

MARCELO RODRIGUES DE AMORIM

Prospecção química dos metabolitos produzidos pelos fungos endofíticos associados aos capítulos de *Paepalanthus planifolius* e estudo fitoquímico dos capítulos de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae)

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

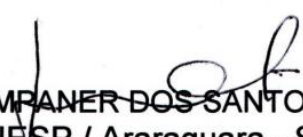
Araraquara
2015

MARCELO RODRIGUES DE AMORIM

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

Araraquara, 7 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP.



Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP.



Prof. Dr. MARCELO APARECIDO DA SILVA
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL / Alfenas - MG.

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais:

Nome: Marcelo Rodrigues de Amorim

Telefone: (16) 98166-4855

E-mail: marceloamorim.unesp@gmail.com

Formação Acadêmica:

Graduação: Bacharelado em Química Tecnológica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,

Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara

Local: Araraquara - SP

Período: 2009-2013

Trabalho orientado na Iniciação Científica: Estudo químico de *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Pós Graduação: Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,

Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara

Local: Araraquara - SP

Período: 2013-2015

Título da Dissertação: Prospecção química dos metabolitos produzidos pelos fungos endofíticos associados aos capítulos de *Paepalanthus planifolius* e estudo fitoquímico de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

Publicações:

1) AMORIM, M. R.; RINALDO, D.; AMARAL, F. P.; VILEGAS, W.; MAGENTA, M. A. G.; VIEIRA Jr., G. M.; SANTOS, L. C. HPLC-DAD based method for the quantification of flavonoids in the hydroethanolic extract of *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae) and their radical scavenging activity. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p.1122-1127, 2014.

Trabalhos apresentados em congressos:

1) BOTERO, W. B.; **AMORIM, M. R.**; SANO, P. T.; SANTOS, L. C. Estudo químico dos escapos de *Paepalanthus geniculatus* Kunth. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2014. Araraquara - SP.

2) **AMORIM, M. R.**; AMARAL, F. P.; SANTOS, L. C. Isolamento e identificação de naftopiranonas e flavonas de *Tonina fluviatilis* AUBL. (Eriocaulaceae). In: 24º Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2012. Araraquara – SP.

3) **AMORIM, M. R.**; VIEIRA Jr.; G. M.; AMARAL, F. P.; ROCHA, C. Q., MAGENTA, M. A. G., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Identificação de flavonóis glicosilados de *Tonina fluviatilis* (Eriocaulaceae). In: 23º Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2011. Araraquara – SP.

4) **AMORIM, M. R.**; VIEIRA Jr., G. M.; AMARAL, F. P.; ROCHA, C. Q., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Flavonol dimetoxilado e atividade antiradicalar de *Tonina fluviatilis* (Eriocaulaceae). In: 34ª Reunião Anual da Semana Brasileira da Química. 2011. Florianópolis – SC.

5) VIEIRA Jr., G. M.; **AMORIM, M. R.**; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Atividade antiradicalar de extratos de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). In: 34ª Reunião Anual da Semana Brasileira da Química. 2011. Florianópolis – SC.

6) **AMORIM, M. R.**; AMARAL, F. P.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Estudo químico de *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae). In: 40ª Semana da Química. 2010. Araraquara – SP.

“Dedico este trabalho ao meu pai Delcio, à
minha mãe Vera e à minha irmã Thais, aos
familiares e aos amigos que sempre
estiveram ao meu lado.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer à Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, por ter me aceitado em seu laboratório desde o início de minha iniciação científica. Pela confiança em mim depositada, pelos valiosos conselhos e ensinamentos que me passou durante todo esse período, pela liberdade que sempre me deu para fazer minhas escolhas e a amizade que construímos durante esses quatro anos.

À Profa. Dra. Angela Regina Araujo e à aluna de doutorado Andressa Somensi, por toda a contribuição no desenvolvimento deste projeto, dentro e fora do laboratório.

Aos professores Dr. Daniel Rinaldo e Dra. Lucia Maria Xavier Lopes pela contribuição na avaliação do meu trabalho durante o exame geral de qualificação.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presentes na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Ao Dr. Nivaldo Boralle por toda a ajuda com os experimentos de RMN, compartilhando aprendizado e bons momentos de descontração.

Aos meus colegas do laboratório e do Departamento de Química Orgânica: Felipe Hilário, Ana Zanatta, Felipe Gregório, Carlos Sérgio, Weslei Botero, Daylin, Alexander, Daryne Lu, Carlos Wyrepkowski, Francisco Mininel, Luciano Silva, Doni, Andressa Somensi, Gabriel Mazzi, Fernando Passareli, Gigi, Patrick, Julia Dietsche, Jhuzinha e Carolzinha.

E em especial a toda a minha família. Aos meus pais Delcio e Vera, à minha irmã Thais, aos tios e primos, cuja influência me fizeram a pessoa que eu sou e o carinho e dedicação me ajudaram a conquistar mais esse objetivo.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Eriocaulaceae se destacam como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço - MG, não só pela grande riqueza de espécies, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica. Dos capítulos de *Paepalanthus planifolius*, um dos gêneros mais representativos da família já foram isoladas do extrato etanólico e diclorometano as naftopiranonas, substâncias com comprovadas atividades biológicas como antirradicalar, antiúlcera e mutagênica. Apesar, dos estudos realizados até o momento com espécies de Eriocaulaceae, é importante destacar que ainda existe uma grande variedade de substâncias ainda não isoladas e identificadas e que ainda não foram avaliadas para várias atividades biológicas. Portanto, neste trabalho descrevemos o isolamento, purificação, identificação de substâncias e preservação dos endófitos associados à espécie de *P. planifolius*. A triagem química foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos HPLC-DAD, cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e ensaio antirradicalar realizada com os extratos particionados com acetato de etila (AcOEt) dos endófitos isolados dos capítulos de *P. planifolius* em escala reduzida. Os perfis químicos desta triagem preliminar nos permitiu selecionar o extrato produzido pelo fungo endofítico identificado como *Anthostomella brabeji* para o estudo em escala ampliada em meio de cultivo PDB. A estratégia de fracionamento por HPLC-DAD em escala semipreparativa do extrato AcOEt do endófito *A. brabeji* permitiu isolar e identificar quatro metabólitos secundários [(6-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-7,8-epoxicroman-4-ona (**Ab1**), Sicaina (**Ab2**), Eutipinol (**Ab3**) e 6,7,8-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-croman-4-ona (**Ab4**)] que foram identificados por técnicas de RMN mono e bi-dimensionais e espectrometria de massas, sendo que a substância **Ab4** está sendo descrita pela primeira vez na literatura. Ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados e indicaram resultados promissores, para o extrato de *A. brabeji* para *Candida albicans* (CIM = 250 µg/mL), todas as amostras podem ser classificadas como inibidores potentes, especialmente **Ab2** para *C. albicans* (CIM = 62,5 µg/mL) e **Ab3** para *Staphylococcus aureus* e para *Salmonella setubal* (CIM = 31,25 µg/mL).

Paralelamente, o fracionamento do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* (**Ext. Pp**) permitiu até o momento a identificação de duas naftopiranonas: vioxantina (**Pp1**) e planifolina B (**Pp3**), esta última um novo dímero de naftopiranona. Ensaios antimicrobianos do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* apresentou um alto potencial de inibição para a bactéria *S. aureus*, CIM = 7,8 µg/mL. Essa alta atividade antibacteriana pode ser explicada pela presença da substância vioxantina (**Pp1**) que, isolada, também apresentou o mesmo valor de concentração inibitória mínima para *S. aureus*, sugerindo-a como responsável por essa inibição no extrato.

Palavras-chave: *Anthostomella brabeji*, fenólicos acetilênicos, cromanona, *Paepalanthus planifolius*, naftopiranonas.

ABSTRACT

Eriocaulaceae stand out as one of the most representative families of the rocky fields of the Espinhaço - MG, not only for the great richness of species, but also the high number of endemic taxa of this geological formation. The capitula of *Paepalanthus planifolius*, one of the most representative genera of the family, have been isolated from the ethanol extract and dichloromethane the naphytopyranonones, substances with proven biological activity as antiradical, anti-ulcer and mutagenic. Despite the studies performed to date with Eriocaulaceae species, it is important to note that there is still a wide variety of substances were not yet isolated and identified and that have not been evaluated for various biological activities. So in this paper we describe the isolation, purification, identification of substances and preservation of endophytes associated with the *P. planifolius* specie. The chemical screening was performed by high-performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector HPLC-DAD, comparative thin layer chromatography (TLC) and antiradical assay conducted with extracts partitioned with ethyl acetate (EtOAc) of the capitula of the isolated endophytic *P. planifolius*, on a reduced scaled. The chemical profile of this preliminary screening allowed us to select the extract produced by the endophytic fungus identified as *Anthostomella brabeji* for the study on a large scale in the PDB culture media. The fractionation strategy by HPLC-DAD in semi-preparative scale EtOAc extract endophyte *A. brabeji* allowed to isolate and identify four secondary metabolites [(6-hydroxy-2,2-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-7,8-epoxychroman-4-one (**Ab1**), Siccayne (**Ab2**), Eutypinol (**Ab3**) e 6,7,8-hydroxy-2,2-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-chroman-4-one (**Ab4**)] which were identified by NMR techniques mono- and bi-dimensional and mass spectrometry, and the **Ab4** substance is being described at the first time in the literature. Antifungal and antibacterial activity assays were performed and showed promising results for *A. brabeji* extract for *Candida albicans* (MIC = 250 µg/mL), all samples can be classified as strong inhibitors, especially **Ab2** for *C. albicans* (MIC = 62.5 µg/mL) and **Ab3** for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella setubal* (MIC = 31.25 µg/mL).

At the same time, the fractionation of the EtOAc extract of *P. planifolius* capitula (**Ext. Pp**) allowed to date the identification of two naphytopyranonones: vioxanthin (**Pp1**) and planifolin B (**Pp3**), the latter a new dimer naphytopyranonones. Antimicrobial testing the EtOAc extract of *P. planifolius* capitula presented a high potential inhibition for *S. aureus*, MIC = 7,8 µg/mL. This high antibacterial activity can be explained by the presence of vioxanthin substance (**Pp1**) which, individually, also had the same value of minimum inhibitory concentration for *S. aureus*, suggesting it as responsible for this inhibition in the extract.

Keywords: *Anthostomella brabeji*, phenolic acetylenic, chromanone, *Paepalanthus planifolius*, naphytopyranonones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade estrutural dos metabólitos secundários identificados de fungos endofíticos.	19
Figura 2. Ilustração morfológica dos escapos, folhas e capítulos em Eriocaulaceae. A: <i>Comanthera dímera</i> . B: Capítulo.	20
Figura 3. Capítulos de <i>Paepalanthus planifolius</i> .	21
Figura 4. Naftopiranonas isoladas do gênero <i>Paepalanthus</i> .	22
Figura 5. <i>A. brabeji</i> (A) Parte superior e, (B) Parte inferior do endófito.	23
Figura 6. Substância isolada do fungo <i>Anthostomella eucalyptorum</i> .	24
Figura 7. CCDC dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos isolados dos capítulos.	40
Figura 8. Ensaio antirradicalar dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos.	40
Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-01 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.	41
Figura 10. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-02 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.	42
Figura 11. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-04 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos	42
Figura 12. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-05 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.	43
Figura 13. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-06 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.	43
Figura 14. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-07 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.	44

Figura 15. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-08 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.	44
Figura 16. Fluxograma do crescimento em escala ampliada do endófito <i>A. brabeji</i> e obtenção dos constituintes.	46
Figura 17. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de <i>A. brabeji</i> (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 15 µL	47
Figura 18. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos Ab1 , Ab2 , Ab3 e Ab4 do extrato AcOEt de <i>A. brabeji</i> .	47
Figura 19. Cromatograma HPLC-DAD semipreparativo do extrato AcOEt de <i>A. brabeji</i> (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 20,0 mm d.i., 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 13,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 400 µL	48
Figura 20. Cromatograma HPLC-DAD analítico da Fr.Ab1 (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 10 µL.	49
Figura 21. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos Ab1 , Ab4 e Ab5 da fração Fr.Ab1 .	49
Figura 22. Cromatograma HPLC-DAD analítico da fração Fr.Ab1 (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 20 mm d.i.; 5 µm), $\lambda = 280$ nm, vazão 13,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 400 µL.	50
Figura 23. Cromatograma HPLC-DAD analítico das substâncias Ab2 e Ab3 (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 5 µL.	51
Figura 24. Substâncias Ab2 e Ab3 e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$), respectivamente.	52
Figura 25. Cromatograma HPLC-DAD analítico das substâncias Ab1 , Ab4 e Ab5 (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 10 µL.	54

Figura 26. Espectro de massas de primeira-ordem de Ab4 obtido em modo positivo.	56
Figura 27. Espectro de massas de segunda-ordem, em modo positivo, do íon precursor de m/z 229,1070.	57
Figura 28. Proposta de padrão de fragmentação para Ab4 .	57
Figura 29. Substâncias Ab1 e Ab4 , e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).	58
Figura 30. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de <i>P. planifolius</i> (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 μ L	63
Figura 31. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de <i>P. planifolius</i> (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 67-85% B (60 min), volume de injeção de 10 μ L	64
Figura 32. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos Pp1 , Pp2 , Pp3 e Pp4 do extrato AcOEt <i>P. planifolius</i> .	64
Figura 33. Fluxograma representativo do fracionamento do extrato AcOEt dos capítulos de <i>P. planifolius</i> .	66
Figura 34. Cromatograma HPLC-DAD analítico das substâncias Pp1 e Pp4 (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 67-85% B (60 min), volume de injeção de 10 μ L.	67
Figura 35. Substância Pp1 e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).	68
Figura 36. Cromatograma HPLC-DAD analítico da substância Pp3 (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 67-85% B (60 min), volume de injeção de 10 μ L.	69
Figura 37. Substância Pp3 e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).	70
Figura 38. Espectro de massas de alta resolução de Pp3 em modo negativo de ionização: <i>full-scan</i> (A) e MS/MS (B).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de esterilização das partes áreas de <i>P. planifolius</i> .	29
Tabela 2. Fungos endofíticos isolados dos capítulos <i>P. planifolius</i> .	37
Tabela 3. Fungos endofíticos isolados dos escapos e das folhas de <i>P. planifolius</i> .	38
Tabela 4. Massa obtida dos extratos AcOEt produzidos pelos fungos endofíticos.	39
Tabela 5. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de Ab2 , incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	53
Tabela 6. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de Ab3 , incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	53
Tabela 7. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de Ab1 , incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	59
Tabela 8. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de Ab4 , incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	60
Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima do extrato do fungo endofítico <i>A. brabeji</i> (Ext. Ab) e das substâncias isoladas Ab1 , Ab2 , Ab3 e Ab4 .	61
Tabela 10. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de Pp1 , incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	68
Tabela 11. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de Pp3 , incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC, em $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.	71
Tabela 12. Dados de Pp3 obtidos nos mapas de contornos HMBC, em $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$.	71
Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima do extrato AcOEt dos capítulos de <i>P. planifolius</i> (Ext. Pp) e da vioxantina (Pp1).	73
Tabela 14. Concentrações Bactericida ou Fungicida Mínima do extrato AcOEt dos capítulos de <i>P. planifolius</i> (Ext. Pp) e da vioxantina (Pp1).	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CMH	Caldo Müller-Hinton
COSY	Gradient correlate spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
EtOH	Etanol
HMBC	Gradient heteronuclear multiple bond correlations
HSQC	Gradient heteronuclear through singlet quantum coherence
HOMODEC	Homonuclear decoupling
HPLC-DAD	High performance liquid chromatography-diode array detector
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHA	Agar Müller-Hinton
MOPS	Ácido 3-[n-morfino] propanossulfônico
MPLC	Medium performance liquid chromatography
NOESY 1D	Nuclear overhauser effect spectroscopy
<i>R_f</i>	Fator de retenção
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
PTFE	Polytetrafluoroethylene

RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RP18	Reverse phase 18
s	Simpleto
SDA	Agar sabouraud dextrose
SDC	Caldo sabouraud dextrose
SPE	Solid phase extraction
TFA	Ácido trifluoracético
TOCSY 1D	Total correlation spectroscopy
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
t_r	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Fungos endofíticos.....	18
1.2. Espécie vegetal: <i>Paepalanthus planifolius</i> (Eriocaulaceae).....	20
1.3. Fungo endofítico <i>Anthostomella brabeji</i>	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Equipamentos, materiais, reagentes e solventes.....	26
3.2. Material vegetal.....	28
3.3. Isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos....	28
3.4. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em PDB.....	29
3.5. Ensaio antirradicalar qualitativo dos extratos brutos.....	30
3.6. Identificação do fungo endofítico <i>Anthostomella brabeji</i>	30
3.7. Fracionamento do extrato AcOEt de <i>A. brabeji</i> por HPLC-DAD semipreparativo.....	30
3.8. Obtenção do extrato AcOEt dos capítulos de <i>P. planifolius</i>	30
3.9. Fracionamento em Sephadex® LH-20 do extrato AcOEt dos capítulos de <i>P. planifolius</i>	31
3.10. Fracionamento em MPLC do extrato AcOEt dos capítulos de <i>P. planifolius</i>	31
3.11. Fracionamento das frações AcOEt de <i>P. planifolius</i> por HPLC- DAD semipreparativo.....	32
3.12. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.....	32
CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS METABOLITOS PRODUZIDOS PELOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AOS CAPÍTULOS DE <i>Paepalanthus planifolius</i>.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Fungos endofíticos isolados dos capítulos, escapos e folhas.....	37
4.2. Triagem química e biológica dos extratos brutos AcOEt.....	39
4.3. Identificação do fungo endofítico <i>Anthostomella brabeji</i>	45
4.4. Cultivo de <i>A. brabeji</i> em escala ampliada e separação dos constituintes do extrato AcOEt por HPLC-DAD semipreparativo.....	45

4.5. Identificação estrutural das substâncias.....	50
4.5.1. Substâncias Ab2 e Ab3	50
4.5.2. Substâncias Ab1 e Ab4	51
4.6. Atividade antibacteriana e antifúngica.....	60
CAPÍTULO 2: ESTUDO FITOQUÍMICO DOS CAPÍTULOS DE <i>P.</i>	
<i>planifolius</i>	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. Identificação das classes de substâncias presentes.....	63
5.2. Fracionamento do extrato AcOEt de <i>P. planifolius</i> em Sephadex	
LH-20 e por MPLC.....	65
5.3. Identificação estrutural das substâncias.....	66
5.3.1 Substância Pp1	66
5.3.2 Substância Pp3	68
5.4. Atividade antibacteriana e antifúngica.....	72
6. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos endofíticos

Entre as várias fontes de moléculas naturais, os fungos são considerados uma fonte rica de diversos metabólitos bioativos aplicados de diversas formas como: agrotóxicos, antibióticos, antiparasitários, imunossupressores e agentes anticancerígenos. Os fungos podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos, ocupando desde regiões árticas, antárticas e alpinas, desertos, sedimentos de rochas profundas, ambientes marinhos, e até mesmo fontes hidrotermais (MANLY; PADMANABHA; LOWE, 2002; GUNATILAKA, 2006).

Entre as espécies fúngicas, 6400 compostos foram obtidos a partir de vários fungos filamentosos. Entre eles, 950, 900 e 350 são compostos isolados a partir de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, respectivamente (BERDY, 2005; IZUMIKAWA et al, 2014).

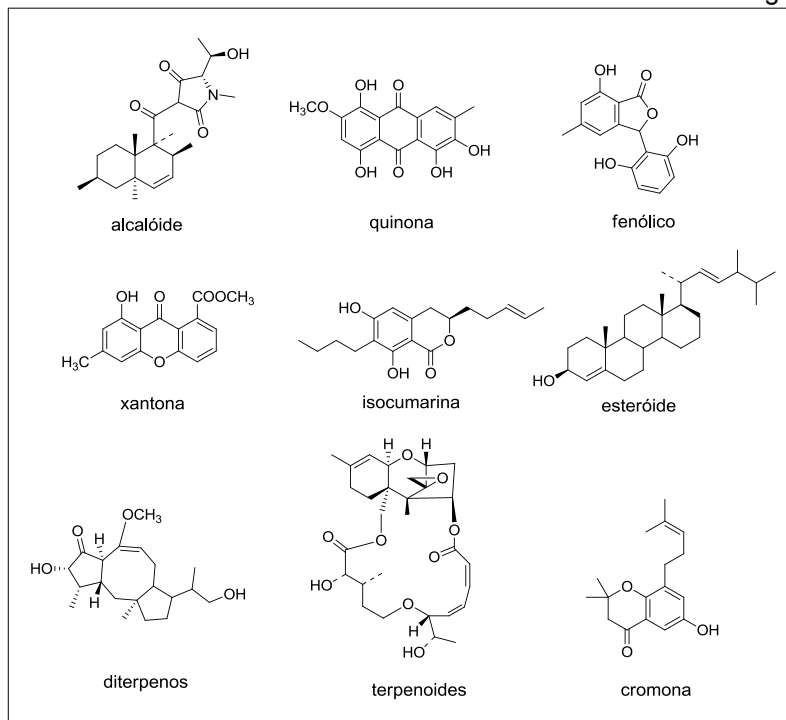
Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de fungos ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática dentro dos tecidos das plantas, ocorrem em todas as grandes linhagens de plantas terrestres, nas comunidades naturais e antrópicas que vão desde o ártico aos trópicos (ARNOLD, 2007). Os endófitos colonizam os tecidos internos de plantas, os espaços intercelulares assim como as células do xilema e floema, mas não exercem efeitos patogênicos aparentes ao seu hospedeiro. (HALLMAN et al., 1997; REKHA et al., 2013).

Interações entre plantas e fungos desempenham um papel crucial nos ecossistemas terrestres (EATON; COX; SCOTT, 2011). As interações de um fungo com o seu hospedeiro vegetal podem variar e, dependem do modo como o fungo infecta seu hospedeiro e pela extensão da resposta de defesa da planta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter e intracelular. Os endófitos que colonizam seus hospedeiros assintomaticamente são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes (MACÍAS-RUBALCAVA et al., 2010; AZEVEDO et al., 2000).

Os fungos endofíticos têm se revelado pela alta capacidade na produção de metabólitos bioativos, que podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, lignanas, ácidos fenólicos, citocalasinas, dicetopiperazinas, entre outros (ZHANG; SONG; TAN, 2006) como demonstrado na figura 1, se tornando alvo nas pesquisas pela busca de substâncias

com potencial para a utilização na indústria farmacêutica e agrícola (KHARWAR et al., 2011).

Figura 1. Diversidade estrutural dos metabólitos secundários identificados de fungos endofíticos.



Fonte: ZHANG et al., 2006; KHARWAR et al., 2011.

As Eriocaulaceae são espécies utilizadas em nosso País, principalmente nas regiões de Tocantins e Minas Gerais como ornamentais. Muitas são exportadas para Países da Europa e Japão contribuindo assim como fonte de renda para a maioria das pessoas destas regiões. Outro fato relevante é que muitas destas espécies já fazem parte da lista de plantas em extinção, dados relevantes e preocupantes porque apesar de muitas das Eriocaulaceae já terem sido estudadas, ainda existe um número muito grande de espécies sem estudos químicos.

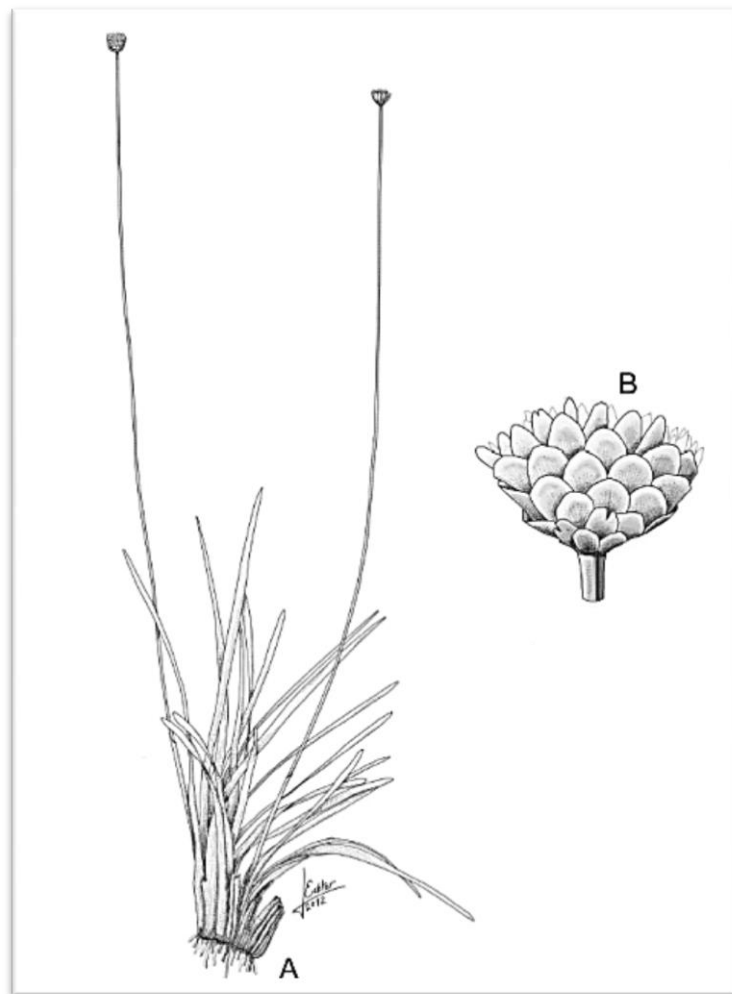
Portanto, é de importância significativa o estudo de associação fungo endofítico às Eriocaulaceae, uma vez que não existe nenhum dado na literatura sobre o estudo associação Eriocaulaceae-fungos. Dessa forma, neste trabalho, estabelecemos o início dos estudos com a espécie *Paepalanthus planifolius*.

1.2. Espécie vegetal: *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae)

A família Eriocaulaceae é composta por 1200 espécies e está dividida em 10 gêneros, sendo uma das famílias mais citadas nas listas vermelhas de espécies em extinção. Esta família é dividida em duas subfamílias, *Eriocauloidae* Ruhland e *Paepalanthoideae* Ruhland, sendo que a subfamília *Eriocauloidae* possui os gêneros *Eriocaulon* e *Mesanthemum*, enquanto que a subfamília *Paepalanthoideae* apresenta os gêneros *Blastocaulon*, *Comanthera*, *Actinocephalus*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Paepalanthus*, *Philodice*, *Rondonanthus*, *Syngonanthus* e *Tonina* (RUHLAND, 1903; ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al. 2012).

De acordo com a classificação morfológica desta família, as Eriocaulaceae apresentam folhas em forma de roseta, de onde partem os escapos que sustentam as inflorescências do tipo capítulos (Figura 2) (MONTEIRO; MAZZONI, 1976).

Figura 2. Ilustração morfológica dos escapos, folhas e capítulos em Eriocaulaceae. **A:** *Comanthera dímera*. **B:** Capítulo.



Fonte: Adaptado de Andrade, 2012.

A família das Eriocaulaceae é conhecida popularmente como “sempre-vivas”, devido os capítulos e escapos permanecem com aparência de vivos durante muitos anos, mesmo depois de retirados do solo.

As Eriocaulaceae ocorrem em sua maioria em regiões pantropicais e se destacam como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais, Goiás, Bahia), não só pela grande riqueza específica, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008).

O gênero *Paepalanthus* pertence à Eriocaulaceae, sendo um dos maiores e mais importantes da família com aproximadamente 400 espécies (TROVÓ; SANO, 2010). No Brasil, a maior diversidade do gênero encontra-se na Cadeia do Espinhaço, sendo que aproximadamente 82% são endêmicas da região (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008).

Dos capítulos de *P. planifolius* (Figura 3), já foram isoladas várias naftopiranonas, como as estruturas contidas da figura 4 (COELHO et al., 2000; VILEGAS et al., 1990; VILEGAS et al., 1998; SANTOS et al., 2001), substâncias com comprovadas atividades biológicas como antirradicalar, mutagênica e antiúlcera (SANTOS; HONDA; CARLOS, 2004; SILVA et al., 2007; MORAES et al., 2008).

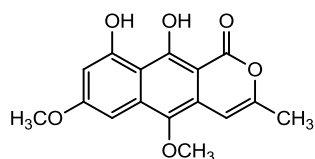
O gênero *Paepalanthus* também se caracteriza pela presença de flavonoides. Estudos mostram a presença de flavonóis acilados e glicosilados derivados da quercetina em *P. chiquitensis* (ZANUTTO et al., 2013), *P. geniculatus* (AMARAL et al. 2012) entre outros.

Figura 3. Capítulos de *Paepalanthus planifolius*.

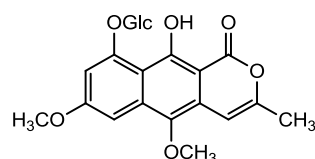


Fonte: Fornecida pelo autor.

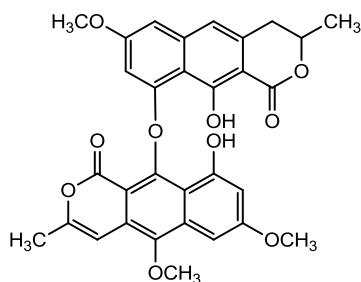
Figura 4. Naftopiranonas isoladas do gênero *Paepalanthus*.



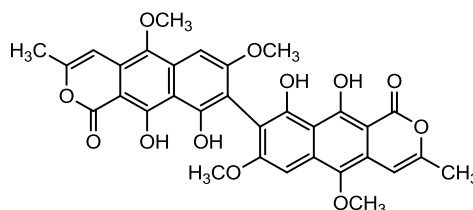
Paepalantina
Vilegas et al., 1990



Paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosideo
Vilegas et al., 1998



Planifolina
Santos et al., 2001



Dimero da paepalantina
Coelho et al. 2000

Este trabalho conduziu ao isolamento de dezesseis fungos endofíticos associados à *P. planifolius*, sendo que sete endófitos foram isolados dos capítulos desta espécie vegetal. A partir da triagem química, o fungo endofítico selecionado e identificado para estudo químico dos metabólitos secundários foi *Anthostomella brabeji*.

1.3. Fungo endofítico *Anthostomella brabeji*

Anthostomella sp. são fungos endofíticos pertencentes à família Xylariaceae. Esta família apresenta mais de 1300 espécies distribuídas em mais de 70 gêneros e é uma das maiores dentro do filo Ascomycota. Sua maior diversidade encontra-se nos trópicos, mas mesmo nas zonas de clima temperado, novas espécies estão continuamente sendo descobertas. A família é dividida em dois grandes grupos, as subfamílias Xylarioideae e Hypoxyloideae (STADLER et al., 2013).

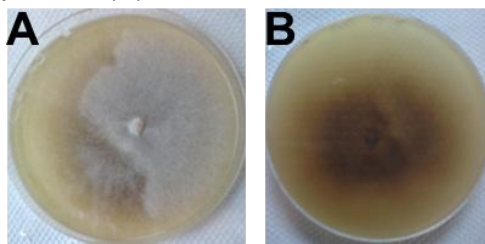
O protótipo do gênero *Anthostomella* é caracterizado por ter ascoma imersa a um estroma reduzido. Tal combinação de características pode ser interpretado como basal, ou seja, as respectivas espécies podem ser um taxon primitivo que ainda não desenvolveu estroma. Por outro lado, não se pode excluir que certas espécies de *Anthostomella* são derivadas a partir dos gêneros com estromas de Xylariaceae,

através de redução secundária que pode ter surgido no decurso da sua co-evolução com hospedeiros vegetais (STADLER et al., 2013).

A espécie *Anthostomella brabeji* foi identificada pela primeira vez a partir das folhas de *Brabejum stellatifolium*, pertencente à vegetação típica da África do Sul denominada “fynbos”. Esta vegetação apresenta mais de 7700 espécies de plantas compostas por arbustos e espécies específicas compreendidas entre o sul-oeste e sul do Cabo Ocidental, na qual 70% são endêmicas na região (COWLING; RICHARDSON, 1995; LEE; CROUS, 2003).

A cultura de *A. brabeji* forma micélio na parte superior de coloração branca levemente acinzentada e, a parte inferior do endófito apresenta coloração marrom (Figura 5)

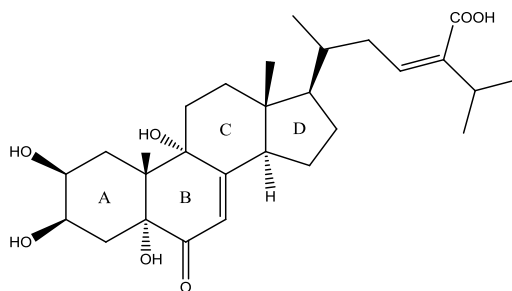
Figura 5. *A. brabeji* (A) Parte superior e, (B) Parte inferior do endófito.



Fonte: Fornecida pelo autor.

Em uma busca realizada na literatura (Scifinder, Web of Science e Reaxys) não foram encontrados trabalhos referentes ao estudo químico do fungo *Anthostomella brabeji*. Com relação ao gênero poucos metabolitos secundários foram identificados sendo apenas dois isômeros derivado do ácido succínico relatados em *Anthostomella auocetta*. Recentemente a partir do extrato do fungo *Anthostomella eucalyptorum* foi isolado um composto considerado citotóxico, que contém o esqueleto ergostano altamente oxigenado (Figura 6) (IZUMIKAWA et al., 2014).

Figura 6: Substância isolada do fungo *Anthostomella eucalyptorum*.



Portanto, diante da grande diversidade química e biológica de metabólitos já identificados nas espécies de *Paepalanthus* e por estas apresentarem-se em extinção, faz-se necessário a continuidade com o estudo para aumentar o conhecimento de sua constituição química. Também por não existir na literatura nenhum estudo químico de endofíticos associados às espécies de Eriocaulaceae e devido a sua importância como alvo promissor de moléculas biologicamente ativas, faz-se necessário o estudo químico e biológico de endofíticos associados à *P. planifolius*.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais:

- ✓ Contribuir para o conhecimento químico sobre fungos endofíticos associados às espécies de Eriocaulaceae;
- ✓ Contribuir para o conhecimento da química de Eriocaulaceae.

Os objetivos específicos:

- ✓ Isolar, purificar, identificar e preservar os fungos endofíticos associados à *P. planifolius*;
- ✓ Cultivar os microrganismos endofíticos isolados em PDB (escala reduzida) e obter os respectivos extratos brutos para “fingerprint”;
- ✓ Realizar a triagem química (ensaio antirradicalar, HPLC-PDA, CCDC) dos extratos produzidos pelos endofíticos em escala reduzida;
- ✓ Selecionar o extrato mais promissor a partir da triagem química em escala reduzida e, realizar o cultivo em escala ampliada;
- ✓ Isolar e identificar/elucidar os metabolitos secundários do extrato selecionado;
- ✓ Estudar a composição química do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius*;
- ✓ Avaliar atividade antibacteriana e antifúngica de extratos, frações e substâncias puras.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. 1. Equipamentos, materiais, reagentes e solventes

Para registro dos “fingerprints” de extratos, frações e substâncias purificadas foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência modo analítico com quatro canais de bomba modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2018 (Jasco[®]), contendo um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco[®]).

Para a purificação das substâncias foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência semipreparativo, com duas bombas modelo PU-2086 (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco[®]), contendo um injetor com loop 500 µL.

Em modo analítico foi usada uma coluna de fase reversa RP18, modelo Aquasil Gold aQ (Thermo[®]) de 250 x 4,6 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm, com coluna de guarda de fase reversa RP18 (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm.

Em modo semipreparativo foi usada uma coluna de fase reversa RP18, modelo Aquasil Gold aQ (Thermo[®]) de 250 x 20 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm, com coluna de guarda de fase reversa de RP18 (Phenomenex[®]) de 10 x 10 mm.

Para o fracionamento do extrato acetato de etila dos capítulos de *P. planifolius*, utilizou-se uma coluna de vidro (85 x 2,5 cm d.i.) contendo Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia[®]). Para inserir o solvente na coluna contendo a fase estacionária, utilizou-se uma bomba peristáltica modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia[®]). As frações foram recolhidas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]).

Também utilizou-se um sistema MPLC (Buchi[®]), composto por módulo Gerente C-615 (Buchi[®]) que monitora duas bombas C-601 (Buchi[®]), permitindo um sistema binário de solvente. Este sistema foi acoplado a uma coluna de RP18 (160 x 15 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 50 µm) a um vazão de 2,5 mL.min⁻¹ conectado ao coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]).

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas AB SCIex 3200 QTRAP[®], equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo a 10 µL/min. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) na concentração de 0,2 ppm e analisadas no modo de ionização por electrospray (ESI). As fragmentações em múltiplos estágios

(MSⁿ) realizadas em uma interface do tipo quadrupolo – íon trap linear. Para espectrometria em alta resolução, os espectros foram obtidos em um espectrômetro de massas Q-TOF MaXis ImpactTM, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo a 3 µL/min. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) na concentração de 3 ppm e analisadas no modo de ionização por electrospray (ESI). As fragmentações em múltiplos estágios (MSⁿ) realizadas em uma interface do tipo quadrupolo – TOF. Em modo positivo a amostra foi acidificada com 0,1% de ácido fórmico e em modo negativo adicionou-se 0,1% de hidróxido de amônio para as análises.

Os espectros de RMN foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 600. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado sem TMS ou metanol deuterado contendo TMS.

As amostras foram concentradas em evaporador rotativo modelo Laborota 4001 – efficient marca Heidolph, equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac valve control Heidolph.

Foram utilizadas balanças (Sartorius[®]) com capacidade para 210g e precisão de 0,001g para pesagem das amostras.

Balões volumétricos, micropipetas, vials e demais vidrarias usadas no preparo dos extratos e frações foram imersos por 24 h em solução de Extran (Merck[®]) 3% (v/v), para remoção de contaminantes. O material foi enxaguado em água Milli-Q (Millipore[®]) e seco a temperatura ambiente.

Como fase móvel em HPLC-DAD, assim como na preparação das amostras, foram utilizados ACN, MeOH e TFA (Tedia Company, Inc.), todos de grau HPLC, e água Milli-Q (Millipore[®]). Os demais solventes utilizados são todos de grau PA.

Os extratos e frações foram submetidos a “clean-up” em cartucho de SPE-C18 (Agilent[®]) na proporção de 1:10 m/m de extrato em relação à fase estacionária. O cartucho foi previamente ativado com MeOH (4 mL) e depois ambientado na mesma condição na qual a amostra foi solubilizada, e o material foi eluído.

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos microrganismos, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave do fabricante Quimis[®], sendo mantidos a temperatura de 121 °C por 20 minutos.

O procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação dos microrganismos foram realizados em Capela de Fluxo Laminar (Pachame[®]) PA 310-Serie 172-99.

Para cultivo dos micro-organismos foram utilizados os meios PDA (Potato Dextrose Ágar: 39 g.L⁻¹ de água) e PDB (Potato Dextrose Broth: 24 g.L⁻¹ de água), ambos da marca Himedia[®].

3. 2. Material vegetal

As partes aéreas de *P. planifolius* (capítulos, escapos e folhas) foram coletadas no mês de Outubro de 2013, na Serra do Cipó, estado de Minas Gerais, Brasil, pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP. A identificação foi feita pelo mesmo, catalogadas com *Voucher*: Sano 4979. Foram coletadas 310 g de material vegetal representativas da espécie.

3.3. Isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos

Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório de microrganismo do IQ-Ar, em colaboração com a Pós-Graduanda Andressa Somensi, orientada pela Profa. Dra. Angela Regina Araújo (NuBBE).

O procedimento de isolamento dos endófitos iniciou-se com a lavagem da superfície do material vegetal em água corrente e esterilizadas por imersão em NaClO 1% e em etanol 70%, seguida de dupla lavagem com água estéril para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do material vegetal (SILVA, 2005). O tempo de esterilização pode variar de acordo com a textura do material vegetal. Para os capítulos em NaClO 1% e etanol 70% foi menor em relação às folhas e escapos, devido os capítulos apresentar aspecto mais sensível de sua textura em comparação às outras partes do material vegetal (Tabela 1).

Após o processo de esterilização, as partes do material vegetal foram cortadas assepticamente (3 a 4 pedaços com aproximadamente 0,5 cm²) e incubadas em placas de Petri contendo PDA, sendo que após a esterilização em autoclave foi adicionado o antibiótico sulfato de gentamicina (20 mg.mL⁻¹) ao meio de cultivo para evitar o crescimento bacteriano.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras. As linhagens foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme nas placas com os meios próprios, sendo posteriormente preservadas em água estéril (*slants*), em triplicatas.

Tabela 1. Tempo de esterilização das partes áreas de *P. planifolius*.

	NaClO 1%	Etanol 70%	Lavagem com água
Capítulos	1 min	2 min	10 min total
Folhas	3 min	5 min	10 min total
Escapos	3 min	5 min	10 min total

3.4. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em PDB

Os endófitos que haviam sido preservados em *slants* foram repicados em placas de Petri contendo PDA, em duplicatas, devido à possibilidade de contaminação, e incubados por 10 dias a 25 °C. A seguir, aproximadamente um terço de micélio de cada uma das culturas isoladas foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (500,0 mL) contendo 300,0 mL de meio PDB (líquido) sendo estes autoclavados a 121 °C por 20 minutos um dia antes, em modo estático por 28 dias a 25°C. Após esse período, o meio líquido aquoso foi separado dos micélios por filtração e submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila (AcOEt). A escolha do solvente AcOEt foi devido ao estudo neste trabalho do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius*, dessa forma podendo comparar os metabólitos secundários. Em seguida a fração orgânica AcOEt foi filtrada e concentrada em rota-evaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 34°C obtendo-se os extratos brutos em escala reduzida, estes extratos foram transferidos para um vidro tarado e deixados na capela até completa eliminação do solvente. Depois de totalmente seco foram armazenados no freezer. As massas dos extratos obtidos encontram-se na tabela 4.

Para obtenção do extrato bruto do endófito *A. brabeji* em PDB em escala ampliada, utilizou-se o mesmo procedimento, porém foi inoculado em 15 frascos de Erlenmeyer (500,0 mL) contendo 300,0 mL de meio PDB (líquido). A massa do extrato obtido foi de 732,3 mg.

3.5. Ensaio antirradicalar qualitativo dos extratos brutos

Os extratos brutos foram avaliados quanto à reatividade com difenilpicrilhidrazina (DPPH) utilizando o método por cromatoplaça (PIRES et al., 2005).

Os extratos foram aplicados em placa de sílica gel a uma massa de 15 µg e eluídos com CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20 v/v). A seguir, a cromatoplaça foi nebulizada com uma solução de DPPH (0,2 %) em metanol e deixadas sob a luz artificial durante 30 minutos. O potencial antirradicalar foi evidenciado pela presença de manchas claras, decorrentes da redução do DPPH.

3.6. Identificação do fungo endofítico *Anthostomella brabeji*

O fungo codificado como Pp-C-08 foi identificado como a espécie *Anthostomella brabeji* pela Genotyping Biotecnologia em Botucatu-SP utilizando como metodologia o sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank.

3.7. Fracionamento do extrato AcOEt de *A. brabeji* por HPLC-DAD semipreparativo

O extrato AcOEt do fungo endofítico *A. brabeji* dos capítulos de *P. planifolius* (732,3 mg) foi solubilizado em MeOH/H₂O (7:3, v/v), utilizando-se banho ultra-som por 10 minutos. Amostra na concentração de 50 mg/mL foi filtrada em filtro de PTFE 0,22 µm, a seguir volumes de 400 µL injetados utilizando a condição cromatográfica em modo gradiente binário com vazão de 13,0 mL/min na qual a fase móvel consistiu de MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A), modo gradiente de 5-75% B (45 min), λ = 270 nm e temperatura a 25 °C.

3.8. Obtenção do extrato acetato de etila dos capítulos de *P. planifolius*

O material vegetal (partes aéreas – 310,0 g) foi submetido à secagem em estufa de ar circulante a 45°C. Posteriormente, houve a separação das partes aéreas em capítulos, escapos e folhas. O material foi pulverizado através da utilização de um moinho de facas.

O extrato acetato de etila foi obtido por maceração deixando os capítulos do material vegetal em contato com o respectivo solvente durante dois dias e realizando as extrações.

Em seguida o extrato foi filtrado e concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 34°C.

O extrato foi transferido para um vidro tarado e deixado na capela até completa eliminação do solvente, obtendo 1,656 g de extrato a partir de 50,0 g de capítulos (3,3% de rendimento) e armazenado no freezer.

3.9. Fracionamento em Sephadex® LH-20 do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius*

O extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* (200 mg) foi solubilizado em AcOEt (5,0 mL), utilizando-se banho ultra-som por 10 minutos, em seguida centrifugado por 15 minutos, separando-se o precipitado (15 mg) do sobrenadante. O sobrenadante foi cromatografado em coluna de Sephadex LH-20 (75 x 2,0 cm d.i.), eluída com AcOEt.

As frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em coletor automático. Foram obtidas 67 frações, as quais foram eluídas em CHCl₃/AcOEt, (1:1, v/v) e reveladas com luz UV e nebulizado com solução de anisaldeído/H₂SO₄, a placa foi posteriormente levada a uma estufa a 130 °C. Estas frações foram reunidas por CCDC, de acordo com a coloração e o R_f.

3.10. Fracionamento em MPLC do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius*

Inicialmente foram pesados 200 mg do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* e 600 mg de C18 para o preparo da pastilha que foi empacotada e inserida na cabeça da coluna.

A partir da otimização cromatográfica por HPLC-DAD analítico do extrato (Figura 25), foi empregado o conceito *scale-up* ou transposição cromatográfica para o fracionamento por MPLC, na qual foi determinado pelo simulador computacional HPLC Calculator v3.0. Utilizando-se uma coluna de RP18 (160 x 15 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 50 µm) a um vazão de 2,5 mL.min⁻¹ e coletor automático Redifrac (Pharmacia®).

As frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em coletor automático. Foram obtidas 138 frações, as quais foram eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$, (1:1, v/v) e reveladas com luz UV e nebulizado com solução de anisaldeído/ H_2SO_4 , a placa foi posteriormente levada a uma estufa a 130 °C. Estas frações foram reunidas por CCDC, de acordo com a coloração e o R_f .

3.11. Fracionamento das frações AcOEt de *P. planifolius* por HPLC-DAD semipreparativo

As frações AcOEt de *P. planifolius* (197 mg) obtidas por Sephadex-LH20 e MPLC foram reagrupadas e solubilizada em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2, v/v), utilizando-se banho ultra-som por 10 minutos. Amostra na concentração de 50 mg/mL foi filtrada em filtro de PTFE 0,22 μm , a seguir volumes de 400 μL injetados utilizando a condição cromatográfica em modo gradiente binário com vazão de 13,0 mL/min na qual a fase móvel consistiu de $\text{MeOH} + \text{TFA } 0,1\%$ (B) e $\text{H}_2\text{O} + \text{TFA } 0,1\%$ (A), modo gradiente de 67-85% B (60 min), $\lambda = 270 \text{ nm}$ e temperatura a 25 °C

3.12. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Esta etapa do trabalho foi realizada pelos alunos de Pós-Graduação Felipe Hilário e Bruna Bonifácio no laboratório de fisiologia de microrganismos da FCFAr coordenado pela Profa Dra.Tais Maria Bauab.

3.12.1. Avaliação da atividade antibacteriana

- Padronização da suspensão bacteriana

Foram preparados cultivos das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella setubal* (ATCC 19196) em caldo Mueller-Hinton (CMH), e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a padronização das cepas bacterianas. Cada um dos cultivos foi transferido para solução tampão fosfato pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland ($1,0 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância de 0,10 a 0,15. Após isso, a suspensão foi diluída na proporção 1:10 em CMH para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$, mantida em banho de gelo até o momento de ser utilizada nos ensaios.

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos e substâncias isoladas foram realizadas segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) com modificações.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 80 μ L de CMH, seguido de 100 μ L de cada um dos extratos, diluídos em DMSO 20% na concentração inicial de 2000 μ g/mL. Após a homogeneização, uma alíquota de 100 μ L da mistura foi retirada e transferida para o próximo poço, realizando diluições seriadas na razão 1:1 sucessivamente da coluna A até a coluna H. Um volume de 20 μ L da suspensão bacteriana padronizada foi adicionada em cada poço completando um volume final de 100 μ L, a concentração final no poço A foi de 1000 μ g/mL e no poço H de 7,8 μ g/mL.

Como controle positivo foi utilizado solução de ampicilina a 50 μ g/mL para *E. coli* e *S. setubal* e 5 μ g/mL para *S. aureus*. Também foi realizado o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controles de turbidez dos extratos e controle negativo (DMSO 20%).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Foi observada a turbidez por meio da leitura visual sem uso de revelador, e posterior avaliação colorimétrica utilizando 30 μ L resazurina (100 μ g/mL) como indicador. Após 2 horas de incubação a 37 °C, os poços que apresentam atividade antibacteriana permanecem corados de azul, enquanto os poços onde houve crescimento microbiano se coram em rosa. Assim, a CIM foi determinada como a menor concentração do extrato bruto onde não foi observado visualmente crescimento microbiano. Os testes foram realizados em triplicata.

- Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Antes da adição de resazurina, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo Agar Müeller-Hinton (AMH), e incubadas durante 24 h em estufa a 37 °C.

Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a concentração bactericida mínima (CBM) que é

definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Os testes foram realizados em triplicata.

3.12.2. Avaliação da atividade antifúngica

- Padronização da suspensão fúngica

Foi preparado cultivo de levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) em caldo sabouraud dextrose (CSD), e incubados a 37 °C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a padronização da levedura. O cultivo foi transferido para tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland (5×10^6 UFC/mL). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 530 nm até obtenção de absorbância de 0,12 a 0,15. Após isso, a suspensão foi diluída na proporção 1:100, em tampão fosfato (PBS) seguido de diluição 1:20 em meio RPMI (Meio Roswell Park Memorial Institute) para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, mantida em banho de gelo até o momento de ser utilizada nos ensaios.

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antifúngica e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram realizadas segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) com modificações.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 100 µL de RPMI 1640 (Meio Roswell Park Memorial Institute), ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Seguido de 100 µL de cada um dos extratos, diluídos em DMSO 20% (dimetilsulfóxido) na concentração inicial de 2000 µg/mL. Após a homogeneização, uma alíquota de 100 µL da mistura foi retirada e transferida para o próximo poço, realizando diluições seriadas na razão 1:1 sucessivamente da coluna A até H. Um volume de 100 µL da suspensão de levedura padronizada foi adicionada em cada poço completando um volume final de 200 µL, a concentração final no poço A foi de 1000 µg/mL e no poço H foi de 7,8 µg/mL.

Como controle positivo foi utilizado solução de anfotericina B na concentração de 16 µg/mL e fluconazol a 128 µg/mL. Também foi realizado o controle de

esterilidade do meio, controle do crescimento do inoculo, controles de turbidez das substâncias testes e controle negativo (DMSO 20 %).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 48 horas. Foi observado a turbidez por meio de leitura visual sem uso de revelador, e posterior avaliação colorimétrica utilizando 20 µL cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (0,02g/mL) como indicador. Após 2 horas de incubação a 37 °C, os poços que apresentam atividade antifúngica permanecem incolores, enquanto os poços onde houve crescimento microbiano se coram em vermelho. Os testes foram realizados em triplicata.

- Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose (SDA), e incubadas durante 48 horas em estufa a 37 °C. Após esse período foi observado os pontos onde ocorreram crescimento microbiano, determinando assim a concentração fungicida mínima (CFM) que é definida como a menor concentração testada na qual não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Os testes foram realizados em triplicata.

CAPÍTULO 1.

Prospecção química dos metabolitos produzidos pelos fungos endofíticos associados aos capítulos de *Paepalanthus planifolius*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fungos endofíticos isolados dos capítulos, escapos e folhas

A avaliação da pureza das linhagens foi realizada pela aparência uniforme das placas. Foram obtidas 16 linhagens puras (Tabelas 2 e 3), sendo posteriormente preservadas em *slants* e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQAr-UNESP.

Tabela 2. Fungos endofíticos isolados dos capítulos *P. planifolius*.

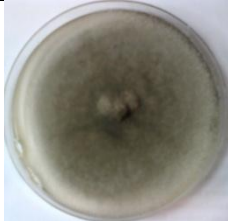
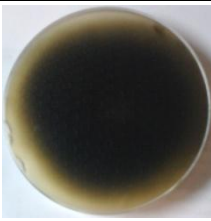
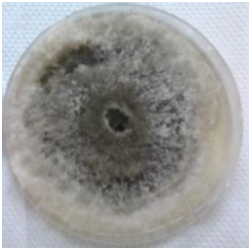
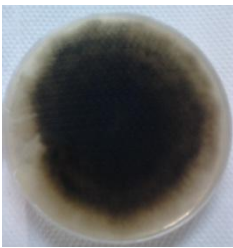
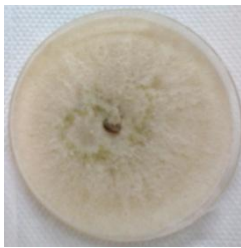
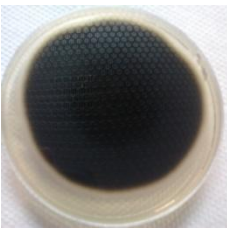
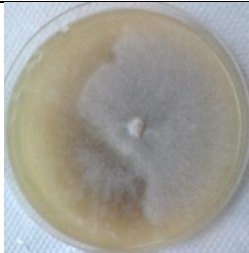
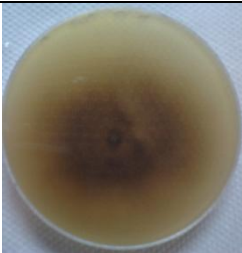
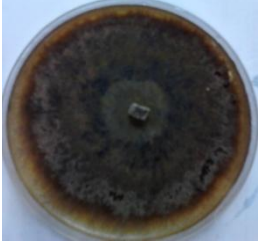
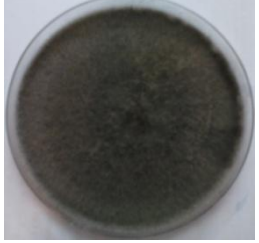
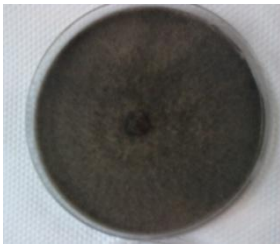
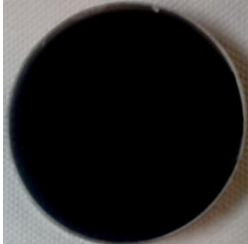
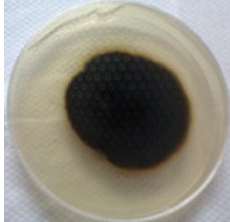
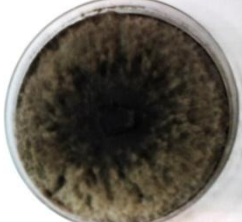
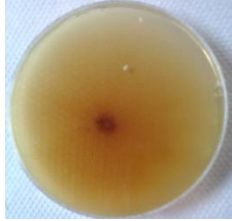
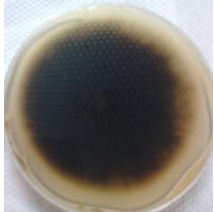
Fungos endofíticos isolados dos capítulos			
Frente	Verso	Frente	Verso
Pp- C-01		Pp-C-02	
			
Pp-C-04		Pp-C-05	
			
Pp-C-06		Pp-C-07	
			
Pp-C-08			
			

Tabela 3. Fungos endofíticos isolados dos escapos e das folhas de *P. planifolius*.

Fungos endofíticos isolados dos escapos e das folhas			
Frente	Verso	Frente	Verso
Pp-E-01		Pp-E-02	
			
Pp-E-03		Pp-E-04	
			
Pp-E-05		Pp-F-01	
			
Pp-F-02		Pp-F-03	
			
Pp-F-04			
			

Considerando que cada fungo possui diferentes condições ótimas de cultivo e neste trabalho foi empregada a mesma metodologia para todos os fungos, as massas dos extratos brutos obtidas no crescimento em 900 mL de meio líquido foram satisfatórias (Tabela 4).

Tabela 4. Massa obtida dos extratos AcOEt produzidos pelos fungos endofíticos.

Capítulos	Massa (mg)	Escapos	Massa (mg)	Folhas	Massa (mg)
Pp-C-01	86,4	Pp-E-01	75,5	Pp-F-01	36,6
Pp-C-02	102,0	Pp-E-02	143,7	Pp-F-02	18,8
Pp-C-04	66,5	Pp-E-03	173,0	Pp-F-03	202,1
Pp-C-05	30,1	Pp-E-04	57,7	Pp-F-04	99,2
Pp-C-06	67,9	Pp-E-05	42,6		
Pp-C-07	122,6				
Pp-C-08	135,6				

4.2. Triagem química e biológica dos extratos AcOEt produzido pelos fungos endofíticos associados aos capítulos de *P. planifolius*

Após o crescimento em escala reduzida em meio líquido PDB, foram obtidas os extratos brutos para cada cultura de fungo isolada.

Este trabalho permitiu o estudo dos endófitos isolados dos capítulos da espécie vegetal hospedeira. A escolha, inicialmente, do estudo dos metabólitos secundários produzidos pelos endófitos obtidos dos capítulos foi devido à busca de substâncias da classe de compostos das naftopiranonas que são comuns em espécies de plantas do gênero *Paepalanthus* e apresentam diversas atividades biológicas.

Análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi realizada em placas de sílica gel utilizando como eluente uma mistura de CHCl_3 :MeOH:H₂O (43:37:20 v/v) e revelada com anisaldeído (Figura 7).

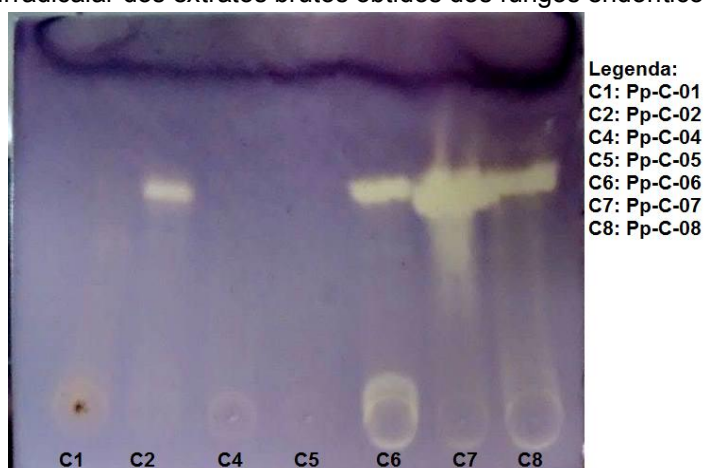
Observa-se pela coloração das manchas e os R_f 's apresentadas na cromatoplaça da figura 7, que os endófitos apresentam diversidade de metabólitos secundários quando comparados entre as linhagens e com o branco, o meio de cultura PDB.

Figura 7. CCDC dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos isolados dos capítulos



Para avaliar a atividade antirradicalar dos extratos dos fungos endofíticos foi utilizada a metodologia proposta por Pires (2005). Foram aplicados 15 µg de cada extrato na cromatoplaca, eluida com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20 v/v) e nebulizada com solução de DPPH (0,2 %) em metanol. Observam-se manchas amarelas claras conforme demonstrado na figura 8, que indica a presença de metabólitos com potencial antirradicalar nos extratos Pp-C-02, Pp-C-06, Pp-C-07 e Pp-C-08. Os demais extratos não apresentaram manchas amarelas.

Figura 8. Ensaio antirradicalar dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos



Os perfis químicos obtidos por HPLC-DAD dos sete extratos brutos dos endófitos isolados dos capítulos permitiu corroborar a informação da diversidade dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos por CCDC. De acordo com a análise do tempo de retenção de cada pico cromatográfico e seus respectivos espectros de absorção no UV, também é possível prever que as linhagens de

fungos isoladas são diferentes umas das outras, possibilitando uma diversidade de metabólitos secundários a serem estudados (Figuras 9 a 15).

Para cada extrato bruto, 18 mg foram submetidos ao *clean-up* e solubilizados em ACN/H₂O (7:3, v/v) atingindo a concentração de 10 mg mL⁻¹, filtrado e avaliado por HPLC-DAD. A solubilização foi realizada com solvente orgânico ACN devido alguns extratos não solubilizarem com MeOH, portanto para a padronização e comparação dos “fingerprints” os extratos foram solubilizados em ACN/H₂O (7:3, v/v).

Interessante notar que no cromatograma da figura 15 pertencente ao fungo endofítico codificado como Pp-C-08 apresentou espectros de absorção no UV de substâncias com $\lambda_{\text{máx.}}$ = 269 e 320 nm (t_r = 23,7 min) com semelhança aos das naftopiranonas isoladas de espécies de Eriocaulaceae (VILEGAS et al., 1998). Portanto, com a finalidade de se identificar substâncias desta classe de compostos, o fungo codificado Pp-C-08 foi selecionado para estudo. Assim, este trabalho poderia fornecer informações relevantes a respeito da origem dos metabólitos secundários encontrados.

Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-01 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 μ L, com espectro no UV representativos.

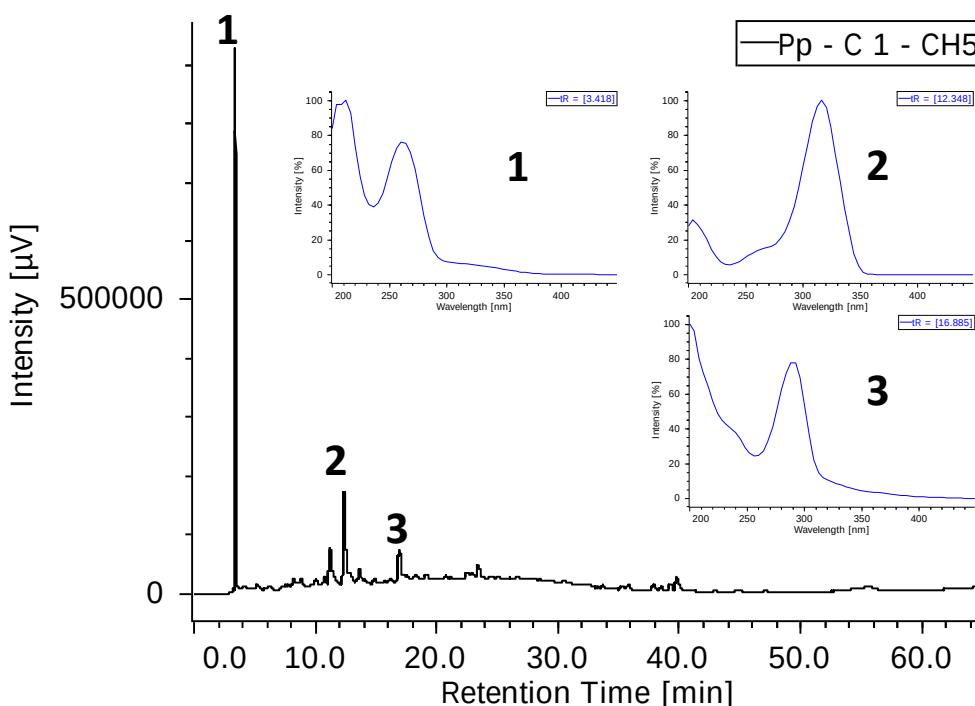


Figura 10. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-02 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 μ L, com espectro no UV representativos.

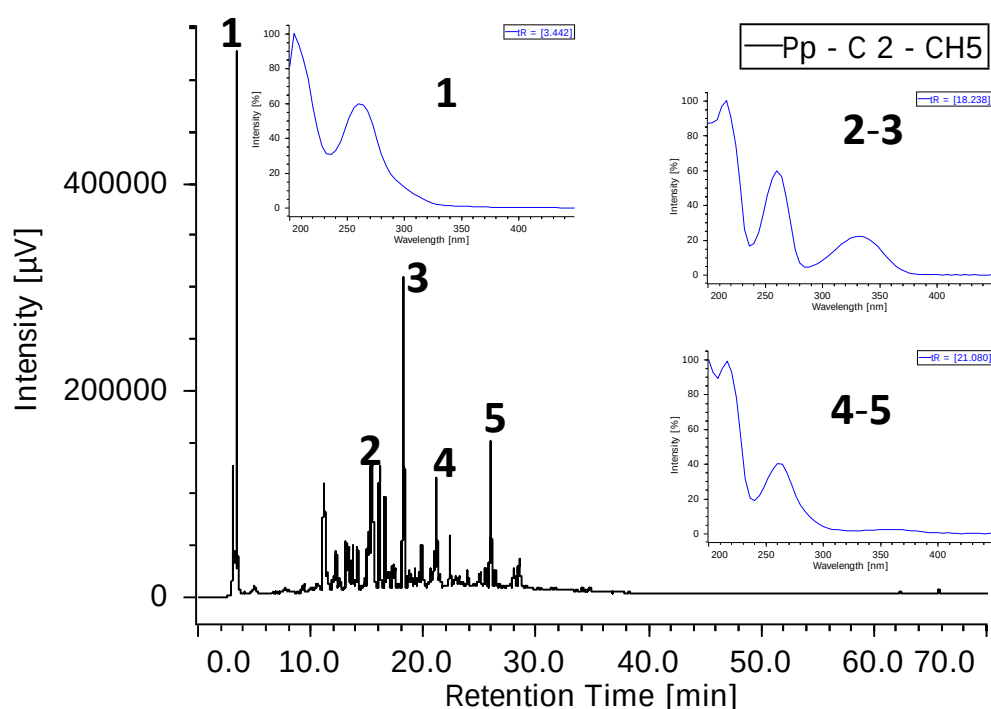


Figura 11. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-04 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 μ L, com espectro no UV representativos.

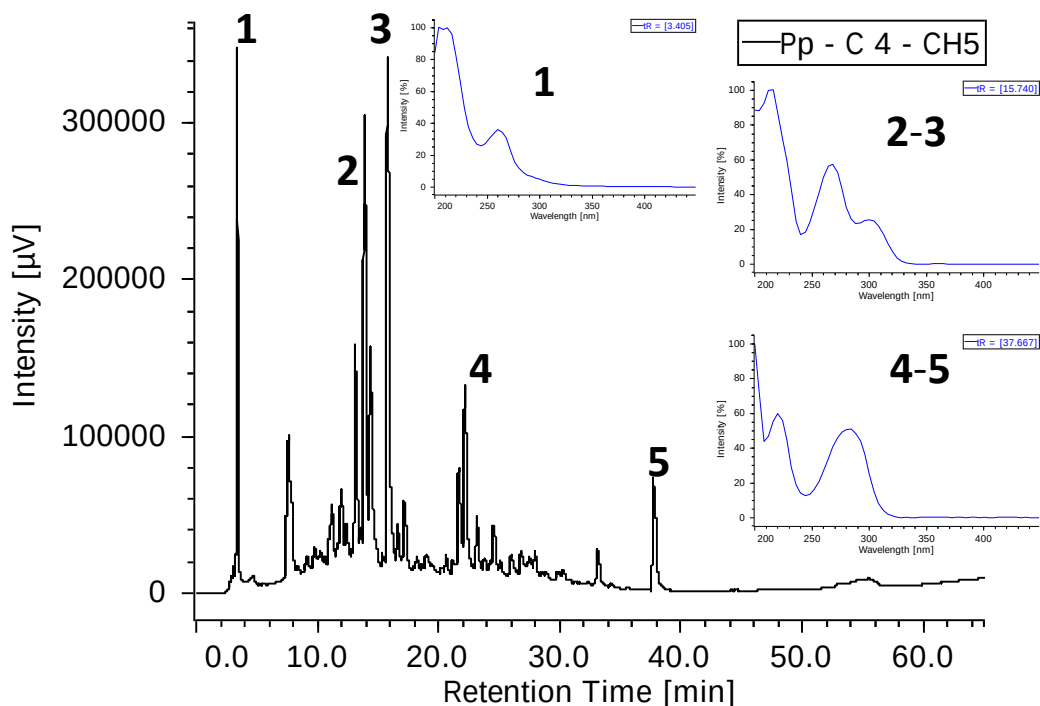


Figura 12. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-05 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 μ L, com espectro no UV representativos.

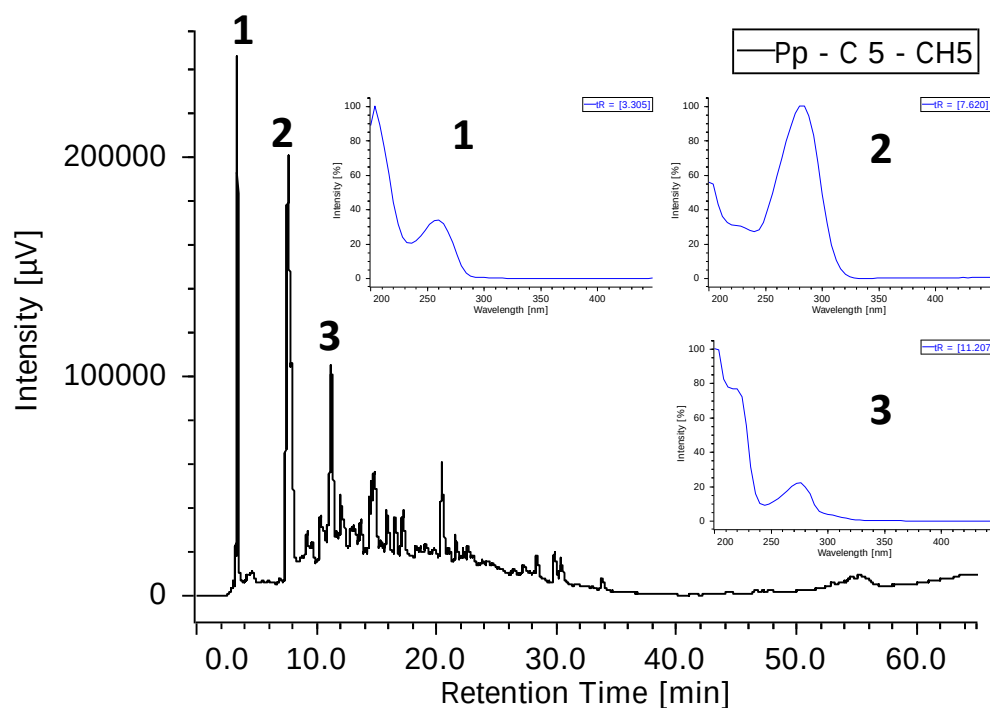


Figura 13. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-06 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 μ L, com espectro no UV representativos.

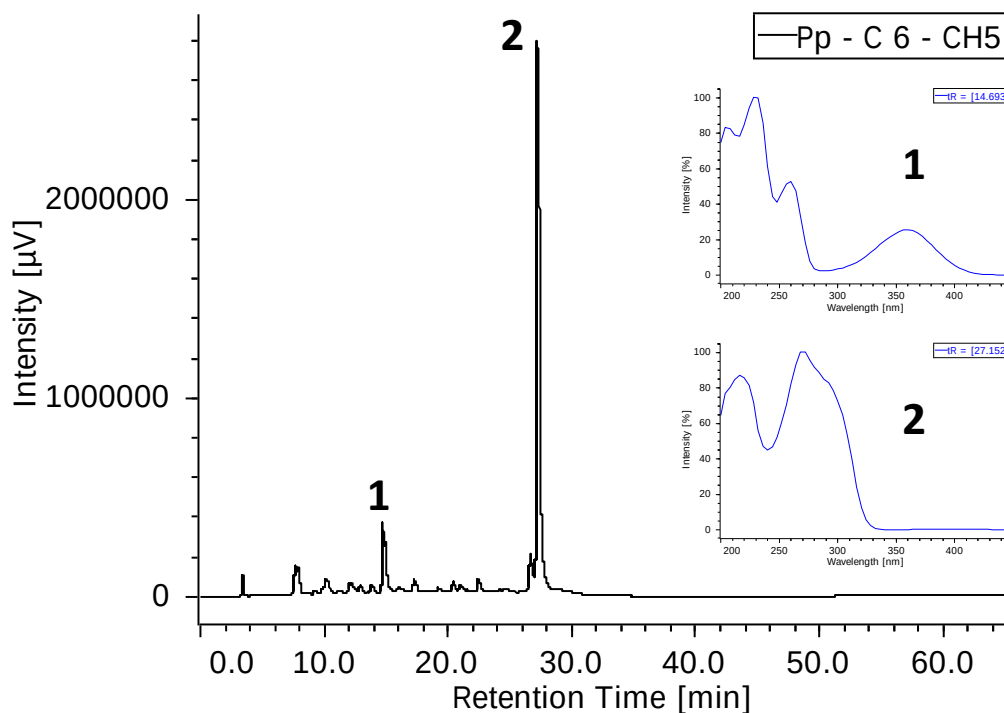


Figura 14. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-07 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.

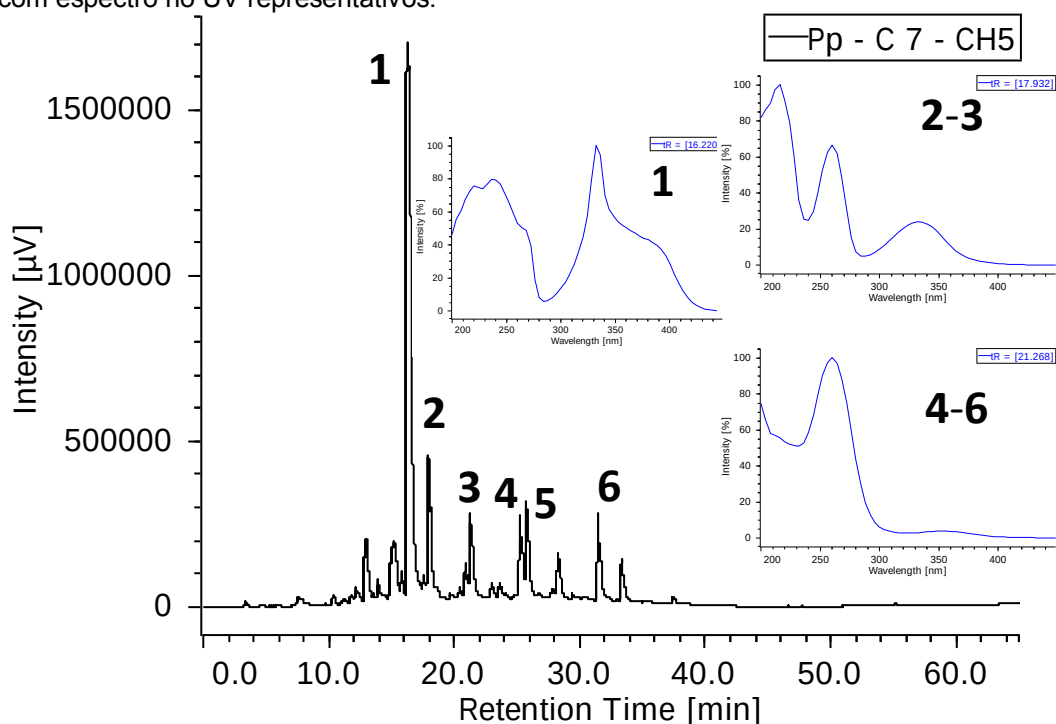
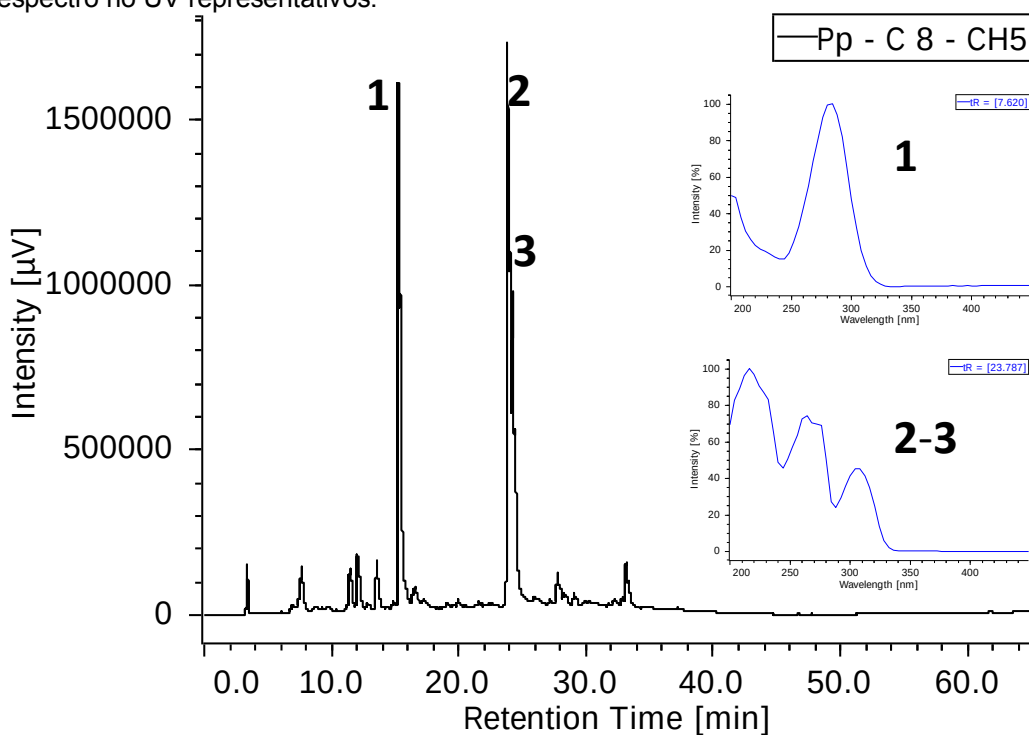


Figura 15. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de Pp-C-08 (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL, com espectro no UV representativos.



