

REBECA PREVIA TE MEDINA

Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos

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

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

ARARAQUARA
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

M491p Medina, Rebeca Previante
Prospecção química e biológica das algas vermelhas
Asparagopsis taxiformis e *Pyropia spiralis* seus fungos
endofíticos / Rebeca Previante Medina. – Araraquara : [s.n.], 2016
430 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Alga marinha. 2. Fungos endofíticos. 3. Análise
cromatográfica. 4. Metabólitos. 5. Ressonância magnética
nuclear. I. Título.

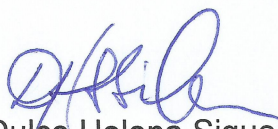
Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

REBECA PREVIA TE MEDINA

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

Araraquara, 22 de junho de 2016.

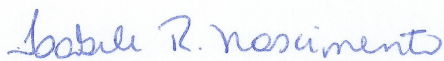
BANCA EXAMINADORA



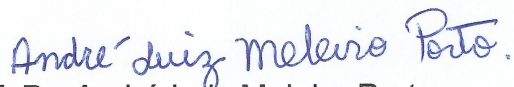
Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araújo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara -SP



Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto
Instituto de Química – USP, São Carlos -SP



Prof^a. Dr^a. Ana Helena Januário
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rebeca Previante Medina

Nome em citações bibliográficas: MEDINA, R. P.; MEDINA, Rebeca Previante; Rebeca Previante Medina; R. P. Medina; MEDINA, REBECA P.

ENDEREÇO

Endereço Profissional:

NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

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

e-mail: rebecapm_2@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2012-2016

Doutorado em Química - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Instituto de Química, Araraquara - SP - com período sanduíche em University of British Columbia (Orientador: Raymond J. Andersen).

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

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

Bolsista: Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE-CAPES.

2009 - 2011

Mestrado em Química - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá - PR.

Título: Estudo químico e avaliação da atividade antiinflamatória e antiproliferativa dos galhos da espécie vegetal *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). Ano de Obtenção: 2011.

Orientadora: Pr^ª. Dr^ª. Silvana Maria de Oliveira Santin.

Bolsista: CAPES.

2005 - 2008

Graduação em Química Bacharelado - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá - PR. Título da Monografia: Produção de amidos modificados a partir de fécula de mandioca.

Orientador: Prof. Ms. Expedito Leite Silva.

Bolsista de Iniciação Científica (2007-2008) - UEM - Título do projeto: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Eichhornia azurea* - Parte IV. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clara Megumi Abe Tanaka.

Iniciação Científica (2006 - 2007) - UEM - Título do projeto: Síntese de derivados de celulose e celulose microcristalina de *Eichhornia azurea*. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clara Megumi Abe Tanaka.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Estágio Docência: Disciplina - Preparação e caracterização das substâncias orgânicas; Curso de Graduação em Química - IQ-UNESP-Araraquara; Período: 1º semestre de 2013. Número de horas realizadas: 6 horas semanais / 90 horas totais.

- Minicurso: Interpretação espectros de massas com ionização por eletrospray e MALDI. (Carga horária: 8h). VII Simpósio do Programa Biota/FAPESP.

- Minicurso: História da Descoberta dos Fármacos. (Carga horária: 6h). 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

- Curso de Extensão: Toxicologia Forense. (Carga horária: 6h) - Universidade Estadual de Maringá (UEM).

- Minicurso: Introdução a Nanoquímica e Nanomateriais. (Carga horária: 5h). XV SBQ-SUL - Sociedade Brasileira de Química - Secretarias Regionais do RS, SC e PR.

- Minicurso: Química de Superfície e Coloides. (Carga horária: 5h). Sociedade Brasileira de Química Secretarias Regionais do RS, SC e PR, 14º SBQ-SUL.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

MEDINA, REBECA P.; SCHUQUEL, IVÂNIA T. A.; POMINI, ARMANDO M.; SILVA, CLEUZA C.; OLIVEIRA, CECÍLIA M. A.; KATO, LUCÍLIA; NAKAMURA, CELSO V.; SANTIN, SILVANA M. O. Ixorine, a New Cyclopeptide Alkaloid from the Branches of *Ixora brevifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 753758, 2016.

De OLIVEIRA, PAULO R. N.; TESTA, GLÁUCIO; MEDINA, REBECA P.; DE OLIVEIRA, CECÍLIA M. A.; KATO, LUCILIA ; DA SILVA, CLEUZA C. ; DE CARVALHO, JOÃO E.; SANTIN, SILVANA M. O. Cytotoxic activity of *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Natural Product Research**, v. 27, p. 1677-1681, 2013.

de Oliveira, Pollyanna Laurindo; Tanaka, Clara M. A.; Kato, Lucilia ; da Silva, Cleuza C.; MEDINA, Rebeca Previante; Moraes, Aline P.; Sabino, Jose R.; de Oliveira, Cecília M. A. Amaiouine, a Cyclopeptide Alkaloid from the Leaves of *Amaioua guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1195-1197, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Airton Damasceno Silva; Rebeca Previante Medina; Alessandra Regina Pepe Ambrozini; Lourdes Campaner dos Santos; Angela Regina Araújo; Dulce Helena Siqueira Silva. Antifungal and antitumoral activity of extracts and fractions from an endophytic fungus isolated from the marine red alga *Asparagopsis taxiformis*. In: 5th Brazilian Conference on Natural Products BCNP, 2015, Atibaia-SP. 5th BCNP Book of Abstracts, 2015.

PRECCARO, M.; MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; LOPES, M. N.; ARAUJO, A. R.; SILVA, D. H. S. Bioprospecção de fungos endofíticos das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis*. In: 37 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (37 RASBQ), 2014, Natal. Livro de Resumos da 37 RASBQ, 2014.

MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; YOKOYA, N. S.; LOPES, M. N.; ARAUJO, A. R. ; SILVA, D. H. S. . 5Hydroxymethylmellein: an isocoumarin derivative from an endophytic fungus from red alga *Asparagopsis taxiformis*. In: 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research GA 2014, 2014, Guimarães. Book of Abstracts of GA2014, 2014.

Rebeca Previante Medina; Silvana Maria de Oliveira Santin; Cleuza Conceição da Silva; Ivânia Terezinha Albrecht Schuquel; Cecília Maria Alves de Oliveira; Lucília Kato. A new cyclopeptide alkaloid from branches of *Ixora brevifolia* Benth. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2013, Natal. Abstracts of the 4th BCNP, 2013.

MEDINA, R. P.; SILVA, C. C.; KATO, L.; OLIVEIRA de, C. M. A.; SANTIN, S. M. O. Constituintes químicos isolados dos galhos de *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais da 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

ANTONIASSI, J. P.; GALUCH, M. B.; MEDINA, R. P.; SILVA, C. C.; SANTIN, S. M. O. Flavonóides isolados das partes aéreas de *Ipomoea alba*. In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais da 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

MEDINA, R. P.; SANTIN, S. M. O.; SILVA, C. C.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A. Lignan and cyclopeptide alkaloid isolated from branches of *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae).. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP), XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXIX RESEM) and VII Meeting of the Latin America Society of Phytochemistry (VII SFL), 2011, Ouro Preto MG. Abstracts of 3rd BCNP, 2011.

MEDINA, R. P.; TANAKA, C. M. A.; SILVA, C. C.; PERALTA, R. M.; ZAMUNER, M. L. M. Avaliação da atividade antioxidante e moluscicida do extrato bruto de *Eichhornia azurea*. In: V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2010, Maringá. Anais do V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2010.

MEDINA, R. P.; FRANÇA, P. B.; ANTONIASSI, J. P.; GALUCH, M. B.; VISENTAINER, J. V.; OLIVEIRA de, C. M. A.; SANTIN, S. M. O. Perfil de ácidos graxos dos frutos in natura de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). In: XVIII Encontro de Química da Região Sul - Química: contribuições para o futuro, 2010, Curitiba. Anais do XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010.

MEDINA, R. P.; TANAKA, C. M. A.; SILVA, C. C.; PERALTA, R. M. ; ZAMUNER, M. L. M. Avaliação da atividade antioxidante e moluscicida do extrato bruto de *Eichhornia azurea*. In: XVII Encontro de Química da Região Sul - Desafios em Química Tecnológica e Ambiental, 2009, Rio Grande. Anais do XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009.

OLIVEIRA, P. L.; OLIVEIRA de, C. M. A.; TANAKA, C. M. A.; FARIA de, E. O.; MEDINA, R. P.; MORAES, A. P. Atividade antioxidante de *Amoioya guianensis* (Rubiaceae). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Anais da 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

MEDINA, R. P.; TANAKA, C. M. A. ; SILVA, C. C. Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do extrato bruto de *Eichhornia azurea*. In: XVII Encontro Anual de Iniciação Científica (XVII EAIC), 2008, Foz do Iguaçu. Anais do XVII EAIC, 2008.

MEDINA, R. P.; OLIVEIRA DE MELO, J.; BERSANI-AMADO, C.A. ; SILVA, C. C.; DANTAS, J. A.; TANAKA, C. M. A. Efeito anti-inflamatório tópico do extrato bruto e das frações de *Eichhornia azurea*. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil / X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. Anais do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e do X International Congress of Ethnopharmacology, 2008.

MEDINA, R. P.; SUEHIRO, G.; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W.; TANAKA, C. M. A. Preparação de celulose e derivados a partir das folhas da planta *Eichhornia azurea*. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

MEDINA, R. P.; PINEDA, E. A. G. ; TANAKA, C. M. A. . Identificação por infravermelho de celulose e seus derivados preparados a partir da planta *Eichhornia azurea*. In: XVI Encontro Anual de Iniciação Científica (XVI EAIC), 2007, Maringá. Anais do XVI EAIC, 2007.

MEDINA, R. P.; SOUZA, M. C. de; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W.; TANAKA, C. M. A. . Identificação por infravermelho de celulose e seus derivados preparados a partir da planta *Eichhornia azurea*. In: XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade, 2007, Ponta Grossa. Anais do XV Encontro de Química da Região Sul, 2007.

MEDINA, R. P.; SANTIN, S. M. O. ; COSTA, S. M. G. da ; TANAKA, C. M. A. . Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica do extrato bruto do fungo *Agaricus blazei*, utilizando larvas de *Artemia salina*. In: 14º Encontro de Química da Região Sul - Química na Sociedade: significados e implicações, 2006. Anais do 14º Encontro de Química da Região Sul, 2006.

Apresentações de Trabalho

MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; YOKOYA, N. S.; LOPES, M. N.; ARAUJO, A. R.; SILVA, D. H. S. 5-Hydroxymethylmellein: an isocoumarin derivative from an endophytic fungus from red alga *Asparagopsis taxiformis*. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Rebeca Previante Medina; Silvana Maria de Oliveira Santin; Cleuza Conceição da Silva; Ivânia Terezinha Albrecht Schuquel; Cecília Maria Alves de Oliveira; Lucília Kato. A new cyclopeptide alkaloid from branches of *Ixora brevifolia* Benth. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; SILVA, C. C. ; KATO, L. ; OLIVEIRA de, C. M. A. ; SANTIN, S. M. O. . Constituintes químicos isolados dos galhos de *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; SANTIN, S. M. O. ; SILVA, C. C. ; KATO, L. ; OLIVEIRA, C. M. A. . Lignan and cyclopeptide alkaloid isolated from branches of *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; TANAKA, C. M. A. ; SILVA, C. C. ; PERALTA, R. M. ; ZAMUNER, M. L. M . Avaliação da atividade antioxidante e moluscicida do extrato bruto de *Eichhornia azurea*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; FRANÇA, P. B.; ANTONIASSI, J. P.; GALUCH, M. B.; VISENTAINER, J. V.; OLIVEIRA de, C. M. A.; SANTIN, S. M. O. Perfil de ácidos graxos dos frutos in natura de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; TANAKA, C. M. A.; SILVA, C. C.; PERALTA, R. M.; ZAMUNER, M. L. M . Avaliação da atividade antioxidante e moluscicida do extrato bruto de *Eichhornia azurea*. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; OLIVEIRA DE MELO, J. ; BERSANI-AMADO, C.A. ; SILVA, C. C. ; DANTAS, J. A. ; TANAKA, C. M. A. Efeito anti-inflamatório tópico do extrato bruto e das frações de *Eichhornia azurea*. 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

MEDINA, R. P.; TANAKA, C. M. A. ; SILVA, C. C. . Avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato bruto de *Eichhornia azurea*. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

OLIVEIRA, P. L. ; OLIVEIRA de, C. M. A.; TANAKA, C. M. A.; FARIA de, E. O.; MEDINA, R. P.; MORAES, A. P. Atividade antioxidante de *Amoioia guianensis* (Rubiaceae). 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; SUEHIRO, G.; SOUZA, M. C. de; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W. ; TANAKA, C. M. A. Preparação de celulose e derivados a partir das folhas da planta *Eichhornia azurea*. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; PINEDA, E. A. G.; TANAKA, C. M. A. Identificação por infravermelho de celulose e seus derivados preparados a partir da planta *Eichhornia azurea*. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; SOUZA, M. C. de; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W.; TANAKA, C. M. A. Identificação por infravermelho de celulose e seus derivados preparados a partir da planta *Eichhornia azurea*. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MEDINA, R. P.; SANTIN, S. M. O. ; COSTA, S. M. G. da; TANAKA, C. M. A. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica do extrato bruto do fungo *Agaricus blazei*, utilizando larvas de *Artemia salina*. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics. FCFRP - USP, Ribeirão Preto. 2015.

- 1st UNESP NMR Symposium - Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). 2014.

- Entrepreneurship for Graduate in Chemistry. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). 2014

- 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research GA 2014. (Congresso).

- VIII Simpósio do Programa Biota/FAPESP. 2014. (Simpósio).

- 4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM). 2013. (Congresso).

- Workshop 2012 - de Pós Graduação em Química e Biotecnologia - IQ-UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). 2012

- 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Constituintes químicos isolados dos galhos de *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae).. 2011. (Congresso).

- 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP), XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXIX RESEM) and VII Meeting of the Latin America Society of Phytochemistry (VII SFL). 2011. (Congresso).

- V Workshop de Biocatálise e Biotransformação. 2010. (Congresso).
- XVIII Encontro de Química da Região Sul - Química: contribuições para o futuro. 2010. (Congresso).

- XVII Encontro de Química da Região Sul - Desafios em Química Tecnológica e Ambiental. 2009. (Congresso).

- XVII Encontro Anual de Iniciação Científica (XVII EAIC). 2008. (Congresso).

- XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil / X International Congress of Ethnopharmacology. 2008. (Simpósio).

- 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007. (Congresso).

- XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade. 2007. (Congresso).

- XVI Encontro Anual de Iniciação Científica (XVI EAIC). 2007. (Congresso).

- XXIII Semana de Química da Universidade Estadual de Maringá. 2007. (Outra).

- 14º Encontro de Química da Região Sul - Química na Sociedade: significados e implicações. 2006. (Congresso).

- SulPET. 2006. (Outra).

- XXII Semana de Química da Universidade Estadual de Maringá. 2006. (Outra).

- XXI Semana de Química da UEM. 2005. (Outra).

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES:

Monografia de conclusão de curso - Mariana Preccaro; Título: Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*. (2014). Período: 2013-2014.

Às minhas avós Marcília e Maria (*in memoriam*)
e à minha mãe Ana, mulheres fortes e guerreiras,
meus exemplos de coragem, determinação e superação.

AGRADECIMENTOS

À minha mamis linda Ana Regina, por ser minha grande motivação, por ser quem você é, pelo seu exemplo, seu amor e pelo seu companheirismo. Te amo imensamente!

Ao meu pai Adilson, pelo carinho, amor e incentivo e por me ouvir em momentos de angústia. Te amo imensamente!

Ao meu noivo Rodrigo, por todo amor, carinho e compreensão, pelo apoio incondicional e por me suportar até mesmo quando eu não conseguia. Sei que me tornei uma pessoa melhor por ter você ao meu lado. Te amo lindo!

À minha grande, louca e maravilhosa família, que vibra pelas minhas conquistas e me incentiva a todo momento.

À Lêda e a Dona Maria (Mica) que estão sempre torcendo pelo meu sucesso.

Às minhas amigas Larissa, Aracelli e Vanessa, que sempre torceram por mim e aplaudiram minhas vitórias, apesar do tempo e da distância. Seus abraços me confortaram e suas palavras me motivaram.

Às minhas amigas de Graduação, Milena, Polyana, Thaís, Karina e Gláucia, por estarem presentes durante toda esta jornada e por me fazerem sorrir muitas vezes.

Aos amigos Ulisses, Kalil, Tayana, Thiago, Letícia, Jamile e Fernanda, por serem quem são, pelas risadas e pelas palavras de carinho.

Aos amigos do NuBBE, Patrícia, Alessandra, Karina, Malu, Marília, Amauri, Nerilson, Teresinha, Lidi, Vivi, Meri, Andrea, Gabriel, Paula e tantos outros, pelas palavras de carinho e pelos momentos de descontração em longos dias de trabalho. Vocês tornaram a jornada mais fácil.

Aos alunos do grupo, Luís Paulo, Erika, Alana, Camila, Airton e Leo, pelos momentos de descontração e pelas palavras de carinho em momentos difíceis.

Às minhas nubbinhas prediletas Andressa e Carol, por me ensinarem a trabalhar com fungos endofíticos, e mais ainda, pela amizade, carinho, pelas palavras de motivação e pelos nossos cafés da tarde.

À Amanda, que apesar do pouco tempo em que convivemos, se tornou uma grande amiga, que me escuta e me aconselha mesmo de longe.

Aos professores do NuBBE, Alberto, Ian, Vanderlan, Maysa e Márcia por todos os ensinamentos, e em especial, à professora Angela, que tanto nos auxiliou nesse projeto, sempre receptiva e empolgada com nosso trabalho.

À minha orientadora, professora Dulce, por ter me aceitado como sua aluna, pelos ensinamentos, pelas discussões valiosas e, principalmente, por não ter me deixado desistir do Doutorado Sanduíche.

Ao Nivaldo e a Lucinéia, responsáveis pelo laboratório de RMN, do IQ-UNESP, exemplos de profissionais dedicados e competentes.

Ao João e a Juliana, técnicos responsáveis pelos nossos laboratórios, pela amizade e pela paciência em nos ajudar sempre. Especialmente à Juliana, que me ajudou em tantas análises e me explicou e ensinou tanta coisa.

À Dr^a. Nair Yokoya pela disposição em nos ajudar nas coletas e identificação das algas. Ao professor Márcio Webber Paixão, do Departamento de Química da UFSCAR, e à professora Isabele por nos auxiliar na obtenção da rotação óptica das substâncias isoladas.

Ao professor Raymond Andersen, que me acolheu em seu laboratório na University of British Columbia, Vancouver, Canadá, e que permitiu meu crescimento e me ensinou tanta coisa valiosa.

Ao grupo de pesquisa do professor Raymond, em especial Rosanne, Kalindi, Ryan, Mandy e Lynn, que tanto me ajudaram durante o pouco tempo de convivência.

À Jie, pelos horários de almoço descontraídos, pelas risadas e por tanto se preocupar comigo.

À professora Débora Baldoqui, que hoje está na Universidade Estadual de Maringá, mas que fez parte do NuBBE e que me incentivou a fazer o Doutorado com esse grupo que adoro.

À professora Silvana, minha orientadora do Mestrado, que até hoje se preocupa comigo, me aconselha e torce pelas minhas vitórias.

À professora Clara (*in memoriam*), minha orientadora da Iniciação Científica, que infelizmente nos deixou tão precocemente, mas que sempre me incentivou e me ensinou a gostar de PN.

A todos os funcionários do Instituto de Química que nos ajudam diariamente.

Às agências de fomento, CAPES, pelas bolsas concedidas, e FAPESP.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho ou que simplesmente, me ajudaram a ser uma pessoa melhor.

O sonho

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecerem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância
das pessoas que passaram por suas vidas.

Clarice Lispector.

RESUMO

Os Produtos Naturais desempenham um papel dominante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças. Com isso, a busca por novas fontes de substâncias bioativas tem se intensificado, com destaque para estudos realizados com organismos e micro-organismos marinhos. As algas vermelhas marinhas (Rhodophyta) são as principais produtoras de metabólitos secundários biologicamente ativos dentre as algas e produzem principalmente substâncias halogenadas. Dentre os micro-organismos, podemos destacar os fungos endofíticos de algas marinhas, pois apresentam alta diversidade de espécies e diversidade estrutural dos metabólitos secundários, os quais têm mostrado potencial antitumoral, antimicrobiano e antifúngico. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo explorar o potencial das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* (estágio *Falkenbergia*) e *Pyropia spiralis*, bem como de seus fungos endofíticos, como fontes de substâncias bioativas. O estudo de *A. taxiformis* e de *P. spiralis* levou à identificação de dezesseis substâncias por CG-EM, como os ácidos eicosapentaenóico e araquidônico, além de nucleosídeos, como a uridina e a timidina, obtidos de *A. taxiformis*, e a uridina e a inosina, obtidas de *P. spiralis*. Os extratos brutos e frações das algas estudadas foram avaliados frente ao fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*, frente à enzima acetilcolinesterase e frente a linhagens tumorais de carcinoma de ovário (OVCAR-8), adenocarcinoma de cólon humano (HCT-116) e glioblastoma - humano (SF-295), sendo que os mesmos não apresentaram atividades antifúngica e anticolinesterásica significativas e apenas as frações hexânicas e butanólicas de ambas as algas apresentaram atividade citotóxica moderada frente à linhagem SF-295. Em relação ao estudo dos micro-organismos associados às algas, foi possível isolar sete linhagens de fungos endofíticos da alga *A. taxiformis* e três linhagens de *P. spiralis*, que foram cultivadas em meio de batata e dextrose (MBD) preparado com água do mar ou água ultra pura. Após o período de incubação, foram obtidos os extratos brutos em acetato de etila, que foram avaliados quanto ao perfil químico por CLAE e RMN, e perfil biológico por meio dos bioensaios *in vitro*. Após a prospecção inicial, *Nemania bipapillata* (AT-05), *Sarocladium strictum* (PS-01), *Annulohypoxylon stygium* (AT-03) e *Hypoxylon* sp. (AT-06) foram selecionados para investigação. O estudo de *N. bipapillata*, cultivado em água do mar e MBD, levou ao isolamento da dicetopiperazina ciclo(Pro-Tir), tirosol e das isocumarinas, (3*R*)-5-hidroximetil-meleína e (3*R*)-5-carbóxi-meleína. Ao cultivar essa linhagem fúngica em água ultra pura e MDB, foram isolados dois norsesquiterpenos e três sesquiterpenos do tipo botriano inéditos na literatura e um conhecido, 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -triidroxiprobotridial. A análise do extrato bruto de *S. strictum*, cultivado em água ultra pura e MDB, levou à identificação em mistura de duas dicetopiperazinas e ao isolamento da isoflavona daidzeína e de seis ftalatos naturais, dos quais dois ainda não foram descritos na literatura e nem sintetizados. *A. stygium* e *Hypoxylon* sp. foram cultivados em água do mar e MDB, sendo que *A. stygium* forneceu o pirogalol, que apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilicilina, além do tirosol e (-)-(3*R*,4*R*)-3,4,5-triidróxi-tetralona, enquanto *Hypoxylon* sp. forneceu (3*R*)-scytalona, (3*R*,4*R*)-4-hidróxi-scytalona e daidzeína. Portanto, esses resultados ressaltam a importância da investigação dos organismos marinhos, bem como de seus micro-organismos associados, e contribuem para o conhecimento da quimiodiversidade de organismos de origem marinha da costa brasileira, ainda sub-explorada do ponto de vista químico.

Palavras-chave: *Asparagopsis taxiformis*. *Pyropia spiralis*. Alga marinha vermelha. Fungos endofíticos. *Nemania bipapillata*. *Sarocladium strictum*. *Annulohypoxylon stygium*. *Hypoxylon* sp. Quimiodiversidade. Prospecção química. Prospecção biológica.

ABSTRACT

Natural Products have a major role in the discovery and development of new drugs used for diseases treatments. Thus, the search for new sources of bioactive compounds has been intensified and studies have increasingly focused on marine organisms and microorganisms. Marine red algae (Rhodophyta) are the major producers of biologically active secondary metabolites among algae, and biosynthesize mainly halogenated compounds. Among microorganisms, we highlight endophytic fungi from marine algae, as they present marked species diversity as well as structural diversity of secondary metabolites. Such metabolites have shown interesting potential as antitumor, antimicrobial and antifungal agents. Therefore, this project aimed to explore the potential of red algae *Asparagopsis taxiformis* (Falkenbergia stage) and *Pyropia spiralis* and their endophytic fungi, as novel sources of bioactive compounds. The study of *A. taxiformis* and *P. spiralis* led to identification of sixteen compounds by GC-MS, as eicosapentaenoic and arachidonic acids, in addition to nucleosides uridine and thymidine, obtained from *A. taxiformis*, and uridine and inosine, obtained from *P. spiralis*. The crude extracts and fractions from the studied algae were evaluated against phytopathogenic fungus *Cladosporium sphaerospermum*, against acetylcholinesterase enzyme and against tumor cell lines of ovarian carcinoma (OVCAR-8), human colon adenocarcinoma (HCT-116) and human glioblastoma (SF-295). No significant antifungal or acetylcholinesterase activities were observed, whereas the hexane and butanol fractions from both algae showed moderate cytotoxicity against SF-295 cell line. As for the study on the microorganisms associated to algae, seven endophytic fungi strains were isolated from *A. taxiformis* and three strains from *P. spiralis*, which were cultivated in potato dextrose broth (PDB) prepared with either sea water or ultra pure water. After incubation, the ethyl acetate crude extracts were obtained and evaluated for their chemical and biological profiles, by HPLC, NMR and *in vitro* bioassays, respectively. After the preliminary prospection, *Nemania bipapillata* (AT-05), *Sarocladium strictum* (PS-01), *Annulohypoxylon stygium* (AT-03) and *Hypoxylon* sp. (AT-06) were selected for further investigation. The study of *N. bipapillata*, cultivated in sea water and PDB, led to isolation of diketopiperazine cyclo(Pro-Tyr), tyrosol and isocoumarins, (3*R*)-5-hydroxymethylmellein and (3*R*)-5-carboxymellein. Cultivation of this fungal strain in ultra pure water and PDB afforded two botryane-type norbornesquiterpenes and three sesquiterpenes, unprecedented compounds in the literature and one known, 4β-acetoxy-9β,10β,15α-trihydroxyprobotrydial. Analysis of the crude extract from *S. strictum*, cultivated in ultra pure water and PDB, afforded a mixture of two diketopiperazines, in addition to isoflavone daidzein and six natural phthalates, including two novel ones which had been neither described in the literature nor synthesized. *A. stygium* and *Hypoxylon* sp. were cultivated in sea water and PDB, and *A. stygium* afforded pyrogallol, which was active against *Escherichia coli* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), in addition to tyrosol and (-)-(3*R*,4*R*)-3,4,5-trihydroxy-1-tetralone. *Hypoxylon* sp. afforded (3*R*)-scytalone, (3*R*,4*R*)-4-hydroxy-scytalone and daidzein. Such results highlight the importance of research on marine organisms and their associated microorganisms, and contribute to the knowledge of chemodiversity of marine organisms from the still chemically underexplored Brazilian coast.

Keywords: *Asparagopsis taxiformis*. *Pyropia spiralis*. Marine red alga. Endophytic fungi. *Nemania bipapillata*. *Sarocladium strictum*. *Annulohypoxylon stygium*. *Hypoxylon* sp. Chemodiversity. Chemical prospection. Biological prospection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Total de novos fármacos aprovados entre Janeiro/1981 e Dezembro/2014. (B - macromolécula biológica; N - Produto Natural inalterado; NB - fármaco botânico, definido como mistura; ND - derivado de Produto Natural; S - fármaco sintético; S* - fármaco sintético que apresenta como farmacóforo um Produto Natural; V - vacinas; /NM - mimetizam Produtos Naturais.....	51
Figura 2 -	Princípio da epoxidação do β -cariofileno (Car) para óxido de (-)- β -cariofileno (Car-Ox) usando a espécie <i>Nemania aenea</i> em um biorreator de interface líquido-líquido.....	72
Figura 3 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de AT-FAc (254 nm).....	88
Figura 4 -	Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 10 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de AT-FAc-F1 (254 nm).....	89
Figura 5 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de PS-FHm (254 nm).....	90
Figura 6 -	Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 5 a 50% MeOH:H ₂ O v/v a 10 mL.min ⁻¹ ; 20 minutos) de PS-FHm-F1 (254 nm).....	92
Figura 7 -	Fungos endofíticos isolados de <i>Asparagopsis taxiformis</i>	95
Figura 8 -	Fungos endofíticos isolados de <i>Pyropia spiralis</i>	96
Figura 9 -	Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 40 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 10 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de AT-05 (254 nm).....	100
Figura 10 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto BM-Mi de AT-05 (254 nm)	102
Figura 11 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 30 a 80% MeOH:H ₂ O v/v a 4,5 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de BM-Mi-F2 (254 nm).....	104
Figura 12 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto BM-Mi de AT-05 obtido em escala reduzida (preto) e em escala ampliada (vermelho) (254 nm).	106

Figura 13 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 30 a 80% MeOH:H ₂ O v/v a 4,5 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de BM-Mi-F2 (254 nm).....	108
Figura 14 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de PS-01 (254 nm).....	109
Figura 15 -	Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 10 a 75% MeOH:H ₂ O v/v a 10 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de PS-01-F1 (preto - 254 nm; azul - 230 nm)....	111
Figura 16 -	Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 30 a 80% MeOH:H ₂ O v/v a 10 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de PS-01-F2 (254 nm).....	112
Figura 17 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 70 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 4,5 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de PS-01-F6 (254 nm).....	114
Figura 18 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna InertSustain C-18; ACN:H ₂ O 12:88 v/v a 2,0 mL.min ⁻¹ ; 65 minutos) de AT-03-F8 (vermelho - 254 nm; azul - 210 nm e verde - 310 nm).....	117
Figura 19 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna C-18 CSC - Inertsil; gradiente 10 a 30% ACN:H ₂ O v/v a 2 mL.min ⁻¹ ; 50 minutos) de AT-03-F5 (preto - 254 nm e cinza - 210 nm).....	118
Figura 20 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna InertSustain C-18; ACN:H ₂ O 12:88 v/v a 2,0 mL.min ⁻¹ ; 75 minutos) de AT-06-F8 (preto - 210 nm; cinza - 254 nm).....	121
Figura 21 -	Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna C-18 CSC - Inertsil; gradiente 5 a 50% ACN:H ₂ O v/v a 2,0 mL.min ⁻¹ ; 60 minutos) de AT-06-F9 (preto - 254 nm; cinza - 210 nm).....	123
Figura 22 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos) de AT-EB (254nm).....	127
Figura 23 -	Espectro de RMN de ¹ H de AT-EB (CD ₃ OD, 300 MHz).....	128
Figura 24 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min.; 254 nm) de PS-EBL (azul), PS-EBM (verde) e PS-EBN (vermelho).....	129
Figura 25 -	Espectros de RMN de ¹ H de PS-EBL (azul), PS-EBM (verde), PS-EBN (vermelho) (CD ₃ OD, 300 MHz).....	129

Figura 26 -	Espectro e expansões de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. spiralis</i> em escala ampliada (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	130
Figura 27 -	Cromatogramas das frações de <i>A. taxiformis</i> (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 40 min; 254 nm): a) Frações AT-FH1 (preto) e AT-FH2 (azul); b) Frações AT-FAc (preto) e AT-FD (azul).....	131
Figura 28 -	Cromatogramas das frações de <i>A. taxiformis</i> (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 40 min.; 254 nm): a) Frações AT-FBu1 (preto) e AT-FBu2 (azul); b) Frações AT-FHm1 (preto), AT-FHm2 (azul) e AT-FAq (vermelho).....	132
Figura 29 -	Espectros de RMN de ^1H de AT-FH1 (roxo), AT-FH2 (azul), AT-FD (verde) (CDCl ₃ , 300 MHz) e AT-FAc (vermelho) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	133
Figura 30 -	Espectros de RMN de ^1H de AT-FBu1 (azul) e AT-FBu2 (vermelho) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	134
Figura 31 -	Espectros de RMN de ^1H de AT-FHm1 (azul), AT-FHm2 (verde) e AT-FAq (vermelho) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	135
Figura 32 -	Cromatogramas das frações de <i>P. spiralis</i> (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 40 min.; 254 nm): a) Frações PS-FH1 (preto) e PS-FH2 (azul); b) Frações PS-FAc (preto) e PS-FD (azul).....	136
Figura 33 -	Cromatogramas das frações de <i>P. spiralis</i> (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 40 min.; 254 nm): a) Frações PS-FBu1 (preto) e PS-FBu2 (azul); b) Frações PS-FHm1 (preto), PS-FHm2 (vermelho) e PS-FAq (azul).....	137
Figura 34 -	Espectros de RMN de ^1H de PS-FH1 (roxo), PS-FH2 (azul), PS-FD (verde) (CDCl ₃ , 300 MHz) e PS-FAc (vermelho) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	138
Figura 35 -	Espectros de RMN de ^1H de PS-FBu1 (azul) e PS-FBu2 (vermelho) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	138
Figura 36 -	Espectros de RMN de ^1H de PS-FHm1 (azul), PS-FHm2 (verde) e PS-FAq (vermelho) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	139
Figura 37 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de AT-FH (254 nm).....	140

Figura 38 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de PS-FH (254 nm).....	140
Figura 39 -	Mecanismo para a reação de sililação (exemplificada para um álcool).....	141
Figura 40 -	Cromatograma, obtido por CG-EM, de AT-FH	143
Figura 41 -	Cromatograma, obtido por CG-EM, de PS-FH	143
Figura 42 -	Espectros no UV-Vis das substâncias: a) S01 (25% MeOH:75% H ₂ O) e b) S02 (35,6% MeOH:64,4% H ₂ O).....	147
Figura 43 -	Espectro de RMN de ¹ H de S01 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	149
Figura 44 -	Mapa de contornos COSY de S01 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	150
Figura 45 -	Mapa de contornos HSQC de S01 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	151
Figura 46 -	Mapa de contornos HMBC de S01 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	152
Figura 47 -	Espectro de RMN de ¹ H de S02 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	155
Figura 48 -	Mapa de contornos COSY de S02 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	156
Figura 49 -	Mapa de contornos HSQC de S02 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	157
Figura 50 -	Mapa de contornos HMBC de S02 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	158
Figura 51 -	Espectros no UV-Vis das substâncias: a) S01 (23,9% MeOH:76,1% H ₂ O) e b) S03 (28,9% MeOH:71,1% H ₂ O).....	160
Figura 52 -	Espectro de RMN de ¹ H da subfração PS-FHm-F1-6 e identificação de S01 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	161
Figura 53 -	Espectro de RMN de ¹ H da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de S03 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	163
Figura 54 -	Mapa de contornos COSY da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de S03 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	164
Figura 55 -	Mapa de contornos HSQC da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de S03 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	165
Figura 56 -	Mapa de contornos HMBC da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de S03 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	166

Figura 57 -	a) Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de AT-FBu (254 nm); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,7 min; c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 10,4 min.....	169
Figura 58 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de AT-FHm (254 nm); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,7 min; c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 8,9 min.....	170
Figura 59 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de PS-FAc (254 nm); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,6 min; c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 8,8 min.....	171
Figura 60 -	Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) de PS-FBu (254 nm); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,5 min; c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 8,6 min.....	172
Figura 61 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>A. taxiformis</i> : a) AT-01; b) AT-02; c) AT-03 e d) AT-04	176
Figura 62 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>A. taxiformis</i> : a) AT-05; b) AT-06 e c) AT-07	177
Figura 63 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>P. spiralis</i> : a) PS-01; b) PS-02 e c) PS-03	178
Figura 64 -	Espectros de RMN de ¹ H de AT-01 (roxo), AT-02 (azul), AT-03 (verde) e AT-04 (vermelho) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).....	180
Figura 65 -	Espectros de RMN de ¹ H de AT-05 (azul), AT-06 (verde) e AT-07 (vermelho) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).....	181

Figura 66 -	Espectros de RMN de ^1H de PS-01 (azul), PS-02 (verde) e PS-03 (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).....	182
Figura 67 -	Espectro no UV-Vis da substância S05 (48,4% MeOH:51,6% H_2O).....	185
Figura 68 -	Espectro de Massas de alta resolução de S05 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	187
Figura 69 -	Espectro de RMN de ^1H de S05 ($\text{DMSO} - d_6$; 300 MHz).....	188
Figura 70 -	Mapa de contornos COSY de S05 ($\text{DMSO} - d_6$; 300 MHz).....	189
Figura 71 -	Mapa de contornos HSQC de S05 ($\text{DMSO} - d_6$; 300 e 75 MHz).....	190
Figura 72 -	Mapa de contornos HMBC de S05 ($\text{DMSO} - d_6$; 300 e 75 MHz).....	191
Figura 73 -	Espectros de RMN de ^1H de S05 (azul claro) e NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,24 (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz).....	193
Figura 74 -	Espectro no UV-Vis da substância S06 (50% MeOH:50% H_2O).....	195
Figura 75 -	Espectro de Massas de alta resolução de S06 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	196
Figura 76 -	Espectro de RMN de ^1H de S06 (CD_3OD ; 600 MHz).....	198
Figura 77 -	Mapa de contornos COSY de S06 (CD_3OD ; 600 MHz).....	199
Figura 78 -	Mapa de contornos HSQC de S06 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	200
Figura 79 -	Mapa de contornos HMBC de S06 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	201
Figura 80 -	Espectro no UV-Vis da substância S07 (57,4% MeOH:42,6% H_2O).....	203
Figura 81 -	Espectro de Massas de alta resolução de S07 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	204
Figura 82 -	Espectro de RMN de ^1H de S07 (CD_3OD ; 600 MHz).....	206
Figura 83 -	Mapa de contornos COSY de S07 (CD_3OD ; 600 MHz).....	207
Figura 84 -	Mapa de contornos HSQC de S07 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	208
Figura 85 -	Mapa de contornos HMBC de S07 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	209
Figura 86 -	Espectro de dicroísmo circular de S07 (200-400 nm).....	210
Figura 87 -	Espectros no UV-Vis da substância S08 (68,7% MeOH:31,3% H_2O)....	212

Figura 88 -	Espectro de Massas de alta resolução de S07 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	213
Figura 89 -	Espectro de RMN de ^1H de S08 (CD_3OD ; 600 MHz).....	215
Figura 90 -	Mapa de contornos COSY de S08 (CD_3OD ; 600 MHz).....	216
Figura 91 -	Mapa de contornos HSQC de S08 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	217
Figura 92 -	Mapa de contornos HMBC de S08 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	218
Figura 93 -	Espectro de dicroísmo circular de S08 (200-400 nm).....	219
Figura 94 -	Proposta biossintética para as isocumarinas isoladas.....	221
Figura 95 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos BMi-M (preto) e BM-M (vermelho).....	222
Figura 96 -	Espectros no UV-Vis das substâncias: a) S07 ($t_R = 21,8$ min.) e b) S08 ($t_R = 29,3$ min.) nos cromatogramas de BMi-M e BM-M	223
Figura 97 -	Espectros de RMN de ^1H dos extratos BMi-M (azul) e BM-M (vermelho).....	223
Figura 98 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos BM-M (preto) e BM-Mi (vermelho) obtidos em água do mar e água ultra pura, respectivamente.....	224
Figura 99 -	Espectro no UV-Vis associado ao pico em 21,7 min. no cromatograma de BM-Mi	224
Figura 100 -	Espectros de RMN de ^1H dos extratos BM-M (azul) e BM-Mi (vermelho).....	225
Figura 101 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos CM-M (preto) e BM-M (vermelho).....	226
Figura 102 -	Espectros de RMN de ^1H dos extratos BM-M (azul) e CM-M (vermelho).....	226
Figura 103 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 min; 254 nm) dos extratos CM-M (preto) e CM-Mi (vermelho).....	227
Figura 104 -	Espectros no UV-Vis associados ao pico em 29,2 min. no cromatograma de: a) CM-M ; b) CM-Mi	227

