UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Weslei Bruno Botero

Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae)

Araraquara

2018

WESLEI BRUNO BOTERO

Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius*

Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Profª. Drª. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara

FICHA CATALOGRÁFICA

Botero, Weslei Bruno
B748b Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) / Weslei Bruno Botero. – Araraquara : [s.n.], 2018
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

1. Fungos endofíticos. 2. Eriocaulaceae. 3. Citotoxicidade. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Biossíntese. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius*"

AUTOR: WESLEI BRUNO BOTERO

ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MAYSA FURLAN
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARCELO APARECIDO DA SILVA
Departamento de Alimentos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNIFAL - Alfenas

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018

“Quando eu era jovem, preferi juntar o pouco dinheiro que tinha para começar esta loja. Pensava em ser rico algum dia para ir a Meca. Passei a ganhar dinheiro, mas não podia deixar ninguém cuidando dos cristais, porque os cristais são coisas delicadas. Ao mesmo tempo, via passar defronte a minha loja muitas pessoas que seguiam na direção de Meca. Haviam alguns peregrinos ricos, mas a maior parte das pessoas era muito mais pobre do que eu era.

Por que não vai a Meca agora? - Perguntou o rapaz.

Porque Meca é o que me mantém vivo. É o que me faz aguentar todos estes dias iguais, estes vasos calados nas prateleiras, o almoço e o jantar naquele restaurante horrível. Tenho medo de realizar meu sonho, e depois não ter mais motivos para continuar vivo.

Você sonha com ovelhas e com pirâmides. É diferente de mim, porque deseja realizar seus sonhos. Eu quero apenas sonhar com Meca. ”

-O Alquimista

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as realizações e oportunidades que tenho em minha vida.

Agradeço aos meus pais Edna e Eduardo por todo o apoio, confiança e amor. Sei que posso contar com vocês em todos os momentos

À minha orientadora Profª. Lourdes um agradecimento especial por todos os anos de orientação, ensinamentos e amizade. Sempre levarei você no meu coração e sei que tenho uma amiga para a vida toda.

Agradeço aos membros da examinadora pela contribuição e ajuda no trabalho.

Agradeço a minha namorada Ana por estar comigo e fazer todos meus dias mais felizes.

Ao meu irmão Wander e demais familiares, um obrigado por toda ajuda e cumplicidade.

Aos meus avós, que sempre cuidaram de mim, gratidão e muitas saudades.

Agradeço também aos meus amigos da faculdade Gabriel, Naira, Renan, Rodrigo, Raphael, Augusto, João, Douglas, Luís, Thaís e Camila por todos os momentos de alegria durante essa caminhada.

Agradeço também aos alunos do laboratório de fitoquímica que sempre se mostraram prestativos e atenciosos comigo. Obrigado Marcelo, Felipe, Talita, Felipe Gregório, Ana Zanatta, Daylin, Alexander, Carla, Giulia, Joao, Thayná. Um agradecimento especial aos meus amigos Léo Inácio e Andressa Nascimento por me acompanharem nessa caminhada.

Por fim agradeço aos servidores do Instituto de Química, em especial ao Nivaldo, Lucinéia, João, Juliana Rodrigues, Albertinho, Marquinhos e aos amigos da biblioteca.

RESUMO

As espécies da família Eriocaulaceae apresentam estudos químicos na literatura que descrevem a presença de substâncias com potencial biológico, com destaque para a planifolina em *Paepalanthus planifolius*. Apesar disso, existem poucos dados sobre a química dos microrganismos associados a essas espécies, como fungos endofíticos. Para esse estudo, selecionamos o fungo endofítico *Microsphaeropsis arundinis,* isolado dos capítulos de *P. planifolius*. O endófito foi cultivado em meios de cultivo líquido (Caldo Batata Dextrose, Caldo YM, Extrato de Malte, Caldo Nutrient e Caldo Czapek-Dox) e sólido (arroz parboilizado e milho canjica) e os extratos acetato de etila obtidos foram analisados quimicamente quanto a seu perfil cromatográfico por HPLC-PDA e biologicamente a partir da atividade antitumoral contra linhagens de câncer de mama e de câncer de pulmão. O extrato acetato de etila cultivado em arroz parboilizado demonstrou-se o mais ativo frente as linhagens de adenocarcinoma de mama murino (IC_{50} = 39,91 µg mL^{-1}) e adenocarcinoma de mama humano (IC_{50} = 51,93 µg mL^{-1}), sendo cultivado em escala ampliada e estudado fitoquimicamente buscando-se o isolamento das substâncias produzidas. A utilização de técnicas espectroscópicas e espectrométricas permitiu a identificação de oito substâncias, sendo as substâncias **1** (ácido (*2Z*, *5E*)-4,7,9-triidroxideca-2,5-dienóico), **2** (ácido (*2Z, 5E*)-4-acetóxi-7,9-diidroxideca-2,5-dienóico), **3** (ácido (*2Z,5E*)-7-acetóxi-4,9-diidroxideca-2,5-dienóico) e **7** (1-(2,5-diidroxifenil)-3'-oxobutan-2''-il acetato) inéditas na literatura e a substância **5** (1-(2,5-diidroxifenil)-3-hidroxibutanona) descrita pela primeira vez como produto natural. Uma análise biossintética mostra que as substâncias são provenientes da via do acetato.

Palavras-chave: *Microsphaeropsis arundinis; Paepalanthus planifolius*; bioprospecção; atividade antitumoral.

ABSTRACT

Species of Eriocaulaceae family showed some chemical studies that describe the presence of compounds with biological potential, such as planifolin in *Paepalanthus planifolius*. Despite these compounds, there are few data about the chemistry of the microorganisms associated with these species, such as endophytic fungi. For this study, we selected the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis*, isolated from *P. planifolius* capitula. The endophyte was cultivate in liquid culture media (Potato Dextrose Broth, YM Broth, Malt Extract, Nutrient Broth and Czapek-Dox Broth) and solid culture media (parboiled rice and corn) and the ethyl acetate extracts were chemically analyzed by HPLC-PDA and biologically evaluated against adenocarcinoma cell lines using MTT assay. The ethyl acetate extract cultivated in parboiled rice was the most active one against murine breast adenocarcinoma (IC_{50} = 39,91 µg mL^{-1}) and human breast adenocarcinoma (IC_{50} = 51,93 µg mL^{-1}), being select to cultivated on an enlarged scale and fractionated result in the isolation of major compounds. The use of spectroscopic and spectrometric techniques result in the identification of eight compounds, with **1** (*2Z*, *5E*)-4,7,9-trihydroxy-2,5-decadienoic acid) **2** ((*2Z, 5E*)-4-acetoxy-7,9-dihydroxydeca-2,5-dienoic acid), **3** ((*2Z,5E*)-7-acetoxy-4,9-dihydroxydeca-2,5-dienoic acid) and **7** (1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3'-oxobutan-2''-yl acetate) unpublished in the literature. The compound **5** (1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3-hydroxybutanone) was described for the first time as a natural product. A biosynthetic analysis shows that this compounds come from the acetate pathway.

Keywords: *Microsphaeropsis arundinis; Paepalanthus planifolius;* bioprospecting; antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partes aéreas de *P. planifolius* coletada na Serra do Cipó. 11
Figura 2 – Compostos isolados de espécies do gênero *Paepalanthus*. 12
Figura 3 - Metabólitos isolados de espécies do gênero *Microsphaeropsis*. 14
Figura 4 - Endófito *Microsphaeropsis arundinis* e substâncias isoladas do fungo endofítico já descritas na literatura. 15
Figura 5 - Endófito inoculado em diferentes meios de cultivo líquido 18
Figura 6 - Representação da clivagem do anel tetrazólio do MTT na presença de desidrogenases de células viáveis 20
Figura 7 - Placa após a adição de isopropanol. Os pontos onde há viabilidade celular apresentam-se em violeta 21
Figura 8 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo Batata Dextrose. 27
Figura 9 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo YM. Condições 28
Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Extrato de Malte. 28
Figura 11 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo Nutrient. 29
Figura 12 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo Czapek-Dox. 29
Figura 13 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em arroz parboilizado. 30
Figura 14 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em milho canjica. 30
Figura 15 - Cromatograma no UV e cromatograma pico base obtidos na análise por HPLC-MS em modo positivo 31
Figura 16 - Substâncias isoladas a partir do extrato cultivado em arroz parboilizado. 32
Figura 17 – Separação cromatográfica obtida no HPLC-RI. 32
Figura 18 - Espectro de massas da substância **1** 34
Figura 19 - Espectro de massas da substância **2**. 36
Figura 20 - Espectro de massas da substância **3**. 38
Figura 21 - Cromatograma otimizado para o extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz parboilizado. 39
Figura 22 - Espectro de massas da substância **4** 41
Figura 23 - Espectro de massas da substância **5** 43
Figura 24 - Proposta para a fragmentação do íon molecular da substância **5**. 43
Figura 25 - Espectro de massas da substância **6**. 45
Figura 26 - Espectro de massas da substância **7** 47
Figura 27 - Proposta para a fragmentação do íon molecular da substância **7**. 48
Figura 28 - Espectro de massas da substância **8**. 49
Figura 29 – Primeira etapa da biossíntese pela via do acetato. 50
Figura 30 - Esquema para a biossíntese de ácidos graxos 51

Figura 31 - Proposta de biossíntese para os derivados do ácido decanóico isolados 52
Figura 32 - Proposta para a biossíntese da substância 4. 52
Figura 33 - Produção de ácido orselínico ou floracetofenona a partir do poli-β-ceto éster... 53
Figura 34 - Proposta de biossíntese para os policetídeos isolados. 53
Figura 35 – Esquema de biossíntese simplificado das naftopiranonas a partir da condensação de unidades de acetato..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de IC_{50} para os extratos acetato de etila frente ao ensaio antitumoral ... 25
Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo utilizados e rendimentos obtidos para os extratos acetato de etila. 27
Tabela 3 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **1**. 34
Tabela 4 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **2**. 36
Tabela 5 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **3**. 38
Tabela 6 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **4**. 41
Tabela 7 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **5**. 43
Tabela 8 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **6**. 45
Tabela 9 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **7**. 47
Tabela 10 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **8**. 49

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fluxograma para o preparo dos extratos do endófito cultivado nos diferentes meios
líquidos..... 18

Fluxograma 2 - Fluxograma para o preparo dos extratos do endófito cultivado nos meios sólidos..... 19

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

COSY – Espectroscopia de correlação homonuclear

d - dubleto

ESI – *electrospray*

***g*HMBC** – Espectroscopia de correlação de desvio heteronuclear espaçado por várias ligações via correlação heteronuclear de múltiplas ligações

gHSQC – Espectroscopia de correlação de desvio heteronuclear espaçado por uma ligação via correlação heteronuclear de quantum-simples

Hex - hexano

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

HPLC-PDA – Cromatografia líquida de alfa eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-RI – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração

IC – Concentração inibitória

LM3 – Linhagem de adenocarcinoma de mama murino

LP-07 – Linhagem de adenocarcinoma de pulmão murino

m - multipleto

m/z – razão massa carga

MCF-7 – Linhagem de adenocarcinoma de mama humano

MeOH – metanol

MS – Espectrometria de massas

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NMR – Ressonância Magnética Nuclear

ppm – partes por milhão

PTFE - politetrafluoretileno

s - simpleto

t - tripleto

TFA – ácido trifluoroacético

TOF – Tempo de vôo

T_R – Tempo de retenção

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

1.1 A família Eriocaulaceae e *Paepalanthus planifolius* 11

1.2 Fungos endofíticos e *Microsphaeropsis arundinis* 13

2 OBJETIVOS 16

3 MATERIAIS E MÉTODOS 17

3.1 Coleta e identificação do material vegetal 17

3.2 Obtenção da cepa fúngica e identificação do endófito 17

3.3 Obtenção dos extratos acetato de etila 17

3.3.1 Escala reduzida 18

3.3.2 Escala ampliada 19

3.4 Avaliação da atividade antitumoral 19

3.5 Fracionamento, Isolamento e Identificação das substâncias 21

3.5.1 Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos acetato de etila por HPLC-PDA analítico 21

3.5.2 Obtenção do perfil cromatográfico do extrato mais ativo por HPLC-MS 22

3.5.3 Fracionamento do extrato mais ativo por HPLC-PDA semipreparativo 23

3.5.4 Fracionamento do extrato mais ativo por HPLC-RI semipreparativo 23

3.5.5 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear 24

3.5.6 Análise das substâncias isoladas por Espectrometria de Massas (MS) 24

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 25

4.1 Prospecção biológica 25

4.1.1 Avaliação do potencial antitumoral 25

4.1.2 Cultivo do endófito em diferentes meios de cultivo 26

4.2 Fracionamento, Isolamento e Identificação de substâncias 31

4.2.1 Isolamento e identificação de derivados do ácido decanóico 32

4.2.1.1 Identificação da substância **1** 33

4.2.1.2 Identificação da substância **2** 35

4.2.1.3 Identificação da substância **3** 37

4.2.2 Isolamento e identificação de policetídeos 39

4.2.1.1 Identificação da substância **4** 40

4.2.1.2 Identificação da substância **5** 42

4.2.1.3 Identificação da substância **6** 44

4.2.1.3 Identificação da substância **7** 46

4.2.1.3 Identificação da substância **8** 48

4.3 Análise biossintética dos metabólitos 50

4.3.1 Síntese de derivados do ácido decanóico 50

4.3.1 Síntese das demais substâncias 52

5 CONCLUSÕES 55

6 REFERÊNCIAS 56

ANEXOS 60

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Eriocaulaceae e *Paepalanthus planifolius*

A família Eriocaulaceae é uma das famílias mais citadas nas listas vermelhas de espécies em extinção e é composta por 1200 espécies atualmente divididas em 10 gêneros (ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012). As espécies pertencentes a essa família possuem distribuição pantropical, sendo encontradas em nosso país principalmente na região da Cadeia do Espinhaço, um dos maiores centros de diversidade da família com aproximadamente 629 espécies, sendo a maioria endêmica (SANO et al., 2015).

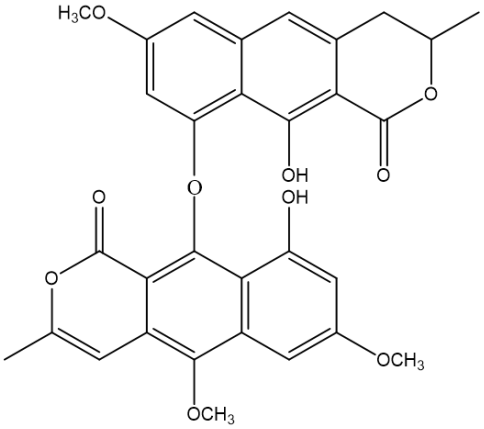
Nessa região temos um bioma de cerrado e uma vegetação de campos rupestres, de modo que as espécies crescem em um clima seco e árido e na presença de um solo formado principalmente por quartzito e arenito, sendo o mesmo ácido e pobre em nutrientes (MOREIRA & CAMELIER, 1997). Devido a essas características do ambiente, as espécies armazenam moléculas de água em ceras epicuticulares, o que faz com que as mesmas apresentem um aspecto de vivo por muitos anos após a coleta, fazendo com que sejam conhecidas popularmente como “sempre-vivas”.

O gênero *Paepalanthus* possui 460 espécies, sendo 200 delas endêmicas em nosso país e presentes na região da Cadeia do Espinhaço. É o segundo maior gênero dentro da família e se distingue morfologicamente dos demais pela presença de folhas em forma de roseta na base do material vegetal e pelas inflorescências capituliformes envoltas por brácteas (Figura 1) (SCHMIDT et al., 2007; COSTA et al., 2008; TROVÓ & SANO, 2010).

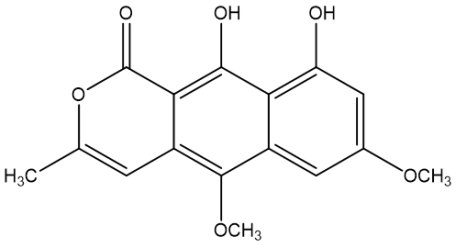
Figura 1 - Partes aéreas de *P. planifolius* coletada na Serra do Cipó. Fonte: TROVÓ, M.

No aspecto químico e biológico podemos identificar a presença de flavonoides nos capítulos e escapos do material vegetal e naftopiranonas majoritariamente nos capítulos, com destaque para o potencial biológico de algumas espécies bem como atividade antioxidante (DAMASCENO et al., 2015), citotóxica (KITAGAWA et al., 2015), mutagênica (VARANDA et al., 2006), anti-inflamatória (CESTARI et al., 2009), entre outras. Dentre essas substâncias podemos destacar a paepalantina isolada de *Paepalanthus vellozioides* (VARANDA et al., 1997), a planifolina e a planifoliusina A isoladas de *Paepalanthus planifolius* (SANTOS et al., 2001; AMORIM et al., 2018, no prelo) (Figura 2).

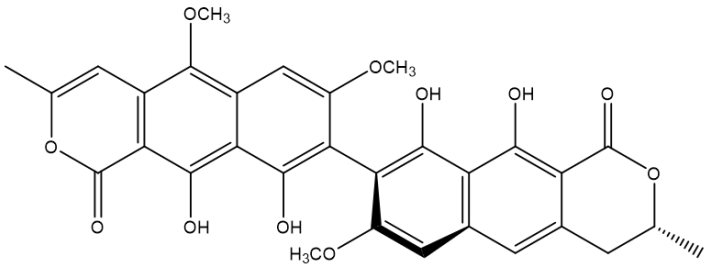
Figura 2 – Compostos isolados de espécies do gênero *Paepalanthus*.



Planifolina (SANTOS et al,, 2001)
citotóxico, mutagênico e anti-inflamatório



Paepalantina (VARANDA et al., 1997)
mutagênico e citotóxico



Planifoliusina A (AMORIM et al., 2018)
antimicrobiano

Apesar da grande quantidade de estudos já realizados com espécies da família, existem poucos dados publicados sobre a produção metabólica de microrganismos associados a essas espécies vegetais. De acordo com Strobel e Daisy (2003) existem alguns critérios para a seleção da planta hospedeira para o isolamento e estudo dos microrganismos endofíticos, dentro os quais *P. planifolius* destaca-se por pertencer a uma região de grande diversidade e endemismo. Além disso, temos que dímeros de naftopiranonas com monômeros semelhantes ao da vioxantina e paepalantina

também são encontrados em fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (HILL, 1986). Desse modo, nesse trabalho realizamos o estudo químico e prospecção biológica dos endófitos associados à *P. planifolius*.

1.2 Fungos endofíticos e *Microsphaeropsis arundinis*

Entre as várias fontes de moléculas naturais, os microrganismos como fungos e bactérias podem ser considerados uma fonte rica de metabólitos biologicamente ativos. Quando associados a organismos terrestres e marinhos, esses podem colonizar os órgãos internos (endofíticos) ou externos (epifíticos) do hospedeiro.

Fungos endofíticos se associam a um organismo hospedeiro em uma associação simbiótica onde não exercem efeitos patogênicos aparentes (REKHA et al., 2013). Nessa associação, a planta protege e alimenta o endófito que em troca compartilha material genético ou produz metabólitos que auxiliam no crescimento, na competitividade e na proteção do hospedeiro contra herbívoros e patógenos (GUNATILAKA, 2006). Como exemplo dessa associação podemos citar a associação de fungos micorrízicos com as raízes de plantas, onde os microrganismos auxiliam na absorção de água e sais minerais do solo, bem como a presença de bactérias nas raízes que auxiliam na fixação de nitrogênio e outros nutrientes.

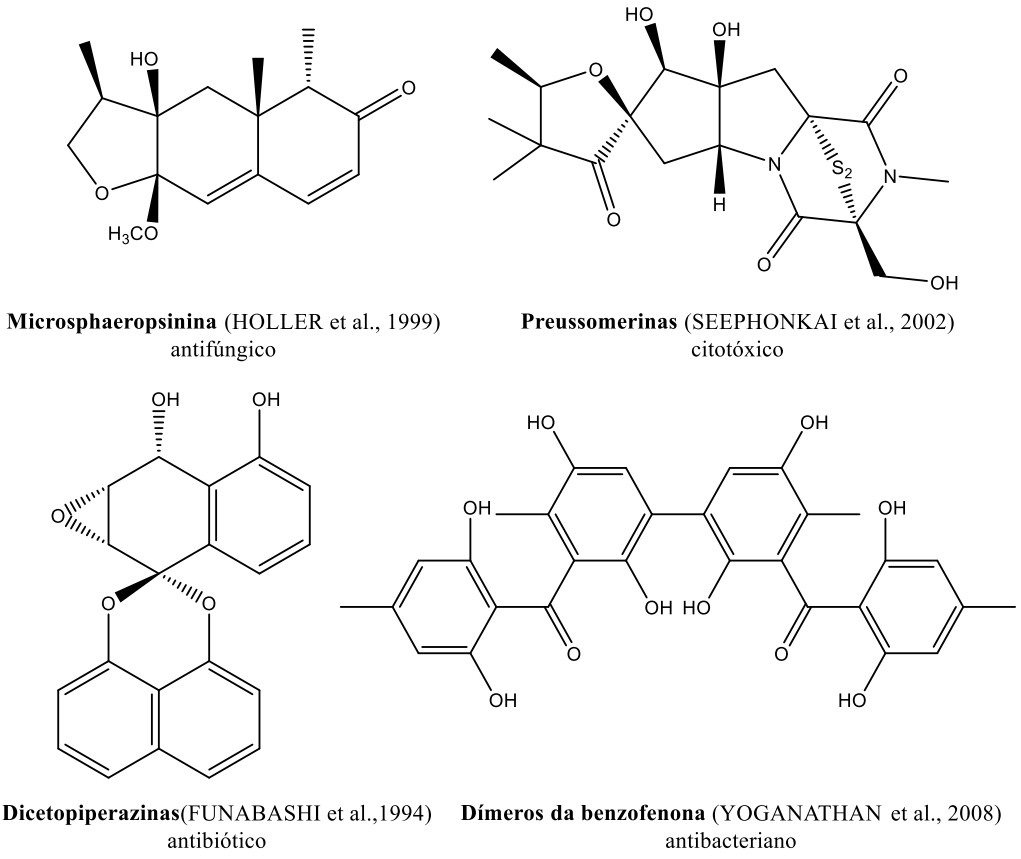
Os fungos endofíticos são um grupo polifilético de grande diversidade metabólica estando presentes em praticamente todos os organismos. Sua produção metabólica varia de acordo com o meio de cultivo em que o microrganismo está inoculado, de modo que a diferença dos tipos de nutrientes presentes no meio altera a eficiência e a ativação de diferentes vias biossintéticas, resultando na produção de diferentes substâncias (KHARWAR et al., 2011).

Nesse trabalho, realizamos o estudo do endófito *Microsphaeropsis arundinis*, isolado de *P. planifolius,* avaliando a produção metabólica a partir do cultivo em diferentes meios.

Endófitos pertencentes ao gênero *Microsphaeropsis* são normalmente encontrados em plantas, esponjas e sedimentos marinhos, o que demonstra sua grande capacidade de adaptação. No aspecto químico temos a produção de substâncias pertencentes a diferentes classes de compostos, como preussomerinas (SEEPHONKAI et al., 2002), dicetopiperazinas (FUNABASHI et al., 1994) e dímeros

da benzofenona (YOGANATHAN et al., 2008), com a presença de atividades biológicas (Figura 3).

Figura 3 - Metabólitos isolados de espécies do gênero *Microsphaeropsis*.



Microsphaeropsinina (HOLLER et al., 1999)
antifúngico

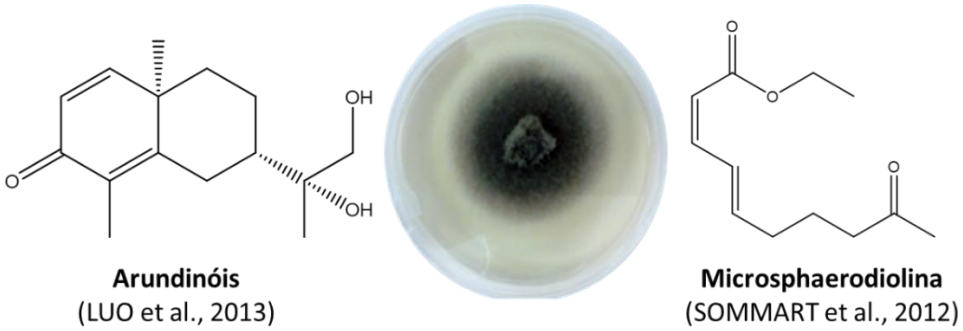
Preussomerinas (SEEPHONKAI et al., 2002)
citotóxico

Dicetopiperazinas(FUNABASHI et al.,1994)
antibiótico

Dímeros da benzofenona (YOGANATHAN et al., 2008)
antibacteriano

O endófito de estudo foi identificado como *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo pertencente à classe dos Coelomycetes que se distingue dos demais pela presença de conídios pequenos cilíndricos com paredes lisas. Estudos realizados demonstram que o endófito é patógeno para mamíferos, principalmente para humanos imunocomprometidos e gatos com lesões nos tecidos, sendo responsável por infecções de pele de difícil identificação devido à baixa esporulação do fungo (KLUGER et al., 2004; CRAWFORD et al., 2015). No aspecto químico, temos o isolamento de sesquiterpenóides e macrolídeos como o arundinol e a microsphaerodiolina (SOMMART et al., 2012; LUO et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 - Endófito *Microsphaeropsis arundinis* e substâncias isoladas do fungo endofítico já descritas na literatura. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.



Arundinóis
(LUO et al., 2013)

Microsphaerodiolina
(SOMMART et al., 2012)

De acordo com as atividades descritas para os metabólitos da planta, em especial a planifolina, optou-se por realizar uma bioprospecção antitumoral dos extratos acetato de etila do endófito *M. arundinis* em busca da seleção do mais ativo e posterior isolamento de novos metabólitos com potencial biológico. É a primeira vez que um estudo desse tipo é realizado com uma espécie do gênero e espera-se que o mesmo ajude na elucidação das relações entre o endófito e o hospedeiro.

2 OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Realizar o isolamento e a identificação dos metabólitos presentes no extrato mais ativo do endófito *Microsphaeropsis arundinis*.

Objetivos específicos:

a) Obter o extrato acetato de etila do endófito cultivado em meios de cultivo líquido e sólido (escala reduzida);
b) Avaliar o potencial citotóxico nas linhagens tumorais de mama murino (LM3), pulmão murino (LP-07) e mama humano (MCF-7);
c) Realizar o cultivo do extrato mais ativo em escala ampliada;
d) Analisar o extrato mais ativo por técnicas cromatográficas de HPLC-MS, HPLC-PDA e HPLC-RI visando o fracionamento e isolamento de substâncias;
e) Identificar as substâncias isoladas usando técnicas espectroscópicas (NMR) e espectrométricas (MS).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação do material vegetal

Capítulos, escapos e folhas de *Paepalanthus planifolius* foram coletados em outubro de 2013 na cidade de Santana do Riacho-MG (19º13'21.64"S, 43º30'04.06"W, elev. 1340 m) pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biociências (IB-USP) com o registro SANO 4979.

3.2 Obtenção da cepa fúngica e identificação do endófito

A obtenção da cepa fúngica foi realizada como descrito por Amorim (2016), onde após a esterilização das partes externas, os tecidos do material vegetal foram cultivados em placas contendo Ágar Batata Dextrose e gentamicina. Após, os endófitos foram sendo repicados para a obtenção de linhagens puras até a obtenção do endófito codificado como Pp-C-07 proveniente dos capítulos. A identificação desse fungo como *Microsphaeropsis arundinis* foi realizada através da empresa Genotyping Biotecnologia (Botucatu-SP), utilizando como metodologia o sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidos com as sequências de referência depositadas no GenBank (nº acesso KJ774055.1), obtendo uma similaridade de 99% devido a comparação de seu sequenciamento na região do ITS (*Internal Transcribed Spacer)*.

3.3 Obtenção dos extratos acetato de etila

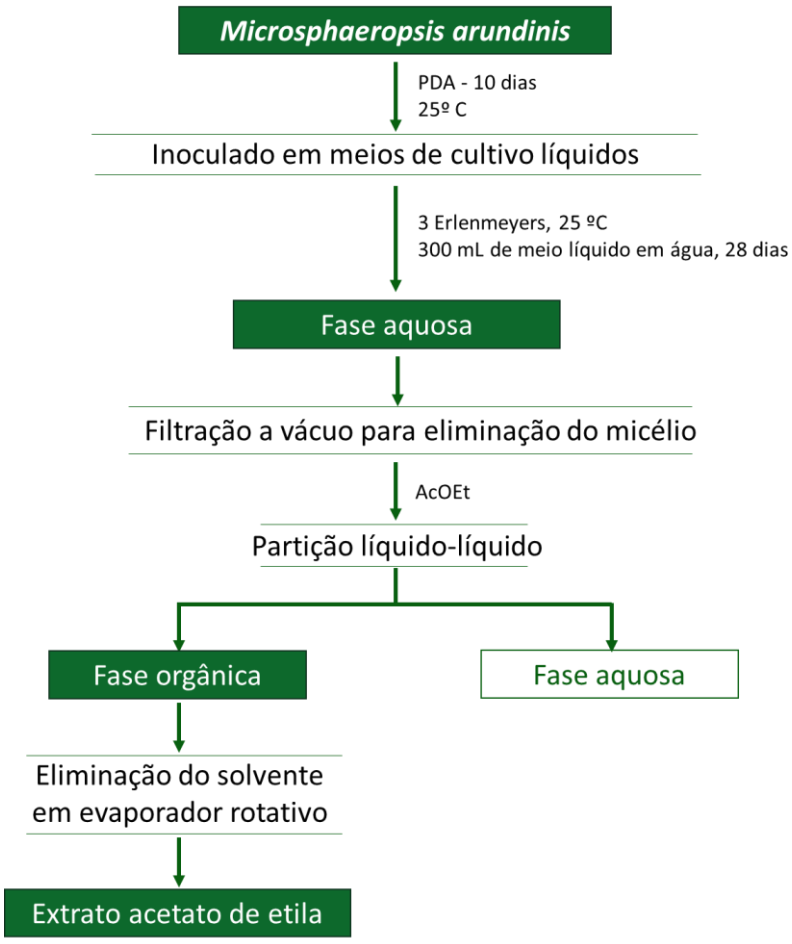
Para a produção dos extratos acetato de etila, o endófito foi cultivado em placas contendo Ágar Batata Dextrose durante 10 dias para o crescimento do microrganismo e posteriormente cultivado em meios líquidos de Caldo Batata Dextrose, Caldo YM, Extrato de Malte, Caldo Nutrient e Caldo Czapek-Dox (Figura 5). Também foi realizado o cultivo nos meios sólidos de arroz parboilizado e milho canjica.

Figura 5 - Endófito inoculado em diferentes meios de cultivo líquido. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.

3.3.1 Escala reduzida

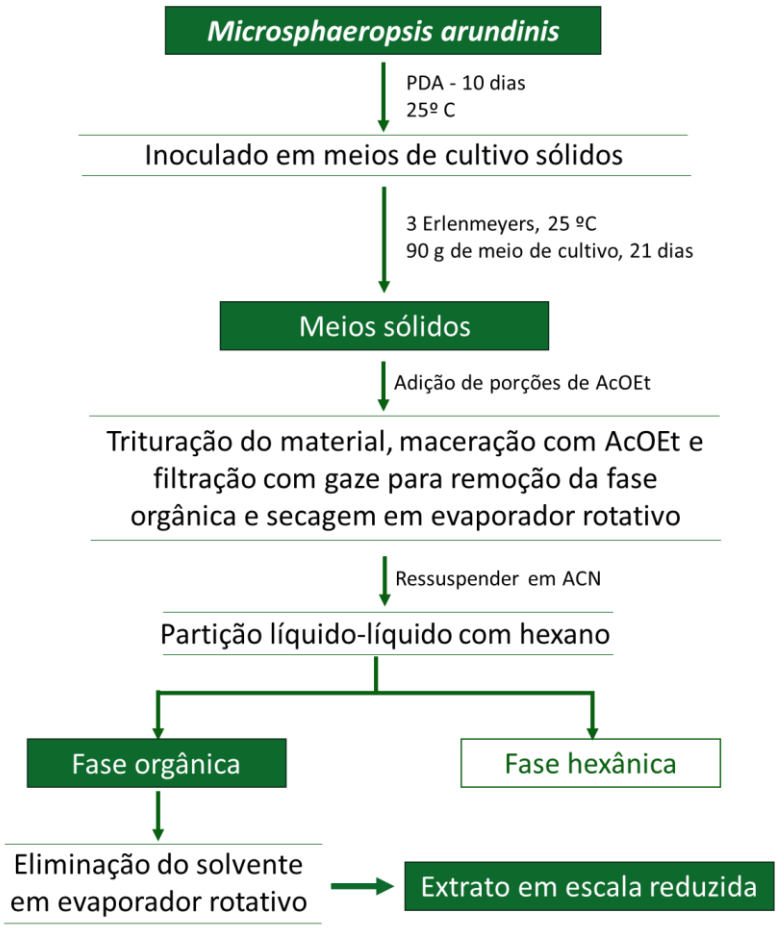
O cultivo do endófito nos meios líquidos foi realizado conforme descrito no fluxograma 1.

Fluxograma 1 – Fluxograma para o preparo dos extratos do endófito cultivado nos diferentes meios líquidos.



Os extratos resultantes do cultivo nos meios sólidos de arroz parboilizado e milho canjica são apresentados no fluxograma 2.

Fluxograma 2 – Fluxograma para o preparo dos extratos do endófito cultivado nos meios sólidos.



3.3.2 Escala ampliada

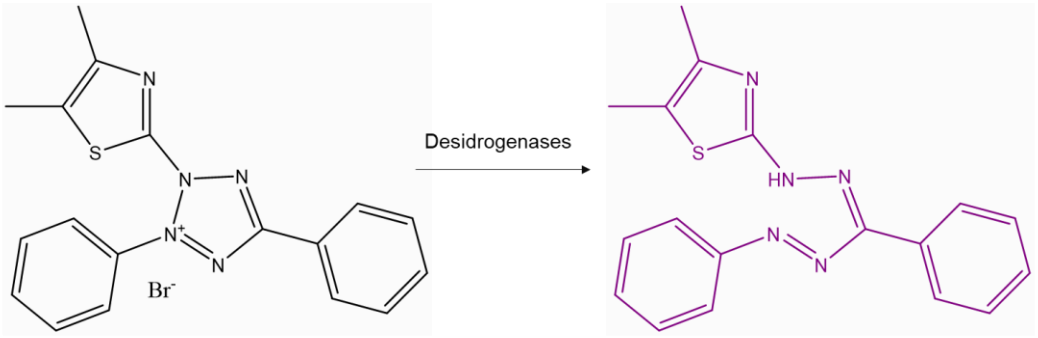
A partir dos resultados de atividade antitumoral e rendimento, o extrato acetato de etila do fungo cultivado em arroz parboilizado foi selecionado para crescimento em escala ampliada. O procedimento ocorreu do mesmo modo que para o cultivo em escala reduzida, porém o cultivo em 40 erlenmeyers resultou em uma quantidade de extrato acetato de etila de 3,0 g.

3.4 Avaliação da atividade antitumoral

A avaliação do potencial antitumoral dos extratos acetato de etila foi realizada pelo aluno em colaboração com a Profª. Drª. Iracilda Zeppone Carlos, pesquisadora da FCFAr – Unesp Araraquara. O ensaio de viabilidade celular seguiu a metodologia descrita por Mosmann (1983), baseando-se na capacidade das enzimas

desidrogenases das mitocôndrias de células vivas reduzirem o anel tetrazólico presente no sal de MTT. Essa redução é acompanhada da produção de um cristal de formazana e na presença de uma coloração violeta (Figura 6).

Figura 6 - Representação da clivagem do anel tetrazólio do MTT na presença de desidrogenases de células viáveis. Fonte: MOSMANN, 1983.



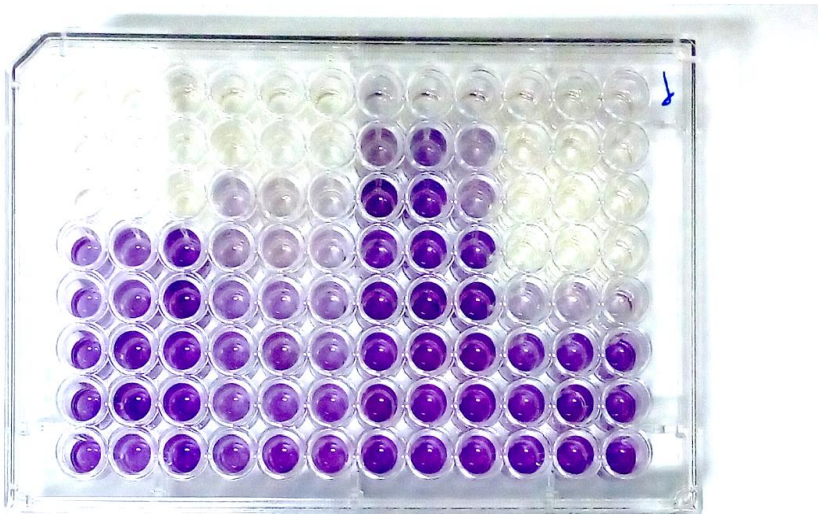
Sal de MTT
brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

Cristal de formazana

Para a realização do ensaio, células tumorais de adenocarcinoma de mama murino (LM3), adenocarcinoma de pulmão murino (LP-07) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foram cultivadas em meio RPMI-1640-C, suplementadas com 10% de soro fetal bovino + 1% de antibiótico e mantidas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 a 37º C. As células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas até uma concentração de 5 x 10^4 células mL^{-1}.

Em placas de 96 poços foram adicionadas 200 µL da concentração celular para a produção de uma monocamada no fundo da placa. Após 24 horas a solução foi vertida e adicionou-se 200 µL dos extratos acetato de etila (solubilizados em uma solução 5% DMSO) em concentrações crescentes de 1000-7,8 µg mL^{-1}. As placas foram novamente mantidas em estufa durante 24 horas e posteriormente o material foi vertido. Realizou-se a adição de 100 µL de uma solução de MTT (0,5 mg mL^{-1}) e as placas foram mantidas por mais 4 horas na estufa. Após, o material foi vertido e a adição de 100 uL de isopropanol permitiu a solubilização dos cristais de formazana (Figura 7).

