

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GISLAINE FELIPPE MARTINS

**Prospecção de griseofulvina, um potente  
antimicótico, em fungos endofíticos do gênero  
*Xylaria* sp. isolados de espécies vegetais do Cerrado**

Profa. Dra. Angela Regina Araujo

**Orientadora**

**Araraquara**

**-2016-**

GISLAINE FELIPPE MARTINS

**Prospecção de griseofulvina, um potente antimicótico, em  
fungos endofíticos do gênero *Xylaria* sp. isolados de espécies  
vegetais do Cerrado**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Profa. Dra. Angela Regina Araujo  
**Orientadora**

**Araraquara**  
**-2016-**

FICHA CATALOGRÁFICA

M379p Martins, Gislaine Felipe  
Prospecção de griseofulvina, um potente antimicótico, em fungos endofíticos do gênero *Xylaria* sp. isolados de espécies vegetais do Cerrado / Gislaine Felipe Martins. – Araraquara-SP : [s.n.], 2016  
204 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos. 3. Análise cromatográfica. 4. Citotoxicidade. 5. Atividade antifúngica.  
I. Título.

GISLAINE FELIPPE MARTINS

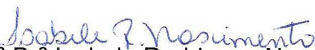
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 11 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araújo (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª Drª Isabele Rodrigues Nascimento  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Dr. Nivaldo Boralle  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Drª Adriana Aparecida Lopes  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Ribeirão Preto -SP



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

Agradeço a Deus, e aos meus familiares pelo  
amor e apoio incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e força nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, que foram meus primeiros professores nessa escola que se chama vida.

À Profa. Dra. Angela Regina Araujo, pela disponibilidade de orientação, pela paciência, dedicação, e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Geraldo H. Silva e Cláudio Rodrigo Nogueira pela ajuda nas determinações estruturais.

À Dra. Lucinéia e ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade e pelos momentos de descontração no café e também pela realização dos espectros de RMN.

Ao João pela realização das análises de Espectrometria de Massas.

Aos técnicos Juliana João, e Marquinhos pela ajuda, ensinamentos e amizade.

À Dra. Adriana Aparecida Lopes e ao Dr. Nivaldo Borale pelas valiosas contribuições no meu exame de Qualificação, e pela disponibilidade em estarem na minha defesa em conjunto com a Profa. Isabele, com quem tenho uma profunda admiração e carinho, e com o Prof. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, agradeço a todos pela presença no fechamento deste ciclo.

Às Profa. Dra. Andréia Morandim, Profa. Dra. Maria Luíza Zeraik, Dr. Gabriel e ao Mestrando Richard pelo tratamento dos dados estatísticos e ajuda nas análises.

As pessoas que auxiliaram em meu trabalho: Carol, Juliana, Júlia, Afif, Karina, Lidiane, Alana, Fernandinho, Richard, entre muitos outros... muito obrigada pelo carinho, disponibilidade e ajuda.

Aos amigos do IQ, em especial: Júlia, Bruninha, Doni, Juliano, Alexander, Juhzinha, Amauri e Carla pela paciência e momentos alegres e tristes, e como Garth Henrichs mencionou: a gente não amigos, reconhece-os... Tenho muito orgulho de tê-los encontrado nesse percurso.

As secretárias do departamento de Química Orgânica: Ângela, Fátima e Vilma pela ajuda, paciência e amizade.

À Marli e a todas as meninas da Alt Tec pelo café maravilhoso, pelas conversas descontraídas, e também pela companhia nos dias e horários ermos.

Às meninas da STPG: Wennia, Célia, Paula e Cíntia, que sempre foram muito atenciosas e exemplos de pessoas, sempre dispostas a nos ouvir e ajudar, o meu muito obrigada, o carinho e gratidão que sinto por vocês é imenso!

Às meninas da Seção de Comunicação, Valéria e Regina, que sempre foram muito queridas comigo, agradeço de coração.

À Gabriela da AGREO que sempre me atendeu com sorriso no rosto e me auxiliou em minhas dúvidas, obrigada Gabi por tudo.

Ao meu marido Diogo, por sempre estar ao meu lado até quando eu não estava, pelo apoio incondicional, paciência e carinho.

Às minhas irmãs, pelas conversas, risadas, por serem minhas melhores amigas, e principalmente por serem verdadeiras nas horas em que eu mais precisei.

À família que adiquiri aqui em Araraquara, agradeço por toda ajuda e carinho.

Aos meus sobrinhos e afilhados que me divertem e me fazem esquecer um pouco dos problemas e das obrigações que a vida nos determina.

Às minhas meninas pelo amor incondicional, carinho, afeto e minhas desculpas por não ter tanto tempo para ficarmos juntas e cuidar melhor de vocês.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho, que dedicaram o que tinham de mais precioso em sua vida, o tempo, para me axiliar em meu trabalho, incluo aqui todos os funcionários do IQ que sempre me trataram com muito carinho e respeito, pois um trabalho não é realizado por uma só pessoa, mas por várias que nos auxiliam dentro deste percurso.

E ao Instituto de Química e às agências de fomento CNPq, pela bolsa, e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

*“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”*

*(Chico Xavier)*

## RESUMO

Fungos são organismos que podem ser encontrados nos mais diversos habitats e constituem um dos maiores grupos sobre a Terra. Em particular, os fungos endofíticos associados a espécies vegetais, são excelentes produtores das mais diversas classes de metabólitos secundários, sendo uma fonte promissora e racional na obtenção de protótipos para os mais diversos usos terapêuticos. Os endófitos do gênero *Xylaria* pertencentes à família Xylareaceae, constituem um grupo de espécies que produzem substâncias que apresentam as mais diversas atividades biológicas como antitumorais, antibióticas, entre outros. Dentro deste contexto, neste trabalho avaliamos a produção de griseofulvina, um metabólito secundário produzido por *Xylaria* spp., e de utilização na terapêutica animal e humana. Também foi realizado o estudo químico e biológico de sete espécies diferentes de fungos endofíticos do gênero *Xylaria*. Estes foram cultivados em meios líquidos comerciais (MDB, Czapek, YM, EM e Nutrient) e sólidos (arroz e milho) para obtenção dos extratos brutos, totalizando 49 extratos. Cinco evidenciaram a produção de griseofulvina e foram submetidos a análises por RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD para a detecção e quantificação desta substância, respectivamente. O fungo que apresentou maior produção de griseofulvina foi o *Xylaria* sp., codificado como PR-03 e cultivado em Czapek. Neste meio foi realizado o estudo de aplicação de estímulos, tais como agitação e luz, utilizando planejamento experimental visando a maximização da produção desta substância, o que culminou em um aumento significativo desta produção. Paralelamente, todos os extratos obtidos foram submetidos a bioensaios para verificação das atividades antitumoral, antifúngica, e anticolinesterásica. Dois extratos que apresentaram perfis químico e biológico promissores foram submetidos a fracionamento cromatográfico para isolamento e identificação de substâncias. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas determinadas ou elucidadas por técnicas de RMN uni e bidimensionais, Espectrometria de Massas, UV, entre outras. De *Xylaria* sp. CSY-06 foram isoladas e identificadas seis substâncias: kigelina, demetiligelina, xylariolideo D, dankasterona A, 6-hidroxi-3-metil-7,8-dimetoxi-3,4-dihidroisocumarina e 5-butil-6-hidroximetil-2H-piran-2-ona sendo as duas últimas inéditas. De *Xylaria* sp. PR-03 foram isoladas dez substâncias, sendo oito identificadas como: declorogriseofulvina, griseofulvina, ácido 2-hexilideno-3-metil-butanodioico, e as citocalasinas B, Z<sub>2</sub>, F, B<sub>2</sub>, e T. Os estudos com endófitos *Xylaria* sp. visam contribuir e fornecer subsídios para maior conhecimento sobre a constituição química dos extratos analisados, e relacionar a sua composição com a interação micro-organismo e espécie vegetal, levando a compreensão da função ecológica existente.

**Palavras-chave:** fungos endofíticos. *Xylaria* sp. griseofulvina. Cerrado.

## ABSTRACT

Fungi are organisms that can be found in a diversity of habitats and constitute one of the largest groups on Earth. In particular, the endophytic fungi associated with plant species are excellent producers of several classes of secondary metabolites, as well a promising rational source in obtaining prototypes for several therapeutic effects. Endophytes of the genus *Xylaria* belong to Xylareaceae family, are a group of species that produce substances with potential biological activities, including antitumoral, antibacterial, among others. In this context, this study evaluated the optimal conditions of griseofulvin-producing endophytic fungus from *Xylaria* spp., for application in animal and human therapy. It was also conducted chemical and biological study of seven different species of endophytic fungi of the genus *Xylaria*. The fungal strain was cultivated in commercial liquid (Potato Dextrose Broth, Czapek, Yeast Medium, Malt Extract and Nutrient) and solid media forms (rice and corn) to obtain the crude extracts (n= 49). Five samples showed griseofulvin production and were analyzed by <sup>1</sup>H NMR and HPLC-DAD for the detection and quantification of the substance, respectively. The fungus that showed higher production of griseofulvin was *Xylaria* sp., encoded as PR-03 and cultured in Czapek. In this environment, the experiments design under light and shaker induced stimulus were performed in order to improve the production of the substance. It was observed a significant increase of production under both conditions. At the same time, all the extracts were submitted to bioassays for evaluation of antitumor, antifungal, and acetylcholinesterase activities. Two extracts that revealed promising chemical and biological profiles were subjected to chromatographic fractionation for isolation and identification of substances. Two compounds had their structures determined or elucidated by NMR uni and bidimensional techniques, mass spectrometry, UV, among others. In *Xylaria* sp. CSY-06 were isolated and identified six substances kigelin, demetilkigelin, xylariolideo D, dankasterone A, 6-hydroxy-7,8-dimethoxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin and 5-butyl-6-hydroxymethyl-2H-pyran-2-one with the last two unpublished. In *Xylaria* sp. PR-03 were isolated ten substances, eight identified as dechlorogriseofulvin, griseofulvin, 2-hexylidene-3-methyl-butanedioic acid, and cytochalasins B, Z<sub>2</sub>, F, B<sub>2</sub>, and T. Studies with endophytes *Xylaria* sp. aim to contribute and provide support for greater knowledge about the chemical composition of the extracts analyzed, and relate its composition to the micro-organism interaction and plant species, leading to understanding of the ecological function.

**Keywords:** Endophytic fungi. *Xylaria* sp. griseofulvin. Cerrado.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida dos endófitos em associação com a planta hospedeira. .... 23
- Figura 2.** Substâncias isoladas do endófito *Xylaria* sp. associado à espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae)..... 26
- Figura 3.** Substâncias isoladas dos endófitos *Xylaria* sp. associados às espécies vegetais *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) e *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) ..... 27
- Figura 4.** Estrutura da griseofulvina..... 28
- Figura 5.** Crescimento dos endófitos (AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03) cultivados em placas de Petri contendo BDA ..... 40
- Figura 6.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. AS-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 49
- Figura 7.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 50
- Figura 8.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-06 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 51
- Figura 9.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CV-06 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 52
- Figura 10.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PA-01 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 53
- Figura 11.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PM-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 54
- Figura 12.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PR-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 55
- Figura 13.** Perfil cromatográfico dos brancos dos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente ..... 56
- Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. AS-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T ..... 58
- Figura 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T ..... 58
- Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-06 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T ..... 59
- Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CV-06 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T ..... 59

<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PA-01 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T .....	60
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PM-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T .....	60
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T .....	61
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT dos brancos dos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- $d_6$ ; 7,1 T .....	61
<b>Figura 22.</b> (a) Cromatograma da substância padrão, griseofulvina, na concentração de 0,1 mg mL $^{-1}$ , e (b) sua absorção no UV. Condições do CLAE-DAD: coluna Phenomenex, Fenil-Hexil (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), fase móvel ACN:H $_2\text{O}$ 45:65, vazão 0,5 mL min $^{-1}$ , detector UV: 232 nm .....	62
<b>Figura 23.</b> Curva analítica da substância padrão, griseofulvina, obtida com as seguintes concentrações: 0,0075; 0,005; 0,001; 0,05; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 e 0,25 mg mL $^{-1}$ .....	63
<b>Figura 24.</b> (a) Cromatograma, e comparação do (b) RMN de $^1\text{H}$ e com PRESAT do extrato bruto obtido pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em meio líquido de Czapek, e do padrão griseofulvina (DMSO- $d_6$ , 14,1 T). 66	66
<b>Figura 25.</b> Curva analítica da substância padrão, griseofulvina, obtida com as seguintes concentrações: 0,001; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 mg mL $^{-1}$ ; utilizada para análise do planejamento fatorial .....	68
<b>Figura 26.</b> Gráfico de pareto indicando os valores dos efeitos padronizados .....	73
<b>Figura 27.</b> Superfície de resposta e mapa de contorno gerados a partir dos dados obtidos no planejamento fatorial da combinação dos fatores: (a) A+B; (b) A+C; e (c) B+C.....	74
<b>Figura 28.</b> Gráfico dos efeitos principais para o rendimento de griseofulvina.....	75
<b>Figura 29.</b> Análise da produção de griseofulvina em diferentes dias (24, 26, 28, 30 e 32 dias) pelo endófito PR-03 em Czapek, com utilização de agitação e luminosidade durante o cultivo.....	75
<b>Figura 30.</b> Condições cromatográficas no modo preparativo: eluição em gradiente ACN/H $_2\text{O}$ 5-100% em 40 min., e 10 min. a 100 % de ACN; C18 preparativa, vazão 4,5 mL min. $^{-1}$ , $\lambda$ de 254 nm .....	82
<b>Figura 31.</b> Estrutura atribuída à substância <b>3</b> .....	83
<b>Figura 32.</b> Determinação da unidade <b>A</b> da substância <b>3</b> .....	84
<b>Figura 33.</b> Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>3</b> .....	84
<b>Figura 34.</b> Estrutura atribuída à substância <b>4</b> .....	85
<b>Figura 35.</b> Determinação da estrutura parcial, <b>A</b> , da substância <b>4</b> .....	86
<b>Figura 36.</b> Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>4</b> .....	87
<b>Figura 37.</b> Estrutura atribuída à substância <b>5</b> .....	87
<b>Figura 38.</b> Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>5</b> .....	88
<b>Figura 39.</b> Estrutura atribuída às substâncias <b>1</b> e <b>2</b> .....	90
<b>Figura 40.</b> Estruturas das substâncias <b>1</b> e <b>5</b> .....	91
<b>Figura 41.</b> Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>1</b> .....	91
<b>Figura 42.</b> Estruturas das substâncias <b>2</b> e <b>3</b> .....	91
<b>Figura 43.</b> Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>2</b> .....	92
<b>Figura 44.</b> Proposta biossintética para as isocumarinas e pironas isoladas .....	93
<b>Figura 45.</b> Estrutura atribuída à substância <b>6</b> .....	94

<b>Figura 46.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>6</b>	96
<b>Figura 47.</b>	Extrato produzido pelo endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em Arroz; a) imagem do frasco contendo o extrato, e b) fundo do frasco .....	97
<b>Figura 48.</b>	Perfil do extrato produzido em escala ampliada obtido por inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em meio sólido de Arroz (a) cromatográfico; e b) por RMN de $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 14,1 T), respectivamente .....	98
<b>Figura 49.</b>	Perfil cromatográfico das frações: (a) Fr_1-3 a (k) Fr_47-49, respectivamente, obtidas pelo fracionamento em coluna de PR-03 A	100
<b>Figura 50.</b>	Estrutura atribuída a substância <b>12</b> .....	101
<b>Figura 51.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>12</b> .....	102
<b>Figura 52.</b>	Estrutura atribuída à substância <b>9</b> .....	103
<b>Figura 53.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>9</b> .....	104
<b>Figura 54.</b>	Biossíntese proposta para a substância <b>12</b> .....	105
<b>Figura 55.</b>	Estrutura atribuída à substância <b>10</b> .....	106
<b>Figura 56.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>10</b> .....	107
<b>Figura 57.</b>	Estrutura atribuída à substância <b>11</b> .....	108
<b>Figura 58.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>11</b> .....	110
<b>Figura 59.</b>	Comparação dos espectros obtidos por RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT das substâncias: (a) <b>11</b> ; (b) <b>13</b> , (c) <b>14</b> , (d) <b>15</b> , e (e) <b>16</b> (CD $_3$ OD; 14,1 T) ...	111
<b>Figura 60.</b>	Estrutura atribuída à substância <b>13</b> .....	112
<b>Figura 61.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>13</b> .....	113
<b>Figura 62.</b>	Estrutura atribuída à substância <b>14</b> .....	114
<b>Figura 63.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>14</b> .....	115
<b>Figura 64.</b>	Estrutura atribuída a substância <b>15</b> .....	116
<b>Figura 65.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>15</b> .....	117
<b>Figura 66.</b>	Estrutura atribuída à substância <b>16</b> .....	117
<b>Figura 67.</b>	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância <b>16</b> .....	119
<b>Figura 68.</b>	Comparação dos espectros obtidos por RMN de $^1\text{H}$ e com PRESAT de: (a) substância <b>11</b> ; (b) substância observada no funil de separação; e (c) extrato bruto PR-03 A. Os espectros de (a) e (b) obtidos em CD $_3$ OD, e (c) em DMSO- $d_6$ , 14,1 T.....	120
<b>Figura 69.</b>	Biossíntese proposta para as citocalasinas isoladas: <b>11</b> , <b>13</b> , <b>14</b> , <b>15</b> e <b>16</b> .....	122

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Metodologia de isolamento e purificação de cepas fúngicas .....	38
<b>Esquema 2.</b> Obtenção dos extratos brutos dos endófitos nos meios líquidos de MDB, Czapek, Extrato de Malte, YM e Nutrient .....	41
<b>Esquema 3.</b> Obtenção dos extratos dos endófitos nos meios sólidos de arroz e milho .....	42
<b>Esquema 4.</b> Planejamento fatorial completo $2^3$ com níveis codificados e utilizando as variáveis: Adição de KCl, Luminosidade e Agitação.....	44
<b>Esquema 5.</b> Fracionamento em coluna cromatográfica do extrato produzido pelo endófito PR-03 em Arroz .....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação dos endófitos do gênero <i>Xylaria</i> sp. que foram isolados de diferentes espécies vegetais do cerrado .....	38
<b>Tabela 2.</b> Meios de cultivo utilizados para o crescimento dos endófitos.....	39
<b>Tabela 3.</b> Massa dos extratos obtidos a partir dos endófitos <i>Xylaria</i> sp. inoculados nos respectivos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e nos meios sólidos (Arroz e Milho). Sendo referente aos endófitos codificados como AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03.....	47
<b>Tabela 4.</b> Dados referentes à curva analítica de griseofulvina (padrão) .....	63
<b>Tabela 5.</b> Concentração de griseofulvina presente nos extratos dos endófitos do gênero <i>Xylaria</i> sp. obtida a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta .....	65
<b>Tabela 6.</b> Dados referentes à curva analítica de griseofulvina (padrão) para análise do planejamento experimental.....	68
<b>Tabela 7.</b> Precisão intra e inter-dia. Cálculo das médias, desvio padrão e coeficientes de variação percentual dos picos cromatográficos do padrão griseofulvina .....	69
<b>Tabela 8.</b> Avaliação da robustez do método cromatográfico com relação aos $t_R$ do padrão analisado em diferentes temperaturas .....	70
<b>Tabela 9.</b> Análise da recuperação de griseofulvina avaliado pelo método de extração com a adição de padrão ao meio de cultivo isento do endófito.....	71
<b>Tabela 10.</b> Produção de griseofulvina em função dos experimentos realizados a partir do planejamento fatorial aplicado ao endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em meio de Czapek.....	72
<b>Tabela 11.</b> Percentual de inibição do crescimento celular (IG%) dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos <i>Xylaria</i> sp. nos meios líquidos e sólidos em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , controle positivo doxorrubicina.....	77
<b>Tabela 12.</b> Resultado da avaliação da atividade antifúngica contra os fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos <i>Xylaria</i> sp. nos meios líquidos e sólidos, controle positivo nistatina.....	79
<b>Tabela 13.</b> Resultado da avaliação da atividade anticolinesterásica produzidos pelos endófitos frente ao padrão fisostigmina.....	80
<b>Tabela 14.</b> Rendimento das substâncias obtidas por fracionamento cromatográfico do extrato CSY-06 A .....	82
<b>Tabela 15.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	83
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	85
<b>Tabela 17.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>5</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	88
<b>Tabela 18.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>1</b> e <b>2</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	90
<b>Tabela 19.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>6</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	94
<b>Tabela 20.</b> Rendimento das substâncias 7 a 16 obtidas pela separação cromatográfica em CLAE <sub>preparativo</sub> das frações de PR-03 A.....	99
<b>Tabela 21.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e HSQC da substância <b>12</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	101
<b>Tabela 22.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e HSQC da substância <b>9</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	103

<b>Tabela 23.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e HSQC da substância <b>10</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	106
<b>Tabela 24.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>11</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	108
<b>Tabela 25.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>13</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	112
<b>Tabela 26.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	114
<b>Tabela 27.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>15</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	116
<b>Tabela 28.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ com PRESAT e $^{13}\text{C}$ da substância <b>16</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T).....	118

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Arroz
a	Coefficiente linear da reta
AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AS-03	Espécie de <i>Xylaria</i> associado à <i>Arrabidea samydoides</i>
b	Coefficiente angular da reta
atm	atmosfera
BDA	Batata Dextrose Ágar
C	Concentração
Cálc.	Calculado
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CE	Ceará
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cél/mL	Célula por Mililitro
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
C18	Sílica Gel de fase reversa tipo Octadecil Silano
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CSY-03 e CSY-06	Espécies de <i>Xylaria</i> associados à <i>Casearia sylvestris</i>
CV-06	Espécie de <i>Xylaria</i> associado à <i>Cupania vernaes</i>
CV	Coefficiente de Variância
CZP	Czapek
°C	Graus celsius
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
ddd	Duplo-duplo-dubleto
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsufóxido deuterado
δ <sub>C</sub> e δ <sub>H</sub>	Deslocamentos químicos de Carbono e Hidrogênio, respectivamente
DP	Desvio Padrão
DPM	Desvio Padrão da Média
EC	Eletroforese Capilar
EM	Extrato de Malte
ESI-qQ-TOF	Electrospray Ionization – Time of Flight
EUA	Estados Unidos da América
eV	Eletron Volt
Fr	Fração
g	Gramas
g/L	Gramas por Litro
HCT	Linhagem Tumoral de Cólon Humano
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC <sub>50</sub>	Half Maximal Inhibitory Concentration
ICI	Investment Company Institute
LD e LQ	Limite de Detecção e Quantificação, respectivamente

LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
M	Milho
<i>m</i>	Multiplete
MDB	Meio Líquido de Batata Dextrose
MG	Minas Gerais
mg	Miligramas
min.	Minutos
MHz	Mega Hertz
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mol.	Molécula
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
m/z	Razão Massa-Carga
nº	Número
N	Nutrient
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OVCAR	Linhagem Tumoral de Carcinoma de Ovário Humano
p.	Página
P.A.	Para Análise
PA-01	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Piper aduncum</i>
PAJ-11	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Ocotea corymbosa</i>
pH	Potencial Hidrogênio
PM-03	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Palicourea marcgravii</i>
ppm	Parte por Milhão
PRESAT	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H com supressão do sinal da água do solvente
PR-03	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Prunus myrtifolia</i>
r <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão linear da reta
RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono
rpm	Rotação por Minuto
RUV-01	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Rudgea viburnioides</i>
s	Singleto
SAM	S-adenosilmetionina
SF	Linhagem Tumoral de Glioblastoma Humano
<i>sl</i>	Singleto Largo
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/Volume
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
t <sub>R</sub>	Tempo de Retenção
YM	Yeast Medium
λ	Comprimento de Onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Química de Produtos Naturais e micro-organismos .....	19
1.2 Fungos – aspectos gerais .....	20
1.3 Fungos endofíticos .....	21
1.4 Família Xylariaceae, gênero e espécies <i>Xylaria</i> .....	23
1.5 Griseofulvina .....	28
1.6 Análise Quantitativa .....	29
1.7 Aplicação de estímulos às condições de cultivo de micro-organismos .....	31
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
<b>3 MATERIAIS, MÉTODOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS</b> .....	34
3.1 Análises por Ressonância Magnética Nuclear .....	34
3.2 Espectrometria de Massas .....	34
3.3 Análises cromatográficas .....	34
3.4 Esterilização dos materiais .....	36
3.5 Manipulação dos micro-organismos.....	36
<b>4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	37
4.1 Endófitos do gênero <i>Xylaria</i> sp. associados a espécies vegetais.....	37
4.1.1 Isolamento das cepas fúngicas de <i>Xylaria</i> sp. ....	37
4.1.2 Cultivo dos endófitos .....	39
4.1.2.1 Cultivo dos endófitos nos meios líquidos.....	40
4.1.2.2 Cultivo dos endófitos nos meios sólidos .....	41
4.2 Análises quantitativas e quimiométricas.....	43
4.2.1 Análise quantitativa de griseofulvina .....	43
4.2.2 Análises quimiométricas .....	43
4.3 Atividades biológicas dos extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos .....	44
4.3.1 Ensaio citotóxico .....	44
4.3.2 Ensaio antifúngico.....	45
4.3.3 Ensaio anticolinesterásico .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
5.1 Rendimento dos extratos .....	47
5.2 Perfil cromatográfico dos extratos (CLAE-DAD) .....	48
5.3 Perfil químico dos extratos por RMN de <sup>1</sup> H (PRESAT).....	57
5.4 Análise quantitativa de griseofulvina nos extratos .....	62
5.4.1 Análises quantitativas e quimiométricas aplicadas ao endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em Czapek .....	66
5.4.1.1 Análise quantitativa de griseofulvina .....	67
5.4.1.2 Validação do método cromatográfico (CLAE-DAD).....	68
5.4.1.3 Seletividade, Linearidade e Limites de detecção e quantificação.....	68
5.4.1.4 Precisão.....	69
5.4.1.5 Robustez.....	70
5.4.1.6 Recuperação e exatidão .....	70
5.4.1.7 Otimização da produção de griseofulvina aplicando planejamento fatorial .....	71
5.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos .....	76

5.5.1 Ensaio citotóxico .....	76
5.5.2 Ensaio antifúngico.....	78
5.5.3 Ensaio anticolinesterásico .....	80
5.6 Fracionamento do extrato produzido pelo endófito CSY-06 .....	82
5.6.1 Determinação estrutural de <b>3</b> .....	83
5.6.2 Determinação estrutural de <b>4</b> .....	85
5.6.3 Determinação estrutural de <b>5</b> .....	87
5.6.4 Determinação estrutural de <b>1 e 2</b> .....	89
5.6.5 Proposta biossintética das isocumarinas e pironas isoladas .....	92
5.6.6 Determinação estrutural de <b>6</b> .....	93
5.7 Fracionamento do extrato produzido pelo endófito PR-03 .....	97
5.7.1 Determinação estrutural de <b>12</b> .....	101
5.7.2 Determinação estrutural de <b>9</b> .....	102
5.7.3 Biossíntese da griseofulvina.....	104
5.7.4 Determinação estrutural de <b>10</b> .....	106
5.7.5 Determinação estrutural de <b>11</b> .....	107
5.7.6 Determinação estrutural de <b>13</b> .....	112
5.7.7 Determinação estrutural de <b>14</b> .....	113
5.7.8 Determinação estrutural de <b>15</b> .....	115
5.7.9 Determinação estrutural de <b>16</b> .....	117
5.7.10 Biossíntese proposta para as citocalasinas isoladas.....	121
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	123
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	125
<b>APÊNDICE</b> .....	131

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Química de Produtos Naturais e micro-organismos*

Pode-se dizer que o interesse do homem pelas substâncias químicas, que o rodeiam, é tão antigo como o próprio homem e que o reconhecimento das propriedades químicas de tais substâncias, numa época em que a palavra química ainda não era conhecida, está associado com a sua própria sobrevivência no planeta. É que desde muito cedo e de forma bem rudimentar a espécie humana utiliza os produtos naturais, seja na alimentação, na caça, na medicina, ou em rituais religiosos, entre outras formas. <sup>1</sup>

Durante grande parte da história a natureza tem fornecido, de forma expressiva, uma grande quantidade de medicamentos para o tratamento de diversas doenças, sendo que a ingestão de ervas e folhas tenha constituído uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais para este fim. Descrições sobre a utilização de produtos naturais na medicina, realizada pelo homem, datam desde as sagradas escrituras. No Papiro de Ebers enumeram-se mais ou menos 100 doenças e um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. <sup>1</sup>

Por volta do século XIX, os avanços no conhecimento científico levaram à descoberta de substâncias bioativas, frequentemente relatadas como produtos naturais e se deu o início da fitoquímica. <sup>2</sup>

Compreendem-se como produtos naturais os bioprodutos obtidos a partir de plantas, animais, e micro-organismos, e que podem ser utilizados para seu benefício. As propriedades bioativas dos produtos naturais são atribuídas à diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários. <sup>3</sup>

Dentro deste contexto, os produtos naturais são divididos em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários estão relacionados aos processos essenciais à vida, amplamente distribuídos em plantas e micro-organismos, ou seja, são comuns a estas espécies. Os metabólitos secundários são produtos do metabolismo especial, biossintetizados a partir do metabolismo primário. Grande parte dos

princípios ativos responsáveis pela atividade biológica de uma planta é atribuída aos metabólitos secundários presentes, que englobam as classes de substâncias como terpenos, alcaloides, compostos fenólicos e policetídeos. <sup>4</sup>

São várias as utilidades dos produtos naturais, sendo que o seu estudo tem contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversas áreas. Suas maiores contribuições são na utilização como suplementos na indústria alimentícia, intermediários utilizados na indústria farmacêutica e agroquímica, e na indústria de cosméticos. <sup>5</sup>

Contribuindo para a enorme importância dos produtos naturais, os micro-organismos também começaram a ser investigados como fonte de princípios bioativos. Os fungos passaram a serem estudados quimicamente após a descoberta acidental da penicilina G, por Fleming (1928), um poderoso antibiótico produzido por *Penicillium notatum*. <sup>6</sup>

Deste modo, nos últimos anos os micro-organismos receberam atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores de produtos naturais. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação e triagem na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu potencial em fornecerem novas substâncias químicas bioativas, <sup>7</sup> com utilização nas mais diversas áreas.

## 1.2 Fungos – aspectos gerais

Fungos são organismos que utilizam como fonte de energia compostos orgânicos (quimiorganotróficos), cujo corpo pode ser unicelular (leveduriforme) ou pluricelular (filamentoso). <sup>8</sup> São encontrados em diferentes lugares, como água, solo, ar, animais e plantas, <sup>9</sup> devido às condições simples de temperatura (~ 25°C), pH ligeiramente ácido, condições aeróbias ou anaeróbias necessárias para o seu crescimento. <sup>10</sup> Os fungos são divididos em vários grupos como coprófilos, micoparasitas, termófilos, epifíticos, endofíticos, entre outros. <sup>11</sup>

Estes organismos são descritos por uma característica universal que é a impossibilidade de realizar a fotossíntese e desprovidos de clorofila, portanto são heterotróficos. Com isto, os fungos adquirirão seus nutrientes

no meio ambiente em que vivem ou de organismos mortos, além disso, alguns fungos são capazes de desenvolver uma relação simbiótica com seus hospedeiros. <sup>12</sup>

Os fungos ocorrem basicamente em três modos de vida: simbiótico, parasítico e saprófita. Quando associados às plantas, assumem vários tipos de interações, sendo as simbióticas as que conferem a ambos os organismos diversas vantagens, produzindo ou induzindo a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros micro-organismos. <sup>13</sup> Por outro lado, eles são capazes de sequestrar metabólitos produzidos pelas plantas que irão atuar como defesa química, ou produzi-los em resposta à pressão exercida por outros micro-organismos endofíticos ou fitopatógenos ou até mesmo por predadores. <sup>14</sup>

Nas associações parasitárias o fungo vive dentro da planta, de onde obtém o alimento necessário para seu desenvolvimento. Neste caso, geralmente o metabolismo secundário do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas às plantas. O parasitismo está relacionado à patogenicidade e pode, eventualmente, levar a planta à morte. <sup>15</sup>

Os fungos que vivem na forma de saprófitas obtêm seus alimentos de substâncias orgânicas em decomposição, eles criam estruturas reprodutoras a partir do micélio, sendo de grande importância no ecossistema. <sup>16</sup>

Com relação à ocorrência e biodiversidade, os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a terra, perdendo apenas para os insetos. Estimativas sugerem que existam aproximadamente 5,1 milhões de espécies diferentes, sendo que, menos de 5% foram descritas. <sup>9, 17</sup> Assim tem-se constatado nos últimos anos uma urgente necessidade em se estudar a química dos fungos, temendo-se a perda da biodiversidade. <sup>6, 18</sup>

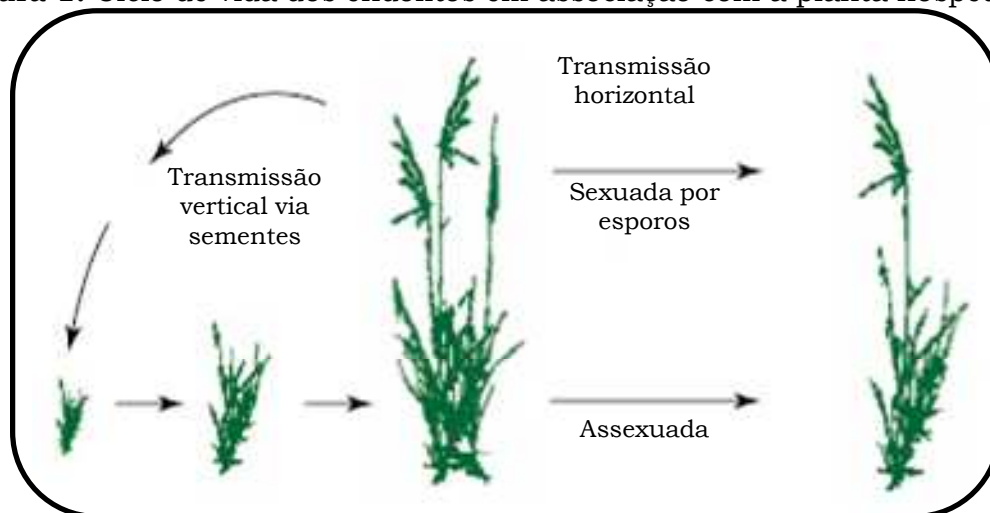
### *1.3 Fungos endofíticos*

O termo endofítico ocorreu em 1866, quando De Bary apresentou ao mundo que “endófito é qualquer organismo que ocorre dentro dos tecidos vegetais”. Entretanto, a definição mais amplamente citada foi dada por

Petrini em 1991 afirmando que endófitos são "todos os organismos que habitam os órgãos da planta que, em algum momento de sua vida, podem colonizar tecidos internos da planta sem causar dano aparente para o hospedeiro". Mais tarde, Bacon e White propuseram uma definição mais conclusiva e amplamente aceita: "endófitos são micro-organismos que colonizam tecidos internos das plantas, sem causar efeitos negativos imediatos".<sup>19, 20</sup> A definição dada por Strobel (2013) de que "fungos endofíticos são encontrados em toda a natureza e habitam os espaços intra e intersticiais dos tecidos vegetais sem provocar nenhuma evidência externa aparente de sua presença na planta", é a mais atual.<sup>21</sup>

Um fungo endofítico encontra-se em um processo de relacionamento biológico com a planta hospedeira, no entanto, seu papel na vida das plantas é pouco compreendido. Alguns autores descrevem que os endófitos podem ser patógenos, mas, que estão em estado latente. No entanto, o que decide se um endófito é inofensivo ou prejudicial é o equilíbrio entre as demandas da invasão de fungos e a resposta da planta, sendo que uma vez desequilibradas, o endófito pode se transformar em um patógeno.<sup>20</sup> Embora a relação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros varie de organismo para organismo, eles constituem um componente importante da biodiversidade microbiana. A espécie hospedeira pode ser infectada, pelos endófitos, horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida (**Figura 1**, p. 23).<sup>22</sup> O modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não sistêmica) essa interação tende a ser antagonica. Uma vez no hospedeiro o endófito permanece, geralmente, em um estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado, até que as condições ambientais lhe sejam favoráveis, assumindo uma função patogênica.<sup>23, 24</sup>

**Figura 1.** Ciclo de vida dos endófitos em associação com a planta hospedeira.



**FONTE:** Adaptado de SAIKKONEN et al (2004).<sup>22</sup>

Os fungos endofíticos são micro-organismos capazes de produzir metabólitos potencialmente bioativos, e estes habitam o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações por meio da semente do hospedeiro.<sup>16</sup> Evidências da associação planta-micro-organismo têm sido descobertas em tecidos fossilizados de caules e folhas. Provavelmente, ao longo do tempo e da evolução das espécies, os endofíticos podem ter desenvolvido sistemas de comunicação que permitissem a transferência de informações entre eles e a planta e vice-versa, possibilitando ao endófito lidar com condições ambientais instáveis e aumentando a compatibilidade com a planta hospedeira.<sup>6</sup>

Uma das vantagens dos micro-organismos sobre outras fontes naturais está relacionada com a conservação ambiental, uma vez que requerem uma única e pequena remoção do ambiente natural. Outra vantagem é que por se tratarem de fontes renováveis, o cultivo em escala ampliada para produzir metabólitos bioativos pode ser realizada usando a tecnologia existente com a otimização das condições de cultivo.<sup>25</sup>

#### 1.4 Família Xylariaceae, gênero e espécies *Xylaria*

Fungos do gênero *Xylaria* sp. pertencem à ordem Xylariales e a família Xylariaceae. Xylariaceae pertence a classe dos pirenomicetos (Ascomycota) e

é uma das famílias mais conhecidas e está distribuída por todo o mundo, ocorrendo predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. <sup>26, 27, 28</sup>

A maioria destas espécies habita tocos e ramos de árvores caídas ou mortas, podendo atuar como saprófitas, mas algumas espécies podem ser comumente isoladas como endófitas e outras espécies são consideradas patógenas. <sup>29, 30</sup>

Compreende mais de 85 gêneros e 1300 espécies desta família, porém torna-se óbvio que estes números tendem a ser maiores devido a remanescentes fungos que poderão ser descobertos e classificados em diversas regiões tropicais. <sup>26, 31</sup>

A família Xylariaceae tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas, isso se deve às propriedades químicas, biológicas e taxonômicas apresentadas por suas espécies. <sup>30</sup> Estes estudos demonstram que os representantes desta família produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, sendo que um número considerável destes é inédito. Os principais metabólitos produzidos podem ser agrupados como: diidroisocumarinas e derivados, ácido succínico e seus derivados, butirólactonas, citocalasinas, sesquiterpenos, griseofulvina e derivados, derivados do naftaleno, ácidos graxos de cadeia longa, entre outros. <sup>32, 33</sup>

Devido à grande dificuldade na classificação e a falta de coleções modernas de espécies tropicais, uma forma alternativa de identificação pode ser a de relacionar a presença destes compostos com sua posição sistemática e pelos dados químicos, os quais comprovar-se-ia a associação entre as espécies, grupos de espécies e gêneros desta família. <sup>29, 32, 33</sup>

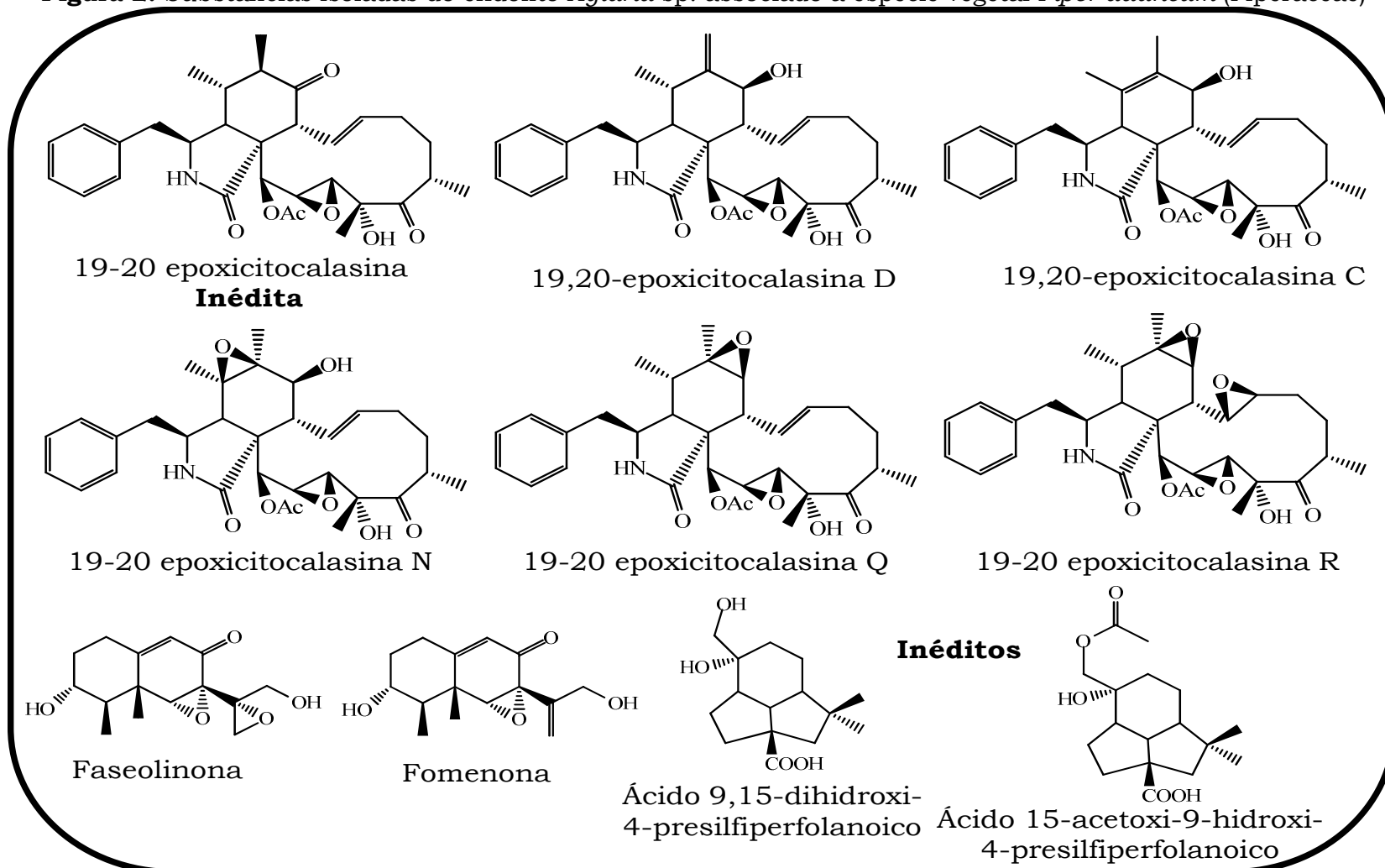
Como contribuição a identificação de espécies *Xylaria*, a experiência do grupo de pesquisa em estudos com estas espécies mostrou-se muito promissora, conduzindo ao isolamento e determinação estrutural das mais diversas classes de substâncias bioativas.

Fato este comprovado pelo trabalho do Dr. Geraldo H. Silva com o endófito *Xylaria* sp. associado a espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae), conduzindo ao isolamento e determinação estrutural de dez substâncias, incluindo seis citocalasinas e sesquiterpenos eremofilanos e

persilfiperfolanos, sendo algumas destas substâncias inéditas na literatura (**Figura 2**, p. 26 ).<sup>9, 34</sup>

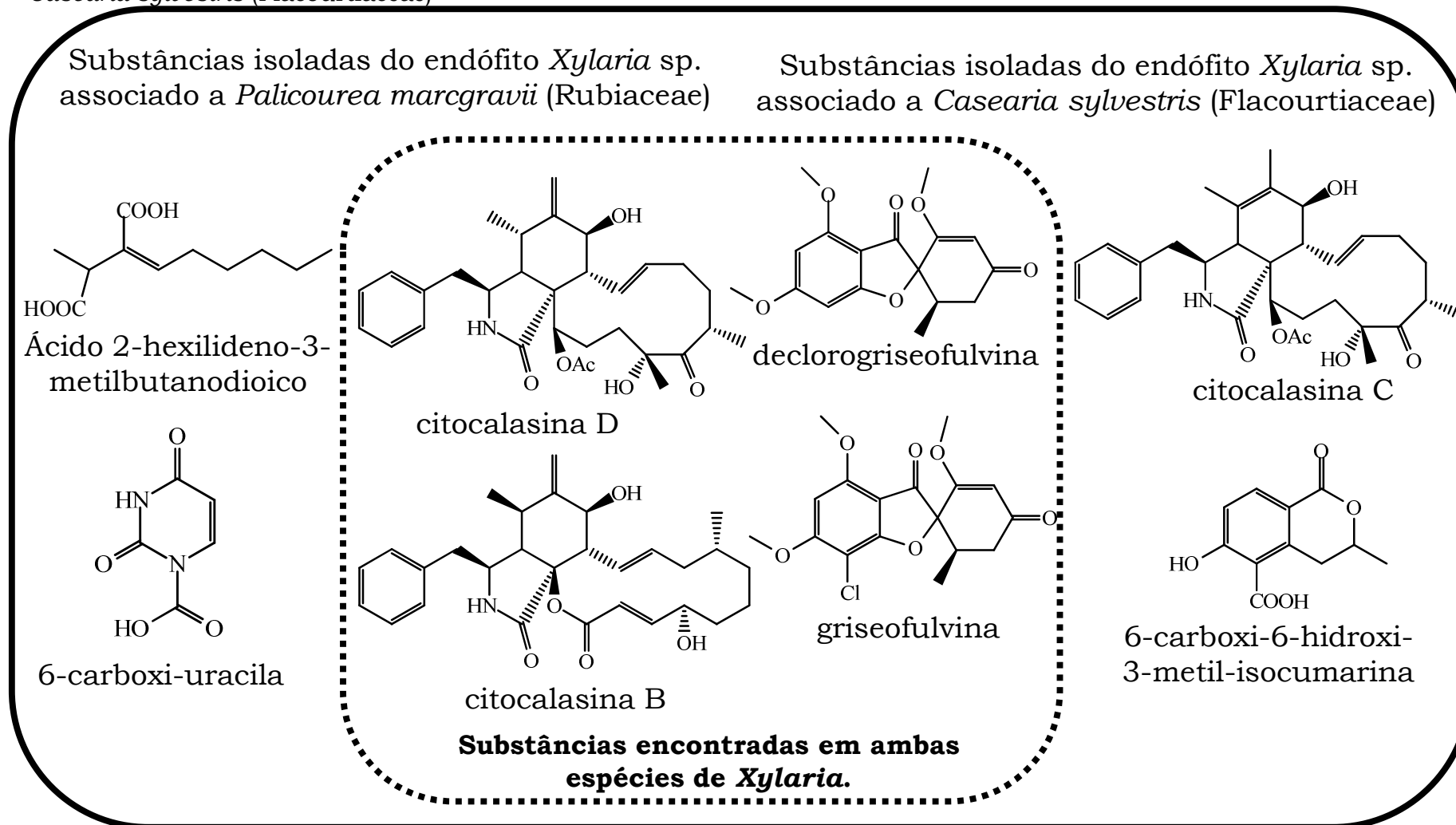
Nos trabalhos com endófitos *Xylaria* sp. associados às espécies vegetais *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) e *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), ambos conduzidos por Mariana C. Cafêu, resultaram no isolamento de substâncias bioativas de grande importância econômica (**Figura 3**, p. 27), ênfase dada as citocalasinas B, C, e D que são substâncias altamente citotóxicas frente a linhagens de células tumorais, e para a griseofulvina, uma substância antifúngica, sendo que para esta última substância, foi constatado também que seu rendimento nos extratos brutos é influenciado pelo meio de cultivo.<sup>35, 36</sup>

**Figura 2.** Substâncias isoladas do endófito *Xylaria* sp. associado à espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae)



**FONTE:** Adaptado de SILVA, G. H. (2005 e 2010) , 8, 34

**Figura 3.** Substâncias isoladas dos endófitos *Xylaria* sp. associados às espécies vegetais *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) e *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)

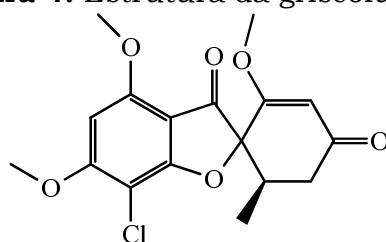


### 1.5 Griseofulvina

O produto natural griseofulvina é um medicamento antifúngico, utilizado em terapêutica humana e animal, por possuir ação fungistática afetando o sistema microtubular dos fungos, o fuso mitótico e os microtúbulos citoplasmáticos (**Figura 4**, p. 28).<sup>37</sup>

A griseofulvina foi isolada em 1939 por Oxford e colaboradores a partir da produção metabólica do fungo *Penicillium griseofulvum* Diercks. Em 1946, foram publicados estudos por Brian e colaboradores sobre uma substância isolada a partir do fungo *P. janczewskii* descrito como o "Fator de ondulação", devido à indução da ondulação das hifas fúngicas. Em 1947 descobriu-se que griseofulvina e o "Fator de ondulação" constituíam de fato a mesma substância.<sup>38</sup>

**Figura 4.** Estrutura da griseofulvina



Esta substância tem sido amplamente utilizada como um potente antibiótico com atuação antifúngica para o tratamento de doenças causadas por fungos patogênicos e de doenças inflamatórias, podendo ser administrada no tratamento de humanos e animais, no combate a micoses epiteliais na pele (inclusive no couro cabeludo) e nas unhas, e na agricultura.<sup>39, 40</sup>

Recentemente, griseofulvina tem atraído renovada atenção devido a relatos de bioatividades complementares tais como: antiviral, contra o vírus da hepatite C, suprimindo a replicação do vírus *in vitro*; e como antitumoral, quando em associação com outros medicamentos quimioterápicos, inibindo a proliferação de vários tipos de células cancerígenas induzindo a apoptose destas, com baixíssima toxicidade ao organismo, atraindo considerável atenção para utilização em quimioterapia.<sup>39, 40, 41</sup>

Utilizada comercialmente desde 6 de abril de 1959 nos EUA pela ICI sob o nome comercial "Fulcin" e no Reino Unido pela Glaxo como "Grisovin",<sup>38</sup> foi introduzida para tratamento de micoses em animais e seres humanos, apresentando atividade contra várias espécies de *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trychophyton*.<sup>42</sup> Como agente antifúngico, possui mecanismo de ação fungistático, em oposição a fungicida, ou seja, inibe o crescimento de fungos ao invés de matá-los por competição.<sup>43</sup>

Existem relatos que as espécies de fungos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Xylaria* sp. e *Nigrospora* sp. são típicos produtores de griseofulvina, e que apesar de alguns pesquisadores já proporem a possibilidade de se produzir esta substância por via sintética, esta forma de obtenção não é economicamente viável devido à necessidade de várias etapas e intermediários até o produto final. Deste modo, atualmente a griseofulvina é produzida comercialmente por fermentação empregando diferentes espécies de *Penicillium*.<sup>37, 43</sup>

### 1.6 Análise Quantitativa

Técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) se sobressaem na química analítica por propiciarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos.<sup>44</sup>

A aplicabilidade de uma análise quantitativa compreende a identificação dos analitos de interesse, livres de compostos interferentes, e propicia a determinação da concentração destes presentes em uma amostra. Para isto, esta análise pode ser baseada em estabelecer o valor da área da banda cromatográfica registrada como um pico, que idealmente deve ter um formato gaussiano, com resposta linear na faixa de detecção utilizado e tendo pleno conhecimento das limitações do método adotado.<sup>45</sup>

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser validado.<sup>46</sup> Segundo a resolução n° 899 da ANVISA,<sup>46</sup> o objetivo de uma validação é demonstrar que o método utilizado é apropriado para a finalidade

pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa de determinadas substâncias em matrizes complexas. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados na validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estes termos conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, <sup>47</sup> podem ser definidos como:

**Seletividade:** é a capacidade que o método possui de medir exatamente o analito em presença de outros componentes tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz;

**Linearidade:** é a capacidade de um método analítico corroborar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado;

**Limite de detecção:** é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada;

**Limite de quantificação:** é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com apropriada precisão e exatidão;

**Precisão:** é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta avaliação deve ser considerada em três níveis:

*Repetibilidade (precisão intra-dia):* concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

*Precisão intermediária (precisão inter-dia):* concordância entre os resultados do mesmo laboratório em dias diferentes.

*Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial):* concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos;

**Robustez:** mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações dos seus valores otimizados, quando este não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros;

**Exatidão ou recuperação:** é a proximidade dos resultados encontrados pelo método em estudo em relação ao verdadeiro convencional. <sup>48, 49</sup>

### *1.7 Aplicação de estímulos às condições de cultivo de micro-organismos*

Produtos naturais de micro-organismos são uma fonte essencial para agentes terapêuticos inovadores. O metabolismo secundário de micro-organismos é regulado por uma grande quantidade de genes que codificam enzimas biossintéticas e, portanto, pode ser produzido uma variedade de metabólitos secundários. De fato, apenas uma minoria desses genes de vias é expresso sob condições de laboratório padronizadas e muitos metabólitos valiosos são negligenciados. <sup>50</sup>

Considerando que cada etapa biossintética pode ser influenciada por diferentes fatores ambientais, aplicações de estímulos simples ou alterações nos parâmetros de cultivo (como por exemplo: composição do meio, pH, temperatura, adição de inibidores enzimáticos, nível de aeração, recipiente de cultura e controle da luminosidade) provavelmente influenciarão na produção de novas substâncias, bem como no aumento da produção de um metabólito de interesse a partir de um único micro-organismo. <sup>51</sup>

Novas abordagens de separação, identificação e quantificação estão sendo desenvolvidas para acelerar o processo de obtenção de substâncias químicas que possuam atividades farmacológicas. Dentre elas podemos destacar a utilização de ferramentas quimiométricas que auxiliam no planejamento e otimização experimental. A necessidade de uma instrumentação mais complexa para analisar estes sistemas de forma eficiente exige, da mesma forma, ferramentas computacionais para manipular e interpretar as informações obtidas. <sup>51</sup>

A utilização de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, permite extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos, podendo melhorar e

aperfeiçoar o trabalho realizado. Esses métodos são ferramentas poderosas, com as quais, vários objetivos específicos podem ser alcançados.<sup>52</sup>

Para tal, ao invés de variar apenas um fator de cada vez para encontrar condições otimizadas de análise, é razoável propor a variação de todos os fatores simultaneamente. A razão para isso é que as variáveis podem influenciar-se mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. As nomenclaturas adotadas para esse procedimento são a propriedade de interesse chamada resposta, as variáveis que em princípio influenciam a resposta são os fatores e a função que descreve essa influência é chamada de superfície de resposta.<sup>50</sup>

Considerando que o Brasil importa toda griseofulvina e o alto custo que isto acarreta ao país a quantificação deste potente antifúngico em diferentes espécies de *Xylaria*, poderá se tornar uma fonte alternativa na produção desta substância e então contribuir para a utilização de uma fonte biológica alternativa para a produção de griseofulvina e para um melhor direcionamento na produção farmacológica de produtos que utilizam esse princípio ativo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar e quantificar griseofulvina nos extratos brutos produzidos pelos endófitos *Xylaria* sp., bem como, realizar o estudo químico dos extratos que apresentarem potencial biológico frente aos bioensaios antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos envolvidos neste trabalho são:

- Cultivar as espécies de *Xylaria* nos meios líquidos (MDB, Czapek, YM, EM e Nutrient) e sólidos (Arroz e Milho), em pequena escala, para obtenção dos extratos brutos;
- Triagem dos extratos obtidos nos meios líquidos e sólidos por CLAE-DAD e RMN de  $^1\text{H}$  para a detecção de griseofulvina;
- Quantificar a produção de griseofulvina por CLAE-DAD, nos extratos brutos obtidos;
- Submeter o endófito *Xylaria* sp., mais promissor na produção de griseofulvina, a aplicações de estímulo para maximizar sua produção;
- Submeter os extratos brutos obtidos para a avaliação das atividades: antifúngica, antitumoral, e anticolinesterásica;
- Estudar química e biologicamente as espécies de *Xylaria* que produzirem o extrato bruto com maior bioatividade frente aos ensaios biológicos testados;
- Submeter as substâncias isoladas a bioensaios, para uma possível compreensão da função ecológica do micro-organismo na espécie vegetal.

### 3 MATERIAIS, MÉTODOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

#### 3.1 Análises por Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro da Bruker Avance III HD 600 (14,1 T) operando a 600 MHz na frequência do  $^1\text{H}$  e a 150 MHz na frequência do  $^{13}\text{C}$ , utilizando a sonda criogênica Triple Inverse TCI Cryo-probehead, de 5 mm com detecção inversa para três canais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ ) e amplificadores resfriados para os núcleos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^2\text{H}$ ; e também em um espectrômetro Bruker INOVA-300 operando em 300 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$  e em 75 MHz para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ , usando sonda dual ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) 5 mm, ambos tendo como referência interna o TMS. Como solventes deuterados foram utilizados DMSO- $d_6$  (99,9%, Aldrich),  $\text{CD}_3\text{OD}$  (99,8%, Aldrich), e  $\text{CDCl}_3$  (99,8%, Aldrich). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm.

#### 3.2 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de alta resolução micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer, (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), calibrado com NA-TFA a  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  (TOF), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra com bomba de infusão (COLE PARMER), utilizando vazão de  $300 \mu\text{L h}^{-1}$  e fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O. Modo de detecção negativo e positivo para as amostras. A faixa de aquisição foi de  $m/z$  50-2000. O software Data Analysis Shortcut (Bruker Daltonik®) foi utilizado durante a aquisição dos dados e processamento dos dados espectrométricos.

#### 3.3 Análises cromatográficas

##### 3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nas análises por CCD foram utilizadas placas prontas de sílica gel da marca SORBET Technologies (Sílica G TLC Plates W/UV 254;  $200 \mu\text{m}$   $20 \times 20 \text{ cm}$ ). As revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (UV 254 e 366 nm).

### 3.3.2 Cromatografia em coluna

Para o fracionamento cromatográfico em coluna foi utilizada uma coluna de vidro de diâmetro interno de 3,0 cm e comprimento 40,0 cm. Fase estacionária: Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences).

### 3.3.3 Cromatografia líquida

Para as análises por CLAE-analítico foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-20A, controlador CBM-20A e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando o software LC-solution.

Para a cromatografia no modo preparativo foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca VARIAN ProStar equipado com duas bombas modelo SD-1 PrepStar e detector UV-Vis modelo 320.

As colunas utilizadas para tais análises foram:

- ✓ Phenomenex, Fenil-Hexil e C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), ambas analíticas; e
- ✓ Phenomenex, C-18 (250 x 10,00 mm e partículas de 5  $\mu$ m), semi-preparativa.

Os sistemas de eluição cromatográficos utilizados foram:

- Gradiente exploratório: utilizado para perfil cromatográfico dos extratos brutos, ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v) até 100% de ACN em 40 min., e permaneceu por mais 10 min. a 100% de ACN, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Volume de injeção da amostra 20  $\mu$ L e coluna C-18; e
- Isocrático: utilizado para quantificação de griseofulvina nos extratos brutos, ACN/H<sub>2</sub>O (45:55 v/v), vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, detector UV em 232 nm, e volume de injeção de 20  $\mu$ L, o tempo de aquisição para as análises variaram entre 40 min. para substância padrão e 60 min., para extratos, coluna Fenil-Hexil.

Todas as amostras analisadas por cromatografia líquida foram anteriormente solubilizadas em MeOH:H<sub>2</sub>O (95:05 v/v) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,22  $\mu$ m). As concentrações destas soluções variaram de acordo com cada método utilizado, analítico e preparativo.

É importante ressaltar que todos os solventes orgânicos empregados tanto no preparo das amostras como nos processos cromatográficos descritos acima foram de grau cromatográfico, a água foi destilada e deionizada (resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm a 25°C).

### *3.4 Esterilização dos materiais*

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclaves dos fabricantes QUIMIS® e MARKET FORGE Industries INC, sendo mantidos à temperatura de 121°C por aproximadamente 20 minutos.

### *3.5 Manipulação dos micro-organismos*

Todo o procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação dos micro-organismos foram realizados em Capela de Fluxo Laminar Pachame® PA 310-Série 172-99 e SterilGARD® Advance.

### *3.6 Demais equipamentos*

- Evaporador rotatório - Büchi
- Balança analítica – METLER TOLEDO AG 245 e SHIMADZU
- Balança semi-analítica – OHAUS.
- Linha de vácuo – VWR Scientific Products.
- Incubadora vertical - VWR Scientific Products (modelo 1925).
- Incubadora rotatória SHAKER refrigerada – SOLAB SL 223.
- Espectrofotômetro – SHIMADZU UV-1601.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

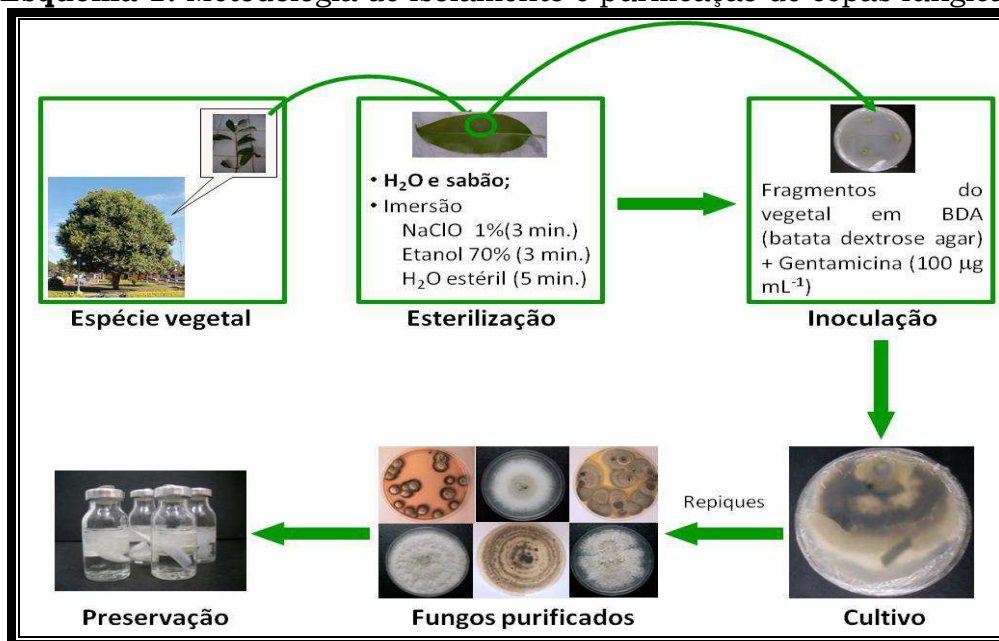
### 4.1 Endófitos do gênero *Xylaria* sp. associados a espécies vegetais

Foram selecionadas e coletadas diversas espécies vegetais do Cerrado do Estado de São Paulo e que posteriormente foram trabalhadas e forneceram o isolamento de mais de 200 linhagens, das quais dez foram identificadas como pertencentes ao gênero *Xylaria* sp. As espécies vegetais que hospedavam este gênero destes micro-organismos são: *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae), *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), *Cupania vernalis* (Sapindaceae), *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae), *Piper aduncum* (Piperaceae), *Prunus mirtifolia* (Rosaceae), *Rudgea viburnioides* (Rubiaceae) e *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). Estas espécies vegetais foram coletadas na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçú com exceção da *Piper aduncum* que foi coletada na casa de vegetação do IQ/UNESP-Araraquara/SP.

As exsiccatas das espécies vegetais encontram-se devidamente classificadas e depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo. Todo o trabalho de coleta e isolamento das linhagens fúngicas foi realizado pelo Doutor Geraldo H. Silva.

#### 4.1.1 Isolamento das cepas fúngicas de *Xylaria* sp.

Folhas saudáveis das espécies vegetais coletadas foram lavadas com água e sabão e esterilizadas por imersão em NaClO 1% (três minutos) e em etanol 70% (três minutos), seguida de lavagem com água estéril (cinco minutos) e secagem, objetivando a remoção de organismos epifíticos, que foi comprovado pelo plaqueamento da última água de lavagem, evidenciando que não houve contaminação. Após o processo de esterilização, as folhas foram cortadas e incubadas em placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar) e o antibiótico gentamicina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), utilizado para evitar o crescimento bacteriano. Repiques utilizando outras placas de Petri contendo BDA foram realizados sucessivamente e resultaram nas linhagens fúngicas puras, as quais foram preservadas em frascos com água estéril, conforme pode ser visualizado no **Esquema 1** (p. 38).<sup>53</sup>

**Esquema 1.** Metodologia de isolamento e purificação de cepas fúngicas

**FONTE:** CHAPLA et al, 2013. <sup>53</sup>

As linhagens puras estão depositadas na micoteca lotada no Laboratório de Micro-organismos do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP e a identificação destas linhagens foi realizada pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

Na **Tabela 1** (p. 38) consta a relação da espécie vegetal e a família da qual foram isolados e identificados os endófitos do gênero *Xylaria* sp. e a codificação pela qual estes endófitos estão representados.

**Tabela 1.** Relação dos endófitos do gênero *Xylaria* sp. que foram isolados de diferentes espécies vegetais do cerrado

Espécie vegetal (Família)	Codificação
<i>Arrabidaea samydoides</i> (Bignoniaceae)	AS-03
<i>Casearia sylvestris</i> (Flacourtiaceae)	CSY-03
	CSY-04
	CSY-06
<i>Cupania vernalis</i> (Sapindaceae)	CV-06
<i>Ocotea corymbosa</i> (Lauraceae)	PAJ-11
<i>Piper aduncum</i> (Piperaceae)	PA-01
<i>Palicourea marcgravii</i> (Rubiaceae)	PM-03
<i>Prunus mirtifolia</i> (Rosaceae)	PR-03
<i>Rudgea viburnioides</i> (Rubiaceae)	RUV-01

#### 4.1.2 Cultivo dos endófitos

Na **Tabela 2** (p. 39) estão listados os meios de cultivo sólido e líquidos, sua composição e especificação, utilizados para o crescimento dos fungos endofíticos durante o período deste trabalho.

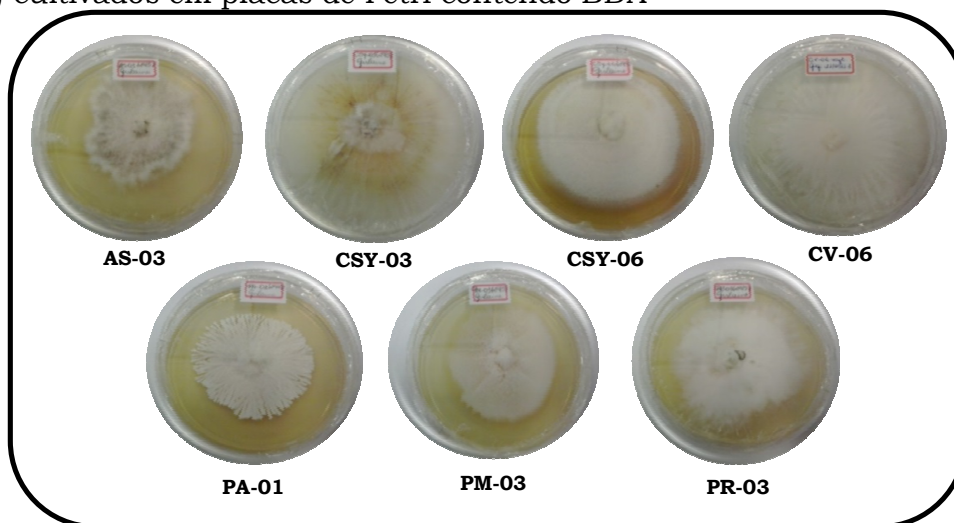
**Tabela 2.** Meios de cultivo utilizados para o crescimento dos endófitos

Meio de cultivo	Tipo	C (g L <sup>-1</sup> )	Composição	Base de cultivo	Fabricante
BDA	Sólido	39,0	Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g), ágar (15 g)	Fungos e leveduras	SIGMA
MDB	Líquido	24,0	Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g)	Fungos e leveduras	DIFCO
Czapek	Líquido	35,0	Sacarose (30 g), NaNO <sub>3</sub> (3 g), Na <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (1 g), MgSO <sub>4</sub> (0,5 g), KCl (0,5 g), FeSO <sub>4</sub> (0,01 g)	Fungos e bactérias capazes de utilizar Nitrogênio Inorgânico	DIFCO
Extrato de Malte	Líquido	20,0	Extrato de Malte (20 g)	Fungos e bactérias	KASVI
YM	Líquido	12,8	Extrato de levedura (1 g), Malte (10 g), Sulfato de Magnésio (0,2 g), NaCl (0,1 g), CaCO <sub>3</sub> (1 g)	Leveduras, fungos e outros micro-organismos acidúricos	HIMEDIA
Nutrient	Líquido	8,0	Extrato de carne (3 g), peptona (5 g)	Micro-organismos não fastidiosos	ACUMEDIA
Arroz	Sólido		Arroz parbolizado	-	Tio João
Milho	Sólido		Milho tipo canjica	-	YOKI

Os endófitos descritos na **Tabela 1** (p. 38) que estavam preservados em água estéril foram inoculados em placas de Petri contendo meio sólido de BDA e monitorados durante dez dias até que suas hifas atingissem cerca de 5 cm de diâmetro. Dos dez endófitos inoculados apenas três não puderam ser cultivados (CSY-04, PAJ-11 e RUV-01), pois não houve crescimento, apesar de diversas tentativas com outras hifas e frascos de preservação das mesmas linhagens, não obtivemos êxito.

Durante o crescimento das linhagens de *Xylaria* sp. AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03 (**Figura 5**, p. 40), estas foram avaliadas quanto à sua pureza, por meio da aparência uniforme da colônia nas placas. Todos estes endófitos foram novamente preservados em frascos de penicilina com água estéril em meio de BDA para novos repiques.

**Figura 5.** Crescimento dos endófitos (AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03) cultivados em placas de Petri contendo BDA

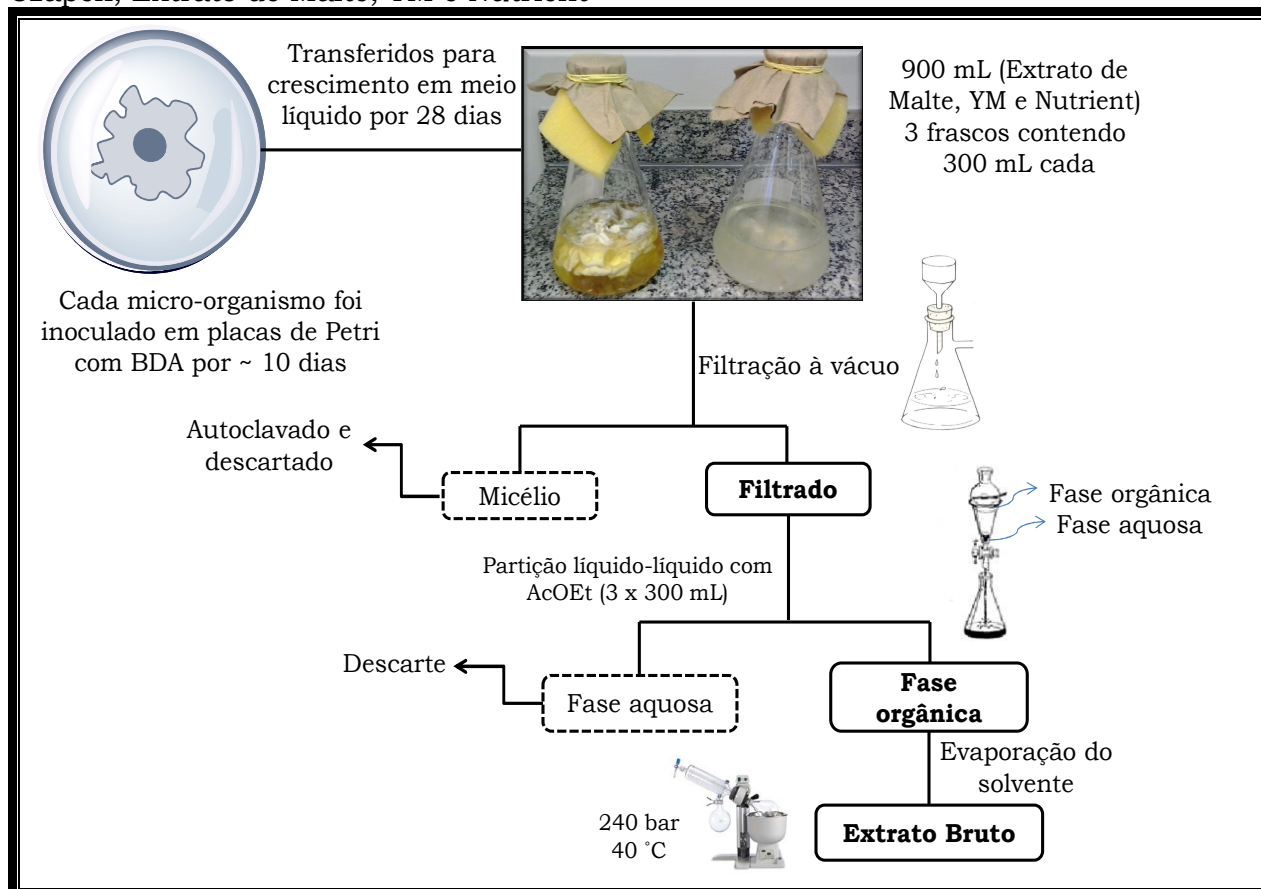


#### 4.1.2.1 Cultivo dos endófitos nos meios líquidos

Após período de incubação em placas de Petri das linhagens acima, estas foram cultivadas nos meios líquidos descritos na **Tabela 2** (p. 39). O cultivo foi realizado em pequena escala com a inoculação dos endófitos em 0,9 L de cada meio de cultivo (três frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio previamente esterilizados em autoclave vertical por vinte minutos a pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C), e mantidos sob forma estática com agitação esporádica para oxigenação, e em temperatura controlada a 25°C por 28 dias conforme pode ser visualizado no **Esquema 2** (p. 41).

Terminado o período de incubação (crescimento em meio líquido), a suspensão micelar de cada cultivo foi submetida à filtração, separando-se os micélios do filtrado. O filtrado aquoso, contendo os metabólitos secundários secretados pelo fungo, foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. A evaporação do solvente orgânico foi realizada em um evaporador rotatório Büchi (40°C e 240 bar), fornecendo os extratos brutos.

