

RAFAEL TEIXEIRA FREIRE

Estudo visando a otimização do solvente extrator e estudo preliminar sobre a quantificação da citocalasina D produzida pelo endófito *Xylaria sp.*, usando a técnica de RMN de ^1H

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, no curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara

2009

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Rafael Teixeira Freire

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP. Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica. NuBBE.

Rua professor Francisco Degni s/n. jd. Quitandinha, CEP 14.800-900.

Telefone: (16) 3301-6785

E-mail: rafaeltfreire@hotmail.com

Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP. Instituto de Química

Local: Araraquara/ São Paulo.

Curso: Química.

Período: 2003-2007.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que sempre iluminou o caminho a ser percorrido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para esta experiência maravilhosa.

A minha mulher e filhos.

Aos meus pais e irmãos.

Ao eterno Prof. Henrique.

A Profa. Angela.

A todos os professores e servidores deste instituto.

A todos meus amigos e pessoas que conviveram do meu lado esses anos.

A CAPES pela bolsa concedida.

Acima de tudo agradeço a Deus.

EPIGRAFE

“Deus, conceda-me serenidade para aceitar as coisas que eu não posso modificar.
Coragem para modificar aquelas que eu posso e sabedoria para reconhecer a
diferença. Só por hoje, funciona. ☯”
Oração da serenidade

“Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça.
No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.”
Confúcio

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e
Z é manter a boca fechada.”
Albert Einstein

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”
Winston Churchill

“O homem que move montanhas, começa carregando pedras pequenas.”
Ditado chinês

“Procure me amar quando eu menos merecer, porque é quando mais preciso.”
Provérbio sueco

“Cure o passado. Viva o presente. Sonhe o futuro.”
Provérbio irlandês

“Os que falam mau dos outros em tua presença, na tua ausência falará mal de ti.”
Provérbio Árabe

“Se você pensa que é muito pequeno para fazer diferença, tente dormir em um
quarto fechado com um mosquito.”
Provérbio africano

"Alegria compartilhada é alegria em dobro. Tristeza compartilhada é tristeza pela
metade."
Provérbio Sueco

“Quando o jogo termina, o rei e o peão voltam sempre para a mesma caixa.”
Provérbio italiano

“A palavra é prata, o silêncio é ouro”.
Proverbio chinês

"Todas as flores do futuro estão nas sementes de hoje"
Provérbio chinês

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

Confúcio

“O amor é a única loucura de um sábio e a única sabedoria de um tolo.”

William Shakespeare

“Aquele que sabe pouco rapidamente revela isto.”

Provérbio italiano

“Você pode descobrir mais sobre uma pessoa em uma hora de brincadeira do que em um ano de conversa.”

Platão

“O que faz andar o barco não é a vela enfunada, mas o vento que não se vê.”

Platão

“Educar é semear com sabedoria e colher com paciência.”

Augusto Cury

“Escuta e serás sábio. O começo da sabedoria é o silêncio.”

Pitágoras

“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz.”

Aristóteles

“Conhece-te a ti mesmo e conhecerás o universo e os deuses.”

Sócrates

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de método de extração e quantificação da citocalasina D, produzida pelo fungo endofítico *Xylaria sp.*. A técnica de extração tem embasamento no planejamento fatorial utilizando um gráfico ternário como referência, onde cada vértice foi constituído de um solvente puro. Os solventes utilizados foram: acetato de etila, álcool isopropílico e éter etílico. Foram selecionados 10 pontos no gráfico a partir dos quais foram realizadas as devidas extrações em triplicata, resultando em 30 amostras do extrato bruto de *Xylaria sp.*. A avaliação da quantidade de citocalasina D no extrato bruto foi feita por quantificação por RMN de ^1H utilizando-se o antraceno como padrão interno. A escolha do melhor solvente extrator ocorreu após a quantificação, em que foi levado em conta: o teor de citocalasina D no extrato bruto, o rendimento do extrato bruto, a quantidade total de citocalasina D presente no extrato bruto e o custo de extração. A análise das variáveis nos permitiu a escolha do acetato de etila como melhor solvente extrator.

Palavras chave: Citocalasina, quantificação por RMN de ^1H , extração, fungo endofítico, *Xylaria sp.*

ABSTRACT

The present work describes the development of method for extraction and quantification of cytochalasin D, produced by the endophytic fungus *Xylaria sp.* The technique of extracting makes uses of a factorial design with a ternary graph as reference, where each vertex has consisting of one solvent. The solvents used were: ethyl acetate, ethyl ether and isopropyl alcohol. It was selected 10 points at the graph which were due to extractions in triplicate, resulting in 30 samples of crude extract of *Xylaria sp.* For the avaliation of the amount of cytochalasin D in crude extract it was developed a quantification technique by ^1H NMR of which the internal standard used was the anthracene.. Choosing the best solvent extractor occurred after the quantification, which was taken into account: the content of cytochalasin D in the crude extract, the yield of the crude extract, the total cytochalasin D present in the crude extract and the cost of extraction. After the analysis, the ethyl acetate was elected the best solvent for the extraction.

Key words: cytochalasin, quantification by ^1H NMR, extraction, endophytic fungus, *Xylaria sp.*

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1.Introdução	17
1.1 Importância Ecológica e tecnológica dos fungos em geral	17
1.2.1 Fungos	18
1.2.2 Fungos Endofíticos	19
1.2.3 Família Xylariaceae	20
1.2.4 Gênero Xylaria	21
1.3 A espécie vegetal hospedeira: <i>Palicourea marcgravii</i>	23
1.4.1 Citocalasinas	25
1.5.1 Usos da espectroscopia de RMN	26
1.5.2 O básico sobre RMN	26
1.5.3 Deslocamento químico	27
1.5.4 Acoplamento Spin-spin	28
1.5.5 Quantificação por RMN	28
1.5.6 Relação sinal ruído	30
1.5.7 Shimming	31
1.5.8 Janela Espectral	31
1.5.9 Correções de fase	31
1.5.10 Tempo de relaxação	32
1.5.11 Comprimento ou largura do pulso	35
1.5.12 Tempo de aquisição	36
1.6 Atribuição dos deslocamentos químicos das citocalasinas extraídas de fungos descritos na literatura.	37
2.1 Objetivos e Justificativa	46
3.Parte experimental	48
3.1 Materiais e métodos	48
3.1.1 Equipamentos	48
3.1.2 Reagentes	48
3.2 Microorganismo e preparação do inóculo	48
3.3 Obtenção do extrato bruto produzido por <i>Xylaria</i> sp.	49
3.4. Análise dos extratos brutos por RMN de ¹ H.	51

3.5. Tratamento dos Resíduos químicos	52
4.Resultados e Discussão	54
4.1. Discussão dos dados de RMN de ^1H dos extratos brutos	59
4.2 Tempo de análise.....	61
4.3.1 Interpretação dos resultados obtidos	63
4.3.2 Quantificação da citocalasina D. Cálculo para obter a massa de citocalasina na quantidade de massa que foi enviada para RMN.....	64
4.3.3 Cálculo para o teor	65
4.3.4 Cálculo para total de citocalasina D presente no extrato bruto	65
4.3.5 Cálculo do custo de solvente para extração de 1mg de citocalasina D. ..	66
4.4 Rendimento do extrato bruto.....	67
4.5. Teor.....	68
4.6.Quantidade total de citocalasina D extraída	68
4.7. Custo do solvente para a extração de 1mg de citocalasina D	68
5.Conclusão	69
Referências.....	70
Referencias consultadas.....	75
ANEXO	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Substâncias bioativas isoladas do fungo endofítico <i>Xylaria sp.</i> (Cafeu, M., 2004)	22
Figura 2 Placa de petri contendo o fungo <i>Xylaria sp.</i>	23
Figura 3 Fungo <i>Xylaria sp.</i> visto ao microscópio. (a) 300x. (b) 500x. (c) 750x.	23
Figura 4 <i>Palicourea marcgravii</i> , detalhe de sua inflorescência e uma visão geral do arbusto	23
Figura 5 Acoplamento de segunda ordem.....	28
Figura 6 Evolução do momento magnético longitudinal (retirado de Doyon, Cabanis et al. 2001).....	33
Figura 7 O experimento de recuperação e inversão realizado no α pineno em CDCl_3 (região dos alifáticos mostradas no espectro de ^1H). Tempo de recuperação entre 5ms a 20s.	34
Figura 8 Evolução do momento magnético transversal (retirado de Doyon, Cabanis et al. 2001).....	35
Figura 9 Número de publicações da RMN quantitativa (QRMN)	36
Figura 10 Esqueleto básico das citocalasinas 1-14	37
Figura 11 Esqueleto básico das citocalasinas 15-18.....	42
Figura 12 Gráfico ternário com os respectivos pontos utilizados na extração	50
Figura 13. Fluxograma de extração do fungo <i>Xylaria sp.</i>	51
Figura 14. Citocalasina D	54
Figura 15 Regiões expandidas do espectro de RMN de ^1H 500 MHz da citocalasina D.....	56
Figura 16. Antraceno	58
Figura 17 Espectro RMN de ^1H 500 MHz 1mg de antraceno em CDCl_3	58
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da citocalasina D com o padrão interno antraceno, em CDCl_3	59
Figura 19. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 0-2 ppm.....	59
Figura 20. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 2-5 ppm.....	60
Figura 21. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 5-7 ppm pode-se observar o duplo dubleto em 6,05 ppm bem resolvido e que foi utilizado na quantificação da citocalasina D.....	60
Figura 22. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 5-7 ppm. Nesta região pode-se observar os sinais do padrão interno, o antraceno, em 7,3; 7,95 e 8,4 ppm.	61
Figura 23 Sobreposição dos sinais de RMN de ^1H do duplo dubleto olefínico referente ao C-20.	63
Figura 24 Fórmula para o calculo do desvio padrão.....	66
Figura 29 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,2 mg da amostra A8A (replicata A; AcOEt=80%, iPrOH=10%, Et ₂ O=10%) + 1mg de antraceno.	81

Figura 30 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,8 mg da amostra A8E (replicata A; AcOEt=10%, iPrOH=10%, Et ₂ O=80%) + 1mg de antraceno.	82
Figura 31 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 38,0 mg da amostra A8I (replicata A; AcOEt=10%, iPrOH=80%, Et ₂ O=10%) + 1mg de antraceno.	83
Figura 32 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,2 mg da amostra AAEI (replicata A; AcOEt=33%, iPrOH=33%, Et ₂ O=33%) + 1mg de antraceno.	84
Figura 33 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 54,0 mg da amostra AAc (replicata A; AcOEt=100%) + 1mg de antraceno.	85
Figura 34 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,8 mg da amostra AAE (replicata A; AcOEt=50%, Et ₂ O=50%) + 1mg de antraceno.	86
Figura 35 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,0 mg da amostra AAI (replicata A; AcOEt=50%, iPrOH=50%)+ 1mg de antraceno.	87
Figura 36 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 50,1 mg da amostra AE (replicata A, Et ₂ O=100%) + 1mg de antraceno.	88
Figura 37 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,7 mg da amostra AEI (replicata A; iPrOH=50%, Et ₂ O=50%) + 1mg de antraceno.	89
Figura 38 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,1 mg da amostra AI (replicata A; iPrOH=100%,) + 1mg de antraceno.	90
Figura 39 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 36,7 mg da amostra B8A (replicata B; AcOEt=80%, iPrOH=10%, Et ₂ O=10%) + 1mg de antraceno.	91
Figura 40 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,5 mg da amostra B8E (replicata B; AcOEt=10%, iPrOH=10%, Et ₂ O=80%) + 1mg de antraceno.	92
Figura 41 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,1 mg da amostra B8I (replicata B; AcOEt=10%, iPrOH=80%, Et ₂ O=10%) + 1mg de antraceno.	93
Figura 42 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,1 mg da amostra BAEI (replicata B; AcOEt=33%, iPrOH=33%, Et ₂ O=33%) + 1mg de antraceno.	94
Figura 43 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 42,9 mg da amostra BA (replicata B; AcOEt=100%) + 1mg de antraceno.	95
Figura 44 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,0 mg da amostra BAE (replicata B; AcOEt=50%, Et ₂ O=50%) + 1mg de antraceno.	96
Figura 45 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,9 mg da amostra BAI (replicata B; AcOEt=50%, iPrOH=50%) + 1mg de antraceno.	97
Figura 46 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 28,9 mg da amostra BE (replicata B; Et ₂ O=100%) + 1mg de antraceno.	98
Figura 47 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 43,1 mg da amostra BEI (replicata B; iPrOH=50%, Et ₂ O=50%) + 1mg de antraceno.	99
Figura 48 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 42,4 mg da amostra BI (replicata B; iPrOH=100%) + 1mg de antraceno.	100
Figura 49 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,5 mg da amostra C8A (replicata C; AcOEt=80%, iPrOH=10%, Et ₂ O=10%) + 1mg de antraceno.	101
Figura 50 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,7 mg da amostra C8E (replicata C; AcOEt=10%, iPrOH=10%, Et ₂ O=80%) + 1mg de antraceno.	102
Figura 51 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,0 mg da amostra C8I (replicata C; AcOEt=10%, iPrOH=80%, Et ₂ O=10%) + 1mg de antraceno.	103
Figura 52 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,7 mg da amostra CAEI (replicata C; AcOEt=33%, iPrOH=33%, Et ₂ O=33%) + 1mg de antraceno.	104
Figura 53 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,5 mg da amostra CA (replicata C; AcOEt=100%) + 1mg de antraceno.	105

Figura 54 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,9 mg da amostra CAE (replicata C; AcOEt=50%, Et ₂ O=50%) + 1mg de antraceno.....	106
Figura 55 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,1 mg da amostra CAI (replicata C; AcOEt=50%, iPrOH=50%) + 1mg de antraceno.....	107
Figura 56 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 31,8 mg da amostra CE (replicata C; Et ₂ O=100%) + 1mg de antraceno.....	108
Figura 57 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,4 mg da amostra CEI (replicata C; iPrOH=50%, Et ₂ O=50%) + 1mg de antraceno.....	109
Figura 58 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,6 mg da amostra CI (replicata C; iPrOH=100%) + 1mg de antraceno.....	110
Figura 59 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 1,5 mg da citocalasina D + 1mg de antraceno.....	111
Figura 60 Espectro RMN de ^1H 500 MHz 1mg de antraceno.....	112
Figura 61 Mapa de contorno HMBC da citocalasina D (1,5 mg) + antraceno (1mg)	113
Figura 62 Mapa de contorno HMQC da citocalasina D (1,5 mg) + antraceno (1mg)	114
Figura 63 Citocalasina D	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Citocalasinas conhecidas de macrociclo com 11 carbonos e seus respectivos radicais.....	37
Tabela 2 Dados de RMN de ^1H das citocalasinas 1-6 (400 MHz; CDCl_3)(J=Hz, δ PPM).....	38
Tabela 3 Dados de RMN de ^1H das citocalasinas 7-9 (400 MHz; CDCl_3), e das citocalasinas 10-11 (600 MHz; CDCl_3)(J=Hz, δ PPM).	39
Tabela 4 Dados de RMN de ^1H da citocalasina 12 (500 MHz; DMSO-d_6), da citocalasina 13 (400 MHz; CDCl_3 e da citocalasina 14 (500 MHz em DMSO-d_6) (J=Hz, δ PPM).....	40
Tabela 5 Dados de RMN de ^{13}C das citocalasinas 1-6 (100 MHz; CDCl_3)(δ ppm). ...	41
Tabela 6 Dados de RMN de ^{13}C das citocalasinas 7-9 (100 MHz; CDCl_3), das citocalasinas 10-11 (150 MHz; CDCl_3), das citocalasinas 12 e 14 (125 MHz; DMSO-d_6)	41
Tabela 7 Tabela referente as citocalasinas de macrociclo com 11 carbonos e seus respectivos radicais.....	42
Tabela 8 Dados de RMN de ^1H a 500 MHz e ^{13}C a 125 MHz em CDCl_3 (J=Hz, δ PPM) das citocalasinas 15 e 16.	43
Tabela 9 Dados de RMN de ^1H a 500 MHz e ^{13}C a 125 MHz (J=Hz, δ PPM) das citocalasinas 17 (CDCl_3) e 18 (DMSO-d_6).	43
Tabela 10 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da citocalasina D em 500 MHz em CDCl_3 (J=Hz, δ PPM).....	55
Tabela 11. Deslocamento químico dos Hidrogênios do antraceno	57
Tabela 12 Tempo de análise de RMN de ^1H com tempo de aquisição fixado em 4 segundos, variando tempo de relaxação (d1) em segundos e numero de varreduras. (nt)	62
Tabela 13 .Valores das variáveis em cada replicata obtidos através dos cálculos de quantificação.	65
Tabela 14 Valores médios das variáveis analisadas com os respectivos desvios padrão	66
Tabela 15 Valor do litro de cada solvente P. A. (1U\$=R\$2,35; 16/12/2008).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS

δ : Deslocamento químico

AcOEt: Acetato de Etila

d: dubleto

dd: duplo dubleto

ddd: duplo duplo dubleto

DMSO-*d*6 Dimetilsufóxido deuterado

Et₂O: Éter etílico

Fig: Figura

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Bond Coherence

iPrOH: Isopropanol

J: Constante de acoplamento

lig: ligação

m: multiplete

NuBBE: Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

q: quadruplete

QRMN: Ressonância magnética nuclear quantitativa

QRMN-NP: Ressonância magnética nuclear quantitativa de produtos naturais

RMN: Ressonância magnética nuclear

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: singleto

t: tripleto

1. Introdução

1.1 Importância Ecológica e tecnológica dos fungos em geral

A descoberta da penicilina foi um grande marco, não só na área da medicina por seu uso como antibiótico potente, como também uma alavanca que despertou a curiosidade dos pesquisadores na área dos micro-organismos. Especialmente, após Fleming e Chain anunciarem que um fungo, o *Penicillium notatum*, (Strobel Et al., 2004) era o responsável pela produção da penicilina. Essa novidade na área científica, atraiu os estudiosos para que avançassem em busca de novos metabólitos produzidos a partir dos fungos.

Com o avançar dos estudos sobre os fungos, foram descobertas substâncias altamente tóxicas para os mamíferos denominadas micotoxinas, algumas delas sendo consideradas carcinogênicas potentes. Tais substâncias são as aflatoxinas, as ocratoxinas, as citreoviridinas, os tricotecenos e as fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos termogênicos (Miller; Trenhuolm, 1991).

Aproximadamente 25% de todos os produtos naturais biologicamente ativos até hoje conhecidos foram obtidos a partir de fungos (Kongsaeree, et al, 2003) destacando-se os antibióticos β -lactâmicos da classe da penicilina F (*Penicillium chrysogenum*) e as cefalosporinas C (*Cephalosporium acremonium*) os quais juntos representam um montante de vendas de U\$ 15 bilhões/ano. A ciclosporina A (*Tolypocladium inflatum gams*) usada como imunossupressor e a lovastatina (*Aspergillus terreus*) usada como redutor de colesterol responsáveis, respectivamente, por um mercado mundial de U\$1,5bi e U\$8,4bi (Demain, 2000).

O fato dos fungos produzirem uma gama enorme de metabólitos está relacionada a sua íntima relação de desenvolvimento com plantas, insetos, micro-organismos e mamíferos, o que os levou a desenvolver uma atividade ecológica bastante diversificada, envolvendo principalmente a atração e a defesa. (Andrade, 2005).

Bibliografias atuais traduzem um alto potencial revolucionário na área farmacológica a partir de descobertas derivadas de metabólitos de fungos. Nos anos de 2000 e 2003, dentre 20 fármacos originados de produtos naturais ou deles derivados lançados nos EUA, Europa e Japão pelo menos quatro resultam de derivados ou foram sintetizados a partir de metabólitos secundários de fungos (Butler, 2004).

Dentre todos os micro-organismos estudados, os melhores produtores de metabólitos secundários são representados pelos actinomicetos e fungos imperfeitos. Com base nesses estudos foi sugerido que eles são essenciais para a prosperidade de todo o ecossistema, criando assim uma alta biodiversidade e sustentabilidade do mesmo. Os fungos cohabitam na natureza em relações com outras espécies. Através das relações simbióticas onde ambas as espécies se beneficiam, por exemplo, quando o micro-organismo oferece proteção contra pragas ou oferece proteção a um outro micro-organismo patogênico. Esta proteção ocorre quando um dos micro-organismos em interação produz um metabólito secundário que atingirá o propósito desejado, ou seja, o metabólito secundário produzido por um protege o outro. Um outro exemplo é o comensalismo, onde há uma relação harmônica entre micro-organismo e hospedeiro.

A co-evolução dos organismos vivos permitiu um forte ciclo de interação entre eles em especial um hospedeiro e um micro-organismo. Em um estudo feito, foi possível averiguar a existência de fungos micorrízicos arbusculares migrando para o interior da planta e estabelecendo uma relação mutualista (Gunatilaka, 2006).

1.2.1 Fungos

Durante um longo período os fungos foram incluídos no reino vegetal, mesmo possuindo características distintas das plantas e não apresentando clorofila em sua composição metabólica. Como microrganismos eucarióticos quimiorganotróficos, os fungos são hoje classificados em um reino independente.

Apresentam como características serem encontrados tipicamente em ambientes úmidos, distribuídos nos diversos habitats na natureza: água, solo, ar, sobre partículas em suspensão ou ainda como parasitas de plantas e animais. São divididos conforme o habitat, em grupos, como: coprófilos, micoparasitas, de água doce, marinhos, termofílicos, parasitas de nematóides, epifíticos, endofíticos, entre outros.

Com relação à ocorrência e biodiversidade, os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a terra, menor apenas que os insetos. Estimativas sugerem que existam aproximadamente 1,5 milhões de espécies diferentes, sendo que, menos de 5% foram descritas (Hawksworth, 2001). Assim, tem-se constatado nos últimos anos uma urgente necessidade em se estudar a química dos fungos,

temendo-se a perda da biodiversidade (Balandrin et al., 1993). Muitas espécies de plantas superiores e insetos ameaçados de extinção estão associados com a flora específica dos fungos e, se estas perdas ocorrerem, poderão resultar no desaparecimento de espécies de fungos.

Uma das vantagens dos microorganismos sobre outras fontes naturais está relacionada com a conservação ambiental, uma vez que requer uma única e pequena remoção do ambiente natural. Outra vantagem é que por se tratarem de fontes renováveis, o cultivo em larga escala para produzir seus metabólitos bioativos pode ser realizada usando a tecnologia existente com a otimização das condições de cultivo. (Bills, 1995).

Os fungos são organismos que prosperam naturalmente em ambientes competitivos mantendo relações ecológicas (mutualismo e comensalismo), tróficas (predação e parasitismo), e de competição (por território e recursos alimentares) com outros organismos do ecossistema.

1.2.2 Fungos Endofíticos

São microrganismos que habitam os tecidos internos e subcuticulares das plantas, em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (Andrews et al, 1991), sendo encontrados em folhas, ramos e raízes. Podem habitar a planta por toda a vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações, através da semente do hospedeiro (Melo e Azevedo, 1998). Alguns destes fungos invadem e induzem efeitos severos e imediatos ao crescimento do hospedeiro. Outros são capazes de invadir, tomar conta ou neutralizar a defesa e persistir por anos, freqüentemente sem causar dano ao hospedeiro. Isto não impede a possibilidade de se tornarem patogênicos quando o hospedeiro é submetido a estresse (Andrews e Hirano, 1991; Melo e Azevedo, 1998). Assim, a natureza da associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros é diversa e varia de parasitismo a neutro ou simbiótico (Carrol, 1988).

A maior diversidade de fungos endofíticos ocorre nas regiões mais húmidas, sendo que os de certas famílias, gêneros e até espécies de plantas, sofrem menor influência do clima (Petrini, 1991). Qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 a 100 diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo que de 2 a 5 podem ser específicos do hospedeiro (são chamados de espécies dominantes)

(Gullo, 1994). Esta especificidade sugere qualquer que seja a taxa de extinção das espécies de plantas, a taxa de extinção das espécies de fungos endofíticos sera maior. A especificidade pelo hospedeiro também assegura que novas espécies de fungos serão encontradas se novas espécies de plantas forem exploradas.

A busca de princípios bioativos em certos nichos de fungos vem sendo realizada pelas indústrias farmacêuticas de maneira randômica e aleatória (Bills, 1995; Miller, 2001). Entretanto, considerando-se que a produção de substâncias biologicamente ativas está associada ao seu habitat, a ecologia dos fungos pode ser usada como um meio racional e útil para a busca de princípios bioativos.

Entre as várias famílias de fungos endofíticos isolados, identificados e promissores na produção de metabólitos bioativos, pode-se destacar a Xylariaceae.

1.2.3 Família Xylariaceae

Xylariaceae pertence à classe dos pirenomicetos, que são caracterizados pelo corpo de frutificação do tipo peritécio (Pfenning, 2000).

A família Xylariaceae possui em torno de 40 gêneros, com representantes na maioria dos países do mundo, e a maior diversidade ocorre nos trópicos. O número exato de espécies da família ainda não pôde ser determinado devido à grande dificuldade na classificação e à falta de coleções modernas de espécies tropicais; porém, com base em revisões, foram descritas 431 espécies (Hawksworth, 1991b).

A família Xylariaceae tem se destacado na produção de metabólitos secundários, com uma diversidade estrutural notável (Whalley e Edwards, 1995). Os principais metabólitos secundários produzidos pelos representantes investigados podem ser agrupados em diidroisocoumarinas e derivados (Anderson et al., 1983); ácido succínico e derivados (Anderson et al., 1983); butirolactonas (Anderson et al., 1982); citocalasinas (Edwards et al., 1989); sesquiterpenos (Anderson et al., 1988); griseofulvina e derivados (Whalley e Edwards, 1995); derivados do naftaleno (Whalley e Edwards, 1995) e ácidos graxos de cadeia longa (Edwards et al., 1991).

1.2.4 Gênero *Xylaria*

O gênero *Xylaria* é uma fonte rica de metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo sordaricinas antifúngicas, sesquiterpenoides anti HIV-1 e hexaidronaftalenonas antimaláricas (Pongcharoen W., 2007).

Devido à dificuldade e confusão quanto identificação das espécies *Xylaria* a sua composição de mistura de metabólitos é utilizada como marcador para a sua identificação taxonômica. (Pittayakhajonwut P. 2005)

Espécies deste gênero são difundidas desde o clima temperado da Terra até o clima tropical. Estromas de *Xylaria sp.* são comuns em tocos e ramos caídos de árvores mortas. A maioria das espécies é decompositora da madeira. Este gênero possui 100 espécies já descritas, mas estima-se que possa chegar a 500 (Whalley, 1996). Os fungos deste gênero são encontrados como saprófitos (se alimentam de vegetais ou animais em decomposição), fitoparasitas e endofíticos. Os relatos de *Xylaria* como endofíticos só ocorreram nos últimos anos com a intensificação dos estudos com plantas tropicais (Bayman et al., 1998). Espécies endofíticas de *Xylaria* foram encontradas em palmas, orquídeas, e bromélias, entre outras (Bayman et al., 1998).

Em um trabalho realizado no instituto de química de Araraquara (Cafeu M., 2004) o fungo *Xylaria sp.* (Figura 2 pág 23 e Figura 3 pág 23) foi incubado por 21 dias em meios sólidos (arroz e milho) e 28 dias em meio líquido (Czapek, Nutrient, YM e PDB). A partir dos extratos foram isoladas e identificadas 6 substâncias (Figura 1, pág 22). Nas condições experimentais adotadas (Cafeu M., 2004) conseguiu-se isolar até 52 mg de citocalasina D por litro de meio de cultura. No caso da citocalasina B e da griseofulvina isolou-se até 58,9 mg e 23,5 mg para cada 100 g de milho inoculado.

Figura 1 Substâncias bioativas isoladas do fungo endofítico *Xylaria* sp. (Cafeu, M., 2004)



Figura 2 Placa de petri contendo o fungo *Xylaria* sp.

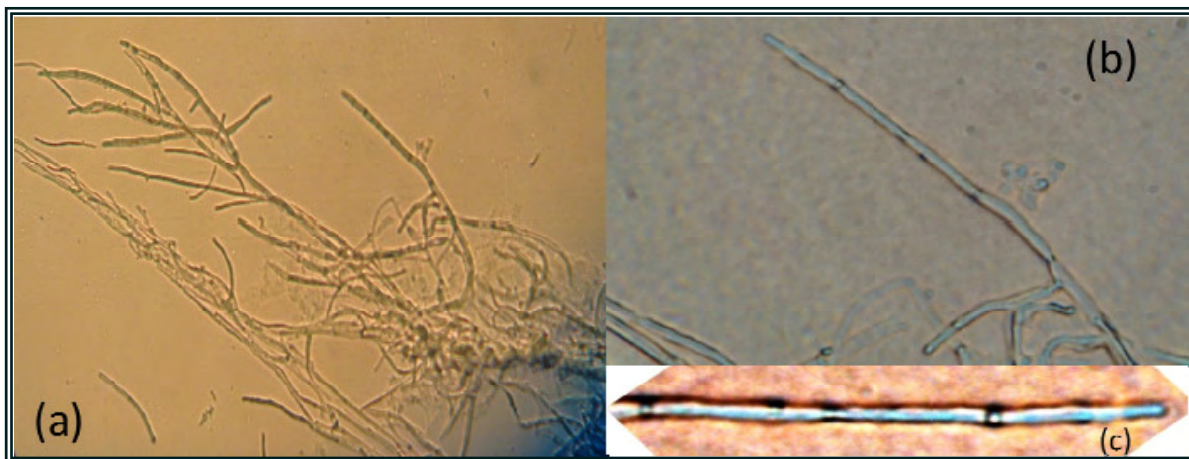


Figura 3 Fungo *Xylaria* sp. visto ao microscópio. (a) 300x. (b) 500x. (c) 750x.

1.3 A espécie vegetal hospedeira: *Palicourea marcgravii*



Figura 4 *Palicourea marcgravii*, detalhe de sua inflorescência e uma visão geral do arbusto

Nomes populares: erva-de-rato, café-bravo, cotó-cotó, tangará-açu.

A *Palicourea marcgravii* caracteriza-se por ser um arbusto com aproximadamente 2m de altura, ramos secundários cilíndricos, de terminais compridos, angulosos, delgados, de cor vermelha escura ao secar, glabros ou levemente pubescentes na parte superior, estípulas agudas, triangulares, soldadas na base. Suas folhas, caracterizam-se por serem curto-pecioladas, pubescentes quando novas, opostas, oblongas, longamente acuminadas na parte superior. Floresce de novembro a março, com frutificação ocorrendo entre janeiro e julho. Inflorescências em panícula, com flores tubulosas amareladas na base e azul-arroxeadas na parte superior. Frutos bagas biloculares de início avermelhados e depois arroxeados

A *P. marcgravii* é nativa do Brasil, ocorrendo em praticamente todo o país, especialmente nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Amazonas e Pernambuco. O fruto foi bastante empregado antigamente para matar ratos, daí seu nome popular erva-de-rato. Algumas plantas da família Apocynaceae e Asclepiadaceae, e até mesmo outras espécies de Rubiaceae recebem este mesmo nome popular e, devido a isto, *P. marcgravii* St. Hill. é muitas vezes referida como "erva-de-rato verdadeira".

A espécie é a maior responsável pelos casos de envenenamentos do gado brasileiro, o que lhe confere certa importância econômica. Vários estudos foram realizados com o objetivo de elucidar o mecanismo toxicológico desta planta.

Por muito tempo houve um impasse no esclarecimento do princípio tóxico. A toxicidade foi primeiramente atribuída à grande quantidade de cafeína presente nas folhas. Porém, em 1989 Eckschmidt et al. publicaram um trabalho demonstrando que a toxidez da planta é resultado da ação do ácido monofluoracético presente nas folhas e principalmente nos frutos.

A intoxicação é caracterizada por sinais neurotóxicos como depressão, ausência de coordenação motora, crises convulsivas e morte. Os sinais neurotóxicos, segundo Eckschmidt et al (1989), são conseqüentes a ação do fluorocitrato, metabólito dos fluoracetatos. Esse metabólito inibe duas importantes enzimas do ciclo de Krebs: a aconitase, que catalisa o metabolismo do citrato, e a succinato desidrogenase, que catalisa o metabolismo do succinato. A inibição destas duas enzimas e a subsequente formação do bloqueio do citrato no ciclo de Krebs, leva a uma diminuição do metabolismo da glicose, do armazenamento de energia e da respiração celular. Os órgãos que apresentam altas taxas metabólicas como o

coração, os rins e o cérebro, são os mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do fluorocitrato (Ellenhorn & Barceloux, 1988).

Ellenhorn & Barceloux (1988) e Schvartsman (1979) descrevem sintomas gastrintestinais como náuseas, vômitos e dores abdominais após um período latente de 30 a 150 minutos depois da ingestão. Subseqüentemente observa-se ansiedade, agitação, espasmo muscular, crises convulsivas e coma. Taquicardia e hipotensão são sinais cardiovasculares comuns.

1.4.1 Citocalasinas

Citocalasinas constituem um grupo de metabólitos naturais produzidos por diversas espécies de fungos, incluindo *Helminthosporium sp.*, *Phoma sp.*, *Xylaria sp.*, *Hypoxylon sp.*, *Zygosporium mansonii*, *Chalara sp.*, *Pyrenophora semeniperda*, *Daldinia SP.* Desde sua descoberta em 1966 até a atualidade, mais de 20 são descritas. Estruturalmente são caracterizadas pela presença de um anel biciclo isoindolona, fundido a um macrociclo de 11 a 14 membros e pela presença de uma unidade fenil na posição 10. (Figura 10, pág 37, Figura 11, pág 42e Figura 14, pág 54)

As citocalasinas têm sido largamente utilizadas em pesquisas biológicas, devido à atividade característica de ação citostática em culturas de células, porém a sua aplicação terapêutica é limitada devido a sua alta toxicidade (Wagenaar et al., 2000). São relatadas como sendo um mecanismo de defesa no corpo de frutificação do fungo *Hypoxylon fragiforme*, porque elas têm modo de ação biológico não seletivo, são produzidas em grandes quantidades na fase inicial de maturação do peritécio (2-3% da biomassa seca é constituída de citocalasina), e estão localizadas na parte periférica do estroma que é vulnerável a ataques de predadores (Stadler M. 2006). Estão relacionadas com várias atividades biológicas: induzem a apoptose (morte celular programada) (Nagasawa et al. 2000), são altamente inibidoras da enzima (HIV)-1 protease do vírus humano da AIDS (Dombrowski et al. 1992; Lingham et al 1992; Ondeyka et al. 1992), inibem o alongamento radicular (Evidente A. 2002), possuem alta citotoxicidade frente a uma linhagem celular derivada de um carcinoma da nasofaringe humana, as células KB e KBv2000 (Tao Y. 2008) e exibem potente citotoxicidade contra células fibroblásticas renais do Macaco verde africano (Vero) (Pongcharoen W. 2007).