Figura 7 - Placa após a adição de isopropanol. Os pontos onde há viabilidade celular apresentam-se em violeta. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.



Todos os pontos foram analisados em triplicata e a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro foi realizada em λ = 540 nm com filtro de referência em λ = 620 nm. Como parâmetro, foram utilizados como controle positivo a cisplatina e como controle negativo o meio de cultura.

3.5 Fracionamento, Isolamento e Identificação das substâncias

Após a obtenção dos extratos acetato de etila, foram registrados os perfis cromatográficos dos mesmos para a verificação da variabilidade na produção metabólica e posteriormente o mais ativo foi analisado por HPLC-MS para a visualização de todos os metabólitos ionizáveis presentes.

3.5.1 Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos acetato de etila por HPLC-PDA analítico

Os extratos acetato de etila (10 mg) foram solubilizados em H_2O:MeOH (1:1 v/v) para a concentração de 10 mg mL^{-1} com o auxílio de ultrassom e posteriormente filtrados em cartuchos de fase reversa Bond Elut C18 (Agilent®) acoplados com filtro PTFE de 0,22 µm (Simplepure®), sendo esses previamente ativados com MeOH e com a fase móvel. Esse procedimento de *clean up* permitiu a eliminação de partículas insolúveis e muito apolares.

O filtrado foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-2000 (Jasco®), consistindo de um sistema quaternário de bombas PU-2089 (Jasco®), um injetor automático AS-2055 (Jasco®) e um detector de arranjo de diodos MD-2018

(Jasco®). A análise em modo analítico foi realizada com uma coluna de fase reversa Eurospher II 100-5 C18 25 cm x 4.6 mm x 5 µm (Knauer®) com uma vazão de 1,0 mL min^{-1}. O sinal cromatográfico foi registrado em λ = 254 nm a partir do software ChromNAV (Jasco®). A obtenção do perfil cromatográfico foi realizada utilizando-se um gradiente de H_2O:MeOH (95:5 v/v) para H_2O:MeOH (0:100 v/v) durante 60 minutos com a presença de 0,05% de TFA na fase móvel.

3.5.2 Obtenção do perfil cromatográfico do extrato mais ativo por HPLC-MS

As análises por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto – SP, sob a supervisão do Profº. Drº. Norberto Peporine Lopes.

O extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz parboilizado (1 mg) foi solubilizado em H_2O:MeOH (1:1 v/v) para a concentração de 1 mg mL^{-1} com o auxílio de ultrassom. Para as análises, a solução foi filtrada em cartucho de fase reversa Bond Elut C18 (Agilent®) acoplados com filtro PTFE de 0,22 µm (Simplepure®) e posteriormente 10 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

Os experimentos de foram realizados em um cromatógrafo líquido UFLC (Shimadzu®), consistindo de um sistema binário de bombas LC20AD (Shimadzu®), injetor automático SIL20AHT (Shimadzu®), forno de coluna CTO20A (Shimadzu®), controlador de sistema CBM20A (Shimadzu®) e um detector de arranjo de diodos SPD-M20AV (Shimadzu®). Esse sistema foi hifenado com um espectrômetro de massas ESI-TOF-HRMS (Bruker®) com ionização por eletrospray analisador de tempo de vôo. Utilizou-se das seguintes condições experimentais: tensão capilar 3,5 kV, temperatura capilar 220ºC, tensão de *offset* da placa de extremidade 490V, pressão do gás nebulizador 5,5 bar, concentração de gás secante (N_2) 10 L min^{-1}. Os espectros foram registrados no modo positivo de ionização.

A análise em modo analítico foi realizada com uma coluna de fase reversa Eurospher II 100-5 C18 25 cm x 4.6 mm x 5 µm (Knauer®) com uma vazão de 1,0 mL min^{-1} a 30º C. O software Data Analysis 4.2 (Bruker®) foi utilizado para processamento e coleta de dados. A obtenção do perfil cromatográfico foi realizada na condição otimizada, um gradiente de H_2O:MeOH (57:43 v/v) para H_2O:MeOH (35:65 v/v) durante 30 minutos com a presença de 0,05% de TFA na fase móvel.

3.5.3 Fracionamento do extrato mais ativo por HPLC-PDA semipreparativo

O extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz (1,5 g) foi solubilizado em H_2O:MeOH (1:1 v/v) para a concentração de 100 mg mL^{-1} com o auxílio de ultrassom e filtrado em cartucho de fase reversa Bond Elut C18 (Agilent®) acoplado a filtro PTFE de 0,22 µm (Simplepure®), sendo esses previamente ativados com MeOH e com a fase móvel. O filtrado foi solubilizado e posteriormente os sinais cromatográficos do extrato foram purificados por cromatógrafo LC-2000 (Jasco®) contendo um sistema binário de bombas PU-2086 (Jasco®), injetor manual e um detector de arranjo de diodos MD-2010 (Jasco®). Utilizou-se uma coluna de fase reversa Eurospher II 100-5 C18 25 cm x 8 mm x 5 µm (Knauer®) com uma vazão de 3,2 mL min^{-1}. O sinal cromatográfico foi registrado em λ = 254 nm a partir do software ChromNAV (Jasco®). A obtenção do perfil cromatográfico foi realizada utilizando-se um gradiente otimizado de H_2O:MeOH (57:43 v/v) para H_2O:MeOH (35:65 v/v) durante 20 minutos com a presença de 0,05% de TFA na fase móvel. Esse fracionamento resultou no isolamento das substâncias **4**-**8**.

3.5.4 Fracionamento do extrato mais ativo por HPLC-RI semipreparativo

Durante o isolamento dos metabólitos por HPLC-PDA, a região correspondente as substâncias que não apresentam absorção no ultravioleta (T_R = 10-15 min) foi coletada e seca. Essa região (40,3 mg) foi solubilizada em H_2O:MeOH (55:45 v/v) para a concentração de 50 mg mL^{-1}, filtrada em cartucho de fase reversa como no item anterior e analisada em cromatógrafo preparativo Azura (Knauer®) constituído de um sistema binário de bombas P 6.1L (Knauer®), um sistema assistente ASM 2.1L (Knauer®) e um detector de índice de refração Smartline RI Detector 2300 (Knauer®). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna de fase reversa Luna C18 (2) 25 cm x 10 mm x 5 µm (Phenomenex®) com uma vazão de 4,0 mL min^{-1}. O sinal cromatográfico foi obtido a partir do software ClarityChrom (Knauer®). O isolamento das substâncias ocorreu a partir da utilização de uma metodologia isocrática de H_2O:MeOH (55:45 v/v), resultando no isolamento das substâncias **1**-**3**.

3.5.5 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear (NMR) foram realizadas em espectrômetro Avance III (Bruker®) com campo de 14,1 T. As substâncias isoladas foram solubilizadas no menor volume de CD_3OD (Aldrich®) utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Foram realizados experimentos monodimensionais de ^{1}H, ^{13}C, DEPT-135 e bidimensionais de COSY, *g*HSQC e *g*HMBC.

3.5.6 Análise das substâncias isoladas por Espectrometria de Massas (MS)

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Q-TOF MaXis Impact (Bruker®) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo a 3 µL min^{-1}. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H_2O (1:1, v/v) para uma concentração de 3 ppm e acidificadas com 0,1% de ácido fórmico para a análise em modo positivo. A fonte de ionização utilizada foi *electrospray* (ESI).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Prospecção biológica

Para a prospecção biológica o fungo foi cultivado em sete diferentes meios de cultivo e os extratos obtidos avaliados quanto a seu potencial antitumoral frente as linhagens de adenocarcinoma de mama murino (LM3), pulmão murino (LP-07) e mama humano (MCF-7). O extrato mais ativo foi selecionado para a etapa fitoquímica.

4.1.1 Avaliação do potencial antitumoral

A avaliação do potencial antitumoral foi realizada de acordo com o descrito no item 3.4 e cada extrato acetato de etila foi analisado em triplicata em diferentes concentrações (1000-7,8 µg mL^{-1}). Após a leitura das microplacas em espectrofotômetro, os valores de atividade para cada extrato foram calculados a partir da diferença nos valores de absorção entre o comprimento de onda da amostra e o comprimento de onda de referência.

$$Atividade\ antitumoral = \frac{(A_{amostra} - A_{referência})}{A_{referência}}\ x\ 100$$

Os dados de atividade por concentração obtidos foram interpolados em uma curva dose-resposta e posteriormente foi calculado o IC_{50} para cada extrato acetato de etila. Os dados de concentração inibitória estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Valores de IC_{50} para os extratos acetato de etila frente ao ensaio antitumoral

Extratos	**IC_{50} ± (DP) (µg mL^{-1})**		
	LM3	**LP07**	**MCF-7**
Caldo Batata Dextrose (líquido)	108,15 ± 1,36	266,12 ± 2,36	170,10 ± 5,56
Caldo YM (líquido)	82,47 ± 7,67	793,84 ± 19,58	89,99 ± 23,20
Extrato de Malte (líquido)	63,21 ± 2,39	93,66 ± 6,33	66,60 ± 2,54
Caldo Nutrient (líquido)	496,90 ± 9,24	>1000	428,96 ± 34,40
Caldo Czapek-Dox (líquido)	444,88 ± 52,37	>1000	559,65 ± 39,72
Arroz parboilizado (sólido)	39,91 ± 9,03	155,88 ± 3,28	51,93 ± 0,60
Milho canjica (sólido)	118,66 ± 7,62	180,37 ± 3,69	96,03 ± 14,38
Cisplatina	9,09 ± 1,11	1,30 ± 0,12	5,88 ± 1,38

Os resultados obtidos mostram a concentração mínima necessária para inibir 50% das células tumorais presentes, de modo que os menores valores foram obtidos para o extrato de arroz parboilizado, principalmente contra as linhagens de adenocarcinoma de mama. Além disso, foram obtidos bons resultados também para o extrato de Malte, sendo que o mesmo se mostra com um perfil cromatográfico muito similar ao observado para o extrato de arroz, o que pode indicar que as substâncias potencialmente ativas estão presentes em ambos os extratos. Desse modo, o extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz foi selecionado para cultivo em escala ampliada, análise de seu perfil cromatográfico por HPLC-MS e para as etapas seguintes de separação.

4.1.2 Cultivo do endófito em diferentes meios de cultivo

O objetivo de cultivar um endófito em diferentes meios é avaliar seu desenvolvimento na presença de diferentes quantidades e tipos de nutrientes, o que deve resultar em uma diferente produção metabólica (IKECHI–NWOGU, 2012).

Em nosso estudo, *M. arundinis* foi cultivado em meios líquidos (Caldo Batata Dextrose, Caldo YM, Extrato de Malte, Caldo Nutrient, Caldo Czapek-Dox) e em meios sólidos (arroz parboilizado e milho canjica) para a obtenção de extratos acetato de etila. A composição de cada extrato e os rendimentos obtidos após o cultivo do endófito estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo utilizados e rendimentos obtidos para os extratos acetato de etila.

Meios de cultivo	Composição	Massa de extrato obtida
Caldo Batata Dextrose (Acumedia) (líquido)	Batata (4g), Dextrose (20g)	111,70 mg
Caldo YM (Acumedia) (líquido)	Extrato de levedura (3g), Extrato de Malte (3g), Peptona (5g), Dextrose (10g)	46,00
Extrato de Malte (Acumedia) (líquido)	Extrato de Malte (20g)	254,50 mg
Caldo Nutrient (Acumedia) (líquido)	Extrato de carne (3g), Digestão enzimática de gelatina (5g)	55,50 mg
Caldo Czapek-Dox (Kasir) (líquido)	Nitrato de sódio (2g), Sulfato de Magnésio (0,5g), Cloreto de Potássio (0,5g), Sulfato Ferroso (0,01g), Difosfato de Potássio (1g), Sacarose (30g)	218,30 mg
Arroz parboilizado (Tio João) (sólido)	Arroz	272,20 mg
Milho canjica (Yoki) (sólido)	Milho	219,80 mg

É possível observar que o maior rendimento foi obtido quando o endófito foi cultivado nos meios sólidos e no extrato de Malte. Além dos diferentes rendimentos, uma análise do perfil cromatográfico por HPLC-PDA (metodologia em 3.5.1) demonstrou as diferenças em termos dos metabólitos produzidos (Figuras 8-14).

Figura 8 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em Caldo Batata Dextrose. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.

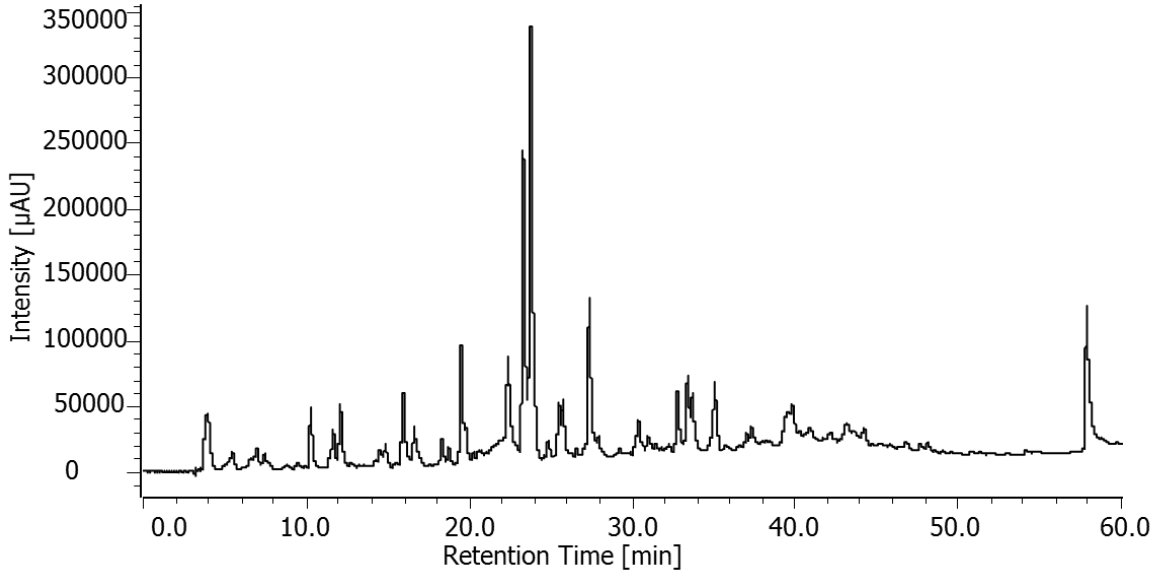


Figura 9 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em Caldo YM. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.

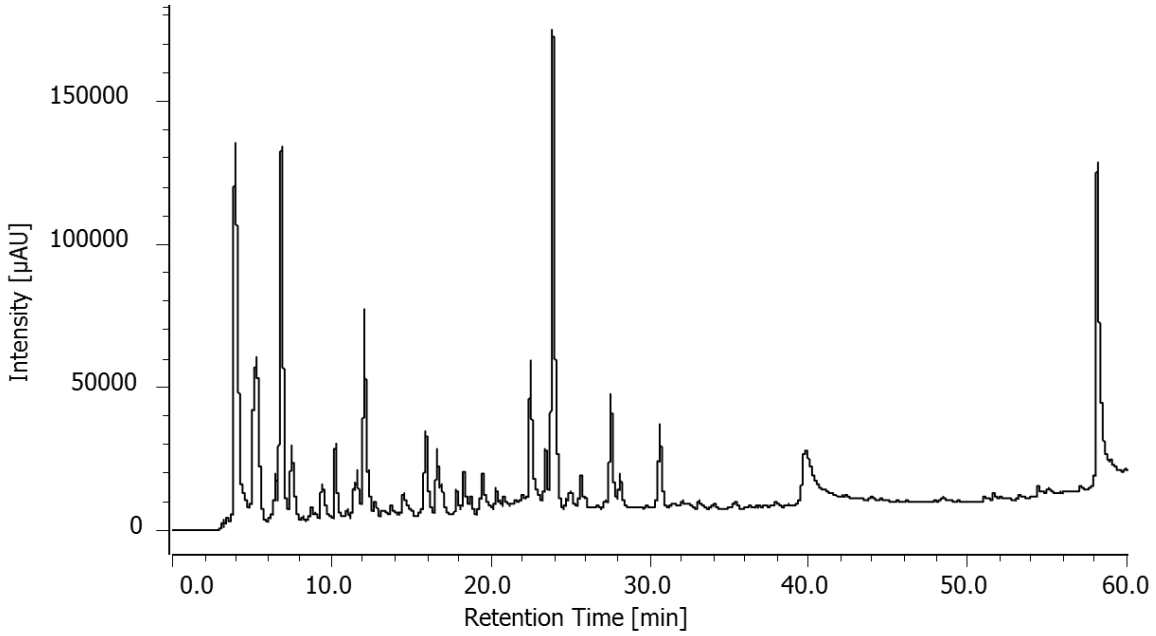


Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em Extrato de Malte. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.

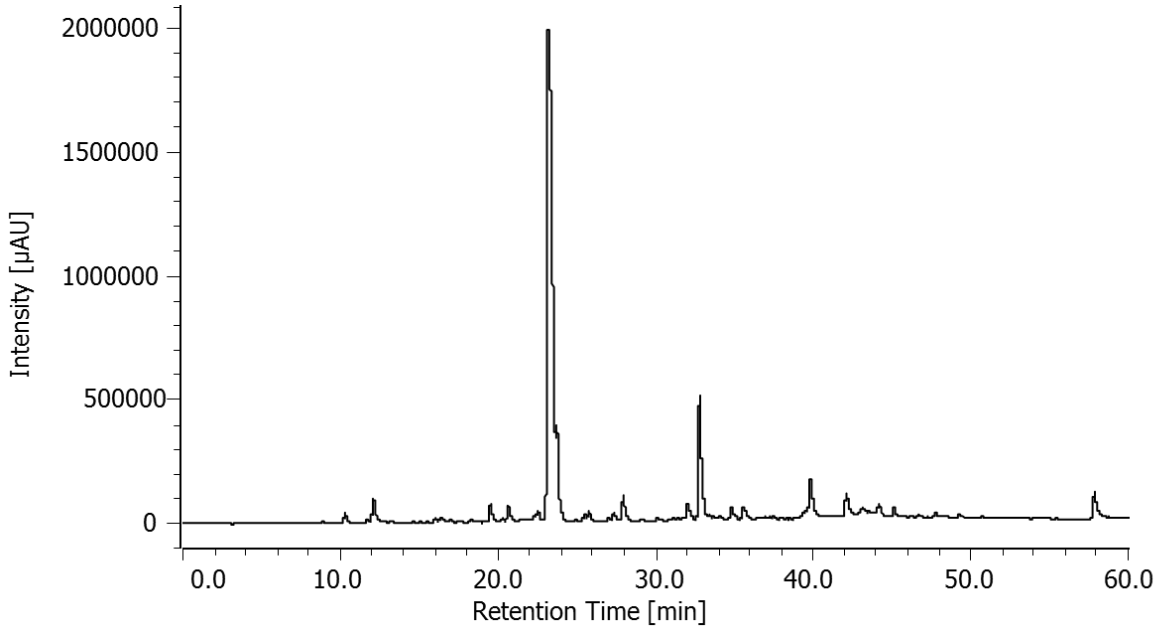


Figura 11 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em Caldo Nutrient. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.

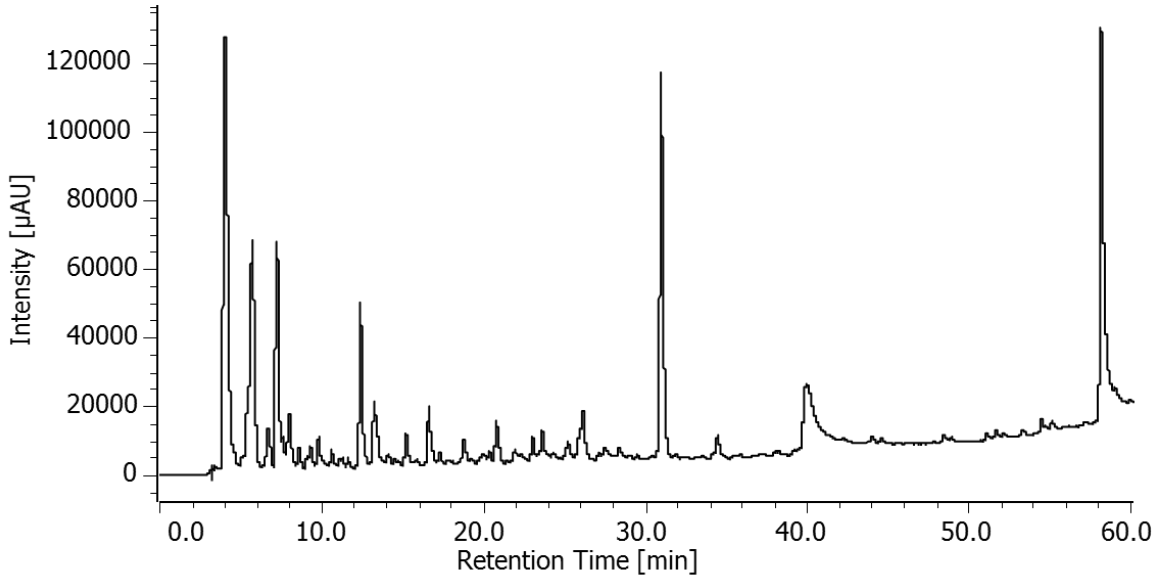


Figura 12 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em Caldo Czapek-Dox. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.

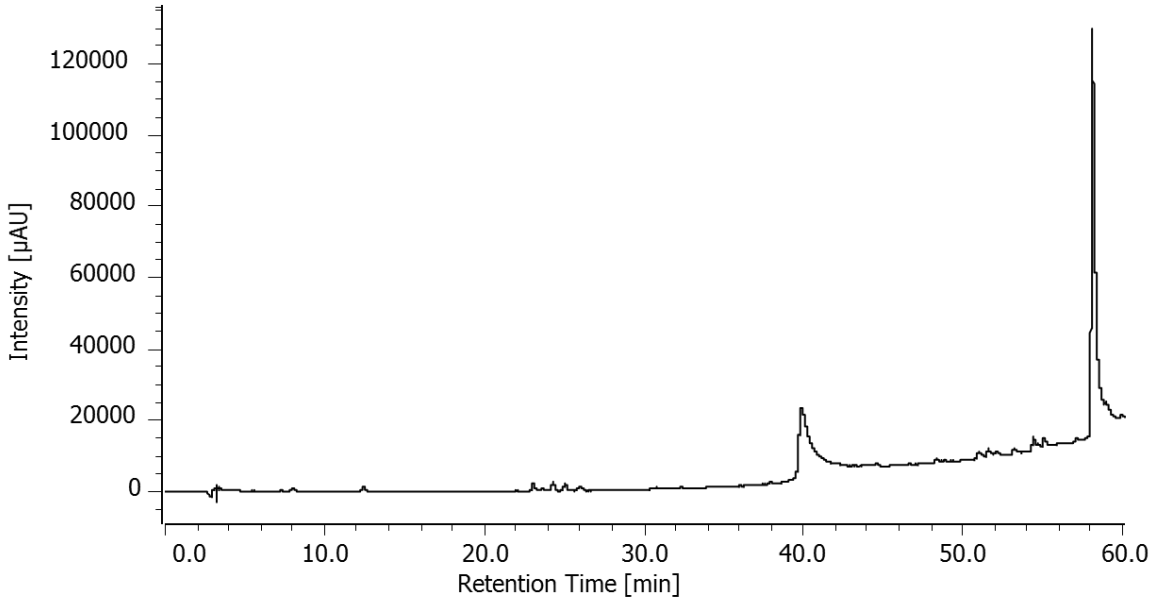


Figura 13 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em arroz parboilizado. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.

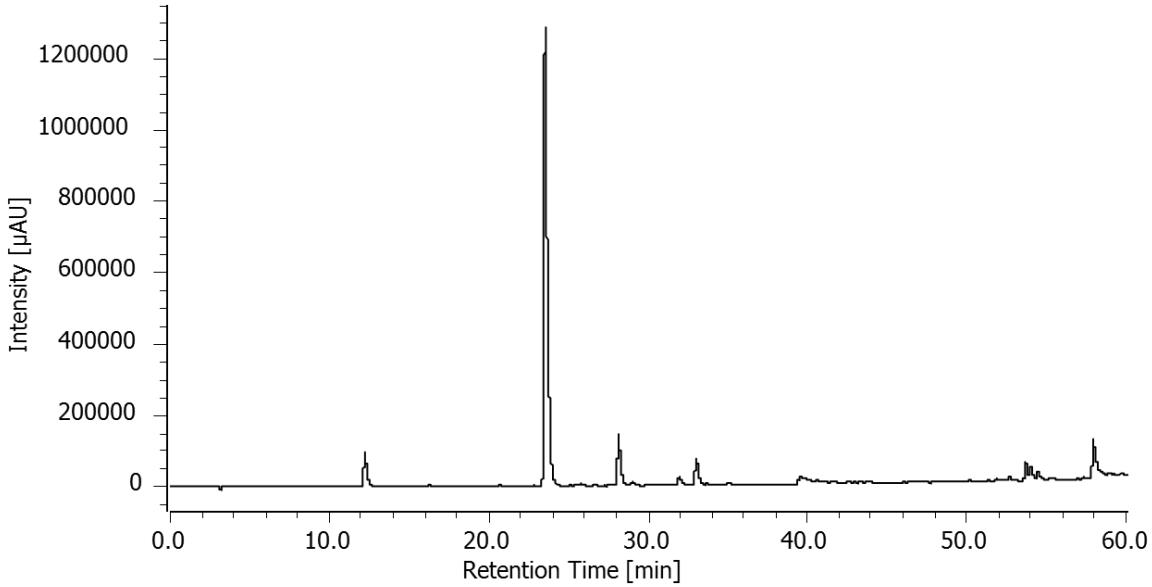
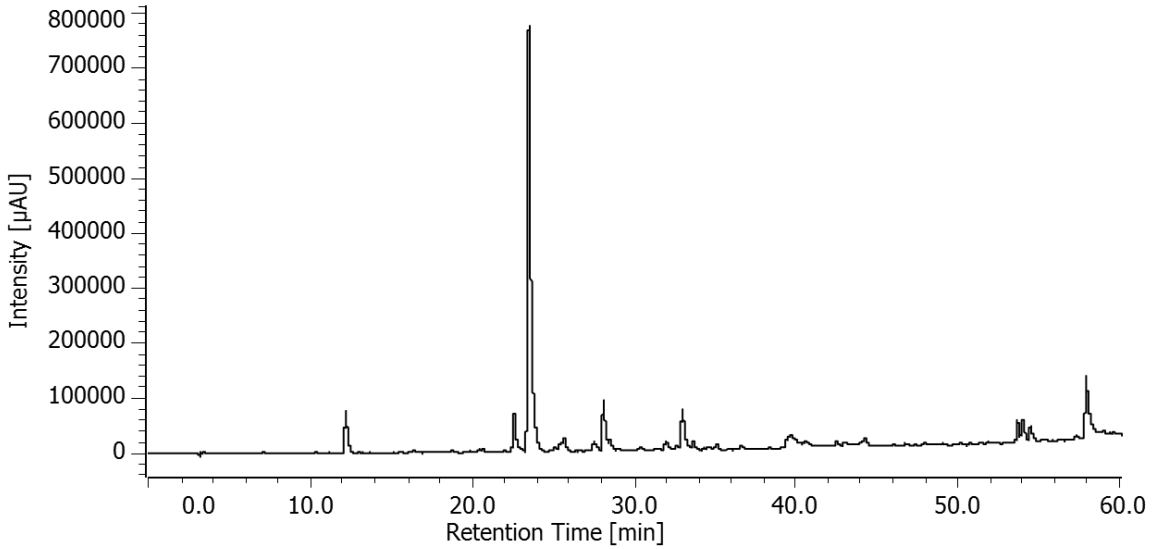


Figura 14 - Perfil cromatográfico do extrato acetato de etila cultivado em milho canjica. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.1.



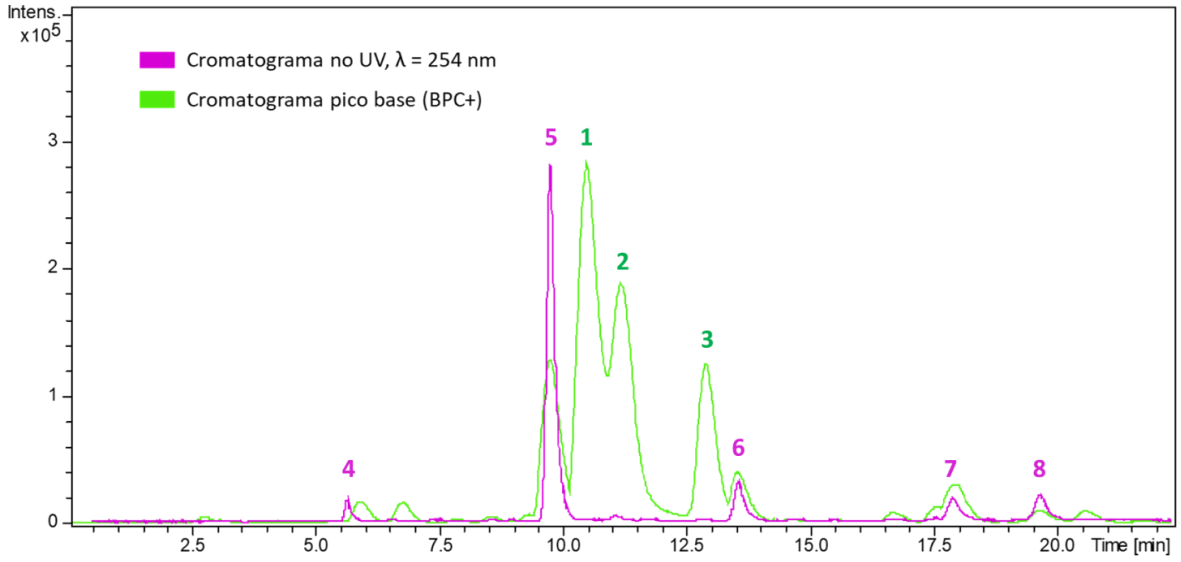
Através da análise dos cromatogramas verificamos a variabilidade obtida pelo cultivo com esses diferentes meios. O extrato acetato de etila cultivado em Caldo Batata Dextrose apresentou o maior número de substâncias com absorção no UV, enquanto que o cultivo em Caldo YM e Caldo Nutrient foram os mais indicados para a obtenção de compostos de maior polaridade. O caldo Czapek-Dox mostrou-se o mais pobre e com a menor produção, enquanto que os que apresentaram maior rendimento (cultivo em arroz parboilizado, milho canjica e extrato de Malte) mostraram semelhanças com a produção majoritária de uma substância com T_R = 24 min.

4.2 Fracionamento, Isolamento e Identificação de substâncias

Após a seleção e cultivo do extrato mais ativo (cultivo em arroz parboilizado) em escala ampliada, o mesmo foi submetido a uma otimização cromatográfica e a análise do perfil por HPLC-MS. Essa análise buscou identificar a presença de metabólitos já descritos em outras espécies do gênero do fungo e também a possível verificação de substâncias comuns tanto ao endófito quanto ao hospedeiro.

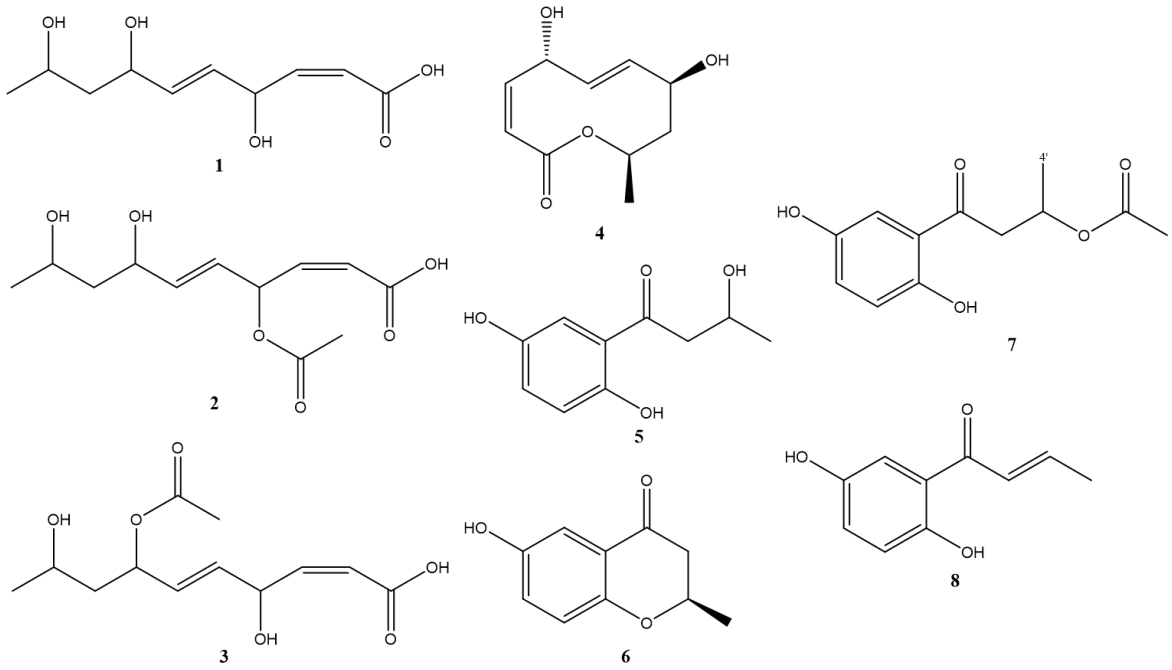
A condição cromatográfica foi ajustada para um gradiente de 43-65% de MeOH em 30 minutos, resultando em uma maior resolução entre os picos (Figura 15).

Figura 15 - Cromatograma no UV e cromatograma pico base obtidos na análise por HPLC-MS em modo positivo. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.2.



Como resultado, verificamos a presença de cinco substâncias com absorção no ultravioleta, sendo essas (**4**-**8**) isoladas e purificadas em cromatógrafo liquido semipreparativo com detector de arranjo de diodos (HPLC-PDA). Além disso verificamos a presença de substâncias que não apresentam absorção no UV, com destaque para a região com T_R = 10-15 min. Essa região foi analisada e os três sinais purificados a partir da utilização do cromatógrafo liquido semipreparativo com índice de refração (HPLC-RI) resultando nas substâncias **1**-**3**.

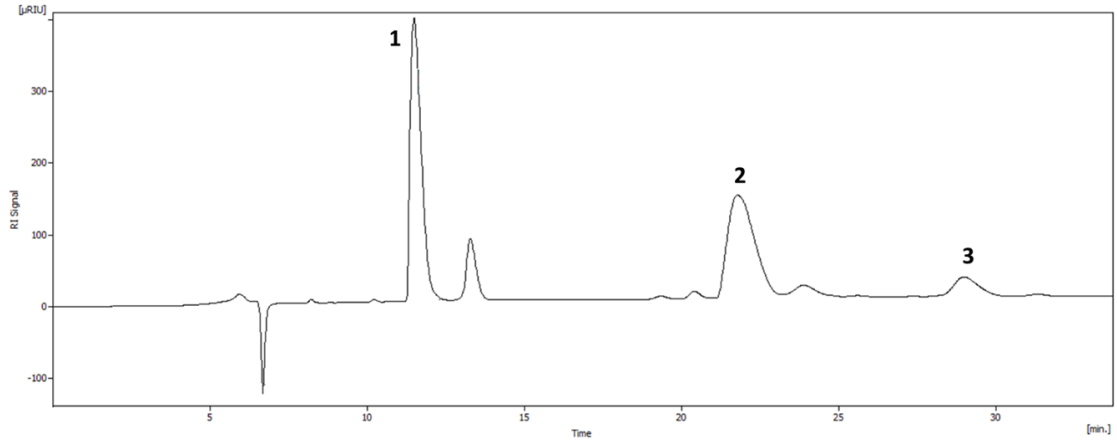
Figura 16 - Substâncias isoladas a partir do extrato cultivado em arroz parboilizado. Os dados espectroscópicos apresentam-se descritos nas próximas seções.



4.2.1 Isolamento e identificação de derivados do ácido decanóico

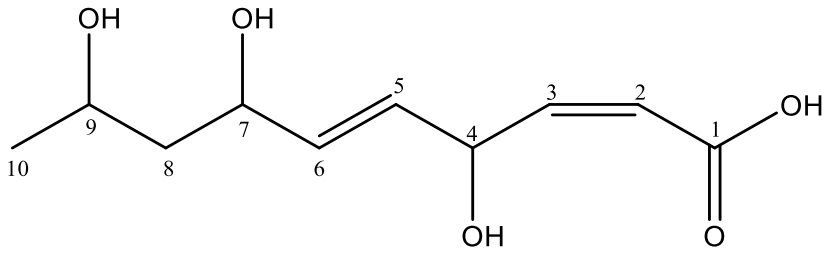
A região com substâncias que não apresentam absorção no UV (40,3 mg) foi isolada e analisada por HPLC-RI de acordo com a metodologia descrita em 3.5.4. Devido ao pequeno intervalo entre os tempos de retenção dessas substâncias foi possível desenvolver uma metodologia isocrática resultando em um cromatograma bem resolvido. O cromatograma otimizado está apresentado na figura 17.

Figura 17 – Separação cromatográfica obtida no HPLC-RI. Condições cromatográficas descritas em 3.5.3.



Os sinais apresentados foram coletados separadamente e as substâncias obtidas analisadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, sendo identificadas como derivados do ácido decanóico **1** (6,9 mg), **2** (10,2 mg) e **3** (2,1 mg).

