hexahidroantracen-10-ona (Figura 11). Esses derivados de antraquinonas possuem baixa atividade citotóxica frente as linhagens de células KB, KBV 200, MCF-7 (CHEN, 2008) .

Figura 11- Estrutura química dos derivados de antraquinonas isoladas do fungo marinho *Fusarium* sp.



Fonte: Chen (2008, p.363)

Raveendram demonstrou que a fração contendo antraquinonas de *Ophiorrhiza rugosa* Wall. Var *decumbens* (Rubiaceae) apresentou atividade anti-inflamatória e antitumoral (RAVEENDRAN, 2011).

O estudo com fungos endofíticos tem se mostrado promissor na obtenção de metabólitos secundários. As substâncias descritas na literatura pertencentes à classe das antraquinonas isoladas tanto de fungos quanto de plantas apresentam estrutura química diversa e diferentes atividades biológicas. Tais resultados ressaltam a necessidade do estudo dos metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira.

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi o estudo químico/biológico dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos Dm-1, Dm-2 e Dm-3, isolados da alga vermelha *Dichotomaria marginata*.

2.1. Objetivos Específicos

- a. Produzir em escala de bancada o extrato bruto obtido pelo fungo endofítico isolado da alga *Dichotomaria marginata*;
- b. Realizar o fracionamento do extrato bruto através de técnicas cromatográficas convencionais até o isolamento dos metabólitos secundários;
- c. Elucidar e/ou identificar as estruturas dos metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, respectivamente;
- d. Avaliar a atividade antifúngica das frações e substâncias puras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e classificação do material algal

Algas vermelhas da espécie *Dichotomaria marginata* foram coletadas, em setembro de 2008, nas encostas rochosas da Praia de Fortaleza, Ubatuba - SP, Brasil. As algas foram coletadas e identificadas pela Dra. Nair Sumiê Yokoya, bióloga pesquisadora do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt) – Brasil e a exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica.

3.2. Isolamento dos fungos endofíticos

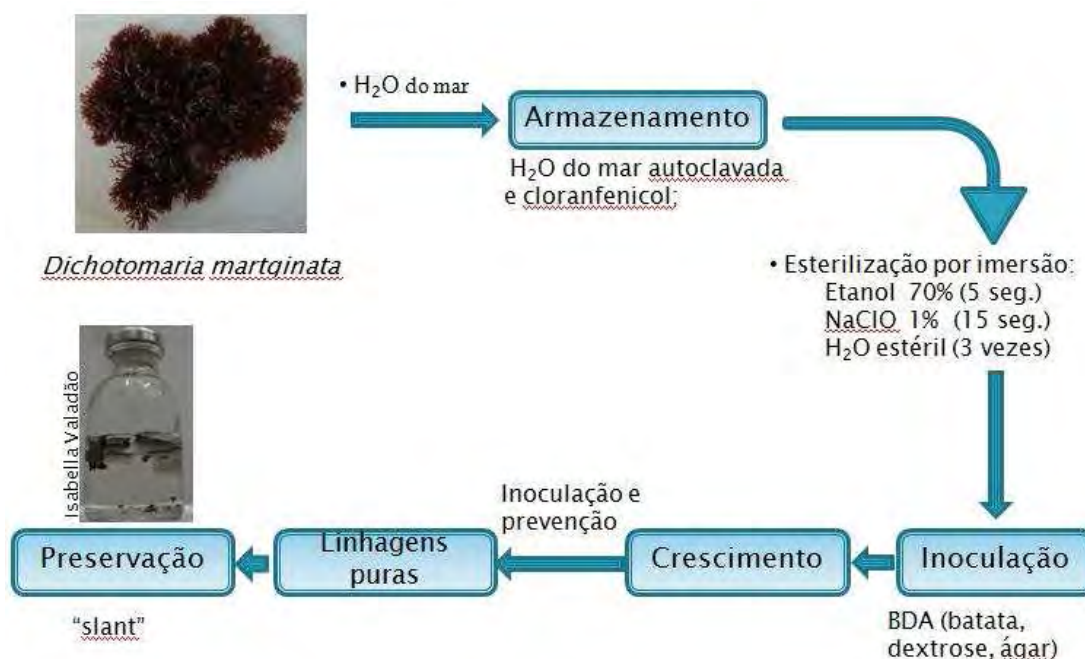
O material algal foi lavado em água do mar para remover contaminantes (areia, crustáceos) e estocado em frascos de vidro com água do mar filtrada, esterilizada por autoclavagem e suplementada com 200 mg/L de cloranfenicol (2 frascos por espécie). Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao nosso Laboratório.

O material contido em cada frasco foi desinfetado superficialmente em câmara asséptica por incubação em etanol 70% por 5 segundos, seguido de incubação em hipoclorito de sódio por 15 segundos e três enxágües em água do mar esterilizada.

Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água da última lavagem foi semeada pela técnica de “spread plate” nos meio utilizados no isolamento. As amostras esterilizadas foram fragmentadas com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis e transferidas para placas de Petri em meio BDA (Batata Dextrose Agar, 13-15 fragmentos por placa).

As placas de Petri contendo os inóculos foram mantidas em câmaras B.O.D. a 30°C por 40 dias, com observações diárias para verificar o crescimento de microrganismos. Fragmentos com sinais de crescimento fúngico foram transferidos para novas placas com meio sólido BDA (uma para cada fragmento), para isolamento da linhagem. Após a confirmação do crescimento e isolamento das linhagens fúngicas na placa procedeu-se à preservação das mesmas, constituindo uma micoteca disponível para estudos posteriores (Figura 12).

Figura 12 - Esquema do isolamento dos fungos endofíticos da *Dichotomaria marginata*.



Foram isolados da *Dichotomaria marginata* sete fungos endofíticos codificados como Dm-1, Dm-2 ... a Dm-7. O presente trabalho iniciou-se com o estudo dos extratos produzidos por Dm-1, Dm-2 e Dm-3. De acordo com os resultados apresentados pelo extrato bruto do fungo Dm-3 optou-se por continuar o trabalho com esse extrato.

O fungo Dm-3 foi identificado por biologia molecular como *Hypoxyylon* sp., pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/UNICAMP) e está depositado na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/Car.

3.3. Obtenção do extrato bruto da cultura de fungos

Os fungos isolados Dm-1, Dm-2 e Dm-3 foram repicados para placas de Petri em BDA, e após o crescimento foram inoculados, cada fungo, em 6 frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo cada um 90 g de arroz parboilizado e 75 mL de água destilada (esterilizados três vezes por meio de autoclave, a 121°C, 1 atm, por 40 min). Os fungos foram cultivados por 21 dias. Após este período, as culturas foram extraídas com acetato de etila (AcOEt) (7x350 mL). O solvente foi evaporado a vácuo fornecendo 7,7 g; 8,8 g e 14,2 g

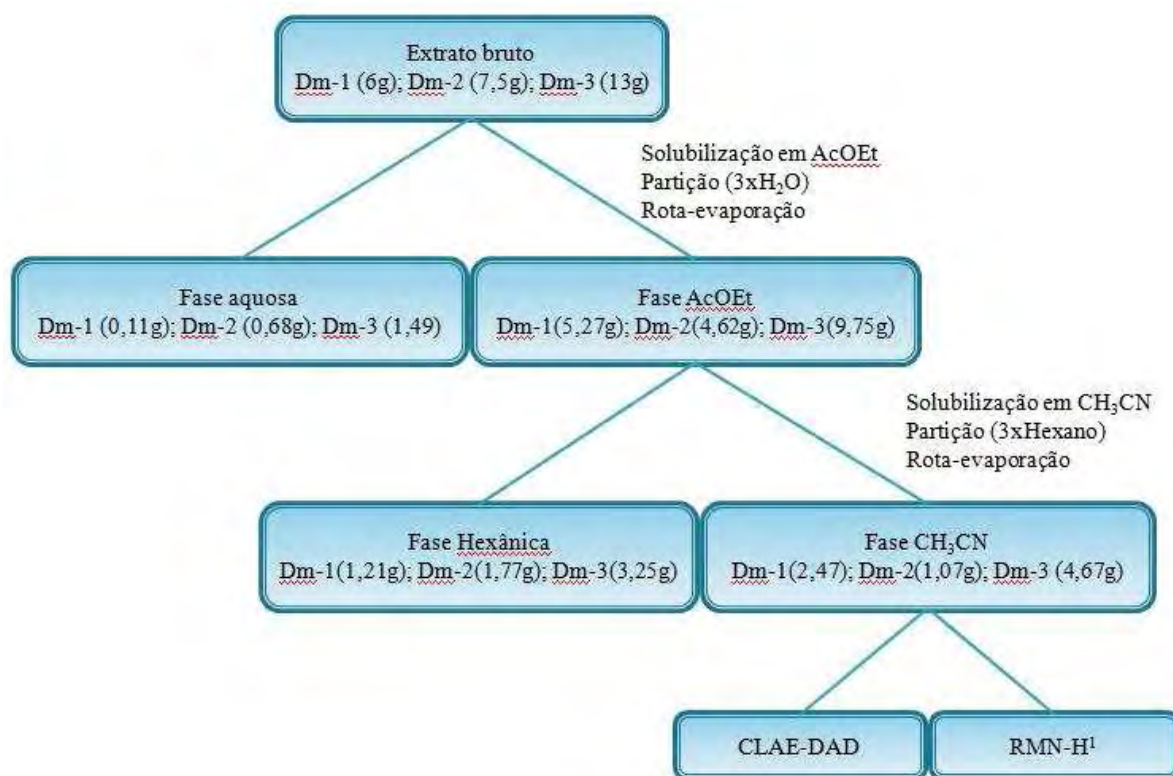
de extrato bruto dos fungos Dm-2, Dm-2 e Dm-3, respectivamente, de extrato bruto. Os meios foram previamente autoclavados para exterminação dos microrganismos antes de serem descartados. Os solventes recuperados foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados à recuperação ou descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf.

3.4. Partição líquido/líquido dos extratos brutos

Uma pequena porção de cada extrato bruto foi retirada e armazenada em microtubos acondicionados na geladeira.

Os extratos brutos foram ressolubilizados em AcOEt e particionados com água Milli-Q. A fração em AcOEt foi evaporada a vácuo e resolubilizada em acetonitrila e particionada com hexano como mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma da partição líquido/líquido do extrato bruto dos fungos Dm-1, Dm-2 e Dm-3.



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

As análises por CLAE-DAD foram realizadas no equipamento Varia Pro Star com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Variam PDA Detector) e injetor manual. Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μm).

As substâncias isoladas foram analisadas por CLAE-DAD analítico realizado no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20A. Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μm).

Os espectros de Infra-Vermelho foram realizados no Espectrômetro de Infra-Vermelho IRPrestige-21 (SHIMADZU), em pastilhas de KBr, localizado no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf) – Departamento de Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, conduzido pelo mestrando Luiz Antonio Dutra.

3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana para fungos: "Hole Plate"

A avaliação da atividade antifúngica, dos extratos brutos foi realizada pela Profa. Dra. Maria José Gianini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Araraquara, e as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas por meio da técnica de microdiluição com adaptações, de acordo com os documentos M27-A e M27-A2 do National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS, 1994 e 1997) e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). O meio de cultura utilizado foi o RPMI - 1640, suplementado com 2% de glicose, e pH ajustado para 7,0. As leituras foram feitas por leitura visual e por absorbância em espectrofotômetro.

Os microrganismos patogênicos humanos usados nos testes foram: leveduras *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

3.6. Avaliação da atividade antifúngica frente à fitopatogenos

Os extratos brutos foram submetidos à técnica de Bioautografia para detecção de atividade fungitóxica, através da nebulização de suspensões dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos/mL em solução de glicose e sais) em placas para CCDC contendo as substâncias de interesse, previamente eluídas com solventes adequados. As placas foram incubadas em câmara úmida a 25°C por 48 horas e os halos de inibição para as substâncias fungitóxicas determinados (HOMANS & FUCHS, 1970).

A metodologia permite detectar uma ou mais substâncias antifúngicas, o que pode ser muito útil no processo de purificação dos princípios ativos. Para as substâncias puras foram determinados os limites de detecção ou quantidade mínima, em µg, requerida para inibir o crescimento do fungo, em comparação com padrões de antibióticos nistatina, miconazol e cetoconazol.

O bioensaio foi realizado pela pesquisadora Dra. M. Cláudia M. Young, do Instituto Botânico, S.P.

3.7. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A substância 1,5-dimetoxi-2,6-dihidroxi-antraquinona (**1**) foi submetida ao ensaio de citotóxicidade a fim de verificar a citotoxicidade *in vitro* da substância pura em 3 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial citotóxico e antitumoral. O bioensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental – Fortaleza – Ceará pelos pesquisadores Cláudia do O Pessoa, Manoel Odorico de Moraes, Paulo Michel Pinheiro Ferreira e pela aluna de iniciação científica Daisy Jereissati Barbosa.

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

(frações: CH-11.5 E C80-9) ou 5 mg/mL (pura: FRD). O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE, 1996). As células foram plaqueadas as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro.

3.8. Fracionamento do extrato acetônitrílico do fungo *Hypoxylon* sp.

O extrato acetônitrílico do fungo *Hypoxylon* sp. foi fracionado em cromatografia de coluna de bancada sob pressão reduzida (Figura 14) (27,5 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária 162,67 g de sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente H₂O:MeOH. Ao final da separação cromatográfica, a sílica C-18 foi recuperada com eluições sucessivas de MeOH.

Figura 14 – Foto da cromatografia em coluna sob pressão reduzida



Fonte: Isabella Valadão

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente trabalho proporcionou avaliar o perfil químico do extrato bruto de três fungos endofíticos, Dm-1, Dm-2 e Dm-3, isolados da alga vermelha *Dichotomaria marginata*. O fracionamento do extrato bruto do fungo Dm-3, posteriormente identificado como *Hypoxylon* sp. proporcionou o isolamento de três substâncias da classe das antraquinonas com atividade antifúngica promissora.

4.1. Avaliação do perfil químico dos extratos brutos obtidos pelos fungos Dm-1, Dm-2 e Dm-3

Os resultados apresentados a seguir mostram o perfil químico dos extratos brutos dos fungos Dm-1, Dm-2 e Dm-3, as Figuras 15 a 20 que se seguem, apresentam os espectros de RMN de ^1H e perfil em CLAE-DAD dos extratos brutos em CH_3CN .

Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato em CH_3CN do fungo Dm-1.

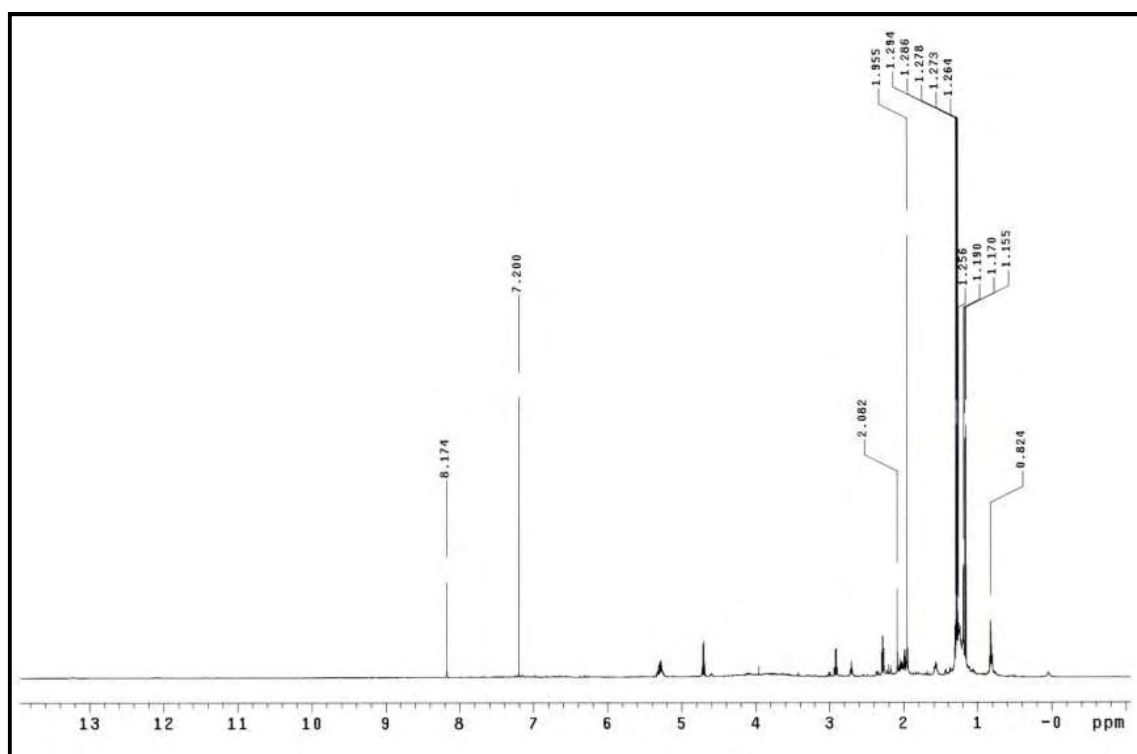


Figura 16 - Perfil CLAE-DAD do extrato em CH₃CN do fungo Dm-1.

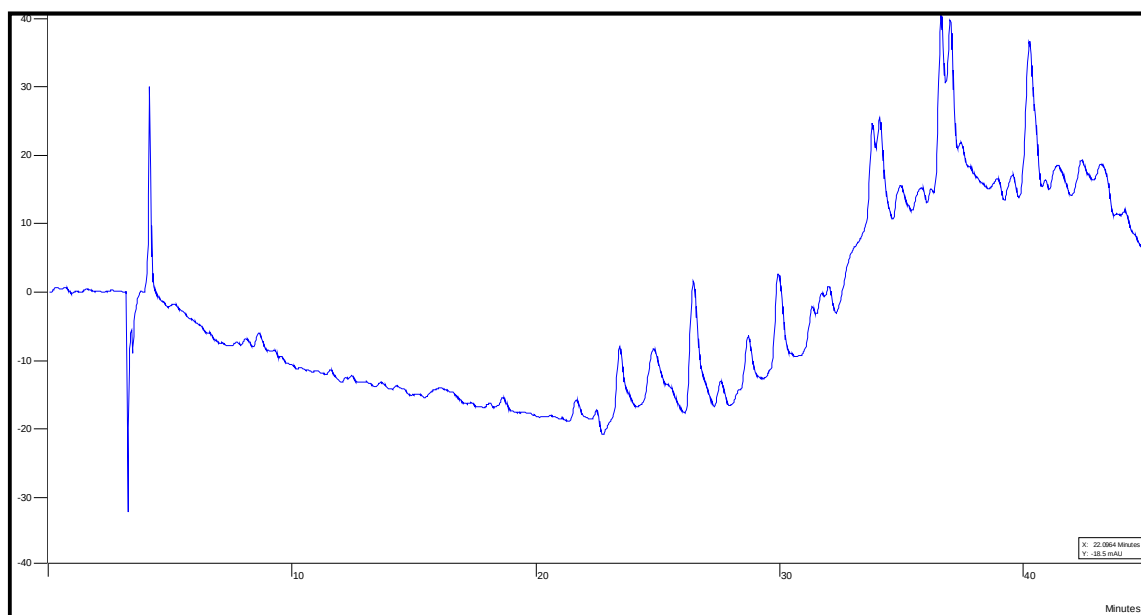


Figura 17 - Espectro de RMN de ¹H do extrato em CH₃CN do fungo Dm-2.

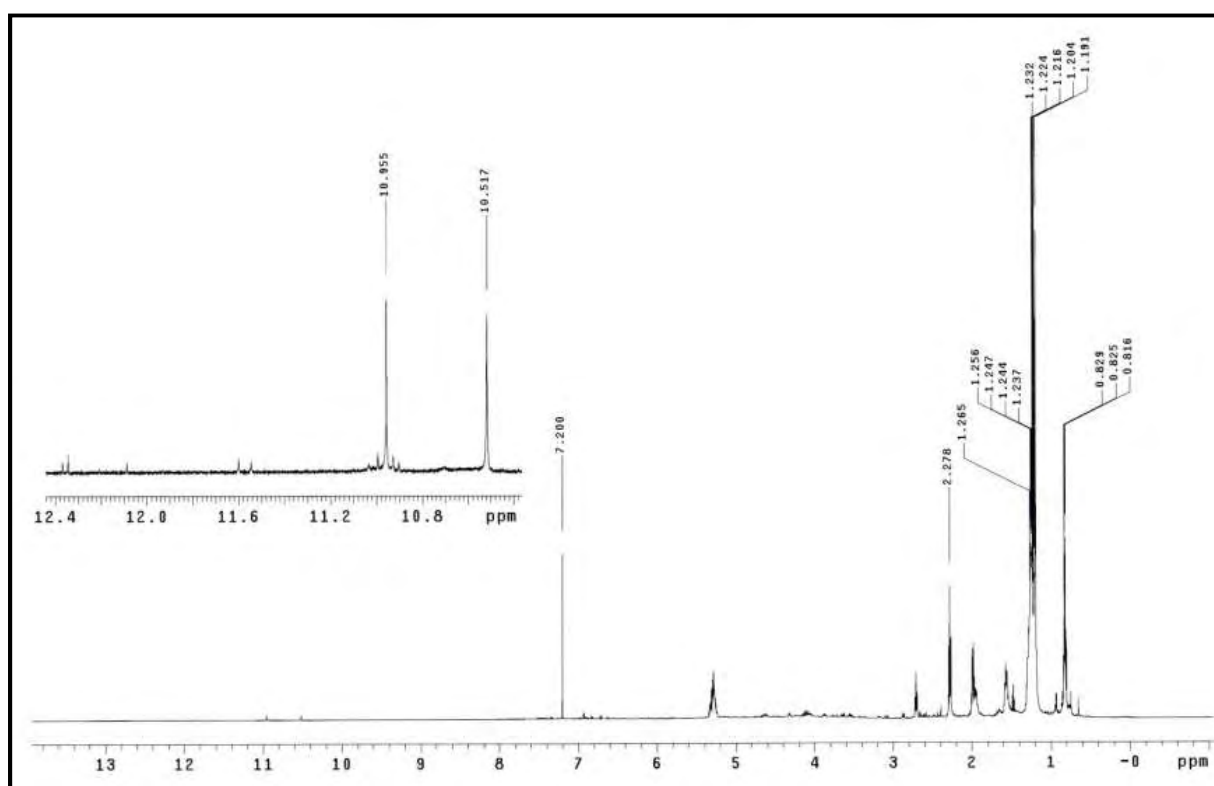


Figura 18 - Perfil CLAE-DAD do extrato em CH₃CN do fungo Dm-2.

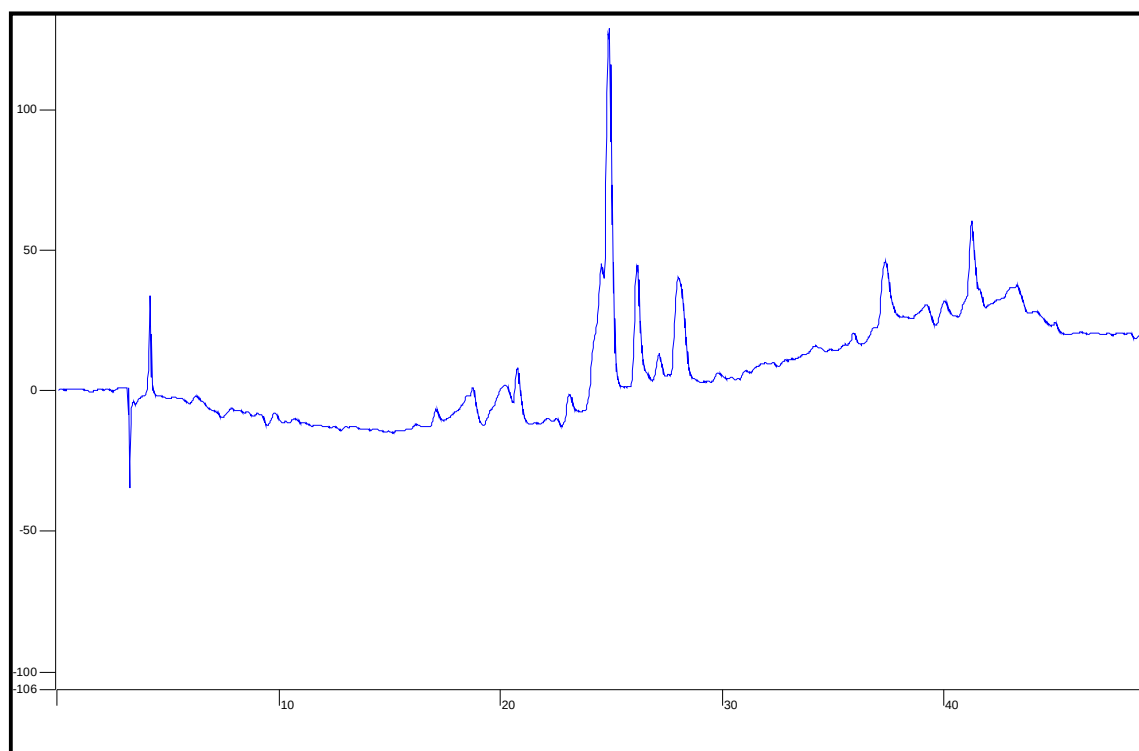


Figura 19 - Espectro de RMN de ¹H do extrato em CH₃CN do fungo Dm-3.

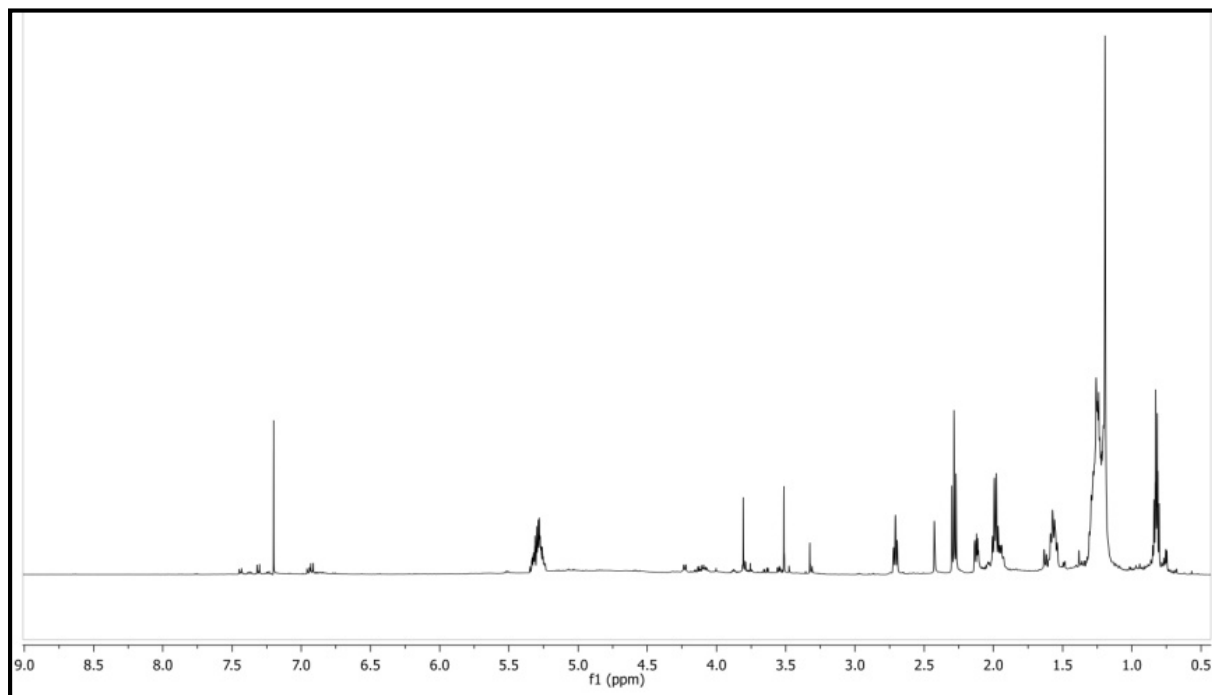
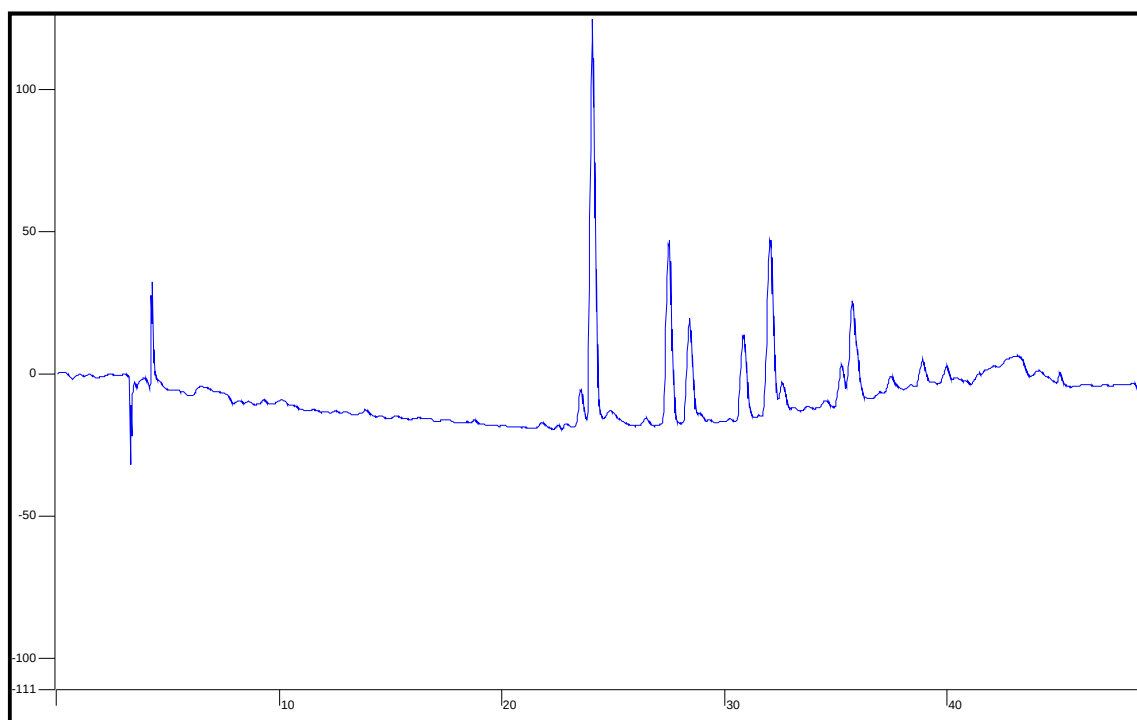


