

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Paepalanthus chiquitensis*
(ERIOCAULACEAE) E EFEITOS DE MODULADORES QUÍMICOS
EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE *Pochonia chlamydosporia*

FELIPE HILÁRIO

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA - SP

2016

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Paepalanthus chiquitensis*
(ERIOCAULACEAE) E EFEITOS DE MODULADORES QUÍMICOS
EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE *Pochonia chlamydosporia*

FELIPE HILÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

H641e Hilário, Felipe
Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis* (ERIOCAULACEAE) e efeitos de moduladores químicos epigenéticos no cultivo de *Pochonia chlamydosporia* / Felipe Hilário — Araraquara, 2016
146 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Lourdes Campaner dos Santos
Coorientador: Taís Maria Bauab

1. Eriocaulaceae. 2. *Paepalanthus chiquitensis*. 3. *Fusarium*. 4. *Bipolaris*. 5. Epigenética.
I. Santos, Lourdes Campaner dos, orient. II. Bauab, Taís Maria, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FELIPE HILARIO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS do(a) Instituto de Química de Araraquara-UNESP / Departamento de Química Orgânica do , Prof. Dr. DANIEL RINALDO do(a) Faculdade de Ciências do Campus de Bauru da UNESP / Departamento de Química da, Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP / Departamento de Fármacos e Medicamentos da , sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FELIPE HILARIO, intitulada **ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFOLÍTICOS ASSOCIADOS À *Paepalanthus chiquetensis* (Eriocaulaceae) E EFEITOS MODULADORES QUÍMICOS EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE *Pochonia chlamydosporia***. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

Prof. Dr. DANIEL RINALDO

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem ou que os
seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vá ser alguém...”*
Renato Russo

*Dedico este trabalho aos meus pais Eduardo e
Maria Anália, e ao meu irmão Fernando
Hilário que sempre me apoiaram.
Muito Obrigado!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por existir, por estar sempre presente na minha vida e por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, Eduardo e Maria Anália, que sempre me incentivaram e por terem acreditado em mim.

Ao meu irmão, Fernando, pela sincera amizade e por sempre poder contar com você.

À minha querida prima Mari e aos meus queridos sobrinhos Lê, Bia, Breno e Léo.

À professora Lourdes Campaner dos Santos, pela excelente orientação e, principalmente, pelo aprendizado adquirido, os quais foram essenciais à minha formação e na realização desse trabalho, pela amizade, paciência, preocupação e respeito depositados a mim desde a IC em 2007.

À professora Taís Maria Bauab, minha estimada co-orientadora, por ter aberto as portas de seu laboratório e proporcionar-me a valiosa oportunidade de trabalhar com os ensaios de atividade antimicrobiana, além das enriquecedoras discussões.

Às professoras Rosemeire C. L. R. Pietro & Lúcia Maria Xavier pela participação na banca de qualificação e pelas importantes sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos professores Rosemeire C. L. R. Pietro & Daniel Rinaldo, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca de defesa do mestrado.

Ao professor Marcelo Aparecido da Silva pela amizade, orientação e imenso aprendizado durante a iniciação científica.

À professora Angela Regina do Araujo por ter dado a oportunidade em trabalhar com fungos endofíticos, pela parceria, contribuição e pelos valiosos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório de fitoquímica: Aninha, Carol Gomes, Carlos, Claudinha, Daniel, Michelle, Guilherme, Rodrigo, Leonardo, Ju Severi, Mayara, Tiago Nakamura, Júlia, Raissa, Fabiano, Viviane, Clenilson, Tangerina, Claudia, Maria do Socorro, Lima Neto, Samara, Sauna, Weslei, Daylin, Alexander, Talitinha, Taís, Carlos, Francisco, Fabiana, Juliana Severe, Cássia, Mariana Pacífico e Fabiana pela amizade e pela convivência. Foi muito bom ter vocês comigo!

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos: Patrícia Bento, Matheus Ramos, Kamila Negri, Victor Lucena, Isadora, Malu, Raquel (Ruge), Thaís Jovenazzo, Larissa, Bruna e Luciene pela amizade, receptividade e prestatividade em todos os momentos.

A todos os colegas do laboratório de Micro-organismos: Juzinha, Carol, Andressa (Blossom), Alana, Rebeca, Vanessa Chapla pela convivência dentro e fora do laboratório.

Aos grandes amigos, Giovana, Roça, Jú Bosso, Alice Haddad, Ana Carolinda, Raquel Sabará, Marininha, Dú, Bel, Patrick, Martina, Revorta, Naira, Babs e Mari ruiva.

Aos estimados de São Carlos, Henry, Michel, Geandro, Cona, Mônica, Rogério e Otávio!

Aos técnicos João e Marília, do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, pelas análises.

Ao Rafael (PT) pelo espectro de IV.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química UNESP-Araraquara, pela acolhida e incentivo à vida acadêmica

Agradeço também The University of Arizona e aos membros do Natural Product Center (Tucson, Arizona-EUA), em especial ao Dr. Kitshir pela amizade e por tudo que aprendi com vocês. Muito obrigado!

Ao prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka pela orientação, pelos ensinamentos, compreensão e amizade.

A todos os funcionários da FCFAr e do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelas bolsas concedidas no Brasil (Processo No. 2013/12564-6) e no exterior (Processo No. 2014/25181-0) e aos funcionários vinculados à FAPESP.

As agências de fomento Capes e CNPq.

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da pesquisa de metabólitos secundários ativos produzidos por fungos endofíticos associados às partes aéreas (folhas, escapos e capítulos) de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). Entre os 25 fungos isolados da espécie de Eriocaulaceae, o *Fusarium* sp. foi o fungo mais promissor quanto à atividade antimicrobiana para as cepas de bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* e *Salmonella setubal*, da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e para a levedura *Candida albicans* resistente ao fluconazol, e ainda exibiu a capacidade bactericida e fungicida. Outro fungo selecionado foi o *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* devido a sua diversidade química. O cultivo dos fungos em *Potato Dextrose Broth* (PDB) em escala ampliada resultou no extrato acetato de etila (EAcOEt) que foram purificados por métodos cromatográficos em escala preparativa. A identificação/elucidação por métodos espectrométricos e espectroscópicos (EM, IV, UV, RMN mono e bidimensionais) forneceu as substâncias: 3,4-Piridinadiamina, *N*⁴-1-metil-5-(3'-buten-1-il) (**S1**), ácido fusárico (**S2**), 2-(1*H*-indol-6-il)-acético (**S3**), 2-Piridinametilamina-*N*⁸-metil-5-hexanoato (**S4**) e o sesterterpeno terpestacina (**S5**), Etanoato de etila-2-(2-acetil-4,6-diidroxifenil) (**B4**) e um alcalóide inédito na literatura (**B1**). Com este trabalho, observamos que os fungos endofíticos estudados possuem sua química completamente distinta quando comparada com as classes de substâncias isoladas de espécies vegetais de Eriocaulaceae, sendo uma importante fonte de novos produtos naturais com potencial atividade biológica. Este trabalho contempla também o estudo dos efeitos de modificadores epigenéticos e íons metálicos na diversificação metabólica do fungo *Pochonia chlamydosporia* (ATCC). A adição de ácido anacárdico (AA) no meio de cultivo líquido (PDB+AA) rendeu 2,6 vezes mais extrato do que o controle PDB. Os perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD) foram comparados, foi identificado que o radicicol é majoritário em todos os extratos analisados. Estes extratos foram submetidos à análise quantitativa por CLAE, o AA adicionado no meio líquido Potate Dextrose Agar (PDB) rendeu 4,6 vezes mais radicicol do que o controle PDB. O EAcOEt preparado do cultivo em escala ampliada em meio PDB + Mg²⁺ foi purificado por métodos cromatográficos em escala preparativa e resultou no isolamento e identificação das substâncias ausentes no controle (PDB), Poconinas B, E e L e também do mixostiol, substâncias (**P1-P4**) respectivamente.

Palavras-chave: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium*, *Bipolaris*, epigenética.

ABSTRACT

This work presents the results of the research of active secondary metabolites produced by endophytic fungi associated with the aerial parts (capitulae, scapes and leaves) of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). Among the 25 species of fungi isolated from the specie of Eriocaulaceae, the *Fusarium* sp. was the fungus that showed the best biological activity against the strains of Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella setubal*, the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* yeast resistant to fluconazole. The *Fusarium* sp also displayed bactericidal and fungicidal effects. The research also presents the chemical studies of the fungus *Bipolares* sp., isolated from the leaves of *P. chiquitensis* which was selected due to its chemical profile. The large scale cultivation of both fungi afforded the respective ethyl acetate extracts which were purified by preparative chromatography methods. The chemical structures were elucidated by spectrometric and spectroscopic methods (MS, IR, UV, mono- and bidimensional NMR affording the following substances from the *Fusarium* sp.: 5-(but-3-en-1-yl)-*N*⁴-methylpyridine-3,4-diamine (**S1**), fusaric acid (**S2**), 2-(1H-indol-6-yl)-acid (**S3**), 5-Butil-2-pyridinecarboxamide (**S4**) and the sesterterpene fusaproliferin (**S5**), while for the *Bipolaris* sp.: Acetic acid, (2-acetyl-3,5-dihydroxyphenyl)-, ethyl ester (**B4**) and a new alkaloid (**B1**). Herein, we also showed the study of the effects of epigenetic modifiers and metal ions in metabolic diversity from the fungus *Pochonia chlamydosporia* (ATCC). The presence of anacardic acid in the liquid medium afforded 2.6 times more ethyl acetate extract compared with the PDB (Potato Dextrose Broth) control. Besides, the analysis by analytical HPLC (High Performance Liquid Chromatography) identified the radicicol as the major compound present in EtOAc extracts and showed that when anacardic acid (AA) is added to the liquid medium, there is a production of 4.6 times more of the radicicol than the PDB control. This fungus was cultivated in large scale in PDB + Mg²⁺, yielding four compounds absent in thePDB control: pochonins B, E and L and the myxostiol compounds (P1-P4), respectively.

Keywords: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp., epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Diversidade estrutural dos metabólitos isolados dos fungos endofíticos (Schulz, 2002)..... 21
- Figura 02.** Espécie hospedeira *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó no estado de Minas Gerais..... 22
- Figura 03.** Diversidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos de *Fusarium* spp. . 28
- Figura 04.** Metabólitos secundários ativos isolados de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*..... 29
- Figura 05.** Esquema da microplaca para a determinação da CIM..... 44
- Figura 06.** Reação de oxirredução da resazurina..... 44
- Figura 07.** Reação de oxirredução do TTC 46
- Figura 08.** Cromatograma representando o perfil do EAcOEt em pequena escala de Pg-Fj-5 produzido pelo fungo *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 54
- Figura 09.** Cromatograma representando o perfil do EAcOEt em escala ampliada produzido pelo fungo *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 54
- Figura 10.** Espectros no UV dos picos 1-4 do EAcOEt de Pg-Fj(5)-2 produzido pelo fungo *Bipolaris* sp isolado das folhas de *P. chiquitensis*; λ= 295 nm. 55
- Figura 11.** Cromatograma representando o perfil do EAcOEt de C8 realizado em pequena escala (A); escala ampliada (B); e da sobreposição de ambas escalas de crescimento (C), produzido pelo fungo endofítico *Fusarium* sp isolado dos capítulos de *P.chiquitensis* [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01 % TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm]. 56
- Figura 12.** Análise por CCD das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes. CHCl₃/MeOH/n-PrOH/H₂O (5.6.1.4,v/v/v/v); 1) Fr. 1-17; 2) Fr. 18-23; 3) Fr. 24-29; 4) Fr. 30-38 e 5) Fr. 39-43..... 57
- Figura 13.** Fluxograma do fracionamento e purificação do EACOEt C8 (*Bipolaris* sp.). . 58
- Figura 14.** Análise por CCD dos extratos, frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20 e substâncias isoladas; Sistema de solventes. CHCl₃/AcOEt (7:3,v/v); C8) Extrato em pequena escala; C8-2) Extrato em escala ampliada; A-F) reuniões das frações obtidas do

fracionamento por Spdx. A) Fr.1-23; B) Fr. 24-29; C) Fr. 30-32; D) Fr. 33-39; E) Fr. 40-49 e F) Fr. 50-79. 59

Figura 15. Cromatograma da Fr.18-23 proveniente do sephadex LH-20 [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 60

Figura 16. Fluxograma do fracionamento e purificação do EACOEt C8 (*Fusarium* sp.). 61

Figura 17. Cromatogramas A, B e C das substâncias **S1-S3** isoladas por CLAE- DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm]. 62

Figura 18. Cromatogramas A, B e C das substâncias S4-S6 isoladas por CLAE- DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente..... 63

exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm]. 63

Figura 19. Cromatograma mostrando o pico da substância **B4**, isolada por CC [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 64

Figura 20. Análise por CCD da substância B4 purificada por cromatografia em coluna de sílica; Sistema de solventes. CHCl₃/AcOEt (7:3,v/v). 64

Figura 21. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 69

Figura 22. Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 70

Figura 23. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 70

Figura 25. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 71

Figura 26. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 72

Figura 27. Mapa de contorno HMBC ¹H-¹⁵N (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. .. 72

Figura 29. Espectro de RMN de DOSY (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 73

Figura 30. Correlações HSQC-TOCSY da substância **B1** 74

Figura 31. COSY, correlações HMBC e HMBC ¹H-¹⁵N da substância **B1**. 74

Figura 34. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância **B4**. 78

Figura 35. Espectro de RMN de COSY (300 MHz, CDCl₃) da substância **B4**. 79

Figura 36. Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl ₃) da substância B4	79
Figura 37. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, CDCl ₃) da substância B4	80
Figura 38. Espectro ESI-IT-MS. (<i>full scan</i> , modo negativo) da substância B4	80
Figura 40. Estrutura química da substância B4	81
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	84
Figura 42. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	85
Figura 43. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	85
Figura 44. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	86
Figura 45. Espectro ESI-IT-MS [/] MS (modo negativo) da substância B4	86
Figura 46. Estrutura química da substância S1	86
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	89
Figura 48. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	90
Figura 49. Espectro de RMN de COSY (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	90
Figura 50. Mapa de contorno HSQC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	91
Figura 51. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	91
Figura 52. Espectro ESI-Qtrap-MS (modo negativo) da substância S2	92
Figura 53. Estruturas químicas propostas para da substância S2	92
Figura 54. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	95
Figura 55. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	96
Figura 56. Espectro de RMN de COSY (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	96
Figura 57. Mapa de contorno HSQC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	97
Figura 58. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	97
Figura 59. Espectro ESI-MS (modo negativo) da substância S3	98
Figura 60. Espectro ESI-MS/MS (modo negativo) da substância S3	98
Figura 61. Estrutura química da substância S3	98
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	101
Figura 63. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	102

Figura 64. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	102
Figura 65. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	103
Figura 66. Espectro ESI-Qtrap-MS (modo positivo) da substância S4	103
Figura 67. Estrutura química da substância S4	104
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	107
Figura 68. Amp; do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	107
Figura 69. Espectro de RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	108
Figura 71. Espectro de RMN DEPT 135 (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	108
Figura 72. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) das substância S5	109
Figura 73. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	109
Figura 74. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	110
Figura 75. Mapa de contorno HSQC TOCSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	110
Figura 76. Espectro ESI-MS (modo negativo) da substância S5	110
Figura 77. Correlações HSQC TOCSY da substância S5	111
Figura 78. Correlações HMBC e COSY da substância S5	112
Figura 79. Estrutura química da substância S5	112
Figure 80. Avaliação dos perfis cromatográficos por CCD em sílica gel dos extratos AcOEt preparados em escala reduzida (PDB); Sistema de solventes. MeOH/DCM (96.4,v/v); anisaldeído H ₂ SO ₄ ; R = radicicol; 1) PDB; 2) PDB + Cu ²⁺ ; 3) PDB + Mg ²⁺ ; 4) PDB + AA; 5) PDB + SAHA; 6) PDB + AZA; 7) PDB + DMSO.	115
Figure 81. Chromatograma representativo dos perfis químicos dos extratos preparados em escala reduzida produzidos pelo fungo <i>P.chlamydosporia</i> ATCC [Coluna analítica Luna (2) C18-Phenomenex® 250 x 4.60 mm id x 5 µm; Solvente B. H ₂ O; Solvente C. MeOH. Gradient 70-100% B em 30 min; vazão 0.80 ml min ⁻¹ ; λ = 250 nm.....	116
Figure 82. Curva de calibração do Radicicol.....	117
Figura 83 CCD (sílica gel), Sistema de solventes MeOH/DCM (6.94; v/v); A) anisaldeído; B) UV 254 nm e C) UV 365 nm	118
Figura 84. Purificação da reunião das frações 19-20 por CCD preparativa.....	120
Figura 87. Esquema de purificação das frações 15-18 por métodos cromatográficos	121
Figura 88. Purificação da reunião das frações 11-14 por métodos cromatográficos.....	122

Figura 89. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P1	124
Figura 90. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância P1	124
Figura 91. Estrutura química da Poconina B.....	125
Figura 92. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P2	127
Figura 93. Estrutura química da Poconina E	127
Figura 94. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P3	129
Figura 95. Espectro de RMN de HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância P3	129
Figure 96. Estrutura química da Poconina L	130
Figura 97. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P4	133
Figura 98. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância P4	133
Figura 99. Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância S4	134
Figura 100. Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da substância S4	134
Figura 101. Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da substância S4	135
Figura 102. Estrutura Química do Mixostiol (Azul ^1H e ^{13}C RMN literaratura)	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de <i>P. chlamydosporia</i>	38
Tabela 02. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	49
Tabela 03. CBM e CFM dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	50
Tabela 04. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	52
Tabela 05. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	52
Tabela 06. Substâncias isoladas do EAcOEt C8 do <i>Fusarium</i> sp.	60
Tabela 07. Dados de RMN de ^1H ^{13}C (600 e 150 MHz, em DMSO- d_6) da substância B1 . 68	
Tabela 08. ^1H ^{13}C (300 e 75 MHz, em CHCl_3) mono e bidimensionais da substância B4 .	
Tabela 09. ^1H e ^{13}C (600 MHz, em CDCl_3) mono e bidimensionais da substância S1	83
Tabela 10. ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, em DMSO- d_6) mono e bidimensionais de S2	88
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, em DMSO- d_6) mono e bidimensionais da substância S3	94
Tabela 12. ^1H e ^{13}C (600 MHz, em CDCl_3) mono e bidimensionais da substância S4 . 100	
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H ^{13}C (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) da substância S5	106
Tabela 14. Cultivo em escala reduzida de <i>P. chlamydosporia</i>	114
Tabela 15. Rendimento e concentração de Radicol presente nos três experimentos.....	117
Tabela 16. Porcentagem e volume dos solventes utilizados - coluna cromatográfica	118
Tabela 17. Código, Massa e rendimento relativo em % das frações reunidas	119
Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C NMR da Poconin B.	125
Tabela 19. Dados RMN ^1H da Poconina E.....	126
Tabela 20. Dados RMN ^1H da Poconina L	130
Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do Mixostiol isolado e da literatura.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica a 20 °C
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
1J	Acoplamento a uma ligação
2J	Acoplamento a duas ligações
3J	Acoplamento a três ligações
AA	Ácido anacárdico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZA	5-azacitidina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DOSY	Espectroscopia de coeficiente de difusão ordenada (<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)
dt	Duplo tripleto
EAcOEt	Extrato acetato de etila
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple-quantum coherence</i>
CLAE	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
$[M - H]^-$	Molécula desprotonada
$[M + H]^+$	Molécula protonada
m/z	Relação massa carga
MHA	Ágar Mueller-Hinton

MOPS	ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MHC	caldo Müller-Hinton
<i>Q</i>	Quadrupeto
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
Nt	não testado
DAD	Photodiode array detector (detector de arranjo de diodos)
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> (ágar batata dextrose)
PDB	<i>Potato dextrose broth</i> (meio de batata dextrose)
PBS	tampão fosfato de sódio
Pg-Cv	<i>Paepalanthus giganteus (Paepalanthus chiquitensis)</i> - capítulos
Pg-Ev	<i>Paepalanthus giganteus (Paepalanthus chiquitensis)</i> - escapos
Pg-Fj	<i>Paepalanthus giganteus (Paepalanthus chiquitensis)</i> - folhas
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
R_f	Distância percorrida pela substância / distância percorrida pelo solvente, em CCD.
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânida
<i>sL</i>	Singleto largo
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
sp.	Espécies
<i>T</i>	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
R_T	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Fungos endofíticos	20
1.2 Espécie hospedeira <i>Paepalanthus chiquitensis</i> (ERIOCAULACEAE)	22
1.3 Gênero <i>Bipolaris</i>	24
1.4 Gênero <i>Fusarium</i>	26
1.5 Diversificação metabólica e epigenética	29
1.5.1 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos gerais	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Etapa química e cultivo dos fungos endofíticos	35
3.1.1 Solventes	35
3.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos	35
3.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos	35
3.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura	36
3.1.5 Manipulação dos micro-organismos	36
3.1.7 Identificação dos fungos endofíticos	36
3.1.8 Micro-organismo	36
3.1.9 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada	36
3.1.10 Suspensão de hifas-esporos	37
3.1.11 Fermentação e extração em meio de cultivo líquido	37
3.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico	38
3.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel	39
3.1.15 Isolamento dos metabólitos secundários por coluna cromatográfica	39
3.1.16 Isolamento por CLAE- DAD no modo semi-preparativo	
3.1.17 Cromatografia em Camada Delgada	40
3.1.18 Análises dos metabólitos secundários por FIA-ESI-IT-MS ⁿ	41
3.1.20 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
3.1.21 Outros equipamentos	42
3.2 Avaliação da atividade antibacteriana	43
3.2.1 DADronização da suspensão bacteriana	43
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	43
3.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima	44
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	45
3.3.1 DADronização da suspensão fúngica	45
3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	45
3.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima	46

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	48
4.1.1 Determinação da CIM dos 25 extratos estudados	48
4.1.2 Determinação da CIM do Extrato C8, frações e substâncias isoladas.....	51
4.2. Obtenção do extrato bruto em escala ampliada	53
4.3. Análises por CLAE- DAD.....	53
4.3.1 Pg-FJ(5) – <i>Bipolaris</i> sp.....	53
4.3.2 Pg-CJ(8) – <i>Fusarium</i> sp.	56
4.4. Fracionamento do EAcOEt em Sephadex e análise por CCD.....	57
4.5.1 Pg-Fj(5)	57
4.5.2. Pg-Cj(8)	59
4.5. Isolamento das substâncias por CLAE- DAD –	59
4.5.1 Pg-Fj(5)- <i>Bipolaris</i> sp.	59
4.5.2 Pg-Cj(8) - <i>Fusarium</i> sp.	60
4.6. Isolamento da substância B4 por coluna cromatográfica	64
4.7 Elucidação estrutural	65
4.7.1 Substância B1	65
4.7.2 Substância B4	76
4.7.3 Substância S1 - <i>Fusarium</i> sp.....	82
4.7.4 Substância S2 - <i>Fusarium</i> sp.....	87
4.7.5 Substância S3 - <i>Fusarium</i> sp.....	93
4.7.6 Substância S4 - <i>Fusarium</i> sp.....	99
4.7.7 Substância S5 - <i>Fusarium</i> sp.....	104
5. ESTUDO COM MODIFICADORES QUÍMICO EPIGENÉTICOS.....	113
5.1. Cultivo em escala reduzida de <i>P. chlamydosporia</i>	113
5.2. Perfil químico por CCD.....	115
5.3. Perfil cromatográfico por CLAE analítico.	115
5.4 Quantificação do radicicol nos extratos AcOEt por CLAE analítico.....	117
5.5 Fracionamento do extrato AcOEt (PDB+ MgSO ₄)	118
5.6 Isolamento do composto minoritário Poconina B	120
5.7 Isolamento das Poconinas E e L	121
5.8 Isolamento do Mixostiol.....	122
5.9 Elucidação estrutural	123
5.9.1 Substância P1 . - <i>P. chlamydosporia</i>	123
5.9.2 Substância P2 - <i>P. chlamydosporia</i>	128
5.9.3 Substância P3 - <i>P. chlamydosporia</i>	128
5.9.4 Substância P4 - <i>P. chlamydosporia</i>	128
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	137
7. REFERÊNCIAS	140

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

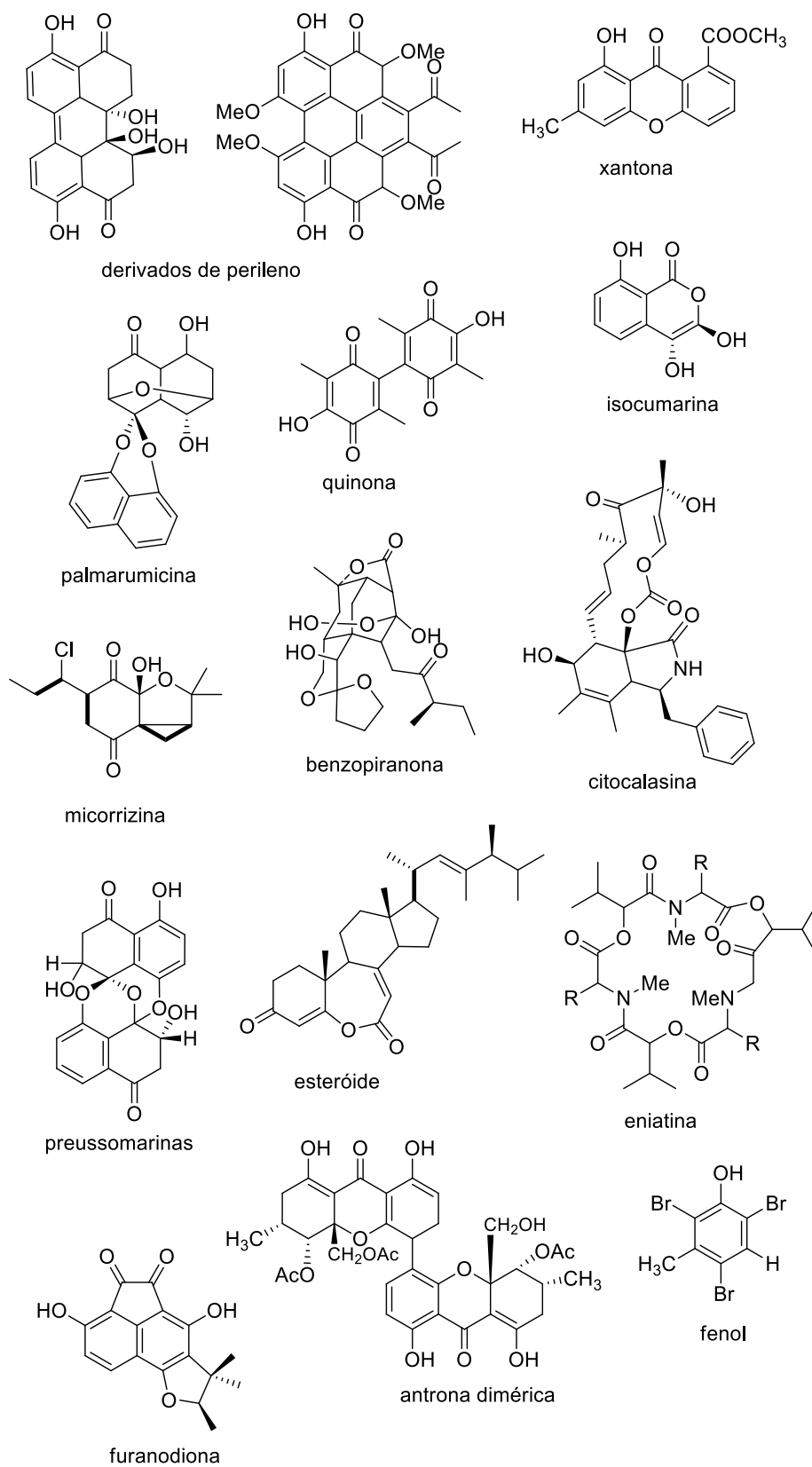
Estima-se a existência de 3,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos no planeta (O'BRIEN et al., 2005; BLACKWELL, 2011), sendo que menos de 0,1 milhão de fungos associados com organismos superiores, parasitas ou saprófitos foram descritos pela literatura (SCHEFFERS et al., 2012, EL-ELIMAT et al., 2014). Em vista disto, pesquisadores de diversas áreas envolvidos no estudo com fungos ficaram intrigados com o seguinte questionamento. onde poderiam existir os demais fungos do planeta? Tal questionamento instigou cientistas nas décadas passadas dando início às pesquisas com plantas, na tentativa de descobrir um reservatório de organismos conhecidos por endofíticos (STROBEL, 2003).

Os fungos endofíticos são definidos como fungos que vivem assintomaticamente dentro do tecido de plantas superiores (KHARWAR et al., 2011; ALY, 2013). Esses organismos são considerados uma importante fonte de novas substâncias bioativas (KHARWAR et al., 2011), sendo também capazes de produzir muitas classes de metabólitos, com várias aplicabilidades na medicina (SCHULZ, 2002). Além disso, trabalhos de relevância destacam que 51 % das substâncias isoladas de fungos endofíticos são biologicamente ativas (STROBEL, 2003; SAIKKONEN et al., 2004).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos são diversos quanto as suas estruturas e atividades biológicas. Alguns são pigmentos, outros são toxinas de plantas e/ou animais, outros podem regular o crescimento da planta, outros apresentam propriedades farmacêuticas, e outros podem também contribuir com a patogenicidade da planta (MA, et al., 2013).

Tan & Zou (2001) revisaram a diversidade de metabólitos que foram isolados de fungos endofíticos, enfatizando seu potencial papel ecológico. Estes metabólitos secundários de endófitos são sintetizados através de diversas vias metabólicas (TKACZ 2000, TAN & ZOU 2001), por exemplo, policetídeos, isoprenóides ou derivação de aminoácidos.

Figura 01. Diversidade estrutural dos metabólitos isolados dos fungos endofíticos (SCHULZ, 2002).



Como pode ser visto na Figura 01, os principais metabólitos isolados foram. esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furanodionas, terpenóides, depsipeptídeos, citocalasinas (KROHN et al., 1996, 1999a, b, 2001). Alguns deles representam novos grupos estruturais, como por exemplo, os palmarumicinas (KROHN et al., 1997a, b) e benzopiranona (KROHN et al., 2002).

1.2 ESPÉCIE HOSPEDEIRA. *Paepalanthus chiquitensis* (ERIOCAULACEAE)

A família Eriocaulaceae possui 1200 espécies e está dividida em 10 gêneros (ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012). É caracterizada por possuir inflorescências do tipo capítulos, que são envolvidos por brácteas, e folhas em forma de roseta, de onde surgem os escapos, e destes, surgem os capítulos (Figura 02) (GIULIETTI, 1997; RICCI et al., 1996).

A família Eriocaulaceae é conhecida na literatura por apresentar xantonas (SANTOS et al., 2001; PACIFICO et al., 2011) e naftopiranonas, (VILEGAS et al., 1998; SANTOS et al., 2001; ZANUTTO et al., 2012, AMARAL et al., 2014); substâncias com comprovadas atividades biológicas como antiúlcera, antioxidante (SANTOS et al., 2002; AMARAL et al., 2012) e mutagênica (VARANDA et al., 1977).

Figura 02. Espécie hospedeira *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó no estado de Minas Gerais.



Fonte: TROVÓ; SANO 2010.

A espécie *Paepalanthus chiquitensis* Herzog tem como sinonímia *Paepalanthus giganteus* Sano (TROVÓ; SANO, 2010), além disso, *Paepalanthus* é o maior gênero da família, contendo 500 espécies, das quais mais de 400 existem apenas no Brasil (GIULIETTI et al., 2012).

Ao contrário das demais espécies da família Eriocaulaceae que habitam locais com altitude elevada, *P. chiquitensis* também ocorre em regiões mais baixas (SATO, 2007).

Sua distribuição geográfica é ampla, podendo ocorrer desde o Amazonas até São Paulo, já que esta espécie se adapta a uma boa variabilidade de solos. Esta característica resulta em uma enorme variabilidade morfológica desta espécie, principalmente no que se refere ao tamanho e forma de suas folhas (SATO, 2007).

A principal utilização destas espécies é ornamental, devido à beleza exibida por seus capítulos que mesmo depois de coletados permanecem com aspecto de vivas por muitos anos, sendo por isto conhecidas popularmente como “sempre vivas”. As espécies de Eriocaulaceae são frequentemente exportadas para países da Europa, sendo por isso consideradas a principal fonte de renda para muitas famílias em Minas Gerais, Bahia e Tocantins.

Um dos fatores mais importantes que também justifica a importância em estudar fungos endofíticos associados às Eriocaulaceae, diz respeito à região onde as mesmas são encontradas. Essas espécies de plantas pertencem principalmente à região da Serra do Cipó localizada em Minas Gerais. Essa região é privilegiada para o estudo de plantas endêmicas e em extinção, que é um fator a mais para a necessidade de estudos de espécies vegetais e micro-organismos associados existentes nessas regiões de habitat extremo.

Portanto, considerando que muitas das espécies são endêmicas possuindo uma grande diversidade química e biológica, e que existem poucos estudos na literatura de micro-organismos associados com espécies da família (AMORIM et al., 2016), foi proposto neste trabalho, o estudo dos fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* a fim de se obter informações à respeito de sua microbiota, visando também à produção de novos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Os resultados dos estudos iniciais com fungos endofíticos associados às partes aéreas de *P. chiquitensis* vêm sendo realizados desde a iniciação científica (2012), resultou no isolamento 25 fungos das partes aéreas (capítulos escapos e folhas) de *P. chiquitensis*. Foram registrados os perfis químicos por CLAE-DAD dos respectivos extratos acetato de etila preparados a partir de cada um dos fungos isolados, sendo selecionado duas cepas para

prosseguimento dos estudos químicos. O fungo identificado como *Bipolaris* sp. foi selecionado por sua diversidade química por CLAE-DAD. Também foi realizada a triagem da atividade antimicrobiana desses 25 extratos preparados previamente, sendo então selecionado o *Fusarium* sp., que por ser o mais promissor quanto a atividade antimicrobiana foi escolhido para dar continuidade ao estudo químico de isolamento e identificação estrutural e também avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos isolados.

1.3 GÊNERO *Bipolaris*

O gênero *Bipolaris* é composto por fungos filamentosos ascomicetos, da Classe Dothideomycetes, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (MANAMGODA et al., 2014). O gênero *Bipolaris* contém mais de 100 espécies das quais a grande maioria é saprófita no solo e agentes patogênicos de plantas, sendo que algumas espécies são potencialmente capazes de infectarem os seres humanos e animais (DA CUNHA et al., 2012).

O gênero *Bipolaris* faz parte do grupo de fungos dematiáceos, também chamados de fungos negros. Formam um grupo de micro-organismos que possuem coloração escura, devido à presença do pigmento melanina na sua parede celular (HOFFMANN, 2011).

A melanina presente nos fungos dematiáceos é formada a partir do polímero diidroxinaftaleno (DNH), produzido no citoplasma e excretado na parede celular. A interação do polímero DNH com macromoléculas como lipídeos, proteínas e carboidratos resultam na formação do complexo melanínico, considerado um fator de virulência associado aos fungos do gênero *Bipolaris* (CALIGIORNE et al., [s.d.]).

Embora a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Bipolaris* sejam sapróbios do solo ou patógenos de plantas, as espécies *Bipolaris australiensis*, *B. hawaiiensis* e *B. spicifera* são responsáveis por infecções em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos (SHANKARAPPA et al., 2014). É considerado um fungo patogênico oportunista (BRANDT; WARNOCK, 2003).

Os fungos dematiáceos são os principais responsáveis por causarem feohifomicoses em humanos e animais (ALINE et al., 2010). A infecção pode ser cutânea, subcutânea e sistêmica (REVANKAR et al., 2002). As apresentações clínicas mais comuns são a sinusite alérgica, ceratite, endoftalmite, onícomiçose, peritonite peritoneal associada à diálise,

infecções de pulmão e pele, e, menos frequente, as infecções do sistema nervoso central (DA CUNHA et al., 2012).

As espécies pertencentes ao gênero *Bipolaris* têm sido extensivamente relatadas como produtoras de micotoxinas, fitotoxinas sendo também fonte de metabólitos secundários ativos de diferentes classes químicas (ARUNPANICHLERT et al., 2012).

Os sesquiterpenos bipolaroxina (fitotoxina) e diidrobipolaroxina foram isoladas da espécie *B. cynodontis* (SUGAWARA et al., 1985); o sesterterpeno 11-epiterpestacina (Nihashi et al., 2002) é uma fitotoxina isolada de *B. sorokiniana* (NIHASHI et al., 2002); além disso, as espécies de *Bipolaris* produzem também as fitotoxinas sesterterpenóides chamadas de ophiobolinas (AU; CHICK; LEUNG, 2000). Por fim, outros quatro diterpenóides chamados de coicenais A-D foram isolados de *B. coicis* (WANG et al., 2013).

É importante ressaltar que embora o conhecimento dos fungos do gênero *Bipolaris*, ainda seja limitado em relação à produção de metabólitos bioativos, esses organismos vêm sendo cada vez mais estudados e observados, visando tanto à descoberta de novas drogas, quanto à análise de seu potencial como possíveis causadores de doenças em humanos (SHEN et al., 1999, BRANDT & WARNOCK, 2003).

A atividade antimicrobiana das trieno amidas bipolamidas A e B isoladas de *Bipolaris* sp. foi avaliada, e a bipolamida B apresentou moderada atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides*, *C. cucumerinum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae*. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram de 16, 32, 32, 64 e 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (SIRIWACH et al., 2014).

Entre outros compostos de relevância estão a micotoxina esterigmatocistina (RABIE; LUBBEN; STEYN, 1976); a anti-microalga bipolaral isolada de *Bipolaris* sp. (WATANABE et al., 1995) e a dioxopiperazina bipolaramida isolada de *B. sorokiniana* (RABIEB, 1982). Arunpanichlert et al. (2012) descreveram o isolamento e a avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de dois compostos, sendo um deles uma cromanona dimérica chamada de bipolarinona e o ftalato bipolarilida.

A victoxinina e a pré-helmentosporolactona (MARDER et al., 2006), as citotoxinas ophiobolinas (BENCSEK et al., 2014); a fitotoxina radicinina isolada de *B. coicis* (COICIS, 1997); e a espirostaphilotrichina apresentou atividade antioxidante (WANG et al., 2013).

1.4 GÊNERO *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é composto por fungos filamentosos ascomicetos, da Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae, apresentando importantes espécies patogênicas de plantas, sendo também produtoras de micotoxinas e causadoras de doenças oportunistas (MA, et al., 2013). O gênero *Fusarium* é muito vasto e tem sido amplamente estudado nos últimos 200 anos. Muitos desses trabalhos são relatados em função da complexa taxonomia e da difícil identificação que requer um conjunto de diferentes marcadores morfológicos, biológicos e filogenéticos (SUMMERELL & LESLIE, 2011).

Durante toda a sua história, as espécies desse gênero têm sido conhecidas por sua habilidade como patógeno de plantas. No início da década de 1960, os metabólitos secundários relatados como micotoxinas em humanos e outros animais foram quimicamente caracterizados. Este arsenal de compostos incluem compostos que estão na lista do governo americano de agentes que afetam a segurança alimentar, e por isso têm se tornado uma barreira comercial (SUMMERELL & LESLIE, 2011). O gênero é capaz de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo os tricotecenos, as fumosininas e as zearalenonas as toxinas alimentares mais amplamente descritas (MARIN et al., 2013).

Os tricotecenos são uma das principais classes conhecidas de fusariotoxinas sendo indubitavelmente considerados um problema mundial por causarem significantes impactos econômicos nas culturas de cereais e de grãos. Essa classe é também comum em outros gêneros como *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* e *Trichothecium*. Todos esses fungos são da ordem Hypocreales, encontrados por todo o mundo, sendo formas bem adaptadas com grande capacidade de colonização e crescimento sob diversas condições nutricionais e disponibilidade de umidade (MCCORMICK et al., 2011).

Os tricotecenos são caracterizados por apresentarem um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno constituindo uma família de sesquiterpenóides. Existem aproximadamente 170 diferentes compostos chamados de tricotecenos, sendo estes divididos em quatro tipos (A-D) de acordo com as variações no grupo funcional hidroxila e no grupo lateral acetoxi. Os tricotecenos dos tipos A são representados pelas toxinas HT-2 e pela toxina T-2, e o tipo B é representado pelo desoxinivalenol (DON). Em geral, os tricotecenos são compostos muito estáveis e não são degradados em altas temperaturas. Os tipos C e D incluem alguns tricotecenos de menor importância (MARIN et al., 2013).

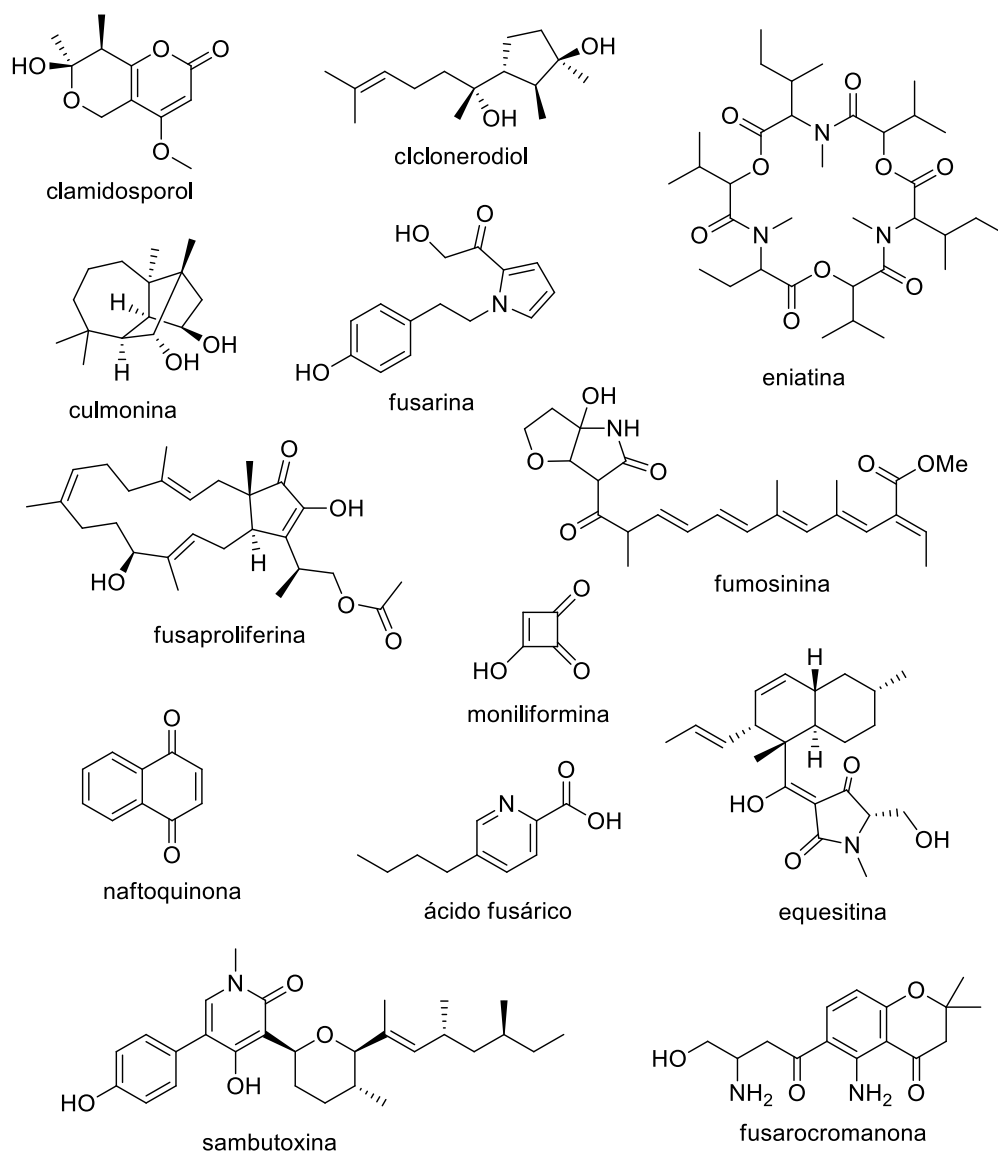
Os tricotecenos estão entre os metabólitos secundários mais nocivos de fungos para a saúde humana e animal, causando uma série de sintomas agudos e crônicos. Quando consumido através de alimentos contaminados, os tricotecenos são neurotóxicos, imunossupressores e nefrotóxicos (FRUHMANN et al., 2014).

Os sintomas resultantes da intoxicação por tricotecenos incluem vômitos, inflamação da pele, perda de peso, podendo ocasionar a morte de humanos e de animais (CORLEY et al., 1987).

Outro metabólito produzido por fungo pertencente ao gênero *Fusarium* é o ácido fusárico, uma das micotoxinas mais distribuídas na natureza (SANTIN et al., 2000). Na literatura BACON et al. (1996) essa micotoxina é considerada um indicador da contaminação de *Fusarium* em grãos e alimentos (SANTIN et al., 2000).

Outros metabólitos secundários de grande importância produzidos pelo *Fusarium* incluem. acuminatum, beauverivina, butenolida, culmorina, ciclonerodiol, eniatinas, equisetinas, fusaprolieferinas, fusariocromanonas, ácido fusárico, fusarinina, moniliformina, moniliformina, sambutoxina e wortmanina (Figura 03), não sendo esses metabólitos produzidos estritamente por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* (SUMMERELL & LESLIE, 2011).