As citocalasinas têm a capacidade de se ligarem a filamentos de actina e bloquear a polimerização e o alongamento da actina. Como resultado da inibição da polimerização da actina, as citocalasinas podem mudar a morfologia celular, inibindo processos celulares tais como a divisão celular (Haidle and Myers, 2004). Elas também possuem permeabilidade através das membranas celulares, impedindo translocação celular e fazendo as células enuclearem (Cooper, 1987). Além disso, agem em outros processos biológicos não referentes à polimerização da actina. Por exemplo: a citocalasina A e B que podem inibir o transporte de monossacarídeos através da membrana celular (Cooper, 1987), a citocalasina H descoberta como uma reguladora no processo do crescimento de plantas (Cox et al., 1983), citocalasina D inibe a síntese protéica (Ornelles et al., 1986) e a citocalasina E impede a angiogenesis (Udagawa et al., 2000), entre outras atividades biológicas (Cole & Schweikert 2003).

1.5.1 Usos da espectroscopia de RMN

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica química analítica utilizada para a determinação do teor e pureza de uma amostra, bem como a sua estrutura molecular. Por exemplo, RMN pode analisar quantitativamente misturas contendo compostos conhecidos.

Para compostos desconhecidos, a RMN pode ser utilizada para comparar os dados obtidos com dados da literatura a fim de comprovar a estrutura do composto analisado ou para elucidar a sua estrutura.

Uma vez que a estrutura básica é conhecida, RMN pode ser utilizada para determinar conformação molecular em solução, bem como estudar as propriedades físicas ao nível molecular, assim como a troca de conformação, variação de fase, solubilidade e difusão. (Pauli G., 2005)

1.5.2 O básico sobre RMN

Os fundamentos físicos por trás da espectroscopia de ressonância magnética nuclear residem nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. A interação do momento magnético nuclear de um núcleo com um campo magnético externo, B_0 , conduz, de acordo com as regras da mecânica quântica, a um diagrama de nível de energia nuclear, devido ao fato da energia magnética do núcleo ser restrita a certos

valores discretos. Associados a esses valores existem os estados estacionários, os quais são os únicos estados em que uma partícula elementar pode existir. Através do uso de transmissor de alta frequência, ocorrem transições entre os estados que são estimadas dentro de um diagrama de nível de energia. A frequência exata de transição de cada núcleo depende das partículas que o compõem, de sua organização e de seu ambiente eletrônico. A transferência de energia acontece por uma radiação eletromagnética aplicada, correspondente a frequência das ondas de rádio, e quando o spin volta ao seu estado inicial, a energia é emitida na mesma frequência da absorvida. A emissão da energia pode ser detectada, amplificada e gravada como uma linha espectral, chamada também de sinal de ressonância. (Gunther H., 1995)

1.5.3 Deslocamento químico

A frequência exata de ressonância da transição de energia é dependente do campo magnético efetivo sentido pelo núcleo que depende do campo magnético aplicado. Este campo é afetado pela blindagem eletrônica que por sua vez, é dependente do ambiente eletrônico. Como resultado, as informações sobre o núcleo no ambiente químico podem ser obtidas a partir de sua frequência de ressonância.

Em geral, quanto mais eletronegativo o núcleo, maior a frequência de ressonância. Outros fatores tais como anisotropia (anel aromático) e ligações duplas ou triplas, afetam o deslocamento da frequência ressonante.

A frequência de ressonância de cada núcleo depende do campo magnético utilizado. Como em sua maioria os números de frequência são grandes e difíceis de serem gravados; por exemplo, a frequência do benzeno pode ser 400.132869 MHz, definiu-se então, para expressar os deslocamentos um número mais conveniente, como 7,17 ppm.

$$\delta = (\nu - \nu_0) / \nu_0 \quad \nu = \text{frequência de ressonância}$$

O deslocamento químico nesta equação não é dependente do campo magnético tornando-se convenientemente expresso em ppm onde para hidrogênio, TMS está definido para ν_0 assim atribuído um deslocamento químico zero. (Gunther H. 1995)

1.5.4 Acoplamento Spin-spin

O campo magnético efetivo, B_{ef} , também é afetado pela orientação dos núcleos vizinhos. Este efeito é conhecido como acoplamento spin-spin, o que pode causar a divisão do sinal para cada tipo de núcleo em duas ou mais linhas.

O valor da divisão do sinal reflete a interação entre os spins e é independente do campo magnético e é medida como uma frequência absoluta (normalmente Hertz). O número de divisões indica o número de ligações químicas adjacentes ao núcleo observado.

. Se os deslocamentos químicos são semelhantes entre dois núcleos, então ocorrem distorções na altura do pico. Se ocorrerem mais de dois spins, sinais extras podem aparecer. Este efeito é chamado de acoplamento de segunda ordem.

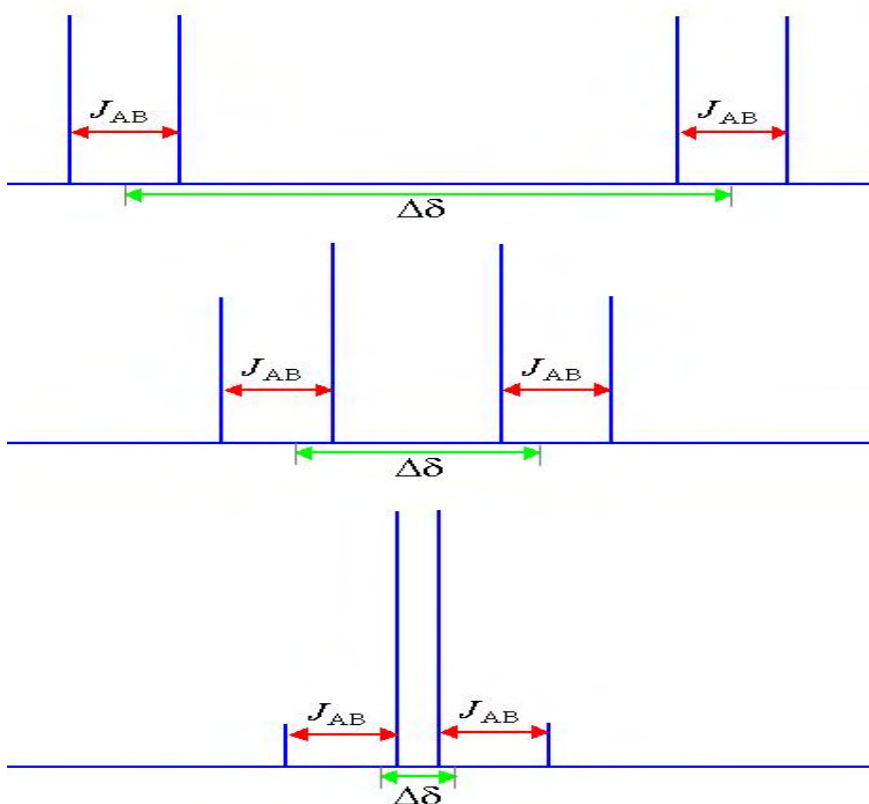


Figura 5 Acoplamento de segunda ordem

1.5.5 Quantificação por RMN

A história de sucesso desta técnica começou em 1945, com a descoberta do fenômeno em sólidos por Purcell e Bloch (Purcell et al, 1946; Bloch et al; 1946).

Apenas alguns anos mais tarde, utilizando o deslocamento químico e o acoplamento spin-spin, RMN se tornou extremamente interessante para os químicos (Emsley e Feeney, 1995; Shoolery, 1995). Com o passar dos anos, novos avanços tecnológicos permitiram que esta técnica se tornasse referência em termos de espectrometria, sendo assim amplamente usada na indústria e em laboratórios de pesquisa. Ela nos revela praticamente toda a estrutura, funcionalidade e dinâmica de uma molécula. (Maniara, G. 1998).

Mesmo após todos esses anos do desenvolvimento desta técnica, ela ainda é amplamente difundida e usada como uma técnica mais qualitativa do que quantitativa. Num espectro qualitativo de RMN, os deslocamentos químicos (posições dos picos), são precisos, mas, suas intensidades não. Cuidados devem ser tomados, quando se for realizar uma interpretação qualitativa do espectro, por exemplo, quando uma ressonância parece ser duas vezes maior do que outra, esta não necessariamente corresponde ao dobro do número dos núcleos contribuindo para o sinal.

Em geral, espectros qualitativos podem ser gravados mais rapidamente do que os quantitativos. A maioria dos espectros de RMN de ^1H , são quantitativos, quando realizados devido ao fato do tempo para realizar o espectro ser baixo para este núcleo. As diferenças entre os dados qualitativos e quantitativos surgem principalmente quando observando ^{13}C ou outros núcleos; em tais casos, pode levar-se de 5 a 10 vezes mais tempo para gravar um espectro quantitativo do que um qualitativo.

Em um espectro RMN quantitativo, tanto deslocamentos químicos (posições dos picos) quanto intensidades relativas são precisos. Se os dados vão ser utilizados para uma análise química tais como, uma determinação da composição, é essencial que as áreas dos picos de interesse reflitam corretamente a relação do número de núcleos que contribuem para os picos.

A análise de RMN quantitativa tem sido descrita em várias aplicações, embora apresente uma sensibilidade baixa se comparada a outras técnicas como por exemplo, a espectrometria de massa e a fluorimetria (Xu, Q., 2006).

Um importante aspecto do QRMN caracteriza-se pelos mecanismos físico-químicos que ocorrem durante o experimento serem completamente diferentes daqueles que se utilizam de outras técnicas analíticas comuns de quantificação.

Portanto, QRMN oferece uma visão geral do analito, quer seja de natureza biológica, nutricional, farmacológica, toxicológica ou de outra importância.

A RMN de hidrogênio é particularmente uma técnica bem adequada para a quantificação, baseada no fato de que todos os hidrogênios mostram um fator de resposta idêntico a todos os hidrogênios dos componentes em solução na amostra, e também é independente das moléculas às quais são ligadas (Ernst, R. R., 1992).

Apesar da limitada dispersão dos deslocamentos químicos de um hidrogênio em um espectro de RMN, a RMN de hidrogênio é freqüentemente escolhida devido a sua alta sensibilidade quando comparada a outros núcleos, isto é decorrente de seu grande momento magnético, abundância natural, bem como tempo de relaxação muito baixo (Cantor, C. R., 1980).

Para obter uma quantificação adequada algumas “condições quantitativas” necessitam ser cuidadosamente otimizadas (Pauli, G. 2005).

. O principal é que a intensidade (ou a área) de um sinal seja diretamente proporcional ao número de núcleos necessários para produzirem o sinal. A precisão da integral determina a precisão da quantificação e depende do nível de ruído do espectro, da qualidade do shimming, da escolha da janela espectral, da correção de fase e da linha de base (Szantay C., 2000).

1.5.6 Relação sinal ruído

A relação Sinal-Ruído (S/N) (signal/noise) após n varreduras é dada por:

$$S/N = n^{1/2} I_S / I_N$$

Onde I_S e I_N são as intensidades do sinal e ruído, respectivamente. A partir da equação acima, observa-se que, ao dobrar-se o número de varreduras aumenta-se S/N, por um fator de 1.4 ($2^{1/2}$). Para realmente dobrar a relação S/N, deve-se quadruplicar o número de varreduras, um aumento de dez vezes em S/N requer $100n$ resultando em um grande aumento no tempo de análise. Para a quantificação a relação sinal ruído deve ser de 1:23. (Gunther H. 1995)

1.5.7 Shimming

O campo magnético dentro do ímã não é espacialmente homogêneo em relação à amostra isto se deve ao fato de ocorrerem pequenas alterações na posição da amostra, gradientes de concentração, partículas insolúveis, ou até mesmo o movimento dos objetos ao redor do aparelho.

Uma vez que a qualidade do espectro resultante depende quase exclusivamente da homogeneidade do campo, pequenos ajustes são aplicados a esse campo, automática ou manualmente, a fim de compensar o maior número de irregularidades possíveis. Este procedimento é chamado shimming. (Gunther H. 1995)

1.5.8 Janela Espectral

A janela espectral ou largura da varredura, refere-se a faixa do deslocamento químico (δ) na qual os dados foram gravados. Um espectro com uma largura de varredura de 12 ppm pode se estender de 0 a 12 ppm, de -2 a 10 ppm, ou sobre qualquer outra faixa para a qual a diferença entre o maior e o menor deslocamento químico seja 12 ppm. A exata faixa gravada é uma função da frequência offset, que seleciona o ponto central. Normalmente, os experimentos padrões recolhem dados através de uma janela espectral que englobe os deslocamentos típicos dos compostos orgânicos. No entanto, existem casos especiais em que a janela é reduzida ou ampliada, a fim de se concentrar em uma determinada faixa de deslocamento químico ou para incluir ressonâncias de espécies incomuns. (Gunther H. 1995)

1.5.9 Correções de fase

Os erros de fase surgem quando uma detecção do sinal da RMN (decaimento livre induzido, ou FID (free-induction decay) tem início em qualquer região de uma oscilação, dependendo dos parâmetros experimentais e instrumentais. Eles aparecem como distorções na linha de base do espectro da transformada de Fourier, e são corrigidos automaticamente pelo espectrômetro do computador ou

manualmente, por tentativa e erro.
(http://arrhenius.rider.edu/nmr/NMR_tutor/dictionary/dict_intro.html)

Além dos parâmetros relacionados com a precisão da integral, existem outros três parâmetros, que são determinantes na obtenção do espectro de RMN de ^1H . São eles: tempo de relaxação ($d1$), ângulo do pulso, tempo de aquisição (Pauli, G. 2005).

1.5.10 Tempo de relaxação

Tempo de relaxação é caracterizado pelo tempo com que se realinham os momentos magnéticos com o campo magnético principal, depois de terem sido alterados por um pulso inicial de RF (Moore and Zouridakis 2004).

Dependendo do núcleo a ser analisado e de certas propriedades da amostra, esse tempo de relaxação pode variar de alguns segundos a várias horas. Assim sendo, o tempo de relaxação, um processo exponencial, pode ser caracterizado por dois tipos diferentes de escalas temporais (Doyon, Cabanis et al. 2001).

1.5.11 Tempo de relaxação T_1

T_1 (longitudinal ou relaxação spin-eco) → A aplicação de pulsos de RF adiciona energia ao sistema e faz com que os núcleos mudem para um estado de maior excitação ou de maior energia. O processo de dissipação dessa energia no ambiente magnético desses núcleos e o seu retorno ao estado de mais baixa energia, é chamado de Tempo 1 de relaxação ou T_1 e corresponde ao tempo após o pulso de 90° em que o momento magnético longitudinal (ML) demora a atingir 63% do seu valor de equilíbrio (Meq), Figura 6, pág 33.

Como para se formar um espectro são necessárias várias ondas de RF, é imperativo que se espere um certo tempo de relaxação para que o próximo pulso seja eficiente; ou seja, deve-se aguardar um determinado T_1 , função de cada tipo de núcleo a ser analisado (Doyon, Cabanis et al. 2001).

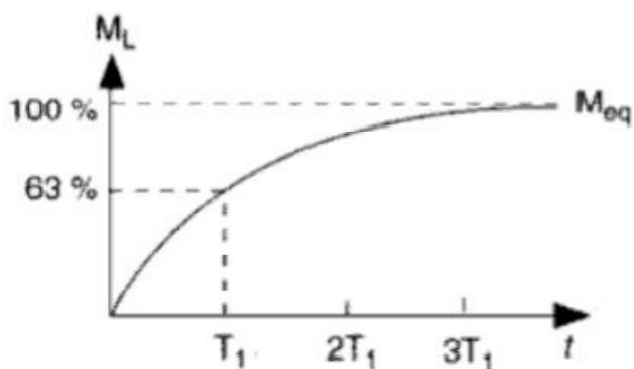


Figura 6 Evolução do momento magnético longitudinal (retirado de Doyon, Cabanis et al. 2001)

1.5.11.1 Determinação experimental do tempo de relaxação T_1

Em muitos casos práticos, é suficiente ter apenas uma estimativa dos tempos de relaxação para calcular os tempos ótimos experimentais para a amostra em questão. Nessas circunstâncias, o procedimento acima descrito é excessivamente elaborado uma vez que as moléculas contenham núcleos exibindo vários valores de T_1 , portanto números exatos serão de pouca utilidade neste experimento. Este método “rápido e sujo” é suficiente para fornecer estimativas de T_1 e faz uso da sequência de inversão-recuperação (*inversion recovery*). Idealmente a amostra em questão será suficientemente forte para permitir bastante poucos exames por valor, tornando todo o processo rápido de executar. A base desse método é o desaparecimento dos sinais quando a magnetização longitudinal na sua volta ao estado inicial passa através do plano x-y (no tempo τ_{nulo}), pois neste momento a diferença de população é zero ($M_t = 0$). A partir da equação abaixo, pode-se demonstrar que:

$$\tau_{nulo} = T_1 \ln 2$$

consequentemente

$$T_1 = \tau_{nulo} / \ln 2 = 1,443 \tau_{nulo}$$

O procedimento é realizar um experimento com $\tau=0$ e ajustar o espectro (fase) para ter uma absorção negativa. Depois de ter aguardado $>5T_1$, a experiência é repetida sequencialmente e cada repetição se aumenta gradativamente o τ . Para ajustar os espectros (correção de Fase) utiliza-se os mesmos valores dos ajustes de fase feitos quando $\tau=0$. A quantidade de repetições deve ser realizada até que o sinal passa pela condição nula (Figura 7, pág 34), definindo assim nulo, o que pode ser diferente para cada ressonância no espectro.

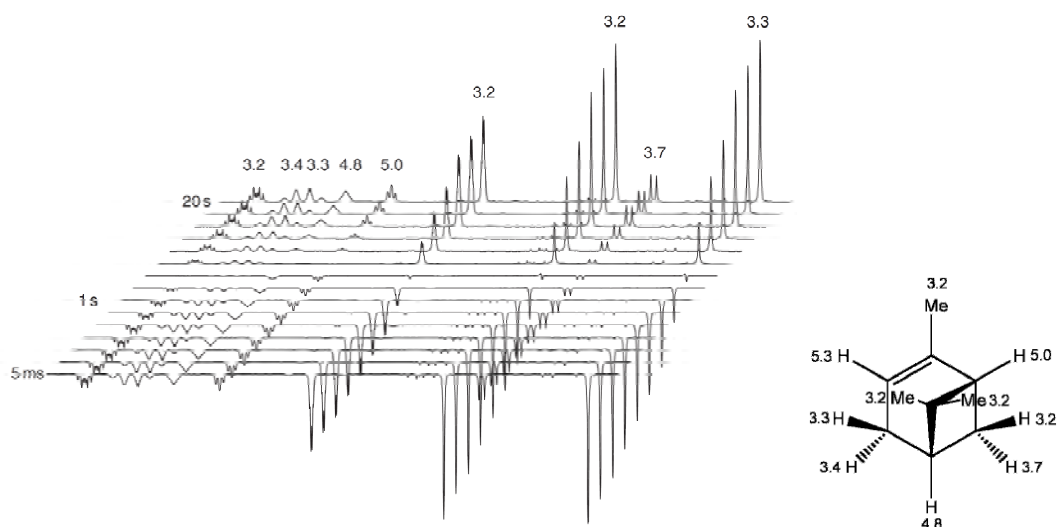


Figura 7 O experimento de recuperação e inversão realizado no α pineno em CDCl_3 (região dos alifáticos mostradas no espectro de ^1H). Tempo de recuperação entre 5ms a 20s.

Os erros podem ser introduzidos a partir de pulsos de 180° imprecisos, a partir de efeitos “fora-de-ressonância” e a partir de tempo espera insuficiente entre as aquisições, para o fato destes valores estimados não pode serem sobrevalorizado. (Claridge T. D. W., 2008)

O tempo de relaxação da análise é calculado pela fórmula:

$$3-5 T_1 = d_1 + aq$$

Onde:

T_1 é o maior tempo de relaxação longitudinal dos hidrogênios presentes na amostra

d_1 é o tempo de relaxação estipulado na análise

aq é o tempo de aquisição estipulado na análise

Segundo Pauli 2005, como o tempo de relaxação do hidrogênio é baixo em torno de 1,5s. Se considerarmos então que o T_1 do hidrogênio com maior tempo de relação longitudinal na amostra for 1,5 segundos a somatória dos valores do tempo de relaxação e o tempo de aquisição estipulados na análise tem que estar entre 4,5-7,5 segundos.

1.5.12 Tempo de relaxação T_2

T_2 (transversal ou relaxação spin-spin) → Cada núcleo tem um campo magnético próprio, que começa a desorganizar-se e a afetar os vizinhos, numa reação simultânea, após cada pulso de RF. Esta relação é chamada de Tempo 2 de relaxação ou T_2 e é o tempo após um pulso de 90° em que o momento magnético transversal (MT) demora a decair para 37% do seu valor de equilíbrio (M_{eq}), (Doyon, Cabanis et al. 2001), figura 3.6.

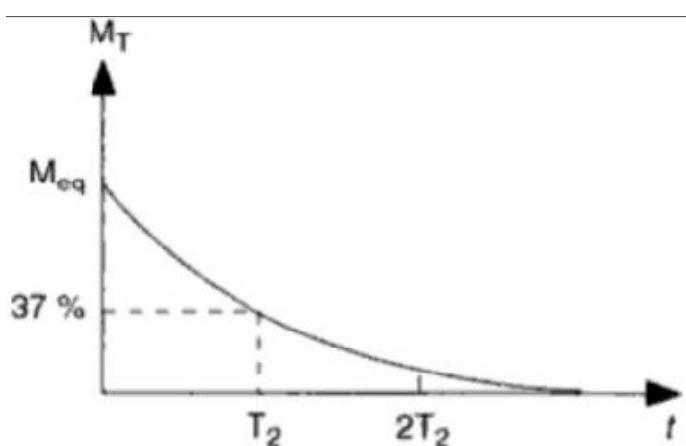


Figura 8 Evolução do momento magnético transversal (retirado de Doyon, Cabanis et al. 2001)

1.5.11 Comprimento ou largura do pulso

Quando um pulso de RF é enviado para a sonda de RMN, os efeitos sobre os núcleos da amostra dependem do nível de potência, da duração e direção do pulso.

O momento magnético associado a um núcleo excitado está alinhado com o campo magnético externo, B_0 , ao longo do eixo $+z$. Após o pulso de 90° , o momento magnético afastado deste eixo se estabelece no plano xy . O ângulo entre esta nova posição e o eixo $+z$ é chamado de ângulo do pulso. A largura do pulso e o ângulo do pulso são diretamente proporcionais. Se um pulso de 3 μseg move o momento magnético através 45° , o pulso de 6 μseg move o momento em 90° , para o plano xy . (Gunther H. 1995)

1.5.12 Tempo de aquisição

O tempo de aquisição é o tempo durante o decaimento idutivo livre. Este parâmetro é estabelecido por uma combinação entre janela espectral e o número de pontos solicitado. Para a maioria dos espectros de RMN de ^1H , o tempo de aquisição (aq) é selecionado para que a resolução espectral (aq^{-1}) seja $>0,25 \text{ Hz}$ (Pauli G., 2005)

Contudo, quando a complexidade das amostras aumenta, pode ocorrer sobreposição dos sinais de ressonância sendo um problema que limita e degrada facilmente a precisão da análise. Às vezes, alterando-se o tipo de solvente ou o valor do pH, uma separação de sinais pode ser alcançada (Campo del G., 2006).

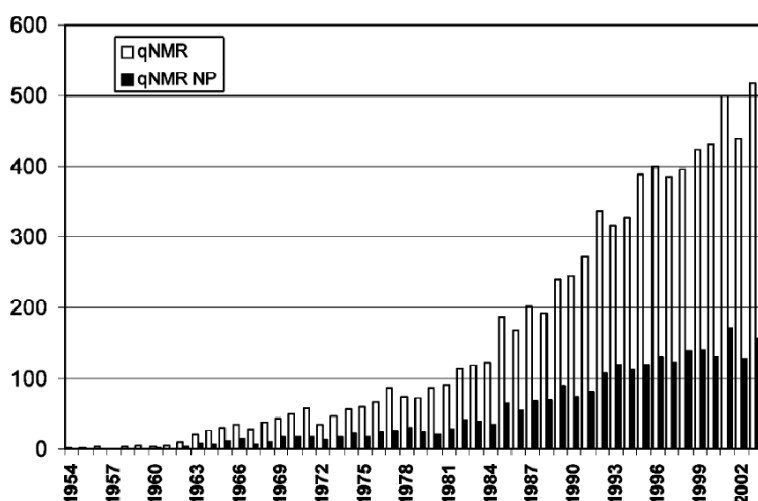


Figura 9 Número de publicações da RMN quantitativa (QRMN)

A figura acima se refere a quantidade de artigos publicados sobre a RMN quantitativa entre 1953 e 2003. Este numero foi observado pelo registro de publicações indexadas no ACS's Chemical Abstracts (quantidade total de publicações no período=7981). O subconjunto de publicações se refere aos produtos naturais e é representado por barras escuras (QRMN-NP), (quantidade de publicações=2610) e foi selecionado com base nas classes químicas de produtos naturais, bioquímica, química dos alimentos. (retirado de Pauli G., 2005).

1.6 Atribuição dos deslocamentos químicos das citocalasinas extraídas de fungos descritos na literatura.

A fim de criar um método específico de identificação e quantificação da citocalasina D na RMN de ^1H , é de suma importância que ao se caracterizar a região utilizada para este fim no espectro, se tenha a certeza que os sinais avaliados sejam da citocalasina D e não outra citocalasina. Como o fungo *Xylaria* sp. já foi previamente estudado se tem o conhecimento da existência da citocalasina D e de outros metabólitos, porém ao se tratar de outro de fungo não se pode afirmar a presença da citocalasina D apenas olhando na região específica. Portanto um estudo de outras citocalasinas presente na literatura é necessário para se ter a certeza de que o sinal utilizado para a quantificação não seja de outra.

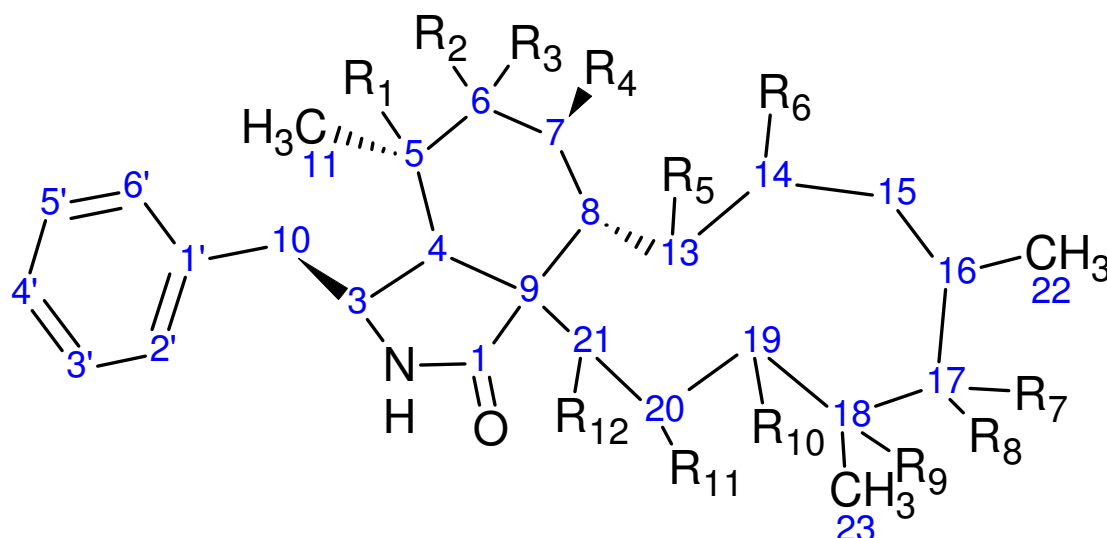


Figura 10 Esqueleto básico das citocalasinas 1-14

Tabela 1 Citocalasinas conhecidas de macrociclo com 11 carbonos e seus respectivos radicais

1	19, 20-epoxi-citocalasina R (Espada A., 1997)	$R_1=\text{H}$; $R_2=\text{CH}_3$; $R_3+R_4=\text{epóxido}$; $R_5+R_6=\text{epóxido}$; $R_7+R_8=\text{dupla O}$; $R_9=\text{OH}$; $R_{10}+R_{11}=\text{epóxido}$; $R_{12}=\text{OAc}$
2	18-desoxi-19, 20-epoxi-citocalasina R (Espada A., 1997)	$R_1=\text{H}$; $R_2=\text{CH}_3$; $R_3+R_4=\text{epóxido}$; $R_5+R_6=\text{epóxido}$; $R_7+R_8=\text{dupla O}$; $R_9=\text{H}$; $R_{10}+R_{11}=\text{epóxido}$; $R_{12}=\text{OAc}$
3	citocalasina R (Espada A., 1997)	$R_1=\text{H}$; $R_2=\text{CH}_3$; $R_3+R_4=\text{epóxido}$; $R_5+R_6=\text{epóxido}$; $R_7+R_8=\text{dupla O}$; $R_9=\text{OH}$; $R_{10}+R_{11}=\text{dupla lig}$; $R_{12}=\text{Oac}$
4	19, 20-epoxi-citocalasina Q (Espada A., 1997)	$R_1=\text{H}$; $R_2=\text{CH}_3$; $R_3+R_4=\text{epóxido}$; $R_5+R_6=\text{dupla lig}$; $R_7+R_8=\text{dupla O}$; $R_9=\text{H}$; $R_{10}+R_{11}=\text{epóxido}$; $R_{12}=\text{OAc}$
5	18-desoxi-19, 20-epoxi-citocalasina Q (Espada A., 1997)	$R_1=\text{H}$; $R_2=\text{CH}_3$; $R_3+R_4=\text{epóxido}$; $R_5+R_6=\text{dupla lig}$; $R_7+R_8=\text{dupla O}$; $R_9=\text{OH}$; $R_{10}+R_{11}=\text{epóxido}$; $R_{12}=\text{OAc}$

	A., 1997)	
6	citocalasina Q (Espada A., 1997)	R ₁ =H; R ₂ =CH ₃ ; R ₃ +R ₄ =epóxido; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ +R ₈ =dupla O; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =dupla lig; R ₁₂ =OAc
7	19, 20-epoxi-citocalasina N (Espada A., 1997)	R ₁ +R ₃ =epóxido; R ₂ =CH ₃ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ =dupla lig; R ₇ +R ₈ =dupla O; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =epóxido; R ₁₂ =OAc
8	19, 20-epoxi-citocalasina C (Espada A., 1997)	R ₁ +R ₃ =dupla lig; R ₂ =CH ₃ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ =dupla lig; R ₇ +R ₈ =dupla O; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =epóxido; R ₁₂ =OAc
9	19, 20-epoxi-citocalasina D (Espada A., 1997)	R ₁ =H; R ₂ +R ₃ =CH ₂ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ +R ₈ =dupla O; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =epóxido; R ₁₂ =OAc
10	fragiformina A (Stadler M., 2006)	R ₁ +R ₃ =dupla lig; R ₂ =CH ₃ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ =H; R ₈ =H ; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =dupla lig; R ₁₂ =dupla O
11	fragiformina B (Stadler M., 2006)	R ₁ =H; R ₂ +R ₃ =CH ₂ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ =H; R ₈ =H; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =dupla lig; R ₁₂ =dupla O
12	citocalasina H (Tao Y., 2008)	R ₁ =H; R ₂ +R ₃ =CH ₂ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ =H; R ₈ =H; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =dupla lig; R ₁₂ =OAc
13	desacetil-19, 20-epoxi-citocalasina C (Abate D., 1996)	R ₁ +R ₃ =dupla lig; R ₂ =CH ₃ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ +R ₈ =dupla O; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =epóxido; R ₁₂ =OH
14	citocalasina D (Cafeu M., 2005)	R ₁ =H; R ₂ +R ₃ =CH ₂ ; R ₄ =OH; R ₅ +R ₆ = dupla lig; R ₇ +R ₈ =dupla O; R ₉ =OH; R ₁₀ +R ₁₁ =dupla lig; R ₁₂ =OAc

Tabela 2 Dados de RMN de ¹H das citocalasinas 1-6 (400 MHz; CDCl₃)(J=Hz, δ PPM)

	1	2	4	5	6
NH	5,91 s	5,65 s	5,72 s	5,68 s	5,69 s
3	3,65 m	3,65 m	3,57 t (6,8)	3,57 dt (7,2; 1,8)	3,55 t (7,3)
4	2,26 dd (4,3; 2,9)	2,07 m	2,19 dd (5,3; 2,0)	2,10 m	2,08 dd (5,7; 2,3)
5	1,48 m	1,54 m	1,60 m	1,61 dq (7,3; 5,6)	1,69 dq (7,3; 5,7)
7	2,96 d (5,6)	3,01 d (5,1)	2,69 d (5,5)	2,71 d (5,7)	2,70 d (5,6)
8	1,38 dd (8,5; 5,6)	1,62 dd (7,1; 5,2)	2,31 dd (10,0; 5,6)	2,25 dq (8,7; 6,9)	2,50 dd (10,0; 5,6)
10	2,87 dd (13,5; 5,8) e 2,81 dd (13,5; 8,0)	2,90 dd (13,5; 4,8) e 2,69 m	2,82 d (7,3)	2,80 m	2,75 d (7,2)
11	0,83 d (7,3)	0,96 d (7,3)	0,83 d (7,4)	0,84 d (7,3)	0,96 d (7,3)
R2	1,20 s	1,26 s	1,16 s	1,18 s	1,16 s
13	3,62 dd (8,5; 1,8)	3,75 dd (7,0; 2,0)	6,01 dd (15,6; 10,0)	6,25 dd (15,3; 10,0)	5,81 dd (15,7; 10,0)
14	2,84 m	2,69 m	5,61 ddd (15,7; 10,8; 5,1)	5,54 ddd (15,7; 10,8; 5,1)	5,23 ddd (15,7; 10,8; 5,2)
15	2,23 ddd (15,2; 1,5; 1,5) e 1,75	2,07 m e 1,84 ddd (15,3;	2,60 ddd (2,9; 12,1; 10,1) e	2,47 dd (13,5; 11,3 10,8)	2,45 ddd (11,6; 11,1; 11,1) e 1,97

	ddd (15,2; 12,1; 9,7)	12,2; 6,8)	2,07 dd (12,9; 5,2)		ddt (13,0; 5,3; 1,0)
16	3,22m	2,86 m	3,19 ddq (12,1;6,7; 2,2)	2,96 (13,5; 6,5; 3,7)	2,71 m
17					
18		2,54 dq (8,9; 6,8)		2,25 dq (8,7; 6,9)	
19	3,33 d (1,7)	3,03 dd (7,2; 2,0)	3,14 d (2,0)	2,92 dd (8,7; 6,9)	6,06 dd (15,7; 2,5)
20	3,63 dd (2,0; 1,4)	3,89 dd (2,0; 1,4)	3,51 dd (2,0; 1,5)	3,53 dd (2; 0,8)	5,09 dd (15,7; 2,4)
21	5,58 s	5,45 s	5,62 s	5,54 s	5,77 dd (2,5; 2,4)
22	1,22 d (6,7)	1,15 d (6,9)	1,18 d (6,7)	1,11 d (6,9)	1,17 d (6,9)
23	1,57 s	1,28 d (6,7)	1,51 s	1,27 d (7,0)	1,47 s
R12	2,06	2,06 s	2,10 s	2,10 s	2,20 s
2' e 6'	7,33 m	7,35 m	7,34 m	7,34 m	7,31 m
3' e 5'	7,19 m	7,15 m	7,17 m	7,16 m	7,14 m
4'	7,26 m	7,15 m	7,17 m	7,16 m	7,24 m

Tabela 3 Dados de RMN de ^1H das citocalasinas 7-9 (400 MHz; CDCl_3), e das citocalasinas 10-11 (600 MHz; CDCl_3)(J=Hz, δ PPM).

