RENATO OYADOMARI ABE

Estudo Químico e Biológico do fungo endofítico C80 (Phaeosphaeriaceae) associado à alga marinha *Bostrychia radicans*

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

Orientadora: Profª Drª Marcia Nasser Lopes

Araraquara

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Abe, Renato Oyadomari
A138e Estudo químico e biológico do fungo endofítico C80 (Phaeosphaeriaceae) associado à alga marinha *Bostrychia radicans* / Renato Oyadomari Abe. –
Araraquara : [s.n], 2013
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Marcia Nasser Lopes

1. Química orgânica. 2. Fungos endofíticos. 3. Metabólitos secundários. 4. Policetídeos aromáticos. I. Título.

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

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Renato Oyadomari Abe

Filiação: Jorge Abe e Nilza Aparecida Rieko Oyadomari Abe

Nascimento: 17/04/1987

Endereço profissional

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Rua Prof. Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, Araraquara/SP, CEP 14800-900
Telefone: (16) 3301-9793 - renatooabe@gmail.com

Formação acadêmica

2011-2013

Mestrado em Química pelo Instituto de Química - UNESP/Araraquara

Título: Estudo Químico e Biológico do fungo endofítico C80 (Phaeosphaeriaceae) associado à alga marinha *Bostrychia radicans*

Orientadora: Profª Drª Marcia Nasser Lopes

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006-2010

Bacharelado em Química pelo Instituto de Química - UNESP/Araraquara

Título: Estudo Químico e Biológico de fungos endofíticos associados à alga vermelha *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)

Orientadora: Profª Drª Marcia Nasser Lopes

Resumos publicados em anais de congressos

LOPES, M. N.; ABE, R. O.; BATISTA, A. N. L.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; ERBERT, C.; LOPES, J. L. C.; DEBONSI, H. M. Aromatic polyketides produced by an endophytic fungus of *Bostrychia radicans*. 6th European Conference on Marine Natural Products, 2009, Porto.

LOPES, M. N.; ABE, R. O.; BATISTA, A. N. L.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; ERBERT, C.; LOPES, J. L. C.; DEBONSI, H. M. Chemical and biological investigation of an endophytic fungus associoated to marine algae *Bostrychia radicans*. 2nd Brazilian Conference on Natural Products & XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM), 2009, São Pedro.

ABE, R. O.; LOPES, M. N.; ARAUJO, A. R.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Policetídeos aromáticos produzidos pelo fungo endofítico isolado da alga marinha *Bostrychia radicans*. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

RENATO OYADOMARI ABE

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

Araraquara, 23 de maio de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. MARCIA NASSER LOPES (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

André Luiz Meleiro Porto.
Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ MELEIRO PORTO
Instituto de Química / USP / São Carlos

Prof. Dr. JAIRO KENUPP BASTOS
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto

Dedico este trabalho...

Aos meus pais e à minha irmã, que sempre me deram suporte, formando meu maior pilar de sustentação.

À Professora Marcia, que foi muito mais que uma orientadora, tornou-se um exemplo que quero seguir.

Aos grandes amigos que fiz em Araraquara, pelas boas conversas e risadas, nas horas boas ou ruins.

AGRADECIMENTOS

À Professora Angela Araújo e seus alunos, por toda dedicação e apoio, que foram fundamentais para o meu desenvolvimento.

Ao Professor Alberto Cavalheiro, que também manteve as portas abertas para discussões e esclarecimentos.

À professora Hosana Debonsi, por toda a participação no projeto e contribuição no exame de qualificação.

Aos colegas Nivaldo Boralle, João Bronzel e Juliana Rodrigues, extremamente prestativos, ajudando o trabalho de inúmeras maneiras.

Ao Luis Octávio Regasini, pelo suporte nas reações desenvolvidas.

Ao José Carlos Tomaz, pelas análises espectrométricas de alta resolução.

A todos os amigos do laboratório, pela boa companhia que torna o laboratório muito mais agradável.

Às funcionárias da biblioteca e pós-graduação, pelo esforço e compreensão.

RESUMO

Este trabalho teve como principal objetivo a obtenção de substâncias bioativas produzidas pelo fungo endofítico C80, pertencente à família Phaeosphaeriaceae, isolado da alga marinha *Bostrychia radicans*. O crescimento do endófito em escala ampliada foi realizado em meio sólido de arroz, modo estático e temperatura ambiente por 28 dias. O extrato em AcOEt produzido a partir deste cultivo foi fracionado através de técnicas cromatográficas, levando ao isolamento de seis substâncias: 7-hidroxi-3-(1-hidroxietil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona (**1**), 3,7-dihidroxi-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona (**2**), 7-hidroxi-3-(1,2-dihidroxietil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona (**3** e **4**), 4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metilenoisocroman-1-ona (**5**) e 8-hidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metilenoisocroman-1-ona (**6**). Estas substâncias foram identificadas por análises espectroscópicas e espectrométricas como sendo policetídeos aromáticos, e então encaminhadas para ensaio citotóxico. Visando a mudança na produção metabólica do fungo, assim como na atividade biológica dos extratos brutos, foram realizados estudos da influência da composição do meio de cultura e do tempo de cultivo. Para a variação de composição, foram utilizados meios comerciais (CBD, Malte, Nutriente e arroz) e meios comerciais modificados com nitrato de amônio ou água do mar. Nenhuma alteração foi observada no perfil cromatográfico e nem na atividade citotóxica dos extratos. A variação do tempo de cultivo foi feita em meio sólido de arroz, com extrações em 10, 20, 30 e 40 dias de cultivo. Neste intervalo de tempo monitorado, a proporção dos metabólitos mudou consideravelmente, uma vez que os compostos majoritários no extrato de 10 dias estavam praticamente ausentes em 40 dias.

Palavras-chave: fungo endofítico, *Bostrychia radicans*, Phaeosphaeriaceae, metabólitos secundários, policetídeos aromáticos

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain bioactive compounds produced by the endophytic fungus C80, belonging to the family Phaeosphaeriaceae, isolated from the marine algae *Bostrychia radicans*. This endophyte was cultivated in rice solid medium (large scale) in static mode at room temperature for 28 days. After addition of ethyl acetate, broth and mycelia were separated by filtration and the solvent was removed under vacuum to furnish the crude extract. The ethyl acetate extract was fractionated by using different chromatographic techniques resulting in the isolation of six compounds: 7-hydroxy-3-(1-hydroxyethyl)-5-methoxy-3,4-dimethyl-isobenzofuran-1(3H)-one (**1**), 3,7-dyhydroxy-5-methoxy-3,4-dimethylisobenzofuran-1(3H)-one (**2**), 7-hydroxy-3-(1,2-dihydroxyethyl)-5-methoxy-3,4-dimethylisobenzo-furan-1(3H)-one (**3** e **4**), 4,8-dihydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methyleneiso-chroman-1-one(**5**) e 8-hydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methyleneisochroman-1-one (**6**), which were identified as aromatic polyketides by using spectroscopic and spectrometric analysis and submitted to cytotoxicity assay. In addition, C80 was cultivated in different culture media at different periods of time to evaluate its chemical diversity and metabolites production. The cultures were undertaken using PDB, Malt, Nutrient and Rice media with or without the addition of ammonium nitrate or sea water. These procedures didn't change the metabolic production and cytotoxicity. The role of time was undertaken only for rice media at 10, 20, 30 and 40 days of incubation. In this time the proportion of the metabolites has changed considerably, since the major compounds in the extract of 10 days, were practically absent in 40 days.

Keywords: endophytic fungus, *Bostrychia radicans*, Phaeosphaeriaceae, secondary metabolites, aromatic polyketides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Medicamentos inspirados em nucleosídeos 19

Figura 2 - Estrutura molecular generalizada das principais penicilinas 20

Figura 3 - Exemplos de substâncias halogenadas de algas vermelhas 24

Figura 4 - *Bostrychia radicans* (Montagne) 24

Figura 5 - Ilustração artística de uma relação endófito-hospedeiro 25

Figura 6 - Interações endófito-hospedeiro com ênfase no endófito 27

Figura 7 - Patentes utilizando metabólitos de fungos endofíticos 28

Figura 8 - Diversidade estrutural de substâncias de fungos endofíticos 30

Figura 9 - Metabólitos de fungos endofíticos isolados de algas 31

Figura 10 - Diversidade estrutural de policetídeos de origem fúngica 33

Figura 11 - Encostas da Praia Dura, e um espécime da alga coletada 42

Figura 12 - Endófito C80, vista superior e inferior da placa de Petri 43

Figura 13 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da substância **1** 46

Figura 14 - CCDC em sílica da substância **2** 47

Figura 15 - Cromatograma da substância **2** em gradiente exploratório 47

Figura 16 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração 17 48

Figura 17 - Cromatograma analítico da fração 17 com método otimizado 48

Figura 18 - Cromatograma da substância **3** em gradiente exploratório 49

Figura 19 - Cromatograma da substância **4** em gradiente exploratório 49

Figura 20 - Cromatograma em gradiente exploratório da subfração 4 50

Figura 21 - Cromatograma em gradiente exploratório da substância **6** 50

Figura 22 - Cromatograma do extrato MALT-MQ obtido por CLAE-DAD-EM 53

Figura 23 - Cromatograma do extrato MALT-NH4 obtido por CLAE-DAD-EM 53

Figura 24 - Cromatograma do extrato PDB-MQ obtido por CLAE-DAD-EM 54

Figura 25 - Cromatograma do extrato PDB-MAR obtido por CLAE-DAD-EM 54

Figura 26 - Cromatograma do extrato PDB-NH4 obtido por CLAE-DAD-EM 54

Figura 27 - Cromatograma do extrato NUT-MQ obtido por CLAE-DAD-EM 55

Figura 28 - Cromatograma do extrato NUT-NH4 obtido por CLAE-DAD-EM 55

Figura 29 - Cromatograma do extrato C80-MQ obtido por CLAE-DAD 56

Figura 30 - Cromatograma do extrato C80-MAR obtido por CLAE-DAD 56

Figura 31 - Cromatograma da amostra C80-10D 57

Figura 32 - Cromatograma da amostra C80-20D 57

Figura 33 - Cromatograma da amostra C80-30D 57

Figura 34 - Cromatograma da amostra C80-40D 57

Figura 35 - Policetídeos aromáticos isolados 58

Figura 36 - Estrutura proposta para a substância **1** 59

Figura 37 - Correlações observadas pelo mapa de contorno HMBC 59

Figura 38 - Estrutura proposta para a substância **2** 60

Figura 39 - Estrutura proposta para a substância **3** 62

Figura 40 - Correlações observadas pelo mapa de contorno HMBC 63

Figura 41 - Estrutura proposta para a substância **4** 64

Figura 42 - Estrutura proposta para a substância **5** 65

Figura 43 - Estrutura proposta para a substância **6** 67

Figura 44 - Substâncias identificadas no extrato bruto 68

Figura 45 - Acetilação da substância **1** com piridina como catalisador 69

Figura 46 - Oxidação de Jones para a substância **1** 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das substâncias ilustradas na figura 8	29
Tabela 2	Relação dos metabólitos ilustrados na figura 9	31
Tabela 3	Meios de cultura utilizados	38
Tabela 4	Meios de cultura comerciais e modificados	44
Tabela 5	Relação dos extratos produzidos para o estudo cinético	45
Tabela 6	Frações reunidas e suas respectivas massas	46
Tabela 7	Subfrações hexânicas e suas respectivas massas	49
Tabela 8	Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) e ^{13}C ($CDCl_3$, 125MHz) para a substância **1**	60
Tabela 9	Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) e ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) para a substância **2**	62
Tabela 10	Dados de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300MHz) e ^{13}C (CD_3OD, 100MHz) para a substância **3**	63
Tabela 11	Dados de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300MHz) e ^{13}C (CD_3OD, 100MHz) para a substância **4**	65
Tabela 12	Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 500MH) para a substância **5**	66
Tabela 13	Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) para a substância **6**	67
Tabela 14	Análise do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BDA	Batata dextrose ágar
CBD	Caldo de batata e dextrose
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
δ	Deslocamento químico
d	Dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
dd	Duplo dubleto
dq	Duplo quarteto
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
E.U.A.	Estados Unidos da América
HEX	Hexano
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
HMQC	*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Coherence*
IES	Ionização por eletrospray
J	Constante de acoplamento
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M+Na]^+$	Molécula sodiada
$[M-H]^-$	Molécula desprotonada

MeOH	Metanol
m/z	Relação massa/carga
q	Quarteto
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
s	Singleto
TIC	Cromatograma de íons totais
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO **16**

1.1 - O ambiente marinho e seu estudo químico **18**

1.2- Micro-organismos e seus metabólitos **20**

1.3 - Produtos Naturais e a quimioterapia **21**

1.4 - Algas Marinhas **22**

1.4.1 - *Bostrychia radicans* e as algas vermelhas 23

1.5 - Fungos endofíticos **25**

1.5.1 - Interação com o hospedeiro 26

1.5.2 - Fungos endofíticos como fonte de PNs 28

1.6 - Policetídeos **32**

2 - OBJETIVOS **35**

3 - MATERIAIS **37**

3.1 - Meios de cultura **38**

3.2 - Esterilização **38**

3.3 - Manipulação do micro-organismo **38**

3.4 - Solventes **38**

3.5 - Cromatografia em coluna **39**

3.6 - Cromatografia em camada delgada **39**

3.7 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com DAD **39**

3.8 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à EM **39**

3.9 - Espectrometria de Massas **40**

3.10 - Ressonância Magnética Nuclear **40**

3.11 - Ensaio citotóxico **40**

3.12 - Outros equipamentos **40**

4 - PARTE EXPERIMENTAL **41**
4.1 - Coleta e classificação do material algal **42**
4.2 - Isolamento dos fungos endofíticos **42**
4.3 - Variação do meio de cultura **43**
4.4 - Variação do tempo de cultura **45**
4.5 - Cultivo em escala ampliada e isolamento das substâncias **45**
4.6 - Procedimentos para o ensaio citotóxico **51**
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO **52**
5.1 - Variação do meio de cultura **53**
5.2 - Variação do tempo de cultura **56**
5.3 - Determinação estrutural e identificação das substâncias isoladas **58**
5.3.1 - Substância 1 59
5.3.2 - Substância 2 61
5.3.3 - Substância 3 62
5.3.4 - Substância 4 64
5.3.5 - Substância 5 65
5.3.6 - Substância 6 67
5.4 - Identificação das substâncias isoladas no extrato bruto **68**
5.5 - Modificações estruturais na substância 1 ..... **69**
5.5.1 - Acetilação 69
5.5.2 - Oxidação 70
5.6 - Ensaio citotóxico **71**
6 - CONCLUSÕES **73**
REFERÊNCIAS **75**
APÊNDICES **83**

1 - INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Produtos naturais costumam ser utilizados em várias áreas como: indústria de alimentos, cosméticos, pigmentos, inseticidas e junto com seus derivados, são muito influentes na medicina popular e tradicional (SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011). Apesar de que a definição de derivados de produtos naturais pode variar um pouco, é seguro dizer que 25-50% dos medicamentos comercializados têm origem natural (KINGSTON, 2011). Durante o último século, eles serviram como principal fonte de material de partida para as descobertas farmacêuticas, e continuam sendo uma fonte promissora de novos medicamentos (MISHRA; TIWARI, 2011; SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011).

Muitos dos produtos naturais utilizados na indústria farmacêutica são metabólitos secundários. Diferentemente dos metabólitos primários, estes compostos de baixa massa molecular (menores que 3000 Daltons) não estão diretamente relacionados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Acredita-se que os metabólitos secundários evoluíram por centenas de milhões de anos, atuando na comunicação química e na sobrevivência de seu produtor, defendendo-o de predadores, competidores, etc. (BRAKHAGE, 2013; MISHRA; TIWARI, 2011; NASTRUCCI; CESARIO; RUSSO, 2012).

A enorme variedade estrutural de substâncias naturais é um destaque, elas podem ser originárias de animais, plantas e micro-organismos, sendo que nos últimos, espécies semelhantes podem produzir perfis metabólicos diferentes (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; NASTRUCCI; CESARIO; RUSSO, 2012). Suas estruturas complexas são frequentemente inviáveis economicamente para a sua obtenção por via sintética, uma vez que a presença de centros estereogênicos e diferentes grupos funcionais, em uma mesma molécula, complicam sua obtenção em quantidade significativa (KUSARI; SPITELLER, 2011).

1.1 - O ambiente marinho e seu estudo químico

Sabe-se que os mares e oceanos possuem um grande intervalo de temperatura e pressão, diversas fontes de nutrientes, ambientes com ou sem luz e cobrem cerca de 70% da superfície terrestre. Essas diversas condições levaram à especiação de organismos consideravelmente diferenciados (HUSSAIN et al., 2012; SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011). As plantas terrestres foram muito utilizadas na medicina tradicional e popular, provavelmente, em função do seu fácil acesso (SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011). Considerando que os produtos naturais têm uma função específica na natureza e evoluíram de acordo com necessidades e desafios, a busca por novas estruturas químicas deve ser feita em novos ecossistemas (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; MISHRA; TIWARI, 2011; SCHULZ et al., 2002).

O ambiente marinho tem uma biodiversidade maior que a terrestre (SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011), contém aproximadamente 80% das variações de vida do nosso planeta (ABRAHAM et al., 2012) e deu origem à maior parte das atividades biológicas conhecidas (BHATNAGAR; KIM, 2010). Esse ambiente é uma reserva excepcional de produtos naturais, dos quais, muitos têm características estruturais únicas (ABRAHAM et al., 2012; BHATNAGAR; KIM, 2010; SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011).

Estas diversas substâncias têm diferentes tipos de atividades biológicas, e são acumuladas em organismos vivos, sendo mais abundante em micro-organismos, algas e invertebrados (ABRAHAM et al., 2012; SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011). Nos últimos trinta anos foram descobertos milhares de novos compostos bioativos (ABRAHAM et al.). Atualmente, mais de 20.000 substâncias de origem marinha foram isoladas e identificadas (ABRAHAM et al.), levando à publicação de revisões bibliográficas focadas em uma atividade biológica específica, como atividade antibiótica (BHATNAGAR; KIM, 2012), anti-inflamatória (D'ORAZIO et al., 2012) e antitumoral (NASTRUCCI; CESARIO; RUSSO, 2012).

No início, as pesquisas marinhas eram feitas com organismos mais vistosos e acessíveis, como algas e esponjas, que já eram conhecidas por suas características moleculares bem peculiares (CAPON, 2010; GERWICK; MOORE, 2012). Em 1951, Werner Bergmann, publicou três trabalhos contendo metabólitos incomuns isolados de uma esponja marinha, os quais levaram ao desenvolvimento de dois

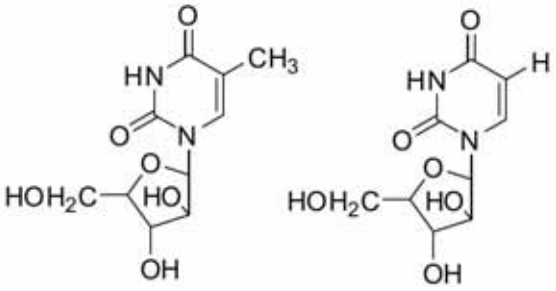
nucleosídeos (citarabina e vidarabina) (Figura 1, p. 19) com propriedade anticâncer e antiviral (MOLINSKI et al., 2009; OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

Com o desenvolvimento de equipamentos individuais de respiração subaquática (*Self-Contained Underwater Breathing Apparatus* – SCUBA) em meados do século passado, os pesquisadores puderam observar *in situ* a grande biodiversidade bentônica marinha (CAPON, 2010; GERWICK; MOORE, 2012). Perto dos anos 2000, produtos naturais marinhos já se tornaram uma subdivisão em produtos naturais, uma vez que o contínuo estudo de outros organismos mostrou seu enorme potencial (GERWICK; MOORE, 2012).

Ziconotídeo (ω-conotoxina MVIIA) é um peptídeo de 25 aminoácidos com atividade analgésica. Depois de mais de duas décadas de pesquisa e desenvolvimento, foi o primeiro medicamento derivado de um produto natural marinho, e foi aprovado pela *FDA* (agência que controla alimentos e remédios nos EUA) em 2004 (COSTA-LOTUFO et al., 2009; MOLINSKI et al., 2009). A trabectedina (ET-743), depois de quase quarenta anos de sua descoberta, foi o primeiro derivado marinho anticâncer comercializado (MOLINSKI et al., 2009).

Com o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis, espécies menores e esquecidas também ficaram atrativas, porém, a investigação biológica era atrasada pela dificuldade em se obter uma quantia suficiente dessas raras amostras a um preço aceitável e sem impacto ambiental. Todos esses fatores fizeram com que a atenção e pesquisa em micro-organismos marinhos crescessem muito na última década, acreditando-se que o cultivo e fermentação destes sejam a solução desses problemas (CAPON, 2010; GERWICK; MOORE, 2012).

Figura 1 - Medicamentos inspirados em nucleosídeos



Citarabina (Ara-C) Vidarabina (Ara-A)

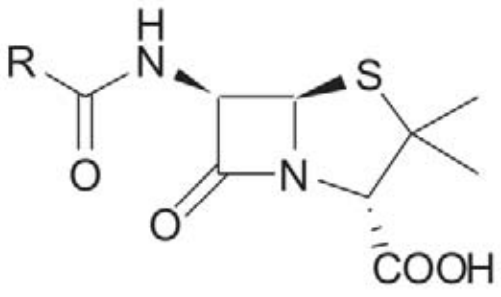
1.2- Micro-organismos e seus metabólitos

A química de fungos começou a despertar interesse desde as observações de Carl Wehmer em 1891, onde era formado ácido oxálico no cultivo de um fungo em solução de açúcar. O estudo focando nos metabólitos secundários vem de 1922, realizado por um grupo de pesquisa liderado por Harold Raistrick. Mas só com a descoberta da penicilina (Figura 2, p.20), em 1929 por Alexander Fleming, que os metabólitos de fungos ganharam um real destaque (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; RAISTRICK, 1950).

Após pouco mais de uma década da sua descoberta, a penicilina entra em uso clínico como o primeiro antibiótico de amplo espectro (COATES et al., 2002; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Essa descoberta fez com que, micro-organismos em geral, fossem reconhecidos como ferramentas notáveis para a produção de antibióticos e outros compostos farmacêuticos (BHATNAGAR; KIM, 2010; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Assim, novos produtos naturais entraram no mercado de antibióticos nas décadas de 40/50 e novas classes destes agentes apareceram até os anos 60, mudando drasticamente a taxa de mortalidade por diversas infecções (COATES et al., 2002; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005)

Embora micro-organismos do solo tenham sido intensamente estudados, seus semelhantes marinhos nem tanto (BHATNAGAR; KIM, 2010). Em função das características físicas e químicas do ambiente em que evoluíram, alguns fungos marinhos são capazes de produzir metabólitos secundários únicos, com novos esqueletos carbônicos (BHATNAGAR; KIM, 2012; HUSSAIN et al., 2012).

Figura 2 - Estrutura molecular generalizada das principais penicilinas



Um fungo é chamado de marinho mais por uma classificação ecológica que fisiológica ou taxonômica. Uma definição bem aceita diz que, um fungo marinho pode ser dividido em dois grupos: obrigatório ou facultativo. Os obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam somente no ambiente marinho, e os facultativos não vêm deste ambiente, mas são capazes de crescer e até esporular no mesmo (RATEB; EBEL, 2011)

Micro-organismos simbiontes em geral já se mostraram promissores como fonte de novas substâncias bioativas e, sabendo que o ambiente marinho possui a maior diversidade microbiológica da Terra, pode-se esperar muito destes micróbios ainda inexplorados (BHATNAGAR; KIM, 2010; BHATNAGAR; KIM, 2012).

1.3 - Produtos Naturais e a quimioterapia

O câncer é um importante problema de saúde pública, o qual se caracteriza pelo crescimento desordenado e descontrolado de algumas células. Estima-se que cerca de seis milhões de novos casos são reportados por ano, e representam aproximadamente 13% de todas as causas de morte, sendo a doença que mais mata no mundo (BRANDÃO et al., 2010; CHANDRA, 2012).

O marco inicial da quimioterapia no tratamento de câncer, início da década de 40, foi o uso de agentes sintéticos nitrogenados similares ao gás mostarda. No fim da mesma década, análogos sintéticos de ácido fólico conseguiram suprimir a proliferação de células malignas. Um antifolato (metotrexato), após oito anos de sua descoberta, foi o primeiro medicamento a curar um tumor sólido em humanos (CHABNER; ROBERTS JR, 2005).

Catharanthus roseus (Vinca) é uma planta conhecida por ser usada no tratamento de diabetes pela população de Madagascar, e também por ser cultivada como planta ornamental. Seus alcaloides foram descritos inicialmente pela atividade antidiabética, mas dois deles (vincristina e vimblastina) ficaram posteriormente famosos por sua potente atividade anticâncer (BRANDÃO et al., 2010; CHABNER; ROBERTS JR, 2005; MUJIB et al., 2012). Em 1965, a vincristina, metotrexato e outras substâncias, foram utilizadas simultaneamente no tratamento de tumores. Esse regime demonstrou que a combinação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação é mais eficaz no tratamento do câncer, pois evita o

desenvolvimento de células tumorais fármaco-resistentes, dando início a quimioterapia moderna (CHABNER; ROBERTS JR, 2005;).

Células tumorais fármaco-resistentes formam um dos maiores problemas na quimioterapia. Em muitos casos o tratamento tem boa resposta no início, mas o tumor ganha resistência como tempo. Outro grande problema na área é a alta toxicidade dos medicamentos e os consequentes efeitos colaterais, que dificultam ou até impossibilitam o tratamento de alguns pacientes. Esses fatores ressaltam que a busca por novos compostos, com menos efeitos colaterais e mais eficientes, é fundamental para o avanço da quimioterapia (ABRAHAM et al., 2012; DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

O mercado de substâncias antitumorais é bilionário. Em 2007, movimentou 60 bilhões de dólares americanos, sendo que os produtos naturais são a principal classe desses agentes. Dos medicamentos aprovados desde os anos 40 e comercializados até hoje, mais de 60% estão relacionados a um produto natural. Estas substâncias pertencem a diversas classes estruturais, e a maioria utilizada na quimioterapia vem de antibióticos produzidos por micro-organismos ou seus derivados (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

1.4 - Algas Marinhas

As algas são conhecidas como uma das primeiras formas de vida, e formam a base da cadeia alimentar aquática, estando presente em todos os ecossistemas existentes (CARDOZO et al., 2007; WEI; QUARTERMAN; JIN, 2013). De forma geral, elas podem ser divididas em duas categorias de acordo com sua morfologia e tamanho, microalga e macroalga. Microalgas são organismos unicelulares, os quais podem se organizar em forma de colônias. Macroalgas são plantas primitivas (talófitas), onde raízes, caule e folhas estão ausentes (BRENNAN, OWENDE, 2010; JOHN et al., 2011; SANT'ANA et al., 2007).

Algumas algas são heterotróficas e não têm cloroplastos, assim, são incapazes de fixar carbono inorgânico, então utilizam nutrientes como fonte de energia. Mas comumente as algas são autotróficas, as quais fixam carbono inorgânico utilizando luz como fonte de energia, e têm a *clorofila a* como principal pigmento fotossintetizante. Outras ainda podem ser mixotróficas, contendo

características dos dois grupos previamente citados (BRENNAN, OWENDE, 2010; JOHN et al., 2011; YOSHIDA et al., 2012).

De modo geral, as macroalgas são consumidas como produtos alimentícios humanos em muitos países, pois costumam ser ricas em fibras, minerais, vitaminas e antioxidantes (CARDOZO et al., 2007). Este mercado corresponde a mais de 80% do capital global das indústrias da área que, em virtude do alto consumo, passaram da colheita *in natura* para o cultivo controlado em larga escala (CARDOZO et al., 2007; WEI; QUARTERMAN; JIN, 2013).

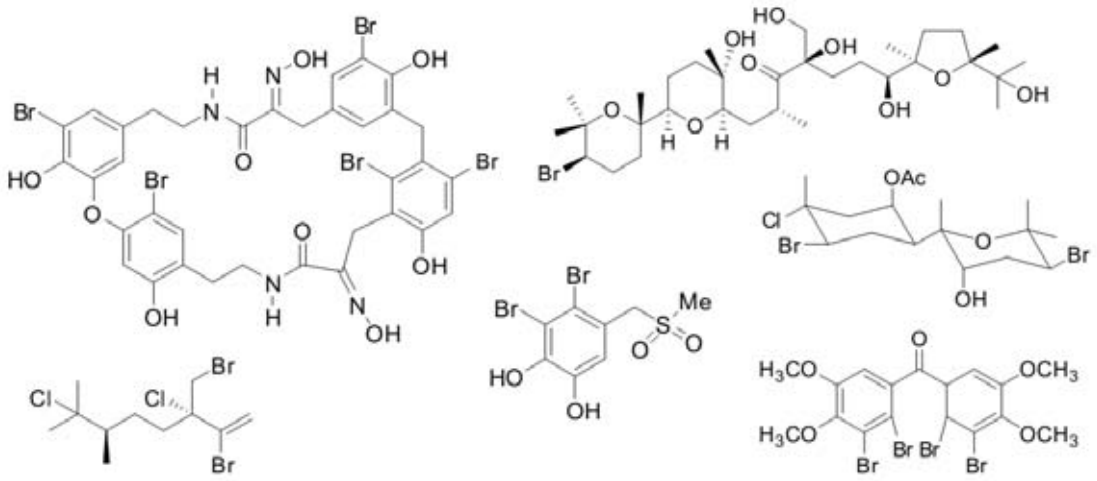
A produção em larga escala deve ser muito bem monitorada. Durante o cultivo podem ser produzidas toxinas, entre outros subprodutos, que representam perigo ao homem de várias maneiras: acumulando-se via cadeia alimentar, contaminando água potável, outras aquiculturas, alterando habitats naturais e ecossistemas, etc. (CARDOZO et al., 2007; WEI; QUARTERMAN; JIN, 2013).

Na área médica, as algas marinhas foram muito utilizadas no Egito antigo. Existem registros delas sendo utilizadas na medicina popular e tradicional chinesa há mais de dois mil anos. Porém, na medicina ocidental, o primeiro registro de algas no tratamento de um câncer vem dos anos 60 (FOLMER et al., 2010).

1.4.1 - *Bostrychia radicans* e as algas vermelhas

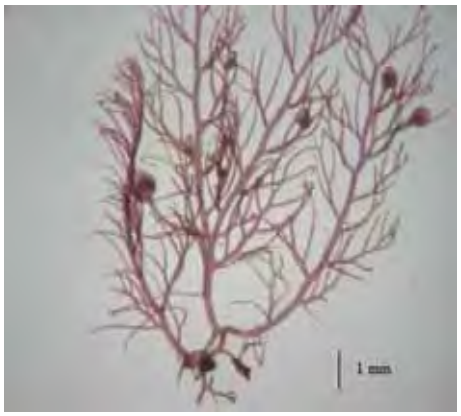
Como consequência do seu ambiente altamente competitivo, as algas desenvolveram mecanismos químicos de sobrevivência, os quais lhes proporcionaram uma diversidade estrutural de metabólitos significativa, vinda de diferentes rotas metabólicas (CARDOZO et al., 2007). Alguns grupos de algas marinhas chamam atenção dos fitoquímicos em função do seu histórico de toxicidade. Dentre eles, pode-se destacar o filo Rhodophyta (algas vermelhas), que é conhecido pela produção de substâncias halogenadas (Figura 3, p.24) de biossíntese intrigante, entre outros metabólitos bioativos (CARDOZO et al., 2007; TEIXEIRA; KELECOM; GOTTLIEB, 1991). Diferenças entre este filo e outras algas eucarióticas, indicam que as algas vermelhas podem produzir metabólitos secundários mais diversificados, em função de um possível maior estágio evolutivo (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

Figura 3 - Exemplos de substâncias halogenadas produzidas por algas vermelhas



As Rhodophytas são majoritariamente marinhas, produzem compostos de diversas classes estruturais com diferentes tipos de atividade biológica (antibiótica, antiviral, antifúngica, citotóxica, etc.) (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012). O gênero *Bostrychia* está espalhado em muitos ambientes tropicais e temperados quentes, sendo comumente encontrado em ambientes de estuário e mangues (OLIVEIRA et al., 2009; ZUCCARELLO; WEST, 2003). *Bostrychia radicans* Montagne (Figura 4, p.24) é uma das espécies mais difundidas, e tolera habitats com diversos graus de salinidade, de 5 a 35% (OLIVEIRA et al., 2012; ZUCCARELLO; WEST, 2003).

Figura 4 - *Bostrychia radicans* (Montagne)



Fonte: Imagem cedida pela Drª Nair Sumie Yokoya, IBt - São Paulo.

1.5 - Fungos endofíticos

Embora muitas pessoas pensem nas plantas como organismos, sabe-se que elas são na verdade uma comunidade complexa. As plantas são interna e externamente colonizadas por diversos micro-organismos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Essas interações micro-organismo/hospedeiro são diversas e dinâmicas, podendo variar entre patogênica, parasítica e mutualista de acordo com o estágio no ciclo de vida e/ou com mudanças ambientais (NEWTON et al., 2010).

A simbiose é uma associação muito próxima entre dois organismos e pode ser classificada como mutualista, comensalista ou parasítica. Uma interação mutualista traz benefícios a ambos os organismos, comensalista beneficia apenas um deles, enquanto no parasitismo o hospedeiro é prejudicado (NEWTON et al., 2010).

Micro-organismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, são aqueles que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes ao hospedeiro (AZEVEDO et al., 2000; SCHULZ; BOYLE, 2005). O termo “endófito” significa literalmente “dentro da planta”, sendo uma definição caracterizada pelo local de colonização e não pela natureza da relação com o hospedeiro (Figura 5, p.25) (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; PORRAS-ALFARO; BAYMAN 2011; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Figura 5 - Ilustração artística de uma relação endófito-hospedeiro



Fonte: Adaptado de Kusari; Spiteller (2011).

Os fungos endofíticos foram encontrados em praticamente todas as plantas do mundo em que foram procurados, sendo que a diversidade destes micro-organismos cresce no sentido dos polos ao equador (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011; JUNKER; DRAEGER; SCHULZ, 2012). A microbiota endofítica de uma planta pode ser muito específica, variando entre espécies, condições ambientais do habitat do hospedeiro, e até entre órgãos e tecidos do vegetal, como resultado da adaptação a diferentes características fisiológicas do hospedeiro (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011). Apesar dos primeiros micro-organismos desse grupo terem sido relatados em 1904, só nas últimas décadas foi que receberam atenção pela sua significância farmacêutica e ecológica (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011; GUTIERREZ; GONZALEZ; RAMIREZ, 2012).

