

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**“Júlio de Mesquita Filho”**

Instituto de Química

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

**Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos  
por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax  
camporum* (Styracaceae).**

Andressa Somensi

Departamento de Química Orgânica

Araraquara

2012

ANDRESSA SOMENSI

**Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos  
por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax  
camporum* (Styracaceae).**

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S693d	<p>Somensi, Andressa Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos por <i>Phomopsis stipata</i>, um endófito de <i>Styrax camporum</i> (Styracaceae) / Andressa Somensi. – Araraquara : [s.n], 2012 97 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Angela Regina Araujo</p> <p>1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Precursores de biocombustíveis. I. Título.</p>
-------	--

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados Pessoais**

**Nome:** Andressa Somensi

**Filiação:** Vilson Luiz Somensi e Josefina Altimira Somensi

**Nascimento:** 21/05/1985 – Toledo – PR

### **Endereço Profissional**

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

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

Endereço eletrônico: [andressasomensi@gmail.com](mailto:andressasomensi@gmail.com)

### **Formação Acadêmica**

**2009**

Graduação: Bacharel em Química.

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Campus Toledo – PR.

Título: Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico da raiz da espécie *Vernonia tweediana* – Baker.

Orientador: Profa. Dra Conceição de Fátima Alves Olguin

Bolsa: Fundação Araucária

**2012**

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica.

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

Dissertação: Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax camporum* (Styracaceae).

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Bolsa: CNPq

### **Produção Bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

- a) DIAZ, G; NOGUEIRA, M A.; OLGUIN, C. F. A.; SOMENSI, A; VIDOTTI, G. J. Estudo Fitoquímico e Biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). Acta Farmaceutica Bonaerense <sup>JCR</sup>, v. 1, p. 56-61, 2008.
- b) OLGUIN, C. F. A.; CARBONESI, L. H.; PERCIO, M. F.; SOMENSI, A. Avaliação da Atividade Biológica de Extratos Fracionados da Raíz da *Vernonia tweediana* Baker. Varia Scientia, v.5, p. 137-143, 2007.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

- a) SOMENSI, A.; RUFINO, M. P.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J; ARAÚJO, A. R. Desreplicação em *Phomopsis stipata*, um fungo endofítico de *Styrax camporum*, por RMN e EM. In: 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia – SP.
- b) CHAPLA, V. M.; SOMENSI, A; CAVALHEIRO, A. J; BOLZANI, V. S; ARAÚJO, A. R. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana*. In: 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia – SP.
- c) Bruna V. C. de Souza, Nyamien Y. Sebastien, Gilmar Baumgartner, Adriana da S. T. Johann, SOMENSI, A., Luiz H. L. Hoff, Ana Paula Ávila, Carolina T. G. Lahoud, Aline R. Z. Soares Monitoramento no

reservatório Salto Santiago/PR dos parâmetros fosforo dissolvido e ortofostato In: XII Congresso Brasileiro de Limnologia, 2009, Gramado, RS. XII Congresso Brasileiro de Limnologia. , 2009.

- d) Thiago Loquete, SOMENSI, A., Ivonete Hoss, Conceição de Fátima A. Olguin, Graziela Braun Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Vernonia tweediana* Backer (Assa-peixe) In: XVI Encontro De Química Da Região Sul, 2008, Blumenau - SC., 2008.
- e) Conceição de Fátima A. Olguin, SOMENSI, A., Gentil J. Vidotti Investigação fitoquímica e avaliação do potencial biológico e alelopático da raiz da espécie *Vernonia tweediana* Baker In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; X International Congress of Ethnopharmacology XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; X International Congress of Ethnopharmacology. , 2008.
- f) SOMENSI, A., Heveline Dal Magro Follmann, Ivonete Hoss, Conceição de Fátima A. Olguin Estudo Fitoquímico Biomonitorada do Extrato Hexânico da Raiz da *Vernonia tweediana* In: XIV Encontro de Química da Região Sul, 2006, Erechim. XIV Encontro de Química da Região Sul. , 2006.
- g) SOMENSI, A., Francieli Polman, Gentil J. Vidotti, Conceição de Fátima A. Olguin Estudo Fitoquímico e Avaliação Alelopática do Extrato Hexânico da Raiz da *Vernonia tweediana* In: II Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e II Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2006, Cascavel , 2006.
- h) SOMENSI, A., Heveline Dal Magro Follmann, Ivonete Hoss, Conceição de Fátima A. Olguin Investigação Fitoquímica Biomonitorada do Extrato Diclorometânico da parte Aérea da *Eichornia crasipis* In: XIV Encontro de Química da Região Sul, 2006, Erechim. XIV Encontro de Química da Região Sul. , 2006.
- i) Francieli Polman, SOMENSI, A., Gentil J. Vidotti, Lidilhone Hamerski Carbonesi, Conceição de Fátima A. Olguin Investigação Fitoquímica do Extrato Hexânico da Raiz da *Eicchorhia Crassispes* In: II Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e II Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2006, Cascavel - Paraná, 2006.

- j) Conceição de Fátima A. Olguin, Lidilhone Hamerski Carbonesi, Maycon F. Percio, SOMENSI, A. Avaliação da Atividade Biológica dos Extratos Fracionados da Raiz da *Vernonia tweediana* Baker In: Encontro Paranaense de Estudantes de Química, 2005, Toledo. Encontro Paranaense de Estudantes de Química. , 2005.
- k) Conceição de Fátima A. Olguin, Lidilhone Hamerski Carbonesi, Maycon F. Percio, SOMENSI, A. Avaliação da Atividade Biológica dos Extratos Fracionados da Raiz da *Vernonia tweediana* baker In: XIII Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis. XIII Encontro de Química da Região Sul. , 2005.
- l) Conceição de Fátima A. Olguin, Gentil J. Vidotti, Graciela L. Heep, Kátia R. Kunzler, SOMENSI, A. Análise dos Constiuintes Químicos Presentes na Raíz da Espécie *Vernonia tweediana* In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava. XII Encontro de Química da Região Sul. , 2004.
- m) SOMENSI, A., Graciela L. Heep, Kátia R. Kunzler Avaliação da Toxicidade a Artemia Salina de Extratos Brutos de Algumas Plantas Medicinais In: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2004, Águas de Lindóia. XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. , 2004.
- n) Conceição de Fátima A. Olguin, SOMENSI, A., Graciela L. Heep, Kátia R. Kunzler, Gentil J. Vidotti Investigação Fitoquímica das Folhas e Caule da *Vernonia tweediana* (assa-peixe) In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava. XII Encontro de Química da Região Sul. , 2004.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

- a) SOMENSI, A., Conceição de Fátima A. Olguin Avaliação do extrato diclorometanico da raiz da espécie *Vernonia tweediana* In: XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica 2009, Londrina/PR. XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica. , 2009.
- b) SOMENSI, A., Conceição de Fátima A. Olguin Investigação

Fitoquímica Biomonitorada do Extrato Acetato de Etila da Raiz da *Vernonia tweediana* In: XVI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2007, Maringá - Paraná. XVI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2007.

- c) SOMENSI, A, Conceição de Fátima A. Olguin, Gentil J. Vidotti. Estudo Fitoquímico Biomonitorado do Extrato Hexânico da Raiz da *Vernonia tweediana* In: XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG, 2006, Ponta Grossa. XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG. , 2006.

## ANDRESSA SOMENSI

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

Araraquara, 22 de junho de 2012.

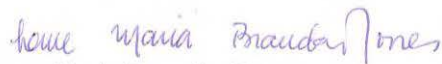
## BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araujo  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



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



Drª Luce Maria Brandão Torres  
Instituto de Botânica – IB, São Paulo - SP

---

*Dedico esta dissertação a minha família, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces da minha história.*

*Ao meu querido namorado Guilherme, por todo amor, paciência, constante incentivo e pela companhia ao longo desta trajetória que levou à concretização deste sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha querida orientadora Profa Dra Angela Regina Araújo, pelo voto de confiança, orientação, dedicação, amizade e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e pessoa que contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

À minha família que sempre me apoiou e contribuiu cada um do seu jeito e com o que podia, para que tudo fosse possível.

Aos queridos sogros, Marcia e Renato por sempre estarem ao meu lado, acompanhando e torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu namorado Guilherme, que sempre esteve ao meu lado dando forças nos momentos difíceis e também nos felizes.

Aos meus amigos de república, Mariana e Leonardo, com quem compartilhei grandes momentos.

Aos amigos que conquistei durante essa trajetória, Aline Coqueiro, Amanda Uliana, Carolina Rabal Biasetto, Gabriel Mazzi, Glauco Pilon dos Santos, Lidiane Gaspareto, Luciene Baccini, Marcelo Tangerina, Miller Pulito Rufino e Renato Abe, simplesmente por estarem ao meu lado e dividirem comigo importantes momentos.

Ao meu amigo-irmão Marcelo Galindo Lahoud, pela amizade sincera e especial, essa que superou a amizade e tornou-se laços de família.

Aos amigos de grupo: Carol, Fernandinho, Vanessa, Juliana, Alana, André, João, Miller, Néia e Júlia pela amizade, discussões, ensinamentos e agradáveis confraternizações.

Em especial quero agradecer ao Miller, Vanessa e Carol, por dedicar seu tempo à ensinar como vencer os obstáculos durante toda essa trajetória, pela amizade e as inúmeras discussões e conselhos.

Ao departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP – Araraquara pela possibilidade da realização deste trabalho.

Aos professores Ian Castro-Gamboa e Ana Helena Janúario que participaram do meu exame de qualificação, que formal ou informalmente me transmitiram valiosos conhecimentos.

Ao meu querido amigo Dr. Nivaldo Boralle, por tudo, pela amizade, paciência, pela experiência e pelos ensinamentos passados a cada experimento de RMN realizado.

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

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

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

*Ou nós encontramos um caminho, ou abrimos um.*

*Anibal*

*A felicidade não está no fim da jornada, e sim  
em cada curva do caminho que percorremos para  
encontrá-la.*

*Érico Veríssimo*

## Resumo

Uma fonte de novas substâncias potencialmente bioativas e úteis como fármacos são os produtos naturais, principalmente os metabólitos oriundos de plantas e microrganismos (fungos, bactérias, actinomicetos). Os fungos endofíticos são microrganismos que residem nos espaços intercelulares das plantas e estabelecem uma interação não-patogênica com a planta. Portanto, o estudo dos endófitos parece ser uma estratégia promissora na obtenção ou identificação e substâncias potencialmente bioativas. *Phomopsis stipata* isolado como endófito da espécie vegetal *Styrax camporum* foi cultivado em diferentes meios de cultivo para se avaliar a produção metabólica e a bioatividade dos extratos brutos obtidos. Com esta avaliação, realizada por RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD, os meios MDB e Milho foram escolhidos para o cultivo de *P. stipata* em escala ampliada. O extrato bruto obtido em MDB foi fracionado utilizando técnicas cromatográficas adequadas fornecendo nove frações, sendo que as frações foram submetidas à desreplicação utilizando a técnica de simulação de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com o auxílio do software MestreNova<sup>®</sup>, e posteriormente a EM. Esta avaliação permitiu a identificação de cinco dicetopiperazinas, que são substâncias que apresentam inúmeras atividades biológicas: a *Rel.ciclo* (Pro-Val), *Rel.ciclo* (Pro-Leu), *Rel.ciclo* (Pro-Phe), *Rel.ciclo* (Pro-Ile) e *Rel.ciclo* (Pro-Tyr) e uma mistura de acilglicerídeos, evidenciando *P. stipata* como um potencial produtor de biocombustíveis. O fungo *P. stipata* também foi cultivado em escala ampliada em milho e o extrato bruto obtido foi fracionado utilizando técnicas cromatográficas apropriadas. Deste fracionamento foi obtido uma mistura de acilglicerídeos, que após análises por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução a Altas Temperaturas (CGARAT) evidenciou a presença de monoacilglicerídeos. Os resultados obtidos até o momento evidenciam *Phomopsis stipata* como um excelente produtor de metabólitos secundários bioativos e com potencial para produção de biodiesel.

**Palavras – chave:** fungos endofíticos, *Phomopsis stipata*, dicetopiperazinas, desreplicação, precursores de biocombustíveis.

## ABSTRACT

One source of new bioactive substances and potentially useful as drugs are the natural products, mainly, the metabolites from plants and microorganisms (fungi, bacteria, actinomycetes). Endophytes are microorganisms that reside in the intercellular spaces of plants and establish a non-pathogenic interaction with the plant. Therefore, the study of endophytes, seems to be a promising strategy for identifying or obtaining potentially bioactive substances. *Phomopsis stipata* isolated as endophytes of the plant *Styrax camporum* was cultivated in different culture medium to evaluate the metabolic production and bioactivity of crude extracts. In this evaluation, carried out by  $^1\text{H}$  NMR and HPLC-DAD, the culture medium of MDB and corn were chosen for the cultivation of *P. stipata* on a large scale. The obtained crude extract was fractionated using MDB suitable chromatographic techniques providing nine fractions, these fractions are subjected to dereplication using simulation technique of NMR spectra of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  with software MestreNova®, and then the MS. This evaluation allowed identification of five diketopiperazines, which are substances that have several biological activities: a *Rel. ciclo* (Pro-Val), *Rel. ciclo* (Pro-Leu), *Rel. ciclo* (Pro-Phe), *Rel. ciclo* (Pro-Ile) and *Rel. ciclo* (Pro-Tyr) and a mix of glycerides, showing *P. stipata* as a potential producer of biofuel. The fungi *P. stipata* was also cultivated on a large scale in corn and the crude extract obtained was fractionated using suitable chromatographic techniques. From this fractionation was obtained a mixture of glycerides, that after analysis by High Resolution Gas Chromatography at High Temperatures (HRGCHT) revealed the presence of monoglycerides. The results obtained until now show *Phomopsis stipata* as an excellent producer of bioactive secondary metabolites and a potential for biodiesel production.

**Keywords:** endophytic fungi, *Phomopsis stipata*, diketopiperazines, dereplication, precursors of biofuels.

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1.</b> Numero de artigos publicados por ano sobre fungos endofíticos.....	31
<b>Figura 2.</b> Substâncias produzidas, em comum, por microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira. ....	33
<b>Figura 3.</b> Paclitaxel isolado de <i>Taxomyces andreanae</i> associado a <i>Taxus brevifolia</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> <i>Styrax camporum</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> <i>Phomopsis stipata</i> .....	36
<b>Figura 6.</b> Substâncias isoladas de <i>Phomopsis stipata</i> .....	38
<b>Figura 7.</b> Esqueleto comum entre as dicetopiperazinas .....	41
<b>Figura 8.</b> Esquema de isolamento de <i>P. stipata</i> . ....	47
<b>Figura 9.</b> Metodologia de obtenção dos extratos brutos em meios comerciais produzidos por <i>P.stipata</i> para avaliação do perfil químico e biológico. ....	48
<b>Figura 10.</b> Metodologia de obtenção do extrato bruto em milho produzido <i>P. stipata</i> para avaliação do perfil químico e biológico. ....	49
<b>Figura 11.</b> Fracionamento do extrato bruto <i>Ps</i> MDB produzido por <i>Phomopsis stipata</i> .....	50
<b>Figura 12.</b> Fracionamento do extrato bruto <i>Ps</i> Milho produzido por <i>P. stipata</i> .51	
<b>Figura 13.</b> Partição da fração <i>Ps</i> Fr06-10.....	52
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos de <i>P. stipata</i> em diferentes meios de cultivo (peq. escala) em 254 nm. ....	57
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>P. stipata</i> em YM peq. escala (DMSO-d <sub>6</sub> , 500 MHz). ....	58

<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>P. stipata</i> em Czapek peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).....	59
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>P. stipata</i> em Nutrient peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).....	59
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>P. stipata</i> em Extrato de Malte peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz). ....	60
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>P. stipata</i> em MDB peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).....	60
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto de <i>P. stipata</i> em Milho peq. escala ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz). ....	61
<b>Figura 21.</b> Reação de redução do reagente MTT em azul de formazana. ....	62
<b>Figura 22.</b> Mecanismo da reação do radical DPPH como antioxidante .....	63
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto MDB produzido por <i>P. stipata</i> escala ampliada (DMSO- $\text{d}_6$ 500 MHz).....	64
<b>Figura 24.</b> Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto MDB de <i>P. stipata</i> em MDB escala ampliada em $\lambda = 254$ nm.....	65
<b>Figura 25.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ das frações: <i>Ps</i> MDB Fr01(1), <i>Ps</i> MDB Fr02(2), <i>Ps</i> MDB Fr03(3), <i>Ps</i> MDB Fr04(4), <i>Ps</i> MDB Fr05(5), <i>Ps</i> MDB Fr06(6), <i>Ps</i> MDB Fr07(7), <i>Ps</i> MDB Fr08(8) e <i>Ps</i> MDB Fr09(9).....	66
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato bruto milho produzido por <i>Phomopsis stipata</i> escala ampliada ( $\text{CDCl}_3$ 500 MHz).....	67
<b>Figura 27.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ das frações: <i>Ps Milho</i> Fr01(1), <i>Ps Milho</i> Fr02(2), <i>Ps Milho</i> Fr03(3), <i>Ps Milho</i> Fr04(4), <i>Ps Milho</i> Fr05(5), <i>Ps Milho</i> Fr06(6), <i>Ps Milho</i> Fr07(7), <i>Ps Milho</i> Fr08(8), <i>Ps Milho</i> Fr09(9) e <i>Ps Milho</i> Fr10(10).....	68
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração <i>Ps</i> .Fr06-10 $\text{CH}_3\text{CN}$ . ....	69

<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das frações <i>Ps.Fr06-10CH<sub>3</sub>CN</i> e Branco (obtida da extração do milho sem a inoculação do endófito) em $\text{CDCl}_3$ .....	70
<b>Figura 30.</b> Substâncias identificadas por desreplicação .....	72
<b>Figura 31.</b> Substâncias encontradas na fração <i>Ps-MDB Fr03</i> .....	73
<b>Figura 32.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Tyr) com o espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração <i>PsMDB Fr03</i> . .....	74
<b>Figura 33.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Tyr) com o espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração <i>PsMDB Fr03</i> . .....	75
<b>Figura 34.</b> Substâncias encontradas na fração <i>Ps-MDB Fr04</i> .....	76
<b>Figura 35.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Ile) com o espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração <i>PsMDB Fr04</i> . .....	77
<b>Figura 36.</b> Substância encontrada na fração <i>Ps-MDB Fr05</i> .....	78
<b>Figura 37.</b> Projeção do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe)com o espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração <i>PsMDB Fr05</i> . .....	79
<b>Figura 38.</b> Cromatograma dos padrões - ASTM.....	82
<b>Figura 39.</b> Cromatograma da fração <i>Ps MDB Fr09 + MSTFA</i> .....	83
<b>Figura 40.</b> Ampliação do cromatograma da fração <i>Ps MDB Fr09 + MSTFA</i> , na região dos monoacilglicerídeos. ....	83
<b>Figura 41.</b> Ampliação do cromatograma da fração <i>Ps MDB Fr09 + MSTFA</i> , na região dos triacilglicerídeos. ....	83
<b>Figura 42.</b> Cromatograma da fração [ <i>Ps.Fr06-10ACN</i> ] + MSTFA .....	84
<b>Figura 43.</b> Ampliação do cromatograma da fração [ <i>Ps.Fr06-10ACN</i> ] + MSTFA, na região dos monoacilglicerídeos. ....	84
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração <i>Ps MDB Fr 03</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).....	92

<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 03 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	92
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 04 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	93
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 04 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	93
<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 05 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	94
<b>Figura 49.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 05 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	94
<b>Figura 50.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Val), $m/z = 197,68$ .....	95
<b>Figura 51.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Leu), $m/z = 211,5$ .....	95
<b>Figura 52.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe), $m/z = 245,94$ . ....	95
<b>Figura 53.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Tyr), $m/z = 261,32$ .....	96
<b>Figura 54.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 04 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Leu), $m/z = 211,47$ .....	96
<b>Figura 55.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 04 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe), $m/z = 245,68$ . ....	96
<b>Figura 56.</b> Espectro de Massas da Fração <i>Ps</i> MDB Fr 05 evidenciando o íon protonado da <i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe), $m/z = 245,72$ . ....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Meios de cultivo para o fungo endofítico <i>P. stipata</i> .....	43
<b>Tabela 2.</b> Programação de temperatura da coluna cromatográfica. ....	45
<b>Tabela 3.</b> Outros equipamentos utilizados no decorrer do trabalho.....	46
<b>Tabela 4.</b> Massa dos extratos brutos obtida dos meios de cultivo líquido e sólido de <i>Phomopsis stipata</i> .....	56
<b>Tabela 5.</b> Resultados da atividade antitumoral em extratos brutos em pequena escala de <i>P. stipata</i> diferentes meios de cultura. ....	62
<b>Tabela 6.</b> Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr03. ....	76
<b>Tabela 7.</b> Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr04. ....	77
<b>Tabela 8.</b> Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr05. ....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
Ala	Alanina
ASTM	American Standard Testing Methods
BDA	Batata dextrose ágar
C18	Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CGRA	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$\text{CH}_3\text{CN}$	Acetonitrila
$\text{CH}_3\text{OH}$	Metanol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DPM	Desvio padrão médio
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazina

EM	Especrometria de massas
ESI-EM	Espectrometria de massas – Ionização por Electrospray
EtOH	Etanol
Ext.	Extrato
Fr	Fração
H <sub>2</sub> O	Água
Hex	Hexano
Ile	Isoleucina
IQ/Ar	Instituto de Química de Araraquara
Leu	Leucina
MDB	Meio de Dextrose e Batata
mg/g	miligramas / grama
MHz/Hz	Megahertz / hertz
Min	Minutos
mL	mililitros
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida)
MTT	3-(4,5 dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo
NuBBE	Núcleo de Bioensaios. Biossíntese e Ecofisiologia de
Produtos Naturais	
NaClO	Hipoclorito de sódio

nm	nanômetro
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por milhão
PDA	Potato-Dextrose-Agar
Ps	<i>Phomopsis stipata</i>
SC	<i>Styrax camporum</i>
Pro	Prolina
Rel	Relativa
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
t. a.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
YM	Yeast Medium

## LISTA DE SIMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu$	Micro
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M-H]^-$	Molécula desprotonada
J	Constante de acoplamento
$m/z$	Relação massa-carga

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	28
1.1 Fungos como fontes de substâncias bioativas .....	28
1.2 Fungos endofíticos e suas associações com a planta hospedeira .....	30
1.2 Espécie vegetal hospedeira: <i>Styrax camporum</i> (Styracaceae).....	34
1.3 Endófito: <i>Phomopsis stipata</i> .....	36
1.4 Novas aplicações de fungos endofíticos.....	39
1.5 Desrepliação .....	40
1.6 Diketopiperazinas .....	41
2. Objetivos .....	42
3 Materiais e Métodos .....	43
3.1 Materiais. ....	43
3.1.1 Meios de cultivo.....	43
3.1.2 Solventes .....	43
3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) .....	44
3.1.4 Cromatografia em coluna (CC) .....	44
3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Aranjio de Diodo (CLAE-DAD). ....	44
3.1.6 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR).....	45
3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C).....	45
3.1.8 Espectrometria de Massas .....	45

3.1.9 Outros equipamentos.....	46
3.2 Métodos.....	46
3.2.1 Obtenção das cepas fúngicas.....	46
3.2.2 Cultivo do endófito <i>P. stipata</i> em escala reduzida em diferentes meios de cultivo e a obtenção dos extratos brutos.....	48
3.2.3 Cultivo de <i>P. stipata</i> em escala ampliada e obtenção do extrato bruto em MDB.....	50
3.2.4 Cultivo de <i>Phomopsis stipata</i> em escala ampliada e obtenção do extrato bruto em milho.....	51
3.2.5 Partição da fração Ps Fr06-10.....	52
3.2.6 Análise direta de mono, di e triacilglicerídeos em frações produzidas por <i>Phomopsis stipata</i> por cromatografia gasosa de alta resolução: resolução ASTM 6540.....	52
3.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos de <i>P. stipata</i> ..	53
3.3.1 Avaliação do potencial citotóxico*.....	53
3.3.2 Atividade sequestradora de radicais livres: DPPH.....	53
4.1 Avaliação dos extratos brutos obtidos em diferentes meios de cultivo do fungo <i>P. stipata</i> .....	55
4.1.1 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos (em escala reduzida) em CLAE-DAD.....	56
4.1.2 Perfil químico dos extratos brutos obtidos em escala reduzida por RMN de <sup>1</sup> H.....	57

4.2 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos do endófito <i>P. stipata</i> .....	61
4.2.1 Avaliação do potencial citotóxico .....	61
4.2.2 Avaliação da atividade antioxidante .....	63
4.3 Aspectos gerais da avaliação do extrato bruto obtido em MDB do cultivo em escala ampliada do fungo <i>Phomopsis stipata</i> .....	64
4.3 Aspectos gerais da avaliação do extrato bruto obtido em milho do cultivo em escala ampliada do fungo <i>P. stipata</i> .....	66
4.4 Desreplicação nas frações obtidas do extrato bruto obtido de MDB. ....	70
4.4.1 Desreplicação fração Ps-MDB Fr03 .....	72
4.4.2 Desreplicação fração Ps-MDB Fr04 .....	76
4.2.3 Desreplicação fração Ps-MDB Fr05 .....	78
4.3 Prospecção de acilglicerídeos em <i>Phomopsis stipata</i> .....	80
5. CONCLUSÕES .....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS .....	91

# 1. Introdução

## 1.1 Fungos como fontes de substâncias bioativas

Os fungos estão entre os organismos mais importantes do planeta, não só por suas funções nos diferentes ecossistemas, mas também pela influência sobre os seres humanos em relação às atividades cotidianas, como produção de alimentos, na indústria farmacêutica, produção de medicamentos, dentre outras (MUELLER; SCHMIT, 2007).

Em geral, os fungos podem se apresentar na forma de duas unidades morfológicas básicas: a leveduriforme e a hifal. Têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e, portanto necessitam de material orgânico para sobreviver, sendo a sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são produzidas por eles e degradam produtos como, celulose e amido. (AZEVEDO, 2010).

