



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-

UNESP



Programa de Pós-Graduação em Química- PPGQ

Camila Souza Santos

**Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos
Microascus sp. e *Nodulisporium* sp. associados à alga
vermelha *Asparagopsis Taxiformis***

Araraquara-SP, Março de 2016

Camila Souza Santos

**Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos
Microascus sp. e *Nodulisporium* sp. associados à alga
vermelha *Asparagopsis Taxiformis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara-SP, Março de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S237e Santos, Camila Souza
Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos
Microascus sp. e *Nodulisporium* sp. associados à alga
vermelha *Asparagopsis Taxiformis* / Camila Souza Santos –
Araraquara : [s.n], 2016
143 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Alga marinha. 3. Metabólitos.
4. Produtos naturais. 5. Análise cromatografica. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Camila Souza Santos

Filiação: Otacílio Nery dos Santos e Luci Ramos de Souza Santos

Nascimento: 12/03/1991 - Ibirataia-Ba-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: cssantos12@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2010-2014

Graduação: Bacharel em Química

Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- Campus Jéquié Jéquié-Ba.

2014-2016

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 dos Fungos Endofíticos *Microascus* sp. e *Nodulisporium* sp. Associados à Alga Vermelha *Asparagopsis Taxiformis*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Livros e capítulos de livro:

Camila Souza Santos.; Dennis Russowsky.; Comprehensive Organic Chemistry Experiments of the Laboratory Classroom, RSC Eds, 2015.

Trabalhos ou resumos em eventos científicos:

JAMILLE SANTOS DOS REIS.; CAMILA SOUZA SANTOS.; JAYCE GABRIELLE TELES DA SILVA LEITE.; VANDERLÚCIA FONSECA DE PAULA. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO CAULE E DAS CASCAS DO CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (RUTACEAE). IV Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco–PLAMEVASF. Juazeiro-BA, 2013.

CAMILA SOUZA SANTOS.;JAMILLE SANTOS DOS REIS.; VANDERLÚCIA FONSECA DE PAULA.ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES NO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *ZANTHOXYLUM RHOIFOLIUM* LAM. (RUTACEAE). In: 65ª Reunião Anual da SBPC, Recife, 2013.

CAMILA SOUZA SANTOS.;JAMILLE SANTOS DOS REIS.; VANDERLÚCIA FONSECA DE PAULA.Constituintes químicos isolados da casca do caule de *Zanthoxylum petiolare* (RUTACEAE). XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Bento Gonçalves-RS, 2012.

Atividades extracurriculares:

Iniciação Científica: Prospecção química de espécies do gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae) e avaliação de suas propriedades farmacológicas. Bolsista da PIBIC/CNPq. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vanderlúcia Fonseca de Paula, 2012-2014.

Estágio em síntese orgânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

Monitoria: Química Orgânica II. (Carga horária: 192h). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Brasil.

Monitoria: Química Geral experimental I. (Carga horária: 192h). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Brasil.

CAMILA SOUZA SANTOS

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

Araraquara, 14 de março de 2016.

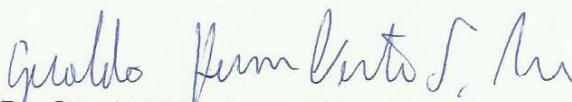
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva
Universidade Federal de Viçosa / UFV / Rio Paranaíba - MG

RESUMO

O presente trabalho apresenta os resultados obtidos sobre o estudo químico e biológico dos fungos endolíticos *Nodulisporium* sp. e *Microascus* sp. associados à alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*. Para tanto, fez-se uso das técnicas cromatográficas de separação CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), CG-EM (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) e cromatografia em coluna (CC), além da avaliação dos potenciais antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico dos extratos brutos, frações e subfrações de *Nodulisporium* sp. e *Microascus* sp. O estudo químico levou ao isolamento de quatro substâncias pertencentes à classe das diidroisocumarinas (substâncias **S1**, **S2**, **S10** e **S11**), duas dicetopiperazinas (substâncias **S3** e **S4**), um composto fenólico (**S12**), uma isoflavona (**S8**), um derivado hidroxiimino (**S9**), uma mistura contendo uma amida (**S5**) e um diol vicinal (**S6**), além do isolamento de um composto aromático (substância **S7**), ainda em fase de identificação. As estruturas das substâncias isoladas foram identificadas com base nos dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , TOCSY-1D, HSQC, HMBC, COSY e HSQC-TOCSY), UV-Vis e espectrometria de massas (EM). Comporta ressaltar que o diol vicinal (**S6**) está sendo descrito pela primeira vez na literatura e que as demais substâncias isoladas não haviam sido relatadas para os gêneros *Nodulisporium* ou *Microascus*. A avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica evidenciaram o potencial de bioatividade de extratos e frações de *Nodulisporium* sp. e *Microascus* sp, sendo reveladas atividades forte e moderada frente às enzimas acetilcolinesterase humana e de enguia elétrica. Este é o primeiro estudo químico e biológico relatado na literatura para os endófitos *Nodulisporium* sp. e *Microascus* sp. associados à alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* e seus resultados promissores destacam a elevada quimiodiversidade dos extratos e frações dos fungos endofíticos obtidos do ambiente marinho, bem como seu potencial de bioatividade. Evidenciam ainda a importância de se aprofundar os estudos destas linhagens fúngicas visando contribuições relevantes na busca de protótipos para novos agentes terapêuticos através da exploração sustentável da biodiversidade marinha brasileira.

Palavras-chave: fungo endofítico, alga marinha, *Nodulisporium*, *Microascus*, *Asparagopsis taxiformis*, anticolinesterase, antifúngico.

ABSTRACT

This work presents results from the chemical and biological study of endophytic fungal strains of *Nodulisporium* sp and *Microascus* sp associated to the red alga *Asparagopsis taxiformis*. Chromatographic separation techniques as HPLC, GC-MS and CC have been used in addition to bioassays for evaluation of the antifungal, anticholinesterasic and cytotoxic potential of crude extracts, fractions and subfractions of *Nodulisporium* sp and *Microascus* sp fungal strains. The chemical study led to the isolation of four dihydroisocoumarins (compounds **S1**, **S2**, **S10** and **S11**), two diketopiperazines (compounds **S3** and **S4**), one phenolic compound (**S12**), one isoflavone (**S8**), one hydroxyl-imino derivative (**S9**), a mixture containing one amide (**S5**) and one novel vicinal diol (**S6**), in addition to one aromatic compound (compounds **S7**) still under structural investigation. Their structures were identified based on 1D and 2D NMR spectroscopic data (^1H and ^{13}C NMR, TOCSY-1D, HSQC, HMBC, COSY and HSQC-TOCSY), UV-Vis and mass spectrometry (MS). Compound **S6** is an aliphatic vicinal diol and is herein described as a novel compound whereas the remaining compounds had not been described before neither for *Nodulisporium* nor *Microascus* genera. Antifungal and anticholinesterase activities evaluation of extracts and fractions of *Nodulisporium* sp e *Microascus* sp evidenced their strong and moderate potential against human and electric eel acetylcholinesterase enzymes. This is the first report on the chemical and biological studies of endophytic fungi *Nodulisporium* sp and *Microascus* sp, associated to the red algae *Asparagopsis taxiformis*. Their promising results highlight the outstanding chemodiversity of extracts and fractions from such fungal strains from marine environment as well as their bioactivity potential. They also evidence the importance of further investigating such fungal strains aiming at relevant contributions in the search for novel therapeutic agents through sustainable exploration of Brazilian marine biodiversity.

Keywords: endophytic fungi, marine algae, *Nodulisporium*, *Microascus*, *Asparagopsis taxiformis*, anticholinesterase, antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação taxinômica de <i>Nodulisporium</i> sp.....	27
Figura 2- Substâncias isoladas de endófitos pertencentes ao gênero <i>Nodulisporium</i> sp.....	28
Figura 3- Classificação taxinômica de <i>Microascus</i> sp.....	29
Figura 4- Substâncias isoladas de endófitos pertencentes ao gênero <i>Microascus</i> sp.	30
Figura 5- Obtenção das sete linhagens de fungos endofíticos associados à <i>Asparagopsis taxiformis</i>	34
Figura 6- Etapas para obtenção dos extratos brutos de cada linhagem fúngica.....	35
Figura 7- Biorreator (A) e estocagem do biorreator (B).....	40
Figura 8- Cromatograma do extrato AT02 (superior) e do branco (inferior). Gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ -254nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å).....	43
Figura 9- Espectro de RMN de ¹ H do extrato AT02 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)...	44
Figura 10- Cromatograma da fração AT02-3 (gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ -254nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) e espectros de UV-Vis dos picos principais.....	45
Figura 11- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S1	47
Figura 12- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S1	48
Figura 13- Espectro de RMN de ¹ H da substância S1 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	97
Figura 14- Espectro de RMN de ¹³ C da substância S1 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 150 MHz).....	98
Figura 15- Mapa de contorno de HSQC da substância S1 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	99
Figura 16- Espectro de RMN de ¹ H da substância S2 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	50

Figura 17- Espectro de RMN de ^1H da substância S3 ($\text{CHCl}_3\text{-}d$, 300 MHz).....	100
Figura 18- Espectro de RMN de ^{13}C da substância S3 ($\text{CHCl}_3\text{-}d$, 75 MHz).....	101
Figura 19- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S3	52
Figura 20- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S3	53
Figura 21- Mapa de contorno de HSQC da substância S3 ($\text{CHCl}_3\text{-}d$, 300 MHz)	102
Figura 22- Espectro de RMN de ^1H da substância S4 ($\text{MeOH-}d_4$, 300 MHz).....	103
Figura 23- Espectro de RMN de ^{13}C da substância S4 ($\text{MeOH-}d_4$, 75 MHz).....	104
Figura 24- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S4	55
Figura 25- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S4	56
Figura 26- Mapa de contorno de HSQC da substância S4 ($\text{MeOH-}d_4$, 300 MHz).....	105
Figura 27- Espectro de RMN de ^1H da substância S4 ($\text{CHCl}_3\text{-}d$, 300 MHz).....	106
Figura 28- Espectro de RMN de ^1H da mistura contendo as substâncias S5 e S6 ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).....	107
Figura 29- Espectros de TOCSY-1D com irradiações seletivas em δ_{H} 2,78 e 3,38 referentes a substância S5 ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).....	57
Figura 30- Espectro de RMN de ^{13}C da mistura contendo as substâncias S5 e S6 ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz).....	108
Figura 31- Correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC  e COSY 	59
Figura 32- Valores de J referentes aos sinais para hidrogênios em 5,06 e 5,19 ppm.....	60
Figura 33- Valores de J referentes aos sinais para hidrogênios em 6,37 e	

6,27 ppm.....	61
Figura 34- Valores de <i>J</i> referentes ao sinal para hidrogênio em 5,76 ppm.....	62
Figura 35- Espectros de TOCSY-1D com irradiações em δ_H 5,06 e 5,19 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	109
Figura 36- Proposta estrutural parcial para a unidade I da substância S6	62
Figura 37- Espectros de TOCSY-1D com irradiações em δ_H 1,71 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	110
Figura 38- Valores de <i>J</i> referentes ao sinal para hidrogênio em 1,71 ppm.....	63
Figura 39- Valores de <i>J</i> referentes ao sinal para hidrogênio em 5,71 ppm.....	64
Figura 40- Valores de <i>J</i> referentes ao sinal para hidrogênio em 5,52 ppm.....	64
Figura 41- Proposta estrutural parcial para a unidade II da substância S6	65
Figura 42- Espectros de TOCSY-1D com irradiações em δ_H 4,00 e 3,95 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	111
Figura 43- Espectro de RMN de ¹ H da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	112
Figura 44- Proposta estrutural para a substância S6	65
Figura 45- Mapa de contorno de COSY da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	113
Figura 46- Mapa de contorno de HSQC da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	114
Figura 47- Mapa de contorno de HMBC da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)-Ampliação da região 1,6-4,3 ppm.....	115
Figura 48- Mapa de contorno de HMBC da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)- Ampliação da região 5,1-7,5 ppm.....	116
Figura 49- Mapa de contorno de HSQC-TOCSY da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	117
Figura 50- Estruturas dos Separacenos A-D.....	66

Figura 51- Espectro de massas da substância S7	118
Figura 52- Espectro de RMN de ^1H da substância S7 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	119
Figura 53- Mapa de contorno de COSY da substância S7 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	120
Figura 54- Mapa de contorno de HSQC da substância S7 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	121
Figura 55- Mapa de contorno de HMBC da substância S7 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	122
Figura 56- Espectro de massas da substância S8	123
Figura 57- Cromatograma da substância S8 e espectro de UV-Vis. Gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ -254 nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 μm ; 110Å).....	67
Figura 58- Espectro de RMN de ^1H da substância S8 (DMSO- d_6 , 600 MHz). Ampliação da região δ_{H} 6,7-9,8 ppm.....	124
Figura 59- Mapa de contorno de HSQC da Substância S8 (DMSO- d_6 , 600 MHz). Ampliação da região δ_{H} 6,1-8,7 ppm.....	125
Figura 60- Mapa de contorno de HMBC da substância S8 (DMSO- d_6 , 600 MHz). Ampliação da região δ_{H} 6,6-9,8 ppm.....	126
Figura 61- Espectro de RMN de ^1H da substância S8 (DMSO- d_6 , 600 MHz). Ampliação da região δ_{H} 5,2-10,2 ppm. Isolada de <i>Microascus</i> sp.....	127
Figura 62- Espectro de RMN de ^{13}C da Substância S8 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Isolada de <i>Microascus</i> sp.....	128
Figura 63- Cromatograma do terceiro sólido precipitado (Gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ -254nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 μm ; 110Å) e espectros de UV-Vis do pico principal.....	70
Figura 64- Espectro de RMN de ^1H da inosina (MeOH- d_4 , 600 MHz).....	71
Figura 65- Cromatogramas obtidos por CG-EM do meio de cultivo PDB (A) e AT04Mar (B).....	129
Figura 66- Cromatogramas obtidos por CG-EM da F.A.AT04MQ (A) e do meio de cultivo PDB (B).....	130

Figura 67- Espectro de RMN de ^1H da Substância S9 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	131
Figura 68- Espectro de RMN de ^{13}C da Substância S9 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	132
Figura 69- Mapa de contorno de HSQC da substância S9 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	133
Figura 70- Mapa de contorno de COSY da substância S9 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	134
Figura 71- Espectro de massas da substância S9	135
Figura 72- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S9	74
Figura 73- Espectro de RMN de ^1H da substância S10 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	136
Figura 74- Espectro de RMN de ^{13}C da substância S10 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	137
Figura 75- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S10	76
Figura 76- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S10	77
Figura 77- Mapa de contorno de HSQC da substância S10 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	138
Figura 78- Espectro de RMN de ^1H da substância S11 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	139
Figura 79- Espectro de RMN de ^{13}C da substância S11 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	140
Figura 80- Mapa de contorno de HSQC da substância S11 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	141
Figura 81- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S11	79
Figura 82- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S11	80
Figura 83- Biossíntese das diidroisocumarinas derivadas da meleína.....	81
Figura 84- Espectro de RMN de ^1H da substância S12 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	

MHz).....	142
Figura 85- Espectro de RMN de ^{13}C da substância S12 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	143
Figura 86- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância S12	82
Figura 87- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S12	83
Figura 88- Mapa de contorno de HSQC da substância S12 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	144
Figura 89- Representação da catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.....	85
Figura 90- Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChEe na presença do inibidor padrão a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Preparo das soluções estoque.....	40
Tabela 2- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S1	46
Tabela 3- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) para a substância S2	49
Tabela 4- Dados de RMN de ^1H (CHCl $_3$ - d , 300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para a substância S3	51
Tabela 5- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para a substância S4	54
Tabela 6- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S5	58
Tabela 7- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S6	66
Tabela 8- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S8	69
Tabela 9- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S9	73
Tabela 10- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S10	75
Tabela 11- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S11	78
Tabela 12- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância S12	82
Tabela 13- Atividade antifúngica dos extratos, AT04Mar, AT02 e suas frações obtidas por bioautografia em CCD [#]	84
Tabela 14- Atividade citotóxica dos extratos AT04Mar, AT02 e suas frações.....	85
Tabela 15- Atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e substâncias purificadas dos fungos <i>Nodulisporium</i> sp. e <i>Microascus</i> sp.....	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Fracionamento do extrato AT02 por CC (fase reversa C18).....36

Esquema 2- Fracionamento do extrato AT04Mar por CC (fase reversa C18).....37

Esquema 3- Fracionamento do extrato AT04MQ por CC (sílica-gel).....37

Esquema 4- Purificação da substância **S7** por CC (sílica gel).....38

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
ICERs	Biorreatores
COSY	Correlation Spectroscopy
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CC	Cromatografia em Coluna
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AChE-ee	Enzima Acetilcolinesterase de Enguia Elétrica
AChE-hu	Enzima Acetilcolinesterase Humana
EM	Espectrometria de Massas
ESI-EM	Espectrometria de Massas – Ionização por Electrospray
Phe	Fenilalanina
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Leu	Leucina
HCT-116	Linhagem de Célula Tumoral de Cólon Humano
MCF-7	Linhagem de Célula Tumoral de Mama Humana
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
MBD	Meio de Batata e Dextrose
min.	Minutos
nm	Nanômetro
PDA	Potato-Dextrose-Agar
Pro	Prolina
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
C18	Sílica Gel de Fase Reversa Tipo Octadecil Silano
TOF	Time of Flight (Tempo de Vôo)
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy

UV	Ultravioleta
$[M+Na]^+$	Aduto de sódio
λ	Comprimento de onda
J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dqd	Duplo quarteto de dubleto
μ	Micro
$[M+H]^+$	Molécula protonada
m	Multiplete
q	Quadruplete
m/z	<i>Relação massa-carga</i>
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
tl	Tripleto largo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Macroalgas.....	24
2.2. <i>Asparagopsis taxiformis</i>	24
2.3. Fungos endofíticos.....	25
2.4. Gênero <i>Nolulisporium</i> sp.....	27
2.5. Gênero <i>Microascus</i> sp.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.1. MATERIAIS.....	32
4.1.1. Meios de Cultivo dos Micro-organismos.....	32
4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	32
4.1.3. Cromatografia em Coluna (CC).....	32
4.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	32
4.1.5. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹ H e RMN de ¹³ C)	33
4.1.6. Espectrometria de Massas.....	33
4.1.7. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	33
4.2. MÉTODOS.....	33
4.2.1. Crescimento dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos brutos...34	
4.2.2. Análise do perfil cromatográfico dos extratos.....	36
4.2.3. Fracionamento dos extratos.....	36

4.2.4. Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT02-3.....	37
4.2.5. Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT02-2.....	38
4.2.6. Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT04MQ-1.....	38
4.3. Ensaios Biológicos.....	39
4.3.1. Avaliação da atividade antifúngica frente a <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	39
4.3.2. Avaliação do potencial citotóxico.....	39
4.3.3. Avaliação da atividade anticolinesterásica por cromatografia de bioafinidade.....	40
4.4. Análise por CG-EM.....	41

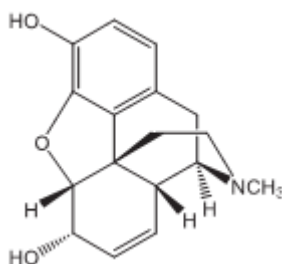
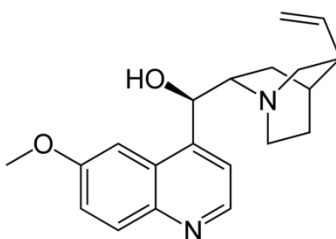
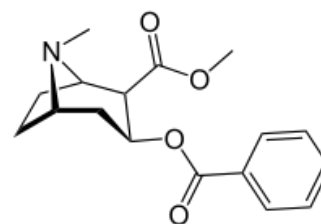
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do perfil químico do extrato AT02 (gênero <i>Nodulisporium</i> sp).....	41
5.1.1. Estudo da fração AT02-3.....	44
5.1.1.1. Elucidação estrutural da substância S1	45
5.1.1.2. Elucidação estrutural da substância S2	49
5.1.2. Estudo da fração AT02-2.....	50
5.1.2.1. Elucidação estrutural da substância S3	50
5.1.2.2. Elucidação estrutural da substância S4	53
5.1.2.3. Elucidação estrutural das substâncias S5 e S6	56
5.1.2.3.1. Substância S5	57
5.1.2.3.2. Substância S6	59
5.1.2.4. Elucidação estrutural da substância S7	67
5.1.2.5. Elucidação estrutural da substância S8	67
5.2. Análise do perfil químico do extrato AT04Mar (gênero <i>Microascus</i> sp.).....	70
5.3. Análise do perfil químico do extrato AT04MQ (gênero <i>Microascus</i> sp.).....	72
5.3.1. Elucidação estrutural da substância S9	72
5.3.2. Elucidação estrutural da substância S10	74
5.3.3. Elucidação estrutural da substância S11	77
5.3.4. Elucidação estrutural da substância S12	81
5.4. Avaliação das atividades antifúngica.....	83

5.5. Avaliação do potencial citotóxico.....	84
5.6. Avaliação da atividade anticolinesterásica por cromatografia de bioafinidade.....	85
6. CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS.....	97

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais e a medicina apresentam conectividade há milhares de anos por meio da medicina popular. Segundo Dias (2012), nas duas últimas décadas, a humanidade vem percebendo a importância dos produtos naturais para a manutenção de uma vida mais saudável. Historicamente, os primeiros estudos fitoquímicos com base científica foram realizados a partir do século XIX e resultaram no isolamento de substâncias com propriedades medicinais, a exemplo os alcaloides morfina (**1**), quinina (**2**) e cocaína (**3**), obtidos a partir de plantas usadas na medicina tradicional, papoula (*Papaver somniferum*), quina-amarela (*Cinchona calisaya*) e coca (*Erythroxylum coca*), respectivamente (WHEELWRIGH¹ apud HALBERSTEIN, 2005).

morfina (**1**)quinina (**2**)cocaína (**3**)

Vários fatores contribuíram para o desenvolvimento exponencial da química de produtos naturais nas últimas décadas. Primeiramente, por proporcionar a descoberta de substâncias biologicamente ativas, que são biossintetizadas *in natura* (SILVA, 2010). Em segundo lugar, as substâncias biossintetizadas (metabólitos secundários) apresentam grande complexidade estrutural, o que as tornam diferentes das substâncias orgânicas sintéticas e demandam técnicas e equipamentos sofisticados para sua elucidação estrutural. Por fim, a biodiversidade por si só justifica o enorme potencial no desenvolvimento da química de produtos naturais para a descoberta de novos medicamentos ou protótipos para agentes terapêuticos, no qual, plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

¹WHEELWRIGH, E. G. **Medicinal plants and their history**. New York: Dover Publications, 1974.

Werner Bergmann foi um dos primeiros pesquisadores na década de 50 a investigar a química de produtos naturais de micro-organismos marinhos (COSTA-LOTUFO, 2009). Após este período, nas últimas duas décadas, o estudo destes grupos de micro-organismos ganhou destaque, sendo que, em 2010 foram descritas na literatura 1011 novas substâncias isoladas de organismos marinhos (STROBEL, 2004; BLUNT, 2012).

Os micro-organismos marinhos, em especial os fungos associados às macroalgas, apresentam grande importância na pesquisa de produtos naturais, não apenas pela ampla gama de metabólitos secundários produzidos, mas também, pela sustentabilidade associada à produção de matéria prima em larga escala através de processos fermentativos (COSTA-LOTUFO, 2009) e principalmente, pelos efeitos biológicos, tais como antifúngico, antimicrobiano, antimalárico, antimicobacteriano, citotóxico e antiviral, dentre outros, que as substâncias produzidas por estes micro-organismos associados à macroalgas são capazes de produzir (ZHANG, 2014), e que representam fontes importantes de protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Macroalgas

Do ponto de vista biológico, as macroalgas são algas multicelulares, autótrofas fotossintetizantes que pertencem a reinos distintos (Monera, Protista ou Plantae). De acordo com o banco de dados AlgaeBase, é estimada a presença de 72.500 espécies de algas em cursos de água doce, salobra e salgada, além de espécies que sobrevivem em ambiente terrestre. Estas espécies são agrupadas em Algas Verdes (Filo Chlorophyta), Algas Pardas (Filo Phaeophyta) e as algas vermelhas (Filo Rhodophyta) (GUIRY, 1996).

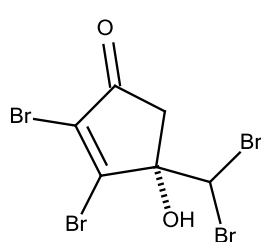
O filo Rhodophyta é um grupo morfológicamente diverso, consiste em 6000 espécies unicelulares e pluricelulares distribuídas em 680 gêneros, vivem geralmente fixas a rochas ou a outras algas (BURGER; NEDELCU, 2012). Por ser uma divisão composta por uma grande diversidade de espécies, as algas do filo Rhodophyta tem sido alvo de interesse para investigações científicas. Em estudos recentes, Leal (2013) estimou que 3129 produtos naturais marinhos foram descobertos a partir de algas entre 1965 e 2012, sendo a maioria das substâncias (1658 ou 53% do total), isoladas a partir da divisão Rhodophyta.

2.2. *Asparagopsis taxiformis*

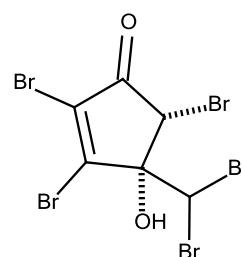
Dentre as algas pertencentes ao filo Rhodophyta, *Asparagopsis taxiformis*, da família Bonnemaisoniaceae (GUIRY, 1996), tem se destacado não apenas em pesquisas sobre a química de produtos naturais, mas também em estudos para produção de biocombustível (GREFF, 2014). O interesse pela química de *A. taxiformis* destaca-se pela capacidade desta alga em biossintetizar substâncias orgânicas halogenadas e uma variedade de metabólitos secundários bioativos durante o seu ciclo de crescimento (GREFF, 2014), que inclui as fases alternadas *Falkenbergia*, diploide esporófitica, e *Asparagopsis*, haploide gametófitica (ANDREAKIS, 2004; LIAO, 1990).

Esta alga é amplamente distribuída nos oceanos e no mar Mediterrâneo, onde é considerada espécie invasora. Na década de 1970 foram realizados os

primeiros estudos químicos de *A. taxiformis*, nos quais comprovaram-se que em grande parte, as substâncias produzidas são halogenadas, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos e acetogeninas com uma série de atividades biológicas como antifúngica e antibacteriana. (BURRESON, 1975; WOOLARD, 1973; GREFF, 2014). Em trabalhos recentes, foram isolados de *A. taxiformis* duas novas ciclopentenonas bromadas, nomeadas de mahorone (4) e 5-bromomahorone (5), ambas com atividade antibacteriana contra o patógeno gram-negativo *Acinetobacter baumannii* associado a graves infecções urinárias e do trato respiratório (GREFF, 2014).



mahorone (4)



5-bromomahorone (5)

Embora haja uma grande diversidade de algas ainda a serem exploradas, na última década as pesquisas com organismos marinhos têm-se concentrando na prospecção química e biológica de micro-organismos associados às algas, como por exemplo, os fungos endofíticos. Estes apresentam uma ampla faixa de diversidade biológica e química, configurando-se, provavelmente, em uma das fontes de substâncias bioativas de maior destaque (LEAL, 2013; KILDGAARD, 2014).

2.3. Fungos endofíticos

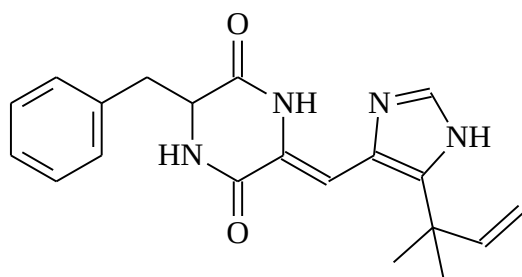
De Bary² apud Kaushik (2014) foi o primeiro a introduzir o termo endofítico para referir-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos de plantas (fungos, bactérias, cianobactérias e actinomicetos). Recentemente, encontram-se na literatura diferentes definições para endofíticos, porém a proposta sugerida por Bacon; Write (2000) é amplamente aceita e utilizada, definindo que endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos

²DE BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten**. Hofmeister's handbook of physiological botany. Leipzig: [s.n.], 1866. v. 2.

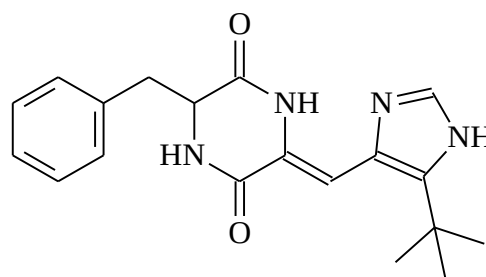
internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro (KHARWAR, 2011).

Não há definição completa sobre as interações que ocorrem entre endófitos e seus hospedeiros, sejam eles, algas ou plantas, pois estas interações dependem de diversos fatores bióticos e abióticos. No entanto há relatos de que as interações podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas, sendo a simbiótica, a interação que induz os micro-organismos a produzirem os metabólitos secundários (SANTOS, 2013). Estes metabólitos seriam originalmente característicos dos hospedeiros (algas ou plantas), conferindo aos mesmos as vantagens de se defenderem do ataque de insetos, diminuição da herbivoria e aumento da tolerância a estresses (KAUSHIK, 2014).

Estudos realizados com o endófito *Aspergillus* sp. levaram ao isolamento da halimida (**6**), uma dicetopiperazina que apresenta potente atividade citotóxica contra células de carcinoma de ovário e cólon (UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States), 2000). A partir deste estudo houve o desenvolvimento do análogo sintético, plinabulina (**7**), que encontra-se em fase II de testes clínicos para o tratamento de câncer de pulmão (UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States), 1999).



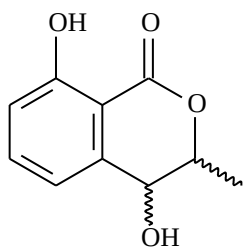
halimida (**6**)



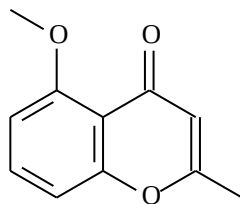
plinabulina (**7**)

Outros estudos de fungos endofíticos, em desenvolvimento no NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia Vegetal) têm revelado resultados importantes e promissores no que diz respeito a bioprospecção destes micro-organismos, sendo identificadas diversas substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase e de linhagens dos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. spheorospermum*, a exemplo da 4-hidroximeleína (**8**), 5-

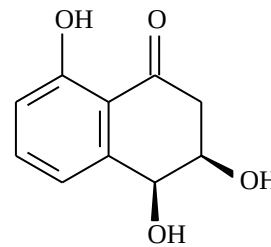
metoxi-2-metil-benzopiran-4-ona (9) e *cis*-4-hidroxi-6-desoxiscitalona (10) (CHAPLA, 2013; ZANARDI, 2014; PRECCARO, 2014).



4-hidroximeleína (8)



5-metoxi-2-metil-benzopiran-4-ona (9)



cis-4-hidroxi-6-desoxiscitalona (10)

2.4. Gênero *Nodulisporium* sp

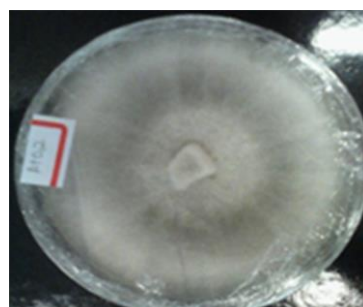
O gênero *Nodulisporium* sp. pertence à família Xylareaceae e inclui 49 espécies de fungos endofíticos (**Figura 1**). Relata-se que até o ano de 2013 foram isolados de espécies do gênero *Nodulisporium* sp mais de 70 metabólitos secundários, incluindo alcaloides, policetídeos, terpenoides, esteroides dentre outras substâncias, com ampla gama de bioatividades como antibacteriana, antifúngica e inseticida (ZHENG, 2013).

Uma série de substâncias nomeadas de ácidos nodulispóricos (11-16) foram isoladas de *Nodulisporium* sp. associado à planta *Bontia daphnoides*. Para esta série de substâncias verificou-se significativa atividade *in vitro* e *in vivo* contra pulgas com LD₅₀ de 10 µg.mL⁻¹ (ONDEYKA, 2003).

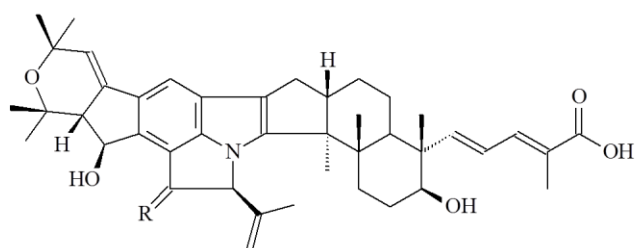
Em outros estudos, endófitos do mesmo gênero foram isolados das plantas *Juniperus cedrus* e *Erica arborea*. O primeiro estudo possibilitou a descoberta de novos compostos derivados do naftaleno (17-19) com atividade antifúngica contra *Microbotryum violaceum* (DAI, 2006). Por outro lado, no segundo estudo isolaram-se substâncias (20-22) com atividade antibacteriana contra *Bacillus megaterium* (DAI, 2009) (**Figura 2**).

Figura 1- Classificação taxinômica de *Nodulisporium* sp.

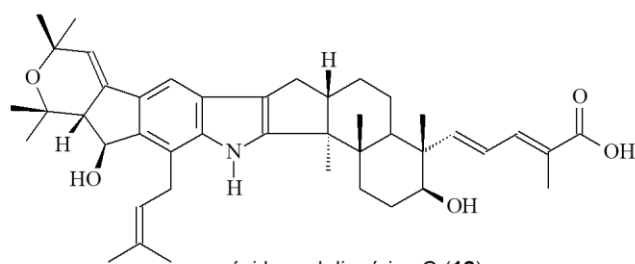
Reino: **Fungo**
 Filo: **Ascomycota**
 Classe: **Sordariomycetes**
 Ordem: **Xylariales**
 Família: **Xylariaceae**
 Gênero: ***Nodulisporium* sp.**



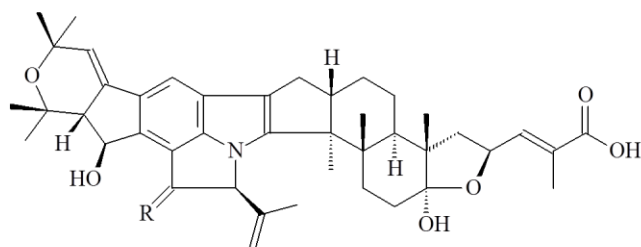
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2- Substâncias isoladas de endófitos pertencentes ao gênero *Nodulisporium* sp.

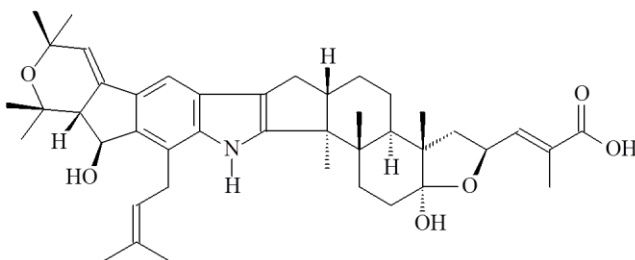
R=O, ácido nodulisporico A (11a)

R=H₂, ácido nodulisporico B (11b)

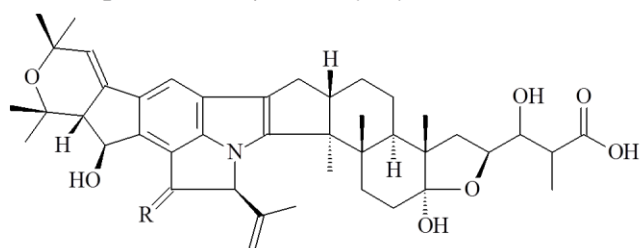
ácido nodulisporico C (12)



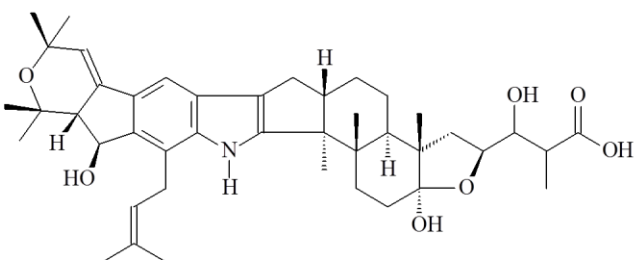
R=O, ácido nodulisporico A1 (13a)

R=H₂, ácido nodulisporico B1 (13b)

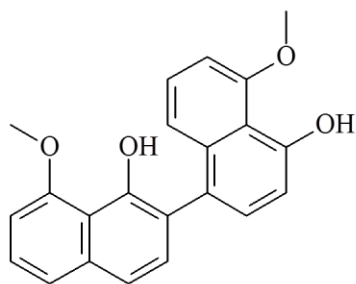
ácido nodulisporico C1 (14)



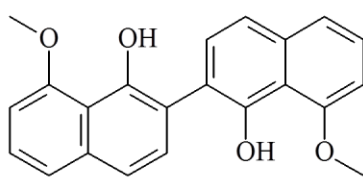
R=O, ácido nodulisporico A2 (15a)

R=H₂, ácido nodulisporico B2 (15b)

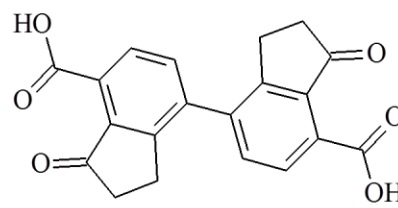
ácido nodulisporico C2 (16)



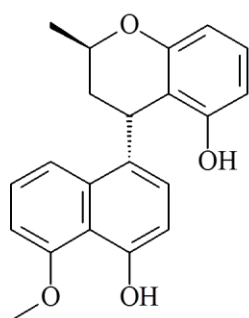
nodulisporina A (17)



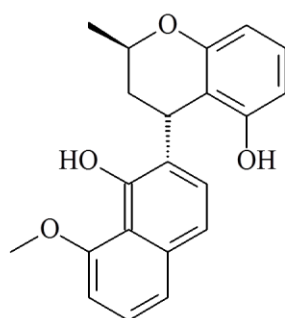
nodulisporina B (18)



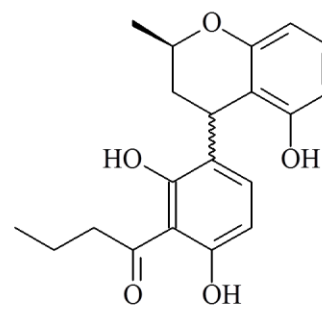
nodulisporina C (19)



nodulisporina D (20)



nodulisporina E (21)



nodulisporina F (22)

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5. Gênero *Microascus* sp

O gênero *Microascus* sp. pertence à família Microascaceae e são descritas 40 espécies para este gênero (**Figura 3**). Algumas espécies têm mostrado propriedades patogênicas contra o homem, animais, plantas, e até mesmo insetos (BARRON, 1958).

Espécies do gênero *Microascus* são comumente isoladas do solo, de decomposição de material vegetal, como fungos coprófilos e de fontes clínicas, tais como os casos de onicomioses, lesões cutâneas e micetomas (BADDLEY, 2000).

Poucos são os relatos sobre o estudo químico e biológico do gênero *Microascus*. Swathi e colaboradores (2013) apresentaram resultados indicando as atividades antibacteriana e antifúngica para o extrato bruto de *Microascus* sp.

Yu e colaboradores (1995) relataram que *Microascus longirostris*, isolado de uma esponja marinha, produziu metabólitos secundários (**23-25**) que inibiram fortemente a protease.

O extrato bruto do endófito *Microascus tardifaciens* apresentou atividade imunossupressora e forneceu oito substâncias pertencentes às classes das antraquinonas, dicetopiperazinas, isocumarinas dentre outras (**26-33**) (**Figura 4**) (FUJIMOTO, 1999).

Levando em consideração que os oceanos dos continentes asiático, africano e europeu são objetos de estudos mais frequentes, destaca-se a importância do estudo de *Asparagopsis taxiformis* coletada na costa brasileira. Além disso, não há relatos na literatura de estudos sobre os fungos endofíticos associados à *A. taxiformis*, o que é proposto neste trabalho. Merece destaque ainda considerar que os fungos endofíticos biossintetizam os metabólitos secundários em culturas de laboratório, reduzindo a necessidade de coletas dos hospedeiros em grande escala, o que contribui para diminuir a interferência nos ecossistemas e a consequente preservação da biodiversidade.

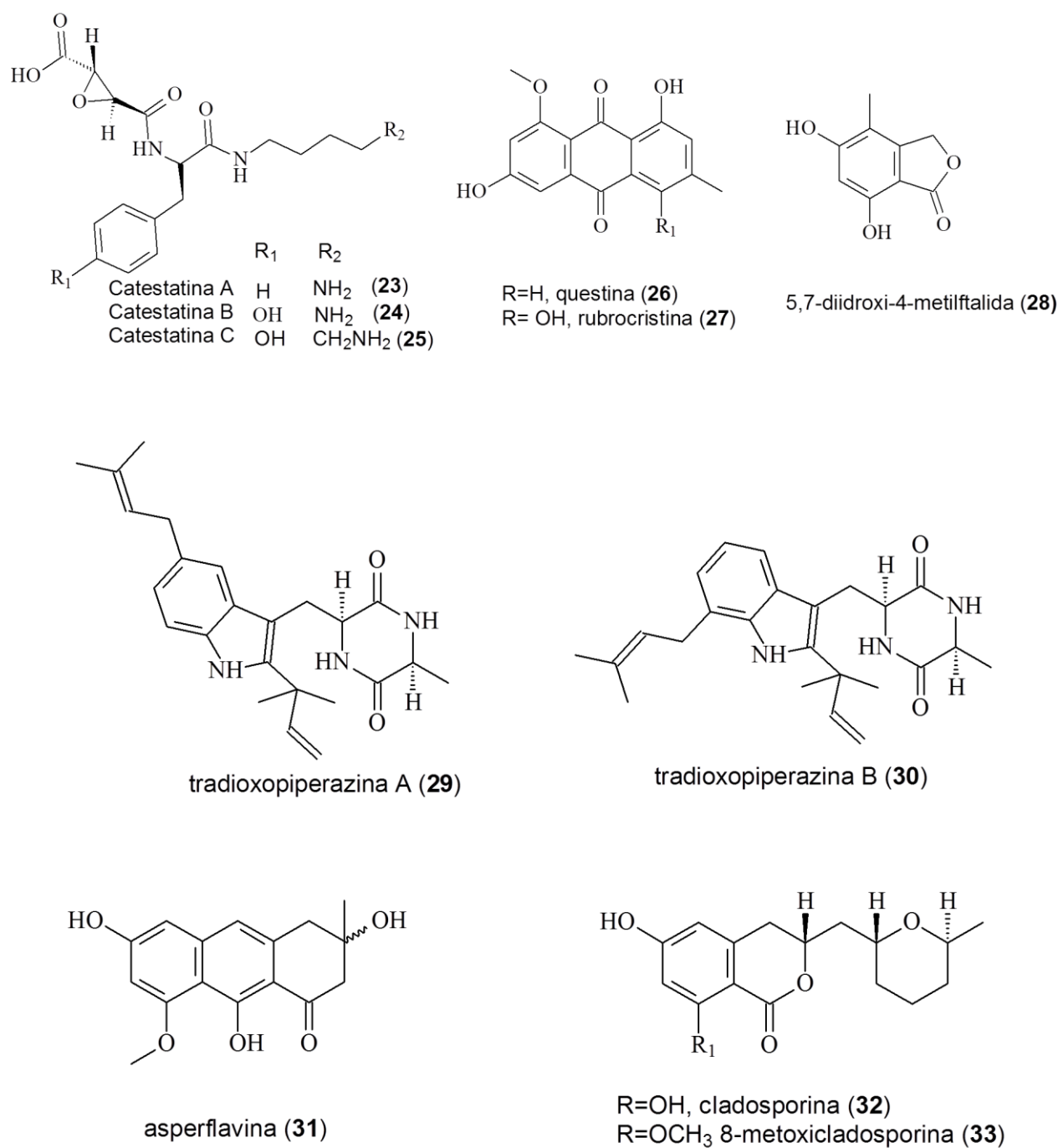
Figura 3- Classificação taxonômica de *Microascus* sp.

Reino: **Fungo**
Filo: **Ascomycota**
Classe: **Sordariomycetes**
Ordem: **Microascales**
Família: **Microascaceae**
Gênero: ***Microascus***



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4- Substâncias isoladas de endófitos pertencentes ao gênero *Microascus* sp.



Fonte: Elaborada pela autora.

3. OBJETIVOS

3.5. Objetivo geral

Investigar os extratos fúngicos e metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. e *Microascus* sp. associados à macroalga vermelha *Asparagopsis taxiformis* em busca de substâncias com potencial antifúngico, anticolinesterásico e/ou citotóxico.

3.6. Objetivos específicos

- 3.6.1. Avaliar o perfil de bioatividade dos extratos em estudo, bem como de frações semipurificadas e substâncias isoladas por seu potencial antifúngico (fitopátogenos), anticolinesterásico e citotóxico;
- 3.6.2. Selecionar para fracionamento os extratos dos fungos endofíticos que apresentarem atividade biológica mais significativa;
- 3.6.3. Purificar as substâncias presentes nas frações por meio de métodos cromatográficos;
- 3.6.4. Elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas por meio dos métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , uni e bidimensionais, UV-Vis) e espectrometria de massas (EM).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Meios de Cultivo dos Micro-organismos

Meio líquido batata dextrose (MBD): Fécula de batata (4,0 g), dextrose (20,0 g).

Meio sólido batata dextrose água (BDA): Fécula de batata (4,0 g), dextrose (20,0 g), Ágar (15,0 g).

4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nas análises por CCD utilizaram-se placas comerciais (marca Whatman) de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV 254 nm), 0,20 mm de espessura e como eluente, misturas de clorofórmio/metanol e/ou acetato de etila/metanol.

4.1.3. Cromatografia em Coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílicas: Fase reversa do tipo octadesil silano (C-18), da marca Sorbent Technologies, porosidade 60 Å, tamanho das partículas 40-75 µm (200-400 mesh); Sílica gel comum da marca Sigma Aldrich porosidade 60 Å, tamanho das partículas 40-63 µm. Utilizaram-se como fase móvel, misturas em diversas proporções dos solventes, clorofórmio/metanol, acetato de etila/metanol ou metanol/água.

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

Para análises por CLAE-DAD o equipamento modelo Shimadzu® foi utilizado. O mesmo possui duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de arranjos de diodos SPD-M20A. Operando no modo analítico, utilizou-se coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x

4.60 mm; 5 μm ; 110Å), no modo preparativo, coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21.20 mm; 5 μm ; 100Å).

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

Os espectros de RMN foram obtidos em dois espectrômetros: Bruker Fourier 300 Hz com campo magnético de 7,0 T e Bruker Ascend III 600 Hz (crioprobe) com campo magnético de 14,1 T. Solubilizaram-se as amostras nos solventes: clorofórmio-*d*, dimetilsulfóxido-*d*₆ ou metanol-*d*₄.

4.1.6. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massas Q-TOF Maxis Impact Bruker® modo positivo.

4.1.7. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Foi utilizado cromatógrafo a gás Shimadzu®, modelo GCMS-QP2010 com autoinjeter AOC-20i, coluna Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , modo de ionização positivo operando a 70 eV e faixa de massa de aquisição *m/z* 50-500 Daltons.

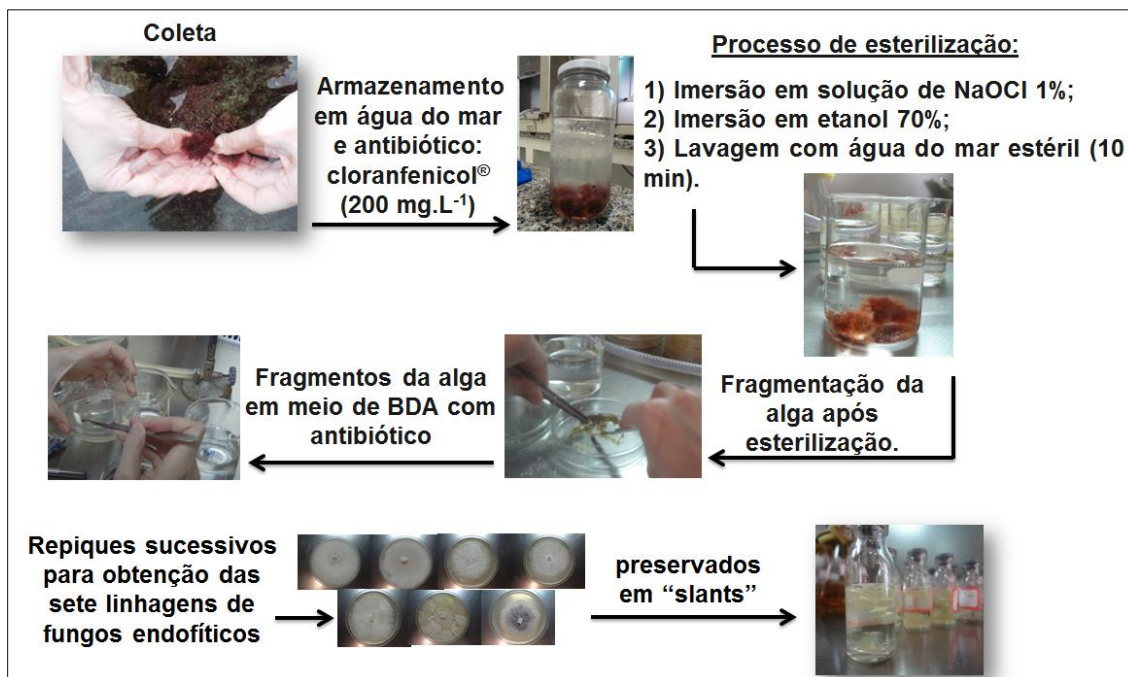
4.2. MÉTODOS

Em trabalhos anteriores, sete linhagens de fungos endofíticos (AT01 a AT07) foram isolados de *A. taxiformis*, que encontram-se preservadas em “slants” (frascos contendo água do mar ou água ultrapura MilliQ® estéril e a linhagem fúngica em meio sólido BDA-batata dextrose ágar) no laboratório de micro-organismos do NuBBE/IQ-UNESP.