	7	8	9	10	11
NH	5,71 s	5,56 s	5,46 s	5,63 s	5,49 s
3	3,58 m	3,33 dd (8,2; 6,7)	3,24 m	3,41 dt(1,1; 7,7)	3,30 m
4	2,55 d (2,4)	2,52 s	2,25 dd (5,2; 3,3)	3,64 s	3,35 dd (2,8; 5,8)
5			2,62 m		2,78 t (6,3)
7	3,49 dd (10,4; 1,5)	3,78 d (9,8)	3,81 d (10,1)	4,07 dd (1,1; 9,9)	4,09 dd (0,8; 10,2)
8	2,90 dd (10,7; 10,4)	2,26 dd (10,2; 9,8)	2,62 m)	2,10 t (10,2)	2,43 t (9,9)
10	3,05 dd (13,5; 5,4) e 2,89 dd (13,5; 7,9)	3,06 dd (13,5; 6,0) e 2,99 dd (13,5; 9,2)	2,85 dd (13,4; 5,0) e 2,73 dd (13,3; 9,1)	2,66 dd (7,7; 13,5) e 2,61 dd(7,7; 13,5)	2,72 dd (5,2; 13,5) e 2,51 dd (9,1; 13,5)
11	1,36 s	1,41 s	0,89 d (6,9)	1,2 s	1,02 d (6,9)
R2	1,19 s	1,65 s	5,27 s, 5,06 s	1,69 s	5,30 s e 5,10 s
13	6,06 dd (15,6; 10,7)	6,13 dd (15,7; 10,2)	5,89 (15,5; 9,8)	5,99 ddd (1,4; 10,2; 15,7)	5,84 ddd (1,4; 9,6; 15,4)
14	5,70 ddd (15,6; 10,8; 5,7)	5,70 ddd (15,8; 9,9; 6,1)	5,69 ddd (15,5; 9,9; 5,8)	5,22 ddd (4,9; 11,0; 15,7)	5,24 ddd (4,4; 11,0; 15,4)
15	2,61 ddd (12,0; 11,5; 10,8) e 2,09 dd (11,5; 5,7)	2,67 ddd (12,6; 10,1; 10,0) e 2,09 m	2,62 m e 2,09 m	2,05 dd (4,4; 12,9 e 1,89 dd(10,7; 12,9)	2,07 dd(4,7; 13,1) e 1,89 dt(11,0; 12,9)
16	3,19 m	3,22 ddq (10,8; 6,7; 1,2)	3,22 m	1,68 m	1,69 m

17				1,98 dd (2,8; 14,3) e 1,65 m	2,00 dd (2,8; 14,3) e 1,66 dd (3,9; 14,3)
19	3,15 d (1,9)	3,19 d (2,0)	3,14 d (1,9)	6,93 d (16,5)	6,82 d (16,5)
20	3,35 dd (1,9; 1,2)	3,43 dd (2,0; 0,8)	3,53 dd (1,9; 0,8)	6,80 d (16,5)	6,98 d (16,5)
21	5,50 s	5,74 s	5,51 s		
22	1,18 d (7,3)	1,18 d (6,7)	1,18 d (6,6)	1,09 d (6,9)	1,08 d (6,9)
23	1,51 s	1,50 s	1,53 s	1,42 s	1,39 s
R12	2,17 s	2,14 d	2,14 s		
2' e 6'	7,33 m	7,31 m	7,32 m	7,20 d (7,6)	7,14 d (7,4)
3' e 5'	7,19 m	7,19 m	7,15 m	7,33 t (7,7)	7,31 t (7,4)
4'	7,25 m	7,25 m	7, 24 m	7,25 t (7,4)	7,24 t (7,4)

Tabela 4 Dados de RMN de ^1H da citocalasina 12 (500 MHz; DMSO-d_6), da citocalasina 13 (400 MHz; CDCl_3 e da citocalasina 14 (500 MHz em DMSO-d_6) ($J=\text{Hz}$, δ PPM).

	12	13	14
NH	5,68 s		8,03
3	3,24 m	3,35 m	3,11 t
4	2,11 t	2,84 s	1,98 dd (5,5; 2,5)
5	2,76 m		2,49
7	3,81 d (11,0)	3,75 d (10)	3,57 d (10,0)
8	2,92 t	2,40 t (10)	2,69 dd (10,0; 10,0)
10	2,64 dd (8,5; 13,5) e 2,84 dd (4,5; 13,5)	2,96 dd (13; 6) e 2,88 dd (1; 8)	2,55 dd (13,0; 8,5) e 2,81 dd (13,0; 5,0)
11	0,97 d (6,5)	1,42 s e 1,43 s	0,39 d (6,5)
R2	5,09 s e 5,33 s	1,66 s e 1,67	4,81 s e 5,03 s
13	5,72 ddd (1,0; 10,5; 15,5)	5,98 dd (15,5; 10)	5,42 dd (15,0; 10,0)
14	5,38 m	5,65 ddd (15; 5; 10; 6)	5,08 ddd (15,0; 6,0; 10,0)
15	1,8 m e 2,03 m	2,09 ddd (12; 6; 2; 1) e 2,60 td (12; 10)	1,89 ddl (12,5; 4,5) e 2,15 m
16	1,77 m	3,21 dqd (12; 7; 2)	2,75 m
17	1,86 dd (3,0; 14,0) e 1,86 dd (3,0; 14,0)		
18			
19	5,84 dd (3,0; 13,5)	3,47 d (2)	5,12 dd (15,0; 2,0)
20	5,52 dd (2,5; 13,5)	3 31 m	5,86 dd (15,0; 2,0)
21	5,54 s	4 13 s	5,26 t (2,0)
22	1,03 d	1,19 d (7)	1,05 d (7,0)
23	1,32 s	1 56 s	1,38 s
R12	2,26 s		2,27 s
2' e 6'	7,13 d	7,20 m	7,15 d (7,0)
3' e 5'	7,31 dd	7,32 m	7,30 t (7,5)
4'	7,23 t	7,26 m	7,22 t (7,5)

Tabela 5 Dados de RMN de ^{13}C das citocalasinas 1-6 (100 MHz; CDCl_3) (δ ppm).

	1	2	3	4	5	6
1	174,1	172,2	174,1	174,2	174,5	174,4
3	54,9	54,8	54,3	54,4	54,3	54,0
4	52,5	51,9	50,9	51,3	50,9	50,6
5	36,6	36,6	36,8	36,7	36,6	36,8
6	55,9	55,8	55,7	57,2	57,1	57,0
7	61,3	59,5	61,2	62,4	65,4	62,5
8	43,6	42,0	43,9	44,7	44,5	45,1
9	53,4	52,8	54,1	54,4	53,9	55,0
10	43,7	45,3	45,9	45,8	45,8	45,9
11	12,5	13,6	12,5	12,4	12,6	12,5
R2	19,8	19,9	19,4	19,5	19,6	19,3
13	57,4	57,6	58,2	131,3	131,3	131,8
14	59,6	57,5	61,4	131,1	120,7	131,7
15	38,6	36,0	37,8	36,7	37,5	37,9
16	37,5	45,9	37,7	41,7	43,6	42,2
17	214,2	214,9	212,5	215,4	215,9	210,3
18	76,3	44,8	77,5	76,3	50,5	77,7
19	57,8	58,0	131,4	59,8	58,5	130,8
20	52,6	57,5	129,0	52,7	57,3	127,6
21	72,9	74,1	75,3	72,7	72,8	75,8
22	19,5	17,5	20,2	19,0	18,6	19,5
23	21,8	15,6	24,2	21,8	14,7	24,2
R12	169,4	169,8	169,5	169,8	170,0	170,6
R12'	20,5	20,4	20,6	20,6	20,5	20,7
1'	136,5	136,7	136,7	136,7	136,9	136,9
2' e 6'	129,2	129,1	129,0	129,2	129,1	129,1
3' e 5'	129,0	128,9	129,0	128,9	129,0	128,9
4'	127,2	127,3	127,2	127,1	127,1	127,3

Tabela 6 Dados de RMN de ^{13}C das citocalasinas 7-9 (100 MHz; CDCl_3), das citocalasinas 10-11 (150 MHz; CDCl_3), das citocalasinas 12 e 14 (125 MHz; DMSO-d_6)

	7	8	9	10	11	12	14
1	173,7	174,0	173,4	174,1	173,2	174,2	173,6
3	56,5	60,6	53,9	59,2	52,2	53,7	52,5
4	49,2	50,6	50,7	46,7	44,5	50,3	47,5
5	64,0	126,5	32,5	126,2	31,7	32,8	31,5
6	63,0	131,2	147,3	131,7	148,6	147,9	150,7
7	68,8	68,0	69,9	69,5	71,4	69,7	70,1
8	43,3	49,1	46,5	53,5	51,7	47,1	46,1
9	53,4	51,3	52,4	62,7	63,5	51,7	53,1
10	44,8	44,6	45,1	42,8	44,2	45,5	43,6
11	14,1	13,9	13,4	17,2	13,2	14,0	12,8

R2	19,5	17,1	114,4	14,0	114,2	114,0	111,5
13	130,3	133,8	131,1	126,8	126,4	127,1	130,8
14	135,0	131,6	133,4	139,0	139,3	138,6	131,6
15	37,6	37,3	37,4	43,0	42,9	42,7	37,9
16	41,7	41,8	41,8	28,8	29,0	28,4	41,4
17	215,1	215,2	215,2	54,3	54,2	53,7	209,9
18	76,3	76,2	76,3	75,2	75,1	74,2	77,4
19	59,5	59,8	59,6	156,1	154,3	125,9	126,9
20	52,7	53,0	52,7	129,7	130,4	138,1	132,1
21	72,5	71,9	74,0	196,0	195,8	77,4	76,4
22	19,1	19,1	19,1	26,6	26,6	26,4	19,2
23	21,7	21,8	21,8	30,2	30,5	31,1	24,5
R12	170,3	170,0	169,8			170,1	169,9
R12'	20,8	20,7	20,6			20,8	21,8
1'	136,7	137,4	137,1	137,3	137,2	137,3	137,1
2' e 6'	129,1	129,0	129,1	129,2	129,2	129,0	129,6
3' e 5'	129,1	128,9	128,9	128,8	128,8	128,9	128,3
4'	127,3	127,0	127,1	126,9	127,0	127,0	126,4

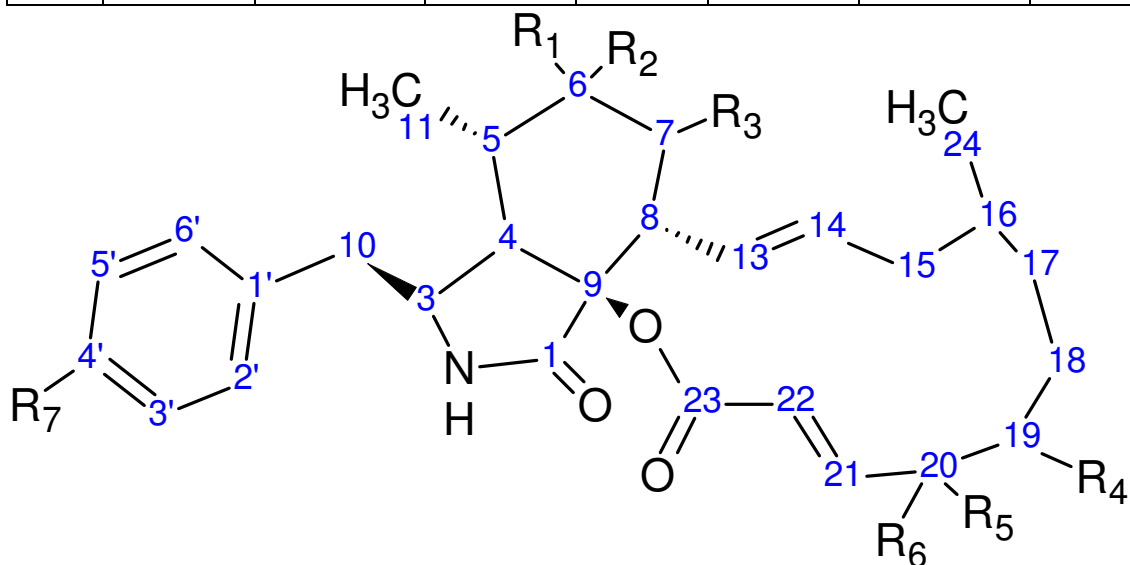


Figura 11 Esqueleto básico das citocalasinas 15-18

Tabela 7 Tabela referente as citocalasinas de macrociclo com 11 carbonos e seus respectivos radicais

15	Citocalasina Z1 (Evidente A., 2002)	$R_1=CH_3$; $R_2+R_3=\text{dupla lig}$; $R_4=R_5=H$; $R_6=CH_3$; $R_7=OH$
16	Citocalasina Z2 (Evidente A., 2002)	$R_1=CH_2OH$; $R_2+R_3=\text{dupla lig}$; $R_4=R_7=H$; $R_5=OH$; $R_6=CH_3$
17	Citocalasina Z3 (Evidente A., 2002)	$R_1+R_3=\text{dupla lig}$; $R_2=OH$; $R_4=R_6=R_7=H$; $R_5=OH$
18	Citocalasina B (Cafeu M., 2005)	$R_1+R_3=\text{dupla lig}$; $R_2=R_4=OH$; $R_5=R_6=R_7=H$

Tabela 8 Dados de RMN de ^1H a 500 MHz e ^{13}C a 125 MHz em CDCl_3 ($J=\text{Hz}$, δ PPM) das citocalasinas 15 e 16.

	15		16	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1		172,0		171,4
2	5,53 s		5,50 s	
3	3,06 ddd (10,4; 3,9; 3,6)	59,6	3,31 ddd (9,7; 4,1; 4,0)	55,9
4	2,70 dd(4,0; 3,9)	59,6	2,78 dd (4,0; 3,9)	51,2
5	2,81 m	34,5	3,06 m	33,8
6		140,2		143,1
7	5,38 s	124,2	5,64 s	127,1
8	3,20 d (10,2)	46,9	3,41 d (10,3)	45,6
9		86,1		86,4
10	2,92 ddd (13,4; 3,6) e 2,81 dd (13,4; 10,4)	43,0	2,91 dd (13,4; 4,1) e 2,88 dd (13,4; 9,7)	44,2
11	1,22 d (6,6)	14,2	1,31 d (7,3)	43,0
R1	1,77 s	19,9	4,15 s	63,5
13	5,87 ddd (14,4; 10,2; 1,8)	128,6	5,95 ddd (14,4; 10,3; 1,8)	127,9
14	5,35 ddd (14,4; 10,9; 3,7)	134,3	5,31 ddd (14,4; 10,7; 3,2)	143,1
15	2,12 d (13,8; 1,8) e 1,77 m	41,1	2,11 d (13,5; 1,8) e 1,77 m	41,2
16	1,41 m	31,3	1,41 m	33,0
17	1,60 m e 0,93 m	19,9	1,40 m e 0,92 m	34,6
18	1,19 m e 0,78 m	20,3	1,47 m e 0,73 m	20,4
19	1,73 m e 1,35 m	34,3	1,86 m e 1,67 m	34,7
20	2,28 m	34,1	4,47 m	71,3
21	7,17 ddd (15,6; 9,0; 6,5)	152,6	7,08 dd (15,7; 6,0)	151,7
22	5,69 d (15,6)	121,0	5,89 dd (15,7; 1,7)	119,7
23		165,1		164,8
Me-16	0,87 d (6,6)	20,3	0,87 d (6,6)	20,3
1'		129,6		137,7
2' e 6'	7,05 d (8,4)	130,2	7,18 d (7,4)	128,9
3' e 5'	6,77 d (8,4)	115,8	7,31 dd (7,4; 7,4)	129,1
4'		155,2	7,23 dd (7,4; 7,4)	126,9

Tabela 9 Dados de RMN de ^1H a 500 MHz e ^{13}C a 125 MHz ($J=\text{Hz}$, δ PPM) das citocalasinas 17 (CDCl_3) e 18 ($\text{DMSO}-d_6$).

	17		18	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1		171,1		170,7
2	5,55 s		8,2	
3	3,30 m	53,5	3,2	52,3
4	2,79 dd (4,0; 4,0)	49,4	2,68 (dd, 2,0; 5,5)	46,6
5	3,28 m	33,7	3,00 (m)	31,0

6		148,3		150,9
7	3,86 d (11,2)	68,5	3,61 (d, 10,5)	69,4
8	3,21 dd (11,2; 10,7)	49,8	3,2	47,5
9		83,1		83,3
10	2,90 dd (13,4; 9,6) e 2,84 dd (13,4; 4,5)	44,0	2,61 (dd, 13,5; 7,0) e 2,76 (dd, 13,5; 5,0)	42,8
11	1,11 d (6,6)	14,4	0,62 (d, 7,0)	13,2
R1	5,41 s e 5,18 s	114,6	4,89 (s) / 5,11 (s)	112,3
13	5,98 dd (14,7; 10,7)	126,5	5,81 (dd, 15,0; 10,0)	128,5
14	5,47 ddd (14,7; 10,9; 3,3)	138,0	5,03 (ddd, 15,0; 10,0; 3,5)	41,6
15	2,16 d (13,7) e 1,79 m	41,3	1,52 (m) / 2,01 (m)	41,6
16	1,33 m	31,9	1,16 (m)	32,9
17	1,64 m e 0,79 m	30,7	0,49 (m) / 1,64 (m)	34,9
18	1,88 m e 1,33 m	37,7	1,34 (m) / 1,20 (m)	20,0
19	3,71 m	71,9	1,43 (m) / 1,77 (m)	34,4
20	2,74 m e 2,25 ddd (8,6; 8,4; 8,4)	42,7	4,36 (m)	68,6
21	7,03 ddd (15,6; 8,4; 8,4)	146,8	6,76 (dd, 15,5; 4,0)	153,3
22	5,75 d (15,6)	122,7	5,70 (dd, 15,5; 1,5)	118,1
23		164,4		164,1
Me-16	0,92 d (6,6)	20,4	0,82 (d, 6,5)	20,3
1'		137,5		137,0
2' e 6'	7,17 d (7,2)	129,1	7,09 (d, 7,0)	129,6
3' e 5'	7,32 dd (7,2; 7,2)	129,0	7,26 (t, 7,5)	128,2
4'	7,24 dd (7,2; 7,2)	127,1	7,17 (t, 7,5)	126,4

2.1 Objetivos e Justificativa

Objetivo

- Produção, extração e quantificação por RMN de ^1H da citocalasina D, produzida pelo endófito *Xylaria sp.*, em meio sólido (Milho)
- Viabilizar a produção deste metabólito para fins comerciais
- Quantificação por RMN de ^1H

Justificativa

As razões da escolha da Citocalasina D

- a necessidade de produção nacional.
- ação citostática (inibição divisão celular)
- inibe a síntese protéica
- Entre outras
- alto valor agregado; 1mg, US\$ 217-295 (Crescent Chemical Co. Inc, ChromaDex, Inc)
- Utilizada em pesquisas

3. Parte experimental

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Equipamentos

Balança analítica Explorer OHAUS®

Câmara de fluxo laminar- NUAIRE II, A/B3

Autoclave Vertical Phenxis

Evaporador rotatório Buechi

Computador Petium 4 2,8GHz 512 RAM

Microondas Panasonic Family

Varian INOVA-500AS 11.8 Tesla 500 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C

3.1.2 Reagentes

PDA - Potato Dextrose Agar Becton, Dickinson Company Lote 3007967

Clorofórmio Deuterado Merck

Canjica Machiara 100% Milho Branco Degerminado lote 0102

Água ultra pura

Acetato de etila P.A A.C.S Synth pureza 99,5% lote 63812

Éter Etílico P.A A.C.S Synth pureza 99,5% lote 62557

Álcool isopropílico P.A A.C.S Synth pureza 99,5% lote 75236

Antraceno Synth pureza 99,9%

3.2 Microorganismo e preparação do inóculo

O fungo *Xylaria* sp, isolado de folhas de *P. marcgravii*, esta preservado em água estéril* em geladeira comum, no Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Para um crescimento inicial do fungo, foi utilizada a técnica de inoculação em meio sólido nas placas de Petri cujo meio de cultura foi composto por Batata Dextrose e Agar 39 g/l de água, até que suas hifas atingissem 2-3 cm de diâmetro, com duração

de 7 a 10 dias. Foram utilizadas 8 placas de Petri sendo que , nenhuma foi descartada por contaminação.

* O isolamento, purificação e preservação deste, bem como a primeira triagem do extrato bruto, foram realizados pelos professores: Geraldo Humberto Silve e Helder Lopes Teles, durante seus trabalhos de doutorado.

A linhagem obtida a partir dessa técnica foi avaliada quanto à pureza, através da aparência uniforme das placas, sendo utilizadas assim na etapa seguinte.

Numa segunda etapa do cultivo, em Erlenmeyers de 500, mL foi adicionado 100g canjica e 90g de água. Após este procedimento o meio foi submetido a um processo de autoclavagem por um período 45 minutos uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos.

Tendo-se completado o preparo do meio de cultura, foram inoculadas nos frascos amostras puras obtidas das placas de Petri, e que foram mantidos em temperatura ambiente por um período de 21 dias.

Após esse período, feita análise dos frascos a olho nu, observou-se um total crescimento dos micélios (hifas), sendo esse resultado esperado para tal etapa do estudo em questão é quesito necessário para prosseguir a próxima etapa.

A próxima etapa deste estudo, visou a homogeneização das amostras, etapa essa, essencial para as etapas de extração do fungo *Xylaria* sp.. Esvaziou-se todos os frascos, depositando as amostras e seus meios de cultura em um recipiente maior, onde foram misturadas com uma espátula, formando assim a mistura homogênea esperada. Após homogeneização da mistura, alíquotas de 90,0 g foram separadas para realização das respectivas extrações em triplicata descritas abaixo.

3.3 Obtenção do extrato bruto produzido por *Xylaria* sp.

As extrações do micélio, foram realizadas baseadas em um planejamento fatorial utilizando-se de um gráfico ternário. Em cada vértice do gráfico foi selecionado um tipo de solvente, acetato de etila, éter etílico e álcool isopropílico. Após a escolha dos solventes, foram selecionados 10 pontos no gráfico, a fim tornar a metodologia de extração a mais representativa possível.

As combinações das extrações selecionadas estão relacionadas abaixo:

100% Acetato de Etila

100% Éter Etílico

100% Álcool Isopropílico

50% Acetato de Etila/ 50% Éter Etílico

50% Acetato de Etila/50% Álcool Isopropílico

50% Álcool Isopropílico/ 50% Éter Etílico

80% Acetato de Etila/ 10% Éter Etílico/ 10% Álcool Isopropílico

80% Éter Etílico/ 10% Acetato de Etila/ 10% Álcool Isopropílico

80% Álcool Isopropílico/ 10% Éter Etílico/ 10% Acetato de Etila

O micélio foi sonificado por 20 minutos. e extraído com 3 x 125 mL de cada mistura extratora.

Após a extração citada foram geradas 30 amostras do extrato bruto que foram analisadas pela técnica de RMN de ^1H (Figura 12, pág 50).

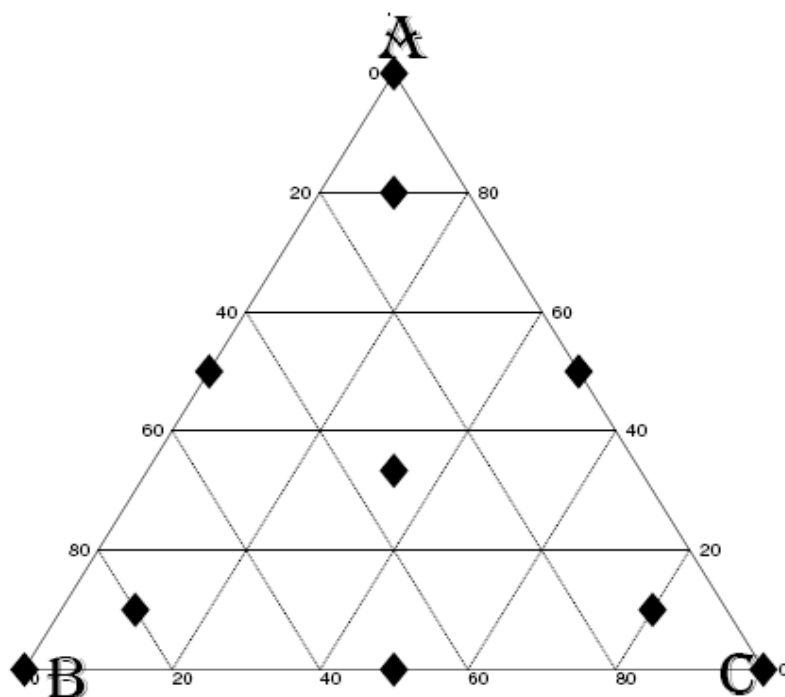


Figura 12 Gráfico ternário com os respectivos pontos utilizados na extração

Figura 13. Fluxograma de extração do fungo *Xylaria sp.*

3.4. Análise dos extratos brutos por RMN de ^1H

As 30 amostras foram analisadas e preparadas como se mostra a seguir :à 30-50 mg de extrato bruto foram adicionados 650 μL de CDCl_3 e 50 μL de CDCl_3 contendo 1 mg de antraceno. O antraceno foi usado como padrão interno para fazer as análises quantitativas.

Os espectros foram obtidos a 303 K, sem a rotação da amostra, com 64 k pontos, e uma largura de pulso de 45° . Trinta e duas varreduras foram feitas com uma janela espectral de 9650 Hz, tempo de aquisição de 4s e tempo de relaxação de 1s. Resultando em um tempo de análise de 2 minutos e 43 segundos para cada amostra.

Os espectros de RMN foram processados usando o software MATLAB com o MATNMR toolbox*. Foi usada a transformada de Fourier e a fase foi manualmente corrigida. A região de integração foi manualmente selecionada e o valor foi

comparado ao valor de integração dos sinais do padrão interno, permitindo uma análise quantitativa das amostras.

* <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/21436>

3.5. Tratamento dos Resíduos químicos

O material fúngico (micélio) e os caldos de cultura residuais dos crescimentos foram autoclavados a 121° C por 15 minutos e depois descartados no lixo comum e na pia, respectivamente. Os solventes orgânicos, recuperados nas partições, extrações e demais procedimentos, foram tratados conforme as normas e os procedimentos descritos no site www.iq.unesp.br.

4. Resultados e Discussão

Para efetuar a quantificação de uma determinada substância em um extrato bruto utilizando o método de $^{\text{RMN de } ^1\text{H}}$, deve-se primeiramente ter conhecimento dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da substância a ser quantificada, neste caso específico a citocalasina D (Figura 14, pág 54).

A citocalasina D foi isolada e teve sua estrutura identificada pela Dra. Mariana Carrara Cafeu durante seu trabalho de mestrado.

Nesta etapa do trabalho foi necessário confirmar a estrutura e atribuir os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios em clorofórmio deuterado, a fim de selecionar o sinal de hidrogênio mais adequado. Sendo assim, foram realizadas análises de RMN de ^1H e HMQC. Com base nestes experimentos pôde-se obter o deslocamento de cada hidrogênio e carbono da citocalasina D, e suas multiplicidades, os quais estão apresentados na

Tabela 10 (pág 55).

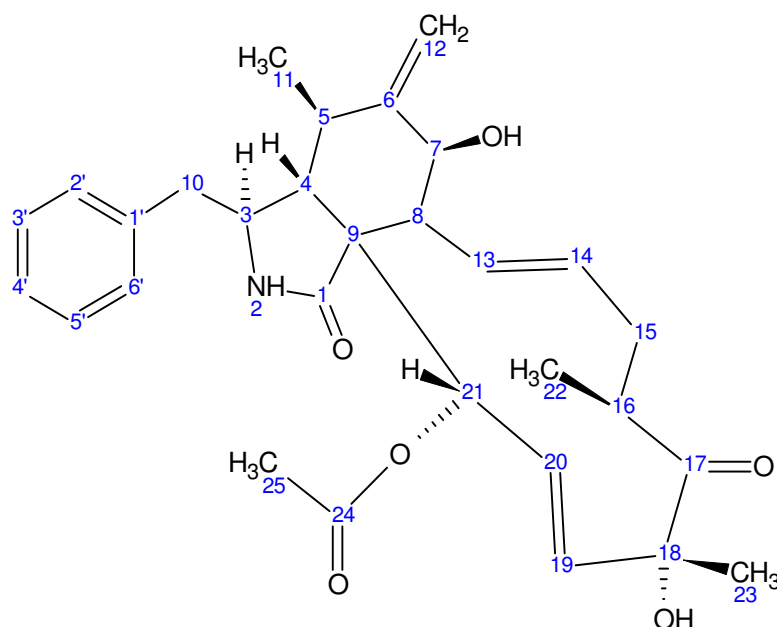


Figura 14. Citocalasina D

Pos ição	^1H	Multiplicidade	^{13}C
1	-		
2	8,57	s	-
3	3,26	t	53,2
4	2,86	dd, 5,5; 2,5	47,0
5	2,75	s	33,2
6	-		145,7
7	3,84	d, 10,0	70,0
8	2,70	d, 10,0	
9	-	-	53,1
10	2,86	dd, 13,0; 8,5	
11	0,90	d, 6,5	14,0
12	5,33	s	114,3
	5,12	s	
13	5,73	dd, 15,0; 10,0	133,0
14	5,36	ddd, 15,0; 6,0; 10,0	133,9
15	2,05	ddl, 12,5; 4,5	37,9
	2,52	m	
16	2,76	m	42,2
17	-	-	

18	-	-	77,4
19	5,84	dd, 15,0; 2,0	132,0
20	6,15	dd, 15,0; 2,0	127,3
21	5,67	t, 2,0	77,0
22	1,23	d, 7,0	19,3
23	1,54	s	23,8
24	-	-	
25	2,28	s	20,5
1'	-	-	
2' e			
6'	7,16	d, 7,0	129,0
3' e			
5'	7,34	t, 7,5	128,7
4'	7,29	t, 7,5	127,0

Tabela 10 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da citocalasina D em 500 MHz em CDCl_3 ($J=\text{Hz}$, δ PPM)

Com tais informações, foi realizada uma pré-seleção dos melhores sinais em RMN de ^1H para proceder à quantificação. Estes devem estar bem resolvidos não se sobrepondo a outros sinais. Neste caso uma expansão das regiões do espectro da citocalasina D mostrou quais são, à primeira vista, os sinais de melhor resolução.

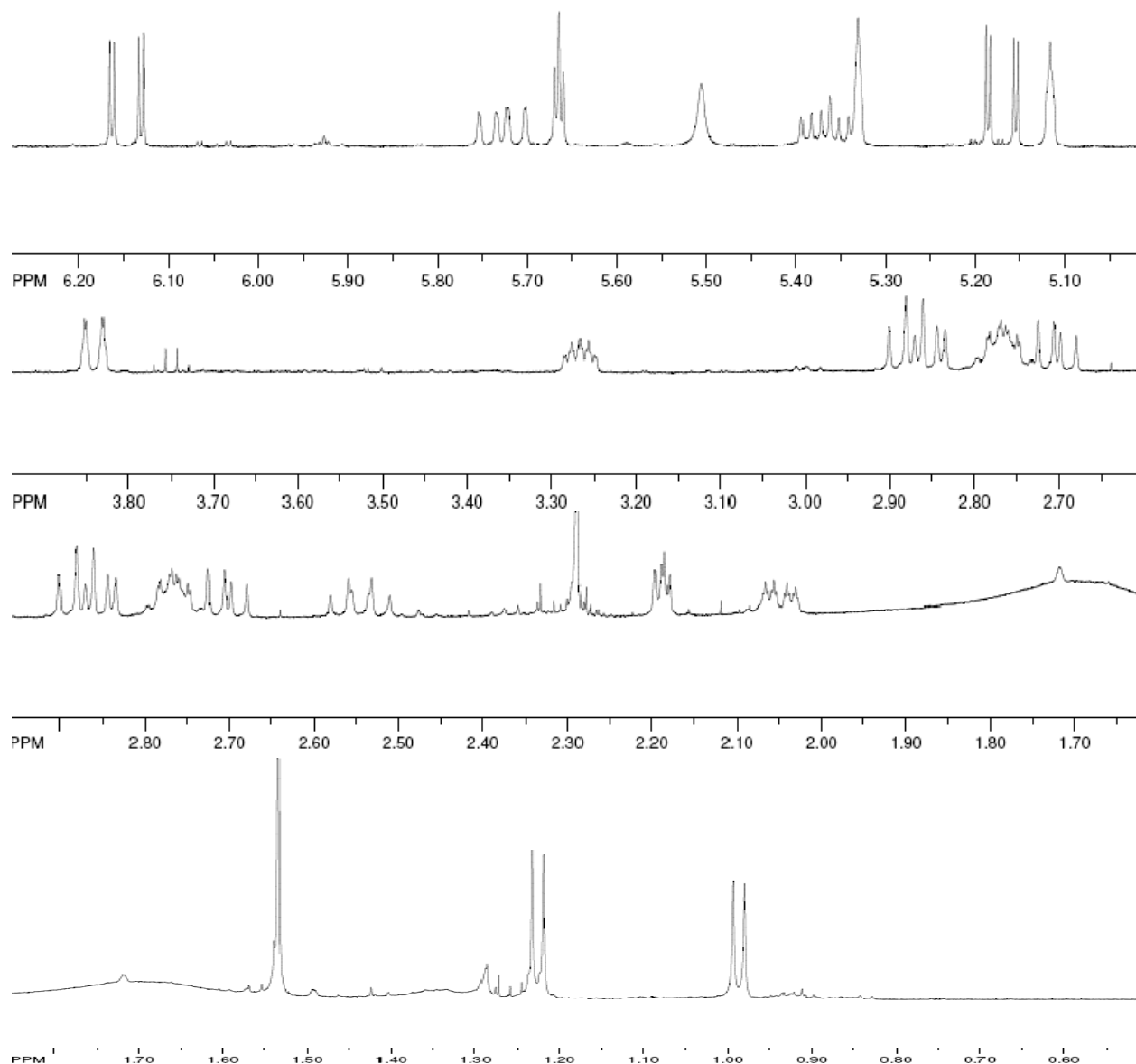


Figura 15 Regiões expandidas do espectro de RMN de ^1H 500 MHz da citocalasina D

Analisando o espectro de RMN de ^1H da citocalasina D, foi possível observar que ao se quantificar esta substância pura, a maioria dos sinais poderiam ser utilizados para este fim. No entanto, como a quantificação foi realizada no extrato bruto, foi necessária uma avaliação do espectro de RMN de ^1H da mistura como um todo. Caso um hidrogênio da amostra em análise tenha o deslocamento químico semelhante a uma outra substância na mistura, ocorre sobreposição dos picos

havendo necessidade de se escolher um outro sinal para proceder aos cálculos de quantificação.