Embora fungos estejam entre os organismos mais importantes do planeta, apenas informações limitadas e incompletas estão atualmente disponíveis para a maioria das espécies e as estimativas atuais sobre o número de espécies de fungos diferem significativamente. Dentre as citações mais usadas, destaca-se a Hawksworth (2001) com estimativas de cerca de 1,5 milhões de espécies, sendo que menos de 5% foram descritos. Excluindo os insetos, fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes (AZEVEDO, 2010). Se entre esses 5% de espécies, já existem muitas de grande importância, como as que entram na fabricação de ácidos orgânicos, fármacos, alimentos, incluindo bebidas e inúmeros outros produtos, a projeção de resultados pela descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico, é promissora (AZEVEDO, 2010).

Com o aumento da população mundial com doenças como câncer, AIDS, infecções respiratórias, doenças provocadas por protozoários, fungos e bactérias resistentes a medicamentos usuais, aliado ao fato inegável da crescente expansão da degradação do meio ambiente e da perda da biodiversidade, intensificaram as pesquisas por novas drogas mais eficazes. (GUO, et. al, 2008). Dentro deste

contexto, os fungos destacam-se como uma fonte promissora na produção de substâncias potencialmente bioativas e portanto candidatas a novos fármacos.

A busca por substâncias bioativas produzidas por microrganismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de planta. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Esta descoberta levou pesquisadores acadêmicos e de companhias farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de microrganismos, e esta busca produtiva resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (GALLO et al., 2008).

É importante ressaltar que os microrganismos são recursos renováveis e a sua produção de substâncias potencialmente bioativas em escala ampliada pode ser realizada usando a tecnologia existente, como a variação do meio e otimização das condições de cultivo. Como exemplo, a manipulação no meio de cultura do *Penicillium notatum*, que resultou em um aumento de 6000 vezes na produção da penicilina (DEMAIN, 2000).

De todos os microrganismos estudados, os fungos têm sido reconhecidos como um dos mais prolíficos produtores de metabólitos secundários bioativos. Tem sido sugerido que os fungos são fundamentais para a saúde e prosperidade de todos os ecossistemas terrestres, sendo essenciais para sua sustentabilidade e biodiversidade (GUNATILAKA, 2006).

As condições do ambiente têm profunda influência sobre o crescimento dos fungos (temperatura ~ 25°C, pH ligeiramente ácido, condições aeróbicas ou anaeróbicas) (ALCANO, 1994), e estes podem ocupar diversos nichos ecológicos, como plantas (epifíticos e endofíticos), animais, fungos (micoparasitas), geleiras e vulcões (extremófilos), desertos, entre inúmeros outros.

Dentro todas as classes de fungos, os endofíticos merecem destaque, uma vez que produzem estruturas moleculares inéditas e biologicamente ativas, com diversidade estrutural elevada (GUO, 2008, GALOO, 2008, GUNATILAKA, 2006).

## 1.2 Fungos endofíticos e suas associações com a planta hospedeira

Desde a descoberta dos endofíticos em Darnel, Alemanha, em 1914, vários cientistas têm definido os endofíticos de diferentes formas. Por definição, estes microrganismos residem nos espaços intracelulares dos tecidos das plantas hospedeiras (STROBEL, 2002) e podem ser detectados em um momento particular associado aos tecidos em uma espécie vegetal estabelecendo uma interação não patogênica (SCHULZ; BOYLE, 2005). Colonizam os tecidos intra ou intercelular da planta hospedeira durante sua vida toda ou parte dela, sem causar sintomas aparentes de doenças, sendo transmitidos, em alguns casos para futuras gerações e podem estar presentes em todos os órgãos (STROBEL, et al., 2004; ZIKMUNDOVÁ, et al., 2002; TAN; ZUO, 2001).

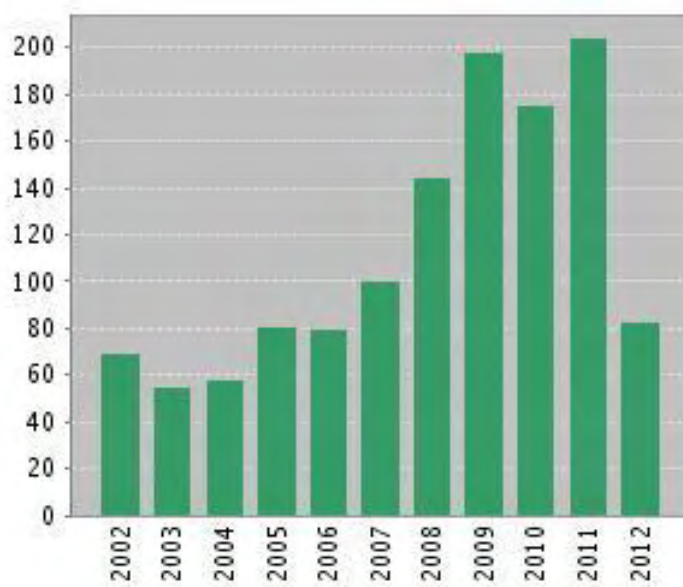
Os endófitos se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. Distinguem-se dos microrganismos epifíticos, que residem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Logo, um endófito, coloniza o interior de uma espécie hospedeira de acordo com as condições ambientais e o próprio estado fisiológico da planta e pode ser considerado um patógeno latente. Assim, a natureza da associação entre os fungos endofíticos e seus hospedeiros varia de parasitismo ou antagonismo a comensalismo ou simbiose (AZEVEDO, 2010).

A simbiose entre planta e endofítico pode ser observada pela proteção e alimentação do fungo que, em contrapartida, produz substâncias bioativas (hormônios reguladores de crescimento, antibacterianos, antibióticos, antifúngicos, antivirais, inseticidas, etc.) que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (LU, et al., 2000; TAN; ZOU, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005). Assim, novas atenções vêm sendo dadas para a química e bioatividade dos metabólitos dos endofíticos, e também para sua biodiversidade e funções ecológicas (TAN; ZOU, 2001).

Segundo Aly (2011), produtos naturais bioativos de fungos endofíticos, isolados de plantas superiores, estão atraindo considerável atenção dos químicos de produtos naturais e biólogos, como indicado pelo aumento constante de publicações dedicadas a este tema nos últimos anos (113 artigos de pesquisa sobre metabólitos secundários de fungos endofíticos no período de 2008-2009, 69 em 2006-2007, 36 em 2004-2005, 14 em 2002 - 2003, e 18 em 2000-2001).

Uma pesquisa realizada na base de dados Web of Science mostrou que nos últimos 10 anos foram publicados, somente de fungos endofíticos, cerca de 1981 artigos científicos, esse dado pode ser melhor visualizado na (Pesquisa realizada em 23 de maio de 2012).

**Figura 1.** Numero de artigos publicados por ano sobre fungos endofíticos



(Fonte: Web of Science)

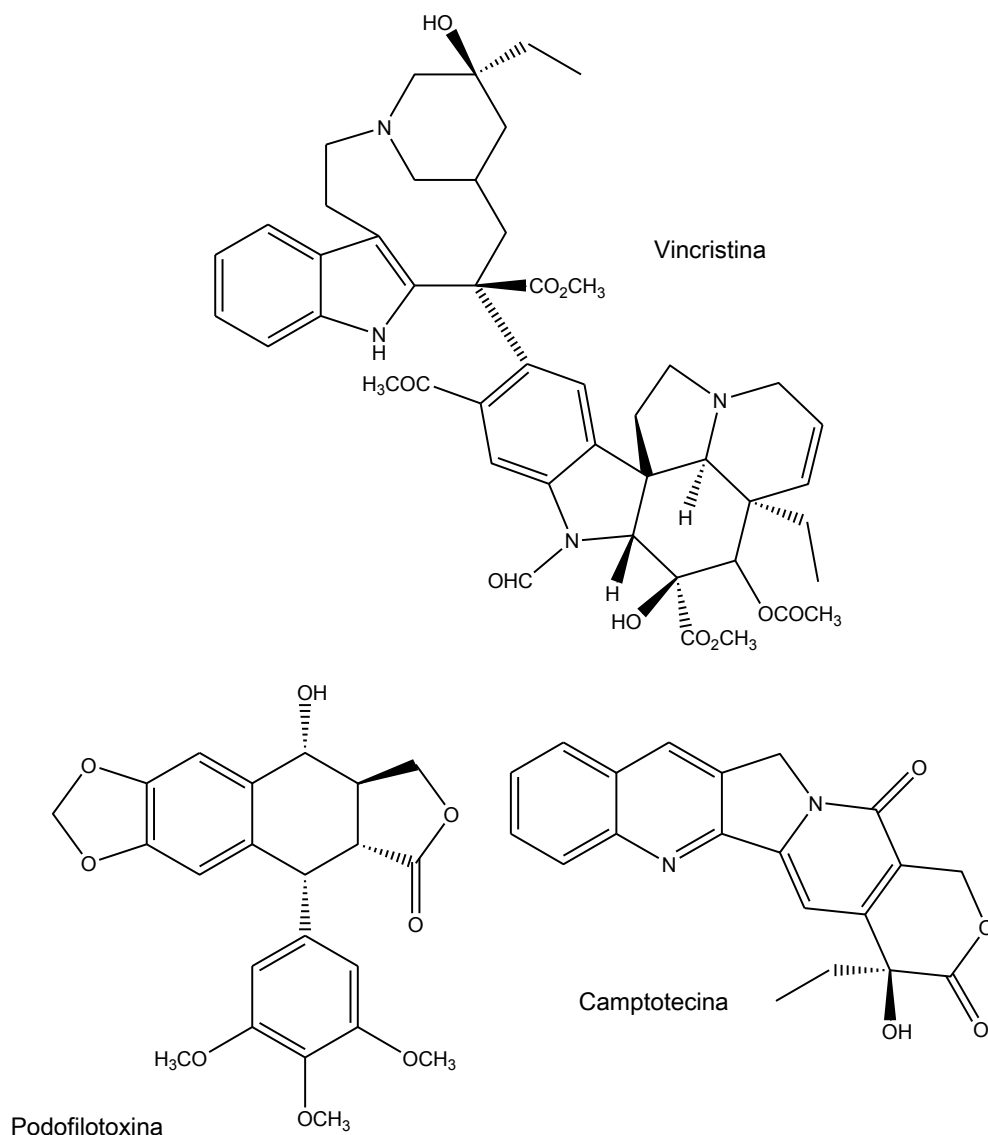
Fungos endofíticos têm atraído especial atenção nas últimas décadas por muitas razões, mas, em especial por terem sido isolado praticamente de todas as espécies plantas estudadas, como algas, musgos, samambaias, coníferas, angiospermas, gramíneas, palmeiras, e uma variedade de dicotiledôneas (ARNOLD, 2000). Existem relatos de endófitos sendo isolados de plantas crescendo em diferentes ambientes como pastagens, florestas tropicais, manguezais e áreas agricultáveis (AZEVEDO, 2010) e por se encontrarem em interação mutualística com a planta hospedeira, que proporciona nutrientes e proteção para o fungo e recebe em troca compostos químicos, que resultam em benefícios para a proteção da planta hospedeira (AZEVEDO, 2010). Esta relação sugere a produção de metabólitos bioativos para a proteção da espécie hospedeira.

Cada uma das 300 mil espécies de plantas existentes é hospedeira de um ou mais microrganismos endofíticos e raras delas têm sido completamente estudadas com relação à sua microbiota endofítica. Conseqüentemente torna-se

grande a oportunidade de descobrir novos e interessantes microrganismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas (STROBEL, 2004).

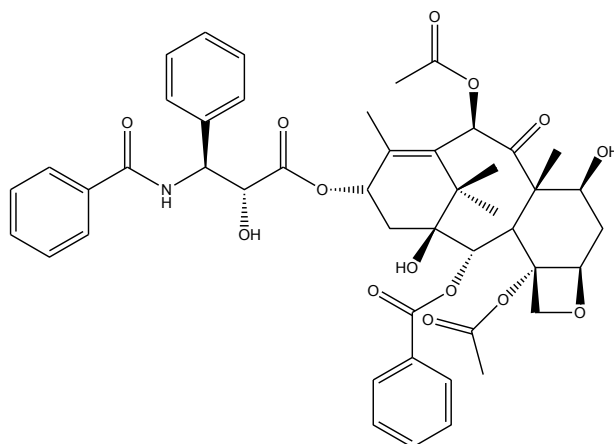
Estudos demonstram que os fungos endofíticos são capazes de produzir uma série de substâncias bioativas naturais importantes, até então apenas conhecidos de plantas, como a vincristina (YANG, et al., 2004), podofilotoxina (PURI, 2006) e a camptotecina (PURI, et al., 2005) (**Figura 2**) aumentando assim o potencial de utilização destes microrganismos como fontes alternativas de metabólitos bioativos (PRITI, et al., 2009). Endófitos podem ter contribuído com seus hospedeiros, produzindo metabólitos para a defesa química destes ou pode ter transmitido genes para a planta produzir os metabólitos de defesa ou vice-versa (WINK, 2008).

**Figura 2.** Substâncias produzidas, em comum, por microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira.



Diversos trabalhos demonstram o potencial dos fungos endofíticos para a produção de substâncias bioativas, como um exemplo clássico a obtenção do paclitaxel (**Figura 3**) produzido por *Taxomyces andreanae* associado a *Taxus brevifolia*, que é um antitumoral de alto valor comercial (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

**Figura 3.** Paclitaxel isolado de *Taxomyces andreanae* associado a *Taxus brevifolia*.



É importante mencionar que, no período de 2008-2009 pesquisas com fungos endofíticos levou à descoberta de mais de 100 novas substâncias, quase o mesmo número de novas substâncias foi relatado para o período de 2000 -2007, a crescente bioprospecção de fungos endofíticos nos últimos anos (ALY, 2011).

A necessidade pela busca de substâncias de interesse para a utilização na agricultura e na indústria (principalmente na alimentícia e farmacêutica) e a constatação da diversidade metabólica apresentada pelos fungos endofíticos, estimula o estudo deste nicho de microrganismos, uma vez que em países tropicais, como o Brasil, ainda existe um enorme potencial a ser explorado, tanto do ponto de vista de plantas tradicionalmente cultivadas, como nativas e endêmicas de áreas do cerrado, caatinga, mangue, mata atlântica e floresta tropical (AZEVEDO, 2010).

### 1.2 Espécie vegetal hospedeira: *Styrax camporum* (Styracaceae)

Styracaceae é composta por onze gêneros distribuídos na Europa, Ásia, trópicos e subtropicais americanos. São conhecidas cerca de 160 espécies nesta família, estando bem representadas no Brasil (PAULETTI et al., 2006). Em alguns gêneros de Styracaceae, na qual se inclui *Styrax*, predominam substâncias de natureza resinosa e balsâmica, que possuem o ácido benzóico como principal componente. Essas substâncias, muito utilizadas na medicina popular, foram denominadas como “benjoin”, “estoraque”, dentre outros. Há algumas décadas o “benjoin” está registrado na farmacopéia (REYNOLDS, 1996), sendo indicado como

fitoterápico para casos de formigamento e bronquites devido às ações anti-séptica, cicatrizante, dentre outras (COIMBRA, 1958).

O principal gênero de Styracaceae é *Styrax* com cerca de 60 espécies registradas (GILG,1926). Algumas espécies destacam-se por apresentarem propriedades medicinais, sendo objetivo de amplos estudos, tais como: *S. aureae*, de ocorrência nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Alagoas, chamada de “estoraqueiro-do-Brasil” ou “benjoeiro” é uma árvore muito conhecida pela goma-resinosa que se obtém por incisão do caule. Seu bálsamo é usado na medicina popular para o tratamento de úlceras crônicas, blenorragia e leucorréia, sendo também indicado nos casos de tosse, dispnéia, rouquidão e como calmante (BALBACH, 1976).

A espécie vegetal *Styrax camporum* (**Figura 4**) ocorre nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná e predomina em regiões de Cerrado (LORENZI, 1998). Amplamente utilizada em doenças gastroduodenais pela medicina popular teve seu potencial antiulcerativo e toxicidade avaliados, a partir de extratos brutos e frações sendo confirmada a sua eficiência no combate de úlceras (BACCHI, SERTIÉ, 1994).

**Figura 4.** *Styrax camporum*



(Fonte: Lorenzi, 1998)

O potencial antiulcerativo de *S. camporum* foi atribuído à presença de taninos (substâncias com ação cicatrizante) (BACCHI et al., 1995). Os taninos possuem em suas estruturas grupos hidroxílicos fenólicos, conferindo-lhes uma forte ação antioxidante, e ação antiulcerogênica (LA CASA et al., 2000).

Levantamento bibliográfico sobre a constituição química das espécies do gênero *Styrax* evidenciou a ocorrência de poucas classes de produtos naturais, predominando lignóides, triterpenos e saponinas (SORDI, 2007).

### 1.3 Endófito: *Phomopsis stipata*

*Phomopsis stipata* (**Figura 5**) é um fungo filamentoso pertencente à família Diaphorthales e classe dos Ascomycota, o qual apresenta micélio septado e septos simples contendo quitina nas paredes celulares. A principal característica que distingue os Ascomicetos de todos os outros fungos é a formação endogênica de meiosporos (Ascóporos) em uma estrutura chamada Asco. O Asco é uma estrutura com diversas formas de diferenciação e, junto com a morfologia dos corpos de frutificação (Ascóporos, Ascoma) é de fundamental importância para a classificação dos táxons inferiores (PFENNING, 2000).

**Figura 5.** *Phomopsis stipata*



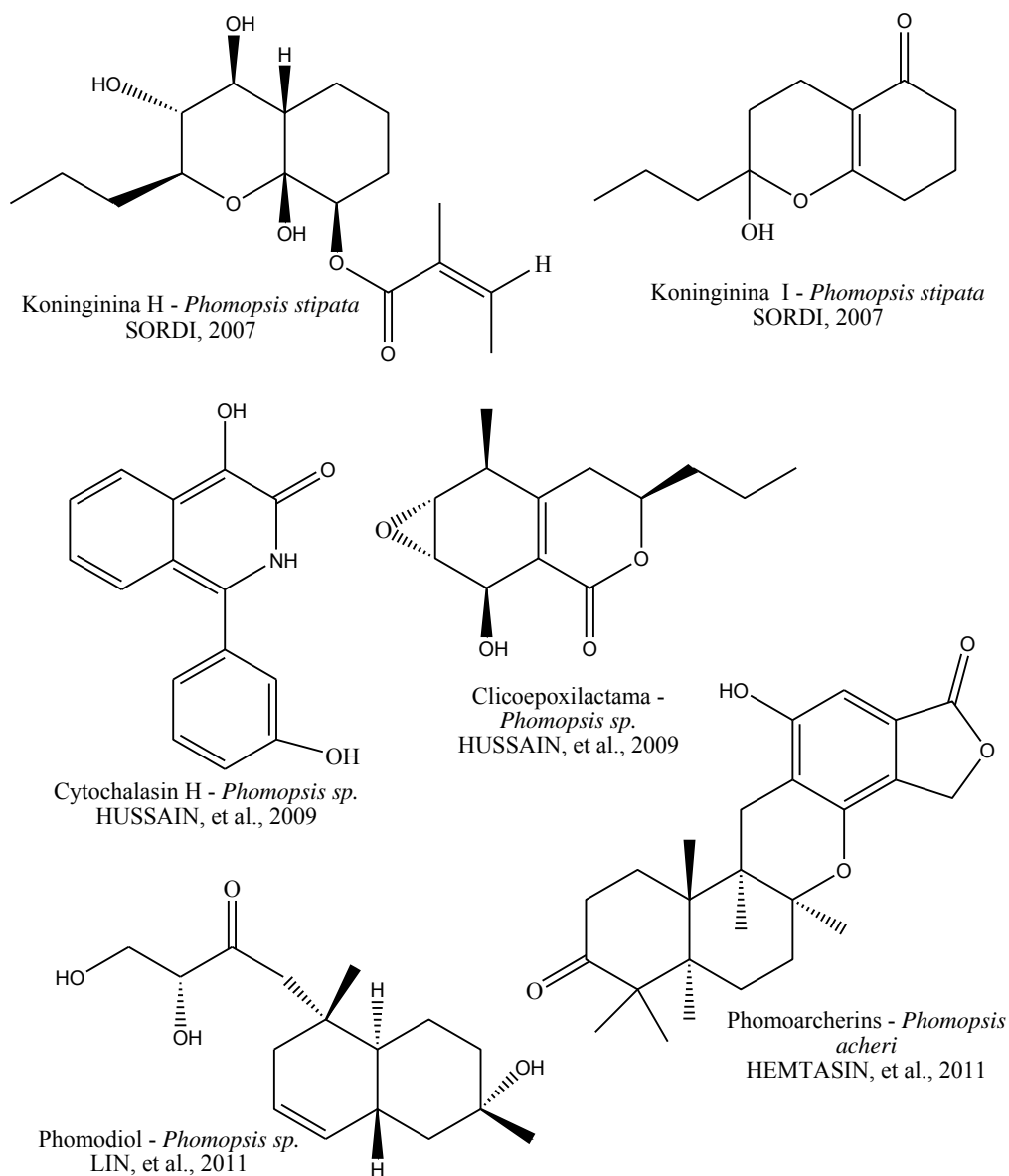
(Fonte: Autor)

O gênero *Phomopsis* tem sido frequentemente isolado como endófito em uma grande variedade de plantas (Azevedo et al., 2000). Alguns dos relatos citam o gênero *Phomopsis* como fitopatógeno isolado de *Citrus aurantium* (laranjeira), *C. nobilis* (tangerineira), *C. paradisi* (pomelo), *C. australis* (laranja), *C. sinensis* (laranja da china), *C. sp.* (citros), *Mangifera indica* (mangueira), *Glycine max* (soja), *Ficus carica* (figueira) e *Anacardium occidentale* (cajueiro), entre muitas outras plantas (ROPERO, 2009).

O gênero *Phomopsis* é um importante grupo de fungos com potencial biológico devido à produção de importantes metabólitos secundários bioativos de estruturas diversas. Entre eles incluem as micotoxinas para que afetam o sistema nervoso de vertebrados (BILLS, et al. 1995), alcalóides com capacidade farmacológicas, tais como phomopsinas (COCKRUM, PETERSON e EDGAR, 1994) e 2,4-diidroxi-5-6-dimetil benzoato de etila e phomopsilactona, produzidos por *Phomopsis cassiae* endófito de *Cassia spectabilis* (SILVA et al, 2005).

Este gênero é conhecido por ser uma fonte rica em metabólitos secundários bioativos de estruturas diversas. Levantamento bibliográfico sobre as estruturas isoladas de *P. stipata* revela que, apesar do grande potencial deste gênero, os seus metabólitos ainda são pouco estudados (SORDI, 2007). Na **Figura 6**, estão relacionados alguns metabólitos produzidos por fungos do gênero *Phomopsis*.

**Figura 6.** Substâncias isoladas de *Phomopsis stipata*.



Estudos preliminares realizados pelo Dr. Geraldo H. Silva (2005) durante seu trabalho de doutorado, indicaram que o extrato bruto AcOEt produzido por *Phomopsis stipata* produz substâncias com atividades antifúngica e anticolinesterásica. Adicionalmente, Renata Sordi (2007) durante sua dissertação de mestrado, isolou dois policetídeos da classe das koningininas, que são substâncias raras, sendo descritas apenas seis delas. Estas informações adicionadas ao fato que estes estudos foram preliminares nos conduziram ao reestudo deste

microrganismo objetivando o isolamento de outras koningininas, provavelmente bioativas.

#### **1.4 Novas aplicações de fungos endofíticos**

Fungos endofíticos, isolados a partir de um número de diferentes espécies de plantas, estão sendo alvo de estudos para a produção de precursores de biocombustíveis.

Ao longo dos anos, a matriz energética mundial tem sido baseada em recursos não renováveis, especialmente combustíveis fósseis. Durante as últimas décadas, as preocupações têm sido levantadas sobre o impacto dessa dependência em relação ao ambiente e economia global, o que conduziu a uma série de discussões em relação à forma de obtenção da energia global (SANTOS-FO, et al.; 2011).

É amplamente reconhecido que existe uma necessidade de novas fontes de energia sustentável em virtude das previsões do esgotamento de recursos não renováveis e dos sucessivos aumentos dos preços do petróleo (SANTOS-FO, et al.; 2011).

Das fontes renováveis que têm sido investigadas, biodiesel tem se mostrado uma das alternativas mais promissoras. Entre as numerosas matrizes utilizadas, cerca de 90% são exclusivamente a partir de plantas (DURRET, et al.; 2008).

Uma maneira de atender às demandas industriais é investigar novas fontes de precursores de biodiesel em outros organismos além de plantas. Microrganismos têm algumas vantagens claras: podem acumular níveis elevados de lipídeos, não necessitam de terra para o crescimento, conseqüentemente não disputam com a agricultura. Além disso, eles podem ser produzidos em escala ampliada, através de processos de fermentação, que os tornam potencialmente mais viável fonte para a produção de biocombustíveis (SANTOS-FO, et al.; 2011).

Em 2008 estudos relataram que a linhagem do fungo endofítico *Gliocladium roseum* (NRRL 50072), isolado de *Eucryphia cordifolia*, produz uma série de hidrocarbonetos voláteis e seus derivados. Estes resultados indicam que esse endófito possui uma capacidade para produzir substâncias voláteis, com alto valor energético, em pequena escala, que são especialmente úteis nos dias atuais como uma nova alternativa para novas fontes de biocombustíveis (STROBEL, et al.; 2008).

A utilização de fungos endofíticos com capacidade de produzir compostos voláteis e derivados não é a solução imediata para a produção alternativa de combustíveis fósseis, mas, indica a possibilidade de estudos nessa área (STROBEL, et al.; 2008; AZEVEDO, 2010).

## 1.5 Desreplicação

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

O termo “desreplicação” (do inglês, *dereplication*) foi introduzido na área acadêmica a partir dos anos 90 como uma importante estratégia no processo de triagem de extratos brutos para a identificação ou confirmação de identidade de compostos químicos conhecidos, além de minimizar a replicação de trabalhos (NG, et al.; 2009).