*4.2.1.1 Identificação da substância **1***



Ácido (2*Z*,5*E*)-4,7,9-triidroxideca-2,5-dienóico

A partir da análise dos espectros mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear foi possível verificar no espectro de NMR ^{1}H (Figuras 36-40) a presença de quatros hidrogênios olefínicos, sendo que o sinal correspondente ao H-2 (δ_H 5,88, *dd*, *J* = 12,6 e 1,70 Hz) apresentou-se correlacionado com o H-3 (δ_H 5,83, *dd*, *J* = 12,6 e 3,2 Hz) com uma constante de acoplamento de *J* = 12,6 Hz, o que indica a configuração relativa desses hidrogênios como *Z*. Do mesmo modo, verificou-se que os hidrogênios H-5 (δ_H 5,63, *dd*, *J* = 15,9 e 8,0 Hz) e H-6 (δ_H 5,56, *dd*, *J* = 15,9 e 8,8 Hz) apresentam configuração relativa *E* devido a constante de acoplamento de *J* = 15,9 Hz. A análise dos espectros de NMR ^{13}C (Figura 41) permitiram verificar a presença de cinco carbonos sp^2 (um grupo carboxila e quatro grupos olefínicos) e cinco carbonos sp^3, incluindo a presença de um grupo metileno em C-8 (δ_C 43,9) e de um grupo metila em C-10 (δ_C 21,6). A análise dos espectros bidimensionais de *g*HSQC (Figura 44) revelaram a presença de hidrogênios diastereotópicos H-8a (δ_H 1,71) e H-8b (δ_H 1,88) no grupo metileno. No espectro bidimensional de *g*HMBC (Figura 45) foi observada a correlação do hidrogênio olefínico H-2 (δ_H 5,88) com C-1 (δ_C 170,2), indicando a posição do grupo carbonílico, e ainda com C-3 (δ_H 137,8) e C-4 (δ_H 72,2). O hidrogênio H-4 (δ_H 4,69) apresentou correlação com C-2 (δ_C 122,9), C-3 (δ_C 137,8), C-5 (δ_C 131,0) e C-6 (δ_C 138,6), resultando na determinação do C-4 entre as duas ligações duplas. Os hidrogênios do grupo metila (δ_H 1,23) mostraram correlação com C-9 (δ_C 70,0) e com o carbono do grupo metileno C-8 (δ_C 43,9). Os demais dados de

deslocamento químico, multiplicidade e correlações observadas estão apresentados na tabela 3 enquanto que os espectros estão apresentados nos anexos.

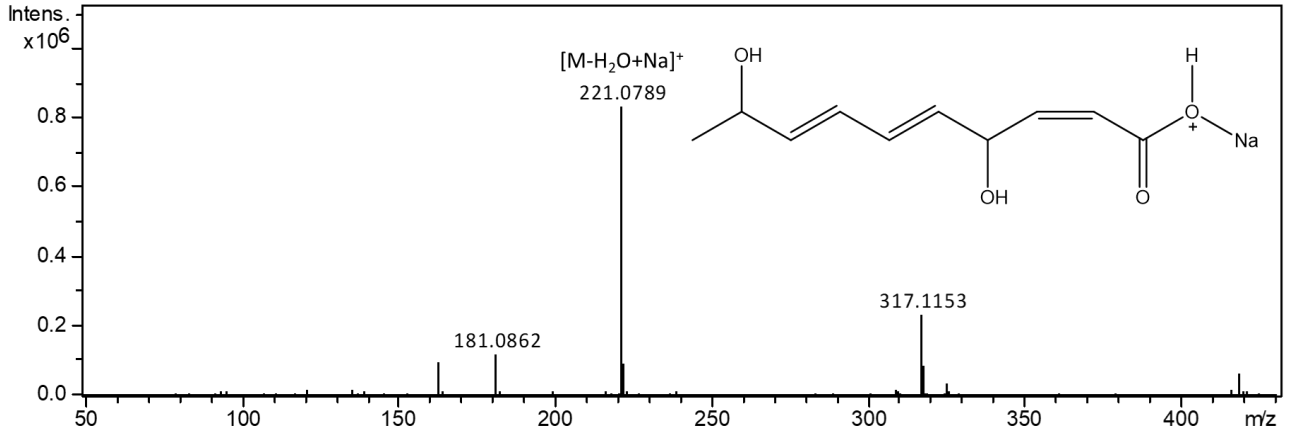
Tabela 3 - Dados de deslocamento químico e correlações observadas para a substância **1**.

	***g*HQSC $^{1}J_{CH}$**		***g*HMBC $^{n}J_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^{2}J_{CH}$ e $^{3}J_{CH}$
1	-	170,2	
2	5,88 *dd (*12,6 e 1,7)	122,9	72,2 (C-4), 137,8 (C-3), 170,2 (C-1);
3	5,83 *dd (*12,6 e 3,2)	137,8	72,2 (C-4), 170,2 (C-1);
4	4,69 *ddd* (8,0, 3,3 e 1,7)	72,2	122,9 (C-2), 131,0 (C-5), 138,6 (C-6);
5	5,63 *dd* (15,9 e 8,0)	131,0	72,8 (C-7), 138,6 (C-6);
6	5,56 *dd* (15,9 e 8,8)	138,6	43,9 (C-8), 72,2 (C-4), 131,0 (C-5);
7	4,13 *m*	72,8	131,0 (C-5);
8ª	1,71 *ddd* (14, 13,3 e 11,2)	43,9	70,0 (C-9), 72,2 (C-4), 72,8 (C-7), 138,6 (C-6);
8b	1,88 *ddd* (14,0, 3,5 e 1,7)		72,8 (C-7), 138,6 (C-6);
9	5,26 *tdd* (8,0, 3,3 e 1,7)	70,0	
10	1,23 *d* (6,5)	21,6	43,9 (C-8), 70,0 (C-9);

A proposta estrutural com fórmula molecular $C_{10}H_{16}O_5$ foi confirmada a partir da análise da substância isolada em espectrômetro de massas em modo positivo.

Os derivados do ácido decanóico apresentam desidratação na fonte de ionização, o que faz com que o sinal do íon $[M+Na]^+$ com *m/z* 239,0890 apareça com baixa intensidade. O pico base do espectro corresponde ao íon da molécula desidratada cationizada $[M-H_2O+Na]^+$ com *m/z* 221,0789 (erro de 2,26 pm) apresentado na figura 18.

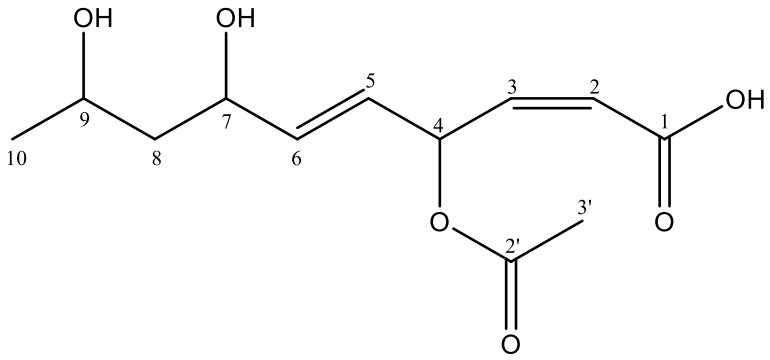
Figura 18 - Espectro de massas da substância **1** confirmando a proposta estrutural apresentada.



Essa substância (ácido (*2Z*, *5E*)-4,7,9-triidroxideca-2,5-dienóico) e os demais derivados do ácido decanóico demonstrados nesse trabalho apresentam-se inéditos

na literatura. A determinação da configuração absoluta dos carbonos C-4, C-7 e C-9 está sendo realizada.

*4.2.1.2 Identificação da substância **2***



Ácido (2*Z*,5*E*)-4-acetóxi-7,9-diidroxideca-2,5-dienóico

No espectro de NMR ^{1}H (Figuras 46-50) verificamos a presença de quatro carbonos olefínicos, com os hidrogênios H-2 (δ_H 6,03, *dd*, *J* = 12,2 e 1,7 Hz) e H-3 (δ_H 5,79, *dd*, *J* = 12,2 e 3,6 Hz) correspondendo a uma dupla de configuração relativa *Z* e os hidrogênios H-5 (δ_H 5,60, *dd*, *J* = 16,0 e 8,1 Hz) e H-6 (δ_H 5,71, *dd*, *J* = 16,0 e 9,2 Hz) designados a uma ligação dupla com configuração relativa *E*. A análise do espectro de NMR ^{13}C (Figura 51) demonstrou a presença de seis carbonos sp^2, com destaque para a presença de uma carboxila C-1 (δ_C 169,9) e uma carbonila de éster C-2' (δ_C 171,8), além da presença de carbonos sp^3 como um grupo metileno em C-8 (δ_C 43,8) e duas metilas em C-10 (δ_C 21,6) e C-3' (δ_C 20,9). A partir do espectro bidimensional de *g*HSQC (Figura 54) foi possível observar que os hidrogênios H-8a (δ_H 1,74) e H-8b (δ_H 1,90) correspondiam a hidrogênios diastereotópicos do grupo metileno. Os espectros bidimensionais de *g*HMBC (Figura 55) auxiliaram na proposta estrutural apresentada, onde temos os hidrogênios H-2 (δ_H 6,03) e H-6 (δ_H 5,71) apresentando correlação com o carbono C-4 (δ_C 73,9), indicando esse como um grupo CH entre as duas duplas ligações. Observamos também a correlação dos hidrogênios H-8 (δ_H 1,74 e δ_H 1,90) com C-6 (δ_C 140,9), C-7 (δ_C 72,7) e C-9 (δ_C 70,2), bem como a correlação dos hidrogênios da metila H-10 (δ_H 1,24) com C-8 (δ_C 43,8) e C-9 (δ_C 70,2). A posição da carbonila C-2' (δ_C 171,8) foi atribuída devido ao maior deslocamento químico do hidrogênio H-4 (δ_H 5,81) para a substância **2** em comparação com a substância **1**, devido ao efeito de desblindagem pela presença do

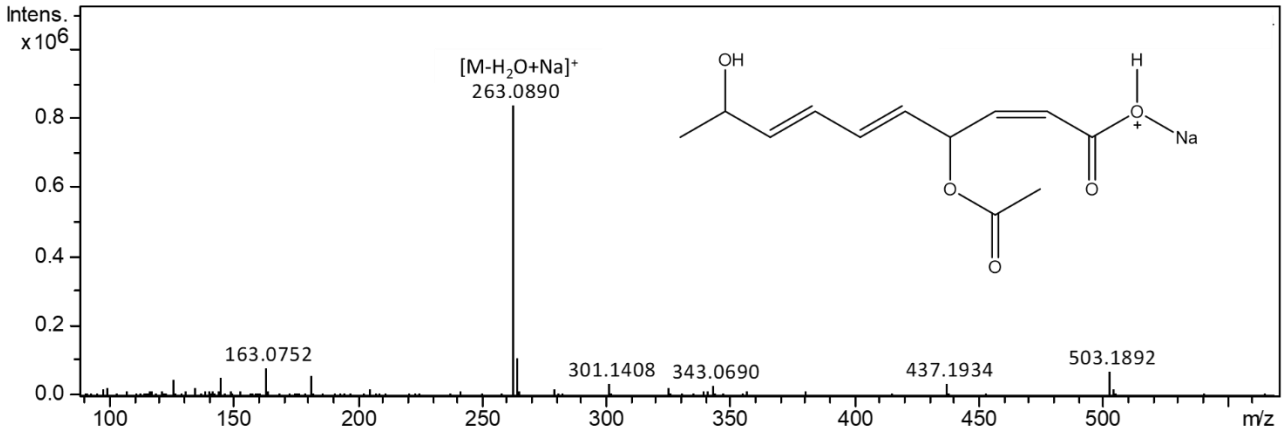
grupo éster. As demais correlações obtidas estão apresentadas na tabela 4 e os espectros nos anexos.

Tabela 4 - Dados de deslocamento químico e correlações observadas para a substância **2**.

	***g*HQSC $^1J_{CH}$**		***g*HMBC $^nJ_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
1	-	169,9	
2	6,03 *dd* (12,2 e 1,7)	125,6	73,9 (C-4);
3	5,79 *dd* (12,2 e 3,6)	133,3	125,6 (C-2);
4	5,81 *m*	73,9	126,6 (C-5), 133,3 (C-3);
5	5,60 *dd* (16,0 e 8,1)	126,6	72,7 (C-7), 140,9 (C-6);
6	5,71 *dd* (16,0 e 9,2)	140,9	73,9 (C-4), 126,6 (C-5);
7	4,13 *ddd* (11,1, 7,2 e 3,4)	72,7	126,6 (C-5);
8ª	1,74 *dt* (14,0 e 11,1)	43,8	70,2 (C-9)
8b	1,90 *ddd* (14,0, 3,4 e 1,7)		72,7 (C-7), 140,9 (C-6);
9	5,28 *tdd* (12,5, 6,4 e 1,7)	70,2	
10	1,24 *d* (6,4)	21,6	43,8 (C-8), 70,2 (C-9);
1'	-	-	
2'	-	171,8	
3'	2,05 *s*	20,9	171,8 (C-2');

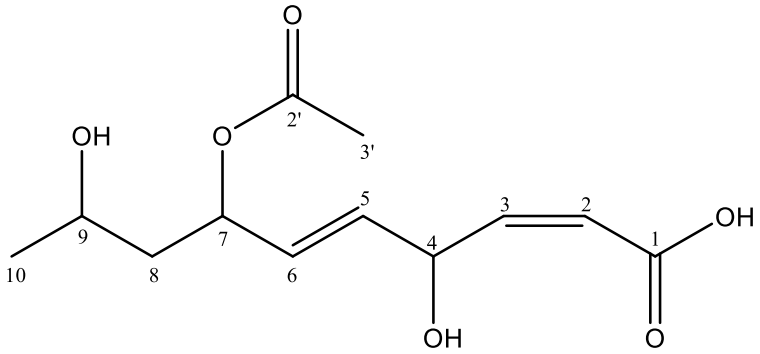
A proposta estrutural com fórmula molecular $C_{12}H_{18}O_6$ foi confirmada a partir da análise da substância isolada em espectrômetro de massas em modo positivo. Do mesmo modo que para a substância **1**, a substância **2** sofre desidratação na fonte de ionização e, portanto, observamos o íon da molécula desidratada cationizada $[M\text{-}H_2O+Na]^+$ com *m/z* 263,0891 (erro de 1,52 ppm) no espectro de massas (Figura 19).

Figura 19 - Espectro de massas da substância **2** confirmando a proposta estrutural apresentada.



Assim como a substância **1**, o ácido (*2Z, 5E*)-4-acetóxi-7,9-diidroxideca-2,5-dienóico (**2**) apresenta-se inédito na literatura, sendo encontrado pela primeira vez como um produto natural do metabolismo de um endófito. A configuração absoluta dos carbonos C-4, C-7 e C-9 está sendo realizada.

*4.2.1.3 Identificação da substância **3***



Ácido (2*Z*,5*E*)-7-acetóxi-4,9-diidroxideca-2,5-dienóico

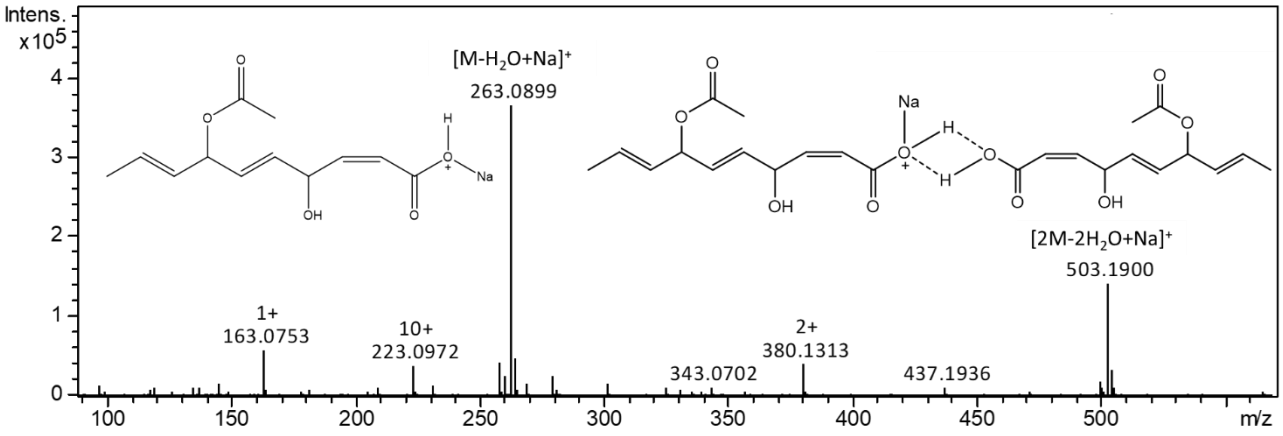
Os dados de NMR ^{1}H (Figuras 56-60) para a substância **3** se mostraram muito parecidos com os obtidos para a substância **2**. Temos novamente quatro hidrogênios olefínicos sendo os hidrogênios H-2 (δ_H 5,89, *dd*, *J* = 12,6 e 1,8 Hz) e H-3 (δ_H 5,83, *dd*, *J* = 12,6 e 3,3 Hz) pertencentes a uma ligação dupla com configuração relativa *E* e os hidrogênios H-5 (δ_H 5,76, *dd*, *J* = 15,9 e 8,4 Hz) e H-6 (δ_H 5,60, *dd*, *J* = 15,9 e 9,5 Hz) pertencentes a uma ligação dupla com configuração relativa *Z*. A partir do espectro de NMR ^{13}C (Figura 61) verificamos a presença de duas carbonilas C-1 (δ_C 170,0) e C-2' (δ_C 171,7), duas metilas em C-10 (δ_C 21,5) e C-3' (δ_C 21,1) e um grupo metileno em C-8 (δ_C 40,7). As correlações de *g*HSQC (Figura 64) mostram os hidrogênios diastereotópicos H-8a (δ_H 1,85) e H-8b (δ_H 1,94) ligados ao grupo metileno e a partir dos dados de *g*HMBC (Figura 65) posicionamos o carbono C-4 (δ_C 72,0) entre as ligações duplas pela correlação de H-2 (δ_H 5,89) e H-6 (δ_H 5,60) com esse carbono. Também verificamos a correlação dos hidrogênios H-2 (δ_H 5,89) e H-3 (δ_H 5,83) com a carboxila (δ_C 170,0) e a presença do grupo éster na posição 7 pela correlação do H-7 (δ_H 5,22) com C-2' (δ_C 171,7) e pelo maior deslocamento químico desse hidrogênio na presença do éster, assim como ocorre na substância **2**. As demais correlações obtidas estão apresentadas na tabela 5 com os respectivos valores de deslocamento químico e multiplicidades. Os espectros registrados encontram-se em anexos.

Tabela 5 - Dados de deslocamento químico e correlações observadas para a substância **3**.

	***g*HQSC $^1J_{CH}$**		***g*HMBC $^nJ_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
1	-	170,0	
2	5,89 *dd* (12,6 e 1,8)	122,9	72,0 (C-4), 137,7 (C-3), 170,0 (C-1);
3	5,83 *dd* (12,6 e 3,3)	137,7	170,0 (C-1);
4	4,69 *m*	72,0	122,9 (C-2), 134,0 (C-6), 137,7 (C-3);
5	5,76 *dd* (15,9 e 8,4)	133,9	75,2 (C-7), 134,0 (C-6);
6	5,60 *dd* (15,9 e 9,5)	134,0	40,7 (C-8), 72,0 (C-4), 133,9 (C-5);
7	5,22 *m*	75,2	40,7 (C-8), 134,0 (C-6), 171,7 (C-3');
8a	1,85 *dt* (13,9 e 11,2)	40,7	69,7 (C-9), 75,2 (C-7);
8b	1,94 *ddd* (13,9, 3,2 e 1,9)		75,2 (C-7), 134,0 (C-6);
9	5,31 *tdd* (12,5, 6,3 e 1,8)	69,7	21,5 (C-10), 75,2 (C-7);
10	1,24 *d* (6,4)	21,5	40,7 (C-8), 69,7 (C-9);
1'	-	-	
2'	-	171,7	
3'	2,00 *s*	21,1	171,7 (C-2')

Essa substância isolada foi analisada em espectrômetro de massas e obteve-se o sinal do íon $[M\text{-}H_2O+Na]^+$ com *m/z* 263,0899 (erro de 3,42 ppm), corroborando com a proposta estrutural apresentada de fórmula $C_{12}H_{18}O_6$ (Figura 20). Para essa substância, também é possível observar o sinal do dímero cationizado em *m/z* 503,1900 (erro de 1,59 ppm).

Figura 20 - Espectro de massas da substância **3** confirmando a proposta apresentada.

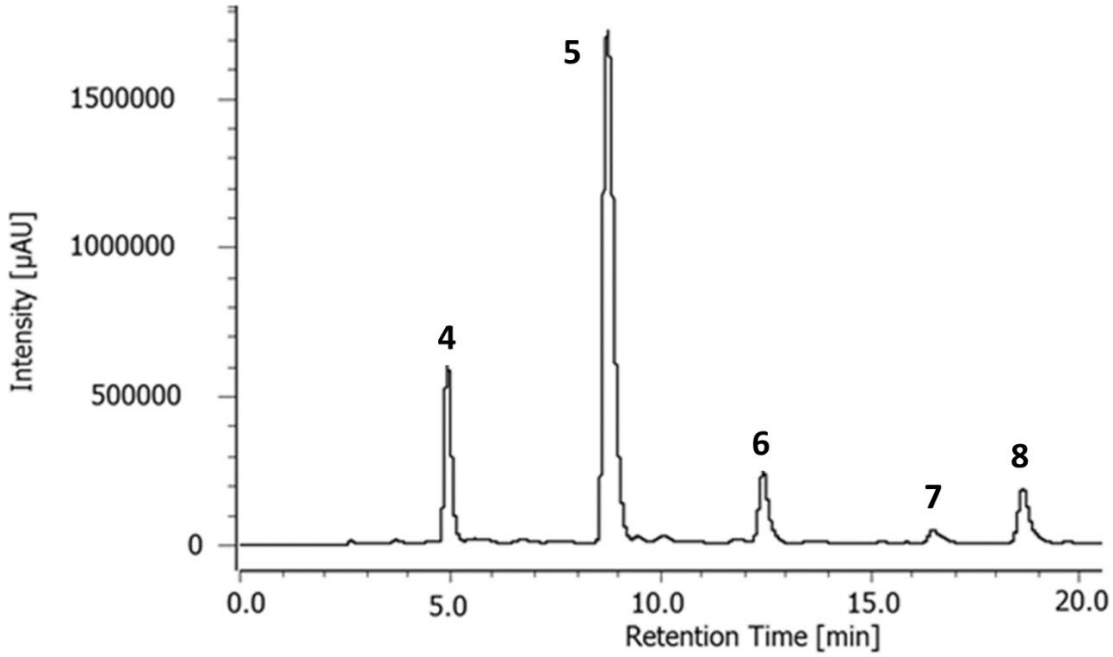


Essa substância **3** (ácido (*2Z,5E*)-7-acetóxi-4,9-diidroxideca-2,5-dienóico) também está sendo reportada pela primeira vez na literatura. A configuração dos carbonos C-4, C-7 e C-9 estão sendo realizadas.

4.2.2 Isolamento e identificação de policetídeos

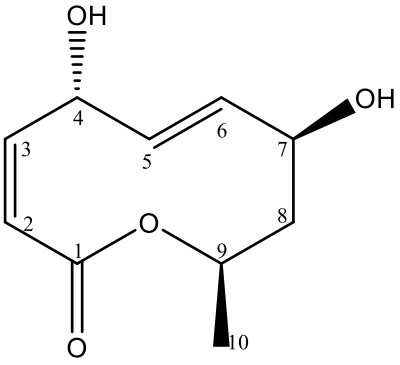
O extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz parboilizado foi analisado na mesma condição otimizada utilizada para a aquisição do cromatograma HPLC-MS, onde temos cinco sinais bem resolvidos (Figura 21).

Figura 21 - Cromatograma otimizado para o extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz parboilizado. Condições cromatográficas presentes no item 3.5.4.



Desse modo, a partir do extrato acetato de etila do cultivo em arroz (1,5 mg) foram isoladas a partir do uso do HPLC-PDA semipreparativo cinco substâncias, **4** (13,2 mg), **5** (47,1 mg), **6** (6,5 mg), **7** (3,7 mg) e **8** (7,5 mg).

*4.2.1.1 Identificação da substância **4***



Modiolida A

A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais juntamente com a comparação de dados da literatura permitiram a identificação da substância **4**, também conhecida como modiolida A. Assim como encontrado nos derivados do ácido decanóico, temos hidrogênios olefínicos que resultam em ligações duplas entre H-2 (δ_H 5,88, *dd*, *J* = 12,5 e 1,7 Hz) e H-3 (δ_H 5,83, *dd*, *J* = 12,5 e 3,2 Hz) com configuração Z e entre H-5 (δ_H 5,63, *dd*, *J* = 15,9 e 8,0 Hz) e H-6 (δ_H 5,56, *dd*, *J* = 15,9 e 8,8 Hz) com configuração *E* (Figuras 66-70). No espectro de NMR ^{13}C (Figura 71) temos a presença de cinco carbonos sp^2 correspondendo aos quatro carbonos olefínicos e a presença de uma carbonila de éster em C-1 (δ_C 170,2). Temos também carbonos sp^3 com destaque para o grupo metileno em C-8 (δ_C 43,9) e metila em C-10 (δ_C 1,23). As informações dos espectros unidimensionais foram complementadas pelos dados presentes nos espectros bidimensionais de *g*HSQC (Figura 74) e *g*HMBC (Figura 75), onde a partir das correlações diretas foi possível estabelecer que os hidrogênios do grupo metileno H-8a (δ_H 1,72) e H-8b (δ_H 1,88) apresentavam diferentes valores de deslocamento químico, sendo hidrogênios diastereotópicos pela proximidade com um centro quiral.

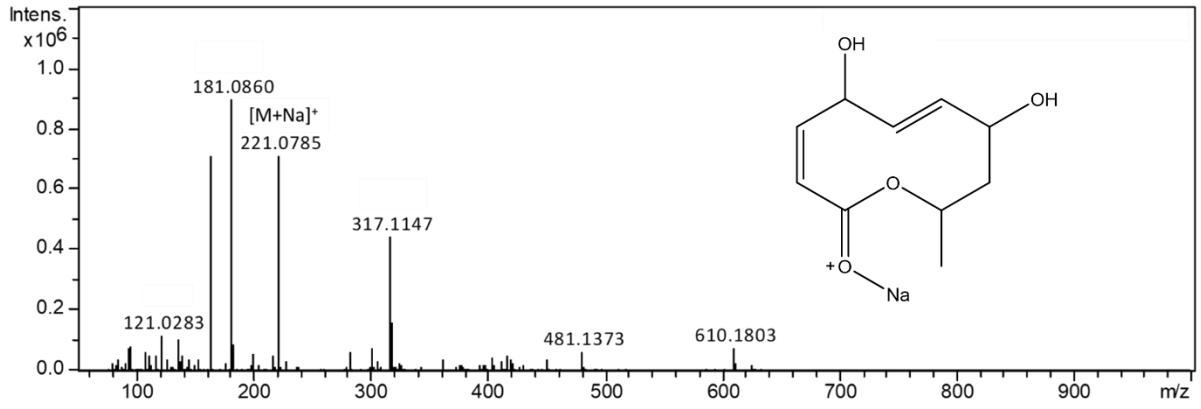
Através das interações a longa distância foi possível determinar a posição do C-4 (δ_C 72,2) entre as duas ligações duplas pelas correlações de H-2 (δ_H 5,88), H-3 (δ_H 5,83), H-5 (δ_H 5,63) e H-6 (δ_H 5,56) com esse carbono. A posição da carboxila foi estabelecida a partir da correlação de H-2 (δ_H 5,88) e H-3 (δ_H 5,83) com C-1 (δ_C 170,2). As demais correlações dos experimentos a longa distância e COSY (Figura 73) estão apresentadas nos anexos. Os dados de deslocamento químico estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Dados de deslocamento químico e correlações observadas para a substância **4**.

	***g*HQSC $^{1}J_{CH}$**		***g*HMBC $^{n}J_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^{2}J_{CH}$ e $^{3}J_{CH}$
1	-	170,2	
2	5,88 *dd* (12,5 e 1,7)	122,9	72,2 (C-4), 138,7 (C-3), 170,2 (C-1);
3	5,83 *dd* (12,5 e 3,2)	138,7	72,2 (C-4), 131,0 (C-5), 170,2 (C-1);
4	4,69 *ddd* (8,0, 3,2 e 1,7)	72,2	122,9 (C-2), 131,0 (C-5), 137,8 (C-6), 138,7 (C-3);
5	5,63 *dd* (15,9 e 8,0)	131,0	72,2 (C-4), 72,8 (C-7), 137,8 (C-6), 138,7 (C-3);
6	5,56 *dd* (15,9 e 8,8)	137,8	43,9 (C-8), 72,2 (C-4), 131,0 (C-5);
7	4,13 *ddd* (11,3, 8,8 e 3,3)	72,8	43,9 (C-8), 131,0 (C-5);
8a	1,72 *ddt* (14,0, 13,4 e 11,3)	43,9	72,8 (C-7), 137,8 (C-6);
8b	1,88 *ddd* (14,0, 3,3 e 1,8)		70,1 (C-9), 72,8 (C-7), 137,8 (C-6);
9	5,26 *dqd* (13,4, 6,4 e 1,8)	70,1	43,9 (C-8), 72,8 (C-7), 21,6 (C-10), 170,2 (C-1);
10	1,23 *d* (6,4)	21,6	43,9 (C-8), 70,1 (C-9)

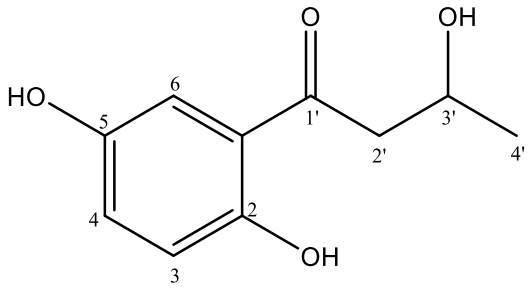
A proposta estrutural de fórmula molecular $C_{10}H_{14}O_4$ foi confirmada a partir da análise do espectro de massas da substância (Figura 22), onde observamos o sinal da molécula cationizada $[M+Na]^+$ em *m/z* 221,0785 (erro de 0,45 ppm).

Figura 22 - Espectro de massas da substância 4 confirmando a proposta apresentada.



Esse composto já foi descrito na literatura como Modiolida A, de modo que a estereoquímica do mesmo foi determinada a partir da comparação da rotação específica descrita na literatura com a experimental, onde obtemos um valor de $[\alpha]_D^{25}$ = + 38º quando os centros possuem configuração 4*R*, 7*S*, 9*R* (TSUDA et al., 2003). Esse composto foi isolado de um fungo pertencente ao gênero *Paraphaosphaeria* e está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Microsphaeropsis.*

4.2.1.2 Identificação da substância ***5***



1-(2,5-diidroxifenil)-3'-hidroxibutanona

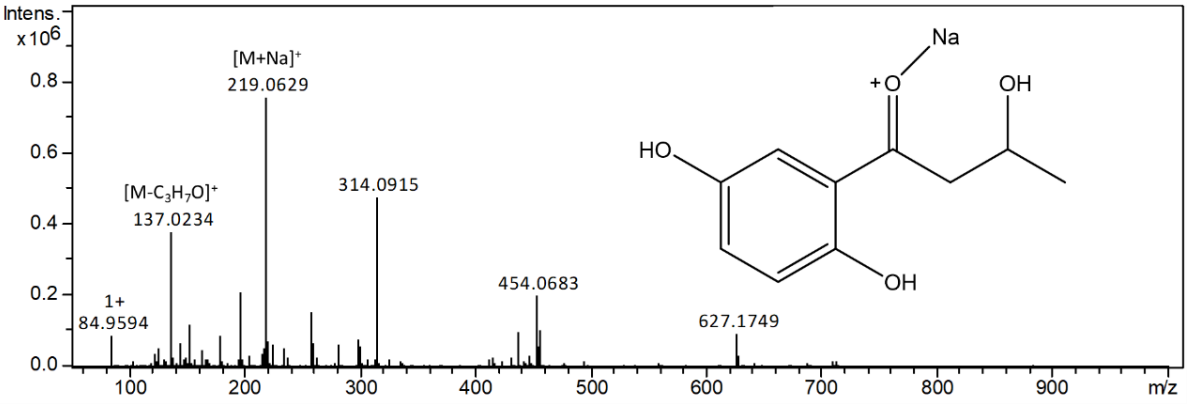
A análise dos espectros de NMR ^{1}H (Figuras 76-80) da substância **5** mostraram a presença de hidrogênios aromáticos H-3 (δ_H 6,79, *d*, *J* = 8,9 Hz), H-4 (δ_H 7,01, *dd*, *J* = 8,9 e 2,9 Hz) e H-6 (δ_H 7,24, *d*, *J* = 2,9 Hz), evidenciando segundo as constantes de acoplamento a presença de um anel tri-substituído. Os dados de NMR ^{13}C (Figura 81) evidenciaram a presença de sete carbonos sp^2, sendo seis pertencentes ao anel aromático e um grupo carbonila de cetona em C-1' (δ_C 206,2), além de carbonos sp^3 como grupos metileno em C-2' (δ_C 48,4) e metila em C-4' (δ_C 23,5). As análises dos espectros bidimensionais permitiram verificar que os hidrogênios do metileno H-2'a (δ_H 3,03) e H-2'b (δ_H 3,17) apresentavam-se como diastereotópicos (Figura 84). O espectro bidimensional de *g*HMBC (Figura 85) mostrou que a correlação dos hidrogênios aromáticos H-3 (δ_H 6,79), H-6 (δ_H 7,24) e dos hidrogênios do grupo metileno H-2 (δ_H 3,03 e 3,17) com a carbonila C-1' (δ_C 206,2), permitindo o estabelecimento da posição dessa cetona entre o anel aromático e a cadeia alifática. As demais correlações obtidas estão apresentadas na tabela 7 e os espectros estão apresentados nos anexos.

Tabela 7 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **5**.

	***g*HQSC $^{1}J_{CH}$**		***g*HMBC $^{n}J_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^{2}J_{CH}$ e $^{3}J_{CH}$
1	-	120,8	-
2	-	156,7	-
3	6.79 *d* (8,9)	119,7	120,8 (C-1), 150,6 (C-2), 156,7 (C-5), 206,2 (C-1');
4	7,01 *dd* (8,9 e 2,9)	125,9	115,9 (C-6), 150,6 (C-2), 156,7 (C-5);
5	-	150,6	-
6	7,24 *d* (2,9)	115,9	125,9 (C-4), 150,6 (C-2), 156,7 (C-5), 206,2 (C-1');
1'	-	206,2	-
2'a	3,03 *dd* (16,1 e 4,9)	48,4	23,5 (C-4'), 65,3 (C-3'), 206,2 (C-1');
2'b	3,17 *dd* (16,1 e 7,6)	-	23,5 (C-4'), 65,3 (C-3'), 206,2 (C-1');
3'	4,37 *dqd* (7,6, 6,2 e 4,9)	65,3	-
4'	1,27 *d* (6,2)	23,5	48,4 (C-2'), 65,3 (C-3');

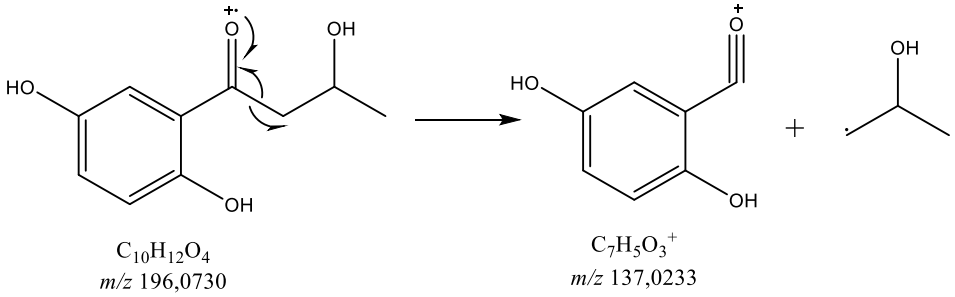
A proposta estrutural de fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_4$ foi confirmada a partir da análise do espectro de massas da substância, onde foi possível visualizar o pico base como o íon $[M+Na]^+$ em *m/z* 219,0629 (erro de 0,46 ppm) (Figura 23).

Figura 23 - Espectro de massas da substância **5** confirmando a proposta apresentada.



O sinal observado com m/z 137,0234 corresponde ao íon formado após uma segmentação α na carbonila do íon molecular protonado, resultando no íon $[M-C_3H_7O]^+$ (erro de 0,73 ppm) (Figura 24).

Figura 24 - Proposta para a fragmentação do íon molecular da substância **5**.



$C_{10}H_{12}O_4$
m/z 196,0730

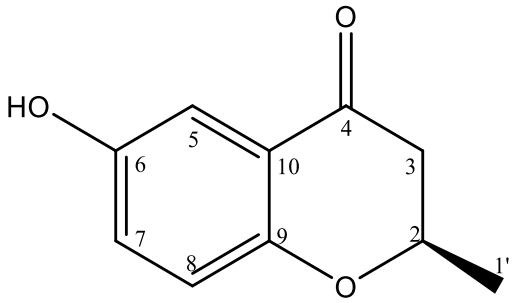
$C_7H_5O_3^+$
m/z 137,0233

A substância **5**, conhecida como 1-(2,5-diidroxifenil)-3-hidroxibutanona está sendo descrita pela primeira vez na literatura como um produto natural, estando disponível apenas comercialmente e não tendo sido reportada em nenhum artigo científico ou tendo sua atividade biológica testada.

Esse metabólito é o que aparece com maior intensidade nos perfis cromatográficos para os extratos acetato de etila do fungo cultivado em arroz parboilizado, extrato de Malte e milho canjica, sendo a substância com maior concentração entre os extratos mais ativos. Desse modo, essa substância será selecionada para ser avaliada isoladamente quanto a seu potencial antitumoral.

