

VICTOR HUGO LINO RUFINO

Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*
isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção
de compostos bioativos.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Química para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

Co-Orientadora: Rebeca Previante Medina

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

R926b Rufino, Victor Hugo Lino
Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*
isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção
de compostos bioativos / Victor Hugo Lino Rufino. –
Araraquara : [s.n.], 2019
111 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

Coorientador: Rebeca Previante Medina

1. Análise cromatográfica. 2. Algas marinhas. 3. Fungos
endofíticos. 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Compostos
bioativos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de compostos bioativos"

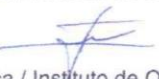
AUTOR: VICTOR HUGO LINO RUFINO

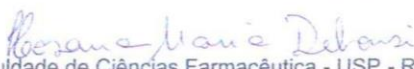
ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

COORIENTADORA: REBECA PREVIAE MEDINA

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

Profª. Drª. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA 
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA 
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. HOSANA MARIA DEBONSI 
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 07 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Victor Hugo Lino Rufino

Endereço Profissional: NUBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP - Brasil.

Endereço eletrônico: vh_lr@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2011-2016

Graduação: Bacharel em Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP.

Título da Monografia: Agentes quimiopreventivos e outras substâncias bioativas da flora brasileira: bioprospecção em *Garcinia brasiliensis*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

2017

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP.

Dissertação: Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de compostos bioativos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos ou resumos em eventos científicos:

RUFINO, V. H. L.; MEDINA, R. P.; SILVA, D. H. S. Metabolic production analysis of

Hypoxylon investiens, an endophytic fungus isolated from the marine red algae *Asparagopsis taxiformis*. 2018. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Foz do Iguaçu-PR, 2018.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS E CONGRESSOS

- 45^a Semana da Química do Instituto de Química da Unesp Araraquara. 2015.
- XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Avaliação do potencial antitumoral e desreplicação dos extratos de *Inga edulis* através de CLAE-DAD. Araraquara-SP, 2015.
- XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Extração, isolamento e caracterização de metabólitos secundários das folhas de *Garcinia brasiliensis*. Araraquara-SP, 2016.
- 1^a Escola de Verão em Química. UNESP, Araraquara - SP. 2018.
- 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Foz do Iguaçu-PR, 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo enorme esforço e apoio para que eu pudesse ter a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colegas do NuBBE, especialmente os integrantes do nosso grupo de pesquisa, pela disposição para ajudar e contribuir com diversas etapas do trabalho.

Aos professores e funcionários do IQ-UNESP, pela dedicação e paciência ao ajudar a resolver problemas e transmitir conhecimento. Sei como é difícil manter a alta qualidade da pesquisa realizada pelo nosso Instituto, considerando as dificuldades que temos no Brasil.

À minha orientadora, professora Dulce, por guiar a pesquisa com entusiasmo e dedicação, mesmo carregando o fardo de ser pesquisadora, educadora e ainda ter que administrar recursos e pessoas, sempre visando melhorar a qualidade do nosso ensino e pesquisa.

À minha co-orientadora, Rebeca, por me ensinar tanto sobre diversos experimentos e como realizar uma boa pesquisa, evitando que eu cometesse erros e também ajudando a corrigí-los.

As agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelas bolsas e investimentos nas nossas pesquisas.

A todos que conheci, desde a graduação até esse momento, com quem pude dividir momentos de alegria e tristeza, e que me fizeram críticas e elogios. Todos esses momentos foram essenciais para que eu pudesse chegar onde cheguei.

“My eyes are constantly wide open to the extraordinary fact of existence. Not just human existence but the existence of life and how this breathtakingly powerful process, which is natural selection, has managed to take the very simple facts of physics and chemistry and build them up to redwood trees and humans.”

(Richard Dawkins)

“We are all connected; to each other, biologically. To the earth, chemically. To the rest of the universe, atomically.”

(Neil DeGrasse Tyson)

RESUMO

Desde antes das primeiras civilizações até o século XIX, o uso de extratos de produtos naturais de plantas, animais e minerais foi o principal meio para tratamento de doenças. A biodiversidade do bioma marinho é enorme e seus organismos têm mostrado importância para o descobrimento de novos fármacos, embora, até algumas décadas atrás, esse ecossistema tenha sido menos explorado que o ambiente terrestre. As macroalgas encontradas em águas rasas foram um dos primeiros organismos marinhos estudados, sendo as algas vermelhas (Rhodophyta), o grupo mais numeroso e com alta produção de metabólitos bioativos. Os micro-organismos vivendo em simbiose com organismos marinhos podem afetar a produção metabólica de algas e outros hospedeiros. Este estudo de bioprospecção visou analisar extratos do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha vermelha *Asparagopsis taxiformis*. Oito substâncias foram purificadas com o uso de técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), e então, identificadas com base nos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional, espectrometria de massas (EM) e espectroscopia UV-Vis. Foram identificadas as dicetopiperazinas ciclo(Pro-Tir), ciclo(Pro-Phe) e ciclo(Pro-Leu), além de três isocumarinas: 5-hidroximetil-meleína, 4-hidroxi-5-metilmeleína e 5-metilmeleína, e ainda, duas tetralonas: nodulisporona e isosclerona. Além das substâncias purificadas por CLAE, foram identificados quatro ácidos orgânicos de baixo peso molecular: ácidos 3-(4-hidroxifenil)lático, 5-hidroxi-indolacético, 3-hidroxibutírico e homogentísico, e o monossacarídeo D-manitol, utilizando cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As frações At01Fr1 a At01Fr5, resultantes do fracionamento preliminar do extrato de *H. investiens* mostraram inibição fraca a moderada das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, envolvidas na Doença de Alzheimer, sendo o melhor resultado, obtido para At01Fr4, com inibição moderada (GI = 48,3%) e seletiva de acetilcolinesterase. Estes dados confirmam a alta quimiodiversidade de endófitos do ambiente marinho e sugerem a necessidade de estudos adicionais, visando a exploração racional dos produtos naturais e de seu potencial biológico, contribuindo ainda para aprofundar o conhecimento deste importante bioma no contexto de práticas de sustentabilidade.

Palavras chave: fungos endofíticos, *Hypoxylon investiens*, alga marinha, *Asparagopsis taxiformis*, quimiodiversidade, citotoxicidade, inibidores de colinesterase, RMN.

ABSTRACT

Since the earliest civilizations through the 19th century, the use of extracts from plants, animals and even minerals was the major option for the treatment of diseases. The biodiversity of the marine environment is huge and its organisms are also important for the discovery of new drugs, although it has been less explored than terrestrial biomes until a few decades ago. The macro-algae found in shallow waters were one of the first marine organisms to be studied, with emphasis on red algae (Rhodophyta), which encompasses the highest number of species and high production of bioactive metabolites. Microorganisms, as fungi and bacteria, living in symbiosis with macro-organisms can affect the metabolic production of algae, invertebrates and other host marine organisms. This bioprospection study aimed to analyze crude extracts of the endophytic fungus *Hypoxylon investiens*, which had been isolated from the red algae *Asparagopsis taxiformis*. Eight compounds were purified using chromatographic techniques, and were further identified based on 1D and 2D nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS) and UV-Vis spectroscopy. Diketopiperazines cyclo (Pro-Tyr), cyclo (Pro-Phe) and cyclo (Pro-Leu) were identified, along with three isocoumarins: 5-hydroxymethyl-mellein, 4-hydroxy-5-methylmellein and 5-methylmellein, and two tetralones: nodulisporone and isosclerone. In addition, four low molecular weight organic acids: acids 3-(4-hydroxyphenyl)lactic, 5-hydroxy-indolacetic, 3-hydroxybutiric and homogentisic, and the monosaccharide D-mannitol, were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Fractions At01Fr1 to At01Fr5, resulting from the preliminary fractionation of *H. investiens* extract, showed weak to moderate inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes, involved in Alzheimer disease. Best results were obtained for At01Fr4, which showed moderate (GI = 48,3%) and selective inhibition of acetylcholinesterase. Such data confirm the high chemodiversity of marine endophytes and suggest the need for additional studies, aiming the rational exploration of natural products and their biological potential, and contributes to deepen the knowledge on this important biome in the context of sustainability.

Key words: marine fungi, *Hypoxylon investiens*, *Asparagopsis taxiformis*, chemodiversity, cytotoxicity, cholinesterase inhibitors, NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Quantidade de produtos naturais marinhos inéditos descobertos de diferentes filos entre 1940 e 2012.....	21
Figura 2 Local de coleta de organismos marinhos que originaram produtos naturais inéditos entre 1965 e 2014.....	22
Figura 3 Alga marinha <i>Asparagopsis taxiformis</i> na região de Ubatuba (SP).	23
Figura 4 Substâncias isoladas do fungo <i>H. investiens</i>	26
Figura 5 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol (A), 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (B) e o ácido 3-nitropropanóico isolados de <i>H. investiens</i>	27
Figura 6 Fungo endofítico <i>Hypoxylon investiens</i> (linhagem AT-01) isolado da alga vermelha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	30
Figura 7 Crescimento da linhagem fúngica AT-01 nos meios de cultivo líquido, em escala ampliada (primeiros dias). Da esquerda para direita: AT-01-Malte e AT-01-MBD.	32
Figura 8 Espectros de RMN de ^1H do extrato bruto AT-01-MBD (vermelho), AT-01-Malte (roxo) e AT-01-Czapek (verde) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).....	39
Figura 9 Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto AT-01-MBD (preto), AT-01-malte (azul) e AT-01-Czapeck (vermelho) no comprimento de onda de 254 nm.	40
Figura 10 Comparação entre o espectro de UV-Vis da substância 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol isolado anteriormente (esquerda) (SILVA, A. D., 2016) e espectro da banda cromatográfica com tempo de retenção de 33,18 minutos do extrato AT-01-Malte (direita).	41
Figura 11 Variação da coloração do meio de cultivo MBD após algumas semanas.	42
Figura 12 Comparação dos espectros de RMN de ^1H do meio de cultivo de malte (ciano), extrato bruto AT-01-Malte da escala reduzida (azul) e AT-01-Malte da escala ampliada (violeta).....	43
Figura 13 Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos da escala ampliada AT-01-MBD-Verde e AT-01-MBD-Amarelo.	44
Figura 14 Cromatogramas em gradiente exploratório das seis frações (Fr 1 – Fr 6) no comprimento de onda de $\lambda = 254 \text{ nm}$. Fr 1: Amarelo, Fr 2: preto, Fr 3: azul, Fr 4: vermelho, Fr 5: verde e Fr 6: rosa.	45

Figura 15 Análise da fração 2 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (85:15 à 40:60 v/v) em 45 min.....	46
Figura 16 Espectros de RMN de ¹ H de nove substâncias isoladas da fração 2 e suas respectivas massas (mg).	47
Figura 17 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P3 (30,45% MeOH:69,55% H ₂ O).	48
Figura 18 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	49
Figura 19 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P3	50
Figura 20 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P3	51
Figura 21 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P3	51
Figura 22 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P7 (36,58% MeOH:63,42% H ₂ O).	53
Figura 23 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	54
Figura 24 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P7	55
Figura 25 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P7	56
Figura 26 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P7	56
Figura 27 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr2-P7	57
Figura 28 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P9 (41,77% MeOH:58,23% H ₂ O).	59
Figura 29 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	61
Figura 30 Espectros CSSF dos sinais sobrepostos da substância Fr2-P9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	61
Figura 31 Mapa de contorno de HMBC de ¹⁵ N da substância Fr2-P9	62
Figura 32 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P9	62
Figura 33 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P9	63
Figura 34 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P9	64
Figura 35 Sobreposição dos espectros TOCSY 1D da substância Fr2-P9	64
Figura 36 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr2-P9	65
Figura 37 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P12 (45,96% MeOH:54,04% H ₂ O).	67
Figura 38 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P12 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	68

Figura 39 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P12	69
Figura 40 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P12	70
Figura 41 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P12	70
Figura 42 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr2-P12	71
Figura 43 Análise da fração 3 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (60:40 à 45:55 v/v) em 30 min.....	73
Figura 44 Espectros de RMN de ¹ H de seis substâncias isoladas da fração 3 e suas respectivas massas (mg).	74
Figura 45 Espectro no UV-Vis da substância Fr3-P1 (46,15% MeOH:53,85% H ₂ O).	75
Figura 46 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr3-P1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	76
Figura 47 Mapa de contorno de COSY da substância Fr3-P1	77
Figura 48 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3-P1	78
Figura 49 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3-P1	79
Figura 50 Espectro MS/MS de alta resolução do íon 245,1294 (modo positivo) para substância Fr3-P1	79
Figura 51 Espectro no UV-Vis da substância Fr3-P3 (47,13% MeOH: 52,87% H ₂ O).	81
Figura 52 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr3-P3	82
Figura 53 Mapa de contorno de COSY da substância Fr3-P3	83
Figura 54 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3-P3	84
Figura 55 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3-P3	84
Figura 56 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr3-P3	85
Figura 57 Espectro no UV-Vis da substância Fr3-P4 (47,35% MeOH: 52,65% H ₂ O).	87
Figura 58 Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para Fr3-P4 (600 e 125 MHz) e para 4-hidróxi-5-Metilmeleína.	88
Figura 59 Mapa de contorno de COSY da substância Fr3-P4	89
Figura 60 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3-P4	90
Figura 61 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3-P4	90

Figura 62 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr3-P4	91
Figura 63 Análise da fração 4 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (50:50 à 20:80 v/v) em 30 min.....	93
Figura 64 Espectros de RMN de ¹ H de quatro substâncias isoladas da fração 4 e suas respectivas massas (mg).	94
Figura 65 Espectro no UV-Vis da substância Fr4-P5 (68,68% MeOH: 31,32% H ₂ O).	95
Figura 66 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr4-P5	96
Figura 67 Mapa de contorno de COSY da substância Fr4-P5	96
Figura 68 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr4-P5	97
Figura 69 Análise da fração 5 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (50:50 à 10:90 v/v) em 30 min.....	99
Figura 70 Espectros de RMN de ¹ H de cinco substâncias isoladas da fração 5 e suas respectivas massas (mg).	100
Figura 71 Cromatograma CG-EM do extrato de malte (vermelho) sobreposto com o cromatograma do meio de malte (azul). 80 – 280°C (3°C/min).	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Massas obtidas dos extratos brutos de cada meio de cultivo em escala reduzida do fungo <i>Hypoxylon investiens</i>	38
Tabela 2 Massas obtidas dos extratos brutos de cada meio de cultivo em escala ampliada do fungo <i>Hypoxylon investiens</i>	42
Tabela 3 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr2-P3 (600 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).	52
Tabela 4 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr2-P7 (600 e 125 MHz) e para a Nodulisporona.	58
Tabela 5 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr2-P9 e para Ciclo(D-Pro-D-Leu).....	66
Tabela 6 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 125 MHz) para Fr2-P12 e para a Isosclerona.	72
Tabela 7 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3-P1 (600 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).	80
Tabela 8 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3-P3 (600 e 125 MHz) e para 5-hidróximetil-meleína.	86
Tabela 9 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3-P4 (600 e 125 MHz) e para 4-hidróxi-5-Metilmeleína.....	92
Tabela 10 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr4-P5 (600 e 125 MHz) e para 5-Metilmeleína.....	98
Tabela 11 Substâncias identificadas por CG-EM.....	102
Tabela 12 Grau de inibição (GI) dos extratos brutos contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama).....	103
Tabela 13 Grau de inibição (GI) dos extratos brutos contra células HCT-116 (carcinoma cólon-retal).....	104
Tabela 14 Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas AChE _{ee} e BChE _{hu}	105
Tabela 15 Porcentagens de inibição de <i>Leishmania infantum</i> para cada fração...105	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
δ_H	Deslocamento químico de 1H (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm)
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
Å	Angstrom
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AChE-ee	Enzima Acetilcolinesterase de Enguia Elétrica
AChE-hu	Enzima Acetilcolinesterase Humana
AcOEt	Acetato de Etila
AT	<i>Asparagopsis taxiformis</i>
BChE-hu	Enzima Butirilcolinesterase Humana
C18	Sílica Gel de Fase Reversa Octadecil Silano
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
CSSF	<i>Chemical Shift Selective Filter</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>dqd</i>	Duplo quádruplo dupleto
EM	Espectrometria de Massas
EPM	Erro Padrão da Média
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>

GI%	<i>Growth Innibition</i>
HCT-116	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICERs	<i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kPa	Quilopascal
Leu	Leucina
<i>m</i>	Multiplete
MBD	Meio de Batata e Dextrose
MCF-7	Linhagem de Célula Tumoral de Mama Humana
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiozol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
nm	Nanômetro
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
T	Tesla
<i>t</i>	Tripleto
Tir	Tirosina
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
tR	Tempo de retenção
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produtos Naturais	19
1.2 Organismos Marinhos	20
1.3 Algas vermelhas	22
1.4 Fungos endofíticos	23
1.5 Fungos do gênero <i>Hypoxylon</i>	24
2 OBJETIVO	28
2.1 Estratégias para atingir o objetivo	28
3 PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1 Coleta da alga	29
3.2 Isolamento e identificação da linhagem fúngica	29
3.3 Obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada	30
3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C)	32
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	32
3.6 Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia em coluna (CC)	33
3.7 Espectrometria de massas de alta resolução	33
3.8 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	33
3.9 Ensaio biológicos	35
3.9.1 Análise de citotoxicidade	35
3.9.2 Análise de atividade anticolinesterásica	35
3.9.3 Análise de atividade leishmanicida	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Análise dos extratos brutos em escala reduzida	38
4.1.1 Análise por RMN de ^1H	38
4.1.2 Análise por CLAE-DAD analítico	39

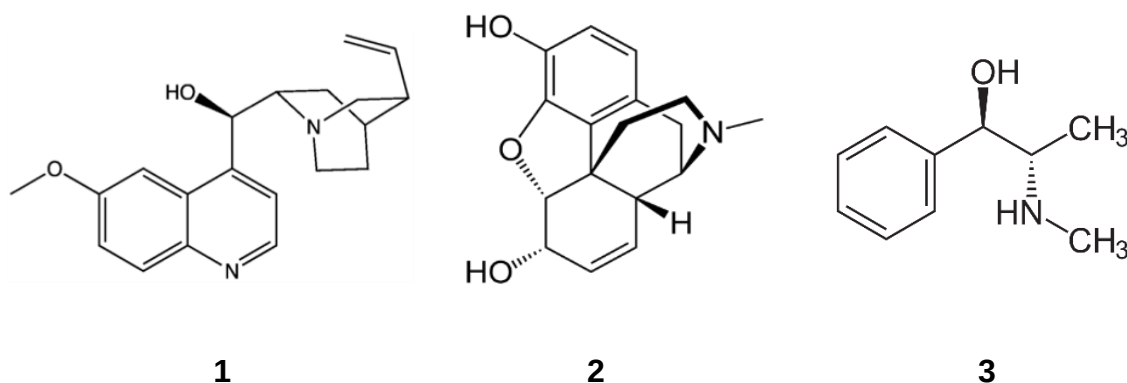
4.2 Cultivo em escala ampliada	41
4.3 Fracionamento do extrato bruto	44
4.4 Purificação da fração 2	46
4.4.1 Elucidação estrutural da substância Fr2-P3	47
4.4.2 Elucidação estrutural da substância Fr2-P7	53
4.4.3 Elucidação estrutural da substância Fr2-P9	59
4.4.4 Elucidação estrutural da substância Fr2-P12	67
4.5 Purificação da Fração 3	73
4.5.1 Elucidação estrutural da substância Fr3-P1	74
4.5.2 Elucidação estrutural da substância Fr3-P3	81
4.5.3 Elucidação estrutural da substância Fr3-P4	87
4.6 Purificação da Fração 4	93
4.6.1 Elucidação estrutural da substância Fr4-P5	94
4.7 Análise da Fração 5 e Fração 1	99
4.8 Análise do extrato de malte por CG-EM	101
4.9 Ensaios biológicos	103
4.9.1 Análise de citotoxicidade	103
4.9.2 Análise de atividade anticolinesterásica	104
4.9.3 Análise de atividade leishmanicida	105
5 CONCLUSÃO	106
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

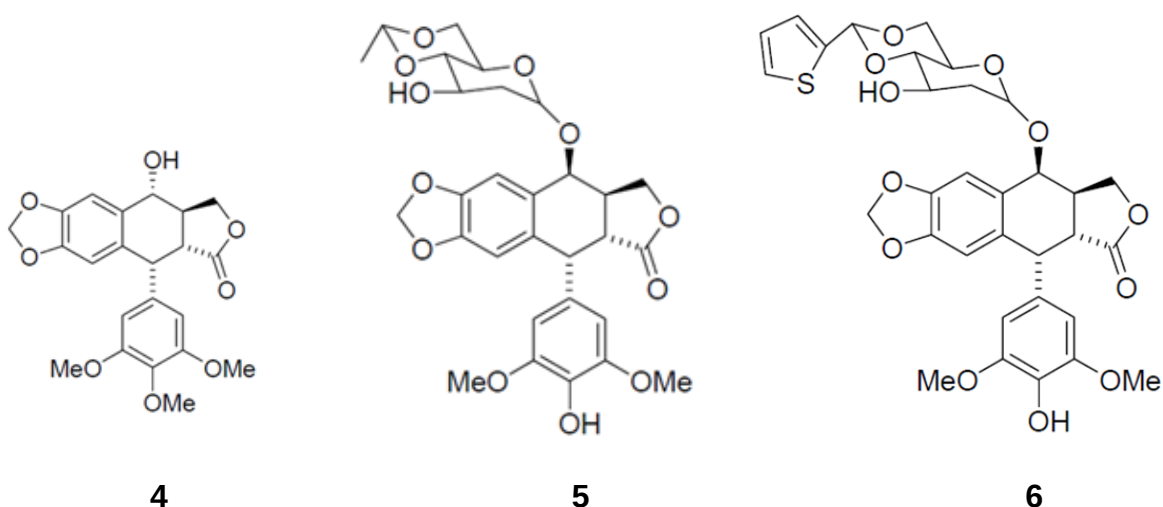
Uma das peculiaridades do ser humano é a capacidade de observar e manipular a natureza de maneira que nenhum outro ser vivo consegue, uma característica fundamental para evolução e sobrevivência da nossa espécie. Desde épocas pré-históricas até o século XIX, o uso de extratos e misturas de produtos naturais era praticamente a única opção para o tratamento das diversas doenças e distúrbios do corpo humano. Registros milenares, como os dos chineses e mesopotâmicos, revelam o uso de diversas plantas, animais e minerais para o preparo de remédios. (PATWARDHAN, 2004)

Os estudos fitoquímicos e microbiológicos se intensificaram com o avanço das técnicas de isolamento e elucidação estrutural, contribuindo para o avanço da farmacologia moderna, que busca o tratamento de doenças através de substâncias isoladas e não somente de extratos. A partir do século 19 começaram a surgir importantes fármacos: a morfina (**1**) foi isolada em 1804 da papoula (*Papaver Somniferum*) e até hoje é utilizada como analgésico. Em 1820 Caventou e Pelletier isolaram a quinina (**2**), um alcalóide anti-malárico presente nas cascas de algumas espécies de *Cinchona*. Outro exemplo clássico de bioprospecção é o isolamento da efedrina (**3**) em 1887, que foi utilizada no tratamento de asma. (CRAGG; NEWMAN, 2013)



Muitos dos agentes terapêuticos disponíveis atualmente foram desenvolvidos devido ao avanço da química sintética, embora quase metade dos novos fármacos das últimas décadas tenham sido obtidos diretamente de produtos naturais ou são

baseados nas estruturas das substâncias isoladas a partir de fontes naturais. (NEWMAN; CRAGG, 2016) Um exemplo é a podofilotoxina (**4**) que foi isolada da *Podophyllum peltatum* e se liga irreversivelmente com a tubulina, o que impede o crescimento da célula tumoral. O etoposídeo (**5**) e o teniposídeo (**6**) são derivados sintéticos da podofilotoxina, porém possuem mecanismo de ação diferente desta: a morte celular ocorre devido inibição da topoisomerase II, impedindo a clivagem do complexo enzima-DNA, induzindo a apoptose celular. Esses três compostos são utilizados no tratamento de câncer de pulmão, leucemias, linfomas, sarcoma de tecido mole, neuroblastoma, entre outros. (HANDE, 2006)

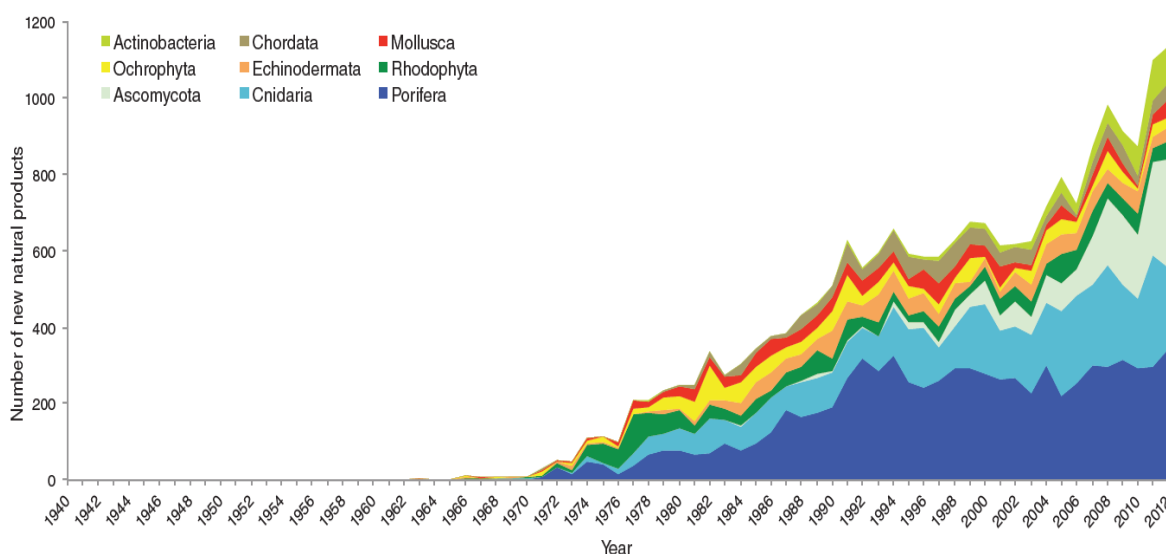


1.2 Organismos Marinhos

Os organismos marinhos podem ser tão diversos e abundantes quanto os terrestres e ambos são fontes de substâncias importantes para a cura de patologias e/ou a manutenção de uma vida saudável. Apesar dos mares e oceanos constituírem um dos maiores ecossistemas do planeta, os organismos marinhos foram bem menos explorados que os terrestres, principalmente devido a maior dificuldade de coletar espécimes (GERWICK; MOORE, 2012). Uma das primeiras descobertas com produtos naturais marinhos biologicamente ativos só foi relatada na década de 1950 por Bergmann e Feeney, que isolaram dois nucleosídeos (espongouridina e espongotimidina) da esponja *Tectitethya crypta*. (BERGMANN; FEENEY, 1951)

Apesar dos estudos com organismos marinhos terem começado nos anos 40, foi somente nos anos 70 que houve o aumento considerável na descoberta de novos produtos naturais marinhos. Nesses primeiros 30 anos foram relatadas 50 novas substâncias (**Figura 1**), o que equivale a menos de 0,2% do total de 26.000 produtos naturais marinhos conhecidos atualmente. (LEAL; CALADO, 2015)

Figura 1 Quantidade de produtos naturais marinhos inéditos descobertos de diferentes filos entre 1940 e 2012.

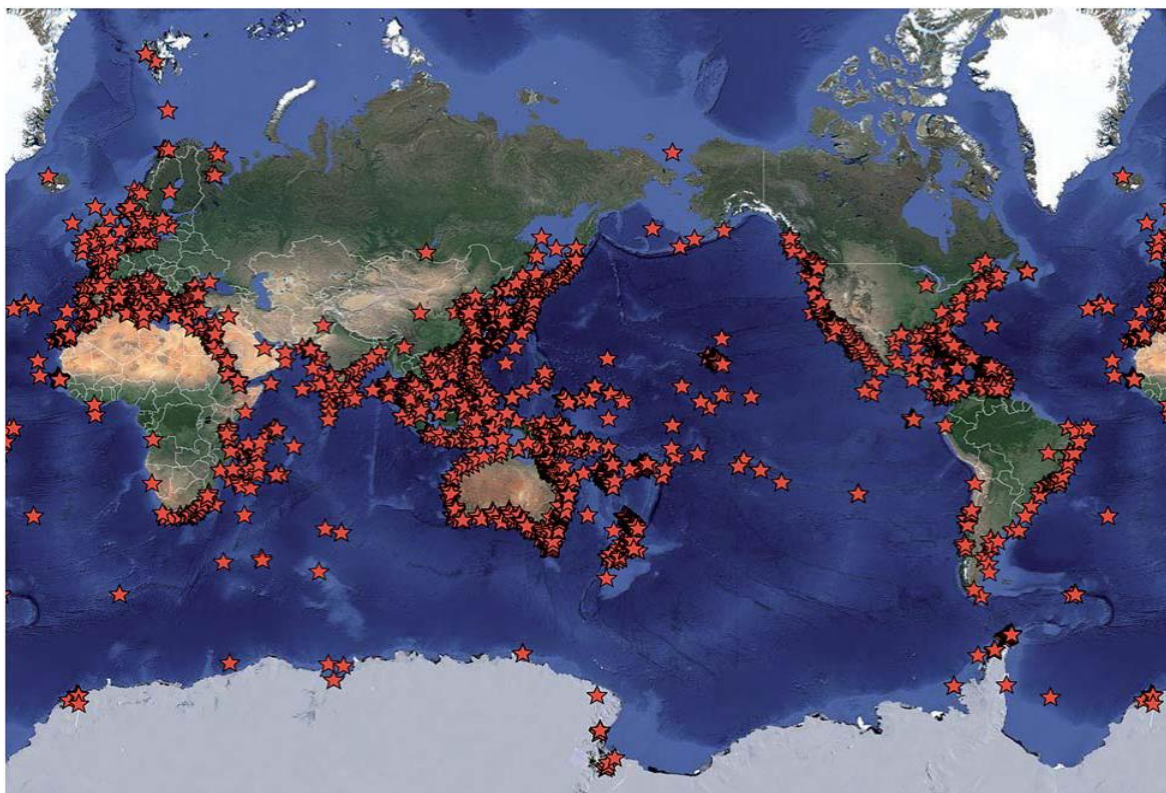


Fonte: Leal; Calado, 2015.

Devido as diferentes condições de crescimento, os organismos marinhos apresentam diferenças na produção metabólica em relação aos terrestres. No geral, os organismos marinhos apresentam metabólitos com cadeias e anéis maiores, mais substituintes halogenados, são mais hidrofóbicos e possuem menos anéis aromáticos. (SHANG et al., 2018)

Essa diversidade de metabólitos e a falta de estudos do ecossistema marinho têm chamado a atenção dos pesquisadores pelo grande potencial de descoberta de novos compostos bioativos. Essa questão é especialmente importante para o Brasil, já que temos uma das maiores costas marinhas do mundo e, ainda assim, a descoberta de novos compostos a partir dos mares da América do sul (538) continua menor do que na Coreia do Sul (848) (**Figura 2**). (BLUNT et al., 2016)

Figura 2 Locais de coleta de organismos marinhos que originaram produtos naturais inéditos entre 1965 e 2014.



Fonte: Blunt et al., 2016.

1.3 Algas vermelhas

As macro-algas encontradas em águas rasas foram um dos primeiros organismos marinhos a serem estudados por serem de fácil coleta. Ainda assim existem muitas espécies de algas a serem estudadas, sendo que só no Brasil foram identificadas 111 novas espécies da classe Rhodophyceae no período de 2010 a 2015. (MENEZES; BICUDO; MOURA, 2015)

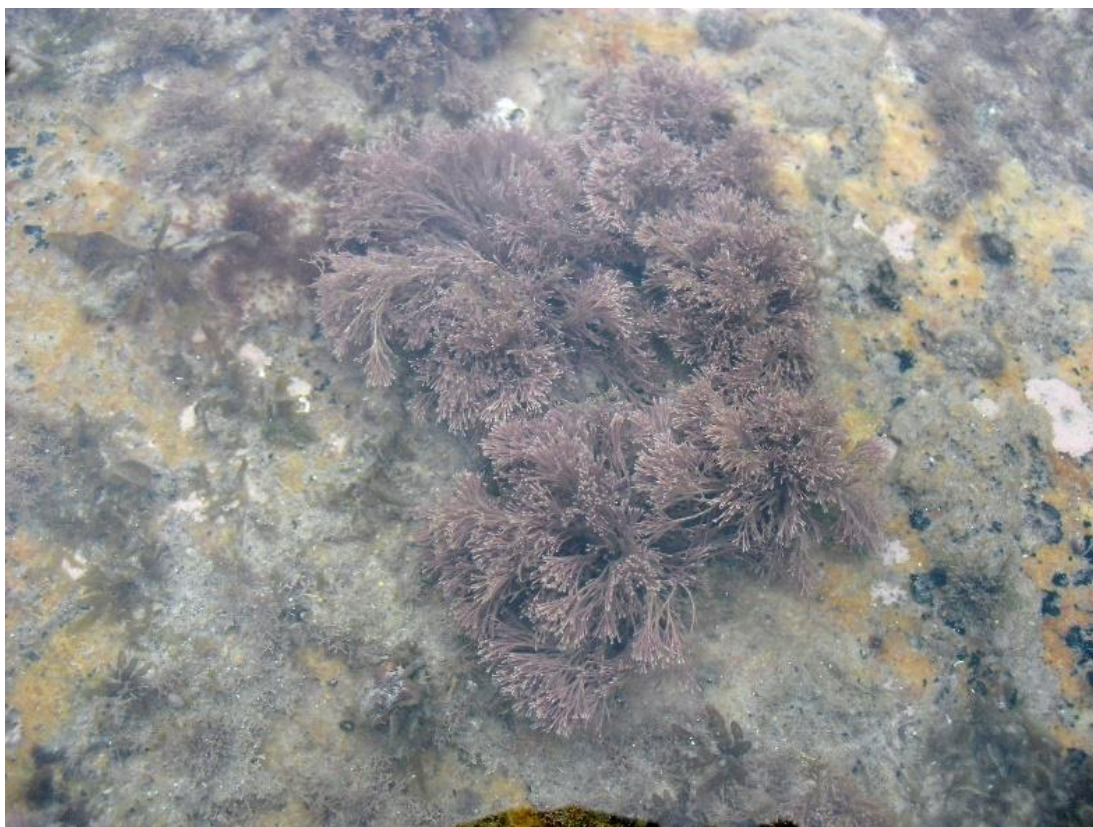
As macro-algas vermelhas (Rhodophyta) se destacam como o grupo com maior número de espécies (aproximadamente 7000) e por apresentarem alta variedade de metabólitos bioativos. (GUIRY, 2012)

Essas algas podem ser encontradas em diversas regiões do globo, a maioria no fundo do mar, mas também podem viver ligadas em substratos rochosos perto da costa. São conhecidas espécies produtoras de metabólitos halogenados com diferentes estruturas. (FAULKNER, 2001)

Devido a maior acessibilidade em relação a outros organismos marinhos e devido à sua grande quimiodiversidade, as algas continuam sendo uma das principais fontes de material para estudo com produtos naturais marinhos.

A alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (**Figura 3**), utilizada para o isolamento dos fungos endofíticos estudados nesse trabalho, foi coletada no litoral norte do Estado de São Paulo. Estudos demonstraram que essa espécie produz substâncias com atividade antibacteriana (MANILAL; SELVIN; GEORGE, 2012), leishmanicida (GENOVESE et al., 2009) e antifúngica (EL-BAROTY et al., 2007).

Figura 3 Alga marinha *Asparagopsis taxiformis* coletada na região de Ubatuba (SP).



Fonte: Medina, 2016.