**Esquema 2.** Obtenção dos extratos brutos dos endófitos nos meios líquidos de MDB, Czapek, Extrato de Malte, YM e Nutrient



#### 4.1.2.2 Cultivo dos endófitos nos meios sólidos

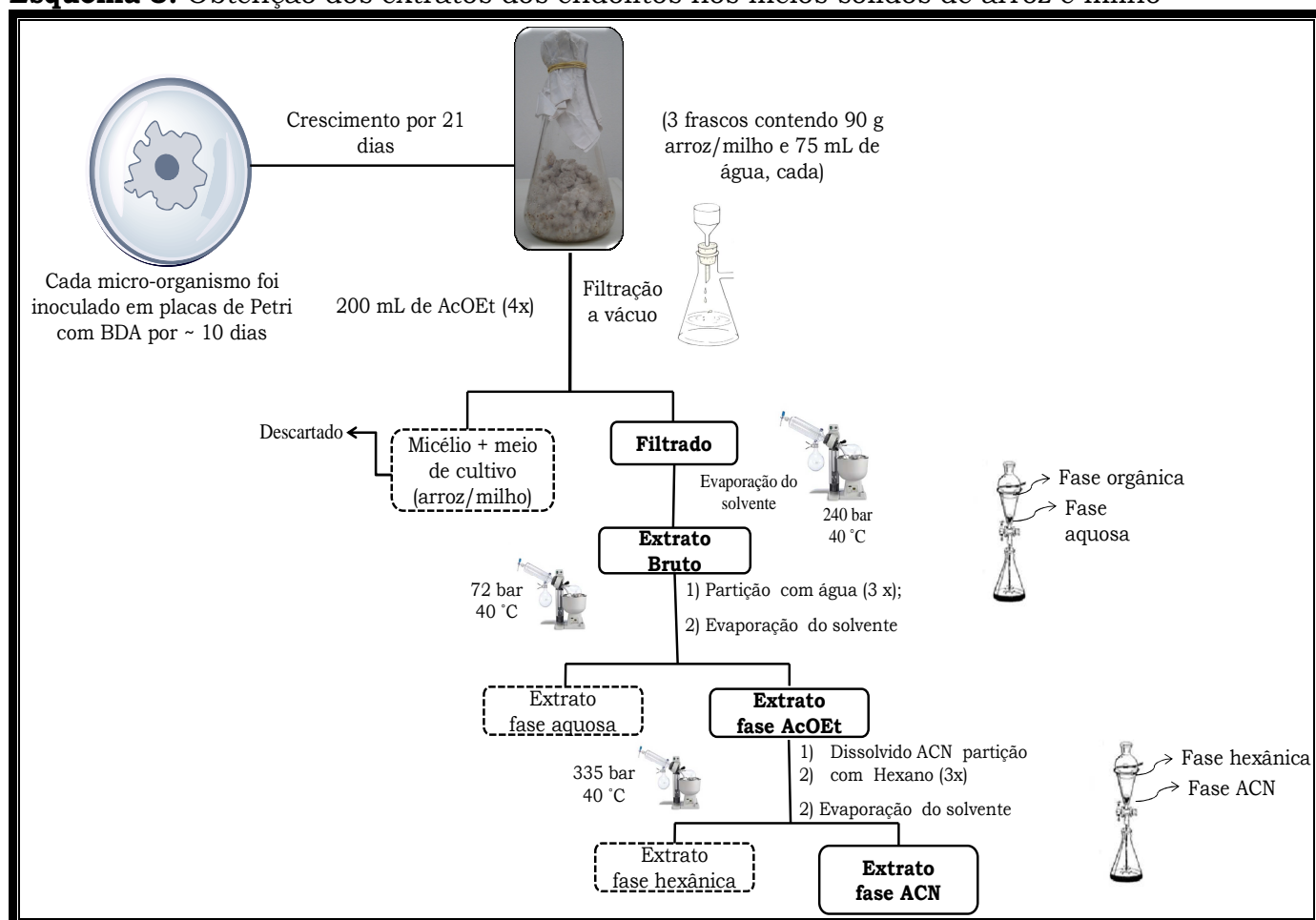
Após período de incubação em placas de Petri das linhagens anteriormente descritas, estas foram cultivadas em arroz e milho. O cultivo nestes meios também foi realizado em pequena escala com a inoculação dos endófitos em 270 g de cada meio de cultivo (três frascos de Erlenmeyer contendo 90 g de meio em 75 mL de água ultrapura previamente autoclavados por três vezes, sendo uma vez por dia durante três dias consecutivos, em autoclave vertical por vinte minutos a pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C). Após a esterilização e inoculação dos micro-organismos nos meios de cultivo de arroz e milho, estes foram mantidos em modo estático por 21 dias, conforme pode ser visualizado no **Esquema 3** (p. 42).

Após este período, os meios sólidos foram triturados (milho/arroz + massa micelar) e extraídos com 200 mL de AcOEt por quatro vezes (a cada doze horas), filtrados e o solvente orgânico evaporado, fornecendo o extrato

bruto em AcOEt. Este foi, novamente, solubilizado em AcOEt (30 mL) e submetido a uma partição líquido/líquido por três vezes com 15 mL de água ultrapura, objetivando a eliminação dos açúcares oriundos do meio de cultivo (arroz/milho) dando origem a fase aquosa e a fase AcOEt, e após evaporação do solvente, forneceu os extratos aquoso e AcOEt. O extrato AcOEt resultante foi submetido a uma nova partição líquido/líquido por três vezes solubilizando a fração AcOEt em 20 mL de ACN com 10 mL hexano, objetivando a eliminação dos compostos de natureza graxa oriundas dos meios de cultivo.

Ambas as fases foram concentradas em evaporador rotatório, porém as fases hexânica e aquosa foram desconsideradas e a fase ACN foi considerada como extrato a ser utilizado nas análises pertinentes ao trabalho. A evaporação dos solventes orgânicos e aquosos foi realizada em um evaporador rotatório da Büchi.

**Esquema 3.** Obtenção dos extratos dos endófitos nos meios sólidos de arroz e milho



## 4.2 Análises quantitativas e quimiométricas

### 4.2.1 Análise quantitativa de griseofulvina

Para validar o método desenvolvido neste trabalho foram adotados os parâmetros analíticos descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), resolução n° 899 de 29 de maio de 2003 (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) <sup>46</sup>, sendo os parâmetros considerados para tal: seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação precisão, exatidão ou recuperação e robustez.

### 4.2.2 Análises quimiométricas

Com o objetivo de maximizar a produção de griseofulvina obtida em experimentos preliminares, propôs-se um método para avaliar a influência das seguintes variáveis: agitação, luminosidade e adição de KCl presente no meio de cultivo, em dois níveis cada um. Para este propósito foi utilizado o planejamento fatorial completo  $2^3$  ( $2^k$ , sendo 2 o número de níveis e k o número de fatores/variáveis) <sup>52</sup>, o qual consiste em um número de experimentos igual a oito, que foi realizado em duplicata totalizando dezesseis experimentos.

Nos planejamentos fatoriais onde as variáveis são exploradas em dois níveis, é comum codificá-los utilizando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores e inferiores é feita arbitrariamente e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes de planejamento. <sup>52, 54</sup> No **Esquema 4** (p. 44) está o modelo utilizado e os valores encontram-se codificados.

Os efeitos e interações obtidos em cada experimentos foram posteriormente analisados por programas estatísticos.

**Esquema 4.** Planejamento fatorial completo  $2^3$  com níveis codificados e utilizando as variáveis: Adição de KCl, Luminosidade e Agitação

Experimentos	Fatores/variáveis		
	A (Adição KCl)	B (Luz)	C (Agitação)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

**Legenda:** Adição de KCl: (+) com adição de 100% de KCl ao meio de cultivo, (-) sem adição de KCl; Luminosidade: (+) com Luz, (-) sem luz; Agitação: (+) com Agitação 110 rpm, (-) estático.

### 4.3 Atividades biológicas dos extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos

#### 4.3.1 Ensaio citotóxico

As células foram inoculadas em placas de Petri na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> para as linhagens OVCAR-8 e SF-295 e em  $0,7 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 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 da amostra (extrato) com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

Ensaio realizado sob a responsabilidade da Profa. Dra. Cláudia Pessoa do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.3.2 Ensaio antifúngico

O ensaio qualitativo da atividade antifúngica foi determinada por bioautografia pela nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (concentração de  $5 \times 10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  em solução de glicose e sais) em placas de CCD contendo as frações de interesse, previamente eluídas com Hexano/AcOEt (70:30). As placas foram incubadas a  $25^\circ\text{C}$  por 48 horas verificando se haviam halos de inibição do crescimento dos fungos, e esses foram determinados. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (0,5  $\mu\text{g}$ ).

Ensaio realizado sob a responsabilidade da Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, da Universidade de São Paulo.

#### 4.3.3 Ensaio anticolinesterásico

O ensaio qualitativo por bioautografia foi realizado juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase. Os extratos brutos foram solubilizados em solvente adequado e cada amostra foi aplicada, numa concentração de 50  $\mu\text{g}$ , em duas placas que foram eluídas nas condições determinadas para análise por CCD (eluentes Hexano/AcOEt 70:30). Fisostigmina a 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi utilizada como padrão positivo. A presença das substâncias foi observada com a revelação de uma das placas inicialmente com luz UV 254 nm e 366 nm e posteriormente com ácido sulfúrico. Na segunda placa foi borrifada a solução da enzima acetilcolinesterase (solução A). Após a evaporação do solvente a placa foi incubada em câmara úmida fechada, a  $37^\circ\text{C}$  por vinte minutos, e em seguida borrifada com a solução.<sup>55</sup>

Caso existam substâncias com atividade sobre a enzima acetilcolinesterase a reação enzimática será observada. À medida que a reação acontece, manchas brancas vão surgindo e aumentando de tamanho de acordo com a intensidade da inibição enzimática.

#### **Soluções:**

\_ Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) foi dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9), a solução

estoque foi armazenada a 4°C e no momento do uso foi adicionado 0,1% de albumina de soro bovino;

- \_ Solução B: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol;
- \_ Solução C: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada;
- \_ Solução D: mistura de 10 mL da solução B + 40 mL da solução C.

Ensaio realizado sob a responsabilidade da Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, da Universidade de São Paulo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento dos extratos

Na **Tabela 3** (p. 47) estão os rendimentos dos extratos brutos obtidos após a inoculação dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. (AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03, e PR-03) em meio de BDA, em placas de Petri, e a seguir cultivados nos meios líquidos e sólidos. Para os meios líquidos (MDB, Czapek, EM, YM e N) os fungos foram cultivados por 28 dias, e para os meios sólidos (Arroz e Milho) por 21 dias. Após o período de incubação estes foram filtrados, particionados e produziram os respectivos extratos brutos, conforme descrito nas seções **4.1.2.1** (p. 40) e **4.1.2.2** (p. 41).

Análise da **Tabela 3** evidencia que a biomassa e a produção metabólica dos fungos endofíticos é dependente dos nutrientes, destaque dado aos endófitos AS-03 e PA-01 que apresentaram maior produção em MDB; CSY-03, CSY-06 e PM-03 em EM; e PR-03 e CV-06 em Czapek, mostrando a potencialidade destes endófitos em diferentes meios de cultivo. Com relação aos meios sólidos podemos destacar a produção de extrato bruto em Arroz de CSY-03 e PA-01, e em Milho de AS-03 e CSY-03.

**Tabela 3.** Massa dos extratos obtidos a partir dos endófitos *Xylaria* sp. inoculados nos respectivos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e nos meios sólidos (Arroz e Milho). Sendo referente aos endófitos codificados como AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03

	MDB	CZP	EM	YM	N	A	M
<b>AS-03</b>	<b>105,2</b>	71,7	37,8	40,3	52,1	352,7	508,7
<b>CSY-03</b>	126,5	32,6	<b>150,7</b>	72,5	52,5	<b>913,8</b>	<b>555,1</b>
<b>CSY-06</b>	40,2	20,7	<b>56,2</b>	16,7	31,3	219,3	286,4
<b>CV-06</b>	59,1	<b>217,9</b>	48,7	35,6	34,9	373,6	228,3
<b>PA-01</b>	<b>150,9</b>	79,1	115,0	35,7	58,1	<b>1222,4</b>	<b>963,9</b>
<b>PM-03</b>	35,4	12,6	<b>52,9</b>	14,0	27,0	589,1	238,5
<b>PR-03</b>	113,1	<b>130,4</b>	98,6	22,5	29,0	591,8	418,8

Após a obtenção dos extratos, estes foram submetidos à análise por RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT (3,0 mg) e cromatografia líquida de alta eficiência (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) para avaliação dos perfis químicos e cromatográficos,

respectivamente. Alíquotas destes extratos foram pesadas e enviadas para avaliação das atividades biológicas (antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica), objetivando obter informações para nos direcionar ao estudo químico dos extratos brutos, potencialmente bioativos.

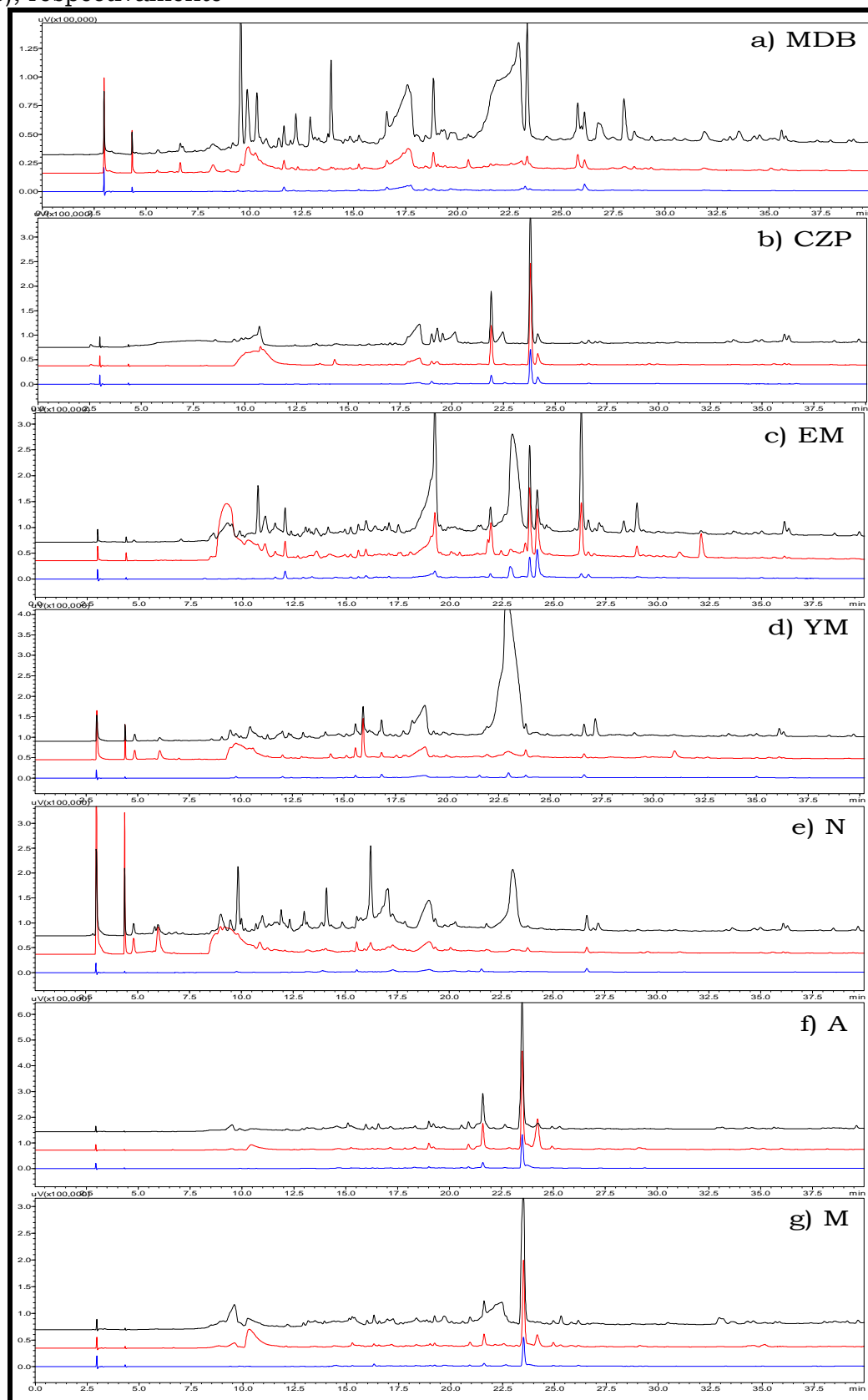
### 5.2 Perfil cromatográfico dos extratos (CLAE-DAD)

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo líquido equipado com arranjo de diodos, como fase estacionária uma coluna analítica C-18 e sistema de eluição em gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v) até 100% de ACN em 40 min., e permaneceu por mais 10 min. a 100% de ACN, numa vazão de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>

Nas **Figuras 6 a 12** (p. 49-55) estão os perfis cromatográficos obtidos dos extratos brutos dos endófitos *Xylaria* sp. codificados como: AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03 obtidos por inoculação destes nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM, N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente, bem como a comparação destes. O detector de arranjo de diodos (DAD) foi utilizado para escolha do melhor comprimento de onda para separação cromatográfica (220, 254 e 330 nm). Para efeitos de comparação, também foi realizada a análise dos brancos (**Figura 13**, p. 56), meios de cultivo sem a inoculação dos endófitos, objetivando visualizar metabólitos oriundos do meio de cultivo.

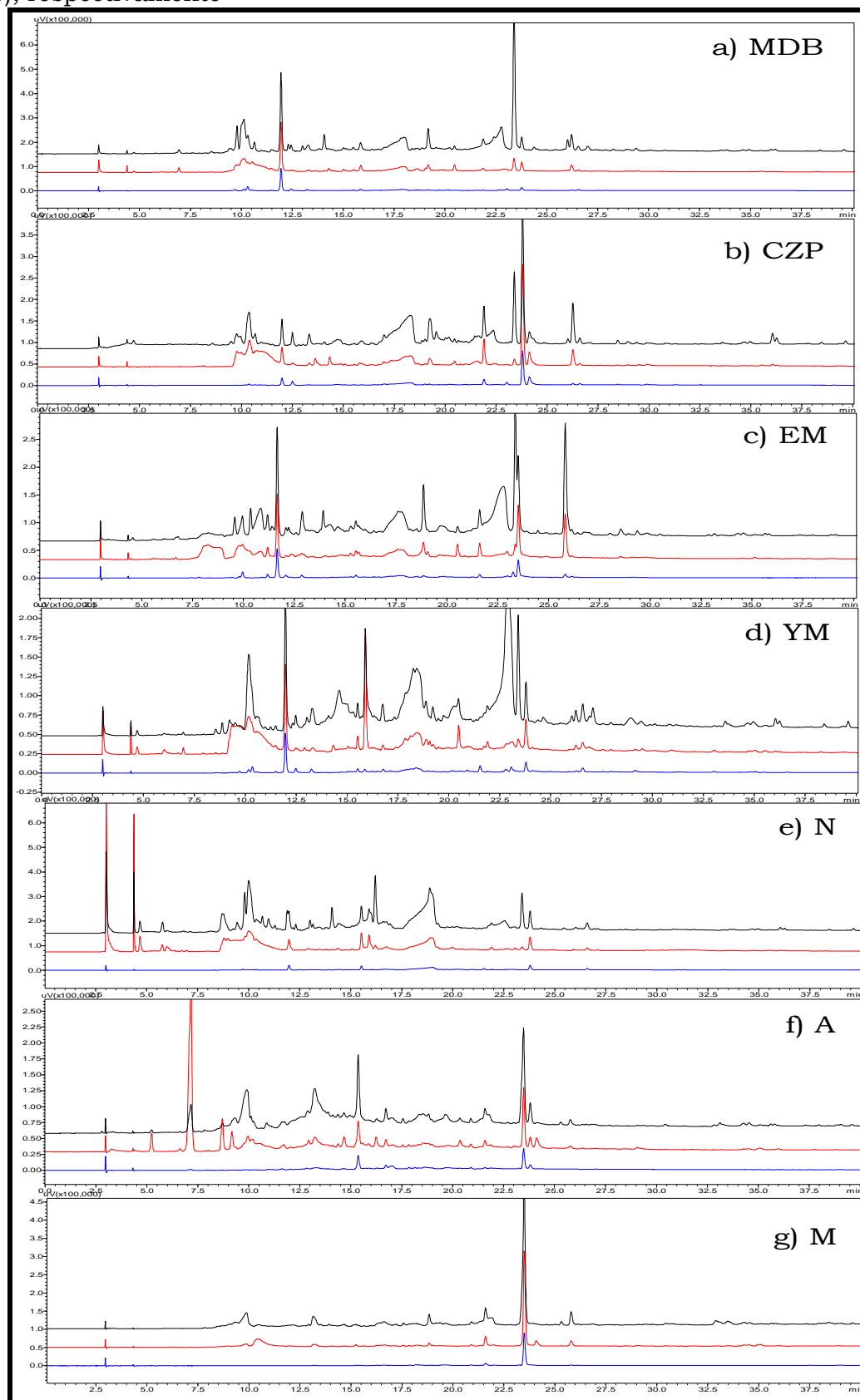
Os tempos de retenção observados, nos sete meios de cultivo, evidenciam que as substâncias produzidas apresentam polaridades variadas, abrangendo toda a faixa de polaridade (baixa a alta polaridade).

**Figura 6.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. AS-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



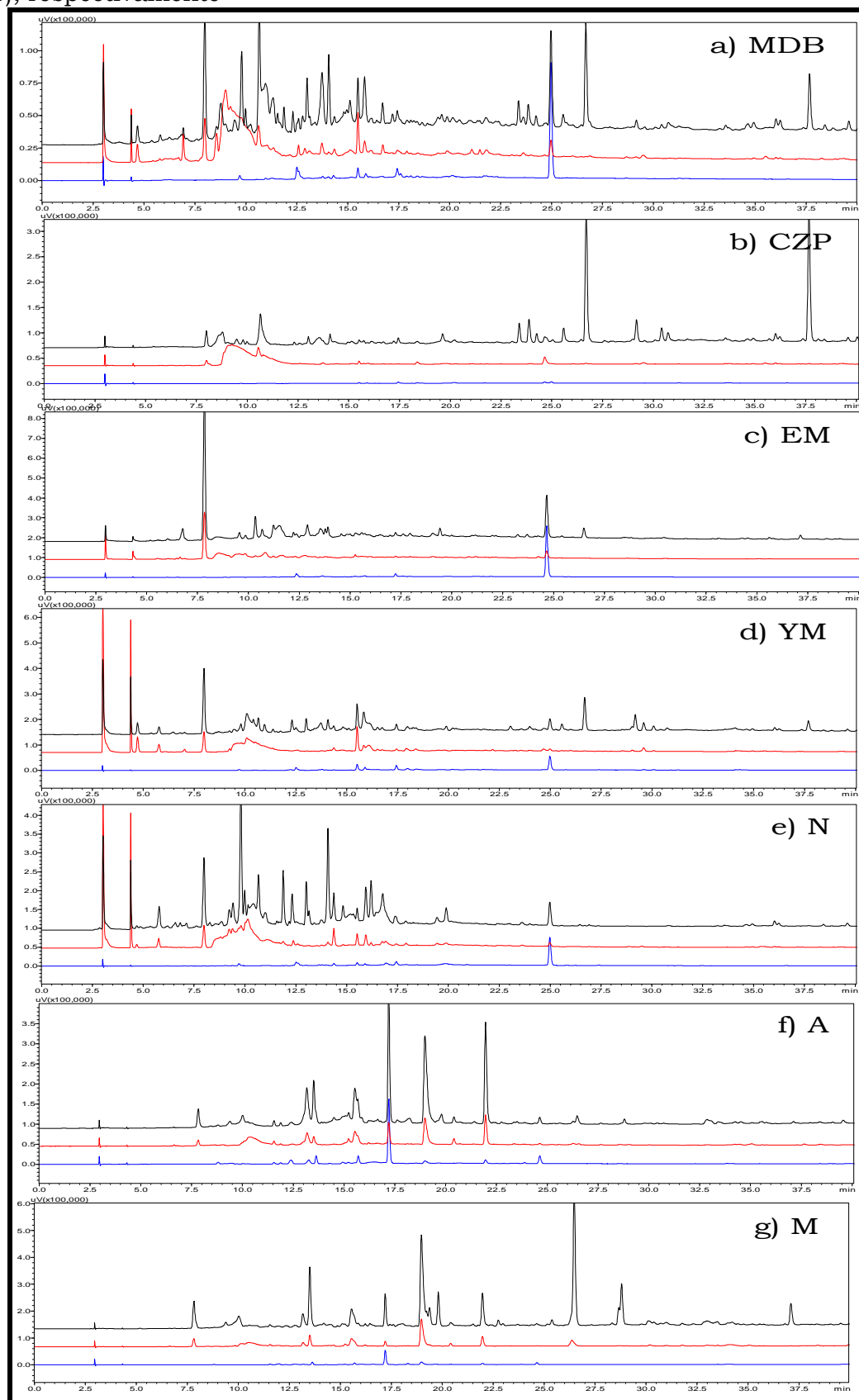
**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; **λ:** Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 7.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



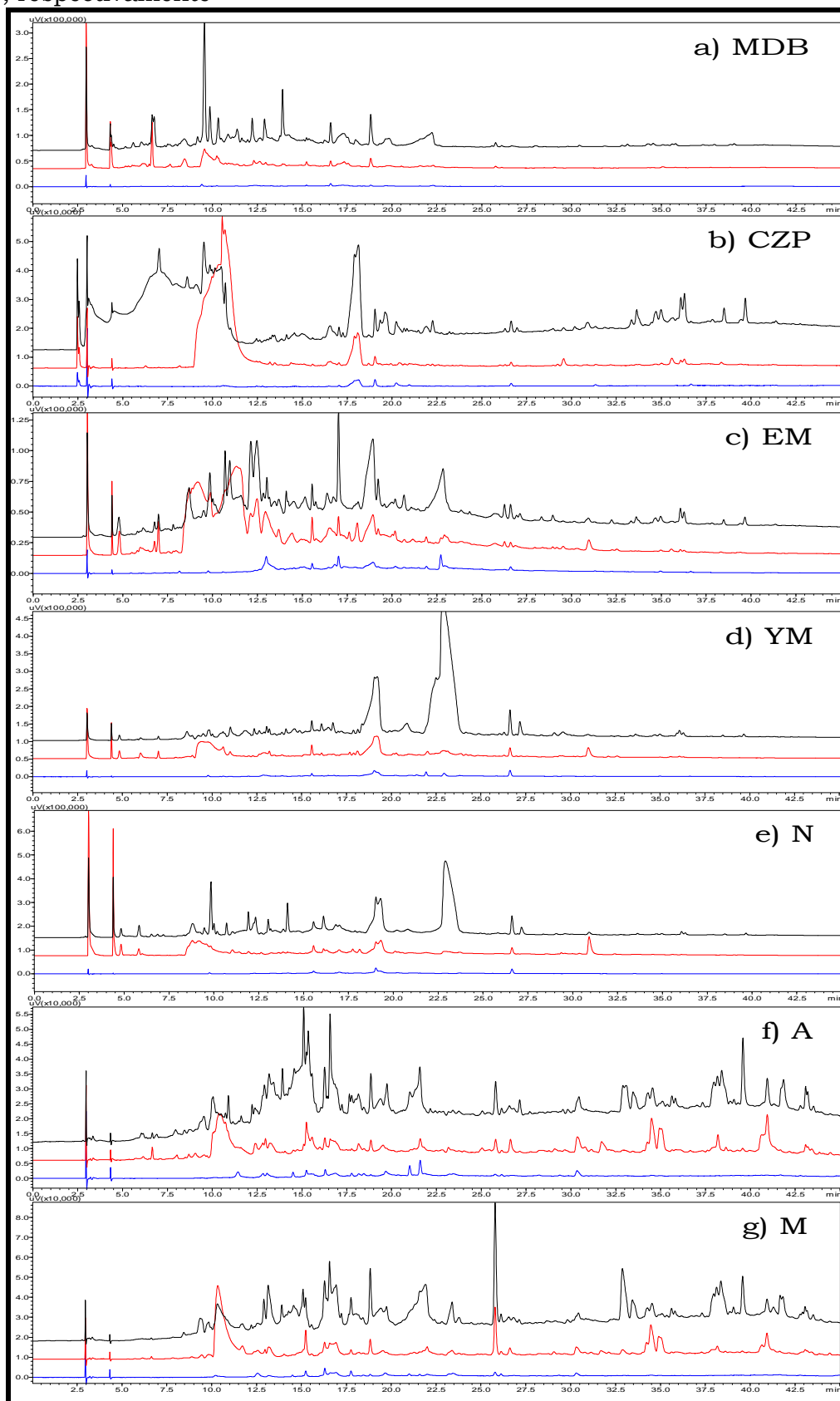
**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; **λ:** Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 8.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-06 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



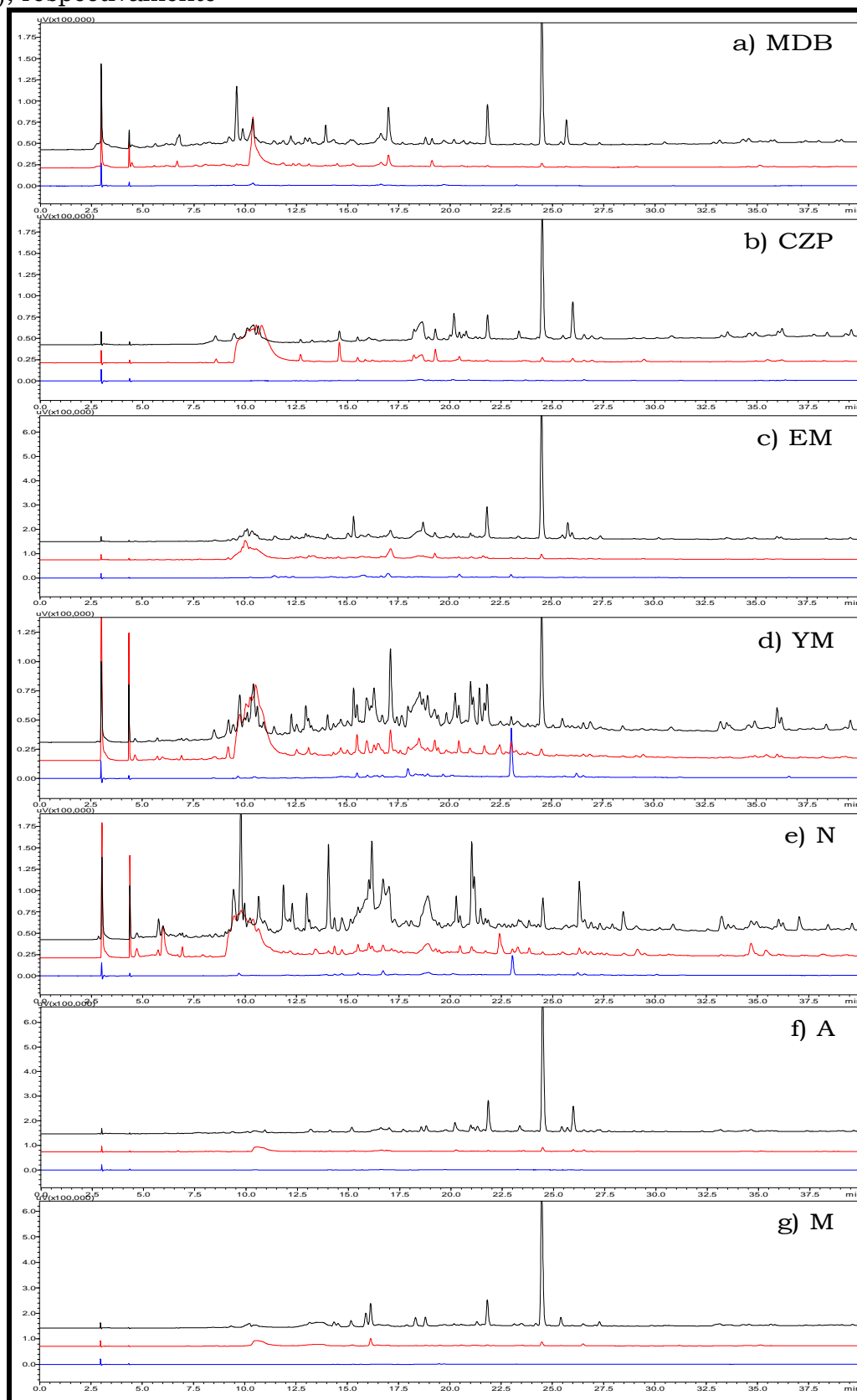
**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; **λ**: Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 9.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CV-06 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



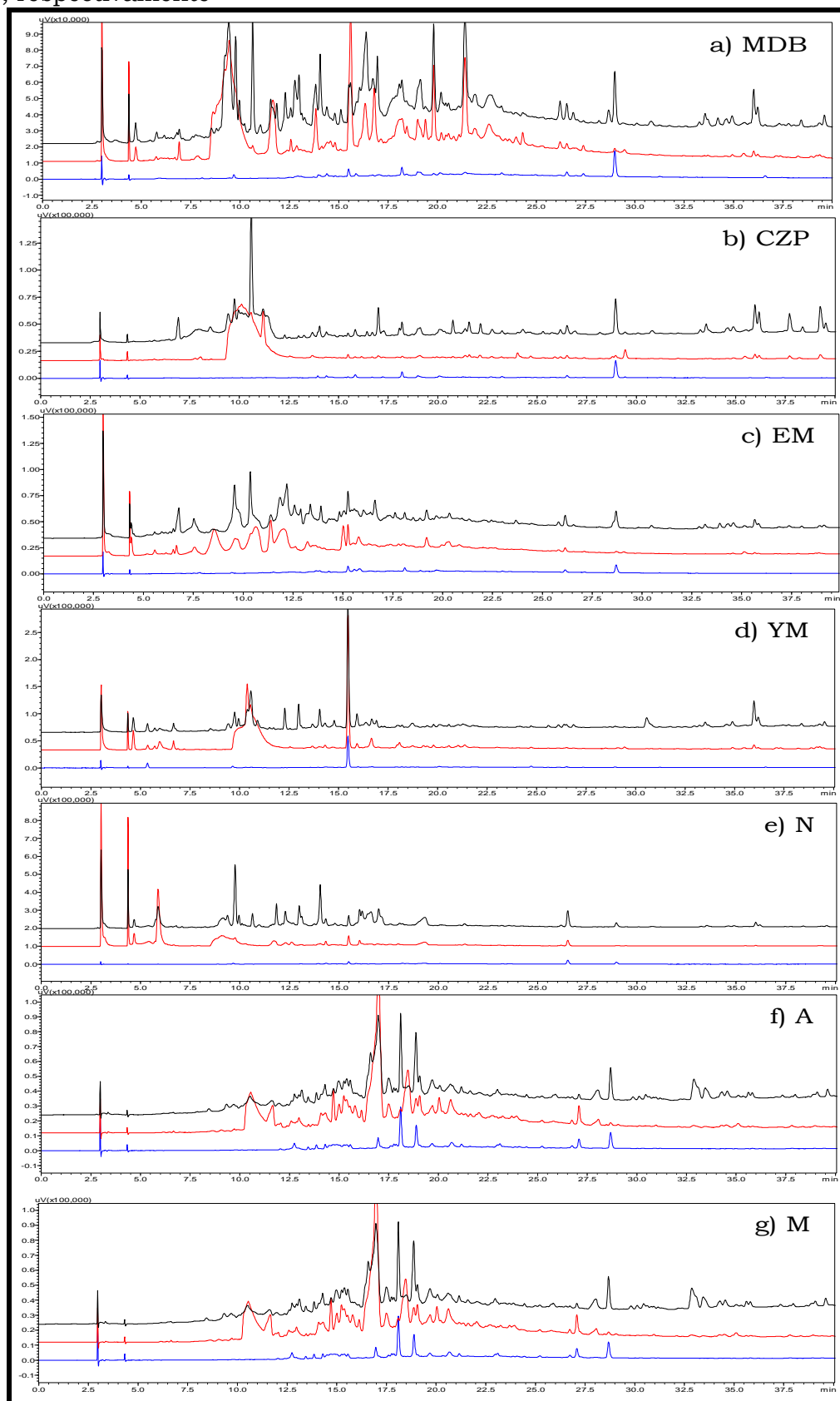
**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 10.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PA-01 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



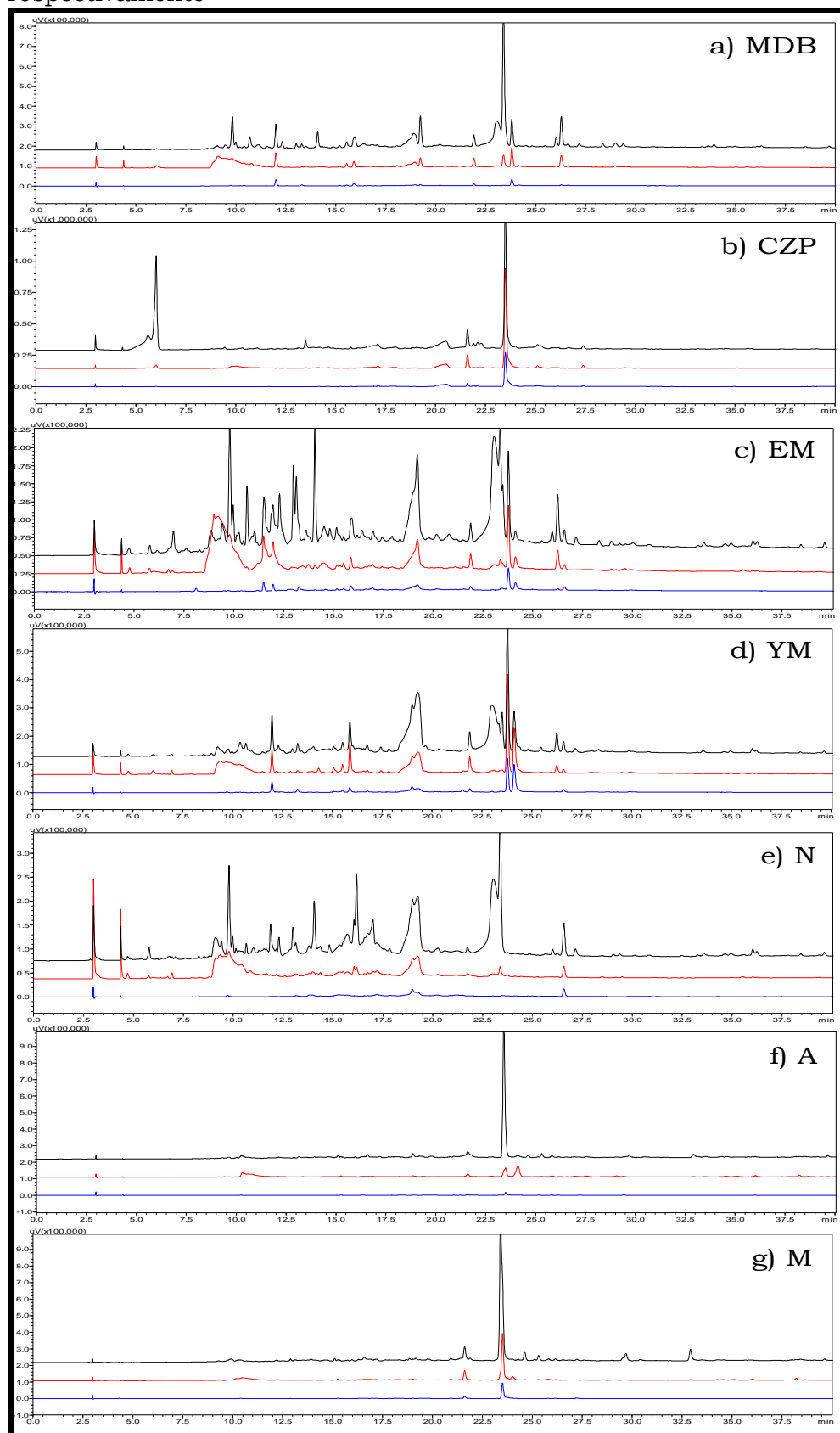
**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; **▲**: Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 11.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PM-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



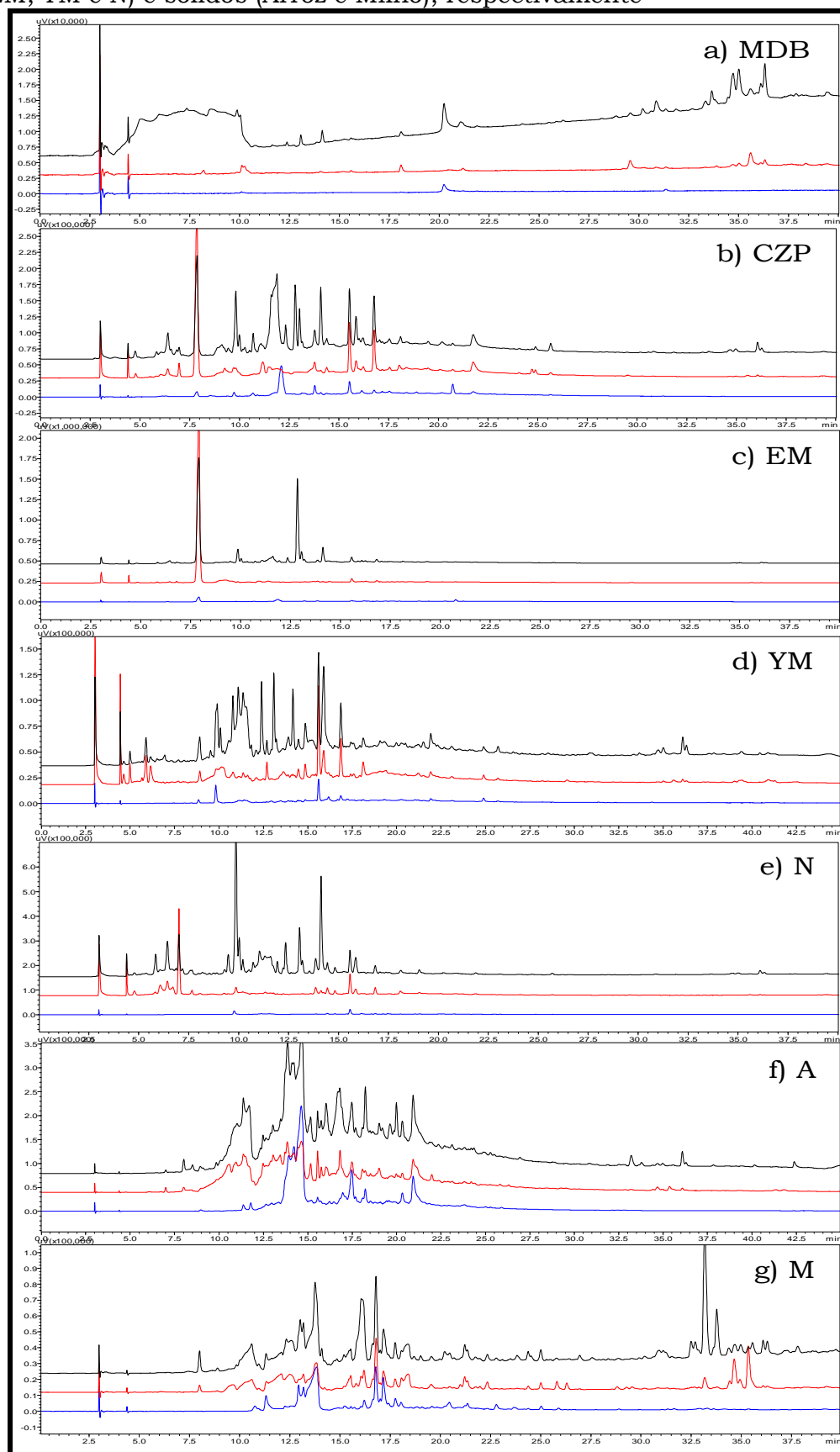
**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 12.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PR-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; **λ**: Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

**Figura 13.** Perfil cromatográfico dos brancos dos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente



**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; **▲**: Preto 220 nm, vermelho 254 nm e azul 330 nm.

### 5.3 Perfil químico dos extratos por RMN de $^1\text{H}$ (PRESAT)

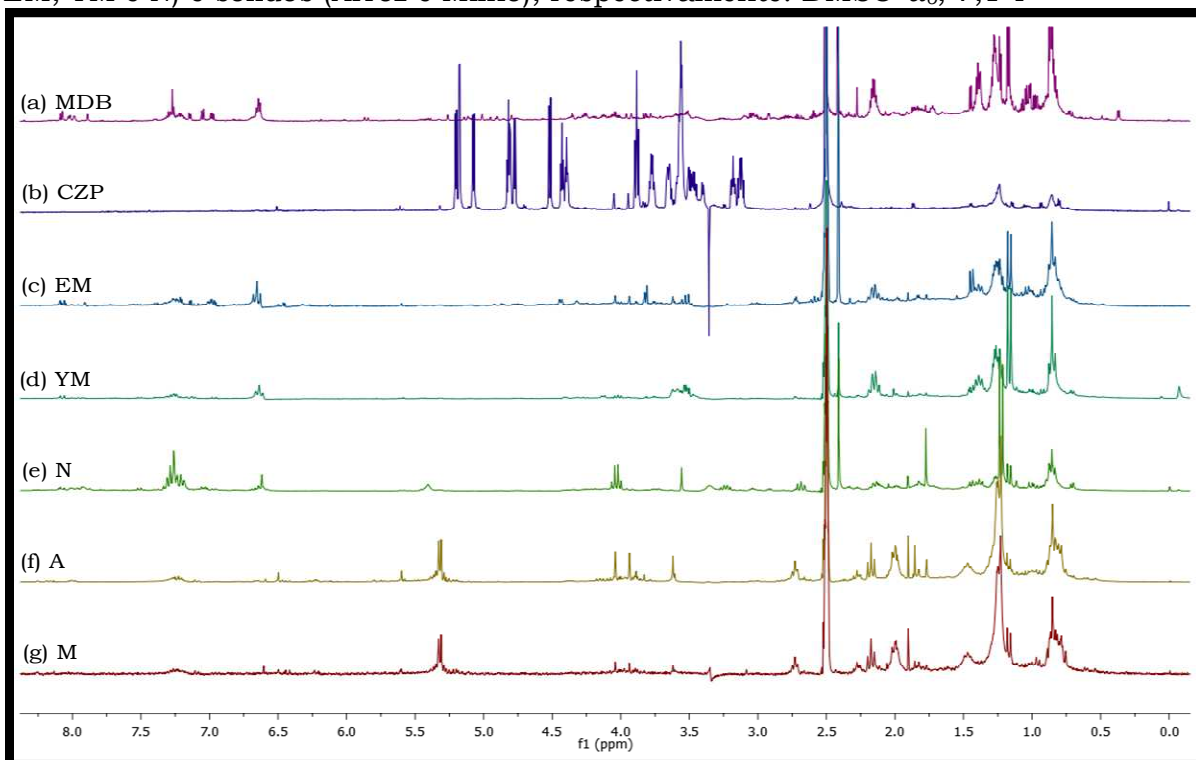
Nas **Figuras 14 a 20** (p. 58-61) estão os perfis químicos (RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT) dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos *Xylaria* sp.: AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. Na **Figura 21** (p. 61) estão os espectros dos brancos dos meios de cultivo obtidos sem a inoculação dos endófitos.

Estes espectros apresentaram uma diversificada produção de metabólitos secundários, onde foram visualizados sinais em uma ampla faixa espectral (0,4 a 9,0 ppm), diversos sinais de hidrogênios aromáticos, olefínicos, carbinólicos, metilênicos e metílicos, evidenciando uma produção de metabólitos secundários.

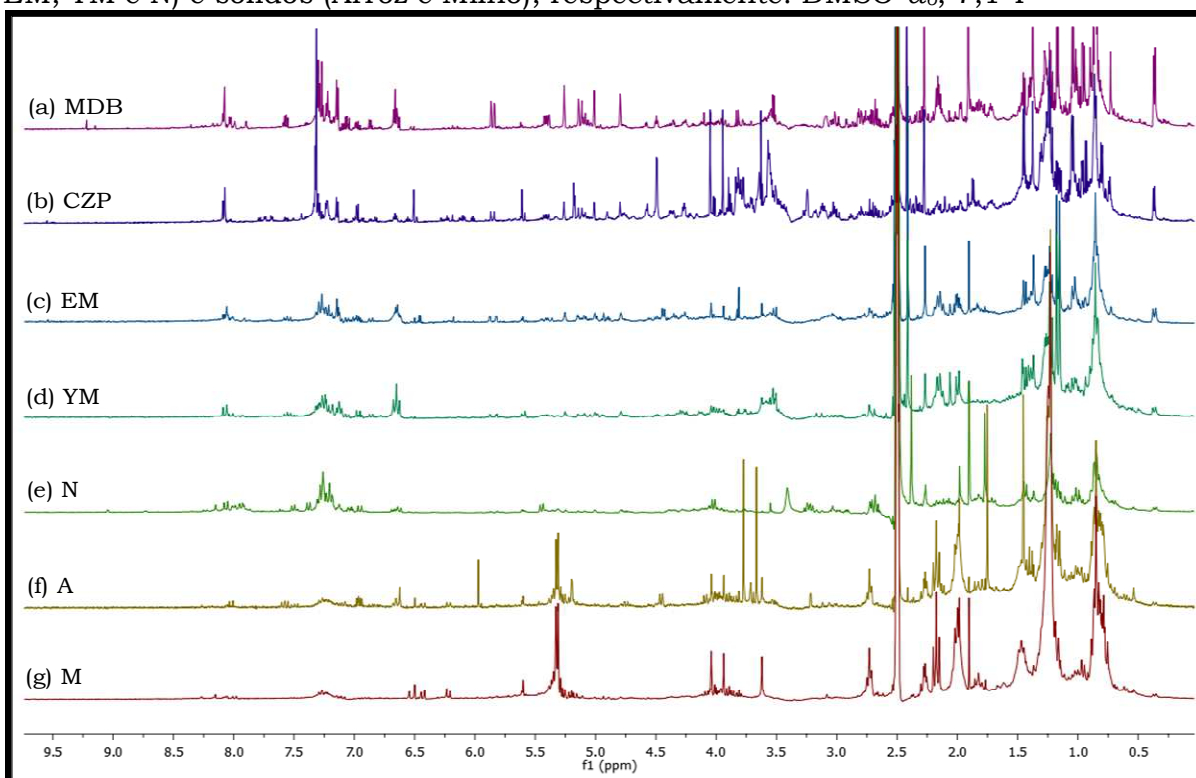
Também foi possível observar a variação da produção metabólica dos endófitos *Xylaria* sp., em função do meio de cultivo empregado, evidenciando a dependência dos nutrientes disponibilizados. Análise mais detalhada dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (com PRESAT) dos extratos obtidos nos meios sólidos (Arroz e Milho) indica que muitas substâncias de caráter graxo ainda encontram-se presentes.

Comparando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (PRESAT) obtidos pela inoculação dos endófitos *Xylaria* sp. com o dos brancos, **Figura 21** (p. 61), observa-se que a variedade dos sinais correspondem somente aos metabólitos secretados pelos fungos, uma vez que os espectros obtidos dos brancos apresentaram sinais não coincidentes com os dos extratos brutos obtidos dos endófitos. Deste modo, nos asseguramos que os metabólitos isolados foram produzidos pelos micro-organismos e não procedentes dos meios de cultivo.

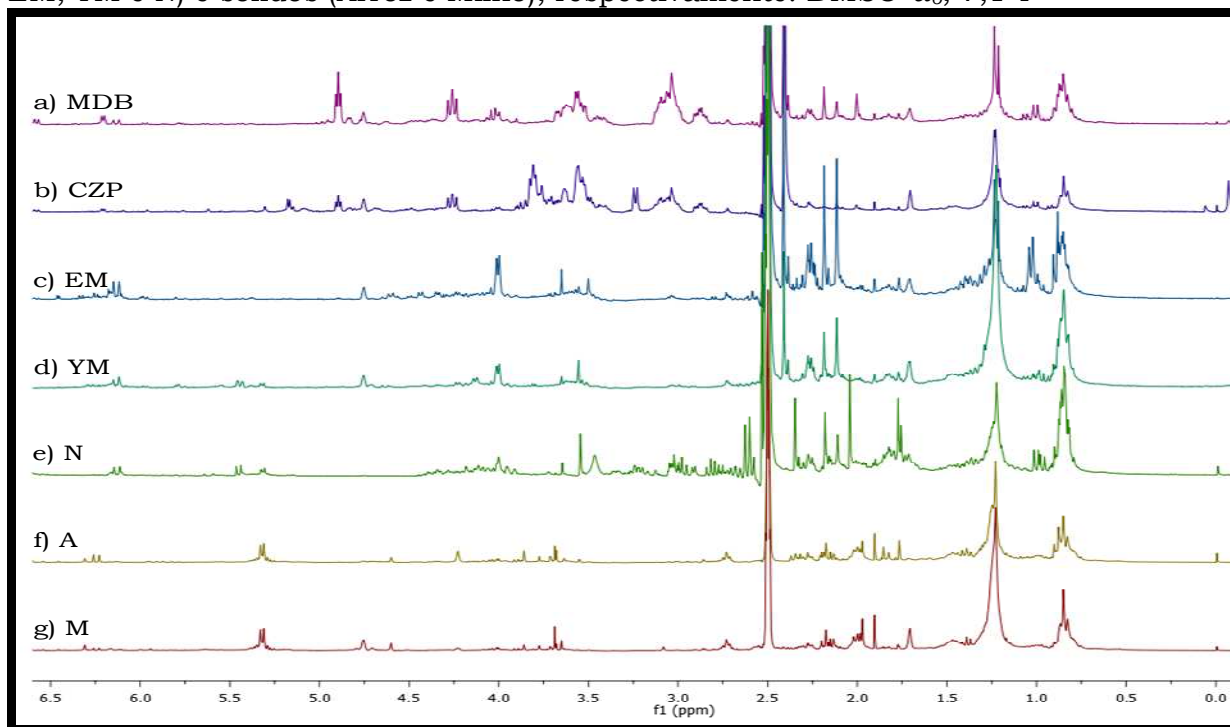
**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. AS-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



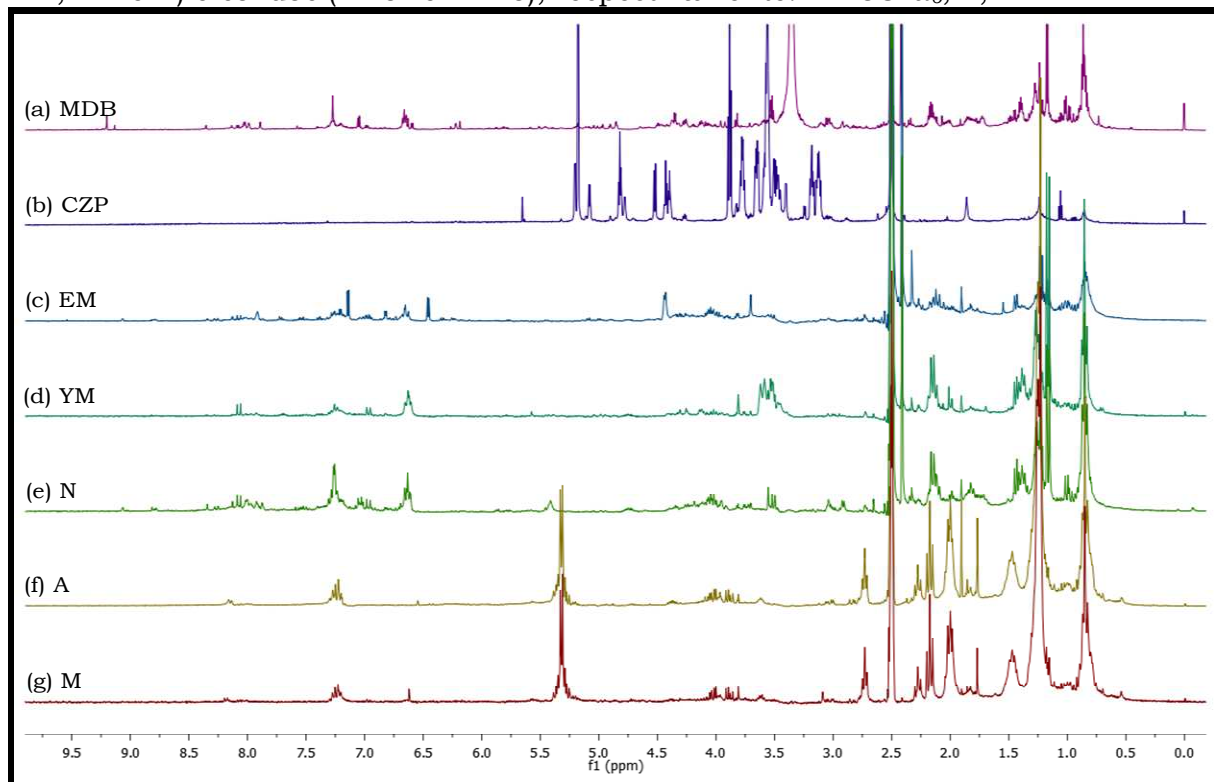
**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



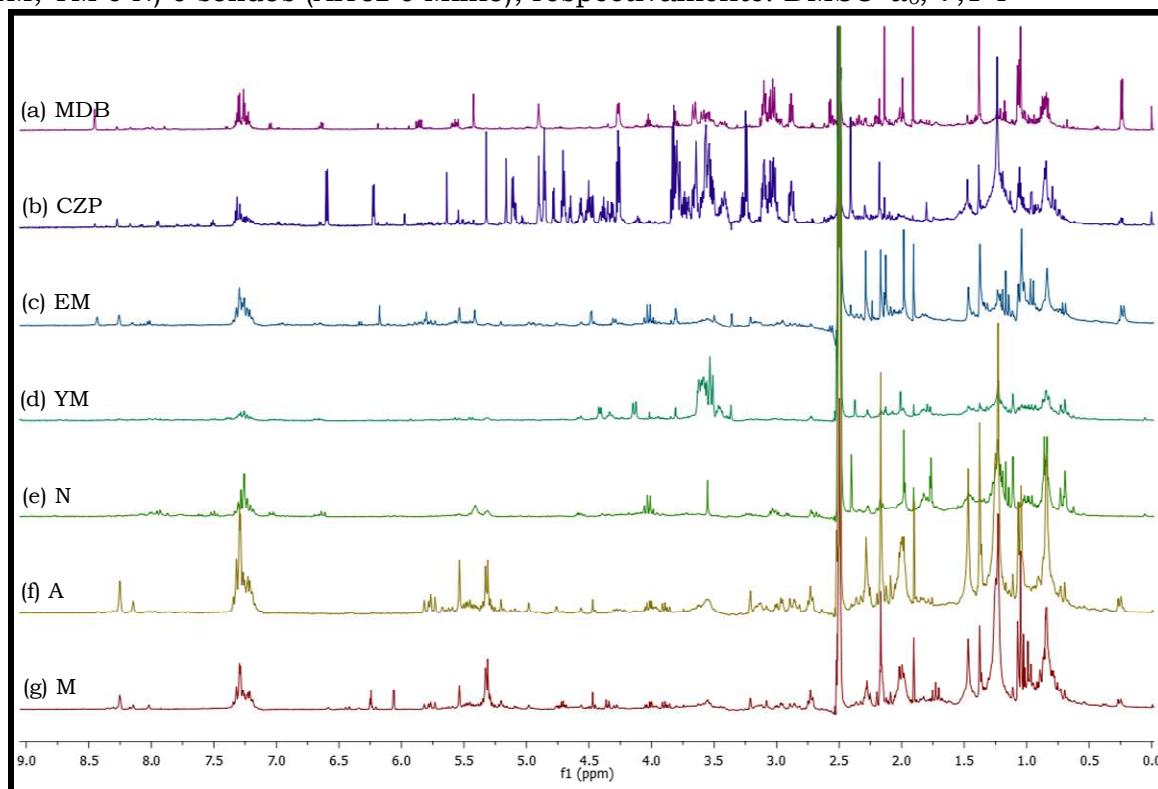
**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-06 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



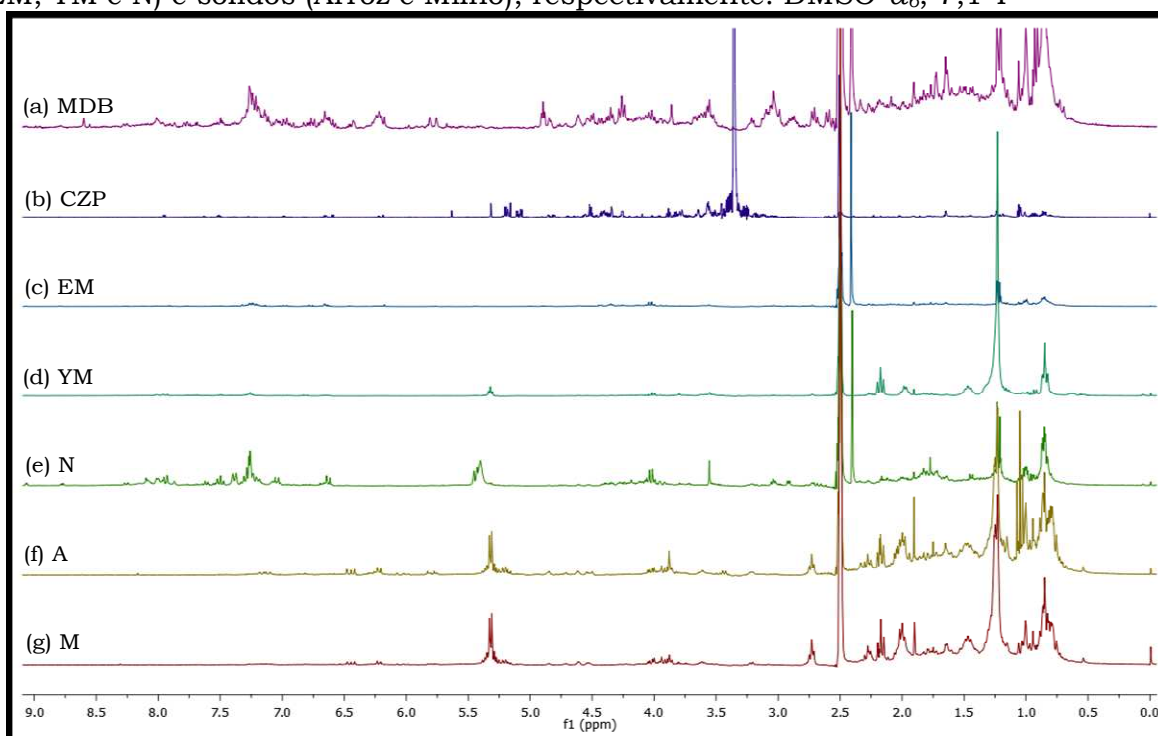
**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CV-06 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



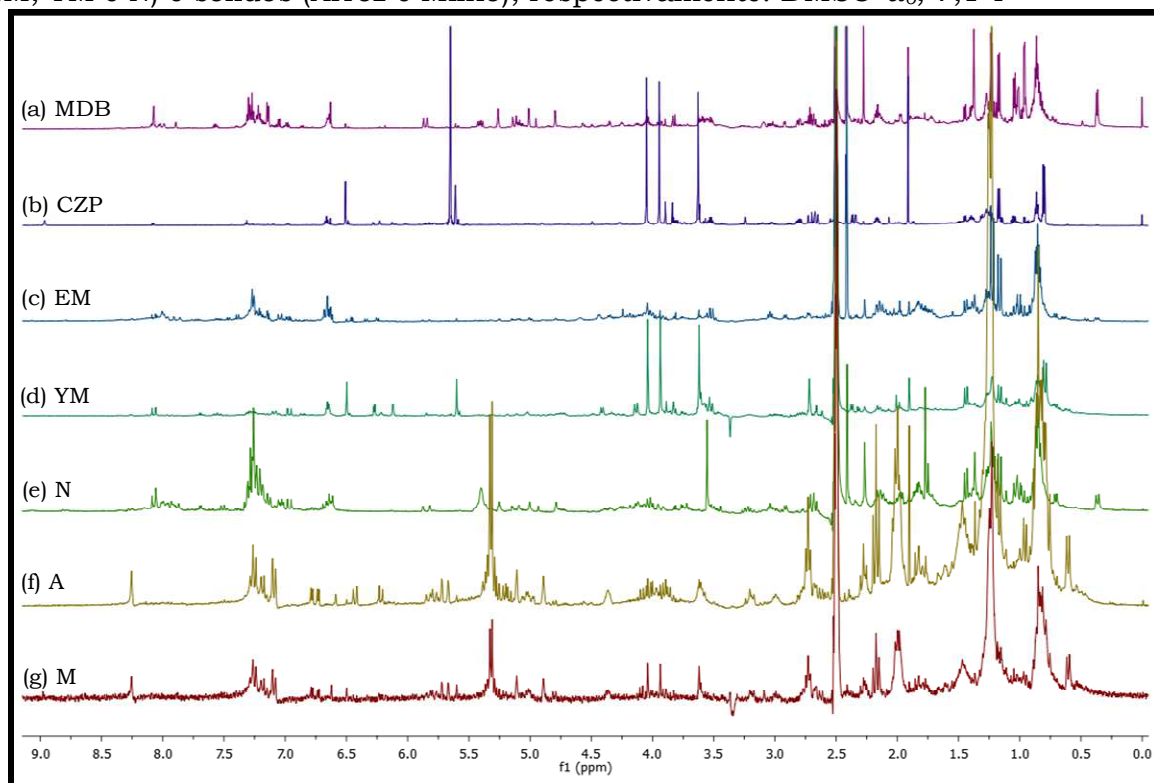
**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. PA-01 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



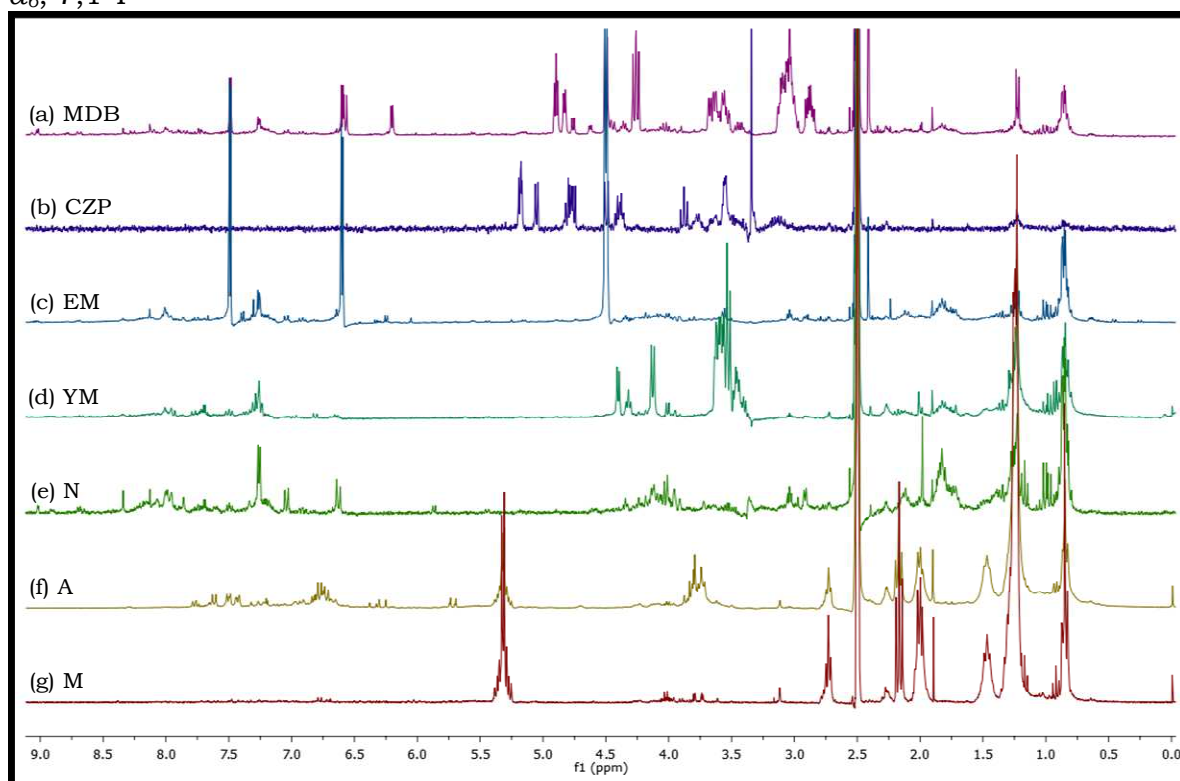
**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. PM-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. PR-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT dos brancos dos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente.  $\text{DMSO-}d_6$ ; 7,1 T



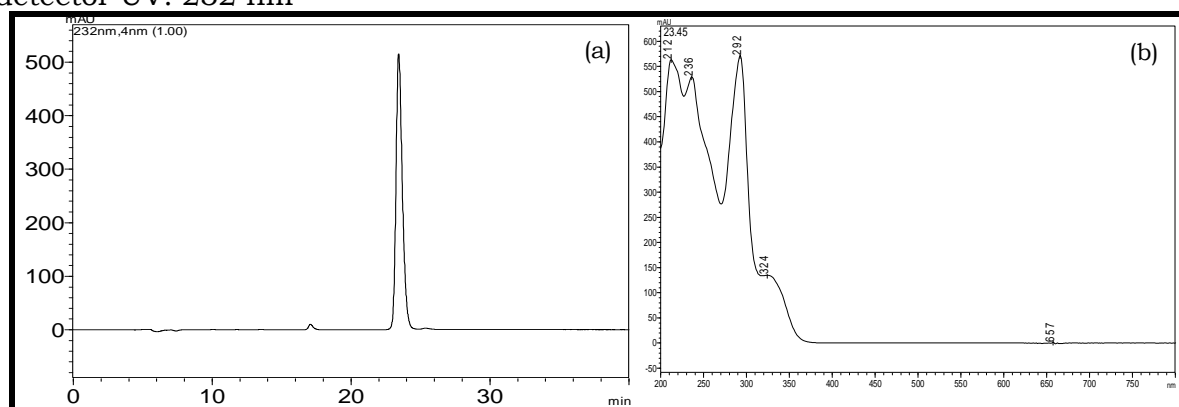
#### 5.4 Análise quantitativa de griseofulvina nos extratos

Com a finalidade de realizar a análise quantitativa da produção de griseofulvina nas diferentes espécies de *Xylaria*, foi adquirida a griseofulvina da SIGMA-ALDRICH® como substância padrão com grau de pureza de 95%.

Para a quantificação, foi utilizada a coluna Fenil-Hexil, como sistema eluente ACN/H<sub>2</sub>O na proporção 45:55 com vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, detector UV em 232 nm, o volume de injeção foi de 20 µL e o tempo de aquisição para cada análise foi de 40 min.

A identificação da griseofulvina nos extratos brutos foi determinada com base no tempo de retenção nas mesmas condições cromatográficas em que os extratos brutos foram analisados e por comparação dos espectros de UV (**Figura 22**, p. 62).

**Figura 22.** (a) Cromatograma da substância padrão, griseofulvina, na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, e (b) sua absorção no UV. Condições do CLAE-DAD: coluna Phenomenex, Fenil-Hexil (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O 45:65, vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>, detector UV: 232 nm



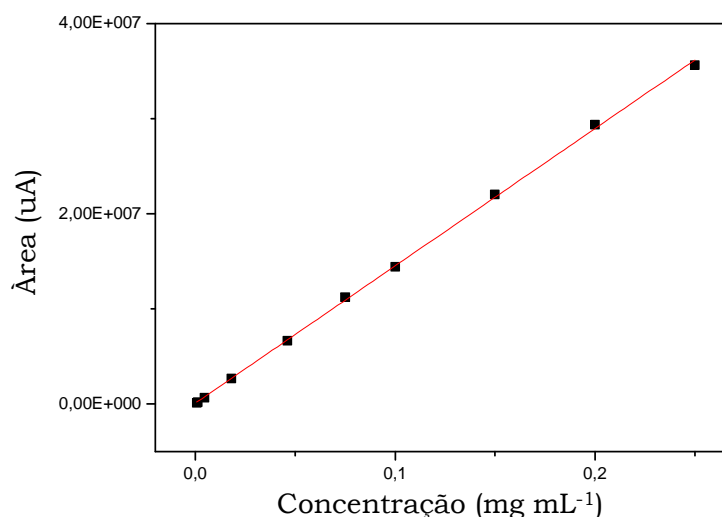
Para a análise quantitativa foi preparada uma solução estoque da substância padrão, a griseofulvina, na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, e a partir desta solução estoque, diluições sucessivas foram feitas para preparar as soluções nas concentrações necessárias para a construção da curva analítica pelo método do padrão externo. 44

As concentrações utilizadas para obter a curva analítica foram determinadas com base nos perfis cromatográficos obtidos anteriormente onde é possível relacionar o valor da área do pico que o padrão gerou na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> com o valor da área do pico que o extrato mais

rico nesta substância apresentava. A partir deste valor estipulado encontrou-se o ponto médio da curva analítica, e, portanto os pontos abaixo e acima deste ponto médio que seriam entre 0,075 a 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, logo, as concentrações para as quais foi obtida esta curva foram: 0,0075; 0,005; 0,001; 0,05; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>; as soluções foram injetadas em triplicatas, com volume de injeção de 20 µL cada, e com tempo de aquisição de dados de 40 min.

Posteriormente, também as soluções dos extratos, numa concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, foram re-injetadas em triplicatas empregando-se a mesma metodologia, porém com tempo de aquisição de 60 min. O tratamento estatístico dos dados para a obtenção da curva analítica envolveu a determinação da equação de regressão linear da reta e do coeficiente de regressão utilizando o software Microsoft Excel®. Assim, obteve-se a curva analítica (**Figura 23** e **Tabela 4**, p. 63).

**Figura 23.** Curva analítica da substância padrão, griseofulvina, obtida com as seguintes concentrações: 0,0075; 0,005; 0,001; 0,05; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>



**Tabela 4.** Dados referentes à curva analítica de griseofulvina (padrão)

<b>Dados da Curva Analítica</b>			
<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Erro</b>	<b>Regressão Linear: y = a + b.x</b>
<b>a</b>	-90639,68686	130639,80272	
<b>b</b>	1,44336x10 <sup>8</sup>	1,09212x10 <sup>6</sup>	
<b>Coefficiente de Regressão Linear (r<sup>2</sup>)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Número de pontos</b>	<b>Imprecisão</b>
0,9995	292191,9889	10	<0,0001

Com relação parâmetros associados à equação de regressão linear da reta, **a** e **b** são referentes aos coeficientes linear e angular, respectivamente, o **y** é a variável dependente e **x** a variável independente. O coeficiente de regressão linear é representado pelo **r<sup>2</sup>**, e a estimativa do desvio padrão relativo por **DP**.<sup>44</sup>

A curva analítica construída a partir das injeções das soluções em diferentes concentrações da substância padrão apresentou coeficiente de regressão linear da reta, 0,9995; indicando a linearidade entre as concentrações analisadas (0,0075 a 0,25 mg mL<sup>-1</sup>) esta medida é obtida matematicamente a partir da curva analítica gerada que relaciona a resposta do equipamento em função das várias concentrações dos analitos, e quanto mais próximo de 1,0 indica que o método é linear. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) foram calculados matematicamente pela relação entre o desvio padrão da curva analítica e sua inclinação, utilizando o fator multiplicador sugerido pela literatura, para LD = 3,3x(DP/b) e LQ = 10x(DP/b),<sup>44</sup> resultando nos valores de 0,0067 e 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, uma vez que estes valores indicam o intervalo de trabalho com maior nível de confiança.

Com base nos valores dos parâmetros obtidos pela equação de regressão linear da reta ( $y = a + b.x$ ) foi possível realizar o cálculo das respectivas concentrações pelas áreas produzidas por cada injeção nos extratos brutos originados pela incubação dos endófitos nos meios líquidos e sólidos que produziram griseofulvina, e a partir da concentração da substância obtida foi possível calcular a quantidade em mg desta substância nestes extratos, bem como inferir a porcentagem desta substância contida nestes, conforme pode ser visualizado na **Tabela 5** (p. 65).