Após avaliação do perfil químico de cada extrato produzido pelos fungos por HPLC-DAD e por CCDC, da potencialidade por ensaio antirradicalar, das suas respectivas massas obtidas de extrato e a possibilidade de encontrar substâncias pertencentes à classe das naftopiranonas devido à semelhança dos espectros de absorção no UV, selecionou-se o fungo Pp-C-08 para sua identificação e cultivo em escala ampliada para o estudo químico dos metabolitos secundários produzidos por este.

Vale ressaltar que os fungos endofíticos isolados a partir de *P. planifolius* apresentaram perfis metabólicos diferentes possibilitando futuros estudos desses fungos para obtenção de diversos metabolitos.

4.3. Identificação do fungo endofítico *Anthostomella brabeji*

A identificação do fungo *Anthostomella brabeji* está descrita no item 3,6.

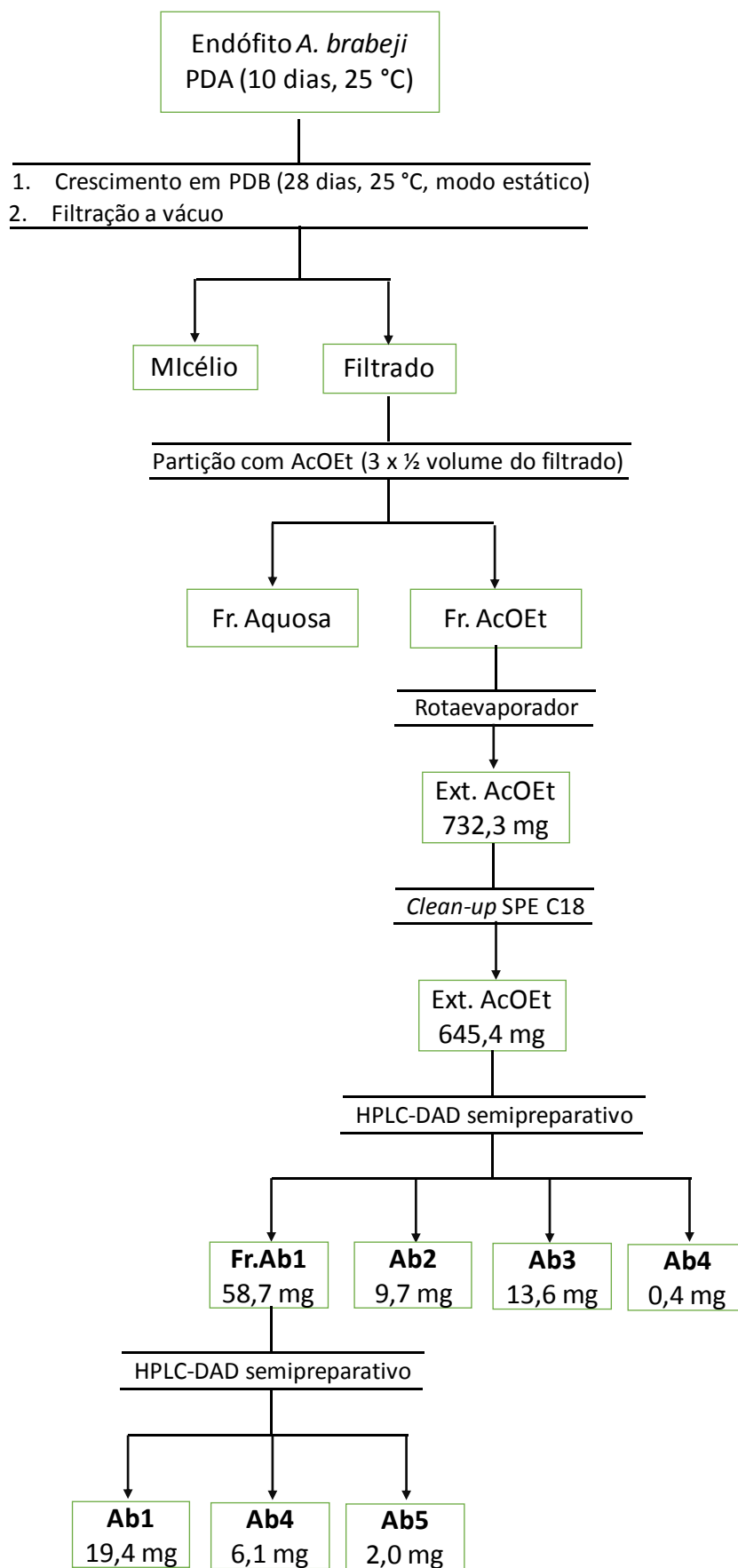
Esse fungo está sendo identificado pela primeira vez em espécie de Eriocaulaceae.

4.4. Cultivo de *A. brabeji* em escala ampliada e separação dos constituintes do extrato AcOEt por HPLC-DAD semipreparativo

O endófito foi inoculado em meio líquido PDB em 15 frascos de erlenmeyer de acordo com o procedimento experimental descrito no item 4.2., obtendo 732,3 mg de extrato AcOEt (Figura 16). Posteriormente, obteve-se a melhor condição de separação por HPLC-DAD analítico (Figura 17) que, junto com a análise de uma matriz não complexa em relação à resolução dos picos cromatográficos, possibilitou o isolamento de **Ab1**, **Ab2**, **Ab3** e **Ab4** do extrato AcOEt por HPLC-DAD semipreparativo (Figura 19). Os espectros de absorção no UV destas substâncias indicavam duas classes de compostos (Figura 18).

A fração na qual foi coletado o pico **Ab1** obtida após a separação por HPLC-DAD semipreparativo apresentou além do pico cromatográfico coletado mais dois picos com espectro de absorção no UV semelhantes (Figuras 20 e 21) havendo a possibilidade de ter ocorrido degradação desse composto. Então, para a purificação dessa fração obtida, 58,7 mg, utilizou-se o mesmo método cromatográfico gradiente, mas sem a utilização de ácido na fase móvel. Assim, foi possível a obtenção dos compostos puros **Ab1**, **Ab4** e **Ab5**.

Figura 16. Fluxograma do crescimento em escala ampliada do endófito *A. brabeji* e obtenção dos constituintes.



O cromatograma da figura 17 apresentou a melhor condição de separação, definida como eluição em modo gradiente com fase móvel constituída por: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-75% B (45 min). Os espectros de absorção no UV dos respectivos constituintes são observados na figura 16.

Figura 17. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de *A. brabeji* (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 15 µL

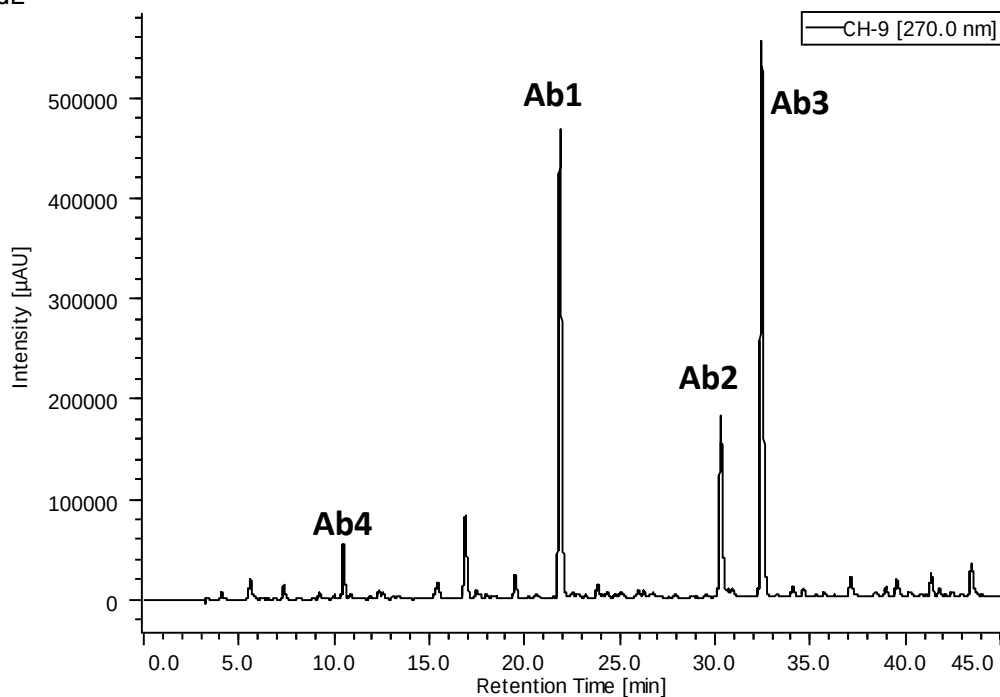
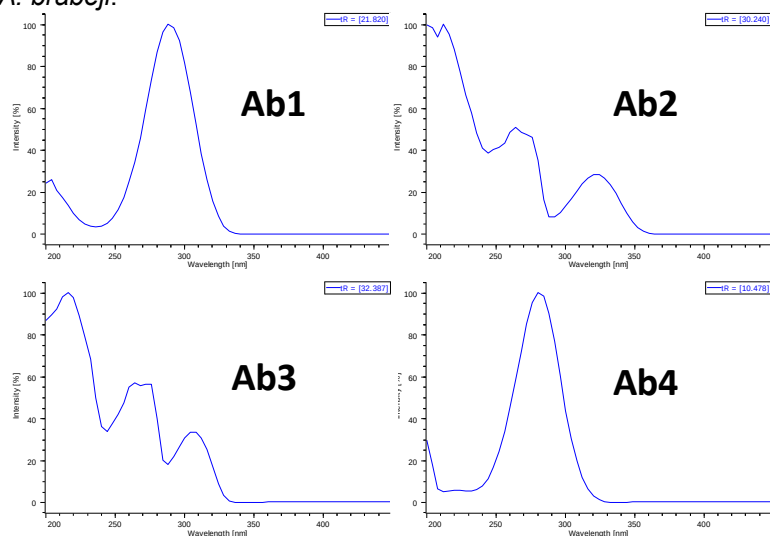
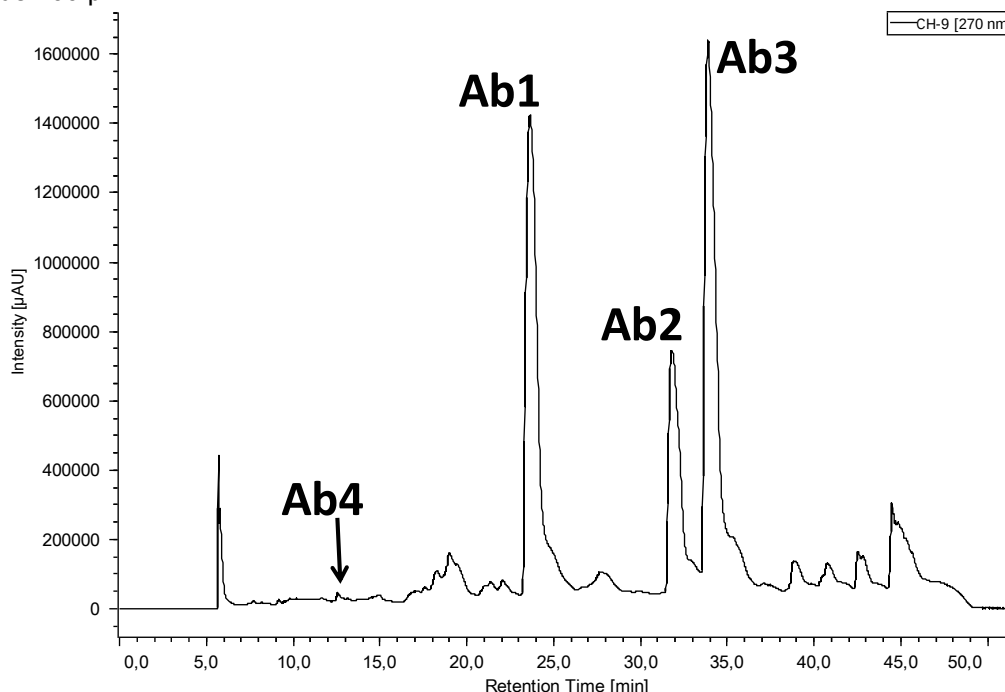


Figura 18. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos **Ab1**, **Ab2**, **Ab3** e **Ab4** do extrato AcOEt de *A. brabeji*.



Esta condição cromatográfica foi utilizada em escala semipreparativa com a vazão de 13 mL/min utilizando a metodologia descrita no item 4.4. para isolamento dos constituintes. Para garantir o máximo de pureza das substâncias, para cada pico cromatográfico foi dividido, conforme a eluição, em subida e descida, e coletado separadamente em frascos.

Figura 19. Cromatograma HPLC-DAD semipreparativo do extrato AcOEt de *A. brabeji* (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 20,0 mm d.i., 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 13,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 400 μ L



Para o pico cromatográfico **Ab4**, obteve-se uma quantidade de massa correspondendo a 0,4 mg de substância. A obtenção deste composto em maior quantidade foi a partir da purificação da fração **Fr.Ab1** que apresentou-se em mistura com outros dois picos cromatográficos quando analisado por HPLC-DAD analítico (Figura 20) na qual apresentavam espectros de absorção no UV semelhantes (Figura 21). A purificação foi realizada por HPLC-DAD semipreparativo (Figura 22) sem a utilização de ácido na fase móvel, sendo possível o isolamento de **Ab1** (19,4 mg), **Ab4** (6,1 mg) e **Ab5** (2,0 mg).

Figura 20. Cromatograma HPLC-DAD analítico da **Fr.Ab1** (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 10 μ L.

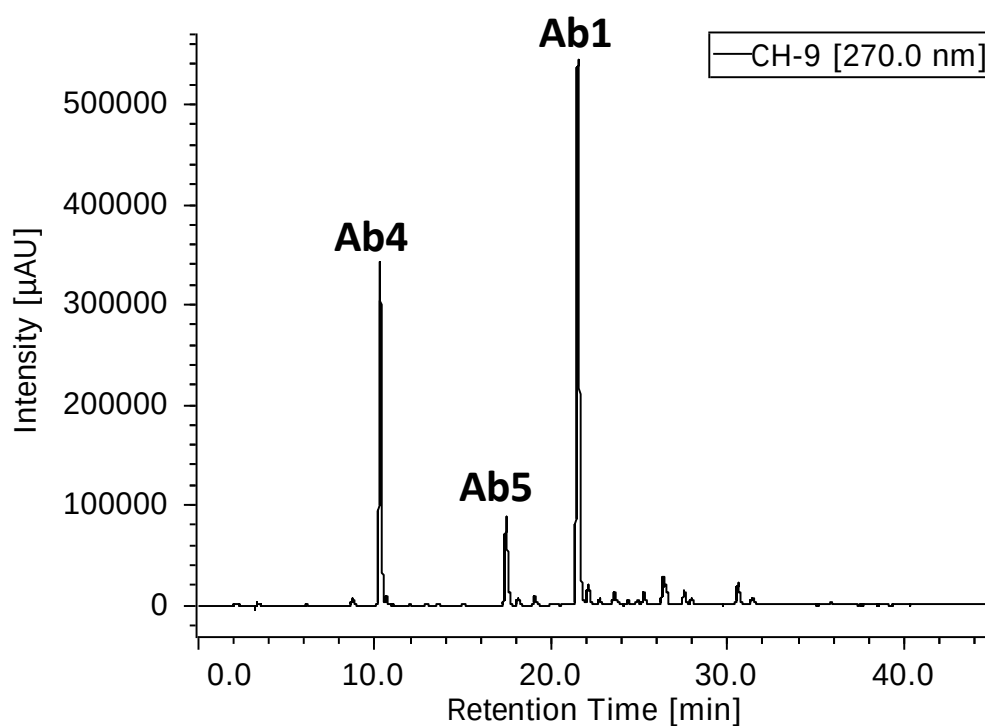


Figura 21. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx}}$) dos picos cromatográficos **Ab1**, **Ab4** e **Ab5** da fração **Fr.Ab1**.

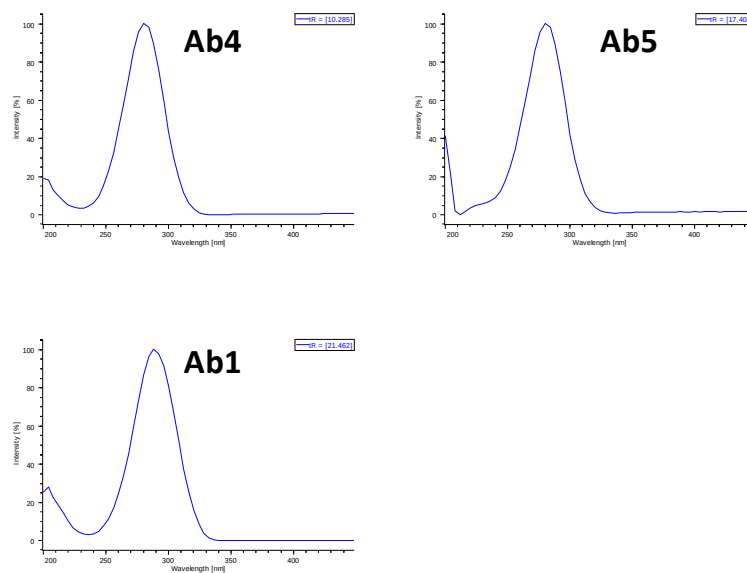
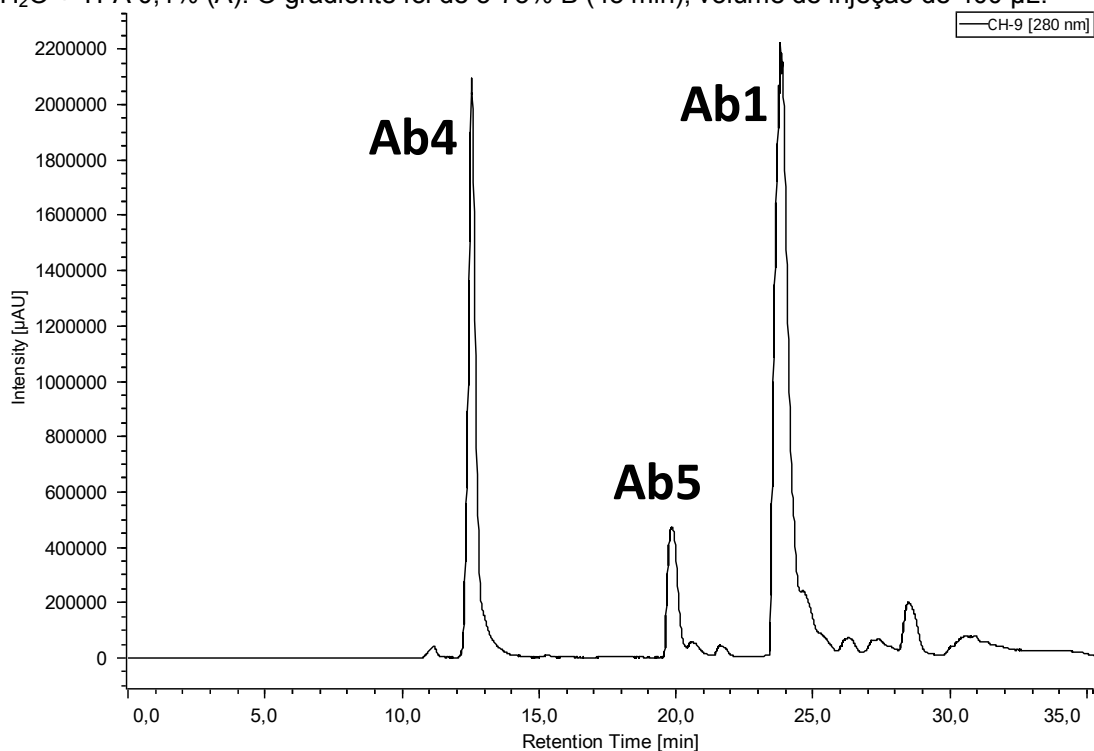


Figura 22. Cromatograma HPLC-DAD analítico da fração **Fr.Ab1** (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 20 mm d.i.; 5 μ m), λ = 280 nm, vazão 13,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 400 μ L.

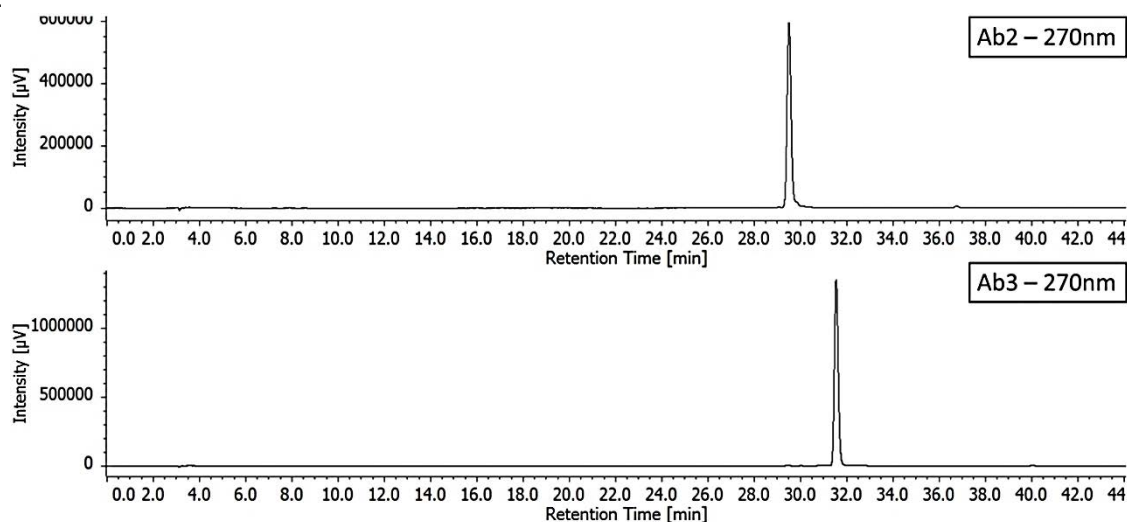


4.5. Identificação estrutural das substâncias

4.5.1. Substâncias **Ab2** e **Ab3**

Após proceder a separação por HPLC-DAD semipreparativo do extrato AcOEt de *A. brabeji* foi realizada a análise por HPLC-DAD analítico das frações na qual desejava-se as substâncias **Ab2** e **Ab3**. O cromatograma da figura 23 evidenciou um único pico cromatográfico para cada uma das substâncias, com espectro de absorção no UV semelhantes evidenciando a possibilidade de mesma classe de metabólitos secundários, sendo que a substância **Ab2** (t_r = 29,5 min) apresentou duas bandas em $\lambda_{m\acute{a}x.}$ = 269 e 322 nm e a substância **Ab3** (t_r = 31,5 min) apresentou em $\lambda_{m\acute{a}x.}$ = 269 e 306 nm.

Figura 23. Cromatograma HPLC-DAD analítico das substâncias **Ab2** e **Ab3** (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 10 μ L.



O espectro de RMN de ^1H da substância **Ab2** (Apêndices 1-4) apresentou na região de hidrogênios aromáticos, um duplete em δ 6,69 (1H, J = 2,8 Hz, H-3) referente a um hidrogênio acoplado em *meta*; um duplete em δ 6,67 (1H, J = 8,7 Hz, H-6) referente a hidrogênio acoplado em *orto* e ainda um duplo duplete em δ 6,63 (1H, J = 2,8 e 8,7 Hz, H-5) correspondente ao hidrogênio acoplado em *orto/meta*, propondo um anel benzênico trissubstituído. Adicionalmente, percebe-se sinal típico de grupo metila em δ 1,97 (3H, H-5') e também, sinal de grupo metileno em δ 5,27 e 5,34 (2H, H-4').

A tabela 5 apresenta os dados de RMN de ^1H , ^{13}C (Apêndice 5) e as correlações dos experimentos HSQC e HMBC (Apêndices 6-9). Com o mapa de correlação HSQC foi possível atribuir todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos à 1J e com os experimentos HMBC foi possível atribuir as correlações à 2J e 3J , possibilitando fazer a atribuição aos carbonos quaternários como os das posições 1', 2' e 3'. A atribuição destes carbonos foi realizada devido as correlações do hidrogênio em δ 6,69 (H-3) com o carbono em δ 85,8 (C-1') e os hidrogênios em δ 1,97 (H-6'), δ 5,27 (H-4a') e δ 5,34 (H-4b') com os carbonos em δ 94,9 (C-2') e em δ 128,6 (C-3').

Já o espectro de RMN de ^1H da substância **Ab3** (Apêndices 10-13) apresentou na região de hidrogênios aromáticos, um duplete em δ 7,27 (1H, J = 2,1 Hz, H-2) referente a hidrogênio acoplado em *meta*, um duplete em δ 6,81 (1H, J =

8,4 Hz, H-5) evidenciando a presença de hidrogênio acoplado em *orto* e ainda um duplo duplete em δ 7,16 (1H, $J = 2,1$ e 8,4 Hz, H-6) correspondente ao hidrogênio acoplado em *orto/meta*, propondo também um anel benzênico trissubstituído. Adicionalmente, percebe-se sinal típico de grupo metila em δ 1,98 (3H, H-5', $J = 1,2$) e também, sinal de grupo metileno em δ 5,28 e 5,36 (2H, H-4', $J = 1,0$) semelhantes à substância **Ab2**. Porém, observou-se ainda um sinal de hidrogênio em δ 4,47 (2H, H-6') mais desblindado, correspondente a um grupo CH₂. Na região aromática, observou-se ainda a presença de outra substância em menor concentração, evidenciando que **Ab3** não se encontrava totalmente pura.

A integração dos sinais de hidrogênio e as constantes de acoplamentos dos sinais obtidos no espectro de RMN de ¹H desta substância possibilitou estabelecer os sinais pertencentes para esta estrutura em mistura.

A tabela 6 apresenta os dados de RMN de ¹H, ¹³C (Apêndice 14) e as correlações dos experimentos HSQC e HMBC (Apêndices 15-19).

A detecção no espectro de massas de primeira ordem no modo negativo do íon da molécula desprotonada m/z 173 [M-H]⁻ para **Ab2** (Apêndices 20 e 21) e m/z 187 [M-H]⁻ para **Ab3** (Apêndices 22 e 23), são compatíveis com a fórmula molecular C₁₁H₁₀O₂ e C₁₂H₁₂O₂ respectivamente. Estas informações possibilitaram, portanto, identificar as estruturas, **Ab2** como sendo a Sicaina (1,4-benzenodiol, 2-[3-metil-3-buten-1-ínil]) e **Ab3** como Eutipinol (4-hidroxi-3-[3-metil-3-buten-1-ínil]-alcoól benzílico), demonstradas na figura 24. Dados da literatura evidenciam estas substâncias pertencentes à classe dos fenólicos acetilênicos (MOLYNEUX et al., 2002).

Figura 24. Substâncias **Ab2** e **Ab3** e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC (→) e COSY (↔), respectivamente.

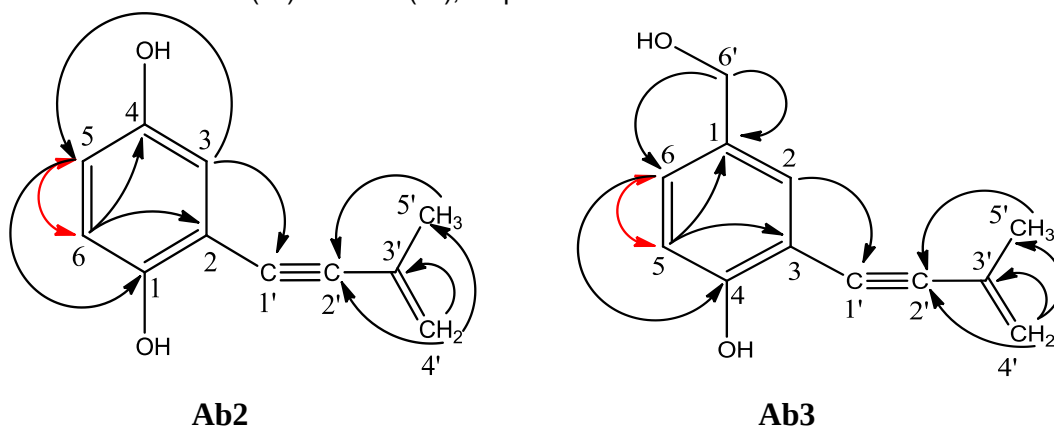


Tabela 5. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de **Ab2**, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

C/H	HSQC $^1J_{\text{CH}}$		HMBC $^nJ_{\text{CH}}$
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$
1	-	152,2	-
2	-	112,1	-
3	6,69 <i>d</i> (2,8)	119,4	85,8 (C-1'), 118,1 (C-5), 152,2 (C-1)
4	-	151,0	-
5	6,63 <i>dd</i> (2,8 e 8,7)	118,1	119,4 (C-3), 152,2 (C-1)
6	6,67 <i>d</i> (8,7)	117,2	112,1 (C-2), 151,0 (C-4)
1'	-	85,8	-
2'	-	94,9	-
3'	-	128,6	-
4a'	5,27 "quinteto" (1,6)	121,7	23,7 (C-5'), 94,9 (C-2'), 128,6 (C-3')
4b'	5,34 "sexteto" (1,1)		
5'	1,97 <i>dd</i> (1,6 e 1,1)	23,7	94,9 (C-2'), 121,7 (C-4'), 128,6 (C-3')

Tabela 6. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de **Ab3**, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

C/H	HSQC $^1J_{\text{CH}}$		HMBC $^nJ_{\text{CH}}$
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$
1	-	133,8	-
2	7,27 <i>d</i> (2,1)	133,0	85,8 (C-1'), 130,0 (C-6), 158,5 (C-4)
3	-	111,6	-
4	-	158,5	-
5	6,81 <i>d</i> (8,4)	116,2	111,6 (C-3), 133,8 (C-1)
6	7,16 <i>dd</i> (2,1 e 8,4)	130,0	133,0 (C-2), 158,5 (C-4)
1'	-	85,8	-
2'	-	95,0	-
3'	-	128,7	-
4a'	5,28 "quinteto" (1,6)	121,7	23,7 (C-5'), 95,0 (C-2'), 128,7 (C-3')
4b'	5,36 "sexteto" (1,1)		
5'	1,98 <i>dd</i> (1,6 e 1,1)	23,7	95,0 (C-2'), 121,7 (C-4'), 128,7 (C-3')
6'	4,47 <i>s</i>	64,6	130,0 (C-6), 133,8 (C-1)

Sicaina foi isolada pela primeira vez do fungo *Helminthosporium siccans* (ISHIBASHI et al., 1968), e do fungo marinho *Halocyphina villosa* apresentando atividade bioativa contra linhagens de bactérias e fungos (KUPKA et al., 1981).

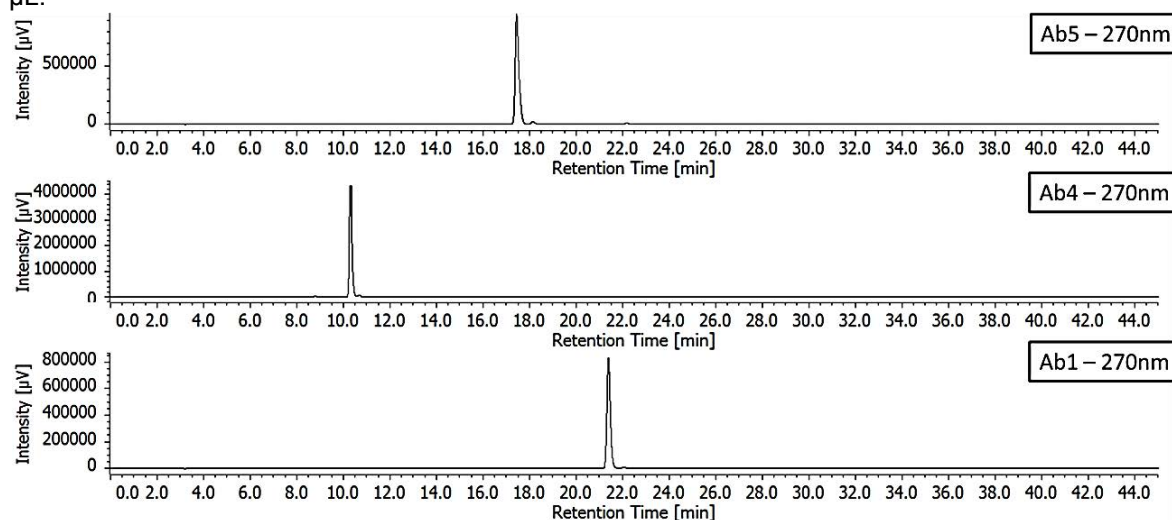
Este composto apresenta atividade antibiótica moderada inibindo a respiração mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (KIM et al., 2003) e também atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas humanas HeLa e HT29 (LIU et al., 2013).

Eutipinol foi isolada pela primeira vez do fungo *Eutypa lata*. Adicionalmente, a Sicaina também foi identificada como metabolito secundário do fungo *Eutypa lata*. (TSOUPRAS et al., 1988; RENOUD; TSOUPRAS; TABACCHI, 1989; JIMENEZ-TEJA; HERNANDEZ-GALAN; COLLADO, 2005).

4.5.2. Substâncias **Ab1** e **Ab4**

Após proceder a separação por HPLC-DAD semipreparativo da fração **Fr.Ab1**, o cromatograma da figura 25 evidenciou um único pico cromatográfico, com espectro de absorção no UV semelhantes, evidenciando a possibilidade de mesma classe de metabólitos secundários, para as substâncias **Ab1** ($t_r = 21,5$ min. com $\lambda_{m\acute{a}x.} = 287$ nm), substância **Ab4** ($t_r = 10,2$ min. com $\lambda_{m\acute{a}x.} = 280$ nm) e a substância **Ab5** ($t_r = 17,5$ min. com $\lambda_{m\acute{a}x.} = 280$ nm.)

Figura 25. Cromatograma HPLC-DAD analítico das substâncias **Ab1**, **Ab4** e **Ab5** (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-75% B (45 min), volume de injeção de 10 μ L.



A interpretação dos espectros de RMN ^1H da substância **Ab4** (Apêndices 26-29), TOCSY (Apêndices 30 e 31) e COSY (Apêndice 32) indicaram uma sequência de cinco hidrogênios no mesmo sistema de spin com deslocamento químicos em δ 4,05 (1H, *dd*, $J = 7,4$ e $1,8$ Hz, H-8), δ 3,60 (1H, *ddd*, $J = 9,5$, $9,3$ e $5,5$ Hz, H-7), δ 3,51 (1H, *dd*, $J = 9,5$ e $7,4$ Hz, H-6), δ 2,02 (1H, *ddd*, $J = 16,0$, $9,5$ e $1,8$ Hz, H-5) e δ 2,72 (1H, *ddd*, $J = 16,0$ e $5,5$ Hz, H-5).

No espectro de ^{13}C da substância **Ab4** (Apêndice 33), observou-se a presença de carbonos oxigenados com deslocamentos químicos típicos de grupo hidroxila ligado, carbono 6 [δ 69,6 (C-6)], carbono 7 [δ 77,8 (C-7)] e carbono 8 [δ 73,7 (C-8)]. Observou-se ainda que o carbono 8 apresentava deslocamento típico de metileno.

A existência de hidrogênios enantiotópicos (H-3a e H-3b) foi confirmada analisando-se as constantes de acoplamento geminal dos hidrogênios com deslocamento químicos em δ 2,52 e 2,56 ($^2J = 16,6$ Hz). Estes hidrogênios no experimento HSQC de **Ab4** (Apêndice 34) apresentaram correlação com o carbono em δ 47,8 (C-3).

Os experimentos HMBC de **Ab4** (Apêndice 35) evidenciaram à 2J que o carbono metileno (C-3) estava posicionado entre a carbonila (C-4) e um carbono quaternário (C-2). Para posicionar os grupos metilas no C-2, observaram-se no HMBC as correlações de H-9 e H-10 com C-2 e C-3. Ainda foram observadas correlações nos experimentos de HMBC entre os hidrogênios H-5 à 2J com o C-4, à 3J com o C-4a e à 3J com o C-8a; dos hidrogênios diastereotópicos H-8 à 3J com o C-4a e à 2J com o C-8a, justificando que C-5 e C-8 estavam interligados por uma ligação dupla de cetona α,β insaturada.

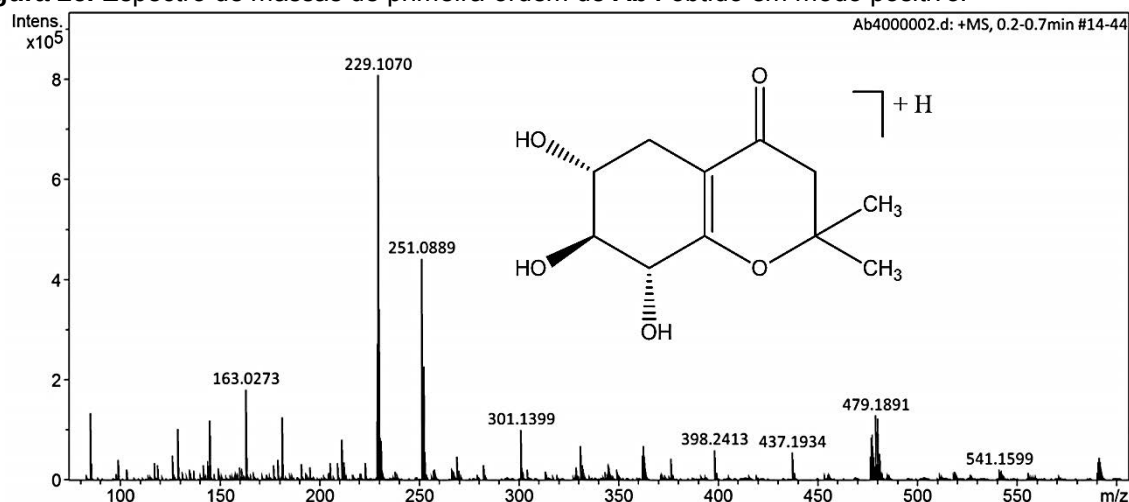
Finalmente, considerando o deslocamento químico e a menor intensidade no espectro de ^{13}C , concluiu-se que os carbonos C-8a e C-2 como quaternários, unidos por um átomo de oxigênio.

