

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

Gustavo Morandi Rahmé

**Prospecção Química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo
Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).**

Araraquara
2017

GUSTAVO MORANDI RAHMÉ

Prospecção Química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

R147p Rahmé, Gustavo Morandi
Prospecção química em *Pseudofusicoccum stromaticum*,
um fungo endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) /
Gustavo Morandi Rahmé. – Araraquara : [s.n.], 2017
78 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais.
3. Microorganismos. 4. Fungos endofíticos. 5. Metabólitos.
I. Título.

GUSTAVO MORANDI RAHMÉ

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

Araraquara, 10 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



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



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



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

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Gustavo Morandi Rahmé

Filiação: José Nagib Rahmé e Lucia Cristina Morandi Rahmé

Nascimento: 14/04/1992 - Campinas/ SP - Brasil

Endereço profissional

NuBBE – Nucleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, s/no – Araraquara-SP,

CEP: 14081-970, SP - Brasil

Telefone: 16 33016600 (ramal 6793)

rahmegm@gmail.com

Formação acadêmica/Titulação

2014 - 2017

Mestrado em Química pela Universidade Estadual Paulista- UNESP - Araraquara, São Paulo.

Titulo: Prospecção Química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).

Orientadora: Angela Regina Araujo

Bolsista do: CNPQ

2010 - 2014

Graduação em Química pela Universidade Estadual Paulista- UNESP - Araraquara, São Paulo.

Titulo: Estudo Químico e Biológico do Fungo Endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* Isolado dos Frutos Maduros de *Eugenia jambolana*.

Orientadora: Angela Regina Araujo

Bolsista do: CNPQ

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho:

Rahmé, G. M.; Uliana, F.; Gubiani, J. R.; Araujo, A. R.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S. Estudo da variação metabólica do fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* isolado de *Eugenia jambolana*. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos Maria Izabel, Eduardo e Felipe pela ajuda e pelos momentos de alegria.

Aos meus pais e meu irmão por todo o apoio, motivação e amor.

A Prof^a Angela pela orientação, bom humor, apoio e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório pela ajuda e ensinamentos.

Ao Nivaldo que sempre se disponibilizou a fazer os diversos experimentos de RMN, além de ceder seu tempo para ajudar na discussão dos mesmos.

Aos técnicos do laboratório pela disposição em ajudar sempre.

A CNPQ pela bolsa concedida.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência.”
Henry Ford

RESUMO

O fungo endofítico *P. stromaticum* isolado dos frutos maduros da espécie vegetal *E. jambolana* foi cultivado em escala ampliada no meio líquido de Malte por 28 dias a 25 °C no modo estático e, no meio sólido de milho tipo canjica por 21 dias a 25 °C no modo estático. Após 28 dias de crescimento no meio líquido, este foi submetido a sucessivas extrações com acetato de etila (AcOEt), que após evaporado forneceu o extrato bruto de Malte AcOEt. O meio sólido, após 21 dias de cultivo, foi extraído com metanol, seguido de filtração e evaporação fornecendo o extrato bruto metanólico. Este foi submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila e água, sendo que a fração AcOEt foi evaporada fornecendo o extrato bruto AcOEt. Este foi particionado com acetonitrila e hexano, e após evaporação dos solventes forneceu os extratos acetonitrila (ACN) e hexânico do meio sólido. O extrato ACN do meio sólido passou por novas partições com acetonitrila e hexano, por apresentar ácidos graxos ainda, fornecendo o extrato bruto de milho NP (novas partições). O extrato bruto de Malte AcOEt, foi fracionado em coluna de bancada, sendo coletadas 11 frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma). Já o extrato bruto de milho NP sofreu partição utilizando-se cartucho de C18, com base em seu cromatograma, resultando em 6 frações (Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho). Das 6 frações obtidas do extrato de milho NP, escolheu-se trabalhar com a primeira, a qual sofreu partição no CLAE-DAD preparativo, resultando em 8 frações (Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho). O extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações, além do extrato bruto de milho NP, foram submetidos à avaliação química por RMN de ¹H e biológica contra o fungo fitopatogêno *Cladosporium sphaerospermum* (e no caso do milho ao *C. cladosporioides* também) e de inibição da enzima acetilcolinesterase, apresentando atividade, enquanto o extrato bruto de milho NP se mostrou inativo. Foram identificadas duas substâncias inéditas, sendo uma da Fr-6 Ps Malte, um ftalato (4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona) e outra da Fr-1.3 Ps Milho, uma cumarina (2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético) e foram propostas as estruturas de outras duas substâncias.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. *Pseudofusicoccum stromaticum*. *Eugenia jambolana*.

ABSTRACT

The endophytic fungus *P. stromaticum* isolated from the ripe fruits of the *E. jambolana* was cultivated in large scale in the malt liquid medium for 28 days at 25 °C in the static mode and in the solid medium of hominy corn for 21 days at 25 °C in static mode. After 28 days of growth in the liquid medium, it was made successive extractions with ethyl acetate (EtOAc). The organic layer was evaporated affording the crude extract of Malt EtOAc. The solid medium, after 21 days of cultivation, was extracted with methanol, followed by filtration and evaporation to give the crude methanolic extract. This was subjected to the liquid/liquid partition with EtOAc and H₂O, being this EtOAc fraction evaporated giving the crude EtOAc extract. After that, the extract was partitioned with acetonitrile and hexane, and after the evaporation of the solvents provided the acetonitrile (ACN) and hexane extracts from the solid medium. The ACN extract of the solid medium was partitioned again with ACN and hexane, due the remaining fatty acid, providing the corn crude extract NP (new partitions). The crude extract of Malt EtOAc was fractionated in a chromatographic column, resulting in 11 fractions (Fr-1 Ps Ma to Fr-11 Ps Ma). The crude extract of corn NP was fractionated by solid phase extraction in reverse phase (C18), based on its chromatogram, resulting in 6 fractions (Fr-1 Ps Corn to Fr-6 Ps Corn). Among the corn fractions collected, it was chosen the fraction Fr-1 Ps Corn to the chemical studies. This fraction was fractionated by preparative HPLC-DAD resulting in 8 fractions. The crude extract of Malt EtOAc and its fraction and the crude extract of corn NP, were submitted to the chemical evaluation by ¹H NMR and biological against the phytopathogenic fungus *Cladosporium sphaerospermum* (and in the case of corn to *C. cladosporioides* as well). Besides, anticolinesterasic activity was made, the crude extract of Malt EtOAc and its fractions showed activity. The fractionating of the crude extracts and then of the fractions gotten afforded the isolation of 2 new substances, one of the Fr-6 Ps Malt, a phthalate (4,5-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydrobenzo [c] [1,6] dioxecyn-1,8-dione) and another from Fr-1.3 Ps Corn, a coumarin (2- (7-hydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-5-yl) acetic acid) and was possible to propose two structures for another two substances.

Keywords: Fungal endophyte. *Pseudofusicoccum stromaticum*. *Eugenia jambolana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Substâncias de uso terapêutico produzidas por fungos.	17
Figura 2 – <i>P. stromaticum</i> , superfície do endófito.	19
Figura 3 – <i>P. stromaticum</i> cultivado no meio sólido de Milho tipo canjica.	28
Figura 4 – Planejamento de partição do extrato bruto de milho NP com base no cromatograma em λ 254.	29
Figura 5 – Frações obtidas da eluição no cartucho de C18.	30
Figura 6 – Crescimento do endófito <i>P. stromaticum</i> no meio líquido de Malte.	33
Figura 7 – Espectros de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (300 MHz) do extrato bruto de milho NP e do extrato branco de milho.	37
Figura 8 – Espectros de RMN de ^1H , com pré-saturação da água, em CD_3OD (300 MHz) das Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho.	38
Figura 9 – Espectros de RMN de ^1H em CD_3OD (600 MHz), com pré-saturação da água, das frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho.	39
Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H e expansão, em DMSO-d_6 (300 MHz), com pré-saturação da água, do extrato bruto de Malte AcOEt.	40
Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H e expansão, em DMSO-d_6 (600 MHz), com pré-saturação da água, do extrato branco de Malte.	40
Figura 12 – Espectros de RMN de ^1H em DMSO-d_6 (300 MHz), com pré-saturação da água, das Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma.	41
Figura 13 – Cromatograma do extrato bruto de milho NP (a, b, c, d, e, f, g) e do branco de milho (h, i, j, l, m, n, o), em λ 203, 210, 230, 254, 267, 290 e 366 nm, respectivamente.	42
Figura 14 – Resultado da atividade antifúngica do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma) ao serem testados frente ao fungo fitopatogênico <i>C. sphaerospermum</i>	45
Figura 15 – Atividade anticolinesterásica, do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).	47
Figura 16 – Estrutura do 2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético.	49
Figura 17 – Espectro de massas de baixa resolução da substância 1 (CLAE-EM).	49
Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) da substância 1.	50
Figura 19 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância 1.	51
Figura 20 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância 1.	52
Figura 21 – Espectro de massas (Ms/Ms) da substância 1, mostrando a quebra sofrida pela mesma.	53
Figura 22 – Fragmentação por EM da substância 1.	54
Figura 23 – Proposta de biossíntese para a substância 1.	55
Figura 24 – Estrutura do 4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona.	56

Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H , com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) da substância 2.....	57
Figura 26 – Espectro de COSY em CD_3OD (600 MHz) da substância 2.....	57
Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (150 MHz) da substância 2.....	58
Figura 28 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância 2.....	59
Figura 29 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância 2.....	60
Figura 30 – Principais correlações observadas no experimento de HMBC (seta preta) e de COSY (seta duplo sentido verde), da substância 2.....	60
Figura 31 – Estrutura do Pseudofusicato.	61
Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) das substâncias 3.	62
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (150 MHz) das substâncias 3.	63
Figura 34 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância 3.....	64
Figura 35 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância 3.....	65
Figura 36 – Formação do Pseudofusicato.....	66
Figura 37 – Estrutura do 5-(hidroximetil)furano-2-ácido carboxílico.	66
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) das substâncias 4.	67
Figura 39 – Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (150 MHz) das substâncias 4.	68
Figura 40 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância 4.....	69
Figura 41 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância 4.....	70

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Obtenção do extrato bruto do endófito em milho.	28
Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de milho NP produzido por <i>P. stromaticum</i>	31
Fluxograma 3 – Fracionamento da Fr-1 Ps Milho, utilizando-se CLAE-DAD preparativo.	32
Fluxograma 4 – Obtenção do extrato bruto do endófito em extrato de Malte.	33
Fluxograma 5 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto AcOEt (3,91g) produzido por <i>P. stromaticum</i> em Malte.....	34
Fluxograma 6 – Fracionamento cromatográfico de 1,2635 g da Fr-1 Ps Ma, produzida por <i>P. stromaticum</i> em malte.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do ensaio antifúngico para o extrato bruto de milho NP.	43
Tabela 2 – Resultado do ensaio anticolinesterásico para o extrato bruto de milho NP.	44
Tabela 3 – Resultado do ensaio antifúngico para o extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).	46
Tabela 4 – Resultado do ensaio anticolinesterásico para o extrato bruto de Malte AcOEt e as frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).....	48
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (600 MHz) da substância 1.....	53
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (14,7 T) da substância 2.....	61
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (14,7 T) da substância 3.....	65
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (14,7 T) da substância 4.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ : Deslocamento químico

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de etila

BDA: Batata dextrose ágar

C18: Octadecilsilano

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CHCl_3 : Clorofórmio

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

d: Dupleto

Da: Dalton

DAD: Detector de arranjo de diodos

dd: Duplo dupleto

EM: Espectrômetro de Massas

Fr: Fração

hep: Hepteto

Hex: Hexano

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

MeOH: Metanol

m/z: Razão massa carga

NP: Novas partições

PTFE: Politetrafluoretileno

RMN: Ressonância magnética nuclear

s: Singleto

SPE: Extração em fase sólida

TMS: Tetrametilsilano

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Fungos endofíticos	18
1.2	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	19
1.3	Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos	19
1.4	Escolha da espécie vegetal.....	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Obtenção do extrato ACN bruto cultivado em milho	26
3.2	Novas partições do extrato bruto de milho ACN.....	29
3.3	Fracionamento do extrato bruto de milho NP	29
3.4	Fracionamento da Fr-1 Ps Milho.....	31
3.5	Obtenção do extrato bruto de Malte AcOEt	32
3.6	Fracionamento, em coluna, do extrato bruto de Malte AcOEt, produzido por <i>P. stromaticum</i>	33
3.7	Fracionamento da Fr-1 Ps Ma	34
3.8	Bioensaios	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H) do extrato bruto de milho NP e suas frações (Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho).....	37
4.2	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio das frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho	38
4.3	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).....	39
4.4	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	42
4.5	Bioensaios do extrato bruto de milho NP.....	43
4.6	Bioensaios do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma)	44
4.7	Determinação Estrutural da Substância 1	49
4.8	Determinação Estrutural da substância 2.....	56
4.9	Determinação Estrutural da substância 3.....	61
4.10	Determinação Estrutural da substância 4.....	66
5	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A	76
	APÊNDICE B	77
	APÊNDICE C	78

1 INTRODUÇÃO

Por mais de 50 anos substâncias produzidas por fungos têm revolucionado a medicina, fornecendo medicamentos de enorme valor terapêutico e de grande potencial na agricultura. Desde a descoberta da penicilina (1), o primeiro antibiótico β -lactâmico, do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming, fungos têm provido a medicina moderna com importantes antibióticos para a cura de doenças infecciosas fatais. Penicilina, inicialmente ativa contra bactérias Gran positivas deu origem a uma nova geração de antibióticos de amplo espectro contra várias linhagens de bactérias, inclusive Gran negativa. Os β -lactâmicos, principalmente penicilinas e cefalosporinas (2) estão entre as drogas mais consumidas, com vendas que atingiram 15 bilhões de dólares em 2002 e representam aproximadamente 65% o mercado de antibióticos no mundo. Estes antibióticos tiveram a produção aumentada pela manipulação nas técnicas de fermentação de *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum*, o que resultou na redução dos custos destes medicamentos (ALY et al., 2011).

A ciclosporina (3), obtida de *Tolypocladium inflatum*, um fungo de solo isolado por pesquisadores da Sandoz, é outro medicamento campeão mundial de vendas com uma arrecadação de 1,4 bilhões de dólares no período de 2004-2008. Esta é um peptídeo cíclico formado por 11 aminoácidos sendo que um deles apresenta a configuração D, raramente encontrado na natureza. A ciclosporina deu origem a nova era em imunologia e transplantes de órgãos, a qual começou em 1971 (ALY et al., 2011).

As estatinas, substâncias antilipêmicas, representam outro grupo de importantes drogas obtidas de fungos, sendo os mais potentes redutores de colesterol disponíveis no mercado. Algumas estatinas são obtidas por reação de biotransformação da mevastatina (4), a qual foi primeira estatina isolada de *Penicillium citrinum*, como exemplo temos a lovastatina (Mevacor®) (5), a qual também já foi isolada de *Monascus ruber* e posteriormente de *Aspergillus terreus*. Outras estatinas são derivadas sintéticas, análogas ao produto natural isolado de fungos, tais como lipitor®, crestor® e livalo®, entre outros. As vendas de todas as estatinas disponíveis no mercado atingiram o valor de 15,5 bilhões de dólares em 2004 (ALY et al., 2011).

Griseofulvina (6) (Fulvicin[®], Grifulvin[®], Grisovin FP[®], Gristatin[®]), outro importante metabólito secundário produzido pelo fungo filamentosso *Penicillium griseofulvum* é usado no tratamento de infecções fúngicas da pele, cabelo e unhas, com um mercado mundial de 31,1 milhões de dólares em 2007 (ALY et al., 2011).

Outras importantes drogas ou produtos para a agricultura, derivados ou inspirados em produtos naturais, de fungos, incluem as estrobilurinas (7, 8), com atividade contra vários fungos filamentosos e leveduras; equinocandinas uma substância com forte atividade antifúngica (ALY et al., 2011).

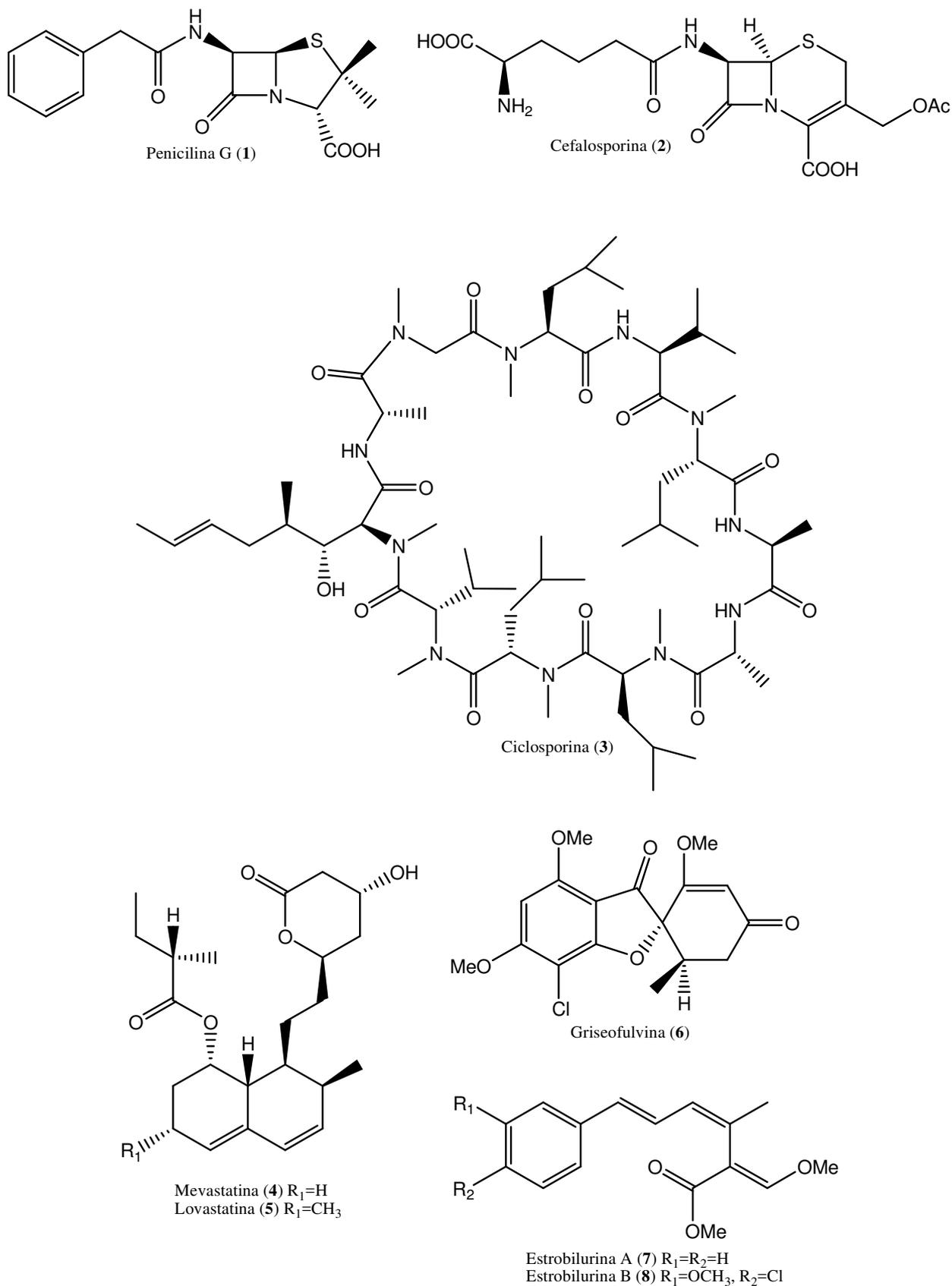


Figura 1 – Substâncias de uso terapêutico produzidas por fungos.

Fonte: adaptado de Aly et al. (2011).

Adicionalmente, a obtenção de hormônios esteroidais usados na medicina como anti-inflamatório, diurético, anabólico, anti-androgênico, antifúngico, anticancerígeno (mama e prostata), no tratamento de osteoporose, prevenção de doenças coronárias, prevenção e tratamento de infecções por HIV, anti-obesidade e por último e, não menos importante como contraceptivo oral, tem sido obtidos por biotransformação de esteróides utilizando fungos. Hormônios esteroidais estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo, e é uma das chaves de sucesso na biotecnologia (MORICCA; RAGAZZI, 2008).

Com base nas colocações acima e que entre os 20 medicamentos mais prescritos no mundo, seis são originários de fungos, e que estimativas sugerem a existência de 5,1 milhões de espécies de fungos, a chance de se encontrar novos compostos com potencial na medicina e agricultura é enorme, e impulsiona o estudo neste nicho de micro-organismo praticamente inexplorado (MORICCA; RAGAZZI, 2008).

1.1 Fungos endofíticos

O termo endófitos originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos das plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. São encontradas diferentes definições de endófitos na literatura (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010), mas a definida por Bacon e Write amplamente aceita e utilizada, é que endófitos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar efeitos negativos imediatos (KHARWAR et al., 2011).

Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática dentro dos tecidos vegetais, ocorrem em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALA et al., 2011; ARNOLD, 2007). Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias, estudadas até o momento, foram encontradas bactérias e fungos endofíticos. Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isolados de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001).

Esta associação sugere que estes micro-organismos co-evoluíram com os

seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação, como a maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematóides parasitas e micro-organismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade, etc.) (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010; KHARWAR et al., 2011; ARAUJO et al., 2010; OWNLEY; GWINN 2010).

1.2 *Pseudofusicoccum stromaticum*

P. stromaticum pertencente à família Botryosphaeraceae. Micro-organismos desta família podem ser saprófitas, se alimentando de cascas de madeira em decomposição, patógenos primários em espécies de plantas lenhosas e agrícolas e endófitos. São encontrados em uma grande diversidade de plantas. (CASTRO-MEDINA; CASTILLO, 2009).

A cultura de *P. stromaticum* forma micélios abundantes na superfície de coloração esbranquiçada e, o reverso das colônias torna-se acinzentado escuro após o envelhecimento (Figura 2).



Figura 2 – *P. stromaticum*, superfície do endófito.

Fonte: Gubiani (2015, p. 150).