Para o isolamento das sete linhagens de fungos endofíticos, a macroalga *Asparagopsis taxiformis* foi coletada em 2013, no litoral norte do Estado de São Paulo no Costão direito da Praia da Fortaleza, pertencente ao município de Ubatuba (GPS: 23°21'38"S, 44°49'63"W). A identificação da macroalga marinha foi realizada pela Profª. Drª. Nair Sumie Yokoya, e a

exsicata (SP 428533) encontra-se depositada no herbário do Instituto de Botânica-São Paulo. O esquema experimental mostrado abaixo foi usado para isolamento dos endófitos (**Figura 5**).

Figura 5- Obtenção das sete linhagens de fungos endofíticos associados à *Asparagopsis taxiformis*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Selecionaram-se duas linhagens como objeto de estudo deste trabalho. Estas linhagens foram identificadas pela empresa *Genotyping Biotecnologia*, Botucatu-SP, como endófitos pertencentes ao gênero *Nodulisporium* sp. (família Xylariaceae) (AT02)³ e *Microascus* sp. (família Microascaceae) (AT04)³.

Os passos para crescimento dos fungos e obtenção dos seus extratos são descritos no item 4.2.1 a seguir.

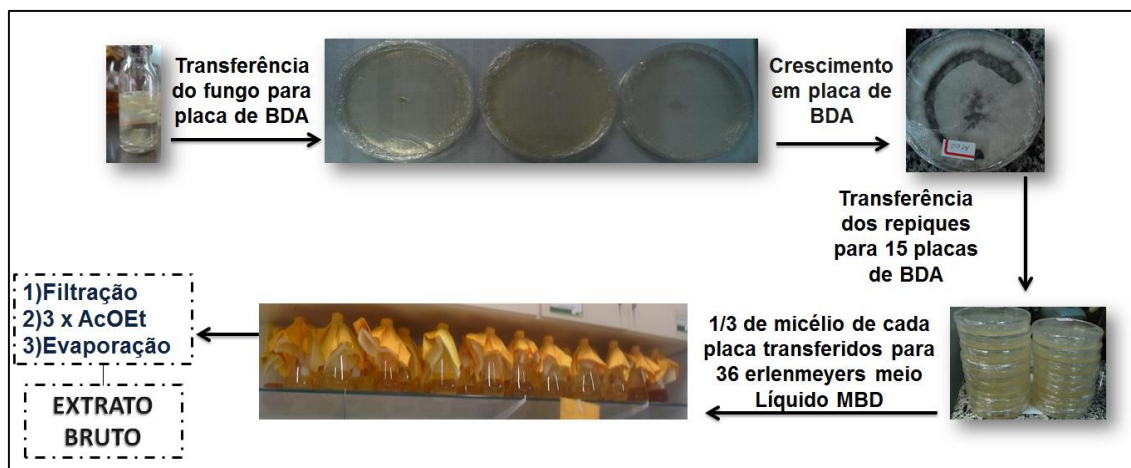
4.2.1. Crescimento dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos brutos

As linhagens dos fungos foram retiradas dos "slants" e repicadas separadamente em três placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (três placas contendo o fungo AT02 e três contendo o fungo AT04). As placas foram mantidas em repouso até o crescimento dos fungos praticamente sobre toda a

placa, sendo necessários cinco dias para AT02 e vinte e dois dias para AT04. Após este período repicou-se uma das placas de cada fungo e transferiu-se 15 repiques para 15 placas com BDA, mantendo novamente as placas em repouso até o crescimento dos fungos. Após o período de crescimento, aproximadamente um terço do micélio de cada placa foi inoculado em 36 erlenmeyers contendo 300 mL de água do mar (AT04) ou água ultrapura MilliQ® (AT02 e AT04)⁴ e 7,24 g do meio de cultivo batata dextrose, esterilizados. Incubaram-se os erlenmeyers por vinte e oito dias a temperatura próxima de 25 °C sem agitação.

Após o período de incubação o caldo foi separado do micélio por filtração, e o filtrado foi submetido à extração líquido-líquido com AcOEt. Evaporou-se o solvente orgânico sob pressão reduzida, resultando nos extratos brutos de cada linhagem de fungo, AT02 (1,450 g), AT04Mar (4,527 g) e AT04MQ (1,560 g). (**Figura 6**). Antes da total evaporação do AcOEt contido em AT04MQ, o mesmo foi submetido a uma lavagem com 50 mL de água por 3 vezes, resultado uma fase aquosa (F.A.AT04MQ) e na fase orgânica (AT04MQ).

Figura 6 – Etapas para obtenção dos extratos brutos de cada linhagem fúngica.



Fonte: Elaborada pela autora.

⁴O extrato do fungo AT04 foi preparado utilizando água do mar e água ultrapura MilliQ®, resultando 2 extratos: AT04Mar e AT04MQ.

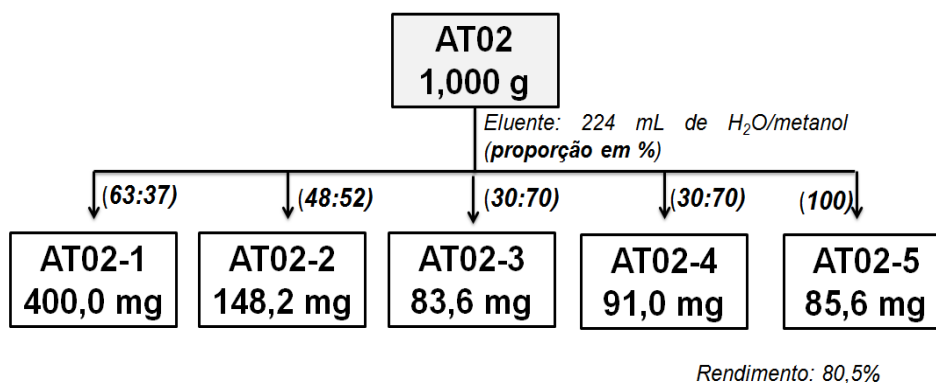
4.2.2. Análise do perfil cromatográfico dos extratos

Os extratos foram previamente analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como eluentes misturas de clorofórmio/metanol ou acetato de etila/metanol. Posteriormente, realizaram-se as análises dos mesmos por CLAE-DAD em modo analítico. Para tanto, 2,0 mg dos extratos foram solubilizadas em 1 mL de solução metanol/água (95:05) e submetidas a “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplados em membrana Millipore® (0,2 µm). Após realização do “clean up”, as amostras foram submetidas a análises por CLAE-DAD com eluição em gradiente exploratório (5 a 100% metanol) em 45 minutos.

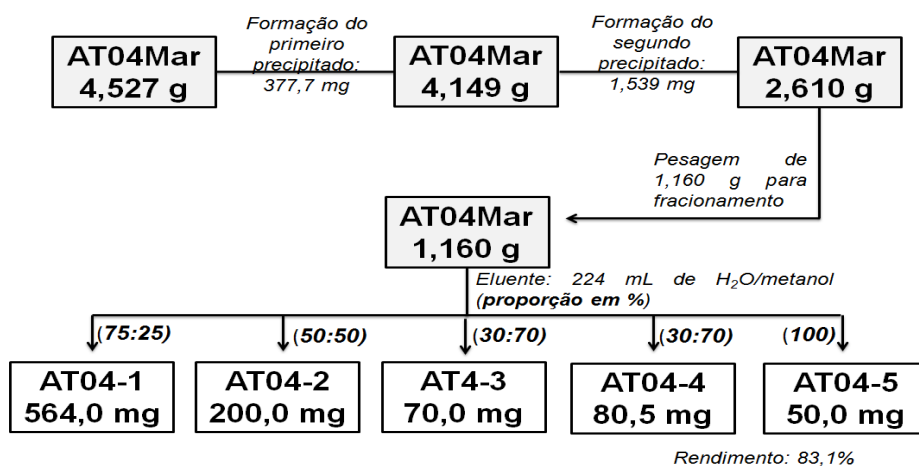
4.2.3. Fracionamento dos extratos

Após análise dos cromatogramas, os extratos AT02 e AT04Mar foram fracionados por CC usando sílica de fase reversa C-18 (100,0 g, $\Phi = 3,5$ cm) eluída com misturas de metanol/água. O extrato AT04MQ foi fracionado em CC com sílica gel 60 comum e fase móvel, misturas de acetato de etila/metanol (Esquemas 1-3).

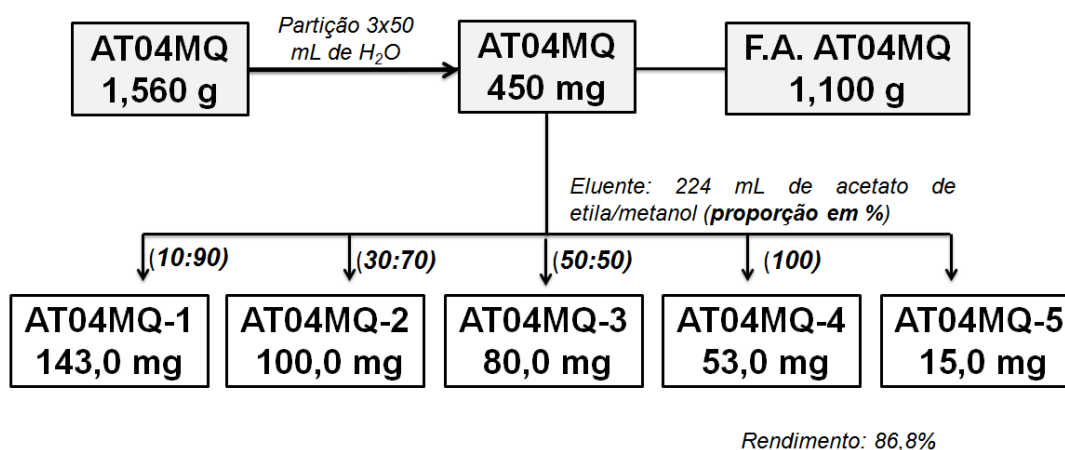
Esquema 1- Fracionamento do extrato AT02 por CC (fase reversa C-18).



Esquema 2- Fracionamento do extrato AT04Mar por CC (fase reversa C-18).



Esquema 3- Fracionamento do extrato AT04MQ por CC (sílica-gel).



As frações AT02-2, AT02-3, AT02-4 e AT04MQ-1, foram selecionadas para purificação com base nas análises prévias realizadas por CLAE-DAD e RMN de ^1H .

4.2.4. Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT02-3

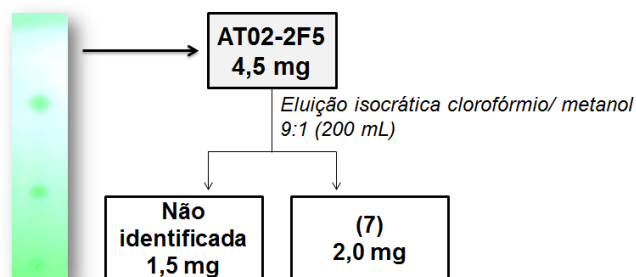
A fração AT02-3 (70 mg) foi submetida a separação por CLAE-DAD (coluna C-18, modo preparativo), sendo realizadas 11 injeções de 300 μL da solução da amostra na concentração de 20 mg.mL^{-1} . O eluente variou de 50% a 100% de metanol em 45 minutos e vazão de 10 mL.min^{-1} . Após o fracionamento foi possível isolar e identificar as substâncias **S1** (2,5 mg) e **S2** (1,0 mg).

4.2.5. Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT02-2

Para purificar os metabólitos presentes em AT02-2, a fração foi submetida a análise por CLAE-DAD em modo preparativo nas mesmas condições descritas no ítem 4.3, exceto pelo eluente, que variou de 40 a 100% de metanol em 25 minutos. Deste fracionamento, isolaram-se as substâncias **S3** (5,0 mg), **S4** (7,0 mg), **S8** (1,0 mg), além das substâncias **S5** e **S6** (2,0 mg), identificadas em mistura.

A fração coletada entre 13,10-13,50 minutos (AT02-2F5, 4,5 mg) foi submetida a um novo fracionamento por CC com sílica gel comum eluída com clorofórmio/metanol (9:1). Deste fracionamento foi possível o isolamento da substância **S7** (2,0 mg) (**Esquema 4**).

Esquema 4- Purificação da substância **S7** por CC (sílica gel).



4.2.6. Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT04MQ-1

A fração AT04MQ-1 foi selecionada para fracionamento por apresentar maior massa, sendo submetida a análise por CLAE-DAD modo preparativo em coluna de fase reversa C-18, nas mesmas condições descritas no tópico 3.3. Deste fracionamento, foi possível isolar as substâncias **S9** (3,0 mg), **S10** (1,0 mg), **S11** (2,0 mg), **S12** (2,3 mg).

4.3. Ensaios biológicos

4.3.1. Avaliação da atividade antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*

Os extratos AT04Mar, AT02 e suas frações foram submetidos aos ensaios antifúngicos sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young do Instituto de Botânica, SP. As amostras AT02, AT02-1 a 5 (40 µg.µL⁻¹) foram eluídas em CCDC com eluente clorofórmio/metanol 9:1. Por outro lado, a placa de CCDC contendo o extrato AT04Mar foi eluída na proporção 8:2.

As cromatoplasmas foram nebulizadas com solução de esporos dos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (concentração de 5x10⁷ esporos mL⁻¹, em solução de glicose e sais) (HOMANS e FUCHS, 1970) e incubadas a 25 °C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (1 µg).

4.3.2. Avaliação do potencial citotóxico

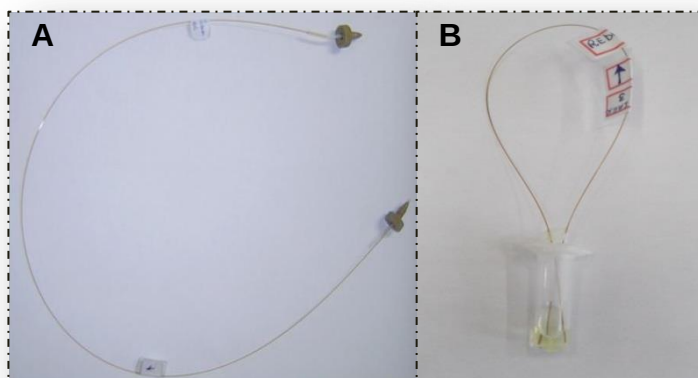
O estudo de citotoxicidade foi realizado pelo método do MTT, que se baseia na mensuração da absorbância do formazan formado após a metabolização do sal de MTT pelas células tumorais viáveis (MOSMANN, 1983). Este ensaio foi realizado pelo Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha da Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade do prof. Dr. Diego Wilke.

Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e mama (MCF-7) cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino foram plaqueadas em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sal de MTT (0,5 mg.mL⁻¹) foi adicionado e a absorbância mensurada a 595 nm. A triagem inicial foi realizada utilizando duas concentrações das amostras para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento da célula tumoral (%GI). Para amostras que demonstraram inibição maior que 75%, o valor de CI₅₀ foi calculado por regressão não linear utilizando o GraphPad Prism 4.0 (Intuitive Software for Science).

4.3.3. Avaliação da atividade anticolinesterásica por cromatografia de bioafinidade

Este ensaio⁵ foi realizado frente às enzimas acetilcolinesterase humana e de enguia elétrica (AChE-hu e AChE-ee) imobilizadas em dois biorreatores denominados ICERs de 30 cm x 0,01 mm em capilar de sílica fundida (**Figura 7**).

Figura 7- Biorreator (A) e estocagem do biorreator (B).



Fonte: Adaptada pela autora.

As amostras foram solubilizadas em metanol/água (1:1) e preparadas nas concentrações desejadas (**Tabela 1**).

Tabela 1- Preparo das soluções estoque.

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Galantamina (inibidor padrão utilizado)	200
S3	200
S4	200
AT02-2-4	300
AT02-2-5	300
AT04MQ	300
AT0-2	300
AT02-1	200
AT02-2	200
AT02-3	200
AT02-4	200
AT04 MQ1	200
AT02-2F2	200

20 μL de cada solução estoque foram pipetados para vials contendo inserts, aos quais foi adicionado 20 μL da solução de acetiltiocolina (ATChI)[(1 mM para o biorreator com AChE-ee, e 2 mM para o biorreator com AChE-hu)]

⁵Ensaio realizado no departamento de química da USP de Ribeirão Preto sob a supervisão da Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso.

e 60 µL da solução tampão Tris 0,1M pH 8,0. O volume final de cada solução foi de 100 µL. As soluções foram preparadas em duplicatas.

O ICER foi utilizado como colunas conectadas ao cromatógrafo e alíquotas de 10 µL das amostras preparadas foram injetadas no ICER nas seguintes condições cromatográficas:

- Fase móvel: Tampão Tris 0,1M pH 8,0 e reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) 0,126 mM;
- Vazão: 0,05 mL.min⁻¹;
- Detector DAD-UV: 412 nm;
- Tempo da corrida: 10 minutos.

Antes da injeção de cada amostra, injetou-se apenas o substrato da enzima para a avaliação da atividade enzimática que consistiu em: 60 µL da solução de tampão trabalho, 20 µL da solução de ATChI (1 mM para o biorreator com AChE-ee e 2 mM para o biorreator com AChE-hu) e 20 µL de metanol (100%).

Também foi realizada análise controle para referência através da injeção de um branco de cada amostra que consistiu em: 60 µL da solução de tampão, 20 µL da solução estoque de cada amostra e 20 µL de metanol/água (1:1).

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (A_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (A_0), de acordo com a equação abaixo.

Equação 1- Cálculo de percentual de inibição da acetilcolinesterase.

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

4.4. Análise por CG-EM

As amostras foram sililadas e metoximadas conforme o procedimento descrito por GULLBERG, 2004; MOLDOVEANU, 2002. As análises foram realizadas nas seguintes condições cromatográficas:

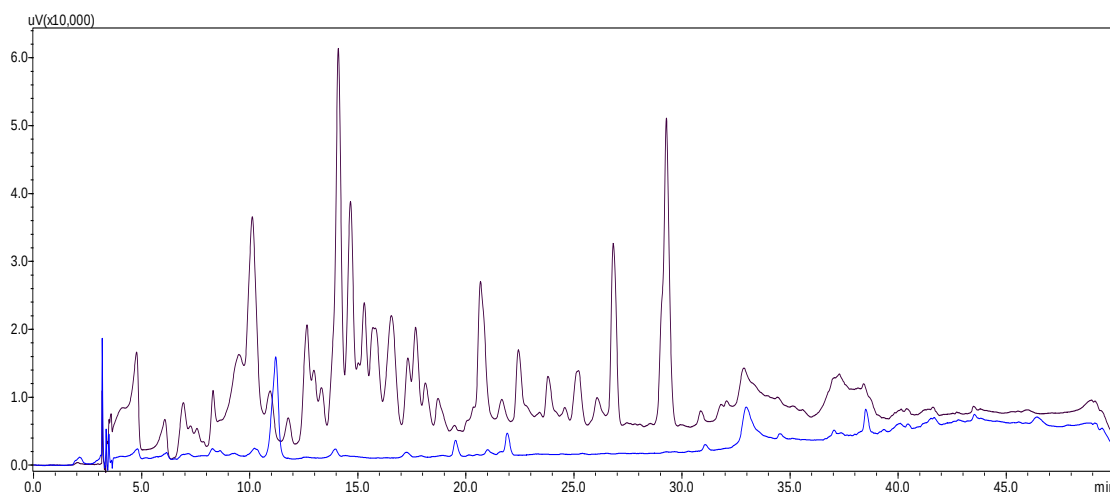
- Temperatura do injetor: 260 °C;
- Modo de injeção: splitless/Split: início splitless, 0,75 min split (1/50) e 2 min split 1/20;
- Temperatura do detector: 310 °C. Temperatura da coluna: 140 °C (3 min) 320 °C (10 min). Aumento de temperatura de 3 °C.min⁻¹
- Vazão do gás de arraste (N₂): 1,0 mL.min⁻¹, gás de *make up*: 29 mL.min⁻¹, ar sintético: 10 mL.min⁻¹ e hidrogênio: 1 mL.min⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do perfil químico do extrato AT02 (gênero *Nodulisporium* sp.)

Após analisar o cromatograma (**Figura 8**) e o espectro de RMN de ^1H do extrato AT02 foi possível verificar a variedade de metabólitos secundários produzidos pela linhagem de fungo endofítico pertencente ao gênero *Nodulisporium* sp. em estudo (codificado por AT02).

Figura 8- Cromatograma do extrato AT02 (superior) e do branco (inferior). Gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H₂O v/v à 1 mL.min⁻¹-254nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å).

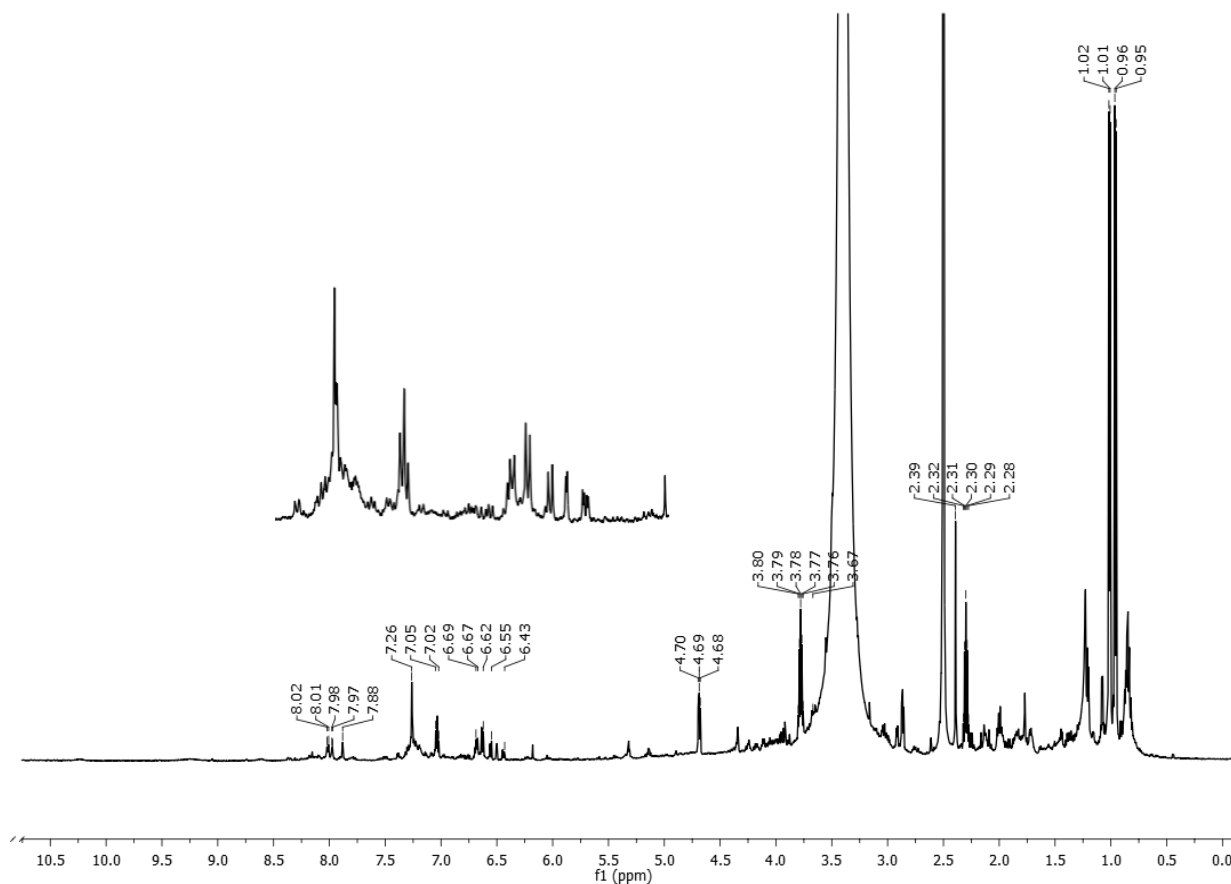


No espectro de RMN de ^1H (**Figura 9**) foram observados dubletos em δ_{H} 1,01 e 0,96, cuja constante de acoplamento (J) é igual a 6,6 Hz, sugerindo a presença de substâncias contendo substituinte metila ligada a carbono metínico ($-\text{CHCH}_3$).

O extrato desta linhagem fúngica foi fracionado por CC em sílica de fase reversa C-18, como descrito no tópico 4.2.3. Após o fracionamento do extrato, selecionaram-se as frações AT02-2, AT02-3 e AT02-4 para isolamento dos metabólitos secundários aí presentes. Tais fracionamentos permitiram isolar da fração AT02-3 as substâncias **S1** e **S2**, e da fração AT02-2, as substâncias **S3**, **S4**, **S7** e **S8**, além de identificar em mistura, as substâncias **S5** e **S6**. Por outro lado, da fração AT02-4 não foi possível isolar nenhum metabólito com massa

suficiente pra identificação estrutural. Nos tópicos seguintes são descritas as etapas de elucidação estrutural das substâncias isoladas.

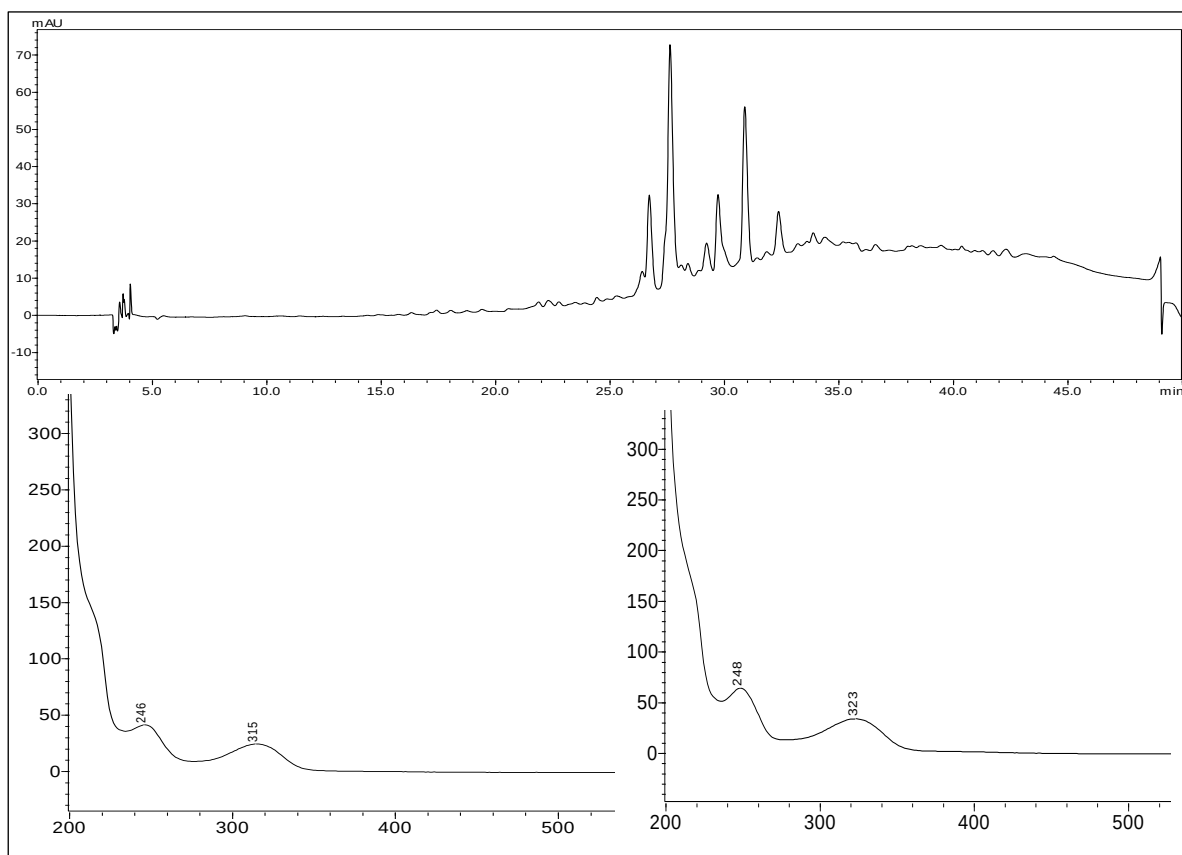
Figura 9-Espectro de RMN de ^1H do extrato AT02 (DMSO- d_6 , 600 MHz).



5.1.1. Estudo da fração AT02-3

Ao analisar o perfil químico da fração AT02-3 por CLAE-DAD (**Figura 10**) foi possível notar a presença de dois picos principais com bandas de absorção com λ_{max} em 208, 246 e 315 nm, para o pico com retenção em 26,70 minutos e λ_{max} em 222, 248 e 323 nm para o pico com retenção em 29,48 minutos. Esta fração foi selecionada para fracionamento por CLAE-DAD, modo preparativo, levando ao isolamento das substâncias **S1** e **S2**, que foram identificadas através da análise dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C uni e bidimensionais.

Figura 10-Cromatograma da fração AT02-3 (gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H₂O v/v à 1 mL.min⁻¹-254nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) e espectros de UV-Vis dos picos principais.



Fonte: Elaborada pela Autora

Os espectros de RMN de ¹H das substâncias **S1** e **S2** apresentaram sinais com deslocamentos químicos similares, sugerindo que são substâncias pertencentes à mesma classe de metabólitos secundários.

5.1.1.1. Elucidação estrutural da substância S1

No espectro de RMN de ¹H observaram-se sinais na região de hidrogênios alifáticos em δ_H 1,48 na forma de dubleto (d), dois duplos dubletos (dd) em 3,02 e 2,69 ppm, um duplo quarteto de dubleto (dq) em 4,54 ppm e dois singletos em 3,86 e 2,25 ppm. Já na região de hidrogênios aromáticos, dois dubletos em δ_H 6,97 e 7,42 ($J = 8,4$ Hz), evidenciaram a presença de dois hidrogênios com acoplamento em *orto*, indicando que se trata de um anel aromático 1,2,3,4-tetrassubstituído.

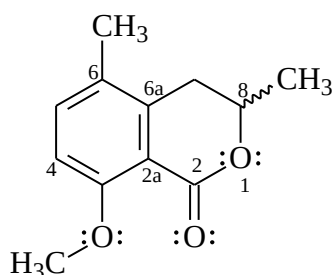
As principais correlações observadas no mapa de contorno de COSY (acoplamento ¹H-¹H) foram os acoplamentos entre os hidrogênios da metila em

1,48 ppm com os sinais para hidrogênios em 2,25, 3,86 e 4,54 ppm, indicando a ligação $\text{CH}_3\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{R}$.

No mapa de contorno de HMBC (acoplamento $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) as correlações ressaltadas são: $[\delta_{\text{H}} 7,42 \rightarrow \delta_{\text{C}} 18,4 \text{ e } 160,8]$; $[\delta_{\text{H}} 1,48 \rightarrow \delta_{\text{C}} 75,5 \text{ e } 33,7]$; $[\delta_{\text{H}} 3,86 \rightarrow \delta_{\text{C}} 160,8]$; $[\delta_{\text{H}} 6,97 \rightarrow \delta_{\text{C}} 127,9]$.

De posse destes dados e comparando-os com os descritos na literatura (CHANGA, 2014), a substância **S1** foi identificada como 6,8-dimetil-3-metoxi-7,8-diidroisocumarina.

Na **Tabela 2** são relatados os valores de deslocamentos químicos para hidrogênios e carbonos (δ_{H} e δ_{C}), bem como, os valores J . Nas **Figuras 11 e 12** são apresentações as correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC. Os dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e HSQC encontram-se nas **Figuras 13-15**, e nas páginas 97-99 em anexo.



Substância **1**: (6,8-dimetil-3-metoxi-7,8-diidroisocumarina)

Tabela 2- Dados de RMN de ^1H ($\text{MeOH}-d_4$, 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S1**.

Posição	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{C} (ppm)
2	---	166,1
2a	---	114,1
3	---	160,8
4	6,97 (d, $J = 8,4$, 1H)	111,7
5	7,42 (d, $J = 8,4$, 1H)	137,5
6	---	127,9
6a	---	141,9
7a e 7b	3,02 (dd, $J_a = 16,6$; 3,0, 1H); 2,69 (dd, $J_b = 16,6$; 12,0, 1H)	33,7
8	4,54 (dq, $J = 12,0$; 6,6; 3,0, 1H)	75,5
Ar- CH_3	2,25 (s, 3H)	18,4
- CH_3	1,48 (d, $J = 6,6$, 3H)	20,9

-OCH ₃	3,86 (s, 3H)	56,3
-------------------	--------------	------

Figura 11- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância **S1**.

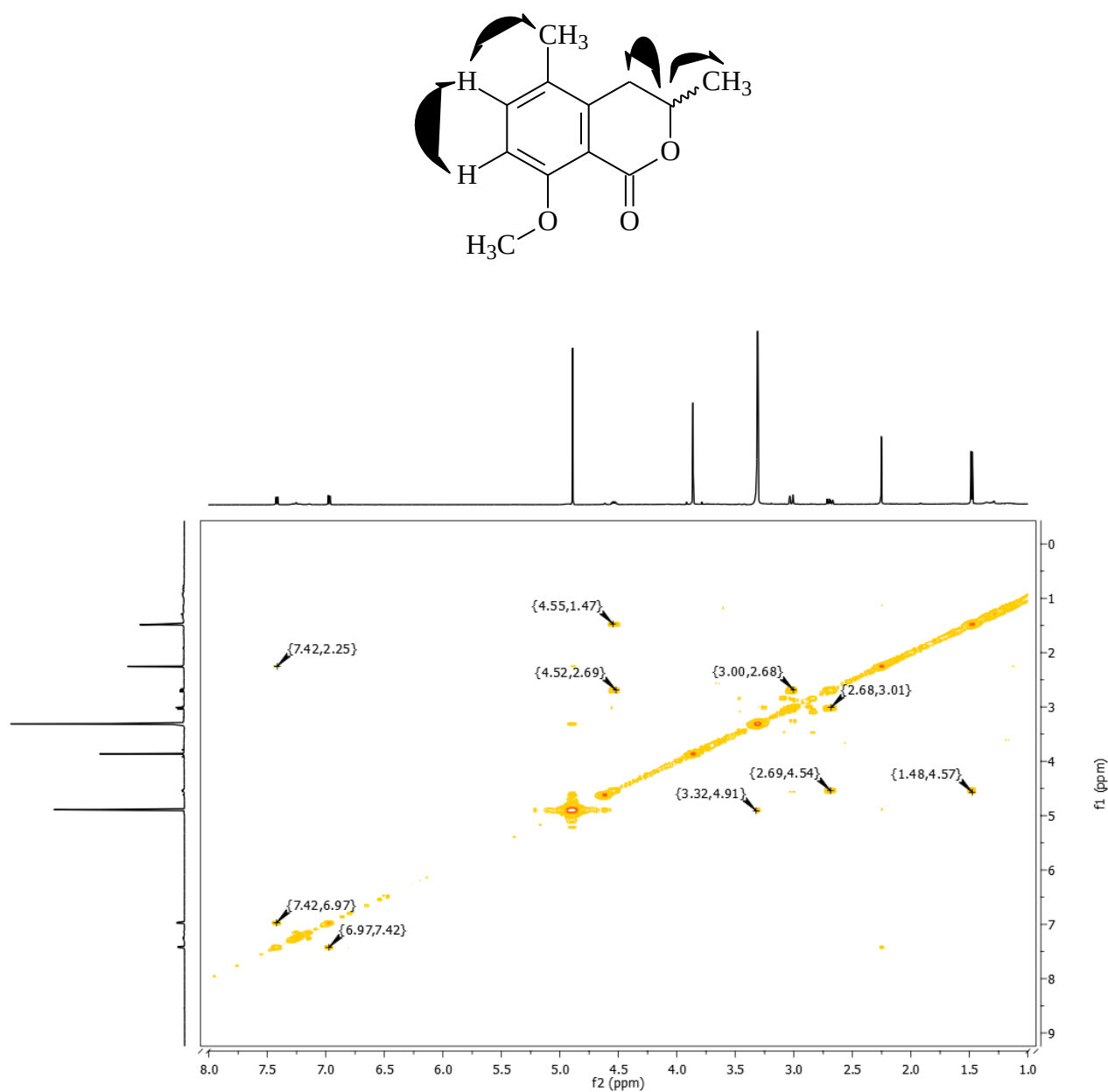
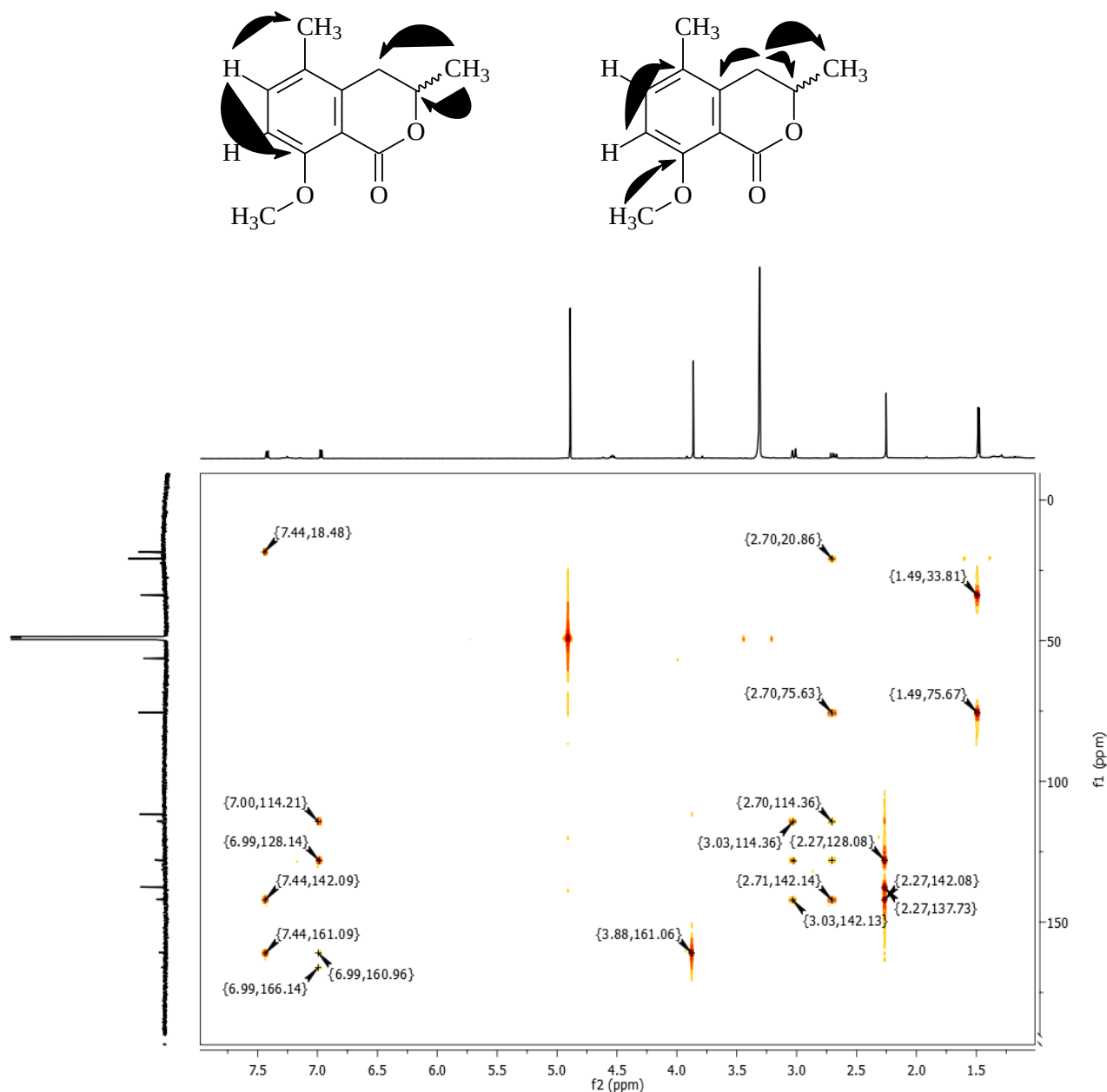


Figura 12- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S1**.

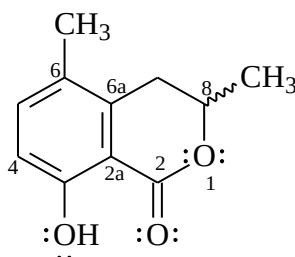


5.1.1.2. Elucidação estrutural da substância **S2**

O espectro de RMN de ^1H da substância **S2** apresentou sinais com os mesmos valores de J e semelhantes valores de deslocamento químico aos observados no espectro de RMN de ^1H da substância **S1**, porém foi possível notar o desaparecimento do singlete em 3,86 ppm.

A análise espectral indicou que a substância **S2** também pertence a classe das diidroisocumarinas, sendo evidente no espectro de RMN de ^1H os sinais em δ_{H} 1,52 (d, $J= 6,6$ Hz), dois duplo-dubletos em δ_{H} 3,07 ($J_{\text{a}}= 16,6$; 3,3 Hz) e 2,73 ($J_{\text{b}}= 16,6$; 12,0 Hz) e um dqd duplo quarteto de dubletos em δ_{H} 4,71, que são sinais bastante característicos para esta classe de metabólitos. Os demais valores de δ_{H} e J encontram-se na **Tabela 3** e de acordo com o descrito da literatura, são valores compatíveis com a estrutura da 6,8-dimetil-8-hidroxi-7,8-diidroisocumarina (BI, 2007).

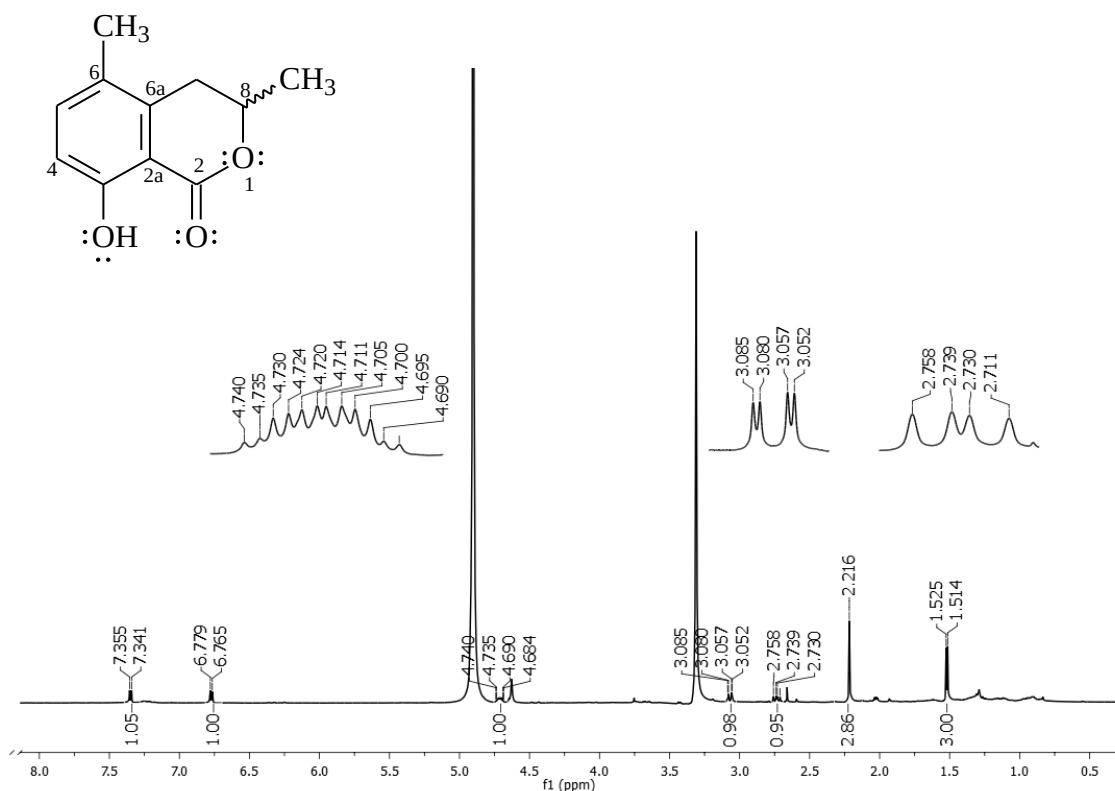
Devido a baixa massa isolada desta substância (1,0 mg), não foi possível obter os espectros de RMN de ^{13}C e os bidimensionais. A **Figura 16** apresenta o espectro de RMN de ^1H da substância **S2**.



Substância **2**: (6,8-dimetil-8-hidroxi-7,8-diidroisocumarina)

Tabela 3- Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) para a substância **S2**.

Posição	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{H} [CDCl_3 -500 MHz (BI, 2007)]
2	---	---
2a	---	---
3	---	---
4	6,77 (d, $J= 8,5$, 1H)	6,75 (d, $J= 8,6$, 1H)
5	7,35 (d, $J= 8,5$, 1H)	7,21 (d, $J= 8,6$, 1H)
6	---	---
6a	---	---
7a e 7b	3,07 (dd, $J_{\text{a}}= 16,6$; 3,3, 1H); 2,73 (dd, $J_{\text{b}}= 16,6$; 12,0, 1H)	2,95 (dd, $J_{\text{a}}= 16,5$; 3,7, 1H); 2,80 (dd, $J_{\text{b}}= 16,5$; 11,7, 1H)
8	4,71 (dq, $J= 12,0$; 6,6; 3,3, 1H)	4,68 (m, 1H)
Ar- CH_3	2,22 (s, 3H)	2,18 (s, 3H)
- CH_3	1,52 (d, $J= 6,6$, 3H)	1,56 (d, $J= 6,5$, 3H)
-OH	Não observado	10,97

Figura 16-Espectro de RMN de ^1H da substância **S2** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

5.1.2. Estudo da fração AT02-2

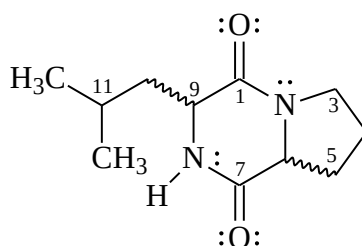
O estudo químico da fração AT02-2 permitiu isolar as substâncias **S3**, **S4**, **S7** e **S8**, e identificar em mistura as substâncias **S5** e **S6**. Para tanto, fez-se uso das técnicas espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais.

5.1.2.1. Elucidação estrutural da substância **S3**

No espectro de RMN de ^1H da substância **S3** foram observados um tripleto em δ_{H} 4,11 ($J = 8,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ_{H} 4,01 ($J = 3,7$ e $9,5$ Hz), cujos hidrogênios estão ligados aos carbonos em δ_{C} 59,1 e 53,5, respectivamente, conforme anotado através das correlações observadas por meio do mapa de contorno HSQC. De acordo com a literatura, estes são sinais evidentes para substâncias contendo anel dicetopiperazínico (MARTÍNEZ-LUIS, 2011).

Outros sinais observados foram dois dubletos em δ_H 0,99 e 0,95 ($J = 6,6$ Hz), atribuídos a duas metilas ligadas a um carbono metínico (δ_C 24,8), sugerindo a presença de um grupo isopropila na molécula. Multipletos na região de 2,20–1,66 e 3,76–3,47 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-3, H-4 e H-5 da unidade cíclica derivada do aminoácido prolina.

Nos mapas de contorno de HMBC e COSY foi possível observar as principais correlações entre o grupo isopropila e o anel dicetopiperazínico. De posse destes dados e comparando com aqueles descritos na literatura, foi possível identificar a dicetopiperazina isolada como um dos isômeros da ciclo-(Pro-Leu) (MARTÍNEZ-LUIS, 2011). Na **Tabela 4** são apresentados os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C (os espectros encontram-se em anexo-**Figuras 17** e **18**, páginas 100 e 101). Nas **Figuras 19** e **20** são apresentadas as correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC e COSY. Em anexo encontra-se o mapa de contorno de HSQC (**Figura 21**, página 102).



Substância **S3**: ciclo-(Pro-Leu)

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H ($CHCl_3-d$, 300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para a substância **S3**.

Posição	δ_H (ppm), mult., J (Hz)	δ_C (ppm)
1	---	166,3
3	3,76 – 3,47 (m, 2H)	45,6
4	2,20 – 1,66 (m)	23,4
5	2,20 – 1,66 (m)	28,2
6	4,11 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H)	59,1
7	---	170,4
9	4,01 (dd, $J = 9,5$; 3,7 Hz, 1H)	53,5
10	1,52 (ddd, $J = 14,4$; 9,5; 4,9 Hz, 1H)	38,7
	2,20 – 1,66 (m)	
11	2,20 – 1,66 (m)	24,8
-CH ₃	0,99 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	21,3
-CH ₃	0,95 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	22,9
N-H	6,03	----

Figura 19- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S3**.