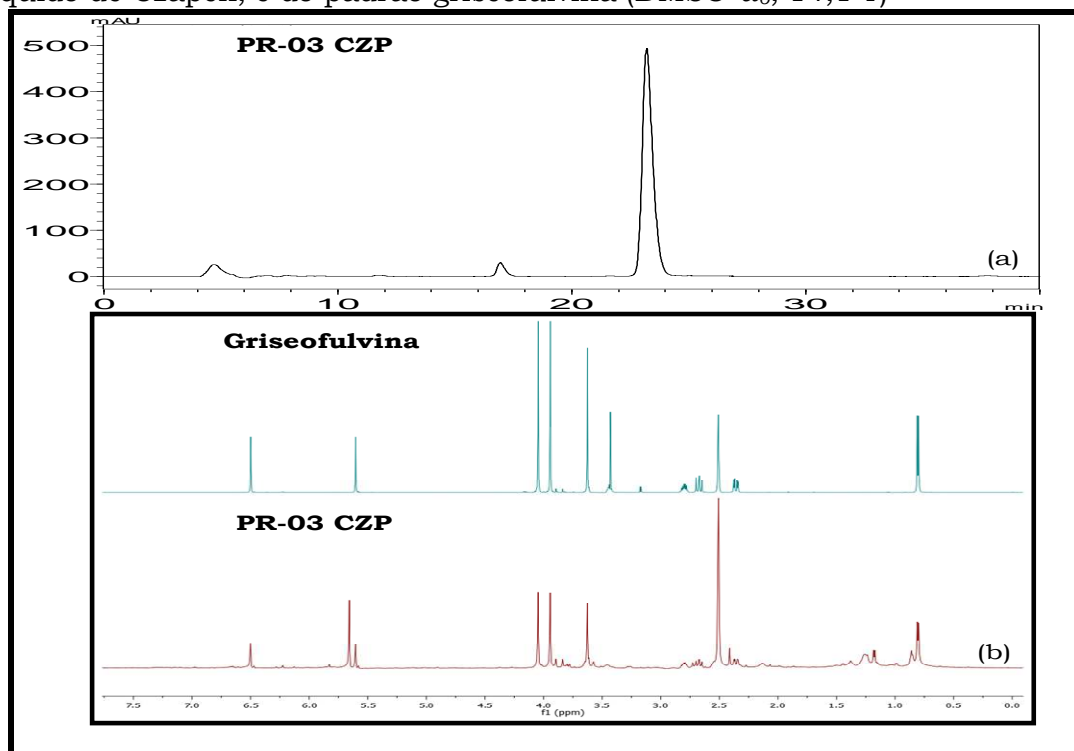
**Tabela 5.** Concentração de griseofulvina presente nos extratos dos endófitos do gênero *Xylaria* sp. obtida a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta

Micro-organismo	Meio de Cultivo	Massa (mg)	Média da Área do pico	griseofulvina (mg mL <sup>-1</sup> )	griseofulvina no extrato (mg)	griseofulvina no extrato (%)
AS-03	MDB	105,2	41097	0,000913**	0,09	0,08
	CZP	71,7	2980345	0,021	1,51	2,1
	EM	37,8	1463155	0,011*	0,42	1,1
	YM	40,3	192305	0,002**	0,08	0,2
	A	352,7	6172729	0,043	14,11	4,0
	M	508,7	2464297	0,02	9,16	1,8
CSY-03	MDB	126,5	498603	0,004**	0,52	0,4
	CZP	32,6	2975423	0,02	0,65	2,0
	YM	32,6	1472103	0,01*	1,51	1,0
	EM	150,7	475418	0,0039**	0,59	0,39
	A	913,8	1337133	0,0098**	9,04	0,99
	M	555,1	4172330	0,029	16,0979	2,9
CSY-06	CZP	20,7	406397	0,0029**	0,0609	0,29
PM-03	M	238,5	4762375	0,034	8,11	3,4
PR-03	MDB	113,1	1261457	0,009**	1,0179	0,9
	<b>CZP</b>	<b>130,4</b>	<b>13544249</b>	<b>0,094</b>	<b>12,2576</b>	<b>9,4</b>
	EM	98,6	1197289	0,008**	0,7888	0,8
	YM	22,5	4821190	0,034	0,765	3,4
	A	591,8	850939	0,007**	4,1426	0,7
	M	418,8	4731135	0,033	13,99	3,3

**Legenda:** \*concentração fora do limite de quantificação; e \*\*concentração fora do limite de detecção e quantificação.

A partir destes resultados podemos inferir que o micro-organismo mais promissor na produção de griseofulvina foi o *Xylaria* sp. codificado como PR-03 quando inoculado em meio líquido de Czapek (9%), meio este que é considerado “pobre em nutrientes”. Adicionalmente, o espectro de RMN de <sup>1</sup>H e o cromatograma deste extrato bruto evidencia, quase que exclusivamente, a produção de griseofulvina (**Figura 24**, p. 66).

**Figura 24.** (a) Cromatograma, e comparação do (b) RMN de  $^1\text{H}$  e com PRESAT do extrato bruto obtido pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. PR-03 em meio líquido de Czapek, e do padrão griseofulvina (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



A partir destes dados um estudo adicional foi realizado neste endófito e meio de cultivo visando aumentar a produção desta substância pela aplicação de estímulos simples, tais como agitação e luminosidade e também pela adição de mais KCl ao meio de cultivo (seção 5.4.1).

#### 5.4.1 Análises quantitativas e quimiométricas aplicadas ao endófito *Xylaria* sp. PR-03 em Czapek

Em vista da alta produção de griseofulvina pelo endófito *Xylaria* sp. PR-03 no meio de cultivo Czapek, este foi submetido a estudos adicionais utilizando o planejamento fatorial completo, objetivando a maximização desta produção

Optou-se pelo planejamento fatorial completo  $2^3$  no qual as variáveis estudadas foram: adição de mais KCl ao meio de cultivo, Luminosidade e Agitação, conforme descrito no **Esquema 4** (p. 44, seção **4.2.2**, p. 43). O tempo de cultivo dos endófitos foi mantido (28 dias), porém a quantidade de meio de cultivo utilizada foi modificada de 300 mL para 200 mL, a

quantidade de material do endófito inoculada foi controlada (círculos com 1 cm de diâmetro), e após a obtenção do caldo fermentado estes foram particionados com AcOEt, e adicionalmente, foram realizadas lavagem com água ultrapura na fase orgânica com o intuito de remover os açúcares provenientes do meio de cultivo.

O fator resposta adotado para tal procedimento foi a quantificação de griseofulvina nos extratos obtidos. Portanto, nas seções **5.4.1.1** (p. 67) a **5.4.1.6** (p. 70) estão as análises cromatográficas utilizadas para esta etapa de quantificação bem como a validação destes métodos cromatográficos. Na seção **5.4.1.7** (p. 71) estão os resultados obtidos utilizando o planejamento fatorial incorporando a quantificação de griseofulvina, bem como as análises dos efeitos associados a este estudo.

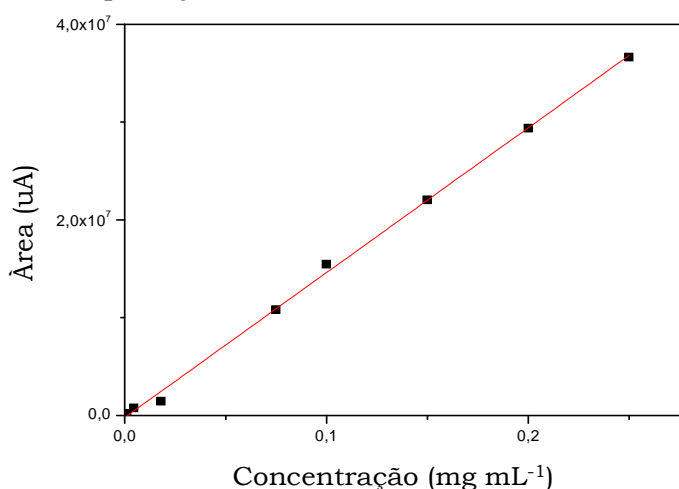
#### *5.4.1.1 Análise quantitativa de griseofulvina*

Para as análises quantitativas aplicadas ao planejamento fatorial foi construída uma nova curva analítica com a substância padrão griseofulvina, as etapas neste procedimento foram semelhantes ao da seção **5.4** (p. 62), mesmas condições cromatográficas, exceto pelo tempo de aquisição dos dados da substância padrão e dos extratos brutos que foram ambos de 40 minutos.

A construção da curva analítica foi preparada a partir de uma solução estoque da substância padrão, na concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , e subsequentemente, sucessivas diluições foram realizadas para preparar as soluções nas concentrações necessárias para a construção da curva analítica pelo método do padrão externo.<sup>44</sup> As concentrações para as quais foi obtida esta nova curva foram: 0,001; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; e  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ; as soluções foram injetadas em triplicatas, com volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$  cada, também as soluções dos extratos, numa concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , foram injetadas em triplicatas.

A curva analítica e os parâmetros associados a esta estão na **Figura 25** e **Tabela 6** (p. 68).

**Figura 25.** Curva analítica da substância padrão, griseofulvina, obtida com as seguintes concentrações: 0,001; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>; utilizada para análise do planejamento fatorial



**Tabela 6.** Dados referentes à curva analítica de griseofulvina (padrão) para análise do planejamento experimental

Dados da Curva Analítica			
Parâmetro	Valor	Erro	Regressão Linear: $y = a + b.x$
<b>a</b>	-191084,37234	300520,43442	
<b>b</b>	$1,48062 \times 10^8$	$2,26388 \times 10^6$	
Coefficiente de Regressão Linear ( $r^2$ )	Desvio Padrão (DP)	Número de pontos	Imprecisão
0,9984	560286,49589	8	<0,0001

#### 5.4.1.2 Validação do método cromatográfico (CLAE-DAD)

Para avaliar o desempenho analítico desta nova etapa de quantificação, foi realizada a validação do método analítico com base nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, robustez e recuperação.

#### 5.4.1.3 Seletividade, Linearidade e Limites de detecção e quantificação

Para avaliar a seletividade do método foi utilizado o CLAE-DAD comparando-se o pico correspondente da substância em análise do padrão com o do extrato no mesmo tempo de retenção, e verificado se possuía as mesmas bandas de absorção no UV (**Figura 22**, p. 62). A linearidade foi atribuída ao coeficiente de regressão linear da reta ( $r^2$ ), 0,9984; obtida entre as concentrações de 0,001 a 0,25 mg mL<sup>-1</sup> analisadas. <sup>44</sup> Os limites de

detecção e quantificação (LD e LQ) foram calculados matematicamente pela relação entre o desvio padrão da curva analítica e sua inclinação, resultando nos valores de 0,01 e 0,04 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, estes parâmetros foram analisados segundo mencionado na seção **5.4** (p. 62).

#### 5.4.1.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada conforme a ANVISA sugere, os parâmetros são verificados a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado, sendo que este foi o procedimento adotado.

A precisão é subdividida em repetibilidade intra-dia e inter-dia. A precisão intra-dia foi avaliada utilizando seis determinações em um mesmo dia, compreendendo a análise do padrão na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. A precisão inter-dia foi avaliada verificando a concordância entre os resultados em dias diferentes, com a mesma amostra, equipamento e analista e foram analisados os tempos de retenção e as áreas dos picos obtidas. Conforme pode ser visualizado na **Tabela 7** (p. 69), foram obtidos as médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual.<sup>44, 46</sup>

**Tabela 7.** Precisão intra e inter-dia. Cálculo das médias, desvio padrão e coeficientes de variação percentual dos picos cromatográficos do padrão griseofulvina

Replicatas	Precisão Intra-dia		Precisão Inter-dia	
	Tempo de retenção (t <sub>R</sub> )	Área do pico	Tempo de retenção (t <sub>R</sub> )	Área do pico
1	21,365	16747433	21,452	16886517
2	21,313	16754184	21,461	16890886
3	21,296	16764093	21,450	16834864
4	21,319	16814664	21,482	16876586
5	21,294	16840069	21,417	16856291
6	21,261	16796642	21,484	16925260
Média	21,308	16786181	21,458	16878401
DP	0,0315	33758,3	0,0225	28299,4
CV (%)	0,15	0,20	0,10	0,17

Os resultados indicam baixos valores de coeficientes de variação percentual em relação ao tempo de retenção dos padrões e das áreas relativas de cada um (valores aceitáveis de CV até 2%), o que demonstra uma boa repetibilidade da análise e da precisão do equipamento utilizado.

#### 5.4.1.5 Robustez

A robustez de um método é a medida da sensibilidade que este apresenta sob pequenas variações. Pode ser avaliada variando-se parâmetros como: temperatura, pH e porcentagem da fase móvel. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites aceitáveis então o método é considerado robusto. <sup>44</sup>

Para analisar a robustez do método, avaliamos o comportamento do padrão, em uma concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, com relação ao tempo de retenção do pico cromatográfico gerado frente a variações de temperatura da coluna cromatográfica. Os limites estabelecidos para tais análises foram  $\pm 2^\circ\text{C}$  na temperatura da coluna, 23 e 27°C, respectivamente.

As análises foram realizadas em triplicatas, conforme descrito na **Tabela 8** (p. 70). Conforme observado, não houve mudanças significativas nos tempos de retenção indicando que o método analítico empregado é robusto. <sup>44</sup>

**Tabela 8.** Avaliação da robustez do método cromatográfico com relação aos  $t_R$  do padrão analisado em diferentes temperaturas

Robustez	23°C	27°C	Média geral	DP	CV (%)
Tempo de retenção ( $t_R$ )	23,827	23,149	23,487	0,339	1,44

#### 5.4.1.6 Recuperação e exatidão

Análise de recuperação e exatidão avalia a eficiência do método de tratamento das amostras, extração e/ou análise, e é expressa em porcentagem da quantidade final em relação à quantidade inicial conhecida de um analito. <sup>44, 54</sup>

Para tal analisou-se a eficiência da extração de griseofulvina a partir do meio de cultivo Czapek isento do endófito. Foram adicionadas quantidades conhecidas do padrão em três níveis de concentrações: 0,02;

0,1 e 0,20 mg mL<sup>-1</sup> ao meio de cultivo, os testes foram efetuados em triplicada e posteriormente analisados por CLAE-DAD.

A recuperação foi expressa em porcentagem do teor encontrado, após quantificação das amostras em relação à quantidade do padrão adicionado inicialmente ao meio de cultivo.

A exatidão do método foi determinada pela obtenção da porcentagem de recuperação média avaliada em todas as amostras. Os valores de recuperação da griseofulvina encontram-se na **Tabela 9** (p. 71)

**Tabela 9.** Análise da recuperação de griseofulvina avaliado pelo método de extração com a adição de padrão ao meio de cultivo isento do endófito

Concentração inicial (mg mL <sup>-1</sup> )	Média áreas dos picos	Média das concentrações	Recuperação (%)	DP	CV (%)
0,02	1440294	0,011	55,1	2852	0,21
0,1	10303515	0,07	70,1	13805	0,13
0,2	19935217	0,15	75,1	86442	0,44

O grau de recuperação variou de 55 a 75% nas concentrações analisadas, que com exceção de 55%, estão dentro das especificações esperadas. Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 e 120% com uma margem de erro de  $\pm 20\%$  para matrizes complexas indicando que o valor encontrado, mesmo que seja baixo, ainda é aceitável.<sup>44</sup> A exatidão do método foi corroborada pelos valores dos coeficientes de variação abaixo de 5%.

Os valores encontrados nos experimentos de recuperação podem estar associados à baixa solubilidade da griseofulvina em meio aquoso.<sup>56</sup>

#### 5.4.1.7 Otimização da produção de griseofulvina aplicando planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> utilizado para avaliar as possíveis interações e efeitos na produção de griseofulvina pelo endófito *Xylaria* sp. PR-03 em meio líquido de Czapek, quando submetido a aplicação das variáveis: luminosidade, agitação e adição de KCl ao cultivo do endófito, foi projetado no **Esquema 4** (p. 44).

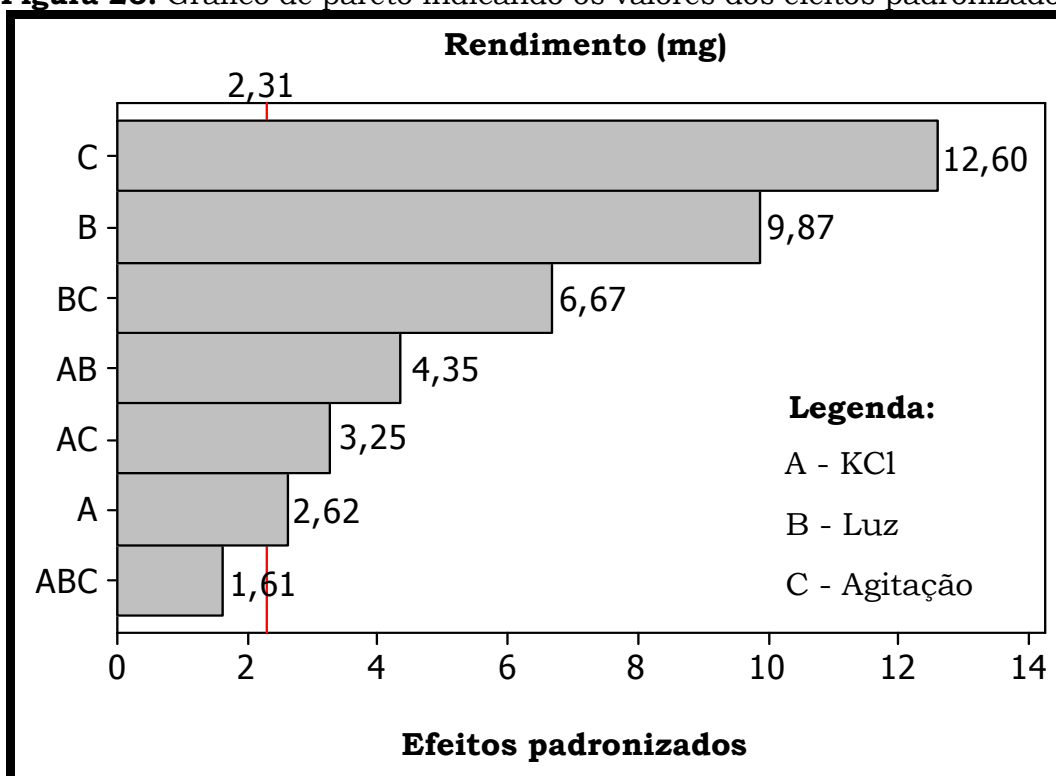
Este planejamento é constituído de oito experimentos realizados em duplicatas (total de dezesseis), que posteriormente foram analisados e quantificados por CLAE-DAD, conforme descrito na seção **5.4.1.1** (p. 67). A média dos rendimentos dos extratos e a quantidade de griseofulvina presente nestes, e que foram obtidos em cada experimento encontram-se na **Tabela 10** (p. 72).

**Tabela 10.** Produção de griseofulvina em função dos experimentos realizados a partir do planejamento fatorial aplicado ao endófito *Xylaria* sp. PR-03 em meio de Czapek

Experimento	Massa do extrato (mg)	Média das Áreas dos picos	Quantidade de griseofulvina no extrato (mg)	Erro
<b>1</b>	5,9	16729787	0,68	± 0,09
<b>2</b>	9,8	21902403	1,46	± 0,37
<b>3</b>	100,4	2845548	2,05	± 0,15
<b>4</b>	67,6	3164915	1,56	± 0,42
<b>5</b>	93,4	3629194	2,42	± 0,21
<b>6</b>	95,2	3577392	2,44	± 0,40
<b>7</b>	<b>73,7</b>	<b>15391241</b>	<b>7,60</b>	<b>± 0,45</b>
<b>8</b>	76,4	9251080	4,87	± 0,32

**Legenda:** **Experimento 1:** sem adição de KCl, ausência de luz e agitação; **Experimento 2:** adição de KCl e ausência de luz e agitação; **Experimento 3:** sem adição de KCl, presença de luz e ausência de agitação; **Experimento 4:** Adição de KCl e luz e ausência de agitação; **Experimento 5:** Sem adição de KCl e luz e presença de agitação; **Experimento 6:** Adição de KCl e ausência de Luz e agitação; **Experimento 7:** Sem adição de KCl e presença de Luz e agitação; **Experimento 8:** Adição de KCl e presença de Luz e agitação.

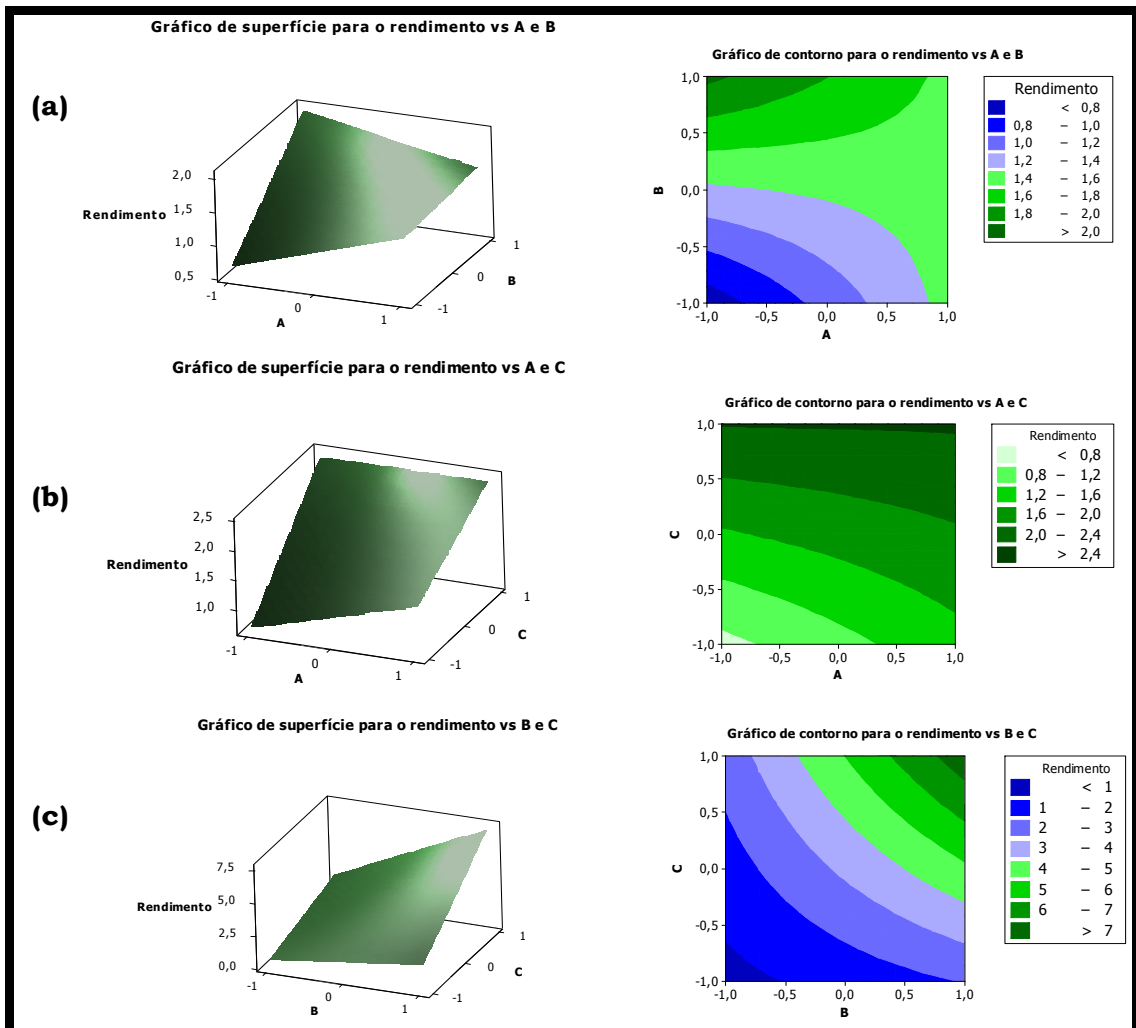
Para analisar os resultados obtidos pelo planejamento fatorial foi utilizado o software MINITAB, que calculou os efeitos envolvidos pela aplicação de cada variável A, B e C (adição de KCl, luminosidade e agitação, respectivamente) às condições de cultivo, bem como as interações obtidas pela combinação destas, considerando o nível de confiança de 95% ( $p > 0,05$ ) que pode ser melhor visualizado no gráfico de pareto obtido na **Figura 26** (p. 73).

**Figura 26.** Gráfico de pareto indicando os valores dos efeitos padronizados

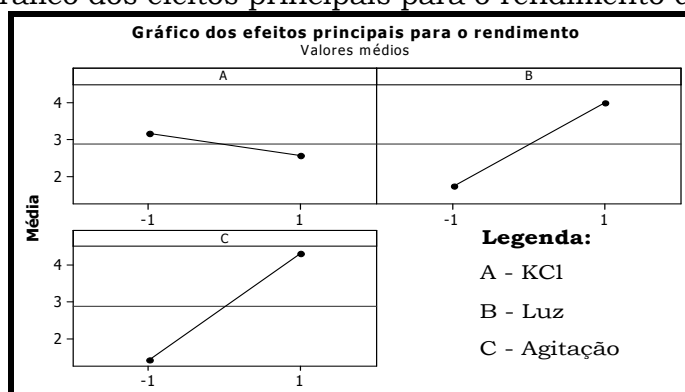
Neste gráfico pode se visualizar que todos os efeitos que ultrapassam a linha no valor de 2,31 são significantes na produção de griseofulvina. Desse modo, observa-se a partir do gráfico de Pareto, que os efeitos produzidos por B e C são os mais significantes, ou seja, Luminosidade e Agitação, bem como a interação destes. O efeito de A (adição de KCl) e as interações entre A e B, e entre A e C também são significantes mas em menor quantidade, evidenciado pelo rendimento (**Tabela 10**), e a única interação não significativa para este propósito foi entre as variáveis A+B+C.

Portanto, dentro das variáveis analisadas, um ótimo é observado quando combinadas as variáveis B+C, como pode ser visualizado no gráfico de superfície (**Figura 27**, p. 74). A superfície de resposta gerada a partir do planejamento fatorial, indica que a maior produção da substância de interesse está relacionada à região de coloração azul intenso, ou seja, com a utilização da combinação entre B+C (**Figura 27c**).

**Figura 27.** Superfície de resposta e mapa de contorno gerados a partir dos dados obtidos no planejamento fatorial da combinação dos fatores: (a) A+B; (b) A+C; e (c) B+C

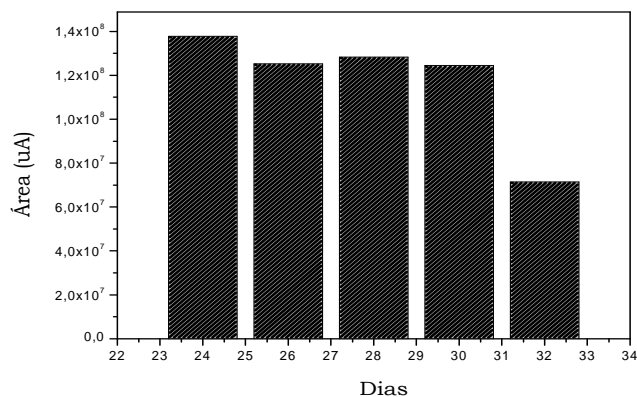


O gráfico dos efeitos principais para maior rendimento de griseofulvina durante o cultivo do endófito PR-03 em Czapek (**Figura 28**, p. 75), mais uma vez evidencia, que quando as variáveis B e C (Luz e Agitação, respectivamente) e a variável A (adição de KCl, no nível mais baixo) são utilizadas há um maior rendimento na produção desta substância.

**Figura 28.** Gráfico dos efeitos principais para o rendimento de griseofulvina

Após verificada a significância das variáveis, luminosidade e agitação, na produção de griseofulvina pelo cultivo do endófito PR-03 em Czapek, efetuou-se um estudo complementar sobre a produção desta substância utilizando estas variáveis em diferentes dias (24, 26, 28, 30 e 32 dias). Estes experimentos foram realizados em duplicata e foi analisada como resposta a área do pico cromatográfico gerado, uma vez que os rendimentos dos extratos brutos produzidos foram semelhantes (entre 60,0 a 70,0 mg).

Na **Figura 29** (p. 75) consta o gráfico área do pico *vs* dias, e pode-se observar, dentro do intervalo analisado, um ligeiro aumento da produção de griseofulvina em 24 dias no cultivo do endófito. Entre os dias 26, 28 e 30 há uma estagnação da produção desta substância, e em 32 dias observa-se um decaimento desta produção, indicando o catabolismo do endófito a partir deste período.

**Figura 29.** Análise da produção de griseofulvina em diferentes dias (24, 26, 28, 30 e 32 dias) pelo endófito PR-03 em Czapek, com utilização de agitação e luminosidade durante o cultivo

## 5.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos

### 5.5.1 Ensaio citotóxico

O câncer é uma doença que pode afetar vários órgãos do corpo, e é caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais. Essas células cancerosas podem se espalhar para outras partes do corpo e produzir novos tumores. Se a propagação de células se tornar descontrolada, pode conduzir o indivíduo a morte. Existe um número limitado de tratamento para câncer, com efeitos colaterais graves e um alto custo associado, tornando o tratamento particularmente desafiador. Além disso, muitas terapias não são eficazes, e certos tipos de tumores apresentam resistência aos medicamentos agravando a complexidade do tratamento.<sup>20</sup>

Portanto a descoberta de novos agentes quimioterápicos dentro deste cenário desafiador seja um dos objetivos dos químicos de produtos naturais.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano.<sup>57</sup> É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983),<sup>58</sup> 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. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.<sup>59</sup>

A atividade citotóxica dos extratos testados está apresentada na **Tabela 11** (p. 77) com os respectivos percentuais de inibição. Somente os extratos que apresentaram valores de inibição  $\geq 75$  % em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativos, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

**Tabela 11.** Percentual de inibição do crescimento celular (IG%) dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos *Xylaria* sp. nos meios líquidos e sólidos em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg mL<sup>-1</sup>, controle positivo doxorrubicina

Amostra	HCT-116*	DP	OVCAR-8**	DP	SF-295***	DP
	IG% (média)		IG% (média)		IG% (média)	
AS-03 MDB	37,19%	4,86%	20,91%	3,26%	74,78%	2,39%
AS-03 CZP	22,68%	9,57%	6,36%	2,04%	25,96%	0,80%
AS-03 EM	40,88%	7,90%	18,39%	1,94%	35,07%	3,65%
AS-03 YM	18,98%	4,35%	17,16%	5,50%	33,21%	0,80%
AS-03 N	73,59%	3,12%	48,64%	3,36%	64,71%	2,73%
<b>AS-03 A</b>	<b>86,00%</b>	<b>12,98%</b>	<b>78,61%</b>	<b>1,73%</b>	<b>74,06%</b>	<b>4,56%</b>
<b>AS-03 M</b>	<b>101,08%</b>	<b>0,51%</b>	<b>92,08%</b>	<b>1,43%</b>	<b>93,47%</b>	<b>2,16%</b>
CSY-03 MDB	52,21%	6,53%	42,16%	1,32%	74,70%	2,28%
CSY-03 CZP	69,44%	6,96%	41,58%	6,83%	80,83%	2,73%
CSY-03 EM	58,83%	1,81%	31,78%	2,75%	77,36%	2,39%
CSY-03 YM	66,88%	5,51%	57,72%	0,71%	52,15%	0,23%
CSY-03 N	39,55%	1,81%	28,69%	0,41%	66,40%	1,25%
<b>CSY-03 A</b>	<b>92,26%</b>	<b>1,23%</b>	<b>80,33%</b>	<b>0,31%</b>	<b>62,86%</b>	<b>1,71%</b>
<b>CSY-03 M</b>	<b>99,13%</b>	<b>0,07%</b>	<b>79,90%</b>	<b>0,71%</b>	<b>63,02%</b>	<b>12,87%</b>
CSY06 MDB	34,80%	0,56%	-17,17%	4,54%	43,71%	3,72%
CSY-06 CZP	61,15%	10,99%	14,24%	1,95%	41,89%	3,72%
CSY-06 EM	77,81%	0,84%	33,96%	19,78%	50,59%	11,45%
CSY06 YM	34,87%	5,68%	8,63%	9,24%	36,42%	8,88%
CSY-06 N	41,39%	10,43%	10,69%	9,24%	40,57%	6,44%
<b>CSY-06 A</b>	<b>102,37%</b>	<b>0,19%</b>	<b>91,75%</b>	<b>12,97%</b>	<b>87,45%</b>	<b>21,19%</b>
<b>CSY06 M</b>	<b>97,30%</b>	<b>0,28%</b>	<b>73,86%</b>	<b>20,43%</b>	<b>57,18%</b>	<b>9,59%</b>
CV-06 MDB	32,37%	12,76%	30,07%	4,86%	49,99%	6,59%
CV-06 CZP	29,14%	3,17%	16,77%	3,57%	36,22%	6,01%
CV-03 EM	16,68%	0,80%	2,03%	3,87%	18,71%	1,71%
CV-06 YM	18,68%	9,14%	1,96%	1,73%	25,88%	0,46%
CV-06 N	51,70%	10,15%	22,49%	6,72%	53,60%	3,42%
CV-06 A	92,98%	3,70%	36,47%	14,06%	43,12%	3,19%
<b>CV-06 M</b>	<b>86,00%</b>	<b>20,67%</b>	<b>91,07%</b>	<b>12,84%</b>	<b>59,15%</b>	<b>19,71%</b>
PA-01 MDB	83,73%	2,89%	47,95%	2,27%	66,79%	0,29%
PA-01 CZP	90,71%	0,65%	64,92%	3,24%	65,07%	11,31%
PA-01 EM	80,77%	2,61%	48,75%	2,76%	54,24%	3,72%
PA-01 YM	80,05%	0,47%	44,17%	1,13%	62,14%	4,87%
PA-01 N	77,81%	1,21%	47,95%	1,95%	54,64%	2,00%
<b>PA-01 A</b>	<b>90,32%</b>	<b>1,21%</b>	<b>37,63%</b>	<b>9,73%</b>	<b>73,88%</b>	<b>0,57%</b>
PA-01 M	87,22%	7,45%	62,74%	4,70%	58,49%	4,30%
PM-03 MDB	13,91%	1,96%	4,20%	1,22%	31,44%	4,90%
PM-03 CZP	15,50%	3,19%	-3,66%	1,12%	17,02%	8,66%
PM-03 EM	9,70%	1,09%	3,84%	0,31%	19,36%	8,09%
PM-03 YM	14,52%	3,84%	7,80%	0,61%	46,42%	4,22%
PM-03 N	34,68%	5,37%	6,36%	2,65%	27,65%	5,70%
PM-03 A	96,72%	5,80%	66,22%	3,16%	28,14%	3,65%
PM-03 M	94,46%	4,64%	45,47%	4,18%	33,45%	5,70%
PR-03 MDB	52,83%	2,32%	35,60%	4,28%	79,30%	1,94%
PR-03 CZP	37,91%	1,09%	42,59%	6,21%	50,78%	2,85%
PR-03 EM	43,90%	1,02%	28,54%	1,43%	38,77%	30,08%
<b>PR-03 YM</b>	<b>59,70%</b>	<b>0,44%</b>	<b>80,91%</b>	<b>2,34%</b>	<b>71,88%</b>	<b>1,71%</b>
PR-03 N	56,77%	0,65%	61,89%	2,55%	72,85%	0,34%
<b>PR-03 A</b>	<b>100,77%</b>	<b>6,31%</b>	<b>96,83%</b>	<b>4,07%</b>	<b>95,25%</b>	<b>1,25%</b>
<b>PR-03 M</b>	<b>94,77%</b>	<b>1,60%</b>	<b>97,33%</b>	<b>0,71%</b>	<b>91,38%</b>	<b>1,25%</b>

\* HCT-116 (côlon); \*\* OVCAR-8 (carcinoma de ovário); \*\*\* SF-295 (glioblastoma).

A partir da análise da **Tabela 11** pode-se observar que cerca de 25% dos extratos produzidos por espécies *Xylaria* produziram substâncias com potencial citotóxico.

### 5.5.2 Ensaio antifúngico

Diversas doenças que ocorrem em plantas, animais e até mesmo em humanos, são devidas à fungos fitopatogênico e patogênicos. Esse fato tem incentivado pesquisadores a buscar novas substâncias com potencial antifúngico de origem natural. <sup>60</sup>

O potencial antifúngico dos extratos obtidos em meios líquidos e sólidos pelos fungos endofíticos foi executado por bioautobiografia com a nebulização dos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, os resultados estão presentes na **Tabela 12** (p. 79).

Estes resultados são muito interessantes, pois sugerem que a maioria dos extratos apresenta atividade antifúngica variando de fraca, moderada a forte, e sugerem estar diretamente relacionados à ecologia química, onde estes micro-organismos produzem substâncias bioativas para a defesa do hospedeiro contra os fitopatógenos.

**Tabela 12.** Resultado da avaliação da atividade antifúngica contra os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos *Xylaria* sp. nos meios líquidos e sólidos, controle positivo nistatina

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
	Atividade	Atividade
<b>AS-03 MDB</b>	***	***
AS-03 CZP	**	**
<b>AS-03 EM</b>	***	***
<b>AS-03 YM</b>	***	***
<b>AS-03 N</b>	***	***
<b>AS-03 A</b>	***	***
AS-03 M	*	-
CSY-03 MDB	***	**
<b>CSY-03 CZP</b>	***	***
<b>CSY-03 EM</b>	***	***
<b>CSY-03 YM</b>	***	***
CSY-03 N	***	*/**
<b>CSY-03 A</b>	***	***
CSY-03 M	***	**
<b>CSY-06 MDB</b>	***	***
<b>CSY-06 CZP</b>	***	***
<b>CSY-06 EM</b>	***	***
<b>CSY-06 YM</b>	***	***
<b>CSY-06 N</b>	***	***
<b>CSY-06 A</b>	***	***
<b>CSY-06 M</b>	***	***
<b>CV-06 MDB</b>	***	***
CV-06 CZP	-	-
CV-06 EM	***	**
CV-06 YM	-	-
<b>CV-06 N</b>	***	***
CV-06 A	-	-
CV-06 M	-	-
PA-01 MDB	***	**
PA-01 CZP	*	*
<b>PA-01 EM</b>	***	***
<b>PA-01 YM</b>	***	***
<b>PA-01 N</b>	***	***
PA-01 A	***	-
<b>PA-01 M</b>	***	***
<b>PM-03 MDB</b>	***	***
<b>PM-03 CZP</b>	***	***
<b>PM-03 EM</b>	***	***
PM-03 YM	-	-
<b>PM-03 N</b>	***	***
PM-03 A	*	*
PM-03 M	*	*
PR-03 MDB	***	**
PR-03 CZP	***	*
PR-03 EM	***	**
<b>PR-03 YM</b>	***	***
<b>PR-03 N</b>	***	***
PR-03 A	*	*
PR-03 M	***	**

Atividade fraca (\*), moderada (\*\*), e forte (\*\*\*).

### 5.5.3 Ensaio anticolinesterásico

A importância deste ensaio reside no fato de que os medicamentos atualmente utilizados no tratamento contra o mal de Alzheimer são principalmente inibidores da enzima acetilcolinesterase. <sup>7</sup> Desta forma, a busca por substâncias que atuam na inibição desta enzima se faz necessário.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos podem ser visualizados na **Tabela 13** (p. 80), e evidenciam que estes endófitos podem ser fontes promissoras de substâncias para este propósito.

**Tabela 13.** Resultado da avaliação da atividade anticolinesterásica produzidos pelos endófitos frente ao padrão fisostigmina

<b>Amostra</b>	<b>Atividade</b>	<b>Amostra</b>	<b>Atividade</b>
AS-03 MDB	**	CV-06 N	**
AS-03 CZP	**	CV-06 A	**
AS-03 EM	*	CV-06 M	**
AS-03 YM	**	PA-01 MDB	*
AS-03 N	**	PA-01 CZP	-
AS-03 A	**	PA-01 EM	*
AS-03 M	**	PA-01 YM	*
CSY-03 MDB	*	PA-01 N	*
CSY-03 CZP	*	PA-01 A	*
CSY-03 EM	*	PA-01 M	*
CSY-03 YM	*	PM-03 MDB	**
CSY-03 N	*	PM-03 CZP	*
CSY-03 A	*	PM-03 EM	*
CSY-03 M	*	PM-03 YM	**
CSY-06 MDB	**	PM-03 N	*
CSY-06 CZP	**	PM-03 A	*
CSY-06 EM	**	PM-03 M	*
CSY-06 YM	**	PR-03 MDB	**
CSY-06 N	**	PR-03 CZP	-
CSY-06 A	**	PR-03 EM	**
CSY-06 M	**	PR-03 YM	**
CV-06 MDB	**	PR-03 N	**
CV-06 CZP	*	PR-03 A	**
CV-06 EM	*	PR-03 M	**
CV-06 YM	**		

Atividade fraca (\*) e moderada (\*\*)

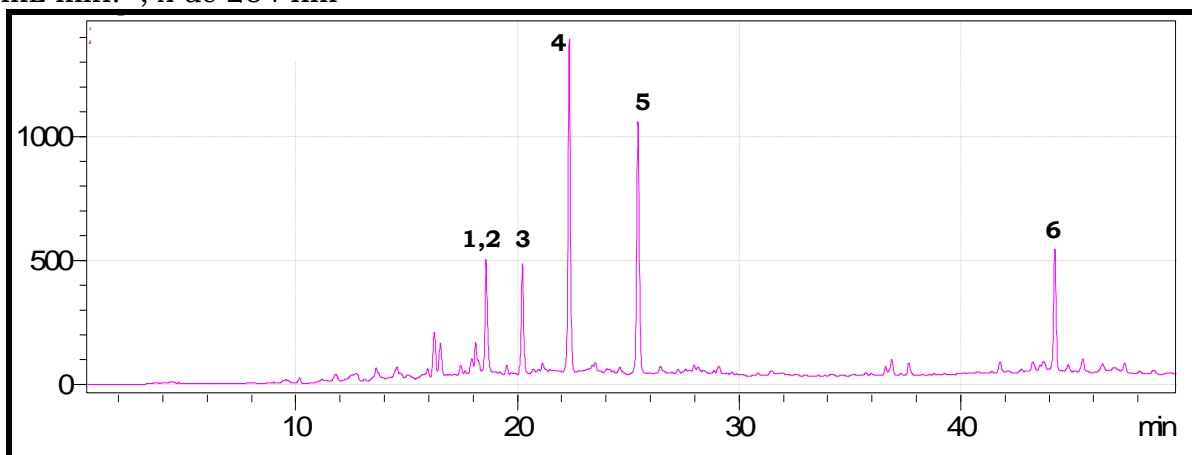
Considerando os perfis químicos e cromatográficos (seções **5.2** e **5.3**), potencial biológico (atividades antitumoral, antifúngica e acetilcolinesterase), e micro-organismos que ainda não foram estudados quimicamente pelo nosso grupo de pesquisa, foram selecionados os extratos obtidos pelos endófitos *Xylaria* sp. CSY-06 e PR-03 por inoculação em meio sólido de Arroz para estudos químico e biológico mais detalhado.

### 5.6 Fracionamento do extrato produzido pelo endófito CSY-06

O extrato produzido pelo endófito CSY-06 em Arroz apresentou excelentes atividades biológicas frente aos ensaios testados e boa resolução cromatográfica (**Figura 8f**, p. 51), devido a pouca massa disponível (180 mg), este foi submetido ao fracionamento por CLAE-DAD no modo preparativo. Para tal, utilizou-se inicialmente, uma alíquota de 5,0  $\mu\text{L}$  ( $C = 20,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) que foi submetida à análise cromatográfica, (**Figura 30**, p. 82) possibilitando a otimização cromatográfica em um menor tempo, bem como selecionar o comprimento de onda necessário para a separação dos constituintes.

Desta separação foram isoladas seis substâncias que tiveram as estruturas elucidadas por técnicas espectrométricas de RMN de  $^1\text{H}$  e PRESAT,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, COSY, TOCSY 1D, NOESY 1D, Espectrometria de Massas, e por comparação dos valores obtidos com a literatura. O rendimento das substâncias isoladas estão descritas na **Tabela 14** (p. 82).

**Figura 30.** Condições cromatográficas no modo preparativo: eluição em gradiente ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  5-100% em 40 min., e 10 min. a 100 % de ACN; C18 preparativa, vazão 4,5  $\text{mL min}^{-1}$ ,  $\lambda$  de 254 nm



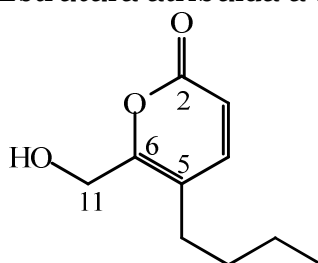
**Tabela 14.** Rendimento das substâncias obtidas por fracionamento cromatográfico do extrato CSY-06 A

Substâncias	Massa (mg)
1 e 2	2,0
3	6,0
4	3,0
5	2,0
6	2,0

### 5.6.1 Determinação estrutural de **3**

A substância **3** foi isolada como um sólido de coloração vermelha e o espectro de massas no modo positivo apresentou um íon com  $m/z$  205,0837  $[M+Na]^+$  indicando a molécula sodiada, e um íon com  $m/z$  183,1019  $[M+H]^+$  (cálc.: 183,1016; erro: 1,63 ppm) conforme pode ser visualizado no **Apêndice 1** (p. 131). Esta informação adicionada aos dados obtidos por RMN de  $^1H$  com PRESAT e  $^{13}C$ , permitiram propor para a substância **3** a fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O_3$  e a estrutura da **Figura 31** (p. 83).

**Figura 31.** Estrutura atribuída à substância **3**



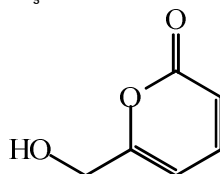
**Tabela 15.** Dados de RMN de  $^1H$  com PRESAT e  $^{13}C$  da substância **3** ( $CD_3OD$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_c$	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> Hz)	HMBC
2	163,0		
3	114,3	6,30 ( <i>d</i> ; 9,7)	C-5, C-2, C-6
4	148,2	7,50 ( <i>d</i> ; 9,7)	C-8, C-11, C-5, C-6, C-2
5	117,6	-	-
6	158,8	-	-
7	27,9	2,46 ( <i>t</i> ; 8,0)	-
8	32,3	1,53 ( <i>m</i> )	C-9, C-10, C-7
9	21,7	1,41 ( <i>m</i> )	C-7, C-8
10	12,8	0,98 ( <i>t</i> ; 7,5)	C-8, C-9
11	57,9	4,41 ( <i>s</i> )	C-5, C-6, C-2,

O espectro de RMN  $^{13}C$  da substância **3** (**Tabela 15**, p. 83; **Apêndice 3**, p. 133) evidenciou dez sinais, sendo que cinco referentes aos carbonos  $sp^2$   $\delta_c$  148,2 (C-4), 114,3 (C-3), 158,8 (C-6), 117,6 (C-5), e 163,0 (C-2) atribuídos a dois carbonos metínicos, dois quaternários e uma carbonila, respectivamente. Adicionalmente foi observado um carbono metilênico carbinólico em  $\delta_c$  57,9 (C-11), e quatro carbonos  $sp^3$ , em  $\delta_c$  12,8; 27,9; 32,3 e 21,7 (C-7, C-8 e C-9), atribuídos a uma metila terminal (C-10) e três carbonos metilênicos, respectivamente.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT de **3** (Tabela 15; Apêndice 2, p. 132) apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,50 (*d*, 1H,  $J = 9,7$  Hz, H-4) e  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (*d*, 1H,  $J = 9,7$  Hz, H-3), a constante de acoplamento observada sugere uma ligação dupla com geometria *cis*. Observou-se também um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  4,41 (*s*, 2H, H-11,  $\delta_{\text{C}}$  57,9) característico de hidrogênios carbinólicos, um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,98 atribuído a uma metila (*t*, 3H,  $J = 7,5$  Hz, H-10), e três unidades metilênicas ( $\text{Csp}^3$ ) em  $\delta_{\text{H}}$  2,46; 1,53 e 1,41. Essas informações adicionadas às correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC (Apêndice 6, p. 136) associado ao mapa de contorno do HSQC (Apêndice 5, p. 135) permitiram visualizar a unidade **A** (Figura 32, p. 84).

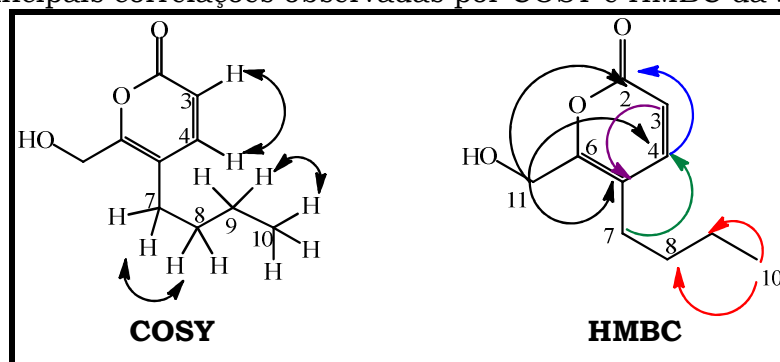
**Figura 32.** Determinação da unidade **A** da substância **3**



No espectro de TOCSY 1D foi observado um sistema de spin evidenciando um radical butil (Apêndice 7, p. 137). O experimento de RMN de  $^{13}\text{C}$  em conjunto ao mapa de contorno do HSQC permitiu atribuir todos os átomos de hidrogênios aos respectivos carbonos.

Análise das correlações observadas pelo mapa de contorno HMBC (Figura 33, p. 84), permitiu posicionar o radical butil em C-5 devido a correlação observada entre H-4 $\leftrightarrow$ C-7, adicionalmente as correlações observadas entre H-4 $\leftrightarrow$ C-6/C-3/C-11 e de H-3 $\leftrightarrow$ C-5/C-6/C-2.

**Figura 33.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **3**

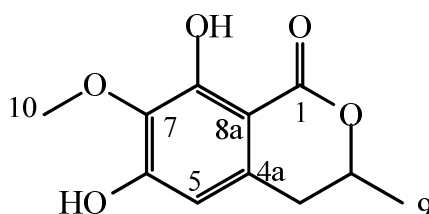


O sistema de spin observado pelo experimento de TOCSY 1D, e as correlações observadas pelo COSY (**Figura 33**, p. 84; **Apêndice 4**, p. 134) associado aos valores das constantes de acoplamento e dos deslocamentos químicos permitiu atribuir para a substância **3** a estrutura 5-butil-6-hidroximetil-2H-piran-2-ona, inédita na literatura.

#### 5.6.2 Determinação estrutural de **4**

A substância **4** foi isolada como um sólido de coloração amarela e o espectro de massas no modo positivo (**Apêndice 8**, p. 138) apresentou um íon com  $m/z$  225,0759  $[M+H]^+$  (cálc.: 225,0757; erro: 0,8 ppm), e um aduto de sódio com  $m/z$  247,0581  $[M+Na]^+$ . Esta informação adicionada aos dados obtidos por RMN de  $^1H$  com PRESAT,  $^{13}C$ , e HSQC (**Apêndice 9**, p. 139; **Apêndice 10**, p. 140; e **Apêndice 12**, p. 142, respectivamente) permitiram sugerir para a substância **4** a fórmula molecular  $C_{11}H_{12}O_5$  e a estrutura da **Figura 34** (p. 85).

**Figura 34.** Estrutura atribuída à substância **4**



**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1H$  com PRESAT e  $^{13}C$  da substância **4** ( $CD_3OD$ ; 14,1 T)

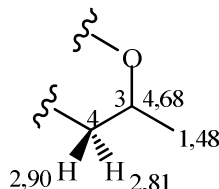
Posição	$\delta_C$	$\delta_H$ (m, J Hz)	HMBC
1	170,6		
3	76,2	4,68 (m)	C-4a
4	33,8	2,90 (dd; 12,0 e 6,0) 2,82 (dd; 12,0 e 6,0)	C-3, C-5, C-4a, C-6, C-9
4a	136,1		
5	106,4	6,31 (s)	C-4, C-6, C-1
6	156,2		
7	133,6		C-10
8	157,0		
8a	100,7		
9	19,4	1,48 (d; 6,3)	C-3, C-4
10	59,5	3,84 (s)	C-7

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT de **4** (Tabela 16, p. 85; Apêndice 9) apresentou dois singletos, sendo um característico de hidrogênio aromático de um anel pentassubstituído em  $\delta_{\text{H}}$  6,31 (s, 1H, H-5,  $\delta_{\text{C}}$  106,4), e um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,84 (s, 3H, H-10,  $\delta_{\text{C}}$  59,5), referente a metoxila aromática e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,48 característico de hidrogênio metílico (*d*,  $J = 6,0$  Hz, 3H, H-9,  $\delta_{\text{C}}$  19,4). Adicionalmente, observam-se dois duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,90 (*dd*, 1H,  $J = 12,0$  Hz e 6,0 Hz; H-4a',  $\delta_{\text{C}}$  33,8) e 2,82 (*dd*, 1H,  $J = 12,0$  Hz e 6,0 Hz; H-4b',  $\delta_{\text{C}}$  33,8) característico de um metileno diastereotópico, e um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,68 (*m*, 1H, H-3,  $\delta_{\text{C}}$  76,2).

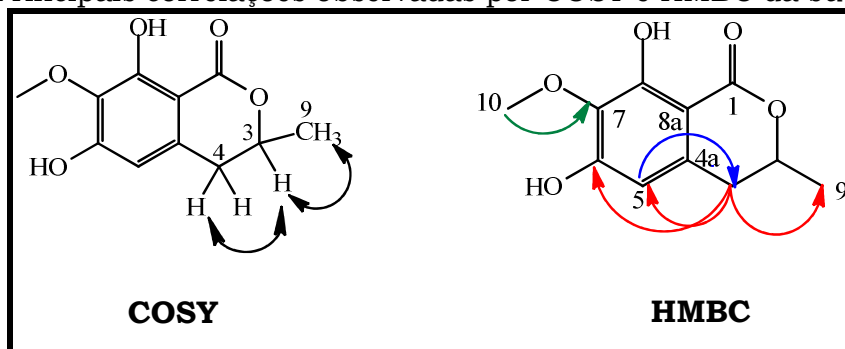
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 16; Apêndice 10) evidenciou a presença de onze sinais, sendo que seis são referentes aos carbonos  $sp^2$   $\delta_{\text{C}}$  157,0 (C-8); 156,2 (C-6); 136,1 (C-4a); 133,6 (C-7); 106,4 (C-5); 100,7 (C-8a); sendo cinco destes atribuídos a carbonos quaternários, um metínico ambos do anel aromático e uma carbonila de lactona em  $\delta_{\text{C}}$  170,6 (C-1), três carbonos  $sp^3$  sendo uma metila, um metínico carbinólico e outro metilênico benzílico. Também foi observada a presença de uma metoxila aromática ( $\delta_{\text{C}}$  59,5). Os átomos de hidrogênios foram atribuídos aos respectivos carbonos pelos experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  em conjunto ao mapa de contorno do HSQC.

Estas observações nos conduziram a sugerir a presença de uma isocumarina. O experimento de COSY (Figura 35, p. 86; Apêndice 11, p. 141) foi observada a correlação entre 1,48 $\leftrightarrow$ 4,68 $\leftrightarrow$ 2,81/2,90; evidenciando a sub-estrutura parcial **A**.

**Figura 35.** Determinação da estrutura parcial, **A**, da substância **4**



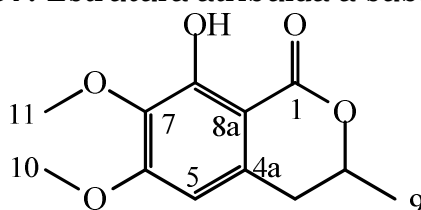
Estas observações aliadas aos experimentos de HMBC (Tabela 17; Apêndice 13, p. 143) onde foram visualizadas as correlações entre H-4 $\leftrightarrow$ C-9/C-5/C-6, H-10 $\leftrightarrow$ C-7, nos permitiram conectar a sub-estrutura parcial **A** no anel aromático (Figura 36, p. 87).

**Figura 36.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **4**

A metoxila foi posicionada em C-7 devido à correlação em HMBC entre H-10↔C-7, e também pela realização de experimentos de NOESY 1D (**Apêndice 15**, p. 145). As correlações observadas pelo experimento de TOCSY 1D (**Apêndice 14**, p. 144), associado aos valores das constantes de acoplamento e dos deslocamentos químicos permitiu atribuir para a substância **4** a estrutura 6,8-dihidroxi-3-metil-7-metoxi-3,4-dihidroisocumarina. A substância **4** é denominada demetilkigelina, e já foi isolada de *Aspergillus terreus*.<sup>61, 62</sup>

### 5.6.3 Determinação estrutural de **5**

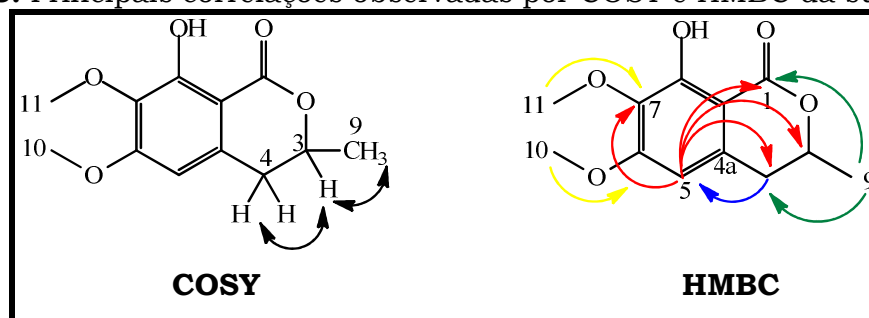
A substância **5** foi isolada como um sólido de coloração amarela e a fórmula molecular foi atribuída com base nos dados de RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT, <sup>13</sup>C e HSQC (**Apêndice 16**, p. 146; **Apêndice 17**, p. 147; e **Apêndice 19**, p. 149, respectivamente) juntamente com os dados encontrados na literatura permitiram sugerir para a substância **5** a estrutura da **Figura 37** (p. 87).<sup>63</sup>

**Figura 37.** Estrutura atribuída à substância **5**

**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  da substância **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC
1	170,0		
3	76,4	4,72 (m)	
4	33,8	3,0 (dd; 11,4 e 3,0) 2,89 (dd; 11,4 e 3,0)	C-5, C-3, C-4a
4a	136,6		
5	102,6	6,55 (s)	C-4, C-6, C-7, C-3, C-1
6	134,8		
7	158,7		
8	155,5		
8a	102,4		
9	19,3	1,50 (d; 6,3)	C-4, C-3, C-1
10	55,5	3,93 (s)	C-7
11	59,6	3,80 (s)	C-6

A substância **5** apresentou perfil por RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  (**Tabela 17**, p. 88; **Apêndices 16** e **17**, p. 146 e 147, respectivamente) muito parecido com **4** evidenciando tratar-se de derivados. A única diferença observada foi que em **5** haviam sinais referentes a duas metoxilas aromáticas em  $\delta_{\text{H}}$  3,93 (s, 3H, C-10,  $\delta_{\text{C}}$  55,5) e  $\delta_{\text{H}}$  3,80 (s, 3H, H-11,  $\delta_{\text{C}}$  59,6) e em **4** foi observado apenas um metoxila  $\delta_{\text{H}}$  3,84 (s, 3H, H-10,  $\delta_{\text{C}}$  59,5). A posição das metoxilas foi atribuída com base na comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com a literatura, e pela realização de experimentos de NOESY 1D (**Apêndice 21**, p. 151). As correlações observadas pelo experimento de COSY (**Apêndice 18**, p. 148) e as principais correlações observadas pelo mapa de contorno HMBC (**Tabela 17**; **Apêndice 20**, p. 150) estão ilustradas na **Figura 38** (p. 88).

**Figura 38.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **5**

Estas informações alicerçadas com a literatura permitiram sugerir que **5** também é uma isocumarina (8-hidroxi-3-metil-6,7-dimetoxi-3,4-

dihidroisocumarina) denominada kigelina, <sup>63</sup> um metabólito bioativo encontrado em em *Kigelia pinnata* (Bignoniaceae).

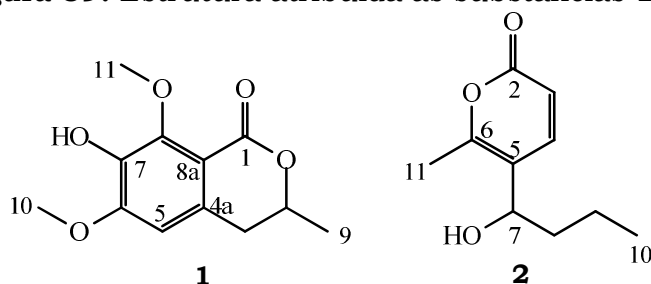
Segundo a literatura, a substância kigelina é um ingrediente ativo de cosméticos e loções para a pele, pois contém propriedades curativas na remoção de lesões solares, especialmente quando utilizada na face, pescoço, mãos e braços. A grande importância biológica e comercial da kigelina juntamente com a sua estrutura simples tornou-a um alvo atraente para estudos sintéticos, <sup>63</sup> sendo que neste trabalho esta substância também foi isolada de fontes naturais e a partir de um fungo endofítico do gênero *Xylaria* sp.

#### 5.6.4 Determinação estrutural de **1** e **2**

Esta amostra foi isolada como um sólido de coloração amarela e o espectro de RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT e <sup>13</sup>C (**Apêndices 24** e **25**, p. 154 e 155, respectivamente), evidenciou a presença de uma mistura, muito provavelmente de isocumarina e pirona devido às similaridades observadas entre as substâncias **3** a **5**. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT observamos, pela integração, que a proporção das duas substâncias era de 1:1.

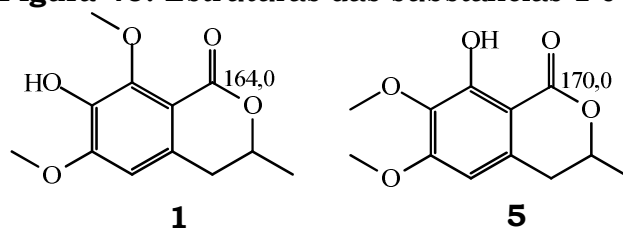
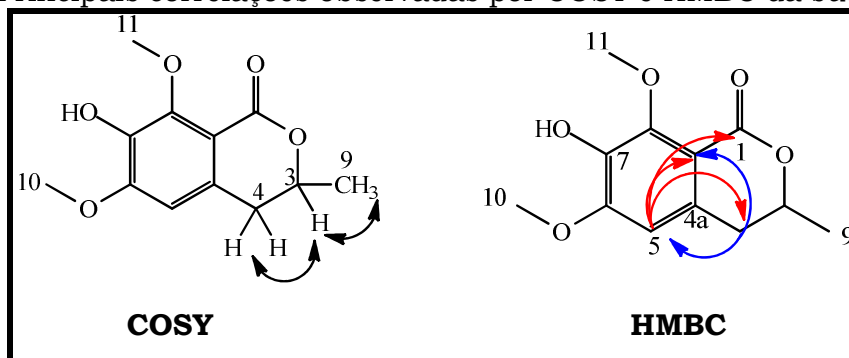
Análise do Espectro de Massas (**Apêndice 23**, p. 153) confirmou a proposta da mistura uma vez que foram observados sinais de íons com  $m/z$  183,1019 [M+H]<sup>+</sup> (cálc.: 183,1016; erro: 1,6 ppm) e o aduto de sódio correspondente com  $m/z$  205,0839 [M+Na]<sup>+</sup>; também observou-se um íon com  $m/z$  239,0919 [M+H]<sup>+</sup> (cálc.: 239,0914; erro: 2,09 ppm) um aduto de sódio com  $m/z$  261,0741 [M+Na]<sup>+</sup>, e um dímero sodiado com  $m/z$  499,1582 [2M+Na]<sup>+</sup> o que contribuiu para a suposição de duas substâncias presentes com as respectivas estruturas atribuídas na **Figura 39** (p. 90).

Esta mistura foi submetida a determinação estrutural das substâncias presentes devido a pequena massa da mesma.

**Figura 39.** Estrutura atribuída às substâncias **1** e **2****Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  das substâncias **1** e **2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

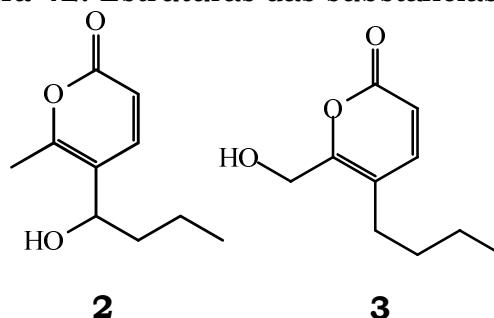
Isocumarina (1)				Pirona (2)			
Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC	Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC
1	163,9			2	163,4		
3	74,6	4,55 (m)		3	112,7	6,26 (d; 9,6)	C-5
4	34,9	2,87 (dd; 16,2 e 3,0) 2,79 (dd; 16,2 e 1,3)	C-9, C-8a, C-5	4	144,6	7,65 (d; 9,6)	C-2, C-7
4a	137,9			5	119,3		
5	110,1	6,57 (s)	C-8a, C-4, C-1	6	158,5		
6	140,6			7	67,1	4,63 (t; 7,0)	C-8, C-9, C-4, C-5
7	156,4			8	38,8	1,75 (m) 1,55 (m)	C-9, C-7
8	156,5			9	18,4	1,31 (m)	C-7, C-8
8a	109,3			10	12,9	0,97 (t; 7,4)	C-8
9	19,4	1,45 (d; 6,0)	C-3	11	15,6	2,30 (s)	C-5, C-6, C-4
10	59,9	3,84 (s)	C-7				
11	60,6	3,91 (s)	C-8				

A isocumarina (**1**) identificada nesta amostra mostrou-se muito parecida com **5**, sendo que a única diferença, observada foi o deslocamento da carbonila em C-1 da lactona. Em **5** o deslocamento químico de C-1 foi observado em  $\delta_{\text{C}}$  170,0 e em **1** passou para  $\delta_{\text{C}}$  163,9 (C-1), evidenciando uma proteção de cerca de 6,0 ppm, que pode ser justificado pela presença da metoxila em C-8 <sup>64</sup> ao invés de em C-7 quando em **5** (**Figura 40**, p. 91), e na **Figura 41** (p. 91) estão as principais correlações observadas em **1** pelo mapa de contorno por COSY e HMBC (**Apêndices 26** e **28**, p. 156 e 158, respectivamente).

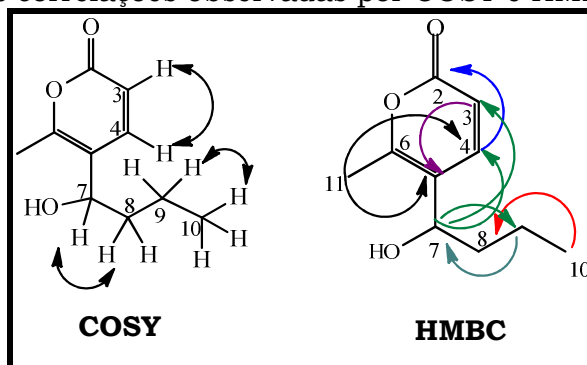
**Figura 40.** Estruturas das substâncias **1** e **5****Figura 41.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **1**

Em posse destes dados podemos atribuir que a substância **1** presente em mistura como 6-hidroxi-3-metil-7,8-dimetoxi-3,4-dihidroisocumarina.

Com relação a substância **2**, esta pertencente a classe das pironas quando comparada a substância **3**, verificou-se também a presença de dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,65 (*d*, 1H, H-4,  $J = 9,6$  Hz,  $\delta_{\text{C}}$  144,6) e  $\delta_{\text{H}}$  6,26 (*d*, 1H, H-3,  $J = 9,6$  Hz,  $\delta_{\text{C}}$  112,7), e a constante de acoplamento observada sugere uma insaturação com geometria *cis*. Observou-se também (**Figura 42**, p. 91) a redução em C-11 de um álcool para uma metila, adicionalmente em **2** há a oxidação no radical butil em **3**. As principais correlações observadas em **1** pelo mapa de contorno por COSY e HMBC estão ilustradas na **Figura 43** (p. 92).

**Figura 42.** Estruturas das substâncias **2** e **3**

**Figura 43.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **2**



A partir dos dados obtidos atribuiu-se para a substância **2** a estrutura 5-hidroxiutil-6-metil-2H-piran-2-ona. A substância **2** é conhecida na literatura como xylariolideo D, e também já foi isolado de *Xylaria* sp. e possui atividades antimicrobiana e antitumoral.<sup>65</sup>

No **Apêndice 27** (p. 157) está o mapa de contorno por HSQC de **1** e **2**, no **Apêndice 31** (p. 161) estão os experimentos de NOESY 1D de **1**, e os **Apêndices 29** e **30** (p. 159 e 160) são referentes aos TOCSY 1D de **1** e **2**, respectivamente.

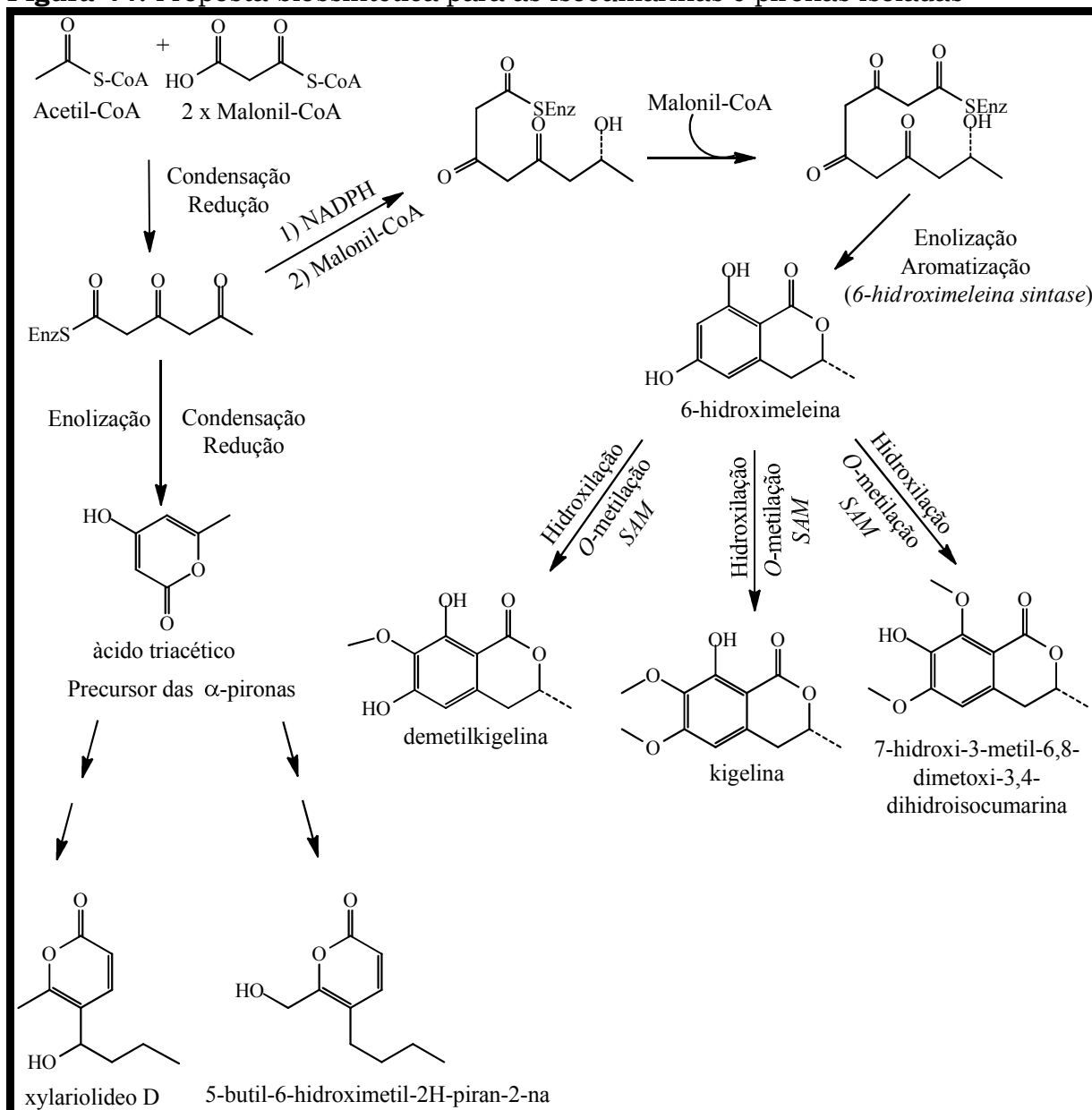
#### 5.6.5 Proposta biossintética das isocumarinas e pironas isoladas

A proposta biossintética para a formação das isocumarinas e pironas se inicia com a condensação de uma unidade de acetil-CoA e duas de malonil-CoA, sendo o intermediário gerado a chave na formação das duas classes de compostos (**Figura 44**, p. 93).<sup>66</sup>

Para a formação de pironas este intermediário sofre uma reação de condensação e redução formando o ácido triacético (lactona), que subsequentemente por reações de adição e oxidação geram as substâncias **2** e **3**.<sup>66</sup>

Para a formação de isocumarinas, o intermediário condensa mais duas unidades de malonil-CoA seguida de ciclização, enolização e aromatização formando a 6-hidroxiemeleina<sup>66</sup> que depois por reações de hidroxilação e O-metilação geram as substâncias **1**, **4** e **5**.

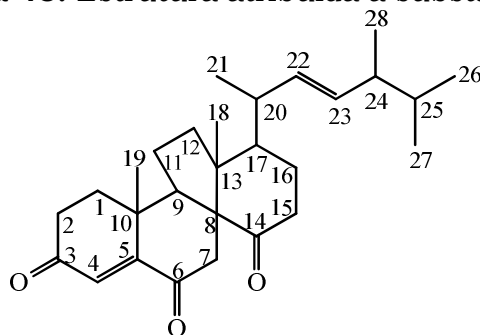
É importante ressaltar que na literatura encontra-se também o relato da formação de pironas pelas mesmas enzimas envolvidas na biossíntese dos flavonoides.<sup>67</sup>

**Figura 44.** Proposta biossintética para as isocumarinas e pironas isoladas

**FONTE:** Adaptado de DEWICK, P. M. (2008). <sup>66</sup>

### 5.6.6 Determinação estrutural de **6**

A substância **6** foi isolada como um sólido de coloração amarela e sua estrutura foi atribuída com base nos Espectros de RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT, <sup>13</sup>C, HSQC juntamente com os dados encontrados na literatura, foi atribuída a estrutura da **Figura 45** (p. 94). <sup>68</sup>

**Figura 45.** Estrutura atribuída à substância **6****Tabela 19.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  da substância **6** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> Hz)	HMBC
1	37,6	2,12 ( <i>m</i> )	
2	33,8	2,42*	
3	200,3		
4	125,2	6,19 ( <i>s</i> )	C-2; C-3; C-5; C-10
5	157,9		
6	201,0		
7	40,0	2,63*	C-6
8	62,7		
9	49,5	2,89*	
10	36,0		
11	24,6	2,14 ( <i>m</i> )	C-14
12	37,6	2,12 ( <i>m</i> )	
13	54,4		
14	216,3		
15	37,2	2,51 ( <i>m</i> )	C-14
16	22,7	1,99 ( <i>m</i> )	
17	48,2	1,72*	
18	15,9	0,97 ( <i>s</i> )	C-8; C-13; C-17, C-20
19	23,3	1,30 ( <i>s</i> )	C-5; C-9, C-10, C-12
20	36,0	2,40 ( <i>m</i> )	
21	22,8	1,15 ( <i>d</i> ; 7,2 Hz)	C-17; C-20; C-23
22	132,9	5,35 ( <i>dd</i> ; 7,8 e 14,5 Hz)	C-20; C-21; C-23
23	134,6	5,37 ( <i>dd</i> ; 14,5 e 7,8 Hz)	C-22
24	43,3	1,91 ( <i>m</i> )	
25	33,0	1,49 ( <i>m</i> )	
26	18,7	0,81 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	
27	19,2	0,84 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	C-24; C25
28	16,7	0,91 ( <i>d</i> ; 7,2 Hz)	C-22; C-23; C-24; C-25

\*Sinal sobreposto.