Figura 03. Diversidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos de *Fusarium* spp (SUMMERELL & LESLIE, 2011).

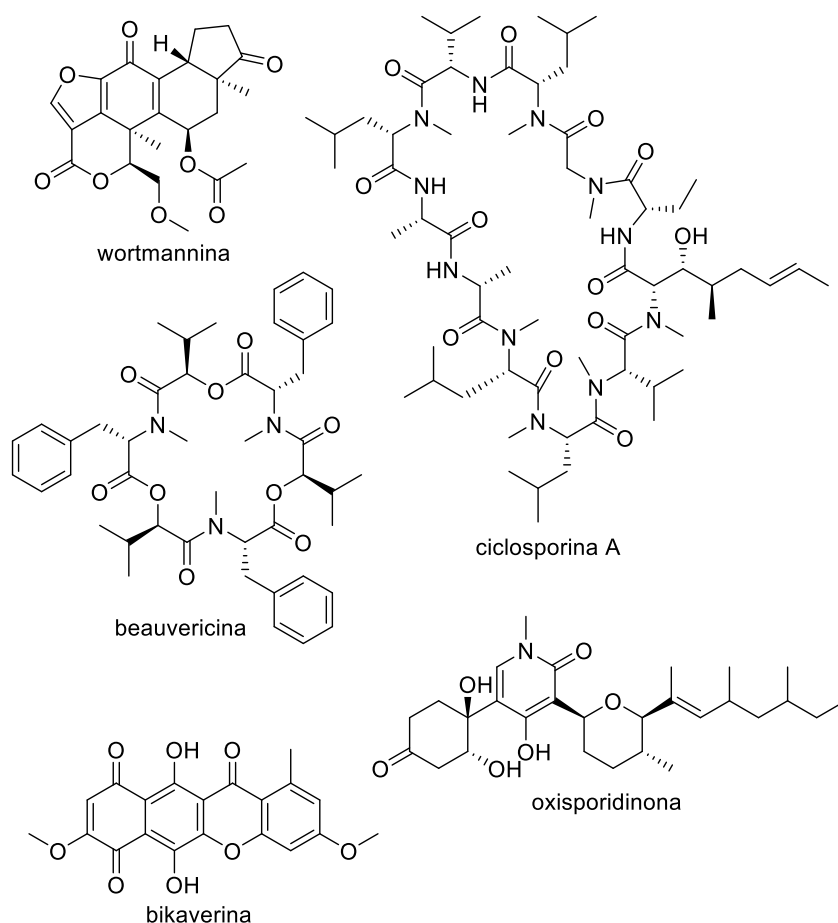


Fonte: SUMMERELL & LESLIE, 2011 com modificações.

Diversos trabalhos descrevem os fungos do gênero *Fusarium* como sendo uma fonte rica de metabólitos secundários biologicamente ativos (WANG et al., 2011), incluindo os agentes antifúngicos oxisporidinona (BREINHOLD et al., 1997), o agente antimicrobiano bicaverina que é um pigmento avermelhado produzido por várias espécies do gênero (LIMÓN; RODRÍGUEZ-ORTIZ; AVALOS, 2010); a micotoxina beauvericinaé, uma micotoxina com propriedade inseticida e que pode induzir apoptose em células animais

sendo produzida por *Fusarium* spp. (Figura 04) (LOGRIECO et al., 1998), e o agente imunossupressor ciclosporina A (RODRIGUEZ; CABRERA; GODEAS, 2006).

Figura 04. Metabólitos secundários ativos isolados de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.



Fonte: elaborada pelo autor.

1.5 DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA E EPIGENÉTICA

Os endofíticos podem ser manipulados geneticamente e físico-quimicamente, tanto para aumentar a produtividade de metabólitos desejados quanto para produzir novos análogos de metabólitos bioativos (KHARWAR et al., 2011).

Infelizmente, os métodos de fermentação usuais tais como modo estático, agitação em “shaker” e os meios de cultura artificialmente definidos não são opções satisfatórias para mimetizar o habitat natural de um fungo endofítico. Consequentemente, apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários serão sempre

expressos no ambiente artificial de laboratório, limitando assim o potencial desses organismos (WILLIAMS et al., 2008).

O termo epigenética é definido como alterações herdáveis na expressão gênica que ocorrem sem que haja mudanças na sequência do DNA (CHERBLANC et al., 2013). O epigenoma representa uma promissora oportunidade para a obtenção de novos metabólitos secundários de fungos e outros organismos.

O uso de modificadores epigenéticos pode ser explorado como uma ferramenta efetiva para promover a expressão das vias biossintéticas silenciosas responsáveis por produzir metabólitos secundários com características únicas (LIU et al., 2014). Além disso, tem sido descrito na literatura que oligossacarídeos, metais pesados e solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido atuam como eliciadores químicos, ou seja, são capazes de induzir a produção de metabólitos pelos fungos (PETTIT, 2011). Diferente dos modificadores químicos e epigenéticos, os eliciadores químicos induzem a produção de metabólitos secundários por meio de mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados (CHAGAS, 2014).

Existem diferentes mecanismos epigenéticos, estes estão envolvidos nas alterações do epigenoma, que controla a acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas. Dos mecanismos epigenéticos, os mais estudados e conhecidos são a metilação do DNA e as modificações das histonas (CICHEWICZ, 2010; FISCH et al., 2009). Assim, o tratamento dos fungos com inibidores químicos das enzimas HDAC e DNA-metiltransferase pode promover potencialmente o aumento na produção e diversificação dos metabólitos produzidos por eles (CHUNG, 2013).

As vantagens em usar inibidores de pequenas moléculas que têm como alvo o epigenoma reside no fato dessa técnica ser de baixo custo, sendo de fácil implantação na maioria dos laboratórios de pesquisa não requerendo o conhecimento prévio sobre sequências genômicas dos fungos (CICHEWICZ, 2010). Verificou-se recentemente que a incorporação de metais pesados nos meios de cultura melhora a produção de metabólitos fúngicos (PARANAGAMA et al., 2007).

1.5.1 *Pochonia chlamydosporia*

A espécie *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams (sinonímia *Verticillium chlamydosporium*) (ZARE; GAMS; EVANS, 2001) foi reportada pela primeira vez em 1974 como sendo um parasita de ovos de nematódeos por Wilcox e Tribe no Reino Unido. Desde então, esse fungo tornou-se um dos mais estudados por ser um agente de controle biológico de nematódeos (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013).

O fungo *P. chlamydosporia* faz parte do numeroso grupo de fungos parasitas de ovos, sendo uma das espécies mais estudados do grupo (ATKINS et al., 2003) possuindo distribuição mundial. Esse fungo é encontrado em solos supressivos (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013), um tipo de solo onde o desenvolvimento de doenças é suprimido, mesmo para patógenos na presença de um hospedeiro suscetível (COOK 1974; GHINI; ZARONI, 2001).

A espécie *P. chlamydosporia* é um fungo nematófago, sendo capaz de infectar ou capturar nematoides (FERNANDES et al., 2014). Esse fungo coloniza e penetra os ovos de helmintos através de uma estrutura chamada de apressórios (LYSEK, 1976, 1978; LYSEK; STERBA, 1991).

Com relação à sua nutrição, a espécie *P. chlamydosporia* não é estritamente dependente de nematoide para sobreviver, sendo considerada também como saprófita na ausência do hospedeiro. É capaz de produzir estruturas de resistência chamadas de clamidósporos (KERRY, 2001). Os clamidósporos são estruturas de sobrevivência do fungo nematófago *P. chlamydosporia* (DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2011), e em situações de condições extremas não favoráveis, aumentam a sobrevivência desse fungo.

Entre os metabólitos secundários isolados de *P. chlamydosporia* relatados na literatura encontra-se o radicicol também conhecido pelo nome de monorden, um inibidor da proteína do choque térmico ou Hsp 90, que tem participação em vários processos celulares como proliferação celular, diferenciação e apoptose (HE et al., 2013). Essas proteínas também estão envolvidas em doenças como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica, o câncer, as doenças infecciosas entre outras (MEYER; SILVA, 1999).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

- Contribuir para o conhecimento químico-farmacológico sobre fungos endofíticos associados às espécies de Eriocaulaceae.
- Explorar a abordagem epigenética na avaliação da produção metabólica do fungos endofítico *P. chlamydosporia*.

2.2 Objetivos específicos:

- Realizar o ensaio antimicrobiano, e avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos produzidos previamente (25 cepas) pela associação de endofíticos e partes aéreas de *P. chiquitensis*;
- Realizar o cultivo em escala ampliada do fungo endofítico que apresentar a melhor atividade antimicrobiana;
- Identificar os gêneros dos endofíticos;
- Fracionar o extrato AcOEt por técnicas cromatográficas convencionais até o isolamento dos metabólitos secundários;
- Elucidar e/ou identificar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas e espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, UV, IV e MS).
- Avaliar a ação de modificadores epigenéticos e metais pesados no extrato produzido pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ETAPA QUÍMICA E CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

3.1.1 Solventes

- ✓ Solventes PA: Acetona, AcOEt (Synthlab®), CHCl₃ (Synthlab®), DCM, DMSO (Sigma-Aldrich®) EtOH, MeOH (Synthlab®), *n*-BuOH (Synthlab®) e *n*-PrOH (Synthlab®);
- ✓ Solventes CLAE: ACN (Tedia®), MeOH (Baker®), água purificada em sistema Milli Q (Millipore®) e TFA (Mallinckrodt®);
- ✓ Solventes deuterados. CDCl₃ (Sigma-Aldrich®) e DMSO-*d*₆ (CIL®).

3.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos

- ✓ PDA (meio de cultivo sólido) - Potato dextrose agar (DIFCO® e Acumedia®). 39 g/L de água. [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g), ágar (15 g)];
- ✓ PDB (meio de cultivo líquido) - Potato dextrose broth (Himedia®). 24 g/L de água. [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g)].

3.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos

Os efeitos na produção e diversificação dos metabólitos foram realizados na presença e ausência de modificados químicos epigenéticos. ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) e 5- azacitidina (AZA), de íons metálicos Cu²⁺ e Mg²⁺ e do composto fenólico conhecido como ácido anacárdico (AA), encontrado no líquido da castanha de caju (LCC) isolado da espécie *Anacardium occidentale* L.

3.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e também dos meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave do fabricante Quimis®, sendo mantidos a temperatura de 121 °C por 15 minutos.

3.1.5 Manipulação dos micro-organismos

O procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação dos micro-organismos foram realizados em capela de vazão laminar (Pachame®) PA 310-Serie 172-99.

3.1.6 Isolamento dos fungos endofíticos

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com Dra. Vanessa Mara Chapla, orientada da Profa. Dra. Angela Regina de Araújo do Instituto de Química da Unesp

3.1.7 Identificação dos fungos endofíticos

A cepa codificada como Pg-CJ (8) foi enviada para a Genotyping incubadora, localizada em Botucatu. A identificação foi realizada através do 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 GenBankSanger (MicroID™). Os dados da sequência obtidos para o *Fusarium* sp. foram depositados no GenBank (número de acesso KF293373) e comparadas com a pesquisa BLAST apresentando 99 % de similaridade com a sequência de *Fusarium* sp. (Fs 027 TNPB-L1). A outra cepa estudada neste trabalho e codificada como Pg-FJ (5) foi identificada como sendo pertencente ao gênero *Bipolaris*

3.1.8 Micro-organismo

Foi realizado o cultivo com modificadores químicos epigenéticos de *Pochonia chlamydosporia* (sin. *Verticillium chlamydosporium*) cepa ATCC.

3.1.9 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada

Para a obtenção do EAcOEt em escala ampliada do fungo *Bipolaris* sp. (Pg-Fj (5)) e *Fusarium* sp. (Pg-CJ(8)), as linhagens estudadas foram repicadas para placas de Petri

contendo PDA para obtenção de maior massa micelar e posterior cultivo em meio líquido PDB. Após o período de incubação, foram inoculadas em respectivamente, 6,3 L (21 frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio líquido) e 8,1 L de meio de cultivo PDB (27 frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio líquido), e mantidas em modo estático, sob temperatura controlada (25 °C) por 28 dias. Ao final do período de fermentação o meio de cultivo foi filtrado. O filtrado aquoso foi submetido a partição líquido/líquido com AcOEt (3x volume total do filtrado), que após a evaporação do solvente resultou nos extratos brutos.

4.1.10 Suspensão de hifas-esporos.

O fungo *P. chlamydosporia* foi repicado em placa de Petri contendo PDA e incubados a 28 °C 160 rpm, por um período de 7 dias. Os micélios foram rasgados e colocados em água estéril. Esta suspensão foi agitada em vortex e filtrada em separador celular (100 µm). Em seguida, as suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro ($OD_{600} = 0.40-0.60$). A suspensão de hifas e esporos foi utilizada no cultivo em meio líquido PDB (item 4.1.11).

4.1.11 Fermentação e extração em meio de cultivo líquido

A suspensão de hifas e esporos preparada como descrita no item 4.1.10 foi utilizada para inocular o fungo *P. chlamydosporia* em meio de cultivo líquido. Este fungo foi cultivado em escala reduzida e avaliados em sete diferentes condições de cultivo, em triplicata. O volume de 750 µL da suspensão de hifas-esporos ($OD_{600} = 0,3$) foi adicionado em cada um dos 21 frascos Erlenmeyer (250 mL) preparados com 50 mL de PDB. As seguintes condições foram avaliadas. PDB (controle), PDB+SAHA; PDB+AZA PDB+ Cu^{2+} ; PDB+ Mg^{2+} , PDB+AA (Tabela 01). Os frascos foram agitados num agitador rotativo a 28 °C e 160 RPM.

No 14º dia foi verificado a ausência de glicose (negativo) para os ensaios contendo AA e SAHA. Os valores de pH foram medidos e a fermentação interrompida para todos os 21 frascos. Então, o meio líquido aquoso foi separado dos micélios por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3x 1/3 volume filtrado). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com água destilada (3x 1/5 volume filtrado), sendo posteriormente secas com $MgSO_4$, o qual foi removido por filtração simples. O solvente orgânico foi

removido em evaporador rotativo para obtenção dos extratos brutos. Os perfis cromatográficos dos extratos foram registrados.

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de *P. chlamydosporia*

Código	Ensaio	[] final meio em µm	Vol. PDB em mL	[] sol. estoque em mM	Vol. solução estoque em µL
FH-198-93_1	PDB	-	50	-	-
FH-198-93_2	CuSO ₄	250	50	100	125
FH-198-93_3	MgSO ₄	250	50	100	125
FH-198-93_4	AA	100	50	100	50
FH-198-93_5	SAHA	100	50	100	50
FH-198-93_6	AZA	100	50	50	100
FH-198-93_7	PDB + DMSO	-	50	-	50

* Soluções estoque de SAHA e AA em 100 % DMSO

3.1.12 Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD

Todos os extratos injetados no cromatógrafo foram previamente submetidos ao *clean-up* em cartucho de SPE de 1000 mg/6 mL (55 µm, Strata-X, Phenomenex®) preenchidos com sílica de fase reversa C18, (1 mg da amostra para 10 mg de fase estacionária sílica C18). Os cartuchos foram primeiramente ativados com MeOH (100%, 2,0 mL, 3 vezes), 20 mg de cada um dos extrato foi solubilizado em 2,0 mL de MeOH a 100 %. Após isso, o extrato foi aplicado no cartucho de SPE e eluído com a mesma fase móvel utilizadas nas etapas de ativação do cartucho e solubilização da amostra. O eluato foi levado a capela até a secar, solubilizado na concentração de 10 mg/mL (MeOH:H₂O, 1:1, v/v) e, por fim, filtrado em membrana de PTFE de 0,22 µm (Millex®, Merck Millipore), coletado em vial de 1,5 mL e analisado por CLAE- DAD.

3.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico

Para registrar os cromatogramas dos extratos e das substâncias isoladas dos fungos de *P. chiquitensis*, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco®). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software

EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec®). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4 x 3 mm d.i. As substâncias foram injetadas por de um injetor Rheodyne® 7125 com um loop de 100 µL, volume de injeção de 20 µl.

Para as análises realizadas com o fungo *P. chlamydosporia* utilizou-se um CLAE modelo HITACHI D-6000 acoplado a um detector de arranjo de foto diodos modelo HITACHI L-4500, bomba quartenária.

3.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel

O extrato AcOEt produzido a partir do cultivo do fungo endofítico foi fracionado em coluna de vidro com 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia), acoplada à bomba peristáltica P1 18-1110-91 e a um coletor automático de frações RedFrac (Pharmacia®), com capacidade para 95 frações. Para o fracionamento, o extrato (1,3 g) foi solubilizado em MeOH (6,0 mL), e em seguida centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm (centrífuga CELM®, COMBATE), separando-se o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado com algodão e aplicado na coluna de sephadex LH-20, eluída com MeOH a 100%. Foram obtidas 45 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais foram submetidas a trigem química por CCD.

O extrato AcOEt preparado a partir do cultivo de *P. chlamydosporia* (ATCC) foi fracionado em coluna de vidro com 60 cm de altura por 1,0 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia), eluída com os sistemas de solventes Hex-DCM (1:4, v/v), DCM-Acetona (3:4, v/v), DCM-Acetone (1:4, v/v), DCM-MeOH (1:1, v/v), e finalmente MeOH, sendo utilizado 7,5 mL de cada um destes sistemas de solventes. Foram coletadas 30 frações (1 mL) cada, analisadas por CCD e foram reunidas em conformidade com os seus perfis químicos sendo reunidas em 5 outras frações.

3.1.15 Isolamento dos metabólitos secundários por coluna cromatográfica

Na cromatografia em coluna *flash* foi utilizada como fase estacionária silica gel (SiO₂), tamanho da partícula na faixa de 230 - 400 mesh (40-63 µm) e tamanho do poro de 60 Å (Fluka®). Empacotada em um suporte de vidro com 45 cm de altura por 2,0 cm de diâmetro interno, na forma de suspensão com clorofórmio a 100%. Antes do dar início ao empacotamento, foi utilizado como agente filtrante algodão e sobre este, colocado uma fina

camada de areia para cromatografia com tamanho de partícula de 50-70 mesh (Sigma-Aldrich®). A coluna foi condicionada com a fase inicial $\text{CHCl}_3.\text{AcOEt}$ (8.2, v/v), durante a eluição foi aumentada a força de eluição, eluindo então a coluna com os sistema $\text{CHCl}_3.\text{AcOEt}$ (7.3, v/v). O bombeamento foi realizado utilizando um aparato montado em nosso laboratório, constituído por uma pera com válvula de metal, 30 cm de mangueira de borracha e uma conexão de vidro com junta esmerilhada 24/40. Frações de 10 ml foram coletadas e analisadas por CCD, condições experimentais descritas no item 3.1.17.

3.1.16 Isolamento dos metabólitos secundários por CLAE- DAD no modo semi-preparativo

As análises preparativas por CLAE- DAD foram executadas usando cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo PU-2086 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos, monitorado nos comprimentos de onda $\lambda=254$ nm, $\lambda=280$ nm, $\lambda=305$ nm e $\lambda=366$ nm, modelo MD-2010 (Jasco®). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software Chromnav (Jasco®). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 10,0 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 10 μm protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4,0 x 3,0 mm d.i. A fração estudada foi injetada através de um injetor Rheodyne® 7125, com um loop de 500 μL , volume de injeção de 200 μL .

3.1.17 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a análise dos extratos, das frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20 e da purificação por coluna cromatográfica de sílica e CLAE-DAD preparativo, foram utilizadas placas de sílica gel, UV 254, marca Sorbent Technologies®, base de alumínio 200 μm . Cada fração obtida das etapas de fracionamento e purificação foi aplicada em uma placa de sílica de 20x5cm. As placas foram eluídas com sistema de solvente quartenário (CHCl_3 : MeOH: *n*-PrOH. H_2O , 5:6:1:4 v/v/v/v) e com sistema de solvente binário ($\text{CHCl}_3.\text{AcOEt}$ 1/1 v/v). Após a eluição, reveladas primeiro com a luz UV, e em seguida foi borrifada uma solução de anisaldeído/ H_2SO_4 . As placas foram posteriormente levadas a uma estufa a 130 °C. Após revelação das cromatoplasas, as frações que apresentaram mesmos R_fs (fatores de retenção) e coloração foram reunidas e transferidas para o mesmo frasco. As reuniões foram concentradas até a secura em evaporador rotativo, as massas medidas em balança analítica e armazenadas ao abrigo da luz e umidade.

3.1.18 Análises dos metabólitos secundários por FIA-ESI-IT-MSⁿ

As substâncias isoladas dos fungos endofíticos de *P. chiquitensis* foram analisadas *on-line* por FIA–ESI-IT-MSⁿ em um espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em vazão contínuo (FIA). Cada composto foi dissolvido em MeOH:H₂O (85:15) na faixa de concentração de 10 a 20 ppm e injetado na fonte de ionização por *electrospray* (ESI) com vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), em modo positivo para as substâncias **B1**, **S1**, **S3**, **S4** e **S5** e modo negativo para as substâncias **B4** e **S2**, assim como para as fragmentações em múltiplos estágios (MSⁿ). As fragmentações foram realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). As condições experimentais utilizadas, são as seguintes. voltagem do spray 3 kV, voltagem do capilar 15 V, temperatura do capilar 275 °C, gás de arraste (N₂) vazão 5 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

3.1.19 Análise dos metabólitos por ESI-qQTOF-MS

Para espectrometria em alta resolução, os espectros foram obtidos em um espectrômetro de massas Q-TOF MaXis ImpactTM, equiDADo 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) e foram ionizadas por electrospray (ESI).

3.1.20 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de 1D. ¹H, ¹³C e 2D. COSY, HMQC, HMBC e TOCSY foram realizadas nos espectrofotômetros de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Ascend III 600 MHz (14.1T) e Bruker Fourier 300 MHz (7.0 T). As substâncias foram dissolvidas em CDCl₃ (Aldrich) ou DMSO-*d*₆ (CIL), sendo empregado TMS como DADrão interno.

As espectros das estruturas das substâncias isoladas de *P. chlamydosporia* foram registrados em um RMN Bruker Avance III de 400 MHz e o espectros de massas foram gravadas em Shimadzu LCMS-QP8000α.

3.1.21 Outros equipamentos

- ✓ Balanças analíticas (Marte[®], AL 200; Shimatzu, AY220) com capacidade para 200g e precisão de 0,001g.
- ✓ Evaporador rotativo (Heidolph[®], Laborota 4001. efficient) equiDADo com bomba à vácuo (Heidolph[®], Rotavac valve control).
- ✓ Polarímetro JASCO DIP-digitais 370
- ✓ IV. ThermoScientific Nicolete modelu iS5. FT-IR Spectrometer (KBr)

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima foi realizada no laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da FCFAr. Unesp Araraquara sob a co-orientação da Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

3.2.1 DADronização da suspensão bacteriana

Foram preparados cultivos das bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella* (ATCC 19196) em caldo MH, e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a DADronização 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 ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância de 0,10 a 0,15. Posteriormente, a suspensão foi diluída na proporção 1.10 em caldo MH 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.

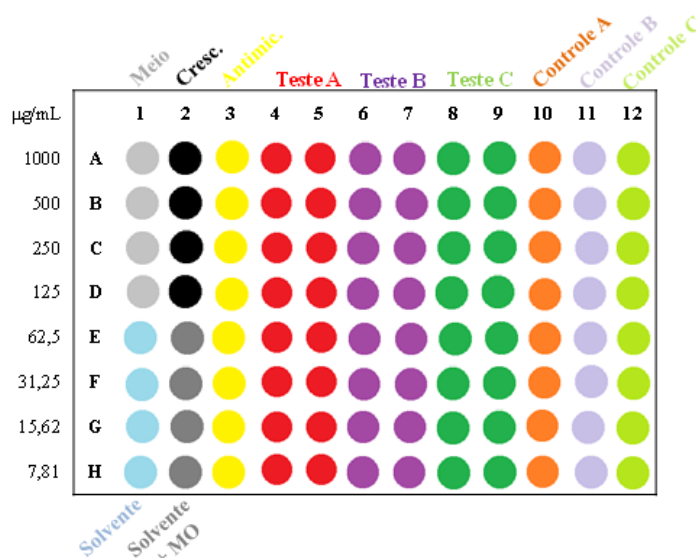
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) foram realizados segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 80 µL de caldo MH, seguido de 100 µL de cada um dos extratos, diluídos em DMSO 20% 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 a coluna H. Um volume de 20 µL da suspensão bacteriana DADronizada foi adicionada em cada poço completando um volume final de 100 µL, a concentração final no poço A foi de 1000 µg/mL e no poço H de 7,8 µg/mL (Figura 05).

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

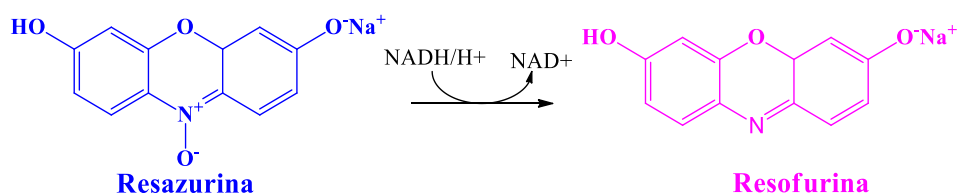
Figura 05. Esquema da microplaca para a determinação da CIM.



Fonte: Adaptado de BONIFÁCIO, 20014.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Foi observado a turbidez por meio da leitura visual sem uso de revelador, e posterior avaliação colorimétrica utilizando 30 µL resazurina (100 µg/mL) como indicador (Figura 06). 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.

Figura 06. Reação de oxirredução da resazurina (FUKUSHIMA et al., 2003)



Fonte: Adaptada de FUKUSHIMA et al., 2003.

3.2.3 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 (MHA), 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.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.3.1 DADronização da suspensão fúngica

Foi preparado cultivo de levedura *C. albicans* (ATCC 10231) em caldo sabouraud dextrose (caldo SD), e incubados a 37 °C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a DADronização 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.

3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antifúngica e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) foi realizadas segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e Duarte et al., 2005, com modificações.

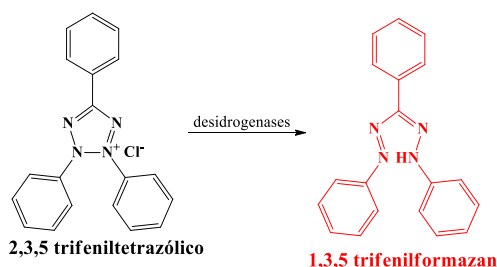
Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 100 µL de RPMI 1640, ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Seguido de 100 µL de cada um dos extratos, diluídos em 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 (Figura 05). Um volume de 100 µL da suspensão de levedura DADronizada 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 foram realizados o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, 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) (0,02 g/mL) como indicador (Figura 07). 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 rosa. Os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano se coram de vermelho (Duarte et al., 2005). Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 07. Reação de oxirredução do TTC (DUARTE et al, 2005).



Fonte: Adaptada de DUARTE et al, 2005.

3.3.3 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.1.1 Determinação da CIM dos 25 extratos estudados

A atividade antimicrobiana dos 25 extratos produzidos a partir do cultivo dos fungos endofíticos isolados das partes aéreas de *P. chiquitensis* (capítulo, escapos e folhas) foi avaliada, através da triagem biológica (conforme descrito no item 3.2) sendo possível identificar o extrato mais promissor, assim como os demais extratos ativos para as cepas de bactérias Gram-negativas (*E.coli* e *S. setubal*), bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e da levedura *C. albicans* resistente ao fluconazol. A Tabela 02 apresenta os resultados de CIM obtidos na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos, após a adição do revelador resazurina para atividade antibacteriana e do TTC para atividade antifúngica.

Os resultados de CIM para as atividades antibacteriana e antifúngica mostraram que 12 extratos apresentaram atividade biológica. Os extratos C8 foi o único que apresentou atividade para *E. coli* na concentração de 500 µg/mL. Outros 5 extratos apresentaram atividade para *Salmonella* com destaque para C8 e C9 que apresentaram atividades nas respectivas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL. A cepa de *S. aureus* foi a que obteve o maior número de extratos ativos (total de 12 extratos). As cepas C8 e C9 apresentaram os melhores resultados nas respectivas concentrações de 250 µg/mL e 62,5 µg/mL. Apenas as cepas C8 (1000 µg/mL) e C9 (500 µg/mL) apresentaram atividade antifúngica para *C. albicans*, sendo este resultado muito interessante por se tratar de uma cepa resistente ao antifúngico fluconazol.

Os resultados de CBM e CFM estão apresentados na Tabela 03 e mostram que apenas a minoria dos extratos testados apresentaram efeitos bactericida e fungicida. Embora inferiores quando comparados aos valores de CIM, o extrato C8 foi o único que apresentou atividade tanto de CBM quanto de CFM para todas as quatro cepas testadas.

Devido a sua excelente capacidade de inibir o crescimento para todos os micro-organismos testados na triagem biológica, (C8) foi então o escolhido para dar continuidade ao estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana.

Tabela 02. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de *P. chiquitensis*.

Extratos Avaliados	CIM ^a			
	<i>Bactérias Gram-negativa</i>		<i>Bactéria Gram-positiva</i>	<i>Levedura</i>
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
F1	-	-	-	-
F2	-	-	-	-
F3	-	-	-	-
F4	-	-	500	-
F5	-	-	1000	-
F6	-	-	-	-
F8	-	1000	-	-
F9	-	-	1000	-
F10	-	-	-	-
F11	-	-	1000	-
F12	-	-	-	-
F13	-	-	-	-
E1	-	-	-	-
E2	-	-	-	-
E3	-	-	-	-
E4	-	-	-	-
E8	-	-	1000	-
E9	-	-	250	-
E10	-	1000	1000	-
E12	-	-	-	-
C1	-	-	-	-
C2	-	1000	-	-
C4	-	-	1000	-
C8	500	500	250	1000
C9	-	500	62,5	500
Amp.	6,25	12,6	0,15	-
Anf. B	-	-	-	8,0
Fluc.	-	-	-	ND

^a valores em µg/mL; (-) CIM > 1000 µg/mL; ND = não detectado; Amp = Ampicilina; Anf. B = Anfotericina B; Fluc = Fluconazol.

Tabela 03. CBM e CFM dos extratos dos fungos endofíticos de *P. chiquitensis*.

Extratos Avaliados	CBM ^a		CFM ^a	
	<i>Bactéria</i> <i>Gram-negativa</i>		<i>Bactéria</i> <i>Gram-positiva</i>	<i>Levedura</i>
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
F1	-	-	-	-
F2	-	-	-	-
F3	-	-	-	-
F4	-	-	-	-
F5	-	-	-	-
F6	-	-	-	-
F8	-	-	-	-
F9	-	-	-	1000
F10	-	-	-	-
F11	-	-	1000	-
F12	-	-	-	-
F13	-	-	-	-
E1	-	-	-	-
E2	-	-	-	-
E3	-	-	-	-
E4	-	-	-	-
E8	-	-	-	-
E9	-	-	500	-
E10	-	-	-	-
E12	-	-	-	-
C1	-	-	-	-
C2	-	-	-	-
C4	-	-	1000	-
C8	250	250	250	1000
C9	-	-	-	1000
Amp.	6,25	12,6	0,15	-
Anf. C	-	-	-	8,0
Fluc	-	-	-	ND

^a valores em µg/mL; (-) CIM > 1000 µg/mL; ^a valores em µg/mL; (-) CIM > 1000 µg/mL; ND = não detectado; Amp = Ampicilina; Anf. B = Anfotericina B; Fluc = Fluconazol.

4.1.2. Determinação da CIM do Extrato C8, das frações e das substâncias isoladas

O extrato C8 (Pg-Cj 8) preparado a partir do cultivo do fungo endofítico *Fusarium* sp. foi o mais ativo e portanto foi o selecionado para prosseguir com os estudos químicos e biológicos. O extrato em escala ampliada de C8 forneceu massa suficiente para as etapas de isolamento e elucidação estrutural. Este extrato foi fracionado em coluna de permeação em gel, Sephadex LH-20, as frações foram reunidas em seis grupos denominados com as letras de A a F (item 4.5.2).

Conforme demonstra as Tabelas 04 e 5 algumas frações e substâncias purificadas tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas.

Os resultados da CIM (Tabelas 04 e 05) mostraram que houve diferenças na atividade entre os extratos produzidos em pequena e escala ampliada, sendo que este último apresentou relativamente menor atividade para todas as quatro cepas testadas quando comparado com o extrato em pequena escala. As quatro frações do Sephadex tiveram na sua grande maioria valores de CIM próximos de 1000 µg/mL, a reunião C foi a que apresentou o melhor resultado para a bactéria *S. aureus* (250 µg/mL).

As substâncias purificadas e identificadas como **S2** e **S3** foram as que apresentaram os melhores valores para as cepas testadas. A substância **S2** apresentou o valor de CIM de 250 µg/mL para todas as quatro cepas testadas. A substância **S3** apresentou os mesmos valores da CIM para *E. coli* e *S. aureus*, diferenciando o CIM para a *S. setubal* que foi de 500 µg/mL, apresentando o melhor resultado para a levedura *C. albicans* (125 µg/mL). A Tabela 04 apresenta os resultados da CIM obtidos na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica das oito amostras testadas, após a adição do revelador resazurina e TTC, respectivamente.

As CBM e CFM foram analisadas apenas para os poços que apresentaram atividade frente à CIM, ou seja, apenas foi realizado o subcultivo dos poços das microplacas que não houveram crescimento em placas de Petri preparadas com AMH (bactérias) ou ASD (levedura). A substância **S3** é bactericida para *E. coli* na concentração de 500 µg/mL, sendo também a única que apresentou CBM para a *S. setubal* e *C. albicans* na concentração de 1000 µg/mL. Os resultados da CBM e CFM estão apresentados na Tabela 05.

Tabela 04. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos, frações e substâncias de *Fusarium* sp.

Amostras Avaliadas	CIM ^a			
	<i>Bactéria</i> <i>Gram-negativa</i>		<i>Bactéria</i> <i>Gram-positiva</i>	<i>Levedura</i>
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
A	1000	1000	1000	-
B	500	500	250	1000
C	1000	1000	250	-
D	1000	-	500	-
E	1000	1000	1000	250
F	-	1000	500	-
S2	250	250	250	250
S3	250	500	250	125

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

Tabela 05. Atividade bactericida e fungicida dos extratos, frações e substâncias de *Fusarium* sp.

Amostras Avaliadas	CBM ^a		CFM ^a	
	<i>Bactéria</i> <i>Gram-negativa</i>		<i>Bactéria</i> <i>Gram-positiva</i>	<i>Levedura</i>
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
A	-	-	1000	-
B	-	-	1000	-
C	-	-	1000	-
D	-	-	1000	-
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-
S2	-	-	-	-
S3	500	1000	-	1000

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

4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO EM ESCALA AMPLIADA

O extrato produzido pelo fungo endofítico Pg-Cj(8), como apresentado na discussão do ensaio biológico, foi o que apresentou melhor resultado na atividade antimicrobiana entre todos os 25 extratos testados, e por isso foi o escolhido para o crescimento em escala ampliada, seguindo a metodologia descrito no item 3.2.

Novos “slants” foram preparados (frascos ampola contendo água estéril) para a preservação da cepa, sendo realizado repique do meio sólido (placas de PDA) para o meio líquido (27 enlenmeyer contendo 300 mL de meio PDB em cada um), e então foram realizadas as etapas finais de preparo do extrato (filtração, partição com AcOEt e concentração em evaporador rotativo) fornecendo 1,7 g do EAcOEt.

4.3. ANÁLISES POR CLAE-DAD

Considerando a natureza de média a alta polaridade das substâncias extraídas pela partição com AcOEt, os extratos em escala reduzida e ampliada, codificado como Pg-FJ(5) e Pg-CJ(8) foram submetidos à análises por CLAE-DAD. Os perfis cromatográficos dos extratos foram comparados possibilitando verificar a reprodutibilidade e a variabilidade dos metabólitos produzidos pelos endofíticos estudados, *Bipolaris* sp. e *Fusarium* sp., respectivamente.

4.3.1 Pg-FJ(5) – *Bipolaris* sp.

A avaliação dos perfis cromatográficos obtidos mostrou semelhança entre o extrato preparado em escala reduzida com o preparado em escala ampliada. Os picos **1** ($t_r = 15,81$ min), **2** ($t_r = 19,37$ min) e **3** ($t_r = 20,33$ min) apresentaram intensidades dos seus sinais com valores muito próximos nos dois modos de crescimento, não havendo aparentemente significativa diferença no número de substâncias produzidas pelo endofítico em ambos os modos de crescimento, porém, o pico **4** ($t_r = 30,69$ min) como mostrado no cromatograma da Figura 05, apresentou-se como um pico intenso, sugerindo que o endofítico produziu em escala ampliada (Figura 06) muito mais desse metabólico do que em escala reduzida.

Uma observação pertinente com relação às diferentes intensidades dos picos foram observadas nos cromatogramas das Figuras 08 e 09, é que durante o crescimento das cepas, ocorreu o problema com o funcionamento do ar condicionado do laboratório de microbiologia.

Com isso diferentes temperaturas no ambiente foram observadas, sendo esta uma possível justificativa para a produção diferenciada dos metabólitos produzidos por esta cepa. A produção e concentração produzidos pelos fungos de metabólitos secundários são alterados pela temperatura, a composição e o grau de aeração do meio (STROBEL et al., 2004). Com isto observamos nos cromatogramas apresentados das Figuras 08 e 09 que o fungo pertencente ao gênero *Bipolaris* produz mais da substância **4** em condições de temperatura mais elevada. Os picos numerados nos cromatogramas (1-4) são respectativos aos das substâncias isoladas neste trabalho.

Figura 08. Cromatograma representando o perfil do EAcOEt em pequena escala de Pg-Fj-5 produzido pelo fungo *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm].

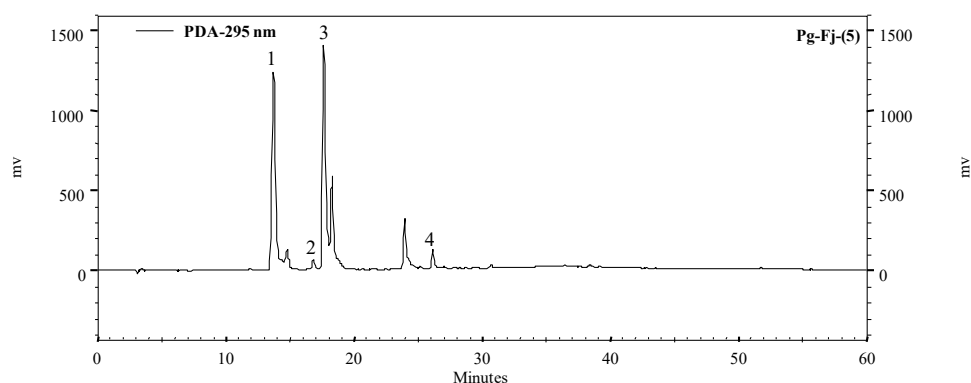
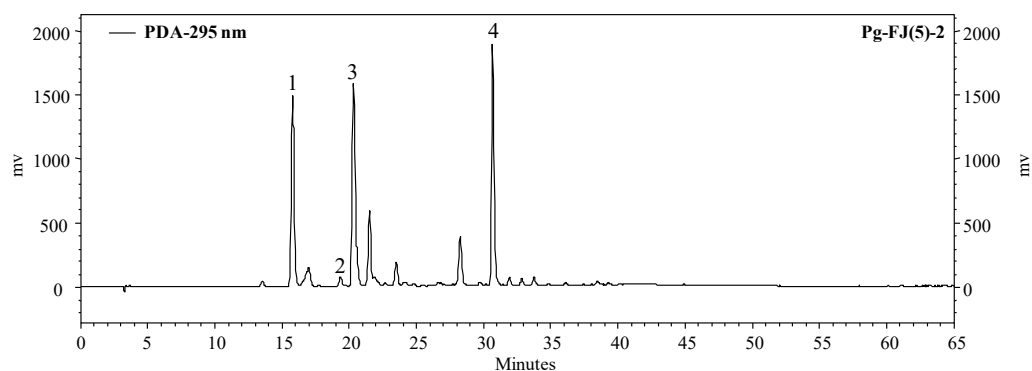


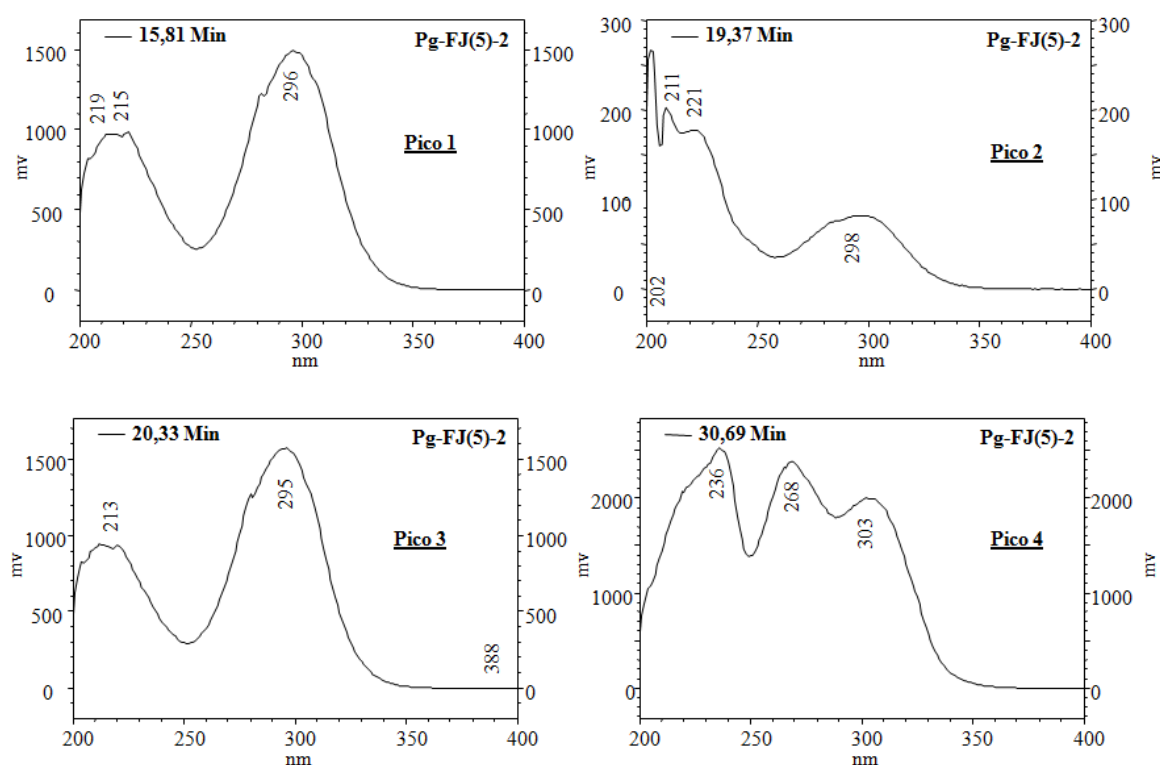
Figura 09. Cromatograma representando o perfil do EAcOEt em escala ampliada produzido pelo fungo *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm].



Análise dos espectros no UV para o extrato de Pg-Fj(5), (Figura 10) mostra dois padrões distintos com máximos de absorções. Os picos de 1 e 2 exibiram duas bandas, uma com $\lambda_{\max}$ na faixa de 218-220 nm e uma segunda banda com $\lambda_{\max}$ na faixa de 295-296 nm. Esse dado pode sugerir que os três compostos fazem parte de uma mesma classe de metabólitos, os quais possuem os mesmos grupos cromóforos e consequentemente perfis bastante similares no espectro de UV.

O pico 4 apresentou DADrão distinto de absorção no espectro de UV, possuindo três bandas. uma primeira com $\lambda_{\max}$ de 236 nm, uma segunda com $\lambda_{\max}$ de 268 nm e uma terceira com $\lambda_{\max}$ de 303 nm, sugerindo assim, pertencer a uma classe diferente de metabólitos.