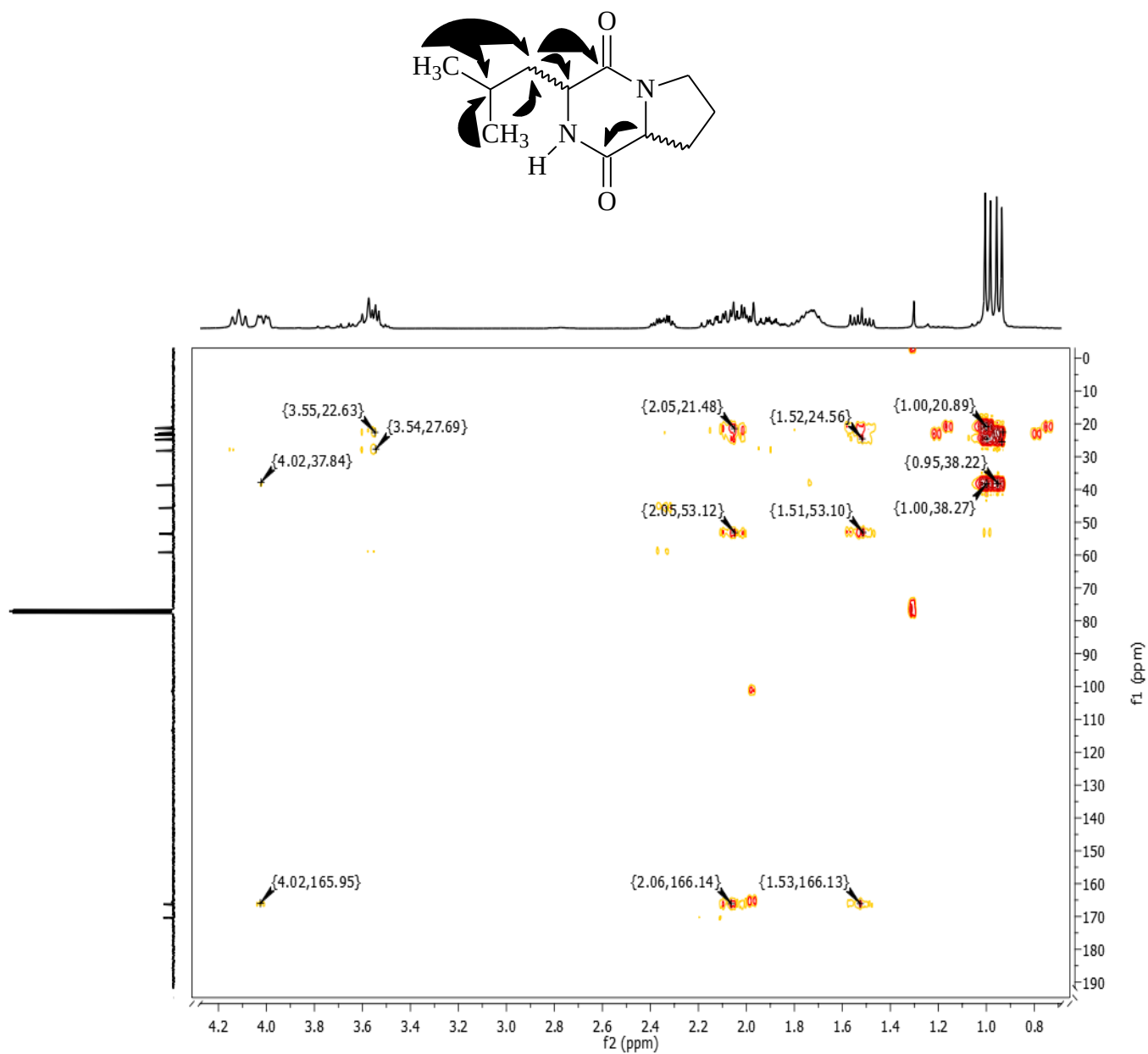
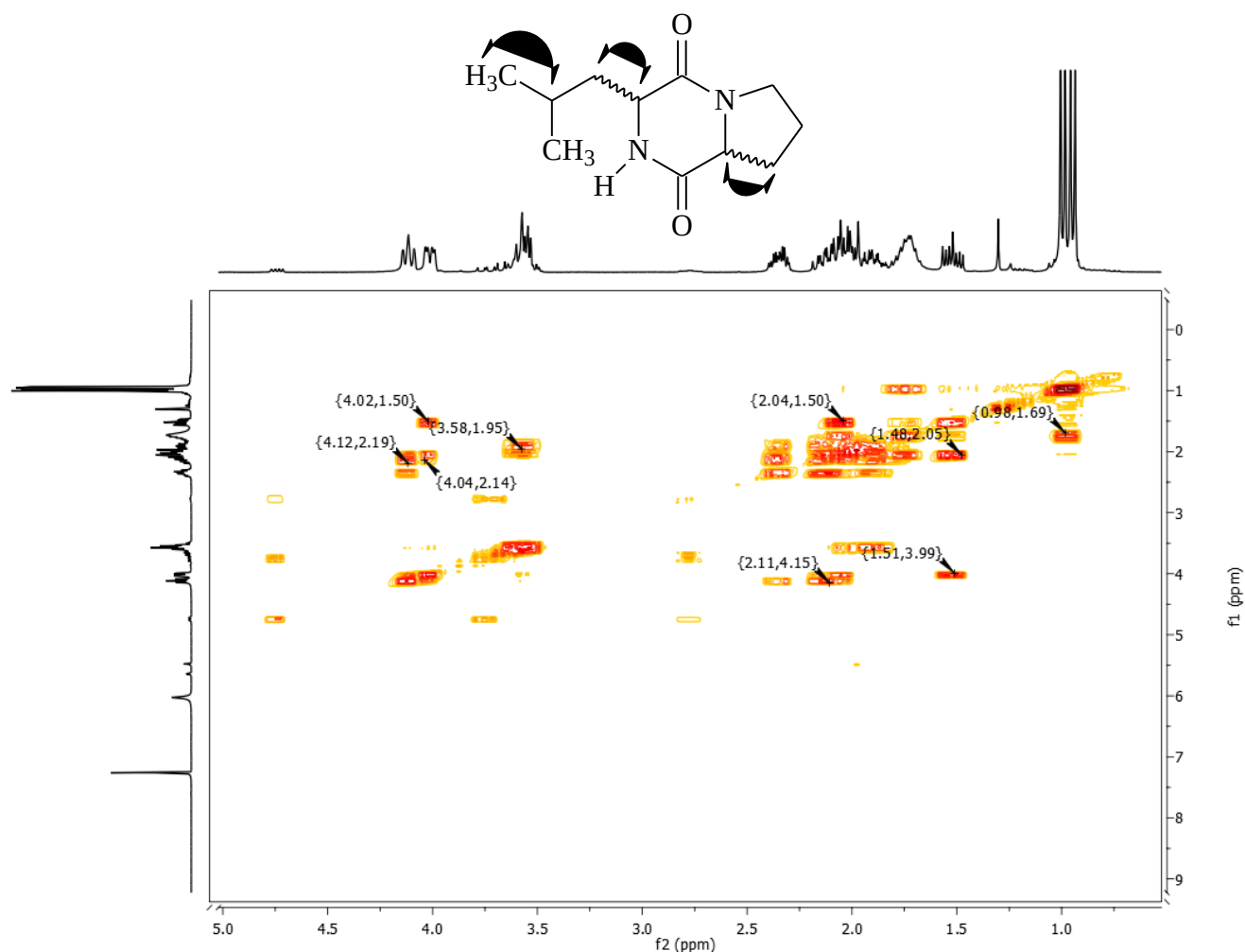


Figura 20- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância **S3**.

5.1.2.2. Elucidação estrutural da substância **S4**

No espectro de RMN de ¹H da substância **S4** observaram-se sinais semelhantes aos apresentados no espectro da substância **S3**, como por exemplo, os sinais em δ_H 4,45 e 4,07 na forma de tripleto de dubleto (td, $J = 4,8$; 1,8 Hz) e duplo duplo dubleto (ddd, $J = 10,6$; 6,4; 1,6 Hz), respectivamente. Além disso, multiplicidades similares àquelas referentes ao ciclo prolina foram ressaltadas, e também sinais em δ_C em 169,7 e 165,5, sugerindo a presença de carbonilas de um anel dicetopiperazínico.

Na região de hidrogênios aromáticos observou-se um multipeto (m) em δ_H 7,34-7,16 ppm com área integrada para 5 hidrogênios, cujos hidrogênios estão ligados aos carbonos em δ_C 126,7, 128,0, 129,7, 135,9, indicando que o anel aromático encontra-se monosubstituído.

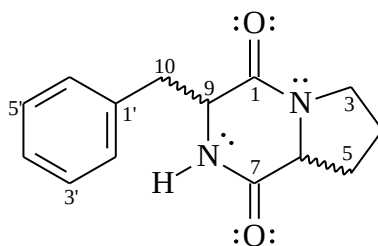
Foram notados por meio do mapa de contorno COSY, os acoplamentos entre H-9 do anel dicetopiperazínico e os hidrogênios benzílicos em δ_H 3,17 (dd, $J = 4,8; 2,4$ Hz), e o acoplamento do H-6 com os hidrogênios H-5 do ciclo prolina.

Averiguaram-se ainda, por meio do mapa de contorno de HMBC, as correlações dos hidrogênios benzílico (H-10) e do anel dicetopiperazínico (H-7) com os sinais para carbonos em: [δ_H 3,17 (H-10) $\rightarrow$ δ_C 56,3; 169,5 e 135,9] e [δ_H 4,07 (H-7) $\rightarrow$ δ_C 28,0].

Com estas informações pode-se inferir que a substância **S4** apresenta uma unidade derivada do aminoácido fenilalanina e outra da prolina, sendo estes dados compatíveis para um dos isômeros da ciclo-(Phe-Pro) (FDHILA, 2003; CAFÊU, 2007).

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na **Tabela 5** (espectros nas **Figuras 22 e 23**-Em anexo, páginas 103 e 104) e **Figuras 24 e 25**, abaixo, com correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC. O espectro de HSQC é apresentado na **Figura 26** (Em anexo, página 105).

Com a finalidade de observar o sinal referente ao hidrogênio da ligação NH, um novo espectro de RMN de ^1H foi obtido utilizando clorofórmio-*d* (**Figura 27**-Em anexo, página 106). Este sinal foi observado em 5,68 ppm como um singlete largo.



Substância **S4**: ciclo-(Phe-Pro)

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (MeOH-*d*₄, 300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) para a substância **S4**.

Posição	δ_H (ppm), mult., J (Hz)	δ_C
1	---	165,5
3	3,54 (dt, $J = 11,9; 8,3$ Hz, 1H); 3,38 (dd, $J = 12,1; 6,2$ Hz, 1H)	44,5
4	1,86 – 1,74 (m, 2H)	21,2

5	1,21 (m, 1H)	28,0
	2,17 – 2,01 (m, 1H)	
6	4,07 (ddd, $J = 10,6; 6,4; 1,6$ Hz, 1H)	58,7
7	---	169,5
9	4,45 (td, $J = 4,8; 1,8$ Hz, 1H)	56,3
10	3,17 (dd, $J = 4,8; 2,4$ Hz, 2H)	36,8
1'	---	135,9
2'	7,34 – 7,16 (m)	129,7
3'	7,34 – 7,16 (m)	128,0
4'	7,34 – 7,16 (m)	126,7
5'	7,34 – 7,16 (m)	128,0
6'	7,34 – 7,16 (m)	129,7
N-H	5,68	----

Figura 24- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância S4.

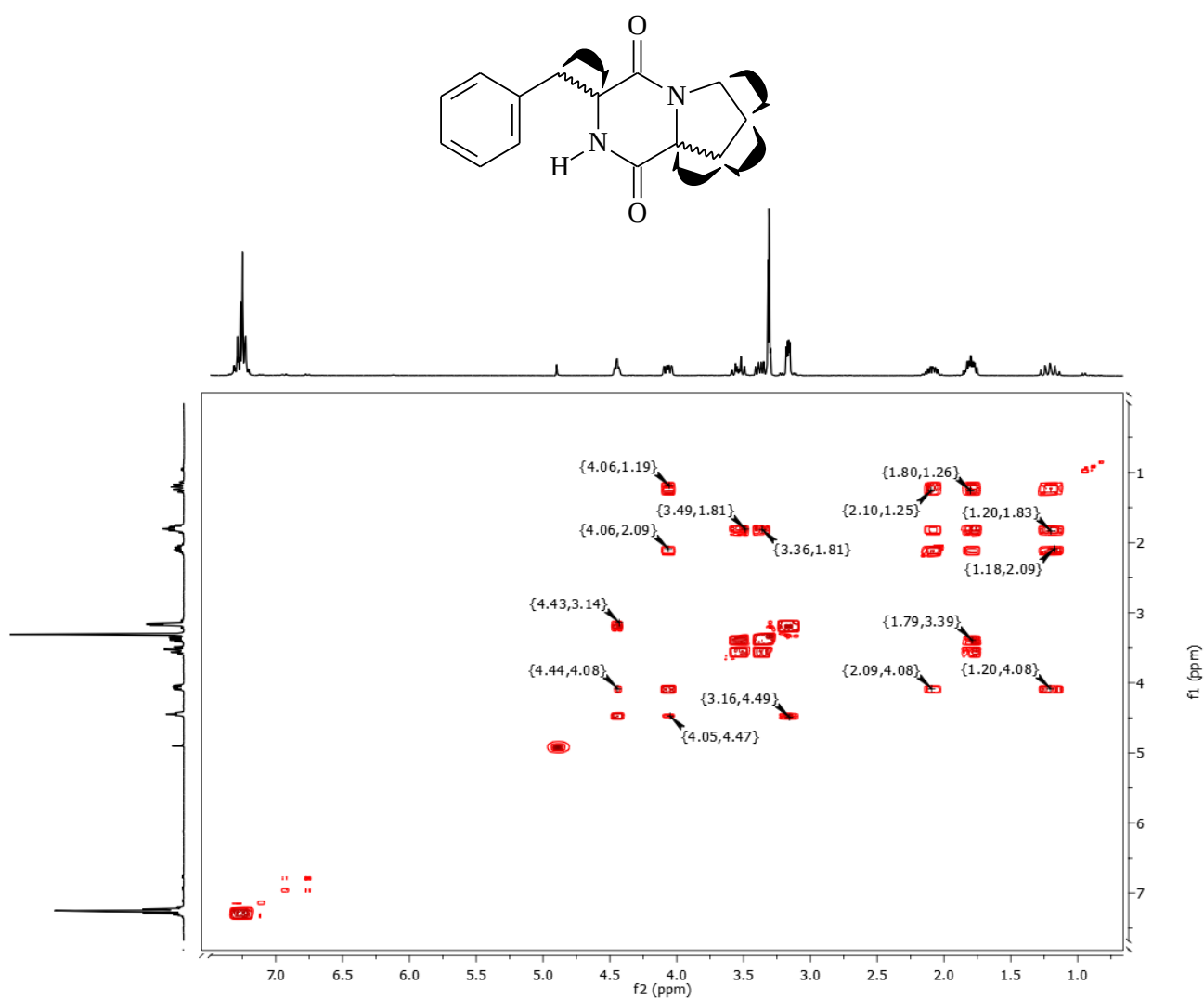
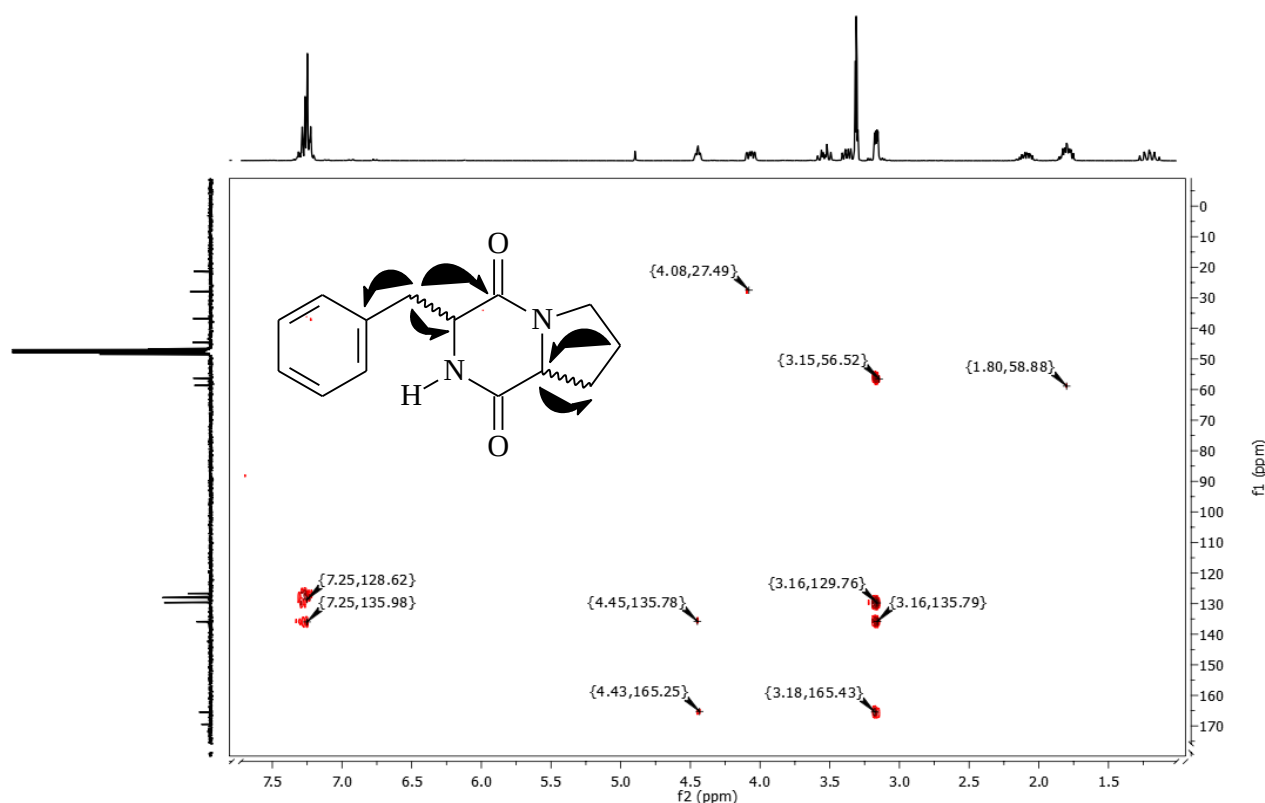


Figura 25- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S4**.

As dicetopiperazinas são substâncias bioativas comumente produzidas por fungos endofíticos e bactérias, sendo biossintetizadas através da condensação de dois ou três aminoácidos como precursores. Há relatos na literatura sobre diversas atividades biológicas para esta classe de substâncias, sendo as propriedades antifúngicas e citotóxicas as mais amplamente descritas (FDHILA, 2003).

5.1.2.3. Elucidação estrutural das substâncias **S5** e **S6**

O espectro de RMN de ^1H da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** apresentou sinais com multiplicidades complexas e diversas, com valores de δ característicos para substâncias contendo um anel aromático e cadeia carbônica alifática insaturada. Por meio dos espectros bidimensionais de COSY, HMBC e HSQC-TOCSY foi possível identificar os sinais correspondentes à substância **S5** e à substância **S6**. Os espectros de TOCSY-1D com irradiações seletivas foram imprescindíveis para propor as estruturas, visto que trata-se de uma amostra com pouca massa (2,0 mg), sendo inviável

submetê-la a mais um processo de purificação. Nos sub-tópicos a seguir são descritas sucintamente a elucidação estrutural de **S5** e **S6**.

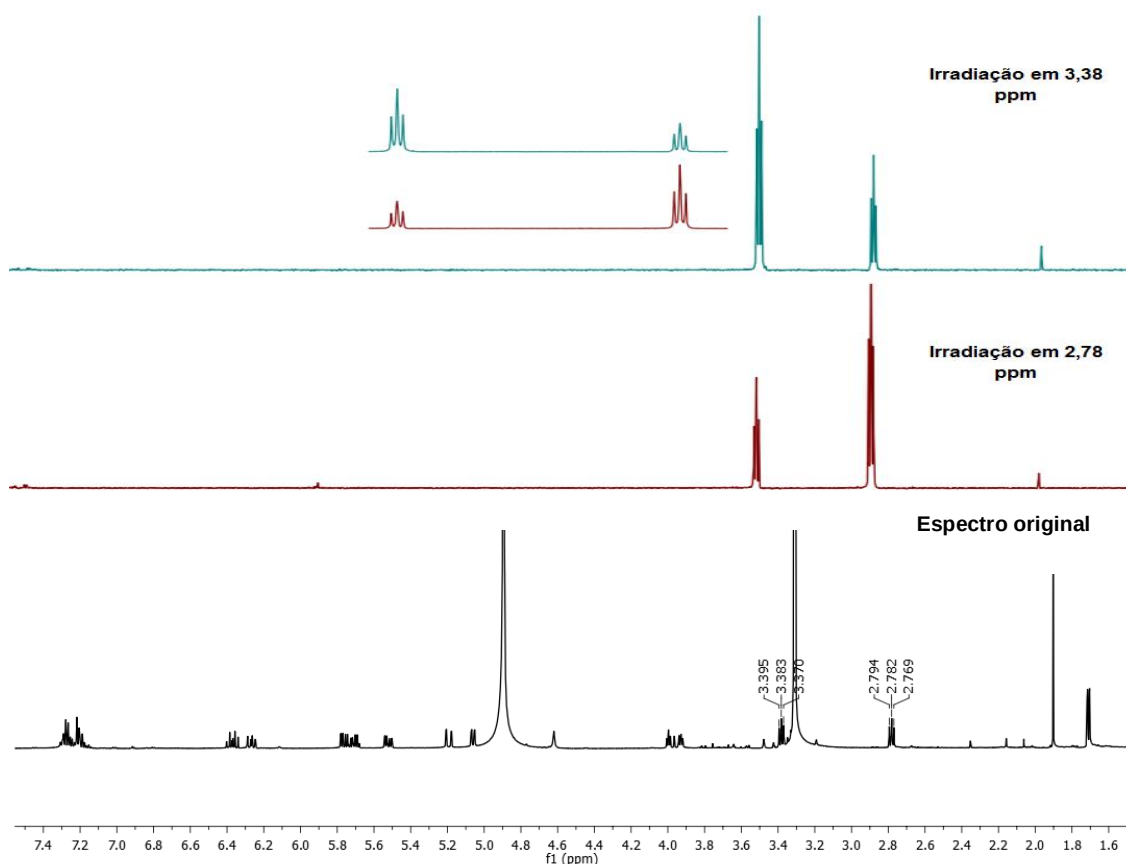
5.1.2.3.1. Substância S5

No espectro de RMN de ^1H da mistura (**Figura 28**-Anexo, página 107) encontram-se dois tripletos em δ_{H} 2,78 e 3,38 ($J = 7,4$ Hz), que correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos em δ_{C} 35,1 e 40,2 ppm respectivamente, cujo valores são característicos para carbonos metilênicos ($-\text{CH}_2-$).

Na região de hidrogênios aromáticos, notou-se a presença de um multipletto na faixa de 7,32-7,13 ppm comumente encontrado para substâncias com anel aromático monosubstituído. Além disso, ainda foi observado um singlete em δ_{H} 1,90 referente a uma metila ($-\text{CH}_3$).

No espectro de TOCSY-1D (**Figura 29**), irradiando-se seletivamente nos tripletos em δ_{H} 2,78 e 3,38 é possível notar que estes sinais fazem parte de um mesmo sistema de spin isolado.

Figura 29-Espectros de TOCSY-1D com irradiações seletivas em δ_{H} 2,78 e 3,38 referentes a substância **S5** ($\text{MeOH}-d_4$, 600 MHz).



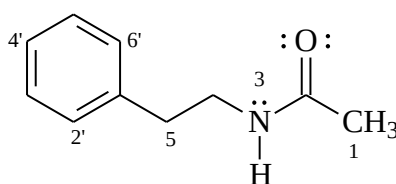
Acoplamentos entre os hidrogênios em δ_H 2,78 e δ_H 3,38 foram observadas no mapa de contorno de COSY. Estes mesmos sinais foram encontrados no espectro de HMBC correlacionando-se com os seguintes sinais para carbonos: [δ_H 2,78 $\rightarrow$ δ_C 40,7; 139,1 e 128,1] e [δ_H 2,78 $\rightarrow$ δ_C 35,1 e 171,9].

A correlação do sinal para metila em δ_H 1,90 (δ_C 21,1) com o sinal para carbono em 171,9 ppm sugeriu a presença de uma carboxila de amida ou éster na estrutura da substância **S5**.

Estes dados e a comparação com aqueles descritos na literatura (MASKEY, 2002) permitiram identificar a substância **S5** como a *N*-(2-feniletil)-acetamida (**Tabela 6**). O espectro de RMN de ^{13}C da mistura encontra-se na **Figura 30**-Anexo, página 108. Na **Figura 31** são apresentadas as principais correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC.

Com o intuito de observar o sinal característico da ligação N-H, adquiriu-se um novo espectro de RMN de ^1H utilizando DMSO- d_6 como solvente, e este sinal foi averiguado na forma de um multipeto em δ_H 7,92.

Há relatos do isolamento desta substância do extrato do fungo endofítico *Colletotrichum crassipes* (CAFÊU, 2007) e a descrição da atividade antimicrobiana de outras ariletilamidas (MASKEY, 2002), evidenciando o potencial de bioatividade da substância **S5**.



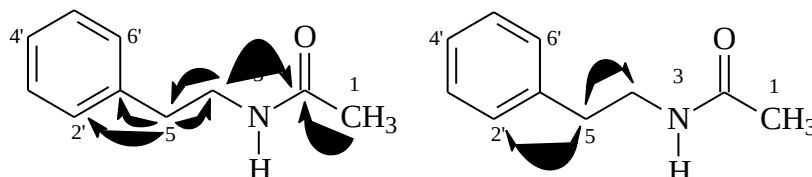
Substância **S5**: *N*-(2-feniletil)acetamida

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S5**.

Posição	δ_H (ppm), mult., J (Hz)	δ_C
1	1,90 (s, 3H)	21,1
2	---	171,9
3	7,92 (m, 1H)	---
4	3,38 (t, J= 7,4 HZ, 2H)	40,7
5	2,78 (t, J= 7,4 HZ, 2H)	35,1

1'	---	139,1
2' e 6'	7,32 – 7,13 (m)	128,1
3' e 5'	7,32 – 7,13 (m)	128,4
4'	7,32 – 7,13 (m)	125,9
N-H	7,92 (m)	--

Figura 31- Correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC  e COSY .

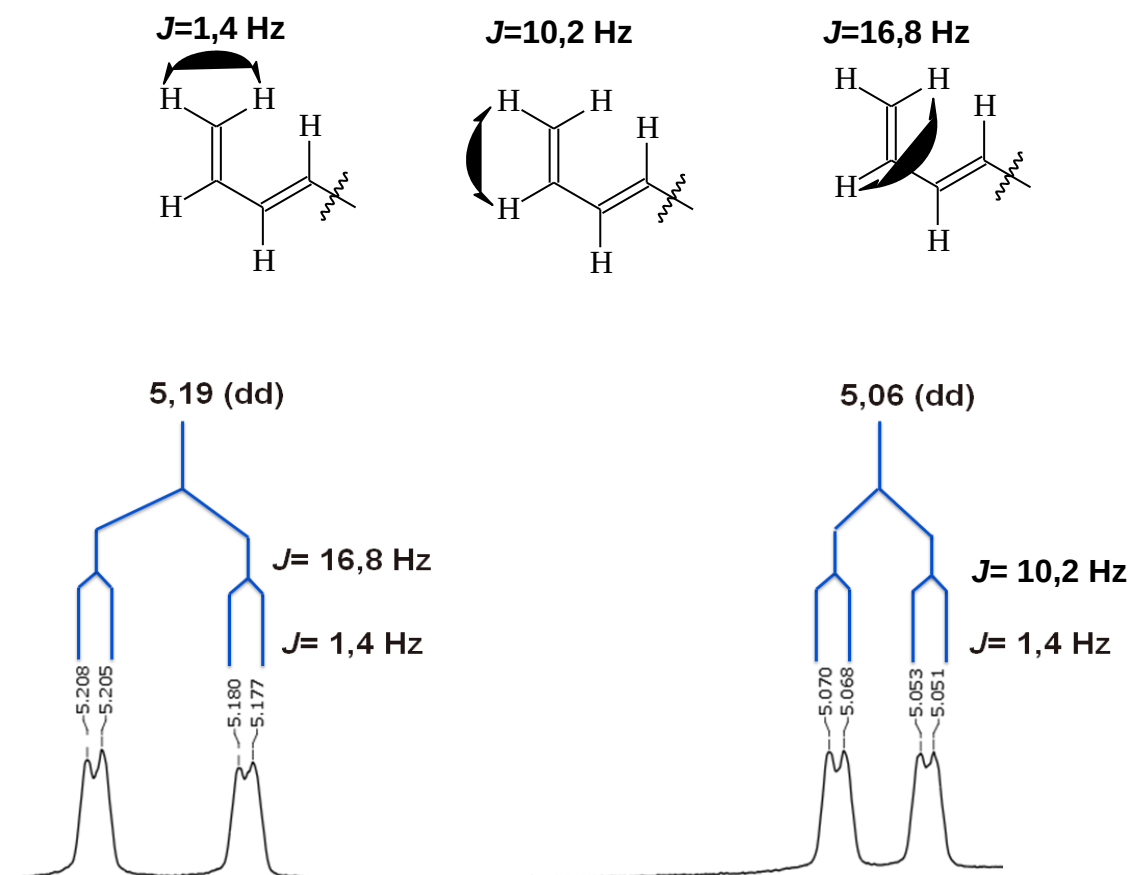


5.1.2.3.2. Substância S6

O espectro de RMN de ^1H da mistura contendo a substância **S6** mostrou sinais em δ_{H} : 5,71 (dq, $J= 15,3; 6,6; 1,4$ Hz), 5,52 (ddq, $J= 15,3; 6,6; 1,4$ Hz), 5,76 (ddd, $J= 15,3; 6,6; 0,6$ Hz), 6,27 (ddd, $J= 15,3; 10,2; 0,6$ Hz), 6,37 (dt, $J= 16,8; 10,2$ Hz), 5,06 (dd, $J= 10,2; 1,4$ Hz, 1H) e 5,19 (dd, $J= 16,8; 1,4$ Hz, 1H) associados a uma estrutura parcial com cadeia carbônica insaturada.

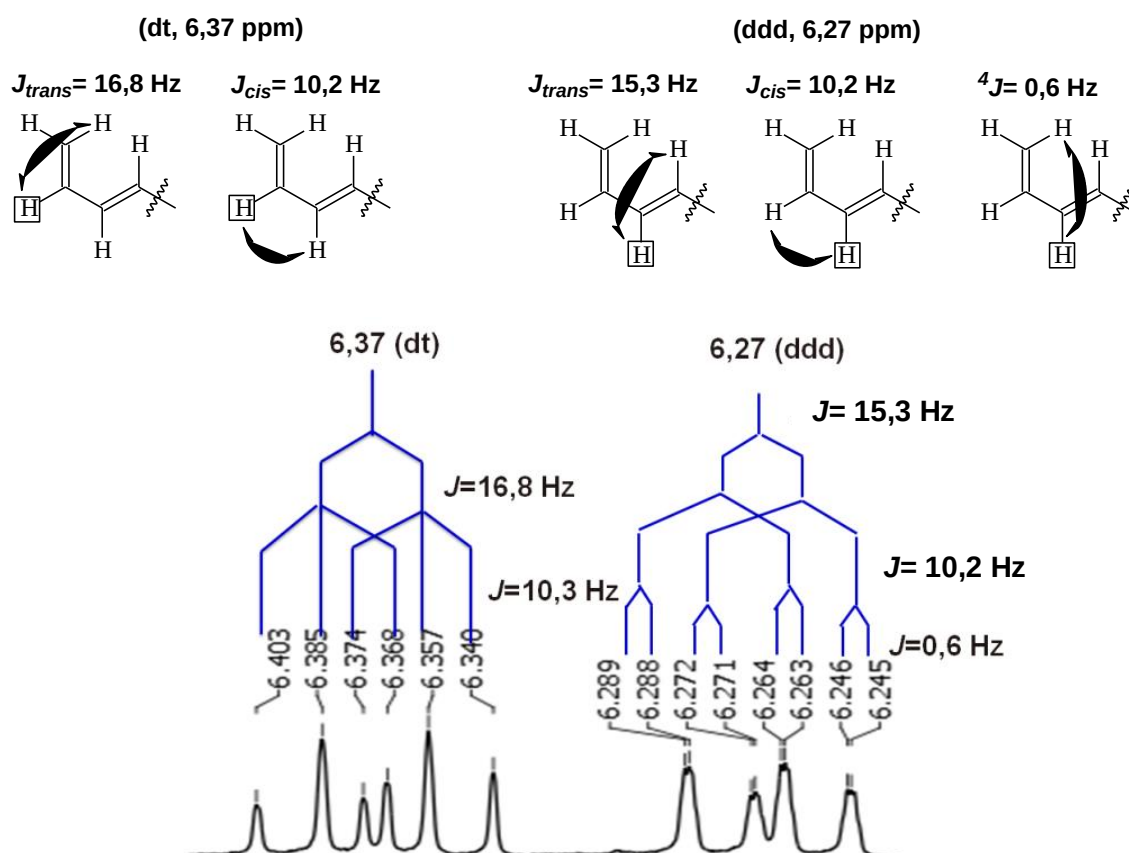
Os pares de duplo-dubletos em δ_{H} 5,06 e 5,19 indicam a presença de uma ligação dupla de alqueno terminal. O valor de $J= 1,4$ Hz ratifica o acoplamento geminal entre estes hidrogênios. Por outro lado, as constantes de acoplamento $^3J= 10,2$ e $16,8$ Hz indicam o acoplamento *cis* e *trans*, respectivamente, dos hidrogênios terminais com um hidrogênio vicinal (**Figura 32**).

Figura 32- Valores de J referentes aos sinais para hidrogênios em 5,06 e 5,19 ppm.



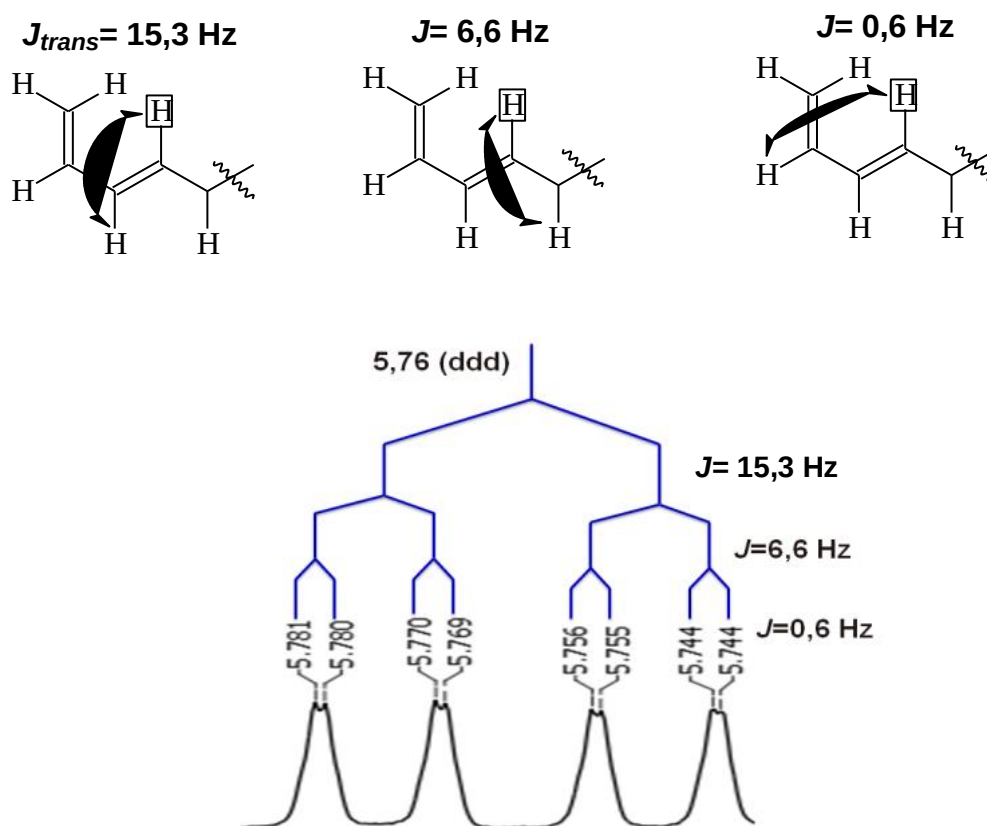
O espectro de RMN de ^1H da substância **S6** mostrou ainda um sinal em 6,37(dt) com valores de $^3J = 10,2$ e $16,8 \text{ Hz}$, sugerindo dois acoplamentos vicinais, um *cis* e outro *trans*. Por outro lado, o ddd em δ_{H} 6,37 exibe dois acoplamentos $^3J_{\text{cis}} = 10,2$ e $^3J_{\text{trans}} = 15,3 \text{ Hz}$, e um acoplamento alílico a longa distância $^4J = 0,6 \text{ Hz}$. (**Figura 33**).

Figura 33- Valores de J referentes aos sinais para hidrogênios em 6,37 e 6,27 ppm.



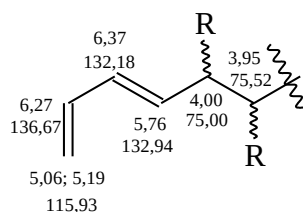
O sinal em δ_H 5,76 apresenta-se como duplo duplo dubleto (ddd) com valores de $J = 15,3$; $6,6$; $0,6 \text{ Hz}$, referentes aos acoplamentos $^3J_{trans}$, ^3J de um hidrogênio ligado ao carbono adjacente a ligação dupla, e ao acoplamento ^4J , respectivamente (**Figura 34**).

Figura 34- Valores de J referentes ao sinal para hidrogênio em 5,76 ppm.



Distintas irradiações seletivas através do experimento de TOCSY-1D foram realizadas com objetivo de indicar quais sinais fazem parte do mesmo sistema de spins. Ao irradiar nos dois duplo-dubletos referentes aos hidrogênios da ligação dupla terminal (**Figura 35**-Em Anexo, página 109) o mesmo sistema de spins foi evidenciado para os sinais em δ_H 3,95 (tl, $J = 6,6$ Hz), 4,00 (ddd, $J = 6,6$; 4,9; 0,6 Hz), 5,76 (ddd, $J = 15,3$; 6,6; 0,6 Hz), 6,27 (ddd, $J = 15,3$; 10,2; 0,6 Hz) e 6,37 (dt, $J = 16,8$; 10,2 Hz). Com estes dados foi possível propor uma parte da estrutura molecular conforme apresentado na **Figura 36**.

Figura 36-Proposta estrutural parcial para a unidade I da substância **S6**.



Adicionalmente, irradiando-se no duplo duplo dubleto (ddd) em δ_H 1,71, ($J= 6,6; 1,4; 0,6$ Hz) foi possível observar que os sinais em δ_H 5,71 (dq, $J= 15,3; 6,6; 1,4$ Hz), 5,52 (ddq, $J= 15,3; 6,6; 1,4$ Hz), 4,00 (ddd, $J= 6,6; 4,9; 0,6$ Hz) e 3,95 (tl, $J=6,6$ Hz) fazem parte do mesmo sistema de spins (espectros de TOCSY-1D em anexo, **Figura 37**, página 110). Os valores de constantes de acoplamento evidenciam que esta parte da molécula também apresenta geometria *trans* e hidrogênios ligados a carbono com hibridização sp^3 ($J= 6,6$ Hz), conforme apresentado nas **Figuras 38-41**.

Figura 38- Valores de J referentes ao sinal para hidrogênio em 1,71 ppm.

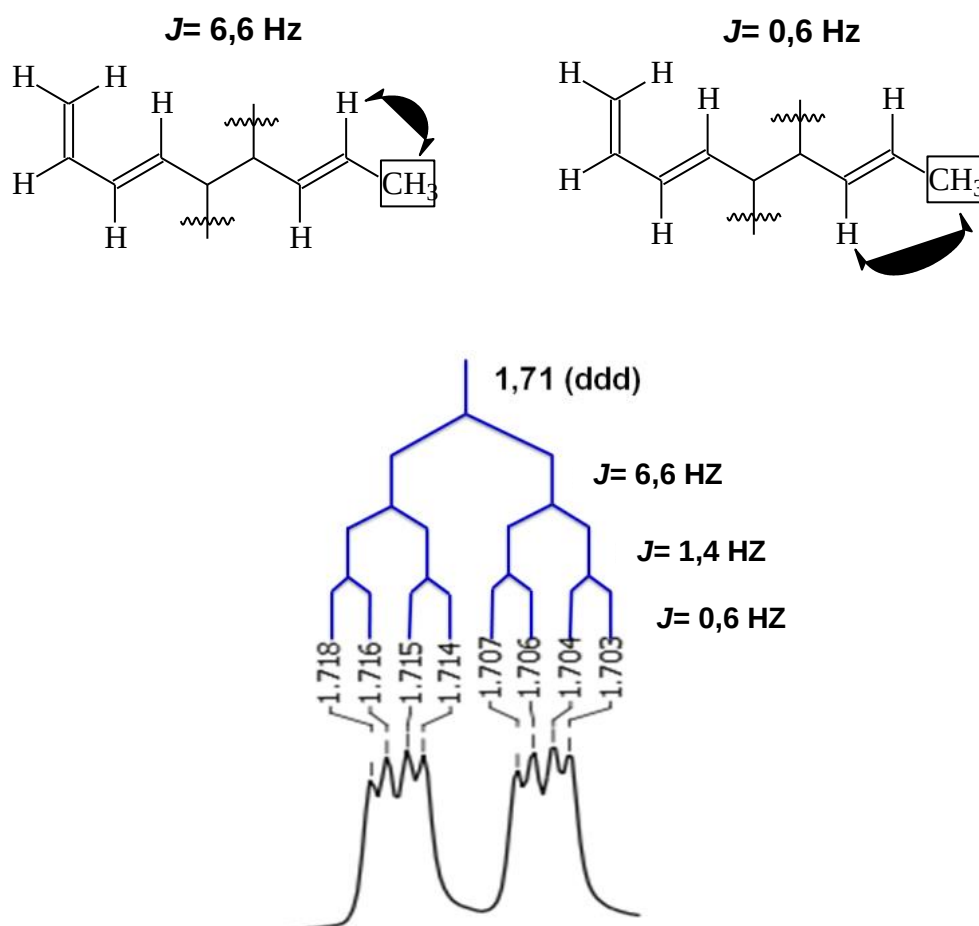


Figura 39- Valores de J referentes ao sinal para hidrogênio em 5,71 ppm

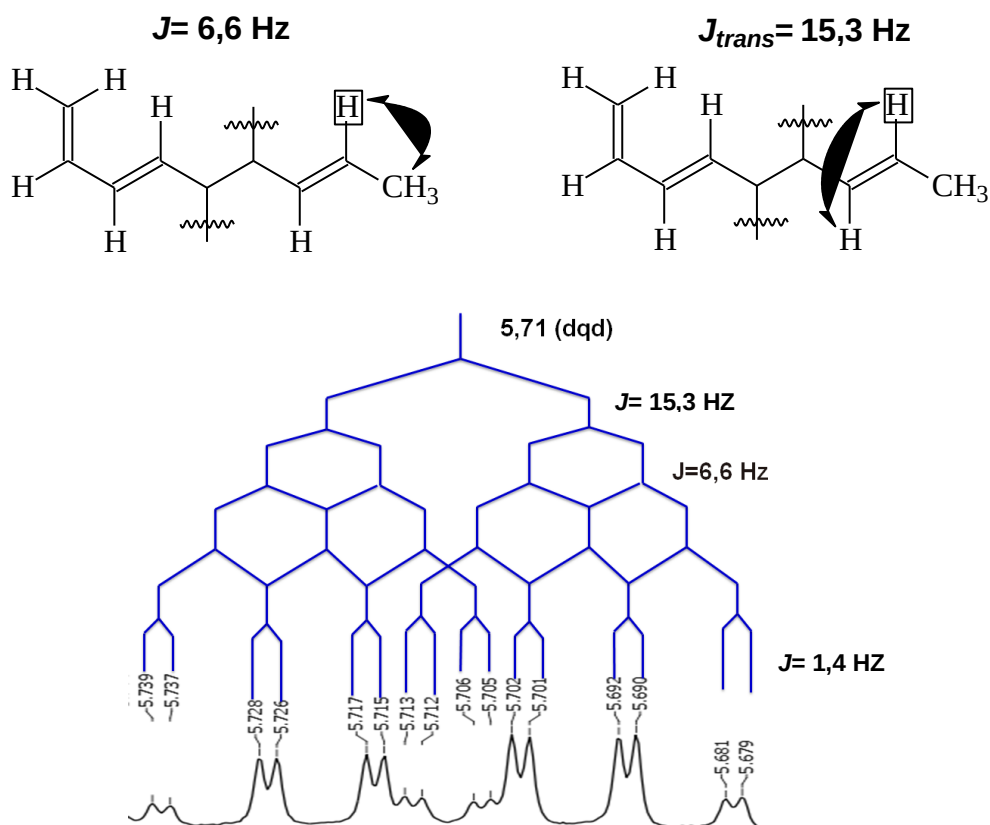


Figura 40- Valores de J referentes ao sinal para hidrogênio em 5,52 ppm.

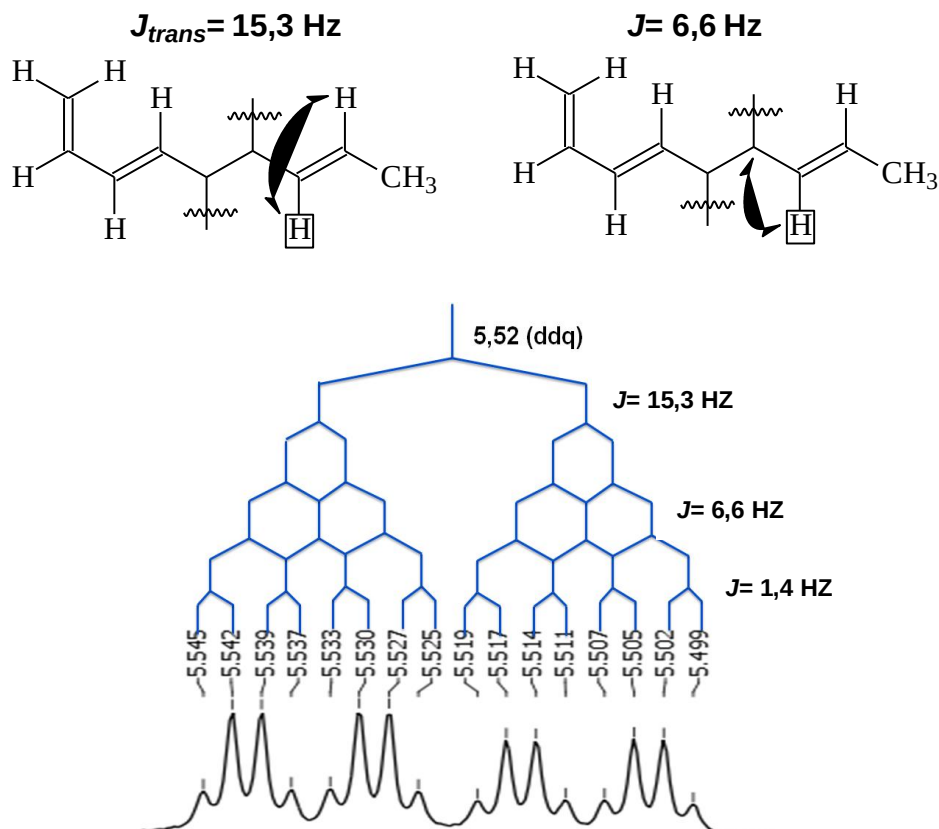
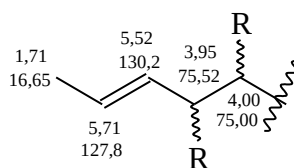


Figura 41-Proposta estrutural parcial para a unidade II da substância **S6**.

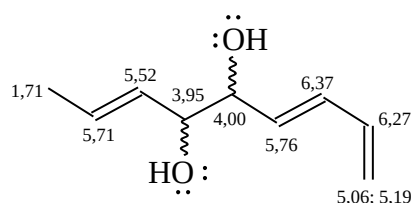


As irradiações no tripleto largo (tl) e no duplo duplo dubleto (ddd) em δ_H 3,95 e 4,00, respectivamente, associadas às informações obtidas pelo experimento de HSQC-TOCSY foram cruciais para proposta estrutural da substância **S6**. Ao irradiar estes sinais, observaram-se as correlações com todos os sinais descritos anteriormente, sugerindo que a estrutura de **S6** apresenta um único sistema de spin (**Figura 42** em anexo, página 111).

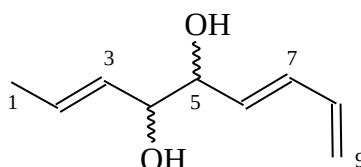
Ao analisar o mapa de contorno de HSQC nota-se que os hidrogênios em δ 3,95 e 4,00 ppm estão ligados aos carbonos em δ 75,5 e 75,0, respectivamente, indicando que sejam carbonos hidroximetínicos.

A repetição do experimento de RMN de ^1H usando DMSO- d_6 permitiu observar o surgimento de dois singletos largos em 4,79 e 4,70 ppm, sugerindo a presença de dois grupos hidroxila na estrutura da substância **S6** (**Figura 43** em anexo, página 112). Avaliando as informações espectrais em conjunto, foi possível propor para a substância **S6**, a estrutura de um diol vicinal insaturado (**Figura 44**).

Figura 44-Proposta estrutural para a substância **S6**.



Buscando a estrutura proposta na base de dados SciFinder® não foram encontrados relatos da mesma na literatura, sugerindo que deve-se tratar de um nova substância. Na **Tabela 7** são mostrados os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros de RMN de ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY são apresentados das **Figuras 45-49** em anexo, páginas 113-117.



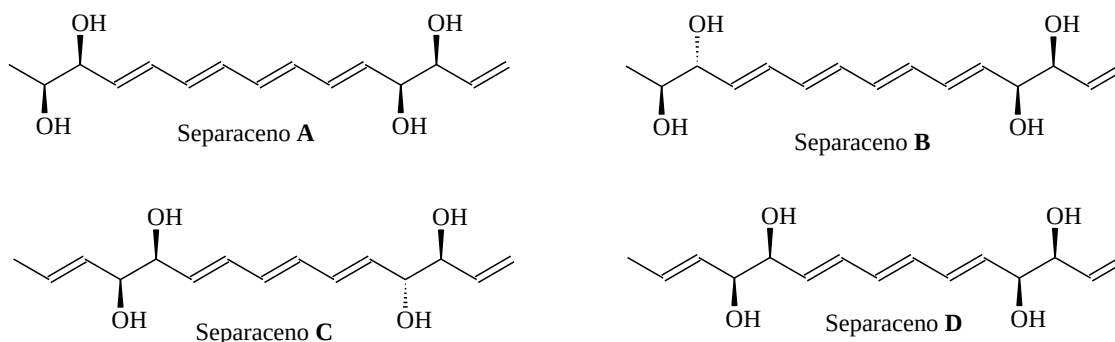
Substância **S6**: (2E, 6E) Nona-2,6,8-trieno-4,5-diol

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S6**.