Figura 20 - Perfil CLAE-DAD do extrato em CH₃CN do fungo Dm-3.



O cromatograma do extrato em CH₃CN do fungo Dm-3 (Figura 20), utilizando gradiente exploratório (CLAE-DAD) apresentou picos com polaridades variando de média a alta e boa resolução cromatográfica, apresentando perfil químico mais interessante em CLAE-DAD que os extratos acetonitrílico dos fungos Dm-1 e Dm-2 (Figura 16 e 18, respectivamente).

O espectro de RMN de ¹H do extrato em acetonitrílico do fungo Dm-3 apresenta sinais correspondentes a grupos metoxílicos aromáticos com deslocamentos químicos na região de δ 3,40 a δ 3,88, além de sinais referentes aos hidrogênios aromáticos entre δ 6,80-7,60. Tendo em vista, a boa resolução cromatográfica do perfil em CLAE-DAD e os sinais característicos à hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ¹H optou-se por continuar o trabalho com o extrato acetonitrílico do fungo Dm-3.

4.2. Fracionamento do extrato acetonitrílico do fungo *Hypoxylon* sp.

A análise do cromatograma em CLAE-DAD do extrato acetonitrílico do fungo Dm-3, permitiu realizar um fracionamento de 2,4 g do extrato em ACN do fungo Dm-3 por cromatografia em coluna sob pressão reduzida, utilizando como fase estacionária sílica de

fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente H₂O:MeOH (Tabela 1).

Tabela 1 - Fracionamento em cromatografia em coluna do extrato bruto do fungo Dm-3.

Frações	Eluentes	Massa (mg)
Fr.A	H ₂ O:MeOH (80:20)	37,8
Fr.B	H ₂ O:MeOH (70:30)	25,6
Fr.C	H ₂ O:MeOH (60:40)	49,9
Fr.D	H ₂ O:MeOH (50:50)	80,8
Fr.E	H ₂ O:MeOH (40:60)	78,8
Fr.F	H ₂ O:MeOH (35:65)	114,1
Fr.F.1	H ₂ O:MeOH (35:65)	23,7
Fr.G	H ₂ O:MeOH (30:70)	28,6
Fr.H	H ₂ O:MeOH (25:75)	36,9
Fr.I	H ₂ O:MeOH (20:80)	48,7
Fr.J	H ₂ O:MeOH (10:90)	98
Fr.K	MeOH (100%)	1052,9
Fr.L	MeOH (100%)	89,8
Fr.M	MeOH (100%)	70,2
Fr.N	MeOH (100%)	24,8
Massa recuperada		1860,60
Rendimento		77,53%

O fracionamento do extrato teve 77,53% de rendimento, resultando em 15 frações (525 mL cada) (Figura 21).

. As frações obtidas foram submetidas a análise em CLAE-DAD, optou-se por reunir as frações “A”, “B” e “C”; “G” e “H”; “K”, “L”, “M” e “N”.

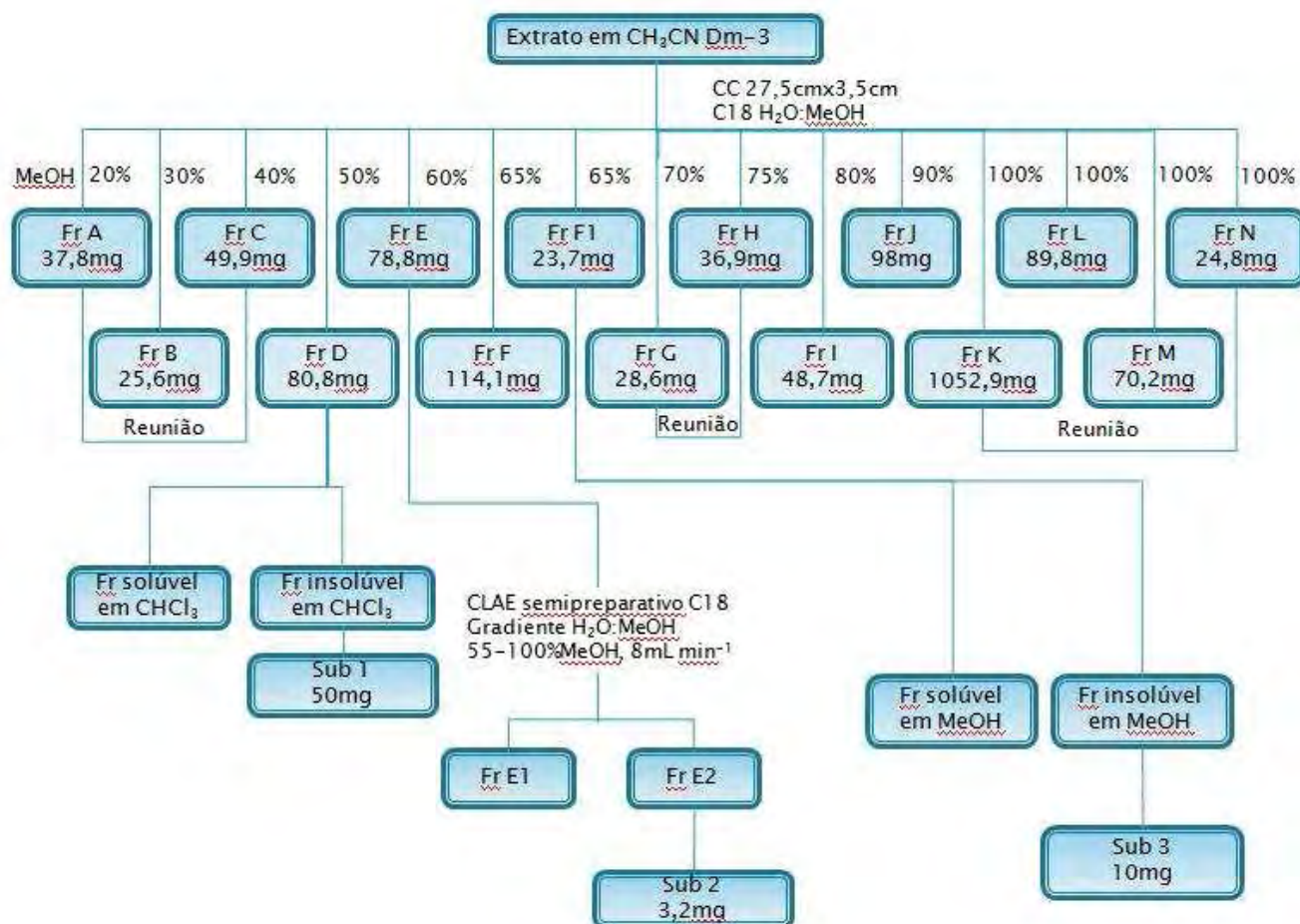
Figura 21 - Frações obtidas da coluna de bancada sob pressão reduzida do extrato acetonitrílico do fungo Dm-3



A fração “E” foi submetida a um fracionamento por CLAE-semi-preparativa realizada no equipamento Varian Pro Star com detector ultravioleta UV-Visível 320 (Varian Detector) e injetor manual. Foi utilizada uma coluna semipreparativa Phenomenex Luna com

sílica tipo octadesil silano (C-18) (150 x 21,20 mm; 5 µm). obtendo duas novas frações, como apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Fracionamento do extrato bruto CH₃CN do fungo Dm-3.



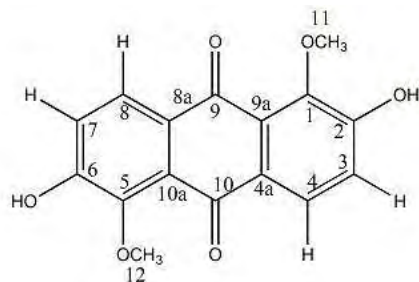
4.3. Identificação estrutural das substâncias produzidas pelo fungo *Hypoxylon* sp.

O estudo químico do extrato produzido pelo endófito *Hypoxylon* sp. resultou na identificação de 3 antraquinonas: 1,5-dimetoxi-2,6-dihidroxi-antraquinona (1), 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona (2) e 1,2,5,6-tetrametoxi-antraquinona (3).

4.3.1. Elucidação estrutural da substância 1

A substância 1, 1,5-dimetoxi-2,6dihidroxi-antraquinona (Figura 23), foi isolada da fração D.

Figura 23 – Estrutura química da substância 1, 1,5-dimetoxi-2,6dihidroxi-antraquinona.



A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu detectar a presença de hidrogênios de metoxila em δ_{H} 3,75 (*sl*; δ_{C} 60,86), hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,8 (*d*) e em δ_{H} 7,15 (*d*) e de duas carbonilas em δ_{C} 183,4, que são sinais característicos de antraquinonas (Figuras 24 e 25).

A presença do deslocamento químico em δ_{C} 157,5 indicou a presença de grupo $-\text{OH}$ ligado ao anel aromático, C-2 e C-6.

Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (DMSO- d_6 , 500MHz)