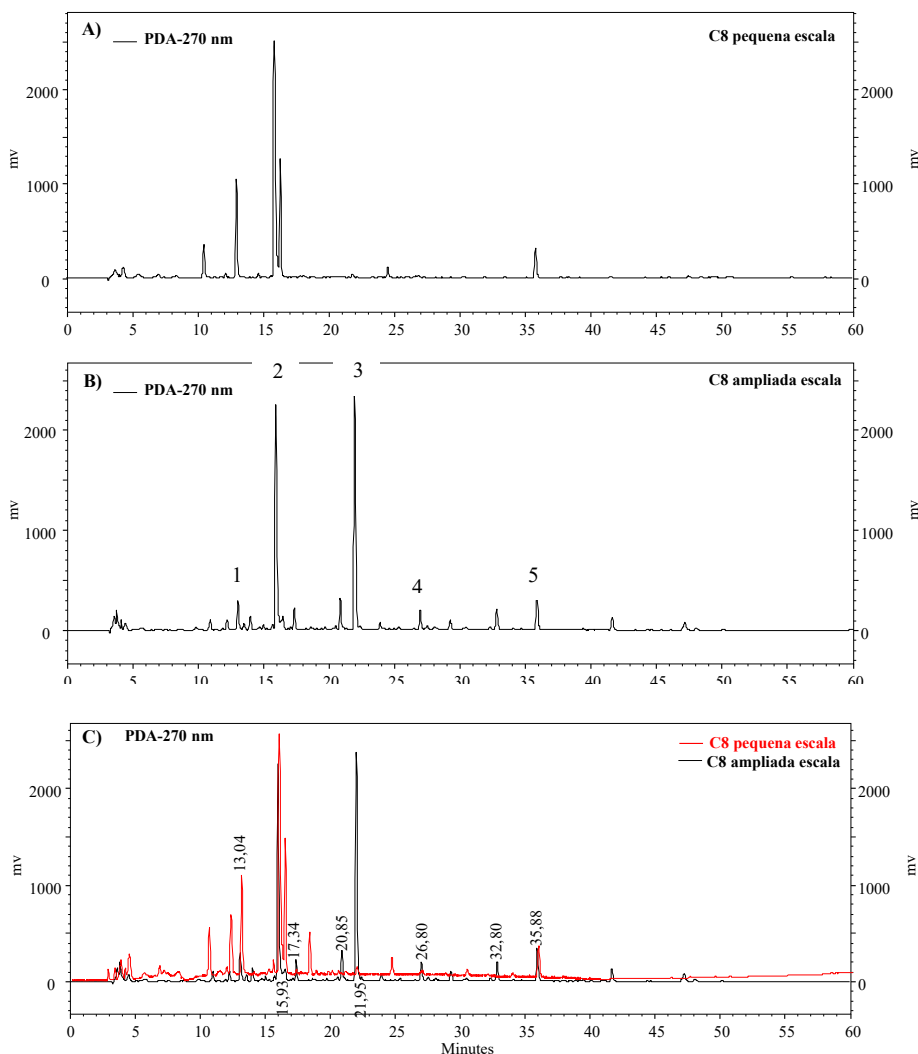
Figura 10. Espectros no UV dos picos 1-4 do EAcOEt de Pg-Fj(5)-2 produzido pelo fungo *Bipolaris* sp isolado das folhas de *P. chiquitensis*; $\lambda = 295$ nm.



4.3.2. Pg-CJ (8) – *Fusarium* sp.

A avaliação dos perfis cromatográficos obtidos de Pg-Cj(8), apresentou qualitativamente semelhança entre o extrato AcOEt preparado em pequena escala com o extrato preparado em escala ampliada, porém houve diferenças significativas com relação a quantidade de substâncias produzidas por esses extratos. Na figura 11 é apresentado os perfis cromatográficos do crescimento em pequena escala (A), em escala ampliada (B) e a sobreposição dos cromatogramas em ambas escalas de crescimento (C). Os picos numerados nos cromatogramas (1-6) são respectivos aos das substâncias isoladas neste trabalho.

Figura 11. Cromatograma representando o perfil do EAcOEt de C8 realizado em pequena escala (A); escala ampliada (B); e da sobreposição de ambas escalas de crescimento (C), produzido pelo fungo endofítico *Fusarium* sp Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01 % TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm].



Como pode ser visto no cromatograma C da Figura 11, a intensidade dos picos do cromatograma do crescimento em pequena escala, com tempos de retenção inferiores a 13,00 min estão mais intensos do que os mesmos picos correspondentes ao da escala ampliada. No crescimento em escala ampliada é evidente a produção pelo *Fusarium sp* de um metabólito não produzido em pequena escala, pico com $t_r = 21,95$ min.

4.4 FRACIONAMENTO DO EAcOEt EM SEPHADEX E ANÁLISE POR CCD

Os EAcOEt de Pg-Fj(5) e Pg-Cj(8) foram fracionados por cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente. Neste tipo de cromatografia, os compostos são separados de acordo com o seu peso molecular (GELLERSTEDT, 1992; STEFFECK et al., 2002), ou seja, moléculas maiores são eluídas mais rapidamente pelo gel enquanto que as moléculas menores movem-se mais lentamente por terem um longo caminho a percorrer. As frações foram analisadas por CCD e as que apresentaram mesmos valores de R_f e semelhante coloração após reveladas com anisaldeído/ H_2SO_4 foram reunidas.

4.5.1 Pg-Fj(5)

O EAcOEt de Pg-Fj(5) forneceu 80 frações que foram reunidas nos seguintes grupos. 1-17, 18-23, 24-29, 30-38 e 39-43. Na Figura 12 é apresentada a CCD do extrato e também das reuniões das frações provenientes do fracionamento do Sephadex LH-20. O fracionamento e purificação do E AcOEt esta representado na figura 13.

Figura 12. Análise por CCD das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes. $CHCl_3/MeOH/n-PrOH/H_2O$ (5.6.1.4,v/v/v/v); 1) Fr. 1-17; 2) Fr. 18-23; 3) Fr. 24-29; 4) Fr. 30-38 e 5) Fr. 39-43.

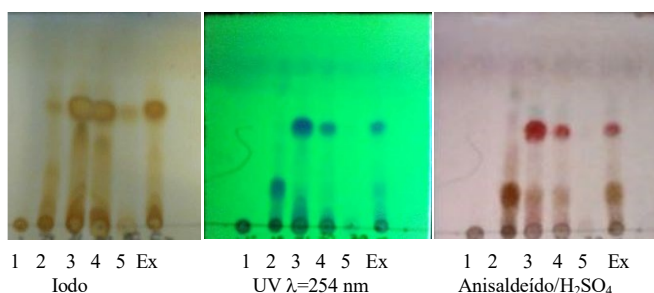
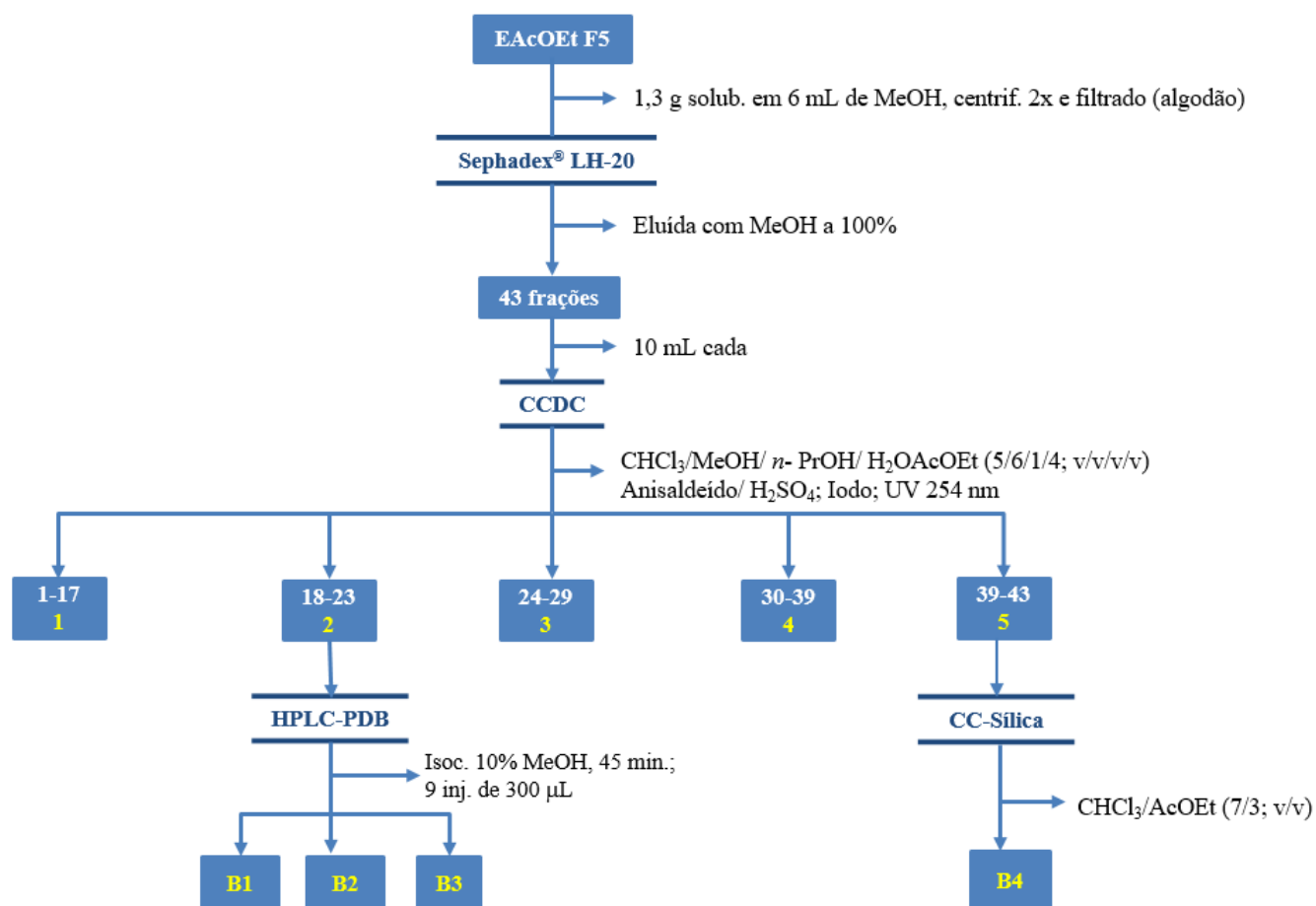
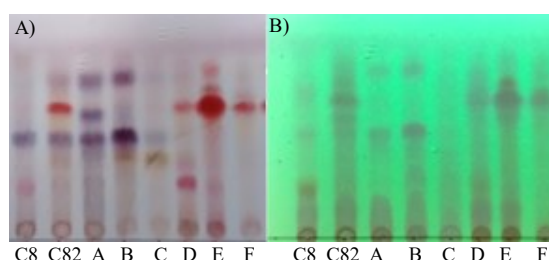


Figura 13. Fluxograma do fracionamento e purificação do EACOEt C8 (*Bipolaris* sp.).

4.5.2. PG-CJ(8)

O EAcOEt de Pg-Cj(8) foi fracionado e forneceu 79 frações as quais foram submetidas à análise por CCD (Figura 14). As frações que apresentaram mesmos valores de R_f e semelhante coloração após reveladas com anisaldeído/ H_2SO_4 (A) e UV 254 nm (B) foram reunidas, e então essas reuniões denominadas de A-G, na Figura 011 é apresentada a CCD dos extratos e das reuniões obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20.

Figura 14. Análise por CCD dos extratos, frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20 e substâncias isoladas; Sistema de solventes. $CHCl_3/AcOEt$ (7:3,v/v); C8) Extrato em pequena escala; C8-2) Extrato em escala ampliada; A-F) reuniões das frações obtidas do fracionamento por Spdx. A) Fr.1-23; B) Fr. 24-29; C) Fr. 30-32; D) Fr. 33-39; E) Fr. 40-49 e F) Fr. 50-79.

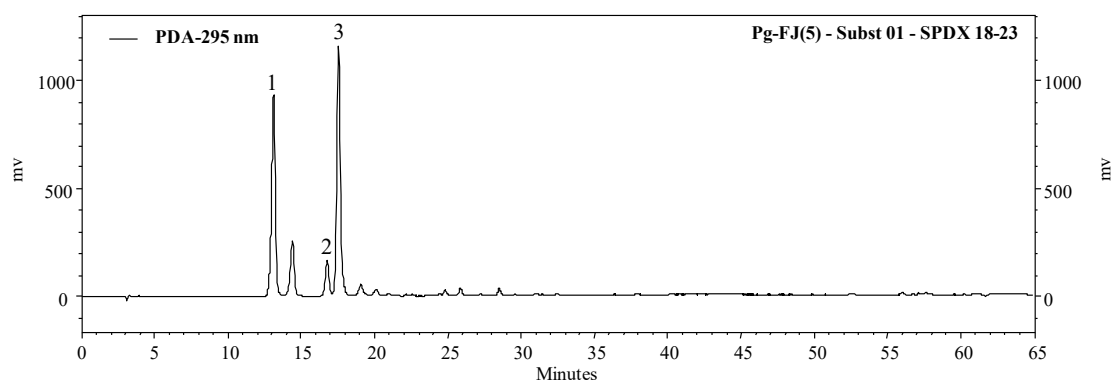


4.5 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS POR CLAE- DAD

4.5.1. Pg-Fj (5)- *Bipolaris* sp.

O cromatograma da Figura 15 é referente à reunião das frações 18-23, provenientes do fracionamento por Sephadex LH-20. Essa fração foi purificada por CLAE- DAD preparativo, onde as condições experimentais estão apresentadas no item 3.1.16. As substâncias **B1** (1,4 mg), **B2** (3,0 mg) e **B3** (2,1 mg) foram isoladas. As análises dos espectros no UV, RMN e EM possibilitaram sugerir uma proposta estrutural para a substância **B1**. Para as substâncias **B2** e **B3** foram registrados os RMN de 1H e estão discutidos nos itens 4.7.1 e 4.7.2, respectivamente.

Figura 15. Cromatograma da Fr.18-23 proveniente do sephadex LH-20 [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm].



4.5.2. Pg-Cj(8) - *Fusarium* sp.

Os cromatogramas por CLAE- DAD das Figuras 17 e 18, Tabela 06 representam as substâncias isoladas **S1-S6** provenientes das frações reunidas **A** (1-23), **B** (24-29) e **E** (40-56). Da fração **A** foram isoladas as substâncias **S1** (1,0 mg) e **S2** (12,0 mg). Da fração **B** foram isoladas as substâncias **S3** (24,0 mg), **S5** (3,0 mg) e **S6** (1,5 mg). E finalmente a fração **E** .forneceu a substância **S4** (0,5 mg). O fracionamento e purificação do EAcOEt estão representados na figura 16.

Tabela 06. Substâncias isoladas do EAcOEt C8 do *Fusarium* sp.

Substância	Reunião do Sephadex	t _r (min)	Massa (mg)
S1	A	13,00	1,0
S2	A	15,93	12,0
S3	B	21,93	24,0
S4	E	26,80	0,5
S5	B	35,80	3,0
S6	B	41,50	1,5

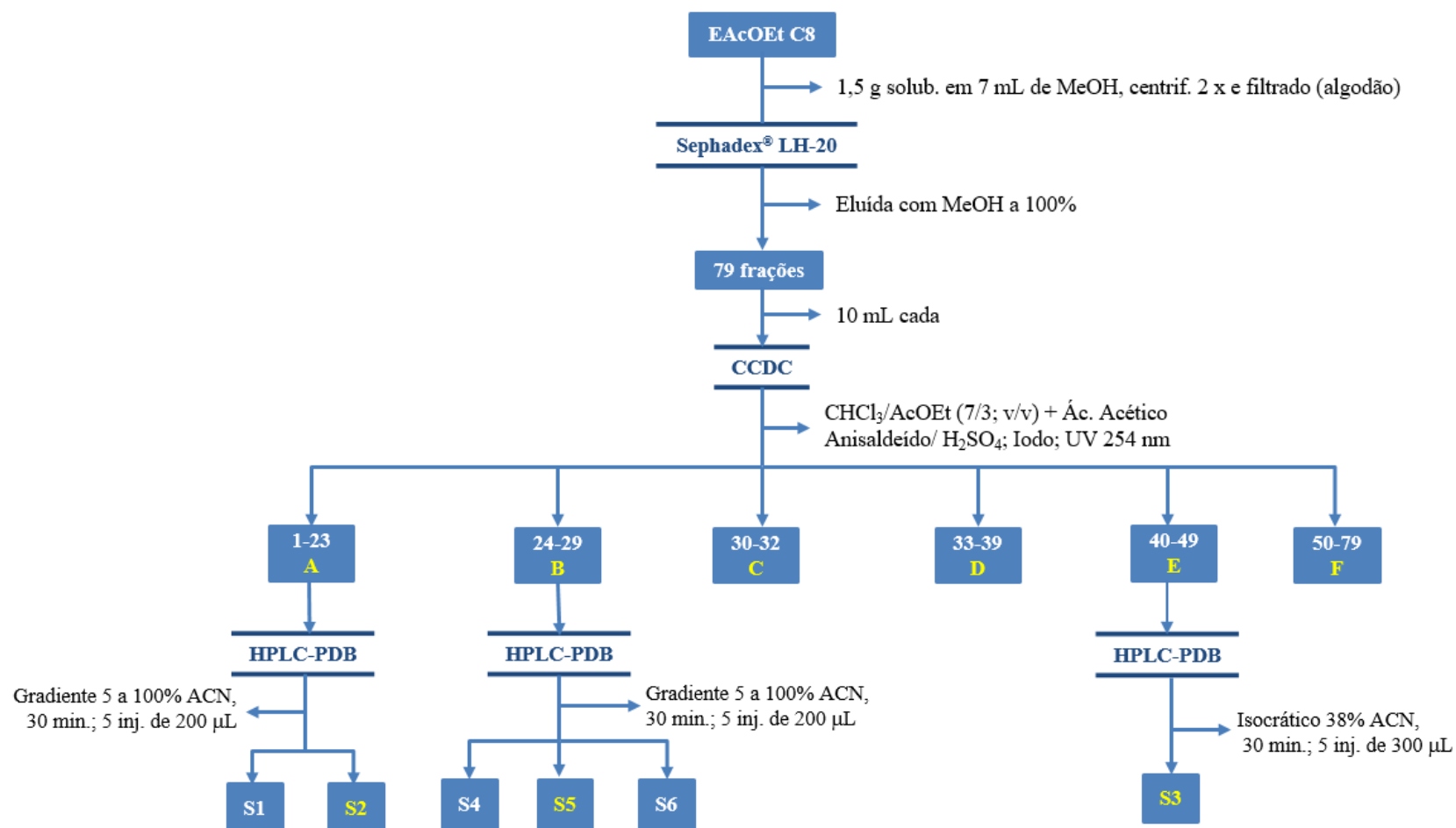
Figura 16. Fluxograma do fracionamento e purificação do EACOEt C8 (*Fusarium* sp.).

Figura 17. Cromatogramas A, B e C das substâncias **S1-S3** isoladas por CLAE- DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 270 nm].

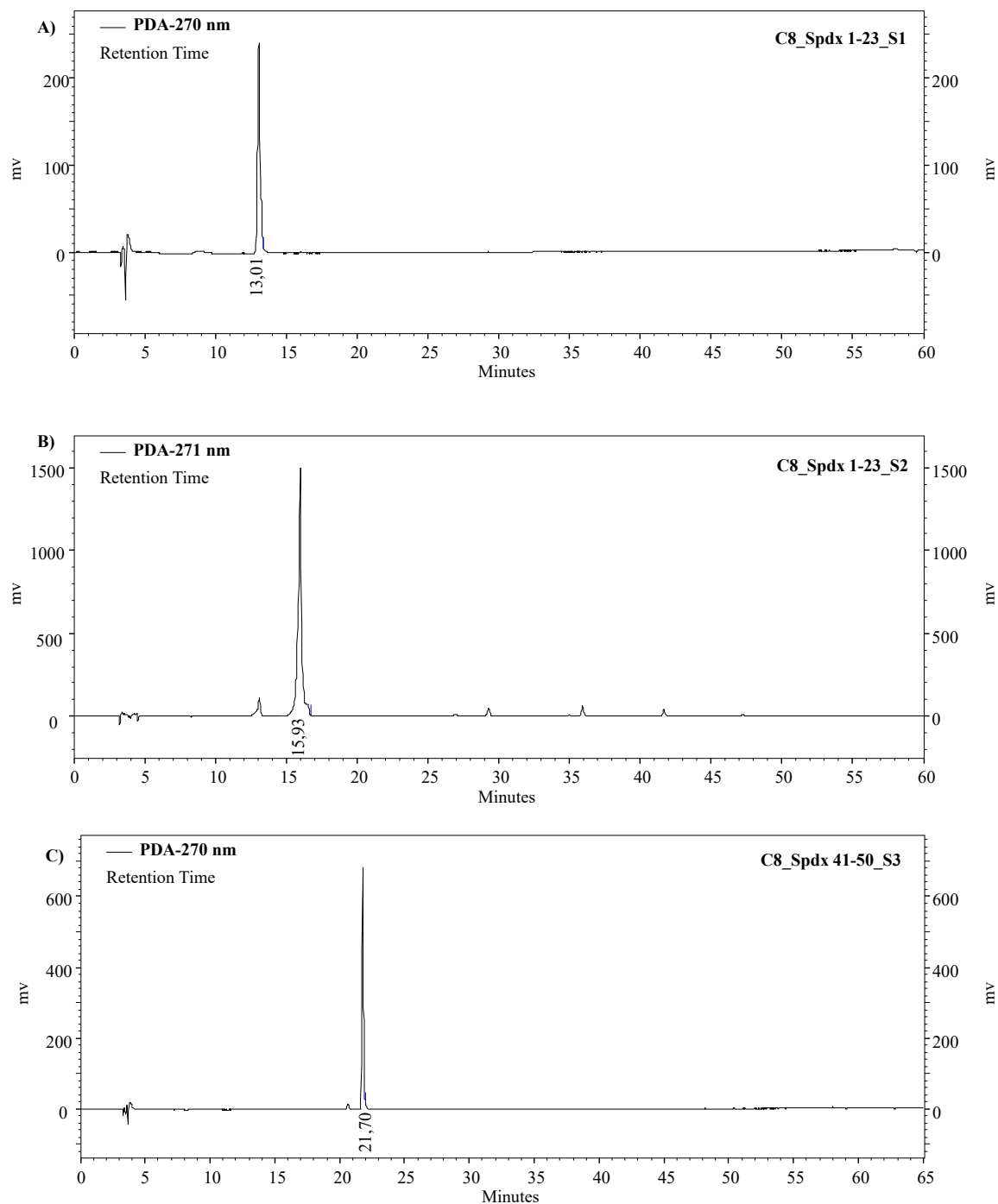
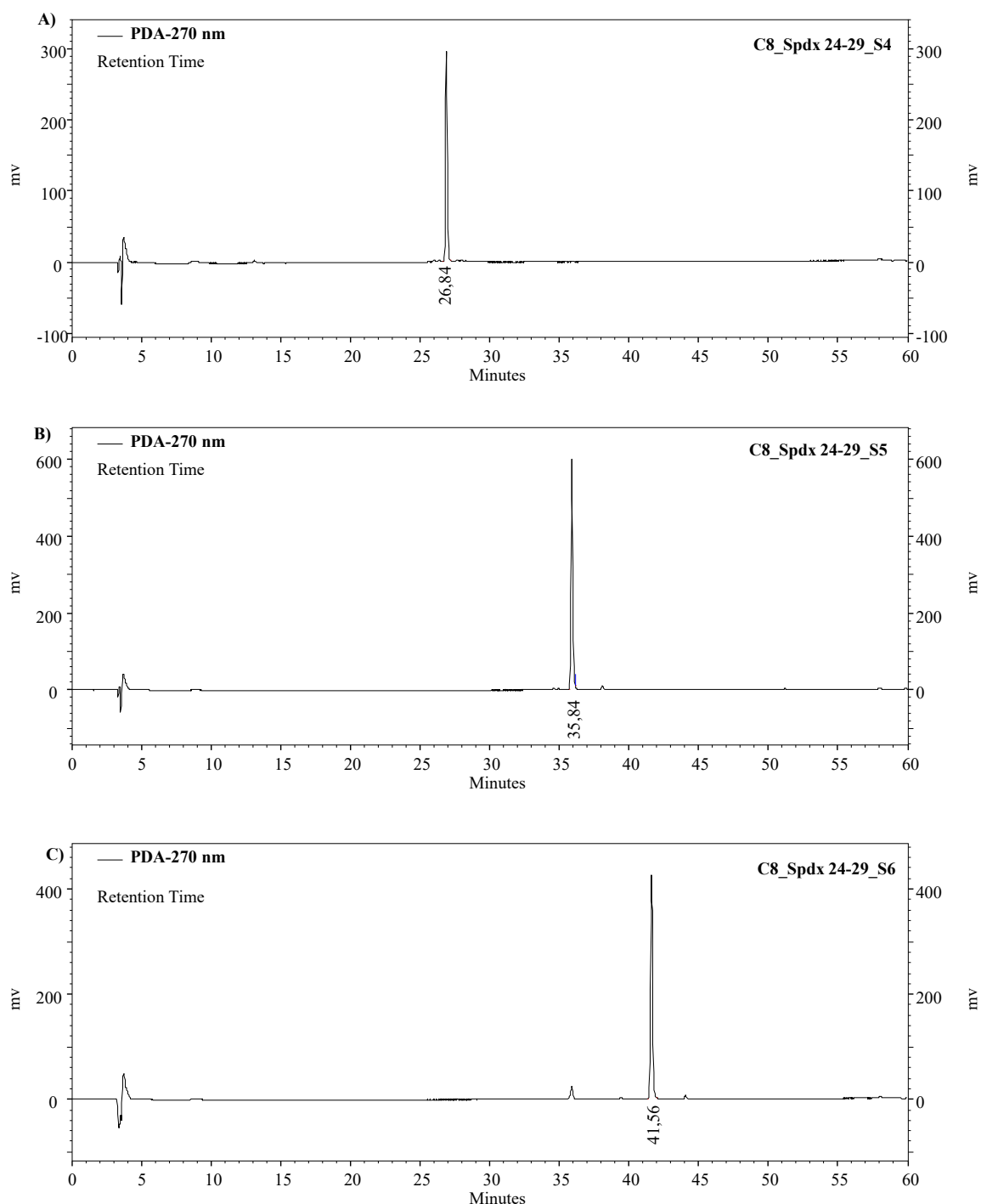


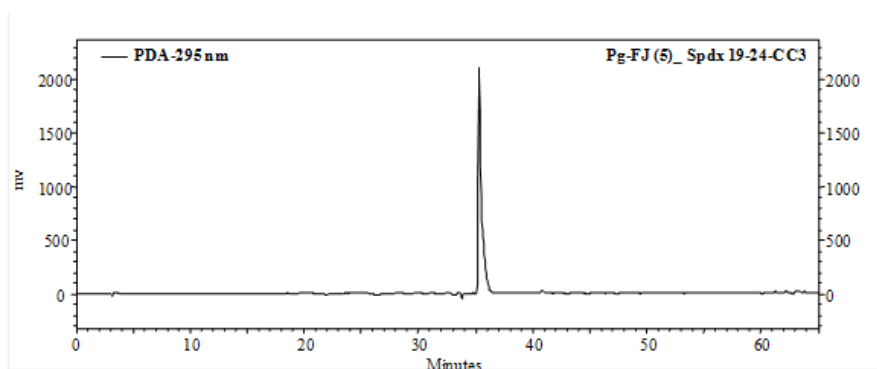
Figura 18. Cromatogramas A, B e C das substâncias S4-S6 isoladas por CLAE- DAD semi-preparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 270 nm].



4.6. ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA B4 POR COLUNA CROMATOGRÁFICA

A reunião das frações 24-29 obtidas do fracionamento por Sephadex de Pg-Fj(5) foi purificada por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária. Foram necessárias duas etapas de purificações para obter a substância isolada **B4** (16,0 mg). Essa substância foi injetada no CLAE- DAD analítico, a purificação por coluna cromatográfica com a fase estacionária sílica foi eficiente, como pode ser visto no cromatograma ilustrado na Figura 19. A substância **B4** apresentou $t_r = 30,69$ min. nas condições experimentais utilizadas.

Figura 19. Cromatograma mostrando o pico da substância **B4**, isolada por CC [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; $\lambda = 295$ nm].



Na Figura 20 é apresentada a análise por CCD, eluída com CHCl₃/AcOEt (7:3,v/v) e revelada com iodo, os três “spots” representam as reuniões das frações da primeira tentativa de purificação (Fr), a substância isolada 4 obtida da purificação de Fr (C1) e das impurezas de Fr (C2).

Figura 20. Análise por CCD da substância B4 purificada por cromatografia em coluna de sílica; Sistema de solventes. CHCl₃/AcOEt (7:3,v/v).



4.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.7.1 Substância **B1**

No espectro de hidrogênio da substância **B1** (Figuras 21 e 22) foram observados sinais de hidrogênios olefinicos em δ 5,74; 5,76; 7,04 a δ 7,08 além de sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios alifáticos na região (δ 0,90 a δ 2,20) referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Análise das integrais sugere a presença 33 hidrogênios na molécula.

Os seis sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios em. δ 7,04 e δ 7,08 (1H cada, *d*, $J=9,6$ Hz), atribuídos para os hidrogênios H6 e H24; δ 6,05 e δ 6,15 (1H cada, *t*, $J=7,8$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H34 e H31' e δ 5,74 e δ 5,76 (1H cada, *d*, $J=9,6$ Hz), para os hidrogênios H25 e H7'. Os deslocamentos de hidrogênios metilênicos foram observados em δ 2,12 (2H, *m*); 2,02 (2H, *m*), e δ 1,99 (2H, *m*) correspondentes a H32, H35 e H29, respectivamente. O espectro apresentou também sinais de hidrogênios metílicos em δ 1,44 (3 H) e δ 1,33 (3H cada, *s*). H37 e H38', e também em δ 0,92 (3 H) e δ 0,91 (6H, *td*, $J=7,4$ Hz) atribuídas a H33, H36 e H30 respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 23) evidenciou a presença de 27 sinais de carbonos, incluindo deslocamentos químicos de carbonila ligada a nitrogênio δ 167,2; 151,9 (C12, C14 e C17, C13), e de duas carbonilas de grupo cetona em δ 197,8 (C8) e δ 196,9 (C26). Os sinais de carbonos metínicos foram observados em δ 57,0 (C4), δ 56,3 (C22), δ 86,3 (C19), além de sinais de carbono carbinólico δ 90,3 (C20). Os carbonos sp^2 foram confirmados com deslocamentos químicos em δ 152,2 (C6), δ 151,9 (C24), δ 148,6 (C34), δ 147,7 (C31'), δ 130,4 (C5), δ 129,9 (C23), δ 121,4 (C28), δ 121,0 (C25). Os carbonos correspondentes às cinco metilas apresentaram os seguintes deslocamentos: δ 22,7 (C38), δ 22,9 (C37), δ 13,3 (C33 e C36) e δ 13,3 (C30). E finalmente, foi possível observar os carbonos de grupos metilênicos em δ 22,7 (C29 e C35) e 19,5 (C32).

No experimento COSY (Figura 24) é evidente a correlação entre os hidrogênios olefinicos em δ 7,04 (H6) com o hidrogênio em δ 5,74 (H25); assim como dos hidrogênios olefinicos em δ 7,08 (H24) e δ 5,76 (H7), confirmando a parte olefínica. O hidrogênio olefinico em δ 6,05 (H34) apresentou correlação com os hidrogênios metilênicos em δ 1,99 (H35) e δ 0,92 (H33), respectivamente. Também foram observadas as correlações de δ 6,15 (H24) com δ 2,12 (H32) e δ 0,92 (H30), respectivamente.

Os deslocamentos químicos observados no experimento de mapa de contorno HSQC (Figura 25) possibilitou atribuir à 1J os hidrogênios com seus respectivos carbonos (Tabela 07).

Os experimentos de mapa de contorno HMBC (Figura 26) possibilitou verificar as correlações a 3J existentes entre o hidrogênio olefínico em δ 7,04 (H6) com os carbonos δ 57,0 (C4), δ 130,4 (C5), e δ 197,8 (C1); e também do hidrogênio olefínico em 7,08 (H24) com os carbonos δ 56,3 (C22), δ 129,9 (C23), δ 147,7 (C24), e δ 196,9 (C26). Para estabelecer a posição do carbono da carbonila com o deslocamento químico em δ 167,2 (C13) observou-se no experimento HMBC a correlações a 3J dos hidrogênios em δ 4,43 (H9), (Figura 23).

Os experimentos de mapa de contorno HMBC 1H - ^{15}N (Figura 22) possibilitou verificar as correlações a 3J existentes entre os hidrogênios metílicos em δ 1,33 (H38) e também dos hidrogenios metínico oxigenado δ 1,43 (H37) com o deslocamento químico do nitrogênio em δ 208,9 (N9).

Com estas informações, aliados à informação do deslocamento químico dos carbonos C-5 e C-7 (δ 57,0 e δ 63,9) foi possível propôr a existência de um epóxido e as posições das metilas nesta parte da estrutura (Figura 25).

O experimento HSQC-TOCSY (Figura 23) possibilitou atribuir os hidrogênios ligados diretamente aos seus respectivos carbonos à 1J (C-H) além da informação da sequência dos carbonos ligados aos hidrogênios do mesmo sistema de spins. Quatro sequências foram estabelecidas, sendo o hidrogênio da posição H-6 com deslocamento químico em δ 7,04 que apresentaram correlação com o carbono δ 120,9 (C-7) e a outra sequência sendo δ 6,15 com o carbono 121, 0 (C-25). O hidrogênio com deslocamento químico 6,05 faz correlação com C35 e C36 respectivamente. Os hidrogênios da outra parte da molécula 6,15 faz correlação com os C32 e 33, estabelecendo portanto a sequencia desta parte da molécula. Na Figura 23 está sendo apresentada as correlações HSQC TOCSY para a estrutura da substância **B1**.

Para atribuir outros sinais observados no espectro de RMN de 1H , não pertencentes a esta molécula, foi realizado o experimento de RMN de DOSY (Figura 24). Esta técnica permite a detecção de impurezas, podendo ser utilizada até mesmo para analisar misturas complexas e baseia-se no coeficiente de difusão das substâncias presentes em mistura, sendo possível determinar quais são os sinais do espectro de 1H que pertencem a cada uma das substâncias

quando apresentam diferentes valores de difusão (Vizzotto, 2004). Portanto, o experimento de RMN de DOSY (Figura 24) confirmou que os sinais do espectro de RMN de ^1H com deslocamento químico em δ 1,05 (2H, *t*) e δ 3,44 (1H, *quadrupletto*) não pertencem à substância **B1**.

A Figura 26 mostra as correlações entre os hidrogênios e os carbonos já estabelecidos pelos experimentos COSY, HMBC e HMBC ^1H - ^{15}N discutidos e apresentados na Tabela 07.

O espectro de massas foi registrado no modo positivo, sendo estabelecido a fórmula da molécula como sendo $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$, com o íon da molécula protonada em $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 617, na figura 32. A figura 30 apresenta uma proposta estrutural para esta molécula.

Na literatura existem poucos artigos que apresentam dados de substâncias isoladas do fungo do gênero *Bipolaris*. O trabalho de Siriwach e colaboradores (2014) apresenta a elucidação estrutural da Bipolamida A e B, isoladas de *Bipolaris* sp; uma outra Bipolaramida isolada da espécie *B. sorokiniana* por Maes e colaboradores (1982), foi identificada como dioxopiperazina, um alcalóide indólico (SOMEI E KAWASAKI, 1996). Os alcalóides são produzidos por fungos e apresentam diversas atividades biológicas (Xu et al., 2014).

Tabela 07. Dados de RMN de ^1H ^{13}C (600 e 150 MHz, em DMSO- d_6) da substância **B1**.

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (Hz)	COSY	HMBC
1	-	-	-	-
2	73,2 (Cq)	-	-	-
3	129,0 (Cq)	-	-	-
4	57,0 CH	3,43	-	-
5	130,4 (Cq)	-	-	-
6	152,2 CH	7,04 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,6)	5,76	57,0; 130,4; 148,6; 197,8
7	120,9 CH	5,76 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,6)	7,04	73,5; 130,4
8	197,8	-	-	-
9	73,5 (Cq)	4,43 (<i>s</i>)	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	167,2	-	-	-
13	151,9	-	-	-
14	167,2	-	-	-
15	57,1 (Cq)	-	-	-
16	-	-	-	-
17	151,9	-	-	-
18	-	-	-	-
19	86,3 (Cq)	-	-	-
20	90,3 (CH)	2,22	-	-
21	48,8 (CH ₂)	3,16 e 3,10	-	-
22	56,3 (Cq)	3,43	-	-
23	129,9 (Cq)	-	-	-
24	151,9 (CH)	7,08 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,6)	5,74	13,3; 56,3; 147,7
25	121,4 (CH)	5,74 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,6)	7,08	73,4; 129,9
26	196,9	-	-	-
27	29,3 (CH ₂)	2,30 (<i>m</i>)	-	-
28	121,0 (CH)	5,84 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,8)	-	-
29	22,7 (CH ₂)	1,99 (<i>m</i>)	-	-
30	13,3 (CH ₃)	0,92 (<i>dt</i> , <i>J</i> 9,6)	-	-
31	147,7 (CH)	6,15 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,6)	2,12	13,3; 56,3; 147,7
32	19,5 (CH ₂)	2,12 (<i>m</i>)	0,92	13,3; 129,9; 147,7
33	13,3 (CH ₃)	0,92 (<i>dt</i> , <i>J</i> 9,6)	-	19,5; 147,7
34	148,6 (CH)	6,05 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,8)	2,02	13,5; 57,0; 152,2
35	22,7 (CH ₂)	2,02 (<i>m</i>)	6,05	13,5; 130,4; 148,6
36	13,3 (CH ₃)	0,92 (<i>dt</i> , <i>J</i> 9,6)	-	22,7; 148,6
37	22,9 (CH ₃)	1,44 (<i>s</i>)	-	73,2
38	22,7 (CH ₃)	1,33 (<i>s</i>)	-	86,3; 90,3

Figura 21. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **B1**.

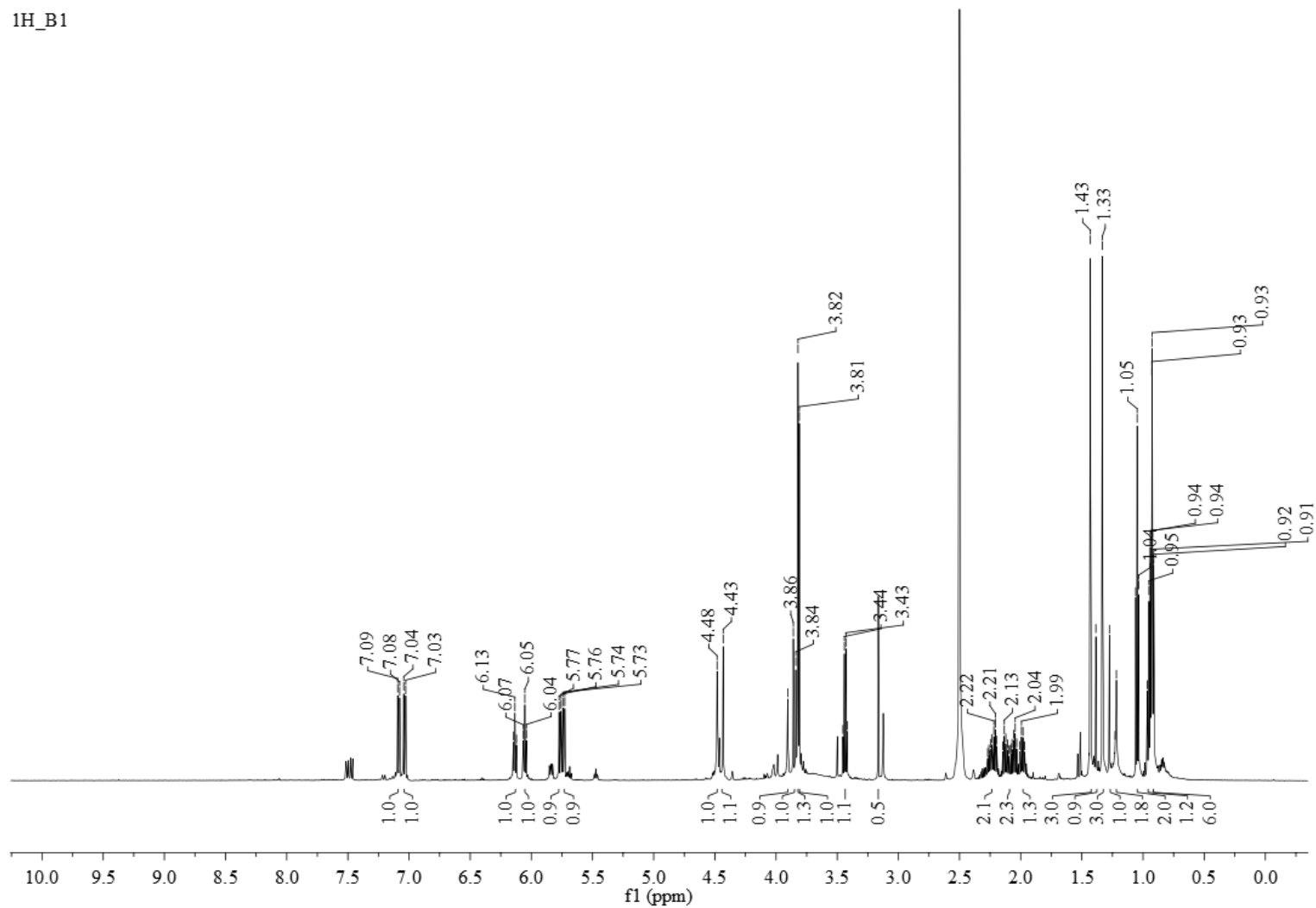


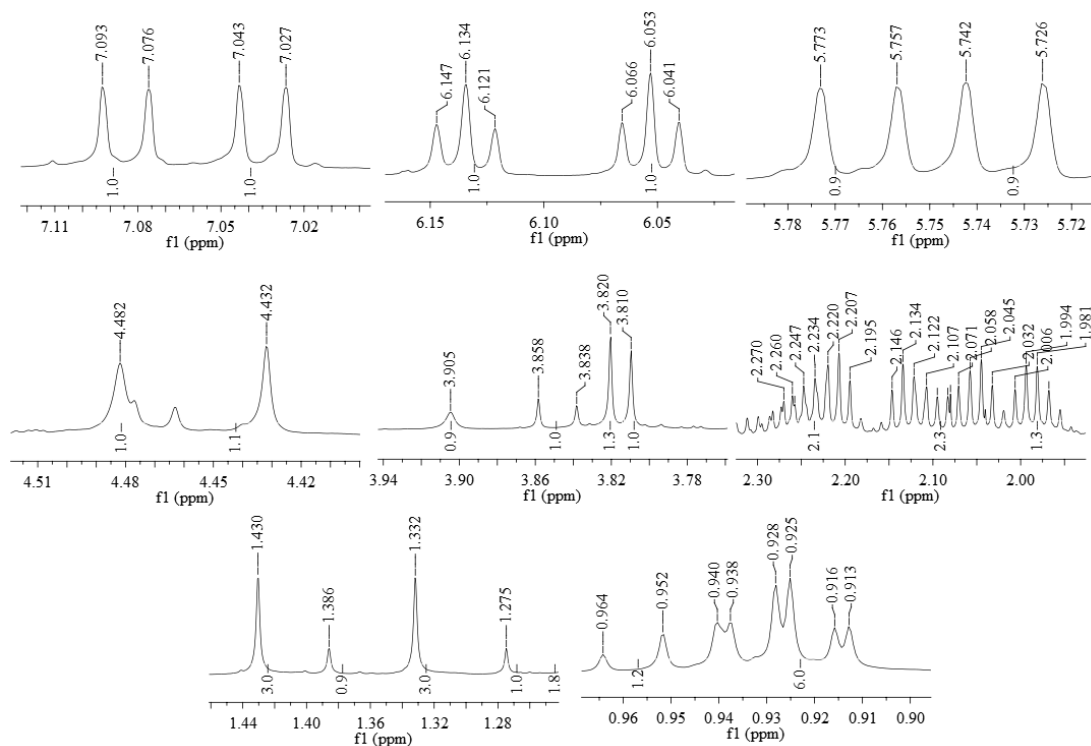
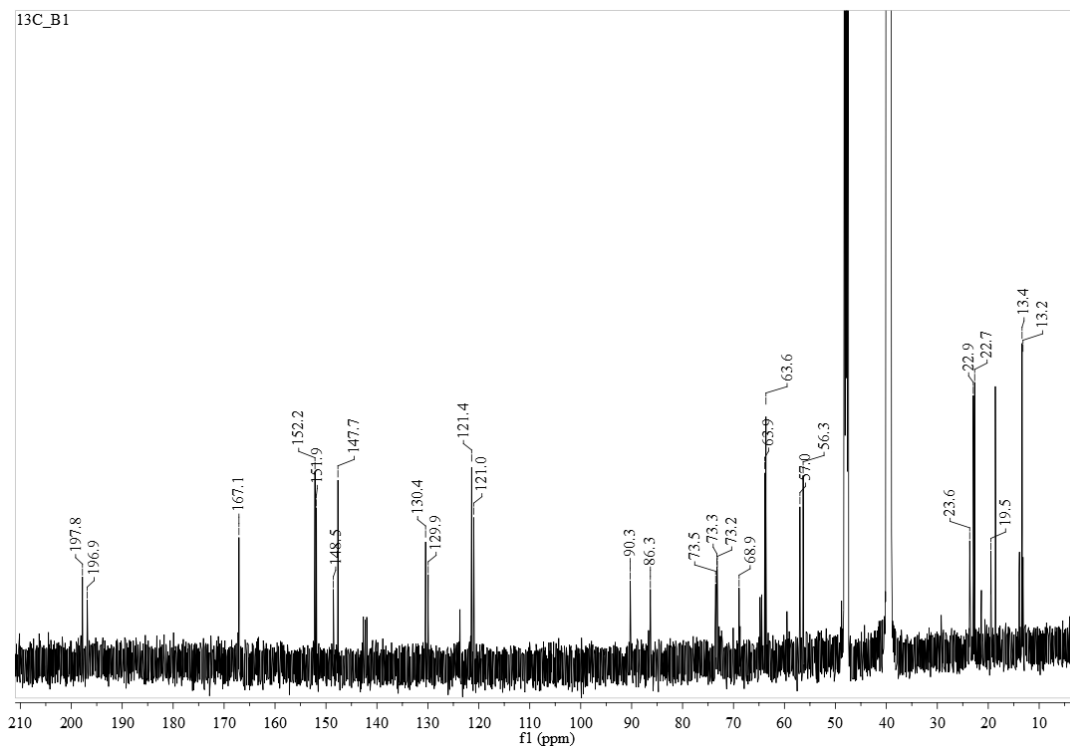
Figura 22. Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **B1**.**Figura 23.** Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **B1**.