1.4 Fungos endofíticos

Assim como no ambiente terrestre, os organismos marinhos podem viver associados a micro-organismos como fungos e bactérias, o que pode ser fundamental para a sobrevivência dos dois organismos. Os micro-organismos endofíticos vivem entre os tecidos do hospedeiro onde conseguem obter nutrientes

sem provocar danos, podendo até produzir substâncias que protegem o hospedeiro de agentes patógenos ou ajudam em seu desenvolvimento. Para sobreviver nesse ambiente os endófitos precisam resistir ao sistema imunológico do hospedeiro e vencer a competição por nutrientes com outros micro-organismos, por isso a maioria dos endófitos dominantes são produtores de metabólitos secundários que agem como antifúngicos, anticarcinogênicos, imunossupressores ou antioxidante. (JIA et al., 2016; KLIMOVA; PEÑA; SÁNCHEZ, 2016)

A importância da simbiose entre organismos para obtenção de substâncias é cada vez mais evidente, já que estudos revelaram que diversos compostos bioativos isolados de organismos marinhos, na verdade foram sintetizados pelos seus micro-organismos associados. (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012)

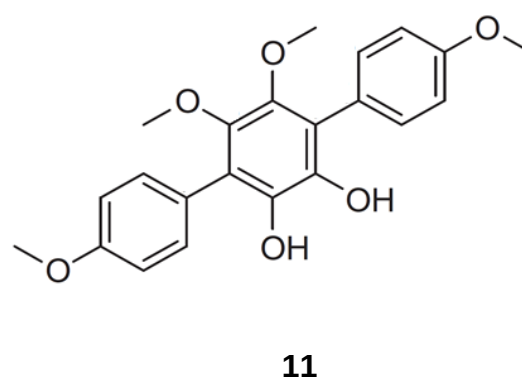
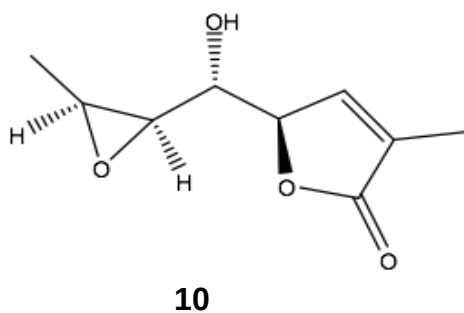
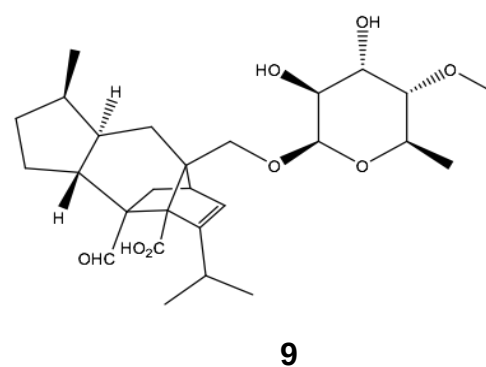
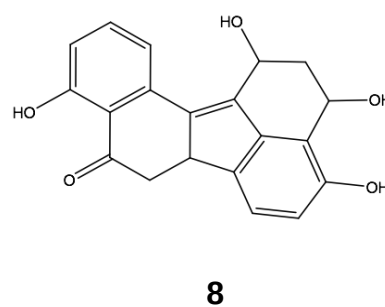
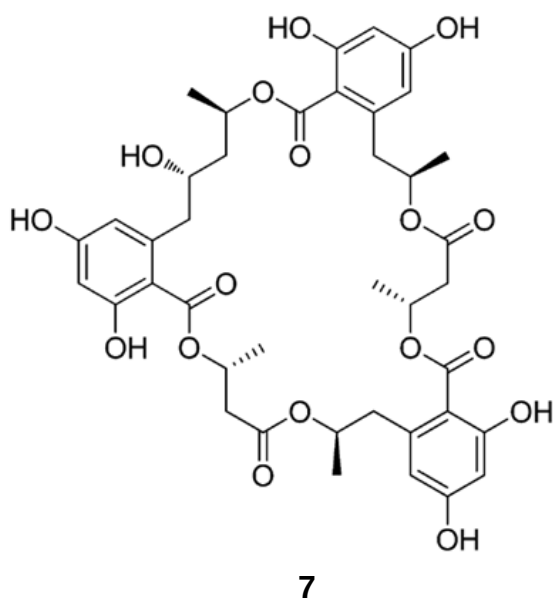
A variação de fatores como a temperatura, água, quantidade de luz, tipo de nutrientes e pH podem mudar drasticamente o desenvolvimento de uma espécie, podendo alterar a quantidade e as espécies de micro-organismos vivendo em simbiose com o hospedeiro. (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012)

Devido a biodiversidade de organismos hospedeiros e a dificuldade de identificar micro-organismos, a quantidade de fungos endofíticos estudados ainda é pequena. Estimativas demonstram a existência de mais de um milhão de espécies de fungos endofíticos, sendo que menos de 10% foram estudados. (STROBEL; DAISY, 2003)

1.5 Fungos do gênero *Hypoxylon*

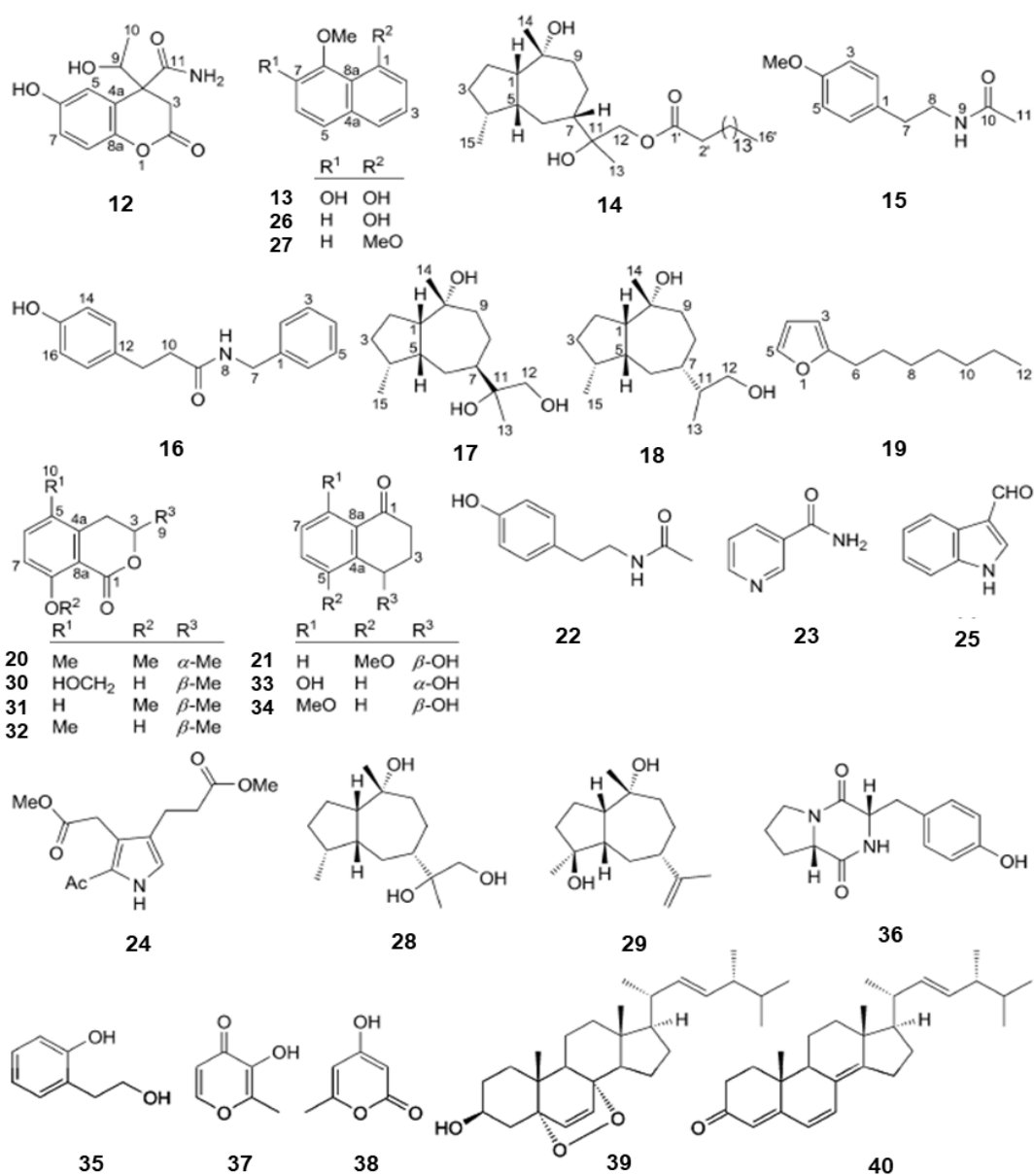
O gênero *Hypoxylon*, pertencente à família Xylariaceae, é constituído de aproximadamente 130 espécies (ÜHLBAUER et al., 2002). Esse gênero é um dos poucos da família que produzem metabólitos secundários policetídicos do tipo azafilonas (ZHANG et al., 2016). Diversas substâncias que apresentaram atividades biológicas foram isoladas de fungos desse gênero como, por exemplo, a Menisporopsina A (7). Esse macrociclo, isolado de *H. oceanicum*, apresentou atividade antimalárica, antimicrobiana e citotóxica contra a linhagem BC-1 (câncer de mama) (CIMMINO et al., 2017). O Hypoxylonol C (8), que é um derivado do benzofluoranteno, foi encontrado em *H. truncatum* e apresentou atividades antiproliferativa, antiangiogênica e citotóxica (FUKAI et al., 2012; FUKAI et al., 2014). Da espécie *H. croceum* foram isoladas a sordarina (9) e hipoxilactona (10), sendo

que ambas apresentaram atividade antifúngica (DAFERNER et al., 1999). O Riquenil A (**11**) é um derivado trifenílico com atividade citotóxica e antioxidante, sendo que essa substância foi encontrada nas espécies *H. fendleri* e *H. rickii*. (INTARAUDOM et al., 2017; KUHNERT et al., 2015)



A espécie *H. investiens* possui poucos estudos de prospecção químico-biológica, por isso seu potencial para obtenção de compostos bioativos é pouco conhecido. Chang e colaboradores (2014) descreveram o isolamento de 29 substâncias dessa espécie (**Figura 4**) sendo que algumas foram descritas pela primeira vez como produtos naturais (**15-21**) e outras são substâncias já conhecidas (**22-40**).

Figura 4 Substâncias isoladas do fungo *H. investiens*.

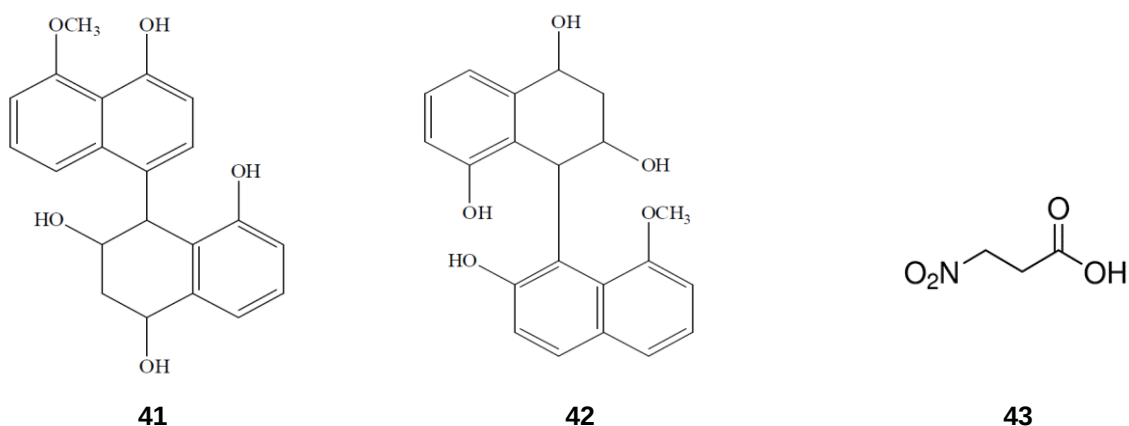


Fonte: Chang et al., 2014; adaptado pelo autor.

Um estudo recente revelou ainda que essa espécie é produtora das enzimas amilase, celulase, lipase e lacase, que apresentam potencial de aplicação em diversos bioprocessos. A lacase, por exemplo, pode ser usada na desintoxicação de efluentes de fábricas de papel, biorremediação de solos contaminados, síntese de polímeros e na catálise em reações para síntese de fármacos (TOGHUEO et al., 2017).

Esse fungo também foi estudado anteriormente em nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2016), tendo sido possível isolar duas substâncias inéditas derivadas do naftaleno (**41** e **42**), além do ácido 3-nitropropanóico (**43**), obtido com alto rendimento (**Figura 5**).

Figura 5 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol (**41**), 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (**42**) e o ácido 3-nitropropanóico (**43**) isolados de *H. investiens*.



Fonte: Silva, 2016.

O presente estudo visa continuar a busca por metabólitos bioativos a partir do extrato do fungo *H. investiens*, já que no estudo anterior foram identificadas frações promissoras que possivelmente continham outros derivados de naftaleno, além da importância do reisolamento dos binaftalenos para estudos de bioatividade e determinação da estereoquímica.

2 OBJETIVO

Estudo químico visando substâncias inéditas e/ou bioativas do extrato com maior quimiodiversidade do fungo endofítico *Hypoxyton investiens*, isolado da alga *Asparagopsis taxiformis*.

2.1 Estratégias para atingir o objetivo

- Análise do perfil químico dos extratos e identificação dos metabólitos produzidos pelo fungo em escala reduzida em diferentes meios de cultivo (MBD, Malte e Czapek).
- Avaliação do potencial anticolinesterásico, leishmanicida e citotóxico dos extratos, frações e substâncias isoladas.
- Crescimento do fungo em escala ampliada utilizando as condições que levaram a maior produção de metabólitos de interesse na escala reduzida.
- Fracionamento dos extratos e isolamento de substâncias utilizando métodos cromatográficos (CLAE, CCD, CPG e CC).
- Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas utilizando métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C e UV) e espectrométricos (CLAE-EM e CG-EM).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Coleta da alga

A fase diploide de *Asparagopsis taxiformis* foi coletada em junho de 2013, no costão direito da praia da Fortaleza em Ubatuba, SP. A alga foi identificada pela Dr^a Nair Yokoya do Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica (SP 428533). A alga foi lavada em água do mar e armazenada em frascos contendo água do mar esterilizada e o antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}). Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Instituto de Química - UNESP Araraquara.

3.2 Isolamento e identificação da linhagem fúngica

A alga foi esterilizada superficialmente através de imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos, seguido de lavagem com água do mar esterilizada por 10 minutos.

Após o processo de esterilização, a alga foi fragmentada com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis, e transferida para placas de Petri contendo meio de cultivo de batata-dextrose-água (BDA), água do mar esterilizada e o antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}). Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada em BDA em água do mar.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção de sete linhagens puras (AT-01 – AT-07), que foram preservadas em *slants* (frascos contendo água do mar ou água ultra pura esterilizada e o fungo em meio sólido BDA), que foram lacrados e mantidos em temperatura ambiente na micoteca do Dep. Química Orgânica do IQ-UNESP.

A identificação da linhagem fúngica foi feita através do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA (ITS) do micro-organismo. Inicialmente foi feita a extração do material genético utilizando kit (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™), seguido do preparo das reações para o sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi feito automaticamente por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e, em seguida, foi

realizado o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no *GenBank* (banco de dados genômicos). Dessa forma foi possível identificar a linhagem AT-01 como *Hypoxylon investiens* (**Figura 6**).

A coleta da alga e as etapas de isolamento e identificação das linhagens fúngicas foram realizadas pela Dr^a. Rebeca P. Medina. (MEDINA, 2016)

Figura 6 Fungo endofítico *Hypoxylon investiens* (linhagem AT-01) isolado da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*.



Fonte: Medina, 2016.

3.3 Obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada

Para fermentação em escala reduzida uma amostra do fungo *Hypoxylon investiens* (AT-01), que estava preservada em frasco *slant* contendo água do mar, foi colocada em uma placa de Petri contendo meio de cultivo BDA. Após sete dias de crescimento a 25 °C, essa linhagem foi repicada em três novas placas contendo o mesmo meio de cultivo e o crescimento ocorreu nas mesmas condições.

Para realizar o crescimento do endófito, foi inoculado um terço de micélio da placa de Petri em cada frasco de Erlenmeyer (500 mL) com abertura de 3 cm de diâmetro contendo 300 mL de meio de cultivo em água do mar, totalizando três frascos Erlenmeyer para cada meio (MBD, Czapek e Malte). Também foram preparados frascos contendo somente os meios líquidos como controle. .

Os fungos cresceram por 28 dias a 25 °C, sendo que os frascos de Erlenmeyers foram levemente agitados uma vez a cada 7 dias. Após o período de incubação o caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo e o filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt). O solvente orgânico foi evaporado no rotaevaporador Buchi® R114 (banho termostatizado B-480) e no SPD SpeedVac™ com refrigeração RVT4104. Os extratos brutos secos foram analisados por RMN e CLAE-DAD para obtenção do perfil químico dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo.

As condições utilizadas para o crescimento da linhagem fúngica AT-01 (temperatura, agitação, local, tempo e volume do meio) em escala ampliada foram as mesmas utilizadas na escala reduzida. Com base nas massas dos extratos brutos obtidos em escala reduzida, os fungos foram inoculados em 24 frascos de Erlenmeyer com MBD, estimando a obtenção de aproximadamente 1,5 g de extrato. Para o crescimento em meio de cultivo de malte foram preparados 39 frascos Erlenmeyer, estimando a obtenção de, aproximadamente, 1,0 g de extrato. Após 28 dias de cultivo, o caldo foi separado do micélio por filtração e o filtrado foi submetido a partição líquido-líquido, seguindo a mesma metodologia usada para escala reduzida. Devido o maior volume de solvente, foi utilizado um rotaevaporador Buchi® R-220 com balão de 20 L.

Figura 7 Crescimento da linhagem fúngica AT-01 nos meios de cultivo líquido, em escala ampliada (primeiros dias). Da esquerda para direita: AT-01-Malte e AT-01-MBD.



Fonte: Próprio autor.

3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C)

As análises por RMN de ^1H dos extratos obtidos em escala reduzida foram realizadas em espectrômetro Bruker Fourier™ 300 com campo magnético de 7,0 T e as análises dos extratos da escala ampliada (COSY, TOCSY, HSQC, ^1H com CSSF, HMBC de ^{13}C e ^{15}N) foram feitas no equipamento Bruker Avance III HD 600 com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Channel Inverse) de 5 mm. TMS foi usado como referência interna e as amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6 , Sigma-Aldrich®).

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD no modo analítico foram realizadas no equipamento Shimadzu® com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, degaseificador DGU-20A₃, duas bombas LC-20AT e injetor automático SIL-20A.

Antes das análises, cada amostra (4,0 mg) foi solubilizada em 1 mL de solução MeOH:H₂O (95:05) e submetida a um “clean up” utilizando cartuchos com sílica C-18.

Foi usada uma coluna analítica Phenomenex® Luna do tipo octadecil silano (C-18; 250 x 4,60 mm; 5 µm; 100 Å), sendo injetados 30,0 µL de cada amostra, com eluição em gradiente exploratório H₂O:MeOH (95:05 – 0:100 v/v) por 40 min e fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

As análises por CLAE-DAD no modo semi-preparativo foram realizadas no equipamento Shimadzu® com detector ultravioleta com arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, degaseificador DGU-20A_{5R} e duas bombas LC-6AD. As amostras (20,0 mg/mL) foram injetadas manualmente e eluídas em uma coluna Phenomenex® Luna C-18 (250 x 10,0 mm; 5 µm; 100 Å).

3.6 Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia em coluna (CC)

O extrato bruto, obtido pelo cultivo em meio de malte em escala ampliada, foi fracionado por CC. A coluna de vidro foi empacotada com a fase estacionária octadecil silano (C-18) (Sorbent Technologies, Inc), que possui partículas de 40 – 75 µm (200 – 400 mesh), porosidade de 60 Å e eluição em modo reverso com soluções de MeOH:H₂O como fase móvel.

3.7 Espectrometria de massas de alta resolução

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massas UHR-ESI-QTOF MaXis™ Impact (*Ultra High Resolution - Electrospray Ionization - Quadrupole - Time of flight*). As amostras foram injetadas diretamente no espectrômetro.

3.8 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Para identificação por desreplicação das substâncias do extrato bruto em escala ampliada, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu CGMS-QP2020® equipado com injetor automático AOC-20i® e coluna capilar Restek® SH-Rtx-5MS (5/95% de

difenil/dimetil polisiloxano com as dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Os cromatogramas foram analisados através do programa GCMS solution®.

Como o perfil químico das substâncias contidas nos extratos brutos era desconhecido, foi necessário realizar reações de derivatização para que essas substâncias se tornassem mais voláteis e estáveis em altas temperaturas. Essas reações substituem os hidrogênios dos grupos funcionais –OH, –SH, –NH e –COOH por unidades de trimetilsilano ou *tert*-butildimetilsilano.

Inicialmente foi realizada a reação de metoximação, na qual 5 – 10 mg da amostra foram solubilizados em 80 µl de uma solução de metoxiamina em piridina (20 mg.mL⁻¹), seguida da adição de 100 µL de piridina e aquecimento da solução resultante em banho-maria a 30 °C por 90 min. À amostra metoximada foram adicionados 200 µL de MSTFA [N-metil-N (trimetilsilil) trifluoroacetamida], seguido de aquecimento a 37 °C por 30 min e repouso na geladeira durante 24 h. Após esses procedimentos, as amostras foram filtradas em microfiltro de 0,22 µm e transferidas para vial com *insert* de 350 µl de onde foi tirado 1 µL para injeção no cromatógrafo.

A injeção foi feita no modo *split* com a temperatura do injetor de 270 °C. A pressão do gás de arraste (He 99,999%) foi de 65,2 KPa, com velocidade linear de 36,8 cm.seg⁻¹ e fluxo total de 104 mL.min⁻¹.

Inicialmente o forno foi mantido a 80 °C por 3 min, a temperatura aumentou com taxa de 3 °C.min⁻¹ até 280 °C que foi mantida por 5 min. Para as condições de detecção por EM, foram utilizadas temperatura da fonte de íons de 270 °C, temperatura de interface de 280 °C e faixa de aquisição de *m/z* 35 – 700 Daltons.

Para identificação das substâncias, os espectros de fragmentação das amostras foram comparados com a base de dados NIST 69™ *Library* e aqueles com menos de 85% de similaridade foram excluídos da análise.

As substâncias com similaridade aceitável tiveram seus índices de retenção calculados pela equação de Van Den Dool e Kratz (**Equação 1**), que depende do tempo de retenção da banda cromatográfica de interesse e das bandas da série homóloga de alcanos (C₈ – C₄₀).

Equação 1 Equação de Van Den Dool e Kratz.

$$IR = 100n + 100 \left(\frac{tRx - tRn}{tRn + 1 - tRn} \right)$$

Onde n é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior ao pico de interesse, tR_x é o tempo de retenção da substância de interesse, tR_n é o tempo de retenção do n -alcano homólogo e $tR_n + 1$ é o tempo de retenção do alcano seguinte ao n -alcano homólogo. Os índices reais de retenção (IR) foram comparados com os índices de retenção teóricos encontrados na literatura. A combinação das duas metodologias de comparação garante uma maior confiabilidade na identificação das substâncias.

3.9 Ensaios biológicos

3.9.1 Análise de citotoxicidade

O ensaio citotóxico foi realizado em parceria com a Prof.^a Dra. Letícia Veras Costa Lotufo no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (ICB-USP). As análises foram feitas com células HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama).

Foram plaqueadas 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células.mL⁻¹ em 200 µL de meio). Após 24 h, as amostras dos extratos foram adicionadas em concentrações de 5 µM e 50 µM, cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. Após 72 h de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg.mL⁻¹). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido e, após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm. (MOSMANN, 1983)

3.9.2 Análise de atividade anticolinesterásica

O ensaio anticolinesterásico foi realizado em parceria com Prof.^a Dra. Carmen Lúcia Cardoso do Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais (USP de Ribeirão Preto). As amostras foram submetidas ao ensaio de inibição para as enzimas acetilcolinesterase de enguia elétrica (AChE_{ee}) e para a enzima butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}).

Para este ensaio foram utilizadas as enzimas AChE_{ee} e a BChE_{hu} imobilizadas em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375 mm x 100 µm d.i.), constituindo um reator capilar com enzima imobilizada (ICER - *Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}, respectivamente.

Os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu} foram utilizados como biorreatores enzimáticos acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e um espectrômetro de massas (EM) formando um sistema *on-flow* para a realização de ensaios de triagem de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática é monitorada pela quantificação direta do produto de hidrólise enzimática *m/z* 104 e utilizando a galantamina como inibidor padrão.

O controle positivo consiste na avaliação da atividade enzimática sem o composto candidato a inibidor, sendo o meio reacional constituído por 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0, 20 µL da solução de ACh, e 10 µL do solvente de solubilização das amostras (metanol).

O controle negativo consiste na avaliação de um branco de cada composto na presença do substrato da enzima, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada. Esse ensaio é realizado para avaliar a interferência do composto na auto-hidrólise do substrato.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área do pico da atividade da enzima na presença do inibidor (*P_i*) com a área do pico da atividade da enzima na ausência de inibidor (*P₀*), conforme descrito na **Equação 2**.

Equação 2 Cálculo de inibição enzimática.

$$\%deinibição = \left[1 - \frac{P_i - Sb}{P_0 - Sb} \right] \times 100$$

3.9.3 Análise de atividade leishmanicida

O ensaio leishmanicida foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (USP de São Carlos). No ensaio de amastigota intracelular, as células THP-1 foram plaqueadas a 2×10^4 células por poço (RPMI-1640, 100 µL) com forbol-12-miristato-

13-acetato (PMA), na concentração de 20 ng.mL^{-1} , para serem diferenciadas em macrófagos. Após incubação por 72 h (5% CO_2 , 37°C), o meio foi aspirado e foram adicionados promastigotas de *Leishmania infantum* em estágio avançado (2×10^5 células por poço, $100 \mu\text{L}$). Após 24 h de incubação, o meio foi aspirado para limpar parasitas extracelulares, as amostras foram adicionadas em diluições de $100 \mu\text{L}$ e as placas foram incubadas por 120 h. As placas incluíam controles negativos e Miltefosina como controle positivo. Após a incubação, o meio foi removido e as células foram fixadas em metanol e coradas com corante Giemsa. O número médio de amastigotas intracelulares por célula THP-1 foi determinado usando microscópio invertido e contador de células. A inibição do crescimento é expressa como uma porcentagem do número médio de amastigotas por macrófago nos poços de controle negativos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos extratos brutos em escala reduzida

Após pesagem dos extratos secos (**Tabela 1**), eles foram analisados por RMN de ^1H e por CLAE-DAD, que permitiram comparar os perfis de produção metabólica do fungo nos diferentes meios de cultivo.

Tabela 1 Massas obtidas dos extratos brutos de cada meio de cultivo em escala reduzida do fungo *Hypoxyylon investiens*.

Extrato	Massa (mg)	Massa por Erlenmeyer (mg)
AT-01-Czapeck	12,3	4,1
AT-01-Malte	83,2	27,7
AT-01-MBD	216,8	72,2

4.1.1 Análise por RMN de ^1H

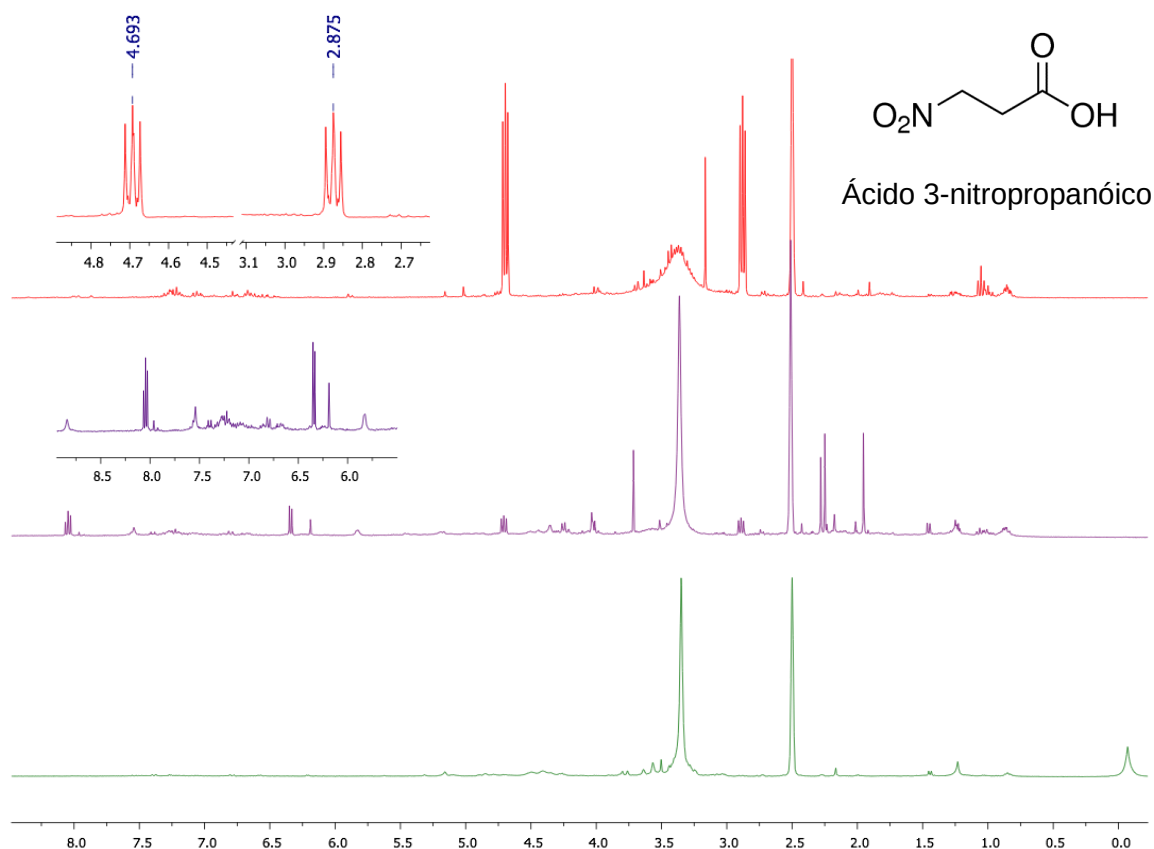
Comparando os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos AT-01-MBD e AT-01-Malte (**Figura 8**), foi possível verificar a variação e aumento da intensidade de sinais na região de 6,25 – 8 ppm no espectro de AT-01-Malte, referentes a hidrogênios aromáticos. O mesmo ocorreu na região de 1,5 – 2,5 ppm que envolve hidrogênios alquílicos e α -carbonílicos, entre outros.

Outra informação importante foi a diminuição da intensidade dos sinais em δ_{H} 2,87 (t , $J_{2-3} = 6,0$ Hz) e δ_{H} 4,69 (t , $J_{3-2} = 6,0$ Hz) no espectro de RMN de ^1H do extrato AT-01-Malte, que são referentes aos sinais dos hidrogênios do ácido 3-nitropropanóico, quando comparado com o espectro de AT-01-MDB. Esse ácido tem um valor comercial considerável, porém sua alta concentração pode dificultar a separação e identificação das substâncias minoritárias que podem ser inéditas e possuir importantes bioatividades.

O espectro de RMN de ^1H do extrato bruto AT-01-Czapek apresentou uma quantidade e intensidade menor dos sinais, demonstrando que esse extrato possui uma variedade menor de substâncias. Devido a esse fato e também ao baixo

rendimento, o extrato bruto obtido a partir do crescimento da linhagem AT-01 em meio de cultivo Czapek não se mostrou promissor para a continuidade dos estudos em escala ampliada.

Figura 8 Espectros de RMN de ^1H do extrato bruto AT-01-MBD (vermelho), AT-01-Malte (roxo) e AT-01-Czapek (verde) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).

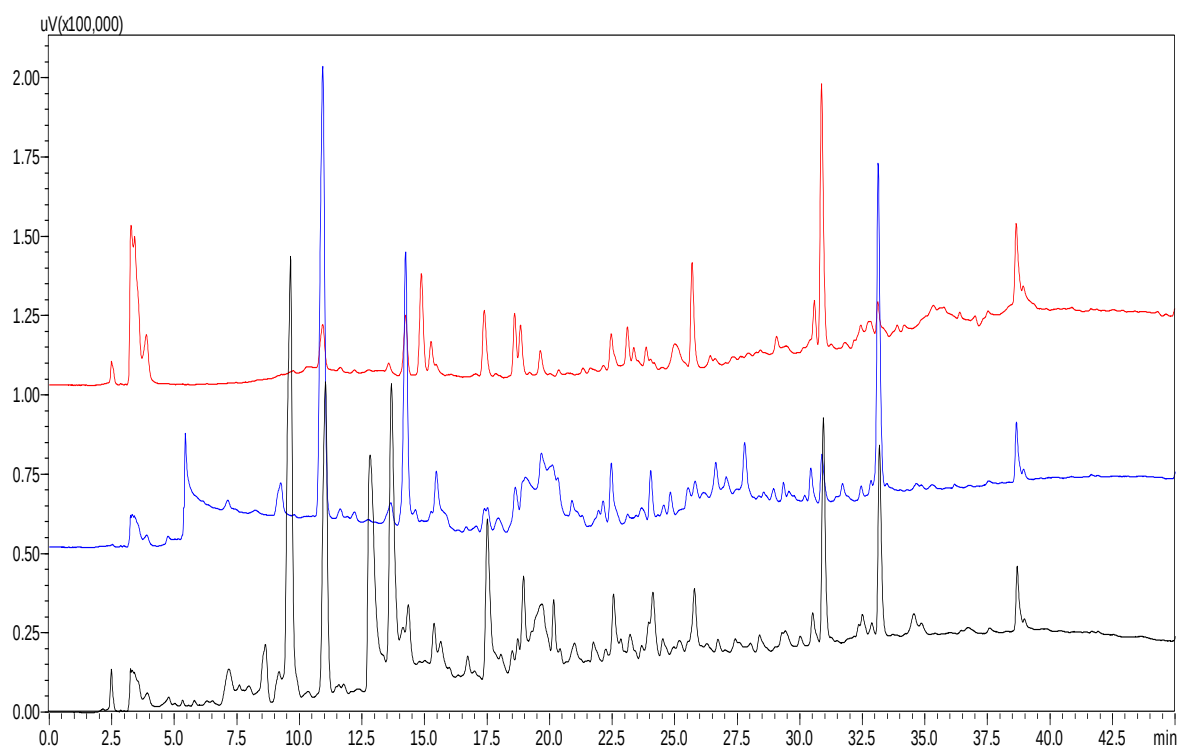


Fonte: Próprio autor.

4.1.2 Análise por CLAE-DAD analítico

Os cromatogramas dos extratos brutos AT-01-Malte e AT-01-MBD (**Figura 9**) apresentaram mais bandas com baixo e médio tempo de retenção, que são referentes a substâncias com alta e média polaridade respectivamente (considerando a análise realizada em fase reversa C18). O cromatograma do extrato bruto AT-01-Czapek apresentou uma variedade menor de sinais.

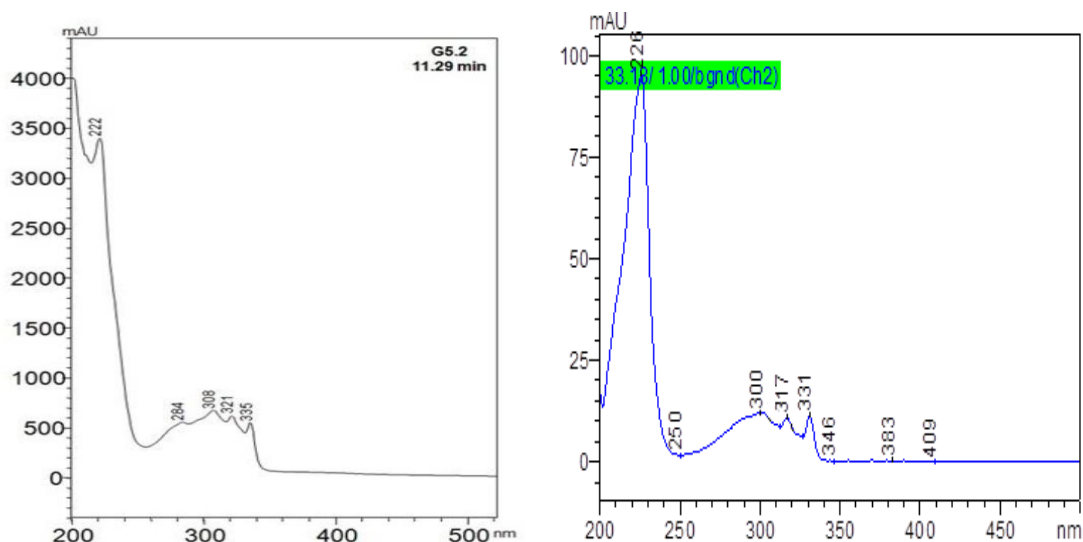
Figura 9 Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto AT-01-Czapeck (vermelho) AT-01-MBD (azul) e AT-01-malte (preto) no comprimento de onda de 230 nm.



Fonte: Próprio autor.

Uma das bandas cromatográficas ($t_R = 33,18$ min) do extrato de malte apresentou perfil de absorção no UV-Vis parecido com os dos binaftalenos tetróis (**Figura 5**) isolados em trabalho anterior com esta linhagem fúngica, a partir do extrato de MBD (SILVA, A. D., 2016) (**Figura 10**).

Figura 10 Comparação entre o espectro de UV-Vis da substância 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol isolado anteriormente (esquerda) (SILVA, A. D., 2016) e espectro da banda cromatográfica com tempo de retenção de 33,18 minutos do extrato AT-01-Malte (direita).



Fonte: Próprio autor.

O extrato bruto AT-01-Malte apresentou uma interessante produção de metabólitos, sendo que algumas substâncias produzidas nesse extrato não foram observadas no extrato AT-01-MDB, como é possível verificar pela comparação de seus cromatogramas. Além disso, muitas substâncias observadas no cromatograma de AT-01-MDB também foram detectadas no cromatograma de AT-01-malte.

4.2 Cultivo em escala ampliada

O meio de cultivo de malte foi selecionado para o crescimento em escala ampliada e isolamento de substâncias, devido a maior variação de bandas cromatográficas, indicativa de maior quimiodiversidade, bem como pelo menor rendimento do ácido 3-nitropropanóico. Como algumas substâncias do extrato bruto AT-01-MBD não puderam ser identificadas no estudo anterior com esta linhagem, optou-se por trabalhar, também, com esse meio de cultivo em escala ampliada.

Após o período de crescimento, alguns frascos Erlenmeyer preparados com meio de cultivo MBD estavam com coloração amarelada enquanto outros estavam com coloração esverdeada (**Figura 11**), por isso eles foram separados para avaliar se os extratos possuíam perfis químicos diferentes.

Figura 11 Variação da coloração do meio de cultivo MBD após algumas semanas.