Posição	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{C}
1	1,71 (ddd, J= 6,6; 1,4; 0,6 Hz, 3H)	16,6
2	5,71 (dq, J= 15,3; 6,6; 1,4 Hz, 1H)	127,8
3	5,52 (ddq, J= 15,3; 6,6; 1,4 Hz, 1H)	130,2
4	3,95 (tl, J= 6,6 Hz, 1H)	75,5
5	4,00 (ddd, J= 6,6; 4,9; 0,6 Hz, 1H)	75,0
6	5,76 (ddd, J= 15,3; 6,6; 0,6 Hz, 1H)	132,9
7	6,27 (ddd, J= 15,3; 10,2; 0,6 Hz, 1H)	136,7
8	6,37 (dt, J= 16,8; 10,2 Hz, 1H)	132,2
9	5,19 (dd, J= 16,8; 1,4 Hz, 1H)	115,9
	5,06 (dd, J= 10,2; 1,4 Hz, 1H)	
-OH	4,79 (sl)	----
-OH	4,70 (sl)	----

Bae e colaboradores (2013) isolaram novos polióis alifáticos insaturados, nomeados de Separacenos A-D (**Figura 50**) da bactéria *Streptomyces* sp. de origem marinha. Alguns destes novos polióis mostraram atividade inibitória da enzima isocitrato-liase, atividade antifúngica contra *Candida albicans*, além de fraca atividade citotóxica contra as linhagens de células carcinogênicas de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e A549, proveniente de carcinoma de pulmão.

Figura 50- Estruturas dos Separacenos A-D.



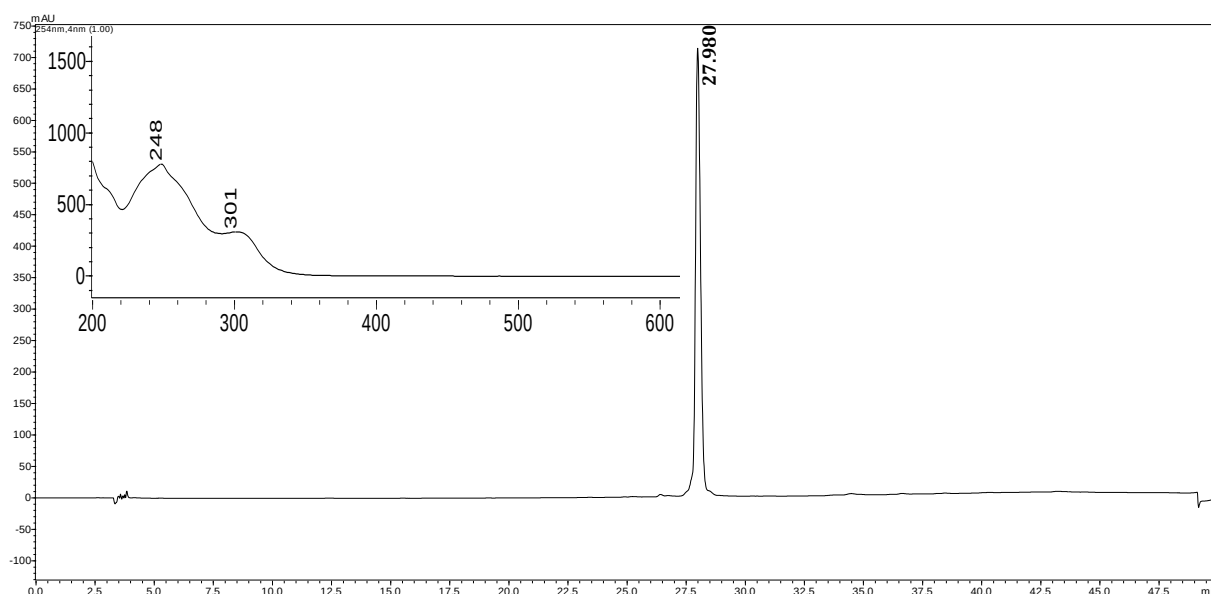
5.1.2.4. Elucidação estrutural da substância S7

No espectro de RMN de ^1H da substância **S7** foram encontrados sinais em δ 7,38 (dd, $J = 8,0, 7,5$ Hz, 1H), 6,81 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,70 (s, 2H), 6,57 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 2,10 (s, 3H). A análise do espectro de massas indicou que esta substância apresenta fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Até o momento não foi possível apresentar uma proposta estrutura plausível para a substância **S7**. Todos os dados espectrais são apresentados nas **Figuras 51-55** nas páginas 118-122 em anexo.

5.1.2.5. Elucidação estrutural da substância S8

A análise da substância **S8** por ESI-EM 20 V no modo positivo, evidenciou que a molécula protonada apresenta m/z 255,0651 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 56** em anexo, página 123). Ao submeter à substância **S8** a análise por CLAE-DAD, modo analítico, verificou-se no cromatograma um único pico com tempo de retenção 27,98 minutos, cujo espectro de UV-Vis apresentou bandas de absorção com λ_{max} em 248 e 301 nm (**Figura 57**).

Figura 57-Cromatograma da substância **S8** e espectro de UV-Vis. Gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H₂O v/v à 1 mL.min⁻¹-254 nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 μm ; 110Å).



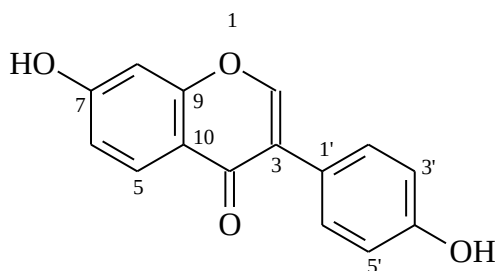
O espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos (d) com $J = 8,7$ Hz, integrados para 2H em 7,37 e 6,80 ppm, sugerindo a presença de um anel aromático *p*-substituído.

Ainda no espectro de RMN de ^1H observaram-se dois dubletos em δ 7,96 ($J = 8,7$ Hz) e 6,87 ($J = 2,4$ Hz) e um duplo dubleto em δ 6,94 ($J = 8,7, 2,4$ Hz), onde cada sinal foi integrado para um hidrogênio. Estes sinais e seus valores de constante de acoplamento indicaram a presença de mais um anel aromático, porém 1,3,4-trisubstituído na estrutura da substância **S8**. Adicionalmente, este espectro mostrou um singleto em δ_{H} 8,23, que apresentou correlação no experimento HSQC com o carbono associado ao sinal em δ_{C} 153, evidenciando uma unidade de carbono monohidrogenado com hibridização sp^2 ligado a um elemento eletronegativo (O ou N). Na **tabela 8** são apresentados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **S8**. Os deslocamentos químicos dos demais carbonos hidrogenados foram atribuídos com o auxílio do mapa de contorno de HSQC, enquanto que os sinais dos carbonos não hidrogenados foram atribuídos parcialmente através das correlações observadas no mapa de contorno de HMBC, já que não foi obtido o experimento de RMN de ^{13}C devido a pouca massa da substância isolada.

Os dados expostos são compatíveis com os descritos na literatura para a isoflavona daidzeína (DEMUNER, 2003).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6)*literatura:* δ 6,82 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3' e H-5'), 6,87 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8), 6,94 (dd, $J = 8,8$ e 2,1 Hz, H-6), 7,39 (d, $J = 8,8$ Hz, H-2' e H-6'), 7,98 (d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 8,28 (s, H-2), 9,54 (s, HO-4'), 10,78 (s, HO-7).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6)*literatura:* δ 102,1 (C-8), 115,0 (C-3' e C-5'), 115,2 (C-6), 116,7 (C-10), 122,6 (C-3), 123,6 (C-1'), 127,8 (C-5), 130,1 (C-2' e C-6'), 152,3 (C-2), 157,2 (C-4'), 157,5 (C-7), 162,6 (C-9), 174,8 (C-4).

Substância **S8**: Daidzeína**Tabela 8-** Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S8**.

Posição	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{C} (ppm)
2	8,29 (s, 1H)	153,28
3	---	*NA
4	---	NA
5	7,96 (d, J= 8,7 Hz, 1H)	127,7
6	6,94 (dd, J= 8,7, 2,4 Hz, 1H)	115,57
7	---	158,0
8	6,87 (d, J= 2,4 Hz, 1H)	102,6
9	---	162,9
10	---	NA
1'	---	NA
2' e 6'	7,37 (d, J= 8,7 Hz, 2H)	130,5
3' e 5'	6,80 (d, J= 8,7 Hz, 2H)	115,30
4'	---	157,3
OH-C4'	9,56 (s, 1H)	---
OH-C7	10,22 (s, 1H)	---

*NA= Valores não atribuídos

Sabe-se que substâncias pertencentes à classe das isoflavonas são metabólitos secundários comumente produzidos por espécies de plantas. Mas, encontrou-se relato da produção de alguns flavonoides no extrato bruto do fungo endofítico *Neotyphodium typhnium* isolado da planta *Poa ampla* (JU, 1998). Coincidentemente a substância **S8** também foi isolada do extrato do gênero *Microascus* sp. (AT04MQ), porém com menor grau de pureza.

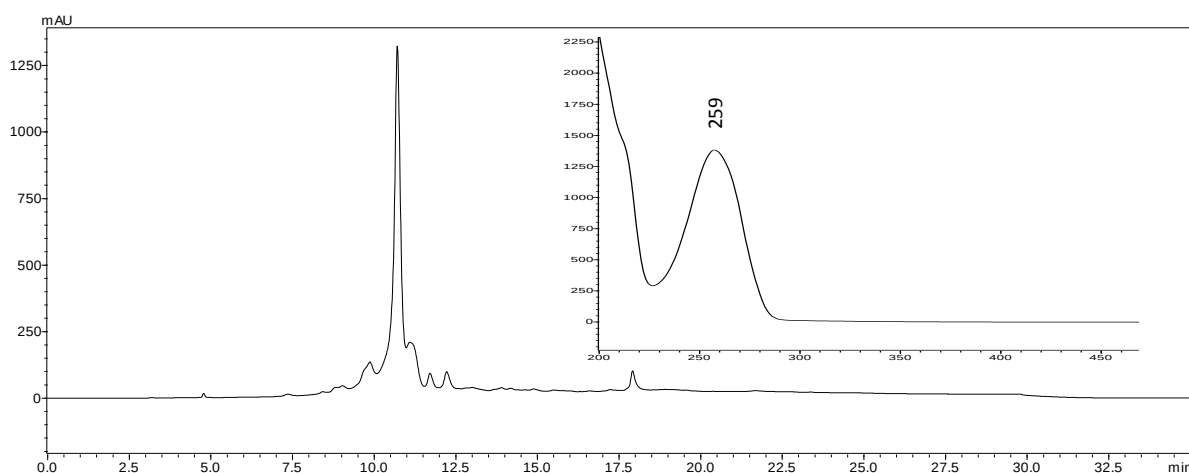
Os espectros de RMN uni e bidimensionais das substâncias isoladas são apresentados em anexo, páginas 124-128, **Figuras 58-62**.

5.2. Análise do perfil químico do extrato AT04Mar (gênero *Microascus* sp.)

A priori o extrato do fungo AT04 foi preparado utilizando água do mar (AT04Mar). Após observar o perfil químico deste extrato por CLAE-DAD e RMN de ^1H e compará-lo com o perfil químico da amostra de referência (branco= meio de cultivo e água do mar), foi possível perceber a grande semelhança entre eles. Isto indica que pode não ter ocorrido produção de metabólitos secundários de interesse químico e biológico, ou caso tenha ocorrido, estes encontram-se em baixa concentração. Além disso, após o preparo do extrato houve a formação de dois precipitados distintos, que provavelmente, são sais inorgânicos oriundos da água do mar, uma vez que estes não apresentaram banda de absorção na região do infravermelho ($600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) e nenhum sinal no espectro de RMN de ^1H .

O terceiro precipitado foi obtido após fracionamento por CC em fase reversa C-18. Trata-se de um sólido amorfo, solúvel em metanol que, quando submetido à análise por CLAE-DAD, monitorando a absorção no comprimento de onda 254 nm, apresentou cromatograma com um pico majoritário com banda de absorção em λ_{max} 259 nm (**Figura 63**).

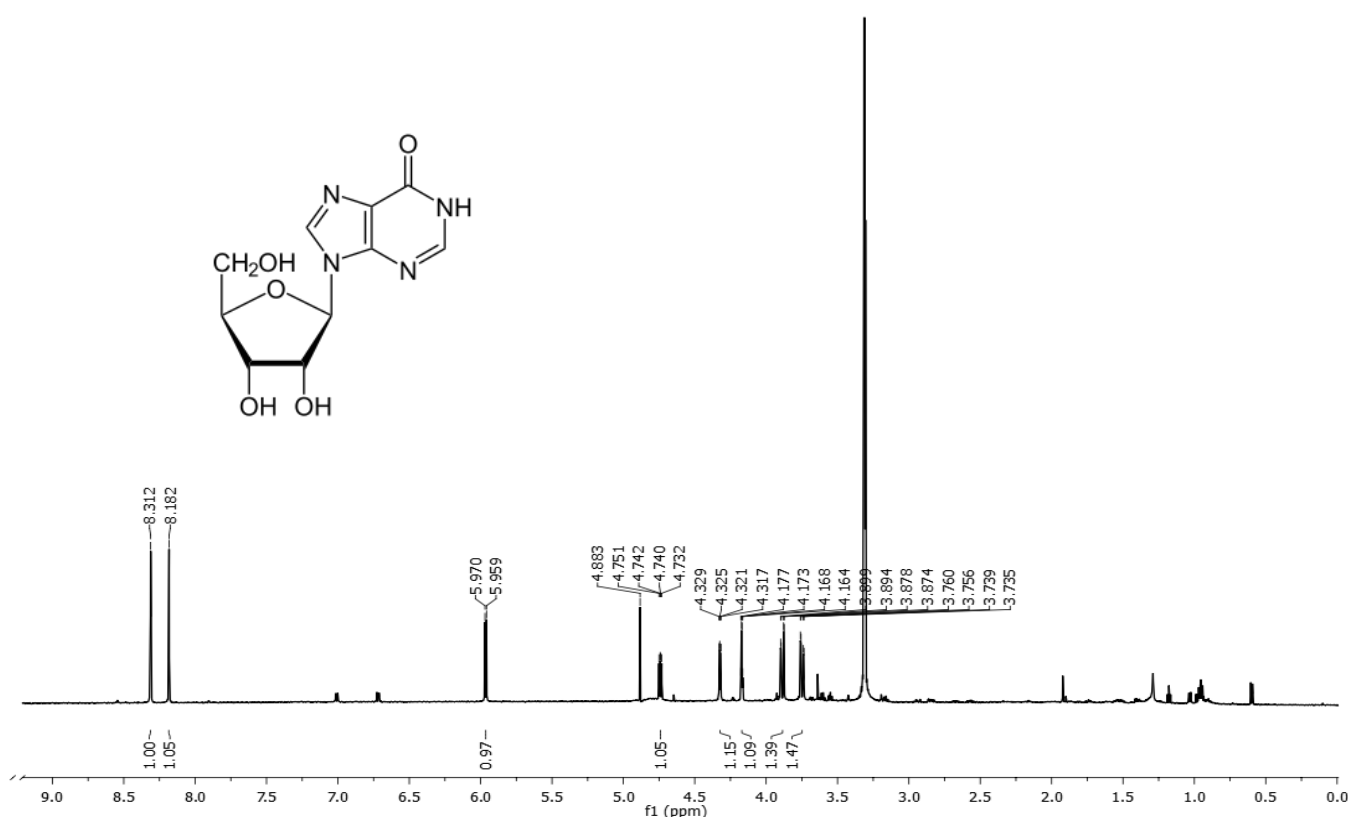
Figura 63- Cromatograma do terceiro sólido precipitado (Gradiente exploratório modo analítico 5 a 100% MeOH:H₂O v/v à 1 mL.min⁻¹-254nm: Coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 μm ; 110Å) e espectros de UV-Vis do pico principal.



O espectro de RMN de ^1H (**Figura 64**) do sólido mostrou dois singletos em δ_{H} 8,31 e 8,18, típicos de hidrogênios aromáticos presentes em

nucleosídeos. Na região do espectro correspondente aos hidrogênios de açúcares, destacam-se cinco duplos dubletos (dd) e um dubleto (d) em δ_H : 5,96 (d, $J= 6,4$ Hz, 1H), 4,74 (dd, $J= 6,4$; 5,1 Hz, 1H), 4,32 (dd, $J= 5,1$; 2,6 Hz, 1H), 4,17 (dd, $J= 5,1$; 2,6 Hz, 1H), 3,89 (dd, $J= 12,5$; 2,5 Hz, 1H) e 3,75 (dd, $J= 12,5$; 2,5 Hz, 1H). Comparando estes dados com os descritos na literatura (RODRIGUES, 2003) foi possível identificar o sólido citado com o nucleosídeo inosina.

Figura 64-Espectro de RMN de ^1H da inosina (MeOH- d_4 , 600 MHz).



Ao realizar um estudo qualitativo (análise feita por CG-EM. Cromatograma em anexo- **Figura 65**, página 129) sobre os constituintes químicos presentes no meio de cultivo PDB e no extrato AT04Mar, foi possível notar a presença das bases nitrogenadas, aminoácidos, açúcares e alguns ácidos orgânicos. Após esta análise, optou-se por preparar um novo extrato do fungo AT04 utilizando água ultrapura MilliQ®, a fim de comparar se o perfil químico das substâncias produzidas por este fungo eram semelhantes às presentes no meio de cultivo.

5.3. Análise do perfil químico do extrato AT04MQ (gênero *Microascus* sp)

Objetivando separar os açúcares, nucleosídeos e quaisquer outras substâncias de alta polaridade oriundas do meio de cultivo, submeteu-se o extrato AT04MQ a uma partição com água antes da total evaporação do acetato de etila ainda presente no mesmo após o processo de extração, originando-se assim a fase aquosa do extrato AT04MQ (F.A.AT04MQ). Esta fase foi analisada por CLAE-DAD e CG-EM, e comparada com o branco (**Figura 66** em anexo, página 130). Estas análises evidenciaram a grande semelhança entre os perfis químicos do branco e da F.A.AT04MQ, sendo a maioria, açúcares, ácidos orgânicos e alguns nucleosídeos.

Como descrito no tópico 4.2.3, após o processo de partição, o extrato AT04MQ foi fracionado por CC em sílica gel 60 comum. A primeira fração obtida deste fracionamento (AT04MQ-1) foi selecionada para estudo químico.

A fração AT04MQ-1 foi fracionada por CLAE-DAD nas condições apresentadas no item 4.3. Este fracionamento resultou no isolamento das substâncias **S9**, **S10**, **S11** e **S12** que foram analisadas por métodos espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais, possibilitando a elucidação estrutural das mesmas.

5.3.1. Elucidação estrutural da substância S9

A conexão dos dados espectroscópicos de RMN e da espectrometria de massas (**Figuras 67-71** em anexo, páginas 131-135) sugeriram que a substância **S9** apresenta fórmula molecular $C_9H_{10}N_2O_2$.

O espectro de RMN de ^1H evidenciou sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,21-7,15 (m) e 7,25 (dt) integrados para 3 e 2 hidrogênios respectivamente, indicando a presença de um anel aromático monosubstituído. Além destes sinais, dois singletos em δ_H 3,80 e 11,85 também foram observados. Este último sinal apresentou-se na forma de um singlete largo característico de -OH.

No espectro de RMN de ^{13}C averiguaram-se a presença de dois carbonos em δ_{C} 165,2 e 151,9 atribuídos aos carbonos das ligações C=O e C=N respectivamente.

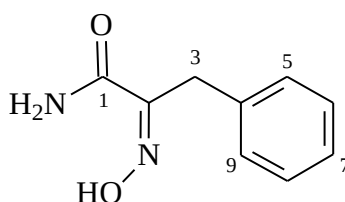
No mapa de contorno de HMBC a principal correlação foi observada entre o singlete em 3,80 ppm com sinais para carbonos em δ_{C} 165,2, 151,9, 137,0 e 128,7.

Ao comparar estes dados com os descritos na literatura, observou-se compatibilidade com os dados espectrais da substância 2-hidroxiimino-3-benzilpropanamida (GUO, 2013).

Guo e colaboradores (2013), em um trabalho sobre biossíntese, isolaram a 2-hidroxiimino-3-benzilpropanamida pela primeira vez de *Aspergillus terreus*, envolvida na biossíntese dos derivados da acilcarnitina que atuam estimulando a oxidação de ácidos graxos.

Em trabalhos anteriores, a mesma substância foi obtida por rotas sintéticas, embora os dados de RMN não tenham sido relatados (IGARASHI, 1967).

Este é o segundo relato do isolamento da substância 2-hidroxiimino-3-benzilpropanamida, e está sendo descrita pela primeira vez para o gênero *Microascus*. A seguir, são apresentados os dados espectrais (**Tabela 9**) e as correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (**Figura 72**).



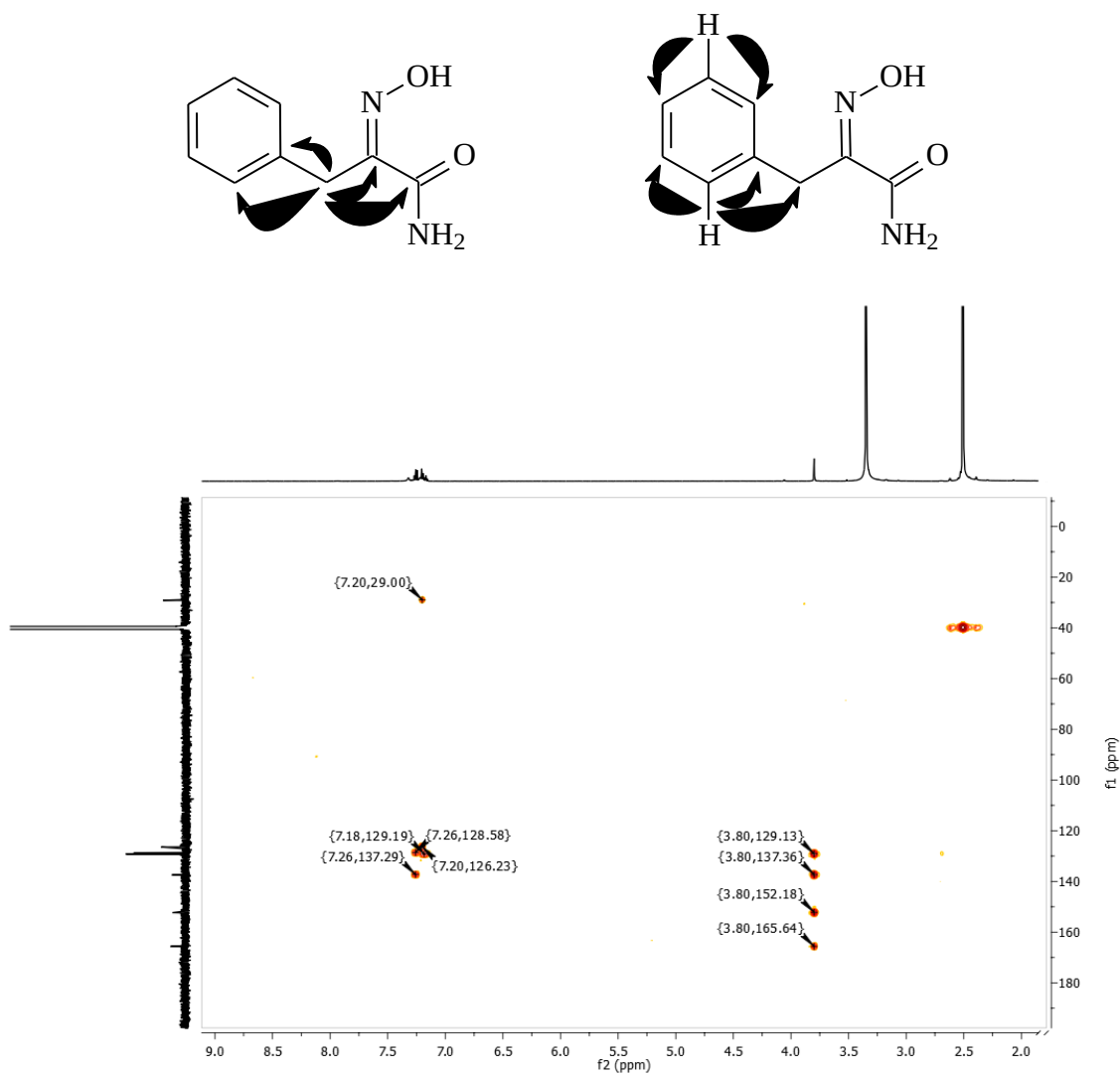
Substância S9: 2-hidroxiimino-3-benzilpropanamida

Tabela 9- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S9**.

Posição	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	---	165,2
2	---	151,9
3	3,80 (s, 2H)	28,7

4	---	137,0
5 e 9	7,25 (dt, $J= 9,0, 1,7$ Hz, 2H)	128,7
6 e 8	7,21 – 7,15 (m, 3H)	128,3
7	7,21 – 7,15 (m, 3H)	126,0
-OH	11,85 (sl)	---
-NH ₂	7,32 e 7,22 (sl)	---

Figura 72- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S9**.

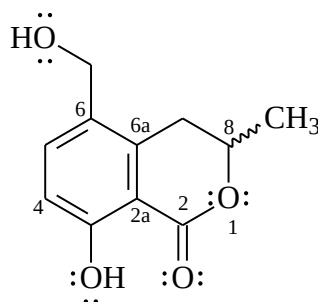


5.3.2. Elucidação estrutural da substância **S10**

As análises dos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C (**Figuras 73 e 74** em anexo, páginas 136 e 137) da substância **S10** permitiram identificar a presença de hidrogênios e carbonos com valores de δ semelhantes aos

encontrados nos espectros das substâncias **S1** e **S2**, como por exemplo, um dubleto em δ_H 1,45 ($J= 6,6$ Hz), dois duplos dubletos em δ_H 2,78 e 3,15, e um dqd em δ_H 4,76. Já na região de hidrogênios aromáticos foram verificados dois dubletos com $J= 8,4$ Hz em 6,87 e 7,55 ppm. Esses dados sugerem que a substância **S10** também pertence à classe das diidroisocumarinas. Ainda no espectro de RMN de ^1H , observou-se um quadrupletto (q) em 4,43 ppm ($J= 12,9$ Hz), que apresentou acoplamento a longa distância com um singlete largo em δ_H 5,12 típico de hidroxila. Esta e outras correções foram observadas através do mapa de contorno de COSY e HMBC (correlações apresentadas na **Figura 75 e 76**). O mapa de contorno de HSQC é apresentado em anexo **Figura 77**, página 138.

De acordo com as análises dos espectros e comparação com os dados descritos na literatura (CAMBIE, 1991) a substância **S10** foi identificada com a diidroisocumarina 6-hidroximetilmeleína.



Substância **S10**: 6-hidroximetilmeleína

Tabela 10- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S10**.

Posição	δ_H (ppm), mult., J (Hz)	δ_C
2	---	170,2
2a	---	108,4
3	---	160,6
4	6,87 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H)	115,2
5	7,55 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H)	136,5
6	---	130,4
6a	---	138,7
7	3,15 (dd, $J_a= 16,8$; 3,0 Hz, 1H); 2,78 (dd, $J_b= 16,8$; 12,3 Hz, 1H)	30,7
8	4,76 (dqd, $J= 12,3$; 6,6; 3,0 Hz, 1H)	76,0
-OH	5,12 (sl)	---
-CH ₃	1,45 (d, $J= 6,6$ Hz, 3H)	20,9

-CH ₂ OH	4,43 (q, J= 12,9, 2H)	60,5
Ar-OH	11,02 (sl)	---

Figura 75- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância **S10**.

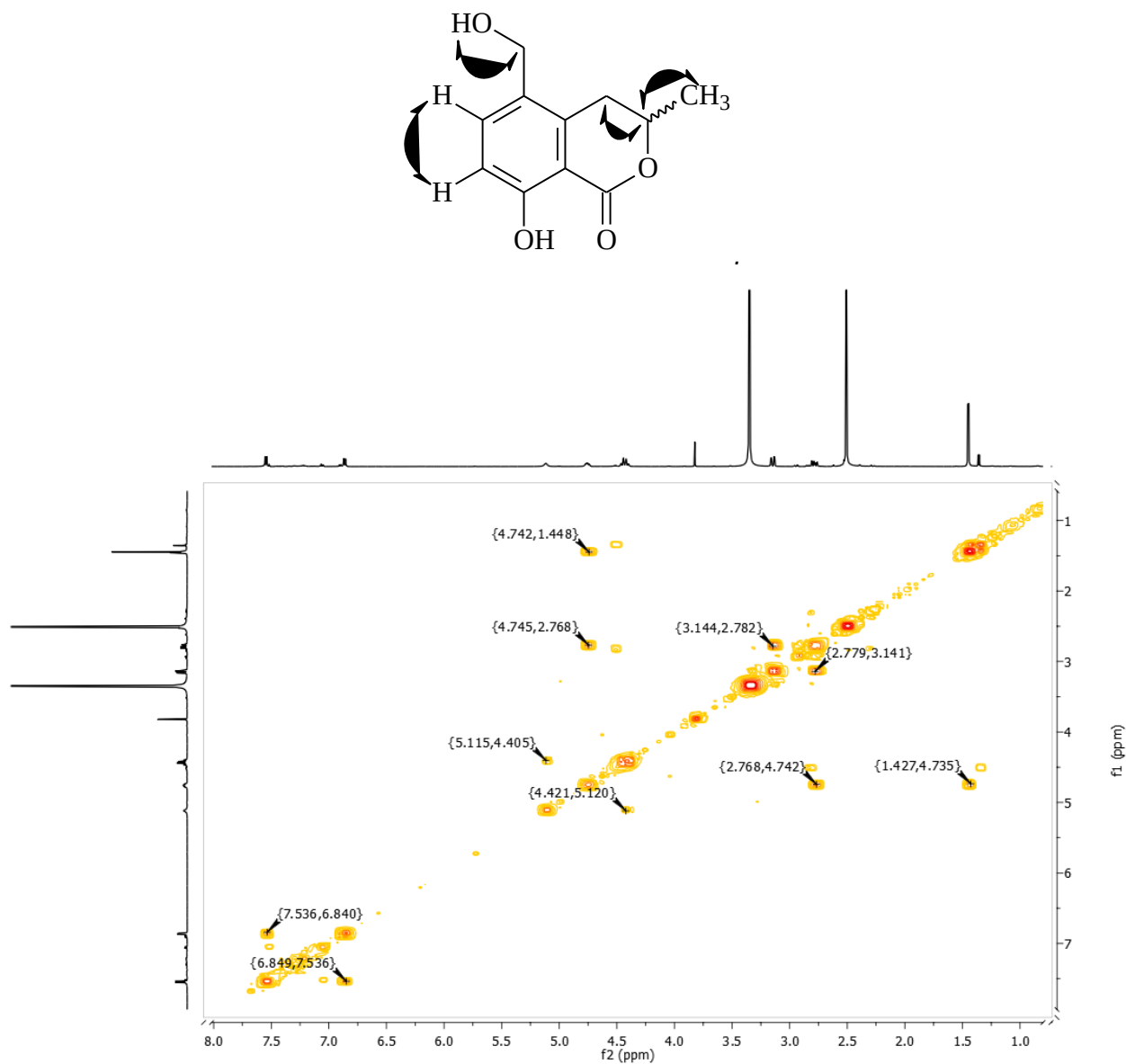
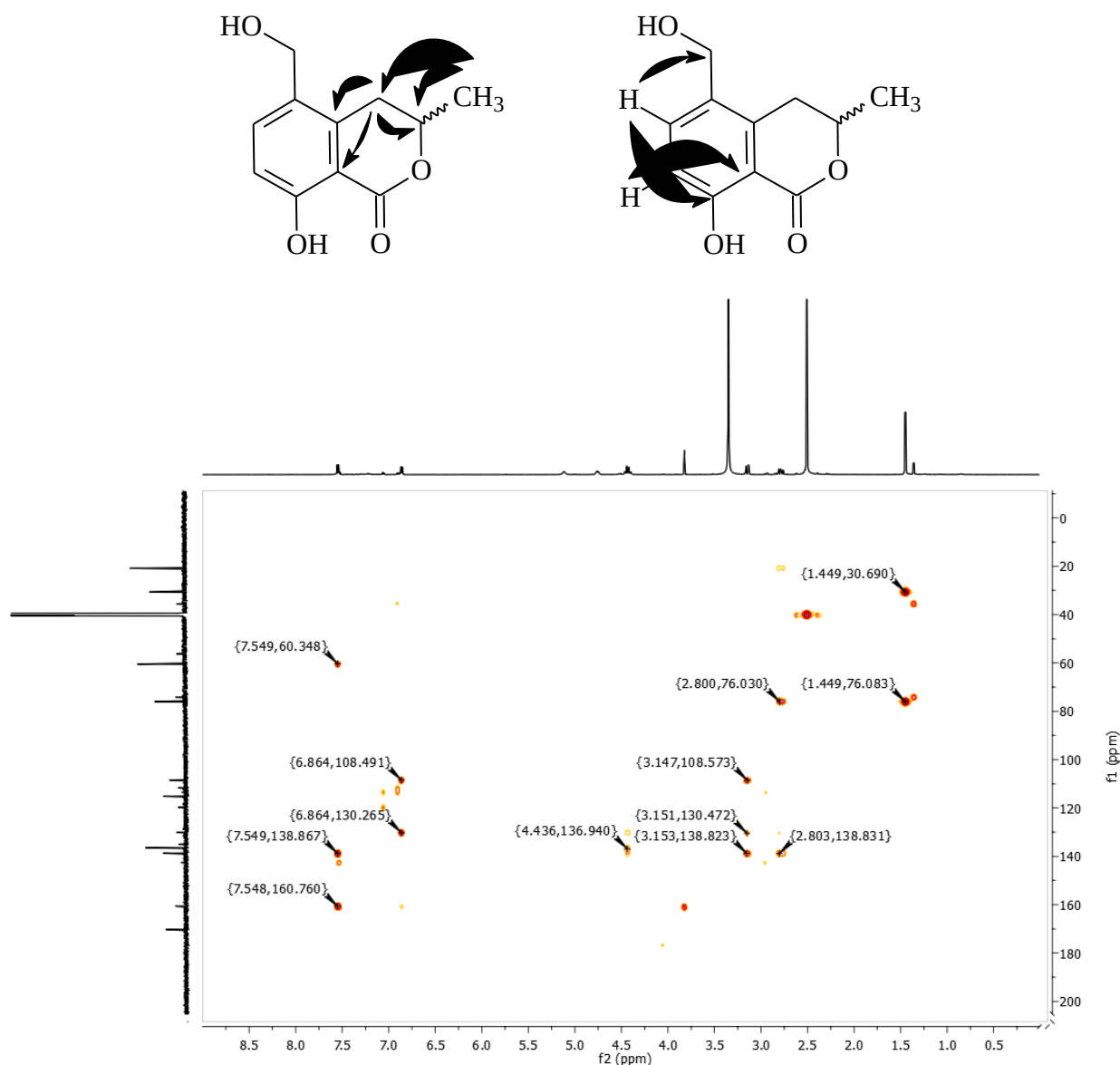


Figura 76- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S10**.

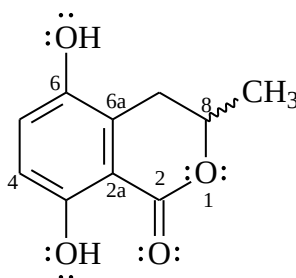
Nos espectros apresentados existem sinais que não foram atribuídos à substância **S10** e que apresentam valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos próximos aos descritos para substância **S10**, o que sugere tratar-se de mais uma substância pertencente à classe das diidroisocumarinas.

5.3.3. Elucidação estrutural da substância **S11**

Os espectros uni e bidimensionais (**Figuras 78-80** em anexo, páginas, 139-141) da substância **S11** exibiram grande semelhança com os espectros da

6-hidroxi metilmeleína, diferindo-se apenas na ausência do quadrupeto em δ_H 4,43, e presença de um singlete largo em δ_H 9,40, atribuído a hidroxila ligada ao anel aromático.

No mapa de contorno de COSY as principais correlações observadas (**Figura 81**) foram entre o hidrogênio em δ_H 4,74 com dois duplos dubletos e um dubleto em δ_H 3,08, 2,78 e 1,44, respectivamente. Por outro lado, no espectro de HMBC (**Figura 82**) as principais correlações destacadas foram: δ_H 1,44 $\rightarrow$ δ_C 76,4; δ_H 1,44 $\rightarrow$ δ_C 28,5; δ_H 6,73 $\rightarrow$ δ_C 146,1 e δ_H 10,40 $\rightarrow$ δ_C 154,4 e 115,7. Estes dados e comparação com os descritos na literatura (OLIVEIRA, 2009) permitiram identificar a substância **S11** com a diidroisocumarina 6-hidroximeleína. Na **Tabela 11** encontram-se os dados espectrais.



Substância **S11**: 6-hidroximeleína

Tabela 11- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S11**.

Posição	δ_H (ppm), mult., J (Hz)	δ_C
2	---	170,1
2a	---	108,6
3	---	154,4
4	6,73 (dd, J= 9,0; 0,6 Hz, 1H)	115,7
5	7,08 (d, J= 9,0 Hz, 1H)	124,4
6	---	146,1
6a	---	125,0
7	3,08 (dd, J_a = 16,8; 3,5 Hz, 1H); 2,78 (dd, J_b = 16,8; 12,3 Hz, 1H)	28,5
8	4,74 (dq, J= 12,3; 6,6; 3,5 Hz, 1H)	76,4
C3-OH	sl, 10,40	---
C6-OH	sl, 9,40	---
-CH ₃	1,44 (d, J= 6,6 Hz, 3H)	20,9

Figura 81- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância **S11**.

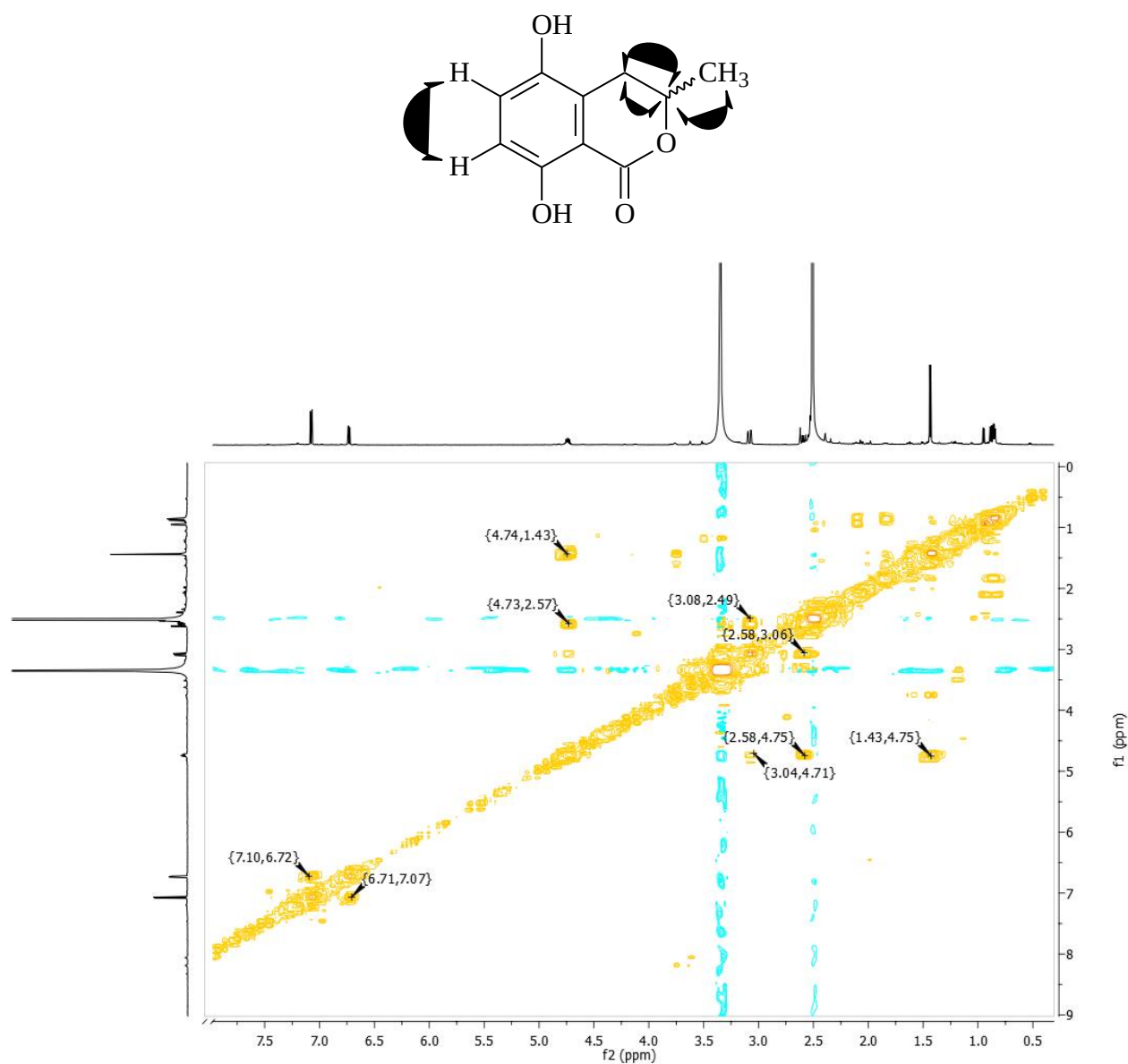
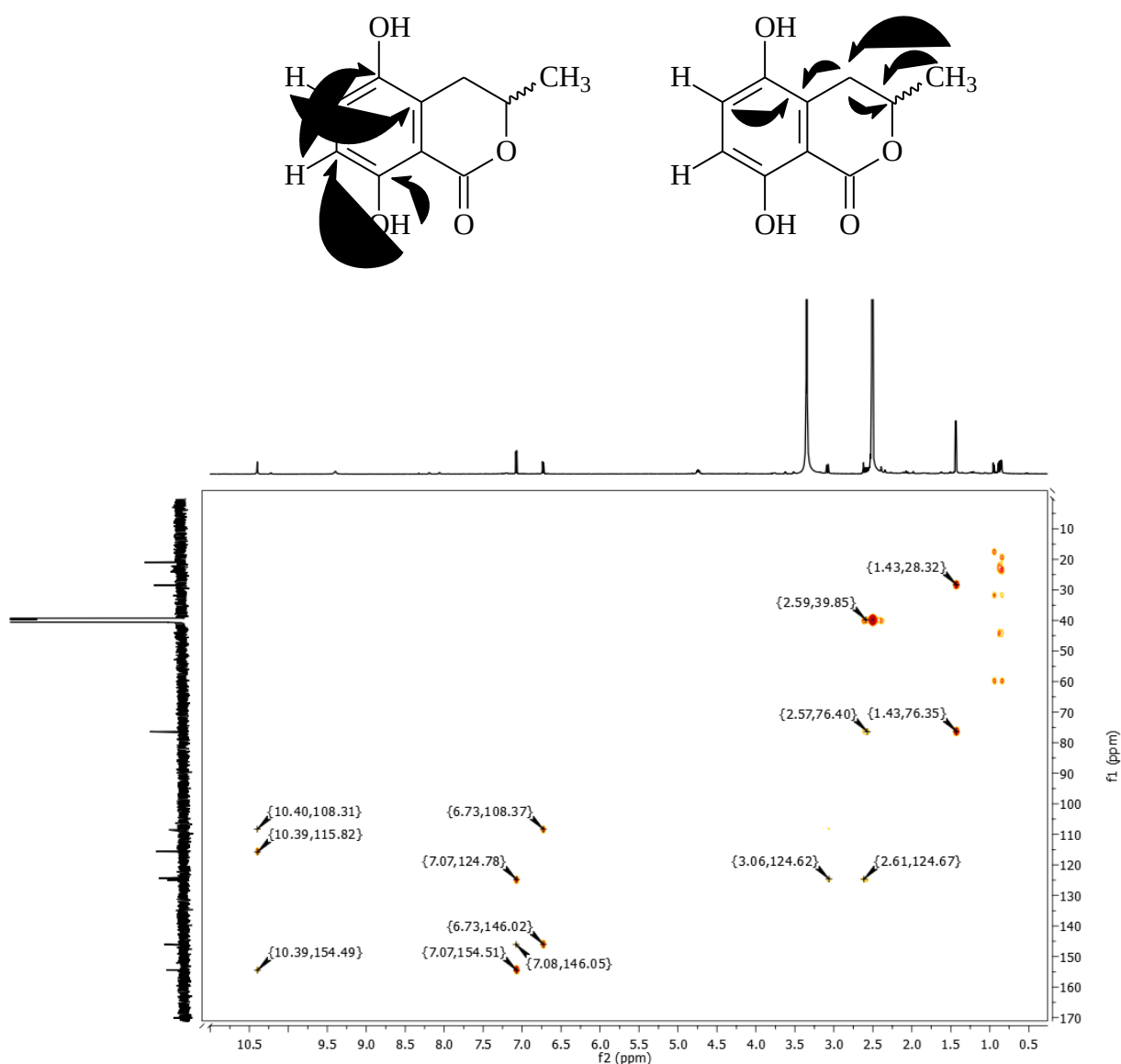


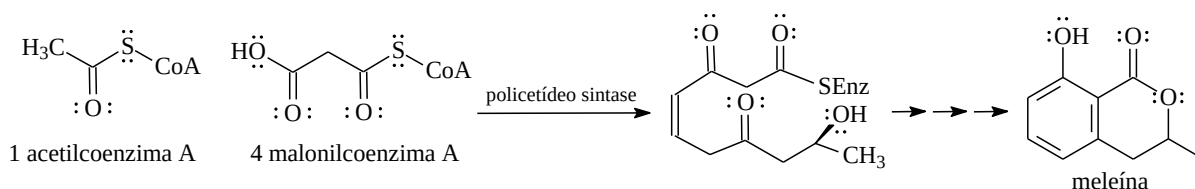
Figura 82- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S11**.

As diidroisocumarinas são metabólitos secundários comumente produzidos por fungos, bactérias, plantas e insetos, sendo isoladas de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Streptomyces* e outros (QADEER, 2007). Dentre as atividades biológicas descritas para as diidroisocumarinas, destacam-se as atividades antimicrobiana, antialérgica, antimalárica e antifúngica, sendo ativa frente a diversos fungos patogênicos para humanos e fitopatogênicos (KUTSCHERA, 2003; ÖZCAN, 2007; OLIVEIRA, 2009).

Do ponto de vista biossintético, as diidroisocumarinas derivadas da meleína são formadas pela condensação entre 1 unidade de acetil-CoA e 4

unidades de malonil-CoA, sendo a primeira etapa, catalisada pela enzima poliketídeo-sintase (GALLO, 2012) (**Figura 83**).

Figura 83- Biossíntese das diidroisocumarinas derivadas da meleína.

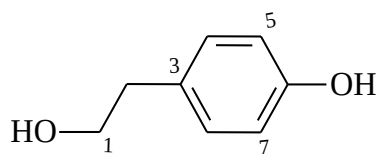


5.3.4. Elucidação estrutural da substância **S12**

O espectro de RMN de ^1H da substância **S12** mostrou-se característico para substância aromática *p*-substituída, com sinais em δ_{H} 6,99 e 6,65 na forma de dubletos (d) com $J = 8,4$ Hz, cada dubleto integrando para 2 hidrogênios. Estes sinais correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos em δ_{C} 130,1 e 115,4 respectivamente. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados nas **Figuras 84 e 85** em anexo, páginas 142 e 143.

Sinais para hidrogênios metínicos também foram encontrados no espectro em δ_{H} 2,60 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H) e 3,52 (td, $J = 7,3; 5,3$ Hz, 2H), associados aos carbonos com sinais em 38,6 e 63,1 respectivamente. Um singlete largo em δ_{H} 9,1 foi observando, indicando a presença de uma hidroxila fenólica. Adicionalmente, foi observado um tripleto em 4,57 ppm com $J = 5,3$ Hz, atribuído a uma hidroxila. Este valor de J sugere um acoplamento ^3J entre o hidrogênio do grupo -OH e os hidrogênios ligados ao carbono α . Este e outros acoplamentos foram observados por meio dos mapas de contornos de COSY e HMBC (**Figuras 86 e 87**). O mapa de contorno HSQC encontra-se em anexo na **Figura 88**, página 144.

Todos os dados espectrais são compatíveis com os descritos na literatura para o feniletanoide tirosol. O tirosol já foi isolado dos fungos endofíticos *Colletotrichum crassipes* (CAFÊU, 2007), *Phomopsis oblonga* e *Ceratocystis fimbriata* (GUIMARÃES, 2006) e apresenta atividade antifúngica contra *Lagenidium callinectes*, um fungo que contagia embriões da lagosta americana (*Homarus americanus*) (GUIMARÃES, 2006).

Substância **S12**: Tirosol**Tabela 12**- Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) para a substância **S12**.