Figura 24. Espectro de COSY (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **B1**.

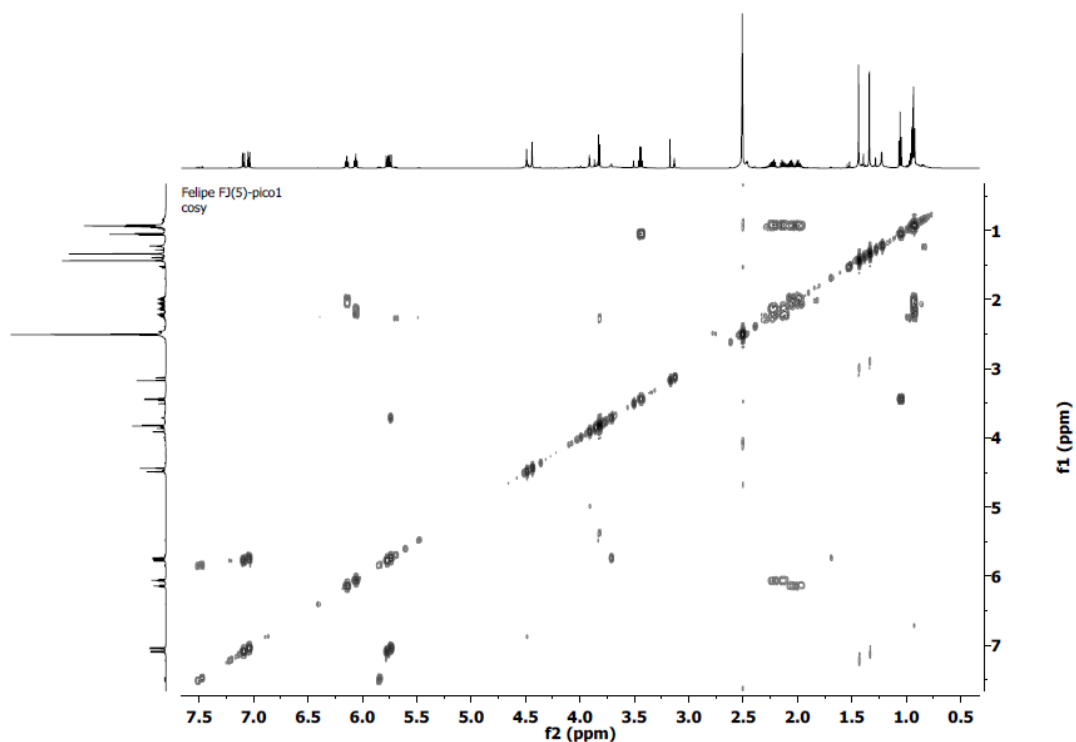


Figura 25. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **B1**.

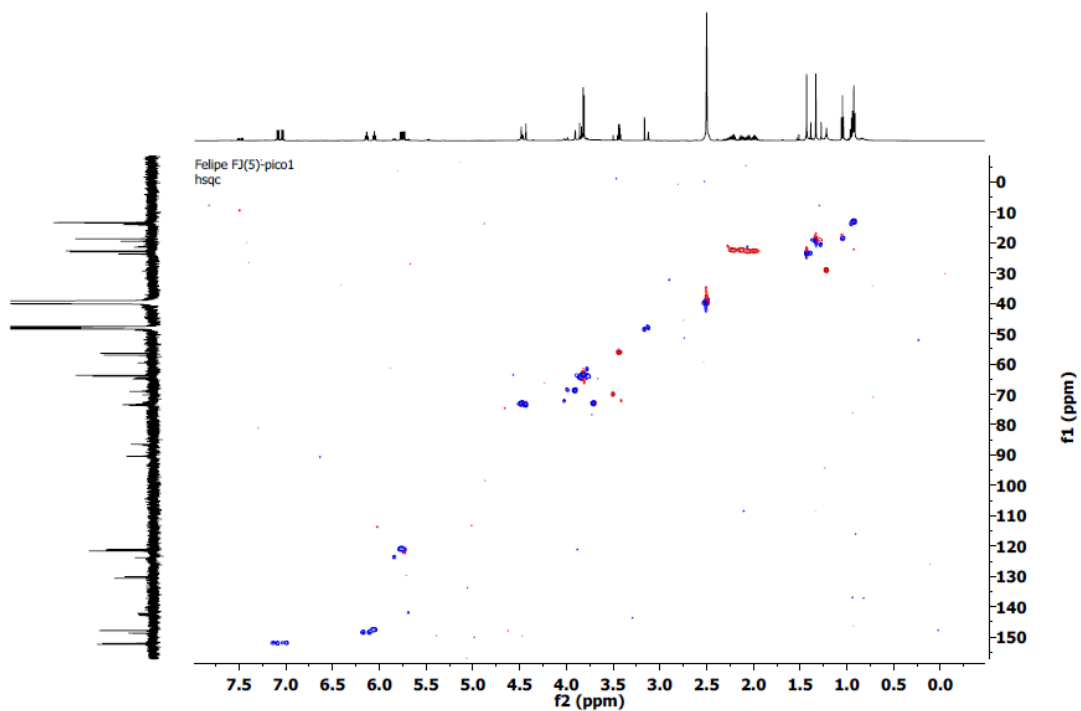


Figura 26. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, DMSO-d₆) da substância **B1**.

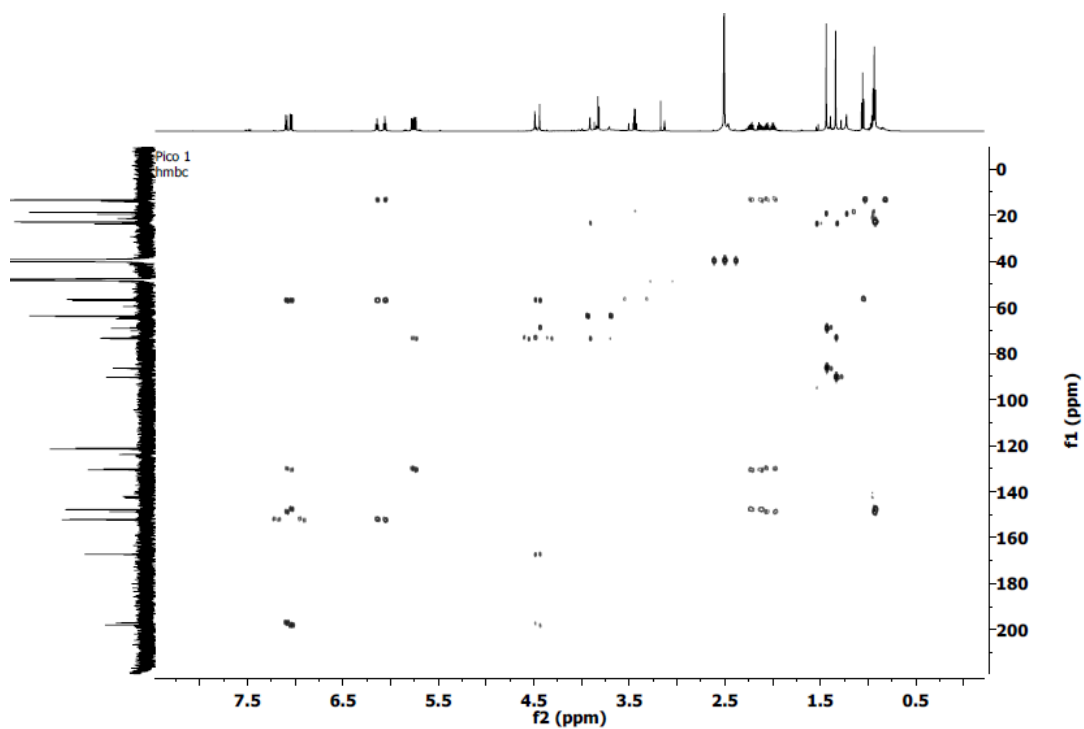


Figura 27. Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{15}N (600 MHz, DMSO-d₆) da substância **B1**.

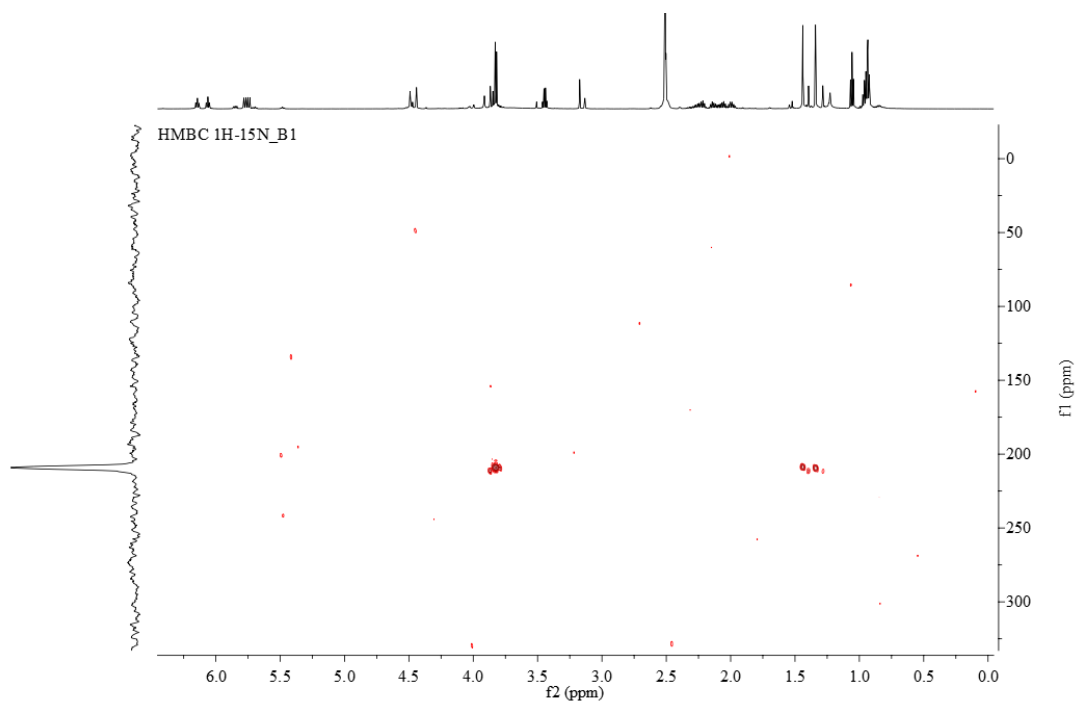


Figura 28. Mapa e contorno HSQC-TOCSY (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **B1**

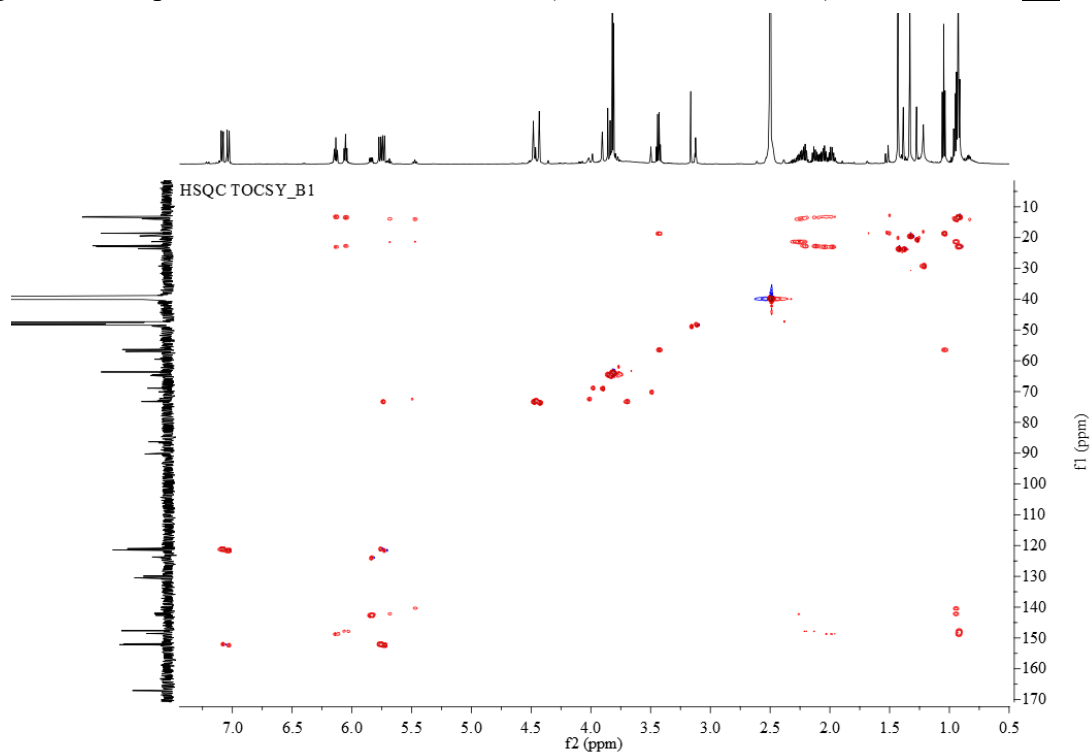


Figura 29. Espectro de RMN de DOSY (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **B1**.

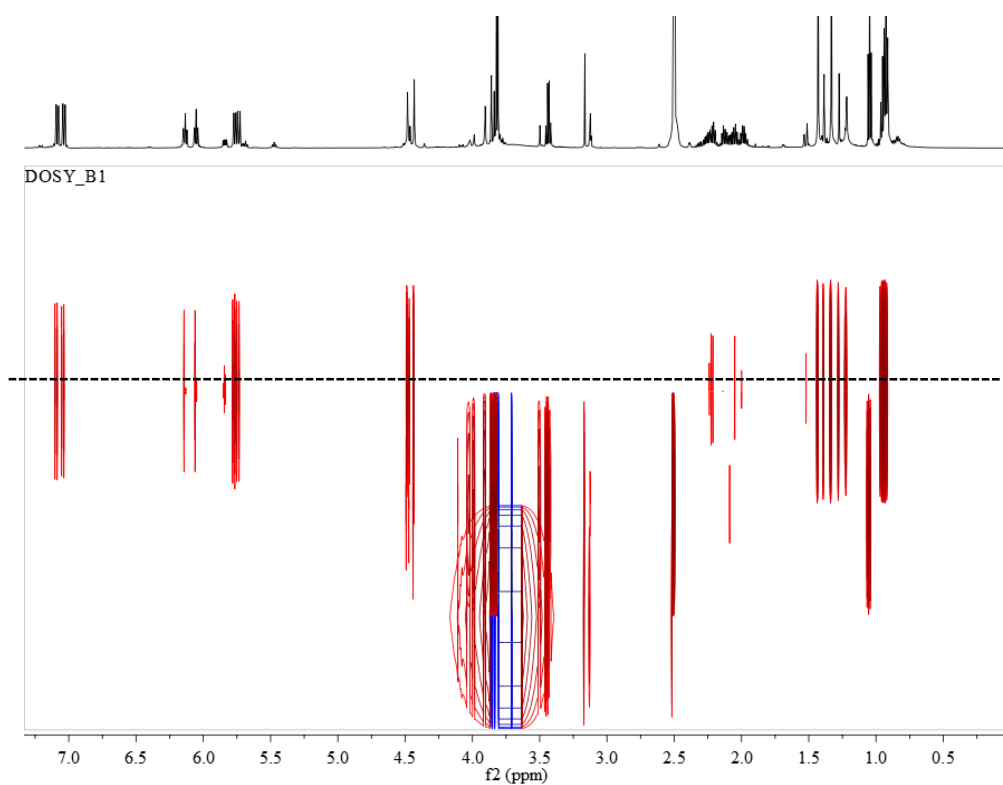


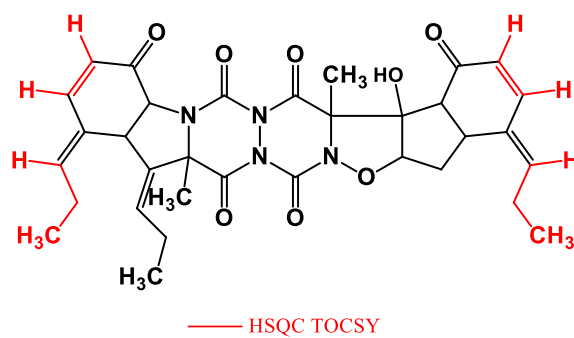
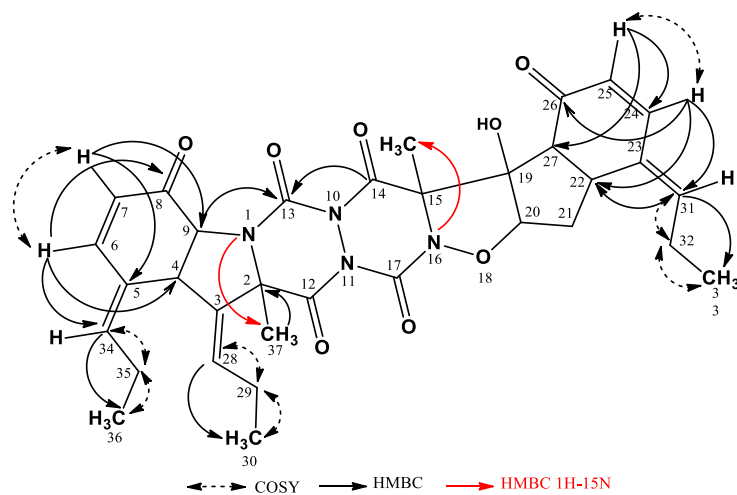
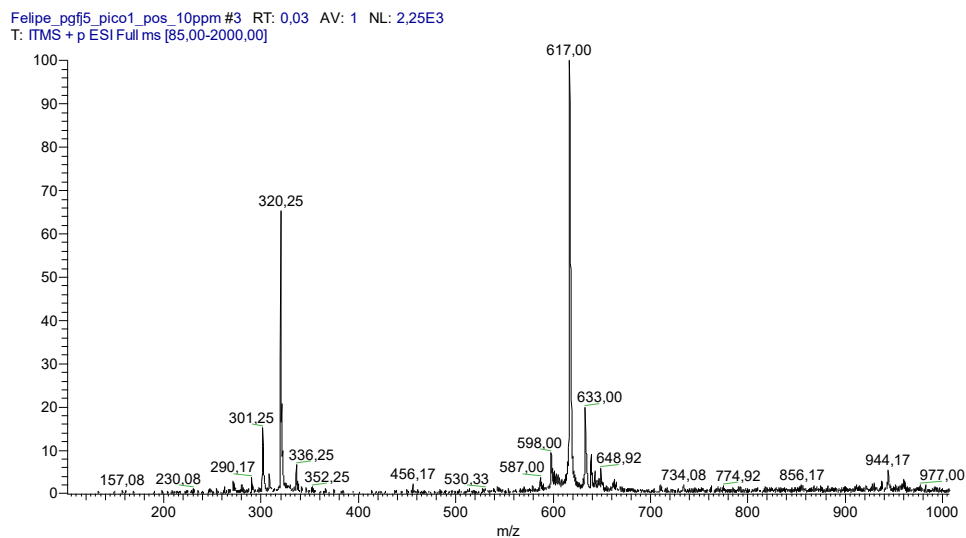
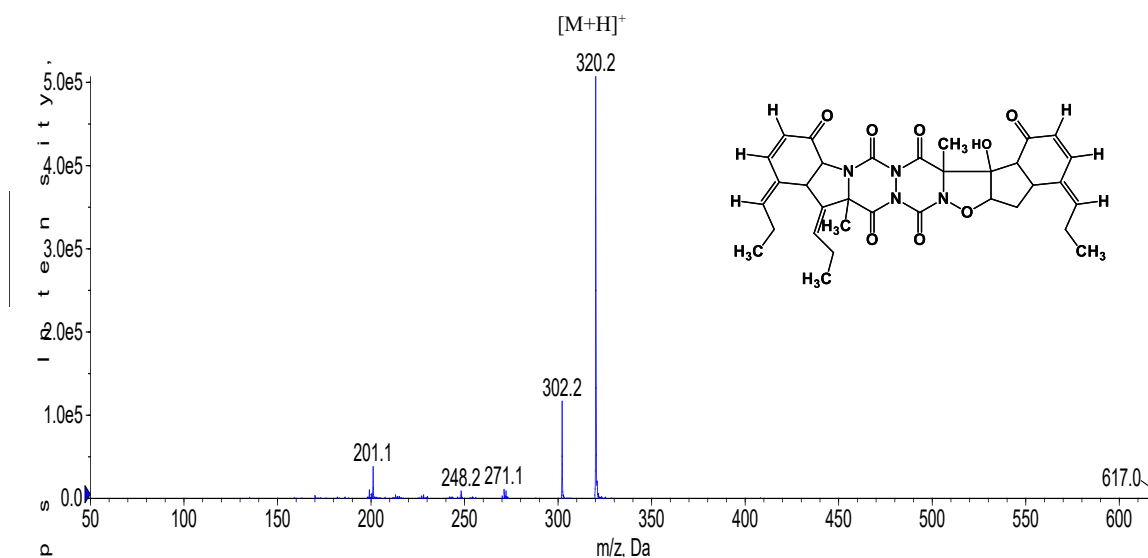
Figura 30. Correlações HSQC-TOCSY da substância **B1**.**Figura 31.** COSY, correlações HMBC e HMBC ^1H - ^{15}N da substância **B1**.

Figura 32. Espectro de massas full scan ESI-IT-MS (modo positivo) substância **B1****Figura 33.** Espectro de massas full scan ESI-IT-MS/MS (modo positivo) substância **B1**

4.7.2 Substância **B4**

O espectro de RMN de ^1H da substância **B4** (Tabela 08, Figura 34) apresentou dois sinais de hidrogênios aromáticos *meta*-acoplados ($d, J = 2,5 \text{ Hz}$) δ 6,32 e δ 6,28, que foram atribuídos a H-3 e H-5 respectivamente. É também evidente um triplete em δ 1,26 (3H, $t, J = 7,0 \text{ Hz}$), correspondente a uma metila CH_3 -14. Os deslocamentos químicos de hidrogênios metilênicos foram observados em δ 4,18 (2H, $q, J = 7,2 \text{ Hz}$), δ 3,87 (2H, s), correspondentes aos H9 e H7, respectivamente. Ainda foi observado um singlete em δ 2,60 (3H, s) correspondente a uma outra metila, que foi atribuída CH_3 -12.

No experimento COSY (Figura 35) observa-se a correlação entre os hidrogênios δ 4,18 CH_2 -9 com os hidrogênios em δ 1,26 CH_3 -10.

Os experimentos HSQC (Figura 36) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 08.

No espectro de HMBC (Figura 37) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila de cetona em δ 203,4 e de éster em δ 170,9. Estes deslocamentos químicos puderam ser observados pela correlação a 2J e a 3J existente entre os hidrogênios δ 3,87 e δ 4,18 com o carbono do grupo éster em δ 170,9 (COO -8). Também foi observado a correlação a 2J entre os hidrogênios em δ 2,60 com a carbonila do grupo cetona em δ 203,4 (C=O -11). A correlação dos hidrogênios aromáticos foram observados respectivamente entre δ 6,32 (H-5) com os carbonos em δ 112,3 (C-3) e entre o hidrogênio em δ 6,28 (H-3) com os carbonos δ (102,4, C-5; 115,7, C-1; 41,6, C-7).

O espectro de ESI-IT-MS (*full scan* - modo negativo), (Figura 38) evidenciou o ion da molécula desprotonada em m/z 237 $[\text{M-H}]^-$, confirmando que esta molécula possui a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$. O espectro MS^2 (Figura 39) mostra a perda de $[\text{M. 46. H}]^-$ formando o íon em m/z 191. Portanto esta molécula foi identificada como sendo Etanoato de etila-2-(2-acetil-4,6-diidroxifenil), Figura 40.

Tabela 08 . ^1H ^{13}C (300 e 75 MHz, em CHCl_3) mono e bi-dimensionais da substância **B4**.

POSIÇÃO	$^*\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC
1	115,7	-	-	-
2	137,4	-	-	-
3	112,4	6,28 (<i>dd</i> , $J=2.5$ Hz)	-	41,6; 102,9; 115,7
4	**	-	-	-
5	103,1	6,32 (<i>dd</i> , $J=2.5$ Hz)	-	112,3
6	**	-	-	-
7	41,5 (CH_2)	3,87 (<i>s</i>)	-	112,3; 115,7; 137,4; 170,9
8	170,9 (Cq)	-	-	-
9	61,4 (CH_2)	4,17 (<i>q</i> , $J=7.2$ Hz)	-	-
10	13,9 (CH_3)	1,26 (<i>t</i> , $J=7.0$ Hz)	4,17	61,2
11	203,4 (Cq)	-	-	-
12	31.91 (CH_3)	2.60(<i>s</i>)	-	203.59

*Sinais atribuídos pela análise HSQC e HMBC

** n.d. sinais não detectados

. **Figura 34.** Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância **B4**

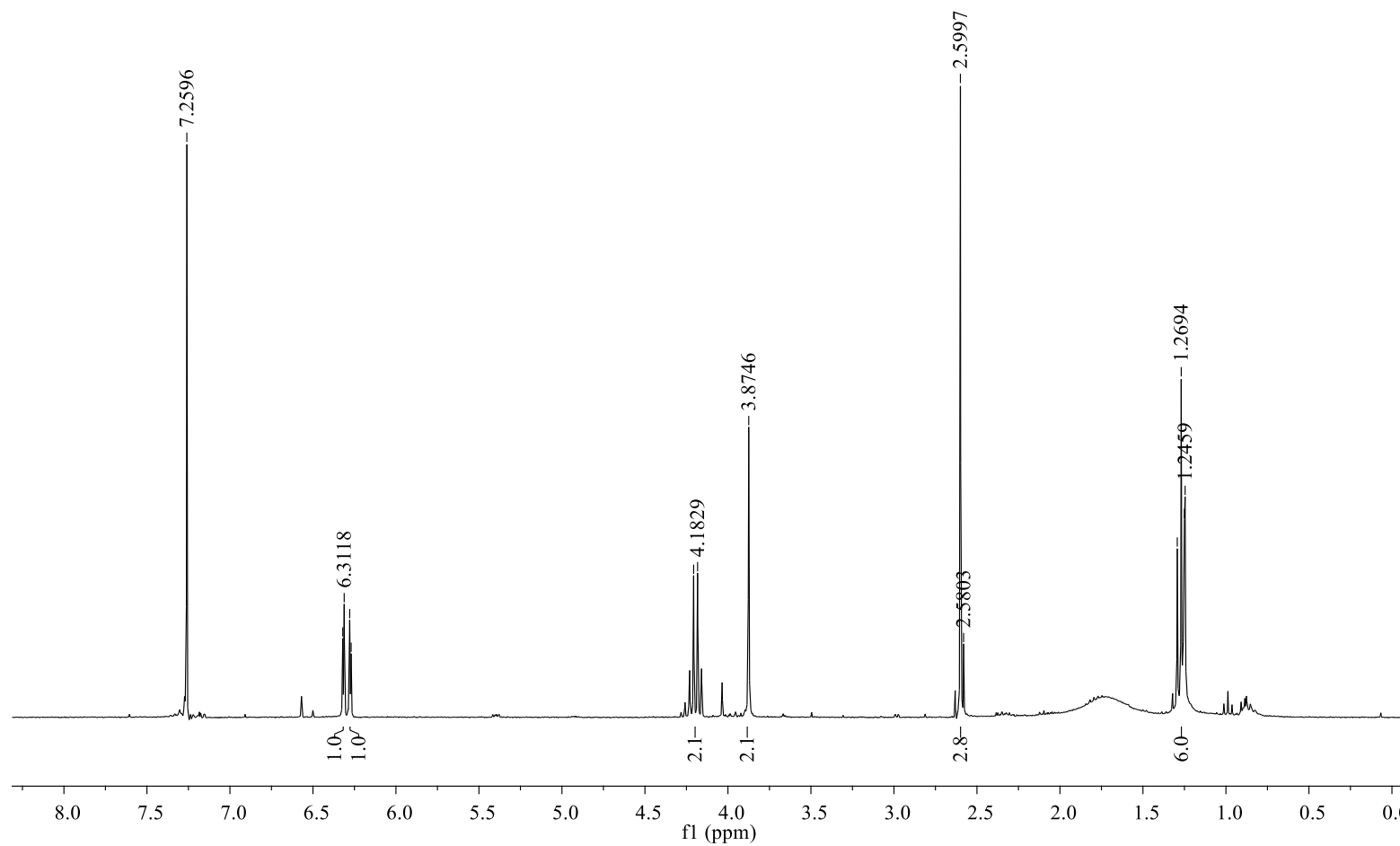


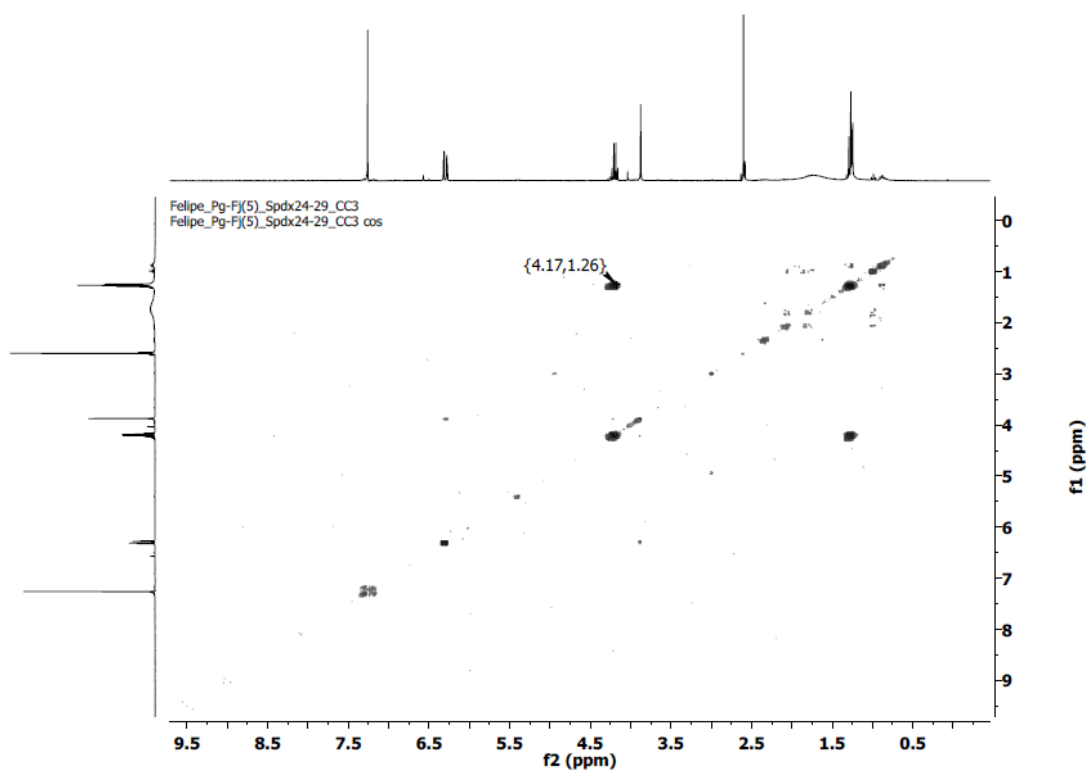
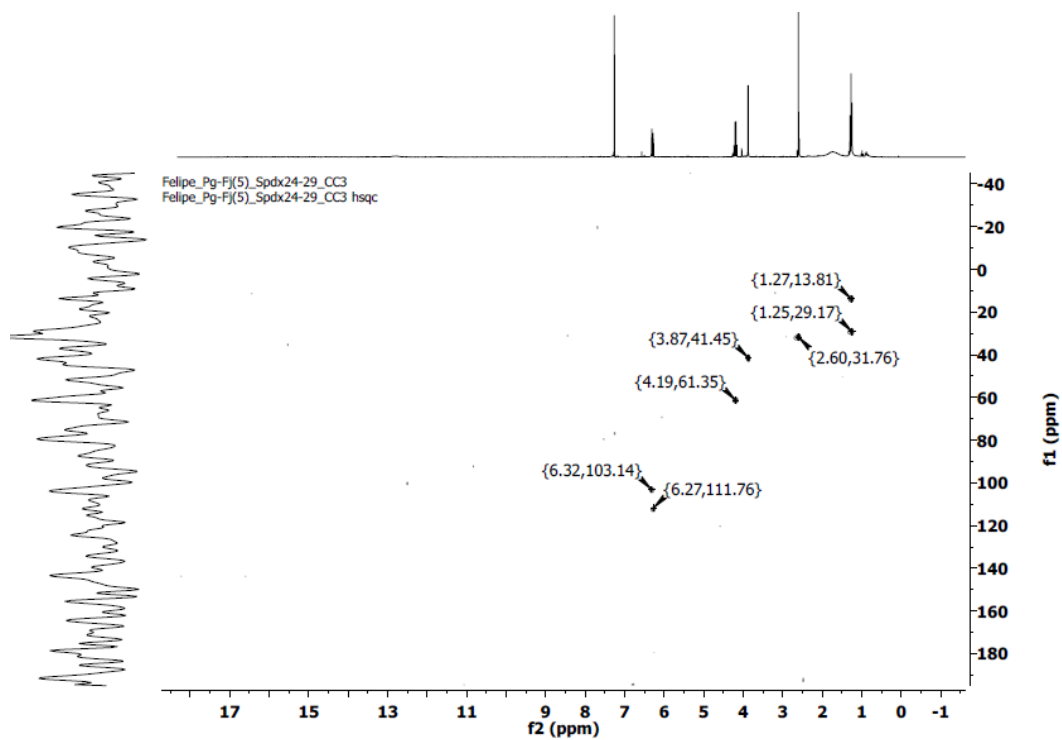
Figura 35. Espectro de RMN de COSY (300 MHz, CDCl_3) da substância **B4**.**Figura 36.** Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl_3) da substância **B4**.

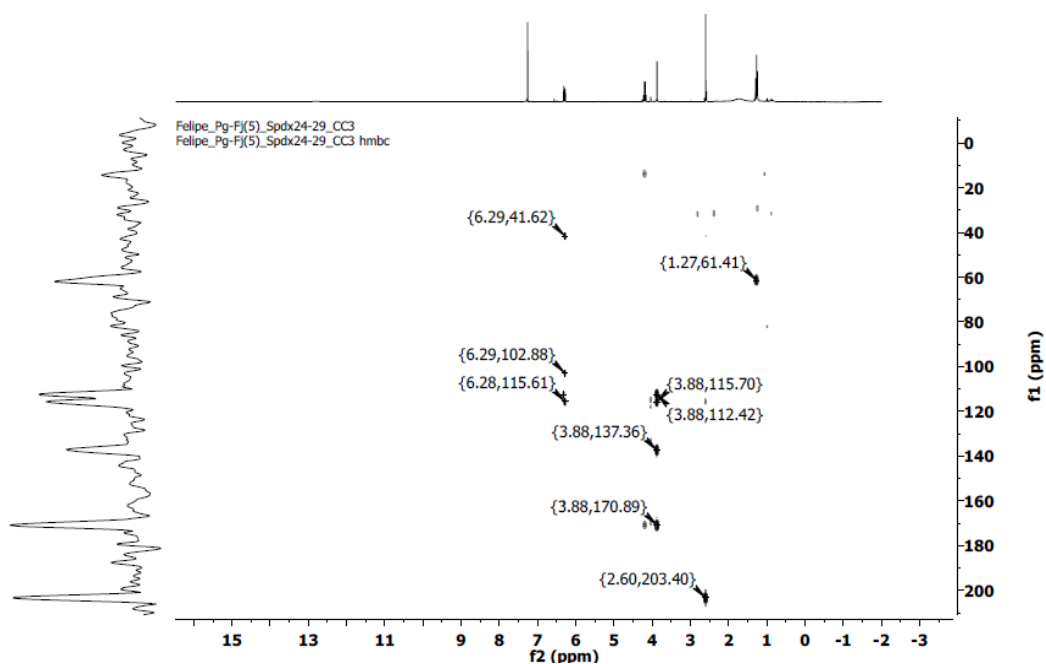
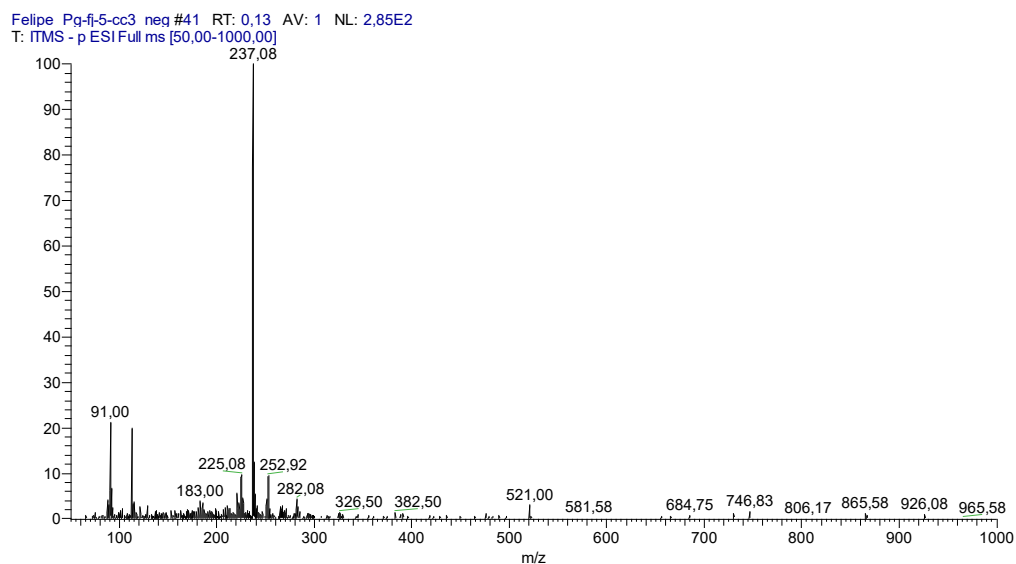
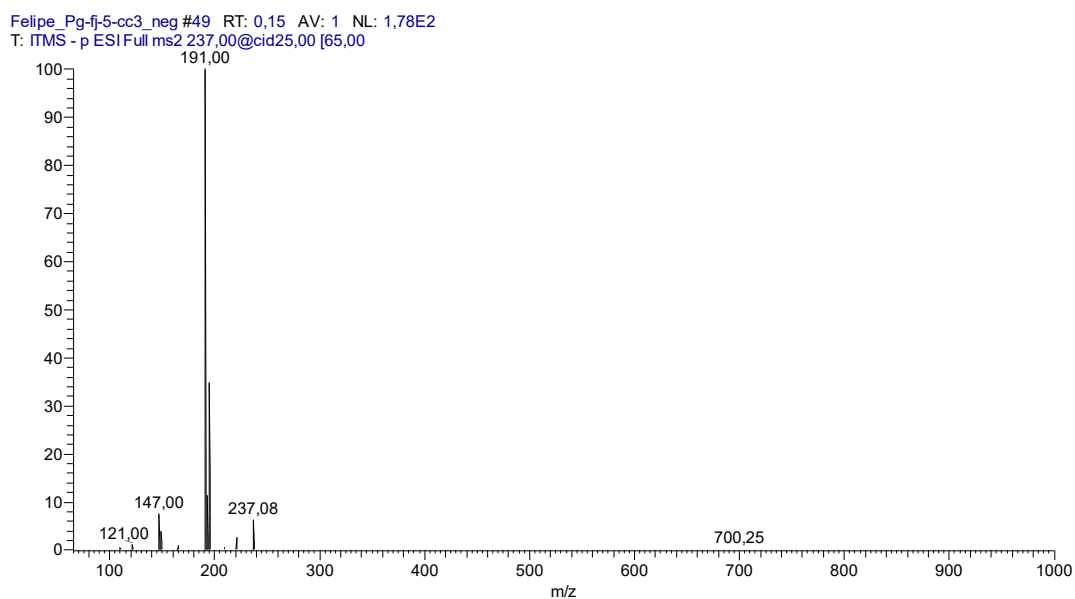
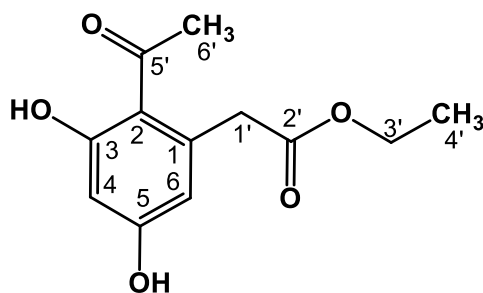
Figura 37. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, CDCl₃) da substância **B4**.**Figura 38.** Espectro ESI-IT-MS. (*full scan*, modo negativo) da substância **B4**.

Figura 39. Espectro ESI-IT-MS (modo negativo) da substância **B4**.**Figura 40.** Estrutura química da substância **B4**.

Etanoato de etila-(2-acetil-3,5-diidroxifenil)
(Curvulina)

4.7.3 SUBSTÂNCIA **S1** – *Fusarium* sp.

O espectro de RMN de ^1H da substância **S1** (Tabela 09, Figura 41) apresentou dois sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 8,13 (sL) e δ 7,69 (sL), que foram atribuídos a H-2 e H-6, respectivamente. É também evidente um singlete largo em δ 2,69 (3H, sL), correspondente a uma metila CH_3 -12. Os deslocamentos químicos de hidrogênios metilênicos foram observados em δ 2,36 (2H, sL), δ 2,79 (2H, sL) e δ 5,01 (2H, d, $J=11,7$ Hz), correspondentes aos H8, H7 e H10, respectivamente. Ainda foi observado um singlete largo em δ 8,36 (1H, sL) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio, que foi atribuído ao hidrogênio na posição 5' ligados ao nitrogênio.

No experimento COSY (Figura 42) é evidente a correlação entre os hidrogênios δ 2,36 CH_2 -2' com os hidrogênios em δ 2,79 CH_2 -1', e também entre os hidrogênios δ 5,76 CH -3' com os hidrogênios em δ 5,01 CH_2 -4' e δ 2,36 CH_2 -2'.

Os experimentos HSQC (Figura 43) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 08.

No espectro de HMBC (Figura 44) pode-se observar a correlação dos hidrogênios aromáticos que foram observados respectivamente entre δ 8,37 (H-6) com os carbonos δ 137,6 (C-4), δ 142,1 (C-5) e δ 147,0 (C-2), entre os hidrogênios em δ 8,01 (H-6) com o carbono δ 142,1 (C-5) e também entre o hidrogênio em δ 7,60 (H-4) com o carbono em δ 148,6 (C-6).

Portando os dados apresentados sugerem que esta substância seja a 3,4-Piridinadiamina, N^4 -1-metil-5-(3-buten-1-il), o espectro de massas de segunda ordem esta apresentado na figura 45 e a respectiva estrutura química na Figura 46.

Tabela 09 . ^1H e ^{13}C (600 MHz, em CDCl_3) mono e bidimensionais da substância S1.