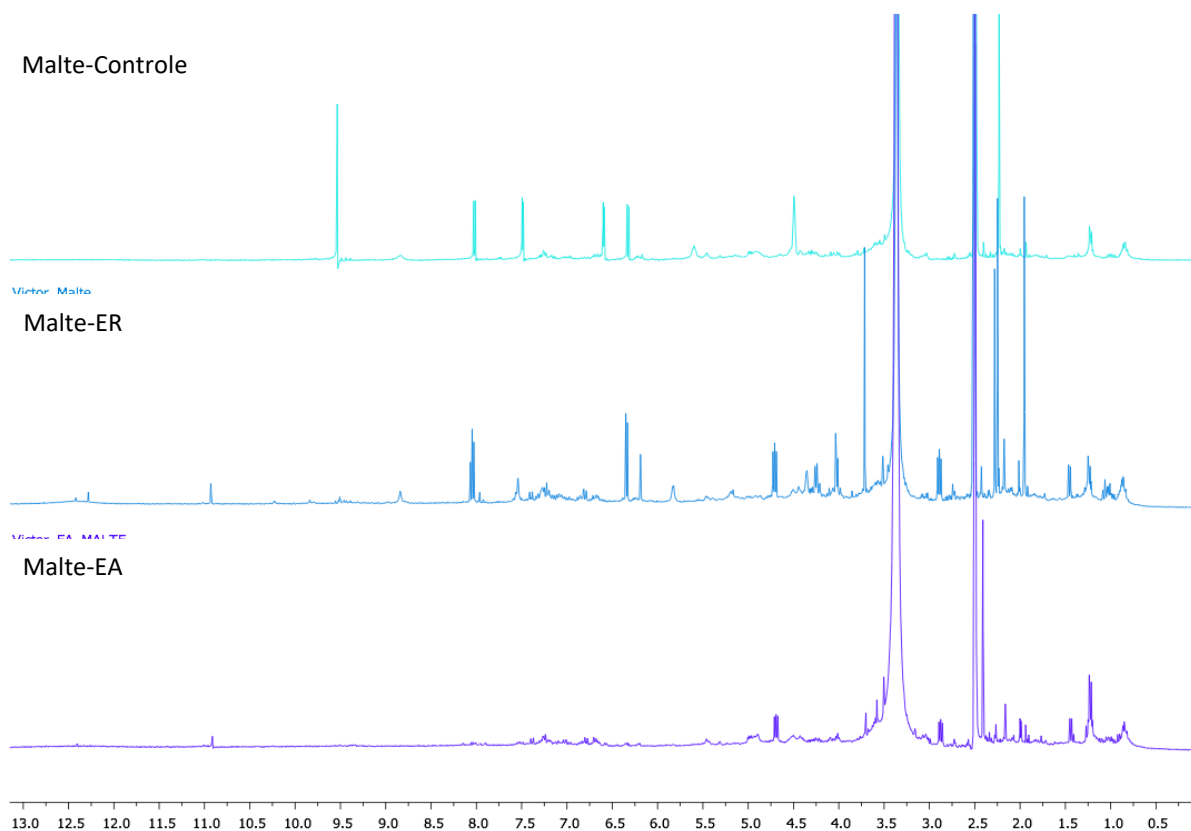
Fonte: Próprio autor.

Tabela 2 Massas obtidas dos extratos brutos de cada meio de cultivo em escala ampliada do fungo *Hypoxylon investiens*.

Extrato	Massa prevista (g)	Massa obtida (g)
AT-01-Malte	1,0	1,259
AT-01-MBD (verde)	1,7	0,955
AT-01-MBD (amarelo)		0,457

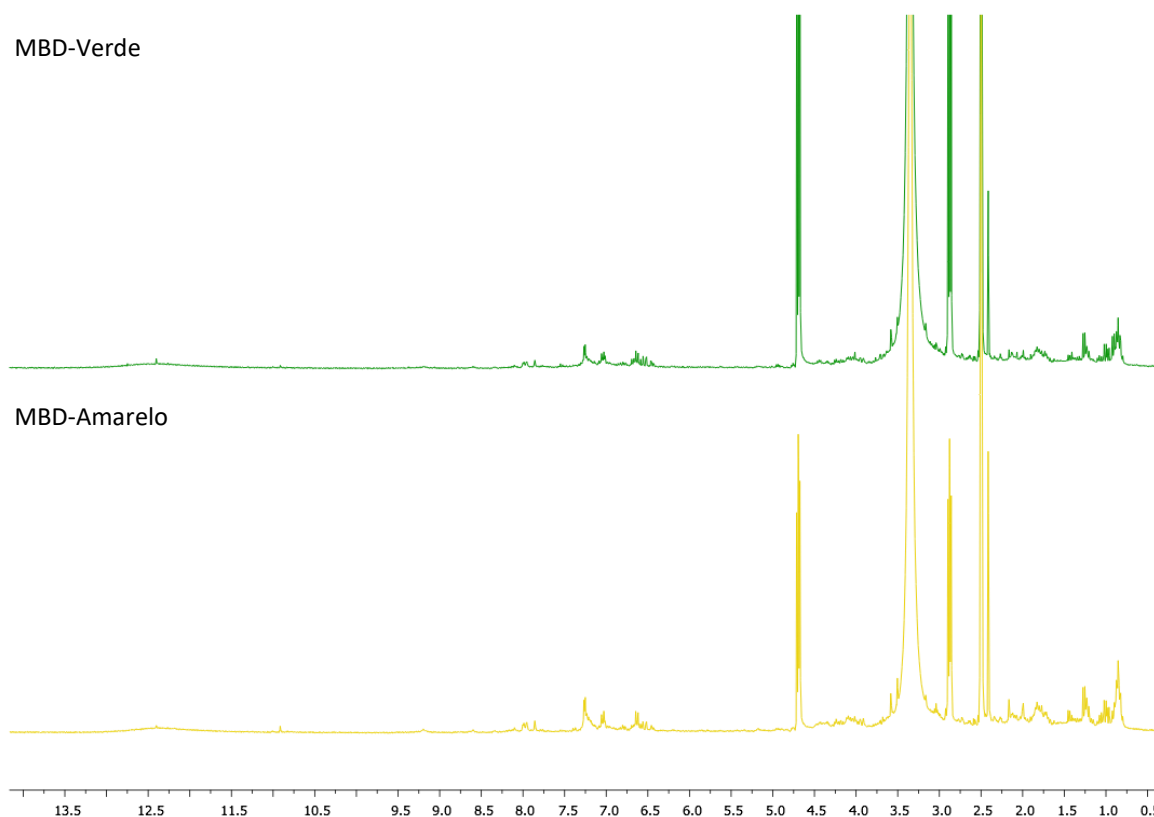
Os espectros de RMN de ^1H dos extratos de malte mostraram uma diminuição da intensidade dos sinais do extrato da escala ampliada em relação à escala reduzida (**Figura 12**). Os espectros de RMN de ^1H dos extratos MBD-Verde e MBD-Amarelo revelaram que ambos os extratos possuíam perfis químicos praticamente idênticos, sugerindo que houve uma interconversão levando os dois extratos a terem perfis químicos parecidos ou a diferença de cor pode ser causada por uma substância com alta absorvidade presente em baixa concentração no extrato. (**Figura 13**)

Figura 12 Comparação dos espectros de RMN de ^1H do meio de cultivo de malte (ciano), extrato bruto AT-01-Malte da escala reduzida (azul) e AT-01-Malte da escala ampliada (violeta).



Fonte: Próprio autor.

Figura 13 Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos da escala ampliada AT-01-MBD-Verde e AT-01-MBD-Amarelo.



Fonte: Próprio autor.

4.3 Fracionamento do extrato bruto

Uma amostra de 858.5 mg do extrato bruto AT-01-Malte foi fracionada por CC de fase reversa (C18) (**Esquema 1**), resultando em seis frações que foram analisadas por CLAE-DAD analítico em gradiente exploratório (**Figura 14**). Optou-se por purificar primeiro a fração 2 (**Fr 2**) e a fração 4 (**Fr 4**) devido a menor complexidade de bandas cromatográficas. Essas duas frações foram novamente analisadas por CLAE-DAD analítico para desenvolvimento dos métodos que resultavam em melhor resolução cromatográfica, possibilitando o isolamento de substâncias por CLAE-DAD semipreparativo. No esquema abaixo estão descritas as composições das fases móveis e a massa de cada fração após a evaporação dos solventes.

Esquema 1 Fracionamento do extrato AT-01-Malte (C-18) com diferentes concentrações (MeOH:H₂O) de fase móvel (VM) e a massa obtida para cada fração.

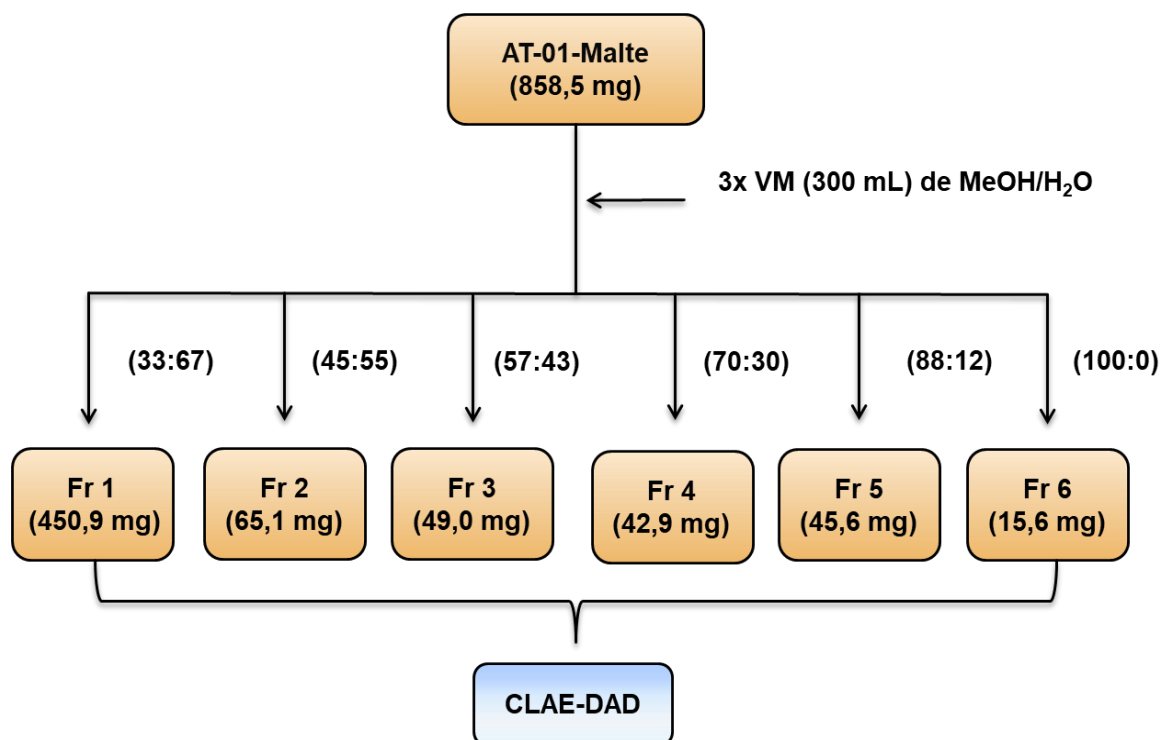
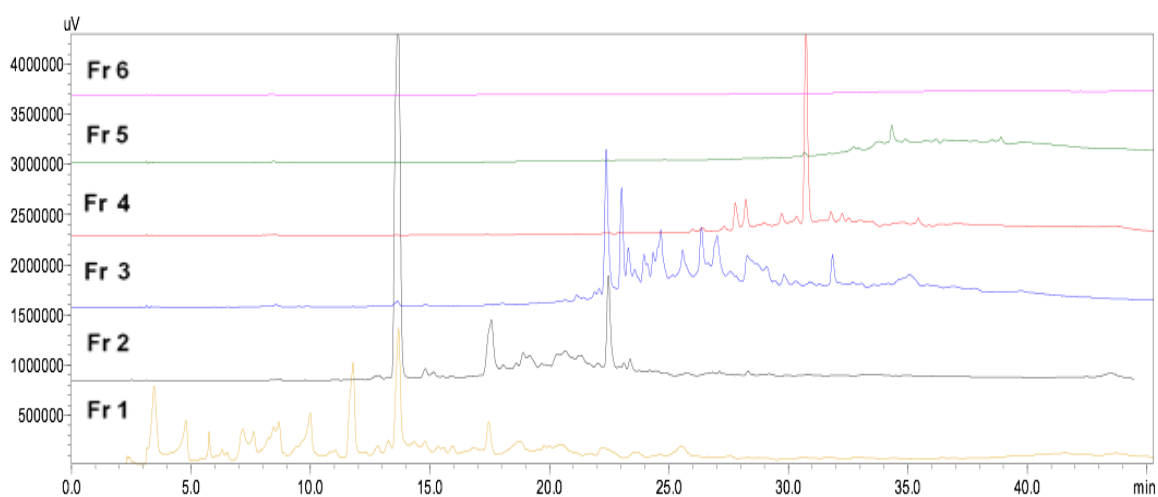


Figura 14 Cromatogramas em gradiente exploratório das seis frações (Fr 1 – Fr 6) no comprimento de onda de $\lambda = 254$ nm. Fr 1: Amarelo, Fr 2: preto, Fr 3: azul, Fr 4: vermelho, Fr 5: verde e Fr 6: rosa.

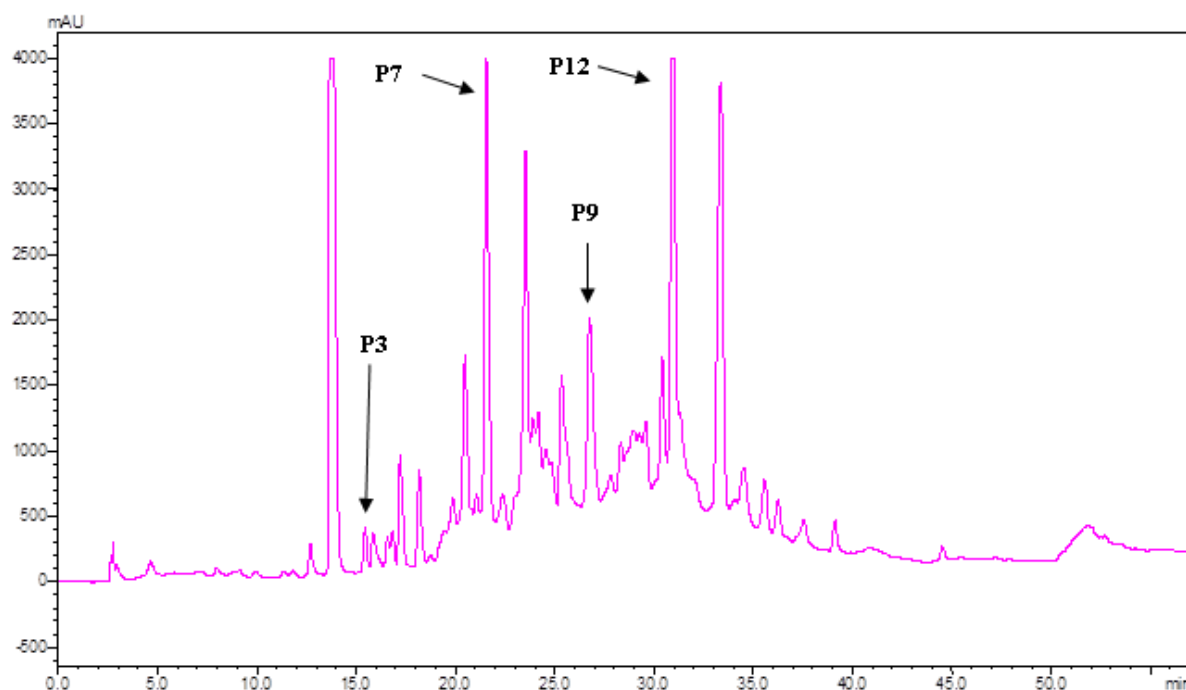


Fonte: Próprio autor.

4.4 Purificação da fração 2

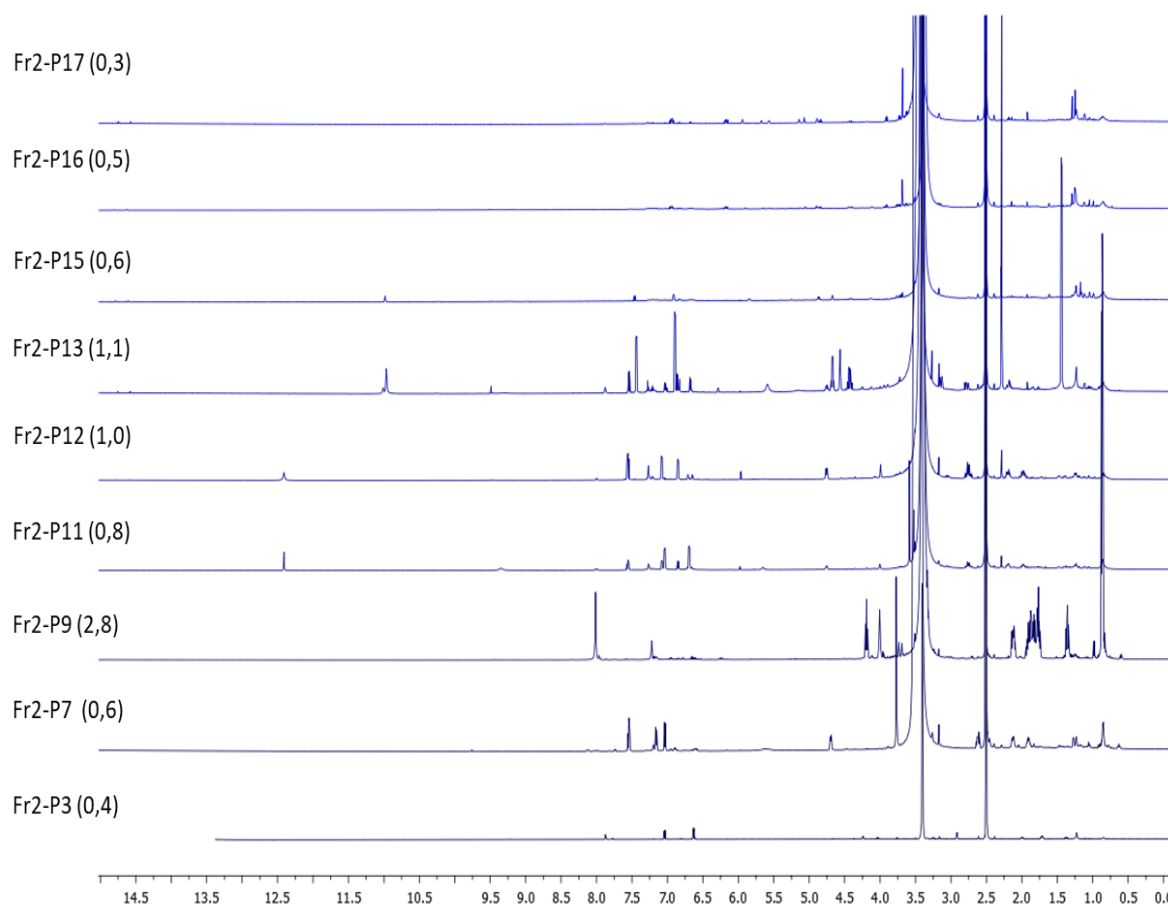
Dessa fração foi possível isolar quatro substâncias (**P3**, **P7**, **P9** e **P12**) com massa e pureza suficiente para serem analisadas por técnicas que permitem a determinação estrutural.

Figura 15 Análise da fração 2 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H₂O:MeOH (85:15 à 40:60 v/v) em 45 min.



Fonte: Próprio autor.

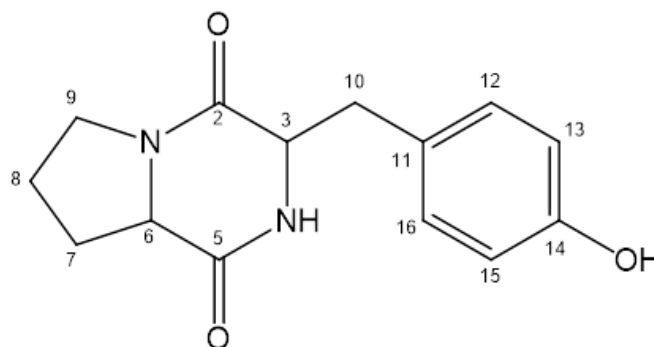
Figura 16 Espectros de RMN de ^1H de nove substâncias isoladas da fração 2 e suas respectivas massas (mg).



Fonte: Próprio autor.

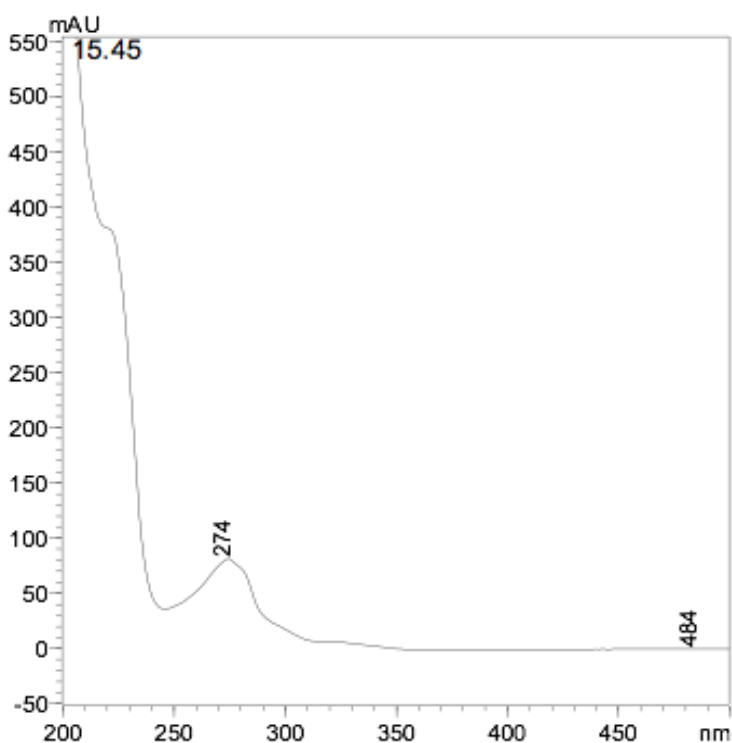
4.4.1 Elucidação estrutural da substância **Fr2-P3**

A substância **Fr2-P3** (0,4 mg) foi identificada como a 2,5-dicetopiperazina ciclo(Pro-Tir) a partir da análise de seus dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 17**) apresentou uma banda de absorção com $\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$, que é condizente com os espectros encontrados na literatura para essa substância. (SUGIYAMA et al., 2009)



Fr2-P3

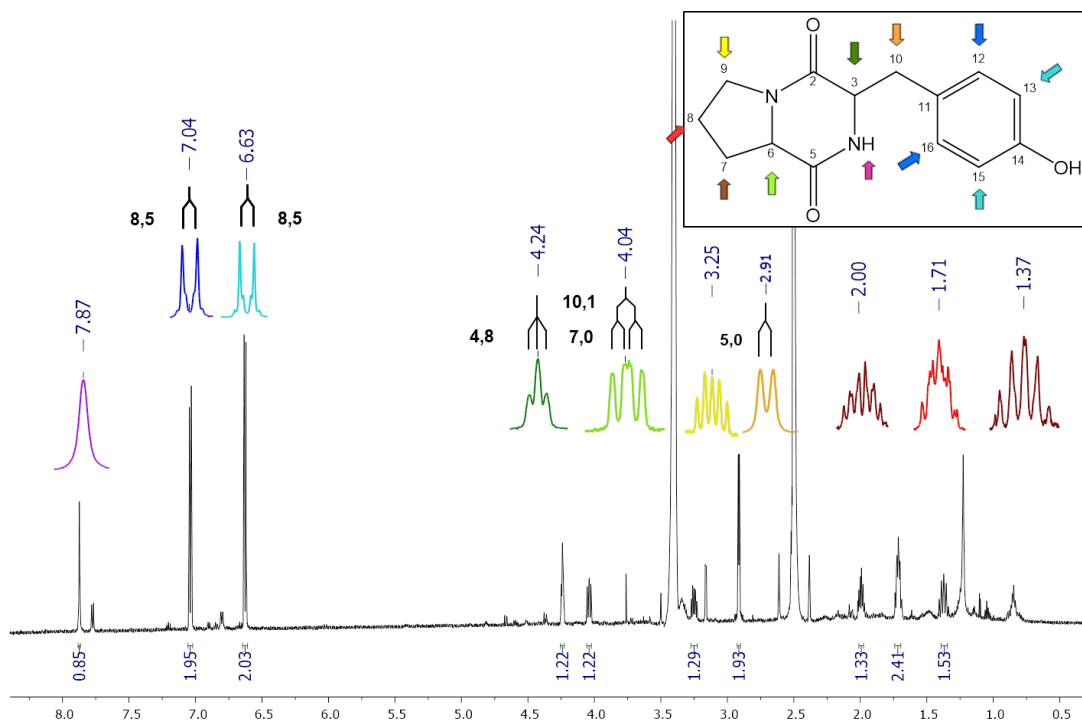
Figura 17 Espectro no UV-Vis da substância **Fr2-P3** (30,45% MeOH:69,55% H₂O).



Fonte: Próprio autor.

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 18**) apresentou um singleto em δ_H 7,87 (4-NH, 1H), um dubleto em δ_H 7,04 ($J_{12-13} = 8,5$ Hz; H-12 e H-16, 2H) e δ_H 6,63 ($J_{13-12} = 8,5$ Hz; H-13 e H-15, 2H), um tripleto alargado em δ_H 4,24 ($J_{3-10} = 4,8$ Hz; H-3, 1H) e um dubleto em δ_H 2,91 ($J_{10-3} = 5,0$ Hz; H-10, 2H); todos esses sinais são referentes aos hidrogênios do aminoácido tirosina.

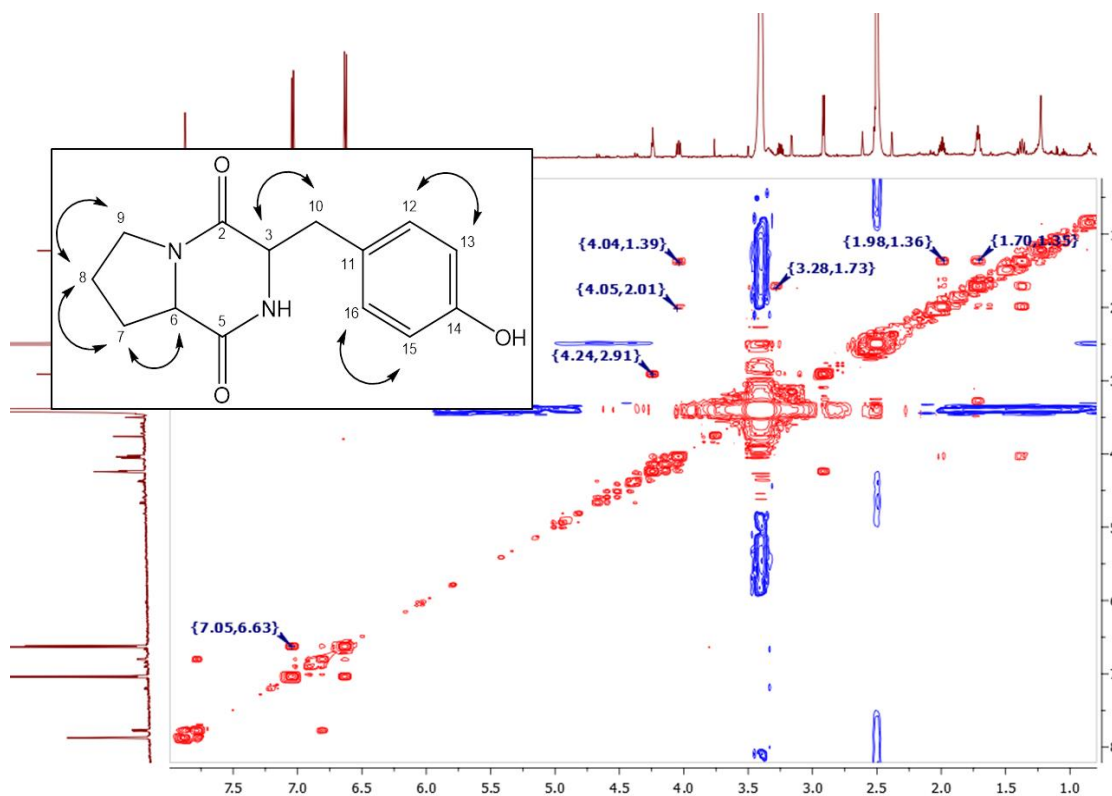
Figura 18 Espectro de RMN de ^1H da substância **Fr2-P3** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).



Fonte: Próprio autor.

No espectro 2D de COSY (**Figura 19**) foram observadas todas as correlações $^3J_{\text{H-H}}$ possíveis, o que permitiu a atribuição do duplo dubleto em δ_{H} 4,04 (J_{6-7a} 7,1 Hz e J_{6-7b} 10,1 Hz; H-6, 1H) e dos multipletos em δ_{H} 2,00 (H-7a, 1H), δ_{H} 1,31 (H-7b, 1H), δ_{H} 3,24 (H-9b, 1H) e δ_{H} 1,71 (H-8, 2H), como sinais referentes ao aminoácido prolina.

Figura 19 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr2-P3**.

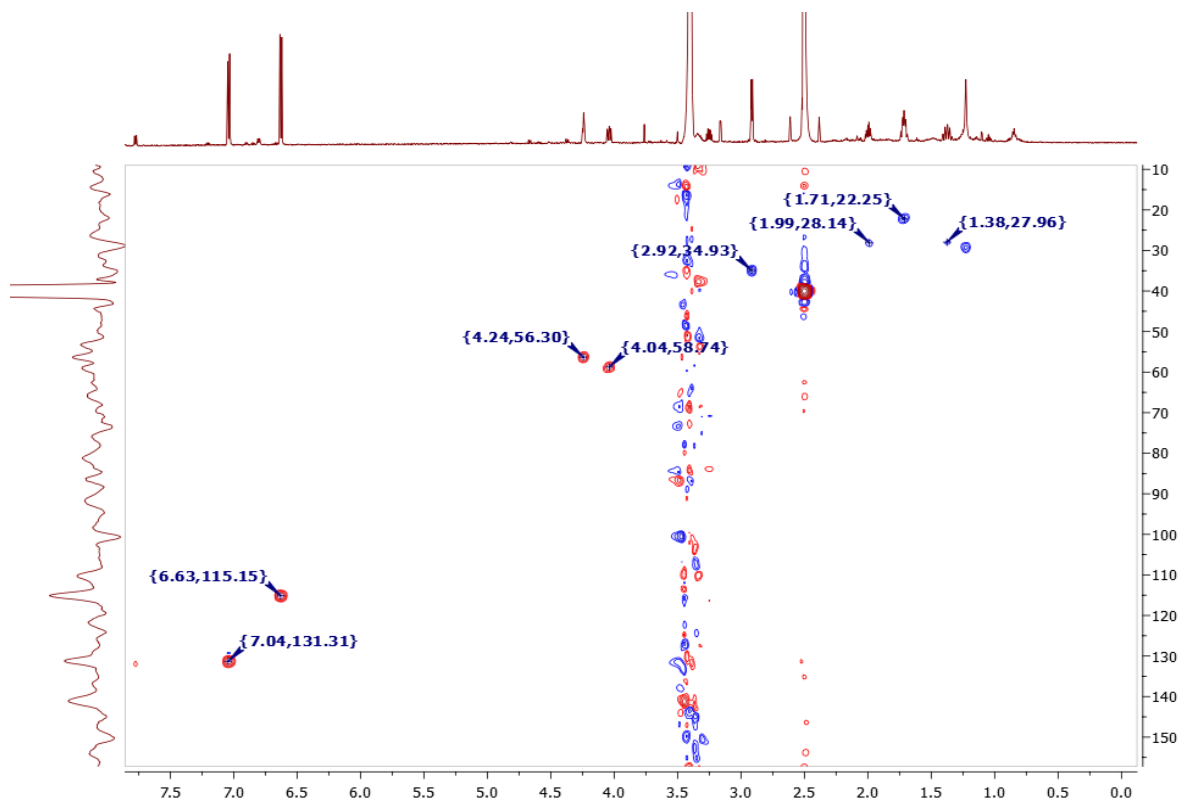


Fonte: Próprio autor.

No espectro HSQC (**Figura 20**) foram observadas as correlações $^1J_{C-H}$ com exceção do carbono na posição 9, possivelmente devido a sobreposição causada pelo sinal de H_2O em δ_H 3,40. Também foi possível identificar três carbonos metilênicos em δ_C 34,9 (C-10), δ_C 28,1 (C-7) e δ_C 22,2 (C-8) (sinais negativos, em azul).

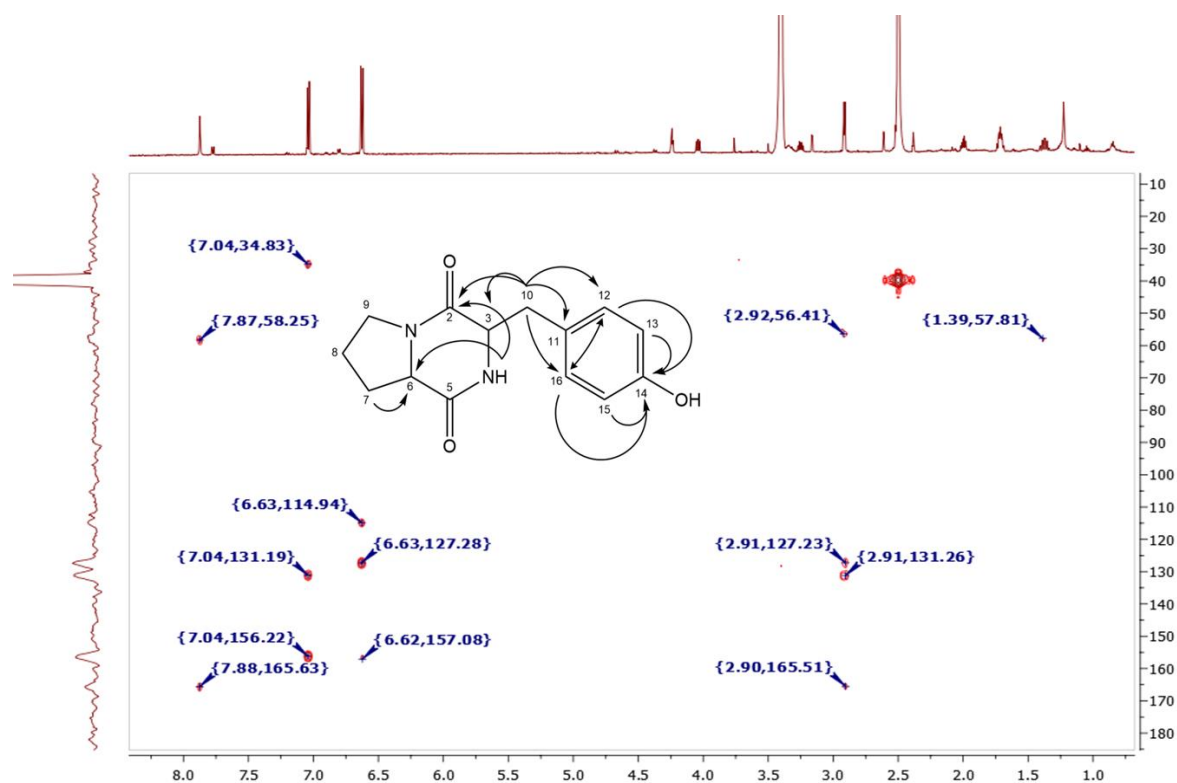
O espectro HMBC (**Figura 21**) mostrou as correlações do hidrogênio 4-NH com o carbono quaternário em δ_C 165,4 (C-2) e com C-6 em δ_C 58,7. Foi possível observar todas as correlações $^3J_{C-H}$ e quase todas as correlações $^2J_{C-H}$ do aminoácido tirosina, e algumas correlações referentes ao aminoácido prolina.

Figura 20 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr2-P3**.



Fonte: Próprio autor.

Figura 21 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr2-P3**.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr2-P3** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).