Estratégias de desreplicação utilizam técnicas analíticas e banco de dados na busca por identificar ou determinar compostos ativos o mais rápido possível no processo de descoberta de novas substâncias potencialmente bioativas. Essa abordagem reduz o consumo da amostra e solventes, e permite que os recursos sejam focados para o desenvolvimento de novas drogas (LANG, et al.; 2008).

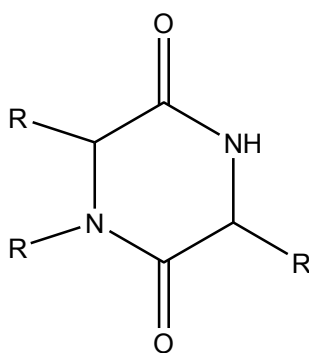
O uso da técnica espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) como ferramenta na desreplicação tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido à robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos ativos mais populosos:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Por meio do uso de sequência de pulso, é possível a detecção *in situ* de compostos conhecidos através da obtenção de espectros de RMN de moléculas individuais em mistura sem haver a necessidade de separação (VERPOORTE, et al.; 2007; KIM, 2010).

## 1.6 Diketopiperazinas

As diketopiperazinas são conhecidas há mais de um século, mas os estudos sobre essa classe de substâncias intensificaram somente quando começaram a relatar a potencialidade biológica destas substâncias. Algumas das mais importantes atividades biológicas desta classe estão relacionadas com alterações em funções cardiovasculares e coagulação do sangue. Também apresentam atividade antitumoral, antiviral, antifúngica, antibacteriana, agentes antihiperglicêmico, afinidades receptoras dos canais de cálcio e serotoninérgico (MARTINS; CARVALHO, 2007).

As diketopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos (**Figura 7**), comumente biossintetizados a partir de dois ou mais aminoácidos por diferentes organismos como mamíferos, leveduras terrestres, líquens, fungos, bactérias e actinomicetos marinhos (ADAMCZESKI, 1995).

**Figura 7.** Esqueleto comum entre as diketopiperazinas



Estes compostos apresentam um esqueleto comum quiral, rígido e funcionalizado, diferenciando-se uma das outras pelas estruturas dos substituintes da cadeia lateral de cada aminoácido. Com isso, as diketopiperazinas são estruturas importantes, pois possuem a capacidade de se ligarem a uma grande variedade de receptores com alta afinidade, gerando assim diversas atividades biológicas (ADAMCZESKI, 1995).

## 2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a identificação dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis stipata* por técnicas espectrométricas, com o auxílio da técnica de desreplicação.

Cultivar *P. stipata* em escala ampliada, em diferentes meios de cultivo, para a investigação de substâncias precursoras de biocombustíveis.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais.

##### 3.1.1 Meios de cultivo

Para uma avaliação da produção metabólica produzida por *P. stipata* foram utilizados cinco meios líquidos e um meio sólido.

**Tabela 1.** Meios de cultivo para o fungo endofítico *P. stipata*.

Meios de Cultura	Tipo	[ ]g L <sup>-1</sup>	Composição	Fabricante
MDB	Líquido	24	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	Acumedia
Czapek	Líquido	35	Sacarose (30g), NaNO <sub>3</sub> (3g), Na <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (1g), MgSO <sub>4</sub> (0,5g), KCl (0,5g), FeSO <sub>4</sub> (0,01g)	Difco
Extrato de Malte	Líquido	20	Extrato de malte (20 g)	Acumedia
Nutrient	Líquido	8,0	Extrato de carne (3 g), peptona (5 g)	Difco
YM	Líquido	21	Extrato de levedura (3 g), extrato de malte (3 g), peptona (5 g) e dextrose (10 g)	Difco
BDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), Ágar (15g)	Acumedia
Milho	Sólido	-	90g de milho em 75,0mL de água ultra pura	Machiara

##### 3.1.2 Solventes

Na obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada, para os fracionamentos, separações cromatográficas em coluna e CLAE, foram utilizados, acetato de etila, hexano, metanol, e acetonitrila das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt, QHEMIS e MTEDIA. Em análises em RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C utilizou-se DMSO-*d*<sub>6</sub> (Aldrich) e CDCl<sub>3</sub> (Aldrich).

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

Nos ensaios de CCDC foram utilizadas placas pré-prontas de sílica gel da marca SORBET Technologies (Sílica G TLC Plates W/UV 254; 200 µm 20 x 20 cm). As revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (UV 254 e 365 nm), nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento ou exposição ao iodo sublimado.

### *3.1.4 Cromatografia em coluna (CC)*

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

### *3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Aranjo de Diodo (CLAE-DAD).*

As análises por CLAE-DAD no modo analítico foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A e injetor automático Shimadzu SIL-20A. O tratamento dos dados foi obtido através de um microcomputador com processador Intel ® Celeron ®, utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1). Foi utilizada uma coluna analítica Luna Phenomenex com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm).

### 3.1.6 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR)

Para obtenção dos cromatogramas, utilizou-se cromatógrafo a Gás Shimadzu modelo GC-2010 equipado com um detector de ionização de chama FID a 380°C e um injetor a 360°C. As injeções foram realizadas por introdução mecânica e o volume de injeção de a 1 microlitro. Utilizou-se N<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> como gases auxiliares e de arraste, respectivamente e coluna apolar RTX®-BDTG com dimensões (15mX0,32mm d.i.X0,10µm). A programação de temperatura esta descrita na Tabela 2 com um tempo total de análise igual a 43,81 min.

**Tabela 2.** Programação de temperatura da coluna cromatográfica.

<b>Programação de Temperatura da Coluna</b>		
<b>Taxa de aquecimento (°C/min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de permanência (min)</b>
<b>0</b>	50	1
<b>15</b>	180°C	-
<b>7</b>	230°C	-
<b>10</b>	370°C	13

3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C).

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

### 3.1.8 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro LCQ FLEET (UHPLC-PDA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, Thermo Scientific®) equipado com dispositivo de inserção

direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A faixa de aquisição foi de  $m/z$  50-2000.

O software Xcalibur (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição dos dados e processamento dos dados espectrométricos.

### 3.1.9 Outros equipamentos.

**Tabela 3.** Outros equipamentos utilizados no decorrer do trabalho.

<b><i>Equipamentos</i></b>	<b><i>Fabricante</i></b>
Autoclave vertical	Quimis Aparelhos Científicos Ltda
Câmara de fluxo laminar	NUEIRE II, A/B3
Milli-Q	Millipore
Rotaevaporador	BUCHI
Balança analítica	Mettler Toledo AG 245

## 3.2 Métodos

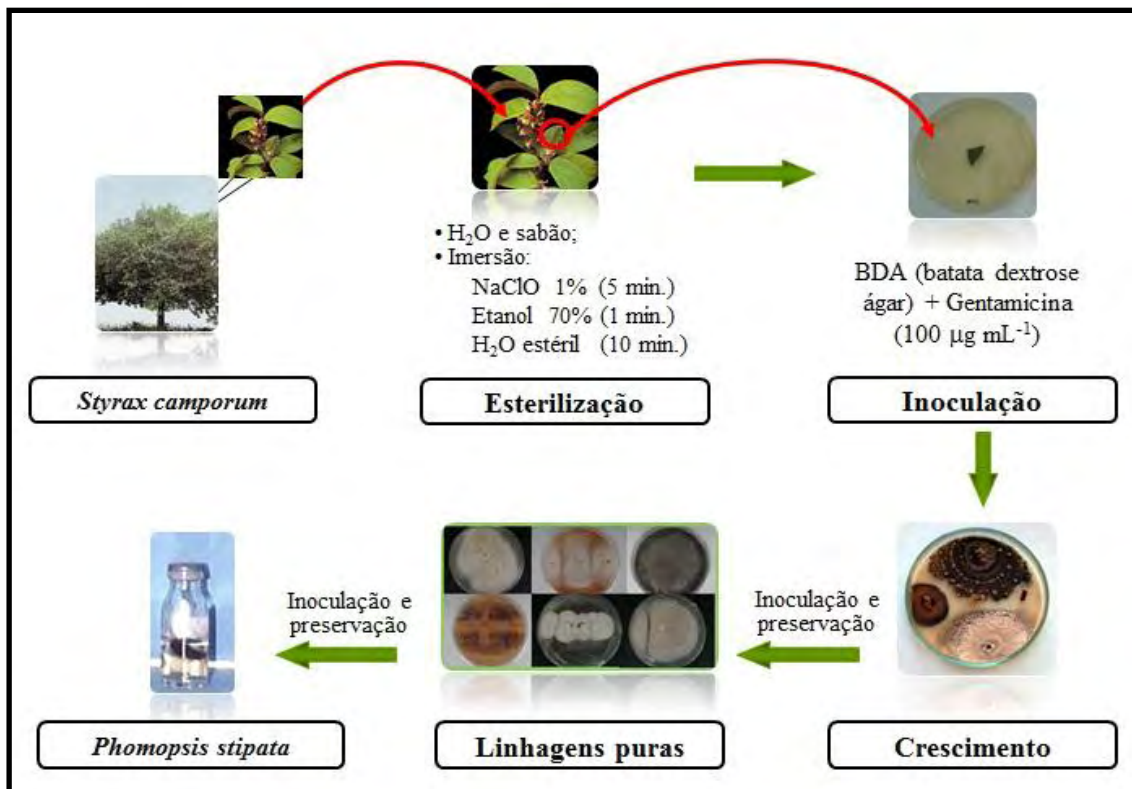
### 3.2.1 Obtenção das cepas fúngicas.

O fungo *Phomopsis stipata* foi isolado de folhas saudáveis da espécie vegetal *Styrax camporum* coletada na Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha. A exsicata do material vegetal encontra-se devidamente classificada e depositada no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo.

O isolamento do endófito foi realizado pelo Dr. Geraldo H. Silva. As folhas da espécie coletada foram esterilizadas por imersão em NaOCl a 5%, de EtOH a 70 % e água destilada, para retirada de microrganismos epifíticos. A seguir, o material vegetal foi inoculado em meio de cultura sólido PDA com o antibiótico sulfato de gentamicina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para evitar o crescimento bacteriano. Após período de incubação de 7 dias, as linhagens obtidas foram separadas, purificadas e

preservadas em água estéril. Foram obtidas 7 linhagens puras que receberam os seguintes códigos: SC-01, SC-02, SC-03, SC-04, SC-05, SC-06 e SC-07 (Figura 8).

Figura 8. Esquema de isolamento de *P. stipata*.



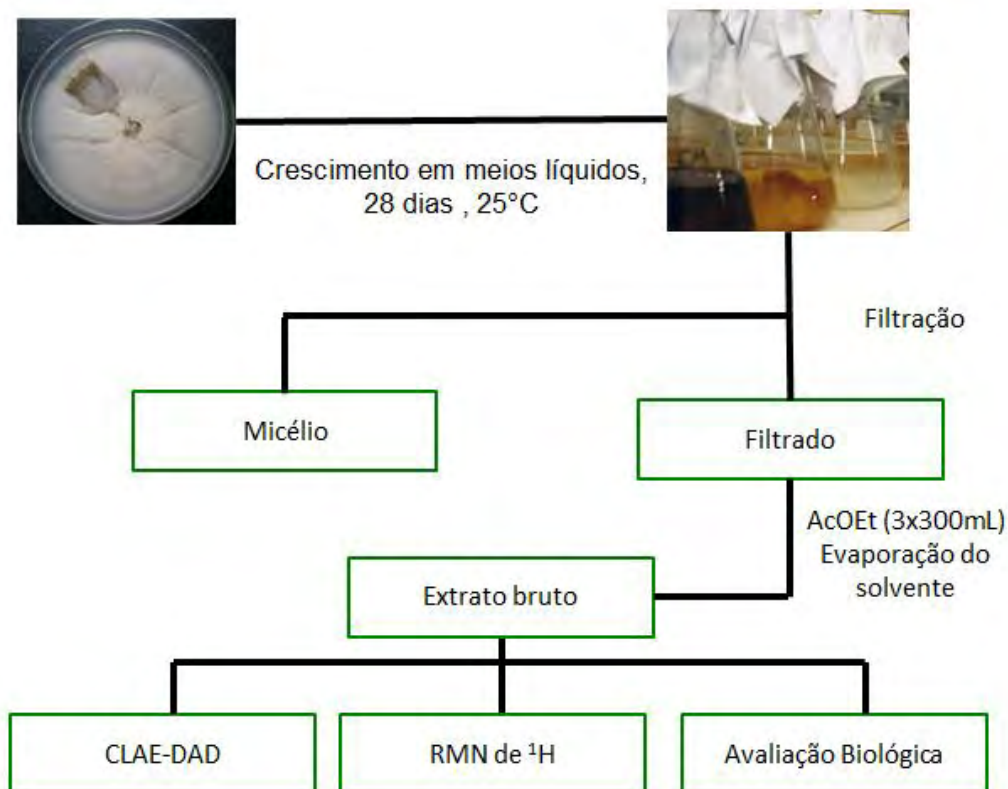
(Fonte: Autor)

A sigla SC refere-se ao nome da espécie vegetal (*Styrox camporum*), e o número refere-se à sequência de isolamento. As linhagens isoladas estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica-IQ/Ar-SP. O fungo codificado SC-04 foi classificado como *Phomopsis stipata*, pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning do Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Lavras – MG.

### 3.2.2 Cultivo do endófito *P. stipata* em escala reduzida em diferentes meios de cultivo e a obtenção dos extratos brutos.

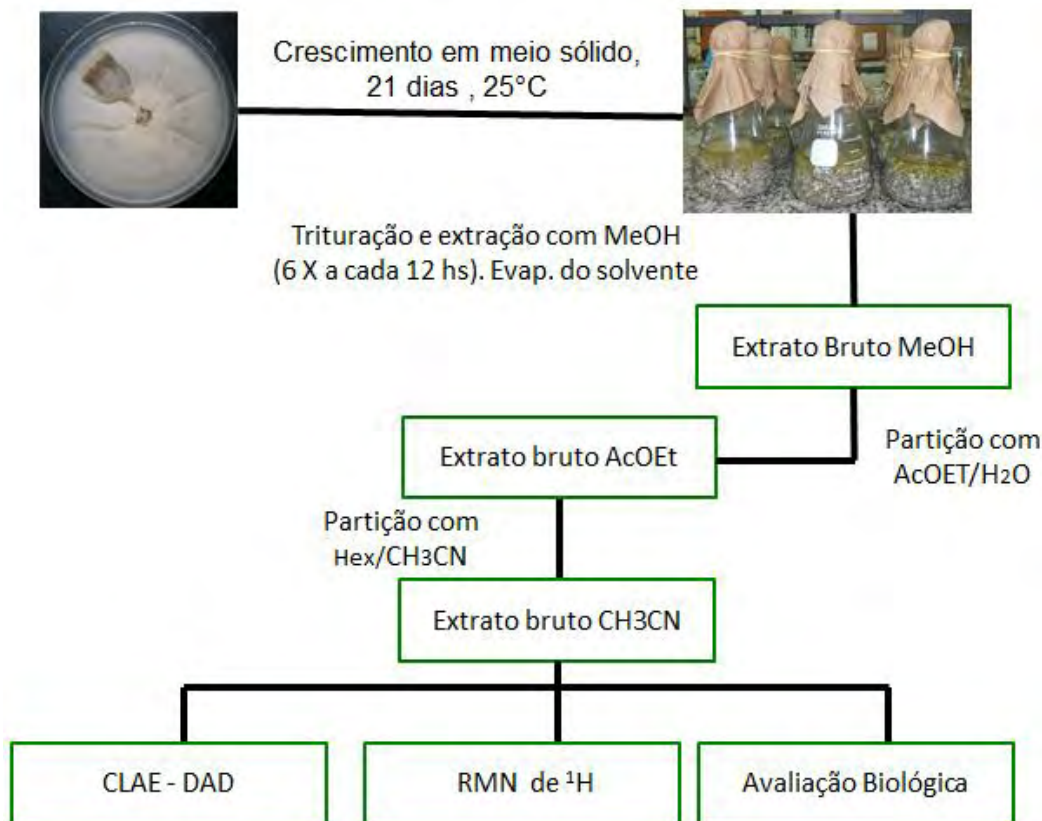
A cultura estoque do fungo endofítico *P. stipata*, preservada em “slants” (frascos vedados contendo apenas água deionizada), foi inicialmente inoculada em placas de Petri contendo meio de cultivo PDA e monitorado até que suas hifas atingissem 2-3 cm de diâmetro. Posteriormente fragmentos de ágar contendo o micélio foram transferidos para cinco meios líquidos (**Figura 9**) e um meio sólido (**Figura 10**), para obtenção do extrato bruto em escala reduzida. O fungo foi cultivado em 28 e 21 dias para os meios líquido sólido, respectivamente, ambos a uma temperatura de 25°C, no modo estático.

**Figura 9.** Metodologia de obtenção dos extratos brutos em meios comerciais produzidos por *P.stipata* para avaliação do perfil químico e biológico.



(Fonte: Autor)

**Figura 10.** Metodologia de obtenção do extrato bruto em milho produzido *P. stipata* para avaliação do perfil químico e biológico.



(Fonte: Autor)

Os solventes orgânicos foram eliminados utilizando evaporador rotatório, fornecendo os respectivos extratos brutos. Os solventes recuperados foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados à recuperação ou descarte conforme nas Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: [www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf](http://www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf).

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos e sólido, em escala reduzida, foram submetidos às técnicas de CLAE-DAD utilizando gradiente exploratório e RMN de  $^1\text{H}$ . Os extratos foram submetidos a “Clean up” por solubilização em MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5), eluição em cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 µm) para filtração. A seguir foram submetidos a gradiente exploratório utilizando coluna analítica de fase reversa Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm) e eluídos com H<sub>2</sub>O/MeOH (Merk) (95:5) até (0:100) em 40 min., permanecendo 10 min. nesta condição, com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

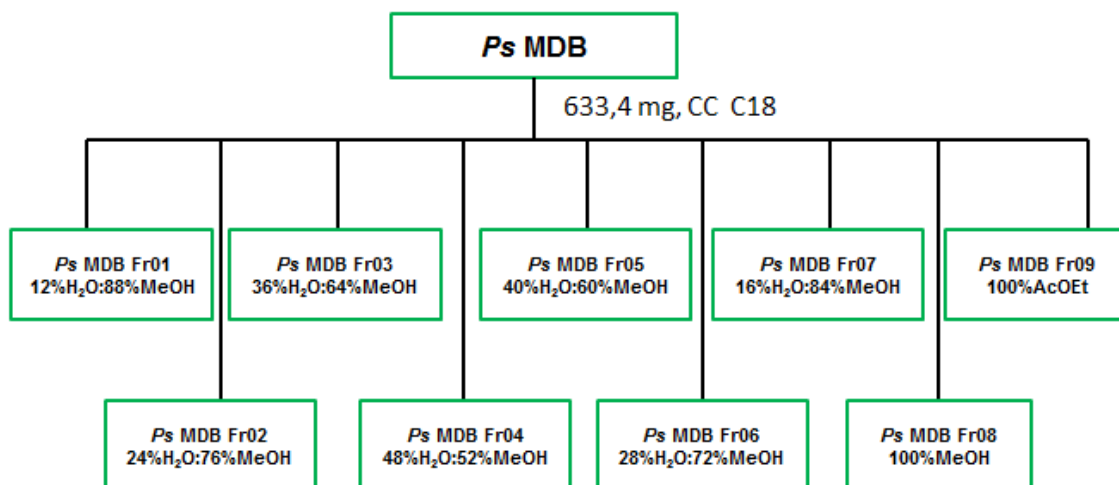
utilizando detector UV-DAD operando inicialmente a  $\lambda = 254$  nm até 800 nm. Para os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foi utilizado um espectrômetro Varian AS-500-OXFORD, operando a 500 MHz, utilizando TMS como referência interna e DMSO- $d_6$  e  $\text{CDCl}_3$  como solvente para as amostras.

### 3.2.3 Cultivo de *P. stipata* em escala ampliada e obtenção do extrato bruto em MDB.

O cultivo em escala ampliada que se processou em MDB foi realizado seguindo o mesmo método que em escala reduzida (**Figura 9**). *Phomopsis stipata* foi cultivado em 6,4 L de meio líquido de MDB ( $24 \text{ g L}^{-1}$ ), por um período de 28 dias, sob modo estático e temperatura controlada de  $25^\circ\text{C}$ . A seguir, realizou-se uma filtração a pressão reduzida para separar o micélio do caldo e este foi submetido a uma partição líquido-líquido com de acetato de etila (AcOEt foi reciclado utilizando um evaporador rotatório durante as extrações).

Foram obtidos 633,4 mg de extrato bruto que foi fracionado utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC). O extrato foi aplicado em coluna de 2,5 cm de diâmetro e 13,5 cm de altura, sob pressão, utilizando 50 g de sílica de fase reversa C18 (Merck) como fase estacionária e sistema de eluição com polaridade decrescente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  como fase móvel, como descreve a **Figura 11**.

**Figura 11.** Fracionamento do extrato bruto *Ps* MDB produzido por *Phomopsis stipata*.



### 3.2.4 Cultivo de *Phomopsis stipata* em escala ampliada e obtenção do extrato bruto em milho.

O cultivo em escala ampliada que se processou em milho foi realizado seguindo o mesmo método que em escala reduzida (**Figura 10**). *P. stipata* foi cultivado em 1,65 g de meio sólido de milho, por um período de 21 dias, sob modo estático e temperatura de 25°C.

Foram obtidos 1,62 g de extrato bruto que foi fracionado utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC). O extrato foi aplicado em coluna de 4 cm de diâmetro e 15 cm de altura, sob pressão, utilizando de sílica de fase reversa C18 (Merck) como fase estacionária e sistema de eluição com polaridade decrescente H<sub>2</sub>O/MeOH como fase móvel, como descreve a **Figura 12**.

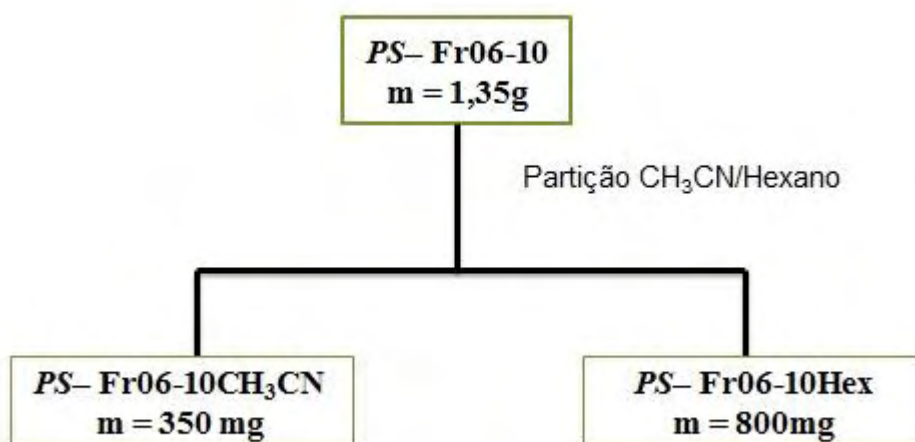
**Figura 12.** Fracionamento do extrato bruto *Ps* Milho produzido por *P. stipata*.



### 3.2.5 Partição da fração Ps Fr06-10

Após a obtenção da fração *Ps* Fr06-10, a mesma foi solubilizada em CH<sub>3</sub>CN e extraída três vezes com hexano, fornecendo as sub-frações *Ps* Fr06-10 CH<sub>3</sub>CN e *Ps* Fr06-10 Hex, conforme **Figura 13**.

**Figura 13.** Partição da fração *Ps* Fr06-10.



3.2.6 *Análise direta de mono, di e triacilglicerídeos em frações produzidas por Phomopsis stipata por cromatografia gasosa de alta resolução: resolução ASTM 6540.*

Com o objetivo de realizar a detecção de glicerol livre, mono, di e triacilglicerídeos foi utilizado o método normalizado da ASTM 6540 para este tipo de análise.

Para a silanização das amostras, 10µL de cada padrão interno (butanotriol, para detecção do glicerol) e (tricaprina, para detecção dos acilglicerídeos) foram adicionados a 5 mg de cada amostra. A mistura reacional foi deixada em repouso por 30 minutos a t.a. A seguir foram adicionados 10µL do agente silanizante MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida), e a amostra foi mantida por 60

minutos em repouso e em temperatura ambiente. Ao final deste período, 8 mL de *n*-heptano foi adicionado a mistura reacional e as amostras foram submetidas a análise cromatográfica.

### **3.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos de *P. stipata*.**

#### *3.3.1 Avaliação do potencial citotóxico\*.*

A avaliação do potencial citotóxico foi realizada utilizando as linhagens tumorais OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

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

\*Ensaio biológico realizado pelo Drº. Paulo Michel Pinheiro Ferreira da Universidade Federal do Ceará, CE.

#### *3.3.2 Atividade sequestradora de radicais livres: DPPH*

Adicionou-se nas microplacas de 96 poços: 200µL de DPPH (4 mg mL<sup>-1</sup> em MeOH) e 100 µL das amostras em 7 concentrações diferentes(33,3µM; 26,7µM; 20,0µM; 13,3µM; 6,7µM; 3,3µM; 1,7µM). Controle positivo: 200 µL de DPPH e 100 µL do antioxidante padrão (quercitina ou rutina). Controle negativo: 200 µL de DPPH e 100 µL de solvente. A microplaca foi mantida por 30 minutos sob ausência de luz.

A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado pela leitura da absorbância em  $\lambda=517\text{nm}$ . (PAULETTI et al., 2003).

## 4. Resultados e Discussões

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

Dentre organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Alguns microrganismos podem crescer com poucas substâncias inorgânicas como sua única exigência nutricional, enquanto outros se assemelham aos organismos superiores na sua necessidade de compostos orgânicos complexos (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996).