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC
1	-	-	-	-
2	124,1 (CH)	8,13 (<i>sL</i>)	-	-
3	119,6 (Cq)	-	-	-
4	137,6 (Cq)	-		-
5	130,9 (Cq)	-		-
6	138,3 (CH)	7,69 (<i>sL</i>)		-
7	34,6 (CH_3)	2,69 (<i>sL</i>)		-
1'	32,3 (CH_2)	2,79 (<i>s</i>)		-
2'	34,3 (CH_2)	2,36 (<i>sL</i>)	2,79	-
3'	138,6 (CH)	5,76 (<i>sL</i>)	2,36; 5,01	-
4'	116,4 (CH_2)	5,01 (<i>dd</i> , $J=7,2$ Hz)		-
5'	-	8,36 (<i>sL</i>)		-
6'	-	-	-	-

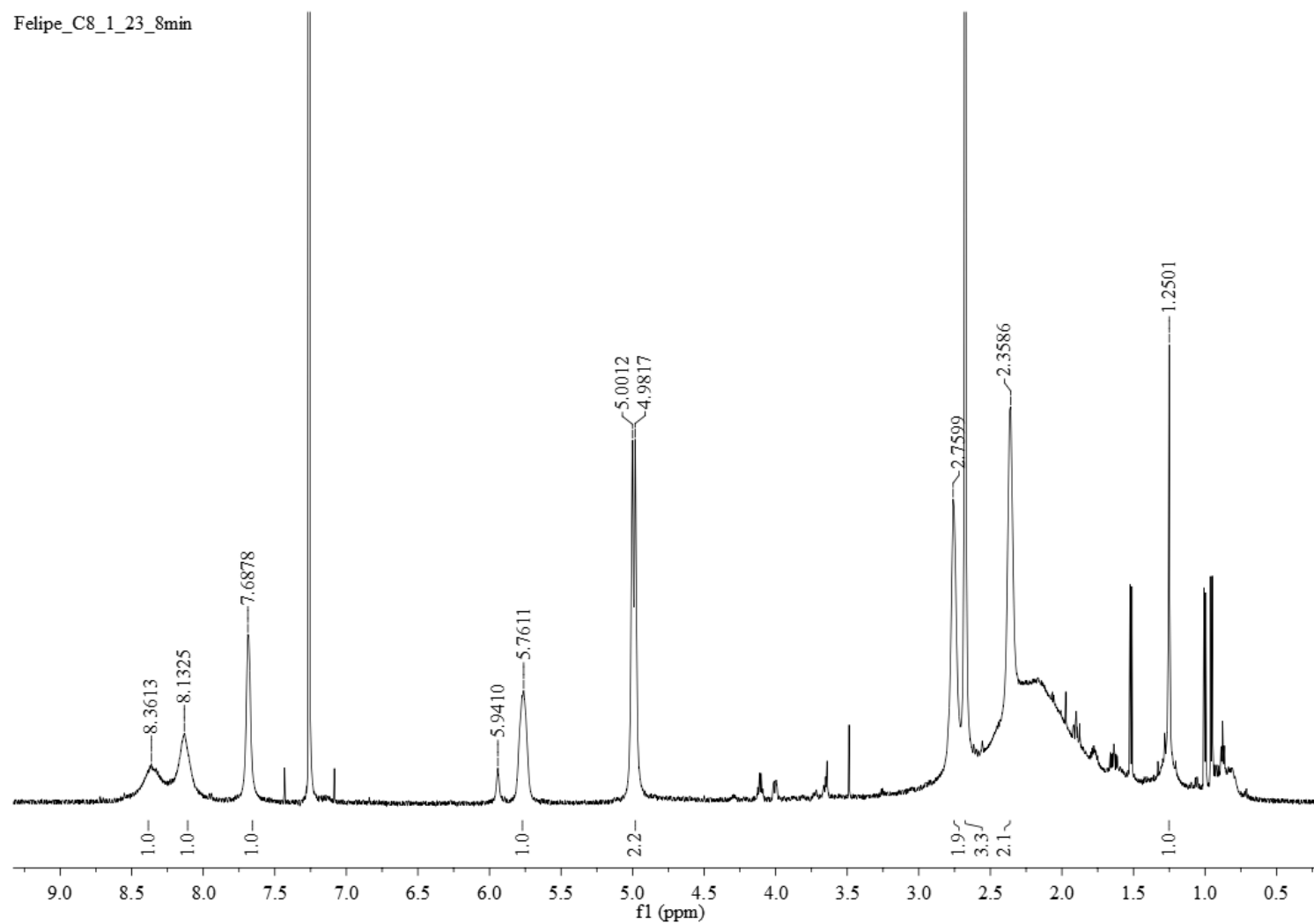
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância **S1**.

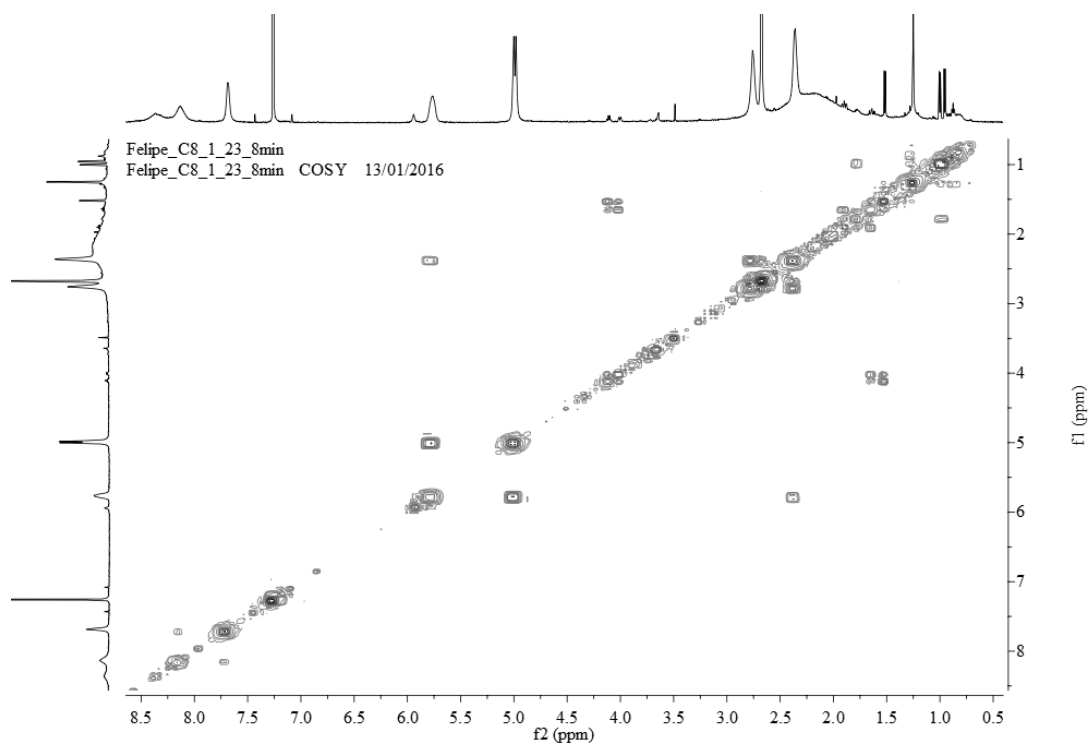
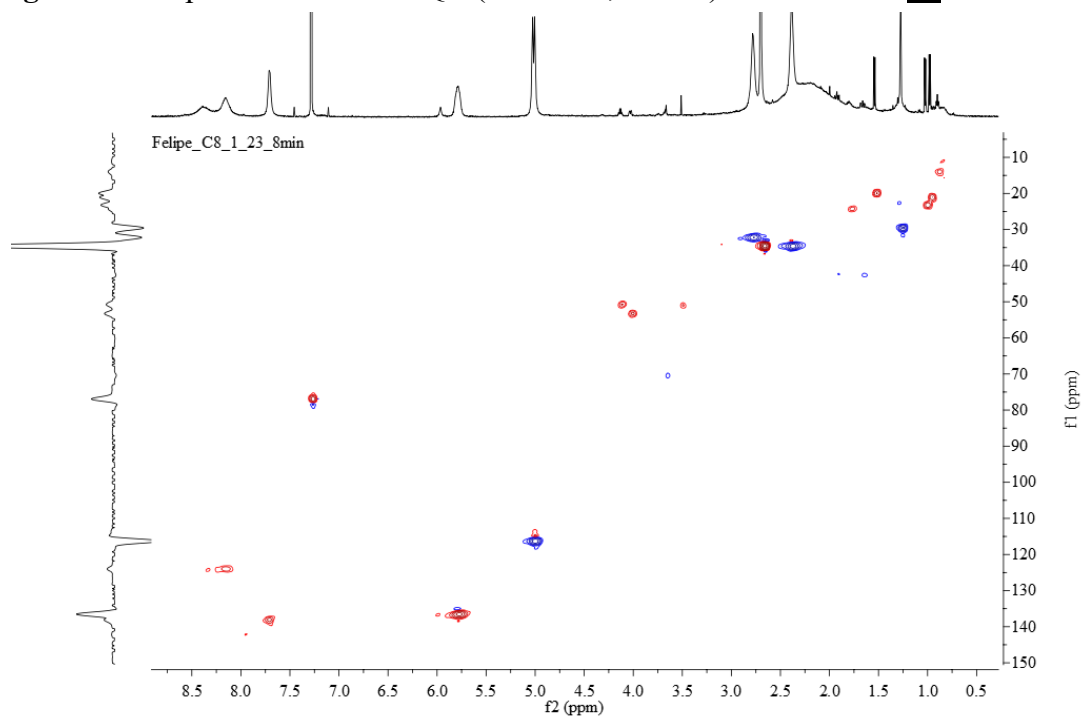
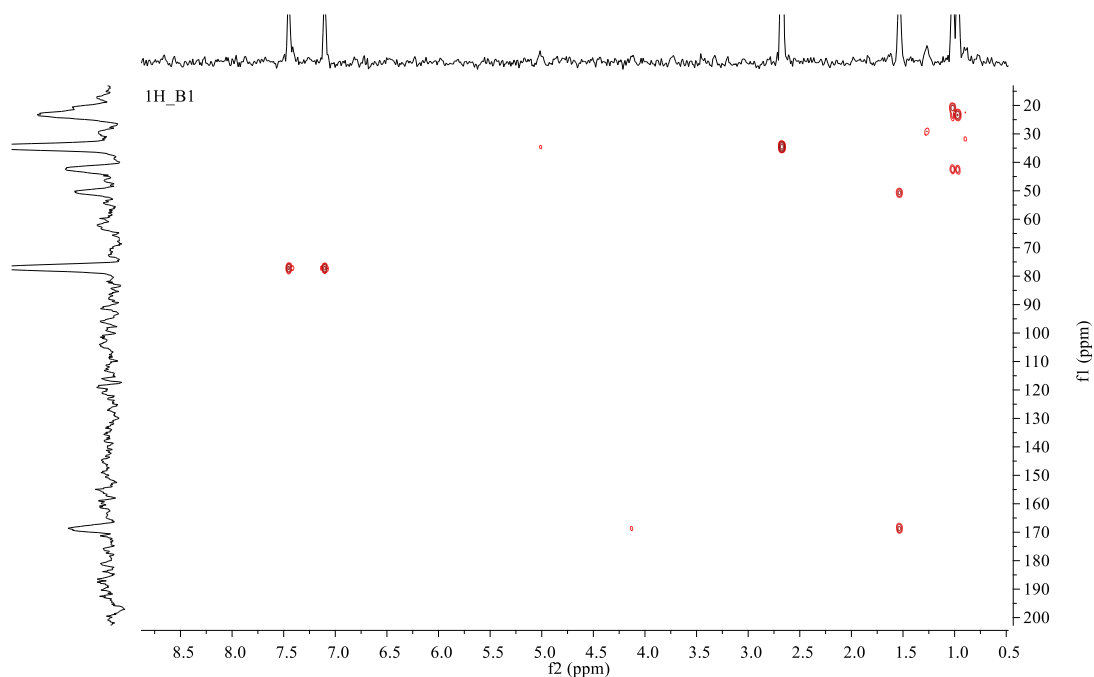
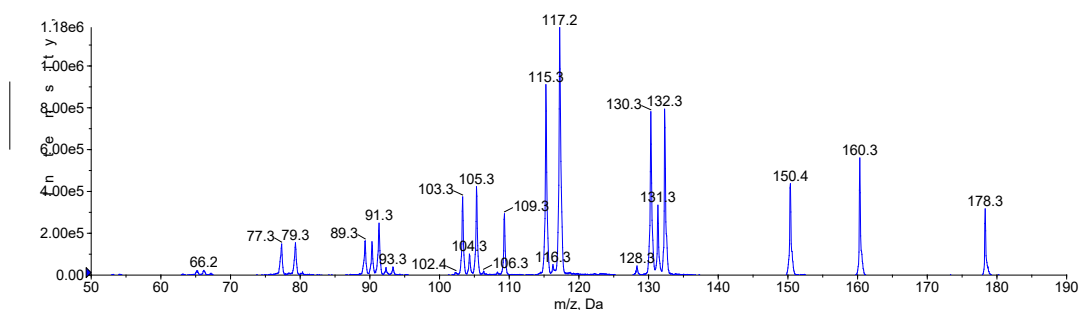
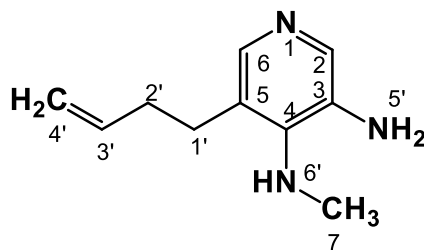
Figura 42. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CDCl_3) da substância **S1**.**Figura 43.** Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl_3) da substância **S1**.

Figura 44. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl_3) da substância **S1**.**Figura 45.** Espectro ESI-IT-MS/MS (modo negativo) da substância **B4**.**Figura 46.** Estrutura química da substância **S1**.3,4-Piridinadiamina, N^4 -1-metil-5-(3'-buten-1-il)

4.7.4 SUBSTÂNCIA **S2** - *Fusarium* sp.

O espectro de RMN de ^1H da substância **S2** (Tabela 10, Figura 47) apresentou três sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 8,57 (*d*, $J=1,8$ Hz) *meta*-acoplado com o hidrogênio δ 7,89 (*dd*, $J=2,1$), sendo este *orto*-acoplado com δ 8,01 (*d*, $J=7,8$ Hz), que foram atribuídos a H-6, H-4 e H-3 respectivamente. É também evidente um triplete em δ 0,90 (3H, *t*, $J=7,2$ Hz), correspondente a uma metila CH_3 -11. Os deslocamentos químicos de hidrogênios metilênicos foram observados em δ 2,68 (2H, *t*, $J=7,8$ Hz), e δ 1,58 (2H, *quinteto*, $J=7,2$ Hz) e δ 1,30 (2H, *sexteto*, $J=7,2$ Hz), correspondentes aos H8, H9 e H10, respectivamente. A multiplicidade dos hidrogênios H-9 e H-10 demonstradas como quinteto e sexteto, justifica a atribuição destes hidrogênios metilênicos. Ainda foi observado um singlete largo em δ 4,92 (2H, *sL*) sugerindo a presença de um hidrogênio ligado a nitrogênio, que foi atribuído aos hidrogênios na posição 12 ligado ao nitrogênio. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 48) mostrou a presença de sinais de 10 átomos de carbono, sendo em δ 165,6 o de uma carbonila.

No experimento COSY (Figura 49) é evidente a correlação entre os hidrogênios δ 1,30 CH_2 -10 com os hidrogênios em δ 0,90 CH_3 -11, e também entre os hidrogênios δ 8,01 CH -3 com os hidrogênios em δ 7,89 CH -4.

Os experimentos HSQC (Figura 50) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 10.

No espectro de HMBC (Figura 51) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila de amida em δ 165,6 (C7). Estes deslocamentos químicos puderam ser observados pela correlação a 3J existente entre os hidrogênios δ 8,01. A correlação dos hidrogênios aromáticos foram observados respectivamente entre δ 8,01 (H-3) com os carbonos δ 31,7 (C-8), δ 145,6 (C-2) e δ 148,8 (C-6).

O espectro ESI-*Q*trap-MS (Figura 51) apresentou íon da molécula protonada em 180.1019, confirmando então fórmula molecular desta substância é a $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_2$, sendo esta este o ácido fusárico (Figura 52).

Tabela 10 . ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) mono e bidimensionais da substância **S2**.

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC
1	-	-	-	-
2	145,6 (Cq)	-	-	-
3	124,1 (CH)	8,01 (<i>d</i> , $J=7,8$ Hz)	7,89	142,1
4	137,7 (CH)	7,89 (<i>dd</i> , $J=2,1$ e $8,1$ Hz)	-	31,7; 145,6; 148,8
5	142,1 (Cq)	-	-	-
6	148,8 (CH)	8,57 (<i>d</i> , $J=1,8$ Hz)	7,89; 8,01	31,7; 137,7; 145,3
7	165,6 (C=O)	-	-	124,1
8	31,7 (CH ₂)	2,68 (<i>t</i> , $J=7,8$ Hz)	1,58	32,5; 137,7; 142,1
9	32,5 (CH ₂)	1,58 (<i>q</i> , $J=7,2$ Hz)	1,30	13,7; 31,7; 142,1
10	21,7 (CH ₂)	1,30 (<i>sext</i> , $J=7,2$ Hz)	0,90	-
11	13,7 (CH ₃)	0,90 (<i>t</i> , $J=7,2$ Hz)	-	21,7; 32,5

Figura 47. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) da substância **S2**.

C8-Spdx 1-23
Felipe_1H

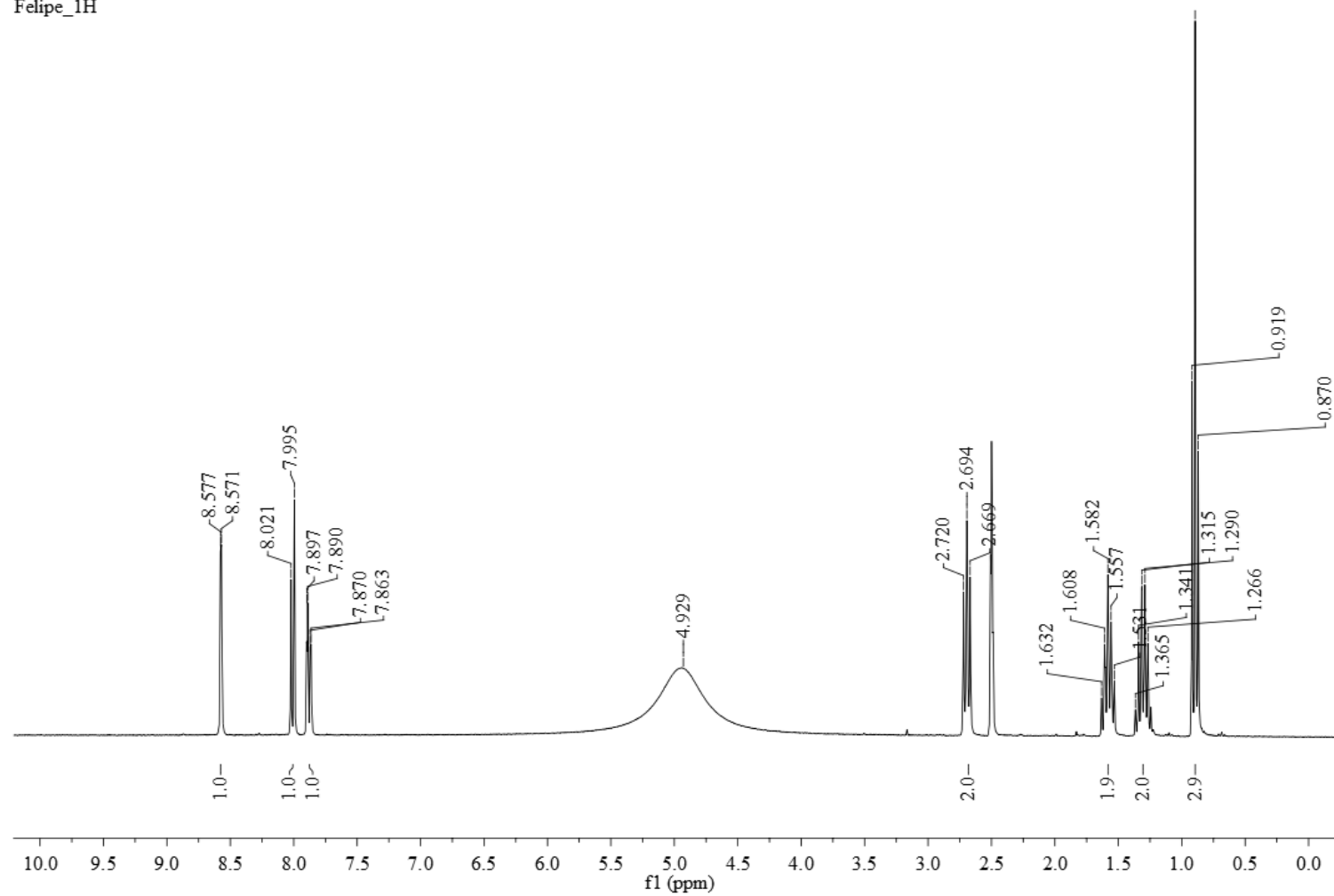


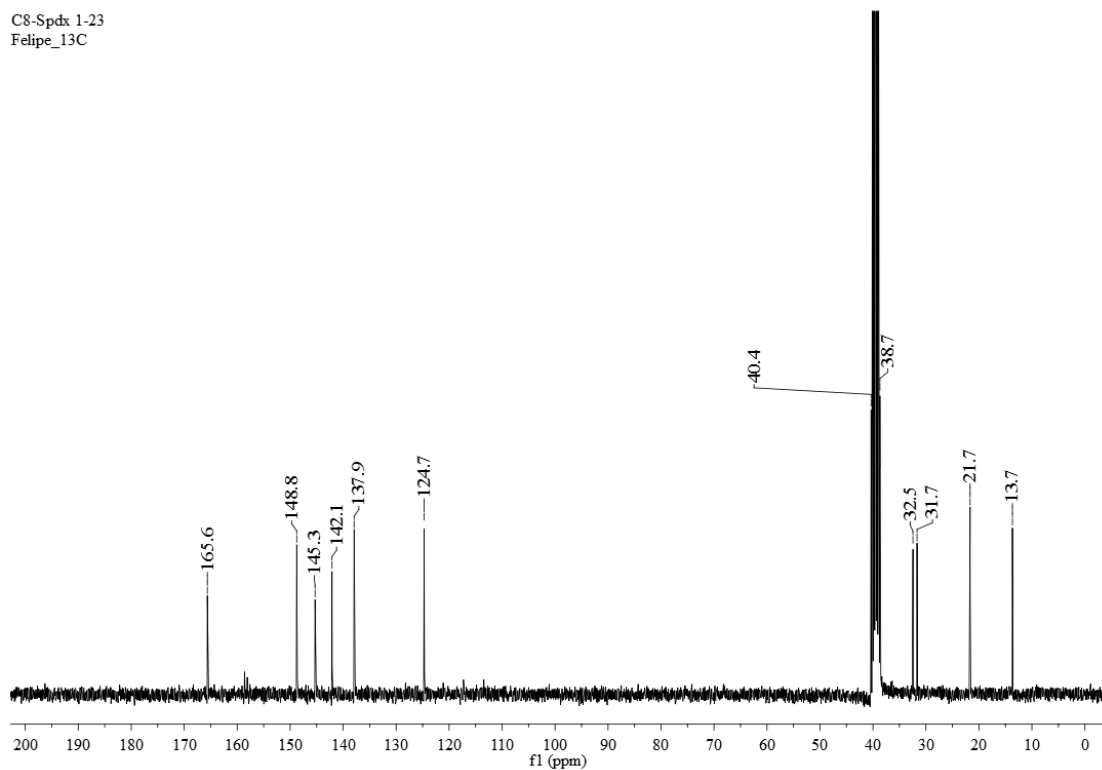
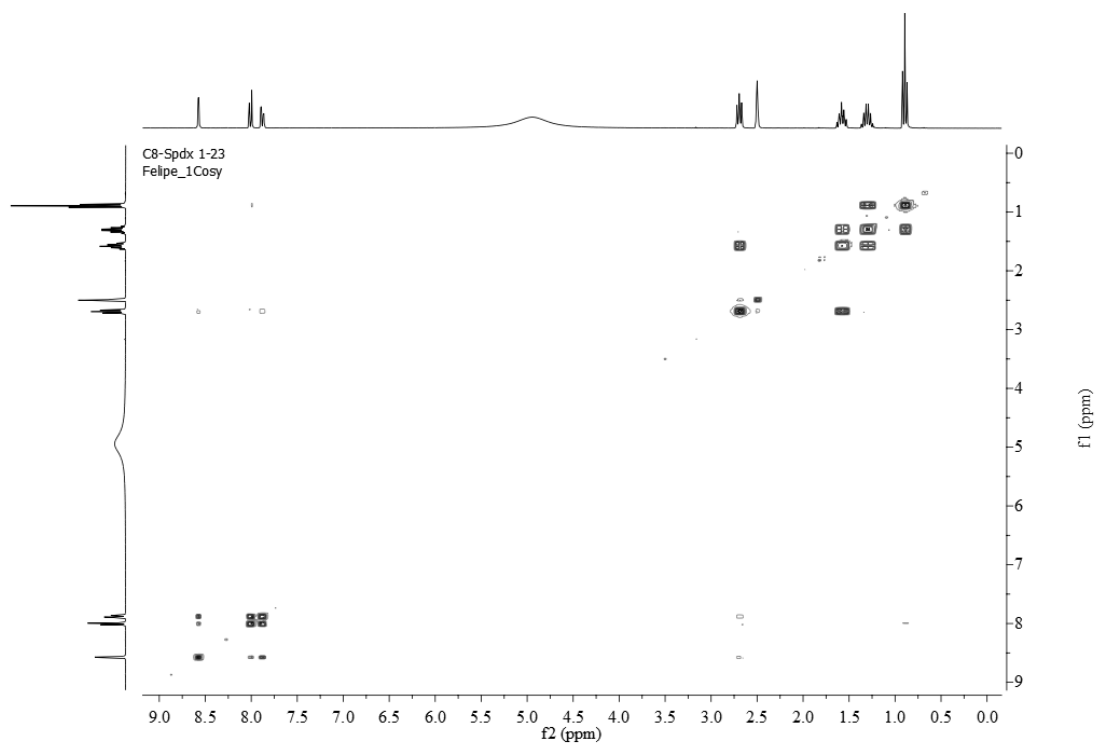
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) da substância **S2**.**Figura 49.** Espectro de RMN de COSY (300 MHz, DMSO- d_6) da substância **S2**.

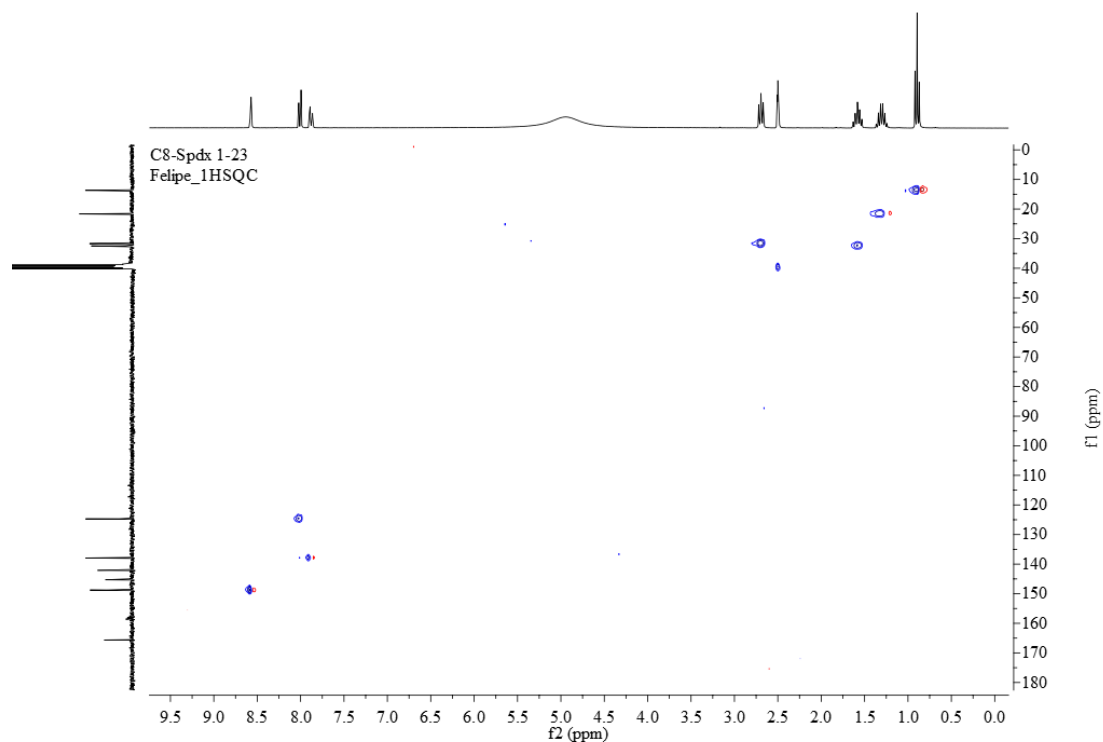
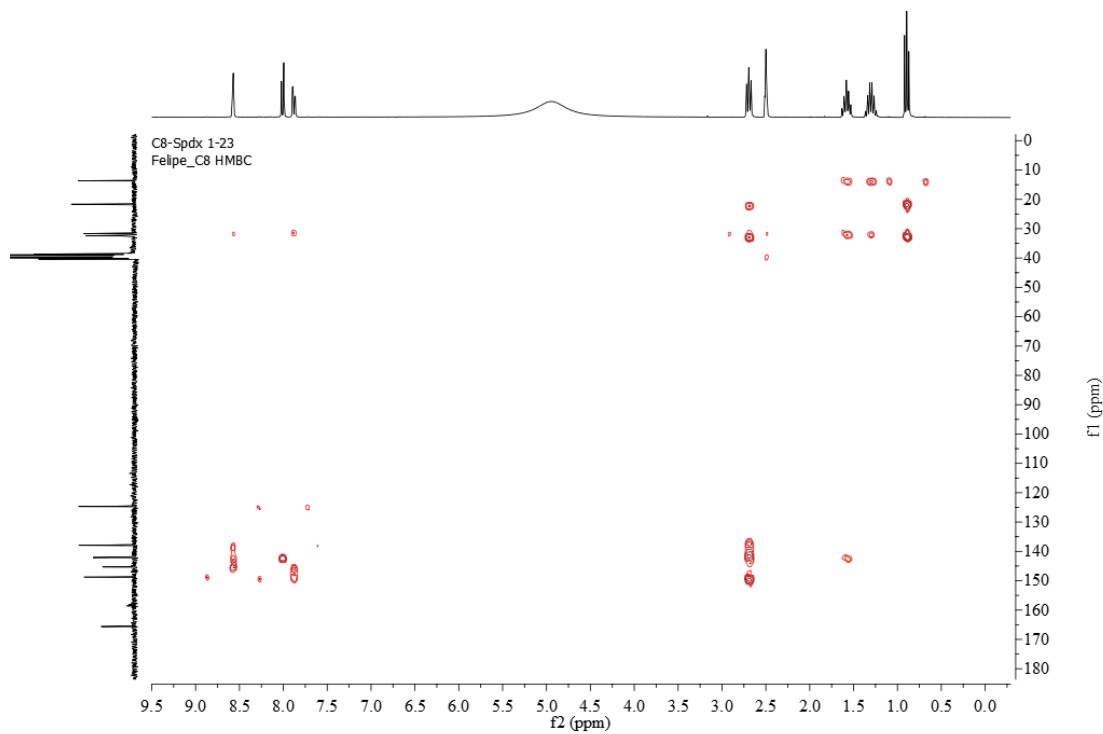
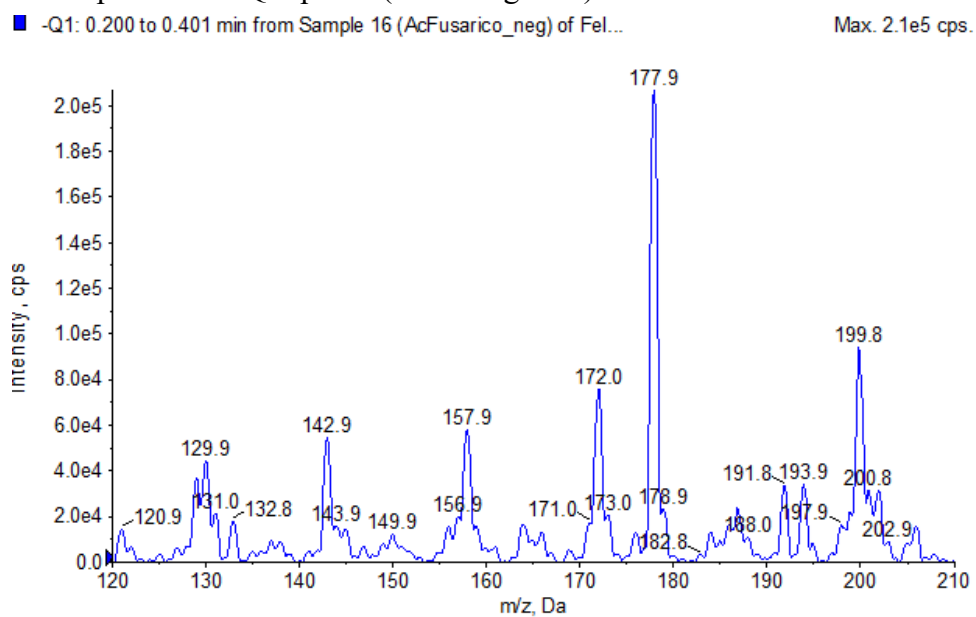
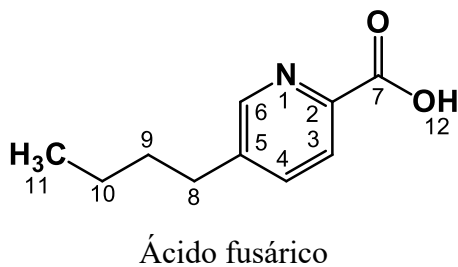
Figura 50 Mapa de contorno HSQC (300 MHz, DMSO-d₆) da substância **S2**.**Figura 51.** Mapa de contorno HMBC (300 MHz, DMSO-d₆) da substância **S2**.

Figura 52. Espectro ESI-Qtrap-MS (modo negativo) da substância S2.**Figura 53.** Estruturas químicas propostas para da substância S2

4.7.5 SUBSTÂNCIA S3 – *Fusarium* sp.

O espectro de RMN de ^1H da substância **S3** (Tabela 11, Figura 54) apresentou sinais característicos de hidrogênios indólicos, sendo três sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,23 (*d*, $J=2,5$ Hz) *meta*-acoplado com o hidrogênio δ 7,10 (*ddd*, $J=1,2$ e $7,5$ Hz), sendo este *orto*-acoplado ao hidrogênio com deslocamento químico em δ 7,48 (*dd*, $J=7,5$ Hz). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-3, H-5 e H-6, respectivamente. Os sinais com deslocamento H-8 e H-9 pertencente ao anel indólico, atribuído ao hidrogênio H-8, é *meta*-acoplado com o hidrogênio com deslocamento químico em δ 6,98 (*ddd*, $J=7,5$ Hz) e δ 7,36 (*dd*, $J=8,1$ Hz), sendo atribuídos portanto ao hidrogênio aromático H-6. O deslocamento químico do hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,63 (2H, *s*). É também evidente um singlete em δ 10,89 correspondente ao NH-1 do anel indólico.

No experimento COSY (Figura 55) foram observados as correlações entre os hidrogênios com deslocamento químico em δ 7,23 CH-3 e δ 7,10 CH-5, e também entre os hidrogênios δ 7,10 CH-4 com o δ 7,48 CH-6.

Os experimentos HSQC (Figura 56) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 01.

No espectro de HMBC (Figura 57) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função ácido carboxílico em δ 173,2 (C-11). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com o hidrogênio em δ 3,63 (CH₂-10), possibilitando atribuí-lo na estrutura. As correlações dos hidrogênios aromáticos foram observados respectivamente entre δ 7,23 (H-3) com os carbonos δ 107,7 (C-4), δ 127,2 (C-5) e δ 136,1 (C-7), e entre δ 7,48 (H-6) com os carbonos δ 121,0 (C-2) e δ 127,2 (C-5). As correlações a 3J dos hidrogênios do anel indólico foram observadas entre δ 6,98 (H-8) com o carbono δ 127,2 (C-5), e entre δ 7,36 (H-9) com os carbonos δ 118,4 (C-8) e δ 127,2 (C-5).

O espectro de ESI-MS no modo negativo (Figura 58) evidenciou o ion com baixa intensidade da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 174.0. Espectro de MS/MS (Figura 59) forneceu o ion produto em m/z 129.9, referente a perda de CO_2 $[\text{M} - 44. \text{H}]^-$, confirmando que esta molécula possui a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$. Portanto esta molécula foi identificada como sendo Ácido 2-(1*H*-indol-6-il)-acético (Figura 60).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) mono e bidimensionais da substância **S3**.

POSICÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC
1	-	10,89 (<i>s</i>)	-	-
2	121,0 (Cq)	-	-	-
3	123,9 (CH)	7,23, (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz)	7,10; 6,98	107,7; 127,2; 136,1
4	107,7 (Cq)	-	-	-
5	127,2 (CH)	7,10 (<i>ddd</i> , $J=1,2$ e $7,5$ Hz)	7,23; 7,48	118,5; 136,1
6	118,5 (CH)	7,48 (<i>dd</i> , $J=7,5$ Hz)	6,98; 7,36	121,0; 127,2
7	136,1 (Cq)	-	-	-
8	118,4 (CH)	6,98 (<i>ddd</i> , $J=7,5$ e $7,5$ Hz)	7,36	127,2
9	111,4 (CH)	7,36 (<i>dd</i> , $J=8,0$ Hz)	6,98	118,4; 127,2
10	31,0 (CH_2)	3,63 (<i>s</i>)	-	107,7; 127,2; 173,2
11	173,2 (C=O)	-	-	-

Figura 54. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) da substância **S3**.

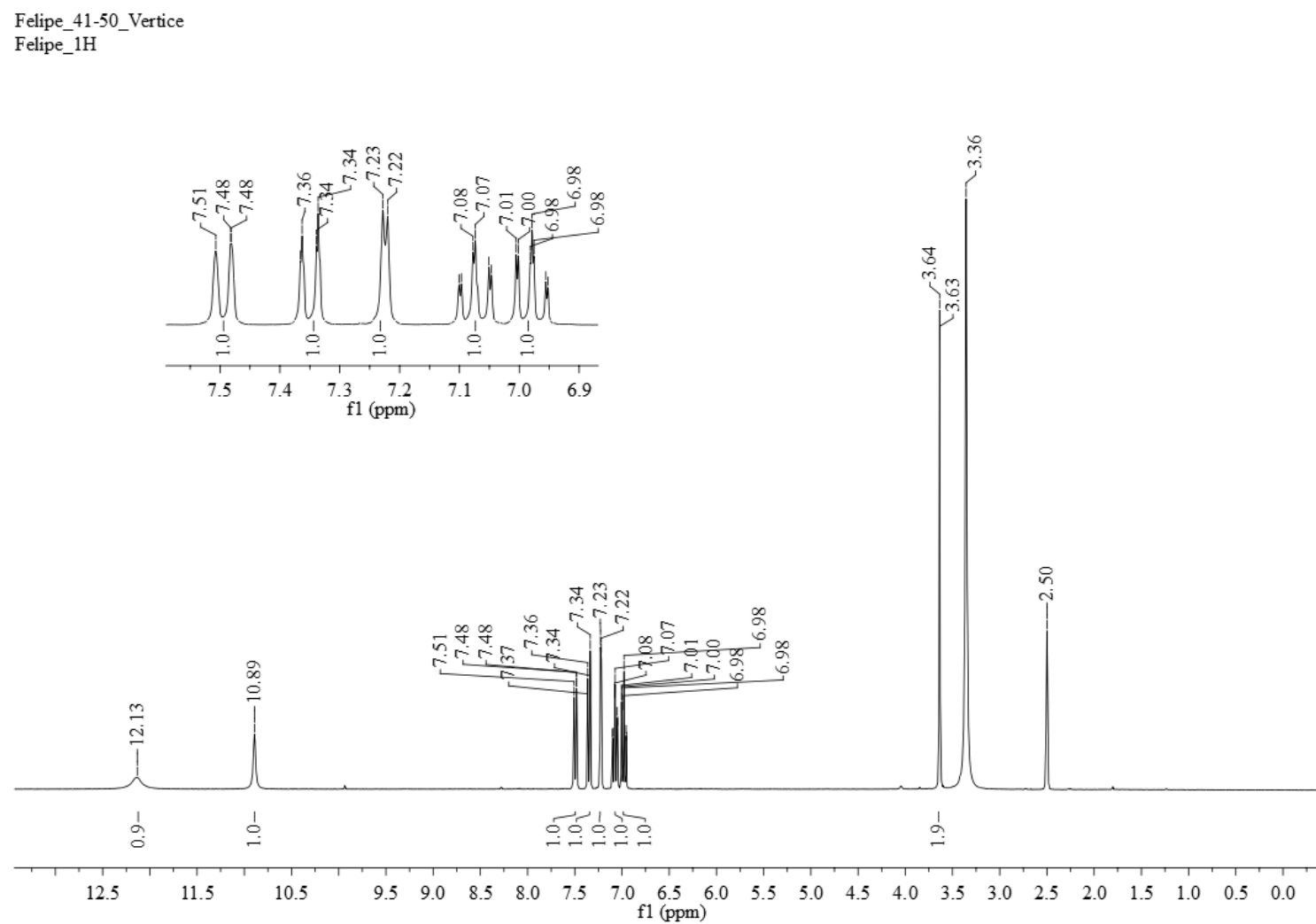


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) da substância **S3**.