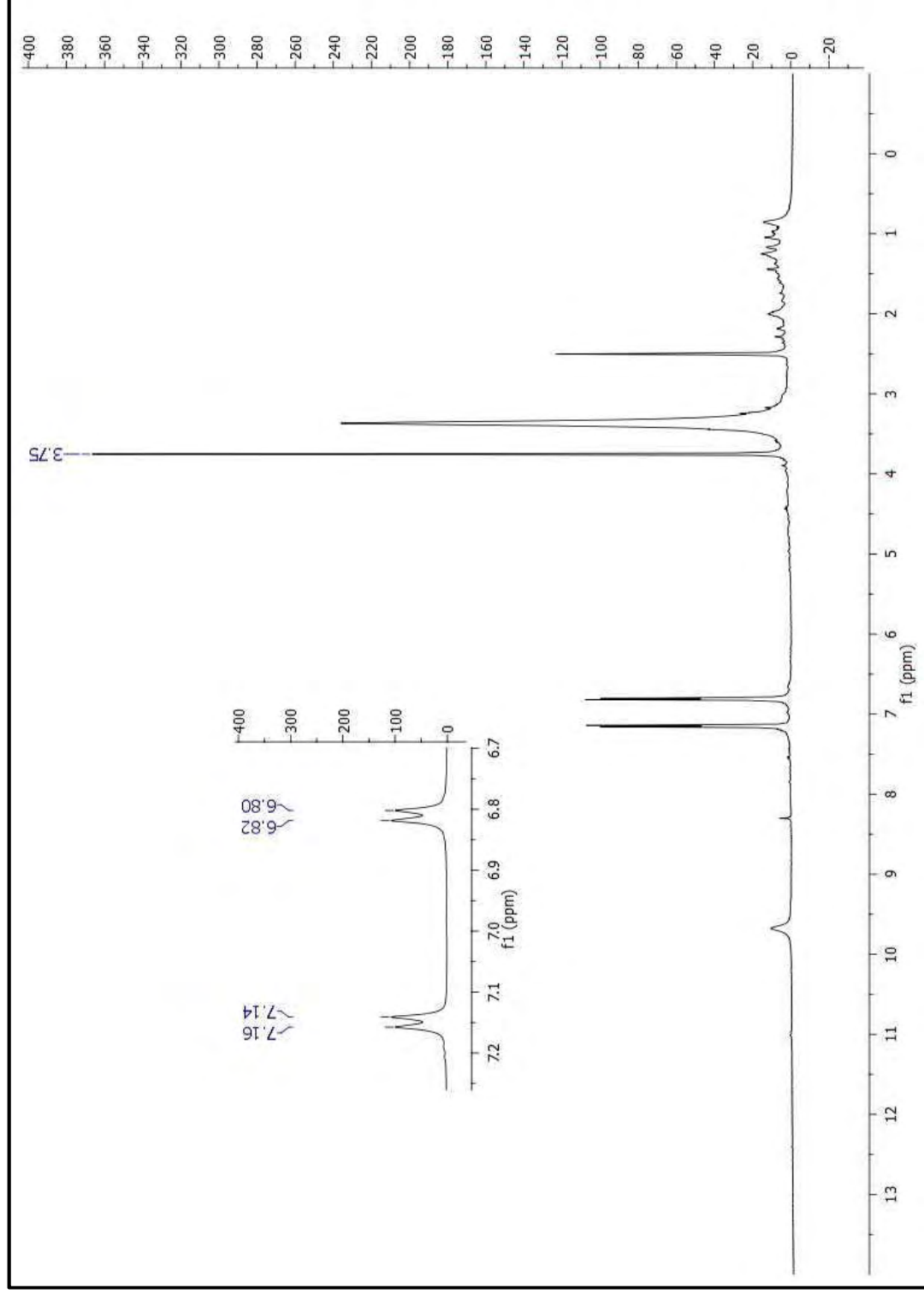
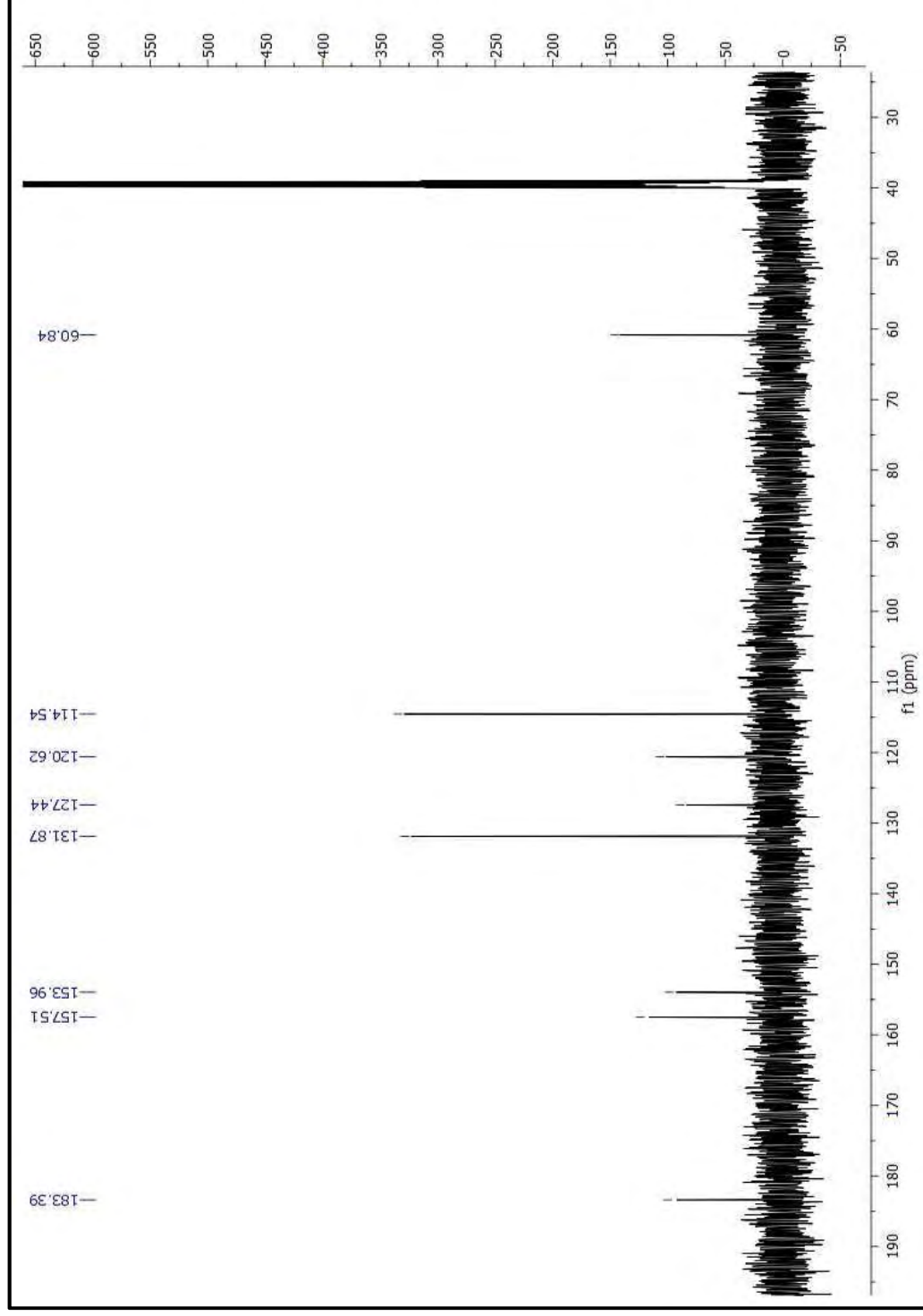


Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (DMSO- d_6 , 500MHz).



As correlações a longa distância observadas em gHMBC de δ_H 7,15 com os carbonos em $\delta_{C-9a, 10a}$ 127,5 e $\delta_{C-2, 6}$ 157,5, permitiram atribuir este deslocamento químico aos hidrogênios H-4 e H-8. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_H 6,8 com o carbono em $\delta_{C-4a, 8a}$ 120,6, permitiu atribuir este deslocamento químico aos hidrogênios H-3 e H-7. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_H 3,75 com o carbono em $\delta_{C-1, 5}$ 153,9, permitiu atribuir este deslocamento químico aos hidrogênios H-11 e H-12 pertencentes à metoxila (Figuras 26 e 27).

Figura 26 – Principais correlações de gHMBC da substância 1.

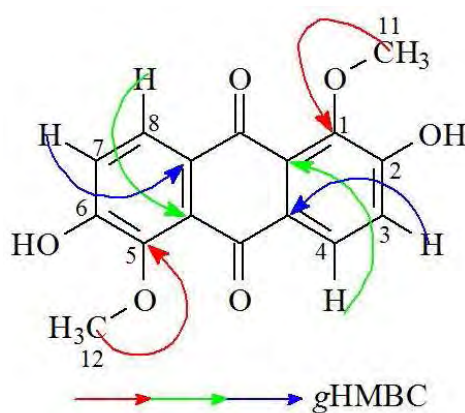
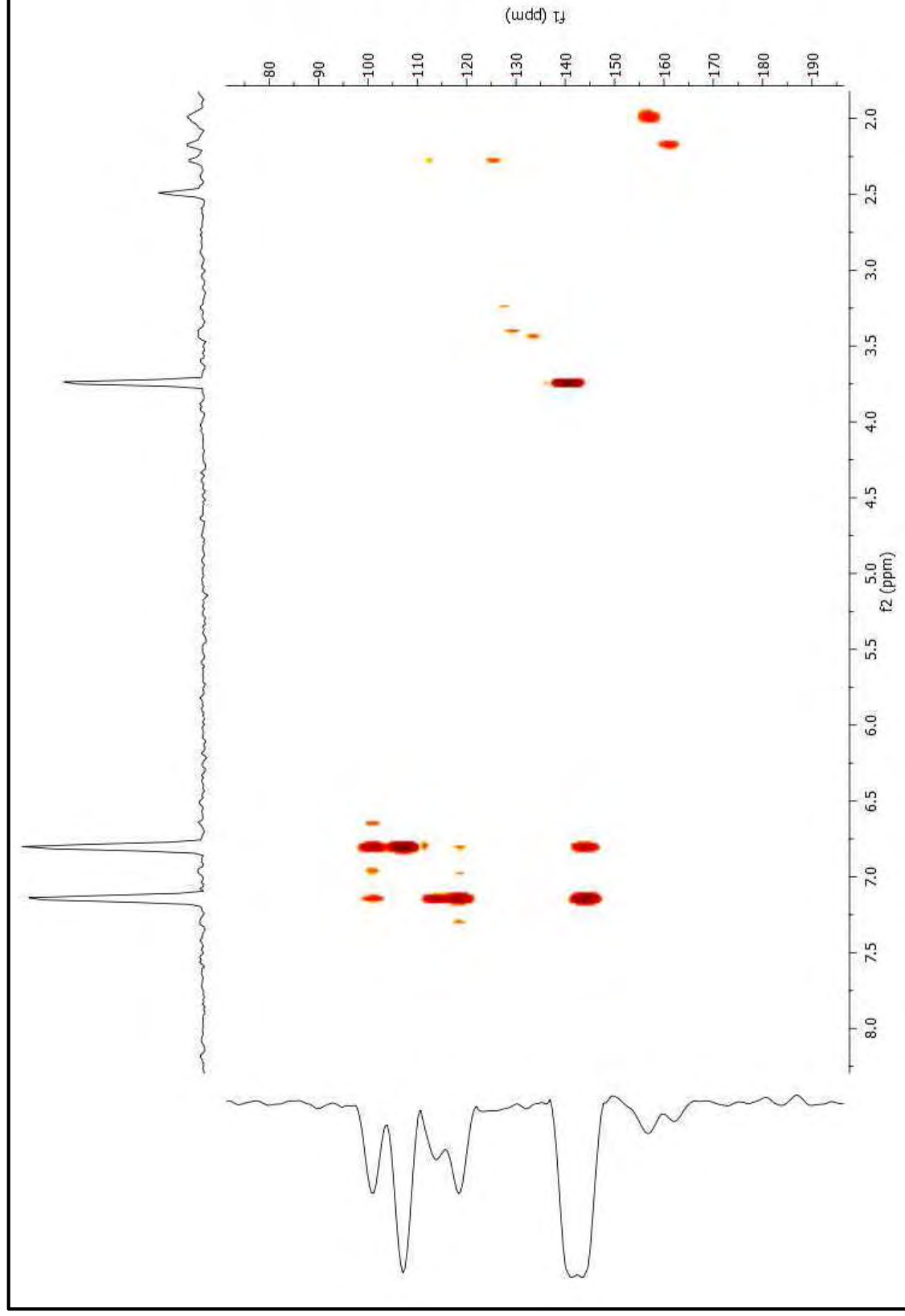


Figura 27 – Mapa de contorno de gHMBC da substância 1 (DMSO-d₆, 500MHz).



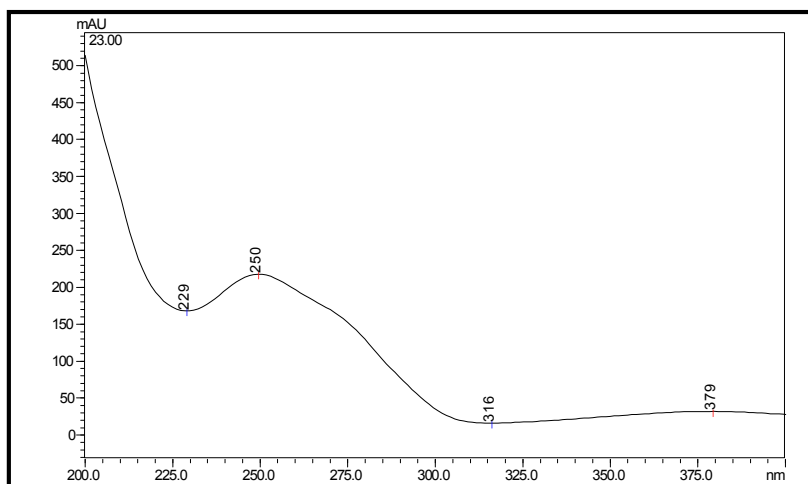
Baseando-se nos dados espectroscópicos e nas correlações observadas foi proposto que a substância **1** é uma antraquinona simétrica, 1,5-dimetoxi-2,6-dihidroxi-antraquinona. Os valores atribuídos estão representados na Tabela 2.

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

	^1H $\delta(\text{ppm})$	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	HMBC(δ)
1/5	-	153,9	-
2/6	-	157,5	-
3/7	6,8	114,5	120,6
4/8	7,15	131,8	157,5; 127,5
4 ^a /8 ^a	-	120,6	
9 ^a /10 ^a	-	127,5	
9/10	-	183,4	
11/12	3,75	60,86	153,9

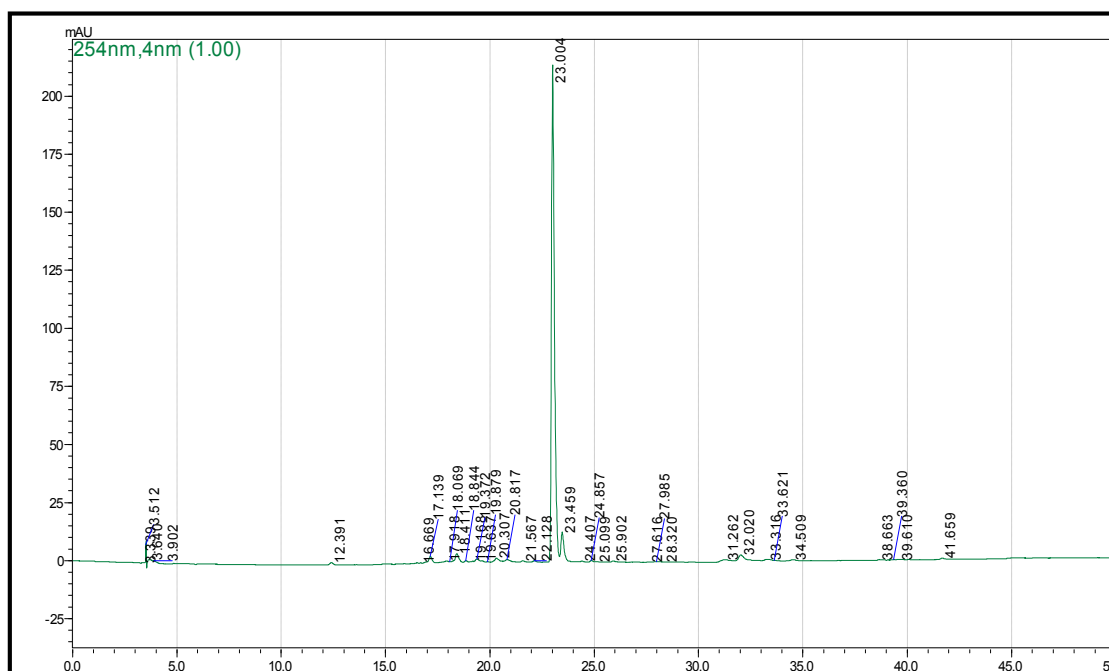
As curvas de UV da substância **1** (Figura 28) estão compatíveis com a estrutura de antraquinonas, apresentando bandas de absorção em 250 nm e 375 nm.

Figura 28 – Espectro de ultravioleta da substância **1**.