O cultivo de microrganismos em laboratório requer meios de cultura apropriados, os quais têm a função de mimetizar ou até melhorar o ambiente natural destes.

É importante salientar que as características fisiológicas de um microrganismo em cultura, podem não ser as mesmas que as do seu crescimento na natureza. As culturas puras em laboratório se desenvolvem adequadamente, porque normalmente têm uma abundância de nutrientes e não há competição com outros microrganismos pelo alimento em disponibilidade (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996). A produção de metabólitos secundários pelos fungos depende intrinsecamente das condições utilizadas para seu crescimento e desenvolvimento.

Para uma avaliação da produção metabólica foram utilizados cinco meios líquidos e um meio sólido. De acordo com a definição da literatura o meio líquido Czapek é classificado como “quimicamente definido”, e os outros meios (Nutriente, MDB, YM, Ext. de Malte e Milho) podem ser classificados como “complexos”. Dados da variação na produção metabólica estão apresentados na **Tabela 4**, a variação na produção é causada pela presença de diferentes componentes nutricionais em cada meio de cultivo, fundamentais para o desenvolvimento do endófito.

**Tabela 4.** Massa dos extratos brutos obtida dos meios de cultivo líquido e sólido de *Phomopsis stipata*.

Meios de Cultivo	MDB	YM	Nutrient	Czapek	Ext. Malte	Milho
Massa obtida (mg)	26,5	14,7	17,2	19,9	9,2	334,5

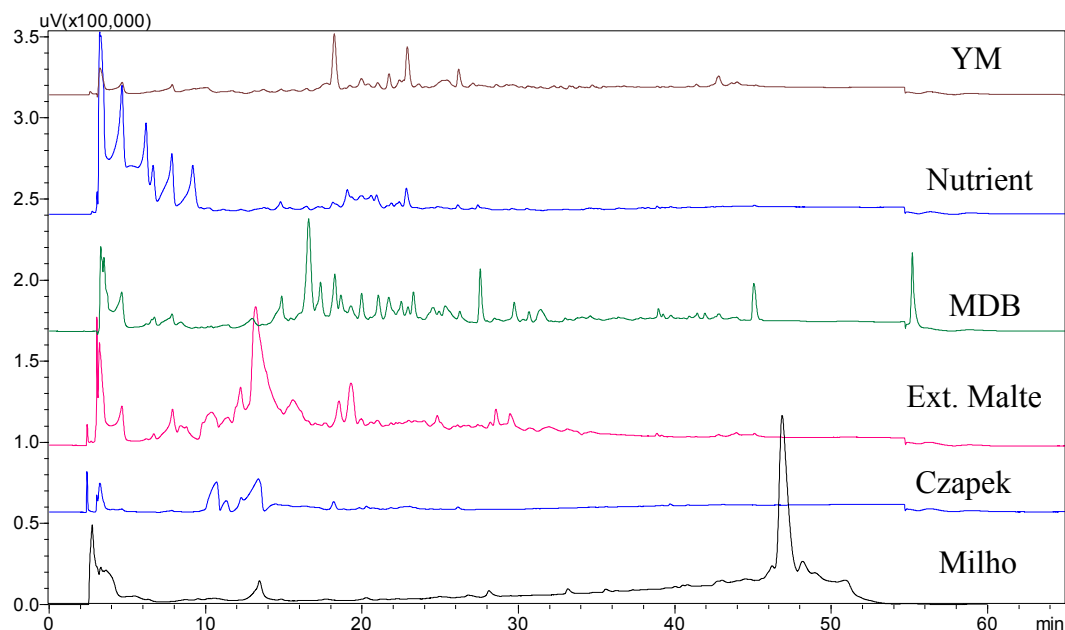
Os extratos brutos obtidos conforme a metodologia 3.2.2, foram submetidos às análises em CLAE-DAD<sub>analítico</sub> e RMN de <sup>1</sup>H.

O solvente acetato de etila foi selecionado, pois apresenta polaridade intermediária, é imiscível com água e garante a separação de uma vasta classe de substâncias, desde as pouco polares até as de mais elevada polaridade, garantindo assim a prospecção dos metabólitos secundários de interesse.

#### 4.1.1 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos (em escala reduzida) em CLAE-DAD.

Uma análise detalhada dos cromatogramas obtidos (**Figura 14**) dos extratos brutos em MBD, Czapek, Extrato de Malte, Nutrient, YM e Milho utilizando gradiente exploratório, evidenciou a presença de várias bandas com polaridade variando de média a alta em todos os extratos brutos. Também foi possível observar uma variação na produção metabólica, pois bandas de diferentes tempos de retenção nos diversos cromatogramas foram detectadas.

**Figura 14.** Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos de *P. stipata* em diferentes meios de cultivo (peq. escala) em 254 nm.



#### 4.1.2 Perfil químico dos extratos brutos obtidos em escala reduzida por RMN de $^1\text{H}$ .

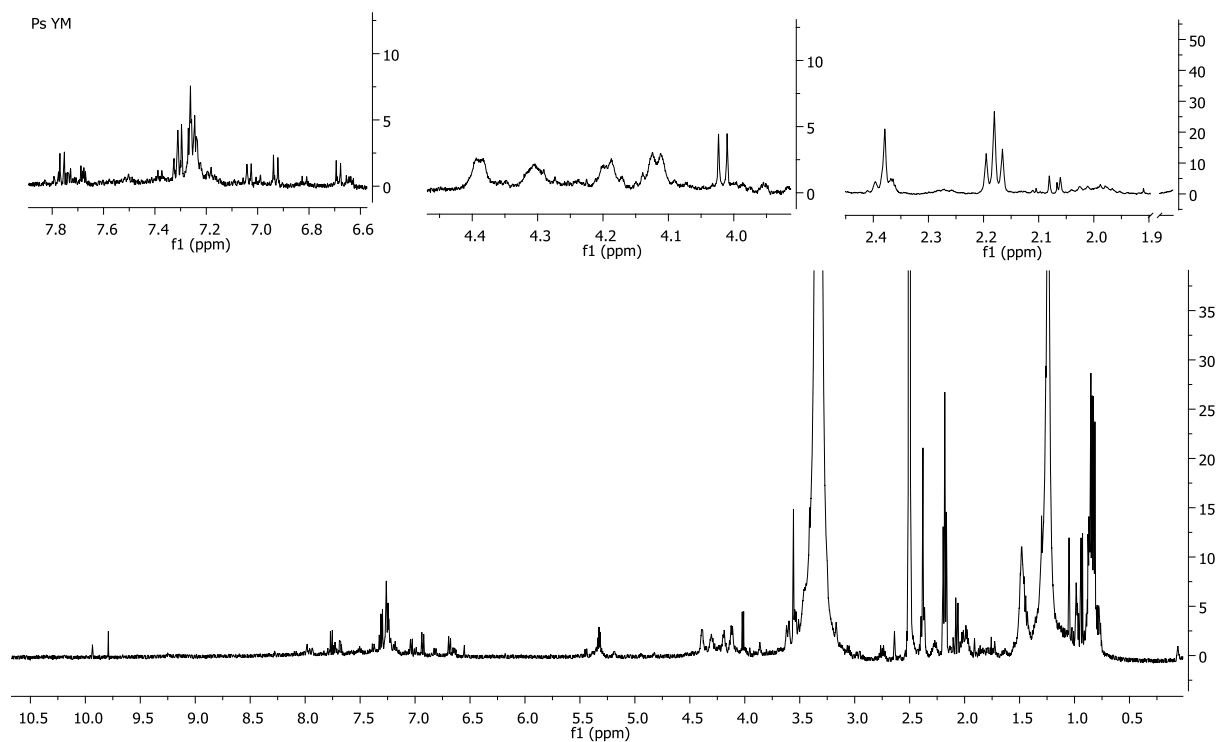
Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio é uma técnica que fornece informações muito importantes sobre características estruturais da amostra, sugerindo as classes químicas presentes em uma mistura e também permitindo a elucidação ou a determinação estrutural de substâncias puras, além de ser uma técnica que não destrói a amostra, permitindo sua posterior recuperação.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 15 a 20**) dos extratos brutos evidenciaram vários sinais ao longo da faixa espectral, que vão de  $\delta_{\text{H}}$  0,5 a aproximadamente  $\delta_{\text{H}}$  10,0. Foram visualizados sinais na região de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, além de carbinólicos. Apresentou também, uma região complexa de hidrogênios aromáticos, sugerindo várias classes destas substâncias.

As análises em CLAE-DAD e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  evidenciaram a diversidade metabólica destes extratos, o que pode ser explicada pela presença de diferentes componentes nutricionais em cada meio de cultivo, fundamentais para o

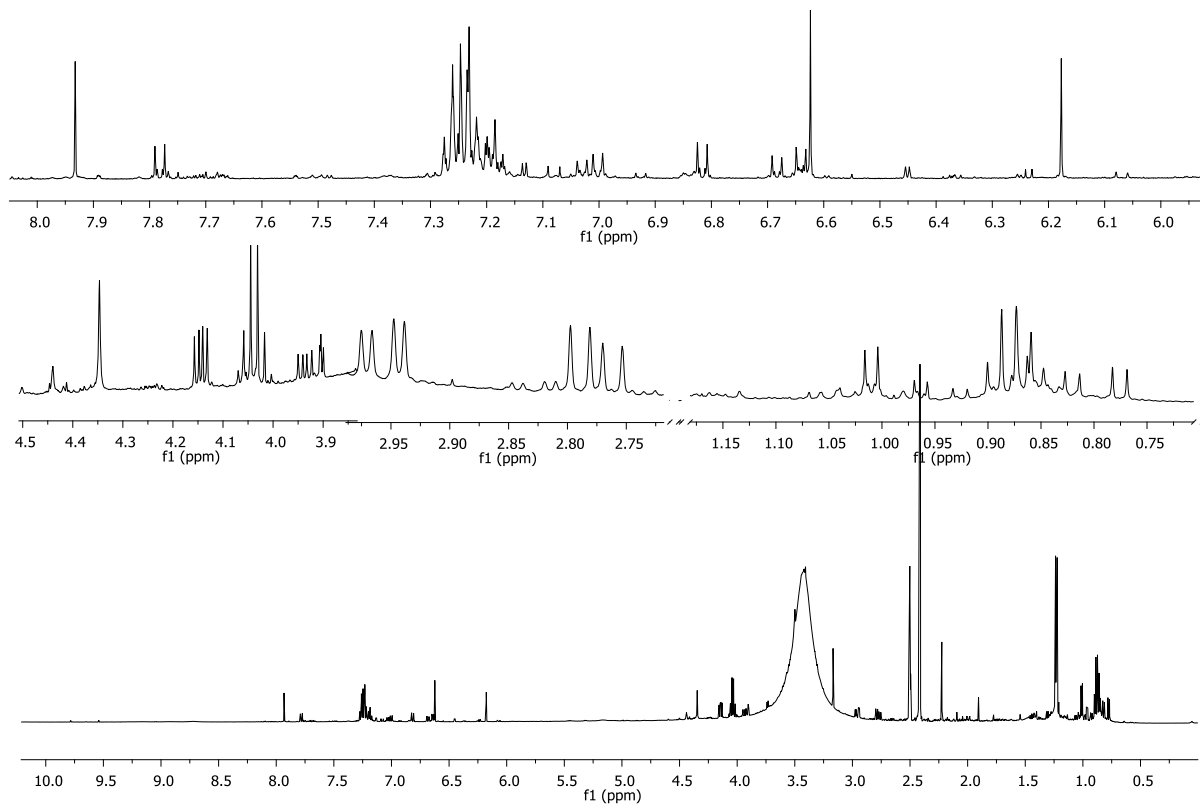
desenvolvimento do endófito e com isto possibilitando a produção de diversos metabólitos secundários.

**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. stipata* em YM peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).



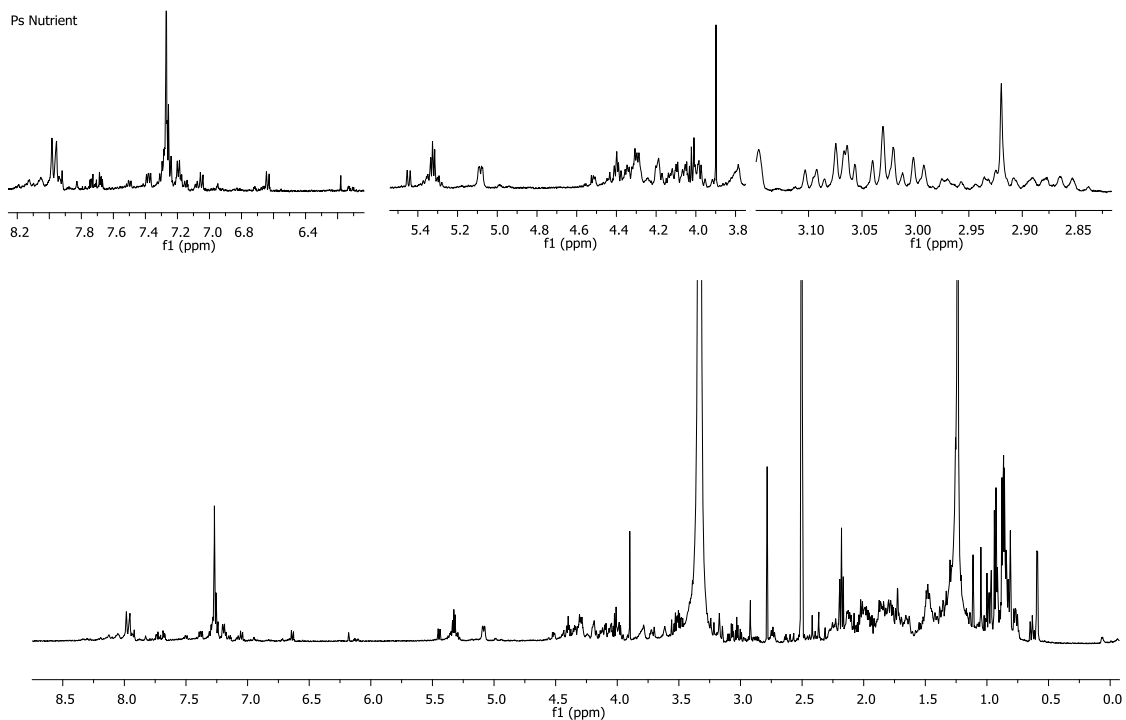
**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. stipata* em Czapek peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).

Ps CZAPEK

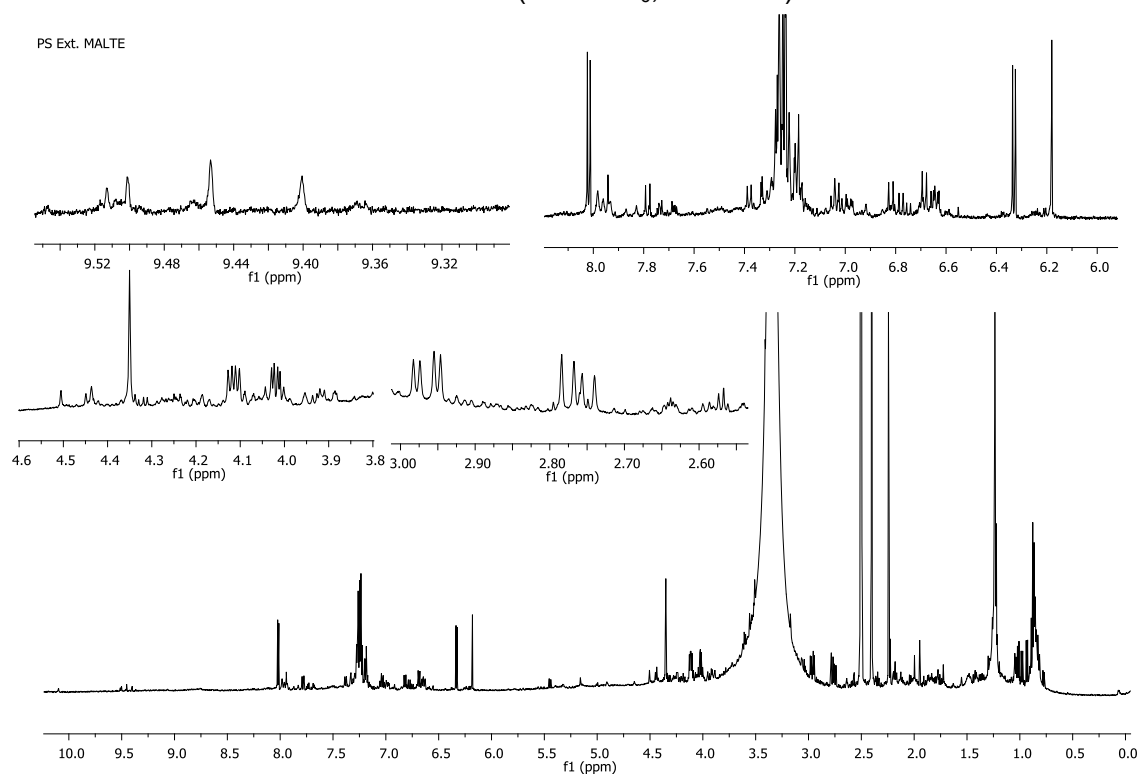


**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. stipata* em Nutrient peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).

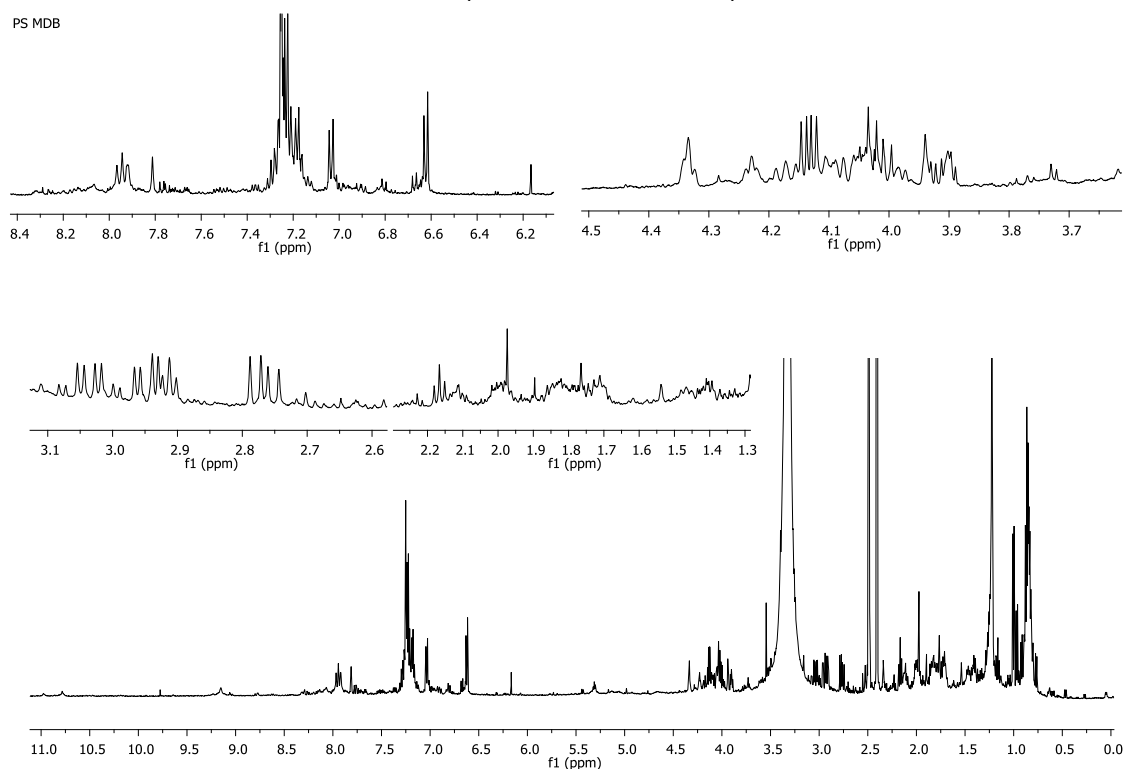
Ps Nutrient



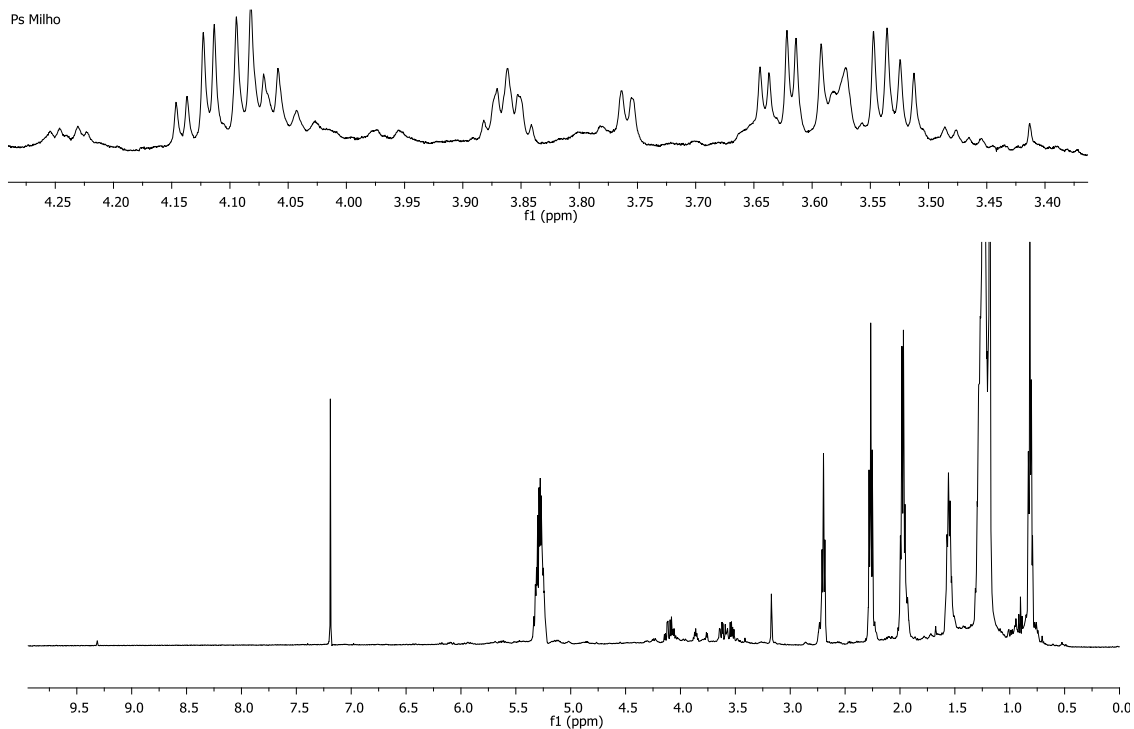
**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. stipata* em Extrato de Malte peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).



**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. stipata* em MDB peq. escala (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).



**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. stipata* em Milho peq. escala ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



## 4.2 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos do endófito

### *P. stipata*.

Considerando os resultados obtidos nas avaliações químicas, foram realizados testes biológicos com os extratos brutos em escala reduzida com o objetivo de avaliar a potencialidade das substâncias presentes nos extratos quanto ao seu potencial biológico.

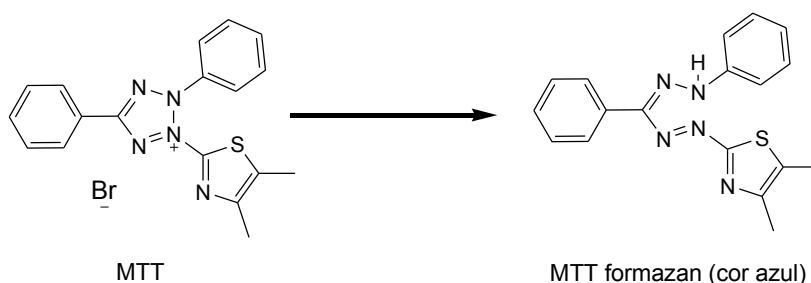
#### 4.2.1 Avaliação do potencial citotóxico

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método

rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula.

É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan (**Figura 21**), 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 (BERRIDGE *et al.*, 1996).

**Figura 21.** Reação de redução do reagente MTT em azul de formazana.



A atividade citotóxica de todos os extratos brutos estão apresentados na **Tabela 5** com os respectivos percentuais de inibição. Somente os extratos que apresentarem valores de inibição  $\geq 75\%$  em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de substâncias com potencial antitumoral.

**Tabela 5.** Resultados da atividade antitumoral em extratos brutos em pequena escala de *P. stipata* diferentes meios de cultura.

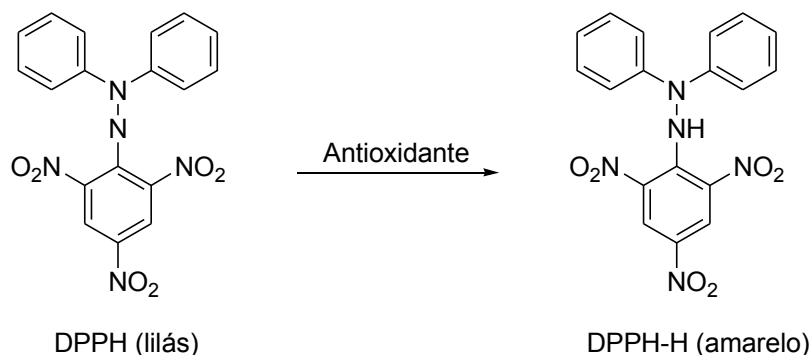
Amostra		HCT-116		OVCAR 8		SF-295	
Nº	Identificação	GI% média)	SD	GI% média)	SD	GI% média)	SD
1	PS-NUT	16,83%	8,00%	33,92%	0,19%	47,03%	1,10%
2	<b>PS-YM</b>	<b>76,70%</b>	<b>2,39%</b>	<b>77,13%</b>	<b>40,06%</b>	<b>83,09%</b>	<b>27,68%</b>
3	PS MILHO	9,30%	3,16%	16,93%	3,19%	16,98%	3,18%
4	PS-MDB	14,59%	2,00%	10,78%	0,29%	40,27%	9,62%
5	PS-MALTE	12,81%	4,64%	26,89%	2,80%	37,51%	1,69%
6	PS CZAPEK	18,19%	8,00%	49,69%	5,50%	49,37%	1,82%

Os resultados da atividade citotóxica mostrados da **Tabela 5** evidenciam que o extrato bruto produzido por *P. stipata*, quando cultivado em YM, apresenta substâncias que inibem o crescimento da linhagem tumoral OVCAR (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólón-humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). Estes resultados indicam este microrganismo como um potencial produtor de substâncias antitumorais.