Felipe_41-50_Vertice
Felipe_13c

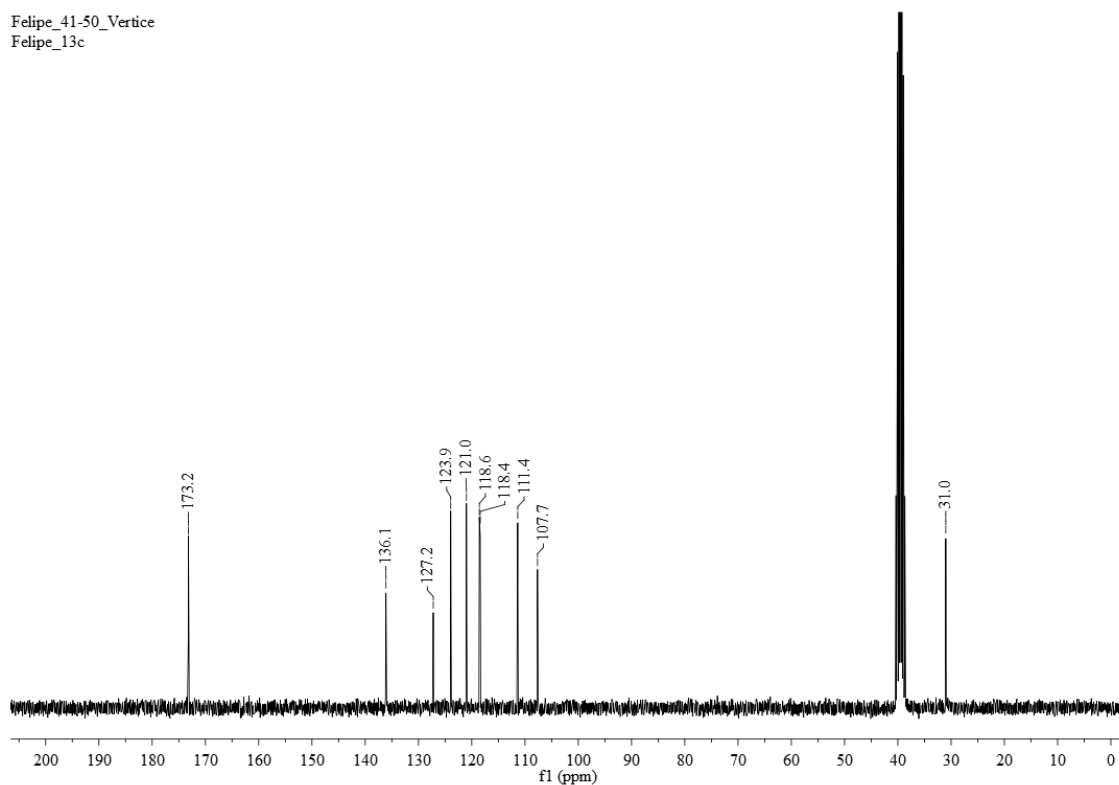
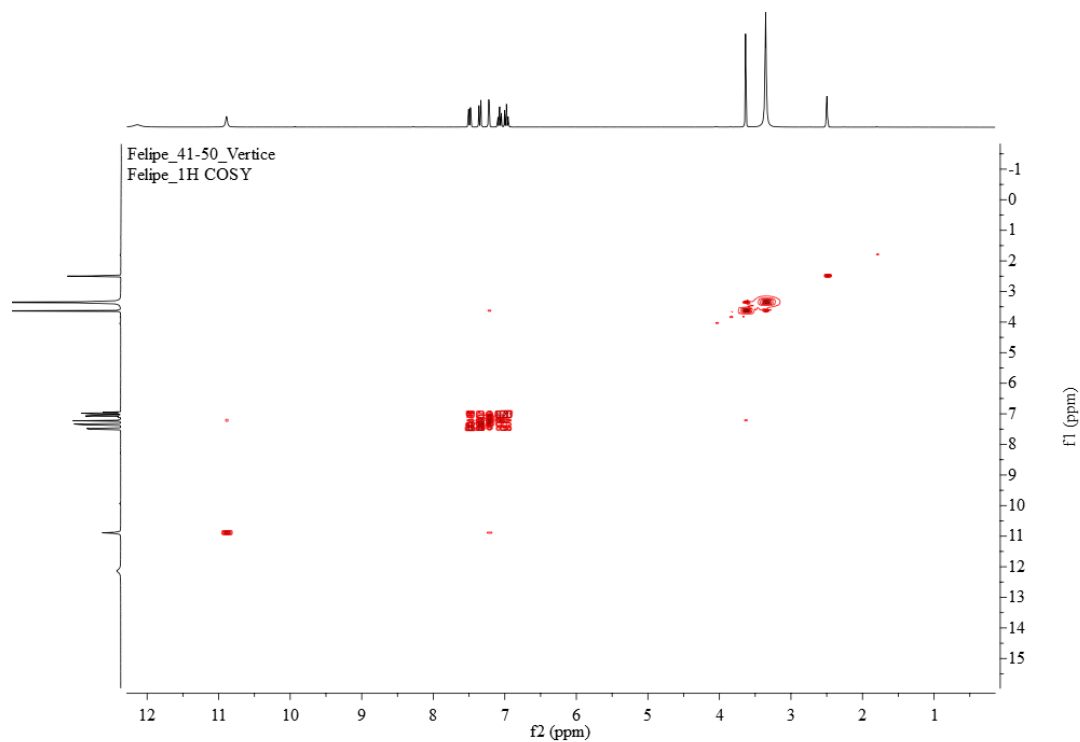
**Figura 56.** Espectro de RMN de COSY (300 MHz, DMSO- d_6) da substância **S3**

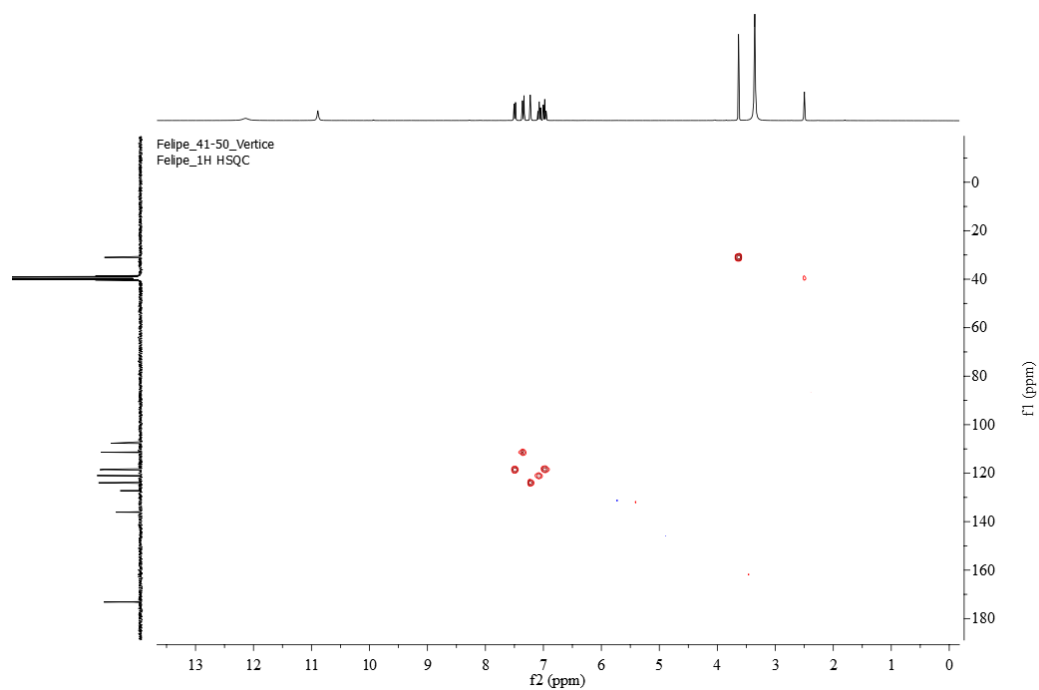
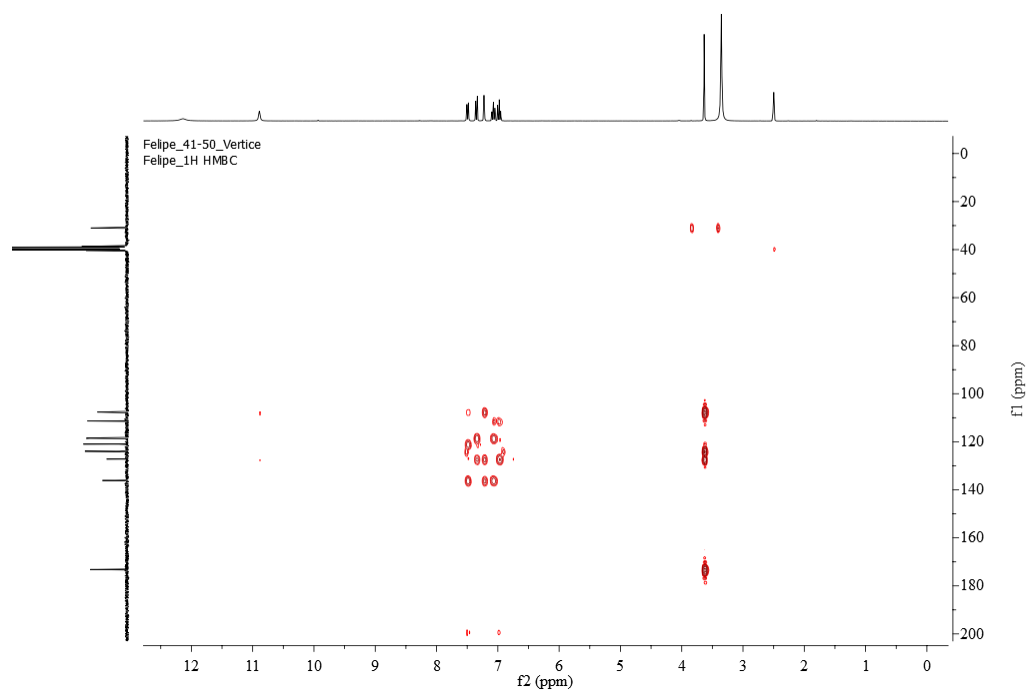
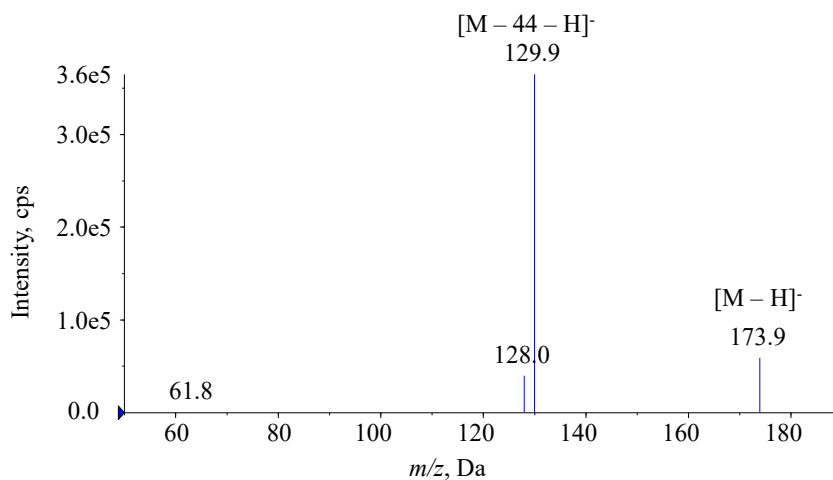
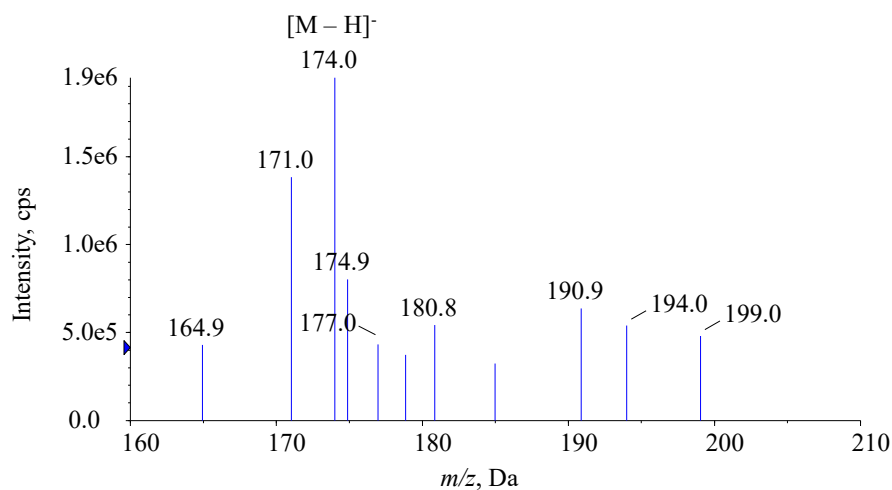
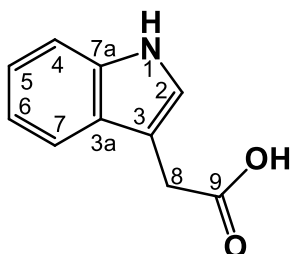
Figura 57. Mapa de contorno HSQC (300 MHz, DMSO-d₆) da substância **S3**.**Figura 58.** Mapa de contorno HMBC (300 MHz, DMSO-d₆) da substância **S3**.

Figura 59. Espectro ESI-MS (modo negativo) da substância **S3**.**Figura 60.** Espectro ESI-MS/MS (modo negativo) da substância **S3**.**Figura 61.** Estrutura química da substância **S3**.Ácido 2-(1*H*-indol-6-il)-acético

4.7.6 SUBSTÂNCIA **S4** - *Fusarium* sp.

O espectro de RMN de ^1H da substância **S4** (Tabela 12, Figura 62) apresentou três sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 8,37 (*sL*), δ 8,00 (*sL*) e δ 7,60 (*sL*), que foram atribuídos a H-6, H-3 e H-4 respectivamente. É também evidente um tripleto em δ 0,86 (3H, *t*, $J = 7,2$ Hz), correspondente a uma metila CH_3 -16. Os deslocamentos químicos de hidrogênios metilênicos foram observados em δ 2,58 (2H, *t*, $J = 7,8$ Hz), δ 1,58 (2H, *sL*), δ 1,53 (2H, *sL*) e δ 1,28 (2H, *sL*, $J = 7,2$), correspondentes aos H12, H13, H14 e H15, respectivamente. A multiplicidade dos hidrogênios H-9 e H-10 demonstradas como quinteto e sexteto, justifica a atribuição destes hidrogênios metilênicos. Ainda foi observado um singleto largo em δ 8,50 (1H, *sL*) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio, que foi atribuído ao hidrogênio na posição 12 ligados ao nitrogênio.

No experimento COSY (Figura 63) é evidente a correlação entre os hidrogênios δ 1,28 CH_2 -10 com os hidrogênios em δ 0,86 CH_3 -11, e também entre os hidrogênios δ 8,01 CH -3 com os hidrogênios em δ 7,60 CH -4.

Os experimentos HSQC (Figura 64) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 13.

No espectro de HMBC (Figura 65) pode-se observar a correlação dos hidrogênios aromáticos que foram observados respectivamente entre δ 8,37 (H-6) com os carbonos δ 137,6 (C-4), δ 142,1 (C-5) e δ 147,0 (C-2), entre os hidrogênios em δ 8,01 (H-6) com o carbono δ 142,1 (C-5) e também entre o hidrogênio em δ 7,60 (H-4) com o carbono em δ 148,6 (C-6).

O espectro de ESI-MS no modo positivo (Figura 58) evidenciou o ion da molécula protonada com alta intensidade $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 237, confirmando que esta molécula possui a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$. Portanto esta molécula foi identificada como sendo 2-Piridinametilamina- N^8 -metil-5-hexanoato (Figura 67).

Tabela 12 . ^1H e ^{13}C (600 MHz, em CDCl_3) mono e bidimensionais da substância **S4**.

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC
1	-	-	-	-
2	147,0 (Cq)	-	-	-
3	122,2 (CH)	8,01 (<i>d</i> , $J=5,5$ Hz)	7,60	142,1
4	137,6 (CH)	7,60 (<i>d</i> , $J=5,2$ Hz)	8,01	148,6
5	142,1 (Cq)	-	-	-
6	148,6 (CH)	8,37 (<i>sL</i>)	-	147,0; 142,1; 137,6
7	42,6 (CH_2)	4,09 (<i>s</i>)	-	124,1
8	-	8,30	-	-
9	34,9 (CH_3)	2,58 (<i>sL</i>)	-	-
10	-	-	-	-
11	171,2	-	-	-
12	32,5 (CH_2)	2,62 (<i>sL</i>)	1,53	142,1
13	27,2 (CH_2)	1,53 (<i>sL</i>)	-	-
14	21,7 (CH_2)	1,28 (<i>sL</i>)	-	-
15	21,7 (CH_2)	1,29 (<i>sL</i>)	-	13,7
16	13,7 (CH_3)	1,26 (<i>t</i> , $J=7,2$ Hz)	1,29	21,7; 32,5

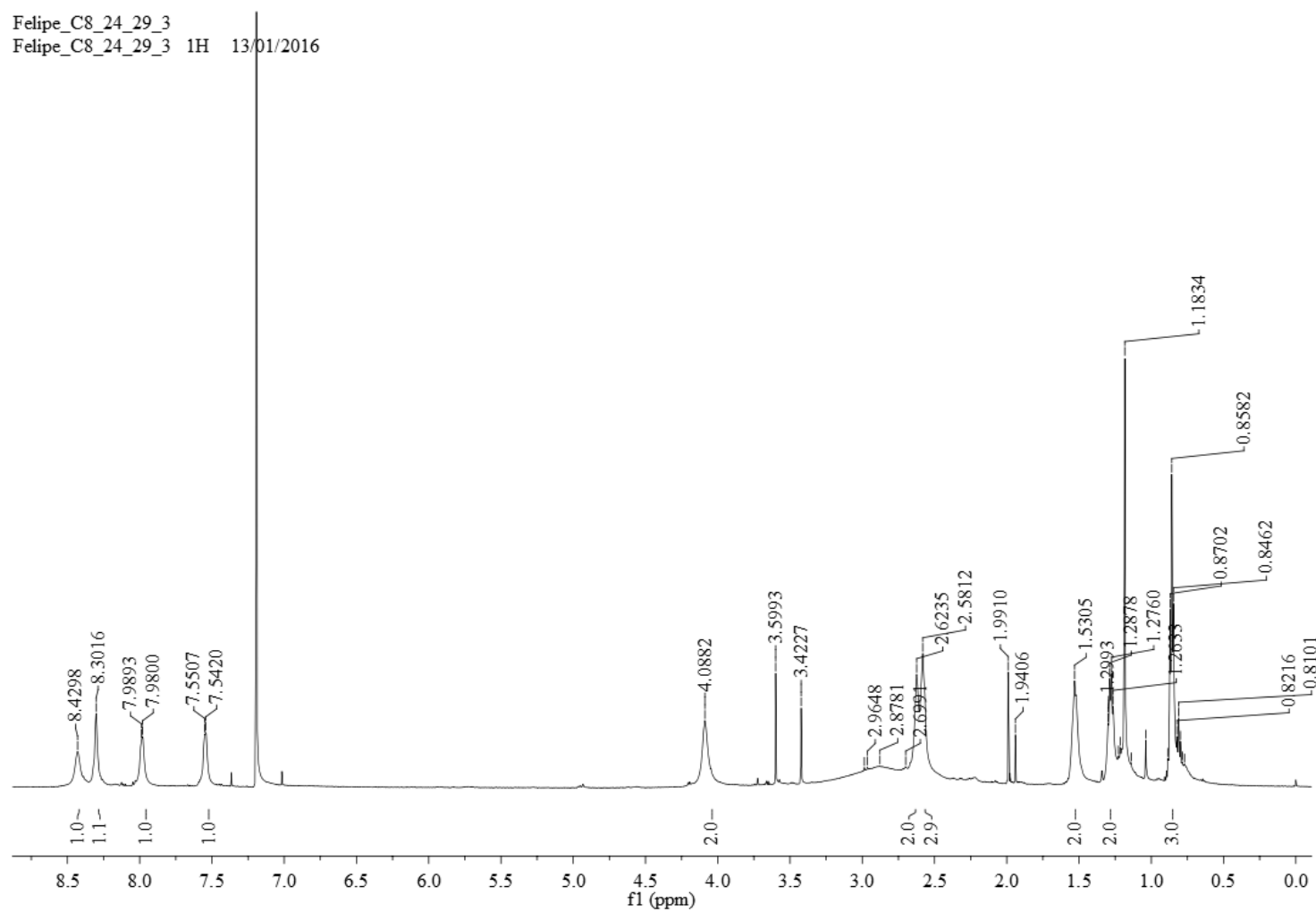
Figura 62. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância **S4**.

Figura 63. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CDCl_3) da substância **S4**.

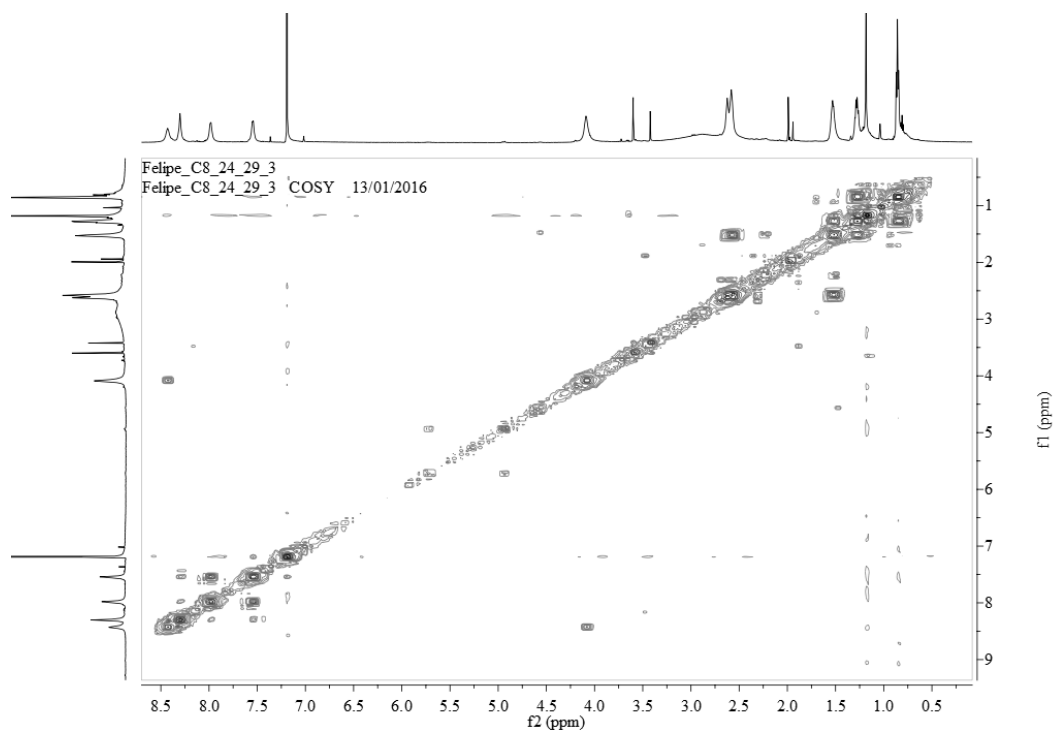


Figura 64. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl_3) da substância **S4**.

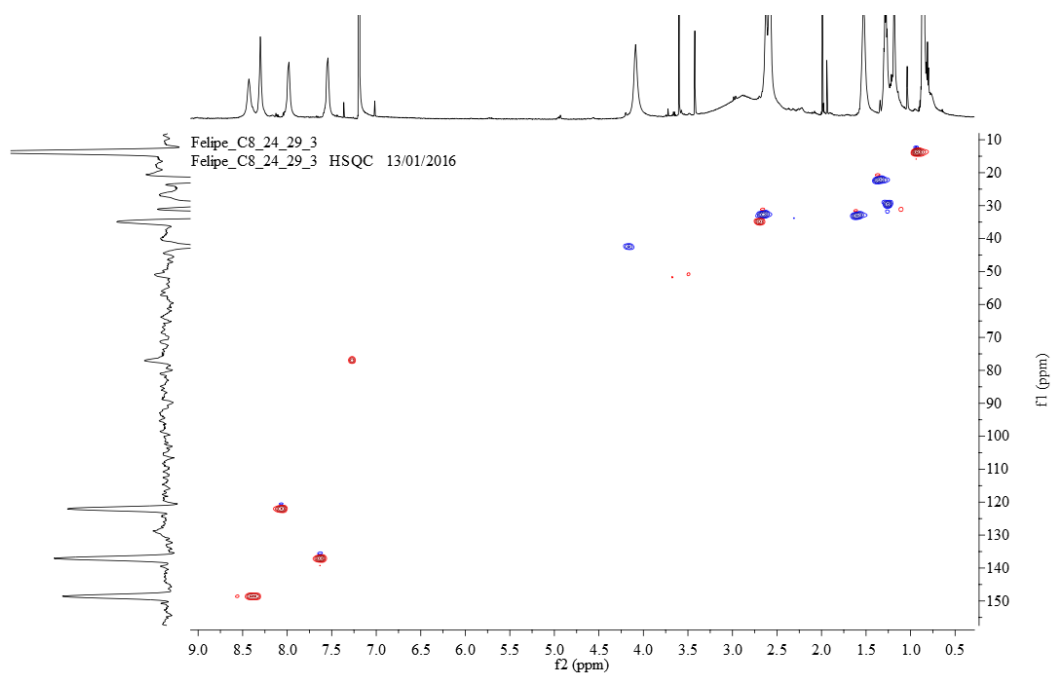


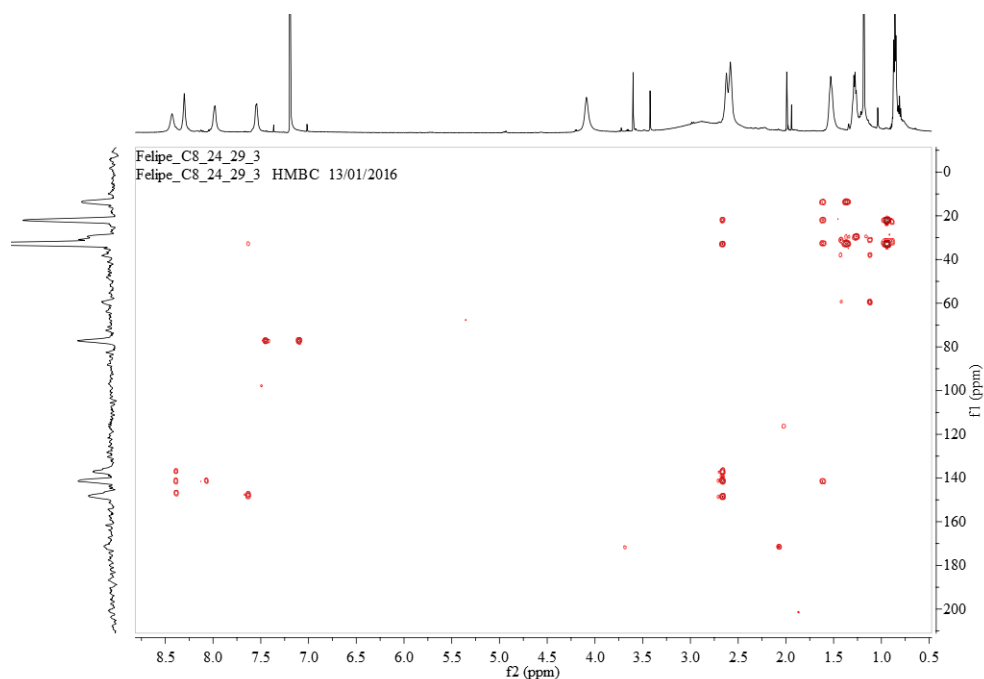
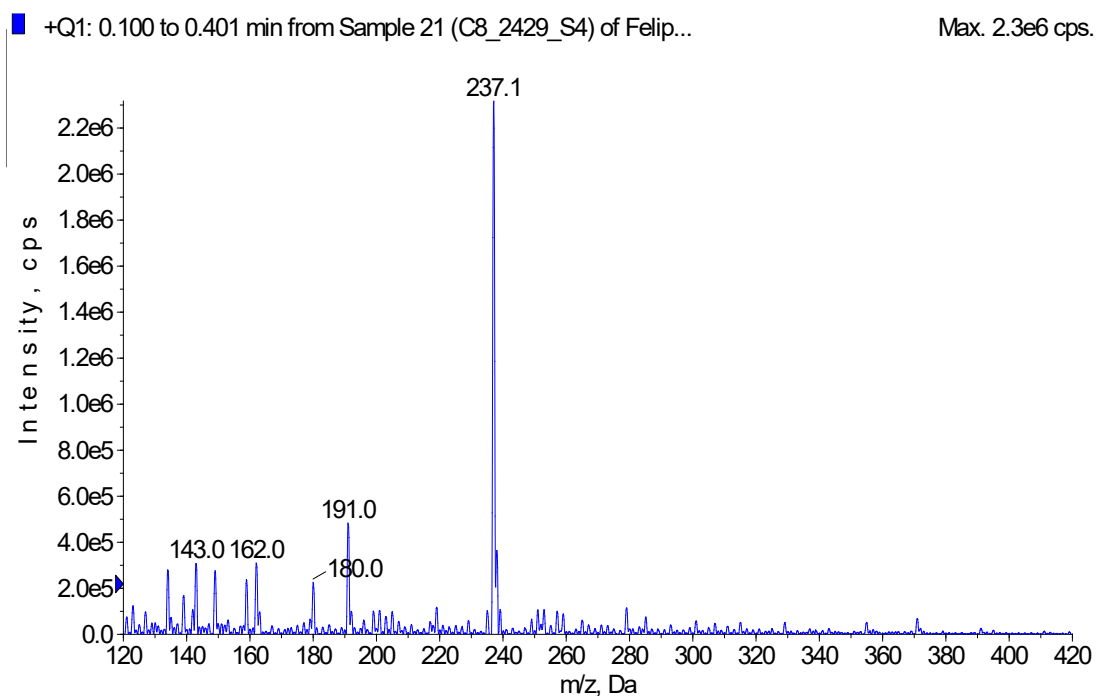
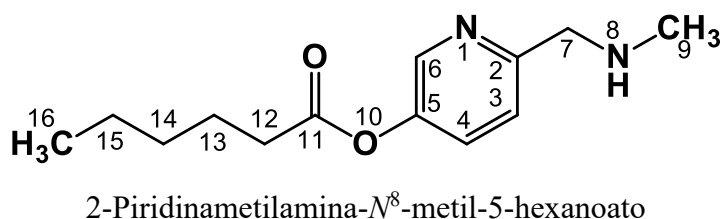
Figura 65. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl_3) da substância **S4**.**Figura 66.** Espectro ESI-Qtrap-MS (modo positivo) da substância **S4**.

Figura 67. Estrutura química da substância **S4**.

4.7.7 SUBSTÂNCIA **S5** – *Fusarium* sp.

A substância **S5** apresentou no espectro de RMN de ^1H (Figuras 68 e 69, Tabela 13) sinais de deslocamentos químicos característicos de um sesterterpeno, derivado de cinco unidades isoprênica (SANTINI et al., 1996). Foram observados cinco sinais de hidrogênios metílicos δ 0,85 (3H, *s*); δ 1,16 (3H, *d* = 7,2 Hz); 1,46 (3H, *s*) e 1,58 (6H, *s*); três hidrogênios olefinicos δ 5,10 (1H, *m*), 5,23 (1H, *m*) e 5,26 (1H, *m*), e sinais de hidrogênios metilênicos entre δ 1,48 e δ 2,24. Sinais de hidrogênios metínicos foram observados em δ 2,62 (1H, *quádruplo*, *J*=9,6 Hz) e 2,50 (1H, *m*).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 70) evidenciou 25 sinais de carbonos sendo que em δ 207,5 observou-se o sinal de um carbono carbonílico de cetona. Os demais sinais puderam ser distinguidos como CH, CH₂ e CH₃ pela análise criteriosa do DEPT 135 (Figura 70). Neste experimento observou-se sinais de carbonos de grupos metilas em δ (10,5; 14,4; 15,8; 16,2 e 16,2). Os carbonos carbinólicos foram observados em δ (74,4 e 64,0). Além de oito carbonos olefinicos que apresentaram deslocamentos químicos entre δ 122,4 e 150,6.

O experimento COSY (Figura 71) apresenta as correlações entre hidrogênios e a Figura 72 mostra as correlações a 1J entre ^1H e ^{13}C , resumidas na tabela 13.

O experimento HSQC-TOCSY (Figura 74) possibilitou atribuir os hidrogênios ligados diretamente aos seus respectivos carbonos à 1J (C-H) além da informação da sequência dos hidrogênios ligados no mesmo sistema de spins; quatro sequências foram estabelecidas. Com estas informações pôde-se atribuir o hidrogênio da posição H-10 com deslocamento químico em δ 3,81 ao carbono δ 74,4 (C-10). Este mesmo hidrogênio apresentou correlações com os carbonos δ 34,7 (C-8) e 30,4 (C-9). Outra sequência de spins observada neste experimento foi com o hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,10

(H-6) que apresentou correlação à 1J com o carbono em δ 123,5 (C-6) e na sequência com os carbonos em δ 40,0 (C-4) e 23,5 (C-5). O hidrogênio em δ 5,23 (H-12) apresentou correlação à 1J com o carbono δ 126,7 (C-12) e na sequência com os carbonos em δ 28,7 (C-13) e δ 48,8 (C-14). Ainda foi possível observar a correlação dos hidrogênios diastereotópicos em δ 3,60 e 3,48 (H-24) à 1J com o carbono em δ 64,0 e com os carbonos δ 14,4 (C-25) e δ 37,5 (C-19).

Com o experimento HMBC (Figura 73) pôde-se observar correlações à 3J e à 2J . Observou-se o deslocamento químico dos hidrogênios da metila em δ 0,85 (CH₃-23) e do hidrogênio em δ 2,62 (H-14) com a carbonila em δ 207,5 (C-16). Os carbonos olefínicos (C-17 e C-18) em δ 147,4 e δ 150,6 respectivamente, também foram atribuídos mediante a correlação com o hidrogênio (H-14) em δ 2,62. Para atribuição dos carbonos olefínicos (C-6 e C-3) em δ 123,5 e 136,9 respectivamente, observou-se a correlação com os hidrogênios em δ 2,06 e 2,24 (H-5). Para a atribuição dos carbonos carbinólicos, observou-se a correlação dos hidrogênios diastereotópicos δ 3,60 e 3,48 (H-24) com os carbonos δ 14,4 (C-25) e δ 150,6 (C-18). As principais correlações observadas nos experimento de COSY HMQC e COSY - HMBC estão apresentadas nas Figuras 77 e 78 respectivamente.

O espectro de ESI-MS no modo negativo (Figura 76) evidenciou o íon da molécula desprotonada [M - H]⁻ em m/z 401, confirmando que esta molécula possui a fórmula molecular C₂₅H₃₈O₄. Com estas informações foi possível propor a estrutura do sesterterpeno conhecida na literatura como terpestacina (Figura 79).

Na literatura existem dados de uma substância semelhante ao da **S5**, denominada Fusaproliferina, isolado de *Fusarium proliferatum* por Santini et al. (1996), sendo uma das principais toxinas produzidas pelo fungo *Fusarium*. A diferença da estrutura isolada por Santini et al (1966) com **S5** isolada do fungo endofítico dos capítulos de *P. chiquitensis*, encontra-se fundamentalmente no grupo acetoxi.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H ^{13}C (600 e 150 MHz, em DMSO- d_6) da substância **S5**.

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC	HSQC TOCSY
1	39,2 (CH ₂)	2,16; 1,62	-	48,8; 122,4; 136,9	122,4
2	122,4 (CH)	5,26 (<i>m</i>)	2,16; 1,62	15,2; 39,2	39,2
3	136,9 (Cq)	-	-	-	-
4	40,0 (CH ₂)	2,23; 1,98	1,80	123,5; 136,9	23,5; 123,5
5	23,5 (CH ₂)	2,24; 2,06	-	122,4; 136,2	-
6	123,5 (CH)	5,10 (<i>m</i>)	2,24; 2,06	15,8; 34,7	23,5; 40,0
7	136,2 (Cq)	-	-	-	-
8	34,7 (CH ₂)	1,98; 1,69	-	16,2; 74,4; 123,5 132,5	-
9	30,4 (CH ₂)	1,58; 1,48	-	74,4; 123,5; 132,5	-
10	74,4 (CH)	3,81 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,6 Hz)	1,58; 1,48	10,5; 126,7	34,7; 30,4
11	132,5 (Cq)	-	-	-	-
12	126,7 (CH)	5,23 (<i>m</i>)	2,32; 1,79	10,5; 74,4; 48,3	28,7; 48,8
13	28,7 (CH ₂)	2,32; 1,79	2,62	48,3; 126,7; 132,5	48,3; 126,7
14	48,8 (CH)	2,62 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,8 e <i>J</i> = 11,4 Hz)	1,79	39,2; 126,7; 147,4; 150,6; 207,5	28,6; 126,7
15	48,3 (Cq)	-	-	-	-
16	207,5 (C=O)	-	-	-	-
17	147,4 (Cq)	-	-	-	-
18	150,6 (Cq)	-	-	-	-
19	37,5 (CH)	2,50	-	14,4; 48,3; 64,0; 147,4; 150,6	14,4; 64,0
20	16,2 (CH ₃)	1,58 (<i>s</i>)	-	40,0; 122,4; 136,9	-
21	15,8 (CH ₃)	1,58 (<i>s</i>)	-	123,5; 132,5	-
22	10,5 (CH ₃)	1,46 (<i>s</i>)	-	74,4; 126,7; 136,9	-
23	16,2 (CH ₃)	0,85 (<i>s</i>)	-	39,2; 48,8; 207,5	-
24	64,0 (CH ₂)	3,60 (<i>dd</i> , <i>J</i> =7,6 Hz) 3,48 (<i>dd</i> , <i>J</i> =10,2 Hz)	2,50	14,4; 39,2; 150,6	14,4; 37,5
25	14,4 (CH ₃)	1,16 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz)	-	37,5; 64,0; 150,6	-

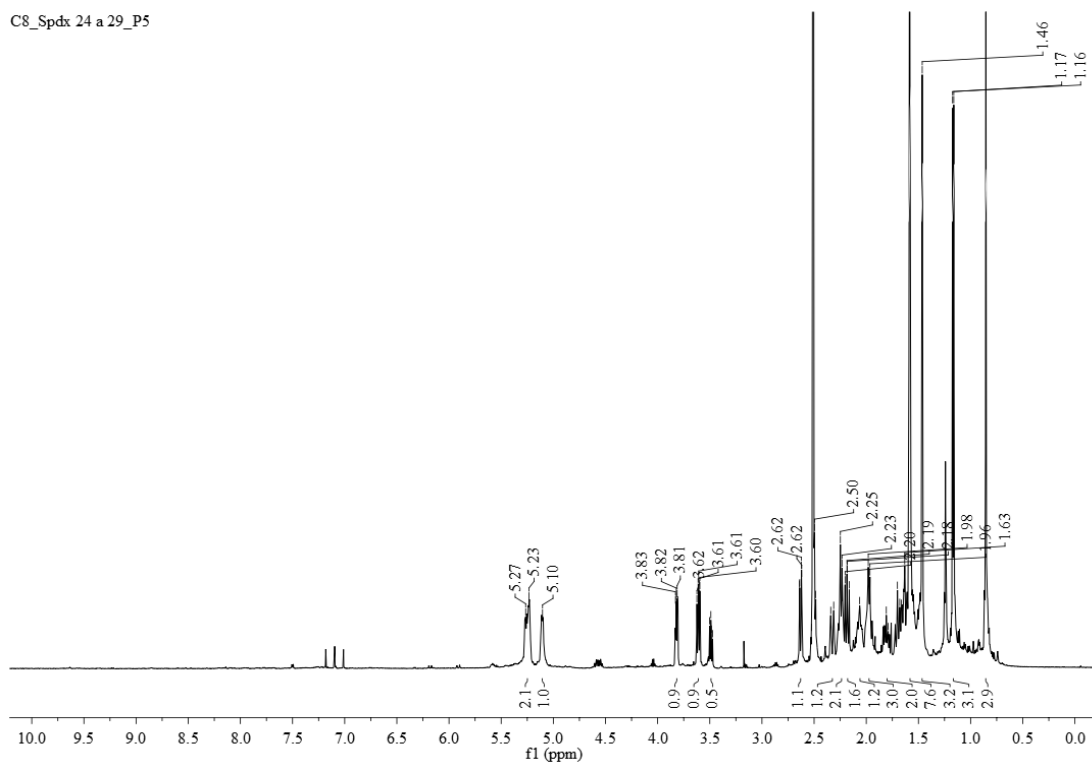
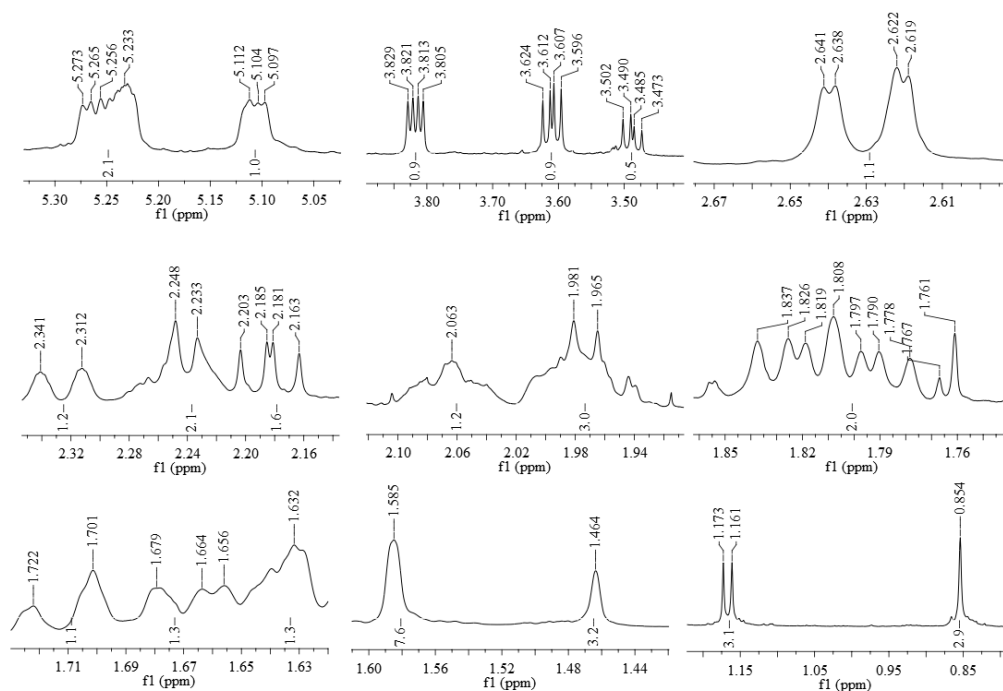
Figura 67. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **S5**.**Figura 68.** Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **S5**.

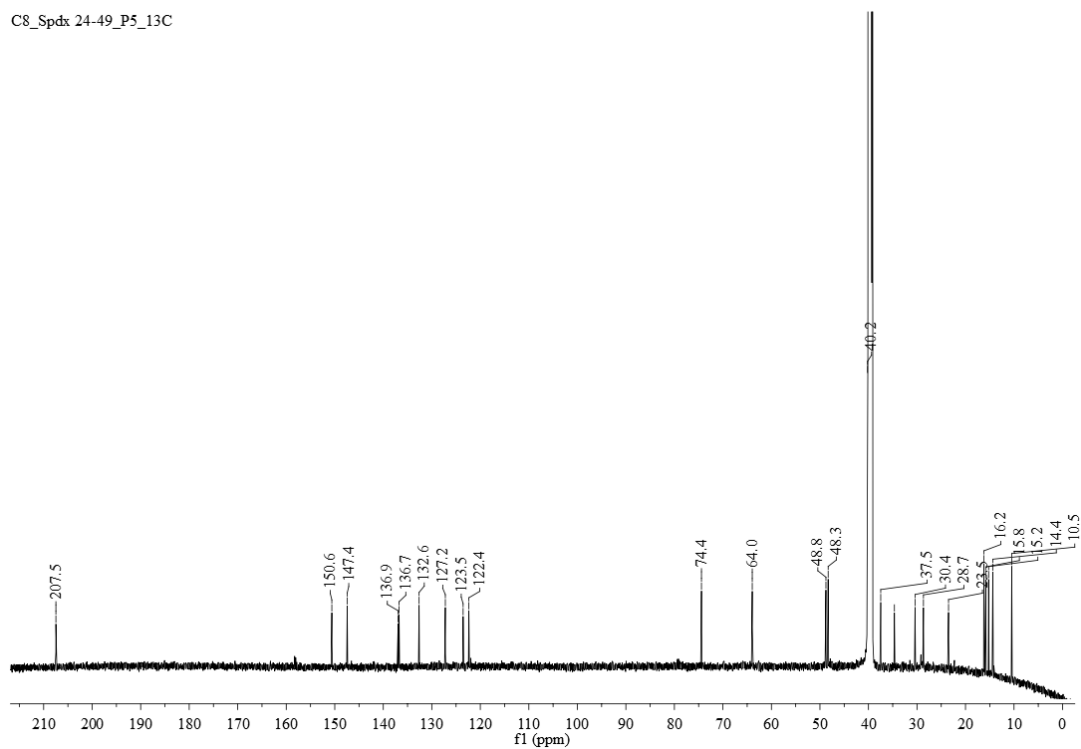
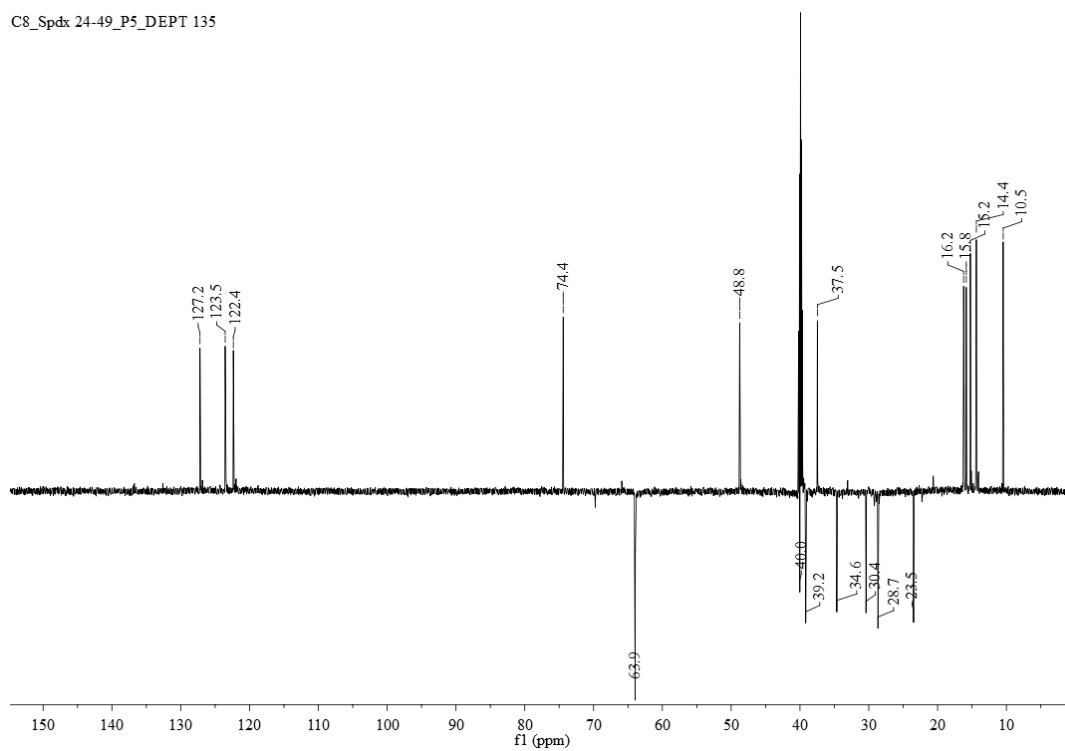
Figura 69. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **S5**.**Figura 71.** Espectro de RMN DEPT 135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **S5**.

Figura 72. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, DMSO- d_6) das substância **S5**.

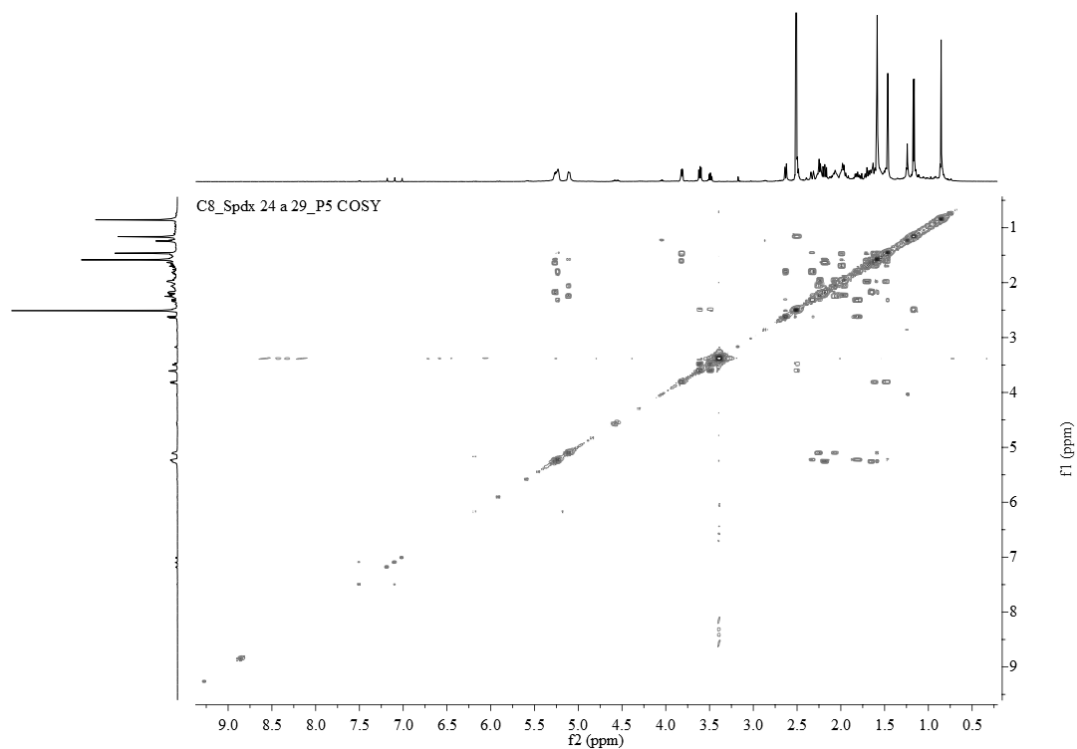


Figura 73. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **S5**.