Assim, a substância proposta (Figura 27) para **Ab4** (6,7,8-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-epoxicroman-4-ona) apresenta três carbonos quirais na qual a configuração relativa de **Ab4** foi deduzida pela análise no espectro de RMN ^1H , HOMODEC (Apêndices 36-38) e NOESY 1D (Apêndices 39 e 40). No experimento HOMODEC, irradiação no H-8 (δ 4,05) apresentou a mudança na multiplicidade dos hidrogênios H-7 (δ 3,51, *d*, $J = 9,5$ Hz) e H-5 (δ 2,02, *dd*, $J = 16,0$ e $9,3$ Hz)

permitindo concluir que os hidrogênios H-5 (δ 2,02), H-6 (δ 3,60) e H-7 (δ 3,51) estavam em posições axiais. Quando irradiado o H-5 axial (δ 2,02), o hidrogênio H-8 (δ 4,05) apresentou um duplete de $J = 7,3$ Hz proveniente de um acoplamento pseudo-axial-axial com o hidrogênio H-7 corroborando para que o hidrogênio H-8 estivesse posicionado em pseudo-axial. Desta forma, todas as hidroxilas se encontram em posições equatoriais na molécula.

O espectro de massas de alta resolução para **Ab4** no modo positivo, apresentou o ion da molécula protonada em m/z 229,1070 $[M+H]^+$ e o ion da molécula cationizada em m/z 251,0889 $[M+Na]^+$ (Figura 26), compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{16}O_5$ (Calculado m/z 229,1070), confirmando assim a estrutura.

Figura 26. Espectro de massas de primeira-ordem de **Ab4** obtido em modo positivo.



A fragmentação de segunda ordem (MS/MS) do ion precursor de m/z 229,1070 correspondente à molécula protonada, apresentou no espectro de massas (Figura 27) o pico base m/z 83,0493 $[M-C_6H_{10}O_4+H]^+$. Outros sinais observados de m/z 173,0444 $[M-C_4H_8+H]^+$ corresponde à perda de 2-metil-1-propeno, de m/z 155,0338 $[M-C_4H_8-H_2O+H]^+$ e de m/z 137,0232 $[M-C_4H_8-H_2O-H_2O+H]^+$ referem-se à perdas de água e de m/z 109,0232 $[M-C_4H_8-H_2O-H_2O-CO+H]^+$ à perda de monóxido de carbono, sucessivamente. A proposta de padrão de fragmentação está descrita na figura 28.

Figura 27. Espectro de massas de segunda-ordem, em modo positivo, do íon precursor de m/z 229,1070.

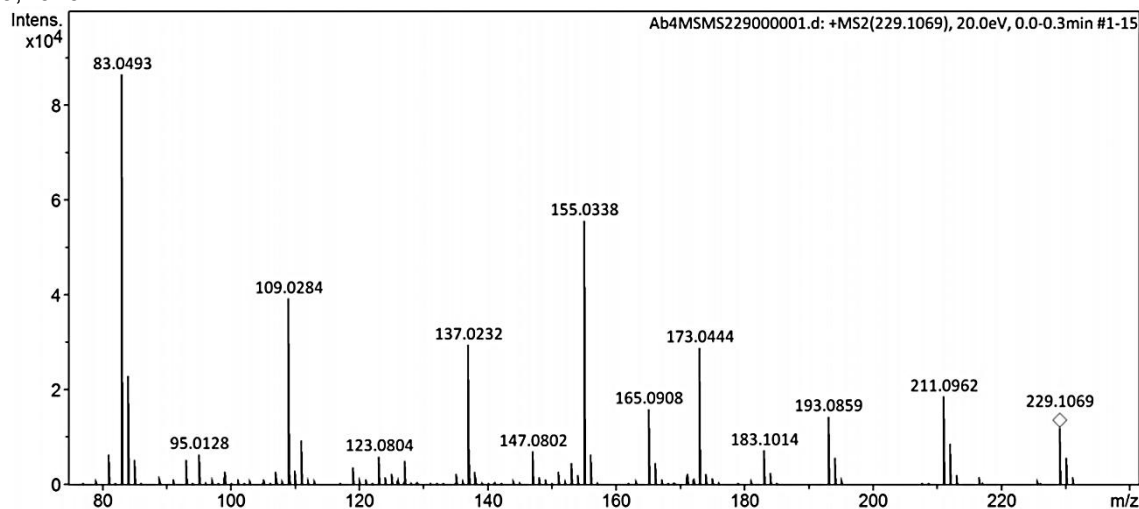
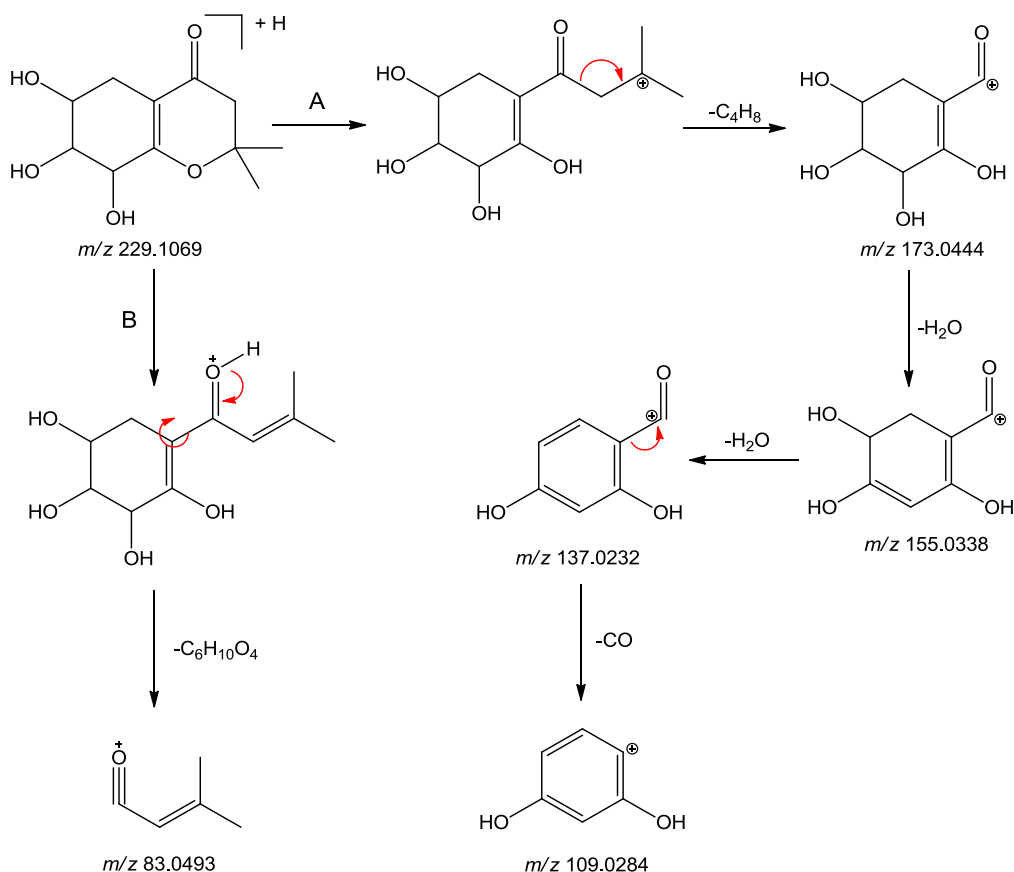


Figura 28. Proposta de padrão de fragmentação para **Ab4**.



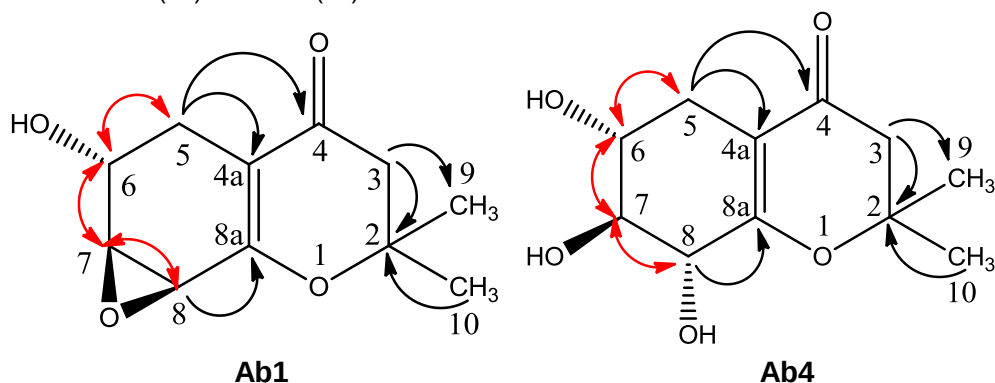
Da mesma forma, a interpretação dos espectros de RMN de ^1H da substância **Ab1** (Apêndices 40-45), TOCSY (Apêndices 46 e 47) e COSY (Apêndice 48) indicaram uma sequência de cinco hidrogênios no mesmo sistema de spin com deslocamentos químicos em δ 3,40 (1H, *d*, $J = 3,9$ Hz, H-8), δ 3,60 (1H, *m*, H-7), δ

4,43 (1H, *m*, H-6), δ 1,97 (1H, *dd*, $J = 16,5$ e $4,5$ Hz, H-5_{ax}) e δ 2,69 (1H, *ddd*, $J = 16,5$, $2,0$ e $1,9$ Hz, H-5_{eq}).

Análise dos espectros de RMN de ^{13}C (Apêndice 49), HSQC (Apêndice 50), HMBC (Apêndice 51) da substância **Ab1** resultou em uma pequena diferenciação em relação à substância **Ab4**, sendo possível observar que os carbonos oxigenados 7 e 8 apresentam deslocamentos químicos típicos de grupo epóxido [δ 57,7 (C-7) e δ 50,3 (C-8)] e a presença de um grupo hidroxila ao carbono 6 [δ 63,9 (C-6)] para a substância **Ab1**, propondo a estrutura descrita na figura 29.

A detecção no espectro de massas de primeira ordem no modo positivo forneceu o íon da molécula protonada m/z 211 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Apêndices 52 e 53) compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$, confirmando assim a estrutura **Ab1**.

Figura 29. Substâncias **Ab1** e **Ab4**, e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).



A configuração relativa de **Ab1** foi deduzida pela análise no espectro de RMN de ^1H pelas constantes de acoplamento ($J = 1,90$, $2,00$ e $4,50$ Hz) que correspondem aos hidrogênios geminais (H-5_{axial} e H-5_{equatorial}) com os hidrogênios H-6 e H-7 do epóxido que são característicos de dois acoplamentos pseudo-equatorial-equatorial e um pseudo-equatorial-axial, respectivamente. Dados importantes foram obtidos no experimento de COSY (Apêndice 48) e NOESY 1D (Apêndice 54) auxiliando na configuração relativa de **Ab1**. No experimento de COSY observou-se a interação à 4J do sinal de H-7 $\leftrightarrow$ H-5_{eq} (δ 3,60 $\leftrightarrow$ δ 2,69) possivelmente de uma interação em W, que é permitida quando estes hidrogênios estão em posições equatoriais na molécula. No espectro de NOESY 1D, irradiando em H-6 (δ 4,43) observa-se interações com H-7 (δ 3,60), H-5_{eq} (δ 2,69) e H-5_{ax} (δ 1,97) que é permitido quando H-6 encontra-se na posição equatorial, corroborando

para a configuração relativa de **Ab1**. Experimentos de HOMODEC também foram realizados para encontrar as constantes de acoplamento de H-6 e H-7. Porém, não foi possível obter essas constantes de acoplamento devido à dificuldade de análise das constantes de acoplamento nos espectros apresentados.

As tabelas 7 e 8 mostram os dados obtidos por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC para as substâncias **Ab1** e **Ab4**, respectivamente.

Tabela 7. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de **Ab1**, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

C/H	HSQC $^1J_{\text{CH}}$		HMBC $^nJ_{\text{CH}}$	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$	
2	—	82,7	—	
3a	2,50 <i>d</i> (16,6)	47,8	25,3 (C-9); 27,1(C-10); 82,7 (C-2); 106 (C-4a); 193,8 (C-4)	
3b	2,62 <i>d</i> (16,6)	47,8	25,3 (C-9); 27,1(C-10); 82,7 (C-2); 193,8 (C-4)	
4	—	193,8	—	
4a	—	106,4	—	
5 _{ax}	1,97 <i>dd</i> (16,5 e 4,5)	24,6	63,9 (C-6); 106,4 (C-4a); 165,9 (C-8a); 193,8(C-4)	
5 _{eq}	2,69 <i>ddd</i> (16,5, 2,0 e 1,9)	24,6	57,7 (C-7); 63,9 (C-6); 106,4 (C-4a); 165,9 (C-8a); 193,8(C-4)	
6	4,43 <i>m</i>	63,9	50,3 (C-8); 106,4 (4a)	
7	3,60 <i>m</i>	57,7	24,6 (C-8); 50, 3 (C-5); 63,9 (C-7)	
8	3,40 <i>d</i> (3,9)	50,3	106,4 (C-4a); 165,9 (C-8a); 193,8(C-4)	
8a	—	165,9	—	
9	1,43 <i>s</i>	25,3	27,1 (C-10), 82,7 (C-2), 47,8 (C-3)	
10	1,48 <i>s</i>	27,1	25,3 (C-9), 82,7 (C-2), 47,8 (C-3)	

Tabela 8. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de **Ab4**, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em MeOH- d_4 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

C/H	HSQC $^1J_{\text{CH}}$		HMBC $^nJ_{\text{CH}}$	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$	
2	—	82,0	—	
3a	2,52 <i>d</i> (16,6)	47,8	25,9 (C-9); 26,6 (C-10); 82,0 (C-2); 194,8 (C-4)	
3b	2,56 <i>d</i> (16,6)	47,8	25,9 (C-9); 26,6 (C-10); 82,0 (C-2); 194,8 (C-4)	
4	—	194,8	—	
4a	—	107,9	—	
5 _{ax}	2,02 <i>ddd</i> (16,0, 9,5 e 1,8)	28,1	69,6 (C-6); 107,9 (C-4a); 77,8 (C-7); 167,6 (C-8a)	
5 _{eq}	2,72 <i>dd</i> (16,0 e 5,5)	28,1	69,6 (C-6); 107,9 (C-4a); 77,8 (C-7); 167,6 (C-8a); 194,8 (C-4);	
6	3,60 <i>ddd</i> (9,5, 9,3 e 5,5)	69,6	77,8 (C-7)	
7	3,51 <i>dd</i> (9,3 e 7,3)	77,8	28,1 (C-5); 69,6 (C-7); 73,7 (C-8)	
8	4,05 <i>dd</i> (7,3 e 1,8)	73,7	77,8 (C-7); 107,9 (C-4a); 167,6 (C-8a)	
8a	—	167,6	—	
9	1,42 <i>s</i>	25,9	26,6 (C-10); 82,0 (C-2); 47,8 (C-3)	
10	1,44 <i>s</i>	26,6	25,9 (C-9); 82,0 (C-2); 47,8 (C-3)	

As substâncias **Ab1** e **Ab4** pertencem à classe de cromanona, sendo que a substância **Ab1** (6-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-7,8-epoxicroman-4-ona) já foi descrita na literatura também como metabolito secundário do fungo *Eutypa lata* (RENAUD et. al., 1989) enquanto que a substância **Ab4** (6,7,8-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-croman-4-ona) está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

4.6. Atividade antibacteriana e antifúngica

A atividade antimicrobiana foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Tais Maria Bauab da FCFAr, seguindo o procedimento experimental conforme o item 3.12.

Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato do fungo endofítico *A. brabeji* (**Ext. Ab**) e das substâncias isoladas **Ab1**, **Ab2**, **Ab3** e **Ab4** encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima do extrato do fungo endofítico *A. brabeji* (**Ext. Ab**) e das substâncias isoladas **Ab1**, **Ab2**, **Ab3** e **Ab4**.

Amostras Avaliadas	CIM ^a			
	Bactéria Gram-negativa		Bactéria Gram-positiva	Levedura
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ext. Ab	–	1000,0	–	250,0
Ab1	–	500,0	–	1000,0
Ab2	–	1000,0	62,5	62,5
Ab3	–	31,2	31,2	1000,0
Ab4	–	1000,0	–	1000,0

^a valores em µg/mL; (–) CIM > 1000 µg/mL

Os resultados do método de microdiluição apresentaram valores para CIM > 1000 µg/mL para atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* para extrato e substâncias isoladas (Tabela 9). Porém, para as amostras **Ab2** e **Ab3** foram observadas uma forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, apresentando valores de CIMs de 62,5 e 31,25 µg/mL, respectivamente. Para *Salmonella setubal*, as substâncias **Ab1** (CIM = 500 µg/mL) e **Ab3** (CIM = 31,25 µg/mL) evidenciaram melhores atividades antibacteriana, uma vez que as outras apresentaram CIMs de 1000 µg/mL. Todas as amostras apresentaram atividade antifúngica, especialmente **Ab2** com uma CIM = 62,5 µg/mL. A literatura não fornece uma pontuação de consenso relacionada com os valores CIM obtidos de produtos naturais. Aligiannis et al. (2001) classificou valores de CIM igual ou inferior a 500 µg/mL como inibidores potentes; CIMs entre 600 e 1500 µg/mL como inibidores moderados e acima de 1600 µg/mL como inibidores fracos. Webster et al. (2008) estabeleceu os valores de CIM como satisfatórios igual ou inferior a 1000 µg/mL. De acordo com a última classificação, todas as amostras podem ser classificadas como inibidores potentes, especialmente **Ab2** para *C. albicans* e **Ab3** para *S. aureus*.

A resistência antimicrobiana é um fator de preocupação, assim, o objetivo das novas abordagens que apresentam atividade antimicrobiana contra vários tipos de fungos e bactérias é relevante (Cragg; Newman, 2013). Neste sentido, o rastreio antimicrobiano deste estudo mostraram bons resultados contra *S. aureus* e *C. albicans*, uma vez que este extrato de fungo e as substâncias isoladas mostraram inibição potencial em concentrações que variam de 1000 – 31,25 µg/mL.

CAPÍTULO 2.

Estudo fitoquímico dos capítulos de *Paepalanthus planifolius*

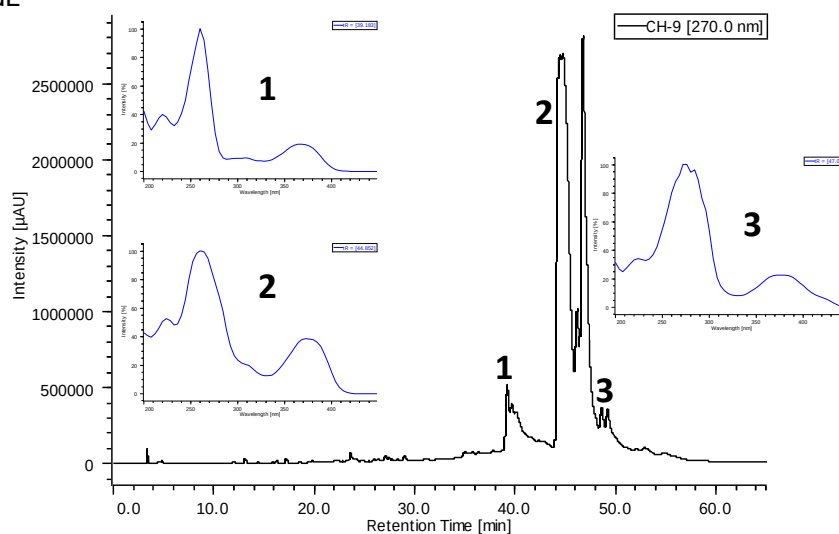
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das classes de substâncias presentes

O estudo preliminar realizado com o extrato AcOEt dos capítulos *P. planifolius* por HPLC-DAD forneceu o perfil químico apresentado no cromatograma da figura 30, sendo observada grande complexidade devido a coeluição de seus constituintes. A fim de se obter uma melhor resolução cromatográfica, realizou-se a mudança de alguns parâmetros como a fase móvel, a coluna e o método de gradiente obtendo o cromatograma da figura 31 com maior separação entre os picos.

Comparando-se os cromatogramas dos extratos AcOEt produzidos por fungos endofíticos associados aos capítulos de *P. planifolius* (Figuras 9 a 15) com o cromatograma do extrato AcOEt dos capítulos desta espécie nas mesmas condições cromatográficas (Figura 30), observamos que os perfis químicos apresentam-se diferentes. Os compostos que coeluem com tempo de retenção entre 40 a 50 minutos do cromatograma da figura 30 não estão presentes no extrato AcOEt produzidos pelos fungos endofíticos associados aos capítulos de *P. planifolius*, pois não são observados estes picos com seus respectivos tempos de retenção nos cromatogramas das figuras 9 a 15 referentes aos *fingerprints* dos endófitos isolados dos capítulos de *P. planifolius*.

Figura 30. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de *P. planifolius* (Coluna Phenomenex® SynergiHydro RP18 com 250 x 4,6 mm d.i., 4 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 5-100% B (60 min), volume de injeção de 15 µL



A otimização cromatográfica do perfil químico do extrato AcOEt dos capítulos desta espécie possibilitou uma melhor resolução cromatográfica (Figura 31), e assim

uma melhor avaliação dos espectros de absorção no UV referentes aos picos cromatográficos codificados como **Pp1**, **Pp2**, **Pp3** e **Pp4** do extrato AcOEt *P. planifolius* (Figura 32) que permitiu concluir que o extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* apresenta substâncias pertencentes à classe de naftopiranonas (VILEGAS et al., 1998)

Figura 31. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato AcOEt de *P. planifolius* (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Modo gradiente de 67-85% B (60 min), volume de injeção de 10 µL.

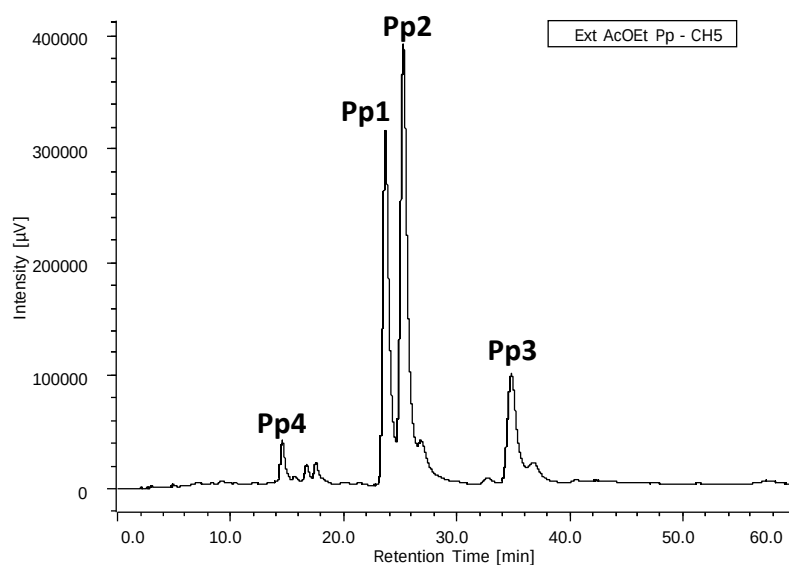
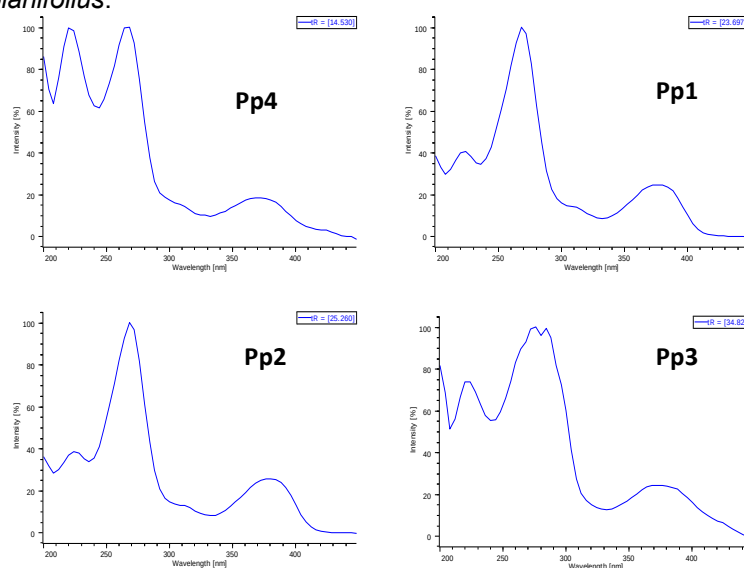


Figura 32. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos **Pp1**, **Pp2**, **Pp3** e **Pp4** do extrato AcOEt *P. planifolius*.



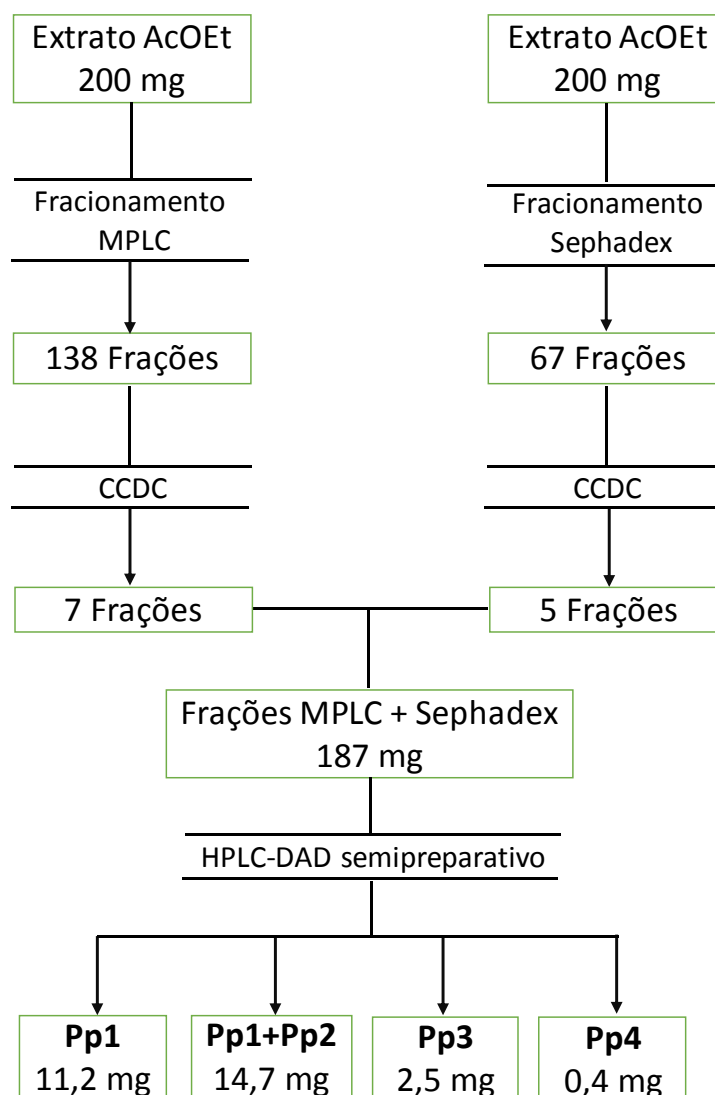
5.2. Fracionamento do extrato AcOEt de *P. planifolius* em Sephadex LH-20 e por MPLC

Devido a pouca massa de extrato (1,65 g) optou-se o fracionamento deste extrato de duas formas em escala reduzida. Após o fracionamento por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20) do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* seguindo a metodologia descrita no item 3.9, as frações foram reagrupadas de acordo com as suas semelhanças de coloração e R_f 's por CCDC (Figura 33). As frações apresentaram-se semelhantes por análise HPLC-DAD, sugerindo a possibilidade dos compostos apresentarem massas e polaridades próximas inviabilizando a separação por exclusão de tamanho.

Posteriormente, houve o fracionamento do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* utilizando cromatografia líquida de média pressão (MPLC) seguindo a metodologia descrita no item 3.10. As frações também se apresentaram semelhantes não obtendo um resultado satisfatório. Este fato pode ser justificado em razão à menor eficiência cromatográfica do MPLC em relação ao HPLC devido ao menor comprimento de coluna e maiores tamanhos de partícula aliados à provável elevada similaridade entre os componentes da mistura analisada.

Desta maneira, após as tentativas de fracionamento por cromatografia de permeação em gel usando Sephadex LH-20 e por MPLC, optou-se pelo reagrupamento das frações para não perder massa do extrato e assim, utilizadas para fracionamento por HPLC-DAD semipreparativo seguindo a metodologia descrita no item 3.11. Portanto, a partir de 187 mg (frações Sephadex+MPLC), realizou-se o fracionamento por HPLC-DAD semipreparativo resultando no isolamento de **Pp1** (11,2 mg), **Pp3** (2,5 mg), **Pp4** (0,4 mg) e uma fração em mistura de **Pp1+Pp2** (14,7 mg) (Figura 33).

Figura 33. Fluxograma representativo do fracionamento do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius*.

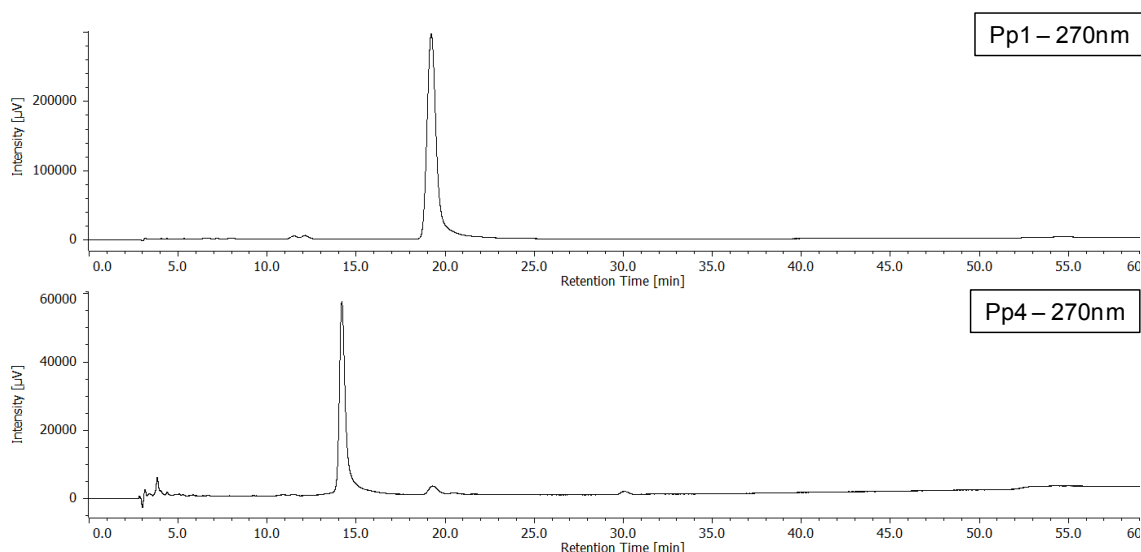


5.3. Identificação estrutural das substâncias

5.3.1. Substância **Pp1**

Após proceder a separação por HPLC-DAD semipreparativo da fração **Fr.MPLC+Sephadex**, o cromatograma da figura 34 evidenciou um único pico cromatográfico, com espectro de absorção no UV semelhantes para as substâncias **Pp1** ($t_r = 19,6$ min, $\lambda_{m\acute{a}x.} = 270$ e 372 nm) e substância **Pp4** ($t_r = 14,2$ min, $\lambda_{m\acute{a}x.} = 270$ e 368 nm) característicos de naftopiranonas (VILEGAS et al., 1998).

Figura 34. Cromatograma HPLC-DAD analítico das substâncias **Pp1** e **Pp4** (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 270 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 67-85% B (60 min), volume de injeção de 10 μ L.



O espectro de RMN de ^1H da substância **Pp1** (Apêndice 55) apresentou na região de hidrogênios aromáticos, um simpleto em δ 6,71 (1H, H-6) e um simpleto em δ 6,96 (1H, H-5) correspondente aos hidrogênios do anel B e C. Adicionalmente percebem-se sinais em δ 1,56 (3H, *d*, J = 6,0, H-11), δ 3,00 (2H, *m*, H-4), δ 3,86 (3H, *s*, H-12) e δ 4,77 (1H, *m*, H-3). Também evidenciou a presença de simpletos de hidroxilas nas regiões δ 9,78 (1H) e δ 13,78 (1H).

A identificação da substância **Pp1** (Figura 35) como sendo a substância vioxantina foi realizada pela interpretação dos dados contidos nos experimentos ^{13}C (Apêndice 56), HSQC (Apêndice 57), HMBC (Apêndice 58) e COSY 1D (Apêndice 59), comparando-os com a literatura (PROVOST; GARCIA, 1990; ALVARADO et al., 2013). A tabela 10 apresenta os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e as correlações dos experimentos HSQC e HMBC.

A detecção no espectro de massas de primeira ordem no modo positivo do íon da molécula protonada em m/z 547 $[\text{M}+\text{H}]^+$ é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$, e permitiu concluir o composto sendo o dímero simétrico da semi-vioxantina. A fragmentação de segunda ordem (MS/MS) do íon de m/z 547 levou aos íons produtos de m/z 529 $[\text{M}-18+\text{H}]^+$ e m/z 511 $[\text{M}-18-18+\text{H}]^+$ referentes às perdas consecutivas de moléculas de água, e ao pico base de m/z 274 referente

à perda de monômero, devido provavelmente à clivagem da união C8-C8' entre as duas unidades monoméricas da estrutura (Apêndices 60 e 61).

Figura 35. Substância **Pp1** e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).

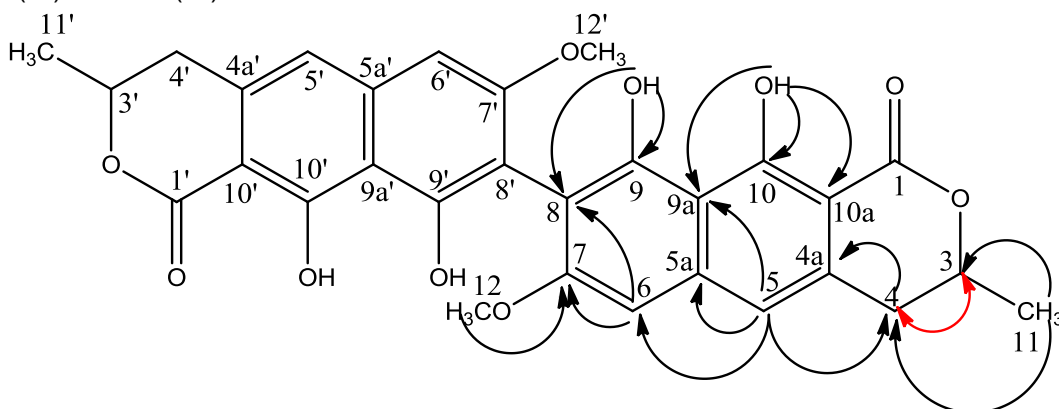


Tabela 10. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de **Pp1**, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

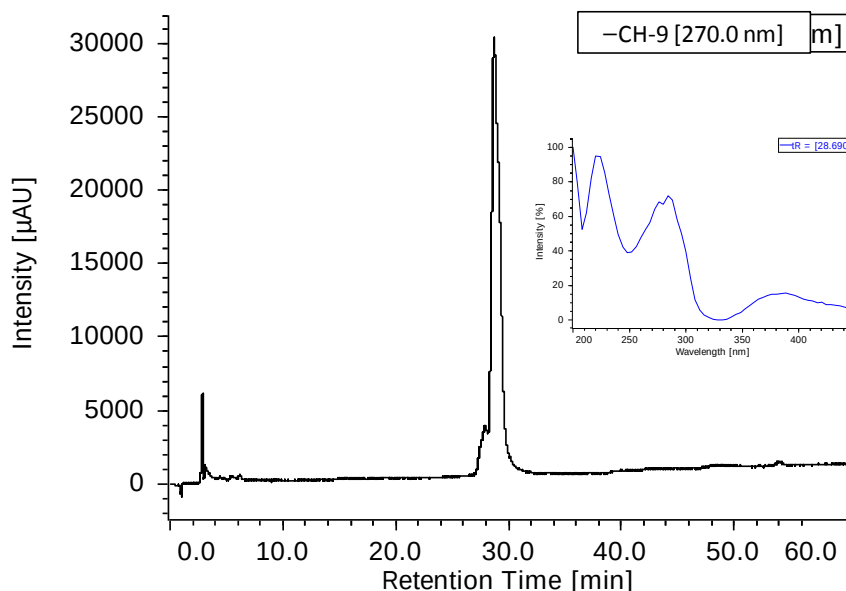
C/H	HSQC $^1J_{\text{CH}}$		HMBC $^nJ_{\text{CH}}$ $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	
1	171,7	—	—
3	76,7	4,77 <i>m</i>	133,0 (C-4a), 20,9 (C-11), 171,7 (C-1)
4	34,9	3,00 <i>m</i>	76,7 (C-3), 133,0 (C-4a), 99,4 (C-10a), 116,2 (C-5), 20,9 (C-11)
4a	133,0	—	—
5	116,2	6,96 <i>s</i>	98,2 (C-6), 34,9 (C-4), 108,6 (C-9a), 140,2 (C-5a)
5a	140,2	—	—
6	98,2	6,71 <i>s</i>	116,2 (C-5), 161,7 (C-7), 108,2 (C-8)
7	161,6	—	—
8	108,2	—	—
9 (OH)	155,5	9,70 <i>s</i>	108,2 (C-8), 155,5 (C-9)
9a	108,6	—	—
10 (OH)	162,9	13,78 <i>s</i>	99,4 (C-10a), 108,6 (C-9a), 162,9 (C-10)
10a	99,4	—	—
11 (CH ₃)	20,9	1,56 <i>d</i> (6,0)	34,9 (C-4), 76,7 (C-3)
12 (OCH ₃)	56,1	3,86 <i>s</i>	161,6 (C-7)

5.3.2. Substância **Pp3**

Após proceder a separação por HPLC-DAD semipreparativo foi realizada a análise por HPLC-DAD analítico da fração a qual se desejava a substância **Pp3**. O

cromatograma da figura 36 evidenciou um pico cromatográfico com $t_r = 28,7$ min e com espectro de absorção no UV com duas bandas: $\lambda_{\text{máx.}} = 280$ e 380 nm.

Figura 36. Cromatograma HPLC-DAD analítico da substância **Pp3** (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μm), $\lambda = 270$ nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 67-85% B (60 min), volume de injeção de 10 μL .