Posição	δ_{H} (ppm), mult., J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	3,52 (td, J= 7,3, 5,3 Hz, 2H)	63,1
2	2,60 (t, J= 7,3 Hz, 2H)	38,7
3	---	129,9
4 e 8	6,99 (d, J= 8,4 Hz, 2H)	130,1
5 e 7	6,65 (d, J= 8,4 Hz, 2H)	115,9
4'	---	155,9
-OH	4,57 (t, J= 5,3 Hz)	---
Ar-OH	9,14 (s)	---

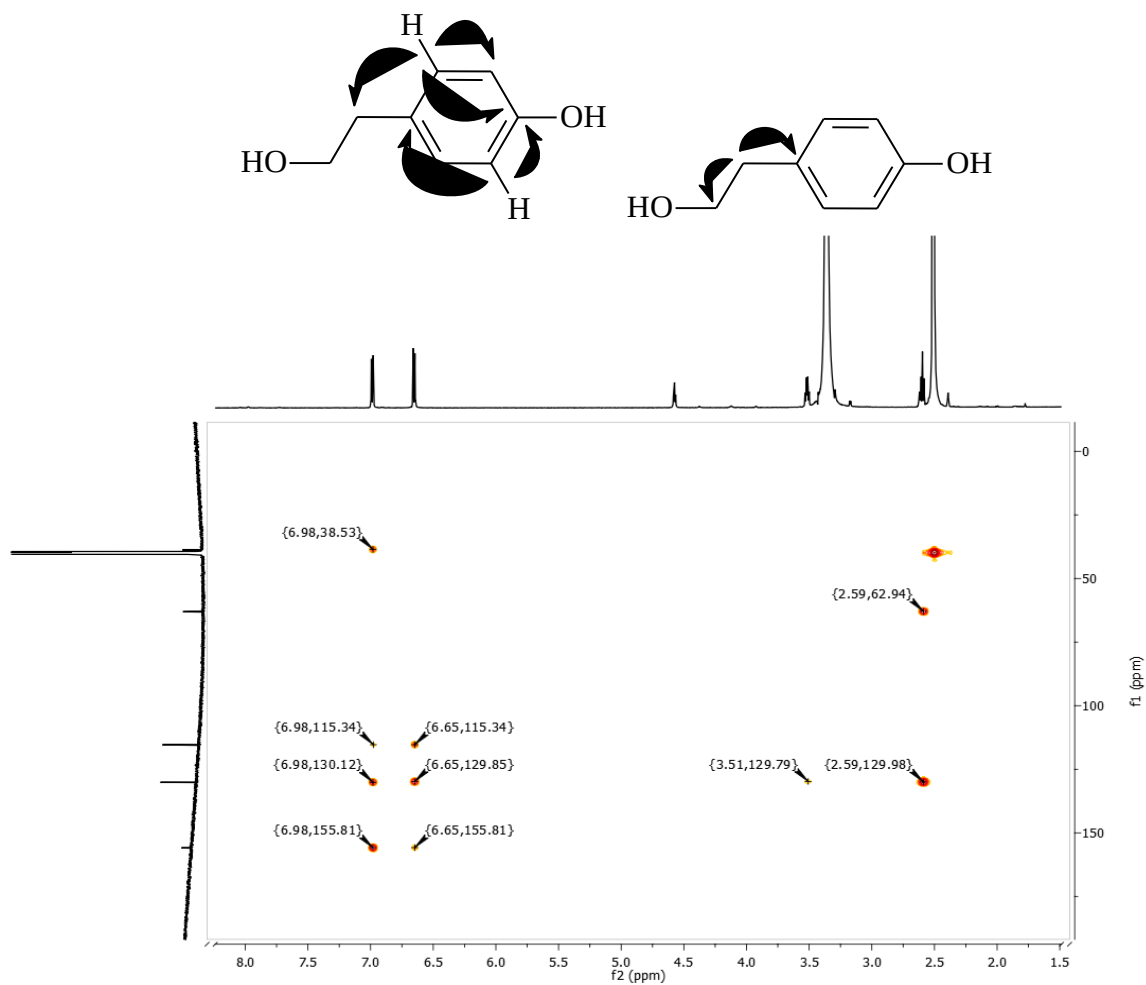
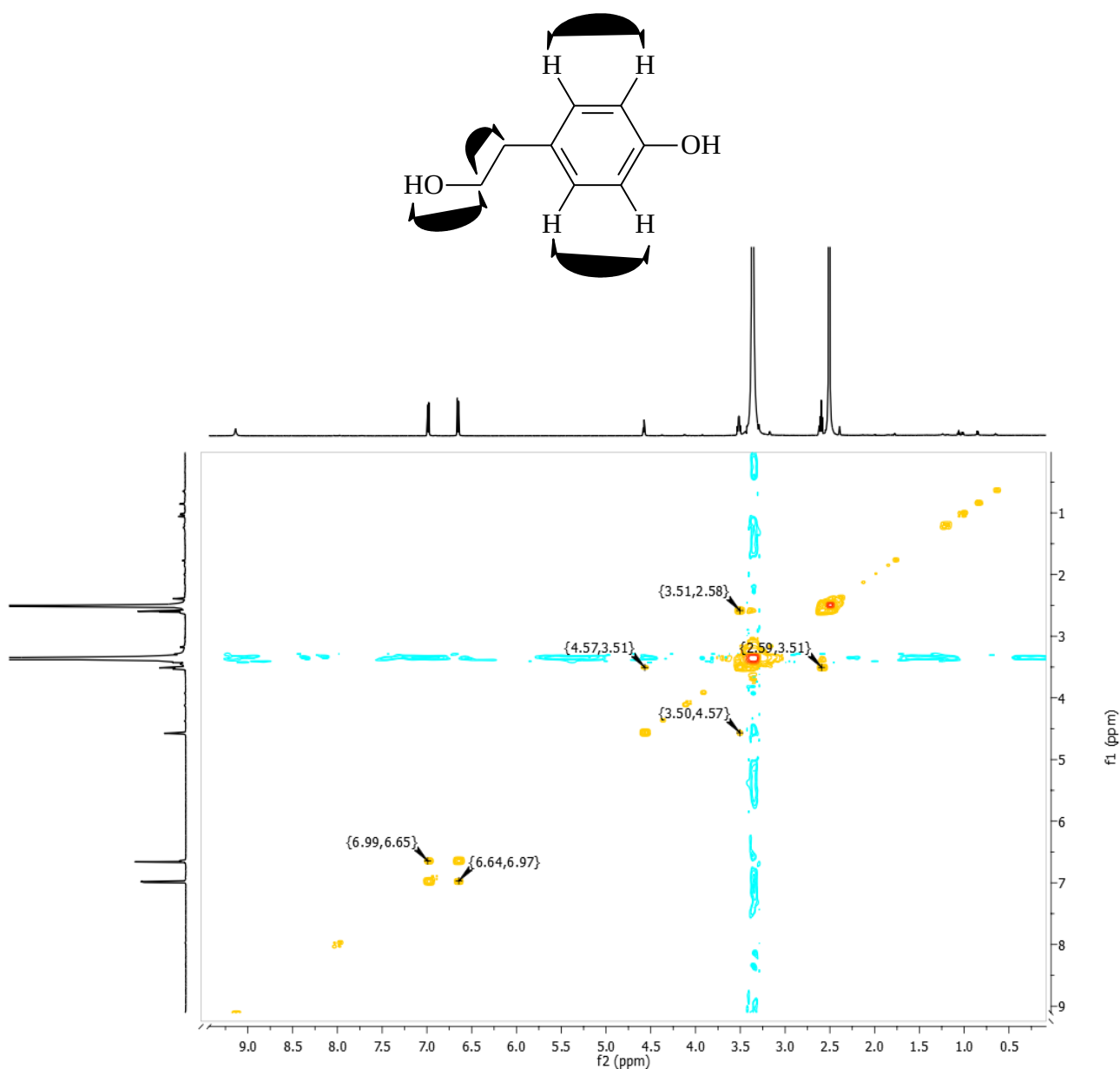
Figura 86- Correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **S12**.

Figura 87- Correlações observadas no mapa de contorno de COSY da substância **S12**.

5.4. Avaliação da atividade antifúngica

Na **Tabela 13** são expressos os resultados obtidos para a atividade antifúngica dos extratos AT04Mar e AT02, bem como das amostras resultantes de seu fracionamento por cromatografia. Pode-se observar que o extrato AT02 e a fração AT02-4 apresentaram atividade antifúngica moderada e fraca frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, enquanto o extrato AT04Mar não apresentou atividade antifúngica.

Tabela 13 - Atividade antifúngica dos extratos, AT04Mar, AT02 e suas frações obtidas por bioautografia em CCD[#].

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
AT02	0,23 a 0,32 ^{**} ; 0,47 a 0,61 ^{**} ; 0,70 a 0,75 ^{**}	0,22 a 0,31 [*] ; 0,49 a 0,75 ^{**}
AT02 - 1	i	i
AT02 - 2	i	i
AT02 - 3	i	i
AT02 - 4	0,75 a 0,81 [*]	0,75 a 0,82
AT02 - 5	i	i
AT04Mar	i	i
padrão	origem ^{***}	origem ^{***}

Legenda: [#] Rf em CCD; ^{*}atividade fraca, ^{**} atividade média, ^{***} atividade forte, i = inativo.

Esses resultados evidenciam que o fungo endofítico *Nodulisporium* sp. (AT02) pode ser promissor, pois produz substâncias bioativas que podem exercer papel ecológico na espécie associada, bem como capazes de atuar em mecanismos de autodefesa contra outros micro-organismos fitopatogênicos, contribuindo para o entendimento das relações simbióticas entre a alga hospedeira *Asparagopsis taxiformis* e o fungo endofítico *Nodulisporium* sp.

5.5. Avaliação do potencial citotóxico

O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos e frações foi avaliado pelo método do MTT contra duas linhagens de células tumorais: HCT-116 (côlon - humano) e (MCF-7) (mama-humano). A atividade citotóxica das amostras testadas é apresentada na **Tabela 14**, com seus respectivos valores de CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). É possível observar que nenhuma das amostras demonstrou inibição da proliferação celular tumoral em níveis significativos nas linhagens testadas, sendo, portanto consideradas não ativas frente a estas duas linhagens.

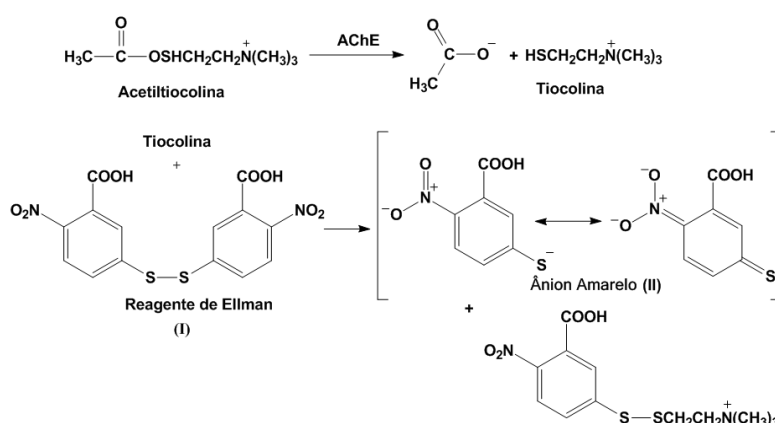
Tabela 14 - Atividade citotóxica dos extratos AT04Mar, AT02 e suas frações.

Amostra	Cl ₅₀ (ug.mL ⁻¹)	
	HCT-116	MCF-7
AT 02	10.34 6.76 –15.83	-
AT 02-2	-	> 50
AT 02-4	> 50	-
AT 02-5	> 50	-
AT04Mar	-	> 50

5.6. Avaliação da atividade anticolinesterásica por cromatografia de bioafinidade

Os ensaios de atividade foram feitos de acordo com o método modificado de Ellmann (ELLMAN, 1961). Tal método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm, **Figura 89**.

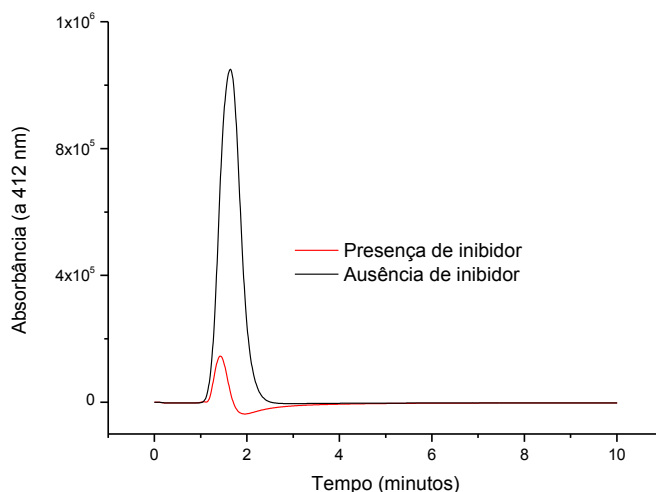
Figura 89- Representação da catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.



O monitoramento da reação enzimática foi observado pela absorbância corresponde à formação do produto da reação enzimática. A seguir apresenta-se o cromatograma (**Figura 90**) representando a diminuição da banda de

absorção referente à formação do produto na presença e ausência do inibidor padrão.

Figura 90- Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChEe na presença do inibidor padrão a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.



De acordo com os dados expostos na **Tabela 15**, algumas frações, subfrações e os extratos AT02 e AT04MQ mostraram-se ativas frente às enzimas acetilcolinesterase humana e de enguia elétrica (AChE-hu e AChE-ee), merecendo destaque as frações AT02-2, AT02-3, a subfração AT02-2F2 e os extratos AT02 e AT04MQ.

Tabela 15- Atividade anticolinesterásica dos extratos, frações e substâncias purificadas dos fungos *Nodulisporium* sp e *Microascus* sp.

Compostos	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% inibição ICER-AChE _{ee}	% inibição ICER-AChE _{hu}
Galantamina (padrão)	200	89,9	97,6
S3	200	17,3	0
S4	200	18,4	0,263
AT02-2-4	300	17,5	42,8
AT02-2-5	300	27,8	77,9
AT04MQ	300	17,8	100
AT02	300	89,5	94,0
AT02-1	200	16,4	33,2
AT02-2	200	41,4	81,2
AT02-3	200	0	92,1
AT02-4	200	49,1	17,0

AT04MQ-1	200	19,3	77,0
AT02-2F2	200	51,3	93,2

Não há relatos na literatura sobre o estudo químico e biológico dos endófitos pertencentes ao gênero *Nodulisporium* sp e *Microascus* sp associados à alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, sendo assim, os resultados relatados neste trabalho ressaltam a importância da investigação dos micro-organismos associados ao ambiente marinho, em especial por sua destacada quimiodiversidade e potencial bioatividade.

6. CONCLUSÕES

Após realizar o estudo químico e biológico dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. e *Microascus* sp. associados à *Asparagopsis taxiformis* foi possível verificar a variada produção de metabólitos secundários, sendo a maioria pertencente a classe das diidroisocumarinas e dicetopiperazinas. Além disso, foram isolados uma isoflavona, um derivado hidroxiiimino, um composto fenólico, além de uma amida e um diol vicinal insaturado, identificados em mistura. Vale ressaltar que, este diol está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

A variação na produção metabólica foi observada quando variou-se a composição do meio de cultivo com água do mar para água ultrapura MilliQ® no crescimento do fungo endofítico do gênero *Microascus* (AT04). Foram produzidos metabólitos mais interessantes do ponto de vista químico e biológico quando o crescimento foi realizado em água ultrapura MilliQ®, evidenciando influência importante da água do mar no metabolismo do fungo *Microascus* sp.

O ensaio antifúngico contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* indicaram que o fungo pertencente ao gênero *Nodulisporium* produziu uma ou mais substâncias com potencial atividade antifúngica. Deve-se ressaltar que as bioatividades de diidroisocumarinas e dicetopiperazinas isoladas e identificadas neste trabalho, foram anteriormente relatadas na literatura, incluindo atividade antifúngica. Já o ensaio anticolinesterásico evidenciou atividade de algumas frações e do extrato AT02 frente às enzimas acetilcolinesterase humana e de enguia elétrica.

Estes resultados ressaltam a importância da investigação dos organismos marinhos, com destaque para os microrganismos, uma vez que estes são ainda sub-explorados no âmbito das pesquisas realizadas no Brasil e que apresentam enorme quimiodiversidade, representando importante fonte de substâncias para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos através da exploração sustentável da biodiversidade marinha brasileira. Os estudos envolvendo microrganismos obtidos do ambiente marinho fornecem, ainda, informações relevantes para o melhor entendimento das relações simbióticas entre os organismos hospedeiros, em nosso caso representados pela alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, e as linhagens fúngicas a ela associadas,

passíveis de serem explorados em estudos ecológicos, cruciais para melhor entendimento e proteção dos ecossistemas costeiros.

REFERÊNCIAS

- ANDREAKIS, N.; PROCACCINI, G.; KOOISTRA, W. H. C. F. *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations. **European Journal of Phycology**, v. 39, p. 273-283, 2004.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. Jr. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000.
- BADDLEY, J.; MOSER, S. A.; SUTTON, D. A.; PAPPAS, P. G. *Microascus cinereus* (Anamorph *scopulariopsis*) brain abscess in a bone marrow transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 395-397, 2000.
- BAE, M.; KIM, H.; SHIN, Y.; KIM, B. Y.; LEE, S. K.; OH, Q. B. ; SHIN, J.; OH, D. C. Separacenes A–D, novel polyene polyols from the marine *Actinomycete*, *treptomyces* sp. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2882-2893, 2013.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BARRON, G. L. **The genus *Microascus***. 1958. 93 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Graduate Faculty, Iowa State University, [Ames], 1958.
- BI, Y.; BI, X.; FANG, A.; ZHAO, Q. Metabolites from the fungus *Cephalosporium* sp. AL031. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p. 267-269, 2007.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 144-222, 2012.
- BURGER, G.; NEDELCU, A. M. Mitochondrial genomes of algae. **Springer Science & Business Media**, v. 35, p. 127-157, 2012.
- BURRESON, B. J.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. Haloforms in the essential oil of the alga *Asparagopsis taxiformis* (rhodophyta). **Tetrahedron Letters**, v. 16, p. 473-476, 1975.
- CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 253 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- CAMBIE, R. C.; LAL, A. R.; RUTLEDGE, P. S.; WOODGATE, P. D. Ent-14[S], 16-beta, 17-Trihydroxyatisan-3-one and further constituents from *Euphorbia fidjiana*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 287-292, 1991.

CHANGA, C.; CHANGB, H.; CHENG, M.; LIUC, T.; HSIEHC, S.; YUANC, G.; CHEN, I. Inhibitory effects of constituents of an endophytic fungus *Hypoxylon* investiens on nitric oxide and interleukin-6 production in RAW264.7 macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 949-961, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 421-437, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

DAI, J.; KROHN, K.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. New naphthalene chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, n. 10, p.1564-1569, 2009.

DAI, J.; KROHN, K.; FLORKE, U.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KISS-SZIKSZAI, A.; ANTUS, S.; KURTÁN, T.; van REE, T. Metabolites from endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 15, p. 3498-3506, 2006.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; NASCIMENTO, J. C.; VIEIRA, J. J.; SANTOS, M. A. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Química Nova**, v. 26, no. 3, p. 335-339, 2003.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

DUARTE, K.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; FREITAS, A. C.; DUARTE, A. C. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 97-110, 2012.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE, R. M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-90, 1961.

FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.

FUJIMOTO, H.; FUJIMAKI, T.; OKUYAMA, E.; YAMAZAKI, M. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 1426-1432, 1999.

GALLO, A.; KENNETH, B. S.; SOLFRIZZO, M.; PERRONE, G.; MULÈ, G.; VISCONTI, A.; BAKE, S. E. New insight into the Ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8208-8218, 2012.

GREFF, S.; ZUBIA, M.; GENTA-JOUE, G.; MASSI, L.; PEREZ, T.; MAHORONES, O. P. T. Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 1150-1155, 2014.

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

GUIRY, M. D. **AlgaeBase**. Galway: National University of Ireland, c1996. Disponível em:
<http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=636>. Acesso em: 10 out. 2014.

GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry, **Analytical Biochemistry**, v. 331, p. 283-295, 2004.

GUO, C. J.; YEH, H. H.; CHIANG, Y.; SANCHEZ, J. F.; CHANG, S. L.; KENNETH S. B.; WANG, C. C. Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 7205-7213, 2013.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686-699, 2005.

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

IGARASHI, M.; MIDORIKAWA, H. Epoxidation of alkylidenecyanoacetic esters with hydrogen peroxide and related reactions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 32, p. 3399-3407, 1967.

JU, Y.; SACALIS, J. N.; STILL, C. C. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3785-3788, 1998.

KAUSHIK, M. K.; MURALI, T. S.; SAHAL, D.; SURYANARAYANAN, T. S. A search for antiplasmodial metabolites among fungal endophytes of terrestrial and marine plants of southern India. **Acta Parasitologica**, v. 59, p. 745-757, 2014.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Journal of Natural Products**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.

KILDGAARD, S.; MANSSON, M.; DOSEN, I.; KLITGAARD, A.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; NIELSEN, K. F. Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS library. **Marine Drugs**, v. 12, p. 3681-3705, 2014.

KUTSCHERA, G. L.; ENGELMEIER, D.; HADACEK, F.; WERNER, A.; GREGER, H.; HOFER, O. Synthesis of side chain substituted 3-butylicoumarins and absolute configuration of natural isocoumarins from *Artemisia dracunculoides*. **Monatshefte für Chemie**, v. 134, p. 1195-1206, 2003.

LEAL, M. C.; MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; PUGA, J.; JESUS, B.; CALADO, R. Biogeography and biodiversity hotspots of macroalgal marine natural products. **Journal of Natural Products**, v. 30, p. 1380-1390, 2013.

LIAO, L. M. Discovery of the "Falkenbergia" phase of *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta: Bonnemaisoniales) in Philippine waters. **Philippine Scientist**, v. 27, p. 5-10, 1990.

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, p. 51-54, 2002.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; BALLESTEROS, J.; GUTIÉRREZ, M. Antibacterial constituents from the octocoral-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 39, p. 1-2, 2011.

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

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. (Ed.). **Sample preparation in chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 2002. (Journal of chromatography library, v. 65).

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, C. M.; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; ZANARDI, L. M.; EVANGELISTA, A. H.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. da S.; ARAÚJO, A. R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp. 1 and sp. 2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, p. 824-830, 2009.

ONDEYKA, J. G.; BYRNE, K.; VESEY, D.; ZINK, D. L.; SHOOP, W. L.; GOETZ, M. A.; SINGH, S. B. Nodulisporic acids C, C1, and C2: a series of D-ring-opened Nodulisporic acids. from the fungus *Nodulisporium* sp. **Journal of Natural Product**, v. 66, n. 1, p. 121-124, 2003.

ÖZCAN, S.; SAHIN, E.; BALCI, M. The synthesis of unusual isocoumarin derivatives: the chemistry of homophthalic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 2151-2154, 2007.

PRECCARO, M.; MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S. Bioprospecção de fungos endofíticos das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 37, 2014, Natal. [Resumos...]. São Paulo: SBQ, 2014. Disponível em: < <http://www.s bq.org.br/37ra/cdrom/resumos/T1035-1.pdf> >. Acesso em: 6 fev. 2016.

QADEER, G.; RAMA, N. H.; FAN, Z.; LIU, B.; LIU, X. Synthesis, herbicidal, fungicidal and insecticidal evaluation of 3-(dichlorophenyl)-isocoumarins and (±)-3 (dichlorophenyl)-3,4-dihydroisocoumarins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1176-1182, 2007.

RODRIGUES, M. C. A. **Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em ratos**: isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina pró-convulsivante. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2003.

SANTOS, L. S.; RHODEN, S. A.; BARROS, I. T.; TONINI, R. C. G.; MARQUES, R. M.; SOUZA, V. H. E.; PAMPHILE, J. A. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 8, p. 92-101, 2013.

SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. da S. Plant diversity from brazilian cerrado and atlantic forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In: MANDER, L.; LIU, H.-W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2010. v. 3, p. 95-133.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SWATHI, J.; NARENDRA, K.; SOWJANYA, K. M.; SATYA, A. K. Biological characterisation of secondary metabolites from marine fungi *Microascus* sp. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 4, p. 754-759, 2013.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States). W. Fenical; P. R. Jensen; X. C Cheng. **Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof and therapeutic use in inhibition of proliferation**. WO1999048889, 25 Mar. 1999, 30 Sept. 1999.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States). W. Fenical; P. R. Jensen; X. C Cheng. **Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof**. US6069146, 12 Nov. 1998, 30 May 2000.

WOOLARD, F. X.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Halogenated acetamides, but-3-en-2-ols, and isopropanols from *Asparagopsis taxiformis* (delile) trev. **Tetrahedron**, v. 32, p. 2843-2846, 1976.

YU, C. M.; CURTIS, J. M.; WALTER, J. A.; WRIGHT, J. L. C.; AYER, S. W.; KALETA, J.; QUERENGESSER, L.; FATHI-AFSHAR, Z. R. Potent inhibitors of cysteine proteases from. **The Journal of Antibiotics**, v. 49, p. 395-397, 1995.

ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. da S.; CAVALHEIRO, J. A.; SILVA, D. H. S.; TREVISAN, H. C.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v. 35, p. 2233-2236, 2012.

ZHANG, P.; MANDI, A.; LI, X. M.; DU, F. Y.; YANG, J. M.; LI, X.; KURPAM, T.; YANG, B. G. Varioxepine A, a 3H-oxepine-containing alkaloid with a new oxacage from the marine algal derived endophytic fungus *Paecilomyces variotii*. **Organic Letters**, v. 16, n. 18, p. 4834-4837, 2014.

ZHENG, Q.-C.; ZHAO, H.; CHEN, G.-D.; WU, Z.-Y.; ZHAO, Q.; LI, X.-X.; GAO, H. Secondary metabolites from *Nodulisporium* sp.: a review. **Journal of International Pharmaceutical Research**, v. 40, n. 6, p.721-725, 2013.

Anexos

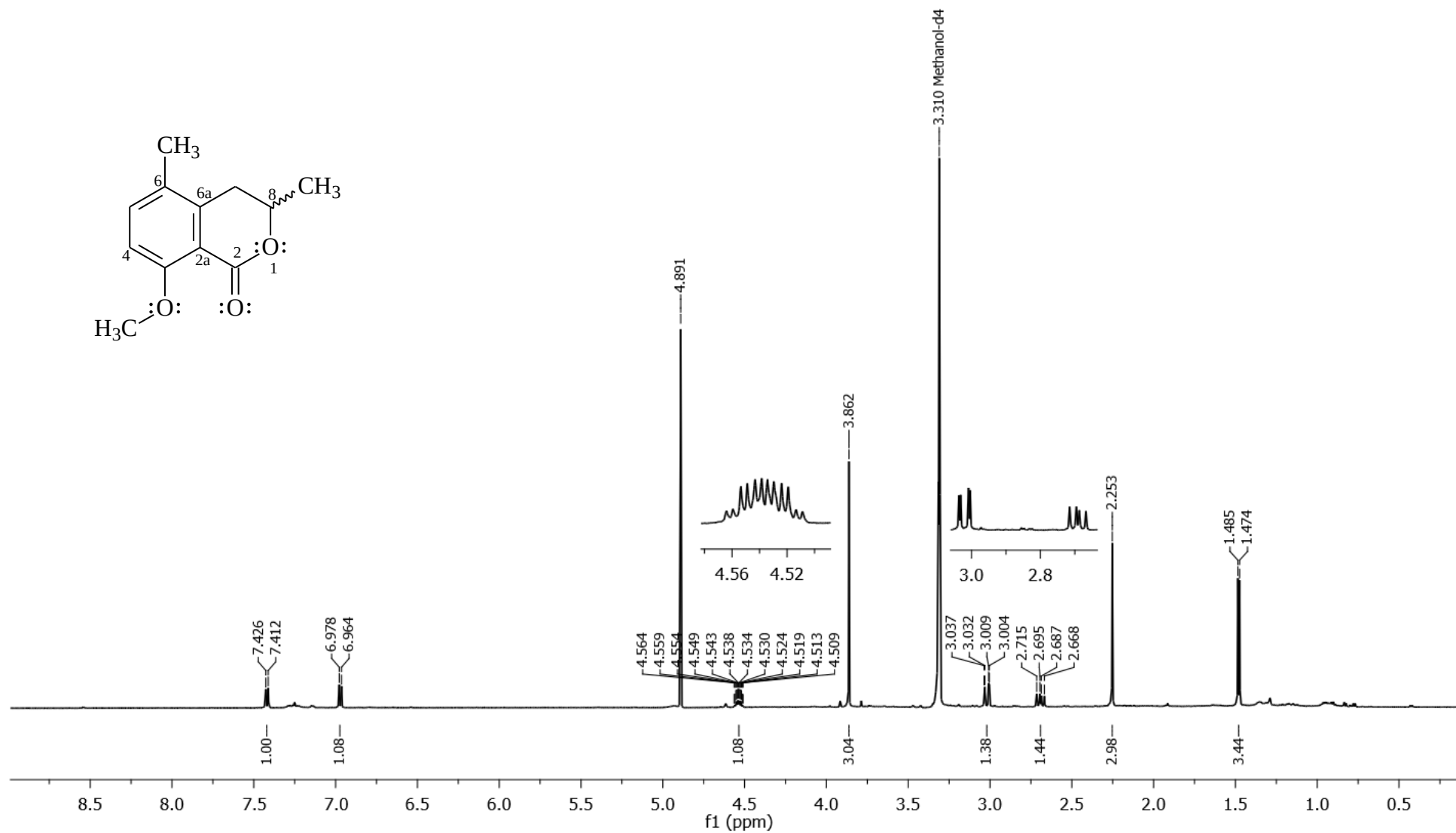
Figura 13-Espectro de RMN de ^1H da substância **S1** ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).

Figura 14-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S1** ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz).

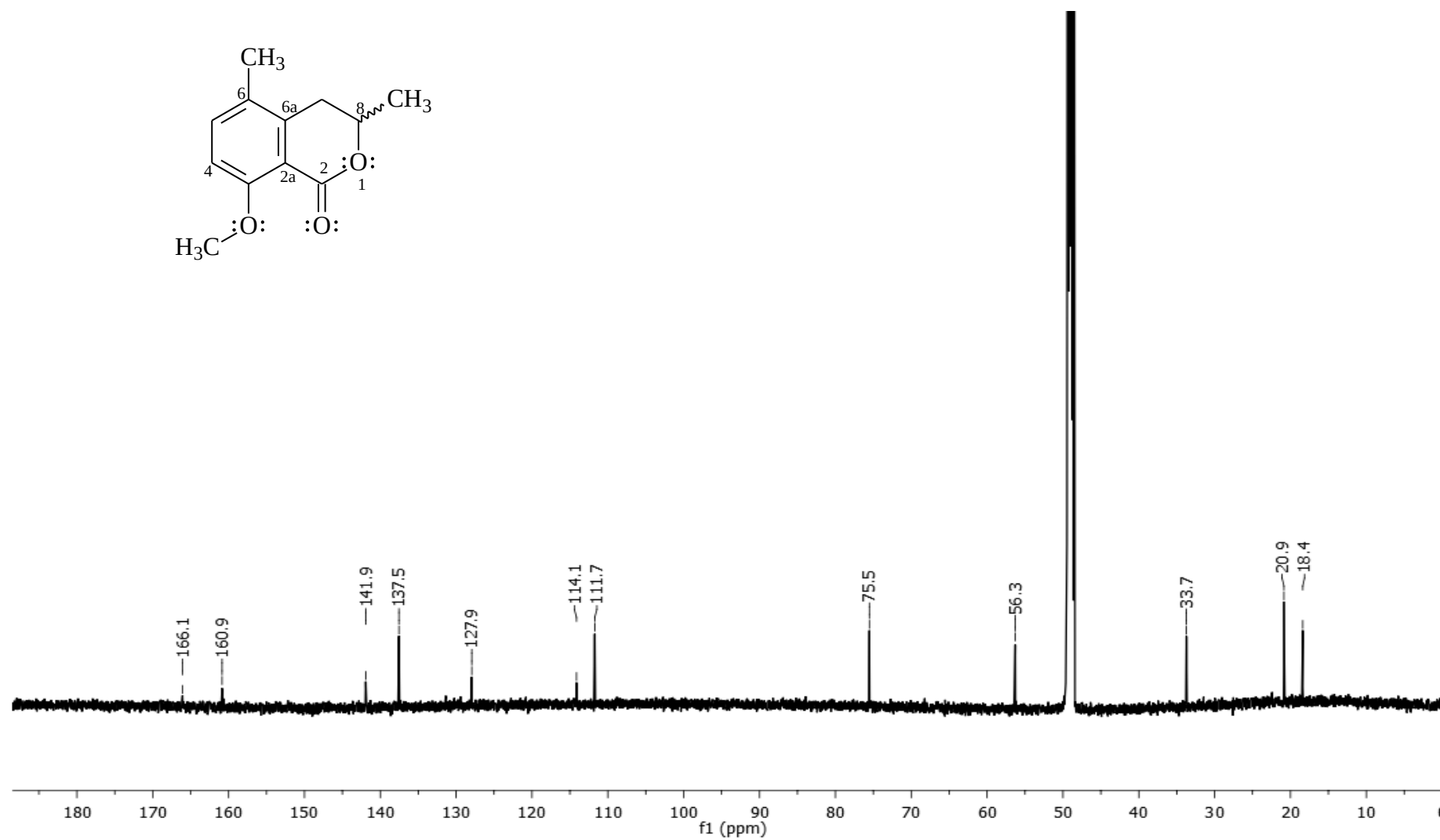


Figura 15-Mapa de contorno de HSQC da substância **S1** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

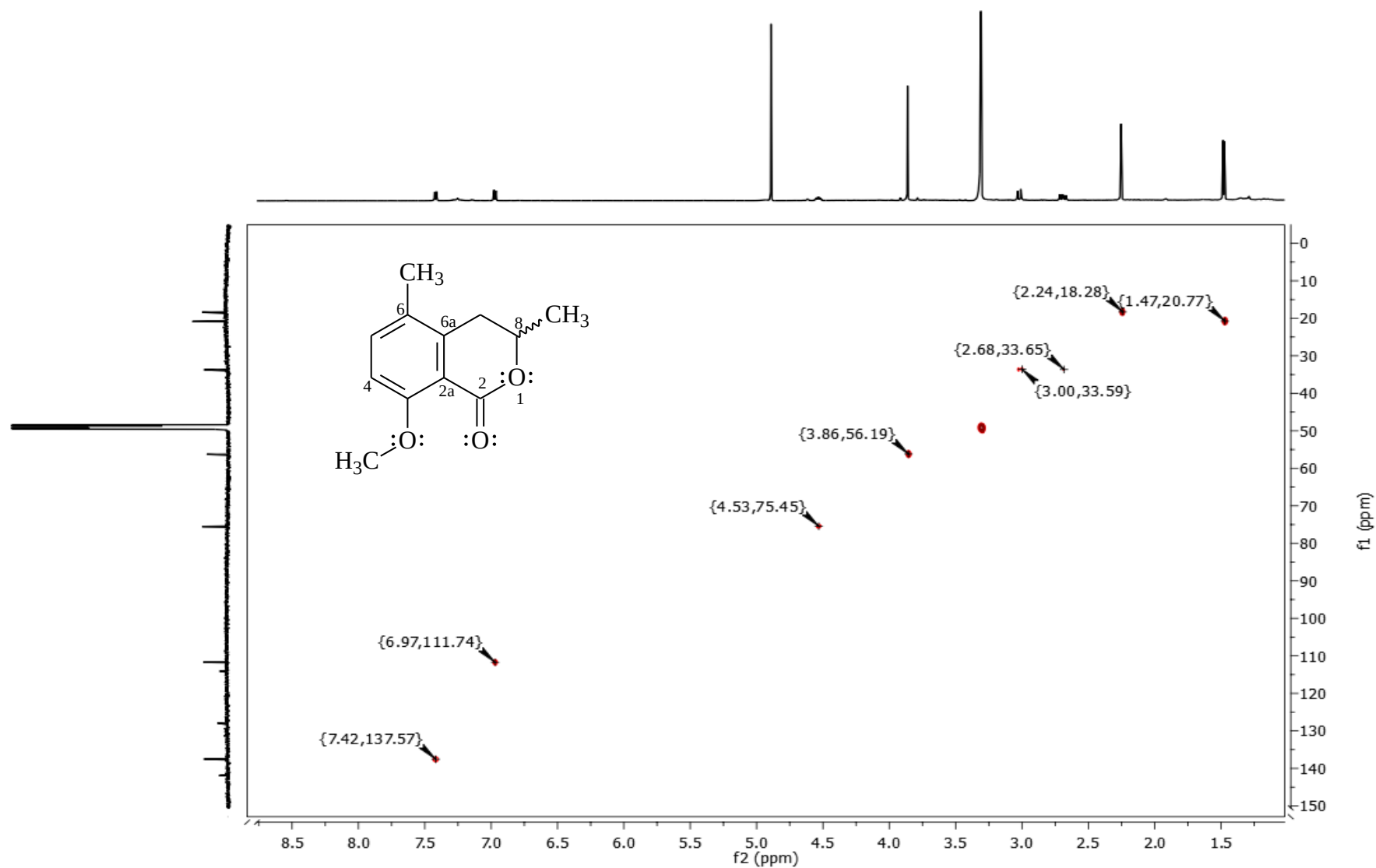


Figura 17-Espectro de RMN de ^1H da substância **S3** ($\text{CHCl}_3\text{-}d$, 300 MHz).

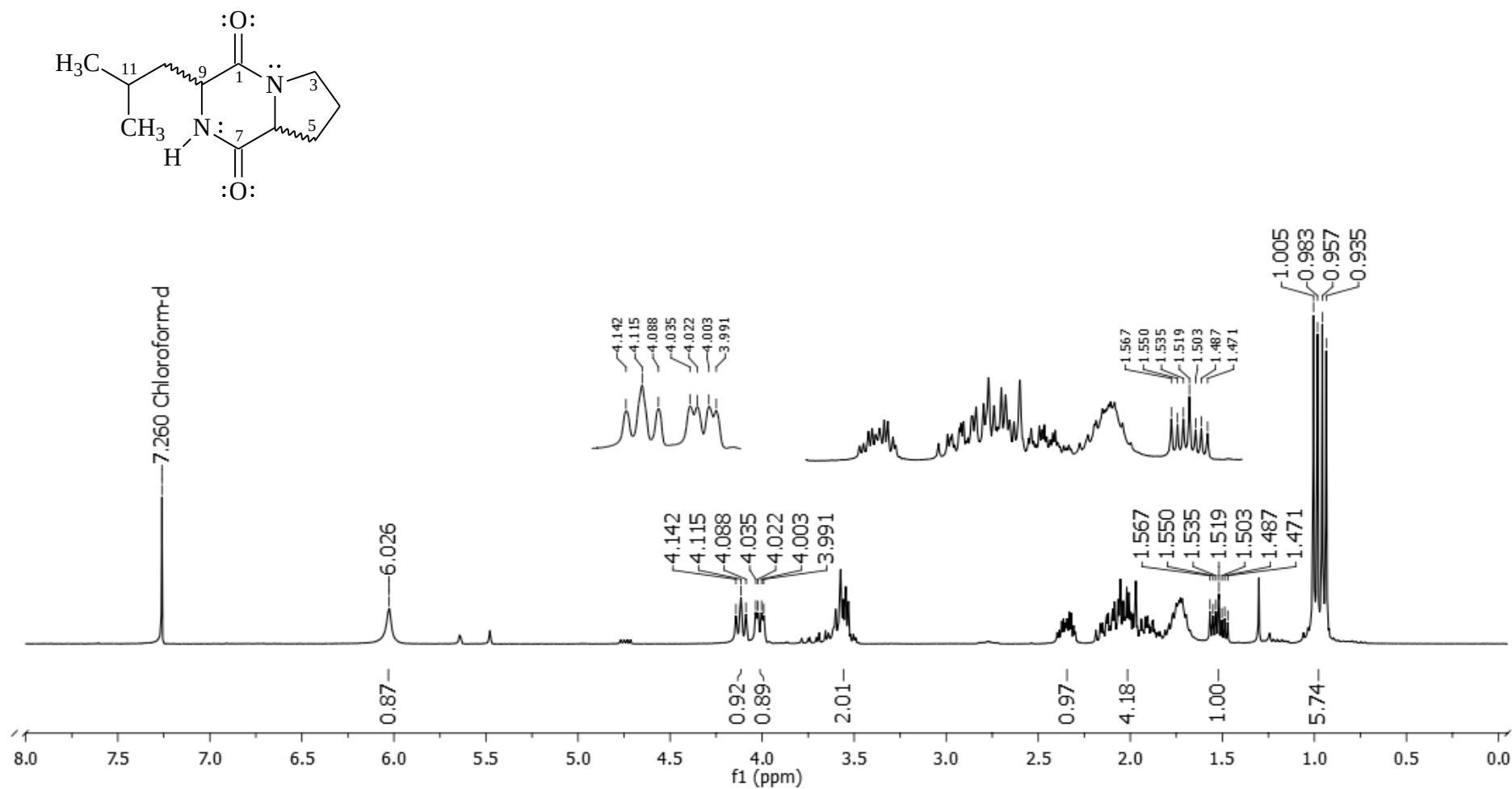


Figura 18-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S3** ($\text{CHCl}_3\text{-}d$, 75 MHz).

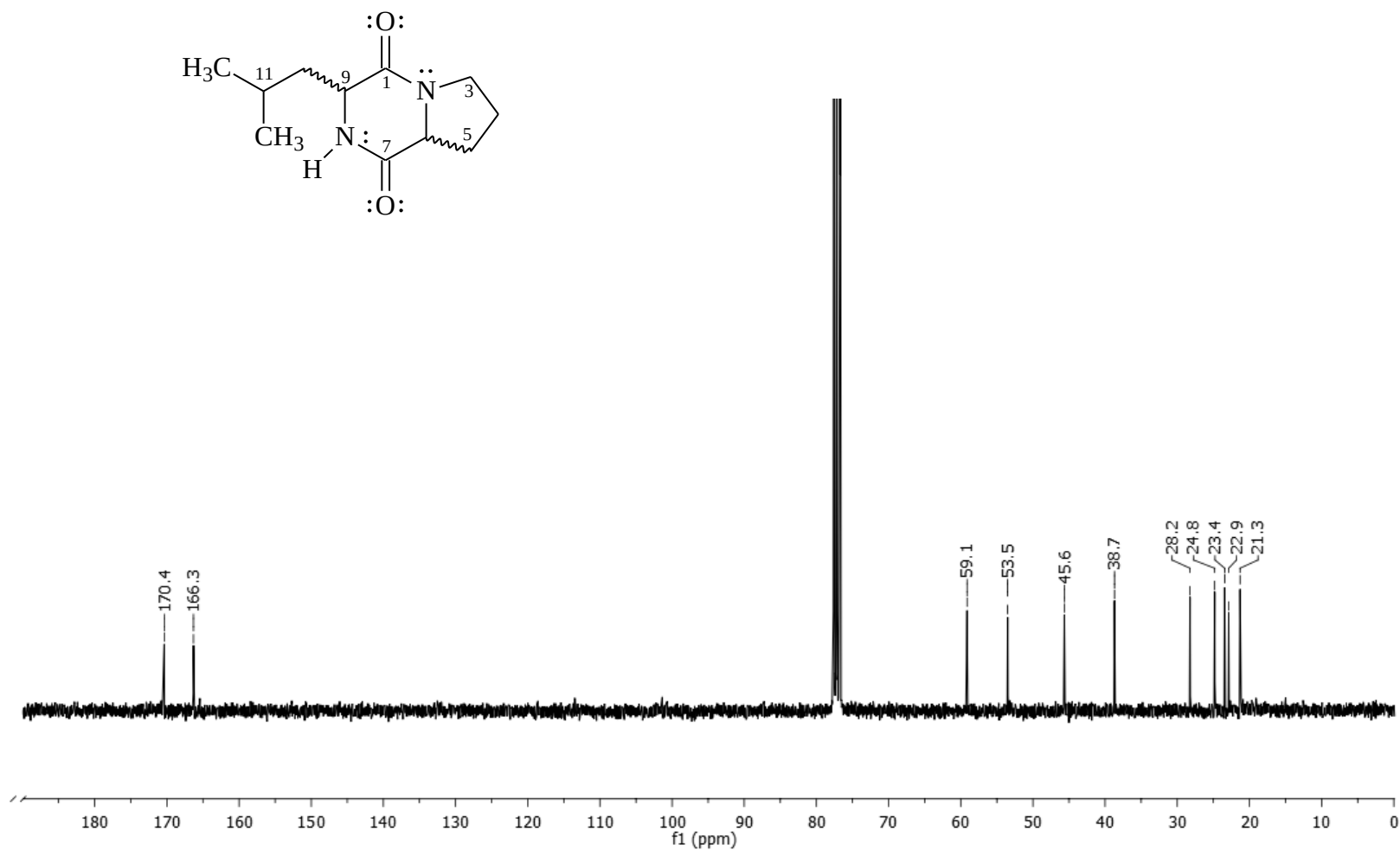


Figura 21-Mapa de contorno de HSQC da substância **S3** (CHCl_3 -*d*, 300 MHz).

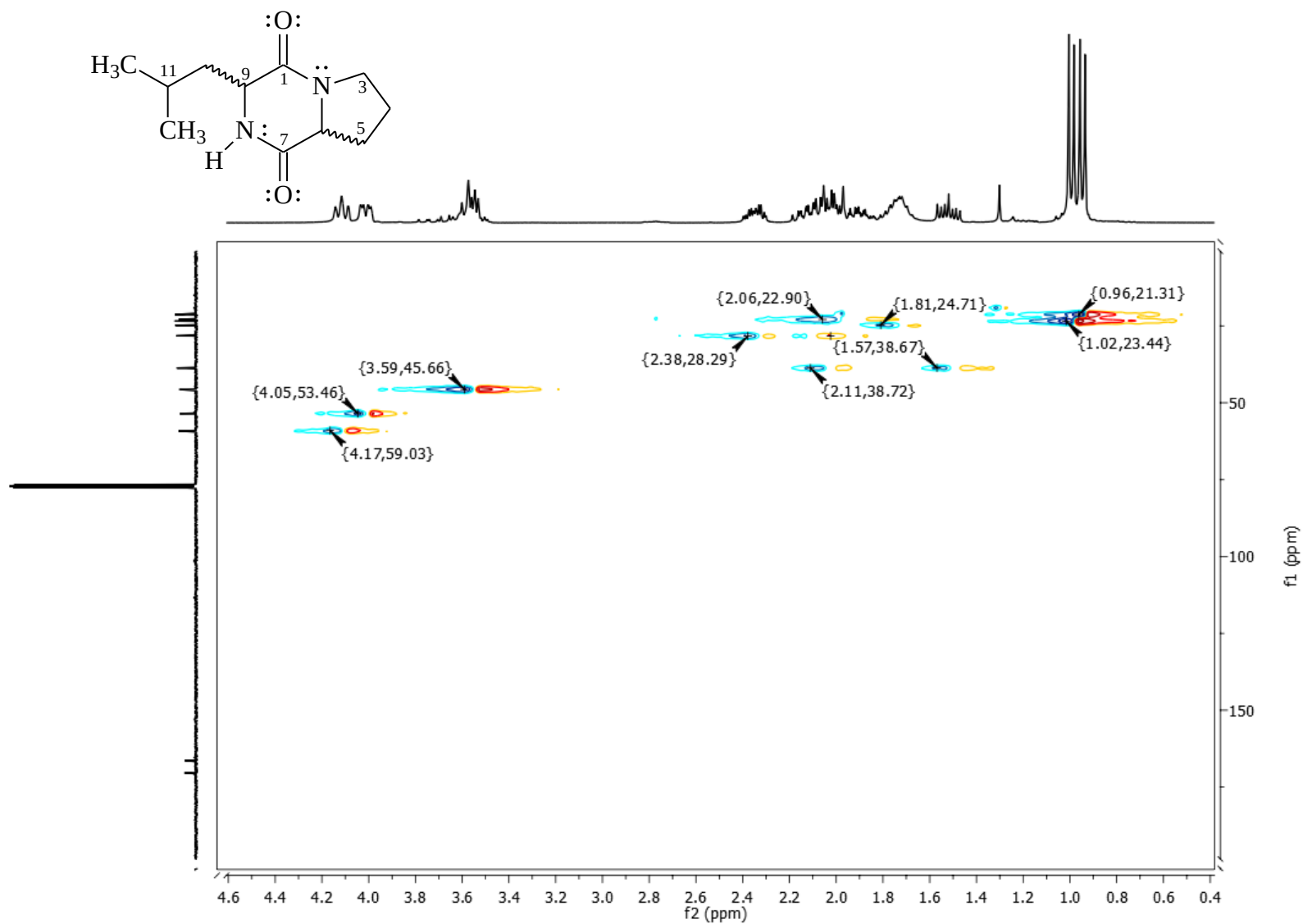


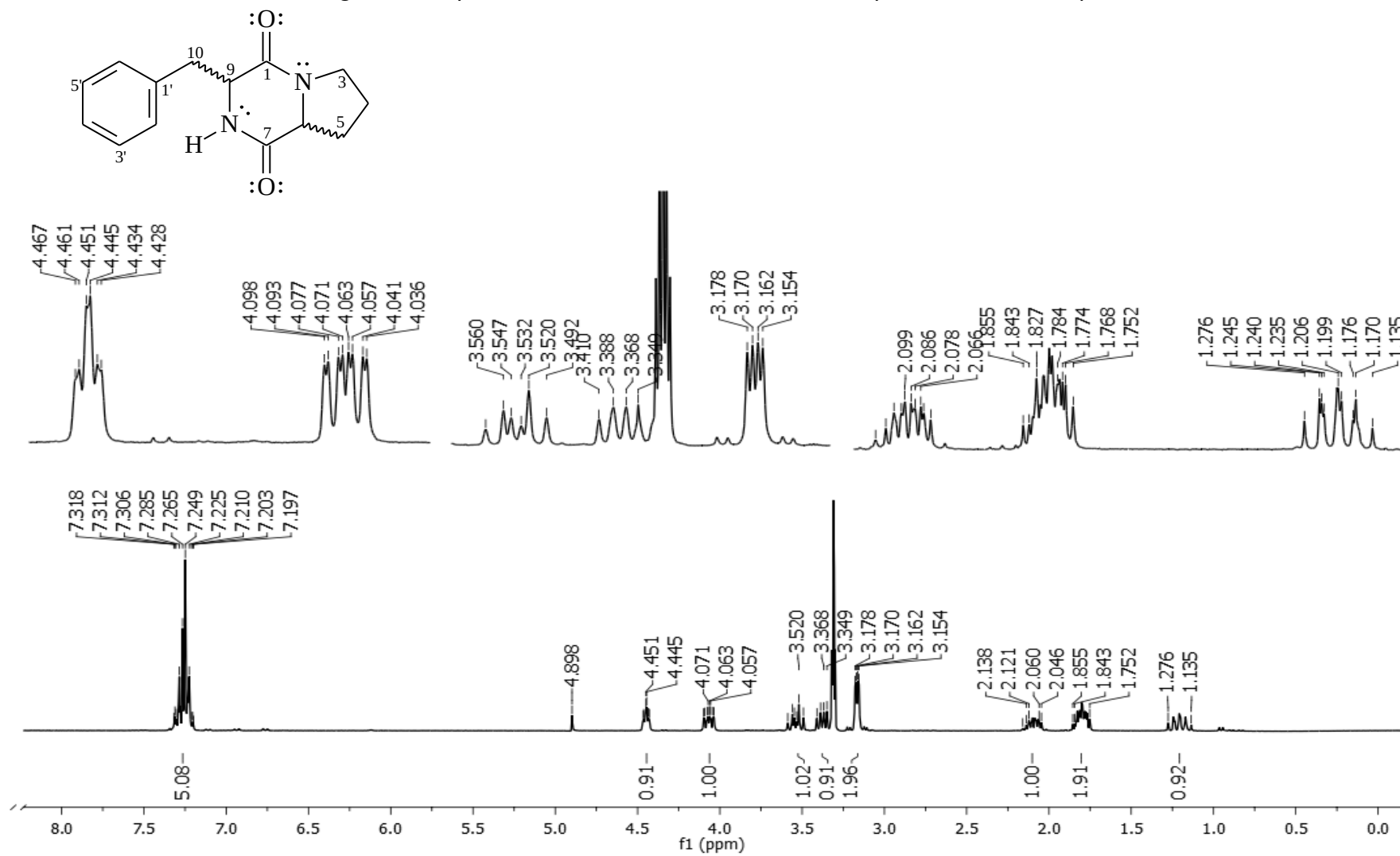
Figura 22-Espectro de RMN de ^1H da substância **S4** (MeOH-d_4 , 300 MHz).