Posição	Fr2-P3		Ciclo(L-Pro-L-Tir)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (Hz)
2	165,4	-	166,9	-
3	56,3	4,24 (t; 5,0)	57,9	4,36 (m)
4	-	7,87 (s; NH)	-	-
5	-	-	170,8	-
6	58,7	4,04 (dd; 10,1 e 7,0)	60,0	4,04 (m)
7	28,1	1,99 (m)	29,4	2,09 (m)
		1,38 (m)		1,21 (m)
8	22,5	1,71 (m; 2H)	22,7	1,80 (m)
9	-	-	45,9	3,54 (m)
		3,24 (m)		3,35 (m)
10	34,9	2,91 (d; 5,0)	37,6	3,08 (dd; 4,6; 9,8)
				3,02 (dd; 4,6; 9,8)
11	127,3	-	127,6	-
12 e 16	131,3	7,04 (d; 8,5)	132,1	7,04 (d; 8,0)
13 e 15	115,1	6,63 (d; 8,5)	116,2	6,70 (d; 8,0)
14	156,6	-	157,7	-

* 500 e 125 MHz, CD_3OD (Sugiyama et al., 2009)

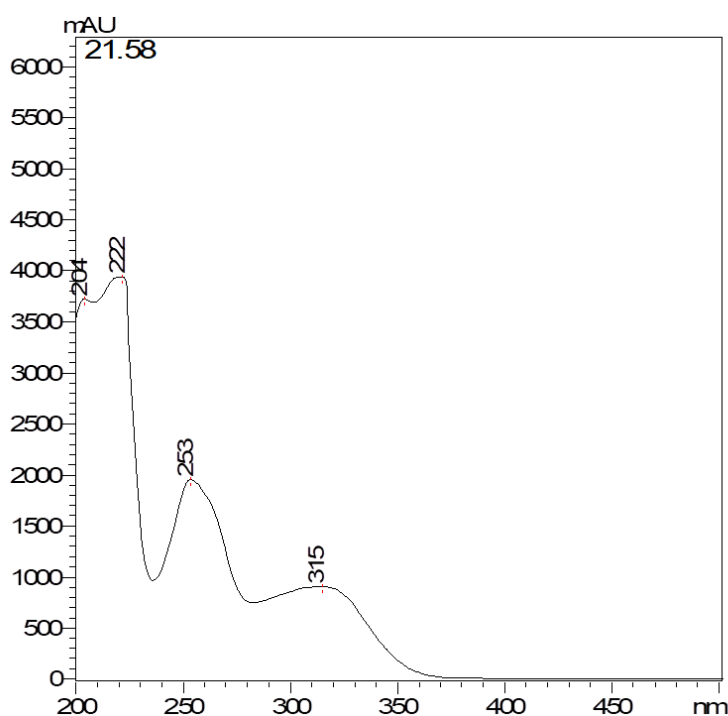
No estudo realizado por Karanam et al. (2019) a ciclo(Pro-Tir) foi isolada de *Bacillus pumilus*, uma das linhagens isoladas da esponja *Callyspongia fistularis*. A substância apresentou atividade citotóxica frente a linhagem de células de câncer hepático HepG2, com valor de $IC_{50} = 42,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em outro estudo, foram isoladas a ciclo(L-Pro-L-Tir) e ciclo(L-Pro-D-Tir) a partir de *Bacillus* sp., sendo que ambas apresentaram forte atividade antifúngica. (KUMAR et al., 2013)

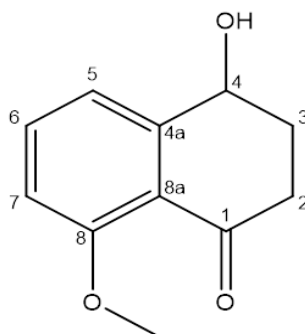
4.4.2 Elucidação estrutural da substância **Fr2-P7**

A substância **Fr2-P7** (0,6 mg) foi identificada como Nodulisporona a partir da análise se seus dados espectroscópicos e espectrométricos, bem como comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 22**) apresentou bandas com máximo de absorção em $\lambda = 222$, 253 e 315 nm, um perfil característico de anéis aromáticos com extensão da conjugação.

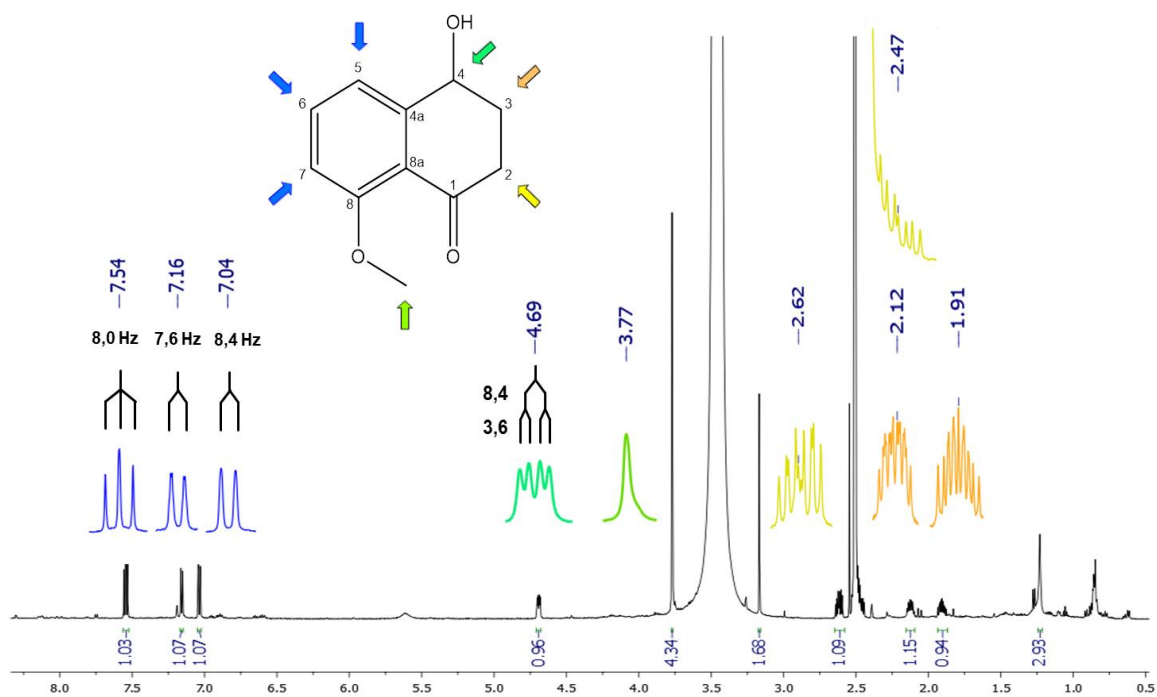
Figura 22 Espectro no UV-Vis da substância **Fr2-P7** (36,58% MeOH:63,42% H₂O).



Fonte: Próprio autor.

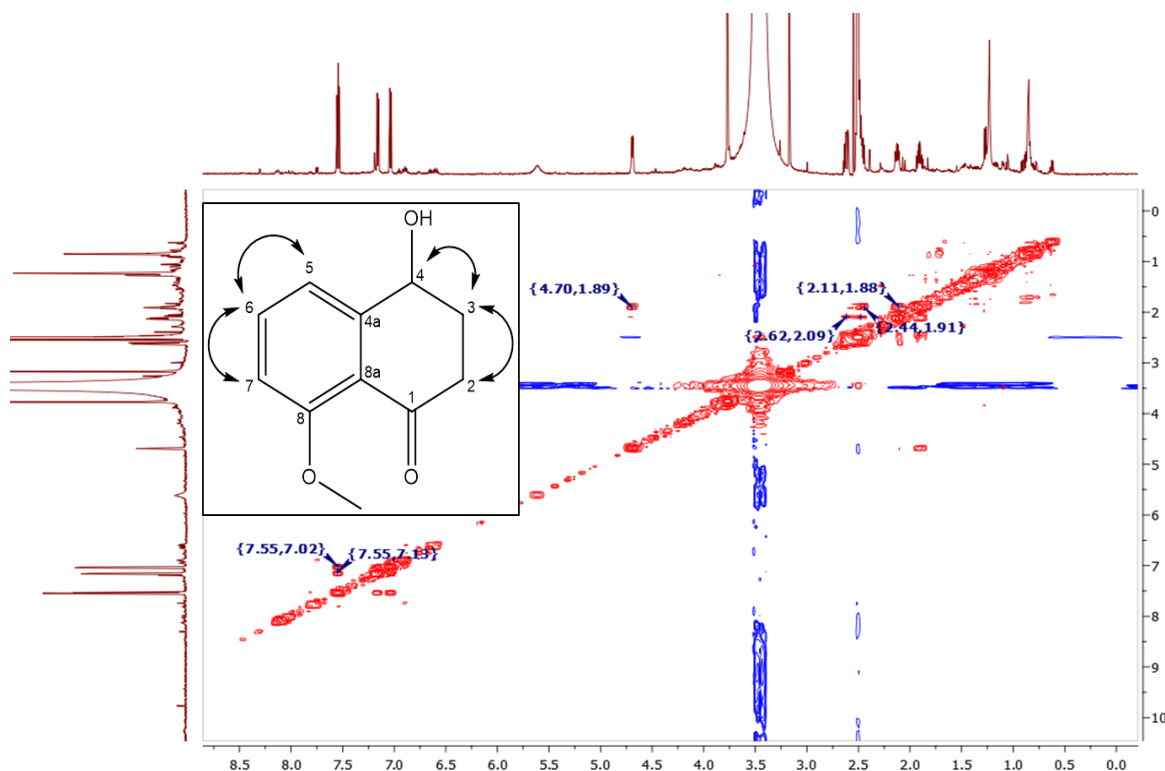
**Fr2-P7**

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 23**) apresentou um duplo dubleto em δ_{H} 7,55 (J_{6-5} 7,6 Hz, J_{6-7} 8,4 Hz; H-6, 1H), um dubleto em δ_{H} 7,16 (J_{5-6} 7,6 Hz; H-5, 1H) e outro em δ_{H} 7,04 (J_{7-6} 8,4 Hz; H-7, 1H), sinais característicos de hidrogênios aromáticos. Mostrou ainda um duplo dubleto em δ_{H} 4,69 (J_{4-3a} 8,4 Hz, J_{4-3b} 3,6 Hz; H-4, 1H) e o singlete em 3,77 (8-OCH₃, 3H), característicos de hidrogênios adjacentes a átomos eletronegativos substituídos em anéis aromáticos. Os hidrogênios alifáticos mais blindados foram identificados pelos multipletos em δ_{H} 2,62 (H-2a, 1H), δ_{H} 2,47 (H-2b, 1H), δ_{H} 2,12 (H-3a, 1H) e δ_{H} 1,91 (H-3b, 1H). No espectro COSY (**Figura 24**) foram observados os acoplamentos $^3J_{\text{H-H}}$ entre estes hidrogênios.

Figura 23 Espectro de RMN de ^1H da substância **Fr2-P7** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Fonte: Próprio autor.

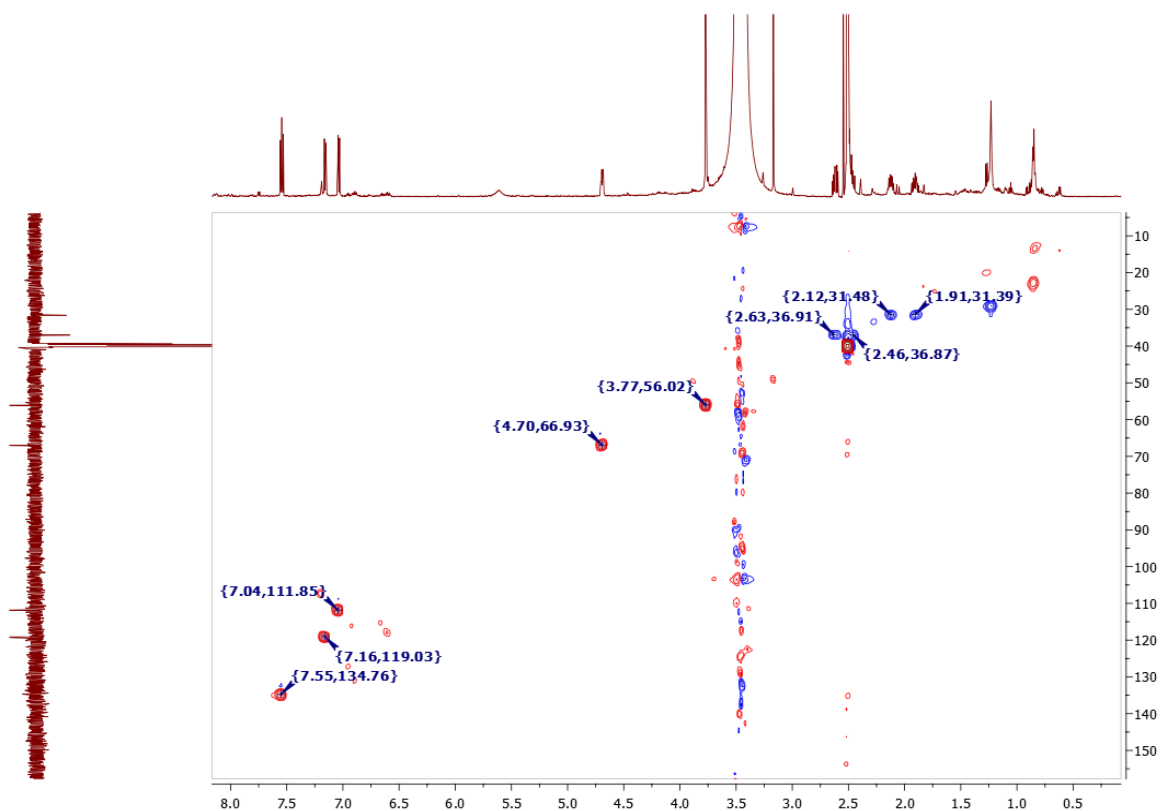
Figura 24 Mapa de contorno de RMN-COSY da substância **Fr2-P7**.



Fonte: Próprio autor.

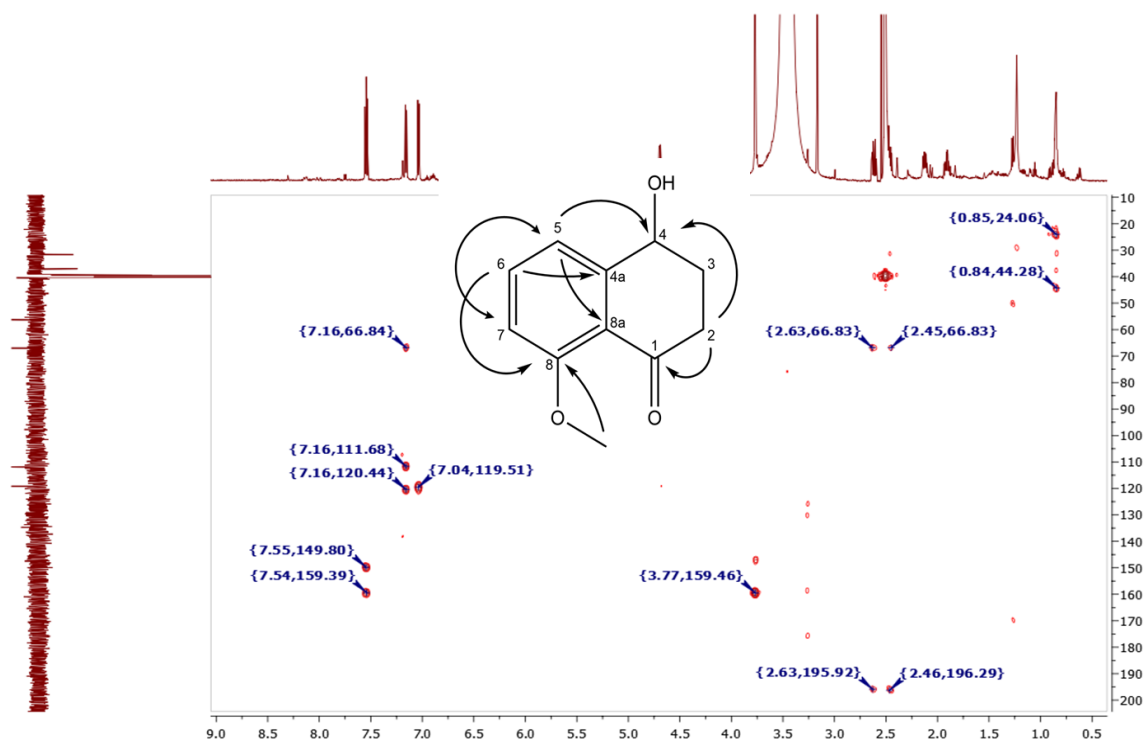
No espectro HSQC (**Figura 25**) foi possível observar as correlações dos sinais dos dois carbonos metilênicos em δ_C 31,4 (C-3) e δ_C 37,0 (C-2). Os carbonos quaternários foram identificados a partir do experimento HMBC (**Figura 26**), que apresentou sinal de acoplamento do hidrogênio 8-OCH₃ com o carbono em δ_C 159,4 (C-8) e de hidrogênios aromáticos com os carbonos em δ_C 149,9 (C-4a) e δ_C 120,4 (C-8a). Esse espectro também apresentou os acoplamentos dos hidrogênios metilênicos (H-2) com a carbonila em δ_C 195,9 (C-1) e com o carbono metínico desblindado pela hidroxila em δ_C 67,0 (C-4). Mostrou ainda uma correlação que revelou o acoplamento desse carbono com o hidrogênio aromático em δ_H 7,16 (H-5).

Figura 25 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr2-P7**.



Fonte: Próprio autor.

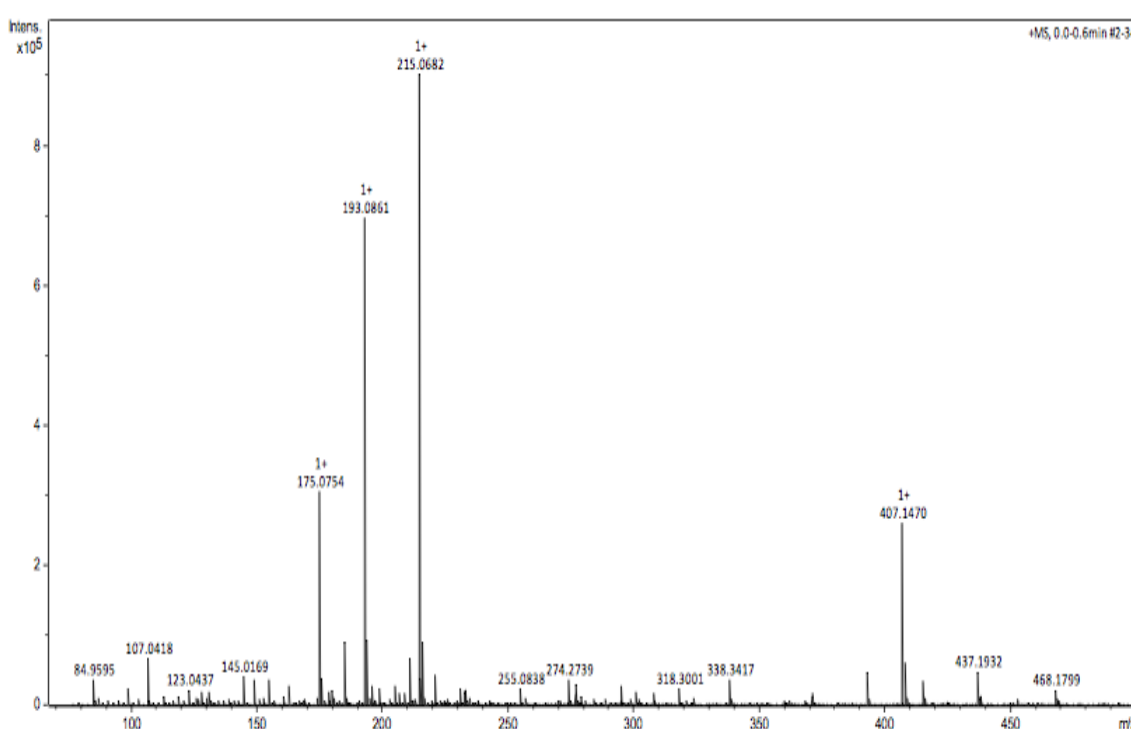
Figura 26 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr2-P7**.



Fonte: Próprio autor.

O espectro de massas de alta resolução (**Figura 27**) apresentou um pico em m/z 193,0861 referente à molécula protonada $[M + H]^+$ e um pico em m/z 215,0682 referente a formação de aduto com sódio $[M + Na]^+$. Kamisuki et al. (2007) relataram um pico m/z 215,0678 referente a Nodulisporona sodiada ($C_{11}H_{12}O_3Na$), bem como dados obtidos por RMN (**Tabela 4**). A comparação desses dados auxiliou na elucidação dessa tetralona.

Figura 27 Espectro de massas de alta resolução (*full scan*, modo positivo) da substância Fr2-P7.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 4 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr2-P7** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para a Nodulisporona.

Posição	Fr2-P7		Nodulisporona*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	195,9	-	196,5	-
2	37,0	2,47 (<i>m</i>) 2,62 (<i>m</i>)	36,3	2,59 (<i>ddd</i> ; 17,3; 8,7; 5,2) 2,91 (<i>ddd</i> ; 17,3; 7,7; 5,1)
3	31,4	1,91 (<i>m</i>) 2,12 (<i>m</i>)	31,3	2,15 (<i>m</i>) 2,33 (<i>m</i>)
4	67,0	4,69 (<i>dd</i> ; 8,4 e 3,6)	68,4	4,91 (<i>t</i> ; 3,5)
4a	149,9	-	147,8	-
5	119,1	7,16 (<i>d</i> ; 7,6)	118,7	7,18 (<i>d</i> ; 7,7)
6	134,9	7,55 (<i>t</i> ; 8,0)	134,7	7,53 (<i>dd</i> ; 8,5; 7,7)
7	111,8	7,04 (<i>d</i> ; 8,4)	111,8	6,97 (<i>d</i> ; 8,5)
8	159,4	-	160,0	-
8a	120,4	-	120,5	-
8-OCH ₃	56,0	3,77 (<i>s</i>)	56,1	3,92 (<i>s</i>)

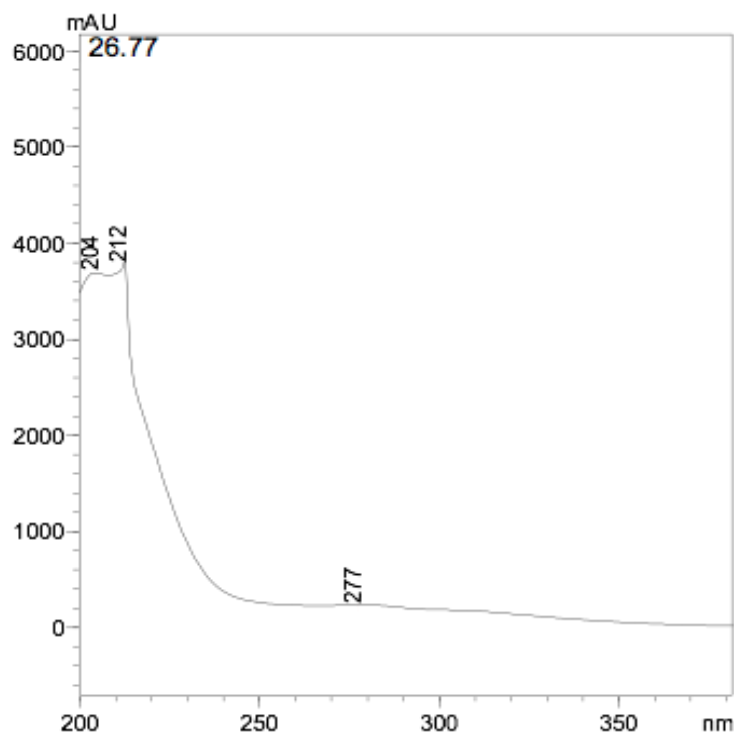
*400 e 100 MHz, CDCl₃ (Kamisuki et al., 2007)

No estudo desenvolvido por Kamisuki et al. (2007) a *Nodulisporona* apresentou atividade seletiva na inibição da DNA-polimerase λ , contribuindo para aumentar o conhecimento sobre as funções biológicas das polimerases.

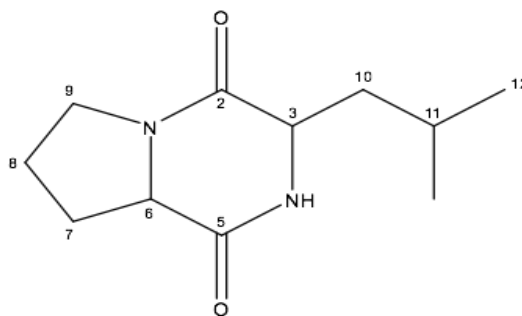
4.4.3 Elucidação estrutural da substância **Fr2-P9**

A substância **Fr2-P9** (2,8 mg) foi identificada como a 2,5-dicetopiperazina ciclo(Pro-Leu) a partir da análise de seus dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 28**) apresentou bandas com máximo de absorção em $\lambda = 212$ nm, compatível com a estrutura da ciclo(Pro-Leu).

Figura 28 Espectro no UV-Vis da substância **Fr2-P9** (41,77% MeOH:58,23% H₂O).



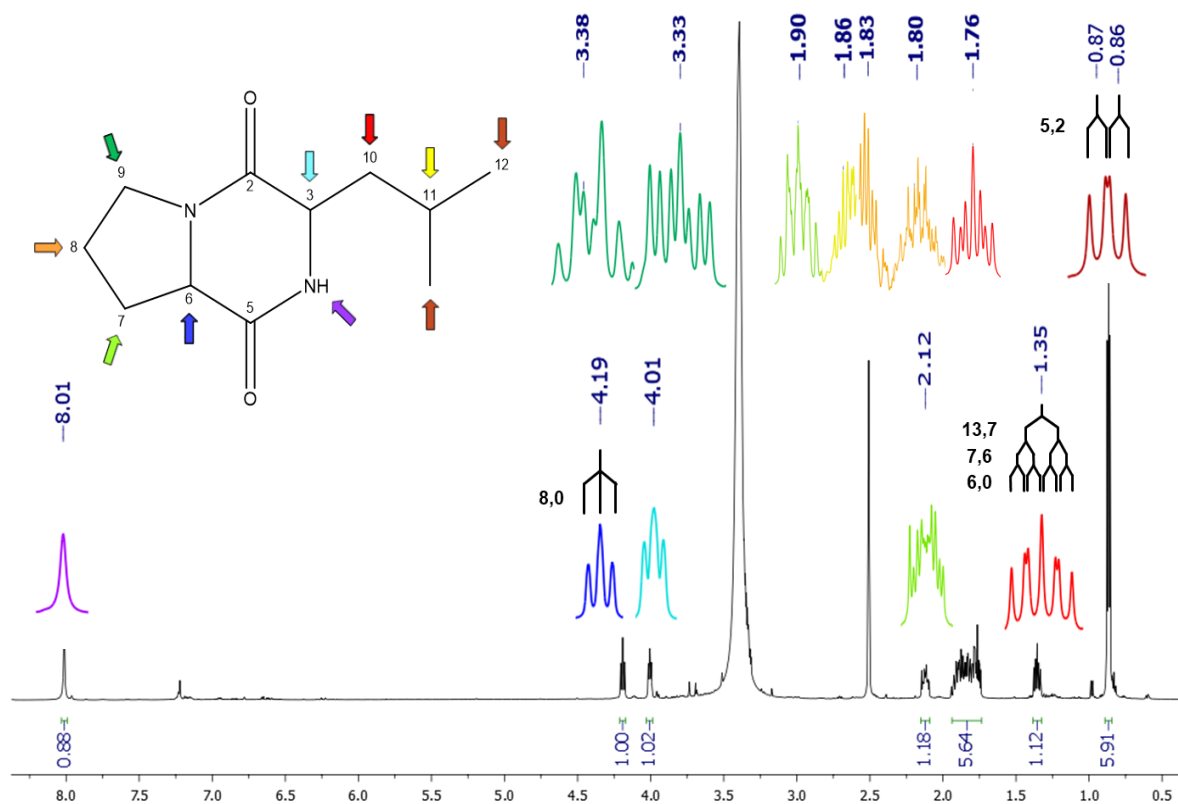
Fonte: Próprio autor.



Fr2-P9

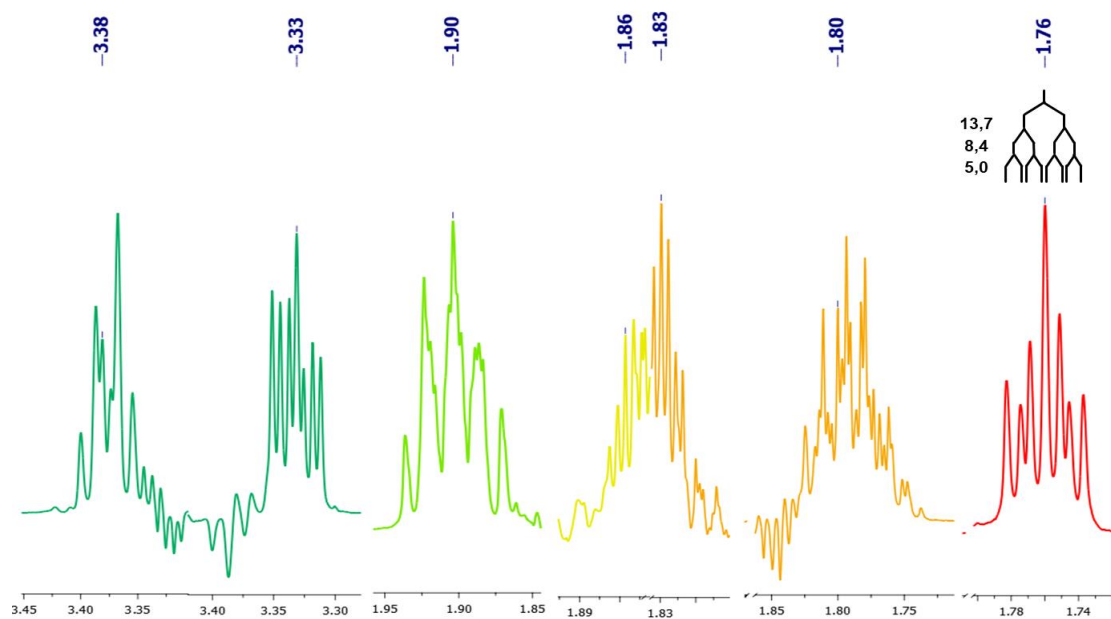
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 29**) dessa substância apresentou sobreposições de sinais em δ_{H} 1,73 – 1,95 (5H) e em δ_{H} 3,30 – 3,40. Para melhorar a resolução desses sinais foram feitas análises com filtro seletivo de deslocamento químico (CSSF) (**Figura 30**), com as quais foi possível separar seis dos sete sinais sobrepostos: δ_{H} 3,33 (H-9b), δ_{H} 3,38 (H-9a), δ_{H} 1,90 (H-7a), δ_{H} 1,83 (H-8a), δ_{H} 1,86 (H-11), δ_{H} 1,80 (H-8b) e o duplo duplo dubleto em δ_{H} 1,76 ($J_{10\text{b}-10\text{a}}$ 13,7 Hz, $J_{10\text{b}-11}$ 8,4 Hz, $J_{10\text{b}-3}$ 5,0 Hz; H-10b). O sinal mais desblindado desse espectro apresentou um singleto em δ_{H} 8,01 referente ao hidrogênio de amina, o que foi confirmado pelo espectro de HMBC de $^{15}\text{N} \times ^1\text{H}$ (**Figura 31**). Os tripletos largos em δ_{H} 4,19 (J_{6-7} 8,0 Hz; H-6, 1H) e δ_{H} 4,01 (J_{3-10} 6,2 Hz; H-3, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios alifáticos desblindados pelos grupos amina e carboxila adjacentes. Foi possível ainda atribuir o multiplete em δ_{H} 2,12 (H-7b, 1H), o duplo duplo dubleto em δ_{H} 1,35 ($J_{10\text{a}-10\text{b}}$ 13,7 Hz, $J_{10\text{a}-11}$ 7,6 Hz, $J_{10\text{a}-3}$ 6,0 Hz; H-10a), o dubleto em δ_{H} 0,87 ($J_{11-\text{CH}_3-11}$ 5,2 Hz; 11-CH₃, 3H) e o dubleto em δ_{H} 0,86 (J_{12-11} 5,2 Hz; H-12, 3H). Todos os acoplamentos $^3J_{\text{H-H}}$ entre estes hidrogênios, com exceção do acoplamento de H-10 com H-11, foram observados no espectro de COSY (**Figura 32**).

Figura 29 Espectro de RMN de ^1H da substância **Fr2-P9** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).



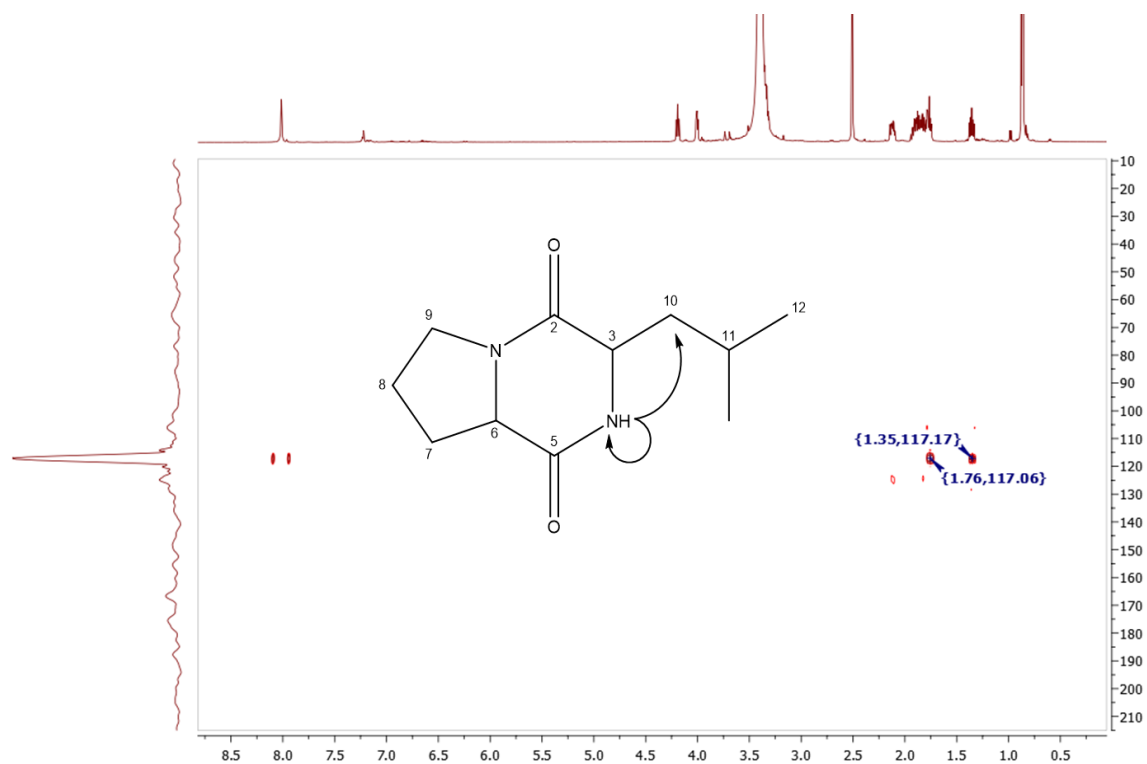
Fonte: Próprio autor.

Figura 30 Espectros CSSF dos sinais sobrepostos da substância **Fr2-P9** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).



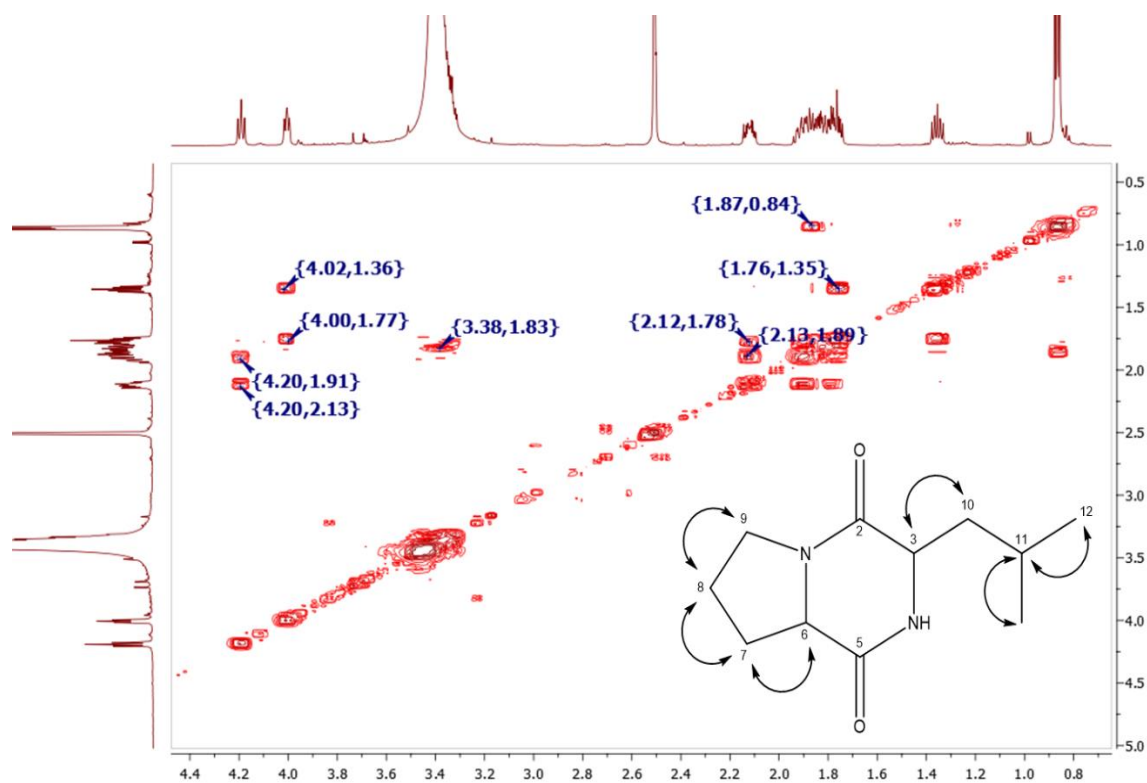
Fonte: Próprio autor.

Figura 31 Mapa de contorno de HMBC de ^{15}N da substância **Fr2-P9**.



Fonte: Próprio autor.