Esse composto assemelha-se estruturalmente aos alquil-resorcinóis, substâncias com caráter anfifílico que conseguem adentrar em membranas celulares e interagir com ácidos nucleicos e enzimas, o que confere a esses compostos uma gama de propriedades biológicas como potencial antifúngico e citotóxico, com destaque para os 5-*n*-alquil-resorcinóis como o olivetol (KOZUBEK & TYMAN, 1999; BISKUP et al., 2017).

*4.2.1.3 Identificação da substância **6***



(*S*)-6-hidroxi-2-metil-4-cromanona

Os dados de NMR ^{1}H (Figuras 86-90) para a substância **6** mostraram novamente a presença de três hidrogênios aromáticos H-5 (δ_H 7,16, *d*, *J* = 3,1 Hz), H-7 (δ_H 7,01, *dd*, *J* = 8,9 e 3,1 Hz) e H-8 (δ_H 6,85, *d*, *J* = 8,9 Hz), evidenciando o anel tri-substituído. No espectro de NMR ^{13}C (Figura 91) observou-se a presença de seis carbonos sp^2 correspondentes ao anel aromático e um carbono correspondente a um grupo carbonila C-4 (δ_C 195,1), além de sinais de carbonos sp^3 como o metileno C-3 (δ_C 45,4) e metila C-1' (δ_C 21,2). A posição da cetona foi determinada a partir dos sinais observados no espectro de *g*HMBC (Figura 94), onde temos a correlação de H-2 (δ_H 4,51), H-3 (δ_H 2,63) e H-5 (δ_H 7,16) com C-1' (δ_C 195,1). As correlações de H-3

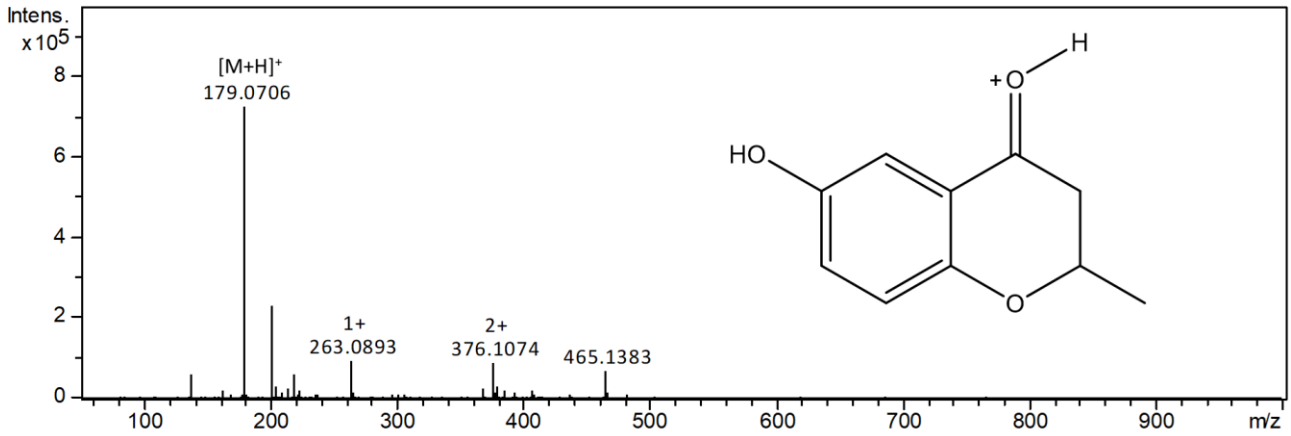
(δ_H 2,63) e H-1' (δ_H 1,46) com C-2 (δ_C 4,51) e o alto valor de deslocamento químico desse carbono mostram a ligação direta desse com um heteroátomo. As demais correlações e deslocamentos químicos estão apresentadas na tabela 8 e os espectros registrados estão nos anexos.

Tabela 8 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância **6**.

	***g*HQSC $^1J_{CH}$**		***g*HMBC $^nJ_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
1	-	-	
2	4,51 *qt* (6,3 e 4,3)	75,7	195,1 (C-4);
3	2,63 *d* (4,3)	45,4	21,2 (C-1'), 75,7 (C-2), 195,1 (C-4);
4	-	195,1	
5	7,16 *d* (3,1)	111,2	125,8 (C-7), 157,1 (C-6), 195,1 (C-4);
6	-	157,1	
7	7,01 *dd* (8,9 e 3,1)	125,8	111,2 (C-5), 157,1 (C-6);
8	6,85 *d* (8,9)	120,0	122,0 (C-10), 125,8 (C-7), 152,7 (C-9), 157,1 (C-6);
9	-	152,7	
10	-	122,0	
1'	1,46 *d* (6,3)	21,2	45,4 (C-3), 75,7 (C-2);

A proposta estrutural apresentada de cadeia fechada com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_3$ foi confirmada a partir da análise do espectro de massas (Figura 25) da substância, onde observou-se um sinal o íon da molécula protonada $[M+H]^+$ em *m/z* 179,0706 (erro de 1,7 ppm).

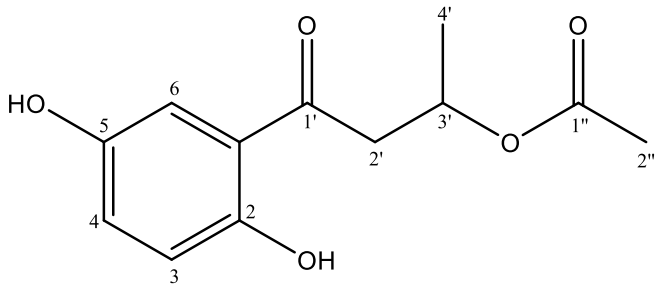
Figura 25 - Espectro de massas da substância **6** confirmando a proposta estrutural apresentada.



Essa substância, conhecida como 6-hidroxi-2-metil-4-cromanona é um metabólito pertencente a classe das cromanonas e um conhecido produto natural do metabolismo de endófitos de plantas e também de endófitos. A estereoquímica do

centro presente na posição 2 foi determinada a partir da análise do espectro de dicroísmo circular, onde obteve-se uma curva de CD com efeito cotton contrário ao presente na literatura para o enantiômero *R* (SAENGCHANTARA et al., 1990). Portanto o composto isolado foi identificado como (*S*)-6-hidroxi-2-metil-4-cromanona.

4.2.1.3 Identificação da substância ***7***



1-(2,5-diidroxifenil)-3'-oxobutan-2"-il acetato

A substância **7** apresentou em seu espectro de NMR ^{1}H (Figuras 95-99) a presença de sinais de hidrogênios aromáticos H-3 (δ_H 6,80, *d*, *J* = 8,9 Hz), H-4 (δ_H 7,02, *dd*, *J* = 8,9 e 2,9 Hz) e H-6 (δ_H 7,23, *d*, *J* = 2,9 Hz), resultando em um anel tri-substituído assim como encontrado para as substâncias anteriores. A partir da análise do espectro de NMR ^{13}C (Figura 100) verifica-se a presença de duas carbonilas, sendo uma do grupo cetona C-1' (δ_C 204,5) e outra de um grupo éster C-1'' (δ_C 172,3), além da presença de um grupo metileno C-2' (δ_C 45,3) e duas metilas com diferentes multiplicidades em C-4' (δ_C 20,3) e C-2'' (δ_C 21,1).

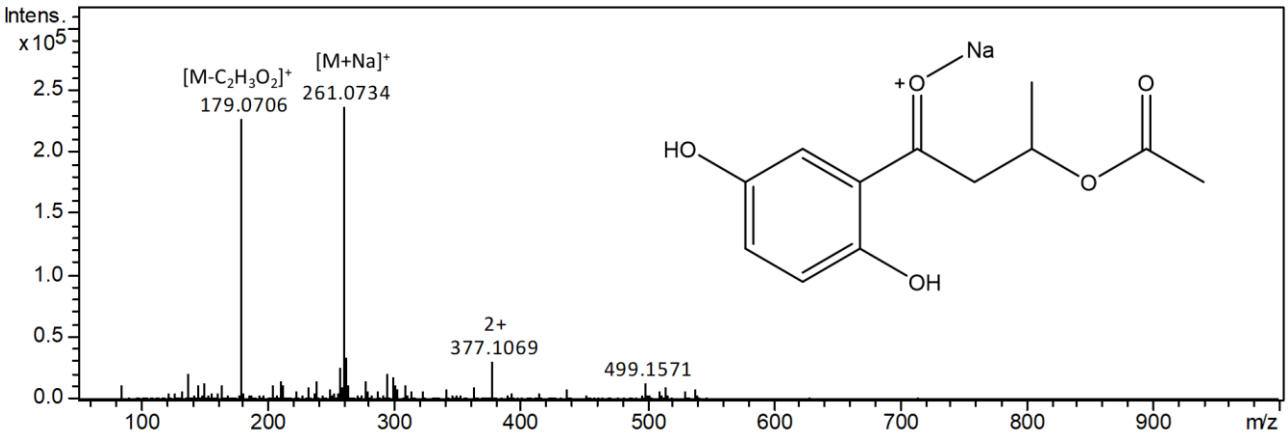
O espectro bidimensional de *g*HSQC (Figura 101) mostrou que os hidrogênios H-2'a (δ_H 3,16) e H-2'b (δ_H 3,40) apresentavam-se como diastereotópicos ligados ao grupo metileno, enquanto que o espectro de *g*HMBC (Figura 102) mostrou sinais que auxiliaram na proposta estrutural apresentada, como a correlação dos hidrogênios H-6 (δ_H 7,23) e H-2' (δ_H 3,16 e 3,40) com a carbonila C-1' (δ_C 204,5) e a correlação do hidrogênio da metila H-2'' (δ_H 1,97) com a carbonila C-1'' (δ_C 172,3), de modo que a presença dessa metila diretamente ligada ao grupo éster explica o sinal apresentado como simpleto. As demais correlações observadas estão expressas na tabela 9 e os espectros presentes nos anexos.

Tabela 9 - Dados de deslocamento químico e correlações observadas para a substância **7**.

	***g*HQSC $^{1}J_{CH}$**		***g*HMBC $^{n}J_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^{2}J_{CH}$ e $^{3}J_{CH}$
1	-	120,7	
2	-	156,6	
3	6,80 *d* (8,9)	119,7	150,7 (C-5), 156,6 (C-2);
4	7,02 *dd* (8,9 e 2,9)	126,0	115,7 (C-6), 150,7 (C-5), 156,6 (C-2);
5	-	150,7	
6	7,23 *d* (2,9)	115,7	126,0 (C-4), 150,7 (C-5), 156,6 (C-2), 204,5 (C-1');
1'	-	204,5	
2'a	3,16 *dd* (16,7 e 5,0)	45,3	204,5 (C-1');
2'b	3,40 *dd* (16,7 e 7,6)		20,3 (C-4'), 68,6 (C-3'), 204,5 (C-1');
3'	5,43 *dqd* (7,6, 6,3 e 5,0)	68,6	45,3 (C-2'), 172,3 (C-1''), 204,5 (C-1');
4'	1,34 *d* (6,3)	20,3	45,3 (C-2'), 68,6 (C-3');
1''	-	172,3	
2''	1,97 *s*	21,1	172,3 (C-1''');

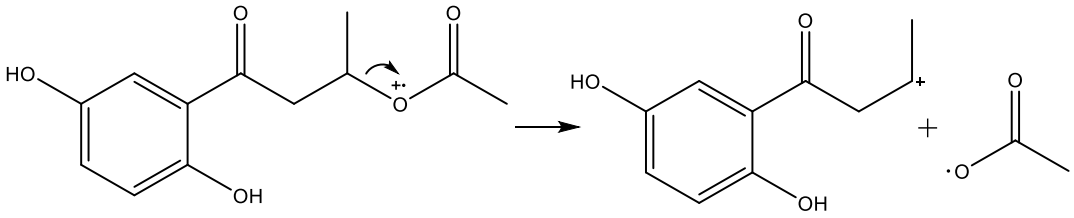
A proposta estrutural de fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_5$ foi confirmada pela presença no espectro de massas de um sinal correspondente ao íon da molécula cationizada $[M+Na]^+$ em *m/z* 216,0734 (erro de 0,46 ppm) (Figura 26).

Figura 26 - Espectro de massas da substância **7** confirmando a proposta estrutural apresentada.



O segundo sinal de maior intensidade no espectro de massas corresponde a uma segmentação indutiva no átomo de oxigênio do grupo éster, resultando no íon $[M-C_2H_3O_2]^+$ em *m/z* 179,0706 (erro de 1,68 ppm) (Figura 27).

Figura 27 - Proposta para a fragmentação do íon molecular da substância **7**.

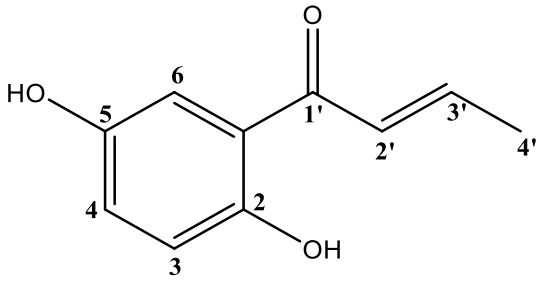


$C_{12}H_{14}O_5$
m/z: 238,0836

$C_{10}H_{11}O_3^+$
m/z: 179,0703

Essa substância, conhecida como 1'-(2,5-diidroxifenil)-1'-oxobutan-3'-il acetato está sendo apresentada pela primeira vez na literatura.

*4.2.1.3 Identificação da substância **8***



(*E*)-1-(2,5-diidroxifenil)but-2'-en-1'-ona

A substância **8** apresentou no espectro de NMR ^{1}H (Figuras 103-105) sinais de hidrogênios aromáticos em H-3 (δ_H 6,80, *d*, *J* = 8,9 Hz), H-4 (δ_H 7,01, *dd*, *J* = 8,9 e 2,9 Hz) e H-6 (δ_H 7,27, *d*, *J* = 2,9 Hz) assim como as substâncias anteriores. Na mesma região de hidrogênios aromáticos é possível verificar a presença de sinais correspondentes a hidrogênios vinílicos H-2' (δ_H 7,11, *dd*, *J* = 15,0 e 1,3) e H-3' (δ_H 7,18, *dq*, *J* = 15,0 e 6,6), sendo essa dupla ligação estabelecida com configuração relativa *E* devido as constantes de acoplamento.

No espectro de NMR ^{13}C (Figura 106) temos sinais de carbonos sp^2 aromáticos, carbonos de dupla ligação C-2' (δ_C 147,0) e C-3' (δ_C 126,9), a presença de uma carbonila de cetona C-1' (δ_C 195,2) e de uma metila C-4' (δ_C 18,7). A análise dos espectros bidimensionais de *g*HSQC (Figura 107) e *g*HMBC (Figura 108) permitiram verificar a correlação de H-6 (δ_H 7,27), H-2' (δ_H 7,11) e H-3' (δ_H 7,18) com a carbonila C-1' (δ_C 195,2), indicando que essa carbonila faz parte de um sistema conjugado que permite aos hidrogênios vinílicos possuírem um alto valor de deslocamento químico. Também é observada a correlação do hidrogênio H-4' (δ_H 2,03) com C-3' (δ_C 126,9) e C-2' (δ_C 147,0), auxiliando no posicionamento do grupo metila. As demais correlações

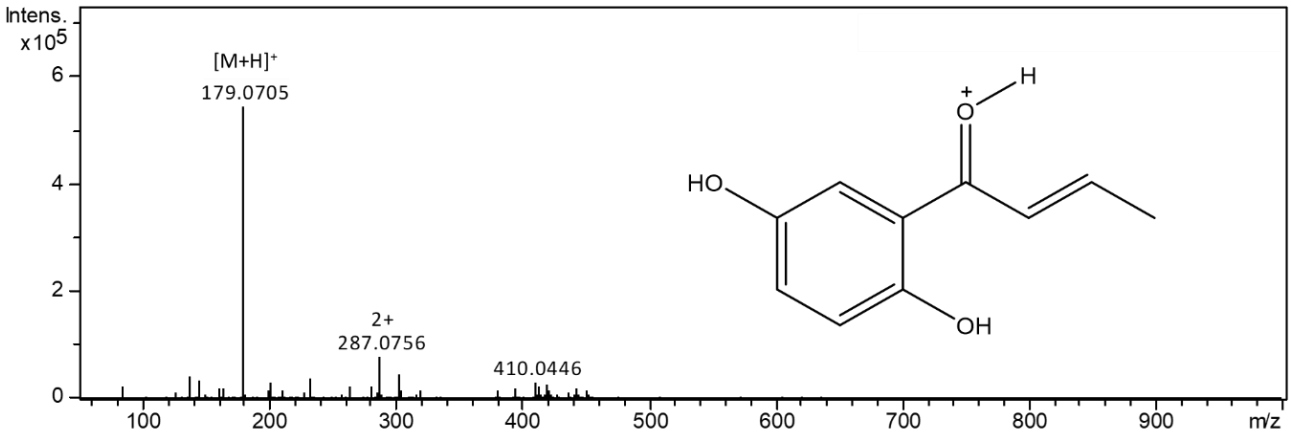
observadas para essa cetona α,β-insaturada estão apresentadas na tabela 10 e os espectros apresentam-se nos anexos.

Tabela 10 - Dados de deslocamento químico e correlações observadas para a substância **8**.

	***g*HQSC $^{1}J_{CH}$**		***g*HMBC $^{n}J_{CH}$**
Posição	δ_H *m* (*J* em Hz)	δ_C	$^{2}J_{CH}$ e $^{3}J_{CH}$
1	-	120,6	
2	-	157,6	
3	6,80 *d* (8,9)	119,6	120,6 (C-1), 150,6 (C-5);
4	7,01 *dd* (8,9 e 2,9)	125,7	115,5 (C-6), 157,6 (C-2);
5	-	150,6	
6	7,27 *d* (2,9)	115,5	125,7 (C-4), 150,6 (C-5), 157,6 (C-2), 195,2 (C-1');
1'	-	195,2	
2'	7,11 *dd* (15,0 e 1,3)	147,0	18,7 (C-4'), 126,9 (C-3'), 195,2 (C-1');
3'	7,18 *dq* (15,0 e 6,6)	126,9	18,7 (C-4'), 147,0 (C-2'), 195,2 (C-1');
4'	2,03 *dd* (6,6 e 1,3)	18,7	126,9 (C-3'), 147,0 (C-2')

A proposta estrutural com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_3$ foi confirmada a partir da análise do espectro de massas da substância 8 (Figura 28), onde podemos observar o íon correspondente ao sinal $[M+H]^+$ com *m/z* 179,0705 (erro de 1,1 ppm).

Figura 28 - Espectro de massas da substância 8 confirmando a proposta estrutural apresentada.

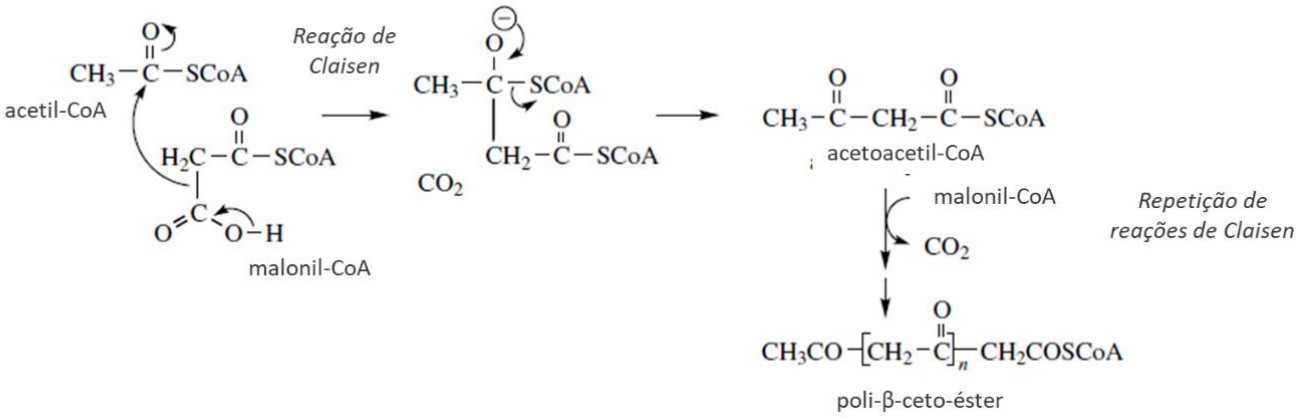


Essa substância, conhecida como (*E*)-1-(2,5-diidroxifenil)but-2'-em-1'-ona, foi anteriormente identificada como produto natural de *M. arundinis* por Sommart e colaboradores (2012).

4.3 Análise biossintética dos metabólitos

De acordo com Dewick (2002), a biossíntese de derivados de ácidos graxos, macrolídeos e policetídeos ocorre a partir da via do acetato. A biossíntese começa com reações de Claisen entre uma molécula de acetil-CoA e moléculas de malonil-CoA, resultando na produção de poli-β-ceto ésteres (Figura 29).

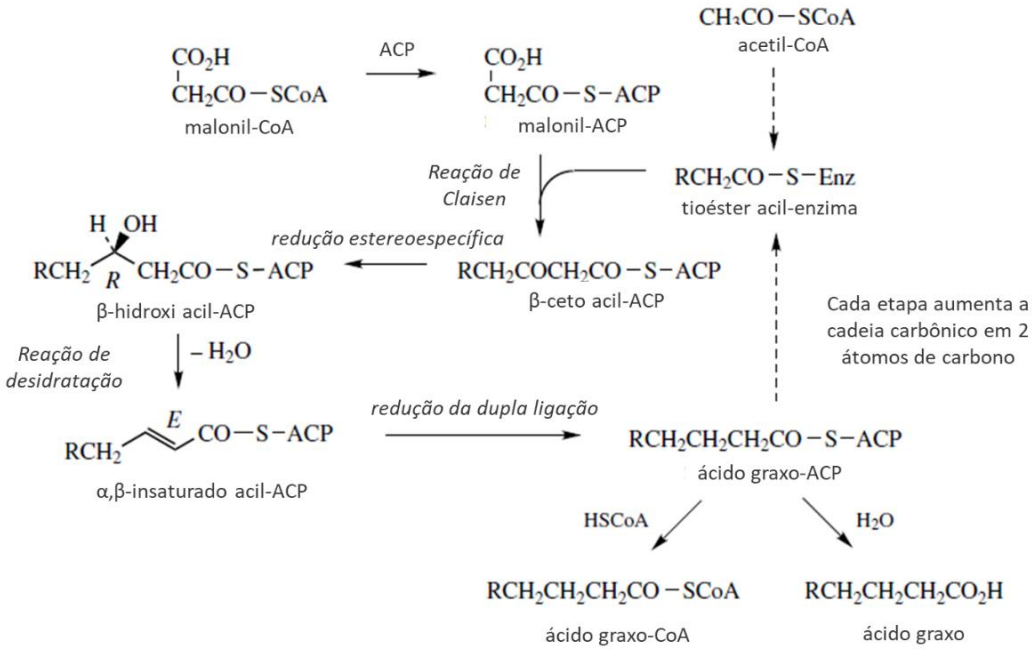
Figura 29 – Primeira etapa da biossíntese pela via do acetato. Fonte: DEWICK, 2012.



4.3.1 Síntese de derivados do ácido decanóico

Para a produção de ácidos graxos, os produtos iniciais são convertidos através de reações enzimáticas. Temos que o malonil-CoA é convertido para malonil-ACP e que o acetil-CoA forma um complexo enzimático. Após a reação de condensação de Claisen há a produção de um β-ceto acil-ACP, sendo que esse pode sofrer uma redução estereoespecífica e produzir o β-hidroxi acil-ACP com a presença de um centro estereogênico. A desidratação desse composto leva a produção de uma ligação dupla e a redução dessa a formação do ácido graxo (Figura 30).

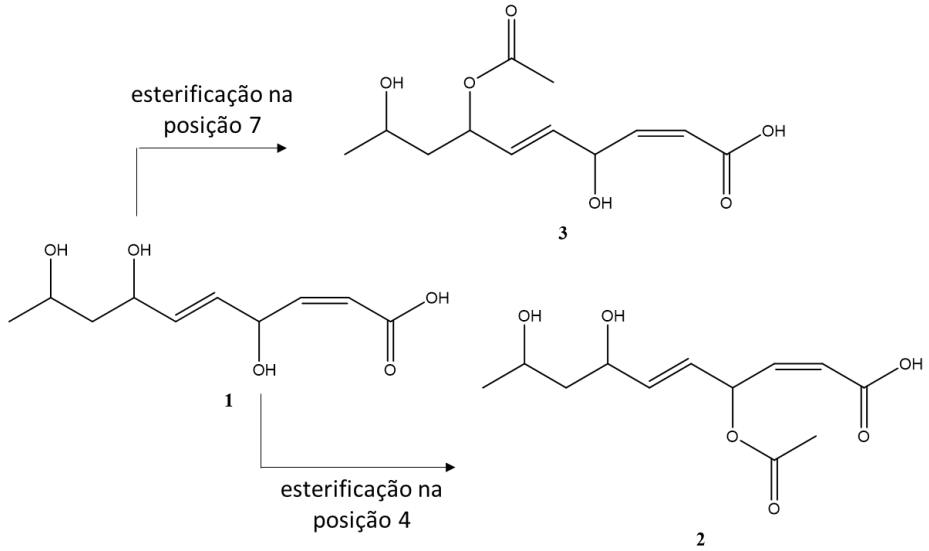
Figura 30 - Esquema para a biossíntese de ácidos graxos. Fonte: DEWICK, 2012.



As insaturações em ácidos graxos são obtidas através da ação de enzimas específicas nas cadeias saturadas, principalmente nas posições ω-3, ω-6 e ω-9. Além disso, verifica-se que essas ligações duplas não são conjugadas, sendo separadas por um átomo de carbono. Essas também podem realizar reações de desidratação para a formação de ligações duplas, reações de oxidação e de redução espcíficas.

As estruturas isoladas nesse trabalho podem ser produzidas através da ação de enzimas específicas a partir do ácido decanóico, sendo que essas enzimas produzem as insaturações nas posições 2 e 5 enquanto outras permitem a esterificação das hidroxilas (posições 4 e 7) da substância **1**, resultando na produção das substâncias **2** e **3** (Figura 31).

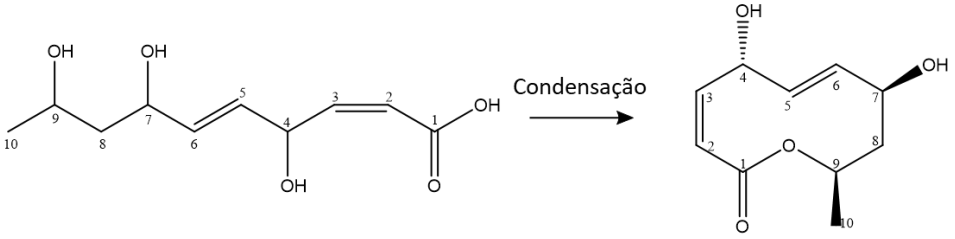
Figura 31 - Proposta de biossíntese para os derivados do ácido decanóico isolados. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.



4.3.1 Síntese das demais substâncias

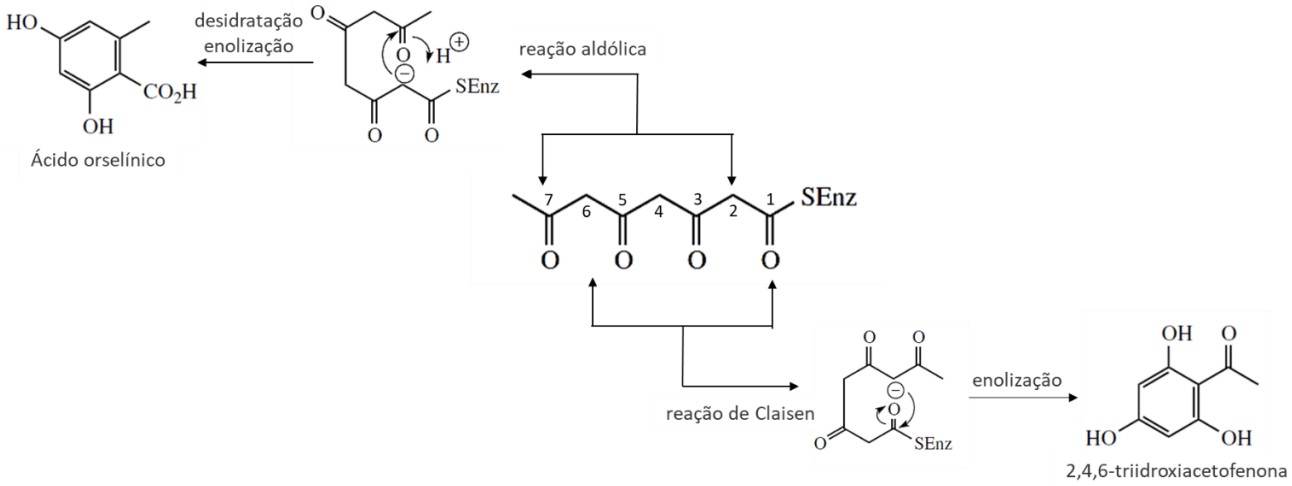
As demais substâncias isoladas e identificadas nesse trabalho apresentam correlação biossintética com os ácidos decanóicos obtidos. A modiolida A (**4**) apresenta-se como uma macrolídeo, uma classe de compostos obtida pela via do acetato a partir de moléculas de acetil-CoA e de malonil-CoA com o auxílio de enzimas policetídeo-sintases. No caso dessa estrutura, podemos descrevê-la a partir do composto **1**, onde uma reação de condensação intramolecular da hidroxila da posição 9 com a carboxila em 1 resulta na modiolida A.

Figura 32 - Proposta para a biossíntese da substância 4. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.



A produção de policetídeos aromáticos leva em conta a reatividade da cadeia do poli-β-ceto éster devido a presença de hidrogênios ácidos entre duas carbonilas, o que resulta em uma grande capacidade de ocorrerem reações de condensação aldólica intramolecular, reações de enolização e hidrólise. Essas reações ocorrem com o auxílio das enzimas policetídeo ciclase e policetídeo sintase e resultam na produção de derivados do ácido orselínico e da 2,4,6-triidroxiacetofenona (Figura 33).

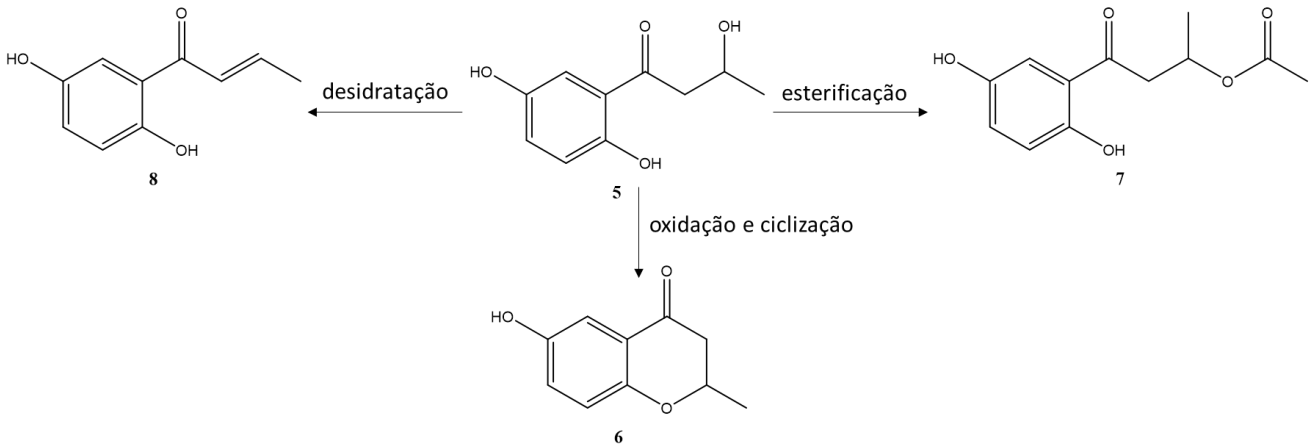
Figura 33 - Produção de ácido orselínico ou floracetofenona a partir do poli-β-ceto éster. Fonte: DEWICK, 2012.



A principal diferença entre os policetídeos isolados e as substâncias produzidas pela via do acetato é o padrão de oxigenação no anel aromático que ocorre nas posições 2 e 5 do anel para as substâncias isoladas do fungo.

Podemos estabelecer uma correlação entre os metabólitos encontrados admitindo-se que o composto **5** é produzido a partir dos mesmos precursores do composto **1**, uma molécula de acetil-CoA e quatro moléculas de malonil-CoA, onde após reações de condensação de Claisen e enolização promovidas por enzimas policetídeo-sintase temos a produção de um policetídeo aromático. Essa substância **5** sofre a ação de enzimas específicas e a partir de reações de oxidação e ciclização temos a produção da substância **6**, enquanto que uma esterificação resulta na substância **7** e uma desidratação do grupo hidroxila resulta na substância **8** (Figura 34).

Figura 34 - Proposta de biossíntese para os policetídeos isolados. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.

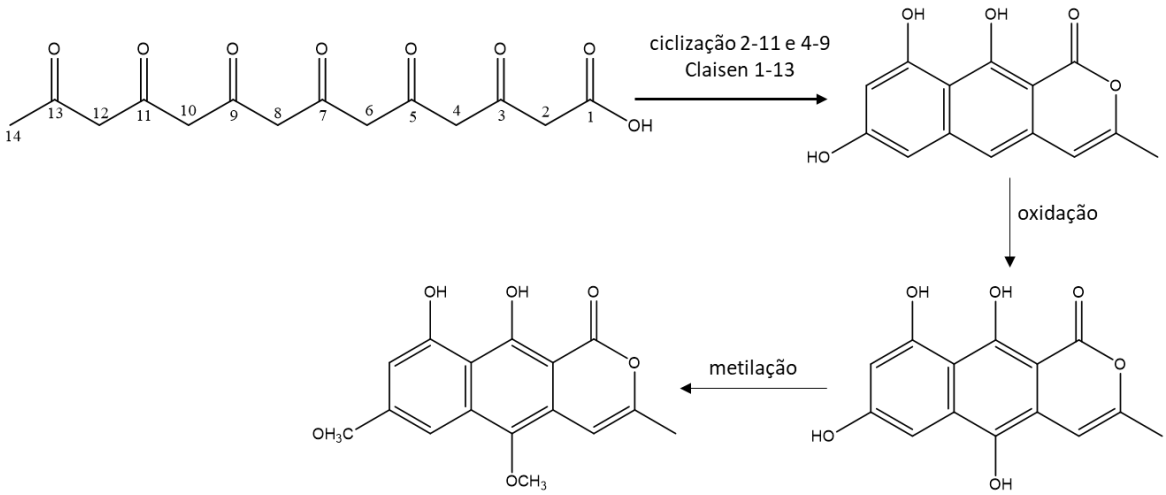


Verificamos, portanto, que a utilização da via do acetato nos fornece propostas biossintéticas para a obtenção de todas as substâncias descritas nesse trabalho, sendo a principal via utilizada pelo endófito *M. arundinis*.

Essa via biossintética também está presente no hospedeiro. Estudos na literatura demonstram que espécies do gênero *Paepalanthus* possuem a presença de naftopiranonas e seus derivados, sendo essas substâncias provenientes da via do acetato e com potencial citotóxico (KITAGAWA et al., 2004). Além disso, as classes de compostos majoritariamente encontradas nas plantas também apresentam semelhanças com a via do acetato. Os flavonoides são biossintetizados a partir de uma via mista do acetato-shiquimato, sendo produzidos a partir de unidades de cinamoil-CoA e malonil-CoA (DEWICK, 2012).

Do mesmo modo, as naftopiranonas encontradas nas plantas hospedeiras possuem sua biossíntese proveniente de unidades de acetato e compartilham muitas enzimas utilizadas na síntese de policetídeos (DONNER, 2015). A proposta de biossíntese apresentada por Santos (2001) demonstra a formação de naftopiranonas a partir de sete unidades de acetato (Figura 35).

Figura 35 – Esquema de biossíntese simplificado das naftopiranonas a partir da condensação de unidades de acetato. Fonte: SANTOS, 2001.



Podemos, portanto, tentar estabelecer uma correlação entre as vias ativas nos endófitos e nas plantas e estimar que a colaboração simbiótica também favoreça a produção dessas classes de compostos nas plantas.

5 CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho foi possível avaliar a variabilidade do cultivo do fungo *Microsphaeropsis arundinis* em diferentes meios, onde verificou-se a partir do perfil cromatográfico as diferenças nas quantidades e nos tipos de metabólitos produzidos. Os extratos acetato de etila obtidos foram também avaliados quanto a seu potencial antitumoral, o que demonstrou que o endófito cultivado em arroz parboilizado produz os metabólitos mais ativos, principalmente contra as linhagens de câncer de mama murino (IC_{50} = 39,91 µg mL^{-1}) e humano (IC_{50} = 51,93 µg mL^{-1}).

O extrato mais ativo foi fracionado cromatograficamente e obteve-se oito substâncias, dentre as quais três derivados do ácido decanóico inéditos na literatura (**1**-**3**), dois policetídeos descritos pela primeira vez (**5** e **7**) e três substâncias já conhecidas como produtos naturais de endófitos (**4**, **6** e **8**). Uma análise das classes de compostos isoladas demonstra que esses metabólitos são provenientes da via do acetato, sendo essa a principal rota biossintética para o endófito dentre o extrato estudado.

6 REFERÊNCIAS

AMORIM, M. R.; HILÁRIO, F.; SANO, P. T.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Antimicrobial activity of *Paepalanthus planifolius* and its Major Components against Selected Human Pathogens. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 766-774, 2018.

AMORIM, M. R.; SOMENSI, A.; ARAUJO, A. R.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. D. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an Endophytic Fungus Isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1048–1054, 2016.

ANDRADE, M. J. G. D.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; VAN DEN BERG, C. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus* : Morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178–184, 2011.

BISKUP, I.; ZACZYNSKA, E.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; FECKA, I. Evaluation of cytotoxicity of 5-n-alkylresorcinol homologs and fraction on mouse fibroblast cell line L929. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 7, p. 1137–1148, 2017.