Para uma análise de RMN de ^1H se tornar quantitativa, vários cuidados precisam ser tomados, em especial o uso do padrão interno, pois, é esse o padrão que servirá como referência, para que a área de um de seus sinais seja comparada com a área dos sinais a serem quantificados. O padrão interno pode ser qualquer substância desde que quando analisada, os deslocamentos químicos dos seus hidrogênios não coincidam com os do analito. Quanto menos sinais o padrão interno possuir melhor, pois assim acarretará em uma menor interferência nas outras regiões do espectro.

Para este trabalho o antraceno (Figura 16, pág 58) foi utilizado como referência, ou seja, o padrão interno. Ao observar o antraceno este possui três diferentes tipos de hidrogênios resultando em apenas três sinais no espectro de RMN de ^1H (Tabela 11), um singleto referente a dois hidrogênios, dois multipletos referentes a quatro hidrogênios cada um. Outro fator relevante para a escolha do antraceno como padrão interno inclui o fato de que os deslocamentos químicos dos seus hidrogênios ocorrem em uma região muito limpa do espectro RMN, em torno de 7,5-8,5 ppm, tendo assim poucos interferentes.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H do antraceno em mistura com a citocalasina D, foi possível atribuir os sinais do antraceno aos seus respectivos hidrogênios, como pode ser visualizado na Tabela abaixo.

Tabela 11. Deslocamento químico dos Hidrogênios do antraceno

Posição	^1H	Multiplicidade
1;6;12;13	7,5	m
2;5;11;14	8,04	m
3;4;8;9		-
7;10	8,56	s

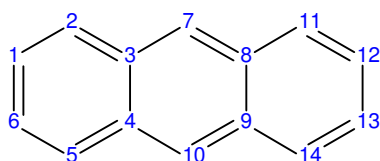


Figura 16. Antraceno

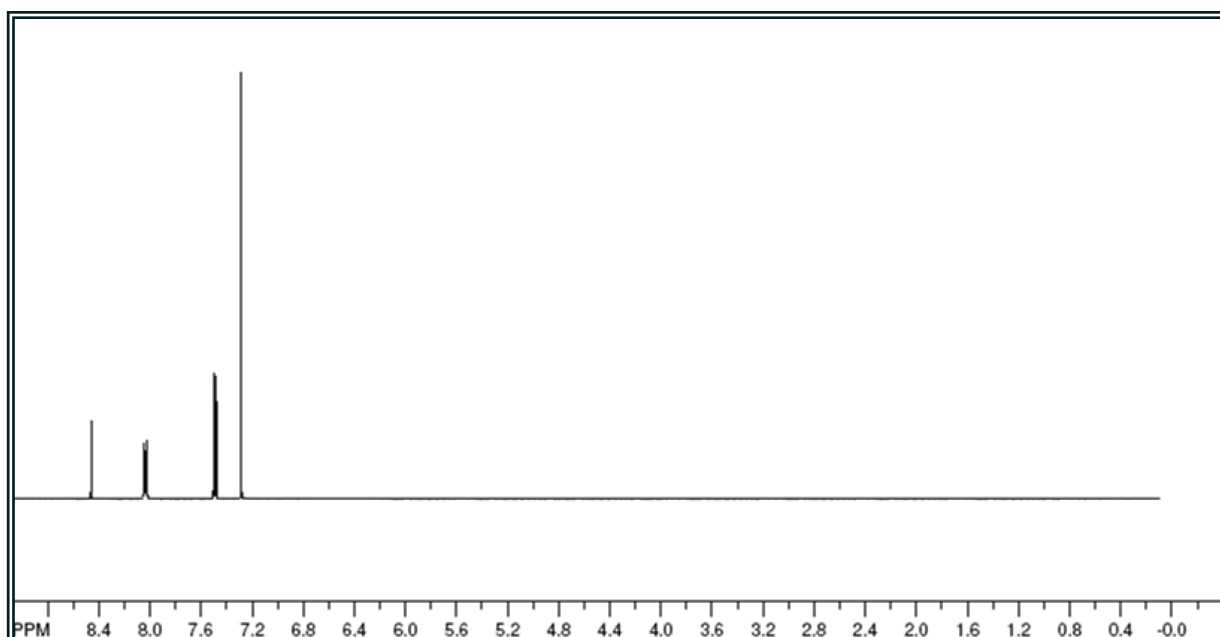


Figura 17 Espectro RMN de ^1H 500 MHz 1mg de antracenoem CDCl_3

Foi realizada uma análise por RMN de ^1H da citocalasina D com o padrão interno (antraceno) para poder observar o comportamento dos sinais das duas substâncias. Analizando-se o espectro Figura 18, pág 59, verifica-se que os três sinais em 7,5; 8,0 e 8,5 ppm são do padrão interno, o restante dos sinais, da citocalasina D, comprovando que nesse sistema o antraceno pode ser usado sem maiores problemas na quantificação da citocalasina D pura, pois não foi observado sobreposição de sinais do analito.

No entanto, no caso da quantificação de uma determinada substância no extrato bruto, deve-se lembrar que o antraceno só pode ser utilizado como padrão interno, se não ocorrer sobreposição com sinais de outras substâncias presentes no extrato bruto.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da citocalasina D com o padrão interno antraceno, em CDCl_3

4.1. Discussão dos dados de RMN de ^1H dos extratos brutos

Os extratos obtidos utilizando diferentes sistemas de extração foram analisados conforme descrito na metodologia e seus sinais foram avaliados para se obter um sinal ideal para a quantificação da citocalasina D.

O método mais fácil para obter essa resposta foi, a sobreposição dos espectros do extrato bruto com o espectro da citocalasina D, ambos contendo 1 mg do padrão interno com a altura do seu singleto normalizada para valor de $y=1$.

Abaixo, visualiza-se a região ampliada das sobreposições dos espectros. O espectro superior é referente ao extrato bruto obtido da extração com éter etílico, e o inferior, referente ao da citocalasina D.

Figura 19. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 0-2 ppm

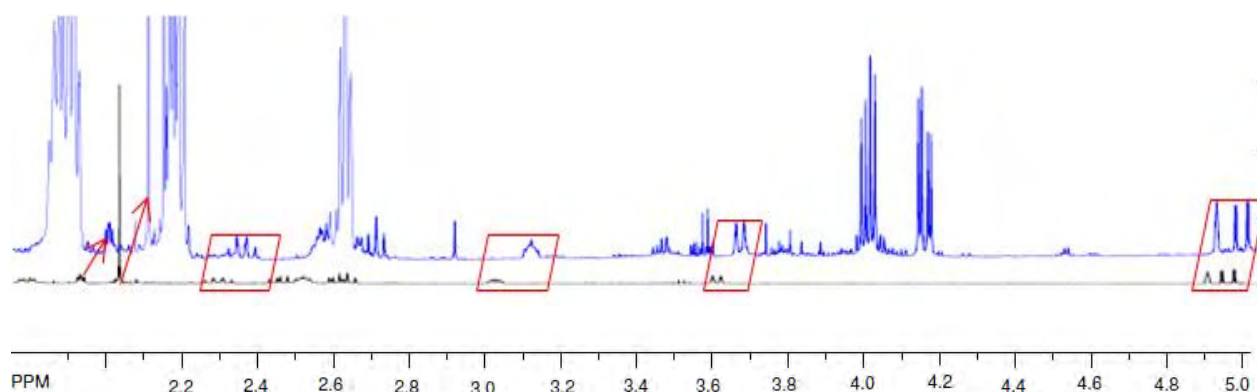


Figura 20. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 2-5 ppm

Observa-se na região de 2-5 ppm (observar os contornos vermelhos), que ocorreu também um leve deslocamento dos sinais, apesar disto, todos podem ser usados para fins quantitativos. No entanto, sugere-se que antes da seleção do sinal a ser utilizado, avalie-se outros aspectos, especialmente a intensidade do sinal, pois quanto mais intenso menor o erro. Portanto, os sinais em 3,6 ppm e os três sinais em torno de 5,0 ppm são os melhores, pois estão bem resolvidos.

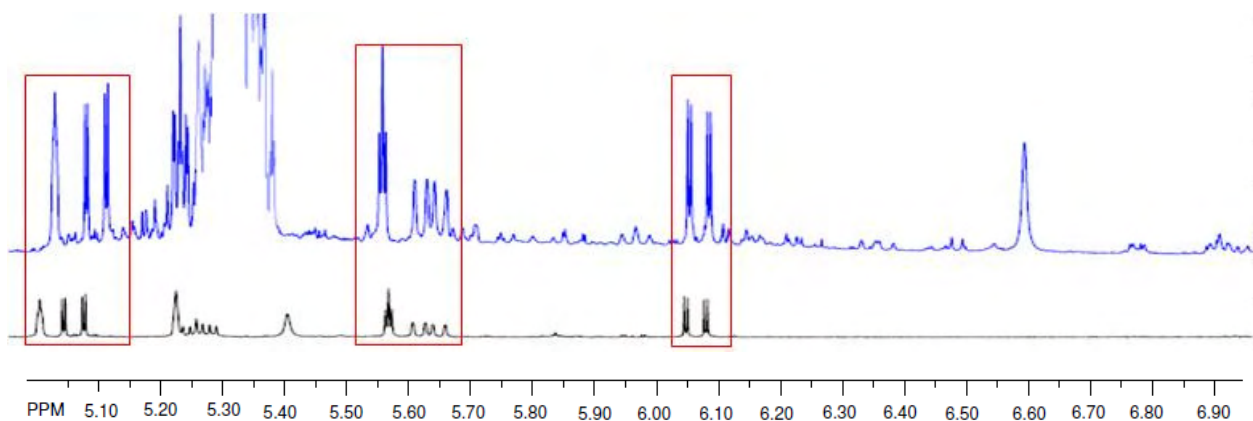


Figura 21. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 5-7 ppm pode-se observar o duplo dubleto em 6,05 ppm bem resolvido e que foi utilizado na quantificação da citocalasina D

Na região entre 5-7 ppm, como discutido anteriormente, os sinais ao redor de 5,60 adicionalmente aos em 6,05 ppm podem ser utilizados para fins quantitativos pois estão bem resolvidos e intensos.

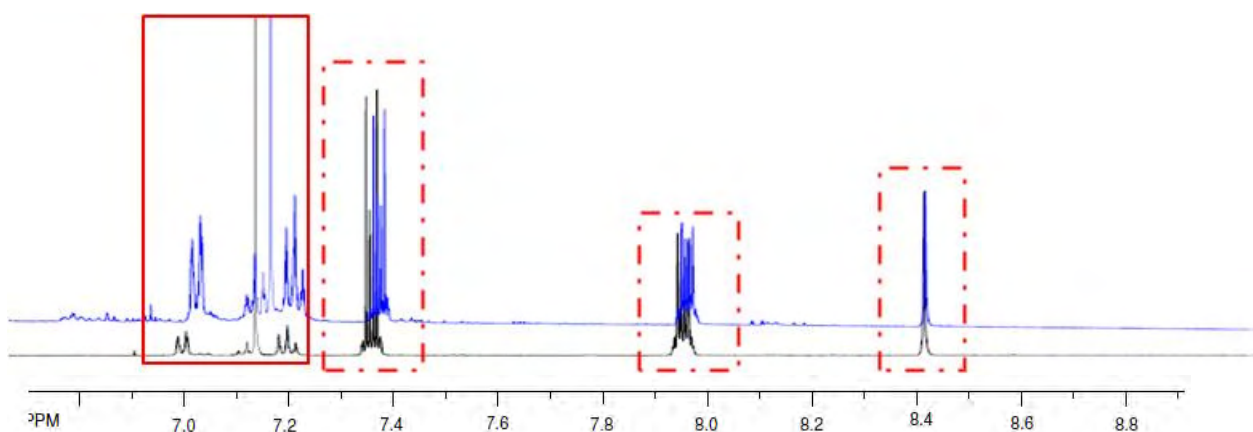


Figura 22. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do extrato bruto obtido pela extração com éter etílico (superior) com a citocalasina D (inferior), região de 5-7 ppm. Nesta região pode-se observar os sinais do padrão interno, o antraceno, em 7,35; 7,95 e 8,4 ppm.

Na região em campo baixo do espectro de RMN de ^1H , observam-se os três sinais do antraceno (tracejado em vermelho), que não interferem por não se sobreporem aos sinais dos hidrogênios aromáticos em 7-7,2 ppm da citocalasina D.

Finalizando a interpretação do espectro de RMN de ^1H da citocalasina D e do extrato bruto, contendo o padrão interno antraceno, e levando-se em conta, outros sinais das citocalasinas encontrados na literatura, temos subsídios para uma seleção de sinais a serem utilizados na quantificação.

Estas análises permitiram selecionar o sinal em 6,15 ppm, atribuído ao hidrogênio olefínico HC-20, para a quantificação da citocalasina. Este sinal apresenta-se como um duplo dubleto ($J = 15,0; 2,0$ Hz). Dentre as citocalasinas listadas, apenas uma, a 19,20-epoxi-citocalasina C (Espada A., 1997), apresentou o deslocamento químico semelhante a citocalasina D; um duplo dubleto em 6,13 ppm.

Porém, as constantes de acoplamento desta citocalasina diferem totalmente da citocalasina D, sendo $J = 15,7$ e $10,2$ Hz.

4.2 Tempo de análise

Um aspecto importante para realizar uma quantificação é o tempo de análise, que varia com o tempo de aquisição, de relaxamento e do número de *varredura*. O tempo de aquisição, é o tempo pelo qual a ocorre o decaimento livre induzido. O tempo de relaxação é o intervalo entre os pulsos eletromagnéticos que se relaciona com a capacidade de cada hidrogênio voltar a seu estado inicial, após a etapa de

aquisição do sinal. O número de varreduras ou transientes, é a quantidade de ciclos de pulsos eletromagnéticos pelos quais a amostra será submetida.

Há uma relação direta entre o tempo de análise e cada variável, se esta aumenta o tempo também aumenta (Tabela 3).

Tabela 12 Tempo de análise de RMN de ^1H com tempo de aquisição fixado em 4 segundos, variando tempo de relaxação (d_1) em segundos e numero de varreduras. (nt)

	nt 32	64	128	256	512	1024
d1(seg)						
1	2'43"	5'27"	10'54"	21'48"	43'37"	1h27'
2	3'15"	6'31"	13'02"	26'04"	52'09"	1h44"
3	3'47"	7'35"	15'10"	30'20"	1h41'	2h01'22"
4	4'19"	8'39"	17'18"	34'36"	1h09'13"	2h18'26"
5	4'51"	9'43"	19'26"	38'52"	1h17'45"	2h35'30"
6	5'23"	10'47"	21'34"	43'08"	1h26'17"	2h52'34"
7	5'55"	11'51"	23'42"	47'24"	1h34'49"	3h09'38"
8	6'27"	12'55"	25'50"	51'40"	1h43'21"	3h26'42"
9	6'59"	13'59"	27'58"	55'56"	1h51'53"	3h43'46"
10	7'31"	15'09"	30'06"	1h00'12"	2h00'25"	4h00'50"

De acordo com Pauli 2005, o tempo de relaxação T_1 para os hidrogênios dificilmente ultrapassa 1,5s. Como não houve conhecimento suficiente da técnica de recuperação e inversão em que se determina experimentalmente T_1 , adotou-se então o valor estipulado por Pauli.

Pela formula citada anteriormente temos que:

$$3-5 T_1 = d_1 + aq$$

Substituindo os valores

$$4,5-7,5 = d_1 + aq$$

Portando uma combinação entre o tempo de relaxação e o tempo de aquisição deve ficar em torno de 4,5s a 7,5s. Como o tempo de aquisição foi de 4s o tempo de relaxação poderia variar de 0,5s a 2,5s. Como 0,5s é um tempo relativamente pequeno e não confiável para que todos os hidrogênios voltem ao seu estado inicial estipulamos então que d_1 tenha valor de 1s tendo assim o tempo de

análise mínimo listado na tabela em 2 minutos e 43 segundos. Isso deve-se ao fato, de que o tempo de relaxação de todos os hidrogênios de todas as substâncias presentes no extrato bruto serem muito baixo. Esse fato é constatado, pois após um ciclo de pulsos eletromagnéticos todos os hidrogênios voltam rapidamente ao estado inicial.

O número de varreduras está relacionado com a massa das substâncias presentes na análise do extrato bruto. Quanto maior a massa, maior o número de hidrogênios presentes, diminuindo assim a quantidade de varreduras necessária para estabelecer a relação ruído-sinal, que por sua vez é usada para a quantificação.

4.3.1 Interpretação dos resultados obtidos

Considerando todas as discussões realizadas até o presente momento, iniciamos então a dissertação dos resultados obtidos. A Figura 23, pág 63 representa a sobreposição dos sinais da citocalasina D que foram usados para a quantificação. Após análise da região que compreende os hidrogênios olefínicos utilizados para quantificação, observa-se que, quanto maior o sinal maior a massa do analito presente na análise.

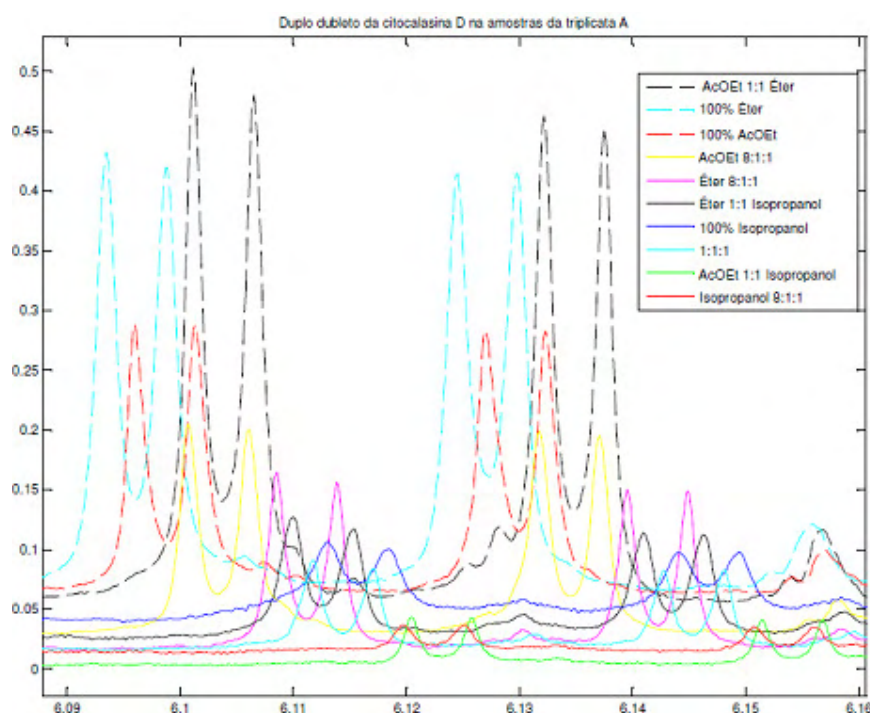


Figura 23 Sobreposição dos sinais de RMN de ^1H do duplo duplete olefínico referente ao C-20.

Os cálculos para obtenção dos valores a serem analisados foram feitos conforme listado abaixo. Cada espectro de hidrogênio foi individualmente analisado, o sinal do padrão interno (antraceno) usado como referência foi o singlete em 8,5 ppm.

4.3.2 Quantificação da citocalasina D. Cálculo para obter a massa de citocalasina na quantidade de massa que foi enviada para RMN

A quantificação de uma substância a partir dos experimentos de RMN de ^1H exige conhecimento do número de hidrogênios que contribui para o sinal que será utilizado no cálculo quantitativo. O mesmo procedimento foi adotado para o padrão interno.

O primeiro passo, é obter o valor da massa equivalente (ME), a qual nos permite fazer uma relação direta entre a massa da substância e a massa do padrão interno, está relacionada com a massa molecular e com a quantidade de hidrogênios presentes no sinal a ser quantificado. Temos então:

ME= (MM/Nº de hidrogênios do sinal), onde MM é a massa molecular.

A partir da massa equivalente pode-se então relacionar diretamente a área do sinal do analito e a área do sinal do padrão interno. Temos então:

$$(A_x \times ME_x / mg_x) = (A_{is} \times ME_{is} / mg_{is}),$$

A massa da substância (mg_x) e a massa do padrão interno (mg_{is}) (do inglês, internal standard) são, então, relacionadas por:

Onde, A_x e A_{is} , correspondem respectivamente a área espectral do analito e do padrão, e ME_x e ME_{is} correspondem respectivamente a massa equivalente do analito e do padrão interno.

Para cada sinal, durante a integração manual, o ruído (S/R) foi visualizado, e a razão entre sinal e ruído S/R menor que 5 não foi inclusa nos dados de análise quantitativa. Para a quantificação da citocalasina D utilizando esse método de análise nenhum sinal precisou ser descartado quanto à relação descrita acima.

Para a quantificação da citocalasina D usando o padrão interno antraceno temos a seguinte relação:

$$A_{\text{citD}} * MM_{\text{citD}} / (mg_{\text{citD}} * n^{\circ} H_{\text{citD}}) = A_{\text{is}} * MM_{\text{is}} / mg_{\text{is}} * n^{\circ} H_{\text{is}}$$

$$A_{\text{citD}} * 507,6 / (mg_{\text{citD}} * 1) = A_{\text{is}} * 178,3 / 1 * 2$$

$$mg_{\text{citD}} = (A_{\text{citD}} / A_{\text{is}}) * 5,69$$

Onde: mg_{citD} é a massa de citocalasina D na massa de extrato enviada para análise, e A_{citD} é a área obtida da integração do duplo dubleto; A_{is} é a área do sinal do padrão interno.

Portanto através da relação direta entre as áreas do sinal do antraceno e do sinal da citocalasina multiplicada por uma constante obtém a massa de citocalasina D na amostra que foi enviada para a análise.

4.3.3 Cálculo para o teor

$$\text{Teor} = (mg_{\text{citD}} / m_{\text{p/ RMN}}) * 100$$

Onde $m_{\text{p/ RMN}}$ é a massa de extrato bruto enviada para análise de RMN H.

4.3.4 Cálculo para total de citocalasina D presente no extrato bruto

$$\text{Total} = (\text{teor} * m_{\text{extrato}}) / 100$$

Tabela 13 .Valores das variáveis em cada replicata obtidos através dos cálculos de quantificação.

Replicata A	A	I	E	A 8	I 8	AE	IA	EI	E 8	AEI
m extrato(mg)	83,10	637,80	52,40	142,60	587,20	73,70	459,70	399,40	188,30	330,80
Teor(%)	9,68	1,64	12,47	5,74	1,36	12,90	1,20	2,78	3,92	2,14
Cit D(mg)	8,05	10,49	6,53	8,19	8,00	9,51	5,49	11,09	7,39	7,07
Replicata B	A	I	E	A 8:1:1	I 8:1:1	A 1:1 E	I 1:1 A	E 1:1 I	E 8:1:1	A,E,I 1:1:1
m extrato	77,60	619,50	70,90	149,20	546,60	73,20	449,10	415,30	211,60	343,30
teor	10,54	1,62	13,74	5,84	1,32	12,77	1,20	2,37	4,18	2,09
total	8,18	10,04	9,74	8,71	7,22	9,34	5,39	9,85	8,85	7,17
Replicata C	A	I	E	A 8:1:1	I 8:1:1	A 1:1 E	I 1:1 A	E 1:1 I	E 8:1:1	A,E,I 1:1:1
m extrato	83,20	620,90	68,10	161,00	564,50	99,40	373,50	379,20	194,20	335,00
teor	9,99	1,50	12,01	5,96	1,34	12,51	1,24	2,24	4,00	2,02
total	8,31	9,34	8,18	9,59	7,54	12,43	4,63	8,48	7,77	6,77

A=100% AcOEt; I=100% iPrOH; E=100% Et₂O; A 8=80% AcOEt, 10% iPrOH e 10% Et₂O, I 8=80% iPrOH, 10% AcOEt e 10% Et₂O; AE=50% AcOEt e 50% Et₂O; IA= 50% iPrOH e 50% AcOEt; E 8=80% Et₂O, 10% iPrOH e 10% AcOEt, A,E,I 1:1:1 33% AcOEt, 33% Et₂O e 33% iPrOH.

A média dos valores foi calculada, assim como o desvio padrão, para cada dado resultante na tabela abaixo.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Figura 24 Fórmula para o cálculo do desvio padrão.

Tabela 14 Valores médios das variáveis analisadas com os respectivos desvios padrão

Média	A	I	E	A 8	I 8
m extrato(mg)	81,3±3,2	626,0±10,1	63,8±9,9	150,9±9,3	566,1±20,3
Teor (%)	10,07±0,43	1,59±0,07	12,74±0,90	5,84±0,11	1,34±0,02
Total (mg)	8,18±0,13	9,95±0,58	8,15±1,60	8,83±0,71	7,59±0,39
Custo(U\$/mg)	0,37	0,29	0,78	0,38	0,43
Média	A E	I A	E I	E 8	A,E,I
m extrato(mg)	82,1±14,9	427,4±47,0	397,9±18,0	198,0±12,1	336,3±6,3
Teor (%)	12,72±0,20	1,21±0,02	2,46±0,28	4,04±0,13	2,08±0,06
Total (mg)	10,43±1,74	5,17±0,47	9,81±1,30	8,00±0,76	7,00±0,21
Custo(U\$/mg)	0,45	0,57	0,47	0,71	0,58

A=100% AcOEt; I=100% iPrOH; E=100% Et₂O; A 8=80% AcOEt, 10% iPrOH e 10% Et₂O, I 8=80% iPrOH, 10% AcOEt e 10% Et₂O; AE=50% AcOEt e 50% Et₂O; IA= 50% iPrOH e 50% AcOEt; E 8=80% Et₂O, 10% iPrOH e 10% AcOEt, A,E,I 33% AcOEt, 33% Et₂O e 33% iPrOH.

4.3.5 Cálculo do custo de solvente para extração de 1mg de citocalasina D.

O custo do processo é o valor necessário para extração de 1mg de citocalasina D do cultivo em milho. Este valor baseia-se no custo da quantidade total de solvente usado para cada extração, que foi de 375ml (tabela 6).

$$\text{Custo} = \frac{(\% \text{Acetato de etila} * 8,09 + \% \text{Isopropanol} * 7,66 + \% \text{Éter etílico} * 17,02) * 0,375}{\text{total de citocalasina D} * 100}$$

Tabela 15 Valor do litro de cada solvente P. A. (1U\$=R\$2,35; 16/12/2008)

Solvente	Valor R\$	Valor U\$
Acetato de		
Etila	19,00	8,09
Isopropanol	18,00	7,66
Éter Etílico	40,00	17,02

Para uma melhor visualização dos dados, estes foram plotados em um gráfico ternário com ajuda do software MATLAB e do toolbox Ternary plot* resultando em uma superfície de reposta. Foram criados quatro gráficos (figura 13 a 16) sendo cada um com uma informação relevante sobre uma variável que foi determinada.

*<http://www.mathworks.de/matlabcentral/fileexchange/2299>

4.4 Rendimento do extrato bruto

Ao observarmos os valores das quantidades totais de massa obtida na extração, nota-se que quanto maior a porcentagem de Álcool isopropílico na mistura de solventes, maior a massa de extrato bruto, resultando em 626,0 mg para este solvente puro. Isso deve-se ao fato deste solvente ter extraído as substâncias mais polares do meio, como por exemplo, os açúcares provenientes do milho. O Diminuindo a quantidade do solvente mais polar, no caso o isopropanol, os açúcares presentes no milho deixam de ser extraídos e o rendimento do extrato bruto é menor, o que é comprovado pelo RMN de ^1H .

Quanto aos solventes Acetato de etila e Éter etílico e suas respectivas misturas, houve um menor rendimento de aproximadamente 100mg, fato explicado facilmente pela ausência dessas substâncias mais polares nos extratos.

Portanto, ao analisar o rendimento das massas do extrato bruto, o álcool isopropílico foi o solvente que teve um maior rendimento, mas esta variável não

pode ser isoladamente analisada para se ter uma conclusão sobre o melhor solvente.

Uma análise mais detalhada dos outros gráficos resultou em maiores fundamentos para selecionar o solvente.

4.5. Teor

Outro parâmetro que foi analisado é o teor, que consiste na porcentagem da citocalasina D no extrato bruto, e está relacionado com a seletividade. Quanto maior o teor da substância no extrato bruto menor a quantidade de interferentes, facilitando assim uma possível etapa de purificação e isolamento. Uma análise detalhada dos dados permite dizer onde a proporção de Éter etílico e Acetato de etila é de 1:1 o teor se mostrou mais expressivo, acima de 12%. Este fato vem a reforçar o fato de que a região de maior teor é aquela que há menor porcentagem de isopropanol na mistura.

4.6. Quantidade total de citocalasina D extraída

A Quantidade total de citocalasina D extraída se refere-se a capacidade do solvente extrator retirar a substância do meio de cultura. Quanto maior esse valor mais solúvel a citocalasina D é nessas condições de extração. Para se avaliar a quantidade total de citocalasina D extraída do extrato obtido do cultivo em milho, levou-se em conta o rendimento do extrato bruto e o teor.

Observando-se os dados, conclui-se que, há dois pontos de maior quantidade e um ponto de menor quantidade da substância presente. No ponto de acetato de etila e éter etílico 1:1 houve a maior extração, em torno de 10mg de citocalasina D. No ponto de isopropanol e acetato de etila 1:1 também houve uma alta quantidade extraída, em torno de 9 mg. No ponto de Acetato de etila e isopropanol 1:1 ocorreu a menor quantidade da substância extraída do milho cultivado, próxima de 5mg.

Conclui-se que para os solventes puros, não ocorreu uma eficiência tão boa quanto a comparada com as suas misturas.

4.7. Custo do solvente para a extração de 1mg de citocalasina D

O custo para a extração de 1mg de Citocalasina D foi baseado no total da substância presente no extrato bruto e o preço de cada solvente. No ponto que

compreende 100% de Éter etílico houve o maior custo, perto de U\$ 0,75. Este valor é devido ao alto preço desse solvente quando comparado aos demais, aliado a uma pouca eficiência na extração da citocalasina D. Nos vértices inferiores do triângulo, que compreende os solventes puros, isopropanol e Acetato de etila, houve um menor custo de extração entre de U\$0,30-0,35. Portanto, levando-se apenas em consideração os custos dos solventes, pode-se dizer que o Acetato de etila e o isopropanol tornam a extração economicamente viável.

No entanto outros aspectos devem ser levados em consideração, tais como: o teor, a toxicidade e inclusive o ponto de ebulição dos solventes, o qual dispensa gasto de energia para ser reciclado (destilação).

5. Conclusão

Pode-se concluir que através do método de quantificação por RMN de ^1H foi possível quantificar a citocalasina D presente no extrato bruto. Este método foi rápido tendo como tempo de análise de 2min e 43seg para cada amostra. Teve uma boa sensibilidade para a citocalasina D, detectando a substância na ordem de 0,0001 g. Quanto à preparação da amostra necessitou apenas de uma simples diluição do extrato bruto sem a necessidade de realizar uma etapa clean up, poupando tempo, esforço e dinheiro. O único empecilho para esta técnica não ter sido altamente difundida, é o custo do aparelho de RMN que ainda é alto frente aos outros equipamentos que possam realizar esta análise.

Com base na extração, houve a necessidade da escolha de um melhor solvente, para isto levou-se em conta o rendimento do extrato bruto, o teor da substância, a quantidade total extraída e o custo de extração de 1mg da citocalasina D. Também foi levando em conta futuras etapas de isolamento e purificação da substância. Para este fim o Acetato de etila foi eleito como o melhor solvente.

Referências

ABATE, D.; ABRAHAM, W.; MEYER, H. Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1443-1448, 1997.

ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher fungi .Serpenone, 3-Methoxy-4-Methyl-5-Prop-1-Enylfuran-2(5H)-One. A new Gamma-Butyrolactone from the fungus Hypoxylon-Serpens (Barrons Strain) (Persoon Ex Fries) Kickx. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions**, v. 1, n.1, p. 215-221, 1982.

ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher fungi . 3-Methyl-3,4-Dihydroisocoumarins and related compounds from the Ascomycete family Xylariaceae. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions**, v.1, n. 9, p. 2185-2192, 1983.

ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L.; POYSER, J. P.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher fungi .The punctaporonins - novel bi-cyclic, tri-cyclic, and tetra-cyclic sesquiterpenes related to caryophyllene, from the fungus *Poronia punctata* (Linnaeus, Fries). **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions**, v. 1, n. 4, p. 823-831, 1988.

ANDRADE, S. F. **Avaliação das atividades analgésicas, antiinflamatórias, antiúlcera, antifertilidade e antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* do extrato bruto, frações e substância isolada das cascas do caule de *Austroplenckia populnea* (Reiss) Lund (celastracea)**. 2005. 125 f. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991.

BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D. ; FARNSWORTH, N. R. **Human medicinal agents from plants**. Washington, DC: American Chemical Society, 1993.

BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BAEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, D. J. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, v.102, p. 944-948, 1998.

BILLS, G. F. Analyses of microfungal diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, v. 73, p. S33-S41, 1995.

BLOCH, F.; HANSEN, W. W.; PACKARD, M. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 69, p. 127-131, 1946.

BUTLER, M. S.; CLARDY, J. CR377 a new pentakide antifungi agente isolated from endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.10, p. 1447-1448, 2004.

CAFÊU, M. C. **Substâncias bioativas produzidas por *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii***. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

CLARIDGE, T.D.W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2008.

CAMPO, G.; BERREGI, I.; CARACENA, R.; SANTOS, I. J. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, p. 462-468, 2006.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry part II: techniques for the study of biological structure and function**. San Francisco: W. H. Freeman, 1980.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves - from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

COLE, R. J.; SCHWEIKERT, M. A. (Ed.). **Handbook of secondary fungal metabolites**. London: Academic Press, 2003. v. 1, cap. 3, p. 245-349.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **Journal Cell Biology**, v. 105, p. 1473-1478, 1987.

COX, R. H.; CUTLER, H. G.; HURD, R. E.; COLE, R. J. Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the conformation of cytochalasin H derivatives and plant growth regulating effects of cytochalasins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 31, p. 405-408, 1983.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of microbe. **Biothechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.