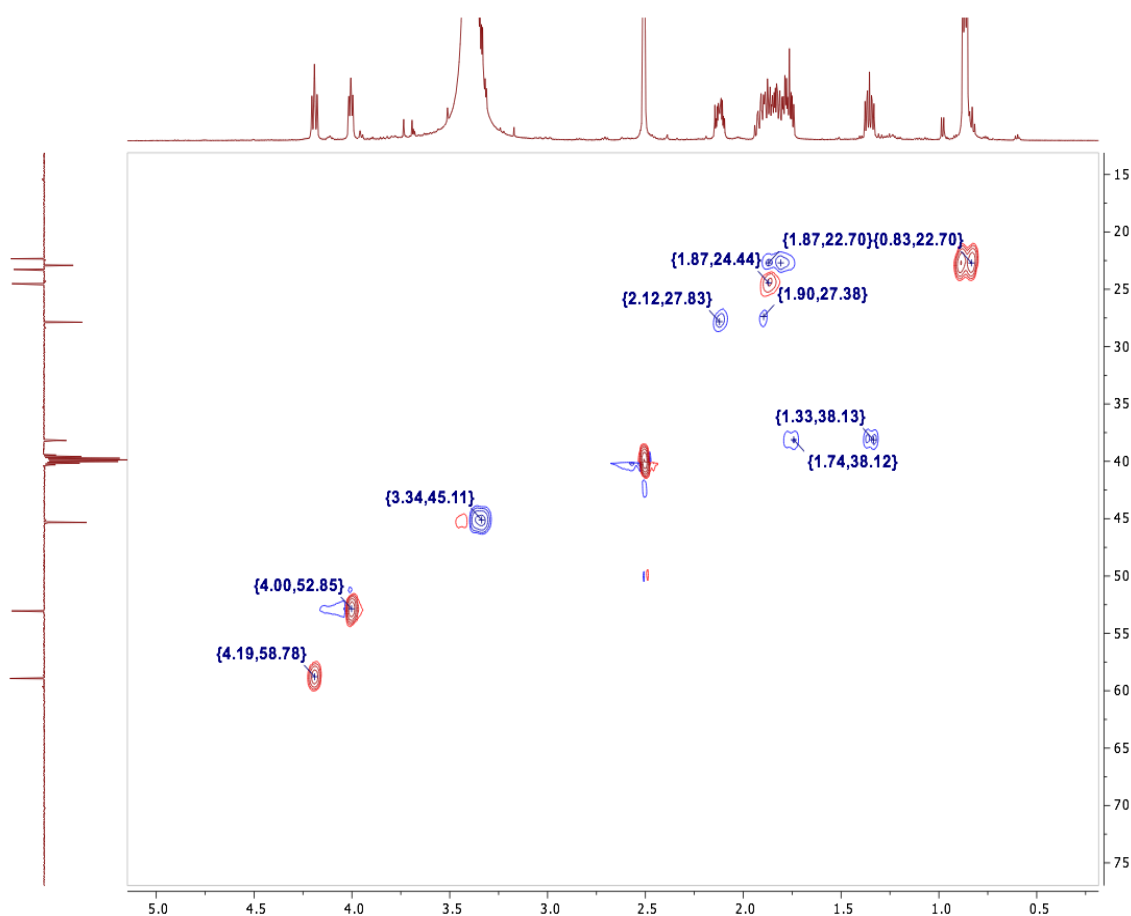
Figura 32 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr2-P9**.



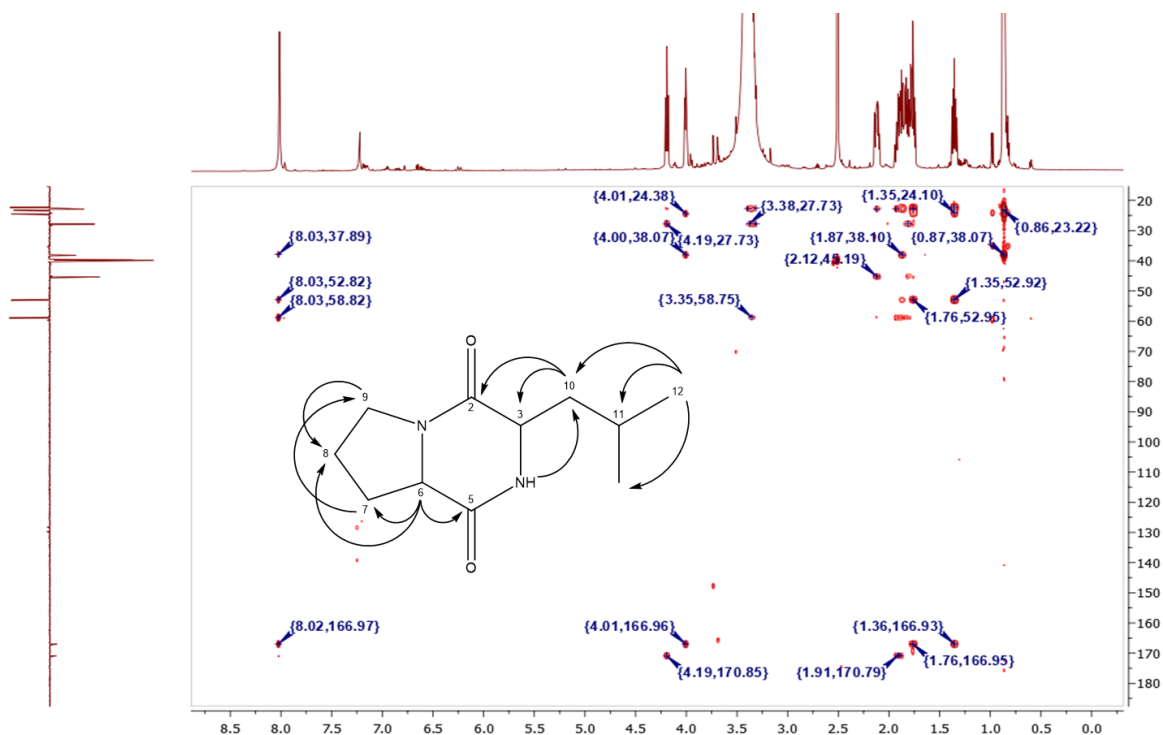
Fonte: Próprio autor.

Apesar da complexidade do espectro, decorrente das sobreposições de sinais, foi possível observar oito sinais de hidrogênios metilênicos no espectro HSQC (**Figura 33**). O experimento HMBC (**Figura 34**) apresentou sinais decorrentes de acoplamentos $^3J_{C-H}$ e $^2J_{C-H}$ de todos os hidrogênios alifáticos e também do hidrogênio -NH com os carbonos em δ_c 38,2 (C-10), δ_c 53,0 (C-3), δ_c 59,0 (C-6) e 167,0 (C-2). Esse espectro também foi essencial para determinar as posições das carbonilas em δ_c 167,0 (C-2) e 170,8 (C-5).

Figura 33 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr2-P9**.

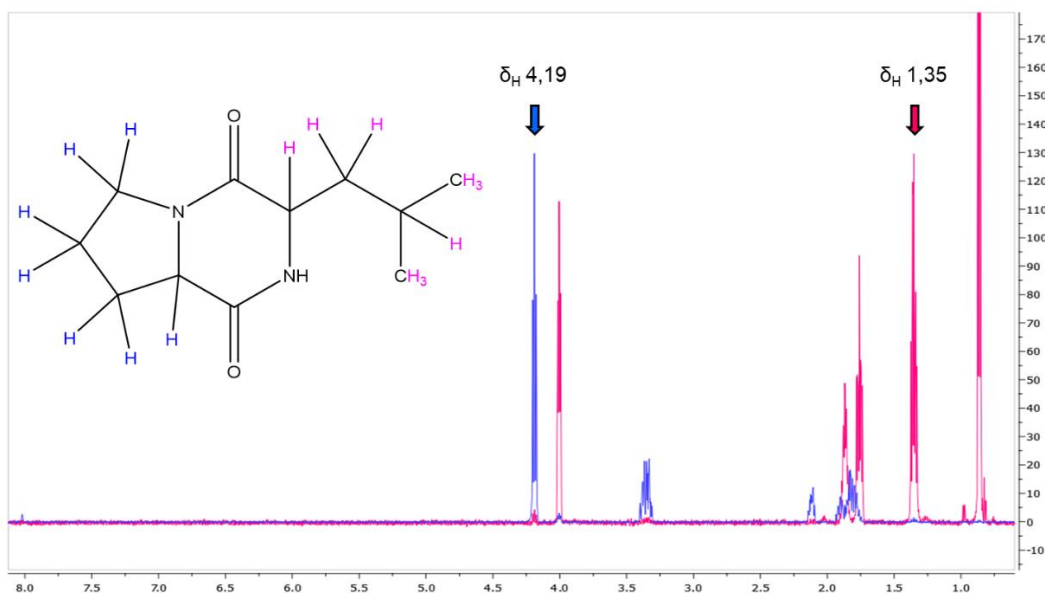


Fonte: Próprio autor.

Figura 34 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr2-P9**.

Fonte: Próprio autor.

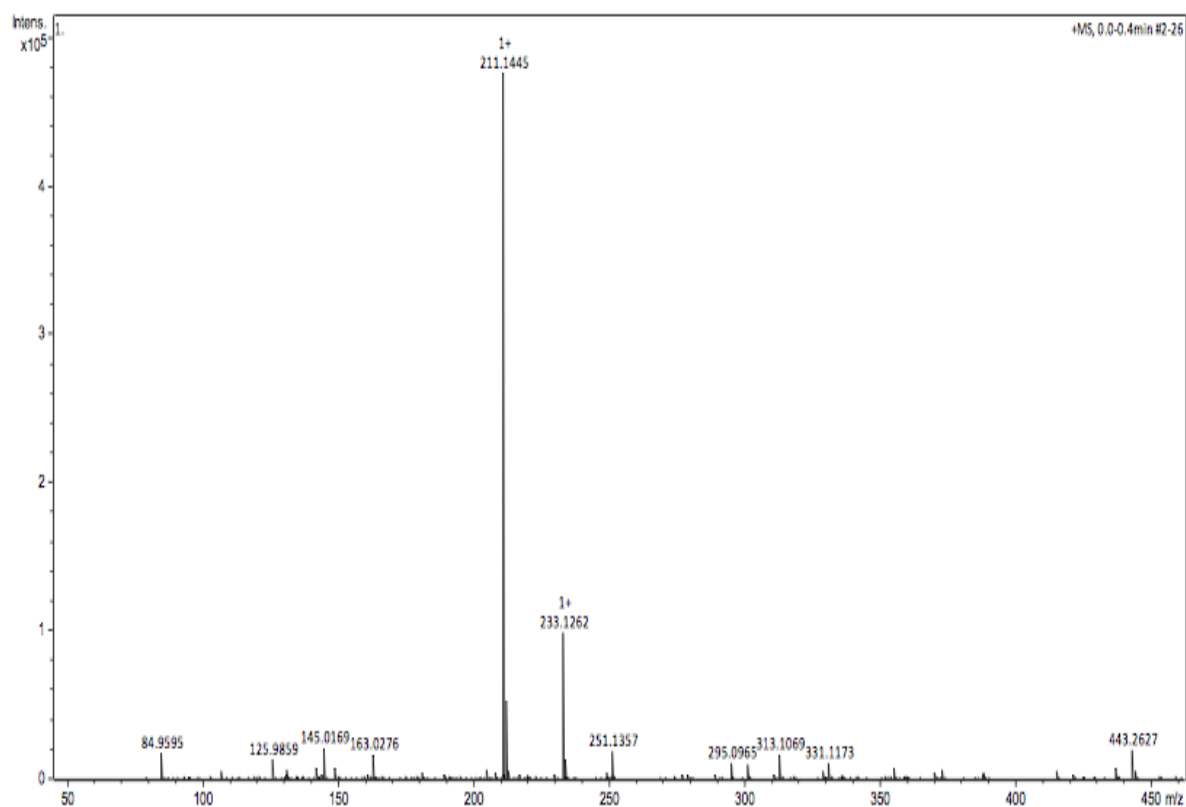
As análises por TOCSY 1D (**Figura 35**) indicaram a presença de dois sistemas de spins na molécula, sendo que um envolve os hidrogênios provenientes do aminoácido Leucina (sinais em rosa) e o outro envolve os hidrogênios associados ao aminoácido Prolina (sinais em azul).

Figura 35 Sobreposição dos espectros TOCSY 1D da substância **Fr2-P9**.

Fonte: Próprio autor.

O espectro de massas de alta resolução de **Fr2-P9** (**Figura 36**) apresentou um pico em m/z 211,1445 referente à molécula protonada $[M + H]^+$ ($C_{11}H_{19}N_2O_2$) e um pico em m/z 233,1262 referente a formação de aduto com sódio $[M + Na]^+$.

Figura 36 Espectro de massas de alta resolução (*full scan*, modo positivo) da substância **Fr2-P9**.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 5 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr2-P9** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para Ciclo(D-Pro-D-Leu).

Posição	Fr2-P9		Ciclo(D-Pro-D-Leu)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (Hz)
2	167,0	-	168,7	-
3	53,0	4,01 (<i>tl</i>)	55,2	3,61 (<i>dt</i> ; 5,0; 9,0)
4	-	8,01 (<i>m</i>)	-	8,30
5	170,8	-	166,0	-
6	59,0	4,19 (<i>tl</i>)	57,3	4,16 (<i>t</i> ; 8,0)
7	27,9	1,90 (<i>m</i>)	28,4	1,79 (<i>m</i>)
		2,12 (<i>m</i>)		2,14 (<i>m</i>)
		1,80 (<i>m</i>)		1,80 (<i>m</i>)
8	22,9	1,83 (<i>m</i>)	21,7	1,85 (<i>m</i>)
		3,33 (<i>m</i>)		3,30
9	45,3	3,38 (<i>m</i>)	44,9	3,43
10	38,2	1,35 (<i>ddd</i> ; 13,7; 7,5; 6,0)	42,1	1,46 (<i>ddd</i> ; 14,0; 9,0; 6,0)
		1,76 (<i>ddd</i> ; 13,7; 8,4; 5,0)		1,57 (<i>ddd</i> ; 14,0; 9,0; 6,0)
11	24,5	1,86 (<i>m</i>)	23,8	1,71 (<i>m</i>)
11-CH ₃	23,3	0,87 (<i>d</i> ; 5,2)	22,7	0,91 (<i>d</i> ; 6,5)
12	22,3	0,86 (<i>d</i> ; 5,2)	21,5	0,88 (<i>d</i> ; 6,5)

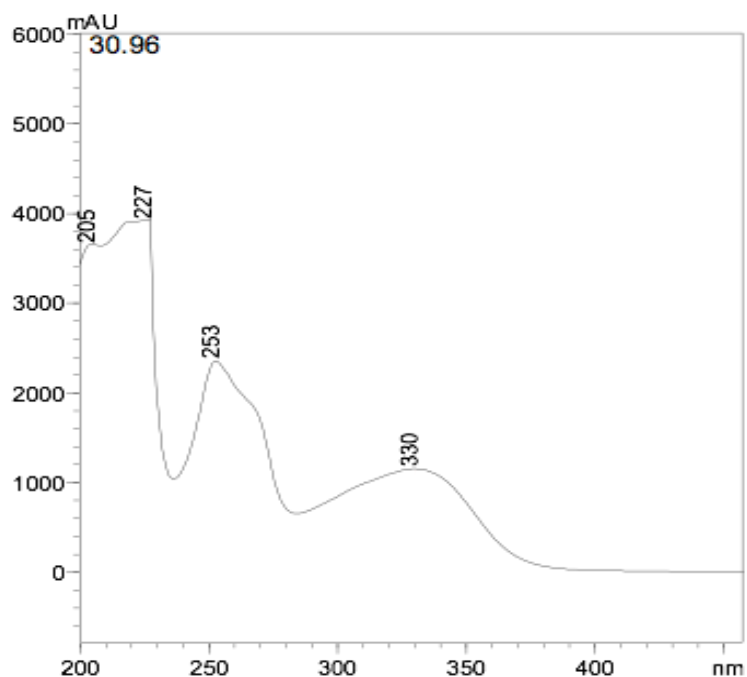
* 500 e 125 MHz, DMSO- d_6 (Cafêu, 2007)

No estudo realizado por Guo et al. (2015) a ciclo(Pro-Leu) apresentou forte atividade algicida contra *Microcystis aeruginosa*, cianobactérias produtoras de toxinas que podem levar a floração algal em lagos. A ciclo(Pro-Leu) também apresenta potencial como bioconservante, já que essa substância inibiu o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* em amostras de soja e amendoim (KUMAR et al., 2013).

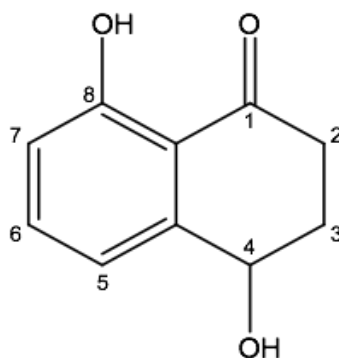
4.4.4 Elucidação estrutural da substância **Fr2-P12**

A substância **Fr2-P12** (1,0 mg) foi identificada como a tetralona Isosclerona a partir da análise de seus dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 37**) apresentou bandas com máximo de absorção em $\lambda = 227$, 253 e 330 nm.

Figura 37 Espectro no UV-Vis da substância **Fr2-P12** (45,96% MeOH:54,04% H₂O).



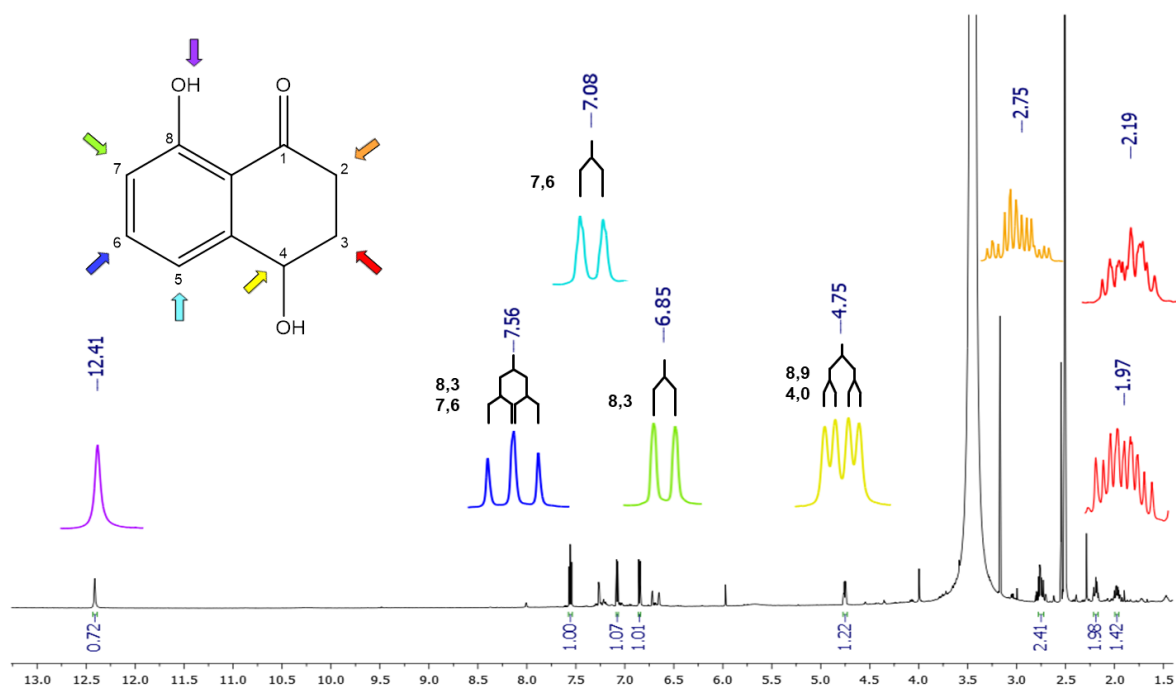
Fonte: Próprio autor.



Fr2-P12

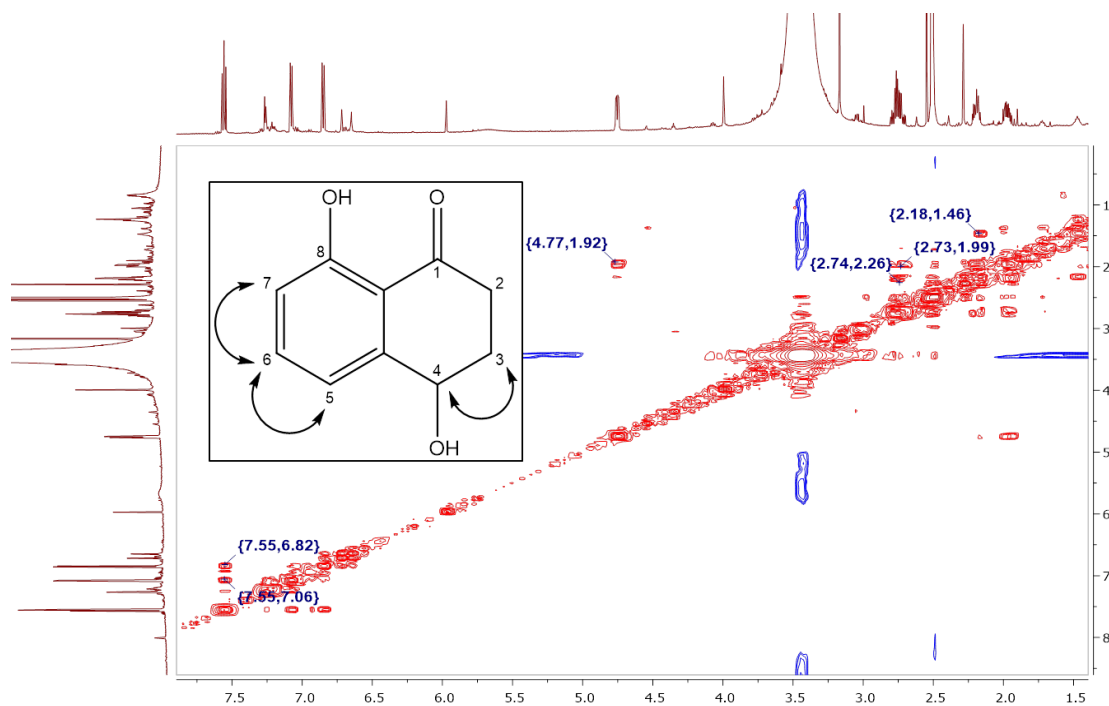
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 38**) de **Fr2-P12** mostrou um duplo dubleto referente ao hidrogênio aromático mais desblindado em δ_{H} 7,56 (J_{6-7} 8,3 Hz, J_{6-5} 7,6 Hz; H-6, 1H). Também foram identificados sinais de hidrogênios hidroxibenzílicos em δ_{H} 4,75 (J_{4-3a} 8,9 Hz, J_{4-3b} 4,0 Hz; H-4, 1H), hidrogênios metilênicos desblindados pela carbonila em δ_{H} 2,75 (H-2; 2H) e metilênicos diastereotópicos mais blindados em 1,97 (H-3a; 1H) e 2,19 (H-3b; 1H). Todas as correlações $^3J_{\text{H-H}}$ entre estes hidrogênios foram observadas no espectro COSY (**Figura 39**). Ainda no espectro 1D foi possível observar um singlete em δ_{H} 12,41 referente ao hidrogênio fenólico da posição 8.

Figura 38 Espectro de RMN de ^1H da substância **Fr2-P12** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



Fonte: Próprio autor.

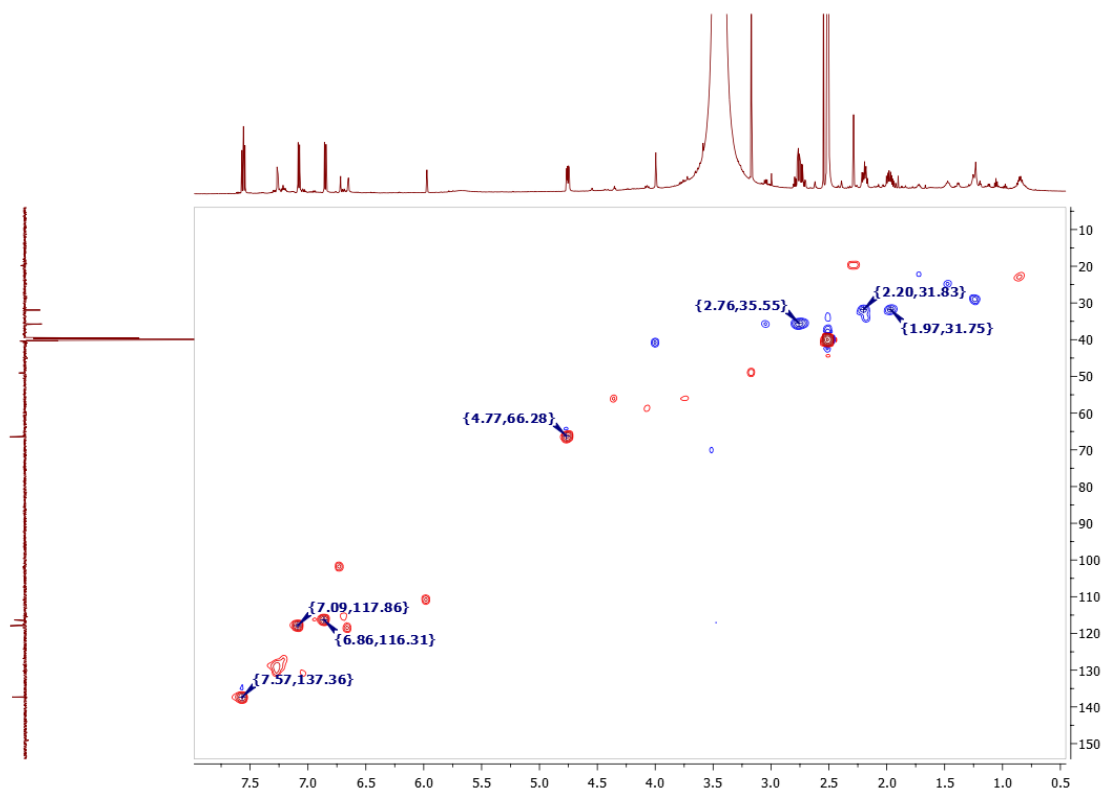
Figura 39 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr2-P12**.



Fonte: Próprio autor.

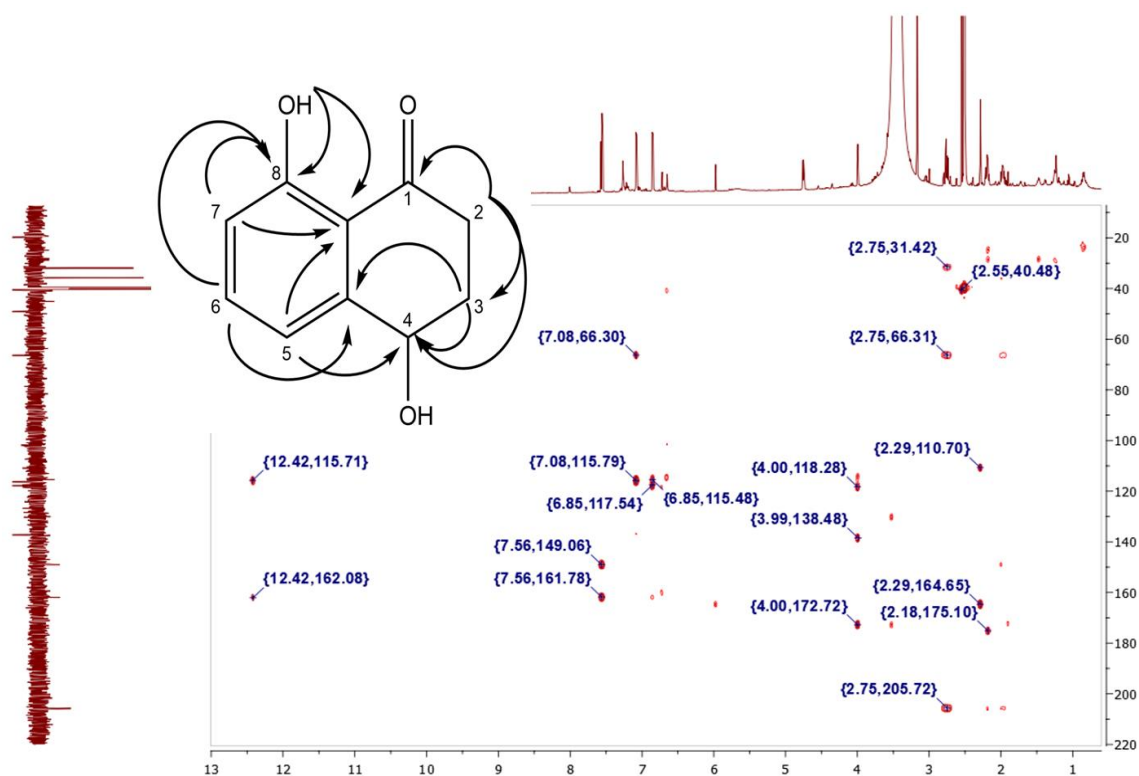
Os sinais dos dois carbonos metilênicos em δ_c 32,0 (C-3) e δ_c 35,8 (C-2), foram atribuídos com base nas correlações observadas no experimento HSQC (**Figura 40**). Assim como no caso anterior, os carbonos quaternários e o carbonílico foram identificados pelo espectro HMBC (**Figura 41**), com seus respectivos sinais em δ_c 162,0 (C-8), δ_c 115,7 (C-8a) e δ_c 149,0 (C-4a).

Figura 40 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr2-P12**.



Fonte: Próprio autor.

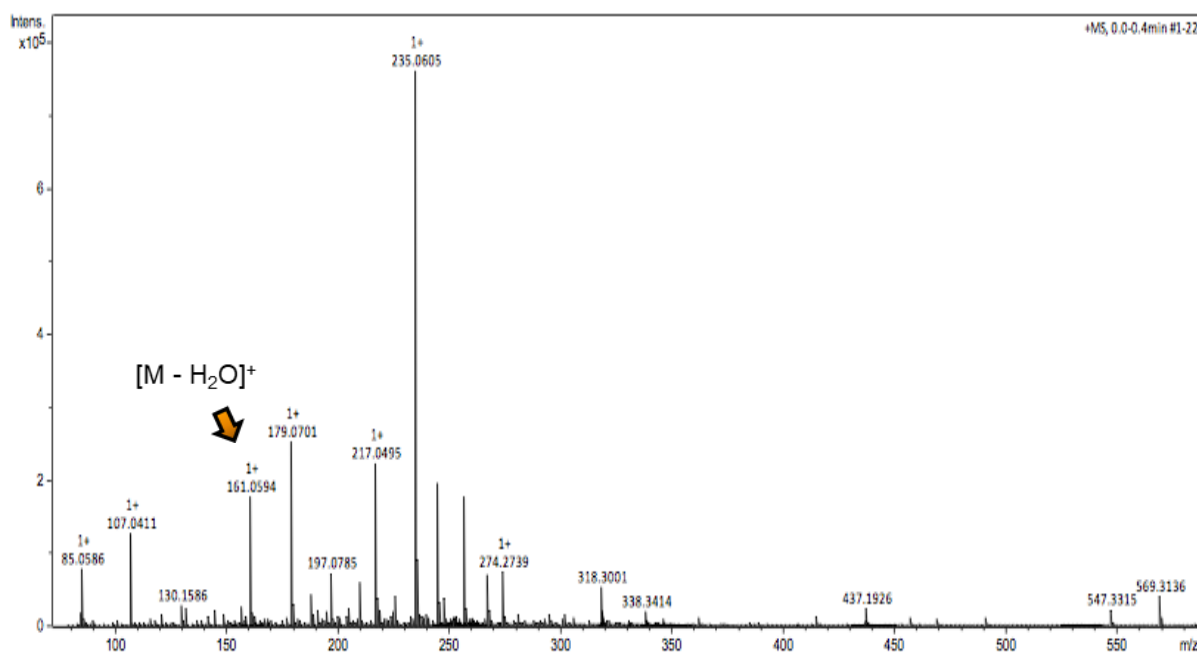
Figura 41 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr2-P12**.



Fonte: Próprio autor.

O espectro de massas de alta resolução de **Fr2-P12** (**Figura 42**) apresentou um pico em m/z 179,0701 referente à molécula protonada $[M + H]^+$ ($C_{10}H_{11}O_3$), compatível com a massa prevista para a isosclerona (178,063).

Figura 42 Espectro de massas de alta resolução (*full scan*, modo positivo) da substância **Fr2-P12**.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 125 MHz) para **Fr2-P12** e para a Isosclerona.

Posição	Fr2-P12		Isosclerona*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	205,7	-	204,2	-
2	35,8	2,75 (<i>m</i>)	34,5	2,64 (<i>ddd</i> ; 17,9; 8,3; 4,8) 3,00 (<i>ddd</i> ; 17,9; 8,3; 4,7)
3	32,0	1,97 (<i>m</i>) 2,19 (<i>m</i>)	31,5	2,19 (<i>m</i>) 2,34 (<i>m</i>)
4	66,6	4,75 (<i>dd</i> ; 8,9; 4,0)	67,6	4,91 (<i>dd</i> ; 7,4; 3,7)
4a	149,0	-	145,8	-
5	117,8	7,08 (<i>d</i> ; 7,6)	117,7	7,01 (<i>dd</i> ; 7,5; 0,8)
6	137,3	7,56 (<i>dd</i> ; 8,3; 7,6)	136,9	7,49 (<i>dd</i> ; 8,4; 7,5)
7	116,3	6,85 (<i>d</i> ; 8,3)	117,3	6,92 (<i>d</i> ; 8,4)
8	162,0	-	162,6	-
8a	115,7	-	115,2	-
8-OH	-	12,41 (<i>s</i>)	-	12,41 (<i>s</i>)
4-OH	-	-	-	1,82 (<i>s</i>)

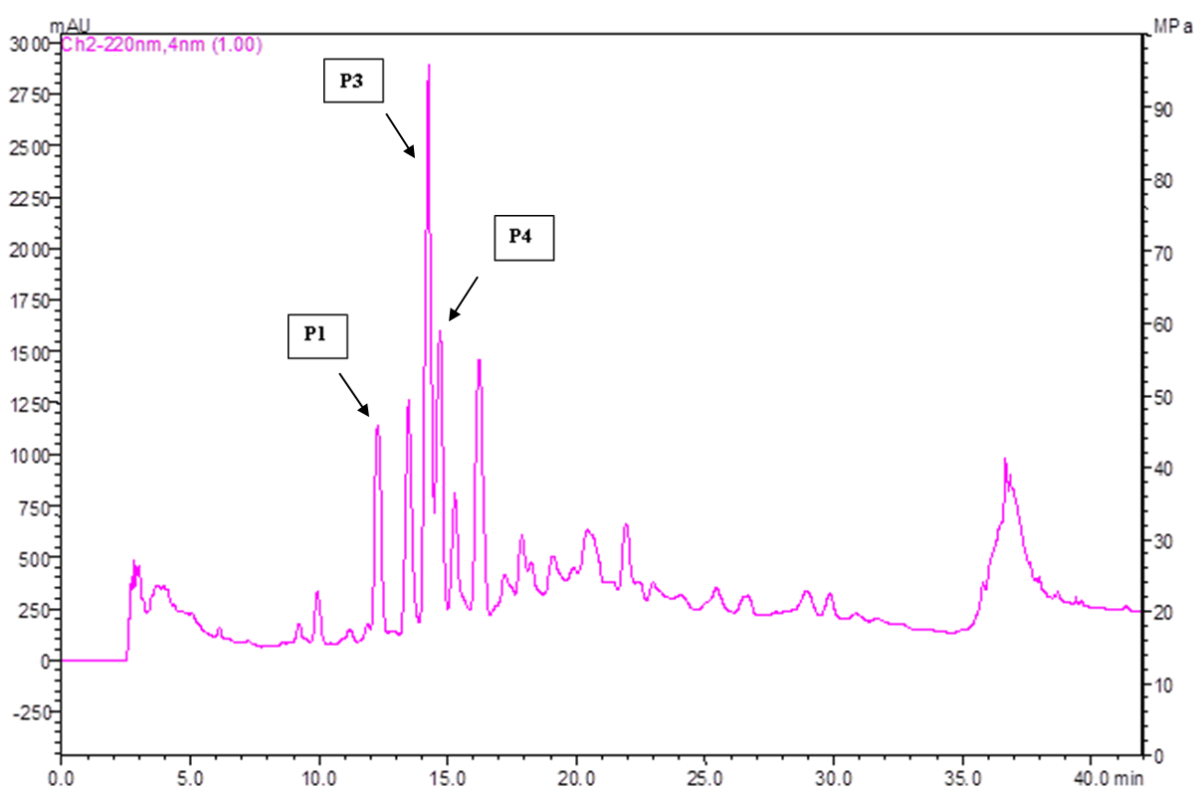
*400 e 100 MHz, CDCl_3 (Couché, 2003)

No estudo realizado por Li et al. (2014) a isosclerona apresentou atividade citotóxica frente a linhagem MCF-7 de câncer de mama, além do efeito de inibição de níveis de expressão gênica e proteica impedindo assim, o crescimento da célula tumoral.