CESTARI, S. H.; BASTOS, J. K.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of baccharis dracunculifolia in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2009.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade - Cadeia do Espinhaço: avaliação do conhecimento científico e prioridades de conservação**, v. 4, n. 1–2, p. 91–99, 2008.

CRAWFORD, S. J.; CHEN, S. C.-A.; HALLIDAY, C.; RANGAN, G. K.; GOTTLIEB, T.; REID, A. B. *Microsphaeropsis arundinis* skin and soft tissue infection in renal transplant recipients: three case reports and a review of the literature. **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, n. 1, p. 915–921, 2015.

DAMASCENO, J. P. L.; GIUBERTI, C. DOS S.; GONÇALVES, R. DE C. R.; KITAGAWA, R. R. Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 395–400, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2002. Cap. 3-4, p. 35-151.

DONNER, C. D. Naphthopyranones – isolation, bioactivity, biosynthesis and synthesis. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 4, p. 578–604, 2015.

FUNABASHI, Y.; HORIGUCHI, T.; TANIDA, S.; HARADA, S.; IINUMA, S. the Relationship of Their Functional Groups and Biological Activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1202–1218, 1994.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N.; PARRA, L. R.; DE ANDRADE, M. J. G.; VAN DEN BERG, C.; HARLEY, R. M. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50–56, 2012.

GUNATILAKA, L. A. A. Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509–526, 2006.

HILL, R. A. Naturally occurring isocumarins. **Fortschritte der Chemie Organischer**, v. 49, n. 1, p. 1-78, 1986.

IKECHI–NWOGU, C. G. Comparative Evaluation of Growth Media for the Cultivation of Fungal Cultures. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 3–6, 2012.

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

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C. DOS; VILEGAS, W. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1487–8, 2004.

KITAGAWA, R. R.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G. Evaluation of mutagenicity and metabolism-mediated cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin from *Paepalanthus latipes*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 1, p. 16–21, 2015.

KLUGER, E. K.; DELLA TORRE, P. K.; MARTIN, P.; KROCKENBERGER, M. B.; MALIK, R. Concurrent *Fusarium chlamydosporum* and *Microsphaeropsis arundinis* infections in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 4, p. 271–277, 2004.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 1, p. 1–26, 1999.

LUO, J.; LIU, X.; LI, E.; GUO, L.; CHE, Y. Arundinols A-C and arundinones A and B from the plant endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 1, p. 107–112, 2013.

MOREIRA, A. A. N.; CAMELIER, C. Relevo. In: GALVÃO, M. G. **Geografia do Brasil, Região Sudeste**. Editora: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1977. p. 1-50.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

REKHA, K. J.; BALA, M.; ARYA, V. Endophytic fungus : a potential source of biologically synthesized nanoparticle. **Basic Research Joural of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2013.

SAENGCHANTARA, S. T.; WALLACE, T. W.; SALFORD, M. Conjugate Addition t 3-(p-tolylsulphinyl)chromone: A route to 2-substitued chromones and chiral 2-substituted chroman-4-ones. **Tetrahedron**, v. 46, n. 18, p. 6553–6564, 1990.

SANO, P. T.; COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; ECHTERNACHT, L. *Paepalanthus magistrae* (Eriocaulaceae), a remarkable new species in honor of Ana Maria Giulietti-Harley. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 299–303, 2015.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; ALBERT, K.; DACHTLER, M.; VILEGAS, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 122–124, 2001.

SANTOS, L. C. **Estudo químico de plantas de Eriocaulaceae**. 187 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SCARIOT, A. Ethnobotany and Effects of Harvesting on the Population Ecology of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), a NTFP from Jalapão Region, Central Brazil. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 73–85, 2007.

SEEPHONKAI, P.; ISAKA, M.; KITTAKOOP, P.; PALITTAPONGARNPIM, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 45–48, 2002.

SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TADPETCH, K.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; SAKAYAROJ, J. Modiolin and phthalide derivatives from the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18. **Tetrahedron**, v. 68, n. 48, p. 10005–10010, 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 67, n. 4, p. 491–402, 2003.

TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section Diphyomene (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, n. 1, p. 49–55, 2010.

TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Modiolides A and B, two new 10-membered macrolides from a marine-derived fungus. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 412–415, 2003.

VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DE LUZ DIAS, F.; ARAÚJO, M. C. P.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85–95, 1997.

VARANDA, E. A.; VARELLA, S. D.; RAMPAZO, R. A.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: A naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 664–668, 2006.

YOGANATHAN, K.; CAO, S.; CRASTA, S. C.; AITIPAMULA, S.; WHITTON, S. R.; NG, S.; BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. Microsphaerins A-D, four novel benzophenone dimers with activity against MRSA from the fungus *Microsphaeropsis* sp. **Tetrahedron**, v. 64, n. 44, p. 10181–10187, 2008.

ANEXOS

Substância **1**

Figura 36 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **1**.

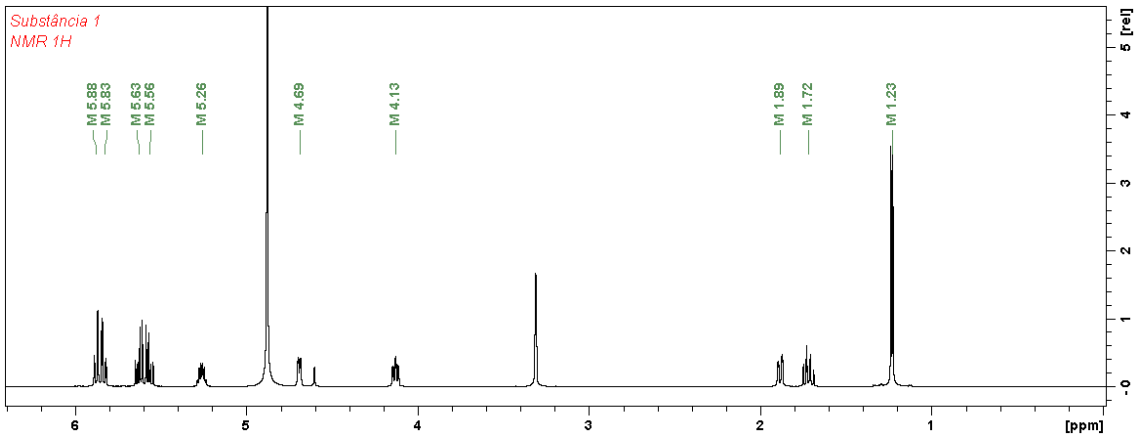


Figura 37 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **1** (expansão da região de δ_H 1,16-1,28 ppm).

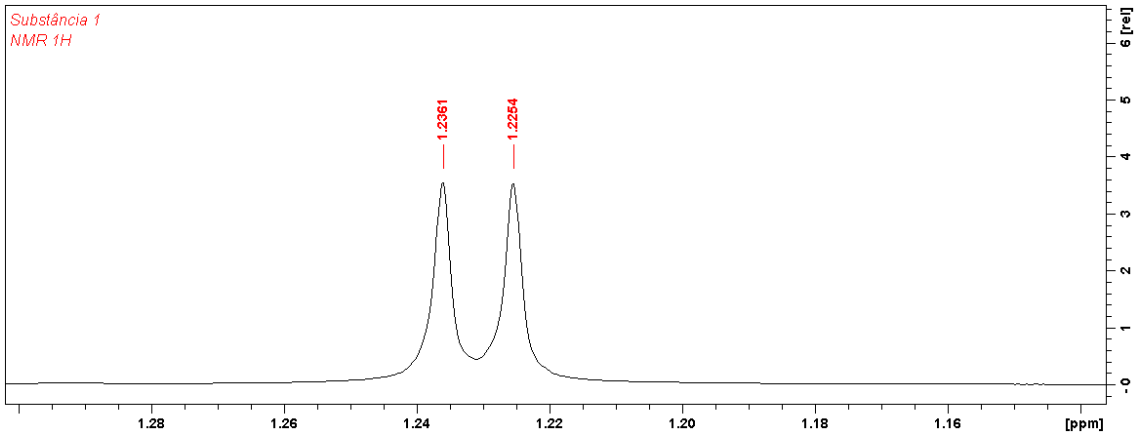


Figura 38 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **1** (expansão da região de δ_H 1,60-2,00 ppm).

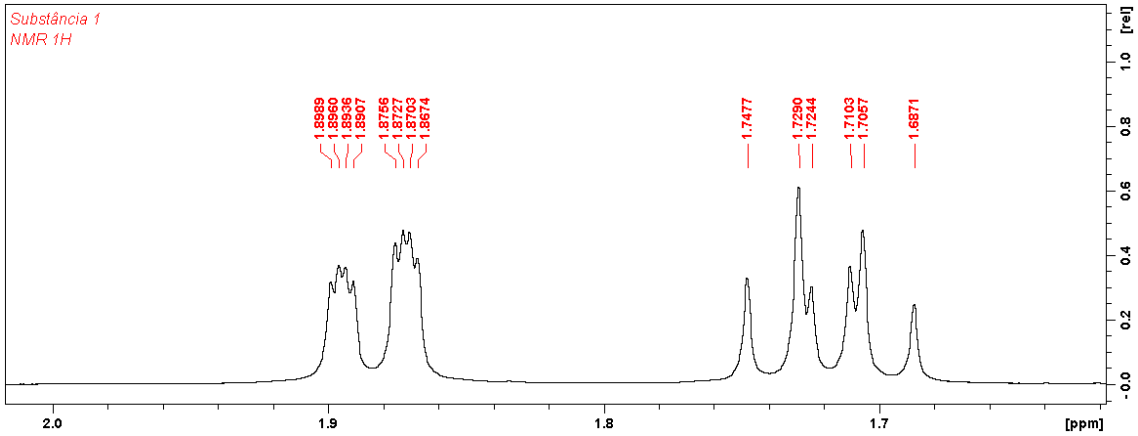


Figura 39 – Espectro de NMR ^{1}H da substância **1** (expansão da região de δ_H 4,00-4,80 ppm).

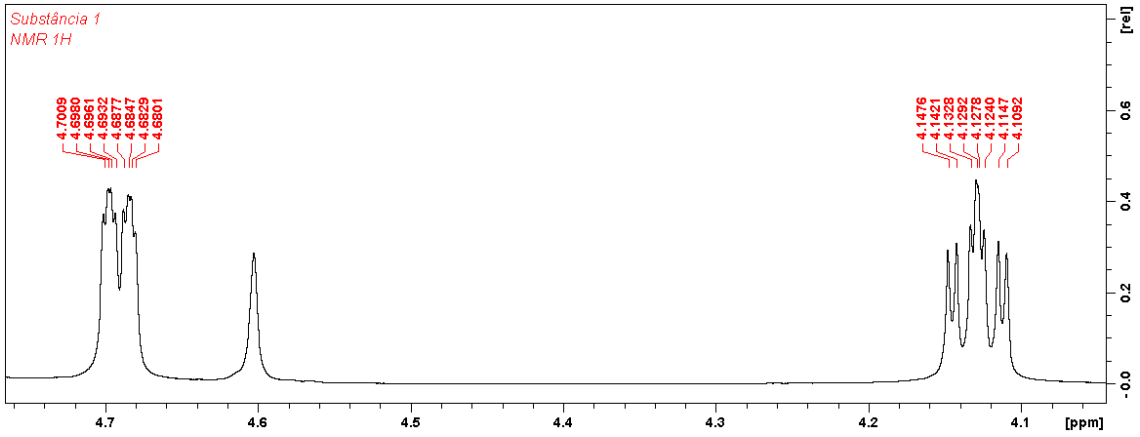


Figura 40 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **1** (expansão da região de δ_H 5,20-6,00 ppm).

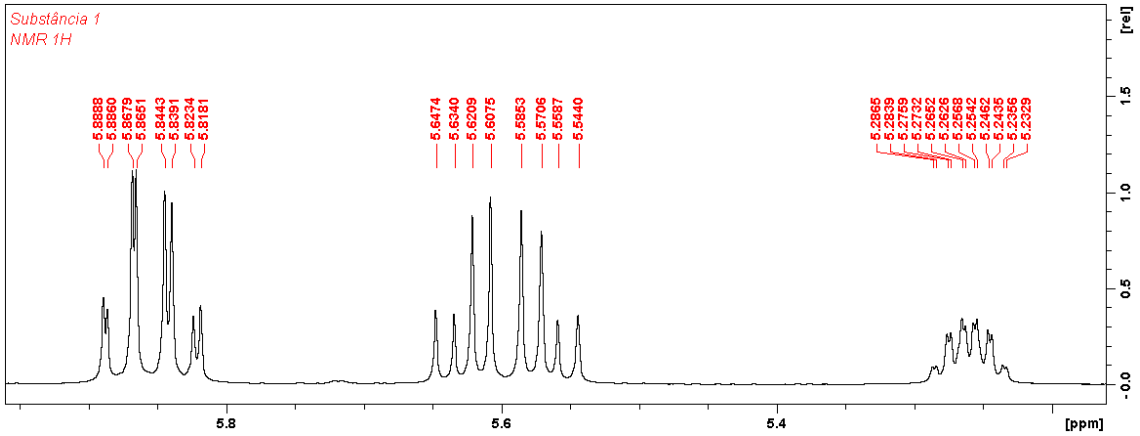


Figura 41 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **1**.

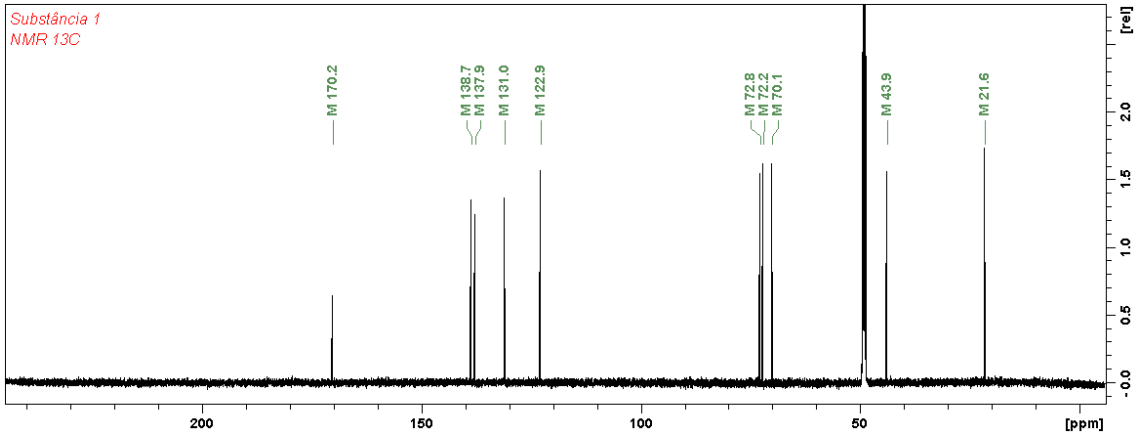


Figura 42 - Espectro de DEPT-135 da substância **1**.

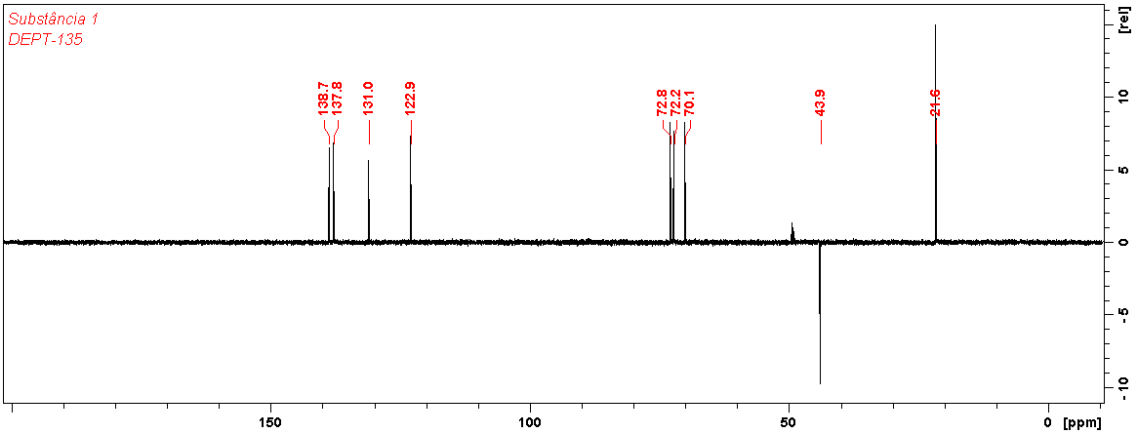


Figura 43 - Espectro de COSY da substância **1**.

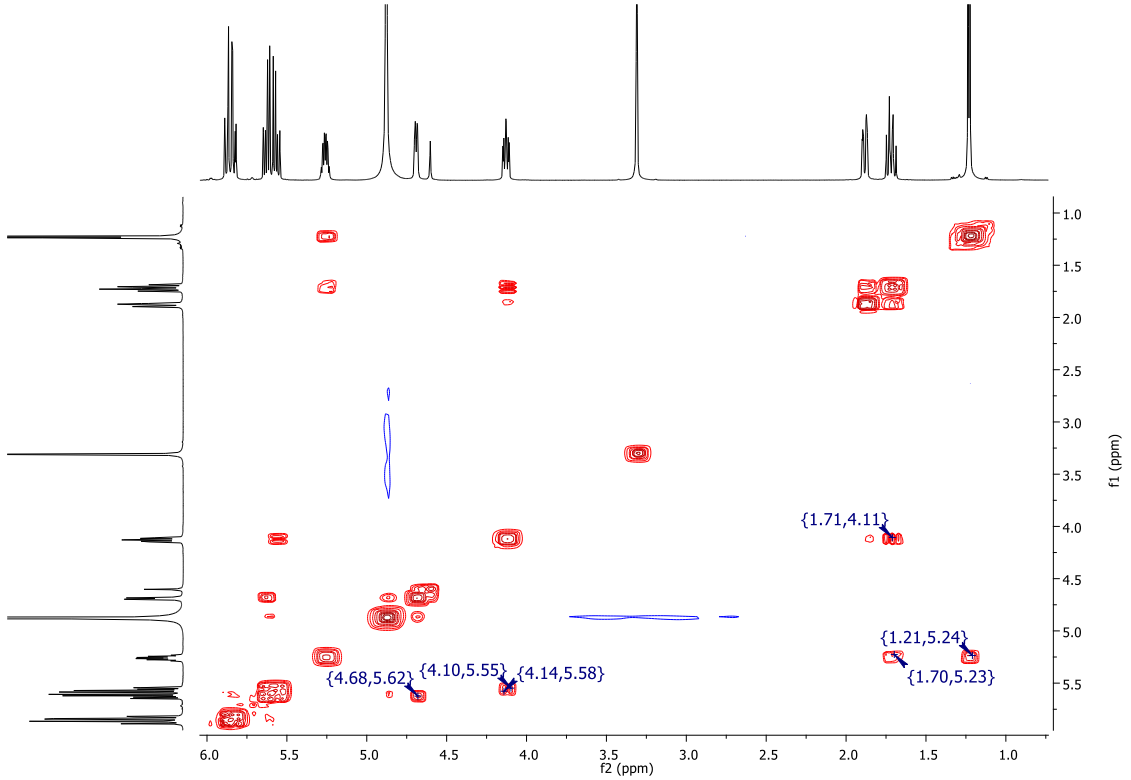


Figura 44 - Espectro de *g*HSQC da substância **1**.

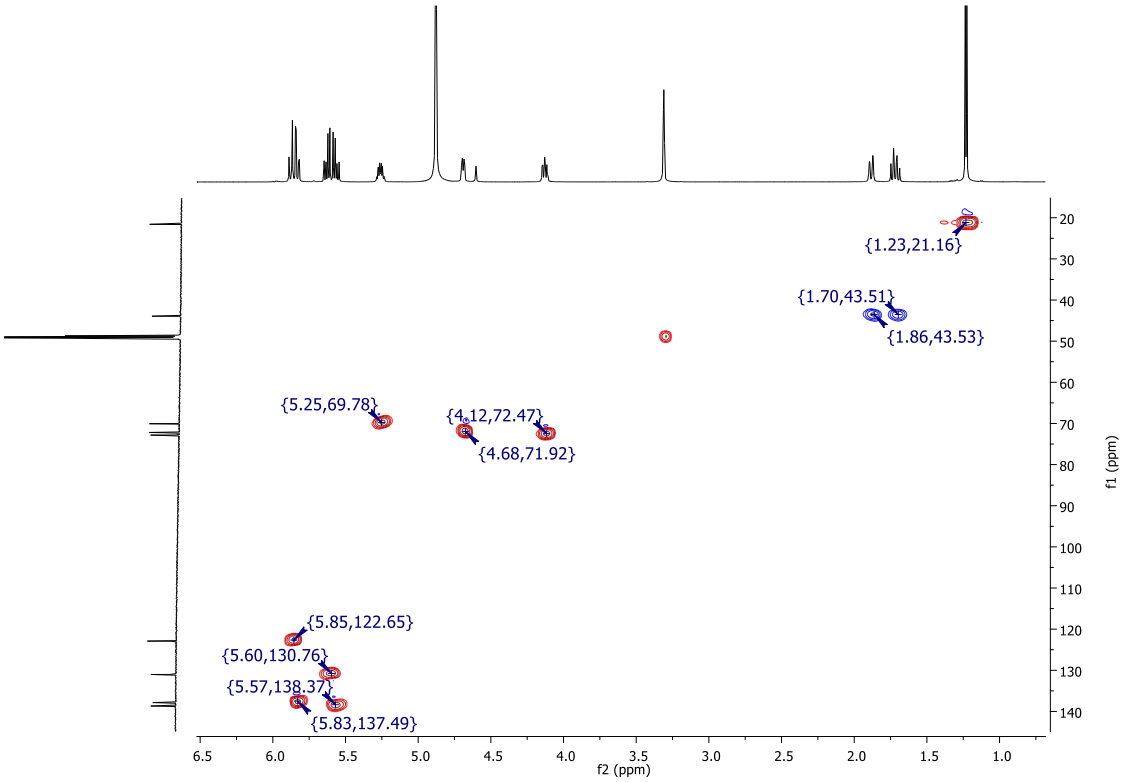
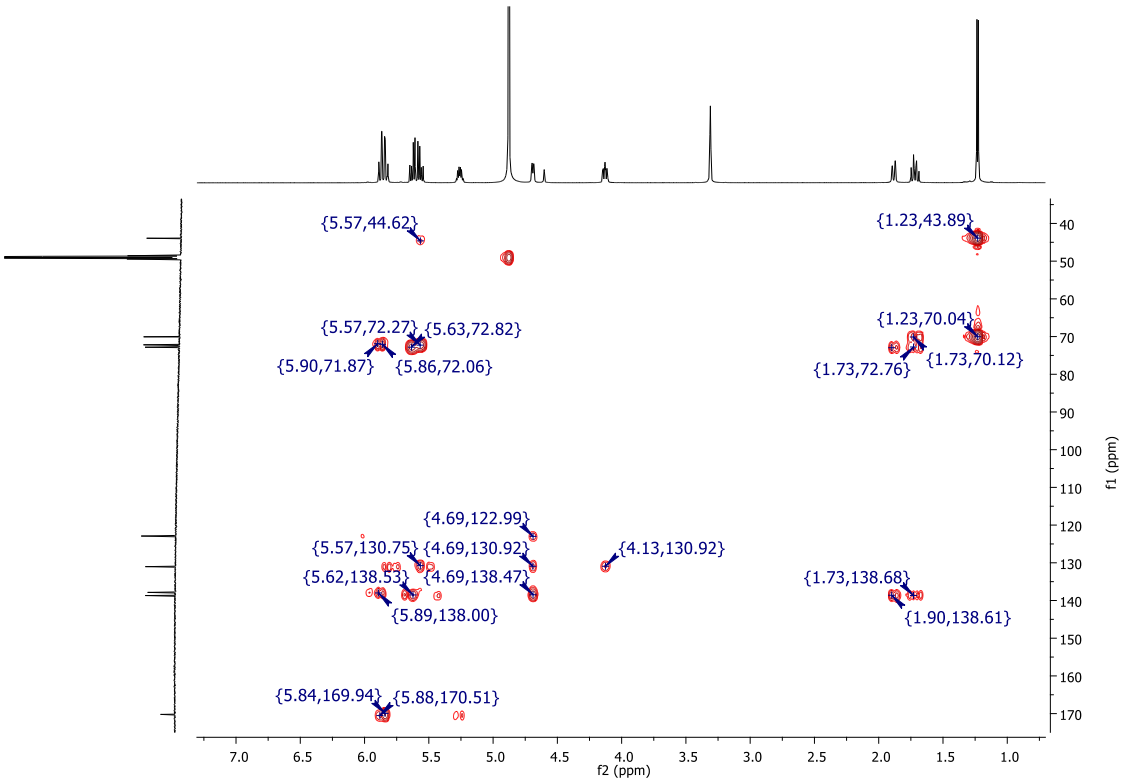


Figura 45 - Espectro de *g*HMBC da substância **1**.



Substância **2**

Figura 46 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **2**.

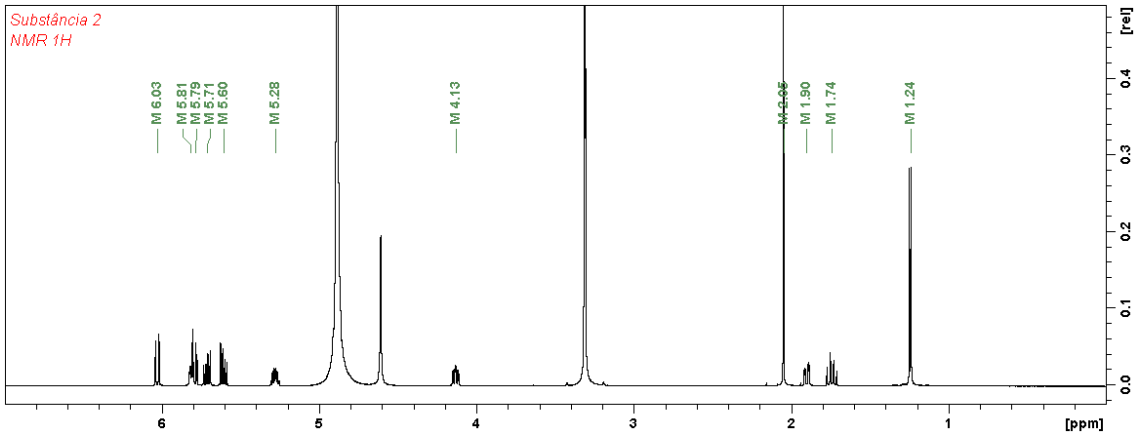


Figura 47 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **2** (expansão da região de δ_H 1,20-1,28 ppm).

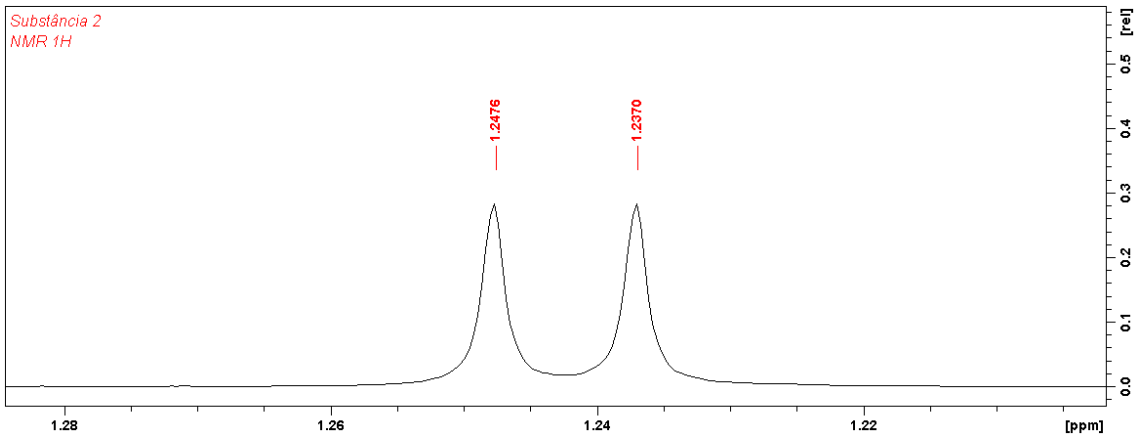


Figura 48 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **2** (expansão da região de δ_H 1,70-2,10 ppm).

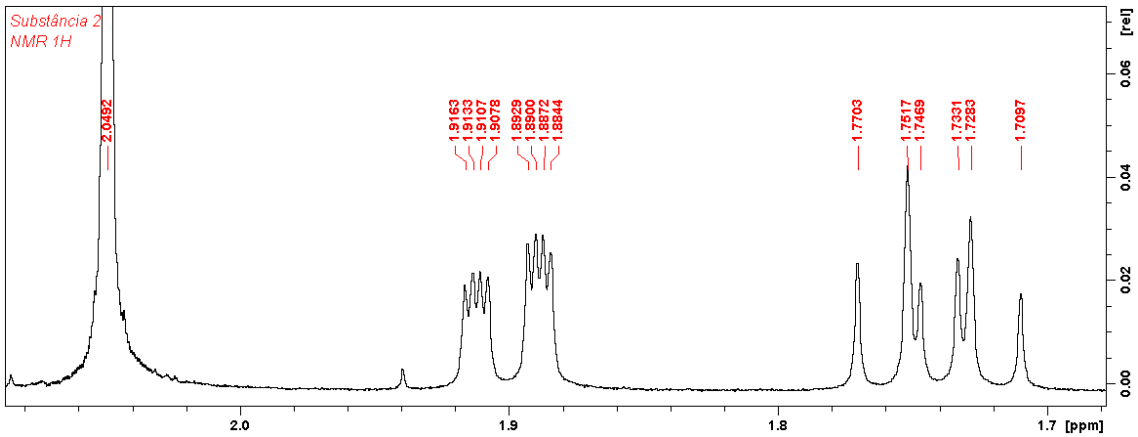


Figura 49 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **2** (expansão da região de δ_H 5,20-5,80 ppm).

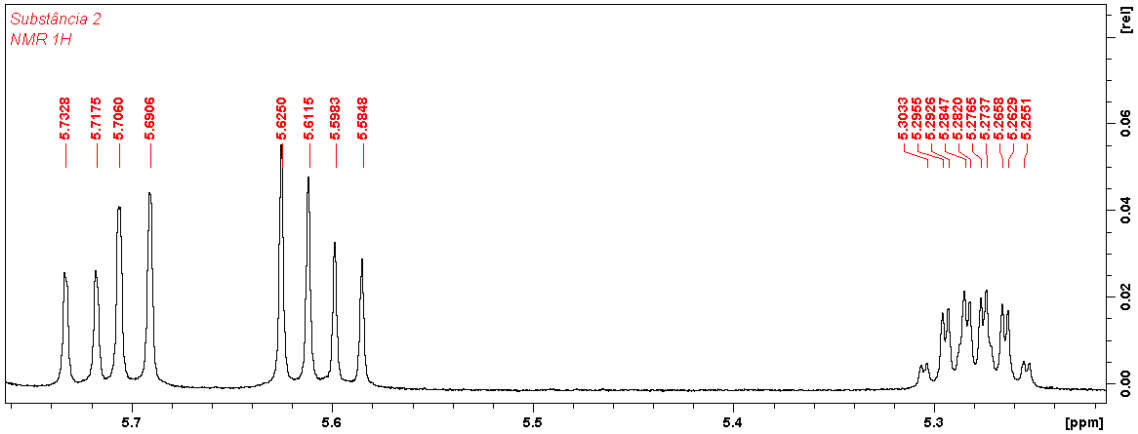


Figura 50 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **2** (expansão da região de δ_H 5,75-6,10 ppm).

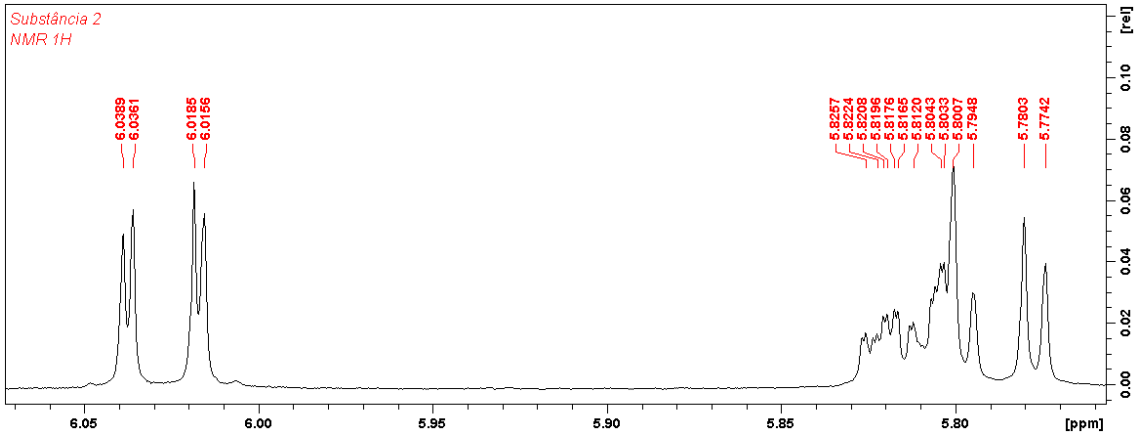


Figura 51 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **2**.

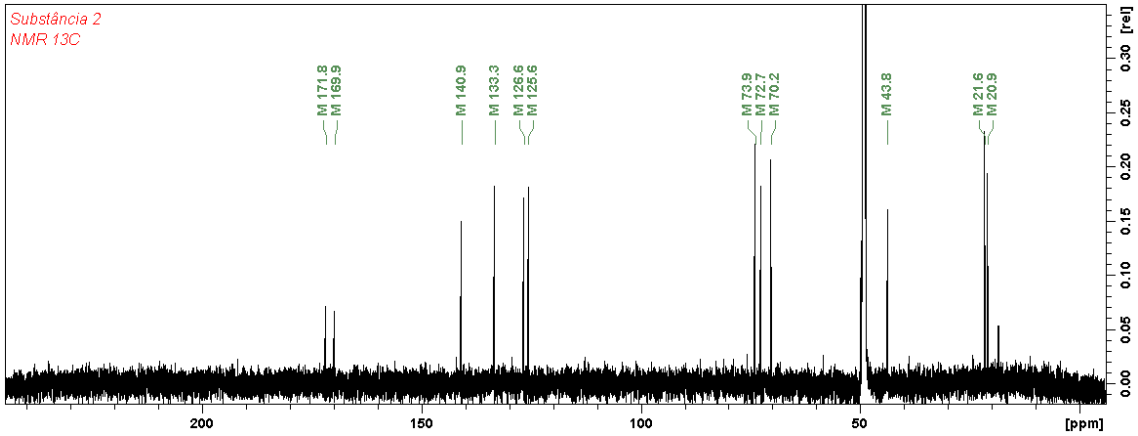


Figura 52 - Espectro de DEPT-135 da substância **2**.

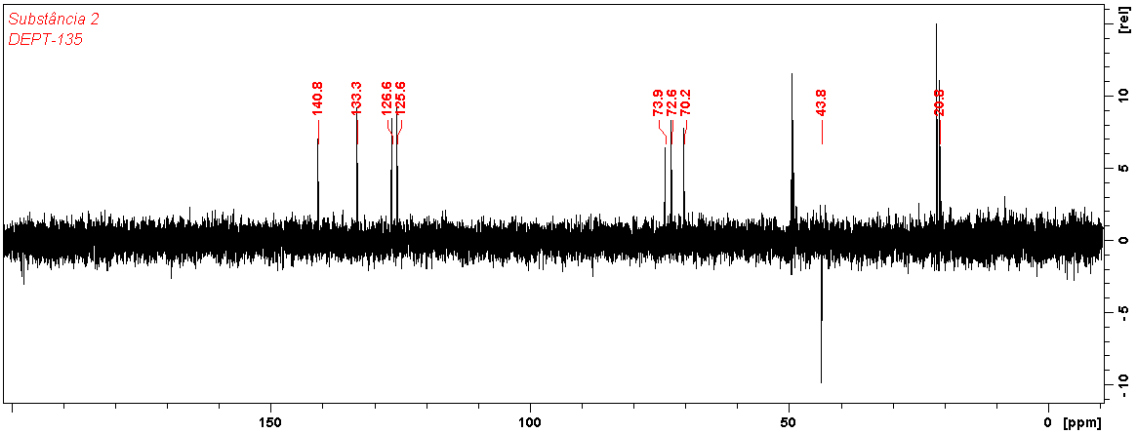


Figura 53 - Espectro de COSY da substância **2**.

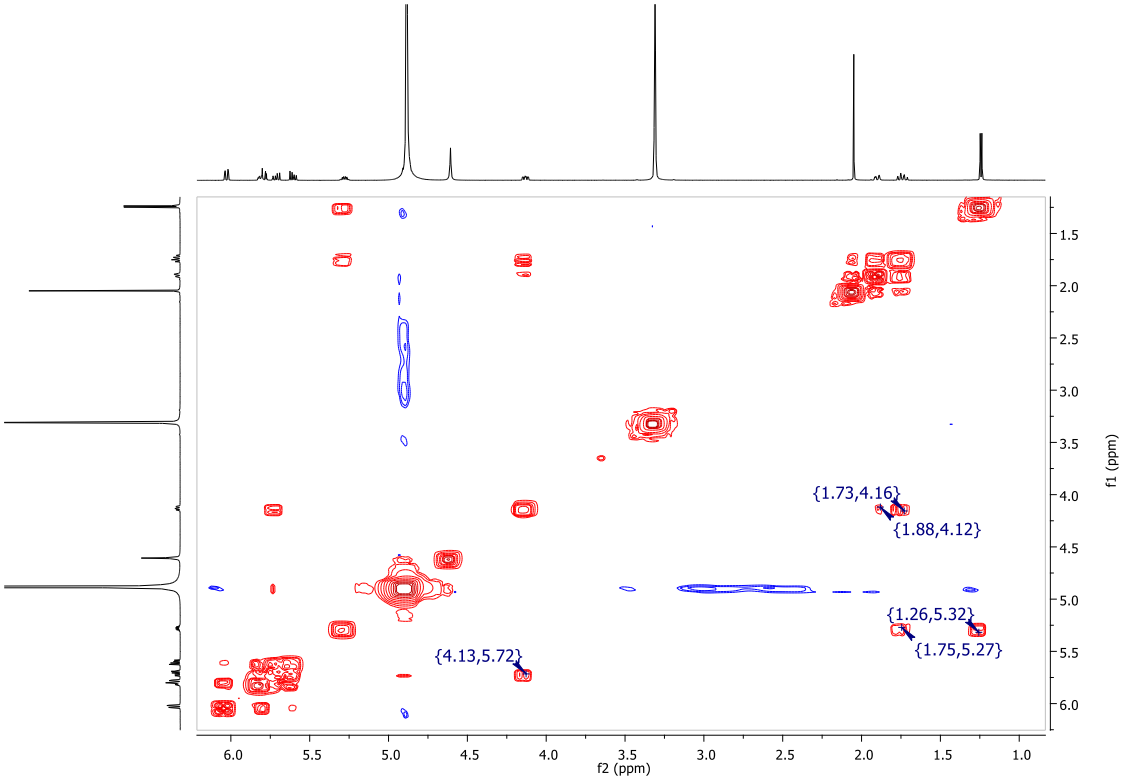


Figura 54 - Espectro de *g*HSQC da substância **2**.