DOMBROWSKI, A. W.; BILLS, G. F.; SABNIS, G.; KOUPAL, L. R.; MEYER, R.; ONDEYKA, J. G.; GIACOBBE, R. A.; MONAGHAN, R. L.; LINGHAM, R. B. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. I. The producing organism and its fermentation. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, p. 671-678, 1992.

DOYON, D.; CABANIS, E. A. **IRM: imagerie par résonance magnétique**. 4 éd. Paris: Masson, 2001.

ECKSCHIMIDT, M.; BRIZOLA, M.; TARRAGÁ, D. P.; PALERMO NETO, J. Is monofluoroacetic acid the active neurotoxic principle in *Palicourea marcgravii*. St. Hill. leaves. **Brazilian Journal of Medical an Biological Research**, v. 22, n. 8, p 975-978, 1989.

EDWARDS, R. L.; MAITLAND, D. J.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher Fungi .24. cytochalasin-N, cytochalasin-O, cytochalasin-P, cytochalasin-Q, and cytochalasin-R - new cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola*. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, n.1, p. 57-65, 1989.

EDWARDS, R. L.; EDWARDS, V.; FAWCETT, D. J.; MAITLAND, R.; NETTLETON, L.; SHIELDS, A.; WHALLEY, J. S. Hypoxyxylone a novel green pigment from the fungus *Hypoxylon fragiforme* (Pers.: Fries) Kickx. **Journal of the Chemical Society: Chemical Communications**, v. 15, p. 1009-1010, 1991.

ELLENHORN, M. J.; BARCELOUX, D. G. **Medical toxicology**: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Science Publishing, 1988.

EMSLEY, J. W.; FEENEY, J. Milestones in the first fifty years of NMR. **Program of Nuclear Magnetic Resonance Spectrom**, v. 28, p. 1-9, 1995.

ESPADA, A.; RIVERA-SAGREDO, A.; FUENTE, J. M.; HUESO-RODRIGUEZ, J. A.; ELSON, S. W. New Cytochalasins from the Fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6485-6492, 1997.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; MOTTA, A. Cytochalasins Z1, Z2 and Z3, three 24-oxa[14]cytochalasins produced by *Pyrenophora semeniperda*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 45-53, 2002.

GUNTHER, H. **Nmr spectroscopy**: basic principles, cConcepts, and applications in chemistry. Chichester: John Willey, 1995.

GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994.

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.

HADLE, A.; MYERS, A. An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p.12048-12053, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, Dec. 2001.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 709-711, Dec. 2003.

LINGHAM, R. B.; HSU, A.; SILVERMAN, K. C.; BILLS, G. F.; DOMBROWSKI, A.; GOLDMAN, M. E.; DARKE, P. L.; HUANG, L.; KOCH, G. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. III. Biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, p. 686-691, 1992.

MANIARA, G.; RAJAMOORTHY, K.; RAJAN, S.; STOCKTON, G. W. Method performance and validation for quantitative analysis by ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4921-4928, 1998.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.

MILLER, J. D. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 321-324, 2001.

MILLER, J. D.; TRENHOLMS, H. L. **Mycotoxins in grain**: compounds other than aflatoxin. Minnesota: Eagan Press, 1991.

MOORE, J.; ZOURIDAKIS, G. **Biomedical technology and devices handbook**. New York: CRC Press; 2004.

NAGASAWA, H.; NAGURA, F.; MOHAMAD, S. B.; UTO, Y.; ZHU, J. W.; TSUKUDA, T.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y.; HORI, H. Apoptosis induction in HCT116 cells by cytochalasins isolated from the fungus *Daldinia vernicosa*. **Phytomedicine**, v. 6, p. 403-409, 2000.

ONDEYKA, J.; HENSENS, O. D.; ZINK, D.; BALL, R.; LINGHAM, R. B.; BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; GOETZ, M. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. II. Isolation and structure. **Journal of Antibiotics**, v. 45, p. 679-685, 1992.

ORNELLES, D. Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. **Molecular Cellular Biology**, v. 6, p.1650-1662, 1986.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, p.133-149, 2005.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991. p. 179-197.

PFENNING, L. H. **Introdução à micologia**. Lavras: Ed. UFLA, 2000.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TANTICHAROENA, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 1341-1344, 2005.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; ISAKA, M.; SRIKL, K. Cytotoxic metabolites from the wood-decayed fungus *Xylaria sp.* BCC 9653. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1647-1648, 2007.

PURCELL, E. M.; TORREY, H. C.; POUND, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, v. 69, p. 37-38, 1946.

SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas**. São Paulo: Sarvier, 1979.

SHOOLERY, J. N. The development of experimental and analytical high resolution NMR. **Program of Nuclear Magnetic Resonance Spectrom**, v. 28, p. 37-52, 1995.

STADLER, M.; QUANG, D. N.; TOMITA, A.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Changes in secondary metabolism during stomatal ontogeny of *Hypoxylon fragiforme*. **Mycological Research**, v. 110, p. 811-820, 2006.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

SZANTAY, C.; DEMETE, A.; GOROG, S. **Identification and determination of impurities in drugs**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 109-145.

TAO, Y.; ZENG, X.; MOU, C.; LI, J.; CAI, X.; SHE, Z.; ZHOUB, S.; LINA, Y. ¹H and ¹³C NMR assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 46, p. 501-505, 2008.

UDAGAWA, T.; YUAN, J.; PANIGRAHY, D.; CHANG, Y. H.; SHAH, J.; D'AMATO, R. J. Cytochalasin E, an epoxide containing *Arpergillius* derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, p. 421-427, 2000.

XU, Q.; SACHS, J. R.; WANG, T.; SCHAEFER, W. H. Quantification and identification of components in solution mixtures from 1D Proton NMR spectra using singular value decomposition. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7175-7185, 2006.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 12, p. 1692-1695, 2000.

WHALLEY, A. J. S. The xylariaceous way of life. **Mycological Research**, v. 100, p. 897-922, 1996.

WHALLEY, A. J. S.; EDWARDS, R. L. Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, v. 73, p. S802-S810, 1995.

Referências consultadas

- ALUM, M. F.; SHAW, P. A.; SWEATMAN, B. C.; UBHI, B. K.; HASELDEN, J. N.; CONNOR, S. C. 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacetate (DSA), a promising universal internal standard for NMR-based metabolic profiling studies of biofluids, including blood plasma and serum. **Metabolomics**, v. 4, p. 122-127, 2008.
- BANDEIRA, K. F.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. da S.; CAVALHEIRO, A. J. Optimisation of conditions for the extraction of casearins from *Casearia sylvestris* using response surface methodology. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 168-175, 2006.
- BEEK, J. D. matNMR: a flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in MATLAB. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 187, p. 19-26, 2007.
- BRUIJNS, R. H. J.; BULT, H. Effects of local cytochalasin D delivery on smooth muscle cell migration and on collar-induced intimal hyperplasia in the rabbit carotid artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, p. 473-483, 2001.
- BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T.; TAKAOKA, S.; NAN, Y.; ASAKA, Y. A 10-phenyl-[II]-cytochalasan from a species of daldinia. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 173-176, 1996.
- BURTON, I. W.; QUILLIAM, M. A.; WALTER, J. A. Quantitative ^1H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 3123-3131, 2005.
- CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. da S.; ARAÚJO, A. R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G.; BOCCHI, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 110-119, 2007.
- CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; PERRY, N. B.; BURGESS, E. J.; REDMOND, W. A.; PORTER, N. G. Extraction of chili, black pepper, and ginger with near-critical CO_2 , propane, and dimethyl ether: analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 4853-4860, 2003.
- CIRONI, P.; ALVAREZ, M. A.; ALBERICIO, F. ^1H NMR spectroscopy with internal and external standards for the quantification of libraries. **Molecular Diversity**, v. 6, p. 165-168, 2003.
- DAGNINO, D.; SCHRIPSEMAB, J. ^1H NMR quantification in very dilute toxin solutions: application to anatoxin-a analysis. **Toxicon**, v. 46, p. 236-240, 2005.

DUQUESNOY, E.; CASTOLA, V.; CASANOVA, J. Triterpenes in the hexane extract of leaves of *olea europaea* L.: analysis using ^{13}C -NMR spectroscopy. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 347-353, 2007.

DUQUESNOY, E.; CASTOLA, V.; CASANOVA, J. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 893-902, 2008.

ELNASHAIE, S.; UHLIG, F. **Numerical techniques for chemical and biological engineers using MATLAB® A Simple Bifurcation Approach**. Auburn: Springer, 2007.

EVILIA, R. F. Quantitative nmr spectroscopy. **Analytical Letters**, v. 34, n. 13, p. 2227- 2236, 2001.

HAHN, B. D.; VALENTINE, D. T. **Essential MATLAB® for engineers and scientists**. 3 rd ed. Jordan Hill: BH, 2007.

HAZEKAMP, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Quantitative analysis of cannabinoids from *cannabis sativa* using ^1H -NMR. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 6, p. 718-721, 2004.

HEIJDEN, F.; DUIN, R. P. W.; RIDDER, D.; TAX, D. M. J. **Classification, parameter estimation and state estimation an engineering approach using MATLAB®**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004.

KARRIS, S. T. **Numerical analysis using MATLAB® and Excel®**. 3rd ed. Berkeley: Orchard Publications, 2007.

KNIGHT, A. **Basics and beyond of MATLAB®**. New York: CRC Press, 2000.

LI, E.; JIANG, L.; GUO, L.; ZHANG, H.; CHE, Y. Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7894-7899, 2008.

LOY, F.; PUXEDDU, R.; ISOLA, M.; LOFFREDO, F.; RIVA, A.; TESTA, F. Morphological alterations induced by cytochalasin D on serous cell of human submandibular gland in basal and stimulated conditions. **Italian Journal of Anatomy & Embryology**, v.110, p. 65-70, 2005.

LYSHEVSKI, S. E. **Engineering and scientific computations using MATLAB®**. Hoboken: John Wiley, 2003.

MANASSAH, J. T. **Elementary mathematical and computational tools for electrical and computer engineers using MATLAB®**. New York: CRC Press, 2001.

MANIARA, G.; RAJAMOORTHY, K.; RAJAN, S.; STOCKTON, G. W. Method performance and validation for quantitative analysis by ^1H and ^{31}P NMR

spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4921-4928, 1998.

MARCHAND, P.; HOLLAND, T. **Graphics and GUIs with MATLAB®**. 3rd ed. New York: Chapman & Hall, 2003.

MARQUES DE SÁ, J. P. **Applied statistics using SPSS, STATISTICA, MATLAB® and R**. 2nd ed. Porto: Springer, 2007.

MEJIA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.

MORTENSEN, K.; LARSSON, L. Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 5, p. 1007-1012, May 2003.

MURPHY, G. J.; JOHNSON, T. W.; CHAMBERLAIN, M. H.; RIZVI, S. I.; WYATT, M.; GEORGE, S. J.; ANGELINI, G. D.; KARSCH, K. R.; OBERHOFF, M.; NEWBY, A. C. Short- and long-term effects of cytochalasin D, paclitaxel and rapamycin on wall thickening in experimental porcine vein grafts. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 607-617, 2007.

NORD, L. I.; VAAG, P.; DUUS, J. Quantification of organic and amino acids in beer by ¹H NMR spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 4790-4798, 2004.

NOWICK, J. S.; KHAKSHOOR, O.; HASHEMZADEH, M.; BROWER, J. O. DSA: a new internal standard for NMR studies in aqueous solution. **Organic Letters**, v. 5, n. 19, p. 3511-3513, 2003.

PAULI, G. F. qNMR-A versatile concept for the validation of natural product reference compounds. **Phytochemical Analytical**, v. 12, p. 28-42, 2001.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 589-595, 2007.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; FRANZBLAU, S. G.; CHADWICK, L. R.; LANKIN, D. C.; ZHANG, F.; WANG, Y. Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1742-1748, 2008.

PAULI, G. F.; SCHINKOVITZ, A.; PRO, S. M.; MAIN, M.; CHEN, S. N.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Dynamic nature of the ligustilide complex. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1604-1611, 2008.

PIERENS, G. K.; CARROLL, A. R.; DAVIS, R. A.; PALFRAMAN, M. E.; QUINN, R. J. Determination of analyte concentration using the residual solvent sesonance in ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 810-813, 2008.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREEC, P.; TANTICHAROENA, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 1341-1344, 2005.

SALU, K. J.; BOSMANS, J. M.; HUANG, Y.; HENDRIKS, M.; VERHOEVEN, M.; LEVELS, A.; COOPER, S.; SCHEERDER, I. K.; VRINTS, C. J.; BULT, H. Effects of cytochalasin D-eluting stents on intimal hyperplasia in a porcine coronary artery model. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 536-544, 2006.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3302-3310, 2007.

SOININEN, P.; HAARALA, J.; VEPSALAINEN, J.; NIEMITZ, M.; LAATIKAINEN, R. Strategies for organic impurity quantification by ^1H NMR spectroscopy: constrained total-line-shape fitting. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, p. 178-185, 2005.

STADLER, M.; WOLLWEBER, H.; MUHLBAUER, A.; ASAKAWA, Y.; HASHIMOTO, T.; ROGERS, J. D.; JU, Y.; WETZSTEIN, H.; TICHY, H. Molecular chemotaxonomy of Daldinia and other Xylariaceae. **Mycological Research**, v. 105, n. 10, p. 1191-1205, Oct. 2001.

SYKORA, J.; BERNASEK, P.; ZAREVUCKA, M.; KURFURST, M.; SOVOVA, H.; SCHRAML, J. High-performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance detection-A method for quantification of α and γ -linolenic acids in their mixtures with free fatty acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, p. 152-155, 2007.

TATSIS, E. C.; EXARCHOUB, V.; TROGANIS, A. N.; GEROTHANASSISA, I. P. ^1H NMR determination of hypericin and pseudohypericin in complex natural mixtures by the use of strongly deshielded OH groups. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 219-226, 2008.

YANG, W. Y.; CAO, W.; CHUNG, T. S.; MORRIS, J. **Applied numerical methods using MATLAB®**. New Jersey: John Wiley, 2005.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.

WELJIE, A. M.; NEWTON, J.; MERCIER, P.; CARLSON, E.; SLUPSKY, C. M. Targeted profiling: a quantitative analysis of ^1H NMR metabolomics data. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 4430-4442, 2006.

WELLS, R. J.; CHEUNG, J.; HOOK, J. M. Dimethylsulfone as a universal standard for analysis of organics by QNMR. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 9, p. 450-456, 2004.

WESTLAND, S.; RIPAMONTI, C. **Computational colour science using MATLAB®**
Chichester: John Wiley, 2004.

WHITE, R. E. **Computational mathematics models, methods, and analysis with MATLAB® and MPI**. New York: Chapman & Hall, 2004.

ANEXO

Espectros de RMN de ^1H de todas as amostras quantificadas contendo 1 mg de antraceno.

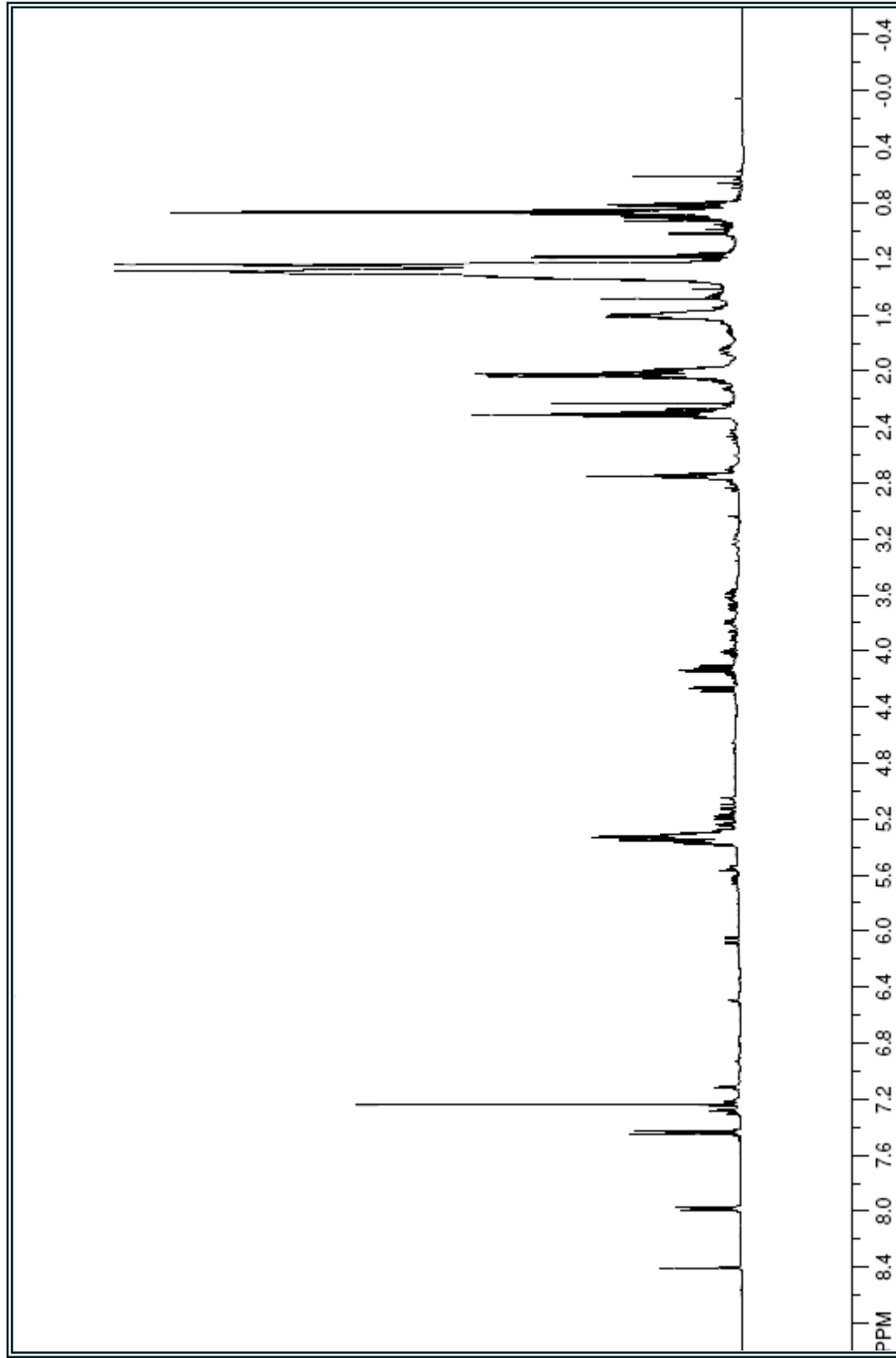


Figura 25 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,2 mg da amostra A8A (replicata A; AcOEt=80%, iPrOH=10%, Et₂O=10%) + 1 mg de antraceno.

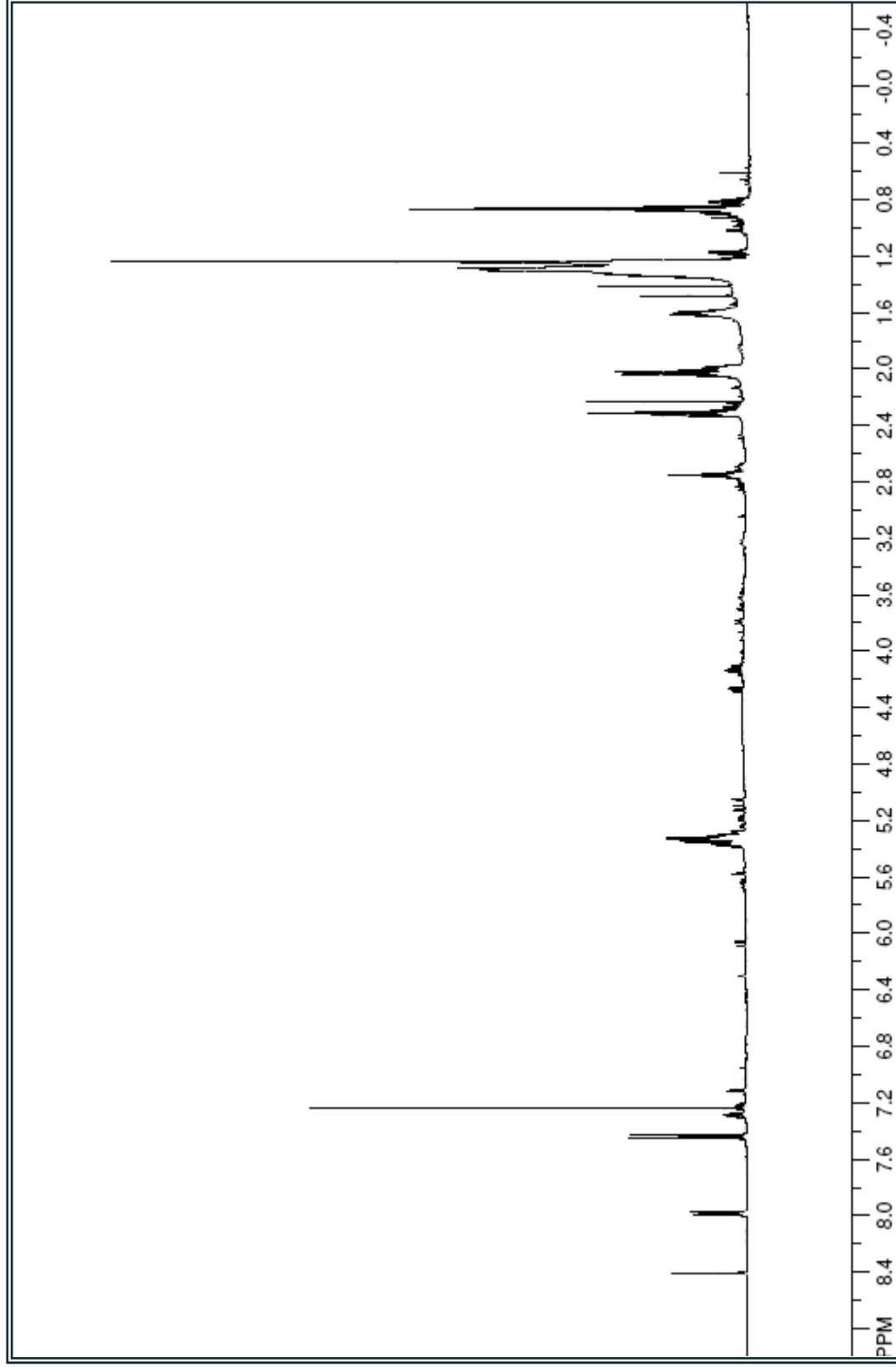


Figura 26 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,8 mg da amostra A8E (replicata A; AcOEt=10%, iPrOH=10%, Et₂O=80%) + 1 mg de antraceno.

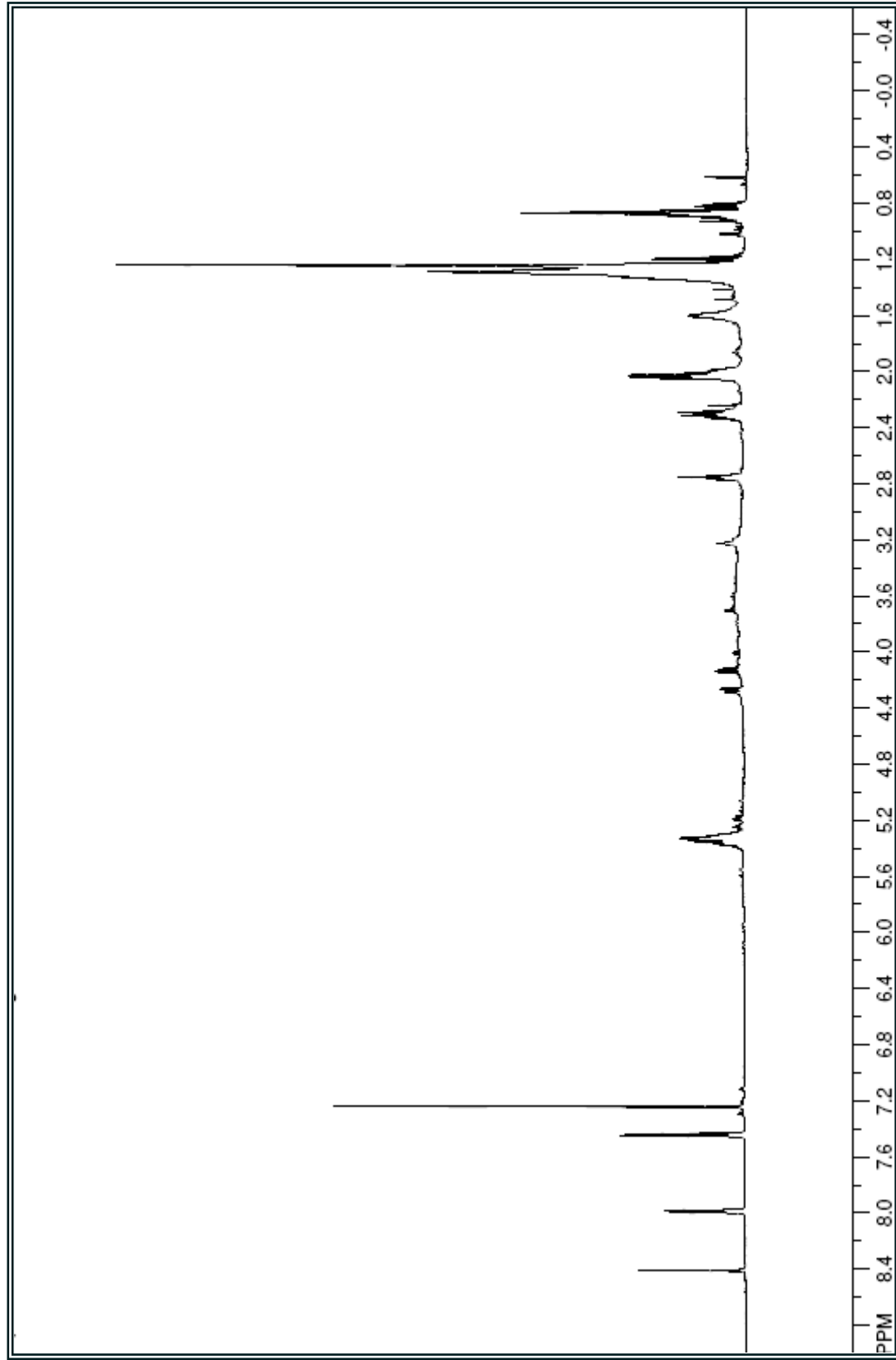


Figura 27 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 38,0 mg da amostra A8I (replicata A; AcOEt =10%, iPrOH =80%, Et_2O =10%) + 1mg de antraceno.

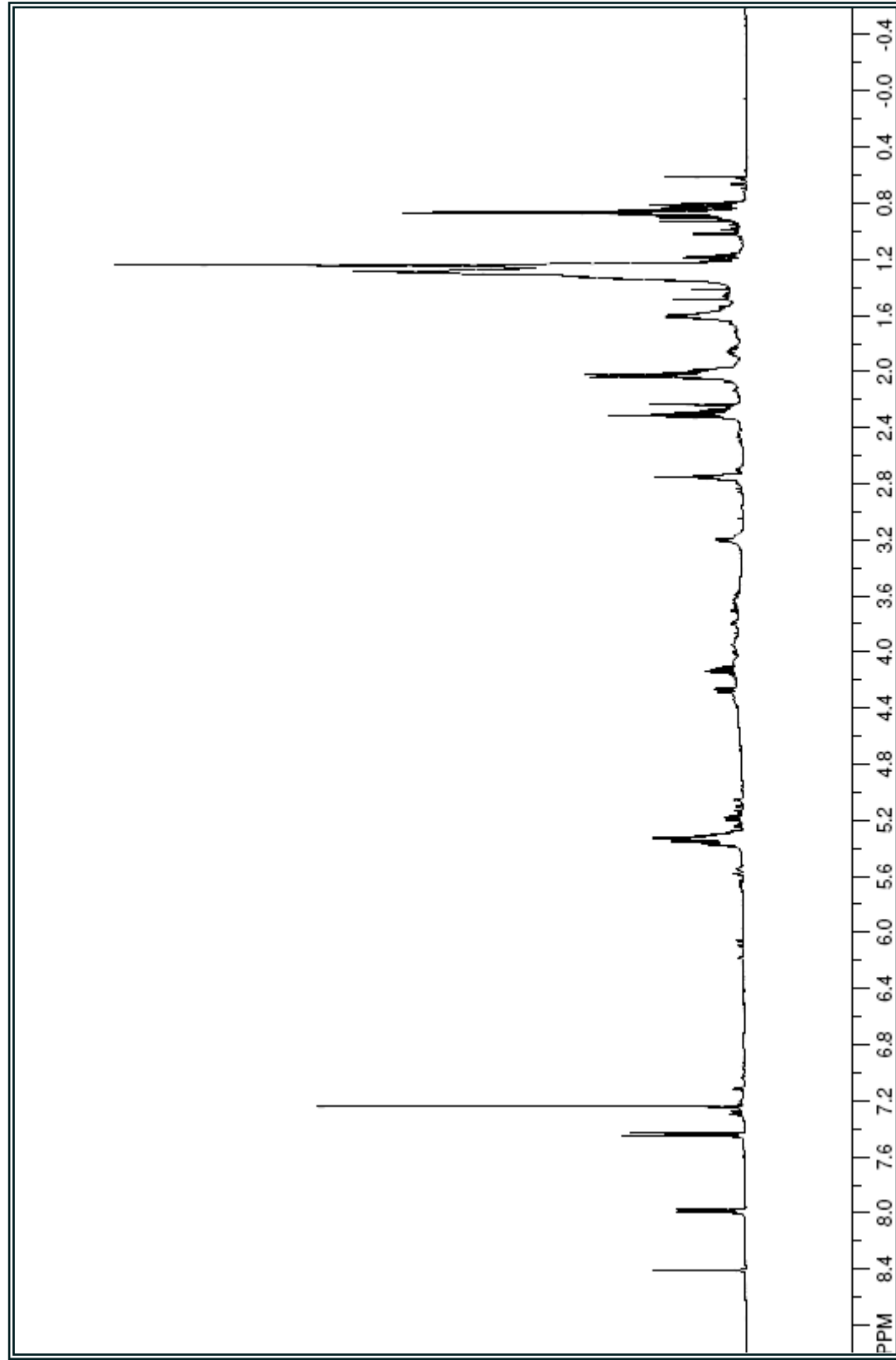


Figura 28 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,2 mg da amostra AAEl (replicata A; AcOEt=33%, iPrOH=33%, Et₂O=33%) + 1 mg de antraceno.

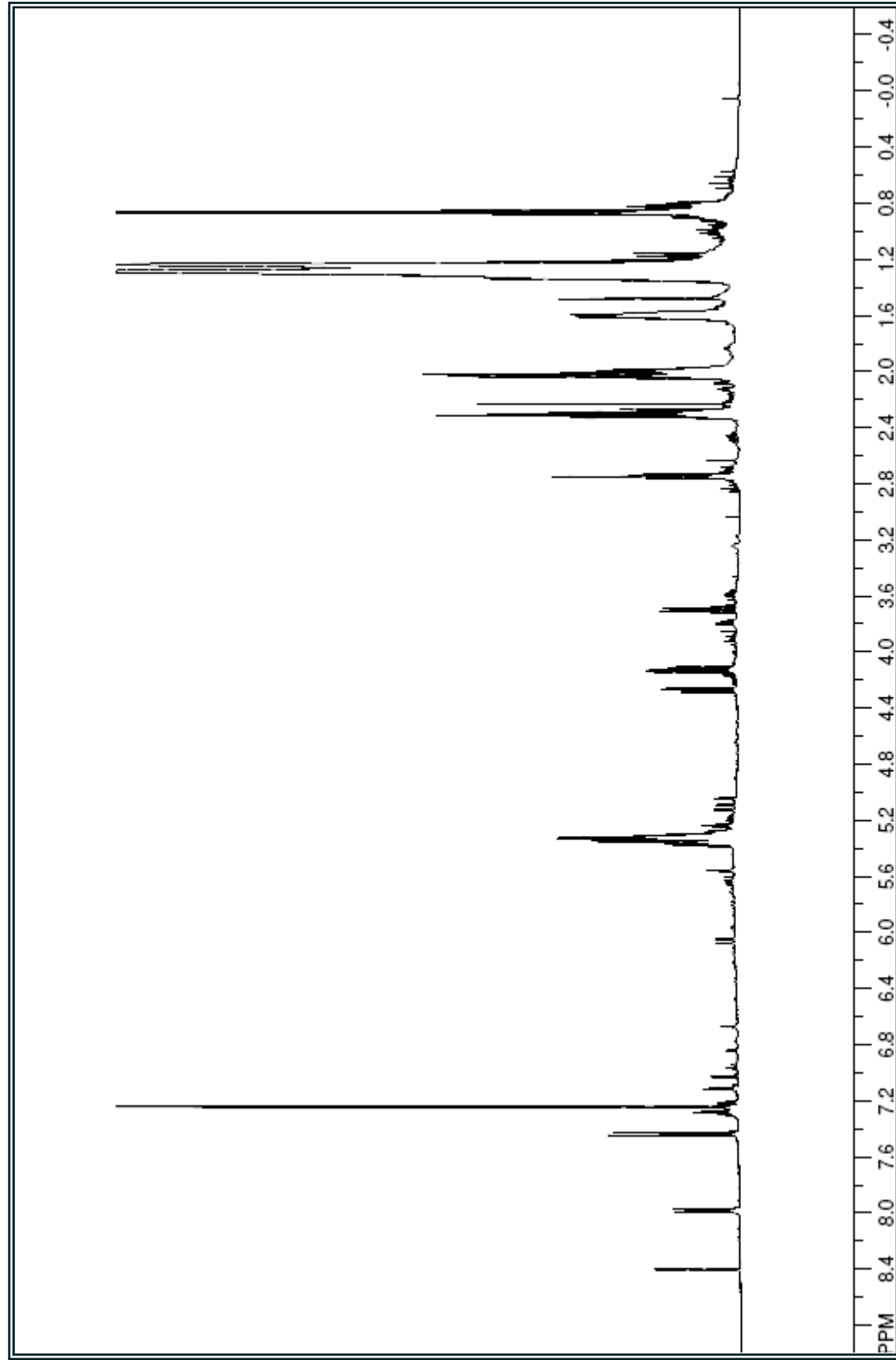


Figura 29 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 54,0 mg da amostra AAC (replicata A; AcOEt=100%) + 1 mg de antraceno.