#### 4.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação qualitativa da atividade sequestradora de radicais livres baseia-se no descoloramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta, que na presença de substâncias antioxidantes, faz com que o radical DPPH se estabilize, o que é indicado pela mudança de cor violeta para amarelo (**Figura 22**) (VELLOSA, 2005).

**Figura 22.** Mecanismo da reação do radical DPPH como antioxidante



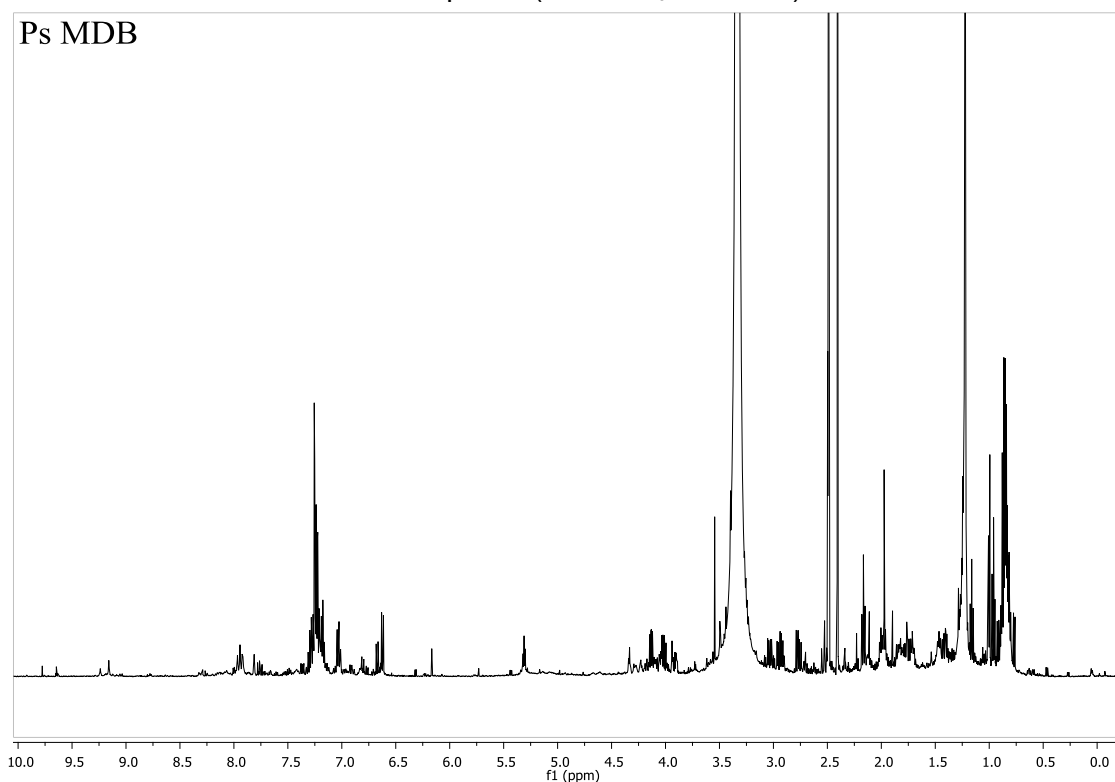
Em todos os extratos brutos produzidos por *Phomopsis stipata* foram realizados os testes para avaliar a atividade antioxidante. Os resultados obtidos na análise dos extratos brutos produzidos pelo endófito indicaram a ausência de metabólitos com potencial antioxidante.

### 4.3 Aspectos gerais da avaliação do extrato bruto obtido em MDB do cultivo em escala ampliada do fungo *Phomopsis stipata*.

Em trabalho experimental anteriormente desenvolvido por Sordi foram isoladas duas novas substâncias da classe das konigininas. Outras foram detectadas, no entanto a massa disponível inviabilizou o isolamento e determinação estrutural das substâncias remanescentes. Deste modo nos propomos neste trabalho, ao recultivo e isolamento de substâncias desta mesma classe.

Após a obtenção do extrato bruto MDB em escala ampliada (633,4 mg), este foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 23**), onde o extrato produzido por *P. stipata* apresentou boa distribuição de sinais por toda a largura espectral, o que implica numa prolífica produção metabólica.

**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto MDB produzido por *P. stipata* escala ampliada (DMSO- $d_6$  500 MHz).

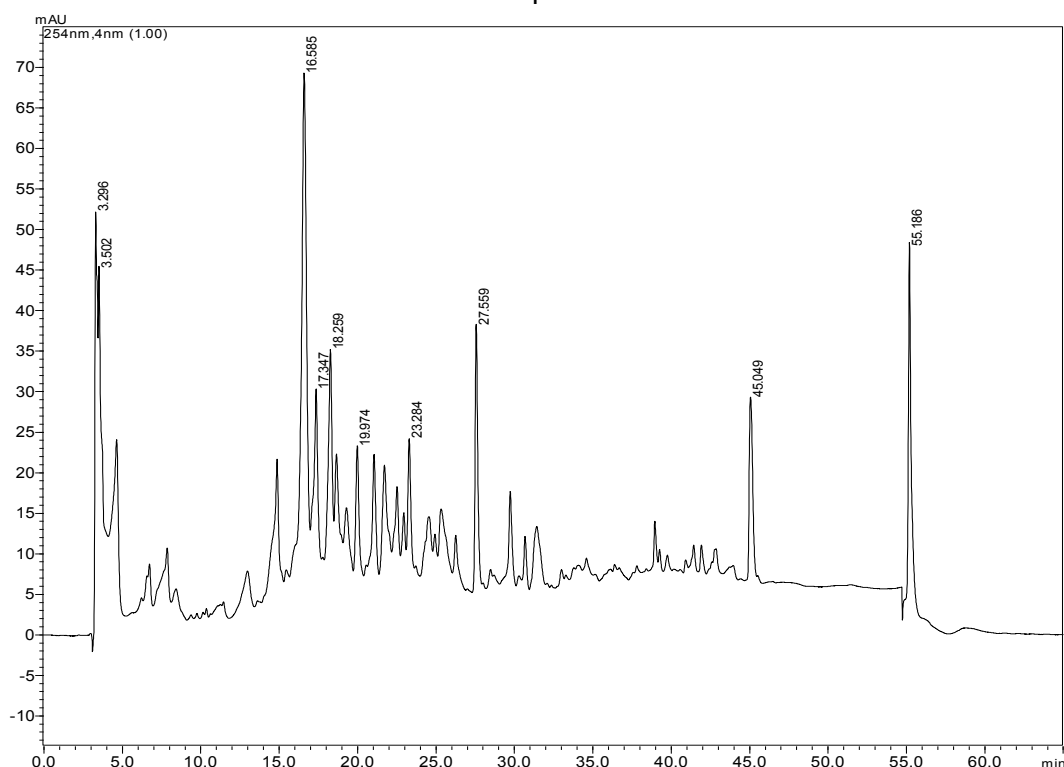


O extrato bruto também foi analisado por CLAE-DAD e os resultados evidenciaram a presença de uma diversidade bandas cromatográficas em diferentes

comprimentos de onda, apresentando bandas variando de média a alta polaridade, reproduzindo o observado em cultivo em escala reduzida.

Uma análise minuciosa de todos os cromatogramas do extrato bruto em MDB, em diferentes comprimentos de onda, utilizando o software LC- Solution permitiu selecionar o  $\lambda = 254\text{nm}$  (**Figura 24**) para estabelecer condições de gradientes de eluição para o desenvolvimento da CC utilizando C-18.

**Figura 24.** Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto MDB de *P. stipata* em MDB escala ampliada em  $\lambda = 254\text{ nm}$ .

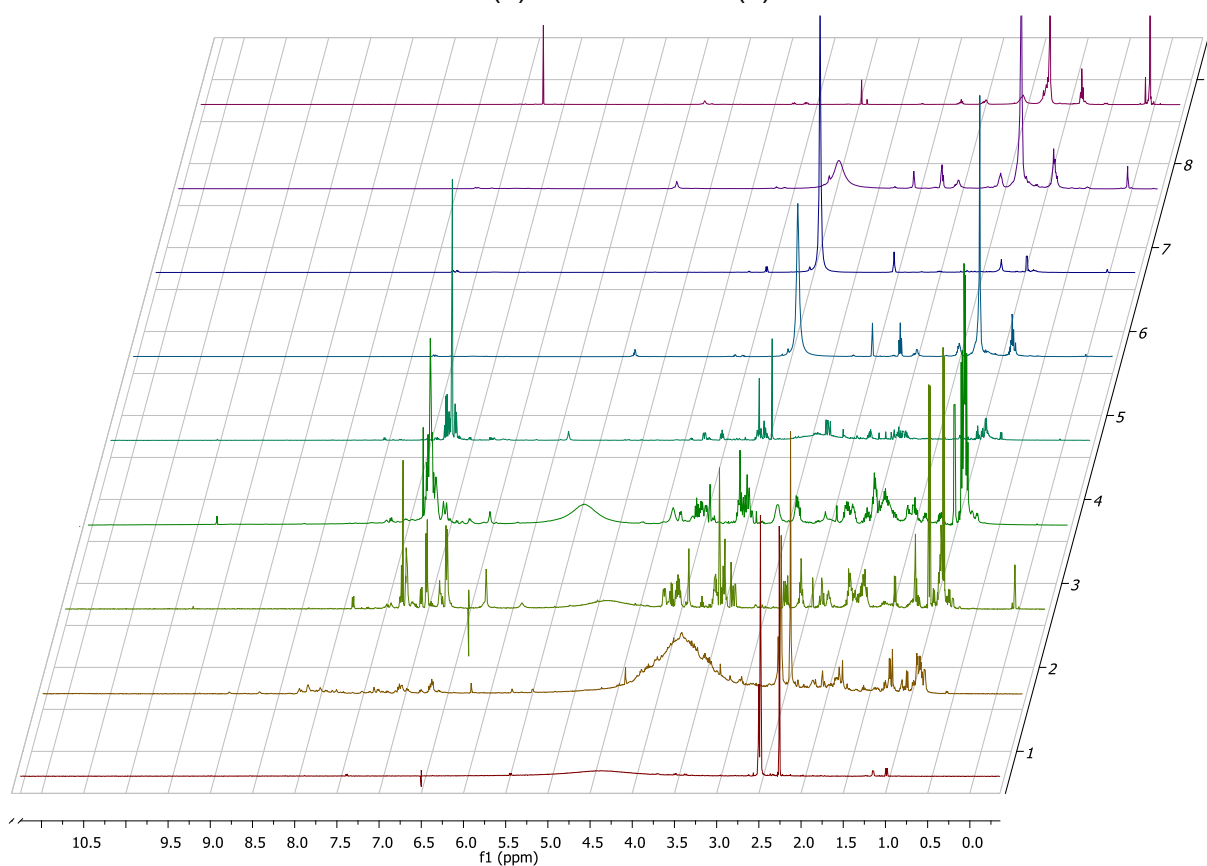


A análise do cromatograma em CLAE-DAD do extrato bruto (Ps-MDB) em escala ampliada conduziu a um fracionamento utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC) com fase reversa e sob pressão, conforme **Figura 11**. A fase reversa foi usada para reproduzir o comportamento do extrato no cromatograma em CLAE-DAD. Esta metodologia foi aplicada para pré-fracionar o extrato em “faixas” de polaridade para facilitar o posterior isolamento das substâncias.

Obteve-se 9 frações, as quais foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD para a avaliação do perfil químico.

Os cromatogramas obtidos apresentaram boa resolução e mostraram uma boa distribuição quanto à polaridade das substâncias nas frações. Foram então realizados experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 25**), para avaliação dos constituintes das frações mais promissoras, e foi possível em uma primeira análise observar sinais característicos de dicetopiperazinas nas frações Ps-MDBFr-03-05 e acilglicerídeos na fração Ps-MDBFr-09.

**Figura 25.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações: Ps MDB Fr01(1), Ps MDB Fr02(2), Ps MDB Fr03(3), Ps MDB Fr04(4), Ps MDB Fr05(5), Ps MDB Fr06(6), Ps MDB Fr07(7), Ps MDB Fr08(8) e Ps MDB Fr09(9).



### 4.3 Aspectos gerais da avaliação do extrato bruto obtido em milho do cultivo em escala ampliada do fungo *P. stipata*.

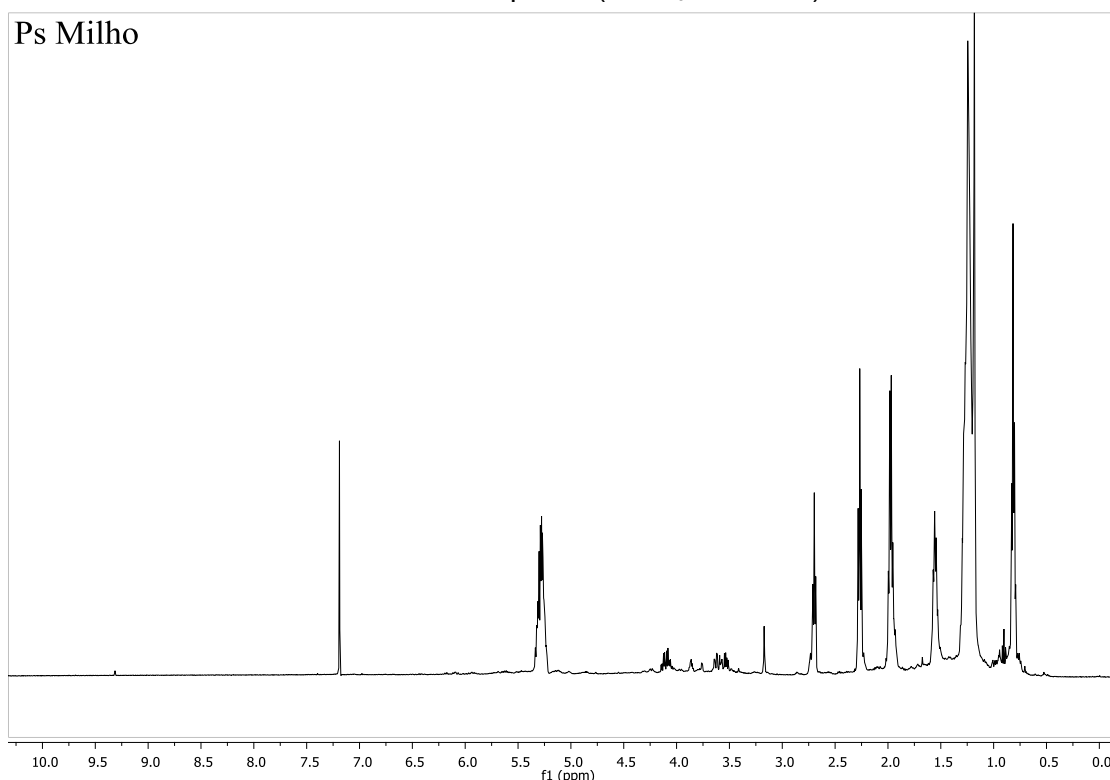
A experiência em nosso laboratório tem evidenciado que fungos endofíticos produzem uma grande massa de extrato bruto quando cultivado em milho, deste

modo optamos pelo cultivo neste meio evitando os mesmos problemas encontrados por Sordi, onde a massa reduzida de extrato bruto em MDB inviabilizou o isolamento de outras substâncias da classe das koningininas.

O cultivo de *Phomopsis stipata* em escala ampliada que se processou em milho foi realizado seguindo o mesmo método que em escala reduzida (**Figura 10**).

Após a obtenção do extrato bruto milho em escala ampliada (1,62 g), este foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 26**) e nos evidenciou a presença de sinais na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  3,5 a 4,2 na faixa de hidrogênios olefínicos além de metilenos em posição a grupos carboxílicos e alílicos além de sinais na região de metilas alifáticas. Este perfil evidencia, claramente, a presença de acilglicerídeos e ácidos graxos de cadeia longa.

**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto milho produzido por *Phomopsis stipata* escala ampliada ( $\text{CDCl}_3$  500 MHz).

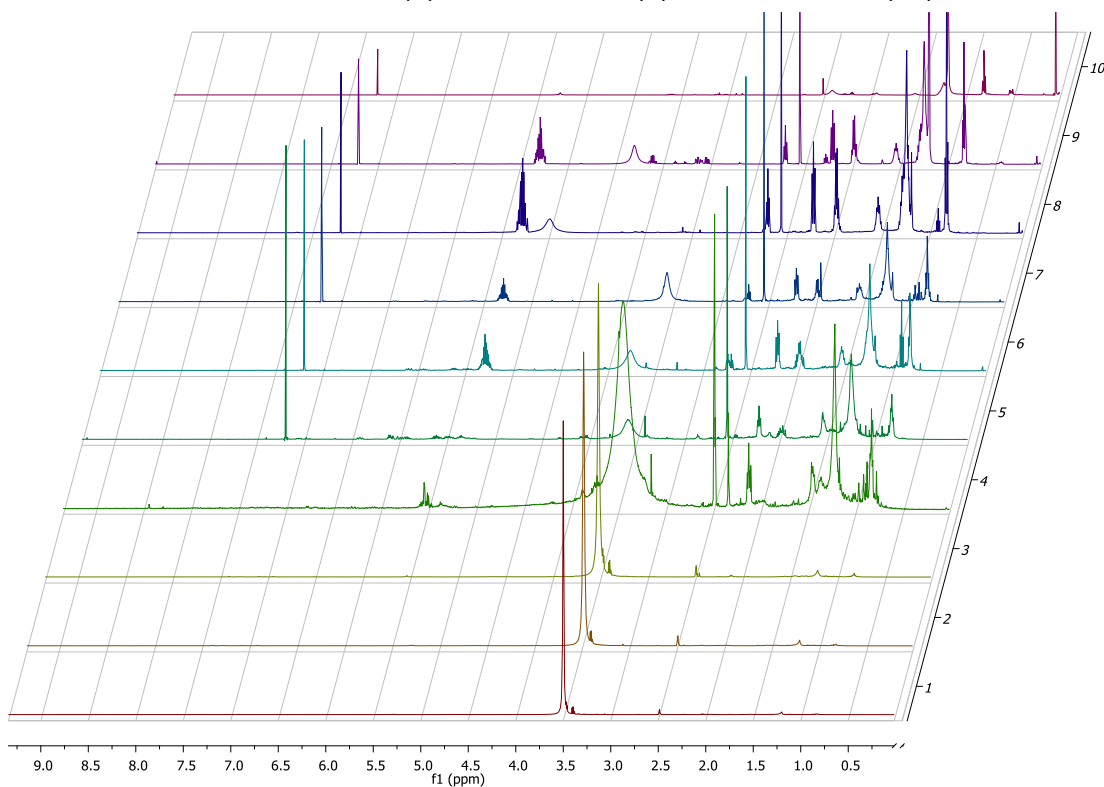


A análise do cromatograma em CLAE-DAD do extrato bruto (Ps-Milho) em escala ampliada, não trouxe resposta significativa, pois como constatamos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  o extrato apresentou basicamente substâncias de cadeia longa, o que dificultou a análise por CLAE-DAD. Estas observações nos conduziram

a um fracionamento utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC) com fase reversa e sob pressão, conforme **Figura 12**, no intuito de prospectar substâncias minoritárias. Esta metodologia foi aplicada para pré-fracionar o extrato em “faixas” de polaridade para facilitar o posterior isolamento das substâncias.

Obteve-se 10 frações (*Ps Milho* Fr01 a *Ps Milho* Fr10), as quais foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 27**) e CLAE-DAD para a avaliação do perfil químico.

**Figura 27.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações: *Ps Milho* Fr01(1), *Ps Milho* Fr02(2), *Ps Milho* Fr03(3), *Ps Milho* Fr04(4), *Ps Milho* Fr05(5), *Ps Milho* Fr06(6), *Ps Milho* Fr07(7), *Ps Milho* Fr08(8), *Ps Milho* Fr09(9) e *Ps Milho* Fr10(10).



Análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações, dos dados de CLAE e CCD nos evidenciou a presença de acilglicerídeos e ácidos graxos de cadeia longa e nos permitiu reunir as frações *Ps Milho* Fr06 a 10 de acordo com o perfil químico.

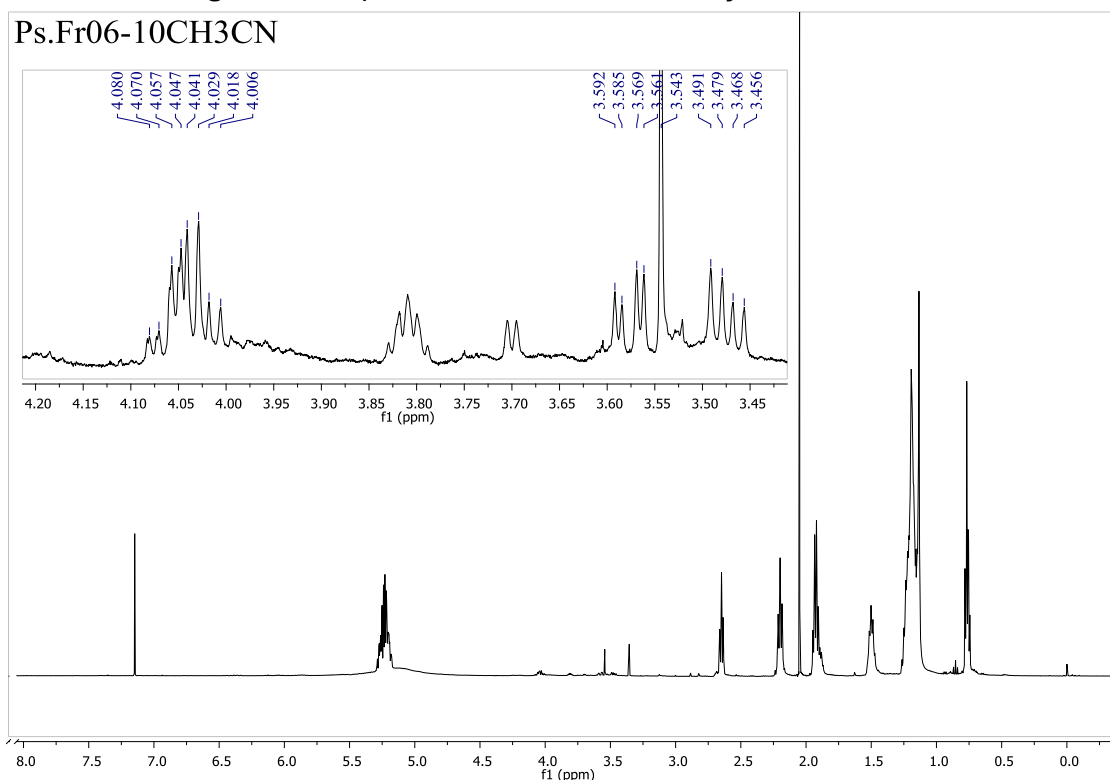
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração [*Ps*.Fr06-10] (1,35g) novamente nos evidenciou a presença de ácidos carboxílicos de cadeia longa glicerídeos. Estas observações nos conduziram a uma nova partição, conforme **Figura 13** objetivando a eliminação destes metabólitos que podem ser provenientes do meio de cultivo.

Este procedimento conduziu a duas frações codificadas [Ps.Fr06-10CH<sub>3</sub>CN] e [Ps.Fr06-10Hex] as quais foram submetidas a RMN de <sup>1</sup>H.

Análise por RMN de <sup>1</sup>H da fração [Ps.Fr06-10CH<sub>3</sub>CN] **Figura 28** foi surpreendente, pois evidenciou a apenas a presença de acilglicerídeos, o que foi confirmado pela observação dos sinais em δ<sub>H</sub> 4,01 - 4,08 e de δ<sub>H</sub> 3,46 - 3,59, muito bem definidos, evidenciando duplos dubletos e hidrogênios carbinólicos dos acilglicerídeos, respectivamente.

Por outro lado, a fração [Ps.Fr06-10Hex], mostrou apenas sinais referentes a hidrogênios olefinicos, metilas e metilenos, sugerindo a presença de ácidos graxos insaturados provenientes do meio de cultivo.

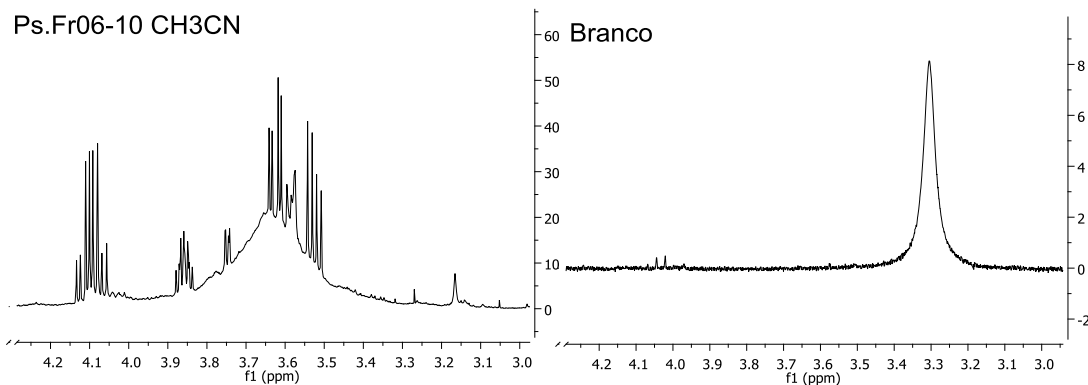
**Figura 28.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração Ps.Fr06-10CH<sub>3</sub>CN.



Para que não houvesse dúvidas quanto à procedência dos acilglicerídeos, o extrato do branco (milho sem endófito) foi obtido e comparado com a fração [Ps.Fr06-10ACN]. Para surpresa, observamos que o espectro obtido do branco não evidenciou a presença de acilglicerídeos, como pode ser observado na **Figura 29**.