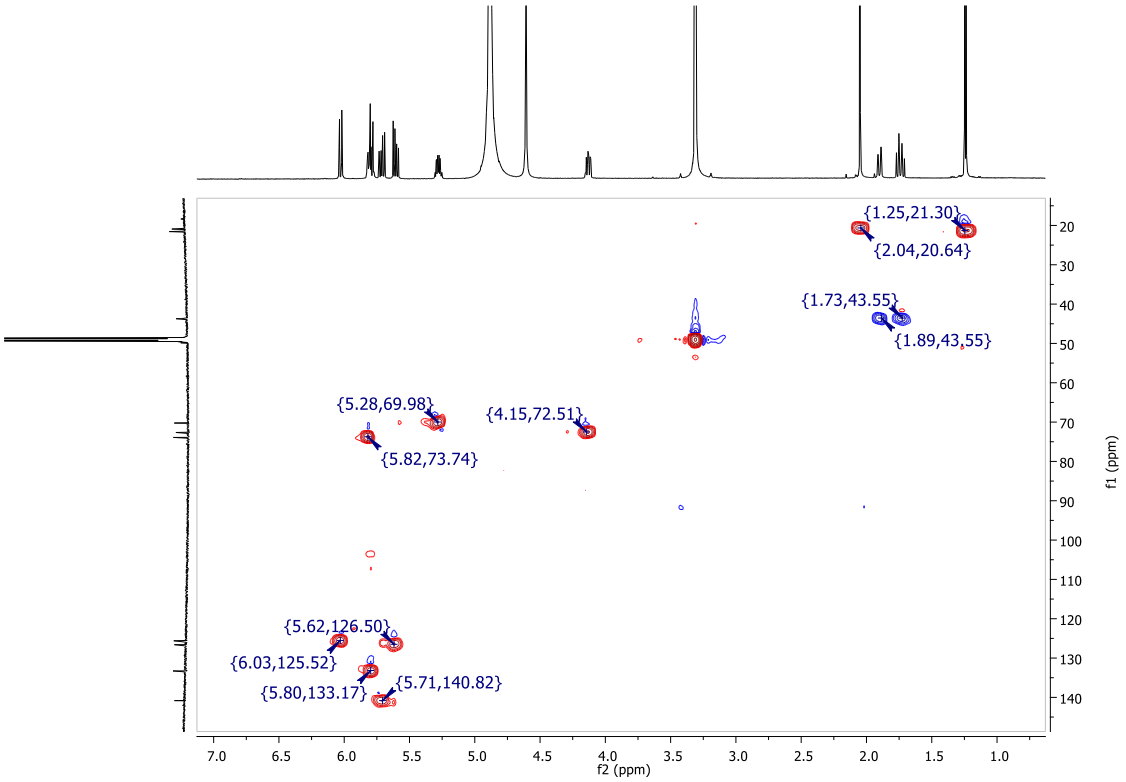
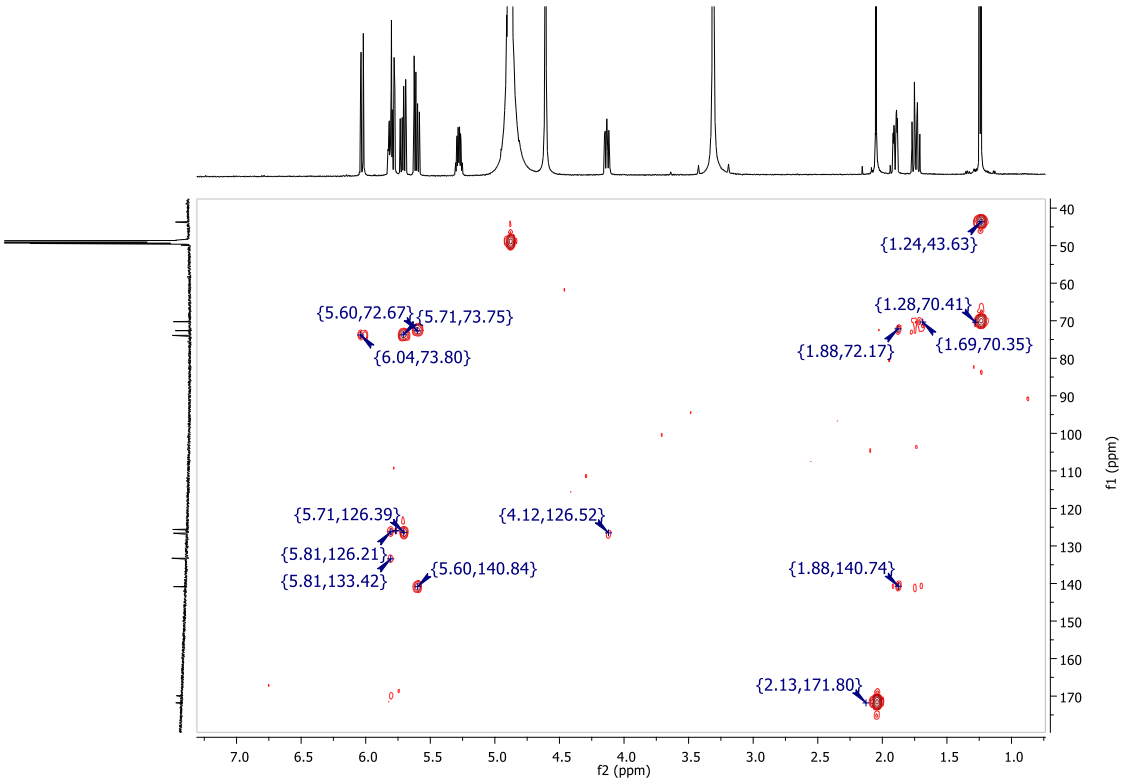


Figura 55 - Espectro de *g*HMBC da substância **2**.



Substância **3**

Figura 56 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **3**.

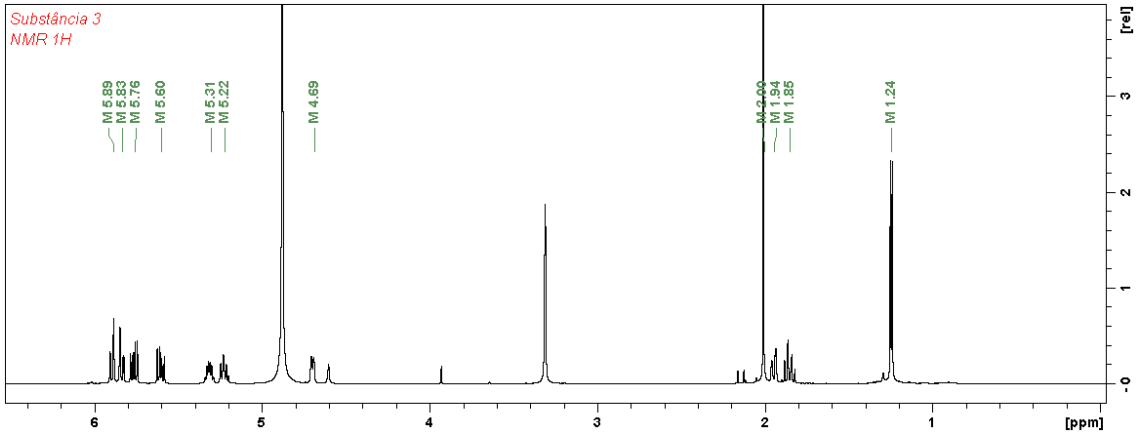


Figura 57 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **3** (expansão da região de δ_H 1,10-1,40 ppm).

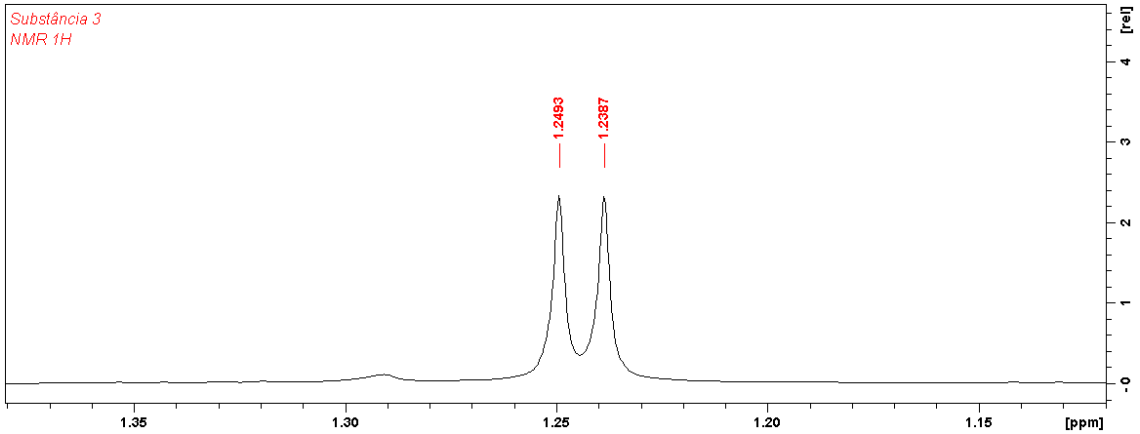


Figura 58 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **3** (expansão da região de δ_H 1,80-2,05 ppm).

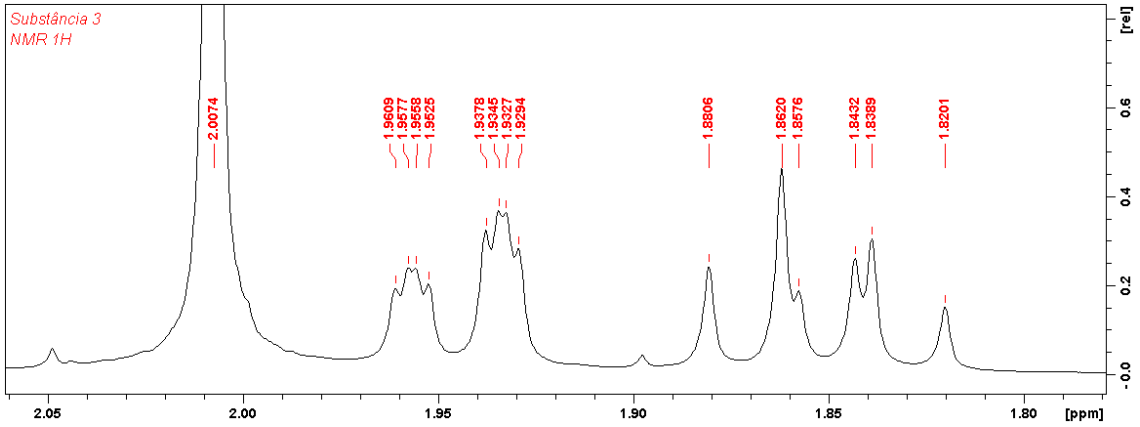


Figura 59 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **3** (expansão da região de δ_H 4,70-5,40 ppm).

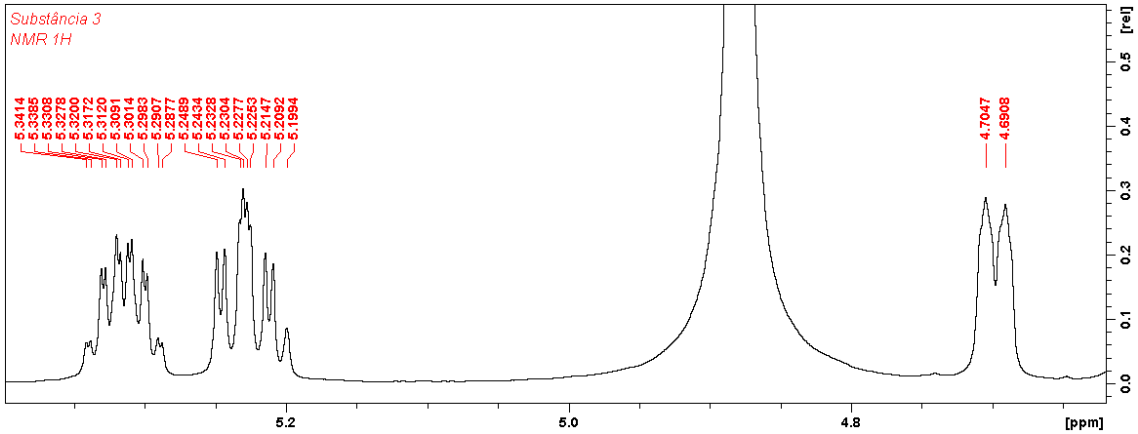


Figura 60 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **3** (expansão da região de δ_H 5,50-6,00 ppm).

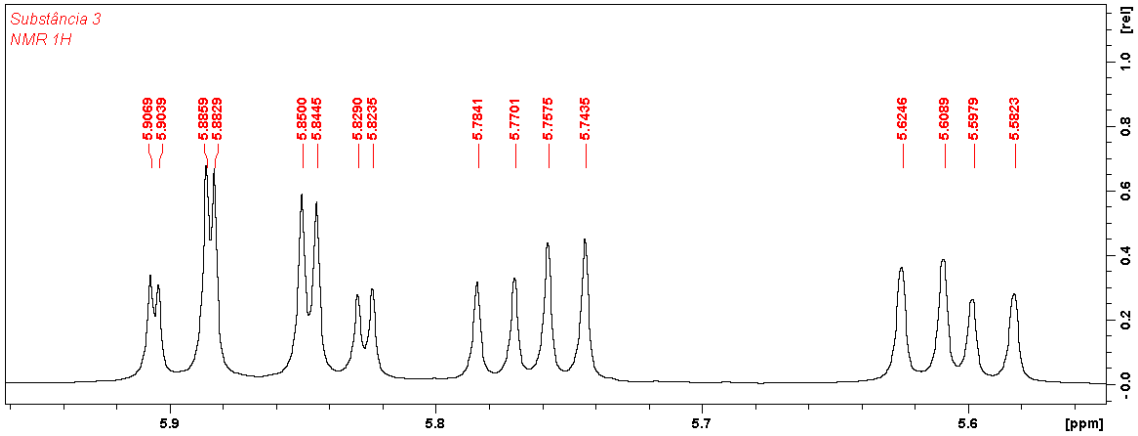


Figura 61 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **3**.

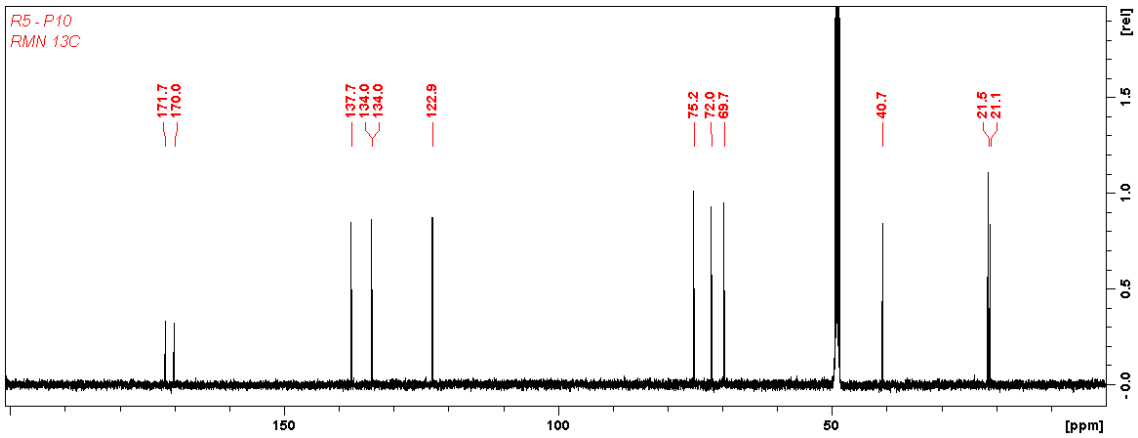


Figura 62 - Espectro de DEPT-135 da substância **3**.

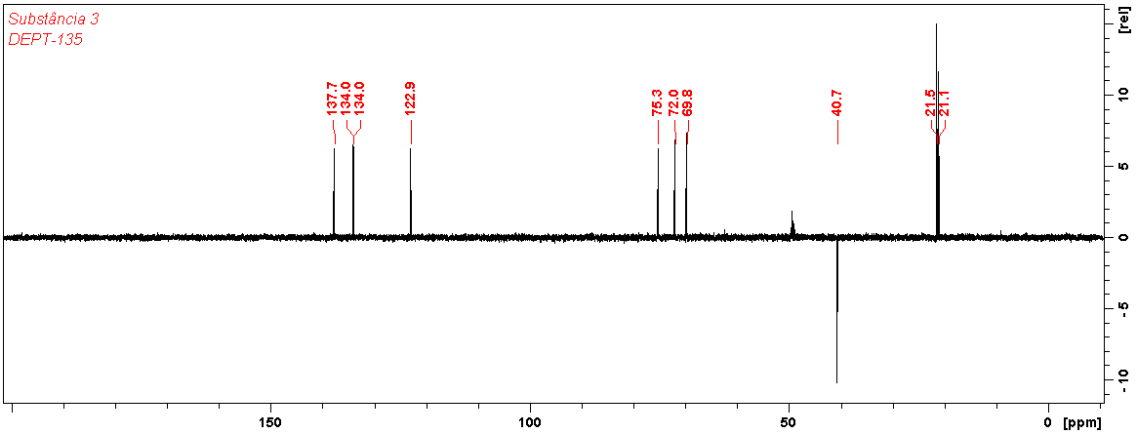


Figura 63 - Espectro de COSY da substância **3**.

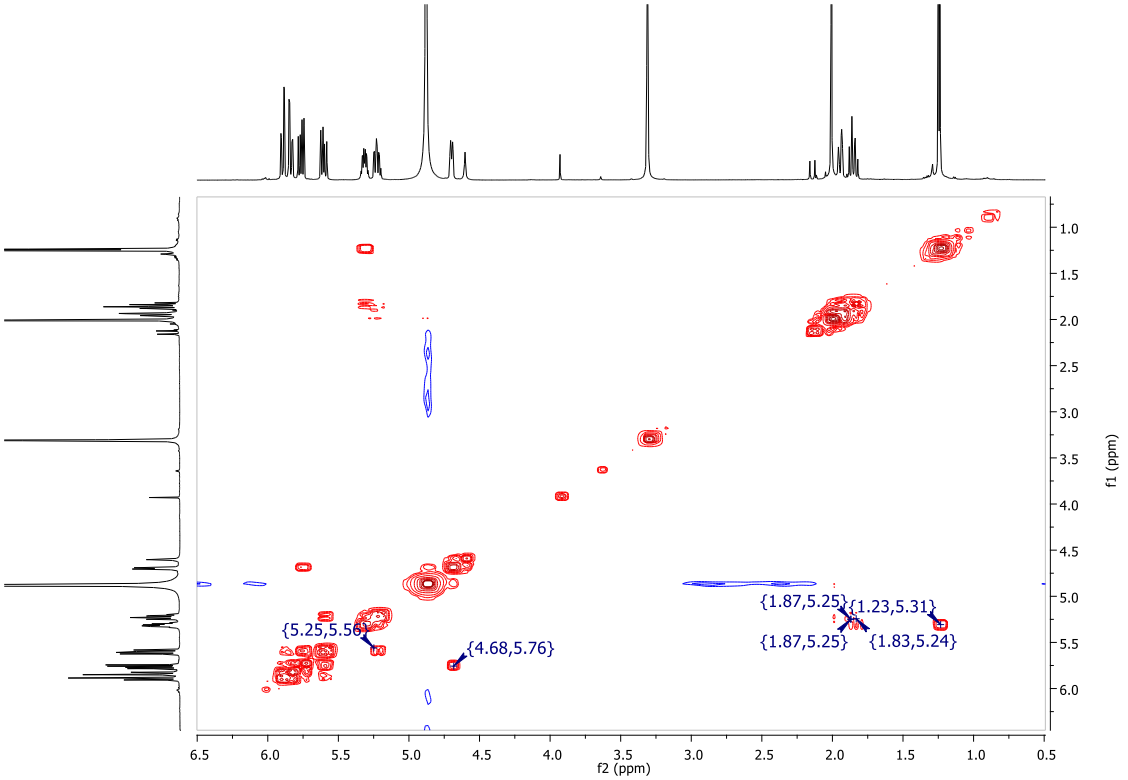


Figura 64 - Espectro de *g*HSQC da substância **3**.

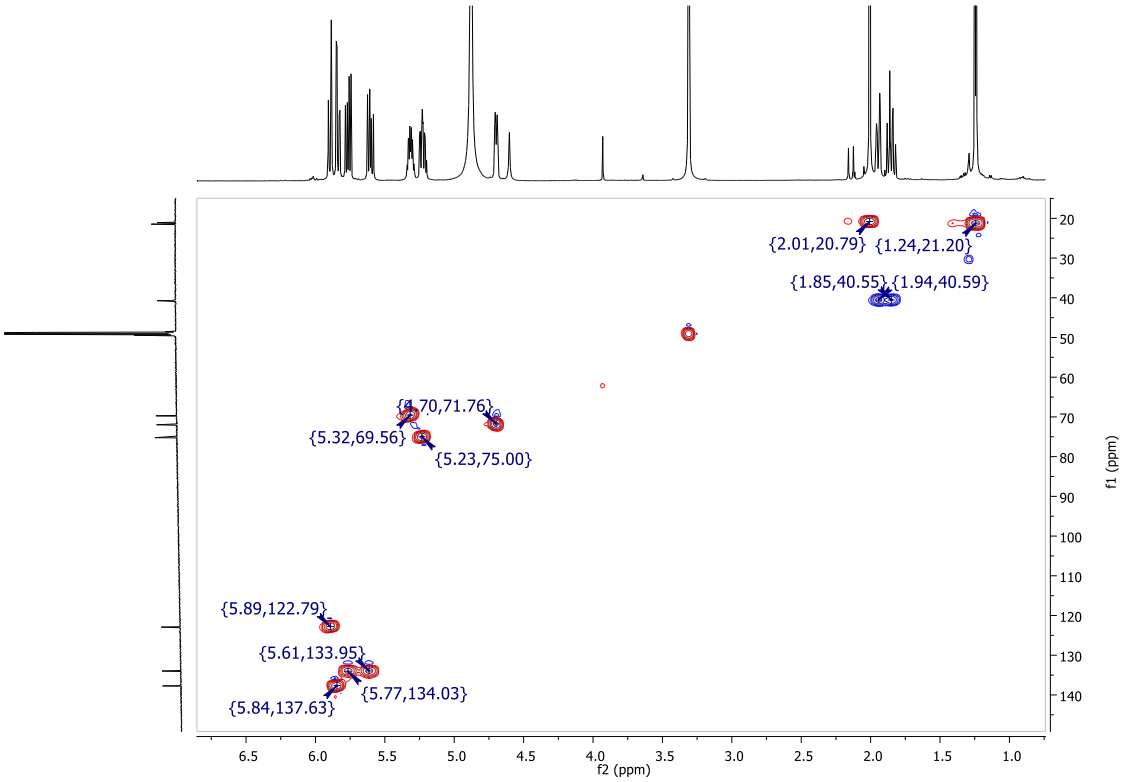
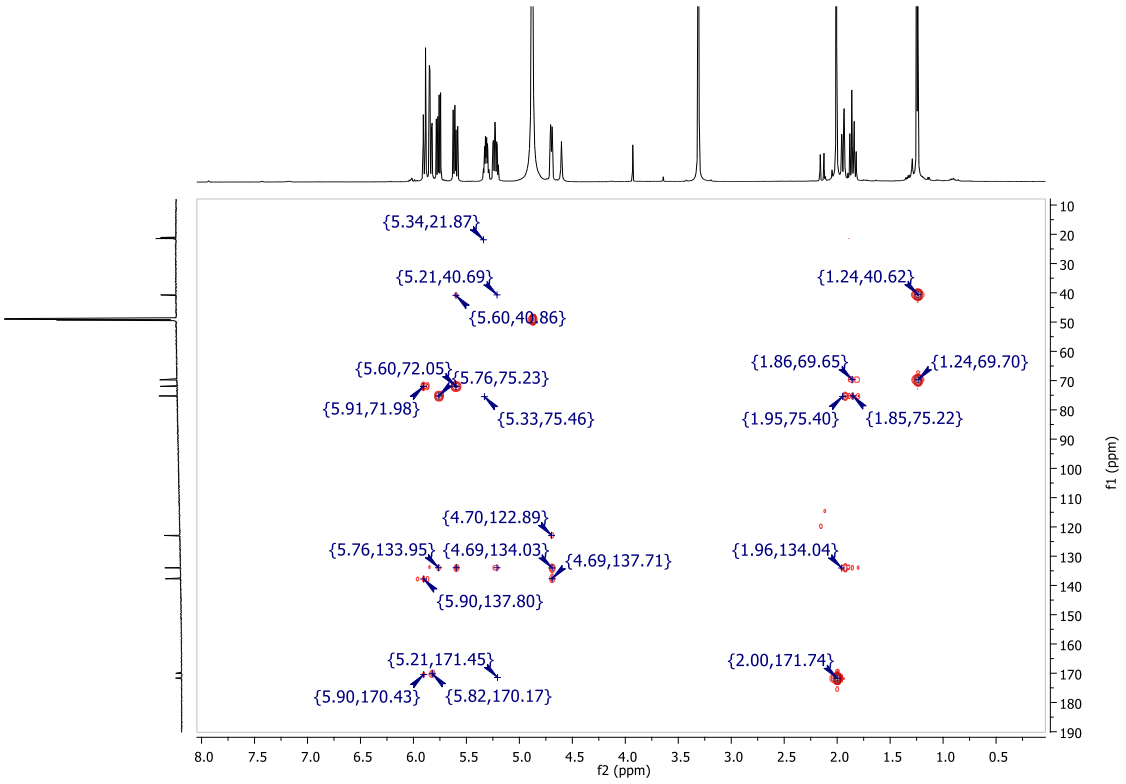


Figura 65 - Espectro de *g*HMBC da substância **3**.



Substância **4**

Figura 66 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **4**.

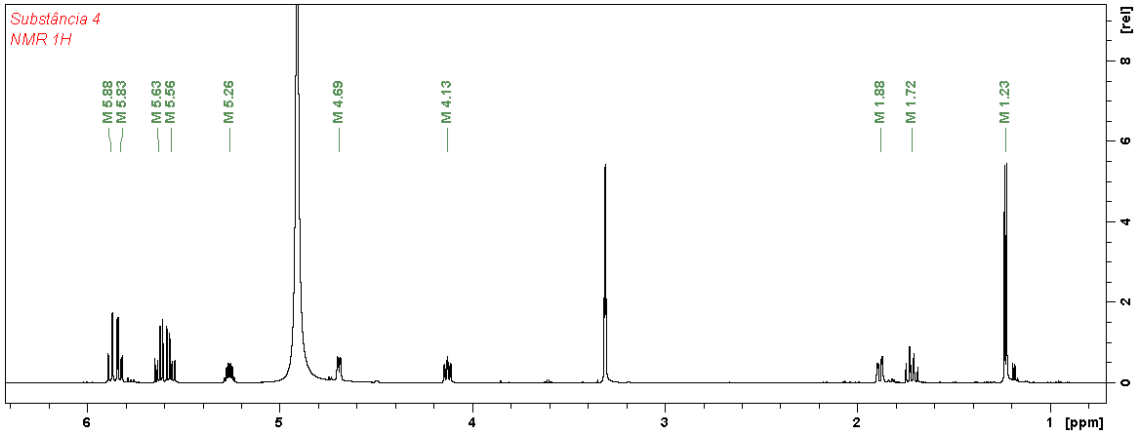


Figura 67 – Espectro de NMR ^{1}H da substância **4** (expansão da região de δ_H 1,16-1,34 ppm).

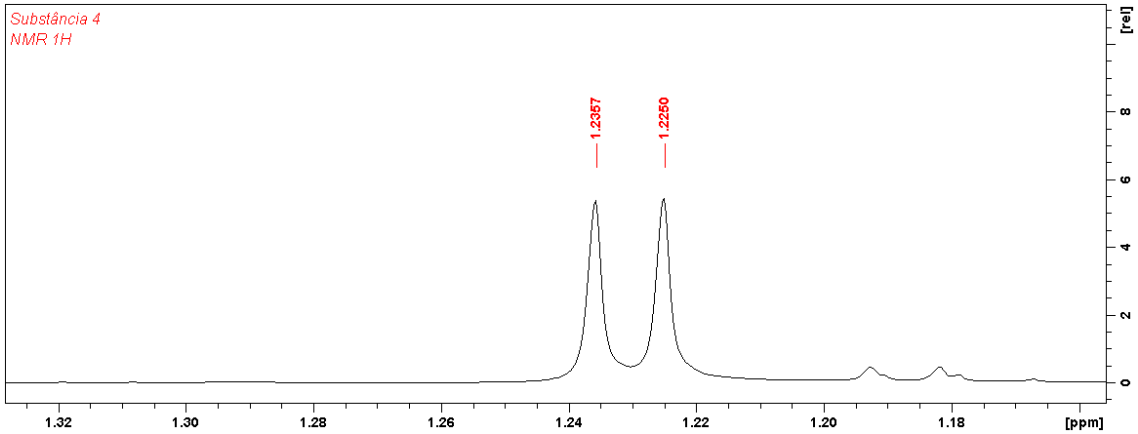


Figura 68 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **4** (expansão da região de δ_H 1,60-2,00 ppm).

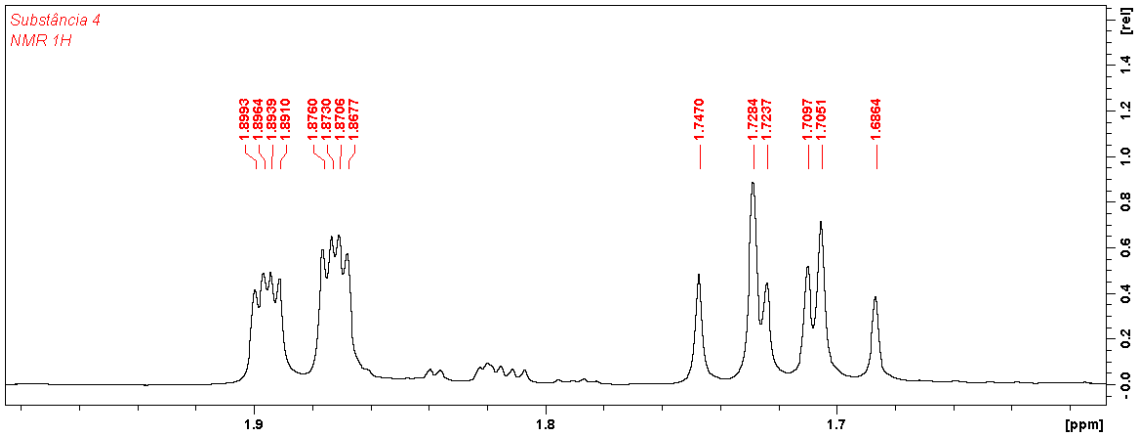


Figura 69 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **4** (expansão da região de δ_H 4,10-4,80 ppm).

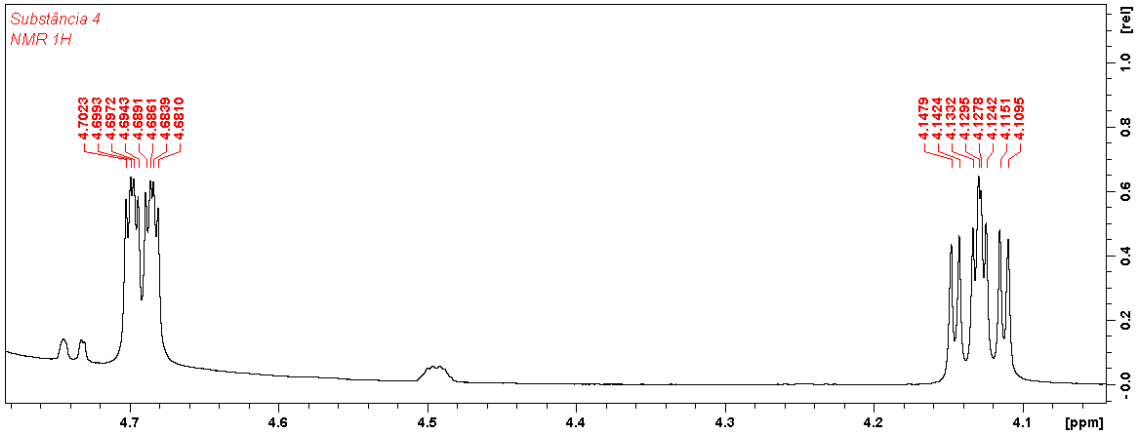


Figura 70 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **4** (expansão da região de δ_H 5,20-5,90 ppm).

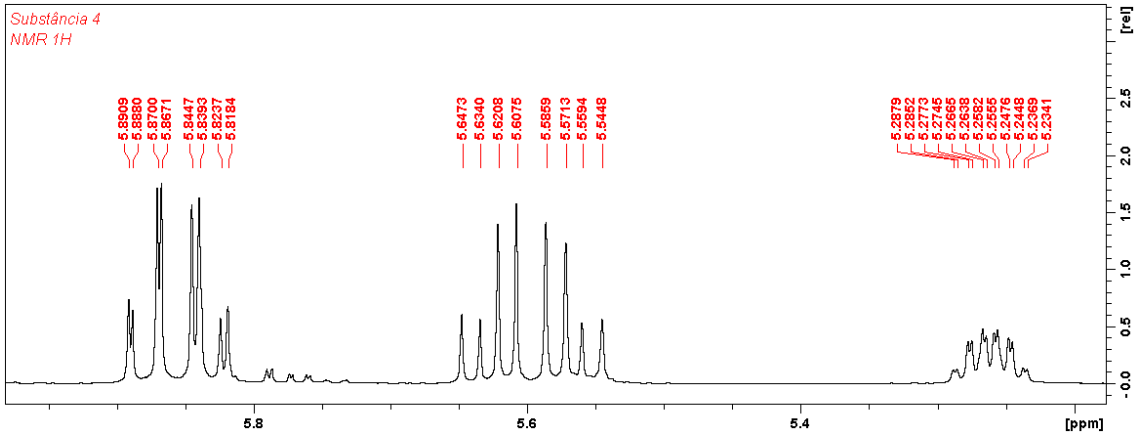


Figura 71 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **4**.

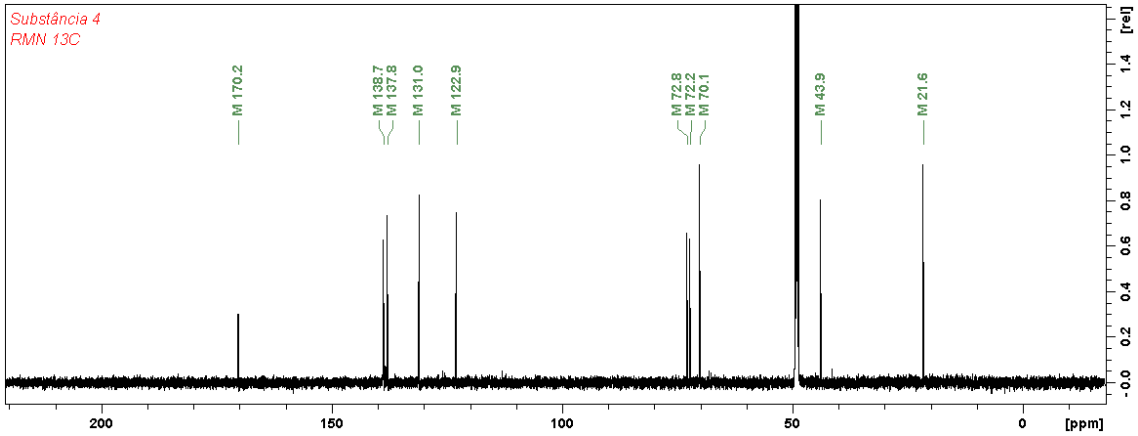


Figura 72 - Espectro de DEPT-135 da substância **4**.

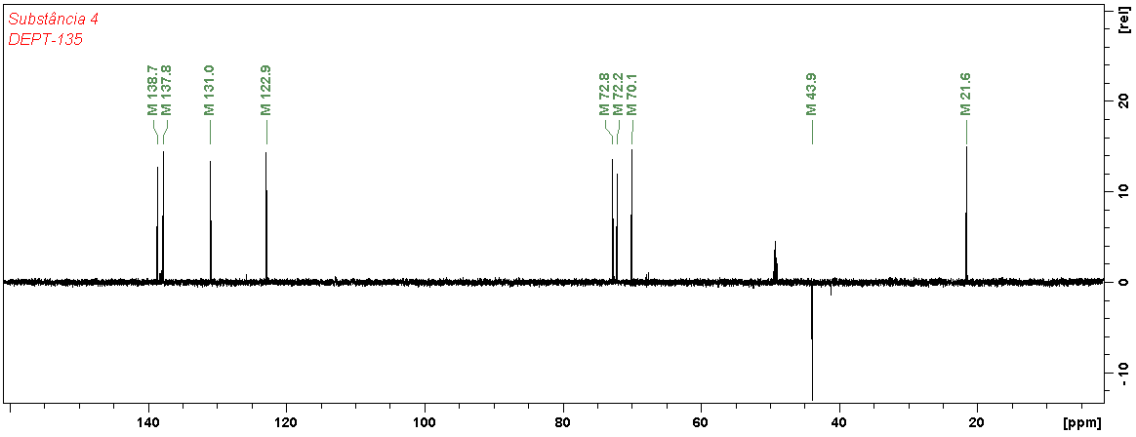


Figura 73 - Espectro de COSY da substância **4**.