Figura 105 -	Espectros de RMN de ^1H dos extratos CM-M (azul) e CM-Mi (vermelho).....	228
Figura 106 -	Potencial citotóxico dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05 frente às linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7.....	230
Figura 107 -	Espectro no UV-Vis da substância S09 (57,3% MeOH:42,7% H_2O).....	231
Figura 108 -	Espectro de Massas de baixa resolução de S09 (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap).....	233
Figura 109 -	Espectro de Massas de baixa resolução de S09 com CD_3OD (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap).....	234
Figura 110 -	Espectro de Massas de alta resolução de S09 (Waters/Micromass - LCT - ESI-TOF).....	235
Figura 111 -	Espectro de RMN de ^1H de S09 (CD_3OD ; 600 MHz).....	237
Figura 112 -	Mapa de contornos COSY de S09 (CD_3OD ; 600 MHz).....	238
Figura 113 -	Espectro de ^{13}C de S09 (CD_3OD ; 150 MHz).....	239
Figura 114 -	Mapa de contornos HSQC de S09 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	240
Figura 115 -	Mapa de contornos HMBC de S09 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	241
Figura 116 -	Ampliação do mapa de contornos HMBC de S09 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	242
Figura 117 -	Espectros de RMN de ^1H de S09 (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,43 (azul claro); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,32 (verde); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,10 (vermelho); (CD_3OD ; 600 MHz).....	244
Figura 118 -	Espectro no UV-Vis da substância S10 (59,4% MeOH:40,6% H_2O).....	246
Figura 119 -	Espectro de massas de baixa resolução de S10 (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap).....	247
Figura 120 -	Espectro de massas de baixa resolução de S10 com CD_3OD (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap).....	248
Figura 121 -	Espectro de massas de alta resolução de S10 (Waters/Micromass - LCT - ESI-TOF).....	249
Figura 122 -	Espectro de RMN de ^1H de S10 (CD_3OD ; 600 MHz).....	251
Figura 123 -	Mapa de contornos COSY de S10 (CD_3OD ; 600 MHz).....	252

Figura 124 -	Espectro de ^{13}C de S10 (CD_3OD ; 150 MHz).....	253
Figura 125 -	Mapa de contornos HSQC de S10 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	254
Figura 126 -	Mapa de contornos HMBC de S10 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	255
Figura 127 -	Ampliação do mapa de contornos HMBC de S10 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	256
Figura 128 -	Espectro de RMN de ^1H de S10 ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz).....	258
Figura 129 -	Mapa de contornos ROESY de S10 ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz).....	259
Figura 130 -	Espectro no UV-Vis da substância S11 (56,4% MeOH:43,6% H_2O).....	261
Figura 131 -	Espectro de Massas de alta resolução de S11 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	262
Figura 132 -	Espectro de RMN de ^1H de S11 (CD_3OD ; 600 MHz).....	264
Figura 133 -	Mapa de contornos COSY de S11 (CD_3OD ; 600 MHz).....	265
Figura 134 -	Mapa de contornos HSQC de S11 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	266
Figura 135 -	Mapa de contornos HMBC de S11 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	267
Figura 136 -	Ampliação do mapa de contornos HMBC de S11 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	268
Figura 137 -	Espectros de RMN de ^1H de S11 (azul); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,10 (verde); NOESY 1D irradiado em δ_{H} 1,48 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz).....	270
Figura 138 -	Espectro no UV-Vis da substância S12 (61,3% MeOH:38,7% H_2O).....	272
Figura 139 -	Espectro de Massas de alta resolução de S12 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	273
Figura 140 -	Espectro de RMN de ^1H de S12 (CD_3OD ; 600 MHz).....	275
Figura 141 -	Mapa de contornos COSY de S12 (CD_3OD ; 600 MHz).....	276
Figura 142 -	Mapa de contornos HSQC de S12 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	277
Figura 143 -	Mapa de contornos HMBC de S12 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	278
Figura 144 -	Ampliação do mapa de contornos HMBC de S12 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).....	279
Figura 145 -	Espectro de HOMODEC de S12 - irradiado em δ_{H} 2,79.....	281

Figura 146 -	Espectro de HOMODEC de S12 - irradiado em δ_H 1,06.....	282
Figura 147 -	Espectros de RMN de: 1H de S12 (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_H 2,33 (azul claro); c) NOESY 1D irradiado em δ_H 1,44 (verde); NOESY 1D irradiado em δ_H 1,06 (vermelho) (CD ₃ OD; 600 MHz).....	284
Figura 148 -	Espectro no UV-Vis da substância S13 (63% MeOH:37% H ₂ O).....	286
Figura 149 -	Espectro de Massas de alta resolução de S13 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	287
Figura 150 -	Espectro de RMN de 1H de S13 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	289
Figura 151 -	Mapa de contornos COSY de S13 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	290
Figura 152 -	Mapa de contornos HSQC de S13 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	291
Figura 153 -	Mapa de contornos HMBC de S13 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	292
Figura 154 -	Ampliação do mapa de contornos HMBC de S13 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	293
Figura 155 -	Espectros de RMN de 1H de S13 (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_H 4,02 (azul claro); NOESY 1D irradiado em δ_H 1,28 (verde); NOESY 1D irradiado em δ_H 1,02 (vermelho) (CD ₃ OD; 600 MHz).....	295
Figura 156 -	Espectro no UV-Vis da substância S14 (64,1% MeOH:35,9% H ₂ O).....	297
Figura 157 -	Espectro de Massas de alta resolução de S14 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	298
Figura 158 -	Espectro de RMN de 1H de S14 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	300
Figura 159 -	Mapa de contornos COSY de S14 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	301
Figura 160 -	Mapa de contornos HSQC de S14 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	302
Figura 161 -	Mapa de contornos HMBC de S14 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	303
Figura 162 -	Ampliação do mapa de contornos HMBC de S14 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	304
Figura 163 -	Espectros de RMN de 1H de S14 (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_H 1,31 (azul claro); NOESY 1D - irradiado em δ_H 1,13 (verde); NOESY 1D - irradiado em δ_H 1,10 (vermelho) (CD ₃ OD; 600 MHz).....	306
Figura 164 -	Espectros de dicroísmo circular (200-400 nm) de: a) S09 (vermelho) e S14 (preto); b) S10 (preto) e S11 (vermelho); c) S12 e d) S13	308
Figura 165 -	Rota biossintética para a formação do botridial.....	310

Figura 166 -	Proposta biossintética para a formação dos derivados do botridial.....	311
Figura 167 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de AT-03 obtido em escala reduzida (azul) e em escala ampliada (vermelho) (254 nm).....	312
Figura 168 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de AT-06 obtido em escala reduzida (preto) e em escala ampliada (azul) (254 nm).....	313
Figura 169 -	Espectros no UV-Vis das substâncias associadas aos picos cromatográficos em: a) 21,4 min. e b) 29 min. no cromatograma de AT-06 em escala reduzida; c) 21,9 min. e d) 28,5 min. no cromatograma de AT-06 em escala ampliada.....	313
Figura 170 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de PS-01 obtido em escala reduzida (azul) e em escala ampliada (vermelho) (254 nm).....	314
Figura 171 -	Potencial citotóxico dos extratos brutos de AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada frente às linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7.....	316
Figura 172 -	Espectro de RMN de ¹ H de PS-01-F1-12 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	319
Figura 173 -	Mapa de contornos HSQC de PS-01-F1-12 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	320
Figura 174 -	Mapa de contornos COSY de PS-01-F1-12 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	321
Figura 175 -	Correlações observadas no mapa de contornos COSY para as substâncias: a) S15 ; b) S16	322
Figura 176 -	Mapa de contornos HMBC de PS-01-F1-12 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	323
Figura 177 -	Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para as substâncias: a) S15 ; b) S16	324
Figura 178 -	Biogênese das 2,5-dicetopiperazinas.....	327
Figura 179 -	Espectro de UV da substância S17 (62,5% MeOH:37,5% H ₂ O).....	327
Figura 180 -	Espectro de Massas de alta resolução de S17 (Bruker - MaXis Impact - ESI-Q-TOF).....	329
Figura 181 -	Espectro de RMN de ¹ H de S17 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	330

Figura 182 -	Mapa de contornos COSY de S17 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	331
Figura 183 -	Espectro de ¹³ C de S17 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 150 MHz).....	332
Figura 184 -	Mapa de contornos HSQC de S17 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	333
Figura 185 -	Mapa de contornos de HMBC de S17 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	334
Figura 186 -	a) Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) do extrato bruto de PS-01 obtido em escala ampliada (vermelho) e do extrato do meio de cultura (azul); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,2 min. (daidzeína) no cromatograma do extrato de PS-01 (vermelho); c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,3 min. no cromatograma do extrato do meio de cultura (azul).....	336
Figura 187 -	Espectro no UV-Vis da substância S18 (83,6% MeOH:16,4% H ₂ O).....	337
Figura 188 -	Espectro de Massas de alta resolução de S18 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	338
Figura 189 -	Espectro de RMN de ¹ H de S18 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	339
Figura 190 -	Mapa de contornos HSQC de S18 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	340
Figura 191 -	Mapa de contornos HMBC de S18 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	341
Figura 192 -	Espectro no UV-Vis da substância S19 (84,1% MeOH:15,9% H ₂ O).....	342
Figura 193 -	Espectro de Massas de alta resolução de S19 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	343
Figura 194 -	Espectro de RMN de ¹ H de S19 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	344
Figura 195 -	Mapa de contornos HSQC de S19 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	345
Figura 196 -	Mapa de contornos HMBC de S19 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	346
Figura 197 -	Espectro no UV-Vis da substância S20 (85,6% MeOH:14,4% H ₂ O).....	348
Figura 198 -	Espectro de Massas de alta resolução de S20 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	349
Figura 199 -	Espectro de RMN de ¹ H de S20 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	350
Figura 200 -	Mapa de contornos HSQC de S20 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	351
Figura 201 -	Mapa de contornos HMBC de S20 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	352

Figura 202 -	Espectro no UV-Vis da substância S21 (85,9% MeOH:14,1% H ₂ O).....	353
Figura 203 -	Espectro de Massas de alta resolução de S21 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	354
Figura 204 -	Espectro de RMN de ¹ H de S21 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	355
Figura 205 -	Mapa de contornos HSQC de S21 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	356
Figura 206 -	Mapa de contornos HMBC de S21 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	357
Figura 207 -	Espectro no UV-Vis da substância S22 (87,5% MeOH:12,5% H ₂ O).....	359
Figura 208 -	Espectro de Massas de alta resolução de S22 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	360
Figura 209 -	Espectro de RMN de ¹ H de S22 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	361
Figura 210 -	Mapa de contornos de S22 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	362
Figura 211 -	Mapa de contornos HMBC de S22 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	363
Figura 212 -	Espectro no UV-Vis da substância S23 (95,3% MeOH:4,7% H ₂ O).....	364
Figura 213 -	Espectro de RMN de ¹ H de S23 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	365
Figura 214 -	Mapa de contornos HSQC de S23 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	366
Figura 215 -	Mapa de contornos HMBC de S23 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).....	367
Figura 216 -	Proposta biossintética para ftalato de dibutila.....	369
Figura 217 -	a) Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) do extrato bruto de PS-01 obtido em escala ampliada (vermelho) e do extrato do meio de cultura (azul); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 38,2 min. (ftalato) no cromatograma do extrato de PS-01 (vermelho); c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 38,3 min. no cromatograma do extrato do meio de cultura (azul).....	370
Figura 218 -	Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) dos extratos brutos, obtidos em escala ampliada, de PS-01 (preto), AT-03 (azul) e AT-06 (vermelho)..	371
Figura 219 -	Espectro de RMN de ¹ H da fração AT-03-F5 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	373
Figura 220 -	Espectro no UV da substância S24 (12% ACN: 88% H ₂ O).....	374

Figura 221 -	Espectro de Massas de baixa resolução de S24 (Kratos MS-50 - EI).....	375
Figura 222 -	Espectro de RMN de ^1H de S24 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).....	377
Figura 223 -	Espectro de ^{13}C de S24 (DMSO- d_6 ; 150 MHz).....	378
Figura 224 -	Espectro de Massas de alta resolução de S25 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).....	380
Figura 225 -	Espectro de RMN de ^1H de S25 (CD $_3$ OD; 600 MHz).....	382
Figura 226 -	Mapa de contornos COSY de S25 (CD $_3$ OD; 600 MHz).....	383
Figura 227 -	Mapa de contornos HSQC de S25 (CD $_3$ OD; 600 e 150 MHz).....	384
Figura 228 -	Mapa de contornos HMBC de S25 (CD $_3$ OD; 600 e 150 MHz).....	385
Figura 229 -	Espectros de RMN de ^1H de S25 (azul claro) e NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 5,10 (vermelho) (CD $_3$ OD; 600 MHz).....	387
Figura 230 -	Espectro de Dicroísmo circular de S25	388
Figura 231 -	Espectro de massas de baixa resolução de S26 (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap).....	391
Figura 232 -	Espectro de RMN de ^1H de S26 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).....	393
Figura 233 -	Mapa de contornos COSY de S26 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).....	394
Figura 234 -	Mapa de contornos HSQC de S26 (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).....	395
Figura 235 -	Mapa de contornos HMBC de S26 (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).....	396
Figura 236 -	Espectro de Dicroísmo circular de S26	397
Figura 237 -	Espectro de massas de baixa resolução de S27 com CD $_3$ OD (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap).....	400
Figura 238 -	Espectro de RMN de ^1H de S27 (CD $_3$ OD; 600 MHz).....	402
Figura 239 -	Mapa de contornos HSQC de S27 (CD $_3$ OD; 600 e 150 MHz).....	403
Figura 240 -	Mapa de contornos COSY de S27 (CD $_3$ OD; 600 MHz).....	404
Figura 241 -	Mapa de contornos HMBC de S27 (CD $_3$ OD; 600 e 150 MHz).....	405
Figura 242 -	Espectros de RMN de ^1H de S27 (azul claro) e NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,48 (vermelho) (CD $_3$ OD; 600 MHz).....	407
Figura 243 -	Espectro de dicroísmo circular de S27	408

Figura 244 -	Rota biossintética da 1,8-di-hidróxi-naftaleno melanina e policetídeos relacionados a vias de derivação.....	411
Figura 245 -	Proposta biossintética da 3,4,5-tri-hidróxi-tetralona (S25) a partir da 3-hidróxi-juglona.....	412
Figura 246-	a) Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v à 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) do extrato bruto de AT-06 obtido em escala ampliada (vermelho) e do extrato do meio de cultura (azul); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,2 min. (daidzeína) no cromatograma do extrato de AT-06 (vermelho); c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,3 min. no cromatograma do extrato do meio de cultura (azul).....	413

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Fracionamento dos extratos brutos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i> pela metodologia 1.....	85
Esquema 2 -	Fracionamento dos extratos brutos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i> pela metodologia 2.....	86
Esquema 3 -	Estudo da fração AT-FAc	90
Esquema 4 -	Estudo da fração PS-FHm	92
Esquema 5 -	Processo realizado para o isolamento dos fundos endofíticos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	94
Esquema 6 -	Processo para obtenção do extrato bruto dos fungos endofíticos isolados.....	98
Esquema 7 -	Estudo do extrato bruto do fungo endofítico AT-05	100
Esquema 8 -	Estudo do extrato bruto BM-Mi de AT-05.....	104
Esquema 9 -	Re-estudo do extrato bruto BM-Mi de AT-05.....	108
Esquema 10 -	Estudo do extrato bruto e frações do fungo endofítico PS-01	115
Esquema 11 -	Estudo do extrato bruto e frações do fungo endofítico AT-03	119
Esquema 12 -	Estudo do extrato bruto e frações do fungo endofítico AT-06	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rendimentos obtidos para as diferentes metodologias de extração de <i>P. spiralis</i>	84
Tabela 2 -	Rendimento das frações obtidas pela <u>metodologia 1</u>	85
Tabela 3 -	Rendimento das frações obtidas pela <u>metodologia 2</u>	86
Tabela 4 -	Rendimento das frações obtidas pelo fracionamento em escala ampliada dos extratos brutos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	87
Tabela 5 -	Fracionamento de AT-FAc em coluna cromatográfica com sílica derivatizada C-18.....	88
Tabela 6 -	Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de AT-FAc-F1	89
Tabela 7 -	Fracionamento de PS-FHm em coluna cromatográfica com sílica derivatizada C-18.....	91
Tabela 8 -	Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de PS-FHm-F1	91
Tabela 9 -	Identificação das linhagens fúngicas isoladas de <i>A. taxiformis</i> (AT) e <i>P. spiralis</i> (PS).....	97
Tabela 10 -	Massa obtida do extrato bruto de cada fungo endofítico isolado das algas <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	98
Tabela 11 -	Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de AT-05	99
Tabela 12 -	Extratos brutos de AT-05 obtidos após variação do seu meio de cultivo.....	101
Tabela 13 -	Fracionamento do extrato bruto BM-Mi de AT-05 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18.....	102
Tabela 14 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de BM-Mi-F2	103
Tabela 15 -	Massa obtida dos extratos brutos de AT-03 , AT-06 e PS-01 e do extrato bruto BM-Mi de AT-05 preparados em escala ampliada.....	105
Tabela 16 -	Fracionamento do extrato bruto BM-Mi do fungo AT-05 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18.....	106
Tabela 17 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de BM-Mi-F2	107
Tabela 18 -	Fracionamento do extrato bruto de PS-01 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18.....	109

Tabela 19 -	Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de PS-01-F1	110
Tabela 20 -	Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de PS-01-F2	112
Tabela 21 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de PS-01-F6	113
Tabela 22 -	Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do extrato bruto de AT-03	116
Tabela 23 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de AT-03-F8	117
Tabela 24 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de AT-03-F5	118
Tabela 25 -	Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do extrato bruto de AT-06	120
Tabela 26 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de AT-06-F8	121
Tabela 27 -	Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de AT-06-F9	122
Tabela 28 -	Identificação das substâncias presentes em AT-FH por CG-EM e a comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura*....	144
Tabela 29 -	Identificação das substâncias encontradas em PS-FH por CG-EM e por comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura*....	145
Tabela 30 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S01 e para a uridina.....	153
Tabela 31 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S02 e para a timidina.....	159
Tabela 32 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S03 e para a inosina.....	167
Tabela 33 -	Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i> ^a	173
Tabela 34 -	Potencial citotóxico dos extratos brutos e frações de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	174
Tabela 35 -	Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos dos fungos endofíticos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i> ^a	183
Tabela 36 -	Potencial citotóxico dos extratos brutos dos fungos endofíticos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	184
Tabela 37 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S05 e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).....	194
Tabela 38 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S06 e para o tirosol.....	202
Tabela 39 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S07 e para a 5-hidroximetil-meleína...	211

Tabela 40 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S08 e para a 5-carbóxi-meleína.....	220
Tabela 41 -	Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05 ^a	229
Tabela 42 -	Dados de RMN da substância S09 (600 e 150 MHz; CD ₃ OD).....	245
Tabela 43 -	Dados de RMN da substância S10 (600 e 150 MHz; CD ₃ OD).....	260
Tabela 44 -	Dados de RMN da substância S11 (600 e 150 MHz; CD ₃ OD).....	271
Tabela 45 -	Dados de RMN da substância S12 (600 e 150 MHz; CD ₃ OD).....	285
Tabela 46 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S13 e para a 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -tri-hidroxiprobotridial.....	296
Tabela 47 -	Dados de RMN da substância S14 (600 e 150 MHz; CD ₃ OD).....	307
Tabela 48 -	Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos de AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada ^a	315
Tabela 49 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S15 e para a dicetopiperazina ciclo(L-Ala-L-Leu).....	325
Tabela 50 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S16 e para a dicetopiperazina ciclo(L-Leu-L-Tir).....	326
Tabela 51 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S17 e para a daidzeína.....	335
Tabela 52 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S18 , S19 e para o ftalato de dibutila....	347
Tabela 53 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S20 e S21 (600 e 150 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	358
Tabela 54 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S22 , S23 e para ftalato de bis-(2-etil-hexila).....	368
Tabela 55 -	Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das linhagens AT-03 e AT-06.....	372
Tabela 56 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S24 (δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	376
Tabela 57 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S25 e para a 3,4,5-tri-hidróxi-1-tetralona.....	389
Tabela 58 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S26 e para a scytalona.....	398
Tabela 59 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S27 e para a <i>cis</i> -4-hidróxi-scytalona e de RMN de ^1H para a <i>trans</i> -4-hidróxi-scytalona.....	409

Tabela 60 -	Atividade antimicrobiana das subfrações e substâncias obtidas a partir do estudo das frações AT-03-F8, AT-06-F8 e AT-06-F9.....	414
--------------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{23}$	Medida de desvio da luz plano-polarizada a 23°C
Φ	Diâmetro
δ_H	Deslocamento químico de 1H (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm)
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AT	<i>Asparagopsis taxiformis</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i> - coleção americana de tipos de cultura
ATCC 27853	Linhagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 33591	Linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
ATCC 90028	Linhagem de <i>Candida albicans</i>
BDA	Meio de batata-dextrose-ágar
BM-M	Extrato bruto obtido a partir do cultivo de fungo, preservado em água do mar, em meio de batata-dextrose e água do mar
BM-Mi	Extrato bruto obtido a partir do cultivo de fungo, preservado em água do mar, em meio de batata-dextrose e água ultra pura
BMi-M	Extrato bruto obtido a partir do cultivo de fungo, preservado em água ultra pura, em meio de batata-dextrose e água do mar
BMi-Mi	Extrato bruto obtido a partir do cultivo de fungo, preservado em água ultra pura, em meio de batata-dextrose e água ultra pura
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG-FID	Cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM-M	Extrato bruto obtido a partir do cultivo de fungo, preservado em água do mar, em meio de Czapeck e água do mar
CM-Mi	Extrato bruto obtido a partir do cultivo de fungo, preservado em água do mar, em meio de Czapeck e água ultra pura
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> - Espectroscopia de correlação ($^1H \times ^1H$)
d	Dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodos

dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dl	Dubleto largo
DO	Densidade óptica
DPM	Desvio padrão da média
EB	Extrato bruto
EBL	Extrato bruto preparado com a amostra triturada em liquidificador
EBM	Extrato bruto preparado com a amostra apenas fragmentada
EBN	Extrato bruto preparado com a amostra congelada com nitrogênio líquido e moída
EI	<i>Electronic impact</i> - Impacto eletrônico
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por eletrospray
FAc	Fração acetato de etila
FAq	Fração aquosa
FBu	Fração butanólica
FD	Fração diclorometano
FH	Fração hexânica
FHm	Fração hidrometanólica
GI%	Growth Inhibition - Porcentagem de inibição de crescimento
H344	Linhagem de <i>Bacillus subtilis</i>
HCT-116	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> – correlação heteronuclear a múltiplas ligações ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> – correlação heteronuclear a uma ligação ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
IR _{calc.}	Índices de retenção calculados de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz
IR _{lit.}	Índices de retenção descritos na literatura de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz
ITS	Internal Transcribed Spacer - Espaçador transcrito interno
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete

MBD	Meio de batata-dextrose
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MHA	Muller Hinton ágar
MHB	Muller Hinton Broth - meio líquido Muller Hinton
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiozol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
mult.	Multiplicidade
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NCI	<i>National Cancer Institute</i> – Instituto Nacional de Câncer
NOESY-1D	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> – espectroscopia de efeito nuclear Overhauser em uma dimensão
OVCAR-8	Linhagem de células de carcinoma de ovário
PS	<i>Pyropia spiralis</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
Q-TOF	Analisador quadrupolo-tempo de voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating-frame Overhauser effect spectroscopy</i> - Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser com eixos giratórios
RPMI 1640	Meio líquido utilizado para cultura de células, composto por aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos
UBC 8161	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
UV ₂₅₄	Ultra-violeta com comprimento de onda de 254 nm
UV-Vis	Ultra-violeta-visível
s	Singleto
SD	Desvio Padrão
SF-295	Linhagem de células de glioblastoma - humano
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
TMS	Grupo trimetilsilil
t _R	Tempo de retenção
TOF	Analisador por tempo de voo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	47
1.1	PRODUTOS NATURAIS.....	47
1.2	ORGANISMOS MARINHOS.....	52
1.2.1	Algas vermelhas.....	54
1.2.1.1	<i>Gênero Asparagopsis.....</i>	54
1.2.1.2	<i>Gênero Pyropia.....</i>	55
1.3	MICRO-ORGANISMOS MARINHOS.....	58
1.3.1	Fungos marinhos.....	59
1.3.2	Fungos associados a algas.....	59
1.3.2.1	<i>Fungos endofíticos de algas.....</i>	61
1.4	FUNGOS DA FAMÍLIA XYLARIACEAE.....	64
1.4.1	<i>Gênero Hypoxylon.....</i>	64
1.4.2	<i>Gênero Annulohypoxylon.....</i>	69
1.4.3	<i>Gênero Nemanía.....</i>	71
1.5	FUNGOS DO GÊNERO <i>Sarocladium</i>	72
1.5.1	Espécie <i>Sarocladium strictum</i>.....	74
2	OBJETIVOS.....	77
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	78
3.1	MATERIAIS.....	78
3.1.1	Solventes e equipamentos gerais.....	78
3.1.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	79
3.1.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	79
3.1.4	Cromatografia Gasosa.....	80
3.1.5	Espectrometria de Massas.....	80
3.1.6	Materiais e equipamentos utilizados durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry.....	81
3.1.6.1	<i>Solventes e equipamentos gerais.....</i>	81
3.1.6.2	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	81
3.1.6.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i>	82
3.1.6.4	<i>Espectrometria de Massas.....</i>	82
3.2	MÉTODOS.....	82

3.2.1	Estudo das Algas.....	82
3.2.1.1	<i>Coleta e Preparo do extrato bruto de Asparagopsis taxiformis.....</i>	82
3.2.1.2	<i>Coleta e preparo de diferentes extratos brutos de Pyropia spiralis em escala reduzida.....</i>	83
3.2.1.3	<i>Obtenção do extrato bruto de P. spiralis em escala ampliada.....</i>	84
3.2.1.4	<i>Fracionamento dos extratos brutos de A. taxiformis e P. spiralis em escala reduzida.....</i>	84
3.2.1.5	<i>Fracionamento dos extratos brutos de A. taxiformis e P. spiralis em escala ampliada.....</i>	86
3.2.1.6	<i>Estudo das frações AT-FH e PS-FH.....</i>	87
3.2.1.7	<i>Estudo da fração AT-FAc.....</i>	87
3.2.1.7.1	<i>Estudo da fração AT-FAc-F1.....</i>	88
3.2.1.8	<i>Estudo da fração PS-FHm.....</i>	90
3.2.1.8.1	<i>Estudo da fração PS-FHm-F1.....</i>	91
3.2.2	Estudo dos fungos endofíticos isolados das algas A. taxiformis e P. spiralis.....	93
3.2.2.1	<i>Obtenção das linhagens fúngicas.....</i>	93
3.2.2.2	<i>Identificação das linhagens fúngicas.....</i>	96
3.2.2.3	<i>Obtenção dos extratos brutos das linhagens fúngicas em escala reduzida.....</i>	97
3.2.2.4	<i>Estudo químico do fungo Nemanía bipapillata (AT-05).....</i>	99
3.2.2.5	<i>Variações do meio de cultivo e/ou preservação de Nemanía bipapillata (AT-05).....</i>	100
3.2.2.6	<i>Estudo químico do extrato bruto BM-Mi de Nemanía bipapillata (AT-05).....</i>	102
3.2.2.6.1	<i>Estudo da fração BM-Mi-F2.....</i>	103
3.2.2.7	<i>Obtenção dos extratos brutos de Annulohypoxylon stygium (AT-03), Hypoxylon sp. (AT-06) e Sarocladium strictum (PS-01) e do extrato bruto BM-Mi de Nemanía bipapillata (AT-05) em escala ampliada.....</i>	105
3.2.2.8	<i>Re-estudo do extrato bruto BM-Mi de Nemanía bipapillata (AT-05).....</i>	106
3.2.2.8.1	<i>Estudo da fração BM-Mi-F2.....</i>	107
3.2.2.9	<i>Estudo químico do fungo Sarocladium strictum (PS-01).....</i>	109
3.2.2.9.1	<i>Estudo da fração PS-01-F1.....</i>	110

3.2.2.9.2	Estudo da fração PS-01-F2.....	111
3.2.2.9.3	Estudo da fração PS-01-F6.....	113
3.2.3	Métodos desenvolvidos durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry.....	115
3.2.3.1	<i>Estudo químico do fungo Annulohypoxylon stygium (AT-03).....</i>	<i>115</i>
3.2.3.1.1	Estudo da fração AT-03-F8.....	116
3.2.3.1.2	Estudo da fração AT-03-F5.....	117
3.2.3.2	<i>Estudo químico do fungo Hypoxylon sp. (AT-06).....</i>	<i>119</i>
3.2.3.2.1	Estudo da fração AT-06-F8.....	120
3.2.3.2.2	Estudo da fração AT-06-F9.....	122
3.2.4	Atividades Biológicas.....	124
3.2.4.1	<i>Avaliação da atividade antifúngica.....</i>	<i>124</i>
3.2.4.2	<i>Avaliação da atividade anticolinesterásica.....</i>	<i>125</i>
3.2.4.3	<i>Avaliação do potencial citotóxico.....</i>	<i>125</i>
3.2.4.4	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana (realizada durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry).....</i>	<i>126</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
4.1	ESTUDO DAS ALGAS.....	127
4.1.1	Avaliação do perfil químico do extrato bruto de <i>Asparagospis taxiformis</i> (AT-EB).....	127
4.1.2	Avaliação dos perfis químicos dos extratos brutos de <i>P. spiralis</i> em escala reduzida.....	128
4.1.3	Avaliação dos perfis químicos das frações de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i> em escala reduzida.....	130
4.1.4	Estudo das frações, em escala ampliada, de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>. ..	139
4.1.4.1	<i>Estudo das frações AT-FH e PS-FH.....</i>	<i>140</i>
4.1.4.2	<i>Estudo da fração AT-FAc.....</i>	<i>146</i>
4.1.4.2.1	Elucidação estrutural de S01	147
4.1.4.2.2	Elucidação estrutural de S02	153
4.1.4.3	<i>Estudo da fração PS-FHm.....</i>	<i>159</i>
4.1.4.3.1	Elucidação Estrutural de S03	162
4.1.4.4	<i>Estudo das demais frações.....</i>	<i>168</i>

4.1.5	Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das algas	
	<i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	173
4.1.5.1	Atividades antifúngica e anticolinesterásica.....	173
4.1.5.2	Potencial citotóxico.....	173
4.2	ESTUDO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS ALGAS	
	<i>A. taxiformis</i> E <i>P. spiralis</i>	175
4.2.1	Avaliação dos perfis químicos dos extratos brutos dos fungos	
	endofíticos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	175
4.2.2	Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos dos fungos	
	endofíticos de <i>A. taxiformis</i> e <i>P. spiralis</i>	183
4.2.2.1	Atividades antifúngica e anticolinesterásica.....	183
4.2.2.2	Potencial citotóxico.....	183
4.2.3	Estudo químico do fungo <i>Nemania bipapillata</i> (AT-05)	184
4.2.3.1	Elucidação estrutural de S05	185
4.2.3.2	Elucidação estrutural de S06	195
4.2.3.3	Elucidação estrutural de S07	203
4.2.3.4	Elucidação estrutural de S08	212
4.2.4	Avaliação da produção metabólica através de variações do meio de	
	cultivo e/ou preservação de <i>Nemania bipapillata</i> (AT-05)	222
4.2.4.1	Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos obtidos a partir	
	da variação do meio de cultivo e ou preservação de <i>Nemania bipapillata</i>	
	(AT-05).....	229
4.2.4.1.1	Atividades antifúngica e anticolinesterásica.....	229
4.2.4.1.2	Potencial citotóxico.....	230
4.2.5	Estudo químico do extrato bruto BM-Mi de <i>Nemania bipapillata</i>	
	(AT-05)	231
4.2.5.1	Elucidação estrutural de S09	231
4.2.5.2	Elucidação estrutural de S10	245
4.2.6	Re-estudo do extrato bruto BM-Mi de <i>Nemania bipapillata</i> (AT-05) ...	260
4.2.6.1	Elucidação estrutural de S11	261
4.2.6.2	Elucidação estrutural de S12	271
4.2.6.3	Elucidação estrutural de S13	285
4.2.6.4	Elucidação estrutural de S14	297

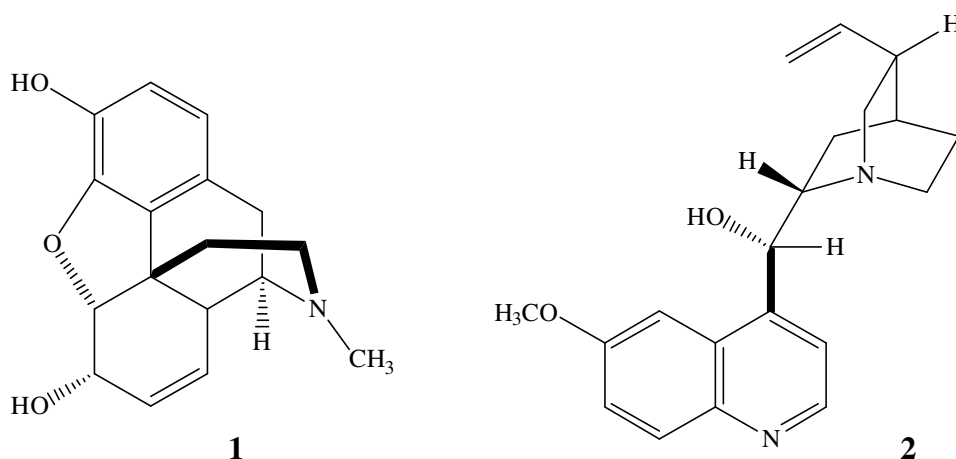
4.2.7	Avaliação dos perfis químicos e biológicos dos extratos brutos de <i>Annulohypoxylon stygium</i> (AT-03), <i>Hypoxylon</i> sp. (AT-06) e <i>Sarocladium strictum</i> (PS-01) obtidos em escala ampliada.....	312
4.2.7.1	<i>Avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica.....</i>	314
4.2.7.2	<i>Avaliação do potencial citotóxico.....</i>	315
4.2.8	Estudo químico do fungo <i>Sarocladium strictum</i> (PS-01).....	316
4.2.8.1	<i>Elucidação estrutural de S15 e S16.....</i>	317
4.2.8.2	<i>Elucidação estrutural de S17.....</i>	327
4.2.8.3	<i>Elucidação estrutural de S18 e S19.....</i>	337
4.2.8.4	<i>Elucidação estrutural de S20 e S21.....</i>	347
4.2.8.5	<i>Elucidação estrutural de S22 e S23.....</i>	358
4.2.9	Resultados obtidos durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry.....	371
4.2.9.1	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir dos extratos brutos de <i>Annulohypoxylon stygium</i> (AT-03) e <i>Hypoxylon</i> sp. (AT-06).....</i>	371
4.2.9.2	<i>Estudo químico do fungo <i>Annulohypoxylon stygium</i> (AT-03).....</i>	373
4.2.9.2.1	<i>Elucidação estrutural de S24.....</i>	374
4.2.9.2.2	<i>Elucidação estrutural de S25.....</i>	379
4.2.9.3	<i>Estudo químico do fungo <i>Hypoxylon</i> sp. (AT-06).....</i>	390
4.2.9.3.1	<i>Elucidação estrutural de S26.....</i>	390
4.2.9.3.2	<i>Elucidação estrutural de S27.....</i>	399
4.2.9.3.3	<i>Substância S17.....</i>	412
4.2.9.4	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana das subfrações e substâncias obtidas a partir do estudo de AT-03-F8, AT-06-F8 e AT-06-F9.....</i>	413
5	CONCLUSÃO.....	415
	REFERÊNCIAS.....	417

1 INTRODUÇÃO

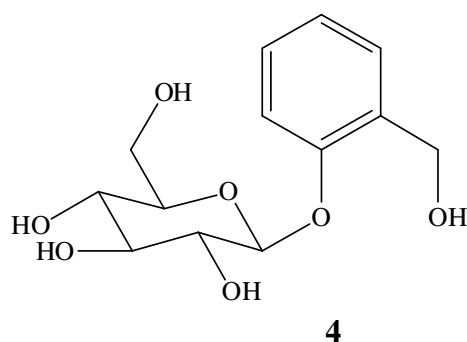
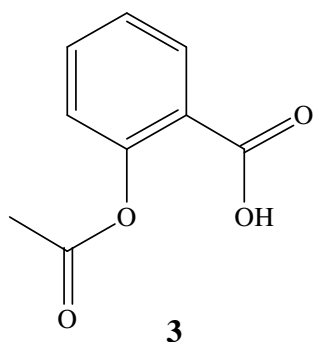
1.1 PRODUTOS NATURAIS

Ao longo da História, sabe-se que a Natureza, principalmente as plantas, tem fornecido uma gama surpreendente de substâncias para o tratamento de diversas doenças. Os estudos relatando o isolamento de Produtos Naturais tiveram início no século XIX, sendo que em 1804, o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam, isolou a morfina (**1**) como constituinte majoritário de *Papaver somniferum*, planta da qual se obtém o ópio e que é conhecida por suas propriedades soporíferas e analgésicas. A morfina foi o primeiro metabólito secundário a ser comercializado, por E. Merck em 1826, e foi amplamente utilizada durante a Segunda Guerra Mundial e é usada até hoje como analgésico (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

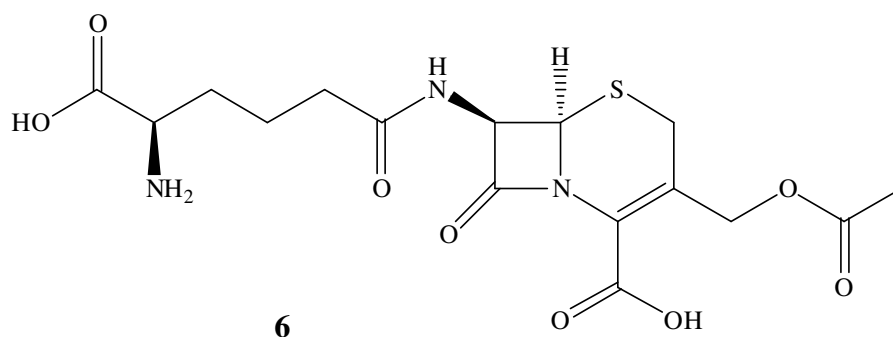
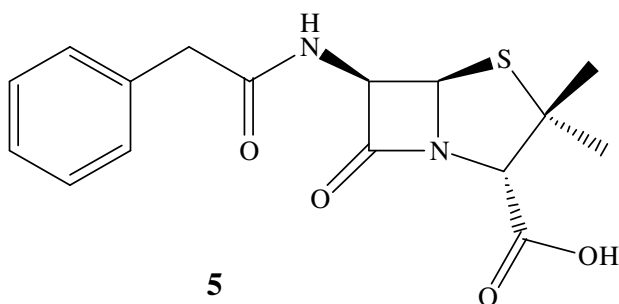
Pelletier e Caventou estudaram as cascas secas de espécies de *Cinchona*, que eram utilizadas para o tratamento de alguns tipos de febre e, em 1820, isolaram a quinina (**2**), que por quase trezentos anos foi o único princípio ativo eficaz contra a malária (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