1.3 Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos associados a plantas representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20.000 substâncias descritas (OWNLEY; GWINN 2010), sendo que a grande maioria

apresenta alguma bioatividade, evidenciando o potencial biológico e biossintético (PARANAGAMA et al., 2007; YANG et al., 2012). Isto pode ser explicado pela teoria ecológica, que estabelece que a produção metabólica depende do nicho ecológico no qual o micro-organismo está inserido e das conseqüentes interações bióticas e abióticas (STROBEL; DAISY, 2003; CARTER, 2011). Estes relatos sugerem que a seleção do endófito deve se realizada com fungos de diferentes biotas, principalmente os que enfrentam freqüentes e intensas interações no ambiente como plantas de regiões áridas, florestas tropicais, entre outras (SCHULZ et al., 2002; STROBEL et al., 2004).

Os produtos naturais de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividade biológica como, antimicrobiana, antiparasita, neuroprotetora, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, agentes neoplásicos e citotóxicas, estes metabólitos podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos, entre outros (STROBEL; DAISY, 2003; ALY et al., 2011; WANG et al., 2012).

Outros produtos potencialmente bioativos produzidos por fungos endofíticos merecem destaque, como os anticancerígenos derivados de antracenediona (ZHANG et al., 2010) e 22-oxa-(12)-citocalasinas (PRITI et al., 2009). Pesquisas ainda relatam outros compostos com atividades promissoras como as antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006) e a 10-hidroxiamptotecina (SHWETA et al., 2010), poderosos agentes antineoplásicos, isolado dos fungos endofitos *Pleospora sp.* e *Fusarium solani*, respectivamente; e o subglutinol A e B, agentes imunossupressores, produzidos pelo endófito *Fusarium subglutinans* (GUO et al., 2008). Kusari (2011) descreveu a produção de hipericina em cultura do endófito *Hypericum perforatum*, um agente no combate a depressão e ansiedade. O metabólito fomocromona A foi isolado do endófito *Phomopsis sp.*, demonstrando uma boa atividade antifúngica, antibacteriana e inibidora de crescimento de algas (AHMED et al., 2011).

Em 2012, isolou-se do endófito pertencente ao gênero *Phoma* associado a *Arisaema erubescens*, os metabólitos tricodermina e cercosporamida, com fortes atividades antifúngicas e antitumorais (WANG et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos,

conhecidos apenas em plantas, sugerindo dessa forma que os endófitos são uma fonte alternativa na produção destes metabólitos (ALY et al., 2011; ALY et al., 2010; GREVE et al., 2010; JALGAONWALA et al., 2011). Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol[®], uma importante droga anticancerígena, pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado da planta *Taxus brevifolia* que também produz esta substância. Outro importante anticancerígeno é a vincristina isolada da planta *Catharanthus roseus*, e recentemente isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (JALGAONWALA et al., 2011). Podofilotoxina também utilizada no tratamento de câncer é conhecida por ser encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophyllum* e também relatada dos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (ALY et al., 2011). Existem outros exemplos de compostos de origem vegetal que também são produzidos por fungos que habitam os vegetais (ALY et al., 2011; ARNOLD, 2007).

Endófitos representam uma inesgotável e sustentável fonte de recursos de novos produtos naturais (KUSARI; SPITELLER, 2011). Das 300 mil espécies de plantas existentes, cada uma é hospedeira de pelo menos um micro-organismo endofítico e raras destas espécies vegetais têm sido estudadas em relação a sua biologia endofítica. Conseqüentemente é grande a possibilidade de descoberta de novos e interessantes micro-organismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas (STROBEL et al., 2004; AZEVEDO; ESPOSITO, 2010).

1.4 Escolha da espécie vegetal

Devido ao enorme número de espécies de vegetais no mundo, algumas estratégias de seleção devem ser utilizadas na busca por fungos endofíticos produtores de substâncias bioativas (STROBEL et al., 2004), tais como plantas com história etnobotânica que relata uso e aplicação específica de partes do vegetal; plantas endêmicas que ocupam solos mais antigos, plantas nativas de áreas com grande biodiversidade, plantas de habitats extremos, entre outras. Esta seleção pode nos garantir oportunidade de isolamento de novos gêneros e espécies de fungos endofíticos e possivelmente novos metabólitos secundários com possível aplicação na medicina, agricultura e indústria alimentícia.

Dentro deste contexto, *Eugenia jambolana*, uma espécie vegetal muito utilizada na medicina popular para tratamento de diabetes e que apresenta

diferentes atividades biológicas como adstringente, diurética, antidiabética, antioxidante, antibiótica e anti-inflamatória (VASI et al., 2009; SANTOS et al, 2012) foi selecionada para estudo da microbiota associada. Utilizando metodologia adequada, treze fungos endofíticos foram isolados das folhas, caule, frutos verdes e maduros. Estes foram cultivados em pequena escala em diversos meios e os extratos obtidos foram submetidos a ensaios para avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica. Dentre os extratos ensaiados, o produzido por Eifm-01 (classificado como *P. stromaticum*) em milho tipo canjica e em extrato de Malte, apresentou atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e anticolinesterásica. Esta observação nos direcionou para o estudo químico e biológico dos extratos brutos produzidos por *P. stromaticum*, objetivando o isolamento das substâncias responsáveis pelas atividades observadas nos extratos brutos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação do perfil químico e biológico e obtenção de substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* isolado de *Eugenia jambolana*.

2.2 Objetivos Específicos

- Produção em escala ampliada dos extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico *P. stromaticum*, isolado dos frutos maduros de *E. jambolana*;
- Isolamento, elucidação ou identificação estrutural dos metabólitos secundários, utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Meios para cultivo dos micro-organismos

O micro-organismo foi cultivado em temperatura controlada de 25 °C.

- BDA (meio de cultivo sólido) – Batata, dextrose e ágar (DIFCO® e Acumedia®): 39 g/L de água [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g), ágar (15 g)];
- Extrato de Malte (meio de cultivo líquido) – Acumedia® 20g/L de água;
- Milho tipo canjica (Camil®) – 90 g em 80 mL de água.

Solventes utilizados

Deuterados: Merck, Aldrich e Fluka.

Não deuterados: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt P.A. e H₂O Milli-Q (Millipore).

Esterilização dos materiais e meios de culturas

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e dos meios de culturas, foi realizada em autoclave da Quimis®, sendo mantidos a temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Manipulação do micro-organismo

O procedimento de manipulação do micro-organismo foi realizado em capela de fluxo laminar (Pachame®) PA 310-Série 172-99.

Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Foram utilizadas placas pré-prontas de sílica gel da marca Sorbent Technologies (TLC Plates W/UV 254, Aluminium backed, 200 µm 20 x 20 cm). As visualizações foram feitas por radiação na região do ultravioleta nos comprimentos de onda (λ) 254 e 366 nm, e a revelação feita por nebulização de anisaldeído seguida de aquecimento.

Cromatografia em Coluna

Na separação cromatográfica em coluna sob pressão foi utilizada como fase estacionária sílica gel C18 da Sorbent Technologies com tamanho de poro de 60A, 40-75 µm.

Cromatografia em Cartucho de C18 (SPE).

Foram utilizados cartuchos de C18 da Chromabond® com 1000 mg de fase estacionária e capacidade de 6 mL de fase móvel.

Preparo das amostras para as análises por CLAE:

Todos os extratos analisados foram previamente submetidos ao Clean-up em cartucho de SPE de 1000 mg 6 mL⁻¹ (Strata-X, Phenomenex®) preenchidos com C18. Os cartuchos foram primeiramente ativados com MeOH (100%, 2,0 mL, 3 vezes) e depois condicionados com o solvente, ou mistura de solventes, no qual o extrato se encontrava diluído. A seguir o extrato foi aplicado no cartucho de SPE e eluído com o solvente, ou mistura de solventes, utilizado(s) em sua diluição. Membrana de PTFE de 0,22 µm (Millex®, Merck Millipore) acoplada ao cartucho de SPE foi utilizada durante todo o processo. O eluato foi coletado em vial de 1,5 mL e analisado por CLAE-DAD.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as análises do perfil químico, otimização e isolamento das substâncias por CLAE foram utilizados equipamentos Varian ProStar com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD), Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A₃ e injetor automático Shimadzu SIL-20A, módulo de comunicação Shimadzu CBM-20A e bombas Shimadzu LC-10 AD. O tratamento dos dados foi obtido através de um microcomputador com processador Intel® Celeron®, utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1). As colunas utilizadas foram: coluna analítica Luna Phenomenex C18 (250,0 x 4,60 mm, 5 µm, 100A) e coluna preparativa Luna Phenomenex C18 (150,0 x 21,20 mm, 5 µm).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE-EM)

Para análise da Fr-1.3 Ps Milho foi utilizado o cromatógrafo da Agilent 1200 Series, autosampler 1200 Series, detector DAD 1260, bomba quaternária 1200, forno para coluna 1200 Series e como fase estacionária, utilizou-se coluna analítica tipo Luna Phenomenex C18 (250,0 x 4,60 mm, 5 µm, 100^a) e eluição em gradiente de H₂O:ACN (88:12→65:35 v/v) em 50 minutos e H₂O:ACN (65:35→0:100 v/v) de 50

a 55 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O espectrômetro de massas utilizado foi o 3200 QTRAP (quadrupolo – ion trap linear), AB SCIEX. As condições de análise foram:

- Ionização por electrospray (Turbo Ion Spray) no modo negativo.
- Parâmetros da fonte de ionização no modo negativo: Ion Spray: -4500 V, Curtain Gás: 20 psi, Temperatura: 650°C, Gás 1: 50 psi, Gás 2: 50 psi, Interface heater: ON, DP (Declustering Potential) -25.0 V, EP (Entrance Potential) -10.0 V e CEP (Cell entrance potential) -16.0 V.
- Modo de varredura de ions (EMS – Enhanced Scan): 110 – 600 Da
- EPI (Enhanced product ion) Energia de colisão: 35.0 V +/- 15.0V

Evaporador Rotativo

As soluções foram concentradas sob pressão reduzida no evaporador rotativo do fabricante Heidolph®.

Balança Analítica

A pesagem de todo o material foi feita em balança analítica Mettler Toledo AG 245.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram realizados em espectrômetros Bruker Avance 600, usando sonda direta, multinuclear BBO 14,7 T S3 e Bruker Fourier 300 a 7 Tesla, usando sonda dual ¹H/¹³C 5 mm. Todos os experimentos foram realizados a 23 °C.

3.1 Obtenção do extrato ACN bruto cultivado em milho

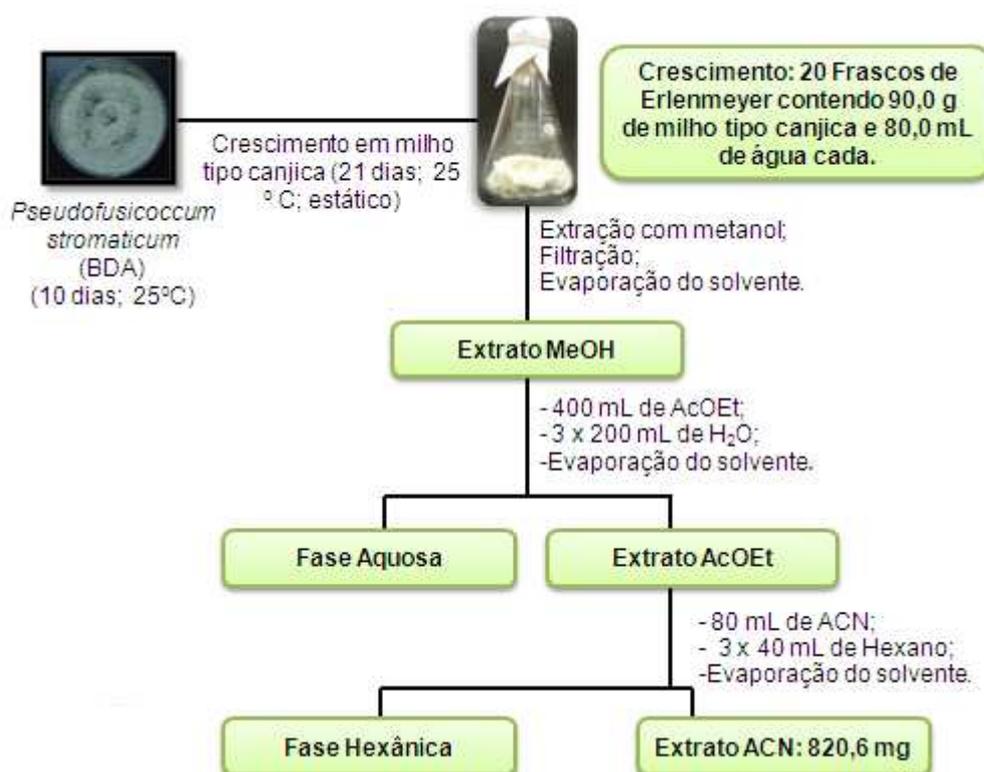
P. stromaticum foi inoculado em meio sólido de batata, dextrose, ágar (BDA), para obtenção de massa micelar, para o cultivo em meio sólido de milho tipo canjica.

Foram preparados 20 frascos de Erlenmeyer contendo o meio sólido (milho tipo canjica), utilizando-se 90 g do meio sólido e 80 mL de água Milli-Q em cada. Estes foram autoclavados a 121 °C durante vinte minutos, a cada 24 horas durante 3 dias. Depois de 24 horas passadas desde a última esterilização, o fungo foi inoculado no meio de cultivo e permaneceu em modo estático durante 21 dias a 25

°C. Ao final deste período foi feita a trituração, utilizando bastão de vidro, do meio sólido juntamente com a massa micelar. O meio de cultura foi extraído com metanol (MeOH), sendo feitas 3 extrações por frasco de Erlenmeyer, utilizando 200 mL de solvente em cada, com um intervalo de 12 horas entre cada extração. Posteriormente, foi realizada filtração a pressão reduzida e o solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo obtendo-se o extrato bruto metanólico.

O extrato bruto metanólico foi solubilizado em 400,00 mL de acetato de etila (AcOEt) e submetido a uma partição líquido/líquido com 3 x 200,00 mL de água (H₂O) afim, de se eliminar os açúcares oriundos do meio de cultivo. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica evaporada, fornecendo o extrato AcOEt. Este foi solubilizado em 80,00 mL de acetonitrila (ACN) e submetido a uma nova partição líquido/líquido 3 x 40,00 mL de hexano (Hex), afim, de se eliminar os ácidos graxos oriundos do meio de cultivo. Tanto a fase hexânica, quanto a fase acetonitrila foram mantidas sob refrigeração, porém a de interesse foi a fase acetonitrila, a qual teve o solvente evaporado fornecendo o extrato ACN (820,6 mg)

Seguindo a metodologia descrita no Fluxograma 1, preparou-se mais 1 frasco de Erlenmeyer contendo o meio sólido (milho tipo canjica), porém sem a inoculação do endófito, sendo este o branco.



Fluxograma 1 – Obtenção do extrato bruto do endófito em milho.

Fonte: elaborada pelo autor¹.



Figura 3 – *P. stromaticum* cultivado no meio sólido de Milho tipo canjica.

¹ Os fluxogramas de 1 a 6 e as figuras de 3 a 41 foram elaboradas pelo autor.

3.2 Novas partições do extrato bruto de milho ACN

O extrato bruto de milho ACN (820,6 mg) foi analisado por RMN de ^1H , no qual se constatou a presença de muitas substâncias de caráter graxo, provenientes do meio de cultura (Apêndice A). Sendo assim o extrato bruto de milho ACN passou por novas partições com ACN e Hex, fornecendo o extrato bruto de milho ACN NP (NP=novas partições), de massa 529,6 mg.

3.3 Fracionamento do extrato bruto de milho NP

Do extrato bruto de milho NP (529,6 mg), foi separado 371,8 mg, que foi fracionado, utilizando-se como base o cromatograma (obtido utilizando-se coluna analítica tipo Luna Phenomenex (C18), como fase estacionária e eluição em gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, contendo 0,1% de ácido fórmico em ambos os solventes, (95:05→0:100 v/v) em 60 minutos permanecendo nesta condição por mais 5 minutos, com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), conforme a Figura 4. Este fracionamento foi realizado visando eliminar as substâncias graxas residuais, as quais por terem caráter apolar acabam por sair nas ultimas frações e para simplificação do cromatograma facilitando o isolamento de substâncias.

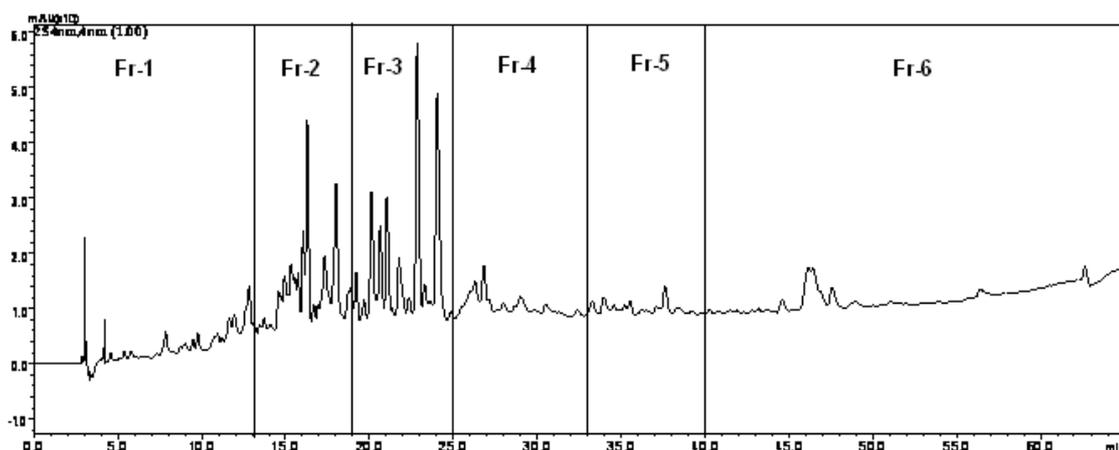


Figura 4 – Planejamento de partição do extrato bruto de milho NP com base no cromatograma em λ 254.

As porcentagens de ACN e de água para cada uma das frações é mostrada no Fluxograma 2. Escolheu-se não usar o ácido, pois este poderia interagir com as

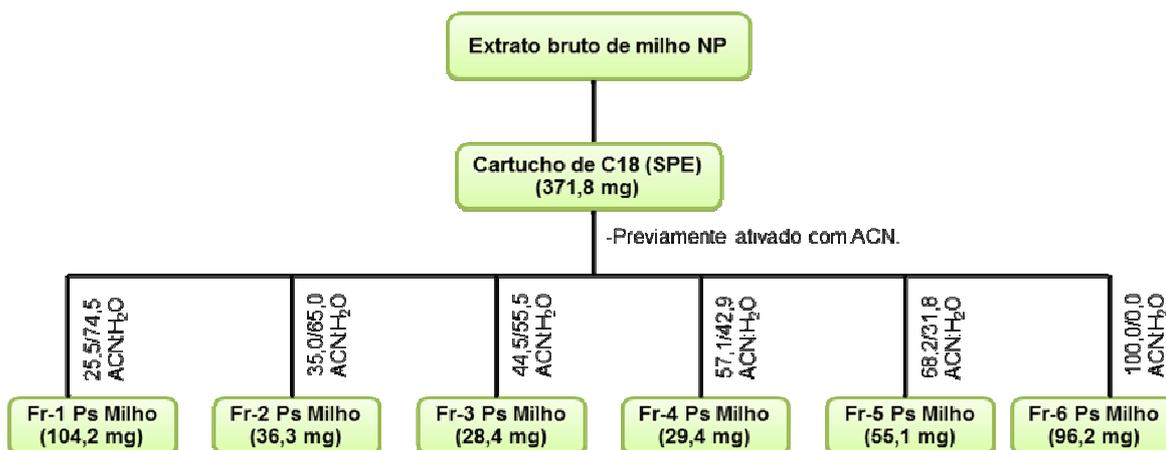
substâncias presentes no extrato bruto dando origem a artefatos. As fases móveis de cada fração foram preparadas de acordo com o Fluxograma 2.

O cartucho de C18 foi previamente ativado com ACN 100% e depois condicionado com a primeira fase móvel. O extrato diluído na primeira fase móvel foi aplicado no cartucho, no qual as fases móveis de cada fração foram aplicadas em ordem, de acordo com o Fluxograma 2, onde é possível observar as frações obtidas na Figura 5.



Figura 5 – Frações obtidas da eluição no cartucho de C18.

As frações foram secas em evaporador rotativo e pesadas, obtendo-se as massas do Fluxograma 2, a seguir foram analisadas por RMN de ^1H .



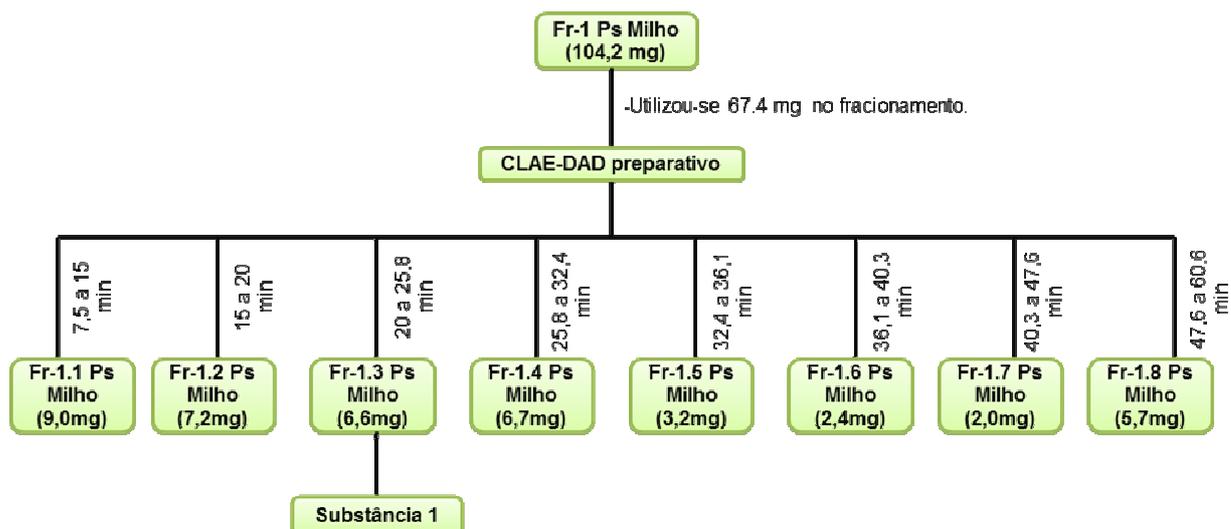
Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de milho NP produzido por *P. stromaticum*.