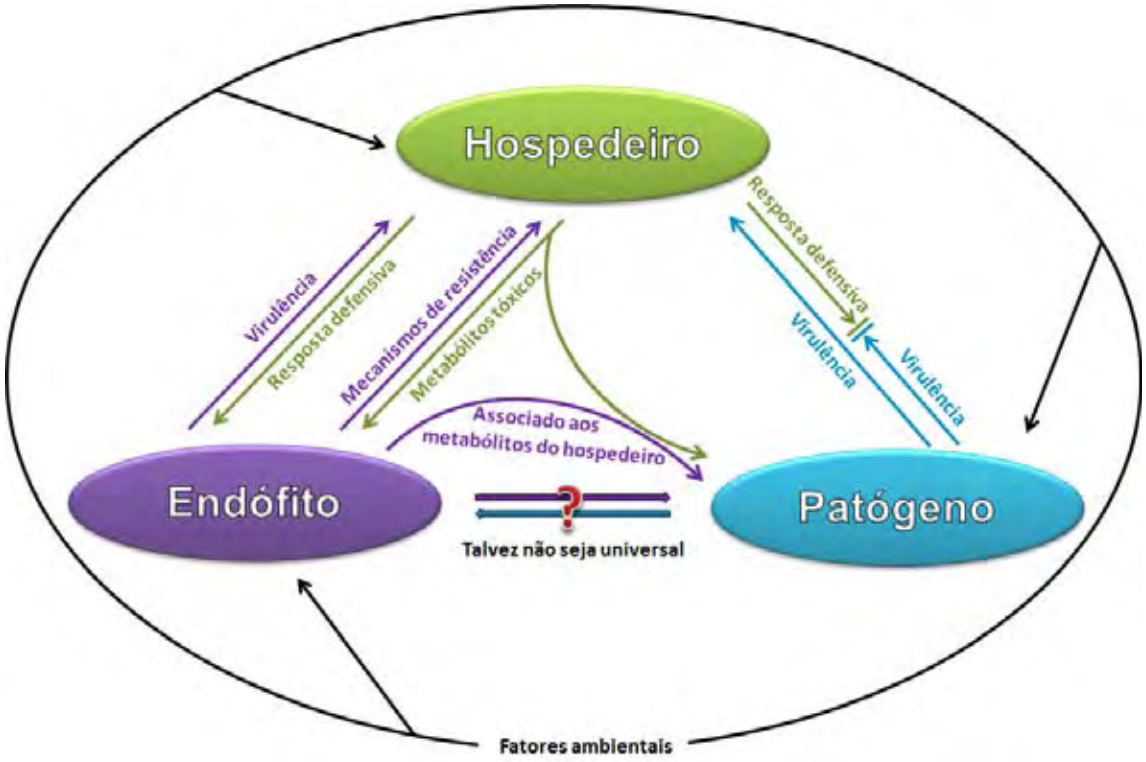
1.5.1 - Interação com o hospedeiro

As interações endófito-hospedeiro ainda são pouco compreendidas, mas como toda relação fungo-planta, sabe-se que é necessária a superação de diversas barreiras físicas e químicas para que esta seja bem sucedida (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Fungos endofíticos possuem uma relação muito próxima com o hospedeiro, na qual nenhum dos lados é visivelmente prejudicado (CHANDRA, 2012, KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Estes micro-organismos produzem as enzimas necessárias para penetrar e colonizar o vegetal em espaços intra e/ou inter-celulares, de maneira localizada ou sistêmica (RODRIGUEZ et al., 2009; SCHULZ et al., 2002; TENGURIA; KHAN; QUERESHI, 2011)

A complexa relação endófito-hospedeiro parece ser resultado de um equilíbrio simbiótico entre a virulência do micro-organismo e a resposta defensiva do hospedeiro (SCHULZ et al., 2002), e entre os metabólitos tóxicos do hospedeiro e os mecanismos de resistência do micro-organismo (Figura 6, p.27) (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Esses equilíbrios são dinâmicos, continuamente variando entre mutualismo, comensalismo e parasitismo. Durante a senescência do hospedeiro, ou caso esses equilíbrios sejam perturbados por fatores bióticos ou abióticos, essa relação ainda pode se tornar patógena (BORGES et al., 2009; CHANDRA, 2012; SCHULZ et al., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Figura 6 - Interações endófito-hospedeiro com ênfase no endófito



Fonte: Adaptado de Kusari; Hertkweck; Spiteller (2012).

Seja pela adaptação consequente de um longo período de coevolução endófito-hospedeiro, ou pela pré-adaptação dos endófitos ao hospedeiro, as interações são muito específicas e rigorosamente selecionadas pelo tempo de coexistência (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Alguns fungos são influenciados pelo genótipo do hospedeiro na determinação de uma relação mutualista ou parasítica (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011), enquanto outros exibem simbioses habitat-adaptadas, onde o mesmo endófito confere tolerância a estresse em duas plantas geneticamente distantes (RODRIGUEZ et al., 2008).

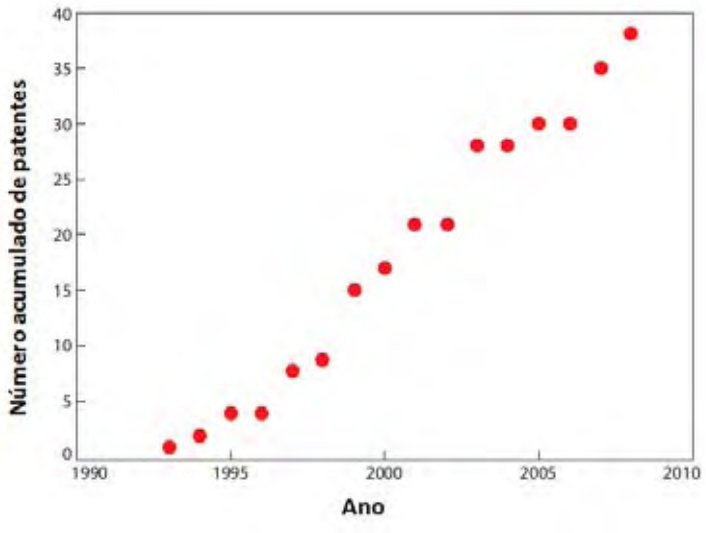
Os benefícios desta relação dependem de ambos os lados, micróbio e hospedeiro (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Micro-organismos endofíticos podem estimular o crescimento do vegetal aumentando a resistência a estresses abióticos, como períodos de estiagem, alta salinidade ou alta temperatura, sendo que, em alguns casos, essa relação é fundamental para a sobrevivência de ambos (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011; JUNKER; DRAEGER; SCHULZ, 2012; RODRIGUEZ et al., 2008; TENGURIA; KHAN; QUERESHI, 2011). Um aumento na

resistência do hospedeiro a estresses bióticos (herbívoros e patógenos) também pode ser observado, o qual costuma ser atribuído à produção de metabólitos bioativos pela microbiota (ALY; DEBBABB; PROKSCH, 2011; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; WANG; DAI, 2011). Como benefício, os endófitos têm a oferta de nutrientes. Os fungos deste grupo possuem um acervo enzimático que os permite transformar e degradar compostos complexos, assim, eles podem utilizar diferentes substâncias orgânicas como fonte de carbono e energia (WANG; DAI, 2011).

1.5.2 - Fungos endofíticos como fonte de PNs

Com a descoberta de um novo nicho da biodiversidade, novos produtos naturais aparecem. Nesse contexto, os endófitos chamaram atenção tanto na área acadêmica como na industrial (RADIĆ; ŠTRUKELJ, 2012). Estes micróbios vêm sendo estudados como fabricantes de novos compostos por mais de vinte anos, centenas de substâncias naturais já foram caracterizadas, muitas delas com novas estruturas e/ou atividades biológicas interessantes, fazendo com que as patentes na área cresçam muito (Figura 7, p. 28) (GUTIERREZ; GONZALEZ; RAMIREZ, 2012; PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011; RADIĆ; ŠTRUKELJ, 2012).

Figura 7 - Número de patentes norte-americanas utilizando metabólitos secundários de fungos endofíticos



Fonte: Porras-Alfaro; Bayman (2011).

Os metabólitos isolados de fungos endofíticos apresentam uma grande diversidade estrutural, sendo relatados policetídeos, terpenóides, esteróides, flavonóides, citocalasinas, alcalóides, peptídeos, etc. (BORGES et al., 2009; PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Geralmente as substâncias novas são descritas com atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica (BORGES et al., 2009; WANG; DAI, 2011). A tabela 1 (p. 29) demonstra a diversidade química de substâncias originalmente produzidas por fungos endofíticos. A tabela 2 (p. 31) relaciona alguns metabólitos provenientes de fungos endofíticos isolados de algas.

Tabela 1 – Relação das substâncias ilustradas na figura 8 (p.30)

	Fungo	Produto Natural/Atividade	Referência
1	*Phomopsis cassiae*	Phomopsilactona Antifúngica	Silva et al. 2005
2	*Aspergillus niger**	Asperamide A Antifúngica	Zhang et al. 2007a
3	*Pullularia* sp.	Pullularin A Antimalária e antiviral	Isaka et al. 2007
4	*Xylaria* sp.	Xyloallenolide A -	Lin et al. 2001
5	*Phoma* sp.	7'-acetyl-*seco*-dihydropyrenophorin Antibacteriana, antifúngica e algicida	Zhang et al. 2008
6	*Phomopsis* sp.	8-O-acetylmultiplolide A Inibidora de AChE	Tan et al. 2007
7	*Pestalotiopsis adusta*	Pestalachlorides B Antifúngica	Li et al. 2008
8	*Acremonium* sp.*	Acremonin A Antioxidante	Abdel-Lateff et al. 2002
9	*Xylaria* sp.	Xylarenones A Citotóxica, antibacteriana e antitumoral	Hu et al. 2008
10	*Pestalotiopsis fici*	Chloropupukeananin Antiviral e antibacteriana	Liu et al. 2008
11	*Epichloe typhina*	Epichlicin Antifungica	Seto et al. 2007

* Fungos endofíticos isolados de alga.

Figura 8 – Diversidade estrutural das substâncias isoladas de fungos endofíticos

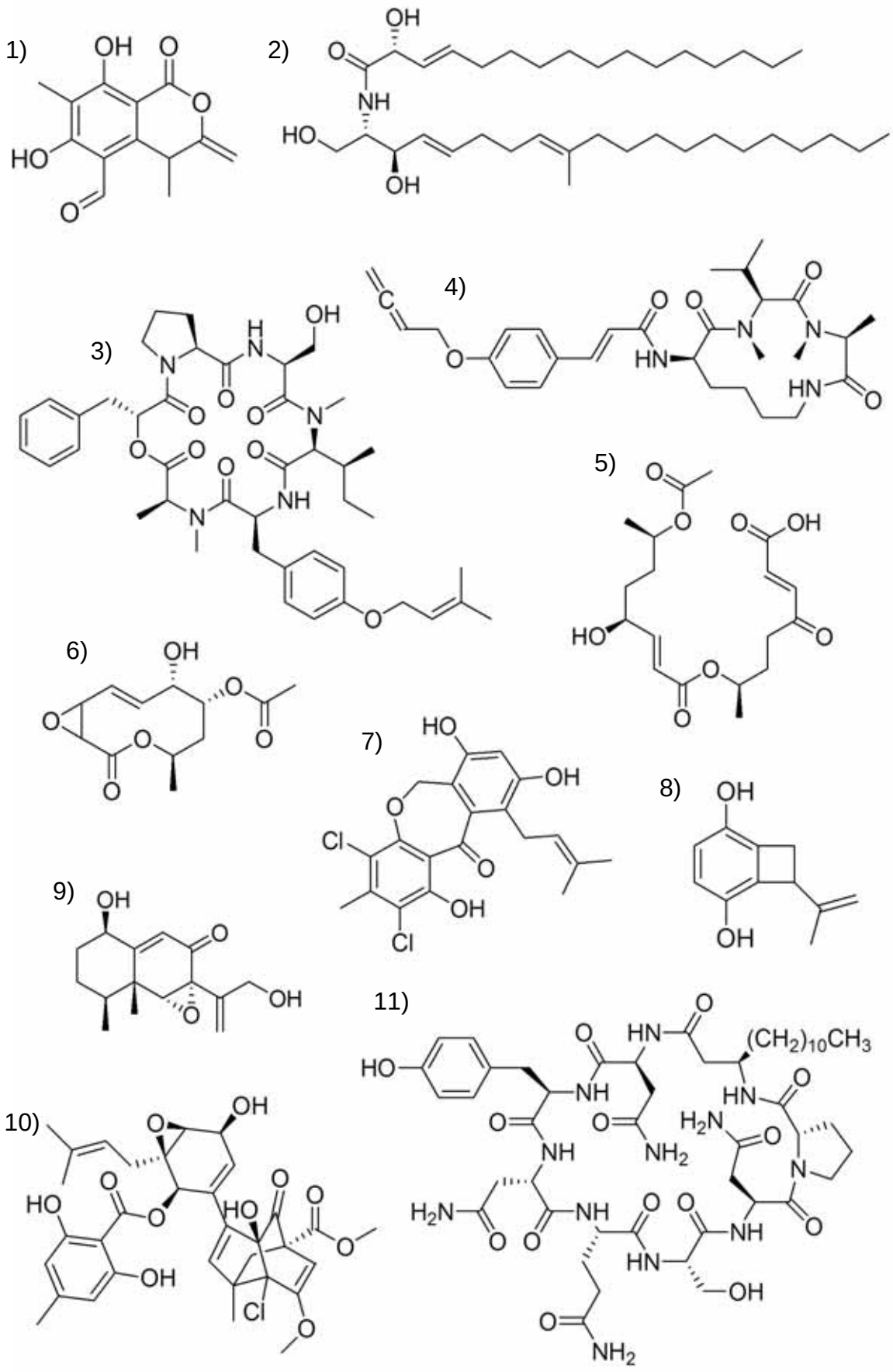
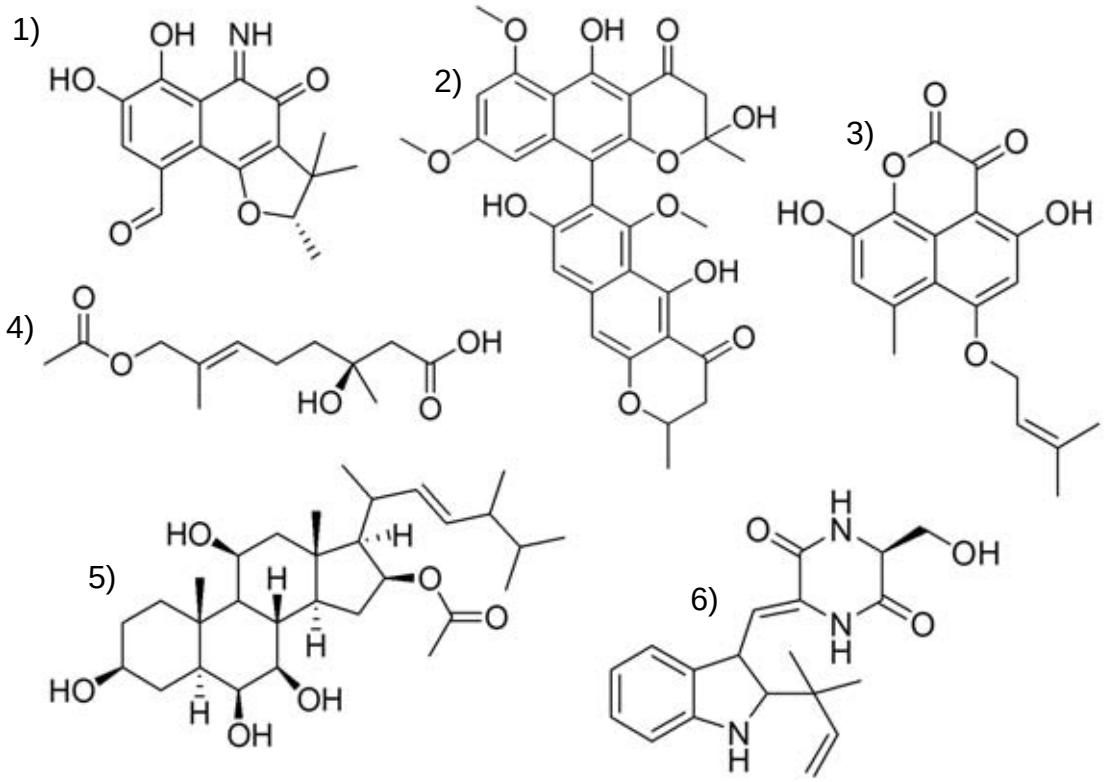


Tabela 2 – Relação dos metabólitos ilustrados na figura 9 (p. 31)

	Alga Hospedeira	Produto Natural/Atividade	Referência
1	*Enteromorpha* sp. (Alga Verde)	Cereoaldomine Inibidora de ELH**	Elsebai et al. 2011b
2	*Colpomenia sinuosa* (Alga Parda)	Nigerasperone C Antioxidante	Zhang; Li; Wang 2007
3	*Enteromorpha* sp. (Alga Verde)	Coniosclerodérolide Antibacteriana e Inibidora de ELH**	Elsebai et al. 2011a
4	*Laurencia** (Alga Vermelha)	Penicimonoterpene Antifúngica	Gao et al. 2011a
5	*Laurencia** (Alga Vermelha)	Penicisteroids A Antifúngica e citotóxica	Gao et al. 2011b
6	*Sargassum thunbergii* (Alga Parda)	Cristatumins A Antibacteriana	Du et al. 2012

*Espécies não identificadas; ** elastase de leucócito humano.

Figura 9 - Metabólitos de fungos endofíticos isolados de algas



Aproximadamente 22.000 compostos bioativos derivados de micro-organismos são conhecidos, dos quais, 38% vêm de fungos em geral, sendo que apenas cerca de 5% das espécies fúngicas foram descritas. (SCHULZ et al., 2008). Os resultados de um estudo realizado por Schulz et al. (2002) envolvendo cerca de 6.500 fungos endofíticos e aproximadamente 2.800 fungos de solo, indicam que os endófitos produzem mais substâncias com atividade biológica e de estruturas novas, quando comparados aos isolados do solo.

Além de produtores de substâncias naturais, os fungos endofíticos vêm sendo estudados como biocatalisadores na transformação química de produtos naturais e medicamentos (BORGES et al., 2009; PIMENTEL et al., 2011). Biotransformação pode ser definida como uma alteração química feita por um sistema biológico, em um composto diferente do substrato natural (PIMENTEL et al., 2011; WANG; DAI, 2011).

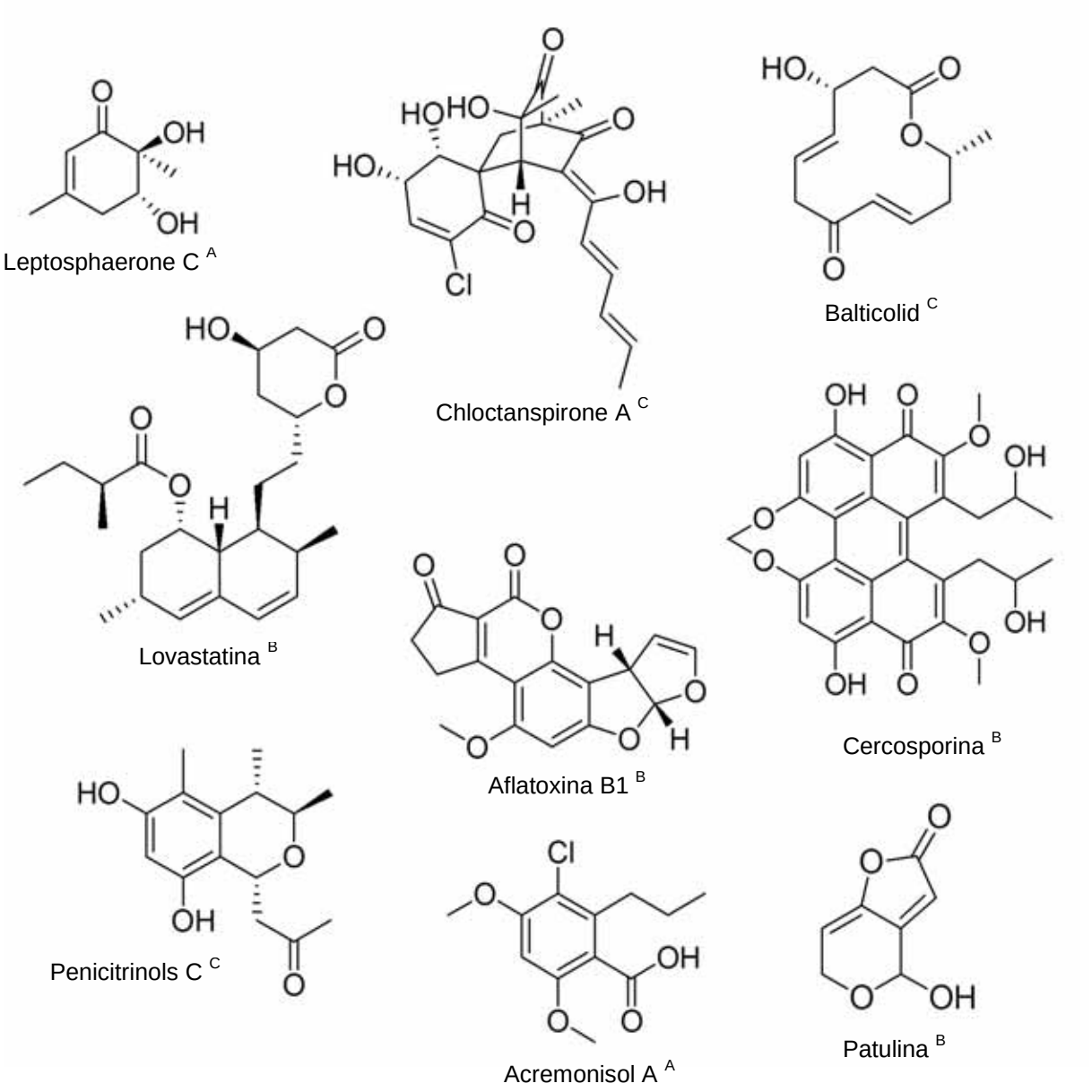
Os fungos endofíticos são capazes de conduzir reações quimio, regio e estereosseletivas. Em função dessa capacidade, são vistos como uma boa estratégia na produção de medicamentos e/ou intermediários, assim como, no desenvolvimento de novos compostos que não podem ser quimicamente sintetizados (BORGES et al., 2009; WANG; DAI, 2011). A utilização destes micro-organismos tem como principais vantagens, em relação à síntese tradicional, a redução de produtos indesejáveis e da demanda energética, eliminando etapas de purificação, diminuindo o custo da produção e tornando-a mais ambientalmente amigável (PIMENTEL et al., 2011).

1.6 - Policetídeos

Policetídeos compõem uma classe de metabólitos secundários muito importante e diversificada, podendo ser produzida por bactérias, fungos e plantas. Os de origem fúngica apresentam uma das maiores diversidades estruturais dentre os produtos naturais (Figura 10, p. 33) e, geralmente, possuem atividade em sistemas biológicos (PASTRE et al., 2007; SCHNEIDER, 2005).

Mais de vinte medicamentos comercializados vieram dos policetídeos. Muitos deles são sucessos de venda, por exemplo, a lovastatina (Figura 10, p. 33), um dos mais bem sucedidos agentes redutores de colesterol no mercado (CRAWFORD; TOWNSEND, 2010; LI; VEDERAS, 2009; QUADE et al., 2011).

Figura 10 - Diversidade estrutural de policetídeos de origem fúngica



Fonte: A - Borges et al. (2009); B - Crawford; Townsend (2010); C - Hill (2012).

Muitos dos antibióticos populares e agentes anticâncer vendidos são provenientes dos aromáticos desta classe, nos quais o anel benzênico ou fenólico lhes permite ultrapassar membranas celulares para exercerem sua função (SCHNEIDER, 2005; YU; JEZ, 2008).

Dada a grande importância dos policetídeos na área médica, a biossíntese destes compostos tem sido muito estudada, sendo que na última década, o conhecimento na produção dos aromáticos por fungos avançou muito (CRAWFORD; TOWNSEND, 2010; SCHNEIDER, 2005).

As enzimas, formadas por grandes maquinários multimodulares, responsáveis pela biossíntese dos policetídeos são denominadas “policetídeo sintases”, ou PKS. (PASTRE et al., 2007; QUADE et al., 2011). Parte da diversidade estrutural dos policetídeos é gerada em função da multimodularidade das linhas de montagem, cujas funções envolvem a escolha do precursor, escolha da unidade extensora, e determinação do estado de oxidação em cada região do composto (QUADE et al., 2011). De acordo com a atuação dos módulos, os produtos podem variar de compostos altamente oxidados à ácidos graxos (PASTRE et al., 2007). Além da diversidade gerada por reações de metilação em grupos hidroxila ou átomos de carbono, e reações feitas após a geração do produto, como hidroxilação e glicosilação (QUADE et al., 2011).

Atualmente, as PKS são divididas em três classes gerais: tipo I, tipo II e tipo III. Nos fungos geralmente são encontradas PKS do tipo I, que são posteriormente subdivididas em outros três grupos, de acordo com o nível do processo redutivo desenvolvido. As PKS tipo I não redutoras geram compostos aromáticos poli-hidroxilados, as parcialmente redutoras dão origem a substâncias alifáticas pouco oxigenadas ou policetídeos pouco reduzidos, e por fim, as altamente redutoras são responsáveis pela síntese de compostos alifáticos altamente reduzidos (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; PASTRE et al., 2007; CRAWFORD; TOWNSEND, 2010).

2 - OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Realizar o estudo químico dos metabólitos produzidos pelo endófito C80 e avaliar o potencial citotóxico dos extratos, frações e/ou substâncias puras.

Objetivos Específicos::

Verificar a influência da composição do meio de cultura no perfil cromatográfico e na atividade citotóxica do extrato bruto do fungo, alterando a composição dos meios de cultura comerciais.

Cultivar o fungo endofítico C80 em escala ampliada, visando a obtenção de uma massa de extrato bruto grande o suficiente para o estudo das substâncias produzidas.

Realizar o fracionamento deste extrato bruto através de técnicas cromatográficas até o isolamento dos metabólitos secundários.

Elucidar ou determinar a estrutura dos compostos isolados, utilizando técnicas de EM, RMN de ^{1}H e ^{13}C uni- e bidimensionais, e encaminhá-las para o ensaio de citotoxicidade.

3 - MATERIAIS

MATERIAIS

3.1 - Meios de cultura

Todos os cultivos do endófito C80 foram feitos em modo estático e temperatura ambiente. Foram utilizados três meios líquidos comerciais e um meio sólido de arroz.

Tabela 3 – Meios de cultura utilizados

Meio	Tipo	Composição	[ ]	Fabricante
BDA	Sólido	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), ágar (15g)	39g.L^{-1}	Acumedia®
Arroz	Sólido	Arroz parboilizado	1,2Kg.L^{-1}	Brejeiro®
CBD	Líquido	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	24g.L^{-1}	Acumedia®
Malte	Líquido	Extrato de malte (20g)	20g.L^{-1}	Acumedia®
Nutriente	Líquido	Extrato de carne (3g), digestão enzimática de gelatina (5g)	8g.L^{-1}	Acumedia®

3.2 – Esterilização

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave do fabricante Quimis, sendo mantidos à temperatura de 121ºC por, no mínimo, 20 minutos.

3.3 - Manipulação do micro-organismo

Todo o procedimento de manipulação dos micro-organismos foram realizados em Capela de Fluxo Laminar Pachame PA 310-Série 172-99.

3.4 – Solventes

Os solventes utilizados para a obtenção dos extratos bruto, extrações líquido-líquido, fracionamentos em coluna aberta, análises cromatográficas em placas

comparativas e preparativas, foram hexano, acetato de etila, metanol P.A.. e acetonitrila grau HPLC da marca J. T. Baker.

Para as análises por CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM e EM foi utilizado metanol grau HPLC das marcas, Merck, J. T. Baker e Panreac.

Nas análises por RMN foram utilizados clorofórmio e metanol *-d4* deuterados CIL (Cambridge Isotope Labratories).

3.5 - Cromatografia em coluna

Nos fracionamentos em coluna aberta foi utilizada sílica Acros organics (0,060-0,200mm diâmetro do poro *ca*. 6nm) para o fracionamento do extrato em AcOEt e sílica Sigma-Aldrich® (0,040-0,063mm, diâmetro do poro *ca*. 6nm) para o fracionamento da fração em HEX.

3.6 - Cromatografia em camada delgada

As análises por CCDC foram realizadas em placas comerciais prontas da Merck (Sílica G TLC Plates W/UV 254). As placas utilizadas em escala preparativa foram feitas com sílica gel 60 G F254 (Merck) suspensas em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre uma placa de vidro de 20 x 20 cm utilizando um espalhador Quickfitt®.

3.7 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com DAD

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em um Shimadzu® Prominence com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A. Nas análises em escala analítica foram utilizados diferentes gradientes de MeOH/H_2O, todos com fluxo de 1mL/min e uma coluna Phenomenex® Luna com sílica tipo octadesil silano (250 x 4,60 mm; 5 µm). Em escala preparativa foi utilizada uma coluna Phenomenex® Luna com sílica tipo octadesil silano (150 x 21,20 mm; 5 µm).

3.8 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à EM

Cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu® equipado com duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A. Espectrômetro Bruker Daltonics® modelo ultrOTOF$_Q$ de alta resolução com ionização

por eletrospray operando no modo positivo. E uma coluna Phenomenex® Luna com sílica tipo octadesil silano (250 x 4,60 mm; 5 µm), gradiente de 5-100% de MeOH em 40 minutos, fluxo de 1mL/min.

3.9 - Espectrometria de Massas

Nas análises por infusão direta foi utilizado um espectrômetro Bruker Daltonics® modelo ultrOTOF$_Q$ de alta resolução com ionização por eletrospray, operando no modo positivo e negativo.

3.10 - Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, uni e bidimensionais, foram obtidos em um espectrômetro Varian INOVA-500 operando a 500MHz para o núcleo de ^{1}H e 125MHz para o núcleo de ^{13}C, um Varian INOVA-300 operando a 300MHz para o núcleo de ^{1}H e 75MHz para o núcleo de ^{13}C, e um Bruker DRX-400 operando a 400MHz para o núcleo de ^{1}H e 100MHz para o núcleo de ^{13}C.

3.11 - Ensaio citotóxico

As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2.

3.12 - Outros equipamentos

Para a remoção dos solventes sob pressão reduzida foram utilizados evaporadores rotativos da marca BUCHI, com banho entre 35-40ºC.

Para a pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo AG 245, para o preparo dos meios foi utilizada uma balança semianalítica da marca Gehaka.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Coleta e classificação do material algal

A Alga vermelha da espécie *Bostrychia radicans* foi coletada, pela Profª Drª Hosana Maria Debonsi, nas encostas rochosas da Praia Dura, Ubatuba - SP, Brasil (Figura 11, p. 42).

Figura 11 - A) Encostas rochosas da Praia Dura, Ubatuba – SP, e B) um espécime da alga *Bostrychia radicans* coletada



Fonte: Imagens cedidas pela Profª Drª Hosana Maria Debonsi, USP/RP.

O material algal foi lavado em água do mar para remoção de contaminantes (areia, crustáceos) e estocado em frascos de vidro com água do mar filtrada, suplementada com 200 mg/L de cloranfenicol e esterilizada por autoclavagem (2 frascos por espécie). Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados. As algas foram identificadas pela Dra. Nair Sumiê Yokoya, bióloga pesquisadora do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt).

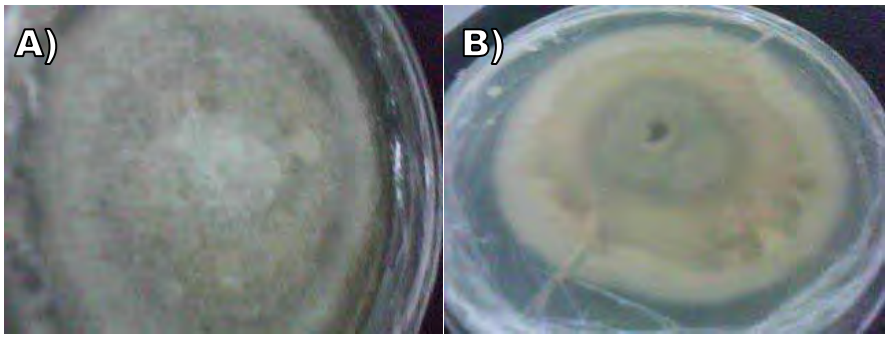
4.2 - Isolamento dos fungos endofíticos

O isolamento dos fungos, também feito pela Profª Drª Hosana Maria Debonsi, foi realizado usando um método indireto. O material algal foi desinfetado superficialmente em câmara asséptica por incubação em solução de hipoclorito de sódio por cinco segundos, incubação em etanol 70% por cinco segundos e três enxagues em água do mar esterilizada. Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água da última lavagem foi semeada pela técnica de

“spread plate” em uma placa de ágar. As algas esterilizadas foram fragmentadas com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis e transferidas para placas de Petri (13-15 fragmentos por placa) contendo o meio de cultura BDA.

As placas de Petri, contendo os inóculos, foram mantidas a 30^{o} por 40 dias, com observações diárias para verificar o crescimento de micro-organismos. Fragmentos com sinais de crescimento fúngico foram transferidos para novas placas com meio sólido BDA (uma para cada fragmento), para isolamento da linhagem. Após a confirmação do crescimento e isolamento das linhagens fúngicas na placa, procedeu-se à preservação das mesmas, constituindo uma micoteca disponível para estudos posteriores.

Figura 12 - Endófito C80, A) vista superior da placa de Petri e B) vista inferior



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 - Variação do meio de cultura

O estudo da influência do meio de cultura no perfil metabólico do fungo foi realizado em nove meios diferentes, sete meios líquidos e dois meios sólidos de arroz. Dentre os meios de cultura líquidos, foram utilizados três meios comerciais, os quais foram modificados com NH_4NO_3 (fonte de nitrogênio reduzido) ou água do mar (possível fonte de micronutrientes) (Tabela 4, p. 44).

Foram preparados dois frascos de Erlenmeyer (500mL) para cada meio líquido, de acordo com as concentrações indicadas pelos fabricantes, e em seguida foram autoclavados. Após três dias de repouso do meio (período de verificação da eficácia da esterilização), o endófito C80 foi inoculado e cultivado por 28 dias em

modo estático e temperatura ambiente. Cada frasco contendo meio líquido foi extraído com 300mL de AcOEt divididos em três extrações, gerando o extrato bruto.

Para o meio sólido, foram preparados frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo 90g de arroz parboilizado e 75mL de água (ultrapura ou água do mar, Tabela 4, p. 44). Com os meios de cultura preparados, os mesmos foram autoclavados três vezes com intervalo de 24h, repousados por três dias, e então o endófito foi inoculado e cultivado por 28 dias em modo estático e temperatura ambiente. Visando a obtenção do extrato bruto, foram feitas três extrações utilizando AcOEt seguidas pela remoção do solvente sob pressão reduzida. Estes extratos gerados foram então particionados por extração líquido/líquido utilizando ACN:HEX 4:1, gerando uma fração em ACN e outra fração em HEX.

Tabela 4 – Meios de cultura comerciais e modificados

Código	Composição	Massa de extrato por frasco
PDB-MQ	CBD comercial e água ultrapura	10mg
PDB-MAR	CBD comercial e água do mar*	11mg
PDB-NH_4	CBD comercial, água ultrapura e NH_4NO_3 (3g/L)	11mg
MALT-MQ	Meio comercial Malte e água ultrapura	12mg
MALT-NH_4	Meio comercial Malte, água ultrapura e NH_4NO_3 (3g/L)	11mg
NUT-MQ	Meio comercial Nutriente e água ultrapura	6mg
NUT-NH_4	Meio comercial Nutriente, água ultrapura e NH_4NO_3 (3g/L)	8mg
C80-MQ	Arroz parboilizado e água ultrapura	284mg**
C80-MAR	Arroz parboilizado e água do mar*	224mg**

*água coletada nas praias de Ubatuba-SP. **massa referente à fração ACN.

4.4 - Variação do tempo de cultura

Tendo como objetivo o estudo cinético do metabolismo do endófito, foram preparados e autoclavados mais quatro frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo 90g de arroz parboilizado e 75mL de água ultrapura. Após a inoculação do fungo, cada frasco foi extraído com 10, 20, 30 e 40 dias de cultivo em modo estático e temperatura ambiente. As extrações e partições foram feitas da mesma maneira anteriormente citada.