4.5 Purificação da Fração 3

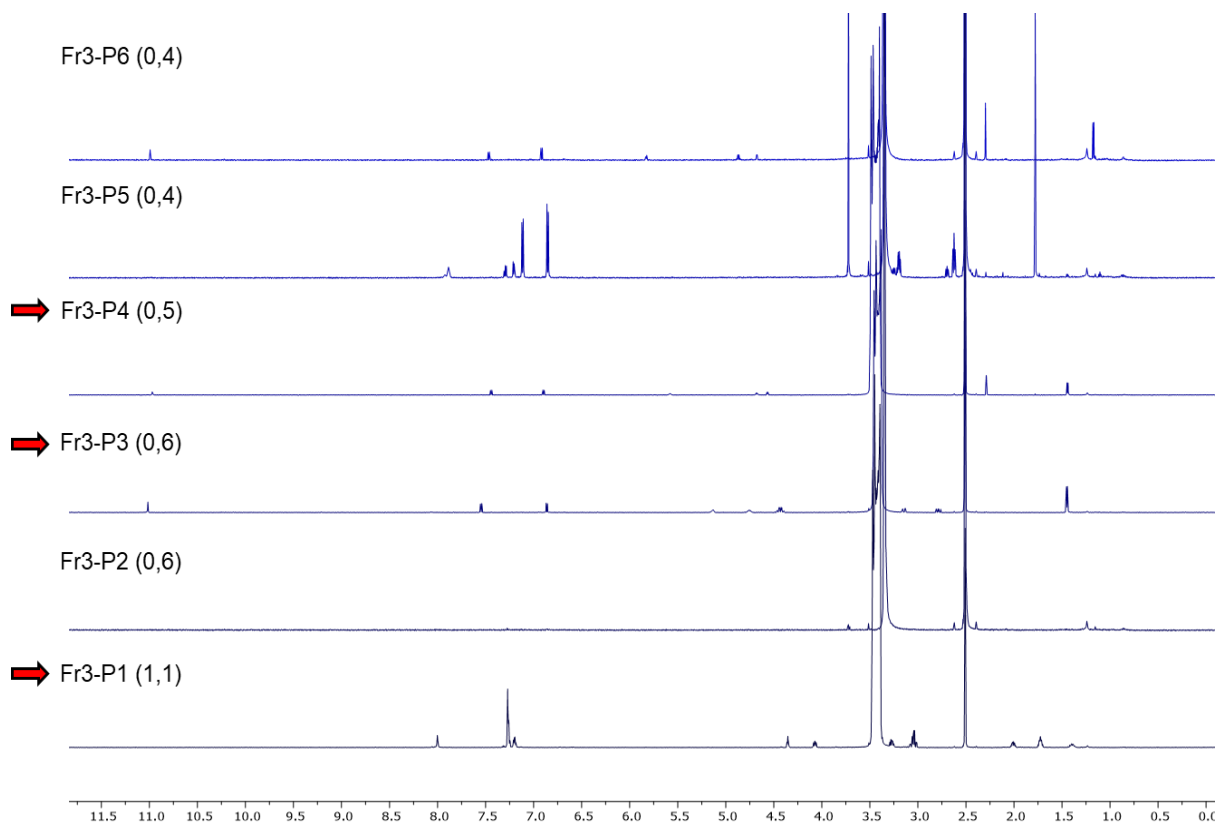
Dessa fração foi possível isolar três substância (**P1**, **P3** e **P4**) com massa, pureza e intensidade de sinais nos espectros 2D suficiente para análises de determinação estrutural.

Figura 43 Análise da fração 3 por CLAE semipreparativa ($\lambda = 220$ nm) em coluna C18 eluída com H₂O:MeOH (60:40 a 45:55 v/v) em 30 min.



Fonte: Próprio autor.

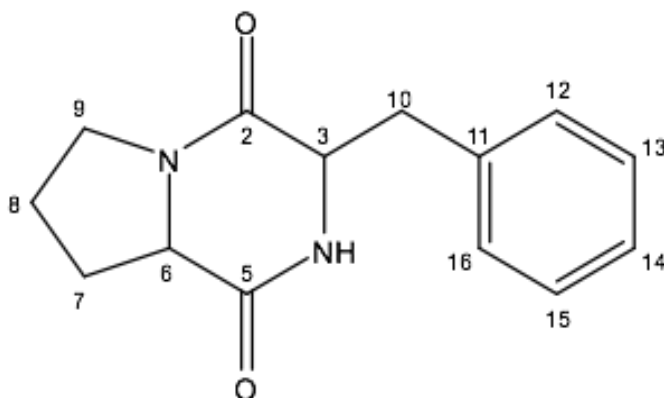
Figura 44 Espectros de RMN de ^1H de seis substâncias isoladas da fração 3 e suas respectivas massas (mg).



Fonte: Próprio autor.

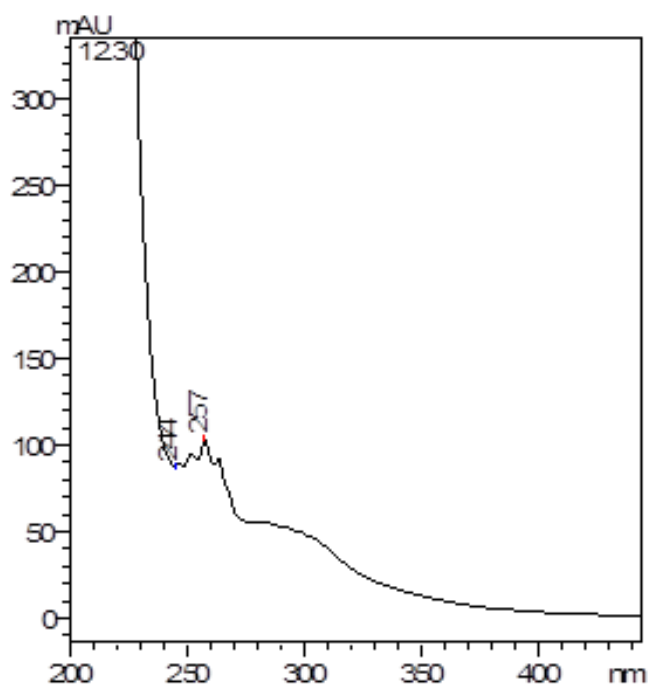
4.5.1 Elucidação estrutural da substância **Fr3-P1**

A substância **Fr3-P1** (1,1 mg) foi identificada como a 2,5-dicetopiperazina ciclo(Pro-Phe) a partir da análise de seus dados espectroscópicos, espectrométricos e comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 45**) apresentou uma banda de absorção em $\lambda_{\text{max}} = 257 \text{ nm}$,



Fr3-P1

Figura 45 Espectro no UV-Vis da substância **Fr3-P1** (46,15% MeOH:53,85% H₂O).

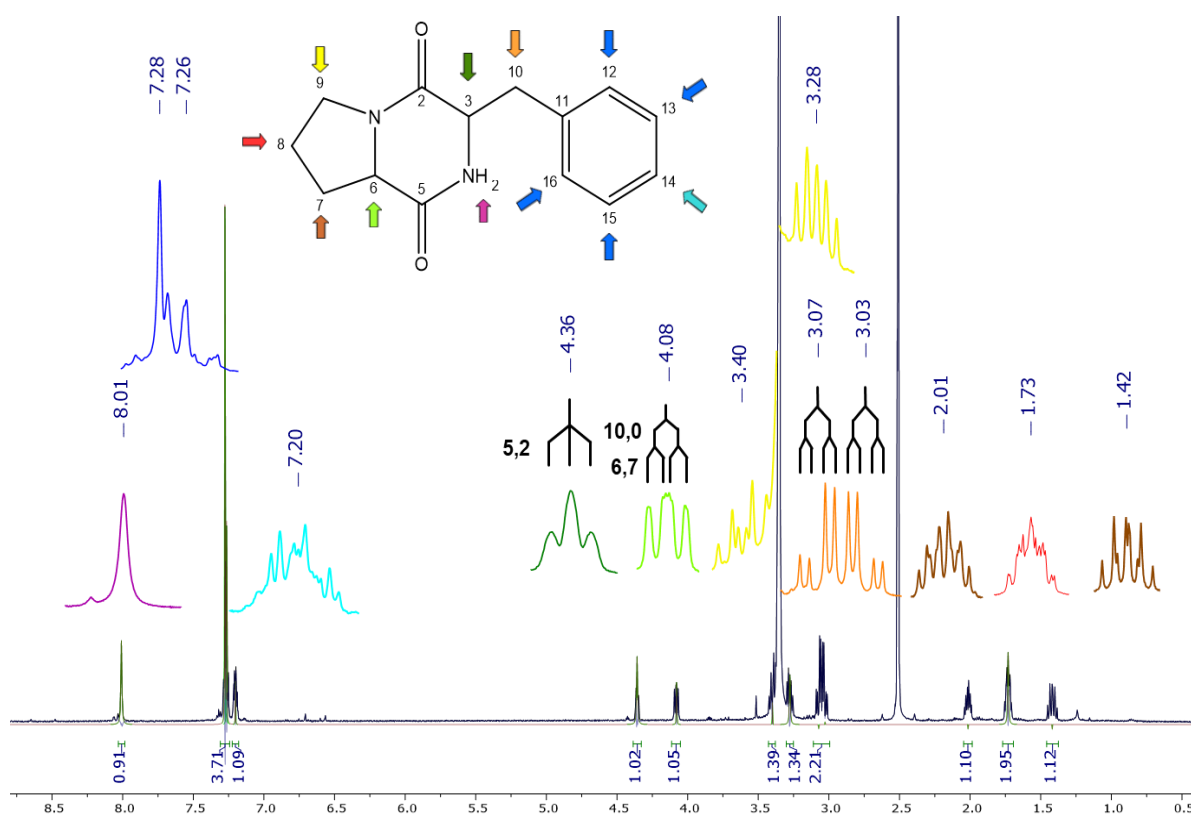


Fonte: Próprio autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 46**) apresentou um singlete em δ_{H} 8,01 (4-NH, 1H), um multiplete em δ_{H} 7,20 (H-14, 1H) e outros multipletos sobrepostos na faixa de δ_{H} 7,25 – 7,29 (H-12, H-13, H-15 e H-16, 4H). Também foi observado um tripleto alargado em δ_{H} 4,36, um duplo dubleto em δ_{H} 3,03 ($J_{10\text{a}-3}$ 5,0 Hz e $J_{10\text{a}-10\text{b}}$ 14,2 Hz; H-10a, 1H) e outro duplo dubleto em δ_{H} 3,07 ($J_{10\text{b}-3}$ 5,3 Hz e $J_{10\text{b}-10\text{a}}$ 14,2 Hz; H-10b, 1H). Todos esses sinais são referentes aos hidrogênios da unidade do aminoácido fenilalanina. Os hidrogênios provenientes do

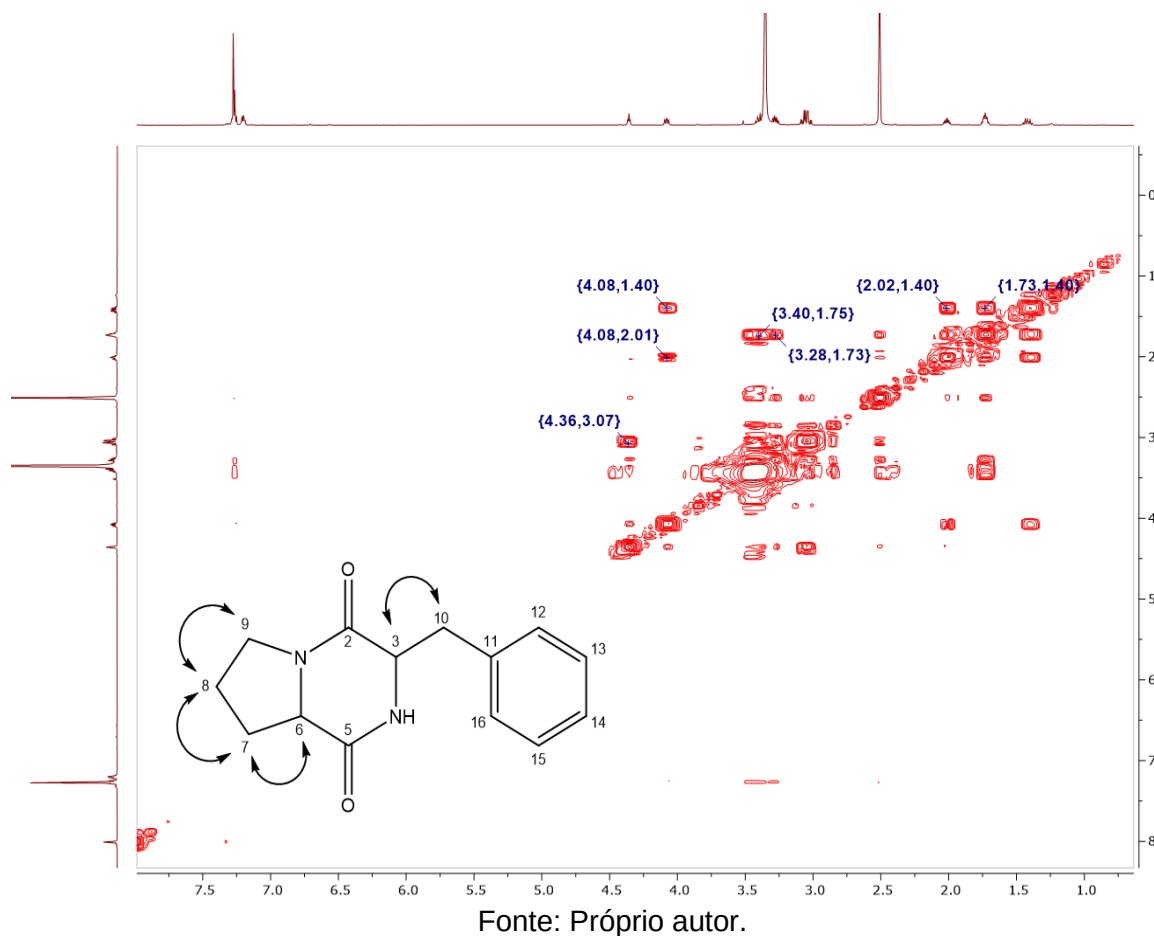
aminoácido prolina foram identificados pelo duplo dubleto em δ_H 4,08 (J_{6-7a} 6,7 Hz e J_{6-7b} 10,0 Hz; H-6, 1H) e pelos multipletos em δ_H 2,01 (H-7_a, 1H), δ_H 1,42 (H-7_b, 1H), δ_H 3,28 (H-9_a, 1H), δ_H 3,40 (H-9_b, 1H) e δ_H 1,73 (H-8, 2H). As correlações $^3J_{H-H}$ desses hidrogênios foram observadas no espectro COSY (**Figura 47**).

Figura 46 Espectro de RMN de 1H da substância **Fr3-P1** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



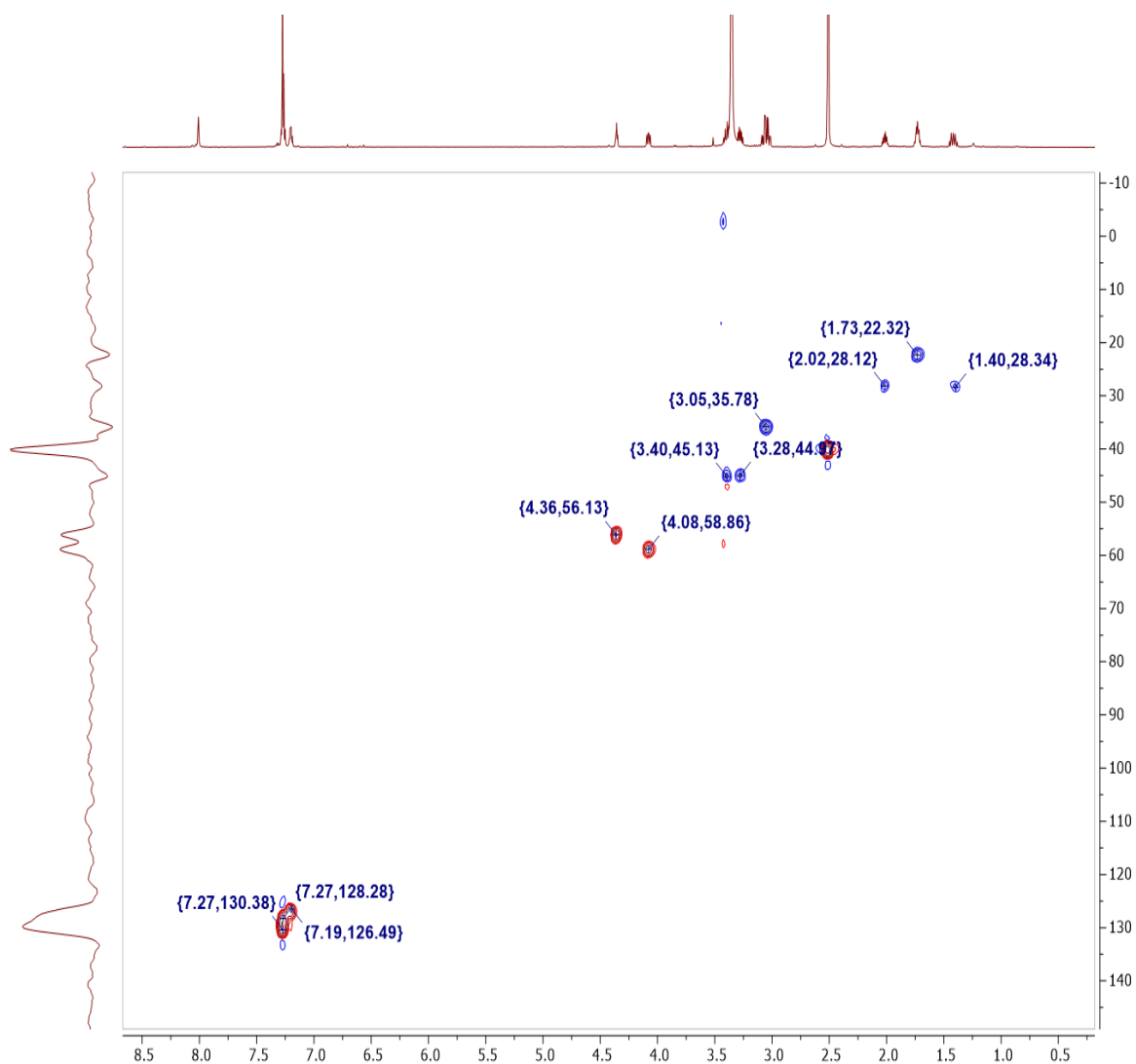
Fonte: Próprio autor.

Figura 47 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr3-P1**.



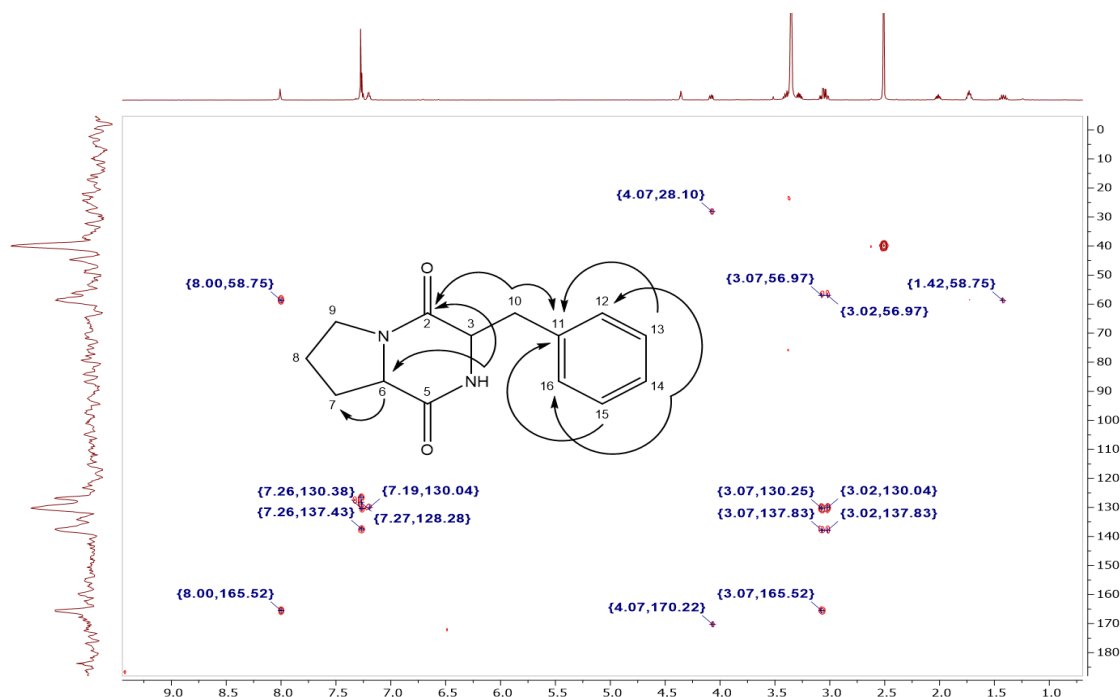
No espectro HSQC (**Figura 48**) foram observadas as correlações $^1J_{C-H}$ que permitiram identificar os carbonos metilênicos em δ_c 35,8 (C-10), δ_c 28,1 (C-7), δ_c 22,3 (C-8) e δ_c 44,9 (C-9).

Figura 48 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr3-P1**.



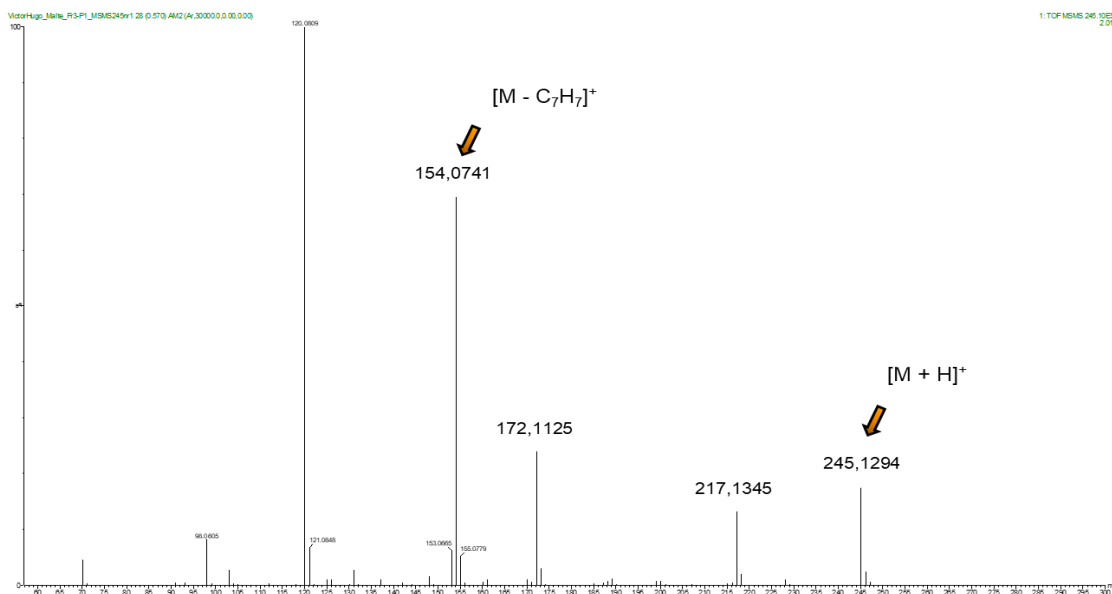
Fonte: Próprio autor.

O espectro HMBC (**Figura 49**) mostrou as correlações do hidrogênio 4-NH com o carbono quaternário em δ_c 165,5 (C-2) e com C-6, em δ_c 58,8. Foi possível observar todas as correlações $^3J_{C-H}$ e a maioria das correlações $^2J_{C-H}$ do aminoácido fenilalanina, e ainda, algumas correlações referentes ao aminoácido prolina.

Figura 49 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr3-P1**.

Fonte: Próprio autor.

O espectro de massas de alta resolução de **Fr3-P1** apresentou um pico majoritário em m/z 245,1294 referente à molécula protonada $[M + H]^+$ ($C_{14}H_{17}N_2O_2$), esse íon foi escolhido para segunda fragmentação da qual foi obtido um espectro MS/MS (**Figura 50**).

Figura 50 Espectro MS/MS de alta resolução do íon 245,1294 (modo positivo) para substância **Fr3-P1**.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr3-P1** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).

Posição	Fr3-P1		Ciclo(S-Pro-S-Phe)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (Hz)
2	165,5	-	168,9	-
3	56,1	4,36 (<i>tl</i>)	55,6	4,34 (<i>t</i> ; 5,2)
4	-	8,01 (<i>s</i>)	-	7,93 (<i>s</i>)
5	170,8	-	164,9	-
6	58,8	4,08 (<i>dd</i> ; 10,0; 6,7)	58,3	4,07 (<i>t</i> ; 8,5)
7	28,1	1,42 (<i>m</i>)	27,6	1,42 (<i>m</i>)
		2,01 (<i>m</i>)		2,01 (<i>m</i>)
8	22,3	1,73 (<i>m</i>)	21,8	1,72 (<i>m</i>)
9	44,9	3,28 (<i>m</i>)	44,5	3,25 (<i>m</i>)
		3,40 (<i>m</i>)		3,39 (<i>m</i>)
10	35,8	3,03 (<i>dd</i> ; 14,2; 5,0)	35,2	3,02 (<i>dd</i> ; 14,0; 5,0)
		3,07 (<i>dd</i> ; 14,2; 5,3)		3,08 (<i>dd</i> ; 14,0; 5,0)
11	137,4	-	137,2	-
12 e 16	130,3	7,25 – 7,29	129,7	7,26 (<i>d</i>)
13 e 15	128,3	7,25 – 7,29	127,8	7,23 (<i>dd</i>)
14	127,0	7,20 (<i>m</i>)	126,2	7,26 (<i>dd</i>)

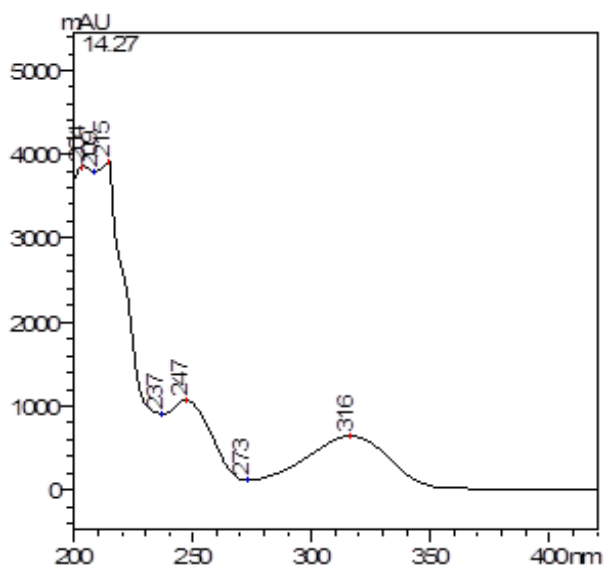
* 500 e 125 MHz, DMSO- d_6 (Cafêu, 2007)

Estudos com a ciclo(Pro-Phe) evidenciaram o potencial antibacteriano e antifúngico dessa substância, pois ela apresentou atividade contra *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. (WANG et al., 2010)

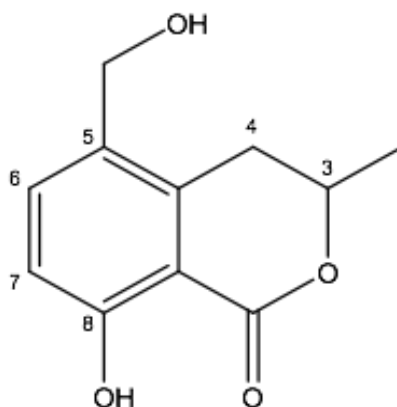
4.5.2 Elucidação estrutural da substância **Fr3-P3**

A substância **Fr3-P3** (0,6 mg) foi identificada como 5-hidroximetil-meleína a partir da análise de seus dados espectroscópicos, espectrométricos e comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 51**) apresentou bandas com máximo de absorção em $\lambda = 215, 247$ e 316 nm.

Figura 51 Espectro no UV-Vis da substância **Fr3-P3** (47,13% MeOH: 52,87% H₂O).



Fonte: Próprio autor.

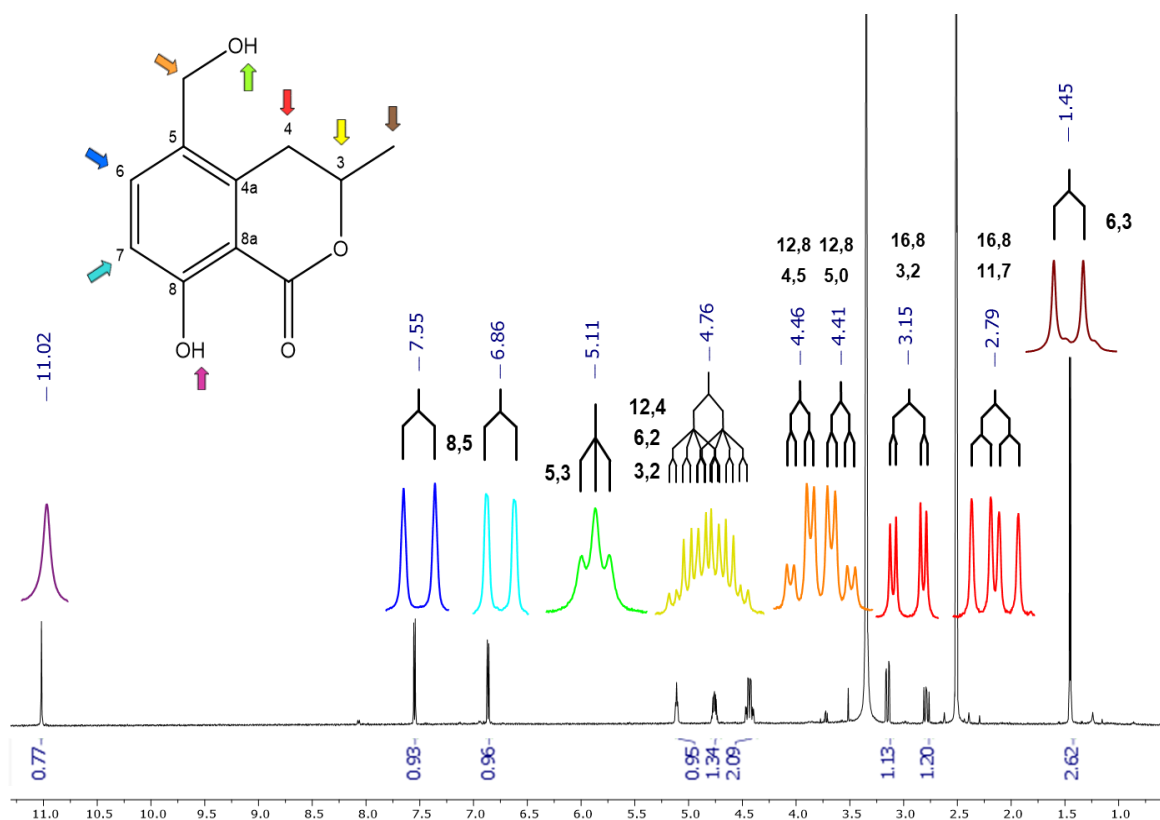


Fr3-P3

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 52**) dessa substância apresentou dubletos para hidrogênios aromáticos em δ_H 7,55 (J_{6-7} 8,5 Hz; H-6, 1H) e em 6,86 (J_{7-6} 8,5 Hz; H-7, 1H). Associado ao anel aromático, foi identificado um grupo

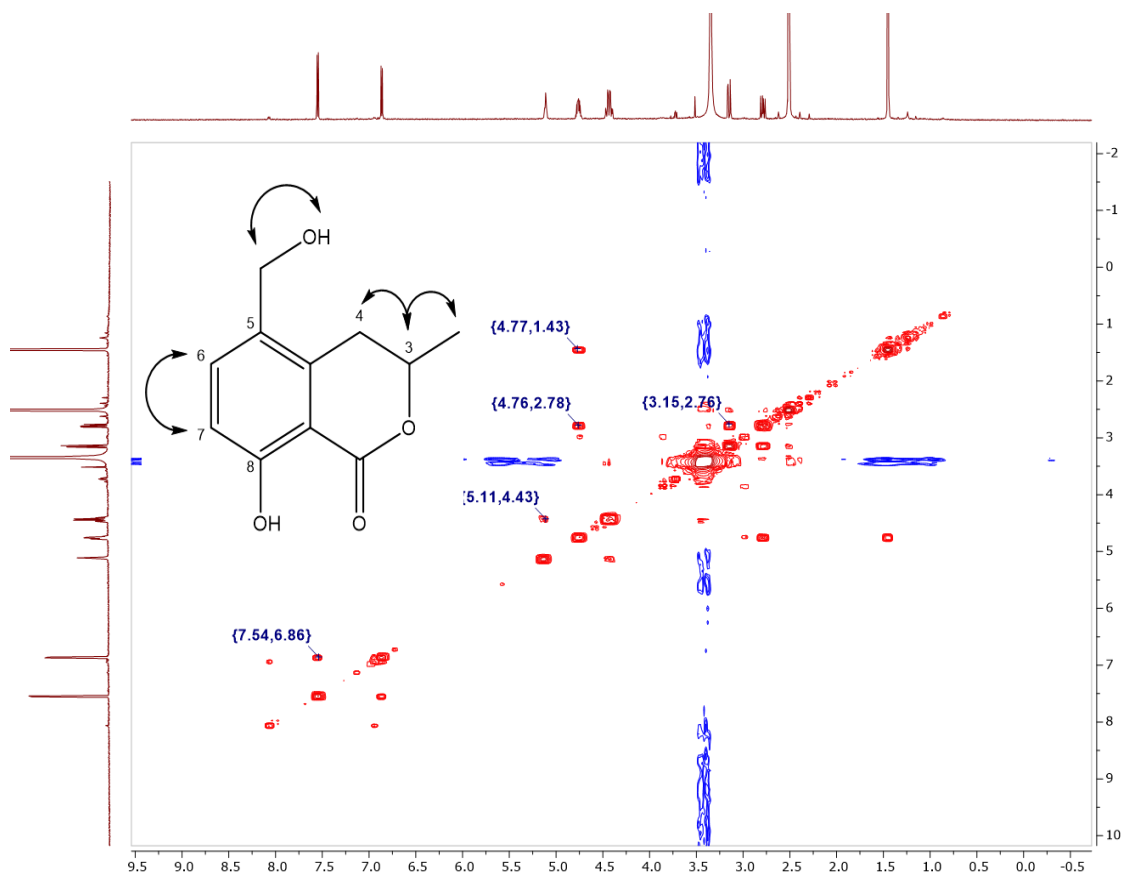
hidroximetilênico pelo duplo dubleto em δ_H 4,41 ($J_{5-CH\alpha}-5-CH\beta$ 12,8 Hz e $J_{5-CH\alpha}-5-OH$ 5,0 Hz; 5-CH α , 1H) e por outro duplo dubleto em δ_H 4,46 ($J_{5-CH\beta}-5-CH\alpha$ 12,8 Hz e $J_{5-CH\beta}-5-OH$ 4,5 Hz; 5-CH β , 1H). Foi ainda identificado um hidrogênio desblindado, atribuído ao hidrogênio fenólico quelatado com a carbonila, em δ_H 11,02 (8-OH; 1H). No anel lactônico, foi identificado um hidrogênio oximetínico pelo duplo quádruplo dubleto em δ_H 4,76 (J_{3-4a} 12,4 Hz, J_{3-Me} 6,2 Hz, J_{3-4b} 3,2 Hz; H-3; 1H) e a metila adjacente a esse hidrogênio foi identificada pelo dubleto em δ_H 1,45 (J_{Me-3} 6,3 Hz; 3-CH $_3$; 3H). Todos os acoplamentos $^3J_{H-H}$ entre os hidrogênios foram observados no espectro de COSY (Figura 53).

Figura 52 Espectro de RMN de 1H da substância **Fr3-P3**.



Fonte: Próprio autor.

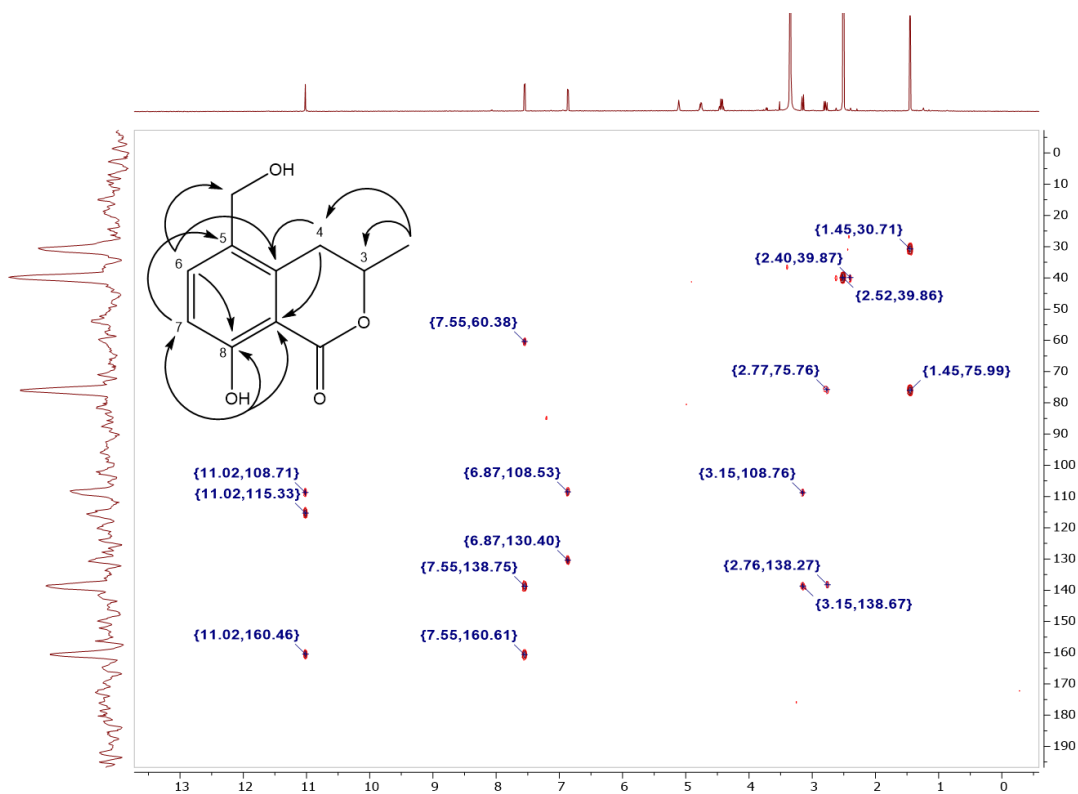
Figura 53 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr3-P3**.