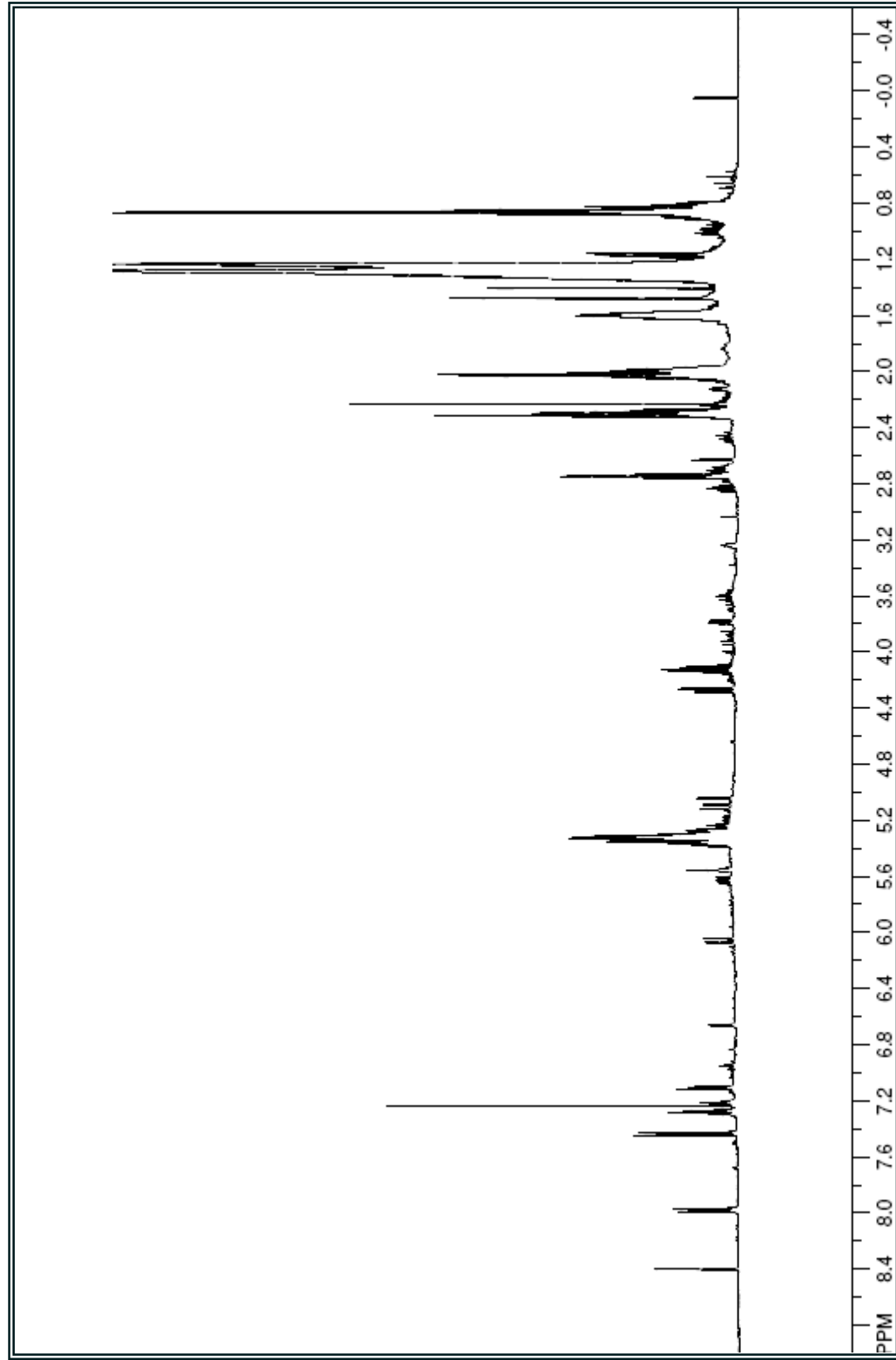


Figura 30 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,8 mg da amostra AAE (replicata A; AcOEt=50%, Et₂O=50%) + 1 mg de antraceno.

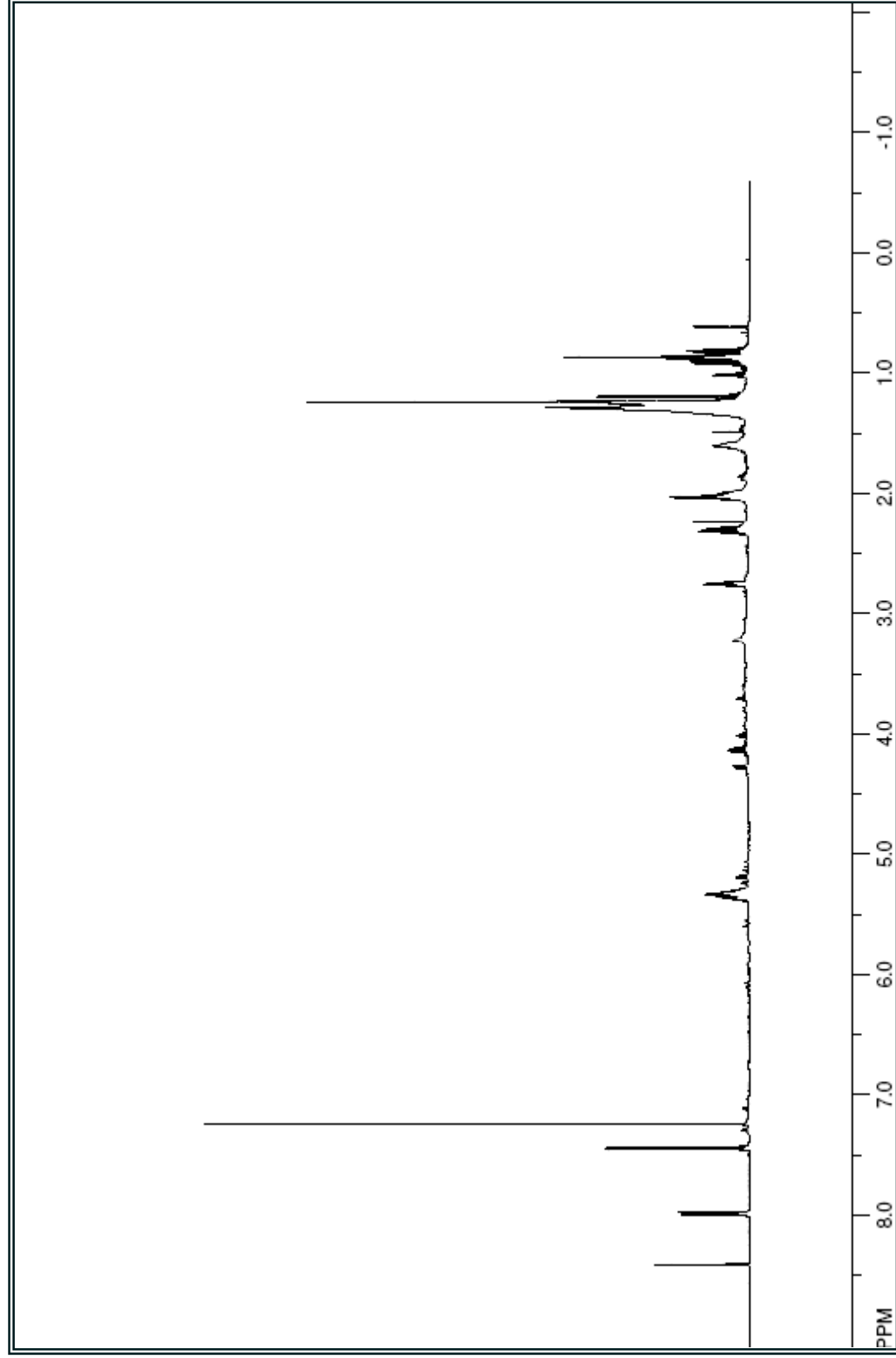


Figura 31 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,0 mg da amostra AAI (replicata A; AcOEt=50%, iPrOH=50%)+ 1 mg de antraceno.

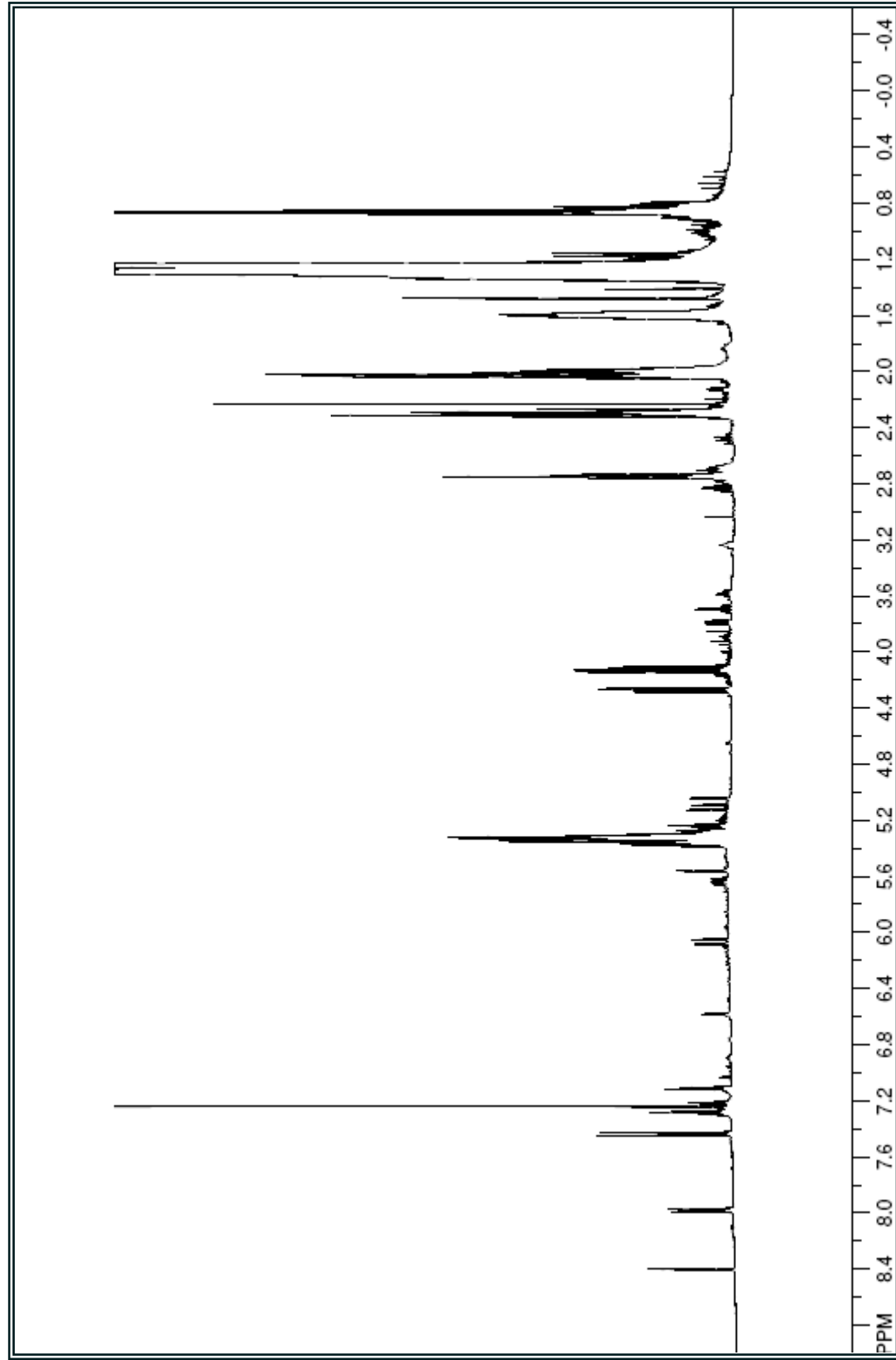


Figura 32 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 50,1 mg da amostra AE (replicata A, Et_2O =100%) + 1 mg de antraceno.

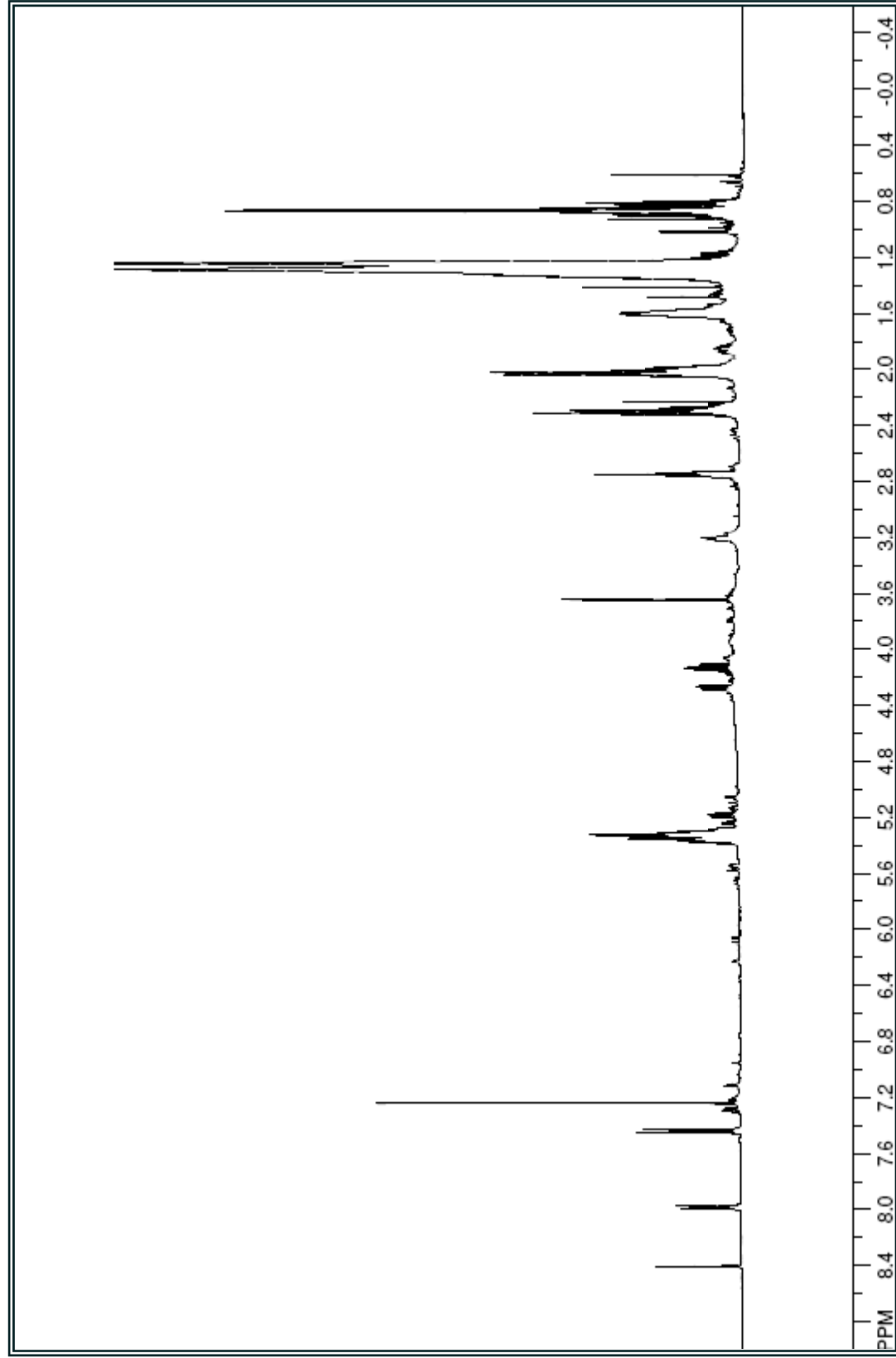


Figura 33 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,7 mg da amostra AEI (replicata A; iPrOH=50%, Et₂O=50%) + 1 mg de antraceno.

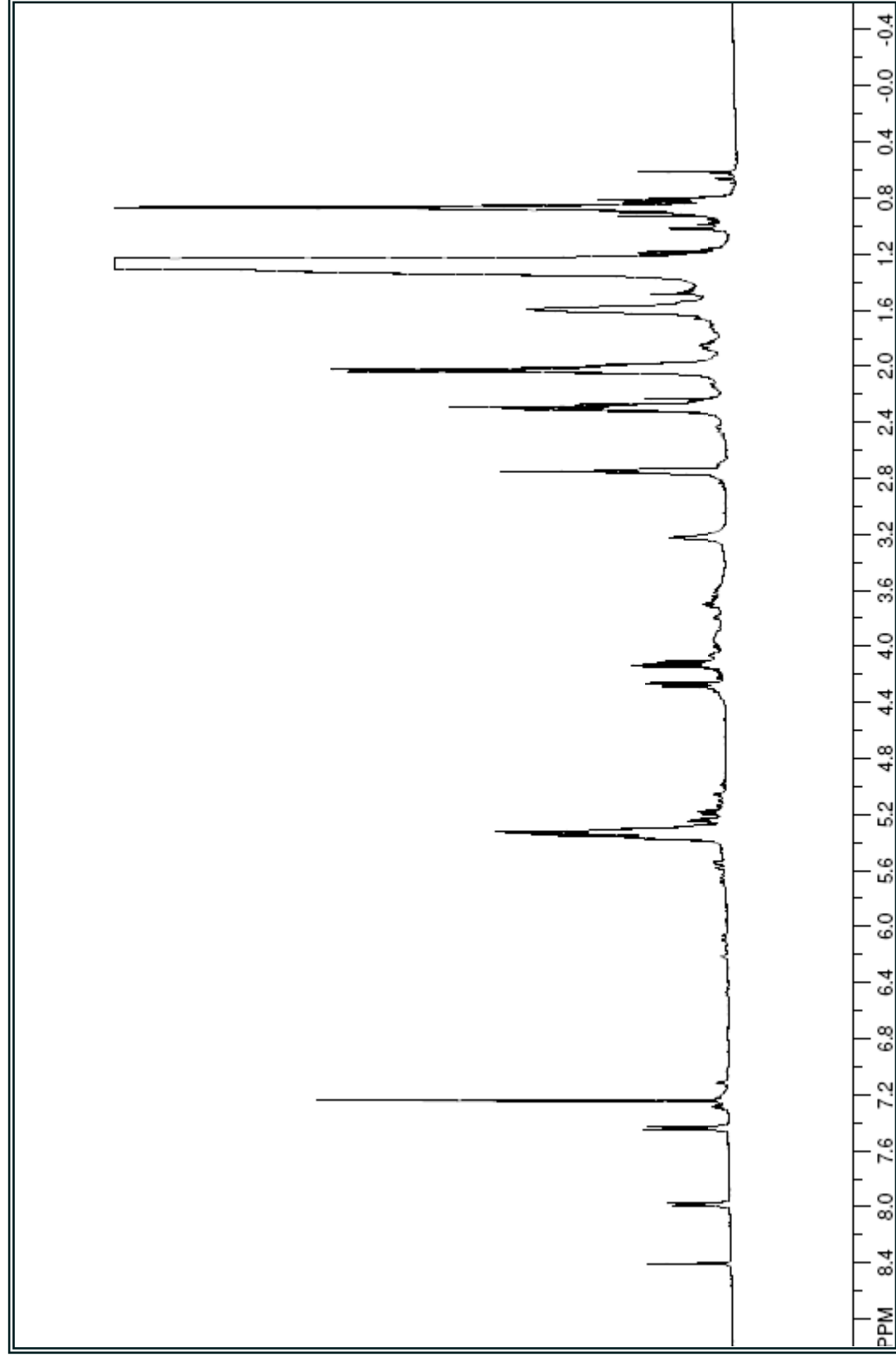


Figura 34 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,1 mg da amostra AI (replicata A; $i\text{PrOH}=100\%$), + 1 mg de antraceno.

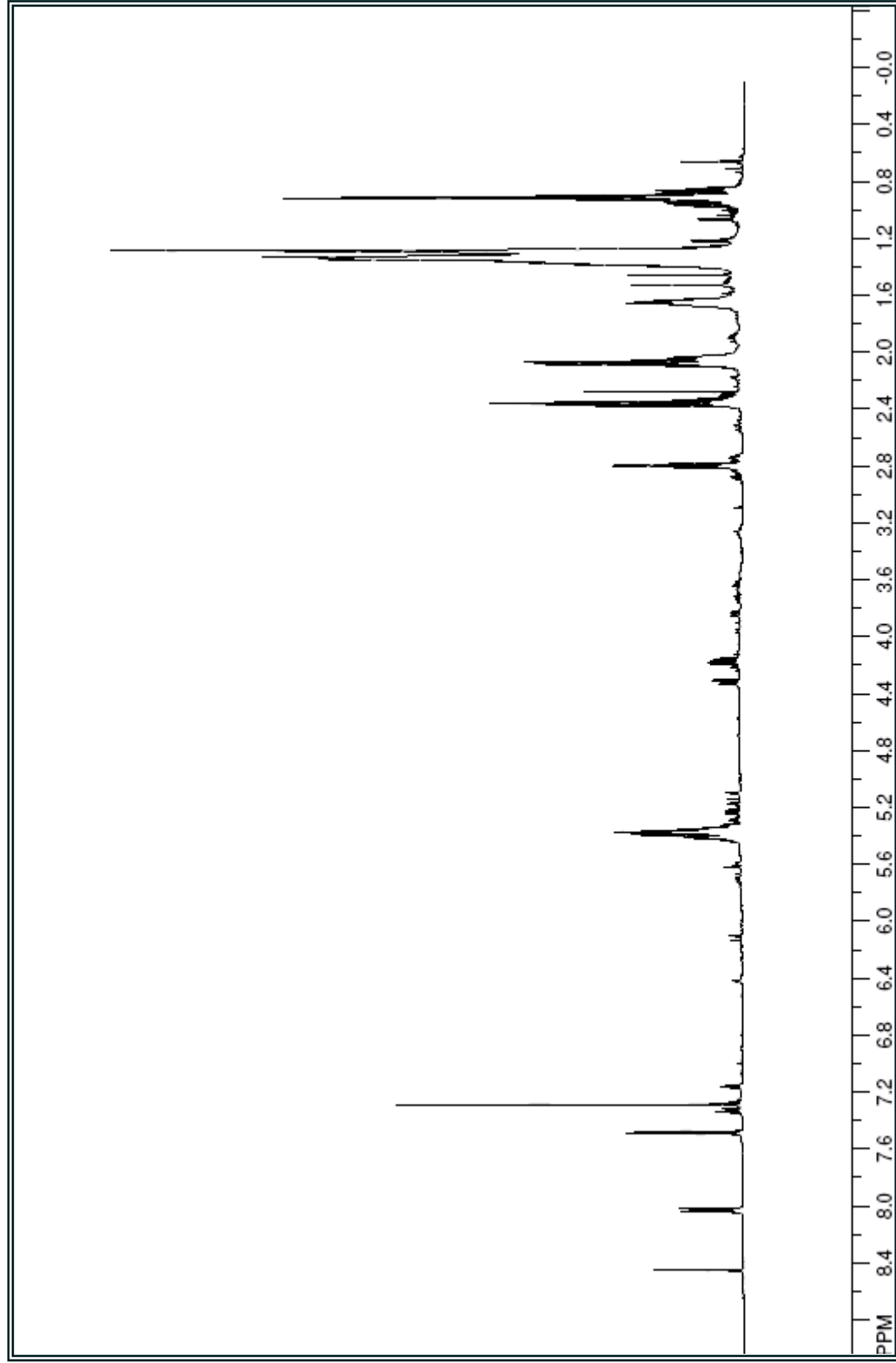


Figura 36 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,5 mg da amostra B8E (replicata B; AcOEt=10%, iPrOH=10%, Et₂O=80%) + 1 mg de antraceno.

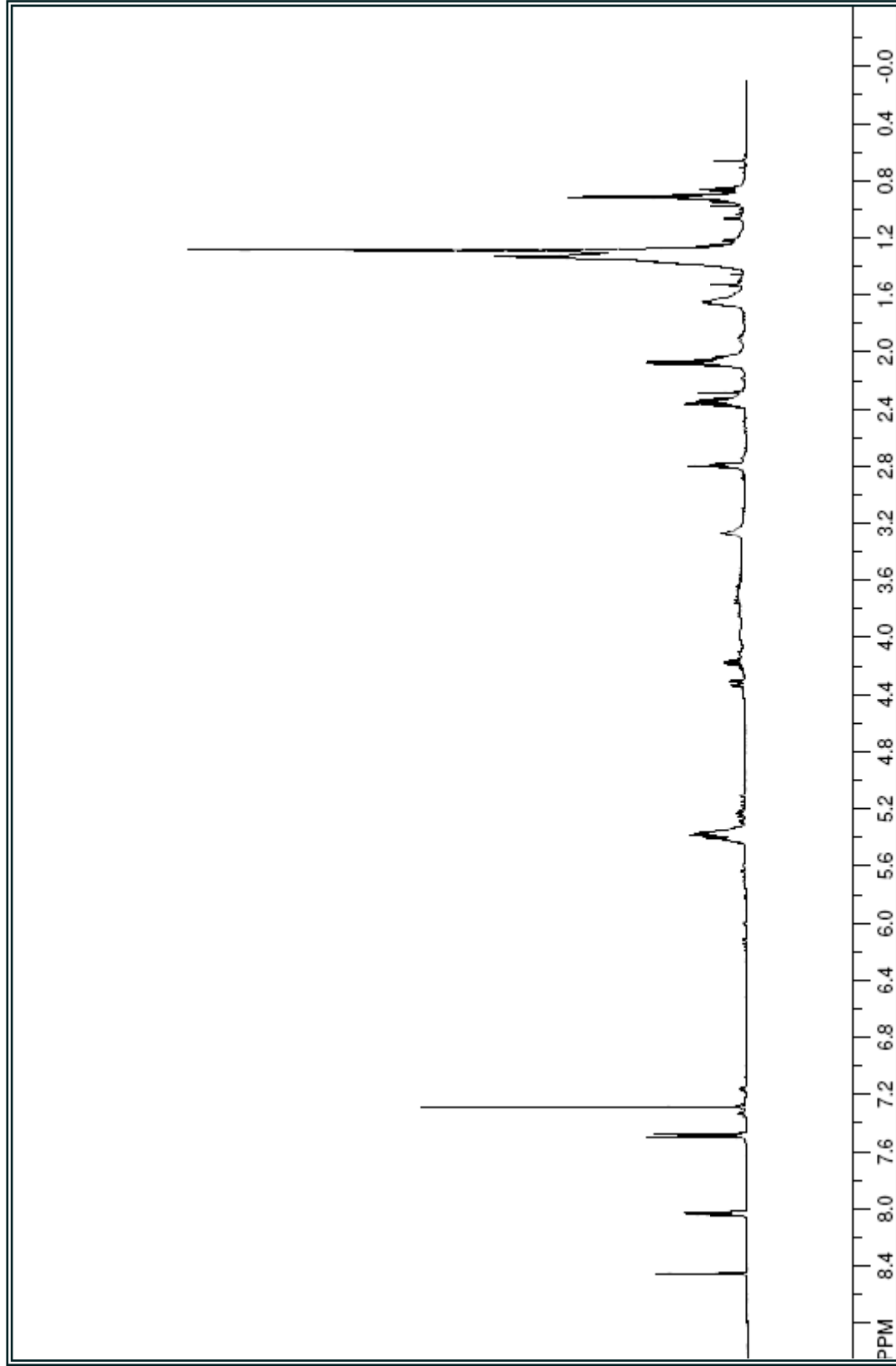


Figura 37 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,1 mg da amostra B8I (replicata B; AcOEt=10%, iPrOH=80%, Et₂O=10%) + 1mg de antraceno.

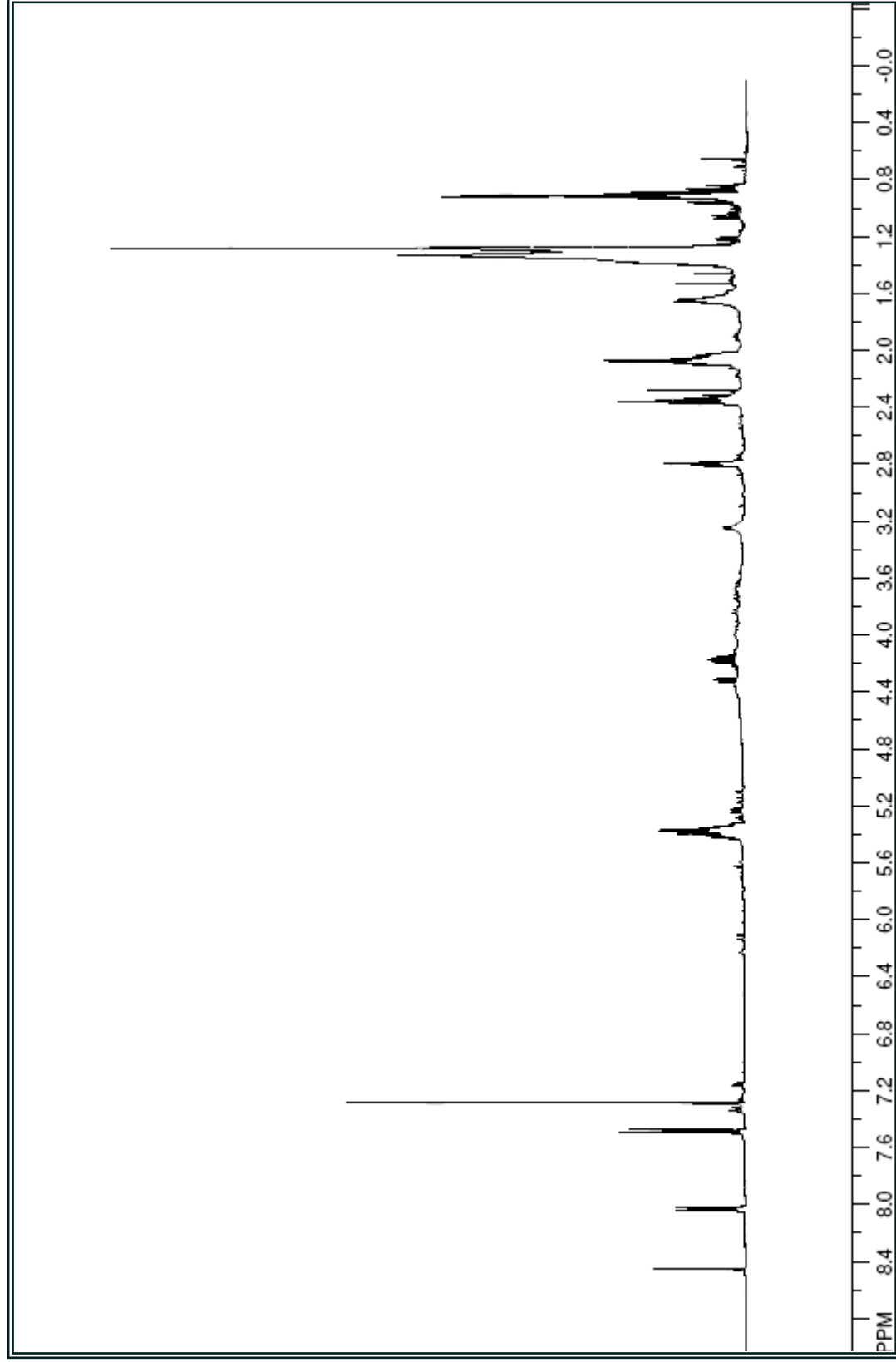


Figura 38 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,1 mg da amostra BAEI (replicata B; AcOEt=33%, iPrOH=33%, Et₂O=33%) + 1 mg de antraceno.

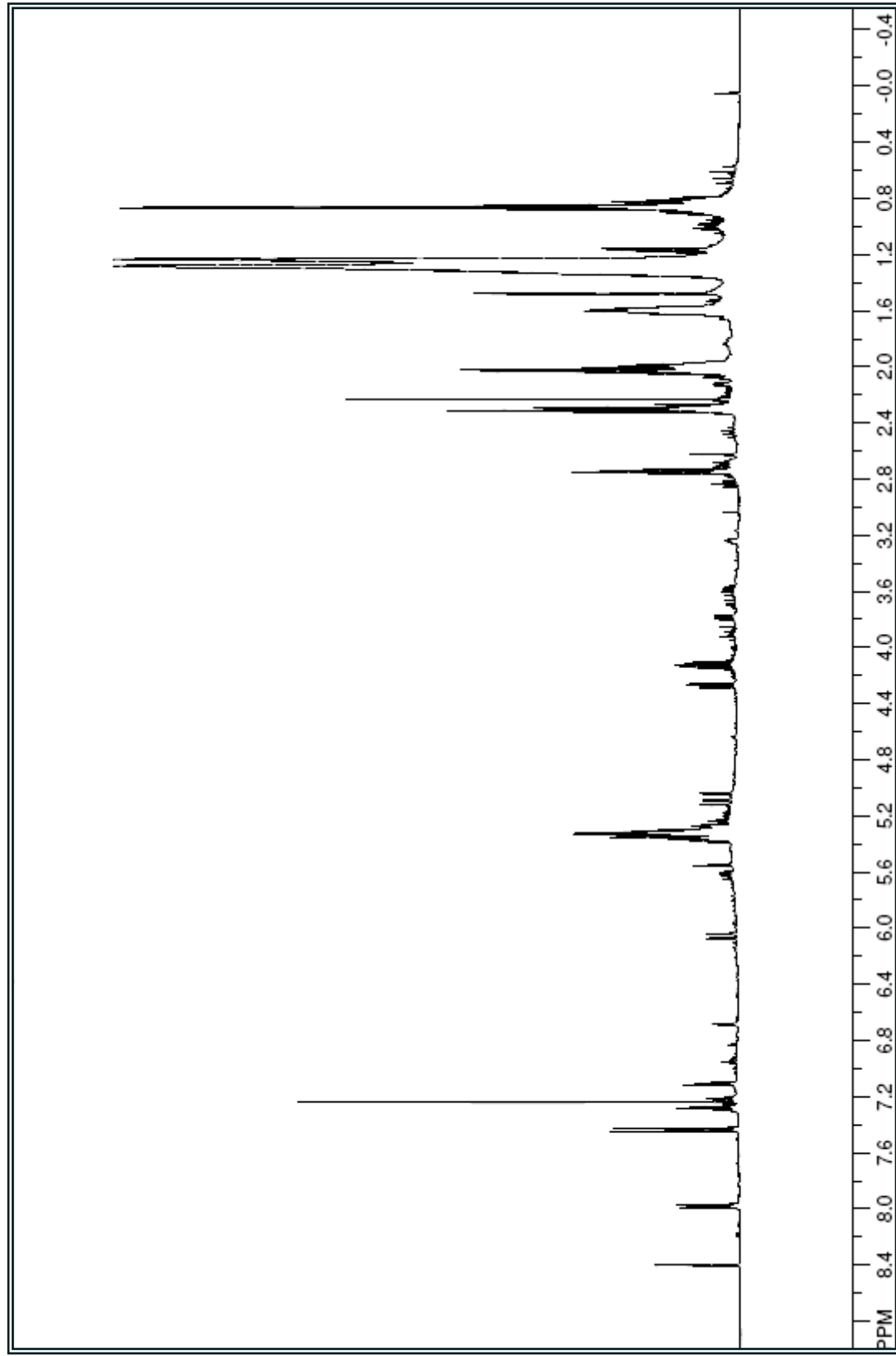


Figura 39 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 42,9 mg da amostra BA (replicata B; AcOEt=100%) + 1mg de antraceno.