Tabela 5 – Relação dos extratos produzidos para o estudo cinético

Código	Tempo de cultivo	Massa por frasco*
C80-10D	10 dias	115mg
C80-20D	20 dias	263mg
C80-30D	30 dias	273mg
C80-40D	40 dias	201mg

* Referente à fração de ACN.

4.5 - Cultivo em escala ampliada e isolamento das substâncias

Visando o isolamento de metabólitos produzidos pelo fungo endofítico C80, foi realizado o crescimento do mesmo em escala ampliada. Para isso, foram utilizados 10 frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo meio de cultura sólido de arroz preparados da mesma maneira anterior. Após 28 dias de crescimento em modo estático e temperatura ambiente, foram feitas três extrações utilizando AcOEt com intervalo de 24h, resultando em 15g de extrato bruto. Este extrato bruto em AcOEt foi lavado com HEX em ultrassom para a retirada de compostos apolares, resultando em um extrato AcOEt (6,7g) mais uma fração HEX (7,8g).

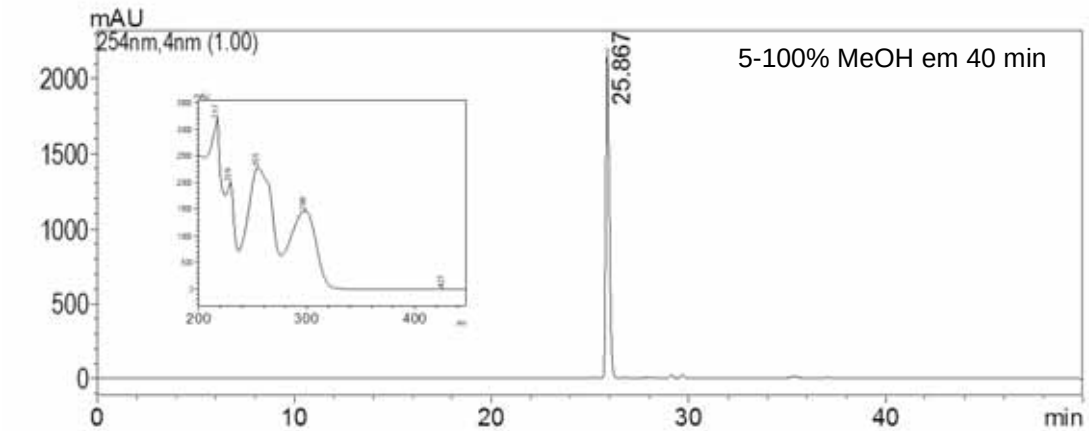
O fracionamento de 5g do extrato em AcOEt foi feito em uma coluna aberta (25cm de altura e 3,5cm de diâmetro) utilizando a sílica Acros organics e gradiente HEX:AcOEt 100:0 a 0:100, AcOEt:MeOH 100:0 a 50:50 seguido de 100% MeOH. Obteve-se 64 frações, que foram analisadas em placas cromatográficas de sílica e eluídas em diferentes fases móveis, para a comparação das frações. As frações que apresentaram o mesmo perfil foram reunidas, resultando em 30 frações (Tabela 6, p. 46).

Tabela 6 – Frações reunidas e suas respectivas massas.

Fração nº	Massa (mg)	Fração nº	Massa (mg)
2	262	**17**	330
3	38	**18**	73
4	98	**19**	16
5	43	**20**	122
6	33	**21**	110
7	59	**22**	49
8	31	**23**	65
9	130	**24**	55
10	41	**25**	92
11	410	**26**	366
12	441	**27**	130
13	146	**28**	20
14	27	**29**	28
15	26	**30**	176
16	32	**31**	62

Pôde-se observar que a fração 9 (130mg) era constituída por um composto majoritário, denominado de substância **1** (Figura 13, p. 46), a qual foi identificada com um policetídeo após análises por RMN de ^{1}H, ^{13}C, e EM.

Figura 13 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da substância 1



Análises por CCDC mostraram que a fração 12 apresentou boa separação em sílica (Figura 14, p. 47), assim, a mancha inferior foi purificada por CCDP. Foram aplicados 220mg da fração em oito placas, obtendo-se 27mg da substância **2** (Figura 15, p. 47).

Figura 14 - CCDC em sílica. Fase móvel AcOEt:MeOH 90:10 + 0,1% HAc

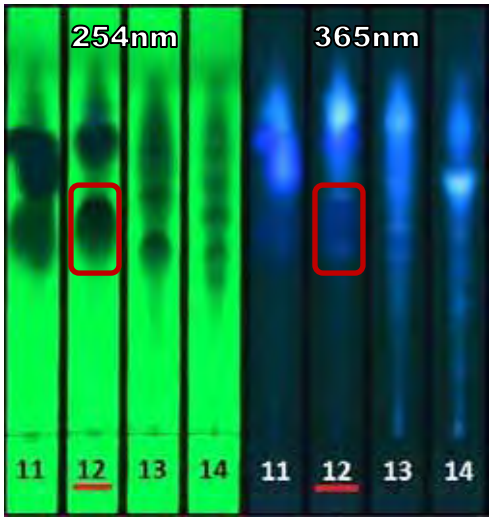
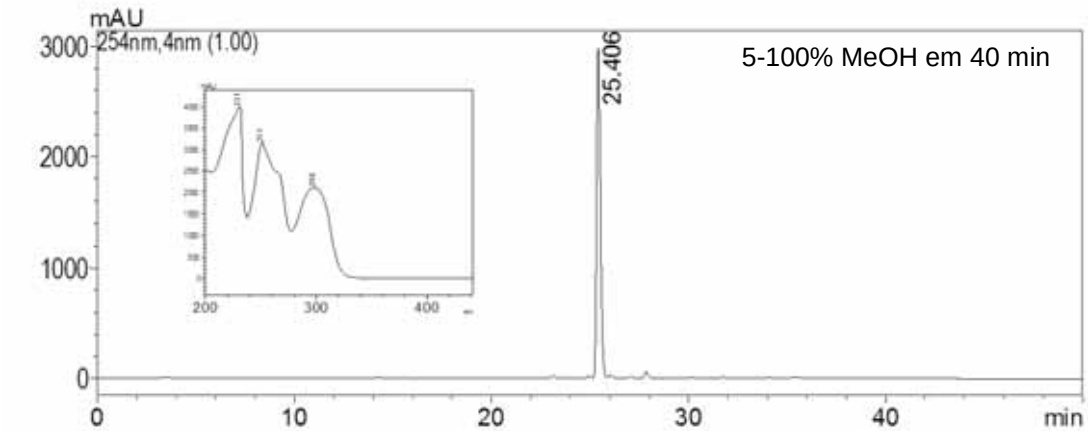


Figura 15 - Cromatograma da substância **2** em gradiente exploratório



A fração 17, proveniente do extrato em AcOEt, foi submetida à CLAE-DAD em escala analítica utilizando gradiente exploratório (Figura 16, p. 48). Um método isocrático, com 30% de MeOH até 35 minutos seguido de um gradiente até 100% em cinco minutos, foi desenvolvido para a mesma (Figura 17, p. 48). Após o desenvolvimento deste método, a fração foi submetida à CLAE-DAD preparativa, onde foram isoladas as substâncias **3** (15mg) (Figura 18, p. 49) e **4** (34mg) (Figura 19, p. 49).

Figura 16 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração 17

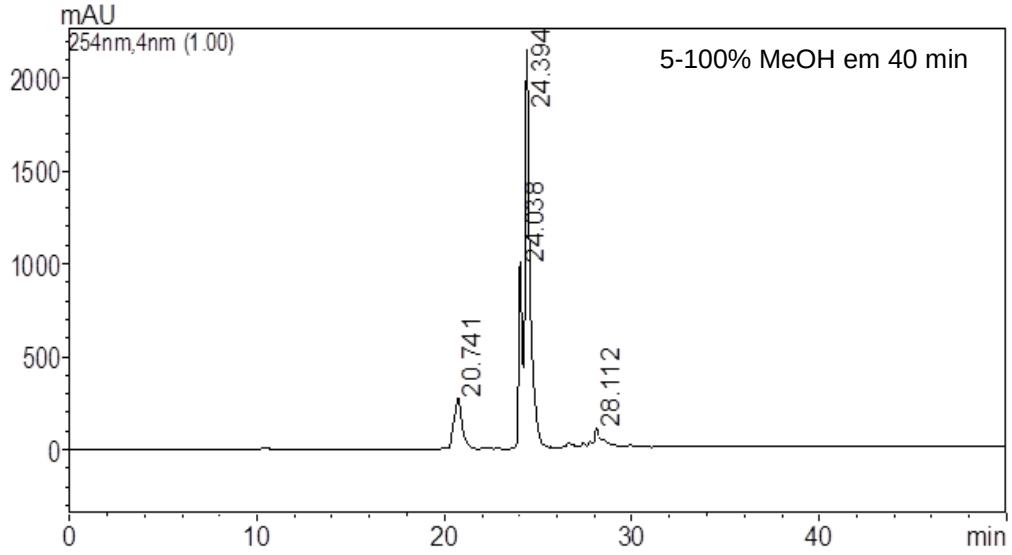
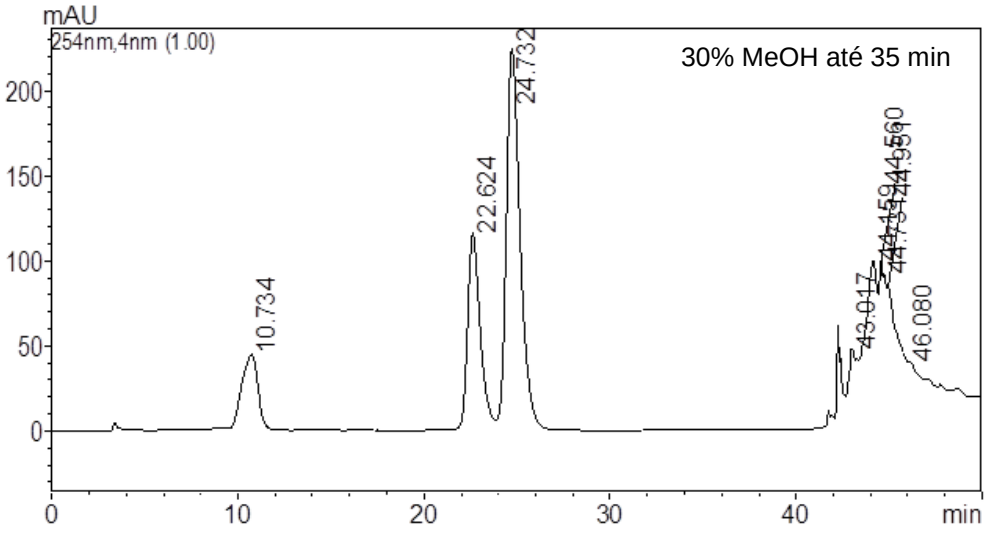


Figura 17 - Cromatograma analítico da fração 17 com método otimizado



O fracionamento de 8g da fração em HEX foi feito em uma coluna aberta (22cm de altura e 5,5cm de diâmetro) utilizando a sílica Sigma-Aldrich® e gradiente HEX:AcOEt 100:0 a 0:100, AcOEt:MeOH 90:10, 50:50 seguido de 100% MeOH. Obteve-se 35 frações, que foram analisadas em placas cromatográficas de sílica e eluídas em diferentes fases móveis, para a comparação das frações. As frações que apresentaram o mesmo perfil foram reunidas, resultando em 27 frações (Tabela 7, p. 49).

Figura 18 - Cromatograma da substância **3** em gradiente exploratório

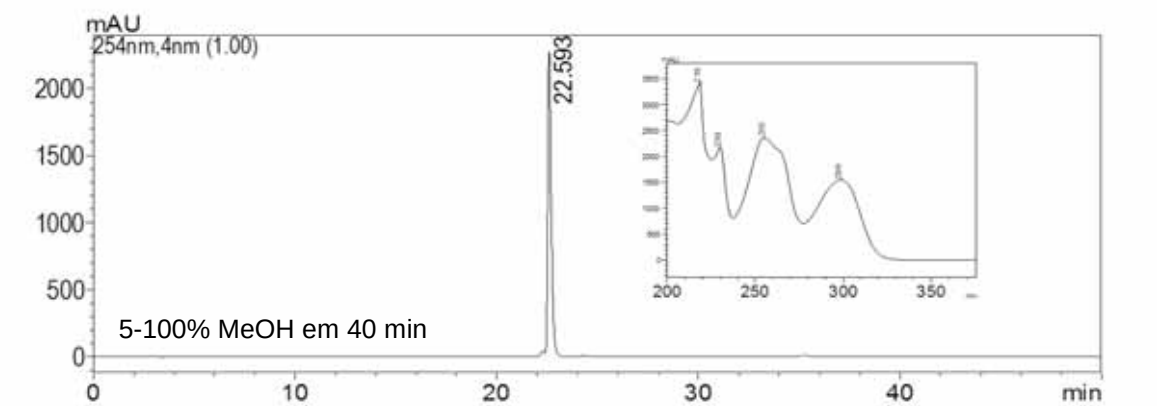


Figura 19 - Cromatograma da substância **4** em gradiente exploratório

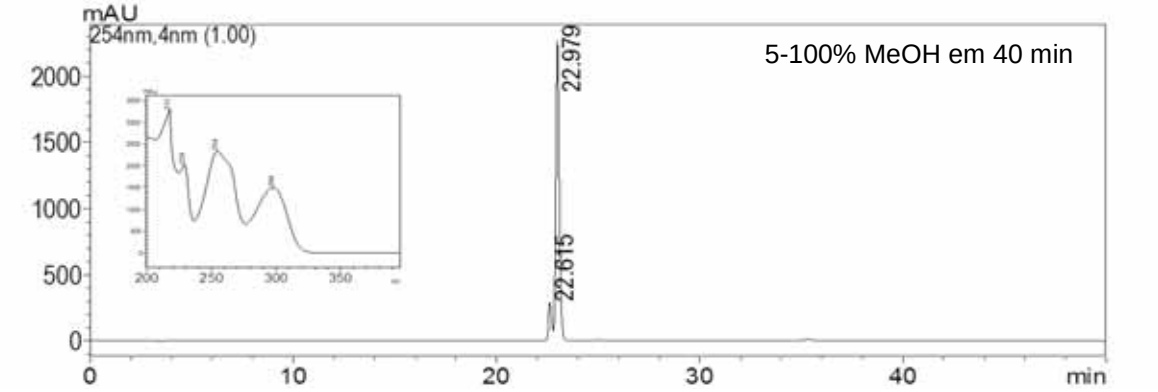
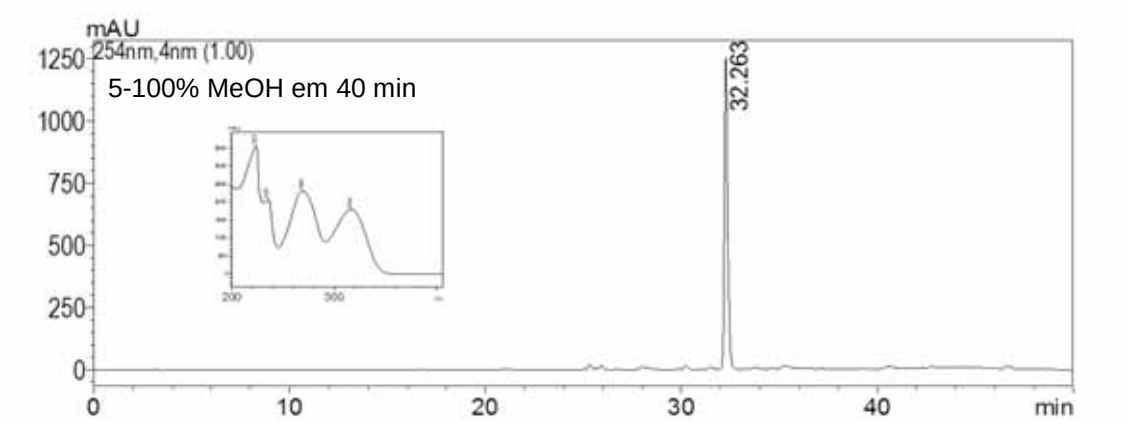


Tabela 7 – Subfrações hexânicas e suas respectivas massas.

Fração nº	Massa (mg)	Fração nº	Massa (mg)
1	167	**15**	82
2	4.130	**16**	42
3	940	**17**	31
4	190	**18**	33
5	102	**19**	15
6	114	**20**	8
7	77	**21**	6
8	66	**22**	11
9	90	**23**	39
10	44	**24**	58
11	48	**25**	145
12	49	**26**	164
13	56	**27**	93
14	235		

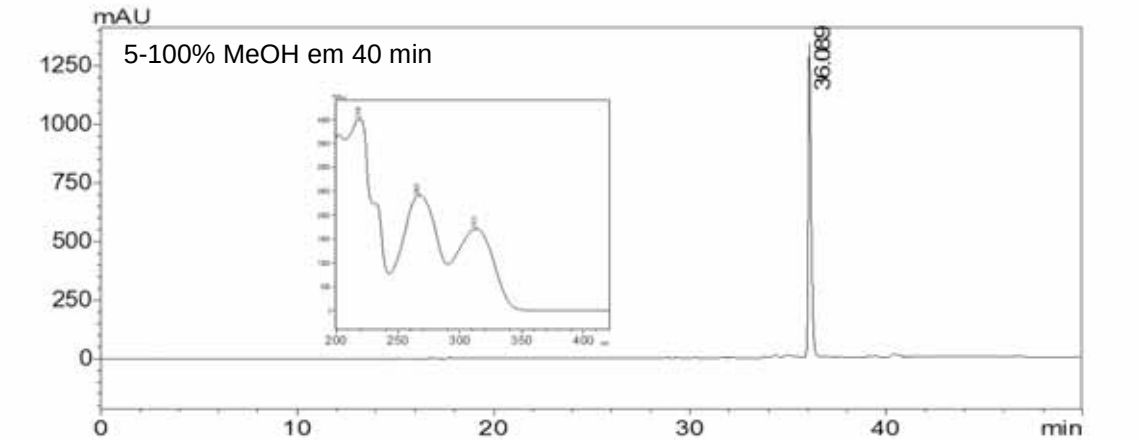
Durante a comparação das subfrações por CCD, pôde-se observar que a subfração 4 (190mg) apresentava um composto majoritário (Figura 20, p. 50), substância **5**. Após análises por RMN de ^{1}H, a substância **5** foi identificada como um policetídeo, já isolado anteriormente (Abe, 2009).

Figura 20 - Cromatograma em gradiente exploratório da subfração 4



Tendo como objetivo o isolamento da substância do extrato bruto com maior Rf em sílica, a amostra C80-10D foi submetida à CCDP juntamente com parte da amostra C80-20D. Aproximadamente 350mg foram aplicados em 16 placas cromatográficas e eluídas com HEX:AcOEt 8:2. A faixa superior foi isolada, obtendo-se a substância **6** (26mg) (Figura 21, p. 50).

Figura 21 - Cromatograma em gradiente exploratório da substância **6**



4.6 - Procedimentos para o ensaio citotóxico

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido puro estéril para a concentração estoque de 10mg/mL. É um método rápido, sensível e barato, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas e as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas, e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por três horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Variação do meio de cultura

Os perfis metabólicos foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detectores de ultravioleta e espectrometria de massas, com exceção das frações em ACN provenientes dos meios sólidos de arroz, que foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando apenas detector de ultravioleta. Todas as análises cromatográficas foram feitas em gradiente exploratório (5-100% de MeOH em 40 minutos). O potencial citotóxico dos extratos foi analisado, porém, não houve variação significativa. Resultado coerente com a semelhança entre os perfis cromatográficos dos extratos

Comparando os cromatogramas obtidos a partir dos extratos provenientes dos meios de cultura a base de malte, observou-se uma variação nos picos em 10, 15, 24, 29 e 31 minutos (Figuras 22 e 23, p. 53).

Figura 22 - Cromatograma do extrato MALT-MQ obtido por CLAE-DAD-EM

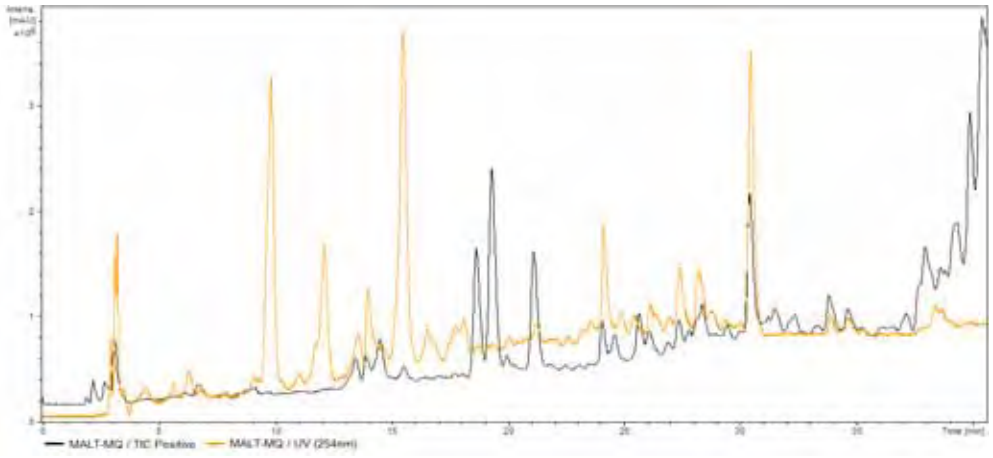


Figura 23 - Cromatograma do extrato MALT-NH_4 obtido por CLAE-DAD-EM

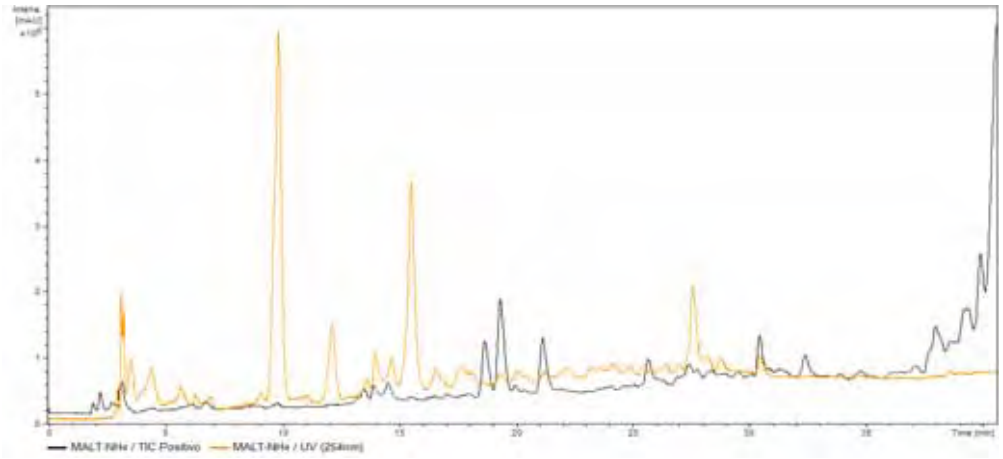


Figura 24 - Cromatograma do extrato PDB-MQ obtido por CLAE-DAD-EM

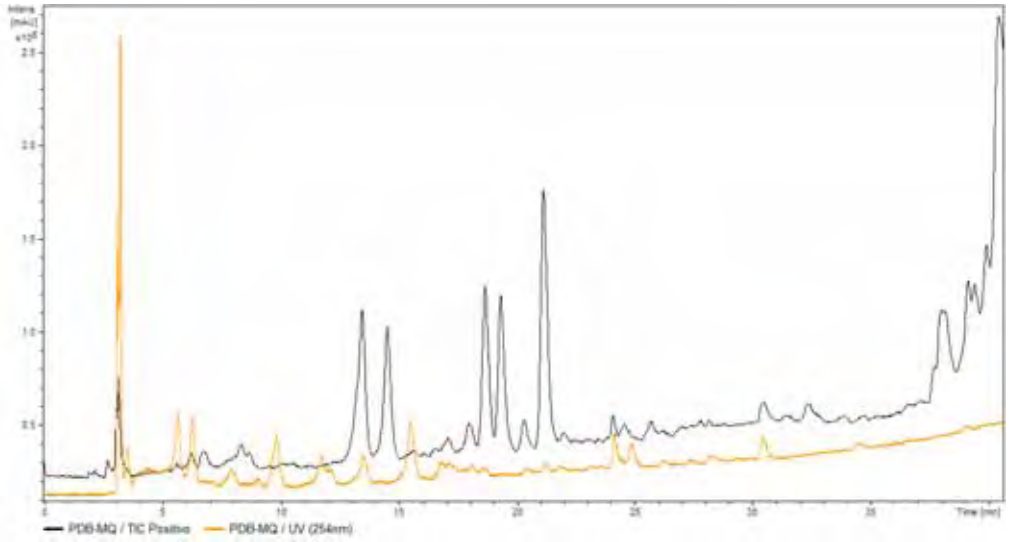


Figura 25 - Cromatograma do extrato PDB-MAR obtido por CLAE-DAD-EM

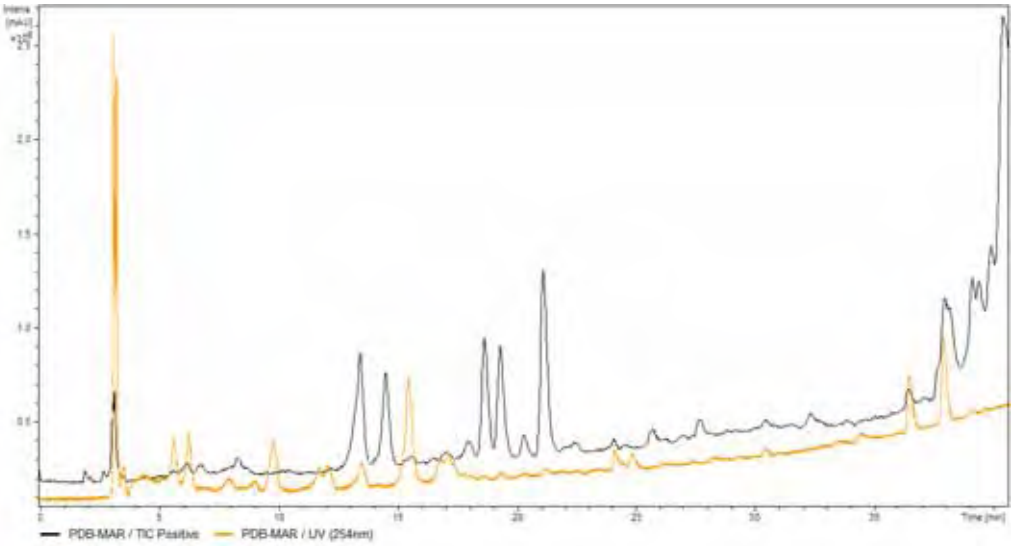


Figura 26 - Cromatograma do extrato PDB-NH_4 obtido por CLAE-DAD-EM

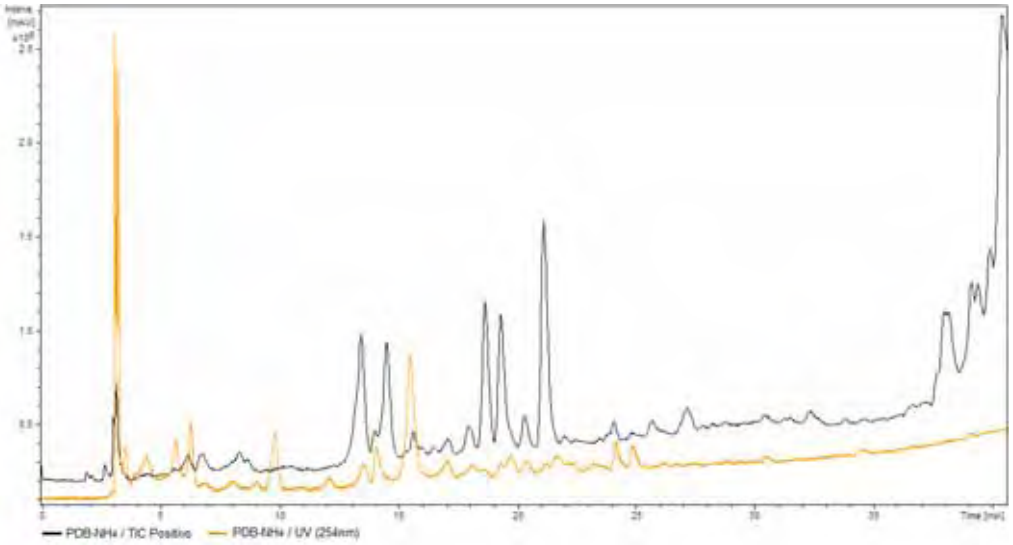


Figura 27 - Cromatograma do extrato NUT-MQ obtido por CLAE-DAD-EM

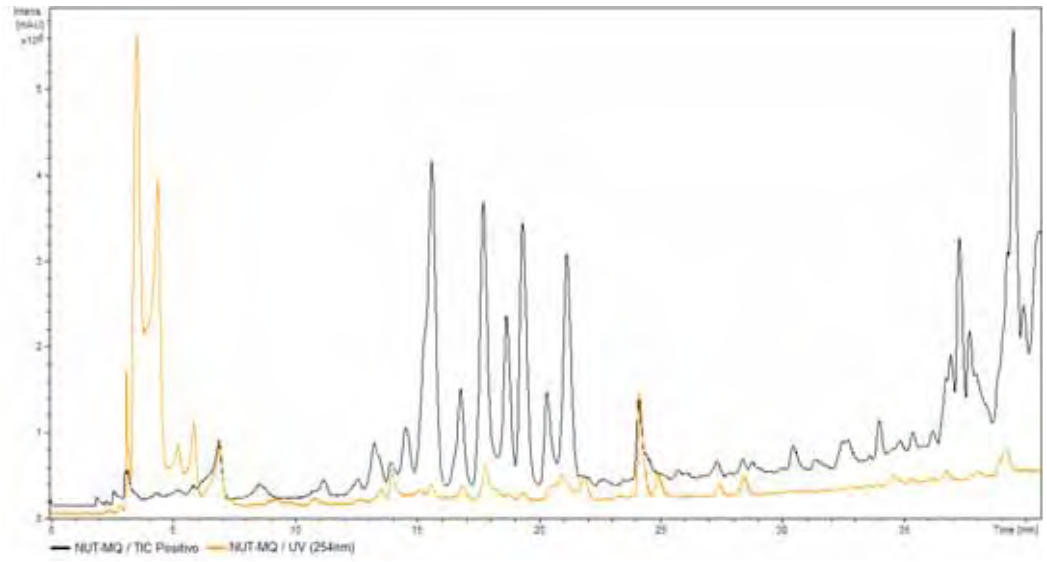
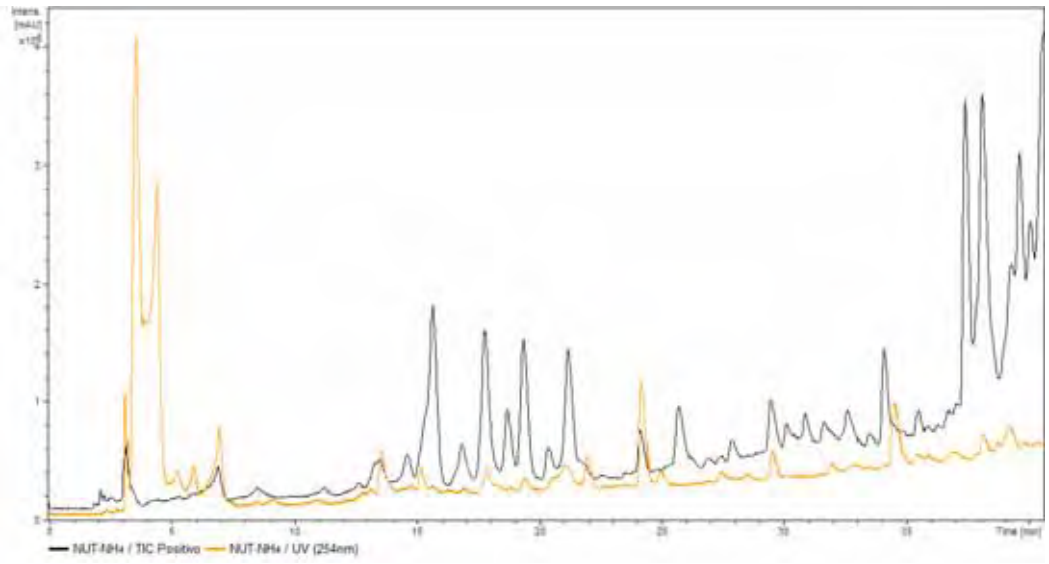


Figura 28 - Cromatograma do extrato NUT-NH_4 obtido por CLAE-DAD-EM



Os extratos provenientes dos meios de cultura a base de batata e dextrose (Figuras 24 a 26, p. 54) não apresentaram variação significativa, e os extratos dos meios a base de extrato de carne (Figuras 27 e 28, p. 55) apresentaram mudança apenas nos picos em 38 minutos.

Pelos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações ACN dos meios sólidos (Figuras 29 e 30, p. 56), observou-se uma mudança apenas na proporção dos metabólitos produzidos.

Figura 29 - Cromatograma do extrato C80-MQ obtido por CLAE-DAD

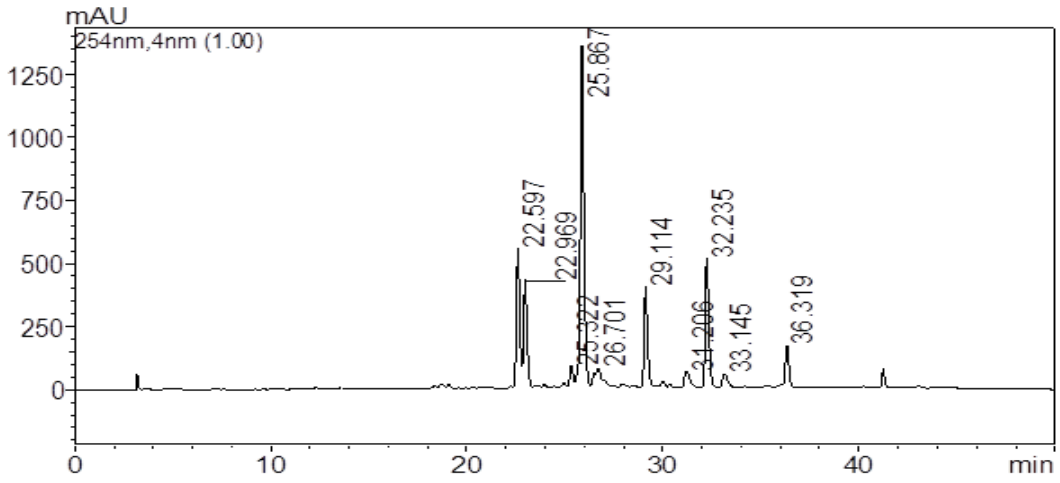
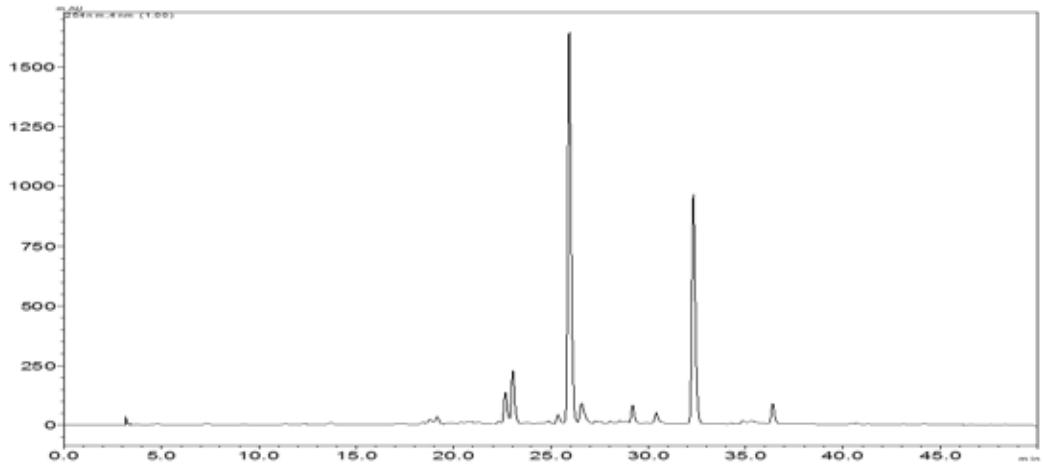


Figura 30 - Cromatograma do extrato C80-MAR obtido por CLAE-DAD



5.2 - Variação do tempo de cultura

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos (30-50% MeOH em 15', 50-100% em 15') pela variação do tempo de cultivo do endófito em meio sólido de arroz, não apresentou grande mudança no intervalo de tempo monitorado, porém, apresentou grande variação na proporção das substâncias produzidas (Figuras 31 a 34, p. 57).