3.4 Fracionamento da Fr-1 Ps Milho

A Fr-1 Ps Milho (escolhida para trabalho pela massa (104,2 mg) e pela comparação de seu espectro de RMN de ^1H com o do extrato branco de milho (Apêndice B), na qual se observa uma vasta diferença de sinais na região dos hidrogênios aromáticos, apresentou como melhor condição cromatográfica gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (88:12→65:35 v/v) em 50 minutos e $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (65:35→0:100 v/v) de 50 a 55 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (Apêndice C). Como fase estacionária, utilizou-se coluna analítica tipo Luna Phenomenex (C18).

Optou-se por realizar o fracionamento, de 67,4 mg da Fr-1 Ps Milho, utilizando-se CLAE-DAD preparativo, tendo como base o cromatograma obtido no mesmo. Como fase estacionária, utilizou-se coluna preparativa tipo Luna Phenomenex (C18) e gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (88:12→65:35 v/v) em 50 minutos e $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (65:35→0:100 v/v) de 50 a 55 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, com um fluxo de $10,0 \text{ mL min}^{-1}$. Este fracionamento foi realizado visando à simplificação do cromatograma, para facilitar o isolamento de substâncias. Os tempos de coleta de cada fração podem ser visualizados no Fluxograma 3.

Foram coletadas 8 frações da Fr-1 Ps Milho (Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho), as quais foram secas em evaporador rotativo e pesadas, obtendo-se as massas do Fluxograma 3.

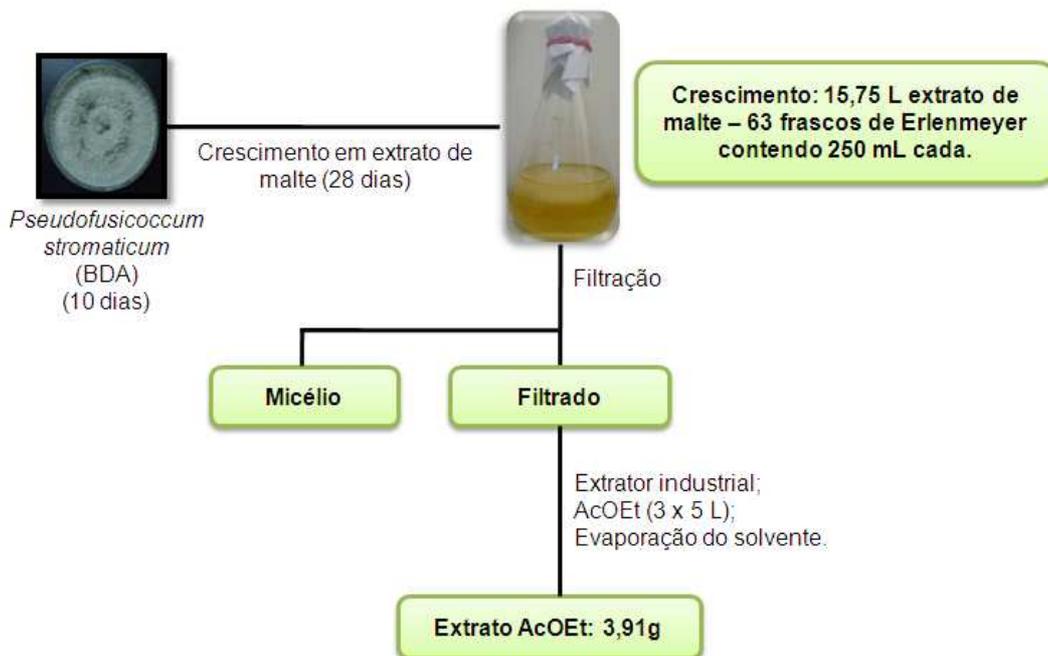


Fluxograma 3 – Fracionamento da Fr-1 Ps Milho, utilizando-se CLAE-DAD preparativo.

3.5 Obtenção do extrato bruto de Malte AcOEt

O cultivo em escala ampliada em meio de extrato de Malte, foi realizado pela aluna de iniciação científica Fernanda Uliana. Foram cultivados 63 frascos de Erlenmeyer de extrato de Malte, contendo 250 mL em cada, do meio de cultivo, totalizando 15,75 L. Estes foram autoclavados a 121 °C durante vinte minutos (para esterilização). Depois 24 horas da esterilização, o fungo foi inoculado no meio de cultivo e permaneceu em modo estático durante 28 dias a 25 °C. Após este período, o meio líquido foi separado do micélio por filtração a pressão reduzida e particionado com AcOEt. Após a partição, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto (3,91 g).

Seguindo a metodologia descrita no Fluxograma 4, preparou-se mais 1 frasco de Erlenmeyer do meio líquido (extrato de Malte), porém sem a inoculação do endófito, sendo este o branco.



Fluxograma 4 – Obtenção do extrato bruto do endófito em extrato de Malte.

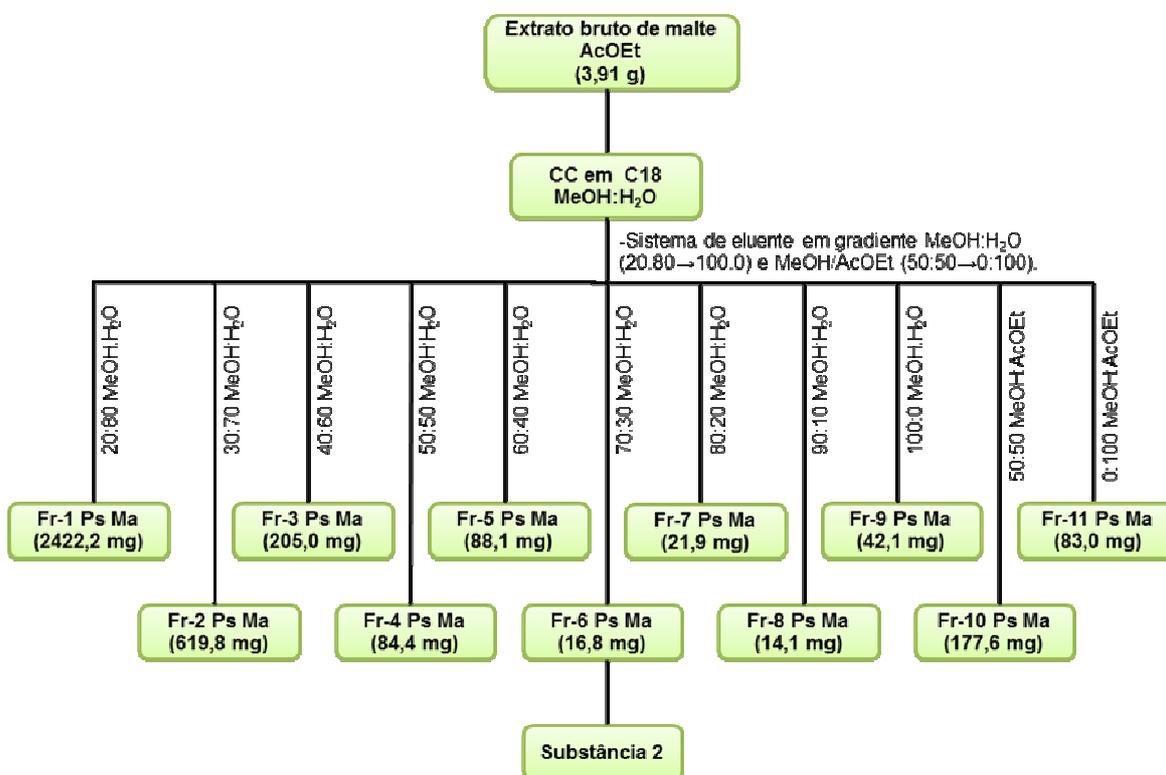


Figura 6 – Crescimento do endófito *P. stromaticum* no meio líquido de Malte.

3.6 Fracionamento, em coluna, do extrato bruto de Malte AcOEt, produzido por *P. stromaticum*

O extrato bruto de Malte AcOEt ($m=3,91$ g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de vidro (raio de 2,5 cm e altura de 12 cm) utilizando como suporte sílica de fase reversa C18 e, um sistema de eluente em gradiente

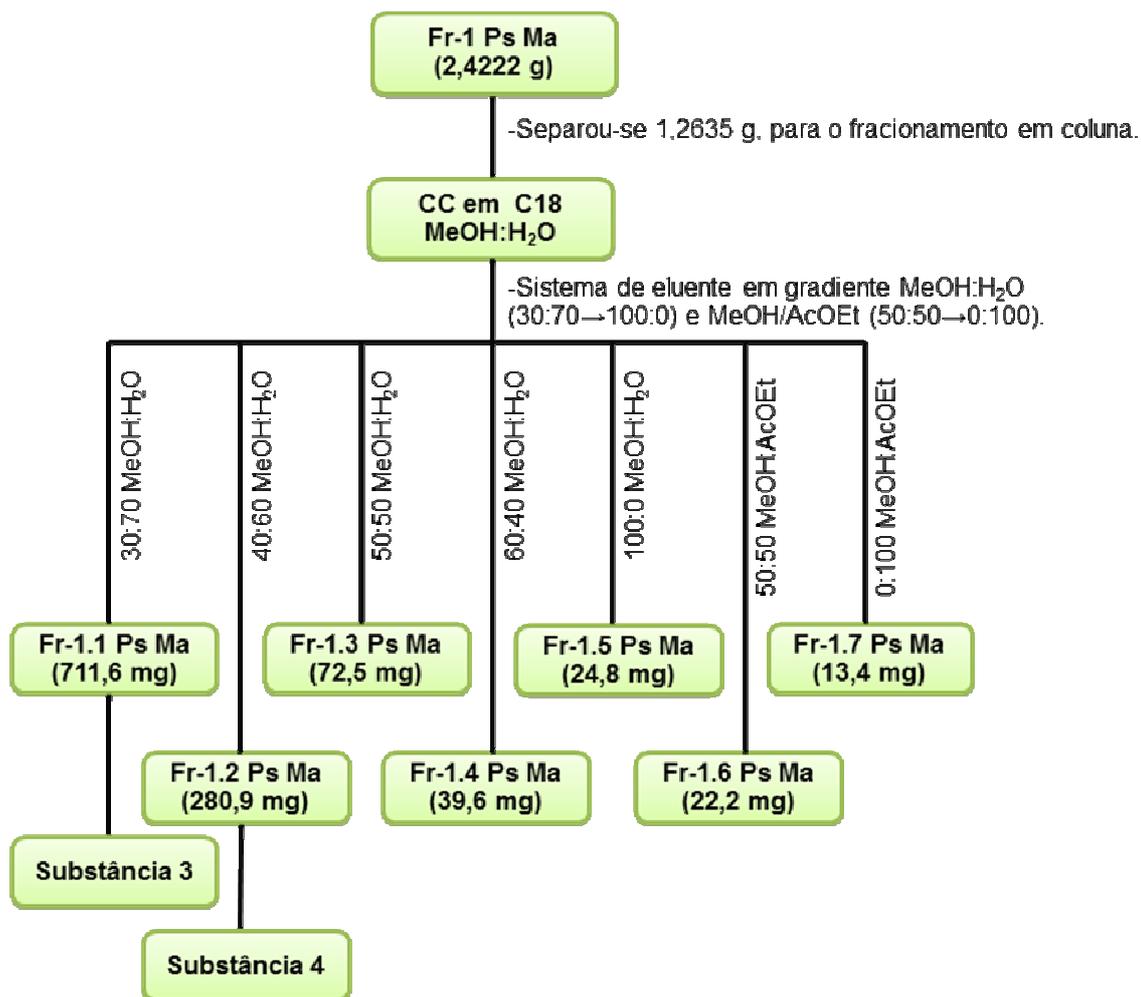
MeOH:H₂O e MeOH:AcOEt conforme o Fluxograma 5, sendo coletadas 11 frações de 532 mL cada (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).



Fluxograma 5 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto AcOEt (3,91g) produzido por *P. stromaticum* em Malte.

3.7 Fracionamento da Fr-1 Ps Ma

Da Fr-1 Ps Ma foi retirado uma alíquota de 1,2635 g, a qual foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de vidro (raio de 1,09 cm e altura de 35,5 cm) utilizando como suporte sílica de fase reversa C18 e, um sistema de eluente em gradiente MeOH:H₂O e MeOH/AcOEt conforme o Fluxograma 6, sendo coletadas 7 frações de 200 mL cada (Fr-1.1 Ps Ma a Fr-1.7 Ps Ma).



Fluxograma 6 – Fracionamento cromatográfico de 1,2635 g da Fr-1 Ps Ma, produzida por *P. stromaticum* em malte.

3.8 Bioensaios

Tanto o extrato bruto obtido do milho (NP), quanto o extrato bruto obtido do Malte e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma), foram encaminhados para ensaios biológicos, para avaliação da atividade antifúngica e anticolinesterásica. Para o extrato bruto do milho (NP) foram testadas duas eluições diferentes (60:40 Hex/AcOEt e 83:17 CHCl₃/MeOH), em CCDC. Para o extrato bruto do Malte e suas frações testou-se apenas uma eluição (60:40 Hex/AcOEt).

Avaliação da atividade antifúngica²

A atividade antifúngica foi determinada por bioautografia através da nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos mL^{-1} em solução de glicose e sais) em placas do CCDC contendo os extratos e as frações de interesse, previamente eluídos com mistura de solventes adequada. As placas foram incubadas a 25 °C por 48 horas verificando se haviam halos de inibição do crescimento dos fungos, e esses foram determinados. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (5 µg) (RAHALISON et al., 1991).

Avaliação da atividade anticolinesterásica²

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos ($20 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), das frações ($10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) em placas de sílica gel com eluentes adequados. Nestas cromatoplasmas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, em seguida incubadas em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos e após este período foi borrifada uma solução C³. Como padrão positivo foi utilizado o composto fisostigmina a $0,05 \mu\text{g } \text{mL}^{-1}$ (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002)

² Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

³ Solução C contém 10 mL da solução A e 40 mL da solução B.

Solução A: 250mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol.

Solução B: 400mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) do extrato bruto de milho NP e suas frações (Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho)

O extrato bruto de milho NP e o branco de milho foram analisados por RMN de ^1H , apresentando os resultados mostrados na Figura 7.

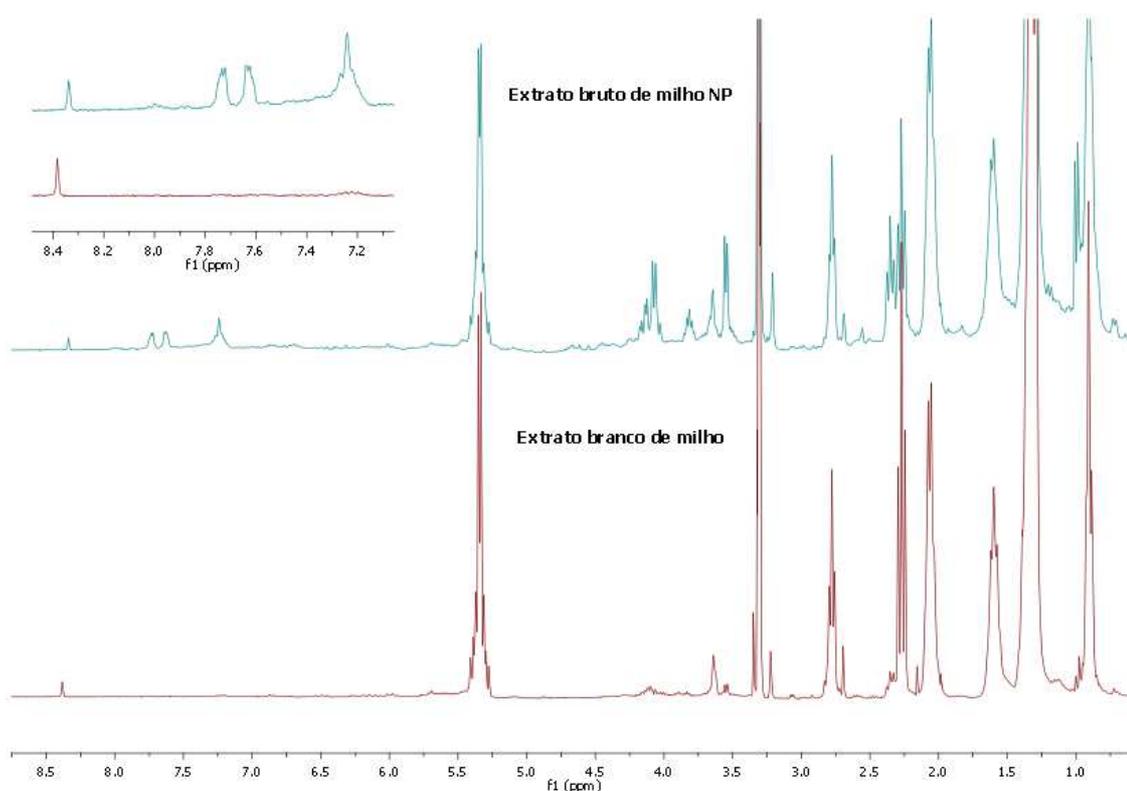


Figura 7 – Espectros de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (300 MHz) do extrato bruto de milho NP e do extrato branco de milho.

Ao se comparar os dois espectros de RMN de ^1H mostrados na Figura 7, observa-se sinais de hidrogênios aromáticos não existentes no extrato branco de milho.

As frações do extrato bruto de milho NP (Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho) também foram analisadas por RMN de ^1H , sendo mostradas na Figura 8.

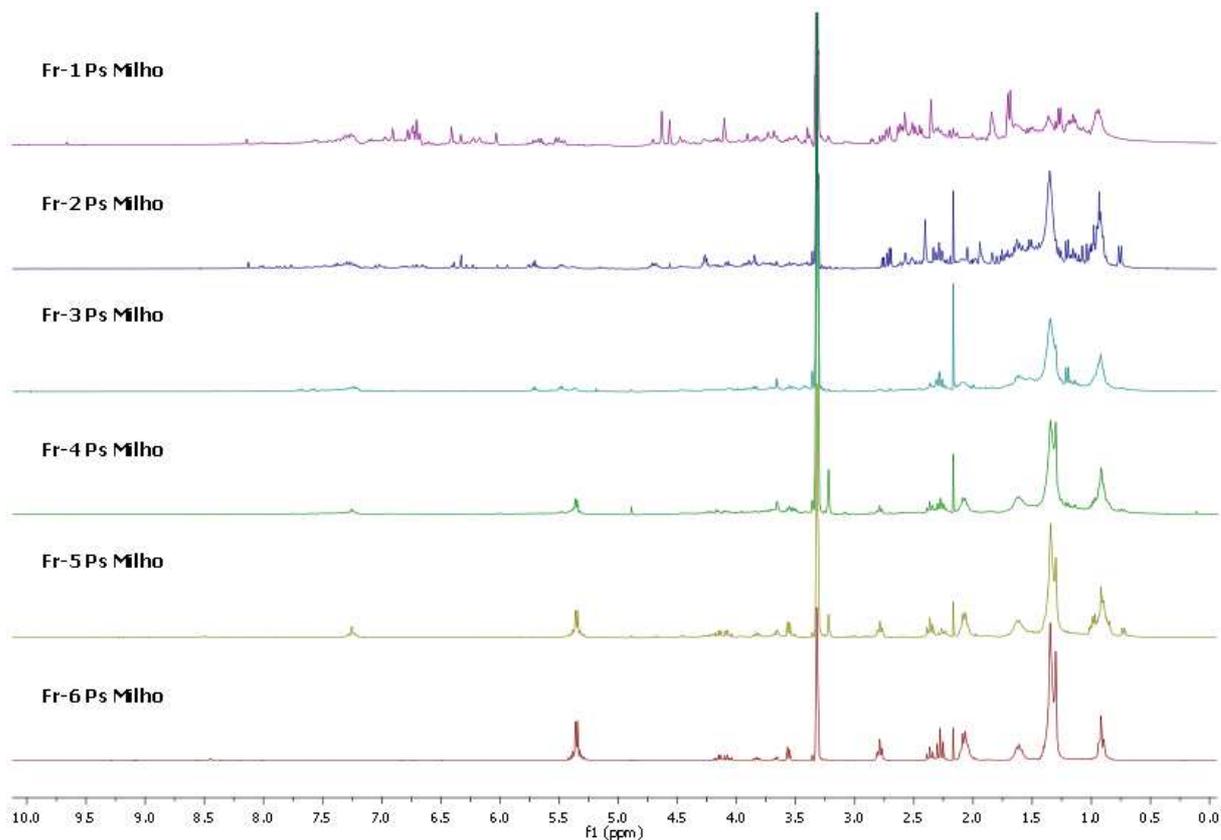


Figura 8 – Espectros de RMN de ^1H , com pré-saturação da água, em CD_3OD (300 MHz) das Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho.

Na análise dos espectros de RMN de ^1H da Figura 8 percebe-se uma vasta produção de metabólitos secundários pelo endófito, com sinais tanto na região de aromáticos quanto de alifáticos para as Fr-1 Ps Milho a Fr-3 Ps Milho.

4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio das frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho

As frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho foram analisados por RMN de ^1H , apresentando os resultados mostrados na Figura 9.