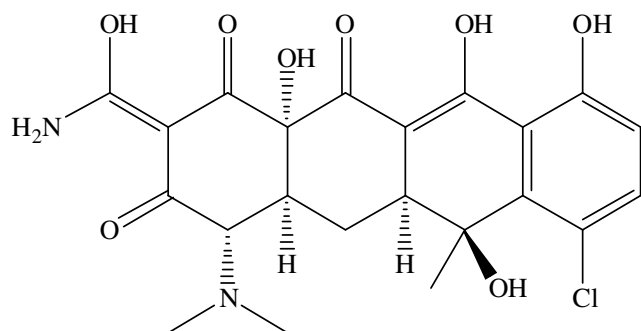


Em 1899, a empresa farmacêutica Bayer iniciou a comercialização do ácido acetilsalicílico (**3**), a primeira substância terapêutica semi-sintética baseada em um Produto Natural, a salicina (**4**), isolada do salgueiro (*Salix alba*). Esse fato foi considerado um dos marcos mais importantes no desenvolvimento dos fármacos a partir de Produtos Naturais (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; CRAGG, GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

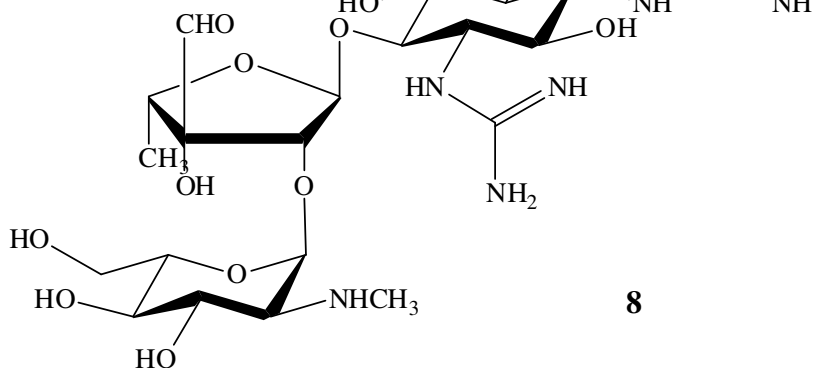


Outro marco importante, foi a descoberta acidental, por Fleming em 1929, do antibiótico penicilina G (**5**), isolada do fungo *Penicillium notatum* e que é comercializada até hoje. Esta descoberta iniciou um período de extensa investigação de micro-organismos, principalmente por empresas farmacêuticas, na busca por novos antibióticos, com a descrição de cefalosporinas como a cefalosporina C (**6**), isolada de fungos do gênero *Acremonium*; tetraciclina como a clortetraciclina (**7**), aminoglicosídeos como a estreptomicina (**8**) e compostos macrocíclicos como a eritromicina (**9**), isoladas de actinomicetos do gênero *Streptomyces* (CRAGG, GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

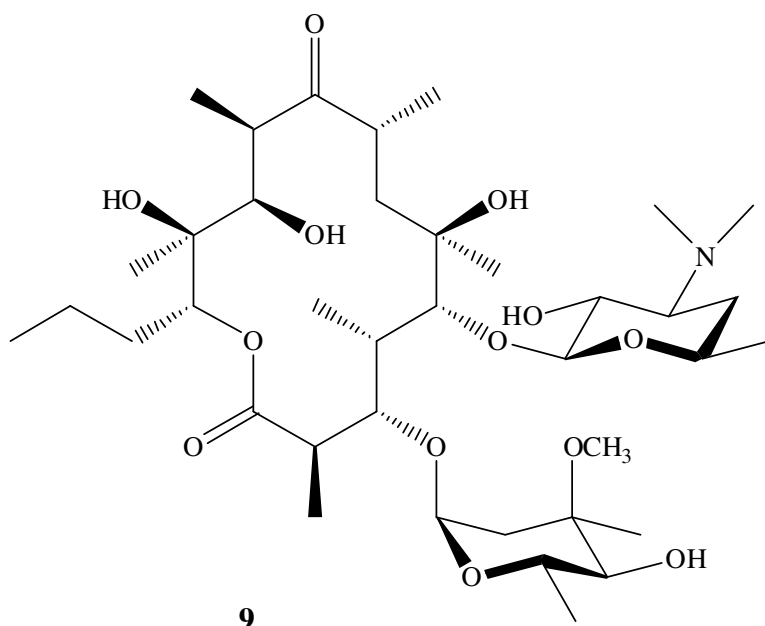




7



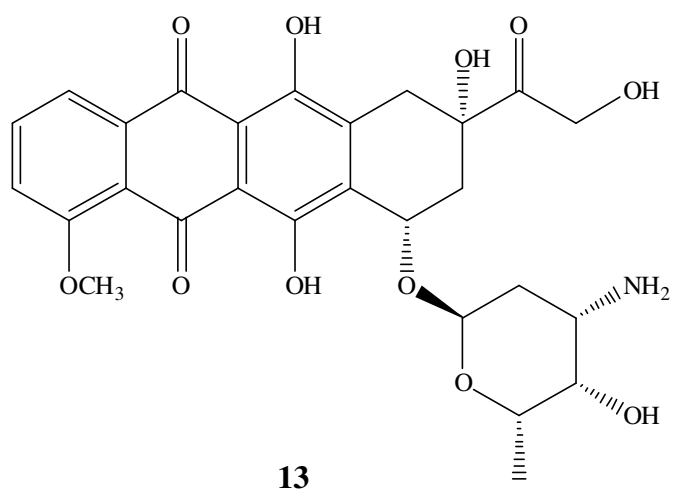
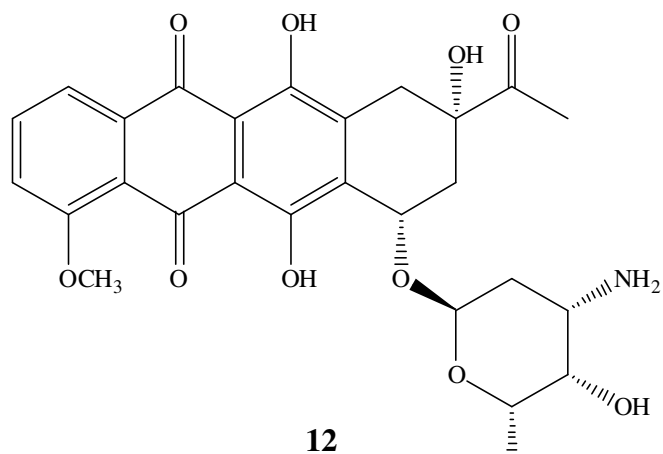
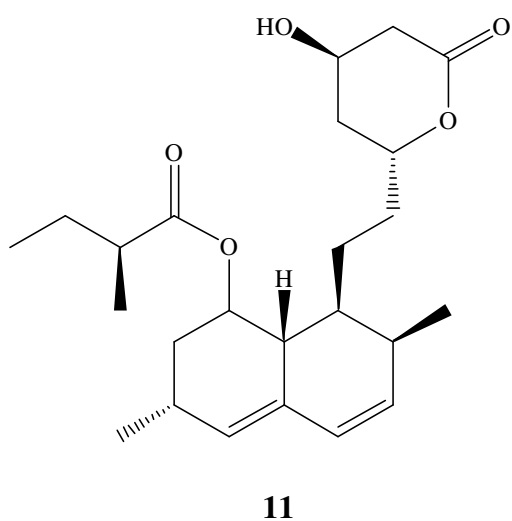
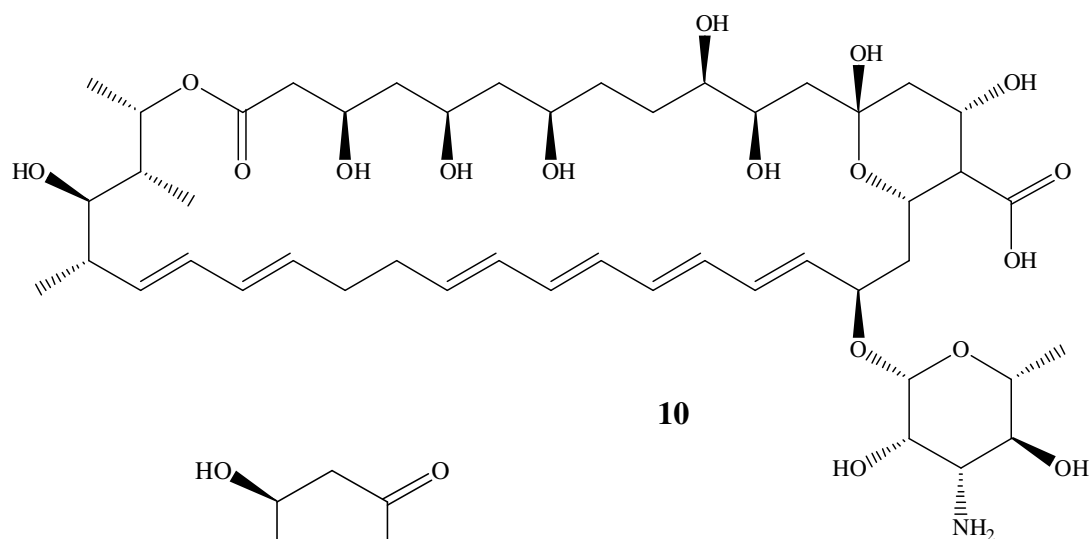
8



9

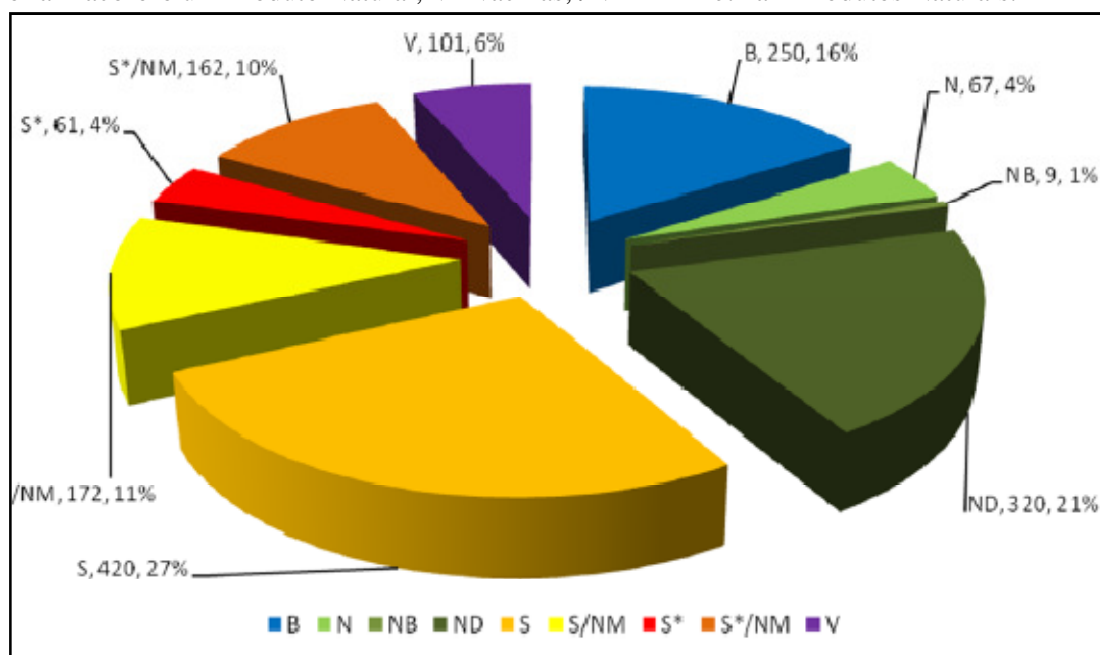
Os micro-organismos também têm fornecido substâncias com outras atividades, como a nistatina (**10**), que foi isolada de *Streptomyces noursei* e é utilizada como antifúngico; a lovastatina (**11**), isolada do fungo *Aspergillus terreus* e usada no tratamento de hipercolesterolemia e prevenção de doenças cardiovasculares; e as antraciclinas utilizadas no tratamento de câncer, daunorrubicina (**12**) isolada de *Streptomyces peucetius* e a doxorrubicina (**13**) obtida a partir de uma mutação desse actinomiceto através da adição de *N*-

nitroso-*N*-metil uretano (CONTRERAS HERNÁNDEZ, 2013; CRAGG, GROTHAUS; NEWMAN, 2014).



De acordo com Newman e Cragg (2016) entre Janeiro de 1981 e Dezembro de 2014, 1562 substâncias foram aprovadas como fármacos, sendo que destas 31% são Produtos Naturais (N - 4%), ou derivados de Produtos Naturais (ND - 21%), ou inspirados em Produtos Naturais (S* - 5%; farmacóforo é/foi Produto Natural), ou são Produtos Naturais botânicos (definidos como mistura - fitoterápicos; NB - 1%), como pode ser observado na **Figura 1**.

Figura 1 - Total de novos fármacos aprovados entre Janeiro/1981 e Dezembro/2014. (B - macromolécula biológica; N - Produto Natural inalterado; NB - fármaco botânico, definido como mistura; ND - derivado de Produto Natural; S - fármaco sintético; S* - fármaco sintético que apresenta como farmacóforo um Produto Natural; V - vacinas; /NM - mimetizam Produtos Naturais.



Fonte: Newman e Cragg (2016)

Apesar dos diversos estudos na área de Produtos Naturais e das muitas substâncias aprovadas e comercializadas, a busca por novas substâncias bioativas se tornou ainda mais necessária nos últimos anos, já que o número de doenças resistentes aos tratamentos atualmente utilizados, como alguns tipos de câncer e infecções fúngicas e bacterianas, aumenta cada vez mais.

Além disso, muitas doenças apresentam poucas opções de tratamento, como é o caso do mal de Alzheimer, já que entre os anos de 1981 e 2014, apenas 6 novas substâncias sintéticas foram aprovadas para seu tratamento, sendo que algumas dessas apresentam, ainda, efeitos colaterais o que restringe seu uso (NEWMAN; CRAGG, 2016; SILVA, J. et al., 2013).

Nesse contexto, muitos pesquisadores têm buscado novas fontes de substâncias bioativas, como os organismos e micro-organismos marinhos.

1.2 ORGANISMOS MARINHOS

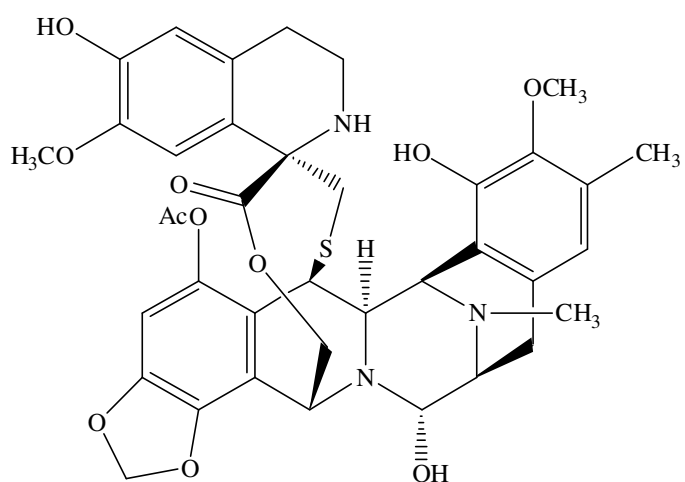
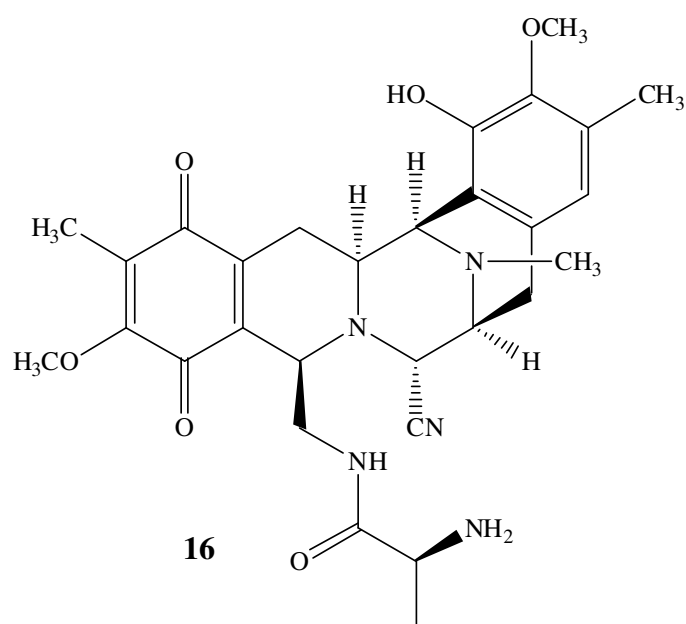
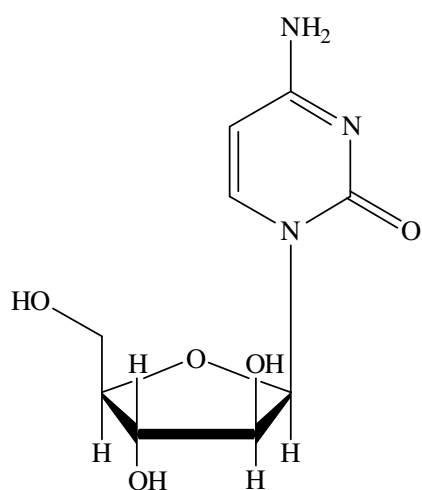
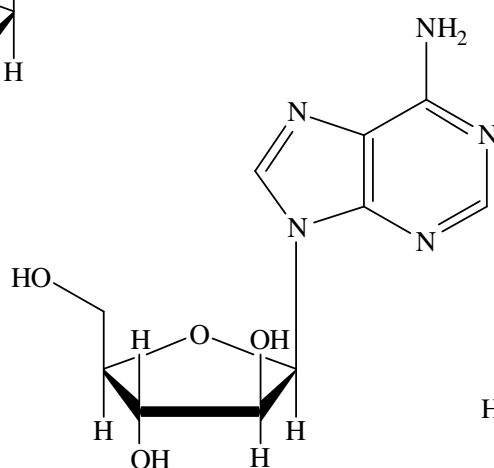
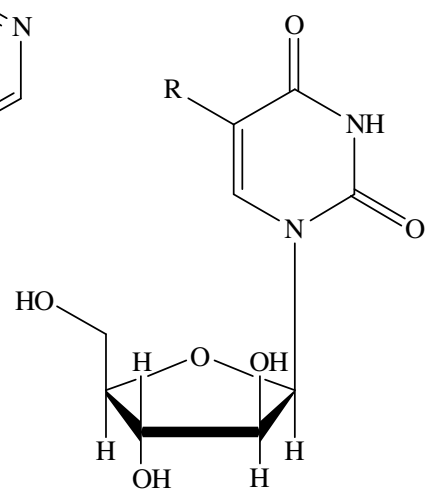
A investigação sistemática dos organismos marinhos foi impulsionada em meados dos anos 70, devido aos avanços das técnicas e equipamentos seguros de mergulho, e tem mostrado uma grande diversidade de substâncias bioativas, sendo que muitas pertencem a classes químicas totalmente novas ou que não são encontradas em fontes terrestres (PINTO et al., 2002).

Entre os anos de 1963 e 2014 foram descritas cerca de 26000 novas substâncias de origem marinha (BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016), sendo que no ano de 1984 foram descritos apenas 332 novos metabólitos secundários, enquanto que em 2014 foram descritos 1378 (BLUNT et al., 2016), evidenciando o aumento marcante das pesquisas com organismos marinhos.

Entre estes novos Produtos Naturais Marinhos podemos destacar o ziconotídeo (Prialt®) (**14**), um peptídeo denominado ω -conotoxina, isolado do molusco *Conus magnus* e que é comercializado como agente terapêutico para dores crônicas. E ainda, podemos citar a ecteinascidina 743 ou trabectedina (Yondelis®) (**15**), isolada do tunicato *Ecteinascidia turbinata* e comercializada para o tratamento de câncer. Atualmente a ecteinascidina 743 é produzida por semi-síntese a partir da cianosafracina B (**16**), um produto natural obtido da fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (GERWICK; MOORE, 2012).

A citarabina ou Ara-C (**17**), comercialmente conhecida como Cytosar-U® ou Depocyt®, é utilizada no tratamento de câncer, enquanto a vidarabina ou Ara-A (**18**), comercializada como Vira-A®, é utilizada como antiviral. Ambas são derivados sintéticos dos nucleosídeos espongouridina (**19**) e espongotimidina (**20**), isolados da esponja caribenha *Tethya cripta* (MAYER et al., 2010).



**15****16****17****18****19** - R = H**20** - R = CH₃

1.2.1 Algas vermelhas

Os primeiros trabalhos com organismos marinhos foram realizados com macro-organismos, como esponjas e macroalgas, encontrados em águas rasas ou em locais que ficavam descobertos durante as marés baixas.

Entre esses macro-organismos estudados, podemos destacar as algas vermelhas (Rhodophyta), consideradas as principais produtoras de metabólitos secundários biologicamente ativos dentre as algas. Uma das principais características desses organismos é a síntese de substâncias halogenadas com grande variedade estrutural, sendo produzidos hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas halogenadas de 1 a 4 carbonos, ou com 7 a 9 carbonos, monoterpênicos, alcaloides indólicos, sesquiterpênicos e diterpênicos halogenados e até mesmo triterpênicos (TEIXEIRA; KELECOM; GOTTLIEB, 1991).

1.2.1.1 Gênero *Asparagopsis*

As espécies do gênero *Asparagopsis* possuem um ciclo de vida heteromórfico, alternando entre um tetraesporófito filamentoso (diploide), conhecido como estágio *Falkenbergia*, e um gametófito ereto e plumoso (haploide) (CHUALÁIN et al., 2004).

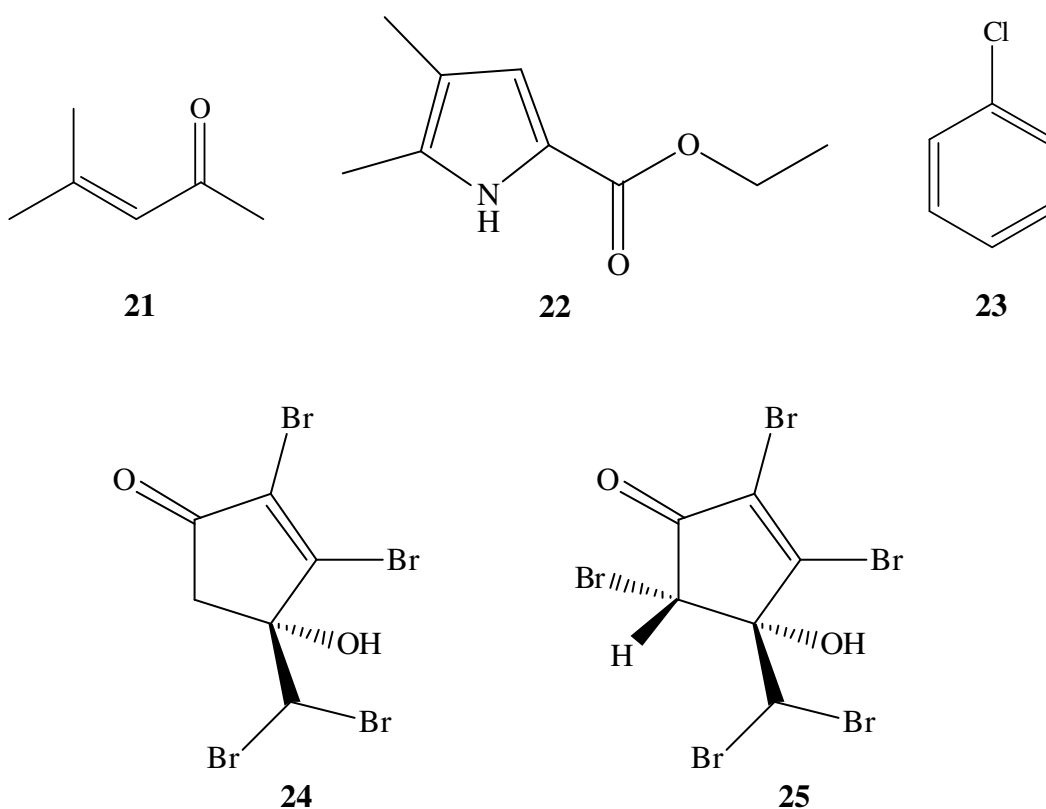
A espécie *A. armata* foi amplamente estudada por McConnel e Fenical (1977) que descreveram a presença de haloacetonas, halometanos e derivados halogenados dos ácidos acético e acrílico. Esta espécie também apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (PAUL; NYS; STEINBERG, 2006; SALVADOR et al., 2007) e atividade contra bactérias patogênicas de peixes (BANSEMIR et al., 2006).

A espécie *A. taxiformis* é conhecida no Havaí como “Limu kohu” e apresenta um aroma pungente, uma vez que seu óleo essencial é composto por bromofórmio e por pequenas quantidades de derivados halogenados de metano, etano, etanol, acetaldeído, acetona, 2-acetoxi-propano, propeno, epoxi-propano, acroleína e butenona (BURRESON; MOORE; ROLLER, 1975; 1976). Outros estudos indicaram a presença de isopropanóis, but-3-en-2-óis e acetamidas halogenados (WOOLARD; MOORE; ROLLER, 1976), além de derivados halogenados dos ácidos acrílico e acético e o composto não-halogenado conhecido como óxido de mesitila (4-metil-3-penten-2-ona) (**21**) (WOOLARD; MOORE; ROLLER, 1979; McCONNEL; FENICAL, 1977). Já o estudo realizado por Manilal et al. (2010) demonstrou as atividades anti-incrustante e anticianobacteriana, bem como a toxicidade para peixes e crustáceos do extrato e frações dessa alga, e ainda, descreveram a presença do éster etílico do

ácido 4,5-dimetil-1H-pirrol-2-carboxílico (**22**), clorobenzeno (**23**), éster metílico dos ácidos 14-metil-pentadecanóico, 9-octadecenóico e octadecanóico e o éster 2,3-diidroxi-propílico do ácido octadec-9-enóico.

Outros estudos mostraram que extratos de *A. taxiformis* representam fonte relevante de produtos naturais com atividade leishmanicida (atividade *in vitro*) (GENOVESE et al., 2009), atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante (EL-BAROTY et al., 2007).

Já um estudo mais recente (GREFF et al., 2014) revelou a presença de ciclopentenonas altamente bromadas, descritas como mahorona (**24**) e 5-bromo-mahorona (**25**), as quais apresentaram atividade antibacteriana contra o patógeno humano *Acinetobacter baumannii* e alta atividade ecotoxicológica contra a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*.



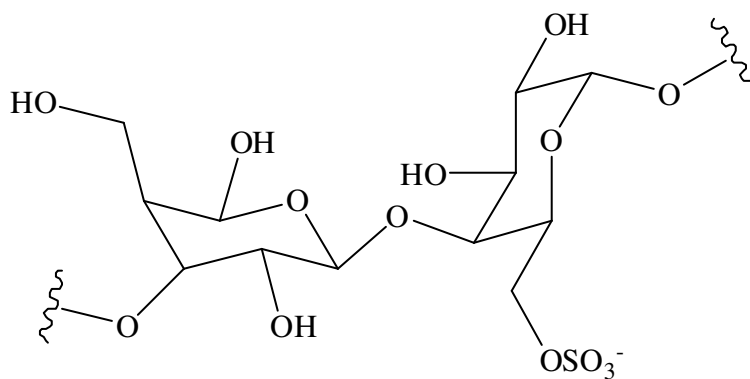
1.2.1.2 Gênero *Pyropia*

O gênero *Pyropia* foi inserido na ordem Bangiales após uma revisão da mesma, na qual foram realizados estudos detalhados de diferentes populações de algas, bem como análises moleculares (SUTHERLAND et al., 2011). A maioria das espécies do gênero *Pyropia* era incluída no gênero *Porphyra*, que passou a ser sinônimo de *Pyropia*.

O gênero *Pyropia* contém mais de 75 espécies, com grande variedade morfológica e que estão amplamente distribuídas, podendo ser encontradas em águas tropicais a temperadas (SUTHERLAND et al., 2011).

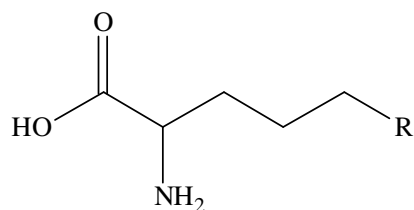
As espécies *Pyropia yezoensis* e *Pyropia tenera*, conhecidas como Susabi-nori e Asakusa-nori, respectivamente, são utilizadas na culinária japonesa para o preparo do sushi (MIYAMOTO et al., 2009). São algas com alto valor nutritivo, já que possuem proteínas, polissacarídeos, vitaminas e minerais, além de serem utilizadas na Medicina Tradicional Chinesa nos últimos 1000 anos (ZHANG, Q. et al., 2004).

Estudos realizados com as espécies *P. yezoensis* e *P. haitanensis* indicaram a presença de polissacarídeos lineares sulfatados do tipo porfiranos (**26**), extraídos da parede celular com o uso de água quente, e que podem atuar como componentes estruturais, materiais de armazenamento ou como substâncias protetoras. Estruturalmente, possuem um esqueleto linear, alternando unidades de β -D-galactopiranosil ligados na posição 3 e de α -L-galactopiranosil-6-sulfato ligados em 4 ou unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosil (ZHANG, Z. et al., 2010). Os porfiranos têm demonstrado diversas atividades biológicas como antiviral, antitumoral, anticoagulante, imunorregulatória e antioxidante *in vitro* e *in vivo* (ZHANG, Q. et al., 2004; ZHOU et al., 2012).



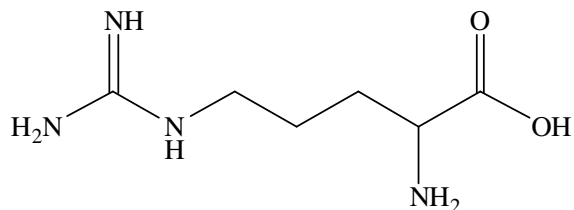
26

Tamura et al. (1998) examinaram a ocorrência de peptídeos e aminoácidos em *P. yezoensis* e, detectaram a presença de lisina (**27**), ornitina (**28**), arginina (**29**), histidina (**30**), 3-metil-histidina (**31**), carnosina (**32**) e anserina (**33**), sendo que as substâncias **30** a **33** apresentaram forte atividade antioxidante pelo método de tiocianato férrico e do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

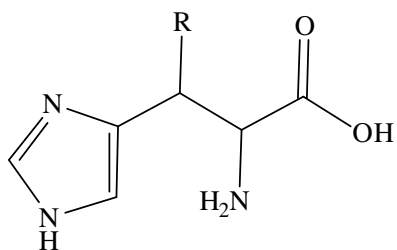


27 – R = CH₂NH₂

28 – R = NH₂

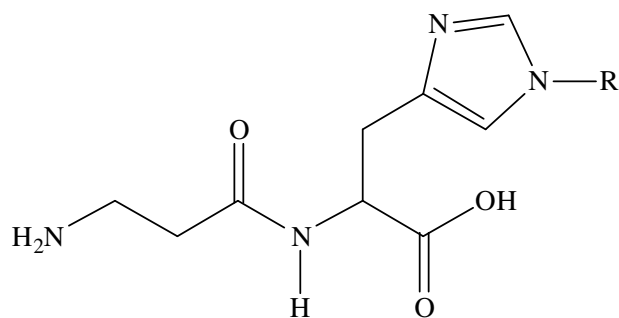


29



30 – R = H

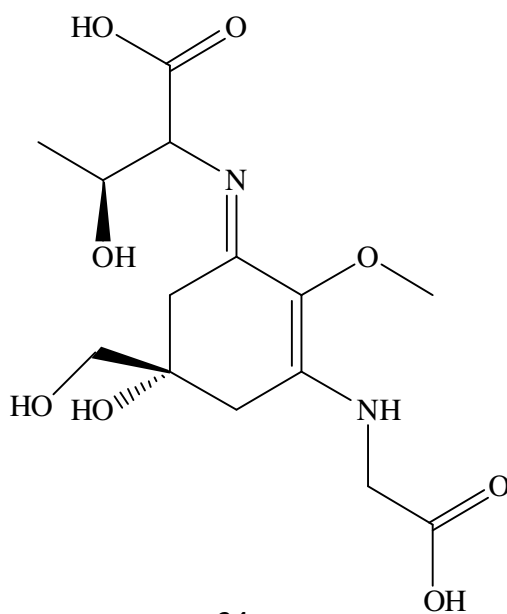
31 – R = CH₃



32 – R = H

33 – R = CH₃

Já Takano et al. (1979) relataram a presença do aminoácido do tipo micosporina porphyra-334 (**34**) em *P. tenera*, enquanto Yoshiki et al (2009) relataram o mesmo composto em *P. yezoensis* e avaliaram sua atividade antioxidante. Um estudo mais recente indicou o efeito protetor do porphyra-334 contra o fotoenvelhecimento induzido por radiação UVA em fibroplastos de pele humana (RYU, 2014).

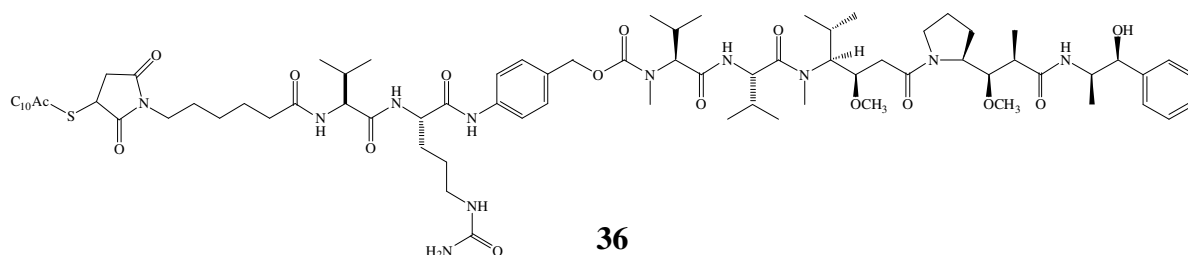
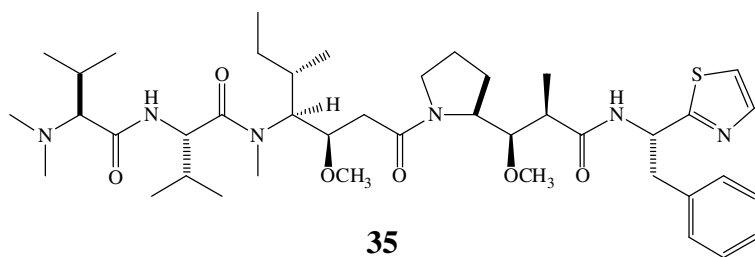


34

1.3 MICRO-ORGANISMOS MARINHOS

Nos últimos anos houve um crescimento significativo nos estudos realizados com micro-organismos marinhos, como cianobactérias, fungos e bactérias marinhas, sendo que em 2002 foram descritas 117 novas substâncias isoladas desses organismos (BLUNT et al., 2004), em 2007 cerca de 200 (BLUNT et al., 2009), já em 2010 foram descritas cerca de 300 substâncias, enquanto em 2013 foram descritas 493, e em 2014 foram descritas 677 novas substâncias isoladas desses organismos (BLUNT et al., 2016).

Esses estudos mostraram que muitos compostos anteriormente isolados de macro-organismos, como esponjas e tunicatos, são na verdade produtos metabólicos associados aos micro-organismos, como por exemplo, a dolastatina 10 (**35**) que foi isolada pela primeira vez do molusco *Dolabella auricularia* e posteriormente foi encontrada como metabólito da cianobactéria *Symploca* sp., que faz parte da cadeia alimentar do molusco. Atualmente, um derivado da dolastatina 10, conhecido como brentuximab vedotin (**36**), é comercializado para o tratamento de linfomas raros (GERWICK; MOORE, 2012).



Além disso, um levantamento realizado por Hu, Y. et al. (2015) mostrou que o número de compostos que apresentam alguma atividade biológica e que são provenientes de micro-organismos marinhos é maior que o número de compostos bioativos isolados de invertebrados e algas.

Sendo assim, grupos de pesquisa ao redor do mundo têm voltado grande atenção aos micro-organismos marinhos. Além disso, nichos ecológicos, como gelo polar, fontes hidrotermais, algas, esponjas e corais, fornecem diferentes habitats para o crescimento de

micro-organismos específicos (KJER et al., 2010), o que contribui para maior quimiodiversidade.

1.3.1 Fungos marinhos

Os estudos com fungos marinhos têm provado que estes são fontes ricas e promissoras de novos agentes antivirais, antibacterianos, antiplasmódicos, anti-inflamatórios e anticancerígenos (DUARTE et al., 2012).

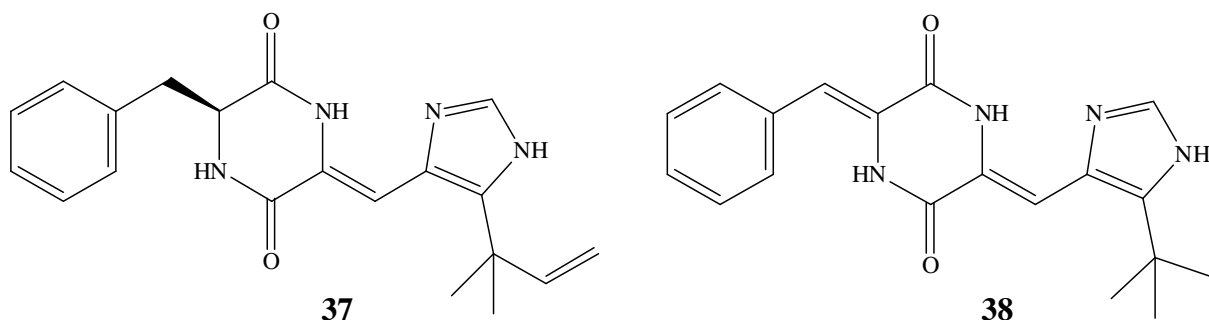
Entre 2006 e meados de 2010, 690 metabólitos de fungos marinhos foram relatados (DUARTE et al., 2012), enquanto nos anos de 2013 e 2014 foram isoladas 223 e 318 novas substâncias de fungos de habitats marinhos, respectivamente (BLUNT et al., 2016). A maioria destas substâncias (aproximadamente 50%) são policetídeos e seus híbridos isoprênicos, seguidos pelos alcaloides (20%), terpenos (15%) e peptídeos (15%) (RATEB; EBEL, 2011).

Assim como os demais micro-organismos, as linhagens de fungos marinhos podem ser obtidas de diversos habitats marinhos, incluindo material inorgânico (solo, sedimentos, substratos artificiais e coluna d'água), comunidades microbianas marinhas, plantas marinhas, algas, plantas de mangues, invertebrados marinhos (esponjas, corais, acídias, bivalves, crustáceos) e vertebrados (principalmente peixes) (RATEB; EBEL, 2011).