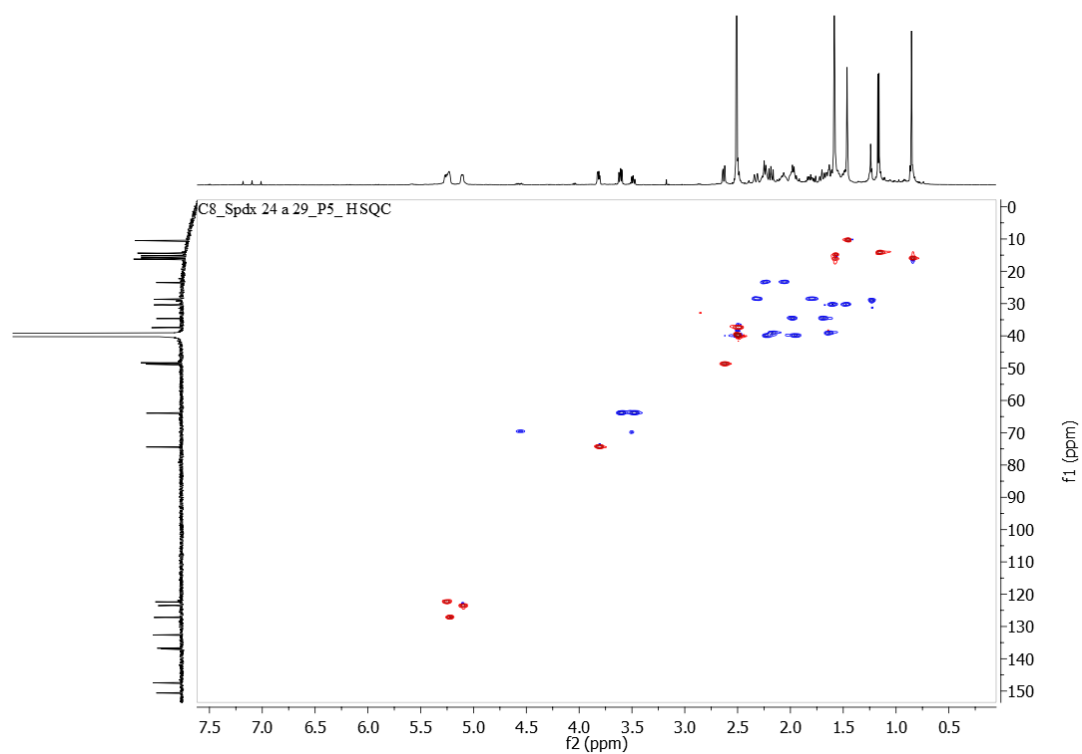


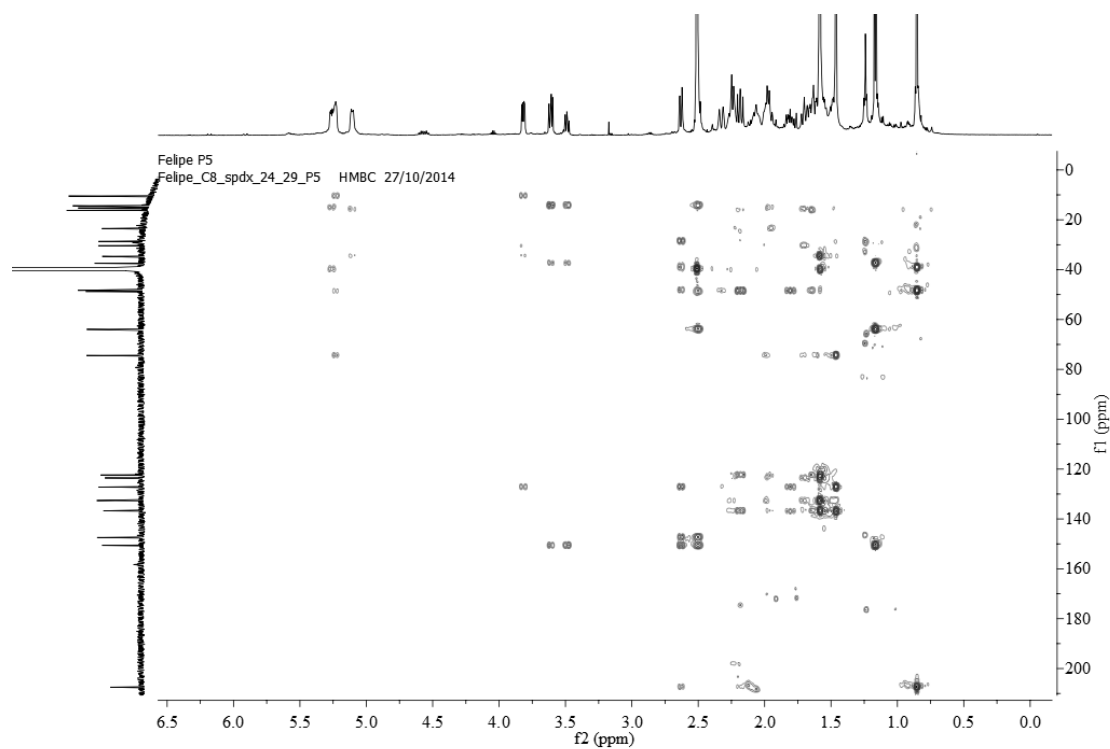
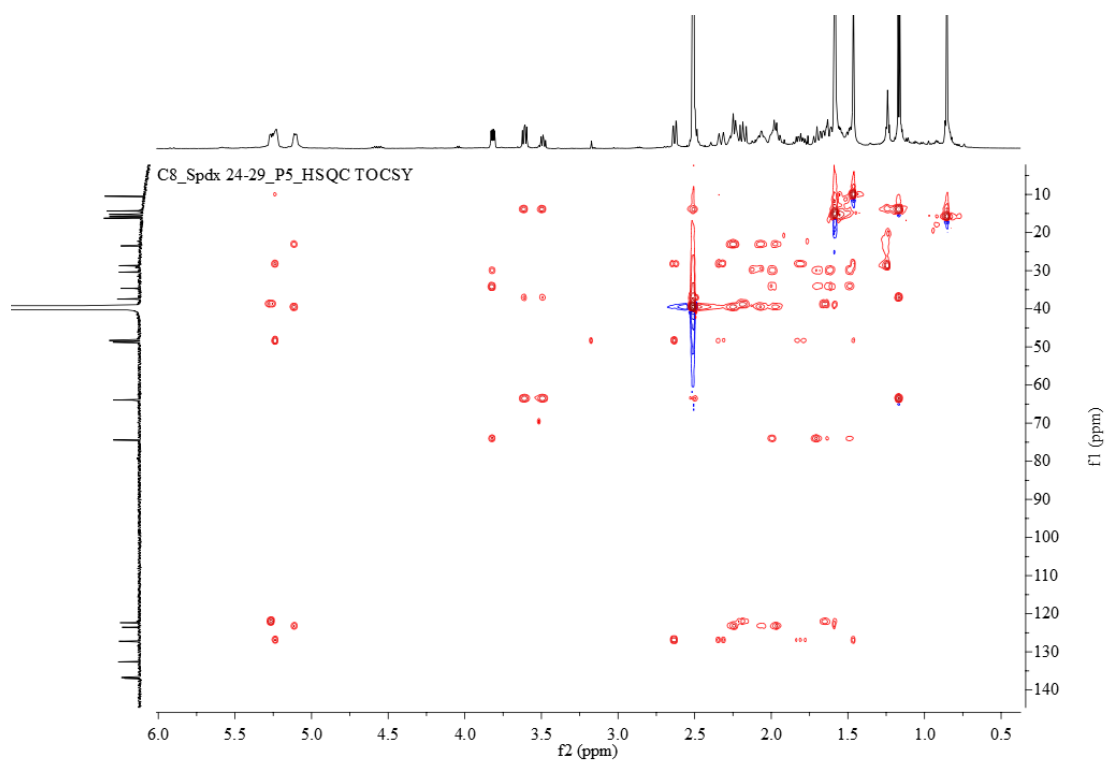
Figura 74. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **S5**.**Figura 75.** Mapa de contorno HSQC TOCSY (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **S5**.

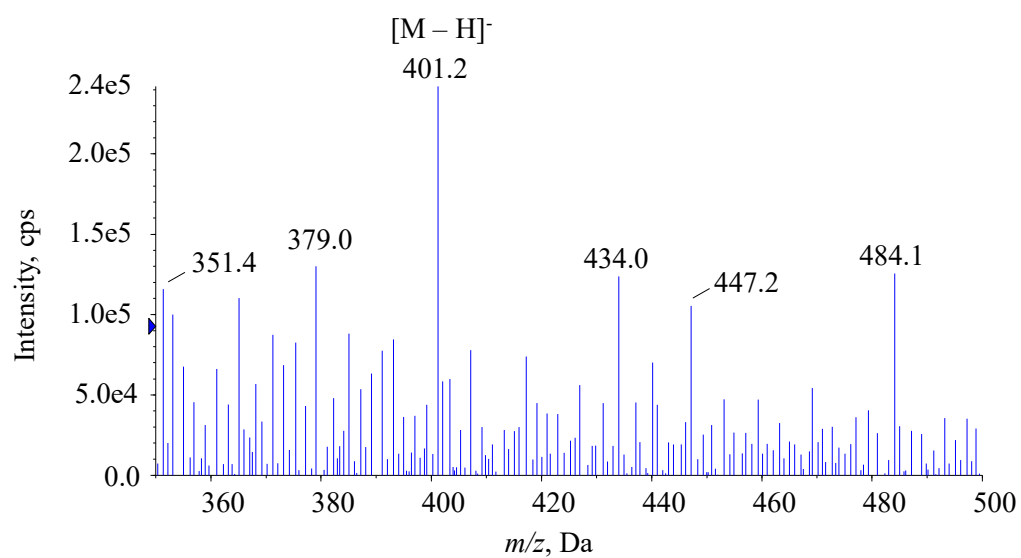
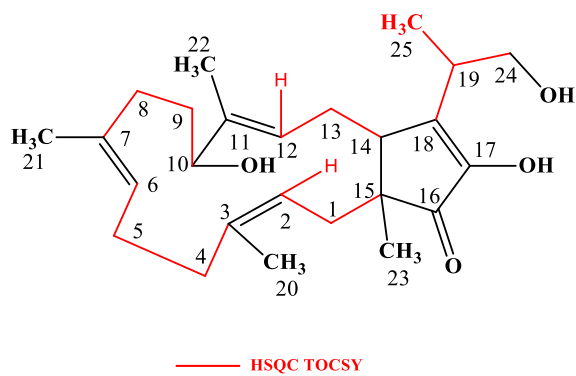
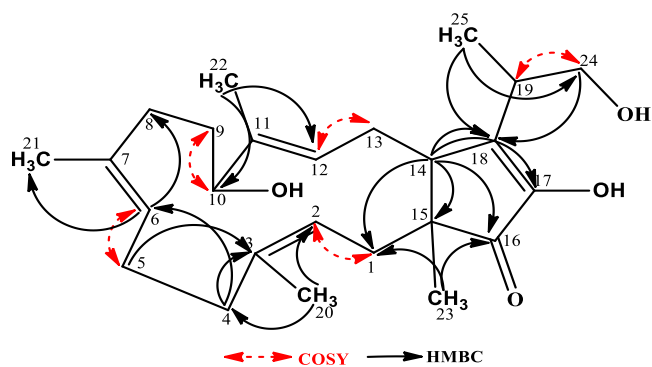
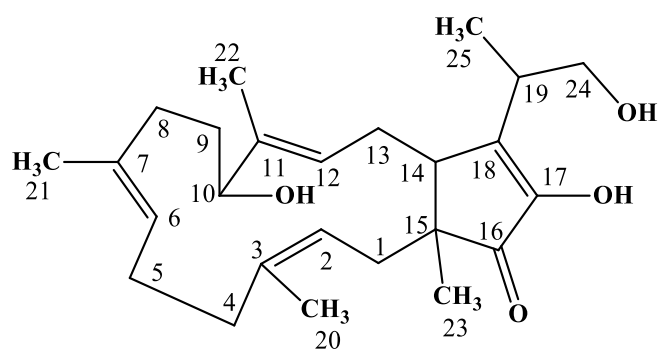
Figura 76. Espectro ESI-MS (modo negativo) da substância **S5****Figura 77.** Correlações HSQC TOCSY da substância **S5**.

Figura 78. Correlações HMBC e COSY da substância **S5**.**Figura 79.** Estrutura química da substância **S5**.**Tespestacina**

5. ESTUDO COM MODIFICADORES QUÍMICO EPIGENÉTICOS

Os resultados apresentados a seguir fazem parte do estágio BEPE (realizado na Universidade do Arizona, Tucson - Estados Unidos) sob a supervisão do Prof. Dr. Leslie Gunatilaka durante o período de 08/03/2015 a 31/08/2015. Foram estudados os efeitos de modificadores epigenéticos, íons metálicos e do ácido anacárdico no cultivo do fungo *P. chlamydosporia* (ATCC).

Este estudo foi realizado para explorar a técnica epigenética, por este motivo, foi escolhido a cepa *P. chlamydosporia* (ATCC) que já estava sendo estudada pelo Grupo de Pesquisa da Universidade do Arizona.

5.1. Cultivo em escala reduzida de *P. chlamydosporia*

O fungo *P. chlamydosporia* foi cultivado em sete diferentes condições de cultivo com o objetivo de investigar os efeitos na produção de metabólitos secundários pelo fungo de modificadores químicos e epigenéticos (ZAHA e AZA), íons de cobre e magnésio e o composto orgânico AA. Conforme descrito em material e métodos, a extração dos metabólitos foi realizada após ter sido verificado no meio de cultivo a ausência de glicose. Após um período de 14 dias os ensaios contendo AA e SAHA foi verificado a ausência de glicose nos meios de cultivo, e então foi realizada a extração dos metabólitos de todos os ensaios. Antes da extração foi verificado o pH do meio em cada frasco Erlenmeyer, e os valores de pH foram na faixa de 6,75-7,80 indicando pH quase neutro (Tabela 14).

A massa e o rendimento obtidos para os extratos AcOEt são apresentados na Tabela 14, devido ter sido visualizado diferentes DADrões de crescimento para os ensaios. FH-198-93_1*, FH-198-93_2* e FH-198-93_5* que foram extraídos separadamente. Os melhores rendimentos foram vistos para os ensaios contendo AA, seguido por MgSO₄ e AZA, o rendimento relativo quando comparado com o controle foi de 262, 217 e 200%, respectivamente.

Tabela 14. Cultivo em escala reduzida de *P. chlamydosporia*.

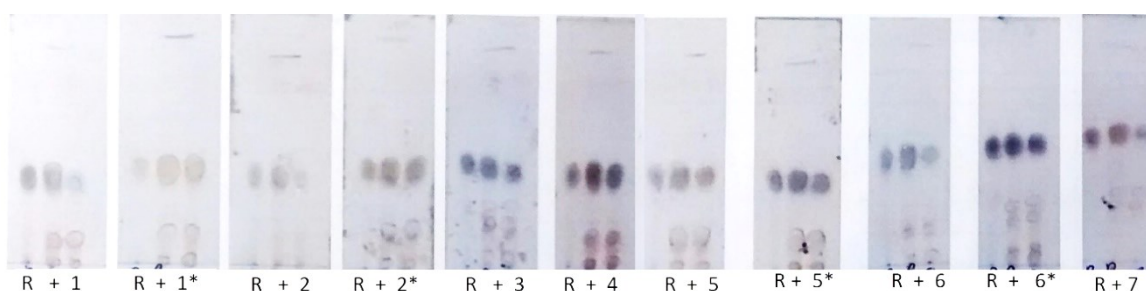
Código	Experimento	Vol. PDB em mL	glicose (14 dias)	pH	Massa em mg do extrato AcOEt	Rendimento em mg de AcOEt/50 mL de PDB	Rendimento relativo ao controle PDB em %
FH-198-93_1	PDB	100	+++	6,75	3,5	1,75	-
FH-198-93_1*	PDB	50	+++	7,88	9,7	9,70	550
FH-198-93_2	CuSO ₄	100	++	6,48	2,9	1,45	82
FH-198-93_2*	CuSO ₄	50	+++	7,55	7,2	7,20	410
FH-198-93_3	MgSO ₄	150	+++	7,37	11,4	3,80	217
FH-198-93_4	AA	150	-	7,72	13,9	4,60	262
FH-198-93_5	SAHA	100	-	7,73	9,1	3,30	188
FH-198-93_5*	SAHA	50	+	7,68	43,1	43,1	2462
FH-198-93_6	AZA	100	++	7,05	4,6	3,5	200
FH-198-93_6*	AZA	50	++	7,80	5,9	5,90	337
FH-198-93_7	PDB + DMSO	150	++	7,06	7,5	2,5	142

* Soluções estoques de SAHA e AA em 100% DMSO.

5.2 Perfil químico por CCD

O perfil químico de cada um dos extratos preparados foi analisado por CCD em fase normal e foi utilizado como DADrão o radicicol (Figura 80), conhecido como metabólito secundário majoritário de *P. chlamydosporia* isolados previamente por pesquisadores do NPC.

Figure 80. Avaliação dos perfis cromatográficos por CCD em sílica gel dos extratos AcOEt preparados em escala reduzida (PDB); Sistema de solventes. MeOH/DCM (96.4,v/v); anisaldeído H₂SO₄; R = radicicol; 1) PDB; 2) PDB + Cu²⁺; 3) PDB + Mg²⁺; 4) PDB + AA; 5) PDB + SAHA; 6) PDB + AZA; 7) PDB + DMSO.



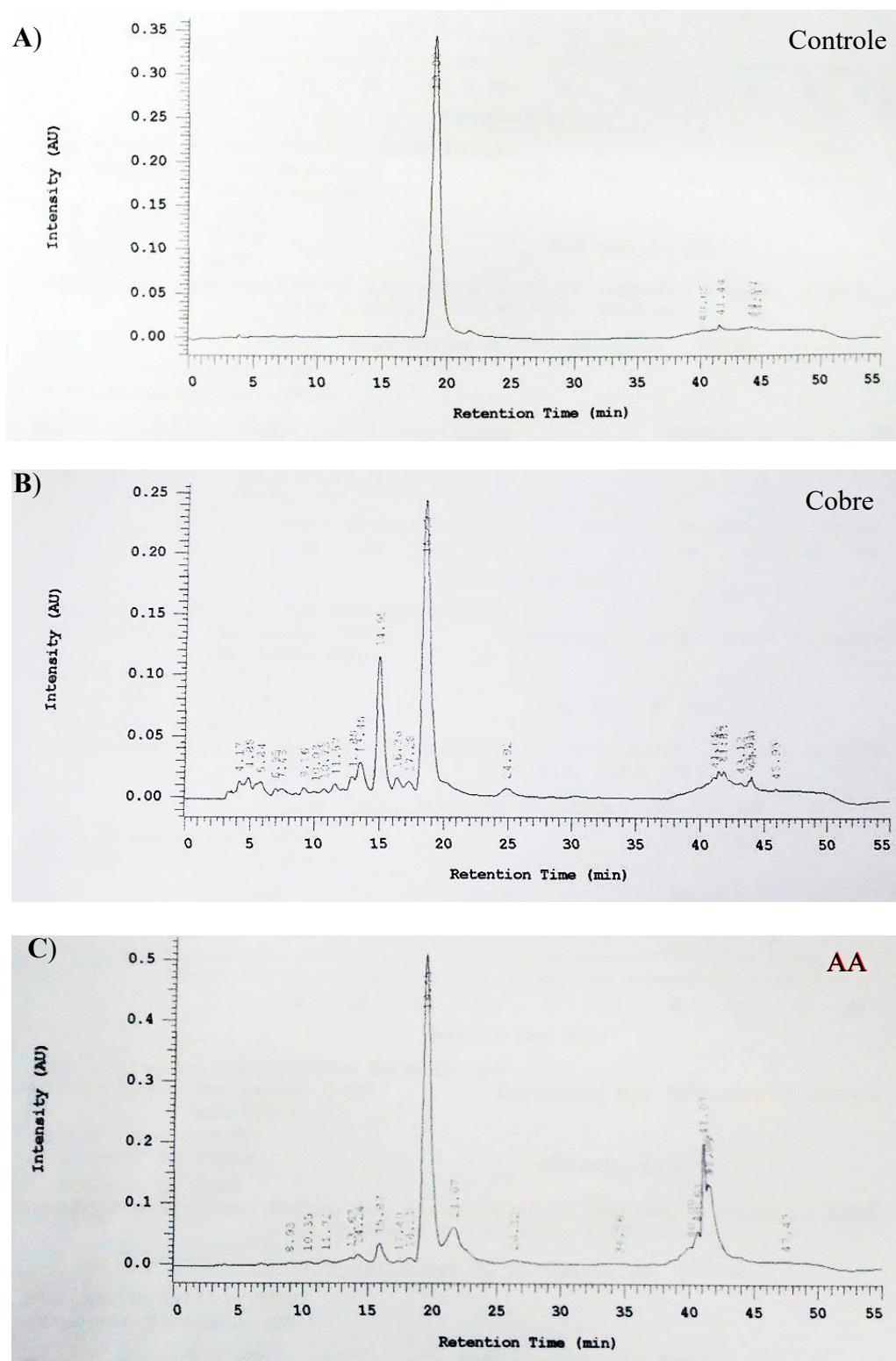
5.3. Perfil cromatográfico por CLAE analítico.

Os compostos presentes nos extratos AcOEt preparados em escala reduzida. PDB, PDB + Cu²⁺ + PDB e AA foram analisados por me CLAE analítico. Os perfis químicos estão apresentados na Figura 78. Para todos os três extratos AcOEt, o composto majoritário é o radicicol (R_t = 19,0 min).

Embora seja evidenciado nos cromatogramas que o radicicol é o composto majoritário presente em todos os extratos AcOEt analisados, os cromatogramas apresentaram diferenças visíveis quanto aos compostos minoritários produzidos pelo fungo. O controle (PDB) quando comparado com PDB + Cu²⁺ indicou a presença de um segundo composto principal (*t_r* = 14,9 min.), e outros componentes minoritários mais polares do que o radicicol.

Finalmente, o perfil químico de PDB + AA é muito semelhante ao do controle, no entanto, o cromatograma mostra que o pico do radicicol é mais intenso, indicando que nesse extrato AcOEt é maior a quantidade de radicicol. Para confirmar em qual extrato AcOEt foi produzido a maior quantidade de radicicol pelo fungo *P. chlamydosporia* foi realizada a quantificação por CLAE analítico (item 5.4).

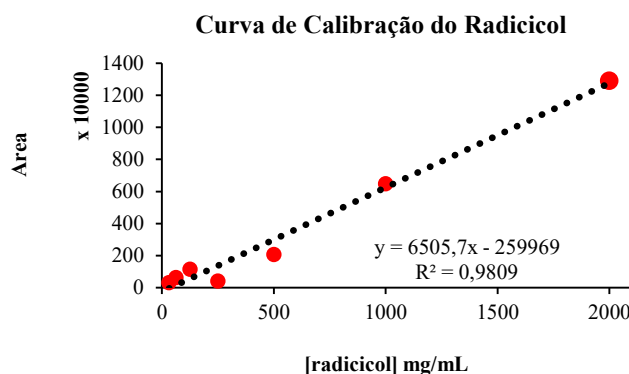
Figure 81. Chromatograma representativo dos perfis químicos dos extratos preparados em escala reduzida produzidos pelo fungo *P.chlamydosporia* ATCC [Coluna analítica Luna (2) C18-Phenomenex® 250 x 4.60 mm id x 5 µm; Solvente B. H₂O; Solvente C. MeOH. Gradient 70-100% B em 30 min; vazão 0.80 ml min⁻¹; λ = 250 nm



5.4 Quantificação do radicicol nos extractos AcOEt por CLAE analítico.

A quantificação do radicicol foi realizada usando o método do DADrão externo, a curva de calibração do radicicol foi representada graficamente, a partir da área do pico para as diferentes concentrações, nas mesmas condições cromatográficas foi utilizado para os extractos de EtOAc estudadas. PDB (controle), PDB + Cu²⁺ e AA + PDB. A linearidade foi utilizado na faixa de 1,0 - 0,32 µg. A tabela 15 apresenta os resultados de quantificação por CLAE, e a Figura 82 apresenta a curva de calibração do radicicol.

Figure 82. Curva de calibração do radicicol.



Na Tabela 15 é mostrado que a presença de AA aumentou o rendimento mais de 4,5 vezes a quantidade de radicicol de PDB (controle). Por outro lado, a presença do metal pesado cobre diminuiu a produção deste metabolito majoritário.

Tabela 15. Rendimento dos extratos AcOEt e rendimento e concentração de Radicicol (Rad.) presente nos três experimentos.

Código	Experimento	Quantidade de Rad. em PDB (µg/mL)	Rendimento relative (%)
FH-189-95-1	PDB	9,89	100,00
FH-189-95-2	PDB + Cu ²⁺	6,35	64,23
FH-189-95-4	PDB + AA	45,87	464,01

5.5 Fracionamento do extrato AcOEt (PDB+ MgSO₄) por coluna cromatográfica

O cultivo em escala ampliada do fungo *P. chlamydosporia* em meio líquido PDB com MgSO₄ (250 µg/mL) assim como a extração e isolamento do composto majoritário radicicol foram realizadas pelo Dr. Kithsiri Wijeratne (pesquisador do NPC). A mesma coluna cromatográfica utilizada no isolamento do radicicol foi utilizada para o isolamento dos metabólitos minoritários e mais polares presentes no extrato AcOEt.

Comparado ao controle (PDB), a presença de MgSO₄ em meio PDB resultou na produção de uma variedade de metabólitos minoritários, o volume e a percentagem de solventes utilizados no fracionamento estão apresentados na Tabela 16. As frações foram analisadas por CCD (Figura 83), o código, massa e o rendimento relativo (%) das frações reunidas são apresentados na Tabela 17.

Tabela 16. Porcentagem e volume dos solventes utilizados coluna cromatográfica em sílica gel de fase normal.

Frações	MeOH (%)	DCM (%)	Volume (mL)
1-7	3	97	50
8-20	4	96	100
21-27	6	94	50
28-34	8	92	50
35-40	10	90	50
41-56	20	80	100

Figura 83. CCD (sílica gel), Sistema de solventes MeOH/DCM (6.94; v/v); **A)** anisaldeído; **B)** UV 254 nm e **C)** UV 365 nm.

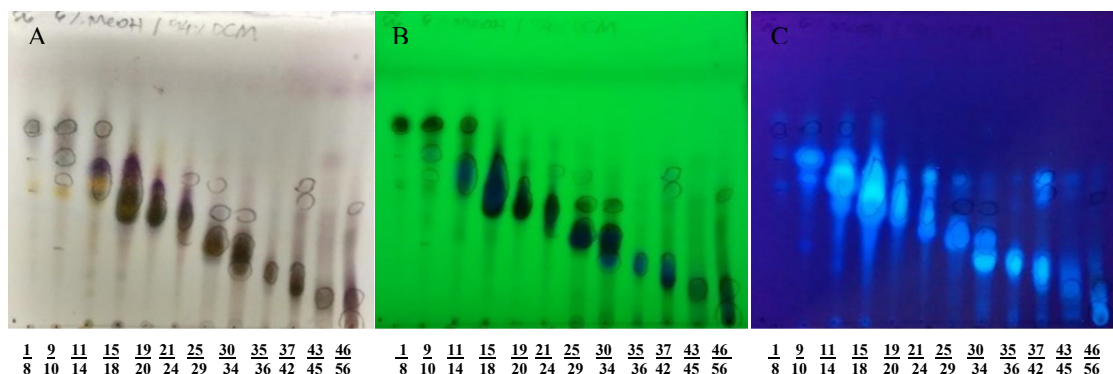


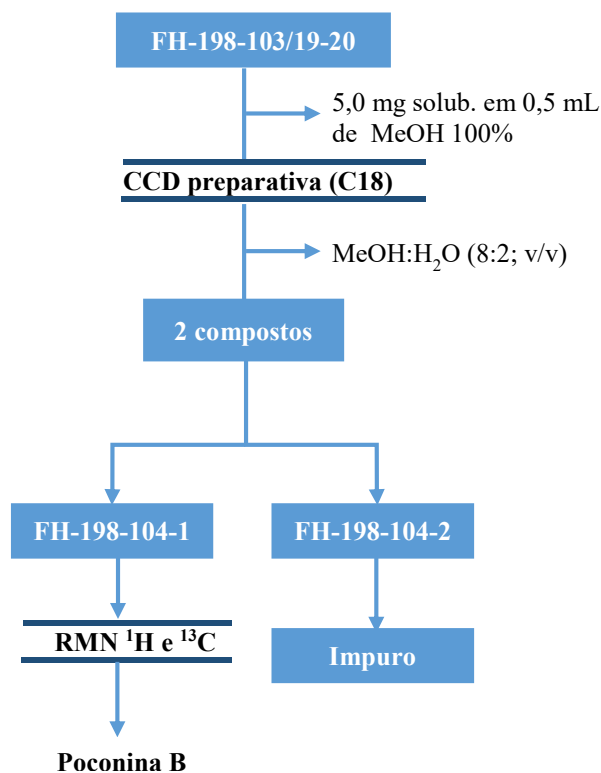
Tabela 17. Código, Massa e rendimento relativo em % das frações reunidas após a análise da CCD.

Código	Massa (mg)	Rendimento relativo (%)
FH-198-103_1-8	1,9	0,63
FH-198-103_9-10	15,8	5,26
FH-198-103_11-14	42,5	14,16
FH-198-103_15-18	52,9	17,63
FH-198-103_19-20	28,8	9,60
FH-198-103_21-24	21,4	7,13
FH-198-103_25-29	36,2	12,06
FH-198-103_30-34	29,2	9,73
FH-198-103_35-36	8,9	2,97
FH-198-103_37-42	19,2	6,40
FH-198-103_43-45	7,8	2,60
FH-198-103_46-56	35,5	11,83
$\Sigma = 300,1$		100

5.6 Isolamento do composto minoritário Poconina B

A reunião das frações 10-20 (5.0 mg) foi purificada por CCD preparativa em fase reversa (MeOH/H₂O; 8:2, v/v) permitindo o isolamento da Poconina B (2,6 mg), Figura 84.

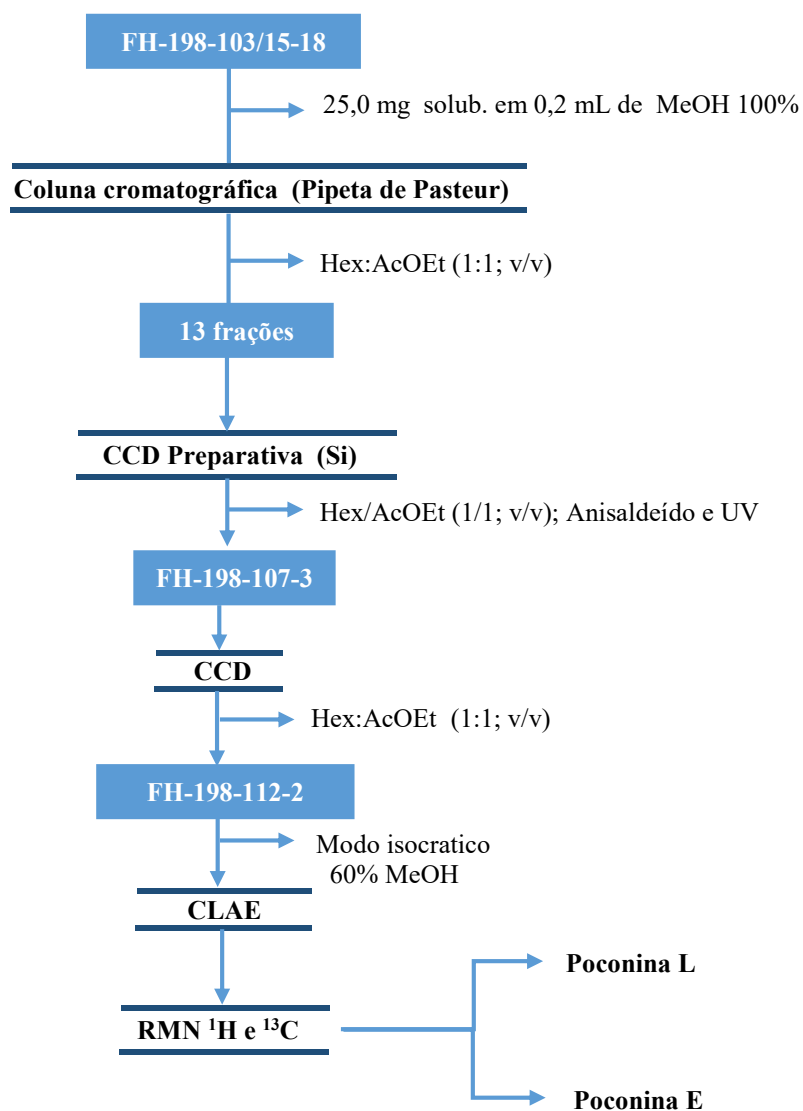
Figura 84. Purificação da reunião das frações 19-20 por CCD preparativa.



5.7. Isolamento da Poconina E e da Poconina L

As frações 15-18 (25,0 mg) foram reunidas e purificadas por coluna de sílica flash, por coluna preparativa de fase reversa e por CLAE semipreparativo fornecendo Poconina E (2,6 mg) e Poconina L (0,8 mg) conforme Figura 85.

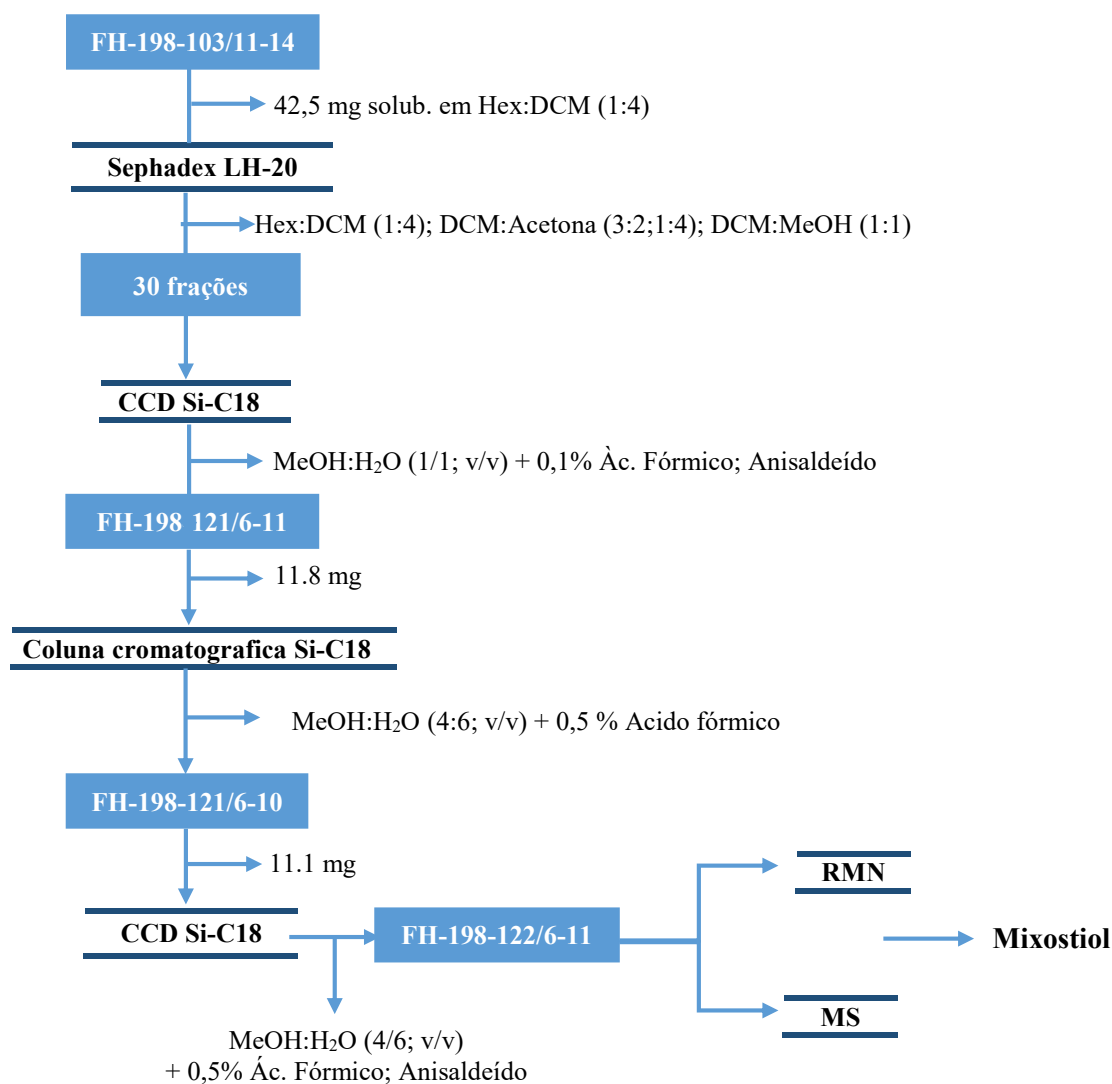
Figura 85. Esquema de purificação das frações 15-18 por métodos cromatográficos.



5.8 Isolamento do Mixostiol.

As frações 11-14 (42,5 mg) foram reunidas e purificadas por coluna de sephadex LH-20, por coluna contendo fase estacionária sílica de fase reversa fornecendo ixostiol (4,4 mg) Figura 86.

Figura 86. Purificação da reunião das frações 11-14 por métodos cromatográficos.



5.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

5.9.1 SUBSTÂNCIA P1. *P. chlamydosporia*

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como comparação com os dados espectroscópicos da literatura, (Tabela 22) Hellwig et al (2002), permitiu identificar a estrutura química dessa substância como sendo a Poconina B (Figura 89).

No espectro de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 87 e 88, Tabela 18) é evidenciado sinais característicos da função álcool secundário em δ_{H} 4,26 (δ_{C} 68,0; OH. δ_{H} 5,3). Além disso, observa-se também um grupo metileno diastereotópico em δ_{H} 1,15, 2,36 (δ_{C} 39,98) na posição 6 entre a função álcool secundário e o anel epóxido. Os sinais de hidrogênio olefínicos conjugados com carbonila são observados em δ_{H} 6,06 e δ_{H} 6,92 respectivamente.

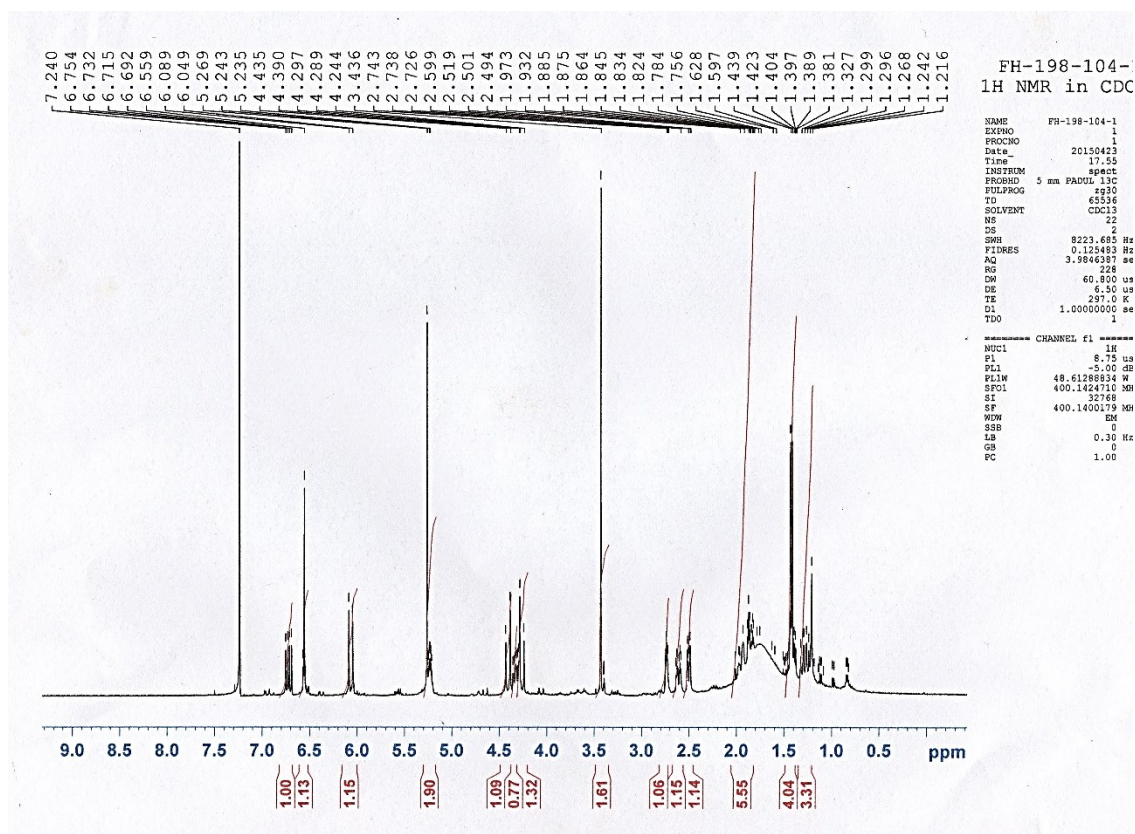
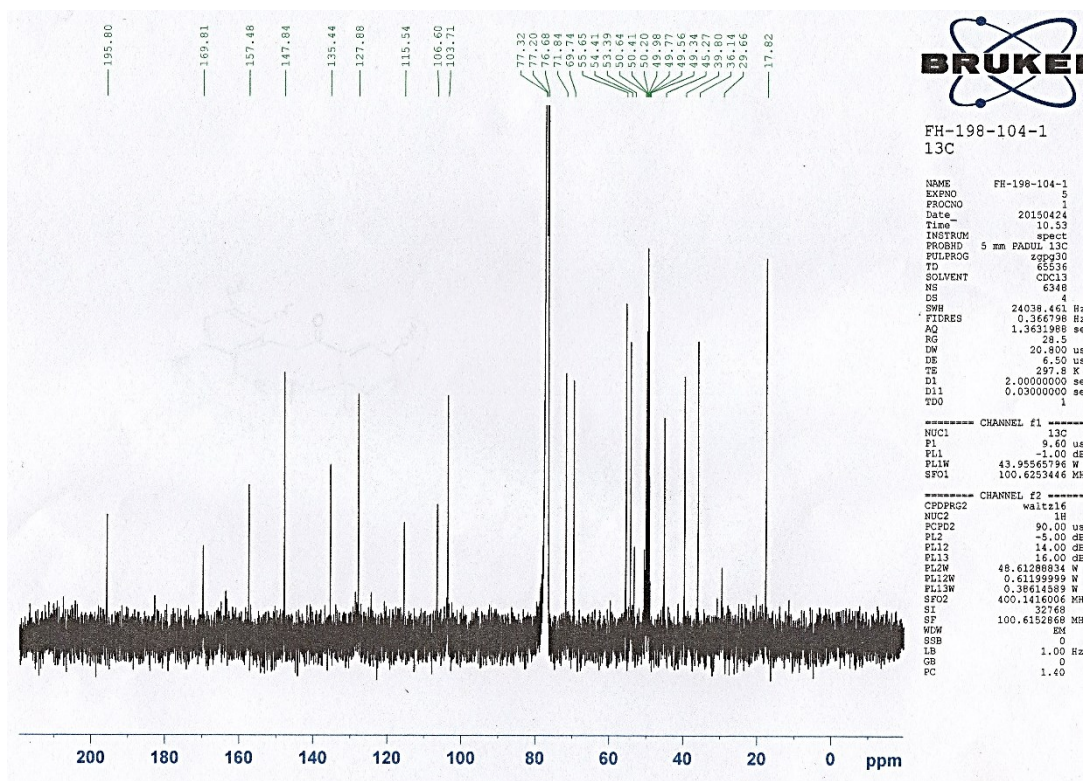
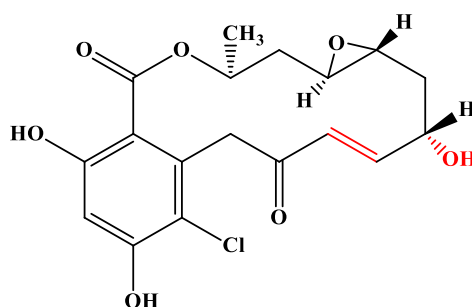
Figura 87. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **P1**.Figura 88. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **P1**.

Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C NMR da Poconina A comparados com os dados da literatura.