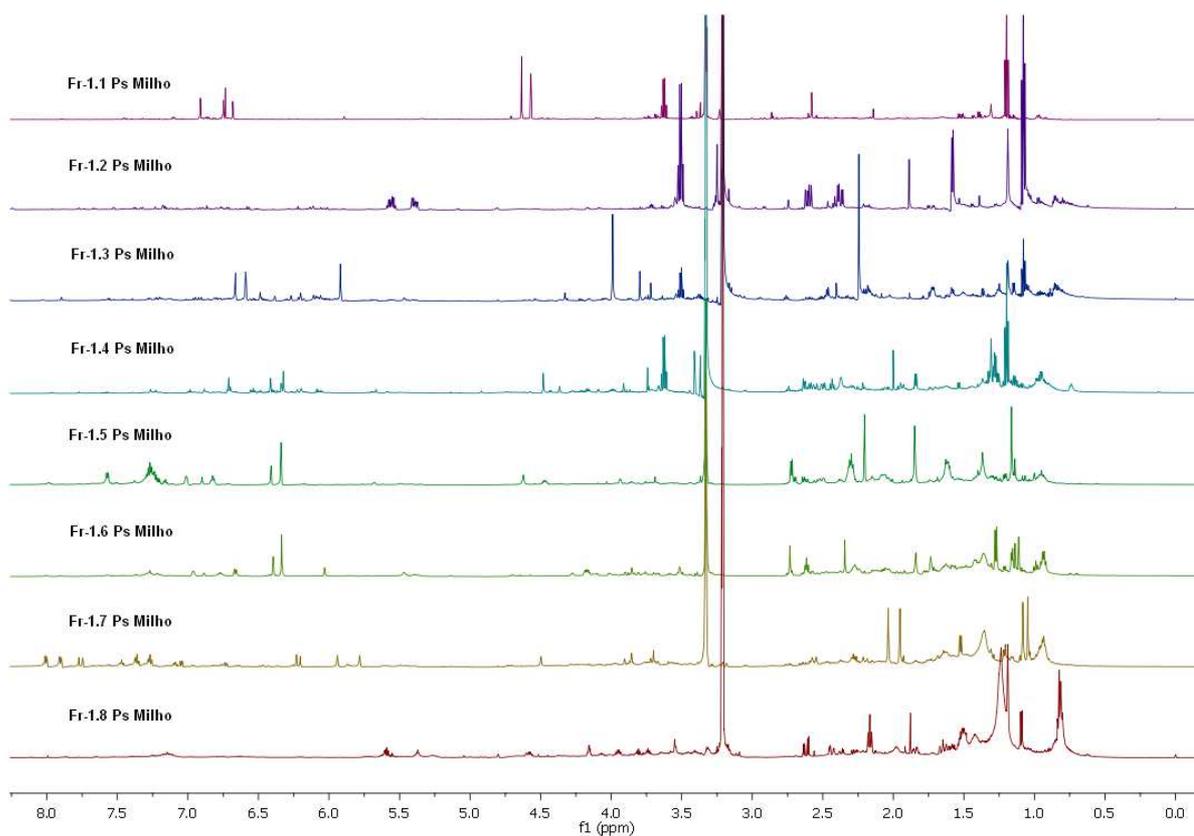


Figura 9 – Espectros de RMN de ^1H em CD_3OD (600 MHz), com pré-saturação da água, das frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho.

Ao se analisar os espectros de RMN de ^1H da Figura 9 observa-se uma vasta produção de metabólitos secundários com sinais de hidrogênios aromáticos e de alifáticos para a Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.7 Ps Milho. É possível observar, também, que a Fr-1.3 Ps Milho, possui uma substância majoritária, a qual foi identificada como sendo a substância **1**.

4.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma)

O extrato bruto de Malte AcOEt e o branco de Malte foram analisados por RMN de ^1H , apresentando os resultado mostrados nas Figura 10 e 11, respectivamente.

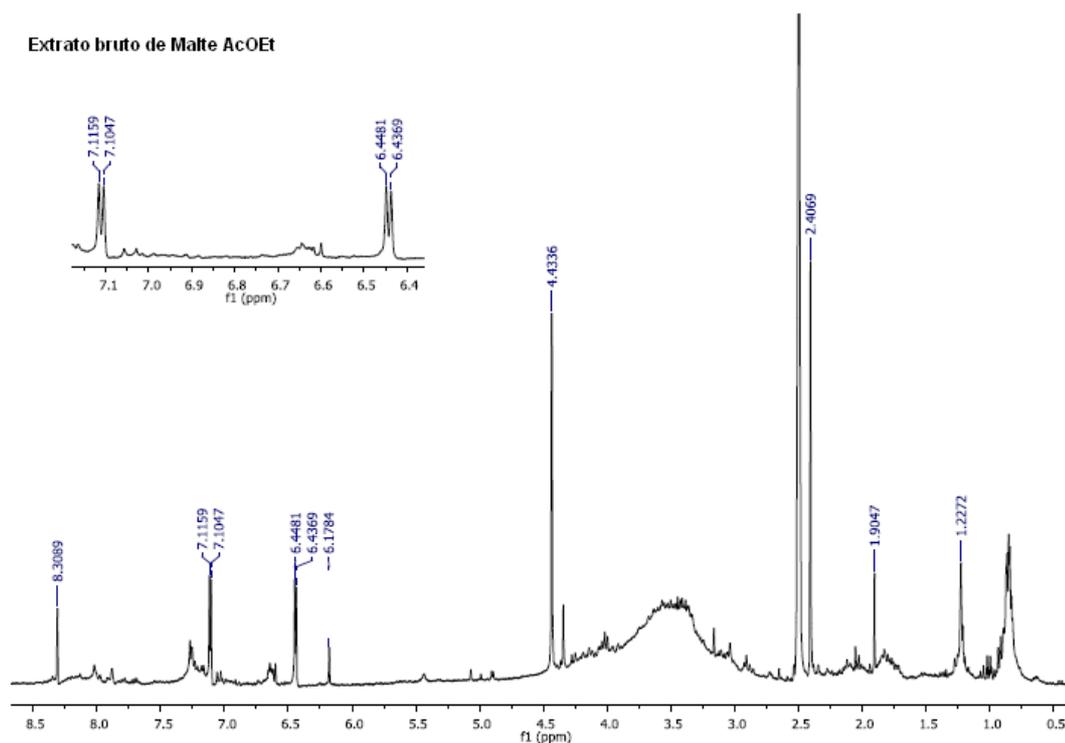


Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H e expansão, em DMSO-d_6 (300 MHz), com pré-saturação da água, do extrato bruto de Malte AcOEt.

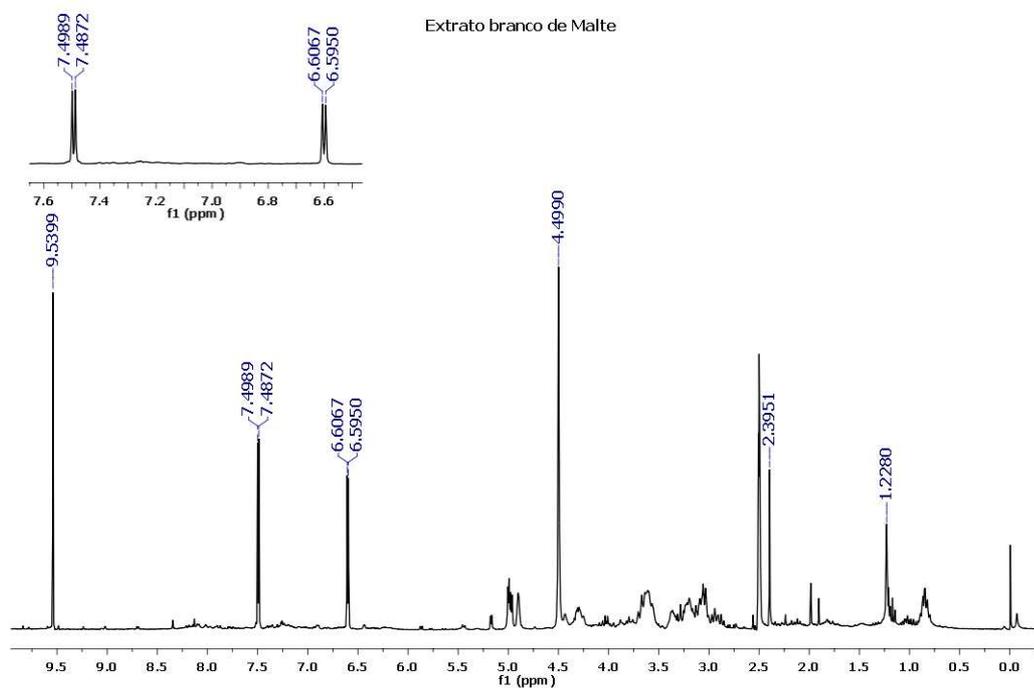


Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H e expansão, em DMSO-d_6 (600 MHz), com pré-saturação da água, do extrato branco de Malte.

Avaliação do experimento de RMN de ^1H do extrato bruto obtido em Malte evidenciou uma substância majoritária com dois dubletos bem resolvidos na região de aromáticos sugerindo um sistema *para* dissustituído. Interessante observar que o mesmo perfil foi observado no branco, no entanto com constantes de acoplamento distintos, indicando tratar-se de substâncias diferentes. Adicionalmente foram observados vários sinais na região de aromáticos e alifáticos.

As frações do extrato bruto de Malte AcOEt (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma) também foram analisadas por RMN de ^1H , sendo mostradas na Figura 12.

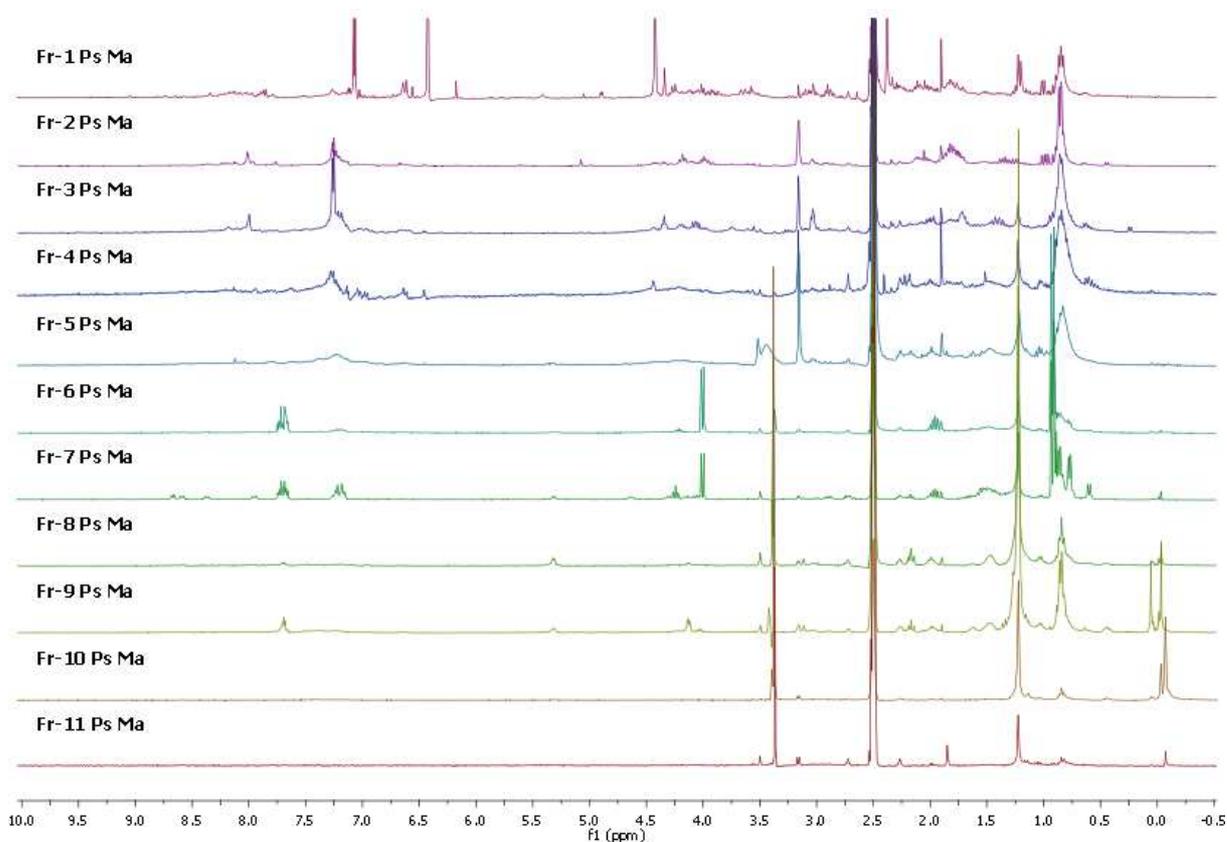


Figura 12 – Espectros de RMN de ^1H em DMSO-d_6 (300 MHz), com pré-saturação da água, das Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma.

Análise detalhada de todos os espectros de RMN de ^1H mostrados na Figura 12, mais uma vez reafirmam a potencialidade metabólica de *P. stromaticum* indicando a produção de substâncias aromáticas e alifáticas, que possivelmente estão atuando como protetoras da espécie vegetal contra fitopatógenos, o que é corroborado pelo resultado positivo da atividade antifúngica. É possível observar, também, que a Fr-6 Ps Ma, esta pura e foi identificada como sendo a substância **2**.

4.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Tanto o extrato bruto de milho NP, quanto o branco de milho foram analisados por CLAE-DAD em gradiente exploratório. Como fase estacionária, utilizou-se coluna analítica tipo Luna Phenomenex (C18) e eluição em gradiente de H₂O:ACN, contendo 0,1% de ácido fórmico em ambos os solventes, (95:05→0:100 v/v) em 60 minutos, permanecendo nesta condição por mais 5 minutos, com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Os resultados podem ser visto na Figura 13.

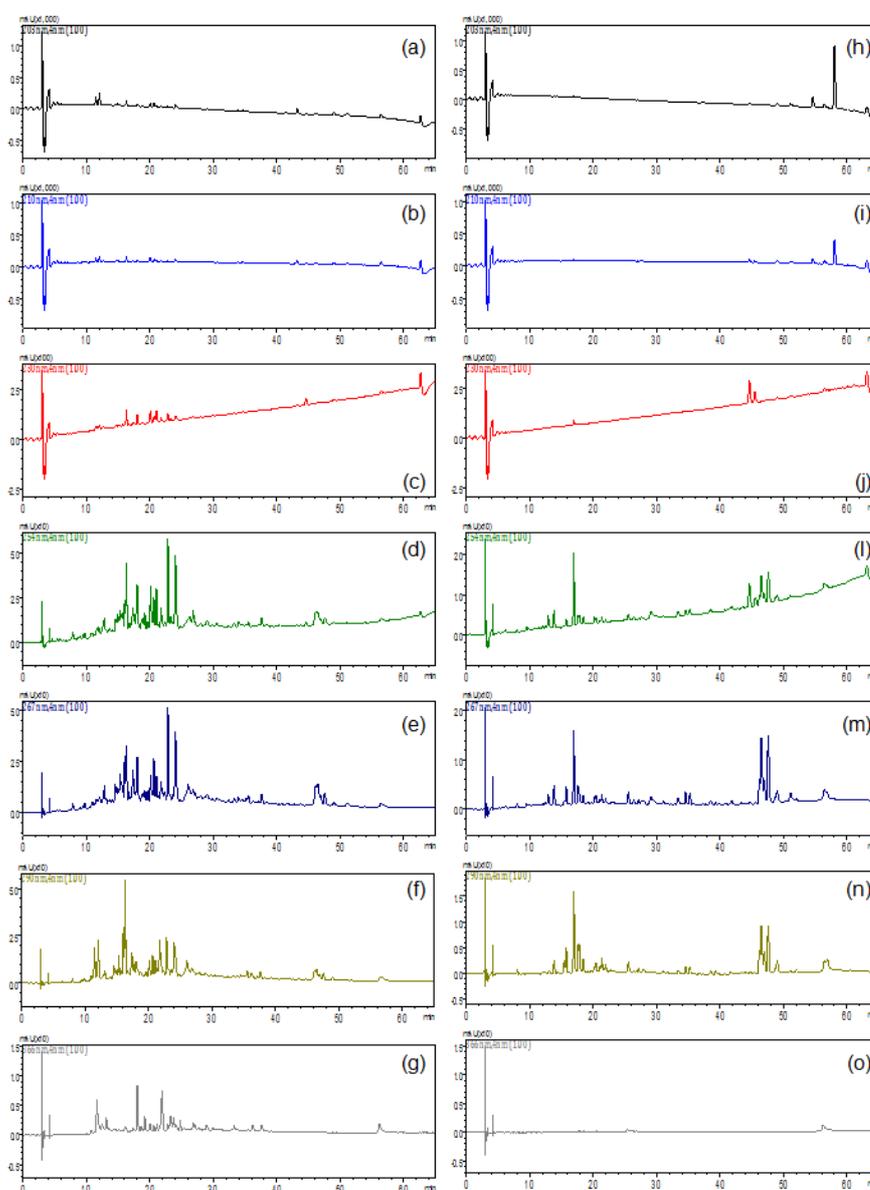


Figura 13 – Cromatograma do extrato bruto de milho NP (a, b, c, d, e, f, g) e do branco de milho (h, i, j, l, m, n, o), em λ 203, 210, 230, 254, 267, 290 e 366 nm, respectivamente.

Ao se analisar a Figura 13 é possível observar que o extrato bruto de milho NP e o branco de milho, apresentam várias diferenças, evidenciando a rica produção metabólica do fungo endofítico. É observado que o fungo endofítico produz substâncias de alta e média polaridade, já no branco é observado substâncias de alta, média e baixa polaridade.

4.5 Bioensaios do extrato bruto de milho NP

Avaliação da atividade antifúngica

O extrato bruto de milho NP, quando testado frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* apresenta os resultados evidenciados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado do ensaio antifúngico para o extrato bruto de milho NP.

	Hex:AcOEt (60:40)		CHCl ₃ :MeOH (83:17)	
	<i>C. cladosporioides</i> (Rf)	<i>C. sphaerospermum</i> (Rf)	<i>C. cladosporioides</i> (Rf)	<i>C. sphaerospermum</i> (Rf)
Extrato bruto de milho NP	-	-	-	-
Padrão nistatina	origem ***	origem ***	origem ***	origem ***

Legenda: atividade fraca *, atividade média **, atividade forte ***, inativo = -

Fonte: elaborada pelo autor⁴.

Segundo a Tabela 1, o extrato bruto de milho NP é inativo contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

⁴ As tabelas de 1 a 8 foram elaboradas pelo autor.

Avaliação da atividade anticolinesterásica

O extrato bruto de milho NP, quando testado frente à enzima acetilcolinesterase apresenta o resultado mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado do ensaio anticolinesterásico para o extrato bruto de milho NP.

	Hex:AcOEt (60:40)	CHCl ₃ :MeOH (83:17)
Extrato bruto de milho NP	-	-

Legenda: atividade fraca *, atividade média **, atividade forte ***, inativo = -

Segundo a Tabela 2, o extrato bruto de milho NP é inativo na inibição da enzima acetilcolinesterase.

4.6 Bioensaios do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma)

Avaliação da atividade antifúngica

O extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma), quando testados frente ao fungo fitopatológico *Cladosporium sphaerospermum* apresentam os resultados evidenciados na Figura 14.

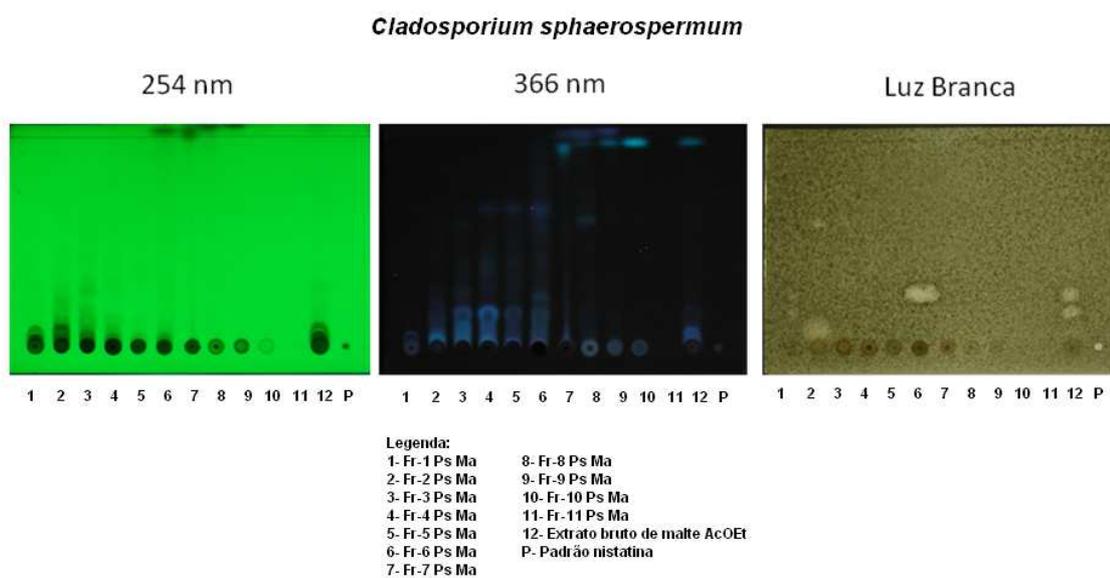


Figura 14 – Resultado da atividade antifúngica do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma) ao serem testados frente ao fungo fitopatológico *C. sphaerospermum*.

Os resultados para o extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma), podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado do ensaio antifúngico para o extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).

Amostra	Atividade	Rf
Fr-1 Ps Ma	*/*	0,18/0,25
Fr-2 Ps Ma	**/*	Base/0,58
Fr-3 Ps Ma	-	-
Fr-4 Ps Ma	-	-
Fr-5 Ps Ma	-	-
Fr-6 Ps Ma	***	0,27
Fr-7 Ps Ma	-	-
Fr-8 Ps Ma	-	-
Fr-9 Ps Ma	-	-
Fr-10 Ps Ma	-	-
Fr-11 Ps Ma	-	-
Extrato bruto de Malte AcOEt	**/**	0,18/0,25

Legenda: atividade fraca *, atividade média **, atividade forte ***, inativo = -

Segundo a Tabela 3, o extrato bruto de Malte AcOEt, a Fr-1 Ps Ma, a Fr-2 Ps Ma e a Fr-6 Ps Ma mostraram-se ativos contra o fungo fitopatógeno *C. sphaerospermum*, apresentado atividade fraca a forte.

Avaliação da atividade anticolinesterásica

O extrato bruto de Malte AcOEt e as frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma), quando testados frente à enzima acetilcolinesterase apresentam os resultados mostrados na Figura 15.

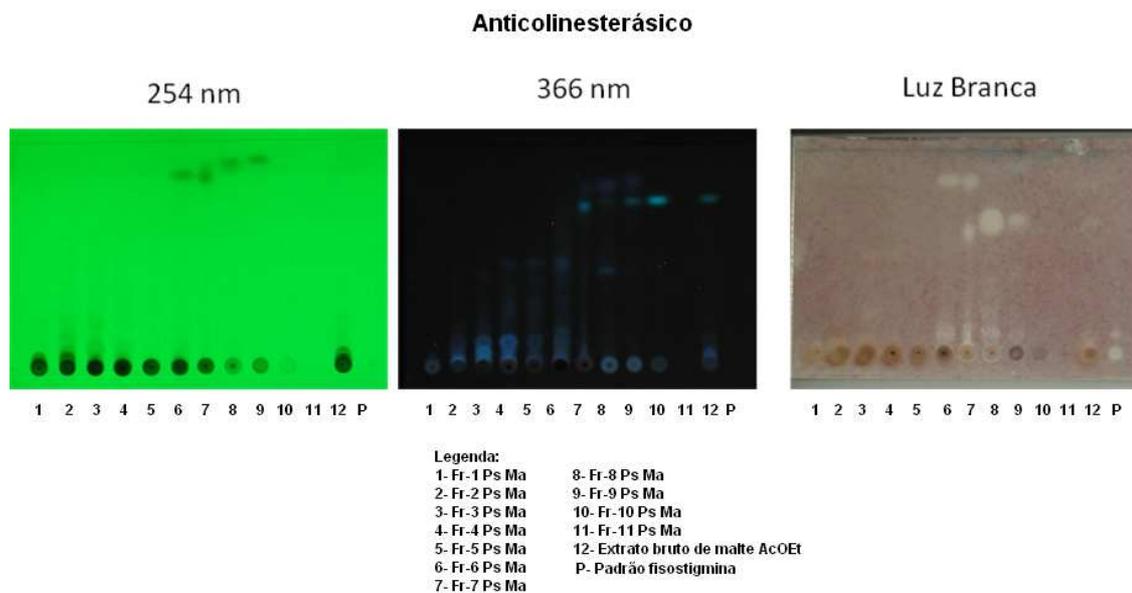


Figura 15 – Atividade anticolinesterásica, do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).