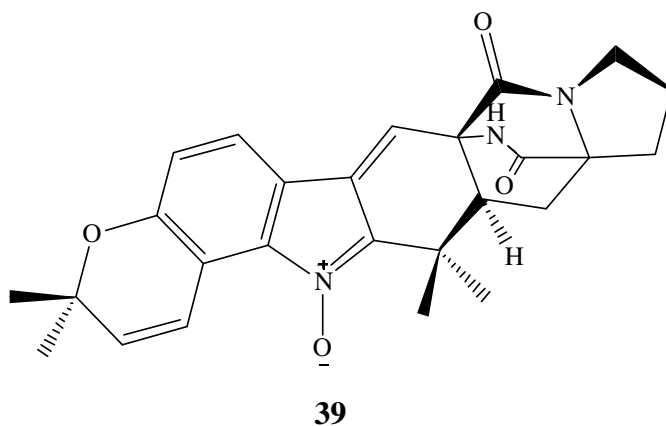
1.3.2 Fungos associados a algas

Estudos realizados com fungos associados a algas têm revelado a diversidade estrutural dos metabólitos secundários, os quais têm mostrado atividades antimicrobianas, antiparasitárias, antioxidantes e, principalmente, anticancerígenas (RATEB e EBEL, 2011).

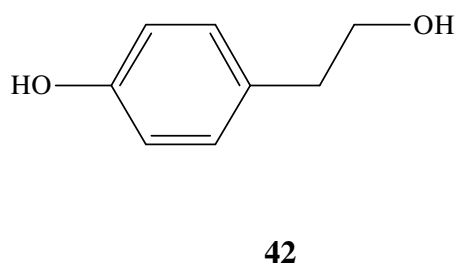
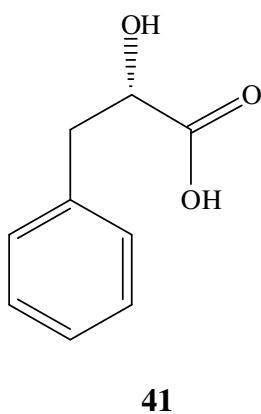
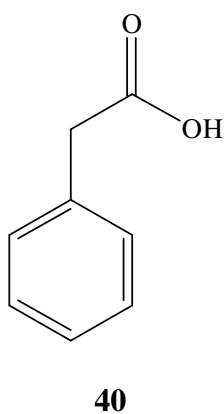
A halimida (**37**), uma dicetopiperazina isolada do fungo *Aspergillus* sp. obtido a partir da alga verde *Halimeda copiosa*, apresentou potente atividade citotóxica contra células de carcinoma de ovário e cólon (UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2000b) e, seu análogo sintético, a plinabulina (**38**), encontra-se em fase III de testes clínicos para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas, aliado ao quimioterápico docetaxel (BEYONDSRING PHARMACEUTICALS, 2015).



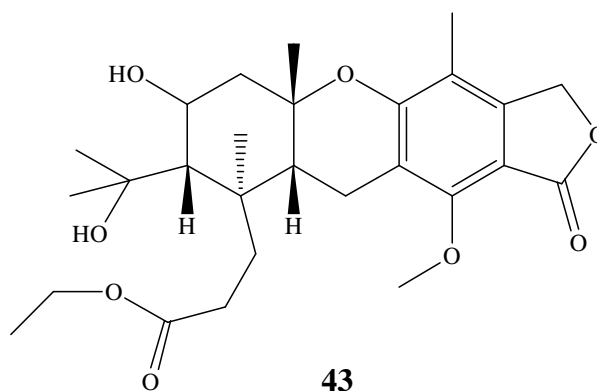
O estudo de *Aspergillus* sp., isolado da alga verde *Avrainvillea* sp., levou ao isolamento e caracterização da substância avrainvilamida (**39**), a qual apresentou atividade antiproliferativa contra uma grande variedade de células tumorais (UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2000a).



Ding et al. (2008) relataram o isolamento dos ácidos fenil-acético (**40**), L-β-fenil-lático (**41**) e do álcool *p*-hidroxi-fenil-etílico ou tirosol (**42**) a partir do fungo *Cladosporium* sp., associado a alga *P. yezoensis*. Estes compostos apresentaram forte atividade antimicrobiana.



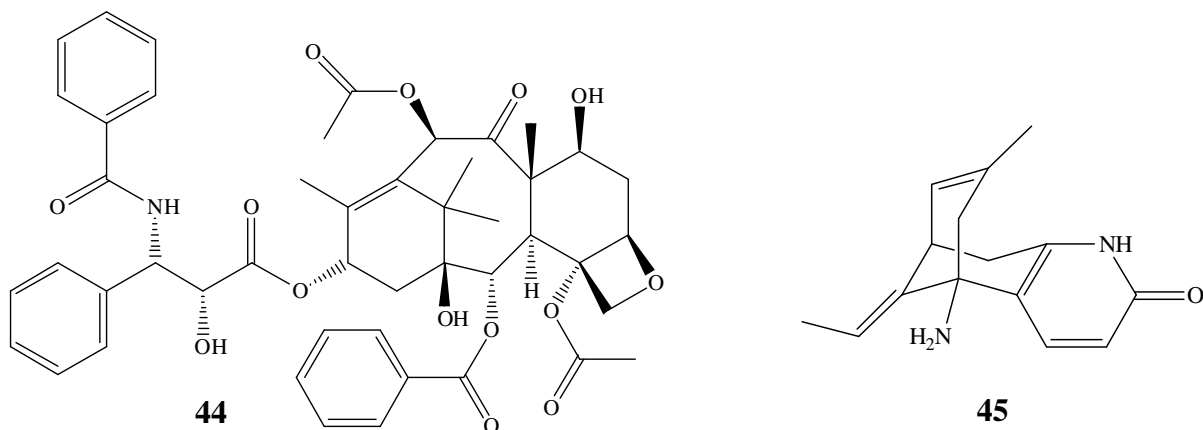
O estudo do fungo *Penicillium thomii*, associado à alga parda *Sargassum miyabei* levou ao isolamento do éster etílico do austalídeo H (**43**), que apresentou atividade inibitória significativa frente à enzima *endo*-1,3- β -D-Glucanase, isolada do molusco marinho *Pseudocardium sachalinensis*, indicando assim, que o fungo protege seu próprio substrato, já que essa enzima está relacionada a degradação celular de fungos (SOBOLEVSKAYA et al., 2016).



1.3.2.1 Fungos endofíticos de algas

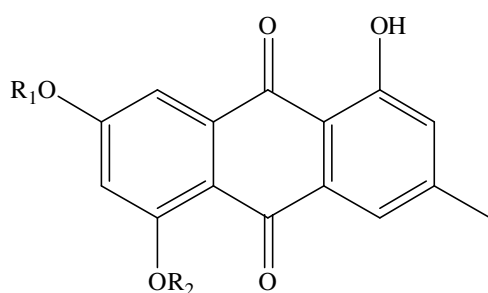
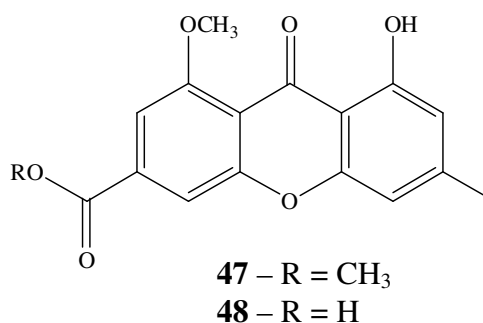
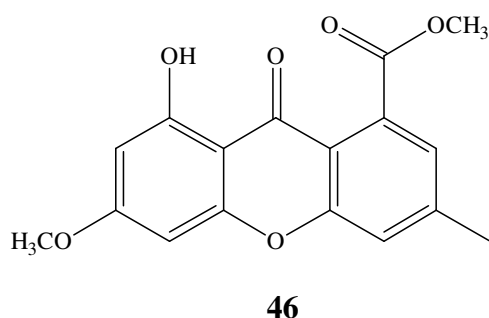
Entre os fungos associados a algas, devemos destacar os fungos endofíticos, que vivem no interior de tecidos e que exercem uma relação mutualística com seu hospedeiro durante uma parte ou toda sua vida (KJER et al., 2010). A complexidade e a importância da relação ecológica entre endófitos e macro-organismos reflete um potencial químico e biológico desses micro-organismos na Química de Produtos Naturais (OLIVEIRA; FELICIO; DEBONSI, 2012).

Muitos estudos foram realizados com fungos endofíticos de plantas terrestres, os quais exibiram resultados significativos, incluindo relatos de que substâncias bioativas, como o paclitaxel (**44**) (quimioterápico) e a huperzina A (**45**) (tratamento do mal de Alzheimer), foram detectadas em linhagens de fungos endofíticos obtidos das plantas originalmente produtoras dessas substâncias (NEWMAN; CRAGG, 2015).

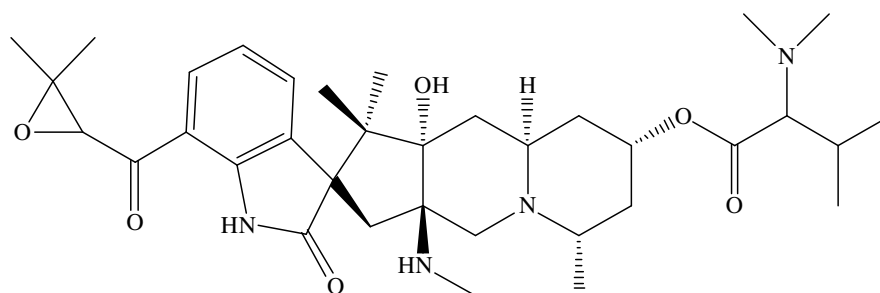
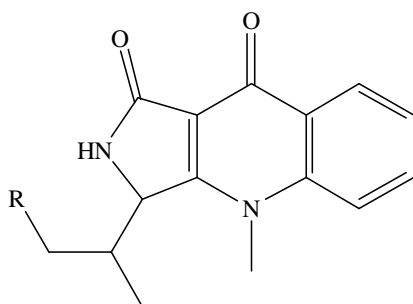
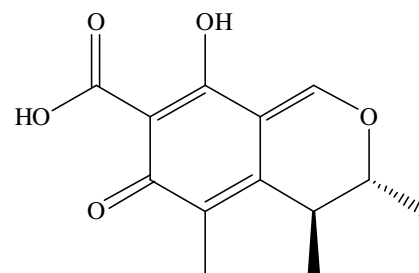
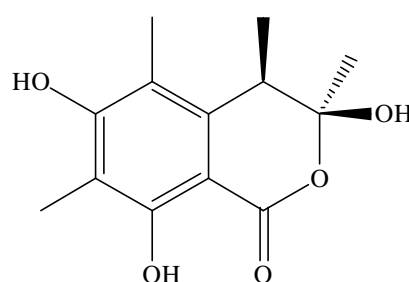


Sendo assim, os fungos endofíticos de plantas marinhas (principalmente plantas de mangue) e macroalgas têm se destacado, uma vez que além da relação ecológica, os mesmos habitam ecossistemas distintos, com variações de temperatura, fornecimento de luz, salinidade e estresse osmótico. Estudos realizados com estes micro-organismos têm mostrado seu potencial como fonte de agentes antitumorais, antimicrobianos e antifúngicos (FLEWILLING et al., 2015).

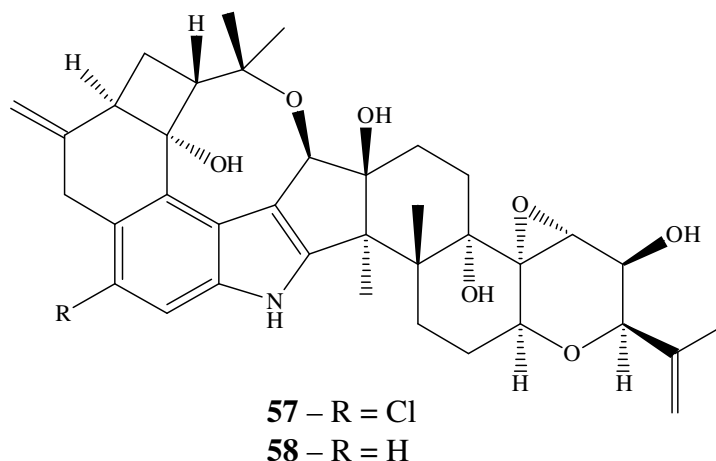
Su et al. (2013) descreveram o isolamento de três novos derivados de xantona, yicatina A-C (**46-48**), e de três novos derivados de antraquinonas - alatinona (**49**), 1,5-diidroxi-3-metoxi-7-metil-antraquinona (**50**) e 5-hidroxi-1,3-dimetoxi-7-metil-antraquinona (**51**) - a partir do fungo endofítico *Aspergillus wentii* pt-1, isolado da alga vermelha *Gymnogongrus flabeliformis*. A yicatina B foi ativa contra *Escherichia coli*, enquanto a yicatina C inibiu *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Colletotrichum lagenarium*.



O estudo do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, isolado da alga vermelha *Dichotomaria marginata* coletada no litoral norte do estado de São Paulo, levou à identificação de alcaloides quinolizidínicos como a citrinidina A (**52**), de alcaloides quinolactínicos como a quinolactina A (**53**) e B (**54**) e derivados de policetídeos como a citrinina (**55**) e a esclerotinina A (**56**), sendo que a substância citrinina apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico, em culturas de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, de forma dose-dependente (ANDRADE, 2014).

**52****53** – R = CH₃**54** – R = H**55****56**

A partir da cultura do fungo endofítico *Aspergillus nidulans* EN-330, isolado da alga vermelha *Polysiphonia scopulorum* var. *villum*, foi possível isolar dois novos indol-terpenoides, 19-hidroxi-penitrem A (**57**) e 19-hidroxi-penitrem E (**58**), sendo que o primeiro mostrou atividade antimicrobiana contra patógenos humanos (*E. coli* e *S. aureus*) e aqua-patógenos (*Edwardsiella tarda* e *Vibrio anguillarum*) (ZHANG, P. et al., 2015).



1.4 FUNGOS DA FAMÍLIA XYLARIACEAE

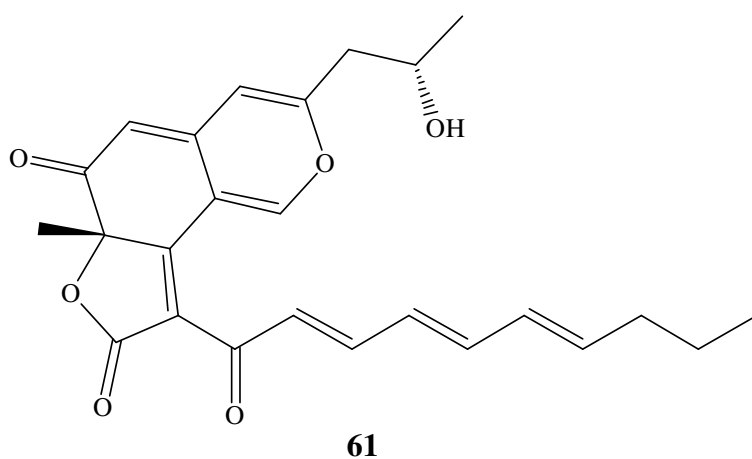
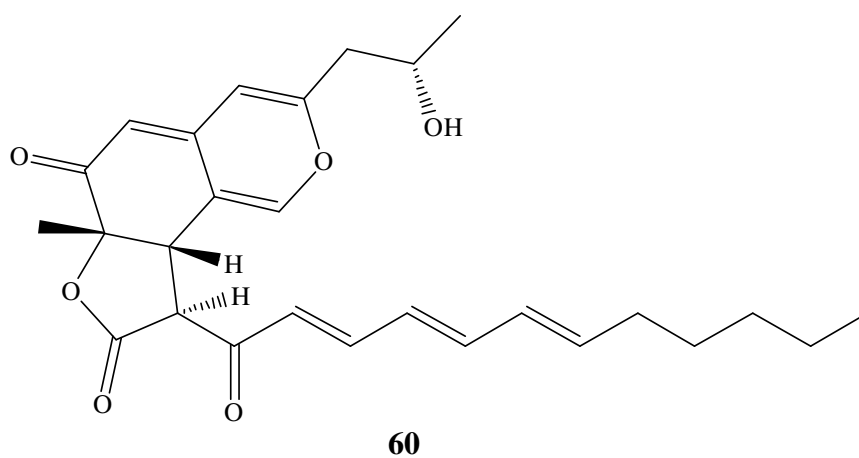
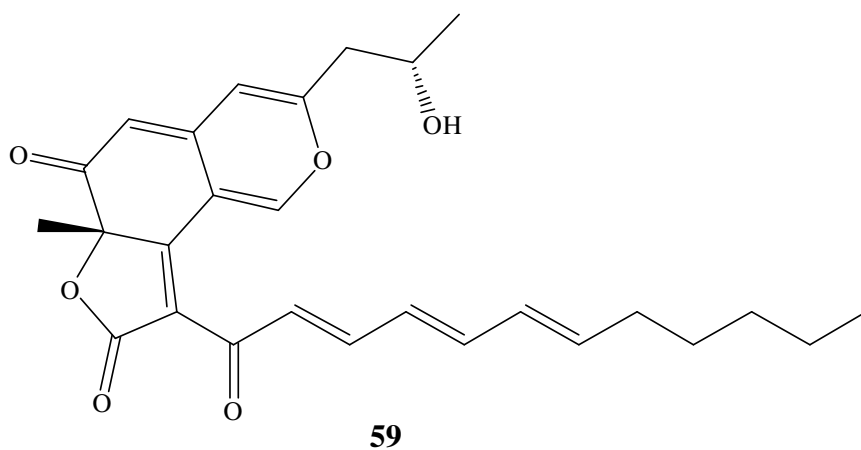
Xylariaceae é uma das maiores famílias do filo Ascomycota, com cerca de 70 gêneros e 1300 espécies descritas (KUHNERT et al., 2015b), sendo que muitas são degradadoras de madeira e são encontradas principalmente nos trópicos. Além disso, muitas espécies dessa família são encontradas como fungos endofíticos de plantas (STADLER et al., 2013).

Os principais metabólitos secundários isolados de espécies de fungos dessa família são isocumarinas e seus derivados, butirolactonas, citocalasinas, derivados do ácido succínico e do naftaleno, álcoois sesquiterpênicos, ácidos graxos de cadeia longa e derivados da griseofulvina (WHALLEY; EDWARDS, 1995).

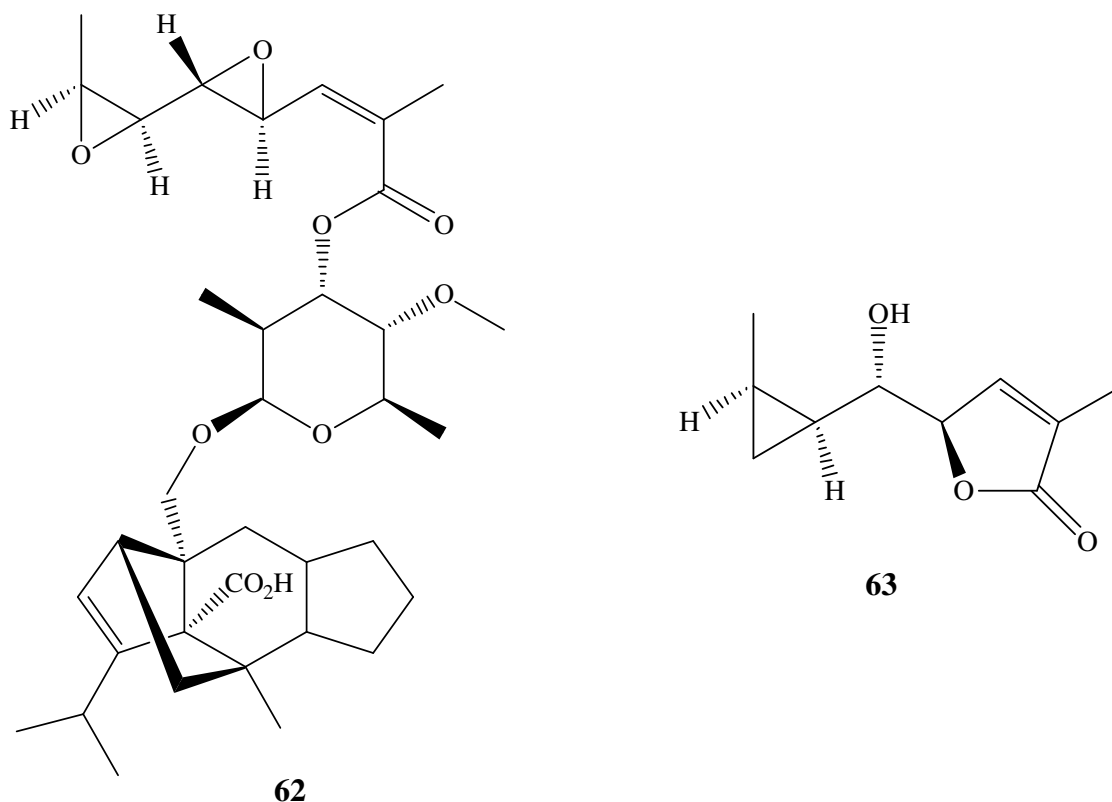
1.4.1 Gênero *Hypoxylon*

Hypoxylon é o gênero que apresenta o maior número de espécies (cerca de 150) dentro da família Xylariaceae, sendo encontrado principalmente em climas quentes. A maioria das espécies desse gênero produz corpo de frutificação na madeira, se alimentando de matéria orgânica morta. No entanto, podem ser encontrados como endófitos durante seu estado vegetativo (KUHNERT et al., 2014).

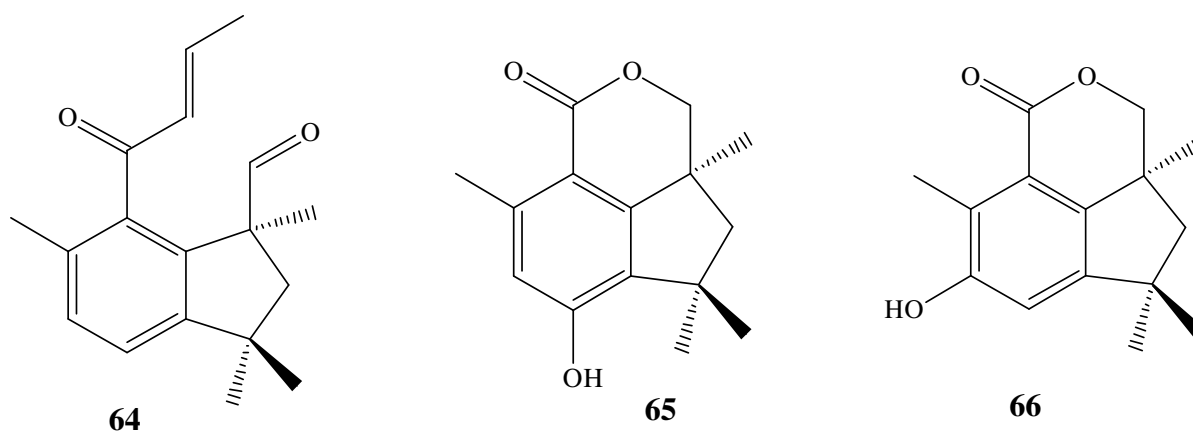
Estudos realizados com o corpo de frutificação de algumas espécies têm revelado o isolamento de pigmentos, como as lenormandinas A-C (**59-61**), isoladas da espécie *Hypoxylon lenormandii*.

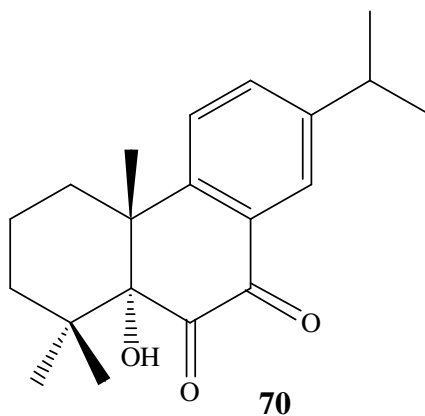
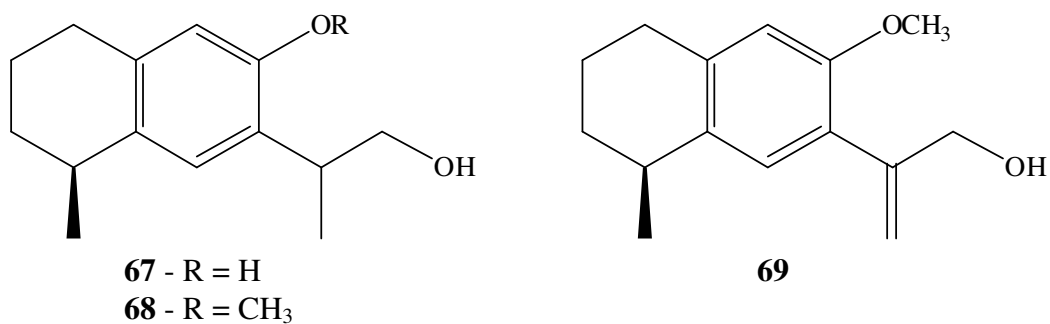


Já os estudos realizados com culturas de espécies endofíticas ou derivadas de ascósporos têm mostrado uma grande diversidade de substâncias bioativas. Daferner et al. (1999) isolaram a hypoxysordarina (**62**), que apresentou atividade antifúngica, e a hypoxylactona (**63**), de culturas micelares derivadas do ascósporo de *Hypoxylon croceum*, sendo que seu corpo de frutificação foi encontrado em um tronco de mangue em Everglades - Flórida.

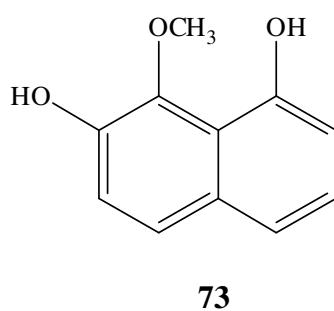
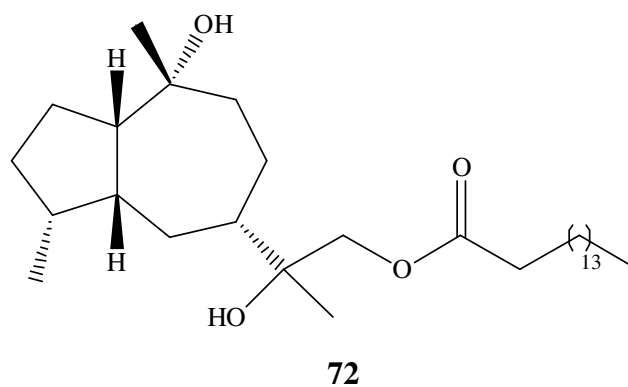
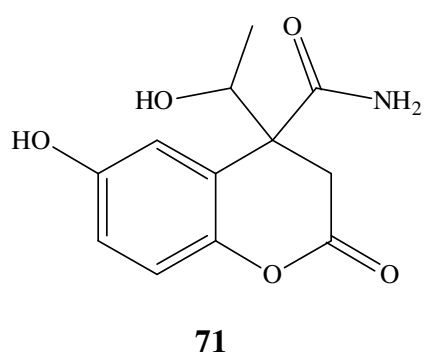


O estudo das culturas do fungo *Hypoxylon rickii* levou ao isolamento de 3 novos sesquiterpenoides com esqueletos do tipo botriano, (1*S*)-7-[(2*E*)-but-2-enoil]-1,3,3,6-tetrametil-2,3-diidro-1*H*-indeno-1-carbaldeído (**64**), (3*aS*)-6-hidroxi-3*a*,5,5,8-tetrametil-3,3*a*,4,5-tetraidro-1*H*-ciclopenta[de]isocromen-1-ona (**65**), (3*aS*)-7-hidroxi-3*a*,5,5,8-tetrametil-3,3*a*,4,5-tetraidro-1*H*-ciclopenta[de]isocromen-1-ona (**66**), 3 novos sesquiterpenoides com esqueletos do tipo 14-noreudesmano que foram nomeados como hypoxylanos A-C (**67-69**) e o diterpenoide rickitina A (**70**), que foi isolado pela primeira vez como um produto natural. Os metabólitos **64-67** e **70** apresentaram atividade citotóxica moderada frente a linhagem de células de fibroblastos de rato L929 (KUHNERT et al., 2015a).

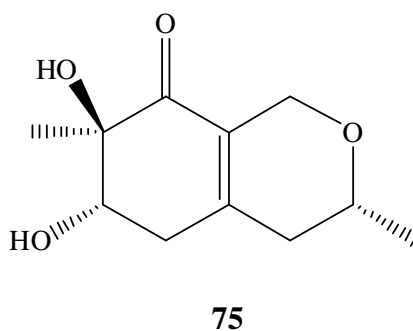
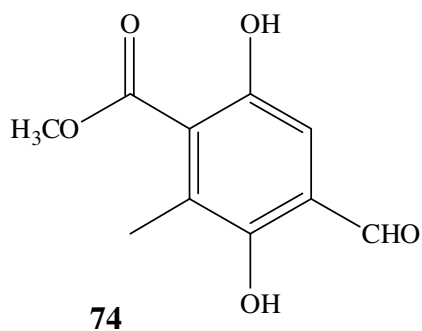




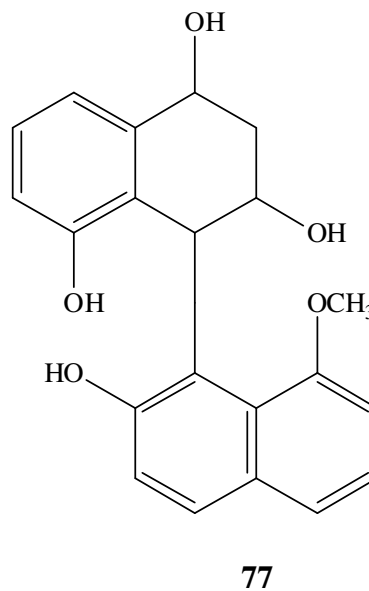
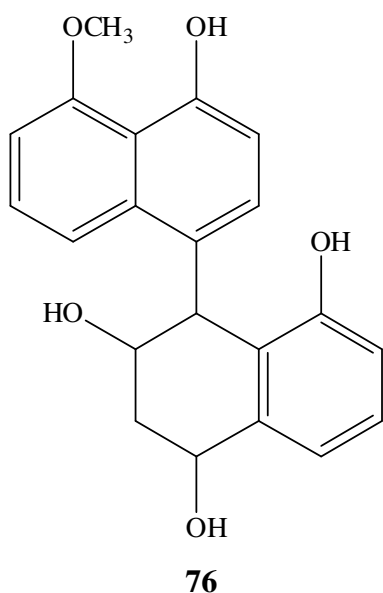
Chang, C. et al. (2014) estudaram o fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da planta *Litsea akoensis* var. *chitouchiaoensis*, do qual foi possível isolar 29 substâncias, sendo 3 inéditas, hypoxylamida (**71**), hypoxylonol (**72**) e 1,7-diol-8-metoxi-naftaleno (**73**). E o último apresentou atividade inibitória na produção de óxido nítrico e de interleucina 6 em macrófagos RAW 264.7.



O fungo endofítico *Hypoxylon* sp. 12F 0687, isolado da planta *Ilex formosana*, foi estudado por Chen, Y. et al. (2015) e foram descritas 16 substâncias, sendo 2 inéditas, hypoxyfenona (**74**) e hypoillexidiol (**75**), e a última apresentou alta atividade inibitória de produção de óxido nítrico e moderada inibição de interleucina 6 em macrófagos RAW 264.7.



Recentemente, o estudo do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* coletada no litoral norte do estado de São Paulo, levou ao isolamento das substâncias inéditas 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol (**76**) e 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (**77**), sendo que suas configurações absolutas ainda não foram determinadas (SILVA, A., 2016).

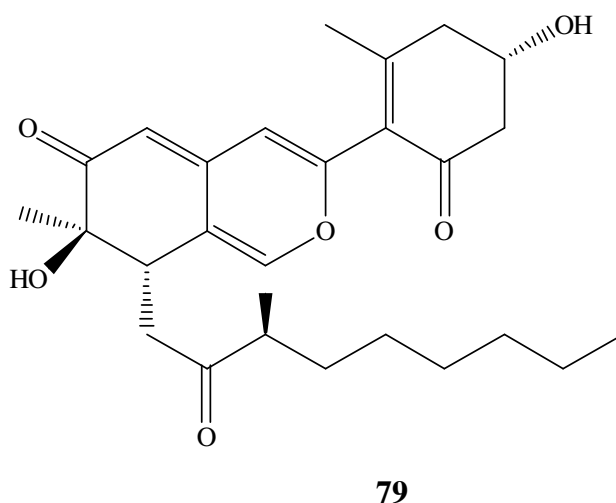
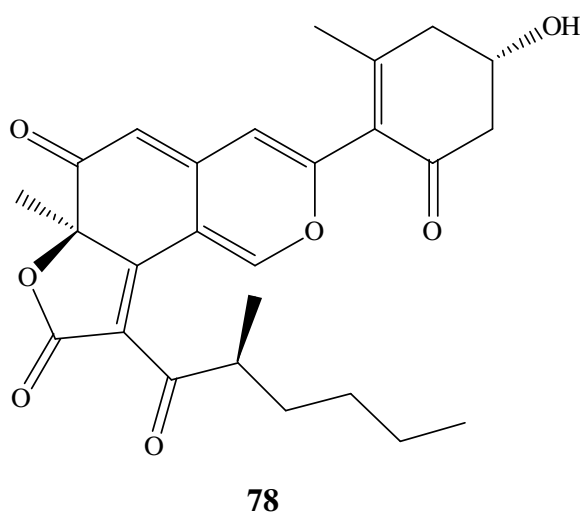


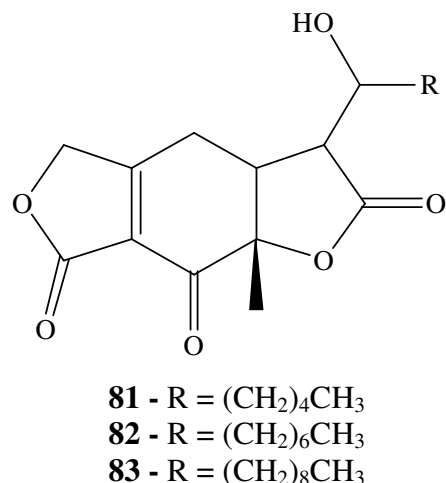
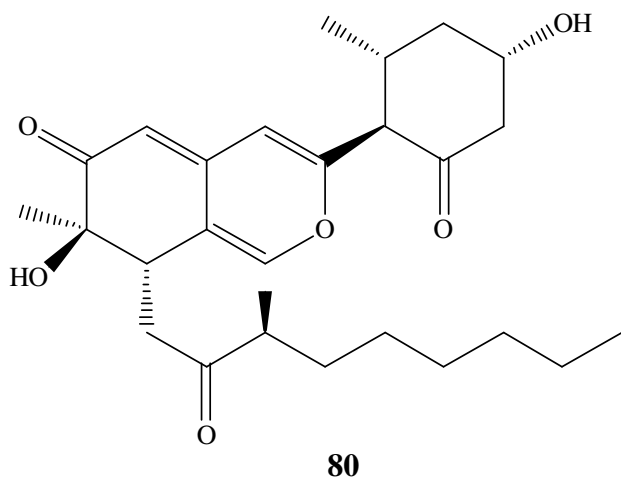
1.4.2 Gênero *Annulohypoxyton*

Após extensas avaliações morfológicas, bem como análises de sequenciamento genômico, foi criado o gênero *Annulohypoxyton* a fim de abrigar espécies que apresentavam características morfológicas distintas de outras espécies do gênero *Hypoxyton*, mas que eram classificadas como pertencentes ao gênero *Hypoxyton* e tratadas como *Hypoxyton* sect *Annulata* (HSIEH; JU; ROGERS, 2005).

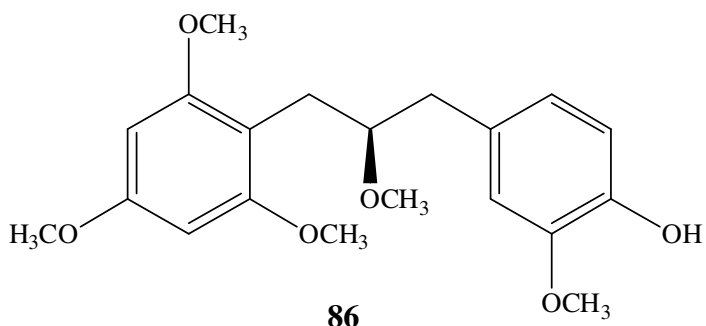
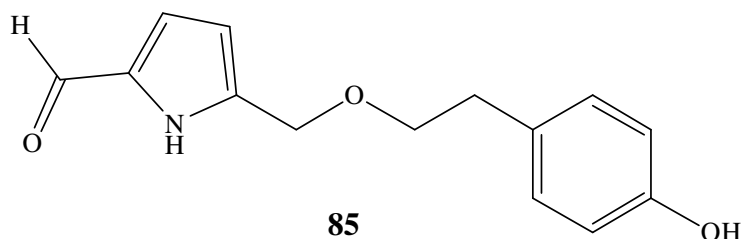
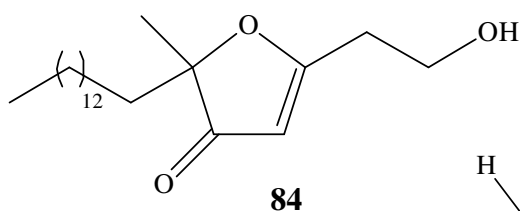
Estudos químicos realizados com as espécies desse novo gênero têm ajudado na classificação taxonômica, sendo que muitas substâncias foram isoladas de uma única espécie como é o caso das azafilonas do tipo cohaerinas, isoladas do corpo de frutificação da espécie *Annulohypoxyton cohaerens* (QUANG et al., 2006; SURUP et al., 2013). Destas podemos destacar as cohaerinas D (**78**), F (**79**) e I (**80**) que apresentaram potente atividade citotóxica frente a linhagens de câncer de fibroblastos de ratos (L-929) (SURUP et al., 2013).

Os estudos dos fungos endofíticos da planta medicinal *Cinnamomum* sp. levou ao isolamento dos derivados de diidrobenezofuran-2,4-diona, annulohypoxyboverina (**81**), annulohypoxylina (**82**), obtidas das culturas de *Annulohypoxyton boveri* var. *microspora* BCRC 34012 (CHENG et al., 2011a; 2011c) e annulosquamulina (**83**), obtida de *Annulohypoxyton squamulosum* BCRC 34022. Sendo que a última substância apresentou moderada atividade citotóxica frente as linhagens das células cancerígenas MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), NCI-H460 (células não pequenas de câncer de pulmão) e SF-268 (glioblastoma) (CHENG et al., 2012).