A proposta para a substância **Pp3** foi realizada com a análise dos experimentos de RMN de ^1H (Apêndice 62), ^{13}C (Apêndice 63), HSQC (Apêndice 64), HMBC (Apêndice 65) e COSY 1D (Apêndice 66). As tabelas 11 e 12 apresentam os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e as correlações dos experimentos HSQC e HMBC.

O espectro de RMN de ^1H apresentou na região de hidrogênios aromáticos, um simpleto em δ 6,72 (1H, H-6) e um simpleto em δ 6,97 (1H, H-5), deslocamentos equivalentes ao da substância **Pp1**. Adicionalmente, ainda apresentou um simpleto em δ 7,06 (1H, H-6') e um simpleto em δ 6,57 (1H, H-4') correspondente aos hidrogênios do anel A e C equivalentes aos deslocamentos encontrados no dímero da paepalantina isolados pela primeira vez dos extratos de *P. bromelioides* (COELHO et al., 2000).

Outros sinais característicos de dímeros da naftopiranonas foram observados em δ 1,56 (3H, *d*, $J = 6,0$, H-11), δ 2,31 (3H, *s*, H-11'), δ 3,00 (2H, *m*, H-4), δ 3,86 (3H, *s*, H-12), δ 3,90 (3H, *s*, H-12'), δ 3,92 (3H, *m*, H-13') e δ 4,77 (1H, *m*, H-3). Também ficou evidente a presença de sinais típicos de hidroxilas nas regiões δ 9,75 (2H), δ

13,44 (1H) e δ 13,80 (1H). Estes sinais nos permitiram sugerir que a substância **Pp3** (Figura 37) contém uma parte do dímero da paepalantina (COELHO et al., 2000) e outra parte da vioxantina (PROVOST; GARCIA, 1990; ALVARADO et al., 2013) unidas através de uma ligação C8-C8'. Esta afirmativa foi realizada devido à ausência na região de hidrogênios aromáticos dos dupletos em *meta* (H-8/H-6) que tornaria a possibilidade de termos as substâncias paepalantina e semi-vioxantina em mistura.

Análise por espectrometria de massas em alta resolução mostrou no espectro de massas de primeira ordem no modo negativo o íon da molécula desprotonada em m/z 573,1367 $[M-H]^-$ (Figura 38), compatível com a fórmula molecular $C_{31}H_{26}O_{11}$ (Calculado m/z 573,1391). Fragmentação no espectro de MS/MS (Figura 35), do íon de m/z 573,1367 levou ao pico base de m/z 558,1115 evidenciando a perda de metila $[M-15-H]$, esta fragmentação perdendo radical metila é encontrada em compostos de naftopiranonas em modo negativo de ionização (AMARAL et al., 2012).

No espectro de massas de primeira ordem, ainda observou-se outros sinais de íons intensos com m/z 278,5552 e m/z 621,1565 possivelmente de interferentes na amostra. Pode-se concluir que o íon de m/z 278,5552 observados no espectro de primeira ordem não é proveniente da fragmentação da molécula **Pp3**, pois não foi observado no espectro MS/MS sinal representativo deste íon.

Figura 37. Substância **Pp3** e suas principais correlações observadas nos mapas de contornos de HMBC ($\rightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).

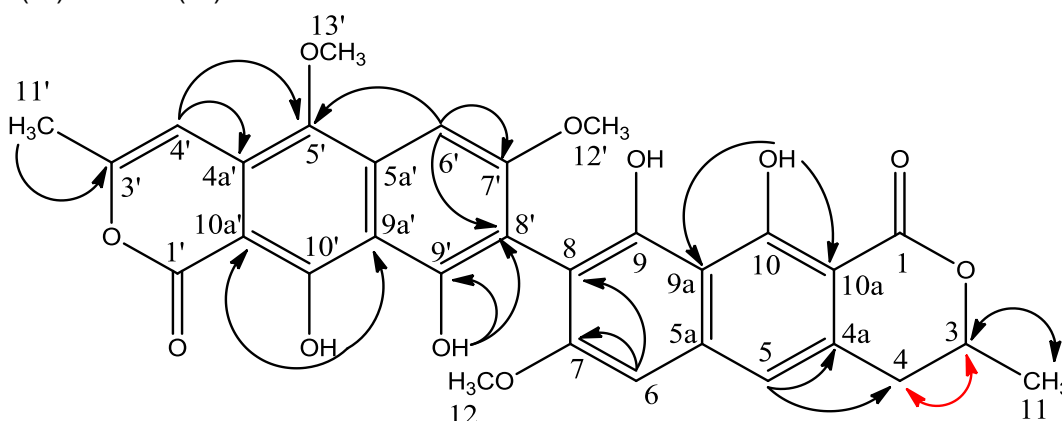


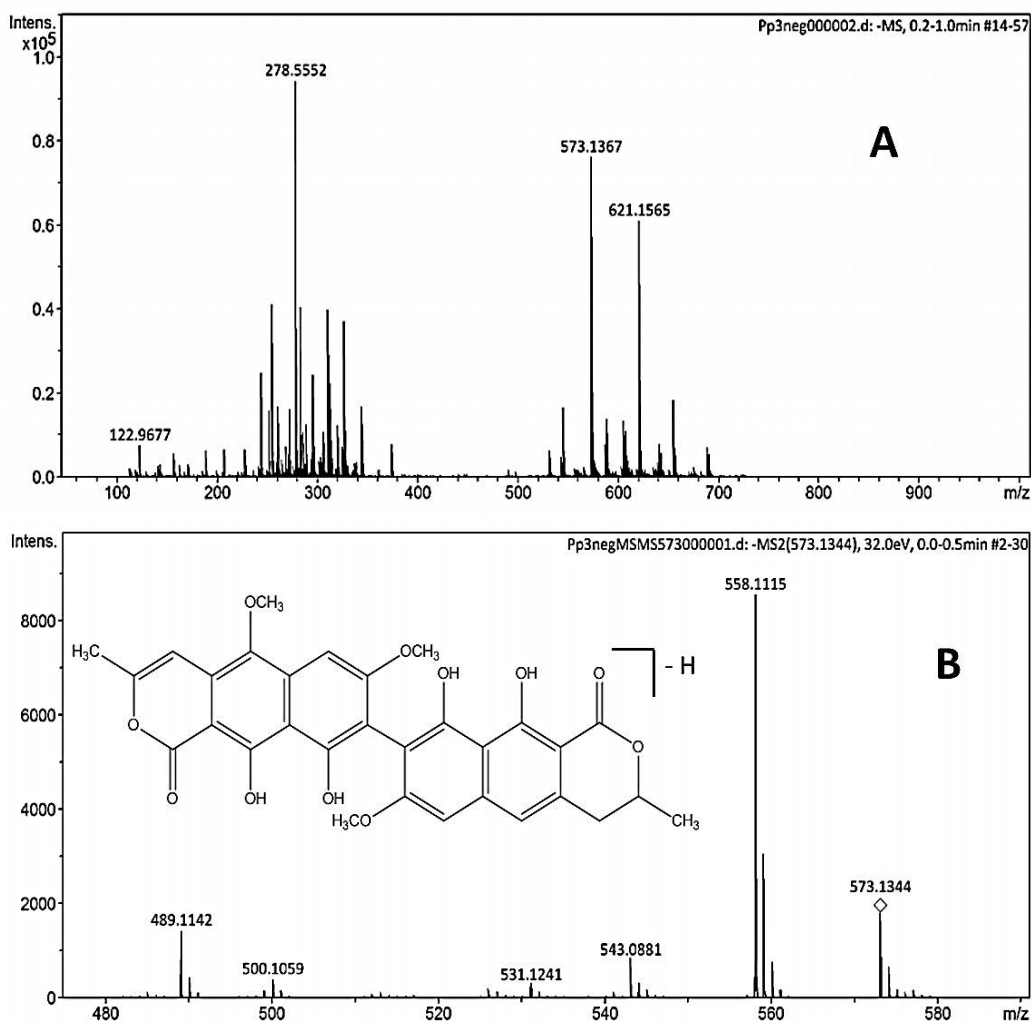
Tabela 11. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de **Pp3**, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC, em $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

HSQC $^1J_{\text{CH}}$			HSQC $^1J_{\text{CH}}$		
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	171,7	—	1'	168,4	—
3	76,7	4,77 <i>m</i>	3'	152,4	—
4	34,9	3,00 <i>m</i>	4'	99,5	6,57 <i>s</i>
4a	133,1	—	4a'	122,3	—
5	116,2	6,97 <i>s</i>	5'	140,6	—
5a	140,2	—	5a'	135,6	—
6	98,2	6,72 <i>s</i>	6'	92,4	7,06 <i>s</i>
7	161,5	—	7'	162,0	—
8	108,6	—	8'	108,6	—
9 (OH)	155,5	9,75 <i>s</i>	9' (OH)	155,9	9,75 <i>s</i>
9a	108,5	—	9a'	108,8	—
10 (OH)	162,9	13,80 <i>s</i>	10' (OH)	158,9	13,44 <i>s</i>
10a	99,4	—	10a'	96,9	—
11 (CH ₃)	20,9	1,56 <i>d</i> (6,0)	11' (CH ₃)	19,8	2,31 <i>s</i>
12 (OCH ₃)	56,1	3,85 <i>s</i>	12' (OCH ₃)	56,2	3,90 <i>s</i>
			13' (OCH ₃)	62,0	3,92 <i>s</i>

Tabela 12. Dados de **Pp3** obtidos nos mapas de contornos HMBC, em $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$.

C/H	HMBC $^nJ_{\text{CH}}$	
	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$	
4	76,7 (C-3), 133,1 (C-4a), 99,4 (C-10a), 116,2 (C-5)	
5	34,9 (C-4), 108,5 (C-9a), 98,2 (C-6), 140,2 (C-5a), 99,4 (C-10a)	
6	116,2 (C-5), 161,5 (C-7), 108,6 (C-8)	
9 (OH)	108,5 (C-9a), 155,5 (C-9)	
10 (OH)	99,4 (C-10a), 108,5 (C-9a), 162,9 (C-10)	
11 (CH ₃)	34,9 (C-4), 76,7 (C-3)	
12 (OCH ₃)	161,5 (C-7)	
4'	19,8 (C-11'), 96,9 (C-10a'), 140,6 (C-5'), 152,4 (C-3')	
6'	108,6 (C-8'), 140,6 (C-5'), 162,1 (C-7')	
9' (OH)	108,6 (C-8'), 155,9 (C-9')	
10' (OH)	96,9 (C-10a'), 108,8 (C-9a'), 158,9 (C-10')	
11' (CH ₃)	99,5 (C-4'), 152,4 (C-3'), 122,3 (C-4a')	
12' (OCH ₃)	162,1 (C-7')	
13' (OCH ₃)	140,6 (C-5')	

Figura 38. Espectro de massas de alta resolução de **Pp3** em modo negativo de ionização: *full-scan* (A) e MS/MS (B).



5.4. Atividade antibacteriana e antifúngica

A atividade antimicrobiana foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Tais Maria Bauab da FCFAr, seguindo o procedimento experimental conforme o item 3.12.

Os antimicrobianos são fármacos utilizados no tratamento de infecções microbianas na medicina humana e veterinária (ARIAS; CARRILHO, 2012). Podem ser representados por compostos naturais ou sintéticos que tem a capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias, podendo ser classificados como fungistáticos/bacteriostáticos ou fungicidas/bacteriocidas, respectivamente (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os resultados do método de microdiluição apresentaram valores para CIM > 1000 µg/mL para atividade antifúngica contra *C. albicans* para o extrato AcOEt dos

capítulos de *P. planifolius* (**Ext. Pp**) e a substância isolada Vioxantina (**Pp1**). Porém, ambos apresentaram uma forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* com valores de CIMs de 7,8 µg/mL (Tabela 13) segundo a classificação de Aligiannis et al. (2001), sendo que a substância **Pp1** é bacteriocida na concentração de 250 µg/mL para *S. aureus* (Tabela 14). Estes resultados sugerem que a substância **Pp1** seja a possível responsável pela atividade inibitória apresentada pelo extrato para *S. aureus*.

Para *E. coli* e *S. setubal*, tanto a substância **Pp1** quanto o extrato **Ext. Pp** apresentaram-se bacteriostáticas na faixa de 500 – 1000 µg/mL, mas apenas nas concentrações de 1000 µg/mL são bacteriocidas. O extrato **Ext. Pp** apresentou-se mais bacteriostática em relação à substância **Pp1** contra *S. setubal*, este resultado pode estar associado ao sinergismo entre as substâncias presentes na matriz do extrato que possibilita uma maior atividade em relação às substâncias isoladamente. As tabelas 13 e 14 mostram os resultados obtidos.

Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* (**Ext. Pp**) e da vioxantina (**Pp1**).

Amostras Avaliadas	CIM ^a			
	Bactéria Gram-negativa		Bactéria Gram-positiva	Levedura
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ext. Pp	500	500	7,8	–
Pp1	500	1000	7,8	–

^a valores em µg/mL; (–) CIM > 1000 µg/mL

Tabela 14. Concentrações Bactericida ou Fungicida Mínima do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* (**Ext. Pp**) e da vioxantina (**Pp1**).

Amostras Avaliadas	CBM ^a			CFM ^a
	Bactéria Gram-negativa		Bactéria Gram-positiva	Levedura
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ext. Pp	1000	1000	500	–
Pp1	1000	1000	250	–

^a valores em µg/mL; (–) CBM > 1000 µg/mL; CFM > 1000 µg/mL.

6. CONCLUSÃO

Conforme mencionado anteriormente, o estudo da associação endófito-Eriocaulaceae ainda não apresenta dados na literatura, o que nos levou à investigação iniciando com a espécie *P. planifolius*. O trabalho realizado para isolamento, purificação e preservação dos endófitos de *P. planifolius* resultou no isolamento de dezesseis linhagens de fungos, sendo que sete destes são provenientes dos capítulos de *P. planifolius*.

O gênero *Anthostomella* apresenta apenas dois estudos descritos na literatura e o estudo químico dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico *A. brabeji* em meio de cultivo PDB conduziu à elucidação de uma nova substância, 6,7,8-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-croman-4-ona (**Ab4**) e à identificação de outras três, conhecidas como 6-hidroxi-2,2-dimetil-5,6,7,8-tetraidro-7,8-epoxicroman-4-ona (**Ab1**), Sicaina (**Ab2**) e Eutipinol (**Ab3**). A literatura recente não reporta a presença destas substâncias, derivados de fenólicos acetilênicos e derivados de cromanona, no gênero *Anthostomella*. Os resultados antimicrobianos destas substâncias mostraram bons resultados contra *S. setubal*, *S. aureus* e *C. albicans*, uma vez que o extrato de *A. brabeji* (**Ext.Ab**) e as substâncias isoladas mostraram inibição potencial em concentrações que variam de 1000 – 31,25 µg/mL.

O isolamento da substância inédita **Ab4** sugere a necessidade de estudos químicos com esse gênero de fungo variando os meios de cultivo como perspectivas futuras assim como dos endófitos isolados da associação endófito – *P. planifolius*.

Finalmente, esperamos que a abordagem proposta neste trabalho possa contribuir para o estudo de outras espécies do gênero *Anthostomella*, propiciando uma estratégia rápida e importante para o reconhecimento da composição química.

Paralelamente, o estudo químico do extrato AcOEt dos capítulos de *P. planifolius* (**Ext. Pp**) permitiu à identificação da Vioxantina (**Pp1**) e à elucidação de um novo dímero de naftopiranona, nomeada como Planifolina B (**Pp3**). O estudo biológico de **Ext. Pp** apresentou uma alta inibição para a bactéria *S. aureus* com concentração inibitória mínima de 7,8 µg/mL. Essa alta atividade antibacteriana pode estar associada pela presença da substância **Pp1** que, isolada, também apresentou o mesmo valor de concentração inibitória mínima para *S. aureus*, sugerindo-a como responsável por essa inibição no extrato para *S. aureus*.

É importante destacar que os metabólitos isolados e identificados dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos, até o momento, demonstraram-se diferentes dos metabólitos identificados do extrato dos capítulos da espécie vegetal estudada neste trabalho, assim como os já relatados na literatura para o gênero *Paepalanthus*.

Como perspectivas futuras, propõem-se a continuidade do estudo biológico de **Ext. Pp** para outras linhagens de bactéria e fungos, uma vez que o extrato demonstrou-se promissor, e a continuidade do estudo químico para identificação e/ou elucidação das outras substâncias presentes no extrato responsáveis por essas atividades para complementar e entender os resultados biológicos.

REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALVARADO, J. G.; ABAD-REYES, J. A.; MONTEALEGRE, R.; AMARO-LUIS, J. M. Naphthopyranones from rhizomes of *Paepalanthus diffissus*. **Avances en Química**, v. 8, n. 3, p. 131-138, 2013.
- AMARAL, F. P.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; SANTOS, L. C.; FESTA, M.; VILEGAS, W.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. HPLC-ESIMSⁿ profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 547-556, 2012.
- ANDRADE, L. E. **Sistemática de Comanthera e de Syngonanthus (Eriocaulaceae)**. 2012. 294 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ANDRADE, M. J. G. de; GIULIETTI, A. M.; van den BERG, C.; HARLEY, R. M. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 775-790, 2012.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites—a personal view. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-26, 2005.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M7-A6**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Wayne, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A3**: reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts. 3rd ed. Wayne, 2008.
- COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. A new cytotoxic naphthopyranone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 497-500, 2000.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1, p. 89-97, 2008.

COWLING, R.; RICHARDSON, D. **Fynbos**: South Africa's unique floral kingdom. Vlaeberg: Fernwood Press, 1995.

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.

EATON, C. J.; COX, M. P.; SCOTT, B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? **Plant Science**, v. 180, p. 190-195, 2011.

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

HALLMAN, J.; QUARDT, H. A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

ISHIBASHI, K.; NOSE, K.; SHINDO, T.; ARAI, M.; MISHIMA, H. Siccayne: acetylenic metabolite of *Helminthosporium siccans*. **Sankyo Kenkyusho Nempo**, v. 20, p. 76-79, 1968.

IZUMIKAWA, M.; ITOH, M.; KAWAHARA, T.; SAKATA, N.; TSUCHIDA, T.; MIZUKAMI, T.; SHIN-YA, K. A highly oxygenated ergostane-MBJ-0005-from *Anthostomella eucalyptorum* f25427. **Journal of Antibiotics**, v. 67, p. 843-845, 2014.

JIMENEZ-TEJA, D.; HERNANDEZ-GALAN, R.; COLLADO, I. G. Metabolites from *Eutypa* species that are pathogens on grapes. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 108-116, 2005.

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

KIM, J. H.; MAHONEY, N.; CHAN, K. L.; MOLYNEUX, R. J.; CAMPBELL, B. C. Secondary metabolites of the grapevine pathogen *Eutypa lata* inhibit mitochondrial respiration based on a model bioassay using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 49, p. 282-287, 2004.

KUPKA, J.; ANKE, T.; STEGLICH, W.; ZECHLIN, L. The biological activity of siccayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa*. **Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 298-304, 1981.

LIU, S.; GUO, L.; CHE, Y.; LIU, L. Pestaloficiols Q–S from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Fitoterapia**, v. 85, p. 114-118, 2013.

MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E.; OROPEZA, F.; DUARTE, G.; GONZÁLEZ, M. C.; GLENN, A. E.; HANLIN, R. T.; ANAYA, A. L. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodora yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 1122-1131, 2010.

MANLY, S. P.; PADMANABHA, R.; LOWE, S. E. Natural products or not? How to screen for natural products in the emerging HTS paradigm. In: JANZEN, W. P. (Ed.). **High throughput screening: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 2002. v. 190, chap. 9, p.153-168.

MONTEIRO, W. R.; MAZZONI, S. C. Aspectos morfológicos em ápice de inflorescências de Eriocaulaceae. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo**, v. 4, p. 23-29, 1976.

LEE, S.; CROUS, P. W. New species of *Anthostomella* on fynbos, with a key to the genus in South Africa. **Mycological Research**, v. 107, n. 3, p. 360-370, 2003.

PIRES, C. A. S.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemistry Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005.

PROVOST, I.; GARCIA, M. First report on the isolation of viioxanthin from a plant source: occurrence in *Paepalanthus* species. **Planta Medica**, v. 56, p. 647, 1990.

REKHA; JYOTI, K.; BALA, M.; ARYA, V. Endophytic fungus: a potential source of biologically synthesized nanoparticle. **Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2013.

RENOUD, J. M.; TSOUPRAS, G.; TABACCHI, R. Biologically active natural acetylenic compounds from *Eutypa lata* (Pers:F.) Tul. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, p. 929-932, 1989.

RENOUD, J. M.; TSOUPRAS, G.; STOECKLI-EVANS, H.; TABACCHI, R. A novel allenic epoxycyclohexane and related compounds from *Eutypa lata* (Pers: F.) Tul. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, p. 1262-1267, 1989.

RUHLAND, W. Eriocaulaceae. In: ENGLER, A. (Ed.). **Das pflanzenreich: regni vegetabilis conspectus**. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1903. v. 13, p. 1-294.

SANTOS, L. C.; HONDA, N. K.; CARLOS, I. Z. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by brazilian lichens. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 473-479, 2004.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; DE RICCARDIS, F.; ELETTO, A. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Xanthones and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 853-856, 2001.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1635-1639, 2007.

STADLER, M.; KUHNERT, E.; PERSOH, D.; FOURNIER, J. The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the "One Fungus-One Name" (1F1N) concept. **Mycology**, v. 4, n. 1, p. 5-21, 2013.

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

TSOUPRAS, G.; DE ANGELIS, P.; ZESIGER, T.; RENOUD, J. M.; TABACCHI, R. Biologically-active natural acetylenes from the culture medium of *Eutypa lata*. **Bioactive Molecules**, v. 7, p. 93-100, 1988.

VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299-2301, 1990.

VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ALÉCIO, A. C.; PIACENTE, S.; DEPAUW, A.; SANO, P. T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 273, p. 207-210, 1998.

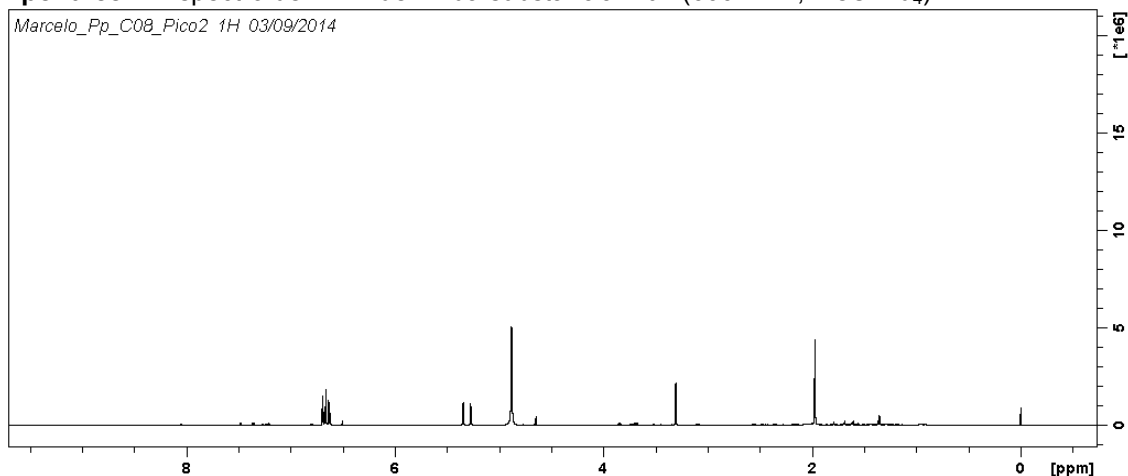
WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

ZANUTTO, F. V.; BOLDRIN, P. K.; VARANDA, E. A.; SOUZA, S. F.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSⁿ and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, p. 244-262, 2013.

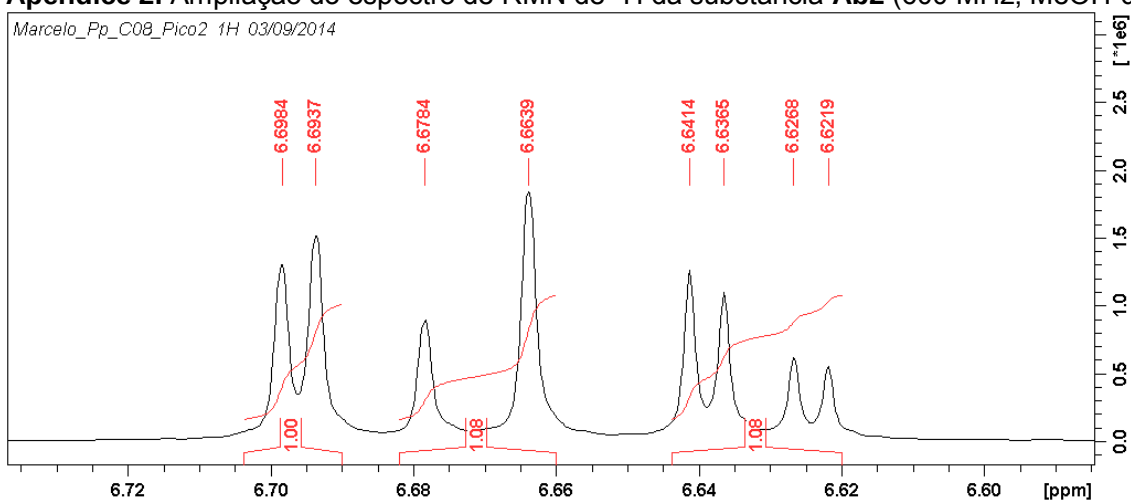
ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.

APÊNDICE

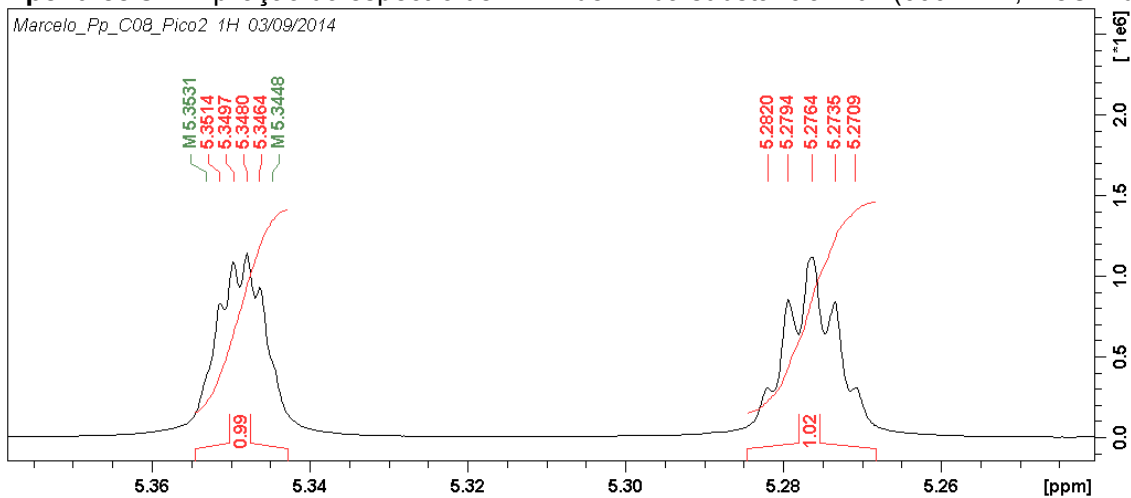
Apêndice 1. Espectro de RMN de ^1H da substância **Ab2** (600 MHz, MeOH- d_4).



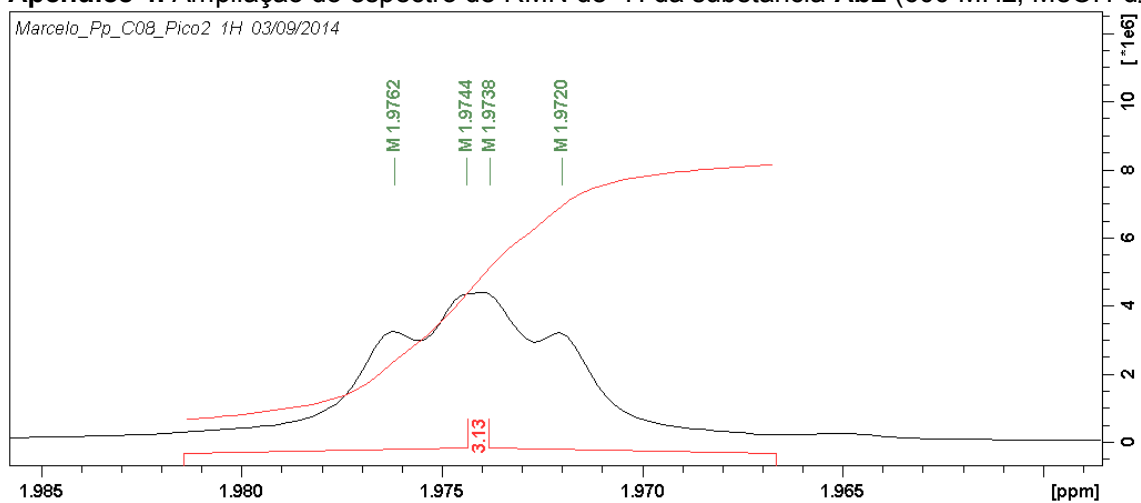
Apêndice 2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab2** (600 MHz, MeOH- d_4).



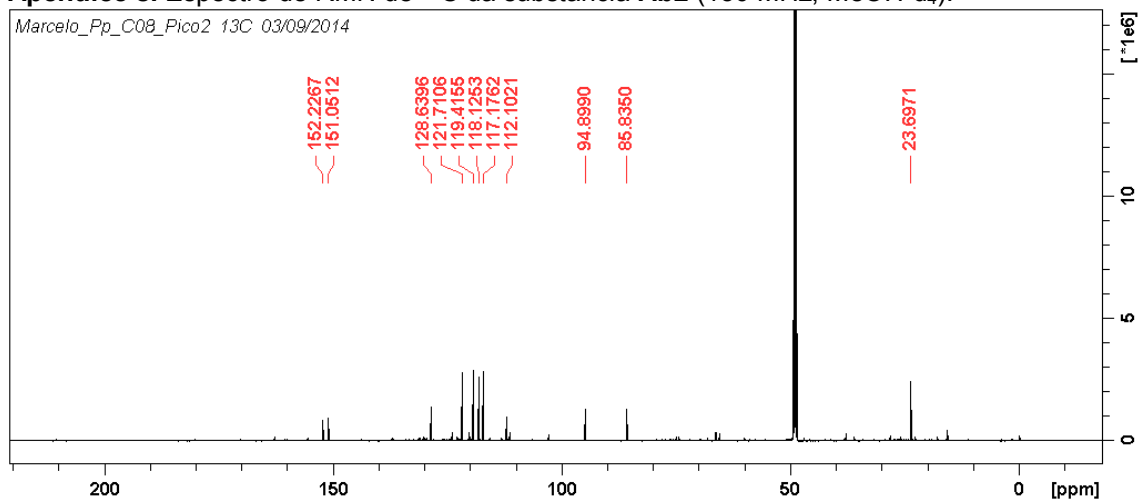
Apêndice 3. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab2** (600 MHz, MeOH- d_4).



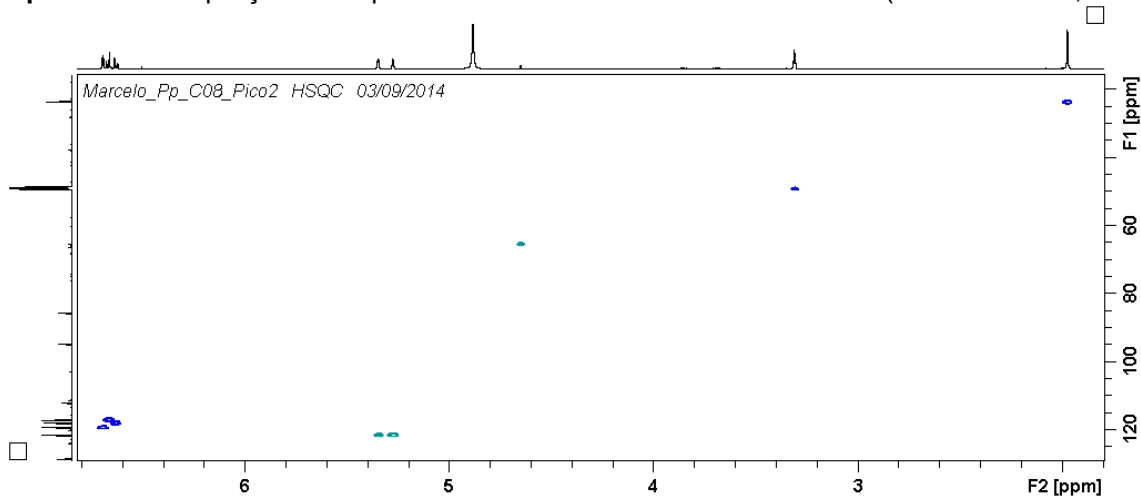
Apêndice 4. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab2** (600 MHz, MeOH-d_4).



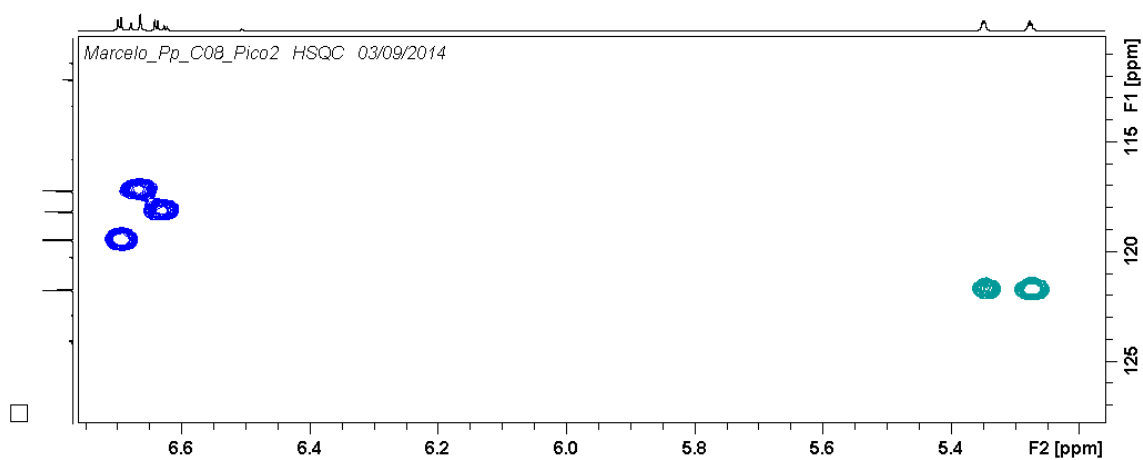
Apêndice 5. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Ab2** (150 MHz, MeOH-d_4).



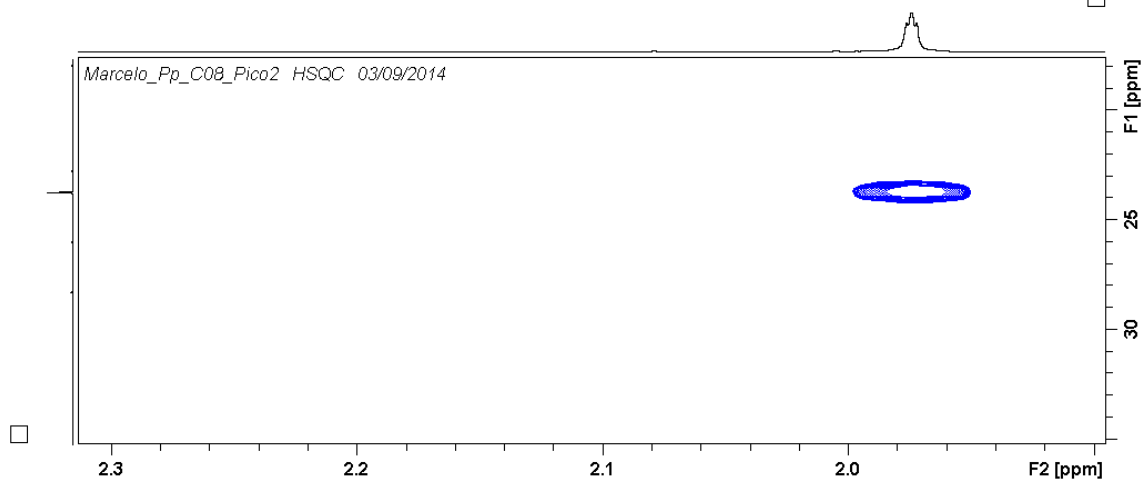
Apêndice 6. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab2** (600 e 150 MHz, MeOH-d_4).



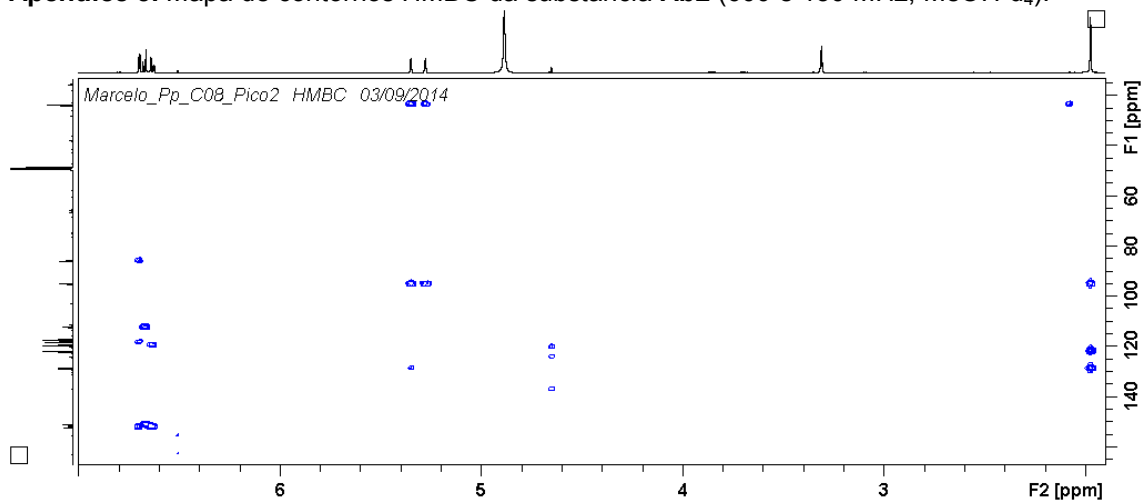
Apêndice 7. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab2** (600 e 150 MHz, MeOH-d₄).