Os resultados para o extrato bruto de Malte AcOEt e as frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma), podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado do ensaio anticolinesterásico para o extrato bruto de Malte AcOEt e as frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).

Amostra	Atividade	Rf
Fr-1 Ps Ma	*	Base
Fr-2 Ps Ma	*	Base
Fr-3 Ps Ma	*	Base
Fr-4 Ps Ma	-	-
Fr-5 Ps Ma	-	-
Fr-6 Ps Ma	*/**	Base/0,86
Fr-7 Ps Ma	**/**	0,6/0,85
Fr-8 Ps Ma	**	0,59
Fr-9 Ps Ma	*	0,66
Fr-10 Ps Ma	-	-
Fr-11 Ps Ma	-	-
Extrato bruto de Malte AcOEt	*	Base

Legenda: atividade fraca *, atividade média **, atividade forte ***, inativo = -

De acordo com a Tabela 4, o extrato bruto de Malte AcOEt, a Fr-1 Ps Ma, a Fr-2 Ps Ma, a Fr-3 Ps Ma, a Fr-6 Ps Ma, a Fr-7 Ps Ma, a Fr-8 Ps Ma e a Fr-9 Ps Ma são ativos na inibição da enzima acetilcolinesterase, apresentando atividade fraca a média, evidenciando *P. stromaticum* como um importante fungo produtor de substâncias com atividade anticolinesterásica.

4.7 Determinação Estrutural da Substância 1

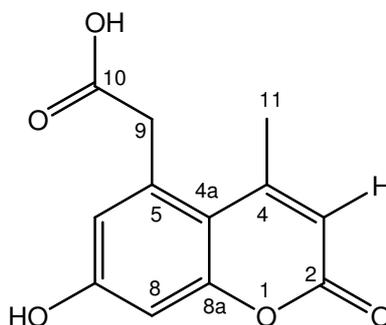


Figura 16 – Estrutura do 2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético.

A substância **1** foi identificada da Fr-1.3 Ps Milho como um óleo de coloração amarelada (6,6 mg). A fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_5$ foi estabelecida utilizando os dados obtidos no espectrômetro de massas de baixa resolução, por ionização em *electrospray* no modo negativo (CLAE-EM) (Figura 17), no qual foi possível observar o sinal de m/z 233,2; referente ao aduto $[M-H]^-$. Tal fórmula molecular ($C_{12}H_{10}O_5$) é corroborada pelos dados de RMN de 1H e pelos espectros de RMN uni e bidimensionais.

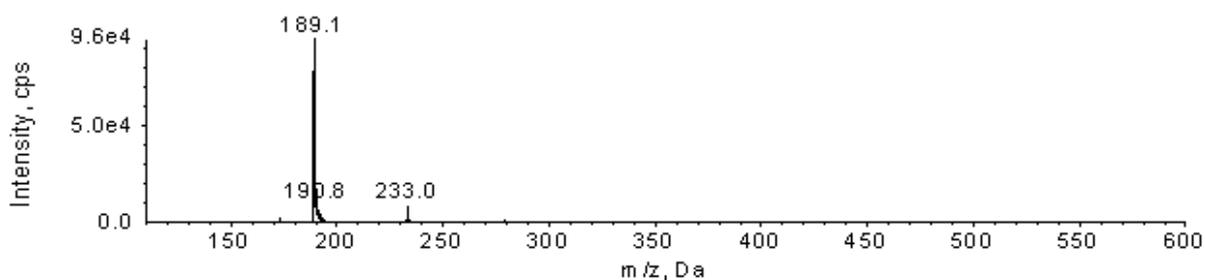


Figura 17 – Espectro de massas de baixa resolução da substância 1 (CLAE-EM).

O espectro de RMN de 1H (Figura 18) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,78 (*d*, $J = 2,34$ Hz, 1H, H-8) e δ_H 6,71 (*d*, $J = 2,34$ Hz, 1H, H-6), evidenciando um anel aromático tetrassubstituído. Também foram observados sinais em δ_H 6,04 (*s*, 1H, H-3) e em δ_H 4,11 (*s*, 2H, H-9) evidenciando um hidrogênios olefínico e metilênicos benzílicos α carboxila, e um sinal em δ_H 2,36 (*s*, 3H, H-11) sugerindo a presença de metila ligada a um carbono sp^2 .

Todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono com base no experimento de HSQC (Figura 19), no qual podemos observar δ_H 6,78 com δ_C 102,5; δ_H 6,71 com δ_C 119,1; δ_H 6,04 com δ_C 110,7; δ_H 4,11 com δ_C 41,7 e δ_H 2,36 com δ_C 19,6.

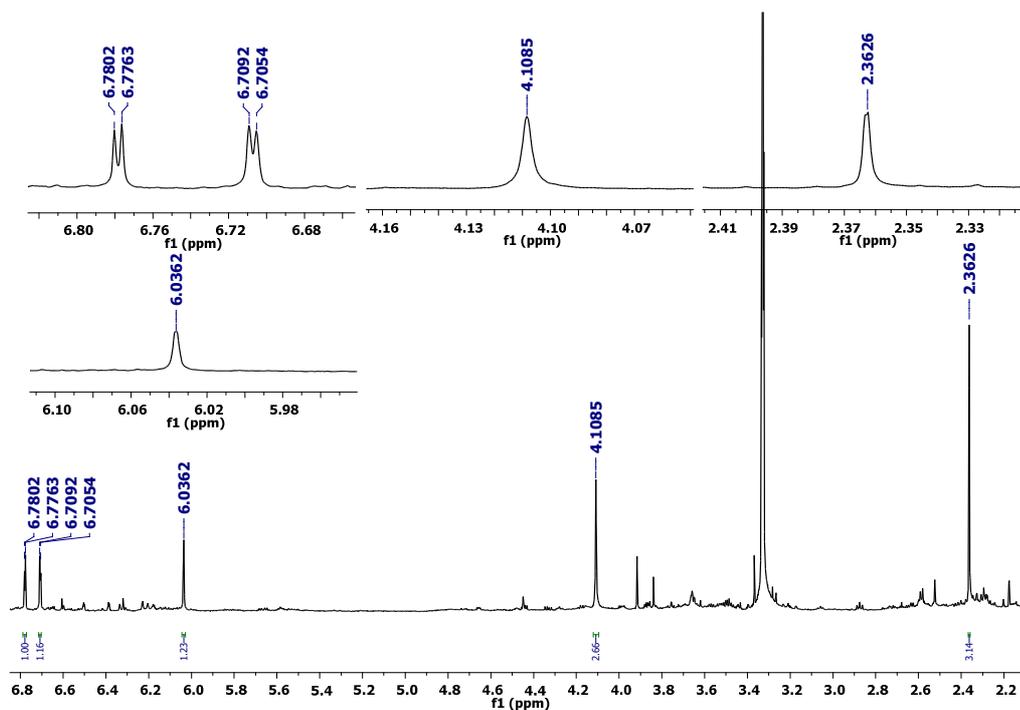


Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) da substância 1.

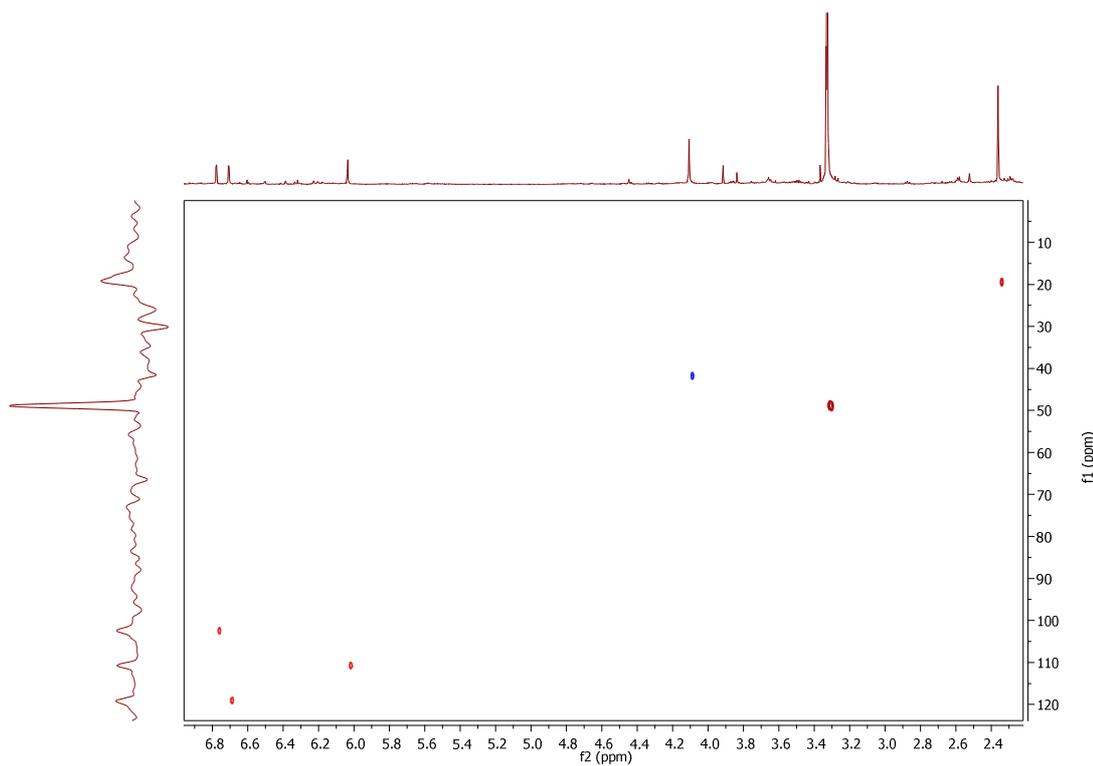


Figura 19 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância **1**.

No experimento de HMBC (Figura 20) foram observadas várias correlações à longa distância dos hidrogênios com os carbonos, mostradas na Tabela 5.

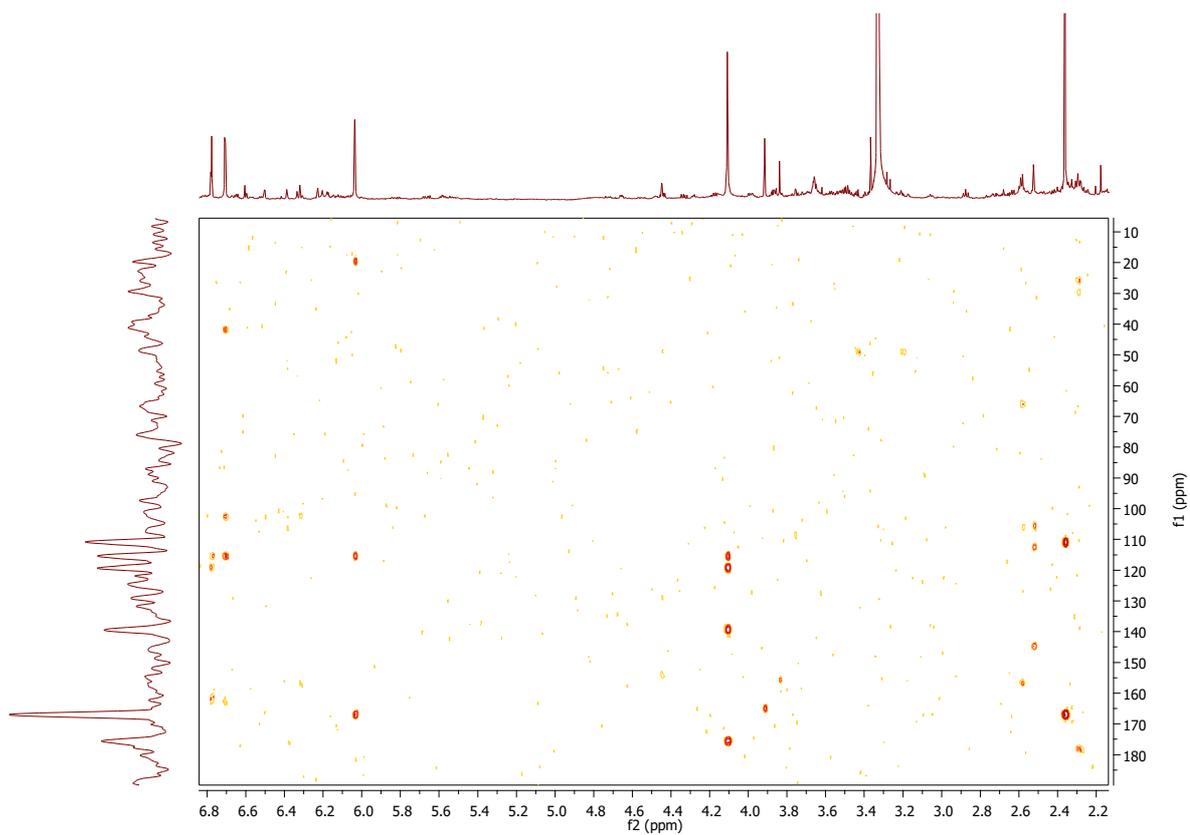


Figura 20 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância **1**.

Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (600 MHz) da substância **1**.

Posição	^1H (δ)	HSQC*	HMBC
2	-	167,0*	-
3	6,04 (s)	110,9	C-11; C-4a; C-2
4	-	-	-
4 ^a	-	115,4*	-
5	-	139,4*	-
6	6,71 (d, $J = 2,34$)	119,1	C-9; C-8; C-4a; C-8a
7	-	161,9*	-
8	6,78 (d, $J = 2,34$)	102,5	C-4a; C-6; C-7
8 ^a	-	162,8*	-
9	4,11 (s)	41,7	C-4a; C-6; C-5; C-10
10	-	175,6*	-
11	2,36 (s)	19,6	C-3; C-2

^aDeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm e J em Hz.

*Valores retirados pelo HMBC.

Na Figura 21 é possível observar o espectro de massas (Ms/Ms) da substância **1**, mostrando a quebra sofrida pela mesma.

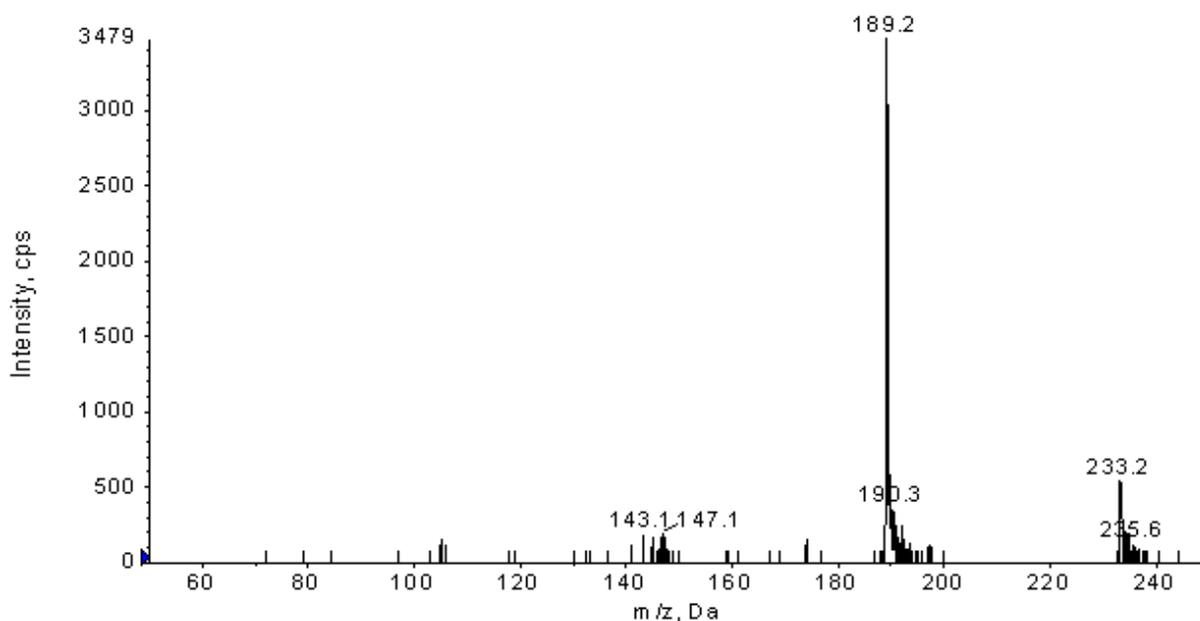


Figura 21 – Espectro de massas (Ms/Ms) da substância **1**, mostrando a quebra sofrida pela mesma.

É possível observar na Figura 21 uma quebra de 233,2 Da para 189,2 Da, sendo esta de 44 Da referente a perda de CO₂ e referente a carbonila em C-10, tal quebra pode ser observada na Figura 22.

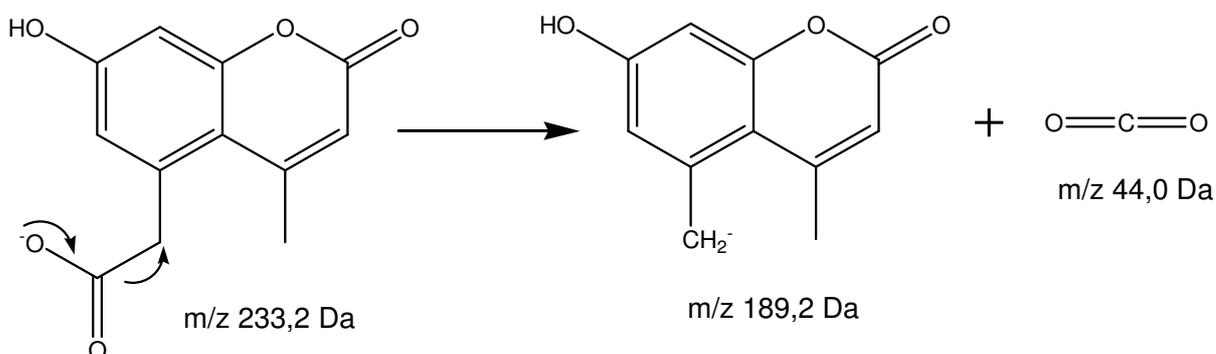


Figura 22 – Fragmentação por EM da substância 1

Análise detalhada de todos os dados associado com a ausência destes na literatura, permitiram atribuir para a substância **1** a estrutura da cumarina inédita nomeada 2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético.

Cumarinas são compostos naturais, constituídos por um anel benzênico fundido com uma α -pirona, tendo sido isoladas de plantas, bactérias e fungos (COSTA, TAVARES, OLIVEIRA, 2016). O primeiro relato de isolamento e determinação estrutural de cumarina ocorreu em 1820 (SOUZA, RENNÓ, FIGUEROA-VILLAR, 2016). Já o primeiro relato de síntese, ocorreu em 1868 e foi, posteriormente, utilizado na indústria farmacêutica como precursor de anticoagulantes (COSTA, TAVARES, OLIVEIRA, 2016).

Cumarinas já foram identificadas e isoladas em extratos de fungos endofíticos, estas possuem diferentes atividades biológicas importantes, como por exemplo: antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, anticâncer, antidiabetes e anti-HIV (UMASHANKAR, GOVINDAPPA, RAMACHANDRA, 2014). Além dessas atividades biológicas, podemos destacar a sua atividade anticolinesterásica, a qual permite ser utilizada no tratamento de doenças como o Alzheimer e o Parkinson (SOUZA, RENNÓ, FIGUEROA-VILLAR, 2016).

As cumarinas apresentam aplicações, não só na indústria farmacêutica, mas também em indústrias agroquímicas, alimentícias e cosméticas. Na indústria cosmética, por exemplo, cumarinas podem ser usadas como fixador ou para

destacar a fragrância (COSTA, TAVARES, OLIVEIRA, 2016).

Pouca informação está disponível sobre a biossíntese microbiana de cumarina, apesar de sua importância industrial, com destaque a indústria farmacêutica (COSTA, TAVARES, OLIVEIRA, 2016). Para a substância **1** propomos que a biossíntese ocorre via ácido cinâmico conforme a Figura 23.