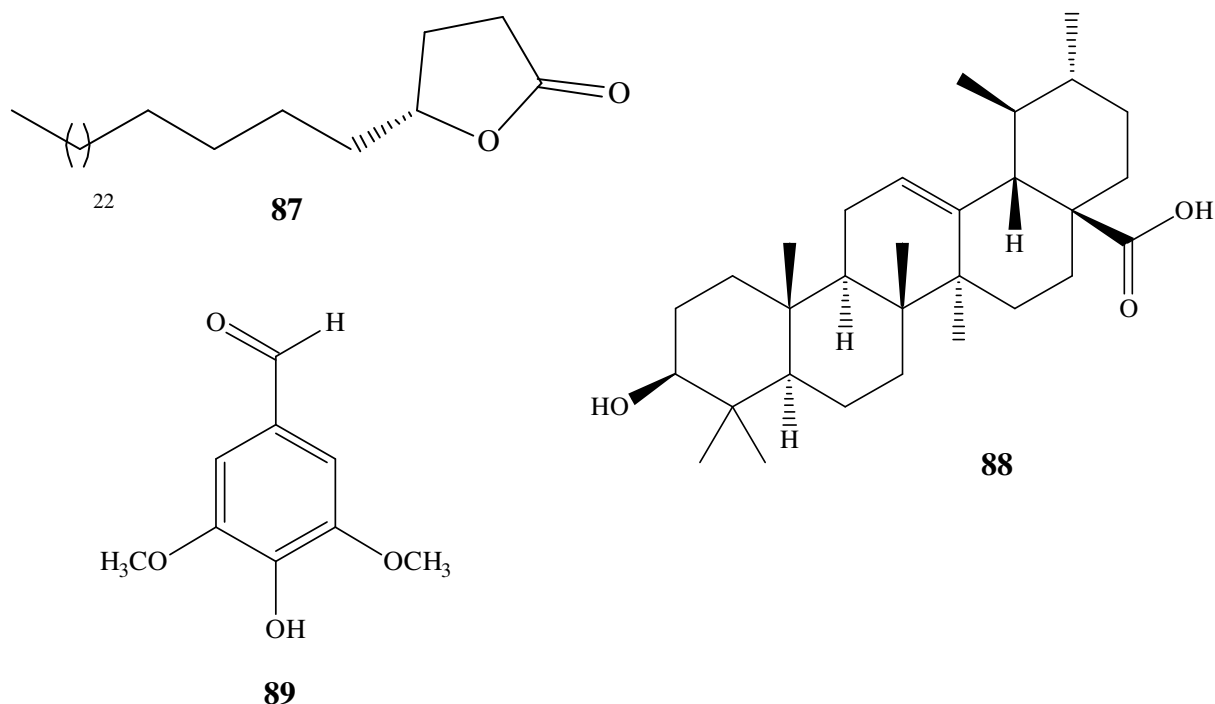




Wu et al. (2013) estudaram o fungo endofítico *Annulohypoxylon ilanense*, também isolado da planta medicinal *Cinnamomum* sp., e descreveram 3 novas substâncias, ilanefuranona (**84**), ilanepirrolal (**85**) e ilanenoide (**86**), sendo que a primeira apresentou forte atividade, enquanto a segunda mostrou atividade moderada contra *Mycobacterium tuberculosis*.



Já o estudo do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* BCRC 34024 levou ao isolamento de uma nova γ -butirolactona, a annulostygilactona (**87**), e de outros 9 metabólitos já descritos na literatura, como por exemplo, o ácido ursólico (**88**) e o siringaldeído (**89**). A nova substância mostrou potente inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (CHENG et al., 2014).



1.4.3 Gênero *Nemania*

Até o presente momento não foram encontrados estudos de isolamento de Produtos Naturais de espécies do gênero *Nemania*.

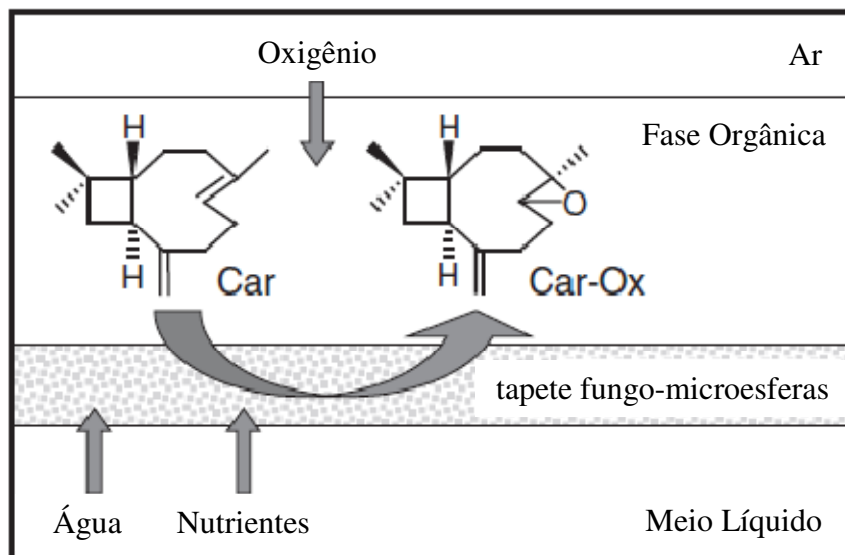
Bussey et al. (2015) isolaram 13 linhagens de fungos endofíticos das raízes de *Anemopsis californica*, planta medicinal usada no tratamento de infecções, que foi coletada em campo, e verificaram a atividade antibacteriana dos extratos das linhagens. A espécie *Nemania serpens* foi identificada entre os fungos endofíticos, sendo que seu extrato apresentou fraca atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O estudo realizado por Zeng et al. (2011) levou ao isolamento de 49 linhagens de fungos endofíticos da planta *Scapania verrucosa*. Os extratos das linhagens foram preparados e testados pelo ensaio de descoloração do ABTS para verificar sua atividade antioxidante. Foram identificadas 3 linhagens de *Nemania diffusa* (T14, T15 e T16) e 2 linhagens de *Nemania* sp. (T20 e T47), sendo que os extratos de T14 e T20 apresentaram moderada atividade antioxidante.

Um estudo de biocatálise utilizou a espécie *Nemania aenea* SF 10099-1 para sintetizar o óxido de (-)- β -cariofileno a partir de uma epoxidação endocíclica regio e estereoseletiva do β -cariofileno usando um biorreator de interface líquido-líquido (ODA et al., 2011), representado na **Figura 2**. O óxido de (-)- β -cariofileno é um Produto Natural encontrado em

poucas plantas e que apresenta atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória (ODA et al., 2011).

Figura 2 - Princípio da epoxidação do β -cariofileno (Car) para óxido de (-)- β -cariofileno (Car-Ox) usando a espécie *Nemania aenea* em um biorreator de interface líquido-líquido.

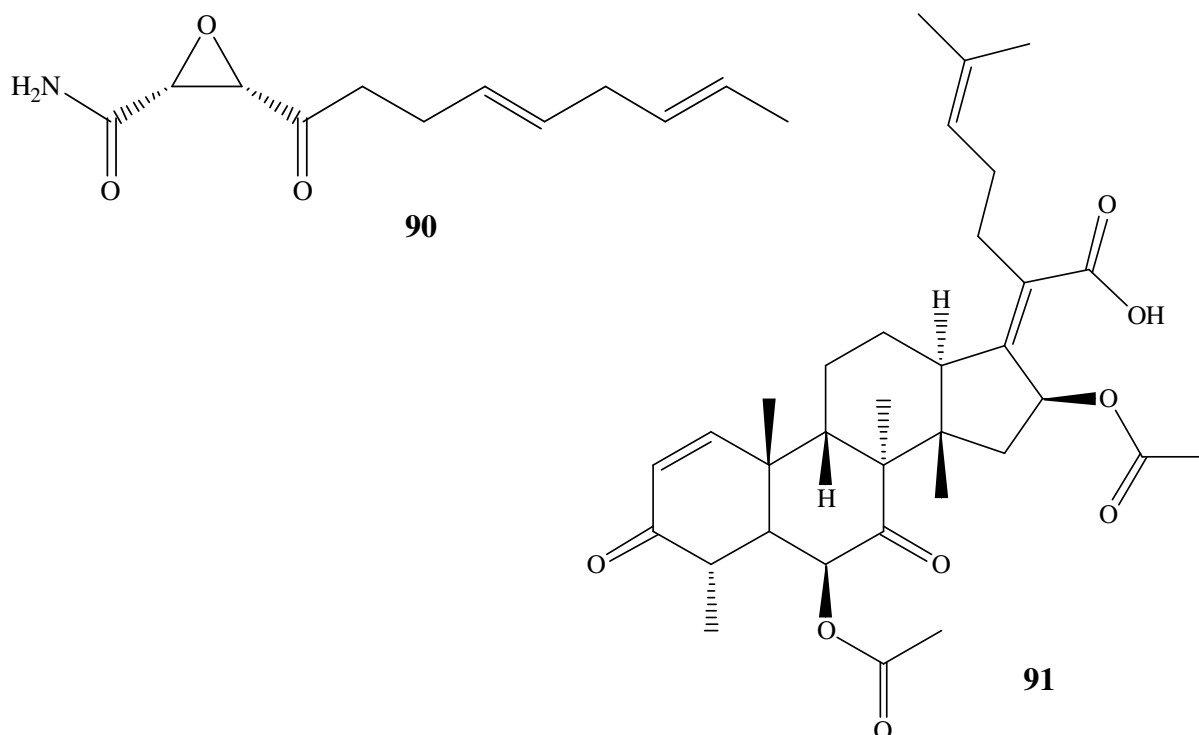


Fonte: ODA et al. (2011); adaptado pelo autor.

1.5 FUNGOS DO GÊNERO *Sarocladium*

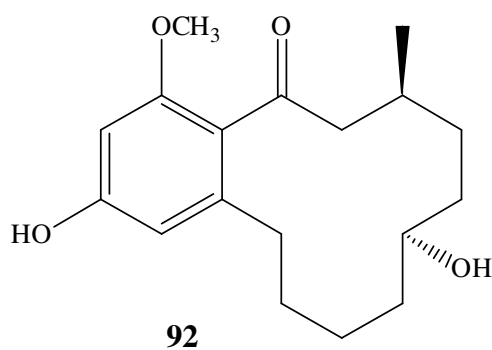
O gênero *Sarocladium* pertence ao Filo Ascomycota, porém a família a qual pertence permanece incerta.

Uma das espécies mais conhecidas desse gênero é a *Sarocladium orizae*, já que é fitopatogênica, causando a doença da "capa podre do arroz". Estudos químicos realizados com essa espécie revelaram as substâncias cerulenina (**90**) e o ácido helvólico (**91**), sendo que estas também causaram lesões no arroz, indicando que são fitotóxicas (SAKTHIVEL; AMUDHA e MUTHUKRISHNAN, 2002). Além disso, a cerulenina apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SAKTHIVEL; GNANAMANICKAM, 1986).



Após análises morfológicas e de sequenciamento genômico, espécies que eram classificadas como sendo do gênero *Acremonium* passaram a ser incluídas no gênero *Sarocladium*, como é o caso das espécies *Sarocladium kiliense* e *Sarocladium strictum*, que antes eram conhecidas como *Acremonium kiliense* e *Acremonium strictum*, respectivamente (SUMMERBELL et al., 2011).

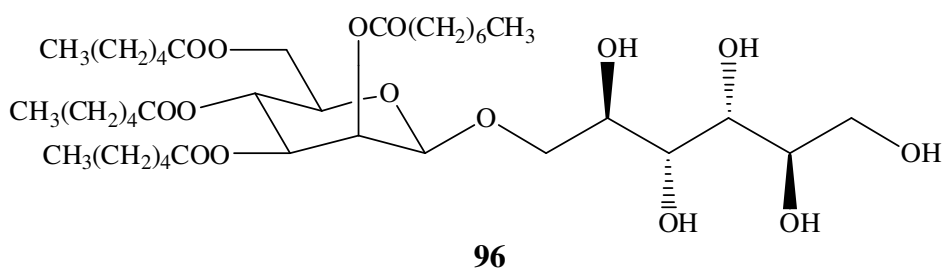
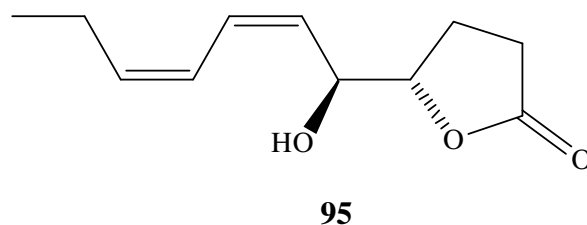
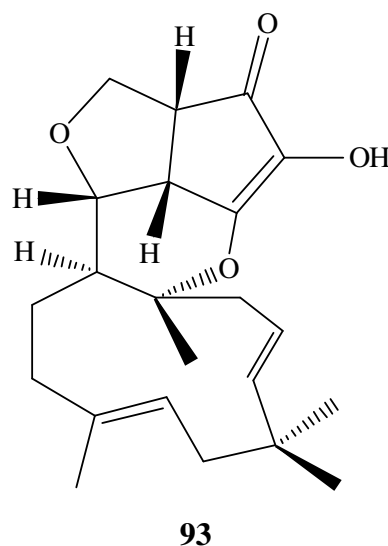
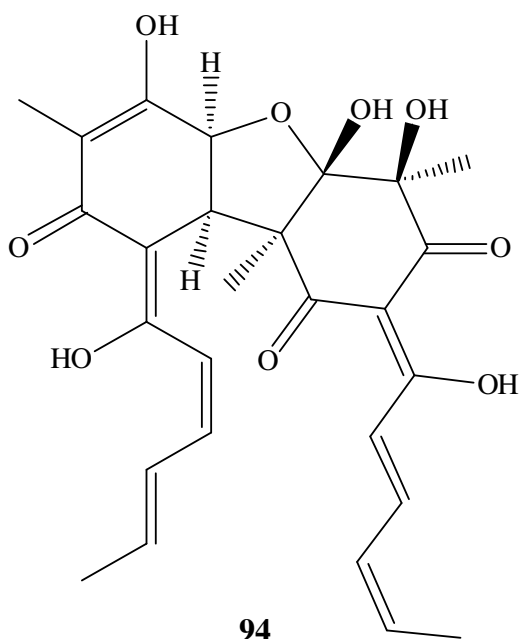
A espécie *Sarocladium kiliense* é um fungo saprófito e pode causar infecções em humanos, como micoses de unha, queratite (inflamação da córnea) e micetomas (FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2014). O estudo com essa espécie, que foi isolada das vísceras do besouro *Apronia germari*, levou a identificação de um novo derivado da lasiodiplodina, a (3*S*),(6*R*)-6-hidroxi-lasiodiplodina (**92**) (YUAN, W. et al., 2013).



1.5.1 Espécie *Sarocladium strictum*

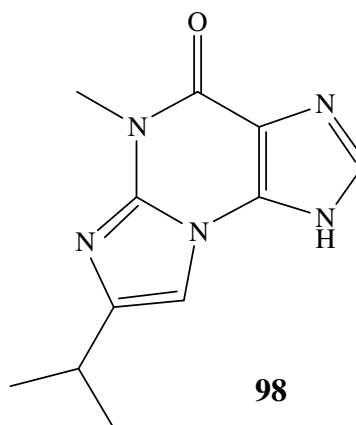
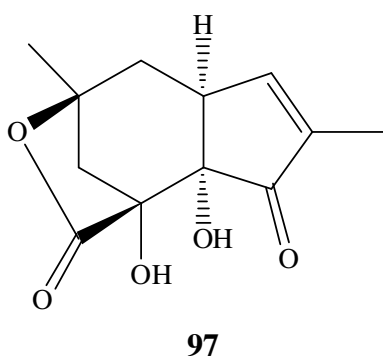
Um dos primeiros estudos realizados com uma linhagem de *Sarocladium strictum* levou ao isolamento da bisvertinolona (**93**), isolada anteriormente do fungo *Verticillium intertextum*, e mostrou que a mesma pode inibir a biossíntese de β -1,6-glicanas (KONTANI, SAKAGAMI, MARUMO, 1994).

O estudo de *Sarocladium strictum* realizado por Ainsworth et al. (1995) levou ao isolamento do xenovuleno A (**94**), que apresentou atividade tranquilizante e anticonvulsiva. Já o estudo realizado por Clough et al. (2000) descreveu a obtenção de uma nova γ -lactona, a (4*S*,5*S*,6*Z*,8*E*)-5-hidroxi-deca-6,8-dien-4-olídeo (**95**). Enquanto o estudo realizado por Sugiura et al. (2012) identificou a substância acremomanolipina A (**96**), que se mostrou um potente modulador do sinal de Ca^{2+} .

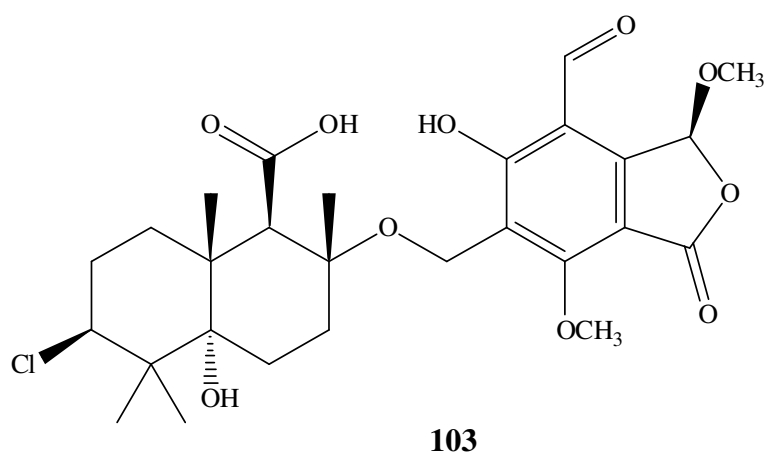
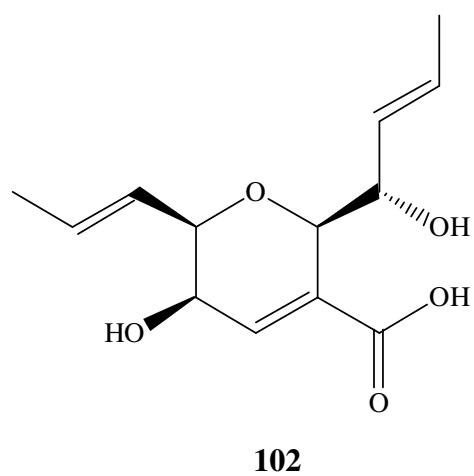
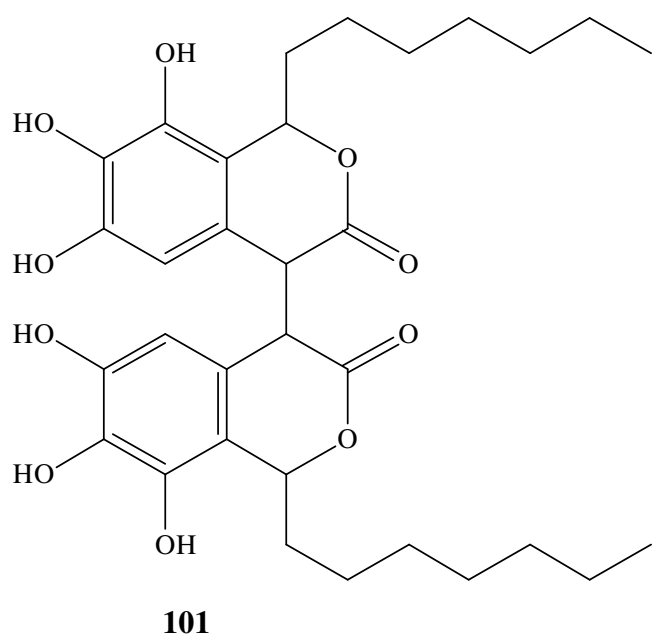
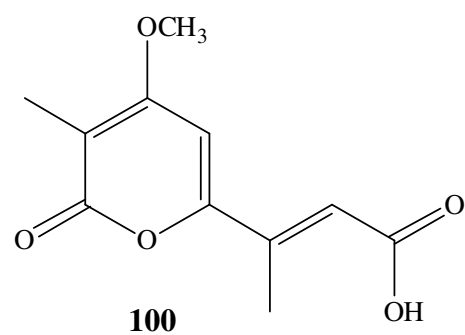
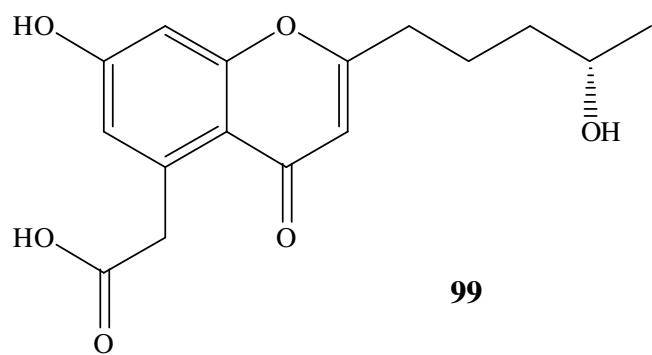


Sarocladium strictum também já foi encontrado em ambientes marinhos. Julianti et al. (2011) isolaram uma linhagem desse fungo de uma esponja não identificada da ordem Choristida e, após seu cultivo (37,4 g meio marinho 2216 e 20,0 g de glicerol em 1 L de H₂O pura), preparo e fracionamento do extrato bruto, obtiveram a substância acremostictina (**97**), que apresentou fraca atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* e *Proteus vulgaris* e moderada atividade antioxidante determinada pelo ensaio de sequestro do radical DPPH.

Ao variar o meio de cultivo (2,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de peptona, 4,0 g de manitol em 1 L de água do mar artificial) dessa mesma linhagem de *Sarocladium strictum* foi possível isolar a substância acremolina (**98**), que apresentou fraca atividade citotóxica frente a linhagem celular A549 (carcinoma de pulmão humano) (JULIANTI et al., 2012; BANERT, 2012).



O estudo de uma linhagem endofítica de *Sarocladium strictum*, isolado da árvore de mangue *Rhizophora apiculata*, levou ao isolamento de 5 novos policetídeos, 6'-hidroxi-pestalotiopsona C (**99**), acropirona (**100**), bicytosporona D (**101**), ácido waol (**102**) e pestalotiopeno C (**103**). Essas substâncias foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico frente à linhagem celular de linfoma de camundongo (L5178Y) e antibacteriano frente a linhagens de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém as mesmas se mostram inativas (HAMMERSCHIMIDT et al., 2014).



2 OBJETIVOS

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivos isolar e/ou identificar substâncias presentes nos extratos e frações de *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e dos seus fungos endofíticos, elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas por métodos espectroscópicos (dados de RMN uni e bidimensionais e UV) e espectrométricos (EM e CG-EM) e avaliar o potencial antimicrobiano, anticolinesterásico e citotóxico dos extratos e frações obtidos e das substâncias puras isoladas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Solventes e equipamentos gerais

Foram utilizados solventes padrões analíticos (PA) ou destilados como diclorometano, clorofórmio, metanol, acetato de etila, hexano e butanol das marcas Synth, Dinâmica, Vetec e Merck. Estes foram usados para extração, fracionamento e obtenção de perfil por cromatografia de camada delgada (CCD).

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments e refrigeração Marconi BTC-9090. E foram secas em liofilizador da marca Christ, modelo Alpha 1-2 LD plus, equipado com bomba de vácuo Vacuubrand, modelo RZ 2.5.

Para esterilização de material foi usada uma autoclave vertical da marca Phoenix Luferco, e para os trabalhos com micro-organismos foi utilizada uma câmara de fluxo laminar vertical da marca Pachane.

As amostras foram pesadas em balanças Mettler Toledo AG245 e AG204 (analíticas) e Marconi BG2000 (semi-analítica).

Nas análises por CCD foram utilizadas placas comerciais (marca Whatman) de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV_{254}), 0,20 mm de espessura.

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílica de fase reversa do tipo octadesil silano (C-18), da marca Sorbent Technologies, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 40-75 µm (200-400 mesh). As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido.

As análises de rotação óptica foram feitas na Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Weber Paixão. Foi utilizado um espectrômetro Polartronic H da marca Schmidt + Haensch e as amostras foram solubilizadas em diferentes solventes, de acordo com os dados da literatura.

Já as análises por dicroísmo circular foram realizadas no Instituto de Química - UNESP-Araraquara, em um espectrômetro JASCO J-815 e as amostras foram solubilizadas em metanol.

3.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em dois equipamentos Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD):

- Analítico: duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A₃, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno modelo CTO-20A.
- Analítico e Preparativo: duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático (modo analítico) SIL-10AF, detector de arranjos de diodos SPD-M20A.

O tratamento dos dados foi realizado através do software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

Foram utilizadas colunas C-18 Phenomenex Gemini e Luna (250 x 4,60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico; coluna C-18 (2) Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5µm; 100Å) no modo semi-preparativo; e coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21,20 mm; 5 µm; 100Å) no modo preparativo.

Para as análises em modo analítico, as amostras (3,5 mg) foram solubilizadas em 1 mL de solução MeOH:H₂O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 (Mackerey-Nagel Chomabond® ou Phenomenex Strata™ - 3mL/500mg) acoplados em membrana Millipore® (0,2 µm). Cada injeção foi de 30 µL.

Para as análises em modo semi-preparativo e preparativo, as amostras também foram solubilizadas em solução MeOH:H₂O (95:05) e submetidas ao “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18. Em seguida, foram secas e diluídas em solução de MeOH:H₂O de mesma polaridade que o início da corrida, até concentração de 20 mg.mL⁻¹. Antes da injeção as amostras foram devidamente filtradas em membranas PTFE (0,22 µm). Cada injeção foi de 200 µL.

Em todas as análises por CLAE foram utilizados solventes de grau CLAE (Merck Millipore Lichrosolv® ou J. T. Baker Solusorb®) e água ultra pura (MilliQ).

3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram realizados em dois espectrômetros, Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,0 T e Bruker Avance III HD 600 com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Chanel Inverse) de 5 mm. Deslocamentos químicos de ¹H foram referenciados de acordo com o pico dos solventes, CDCl₃ (δ_H 7,26 -

Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), DMSO- d_6 (δ_H 2,50 - Sigma-Aldrich;) ou CD₃OD (δ_H 3,31 - Sigma-Aldrich), utilizados para solubilizar as amostras. Os deslocamentos químicos de ¹³C também foram referenciados de acordo com o pico dos solventes, CDCl₃, DMSO- d_6 ou CD₃OD (δ_C 77,2; 39,5; 49,0 respectivamente).

3.1.4 Cromatografia Gasosa

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian CP - 3800, equipado com injetor automático Varian 8200 e detector de ionização em chama (CG-FID), ou em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-MS-QP2010 com autoinjeter AOC-20i (CG-EM). Tanto em CG-FID como em CG-EM foi utilizada uma coluna Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m.

Condições Cromatográficas:

Temperatura do injetor: 260 °C.

Modo de injeção: splitless/split (modo de Grob) início splitless, 0,75 min. split (1/50) e 2 min. split 1/20.

Temperatura do detector: 310 °C

Vazão do gás de arraste (N₂): 1,0 mL.min⁻¹, gás auxiliar: 29 mL.min⁻¹, ar sintético: 10 mL.min⁻¹ e hidrogênio: 1 mL.min⁻¹.

Coluna:

140°C (3 min) $\xrightarrow{3\text{ }^\circ\text{C/min}}$ 320 °C (10 min)

As condições cromatográficas otimizadas no CG-FID foram utilizadas para a análise por CG-EM, onde a ionização por impacto eletrônico (EI) foi realizada a 70 eV e a faixa da massas de aquisição foi m/z 50-500, sendo os demais parâmetros cromatográficos iguais aos usados no CG-FID.

3.1.5 Espectrometria de Massas

Para as análises de Espectrometria de Massas (EM) de alta resolução foi utilizado um espectrômetro da Bruker, modelo Maxix Impact, equipado com eletrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

3.1.6 Materiais e equipamentos utilizados durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry

3.1.6.1 Solventes e equipamentos gerais

As frações foram concentradas em evaporador rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo e refrigeração de gelo seco.

As amostras foram pesadas em balança analítica Sartorius ED1245.

Nas análises por CCD foram utilizadas placas comerciais (Merck) de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV254), 0,20 mm de espessura e solventes grau CLAE (Sigma-Aldrich ou Fisher).

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, empregando como fase estacionária Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) e foram utilizados solventes grau CLAE (Sigma-Aldrich ou Fisher).

3.1.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em dois equipamentos:

- equipamento Waters equipado com uma bomba Waters 1525 (binary HPLC pump) e um detector de duplo comprimento de onda Waters 2487 (Dual λ absorbance detector). O tratamento dos dados foi obtido utilizando o software Breeze.
- equipamento Waters equipado com um sistema controlador Waters 600E (System Controller) e um detector de arranjos de diodos Waters 991 (Photodiode Array Detector - operando entre 200 a 400 nm). O tratamento dos dados foi obtido utilizando o software Millenium³².

Foram utilizadas colunas C-18 semi-preparativas, InertSustain C-18 (250 x 4.60 mm; 5 μ m) e CSC - Inertsil (250 x 9,4 mm; 5 μ m; 150Å/ODS2).

Para a injeção das amostras, as mesmas foram solubilizadas em metanol numa concentração de 40 mg.mL⁻¹. Cada injeção foi, de no máximo, 12 μ L.

Em todas as análises por CLAE foram utilizados solventes grau CLAE e água ultra pura.

3.1.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance 600 com criosonda 5 mm TCI e campo magnético de 14,1 T. Deslocamentos químicos de ^1H foram referenciados de acordo com o pico dos solventes, DMSO- d_6 , CD $_3$ OD (δ_{H} 2,49; 3,31, respectivamente - Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), utilizados para solubilizar as amostras. Os deslocamentos químicos de ^{13}C também foram referenciados de acordo com o pico dos solventes, DMSO- d_6 , CD $_3$ OD (δ_{C} 39,5; 49,0 respectivamente).

3.1.6.4 Espectrometria de Massas

Para as análises de Espectrometria de Massas (EM) de baixa resolução foram utilizados: um espectrômetro da marca Bruker, modelo Esquire (Ion Trap), equipado com ESI como fonte de ionização; ou um espectrômetro da marca Kratos, modelo MS-50, que opera por impacto eletrônico (EI) e possui um analisador magnético. Já para as análises de EM de alta resolução foi utilizado um espectrômetro Waters/Micromass, modelo LCT com analisador por tempo de voo (TOF), também equipado com ESI como fonte de ionização.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudo das Algas

3.2.1.1 Coleta e Preparo do extrato bruto de *Asparagopsis taxiformis*

A fase diploide (estado *Falkenbergia*) de *Asparagopsis taxiformis* foi coletada, em setembro de 2011, no litoral norte do estado de São Paulo, no costão direito da praia da Fortaleza, pertencente ao município de Ubatuba. A mesma foi identificada pela Dr^a Nair Yokoya do Instituto de Botânica- Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e uma exsiccata (SP 401.747) foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica - São Paulo. O material foi lavado em água do mar para eliminação de fragmentos e outros organismos, em seguida, foi armazenada em freezer e transportado em caixa térmica.

Já no laboratório, a alga foi retirada do freezer e colocada na geladeira durante uma noite e, posteriormente, mantida em temperatura ambiente, lavada rapidamente com água

doce e seca com papel toalha, para em seguida ser pesada. A massa do material fresco foi de 511,3 g.

Este foi, então, retalhado e extraído com metanol a frio, seguido de extração com diclorometano. Após a eliminação do solvente em evaporador rotatório a pressão reduzida foi possível separar um precipitado (1,95 g), possivelmente um sal inorgânico, do extrato bruto. E após secagem em liofilizador, foi obtido 4,22 g de extrato bruto (AT-EB).

3.2.1.2 Coleta e preparo de diferentes extratos brutos de *Pyropia spiralis* em escala reduzida

A espécie *Pyropia spiralis* foi coletada em junho de 2012, em um paredão rochoso no costão direito da praia da Fortaleza, Ubatuba, São Paulo. Esta foi identificada pela Dr^a Nair Yokoya do Instituto de Botânica e uma exsiccata (SP 427.981) foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica - São Paulo. O material algal foi transportado em caixa térmica e foi lavado com água doce para a retirada de organismos incrustados no mesmo e, posteriormente, lavado com água do mar esterilizada, seco com papel toalha, pesado e armazenado em freezer. A massa da macroalga fresca foi de 473,7 g.

A fim de se escolher o melhor método de extração, principalmente, um método que garantisse maior rendimento, optou-se por utilizar três diferentes metodologias para o preparo do extrato bruto de *P. spiralis*.

Sendo assim, para cada metodologia foram utilizados 19 g do material algal. Este foi retirado do freezer e mantido na geladeira por uma noite. Posteriormente foi mantido em temperatura ambiente e seco com papel toalha.

Na primeira metodologia a amostra foi triturada no liquidificador com metanol (PS-EBL). Na segunda, a amostra foi apenas retalhada e extraída com metanol (PS-EBM) e, na terceira metodologia a amostra foi congelada com nitrogênio líquido e moída, e também foi extraída com metanol (PS-EBN). Em todas as metodologias foi feita a extração com metanol (3 vezes), seguida de extração com diclorometano (3 vezes). As soluções foram filtradas e concentradas a vácuo. E novamente foi possível separar um sal inorgânico na etapa de concentração. A **Tabela 1** apresenta os rendimentos para as diferentes metodologias de extração.

Tabela 1 - Rendimentos obtidos para as diferentes metodologias de extração de *P. spiralis*.

Metodologia	Massa obtida (g)	
	Extrato Bruto	Precipitado
PS-EBL	1,17	0,39
PS-EBM	0,63	0,17
PS-EBN	0,81	0,10

Fonte: o autor.

Foram realizados os perfis dos extratos brutos obtidos pelas diferentes metodologias, tanto por CLAE-DAD como por RMN de ^1H .

3.2.1.3 Obtenção do extrato bruto de *P. spiralis* em escala ampliada

O material algal (416 g) foi retirado do freezer onde estava armazenado e foi colocado na geladeira durante uma noite. No dia seguinte, o mesmo foi retirado da geladeira e mantido em temperatura ambiente. As algas foram secas com papel toalha, congeladas com nitrogênio líquido e trituradas em moinho. Assim que o material pulverizado foi colocado em um frasco de vidro foi adicionado metanol e, após sucessivas filtrações e adições de metanol (6 vezes; durante 1 mês), o solvente orgânico foi removido sob vácuo em evaporador rotatório em temperatura inferior a 40°C. Fez-se também a adição de diclorometano como etapa final de obtenção do extrato bruto, porém após a evaporação do solvente obteve-se pouca quantidade desse extrato e, portanto, não foram realizadas novas extrações com este solvente.

Após liofilizado, obteve-se 13,42 g de extrato bruto de *P. spiralis* (PS-EB).

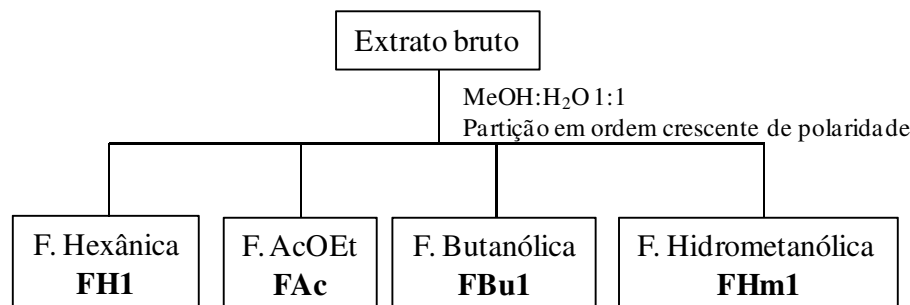
3.2.1.4 Fracionamento dos extratos brutos de *A. taxiformis* e *P. spiralis* em escala reduzida

O fracionamento dos extratos brutos das algas foi realizado, inicialmente, em pequena escala e foram utilizadas duas diferentes metodologias, a fim de se comparar os perfis cromatográficos e espectrométricos e escolher o melhor método de fracionamento.

Na primeira metodologia, 347,5 mg e 308,5 mg do extrato bruto de *A. taxiformis* (AT) e *P. spiralis* (PS), respectivamente, foram solubilizados em metanol:água 1:1 (v/v) e submetidos a partição líquido-líquido com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as frações hexânicas (AT-FH1 e PS-FH1), acetato de etila (AT-FAc e

PS-FAc), *n*-butanólicas (AT-FBu1 e PS-FBu1) e as frações remanescentes hidrometanólicas (AT-FHm1 e PS-FHm1), conforme mostra o **Esquema 1** e a **Tabela 2**.

Esquema 1 - Fracionamento dos extratos brutos de *A. taxiformis* e *P. spiralis* pela metodologia 1.



Fonte: o autor.

Tabela 2 - Rendimento das frações obtidas pela metodologia 1.

Alga	Massa obtida (mg)			
	FH1	FAc	FBu1	FHm1
<i>A. taxiformis</i>	171,6	25,0	63,1	72,6
<i>P. spiralis</i>	95,0	23,9	92,1	69,4

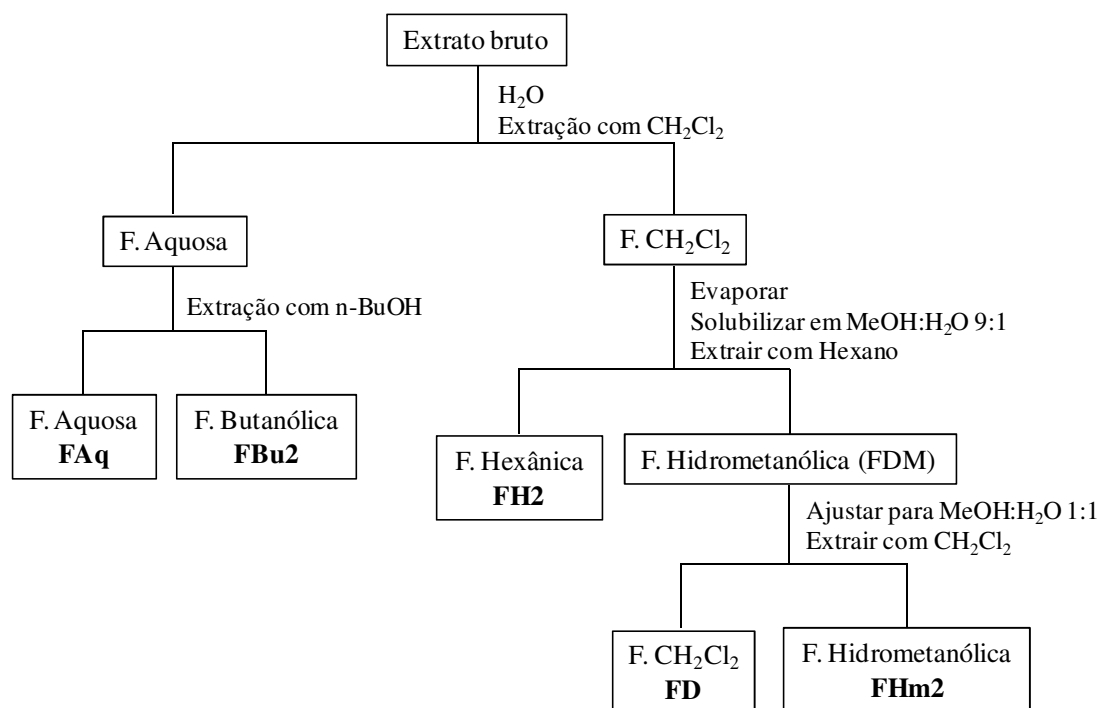
Fonte: o autor.

Na segunda metodologia (RATEB et al., 2009), foi adicionado água em 345,0 mg e 301,4 mg do extrato bruto de AT e PS, respectivamente, que foram então submetidos a partição com diclorometano, obtendo-se uma fase aquosa e outra fase orgânica. A fase orgânica foi evaporada e, posteriormente, dissolvida em metanol:água 9:1 (v/v) (FDM) e extraída com hexano (AT-FH2 e PS-FH2). A fase FDM foi ajustada para metanol:água 1:1 e extraída com diclorometano, obtendo-se as frações diclorometânicas (AT-FD e PS-FD) e as frações hidrometanólicas remanescentes (AT-FHm2 e PS-FHm2). A fase aquosa foi submetida a uma partição líquido-líquido com *n*-butanol e foram obtidas as frações butanólicas (AT-FBu2 e PS-FBu2) e as frações aquosas remanescentes (AT-FAq e PS-FAq), conforme apresentado na **Tabela 3** e **Esquema 2**.