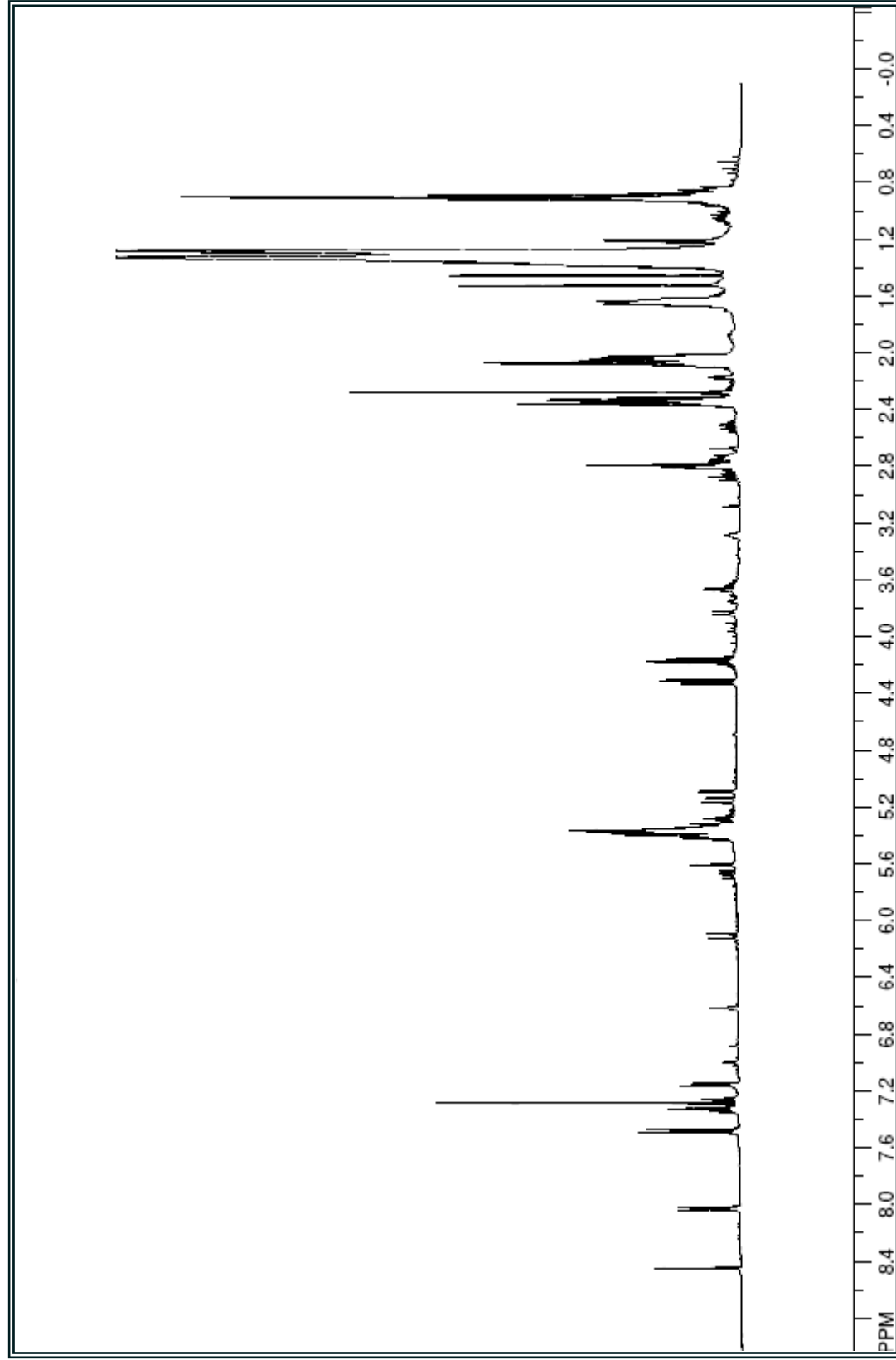


Figura 40 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,0 mg da amostra BAE (replicata B; AcOEt=50%, Et₂O=50%) + 1 mg de antraceno.

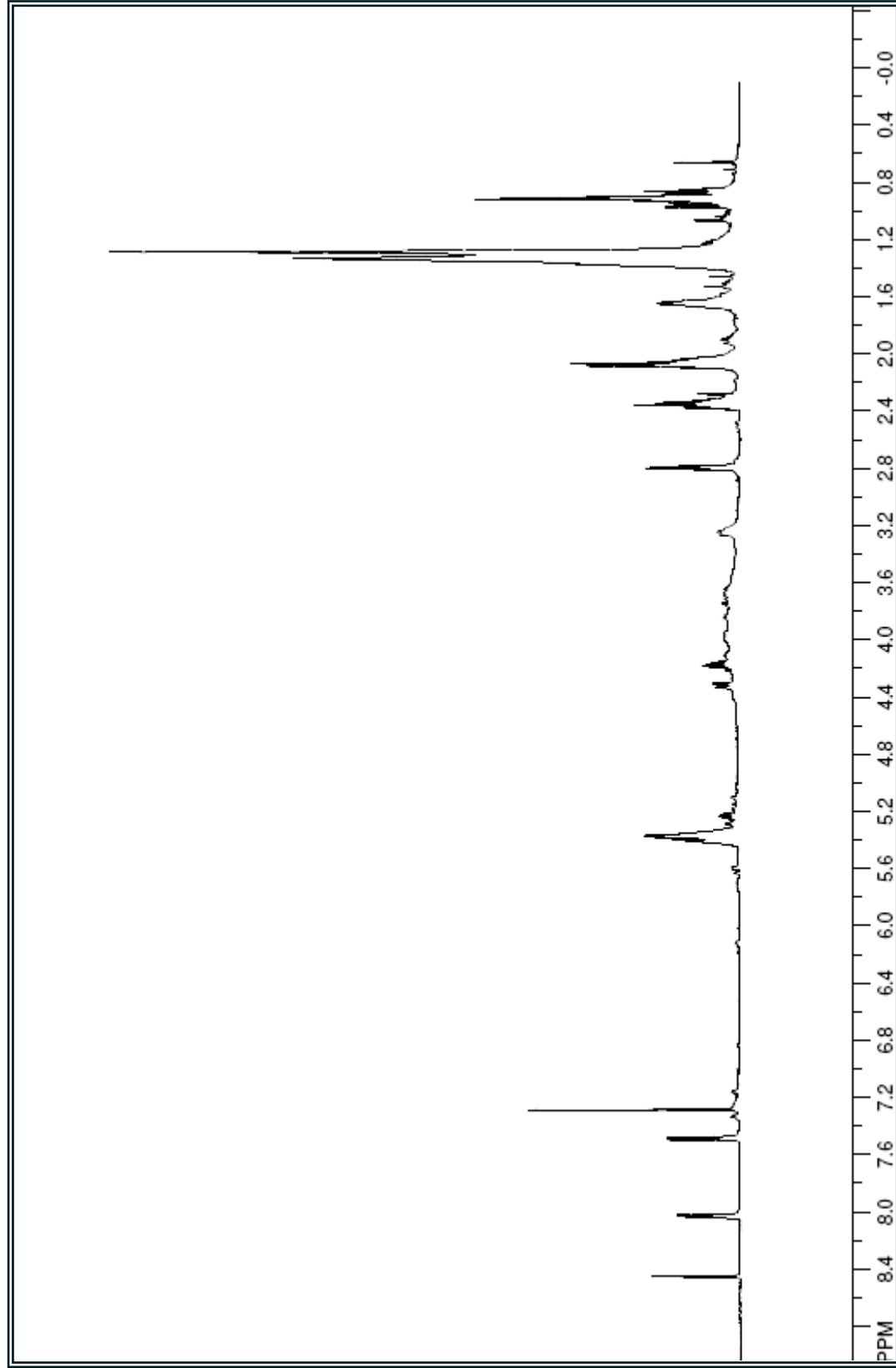


Figura 41 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,9 mg da amostra BAl (replicata B; AcOEt=50%, iPrOH=50%) + 1mg de antraceno.

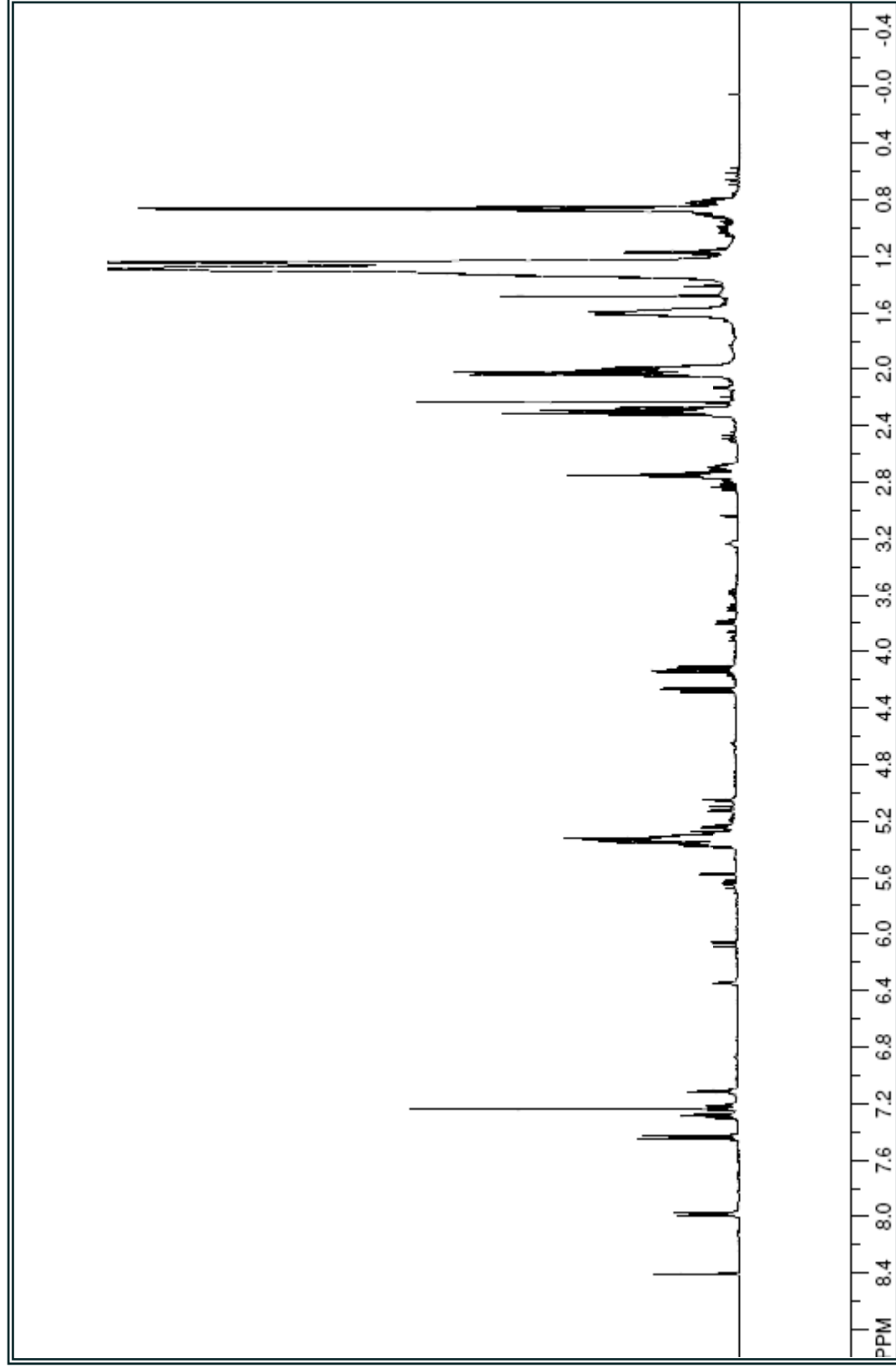


Figura 42 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 28,9 mg da amostra BE (replicata B; Et₂O=100%) + 1 mg de antraceno.

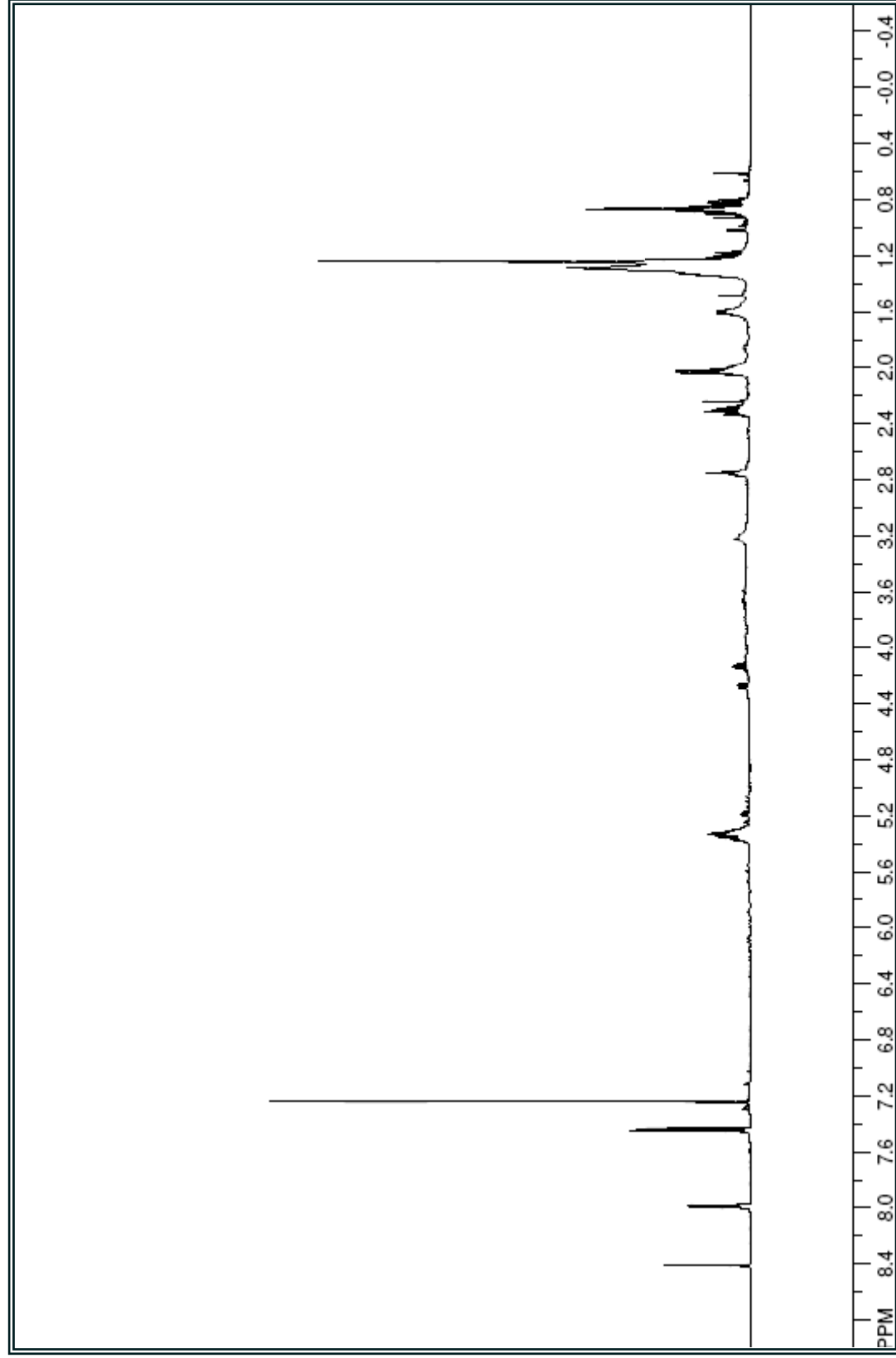


Figura 44 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 42,4 mg da amostra BI (replicata B; $i\text{PrOH}=100\%$) + 1mg de antraceno.

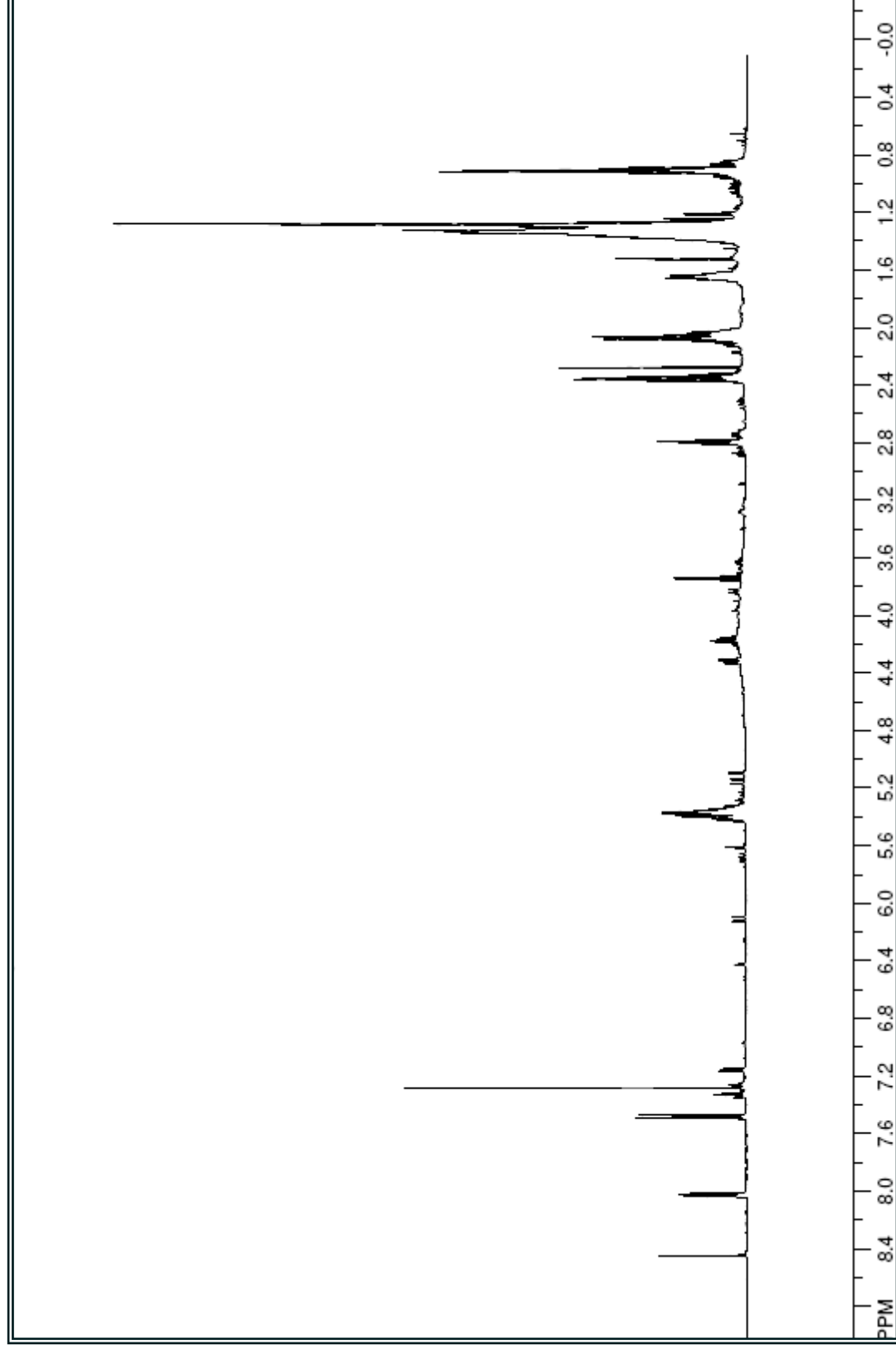


Figura 45 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,5 mg da amostra C8A (replicata C; AcOEt=80%, iPrOH=10%, Et₂O=10%) + 1 mg de antraceno.

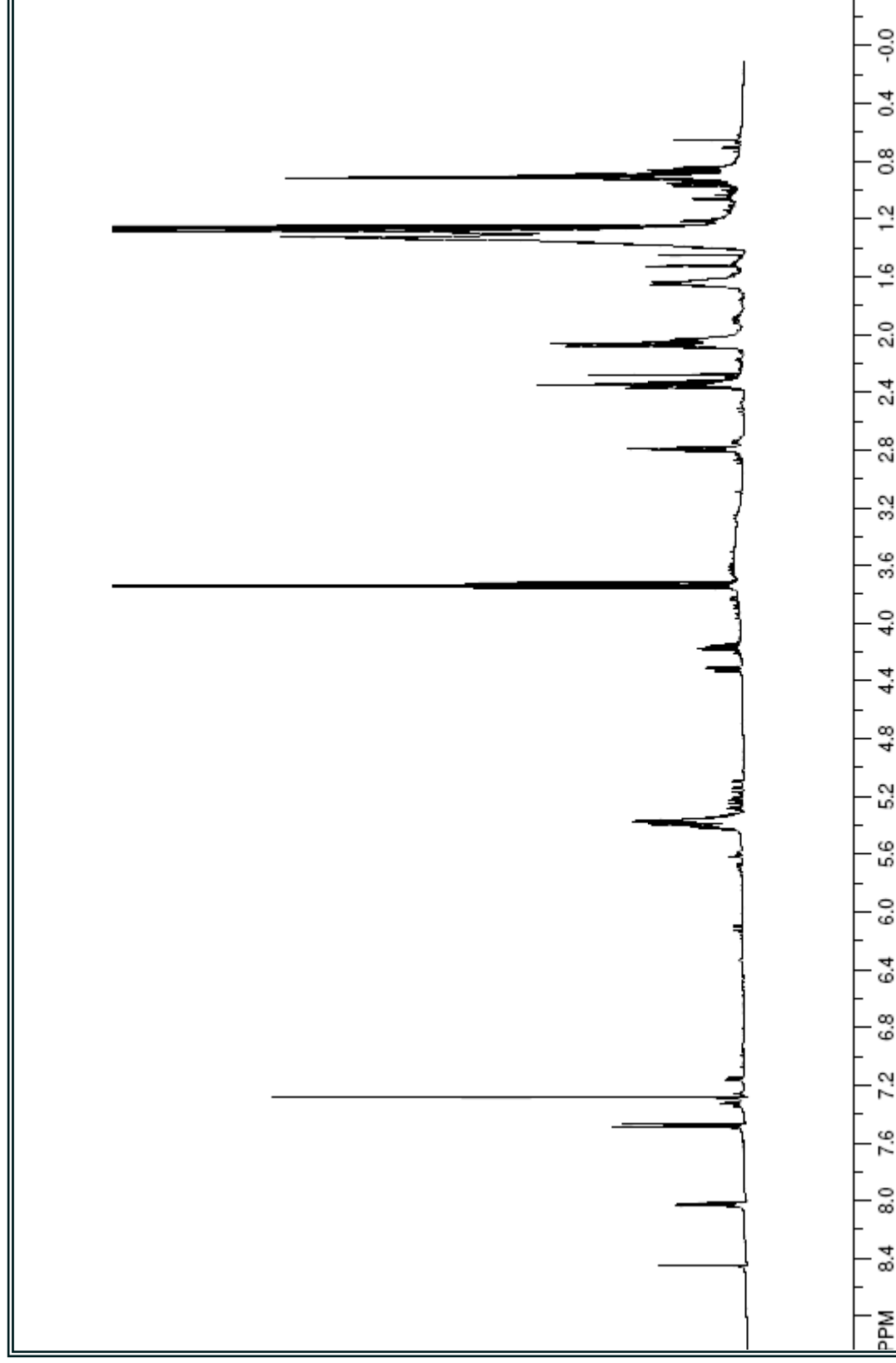


Figura 46 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,7 mg da amostra C8E (replicata C; AcOEt=10%, iPrOH=10%, Et₂O=80%) + 1 mg de antraceno.

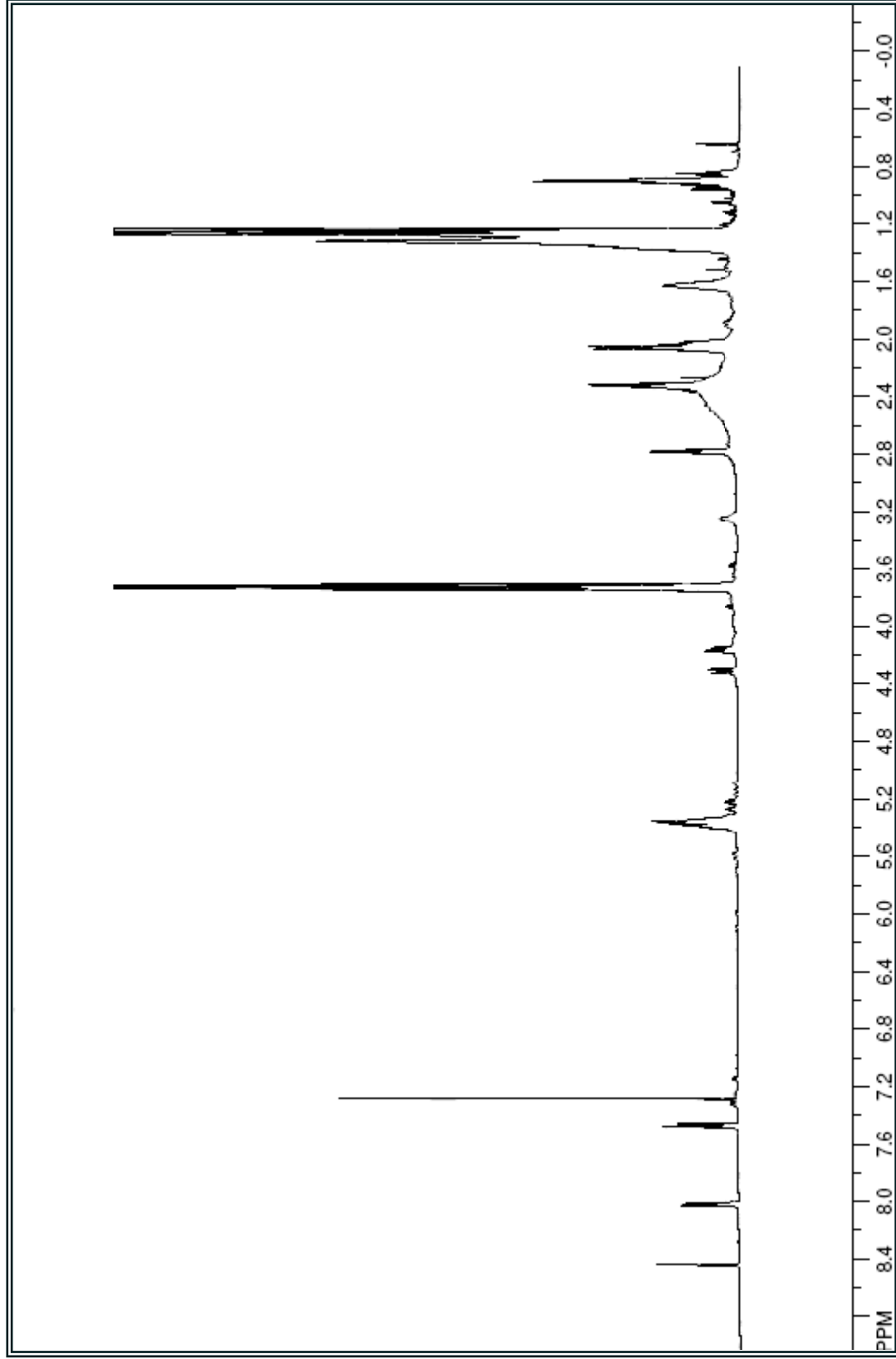


Figura 47 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 41,0 mg da amostra C8I (replicata C; AcOEt=10%, iPrOH=80%, Et₂O=10%) + 1 mg de antraceno.

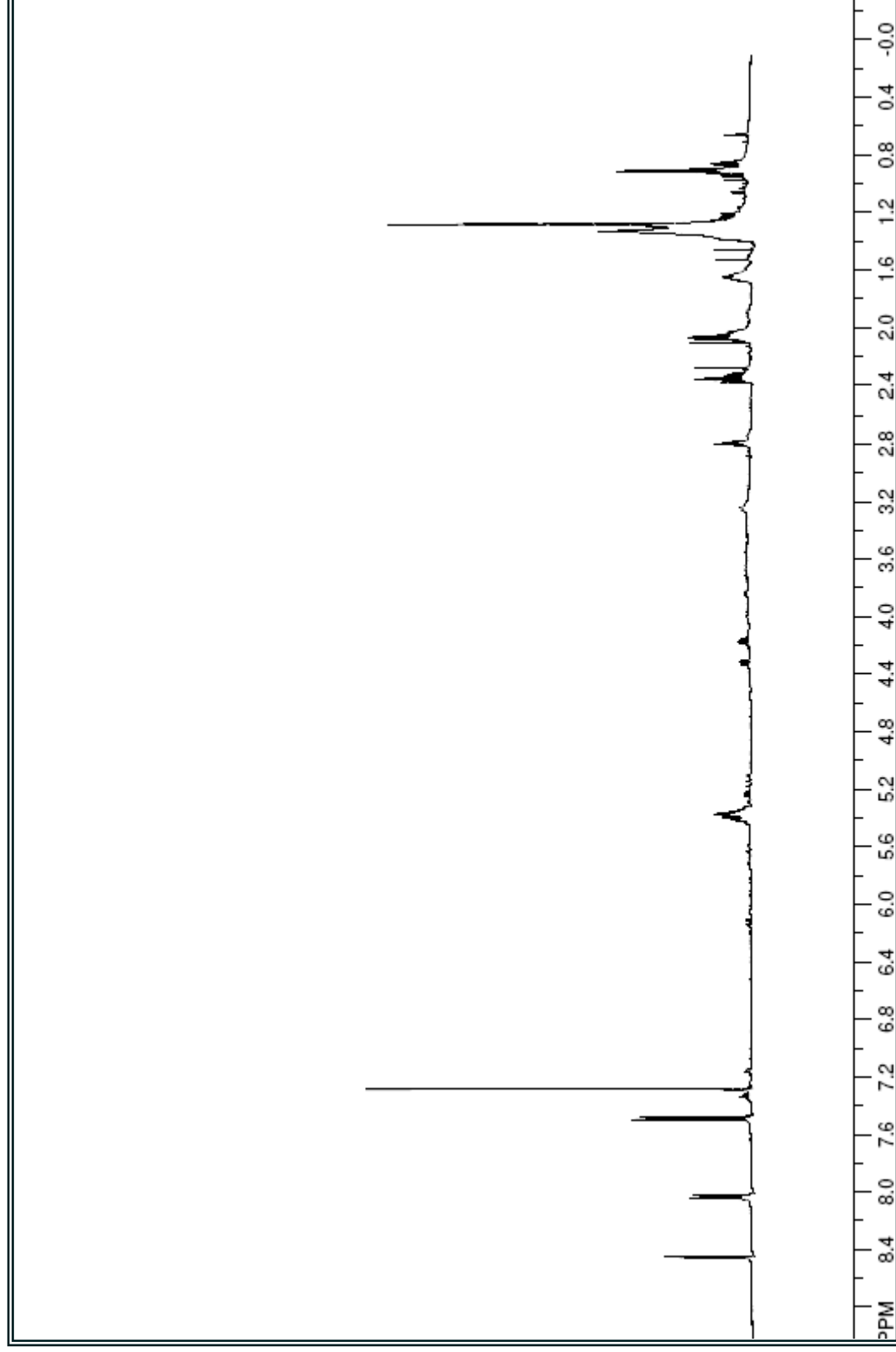


Figura 48 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,7 mg da amostra CAEI (replicata C; AcOEt=33%, iPrOH=33%, Et₂O=33%) + 1 mg de antraceno.

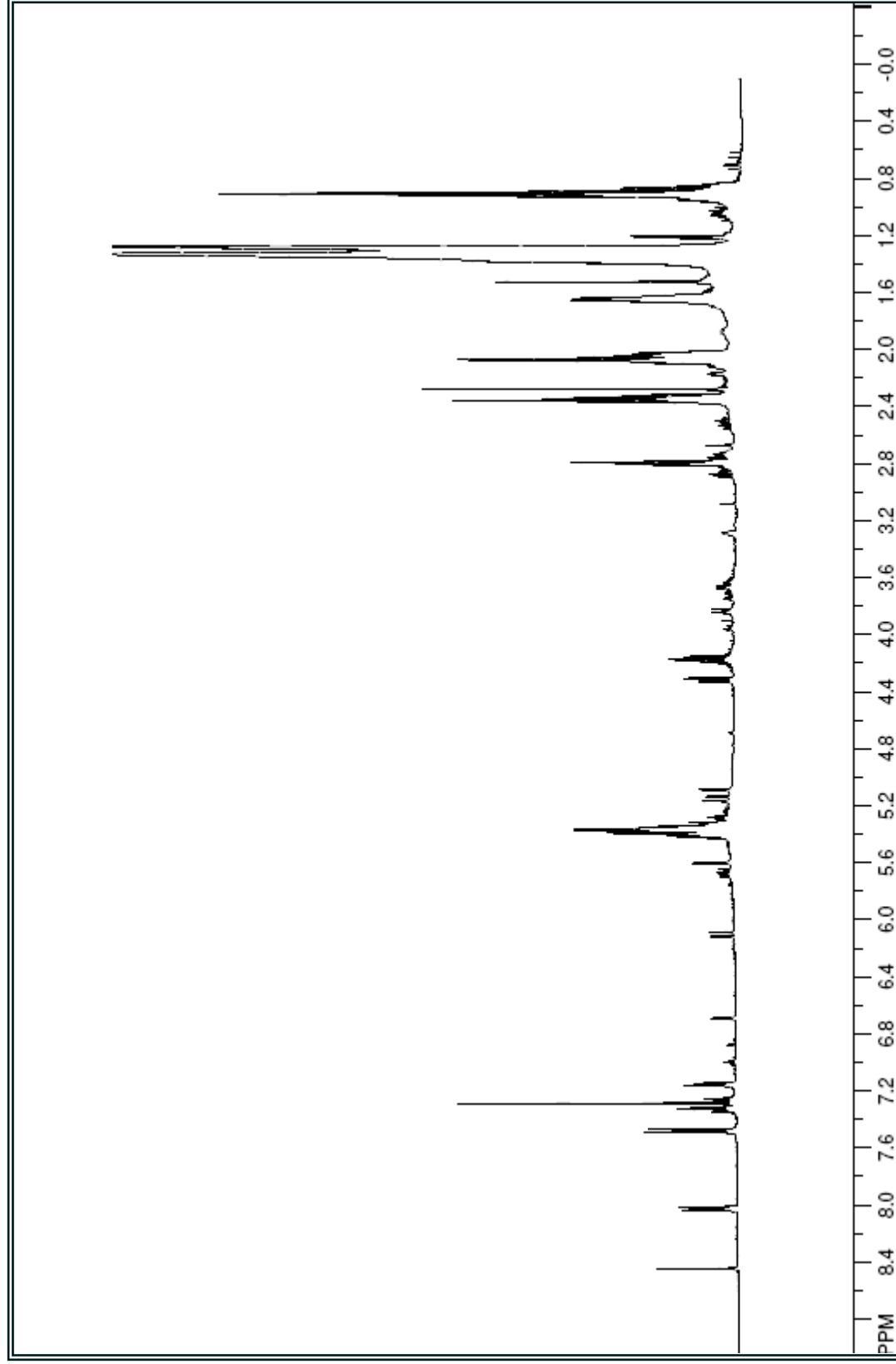


Figura 49 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,5 mg da amostra CA (replicata C; AcOEt=100%) + 1mg de antraceno.