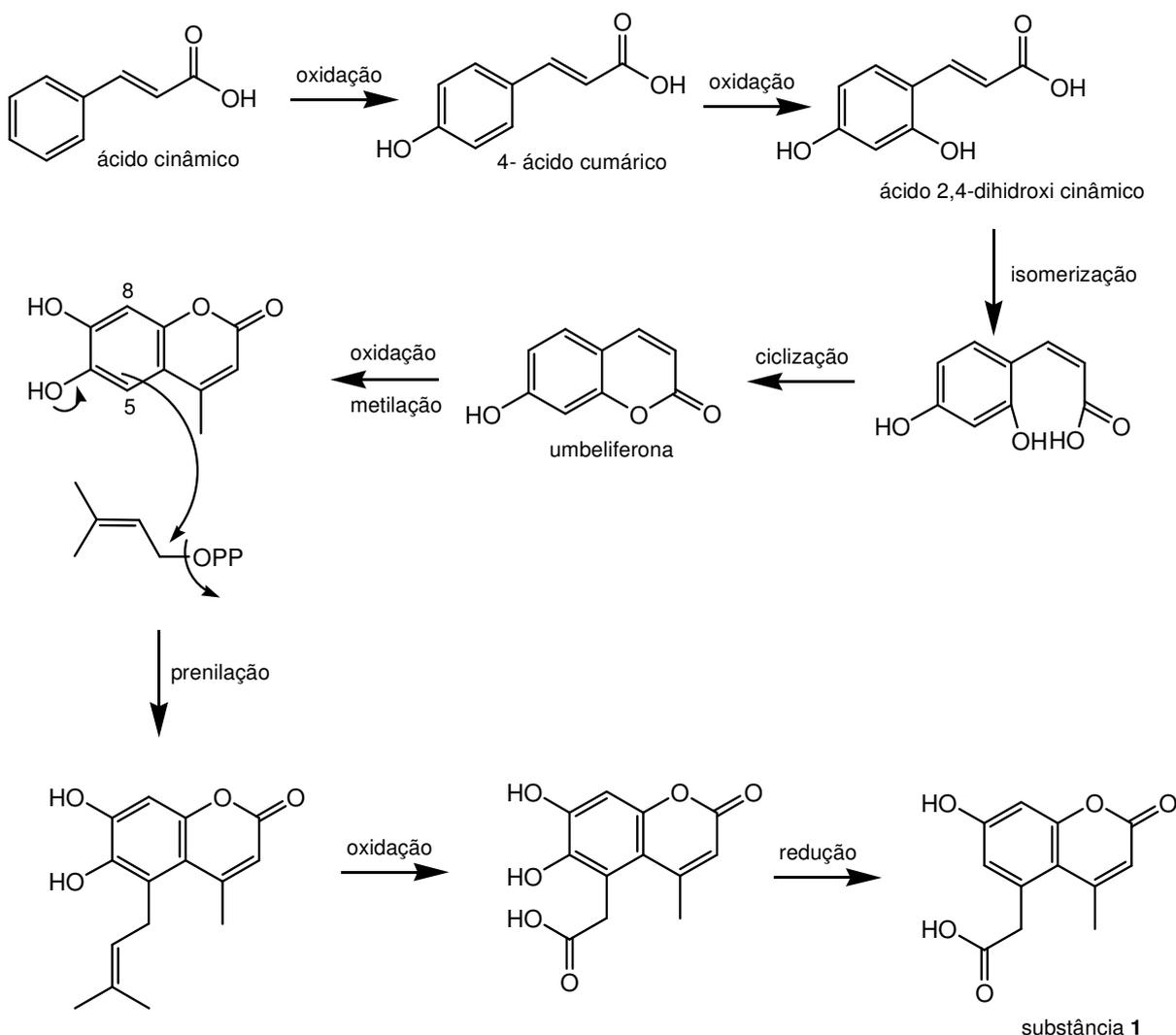


Figura 23 – Proposta de biossíntese para a substância **1**.

A prenilação poderia ocorrer em C-5 assim como em C-8 devido ao efeito doador de elétrons das hidroxilas, porém em C-8 observamos o efeito retirador de elétrons por indução de O-1. Neste caso, o par de elétrons de O-1 está em ressonância com a carbonila (C-2), tornando o efeito de indução mais importante do que o efeito de ressonância em C-8. Deste modo C-5 apresenta maior densidade eletrônica tornando-se nucleofílico e favorecendo a prenilação nele.

4.8 Determinação Estrutural da substância 2

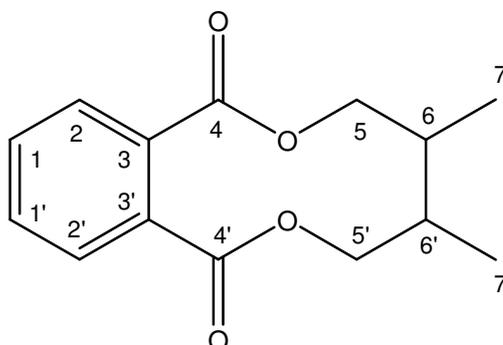


Figura 24 – Estrutura do 4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona.

A substância **2** foi identificada da Fr-6 Ps Ma, a qual após ter o solvente evaporado, forneceu um pó de coloração marrom (16,8 mg). A fórmula molecular $C_{14}H_{16}O_4$ foi determinada utilizando os dados obtidos através das análises dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

O espectro de RMN de 1H (Figura 25) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,74 (*dd*, $J = 3,3$ e $5,7$ Hz, 2H, H-2 e H-2') e δ_H 7,63 (*dd*, $J = 3,3$ e $5,7$ Hz, 2H, H-1 e H-1'), evidenciando um anel aromático dissubstituído e simétrico. Também foi observado, um sinal em δ_H 4,07 (*d*, $J = 6,7$ Hz, 4H, H-5 e H-5') evidenciando hidrogênios metilênicos carbinólicos, um sinal em δ_H 2,03 (*hep*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-6 e H-6') indicou hidrogênios metínicos e um sinal em δ_H 1,00 (*d*, $J = 6,7$ Hz, 6H, H-7 e H-7') atribuído a metilas.

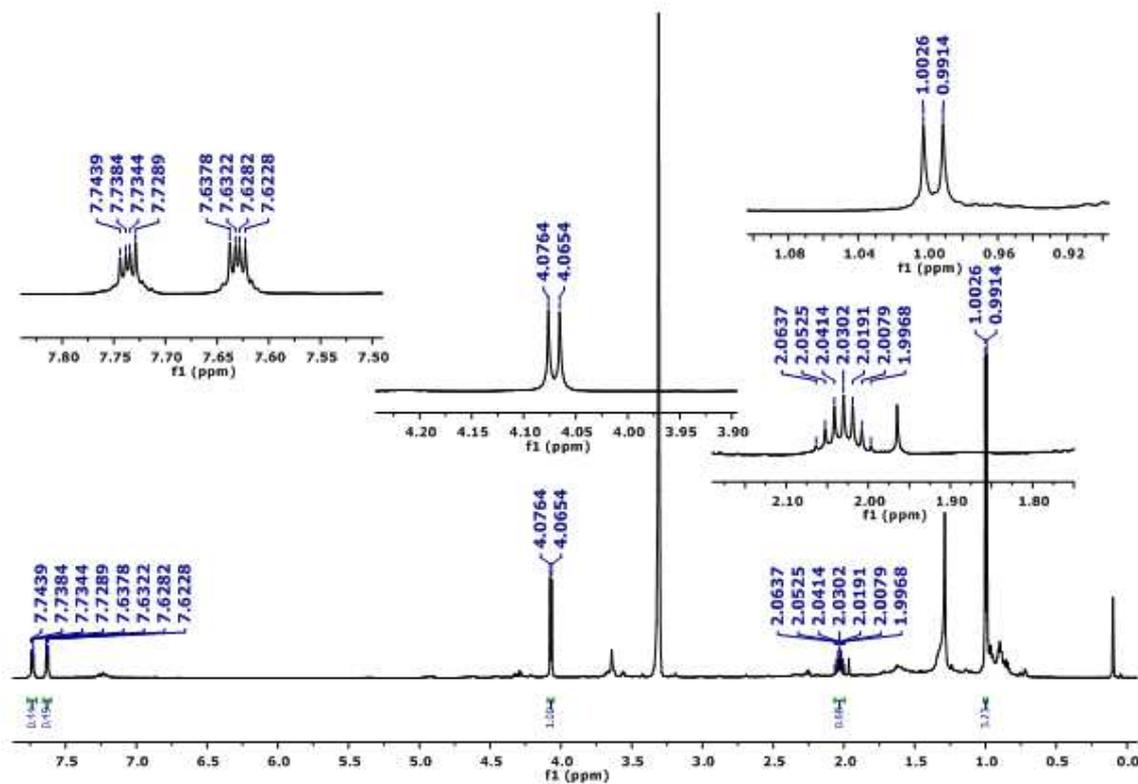


Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H , com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) da substância 2.

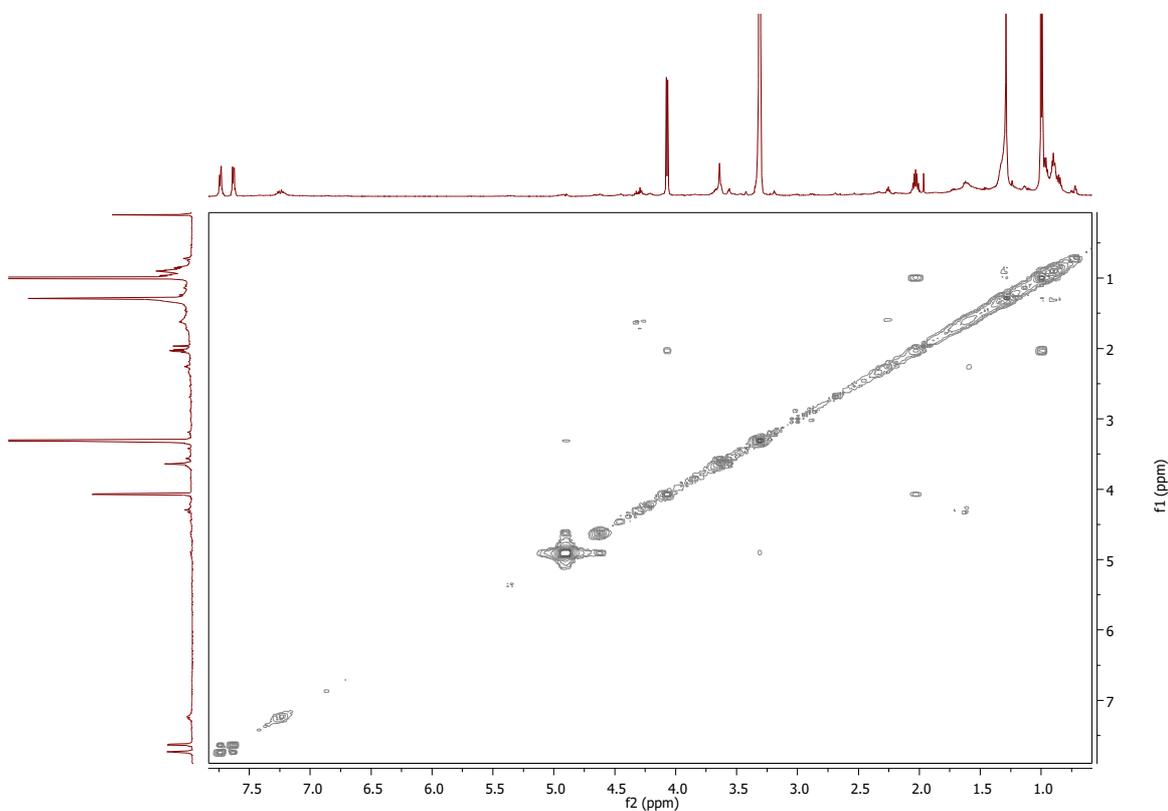


Figura 26 – Espectro de COSY em CD_3OD (600 MHz) da substância 2.

Ao se analisar o experimento de COSY (Figura 26) foi observado interações ^1H - ^1H entre os hidrogênios aromáticos em H-1/H-1' \leftrightarrow H-2/H-2', e dos hidrogênios metínicos em H-5/H-5' \leftrightarrow H-6/H-6' \leftrightarrow H-7/H-7' permitindo estabelecer a estrutura de um anel aromático dissustituído e simétrico para a substância **2**.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 27) apresentou sinal de carbonila de éster em δ_{C} 169,3 (C-4 e C-4'), de carbonos aromáticos em δ_{C} 133,6 (C-3 e C-3'), δ_{C} 132,4 (C-1 e C-1') e δ_{C} 129,9 (C-2 e C-2') evidenciando a presença de um anel aromático. Adicionalmente, foram observados sinais de carbonos metilênicos carbinólicos em δ_{C} 72,9 (C-5 e C-5'), carbonos metínicos em δ_{C} 29,0 (C-6 e C-6') e carbonos metílicos em δ_{C} 19,5 (C-7 e C-7'). Dessa forma tem-se 14 carbonos para a substância **2** e apenas 7 sinais no espectro de RMN de ^{13}C , confirmando que essa substância é simétrica. É possível observar, também, apenas 3 sinais de carbonos aromáticos (δ_{C} 133,6; δ_{C} 132,4 e δ_{C} 129,9) o que novamente confirma um anel benzênico simetricamente dissustituído em *orto*.

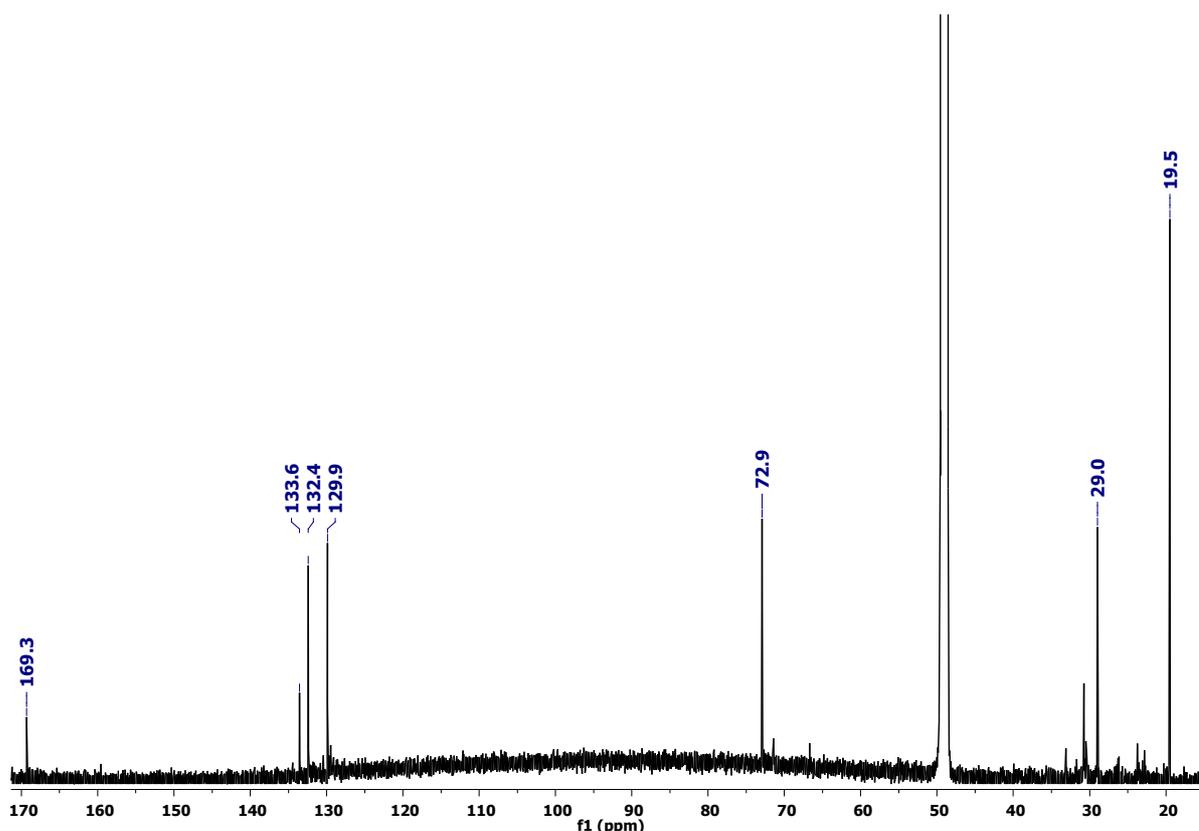


Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (150 MHz) da substância **2**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, com base nas observações no mapa de contorno do espectro de HSQC (Figura 28).

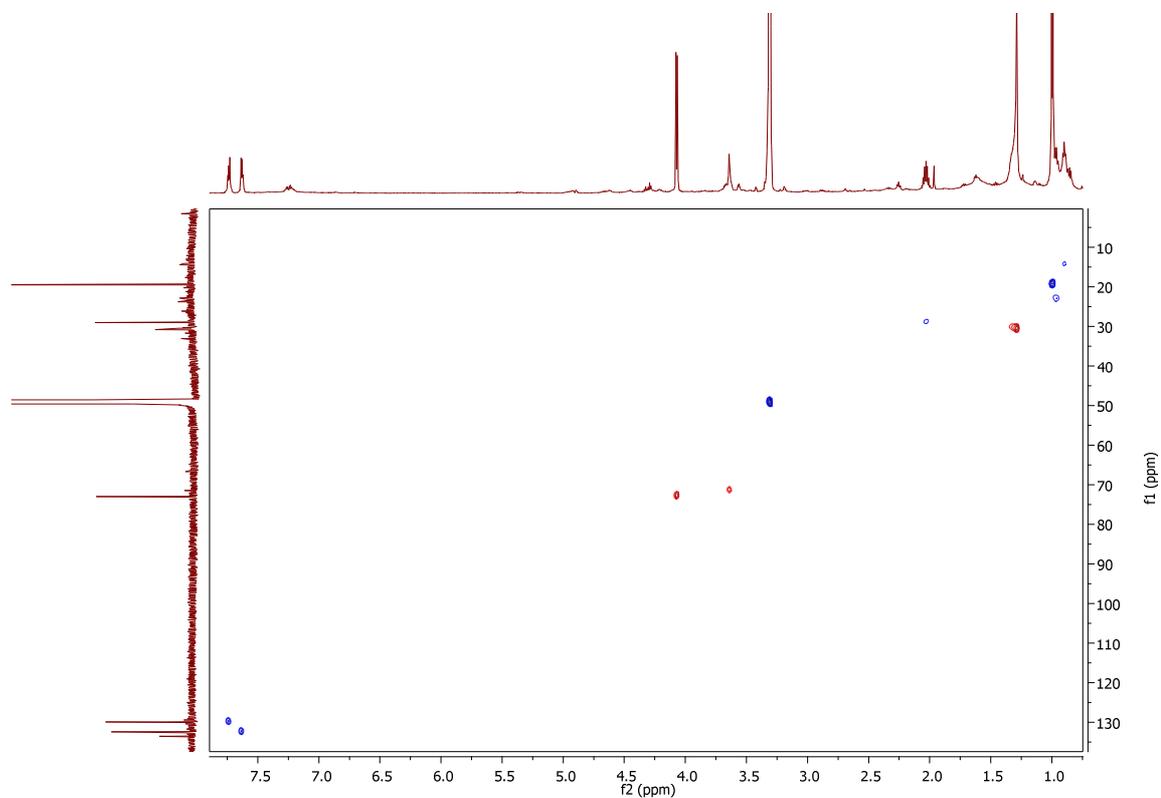


Figura 28 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância **2**.

No espectro de HMBC (Figura 29) foram observadas correlações à longa distância dos hidrogênios com os carbonos, as quais são mostradas na Figura 30.

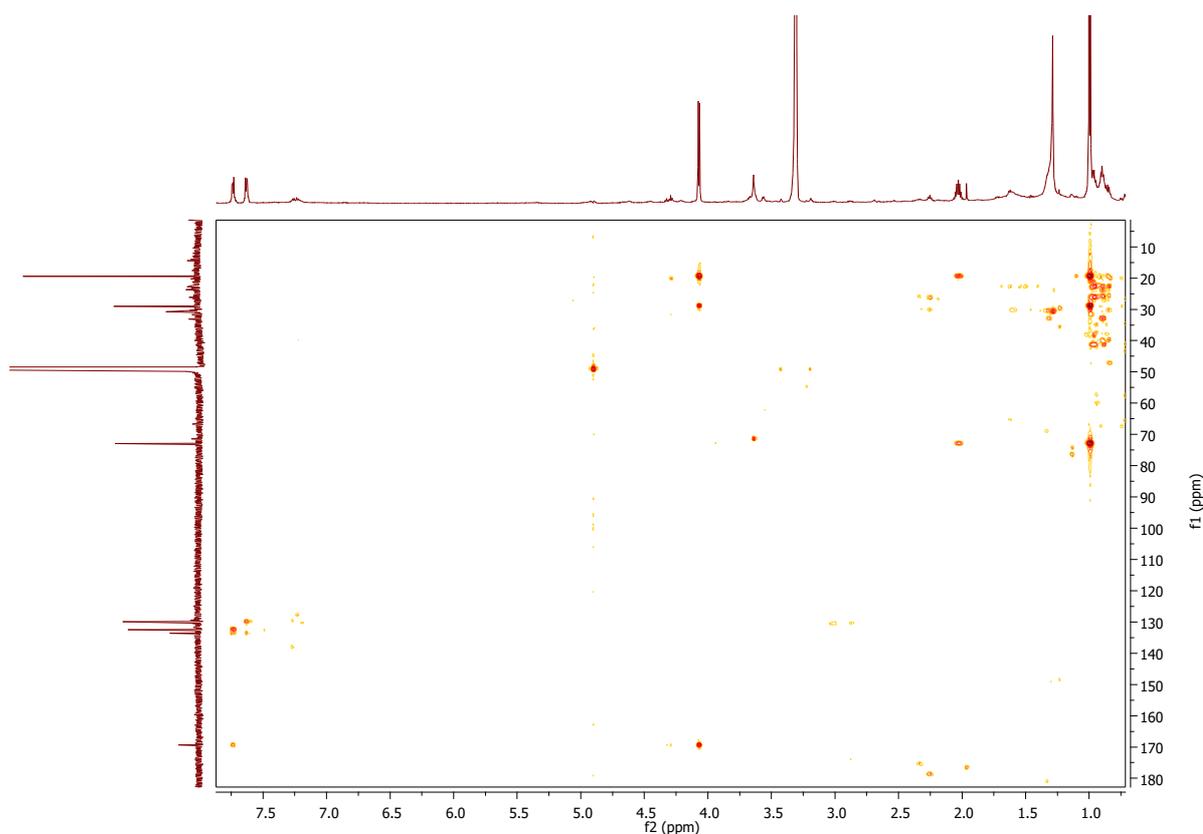


Figura 29 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância **2**.

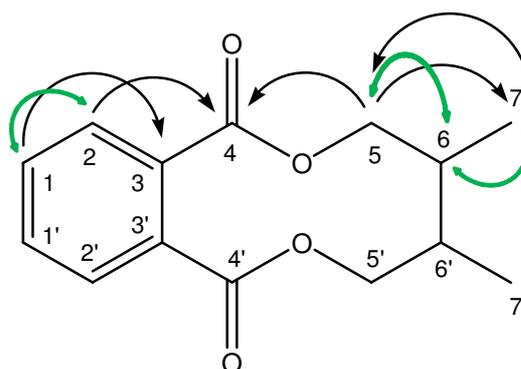


Figura 30 – Principais correlações observadas no experimento de HMBC (seta preta) e de COSY (seta duplo sentido verde), da substância **2**.

Todos os dados mostrados, associados aos presentes na literatura, possibilitaram dizer que a substância **2** é um ftalato, sendo o mesmo inédito de nome 4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[*c*][1,6]dioxecina-1,8-diona.

Ftalatos já foram identificados e isolados em extratos de fungos dos gêneros: *Engyodontium* (HENG-CHAO et al., 2013), *Pestalotiopsis* (LI, YANG, 2014),

Penicillium (SHEN et al., 2012), *Alternaria* (ZHENG, LIU, FAN, 2012), *Curvularia* (LUCAS et al., 2008), entre outros.