Os picos em 26 e 29 minutos estão presentes no extrato de 10 dias e praticamente ausentes no extrato de 40 dias, o inverso observado com os picos em 15 minutos, assim, os extratos de 20 e 30 dias apresentaram uma proporção mais homogênea dos metabólitos.

Figura 31 - Cromatograma da amostra C80-10D

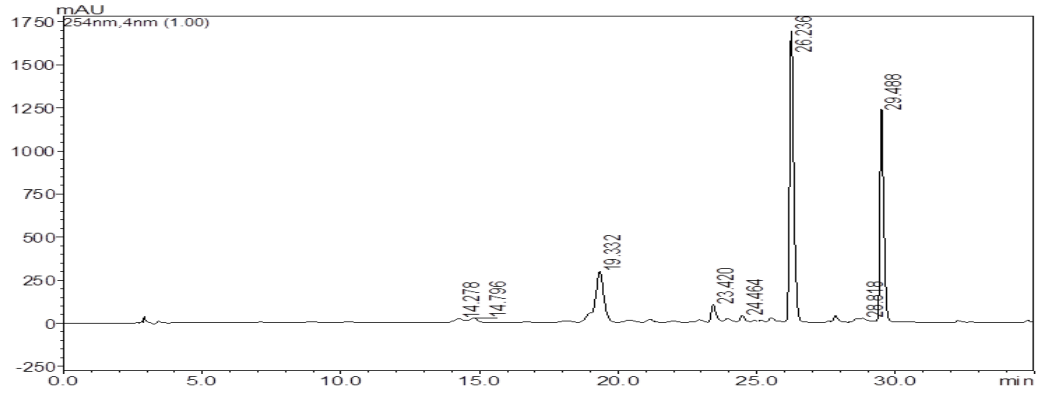


Figura 32 - Cromatograma da amostra C80-20D

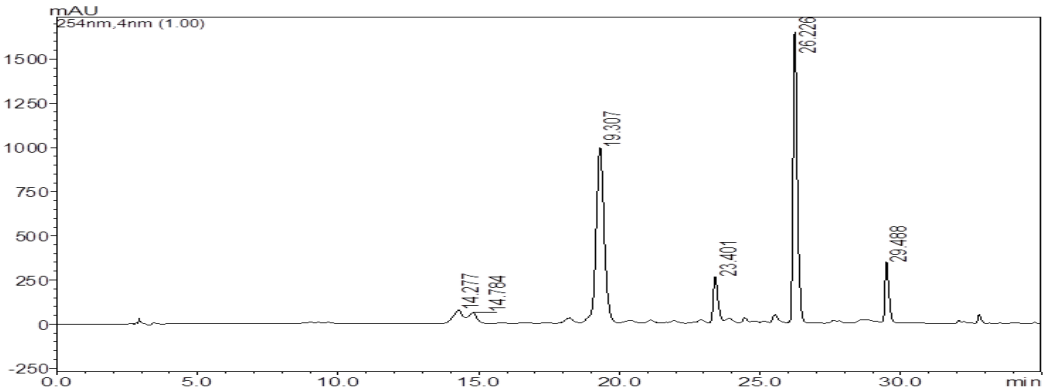


Figura 33 - Cromatograma da amostra C80-30D

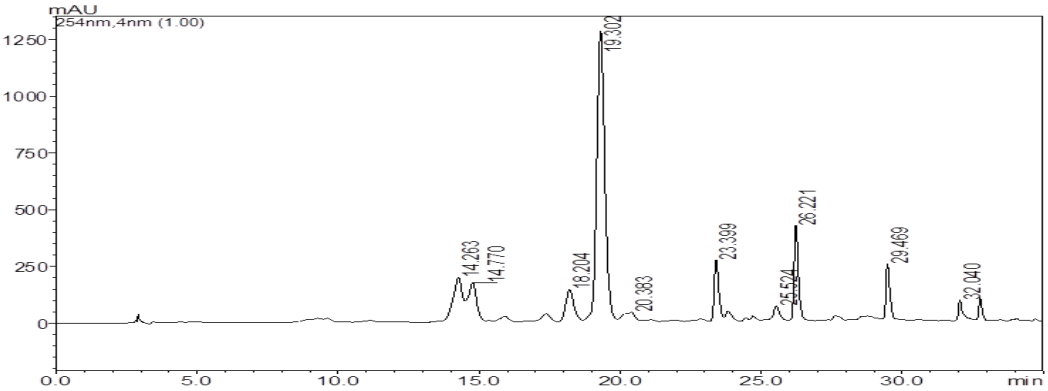
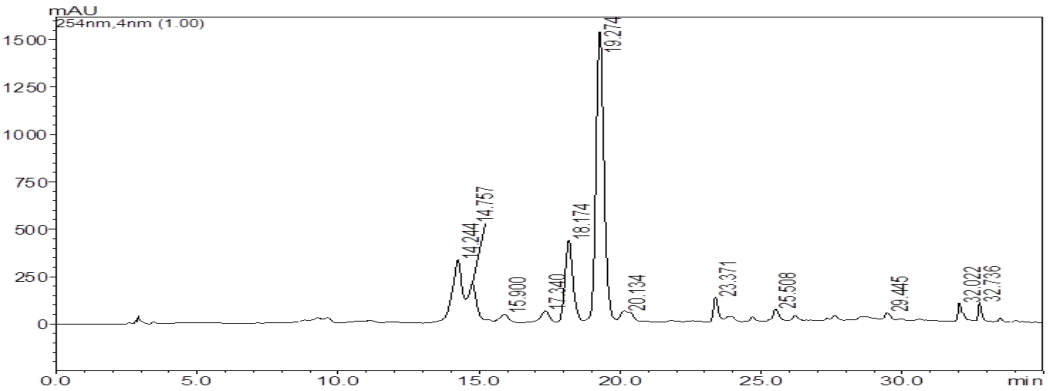


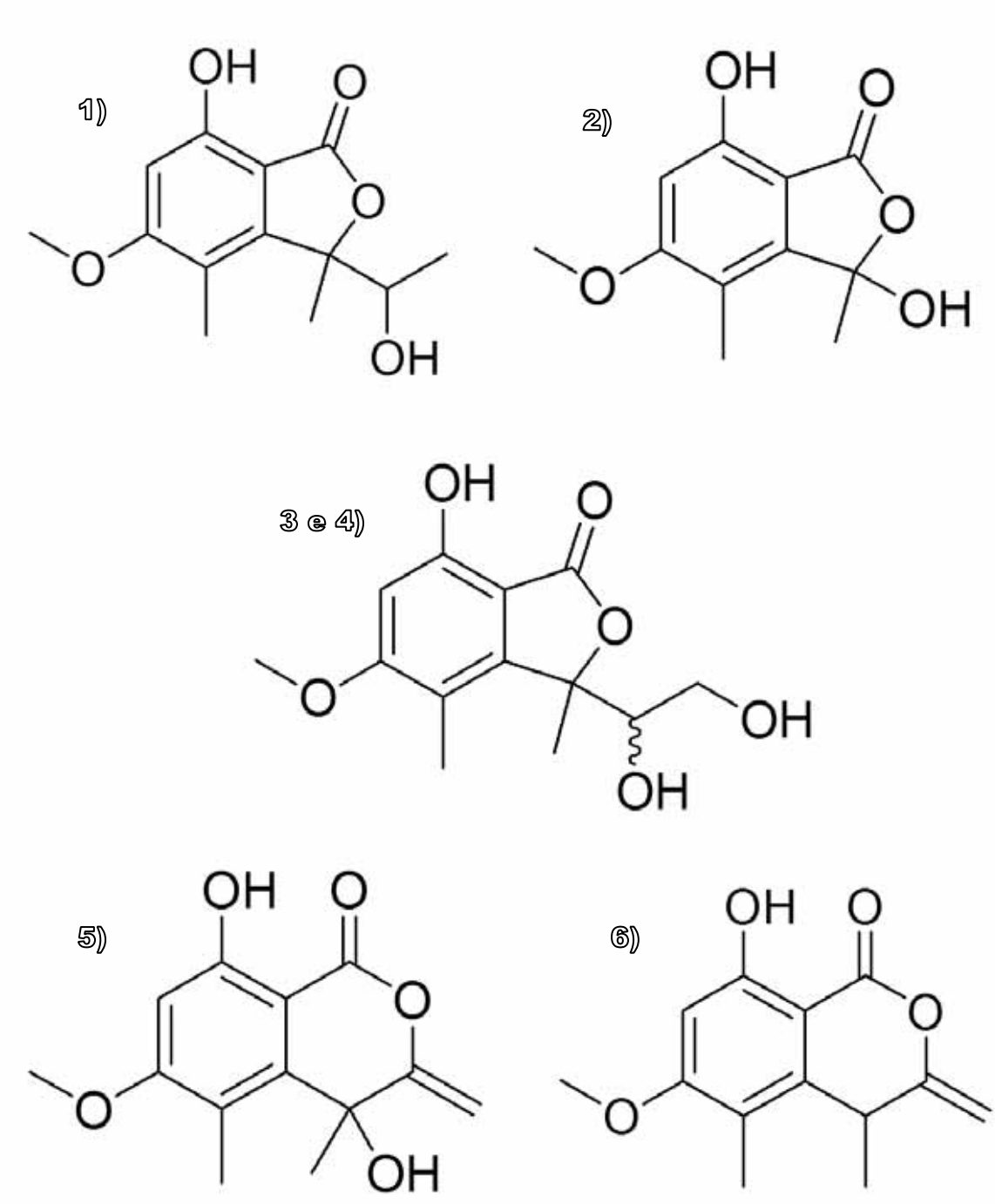
Figura 34 - Cromatograma da amostra C80-40D



5.3 - Determinação estrutural e identificação das substâncias isoladas

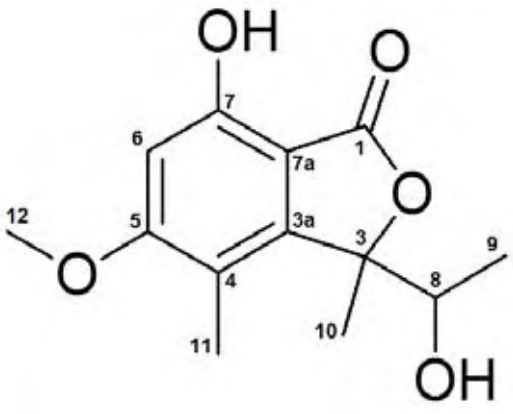
Neste trabalho foram isolados seis metabólitos, do fungo endofítico C80, identificados como policetídeos aromáticos (Figura 35, p. 58). As respectivas estruturas foram determinadas através de análises por RMN de ^{1}H, ^{13}C e EM.

Figura 35 - Policetídeos aromáticos isolados



5.3.1 - Substância 1

Figura 36 - Estrutura proposta para a substância **1**



7-hidroxi-3-(1-hidroxietil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (Apêndice 2) apresenta sinais característicos de hidrogênios metoxílico com δ_H 3,87 (3H, s), e hidrogênios metílicos com δ_H 0,94 (3H, d, J=6,5) acoplando com um hidrogênio oximetínico de δ_H 4,24 (1H, q e J=6,5). Além de um sinal com δ_H 6,43 (1H, s) indicando um hidrogênio aromático protegido, e de dois sinais de hidrogênios metílicos mais desblindados em δ_H 1,80 (3H, s) e δ_H 2,11 (3H, s).

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 3) pôde-se observar seis sinais na região de carbonos aromáticos, sendo que um deles apresentou sinal em δ_C 156,5 indicando um carbono hidroxilado e outro em δ_C 165,4, referente a um carbono ligado a uma metoxila. Observou-se ainda um sinal em δ_c 171,5 indicando a presença de uma carbonila de lactona; um sinal de metila aromática em δ_c 11,2, duas metilas alifáticas em δ_C 21,2 e δ_C 17,8 e um sinal em δ_C 70,9 indicando um carbono sp^3 oxigenado.

Figura 37 - Correlações observadas pelo mapa de contorno HMBC

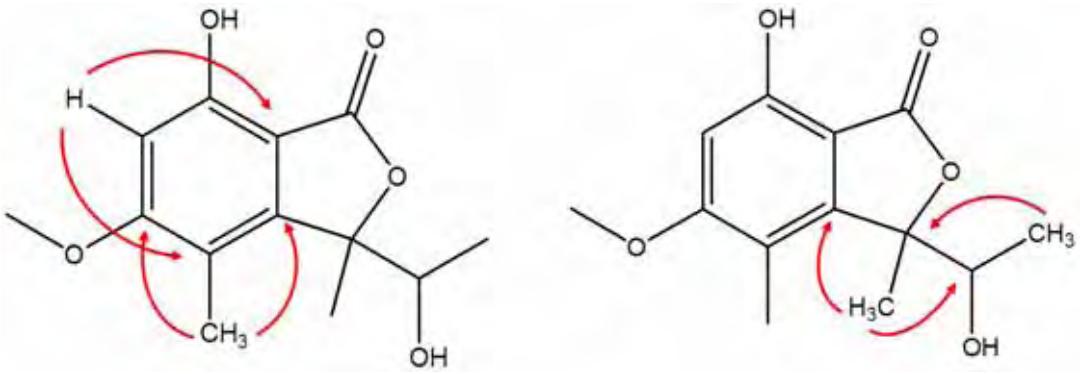


Tabela 8 – Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) e ^{13}C ($CDCl_3$, 125MHz) para a substância **1**

Carbono	δ_H (m,J)	δ_C
1	-	171,5
3	-	91,9
3a	-	149,9
4	-	112,2
5	-	165,4
6	6,43 (s)	98,2
7	-	156,5
7a	-	103,0
8	4,24 (q, 6,5)	70,9
9	0,94 (d, 6,5)	17,8
10	1,80 (s)	21,2
11	2,11 (s)	11,2
12	3,87 (s)	56,3

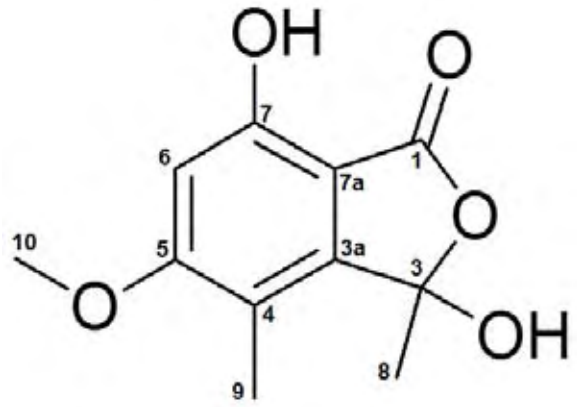
Através do experimento de HMQC (Apêndice 4), os carbonos ligados à hidrogênios foram relacionados, e pelo mapa de correlações à longa distância HMBC (Apêndice 5) pôde-se confirmar a posição da metoxila, hidroxila e metilas.

A substância **1** teve a fórmula molecular $C_{13}H_{16}O_5$ confirmada pela análise dos espectros de EMAR-IES (Apêndices 6 e 7) onde foi visualizado o pico base *m/z* 275,0888 (calc. para $C_{13}H_{16}O_5Na$, 275,0895) no modo positivo e *m/z* 251,0909 (calc. para $C_{13}H_{15}O_5$, 251,0919), indicando a formação dos íons $[M+Na]^+$ e $[M-H]^-$, respectivamente.

Esta estrutura foi descrita pela primeira vez por Tayone et al. (2011b), produzida pelo fungo *Leptosphaeria* sp., coletado em detritos de madeira, no Japão.

5.3.2 - Substância 2

Figura 38 - Estrutura proposta para a substância **2**



3,7-dihidroxi-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (Apêndice 8) apresentou sinais característicos de hidrogênios metoxílico com deslocamento químico δ_H 3,74 (3H, s), de um hidrogênio aromático protegido de δ_H 6,24 (1H, s) e de hidrogênios metílicos desblindados com δ_H 2,15 (3H, s) e δ_H 1,90 (3H, s).

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 9) pôde-se observar um sinal em δ_C 172,5 indicando a presença de uma carbonila de éster, seis sinais na região de carbonos aromáticos, sendo que um deles apresentou sinal em δ_C 158,7 indicando um carbono hidroxilado e outro em δ_C 163,9, referente a um carbono ligado a uma metoxila. O sinal em δ_C 112,9 apresentou maior intensidade em relação aos outros carbonos quaternários, sendo assim atribuído à sobreposição de sinais do C3 e C4. Uma metila aromática com δ_C 10,6, outra metila com δ_C 28,8 e um sinal em δ_C 56,0 indicando uma metoxila aromática.

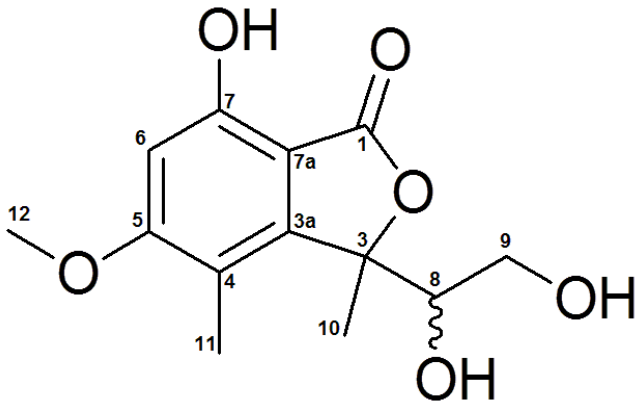
Analisando os dados obtidos por EM-IES (Apêndices 10 e 11) onde foi visualizado o pico de *m/z* 223,15 no modo negativo, atribuído à formação do íon $[M-H]^-$, e o pico de *m/z* 247,07 no modo positivo, atribuído à formação do íon $[M+Na]^+$, indicando a fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_5$ de M.M. 224g.mol^{-1}.

Tabela 9 – Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) e ^{13}C ($CDCl_3$ 75MHz) para a substância **2**

Carbono	δ_H (m,J)	δ_C
1	-	172,5
3	-	112,9
3a	-	146,6
4	-	112,9
5	-	163,9
6	6,24 (s)	99,1
7	-	158,7
7a	-	104,8
8	1,90 (s)	28,8
9	2,15 (s)	10,6
10	3,74 (s)	56,0

5.3.3 - Substância 3

Figura 39 - Estrutura proposta para a substância **3**



7-hidroxi-3-(1,2-dihidroxietil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **3** (Apêndice 12) apresentou sinais característicos de hidrogênios metoxílico com δ_H 3,88 (3H, s), um hidrogênio aromático protegido em δ_H 6,50 (1H, s), e hidrogênios metílicos desblindados em δ_H 2,16 (3H, s) e em δ_H 1,74 (3H, s). Além de três duplo dubletos em δ_H 4,12 (1H, dd, J=8,2 e 3,1), δ_H = 3,38 (1H, dd, J=11,4 e 8,2) e δ_H = 3,18 (1H, dd, J=11,4 e 3,1), indicando a presença de hidrogênios diastereotópicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 13) pôde-se observar um sinal em δ_c 171,4 indicando a presença de uma carbonila de éster, seis sinais na região de carbonos aromáticos, sendo que um deles apresentou sinal em δ_C 158,3 indicando um carbono hidroxilado e outro em δ_C 166,5, referente a um carbono ligado a uma metoxila. Um sinal em δ_c 11,6 da metila aromática, outra metila com δ_C 22,0, um sinal em δ_C 56,8 indicando uma metoxila aromática e três sinais indicando carbonos sp^3 ligados a oxigênio em δ_C 90,2, δ_C 76,1 e δ_C 63,1.

Figura 40 - Correlações observadas pelo mapa de contorno HMBC

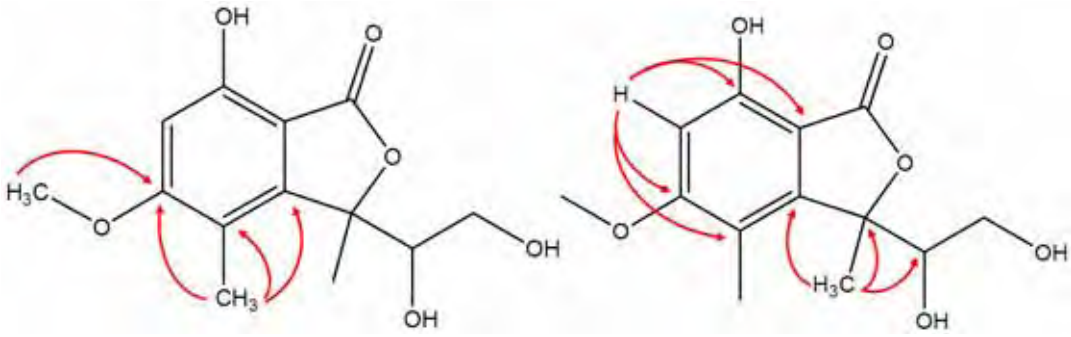


Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H (CD_3OD, 300MHz) e ^{13}C (CD_3OD, 100MHz) para a substância **3,** comparados com dados da literatura* p/ Clearanol D [Gerea et al. (2012)].

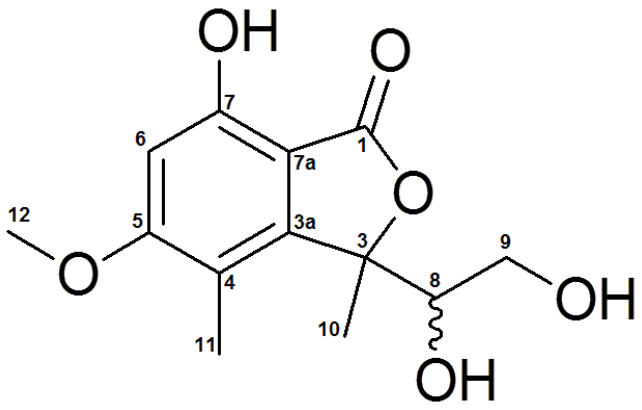
Carbono	δ_H (m,J)	δ_C	δ_H (m,J)*	δ_C*
1	-	171,4	-	171,5
3	-	90,2	-	90,4
3a	-	152,3	-	152,4
4	-	113,1	-	113,3
5	-	166,5	-	166,6
6	6,50 (s)	99,7	6,49 (1H; s)	99,9
7	-	158,3	-	158,3
7a	-	104,4	-	104,6
8	4,12 (dd; 8,2; 3,1)	76,1	4,11 (1H; dd; 8,2; 2,7)	76,2
9	3,38 (dd; 11,4; 8,2); 3,18 (dd; 11,4; 3,1)	63,1	3,34 (1H; dd; 11,3; 8,6); 3,14 (1H; dd; 11,3; 2,7)	63,3
10	1,74 (s)	22,0	1,73 (3H; s)	22,1
11	2,16 (s)	11,6	2,15 (3H; s)	11,7
12	3,88 (s)	56,8	3,88 (3H; s)	56,9

Através do experimento HMQC (Apêndice 15), os carbonos ligados à hidrogênios foram relacionados, e pelo mapa de correlações à longa distância HMBC (Apêndice 14) pôde-se confirmar a posição da metoxila, hidroxila e metilas.

Análises por EMAR-IES no modo positivo (Apêndice 16) e negativo (Apêndice 17) permitiram a visualização dos picos de *m/z* 291,0838 e 267,0865, respectivamente. Picos atribuídos à formação dos íons $[M+Na]^+$ (calc. para $C_{13}H_{16}O_6Na$ 291,0845) e $[M-H]^-$ (calc. para $C_{13}H_{15}O_6$ 267,0869), confirmando a fórmula molecular $C_{13}H_{16}O_6$ proposta.

5.3.4 - Substância 4

Figura 41 - Estrutura proposta para a substância **4**



7-hidroxi-3-(1,2-dihidroxietil)-5-metoxi-3,4-dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona

Análises por EMAR-IES indicaram a mesma fórmula molecular da substância anterior, $C_{13}H_{16}O_6$, pela visualização dos picos de *m/z* 291,0836 e 267,0869 no modo positivo (Apêndice 22) e negativo (Apêndice 23), respectivamente. Picos atribuídos à formação dos íons $[M+Na]^+$ (calc. para $C_{13}H_{16}O_6Na$ 291,0845) e $[M-H]^-$ (calc. para $C_{13}H_{15}O_6$ 267,0869).

Os espectros de RMN de ^1H (Apêndice 18), ^{13}C (Apêndice 19), e as correlações a curta e longa distância também foram muito semelhantes aos da substância **3**, havendo uma mudança significativa apenas no deslocamento de um duplo dubleto dos hidrogênios em C-9, agora com δ_H 3,87ppm (1H, dd, J=11,4 e 3,6).

Assim, a estrutura proposta é do epímero da substância **3**, com inversão da configuração no carbono 8.

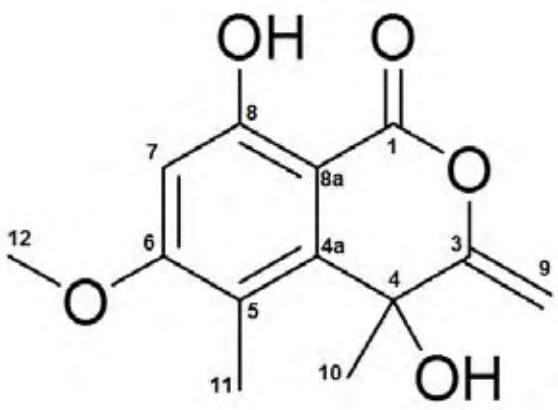
Tabela 11 - Dados de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300MHz) e ^{13}C (CD_3OD, 100MHz) para a substância **4,** comparados com dados da literatura* p/ Clearanol E [Gerea et al. (2012)].

Carbono	δ_H (m,J)	δ_C	δ_H (m,J)*	δ_C*
1	-	171,9	-	171,9
3	-	90,5	-	90,6
3a	-	153,0	-	153,1
4	-	113,2	-	113,4
5	-	166,3	-	166,4
6	6,48 (s)	99,4	6,47 (1H; s)	99,5
7	-	157,7	-	157,8
7a	-	105,3	-	105,4
8	4,15 (dd; 7,8; 3,6)	75,6	4,13 (1H; dd; 8,0; 3,7)	75,7
9	3,87 (dd; 11,4; 3,6); 3,57 (dd; 11,4; 7,8)	63,7	3,83 (1H; dd; 11,3; 3,5); 3,53 (1H; dd; 11,3; 8,2)	63,9
10	1,68 (s)	21,9	1,67 (3H; s)	22,1
11	2,19 (s)	11,2	2,18 (3H; s)	11,4
12	3,88 (s)	56,7	3,87 (3H; s)	56,9

As substâncias **3** e **4** tiveram suas estruturas elucidadas em mistura por Gerea et al. (2012), obtidas de um Dotideomiceto isolado de uma camada microbiana presente em águas doces e ricas em ferro, nos E.U.A..

5.3.5 - Substância 5

Figura 42 - Estrutura proposta para a substância **5**



4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metilenoisocroman-1-ona

Como já mencionado, a substância **5** havia sido isolada no trabalho de monografia, onde teve sua estrutura determinada pela análise dos espectros de RMN de ^{1}H (Apêndice 25) e ^{13}C uni e bidimensionais, e EMAR-IES.

O espectro de RMN de ^{1}H da substância 5 (Apêndice 24) apresentou um sinal de hidrogênio aromático mais blindado de δ_H 6,43, um sinal de hidrogênios metoxílico com δ_H 3,86 e duas metilas mais desblindadas com δ_H 2,38 e δ_H 1,72. Além de um dubleto com δ_H 5,09 e outro com δ_H 4,95, característicos de hidrogênios de carbono sp^2.

A estrutura de fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$ foi confirmada por uma nova análise por EMAR-IES (Apêndice 26), onde foi observado um sinal de *m/z* 251,0911 no modo positivo, atribuído à formação do íon $[M+H]^+$ (calc. para $C_{13}H_{15}O_5$ 251,0919).

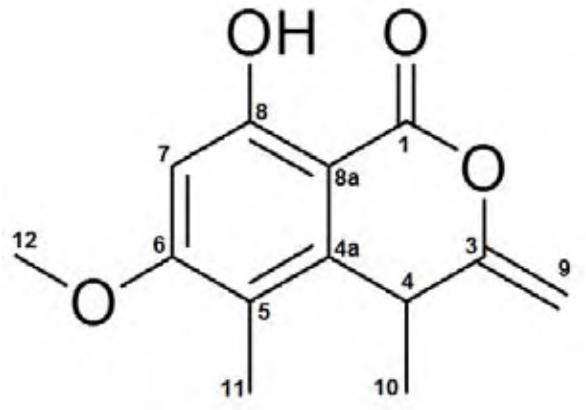
Esta estrutura foi descrita pela primeira vez por Chinworrungsee et al. (2002), obtida do fungo marinho *Halorosellinia oceanica*, coletado na Tailândia.

Tabela 12 – Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 500MHz) para a substância **5**

Carbono	δ_H (m,J)
1	-
3	-
4	-
4a	-
5	-
6	-
7	6,43 (s)
8	-
8a	-
9	5,09 (d; 2); 4,95 (d, 2)
10	1,72 (s)
11	2,38 (s)
12	3,86 (s)

5.3.6 - Substância 6

Figura 43 - Estrutura proposta para a substância **6**



8-hidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metilenoisocroman-1-ona

Tabela 13 – Dados de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300MHz) para a substância **6**

Carbono	δ_H (m,J)
1	-
3	-
4	3,85 (dq; 7,2; 0,3)
4a	-
5	-
6	-
7	6,38 (s)
8	-
8a	-
9	4,79 (dd; 1,8; 0,6) 4,56 (d; 2,1)
10	1,38 (d; 7,2)
11	2,07 (s)
12	3,86 (s)

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **6** (Apêndices 27 e 28) apresentou sinal característico de hidrogênios metoxílico com δ_H 3,86 (3H, s), um sinal de hidrogênio aromático protegido com δ_H 6,38 (1H, s), e uma metila mais desblindada com δ_H 2,07. Além de outra metila com δ_H 1,38 (3H, d, 7,2) acoplando com um hidrogênio metínico de δ_H 3,85 (1H, dq, 7,2; 0,3). Este hidrogênio metínico gerou um "quarteto de sinal largo", em consequência da sobreposição de dois quartetos separados por um discreto acoplamento alílico com hidrogênios em C-9. O acoplamento alílico foi muito pequeno, e apenas pôde ser observado no hidrogênio de δ_H 4,79 (1H, dd, 1,8; 0,6), indicando que a ligação σ C9–H está perpendicular ao orbital π C3-C9.

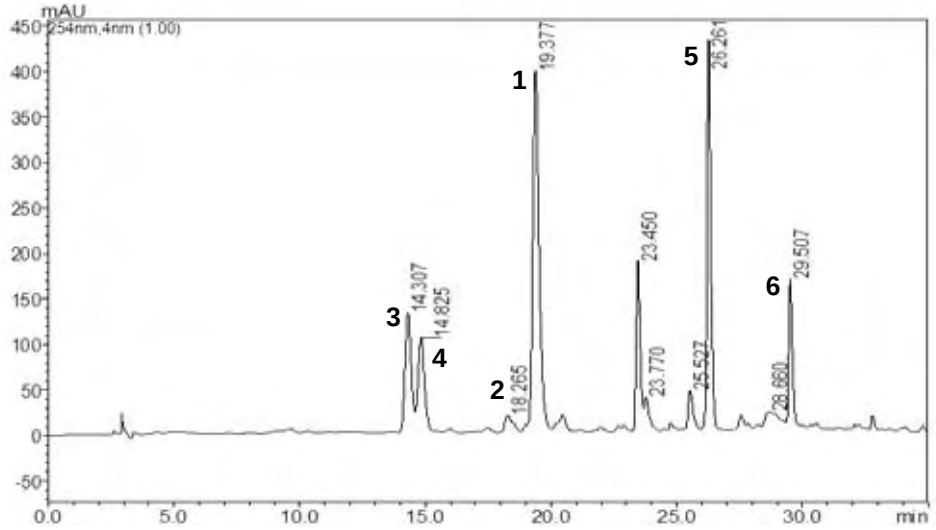
A fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_4$ foi confirmada analisando os dados obtidos por EMAR-IES no modo positivo (Apêndice 29), onde foi visualizado o pico base com *m*/*z* 235,0969, atribuído à formação do íon $[M+H]^+$ (calc. para $C_{13}H_{15}O_4$ 235,0970).

Esta estrutura foi descrita pela primeira vez por Tayone et al. (2011a), também isolada do fungo *Leptosphaeria* sp. descrito anteriormente.

5.4 - Identificação das substâncias isoladas no extrato bruto

Todas as substâncias isoladas foram identificadas no extrato bruto por CLAE-DAD através de co-injeção. Os cromatogramas foram obtidos em gradiente de 30-50% MeOH em 15 minutos, seguido de 50-100% MeOH em mais 15 minutos (Apêndices 35 a 40).

Figura 44 - Substâncias identificadas no extrato bruto



5.5 - Modificações estruturais na substância 1

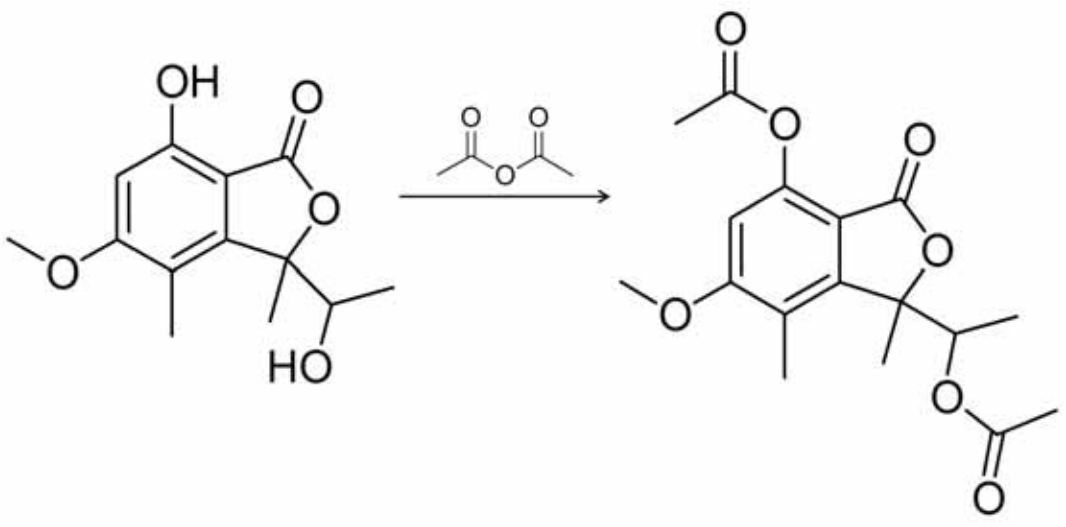
Estudos preliminares demostraram que a substância **1** apresentava potencial citotóxico moderado frente às três linhagens tumorais OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). Estes testes foram realizados em parceria com o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental – UFC. Em função do resultado positivo, a substância **1** foi submetida à pequenas transformações químicas, a fim de se verificar uma variação em sua atividade citotóxica.