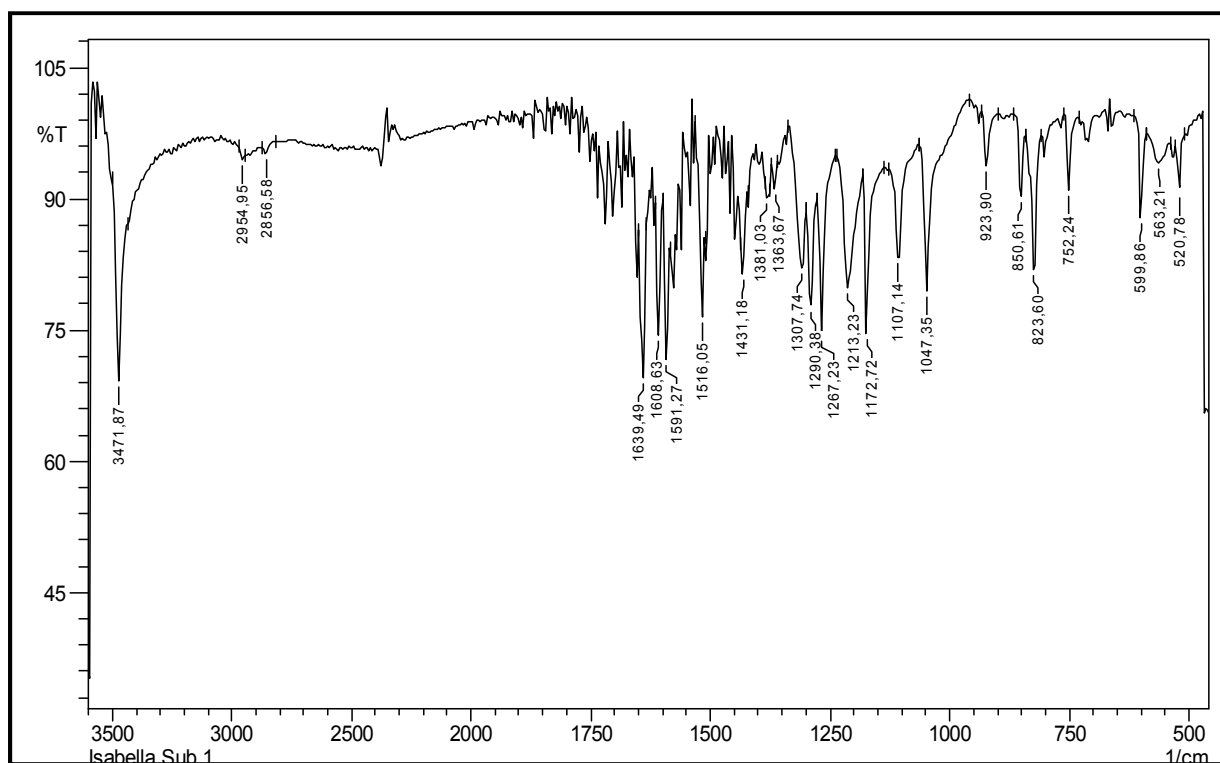
O cromatograma em CLAE-DAD (Figura 29) mostrou o tempo de retenção da substância **1** em 23,0 min.

Figura 29 – Cromatograma em CLAE-DAD da substância 1.



A análise do espectro de absorção na região do infravermelho da substância 1 confirma a presença do grupo hidroxila livre ($\square_{max}^{KBr}$: 3471) e da carbonila ($\square_{max}^{KBr}$: 1639) com valor deslocado devido ao efeito das ligações conjugadas da antraquinona (Figura 30).

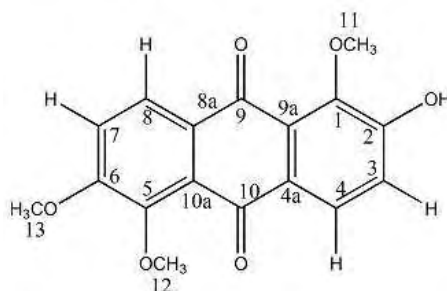
Figura 30 – Espectro de absorção no infravermelho da substância 1 (KBr).



4.3.2. Elucidação estrutural da substância 2

O fracionamento da fração E resultou em duas novas frações, a substância 2, 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona (Figura 31), foi isolada do fração E2.

Figura 31 - Estrutura da substância 2, 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona.



A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu detectar a presença de hidrogênios de metoxila em δ_{H} 3,74 e 3,76 (*sl*; δ_{C} 60,8/60,9), δ_{H} 3,80 (*sl*; δ_{C} 55,11);, hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,8 (*d*; $J=8,5$ Hz), δ_{H} 7,0 (*d*; $J=8,5$ Hz), δ_{H} 7,15 (*d*; $J=9$ Hz) e em δ_{H} 7,25 (*d*; $J=9,0$ Hz), e de duas carbonilas em δ_{C} 183,2 e 183,4, que são sinais característicos de antraquinonas (Figuras 32 e 33).

A presença do deslocamento químico em δ_{C} 157,5 indicou a presença de um grupo –OH ligado ao anel aromático, C-2.

No espectro gCOSY foram observadas correlações entre os hidrogênios aromáticos H-3 (δ_{C} 114,5) e H-4 (δ_{C} 131) e entre os hidrogênios aromáticos H-7 (δ_{C} 113,2) e H-8 (δ_{C} 131).

A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_{H} 7,15 com o carbono em $\delta_{\text{C-2}}$ 157,5, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-4. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_{H} 6,8 com o carbono em $\delta_{\text{C-4a}}$ 120,6, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-3. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_{H} 7,00 com o carbono em $\delta_{\text{C-8a}}$ 122,4, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-7. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_{H} 7,25 com o carbono em $\delta_{\text{C-6}}$ 159,2, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-8.

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H de substância 2 (DMSO- d_6 , 500MHz).

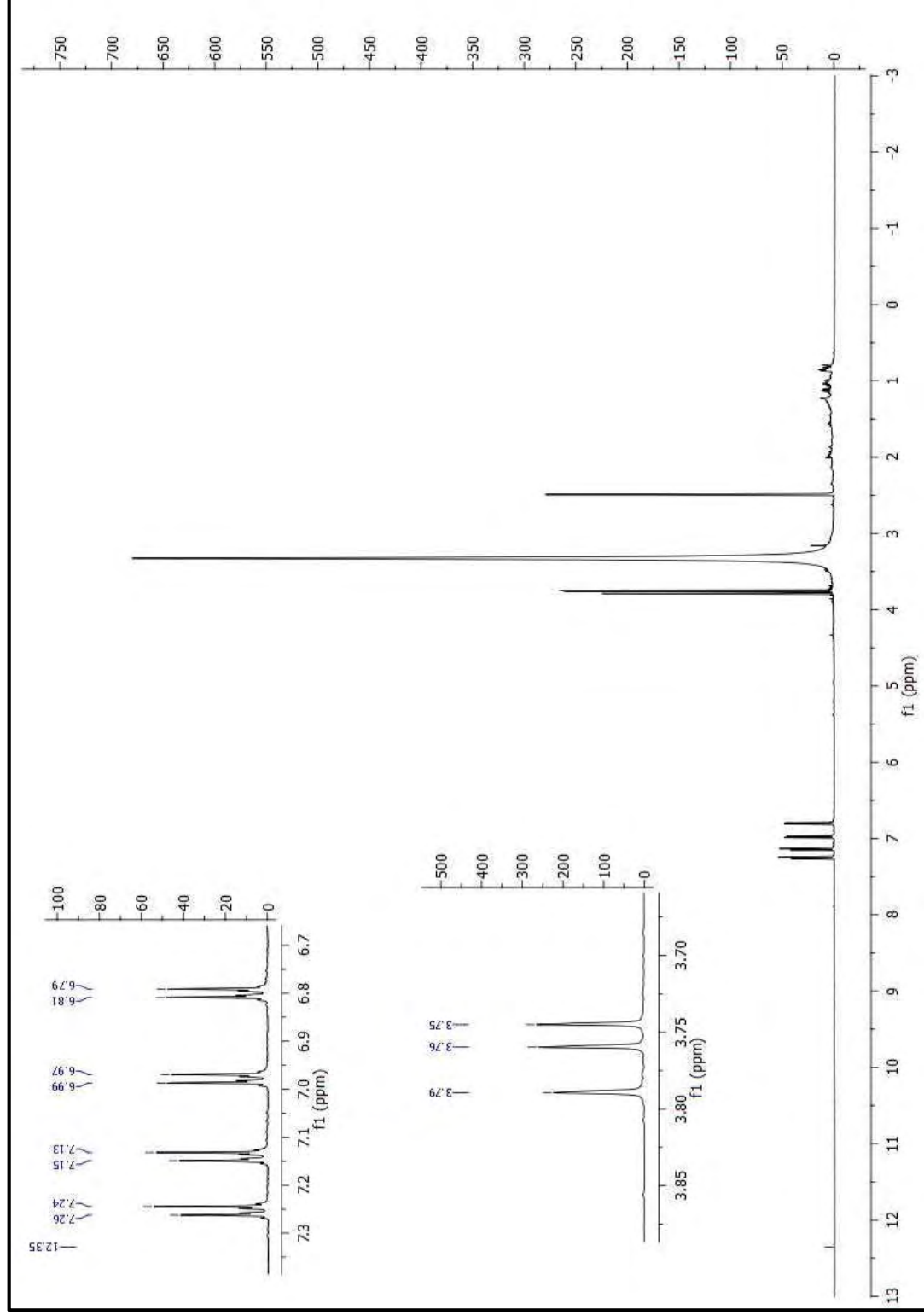
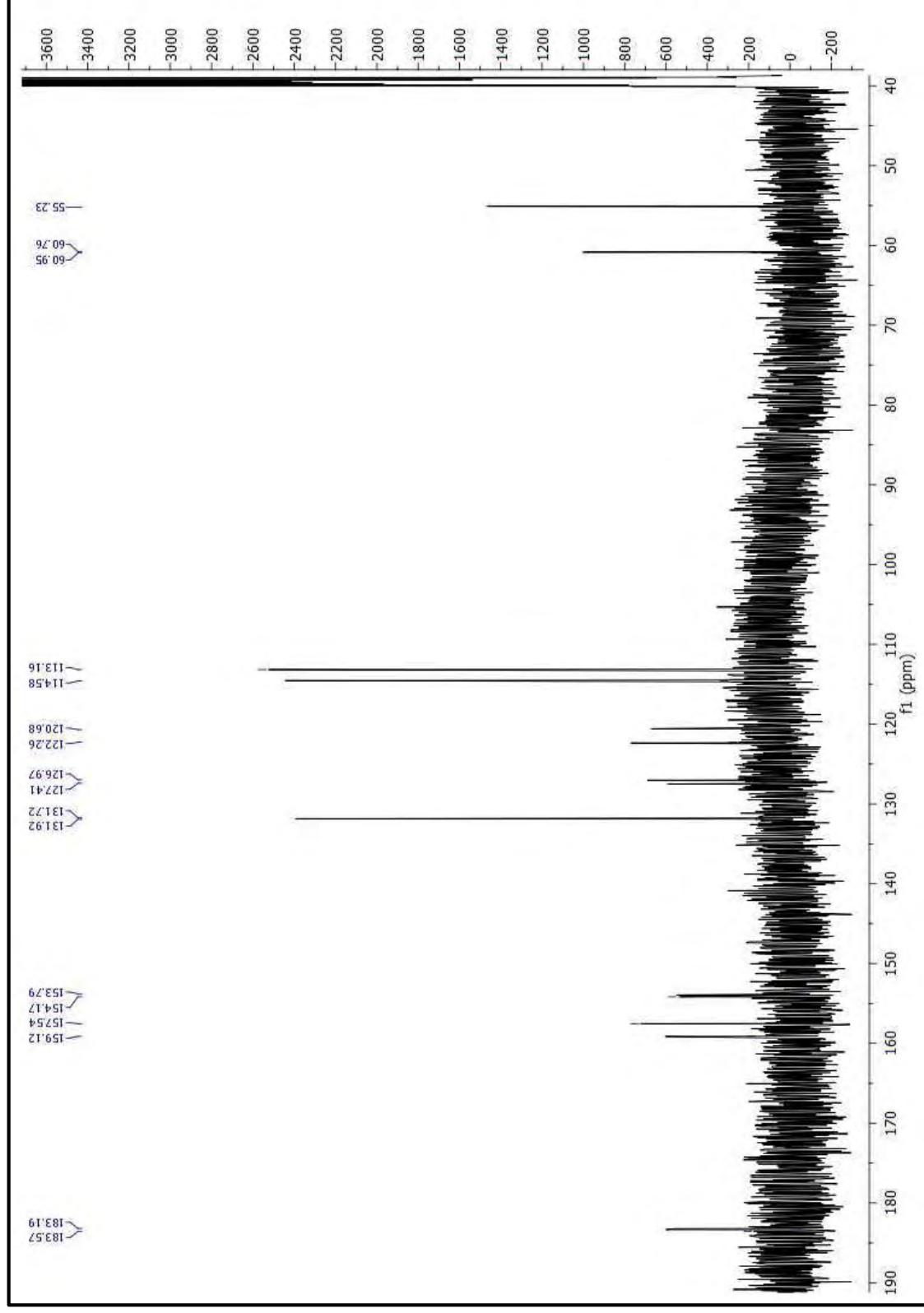
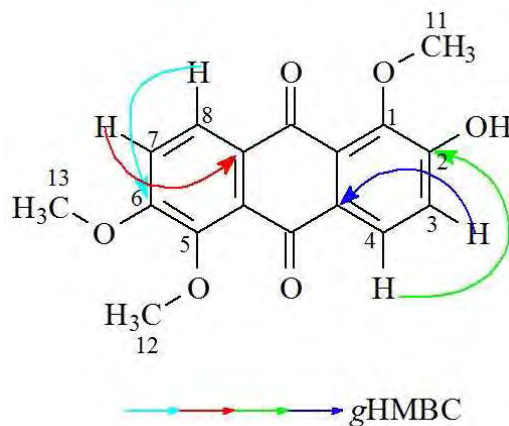


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (DMSO- d_6 , 500MHz).



A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_H 3,80 com o carbono em δ_{C-6} 159,2, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-13. (Figura 34 e 36)

Figura 34 - Principais correlações de gHMBC da substância 2.