Dados RMN ^1H e ^{13}C [500 e 125 MHz] Poconina B (Hellwig et al., 2003)				Dados RMN ^1H e ^{13}C [400 and 100 MHz] Poconina B isolada			
pos	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	J_{HH} [Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	J_{HH} [Hz]	
Me-1	17,5	1,31	<i>d</i> 6,4	17,8	1,42	<i>d</i> 6,4	
2	71,0	5,13	<i>m</i>	71,8	5,23	<i>m</i>	
3	36,3	1,77	<i>m</i>	36,1	1,83	<i>m</i>	
4	54,6	2,80	<i>m</i>	55,6	2,74	<i>m</i>	
5	53,7	2,60	<i>dm</i> 10,2	53,4	2,62	<i>m</i>	
6	40,0	α . 1,15	<i>ddd</i> 12,1, 11,4, 10,2	39,8	α . 1,21	<i>m</i>	
		β . 2,36	<i>dm</i> 12,1		β . 2,50	<i>m</i>	
7	68,0	4,26	<i>m</i>	69,7	4,33	<i>m</i>	
		OH: 5,34 ^a	<i>d</i> 3,5				
8	149,7	6,77	<i>dd</i> 15,9, 8,1	147,8	6,73	<i>dd</i> 15,6, 8,8	
9	127,1	6,10	<i>d</i> 15,9	127,9	6,08	<i>d</i> 16,0	
10	195,9			195,8			
11	43,8	H _a . 4,18	<i>d</i> 17,7	45,3	H _a . 4,35	<i>d</i> 18,0	
		H _b . 4,07	<i>d</i> 17,7		H _b . 4,30	<i>d</i> 18,0	
12	134,1			135,4			
13	113,4 ^b			115,5 ^b			
14	158,4 ^b	OH. 10,81	<i>s</i>	157,5 ^b			
15	102,8	6,52	<i>s</i>	103,7	6,55	<i>s</i>	
16	156,9 ^b	OH. 10,81	<i>s</i>	157,5 ^b			
17	111,1 ^b			106,9 ^b			
18	167,9			167,8			

Figura 89. Estrutura química da Poconina B.

5.9.2 Substância **P2**. *P. chlamydosporia*

A análise dos dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 19) bem como comparação com os dados espectroscópicos da literatura, Hellwig et al (2002), permitiu identificar a estrutura química da substância **P2** como sendo a Poconina E (Figura 91),

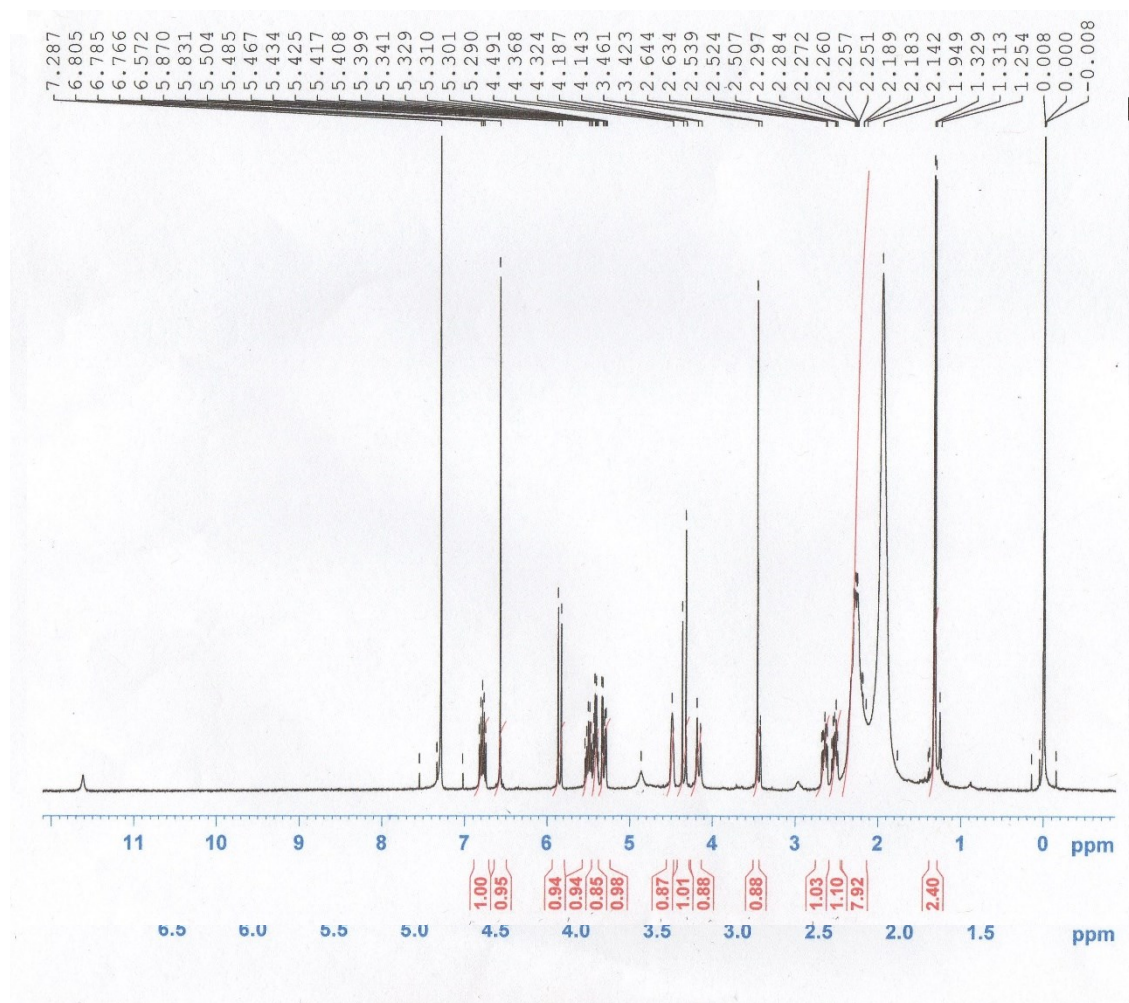
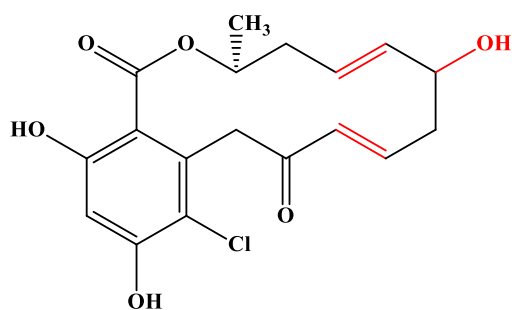
Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 90) pode-se observar a presença de sinais relativos aos hidrogênios de função álcool secundário (δ_{H} 4,00 e 5,03 (OH)) na posição 6.

O RMN ^1H (Tabela 19) evidenciou a presença de 18 hidrogênios, na estrutura do anel da lactona. Além disso foram observados sinais característicos de hidrogênios olefinicos com estereoquímica em *E* ($J = \geq 15,0$ Hz) para os hidrogênios das posições 5,6 e 7 e 8 respectivamente.

Tabela 19. Dados RMN ^1H da Poconina E isolada e comparação com dados da literatura.

Dados RMN ^1H [500 MHz] Poconina E (Hellwig et al., 2003)				Dados RMN ^1H [400 MHz] Poconina E isolada		
pos	δ_{H} [ppm]	J_{HH} [Hz]		δ_{H} [ppm]	J_{HH} [Hz]	
Me-1	1,23	<i>d</i>	6,1	1,32	<i>d</i>	6,1
2	4,98	<i>m</i>		5,37	<i>m</i>	
3	H _a . 2,33–2,40	<i>m</i>		H _a . 2,69	<i>m</i>	
	H _b . 2,10–2,23 ^b	<i>m</i>		H _b . 2,29	<i>m</i>	
4	5,30	<i>ddd</i>	15,6; 8,9; 8,9	5,53	<i>ddd</i>	15,6; 8,9; 8,9
5	5,23	<i>dd</i>	15,6; 6,5	5,33	<i>dd</i>	15,6; 6,5
6	4,00	<i>m</i>		4,49	<i>m</i>	
	OH: 5,03	<i>d</i>	4,1			
7	H _a . 2,33–2,40	<i>m</i>		H _a . 2,42	<i>m</i>	
	H _b . 2,06–2,1 ^b	<i>m</i>		H _b . 2,37	<i>m</i>	
8	6,60	<i>ddd</i>	15,8; 7,9; 7,9	6,78	<i>ddd</i>	15,8; 7,9; 7,9
9	5,78	<i>d</i>	15,8	5,85	<i>d</i>	15,8
11	H _a . 3,87	<i>d</i>	17,2	H _a . 4,17	<i>d</i>	17,2
	H _b . 3,71	<i>d</i>	17,2	H _b . 4,36	<i>d</i>	17,2
14	OH. 10,63 ^c	<i>s</i>				
15	6,52	<i>s</i>		6,57	<i>s</i>	
16	OH. 10,23 ^c	<i>s</i>				

^bSinais podem estar trocados

Figura 90. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **P2**.**Figura 91.** Estrutura química da Poconina E.

5.9.3 SUBSTÂNCIA **P3** *P. chlamydosporia*

A análise dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H (Figura 92) e ^{13}C (Figura 93) da substância **P3** em comparação com os dados espectroscópicos da literatura, Shinonaga et al. (2009), permitiu confirmar a estrutura química desse composto como sendo a Poconina L (Figura 94). As informações estruturais obtidas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 20.

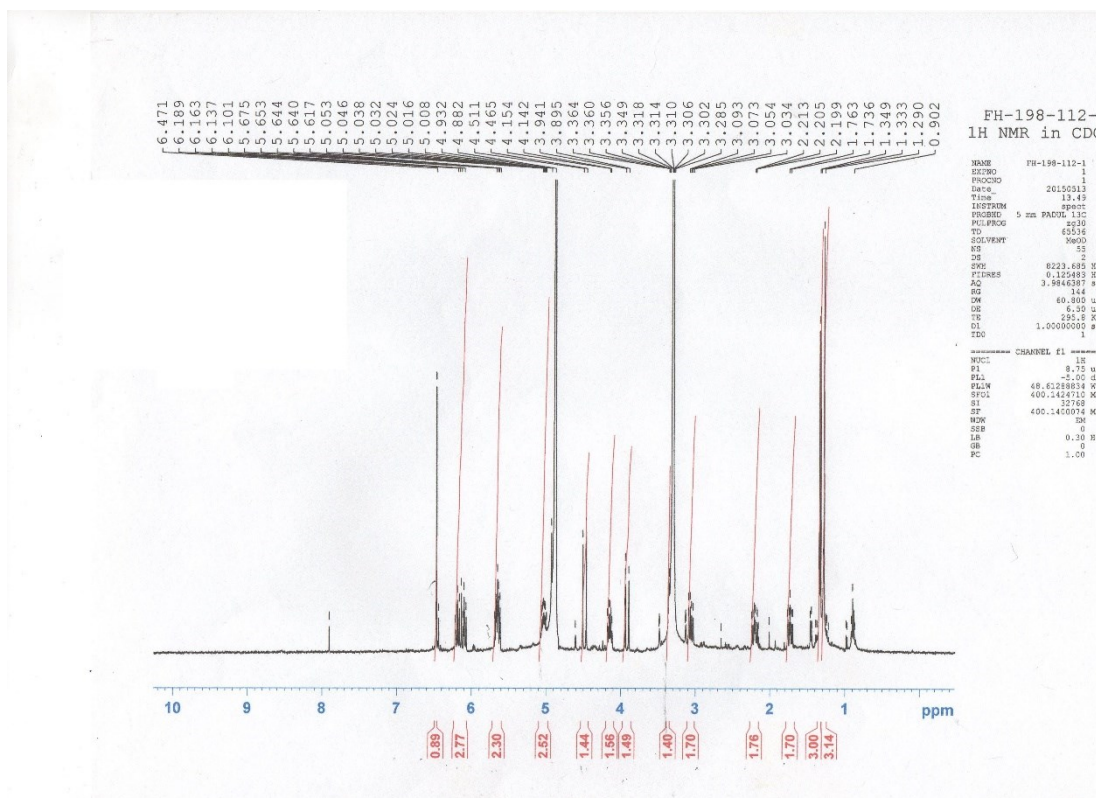
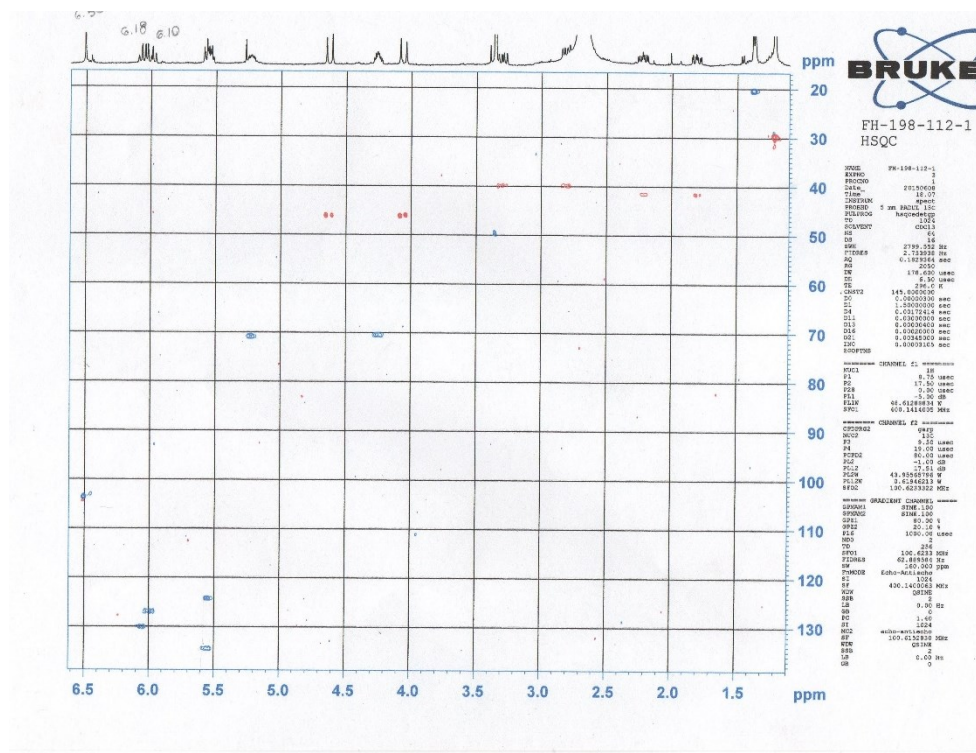
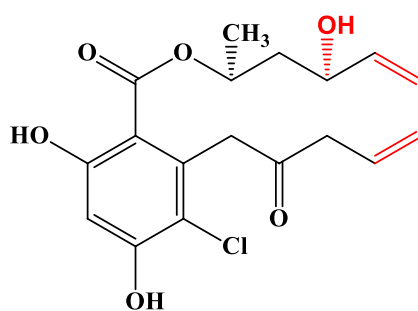
Figura 92. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **P3**Figura 93. Espectro de RMN de HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância **P3**

Tabela 20. Dados RMN ^1H da Poconina L isolada e comparação com dados da literatura

Dados RMN ^1H [500 MHz] PoconinaL (Shinonaga et al., 2009)				Dados RMN ^1H [400 MHz] Poconina L isolada		
pos	δ_{H} [ppm]		J_{HH} [Hz]	δ_{H} [ppm]		J_{HH} [Hz]
Me-1	1,34	<i>d</i>	6,1	1,36	<i>d</i>	6,4
2	5,03	<i>m</i>		5,03	<i>m</i>	
3	H _a . 2,20	<i>ddd</i>	14,0; 11,6; 5,5	H _a . 2,25	<i>ddd</i>	14,0; 12,0; 5,2
	H _b . 1,73	<i>ddd</i>	14,0; 9,4; 3,4	H _b . 1,80	<i>ddd</i>	14,0; 10,0; 6,8
4	4,14	<i>td</i>	9,4; 5,5	4,25	<i>td</i>	9,4; 5,5
5	5,64	<i>m</i>		5,60	<i>m</i>	
6	6,10	<i>dd</i>	14,9; 10,7	6,10	<i>dd</i>	14,9; 10,7
7	6,18	<i>t</i>	10,7	6,18	<i>t</i>	10,8
8	5,65	<i>m</i>		5,63	<i>m</i>	
9	H _a . 3,19	<i>dd</i>	15,5; 6,7	H _a . 3,12	<i>dd</i>	15,6; 7,0
	H _b . 3,06	<i>dd</i>	15,5; 8,2	H _b . 3,05	<i>dd</i>	15,6; 8,0
11	H _a . 4,48	<i>d</i>	18,3	H _a . 4,49	<i>d</i>	18,4
	H _b . 3,91	<i>d</i>	18,3	H _b . 3,92	<i>d</i>	18,4
15	6,47	<i>s</i>		6,50	<i>s</i>	

Figure 94. Estrutura química da Poconina L

5.9.4 SUBSTÂNCIA P4 *P. Chlamydosporia*

A análise dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H (Figura 95) e ^{13}C (Figura 96) da substância **P4** em comparação com os dados espectroscópicos da literatura, Kimura et al (2009), permitiu confirmar a estrutura química desse composto como sendo o Mixostiol (Figura 95). As informações estruturais obtidas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 21.

O Mixostiol apresentou $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -165,18^\circ$ (CDCl_3), enquanto que no trabalho de Kimura et al (2002) foi reportado o valor de $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -137,4^\circ$ (MeOH),

O sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 200,0$ indicou a presença de um $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -carbono carbonílico insaturado. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C evidenciou a presença de três grupos metílicos, um grupo metilênico, um grupo metínico alifático, um metino alifático *O*-substituído, um metino olefínico, um quartenário *O*-substituído, uma carbonila, três átomos de carbono sp^2 . Os experimentos HSQC (Figura 98) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 21, HMBC (Figura 99).

A constante de acoplamento (J) no valor de 2,4 Hz foi averiguada entre os hidrogênios H-5 e H-8a e H₂-1 em 2 (J) 9,0 e 11,2 Hz indicou que H-8a em pseudoaxial com Hb-1, e o os valores das constantes de acoplamento entre H-8a e H-8 (J) 3,4 Hz) indicou que OH-8 em pseudoaxial com H-8a, A partir dos resultados, foi estabelecido que o composto **P4** como sendo. (7*R**,8*R**, 8a*R**)-7,8-diidroxi-3,4,7-trimetil-1*H*,8a*H*-6-oxo-ciclohexa-[4,3-*c*] pirano, e então nomeado de mixostiol. A substância identificada por (KIMURA et al., 2002) foi nomeada como (7*R**,8*R**, 8a*S**)-7,8-diidroxi-3,4,7-trimetil-1*H*,8a*H*-6-oxo-ciclohexa-[4,3-*c*] pirano (Figura 100).

Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do Mixostiol isolado e da literatura.

RMN ^1H e ^{13}C [500 e 125 MHz] Mixostiol (Kimura et al., 2002)					RMN ^1H e ^{13}C [400 e 100 MHz] Mixostiol isolado			
pos	δ_c [ppm]	δ_H [ppm]	J_{HH} [Hz]		δ_c [ppm]	δ_H [ppm]	J_{HH} [Hz]	
1	67,8 (CH ₂)	H _a . 4,33 H _b . 4,15	<i>dd</i> <i>dd</i>	10,2; 5,1 13,5; 10,5	64,9 (CH ₂)	H _a . 3,64 H _b . 4,64	<i>dd</i> <i>dd</i>	10,2; 5,1 13,5; 10,5
2	O	-			O	-		
3	160,3 (Cq)	-			153,9 (Cq)	-		
4	105,6 (Cq)	-			104,9 (Cq)	-		
4a	152,1 (Cq)	-			161,4 (Cq)	-		
5	110,8 (CH)	5,80	<i>d</i>	2,0	111,8 (CH)	5,73	<i>d</i>	2,0
6	200,0 (C=O)	-			200,3 (C=O)	-		
7	76,1 (Cq)	-			75,5 (Cq)	-		
8	74,7 (CH)	4,09	<i>d</i>	10,2	75,2 (CH)	3,67	<i>d</i>	10,2
8a	36,6 (CH)	2,95	<i>dddd</i>	11,2;4,9;3,4;2,4	38,4 (CH)	2,77	<i>m</i>	
9	18,6 (CH ₃)	1,67	<i>s</i>		18,9 (CH ₃)	1,95	<i>s</i>	
10	12,7 (CH ₃)	1,80	<i>s</i>		12,7 (CH ₃)	1,77	<i>s</i>	
11	23,1 (CH ₃)	1,34	<i>s</i>		18,8 (CH ₃)	1,22	<i>s</i>	

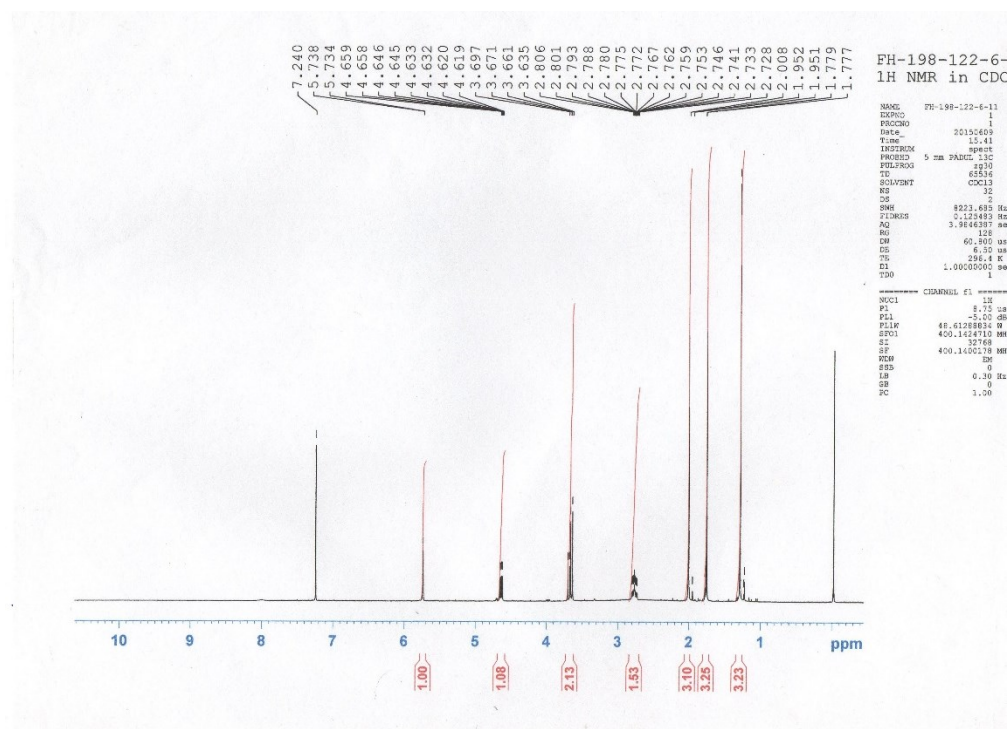
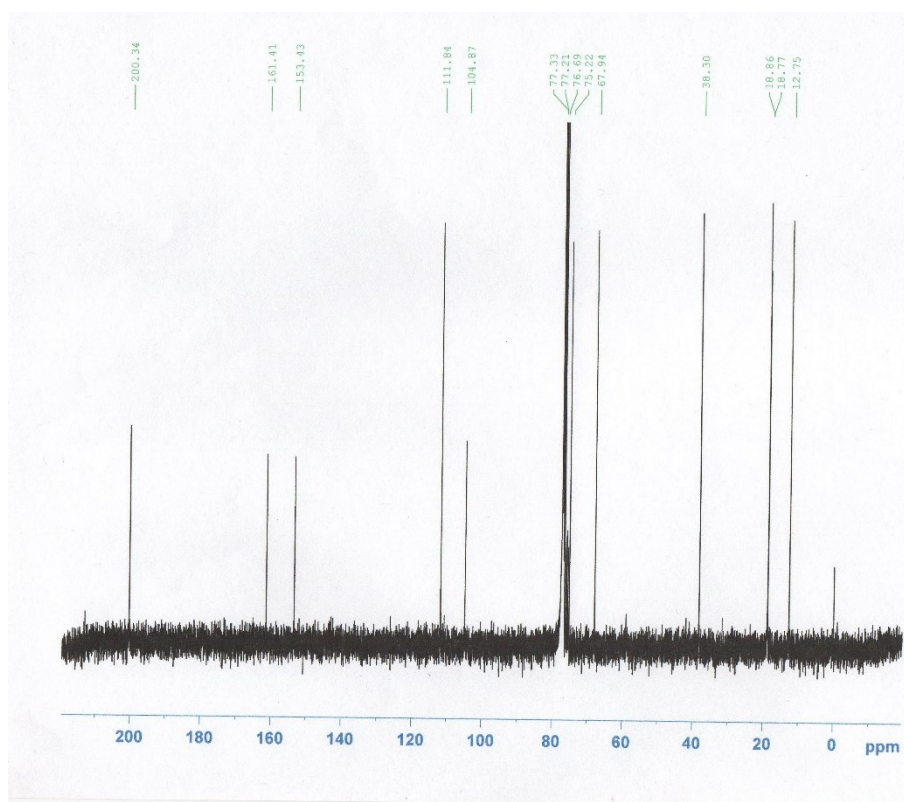
Figura 95. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **P4**.**Figura 96.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **P4**.

Figura 97. Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl₃) da substância S4.

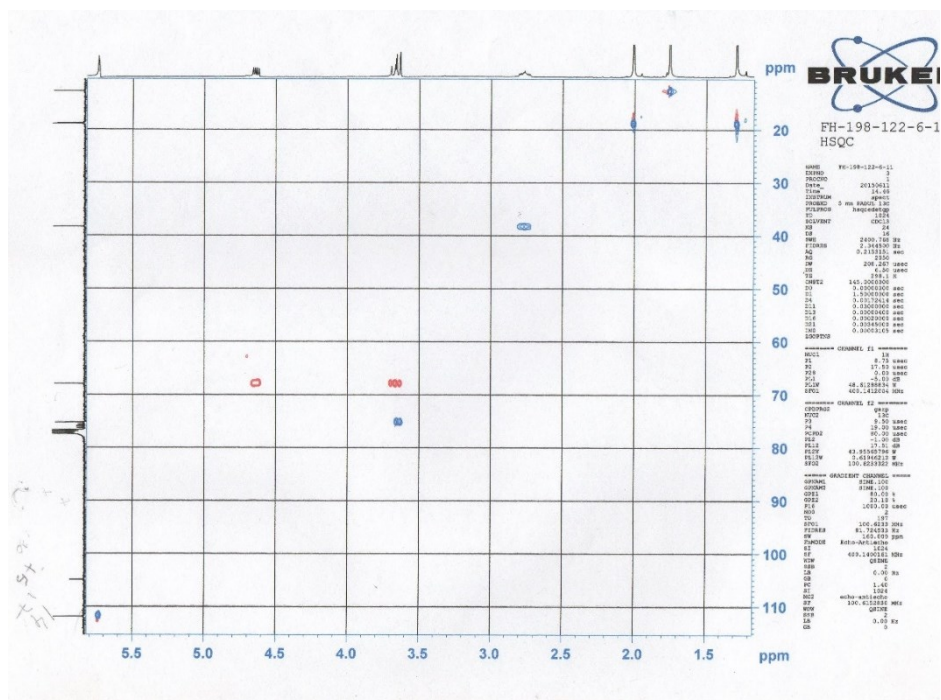


Figura 98. Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da substância **S4**.

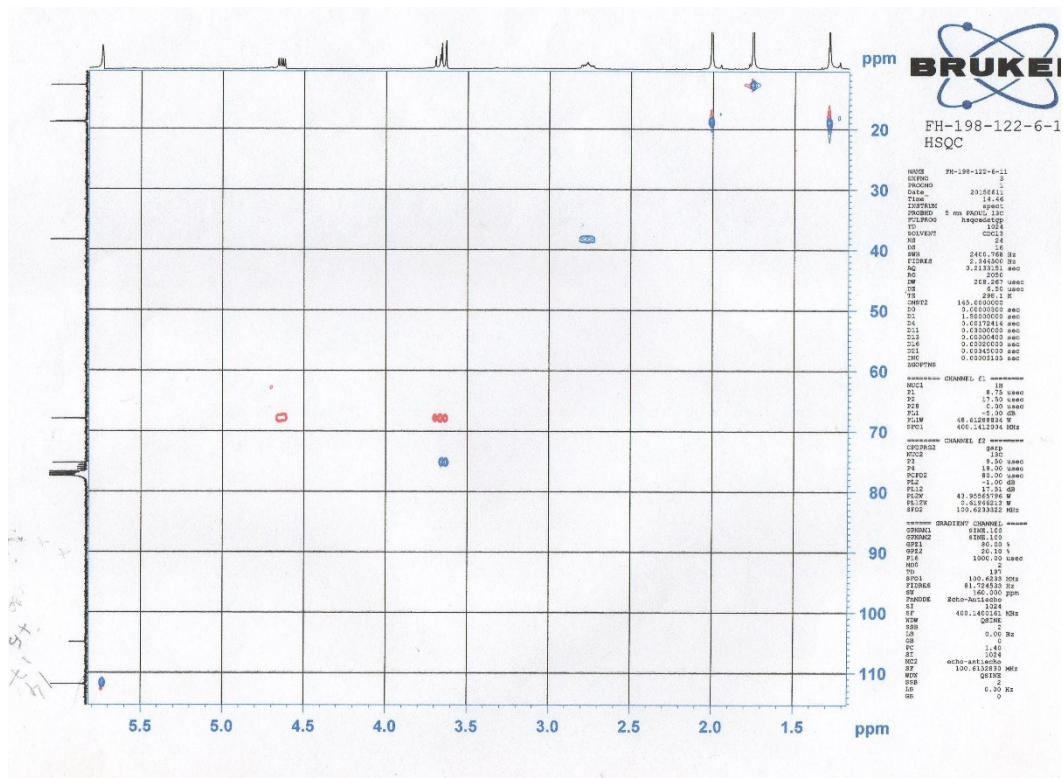


Figura 99. Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da substância **S4**.

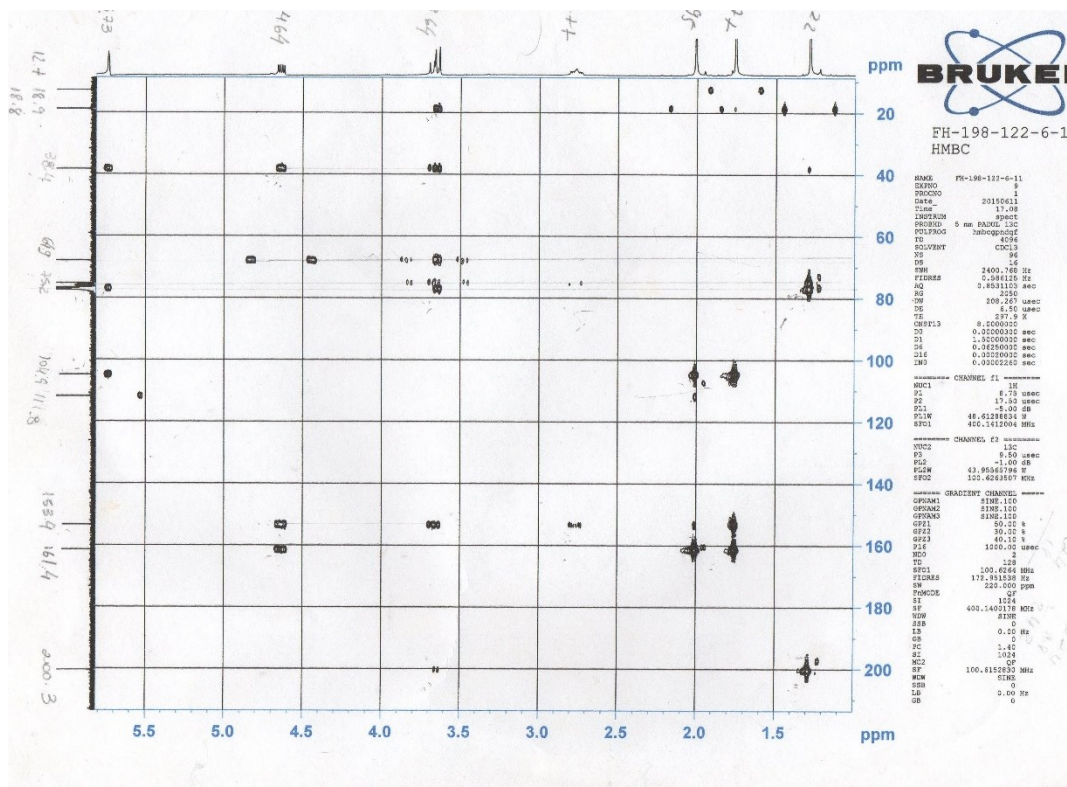
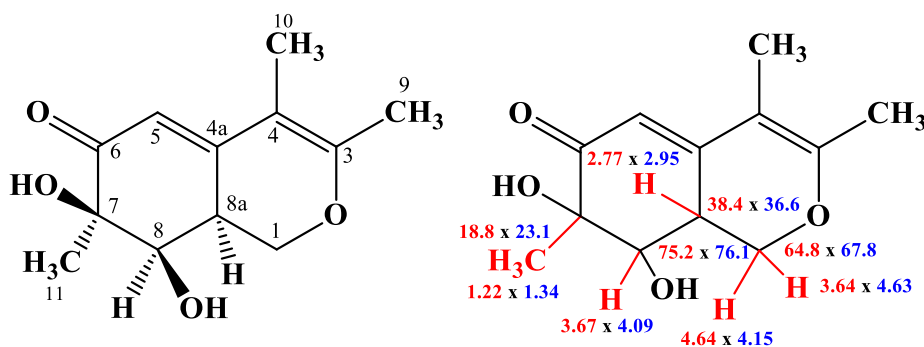


Figura 100. Estrutura Química do Mixostiol (Azul ^1H e ^{13}C RMN literatura).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizado a triagem pela atividade antimicrobiana de 25 extratos AcOEt produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) sendo escolhido o fungo *Fusarium* sp por ter apresentado a melhor CIM para todas as cepas de bactérias e levedura testadas, assim como o único com capacidade bactericida e fungicida para todas elas também.

O fracionamento e purificação do EAcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada forneceu as seguintes substâncias: 3,4-Piridinadamina, *N*⁴-1-metil-5-(3'-buten-1-il) (**S1**), ácido fusárico (**S2**), 2-(1*H*-indol-6-il)-acético (**S3**), 2-Piridinametilamina-*N*⁸-metil-5-hexanoato (**S4**) e o sesterterpeno terpestacina (**S5**). Sendo que as substâncias **S1** e **S4** inéditas até a presente data na literatura.

Do cultivo em escala ampliada de *Bipolaris* sp. foram isoladas quatro substâncias sendo duas delas elucidadas: acetato de etila-2-(2-acetil-4,6-diidroxifenil) (**B4**) e uma proposta para a estrutura da substância (**B1**).

Podemos concluir que ambos os fungos endofíticos de *P. chiquitensis* estudados são fontes de diversas classes de compostos químicos, e sua química é completamente distinta quando comparada com as classes de substâncias isoladas de espécies de Eriocaulaceae, sendo uma importante fonte de novos produtos naturais para outras atividades biológicas.

Foi também realizado o estudo com modificadores epigenéticos, utilizando modificadores químicos epigenéticos no cultivo do fungo *P. chlamydosporia*. O ácido anacárdico adicionado no meio líquido PDB rendeu 4,6 vezes mais radicicol do que o controle PDB, evidenciado a capacidade do AA como um eliciador na produção e diversificação de metabólitos secundários de *P. chlamydosporia*.

A presença dos íons de magnésio no meio de cultivo não apenas levou ao maior rendimento dos EacOEt como também levou a produção de diversas substâncias minoritárias não produzidas no cultivo em meio líquido PDB, permitindo o isolamento e identificação das substâncias: Poconina B (**P1**), Poconina E (**P2**), Poconina L (**P3**) e do Mixostiol (**P4**).

Por fim, podemos concluir que além dos já conhecidos modificadores epigenéticos SAHA e o AZA, íons metálicos e o AA são capazes também de induzir a produção e a diversificação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, sendo portando uma importante abordagem para a descoberta de novos compostos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ALINE, N. colocar todos autores sem et al. Feohifomicose cutânea causada por *Curvularia* sp. em um equino. **Pathology**, v. 38, p. 73-76, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes—secret producers of bioactive plant metabolites. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 7, p. 499-505, 2013.
- AMARAL, F. et al. 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.
- AMORIM, M. A. et al. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae), **Journal of the Brazilian chemical Society**, v. 0, p. 1-16, 2016.
- ANDRADE, M, J, G. et al. Blastocaulon (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*. morphological and molecular evidence, **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011
- ARUNPANICHLERT, J. et al. A dimeric chromanone and a phthalide. Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 604-608, 2012.
- ATKINS, S. D. et al. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 183-189, 2003.
- AU, T. K.; CHICK, W. S.; LEUNG, P. C. The biology of ophiobolins. **Life Sciences**, v. 67, n. 7, p. 733-42, 2000.
- BACON, C. W. et al. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039-4043, 1996
- BENCSIK, O. et al. Ophiobolin A from *Bipolaris oryzae* perturbs motility and membrane integrities of porcine sperm and induces cell death on mammalian somatic cell lines. **Toxins**, v. 6, n. 9, p. 2857-2871, 2014.
- BLACKWELL, M. The Fungi. 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp. incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 2014. 140f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.
- BREINHOLD, J. et al. Oxysporidinone. a novel, antifungal N-methyl-4-hydroxy-2-pyridone from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 33-35, 1997.

CALIGIORNE, R. B. et al. Fungos dematiáceos. **Biotecnologia e Ciência e Desenvolvimento**, p. 4, [s.d.].

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos. estratégias para a diversificação do metabolismo secundário**. 2014. f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-28102014-202425/>>. Acesso em: 25 nov 2015.

CHAPLA, V. M. **Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp.** 2014. 251 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CHERBLANC, F. L.; DAVIDSON, R. W.; DI FRUSCIA, P.; SRIMONGKOLPITHAK, N.; FUCHTER, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 5, p. 605-624, 2013.

CHUNG, Y. M. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1260-1266, 2013.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural product reports**, v. 27, n. 1, p. 11-22, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A6. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 6th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA., 2006.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standard**. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA., 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products. a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUNHA, K. C. et al. Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4061-4066, 2012.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 314-321, 2011.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

- EL-ELIMAT, T. et al. Greensporones. Resorcylic acid lactones from an aquatic *Halenospora* sp. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 9, p. 2088-2098, 2014.
- ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.
- FERNANDES, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 194-200, 2014.
- FRUHMANN, P. et al. Isolation and structure elucidation of pentahydroxyscirpene, a trichothecene *Fusarium* mycotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 188-192, 2014.
- FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.
- GHINI, R.; ZARONI, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2001.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms. distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- HE, Y. et al. Radicicol, a heat shock protein 90 inhibitor, inhibits differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 436, n. 2, p. 169-174, 2013.
- HOFFMANN, C. C. et al. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138-141, 2011.
- HELLWIG, V. et al. *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 829-837, 2003.
- GELLERSTEDT, G. Gel permeation chromatography. In: **Methods in lignin chemistry**, Berlin. Springer Heidelberg. 1992. cap. 8.1, p. 487- 497
- GIULIETTI, A. M. **Análise crítica da evolução da morfologia e da sistemática das Eriocaulaceae**. 1997. 161f. Tese (Titular em Sistemática de Vegetais Superiores)– Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 1997.
- GIULIETTI, A.M. et al. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50-56, 2012.
- HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives. a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

HILARIO, F. Título : Local: Editora, 2012. (Relatório FAPESP)

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, n. 7, p. 1208-1228, 2011.

KIMURA, Y. et al. Myxostiolide, myxostiol, and clavatoic acid, plant growth regulators from the fungus *Myxotrichum stipitatum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 621-623, 2002.

KROHN, K. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi 11. Herbarulide, a ketodivinyllactone steroid with an unprecedented homo-6-oxaergostane skeleton from the endophytic fungus *Pleospora herbarum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 629-630, 1999a.

KROHN, K. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi, 13. Stemphytriol, a new perylene derivative from *Monodictys fluctuata*. **Natural Products Letters**, v. 14, p. 31-34, 1999b.

KROHN, K.; BIELE, C. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi, 18. Fusidilactones, a new group of polycyclic lactones from an endophyte, *Fusidium sp.* **European Journal of Organic Chemistry**, n. 14, p. 2331-2336, 2002.

KROHN, K. et al. Biologically active metabolites from fungi. Part 16. new preussomerins J, K and L from an endophytic fungus. structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute conFiguration by CD calculations. **Tetrahedron**, v. 57, p. 4343-4348, 2001.

LIMÓN, M. C.; RODRÍGUEZ-ORTIZ, R.; AVALOS, J. Bikaverin production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 21-29, 2010.

LIU, D. Z.; LIANG, B. W.; LI, X. F.; LIU, Q.. Induced production of new diterpenoids in the fungus *Penicillium funiculosum*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 607-608, 2014.

LOGRIECO, A. et al. Beauvericin production by *Fusarium species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3084-3088, 1998.

MANAMGODA, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

MAES, C. M. et al. The structure of bipolaramide, a novel dioxopiperazine from *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communications**, v. 6, p. 350-351, 1982.

MANZANILLA, R. et al. *Pochonia chlamydosporia*. Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2013.

- MARDER, L. et al. Quantitative analysis of total mycotoxins in metabolic extracts of four strains of *Bipolaris sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*). **Process Biochemistry**, v. 41, p. 177-180, 2006.
- MEYER, T. N.; SILVA, A. L. DA. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.
- NAKAJIMA, H. et al. Phytotoxins and related metabolites produced by *Bipolaris coicis*, the pathogen of job's tears. **Phytochemistry**, v. 45, n. 1, p. 41-45, 1997.
- NIHASHI, Y. et al. Phytotoxic Sesterterpene, 11-Epiterpestacin, from *Bipolaris sorokiniana* NSDR-011. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 685-688, 2002.
- O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.
- PACIFICO, M. et al. Metabolite *fingerprint* of capim dourado (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 488-496, 2011.
- PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi. effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*, **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1939-1945, 2007.
- PETTIT, R. K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 471- 478, 2011.
- RABIE, C. J.; LUBBEN, A.; STEYN, M. Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 206-208, 1976.
- RABIEB, C. J. The Structure of bipolaramide, a. v. 55, n. 350, p. 350-351, 1982.
- REVANKAR, S. G. et al. Disseminated phaeohyphomycosis . review of an emerging mycosis. v. 34, p. 467- 476, 2002.
- RICCI, C. V. et al. Flavonoids of *Syngonanthus Ruhl*, (Eriocaulaceae). taxonomic implications, **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 24, n. 6, p. 577-583, 1996.
- RODRIGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GODEAS, A. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 575-586, 2006.
- SANTIN, E. et al. Micotoxinas do *Fusarium* spp. na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 185-190, 2000.

- 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. et al. Xanthonenes and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 853-856, 2001.
- SATO, C, S. Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. percepção ambiental e estabelecimento de áreas para educação. 2007.171 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área Botânica) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- SCHEFFERS, B. R. et al. "What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 9, p. 501-510, 2012.
- SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi. a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996–1004, 2002.
- SHANKARAPPA, B. et al. Bipolaris. a rare etiology of ureteric mycosis with Double J stent *in situ*. **International Journal of Advances in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 52, 2014.
- SILVERSTEIN, R. M. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 2006.
- SIRIWACH, R. et al. Bipolamides A and B, triene amides isolated from the endophytic fungus *Bipolaris* sp. MU34. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 2, p. 167-70, 2014.
- SHINONAGA, H. et al. . Pochonins K–P. new radicicol analogues from *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and their WNT-5A expression inhibitory activities. **Tetrahedron**, v. 65, n. 17, p. 3446-3453, 2009.
- SOMEI, M.; KAWASAKI, T. The first and simple synthesis of indole alkaloid, bipolaramide. **Heterocycles**, v. 42, n. 1, p. 281-287, 1996.
- STEFFECK, R. J.; YURY Z.; K. H. GAHM. Enantioselective separation of racemic secondary amines on a chiral crown ether-based liquid chromatography stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 947, n. 2, p. 301-305, 2002.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from endophytic microorganisms¹. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.2, p. 257-268, 2004.
- SUGAWARA, F. et al. Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 24, p. 8291- 8294, 1985.
- TKACZ, J. S. Polyketide and peptide products of endophytic fungi. variations on two biosynthetic themes of secondary metabolism. In **Microbial Endophytes** .BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.). New York:Marcel Dekker, 2000. p.263-294.

- TROVÓ, M.; SANO, P.T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, n. 49-55, 2010.
- VILEGAS, W. et al. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299–2301, 1990.
- VILEGAS, W. et al. Naphtopyranones glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207–210, 1998.
- VIZZOTO, L. **Estudo e aplicações das técnicas de RMN HR-MAS e DOSY em plantas e extratos de plantas de ordem Rutales**. 2004. f. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos - São Carlos, 2004.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. **Plant drug analysis**. a thin layer chromatography atlas. Berlin. Springer, 1984.
- WANG, Q.-X. et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 5, p. 777- 781, 2011.
- WANG, Q.-X. et al. Coicenals A-D, four new diterpenoids with new chemical skeletons from the plant pathogenic fungus *Bipolaris coicis*. **Organic Letters**, v. 15, n. 15, p. 3982-3295, 2013.
- WATANABE, N. et al. Bipolal. anti-microalgal compound isolated as a candidate for marine antifouling produced by *Bipolaris* sp. F5206. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 463- 466, 1995.
- WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895–1897, 2008.
- XU, W, GAVIA, D. J.; TANG, Y. Biosynthesis of fungal indole alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 10, p. 1474-1487, 2014.
- ZANUTTO, F. V. et al. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MS and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 244-262, 2012.
- ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on Rotiferophthora. **Nova Hedwigia**, v. 73, n. 1-2, p. 51-86, 2001.