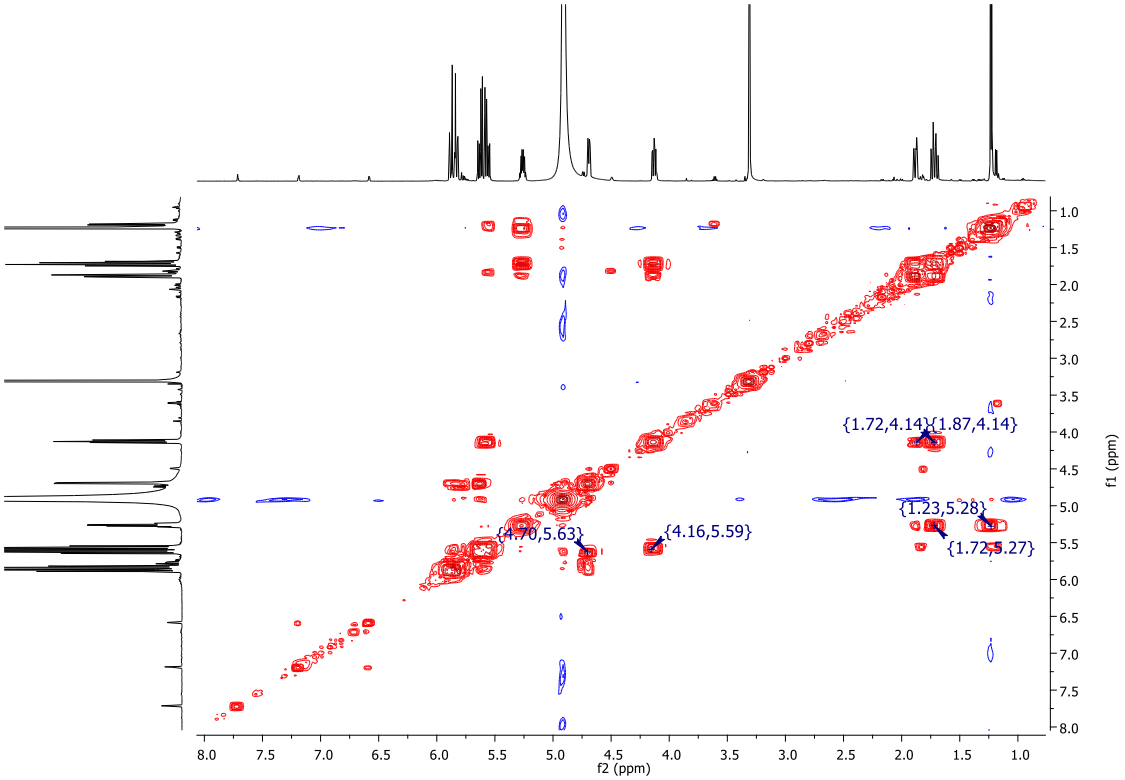


Figura 74 - Espectro de *g*HSQC da substância **4**.

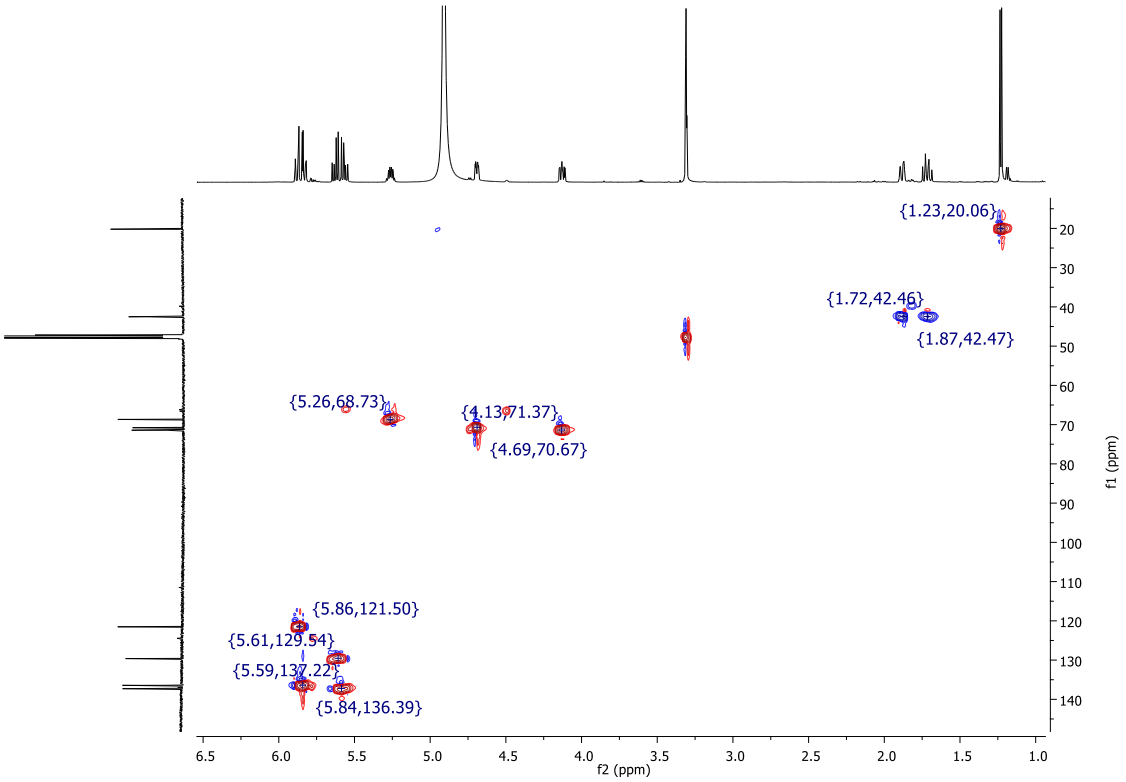
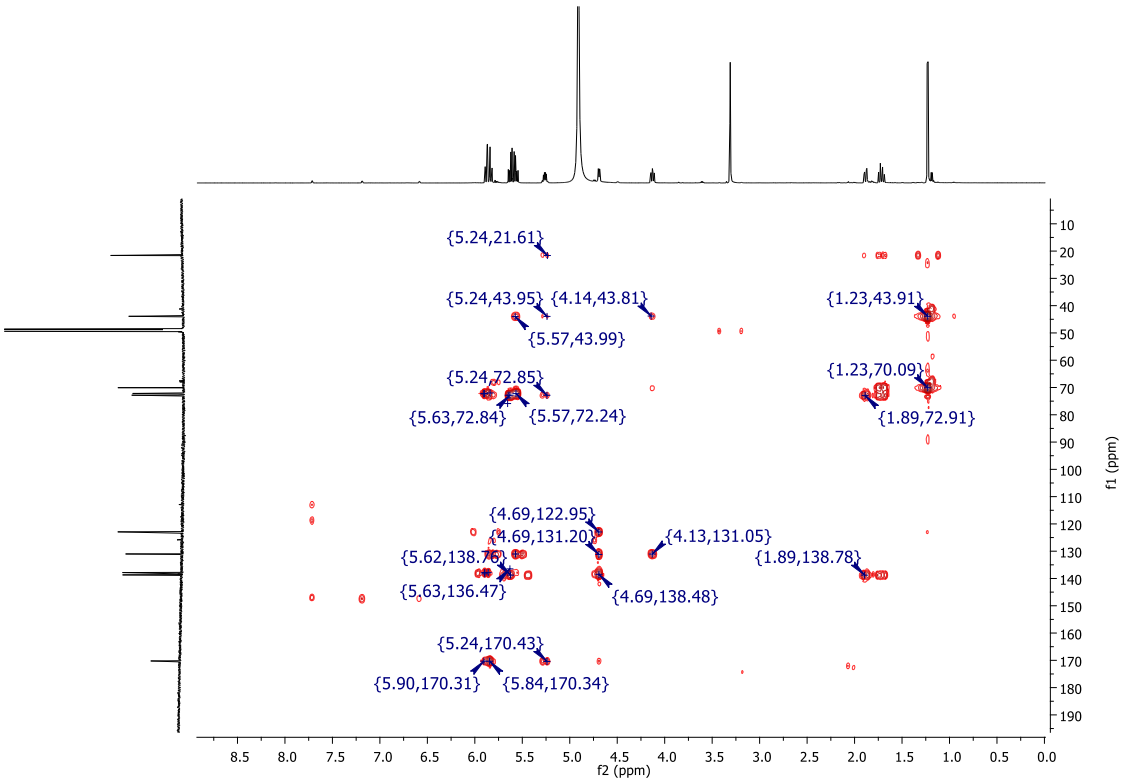


Figura 75 - Espectro de *g*HMBC da substância **4**.



Substância **5**

Figura 76 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **5**.

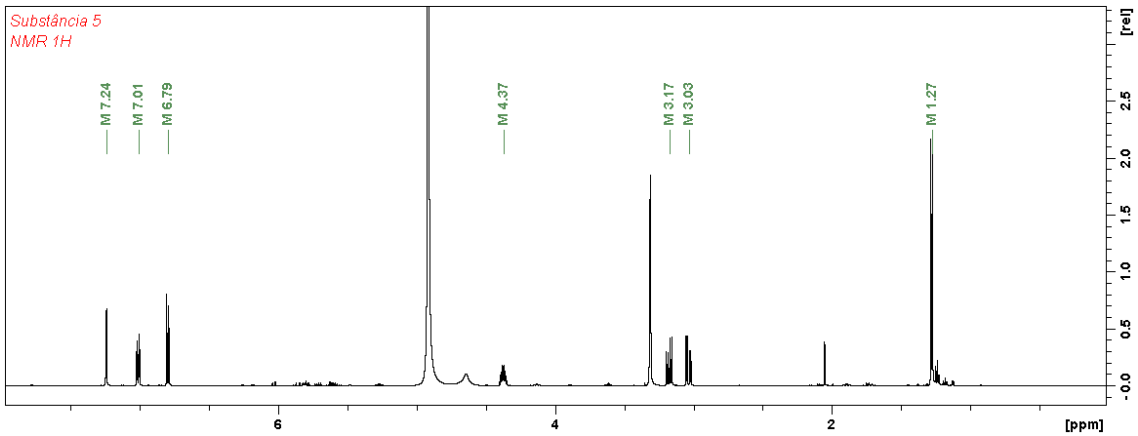


Figura 77 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **5** (expansão da região de δ_H 1,20-1,34 ppm).

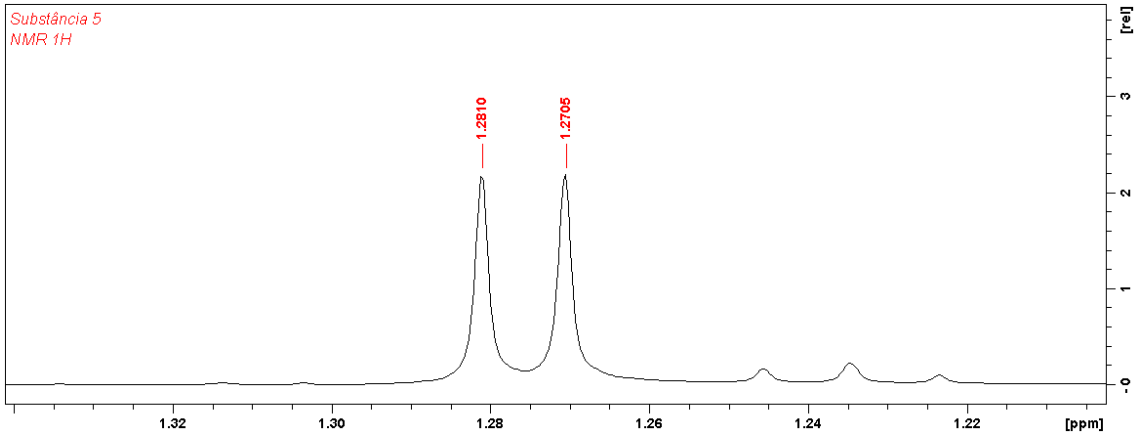


Figura 78 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **5** (expansão da região de δ_H 2,80-3,40 ppm).

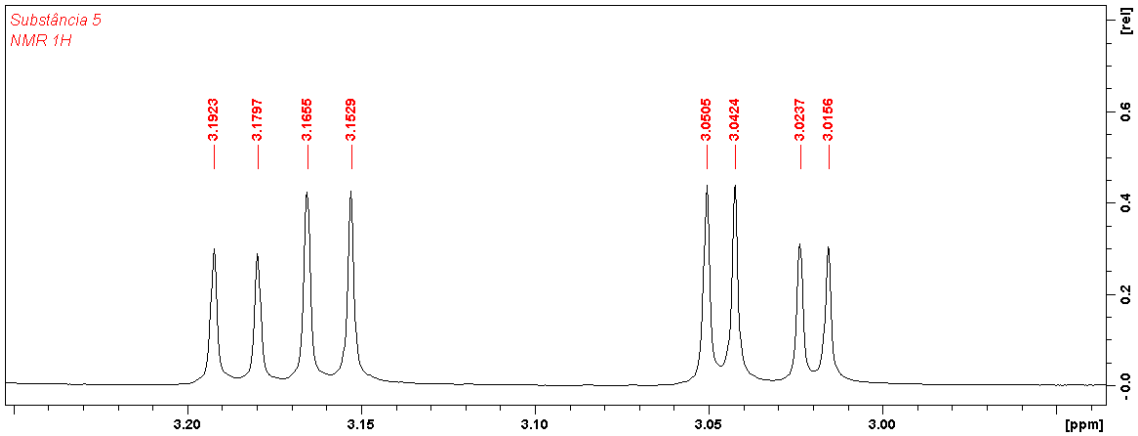


Figura 79 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **5** (expansão da região de δ_H 4,20-4,55 ppm).

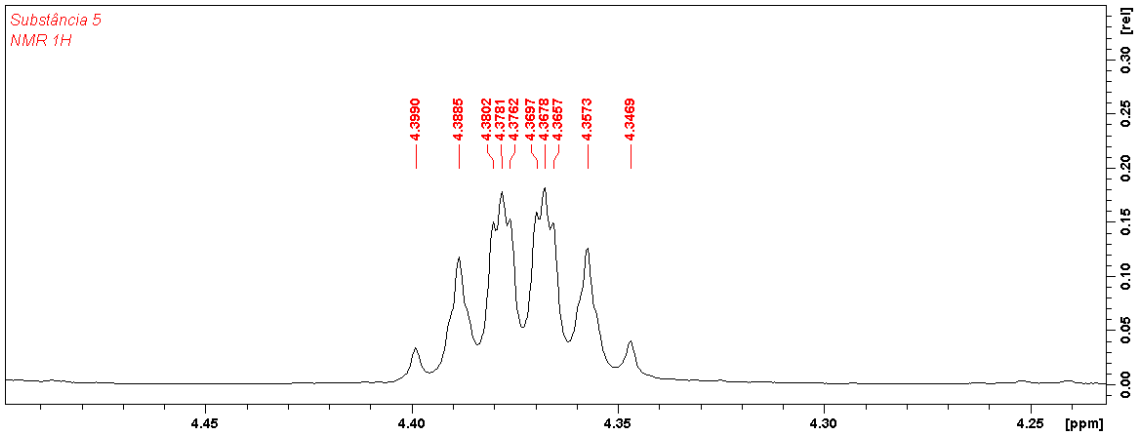


Figura 80 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **5** (expansão da região de δ_H 6,60-7,40 ppm).

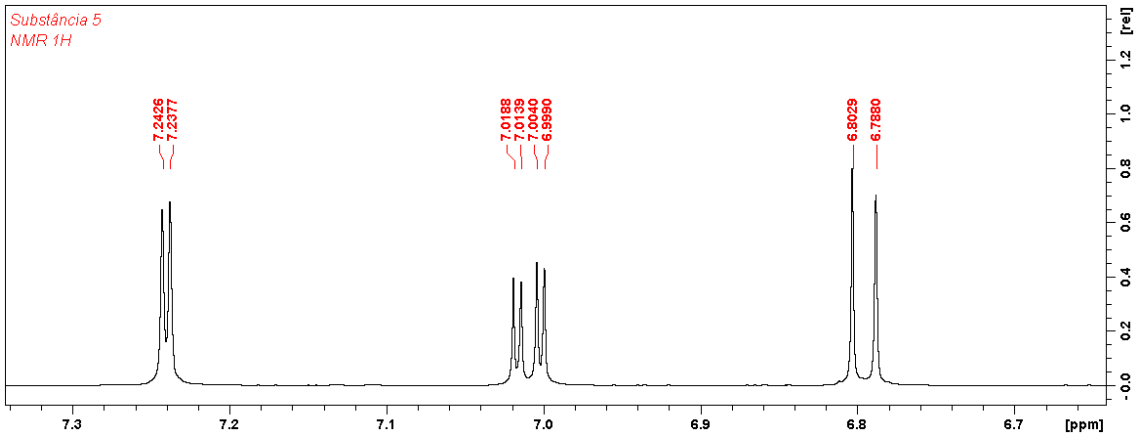


Figura 81 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **5**.

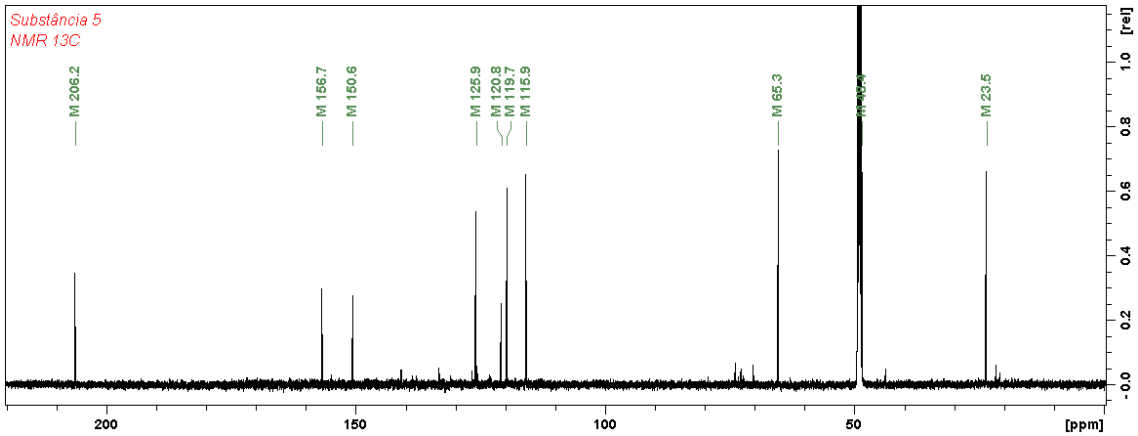


Figura 82 - Espectro de DEPT-135 da substância **5**.

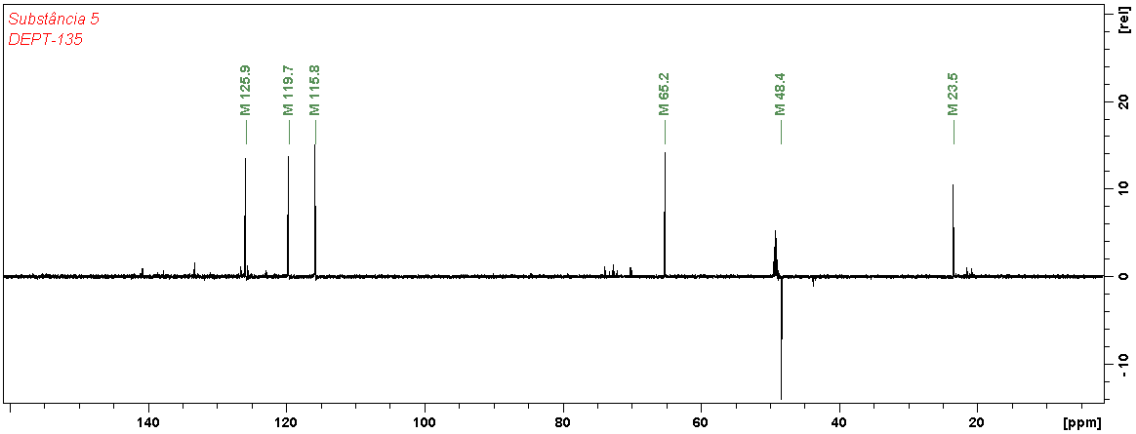


Figura 83 - Espectro de COSY da substância **5**.

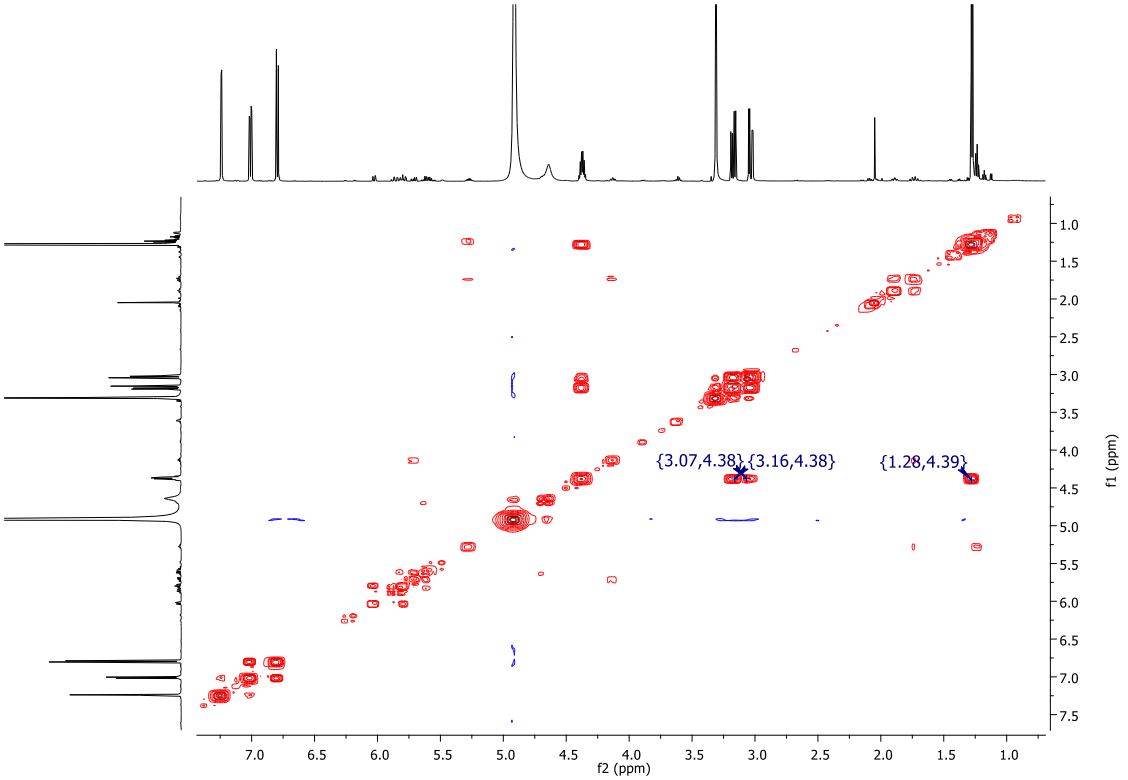


Figura 84 - Espectro de *g*HSQC da substância **5**.

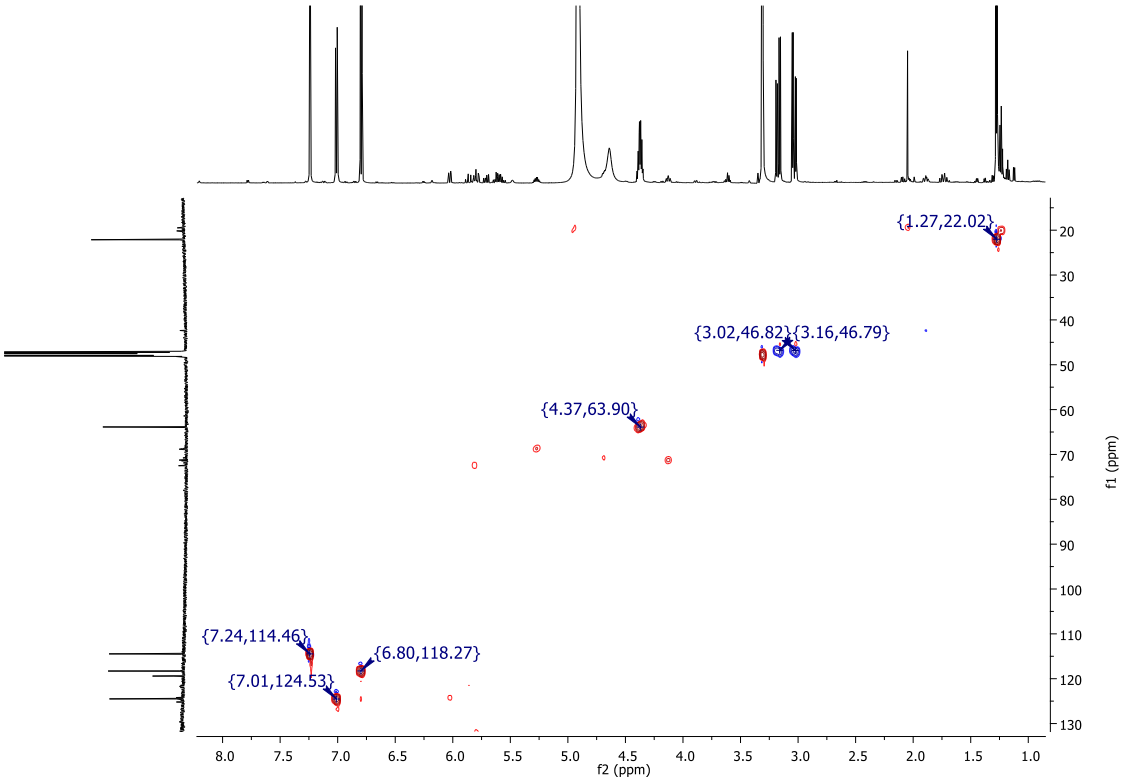
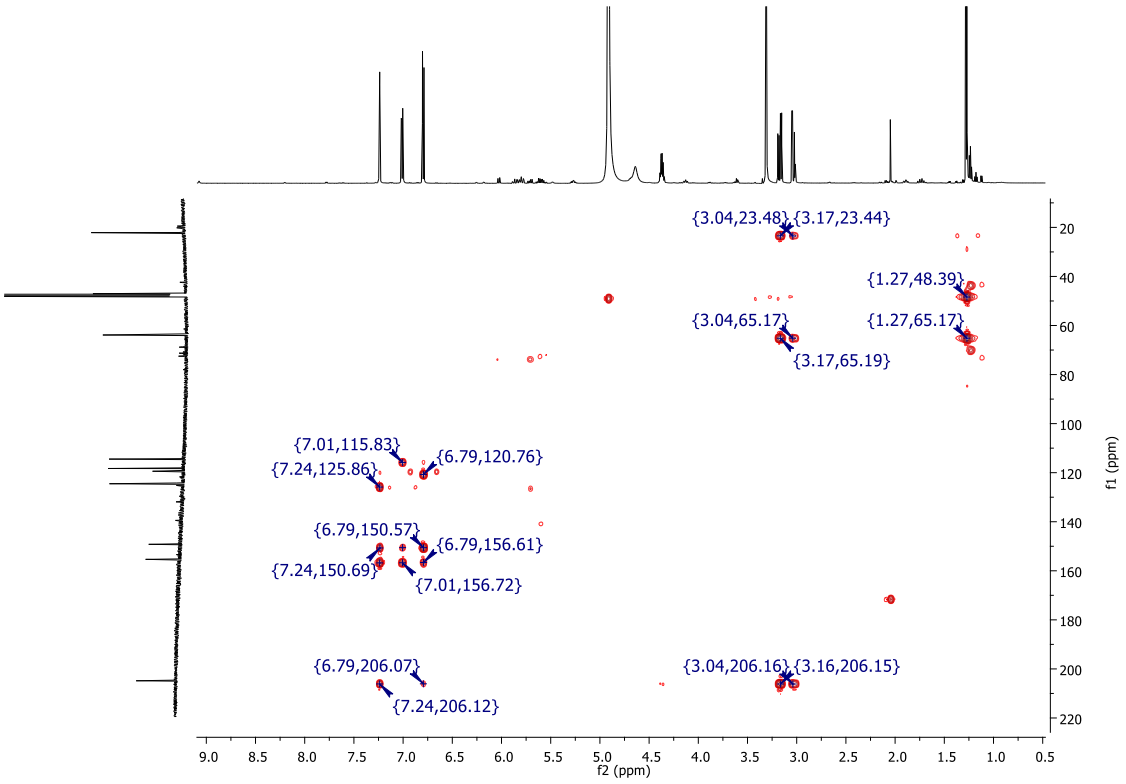


Figura 85 - Espectro de *g*HMBC da substância **5**.



Substância **6**

Figura 86 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **6**.

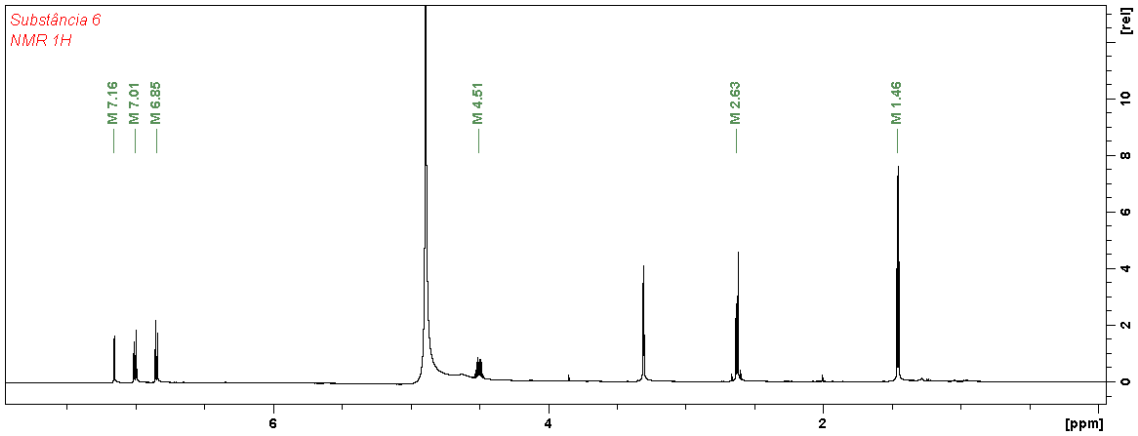


Figura 87 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **6** (expansão da região de δ_H 1,40-1,60 ppm).

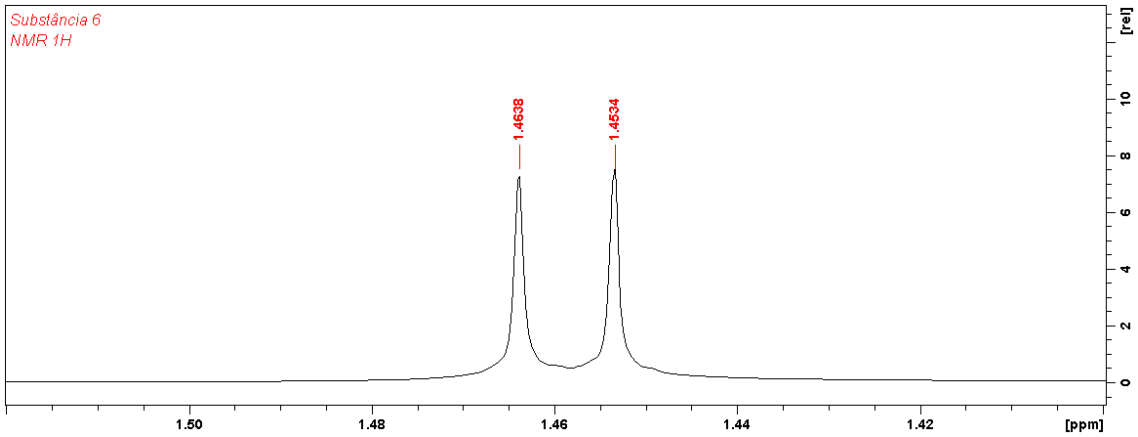


Figura 88 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **6** (expansão da região de δ_H 2,60-3,5 ppm).

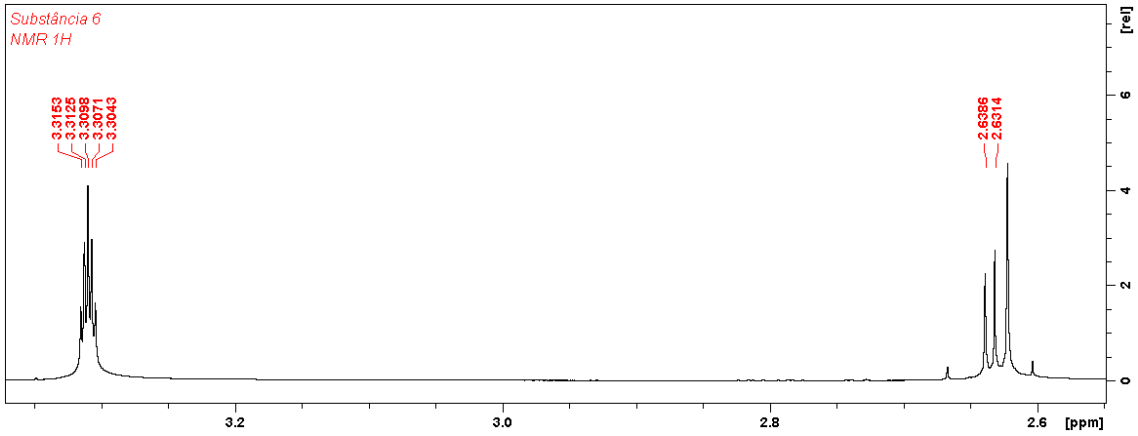


Figura 89 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **6** (expansão da região de δ_H 4,30-4,60 ppm).

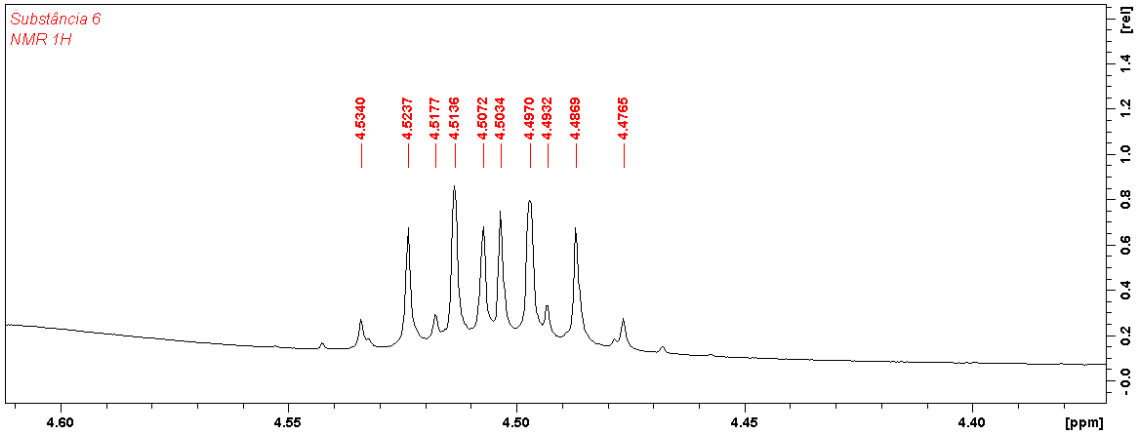


Figura 90 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **6** (expansão da região de δ_H 6,80-7,20 ppm).

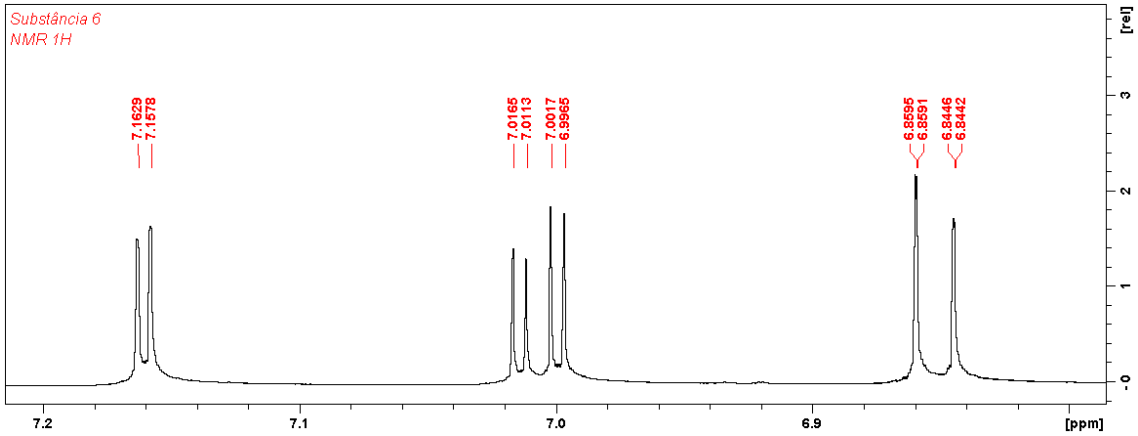


Figura 91 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **6**.