Foram conduzidas duas reações separadamente, uma acetilação e uma oxidação. Ambas as reações formam um produto com menor polaridade, o que facilitaria a sua permeação pelas membranas celulares. A reação de acetilação foi realizada utilizando anidrido acético e catalisada por piridina. Na oxidação foi utilizado o reagente de Jones em meio de acetona. Cada reação gerou um produto, os quais foram identificados por RMN de ^{1}H e EMAR-IES.

5.5.1 - Acetilação

Na acetilação, foram reagidos 12mg da substância **1** em um balão reacional, onde foram adicionados 4mL de anidrido acético e 0,1mL de piridina. Após 24h de reação sob agitação e em temperatura ambiente, o balão foi seco em evaporador rotativo, e então o produto (14mg) foi encaminhado para análises espectroscópicas, espectrométricas e ensaio citotóxico.

Figura 45 - Acetilação da substância **1** com piridina como catalisador



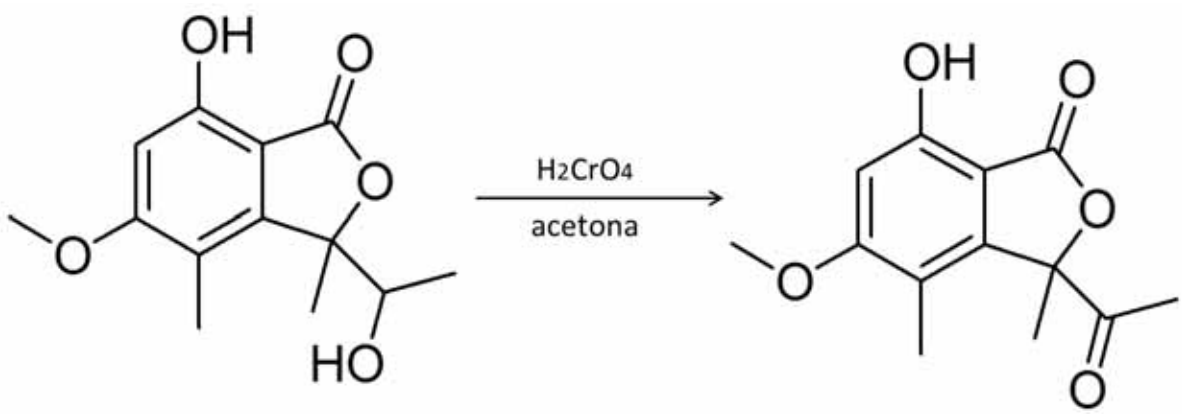
Comparando os espectros de RMN de ^{1}H do material de partida e do produto formado (Apêndice 30), verificou-se o aparecimento de dois sinais de metilas desblindadas de δ_H 2,26 (3H, s) e δ_H 2,39 (3H, s), indicando a acetilação de ambas as hidroxilas. Outra mudança no espectro que indica dupla acetilação é a desblindagem dos hidrogênios aromático e oximetínico. A acetilação da hidroxila aromática diminui a sua contribuição na proteção *orto*/*para* do anel. O hidrogênio oximetínico foi quem sofreu maior mudança no deslocamento químico. Além da desblindagem causada pela esterificação do álcool, este próton provavelmente está sendo desblindado pela anisotropia magnética da carbonila adicionada ao seu ambiente.

A fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_7$ foi confirmada pela análise por EMAR-IES no modo positivo (Apêndice 31), onde foi observado o pico base de *m*/*z* 359,1106, atribuído à formação do íon $[M+Na]^+$ (calc. para $C_{17}H_{20}O_7Na$ 359,1107).

5.5.2 - Oxidação

Na oxidação foram reagidos cerca de 40mg da subfração 13, composta majoritariamente pela substância **1**. Essa massa foi dissolvida em 5mL de acetona, onde o reagente de Jones foi gotejado até a observação de excesso do reagente. Em seguida foi feita uma extração líquido-líquido com AcOEt. A fração AcOEt foi seca em evaporador rotativo, e então o produto obtido (10mg) foi encaminhado para análises espectroscópicas e espectrométricas.

Figura 46 - Oxidação de Jones para a substância **1**



O produto esperado da oxidação havia sido isolado como natural no trabalho de monografia, assim, suas análises foram comparadas ao do produto natural e do material de partida (Apêndices 32 e 33). A substância natural isolada anteriormente teve a sua estrutura determinada por RMN de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais, e EMAR-IES.

Comparando o espectro de RMN de ^{1}H do produto formado com o da substância **1**, pôde-se observar a ausência do quarteto referente ao hidrogênio oximetínico. Também foi possível observar a desblindagem de uma das metilas, que agora está ligada a uma carbonila, gerando um espectro com os mesmos sinais do produto natural isolado anteriormente.

A fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$ esperada para o produto da oxidação foi confirmada por EMAR-IES (Apêndice 34). Foi detectado um pico base de *m*/*z* 251,0911 no modo positivo, atribuído à formação do íon $[M+H]^+$ (calc. para $C_{13}H_{15}O_5$ 251,0919).

5.6 - Ensaio citotóxico

A atividade citotóxica de todas as amostras está apresentada na Tabela 14 (p. 72) com seus respectivos percentuais de inibição. Somente as substâncias que apresentarem valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 14 - Análise do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média ± DPM

Amostra	OVCAR-8	SD	HCT-116	SD	SF-295	SD
Código	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
PDB-MQ	-4,14%	2,05%	1,57%	0,30%	33,45%	1,96%
PDB-MAR	11,90%	1,81%	18,94%	10,46%	35,95%	1,43%
MALT-MQ	29,13%	4,70%	-6,24%	13,91%	39,46%	6,55%
MALT-NH4	23,24%	2,65%	-11,55%	4,83%	28,82%	4,74%
NUT-MQ	11,47%	11,82%	22,57%	0,20%	40,69%	6,32%
NUT-NH4	25,12%	6,51%	0,38%	5,33%	38,35%	3,92%
C80-MQ	43,03%	2,41%	31,64%	1,97%	47,50%	4,82%
C80-10D	13,35%	0,96%	22,15%	1,78%	19,13%	0,68%
C80-20D	6,35%	7,48%	4,22%	13,32%	25,57%	6,17%
C80-30D	18,89%	1,09%	26,68%	2,86%	33,87%	0,75%
C80-40D	28,96%	3,02%	24,45%	3,85%	38,24%	7,08%
Substância 1	75,19%	7,24%	78,08%	6,70%	73,19%	10,68%
Substância 2	5,76%	9,29%	41,75%	0,30%	68,22%	10,92%
Substância 3	2,60%	0,48%	18,17%	0,30%	36,22%	10,99%
Substância 4	-11,04%	12,79%	15,73%	3,16%	33,34%	7,38%
Substância 5	10,02%	4,95%	27,80%	1,48%	46,60%	10,01%
Substância 6	14,03%	2,41%	22,71%	0,00%	54,27%	0,23%
Produto da Acetilação	5,84%	6,27%	15,38%	8,19%	69,12%	2,11%
Produto da Oxidação	10,11%	2,17%	17,40%	0,59%	47,40%	7,08%

6 - CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O estudo químico dos fungos associados às algas marinhas mostrou-se interessante devido à vasta extensão da costa brasileira ainda muito pouco explorada e a capacidade dos endofíticos de produzir compostos novos e bioativos.

A produção metabólica do endófito não apresentou mudança significativa entre os meios de cultura modificados, ao contrário do observado entre os meios comerciais de Malte e Nutriente.

Entre 10 e 40 dias de cultivo em meio sólido de arroz, observou-se grande mudança na proporção dos compostos produzidos. Este resultado levanta uma questão em respeito à produção/transformação dos compostos e mostra que o período de incubação do fungo pode ser ajustado de acordo com a substância de interesse.

O endófito apresentou boa reprodutibilidade do extrato bruto no decorrer de três anos de seu estudo, e as substâncias isoladas confirmam o potencial dos fungos endofíticos na busca por novas estruturas.

A possibilidade de mantermos o fungo preservado e submetê-lo a processos fermentativos permite a obtenção contínua e controlada do material de estudo, o que facilita a obtenção de amostras para ensaios biológicos e, consequentemente, viabiliza o estudo de organismos de origem marinha em regiões distantes do litoral.

As modificações estruturais na substância **1** diminuíram a atividade citotóxica da estrutura, mostrando que a hidroxila ligada ao C8 é importante para a atividade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDEL-LATEFF, A.; KÖNIG, G. M.; FISCH, K. M.; HÖLLER, U.; JONES, P. G.; WRIGHT, A. D. New antioxidant hydroquinone derivatives from algicolous marine fungus *Acremonium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1605-1611, 2002.

ABE, R. O. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados à alga vermelha *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)**. 2009. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

ABRAHAM, I.; SAYED, K. E.; CHEN, Z-S.; GUO, H. Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2312-2321, 2012.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BHATNAGAR, I.; KIM, S-K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2673-2701, 2010.

BHATNAGAR, I.; KIM, S-K. Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: a marine microbial perspective. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 631-643, 2012.

BORGES, W. de S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 21-32, 2013.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásticos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

CAPON, R. J. Marine natural products chemistry: past, present, and future. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, p. 851-854, 2010.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Jr. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 65-72, 2005.

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

CHINWORRUNGSEE, M.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; CHANPHEN, R.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Halorosellins A and B, unique isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. **Journal of the Chemical Society**: Perkin Transactions 1, v. 2002, p. 2473-2476, 2002.

COATES, A.; HU, Y.; BAX, R.; PAGE, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 895-910, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. de A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CRAWFORD, J. M.; TOWNSEND, C. A. New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 879-889, 2010.

D'ORAZIO, N.; GAMMONE, M. A.; GEMELLO, E.; GIROLAMO, M. D.; CUSENZA, S.; RICCIONI, G. Marine bioactives: pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. **Marine Drugs**, v. 10, p. 812-833, 2012.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.

DU, F-Y.; LI, X-M.; LI, C-S.; SHANG, Z.; WANG, B-G. Cristatumins A-D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 4650-4653, 2012.

ELSEBAI, M. F.; KEHRAUS, S.; LINDEQUIST, U.; SASSE, F.; SHAABAN, S.; GÜTSCHOW, M.; JOSTEN, M.; SAHL, H-G.; KÖNIG, G. M. Antimicrobial phenalenone drivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 802-808, 2011a.

ELSEBAI, M. F.; NATESAN, L.; KEHRAUS, S.; MOHAMED, I. E.; SCNAKENBURG, G.; SASSE, F.; SHAABAN, S.; GÜTSCHOW, M.; KÖNIG, G. M. HLE-inhibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2282-2285, 2011b.

FOLMER, F.; JASPARS, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 557-579, 2010.

GAO, S-S.; LI, X-M.; DU, F-Y.; LI, C-S, PROSCH, P.; WANG, B-G. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, p. 59-70, 2011a.

GAO, S-S.; LI, X-M.; LI, C-S.; PROKSCH, P.; WANG, B-G. Penicisteroids A and B, antifungal e cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2894-2897, 2011b.

GEREA, A. L.; BRANSCUM, K. M.; KING, J. B.; YOU, J.; POWELL, D. R.; MILLER, A. N.; SPEAR, J. R.; CICHEWICZ, R. H. Secondary metabolites produced by fungi derived from a microbial mat encountered in an iron-rich natural spring. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 4202-4205, 2012.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 85-98, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; RAMIREZ, A. M. Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2992- 3030, 2012.

HILL, R. A. Marine natural products. **Annual Reports on the Progress of Chemistry Section B**: Organic Chemistry, v. 108, p. 131-146, 2012.

HU, Z-Y.; LI, Y-Y.; HUANG, Y-J.; SU, W-J.; SHEN, Y-M. Three new sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 46-52, 2008.

HUSSAIN, S.; FAREED, S.; ANSARI, S.; KHAN, M. S. Marine natural products: a lead for anti-cancer. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 41, n.1, p. 27-39, 2012.

ISAKA, M.; BERKAEW, P.; INTEREYA, K.; KOMWIJIT, S.; SATHITKUNANON, T. Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. BCC 8613. **Tetrahedron**, v. 63, p. 6855- 6860, 2007.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 186-193, 2011.

JUNKER, C.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. A fine line – endophytes or patogens in *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Ecology**, v. 5, p. 657-662, 2012.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937- 947, 2005.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.

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

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LI, E.; JIANG, L.; GUO, L.; ZHANG, H.; CHE, Y. Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7894-7899, 2008.

LI, J. W-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an Era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LIN, Y.; WU, X.; FENG, S.; JIANG, G.; ZHOU, S.; VRIJMOED, L. L. P.; JONES, E. B. G. A novel *N*-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 449-451, 2001.

LIU, L.; LIU, S.; JIANG, L.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Chloropupukeananin, the first chlorinated Pupukeanane derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. **Organic Letters**, v. 10, n. 7, p. 1397-1400, 2008.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 69-85, 2009.

MUJIB, A.; ILAH, A.; ASLAM, J.; FATIMA, S.; SIDDIQUI, Z. H.; MAQSOOD, M. *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. **Plant Growth Regulation**, v. 68, p. 111-127, 2012.

NASTRUCCI, C.; CESARIO, A.; RUSSO, P. Anticancer drug Discovery from marine environment. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 7, p. 218-232, 2012.

NEWTON, A. C.; FITT, B. D. L.; ATKINS, S. D.; WALTERS, D. R.; DANIELL, T. J. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 365-373, 2010.

OLIVEIRA, A. L. L. de; FELÍCIO, R. da; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, 2012.

OLIVEIRA, A. L. L. de; SILVA, D. B. da; LOPES, N. P.; DEBONSI, H. M.; YOKOYA, N. S. Chemical constituents from red algae *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae): new amides and phenolic compounds. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2186-2188, 2012.

OLIVEIRA, A. L. L. de; SILVA, D. B. da; TURATTI, I. C. C.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Volatile constituents of Brazilian *Bostrychia* species (Rhodomelaceae) from mangrove and rocky shore. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 761-765, 2009.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; MARÓSTTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransforrmation process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-11, 2011. DOI: 10.4061/2011/576286.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergente properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 291-315, 2011.

QUADE, N.; HUO, L.; RACHID, S.; HEINZ, D. W.; MÜLLER, R. Unusual carbono fixation gives rise to diverse polyketide extender units. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 117-124, 2012.

RADIĆ, N.; ŠTRUKELJ, B. Endophytic fungi – the treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v. 19, p. 1270-1284, 2012.

RAISTRICK, H. A region of biosynthesis. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 136, p. 481-508, 1950.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 290-344, 2011.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F. Jr.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J.; VOLKENBURGH, E. V.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F.; KIM, Y-O.; REDMAN, R. S.Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 2, p. 404-416, 2008.

SAMUEL, P.; PRINCE, L.; PRABAKAN, P. Ocean: the inviolated source of pharmaceutical leads and drug metabolites. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 10, p. 74-91, 2011.

SANT'ANNA, C. L.; MELCHER, S. S.; CARVALHO, M. D. C.; GEMELGO, M. P.; AZEVEDO, M. T. D. P. Planktic cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 1-17, 2007.

SCHNEIDER, G. Enzymes in the biosynthesis of aromatic polyketide antibiotics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, p. 629-636, 2005.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K. KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; DELA CRUZ, T. E.; RHEINHEIMER, J.; SIEMS, K.; LOESGEN, S.; BITZER, J.; SCHLOERKE, O.; ZEECK, A.; KOCK, I.; HUSSAIN, H., DAI, J.; KROHN, K. Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. **Botanica Marina**, v. 51, p. 219-234, 2008.

SETO, Y.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; KOGAMI, Y.; YADA, H.; YOSHIHARA, T.; NABETA, K. Novel cyclic peptide, Epichlicin, from the endophytic fungus, *Epichloe typhina*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1470-1475, 2007.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA NETO, C. M. ARAUJO, A. R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1463-1466, 2005.

TAN, Q.; YAN, X.; LIN, X.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SONG, S.; LU, C.; SHEN, Y. Chemical constituents of the endophytic fungal strain *Phomopsis* sp. NXZ-05 of *Camptotheca acuminata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, p. 1811-1817, 2007.

TAYONE, W. C.; KANAMARU, S.; HONMA, M.; TANAKA, K.; NEHIRA, T.; HASHIMOTO, M. Absolute stereochemistry of novel isochromanone derivatives from *Leptosphaeria* sp. KTC 727. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 12, p. 2390-2393, 2011a.

TAYONE, W. C.; HONMA, M.; KANAMARU, S.; NOGUCHI, S.; TANAKA, K.; NEHIRA, T.; HASHIMOTO, M. Stereochemical investigations of isochromenones and isobenzofuranones from *Leptosphaeria* sp. KTC 727. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 425-429, 2011b.

TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, v. 14, n. 2, p. 83-90, 1991.

TENGURIA, R. K.; KHAN, F. N.; QUERESHI, S. Endophytes – mines of pharmacological therapeutics. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 5, p. 127-149, 2011.

WANG, Y.; DAI, C-C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 207-215, 2011.

WEI, N.; QUARTERMAN, J.; JIM, Y-S. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 70-77, 2013.

YOSHIDA, M.; TANABE, Y.; YONEZAWA, N.; WATANABE, M. M. Energy innovation potential of oleaginous microalgae. **Biofuels**, v. 3, n. 6, p. 761-781, 2012.

YU, O.; JEZ, J. M. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. **The Plant Journal**, v. 54, p. 750-762, 2008.

ZHANG, W.; KROHN, K.; EGOLD, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Diversity of antimicrobial Pyrenophorol derivatives from an endophytic fungis, *Phoma* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 25, p. 4320-4328, 2008.

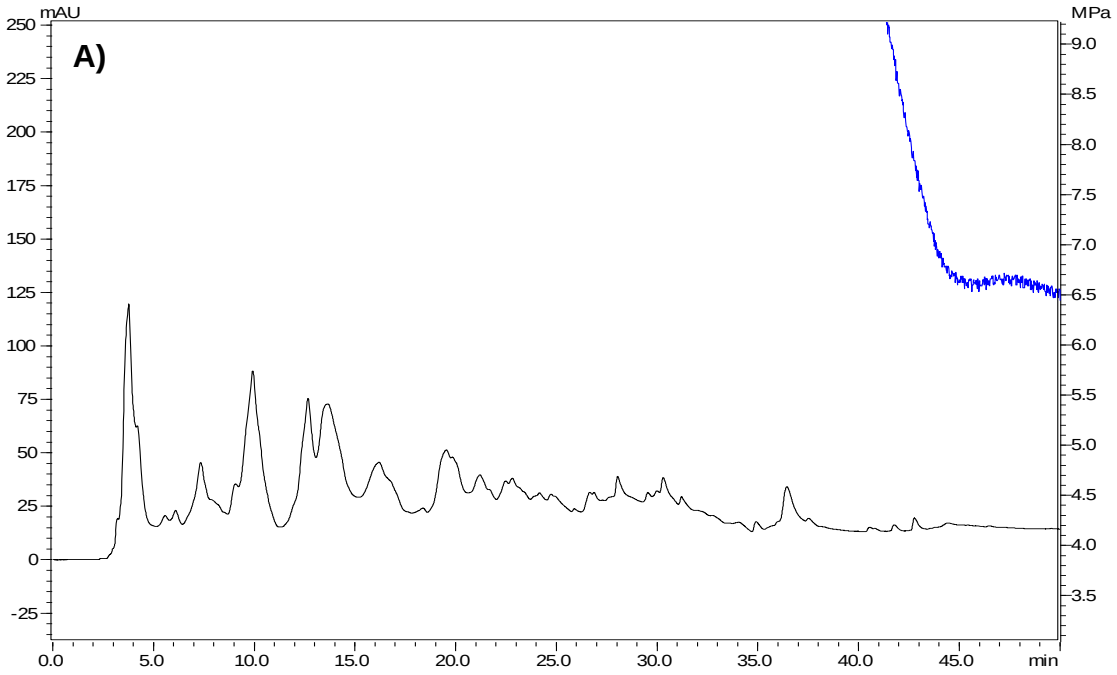
ZHANG, Y.; LI, X-M.; WANG, B-G. Nigerasperones A~C, new monomeric and dimeric naphtho-γ-pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 3, p. 204-210, 2007.

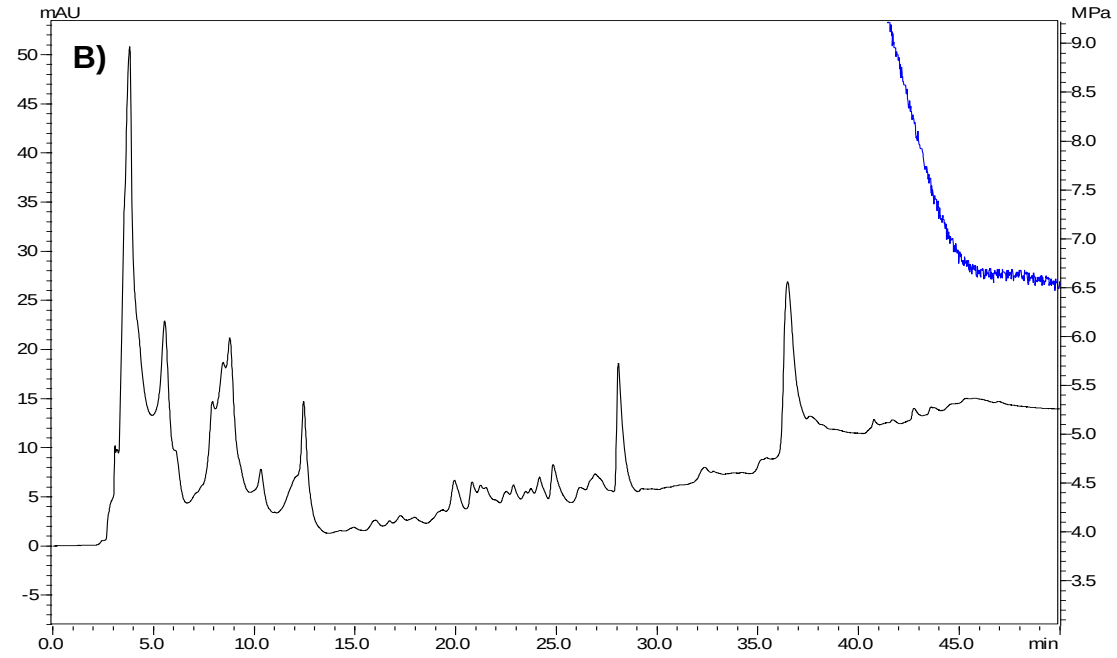
ZHANG, Y.; WANG, S.; LI, X-M.; CUI, C-M.; FENG, C.; WANG, B-G. New Sphingolipids with a previously unreported 9-Methyl-C_{20}-sphingosine moiety from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Lipids**, v. 42, p. 759-764, 2007.

ZUCCARELLO, G. C.; WEST, J. A. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*B. moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. **Journal of Phycology**, v. 39, p. 948-959, 2003.

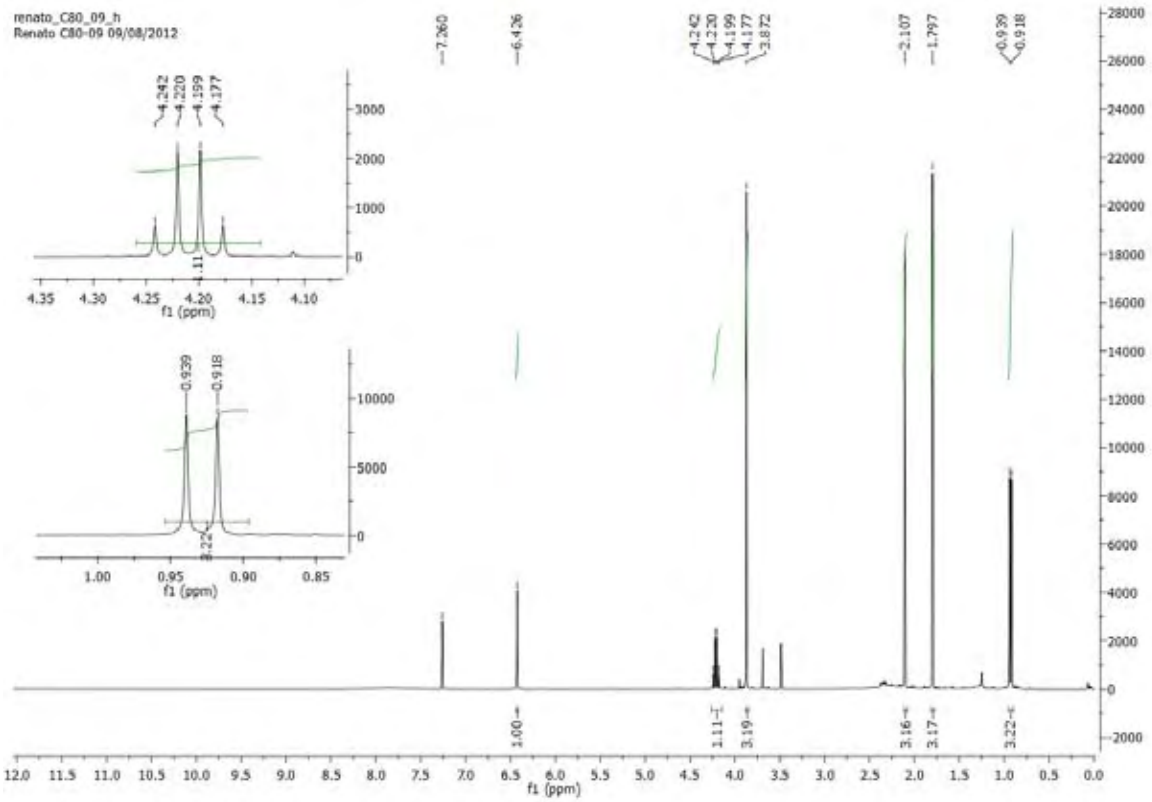
APÊNDICES

Apêndice 1 – Branco cromatográfico dos meios de cultura A) Malte e B) Nutriente

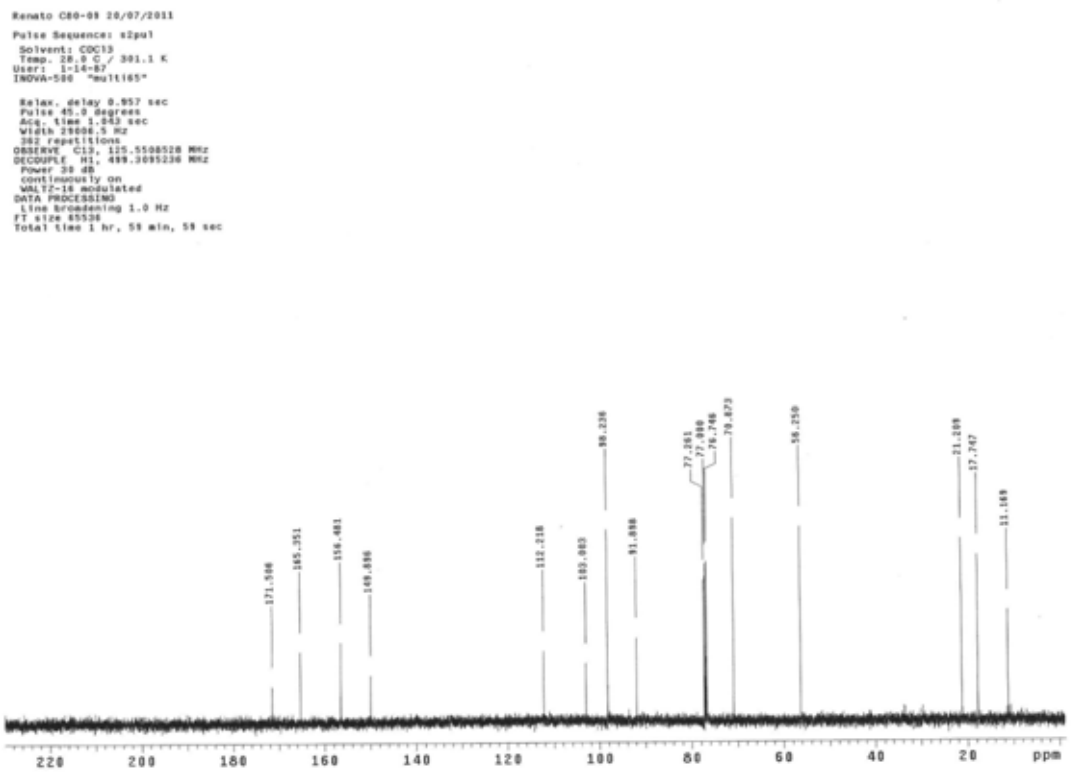




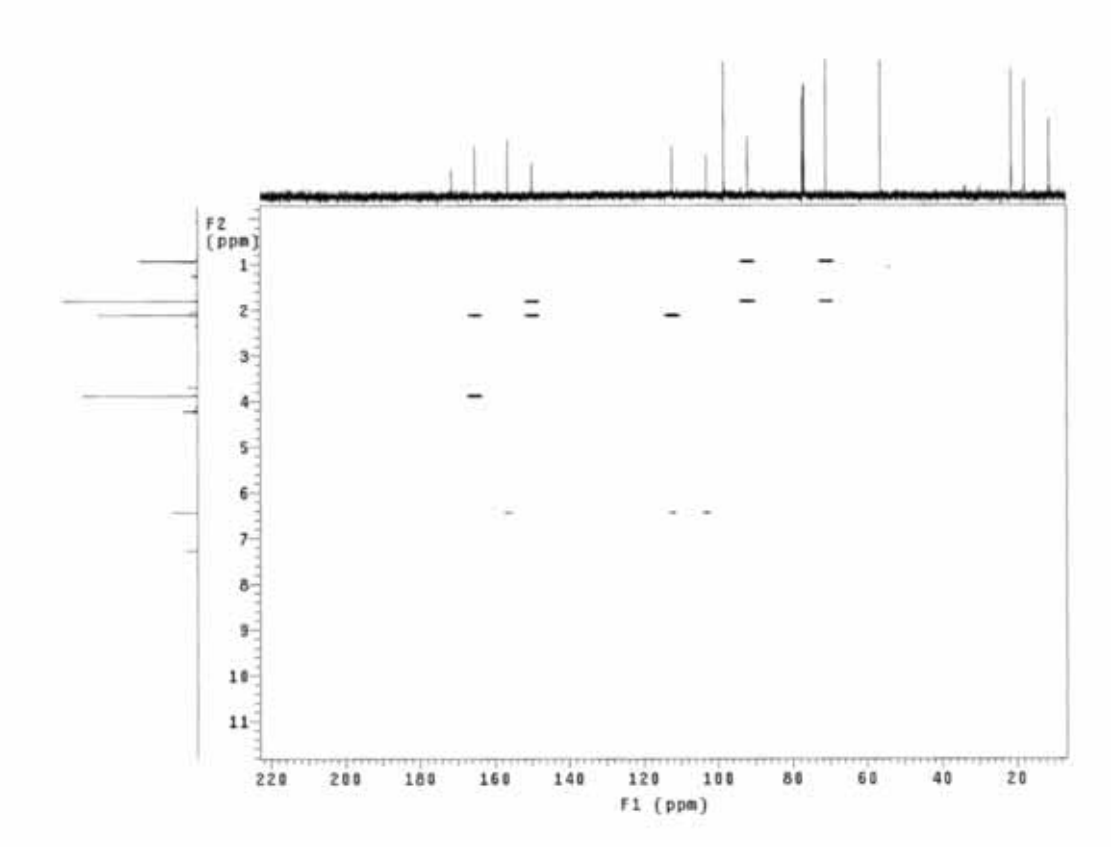
Apêndice 2 – RMN de ^{1}H Substância 1 (300MHz, $CDCl_3$)



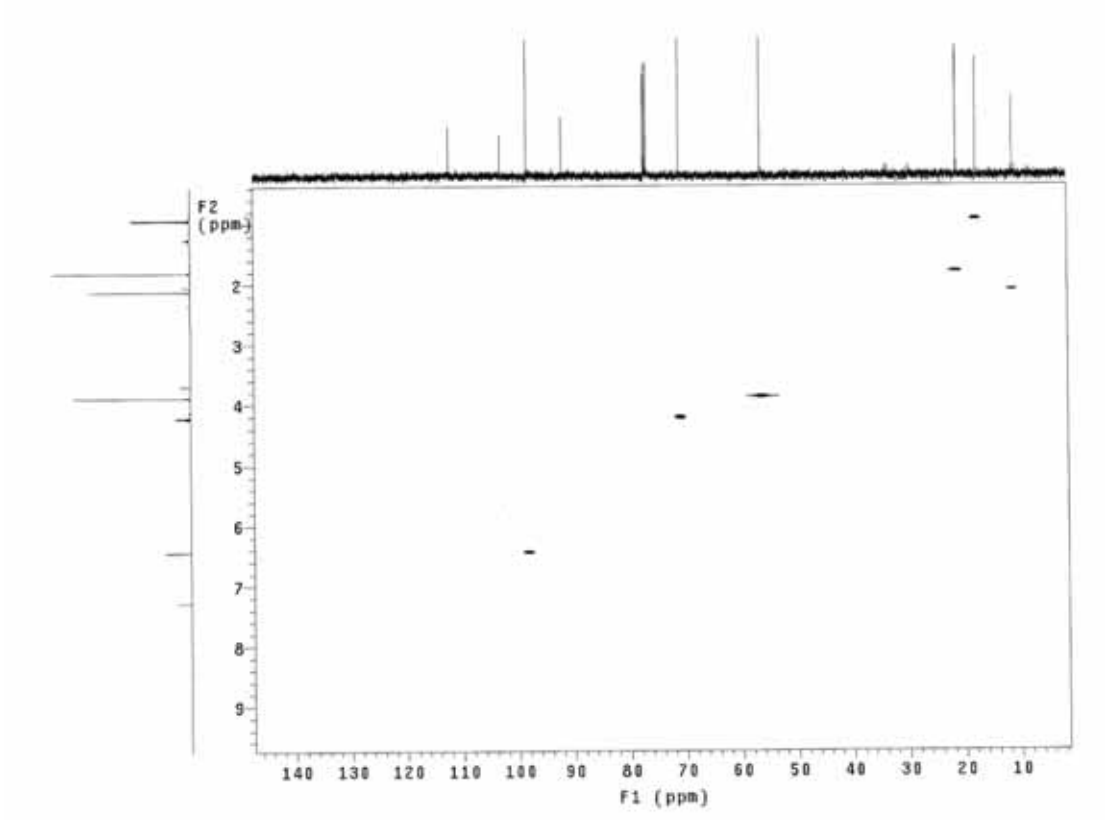
Apêndice 3 – RMN de ^{13}C Substância 1 (125MHz, $CDCl_3$)