Devido a proximidade dos sinais não foi possível atribuir valores para os hidrogênios 11 e 12 e para os carbonos 1 e 5; 4 e 8; 8^a e 10^a; 9 e 10; 11 e 12.

No experimento de NOESY 1D de 7 + 13 (Figura 35) observou-se a interação espacial da metoxila (δ 3,80) com o H-7 (δ 7,0), confirmando a posição desta em C-13.

Figura 35 – Espectro de gNOESY 1D de 7 + 13 irradiado em δ 3,80 (DMSO-d₆, 7,0T).

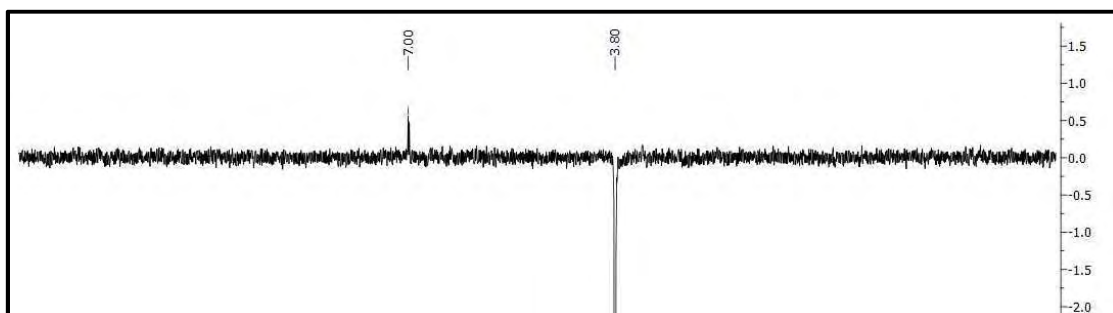
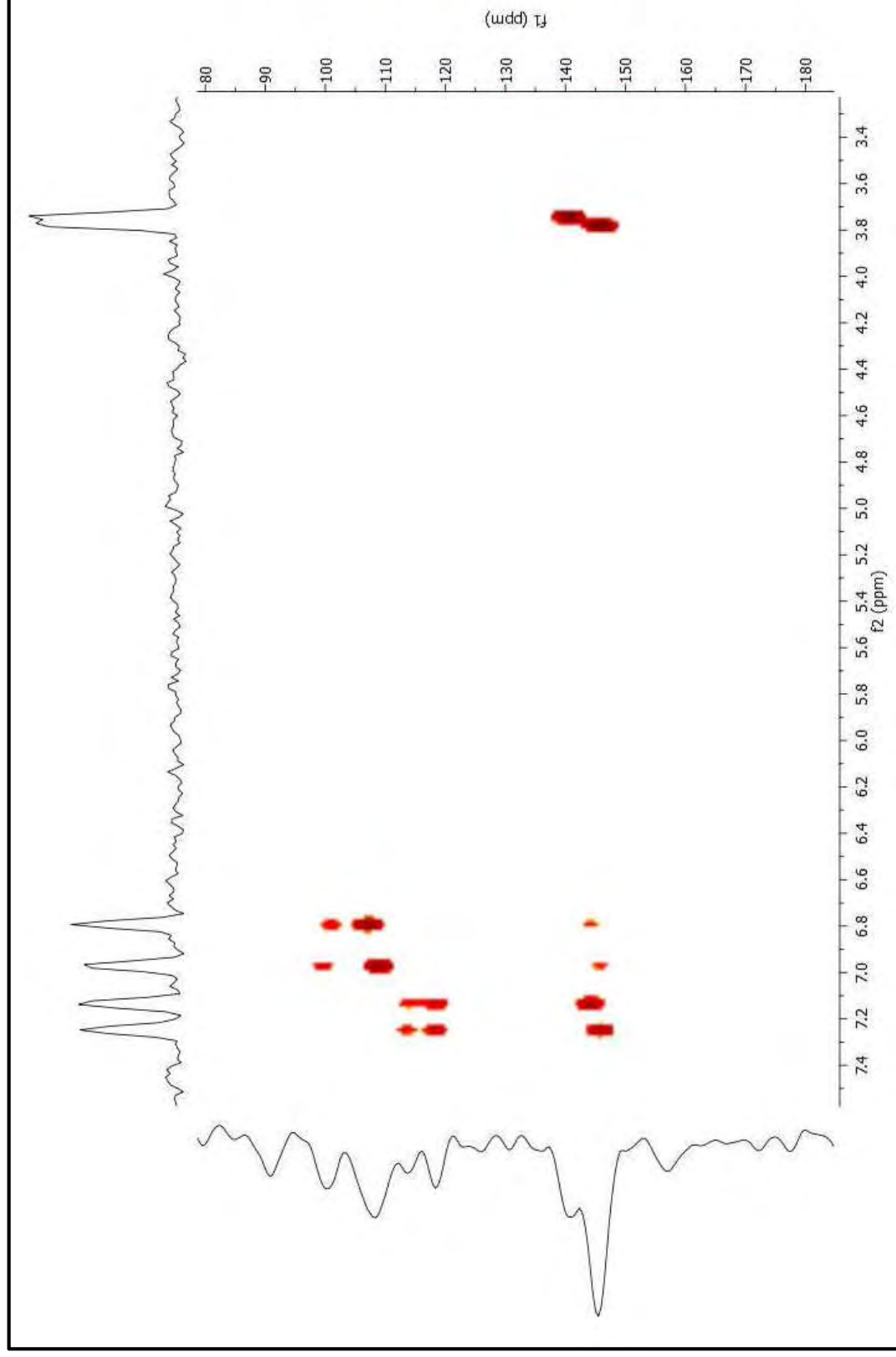


Figura 36 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 2 (DMSO-d₆, 500MHz).



Baseando-se nos dados espectroscópicos e nas correlações observadas foi proposto que a substância **2** é a antraquinona, 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona. Os valores atribuídos estão representados na Tabela 3.

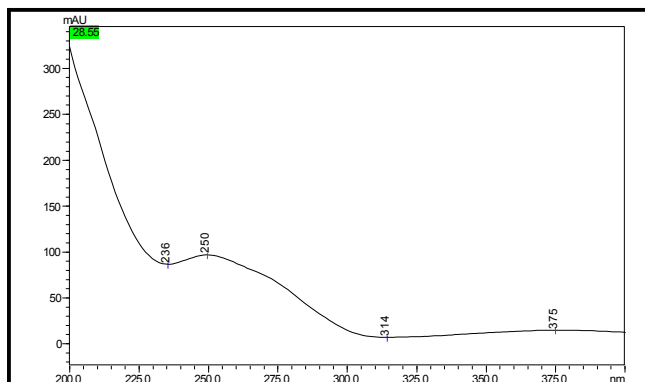
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 500MHz) de **2** (δ em ppm e J em Hz)

	^1H $\delta(\text{ppm})$	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	<i>COSY</i> $\delta(\text{ppm})$	<i>HMBC</i> $\delta(\text{ppm})$	<i>NOESY</i> $\delta(\text{ppm})$
1/5	-	153,9/154,2*			
2	-	157,5			
3	6,80	114,5	7,15	120,6	
4	7,15	131,8/131,9*	6,80	157,5	
4 ^a	-	120,6			
6	-	159,2			
7	7,00	113,2	7,25	122,4	
8	7,25	131,8/131,9*	7,00	159,2	
9 ^a /10 ^a	-	127,0/127,5*			
9/10	-	183,2/183,4*			
8 ^a	-	122,4			
11/12	3,74/3,76*	60,8/60,9*		153,9/154,2	
13	3,80	55,11		159,2	7,0

* Os valores marcados com asterisco não foram confirmados devido à proximidade dos sinais.

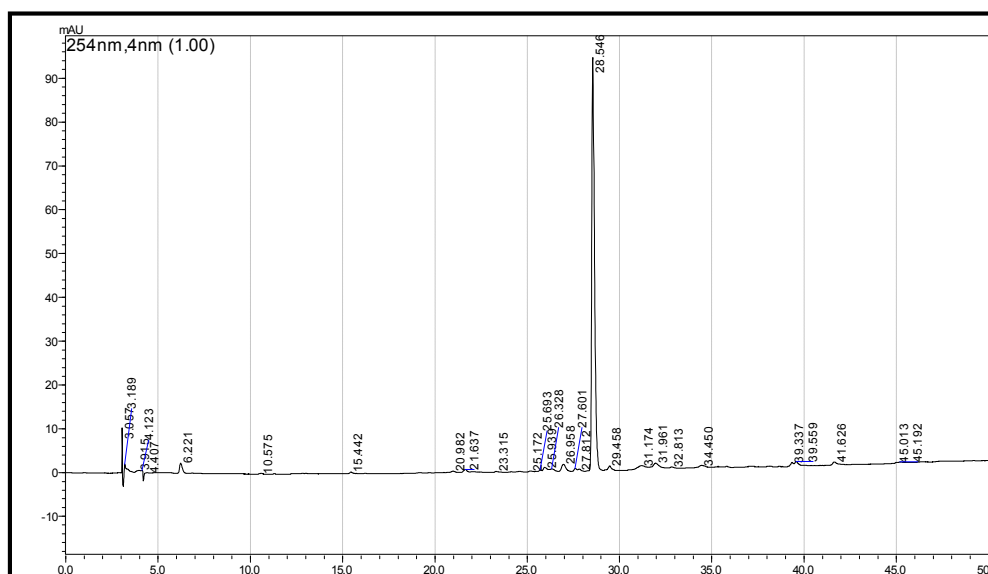
As curvas de UV da substância **2** (Figura 37) estão compatíveis com a estrutura de antraquinonas, apresentando bandas de absorção em 250 nm e 375nm.

Figura 37 - Espectro de ultravioleta da substância **2**.



O cromatograma em CLAE-DAD (Figura 38) mostrou o tempo de retenção da substância **2** em 28,5 min.

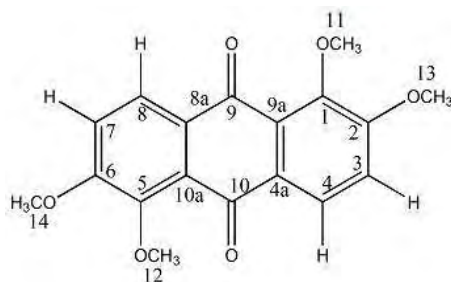
Figura 38 - Cromatograma em CLAE-DAD da substância 2.



4.3.3. Elucidação estrutural da substância 3

A substância 3, 1,2,5,6-tetrametoxi-9,10-antraquinona (Figura 39), foi isolada da fração F.

Figura 39 - Estrutura da substância 3, 1,2,5,6-tetrametoxi-9,10-antraquinona.



A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu detectar a presença de hidrogênios de metoxila em δ_{H} 3,77 (*sl*; δ_{C} 60,9), δ_{H} 3,80 (*sl*; δ_{C} 55,11); hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,0 (*d*; $J=8,5$ Hz) e em δ_{H} 7,27 (*d*; $J=9,0$ Hz), e de duas carbonilas em δ_{C} 183,2, que são sinais característicos de antraquinonas (Figura 40 e 41).

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (DMSO- d_6 , 500MHz).