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (14,7 T) da substância **2**.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1 e 1'	7,63 (<i>dd</i> , $J = 3,3$ e $5,7$)	132,4; CH	C-2, C-2', C-3 e C-3'
2 e 2'	7,74 (<i>dd</i> , $J = 3,3$ e $5,7$)	129,9; CH	C-1, C-1', C-3, C-3', C-4 e C-4'
3 e 3'	-	133,6; C	-
4 e 4'	-	169,3; C	-
5 e 5'	4,07 (<i>d</i> , $J = 6,7$)	72,9; CH_2	C-4, C-4', C-6, C-6', C-7 e C-7'
6 e 6'	2,03 (<i>hep</i> , $J = 6,7$)	29,0; CH	C-5, C-5', C-7 e C-7'
7 e 7'	1,00 (<i>d</i> , $J = 6,7$)	19,5; CH_3	C-5, C-5', C-6, C-6', C-7 e C-7'

^aDeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm e J em Hz.

4.9 Determinação Estrutural da substância **3**

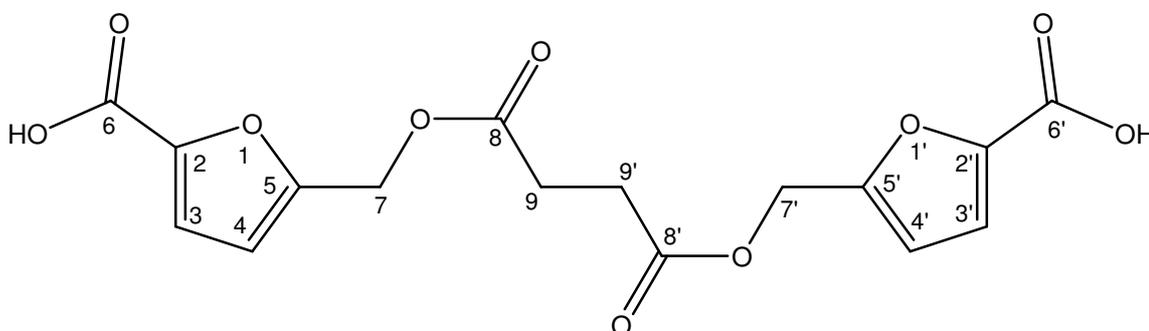


Figura 31 – Estrutura do Pseudofusicato.

A substância **3** foi identificada da Fr-1.1 Ps Ma como um óleo de coloração marrom escuro (711,6 mg).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 32) apresentou para a substância **3** dois dubletos em δ_{H} 7,03 (*d*, $J = 3,36$ Hz, 2H, H-3 e H-3') e δ_{H} 6,41 (*d*, $J = 3,36$ Hz, 2H, H-4 e H-4'). Também foi observado um singlete em δ_{H} 4,55 (*s*, 4H, H-7 e H-7') atribuído a um metileno oxivinílico e um singlete em δ_{H} 2,56 (*s*, 4H, H-9 e H-9') evidenciando hidrogênios metilênicos. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,70 foi descartado como fazendo parte da substância, pois ele apresenta uma integral de 2H, porém no

HSQC ele é observado como um CH ou CH₃ e no HMBC ele não se correlaciona com nenhum outro sinal da substância.

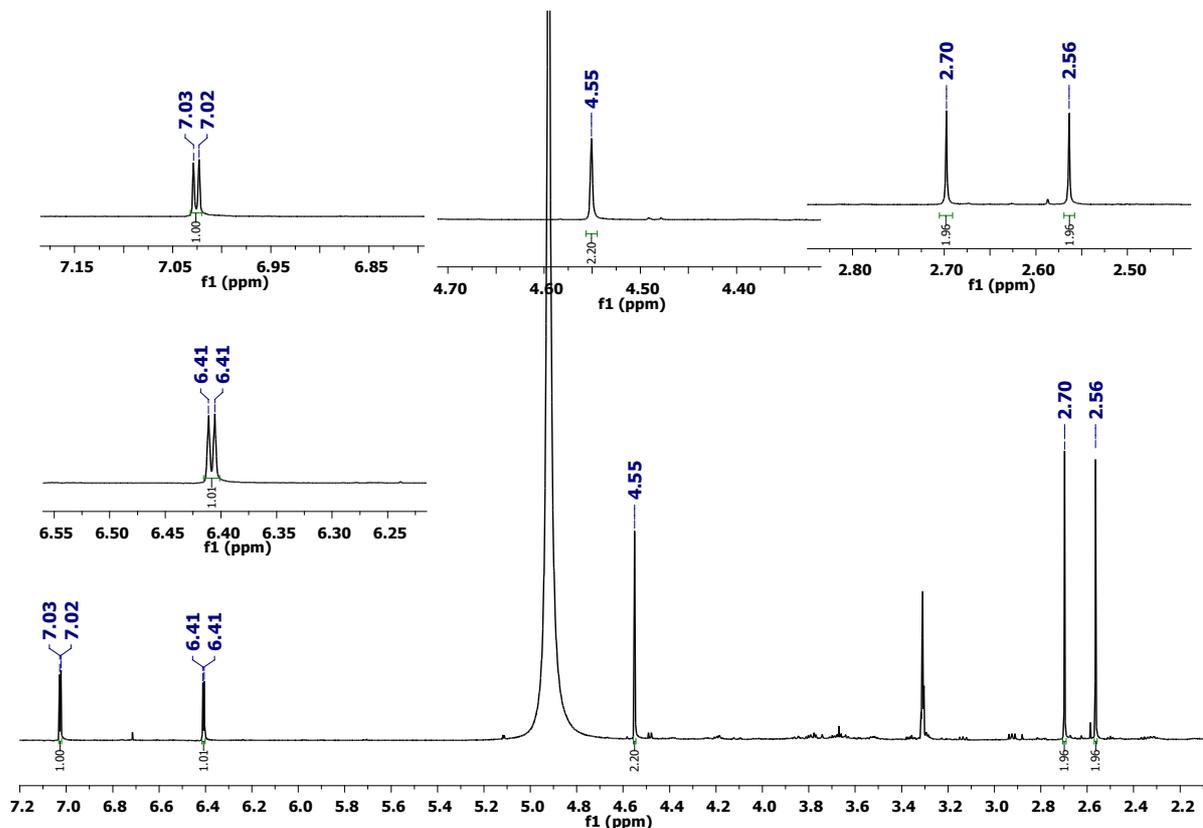


Figura 32 – Espectro de RMN de ¹H e expansões, com pré-saturação da água, em CD₃OD (600 MHz) das substâncias **3**.

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 33) apresentou para a substância **3** sinais de carbonila em δ_c 176,6 (C-8 e C-8') e em δ_c 164,3 (C-6 e C-6'), de carbonos do anel furânico em δ_c 159,0 (C-5 e C-5'), δ_c 148,5 (C-2 e C-2'), δ_c 117,9 (C-3 e C-3') e δ_c 110,1 (C-4 e C-4'). Adicionalmente, foi observado sinal de carbono metilênico carbinólico em δ_c 57,5 (C-7 e C-7') e de carbono metilênico em δ_c 30,1 (C-9 e C-9').

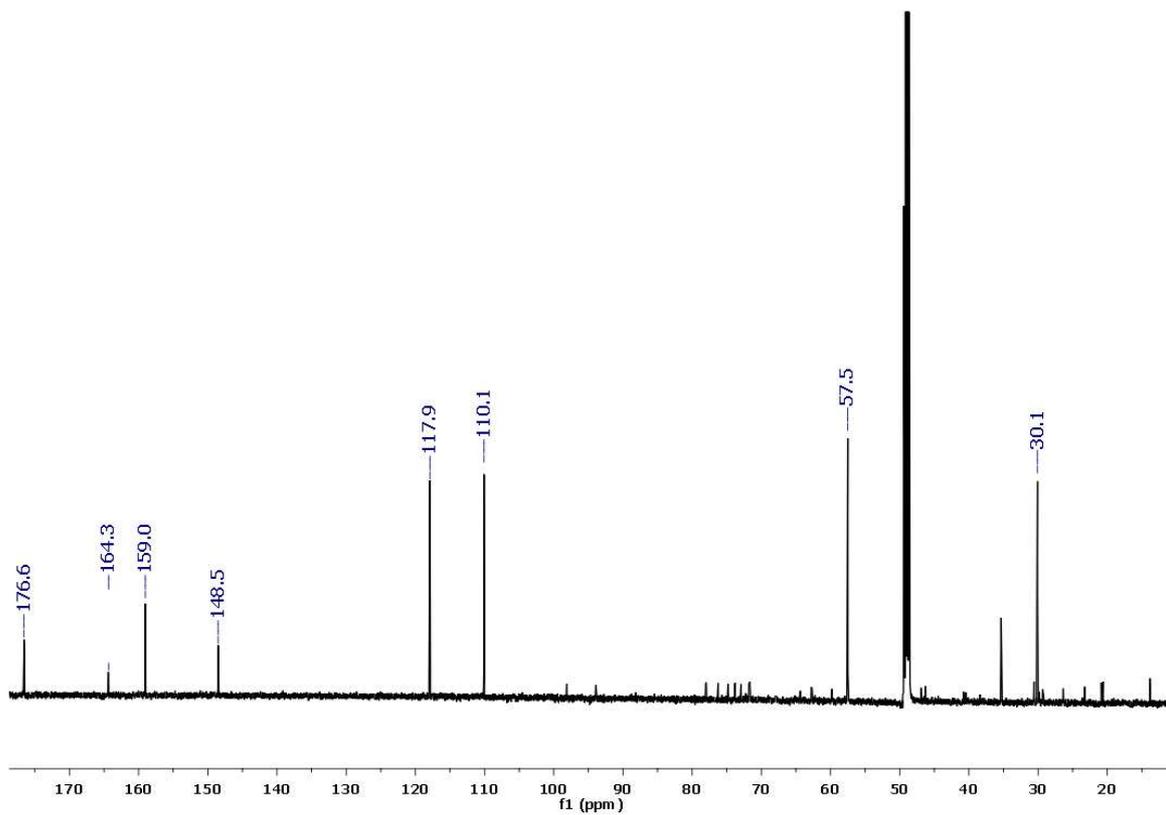


Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (150 MHz) das substâncias **3**.

Todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono com base no experimento de HSQC (Figura 34).

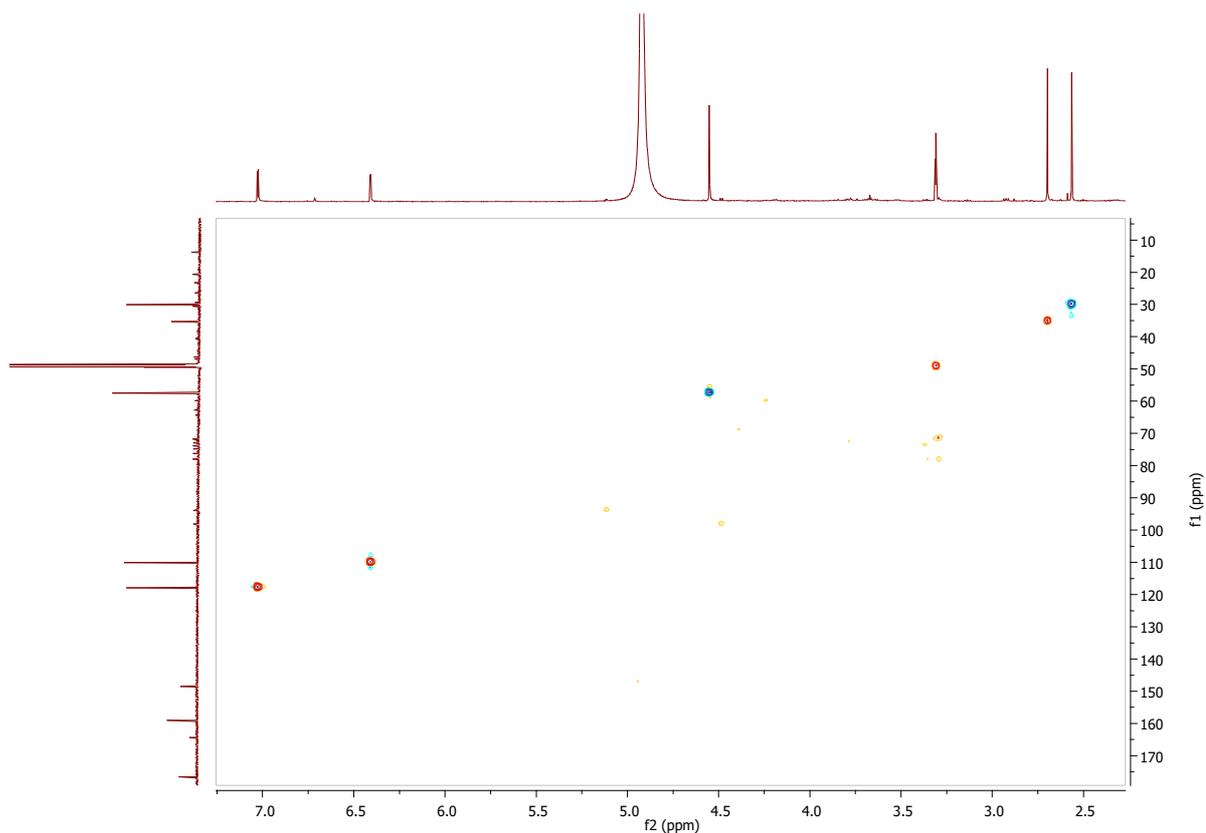


Figura 34 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância **3**.

No experimento de HMBC (Figura 35) foram observadas várias correlações à longa distância dos hidrogênios com os carbonos, mostradas na Tabela 7.

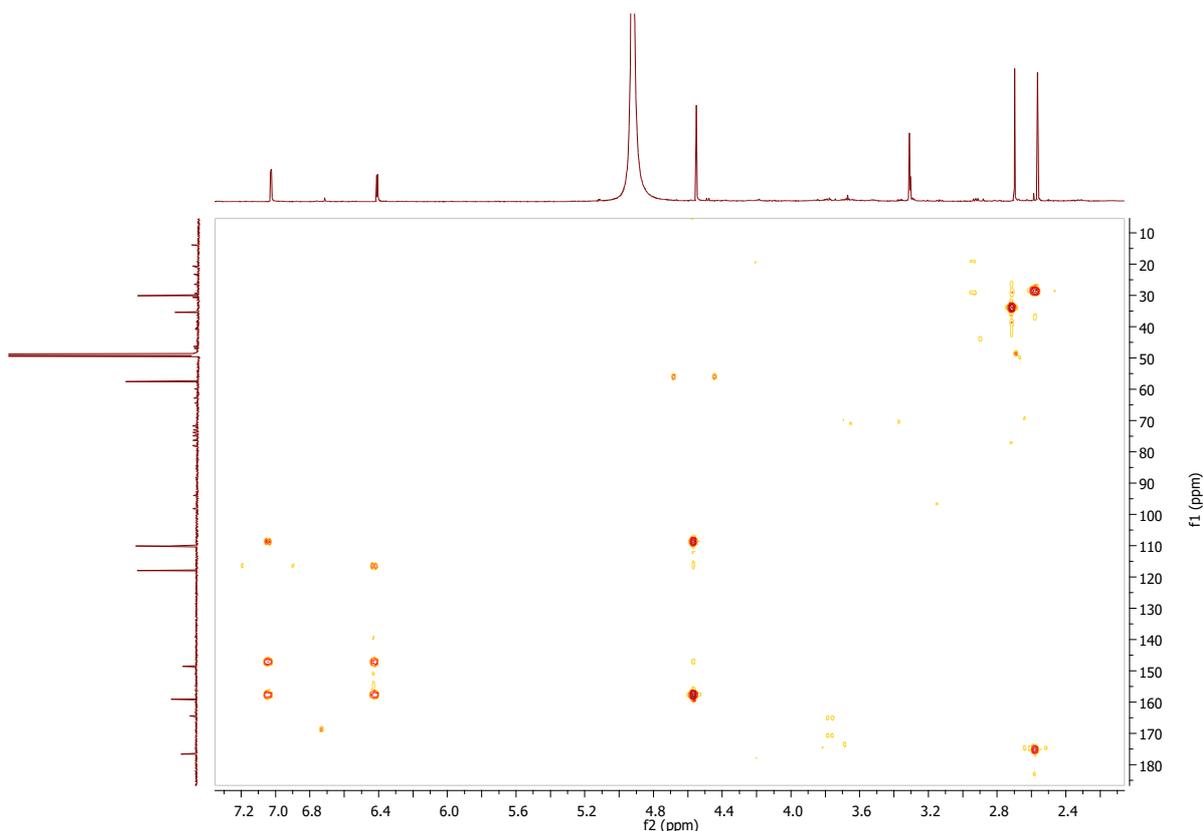


Figura 35 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância **3**.

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (14,7 T) da substância **3**.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
2 e 2'	-	148,5	-
3 e 3'	7,03 (<i>d</i> , $J = 3,36$ Hz)	117,9	C-4, C-4', C-2, C-2', C-5, C-5'
4 e 4'	6,41 (<i>d</i> , $J = 3,36$ Hz)	110,1	C-3, C-3', C-2, C-2', C-5, C-5'
5 e 5'	-	159,0	-
6 e 6'	-	164,3	-
7 e 7'	4,55 (<i>s</i>)	57,5	C-4, C-4', C-5, C-5'
8 e 8'	-	176,6	-
9 e 9'	2,56 (<i>s</i>)	30,1	C-9, C-9', C-8, C-8'

^aDeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm e J em Hz.

Todos os dados mostrados e discutidos acima, associados aos presentes na literatura, possibilitaram sugerir que **3** seja produto de transformação formado pela decomposição da maltose (presente no extrato de malte) a 5-hidroximetilfurfural

(HMF) no processo de esterilização. Na sequência a função aldeídica do HMF seria oxidado a ácido carboxílico por *P. stromaticum* e a seguir a duas unidades de HMF, agora na forma de ácido e não aldeído, seria esterificado com ácido succínico, provavelmente, produzido pelo fungo, como mostrado na Figura 36.

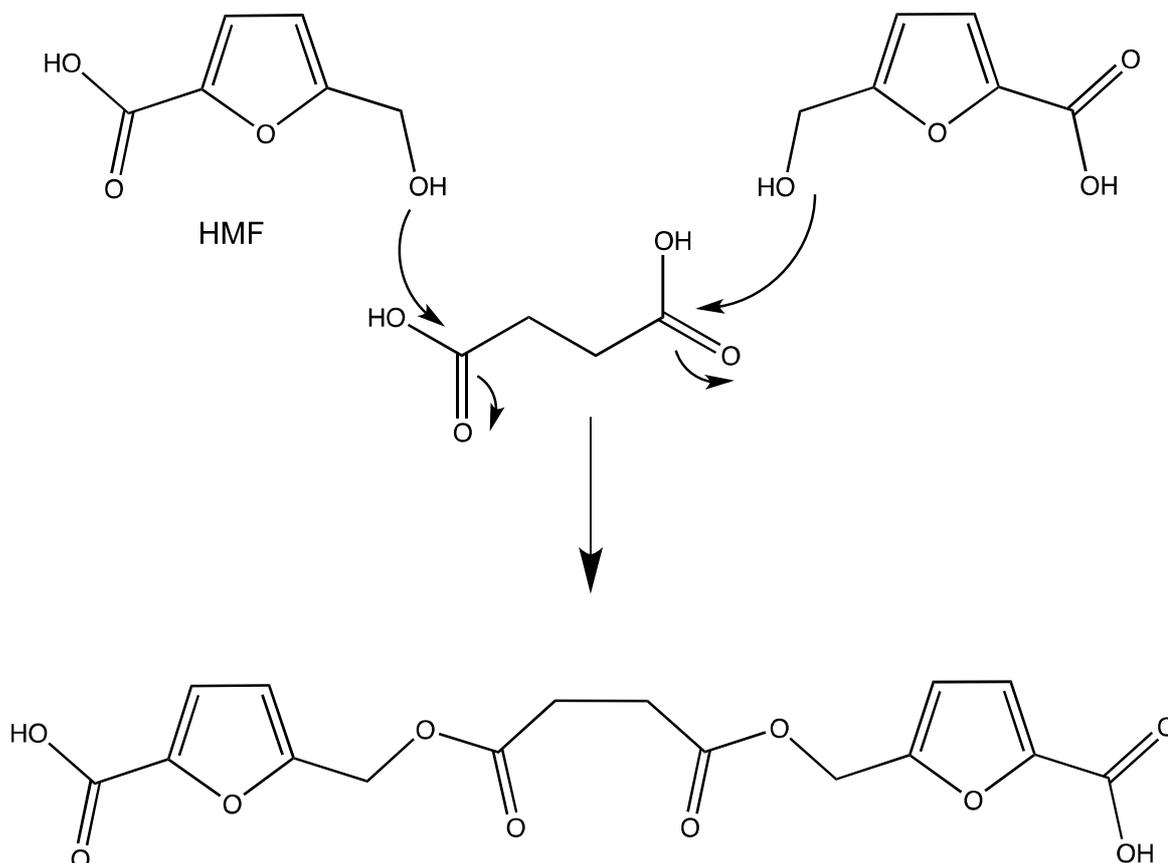


Figura 36 – Formação do Pseudofusicato.

4.10 Determinação Estrutural da substância 4

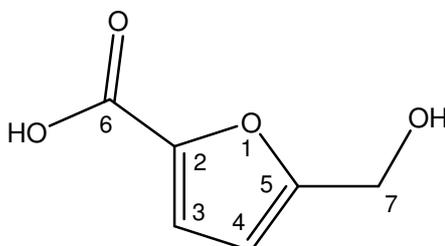


Figura 37 – Estrutura do 5-(hidroximetil)furano-2-ácido carboxílico.

A substância **4** foi identificada da Fr-1.2 Ps Ma como um óleo de coloração amarelada.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 38) apresentou para a substância **4** dois dubletos em δ_{H} 7,13 (*d*, $J = 3,36$ Hz, 1H, H-3) e δ_{H} 6,46 (*d*, $J = 3,36$ Hz, 1H, H-4). Também foi observado um singlete em δ_{H} 4,57 (*s*, 2H, H-7) atribuído a um metileno oxivinílico.