Figura 23-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S4** ($\text{MeOH-}d_4$, 75 MHz).

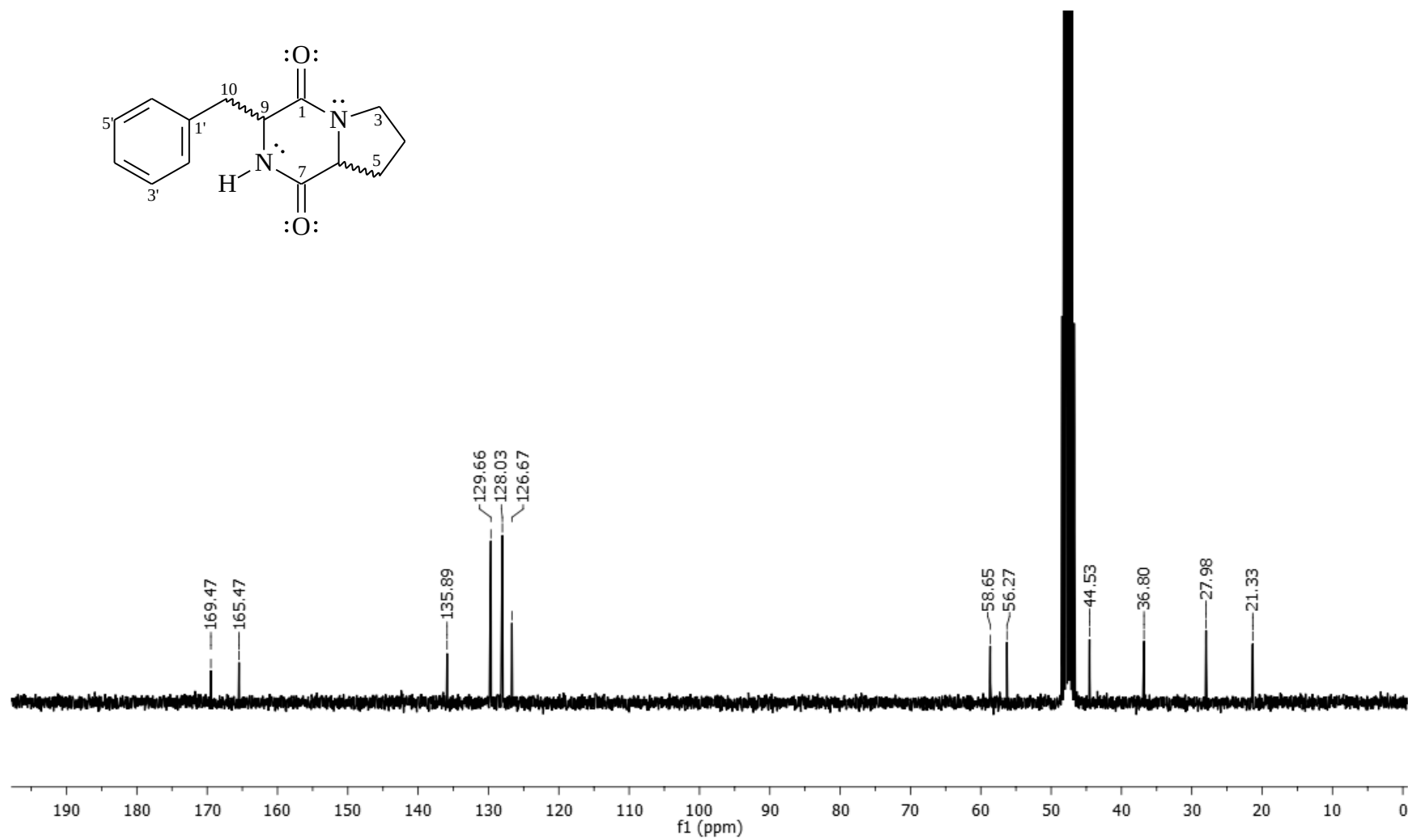


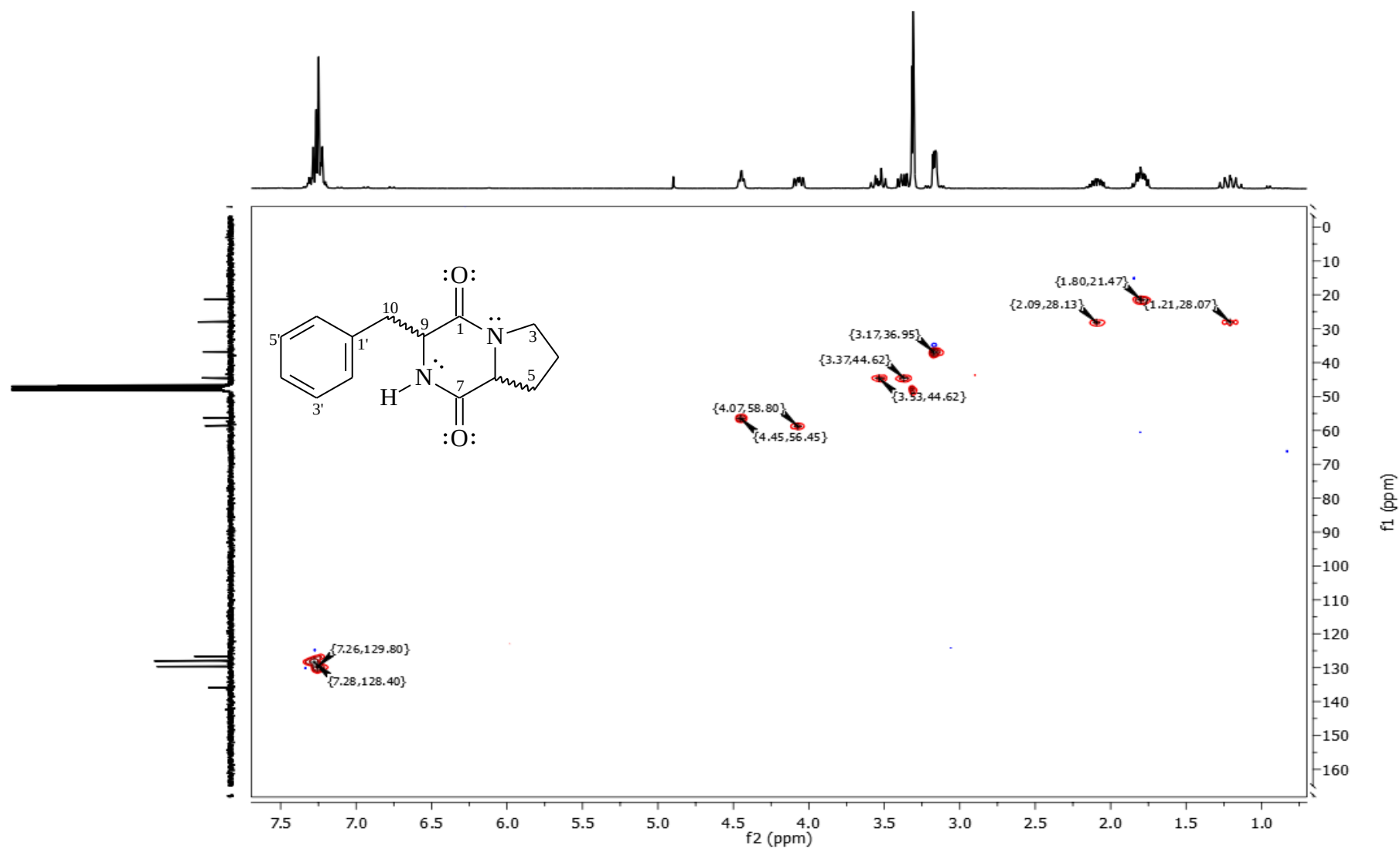
Figura 26-Mapa de contorno de HSQC da substância **S4** (MeOH- d_4 , 300 MHz).

Figura 27-Espectro de RMN de ^1H da substância **S4** (CHCl_3-d , 300 MHz).

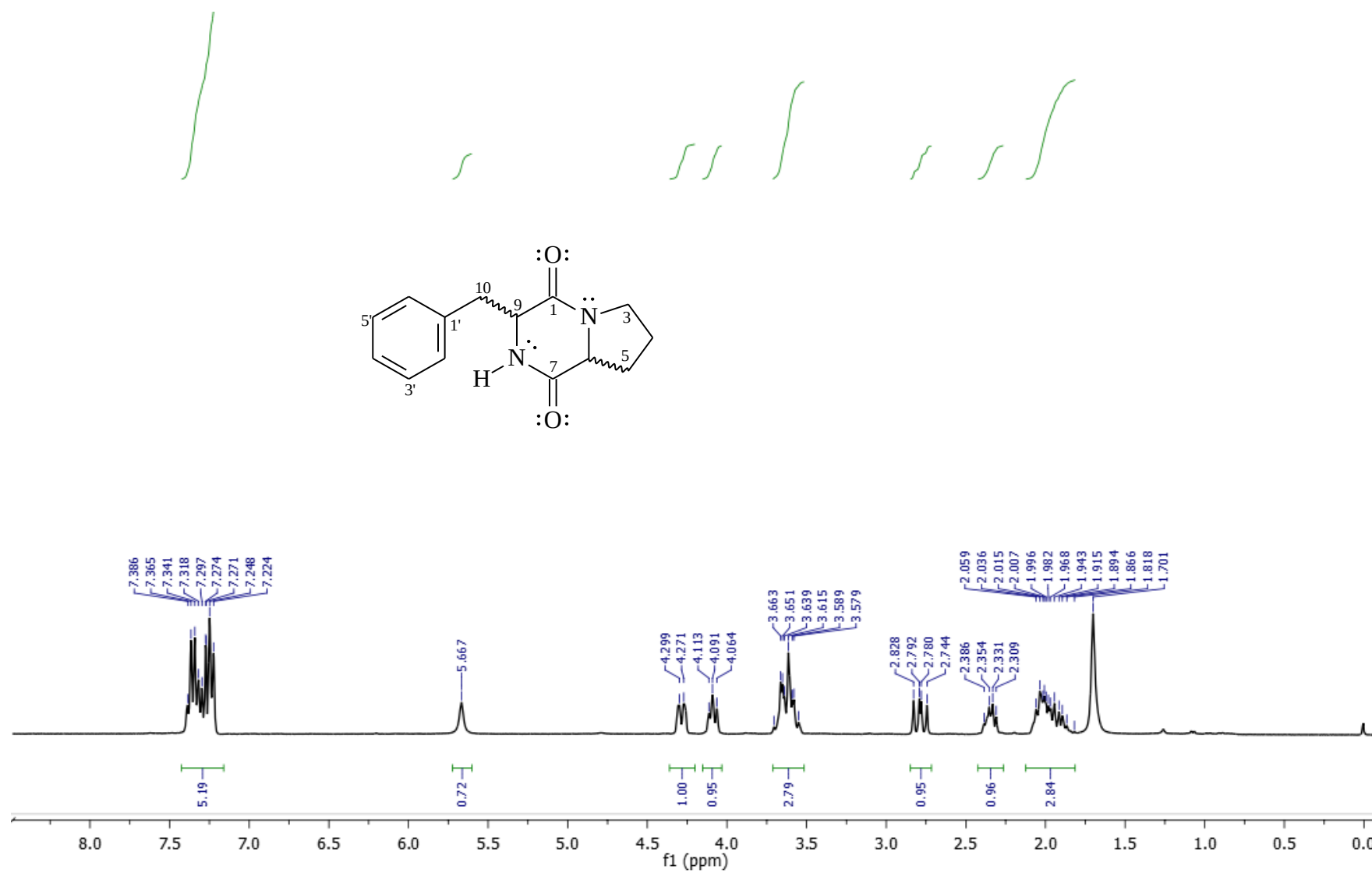


Figura 28-Espectro de RMN de ^1H da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).

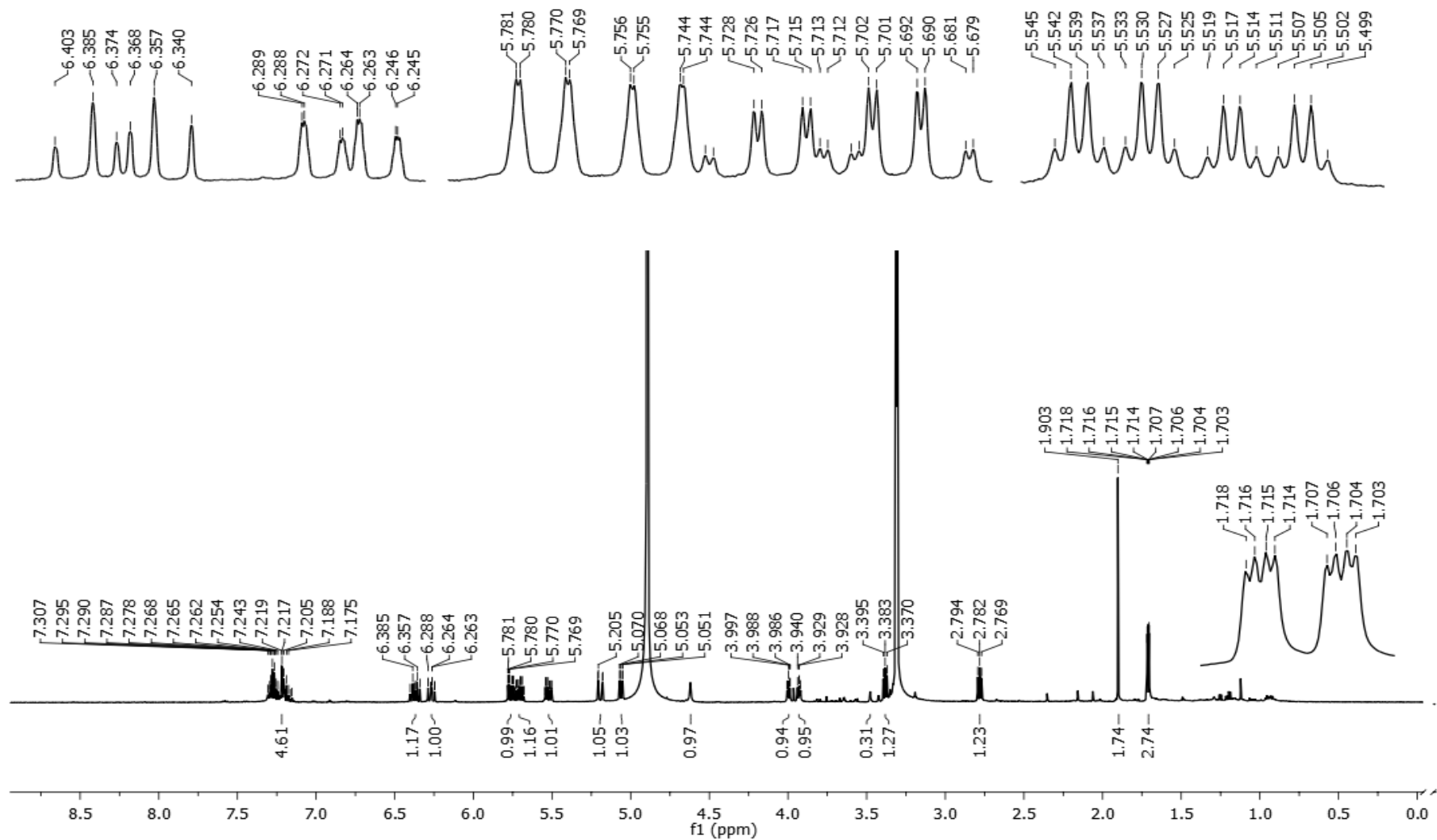


Figura 30-Espectro de RMN de ^{13}C da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** ($\text{MeOH-}d_4$, 150 MHz).

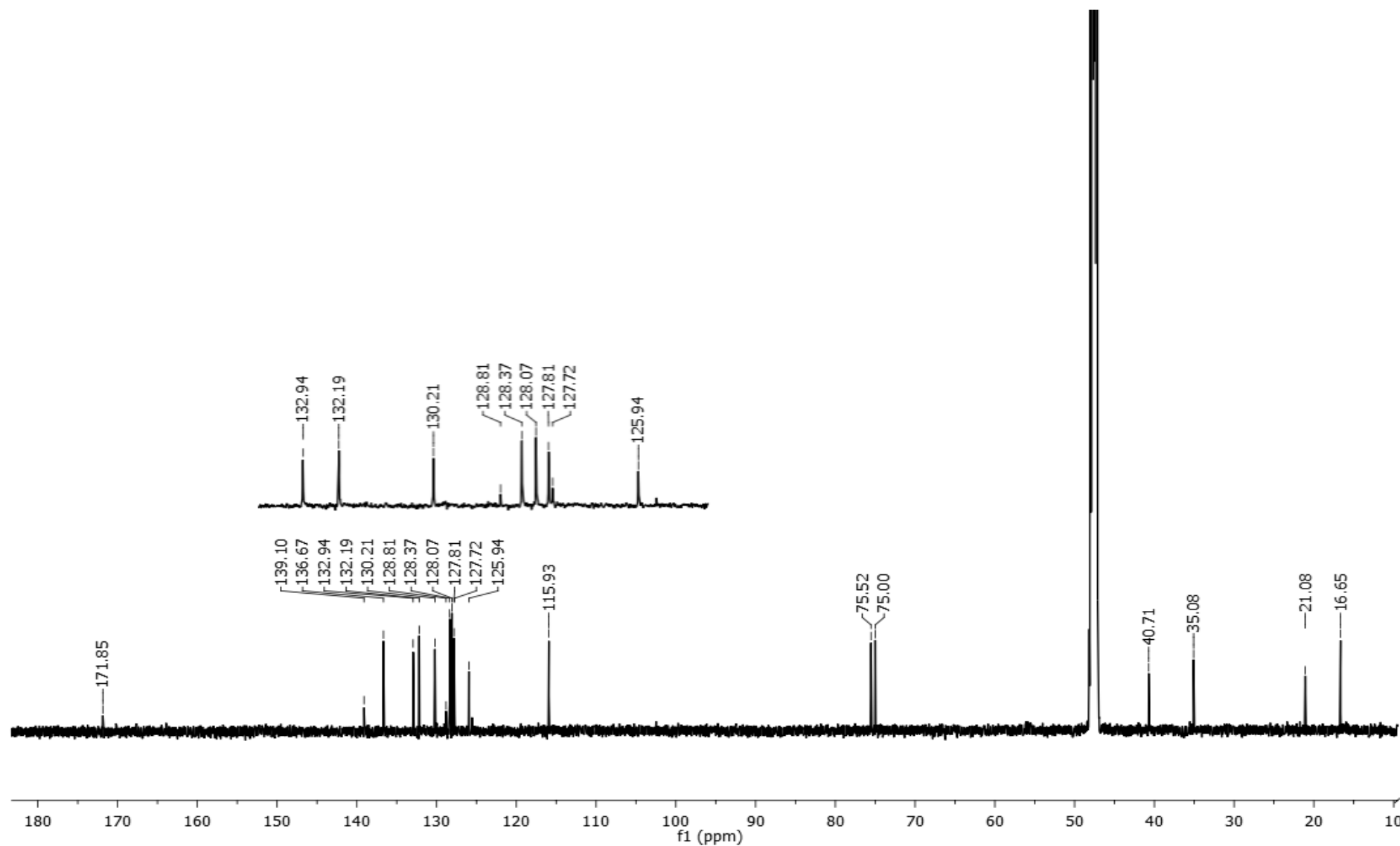


Figura 35-Espectros de TOCSY-1D com irradiações em δ_H 5,06 e 5,19 (MeOH- d_4 , 600 MHz)

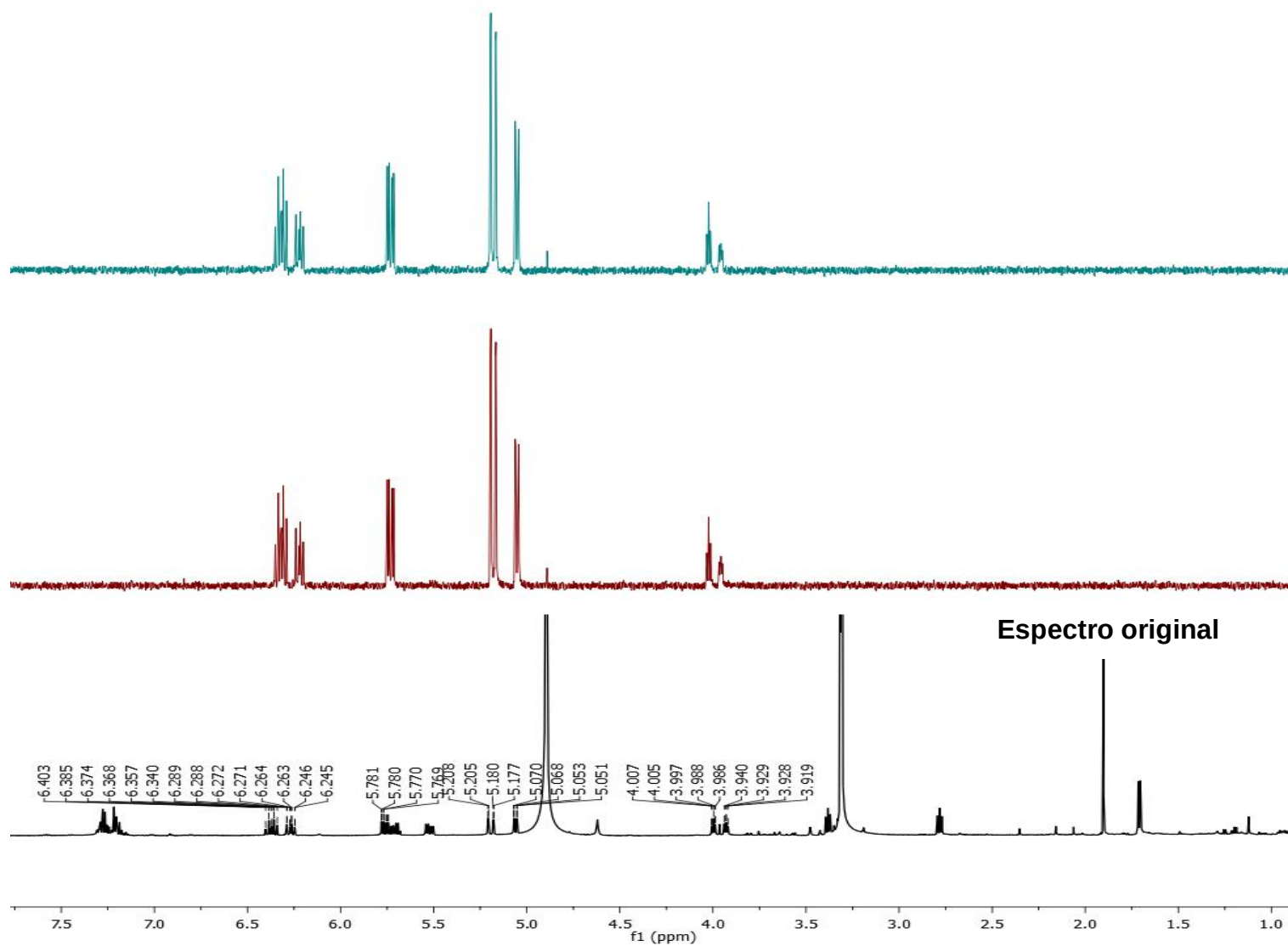


Figura 37-Espectros de TOCSY-1D com irradiações em δ_H 1,71 (MeOH- d_4 , 600 MHz).

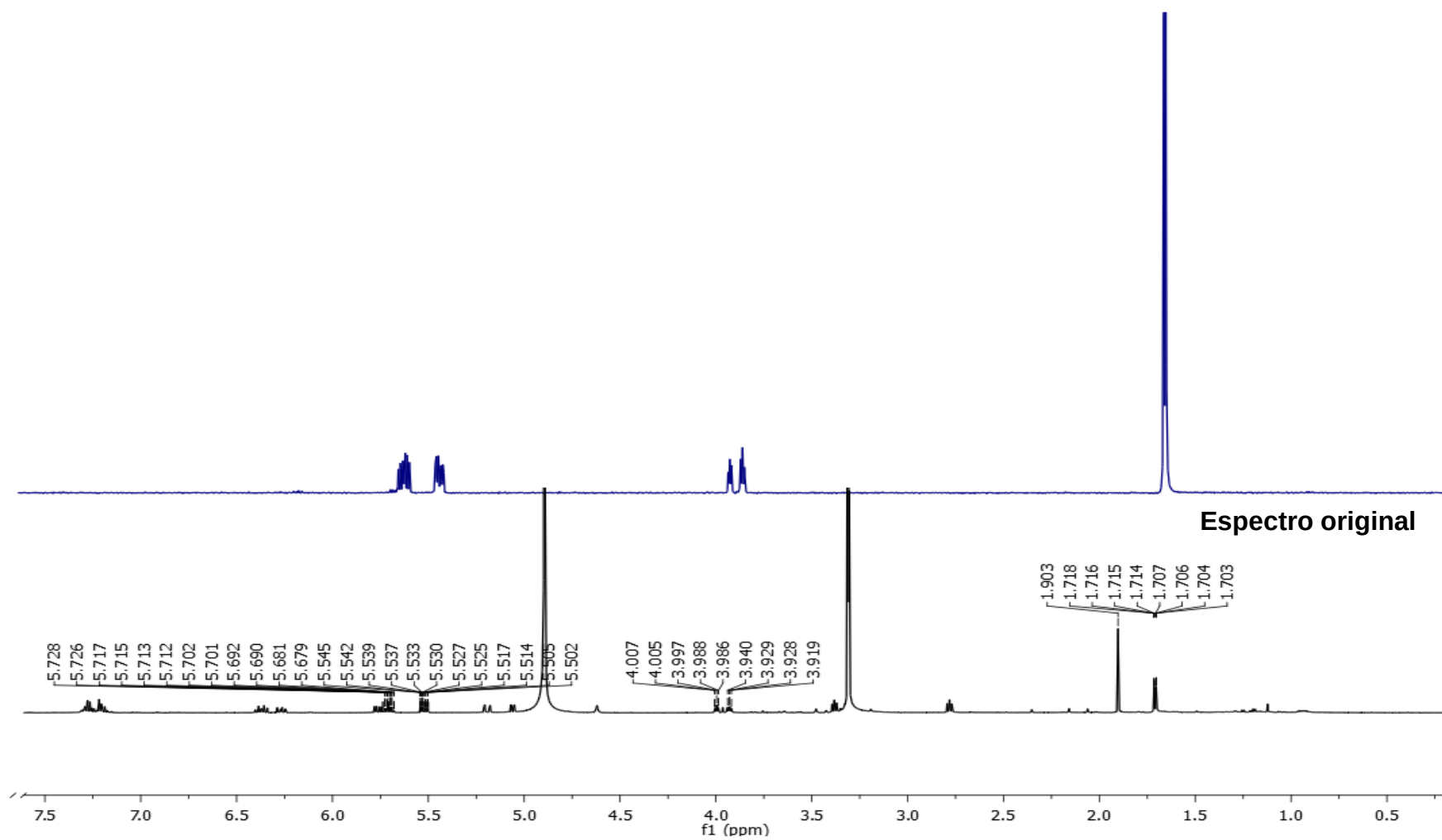


Figura 42-Espectros de TOCSY-1D com irradiações em δ_H 4,00 e 3,95 (MeOH- d_4 , 600 MHz).

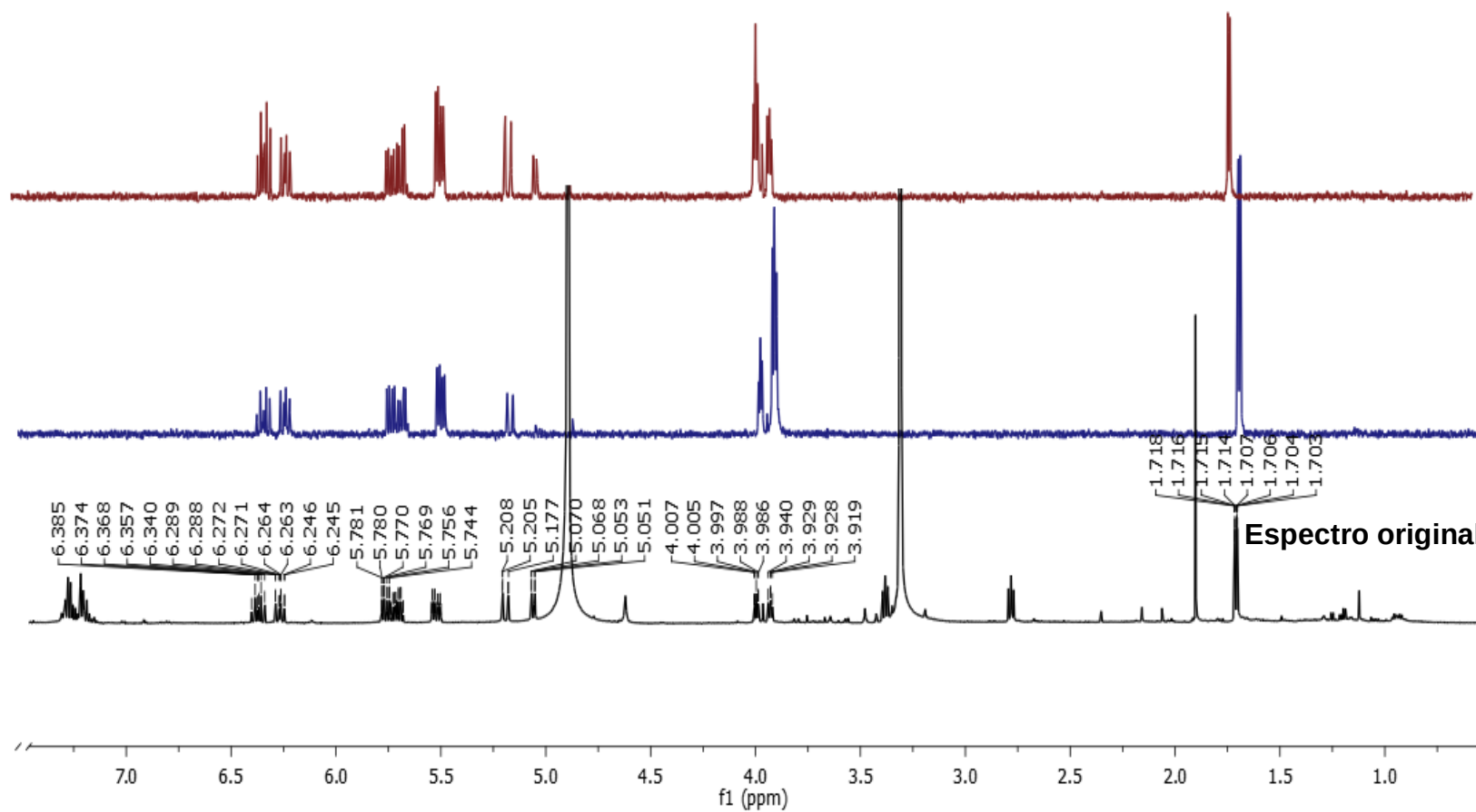


Figura 43-Espectro de RMN de ^1H da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

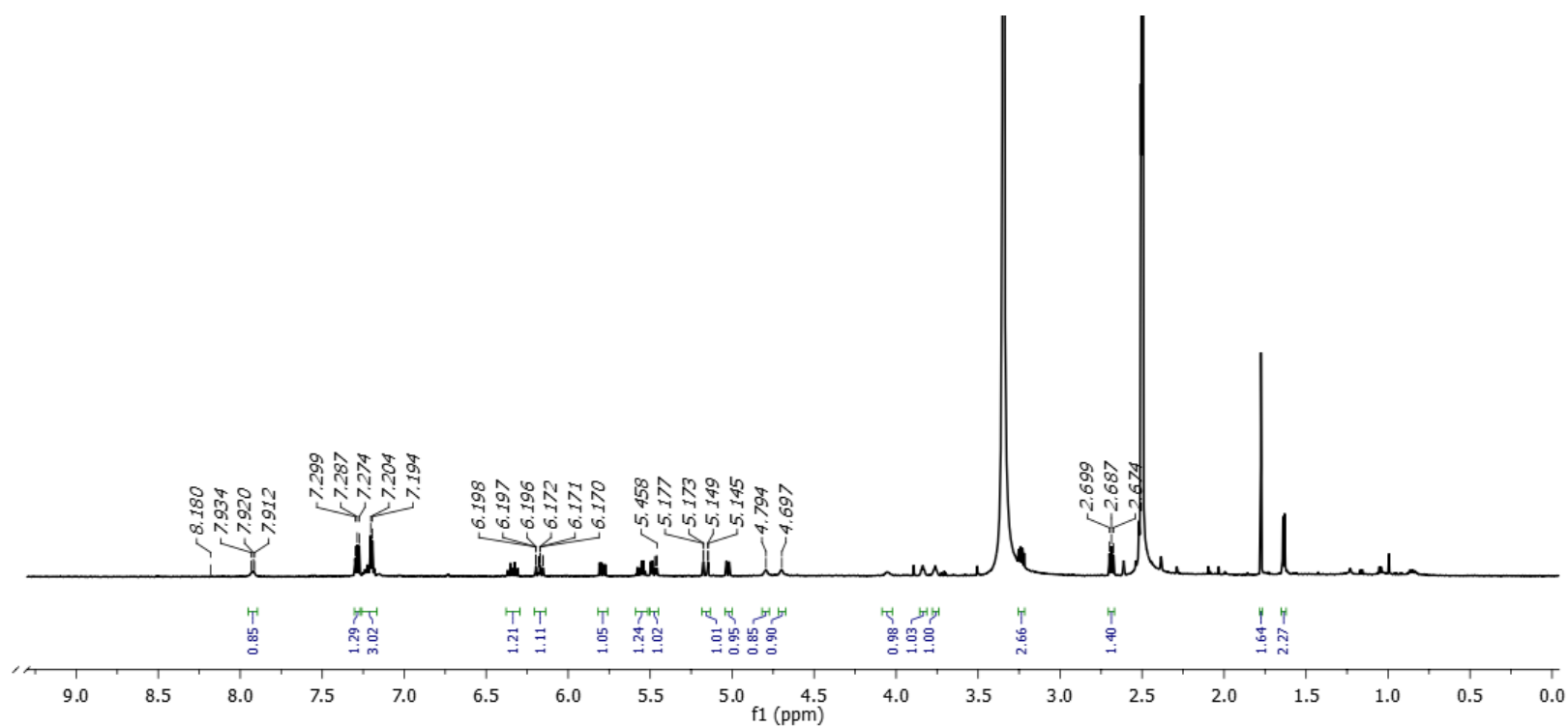


Figura 45- Mapa de contorno de COSY da mistura contendo as substâncias S5 e S6 (MeOH- d_4 , 600 MHz).

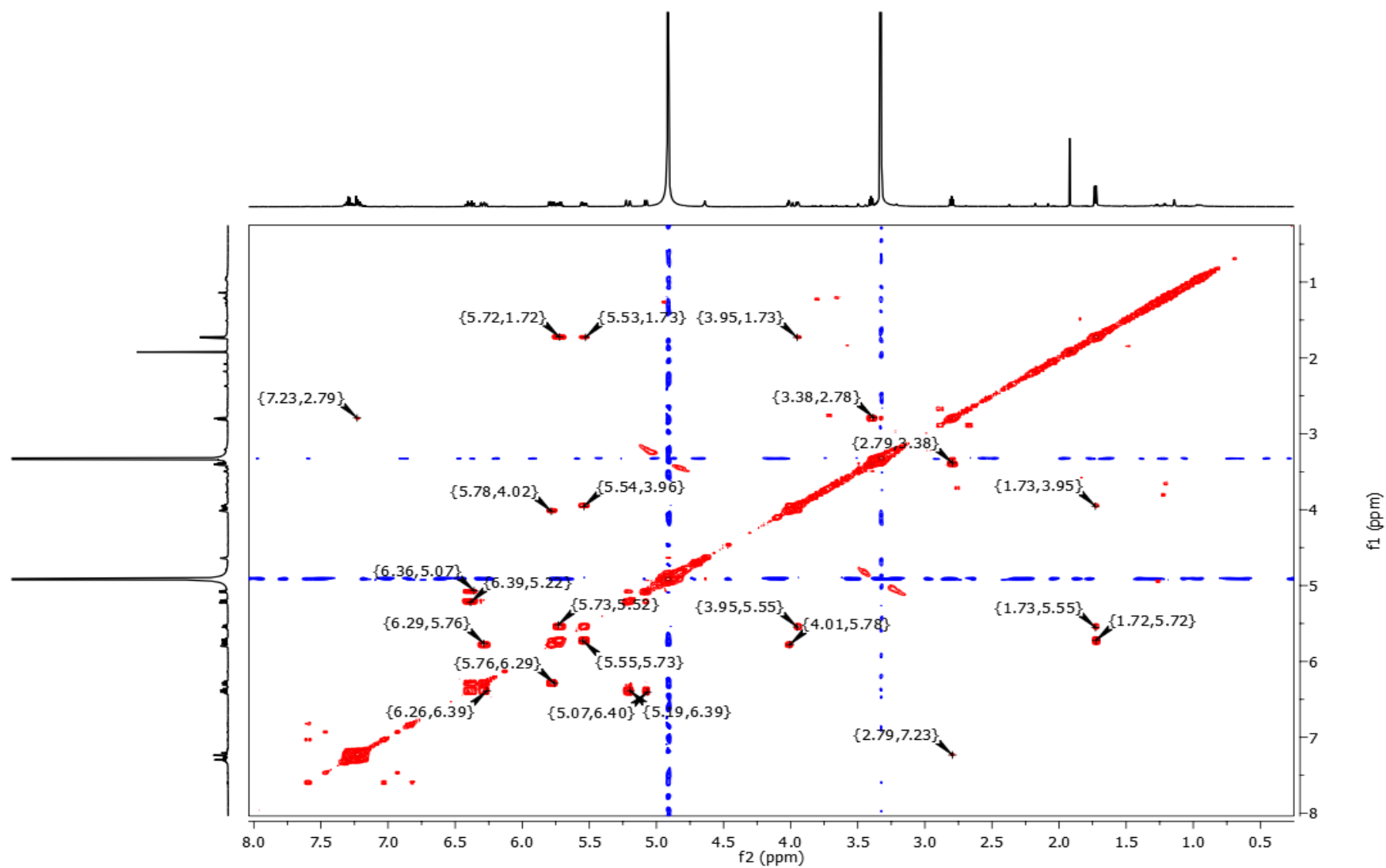


Figura 46- Mapa de contorno de HSQC da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).

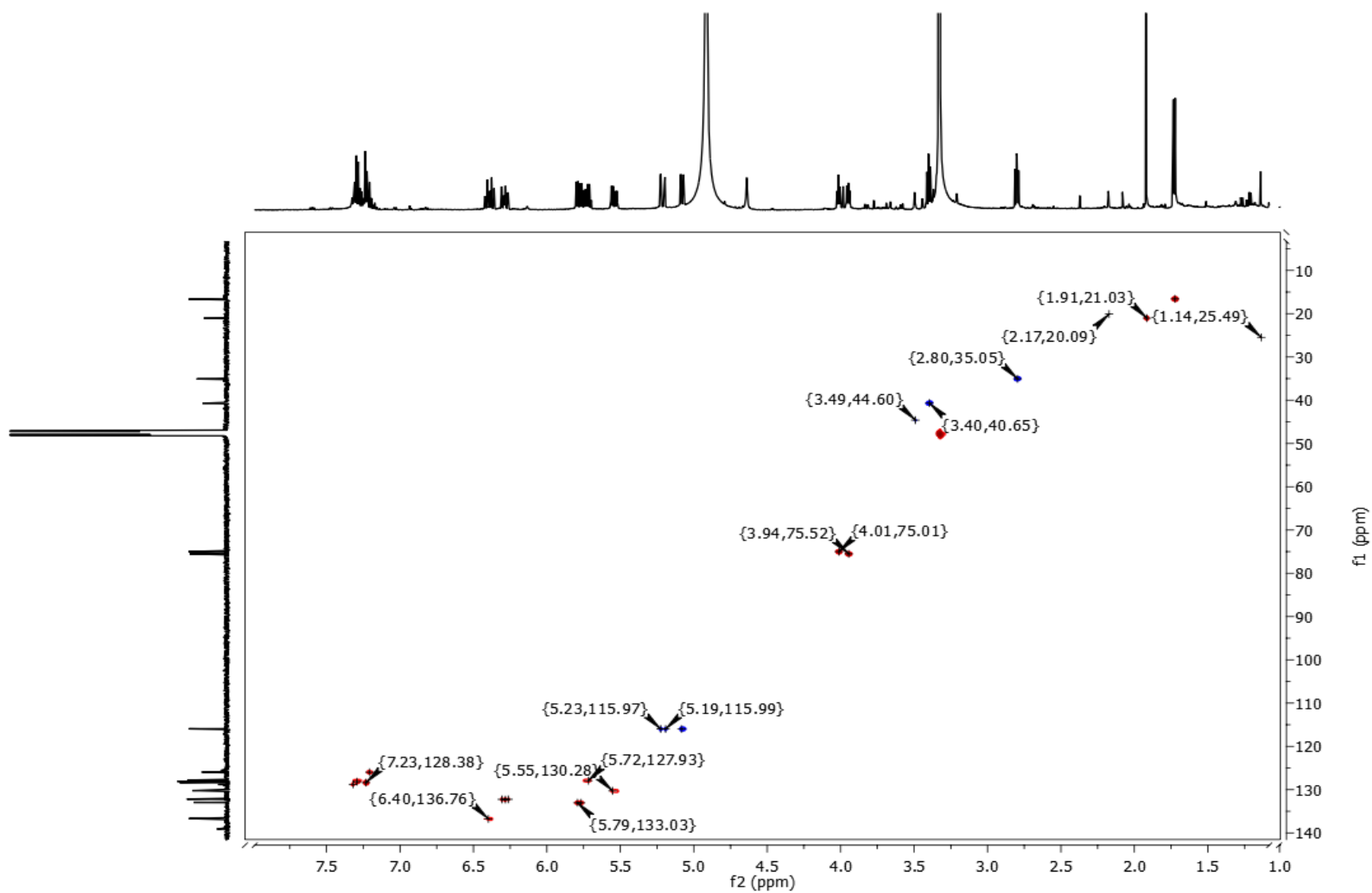


Figura 47- Mapa de contorno de HMBC da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz)- Ampliação da região 1,6-4,3 ppm.

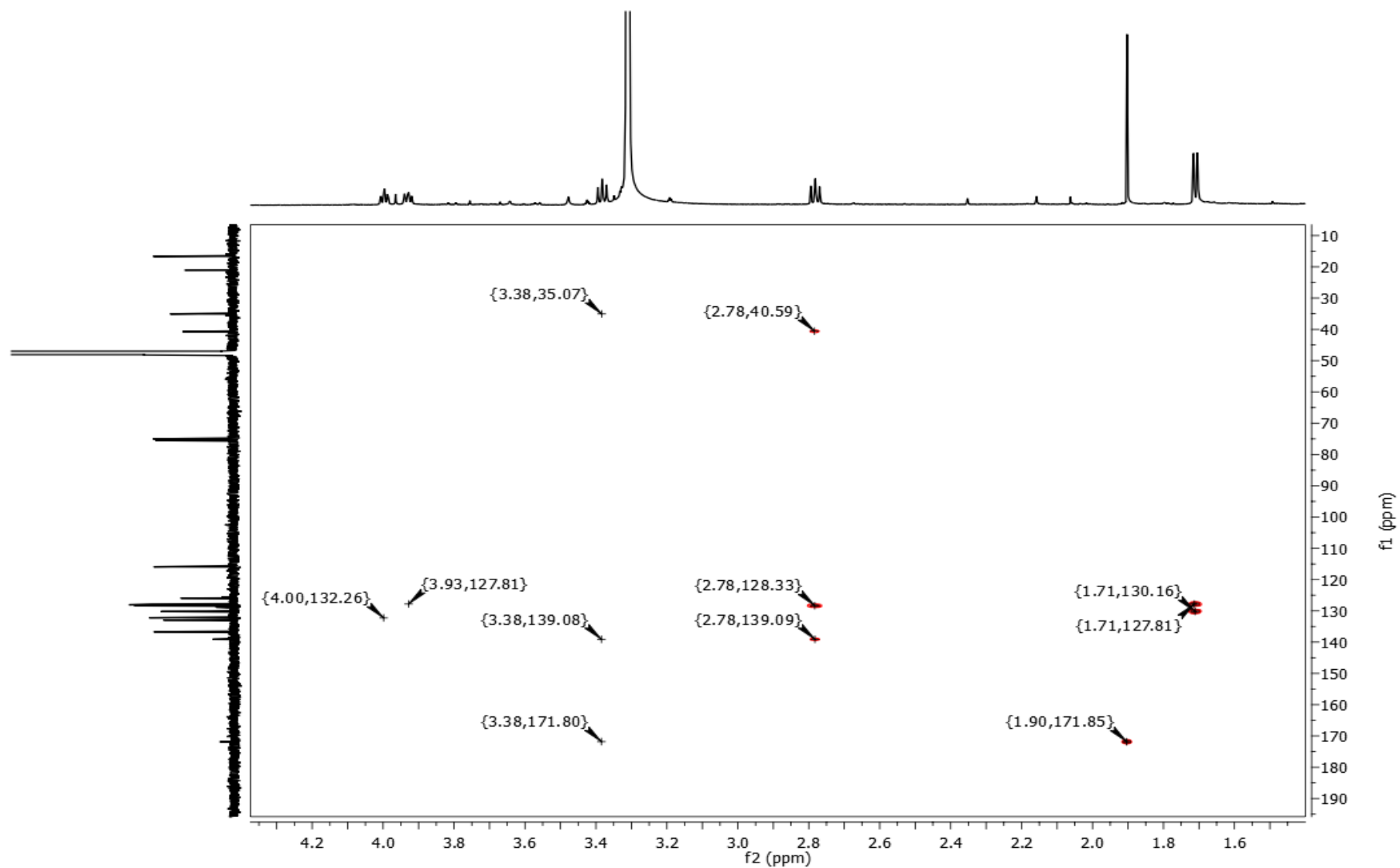


Figura 48 - Mapa de contorno de HMBC da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz)-Ampliação da região 5,1-7,5 ppm.

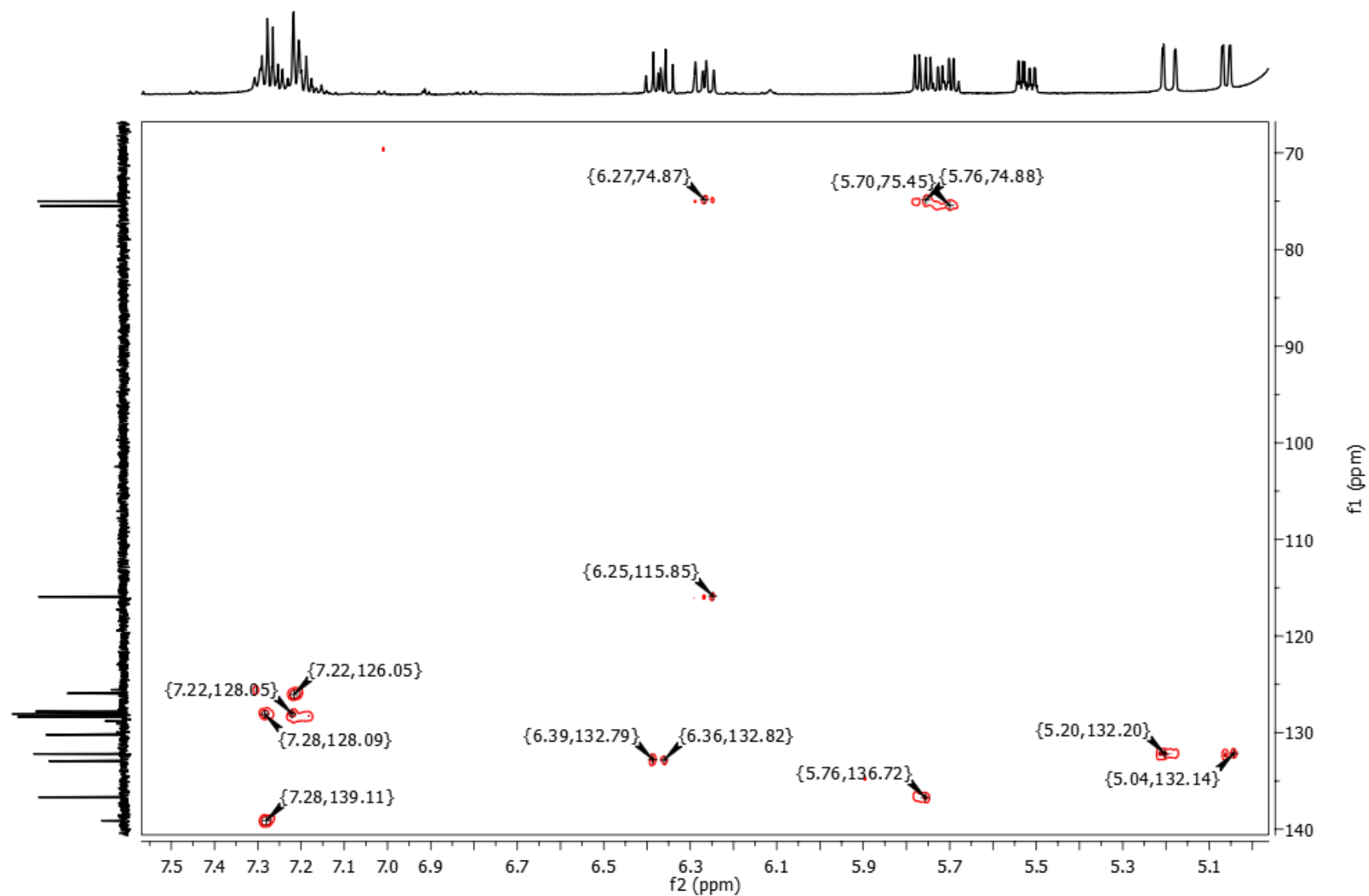


Figura 49- Mapa de contorno de HSQC-TOCSY da mistura contendo as substâncias **S5** e **S6** (*MeOH-d*₄, 600 MHz).