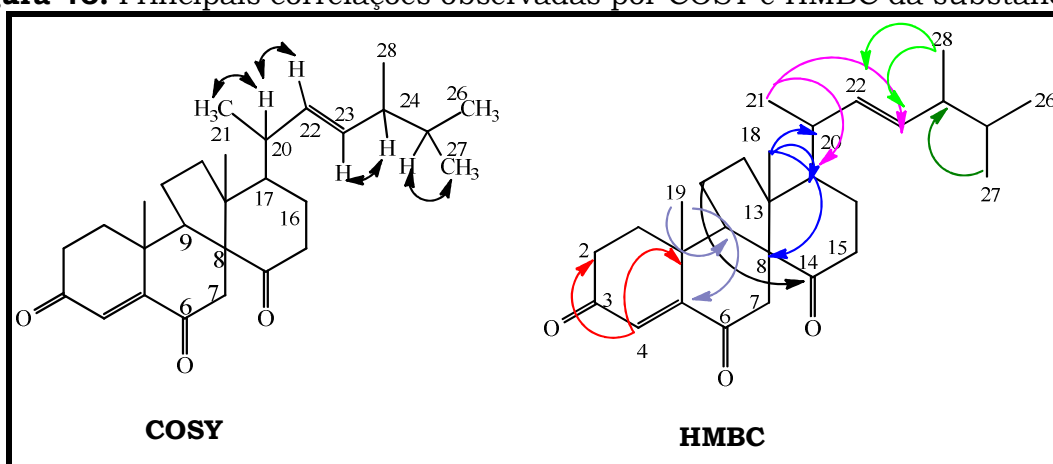
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT de **6** (Tabela 19, p. 94, Apêndice 32, p. 162), apresentou sinais em:  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (*s*, 1H, H-4,  $\delta_{\text{C}}$  125,2);  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (*dd*, 1H, *J* = 14,5 e 7,8 Hz; H-22,  $\delta_{\text{C}}$  132,9);  $\delta_{\text{H}}$  5,37 (*dd*, 1H, *J* = 7,8 e 14,5 Hz; H-23,  $\delta_{\text{C}}$  134,6), característicos de hidrogênios olefinicos. Observa-se uma complexa região de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,81 a  $\delta_{\text{H}}$  2,90; referentes a

hidrogênios metílicos, metilênicos, e metínicos e possibilitando sugerir que **6** é da classe dos esteroides.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  associado às análises por HSQC, (**Tabela 19; Apêndices 33 e 35**, p. 163 e 165, respectivamente) permitiu atribuir os seguintes grupos funcionais: seis grupos metílicos, incluindo duas metilas ligadas a carbono tetrassubstituído: C-18 (s, 3H,  $\delta_{\text{H}}$  0,97;  $\delta_{\text{C}}$  15,9) e C-19 (s, 3H,  $\delta_{\text{H}}$  1,30;  $\delta_{\text{C}}$  23,3) e quatro metilas ligadas a carbonos metínicos C-21 (*d*, 3H,  $\delta_{\text{H}}$  1,15;  $J = 7,2$  Hz;  $\delta_{\text{C}}$  22,8), C-26 (*d*, 3H,  $\delta_{\text{H}}$  0,81;  $J = 6,6$  Hz;  $\delta_{\text{C}}$  18,7), C-27 (*d*, 3H,  $\delta_{\text{H}}$  0,84;  $J = 6,6$  Hz;  $\delta_{\text{C}}$  19,2), e C-28 (*d*, 3H,  $\delta_{\text{H}}$  0,91;  $J = 7,1$  Hz;  $\delta_{\text{C}}$  16,7).

Verificou-se a presença de sete grupos metilênicos: C-1 (*m*, 2H,  $\delta_{\text{H}}$  2,12;  $\delta_{\text{C}}$  37,6), C-2 (2H,  $\delta_{\text{H}}$  2,42;  $\delta_{\text{C}}$  33,8), C-7 (2H,  $\delta_{\text{H}}$  2,63;  $\delta_{\text{C}}$  40,0), C-11 (*m*, 2H,  $\delta_{\text{H}}$  2,14;  $\delta_{\text{C}}$  24,6), C-12 (*m*, 2H,  $\delta_{\text{H}}$  2,12;  $\delta_{\text{C}}$  37,6), C-15 (*m*, 2H,  $\delta_{\text{H}}$  2,51;  $\delta_{\text{C}}$  37,2), e C-16 (*m*, 2H,  $\delta_{\text{H}}$  1,99;  $\delta_{\text{C}}$  22,7); duas ligações com hibridização  $sp^2$ , C-22 (*dd*, 1H,  $\delta_{\text{H}}$  5,35;  $J = 7,8$  e 14,5 Hz;  $\delta_{\text{C}}$  132,9), C-23 (*dd*, 1H,  $\delta_{\text{H}}$  5,37;  $J = 14,5$  e 7,8 Hz;  $\delta_{\text{C}}$  134,6) e C-4 (s, 1H,  $\delta_{\text{H}}$  6,19;  $\delta_{\text{C}}$  125,2), e C-5 (*qC*,  $\delta_{\text{C}}$  157,9). Cinco grupos metínicos característicos de  $Csp^3$  (C- 9,  $\delta_{\text{C}}$  49,5; C-17,  $\delta_{\text{C}}$  48,2; C-20,  $\delta_{\text{C}}$  36,0; C-24,  $\delta_{\text{C}}$  43,3; e C-25,  $\delta_{\text{C}}$  33,0), dois carbonos quaternários  $sp^3$  (C-10,  $\delta_{\text{C}}$  36,0; e C-13,  $\delta_{\text{C}}$  54,4); e por fim, três carbonos característicos de cetonas (C-3,  $\delta_{\text{C}}$  200,3; C-6,  $\delta_{\text{C}}$  201,0; e C-14,  $\delta_{\text{C}}$  216,3).

A análise do experimento de COSY (**Apêndice 34**, p. 164), juntamente com as correlações obtidas pelo mapa de contorno HMBC (**Apêndice 36**, p.166), **Figura 46** (p. 96), permitiram identificar **6** como o esteroide dankasterona A. <sup>68</sup>

**Figura 46.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **6**

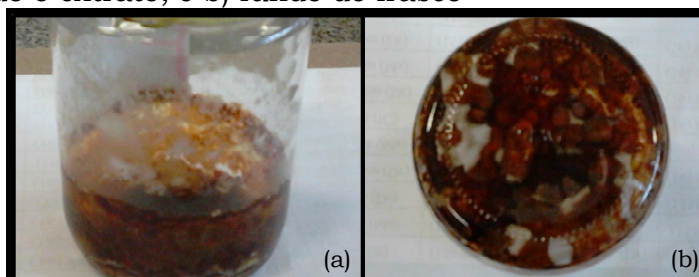
O relato na literatura do isolamento de dankasterona A foi obtido a partir da cultura do fungo *Gymnascella dankaliensis* associado a esponja marinha *Halichondria japonica*. Os estudos biológicos efetuados indicaram que essa substância apresenta ação citotóxica significativa contra células tumorais, <sup>68</sup> e este é o primeiro relato da sua produção por um endófito do gênero *Xylaria*.

### 5.7 Fracionamento do extrato produzido pelo endófito PR-03

O endófito *Xylaria* sp. PR-03 foi submetido a cultivo em Arroz em escala ampliada (total de nove Erlenmeyers; 810,0 g de Arroz), que após período de incubação, conforme descrito na seção **4.1.2.2** (p. 41); **Esquema 3** (p. 42), foi submetido a partições com os solventes apropriados. No entanto, o número de partições utilizadas para obtenção do extrato final foi maior, ou seja, cinco partições com água e cinco com hexano, visando obter um extrato com menos interferentes oriundos do meio de cultivo.

O rendimento do extrato PR-03 A foi de 932,0 mg; pode-se notar a eficácia da realização de um número maior de partições pela observação da cristalização de substâncias puras no próprio frasco contendo o extrato, **Figura 47** (p. 97), também foi observada essa cristalização no funil de separação durante a execução das partições.

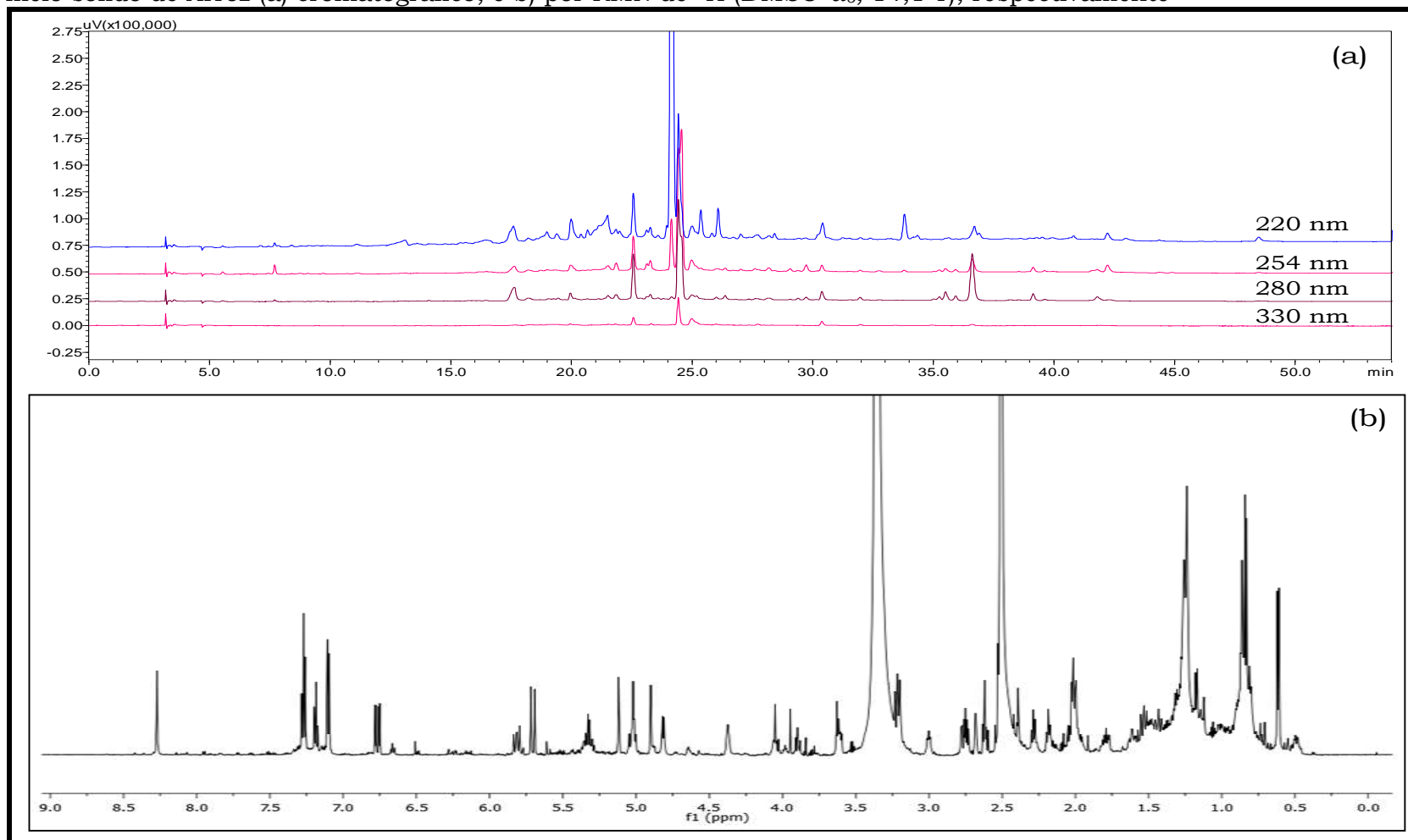
**Figura 47.** Extrato produzido pelo endófito *Xylaria* sp. PR-03 em Arroz; a) imagem do frasco contendo o extrato, e b) fundo do frasco



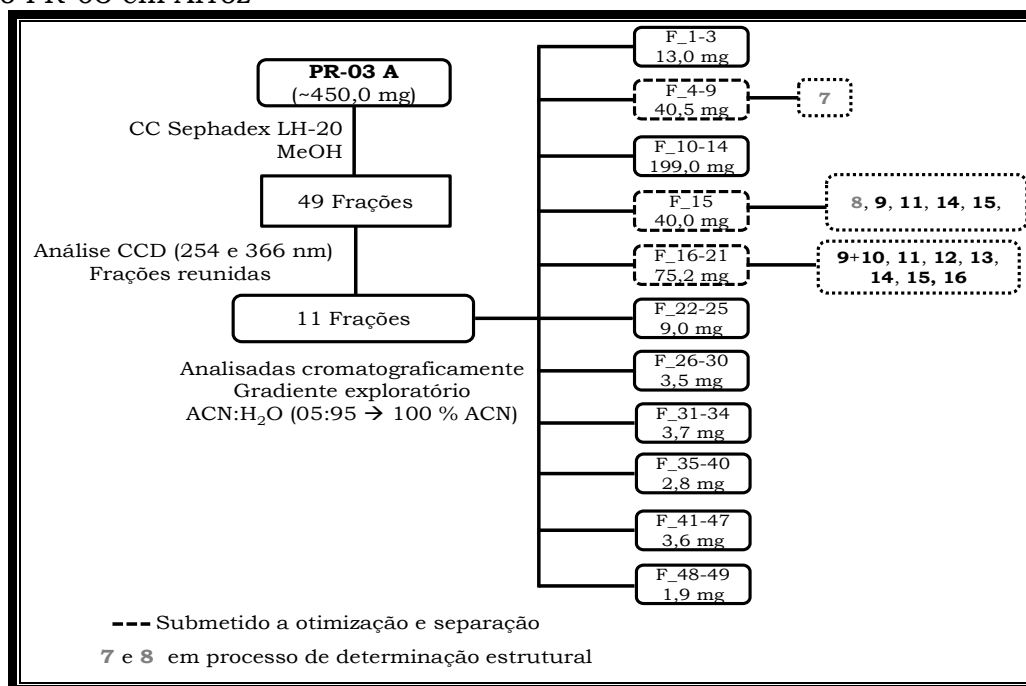
Os perfis químico e cromatográfico obtidos para este extrato constam na **Figura 48** (p. 98). Foram adotadas as mesmas condições descritas na seção **5.2**, ou seja, para análise por RMN de  $^1\text{H}$  foi utilizado 3,0 mg do extrato solubilizado em  $\text{DMSO-}d_6$ ; e para análise cromatográfica: gradiente exploratório  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  (05:95 v/v), C-18, vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , concentração do extrato de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Este extrato foi submetido à separação por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel MeOH. Foram coletadas 49 frações que depois de analisadas por CCD foram reunidas em onze frações, conforme pode ser visualizado no **Esquema 5** (p. 99), onde consta o rendimento obtido destas.

**Figura 48.** Perfil do extrato produzido em escala ampliada obtido por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PR-03 em meio sólido de Arroz (a) cromatográfico; e b) por RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 14,1 T), respectivamente



**Esquema 5.** Fracionamento em coluna cromatográfica do extrato produzido pelo endófito PR-03 em Arroz



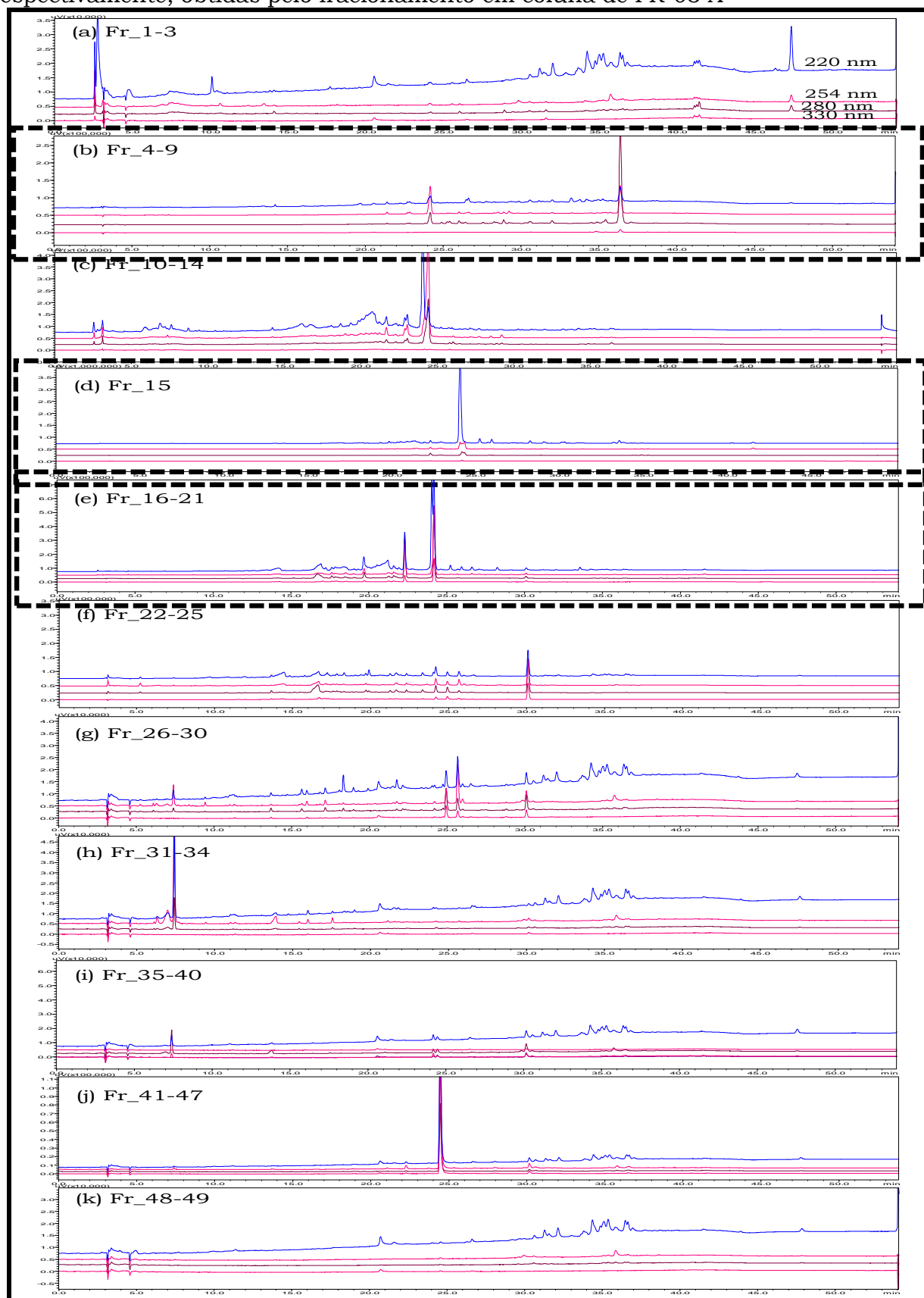
Posteriormente foram obtidos os perfis cromatográficos destas frações reunidas, frações Fr<sub>1-3</sub> a Fr<sub>41-49</sub> (**Figura 49**, p. 100), em gradiente exploratório utilizando ACN:H<sub>2</sub>O (mesmo gradiente utilizado para analisar o perfil do extrato bruto PR-03 A, e mesmos comprimentos de onda analisados). As análises destas frações por CLAE-DAD evidenciaram perfis com diversas bandas cromatográficas, sendo que algumas destas apresentaram boa resolução e foram submetidas a otimização para fracionamento cromatográfico.

O fracionamento cromatográfico por CLAE-DAD<sub>preparativo</sub> das frações Fr<sub>4-9</sub>, Fr<sub>15</sub>, Fr<sub>16-21</sub>, e Fr<sub>31-34</sub>, resultou no isolamento de dez substâncias, das quais oito foram elucidadas utilizando as técnicas uni e bidimensionais de RMN, e por comparação dos valores obtidos com a literatura. O rendimento obtido das substâncias **7 a 16** estão descritas na **Tabela 20** (p.99).

**Tabela 20.** Rendimento das substâncias 7 a 16 obtidas pela separação cromatográfica em CLAE<sub>preparativo</sub> das frações de PR-03 A

Substâncias	7	8	9	9+10	11	12	13	14	15	16
Massa (mg)	0,4	0,5	0,3	3,6	16,8	4,0	1,8	1,2	0,3	0,7

**Figura 49.** Perfil cromatográfico das frações: (a) Fr\_1-3 a (k) Fr\_47-49, respectivamente, obtidas pelo fracionamento em coluna de PR-03 A

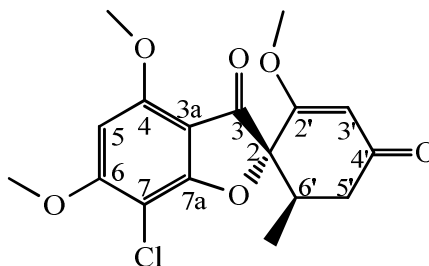


**Legenda:** gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 v/v), C-18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; C = 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; λ=220, 254, 280 e 330 nm, respectivamente.

### 5.7.1 Determinação estrutural de **12**

A substância **12** foi isolada como um sólido de coloração amarela e sua estrutura foi determinada pelos dados espectroscópicos obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT, HSQC, HMBC, COSY e por comparação com os dados da literatura permitiram atribuir a estrutura da **Figura 50** (p. 101).<sup>35, 36</sup>

**Figura 50.** Estrutura atribuída a substância **12**



**Tabela 21.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e HSQC da substância **12** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC
4	165,4*		
5	89,9	6,42 (s)	C-3; C-3a; C-6; C-7; C-7a
6	158,2*		
7	94,8*		
3a	103,3*		
7a	165,8*		
4-OCH <sub>3</sub>	56,5	4,06 (s)	C-4
6-OCH <sub>3</sub>	55,6	3,97 (s)	C-6
2'-OCH <sub>3</sub>	56,2	3,69 (s)	C-2'
3	192,4*		
2	90,4*		
2'	172,2		
3'	106,8	5,62 (s)	C-2; C-2'; C-4'; C-5'
4'	198,2*		
5a'	39,2	2,43 (dd; 15,6 e 3,6)	C-2; C-4'; C-6'
5b'		2,87 (dd; 15,6 e 13,2)	
6'	35,7	2,82 (m)	
6'-CH <sub>3</sub>	12,9	0,91 (d; 6,4)	C-2; C-4'; C-5'

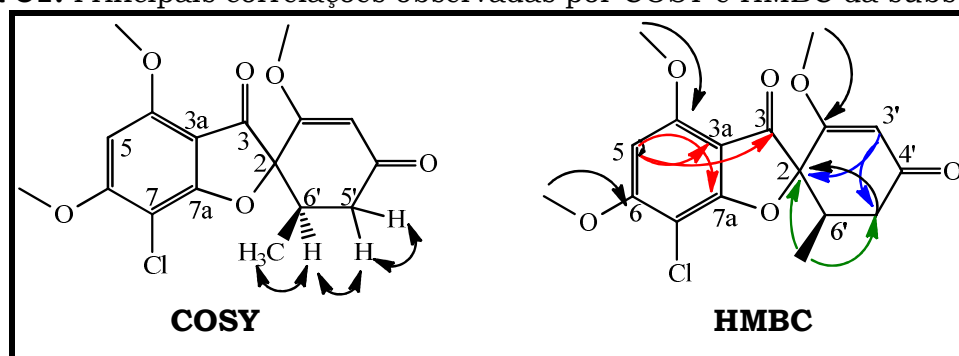
\*Valores obtidos por HMBC.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT de **12** (**Tabela 21**, p. 101; **Apêndice 37**, p. 167) apresentou três singletos típicos de metoxilas em:  $\delta_{\text{H}}$  4,06 (s, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  56,5); 3,97 (s, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  55,6), e 3,69 (s, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  56,2); sendo duas aromáticas e uma sobre sistema insaturado, respectivamente. Um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  5,62 (s, 1H, H-3',  $\delta_{\text{C}}$  106,8) atribuído a hidrogênio olefínico e um singlete na região de hidrogênio aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,45 (s, 1H, H-5,  $\delta_{\text{C}}$  89,9) indicando um anel aromático pentassubstituído. Observou-se também um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,94

(*d*; 3H,  $J = 6,6$  Hz;  $\delta_C$  12,9) atribuído a uma metila ligada a um carbono metínico. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também apresentou dois duplos dubletos em  $\delta_H$  2,43 (*dd*, 2H,  $J = 15,6$  e 3,6 Hz; H-5a') e  $\delta_H$  2,87 (*dd*, 2H,  $J = 15,6$  e 13,2 Hz; H-5b') ambos com  $\delta_C$  39,7; característico de um metileno diastereotópico, e um multiplete em  $\delta_H$  2,76 (*m*, 1H, H-6',  $\delta_C$  35,7).

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono após análise do mapa de contorno HSQC (**Apêndice 39**, p. 169). Pelo experimento de COSY (**Apêndice 38**, p. 168) foi possível verificar as correlações ilustradas na **Figura 51** (p. 102), e no mapa de contorno HMBC (**Figura 51; Apêndice 40**, p. 170) foram observadas as seguintes correlações H-5 $\leftrightarrow$ C-6/C-4/C-7/C-7a/C-3/C-3a; 4-OCH<sub>3</sub> $\leftrightarrow$ C-4; 6-OCH<sub>3</sub> $\leftrightarrow$ C-6; 2'-OCH<sub>3</sub> $\leftrightarrow$ C-2'; H-3' $\leftrightarrow$ C-2/C-4'/C-2'/C-5'; 6'-CH<sub>3</sub> $\leftrightarrow$ C-2/C-5'; 5'-H $\leftrightarrow$ C-4'/C-6'/C-2/C-3.

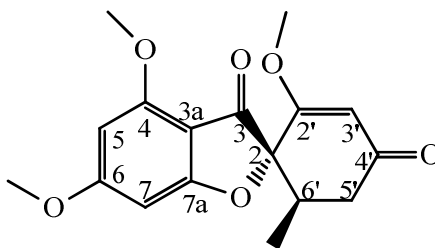
**Figura 51.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **12**



A partir da análise dos dados espectrais e por comparação destes com a literatura identificamos a substância **12** como sendo a griseofulvina.

### 5.7.2 Determinação estrutural de **9**

A substância **9** foi isolada como um sólido de coloração amarela claro e a elucidação estrutural foi realizada por análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT, HSQC, HMBC, COSY e comparação com a literatura foi possível atribuir a estrutura da **Figura 52** (p. 103).<sup>35, 36</sup>

**Figura 52.** Estrutura atribuída à substância **9****Tabela 22.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e HSQC da substância **9** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC
4	159,2*		
5	88,4	6,34 (d; 1,8)	C-3a; C-7
6	171,0*		
7	92,8	6,19 (d; 1,8)	C-3a; C-5
3a	103,0*		
7a	176,0*		
4-OCH <sub>3</sub>	55,6	3,91 (s)	C-4
6-OCH <sub>3</sub>	55,5	3,87 (s)	C-6
2'-OCH <sub>3</sub>	56,3	3,67 (s)	C-2'
3	198,0*		
2	89,7*		
2'	172,0		
3'	103,6	5,59 (s)	C-2; C-2'; C-4'; C-5'
4'	198,7*		
5a'	39,2	2,40 (dd; 16,8 e 4,8)	C-2; C-4'; C-6'
5b'		2,89 (dd; 16,8 e 13,4)	
6'	36,2	2,76 (m)	
6'-CH <sub>3</sub>	12,9	0,91	C-2; C-5'; C-6'

\*Valores obtidos por HMBC.

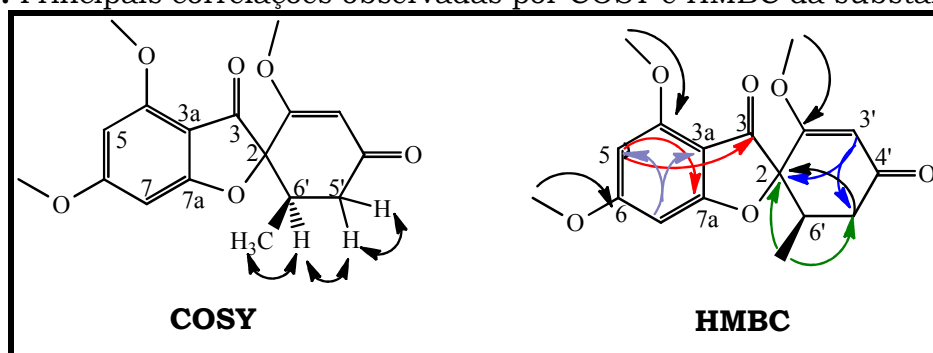
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT de **9** (Tabela 22, p. 103; Apêndice 41, p. 171) apresentou perfil semelhante ao da griseofulvina (**12**) sendo a principal diferença observada, a presença de dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$ : 6,34 (d; 1H,  $J = 1,8$  Hz; H-5,  $\delta_{\text{C}}$  88,4) e  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (d; 1H,  $J = 1,8$  Hz; H-7,  $\delta_{\text{C}}$  92,8) ao invés de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,45 (s, 1H, H-5,  $\delta_{\text{C}}$  89,9) como observado para **12**. Esta observação evidenciou um padrão de substituição *meta*, em um anel aromático tetrassubstituído. Tal suposição foi confirmada pelos valores de  $\delta_{\text{C-6}}$  que passou de 158,2 em **12** para  $\delta_{\text{C-6}}$  171,0 em **9**, evidenciando a proteção de C-6 pela ressonância do par de elétrons do cloro.

Também foram observados singletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,59 (s, 1H, H-3',  $\delta_{\text{C}}$  103,6);  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (s, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  55,6);  $\delta_{\text{H}}$  3,87 (s, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  55,5) e  $\delta_{\text{H}}$  3,67 (s, 3H,  $\delta_{\text{C}}$  56,3) indicando a presença de um hidrogênio olefínico e três metoxilas, sendo duas aromáticas e uma sobre um  $\text{Csp}^2$  de um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado,

respectivamente. Também observou-se, um dubleto em  $\delta_H$  0,91 (*d*; 3H,  $J = 6,6$  Hz,  $\delta_C$  12,9), um multipletto em  $\delta_H$  2,76 (*m*, 1H, H-6',  $\delta_C$  36,2); e dois duplos dubletos em  $\delta_H$  2,40 (*dd*, 2H,  $J = 16,8$  e 4,8 Hz; H-5a') e  $\delta_H$  2,89 (*dd*, 2H,  $J = 16,8$  e 13,4 Hz; H-5b') ambos com  $\delta_C$  39,7; característico de um grupo metileno diastereotópico.

O mapa de contorno HSQC (**Apêndice 43**, p. 173) permitiu atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos, o espectro de COSY (**Apêndice 42**, p. 172) e o mapa de contorno por HMBC (**Apêndice 44**, p. 174), ambos ilustrados na **Figura 53** (p. 104) mostrou-se muito similar ao da griseofulvina **12**.

**Figura 53.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **9**



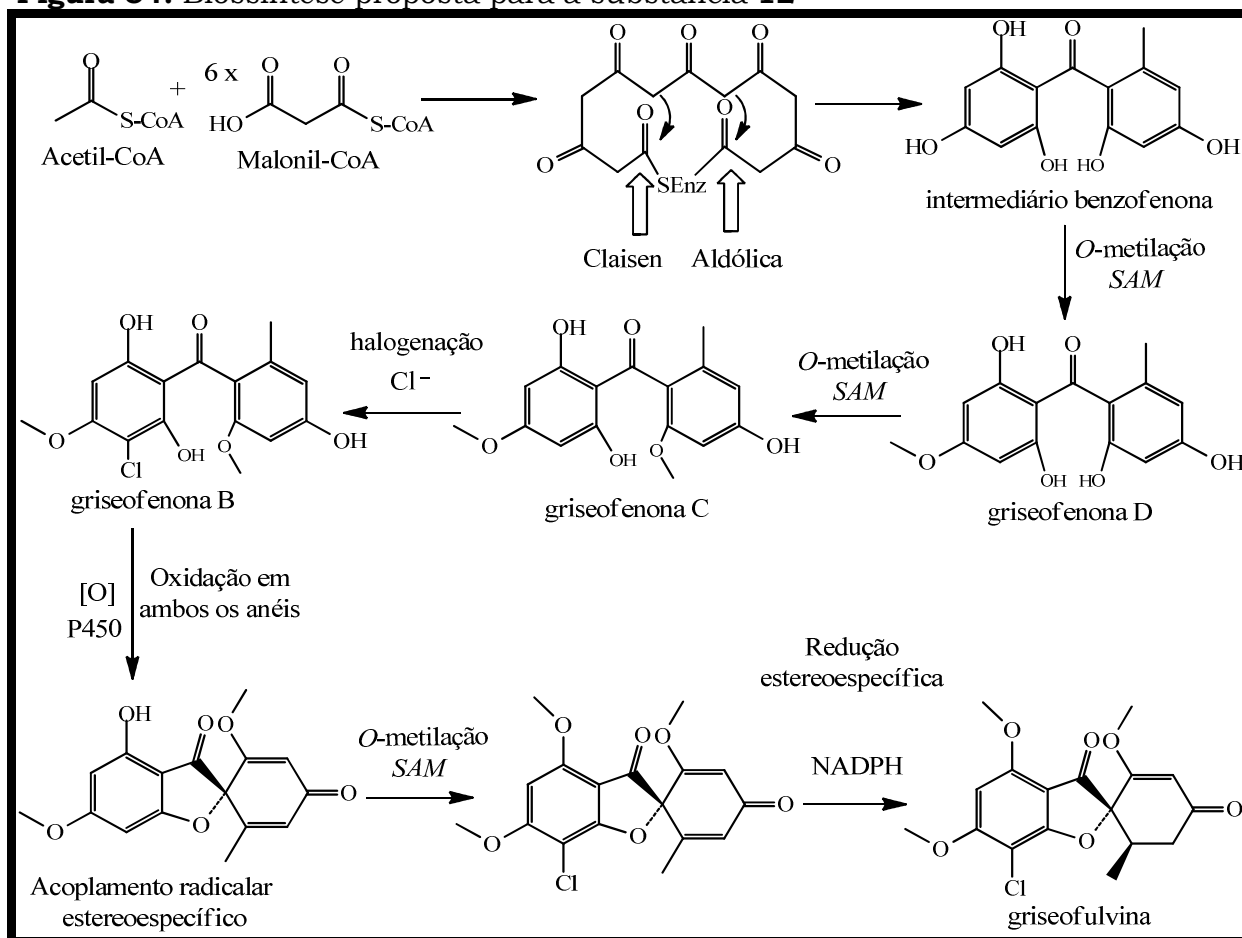
Esses dados comparados com a literatura evidenciaram a substância **9** como a 7-declorogriseofulvina.

### 5.7.3 Biossíntese da griseofulvina

A biossíntese da griseofulvina foi primeiramente estudada por Barton e Cohen em 1957, no qual demonstrou que a formação do heptacetídeo é iniciada por uma unidade de acetil-CoA e seis condensações sequenciais de malonil-CoA, e sugeriram um mecanismo de ciclização do radical fenoxi para a formação do anel espiro da griseofulvina. Rhodes et al. em 1961, por sua vez, inferiram que benzofenonas metiladas seriam os intermediários na biossíntese da griseofulvina, estas suposições foram posteriormente esclarecidas em 1976 por Harris e colaboradores, pelo estudo com isótopos marcados, que determinaram que a *O*-metilação dos dois grupos fenóis ocorre imediatamente após a formação do intermediário benzofenona resultando na griseofenona C, ao passo que a última *O*-metilação ocorre mais tarde na via biossintética.<sup>66, 70</sup>

O estudo do sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese da griseofulvina conduzido por Yi Tang e colaboradores em 2013 confirmou o estudo de Harris e indicou as enzimas envolvidas neste processo. Estes estudos foram realizados a partir dos genes encontrados em *Penicillium aethiopicum* no qual foi indicado serem necessárias pelo menos sete enzimas durante as etapas. As etapas acima descritas até a formação da griseofenona C foram confirmadas, a etapa subsequente foi determinada pela halogenação do anel aromático gerando a griseofenona B, que passa por uma oxidação radicalar fenólica promovido pelo citocromo P450 e sua forma de ressonância origina o esqueleto com centro espiro. A ação de uma nova *O*-metilação do grupo fenol restante e, finalmente, a redução estereoespecífica da ligação dupla levam à griseofulvina, como ilustrado na **Figura 54** (p. 105), a declorogriseofulvina é obtida pela não halogenação do anel.<sup>37</sup>

**Figura 54.** Biossíntese proposta para a substância **12**

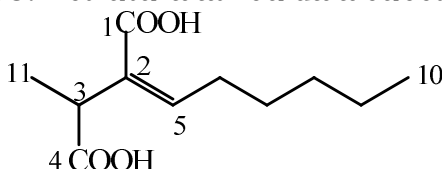


**FONTE:** Adaptado de PETERSEN, A. B. et al (2014).<sup>37</sup>

#### 5.7.4 Determinação estrutural de **10**

Esta amostra foi isolada em mistura e o espectro de RMN  $^1\text{H}$  com PRESAT (**Apêndice 45**, p. 175) evidenciou a presença desta com proporção aproximada de 1:1, indicada pela integração dos sinais. Nesta mistura foi identificada a decolorgriseofulvina (**9**) e uma outra substância. Assim, a identificação desta substância foi realizada pela subtração dos sinais da decolorgriseofulvina e pela análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT, HSQC, HMBC, COSY, principalmente por TOCSY 1D (**Apêndice 46**, p. 176), e comparação com a literatura permitiram atribuir a estrutura da **Figura 55** (p. 106).<sup>35, 42</sup>

**Figura 55.** Estrutura atribuída à substância **10**



**Tabela 23.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e HSQC da substância **10** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> Hz)	HMBC
1	171,4*		
2	133,0*		
3	37,3	3,66**	C-1; C-2; C-4; C-5; C-11
4	176,9*		
5	143,7	6,79 ( <i>t</i> ; 7,6)	C-1; C-2; C-3; C-6; C-11
6	28,7	2,25 ( <i>m</i> )	C-2; C-5; C-7; C-8
7	27,3	1,47 ( <i>m</i> )	C-8; C-9; C-10
8	30,5	1,33 ( <i>m</i> )	C-7; C-9; C-10
9	21,2	1,33 ( <i>m</i> )	C-7; C-8
10	12,7	0,91 ( <i>t</i> ; 6,6)	C-9; C-8
11	14,4	1,29 ( <i>t</i> ; 6,6)	C-2; C-3; C-4

\*Valores obtidos por HMBC; \*\* sinal sobreposto.

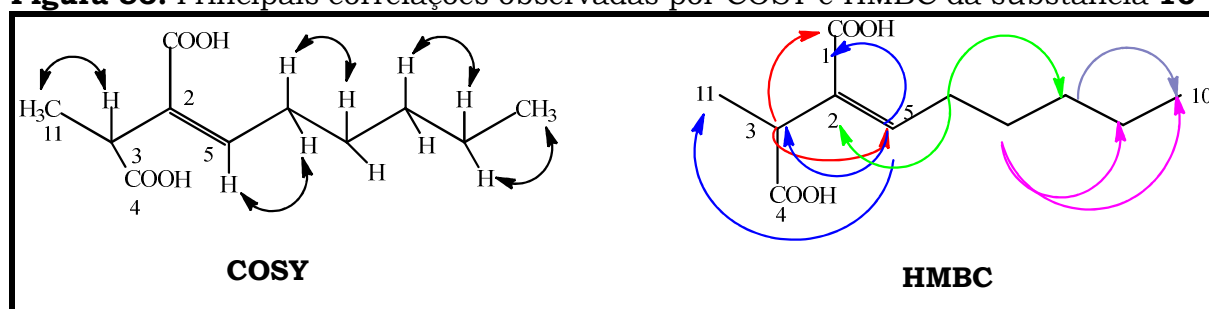
Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT (**Tabela 23**, p. 106; **Apêndice 45**, p. 175) apresentou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,29 (*d*; 3H,  $J = 6,6$  Hz; H-11,  $\delta_{\text{C}}$  14,4), em  $\delta_{\text{H}}$  0,91 (*t*, 3H,  $J = 7,2$  Hz; H-10,  $\delta_{\text{H}}$  12,7) e em  $\delta_{\text{H}}$  3,66 (*m*, 1H, H-3,  $\delta_{\text{C}}$  37,3), atribuídos a H-11, H10 e H-3, respectivamente. Observou-se também, um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,79 (*t*, 1H,  $J = 7,6$  Hz; H-5,  $\delta_{\text{C}}$  143,7), atribuído ao hidrogênio olefínico de H-5,  $\Delta^{2,5}$ , além de multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,25 (*m*, 2H, H-6,  $\delta_{\text{C}}$  28,7),  $\delta_{\text{H}}$

1,47 (*m*, 2H, H-7,  $\delta_C$  27,3),  $\delta_H$  1,33 (*m*, 2H, H-8,  $\delta_C$  30,5), e  $\delta_H$  1,33 (*m*, 2H, H-9,  $\delta_C$  21,2), referentes a quatro grupos metilênicos de H-6, H-7, H-8 e H9, respectivamente.

Análise detalhada dos espectros de HSQC (**Apêndice 48**, p. 178) permitiu a atribuição de todos os átomos de hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

Pela análise do experimento de COSY (**Apêndice 47**, p. 177) e pelo mapa de contorno HMBC (**Apêndice 49**, p. 179) foi possível verificar as principais correlações de: H-11 $\leftrightarrow$ C-2/C-4; H-10 $\leftrightarrow$ C-8/C-9; H-6 $\leftrightarrow$ C-5/C-2/C-7; H-3 $\leftrightarrow$ C-1/C-5/C-11; H-5 $\leftrightarrow$ C-1/C-3/C-11. A conexão do hepteno foi visualizada pela correlação observada entre H-5 $\leftrightarrow$ C-3/C-1 e de H-11 $\leftrightarrow$ C-2, ilustrada na **Figura 56** (p. 107).

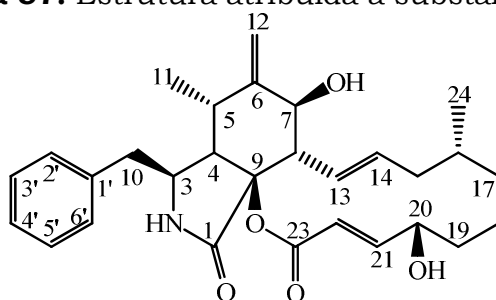
**Figura 56.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **10**



A comparação com dados da literatura permitiu identificar a substância **10** como sendo o ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodioico, estudos demonstraram que esta substância apresentou forte atividade antifúngica contra os fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.<sup>35, 42</sup>

#### 5.7.5 Determinação estrutural de **11**

A substância **11** foi isolada como um sólido de coloração branca e sua elucidação estrutural foi realizada por análise dos dados fornecidos por RMN de  $^1H$  com PRESAT, RMN de  $^{13}C$ , HSQC, HMBC, COSY e comparação com a literatura permitiram inferir a estrutura da **Figura 57** (p. 108).<sup>35,36</sup>

**Figura 57.** Estrutura atribuída à substância **11****Tabela 24.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESATe  $^{13}\text{C}$  da substância **11** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> Hz)	HMBC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
1	172,6			
3	53,4	3,41 ( <i>m</i> )	C-1; C-1'; C-5; C-7; C-9	H-10
4	47,2	2,87 ( <i>dd</i> ; 5,1 e 2,5)	C-5; C-6; C-9; C-10	H-5
5	31,4	3,22 ( <i>m</i> )		H-4; H-11
6	149,9			
7	70,1	3,82 ( <i>d</i> ; 10,7)	C6; C-12; C-13	H-8
8	48,0	3,23*	C-3; C-4; C-6	
9	84,0			
10	42,7	2,82*	C-1'; C-2'; C-3; C-4; C-9	H-3
11	12,8	0,87 ( <i>d</i> ; 6,6)	C-4; C-5; C-6	H-5
12	112,9	5,30 ( <i>s</i> ) e 5,11 ( <i>s</i> )	C-5; C-6; C-7; C-8	
13	127,0	5,85 ( <i>ddd</i> ; 15,0; 9,7 e 1,8)	C-15	H-8
14	136,7	5,25 ( <i>m</i> )		H-13; H-15
15	41,8	2,11 ( <i>m</i> ) e 1,66 ( <i>m</i> )		H-14
16	33,1	1,26 ( <i>m</i> )		H-15
17	35,2	0,61 ( <i>m</i> ) e 1,71 ( <i>m</i> )	C-14; C-19; C-24	H-18; H-20
18	20,0	1,47 ( <i>m</i> ) e 1,29 ( <i>m</i> )	C-20	
19	34,0	1,93 ( <i>m</i> ) e 1,58 ( <i>m</i> )	C-17; C-18; C-20; C-21	
20	69,7	4,47 ( <i>m</i> )		H-19; H-21
21	153,5	6,95 ( <i>dd</i> ; 15,0 e 4,4)	C-20; C-23	H-20; H-22
22	117,3	5,80 ( <i>dd</i> ; 15,0 e 1,8)	C-20, C-23	H-21
23	165,0			
24	19,3	0,89 ( <i>d</i> ; 6,6)	C-15; C-16	H-16
1'	135,3			
2' e 6'	129,5	7,15 ( <i>d</i> ; 7,0)	C-3'; C-10	
3' e 5'	128,2	7,29 ( <i>t</i> ; 7,5)	C-1'; C-2'; C-6'	
4'	126,5	7,21 ( <i>t</i> ; 7,5)	C-2'; C-6'	

\*Sinal sobreposto.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT (**Tabela 24**, p. 108; **Apêndice 50**, p. 180) apresentou sinais característicos de grupos metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  0,87 (*d*, 3H,  $J = 6,6$  Hz; H-11,  $\delta_{\text{C}}$  12,8) e 0,89 (*d*, 3H,  $J = 6,6$  Hz; H-24,  $\delta_{\text{C}}$  19,3) e de hidrogênios carbinólicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (*d*, 1H,  $J = 10,7$  Hz; H-7,  $\delta_{\text{C}}$  70,1) e  $\delta_{\text{H}}$  4,47 (*m*, 1H, H-20,  $\delta_{\text{C}}$  69,7).

Observou-se um anel aromático monossustituído evidenciado pelos sinais em  $\delta_H$  7,15 (*d*, 2H,  $J = 7,0$  Hz; H-2' e H-6',  $\delta_C$  129,5),  $\delta_H$  7,21 (*t*, 1H,  $J = 7,5$  Hz; H-4',  $\delta_C$  126,5) e  $\delta_H$  7,29 (*t*, 2H,  $J = 7,5$  Hz; H-3' e C-5',  $\delta_C$  128,2).

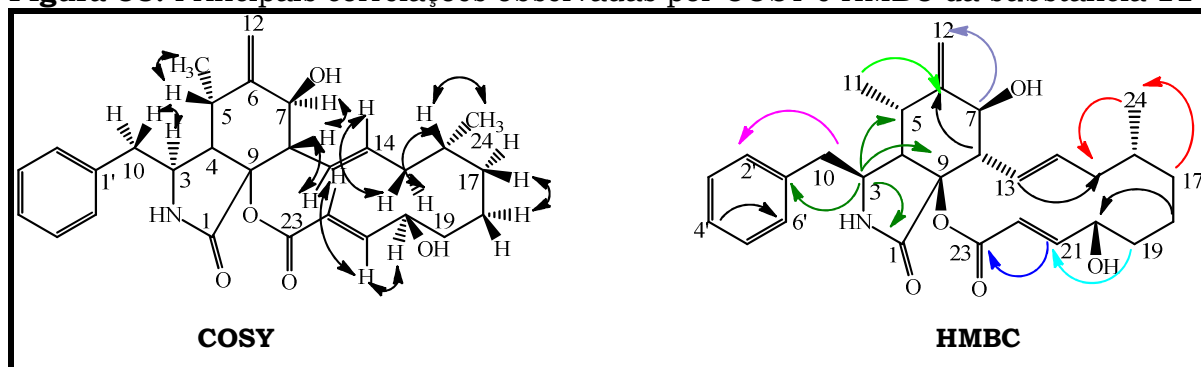
Sinais em  $\delta_H$  5,83 (*ddd*, 1H,  $J = 15,0$ ; 9,7 e 1,8 Hz; H-13,  $\delta_C$  127,0) e  $\delta_H$  5,05 (*m*, 1H, H-14,  $\delta_C$  136,7) e em  $\delta_H$  6,95 (*dd*, 1H,  $J = 4,4$  e 15,0 Hz; H-21,  $\delta_C$  153,5) e  $\delta_H$  5,80 (*dd*, 1H,  $J = 1,8$  e 15,0 Hz; H-22,  $\delta_C$  117,3) referentes às duplas ligações entre C-13/C-14, e C-21/C-22, respectivamente, indicando geometria *trans*, para os dois casos, devido ao valor da constante de acoplamento,  $J = 15,0$  Hz. Também foi observada uma ligação dupla exocíclica entre C-6/C-12 devido a presença do metileno (H<sub>2</sub>C-12) observado no HSQC (**Apêndice 53**, p. 183). O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (PRESAT) também apresentou sinais em  $\delta_H$  2,82 (*m*, 2H, H-10,  $\delta_C$  42,7) atribuído aos hidrogênios benzílicos H-10, que acoplam com  $\delta_H$  3,41 (*m*, 1H, H-3,  $\delta_C$  53,4) conforme pode ser visualizado na **Figura 58** (p. 110).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**Tabela 24; Apêndice 51**, p. 181) apresentou 29 átomos de carbono, sendo os sinais em:  $\delta_C$  126,5 (C-4'),  $\delta_C$  128,2 (C-3' e C-5'),  $\delta_C$  129,5 (C-2' e C-6') e  $\delta_C$  135,3 (C-1') atribuídos aos carbonos aromáticos. Os sinais em:  $\delta_C$  127,0 (C-13),  $\delta_C$  136,7 (C-14),  $\delta_C$  153,5 (C-21),  $\delta_C$  117,3 (C-22) foram atribuídos às ligações duplas. Os deslocamentos químicos em  $\delta_C$  165,0 (C-23) e  $\delta_C$  172,6 (C-1) foram atribuídos às carbonilas características de lactona e lactama, respectivamente.

Análise do espectro de COSY (**Apêndice 52**, p. 182) nos evidenciou correlações de H-10↔H-3↔H-4↔H-5↔H-11↔H-7↔H-8↔H-13↔H-14↔H-15↔H-16↔H-17/H-17↔H-18↔H-19↔H-20↔H-21↔H-22 que podem ser visualizadas na **Figura 58** (p. 110).

Com os dados descritos pudemos confirmar a presença de um anel aromático monossustituído, três ligações duplas sendo duas dissubstituídas e uma exocíclica. Também constatamos a presença de uma  $\gamma$ -lactama e uma lactona, e dois carbonos metínicos carbinólicos. Estas informações nos sugeriram a presença de uma citocalasina.

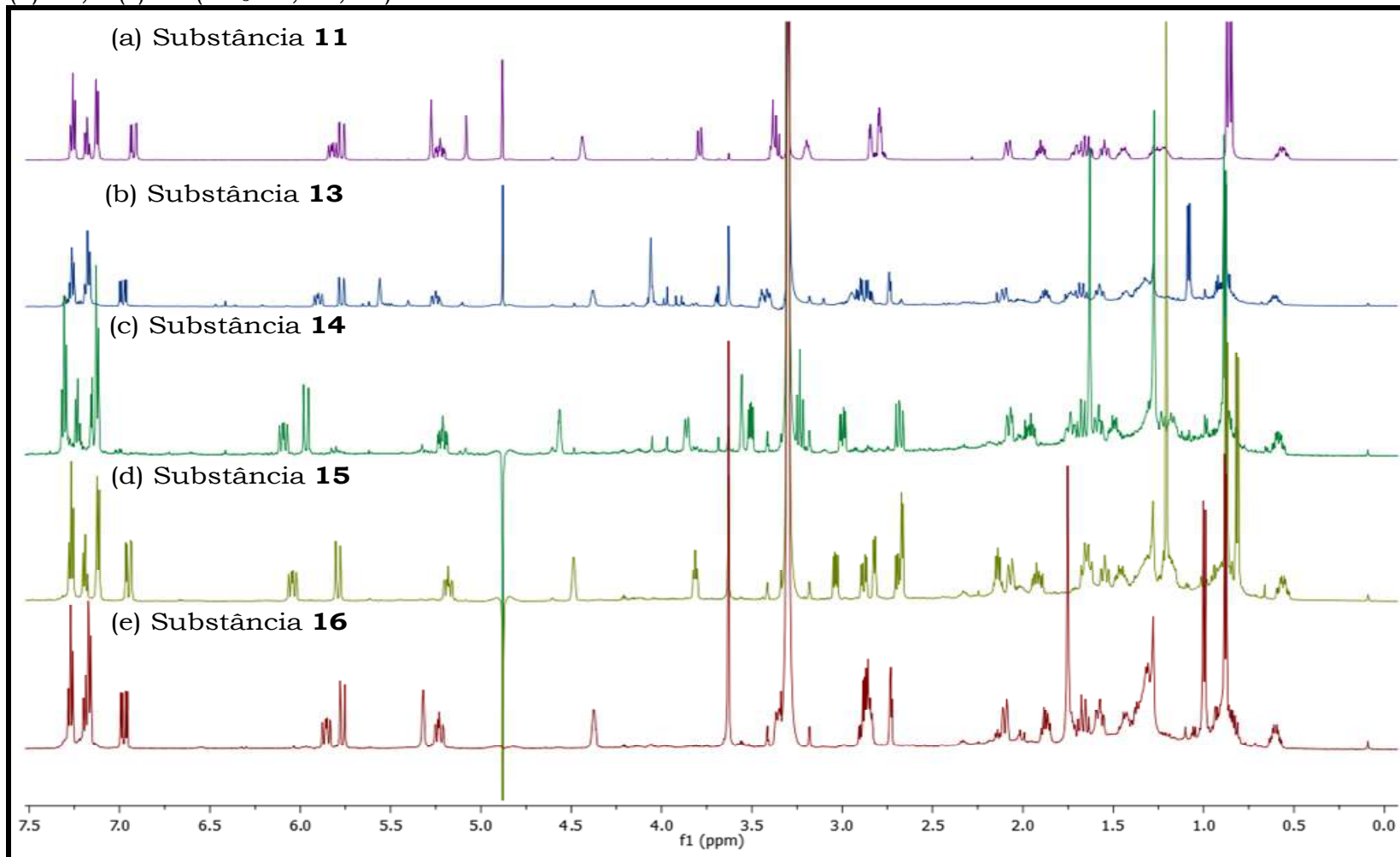
Comparando os dados obtidos com a literatura foi possível atribuir à substância **11** a estrutura da citocalasina B.<sup>35,36</sup>

**Figura 58.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **11**

A configuração absoluta sugerida à substância **11** foi realizada a partir dos dados espectroscópicos (tais como: deslocamento químico e constante de acoplamento) que são coincidentes com os da literatura e baseando-se na biossíntese. A citocalasina B (**Figura 57**, p. 106) já foi isolada anteriormente em estudos com outras espécies de *Xylaria*, esta substância é comercializada como Phomin<sup>®</sup>, e utilizada como agente antineoplásico, porém esta substância também possui propriedades antibiótica e fitopatogena.<sup>35, 36</sup>

As substâncias **13**, **14**, **15** e **16** evidenciaram perfil por RMN de <sup>1</sup>H (com PRESAT) muito semelhantes ao de **11**, como pode ser observado na **Figura 59** (p. 111), deste modo sugerimos pertencerem à classe das citocalasinas e tiveram suas estruturas elucidadas utilizando a mesma metodologia.

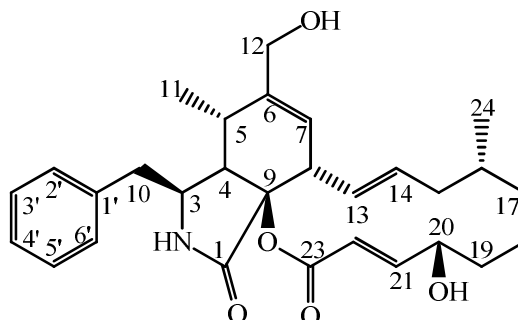
**Figura 59.** Comparação dos espectros obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT das substâncias: (a) **11**; (b) **13**, (c) **14**, (d) **15**, e (e) **16** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



### 5.7.6 Determinação estrutural de **13**

A substância **13** foi isolada como um sólido de coloração branca e sua elucidação estrutural foi realizada por análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, COSY, comparação com a substância **11** e com a literatura permitiram atribuir a estrutura da **Figura 60** (p. 112). <sup>71</sup>

**Figura 60.** Estrutura atribuída à substância **13**



**Tabela 25.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  da substância **13** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
1	172,8			
3	55,8	3,43 (m)	C-4; C-5	H-10
4	49,5	2,73*	C-5; C-6; C-9; C-10	
5	33,5	2,94 (m)	C-4; C-6; C-7	H-11
6	143,7			
7	125,3	5,56 (s)	C-5; C-6; C-7	
8	45,2	3,40 (m)	C-9	H-13
9	87,2			
10	42,8	2,85 (m)	C-3	H-3
11	11,7	1,07 (d; 7,2)	C-4; C-5; C-6	H-5
12	61,7	4,06 (s)		H-8
13	128,2	5,90 (ddd; 15,0; 10,2 e 1,7)	C-15	H-8; H-14
14	134,2	5,25 (m)		H-15; H-16
15	41,2	2,10 (m)	C-13; C-14	H-14
16	33,0	1,32 (m)		
17	34,8	0,61 (m) e 1,73 (m)	C-18	
18	20,2	1,43 (m)		
19	34,1	1,88 (m) e 1,55 (m)	C-17; C-18; C-20; C-21	
20	70,3	4,38 (m)		H-19; H-21
21	152,9	6,98 (dd; 15,6 e 5,7)	C-14; C-22; C-23	H-20; H-21
22	118,6	5,75 (dd; 15,6 e 1,5)	C-20, C-23	H-21
23	165,1			
24	19,2	0,87 (d; 6,6)	C-15; C-16	
1'	137,2			
2' e 6'	129,5	7,18 (m)	C-3'; C-10	
3' e 5'	128,2	7,26 (t; 7,5)	C-1'; C-2'; C-6'	
4'	126,5	7,17 (m)	C-2'; C-6'	

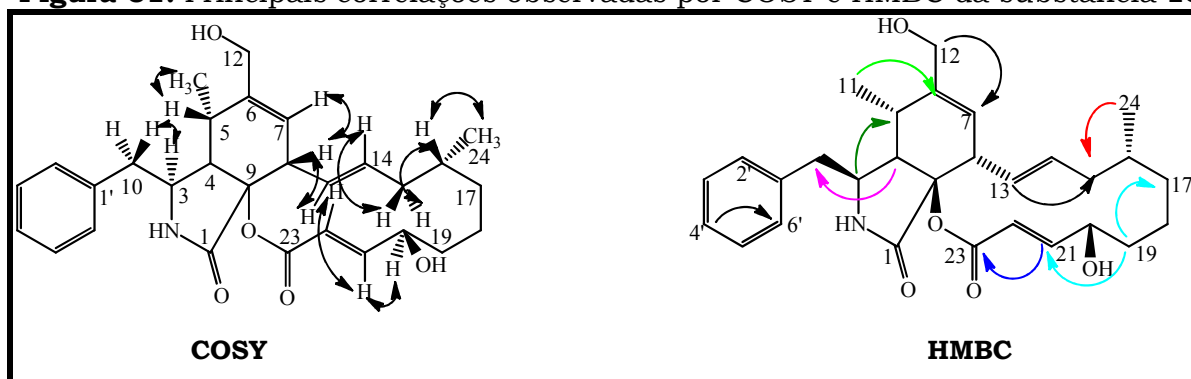
\*Sinal sobreposto.

As únicas diferenças observadas entre as substâncias **11** e **13** foram:

- Isomerização de  $\Delta^{6,12}$  para  $\Delta^{6,7}$ , confirmada pela presença de um carbono metínico  $sp^2$  em  $\delta_H$  5,56 (s, 1H, H-7,  $\delta_C$  125,3); e
- Oxidação de C-12 pela presença de um carbono carbinólico metilênico alílico em  $\delta_H$  4,06 (s, 2H, H-12,  $\delta_C$  61,6).

Estas observações aliadas às correlações obtidas por HSQC (**Apêndice 58**, p. 188), HMBC (**Figura 61**, p. 113; **Apêndice 59**, p. 189) e COSY (**Figura 61**; **Apêndice 57**, p. 187) alicerçados aos dados da literatura permitiram atribuir à substância **13** a estrutura da citocalasina  $Z_2$ .<sup>71</sup>

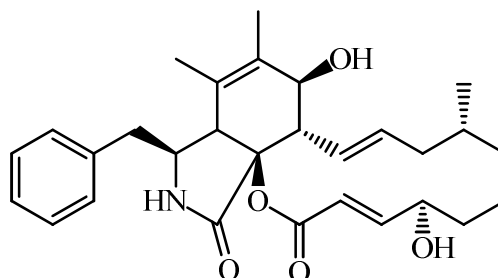
**Figura 61.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **13**



A citocalasina  $Z_2$  foi primeiramente isolada da cultura de *Pyrenophora semeniperda*, um fungo que controla biologicamente o crescimento de ervas daninhas na grama. Nestes estudos, a citocalasina  $Z_2$  mostrou uma notável capacidade em inibir o alongamento da raiz destas ervas, auxiliando no controle biológico desta praga.<sup>71</sup>

#### 5.7.7 Determinação estrutural de **14**

A substância **14** foi isolada como um sólido de coloração branca e sua elucidação estrutural foi realizada por análise dos dados obtidos por RMN de  $^1H$  com PRESAT e  $^{13}C$ , HSQC, HMBC, COSY, por comparação com a substância **11** e com a literatura permitiram atribuir a estrutura da **Figura 62** (p. 114).<sup>72</sup>

**Figura 62.** Estrutura atribuída à substância **14****Tabela 26.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  da substância **14** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
1	173,2			
3	59,2	3,51 (dd; 9,9 e 5,3)		
4	49,0	3,57*	C-1; C-5; C-6; C-9	
5	125,3			
6	133,7			
7	70,3	3,86 (d; 10,0)		H-8
8	48,2	3,23 (t; 10,0)	C-1; C-7; C-9; C-13; C14	H-7; H-13
9	84,4			
10	42,8	3,00 (dd; 13,0 e 5,3) 2,68 (dd; 13,0 e 9,9)	C-3; C-1'; C-2'	H-3
11	16,2	1,24 (s)	C-4; C-5; C-6	
12	13,3	1,63 (s)	C-5; C-6; C-7	
13	127,7	6,09 (ddd; 15,0; 10,0 e 1,6)	C-15	H-8, H-14
14	135,0	5,21 (ddd; 15,0; 10,0 e 3,8)		H-13; H-15
15	41,6	2,08 (m) e 1,67 (m)		H-14
16	33,1	1,17 (m)		
17	35,5	0,61 (m) e 1,74 (m)		
18	19,9	1,49 (m) e 1,21 (m)		
19	33,3	1,96 (m) e 1,56 (m)	C-17; C-20; C-21	H-20
20	69,2	4,56 (m)		H-19; H-20
21	153,9	7,15*	C-22; C-23	H-20; H-21
22	118,1	5,97 (dd; 15,7 e 2,0)	C-20, C-23	H-21
23	165,1			
24	19,4	0,89 (d; 6,6)	C-15; C-16	
1'	137,4			
2' e 6'	129,2	7,12 (m)	C-3'; C-10	
3' e 5'	128,4	7,31 (t; 7,5)	C-1'; C-6'	
4'	126,5	7,23 (m)	C-2'; C-6'	

\*Sinal sobreposto.

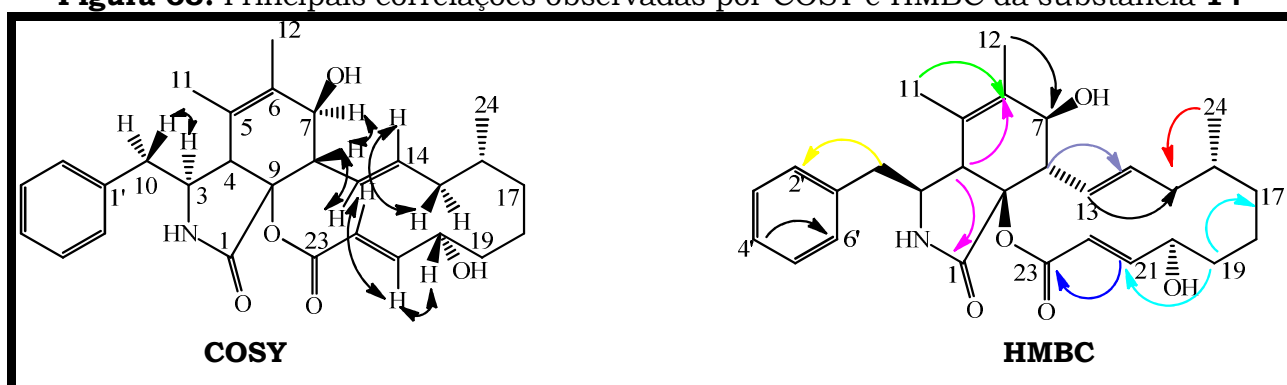
A substância **14** apresentou isomerização da ligação dupla exocíclica de  $\Delta^{12,6}$  para  $\Delta^{5,6}$  pelas seguintes observações:

- presença de uma ligação dupla tetrassubstituída entre C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  125,3) e C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  133,7); e

- presença de duas metilas em H-11 e H-12 como um singlete em  $\delta_H$  1,24 (s, 3H, H-11,  $\delta_C$  16,3) e em  $\delta_H$  1,63 (s, 3H, H-12,  $\delta_C$  13,3), respectivamente.

As correlações obtidas por HSQC (**Apêndice 63**, p. 193), HMBC (**Figura 63**, p. 115; **Apêndice 64**, p. 194) e COSY (**Figura 63**; **Apêndice 62**, p. 192) alicerçados aos dados da literatura permitiram atribuir à substância **14** a estrutura da citocalasina B<sub>2</sub>.<sup>72</sup>

**Figura 63.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **14**

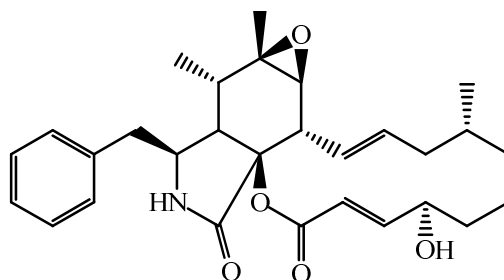


A citocalasina B<sub>2</sub> foi primeiramente isolada a partir do cultivo do fungo *Phoma* sp., e o seu primeiro relato ocorreu em 2012. Na literatura essa substância apresenta atividade citotóxica significativa contra linhagens de células tumorais.<sup>72</sup>

#### 5.7.8 Determinação estrutural de **15**

A substância **15** foi isolada como um sólido de coloração branco e sua elucidação estrutural foi obtida por análise dos dados obtidos por RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT e <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY, comparação com a substância **11** e os dados da literatura permitiram atribuir a estrutura da **Figura 64** (p. 116).<sup>72</sup>

Figura 64. Estrutura atribuída a substância 15

Tabela 27. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  da substância 15 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

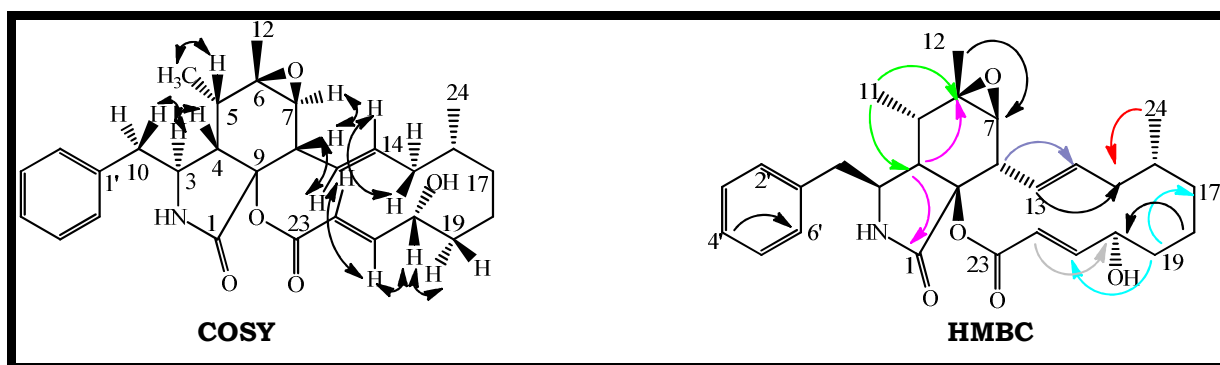
Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
1	173,1			
3	53,6	3,81 (m)		H-4; H10
4	47,1	2,82 (dd; 5,0 e 1,6)	C-1; C-5; C-6; C-9; C-10	H-5
5	35,9	2,14 (dt; 14,3 e 7,3)	C-4; C-6; C-11	H-11
6	57,7			
7	61,1	2,68*		
8	48,2	3,04 (dd; 10,1 e 5,4)	C-1; C-7; C-9; C-13	H-7; H-13
9	85,1			
10	43,5	2,88 (dd; 13,3 e 5,0) 2,68*	C-3; C-1'	H-3
11	11,4	0,81 (d; 7,3)	C-4; C-5; C-6	
12	18,1	1,21 (s)	C-5; C-6; C-7	
13	127,7	6,09 (ddd; 15,0; 10,0 e 1,6)	C-15	H-8; H-14
14	135,0	5,21 (ddd; 15,0; 10,0 e 3,8)		H-14; H-15
15	41,8	2,07 (d; 13,4) e 1,65*		H-14
16	33,2	1,17 (m)		
17	35,2	0,58 (m) e 1,64 (m)		
18	19,9	1,46 (m) e 1,18 (m)	C-20	
19	33,9	1,90 (m) e 1,53 (m)	C-17; C-20; C-21	
20	69,4	4,49 (m)		H-19; H-21
21	153,9	6,95 (dd; 15,7 e 3,6)	C-20	H-20; H-22
22	117,6	5,79 (dd; 15,7 e 2,0)	C-20, C-23	H-21
23	165,0			
24	19,3	0,88 (d; 7,0)	C-15; C-16	
1'	136,5			
2' e 6'	129,6	7,12 (m)	C-3'; C-10	
3' e 5'	128,3	7,27 (t; 7,5)	C-1'; C-2';	
4'	126,6	7,19 (t; 7,5)	C-2'; C-6'	

\*Sinal sobreposto.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  em comparação com a substância 11 evidenciaram ao invés da ligação dupla em  $\Delta^{5,6}$  a presença de dois carbonos carbinólicos em  $\delta_{\text{C}}$  57,7 e  $\delta_{\text{C}}$  61,1. Estes valores indicaram a epoxidação de  $\Delta^{5,6}$ . Esta hipótese foi confirmada pelo deslocamento químico da metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (s, 3H, H-12,  $\delta_{\text{C}}$  18,1) ligada a um carbono  $sp^3$  carbinólico.

As correlações obtidas por HSQC (**Apêndice 68**, p. 198), HMBC (**Figura 65**, p. 117; **Apêndice 69**, p. 199) e COSY (**Figura 65**; **Apêndice 67**, p. 197) alicerçados aos dados da literatura <sup>72</sup> permitiram atribuir à substância **15** a estrutura da citocalasina F. Existem relatos na literatura que a citocalasina F possui propriedade algicida. <sup>73</sup>

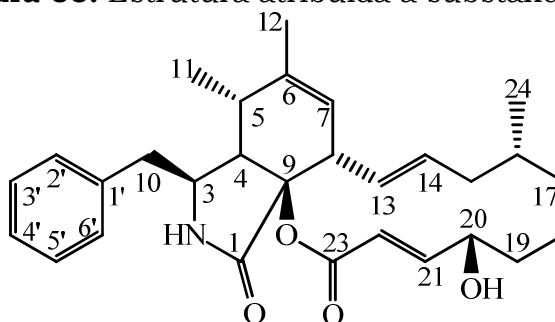
**Figura 65.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **15**



#### 5.7.9 Determinação estrutural de **16**

A substância **16** foi isolada como um sólido de coloração branca e sua elucidação estrutural foi realizada por análise dos dados obtidos por RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT e <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY, por comparação com a substância **13** e com os dados da literatura permitiram atribuir a estrutura da **Figura 66** (p. 117). <sup>71</sup>

**Figura 66.** Estrutura atribuída à substância **16**



A principal diferença observada entre as citocalasinas **13** e **16** foi a redução de C-12 da substância **13**. Foi observado um sinal referente a uma metila em  $\delta_H$  1,74 (s, 3H, H-12,  $\delta_C$  18,6) na substância **16**, ao invés do sinal

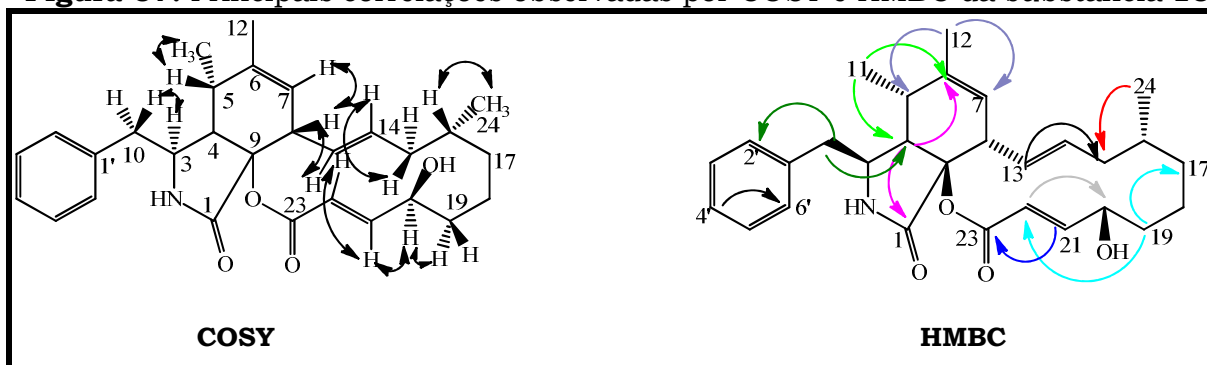
referente a um grupo metilênico alílico carbinólico em  $\delta_{\text{H}}$  4,06 (s, 2H, H-12,  $\delta_{\text{C}}$  61,6) da substância **13**.