Esta constatação é muito importante, pois mostra *P. stipata* como um endófito que produz precursores de biodiesel.

**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das frações *Ps.Fr06-10CH<sub>3</sub>CN* e Branco (obtida da extração do milho sem a inoculação do endófito) em  $\text{CDCl}_3$



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

Novas técnicas hífenadas tem se tornado as mais importantes estratégias para a identificação ou confirmação de identidade de compostos químicos conhecidos. Dentre elas podemos destacar a detecção de metabólitos em matrizes complexas através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto que para as técnicas espectrométricas podemos destacar o arranjo de diodos (DAD), a espectrometria de massas (EM) e, recentemente, a ressonância magnética nuclear (RMN), que são utilizadas na chamada desrepliação de misturas complexas, ou seja, para estabelecer quais já foram previamente identificadas.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) são as técnicas, mas utilizadas para a detecção da composição metabólica de um determinado sistema:

- A EM é altamente sensível e proporciona informações moleculares e padrões de fragmentos para uma ampla gama de metabólitos. No entanto, requer a confirmação a partir de padrões, que muitas vezes não estão disponíveis, especialmente para substâncias desconhecidas (TANG et al., 2009);
- A RMN possui robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos ativos orgânicos mais populosos:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  e permite que um catálogo

de espectros bi-dimensionais possa ser utilizado para obter conectividade atômica em uma molécula e subsequentemente a sua elucidação (VERPOORTE et al., 2007; KIM et al., 2010). Entretanto possui baixa sensibilidade intrínseca para baixas concentrações de metabólitos e a sobreposição de sinais em uma mistura complexa dificulta a elucidação da estrutura destes compostos em baixa concentração (TANG et al., 2009).

Análise detalhada dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , (**Figura 44 a 49**) nos permitiram visualizar sinais característicos de substâncias da classe de dicetopiperazinas nas frações Ps-MDB Fr03, Ps-MDB Fr04, Ps-MDB Fr05. Esta constatação aliada ao fato que temos isolado dicetopiperazinas em nosso laboratório por Chapla (2010) e Cafêu (2005) nos conduziu a escolha da técnica de desreplicação para o estudo químico do extrato bruto produzido pelo endófito *P. stipata*, evitando deste modo, o re-isolamento de substâncias conhecidas.

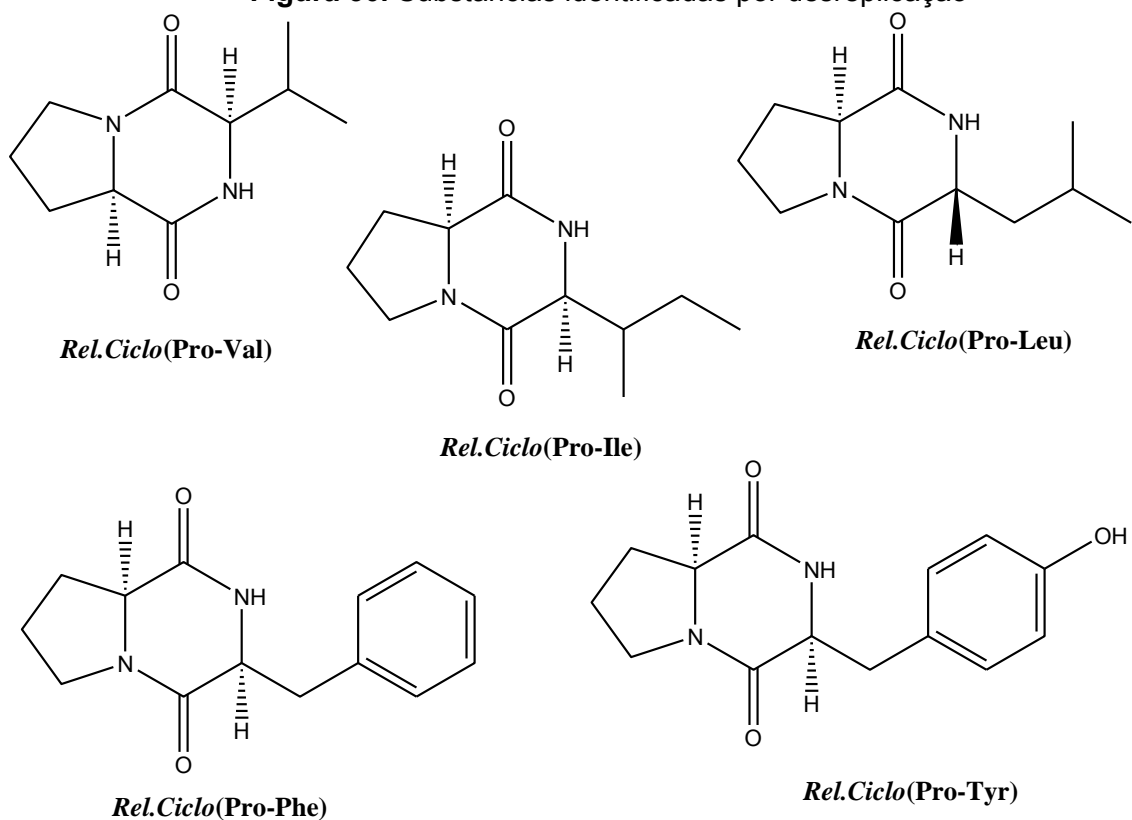
Para o estudo de desreplicação foi utilizado o software MestReNova ver. 6.0.2-5475, disponível no mercado. O software possui ferramentas que permitem a simulação de espectros virtuais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ , com uma margem de acerto acima de 95%. O programa permite a correção dos deslocamentos químicos a partir de dados reais, e assim, possibilita sua posterior projeção em espectros reais, fornecendo assim um meio de comparação de dados.

Com base nessa ferramenta, foi realizada a projeção de algumas substâncias nos espectros das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto de MDB (escala ampliada).

A metodologia utilizada para a desreplicação através de RMN iniciou-se com a elaboração de padrões virtuais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da classe das dicetopiperazinas, a correção dos deslocamentos químicos a partir de dados obtidos por Chapla (2010) e Cafêu (2005). Estas correções foram realizadas em condições idênticas às análises realizadas com as frações obtidas de *P. stipata*.

O resultado desta comparação evidenciou a presença de cinco dicetopiperazinas (**Figura 30**) diferentes para as frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de Ps-MDB.

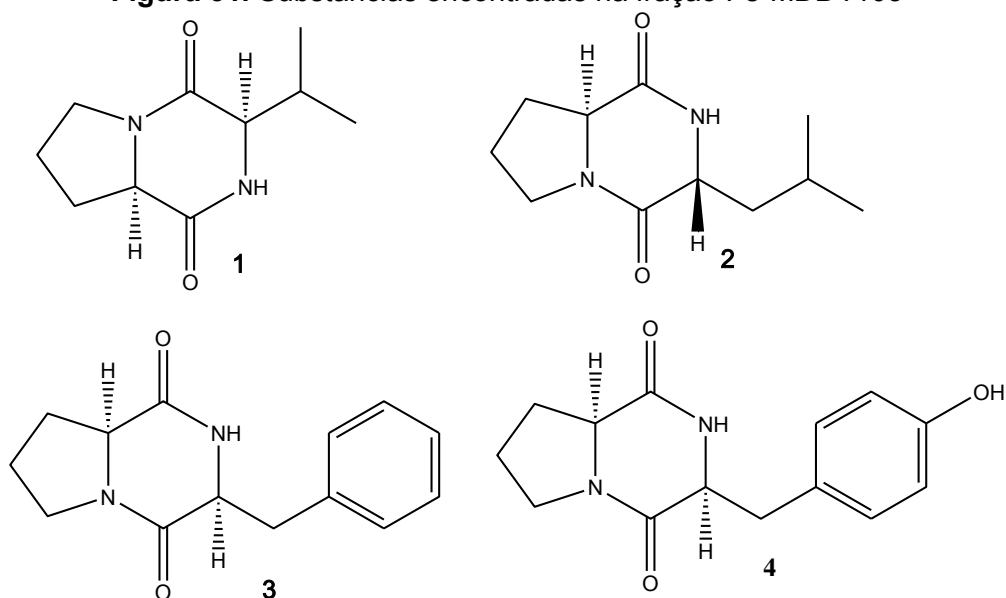
**Figura 30.** Substâncias identificadas por desreplicação



#### 4.4.1 Desreplicação fração Ps-MDB Fr03

Para a fração Ps-MDB Fr03 foram encontradas quatro dicetopiperazinas, sendo *Rel.ciclo* (Pro-Val) **(1)**, *Rel.ciclo* (Pro-Leu) **(2)**, *Rel.ciclo* (Pro-Phe) **(3)** e *Rel.ciclo* (Pro-Tyr) **(4)** (**Figura 31**).

**Figura 31.** Substâncias encontradas na fração Ps-MDB Fr03

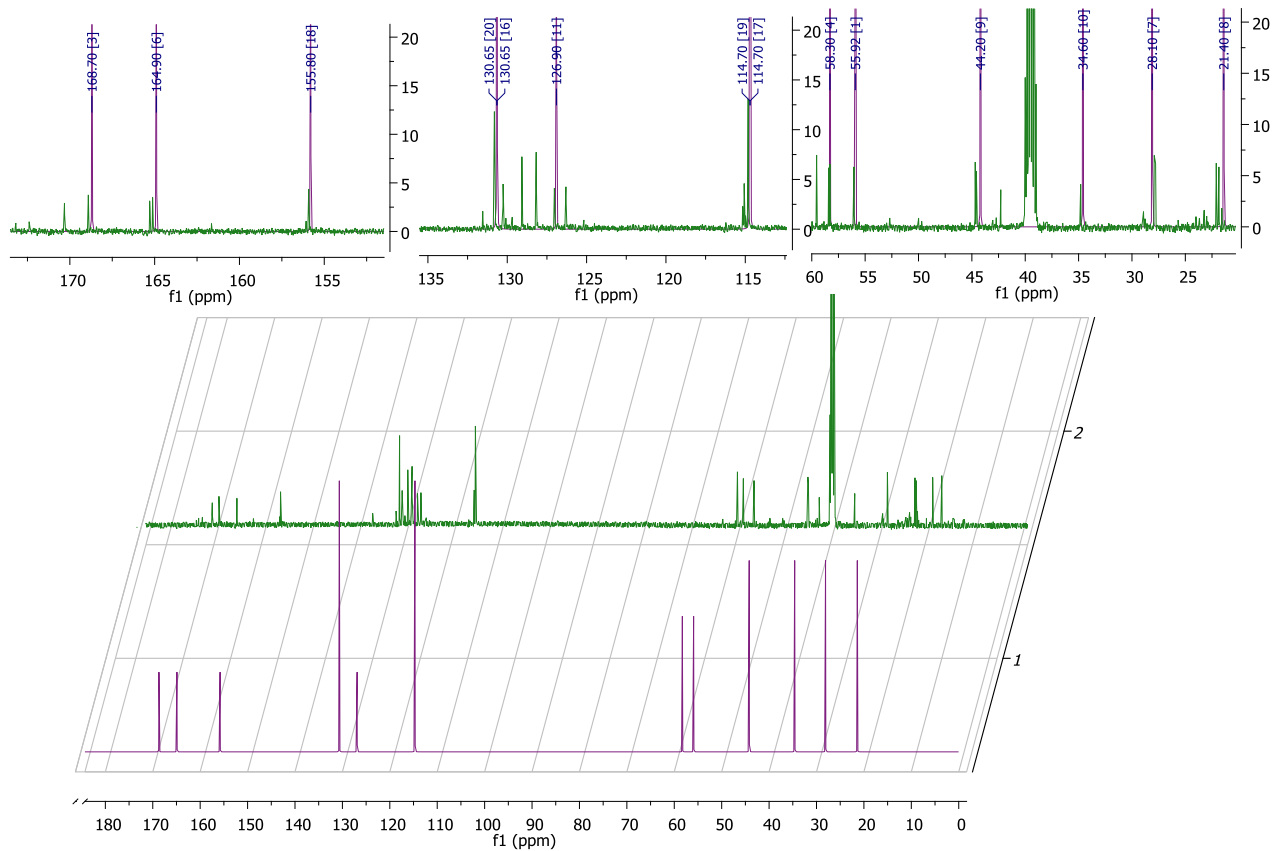


A dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Pro-Tyr) foi selecionada para demonstração da metodologia de desreplicação. Para a análise dos conjuntos de espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foram selecionadas as regiões com sinais característicos para os metabolitos de interesse. A primeira região a ser expandida para análise foi sob o intervalo de 4,02 a 4,25 ppm para o RMN de  $^1\text{H}$ , e duas carbonilas em 168,7 e 165,0 ppm para o RMN de  $^{13}\text{C}$ , permitindo a visualização da presença de sinais característicos de anel dicetopiperazínico.

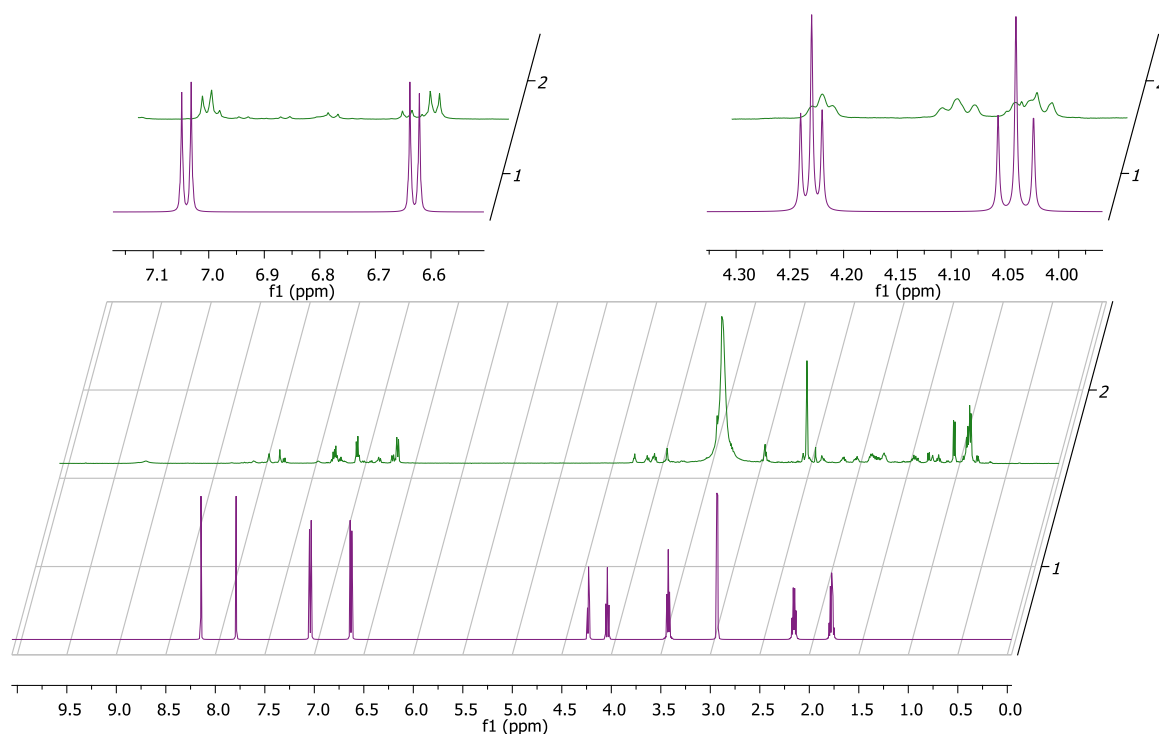
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,05 ( $J=6,5$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,64 ( $J=6,5$  Hz) indicando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído. A presença do deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  155,8 indicou a presença de um grupo OH ligado ao anel aromático sugerindo a presença do resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr).

As **Figuras 32 e 33** mostram as simulações e comparações dos espectros virtuais e reais, para a identificação da dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Pro-Tyr).

**Figura 32.** Projeção do Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *Rel.ciclo* (Pro-Tyr) com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração PsMDB Fr03.



**Figura 33.** Projeção do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  *Rel.ciclo* (Pro-Tyr) com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração PsMDB Fr03.



O mesmo tratamento realizado para *Rel.ciclo* (Pro-Tyr) com o programa Mestre Nova® foi realizado para a *Rel.ciclo* (Pro-Val), *Rel.ciclo* (Pro-Phe) e *Rel.ciclo* (Pro-Leu), e os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono também foram corrigidos a partir de dados obtidos por Chapla (2010) e Cafêu (2005), que permitiu, por comparação dos sinais (tripletos, multipletos, etc.) e deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos, a afirmação de que a *Rel.ciclo* (Pro-Val), *Rel.ciclo* (Pro-Phe) e *Rel.ciclo* (Pro-Leu) estão presente na fração Ps MDB Fr03.

Visando a confirmação das dicetopiperazinas propostas na fração Ps MDB Fr03, efetuou-se um experimento de espectrometria de massas (FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, modo positivo) para identificar os íons produtos das dicetopiperazinas (**Tabela 6. Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr03.**). A faixa de aquisição foi de  $m/z$  50-500. Foi selecionado o modo positivo assim como adição de ácido, pois é conhecido que dicetopiperazinas fragmentam melhor nestas condições.

O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa  $m/z$  estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS<sup>n</sup> realizados a partir de dados da primeira varredura para os íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 20 e 27%

da energia total do instrumento. O software Xcalibur (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição dos dados e processamento dos dados espectrométricos.

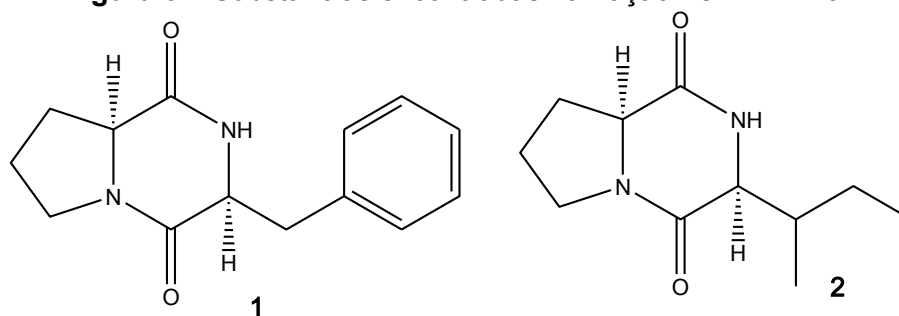
**Tabela 6.** Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr03.

Substância	$([M+H]^+)$ <i>m/z</i>	Espectro
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Val)	197,68	Figura 50
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Leu)	211,50	Figura 51
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe)	245,94	Figura 52
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Tyr)	261,32	Figura 53

#### 4.4.2 Desreplicação fração Ps-MDB Fr04

Para a fração Ps-MDB Fr04 foram encontradas as dicetopiperazinas, *Rel.ciclo* (Pro-Phe) (**1**) e *Rel.ciclo* (Pro-Ile) (**2**), **Figura 34**.

**Figura 34.** Substâncias encontradas na fração Ps-MDB Fr04

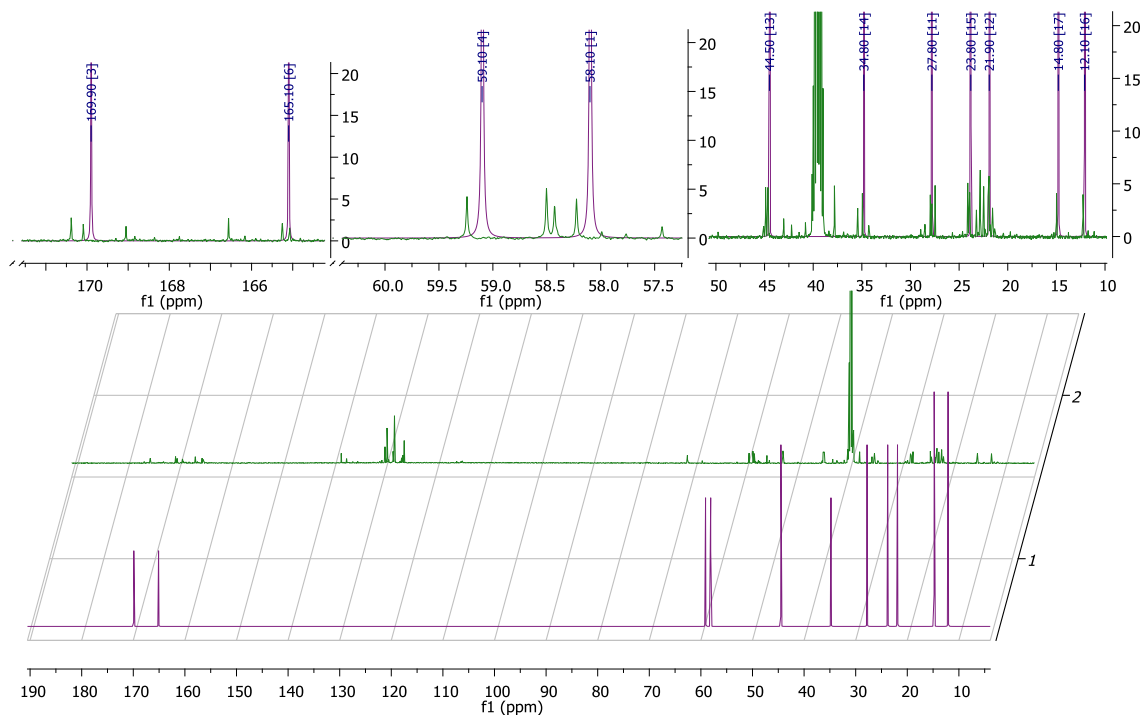


A dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Pro-Ile) foi selecionada para demonstração da metodologia de desreplicação. Para a análise do RMN de  $^{13}\text{C}$ , foram selecionadas as regiões com sinais característicos para os metabolitos de interesse. A primeira região a ser expandida para análise foi sob o intervalo em 169,9 e 165,2 ppm para o RMN de  $^{13}\text{C}$ , permitindo a visualização da presença de sinais característicos de anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  12,10 e  $\delta_{\text{C}}$  14,80 sugerindo a presença do resíduo do aminoácido Isoleucina (Ile).

A **Figura 35** mostra a simulação e comparação do espectro virtual e real, para a identificação da dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Pro-Ile).

**Figura 35.** Projeção do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *Rel.ciclo* (Pro-Ile) com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração PsMDB Fr04.



Visando a confirmação das dicetopiperazinas propostas na fração Ps MDB Fr04, efetuou-se um experimento de espectrometria de massas (FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, modo positivo) para identificar os íons produtos das dicetopiperazinas (**Tabela 7**). A metodologia aplicada foi idêntica a realizada na fração Ps MDB Fr03.

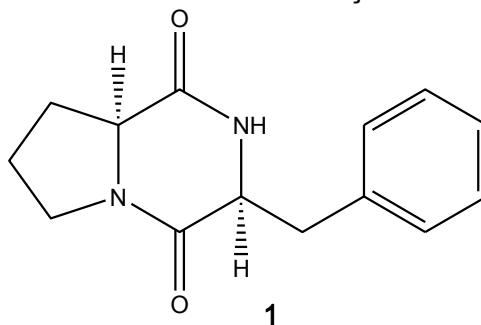
**Tabela 7.** Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr04.

Substância	$([\text{M}+\text{H}]^+)$ $m/z$	Espectro
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Leu)	211,47	Figura 54
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe)	245,68	Figura 55

#### 4.2.3 Desreplicação fração Ps-MDB Fr05

Para a fração Ps-MDB Fr05 foi encontrada uma dicetopiperazina, sendo ela a *Rel.ciclo* (Pro-Phe) (**1**), **Figura 36**.

**Figura 36.** Substância encontrada na fração Ps-MDB Fr05

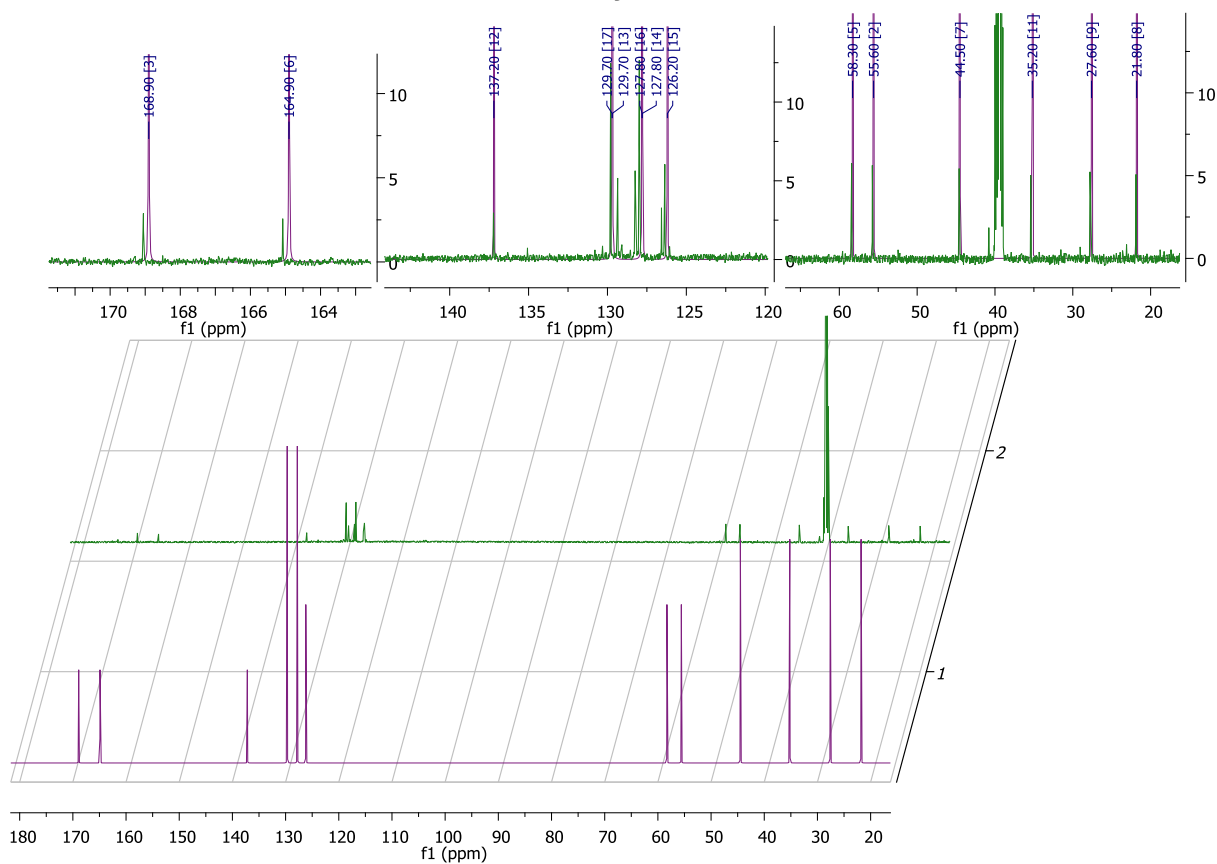


A dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Pro-Phe) foi identificada com base na análise do RMN  $^{13}\text{C}$ , a primeira região a ser expandida para análise foi sob o intervalo em 169,05 e 165,20 ppm para o RMN de  $^{13}\text{C}$ , permitindo a visualização da presença de sinais característicos de anel dicetopiperazínico.