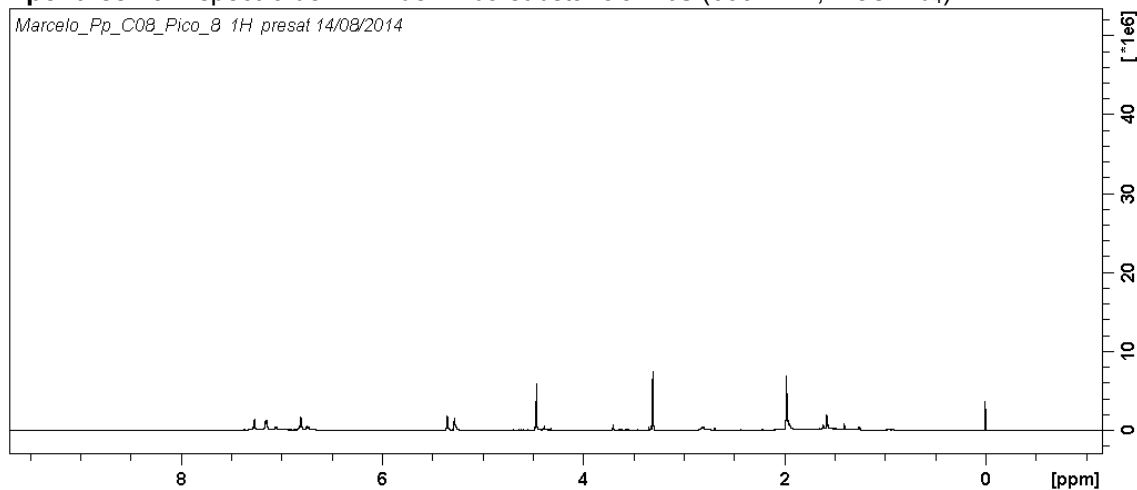
Apêndice 8. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab2** (600 e 150 MHz, MeOH-d₄).



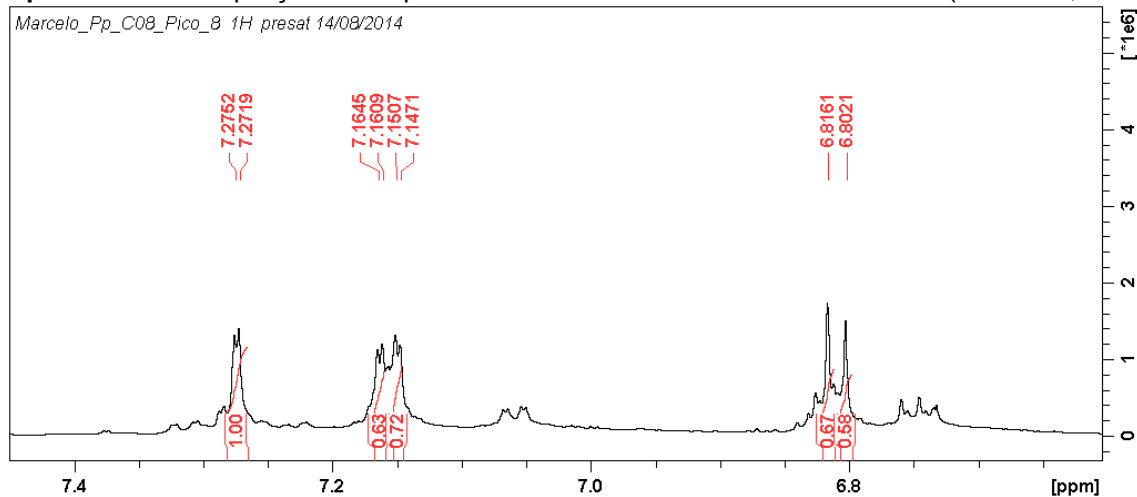
Apêndice 9. Mapa de contornos HMBC da substância **Ab2** (600 e 150 MHz, MeOH-d₄).



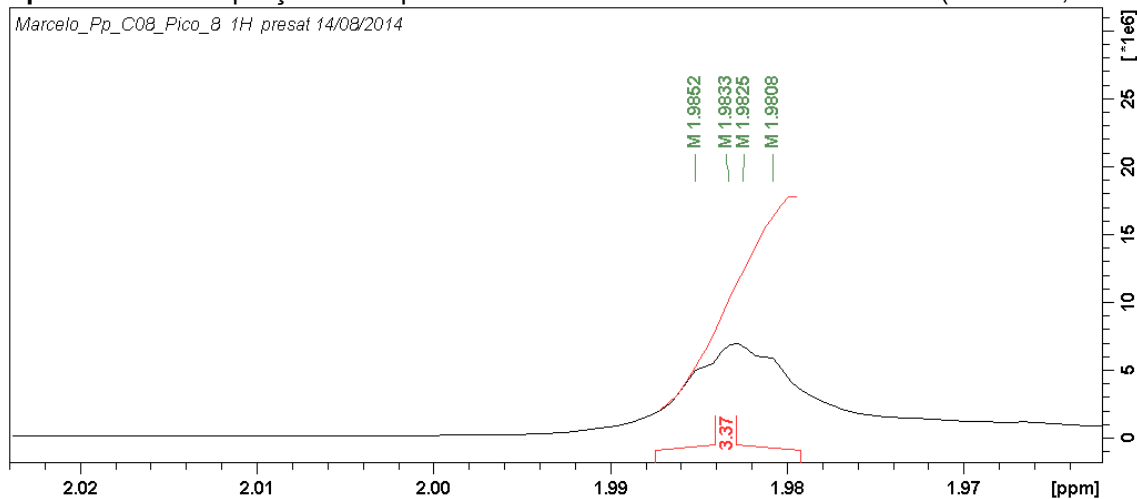
Apêndice 10. Espectro de RMN de ^1H da substância **Ab3** (600 MHz, MeOH- d_4).



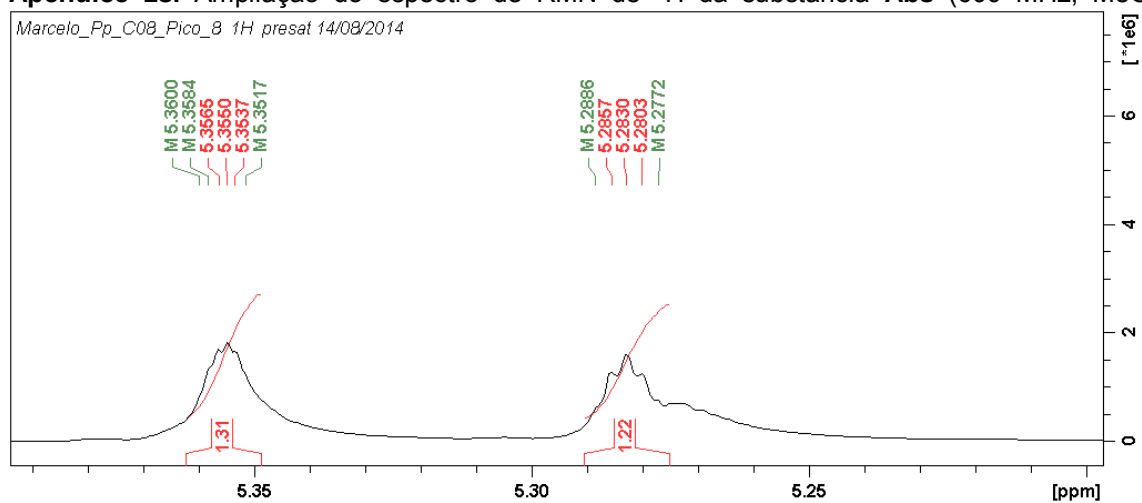
Apêndice 11. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab3** (600 MHz, MeOH- d_4).



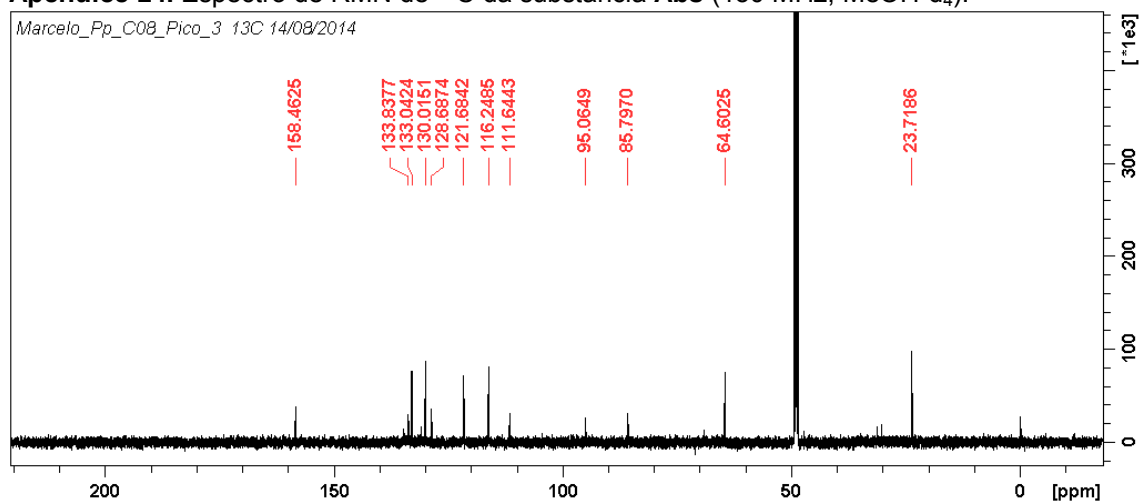
Apêndice 12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab3** (600 MHz, MeOH- d_4).



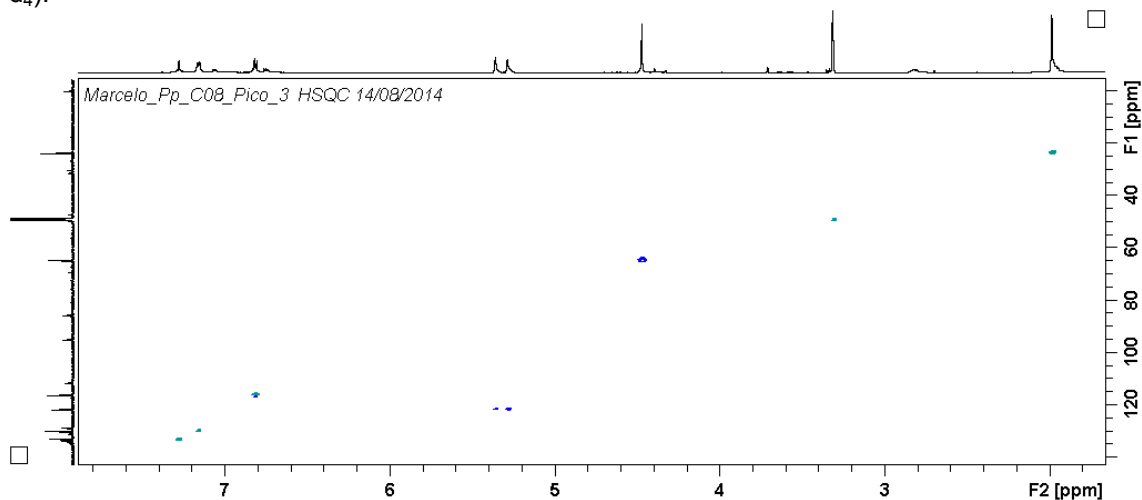
Apêndice 13. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab3** (600 MHz, MeOH-d_4).



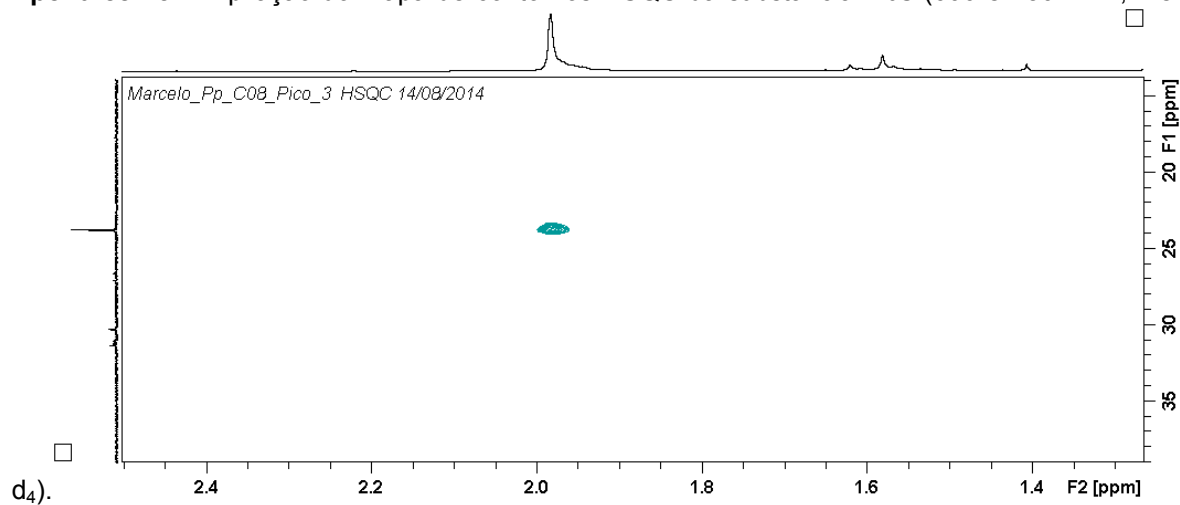
Apêndice 14. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Ab3** (150 MHz, MeOH-d_4).



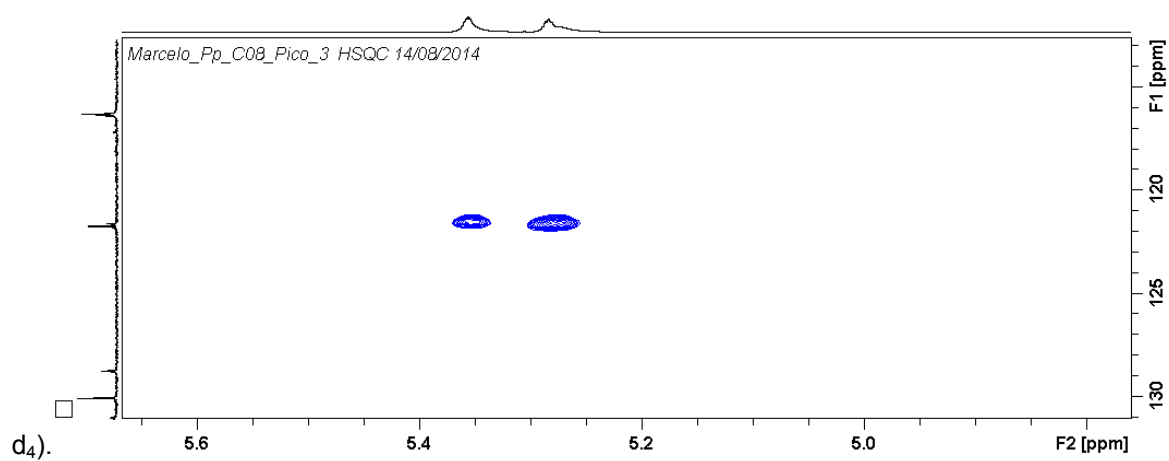
Apêndice 15. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab3** (600 e 150 MHz, MeOH-d_4).



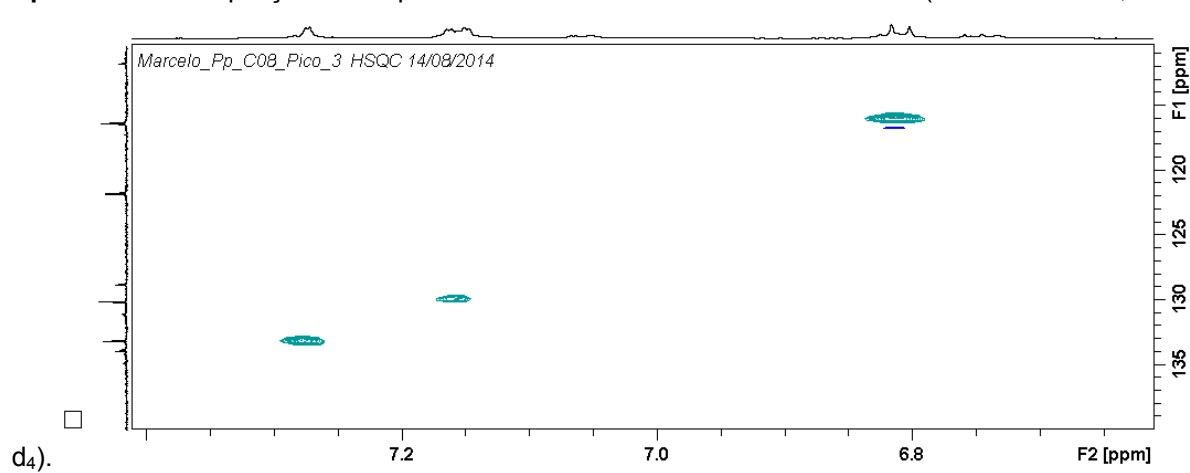
Apêndice 16. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab3** (600 e 150 MHz, MeOH-



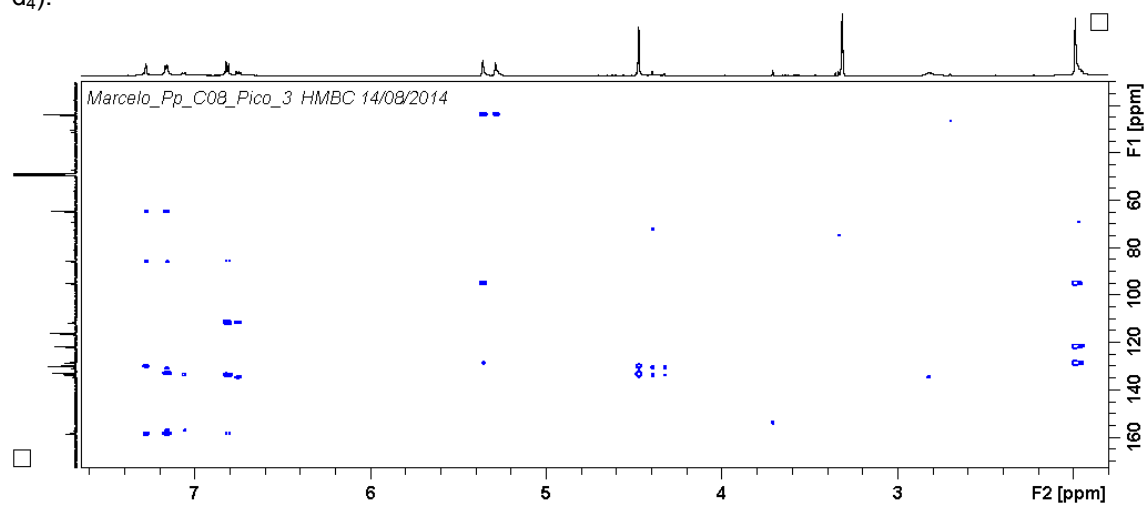
Apêndice 17. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab3** (600 e 150 MHz, MeOH-



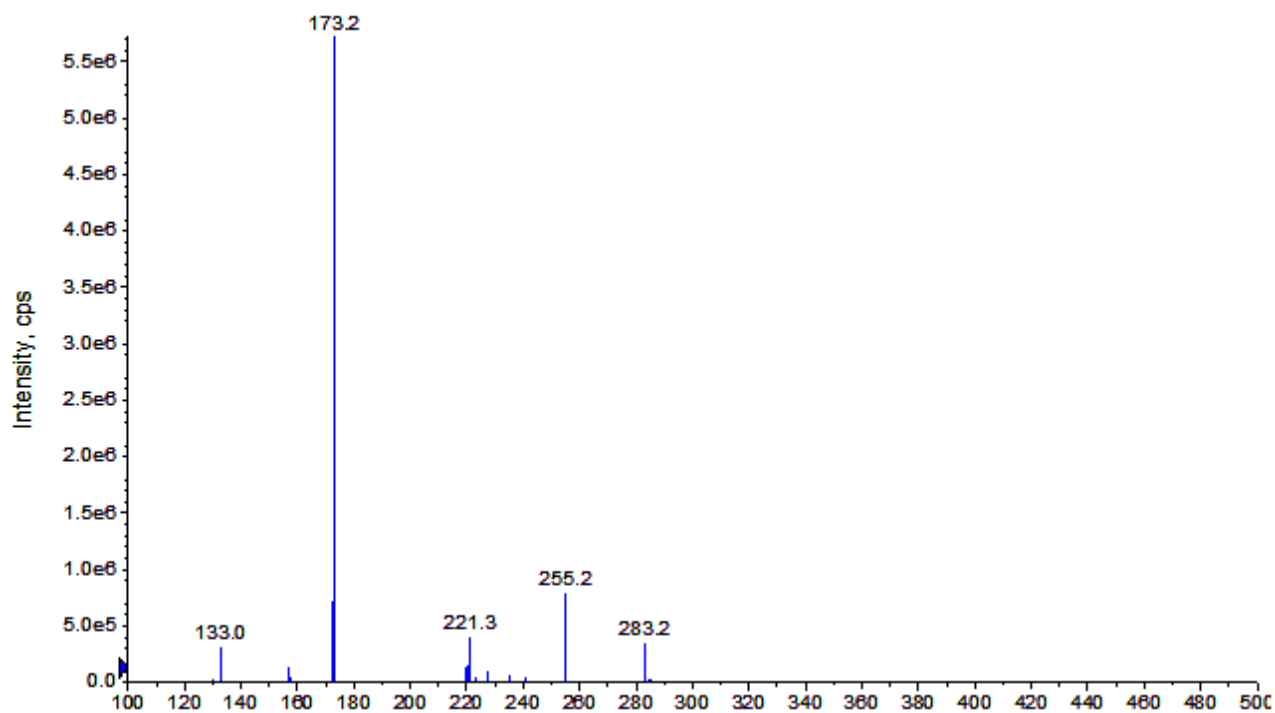
Apêndice 18. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab3** (600 e 150 MHz, MeOH-



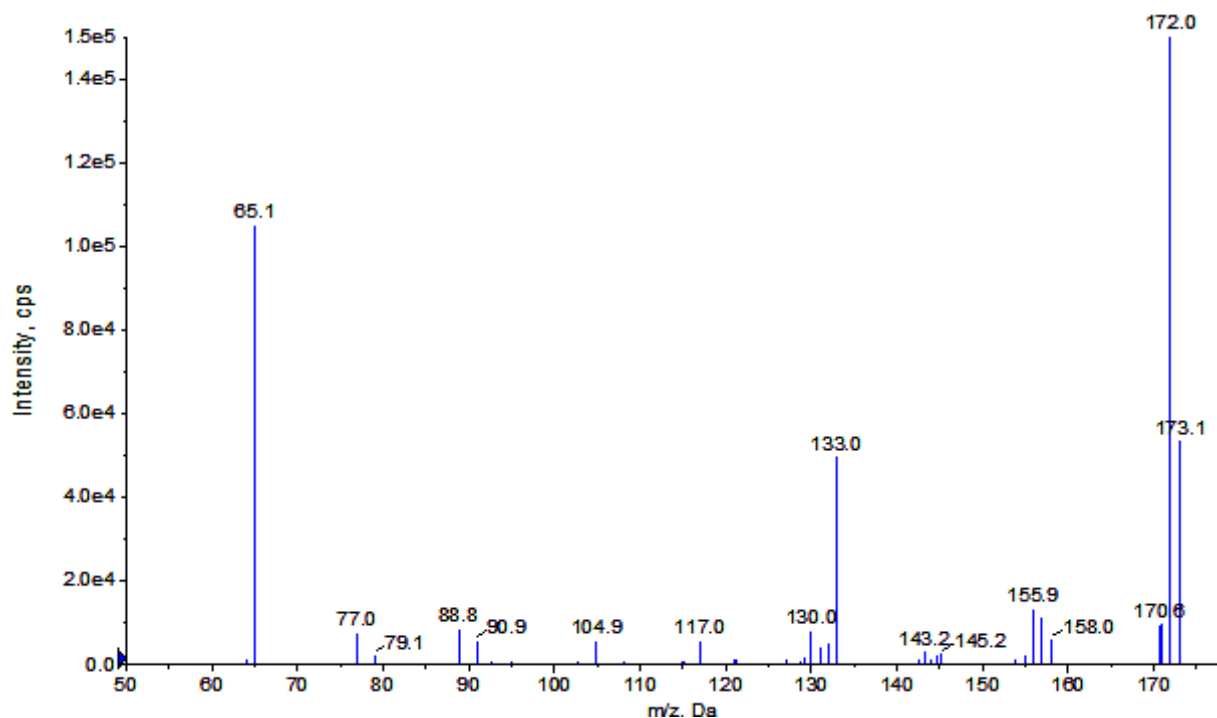
Apêndice 19. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **Ab3** (600 e 150 MHz, MeOH- d_4).



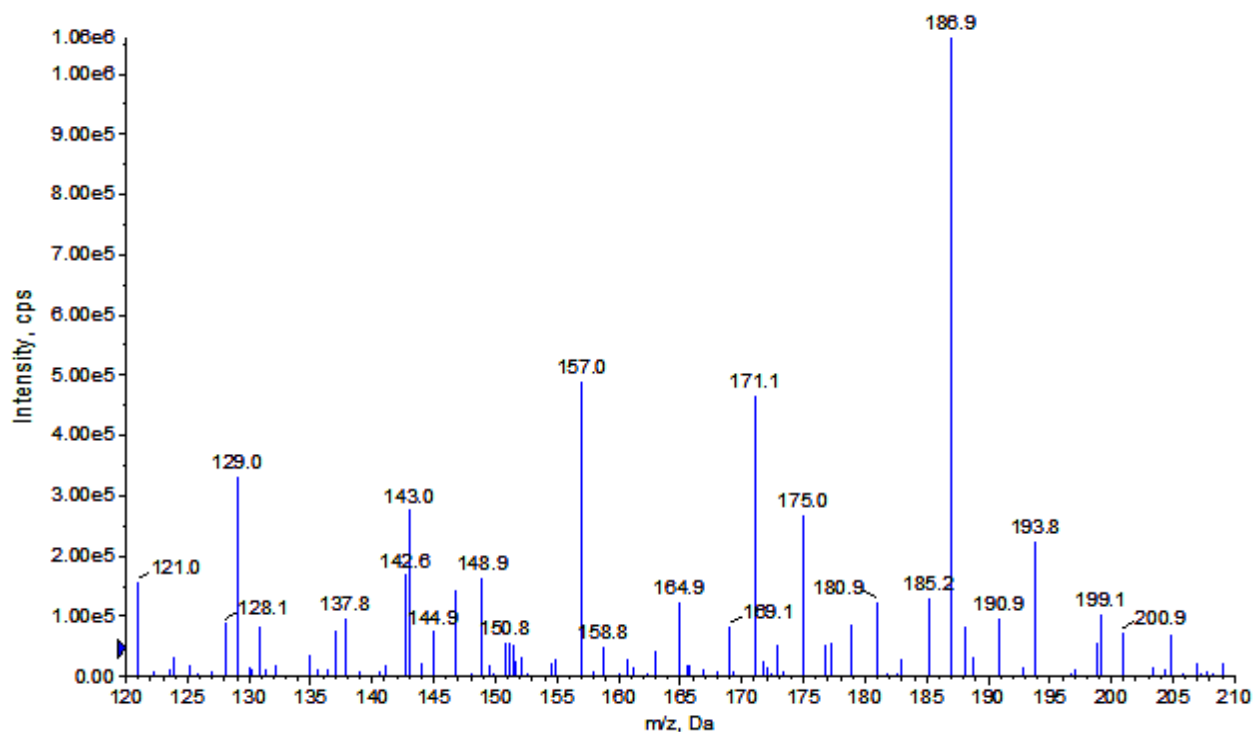
Apêndice 20. Espectro de massas *full scan* no modo negativo de ionização da substância **Ab2**.



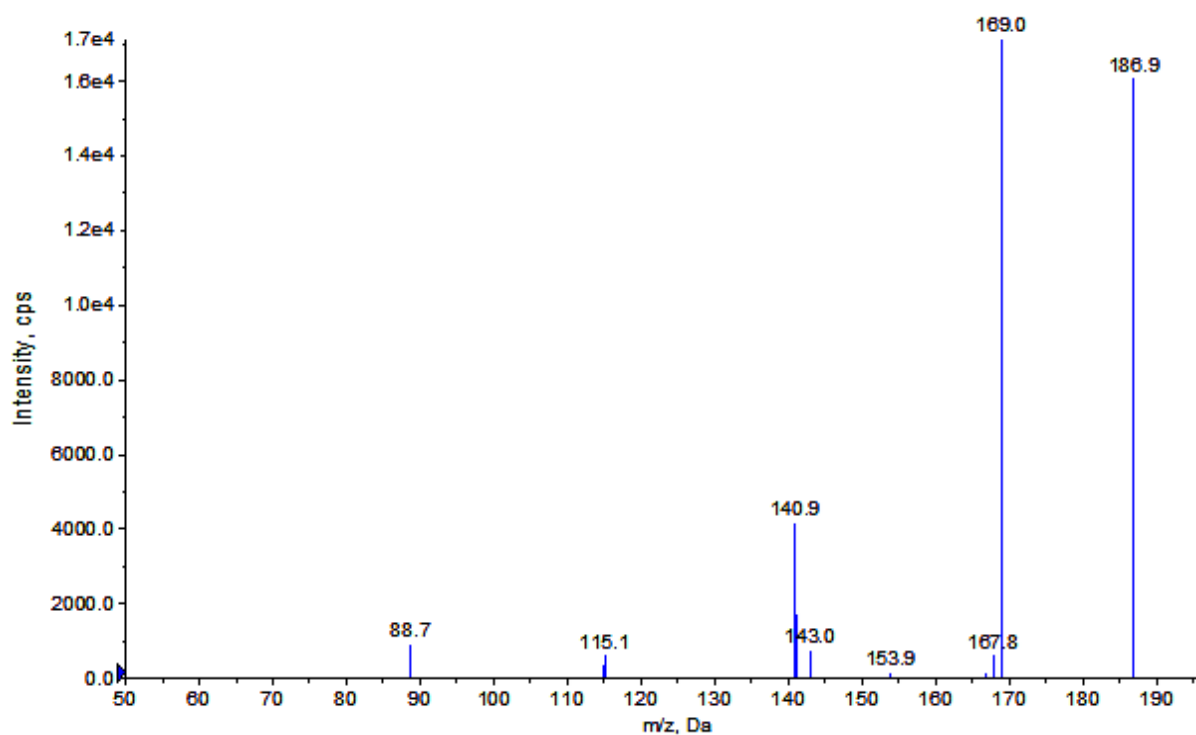
Apêndice 21. Espectro de massas de segunda-ordem, em modo negativo, do íon precursor de m/z 173.



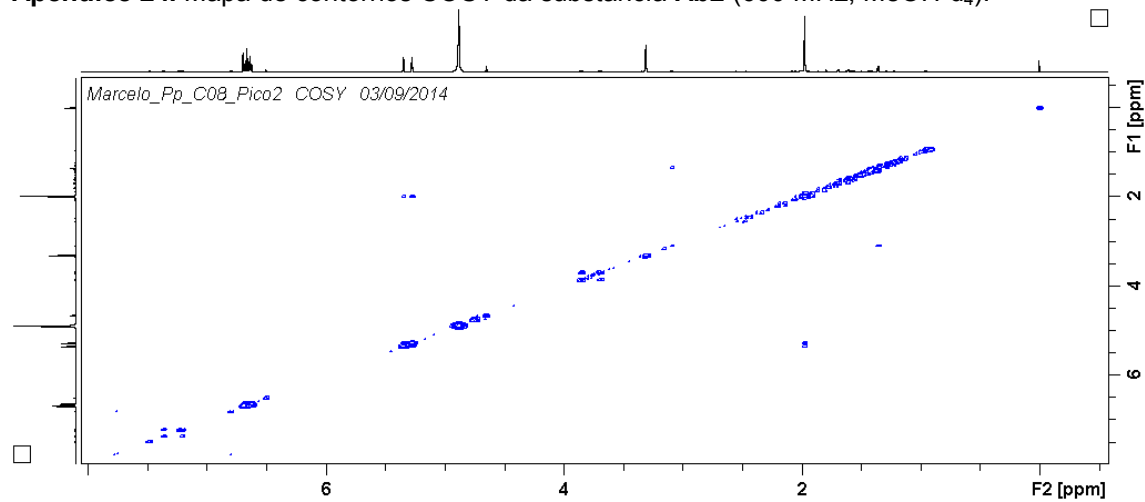
Apêndice 22. Espectro de massas *full scan* no modo negativo de ionização da substância **Ab3**.



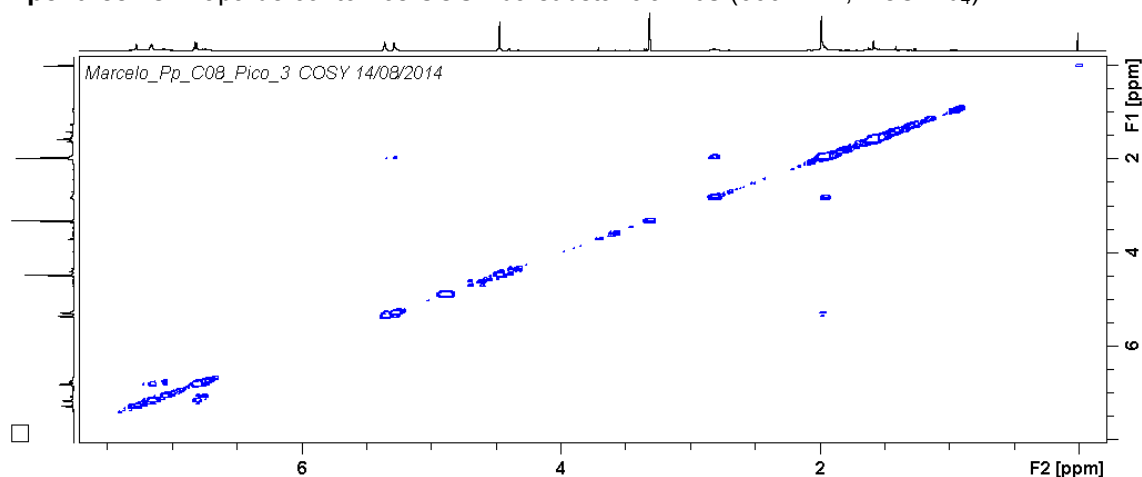
Apêndice 23. Espectro de massas de segunda-ordem, em modo negativo, do íon precursor de m/z 187.



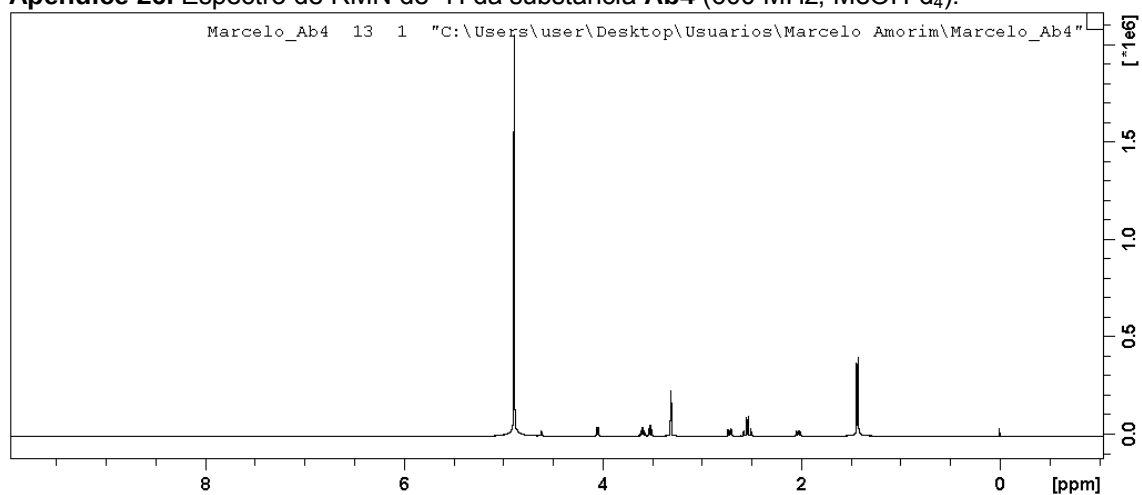
Apêndice 24. Mapa de contornos COSY da substância **Ab2** (600 MHz, MeOH- d_4).



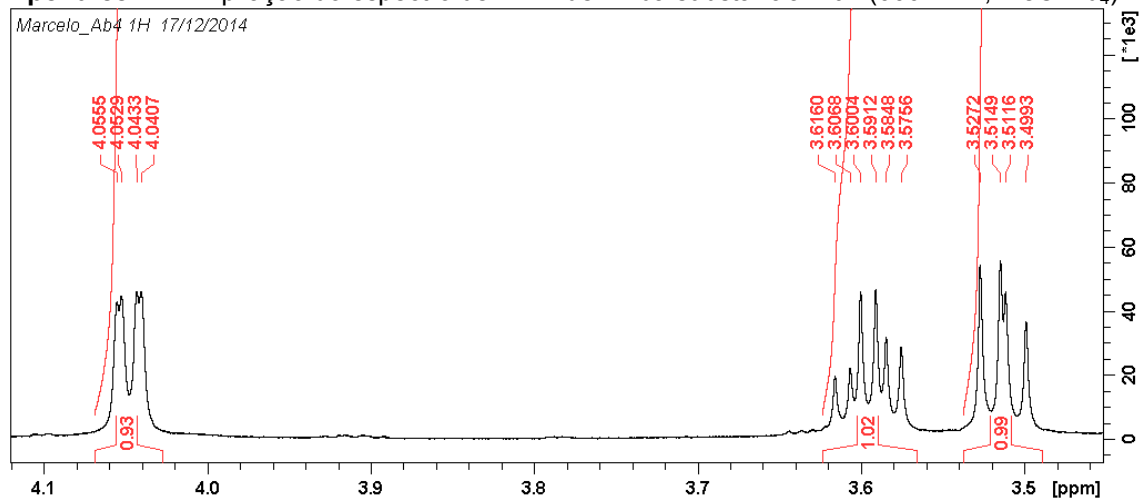
Apêndice 25. Mapa de contornos COSY da substância **Ab3** (600 MHz, MeOH-d₄).