Tabela 3 - Rendimento das frações obtidas pela metodologia 2.

Alga	Massa obtida (mg)				
	FH2	FD	FHm2	FBu2	FAq
<i>A. taxiformis</i>	90,2	90,8	18,2	107,5	23,8
<i>P. spiralis</i>	30,9	37,6	14,4	67,2	125,2

Fonte: o autor.

Esquema 2 - Fracionamento dos extratos brutos de *A. taxiformis* e *P. spiralis* pela metodologia 2.

Fonte: o autor.

Após a obtenção destas frações, foram realizados experimentos para a determinação de seus perfis químicos por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H .

3.2.1.5 Fracionamento dos extratos brutos de *A. taxiformis* e *P. spiralis* em escala ampliada

Após as análises dos perfis químicos das frações obtidas em escala reduzida, optou-se por utilizar a metodologia 1 para o fracionamento em escala ampliada dos extratos brutos das algas *A. taxiformis* e *P. spiralis*.

Parte do extrato bruto de cada espécie de alga (AT – 2,98 g; PS – 10,01 g) foi fracionado como demonstrado no **Esquema 1**, descrito anteriormente. A **Tabela 4** mostra o rendimento obtido para cada fração a partir de cada alga.

Tabela 4 - Rendimento das frações obtidas pelo fracionamento em escala ampliada dos extratos brutos de *A. taxiformis* e *P. spiralis*.

Alga	Massa obtida (g) / Rendimento Parcial (%)				Rendimento
	FH	FAc	FBu	FHm	Total (%)
<i>A. taxiformis</i>	2,009 / 71,0	0,172 / 6,0	0,285 / 10,1	0,364 / 12,9	95
<i>P. spiralis</i>	1,710 / 25,5	0,404 / 6,0	0,587 / 8,7	4,010 / 59,8	67

Fonte: o autor.

Amostras destas frações foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ^1H e, também foram enviadas para avaliação das atividades antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica. A partir dos resultados obtidos, optou-se por estudar as frações AT-FH e PS-FH, bem como as frações AT-FAc e PS-FHm.

3.2.1.6 Estudo das frações AT-FH e PS-FH

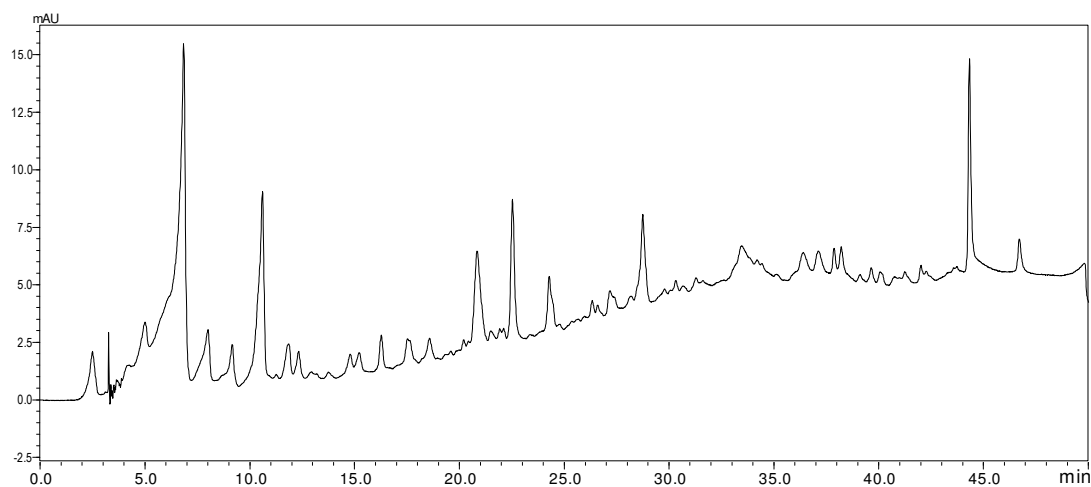
Optou-se em analisar as frações AT-FH e PS-FH por cromatografia gasosa, tanto por CG-FID como por CG-EM, a fim de identificar as substâncias presentes nas mesmas.

Para garantir uma maior estabilidade térmica e maior volatilidade dos constituintes, bem como uma melhor resolução cromatográfica (PELLATTI; BENVENUTI, 2007) foi realizada uma etapa de derivação (sililação), durante o preparo das amostras. Sendo assim, 3 mg das frações foram solubilizadas com 200 μL de *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA - Sigma) em 100 μL de piridina, e em seguida, foram mantidas a 37° C por 30 minutos. Após 24 horas de repouso, as amostras foram filtradas em membranas PTFE (0,22 μm) e foram analisadas (TOMAZ, 2011).

3.2.1.7 Estudo da fração AT-FAc

A partir do perfil obtido por CLAE-DAD da fração AT-FAc (**Figura 3**), optou-se por submetê-la (105,0 mg) a um fracionamento em coluna de sílica de fase reversa do tipo octadecil silano (C-18) (10,0 g, $\Phi = 2$ cm), eluída com diferentes proporções de MeOH:H₂O (determinadas a partir do cromatograma do perfil químico). Foram obtidas 5 frações de 24 mL cada (**Tabela 5**).

Figura 3 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v à 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **AT-FAc** (254 nm).



Fonte: o autor.

Tabela 5 - Fracionamento de **AT-FAc** em coluna cromatográfica com sílica derivatizada C-18.

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (mg)
AT-FAc-F1	35:65	62,4
AT-FAc-F2	1:1	8,3
AT-FAc-F3	65:35	7,8
AT-FAc-F4	80:20	13,6
AT-FAc-F5	100:0	9,2

Fonte: o autor.

Após a análise destas frações por RMN de ¹H e CLAE-DAD (frações AT-FAc-F1 e AT-FAc-F4) optou-se por realizar o estudo da fração AT-FAc-F1.

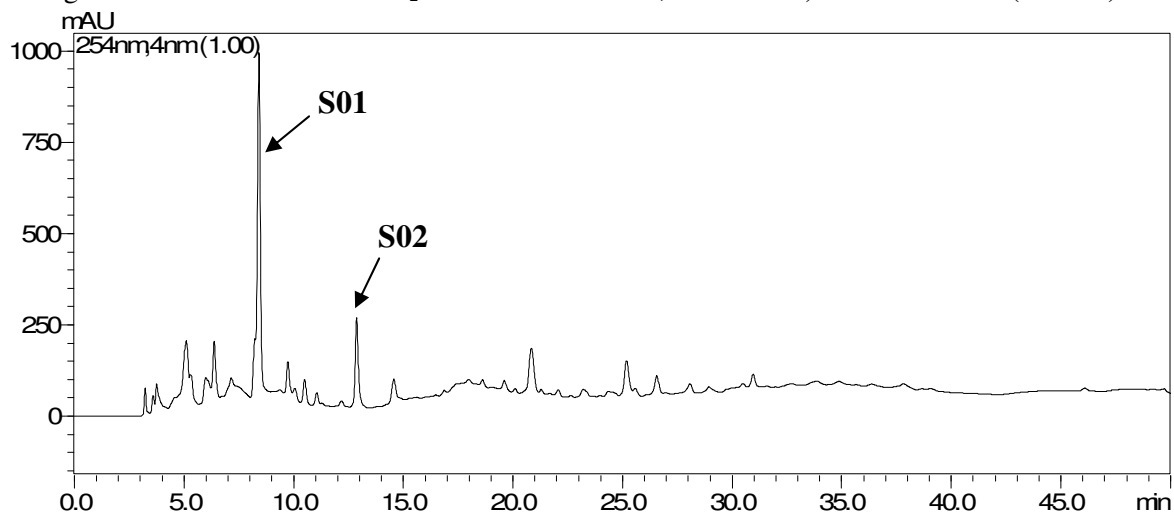
3.2.1.7.1 Estudo da fração AT-FAc-F1

Parte da fração AT-FAc-F1 (39,6 mg) foi submetida à análise por CLAE-DAD em escala preparativa. Foi utilizada uma coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21.20 mm; 5 µm; 100Å), gradiente linear de 5 a 100% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 10 mL.min⁻¹. Foram coletadas 12 frações (**Tabela 6**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 4**) e intervalos entre os mesmos.

Tabela 6 - Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de **AT-FAc-F1**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
AT-FAc-F1-1	0 - 8,0	15,0	
AT-FAc-F1-2	8,4	1,3	S01
AT-FAc-F1-3	8,5 - 12,0	2,1	
AT-FAc-F1-4	12,9	1,6	S02
AT-FAc-F1-5	14,6	0,9	
AT-FAc-F1-6	15,0 - 20,0	2,5	
AT-FAc-F1-7	20,8	1,5	
AT-FAc-F1-8	21,0 - 24,9	2,6	
AT-FAc-F1-9	25,2	1,1	
AT-FAc-F1-10	26,6	1,1	
AT-FAc-F1-11	28,1	1,1	
AT-FAc-F1-12	28,2 - 40,0	6,7	

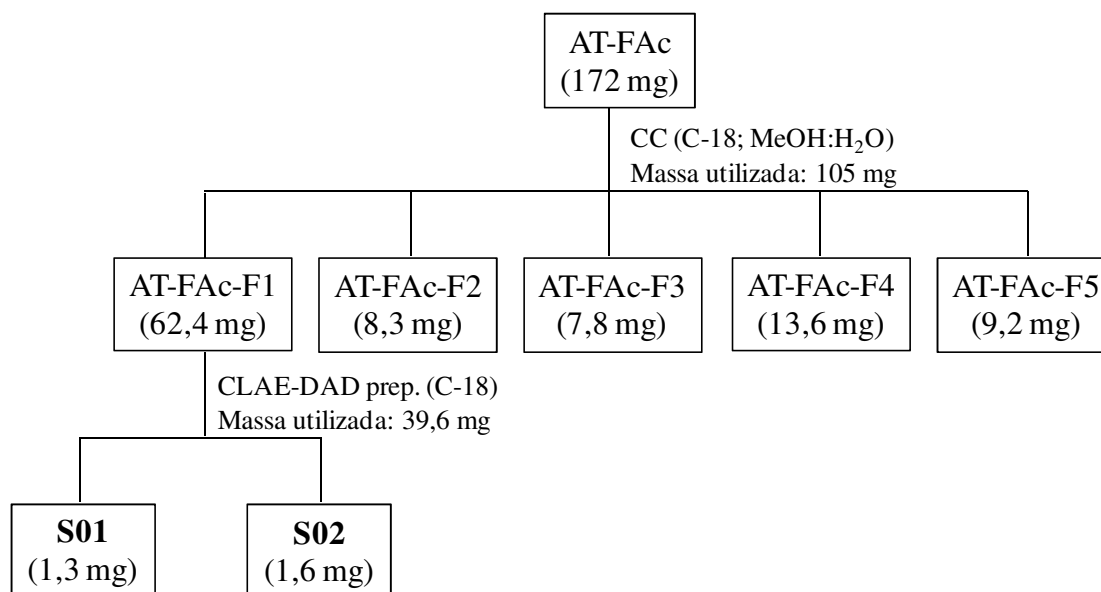
Fonte: o autor.

Figura 4 - Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 10 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **AT-FAc-F1** (254 nm).

Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que as frações AT-FAc-F1-2 e -4 forneceram as substâncias **S01** e **S02**.

O **Esquema 3** representa o estudo da fração AT-FAc, bem como da fração AT-FAc-F1.

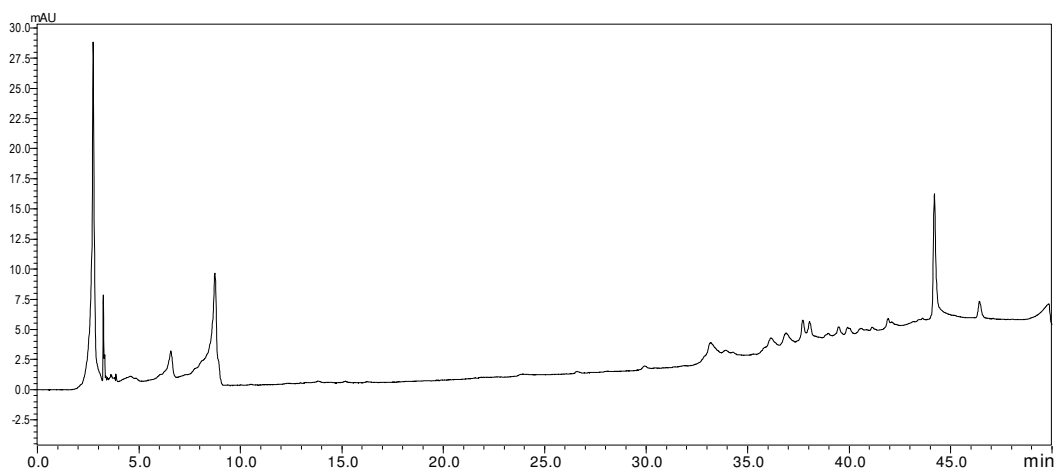
Esquema 3 - Estudo da fração AT-FAc.

Fonte: o autor.

3.2.1.8 Estudo da fração PS-FHm

Após a análise do perfil químico, obtido por CLAE-DAD (**Figura 5**), da fração PS-FHm, a mesma (1,0 g) foi submetida a um fracionamento em coluna de C-18 (100,0 g, $\Phi = 3,5$ cm), utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O. Foram obtidas 3 frações de 225 mL cada (**Tabela 7**).

Figura 5 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **PS-FHm** (254 nm).



Fonte: o autor.

Tabela 7 - Fracionamento de **PS-FHm** em coluna cromatográfica com sílica derivatizada C-18.

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (mg)
PS-FHm-F1	20:80	920,2
PS-FHm-F2	75:25	12,1
PS-FHm-F3	100:0	64,5

Fonte: o autor.

Após a análise destas frações por RMN de ¹H e CLAE-DAD optou-se por realizar o estudo da fração PS-FHm-F1.

3.2.1.8.1 Estudo da fração PS-FHm-F1

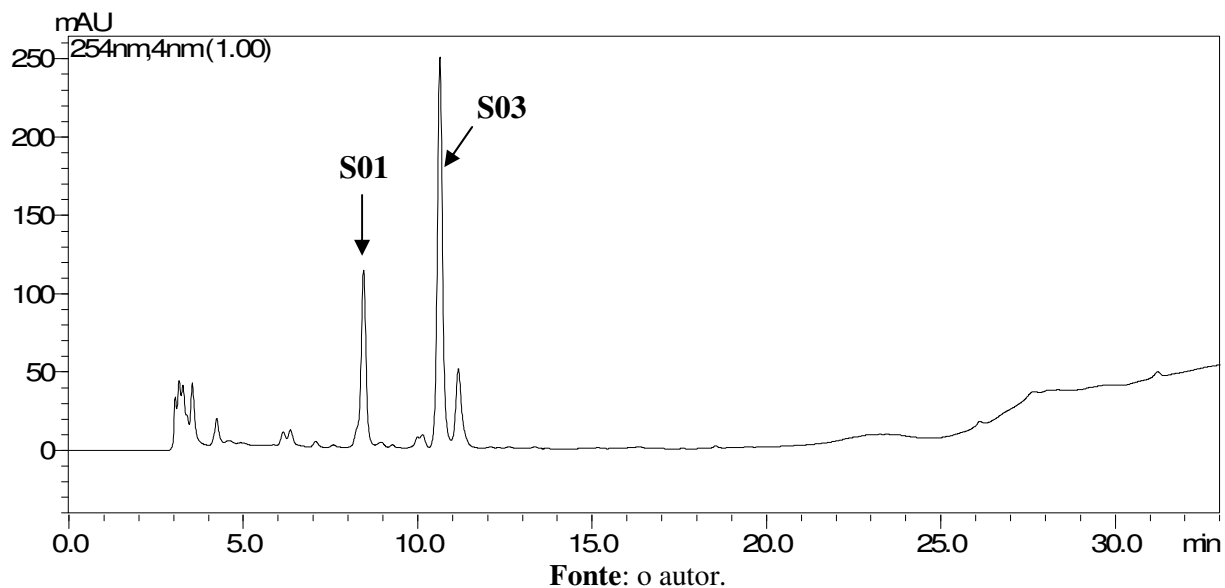
Parte desta fração (50 mg) foi submetida à CLAE-DAD preparativo, utilizando uma coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21.20 mm; 5 µm; 100Å), vazão de 10 mL.min⁻¹ e gradiente linear de 5 a 50% MeOH:H₂O por 20 minutos. Em seguida, aumentou-se a concentração de MeOH até 100% e esta condição foi mantida por mais 10 minutos. Foram coletadas 12 frações (**Tabela 8**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 6**) e intervalos entre os mesmos.

Tabela 8 - Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de **PS-FHm-F1**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
PS-FHm-F1-1	0 - 4,0		
PS-FHm-F1-2	4,2	6,4	
PS-FHm-F1-3	4,3 - 5,9	3,3	
PS-FHm-F1-4	6,10 - 6,3	1,8	
PS-FHm-F1-5	6,4 - 8,0	1,9	
PS-FHm-F1-6	8,4	1,3	S01
PS-FHm-F1-7	8,6 - 9,8	2,1	
PS-FHm-F1-8	10,0	1,8	
PS-FHm-F1-9	10,6	1,6	S03
PS-FHm-F1-10	11,2	1,3	
PS-FHm-F1-11	11,7 - 23,0		
PS-FHm-F1-12	23,1 - 33,0		

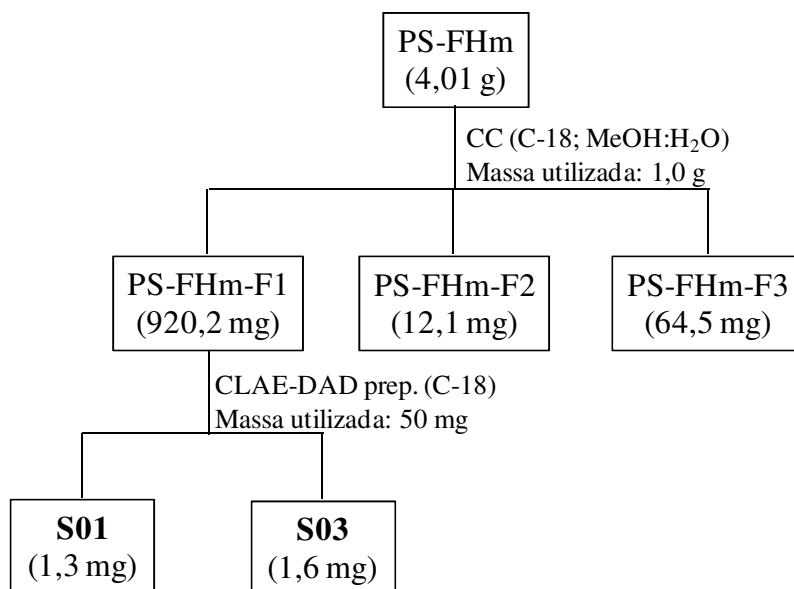
Fonte: o autor.

Figura 6 - Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 5 a 50% MeOH:H₂O v/v a 10 mL.min⁻¹; 20 minutos) de **PS-FHm-F1** (254 nm).



Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H. As frações PS-FHm-F1-6 e -9 forneceram as substâncias **S01** e **S03**. O **Esquema 4** representa o estudo da fração PS-FHm.

Esquema 4 - Estudo da fração **PS-FHm**.



Fonte: o autor.

3.2.2 Estudo dos fungos endofíticos isolados das algas *A. taxiformis* e *P. spiralis*

3.2.2.1 Obtenção das linhagens fúngicas

Em junho de 2013 foram coletadas no costão direito da praia da Ponta da Fortaleza, Ubatuba - São Paulo, pequenas quantidades das algas *Asparagopsis taxiformis* (AT), estágio *Falkenbergia*, e *Pyropia spiralis* (PS) para o isolamento de fungos endofíticos. As algas foram lavadas cuidadosamente em água do mar e armazenadas em frascos (3 para cada espécie) contendo água do mar esterilizada por autoclavagem e o antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}), para evitar a contaminação por bactérias. Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Instituto de Química de Araraquara-UNESP.

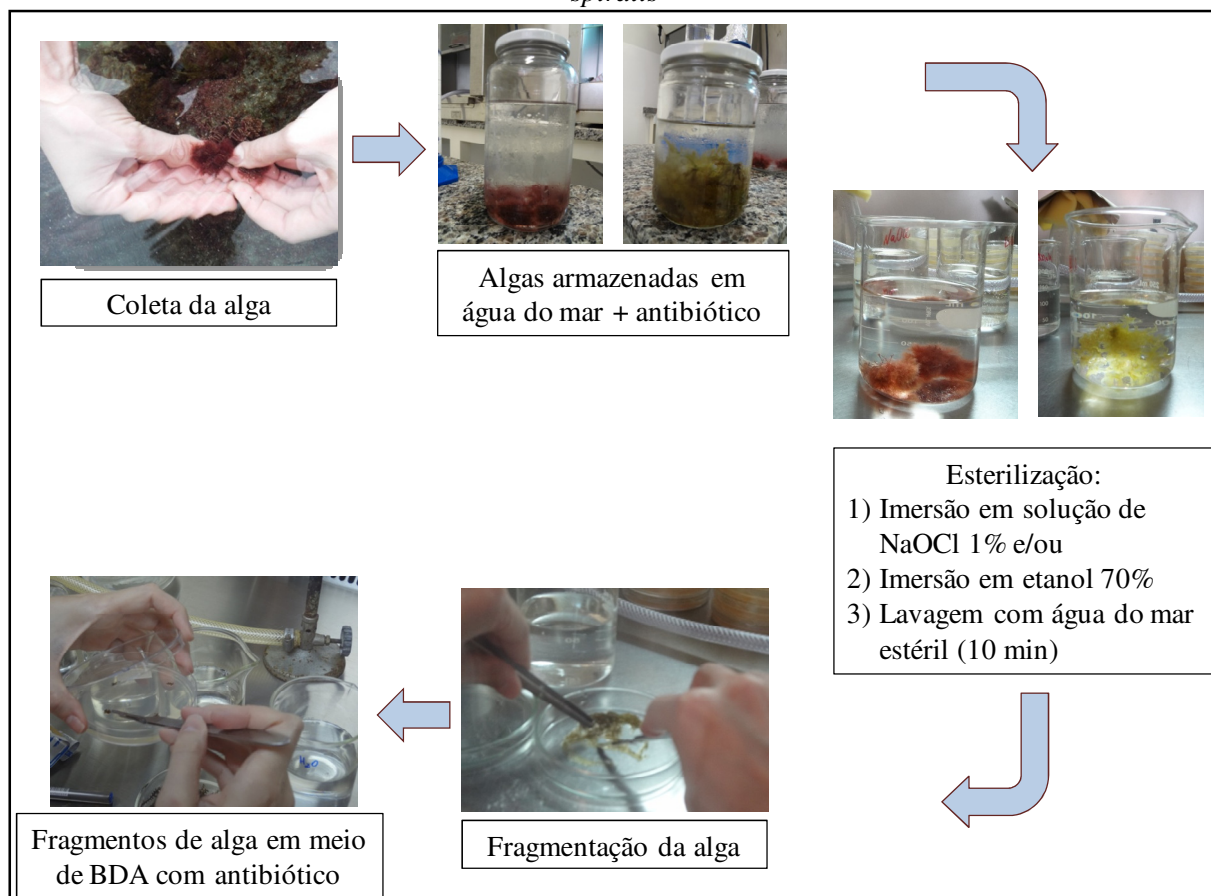
Já no laboratório, as algas foram esterilizadas superficialmente utilizando diferentes métodos:

- Método 1 – imersão em etanol 70% por 10 segundos (PS) e por 12 segundos (AT);
- Método 2 – imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos (AT e PS).

Seguidos de lavagem com água do mar (coletada na praia da Fortaleza, Ubatuba, SP) esterilizada, por 10 minutos.

Após o processo de esterilização as algas foram fragmentadas com uso de pinças e bisturis cirúrgicos esterilizados e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultivo de batata-dextrose-ágar (BDA), água do mar ou água ultra pura esterilizadas e o antibiótico cloranfenicol (200 mg L^{-1}), sendo que em cada placa foram colocados 4 fragmentos de algas e para cada método foram usadas 2 placas preparadas com água ultra pura e duas placas com água do mar. Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada em BDA/água ultra pura e BDA/água do mar (**Esquema 5**).

Esquema 5 - Processo realizado para o isolamento dos fundos endofíticos de *A. taxiformis* e *P. spiralis*



Fonte: o autor.

Acredita-se que os métodos 1 e 2 foram muito drásticos para a esterilização da alga *P. spiralis*, e possivelmente, causaram a morte da mesma ou dos micro-organismos associados, impedindo assim o crescimento de fungos. Sendo assim, foram preparados 4 métodos mais brandos de esterilização para essa alga:

- Método 3 - rápida imersão (1 a 2 segundos) em solução de NaOCl 1% e em etanol 70% (PS)
- Método 4 - imersão em solução de NaOCl 1% por 5 segundos (PS).
- Método 5 - imersão em solução de NaOCl 1% por 5 segundos e em etanol 70% (PS).
- Método 6 - imersão em etanol 70% por 5 segundos (PS).

Seguidos de lavagem com água do mar esterilizada por 10 minutos.

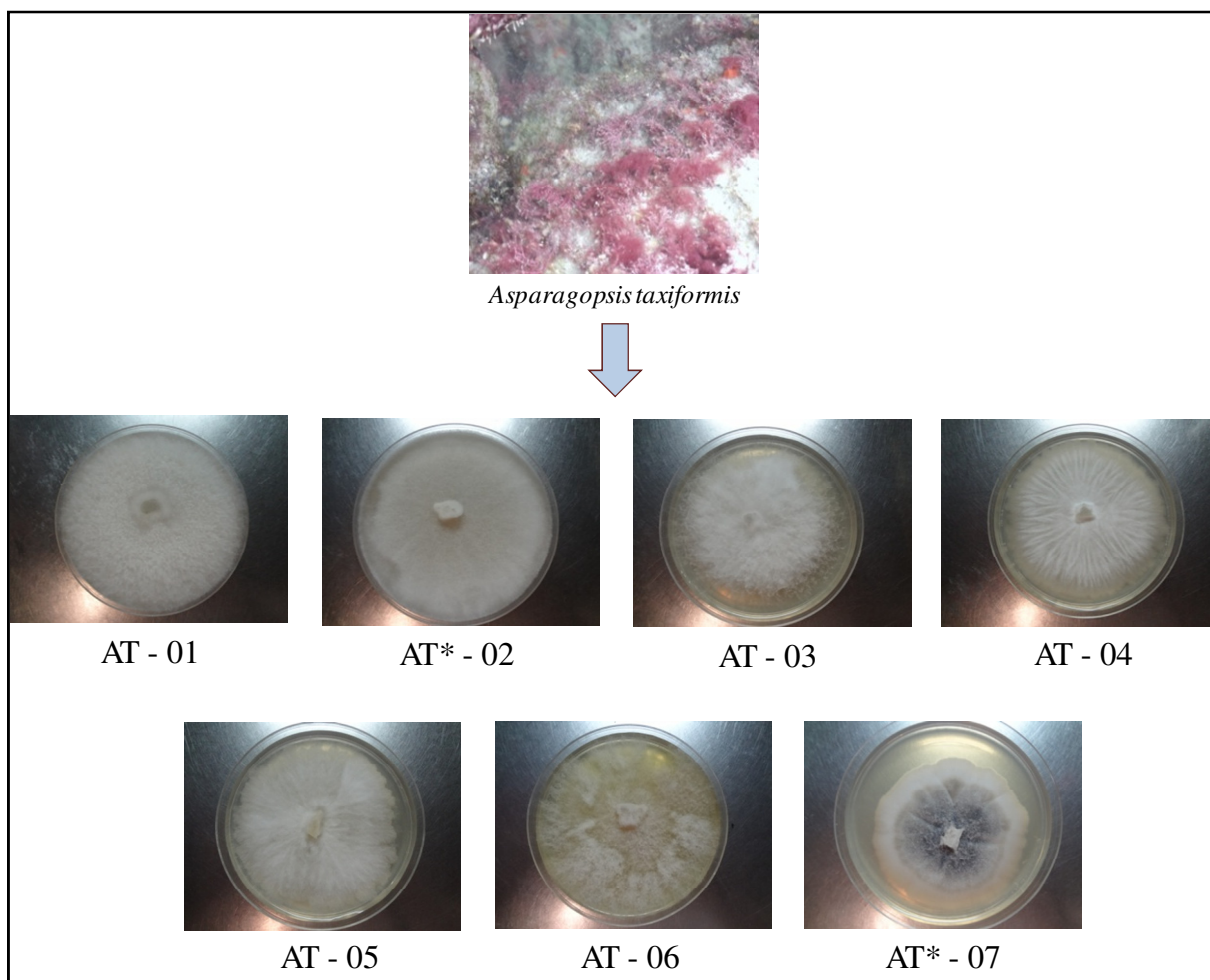
Nas placas provenientes dos métodos 3, 5 e 6 houve o crescimento de fungos e bactérias, inclusive nas placas contendo a água do mar de lavagem, evidenciando que a esterilização não foi adequada para esses casos, e portanto, essas foram descartadas. Já nas placas contendo fragmentos de algas esterilizadas pelo método 4 foi observado apenas o

crescimento de fungos, e portanto, esse método foi adotado para esterilização da alga *P. spiralis*.

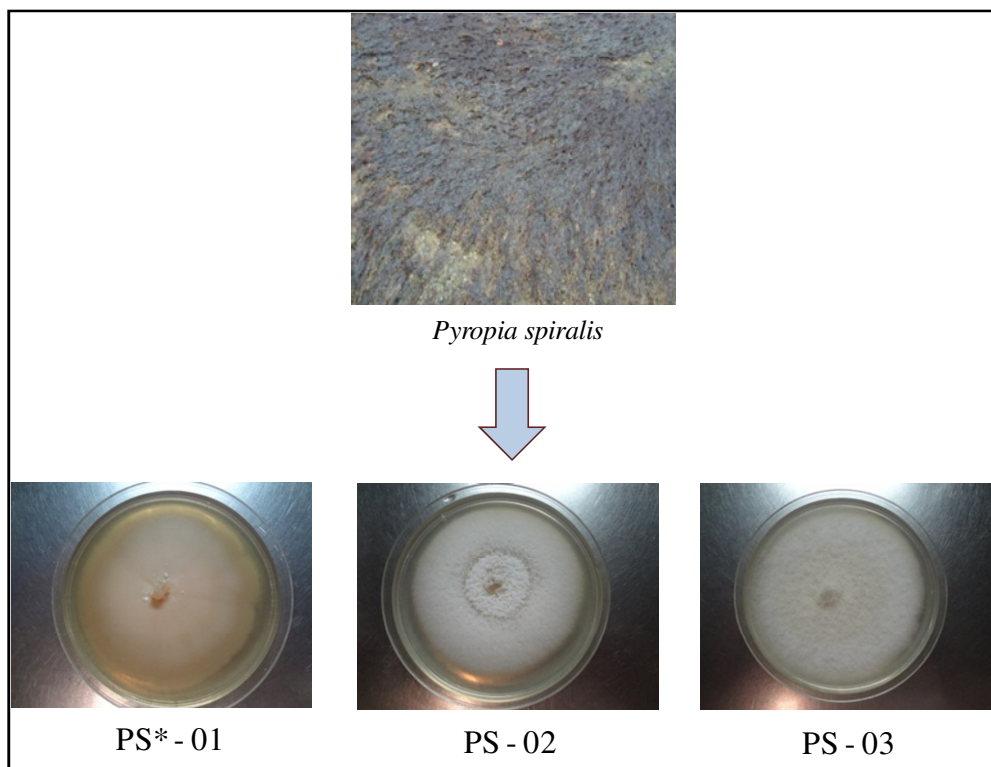
O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em “slants” (frascos contendo água do mar ou água ultra pura esterilizada e o fungo em meio sólido BDA), que foram lacrados e mantidos em temperatura ambiente.

A partir da alga AT foi possível isolar sete linhagens de fungos endofíticos (AT-01 – AT-07) (**Figura 7**) e da alga PS foram isolados três linhagens (PS-01 – PS-03) (**Figura 8**). Vale ressaltar que as linhagens AT-02, AT-07 e PS-01 foram isoladas de placas de Petri preparadas com água ultra pura.

Figura 7 - Fungos endofíticos isolados de *Asparagopsis taxiformis*.



Fonte: o autor.

Figura 8 - Fungos endofíticos isolados de *Pyropia spiralis***Fonte:** o autor.

3.2.2.2 Identificação das linhagens fúngicas

A identificação das linhagens dos fungos endofíticos isolados de *A. taxiformis* e *P. spiralis* foi realizada pela empresa Genotyping (Botucatu-SP).

A identificação foi feita através do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA (ITS) do micro-organismo. Inicialmente foi feita a extração do material genético kit (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™), seguido do preparo das reações para o sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi feito automaticamente por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e, em seguida, o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas foi comparado com as sequências de referência depositadas no *GenBank* (banco de dados genômicos).

A **Tabela 9** apresenta as linhagens fúngicas com suas respectivas identificações.

Tabela 9 - Identificação das linhagens fúngicas isoladas de *A. taxiformis* (AT) e *P. spiralis* (PS).

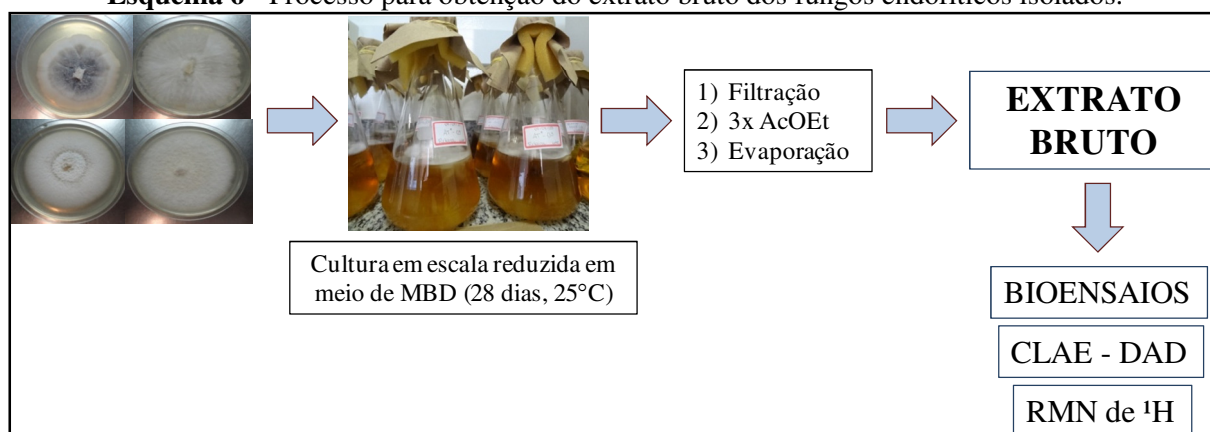
Linhagem fúngica	Identificação (Porcentagem de identidade)
AT-01	<i>Hypoxylon investiens</i> (98%)
AT-02	<i>Nodulisporium</i> sp. (99%)
AT-03	<i>Annulohypoxylon stygium</i> (99%)
AT-04	<i>Microascus</i> sp. (98%)
AT-05	<i>Nemania bipapillata</i> (99%)
AT-06	<i>Hypoxylon</i> sp. (86%)
AT-07	<i>Microascus</i> sp. (99%)
PS-01	<i>Sarocladium strictum</i> (99%)
PS-02	<i>Sarocladium strictum</i> (99%)
PS-03	<i>Coniothyrium</i> sp. (99%)

Fonte: o autor.

3.2.2.3 Obtenção dos extratos brutos das linhagens fúngicas em escala reduzida

Os fungos isolados e preservados foram repicados em placas de Petri contendo BDA. Após o crescimento desses fungos, aproximadamente, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido de batata-dextrose (MBD) contendo água do mar ou água ultra pura esterilizada (3 frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio líquido) por 28 dias a 25 °C, em modo estático.

Após o período de incubação, o caldo foi separado do micélio por filtração e o filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Após evaporação do solvente orgânico, foi obtido o extrato bruto de cada fungo (**Esquema 6**).

Esquema 6 - Processo para obtenção do extrato bruto dos fungos endofíticos isolados.

Fonte: o autor.

A **Tabela 10** mostra a massa obtida do extrato bruto de cada fungo endofítico preparado em escala reduzida.

Tabela 10 - Massa obtida do extrato bruto de cada fungo endofítico isolado das algas *A. taxiformis* e *P. spiralis*.

Fungo	Massa obtida do extrato (mg)
AT-01	96,7
AT-02*	85,5
AT-03	117,2
AT-04	50,3
AT-05	216,2
AT-06	62,7
AT-07*	50,8
PS-01*	61,8
PS-02	70,7
PS-03	34,5

* Fungos inoculados em meio líquido preparado com água ultra pura.

Fonte: o autor.

Os extratos foram então analisados por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H e foram submetidos a bioensaios para avaliação da atividade antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica.

3.2.2.4 Estudo químico do fungo *Nemania bipapillata* (AT-05)

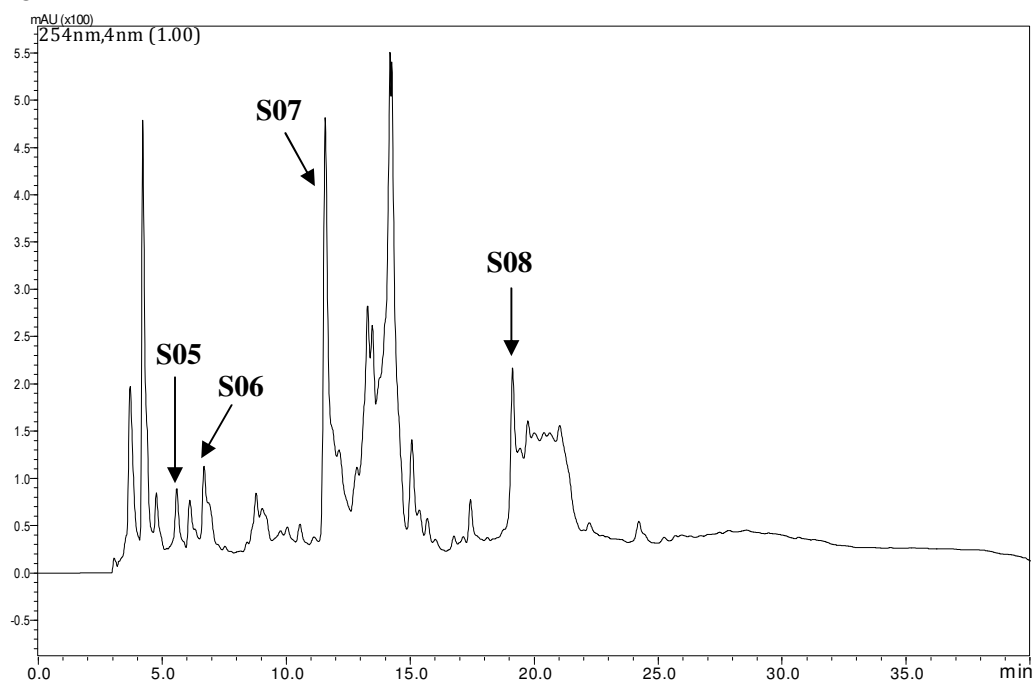
Parte do extrato bruto (escala reduzida) de **AT-05** (126,4 mg) foi submetido à separação em CLAE-DAD preparativo (coluna C-18 Phenomenex Luna - 150 x 21.20 mm; 5 µm; 100Å), com gradiente linear de 40 a 100% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 10 mL.min⁻¹. Foram coletadas 16 frações (**Tabela 11**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 7**).