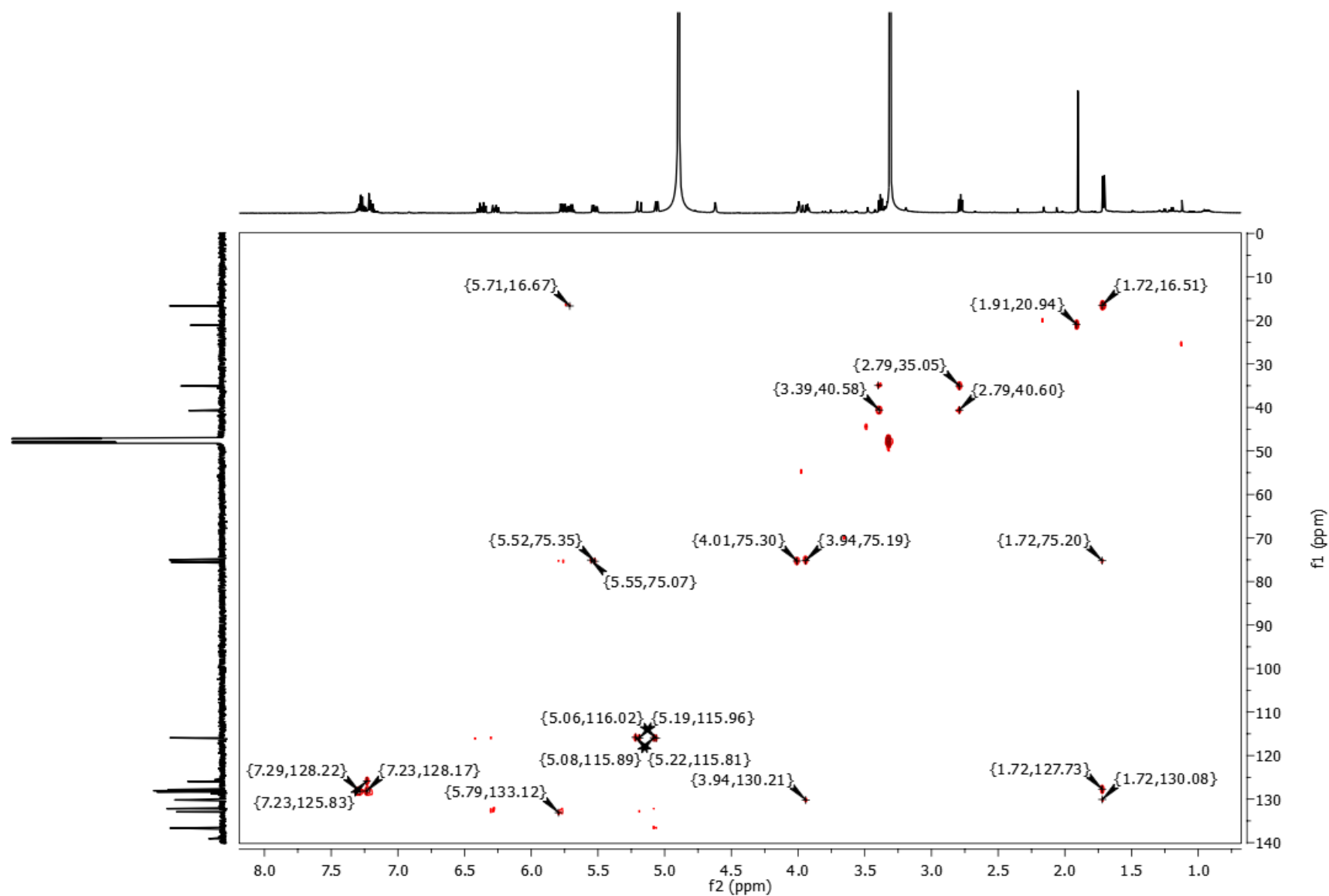


Figura 51- Espectro de massas da substância S7.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

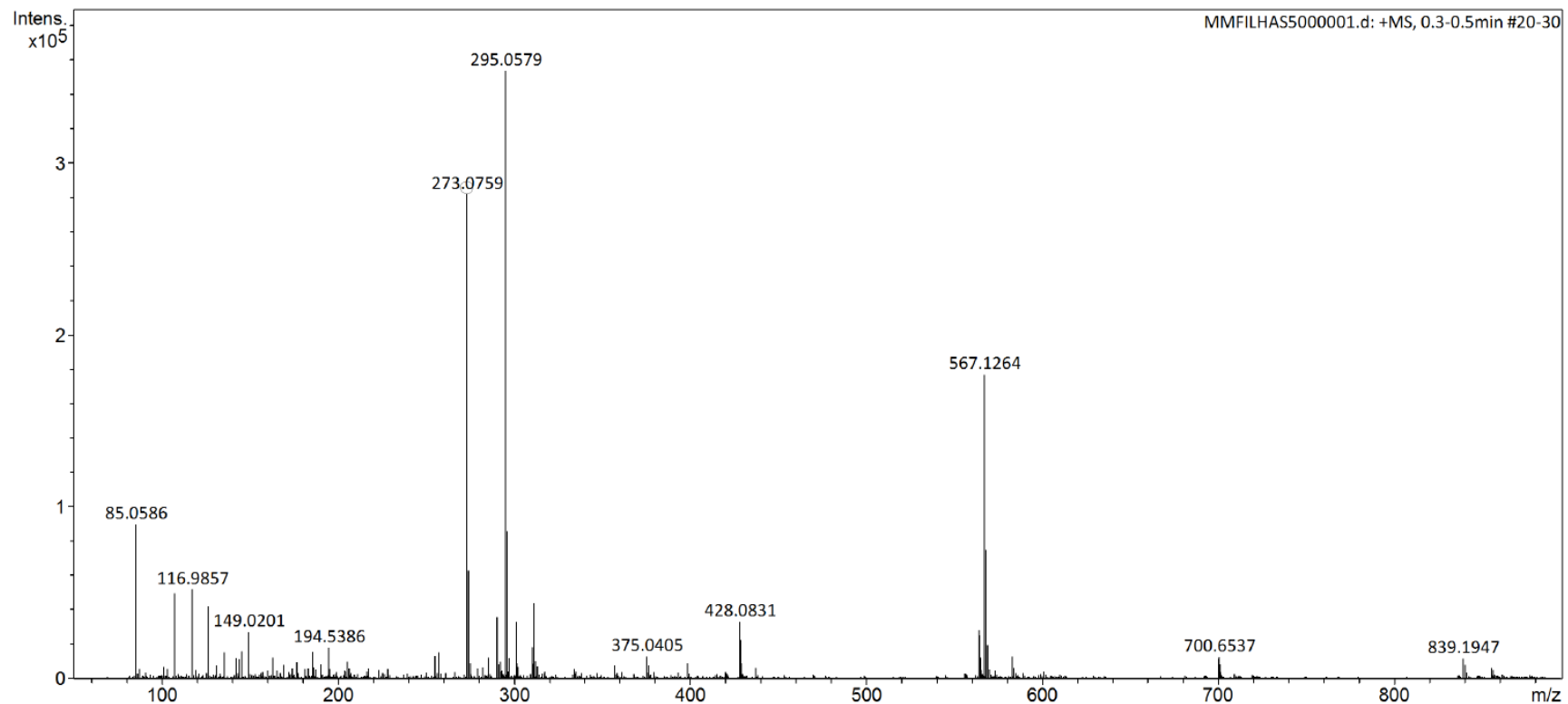


Figura 52-Espectro de RMN de ^1H da substância **S7** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

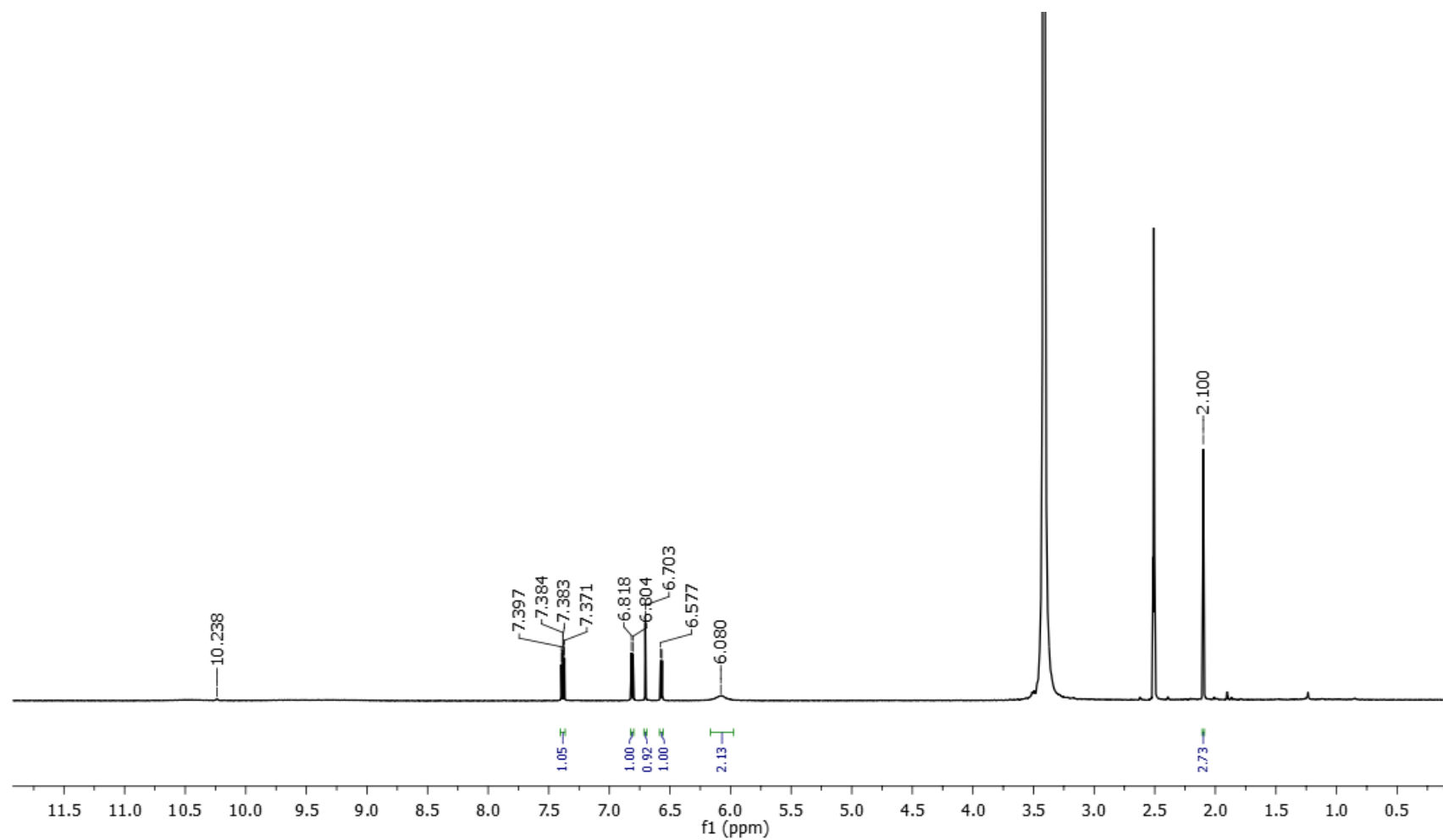


Figura 53- Mapa de contorno de COSY da substância **S7** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

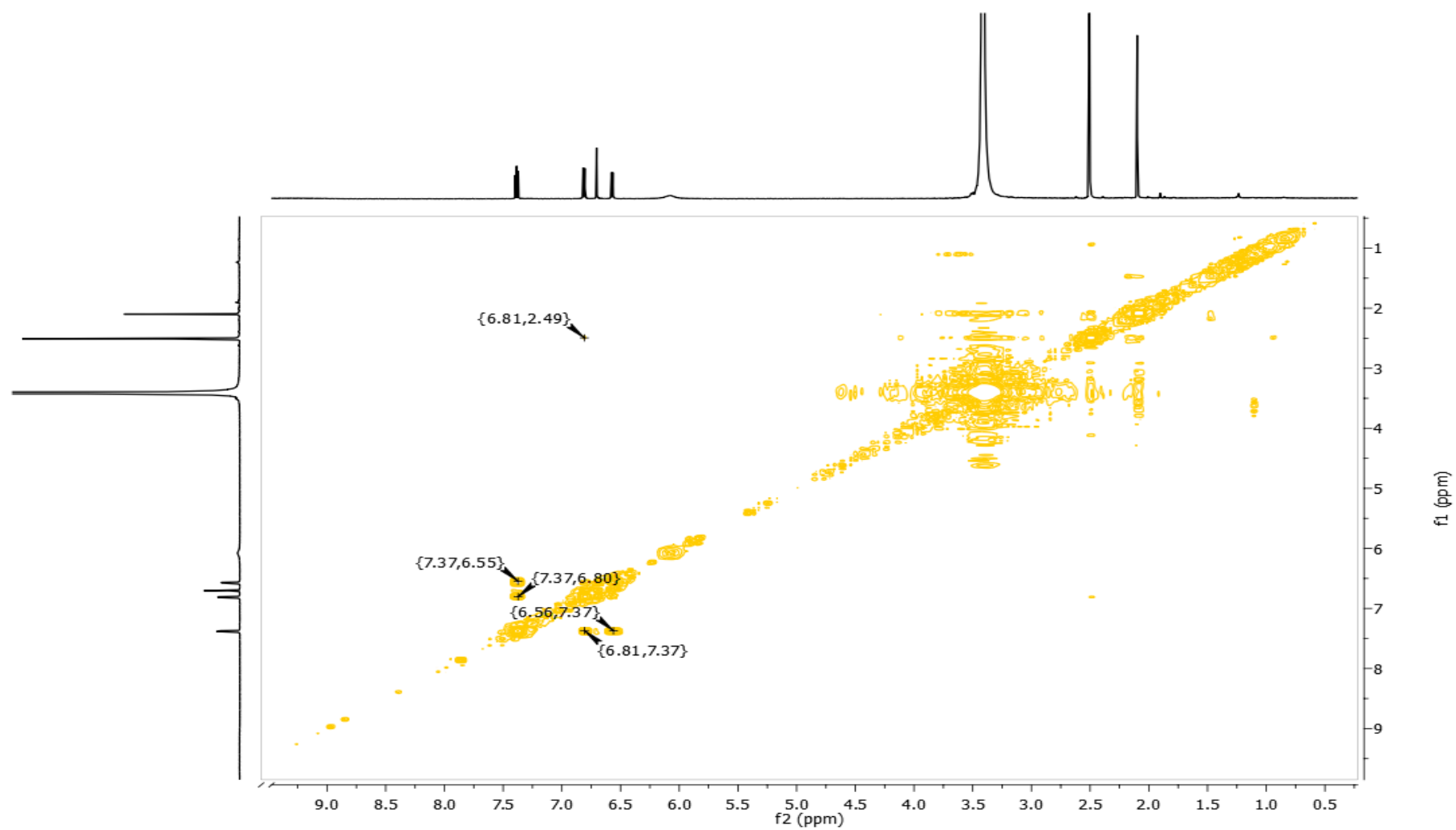


Figura 54- Mapa de contorno de HSQC da substância **S7** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

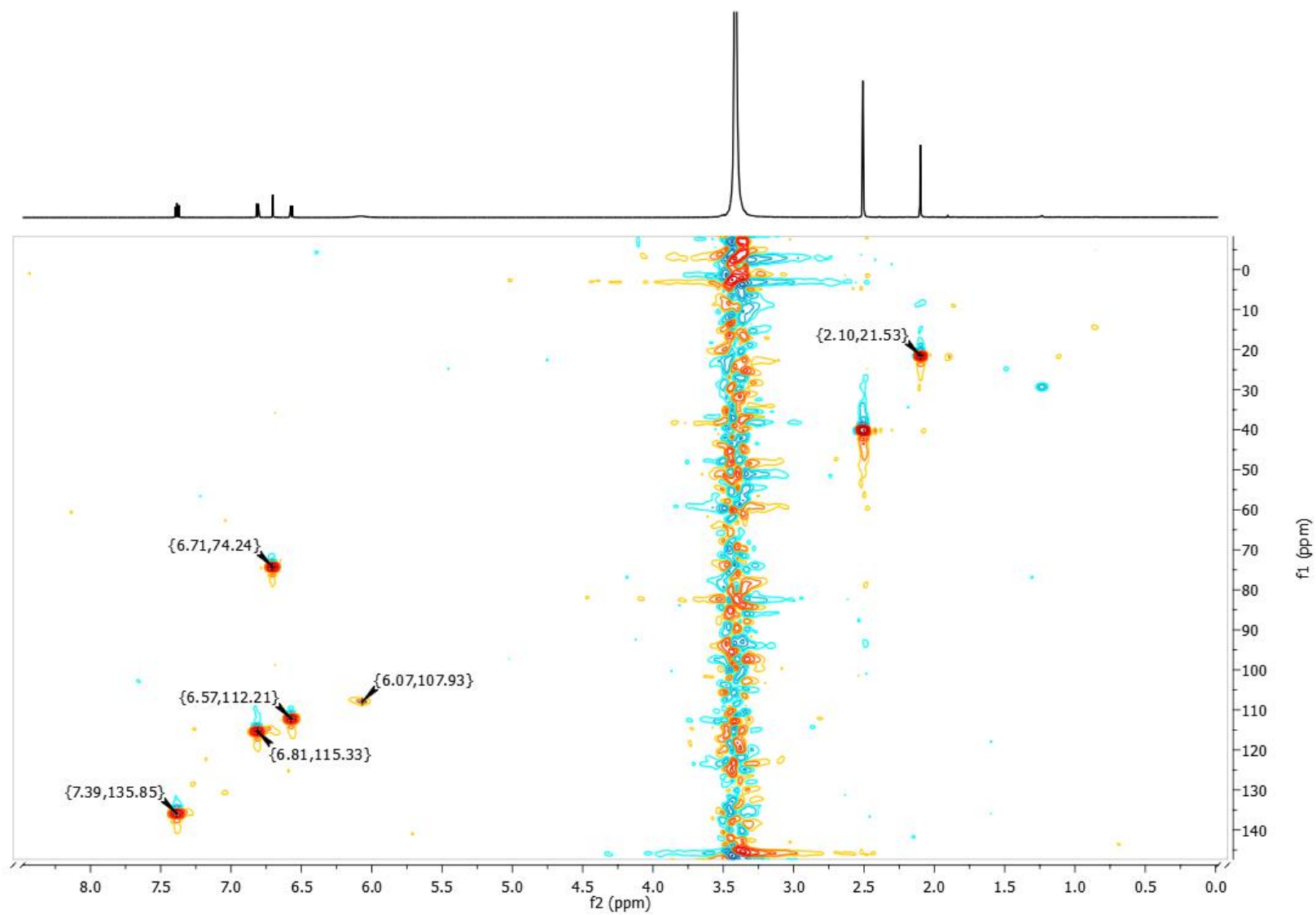


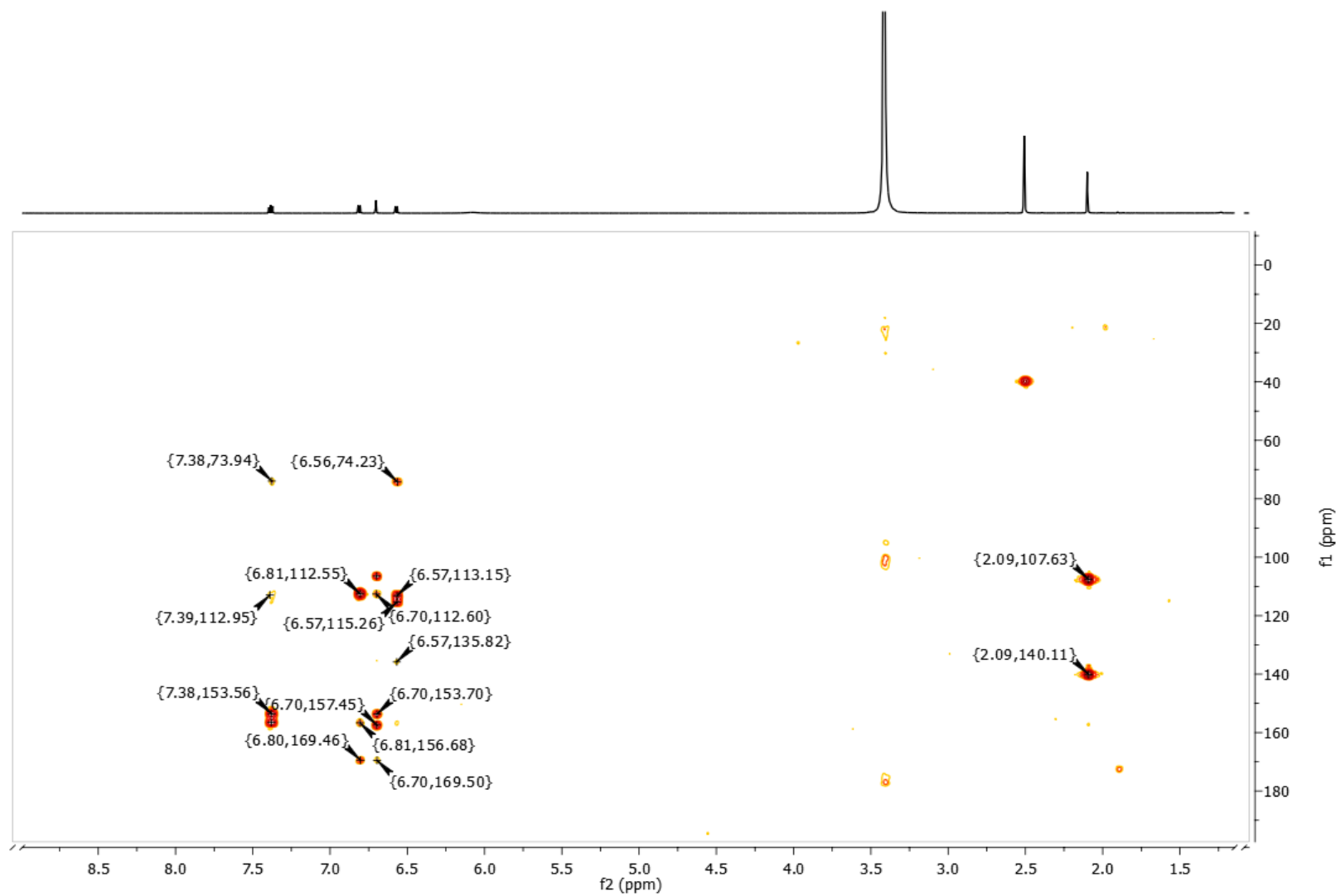
Figura 55- Mapa de contorno de HMBC da substância **S7** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Figura 56- Espectro de massas da substância **S8**.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

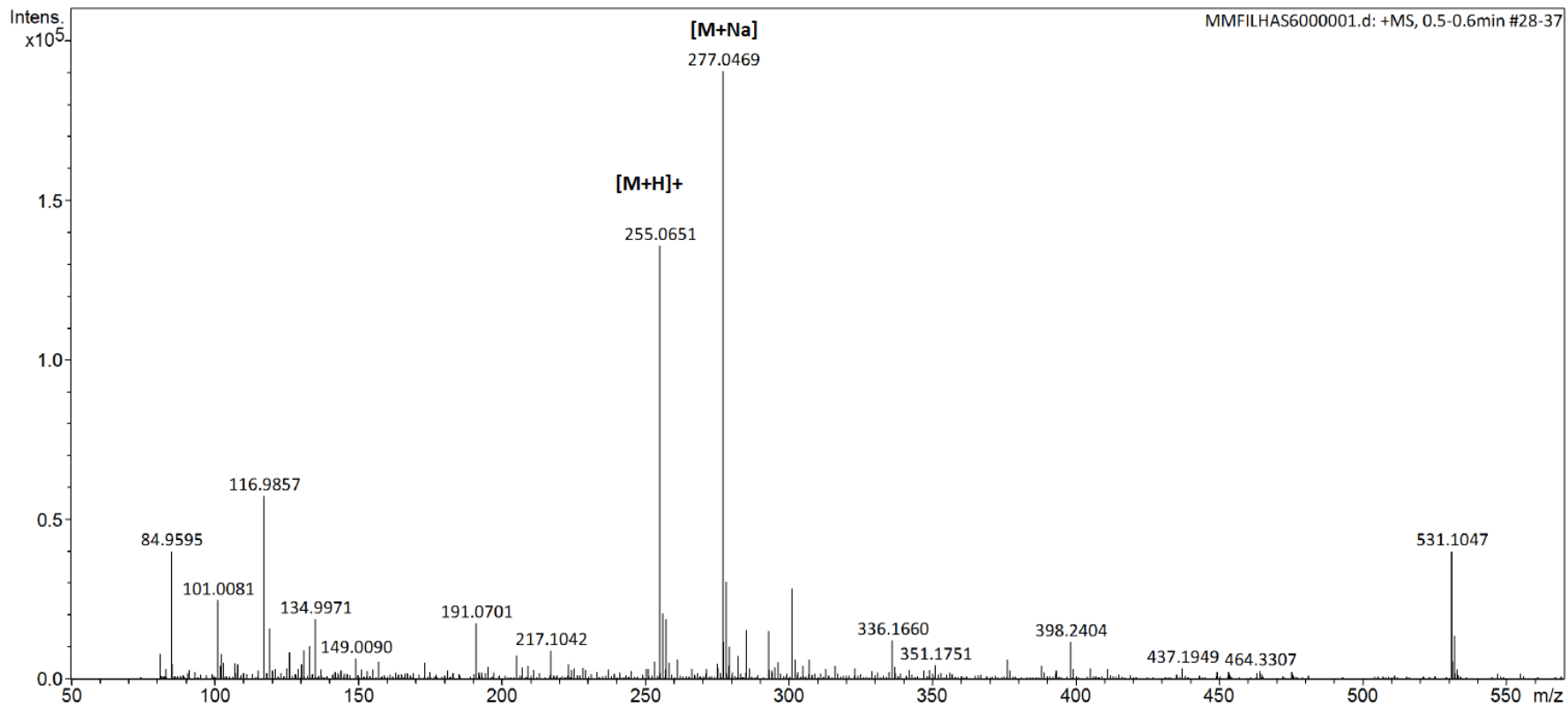


Figura 58- Espectro de RMN de ^1H da substância **S8** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz). Ampliação da região δ_{H} 6,7-9,8 ppm.

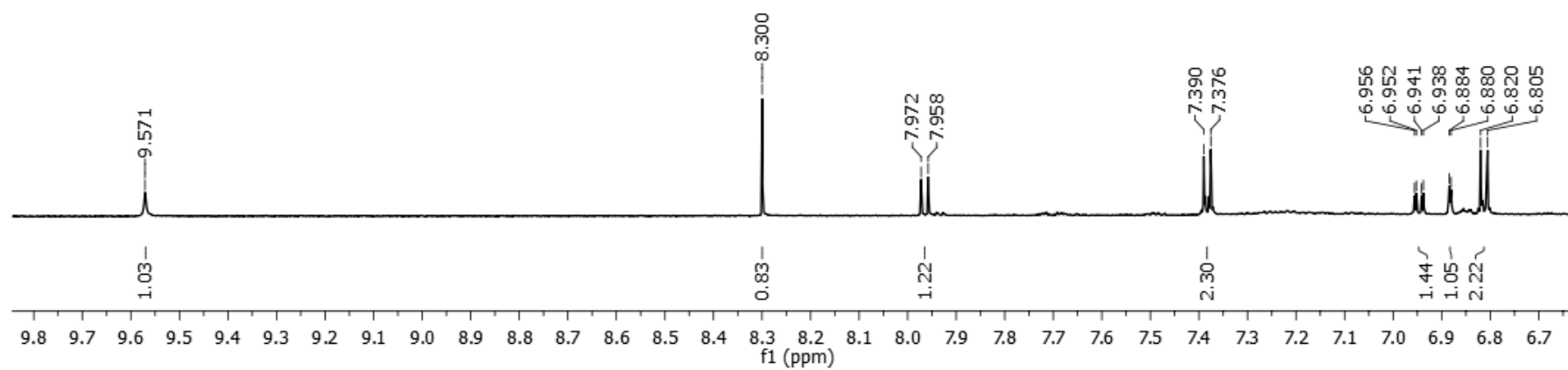


Figura 59- Mapa de contorno de HSQC da Substância **S8** (DMSO- d_6 , 600 MHz). Ampliação da região δ_H 6,1-8,7 ppm.

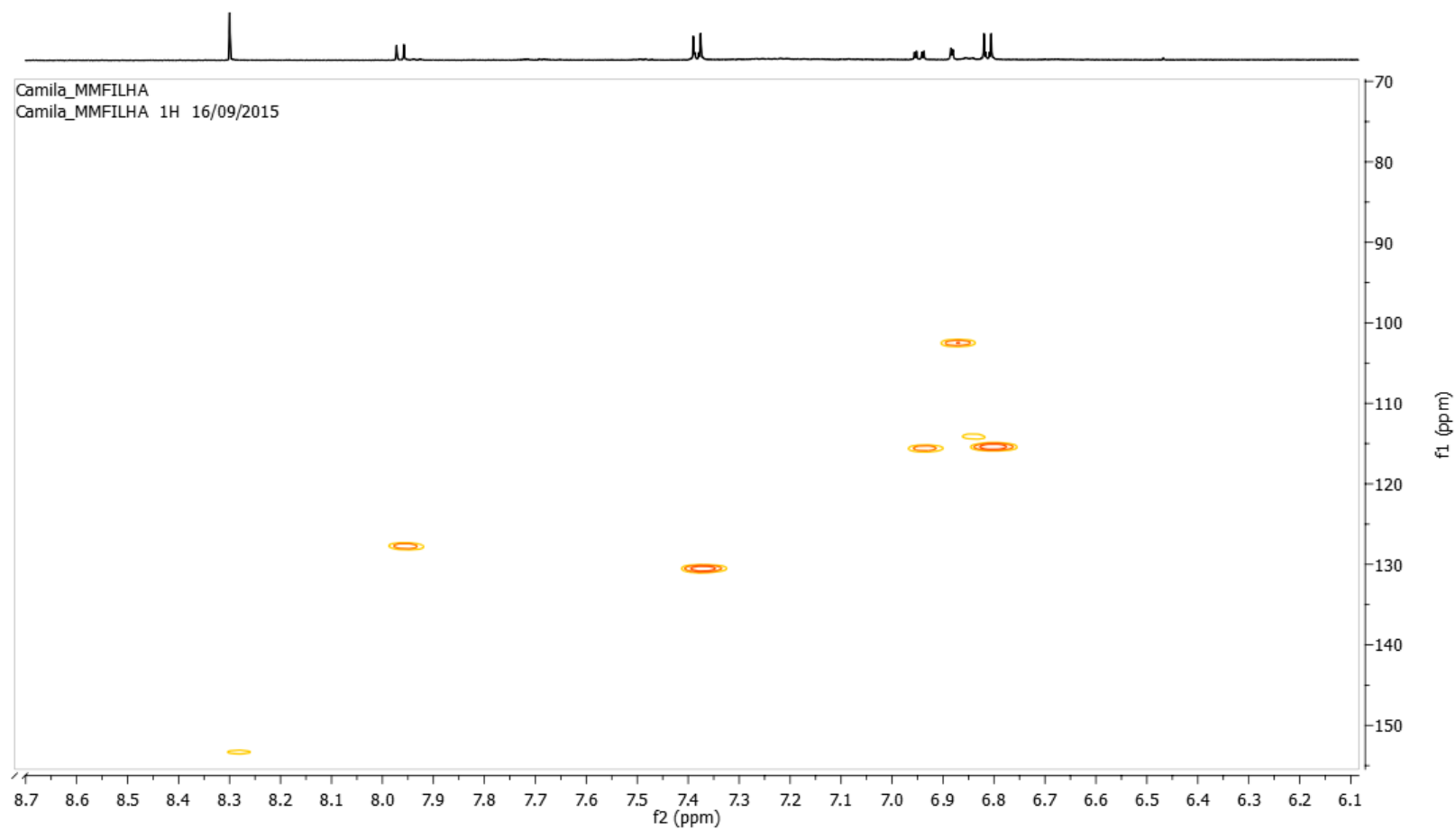


Figura 60- Mapa de contorno de HMBC da substância **S8** (DMSO- d_6 , 600 MHz). Ampliação da região δ_H 6,6-9,8 ppm.

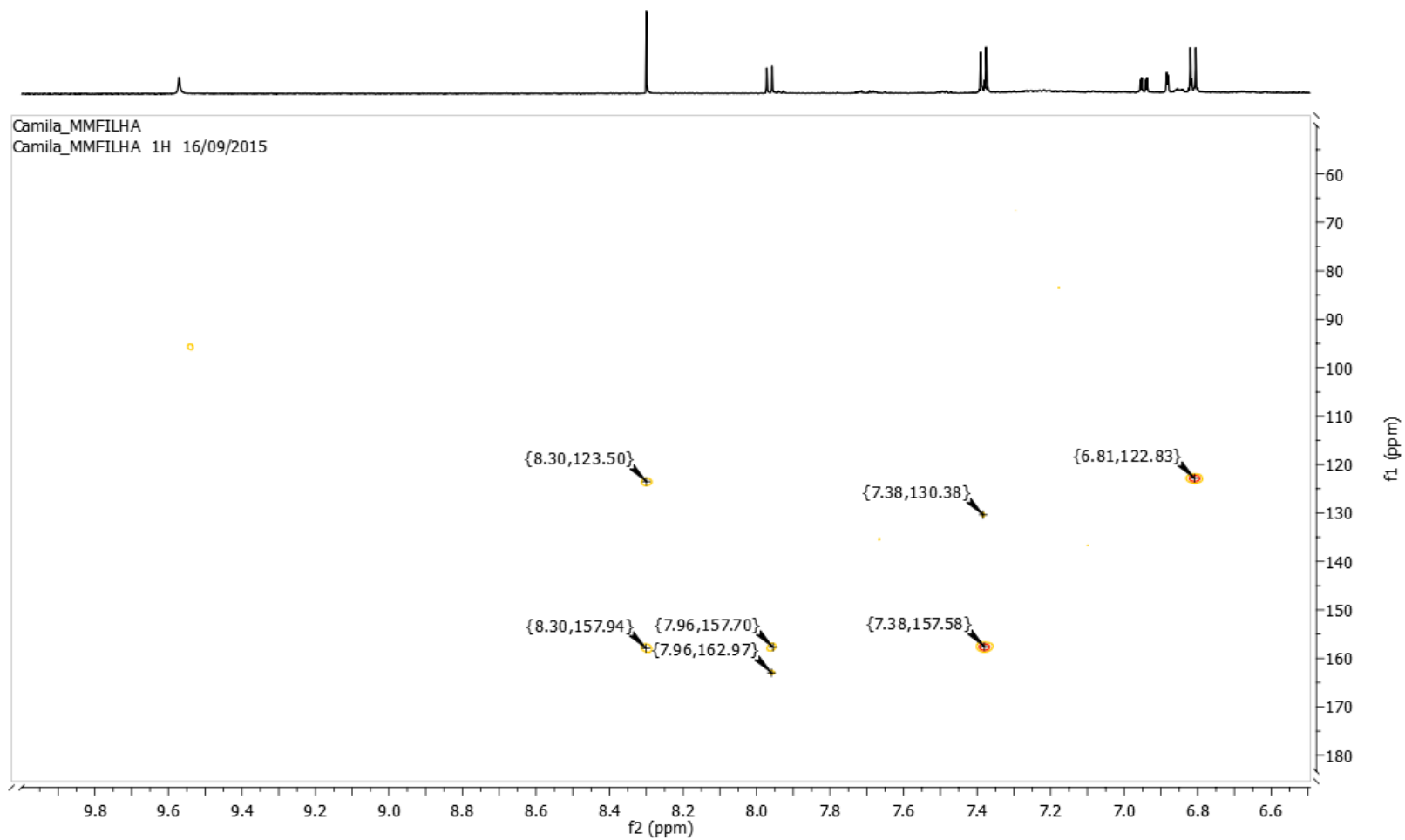


Figura 61- Espectro de RMN de ^1H da substância **S8** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz). Ampliação da região δ_{H} 5,2-10,2 ppm. Isolada de *Microascus* sp.

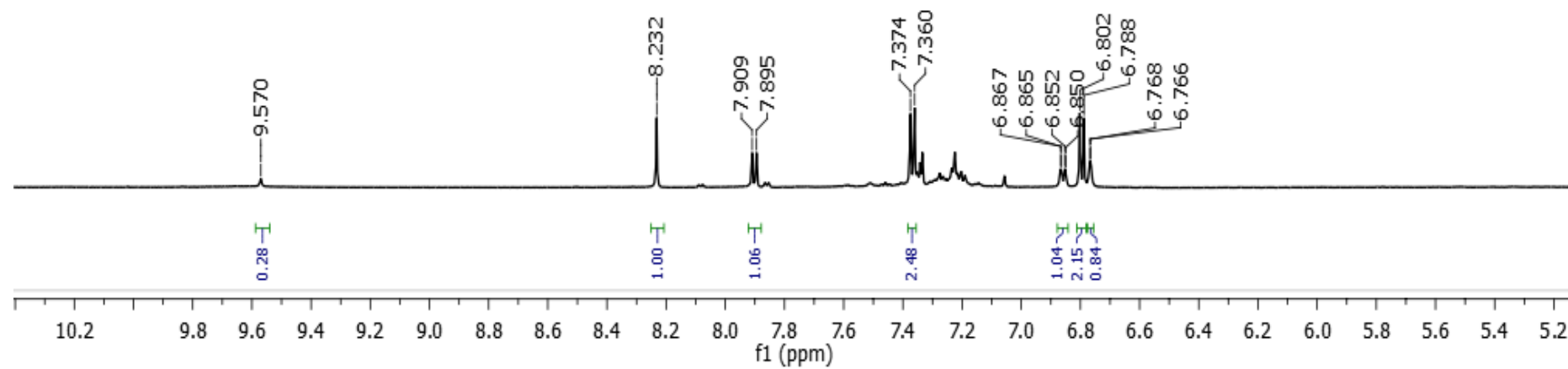


Figura 62- Espectro de RMN de ^{13}C da Substância **S8** ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz). Isolada de *Microascus* sp.

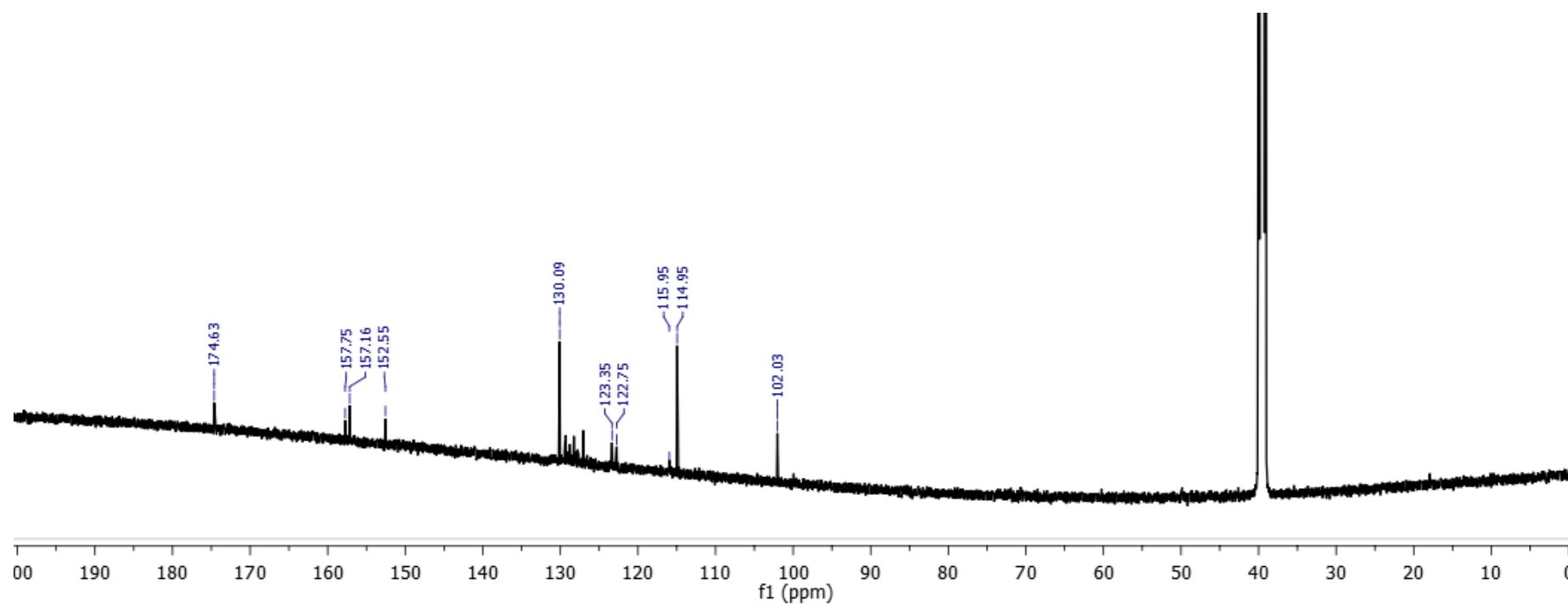


Figura 65-Cromatogramas obtidos por CG-EM do meio de cultivo PDB (A) e AT04Mar (B).

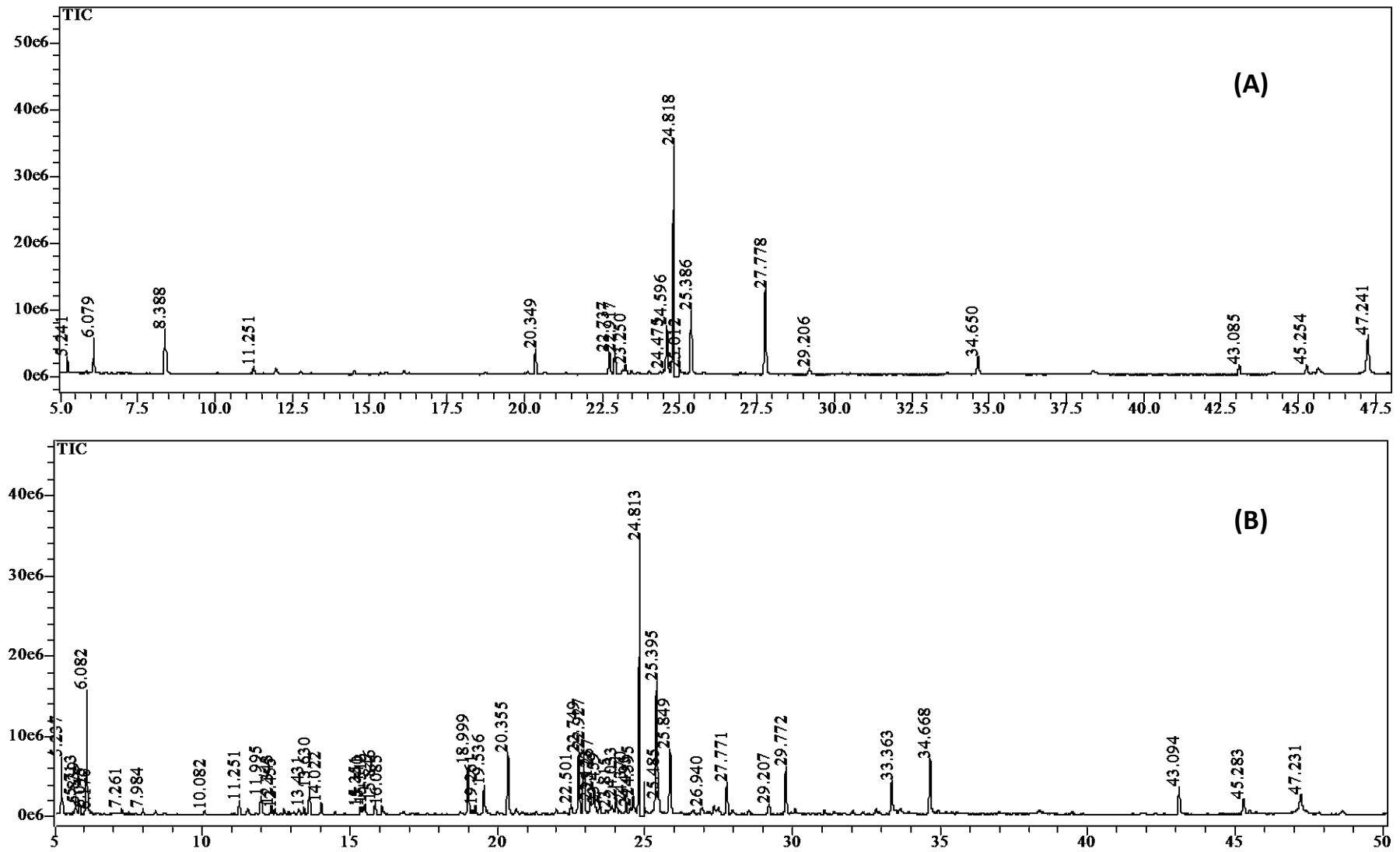


Figura 66- Cromatogramas obtidos por CG-EM da F.A.AT04MQ (A) e do meio de cultivo PDB (B).