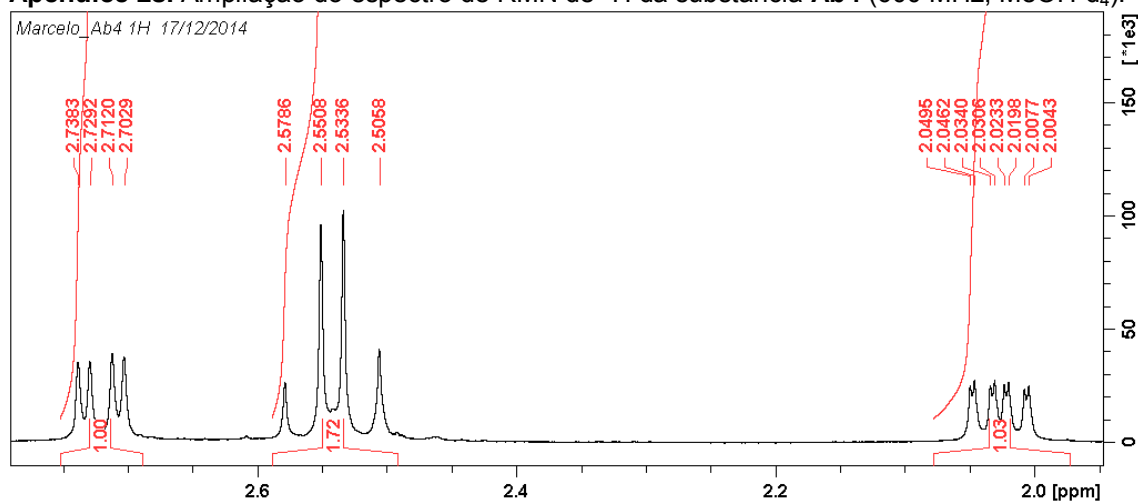
Apêndice 26. Espectro de RMN de ¹H da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d₄).



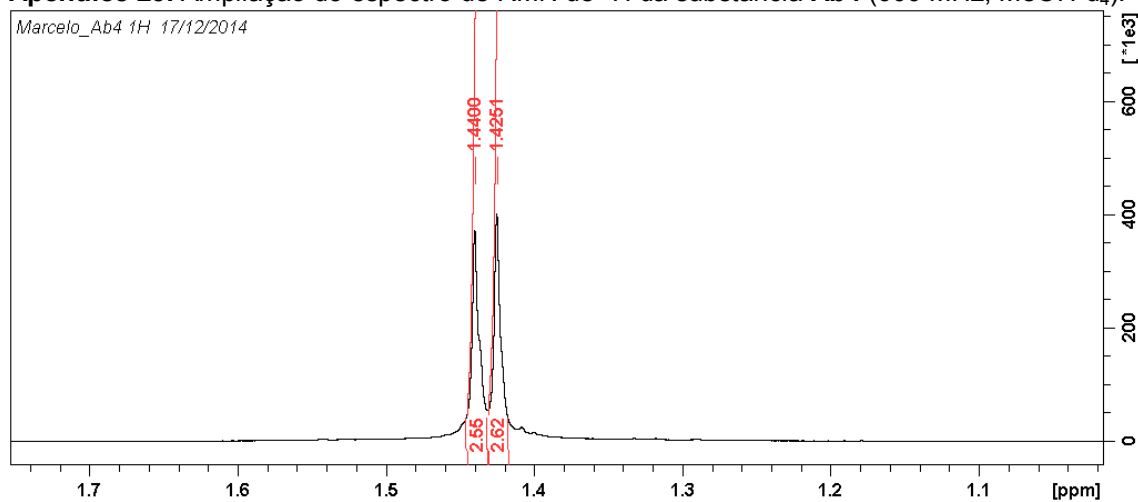
Apêndice 27. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d₄).



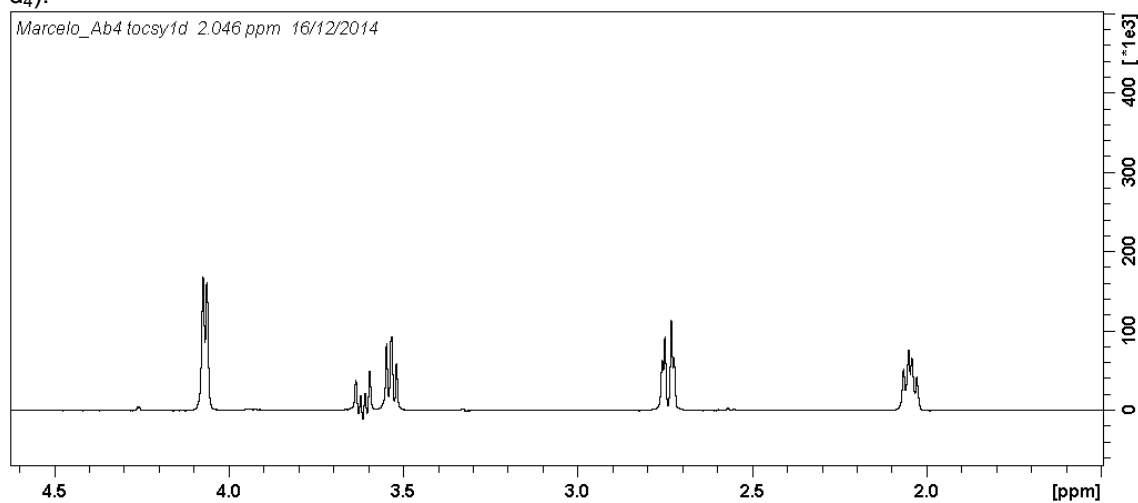
Apêndice 28. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d_4).



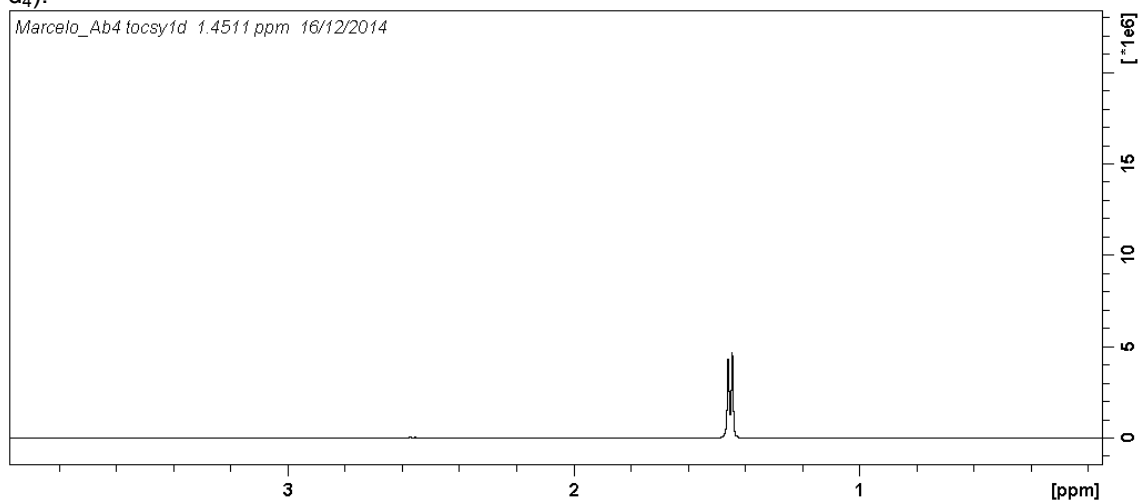
Apêndice 29. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d_4).



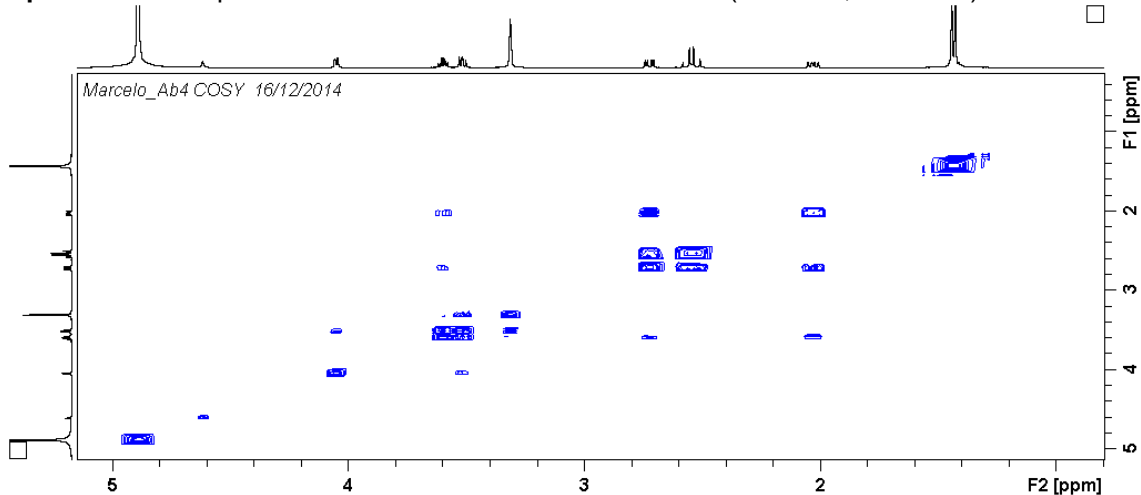
Apêndice 30. Experimento TOCSY 1D irradiando em δ 2,04 da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d_4).



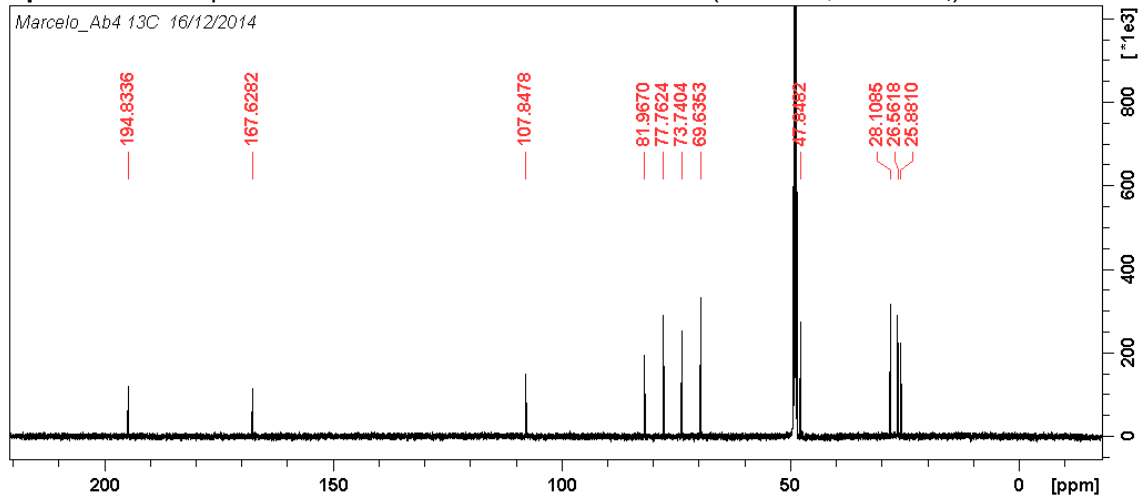
Apêndice 31. Experimento TOCSY 1D irradiando em δ 1,45 da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH- d_4).



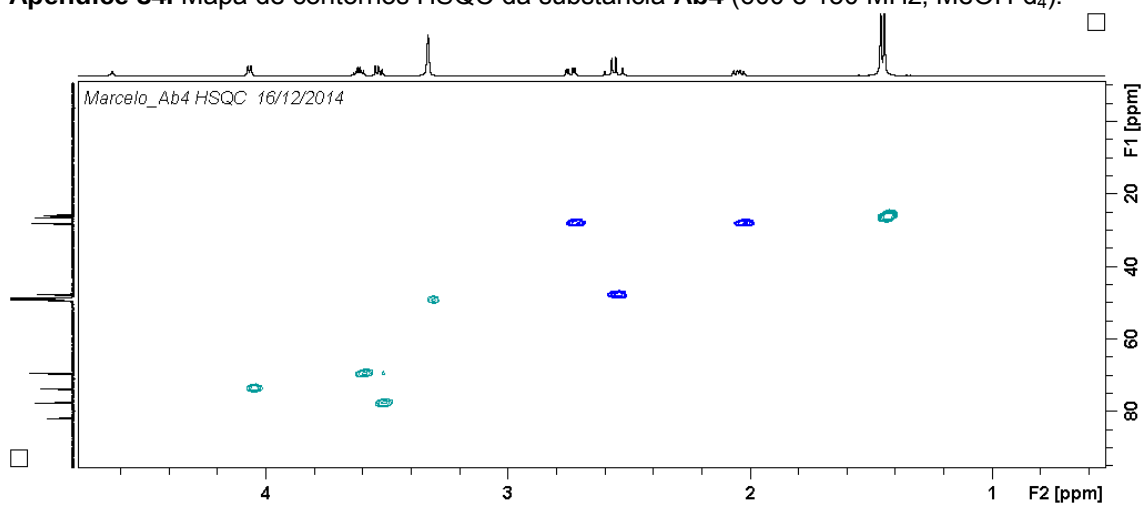
Apêndice 32. Mapa de contornos COSY da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH- d_4).



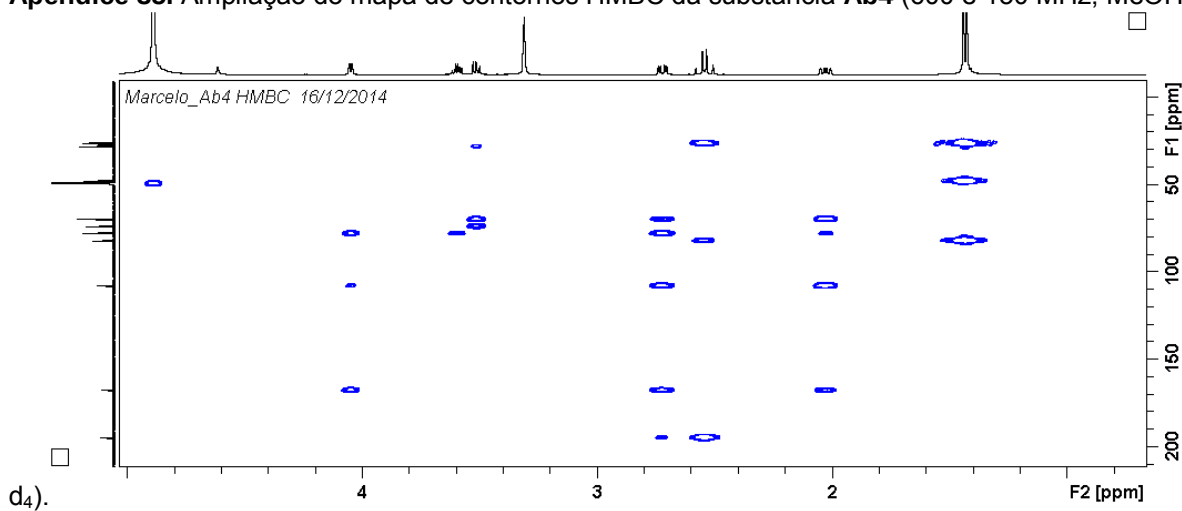
Apêndice 33. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Ab4** (150 MHz, MeOH- d_4).



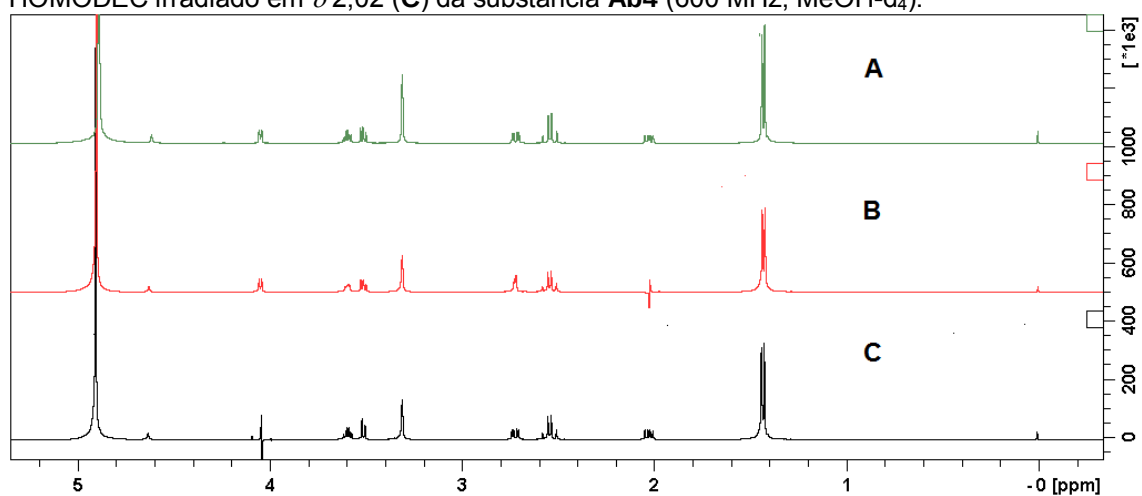
Apêndice 34. Mapa de contornos HSQC da substância **Ab4** (600 e 150 MHz, MeOH-d₄).



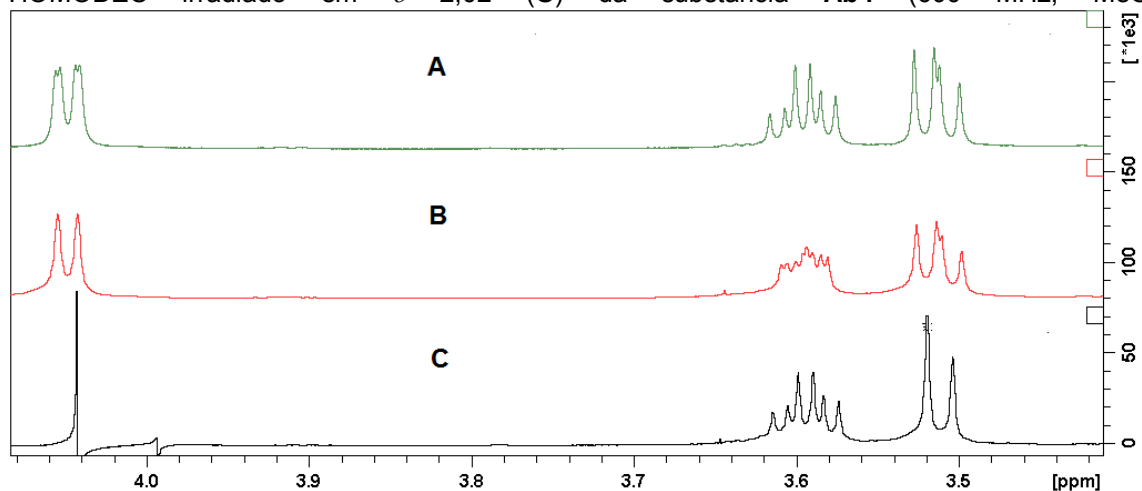
Apêndice 35. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **Ab4** (600 e 150 MHz, MeOH-



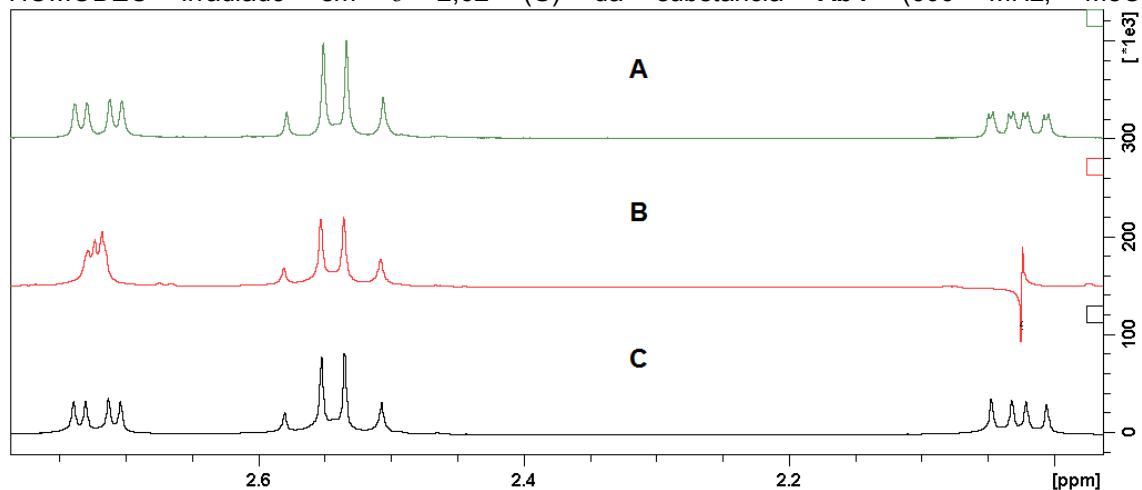
Apêndice 36. Ampliação do espectro de: RMN de ¹H (A), HOMODEC irradiado em δ 4,05 (B) e HOMODEC irradiado em δ 2,02 (C) da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d₄).



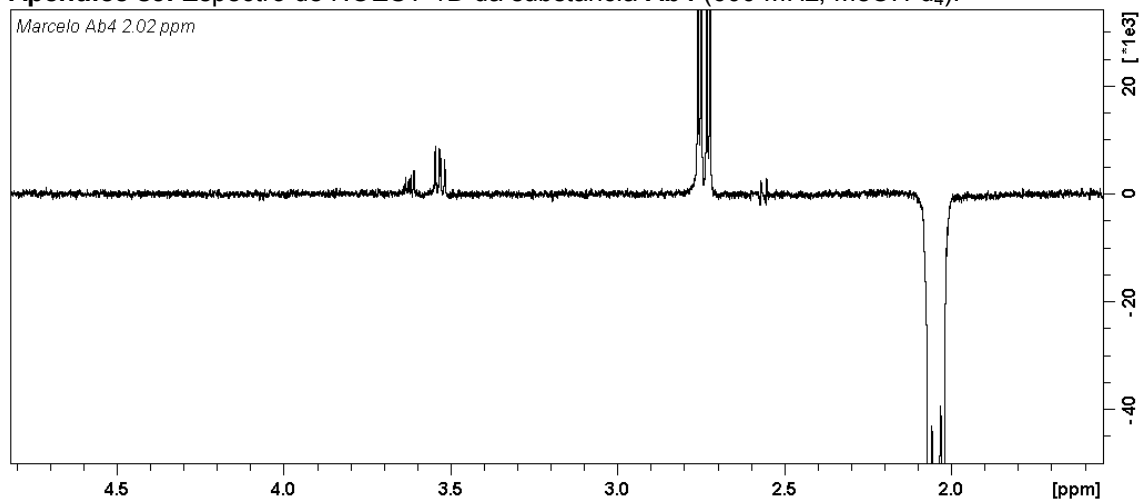
Apêndice 37. Ampliação do espectro de: RMN de ^1H (A), HOMODEC irradiado em δ 4,05 (B) e HOMODEC irradiado em δ 2,02 (C) da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH- d_4).



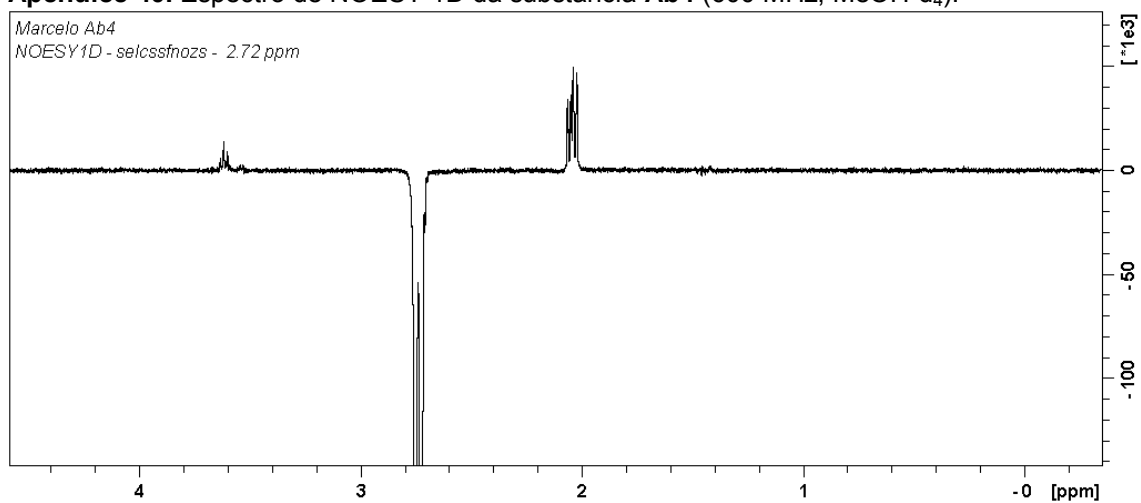
Apêndice 38. Ampliação do espectro de: RMN de ^1H (A), HOMODEC irradiado em δ 4,05 (B) e HOMODEC irradiado em δ 2,02 (C) da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH- d_4).



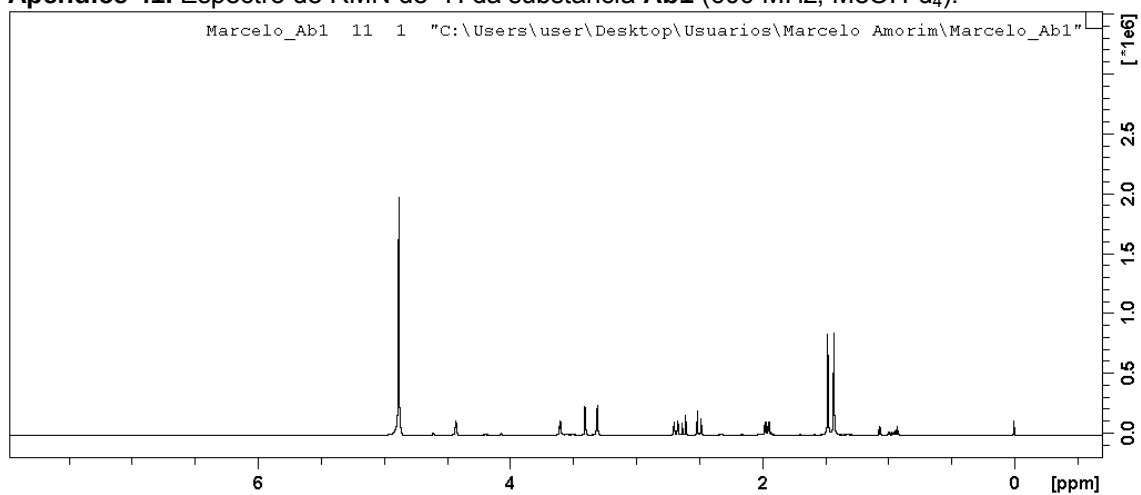
Apêndice 39. Espectro de NOESY 1D da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH- d_4).



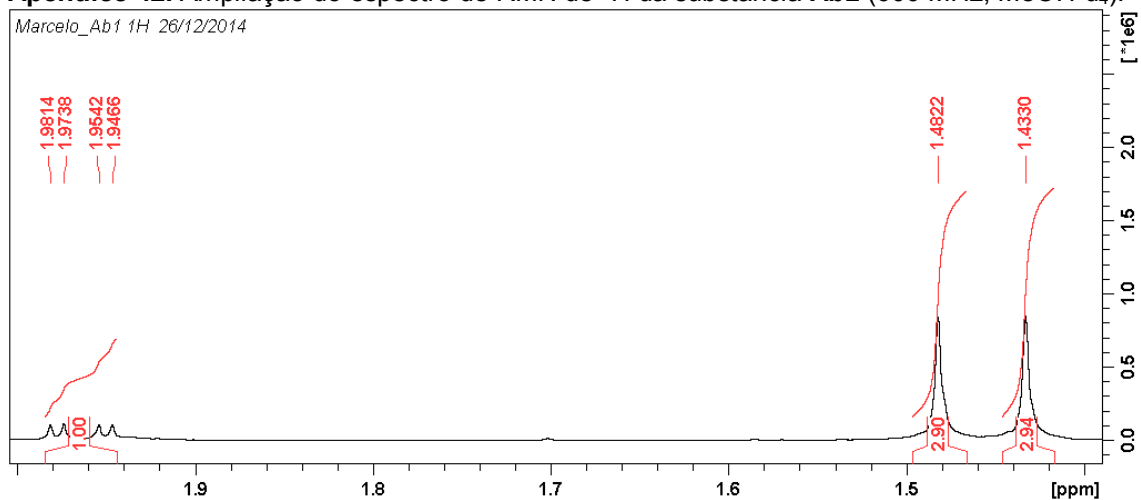
Apêndice 40. Espectro de NOESY 1D da substância **Ab4** (600 MHz, MeOH-d₄).



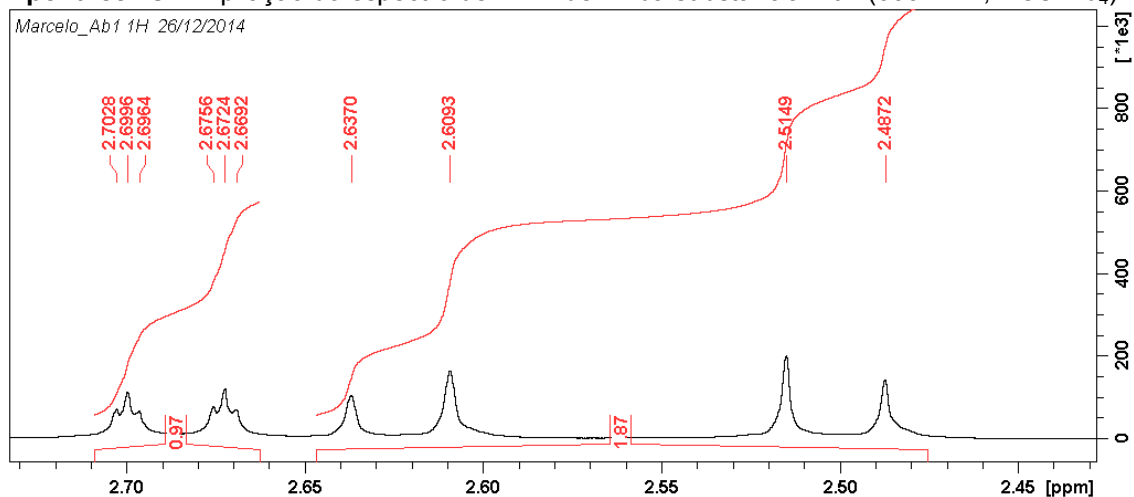
Apêndice 41. Espectro de RMN de ¹H da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH-d₄).



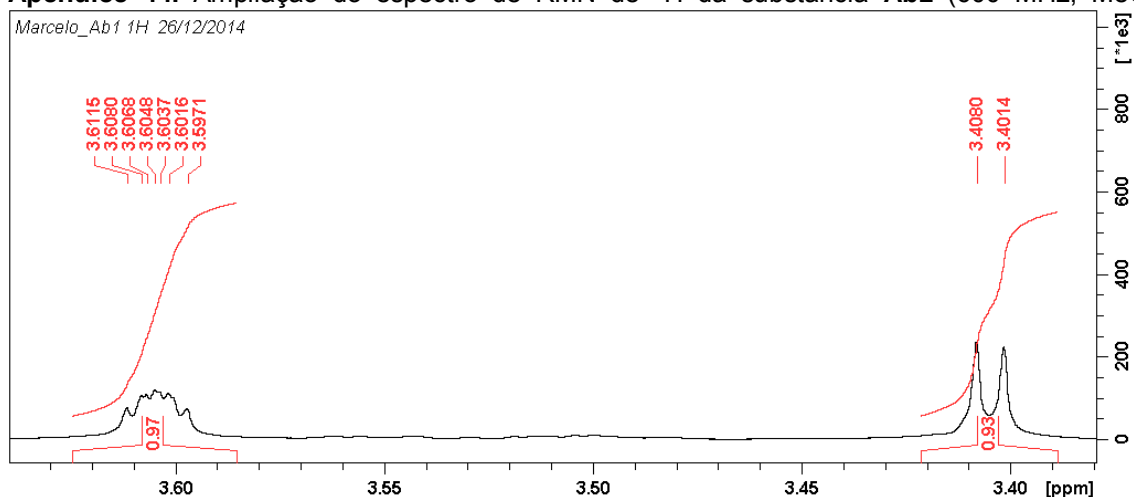
Apêndice 42. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH-d₄).



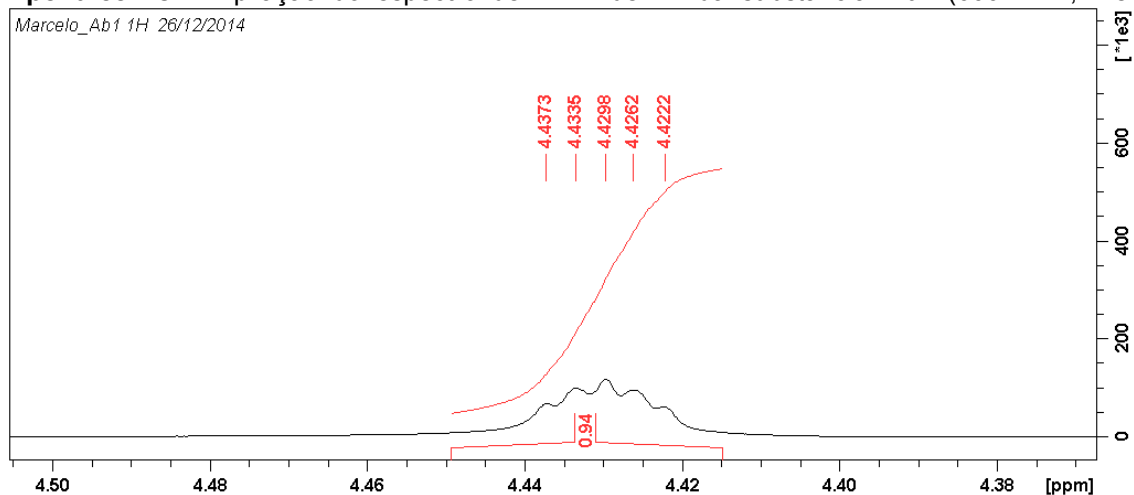
Apêndice 43. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



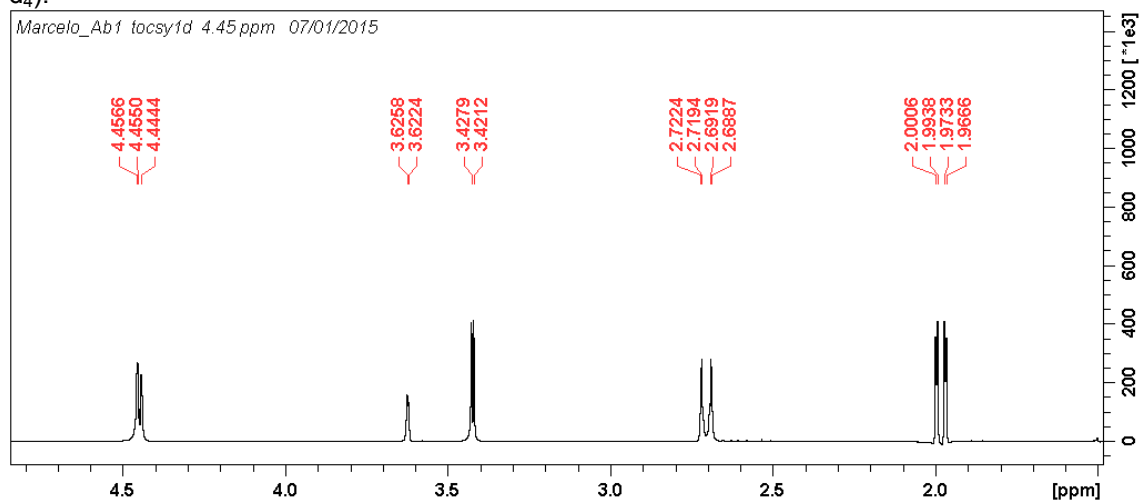
Apêndice 44. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



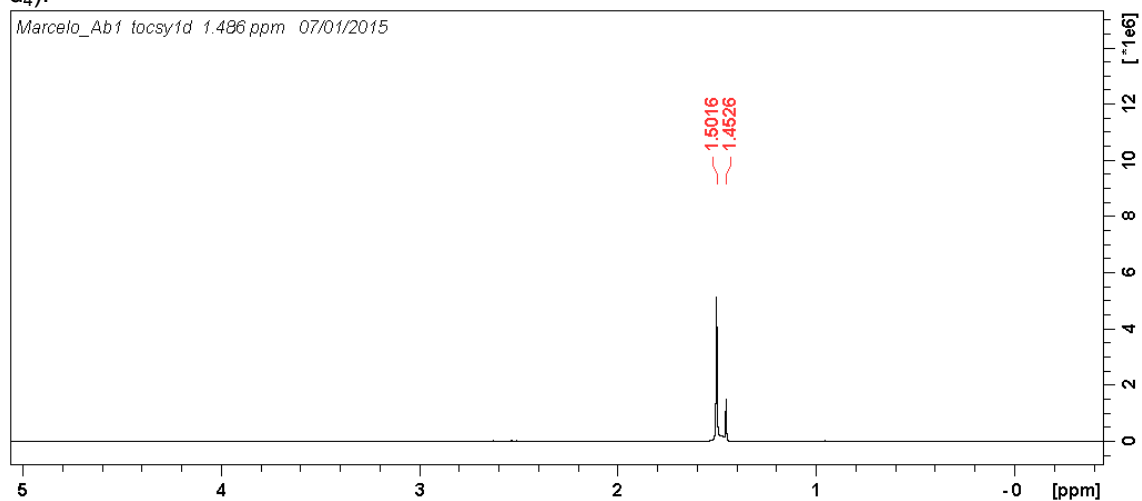
Apêndice 45. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



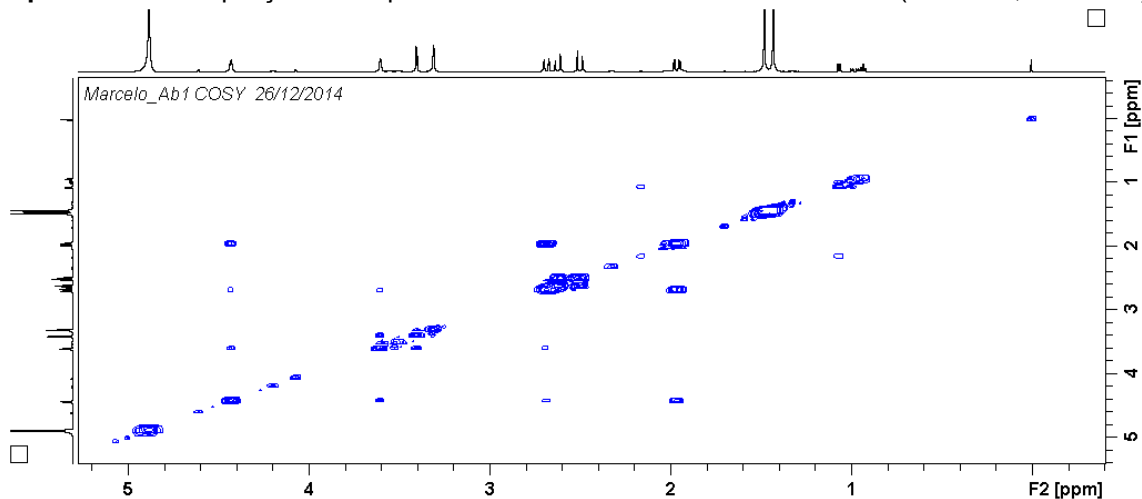
Apêndice 46. Experimento TOCSY 1D irradiando em δ 4,45 da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