Tabela 11 - Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de **AT-05**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
AT-05-F1	3,7	1,4	
AT-05-F2	4,2	6,2	
AT-05-F3	4,8	1,7	
AT-05-F4	5,6	3,5	S05
AT-05-F5	6,1 - 6,3	2,2	
AT-05-F6	6,7	3,6	S06
AT-05-F7	8,5 - 9,2	3,4	
AT-05-F8	9,5 - 11,2	30,6	
AT-05-F9	11,6	0,9	S07
AT-05-F10	11,7	0,5	
AT-05-F11	12,2	1,6	
AT-05-F12	12,5 - 17,0	43,5	
AT-05-F13	17,4	1,8	
AT-05-F14	19,1	1,5	S08
AT-05-F15	19,4 - 22,0	3,9	S08
AT-05-F16	24,2	1,0	

Fonte: o autor.

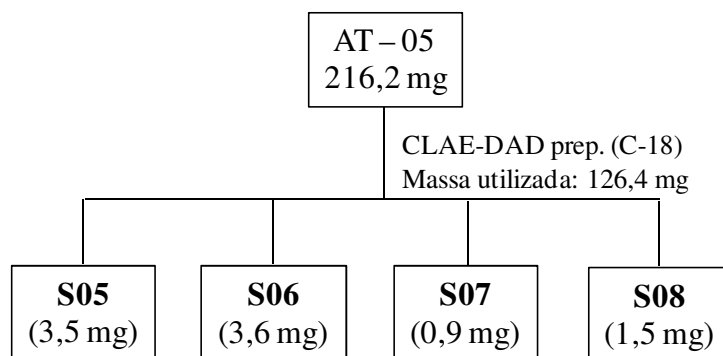
Figura 9 - Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 40 a 100% MeOH:H₂O v/v a 10 mL .min⁻¹; 40 minutos) de **AT-05** (254 nm).



Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H. As frações AT-05-F4, -F6 e -F9, forneceram as substâncias **S05**, **S06** e **S07**, respectivamente, e as frações AT-05-F14 e -F15 forneceram a substância **S08**. O **Esquema 7** mostra o estudo do extrato bruto de AT-05.

Esquema 7 - Estudo do extrato bruto do fungo endofítico **AT-05**.



Fonte: o autor.

3.2.2.5 Variações do meio de cultivo e/ou preservação de *Nemania bipapillata* (AT-05)

Após o estudo do extrato bruto da linhagem fúngica codificada como AT-05, foram realizadas variações do seu meio de cultivo.

Esta linhagem, que foi preservada em slants preparados com água do mar e slants preparados com água ultra pura, foi cultivada em placas de Petri preparadas com meio BDA e água do mar ou água ultra pura. Após seu crescimento, aproximadamente, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido MBD ou Czapeck preparados com água do mar ou água ultra pura esterilizada (3 frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio líquido) por 28 dias a 25 °C. Após esse período de incubação fez-se o processo descrito no **Esquema 6** para a obtenção dos extratos brutos descritos abaixo e na **Tabela 12**:

- BM-M - extrato bruto obtido da linhagem do fungo preservado em slant contendo água do mar esterilizada (M) e inoculado em meio MBD (B) preparado com água do mar esterilizada (M);
- BM-Mi - extrato bruto obtido da linhagem preservada em slant contendo água do mar esterilizada (M) e inoculado em meio MBD (B) preparado com água ultra pura (Mi);
- BMi-M - extrato bruto obtido da linhagem preservada em slant contendo água ultra pura (Mi) e inoculado em meio MBD (B) preparado com água do mar esterilizada (M);
- BMi-Mi - extrato bruto obtido da linhagem preservada em slant contendo água ultra pura (Mi) e inoculado em meio MBD (B) preparado com água ultra pura (Mi).
- CM-M - extrato bruto obtido da linhagem preservada em slant contendo água do mar esterilizada (M) e inoculado em meio Czapeck (C) preparado com água do mar esterilizada (M);
- CM-Mi - extrato bruto obtido da linhagem do fungo preservado em slant contendo água do mar esterilizada (M) e inoculado em meio Czapeck (C) preparado com água ultra pura (Mi).

Tabela 12 - Extratos brutos de AT-05 obtidos após variação do seu meio de cultivo.

Extrato bruto	Massa obtida (mg)
BM-M	238,3
BM-Mi	284,0
BMi-M	249,7
BMi-Mi	272,6
CM-M	10,2
CM-Mi	29,5

Fonte: o autor.

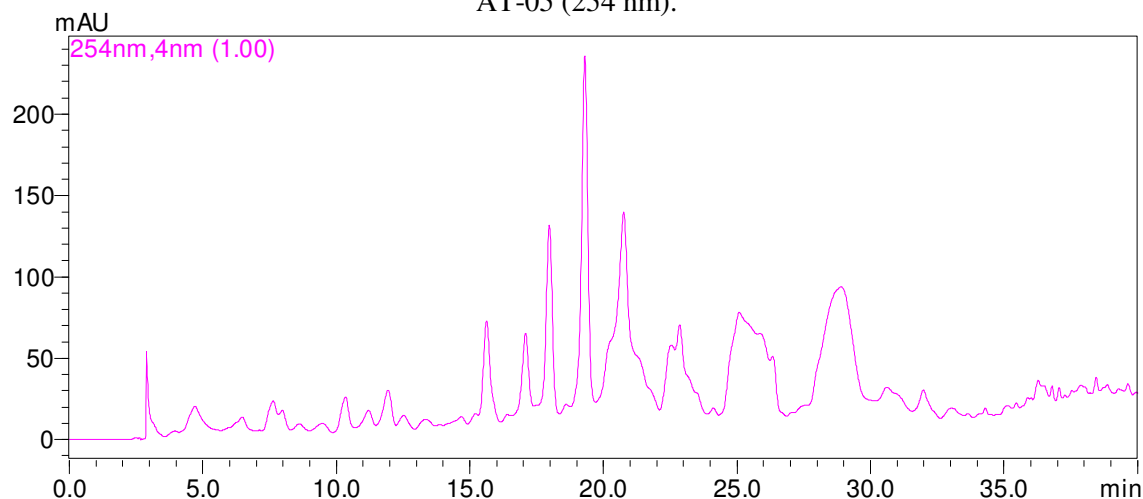
Estes novos extratos brutos também foram avaliados por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H e foram submetidos a bioensaios para avaliação da atividade antifúngica,

anticolinesterásica e citotóxica. Após a análise dos resultados obtidos, optou-se por realizar o estudo do extrato BM-Mi.

3.2.2.6 Estudo químico do extrato bruto BM-Mi de *Nemania bipapillata* (AT-05)

Após a análise do perfil obtido por CLAE-DAD do extrato bruto BM-Mi da linhagem fúngica AT-05 (**Figura 10**), parte do mesmo (172 mg) foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna de sílica derivatizada C-18 (36,9 g, $\Phi = 2,5$ cm), utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O. Foram obtidas 4 frações de 225 mL cada (**Tabela 13**).

Figura 10 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto **BM-Mi** de AT-05 (254 nm).



Fonte: o autor.

Tabela 13 - Fracionamento do extrato bruto **BM-Mi** de AT-05 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (mg)
BM-Mi-F1	1:1	97,1
BM-Mi-F2	60:40	31,0
BM-Mi-F3	75:25	17,2
BM-Mi-F4	100:0	24,7

Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ¹H e por CLAE-DAD. E a partir dos resultados obtidos, optou-se por estudar a fração BM-Mi-F2.

3.2.2.6.1 Estudo da fração BM-Mi-F2

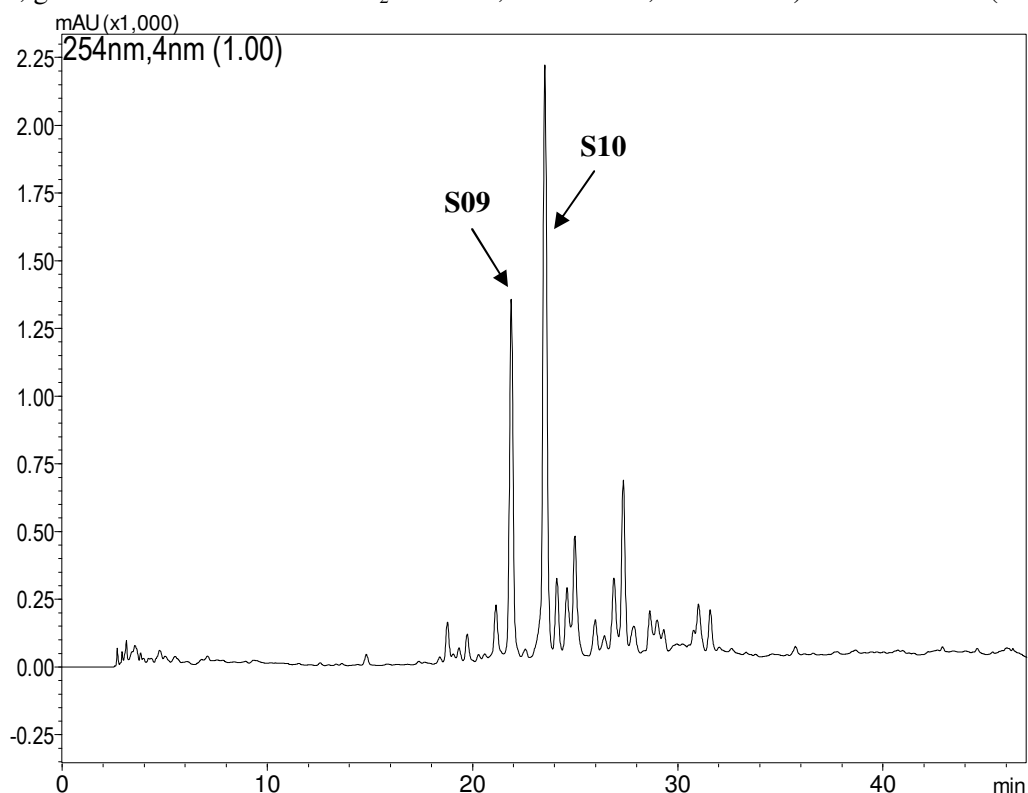
A fração BM-Mi-F2 (30 mg) foi submetida à CLAE-DAD em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), gradiente linear de 30 a 80% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 4,5 mL.min⁻¹. Foram coletadas 19 frações (**Tabela 14**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 11**) e os intervalos entre os mesmos.

Tabela 14 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de BM-Mi-F2.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
BM-Mi-F2-1	0 - 18,4	2,3	
BM-Mi-F2-2	18,7	0,6	
BM-Mi-F2-3	19,3	1,0	
BM-Mi-F2-4	19,7	1,1	
BM-Mi-F2-5	21,1	0,6	
BM-Mi-F2-6	21,8	1,4	S09
BM-Mi-F2-7	23,5	1,9	S10
BM-Mi-F2-8	24,1	0,7	
BM-Mi-F2-9	24,6	1,6	
BM-Mi-F2-10	25,0	1,7	
BM-Mi-F2-11	26,0	1,3	
BM-Mi-F2-12	26,4	3,6	
BM-Mi-F2-13	26,9	1,5	
BM-Mi-F2-14	27,3	1,2	
BM-Mi-F2-15	27,9	1,4	
BM-Mi-F2-16	28,2 - 29,6	2,1	
BM-Mi-F2-17	31,0	1,1	
BM-Mi-F2-18	31,6	0,8	
BM-Mi-F2-19	32,0 - 47,0	3,8	

Fonte: o autor.

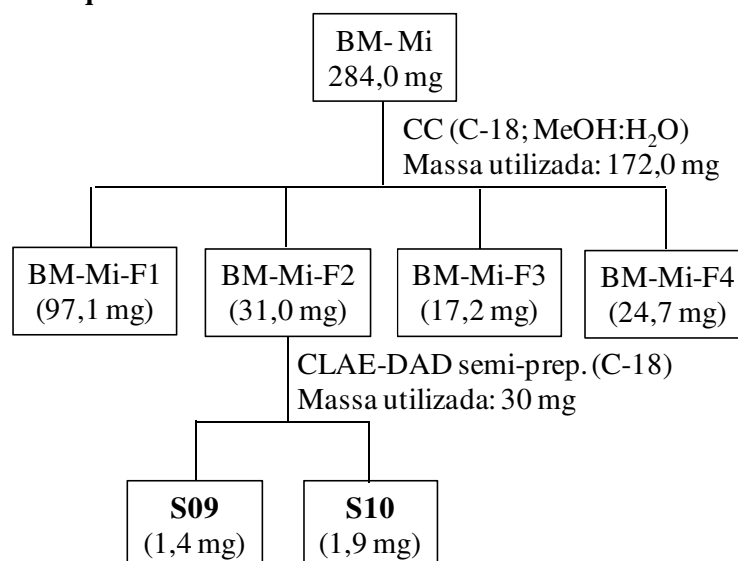
Figura 11 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 30 a 80% MeOH:H₂O v/v a 4,5 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **BM-Mi-F2** (254 nm).



Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que as frações BM-Mi-F2-6 e -7 forneceram as substâncias **S09** e **S10**, respectivamente. O **Esquema 8** representa o estudo do extrato bruto BM-Mi da linhagem fúngica AT-05.

Esquema 8 - Estudo do extrato bruto **BM-Mi** de AT-05.



Fonte: o autor.

3.2.2.7 *Obtenção dos extratos brutos de Annulohypoxylon stygium (AT-03), Hypoxylon sp. (AT-06) e Sarocladium strictum (PS-01) e do extrato bruto BM-Mi de Nemanium bipapillatum (AT-05) em escala ampliada*

Após a análise dos resultados obtidos por CLAE-DAD, RMN de ^1H e pelos ensaios biológicos, as linhagens fúngicas AT-03, AT-06 e PS-01 foram selecionadas para estudo, sendo cultivadas em escala ampliada.

A linhagem fúngica AT-05 também foi cultivada em escala ampliada usando água ultra pura para o preparo dos meios BDA e MDB a fim de se obter mais massa do extrato BM-Mi, para repetir o isolamento das substâncias **S09** e **S10** e de outras substâncias que no estudo anterior foram isoladas em pouca quantidade e/ou em mistura.

Após o crescimento dos fungos em placas contendo BDA, o micélio foi inoculado em meio líquido MBD, contendo água do mar (linhagens AT-03 e AT-06) ou água ultra pura (linhagens AT-05 e PS-01) esterilizada, por 28 dias a 25 °C. Foram utilizados 30 frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio líquido para AT-03, 45 frascos de Erlenmeyer para AT-06 e PS-01 e 15 frascos de Erlenmeyer para AT-05. Essas quantidades de frascos de Erlenmeyer foram calculadas a fim de se obter 1 g de extrato bruto de cada linhagem de fungo, de acordo com a quantidade de extrato bruto obtido em escala reduzida para as mesmas.

Após o período de incubação, o caldo foi separado do micélio por filtração e o filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Após evaporação do solvente orgânico, foram obtidos os extratos brutos (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Massa obtida dos extratos brutos de **AT-03**, **AT-06** e **PS-01** e do extrato bruto **BM-Mi** de **AT-05** preparados em escala ampliada.

Fungo	Massa obtida do extrato (g)
AT-03	0,731
AT-06	1,273
PS-01*	1,286
BM-Mi de AT-05*	1,737

* linhagem inoculada em meio líquido preparado com água ultra pura.

Fonte: o autor.

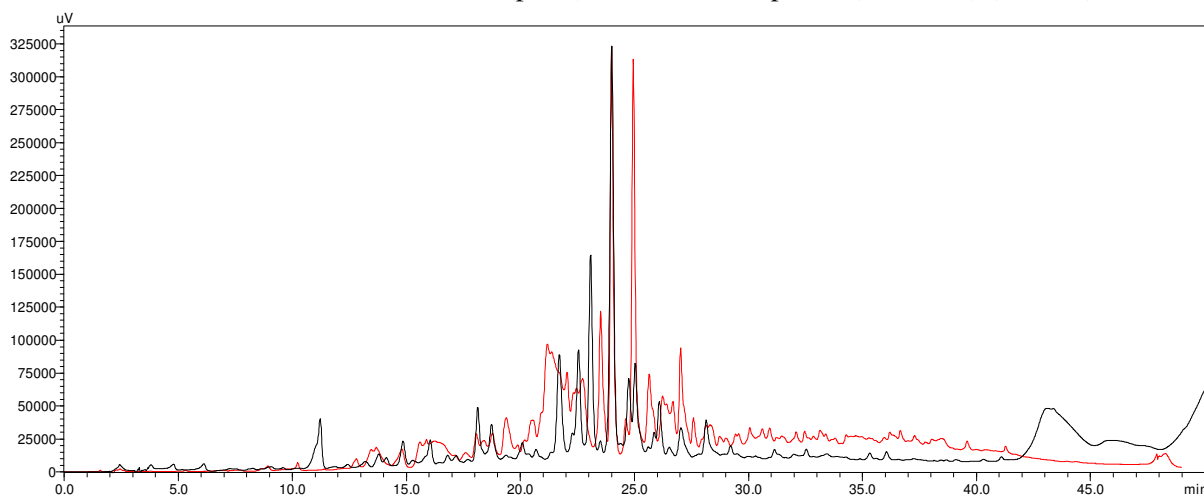
Para o fungo AT-03 foi obtida massa inferior a 1 g e, portanto, optou-se por preparar mais extrato bruto. Foram, novamente, preparados 30 frascos de Erlenmeyer contendo 300

mL de meio líquido. Nesta segunda etapa foi obtido 0,914 g de extrato, totalizando 1,645 g de extrato bruto de AT-03.

3.2.2.8 Re-estudo do extrato bruto BM-Mi de *Nemania bipapillata* (AT-05)

Após a análise por CLAE-DAD do extrato bruto BM-Mi do fungo AT-05 obtido em escala ampliada (**Figura 12**), foi possível notar que seu perfil era igual ao perfil obtido para o extrato BM-Mi em escala reduzida. Sendo assim, o mesmo foi submetido ao mesmo processo de fracionamento realizado anteriormente. Parte de BM-Mi (1,509 g) foi fracionado por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18 (150 g, $\Phi = 3,5$ cm), utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O. Foram obtidas 6 frações de 360 mL cada (**Tabela 16**).

Figura 12 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto **BM-Mi** de AT-05 obtido em escala reduzida (preto) e em escala ampliada (vermelho) (254 nm).



Fonte: o autor.

Tabela 16 - Fracionamento do extrato bruto **BM-Mi** do fungo AT-05 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18.

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (g)
BM-Mi-F1	1:1	1,054
BM-Mi-F2	60:40	0,240
BM-Mi-F3	75:25	0,193
BM-Mi-F4	100:0	0,005

Fonte: o autor.

Após a obtenção dos perfis por CLAE-DAD dessas frações e comparações com as frações obtidas anteriormente em escala reduzida repetiu-se o fracionamento da fração BM-Mi-F2.

3.2.2.8.1 Estudo da fração BM-Mi-F2

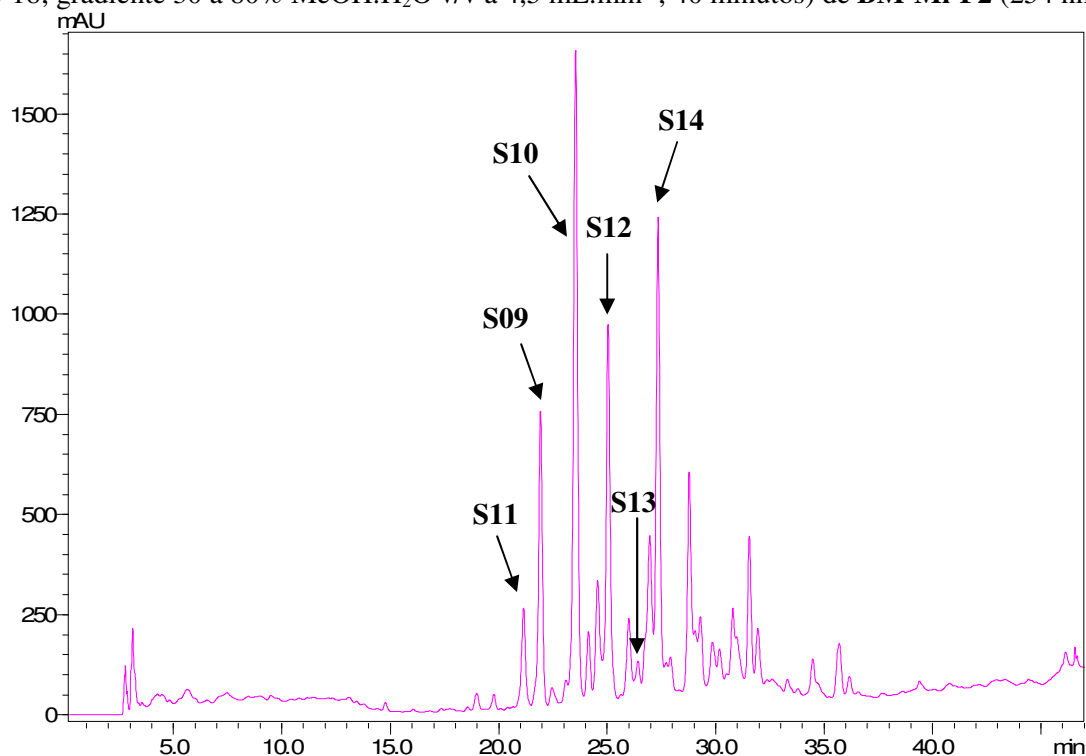
A fração BM-Mi-F2 (200 mg) foi submetida à CLAE-DAD em escala semi-preparativa, usando uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), gradiente linear de 30 a 80% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 4,5 mL.min⁻¹. Foram coletadas 9 frações (**Tabela 17**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 13**) e intervalos entre os mesmos.

Tabela 17 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativa de **BM-Mi-F2**.

Fração	t_R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
BM-Mi-F2-1	21,1	1,0	S11
BM-Mi-F2-2	21,9	1,4	S09
BM-Mi-F2-3	23,5	5,8	S10
BM-Mi-F2-4	25,0	3,0	S12
BM-Mi-F2-5	26,4	13,8	S13
BM-Mi-F2-6	27,3	3,6	S14
BM-Mi-F2-7	28,5	2,6	
BM-Mi-F2-8	35,8	1,1	
BM-Mi-F2-9	Meios e limpeza	166,8	

Fonte: o autor.

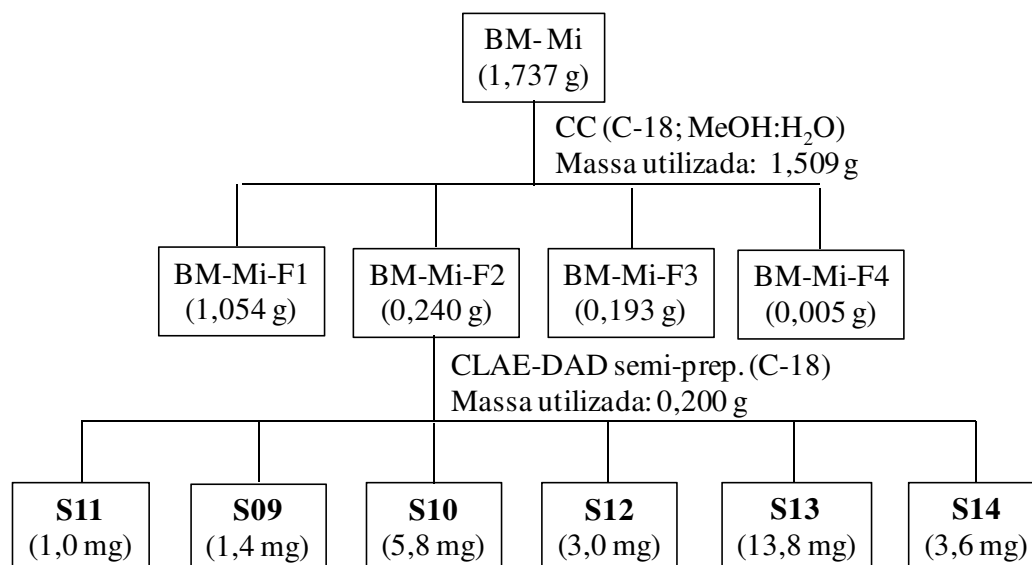
Figura 13 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 30 a 80% MeOH:H₂O v/v a 4,5 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **BM-Mi-F2** (254 nm).



Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que as frações BM-Mi-F2-1, -4, -5 e BM-Mi-F2-6 forneceram as substâncias **S11**, **S12**, **S13** e **S14**, respectivamente, enquanto as frações BM-Mi-F2-2 e -3 forneceram novamente as substâncias **S09** e **S10**. O **Esquema 9** representa o re-estudo do extrato bruto BM-Mi da linhagem fúngica AT-05.

Esquema 9 - Re-estudo do extrato bruto **BM-Mi** de AT-05.

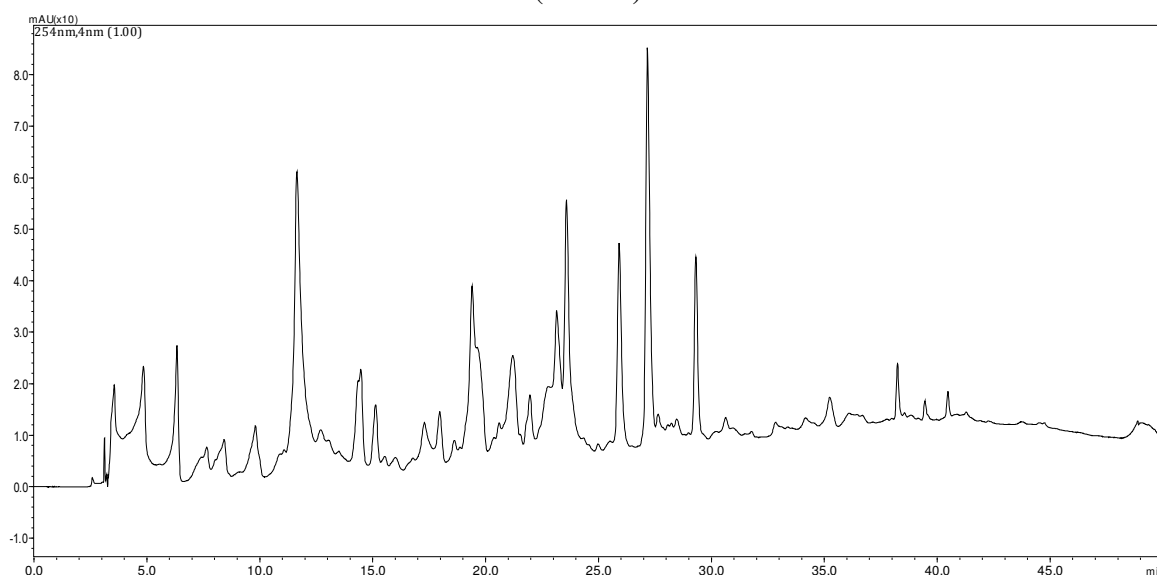


Fonte: o autor.

3.2.2.9 Estudo químico do fungo *Sarocladium strictum* (PS-01)

A partir do perfil obtido por CLAE-DAD do extrato bruto de PS-01 (**Figura 14**), optou-se por submeter parte do extrato (1,00 g) a um fracionamento em coluna de C-18 (100,0 g, $\Phi = 3,5$ cm), utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O. Foram obtidas 6 frações de 225 mL cada (**Tabela 18**).

Figura 14 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de **PS-01** (254 nm).



Fonte: o autor.

Tabela 18 - Fracionamento do extrato bruto de **PS-01** por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18.

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (mg)
PS-01-F1	31:69	381,2
PS-01-F2	43:57	156,6
PS-01-F3	53:47	57,6
PS-01-F4	64:36	20,2
PS-01-F5	76:24	7,8
PS-01-F6	100:0	59,0

Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ¹H e por CLAE-DAD. A partir dos resultados obtidos, optou-se por estudar as frações PS-01-F1, PS-01-F2 e PS-01-F6.

3.2.2.9.1 Estudo da fração PS-01-F1

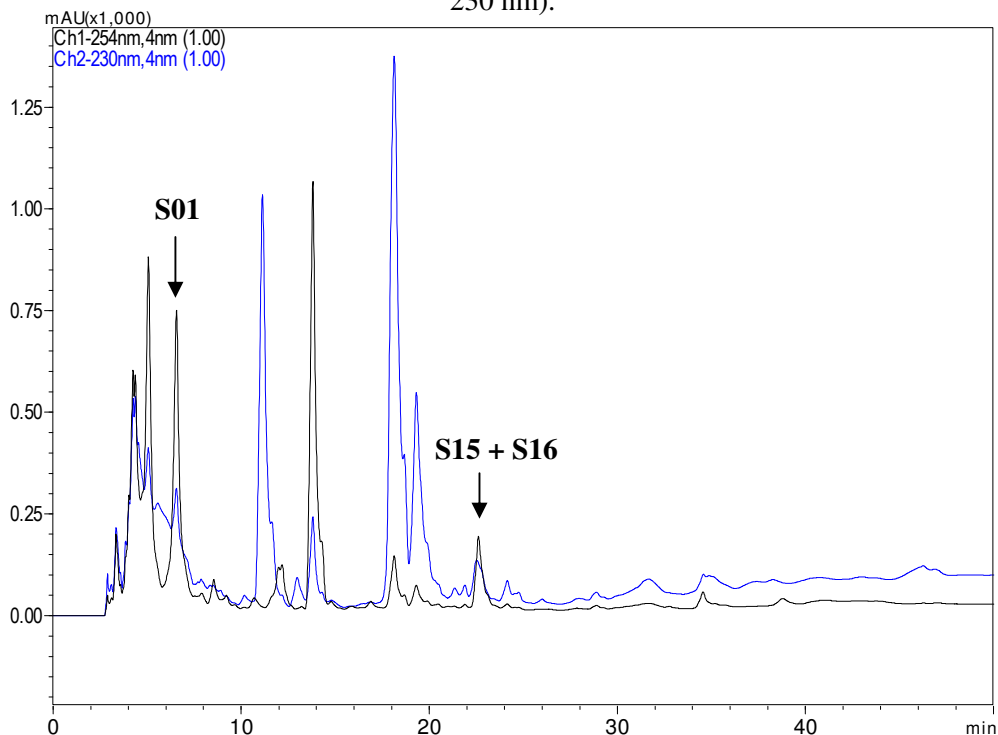
Parte da fração PS-01-F1 (148,1 mg) foi submetida à CLAE-DAD em escala preparativa, utilizando uma coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21.20 mm; 5 μ m; 100Å), gradiente linear de 10 a 75% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 10 mL.min⁻¹. Foram coletadas 13 frações (**Tabela 19**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 15**).

Tabela 19 - Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de **PS-01-F1**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
PS-01-F1-1	0 - 4,8	58,2	
PS-01-F1-2	5,1	7,2	
PS-01-F1-3	6,6	6,6	S01
PS-01-F1-4	7,0 - 10,7	9,1	
PS-01-F1-5	11,1	7,4	
PS-01-F1-6	11,5 - 13,5	3,0	
PS-01-F1-7	13,8	5,3	
PS-01-F1-8	14,0 - 17,0	2,9	
PS-01-F1-9	17,5 - 21,0	21,9	
PS-01-F1-10	21,3	2,0	
PS-01-F1-11	21,9	3,6	
PS-01-F1-12	22,7	2,4	S15 + S16
PS-01-F1-13	23,0 - 47,0	15,1	

Fonte: o autor.

Figura 15 - Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 10 a 75% MeOH:H₂O v/v a 10 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **PS-01-F1** (preto - 254 nm; azul - 230 nm).



Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que a fração PS-01-F1-3 forneceu novamente a substância **S01**, enquanto a fração PS-01-F1-12 forneceu uma mistura de compostos, entre os quais foi possível identificar as substâncias **S15** e **S16**.

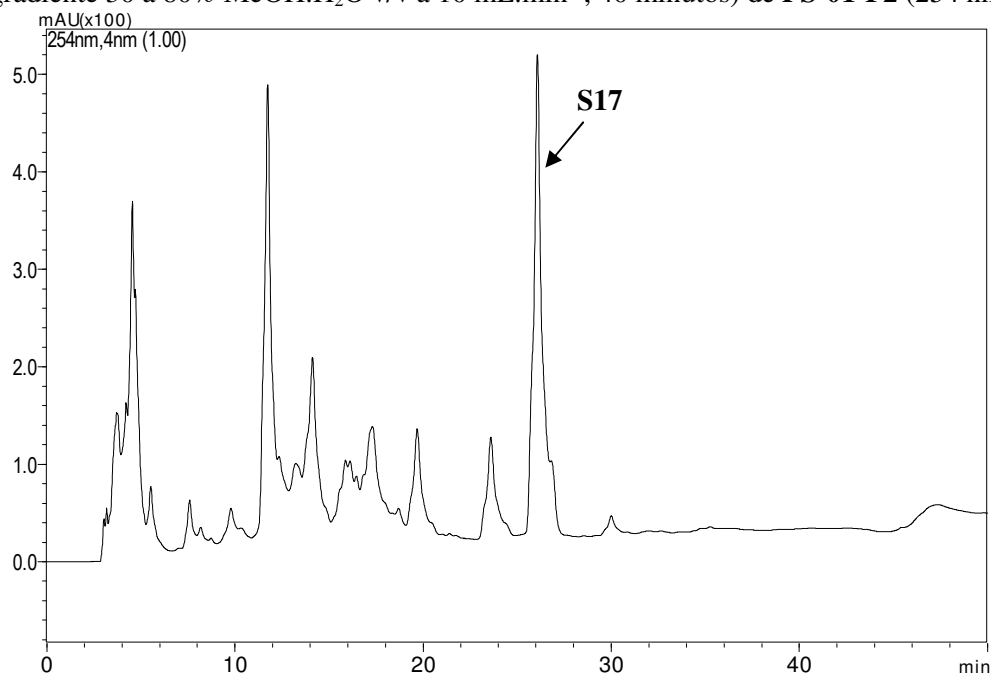
3.2.2.9.2 Estudo da fração PS-01-F2

Parte da fração PS-01-F2 (130 mg) foi submetida à CLAE-DAD preparativo, usando uma coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21.20 mm; 5 μm; 100Å), gradiente linear de 30 a 80% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 10 mL.min⁻¹. Foram coletadas 10 frações (**Tabela 20**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 16**).

Tabela 20 - Frações obtidas por CLAE-DAD preparativo de **PS-01-F2**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
PS-01-F2-1	0 - 7,0	20,2	
PS-01-F2-2	7,0 - 19,0	67,3	
PS-01-F2-3	19,7	3,3	
PS-01-F2-4	20,0 - 23,2	1,4	
PS-01-F2-5	23,5	1,8	
PS-01-F2-6	24,0 - 25,0	0,4	
PS-01-F2-7	26,0	1,9	S17
PS-01-F2-8	26,5 - 29,5	1,2	
PS-01-F2-9	29,9	1,8	
PS-01-F2-10	30,5 - 47,0	6,4	

Fonte: o autor.

Figura 16 - Cromatograma em escala preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 30 a 80% MeOH:H₂O v/v a 10 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **PS-01-F2** (254 nm).

Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que a fração PS-01-F2-7 forneceu a substância **S17**.

3.2.2.9.3 Estudo da fração PS-01-F6

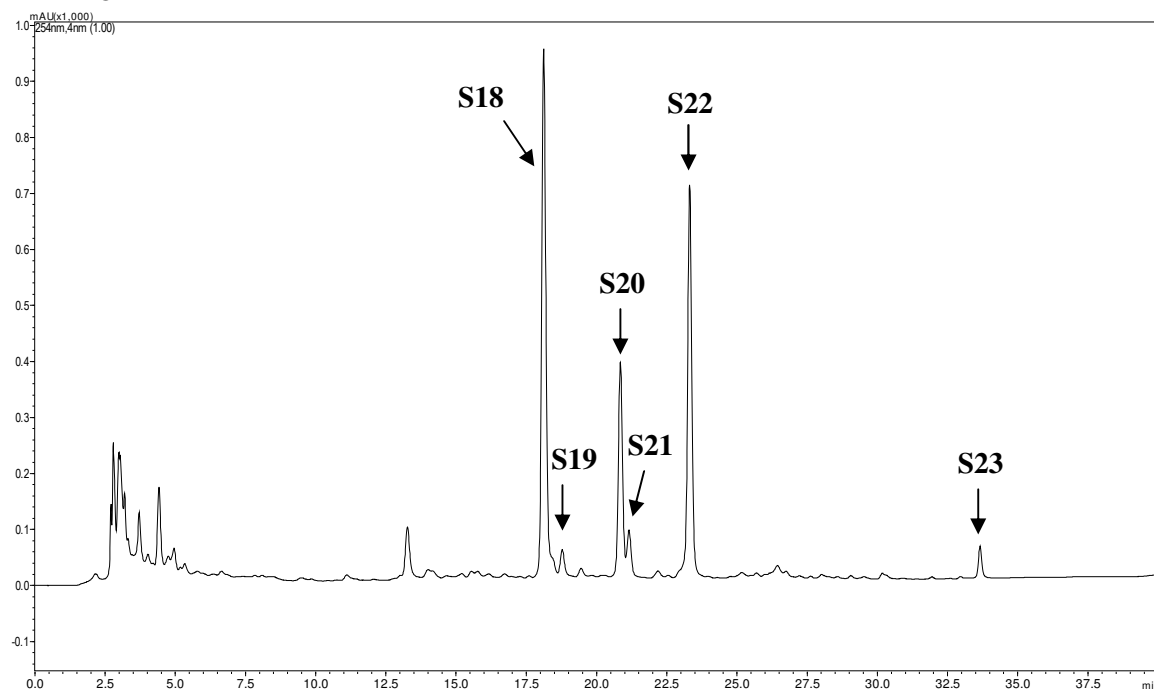
Parte da fração PS-01-F6 (34,8 mg) foi submetida à CLAE-DAD em escala semi-preparativa, utilizando uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), gradiente linear de 70 a 100% MeOH:H₂O por 40 minutos e vazão de 4,5 mL.min⁻¹. Foram coletadas 10 frações (**Tabela 21**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 17**) e os intervalos entre os mesmos.

Tabela 21 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de **PS-01-F6**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
PS-01-F6-1	0 - 13,0	9,5	
PS-01-F6-2	13,2	0,7	
PS-01-F6-3	13,6 - 18,0	3,4	
PS-01-F6-4	18,1	2,5	S18
PS-01-F6-5	18,8	0,9	S19
PS-01-F6-6	20,8	1,4	S20
PS-01-F6-7	21,1	0,9	S21
PS-01-F6-8	23,3	2,4	S22
PS-01-F6-9	23,8 - 33,2	5,4	
PS-01-F6-10	33,6	1,2	S23
PS-01-F6-11	34,0 - 40,0	5,1	

Fonte: o autor.