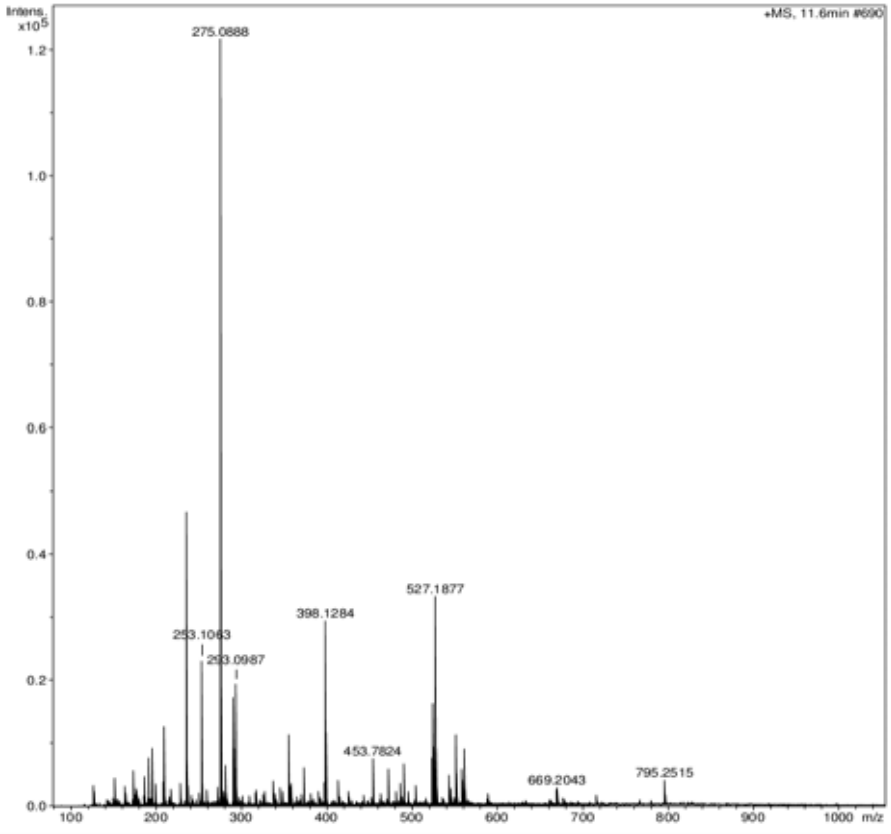
Apêndice 4 – Mapa de contorno HMBC substância 1



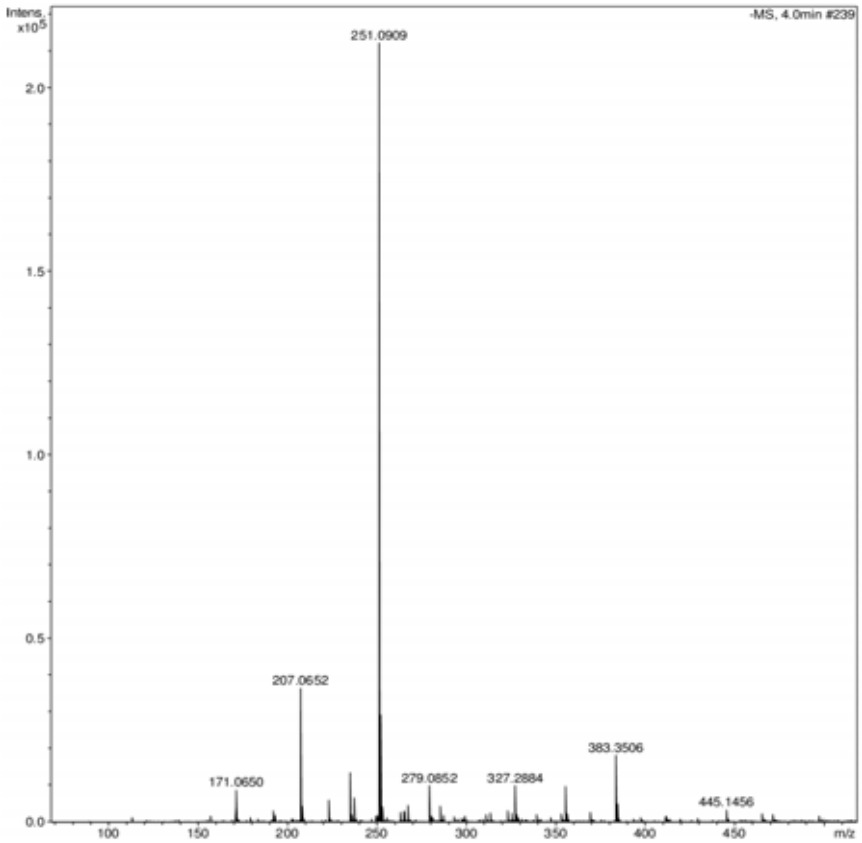
Apêndice 5 – Mapa de contorno HSQC substância 1



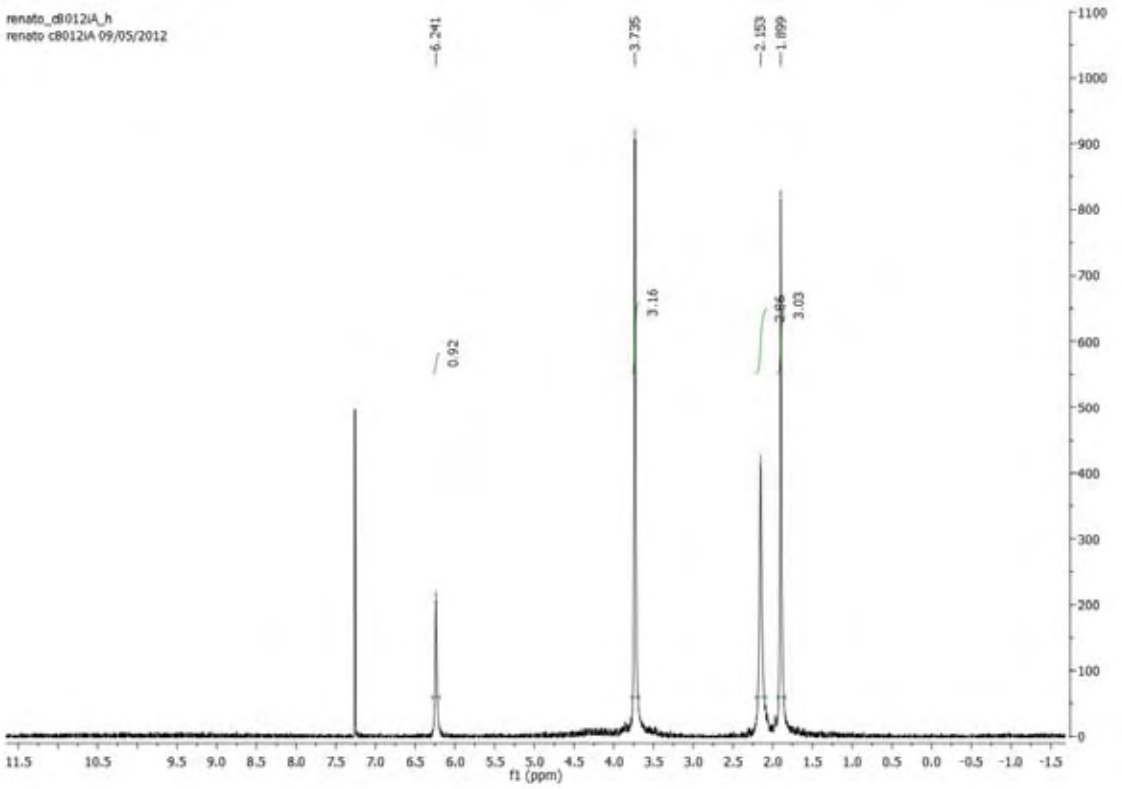
Apêndice 6 – Espectro de massas substância 1, modo positivo



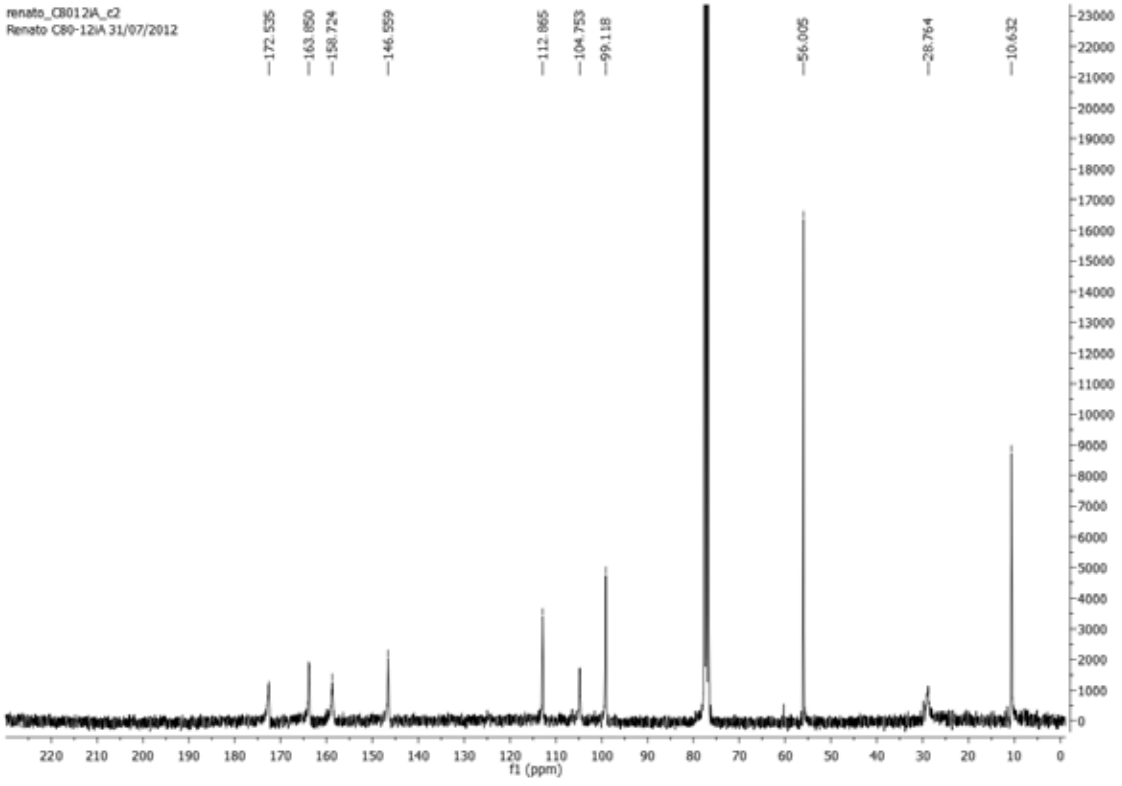
Apêndice 7 – Espectro de massas substância 1, modo negativo



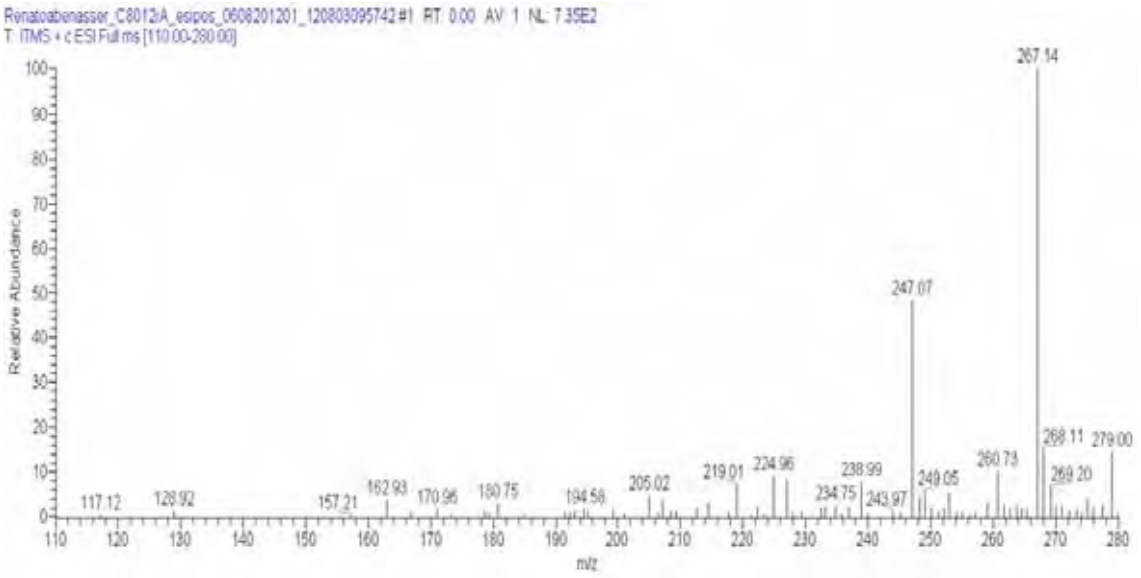
Apêndice 8 – RMN de ^{1}H Substância 2 (300MHz, $CDCl_3$)



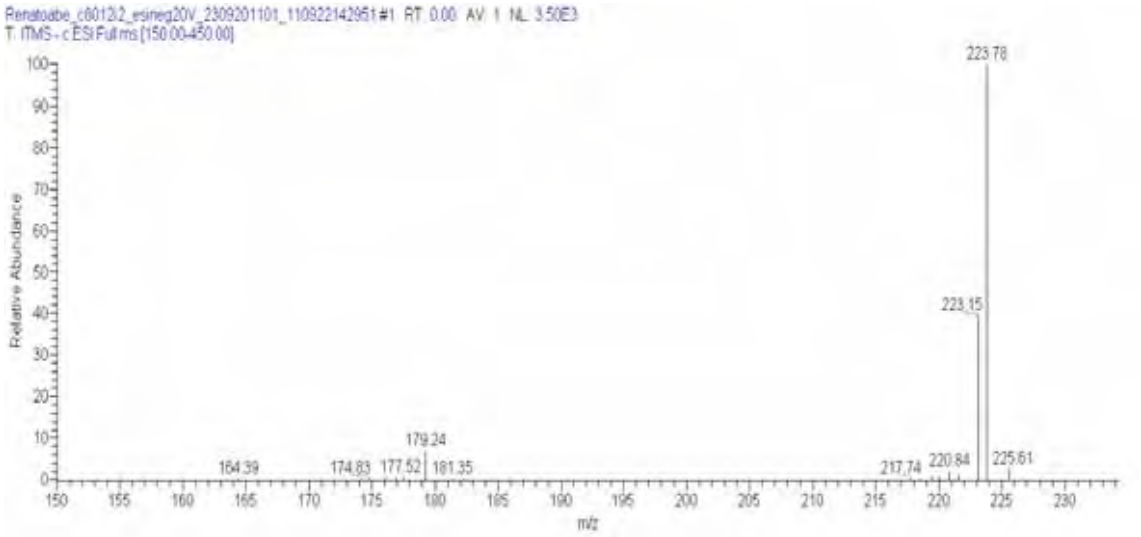
Apêndice 9 – RMN de ^{13}C Substância 2 (75MHz, $CDCl_3$)



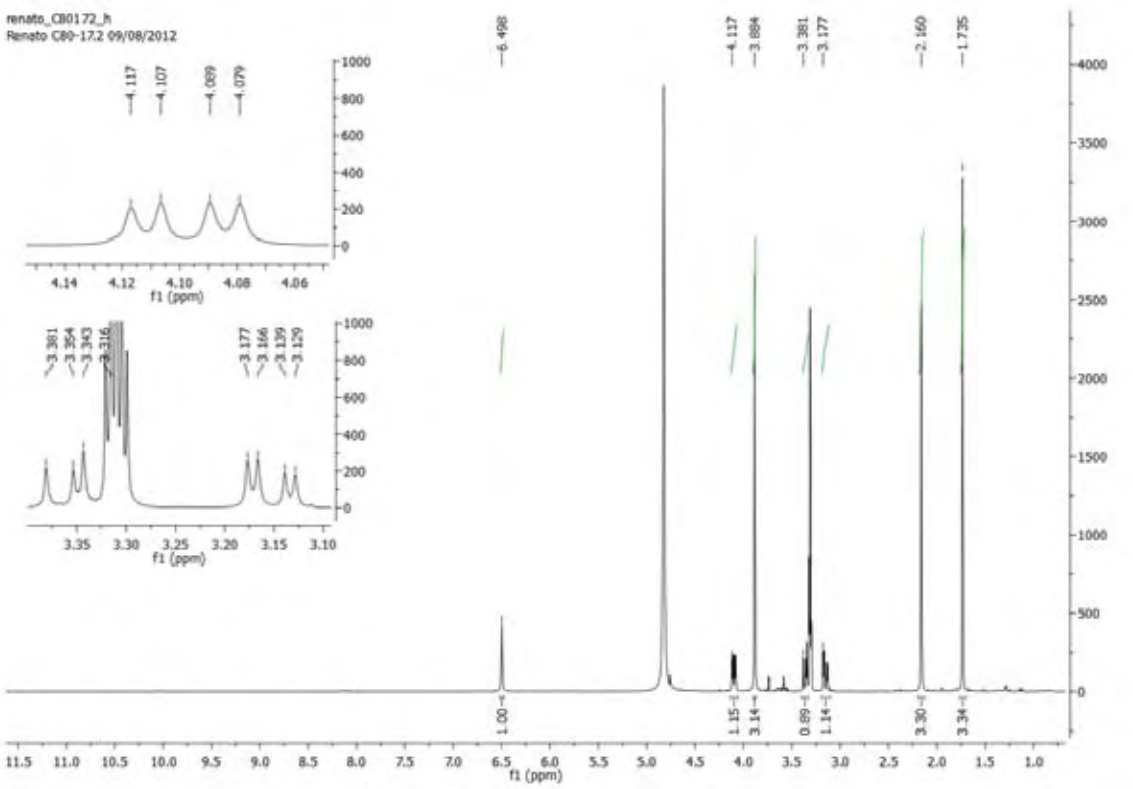
Apêndice 10 – Espectro de massas substância 2, modo positivo



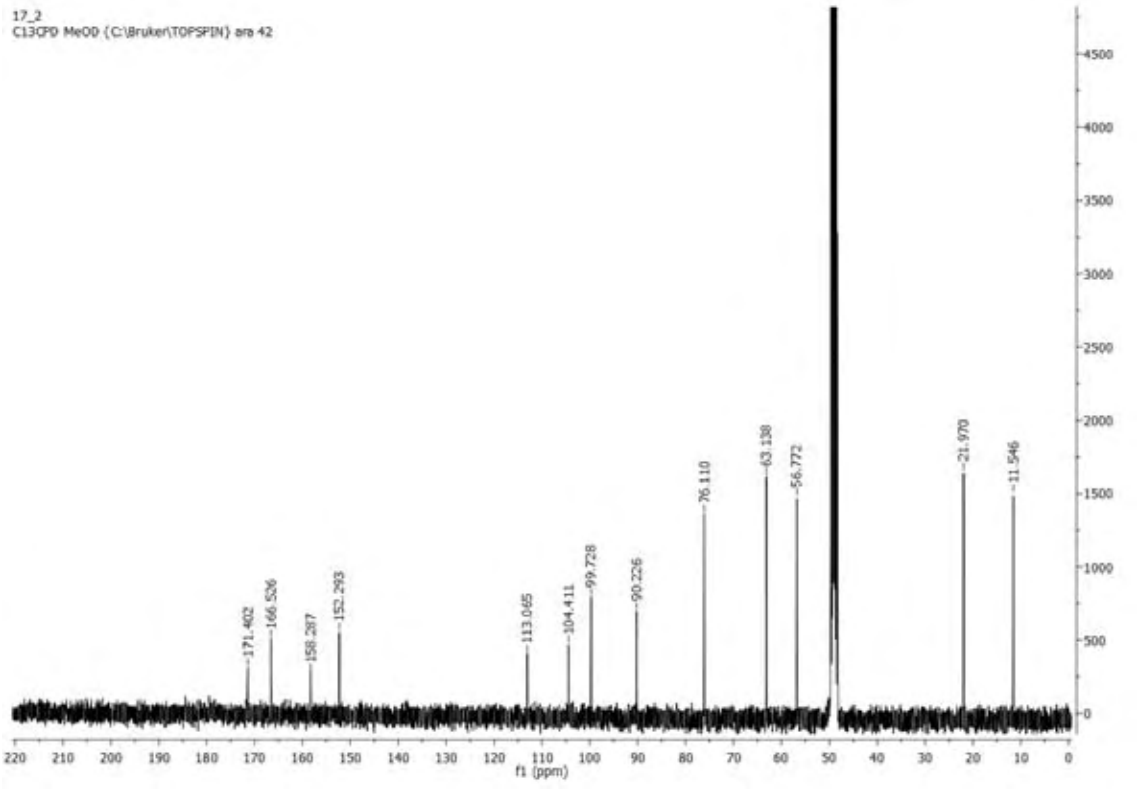
Apêndice 11 – Espectro de massas substância 2, modo negativo



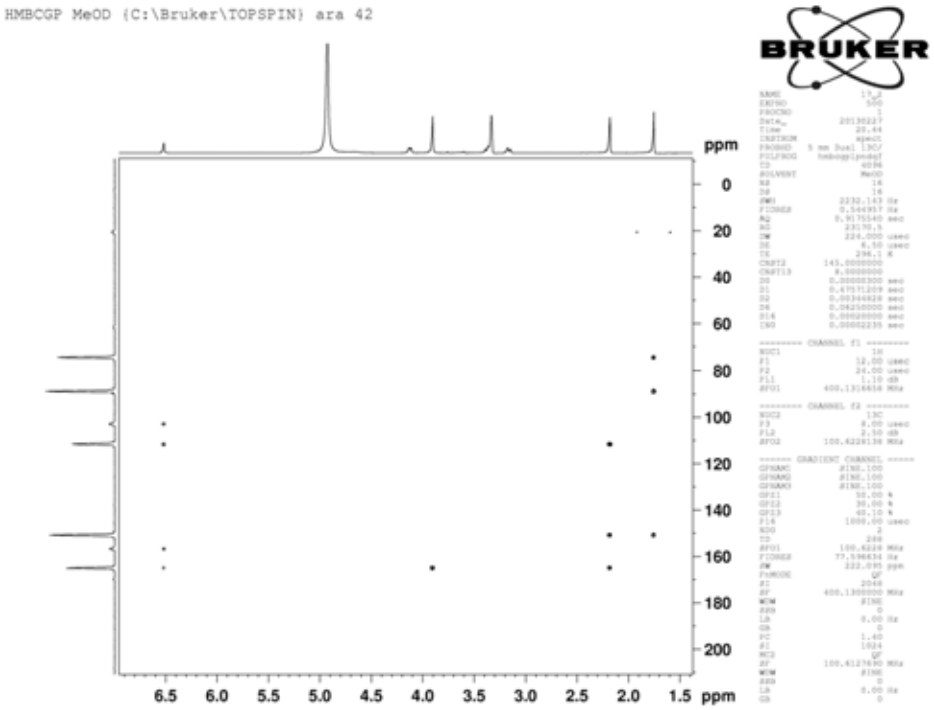
Apêndice 12 – RMN de ^{1}H substância 3 (300MHz, CD_3OD)



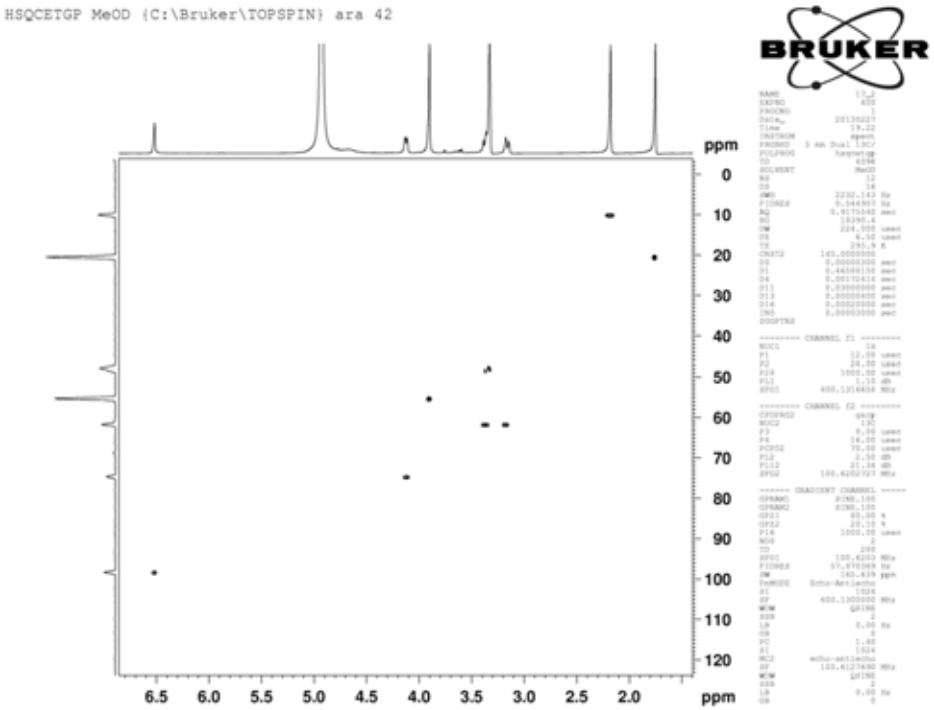
Apêndice 13 – RMN de ^{13}C substância 3 (100MHz, CD_3OD)



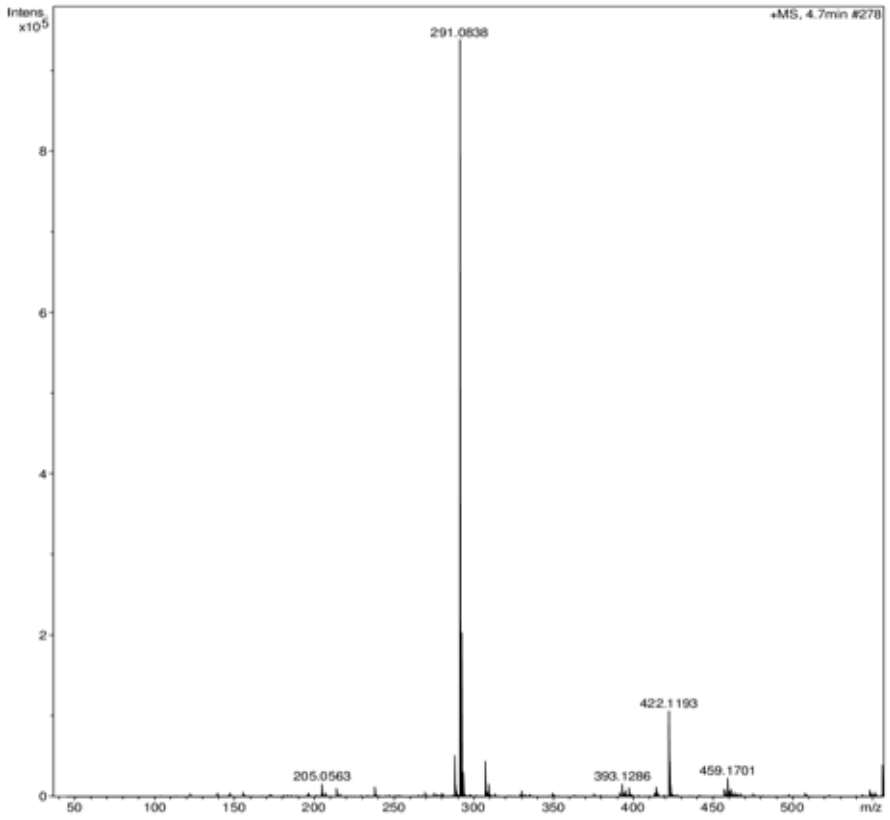
Apêndice 14 – Mapa de contorno HMBC substância 3



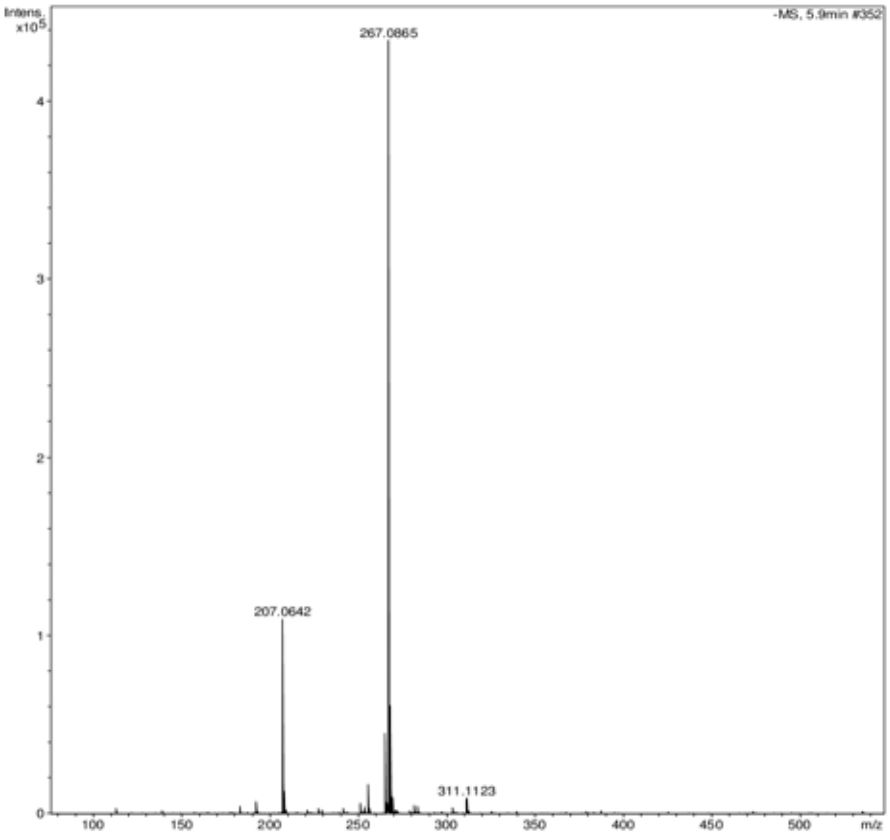
Apêndice 15 – Mapa de contorno HSQC substância 3



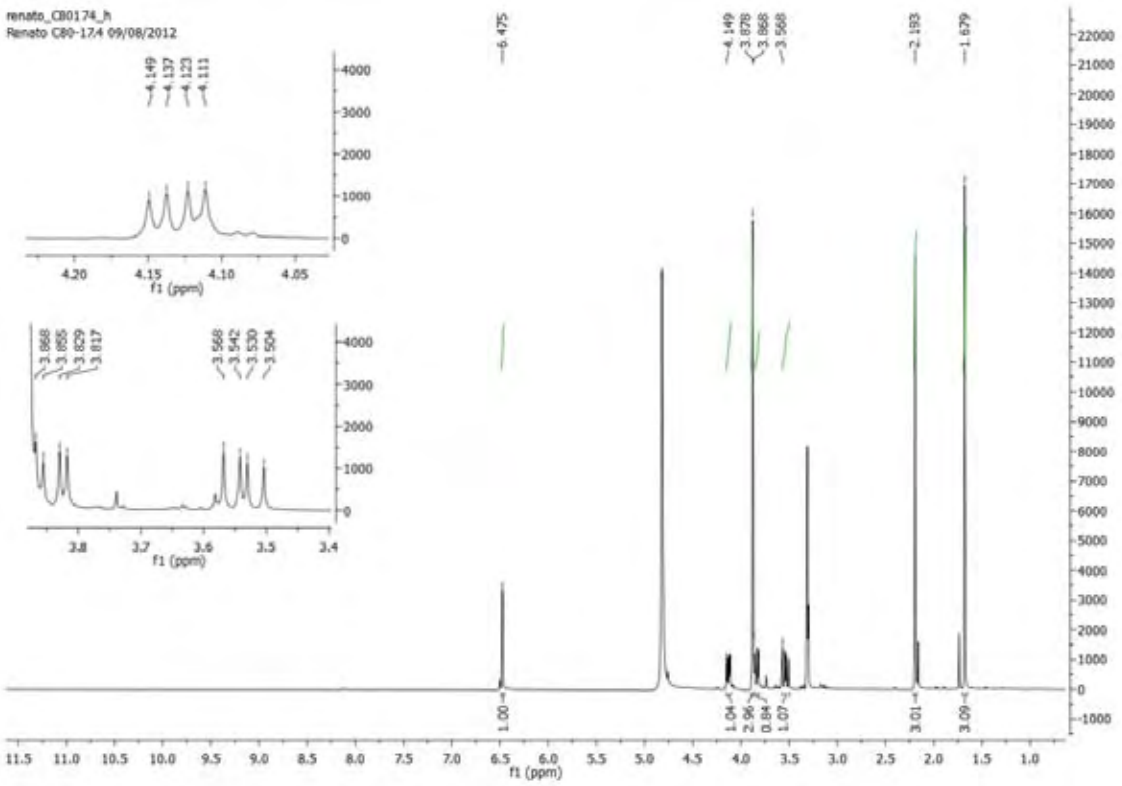
Apêndice 16 – Espectro de massas substância 3, modo positivo



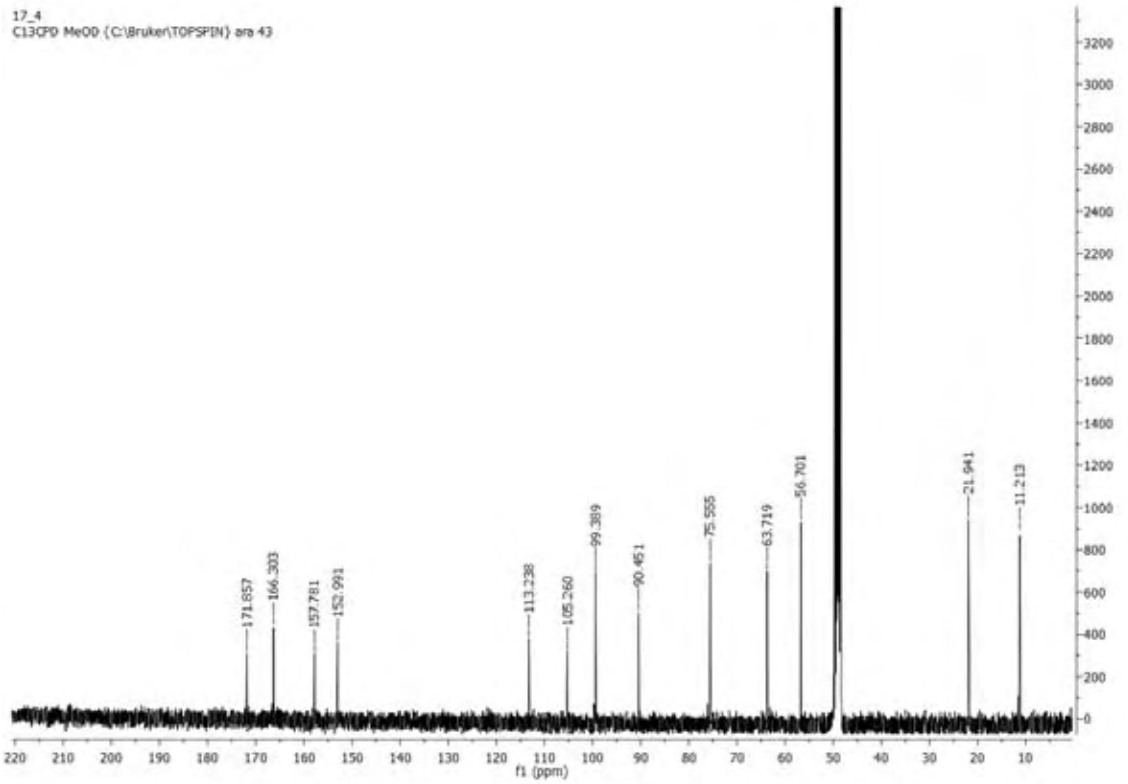
Apêndice 17 – Espectro de massas substância 3, modo negativo