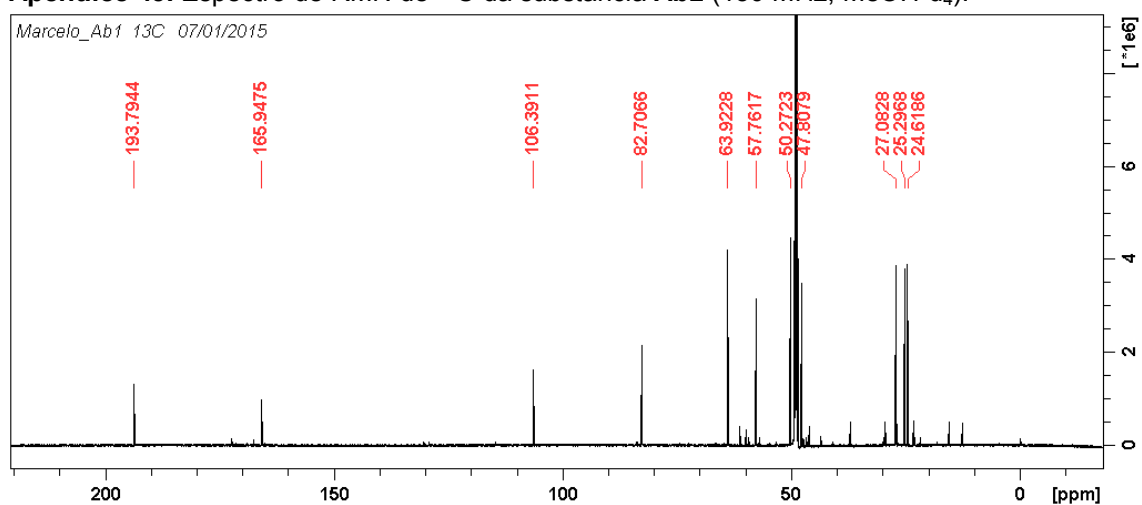
Apêndice 47. Experimento TOCSY 1D irradiando em δ 1,48 da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



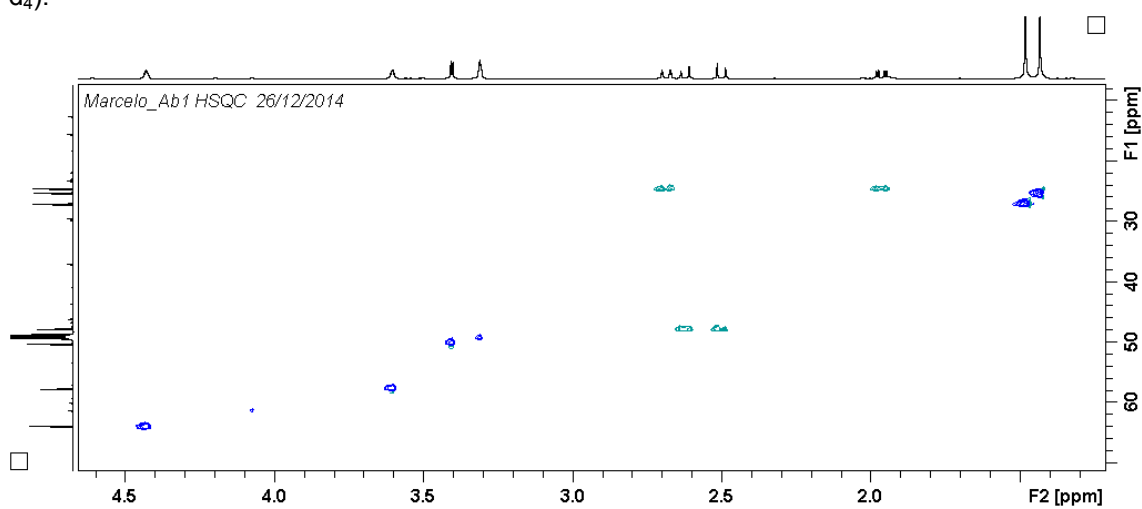
Apêndice 48. Ampliação do mapa de contornos COSY da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



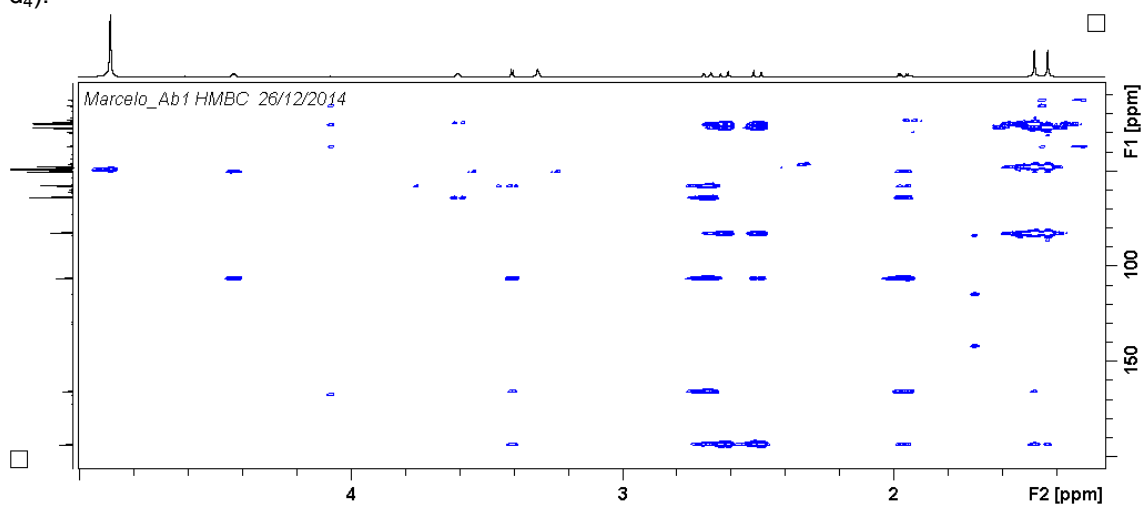
Apêndice 49. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Ab1** (150 MHz, MeOH-d_4).



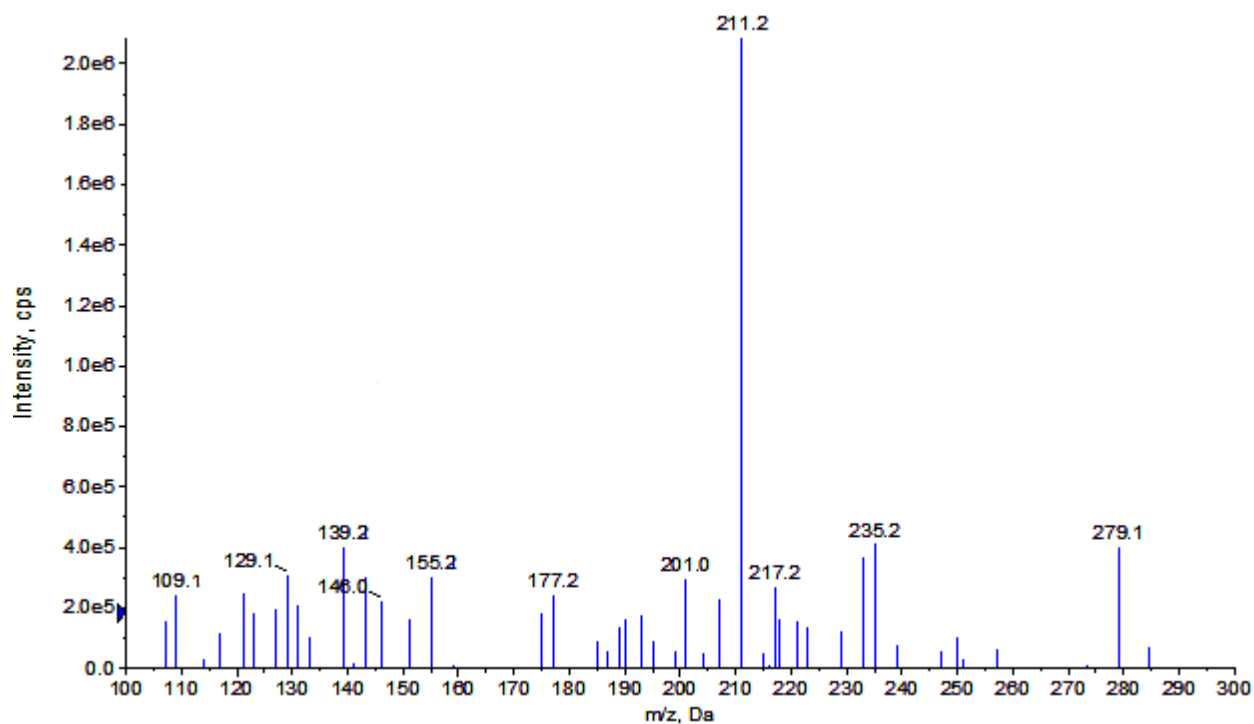
Apêndice 50. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Ab1** (600 e 150 MHz, MeOH-d_4).



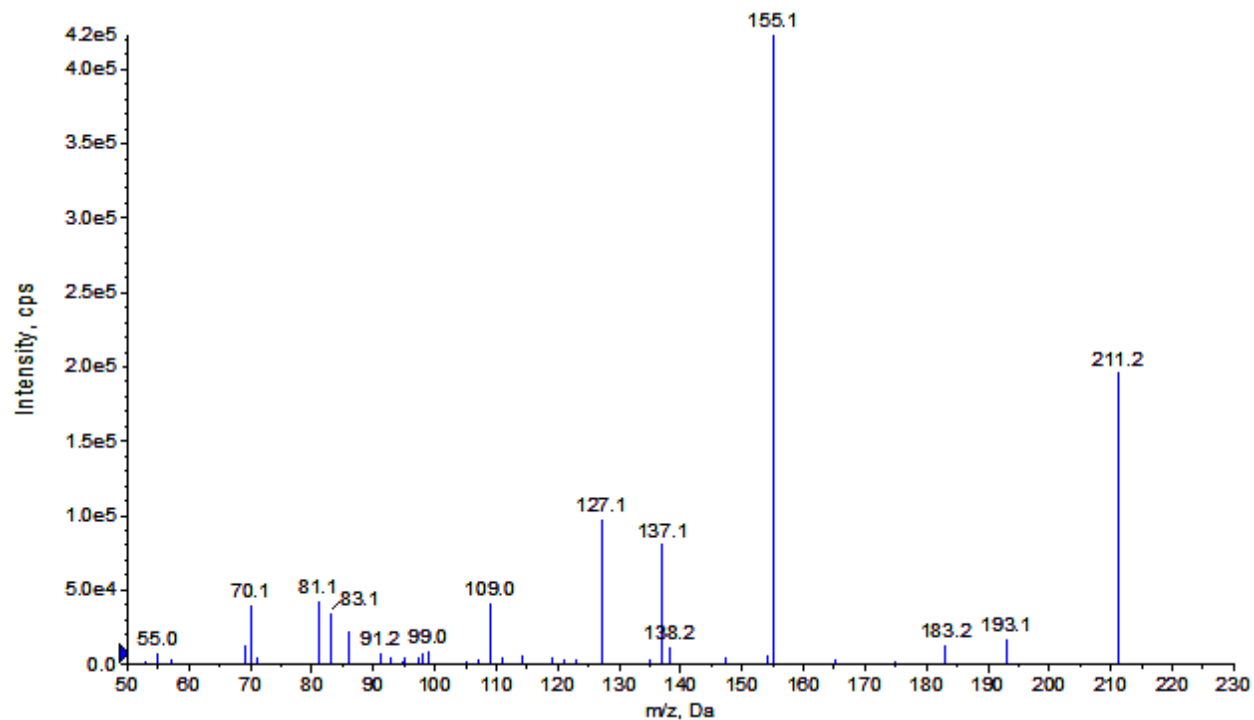
Apêndice 51. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **Ab1** (600 e 150 MHz, MeOH-d_4).



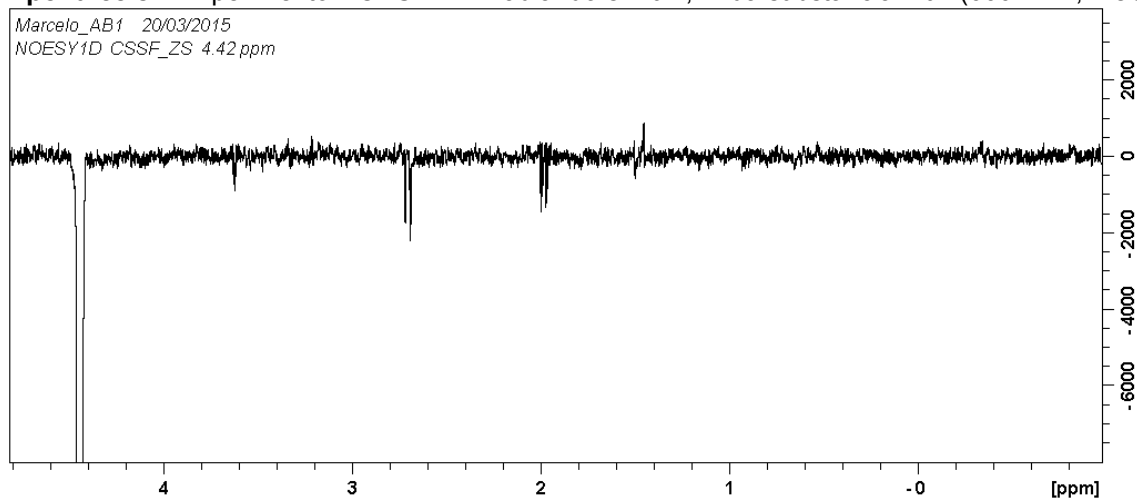
Apêndice 52. Espectro de massas *full scan* no modo positivo de ionização da substância **Ab1**.



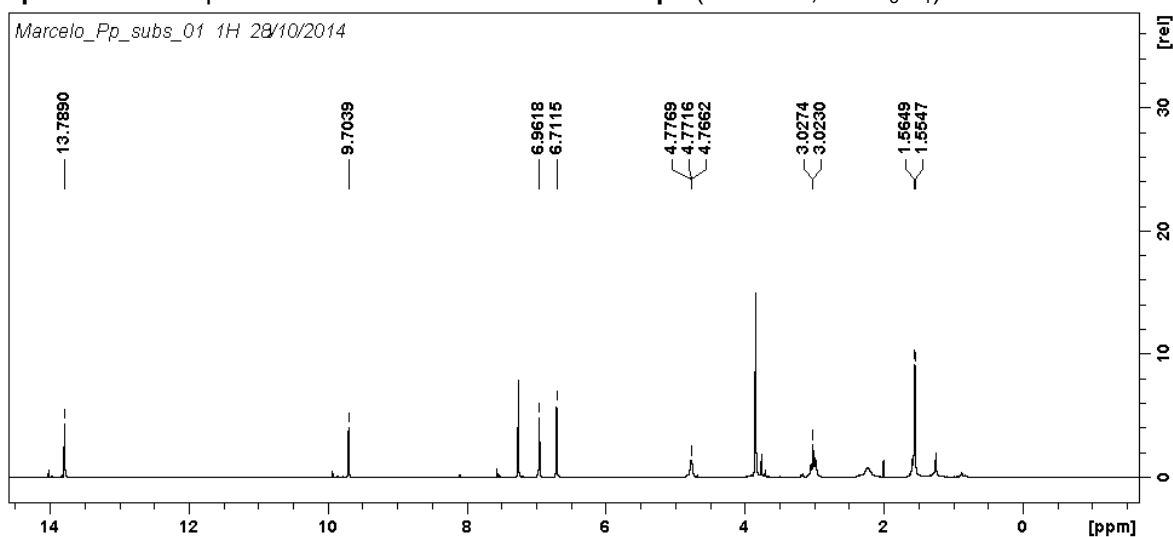
Apêndice 53. Espectro de massas de segunda-ordem, em modo positivo, do íon precursor de m/z 211.



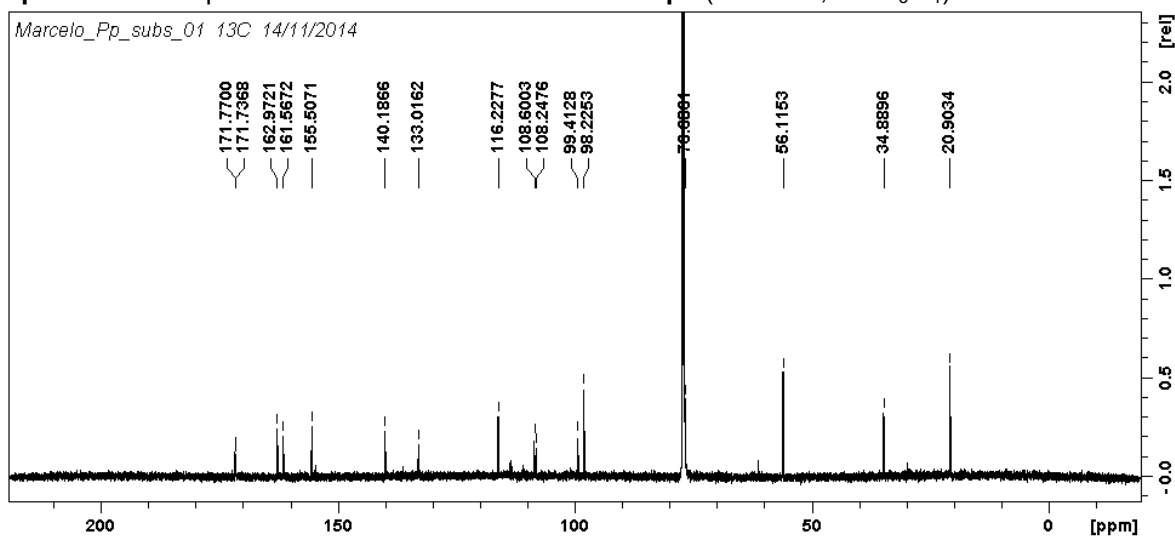
Apêndice 54. Experimento NOESY 1D irradiando em δ 4,42 da substância **Ab1** (600 MHz, MeOH- d_4).



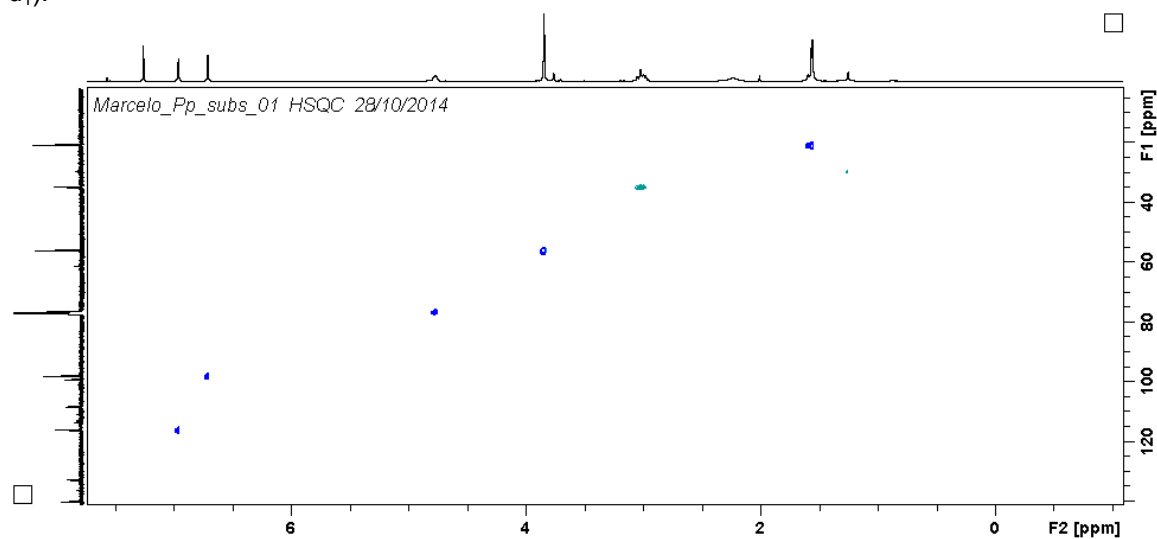
Apêndice 55. Espectro de RMN de ^1H da substância **Pp1** (600 MHz, CDCl_3 - d_1).



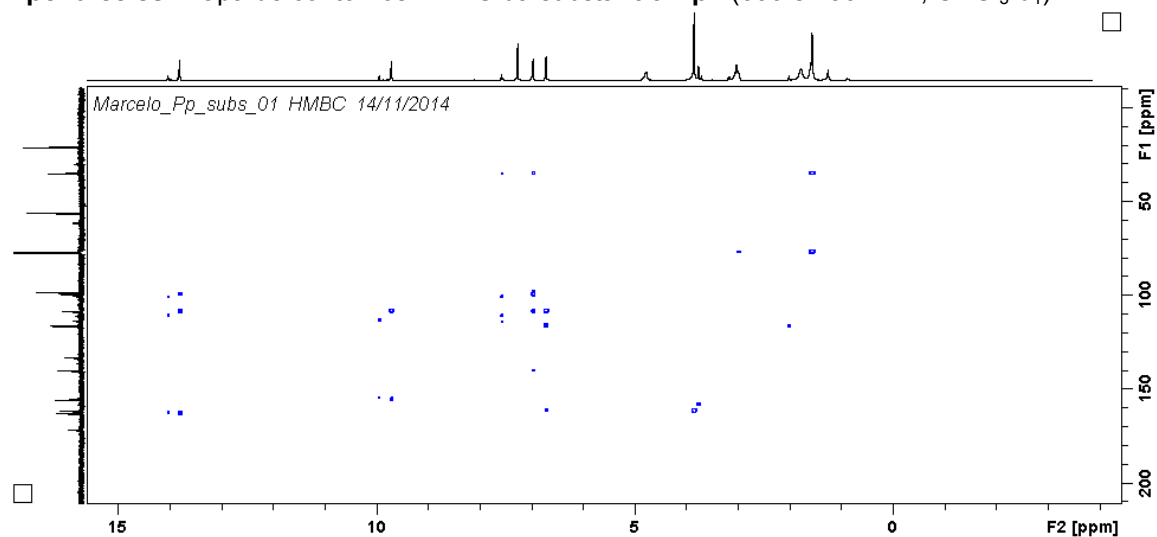
Apêndice 56. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Pp1** (150 MHz, CDCl_3 - d_1).



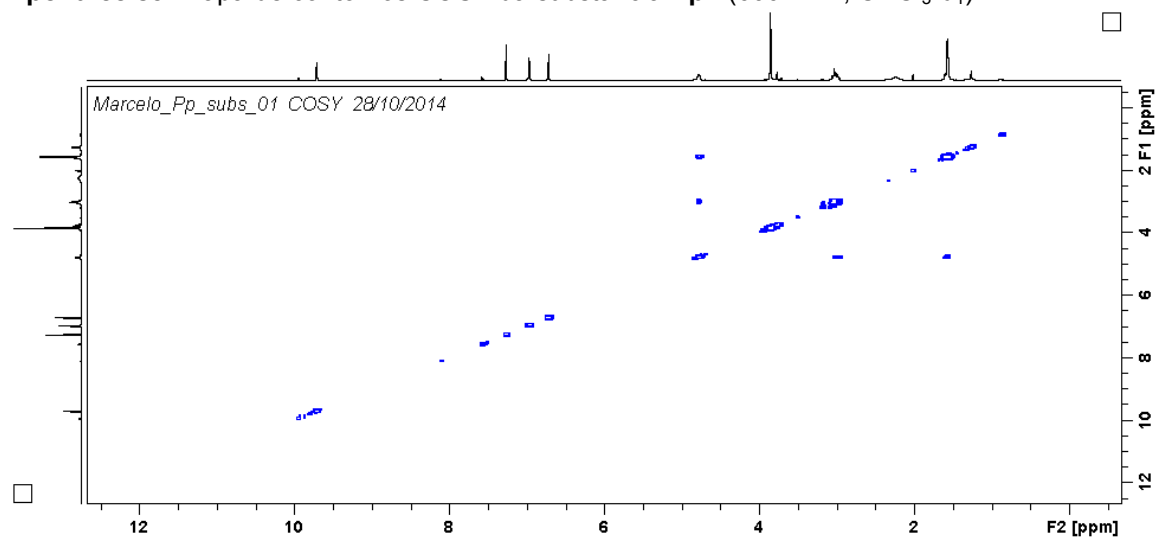
Apêndice 57. Ampliação do mapa de contornos HSQC da substância **Pp1** (600 e 150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).

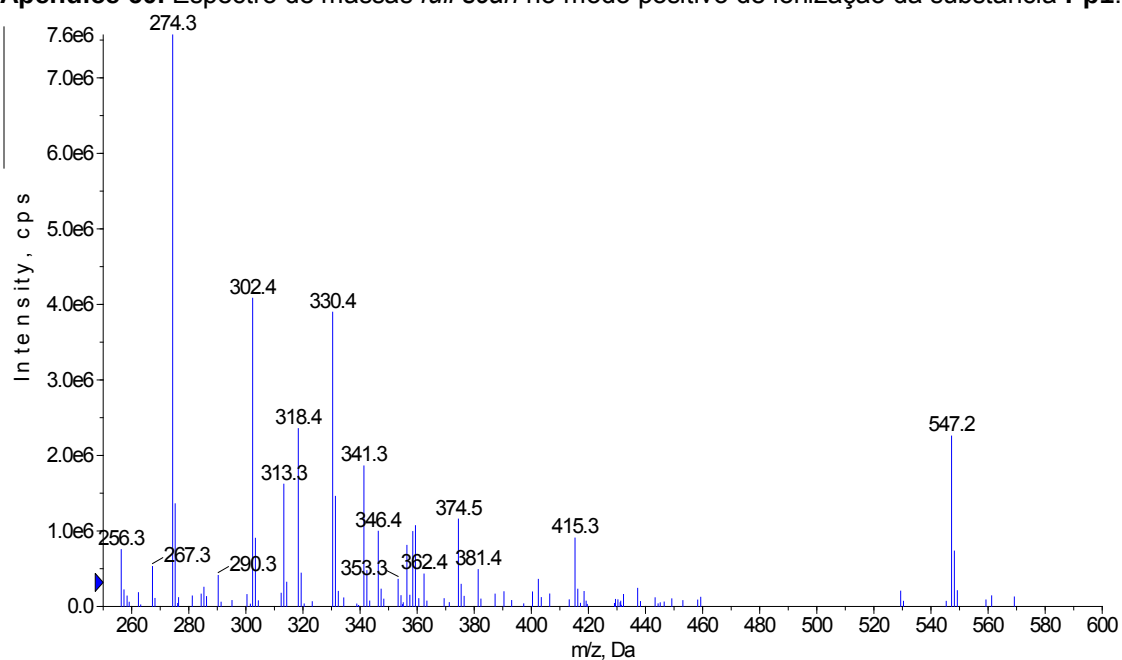
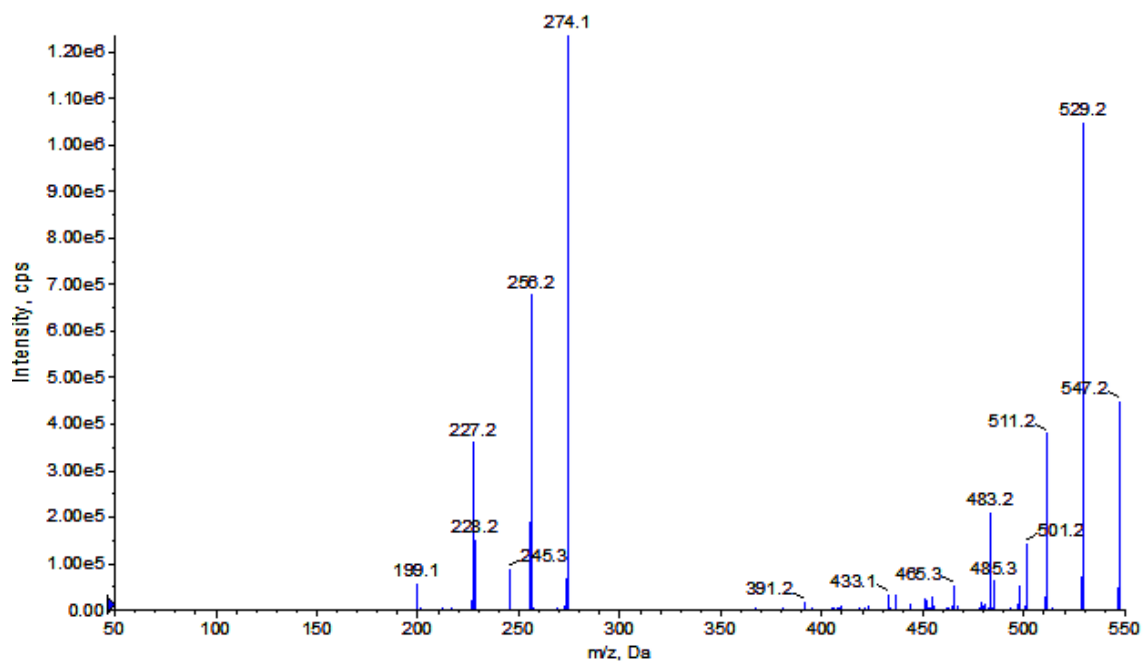


Apêndice 58. Mapa de contornos HMBC da substância **Pp1** (600 e 150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).

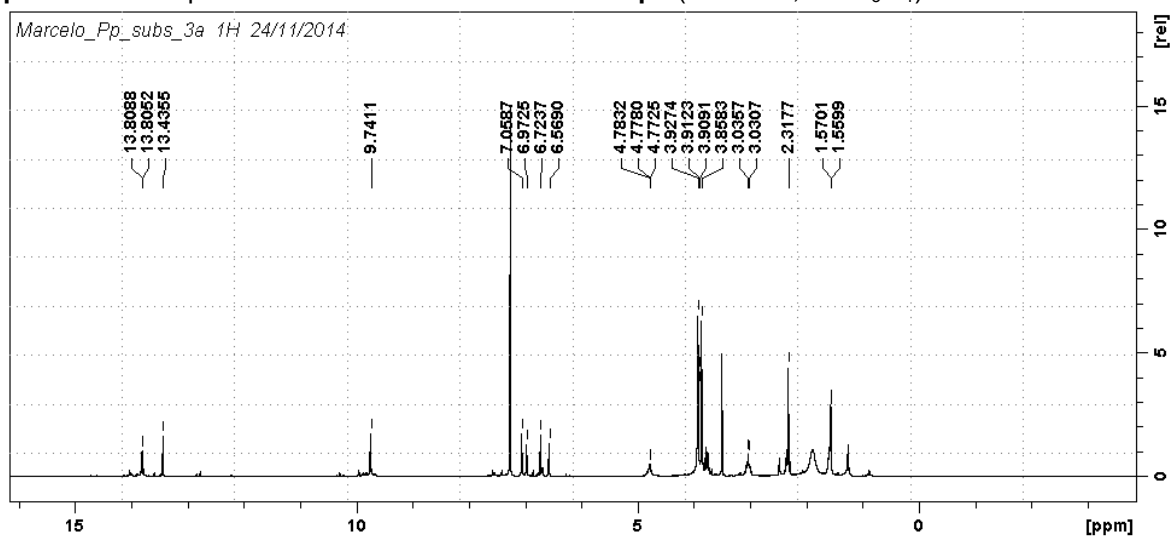


Apêndice 59. Mapa de contornos COSY da substância **Pp1** (600 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).

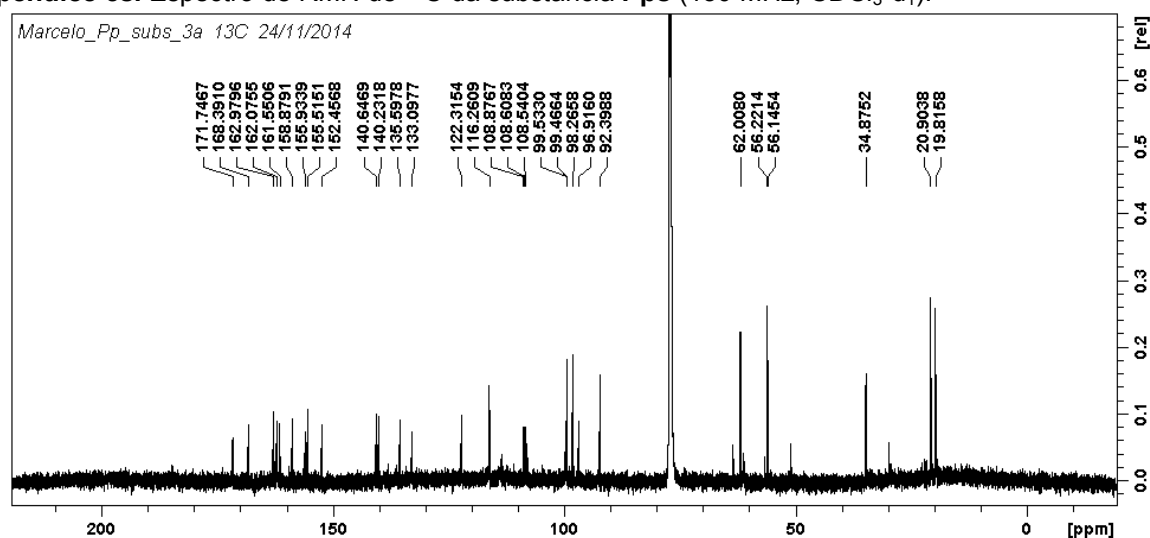


Apêndice 60. Espectro de massas *full scan* no modo positivo de ionização da substância **Pp1**.**Apêndice 61.** Espectro de massas de segunda-ordem, em modo positivo, do íon precursor de m/z 547.

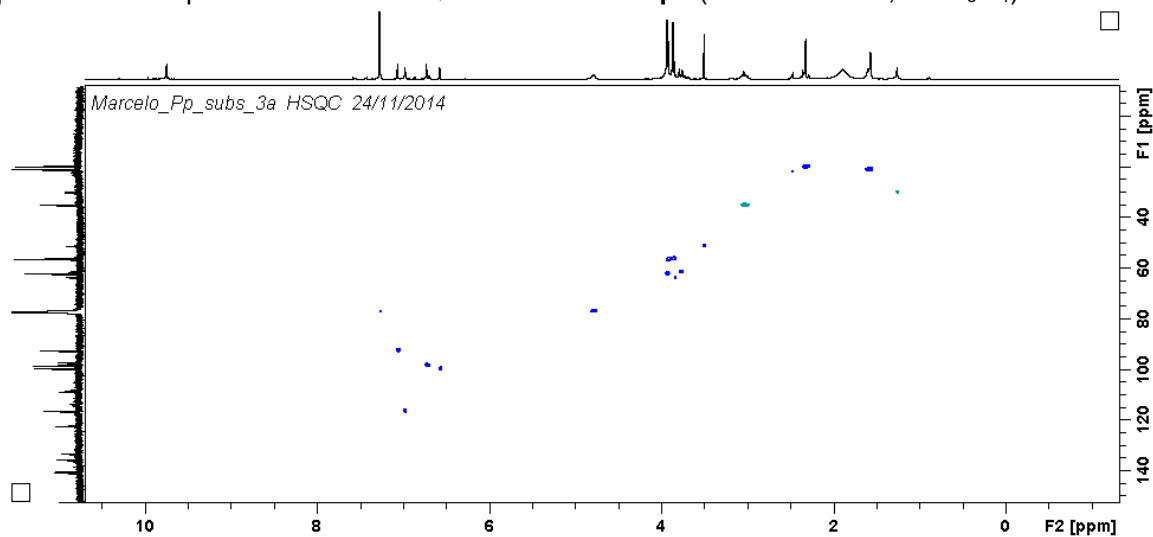
Apêndice 62. Espectro de RMN de ^1H da substância **Pp3** (600 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).



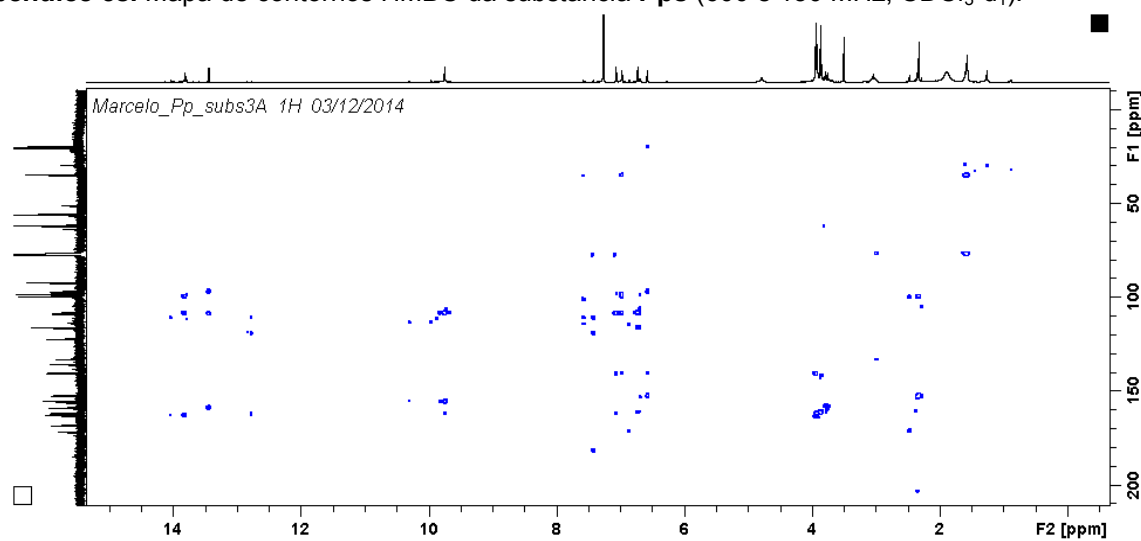
Apêndice 63. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Pp3** (150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).



Apêndice 64. Mapa de contornos HSQC da substância **Pp3** (600 e 150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).



Apêndice 65. Mapa de contornos HMBC da substância **Pp3** (600 e 150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).



Apêndice 66. Mapa de contornos COSY da substância **Pp3** (600 e 150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).