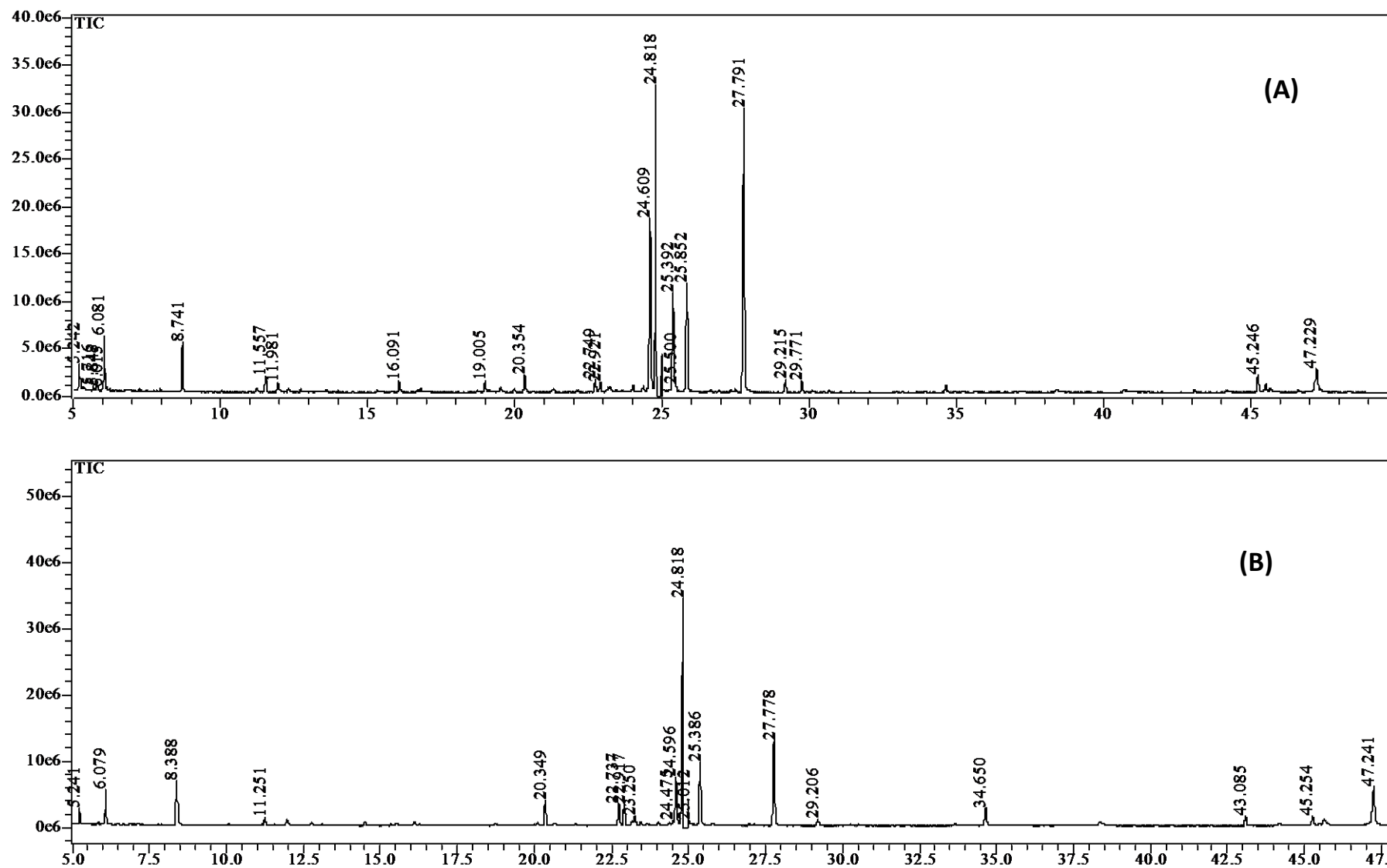


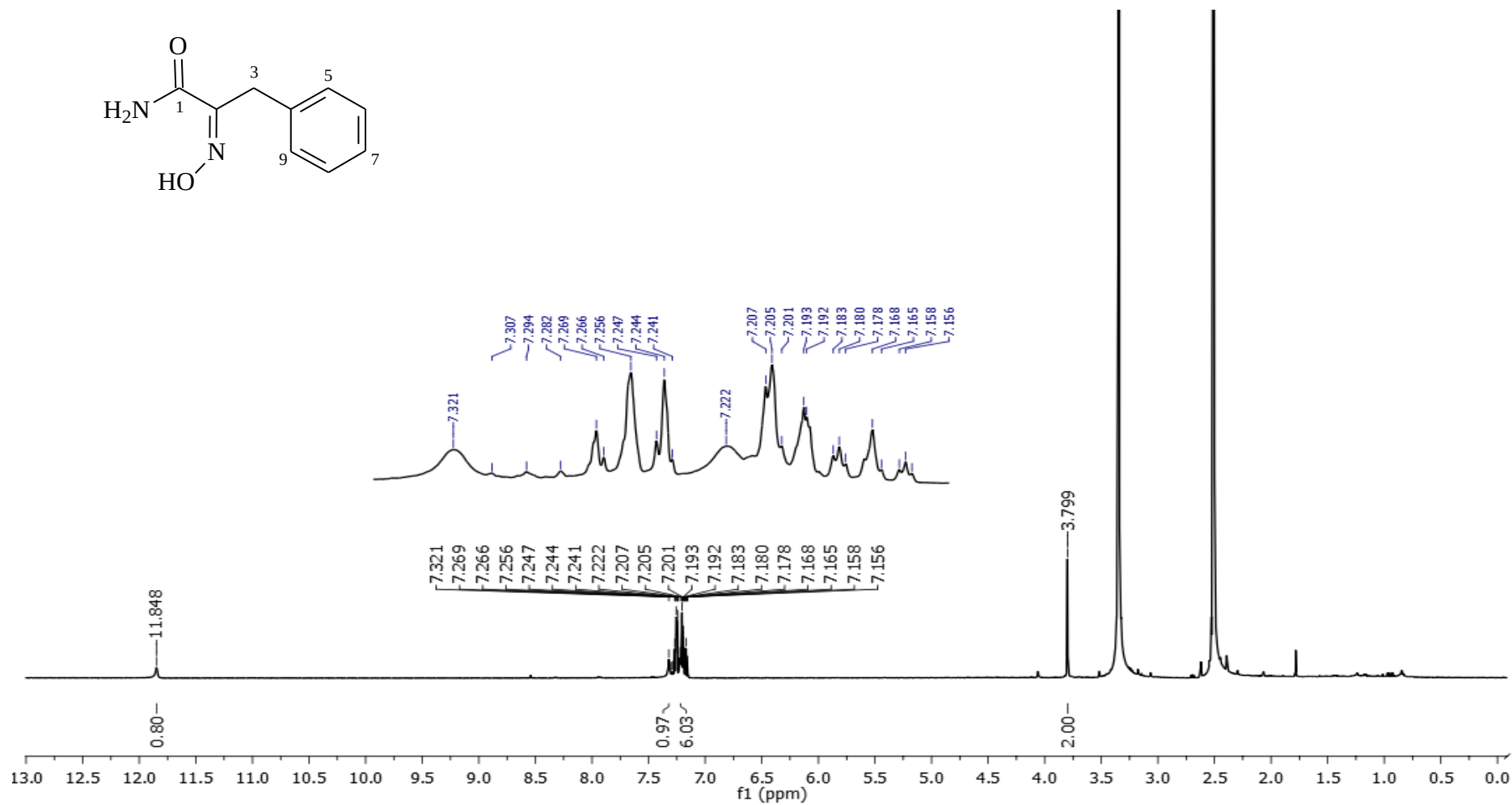
Figura 67-Espectro de RMN de ^1H da substância **S9** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Figura 68-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S9** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

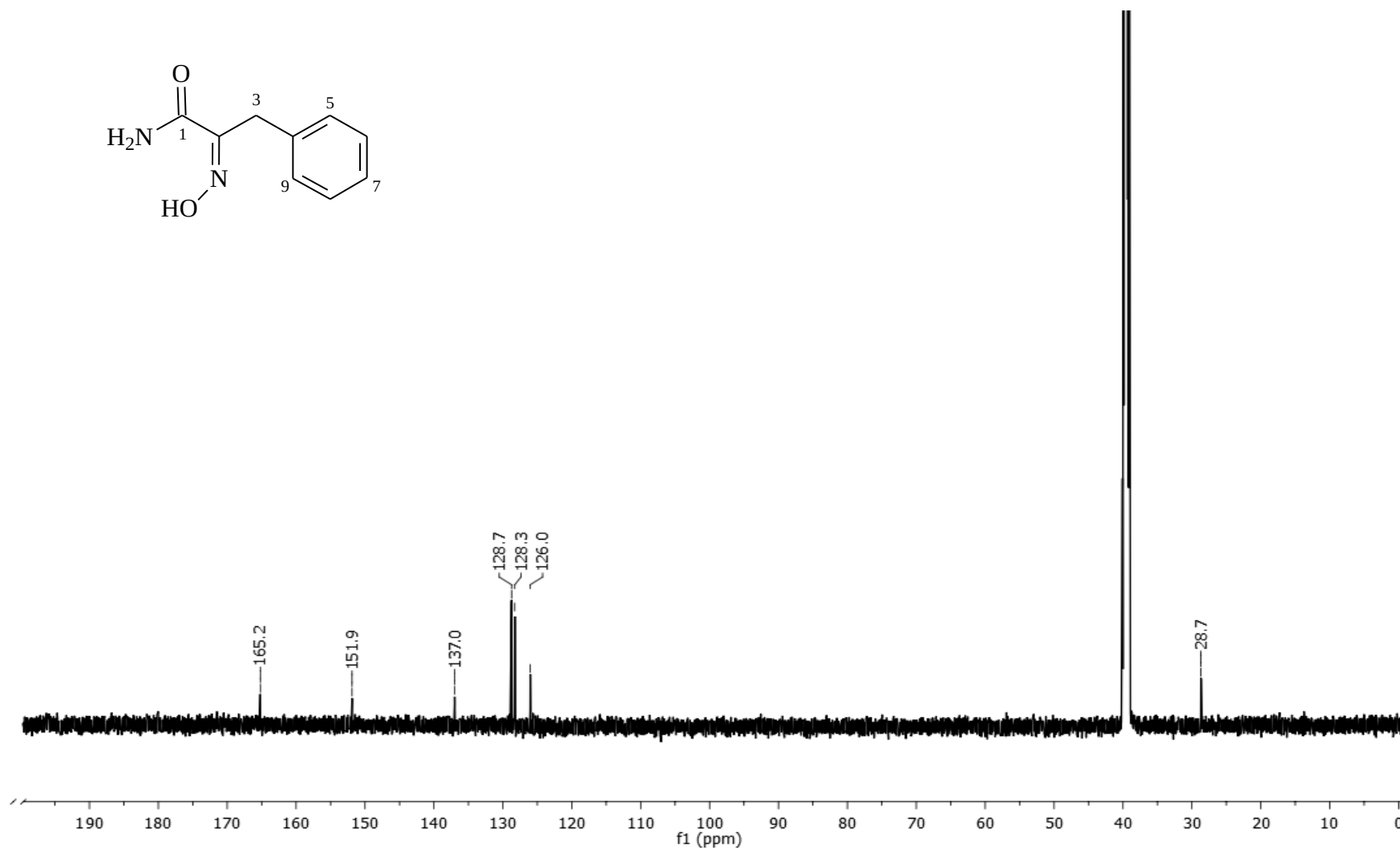


Figura 69- Mapa de contorno de HSQC da substância **S9** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

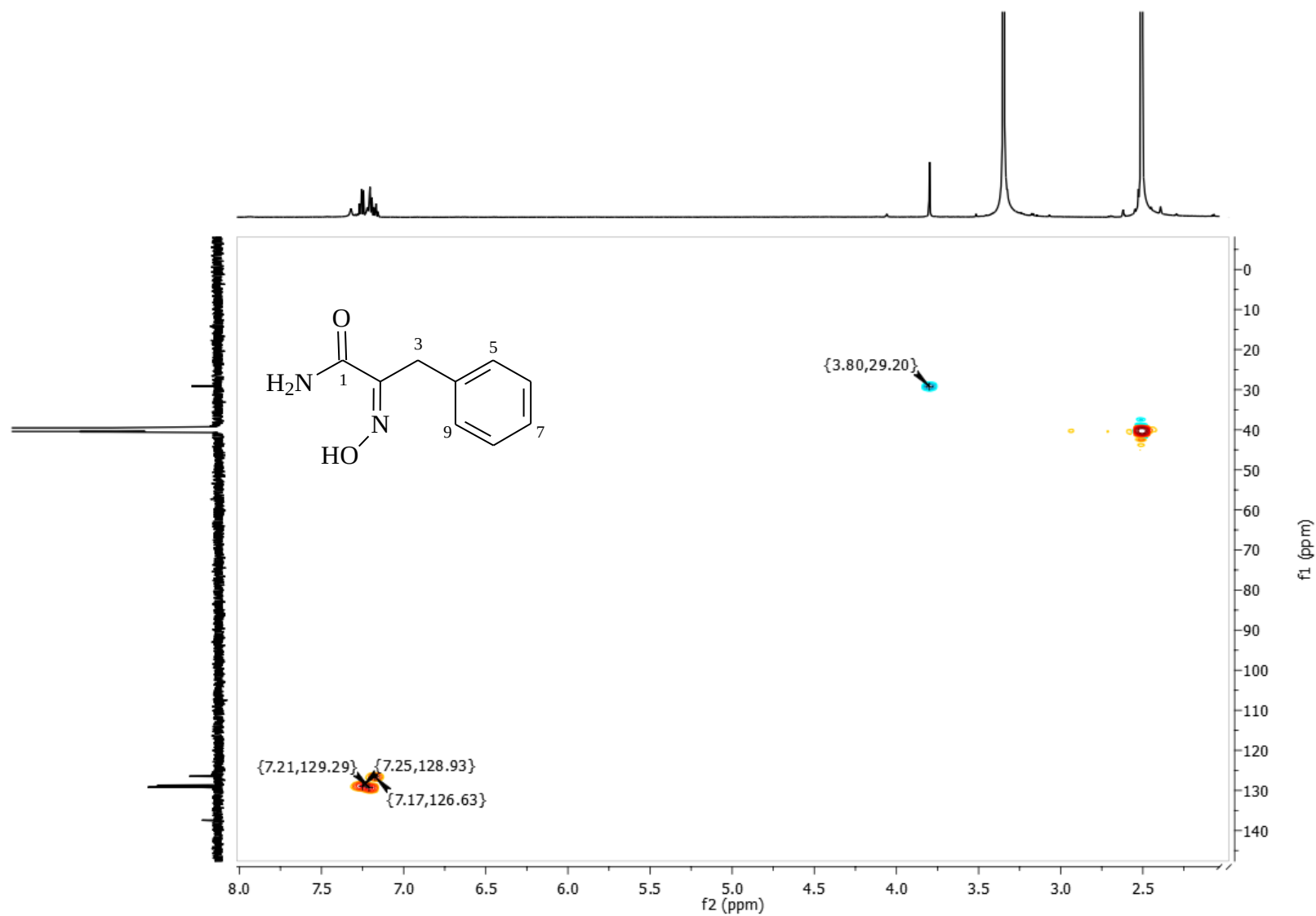


Figura 70-Mapa de contorno de COSY da substância **S9** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

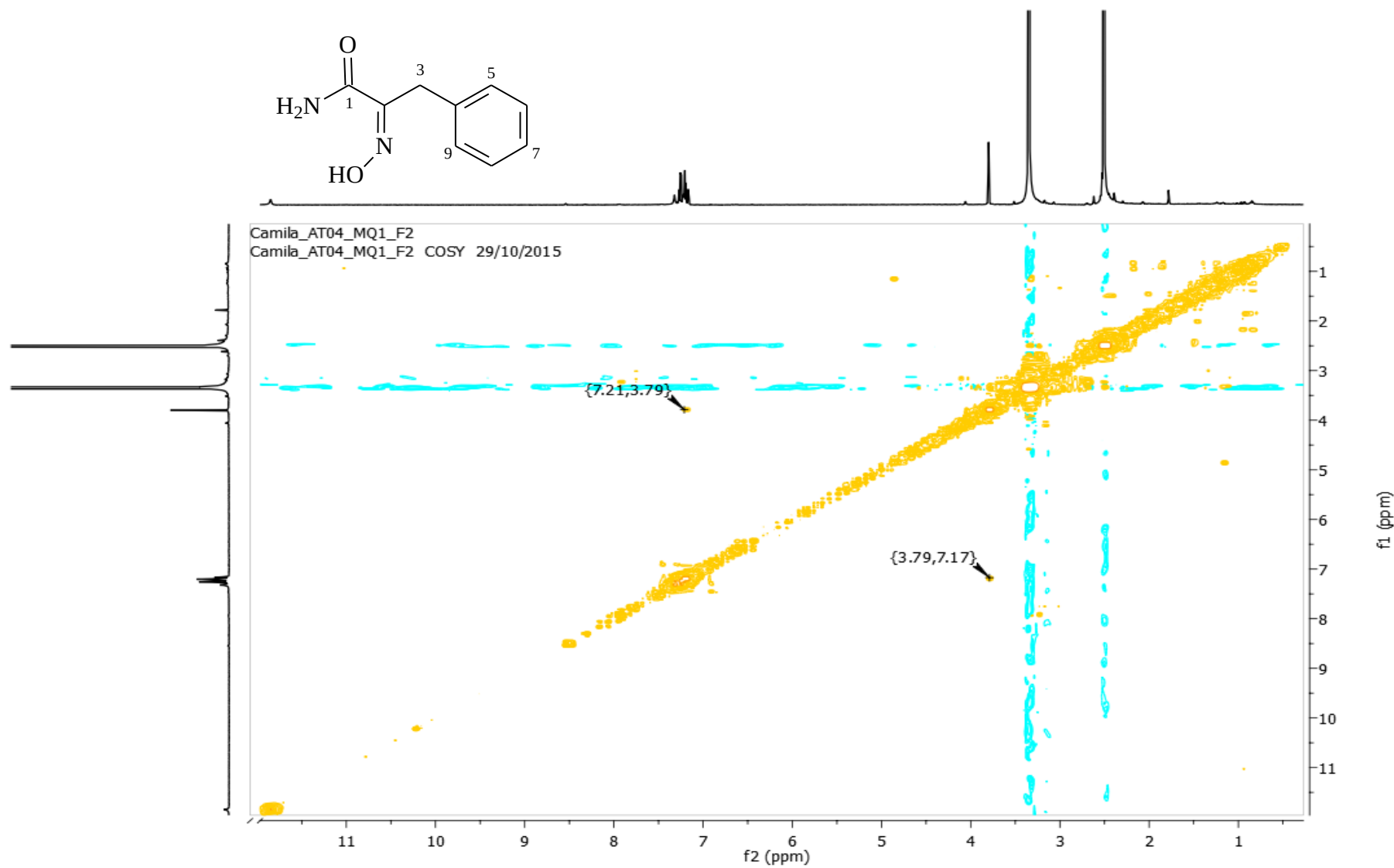


Figura 71-Espectro de massas da substância S9.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

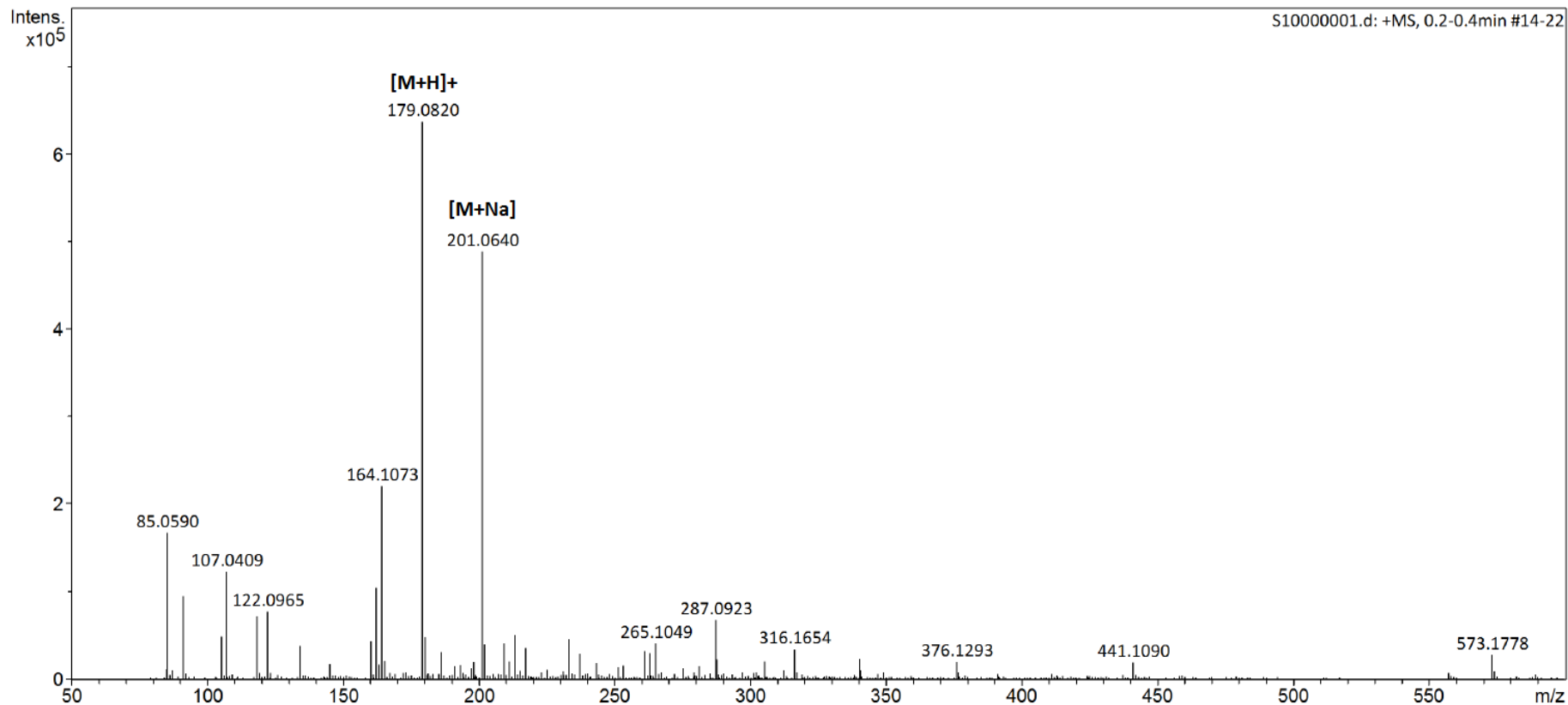


Figura 73-Espectro de RMN de ^1H da substância **S10** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

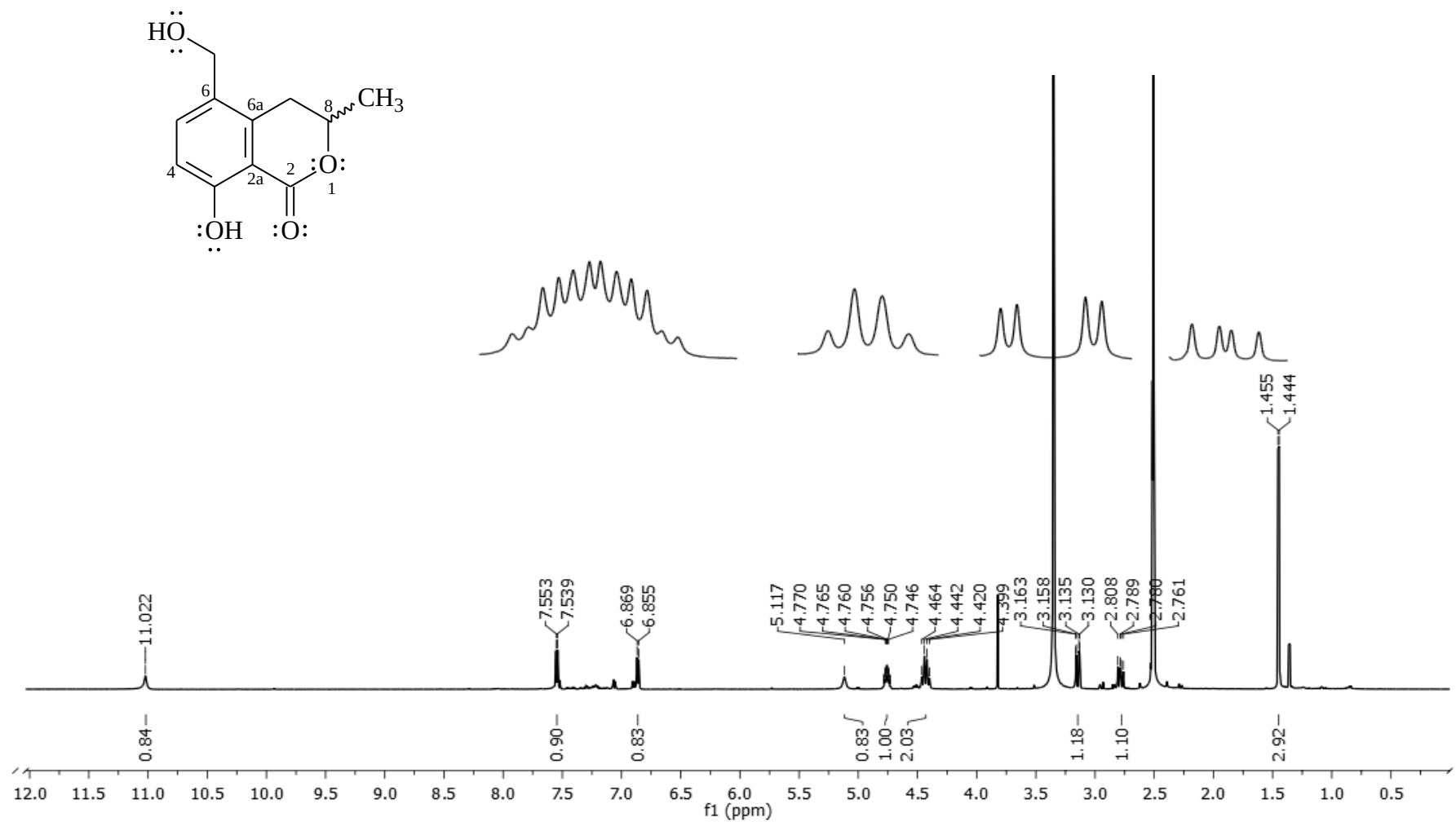


Figura 74-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S10** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

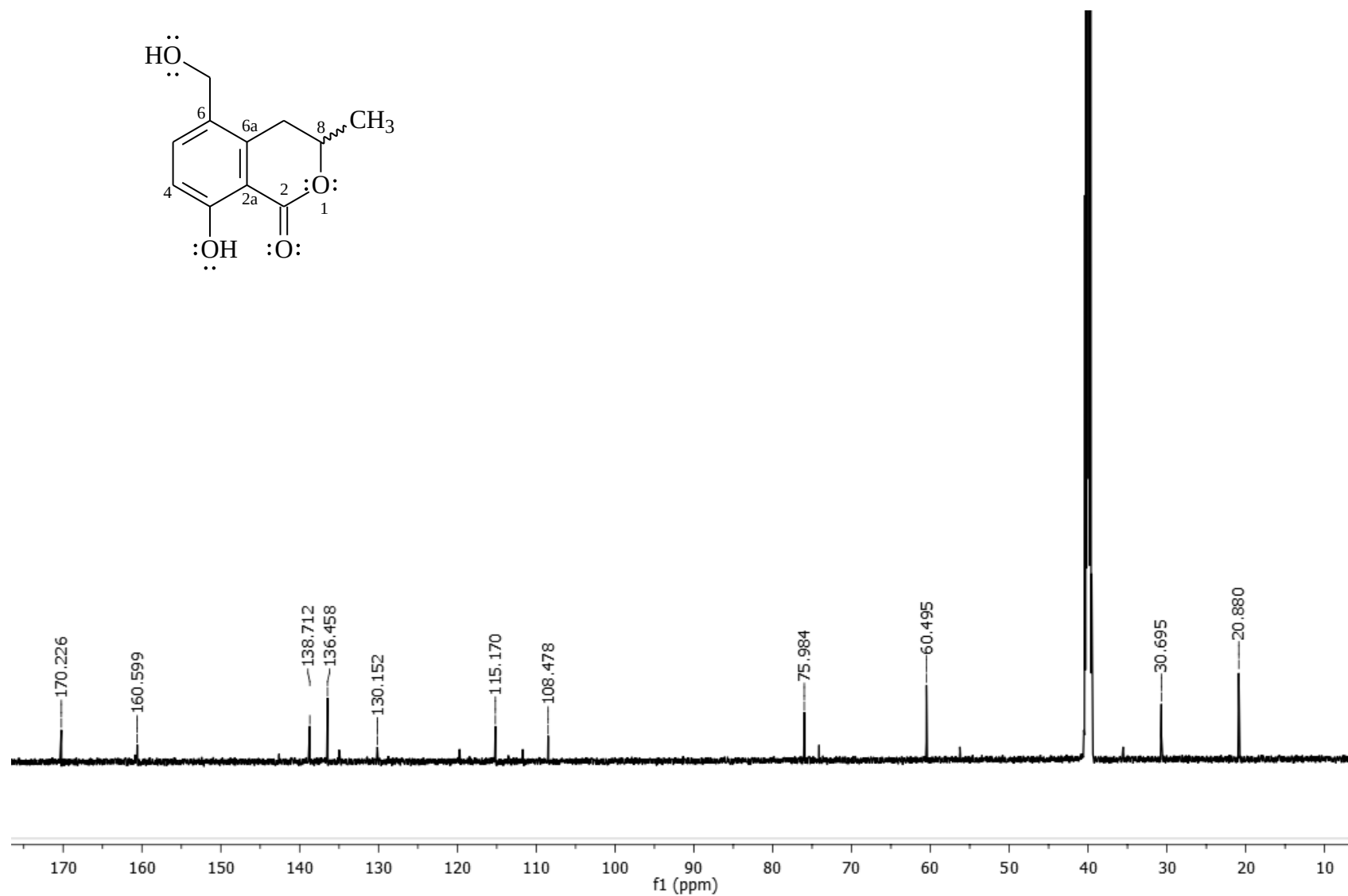


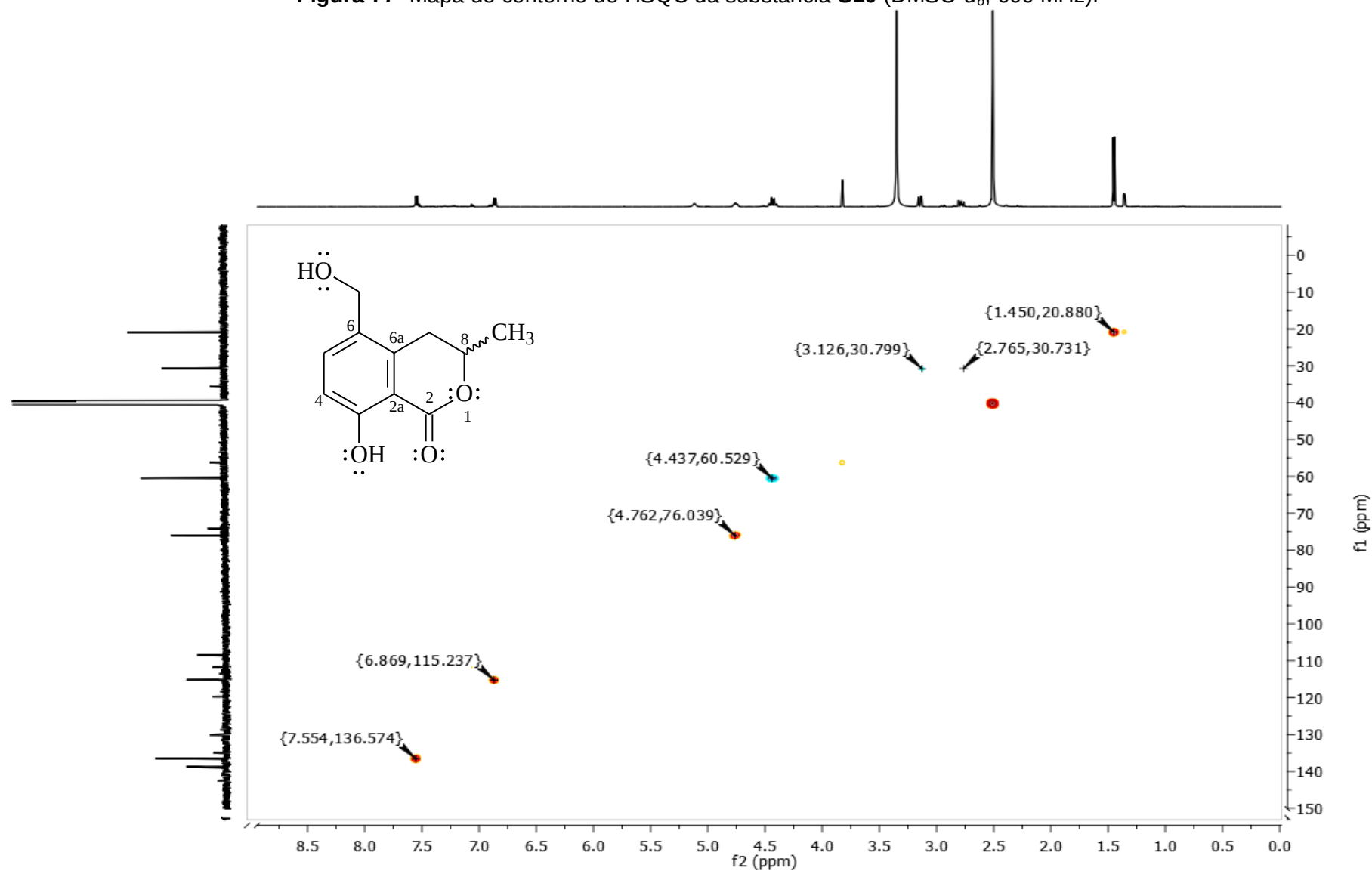
Figura 77- Mapa de contorno de HSQC da substância **S10** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Figura 78-Espectro de RMN de ^1H da substância **S11** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

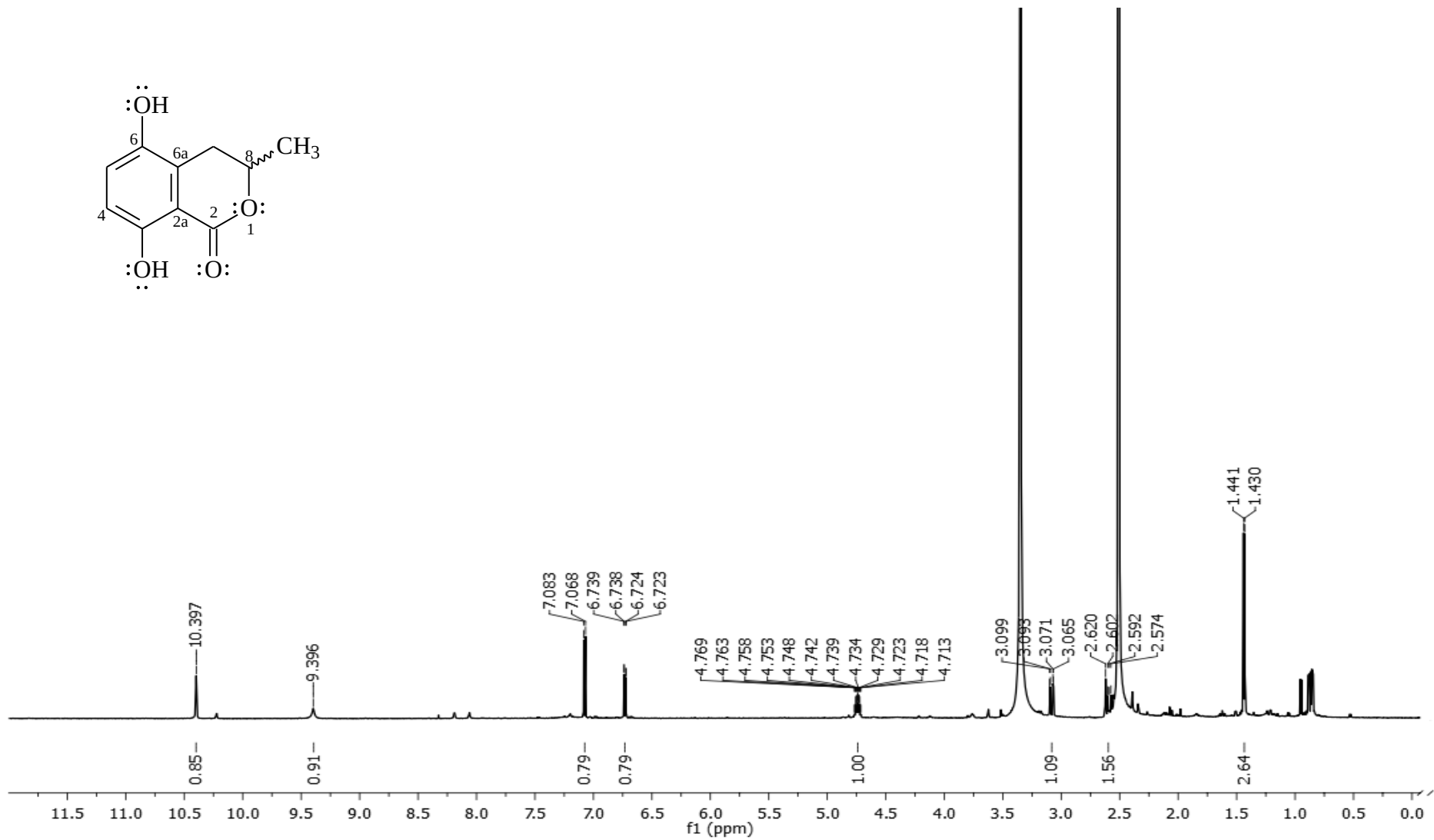


Figura 79-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S11** ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz).

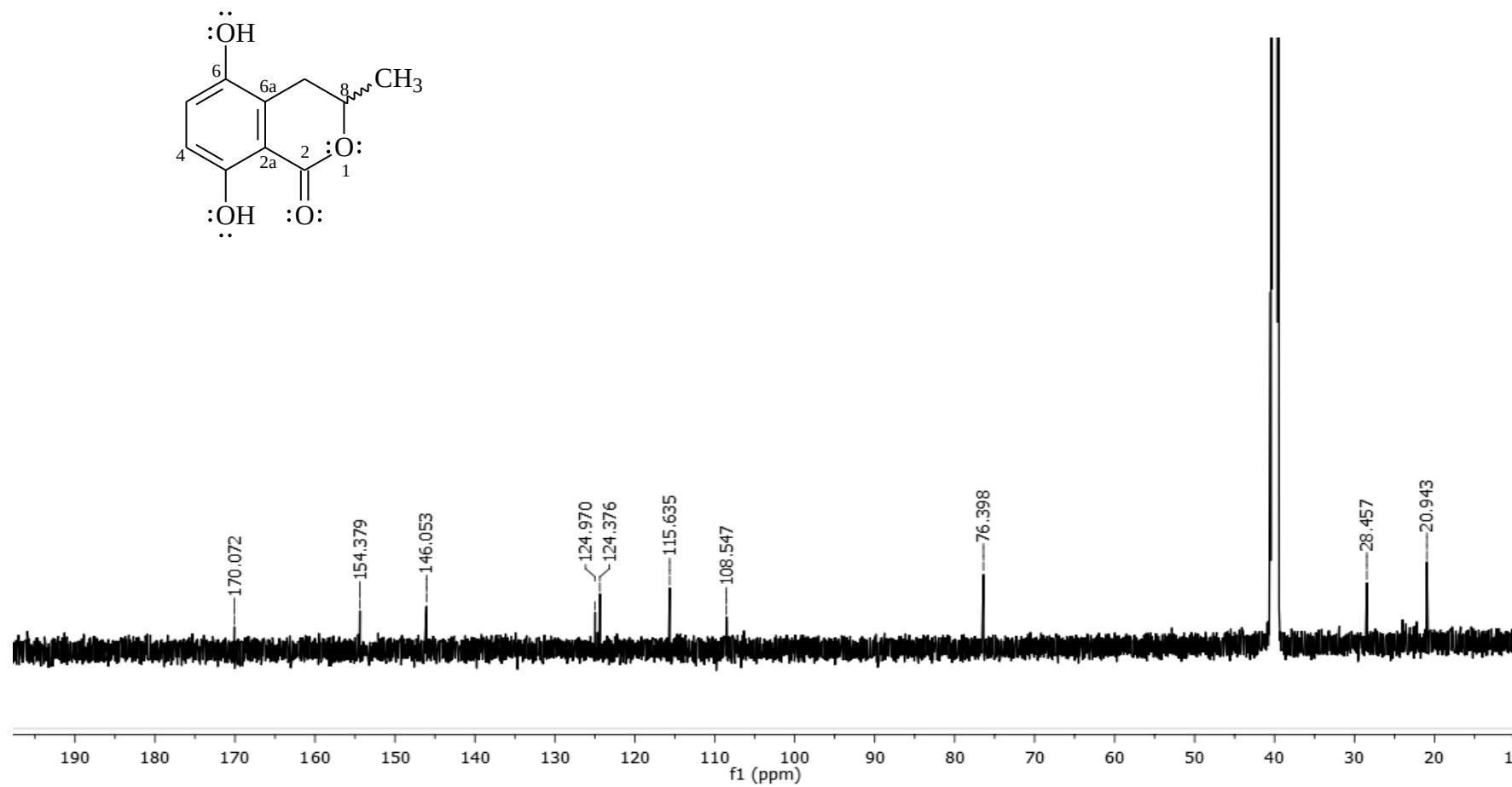


Figura 80- Mapa de contorno de HSQC da substância **S11** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

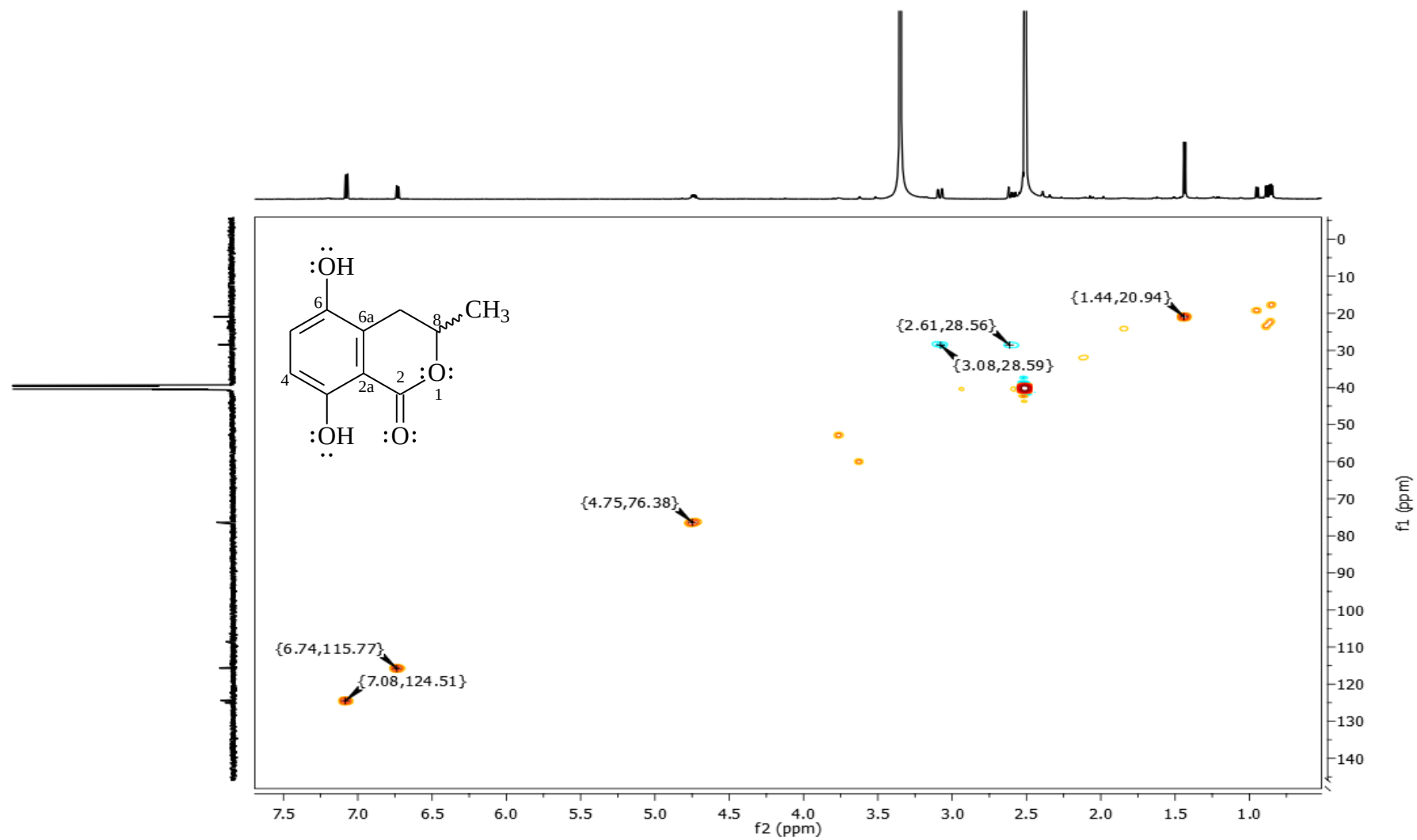


Figura 84-Espectro de RMN de ^1H da substância **S12** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

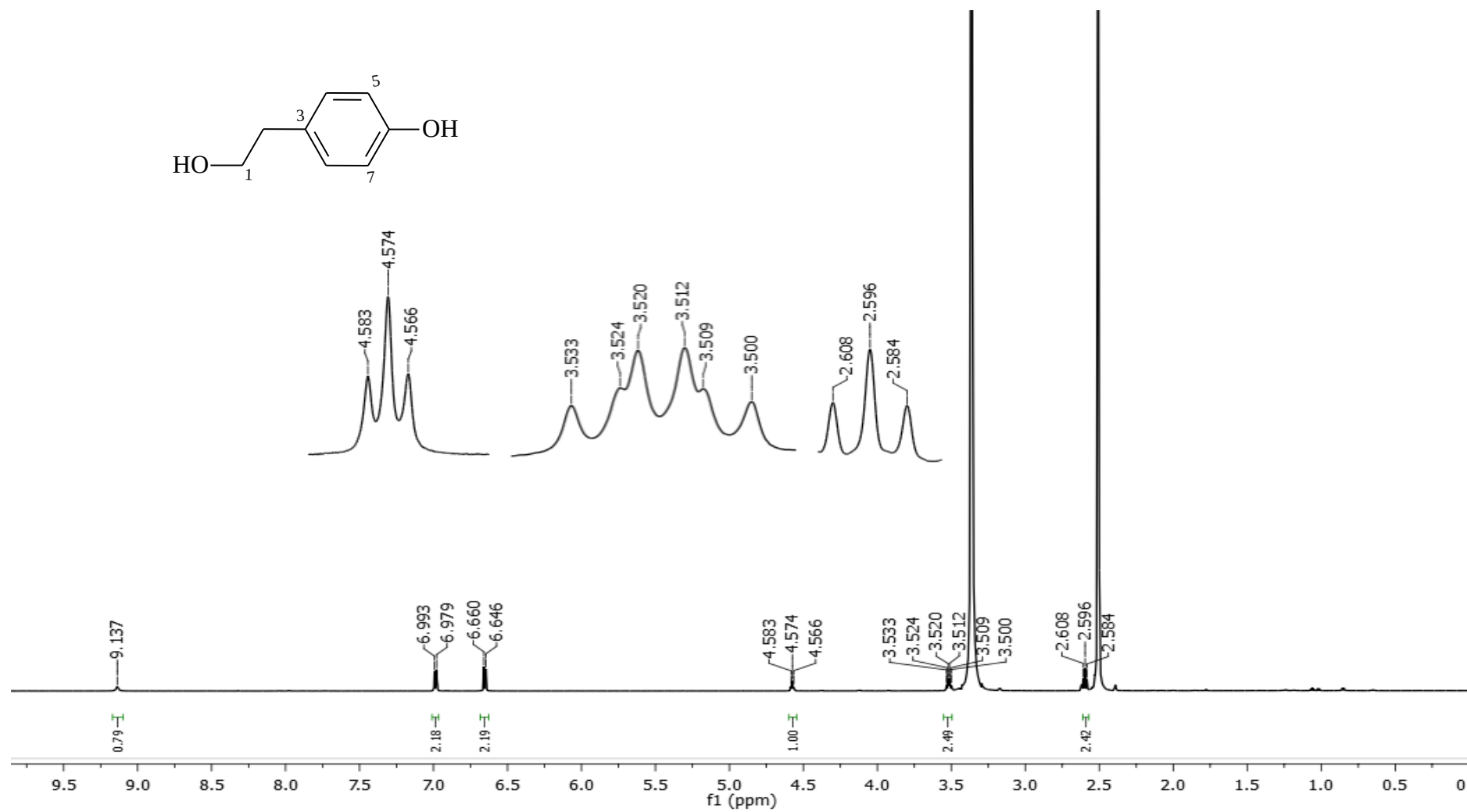


Figura 85-Espectro de RMN de ^{13}C da substância **S12** ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz).

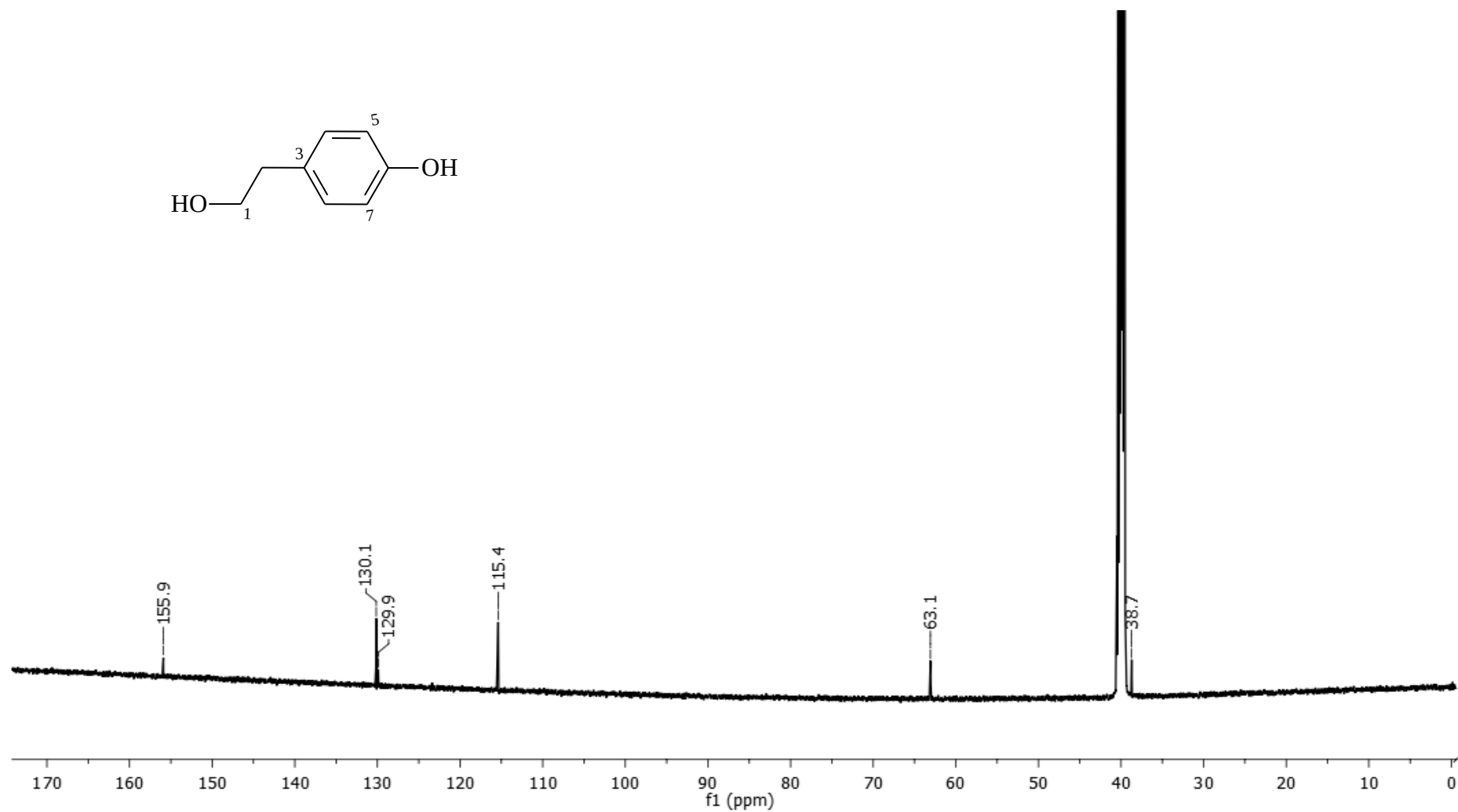


Figura 88- Mapa de contorno de HSQC da substância **S12** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