**Tabela 28.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT e  $^{13}\text{C}$  da substância **16** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m; J Hz)	HMBC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
1	173,0			
3	55,6	3,29*		
4	49,6	2,72*	C-1; C-5; C-6; C-9	
5	34,1	2,85*		
6	140,7			
7	123,5	5,32 (sl)		
8	45,4	3,35*		H-13
9	87,2			
10	42,8	2,86 (dd; 13,5 e 6,1)	C-3; C-4; C-1'; C-2'	
11	12,7	0,98 (d)	C-4; C-5; C-6	H-5
12	18,6	1,74 (s)	C-5; C-6; C-7	
13	127,7	6,09 (ddd; 15,0; 10,0 e 1,6)	C-15	
14	135,0	5,21 (ddd; 15,0; 10,0 e 3,8)		H-13
15	41,2	2,07 (m) e 1,67 (m)		H-14
16	32,8	1,31 (m)		
17	34,8	0,60 (m) e 1,75 (m)		
18	20,2	1,42 (m)		
19	34,0	1,87(m)	C-17; C-20; C-22	
20	70,3	4,38 (m)		H-19; H-21
21	152,9	6,97 (dd; 15,6 e 5,8)	C-20; C-23	H-20; H-22
22	118,6	5,77 (dd; 15,6 e 1,5)	C-20, C-23	H-21
23	165,2			
24	19,2	0,87 (d; 6,6)	C-15; C-16	H-16
1'	137,2			
2' e 6'	129,6	7,16 (m)	C-3'; C-10	
3' e 5'	128,2	7,27 (t; 6,6)	C-1'; C-6'	
4'	126,4	7,18 (m)	C-2'; C-6'	

\*Sinal sobreposto.

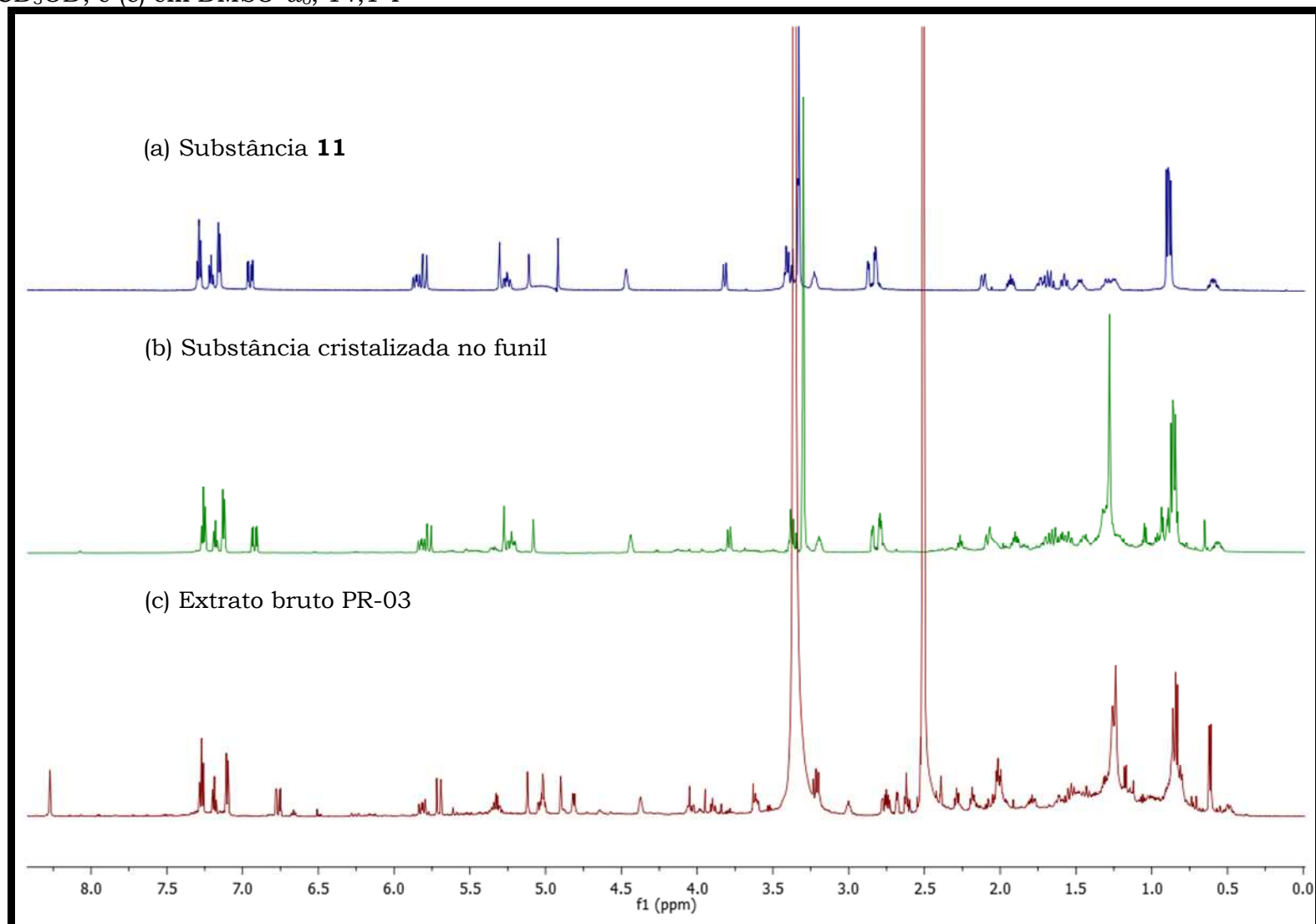
As correlações obtidas por HSQC (**Apêndice 73**, p. 203), HMBC (**Figura 67**, p. 119; **Apêndice 74**, p. 204) e COSY (**Figura 67**; **Apêndice 72**, p. 202) alicerçados aos dados da literatura permitiram atribuir à substância **16** a estrutura da citocalasina T. <sup>72</sup> Esta substância foi primeiramente isolada a partir da produção metabólica do fungo endofítico *Phoma* sp., que em seus estudos mostrou ter significativa toxicidade nos experimentos realizados com mudas de tomate e em larvas de camarão de água salgada (*Artemia salina*). <sup>74</sup>

**Figura 67.** Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância **16**

De modo geral, as citocalasinas constituem um grande grupo de metabólitos produzidos por diversas espécies de fungos, e, embora o primeiro metabólito desta classe tenha sido descoberto há mais de 40 anos atrás, estas substâncias ainda são amplamente estudadas devido as suas importantes propriedades biológicas e possíveis aplicações como produtos farmacêuticos, como antibióticos, e como herbicidas.<sup>75</sup>

Finalmente, é importante salientar que a comparação do espectro obtido por RMN de  $^1\text{H}$  da substância **11** com o espectro da substância que cristalizava no funil de separação durante as partições para obtenção do extrato bruto, e o espectro do próprio extrato bruto de PR-03 A apresentaram perfis muito semelhantes, como pode ser notado na **Figura 68** (p. 120), indicando a presença dessa classe de substâncias.

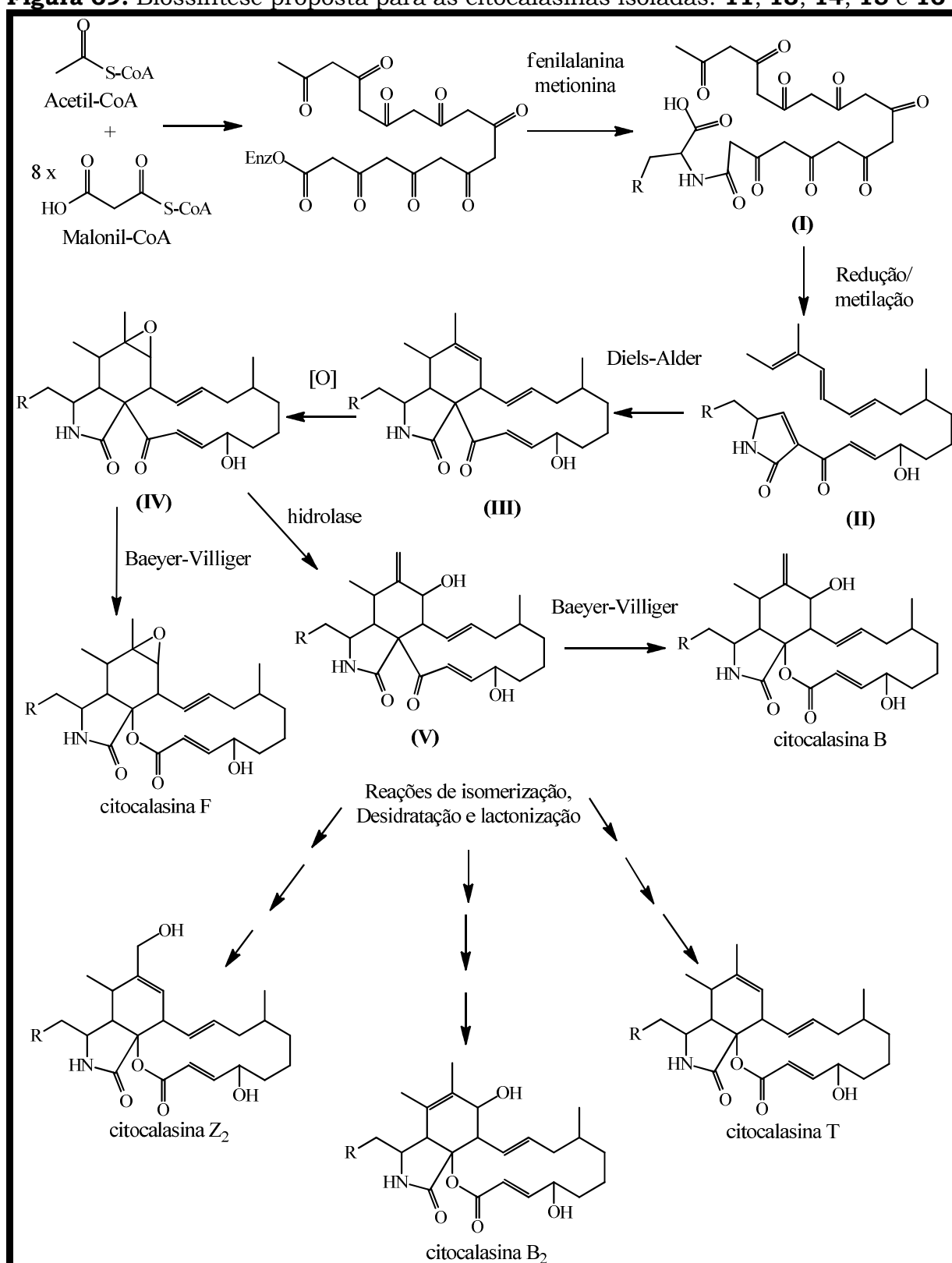
**Figura 68.** Comparação dos espectros obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e com PRESAT de: (a) substância **11**; (b) substância observada no funil de separação; e (c) extrato bruto PR-03 A. Os espectros de (a) e (b) obtidos em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , e (c) em  $\text{DMSO}-d_6$ , 14,1 T



#### 5.7.10 *Biossíntese proposta para as citocalasinas isoladas*

A proposta biossintética para a citocalasina B é que a mesma é formada de uma unidade de fenilalanina, duas de metionina e nove de acetato. Caracterizando uma via biossintética mista acetato/chikimato. Na proposta abaixo, o derivado policetídeo (nonacetídeo) se liga a fenilalanina através de uma conexão com a amida para formar o intermediário (I), que por processo de redução, dehidrogenação e condensação resulta no intermediário (II). O intermediário (II) pode sofrer uma reação de cicloadição para formar (III). A epoxidação da ligação dupla no intermediário (III) resulta no sistema de anel presente na citocalasina F (substância **15**). Em condições levemente ácidas, o epóxido é transformado em álcool alílico (V), que pode sofrer isomerização ou desidratação resultando no tipo de anel presente nas citocalasinas (**13**, **14** e **16**). Sugere-se que a inserção do oxigênio entre os carbonos C-9 e C-23 ocorra por uma via enzimática do tipo Baeyer-Villiger e que o deoxafomina (V) seja um precursor direto uma vez que este possui o mesmo esqueleto carbônico e mesma configuração absoluta que a citocalasina B.<sup>36, 76, 77</sup>

A proposta da rota biossintética para a citocalasina B está ilustrada na **Figura 69** (p. 122), onde R corresponde ao benzeno.

**Figura 69.** Biossíntese proposta para as citocalasinas isoladas: **11, 13, 14, 15 e 16**

**FONTE:** Adaptado de: CAFÊU, M. C. (2007); FUJII, R. et al. (2013); e QIAO, K. et al (2011). 36, 76, 77

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado com os endófitos do gênero *Xylaria* sp. isolados de diferentes espécies vegetais do Cerrado, permitiu uma avaliação da potencialidade dos extratos obtidos em escala reduzida na produção de metabólitos secundários. Os cinco meios de cultivo líquidos comerciais (MDB, Czapek, EM, YM, e Nutrient) e os dois meios sólidos (arroz e milho) apresentaram uma produção metabólica muito rica e com um perfil químico promissor quando analisado por CLAE-DAD e RMN de  $^1\text{H}$  (com PRESAT), podendo-se concluir que a produção metabólica dos endófitos em estudo depende da composição nutritiva de cada meio de cultivo. Embora os meios de cultivo líquido evidenciassem uma rica produção metabólica, os meios de cultura sólidos renderam massa de extrato bem maior que os demais meios.

A potencialidade destes extratos frente aos ensaios anticolinesterásico, citotóxico e antifúngico contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foram surpreendentes, principalmente frente aos ensaios antifúngicos, considerando que a maioria, dos extratos apresentaram uma ou mais substâncias com potencial atividade. Esta triagem inicial permitiu selecionar os endófitos isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) CSY-06, e *Prunus myrtifolia* (Rosaceae) PR-03 para estudo mais detalhado sobre os constituintes químicos presentes nos extratos obtidos em meio sólido de arroz.

O fracionamento do extrato produzido pelo endófito CSY-06 em arroz por CLAE-DAD<sub>preparativo</sub> forneceu o isolamento de seis substâncias pertencentes a diferentes classes: duas substâncias da classe das pironas, três isocumarinas, e um esteroide, e duas destas substâncias são inéditas. Todas as substâncias isoladas e com relatos na literatura possuem interesse, tanto pelas atividades apresentadas, como para utilização comercial.

O fracionamento do extrato produzido pelo endófito PR-03 em arroz primeiramente em coluna e posteriormente por CLAE-DAD<sub>preparativo</sub> conduziu ao isolamento e identificação de oito substâncias, como a griseofulvina e declorogriseofulvina, um diácido, e cinco citocalasinas. Metabólitos estes

com renomado potencial bioativo relatado na literatura, e com alto valor agregado, sugerindo que o micro-organismo em associação com a espécie vegetal deva produzir estas substâncias como forma de proteção quanto a possíveis patógenos.

A potencialidade da produção de griseofulvina pelos endófitos *Xylaria* sp., quando submetidos a diferentes meios de cultivo, líquidos e sólidos, permitiu inferir o endófito e meio de cultivo onde essa produção foi mais acentuada (PR-03 em Czapek). O planejamento fatorial realizado para este endófito neste meio de cultivo apresentou uma maximização desta produção em mais de 150% com o valor obtido inicialmente, e a validação do método cromatográfico permitiu assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, colaborando para uma possível utilização deste endófito na obtenção desta substância para fins comerciais.

Também foi possível verificar, mais uma vez, que o meio de cultivo utilizado favorece a formação de certas classes de metabólitos secundários. Quando o meio de cultivo utilizado foi Czapek (líquido) para o endófito *Xylaria* sp. codificado PR-03, a principal substância produzida foi a griseofulvina, no entanto quando o meio de cultivo utilizado foi o de arroz (sólido) houve maior produção de citocalasinas. Esta observação sugere que as vias biossintéticas são dependentes dos nutrientes oferecidos ao micro-organismo, o que têm sido amplamente discutido na técnica de OSMAC (*One Strain Many Compounds*).

Os resultados encontrados até o momento reforçam a suposição das interações ecológicas existentes entre estes micro-organismos e suas plantas hospedeiras, e a importância em se estudar, química e biologicamente, estes micro-organismos como pode ser verificado pela admirável produção de metabólitos secundários potencialmente bioativos e muitos possivelmente com estruturas inéditas.

## REFERÊNCIAS

- 1 LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: Ed. Instituto Superior Técnico, 2007.
- 2 PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- 3 BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.
- 4 HERBERT, R. B. **The biosynthesis of secondary metabolites**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1989.
- 5 NGUYEN, Q. T.; MERLO, M. E.; MEDEMA, M. H.; JANKEVICS, A.; BREITLING, R.; TAKANO, E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS Letters**, v. 586, p. 2177-2183, 2012.
- 6 STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- 7 VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908-910, 2004.
- 8 SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados com espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 9 HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.
- 10 ALCANO, I. E. The fungi. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of microbiology**. 4th ed. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing, 1994, Chap. 14, p. 421-450.
- 11 HAINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1965. v. 1.
- 12 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.
- 13 SUN, J.; ZANG, W.; GUO, L.; CHI, D. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Science in China Series C**, v. 51, n. 8, p. 751-759, 2008.
- 14 AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.

- 15 AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1998.
- 16 PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Makron Books, 1996. v. 1.
- 17 BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-438, 2011.
- 18 CHEN, Y. L.; ZHANG, Y.; YE, J. S.; HAN, H. Y.; WAN, S. Q.; CHEN, B. D. Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 69, p. 371-381, 2014.
- 19 CHOWDHARY, K.; GONZÁLES, A. C.; KAUSHIK, N.; CABRERA, R. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 467-485, 2012.
- 20 KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S.; STIERLE, A.; STIERLE, D. B. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.
- 21 STROBEL, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 259-272, 2014.
- 22 SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant Symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- 23 ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- 24 IÓCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings-the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 646-675, 2014.
- 25 TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- 26 STADLER, M.; KUHNERT, E.; PERŠOH, D.; FOURNIER, J. The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the “One Fungus-One Name” (1F1N) concept. **Mycology**, v. 4, p. 5-21, 2013.
- 27 CHAREPRASERT, S.; ABDELGHANY, M. T.; EL-SHEIKH, H. H.; AHMED, A. F.; KHALIL, A. M. A.; SHARPLES, G. P.; SIHANONTH, P.; SOLIMAN, H. G.; SUWANNASAI, N.; WHALLEY, A. J. S.; WHALLEY, M. A. Xylariaceae on the fringe. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 53, p. 229-241, 2012.
- 28 HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity-magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- 29 WHALLEY, A. J. S. The xylariaceous way of life. **Mycological Research**, v. 100, p. 897-922, 1996.

- 30 TANG, A. M. C.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. A re-evaluation of the evolutionary relationships within the *Xylariaceae* based on ribosomal and protein-coding gene sequences. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 127-155, 2009.
- 31 STADLER, M.; FOURNIER, J.; LÆSSØE, T.; DECOCK, C.; PERŠOH, D.; RAMBOLD, G. *Ruwenzoria*, a new genus of the Xylariaceae from Central Africa. **Mycology Progress**, v. 9, p. 169-179, 2010.
- 32 WHALLEY, A. J. S.; EDWARDS, R. L. The Xylariaceae: a case study in biological and chemical diversity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY AND BIORESOURCES: CONSERVATION AND UTILIZATION, 1997, Phuket. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 1997. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.577.7836&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 10 set. 2016.
- 33 SONG, F.; WU, S. H.; ZHAI, Y. Z.; XUAN, Q. C.; WANG, T. Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 673-694, 2014.
- 34 SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; PAULETTI, P. M.; CASTRO GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; COSTA NETO, C. M.; PFENNING, L. H.; BERLINCK, R. G. S.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 164-167, 2010.
- 35 CAFÊU, M. C. **Substâncias bioativas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii***. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- 36 CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 255 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- 37 PETERSEN, A. B.; RØNNEST, M. H.; LARSEN, T. O.; CLAUSEN, M. H. The chemistry of griseofulvin. **Chemicals Reviews**, v. 114, p. 12088-12107, 2014.
- 38 DE CARLI, L.; LARIZZA, L. Griseofulvin. **Mutation Research**, v. 195, p. 91-126, 1988.
- 39 SHANGA, Z.; LIA, X. M.; LIA, C. S.; WANG, B. G. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1338-1348, 2012.
- 40 ZHAO, J. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, L. W.; WANG, J. Y.; ZHANG, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 2107-2112, 2012.
- 41 SICA, V. P.; REES, E. R.; TCHEGNON, E.; BARDSLEY, R. H.; RAJA, H. A.; OBERLIES, N. H. Spatial and temporal profiling of griseofulvin production in *Xylaria cubensis* using mass spectrometry mapping. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 544-559, 2016.

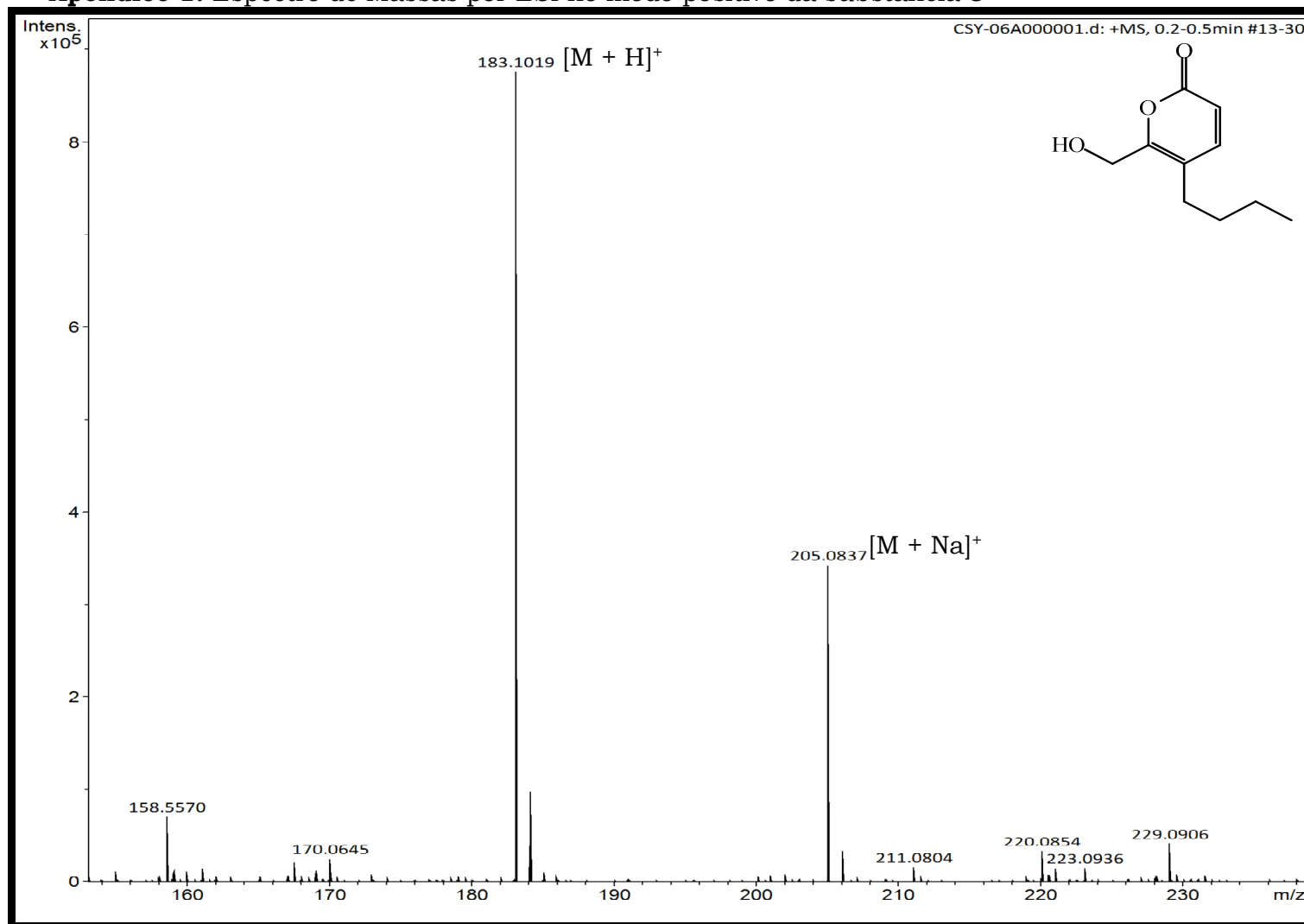
- 42 CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. da S.; ARAUJO, A. R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- 43 PARK; J.-H.; CHOI, G. J.; LEE, H. B.; KIM, K. M.; JUNG, H. S.; LEE, S. W.; JANG, K. S.; CHO, K. Y.; KIM, J.C. Griseofulvin from *Xylaria sp.* Strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 112-117, 2005.
- 44 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 45 NASSER, A. L. M. **Identificação de oligômeros presentes em garrafas PET destinadas ao acondicionamento de água mineral e de suco de fruta: desenvolvimento e validação de método analítico.** 2003. 118 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 46 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determinação da publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jul. 2003.
- 47 SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.
- 48 ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*).** 2010. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 49 ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- 50 ZHANG, H.; DENG, Z.; GUO, Z.; PENG, Y.; HUANG, N.; HE, H; TU, X.; ZOU, K. Effect of culture conditions on metabolite production of *Xylaria sp.* **Molecules**, v. 20, p. 7940-7950, 2015.
- 51 FELIPPE, L. G. **Estudo das lignanas de *Peperomia blanda* (Piperaceae): abordagem de aspectos estruturais, metabólicos e biossintéticos.** 2013. 206 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- 52 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- 53 CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

- 54 TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- 55 MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- 56 CROTHERS, M.; ZHOU, Z. Y.; RICARDO, N. M. P. S.; YANG, Z.; TABOADA, P.; CHAIBUNDIT, C.; ATTWOOD, D.; BOOTH, C. Solubilisation in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, p. 22-31, 2005.
- 57 SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n.13, p. 1107-1112, 1990.
- 58 MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 59 BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- 60 OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 61 SHIMADA, A.; INOKUCHI, T.; KUSANO, M.; TAKEUCHI, S.; INOUE, R.; TANITA, M.; FUJIOKA, S.; KIMURA, Y. 4-hydroxykigelin and 6-demethylkigelin, root growth promoters, produced by *Aspergillus terreus*. **Journal of Biosciences**, v. 59, p. 218-222, 2004.
- 62 GOVINDACHARI, T. R.; PATANKAR, S. J.; VISWANATHAN, N. Isolation and structure of two new dihydroisocoumarins from *Kigelia pinnata*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1603-1606, 1971.
- 63 EHSAN, S.; AZAM, Q.I. Synthesis of (±)-Kigelin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 739-742, 2005.
- 64 FANG, B.; XIE, X.; ZHAO, C.; JING, P.; LI, H.; WANG, Z.; GU, J.; SHE, X. Asymmetric total synthesis of fusarentin 6-methyl ether and its biomimetic transformation into fusarentin 6,7-dimethyl ether, 7-O-demethylmonocerin, and (+)-monocerin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, p. 6338-6343, 2013.
- 65 HU, Z. Y.; LI, Y. Y., LU, C. H.; LIN, T.; HU, P.; SHEN, Y. M. Seven novel linear polyketides from *Xylaria* sp. NCY2. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 925-933, 2010.
- 66 DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Hoboken: Wiley, 2008.

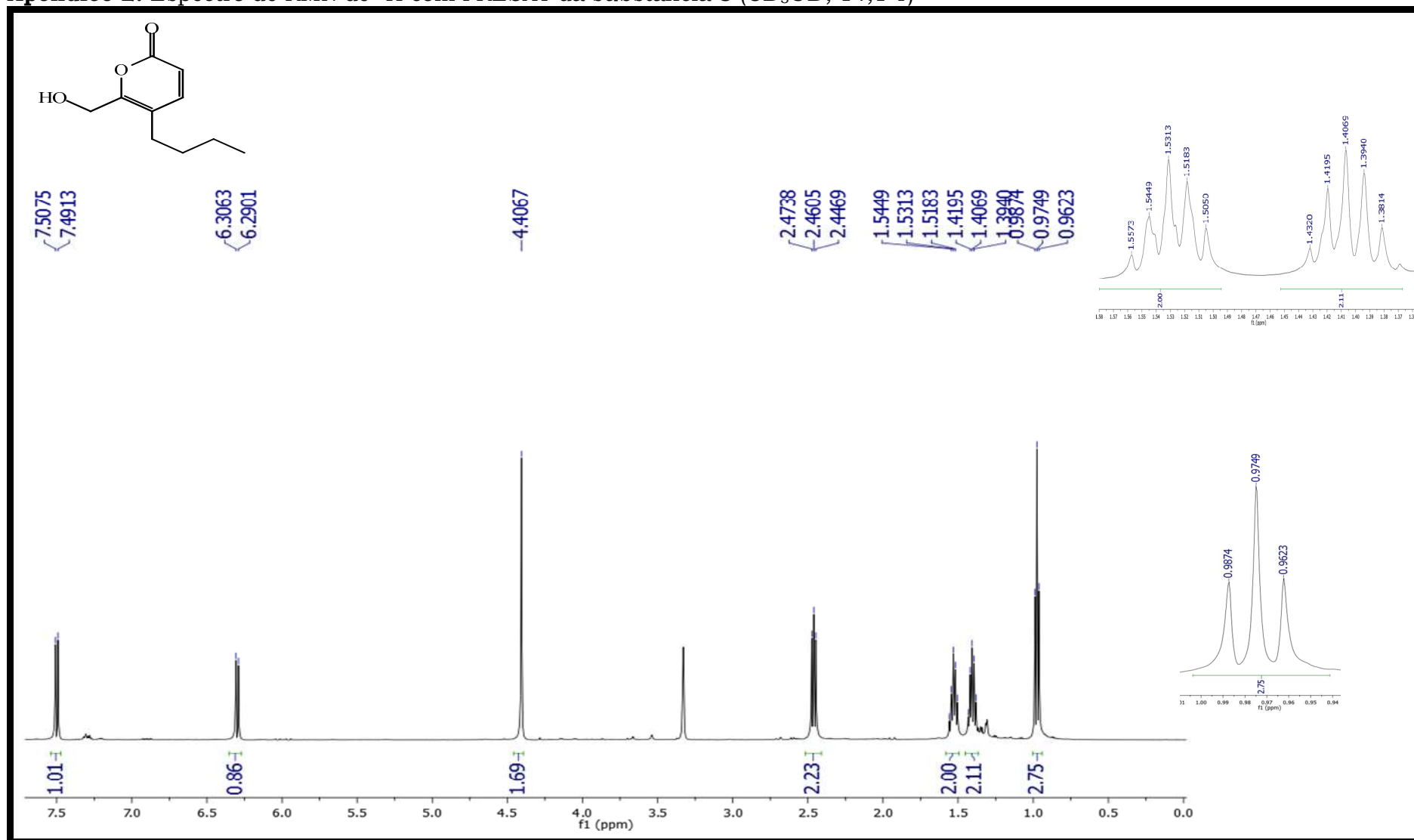
- 67 UMEOKOLI, B. O.; MUHARINI, R.; OKOYE, F. B.; AJIWE, V. I.; AKPUAKA, M. U.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. New C-methylated flavonoids and  $\alpha$ -pyrone derivative from roots of *Talinum triangulare* growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v. 109, p. 169-173, 2016.
- 68 AMAGATA, T.; DOI, M.; TOHGO, M.; MINOURA, K.; NUMATA, A. Dankasterone, a new class of cytotoxic steroid produced by a *Gymnascella* species from a marine sponge. **Chemical Communication**, n. 14, p. 1321-1322, 1999.
- 69 AMAGATA, T.; TANAKA, M.; DOI, M.; MINOURA, K.; OHISHI, H.; YAMORI, T.; NUMATA, A. Variation in cytostatic constituents of a sponge-derived *Gymnascella dankaliensis* by manipulating the carbon source. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1731-1740, 2007.
- 70 CHOOI, Y. H.; CACHO, R.; TANG, Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 483-494, 2010.
- 71 EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; MOTT, A. Cytochalasins Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> and Z<sub>3</sub>, three 24-oxa[14]cytochalasans produced by *Pyrenophora semeniperda*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 45-53, 2002.
- 72 KIM, E. L.; LI, J. L.; DANG, H. T.; HONG, J.; LEE, C. O.; KIM, D. K.; YOON, W. D.; KIM, E.; LIU, Y.; JUNG, J. H. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3126-3129, 2012.
- 73 KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAGER, S.; SCHULZ, B. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 155-157, 1999.
- 74 CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; VURRO, M. Cytochalasins from *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3945-3950, 1991.
- 75 EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; MOTT, A. Cytochalasins Z<sub>4</sub>, Z<sub>5</sub>, and Z<sub>6</sub>, three new 24-Oxa[14]cytochalasans produced by *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1540-1544, 2003.
- 76 FUJII, R.; MINAMI, A.; GOMI, K.; OIKAWA, H. Biosynthetic assembly of cytochalasin backbone. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 2999-3002, 2013.
- 77 QIAO, K.; CHOOI, Y. H.; TANG, Y. Identification and engineering of the cytochalasin gene cluster from *Aspergillus clavatus* NRRL 1. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 723-732, 2011.

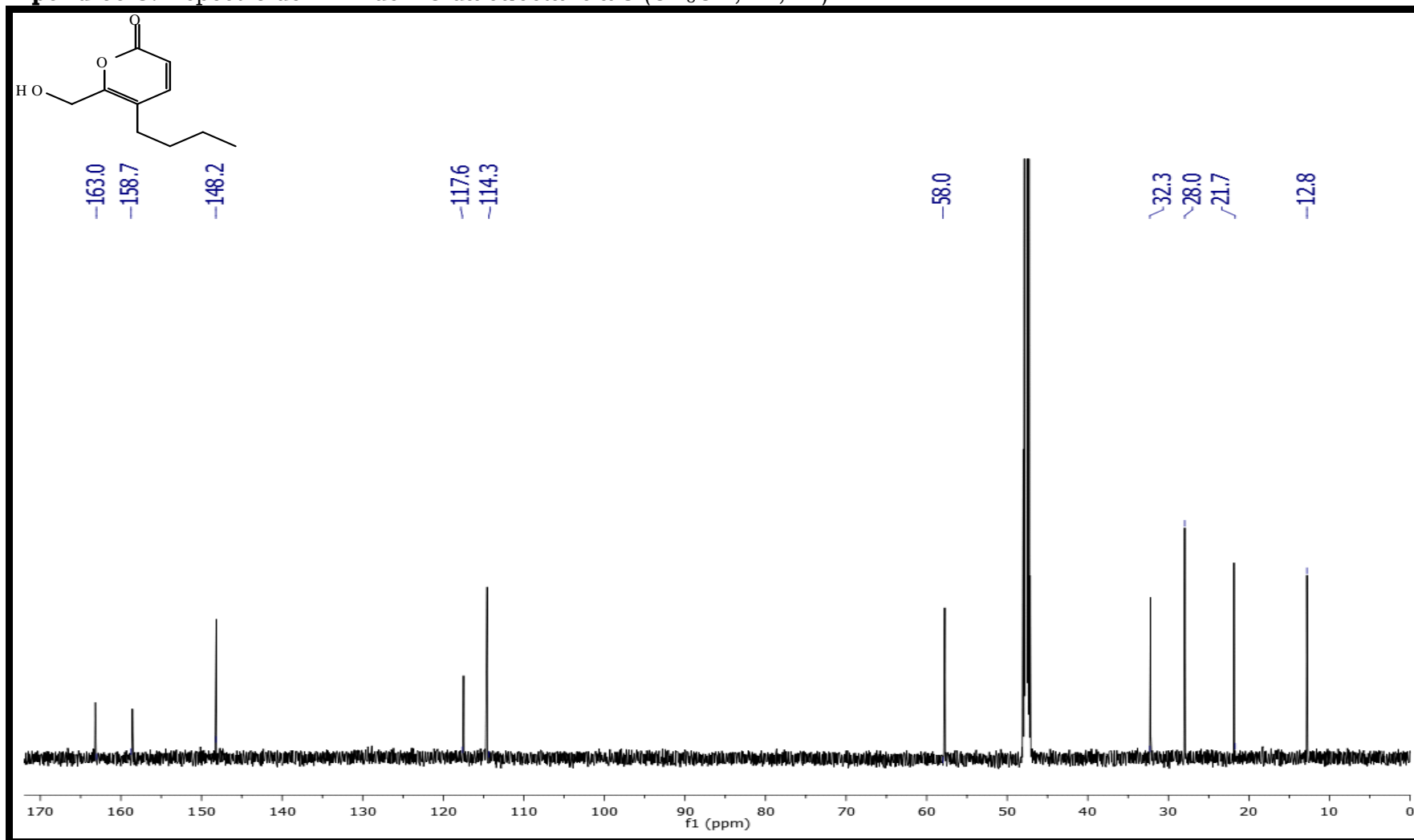
## APÊNDICE

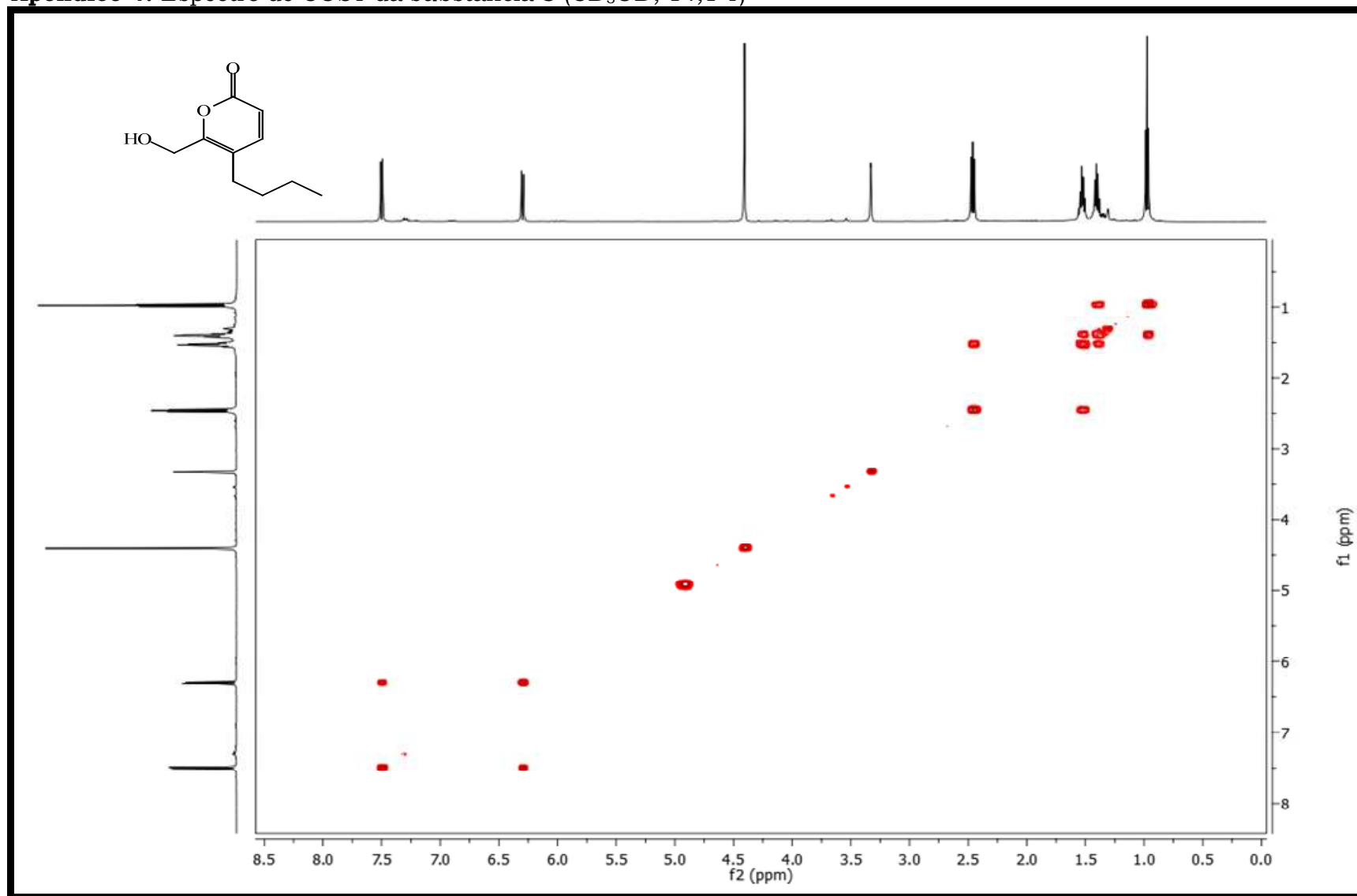
Apêndice 1. Espectro de Massas por ESI no modo positivo da substância 3

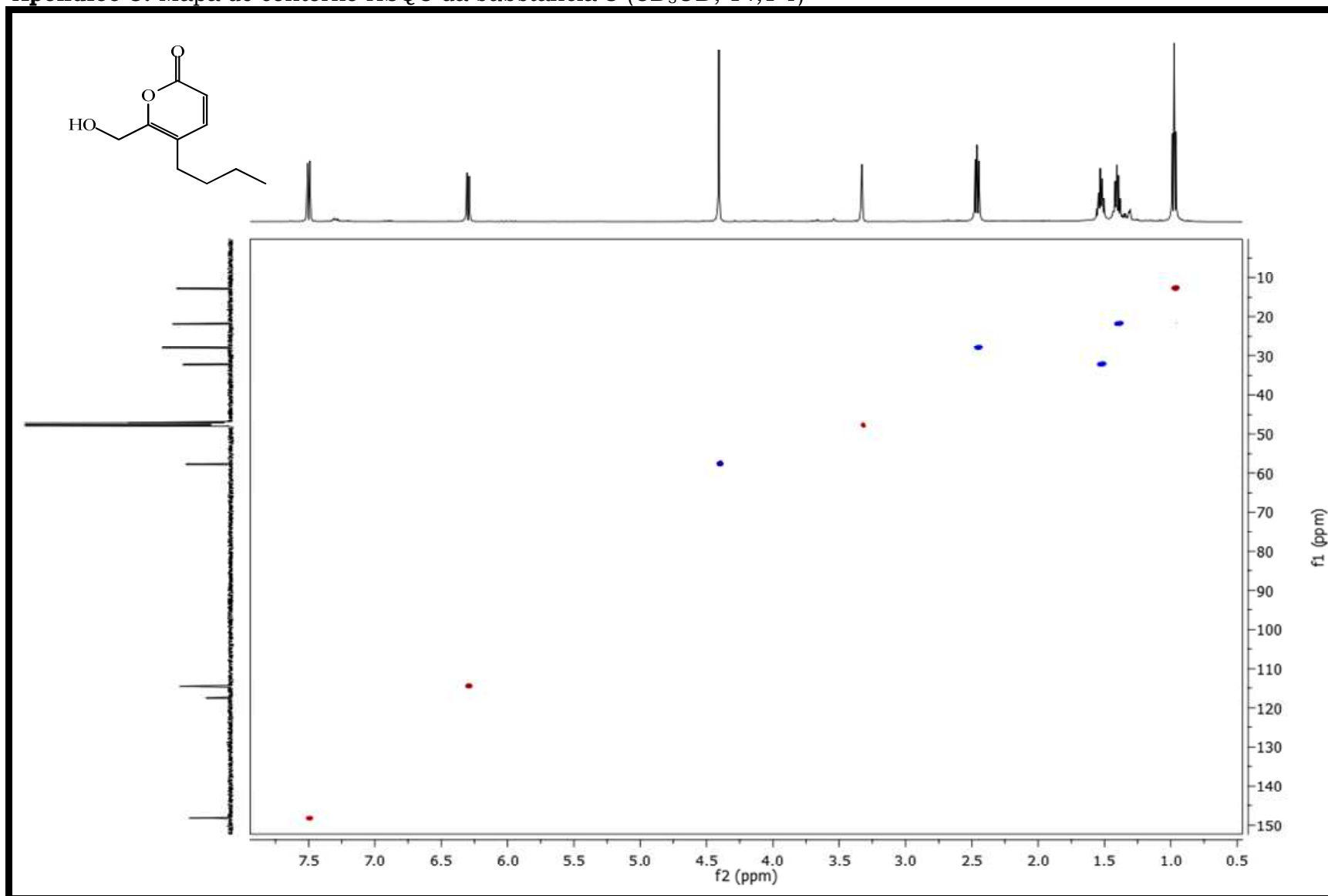


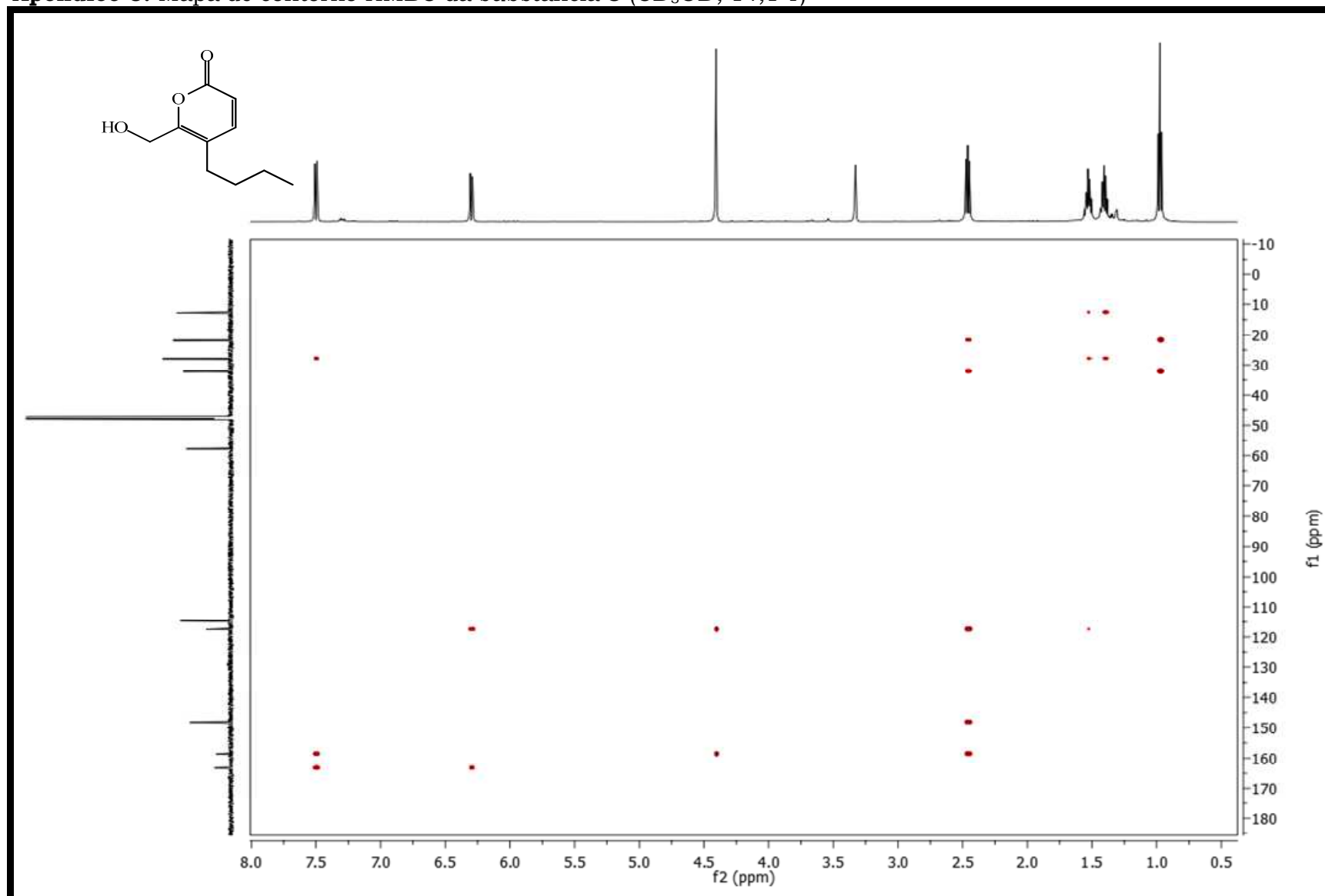
Apêndice 2. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H com PRESAT da substância 3 (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

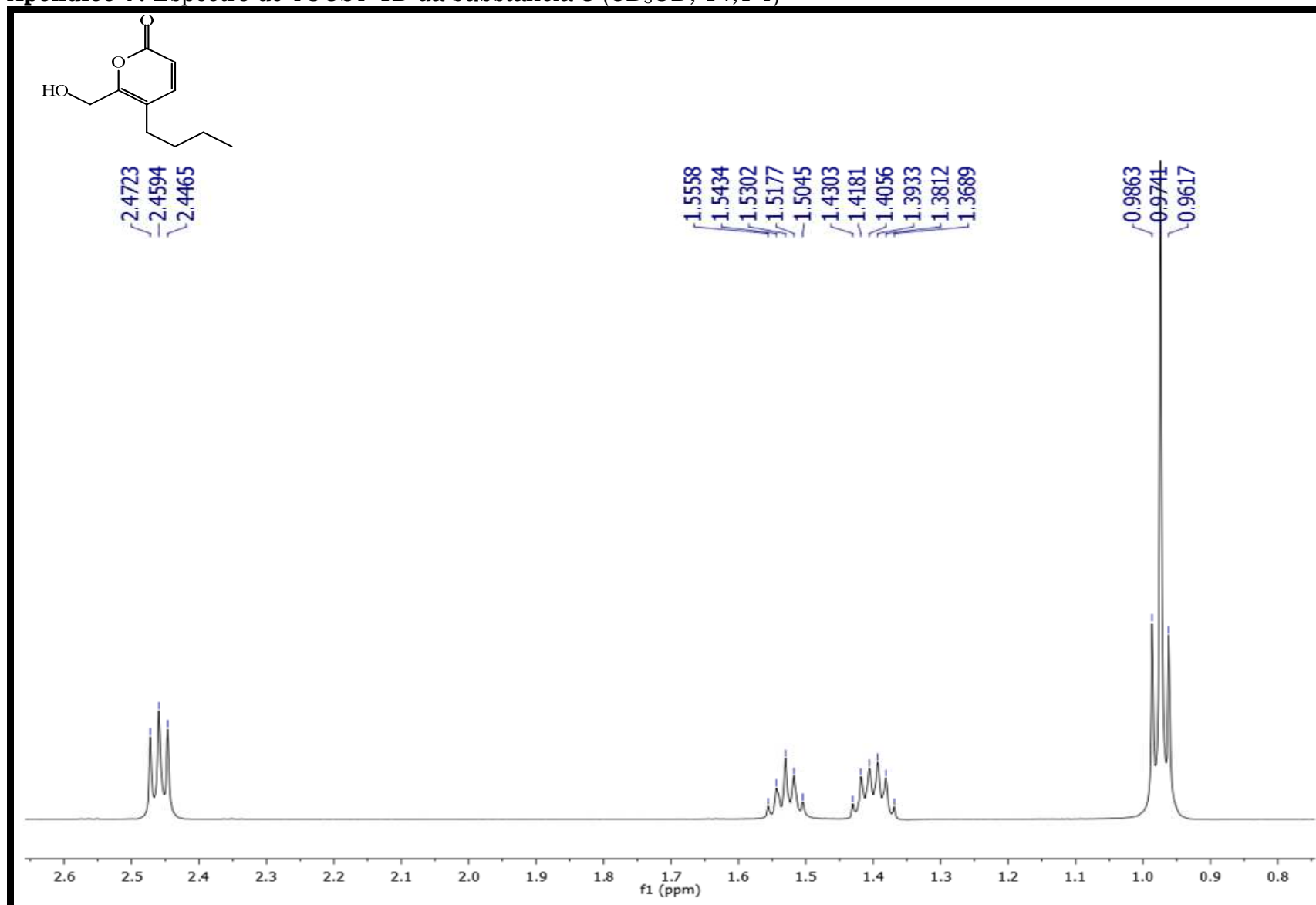


**Apêndice 3.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

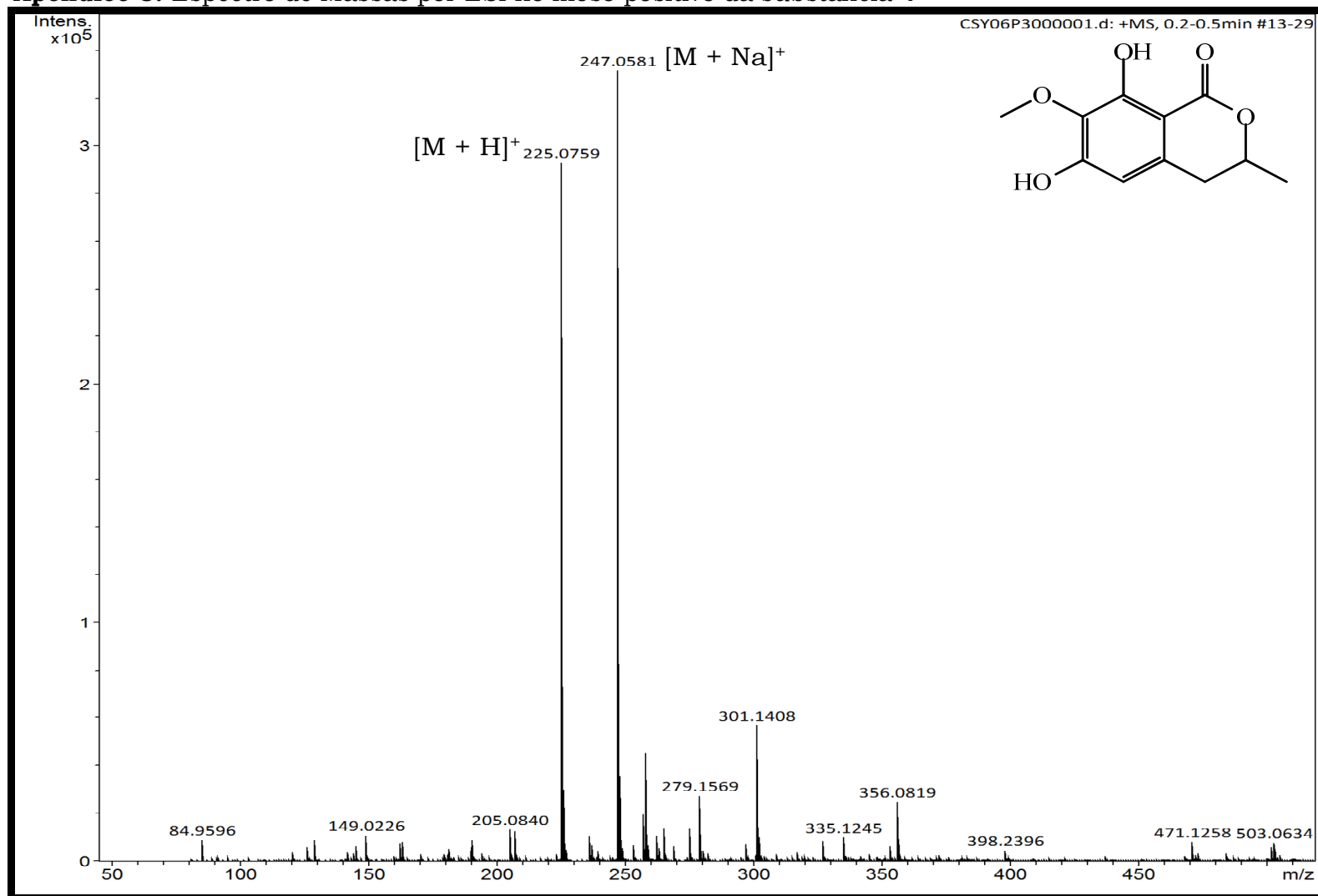
Apêndice 4. Espectro de COSY da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

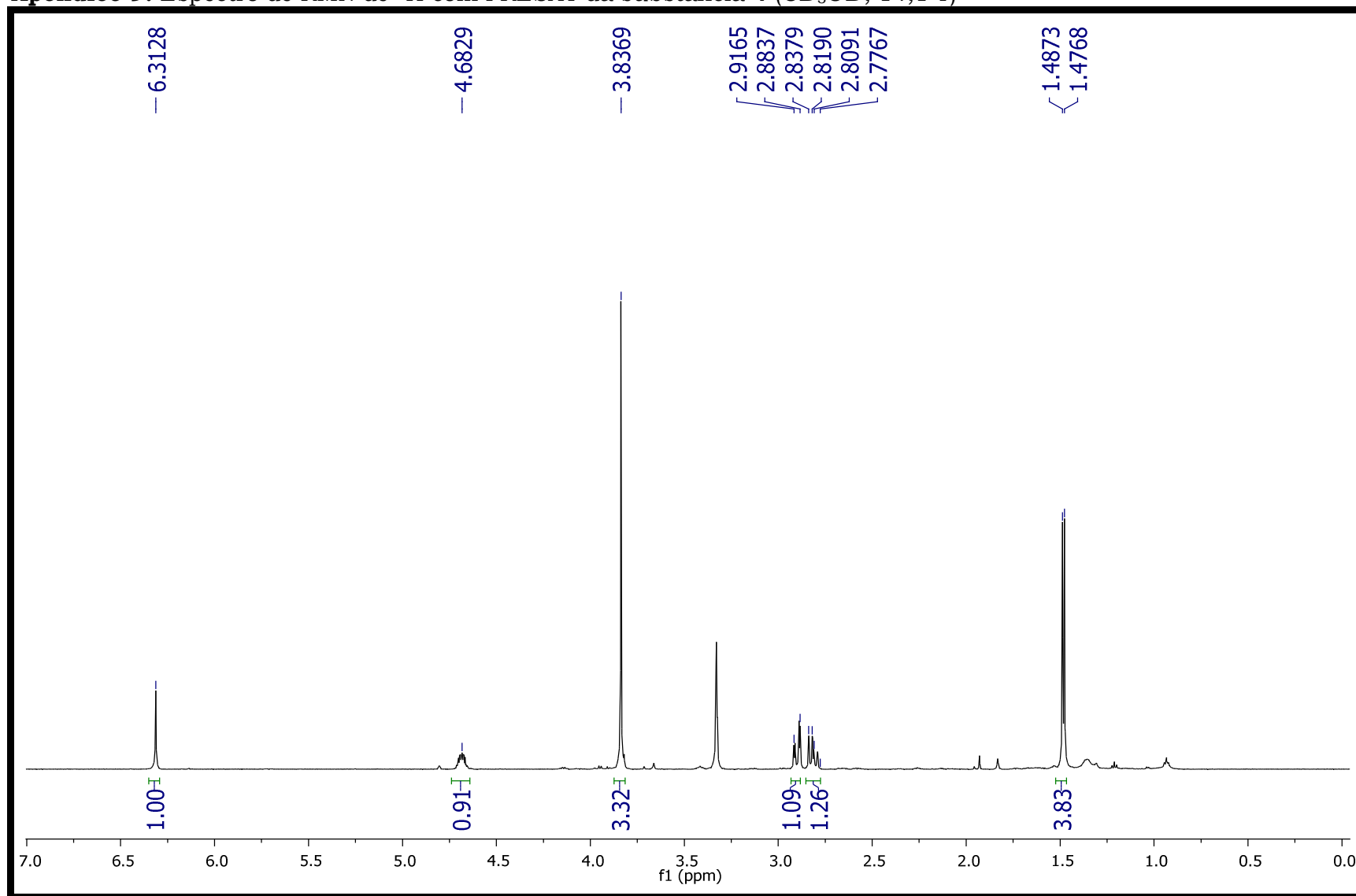
Apêndice 5. Mapa de contorno HSQC da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

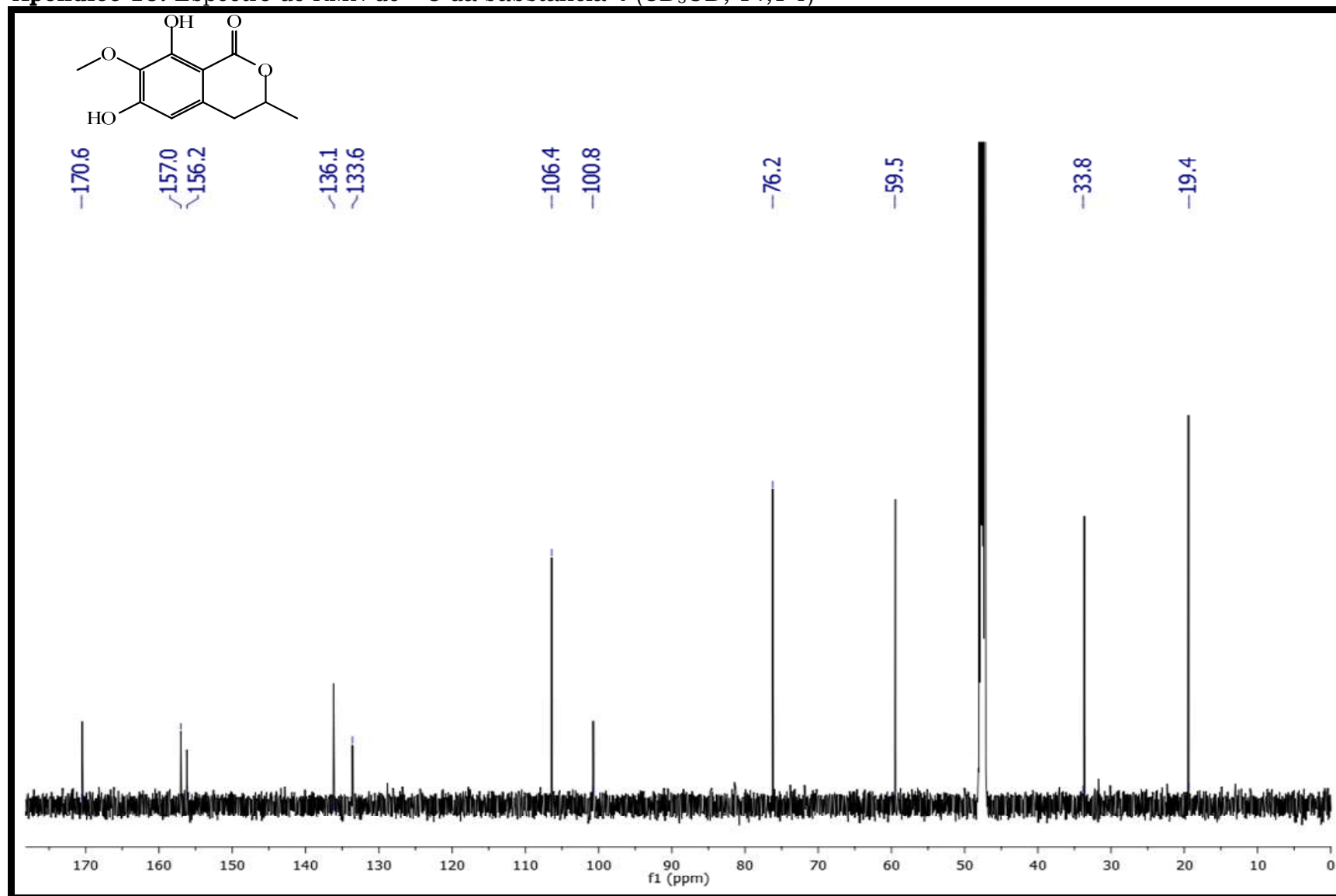
Apêndice 6. Mapa de contorno HMBC da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

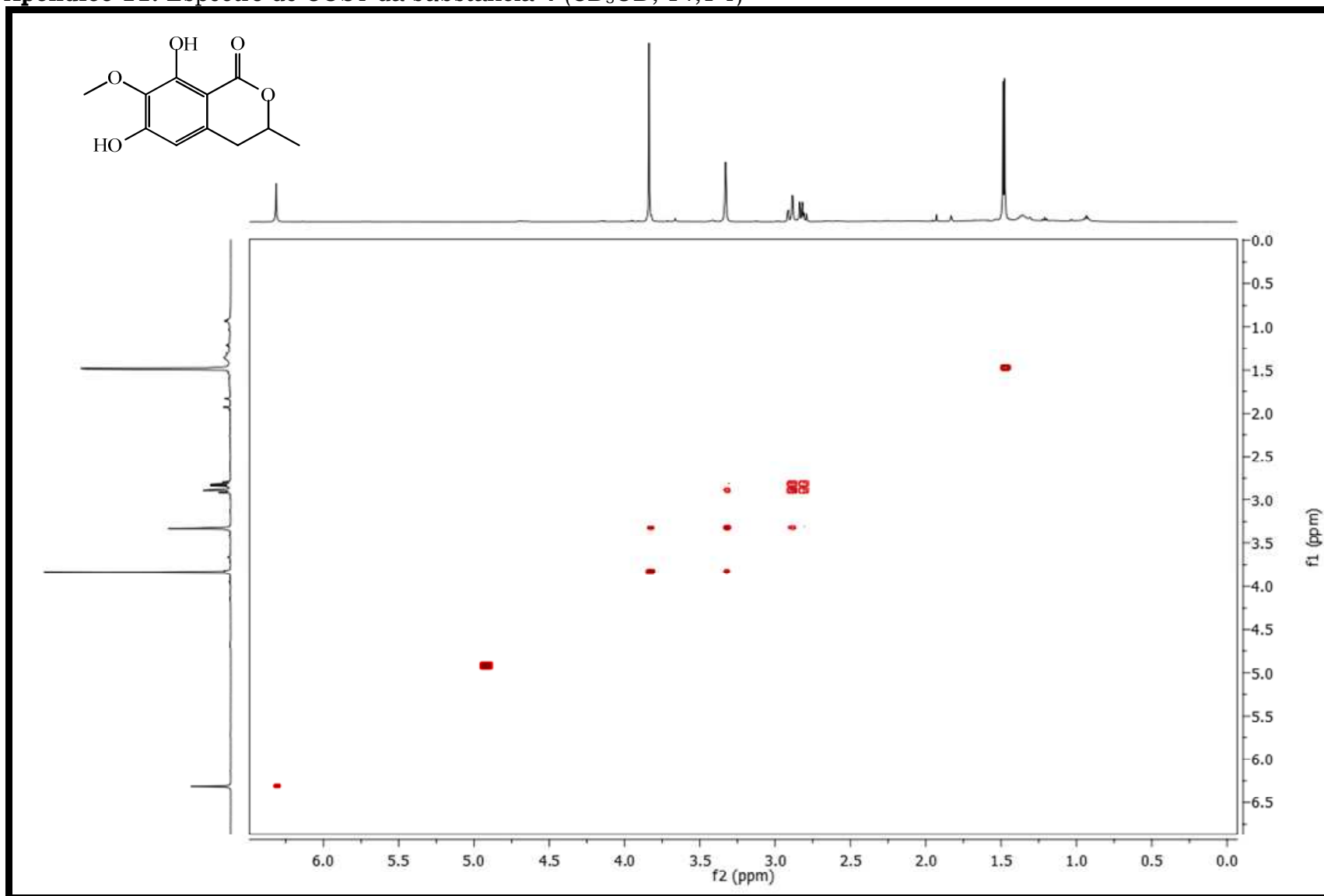
Apêndice 7. Espectro de TOCSY-1D da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

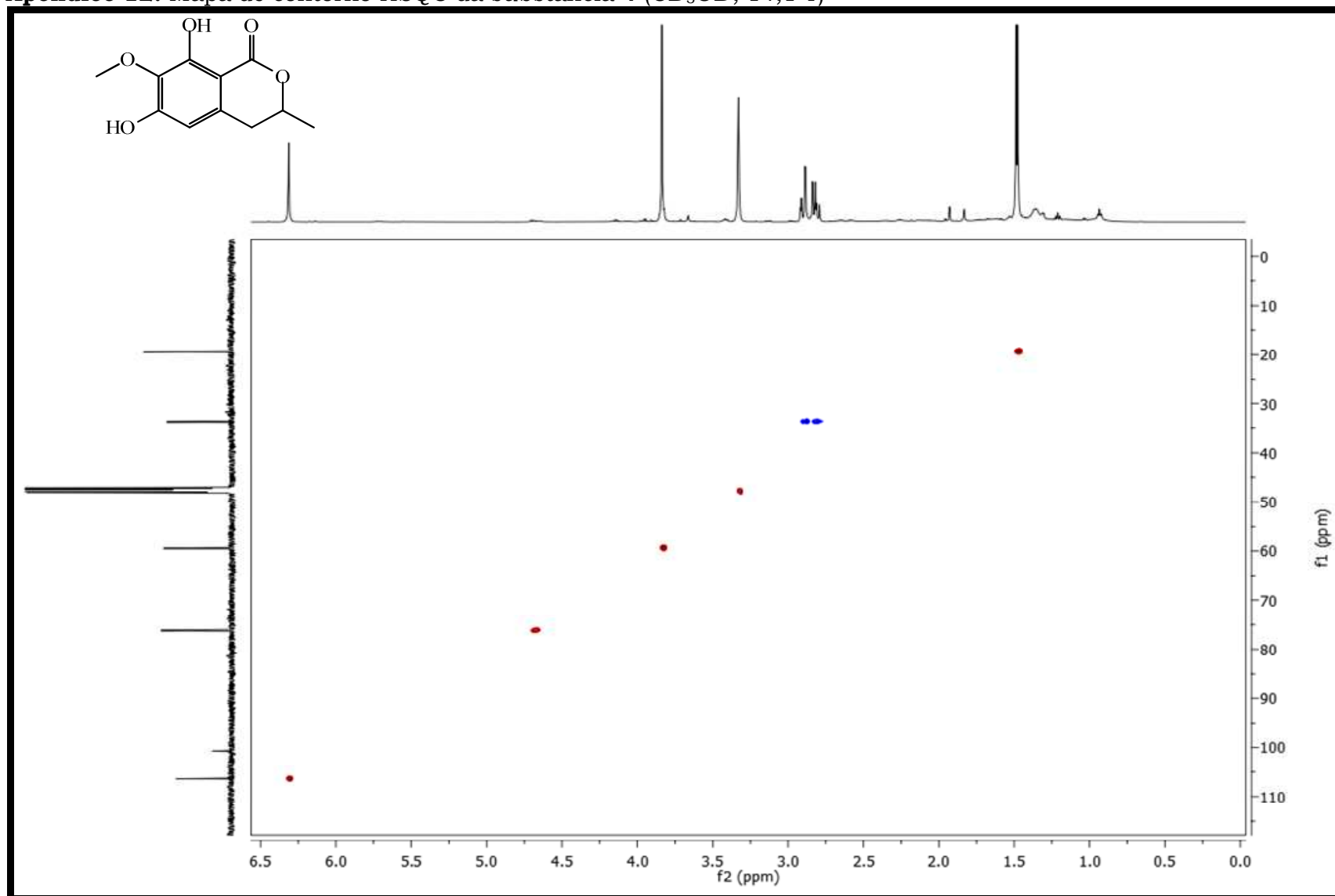
## Apêndice 8. Espectro de Massas por ESI no modo positivo da substância 4

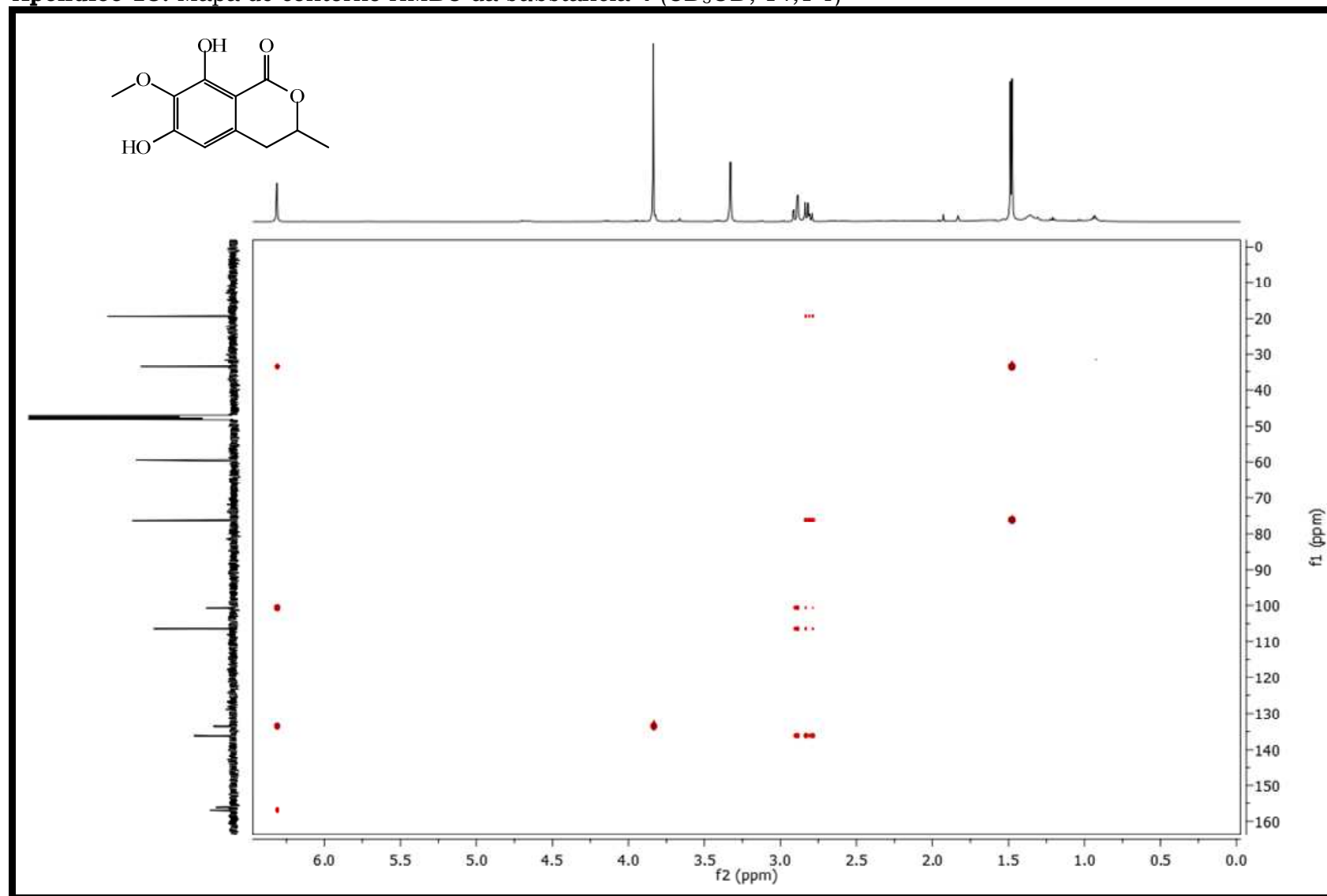


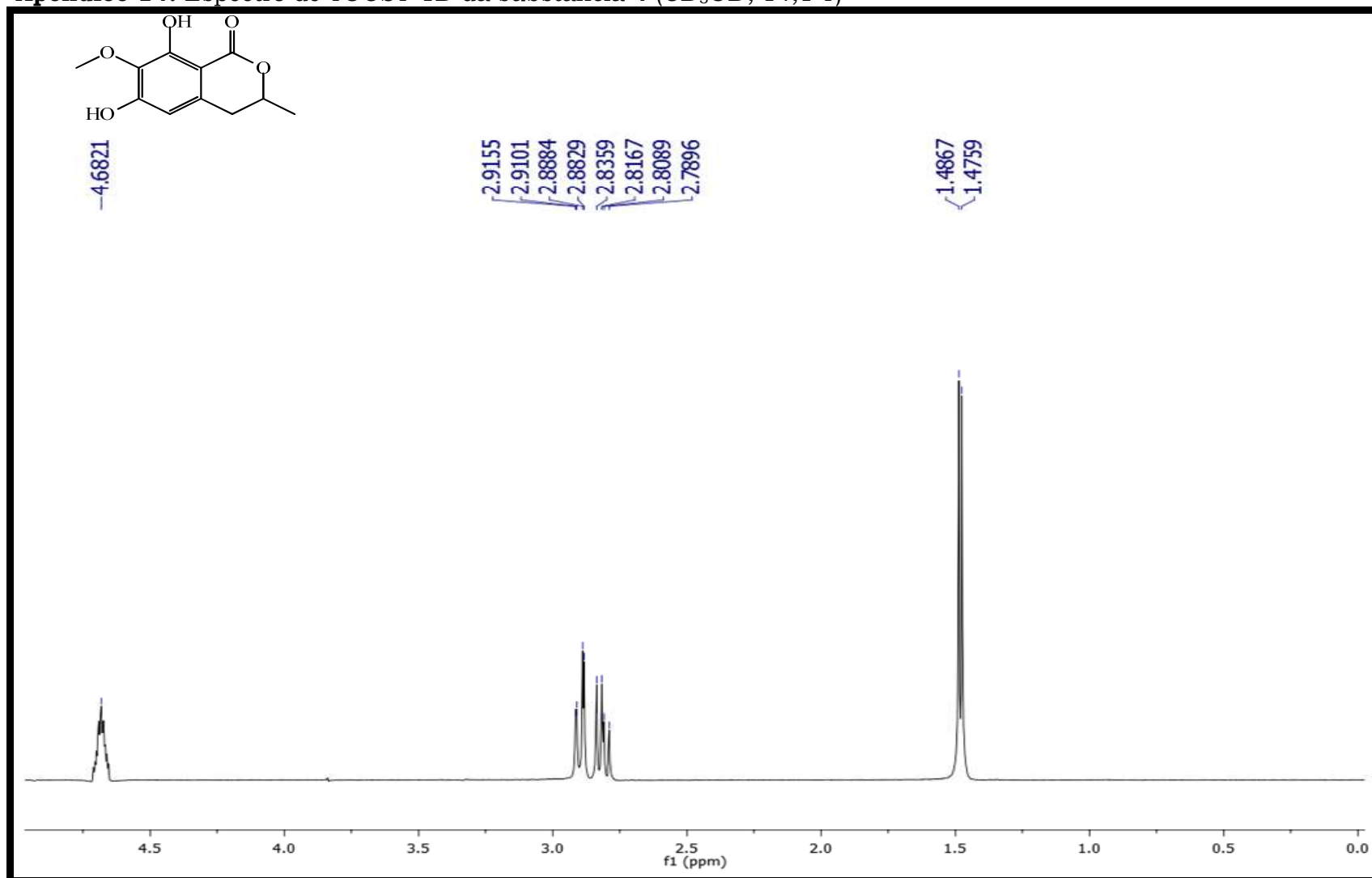
Apêndice 9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