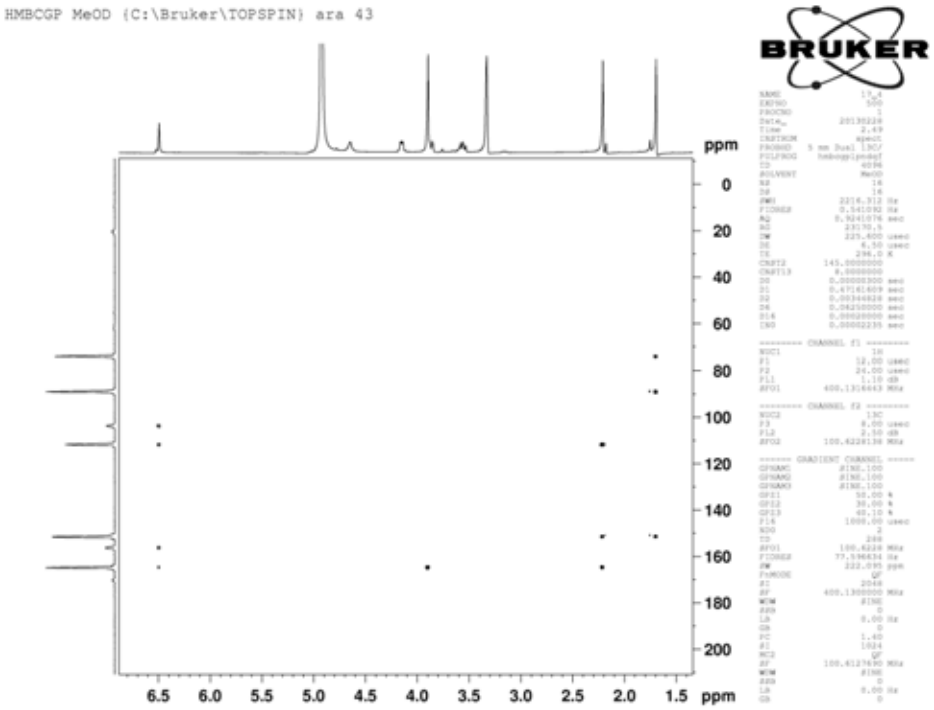
Apêndice 18 – RMN de ^{1}H substância 4 (300MHz, CD_3OD)



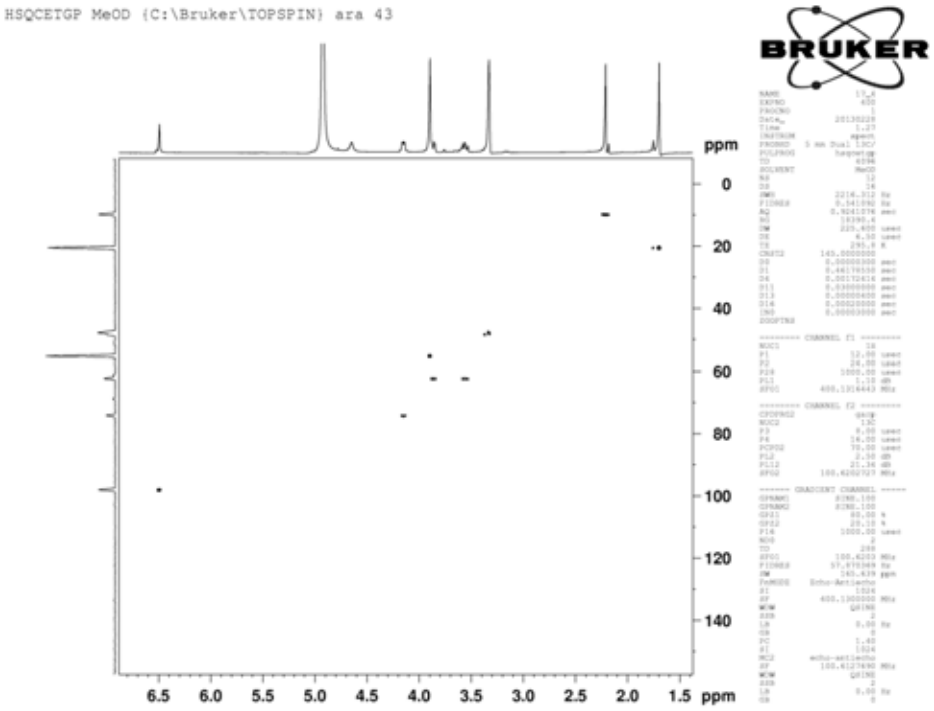
Apêndice 19 – RMN de ^{13}C substância 4 (100MHz, CD_3OD)



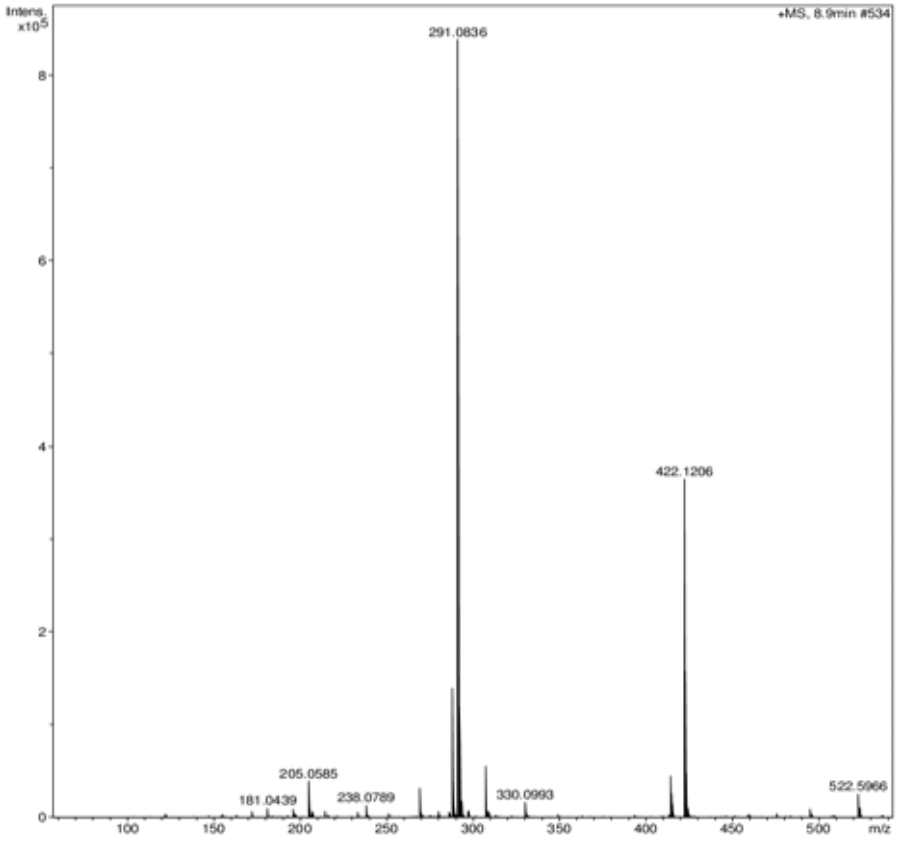
Apêndice 20 – Mapa de contorno HMBC substância 4



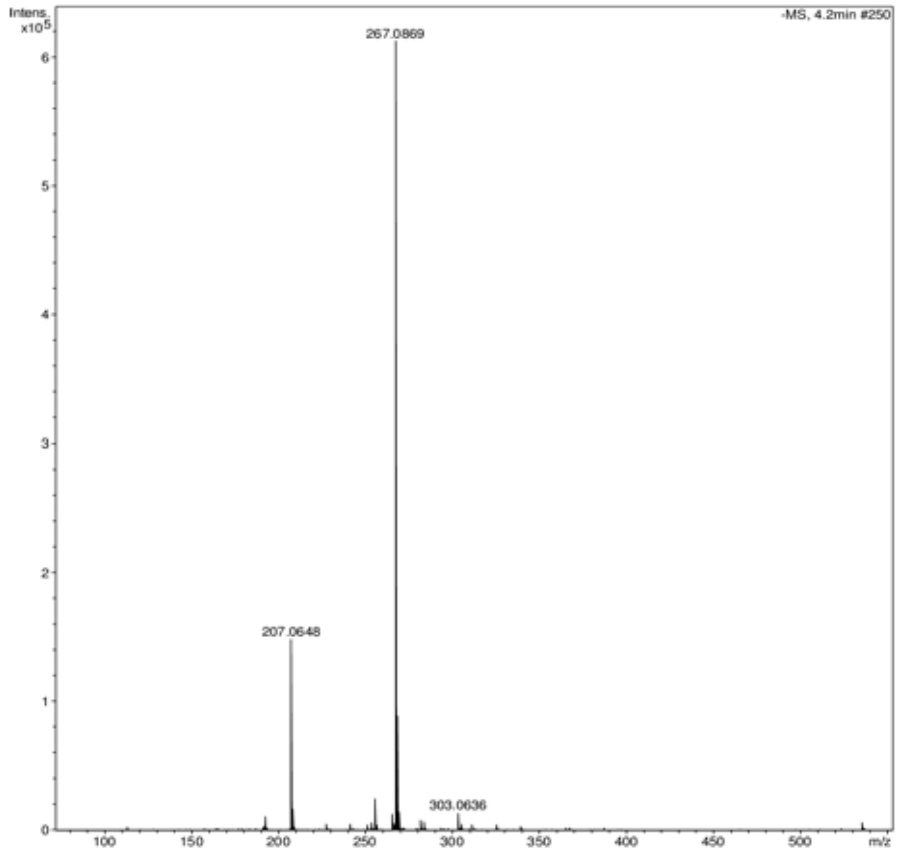
Apêndice 21 – Mapa de contorno HSQC substância 4



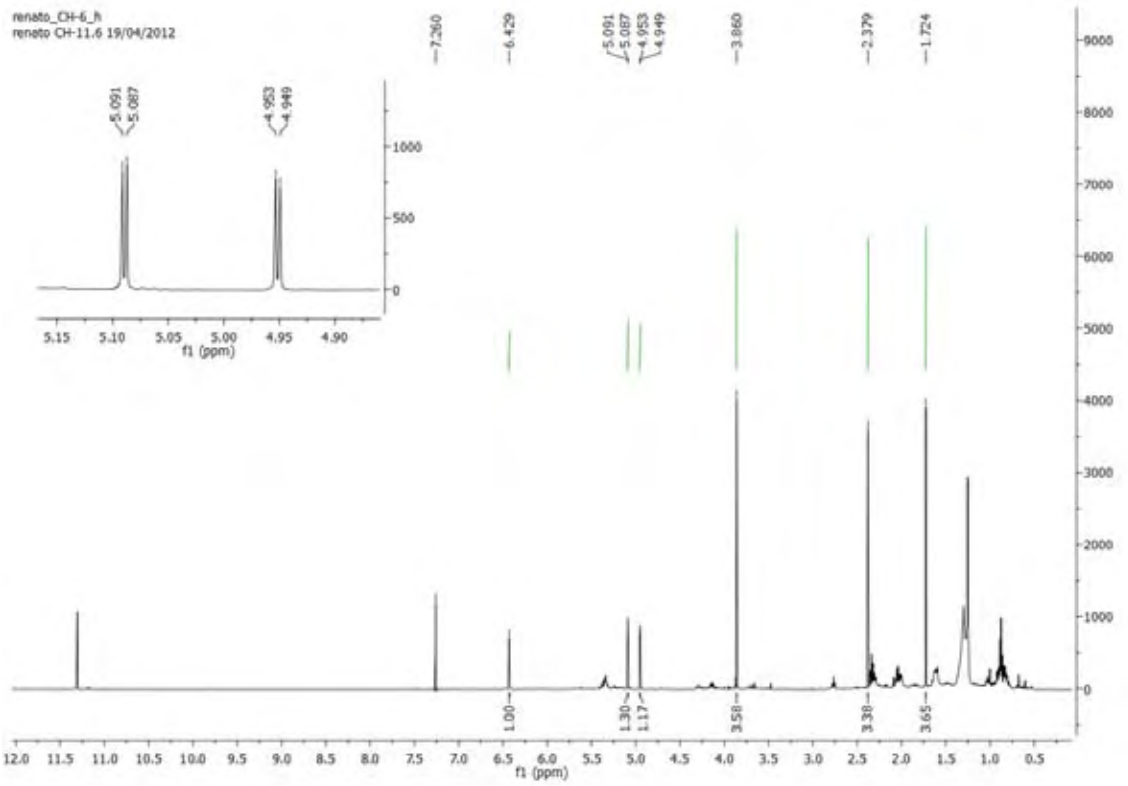
Apêndice 22 – Espectro de massas substância 4, modo positivo



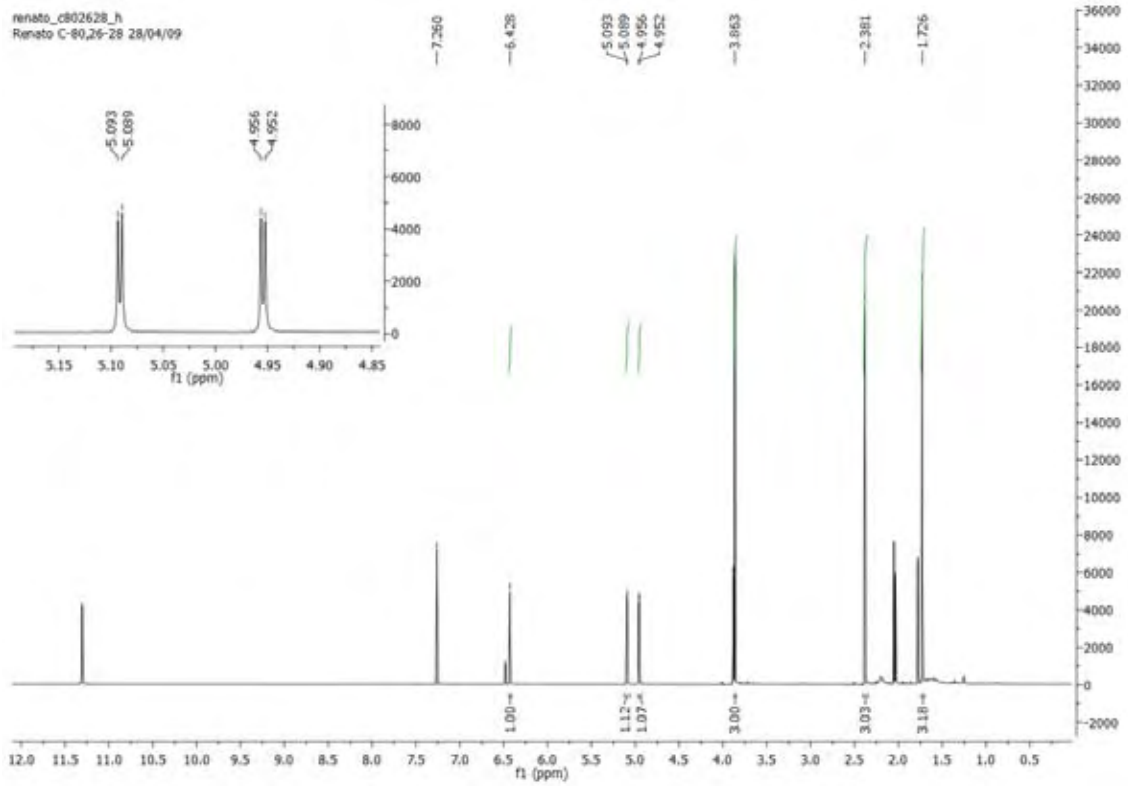
Apêndice 23 – Espectro de massas substância 4, modo negativo



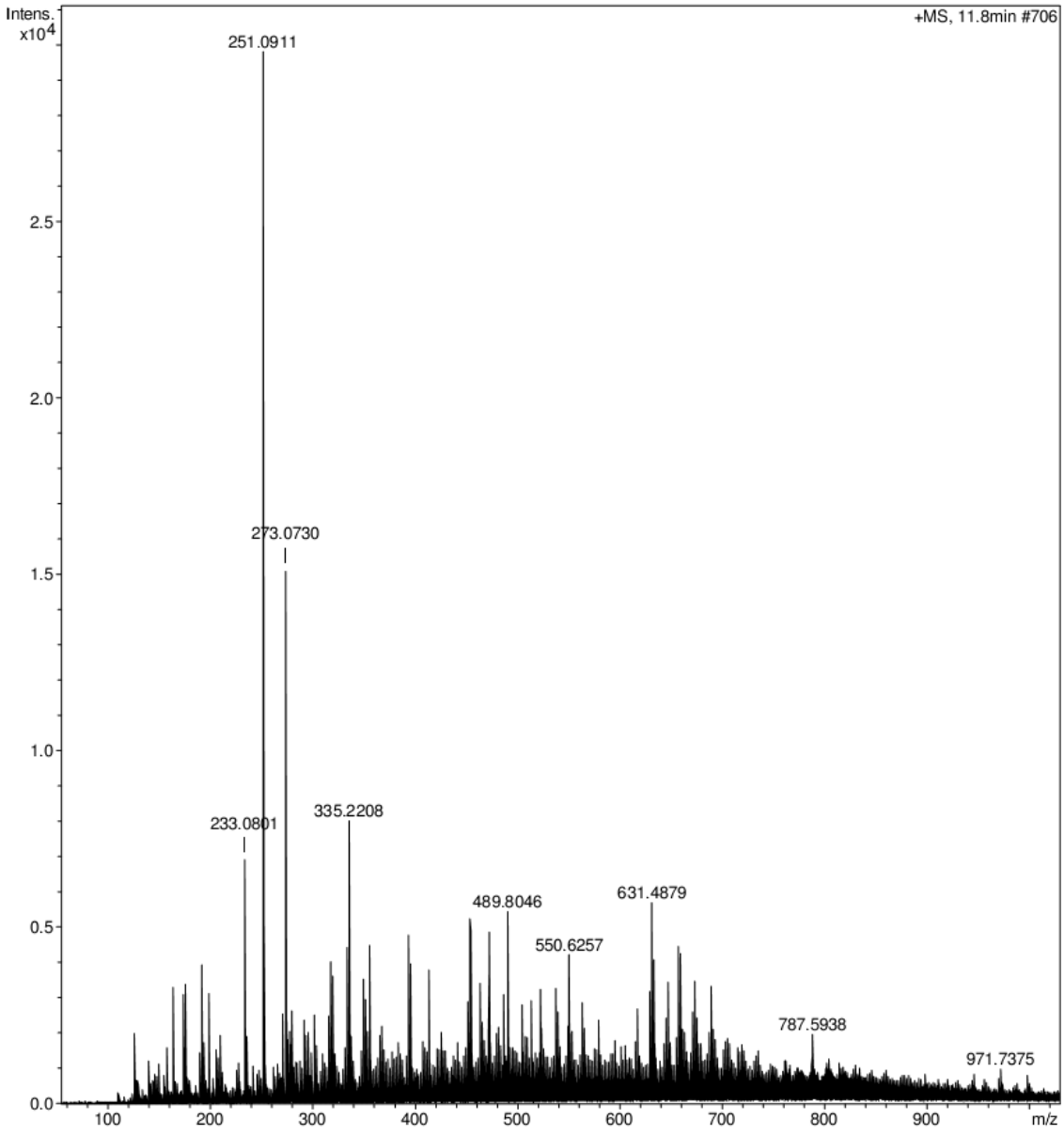
Apêndice 24 – RMN de ^{1}H substância 5 (500MHz, $CDCl_3$)



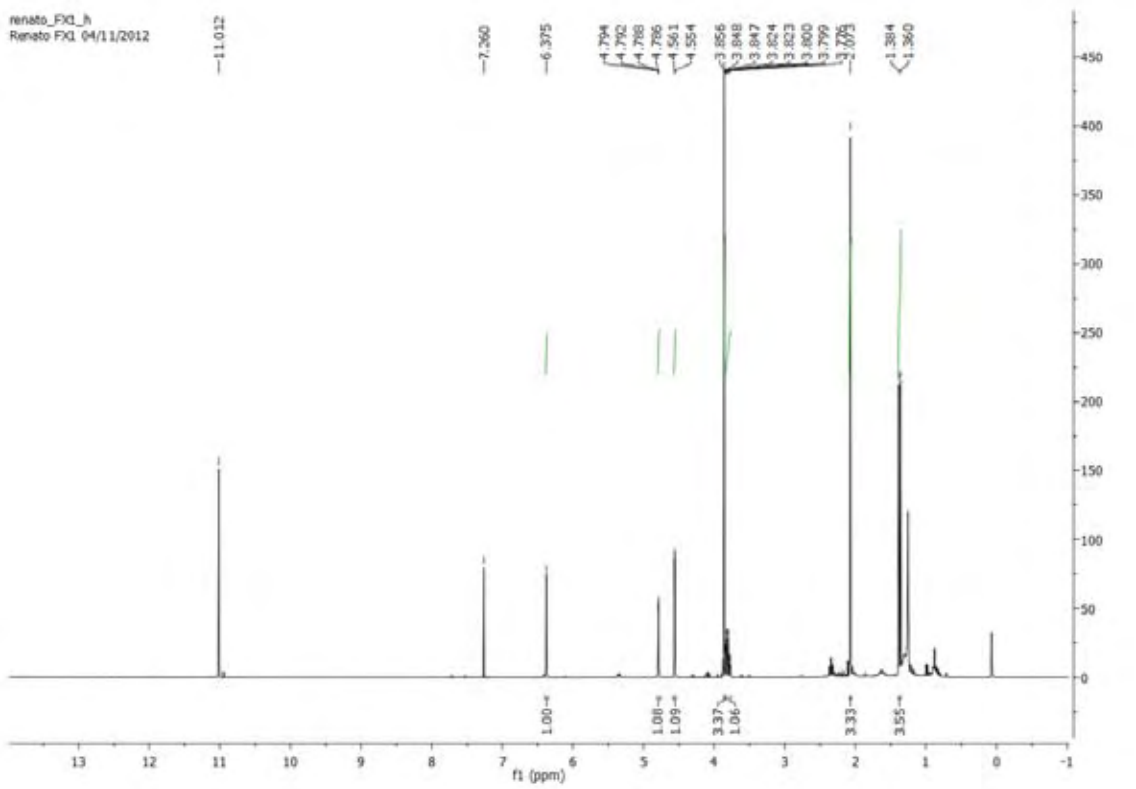
Apêndice 25 – RMN de ^{1}H substância 5 isolada na monografia (500MHz, $CDCl_3$)



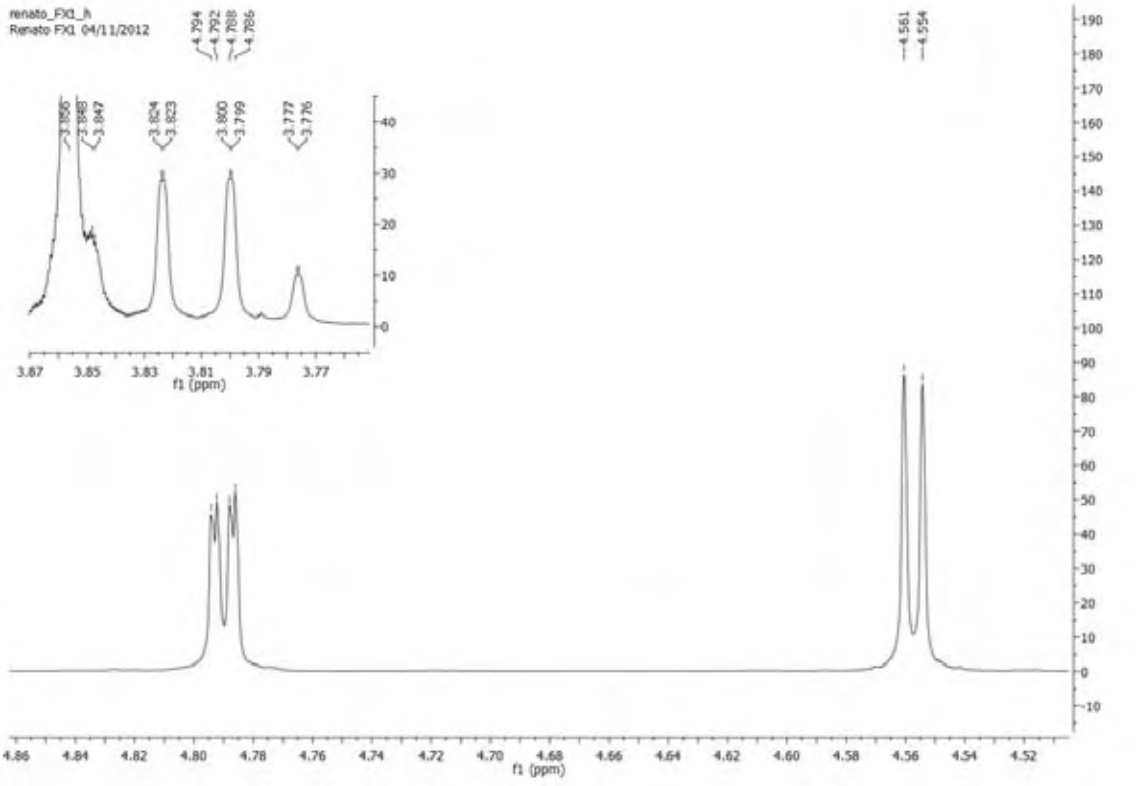
Apêndice 26 – Espectro de massas substância 5, modo positivo



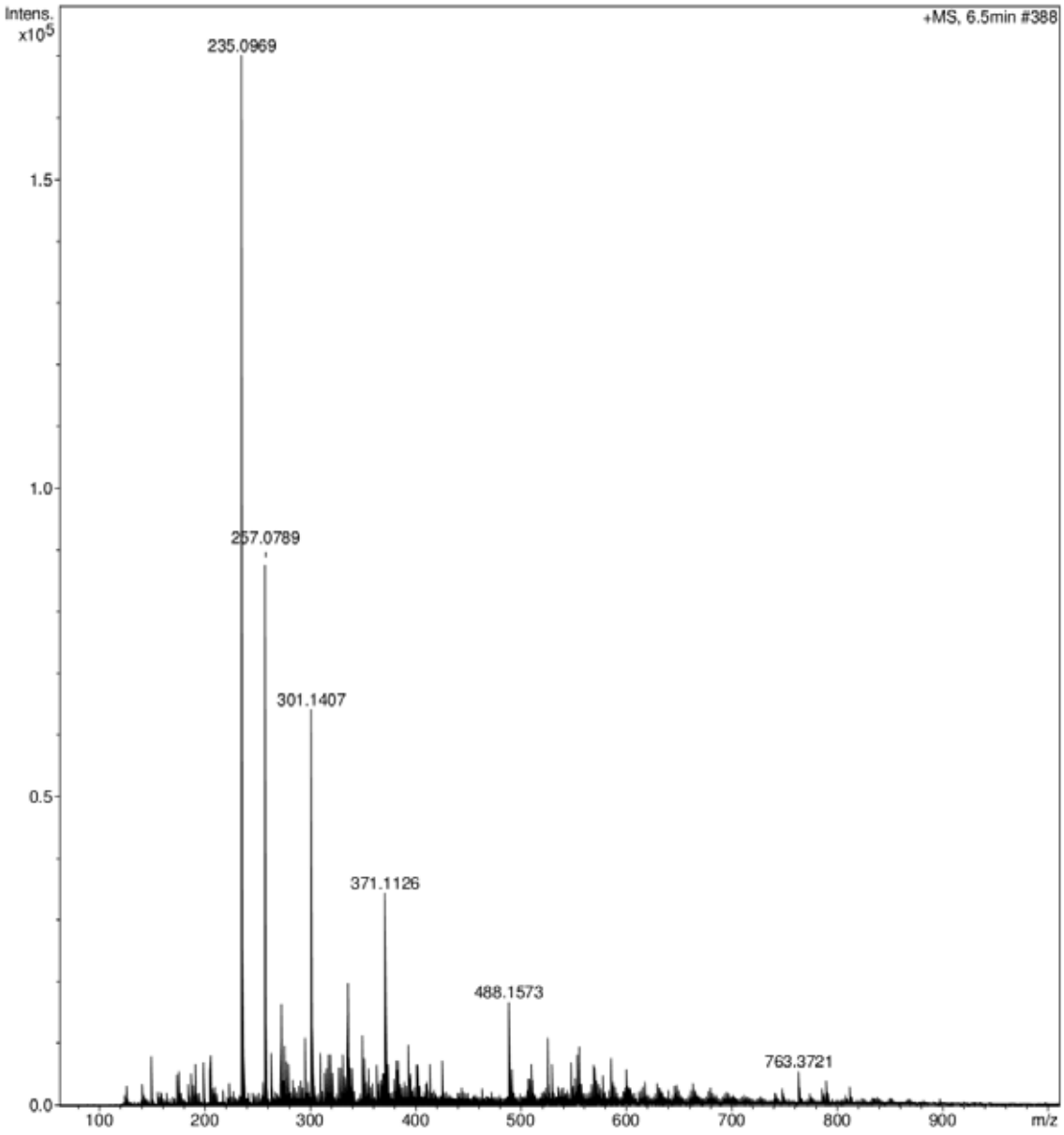
Apêndice 27 – RMN de ^{1}H substância 6 (300MHz, $CDCl_3$)



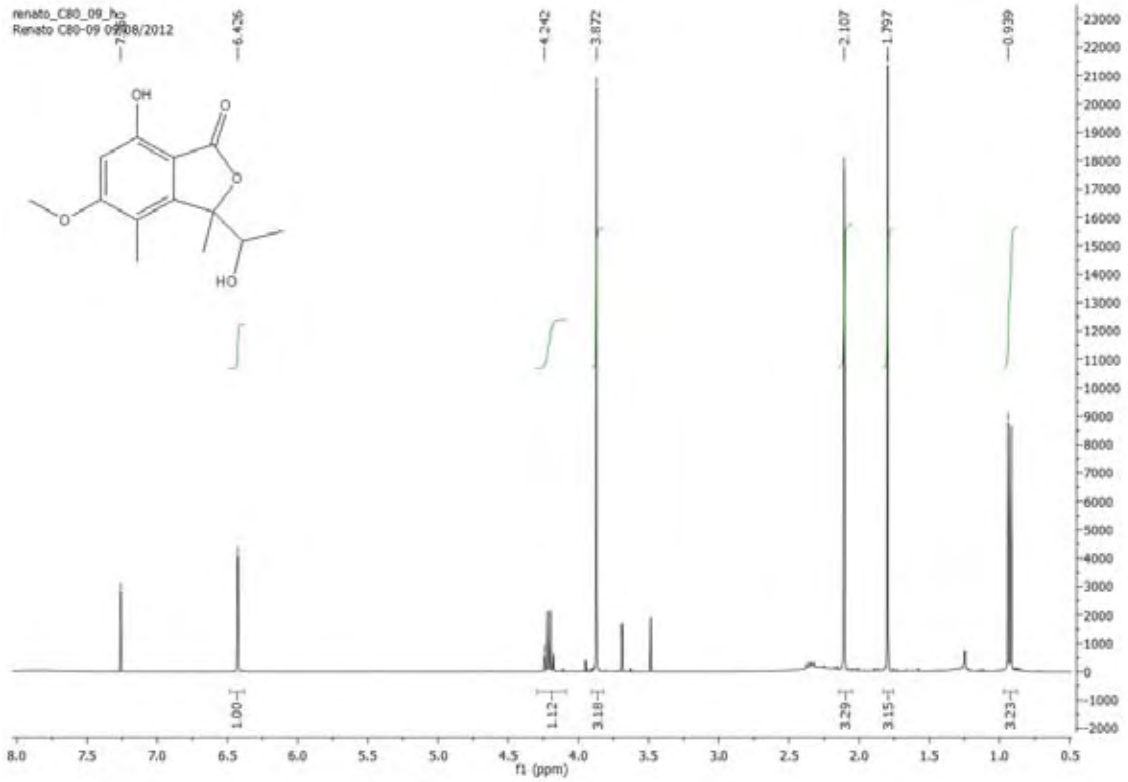
Apêndice 28 – Ampliação RMN de ^{1}H substância 6 (300MHz, $CDCl_3$)