Fonte: Próprio autor.

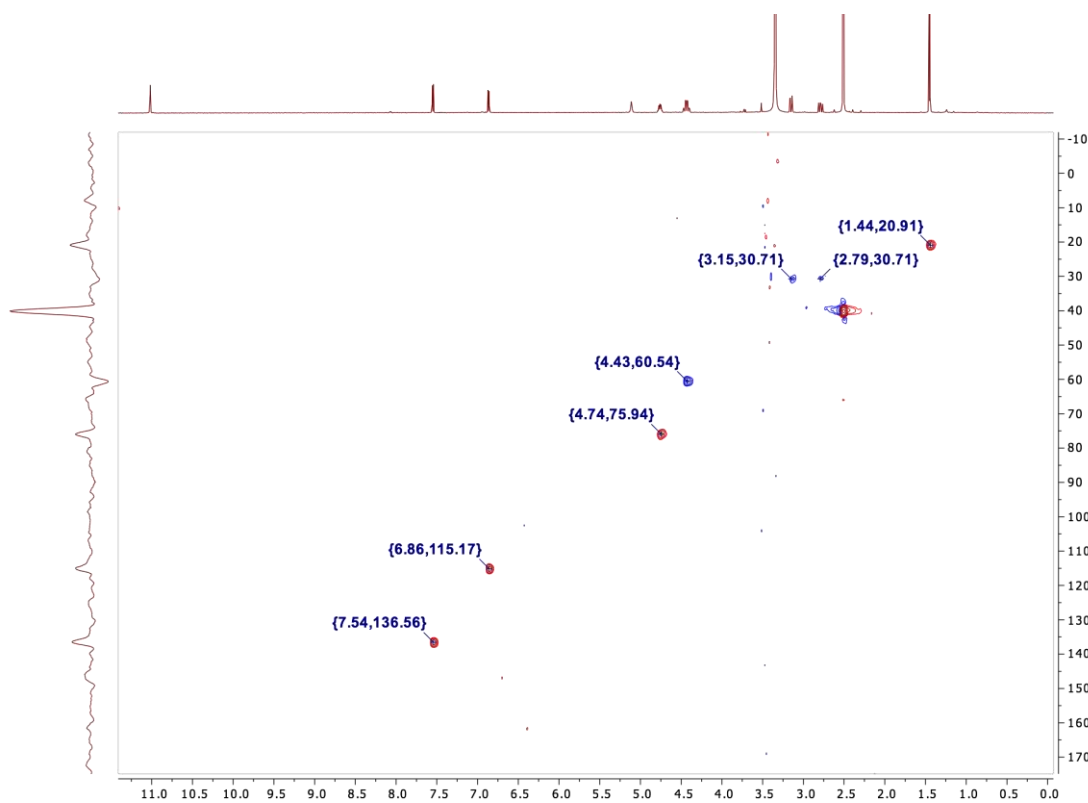
No espectro de HMBC (**Figura 54**) foram observados sinais referentes a acoplamentos $^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$ dos hidrogênios aromáticos, alifáticos e da hidroxila quelada. Esses sinais permitiram identificar as posições dos carbonos quaternários em δ_{C} 138,7 (C-4a), δ_{C} 130,4 (C-5) e δ_{C} 108,7 (C-8a), porém o acoplamento de H-3 com a carbonila não pode ser observado. Os dois carbonos metilênicos foram identificados pelos sinais negativos no HSQC (**Figura 55**).

Figura 54 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr3-P3**.



Fonte: Próprio autor.

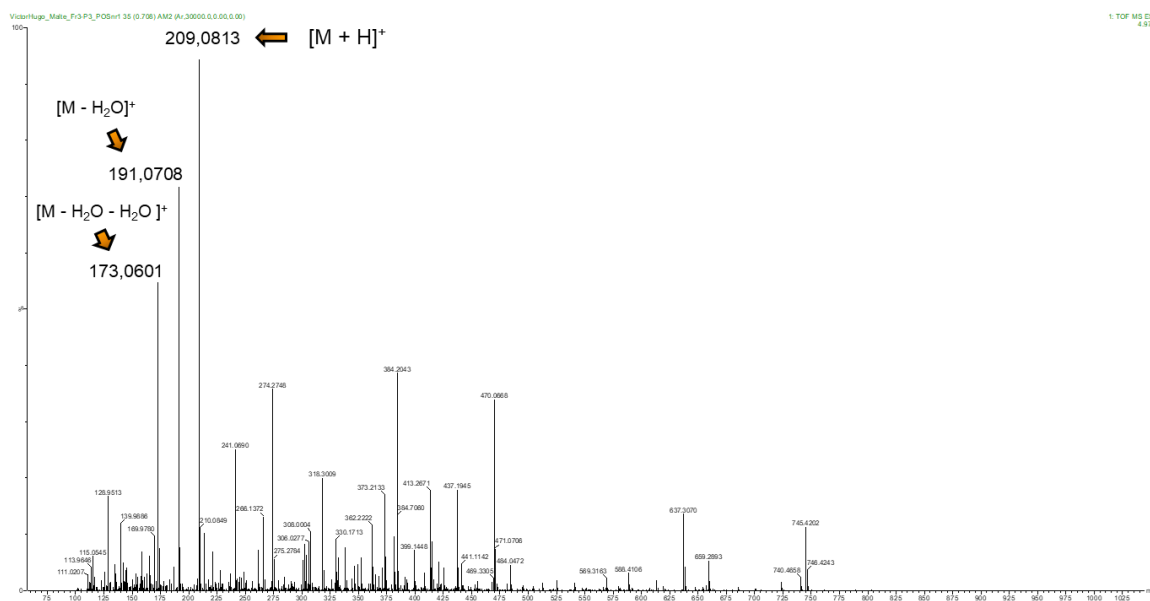
Figura 55 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr3-P3**.



Fonte: Próprio autor.

O espectro de massas de alta resolução de **Fr3-P3 (Figura 56)** apresentou um pico em m/z 209,0813 referente a molécula protonada $[M + H]^+$ ($C_{11}H_{13}O_4$) e duas fragmentações sequenciais de moléculas de água (m/z 191,0708 e m/z 173,0601).

Figura 56 Espectro de massas de alta resolução (*full scan*, modo positivo) da substância **Fr3-P3**.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr3-P3** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para 5-hidróximetil-meleína.

Posição	Fr3-P3		5-hidroximetil-meleína*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	-	-	170,1	-
3	75,9	4,76 (<i>dqd</i> ; 12,4; 6,2; 3,2)	75,6	4,69 (<i>m</i>)
3-CH ₃	20,9	1,45 (<i>d</i> ; 6,3)	20,7	1,52 (<i>d</i> ; 6,0)
4	30,7	2,79 (<i>dd</i> ; 16,8; 11,7) 3,15 (<i>dd</i> ; 16,8; 3,2)	31,1	2,76 (<i>dd</i> ; 16,5 e 10,5) 3,20 (<i>dd</i> ; 16,5 e 3,5)
4a	138,7	-	138,4	-
5	130,4	-	127,9	-
5-CH _{α}	60,5	4,41 (<i>dd</i> ; 12,8; 5,0)	62,3	4,57 (<i>s</i>)
5-CH _{β}		4,46 (<i>dd</i> ; 12,8; 4,5)		
5-CH ₂ OH	-	5,11 (<i>tl</i>)	-	-
6	136,6	7,55 (<i>d</i> ; 8,5)	136,6	7,43 (<i>d</i> ; 8,5)
7	115,1	6,86 (<i>d</i> ; 8,5)	115,7	6,81 (<i>d</i> ; 8,5)
8	160,4	-	161,6	-
8a	108,7	-	108,3	-
8-OH	-	11,02 (<i>s</i>)	-	-

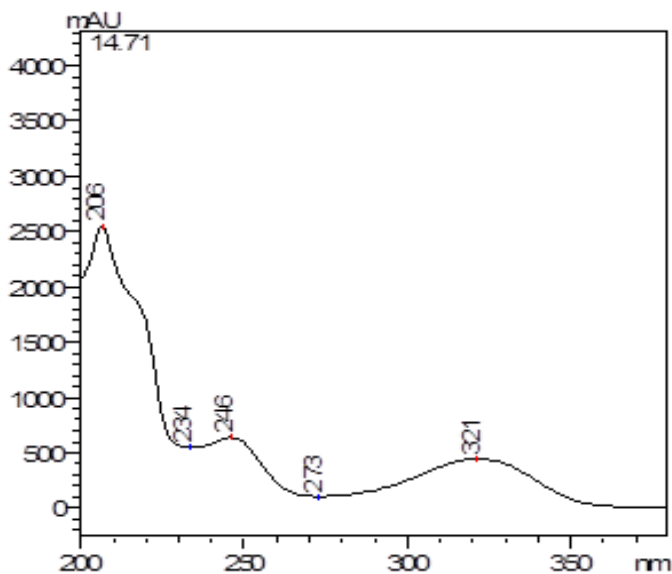
*60 e 15 MHz, CDCl₃ (Okuno et al., 1986)

Um estudo indicou que a 5-hidroximetil-meleína apresenta moderada atividade antibacteriana contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. A substância foi anteriormente obtida de uma linhagem do fungo *Xylaria* sp., que foi isolada da gorgônia leque *Annella* sp. (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009).

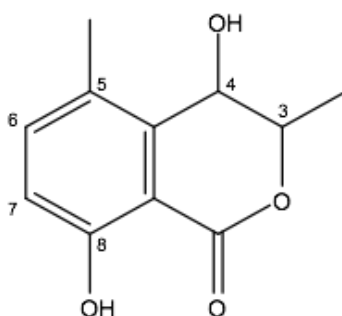
4.5.3 Elucidação estrutural da substância **Fr3-P4**

A substância **Fr3-P4** (0,6 mg) foi identificada como 4-hidróxi-5-metilmeleína. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 57**) apresentou bandas com máximo de absorção em $\lambda = 206$, 246 e 321 nm.

Figura 57 Espectro no UV-Vis da substância **Fr3-P4** (47,35% MeOH: 52,65% H₂O).



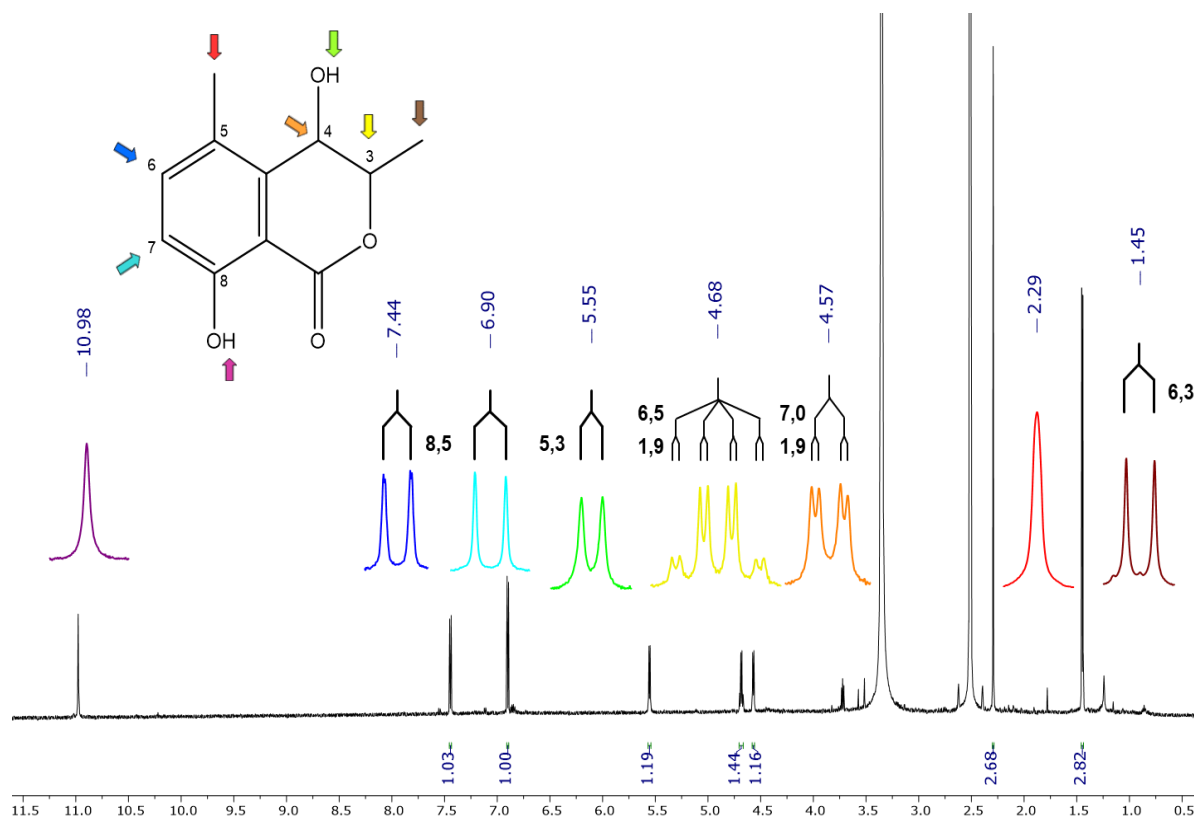
Fonte: Próprio autor.



Fr3-P4

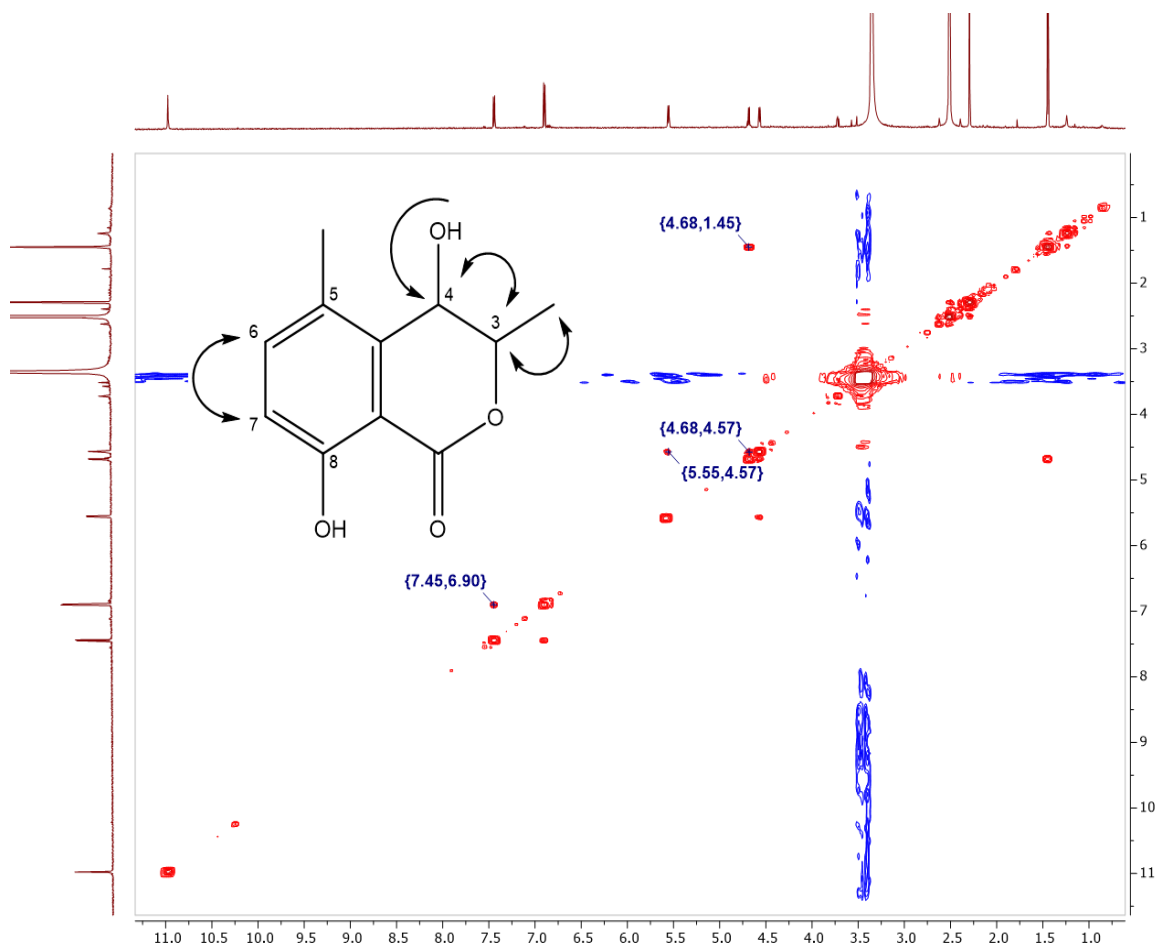
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 58**) desse derivado de meleína apresentou sinais análogos aos do derivado meleína anterior (substância **Fr3-P3**), como os dubletos referentes aos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,44 e em δ_{H} 6,90. Ainda no sistema aromático foi identificada uma metila pelo singlete em δ_{H} 2,29 (5-CH₃; 3H) e um sinal para hidrogênio desblindado, atribuído ao hidrogênio quelado, em δ_{H} 10,98 (8-OH; 1H). O hidrogênio oximetínico foi identificado pelo quádruplo dubleto em δ_{H} 4,68 ($J_{3-\text{Me}}$ 6,5 Hz, J_{3-4} 1,9 Hz; H-3; 1H) e a metila adjacente foi identificada pelo dubleto em δ_{H} 1,45 ($J_{\text{Me}-3}$ 6,5 Hz; 3-CH₃). O hidrogênio hidroxibenzílico H-4 foi identificado pelo duplo dubleto em δ_{H} 4,57 ($J_{4-\text{OH}}$ 7,0, J_{4-3} 1,9; 1H) e a hidroxila adjacente foi atribuída ao dubleto em δ_{H} 5,55 ($J_{\text{OH}-4}$ 7,0; 1H) Todos os acoplamentos $^3J_{\text{H-H}}$ entre estes hidrogênios, inclusive o da hidroxila em C-4, foram observados no espectro de COSY (**Figura 59**).

Figura 58 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr3-P4** (600 e 125 MHz) e para 4-hidroxi-5-metilmeleína.



Fonte: Próprio autor.

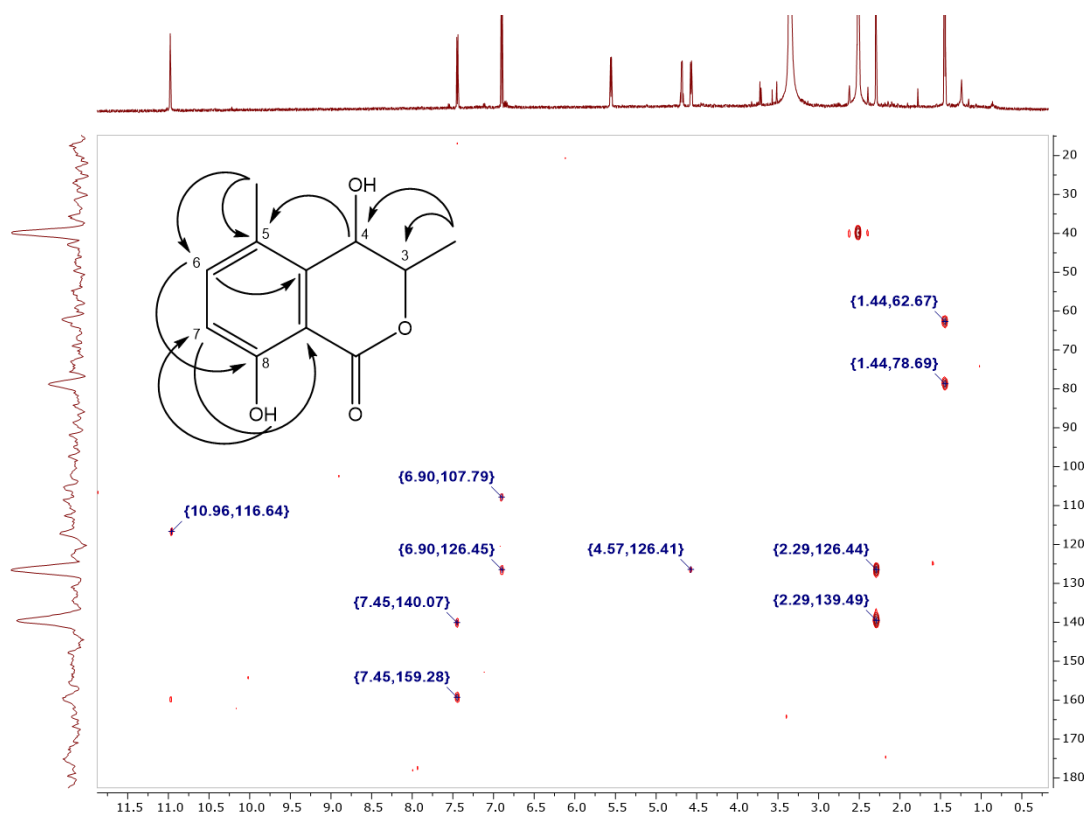
Figura 59 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr3-P4**.



Fonte: Próprio autor.

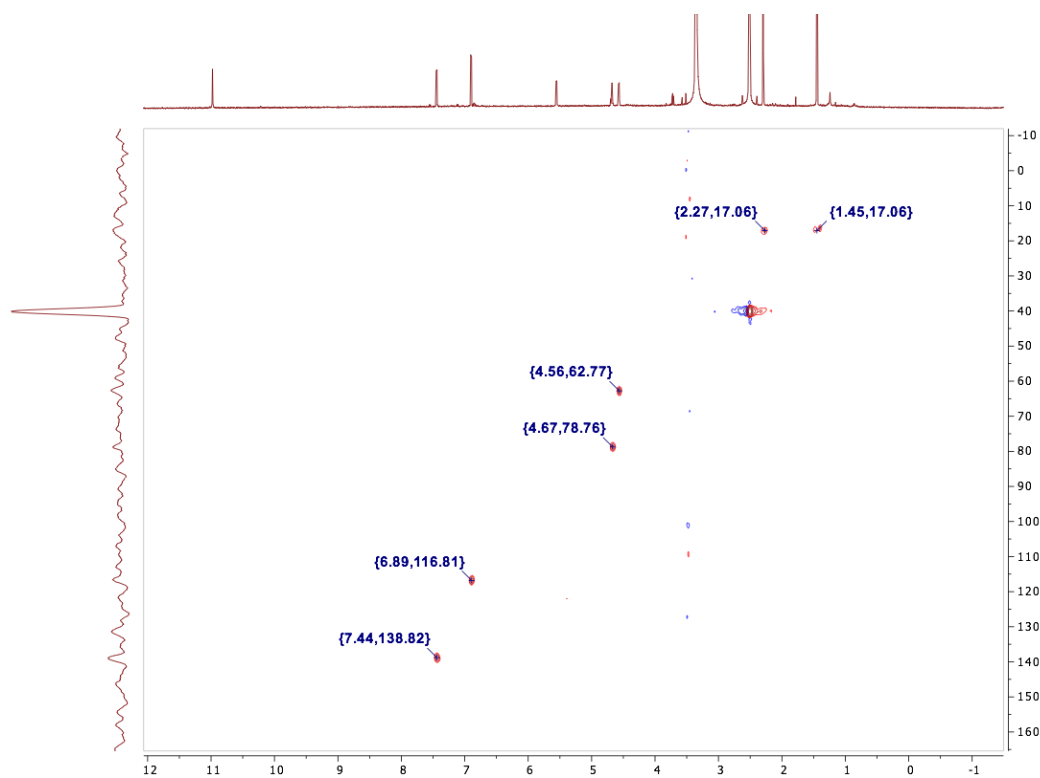
No espectro de HMBC (**Figura 60**) foram observados alguns sinais referentes a acoplamentos $^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$ dos hidrogênios aromáticos, alifáticos e um acoplamento $^3J_{\text{C-H}}$ da hidroxila quelada. Com esses sinais foi possível identificar as posições dos carbonos quaternários em δ_{C} 140,1 (C-4a), δ_{C} 126,4 (C-5) e δ_{C} 107,8 (C-8a), o acoplamento com a carbonila também não foi observado neste caso. No experimento HSQC (**Figura 61**) foram observados acoplamentos $^1J_{\text{C-H}}$ de hidrogênios metílicos ou metínicos que confirmaram as atribuições realizadas.

Figura 60 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr3-P4**.



Fonte: Próprio autor.

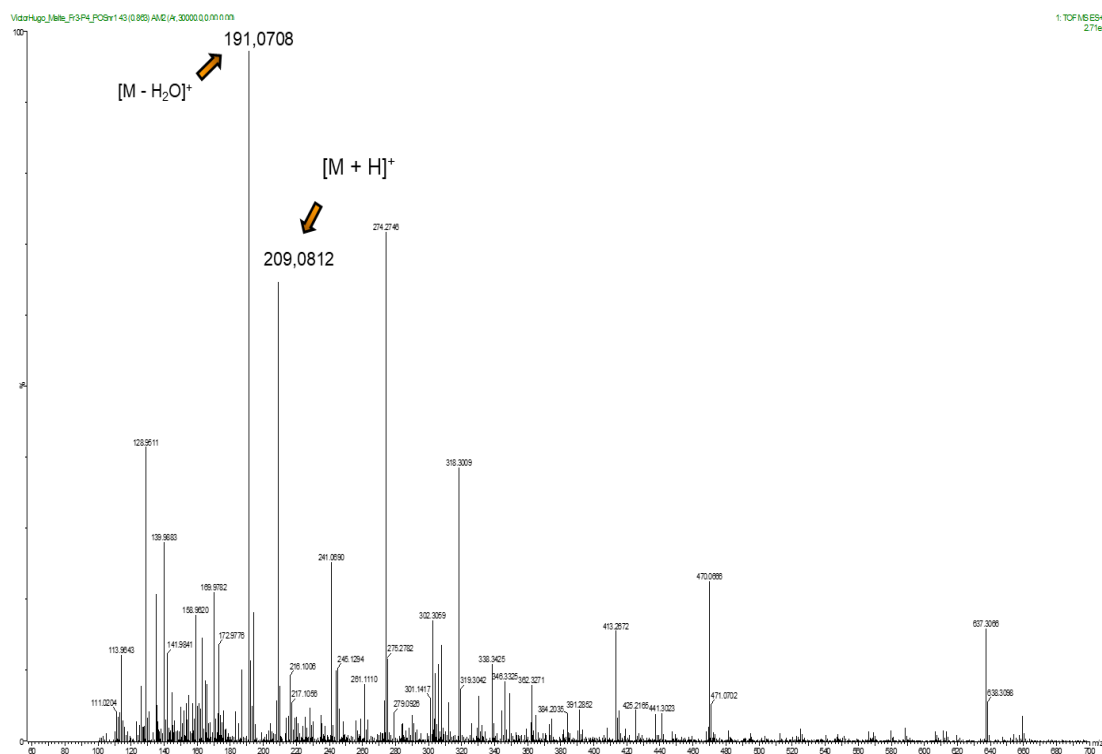
Figura 61 Mapa de contorno de HSQC da substância **Fr3-P4**.



Fonte: Próprio autor.

O espectro de massas de alta resolução de **Fr3-P4 (Figura 62)** apresentou um pico em m/z 209,0812 referente a molécula protonada $[M + H]^+$ ($C_{11}H_{13}O_4$) e pico em m/z 191,0708 referente a fragmentação de uma molécula de água.

Figura 62 Espectro de massas de alta resolução (*full scan*, modo positivo) da substância **Fr3-P4**.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr3-P4** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para 4-hidroxi-5-metilmeleína.

Posição	Fr3-P4		4-hidróxi-5-Metilmeleína*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	-	-	168,0	-
3	78,7	4,68 (<i>qd</i> ; 6,5; 1,9)	80,9	4,87 (<i>qd</i> ; 6,8; 1,2)
3-CH ₃	16,6	1,45 (<i>d</i> ; 6,5)	16,7	1,16 (<i>d</i> ; 6,8)
4	62,7	4,57 (<i>dd</i> ; 7,0; 1,9)	63,6	4,67 (<i>dd</i> ; 5,6; 1,2)
4-OH	-	5,55 (<i>d</i> ; 7,0)	-	5,82 (<i>d</i> ; 5,2)
4a	140,1	-	138,6	-
5	126,4	-	127,0	-
5-CH ₃	17,0	2,29 (<i>s</i>)	17,0	2,29 (<i>s</i>)
6	138,8	7,44 (<i>d</i> ; 8,5)	137,1	7,45 (<i>d</i> ; 8,4)
7	116,8	6,90 (<i>d</i> ; 8,5)	116,7	6,92 (<i>d</i> ; 8,4)
8	159,3	-	158,8	-
8a	107,8	-	107,1	-
8-OH	-	10,98 (<i>s</i>)	-	10,90 (<i>s</i>)

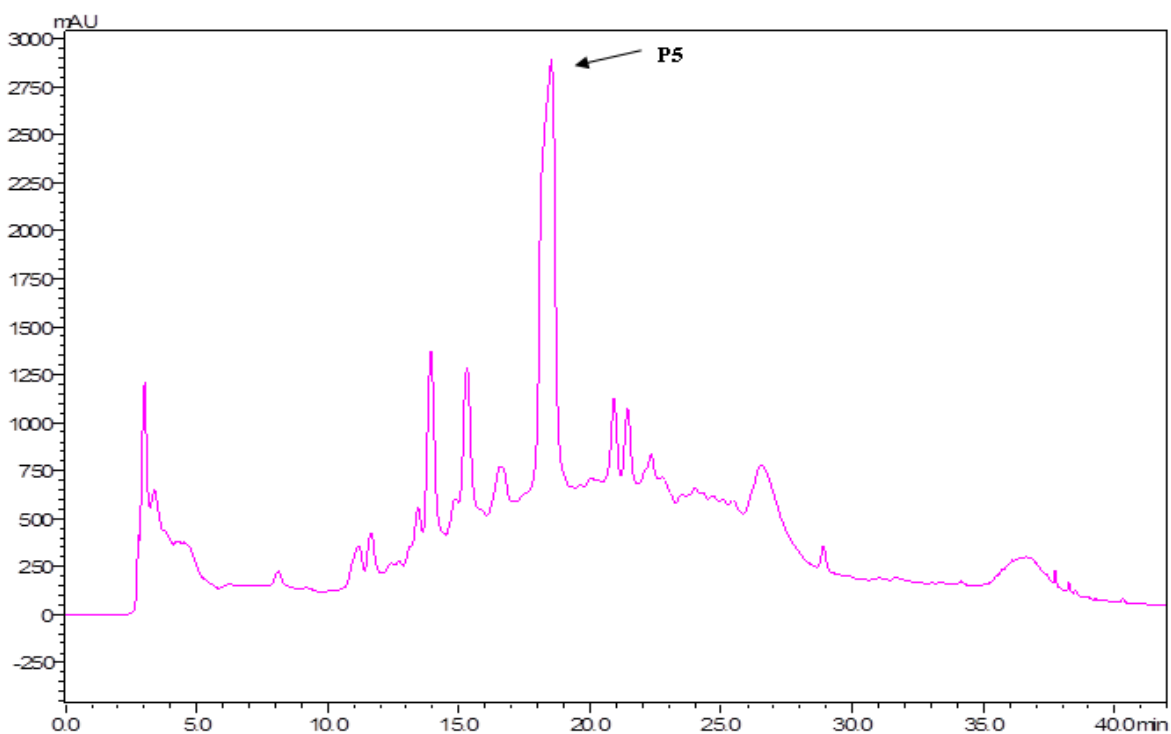
*600 e 150 MHz, DMSO- d_6 (Zhao et al., 2018)

No estudo realizado por Zhao et al. (2018) essa isocumarina foi isolada das raízes de plantas do gênero *Glycyrrhiza* e apresentou atividade moderada frente a linhagem de células de câncer hepático HepG2.

4.6 Purificação da Fração 4

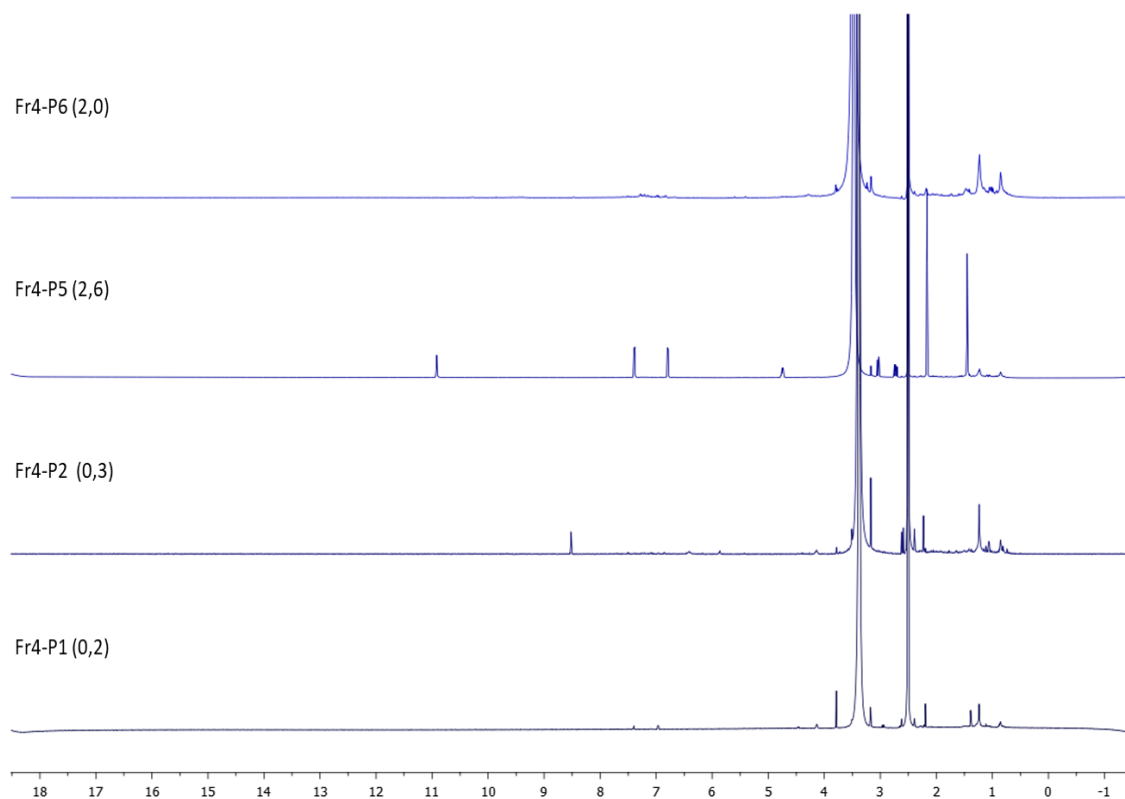
Dessa fração foi possível isolar uma substância (**P5**) com massa e pureza suficiente para análises de determinação estrutural.

Figura 63 Análise da fração 4 por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H₂O:MeOH (50:50 à 20:80 v/v) em 30 min e detecção em $\lambda = 220$ nm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 64 Espectros de RMN de ^1H de quatro substâncias isoladas da fração 4 e suas respectivas massas (mg).

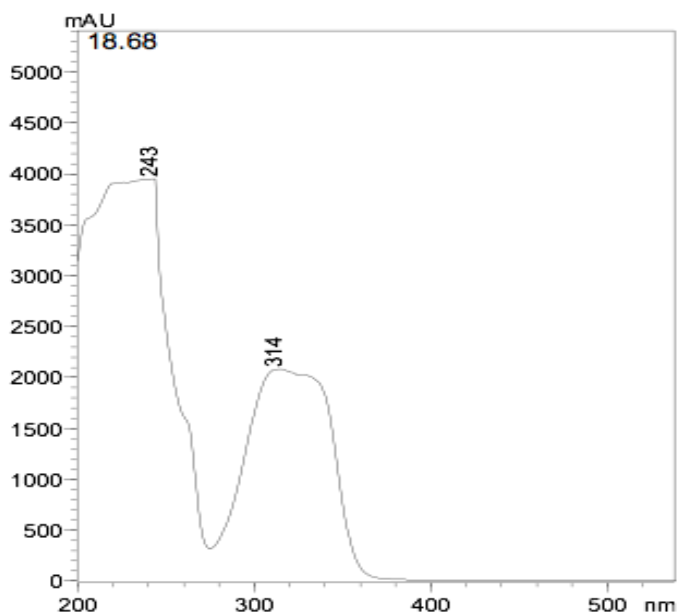


Fonte: Próprio autor.

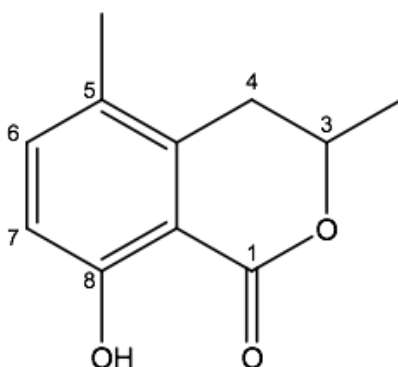
4.6.1 Elucidação estrutural da substância **Fr4-P5**

A substância **Fr4-P5** (2,6 mg) foi identificada como 5-metilmeleína. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 65**) apresentou bandas com máximo de absorção em $\lambda = 243$ e 314 nm.