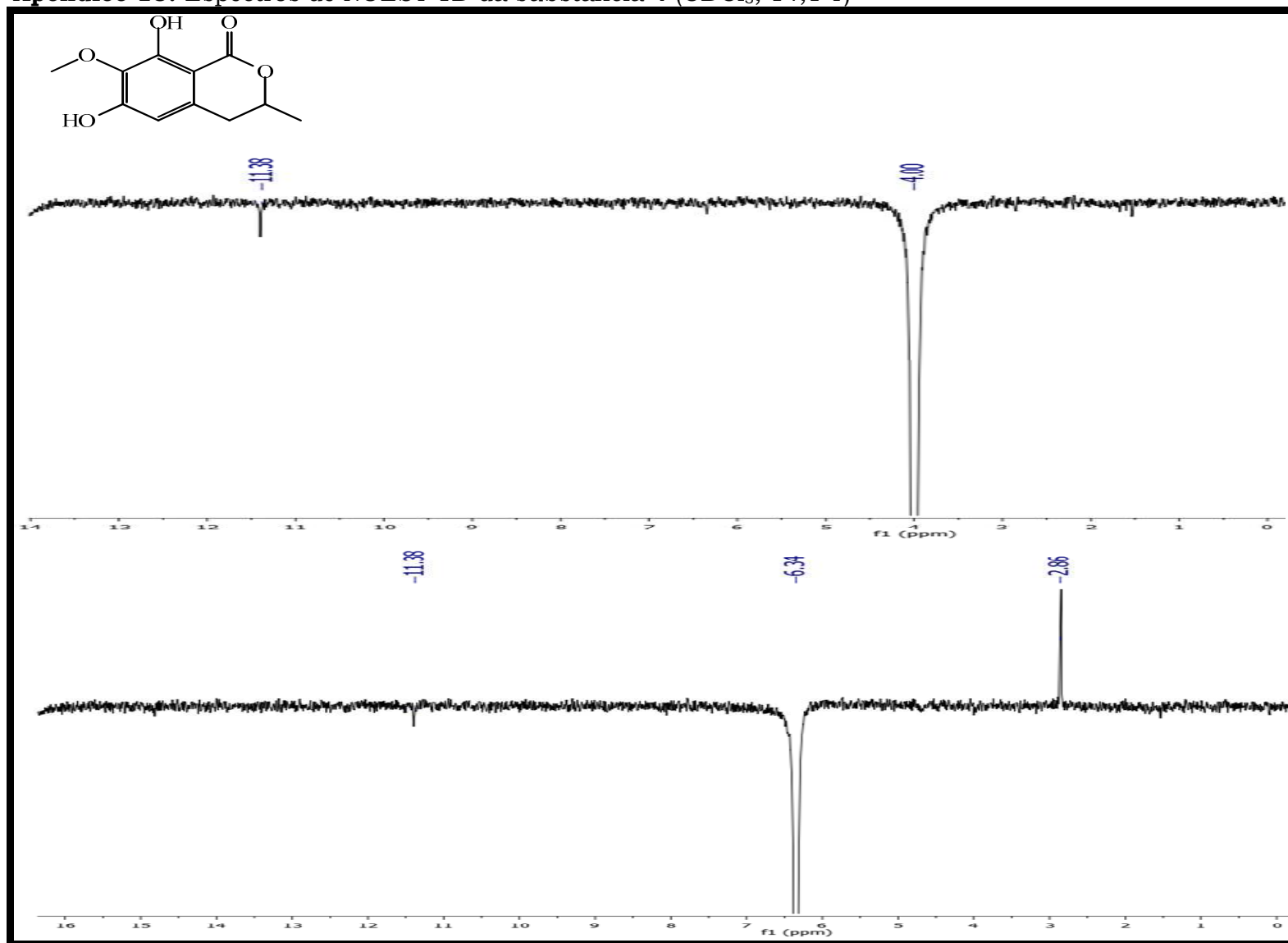
Apêndice 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Apêndice 11. Espectro de COSY da substância **4** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

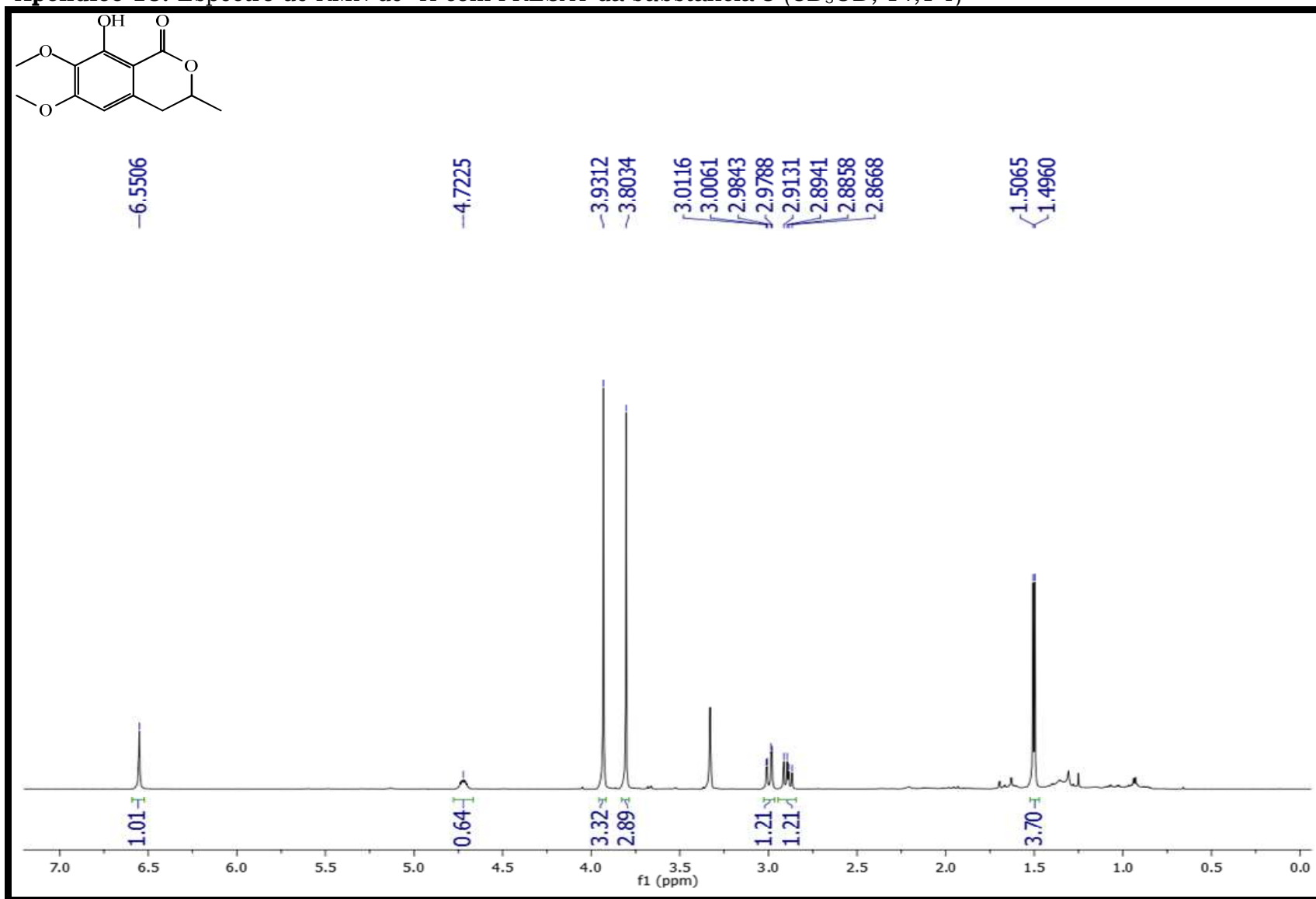
Apêndice 12. Mapa de contorno HSQC da substância **4** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

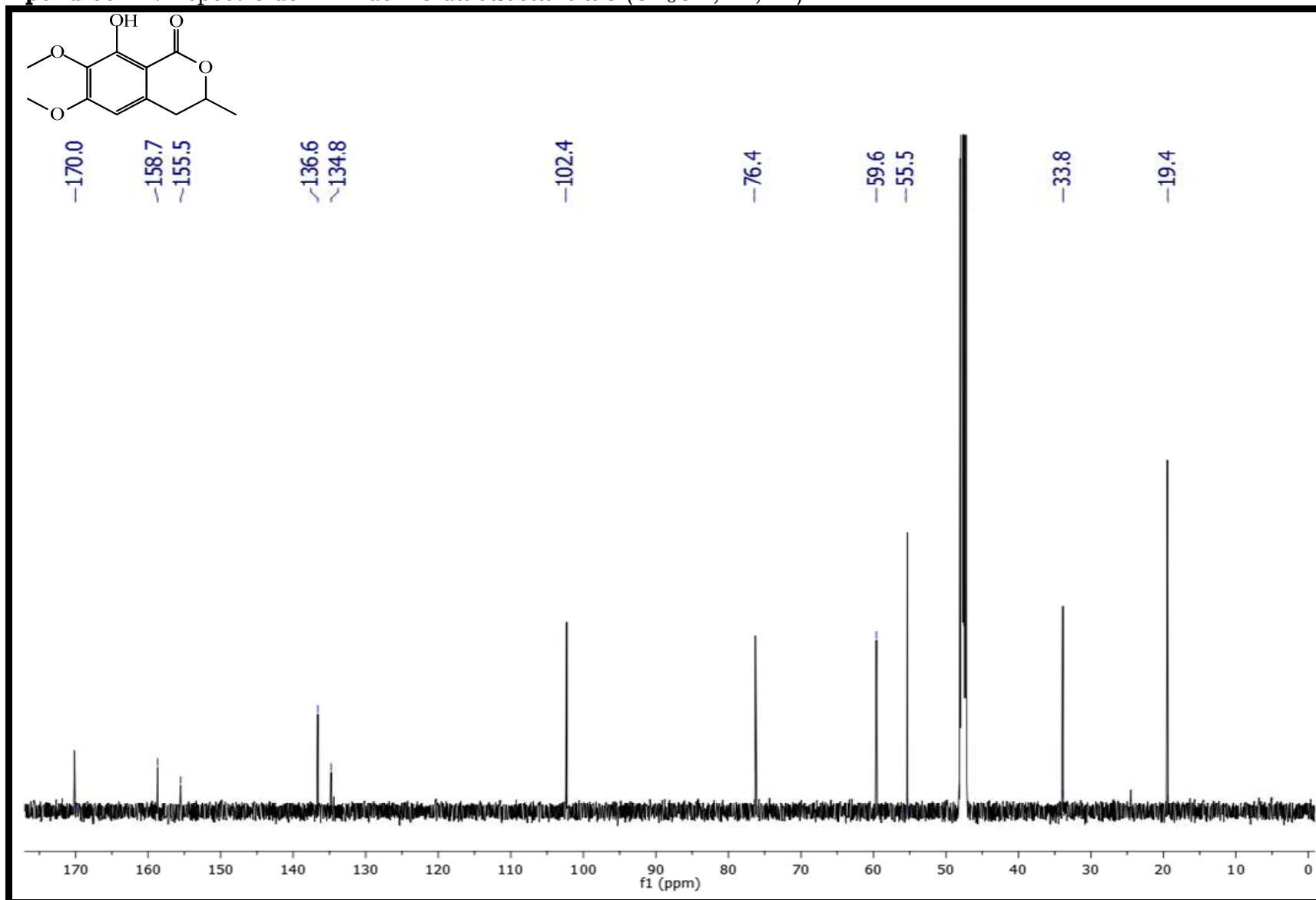
Apêndice 13. Mapa de contorno HMBC da substância **4** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

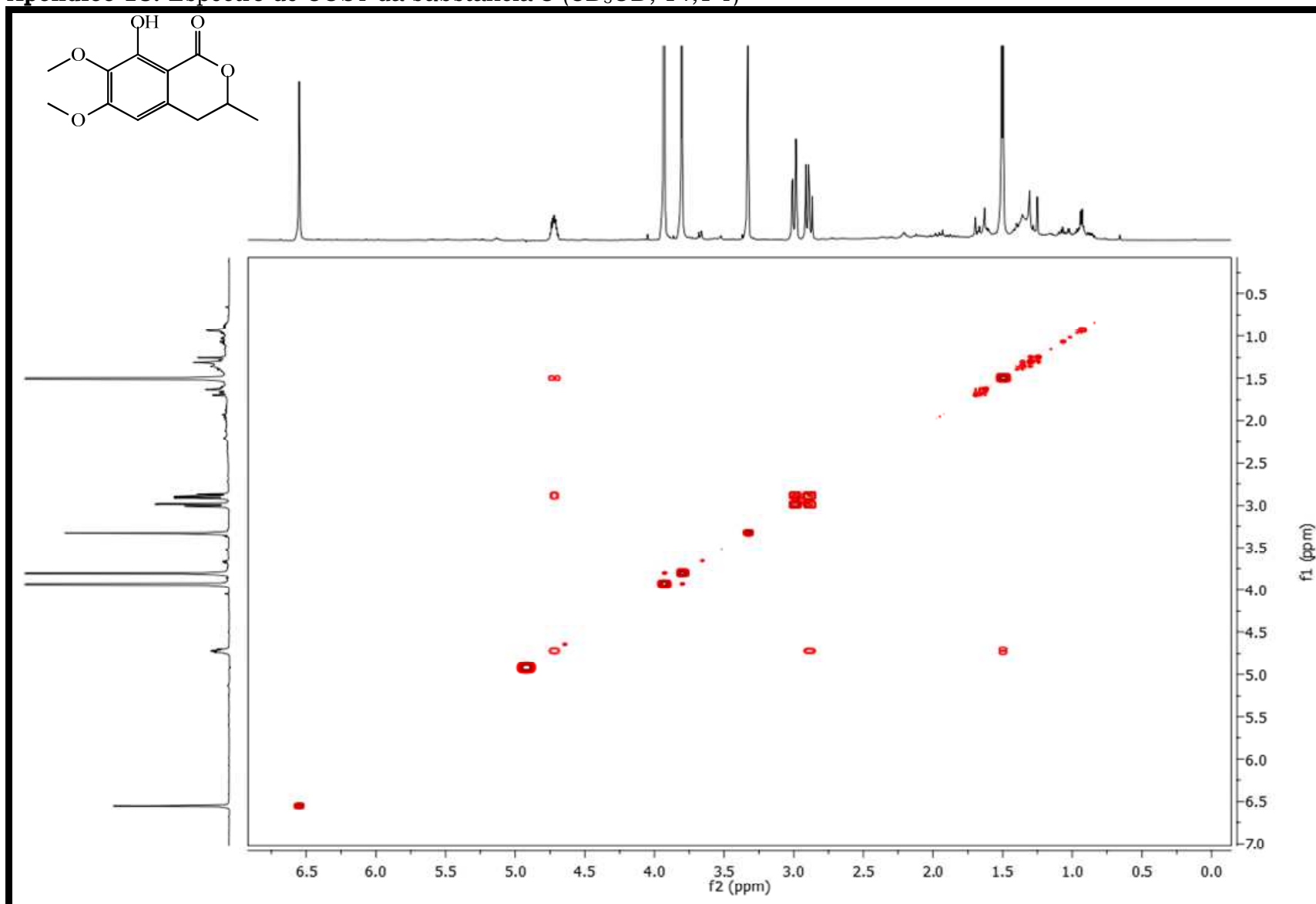
Apêndice 14. Espectro de TOCSY-1D da substância **4** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

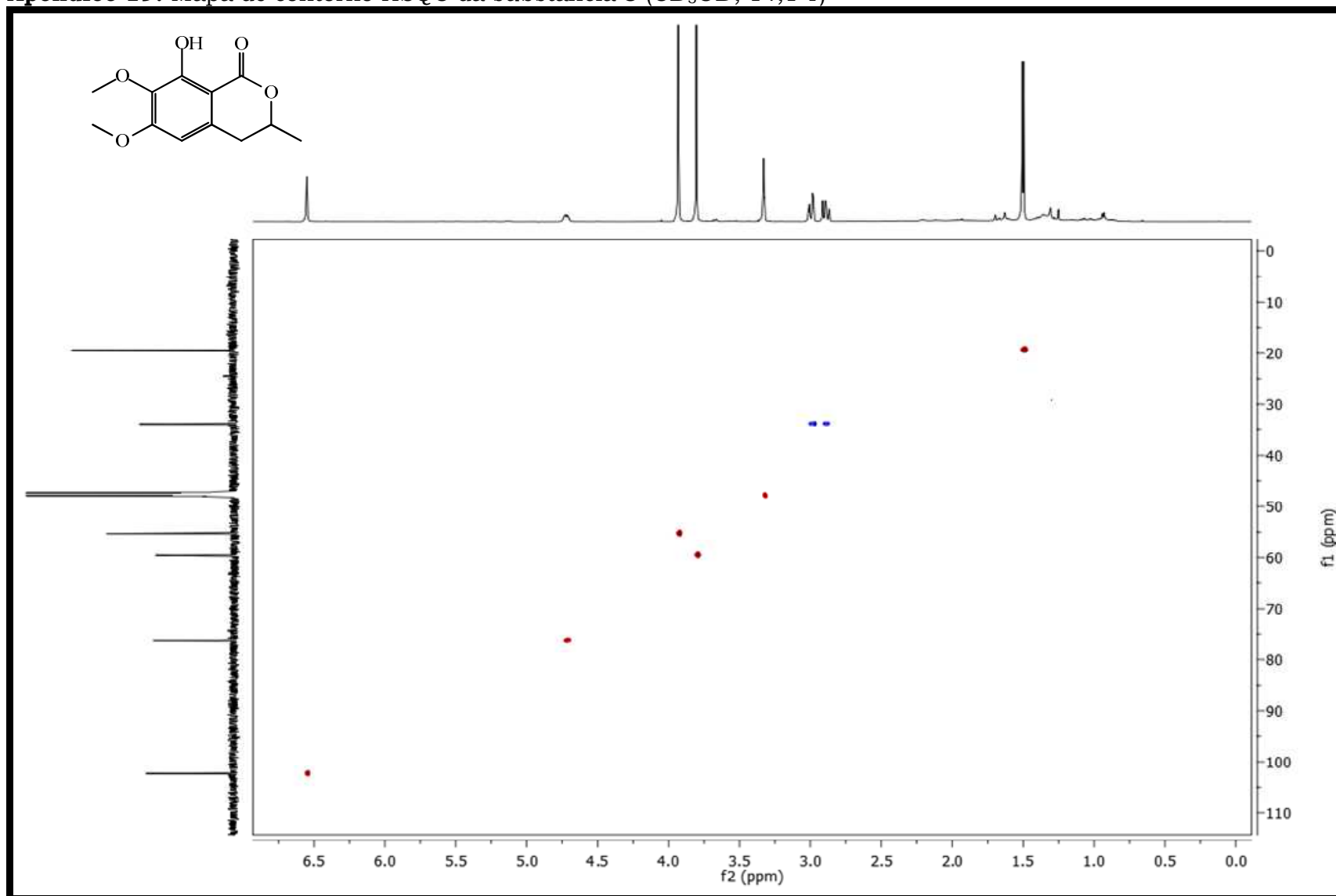
Apêndice 15. Espectros de NOESY 1D da substância **4** (CDCl<sub>3</sub>; 14,1 T)

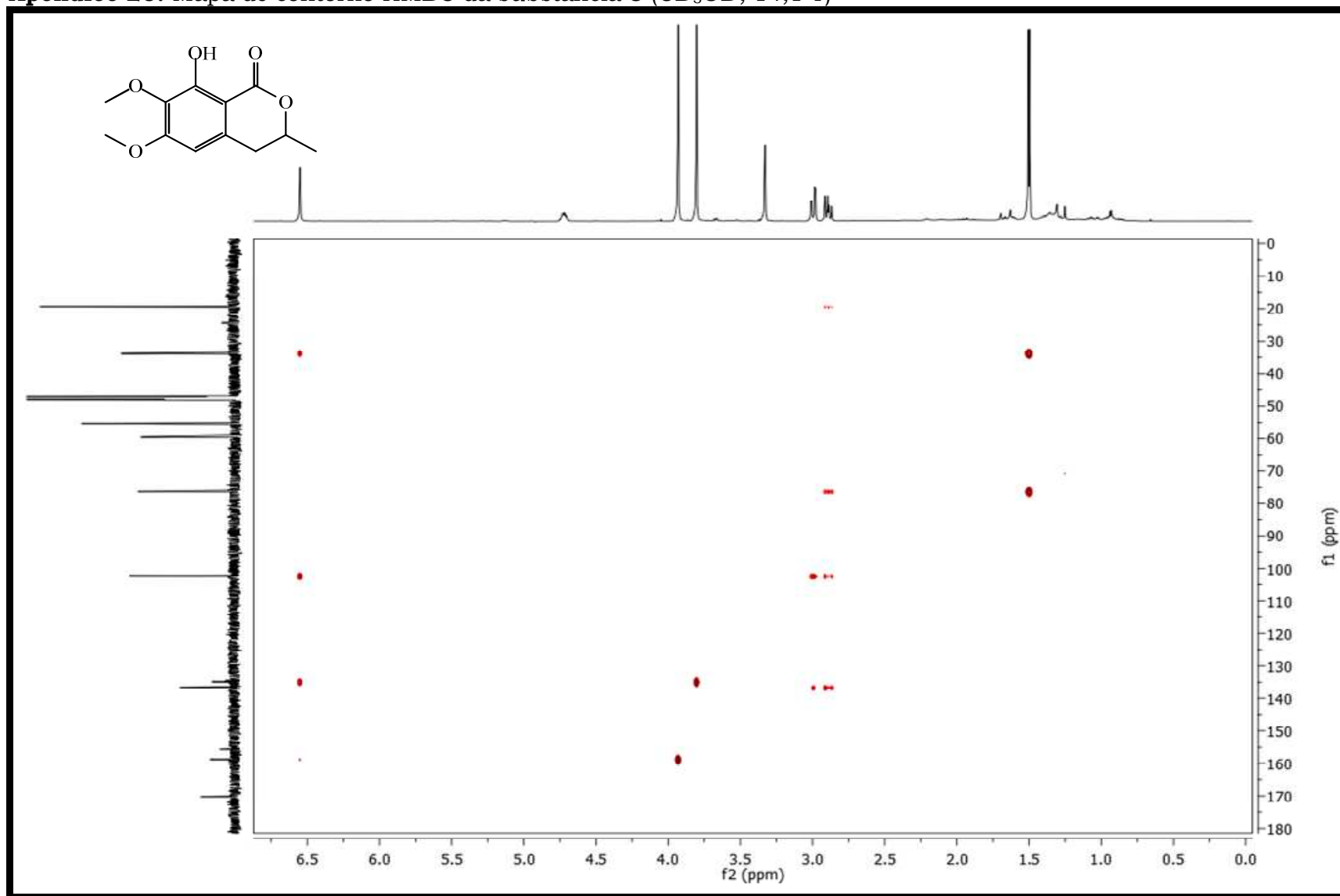
Apêndice 16. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

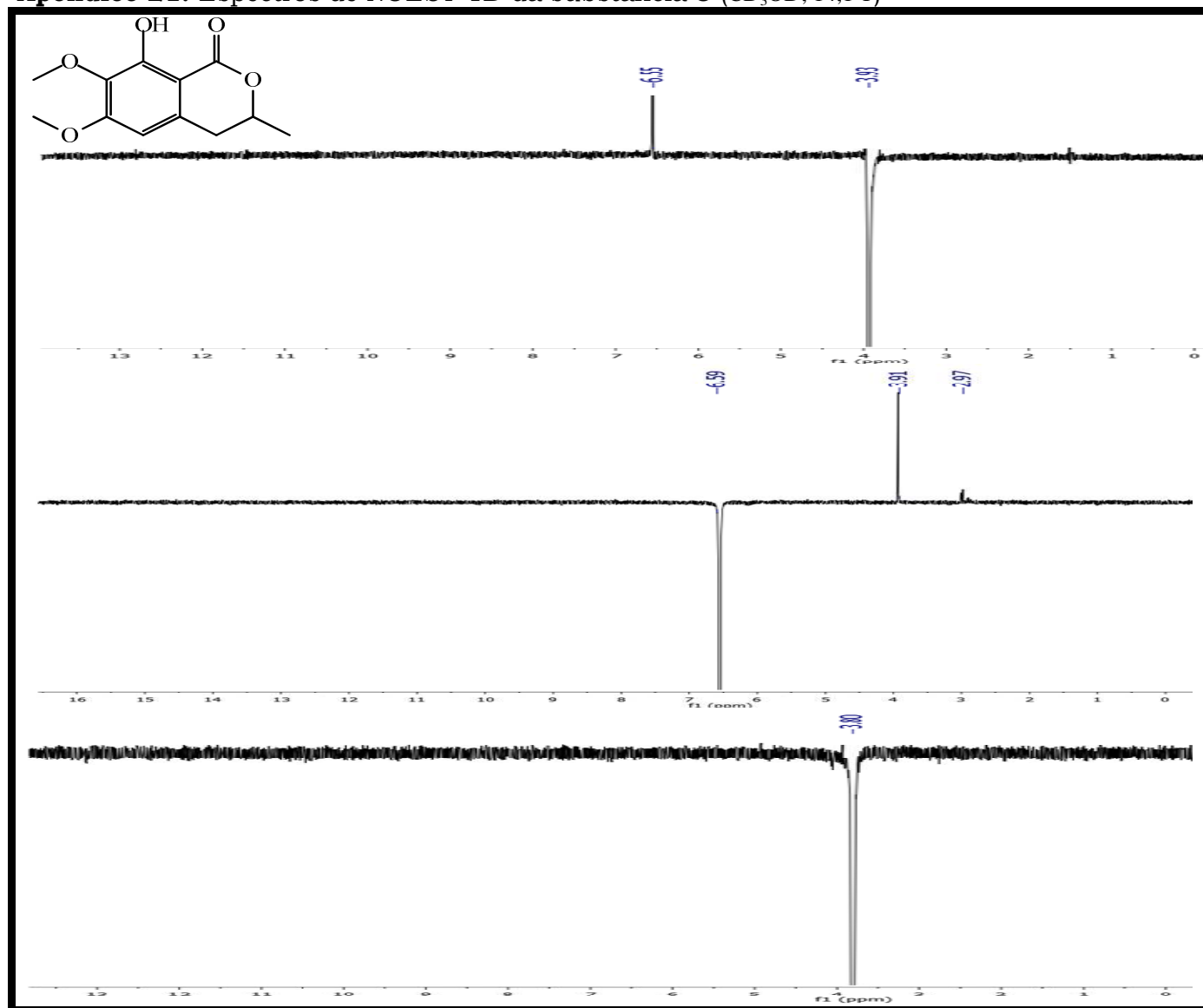


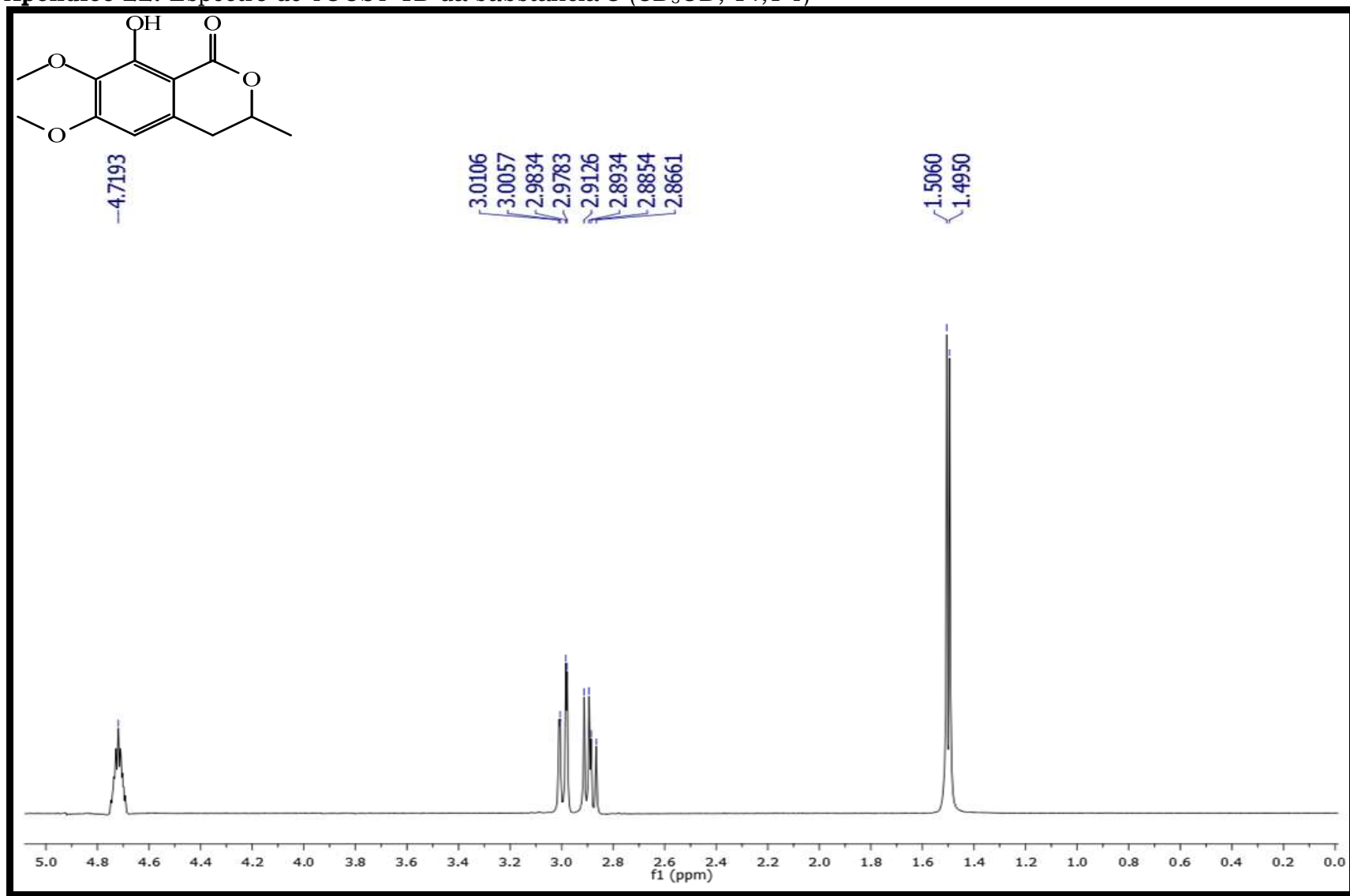
Apêndice 17. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

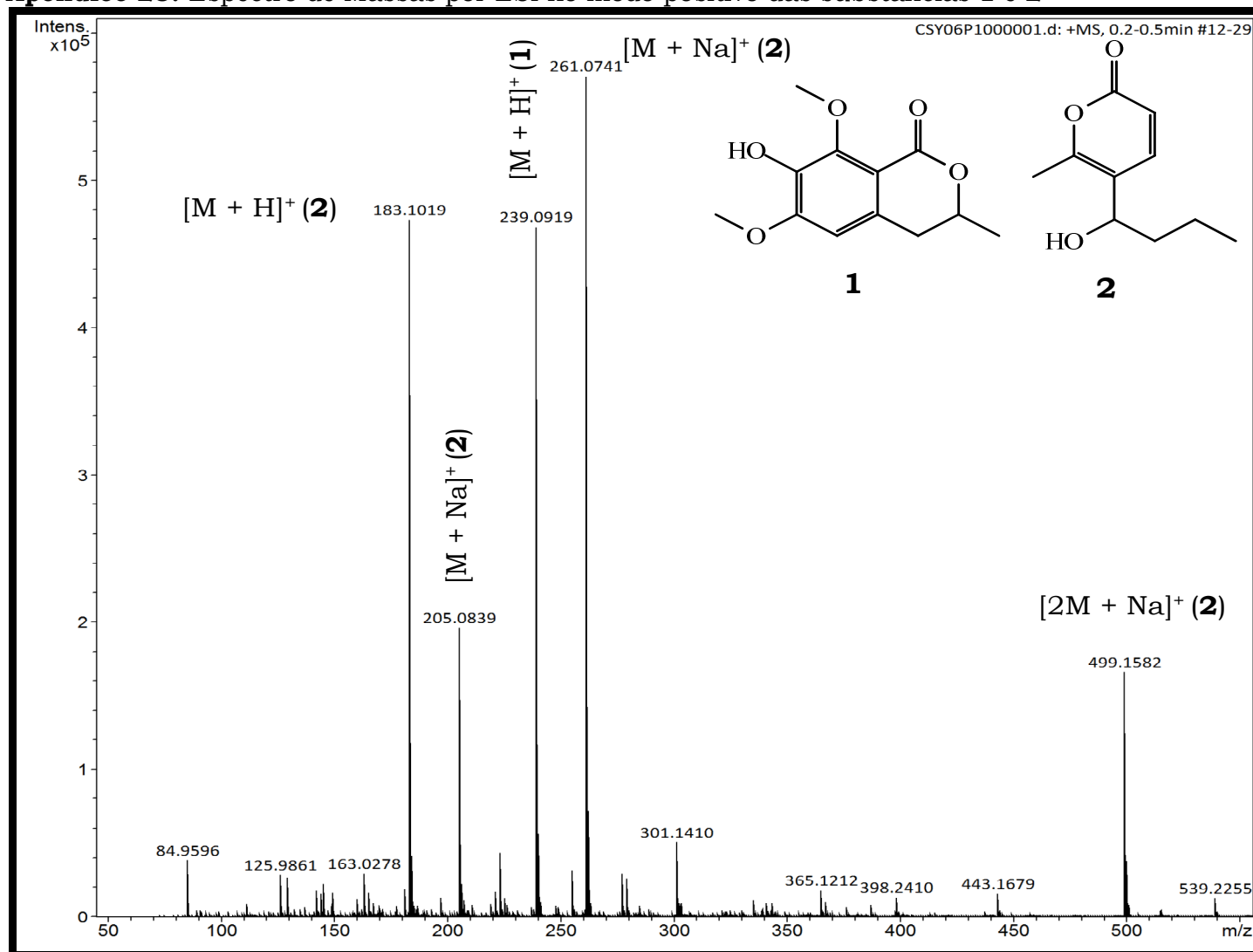
Apêndice 18. Espectro de COSY da substância 5 (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

Apêndice 19. Mapa de contorno HSQC da substância 5 (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

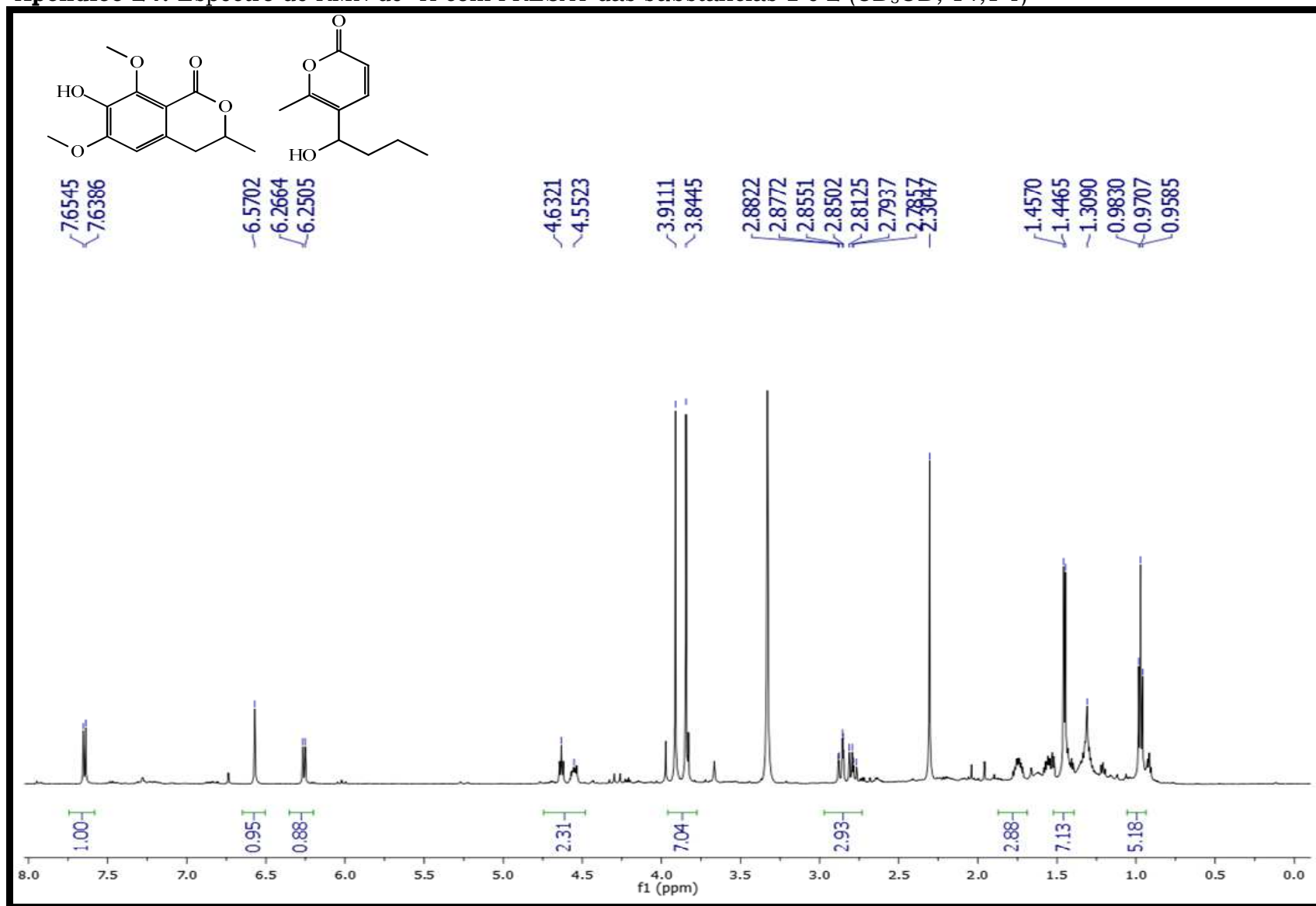
Apêndice 20. Mapa de contorno HMBC da substância **5** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

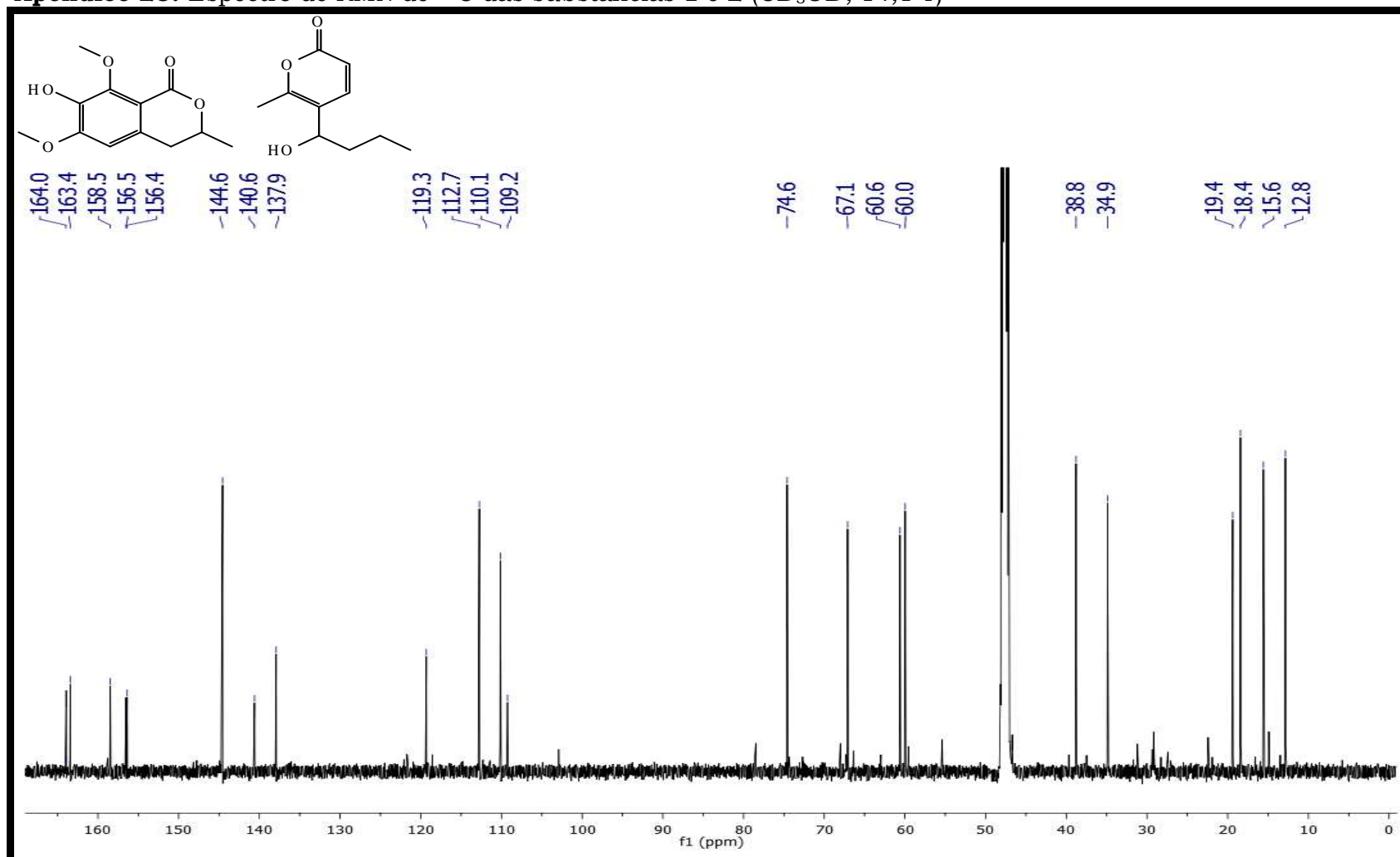
Apêndice 21. Espectros de NOESY-1D da substância **5** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

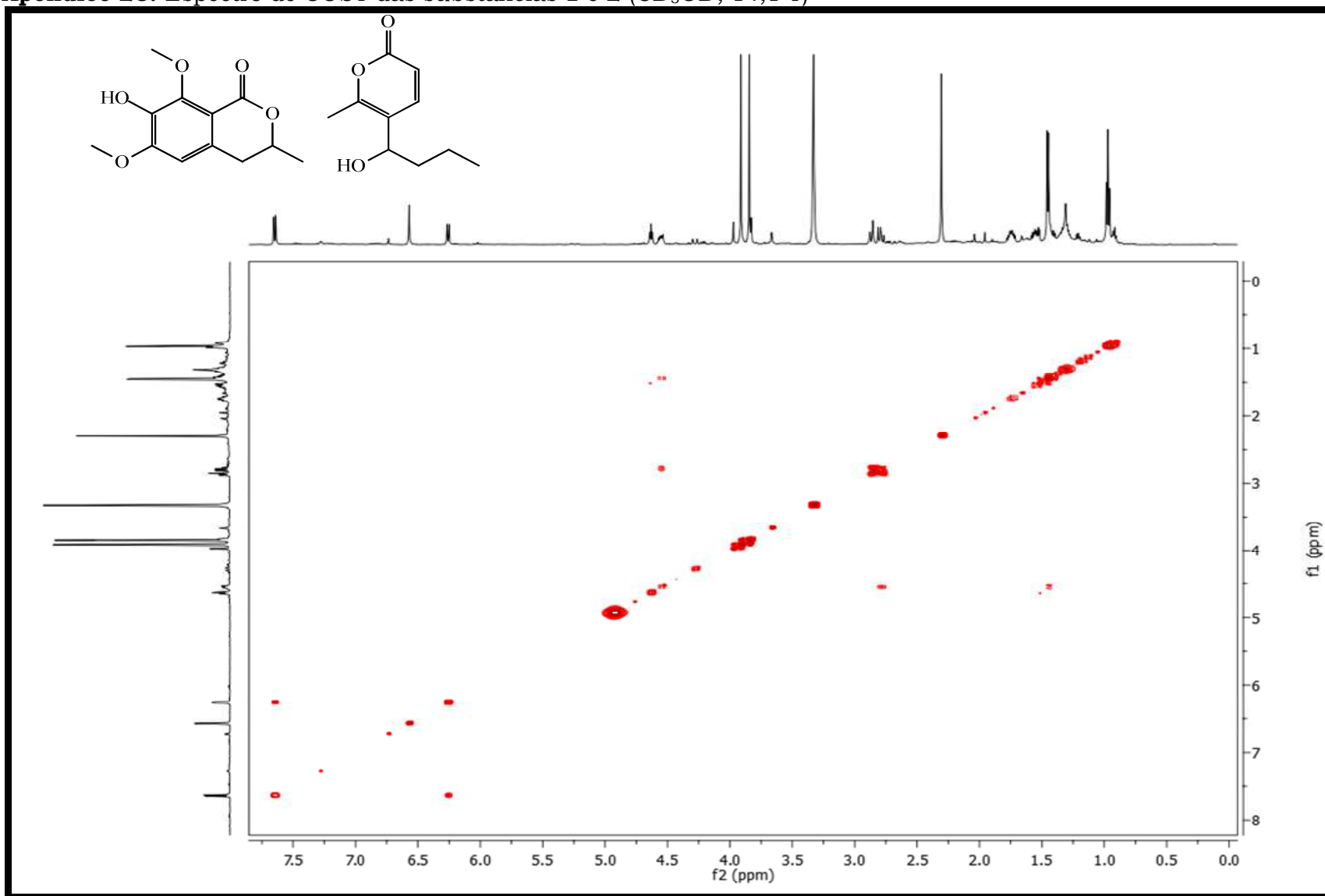
Apêndice 22. Espectro de TOCSY-1D da substância **5** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

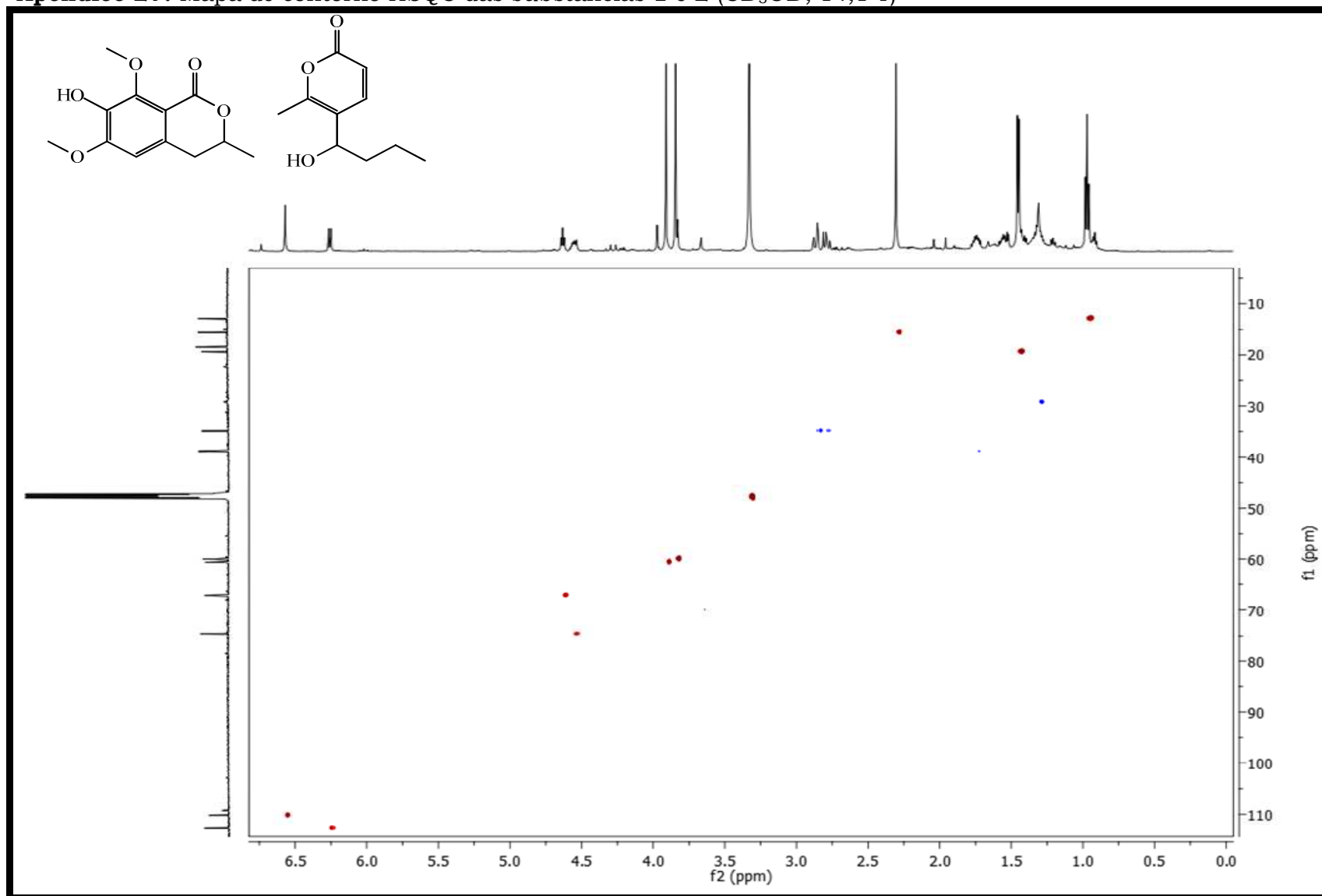
Apêndice 23. Espectro de Massas por ESI no modo positivo das substâncias **1** e **2**

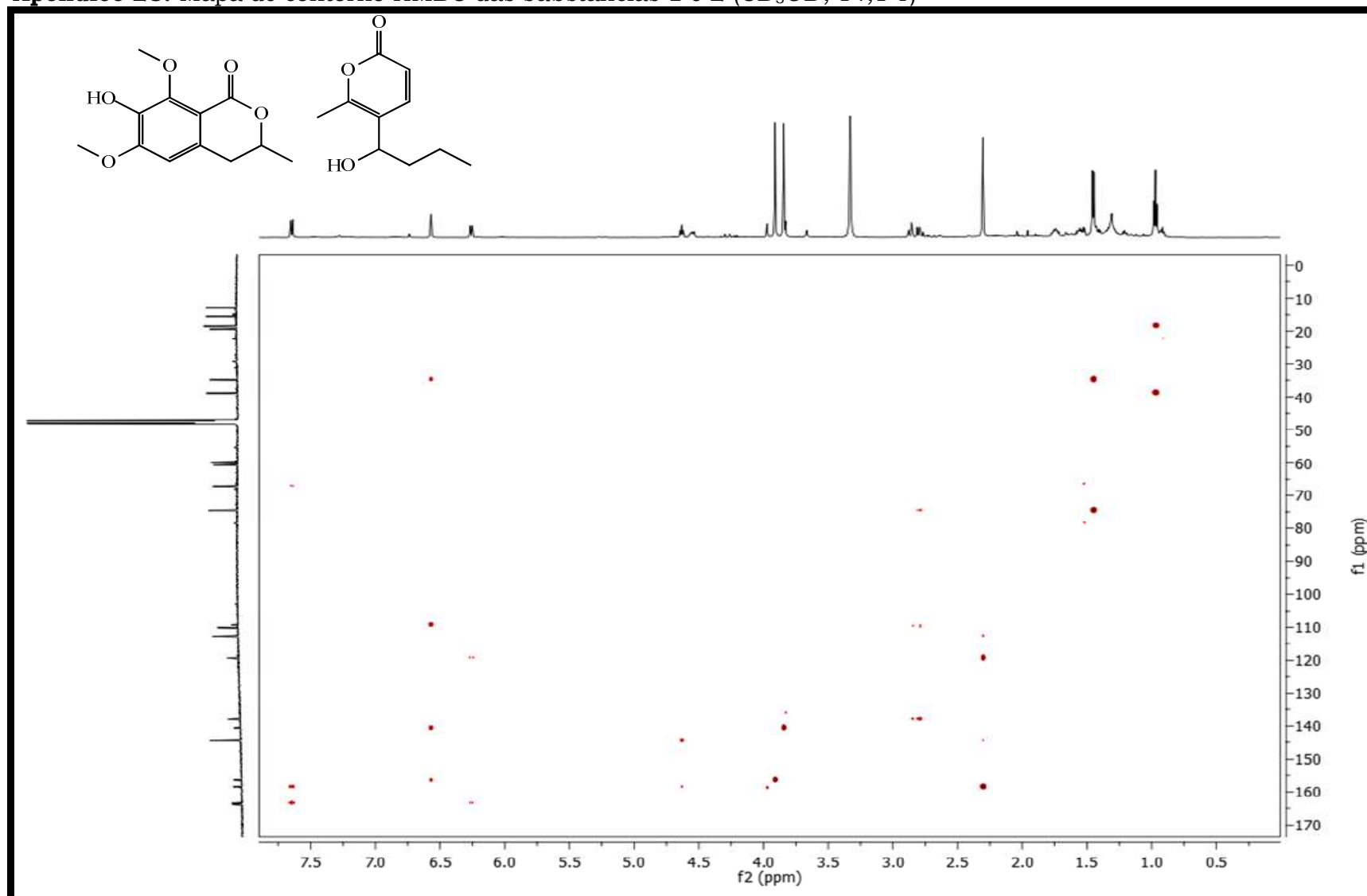
Apêndice 24. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT das substâncias **1** e **2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

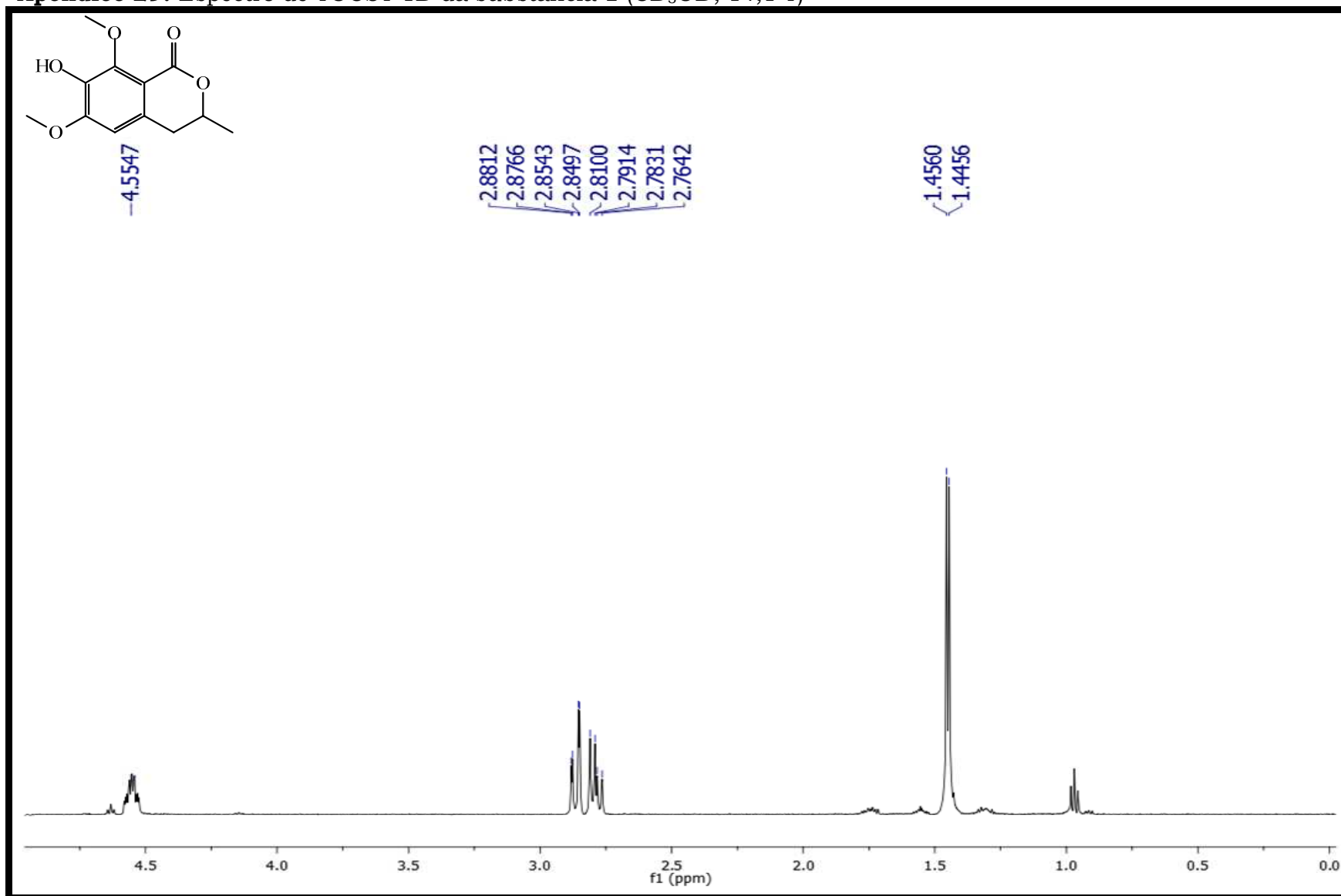


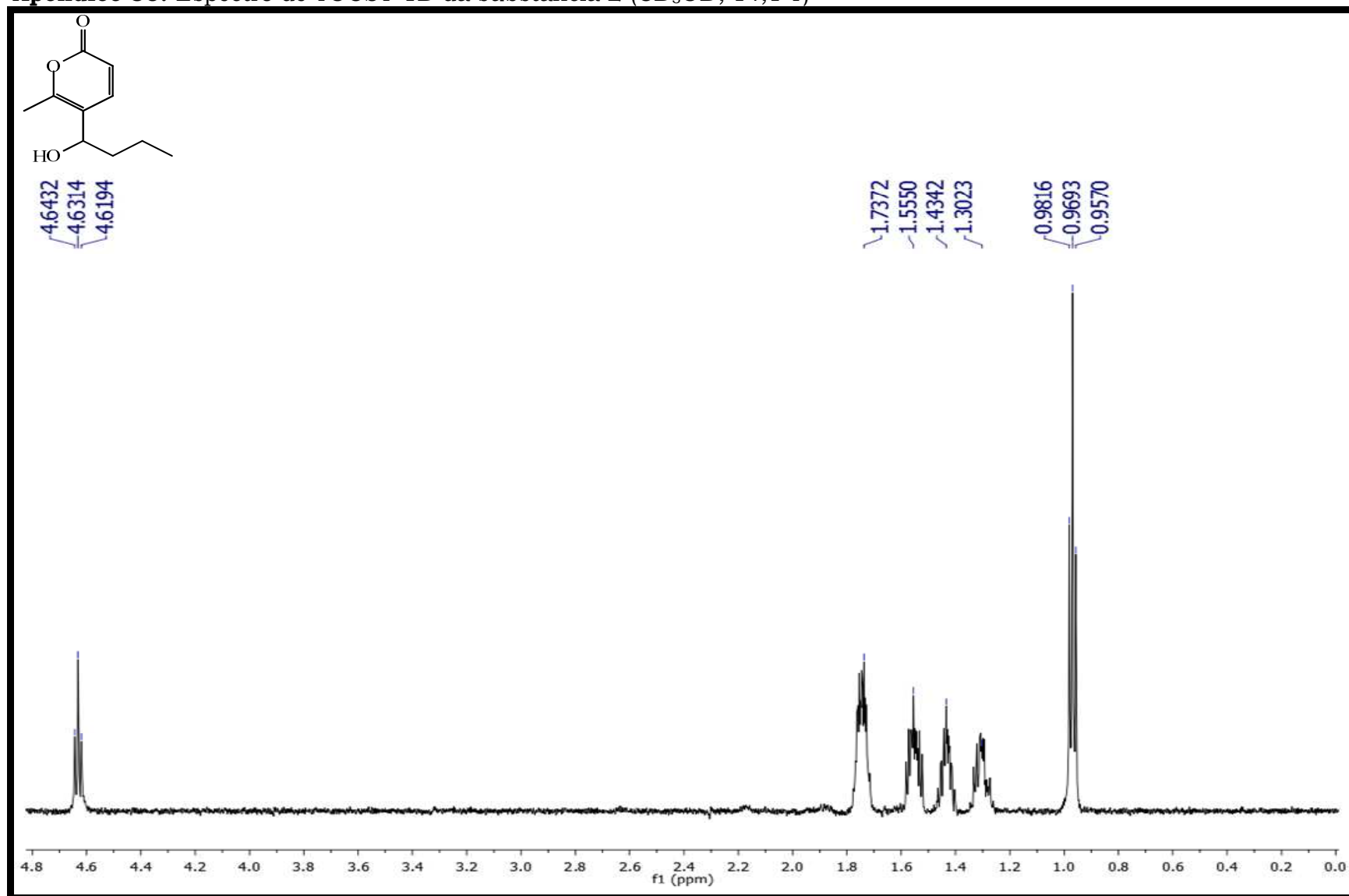
Apêndice 25. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **1** e **2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

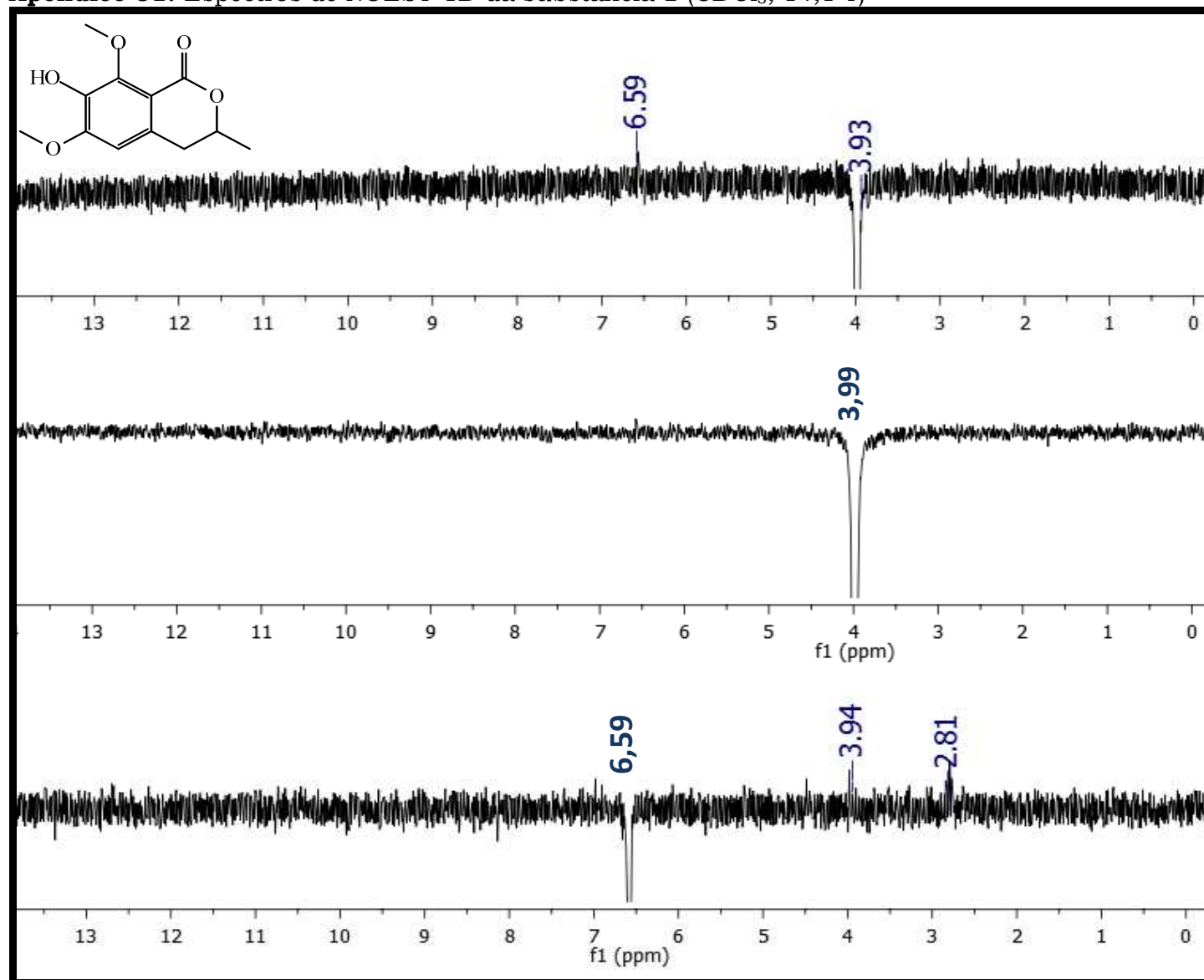
Apêndice 26. Espectro de COSY das substâncias **1** e **2** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

Apêndice 27. Mapa de contorno HSQC das substâncias **1** e **2** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

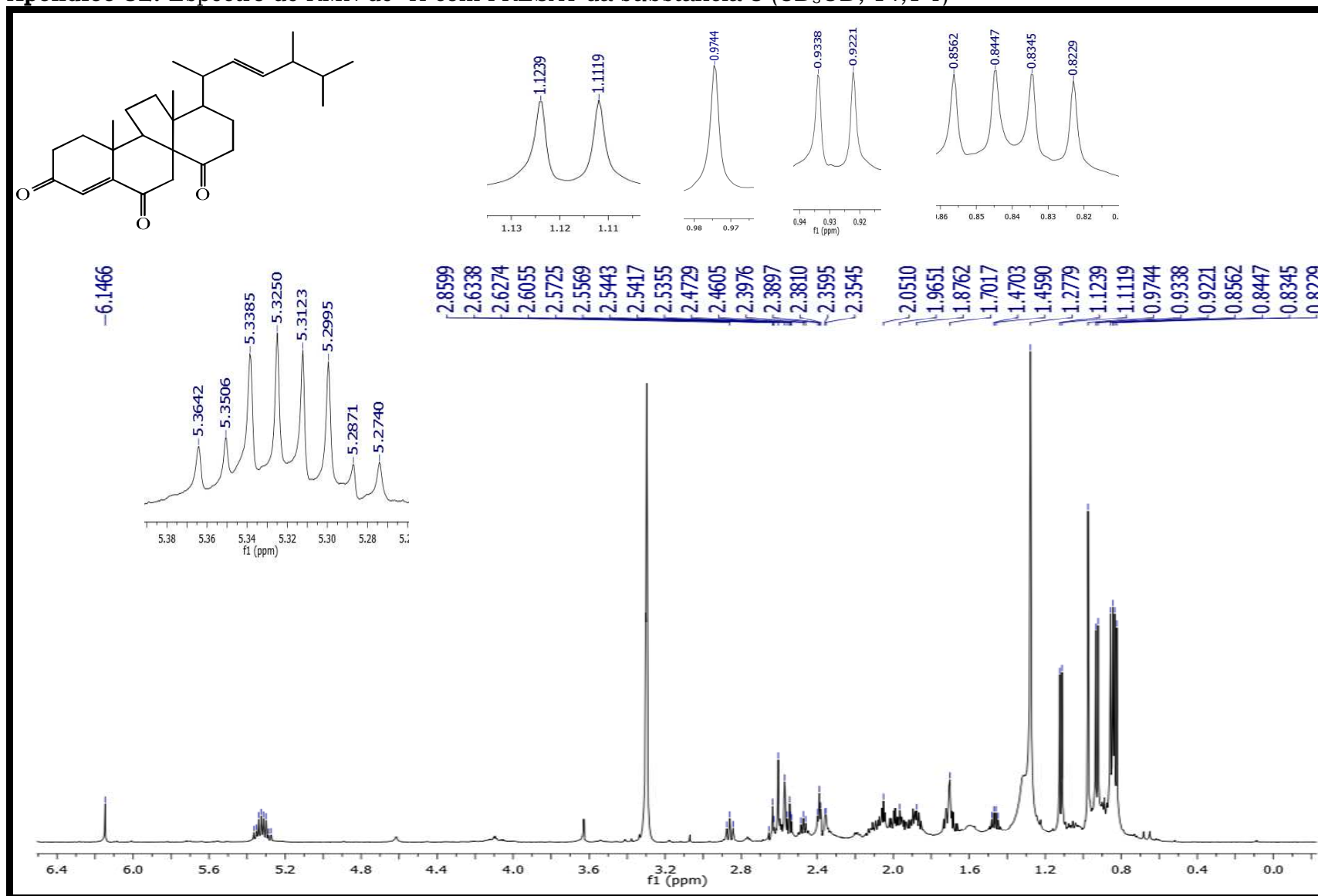
Apêndice 28. Mapa de contorno HMBC das substâncias **1** e **2** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

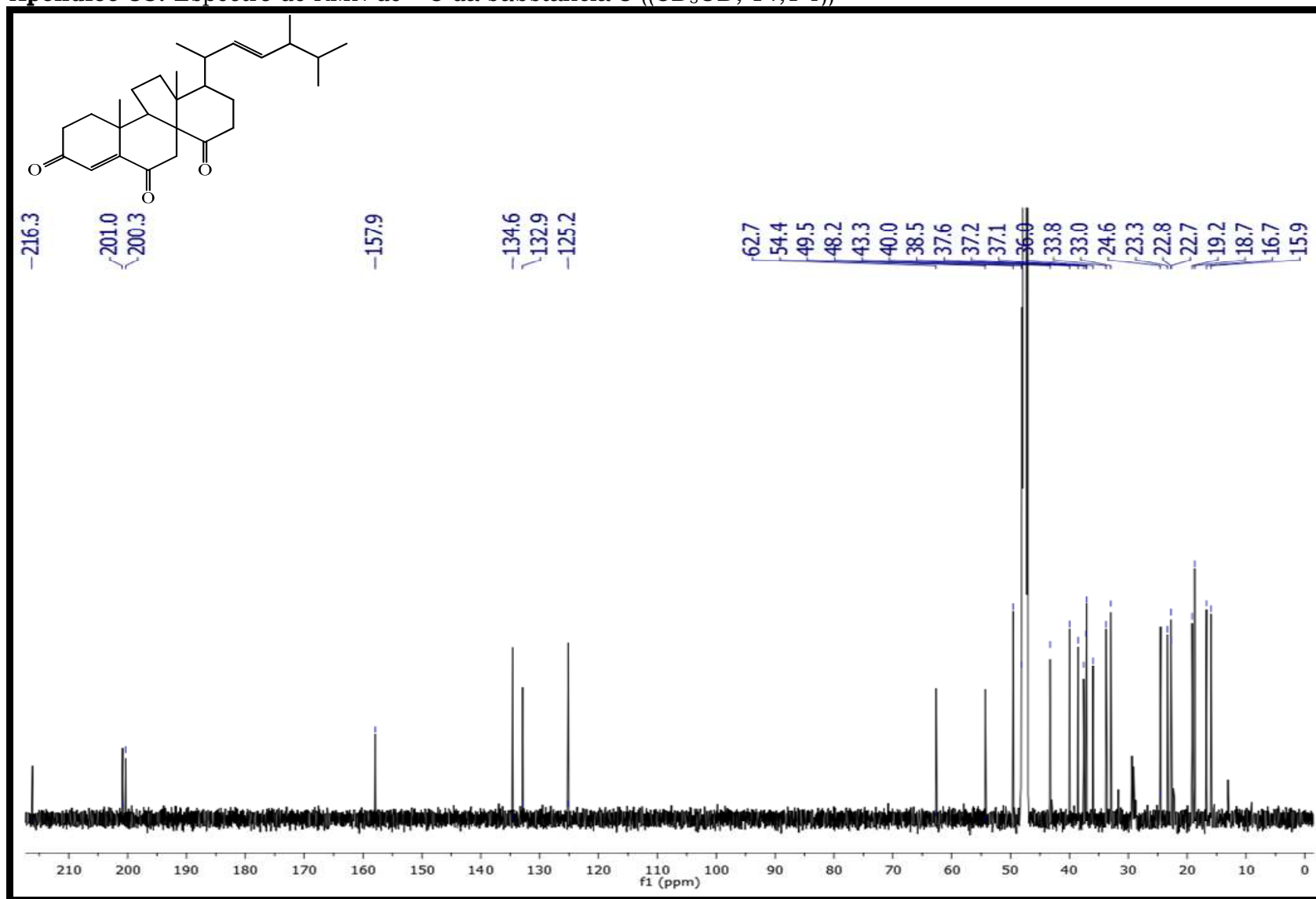
Apêndice 29. Espectro de TOCSY 1D da substância **1** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