Na região dos aromáticos, foram visualizados sinais em  $\delta_{\text{C}}$  129,7;  $\delta_{\text{C}}$  127,8 e  $\delta_{\text{C}}$  126,20 evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído, sugerindo uma unidade de fenilalanina (Phe).

A **Figura 37** mostra a simulação e comparação do espectro virtual e real, para a identificação da dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Pro-Phe).

**Figura 37.** Projeção do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *Rel.ciclo*(Pro-Phe) com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração PsMDB Fr05.



Visando a confirmação das dicetopiperazinas propostas na fração Ps MDB Fr05, efetuou-se um experimento de espectrometria de massas (FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, modo positivo) para identificar os íons produtos das dicetopiperazinas (**Tabela 8**). A metodologia aplicada foi idêntica a realizada na fração Ps MDB Fr03.

**Tabela 8.** Substâncias identificadas na Ps-MDB Fr05.

Substância	$([\text{M}+\text{H}]^+)$ $m/z$	Espectro
<i>Rel.ciclo</i> (Pro-Phe)	245,72	Figura 56

### 4.3 Prospecção de acilglicerídeos em *Phomopsis stipata*

O potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos tem sido muito estudado. Recentemente pesquisas relatam a utilização desses microrganismos na geração de bioenergia.

Consequências ambientais negativas geradas pela produção de combustíveis fósseis e discussões sobre o abastecimento de petróleo têm estimulado a busca por biocombustíveis renováveis (MENG, et al.; 2009).

Na maioria dos casos, a produção de lipídeos a partir de microrganismos vem na forma de triglicerídeos, que são também o principal componente dos óleos vegetais e gorduras animais. Portanto, lipídios oriundos de microrganismos podem ser usados como uma matéria-prima para produção biodiesel (SANTOS-FO, et al.; 2011).

A produção de biodiesel de origem microbiana requer otimização biotecnológica constante e técnicas de engenharia genética tem sido utilizadas para aumentar a geração de lipídeos microbianos em fungos. Por exemplo, o fungo *Mucor circinelloides*, que foi usado pela primeira vez para a produção comercial de lipídeos microbianos, teve seu genoma sequenciado, e técnicas de engenharia genética têm sido aplicadas para a otimização da produção de biocombustíveis (MENG, et al.; 2009).

A manipulação e regulação da biossíntese dos lipídeos microbianos abre possibilidade de pesquisa acadêmica e demonstra o potencial de sua aplicação industrial na produção de biocombustíveis.

Considerando o grande empenho governamental na obtenção de biocombustíveis oriundos de fontes renováveis, e as evidências de acilglicerídeos produzidos pelo endófito *P. stipata*, nos empenhamos na análise deste precursor nas frações *Ps* MDB Fr09 e *Ps* Fr06-10CH<sub>3</sub>CN. Considerando que por RMN de <sup>1</sup>H não é possível distinguir entre mono, di e triacilglicerídeos, optamos pela Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR), de acordo com a resolução ASTM 6584, para atingir este objetivo.

A presença de acilglicerídeos para ambas as frações foi proposta com base nos sinais observados em RMN de <sup>1</sup>H com um tripleto em 0,80 ppm e multipletos na região de 1,19; 1,90; 2,30; 4,07; 4,20 e 5,28 ppm.

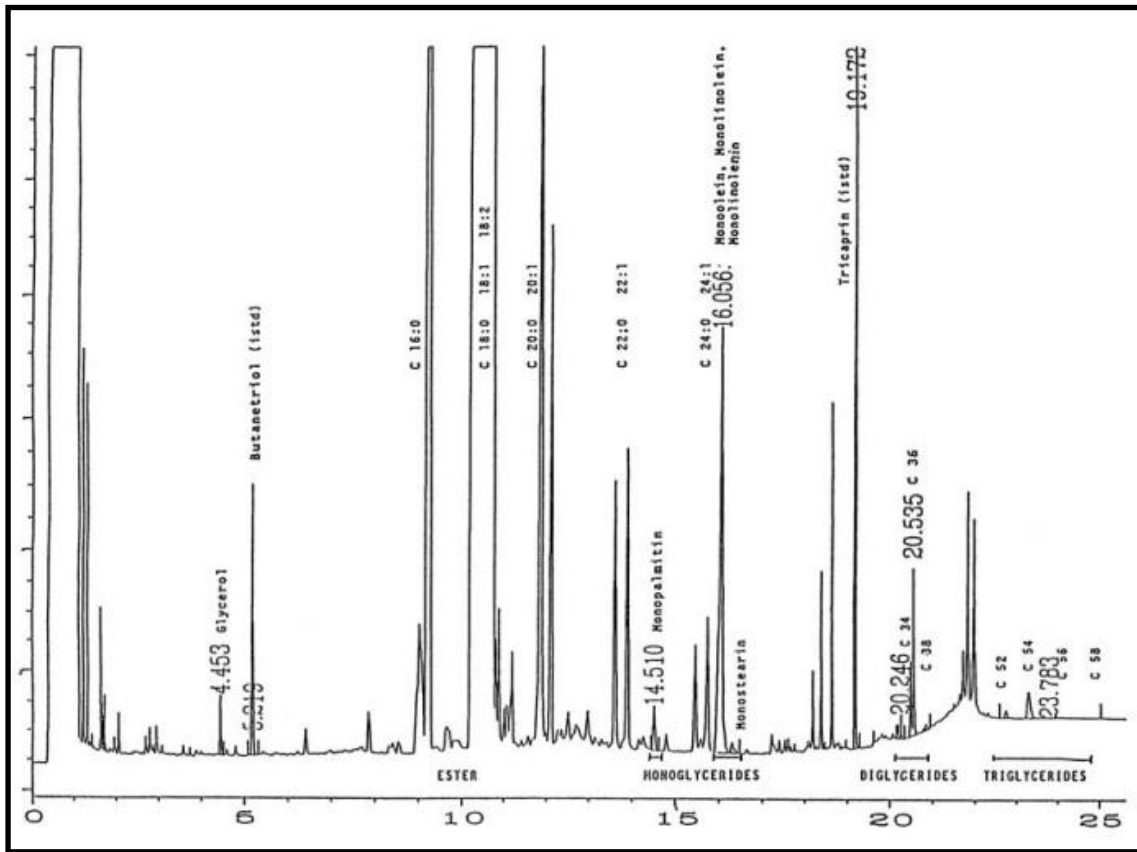
A técnica de CGAR apresenta limitações relacionadas com a elevada polaridade, baixa volatilidade ou estabilidade térmica de vários compostos, que pode ser contornada através da derivatização. Compostos contendo massa molecular elevada e grupos polifuncionais não são, usualmente, adequados à análise direta por cromatografia gasosa. Em geral esses grupos funcionais possuem características bastante polares e reduzem sua volatilidade tornando o tempo de retenção longo, em casos extremos, os analitos não são eluídos da coluna, um exemplo é a análise de ácidos carboxílicos (LANÇAS, 1993).

Vários autores utilizam a reação de silanização para análise de ácidos graxos e acilglicerídeos (FAY, RICHLI, 1991).

A silanização é um tipo de derivatização e estabelece ligações com os grupos hidroxilas formando uma malha com grupos não polares. A reação de silanização envolve duas etapas distintas: inicialmente ocorre a hidrólise do grupo Si-O-CH<sub>3</sub> do agente de “acoplamento” e, em seguida a reação de condensação de SiOH com os grupos OH da molécula.

Os cromatogramas dos padrões segundo o método ASTM 6584 está indicado. **(Figura 38)** A sequência de eluição dos compostos analisados é: glicerol (derivatizado), padrão interno butanotriol, ésteres metílicos, monoacilglicerídeos (derivatizados), padrão interno tricaprina, diacilglicerídeos (derivatizados) e os triacilglicerídeos (derivatizados).

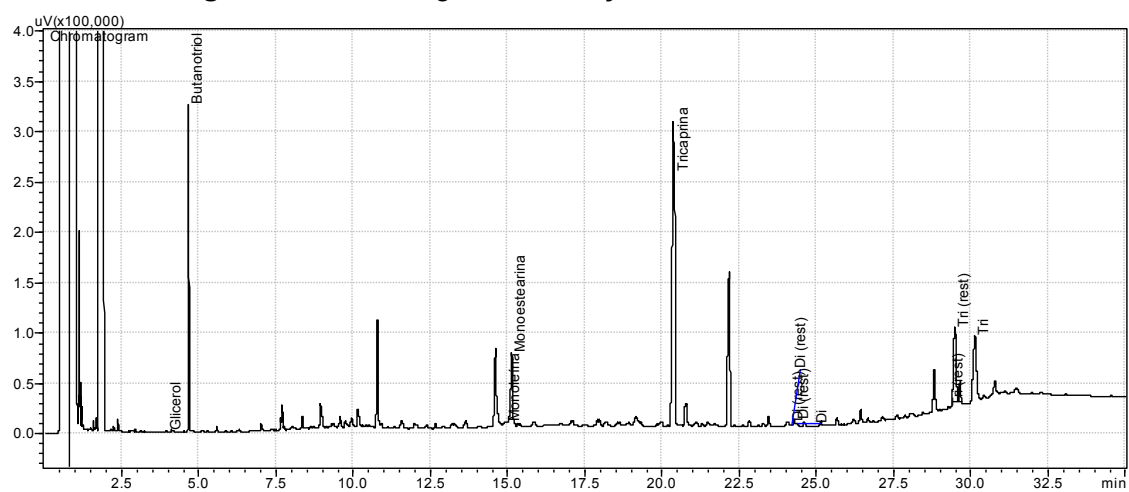
**Figura 38.** Cromatograma dos padrões - ASTM



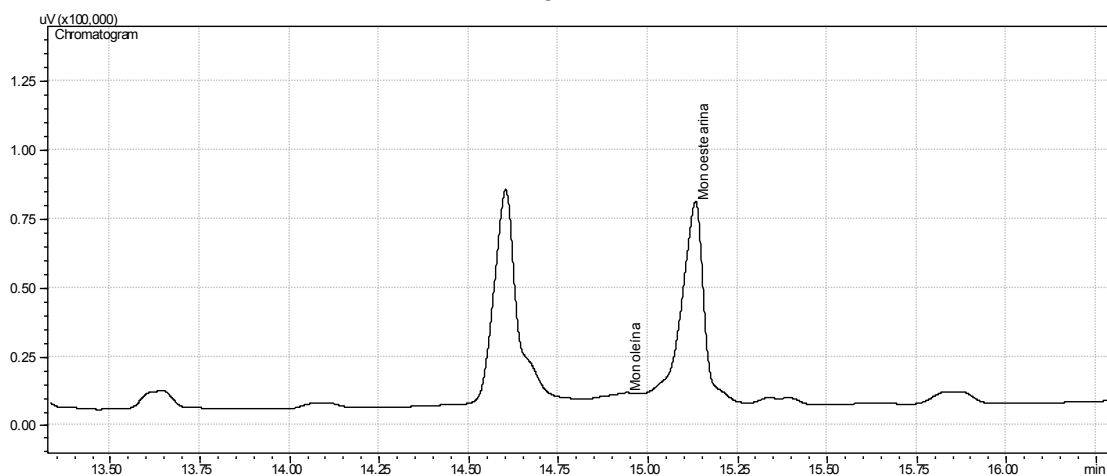
(Fonte: ASTM 6584)

Análise dos cromatogramas (**Figura 39 - 41**) obtidos da fração Ps MDB Fr09 evidenciou a presença de mono e triacilglicerídeos. Tal afirmação é baseada nos tempos de retenção previamente estabelecidos pela norma ASTM 6540 que determina a região do cromatograma onde mono, di e tri acilglicerídeos são observados.

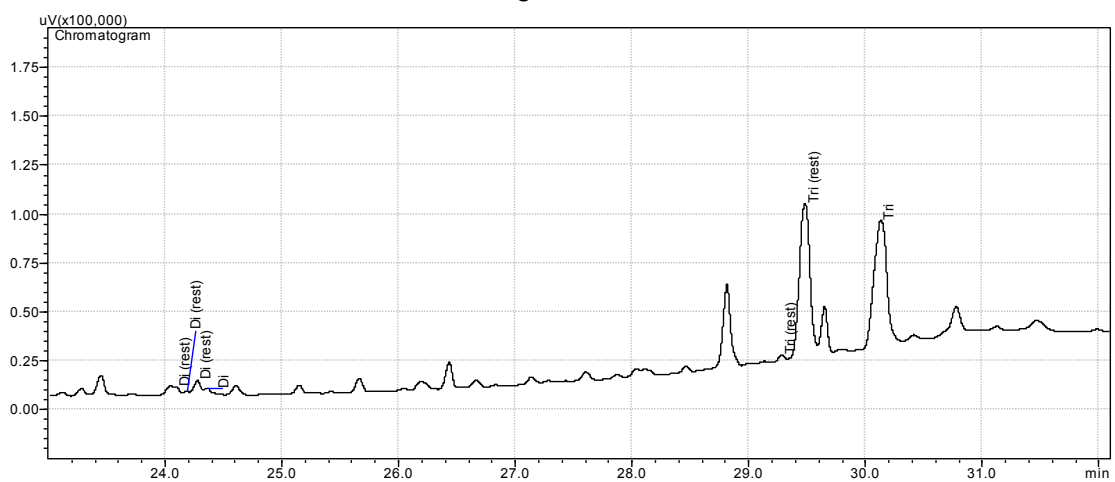
**Figura 39.** Cromatograma da fração Ps MDB Fr09 + MSTFA



**Figura 40.** Ampliação do cromatograma da fração Ps MDB Fr09 + MSTFA, na região dos monoacilglicerídeos.

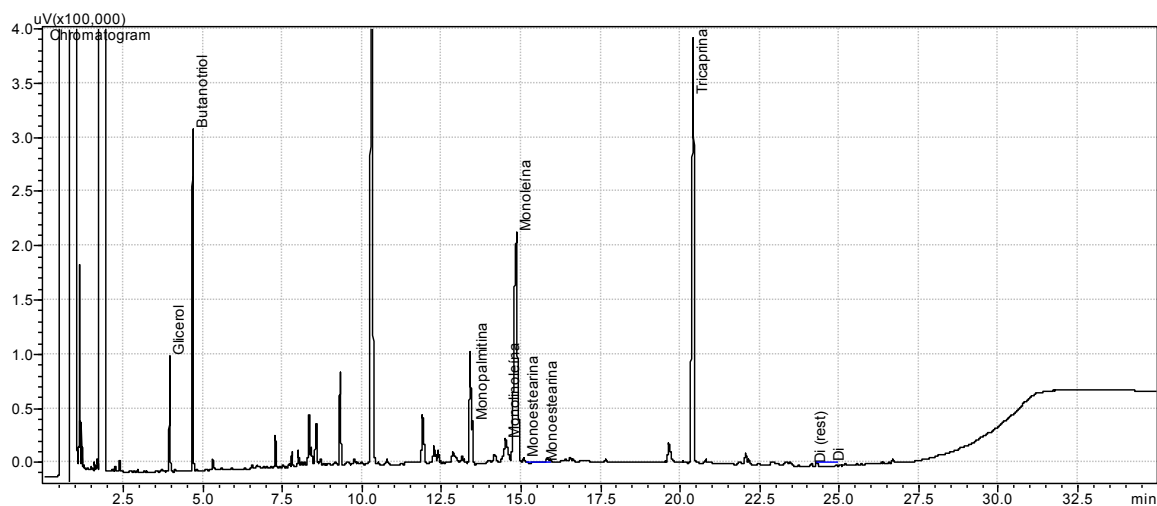


**Figura 41.** Ampliação do cromatograma da fração Ps MDB Fr09 + MSTFA, na região dos triacilglicerídeos.

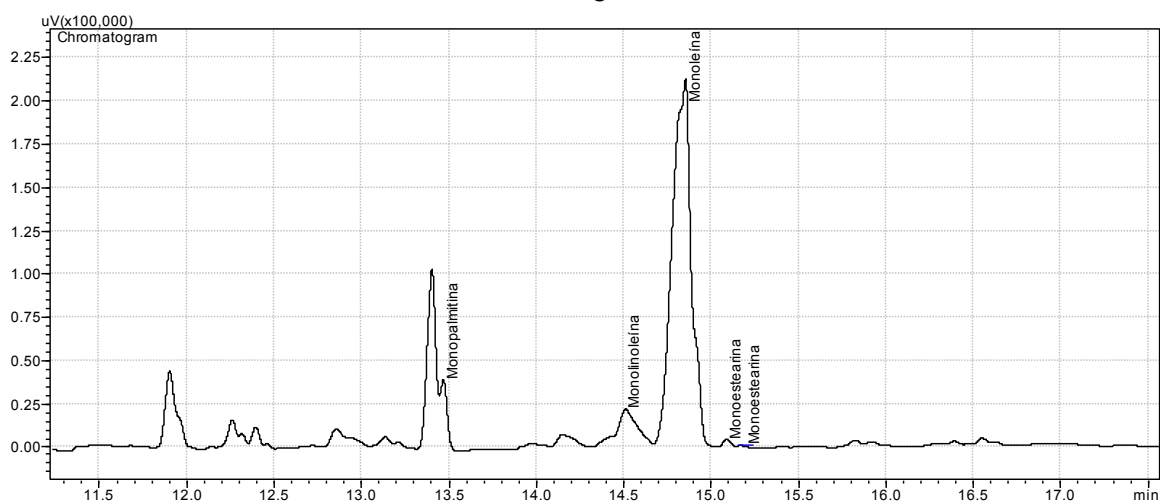


Análise dos resultados claramente mostra que a fração [Ps.Fr06-10ACN], contém uma mistura de monoacilglicerídeos (Figuras 42 e 43).

**Figura 42.** Cromatograma da fração [Ps.Fr06-10ACN] + MSTFA



**Figura 43.** Ampliação do cromatograma da fração [Ps.Fr06-10ACN] + MSTFA, na região dos monoacilglicerídeos.



Os resultados obtidos evidenciam *Phomopsis stipata* como um excelente produtor de metabólitos secundários com potencial para produção de biodiesel além de produzir substâncias potencialmente bioativas.

## 5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu um melhor conhecimento do metaboloma do endófito *Phomopsis stipata* quando comparamos os diferentes meios de cultivo utilizados. Foram observados diferentes perfis cromatográficos e diferentes espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , existindo pequenas semelhanças quantitativas e qualitativas, evidenciando que a alteração na composição dos meios de cultura provoca variação no metabolismo do fungo e, portanto, evidencia uma prolífica produção metabólica de *P. stipata*.

A utilização de técnicas inovadoras no desenvolvimento da desreplicação permitiu a rápida identificação de dicetopiperazinas produzidas por *P. stipata*. Este método se mostrou satisfatório uma vez que as dicetopiperazinas foram identificadas em matrizes complexas e com o auxílio da espectrometria de massas puderam ser identificadas 5 dicetopiperazinas sem a necessidade de isolamento das mesmas.

As dicetopiperazinas identificadas apresentam atividades bioherbicidas, inibidora da enzima acetilcolinesterase, antioxidante e atividade moderada contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. shaerospermum*, permitindo assim sugerir uma possível interação ecológica entre este endófito e a planta-hospedeira protegendo-a contra possíveis fitopatógenos.

Os resultados obtidos evidenciam *P. stipata* como um excelente produtor de metabólitos secundários com potencial para produção de biocombustíveis. Obviamente, a utilização de fungos endófitos com a capacidade de produzir acilglicerídeos não é uma solução imediata para a produção alternativa de combustíveis fósseis, mas indicada uma possibilidade de estudos nessa área.

Estes resultados reforçam a potencialidade deste microrganismo como fontes de metabólitos secundários e indica novas perspectivas ao potencial biotecnológico deste endófito.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, Calyx CF. Podatyda. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.
- ALCANO, I. E. **Fundamentals of microbiology**. 4th ed. Redwood City: Benjamin Cummings, 1994. p. 421-450.
- ALY, H. A.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.
- AMERICAN STANDARD TESTING METHODS. **D6584**: standard test method for determination of total monoglycerides, total diglycerides, total triglycerides, and free and total glycerin in B-100 biodiesel methyl esters by gas chromatography. Pennsylvania, 2011. 9 p.
- ARNOLD, A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. (Ed.). **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010. 533 p.
- BACCHI, E. M. et al. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, p. 204-207, 1995.
- BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 4. ed. São Paulo: EDEL, 1976. v. 1, p. 396.
- 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.
- BILLS, G. F. Analyses of microfungi diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. S33-S41, 1995.
- CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

- COCKRUM, P. A.; PETTERSON, D. S.; EDGAR, J. A. Identification of novel *Phomopsis* in *Lupin* seed extracts. In: DORLING, P. R. **Agricultural, phytochemical and ecological aspects: plant-associated toxins**. Wallingford: CAB, 1994. p. 232-237.
- COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 74.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.
- DURRETT, T. P.; BENNING, C.; OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **Plant Journal**, v. 54, p. 593-607, 2008.
- FAY, L.; RICHLI, U. Location of bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 541, p. 89-98, 1991.
- GALLO, M. B. C. et al. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKIA, R. (Ed.). **Microbial biotechnology**. New Delhi: New India Publishing Agency, 2008. p. 139-168.
- GILG, E. **Botanica aplicada a la farmacia**. 6. ed. Buenos Aires: Labor, 1926. p. 437-438.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 509-526, 2006.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.
- HEMTASIN, C. et al. Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. **Journal Natural Products**. v. 74, n. 4, p. 609-613, 2011.
- HUSSAIN, H. et al. New bioactive 2, 3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 64, p. 749-756, 2009.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, p. 536-549, 2010.
- LA CASA, S. et al. Evidence for protective and antioxidant of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: ACTA, 1993. 240 p.

- LANG, G. et al. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.
- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749-756, 2008.
- LIN, T. et al. Three new oblongolides from *Phomopsis* sp. XZ-01, an endophytic fungus from *Camptotheca acuminata*. **Molecules**, v. 16, p. 3351-3359, 2011.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. p. 332.
- LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Planta Science**, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.
- MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, p. 9923-9932, 2007.
- MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1-5, 2009.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MULLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.
- NG, J. et al. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Natural Methods**, v. 6, n. 8, p. 596-599, 2009.
- PAULLETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samyoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.
- PAULETTI, P. M. et al. The Styracaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 576-590, 2006.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed.: São Paulo: Makron Books, 1996. p. 146-170; 290-329.
- PFENNING, L. H. **Introdução a micologia**. Lavras: Ed. UFLA, 2000. p. 38.
- PRITI, V. et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, 2009.
- PURI, S. C. et al. An endophytic fungus from *Nathapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale**: the extra pharmacopeia. 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 1756.

ROPERO, D. K. **Detecção in silico e caracterização estrutural dos constituintes micromoleculares majoritários do fungo endofítico *Phomopsis stipata* isolado das folhas de *Styrax camporum* Pohl (Styracaceae) usando CLAE-DAD/EMAR e CG-MS**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SANTOS FILHO, F. C. et al. Endophytic fungi as a source of biofuel precursors. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 728-733, 2011.

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

SILVA, D. A. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria sp.*, *Phomopsis cassiae* e *Acremonium sp.* Associados com espécies vegetais de Cerrado**. 2005. 306 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SORDI, R. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados das folhas de *Styrax camporum* Pohl (Styracaceae)**. 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química)–Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

STIELE, A.; STROBEL, G. A.; STIELE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A. et al. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Microbiology**, v. 154, p. 3319-3328, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TANG, H.; XIAOA, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 5157-5162, 2009.

VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidantes de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase**. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 3-14, 2007.

WINK, M. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. **Natural Products Communication**, v. 3, p.1205-1216, 2008.