Figura 65 Espectro no UV-Vis da substância **Fr4-P5** (68,7% MeOH: 31,3% H₂O).



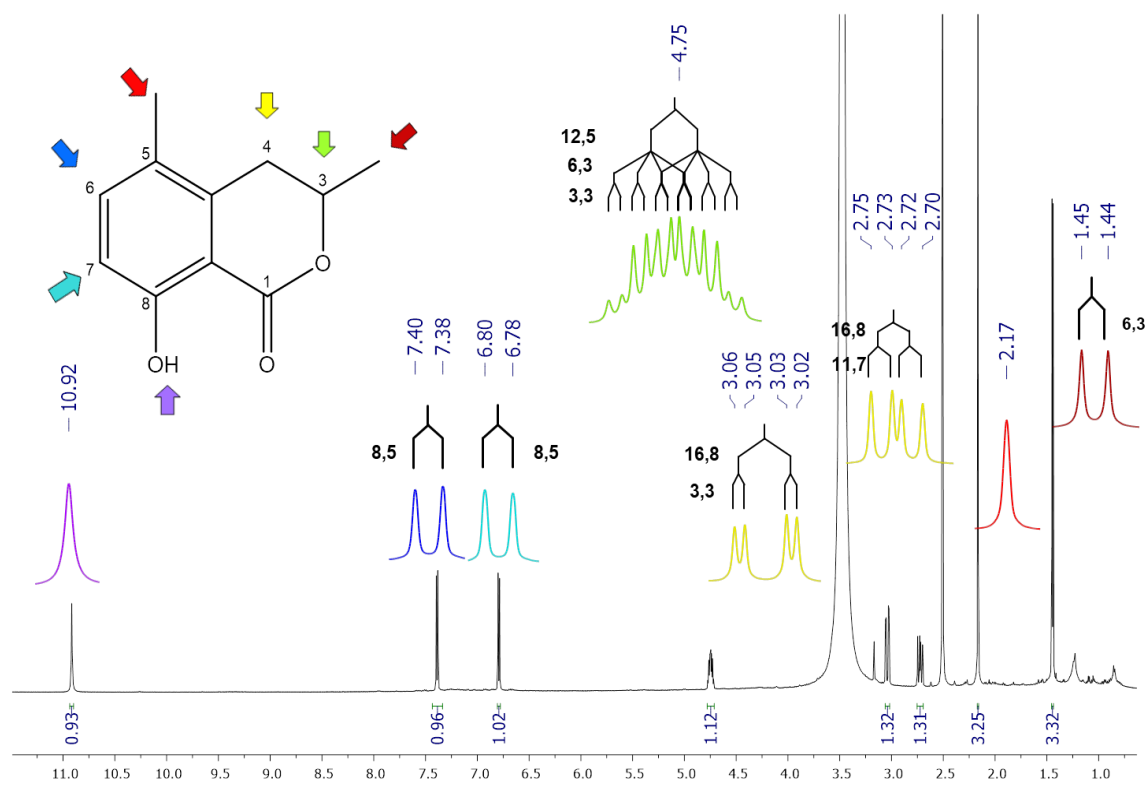
Fonte: Próprio autor.



Fr4-P5

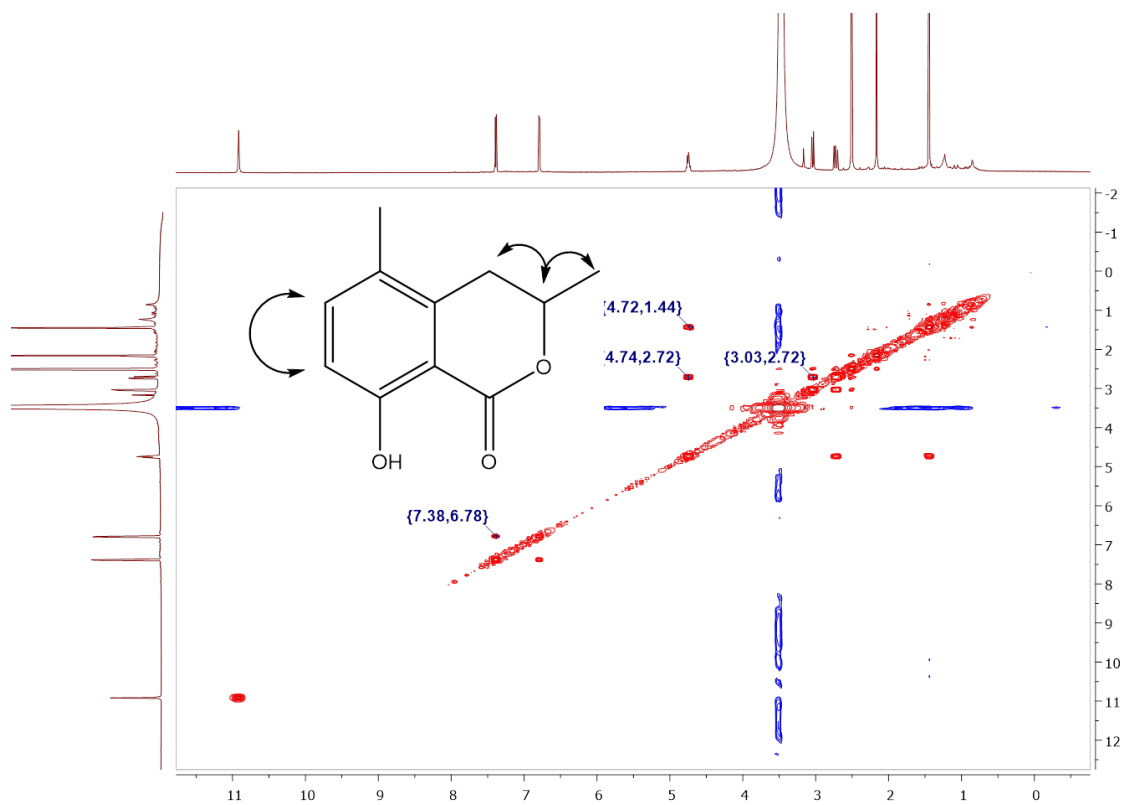
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 66**) dessa substância apresentou dubletos para hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,39 (J_{6-7} 8,5 Hz; H-6, 1H) e em 6,79 (J_{7-6} 8,5 Hz; H-7, 1H). Ainda no sistema aromático foi identificada uma metila pelo singleto em δ_{H} 2,17 (5-CH₃; 3H) e um hidrogênio desblindado, atribuído ao hidrogênio da hidroxila quelatada com a carbonila, em δ_{H} 10,92 (8-OH; 1H). Esse espectro mostrou ainda um duplo quádruplo dubleto em δ_{H} 4,75 (J_{3-4a} 12,5 Hz, $J_{3-\text{Me}}$ 6,3 Hz, J_{3-4b} 3,3 Hz; H-3; 1H) atribuído ao hidrogênio oximetínico H-3, e um dubleto em δ_{H} 1,45 ($J_{\text{Me}-3}$ 6,3 Hz; 3-CH₃) atribuído à metila em C-3. Todos os acoplamentos $^3J_{\text{H-H}}$ entre estes hidrogênios foram observados no espectro de COSY (**Figura 67**).

Figura 66 Espectro de RMN de ^1H da substância **Fr4-P5**.



Fonte: Próprio autor.

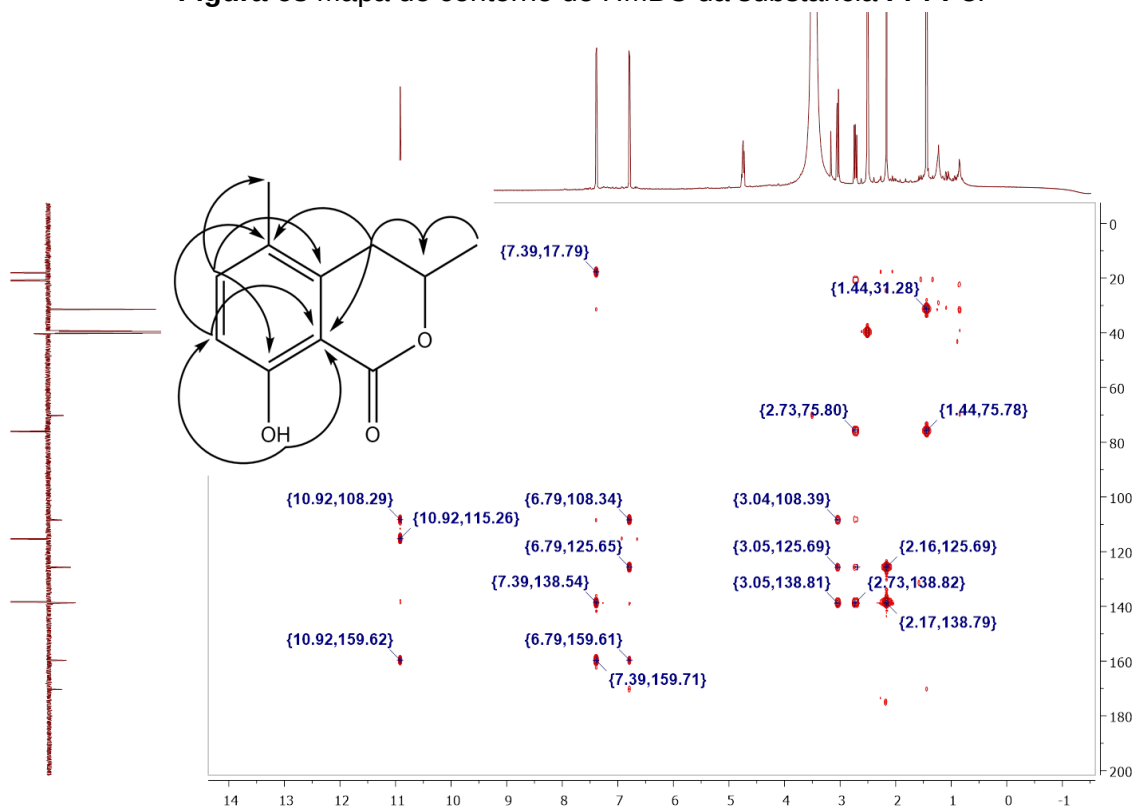
Figura 67 Mapa de contorno de COSY da substância **Fr4-P5**.



Fonte: Próprio autor.

O experimento HMBC (**Figura 68**) mostrou sinais referentes a acoplamentos $^2J_{C-H}$, $^3J_{C-H}$ e $^4J_{C-H}$ de hidrogênios aromáticos, alifáticos e da hidroxila para a substância **Fr4-P5**. Esses sinais permitiram identificar os sinais atribuídos aos carbonos quaternários e a carbonila.

Figura 68 Mapa de contorno de HMBC da substância **Fr4-P5**.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 10 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **Fr4-P5** (600 e 125 MHz, DMSO- d_6) e para 5-Metilmeleína.

Posição	Fr4-P5		5-Metilmeleína*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm), mult e J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm), mult e J (Hz)
1	170,0	-	170,2	-
3	76,0	4,75 (<i>dqd</i> ; 12,5; 6,3 e 3,3)	75,4	4,68 (<i>m</i>)
3-CH ₃	20,9	1,45 (<i>d</i> ; 6,3)	20,9	1,54 (<i>d</i> ; 6,1)
4	31,4	2,72 (<i>dd</i> ; 16,8 e 11,7) 3,04 (<i>dd</i> ; 16,8 e 3,3)	31,9	2,63 (<i>dd</i> ; 16,2 e 10,6) 3,00 (<i>dd</i> ; 16,2 e 4,7)
4a	138,7	-	137,8	-
5	125,7	-	124,9	-
5-CH ₃	18,0	2,17 (<i>s</i>)	18,0	2,18 (<i>s</i>)
6	138,3	7,39 (<i>d</i> ; 8,5)	137,0	7,28 (<i>d</i> ; 8,5)
7	115,3	6,79 (<i>d</i> ; 8,5)	115,6	6,78 (<i>d</i> ; 8,5)
8	159,7	-	160,5	-
8a	108,4	-	108,1	-
8-OH	-	10.92 (<i>s</i>)	-	10,98 (<i>s</i>)

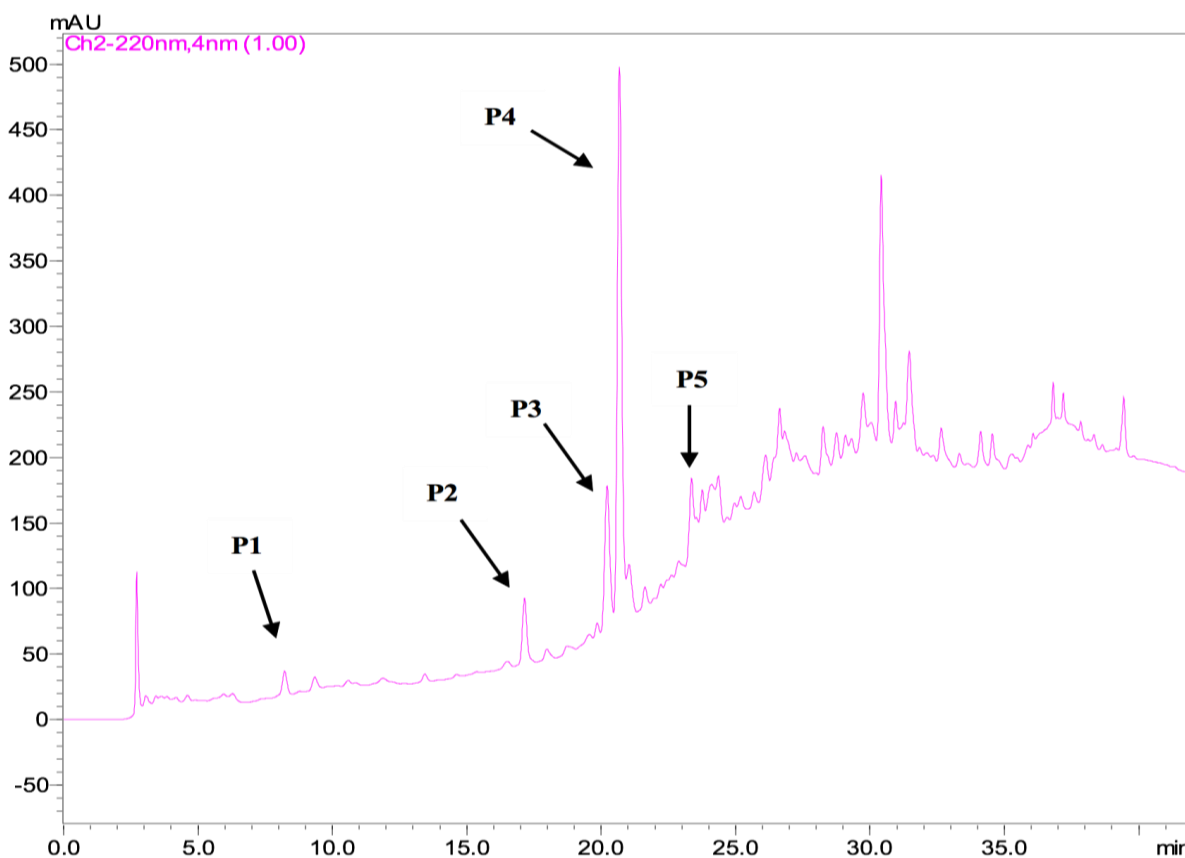
*60 e 15 MHz, CDCl₃ (Okuno et al., 1986)

Em um estudo recente, esse derivado de meleína foi obtido como produto majoritário de um extrato de *Xylaria nigripes* e apresentou inibição seletiva da monoamina oxidase A (MAO-A), sugerindo que esse fungo comestível possa ser usado em tratamentos antidepressivos. (HUANG et al., 2019)

4.7 Análise da Fração 5 e Fração 1

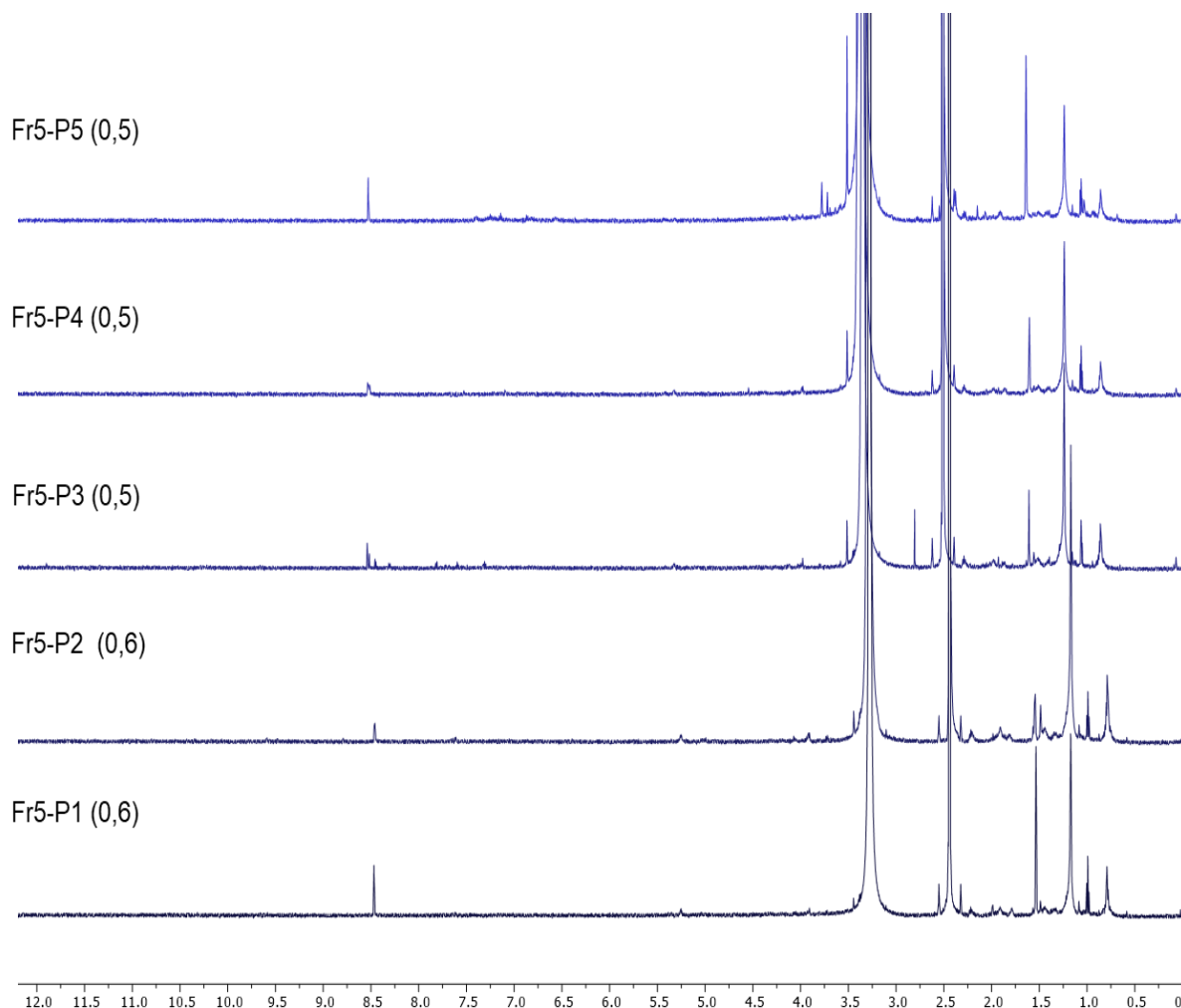
A fração 5 também foi submetida a separação em coluna semi-preparativa e, com base no cromatograma dessa fração (**Figura 69**), foram isoladas cinco substâncias que foram analisadas por RMN de ^1H (**Figura 70**). Os rendimentos das substâncias foram insuficientes para prosseguir o estudo, e os espectros de ressonância só apresentaram sinais de hidrogênios alifáticos, por isso não foram feitas outras análises com essas substâncias visando sua identificação.

Figura 69 Análise da fração 5 por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (50:50 a 10:90 v/v) em 30 min e detecção em λ 220 nm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 70 Espectros de RMN de ^1H de cinco substâncias isoladas da fração 5 e suas respectivas massas (mg).



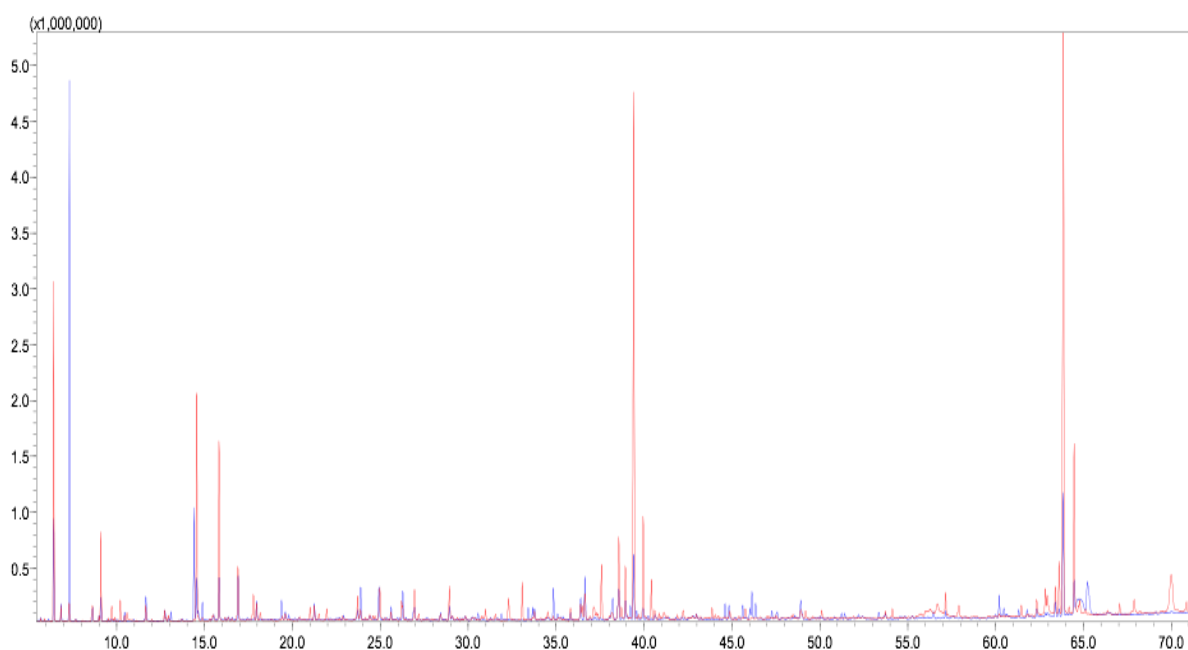
Fonte: Próprio autor.

A fração 1, que contém as substâncias mais polares, provavelmente possui uma alta concentração de ácido 3-nitropropanóico, que foi identificado no extrato pelos seus sinais característicos e com alta intensidade no espectro de RMN (**Figura 8**). As análises por CG-EM (**Figura 71**) indicaram a presença de açúcares provenientes do meio de cultivo, esses açúcares provavelmente também estão presentes em alta concentração na fração 1. Devido à complexidade de substâncias, não foram feitas outras análises com essa fração.

4.8 Análise do extrato de malte por CG-EM

O cromatograma do extrato foi sobreposto com o cromatograma do meio de cultivo (**Figura 71**) para garantir que as substâncias identificadas sejam oriundas do fungo e não do meio de cultivo. Na **Tabela 11** estão descritos os números CAS das substâncias e seus respectivos valores de tempo de retenção (TR), índice de retenção teórico e experimental (IR) e similaridade de fragmentação de massas, que substanciam as propostas de identificação.

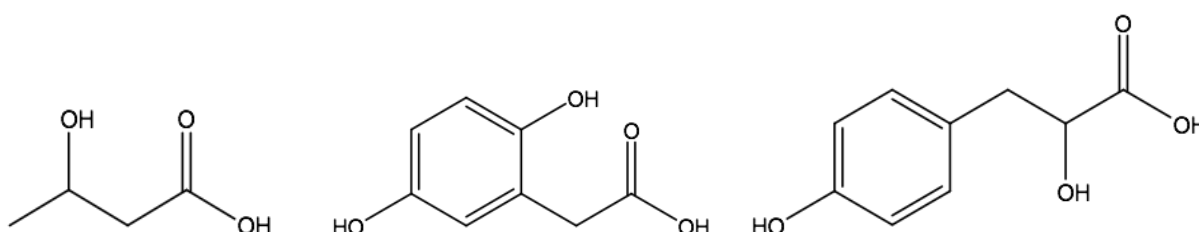
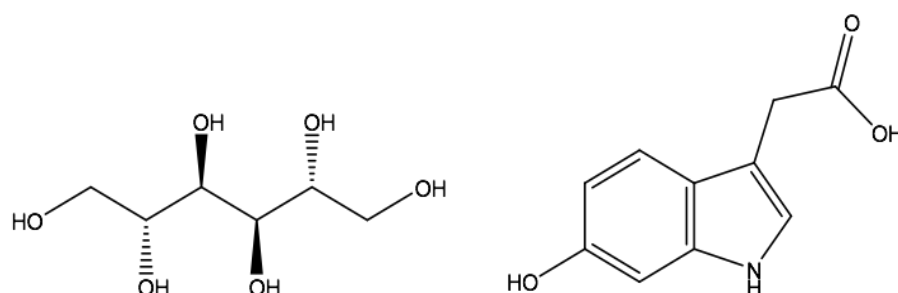
Figura 71 Cromatograma CG-EM do extrato de malte (vermelho) sobreposto com o cromatograma do meio de malte (azul). 80 – 280°C (3°C/min).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 11 Substâncias identificadas por CG-EM.

Código	Nome	#CAS	TR	IR teórico	IR exp.	Similaridade
CG-1	Ácido 3-hidroxi- butírico	55133 - 94 - 3	9,72	1163	1171	87%
CG-2	Ácido homogentísico	55334 - 62 - 8	36,48	1850	1853	90%
CG-3	Ácido 3-(4- hidroxifenil)lático	27750 - 67 - 0	38,71	1919	1920	87%
CG-4	D-Manitol	14317 - 07 - 8	40,41	1973	1971	92%
CG-5	Ácido 5-hidroxi- indolacético	55268 - 67 - 2	47,95	2199	2219	87%

**CG-1****CG-2****CG-3****CG-4****CG-5**

O ácido 3-(4-hidroxifenil)lático e o ácido homogentísico são derivados do aminoácido tirosina. No trabalho realizado por Beloborodova et al. (2012), O ácido 3-(4-hidroxifenil)lático apresentou diminuição na produção de espécies reativas de

oxigênio (ERO), tanto em mitocôndrias quanto em neutrófilos, sugerindo que esse ácido poderia funcionar como um antioxidante natural. Em um estudo recente, realizado por Promgool et al. (2019), derivados do ácido homogentísico apresentaram atividade antimalárica, citotóxica e antibacteriana. O ácido 3-hidroxibutírico está envolvido no metabolismo de compostos cetônicos e o ácido 5-hidroxi-indolacético é o principal metabólito da serotonina.

4.9 Ensaios biológicos

4.9.1 Análise de citotoxicidade

Considerando a menor concentração, o extrato obtido com a fermentação em meio de malte apresentou um grau de inibição de células tumorais maior do que os extratos em MBD, ainda assim, a inibição foi muito baixa frente ambas linhagens tumorais.

Tabela 12 Grau de inibição (GI) dos extratos brutos contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama).

Amostra	GI (%) 5 µg/mL			GI (%) 50 µg/mL		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
AT-01 Malte	20,42	14,04	2	2,17	3,64	2
AT-01 MBD/Vr	-5,75	10,23	2	5,04	5,03	2
AT-01 MBD/Am	-0,06	3,92	2	11,29	6,19	2

Tabela 13 Grau de inibição (GI) dos extratos brutos contra células HCT-116 (carcinoma cólon-retal).

Amostra	GI (%) 5 µg/mL			GI (%) 50 µg/mL		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
AT-01 Malte	10,06	3,17	2	12,72	5,82	2
AT-01 MBD/Vr	-2,08	3,68	2	23,37	7,32	2
AT-01 MBD/Am	9,64	2,16	2	28,41	6,44	2

4.9.2 Análise de atividade anticolinesterásica

As amostras testadas mostraram inibição fraca a moderada das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, envolvidas nos sintomas da Doença de Alzheimer. O melhor resultado foi obtido para a fração 4, que apresentou uma atividade moderada e seletividade para AChE_{ee} com grau de inibição de 48,3 % para essa enzima. Estes resultados sugerem a necessidade de estudos adicionais, visando a avaliação da atividade das substâncias purificadas, eventualmente com maior potência de inibição. Neste momento as substâncias purificadas não puderam ser avaliadas devido às massas insuficientes.

Tabela 14 Resultados dos ensaios de triagem pontual das frações do extrato de *Hypoxylon investiens* para as enzimas AChE_{ee} e BChE_{hu}.

Amostras	% Inibição ± EPM ICER-AChE _{ee}	% Inibição ± EPM ICER-BChE _{hu}
Galantamina	95,4 ± 2	85,7 ± 3
AT-01 Fr1	20,79 ± 0,4	6,19 ± 2
AT-01 Fr2	24,34 ± 0,6	17,66 ± 3
AT-01 Fr3	31,00 ± 1	5,15 ± 1
AT-01 Fr4	48,35 ± 2	7,26 ± 0,05
AT-01 Fr5	23,88 ± 1	31,56 ± 2

4.9.3 Análise de atividade leishmanicida

As frações analisadas não mostraram inibição de crescimento dos promastigotas de *Leishmania infantum*, sugerindo que as substâncias contidas nessas frações não apresentam potencial leishmanicida ou que a mistura delas não é ativa. Isso reforça a necessidade da avaliação de atividade com substâncias purificadas.

Tabela 15 Porcentagens de inibição de *Leishmania infantum* para cada fração

Amostras	% Inibição
Miltefosina	99
AT-01 Fr2	0
AT-01 Fr3	0
AT-01 Fr4	0
AT-01 Fr5	0

5 CONCLUSÃO

Os extratos do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha vermelha *Asparagopsis taxiformis*, investigados neste trabalho foram submetidos a análises químicas e de atividade biológica no contexto de estudos de bioprospecção. As metodologias utilizadas para cultivo da linhagem fúngica foram otimizadas e resultaram na seleção do meio de malte para produção do extrato em escala ampliada. Com o uso da técnica cromatográfica CLAE-DAD, foi possível isolar três dicetopiperazinas: ciclo(Pro-Tir), ciclo(Pro-Phe) e ciclo(Pro-Leu), duas tetralonas: nodulisporona e isosclerona, e três isocumarinas: 5-hidroximetil-meleína, 4-hidroxi-5-metilmeleína e 5-metilmeleína. Essas substâncias foram identificadas utilizando RMN uni e bidimensional, espectrometria de massas e espectroscopia UV-Vis. Também foram identificados quatro ácidos orgânicos de baixo peso molecular: ácidos 3-(4-hidroxifenil)lático, 5-hidroxi-indolacético, 3-hidroxibutírico e homogentísico, e ainda, o monossacarídeo D-manitol por CG-EM..

Os extratos brutos e frações semipurificadas foram analisados em ensaios para avaliação de atividade anticolinesterásica e citotóxica e apresentaram atividade fraca a moderada. No estudo anticolinesterásico, a fração At01Fr4 apresentou seletividade e moderada atividade inibitória de acetilcolinesterase de enguia elétrica (AChE_{ee}) com grau de inibição de 48,4%. No estudo de citotoxicidade com as linhagens MCF-7 e HCT-116, os extratos apresentaram atividades fracas. Diversas bioatividades foram relatadas na literatura para as substâncias isoladas, sugerindo que a fermentação desse fungo, em outras condições de cultivo, pode levar a uma maior produção de metabólitos bioativos além de possíveis substâncias inéditas.

Considerando que o fungo *H. investiens* foi ainda pouco estudado, com raros relatos na literatura, este trabalho também contribui para aumentar o conhecimento referente à quimiodiversidade de micro-organismos associados a organismos marinhos, uma área dos estudos com produtos naturais ainda pouco explorada no Brasil. De forma global, nossos dados sugerem a necessidade de estudos adicionais, visando a exploração racional dos produtos naturais do ambiente marinho e de seu potencial biológico, contribuindo ainda para aprofundar o conhecimento deste importante bioma no contexto de práticas de sustentabilidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELOBORODOVA, N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, p. 1–9, 2012.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, jun 1951.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.

CAFÊU, M. C. Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). 255 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CHANG, H. et al. Inhibitory Effects of Constituents of an Endophytic Fungus *Hypoxylon investiens* on Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in RAW264.7 Macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 949–961, 2014.

CHOI, J. Y. et al. Podophyllotoxin acetate triggers anticancer effects against non-small cell lung cancer cells by promoting cell death via cell cycle arrest, ER stress and autophagy. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 4, p. 1257–1265, 2015

CIMMINO, A. et al. Application of Mosher's method for absolute configuration assignment to bioactive plants and fungi metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.144, p. 59-89, fev. 2017.

COUCHÉ, E.; FKYERAT, A.; TABACCHI, R. Asymmetric Synthesis of the *cis*- and *trans*-3,4-Dihydro-2,4,8- trihydroxynaphthalen-1(2*H*)-ones. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, p. 210–221, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DAFERNER, M. et al. Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, n. 7/8, p. 474-480, 1999.

EL-BAROTY, G. S. et al. Contribution to the aroma, biological activities, minerals, protein, pigments and lipid contents of the red alga: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 12, p. 1825-1834, 2007.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 1–49, 2001.

FUKAI, M. et al. Antiangiogenic activity of hypoxylonol C. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 1065–1068, abr. 2014.

FUKAI, M. et al. Hypoxylonols C–F, Benzo[*j*]fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 22–25, jan. 2012.

GENOVESE, G. et al. The Mediterranean Red Alga *Asparagopsis*: A Source of Compounds against *Leishmania*. **Marine Drugs**, v. 7, p. 361–366, 2009.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, jan. 2012.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, v. 48, p. 1057–1063, 2012.

GUO, X. et al. Synergistic algicidal effect and mechanism of two diketopiperazines produced by *Chryseobacterium* sp. strain GLY-1106 on the harmful bloom-forming *Microcystis aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–12, jun. 2015.

HANDE, K. R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 3–15, 2006.

HUANG, C. et al. Discovery, synthesis, biological evaluation and molecular docking study of (R)-5-methylmellein and its analogs as selective monoamine oxidase A inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 2027–2040, 2019.

IMBERT, T. F. Discovery of podophyllotoxins. **Biochimie**, v. 80, n. 3, p. 207–222, 1998

INTARAUDOM, C. et al. Terphenyl derivatives and drimane-Phthalide/isoindolinones from *Hypoxylon fendleri* BCC32408. **Phytochemistry**, v. 139, p. 8–17, 2017.

JIA, M. et al. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, jun. 2016.

KAMISUKI, S. et al. Nodulisporol and Nodulisporone, novel specific inhibitors of human DNA polymerase λ from a fungus, *Nodulisporium* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3109–3114, 2007

KARANAM, G. et al. Anticancer Effect of Marine Sponge-Associated *Bacillus pumilus* AMK1 Derived Dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr) in Human Liver Cancer Cell Line Through Apoptosis and G2/M Phase Arrest. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1–13, abr. 2019.

KLIMOVA, E. M.; PEÑA, K. R.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, jun. 2017.

KUHNERT, E. et al. Rickenyls A–E, antioxidativeterphenyls from the fungus *Hypoxylon rickii* (Xylariaceae, Ascomycota). **Phytochemistry**, v. 118, p. 68–73, 2015.

KUMAR, N. et al. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 355–364, fev. 2013.

KUMAR, S. N.; MOHANDAS, C; NAMBISAN, B. Purification of an antifungal compound, cyclo(L-Pro-D-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with entomopathogenic nematode. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 278–288, 2013.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Perspective Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012.

LEAL, M. C.; CALADO, R. Marine natural products: Biodiscovery, biodiversity, and bioproduction. **Bioactive Natural Products: Chemistry and Biology**, p. 473–490, 2015.

LI, Y. et al. Anti-proliferative effects of isosclerone isolated from marine fungus *Aspergillus fumigatus* in MCF-7 human breast cancer cells. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2292–2298, 2014.

MANILAL, A.; SELVIN, J.; GEORGE, S. *In vivo* therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 2, p. 165–175, 2012.

MEDINA, R. P. Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos. 430 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MENEZES, M.; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N. Update of the Brazilian floristic list of algae and cyanobacteria. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1047–1062, 2015.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OKUNO, T. et al. Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 997-1001, 1986.

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

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHADE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, n. 6, p. 789–799, 2004.

PROMGOOL, T. et al. Bioactive homogentisic acid derivatives from fruits and flowers of *Miliusa velutina*. **Fitoterapia**, v. 134, n. p. 65–72, fev. 2019.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. An [11]Cytochalasin Derivative from the Marine-Derived Fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 12, p. 1409–1411, 2009.

SHANG, J. et al. A cheminformatic insight into the differences between terrestrial and marine originated natural products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, p. 1182–1193, 2018.

SILVA, A. D. Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral. 2016. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SUGIYAMA, Y. Indole derivatives from a marine sponge-derived yeast as DPPH radical scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2069-2071, nov. 2009.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Canangaodorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146–153, 2017.

ÜHLBAUER, A. et al. Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. **Mycological Progress**, v. 1, n. 3, p. 235–248, 2002.

WANG, G. et al. Two diketopiperazine cyclo(PRO-PHE) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 583–585, 2010.

ZHANG, S. et al. Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora* sp. from *Aconitum carmichaeli*. **Fitoterapia**, v. 112, p. 85–89, 2016.

ZHAO, S. et al. Dihydroisocoumarins from *Radix Glycyrrhizae*. **Chemistry Central Journal**, v. 99, p. 10–15, 2018.