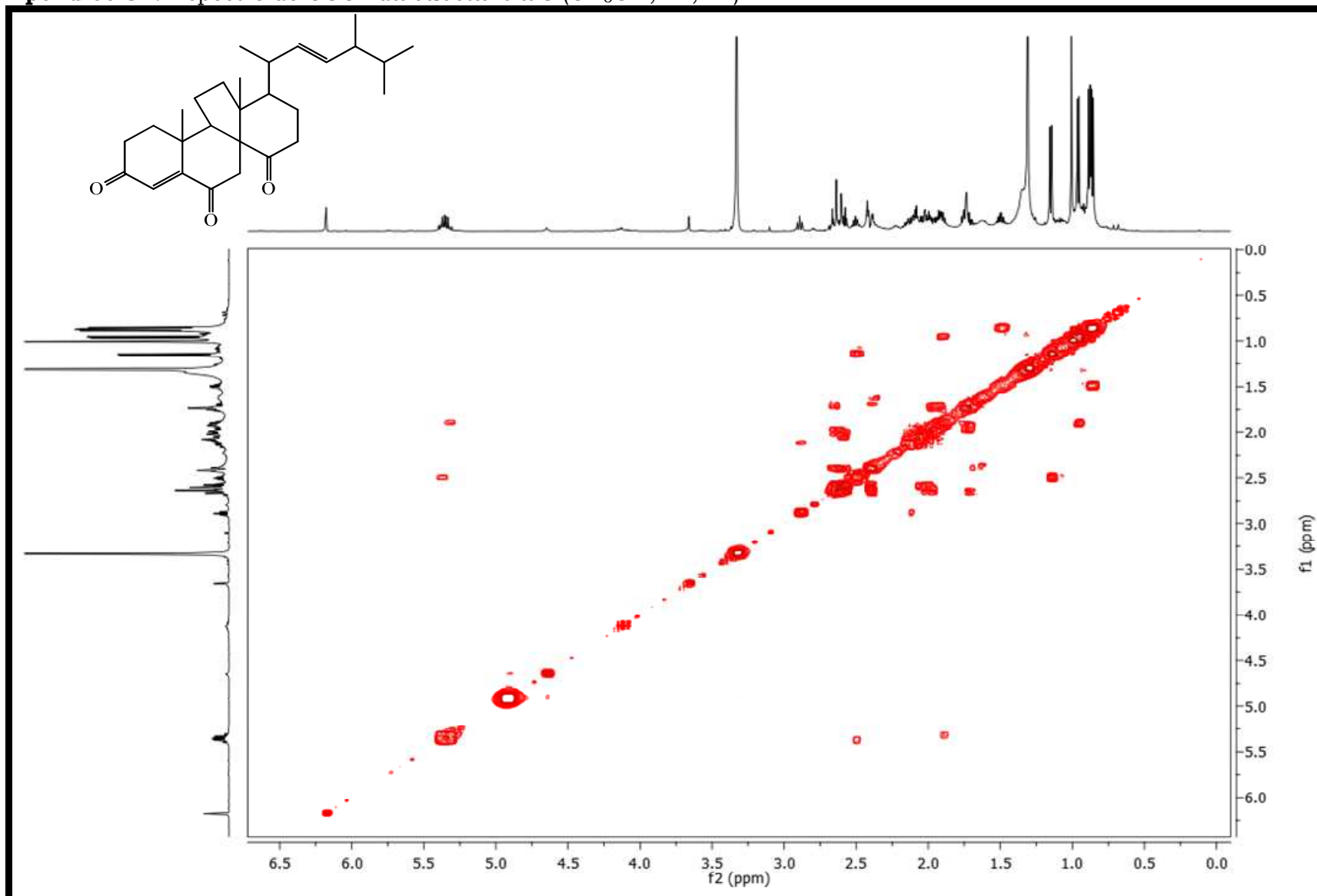
Apêndice 30. Espectro de TOCSY-1D da substância **2** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

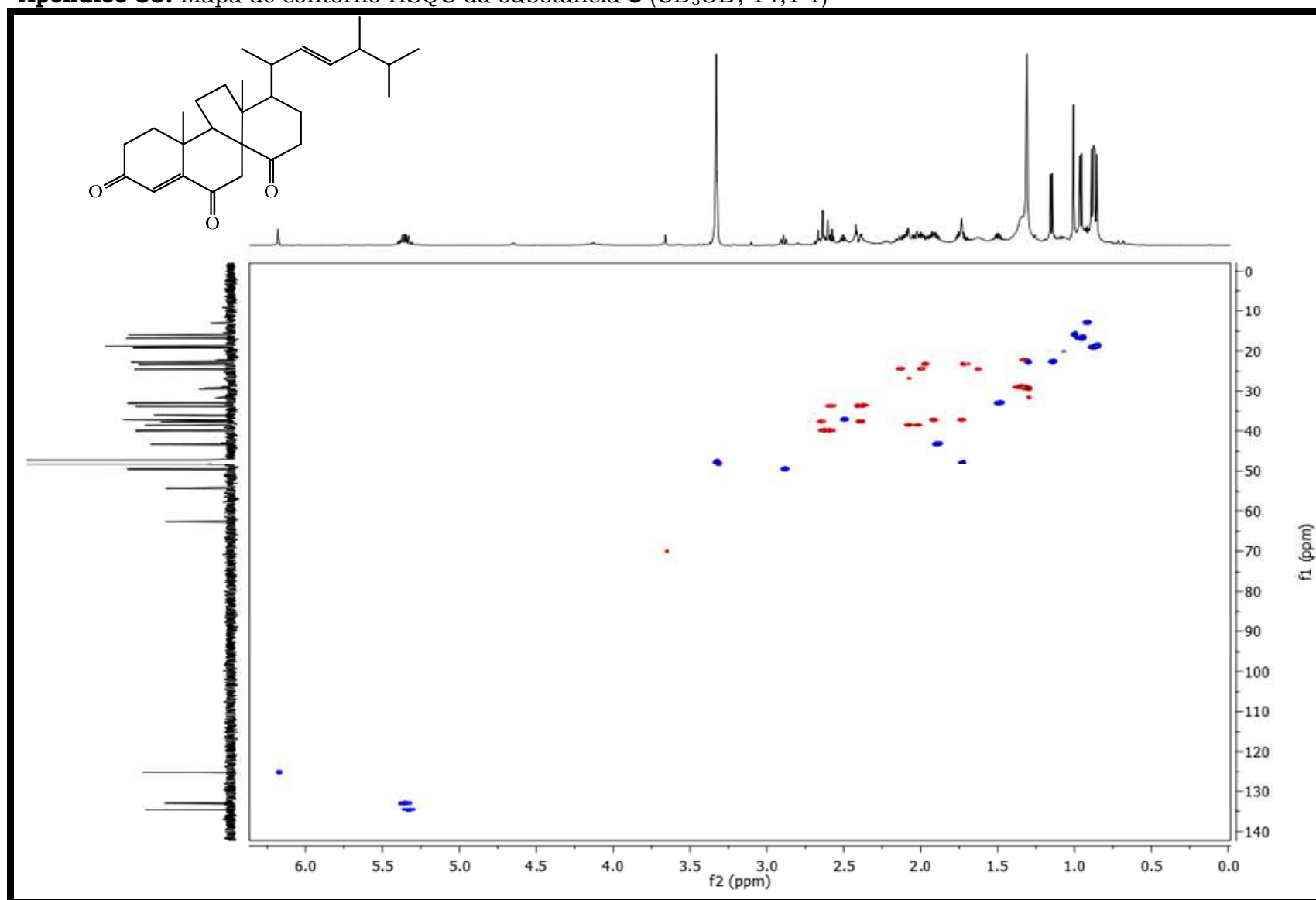
Apêndice 31. Espectros de NOESY-1D da substância **1** (CDCl<sub>3</sub>; 14,1 T)

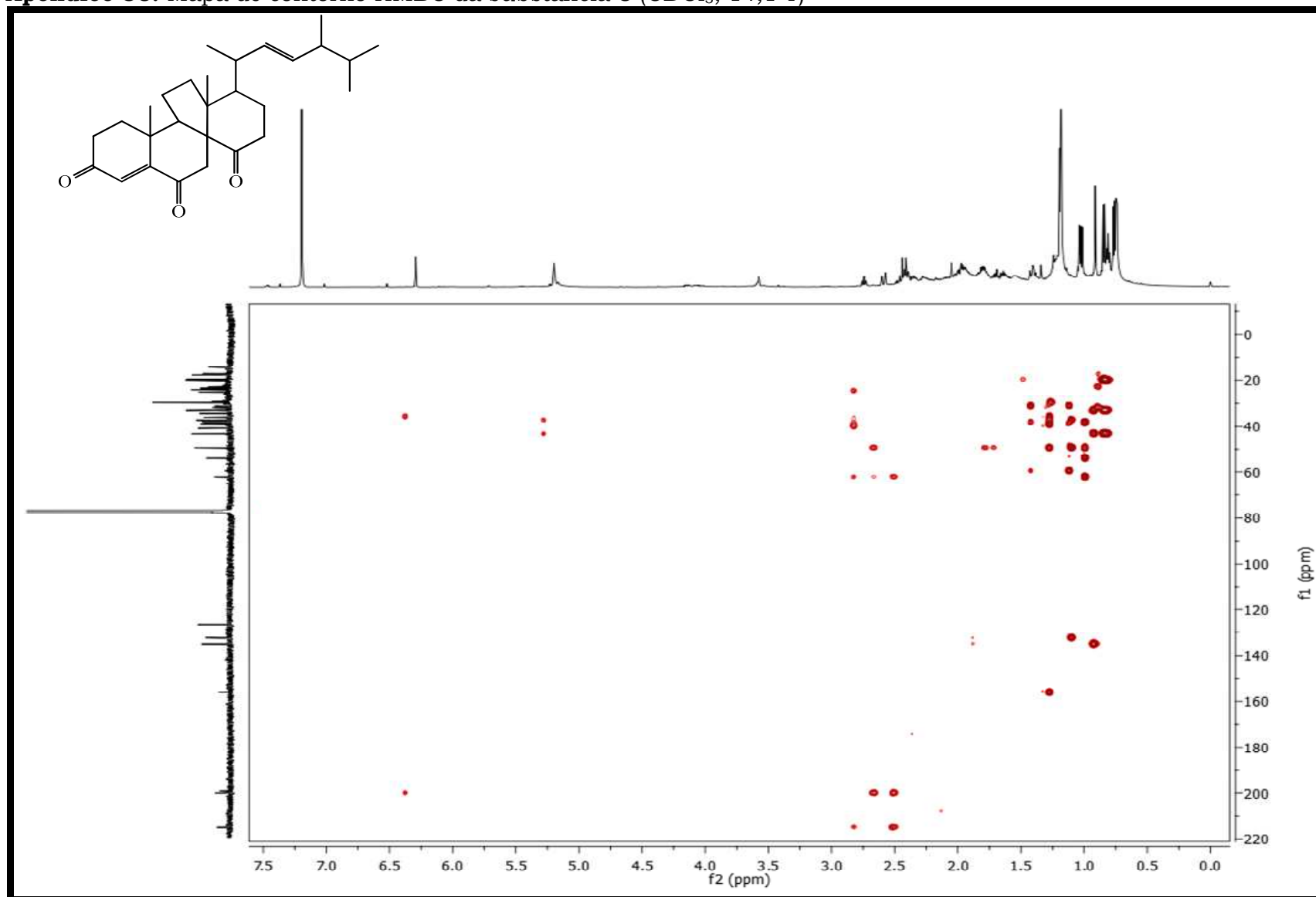
Apêndice 32. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **6** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

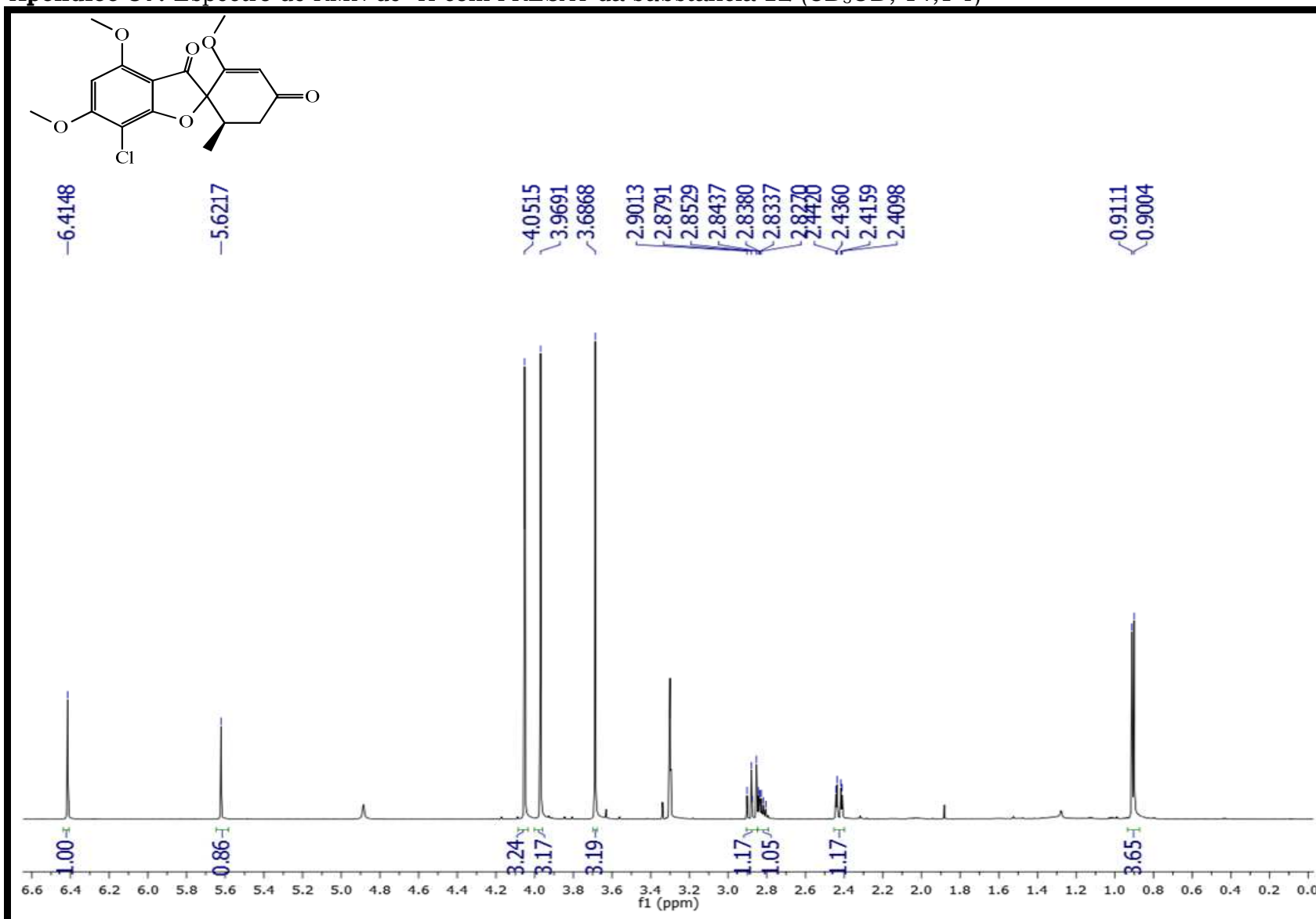


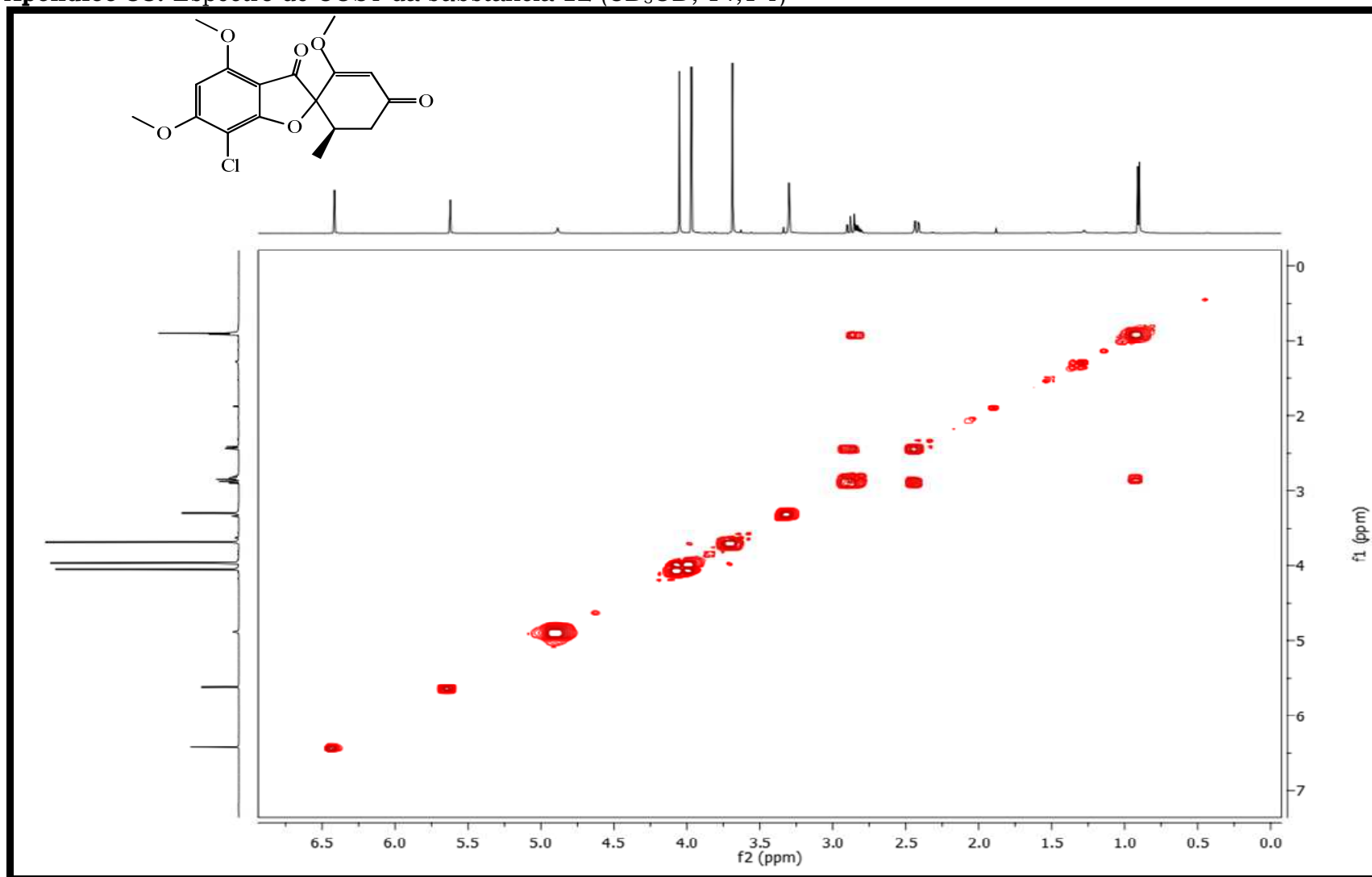
Apêndice 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **6** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

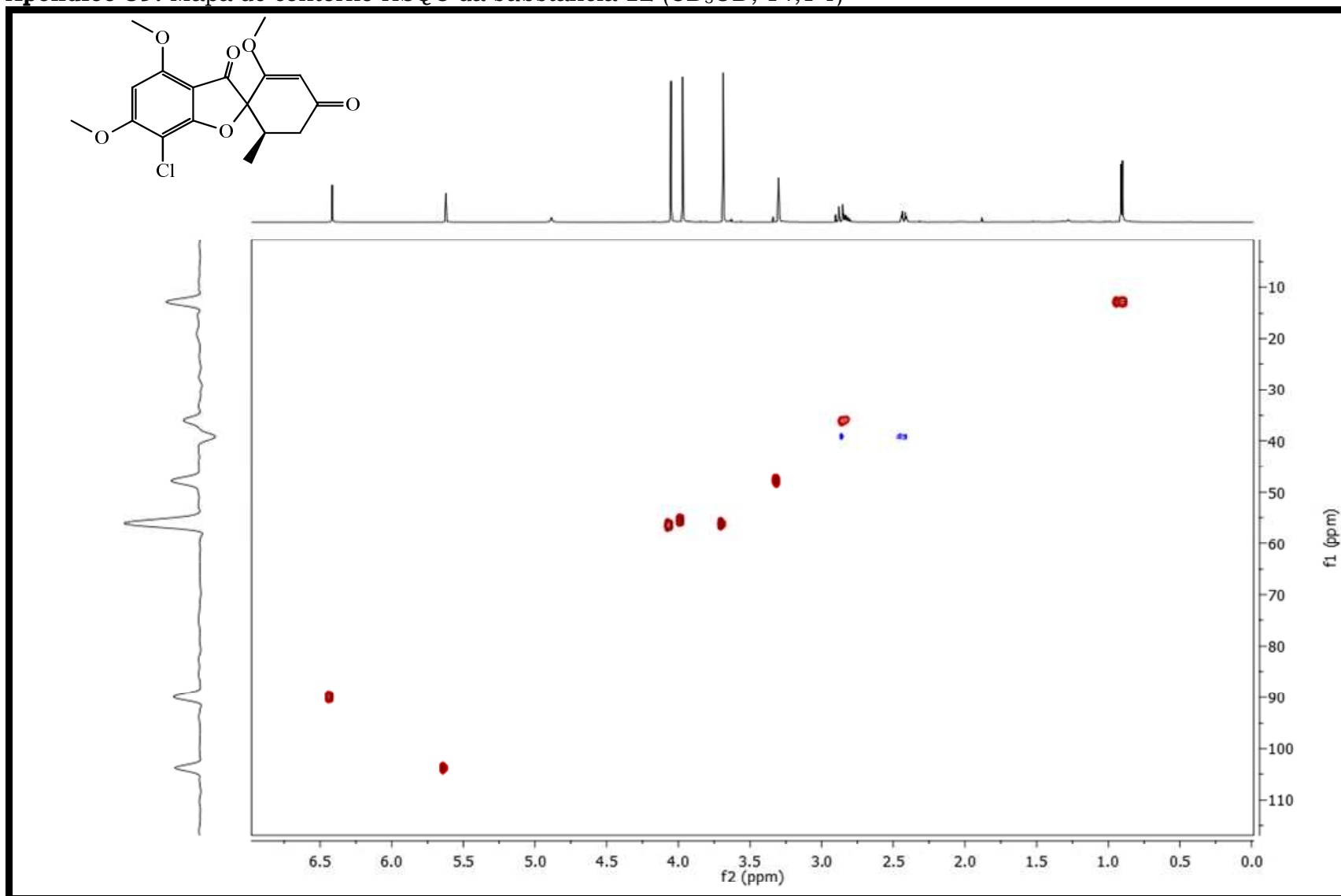
Apêndice 34. Espectro de COSY da substância **6** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

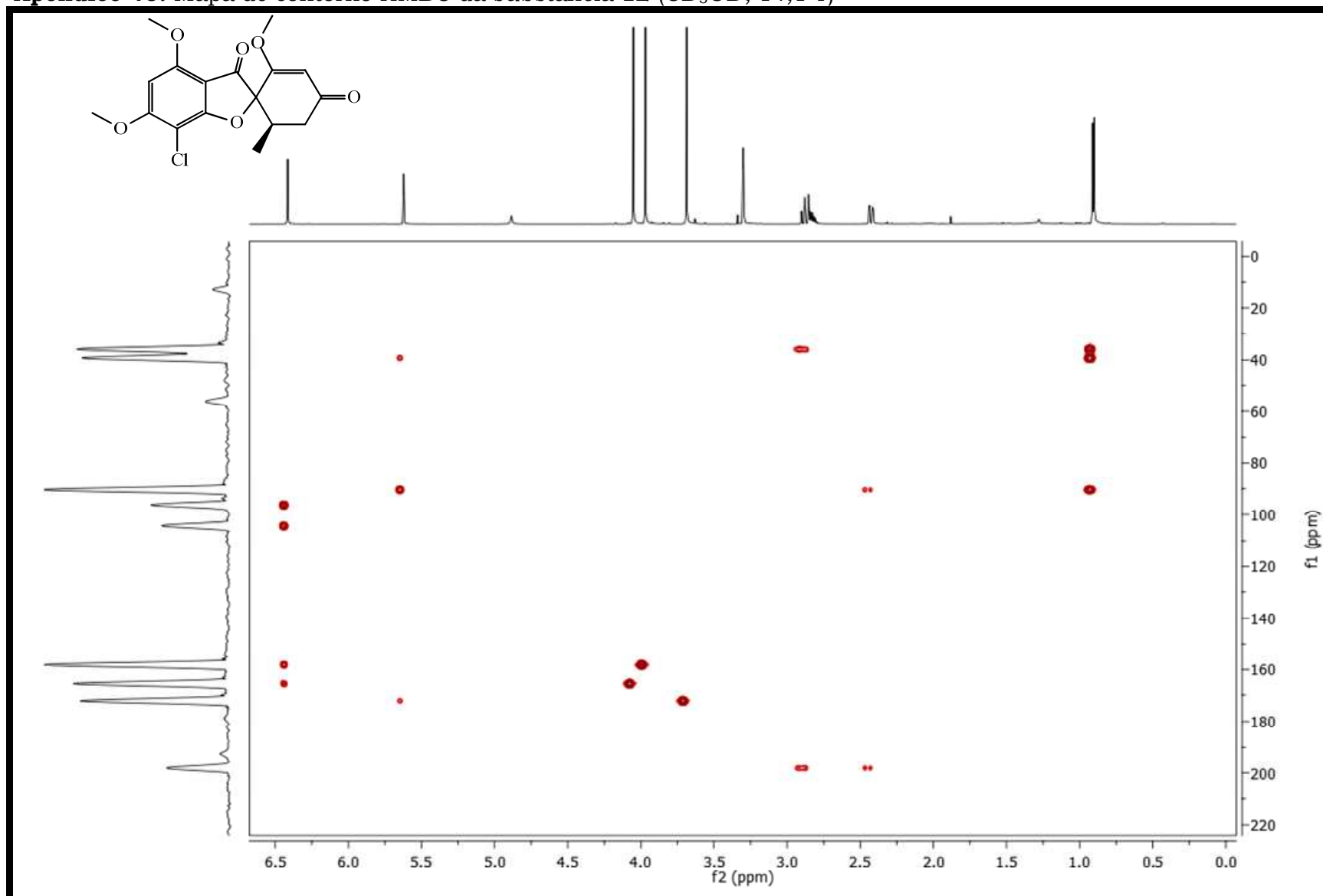
Apêndice 35. Mapa de contorno HSQC da substância **6** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

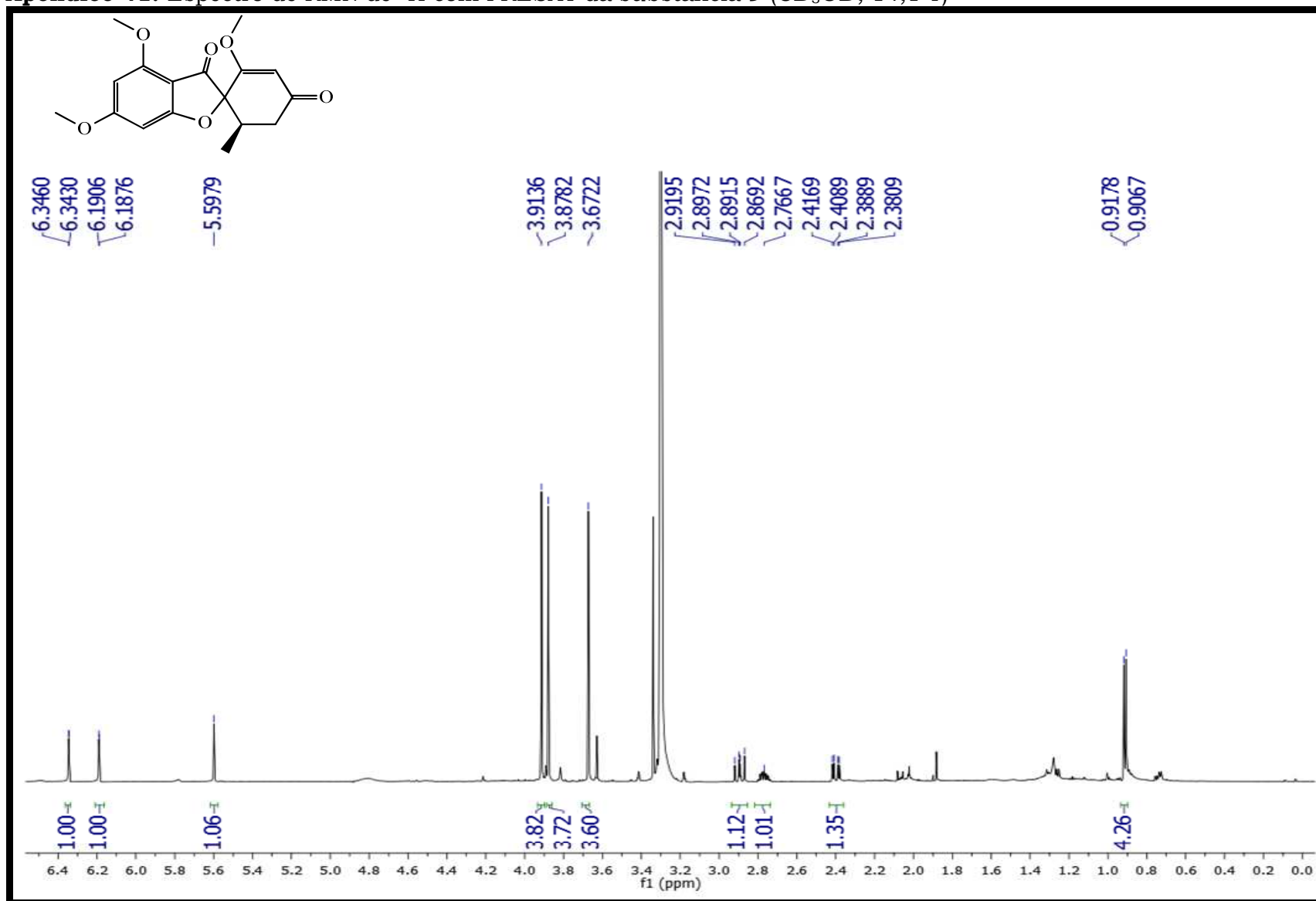
Apêndice 36. Mapa de contorno HMBC da substância **6** (CDCl<sub>3</sub>; 14,1 T)

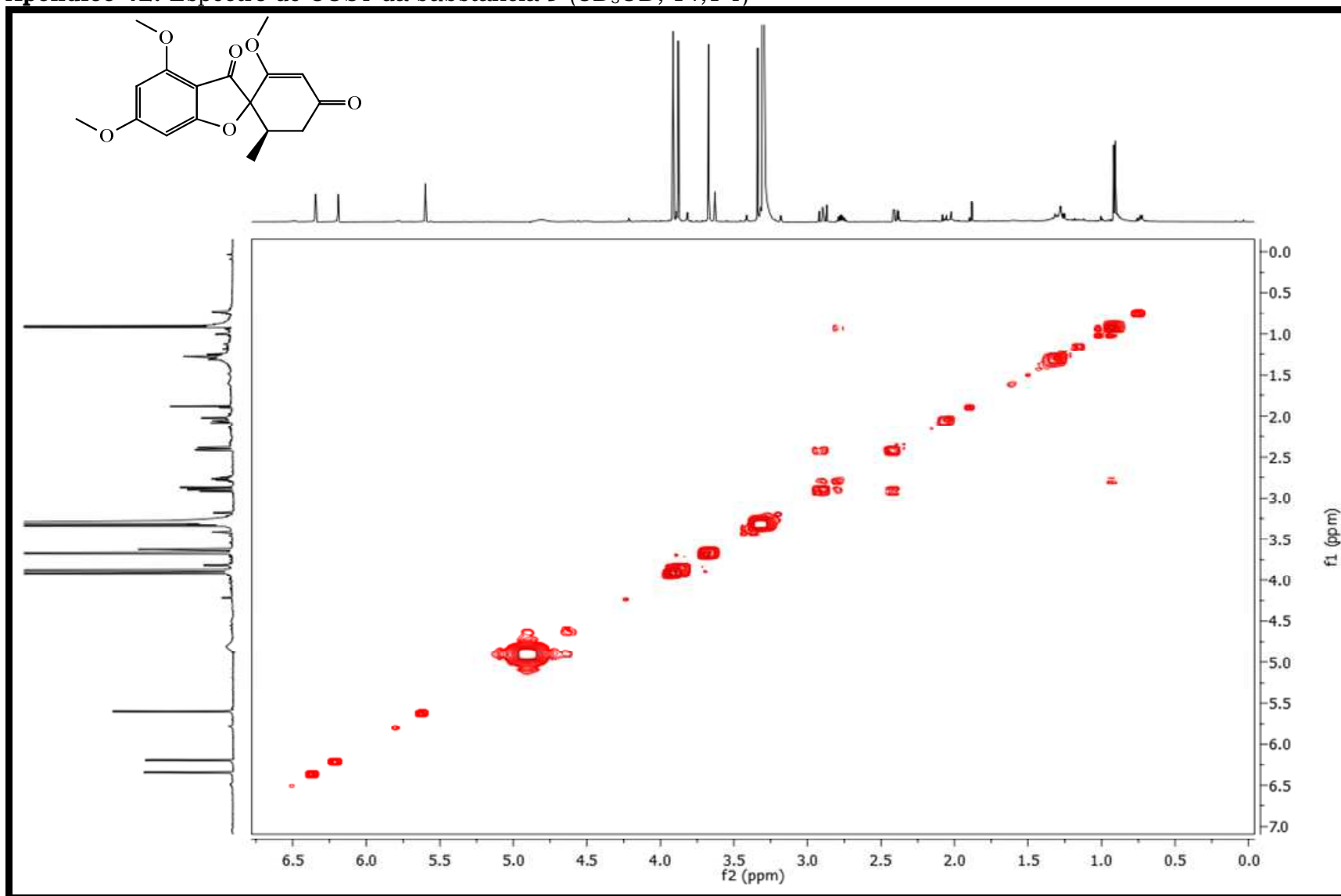
Apêndice 37. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **12** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

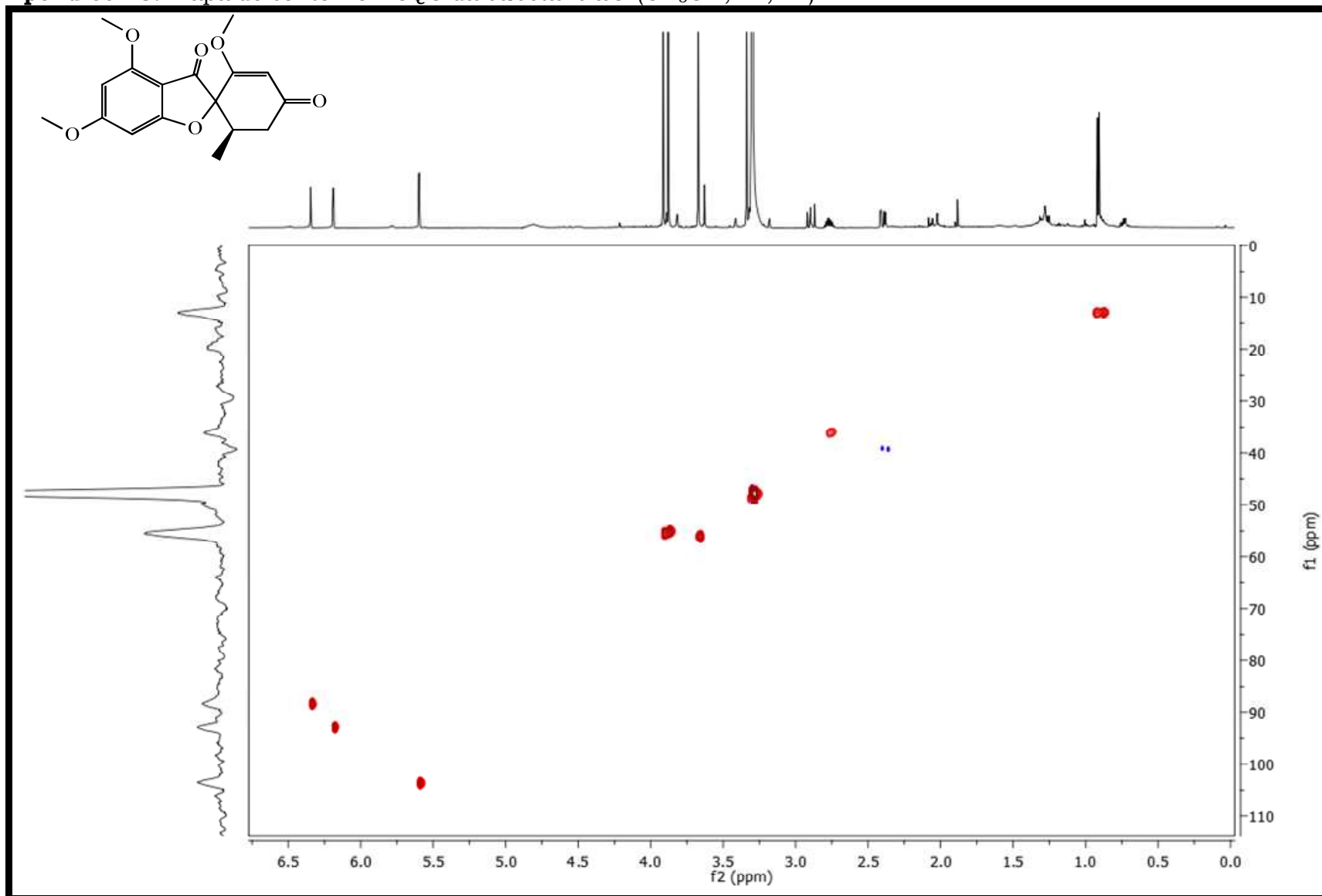
Apêndice 38. Espectro de COSY da substância **12** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

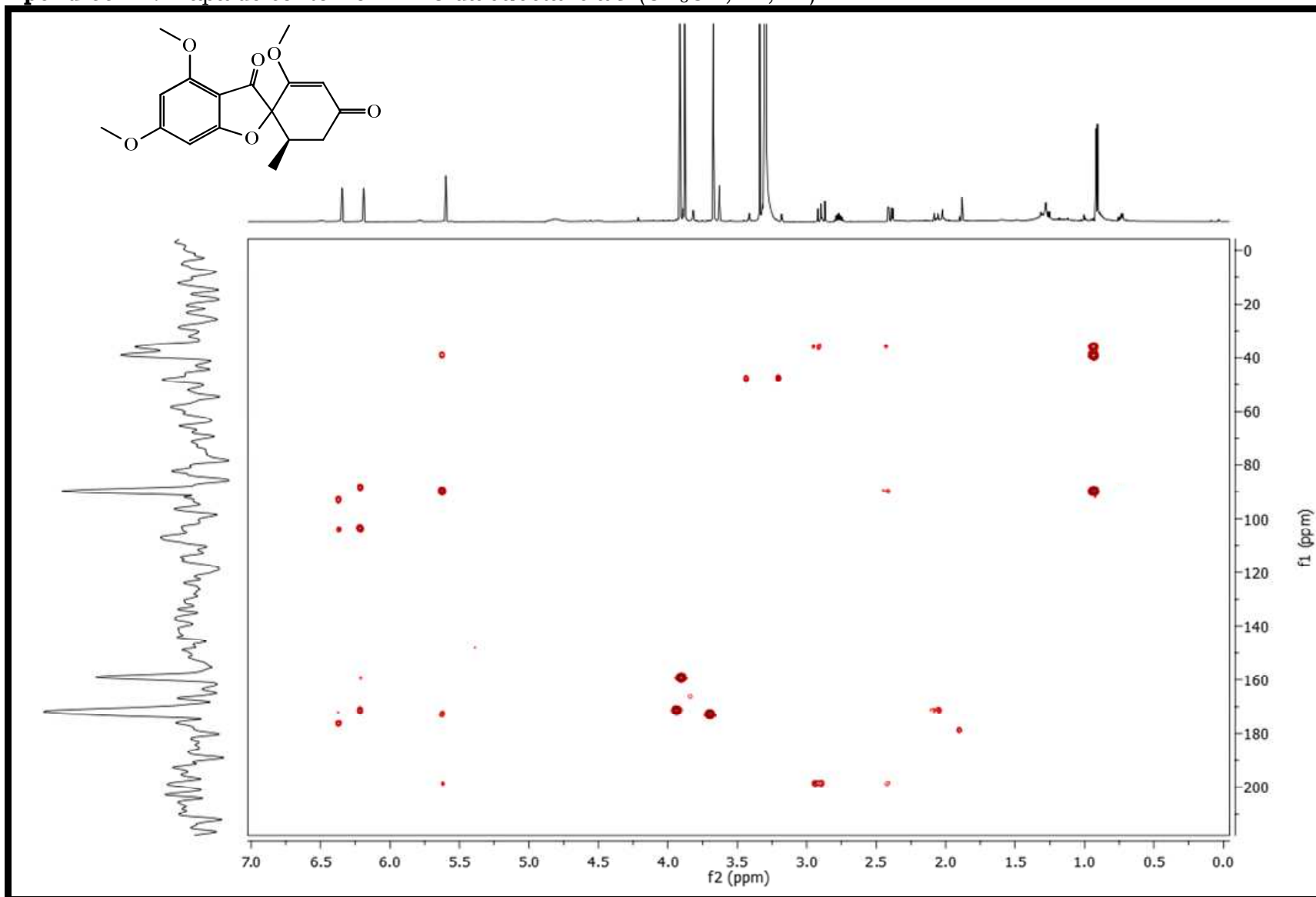
Apêndice 39. Mapa de contorno HSQC da substância **12** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

Apêndice 40. Mapa de contorno HMBC da substância **12** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

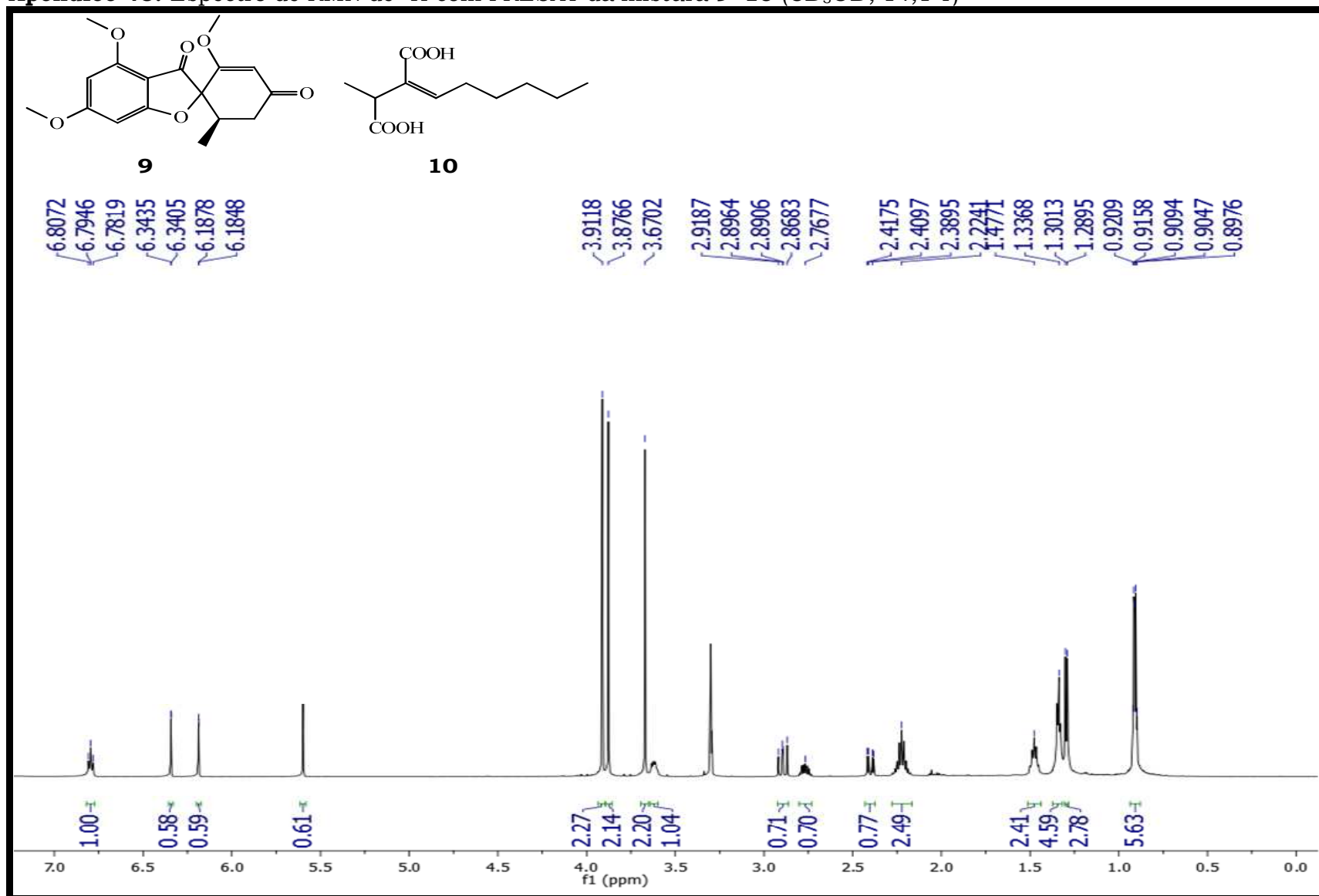
Apêndice 41. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **9** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

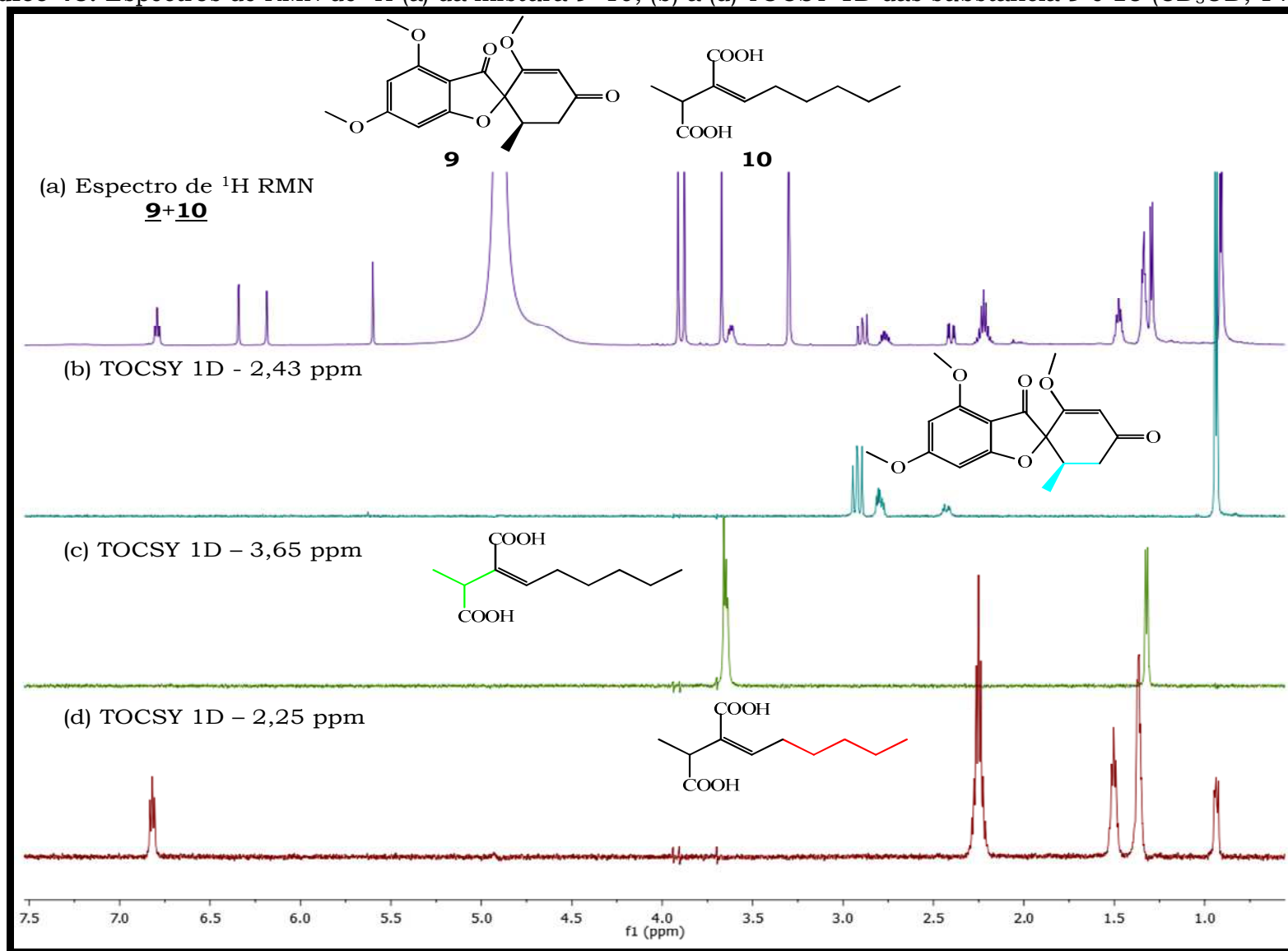
Apêndice 42. Espectro de COSY da substância **9** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

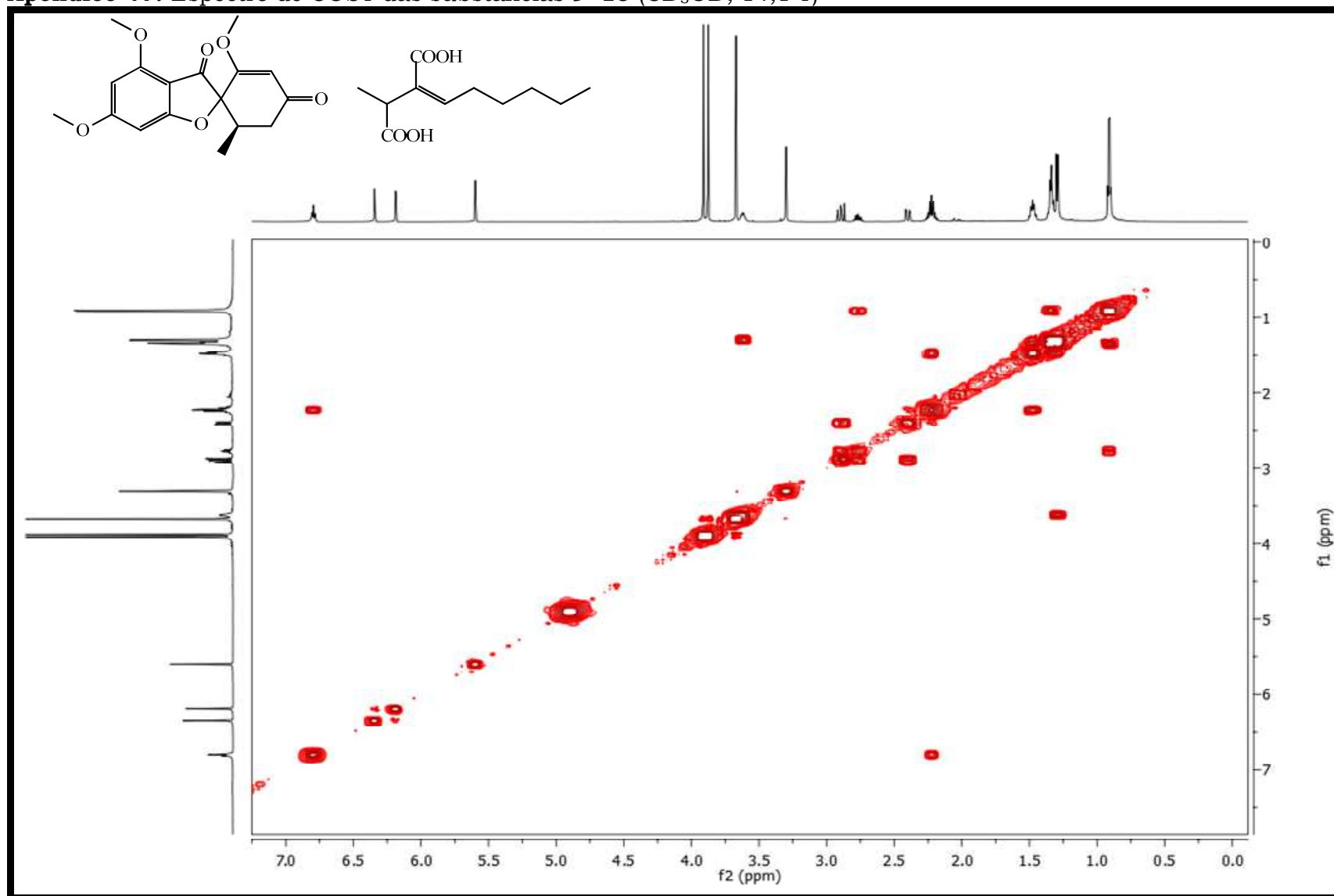
Apêndice 43. Mapa de contorno HSQC da substância **9** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

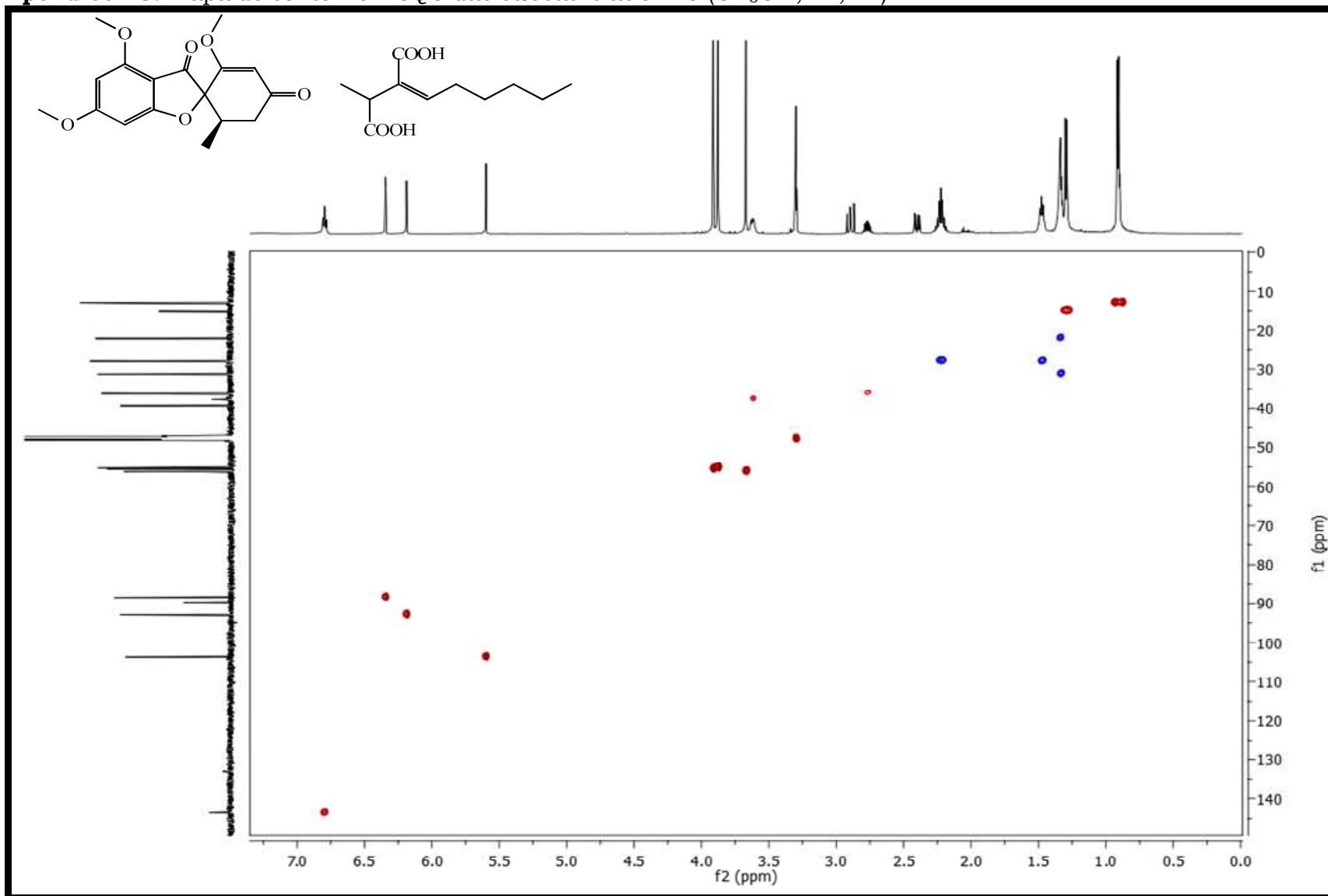
Apêndice 44. Mapa de contorno HMBC da substância **9** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

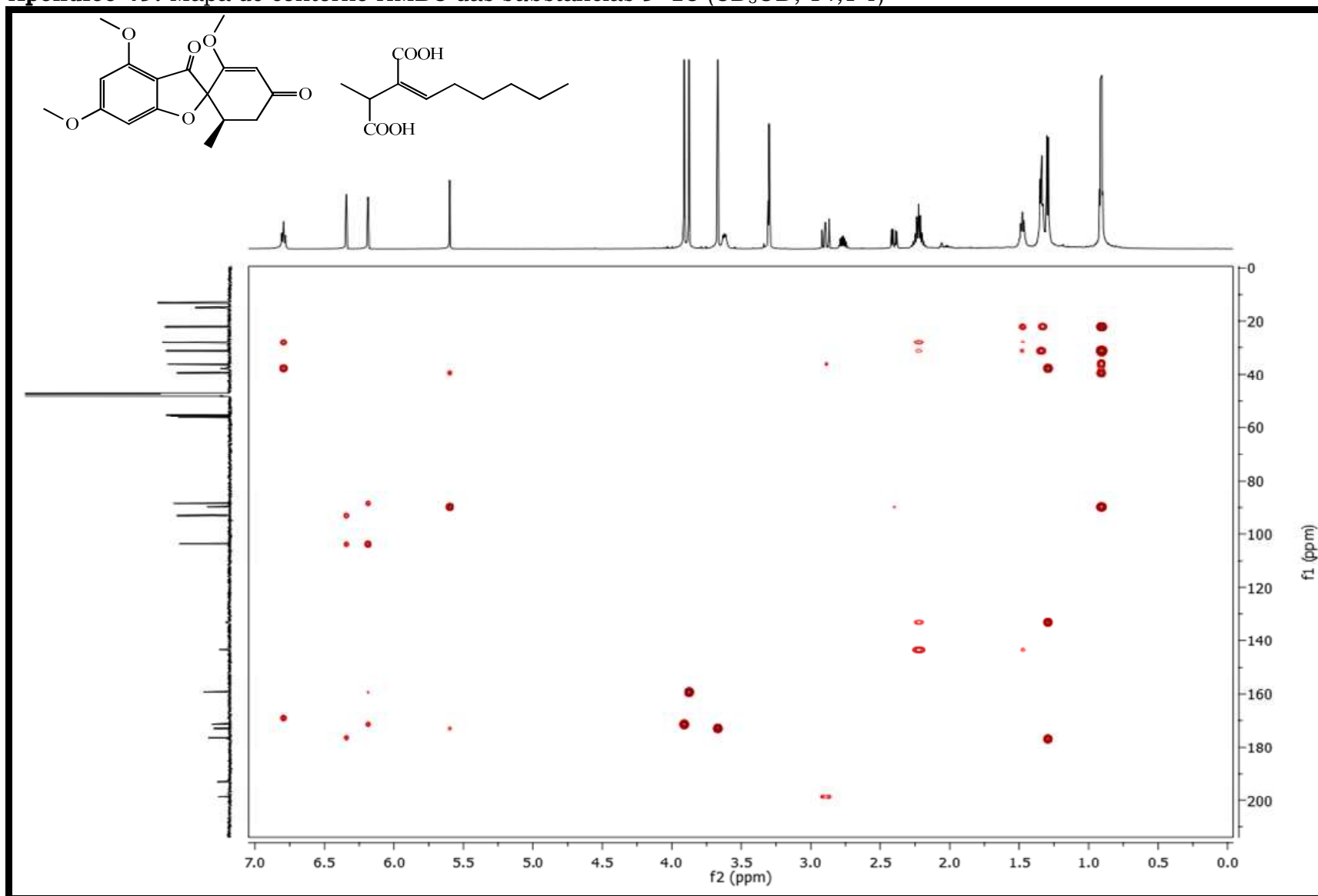
Apêndice 45. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da mistura **9+10** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



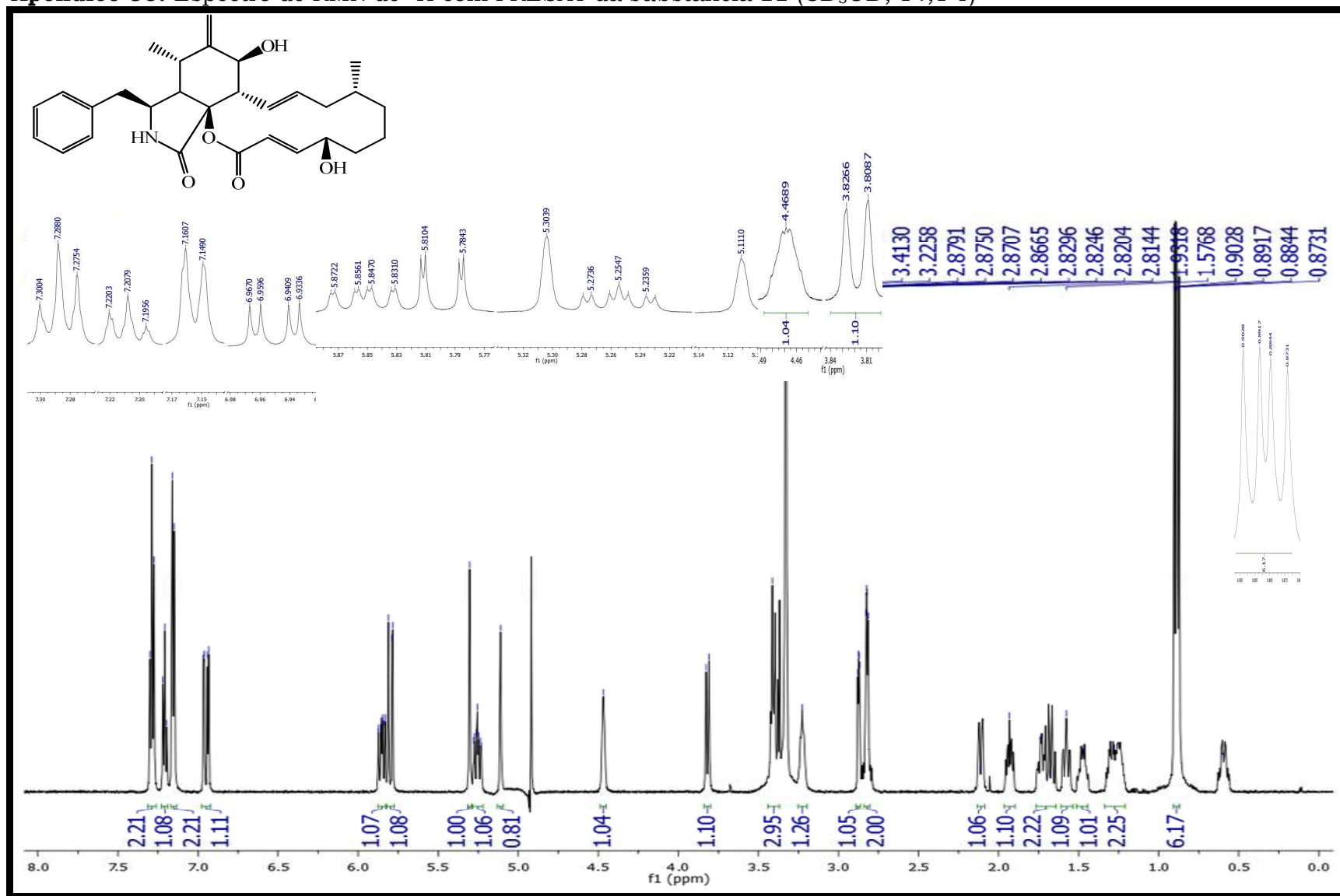
Apêndice 46. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (a) da mistura 9+10, (b) a (d) TOCSY-1D das substância **9** e **10** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

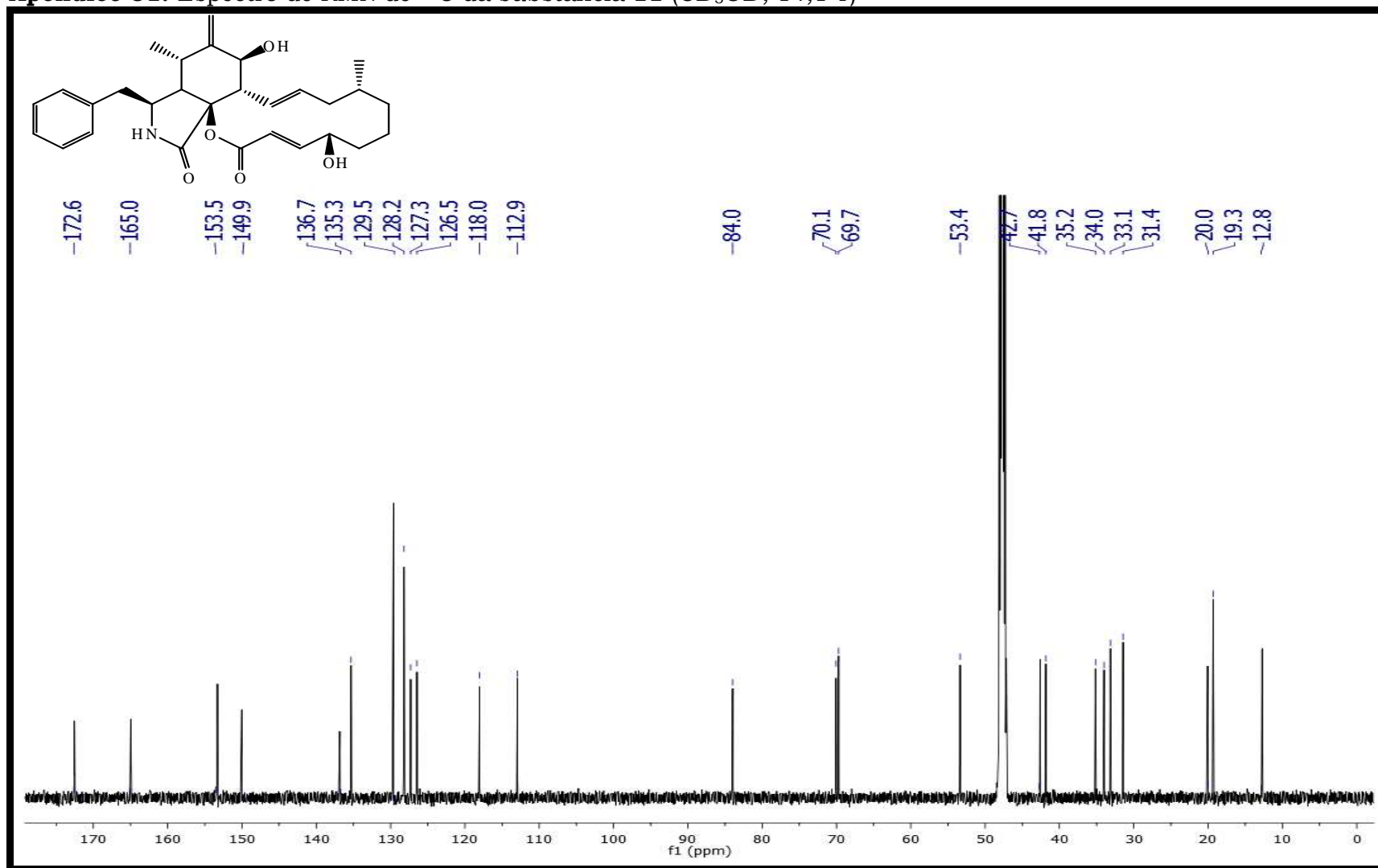
Apêndice 47. Espectro de COSY das substâncias **9+10** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

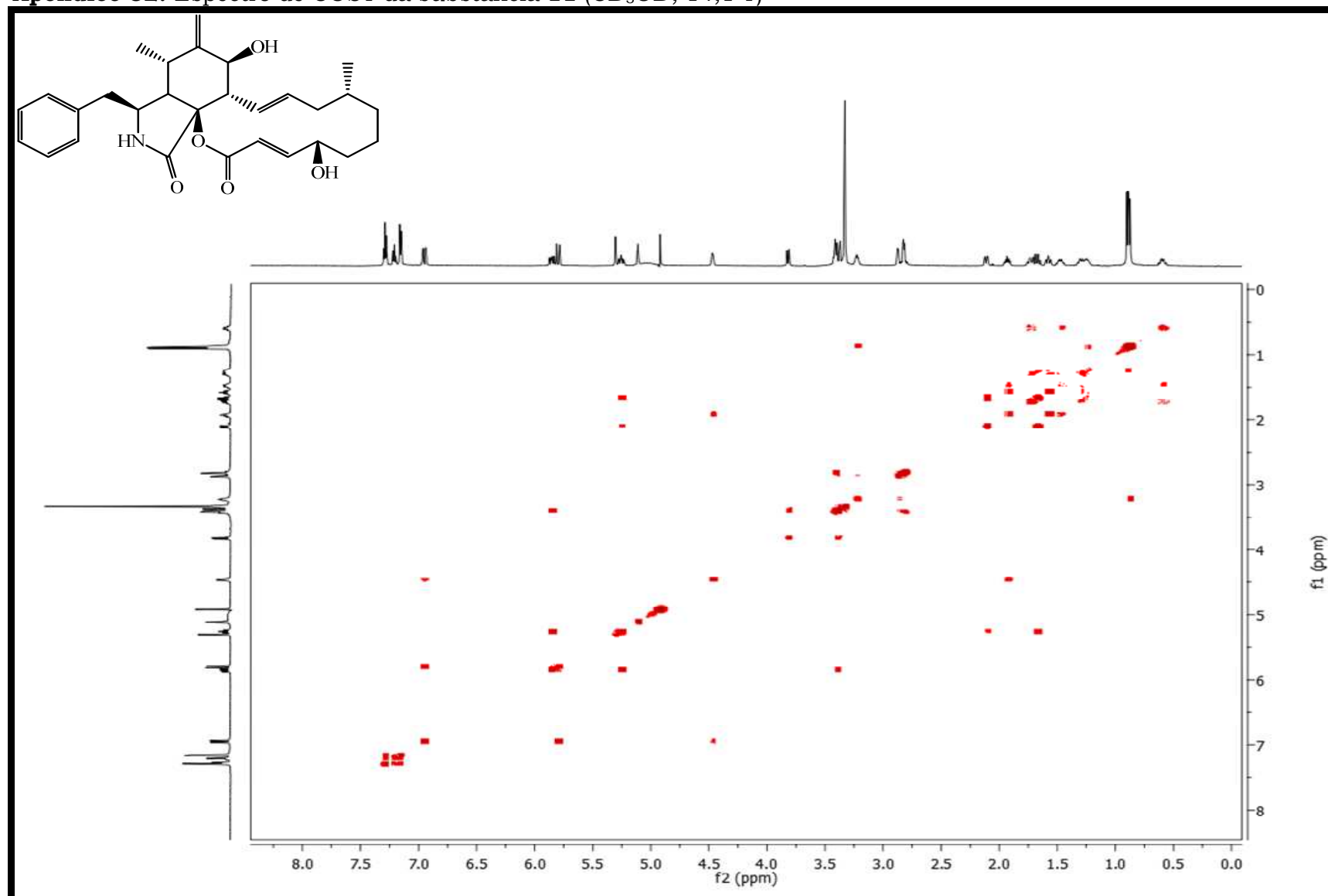
Apêndice 48. Mapa de contorno HSQC das substâncias **9+10** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

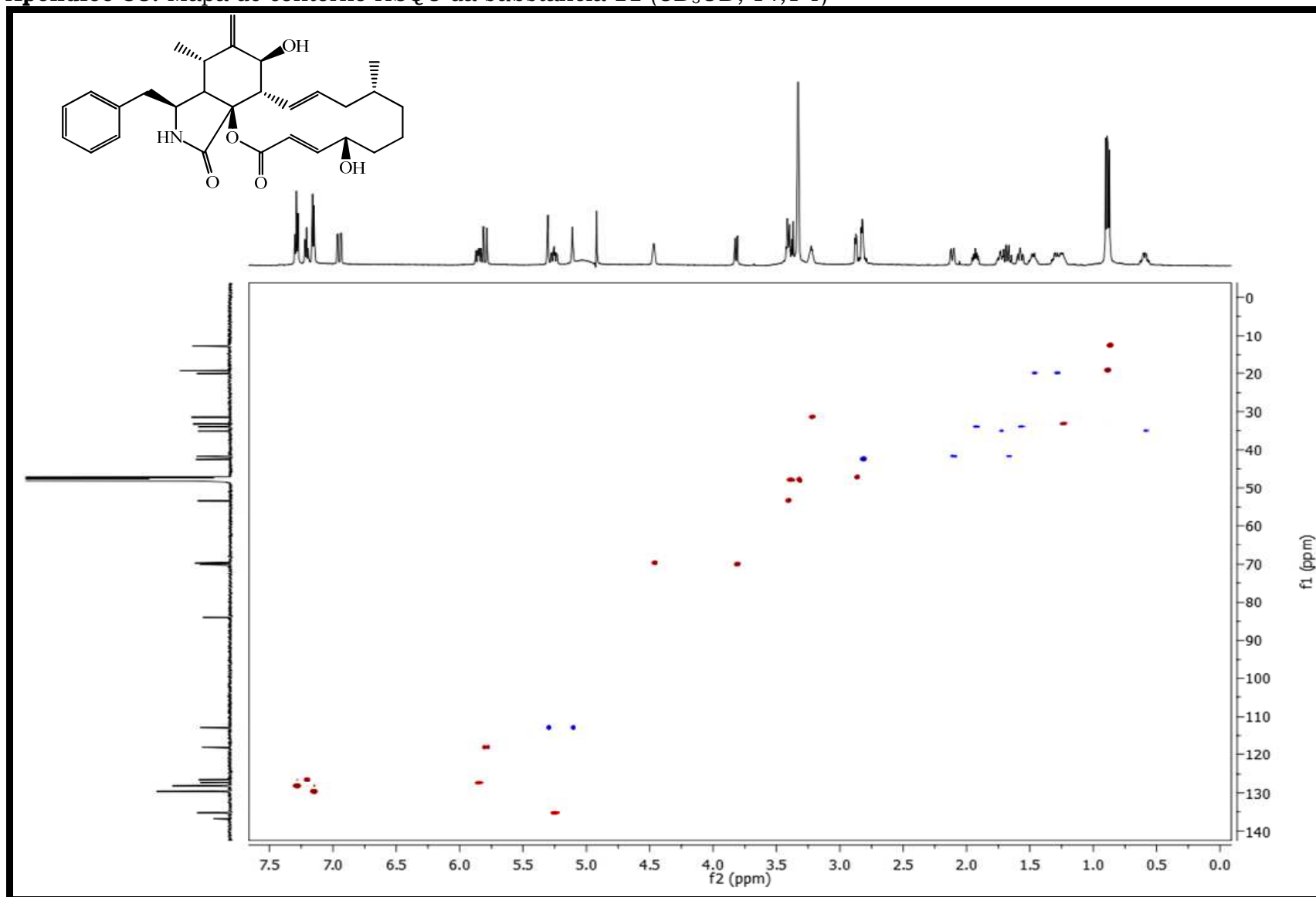
Apêndice 49. Mapa de contorno HMBC das substâncias **9+10** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