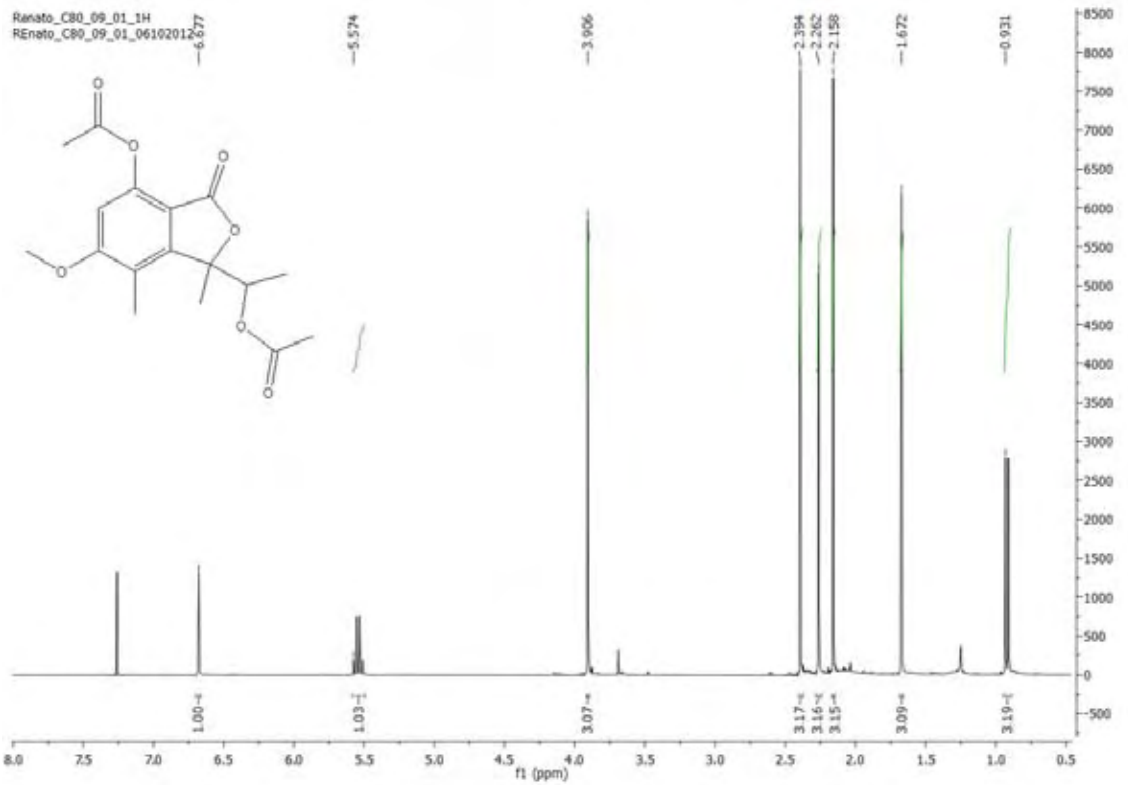


Apêndice 29 – Espectro de massas substância 6, modo positivo

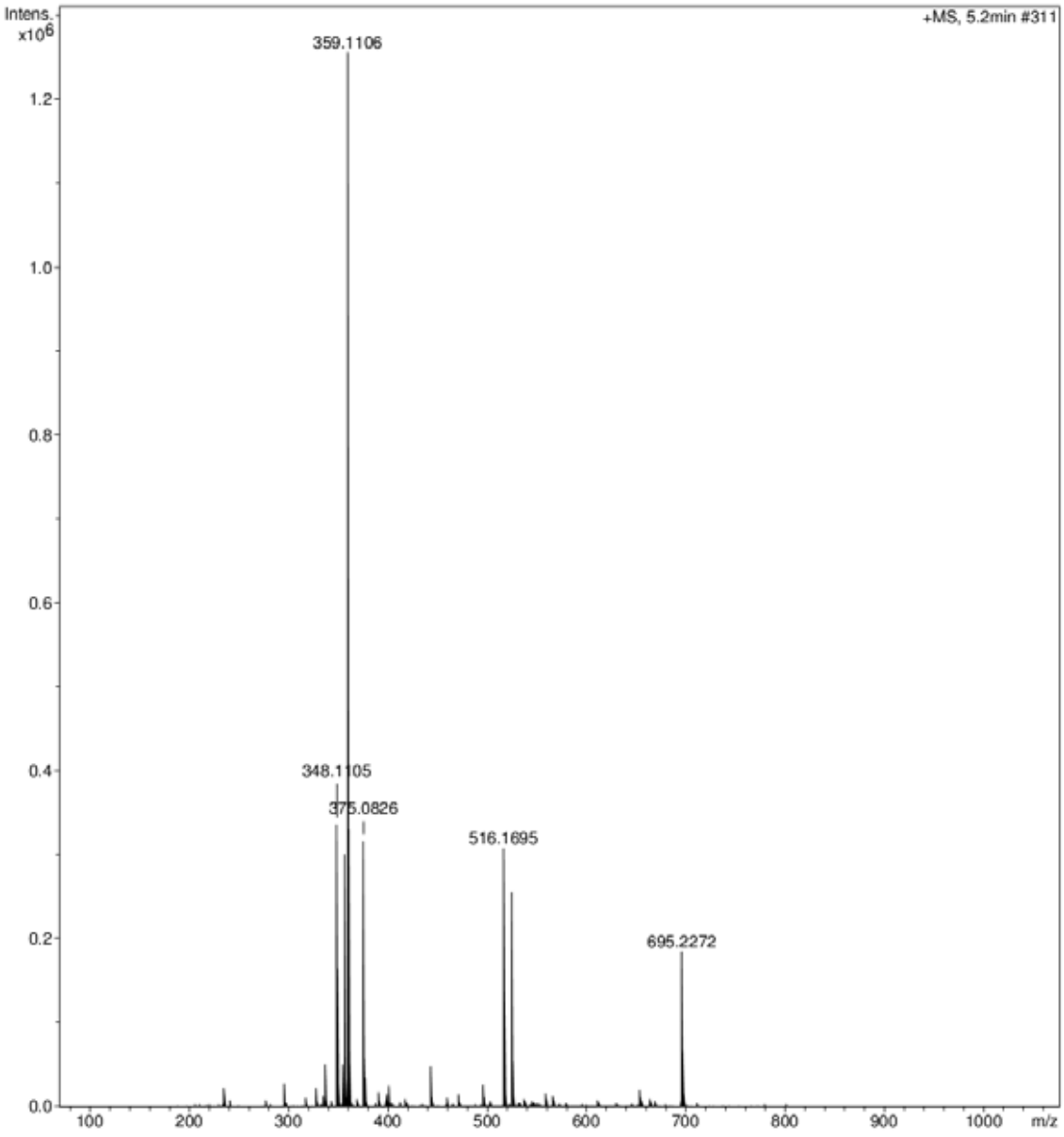


Apêndice 30 – Comparação dos espectros de RMN de ^{1}H, acetilação

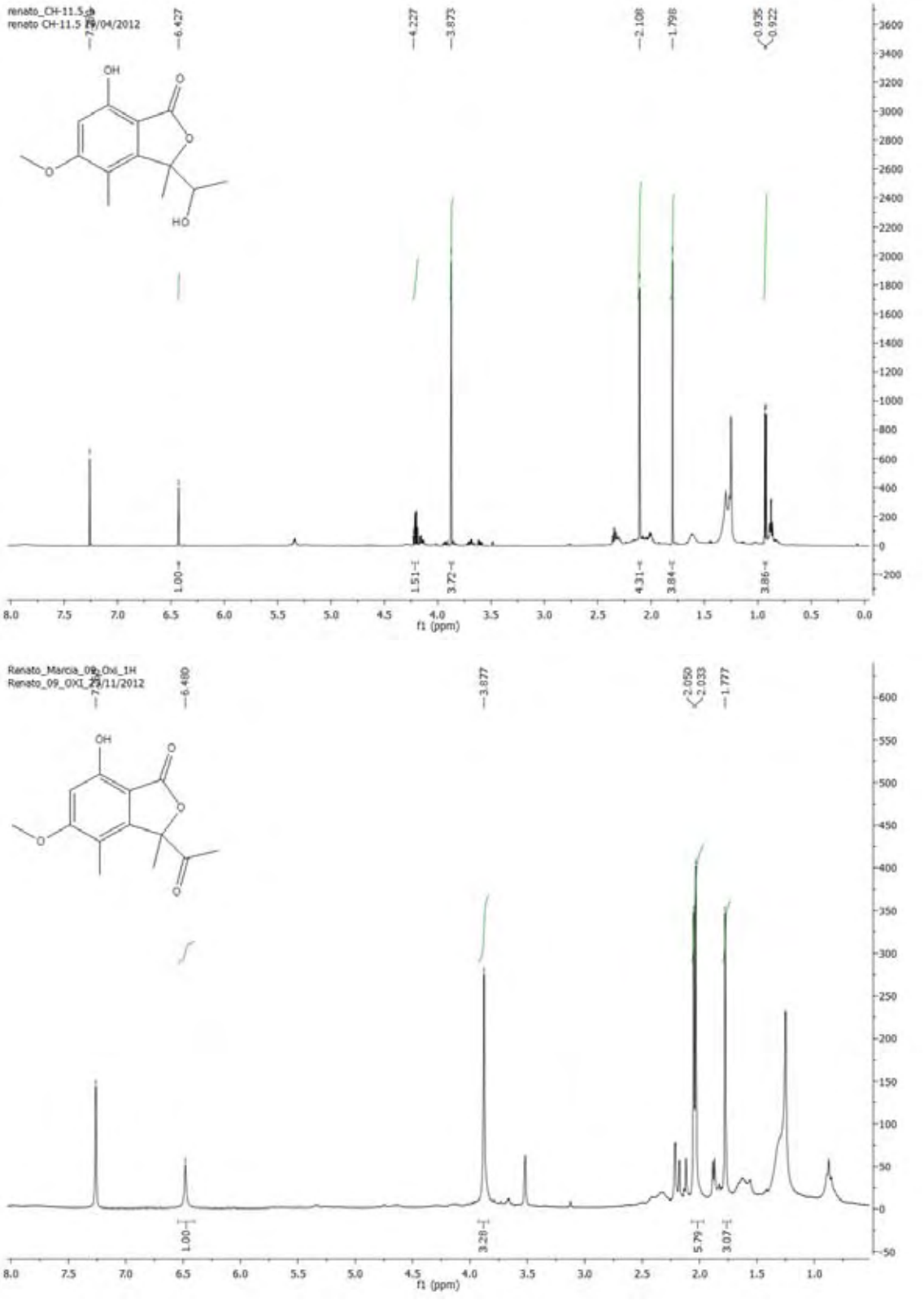




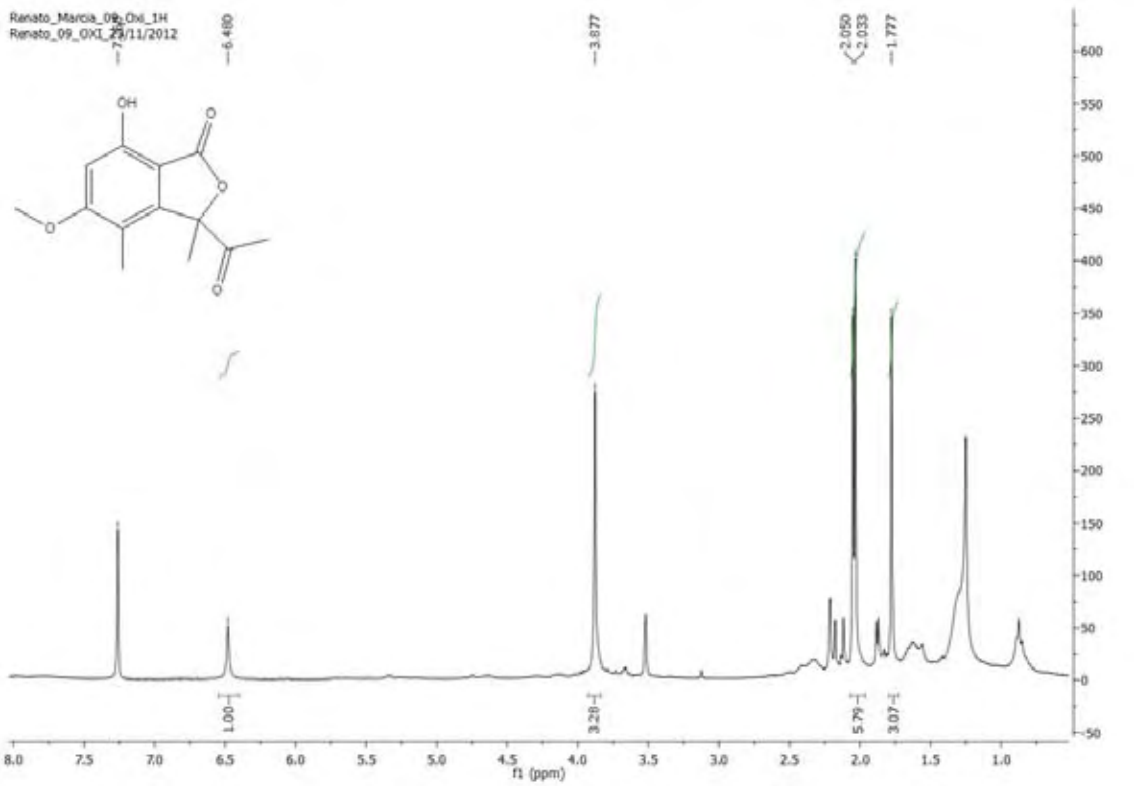
Apêndice 31 – Espectro de massas do produto acetilado, modo positivo

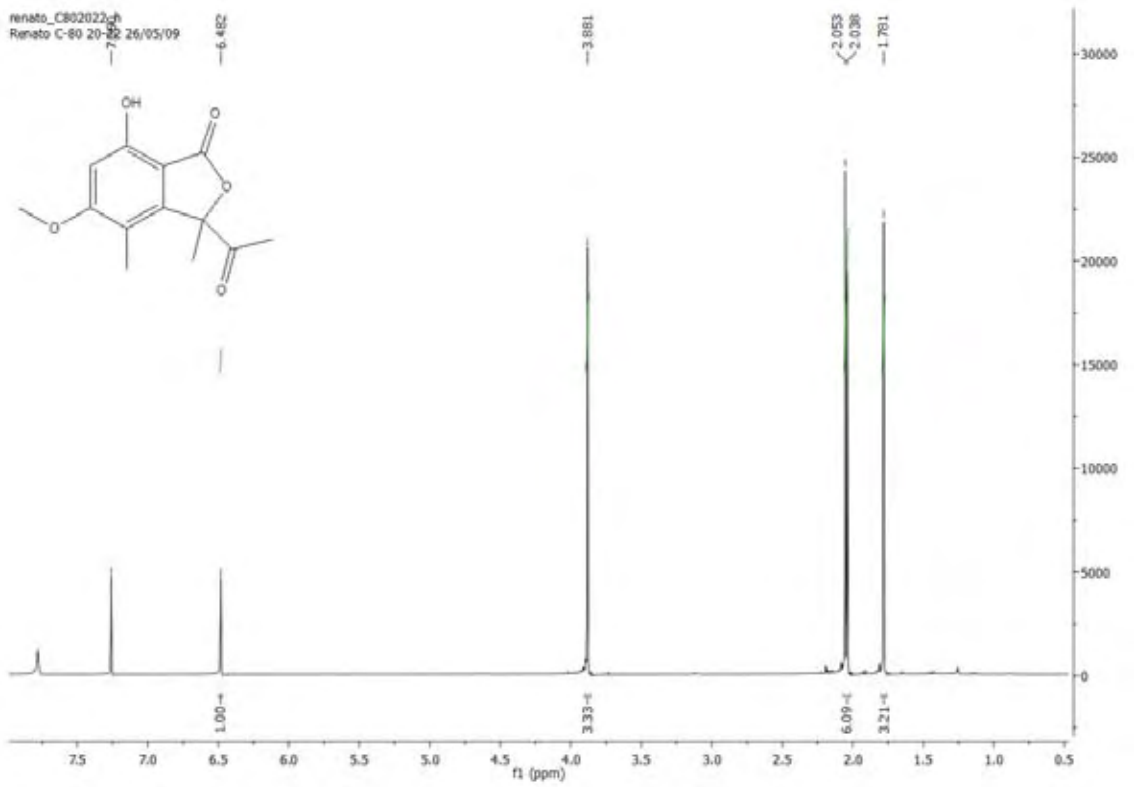


Apêndice 32 – Comparação dos espectros de RMN de ^{1}H, oxidação

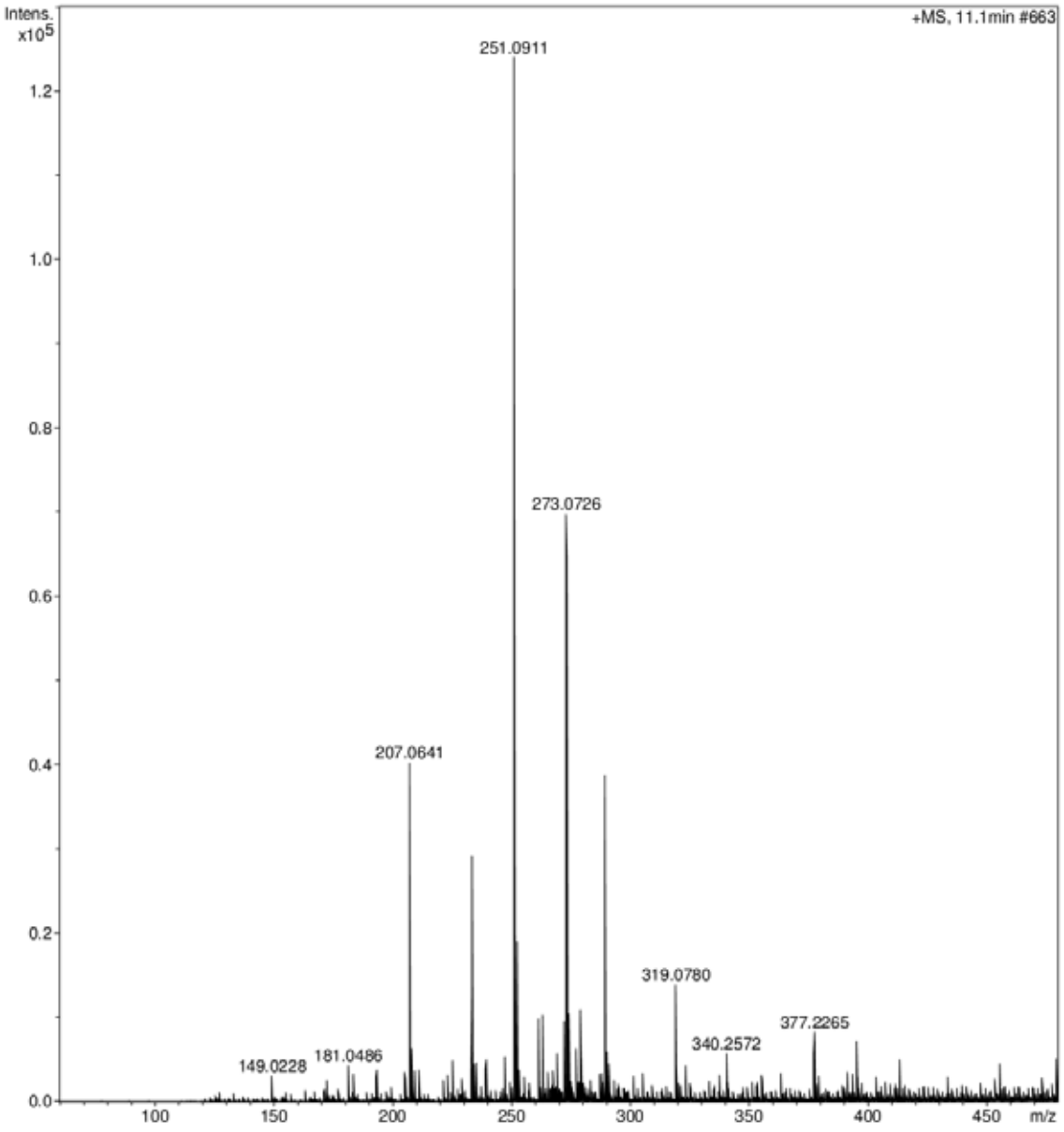


Apêndice 33 – Espectros de RMN de ^{1}H, produto da oxidação e produto natural

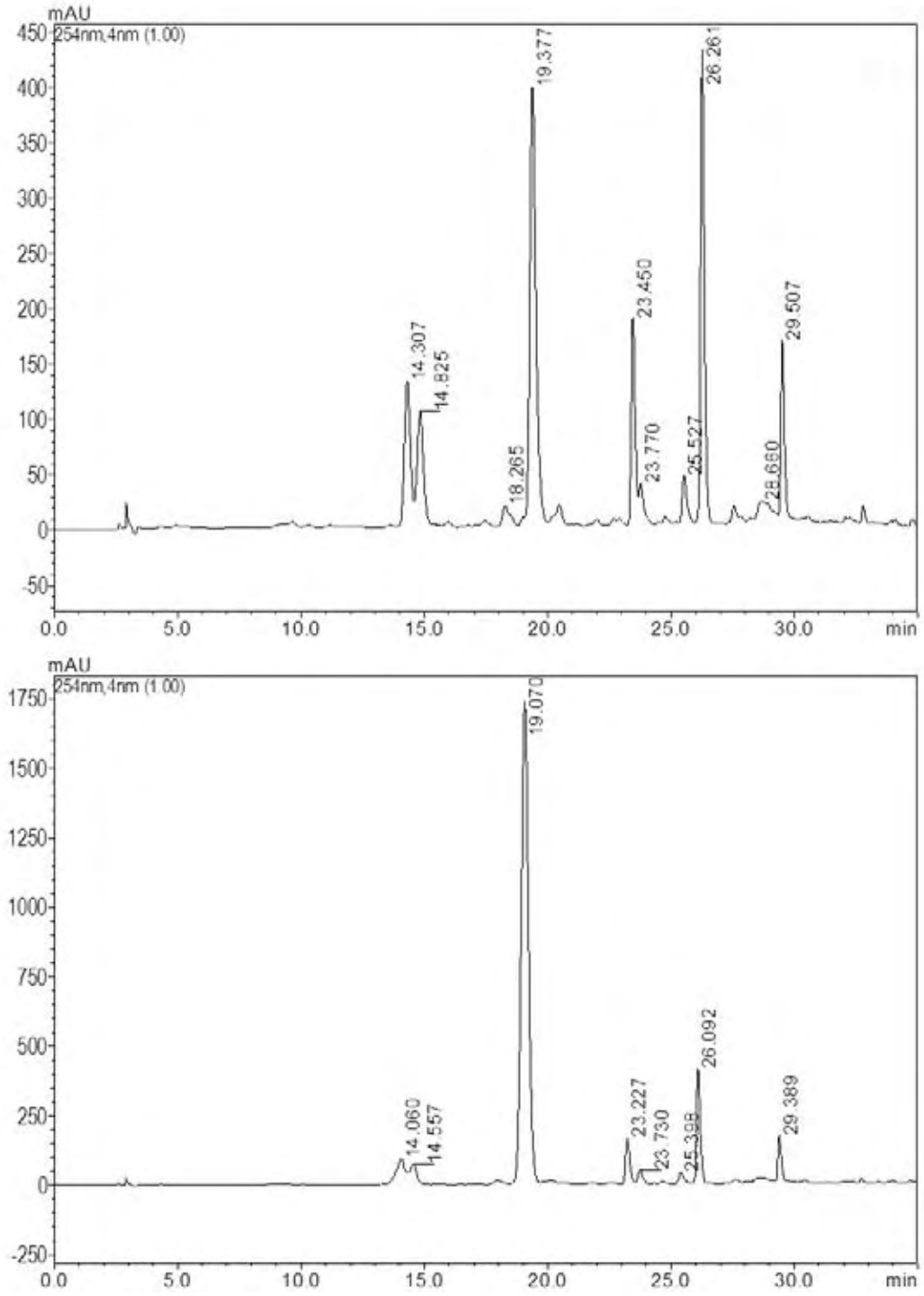




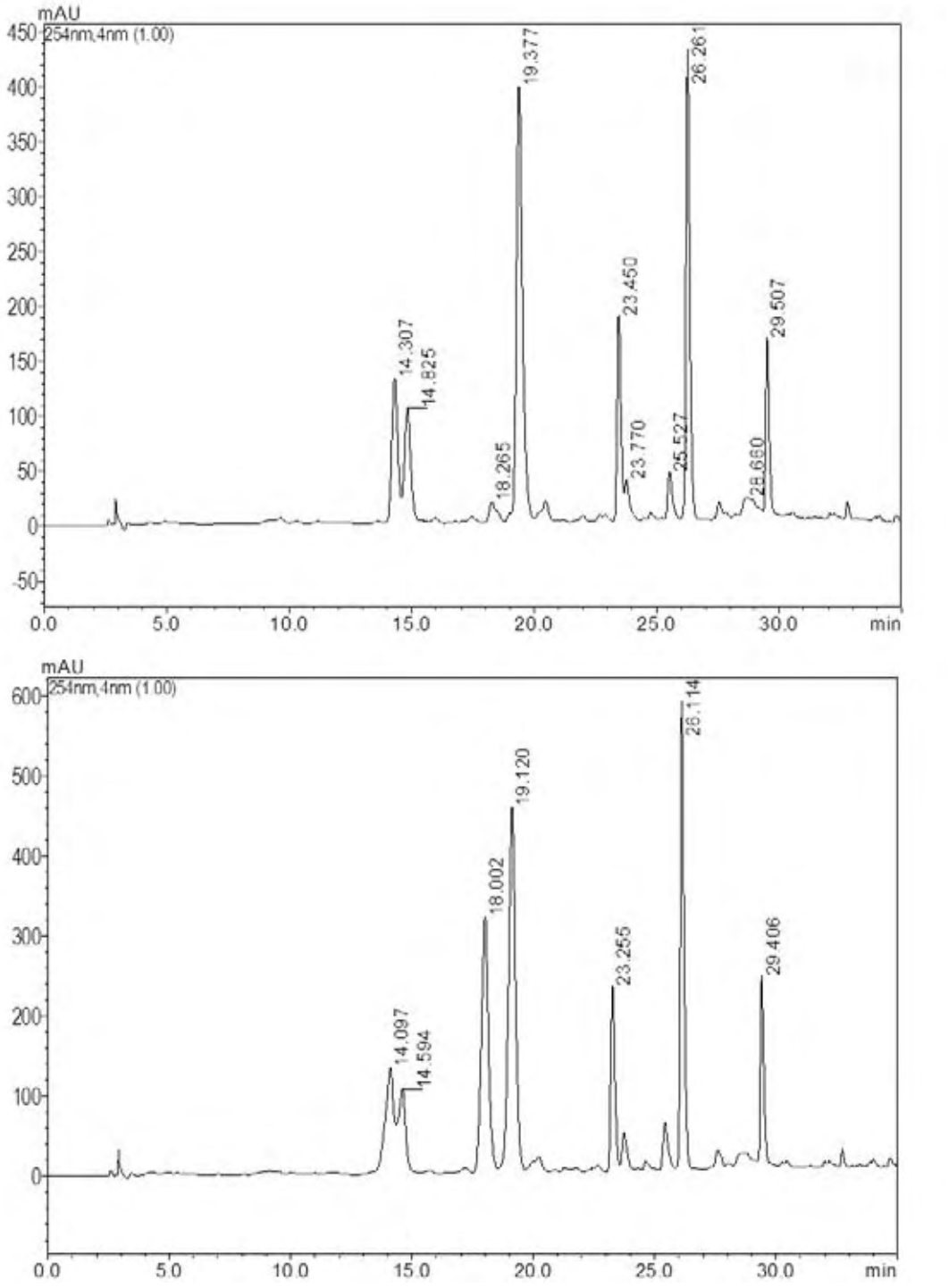
Apêndice 34 – Espectro de massas do produto oxidado, modo positivo



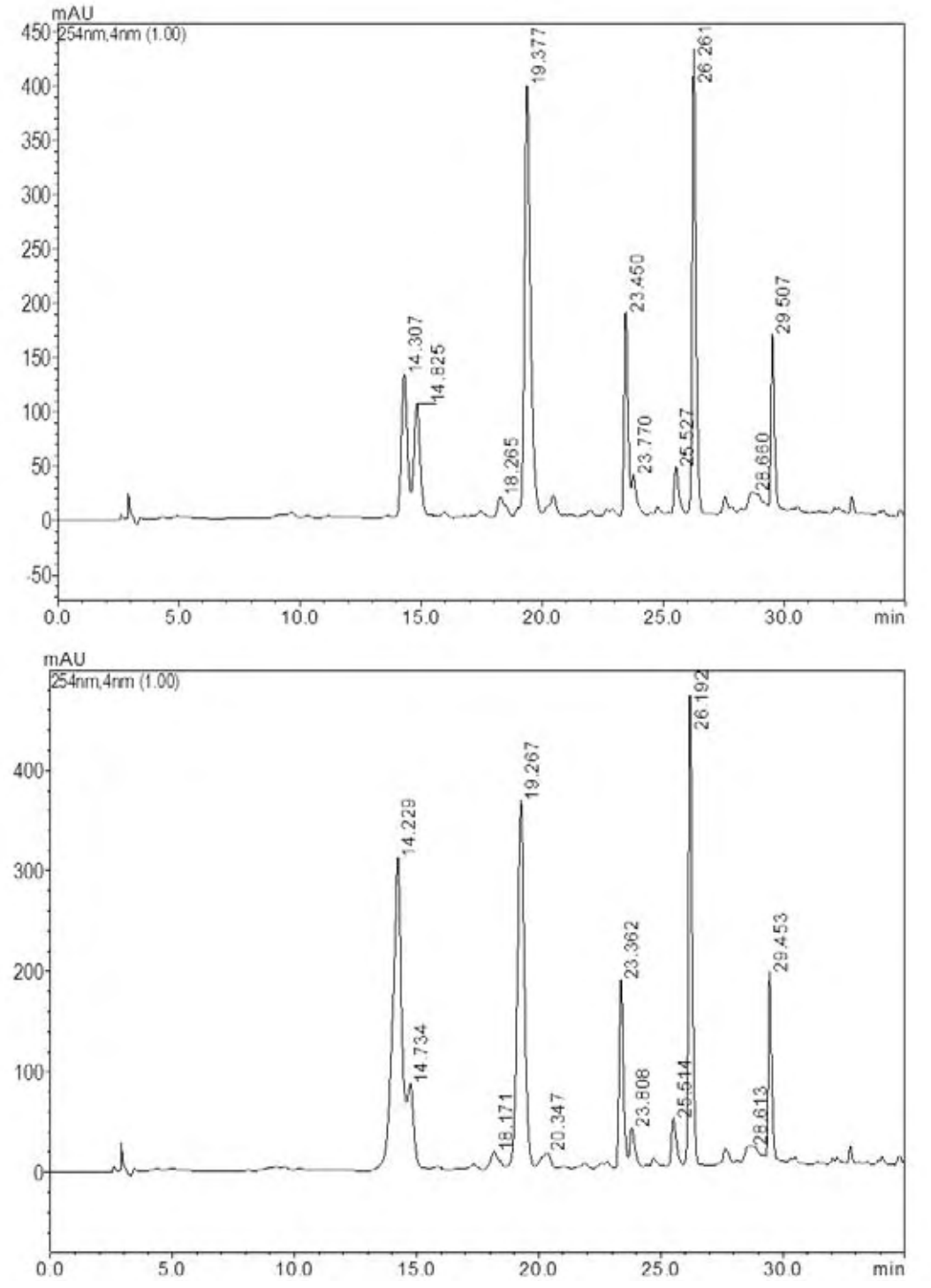
Apêndice 35 – Co-injeção substância 1



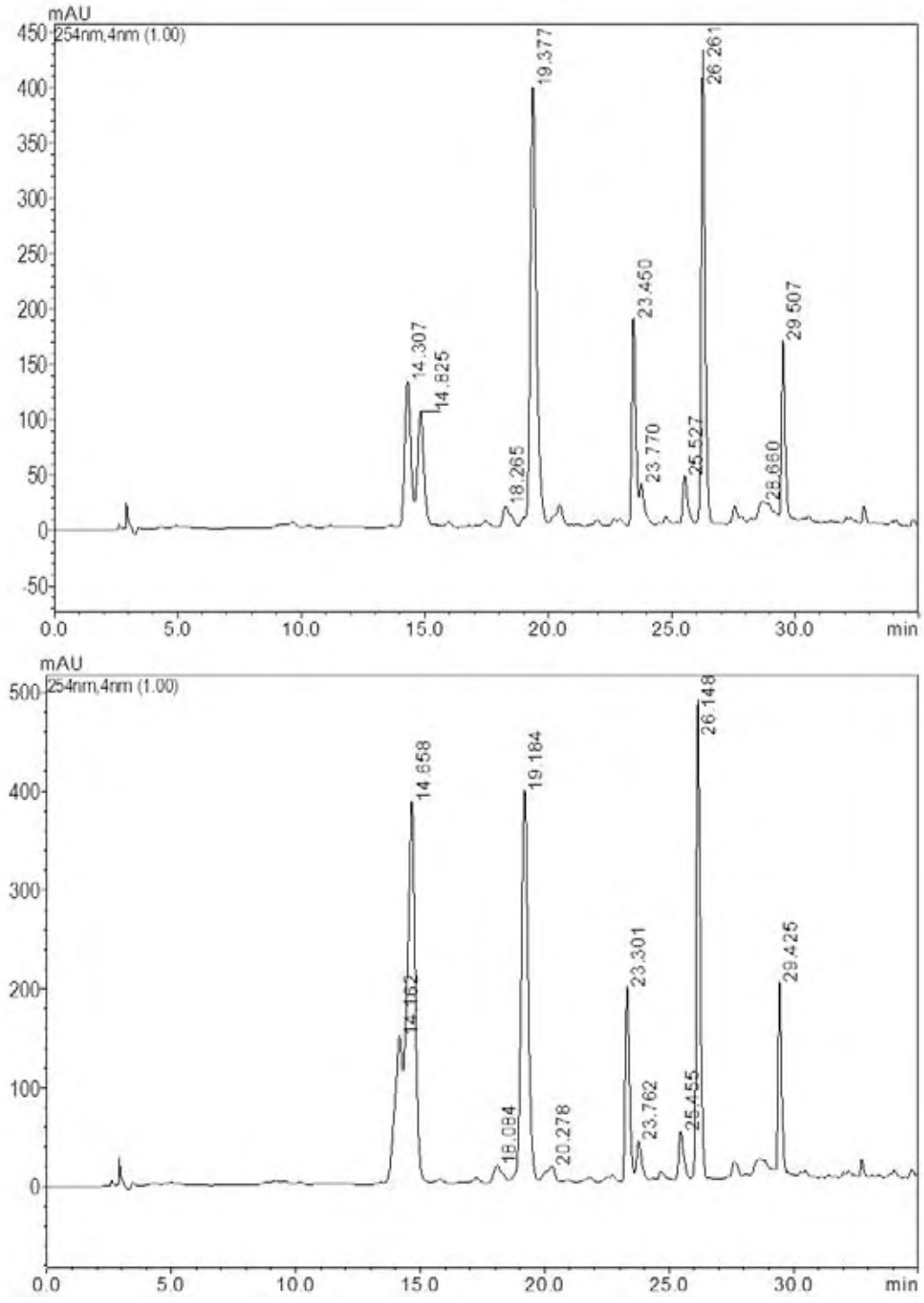
Apêndice 36 – Co-injeção substância 2



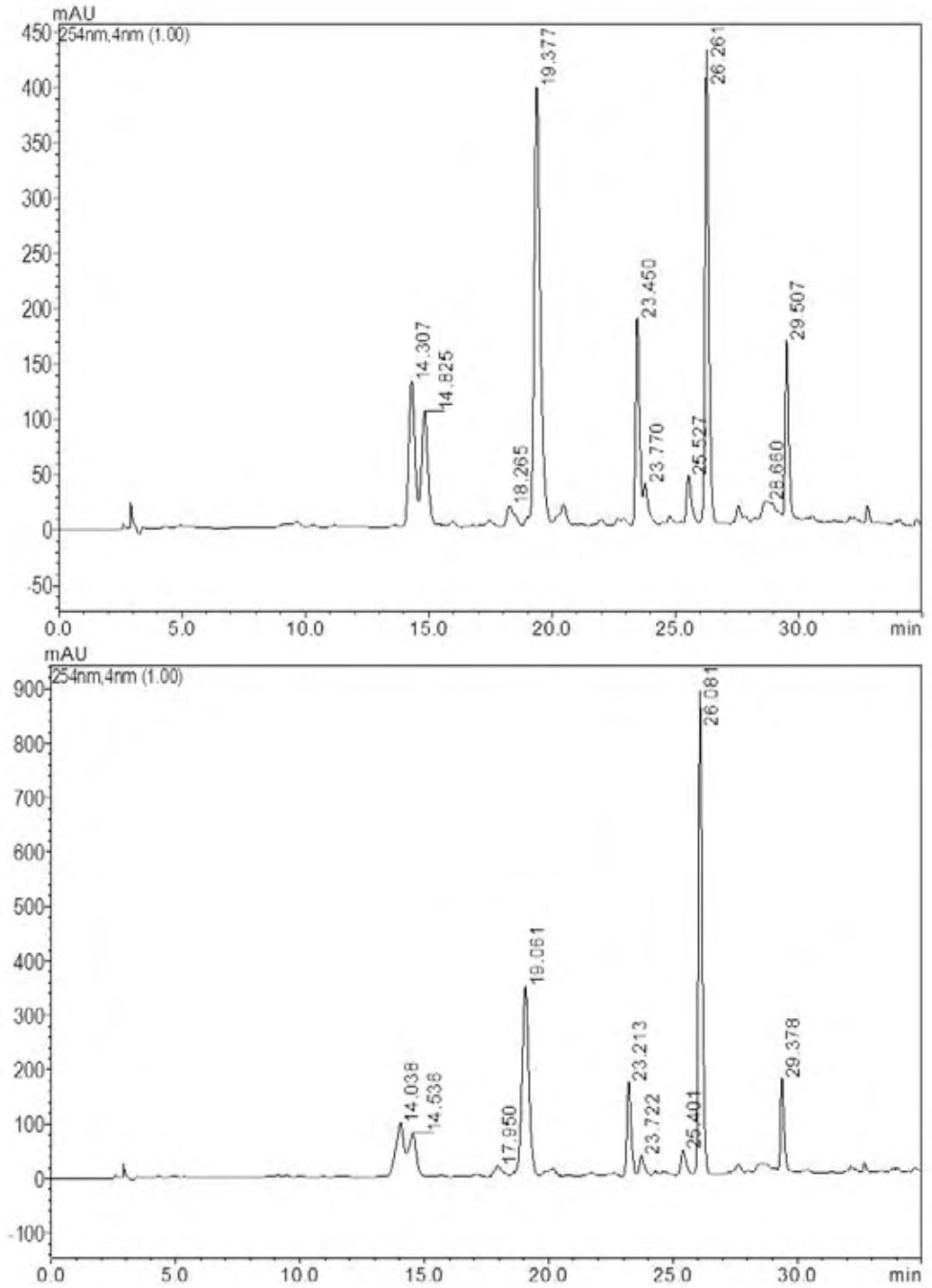
Apêndice 37 – Co-injeção substância 3



Apêndice 38 – Co-injeção substância 4



Apêndice 39 – Co-injeção substância 5



Apêndice 40 – Co-injeção substância 6