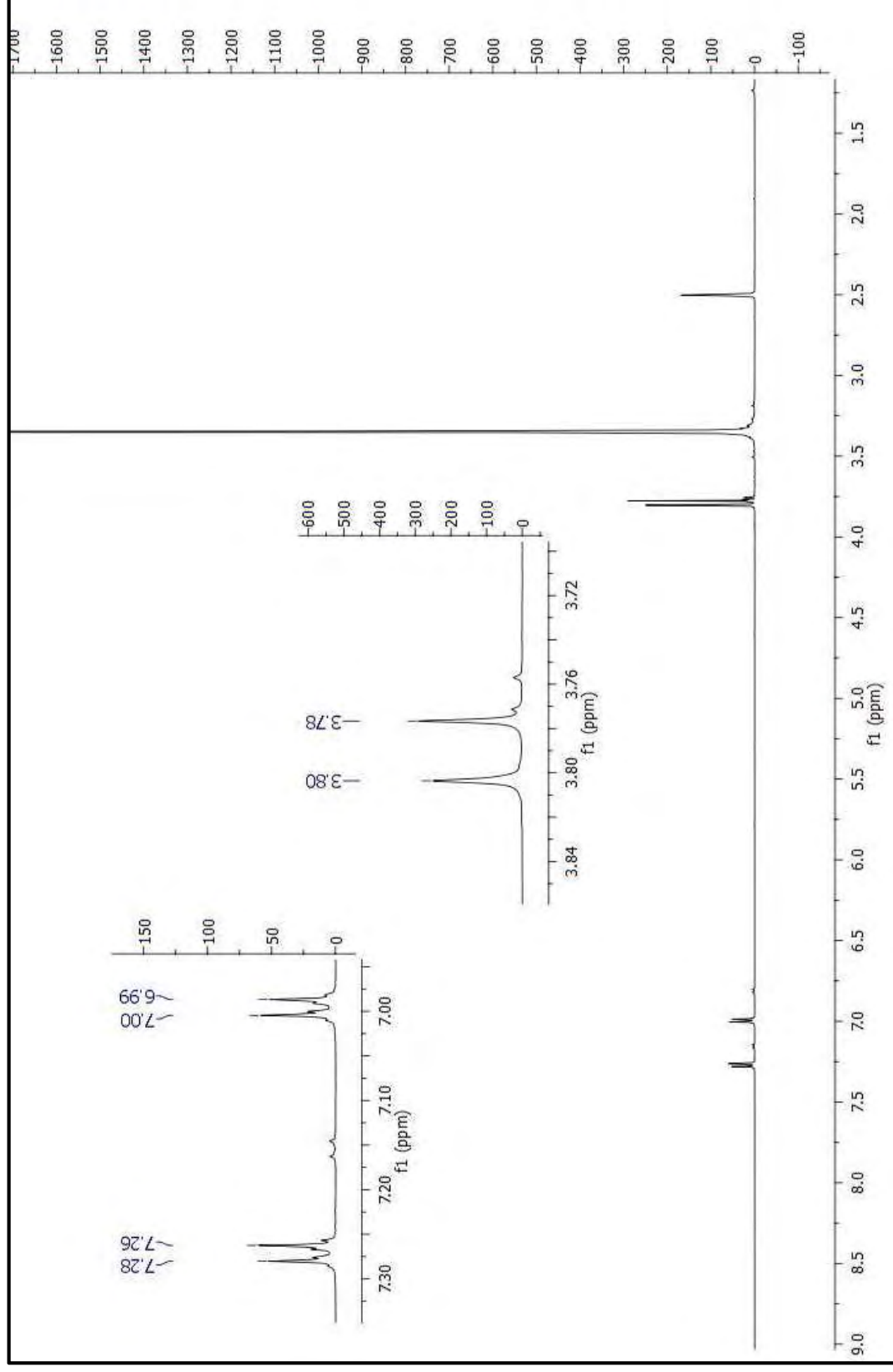
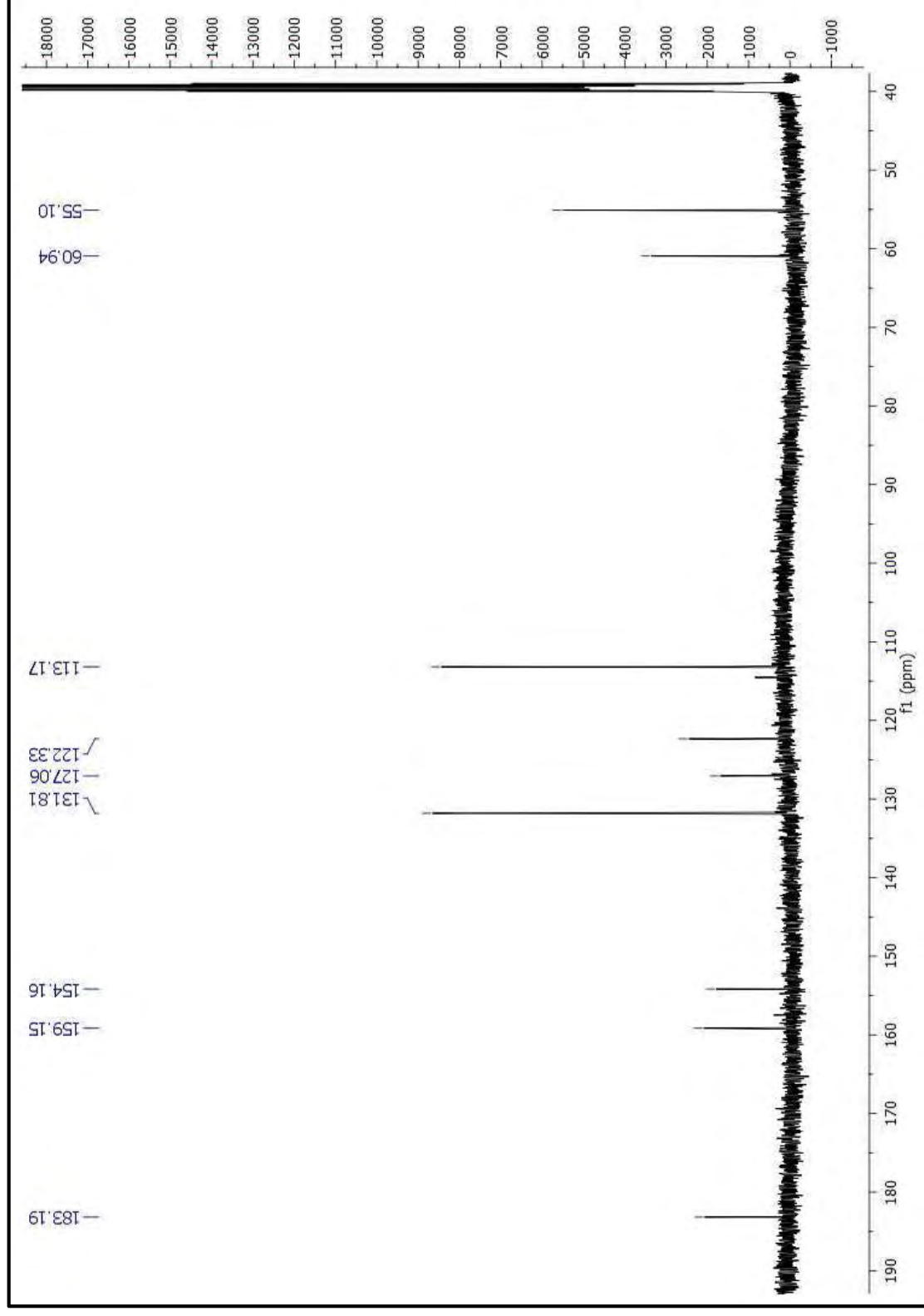


Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (DMSO- d_6 , 500MHz).



As correlações a longa distância observadas em gHMBC de δ_H 7,0 com os carbonos em $\delta_{C-4a, 8a}$ 122,3 e $\delta_{C-2, 6}$ 157,5, permitiram atribuir este deslocamento químico ao H-3 e H-7. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_H 7,27 com os carbonos em $\delta_{C-9a, 10a}$ 127,1 e $\delta_{C-2, 6}$ 159,2, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-4 e H-8. As correlações a longa distância observadas em gHMBC de δ_H 3,77 com os carbonos em $\delta_{C-1,5}$ 154,2, permitiram atribuir este deslocamento químico ao H-11 e H-12 pertencente à metoxila. A correlação a longa distância observada em gHMBC de δ_H 3,80 com os carbonos em $\delta_{C-13,14}$ 159,2, permitiu atribuir este deslocamento químico ao H-13 e H-14 (Figura 42 e 43)

Figura 42 - Principais correlações de gHMBC da substância 3.

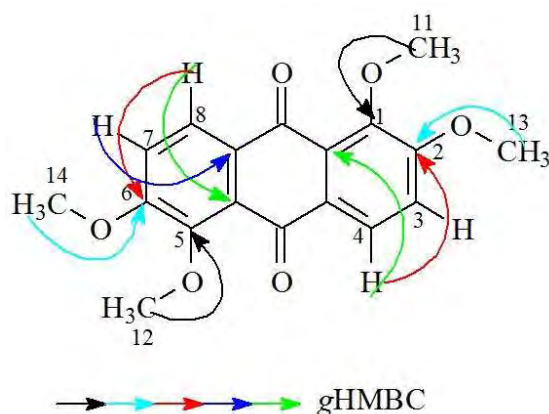
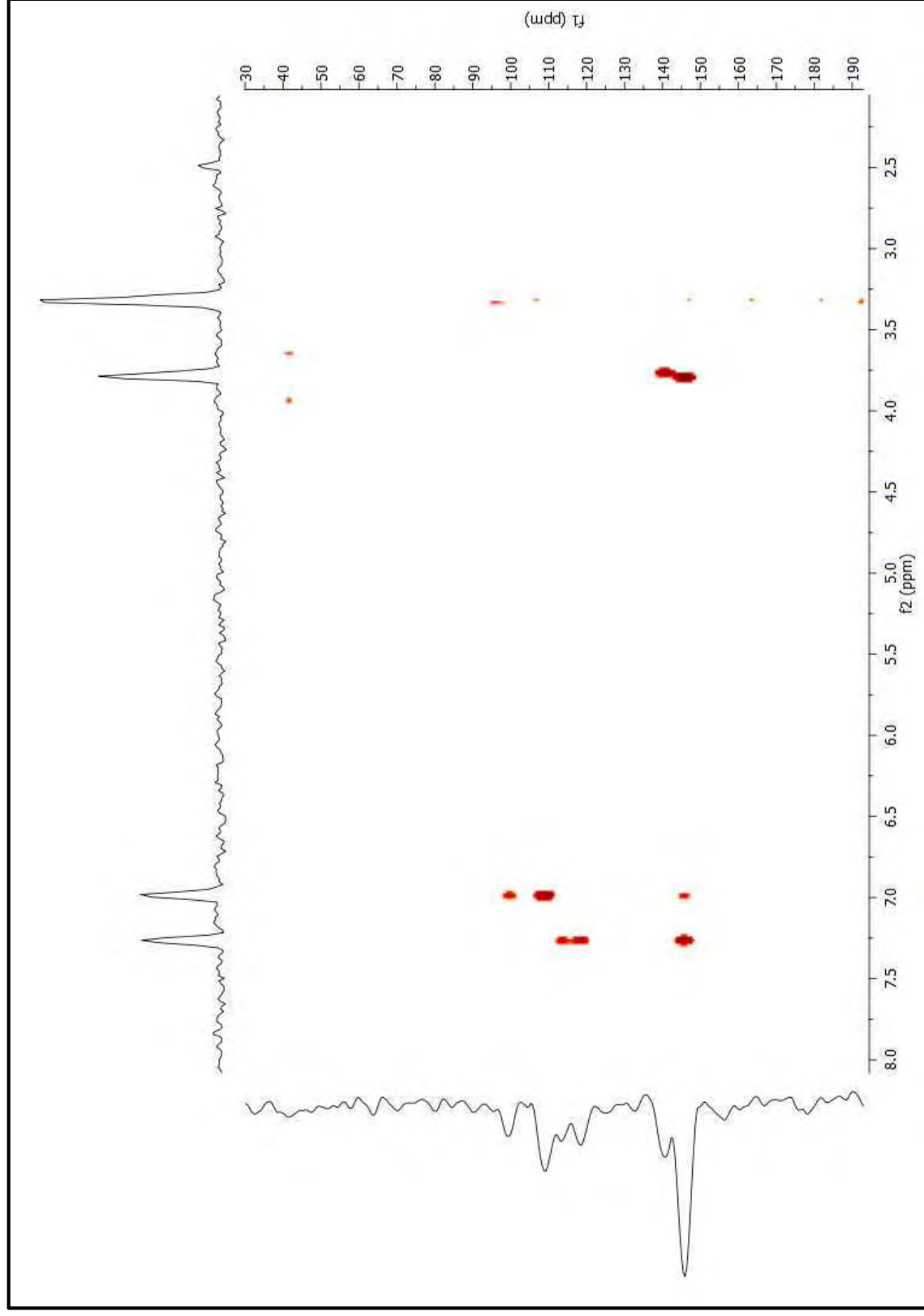
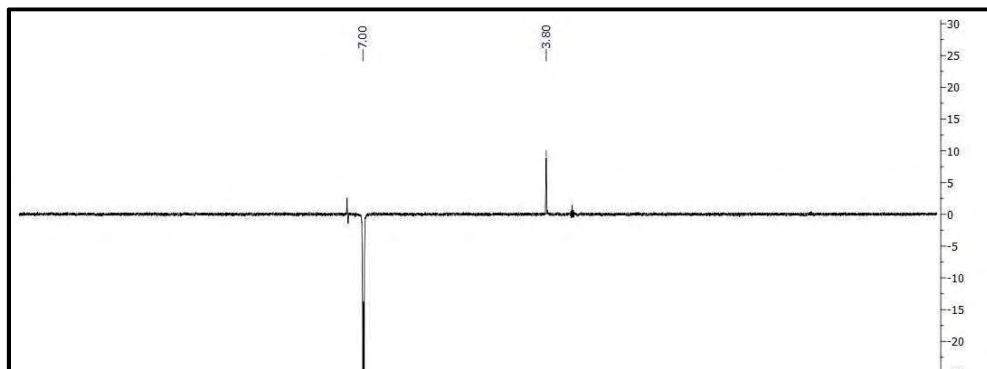


Figura 43 – Mapa de contorno de gHMBC da substância 3 (DMSO-d₆, 500MHz).



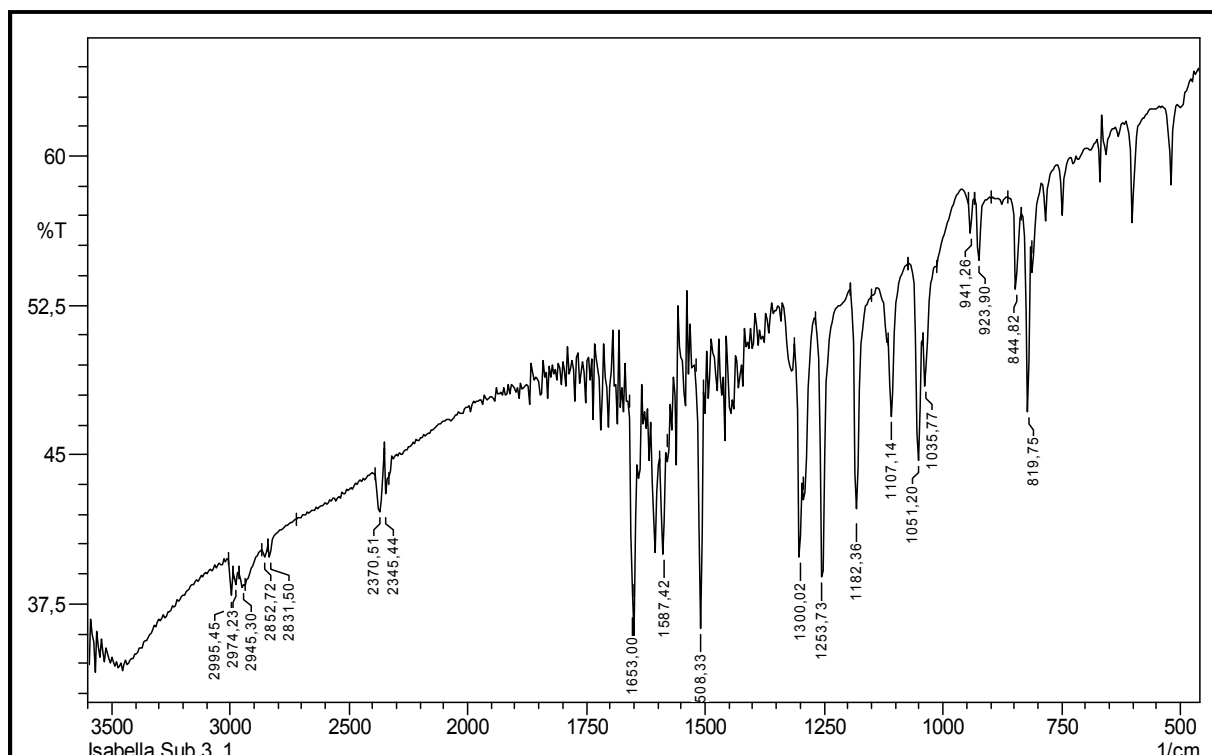
No experimento de NOESY 1D de 3 + 13 (Figura 34) observou-se a interação espacial da metoxila (δ 3,80) com o H-7 (δ 7,0), confirmando a posição desta em C-13 (Figura 44)

Figura 44 - Espectro de gNOESY 1D de 3 + 13 irradiado em δ 3,80 (DMSO- d_6 , 7,0T).