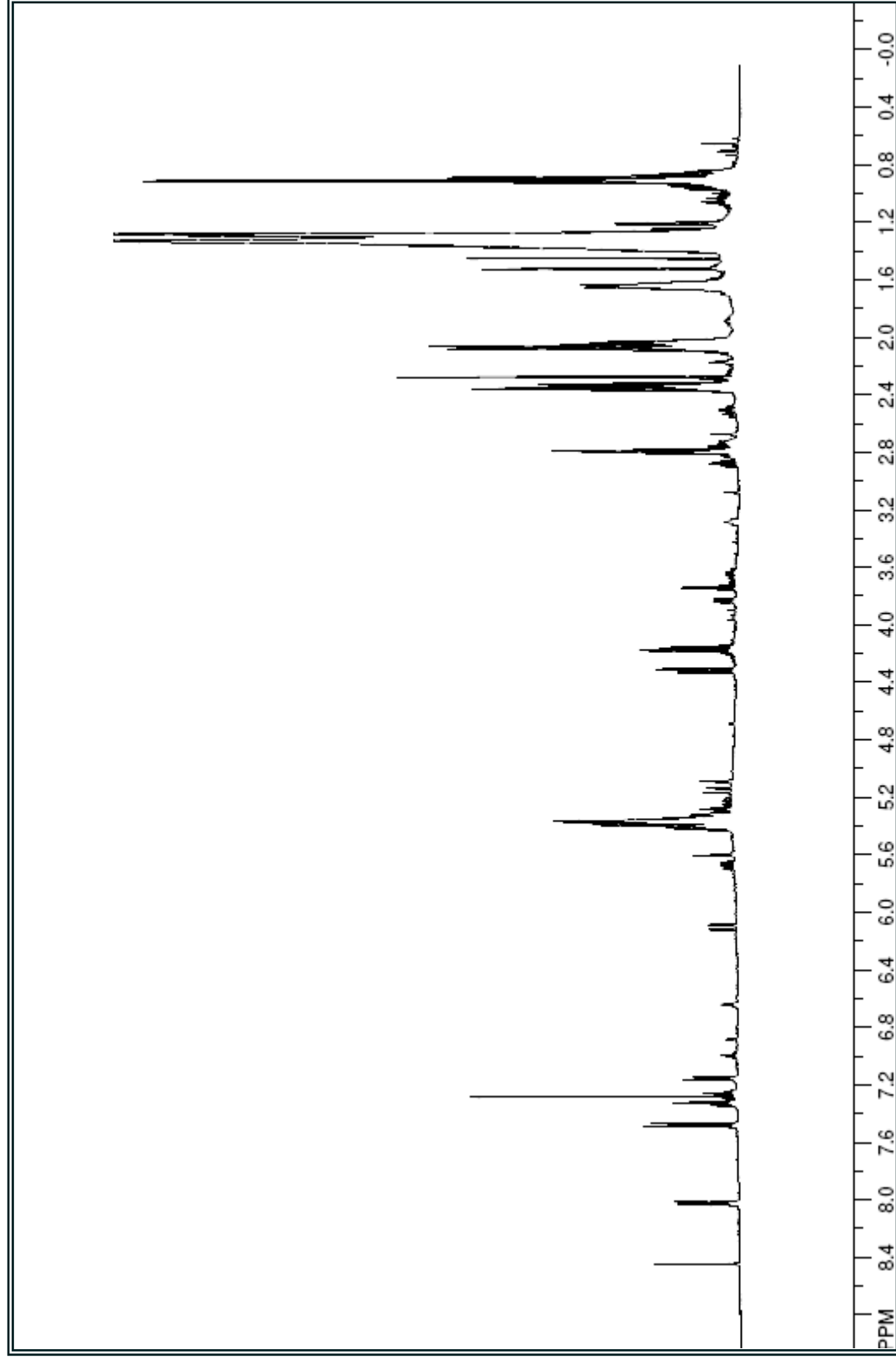


Figura 50 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,9 mg da amostra CAE (replicata C; AcOEt=50%, Et₂O=50%) + 1 mg de antraceno.

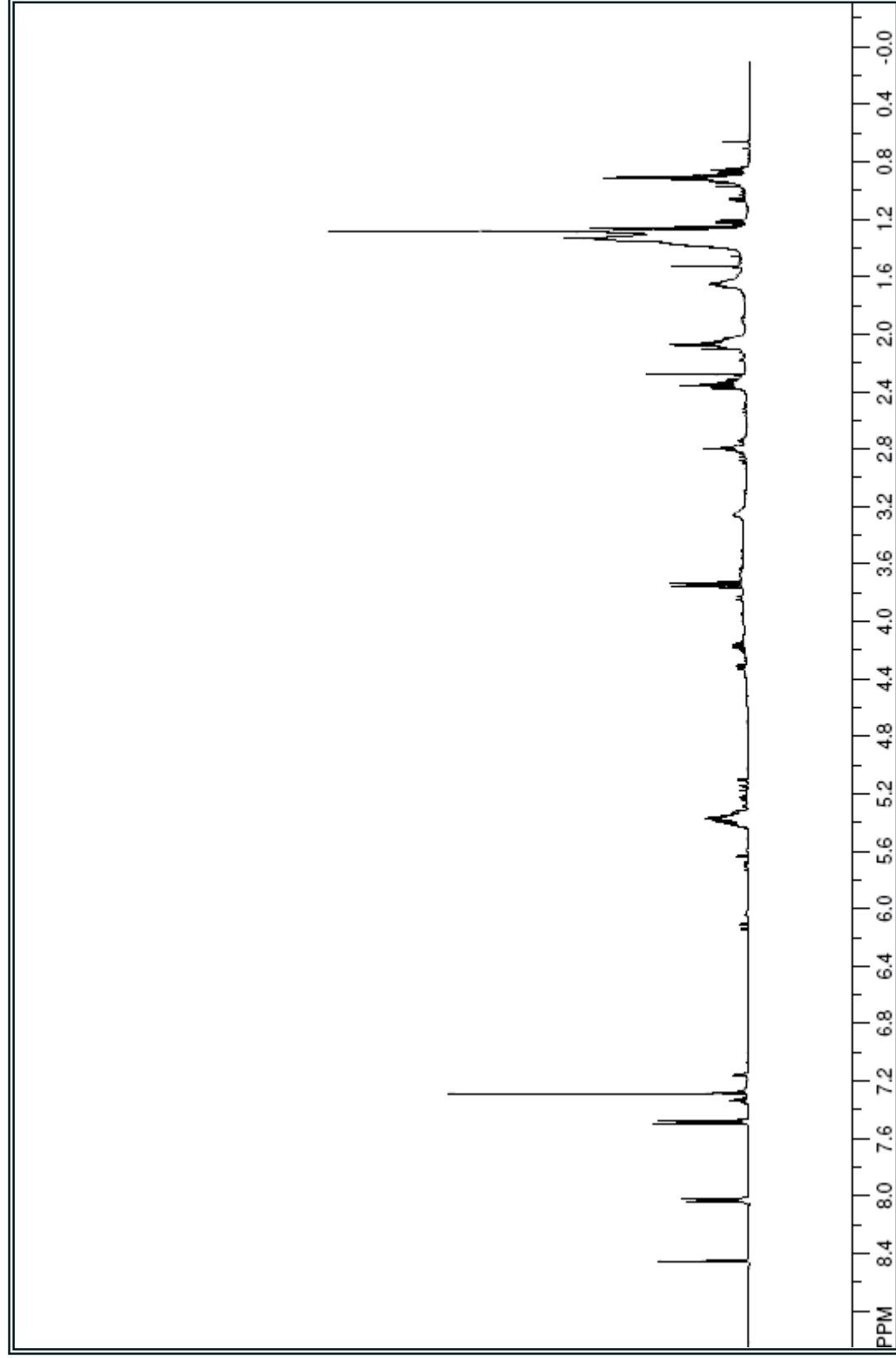


Figura 51 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 39,1 mg da amostra CAI (replicata C; AcOEt=50%, iPrOH=50%) + 1mg de antraceno.

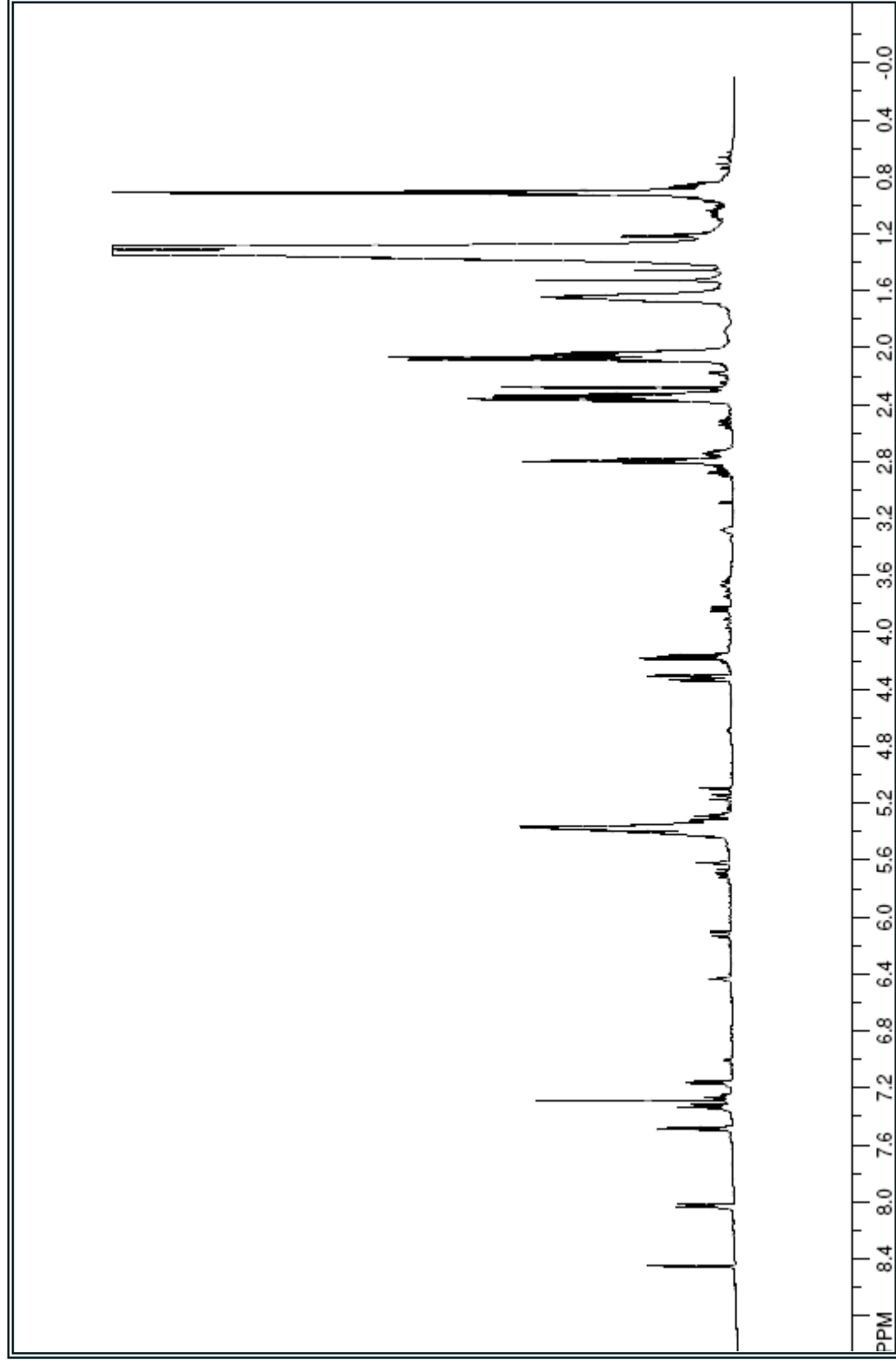


Figura 52 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 31,8 mg da amostra CE (replicata C; Et₂O=100%) + 1 mg de antraceno.

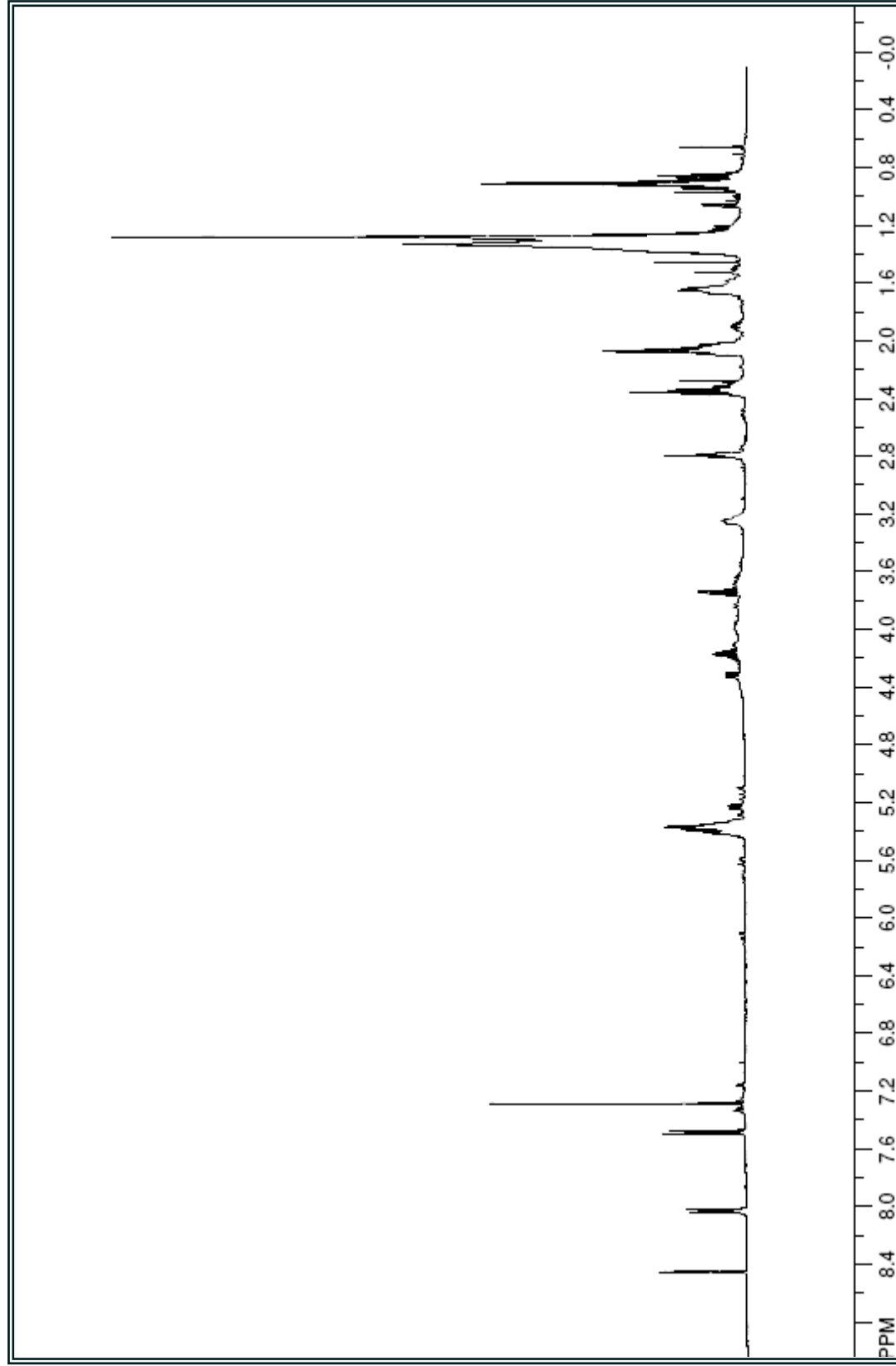


Figura 53 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 40,4 mg da amostra CEI (replicata C; iPrOH=50%, Et₂O=50%) + 1 mg de antraceno.

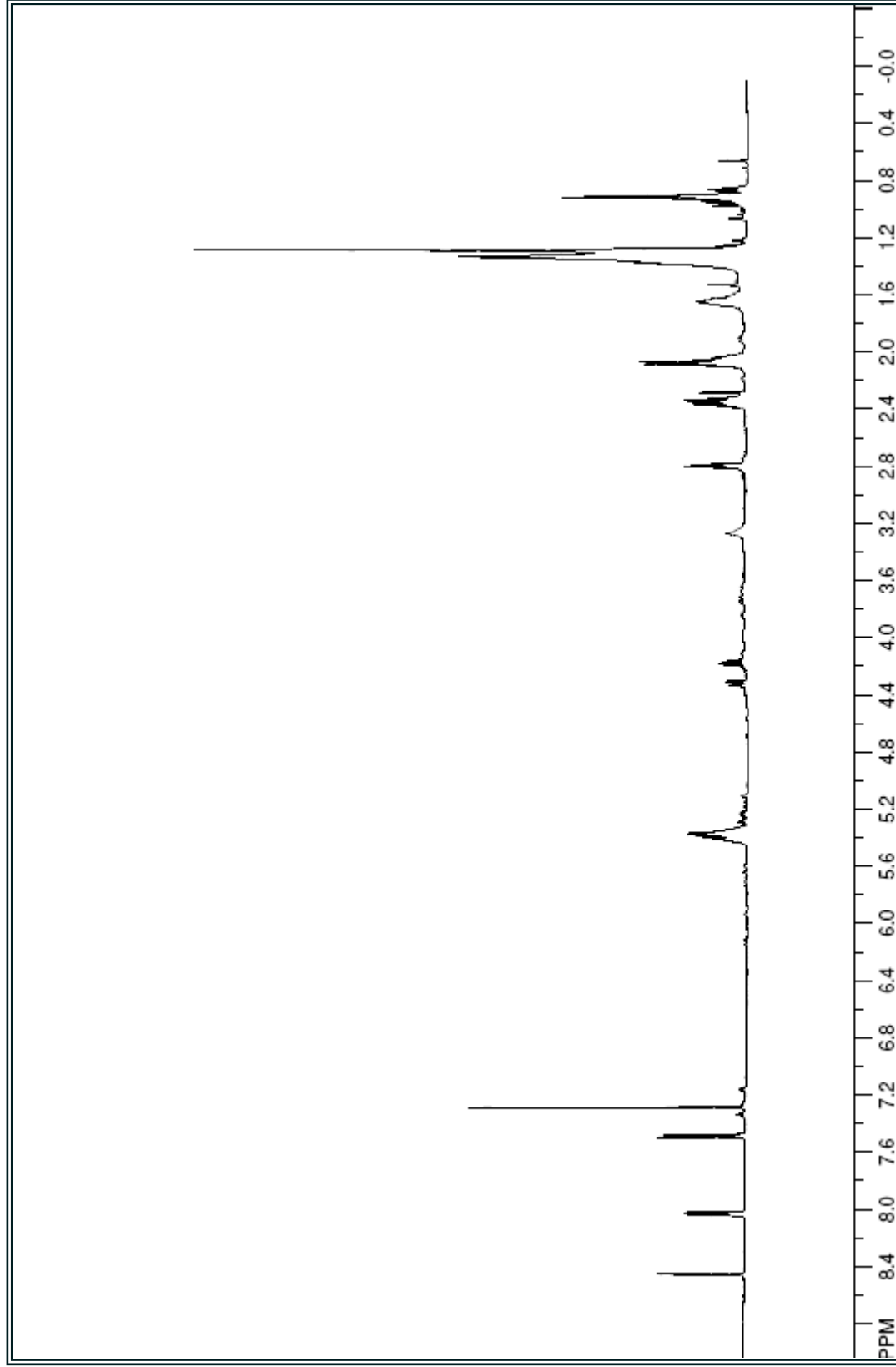


Figura 54 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 37,6 mg da amostra Cl (replicata C; iPrOH=100%) + 1 mg de antraceno.

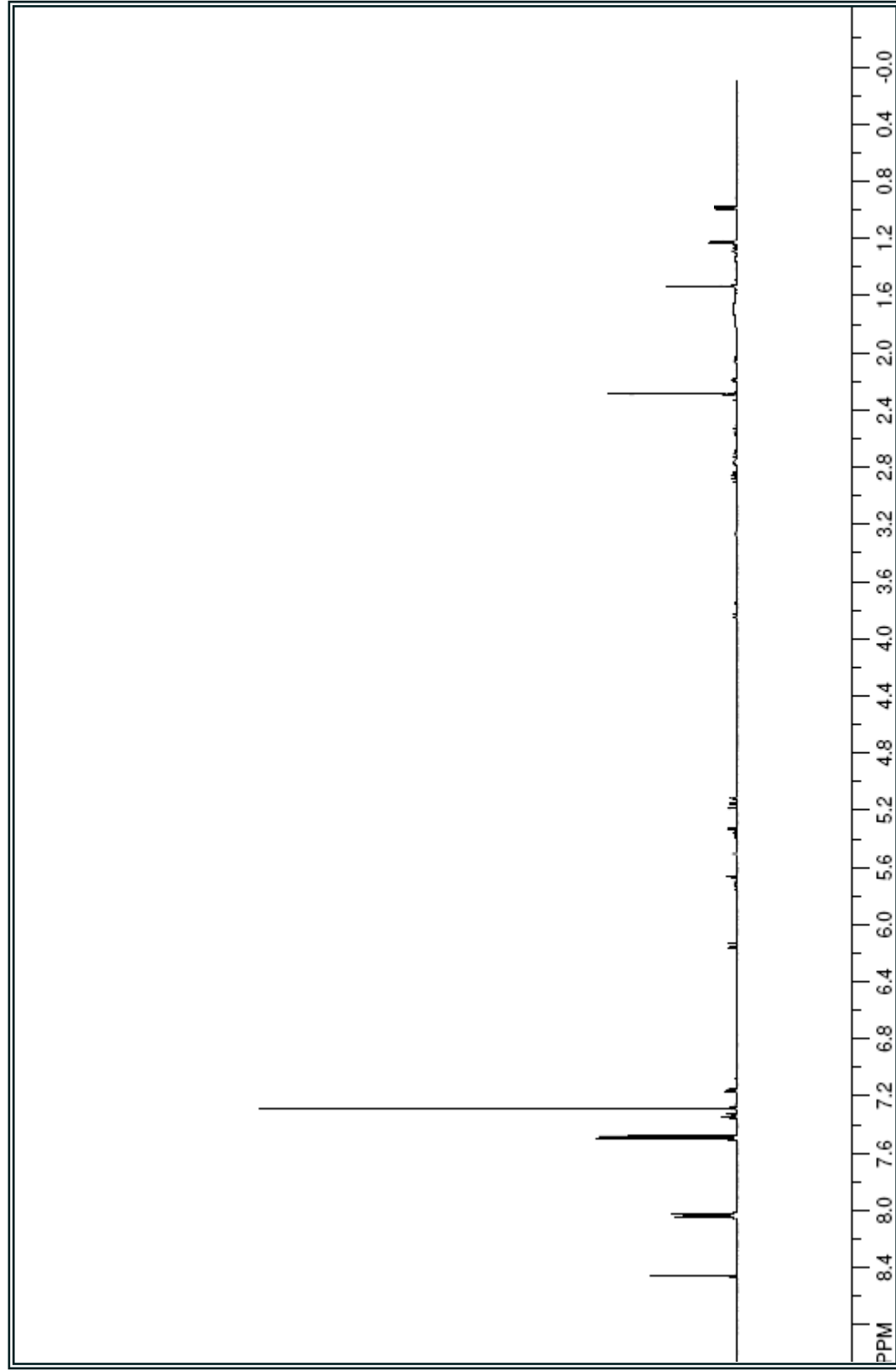


Figura 55 Espectro quantitativo de RMN de ^1H 500 MHz de 1,5 mg da citocalasina D + 1mg de antraceno.

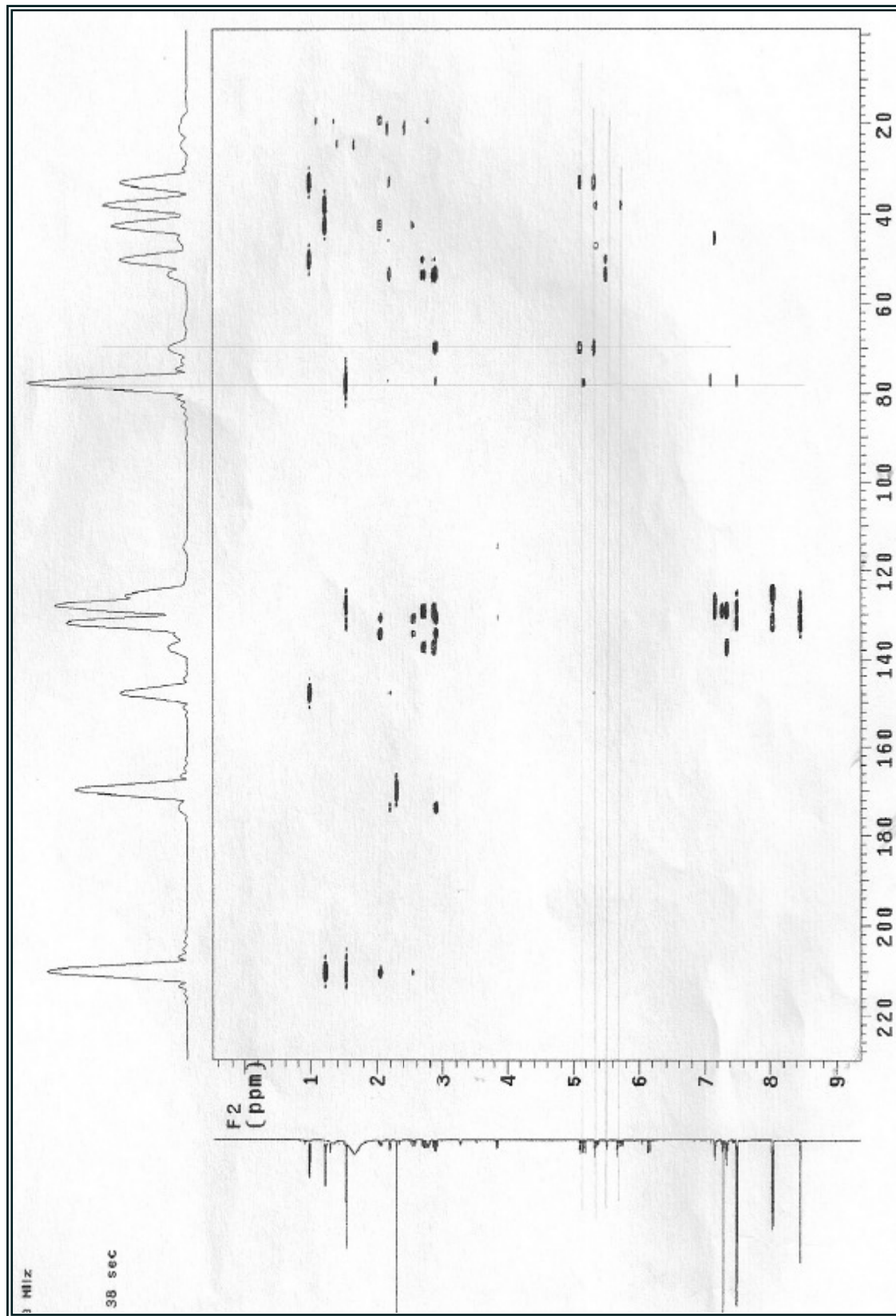


Figura 57 Mapa de contorno HMBC da citocalasina D (1,5 mg) + antraceno (1mg)

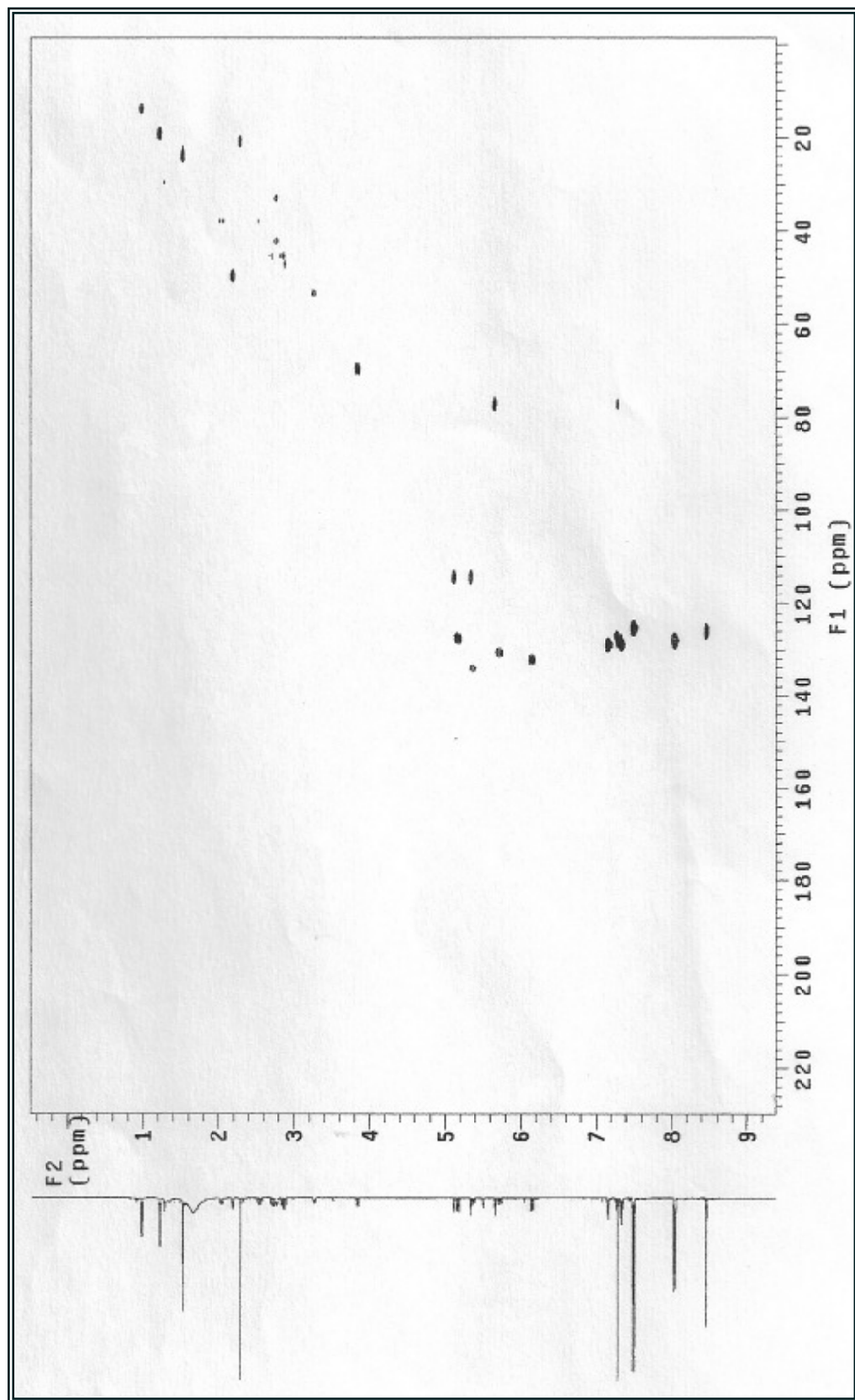


Figura 58 Mapa de contorno HMQC da citocalasina D (1,5 mg) + antraceno (1mg)

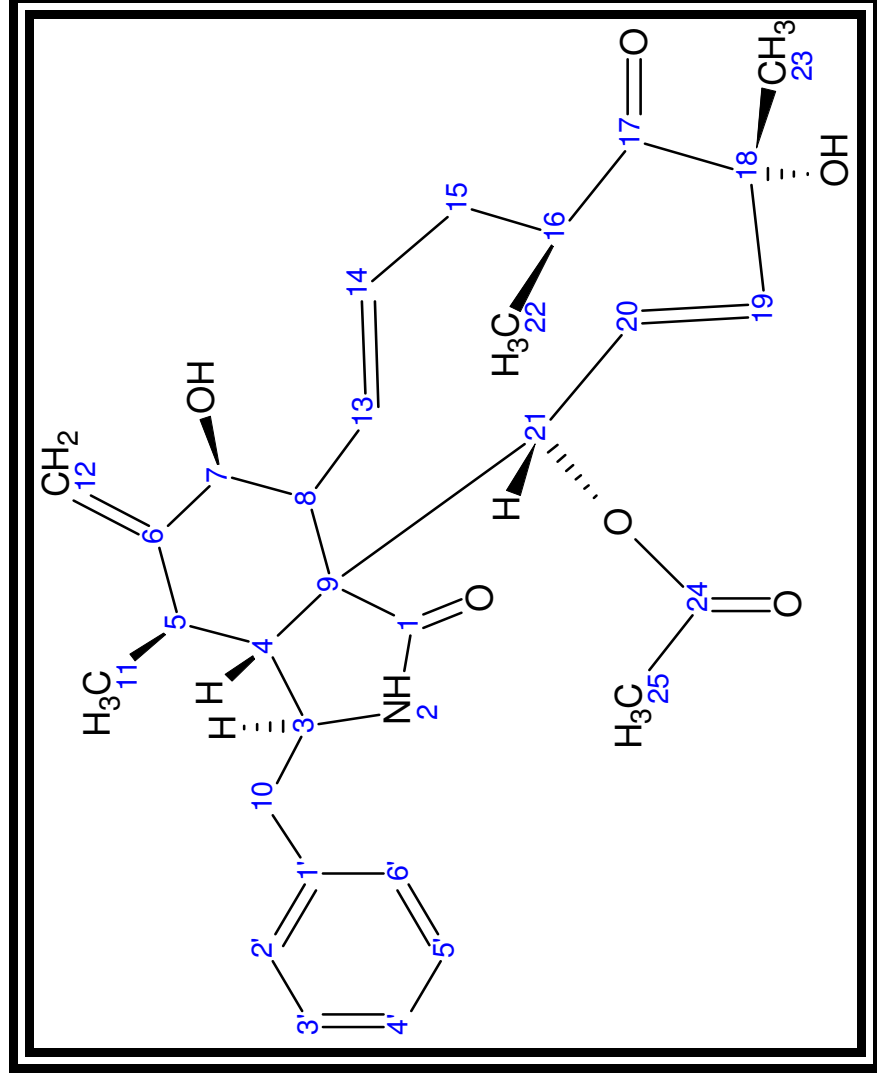


Figura 59 Citocalasina D