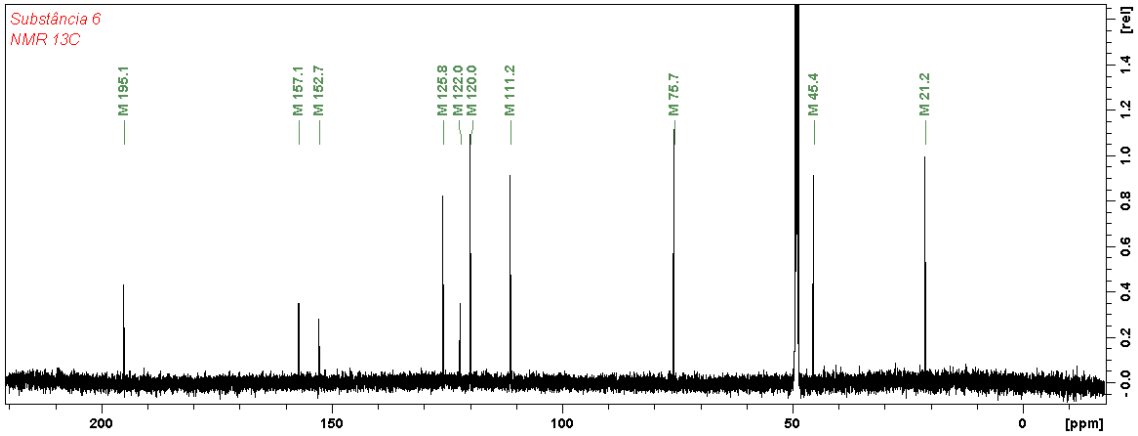


Figura 92 - Espectro de COSY da substância **6**.

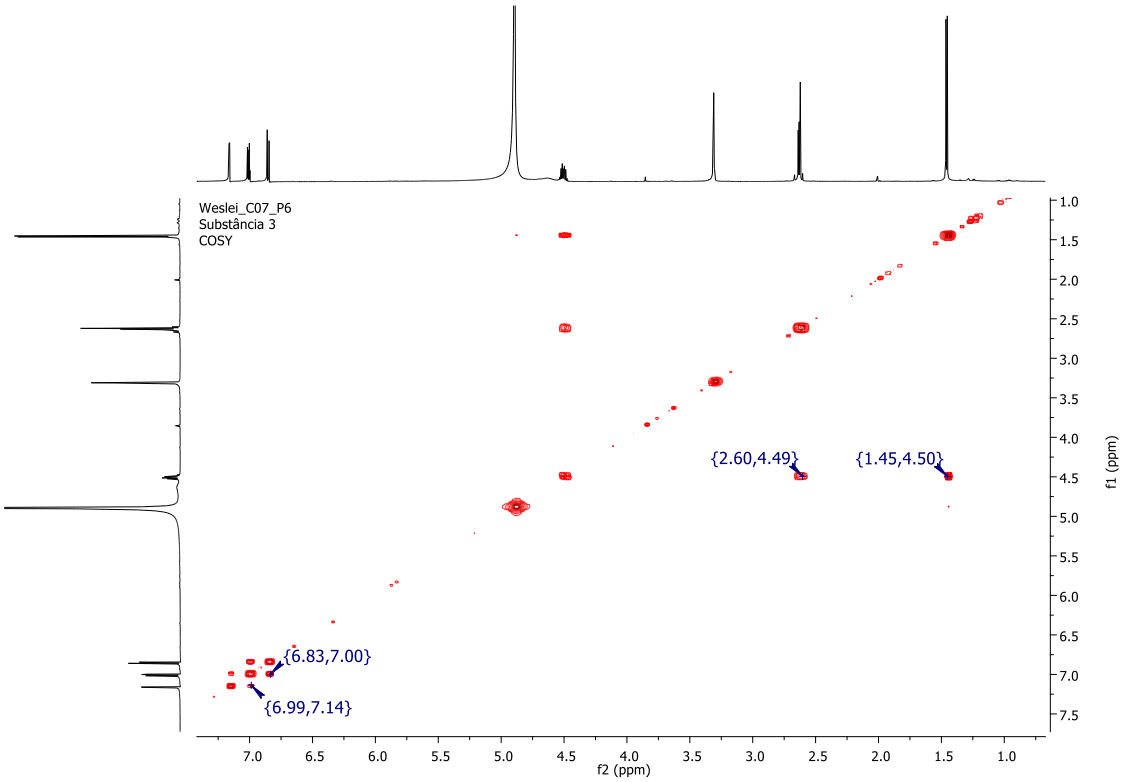


Figura 93 - Espectro de *g*HSQC da substância 6.

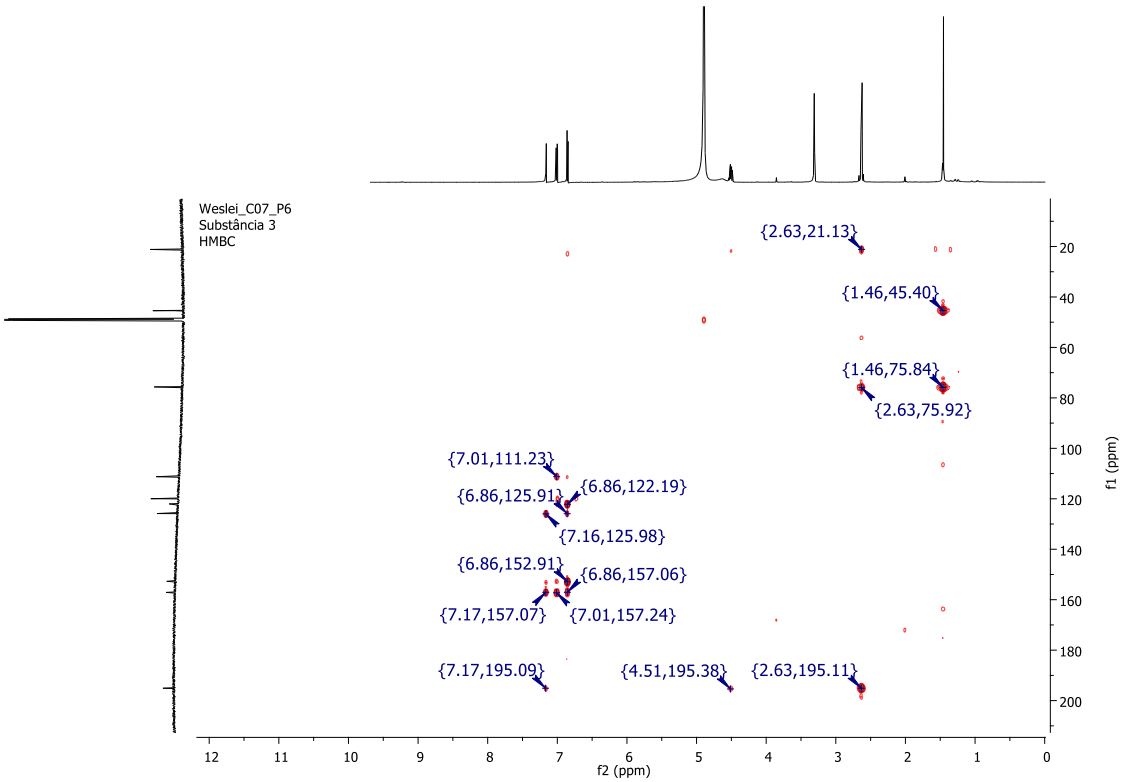
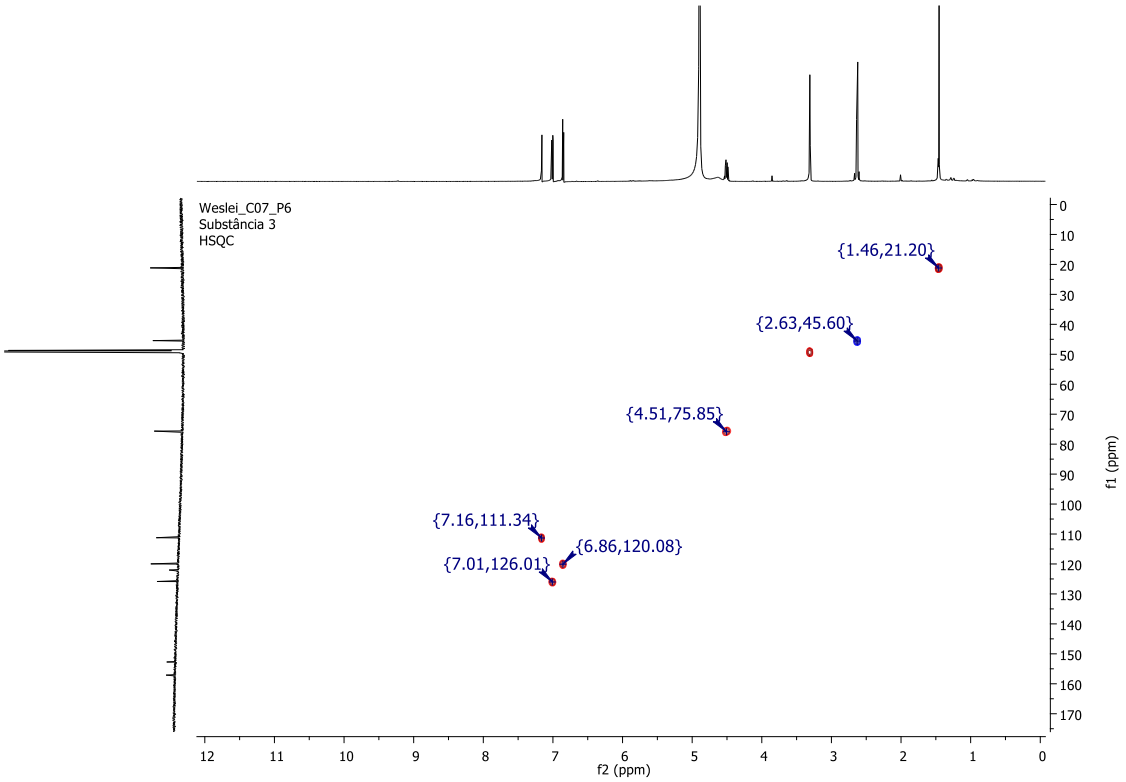


Figura 94 - Espectro de *g*HMBC da substância **6**.



Substância **7**

Figura 95 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **7**.

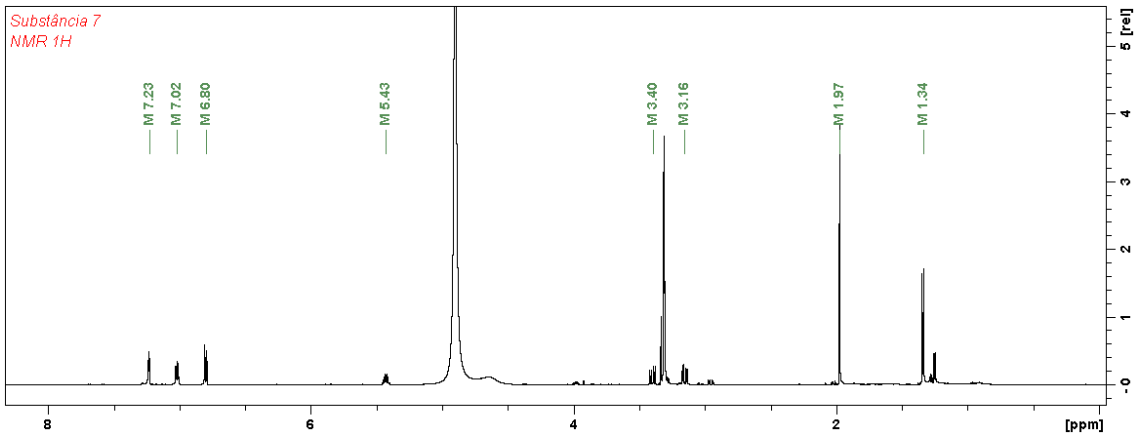


Figura 96 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **7** (expansão da região de δ_H 1,20-2,10 ppm).

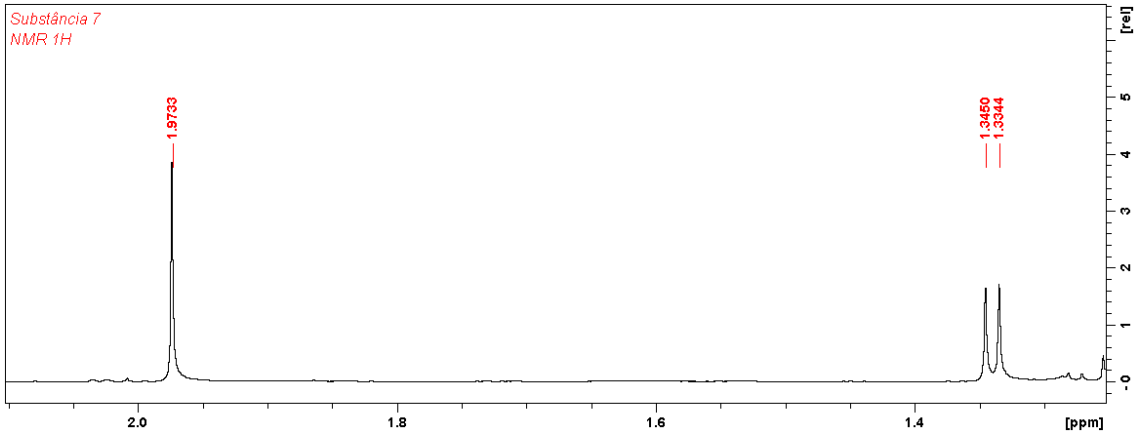


Figura 97 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **7** (expansão da região de δ_H 3,10-3,60 ppm).

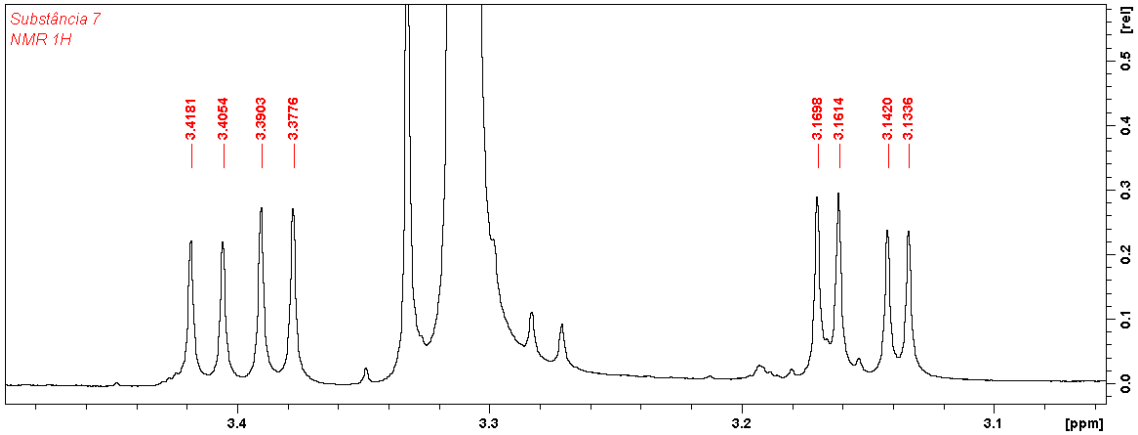


Figura 98 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **7** (expansão da região de δ_H 6,30-5,60 ppm).

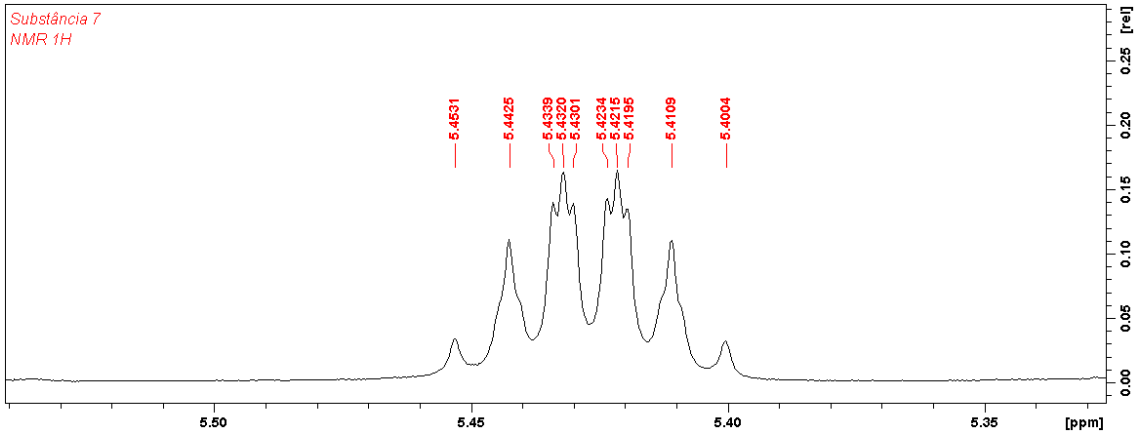


Figura 99 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **7** (expansão da região de δ_H 6,60-7,50 ppm).

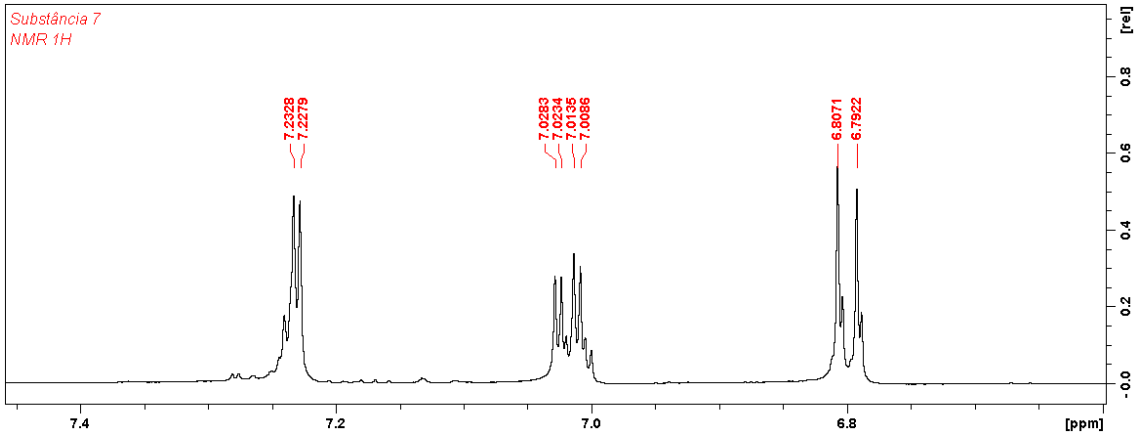


Figura 100 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **7**.

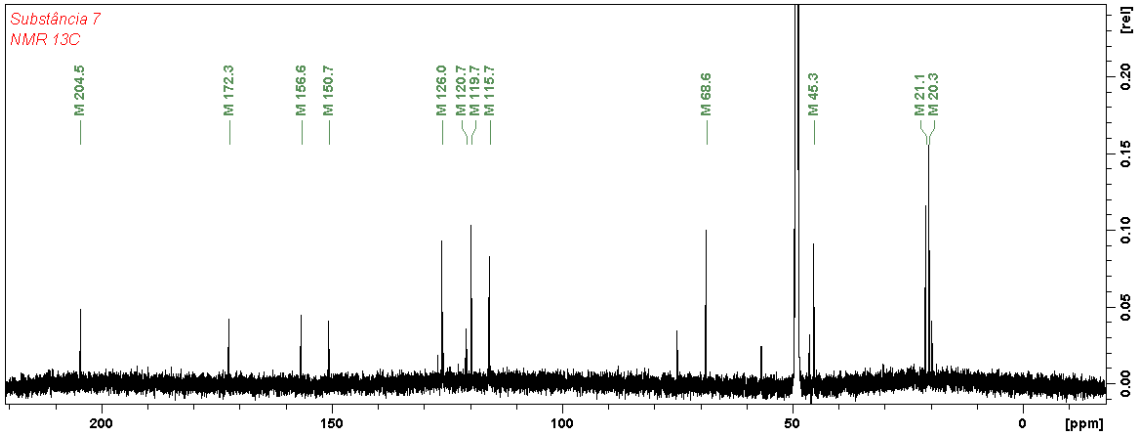


Figura 101 - Espectro de *g*HSQC da substância **7**.

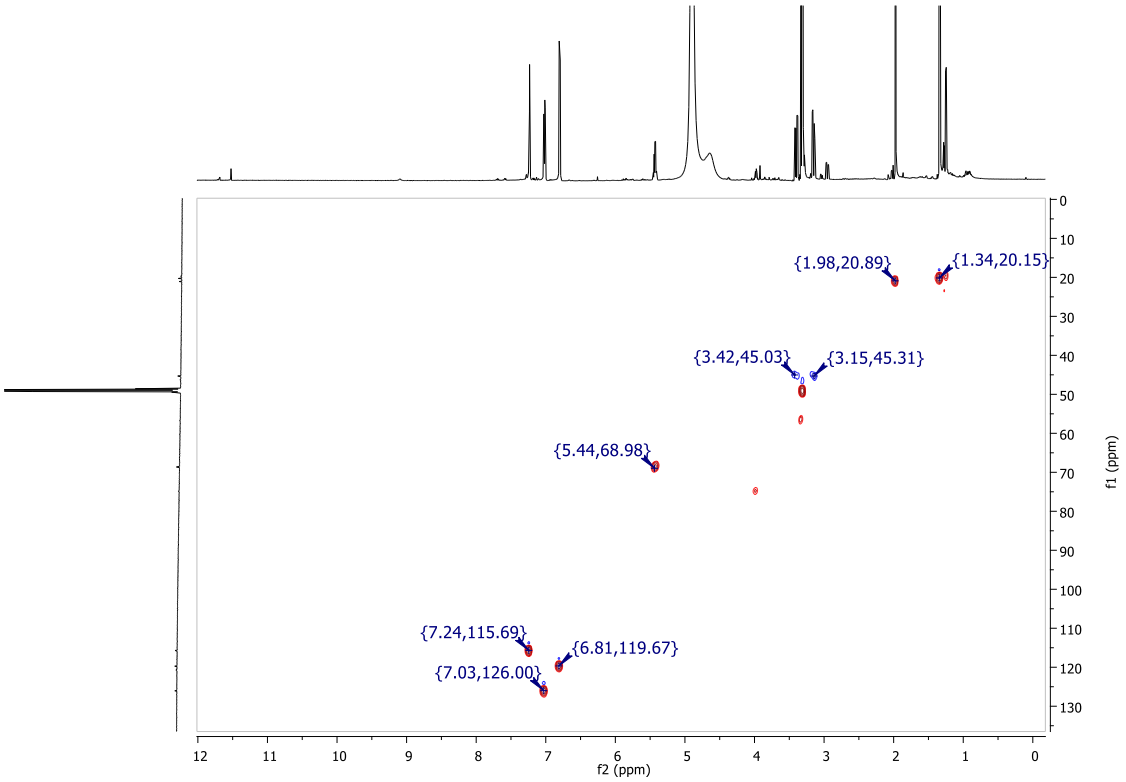
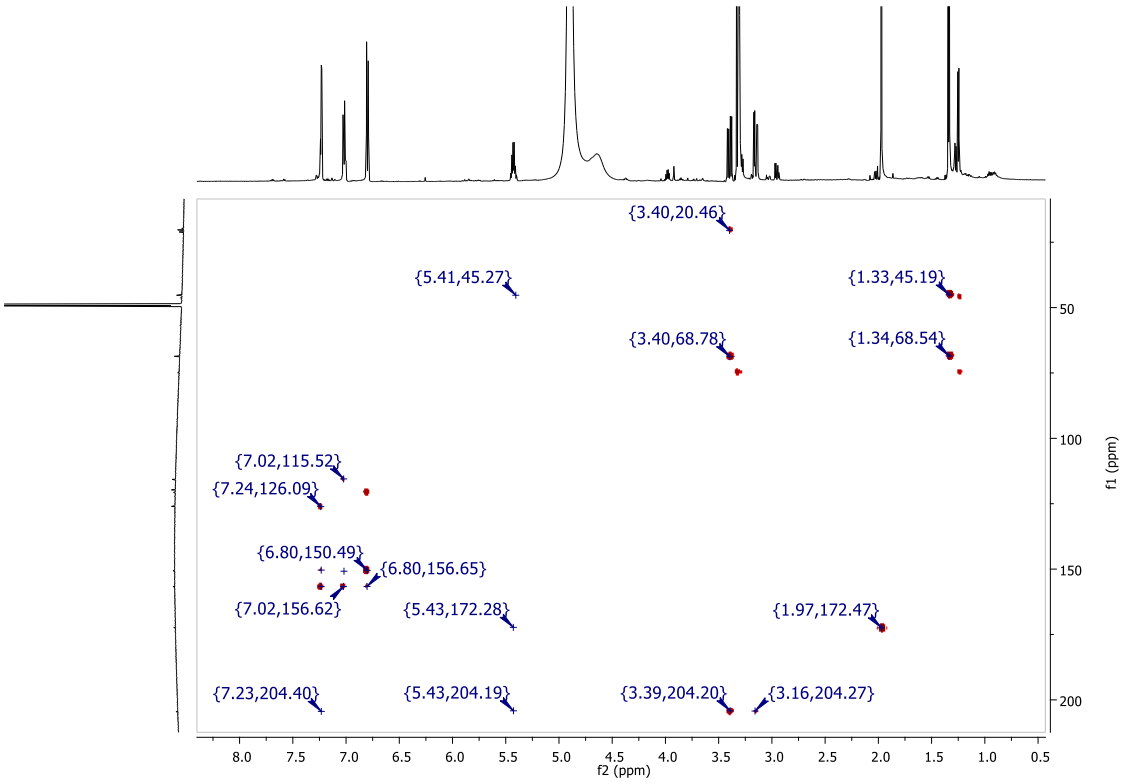


Figura 102 - Espectro de *g*HMBC da substância **7**.



Substância **8**

Figura 103 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **8**.

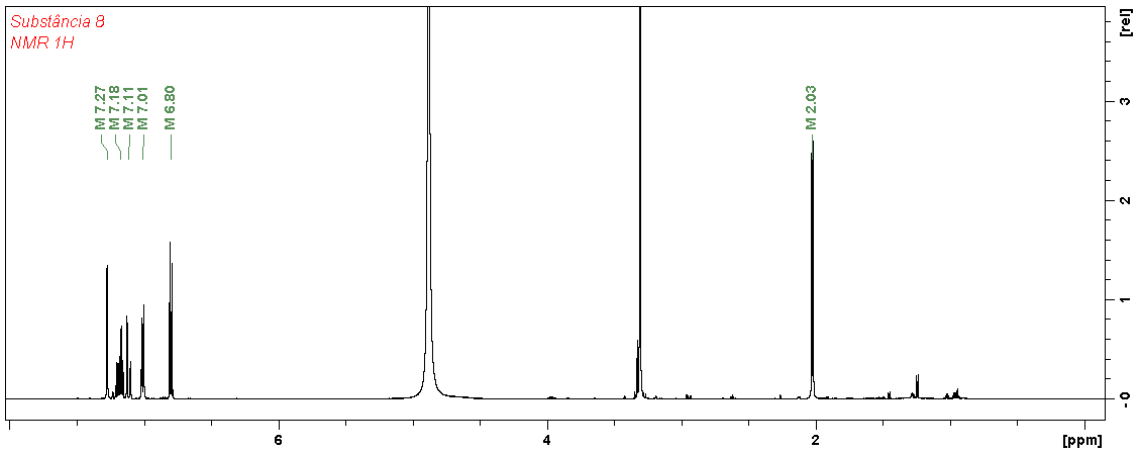


Figura 104 – Espectro de NMR ^{1}H da substância **8** (expansão da região de δ_H 1,80-2,20 ppm).

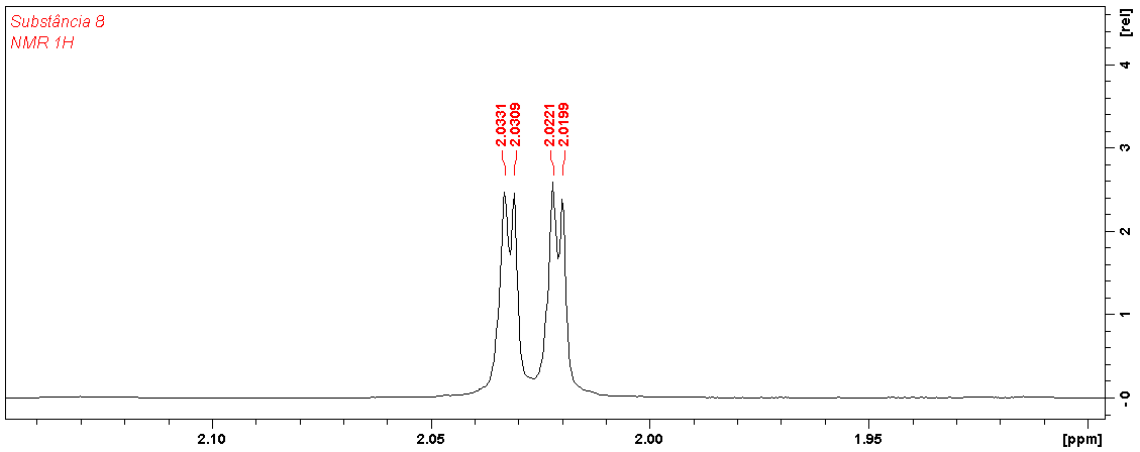


Figura 105 - Espectro de NMR ^{1}H da substância **8** (expansão da região de δ_H 6,70-7,40 ppm).

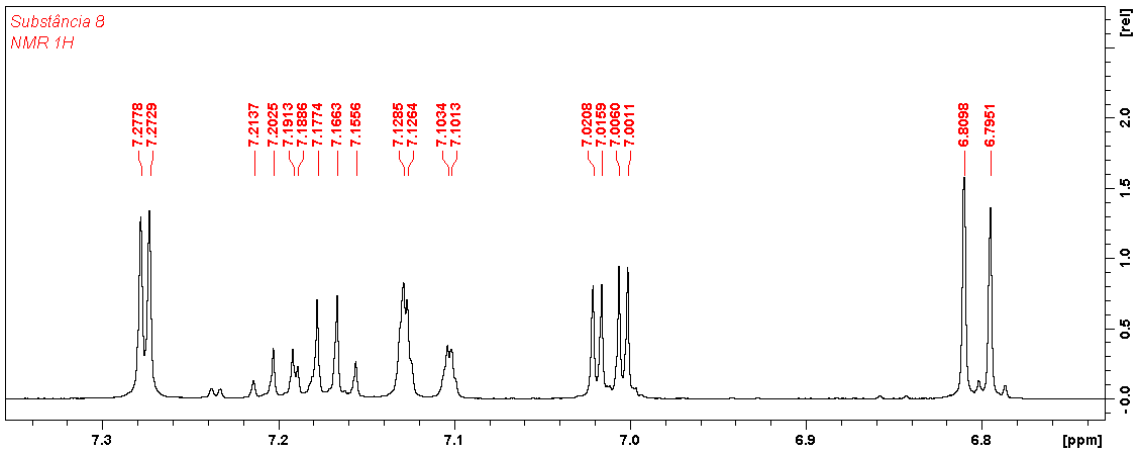


Figura 106 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **8**.

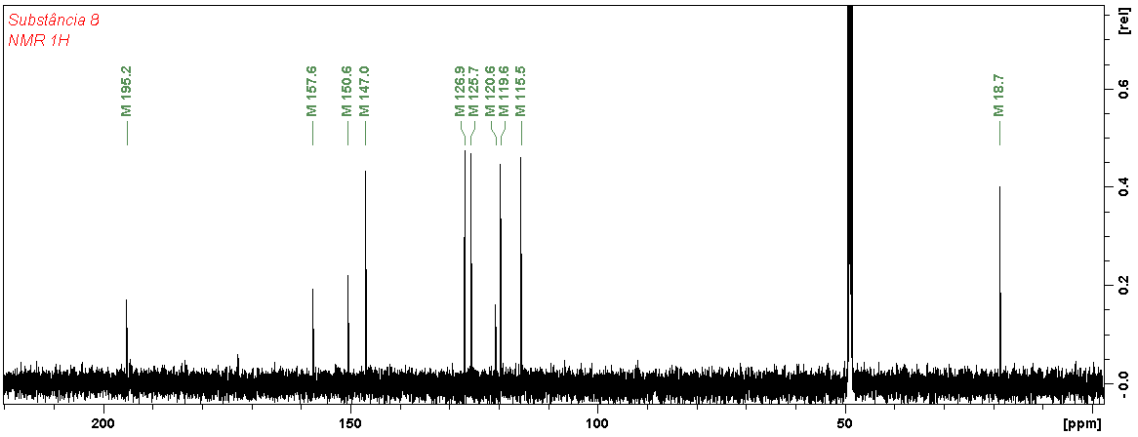


Figura 107 - Espectro de *g*HSQC da substância **8**.

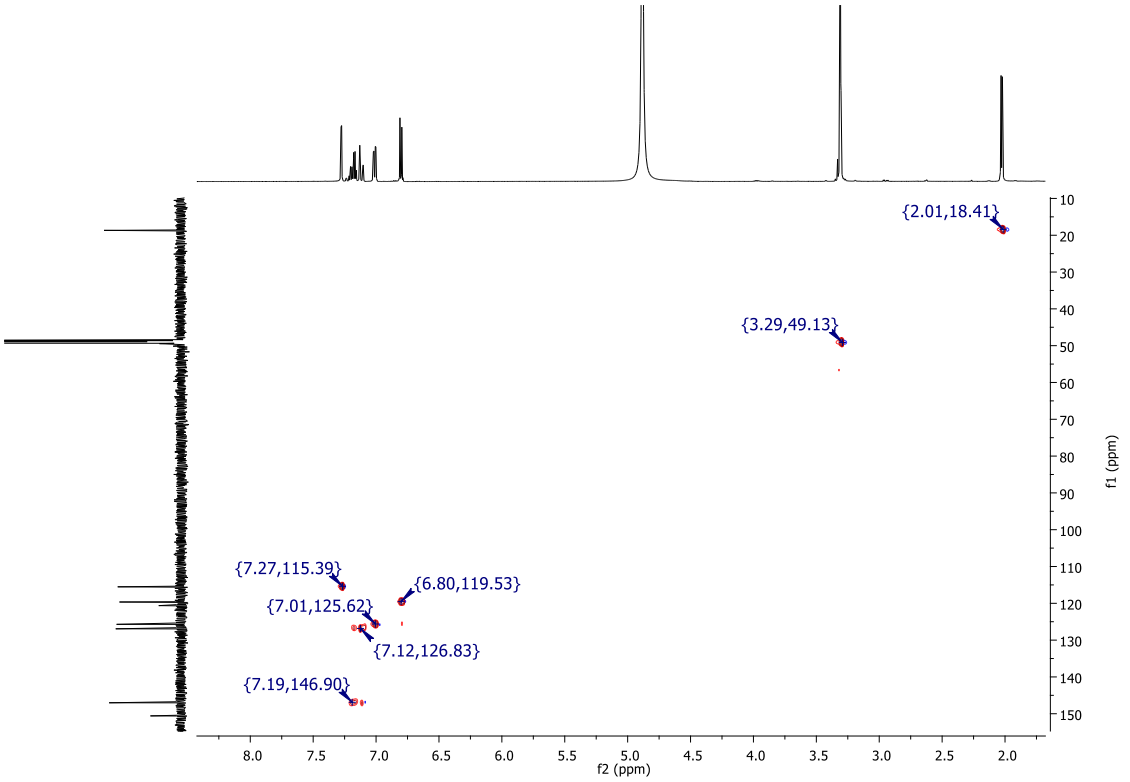
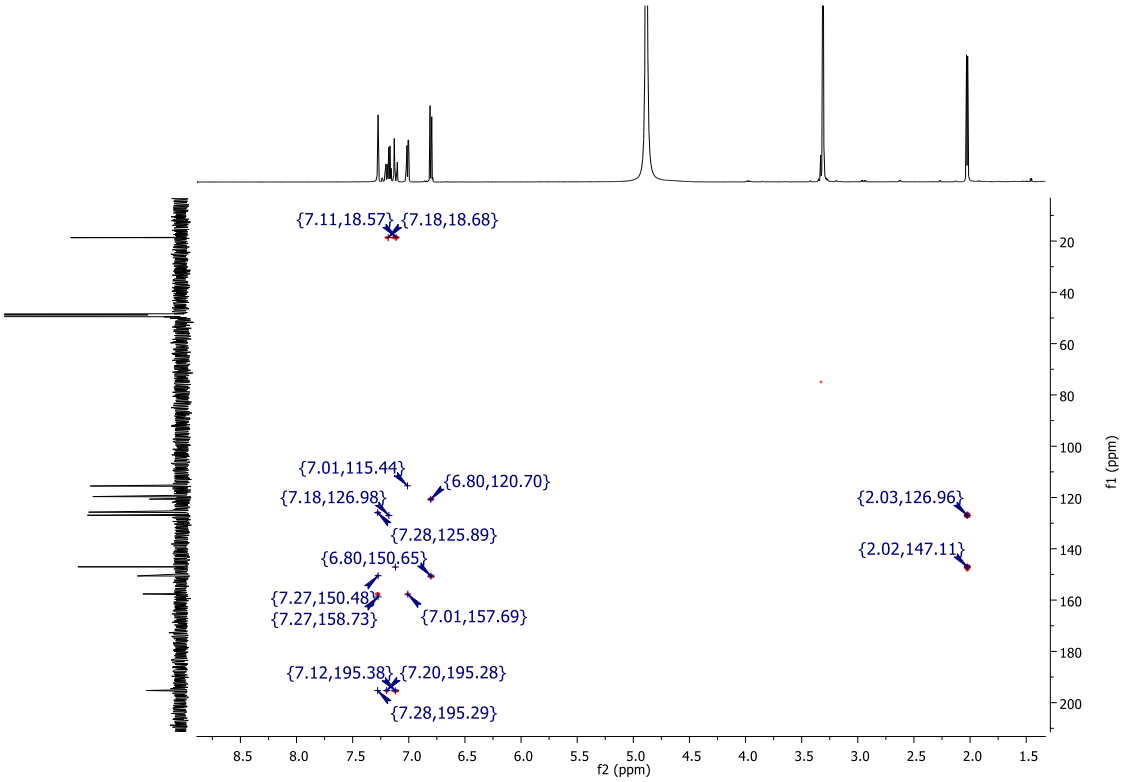



Figura 108 - Espectro de *g*HMBC da substância **8**.