A análise do espectro de absorção na região do infravermelho da substância 3 confirma a ausência do grupo hidroxila e a presença da carbonila ($\square_{max}^{KBr}$: 1653) com sinal deslocado devido ao efeito de duplas conjugadas na estrutura da substância (Figura 45).

Figura 45 - Espectro de absorção no infravermelho da substância 3 (KBr).



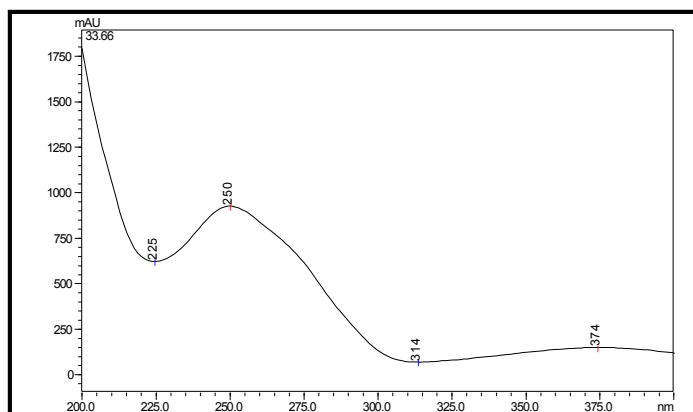
Baseando-se nos dados espectroscópicos e nas correlações observadas foi proposto que a substância **3** é uma antraquinona simétrica, 1,2,5,6-tetrametoxi-antraquinona. Os valores atribuídos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 500MHz) da subs. 3 (δ em ppm e J em Hz)

	^1H $\delta(\text{ppm})$	^{13}C $\delta(\text{ppm})$	HMBC(δ)	NOESY(δ)
1/5	-	154,2	-	
2/6	-	159,2	-	
3/7	7,0	113,2	122,3	
4/8	7,27	131,2	159,2; 127,1	
4 ^a /8 ^a	-	122,3		
9 ^a /10 ^a	-	127,1		
9/10	-	183,2		
11/12	3,77	60,95	154,2	
13/14	3,80	55,11	159,2	7,00

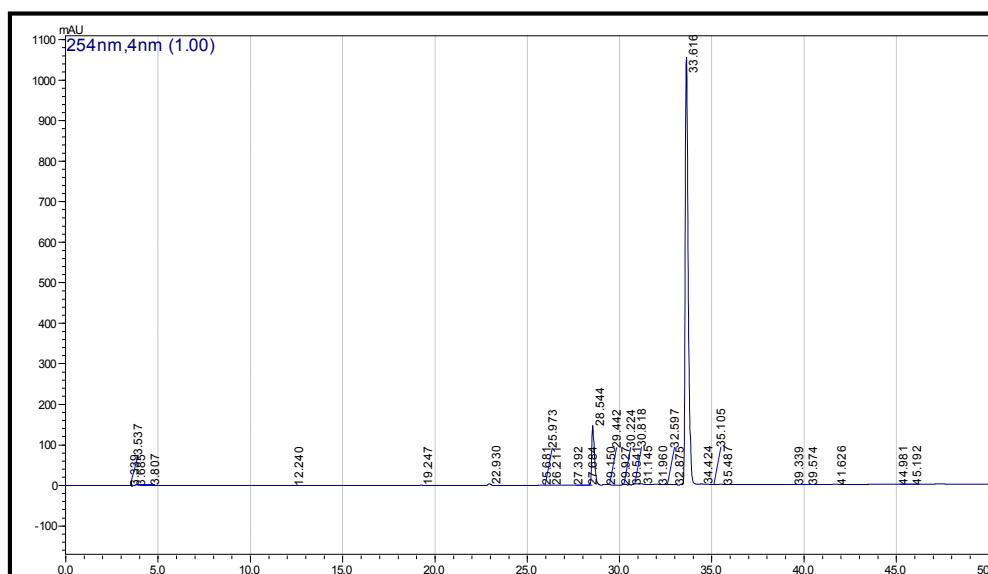
As curvas de UV da substância **3** (Figura 46) estão compatíveis com a estrutura de antraquinonas, apresentando bandas de absorção em 250 nm e 375 nm.

Figura 46 - Espectro de ultravioleta da substância **3**.



O cromatograma em CLAE-DAD (Figura 47) mostrou o tempo de retenção da substância **3** em 33,6 min.

Figura 47 - Cromatograma em CLAE-DAD da substância 3.



As substâncias **1** e **2** não possuem relatos na literatura, apresentam valores de sinais de carbonos característicos próximos aos valores de sinais de carbono de estruturas similares pertencentes à mesma classe de metabólitos secundários (MISHRA, 2010; TUNTIWACHWUTTIKUL, 2008). Robins e colaboradores isolaram da planta *Chinchona ledgeriana* a substância 3 da (ROBINS, 1986).

4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana para fungos: “Hole plate”

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica frente à patógenos humanos dos extratos brutos está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antifúngica dos extratos Dm-1, Dm-2 e Dm-3

Extrato brut	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>
	CIM* g/mL	CIM* µg/mL	CIM* µg/mL	CIM* µg/mL
Dm-1	250	250	>250	62,5
Dm-2	>250	>250	>250	125
Dm-3	125	>250	250	31,25

*Concentração mínima inibitória

O extrato do fungo Dm-3 foi o que apresentou melhor atividade frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*, o extrato do fungo Dm-2 não apresentou atividade antifúngica

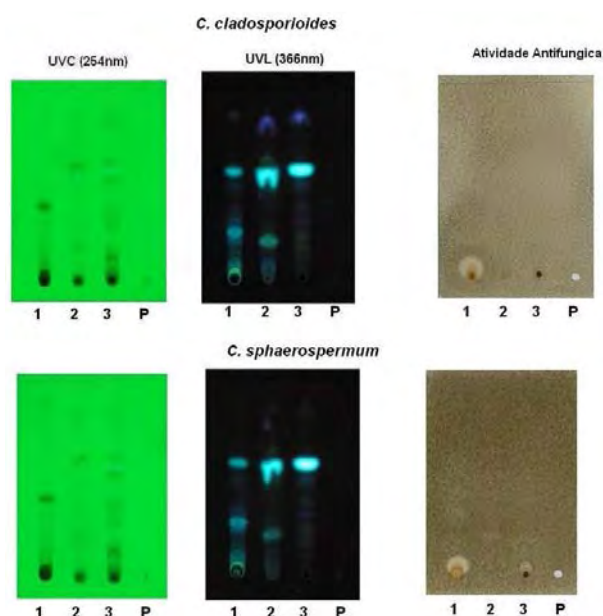
significativa e o extrato do fungo Dm-1 apresentou baixa atividade frente ao fungo *C. neoformans*. Os três extratos não apresentaram atividade antifúngica significativa frente aos fungos *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*.

O patógeno *Cryptococcus neoformans* é conhecido por causar meningite fúngica, principalmente em pacientes com sistema imonológico comprometido por doenças como a AIDS (CASALI, 2001).

4.5. Avaliação da atividade antifúngica frente à fitopatogenos

A detecção do potencial antifúngico por bioautografia em CCDC com nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* foi evidenciado pela inibição do crescimento dos fitopatógenos apenas para o extrato bruto do fungo Dm-1 e para o fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum* foi evidenciado inibição para o extrato bruto do fungo Dm-1 e Dm-3 (Figura 21).

Figura 48 - Avaliação do potencial dos extratos brutos contra *C. Cladosporioides* (a) e contra *C. sphaerospermum* (b).



Legenda: 1 – Dm-1; 2 – Dm-2; 3 – Dm-3; P – padrão (nistatina 5µg)

4.6. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A atividade citotóxica da substância 1 está apresentada na Tabela 6 com os respectivos percentuais de inibição. Somente substâncias que apresentam valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 6 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) da substância 1 em três linhagens tumorais testados. Valores são média $\pm$ DPM.

Substância	SF-295	SD	OVCAR	SD	HCT-116	SD
	GI%		GI%		GI%	
1	(média)		(média)		(média)	
	-209,69%	24,89%	-12,00%	22,27%	22,47%	27,47%

A substância 1 não apresentou potencial citotóxico frente ao ensaio realizado.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

5. CONCLUSÃO

O trabalho realizado com o endófito *Hypoxylon sp.* isolado da alga vermelha *Dichotomaria marginata* permitiu a avaliação da potencialidade do extrato bruto em pequena escala na produção de metabólitos secundários. O meio de cultivo sólido utilizado (arroz) apresentou uma produção metabólica rica e com um perfil químico promissor analisado em CLAE-DAD e RMN de ^1H .

Os consecutivos fracionamentos cromatográficos do extrato bruto conduziram ao isolamento de três substâncias puras como a 1,5-dimetoxi-2,6-dihidroxi-antraquinona (**1**), 1,5,6-trimetoxi-2-hidroxi-antraquinona (**2**) e 1,2,5,6-tetametoxi-antraquinona (**3**). Sendo este o primeiro relato de identificação e isolamento de antraquinonas em fungo endofítico do gênero *Hypoxylon*.

O extrato bruto do fungo Dm-3 apresentou atividade antifúngica moderada contra o fungo patógeno humano *C. neoformans* e baixa atividade contra o fitopatógeno *C. sphaerospermum* indicando uma possível interação entre o microrganismo e a alga hospedeira. A substância **1** não apresentou atividade citotóxica frente às linhagens tumorais OVAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano).

Estes resultados reforçam a importância do estudo de microrganismos como fonte de metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS

- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, n. 4, p. 14-19, Feb. 1996.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Report**, v. 29, n. 24, p.144-222, Nov. 2012.
- CASALI, A. K.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 34-37, maio 2001.
- CHEN, Y.; CAI, X.; PAN, J.; GAO, J.; LI, J.; YUAN, J.; FU, L.; SHE, Z.; LIN, Y. Structure elucidation and NMR assignments for three anthraquinone derivatives from the marine fungus *Fusarium* sp. (No. ZH-210). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 362-365, Nov. 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, abr. 2009.
- GU, W.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; DING, H.; ZHU, H. L.; ZHAO, X. A.; TAN, R. X. Cytotoxic benzo[j]fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an Endophyte of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 114-117, Aug. 2007.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase World-wide electronic publication**. Galway, 2011. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 26 set. 2011.
- GUNATILAKA, L. A. A. Natural products from plants-associated microorganisms: distribution, structural, diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, Nov. 2006.
- HOMANS, A. L.; FUCHS, A. J. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, May 1970.
- LÆSSØE, T.; SRIKITIKULCHAI, P.; FOURNIER, J.; KÖPCKE, B.; STADLER, M. Lepranic acid derivatives as chemotaxonomic markers in *Hypoxylon aeruginosum*, *Chlorostroma subcubisporum* and *C. cyaninum*, sp. nov. **Fungal Biology**, v. 114, p. 481-489, Mar. 2010.
- LEE, Y. P.; LEE, I. K. Notes on Galaxaura (Rhodophyta) from Cheju Island, Korea. **Journal of Phycology**, v. 4, p. 1-9, May 1989.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo: Artimed, 2010. 1160 p.

MISHRA, B. B.; KISHORE, N.; TIWARI, V. K.; SINGH, D. D.; TRIPATHI, V. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family Rutaceae). **Fitoterapia**, v. 81, p. 104-107, Aug. 2010.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, n. 65, p. 55-63, July 1983.

MURPHY, B. T.; NARENDER, T.; KAUFFMAN, C. A.; WOOLERY, M.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Saliquinones A-F, new members of the highly cytotoxic antraquinone- γ -pyrones from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, p. 929-934, May 2010.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; TANAKA, M.; STADLER, M.; ASAKAWA, Y. Cyclic azaphilones daldinins E and F from the ascomycete fungus *Hypoxylon fuscum* (Xylariaceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 469-473, Dec. 2004.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; STADLER, M.; RADULOVIC, N.; ASAKAWA, Y. Antimicrobial azaphilones from the fungus *Hypoxylon multifforme*. **Planta Medica** v. 71, p. 1058-1062, Apr. 2005a.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; NOMURA, Y.; WOLLWEBER, H.; HELLWIG, V.; FOURNIER, J.; STADLER, M. Coharins A and B, azaphilones from the fungus *Hypoxylon cohaerens*, and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 797-809, Jan. 2005b.

RAVEENDRAN, V. V.; VIJAYAN, F. P.; PADIKKALA, J. Antitumor activities of an anthraquinone fraction isolated from *in vitro* cultures of *Ophiorrhiza rugosa* var *decumbens*. **Integrative Cancer Therapies**, v. 20, n. 10, p. 120-128, June 2011.

ROBINS, R. J.; PAYNE, J.; RHODES, M. J. C. The production of anthraquinones by cell suspension cultures of *Chinchona ledgeriana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2327-2334, Jan. 1986.

ROZAS, E.; FREITAS, J. C. Anti-inflammatory activity of the apolar extract from the seaweed *Galaxaura marginata* (Rhodophyta, Nemaliales). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 544-548, May 2007.

SCHLINGMANN, G.; MILNE, L.; CARTER, G. T. Isolation and identification of antifungal polyesters from the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. **Tetrahedron**, v. 58, p. 6825-6835, July 2002.

SHEU, J. H.; HUANG, S. Y.; WANG, G. H.; DUH, C. Y. Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 900-903, Mar. 1997.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer - drug screening. **Journal of Natural Cancer Institute**, n. 82, v. 13, p. 1107-1112, Dec. 1990.

TOMSHECK, A. R.; STROBEL, G. A.; BOOTH, E.; GEARY, B.; SPAKOWIEZ, D.; KNIGHTON, B.; FLOERCHINGER, C.; SEARS, J.; LIARZI, O.; EZRA, D. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 903-914, Oct. 2010.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; BUTSURI, Y.; SUKKOET, P.; PRAWAT, U.; TAYLOR, W. C. Antraquinones from the roots of *Prismatomeris malayana*l. **Natural Product Research**, v. 22, n. 11, p. 962-968, July 2008.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, jul. 2004.

XEU, C. M.; TIAN, L.; LIN, W. H.; DENG, Z. W. Antrquinone derivatives from *Micromonospora rhodorangea*. **Natural Product Research**, v. 26, n. 6, p. 533-538, Oct. 2009.