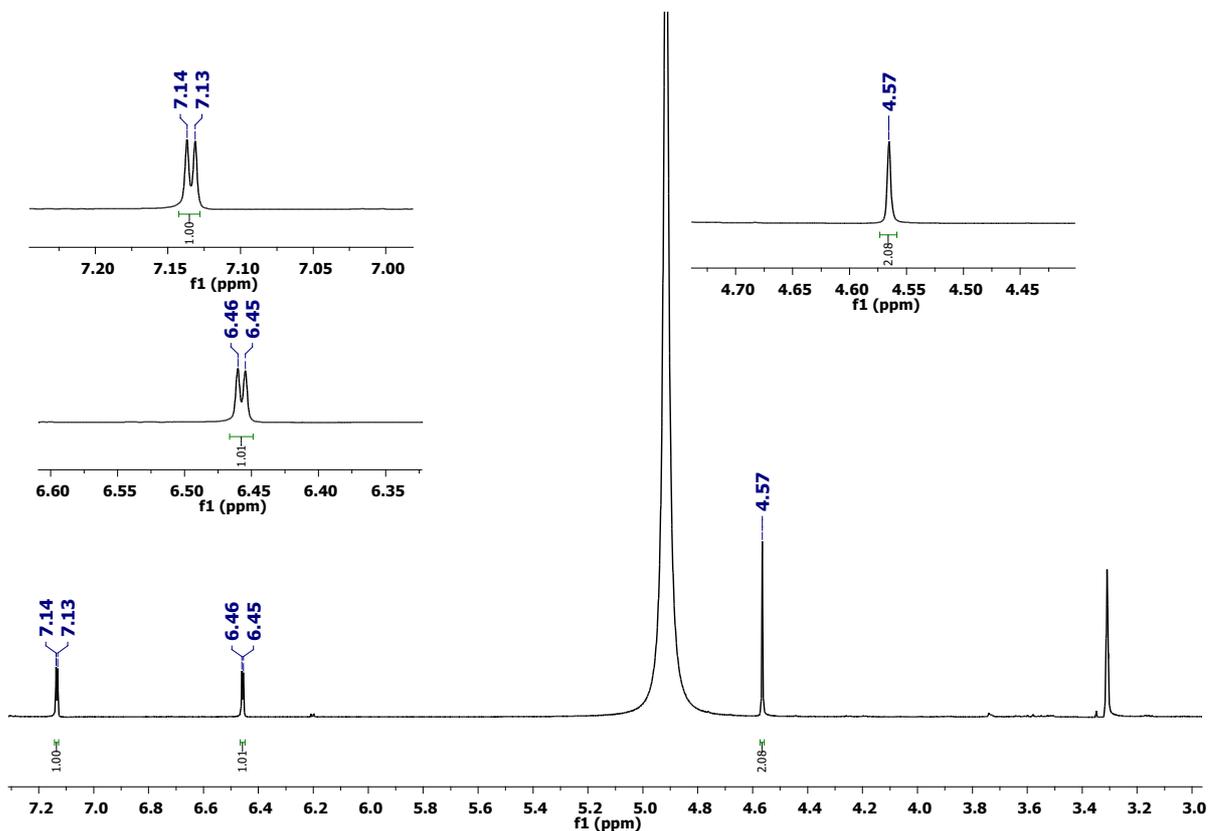


Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H e expansões, com pré-saturação da água, em CD_3OD (600 MHz) das substâncias **4**.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) apresentou para a substância **4** sinais de carbonos típicos de anel de furano em δ_{C} 160,3 (C-5), δ_{C} 119,6 (C-3) e δ_{C} 110,2 (C-4). Adicionalmente, foi observado sinal de carbono metilênico carbinólico em δ_{C} 57,5 (C-7).

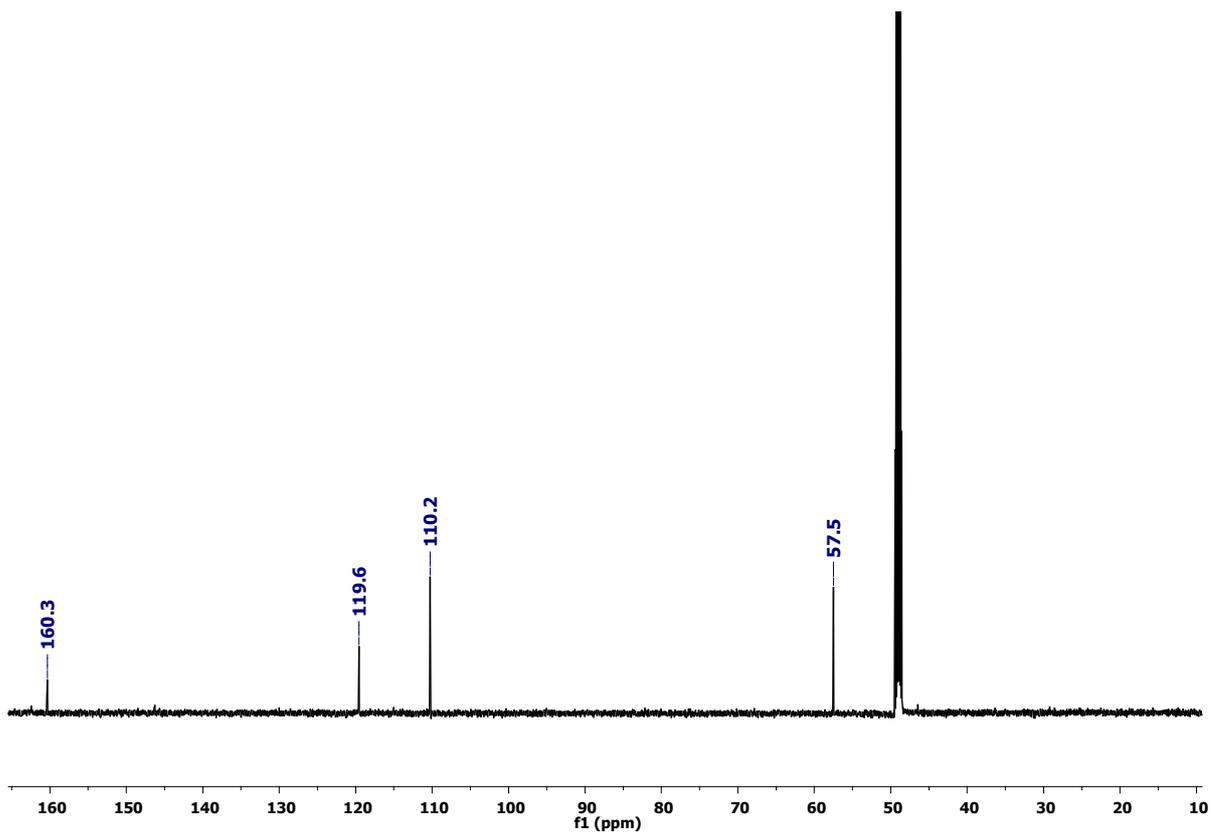


Figura 39 – Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD (150 MHz) das substâncias **4**.

Todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono com base no experimento de HSQC (Figura 40).

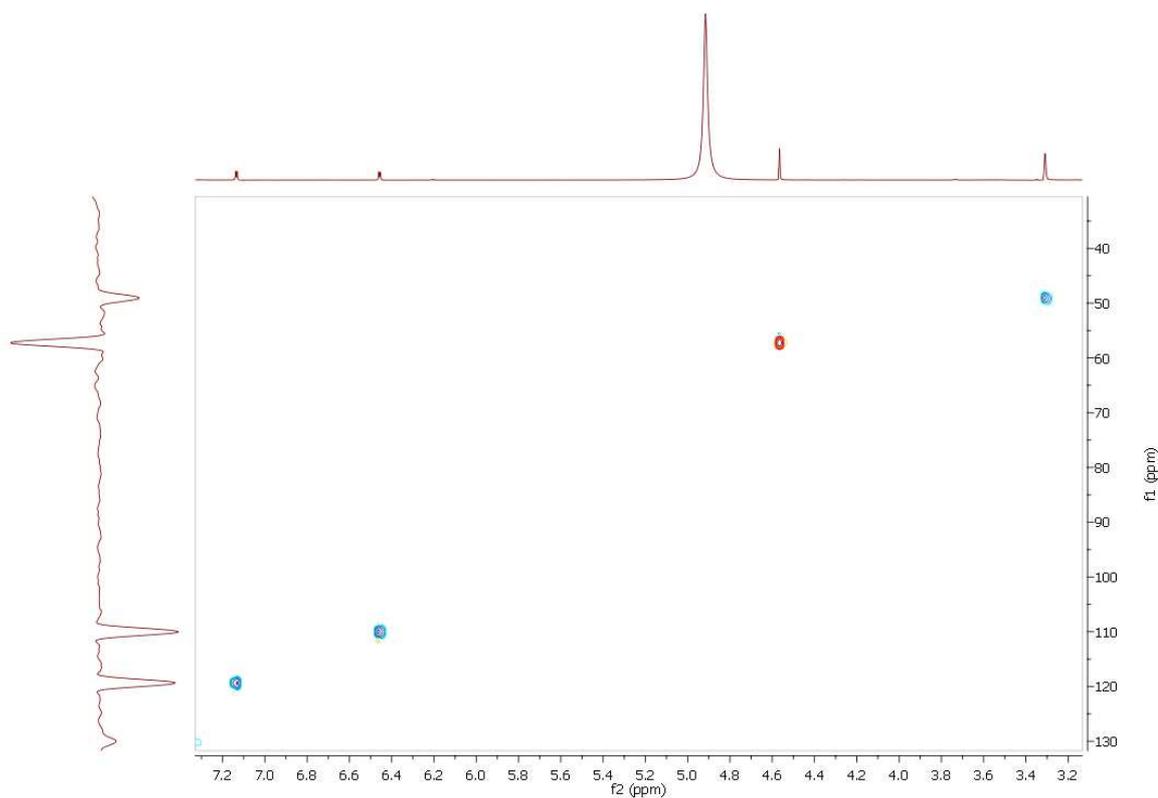


Figura 40 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a uma ligação em CD_3OD (14,7 T) da substância **4**.

No experimento de HMBC (Figura 41) foram observadas várias correlações à longa distância dos hidrogênios com os carbonos, mostradas na Tabela 8.

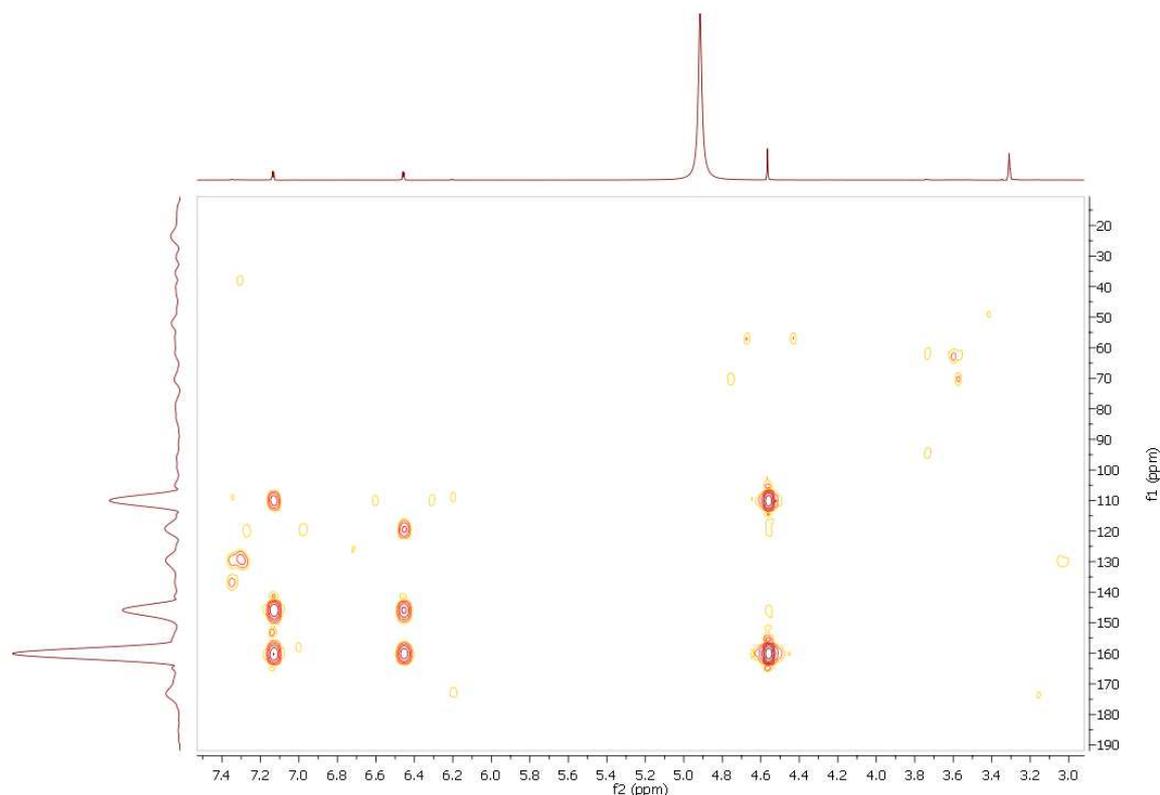


Figura 41 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C a longa distância em CD_3OD (14,7 T) da substância **4**.

Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD^a (14,7 T) da substância **4**.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
2	-	145,9*	-
3	7,13 (<i>d</i> , $J = 3,36$ Hz)	119,6	C-4, C-2, C-5
4	6,46 (<i>d</i> , $J = 3,36$ Hz)	110,2	C-3, C-2, C-5
5	-	160,3	-
6	-	-	-
7	4,57 (<i>s</i>)	57,5	C-4, C-5

^aDeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm e J em Hz.

*Valor obtido do HMBC.

Todos os dados mostrados, associados aos presentes na literatura, possibilitaram sugerir que a substância **4** seja, possivelmente, um produto de transformação da maltose, como discutido para a substância **3** no processo de esterilização em autoclave em hidroximetilfurfural, seguido de oxidação da função

aldeído para ácido carboxílico, sugerindo assim a presença de enzimas oxidases sendo excretadas para o meio de cultivo do fungo.

5 CONCLUSÃO

A triagem química e biológica realizada com os extratos brutos de milho NP e de Malte AcOEt, produzidos por *P. stromaticum*, confirmaram que a produção metabólica é dependente do meio de cultivo e que o extrato bruto de Malte AcOEt produzido por *P. stromaticum* apresenta substâncias com atividade anticolinesterásica e antifúngica, sugerindo que os fungos endofíticos podem estar exercendo função ecológica, protegendo as espécies hospedeiras contra possíveis fitopatógenos.

O isolamento e determinação estrutural de duas substâncias inéditas, o ftalato (4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[*c*][1,6]dioxecina-1,8-diona) **2** e a cumarina (2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético) **1**, sendo que a substância **2** apresenta atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* e anticonesterásica, evidenciam *P. stromaticum* como um prolífico produtor de substâncias inéditas bioativas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, I. et al. Three new antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 15 p. 2867-2873, 2011
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 3-19, 2011
- ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.
- ARAUJO, W. L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2010. 167 p.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. rev. ampl. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010. 638 p.
- CARTER, G. T. Natural products and pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1783-1789, 2011.
- CASTRO-MEDINA, F.; CASTILLO, S. M. Botryosphaeriaceae en Venezuela (una revisión). **Fitopatología Venezolana**, v. 22, n. 2, p. 44-44, 2009.
- COSTA, T. M.; TAVARES, L. B. B.; OLIVEIRA, D. Fungi as a source of natural coumarins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016. doi:10.1007/s00253-016-7660-z.
- GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 537-545, 2010.
- GUBIANI, J. R. **Bioprospecção de fungos endofílicos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma* sp.** 2015. 225 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2015.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008
- HENG-CHAO, E. et al. Secondary metabolites from the fungus *Engyodontium album* associated with starfish *Anthenea pentagonula* in the South China Sea. **Chinese Journal of Marine Drugs**, v. 32, n. 6, p. 8-12, 2013.
- JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.

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

LI, Z.; YANG, X. Cytotoxic secondary metabolites from liquid culture of plant endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula*. **Mycosystema**, v. 33, n. 1, p. 97-102, 2014.

LUCAS, E. M. F. et al. Phthalates production from *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram, a fungal species associated to crops of commercial value. **Microbiological Research**, v. 163, p. 495-502, 2008.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean Oak Forest: a lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, v. 98, n. 4, p. 380-386, 2008.

OWNLEY, B.; GWINN, K.; VEJA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, p. 113-128, 2010.

PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1939-1945, 2007.

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, Aug. 2009.

RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-201, 1991.

SANTOS, K. K. A. et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 66-70, 2012.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SHEN, K. et al. Separation, identification and bioactivity of anti-tumor components from fermented broth and mycelia of fungus *Penicillium stoloniferum* derived from *Salicornia herbacea*. **Food Science**, v. 33, n. 23, p. 278-282, 2012.

SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.

SOUZA, L. G.; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: a review. **Chemico-Biological Interactions**, 2016. doi:10.1016/j.cbi.2016.05.001.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

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

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

UMASHANKAR, T.; GOVINDAPPA, M.; RAMACHANDRA, Y. L. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of partially purified coumarins from fungal endophytes of *Crotalaria pallida*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 58-72, 2014

VASI, S.; AUSTIN, A. Antioxidant potential of *Eugenia jambolana* Lam. Seeds. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 894-898, 2009.

WANG, L. et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012.

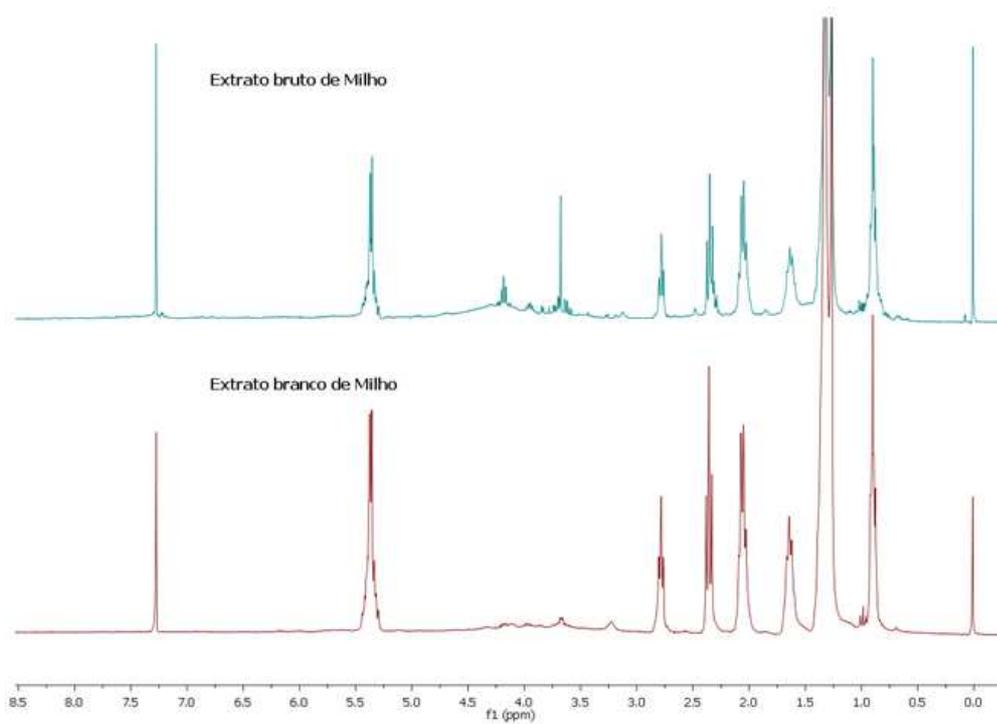
YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 622-641, 2012.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.

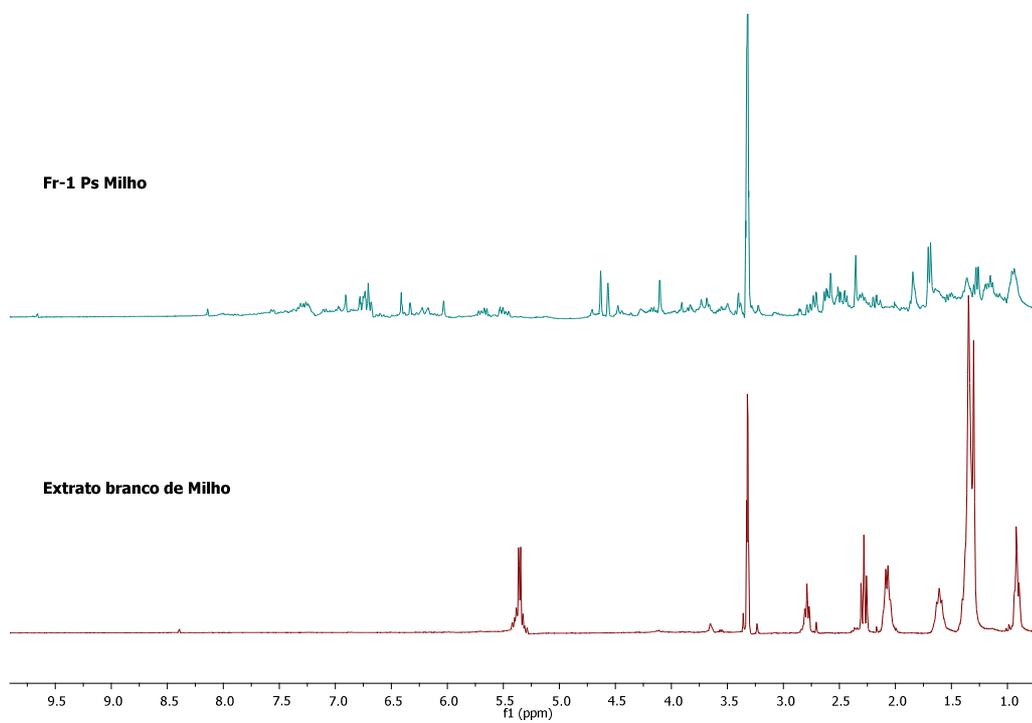
ZHANG, J. Y. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1469-1481, 2010.

ZHENG, Z.; LIU, Y.; FAN, L. Antioxidant activity and structure identification of metabolites of an endophytic fungus *Alternaria* sp. N.SBA10 isolated from *Scutellaria baicalensis*. **Mycosystema**, v. 31, n. 6, p. 917-923, 2012.

APÊNDICE A – Espectros de RMN de ^1H em CDCl_3 (300 MHz) do extrato bruto de milho e do extrato branco de milho.



APÊNDICE B – Espectros de RMN de ^1H em CD_3OD (300 MHz) da Fr-1 Ps Milho e do extrato branco de milho.



APÊNDICE C – Cromatograma da Fr-1 Ps Milho em λ 254 (preto) e 290 (azul) nm.