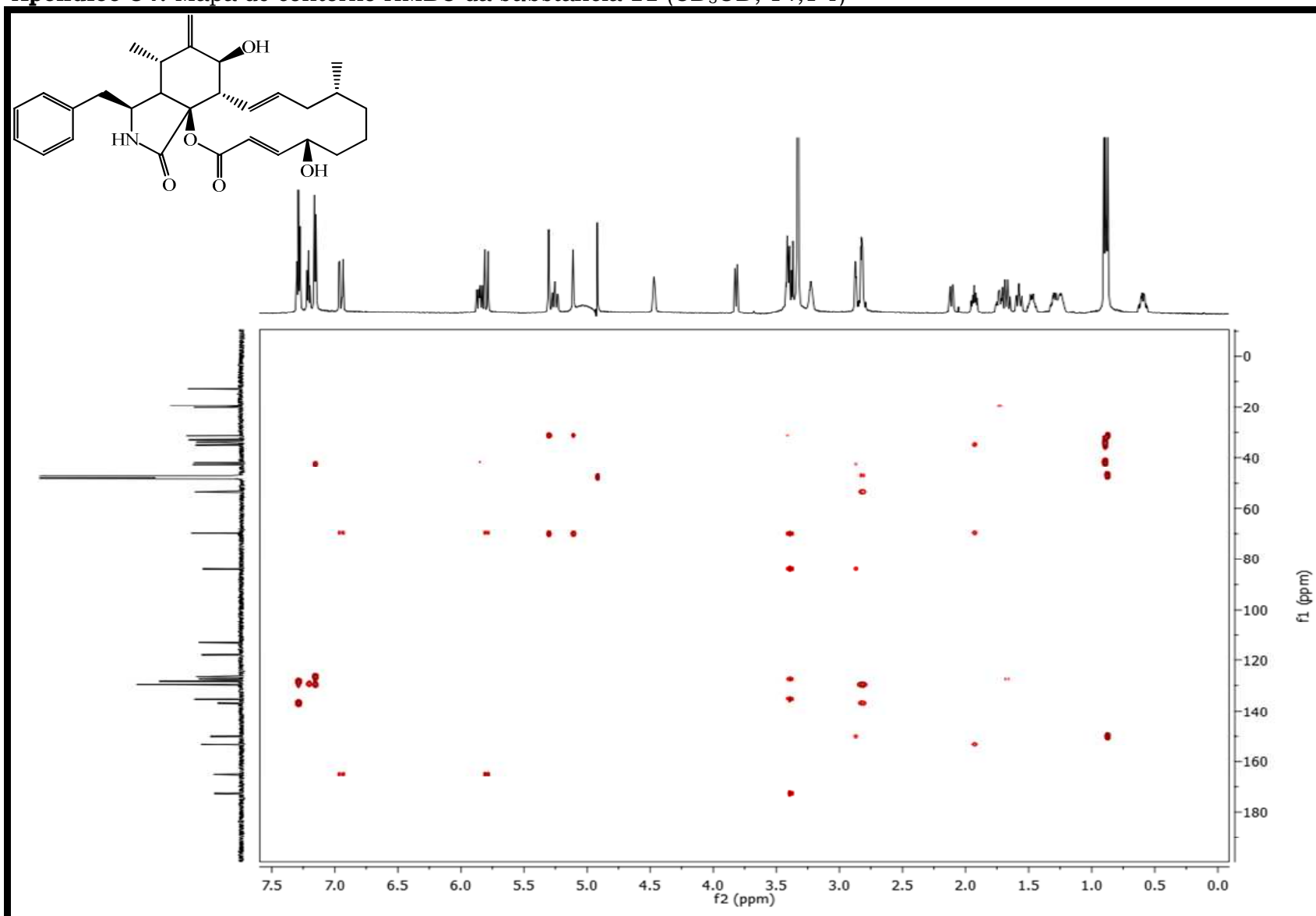
Apêndice 50. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **11** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



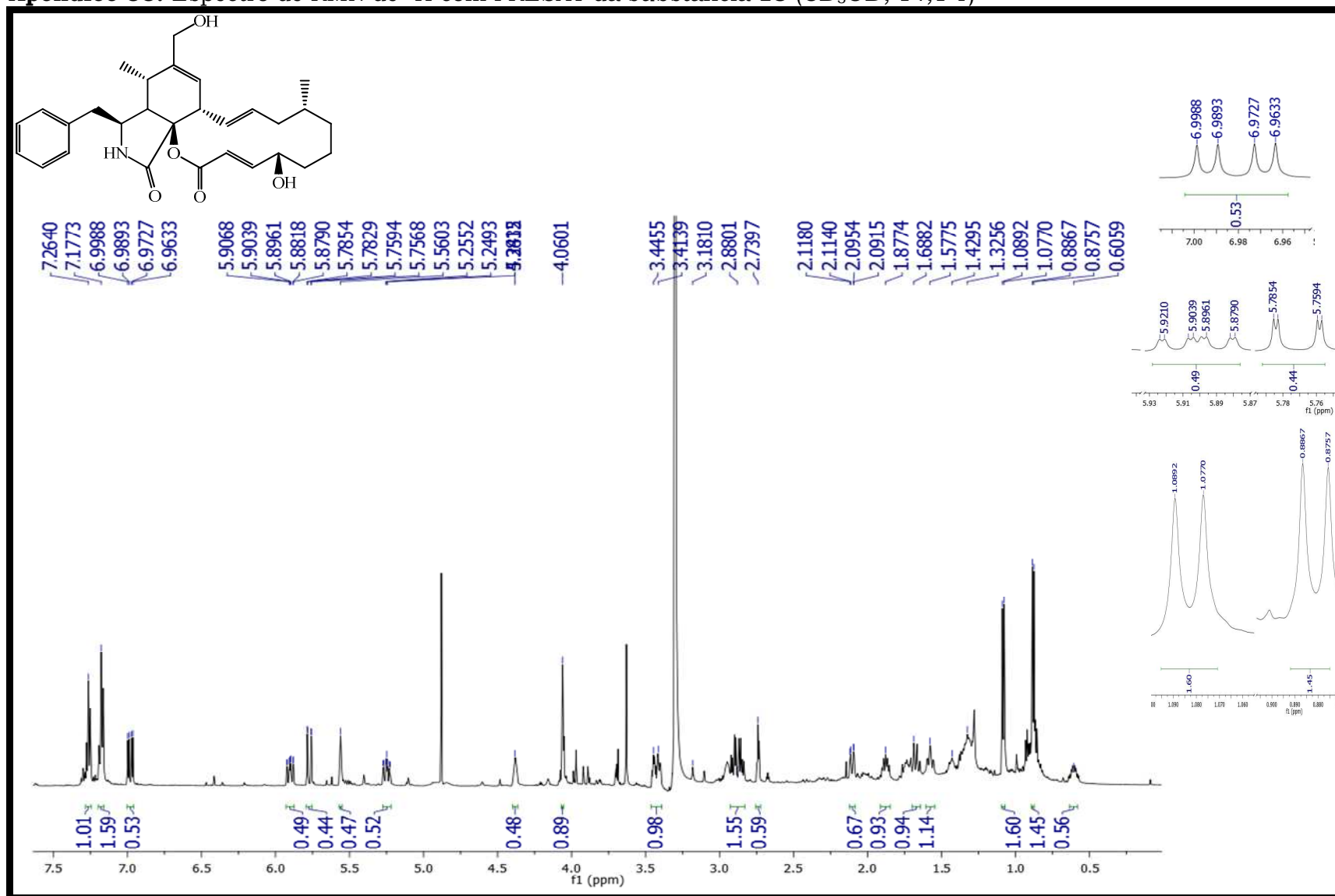
Apêndice 51. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **11** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

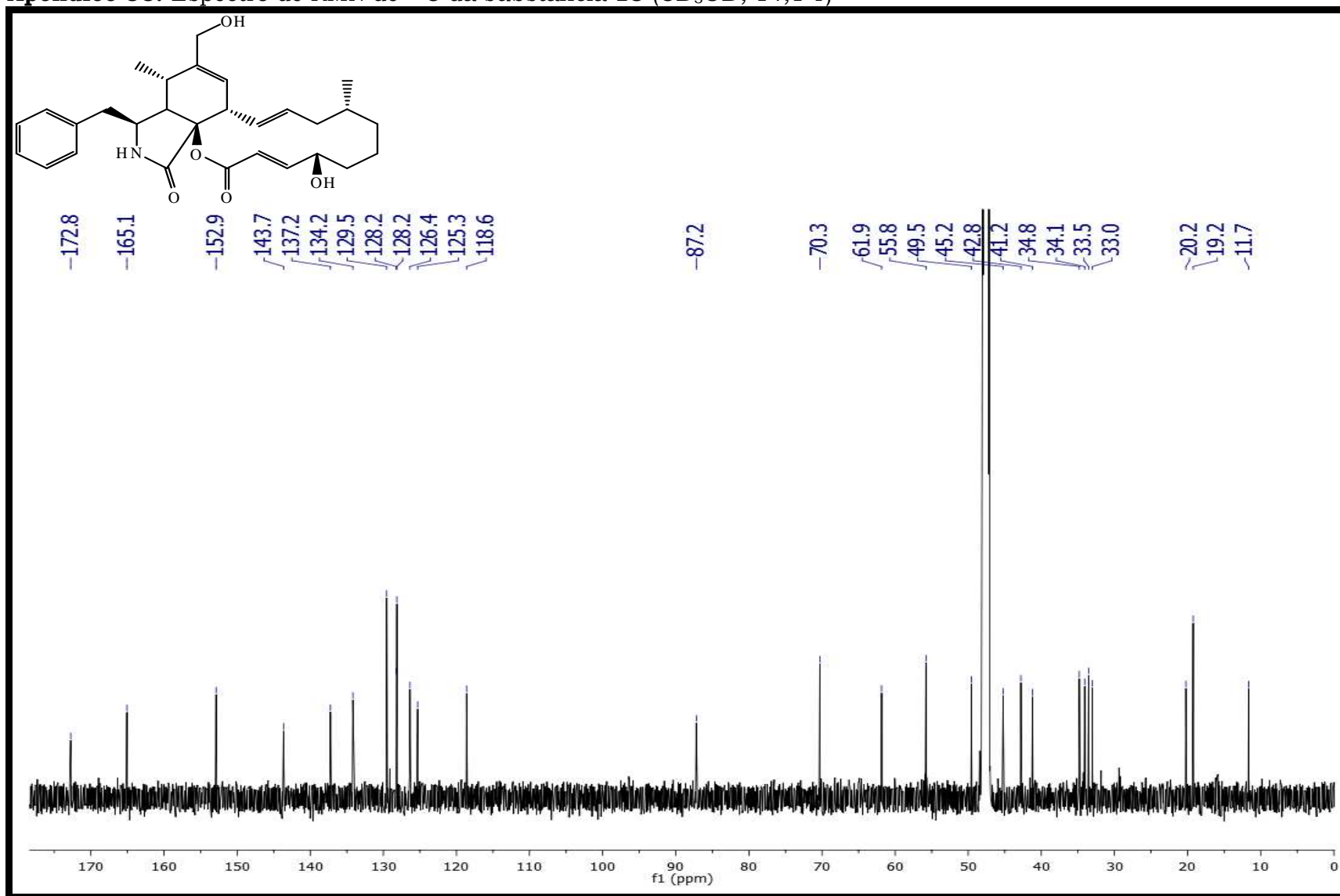
Apêndice 52. Espectro de COSY da substância **11** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

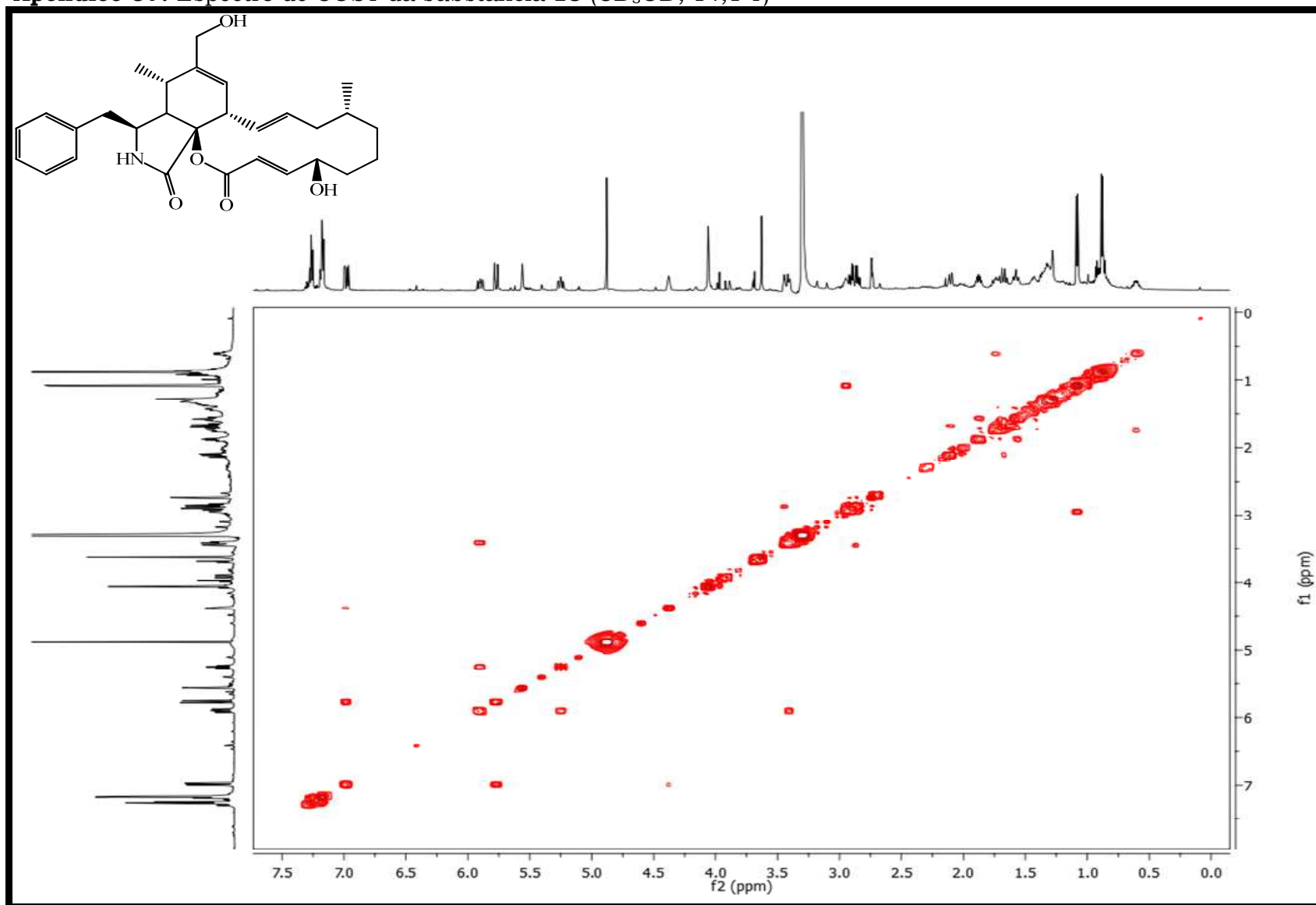
Apêndice 53. Mapa de contorno HSQC da substância **11** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

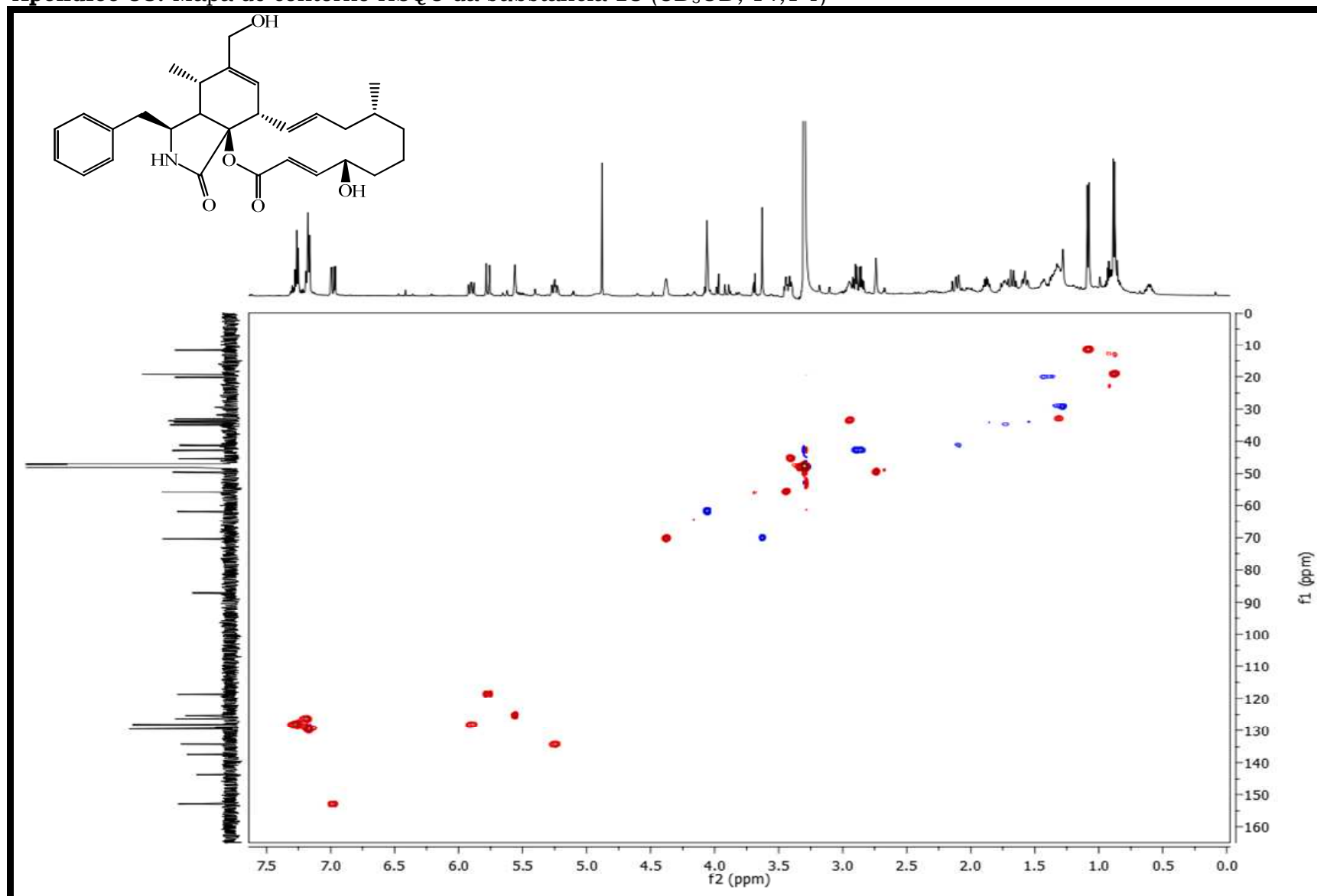
Apêndice 54. Mapa de contorno HMBC da substância **11** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

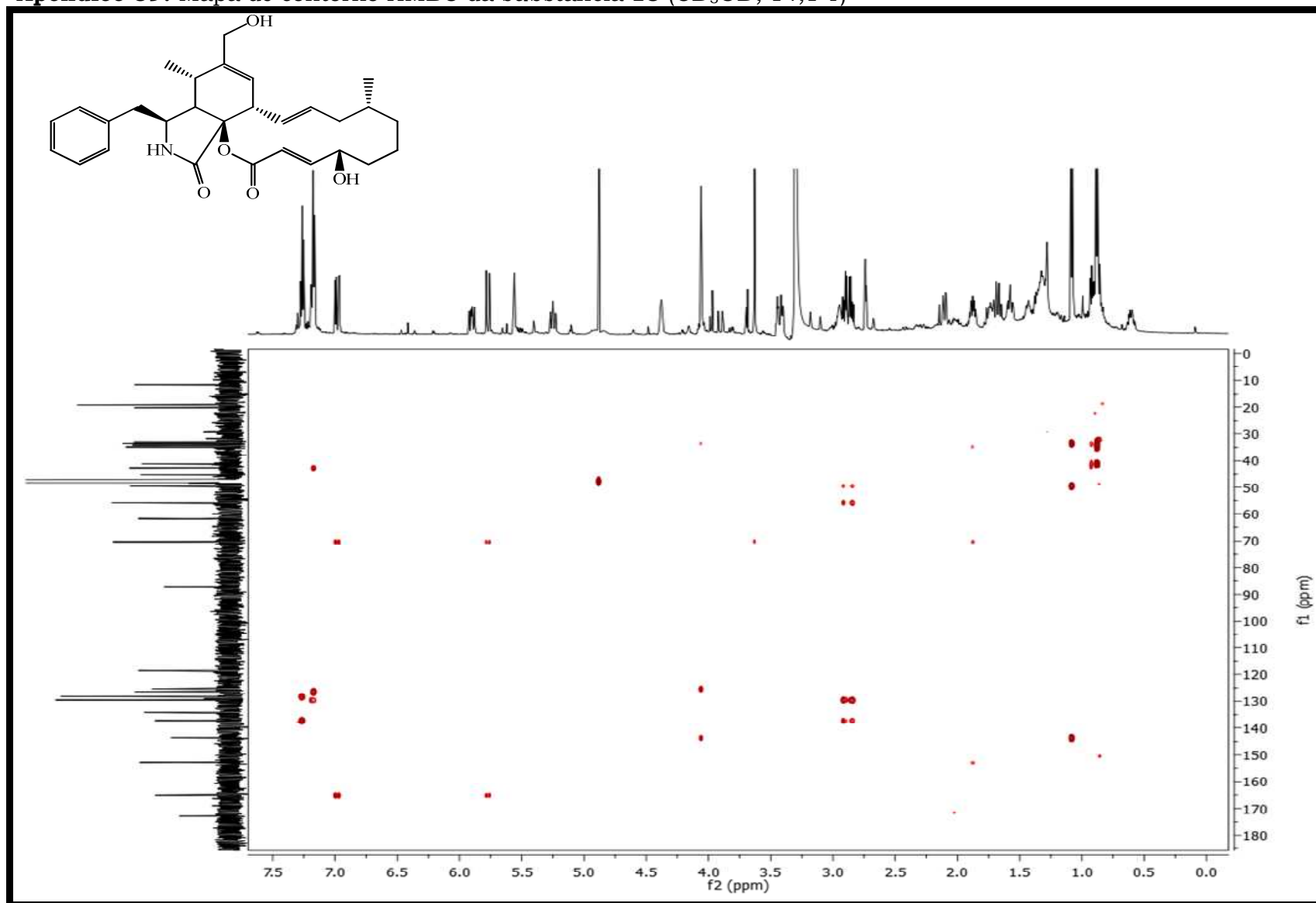
Apêndice 55. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **13** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



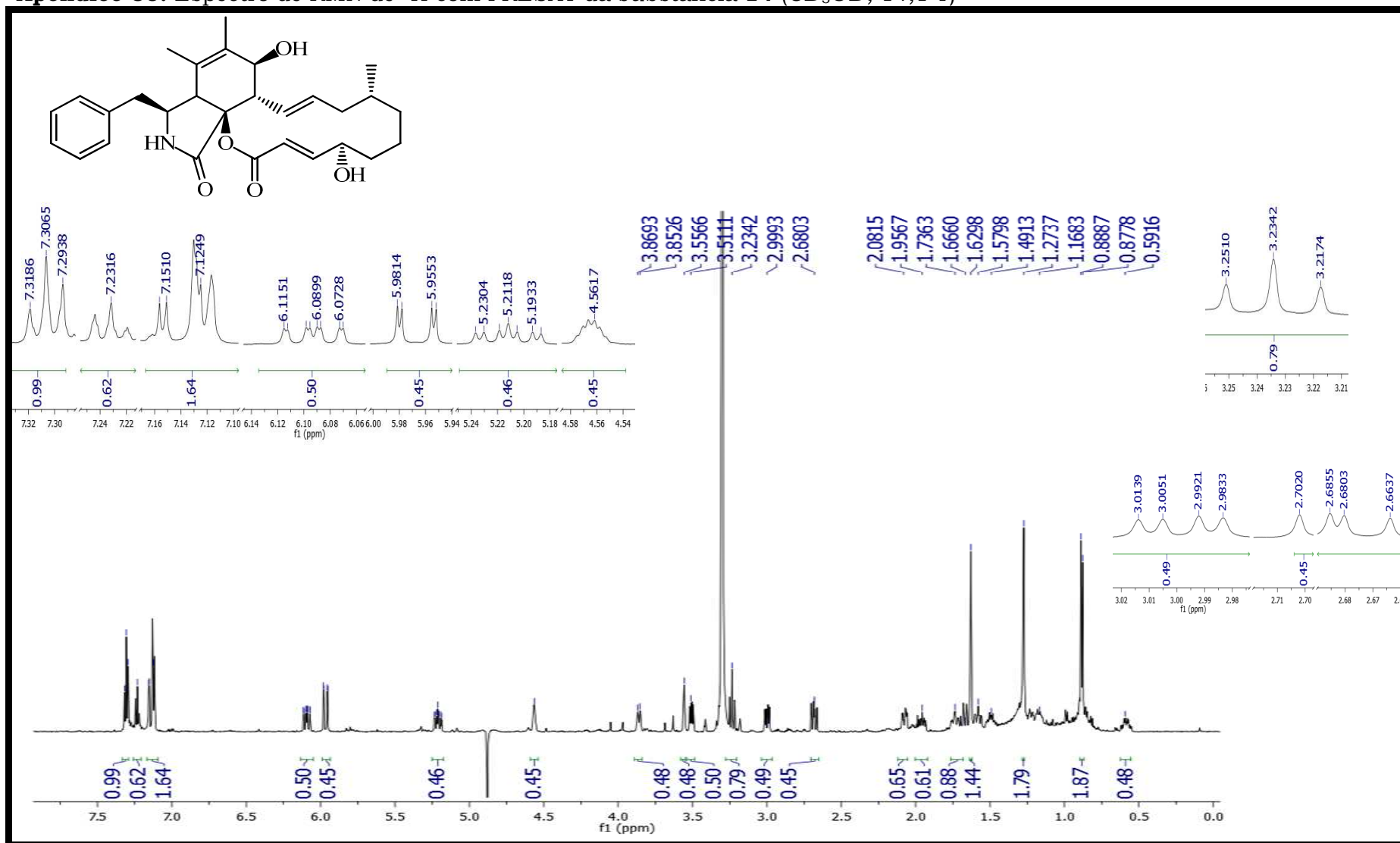
Apêndice 56. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **13** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

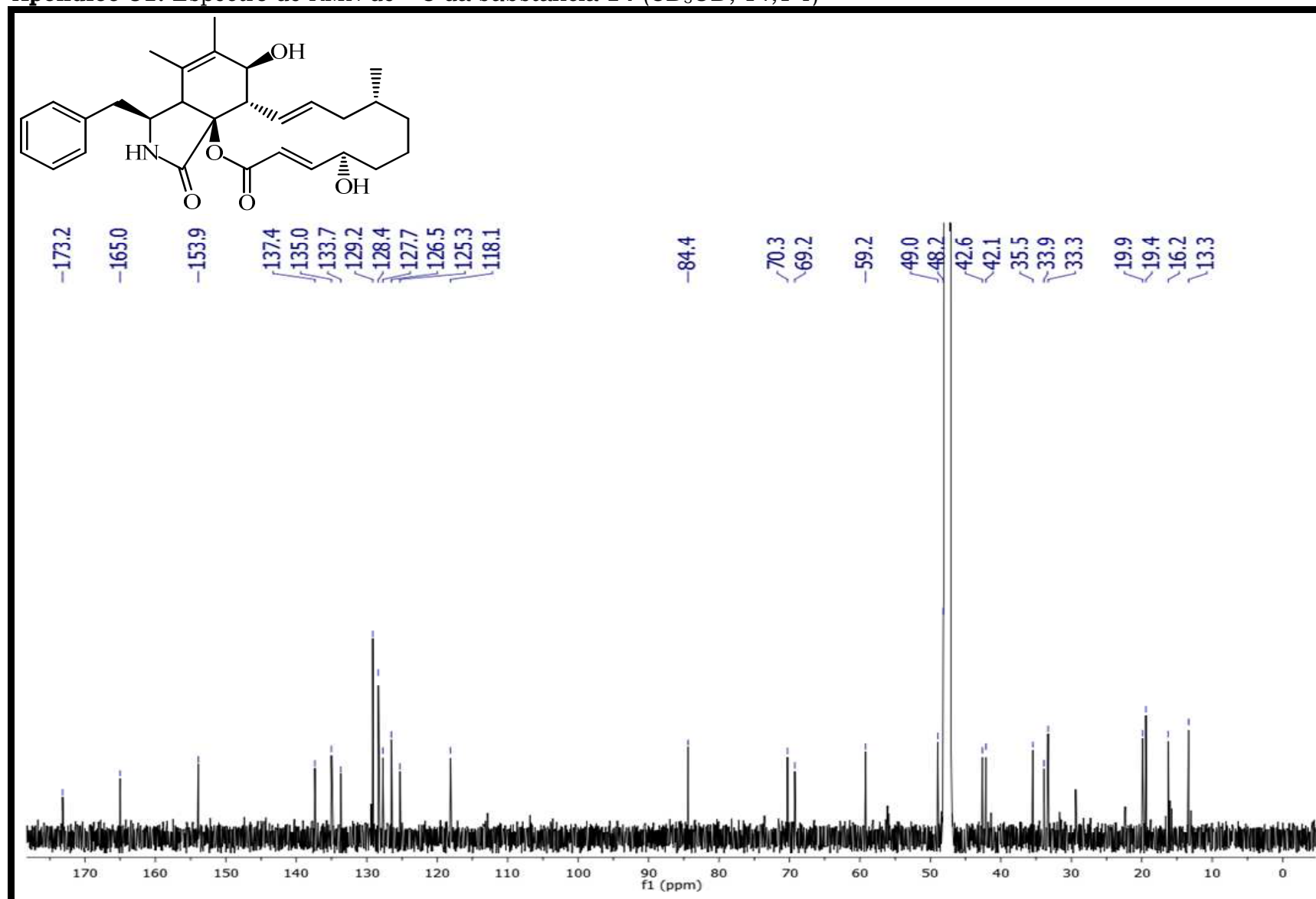
Apêndice 57. Espectro de COSY da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

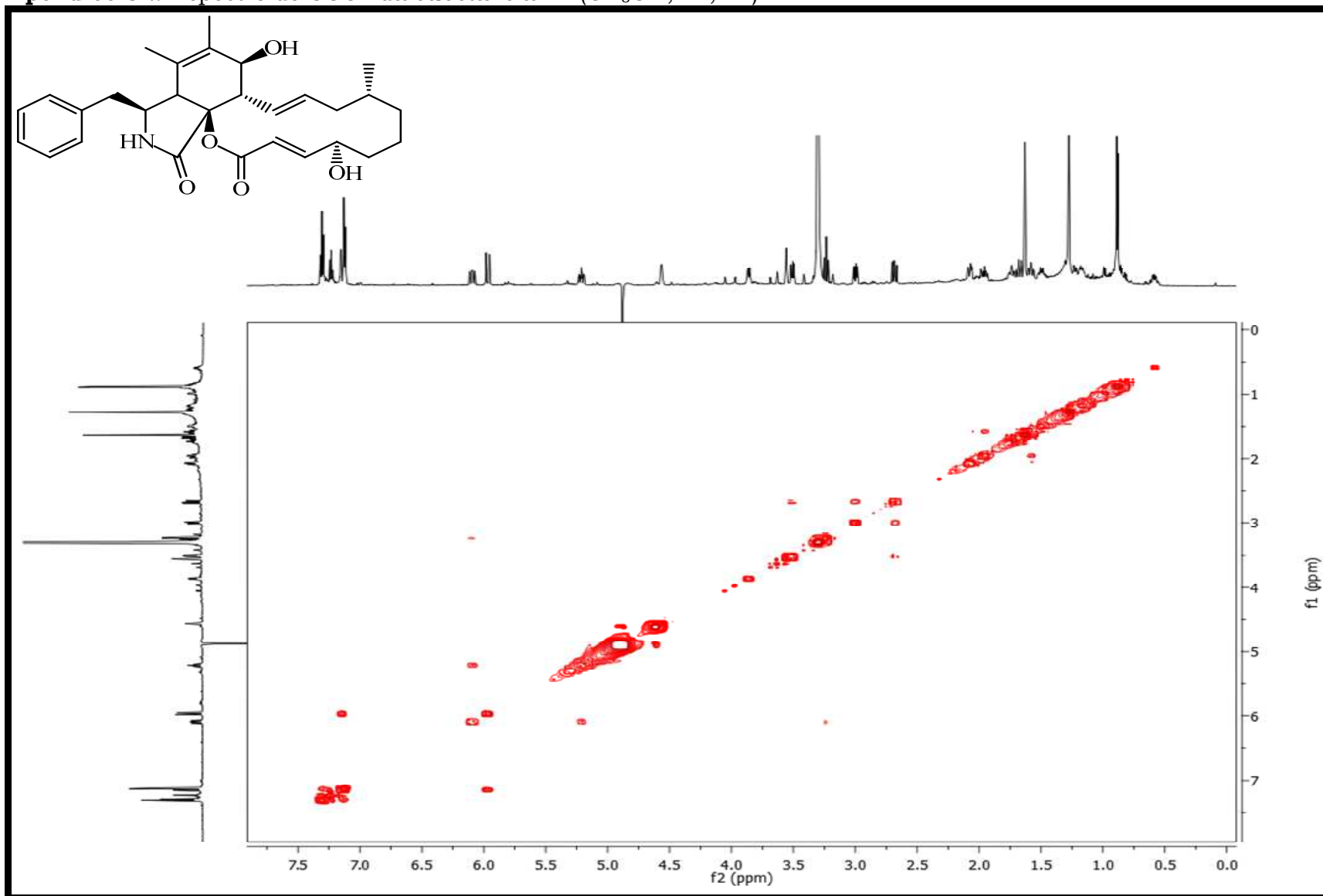
Apêndice 58. Mapa de contorno HSQC da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

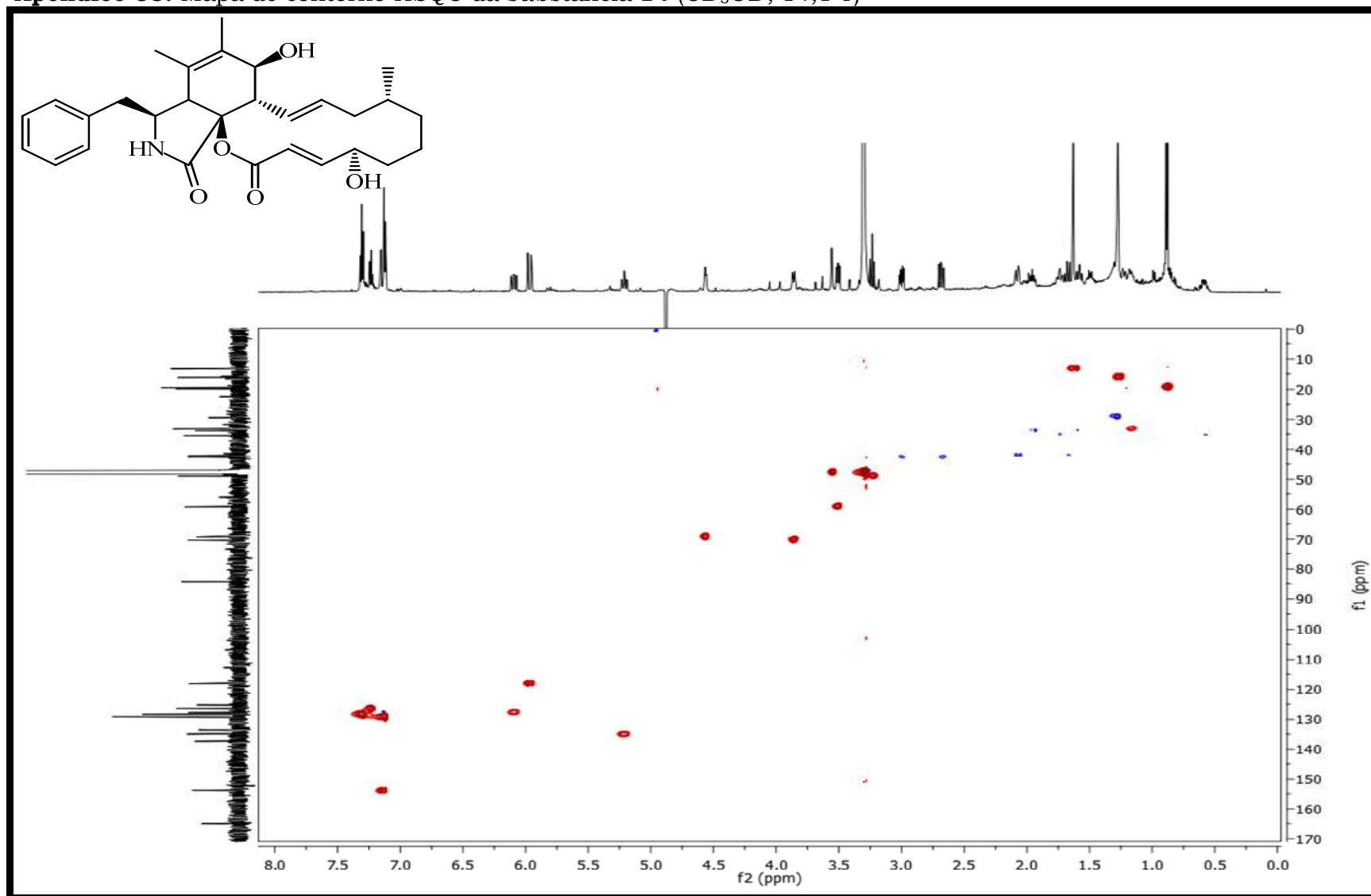
Apêndice 59. Mapa de contorno HMBC da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

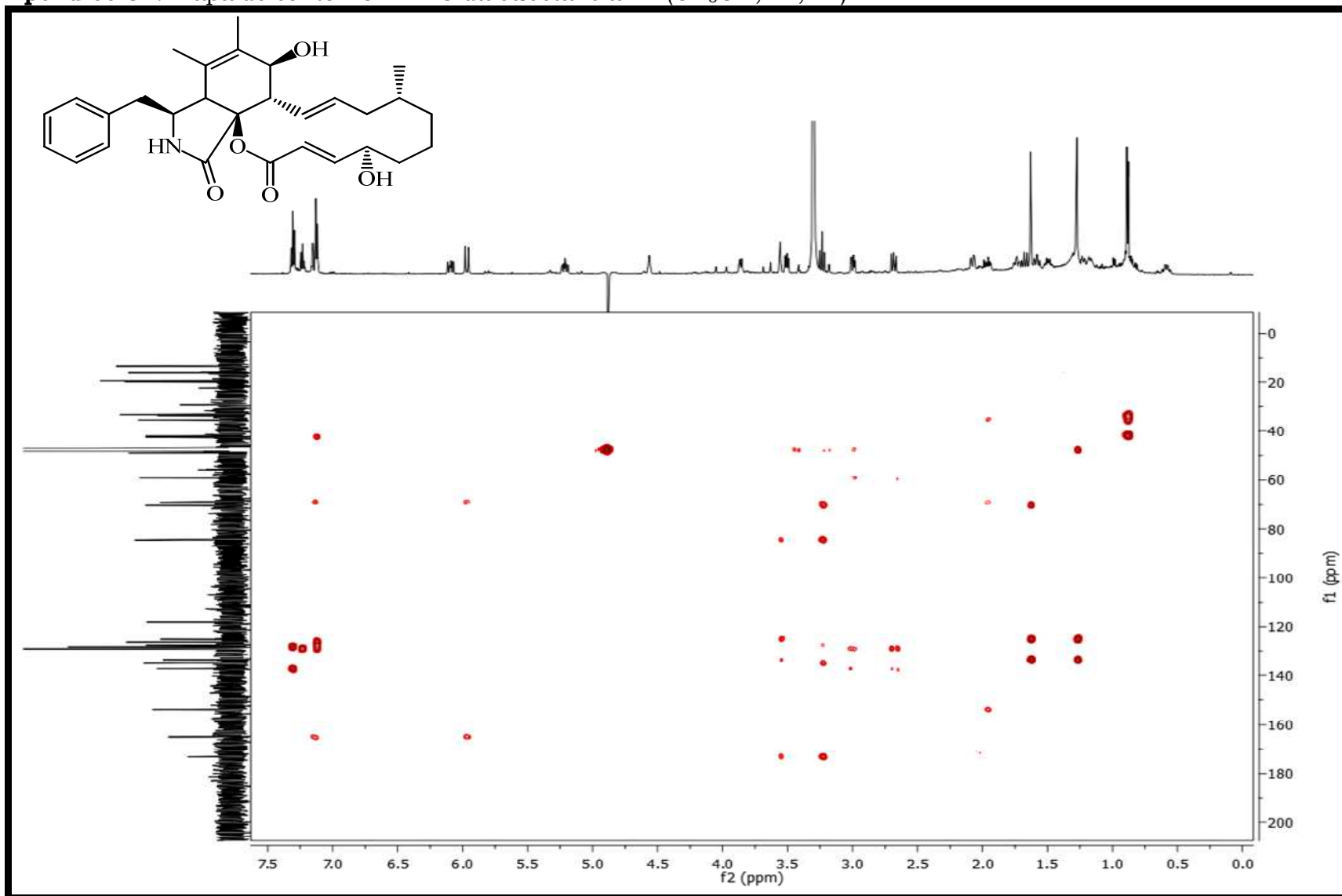
**Apêndice 60.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **14** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



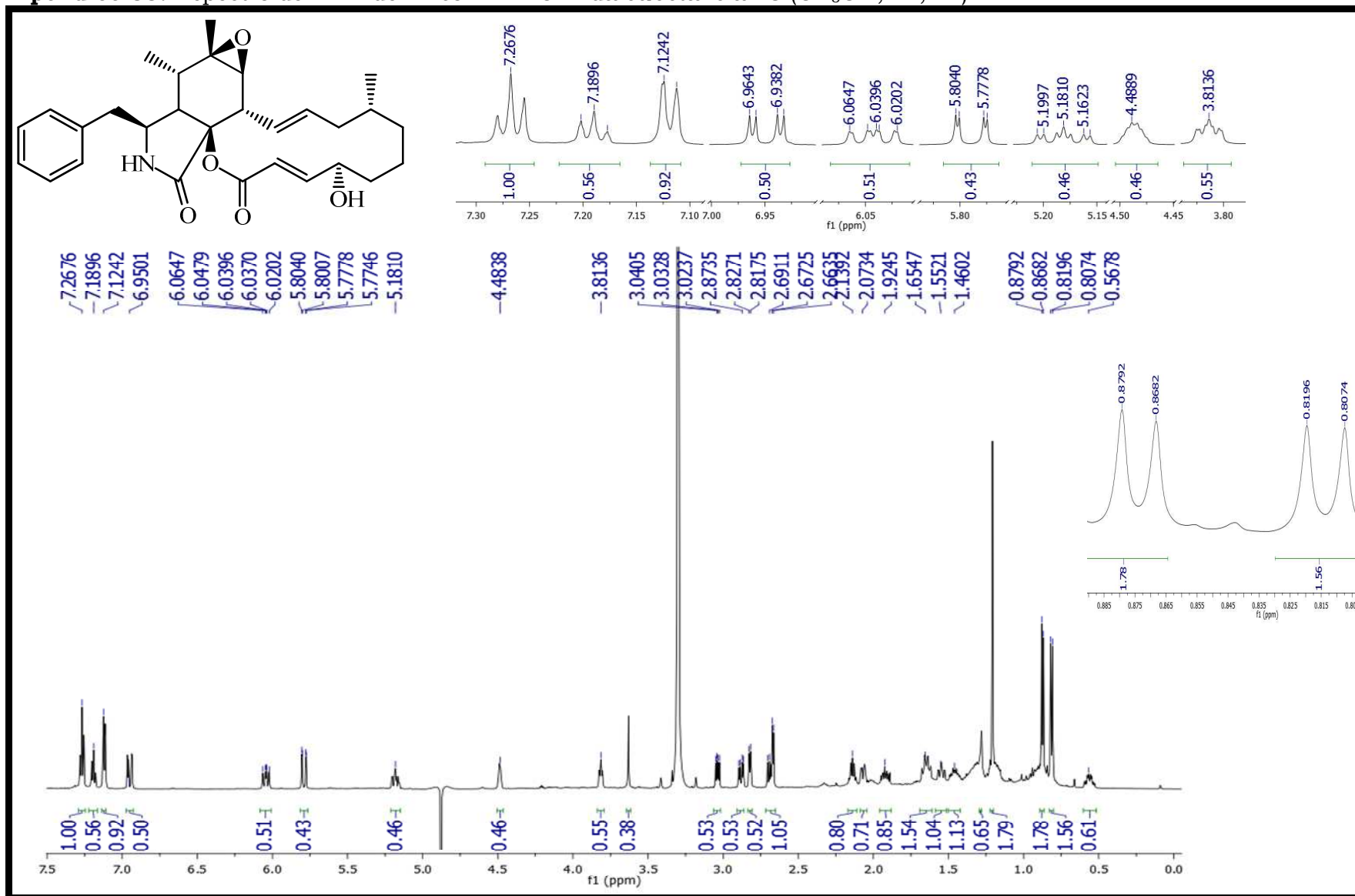
Apêndice 61. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **14** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

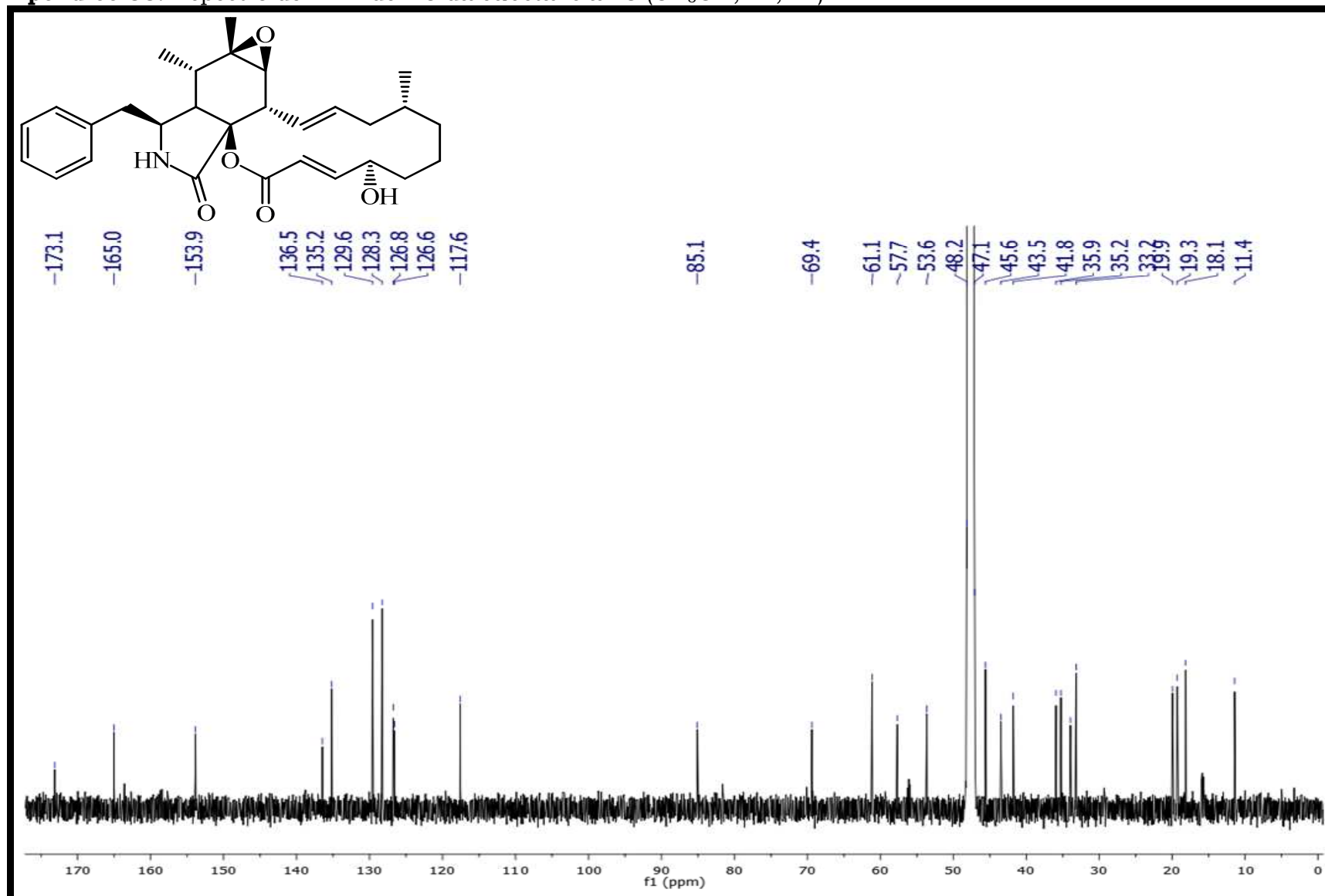
Apêndice 62. Espectro de COSY da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

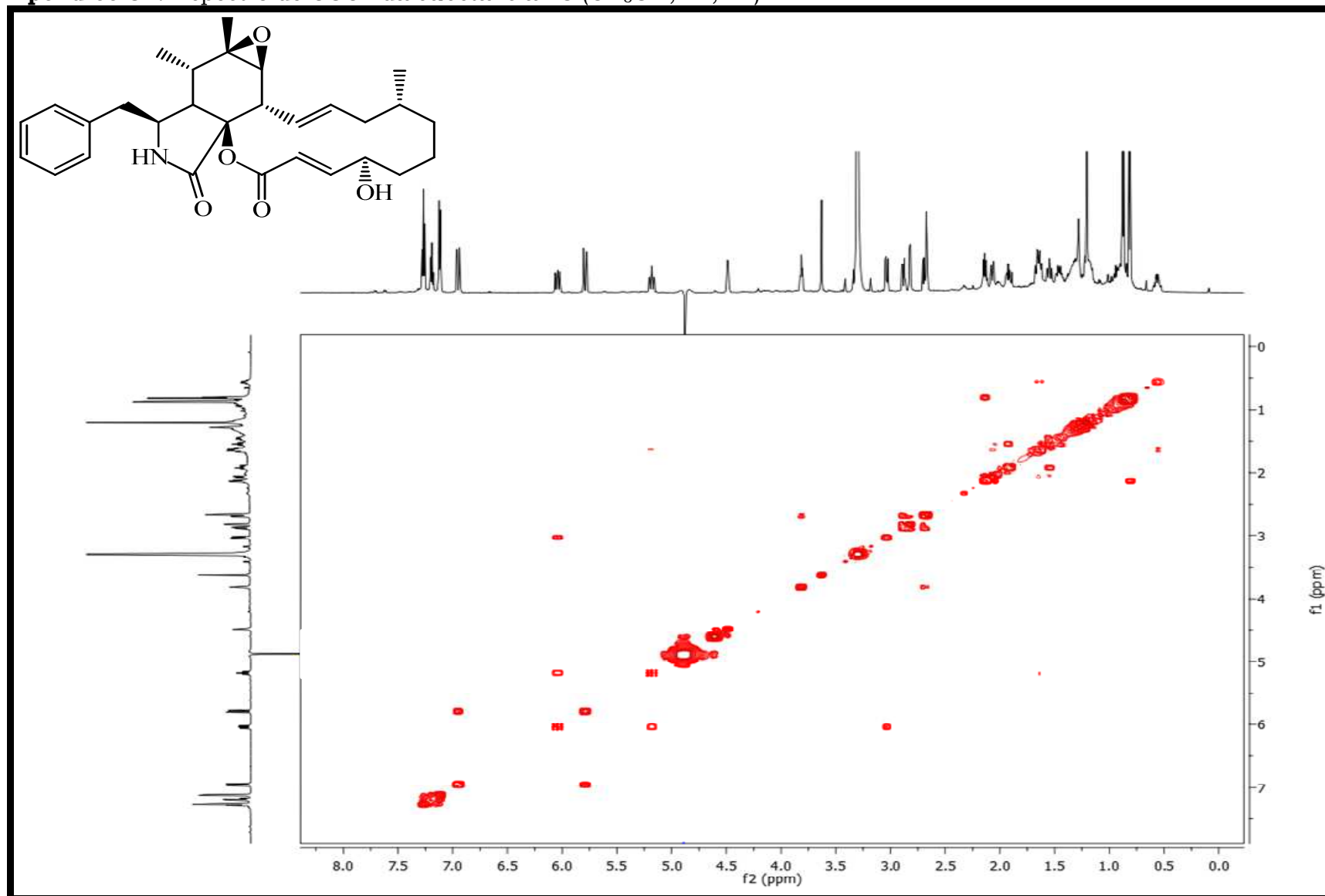
Apêndice 63. Mapa de contorno HSQC da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

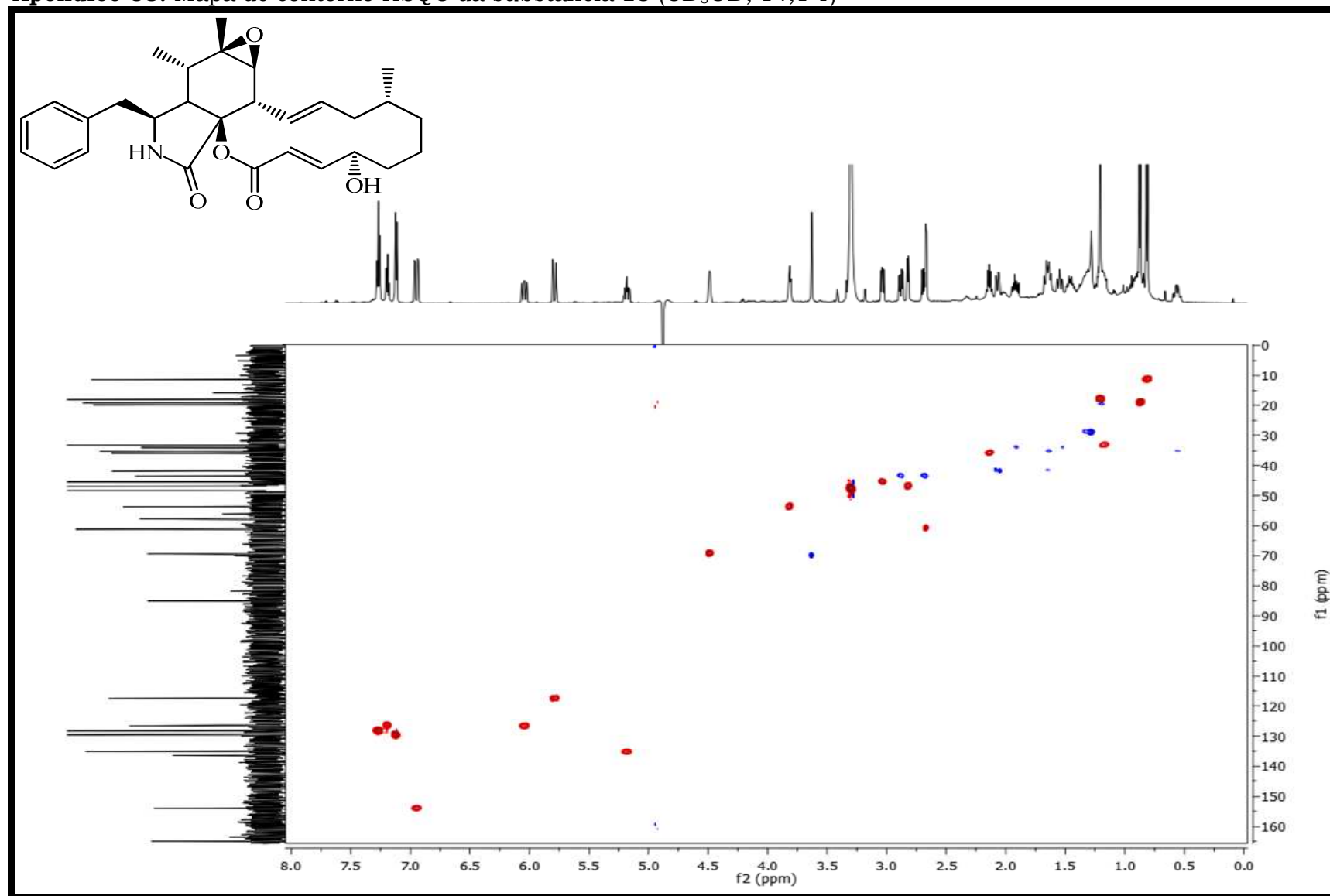
Apêndice 64. Mapa de contorno HMBC da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

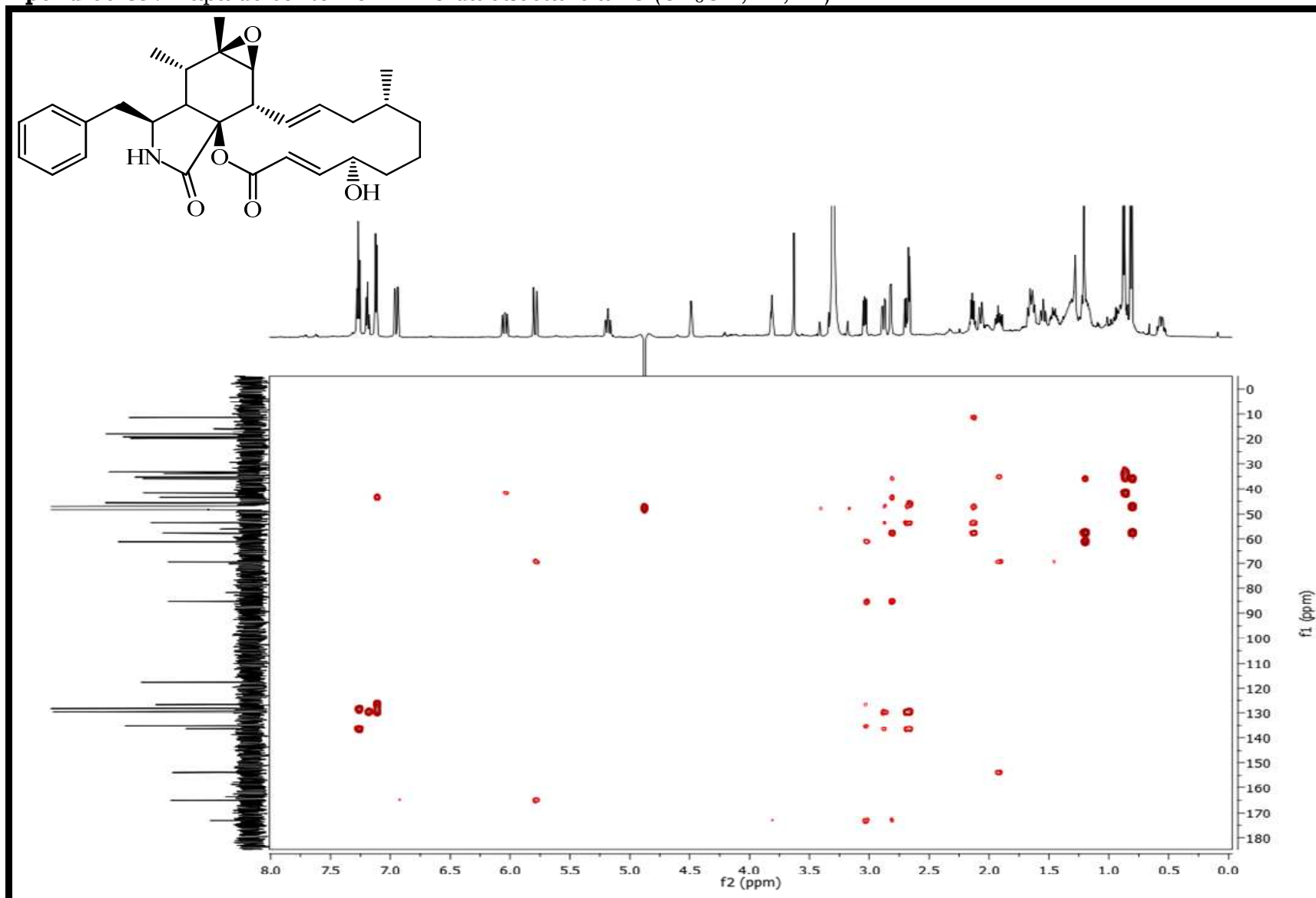
Apêndice 65. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **15** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



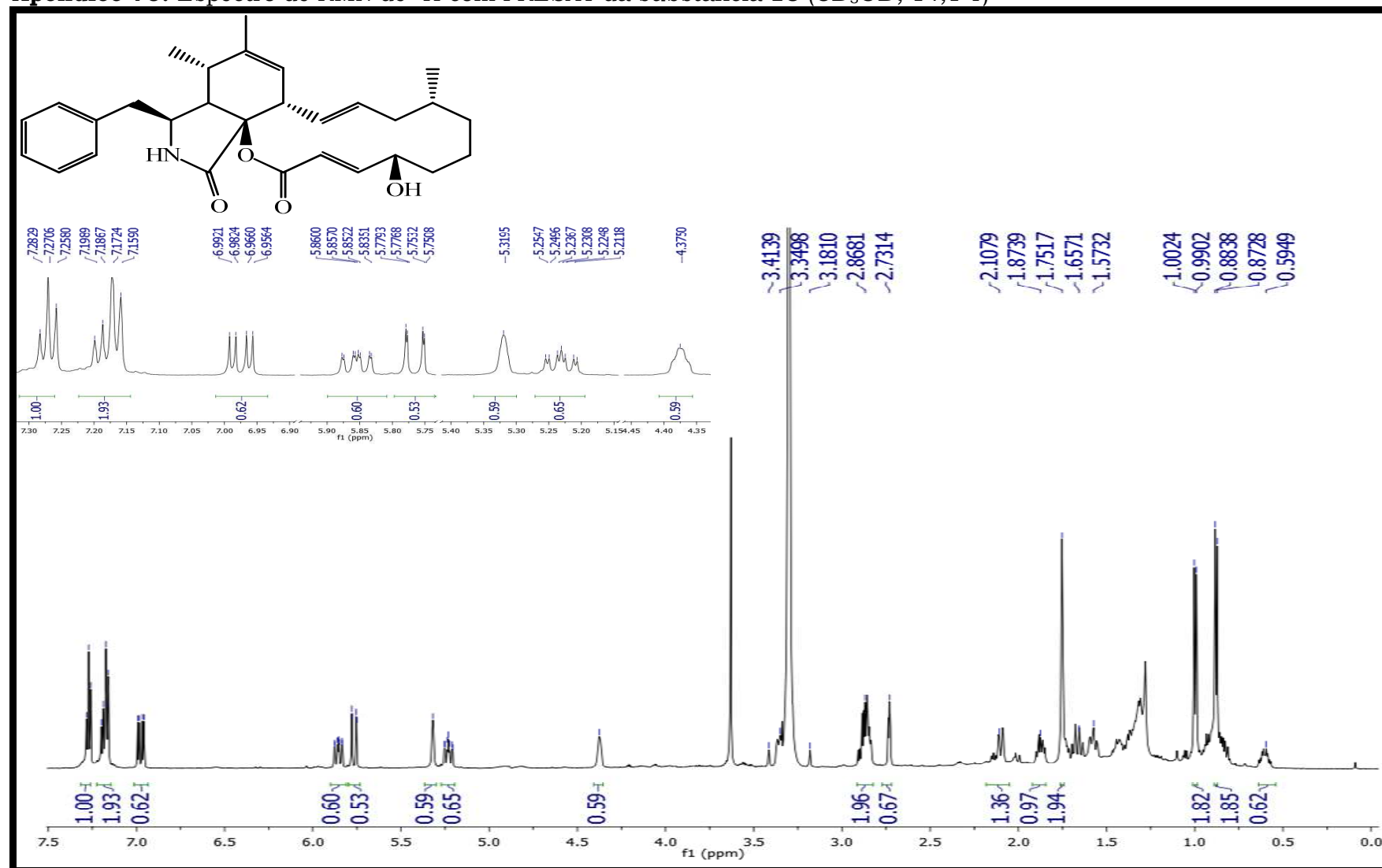
Apêndice 66. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **15** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

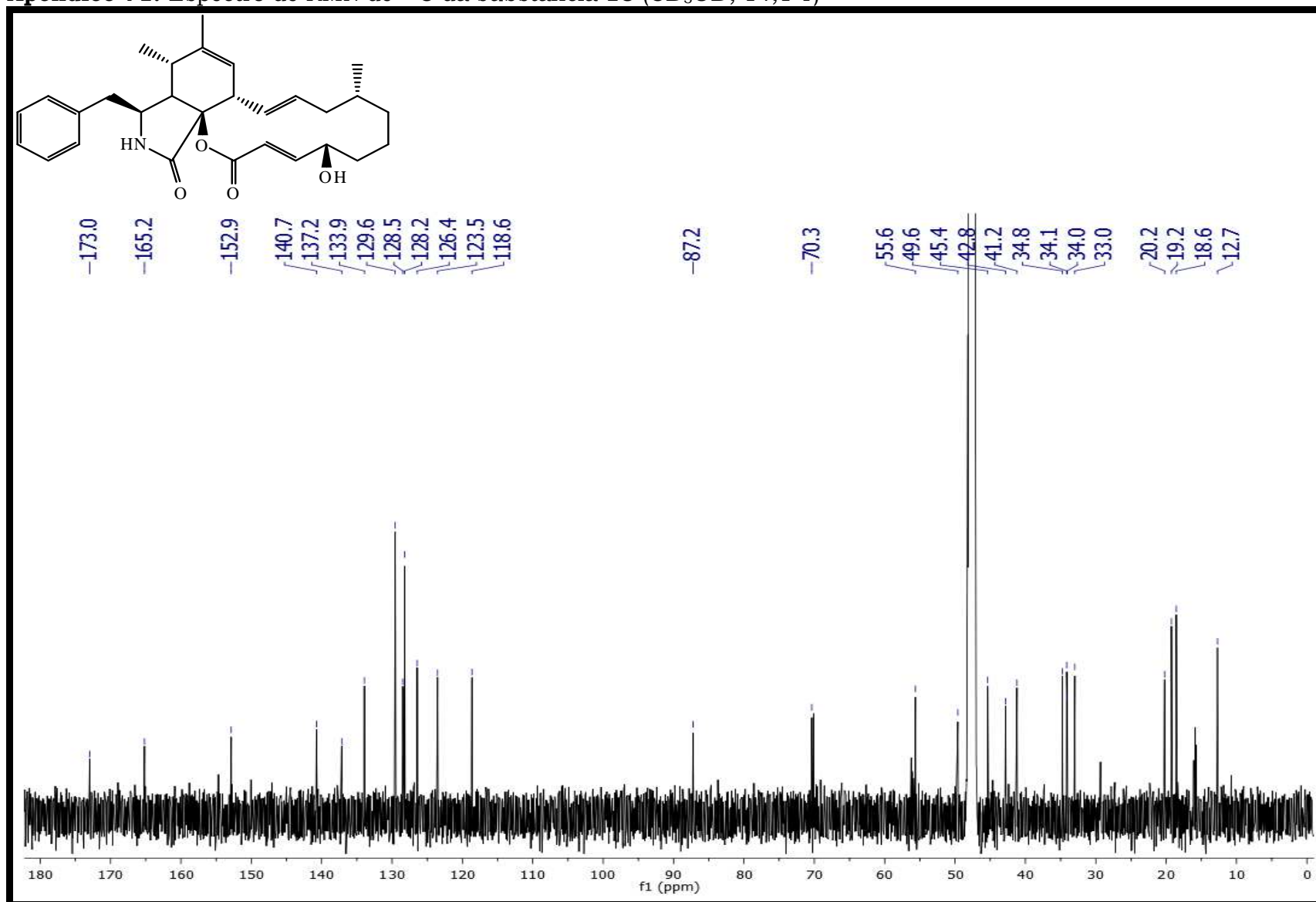
Apêndice 67. Espectro de COSY da substância **15** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

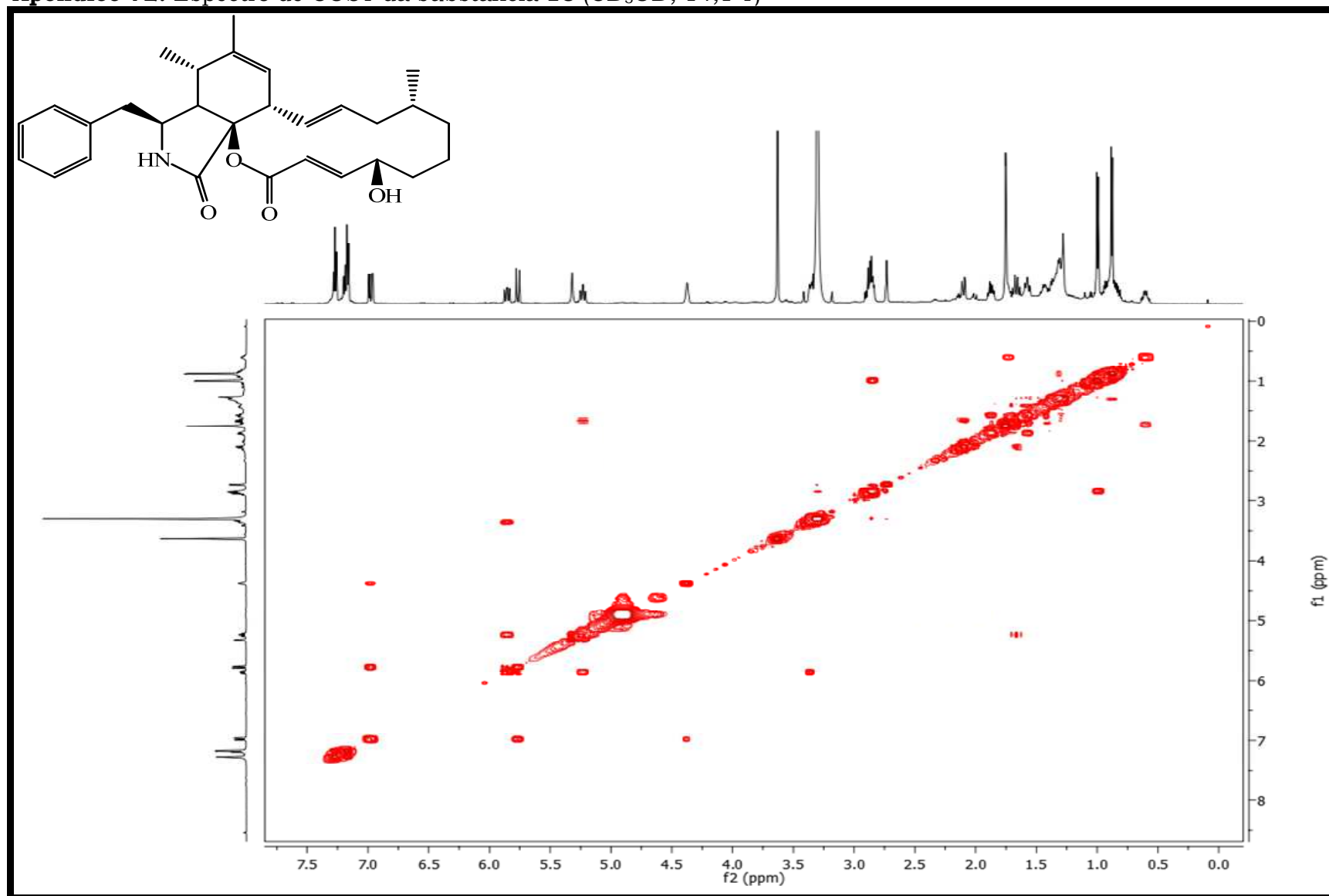
Apêndice 68. Mapa de contorno HSQC da substância **15** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

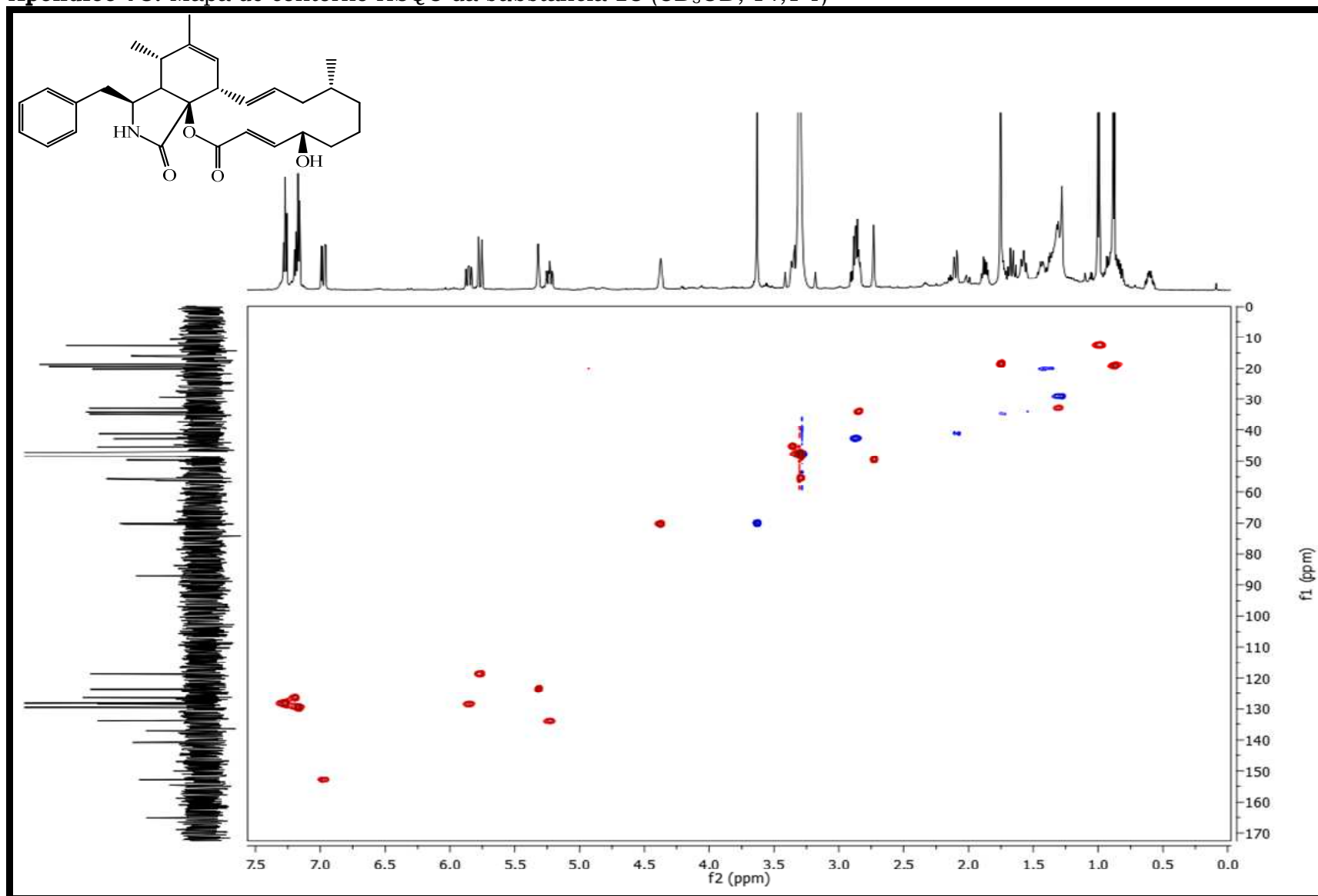
Apêndice 69. Mapa de contorno HMBC da substância **15** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

Apêndice 70. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com PRESAT da substância **16** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)



Apêndice 71. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **16** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 14,1 T)

Apêndice 72. Espectro de COSY da substância **16** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

Apêndice 73. Mapa de contorno HSQC da substância **16** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)

Apêndice 74. Mapa de contorno HMBC da substância **16** (CD<sub>3</sub>OD; 14,1 T)