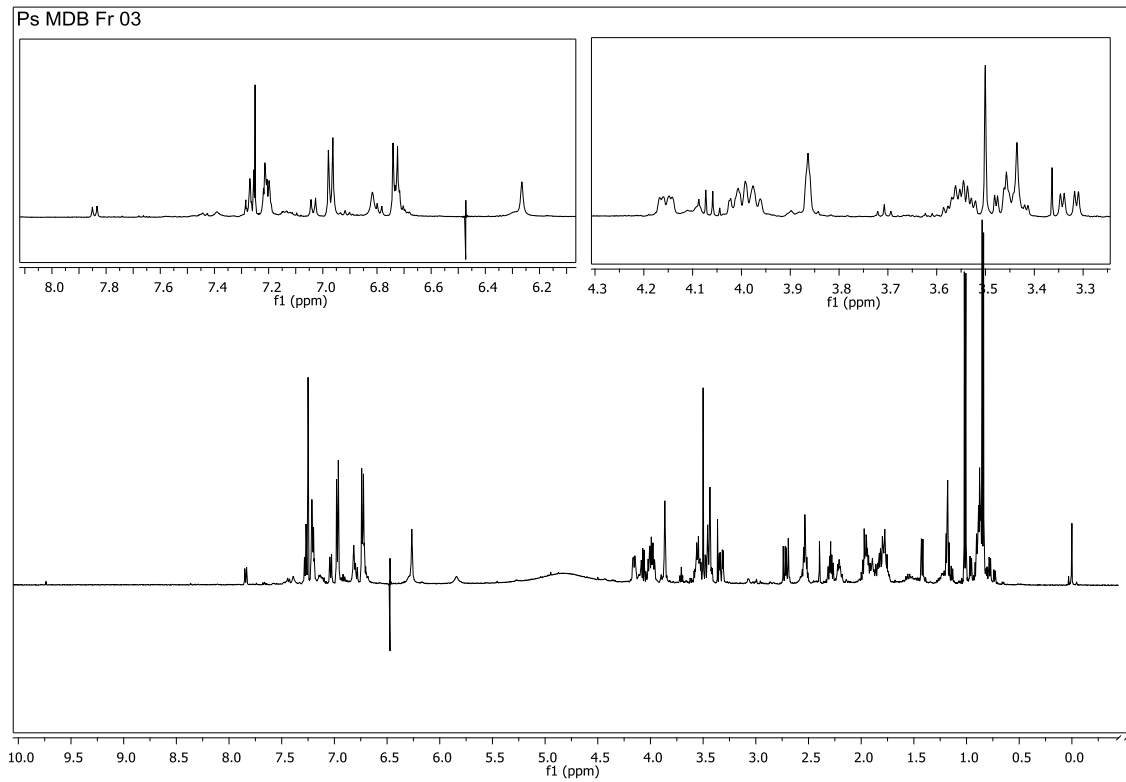
WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural identification of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p. 437-455, 2003.

YANG, X. et al. Preliminary study of vincristine-endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v. 35, p. 79-81, 2004.

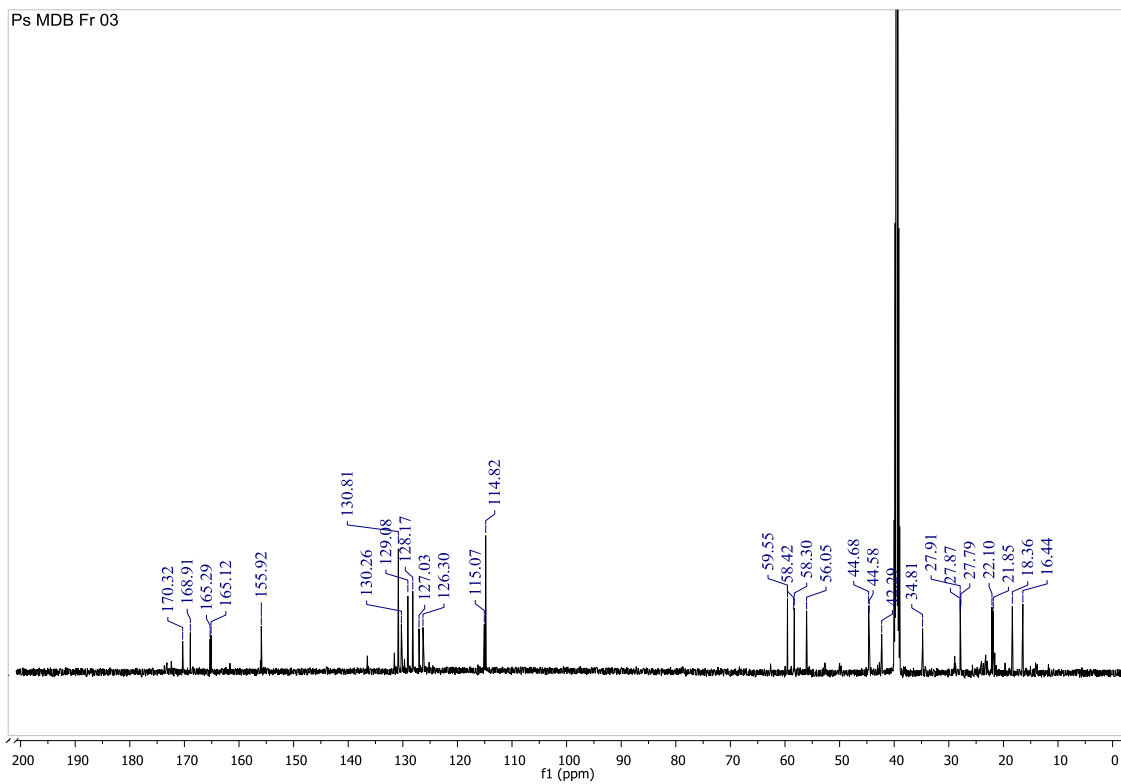
ZIKMUDOVA, M. et al. Biotransformation of 2-benzoxazinone and 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4863-4870, 2002.

## **ANEXOS**

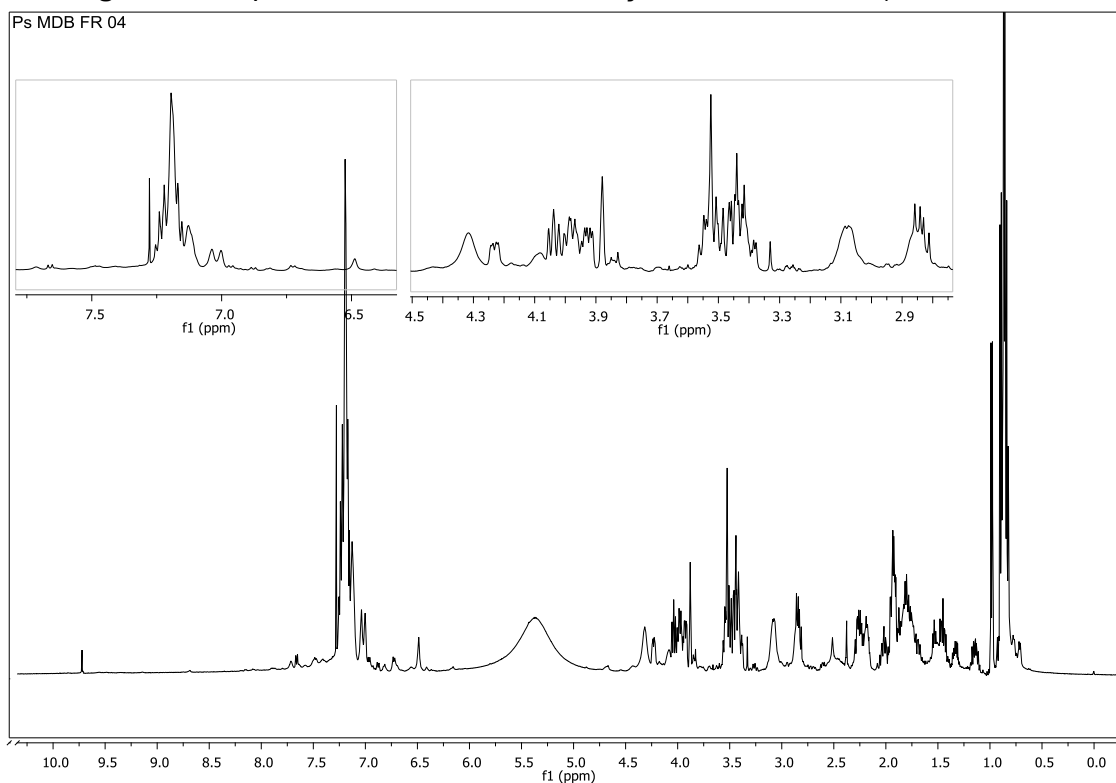
**Figura 44.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração *Ps* MDB Fr 03 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)



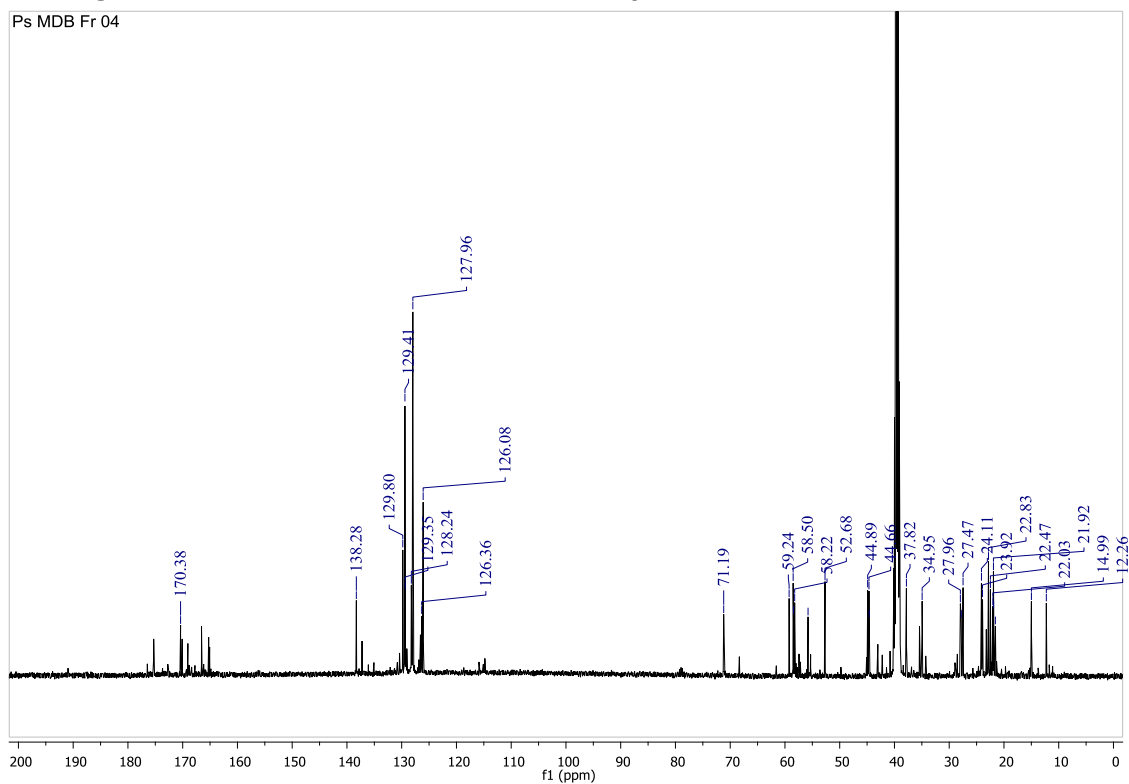
**Figura 45.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Fração *Ps* MDB Fr 03 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)



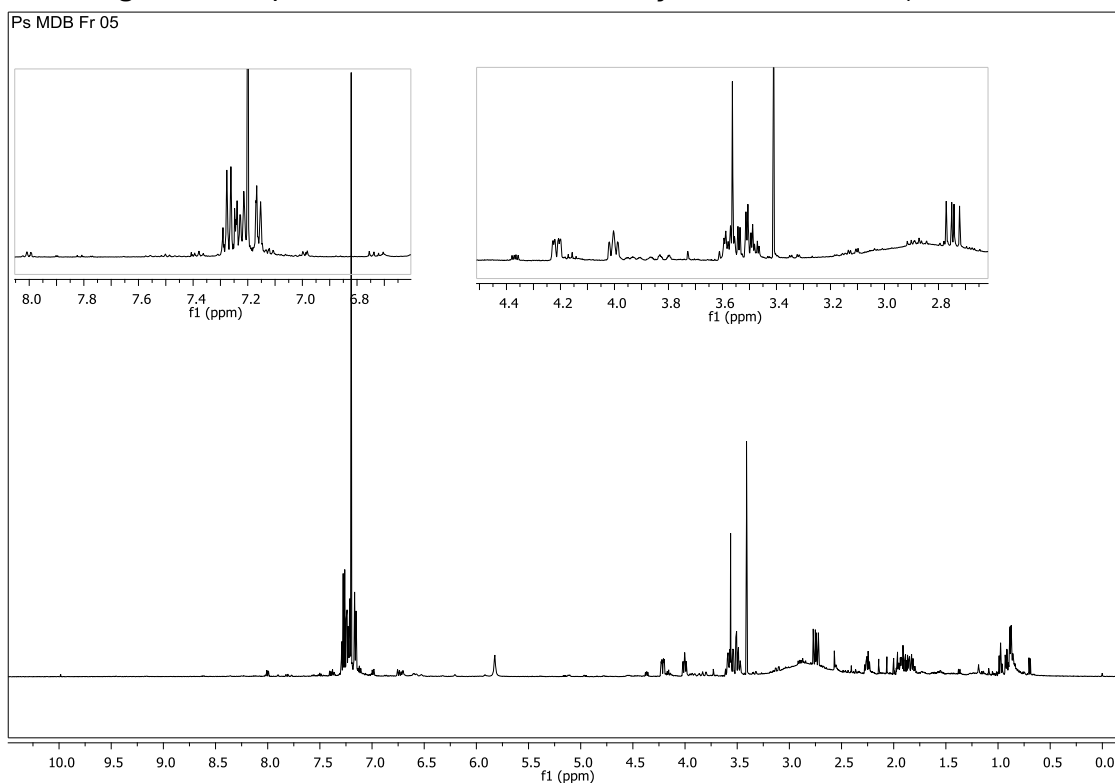
**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fração *Ps* MDB Fr 04 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)



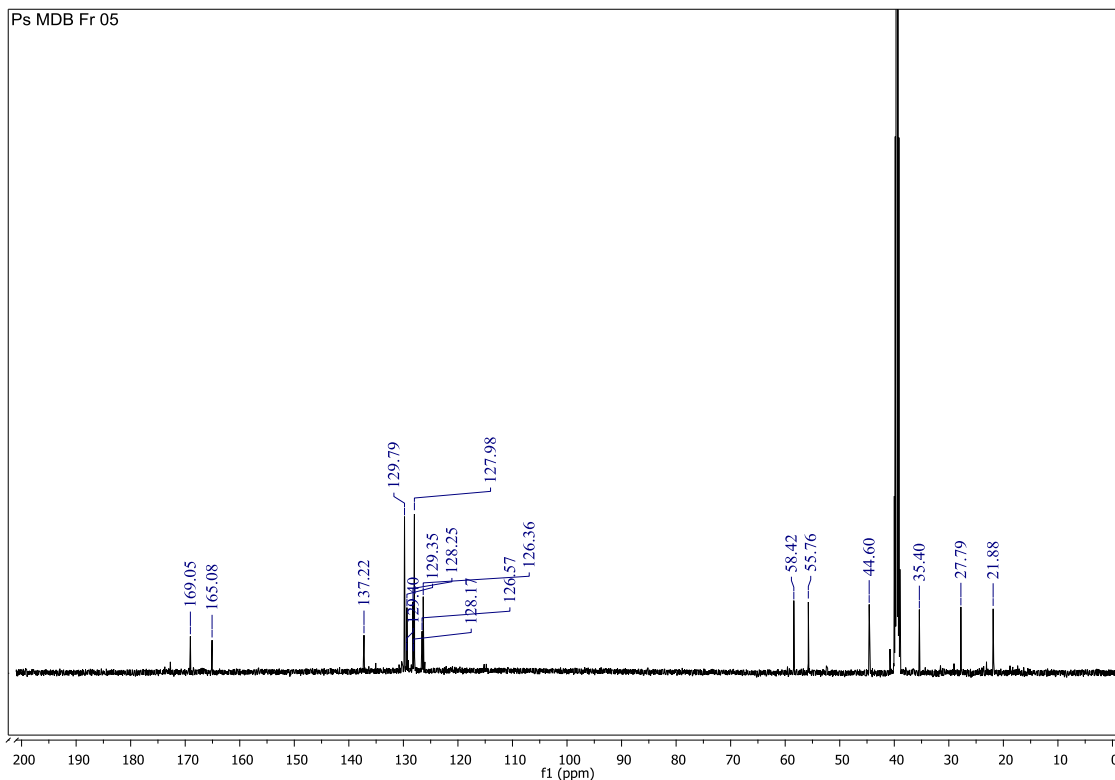
**Figura 47.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Fração *Ps* MDB Fr 04 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)



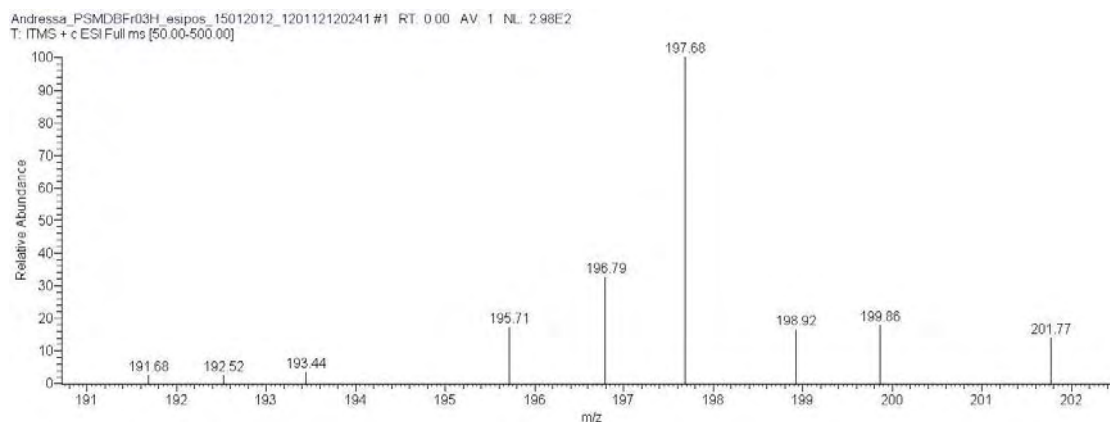
**Figura 48.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Fração *Ps* MDB Fr 05 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



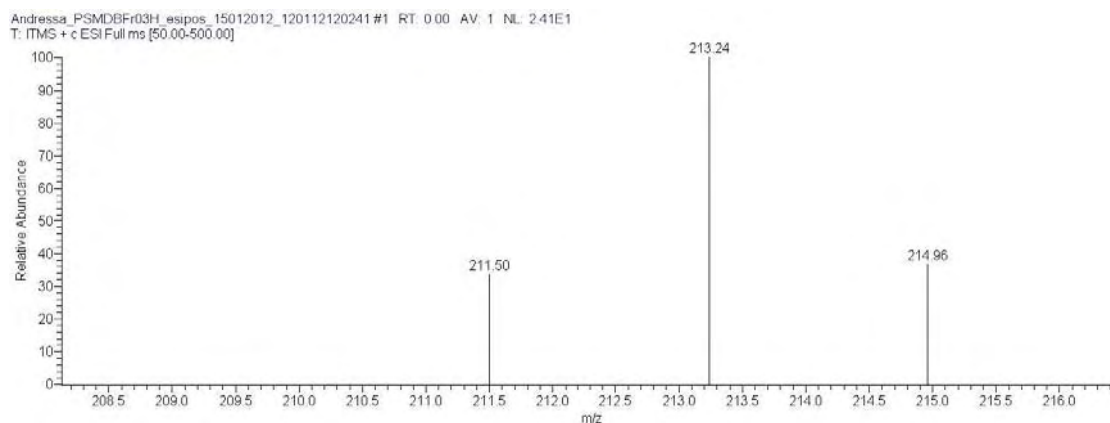
**Figura 49.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Fração *Ps* MDB Fr 05 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)



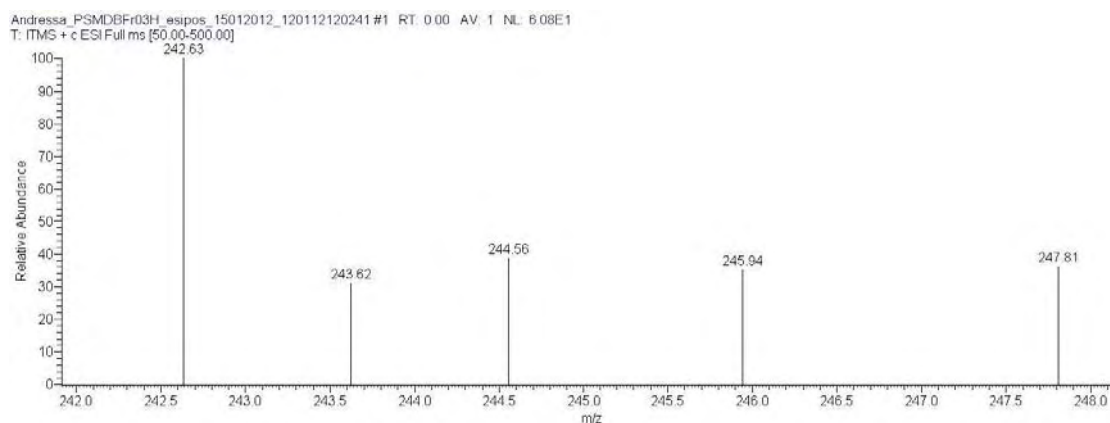
**Figura 50.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Val),  $m/z= 197,68$ .



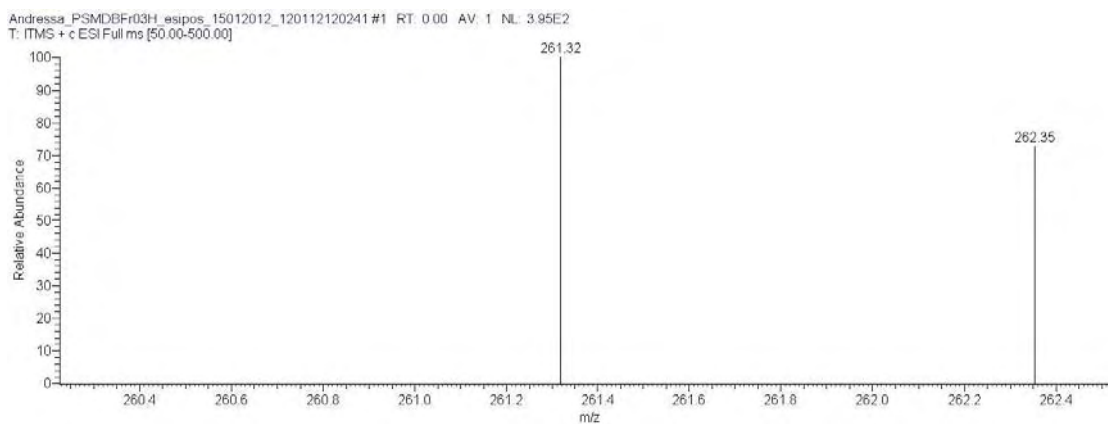
**Figura 51.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Leu),  $m/z= 211,5$ .



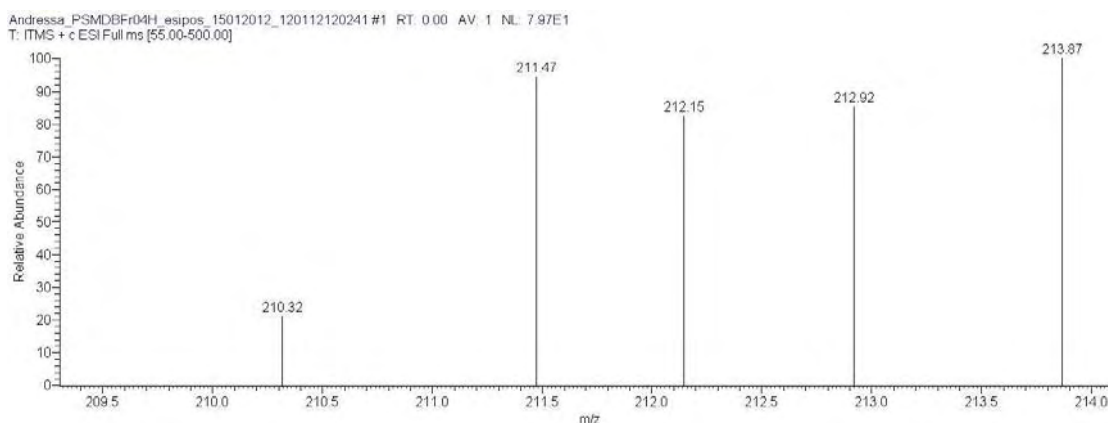
**Figura 52.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Phe),  $m/z= 245,94$ .



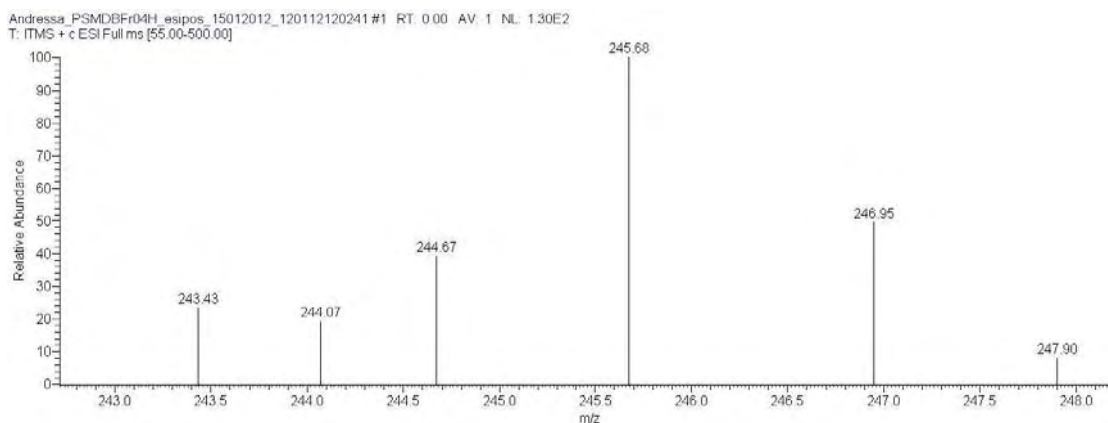
**Figura 53.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 03 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Tyr),  $m/z= 261,32$ .



**Figura 54.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 04 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Leu),  $m/z= 211,47$ .



**Figura 55.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 04 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Phe),  $m/z= 245,68$ .



**Figura 56.** Espectro de Massas da Fração *Ps* MDB Fr 05 evidenciando o íon protonado da *Rel.ciclo* (Pro-Phe),  $m/z= 245,72$ .