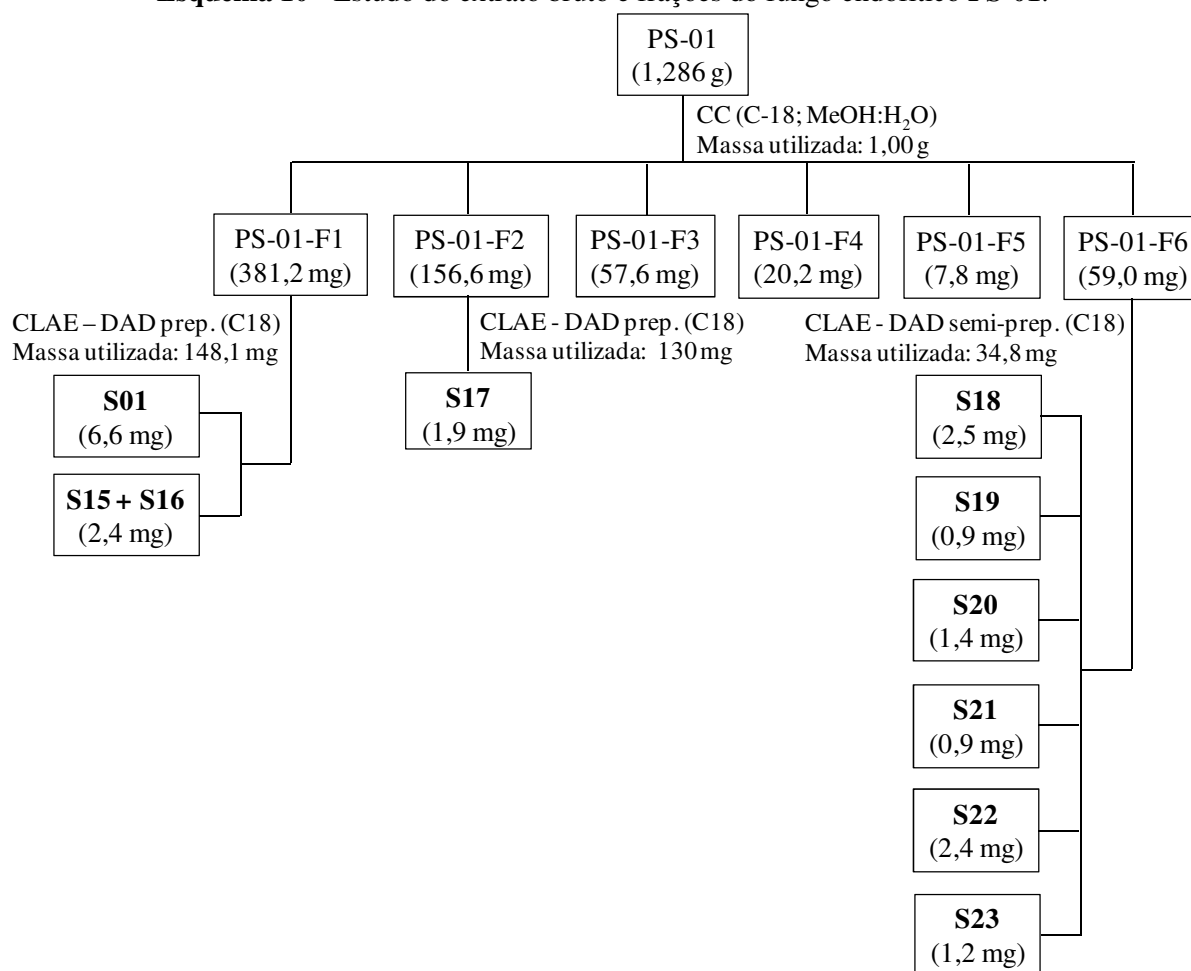
Figura 17 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; gradiente 70 a 100% MeOH:H₂O v/v a 4,5 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **PS-01-F6** (254 nm).



Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H. As frações PS-01-F6-4, -5, -6, -7, -8 e -10 forneceram as substâncias **S18**, **S19**, **S20**, **S21**, **S22** e **S23**, respectivamente.

O **Esquema 10** evidencia o estudo realizado com o extrato bruto de PS-01 e suas frações.

Esquema 10 - Estudo do extrato bruto e frações do fungo endofítico **PS-01**.

Fonte: o autor.

3.2.3 Métodos desenvolvidos durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry

3.2.3.1 Estudo químico do fungo *Annulohypoxylon stygium* (AT-03)

Parte do extrato bruto de AT-03 (370 mg) foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 ($h = 1,30$ m, $\Phi = 3,8$ cm), utilizando como eluente uma solução de MeOH:CH₂Cl₂ 8:2 v/v. Foram obtidas 114 subfrações de, aproximadamente, 10 mL cada, e estas foram agrupadas de acordo com suas semelhanças cromatográficas em 11 frações (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do extrato bruto de **AT-03**.

Fração	Subfrações Agrupadas	Massa (mg)
AT-03-F1	1 - 25	59,6
AT-03-F2	26 - 32	35,2
AT-03-F3	33 - 37	60,4
AT-03-F4	38 - 43	95,2
AT-03-F5	44 - 47	33,3
AT-03-F6	48 - 49	8,7
AT-03-F7	50 - 57	22,3
AT-03-F8	58 - 67	15,2
AT-03-F9	68 - 81	8,6
AT-03-F10	82 - 95	5,9
AT-03-F11	96 - 114	11,4

Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ^1H e foram avaliadas frente à atividade antimicrobiana. A partir dos resultados obtidos, optou-se por estudar as frações AT-03-F8 e AT-03-F5.

3.2.3.1.1 Estudo da fração AT-03-F8

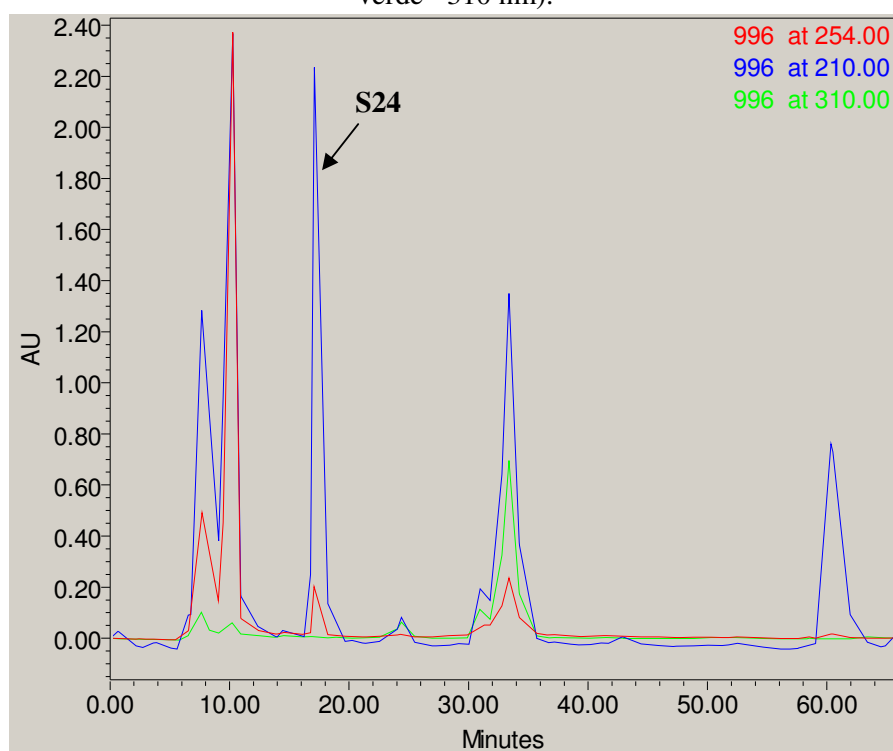
A fração AT-03-F8 (12 mg) foi submetida a um fracionamento em CLAE-DAD semi-preparativo, no aparelho Waters com detector de arranjos de diodos (operando entre 200 a 400 nm). Foi utilizada uma coluna C-18 InertSustain (250 x 10 mm; 5 μm), modo isocrático (acetonitrila:H₂O 12:88 v/v) por 65 minutos e vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Foram coletadas 5 frações (**Tabela 23**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 18**), intervalos entre os mesmos e a limpeza da coluna.

Tabela 23 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de **AT-03-F8**.

Fração	t_R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
AT-03-F8-1	0 - 17,0 + entre picos	2,2	S24
AT-03-F8-2	17,3	0,9	
AT-03-F8-3	33,4	1,3	
AT-03-F8-4	60,3	0,8	
AT-03-F8-5	limpeza	2,4	

Fonte: o autor.

Figura 18 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna InertSustain C-18; ACN:H₂O 12:88 v/v a 2,0 mL.min⁻¹; 65 minutos) de **AT-03-F8** (vermelho - 254 nm; azul - 210 nm e verde - 310 nm).



Fonte: o autor.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que a fração AT-03-F8-2 forneceu a substância **S24**.

3.2.3.1.2 Estudo da fração AT-03-F5

A fração AT-03-F5 (8,0 mg) foi submetida a um fracionamento em CLAE-DAD semi-preparativo, no equipamento Waters com detector de duplo comprimento de onda. Foi utilizada uma coluna C-18 CSC - Inertsil (250 x 9,4 mm; 5 µm; 150Å/ODS2), gradiente linear

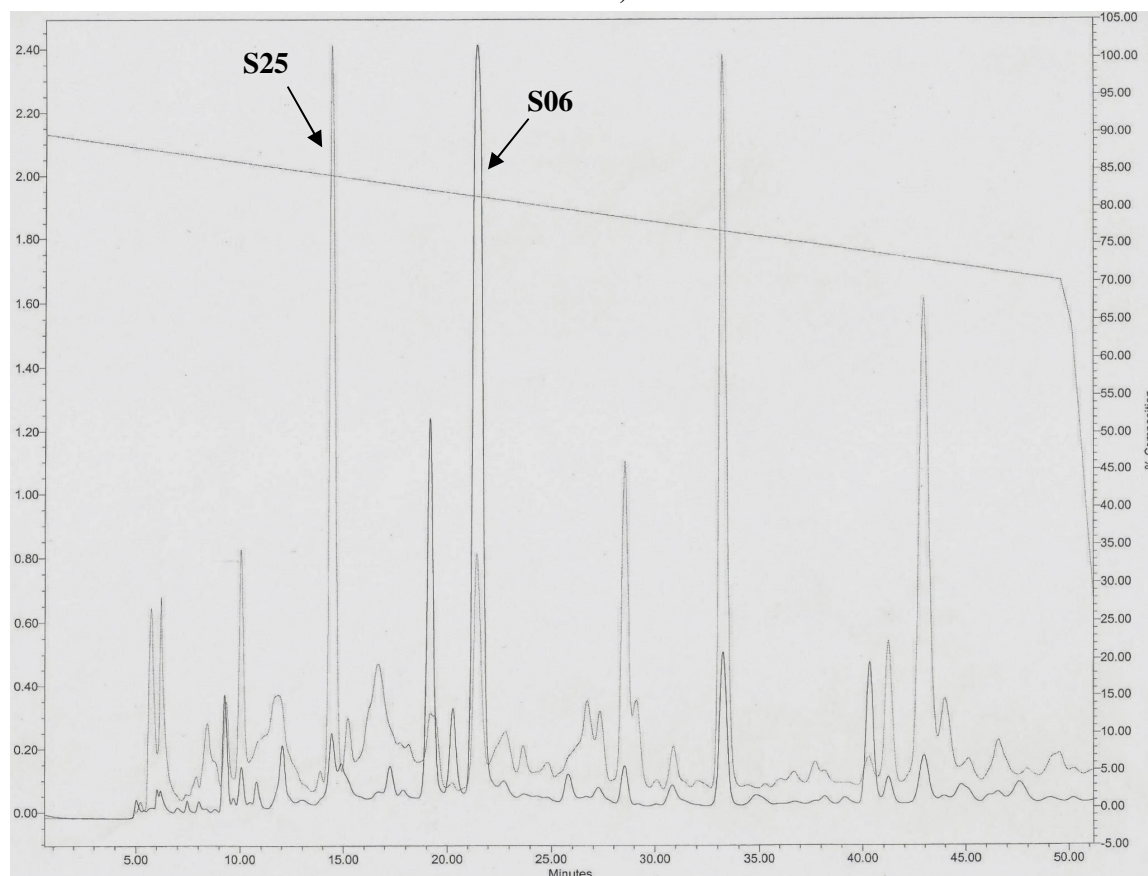
de 10 a 30% ACN:H₂O por 50 minutos e vazão de 2 mL.min⁻¹. Foram coletadas 7 frações (**Tabela 24**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 19**), intervalos entre os mesmos e a limpeza da coluna.

Tabela 24 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de **AT-03-F5**.

Fração	t _R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
AT-03-F5-1	0 - 14,0	1,0	
AT-03-F5-2	14,4	0,9	S25
AT-03-F5-3	15,0 - 21,0	0,9	
AT-03-F5-4	21,4	1,2	S06
AT-03-F5-5	22,0 - 32,0	0,8	
AT-03-F5-6	32,5	0,9	
AT-03-F5-7	33,0 - 62,0	1,1	

Fonte: o autor.

Figura 19 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna C-18 CSC - Inertsil; gradiente 10 a 30% ACN:H₂O v/v a 2 mL.min⁻¹; 50 minutos) de **AT-03-F5** (preto - 254 nm e cinza - 210 nm).

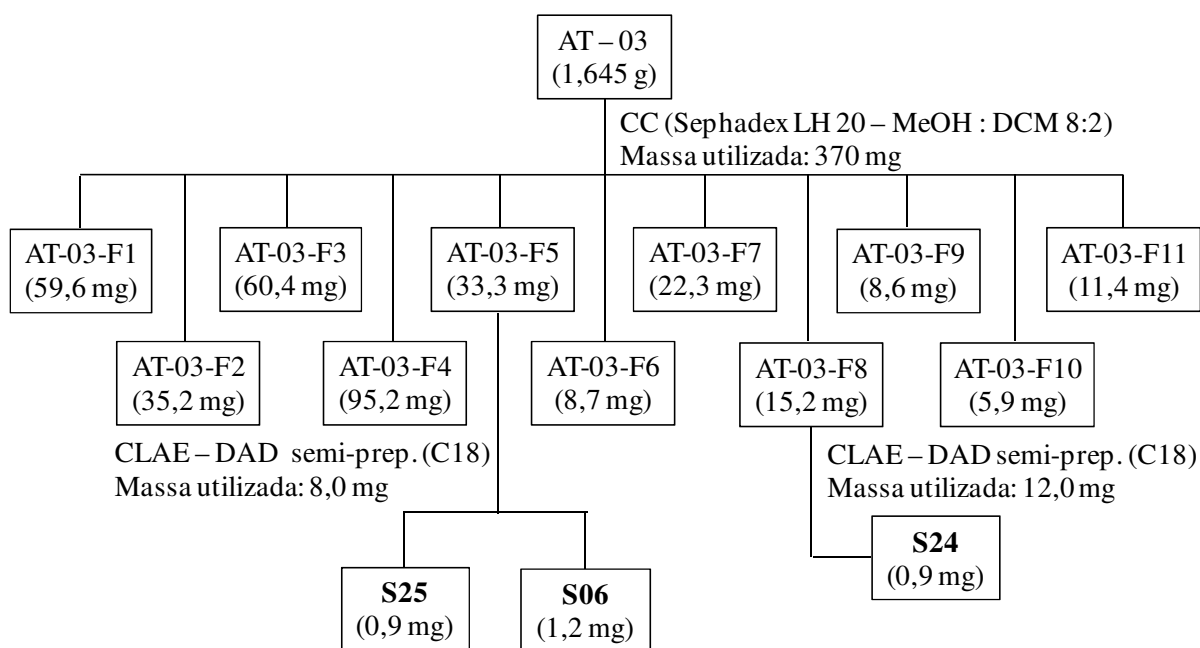


Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ^1H , sendo que a fração AT-03-F5-2 forneceu a substância **S25**, enquanto a fração AT-03-F5-4 forneceu novamente a substância **S06**.

O **Esquema 11** representa o estudo realizado com o extrato bruto do fungo AT-03.

Esquema 11 - Estudo do extrato bruto e frações do fungo endofítico **AT-03**.



Fonte: o autor.

3.2.3.2 Estudo químico do fungo *Hypoxylon* sp. (AT-06)

Parte do extrato bruto de AT-06 (470 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica com Sephadex LH-20 ($h = 1,30$ m, $\Phi = 3,8$ cm), utilizando como eluente uma solução de $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 8:2 v/v. Foram obtidas 110 subfrações de, aproximadamente, 10 mL cada, e estas foram agrupadas de acordo com suas semelhanças cromatográficas em 11 frações (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do extrato bruto de **AT-06**.

Fração	Subfrações Agrupadas	Massa (mg)
AT-06-F1	1 - 25	15,6
AT-06-F2	26 - 28	9,1
AT-06-F3	29 - 34	70,4
AT-06-F4	35 - 36	44,3
AT-06-F5	37 - 43	162,2
AT-06-F6	44 - 48	71,5
AT-06-F7	49 - 51	15,3
AT-06-F8	52 - 57	22,3
AT-06-F9	58 - 67	33,0
AT-06-F10	68 - 80	7,1
AT-06-F11	81 - 110	9,8

Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ^1H e foram avaliadas frente à atividade antimicrobiana. A partir dos resultados obtidos, as frações AT-06-F8 e AT-06-F9 foram selecionadas para estudo.

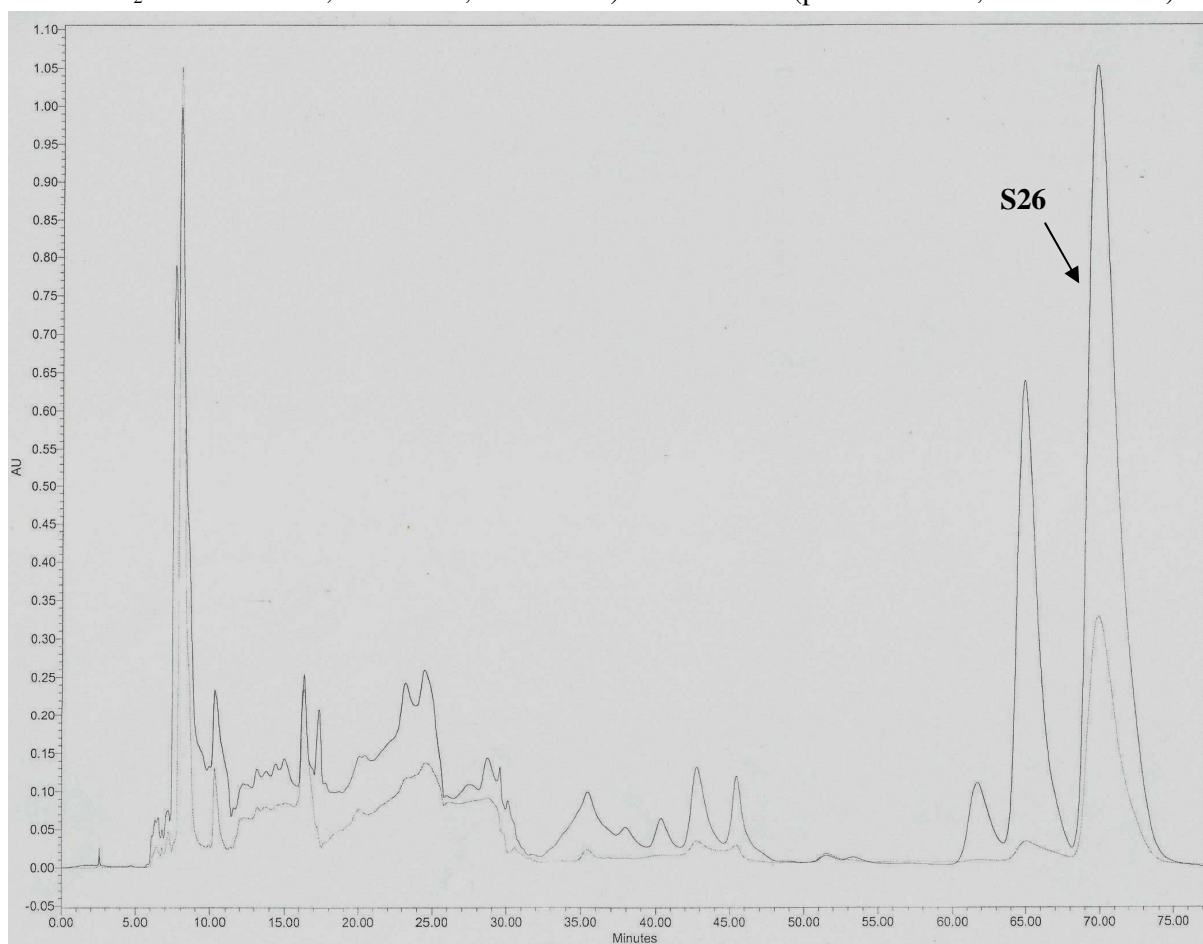
3.2.3.2.1 Estudo da fração AT-06-F8

A fração AT-06-F8 (19 mg) foi submetida a uma separação por CLAE-DAD semi-preparativo, no equipamento Waters com detector de duplo comprimento de onda. Foi utilizada uma coluna C-18 InertSustain (250 x 10 mm; 5 μm), modo isocrático (acetonitrila:H₂O 12:88 v/v) por 75 minutos e vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Foram coletadas 5 frações (**Tabela 26**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 20**), intervalos entre os mesmos e a limpeza da coluna.

Tabela 26 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de **AT-06-F8**.

Fração	t_R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
AT-06-F8-1	0 - 61,0	6,5	
AT-06-F8-2	61,8	0,8	
AT-06-F8-3	65,1	1,9	
AT-06-F8-4	70,0	4,5	S26
AT-06-F8-5	limpeza	4,0	

Fonte: o autor.

Figura 20 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna InertSustain C-18; ACN:H₂O 12:88 v/v a 2,0 mL.min⁻¹; 75 minutos) de **AT-06-F8** (preto - 210 nm; cinza - 254 nm).

Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que a fração AT-06-F8-4 forneceu a substância **S26**.

3.2.3.2.2 Estudo da fração AT-06-F9

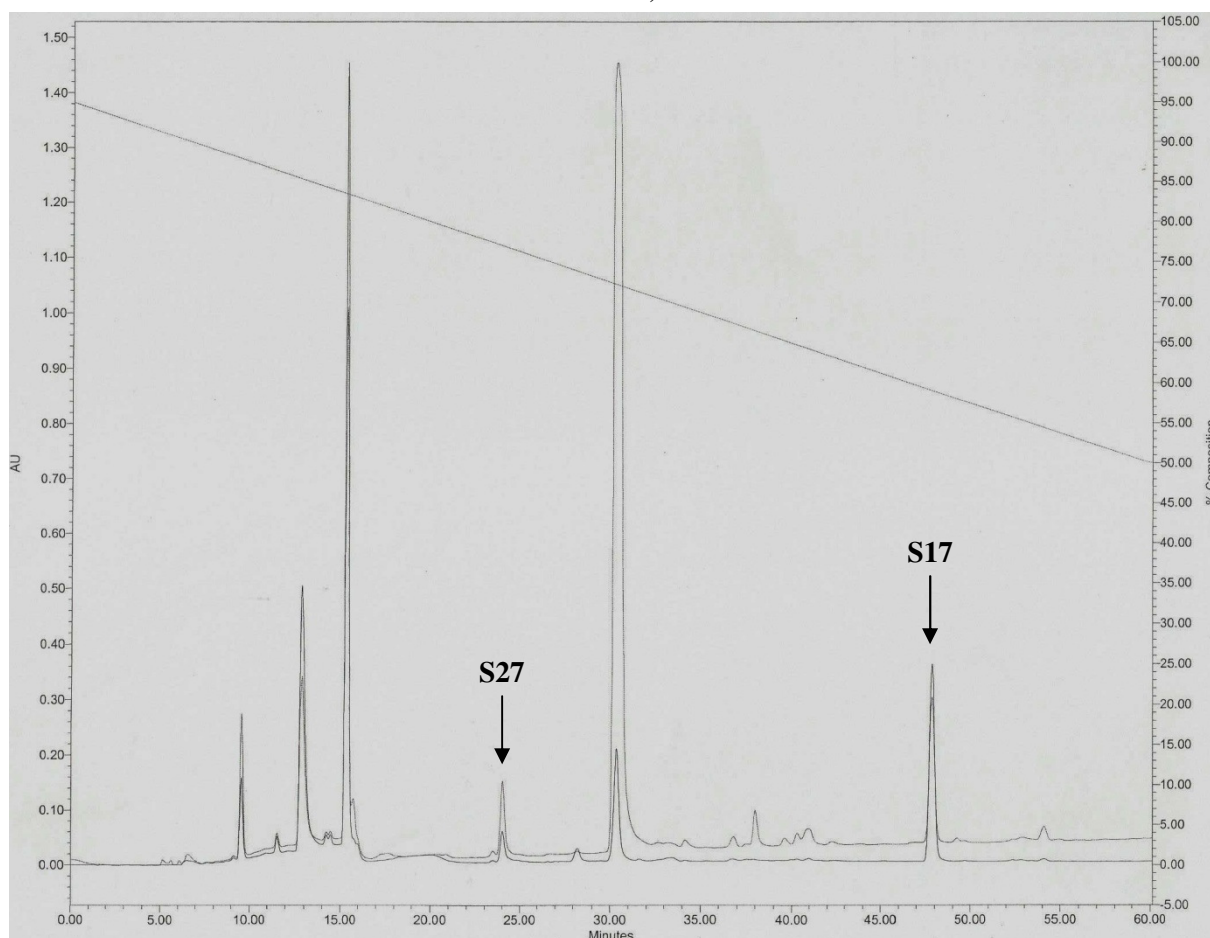
A fração AT-06-F9 (28 mg) foi submetida à CLAE-DAD semi-preparativo, no equipamento Waters com detector de duplo comprimento de onda. Foi utilizada uma coluna C-18 CSC - Inertsil (250 x 9,4 mm; 5 μm ; 150Å/ODS2), gradiente linear de 5 a 50% ACN:H₂O por 60 minutos e vazão de 2 mL.min⁻¹. Foram coletadas 6 frações (**Tabela 27**) de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 21**), intervalos entre os mesmos e a limpeza da coluna.

Tabela 27 - Frações obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo de **AT-06-F9**.

Fração	t_R (min.)	Massa (mg)	Substância isolada
AT-06-F9-1	0 - 9,0	4,0	
AT-06-F9-2	9,5	1,0	
AT-06-F9-3	23,7	1,4	S27
AT-06-F9-4	29,9	8,3	
AT-06-F9-5	47,5	1,2	S17
AT-06-F9-6	meios e limpeza	6,8	

Fonte: o autor.

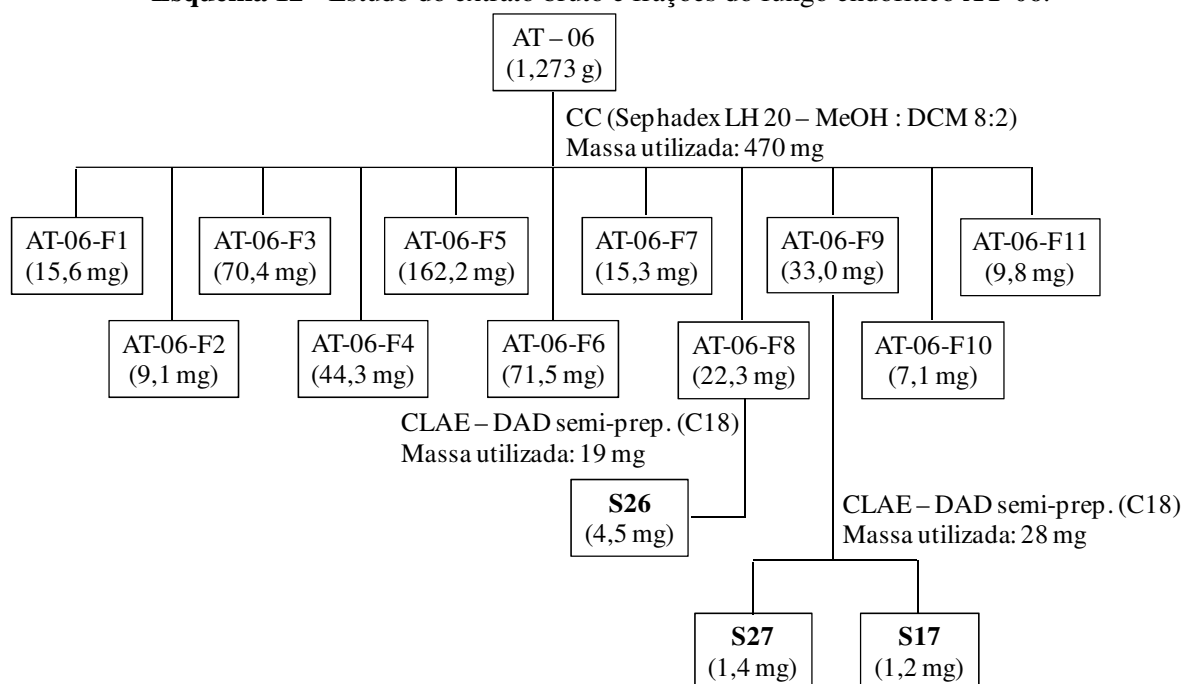
Figura 21 - Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD (coluna C-18 CSC - Inertsil; gradiente 5 a 50% ACN:H₂O v/v a 2,0 mL.min⁻¹; 60 minutos) de **AT-06-F9** (preto - 254 nm; cinza - 210 nm).



Fonte: o autor.

As frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que a fração AT-06-F9-3 forneceu a substância **S27**, enquanto a fração AT-06-F9-5 forneceu novamente a substância **S17**.

O **Esquema 12** representa o estudo realizado com o extrato bruto e frações do fungo endofítico AT-06.

Esquema 12 - Estudo do extrato bruto e frações do fungo endofítico **AT-06**.

Fonte: o autor.

3.2.4 Atividades Biológicas

3.2.4.1 Avaliação da atividade antifúngica

Estes ensaios foram realizados sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young do Instituto de Botânica, SP.

Os extratos brutos ($40\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) e as frações ($20\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) foram eluídos em CCDC, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ em diferentes proporções:

- AT-EB, AT-FH, PS-EB e PS-FH - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 90:10;
- AT-FAc e PS-FAc - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 85:15;
- AT-FBu, AT-FHm, PS-FBu e PS-FHm - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 80:20;
- extratos brutos dos fungos endofíticos em escala reduzida - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 88:12;
- extratos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05 - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 90:10;
- extratos dos fungos AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 90:10

As cromatoplasmas foram nebulizadas com solução de esporos do fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (concentração de 5×10^7 esporos mL^{-1} , em solução de glicose e sais) (HOMANS; FUCHS, 1970; RAHALISON et al.,

1994). As placas foram incubadas a 25° C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (1 µg).

3.2.4.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos (20µg.µL⁻¹) e das frações (10µg.µL⁻¹) em placas de sílica gel, utilizando as mesmas fases móveis descritas acima. Nestas cromatoplasmas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, e estas foram incubadas em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos. Após este período foi borrifada uma solução C (com 10 mL da solução A e 40 mL da solução B. Solução A: 250mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada). Como padrão positivo foi utilizado o composto fisostigmina (0,05 µg mL⁻¹) (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002). Este ensaio também foi realizado sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young do Instituto de Botânica, SP.

3.2.4.3 Avaliação do potencial citotóxico

O estudo citotóxico foi realizado pelo método do MTT (MOSMANN, 1983), que também é utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI). As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), foram cedidas pelo NCI e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Os extratos foram testados na concentração única de 50µg.mL⁻¹.

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél.mL⁻¹ para as linhagens OVCAR-8 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél.mL⁻¹ para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595

nm. Os experimentos foram analisados segundo a média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

3.2.4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana (realizada durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry)

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo ensaio de difusão em disco de papel (ANTONIO; MOLINSKI, 1993; DALISAY; SALUDES; MOLINSKI, 2011), sendo que os extratos brutos e frações de AT-03 e AT-06 foram testados frente aos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (UBC 8161); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA (ATCC 33591); *Bacillus subtilis* (H344) e *Candida albicans* (ATCC 90028).

5 mL de meio líquido Muller Hinton (MHB - Muller Hinton Broth) foi colocado em um tubo Falcon de 15 mL juntamente com um repique da placa de ágar Muller Hinton (MHA - Muller Hinton Agar) de cada patógeno. Estes foram incubados a 37°C (ou 30°C para *B. subtilis*) por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, a suspensão celular de cada patógeno foi diluída (usando MHB) para uma concentração final de 1×10^5 células/mL e $2,8 \times 10^5$ células/mL para *C. albicans*. Para verificar a concentração final foi feita a medida de densidade óptica (DO) a 600 nm de cada suspensão, sendo que um valor de DO de 0,0001 equivale a 1×10^5 células/mL. Em seguida, 5 a 7 mL da suspensão celular de cada patógeno foram distribuídos na superfície de placa de MHA seca, sendo que ao final o excesso de suspensão foi retirado.

As amostras foram diluídas com metanol a uma concentração de 2 mg/mL. 20 uL de cada amostra foram colocados em um disco estéril (e poço da placa de 96 poços), tendo ao final uma concentração de 40 µg/disco. Após a completa secagem das amostras nos discos, 20 uL de DMSO foi colocado em cada disco contendo as amostras, bem como em um disco limpo, como controle negativo. Como controle positivo foram utilizados os antibióticos polimixina B (30 ug/disco) para *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, rifamicina (10 ug/disco) para MRSA e o antifúngico anfotericina B (20 ug/disco) para *C. albicans*.

Os discos contendo amostras, DMSO, antibióticos e antifúngico foram colocados na superfície da placa de cada patógeno, em seguida, as mesmas foram lacradas e incubadas a 37°C (ou 30°C para *B. subtilis*) durante 18 a 24 horas. Após o período de incubação das placas, foi feita a medida do diâmetro (em mm) das zonas de inibição ao redor das amostras e/ou controles positivos e negativos.

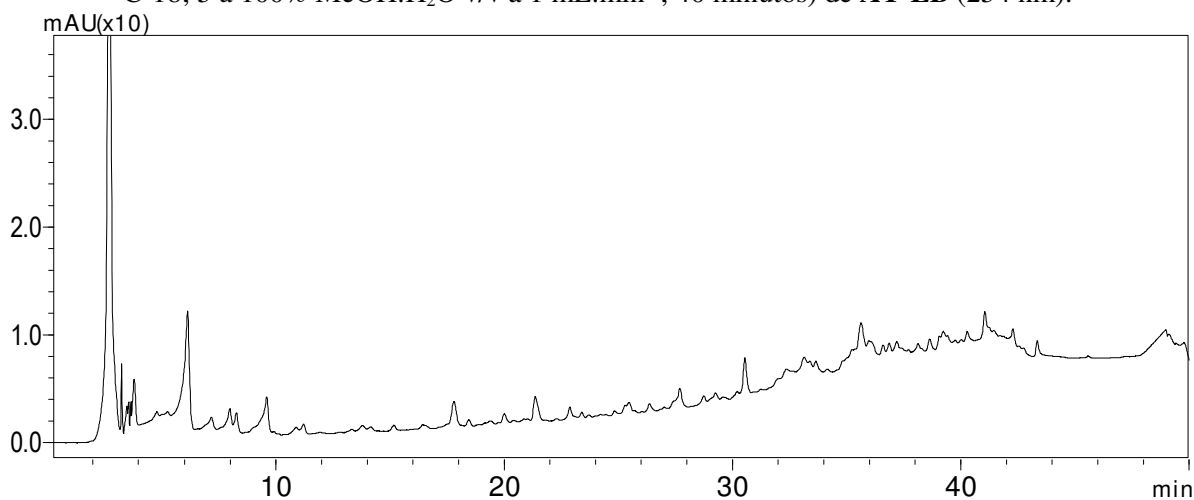
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DAS ALGAS

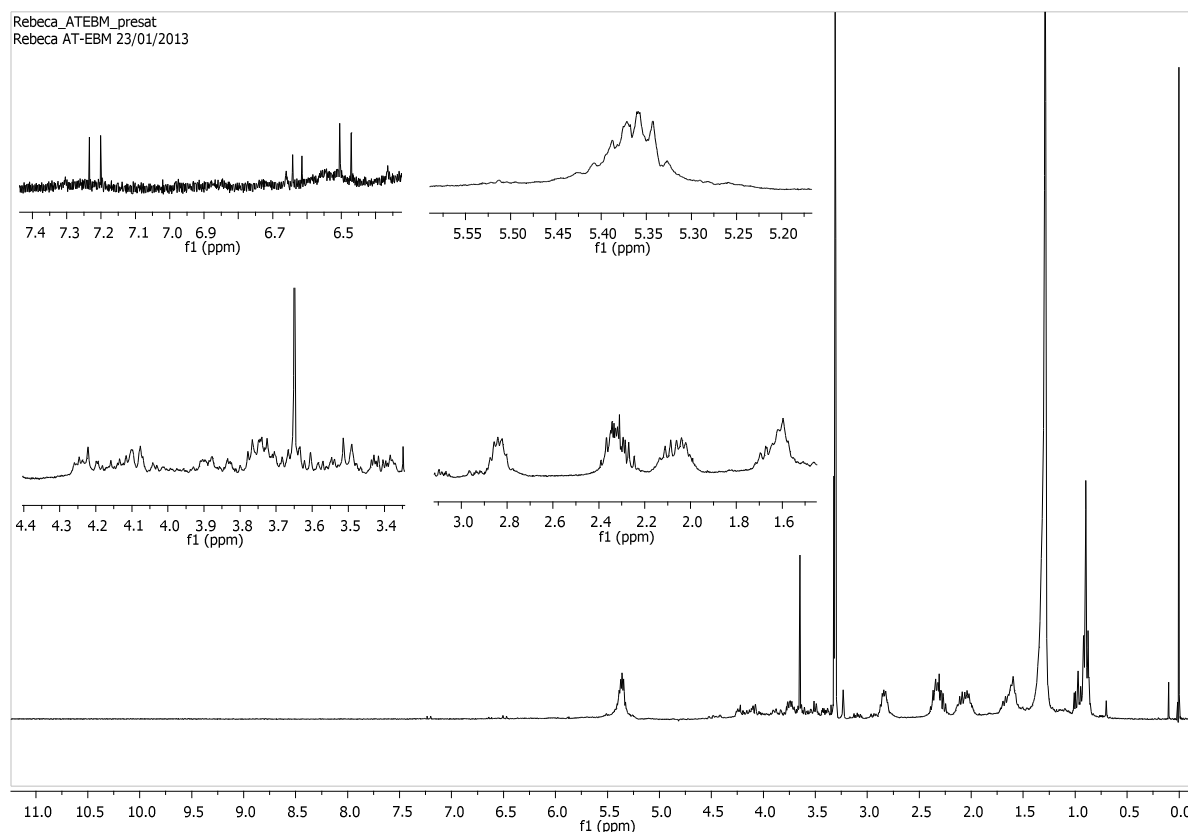
4.1.1 Avaliação do perfil químico do extrato bruto de *Asparagopsis taxiformis* (AT-EB)

O cromatograma de AT-EB (**Figura 22**) mostrou picos ao longo de todo o gradiente exploratório, indicando assim a presença de substâncias com diferentes polaridades no extrato. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 23**) indicou diversidade estrutural das substâncias presentes, uma vez que é possível verificar sinais entre δ_{H} 0,8 e 7,5, sendo que os sinais na região de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,0 e 7,4) foram pouco intensos, ao contrário dos sinais na região entre δ_{H} 3,4 e 4,4, região esta considerada característica de hidrogênios carbinólicos.

Figura 22 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos) de **AT-EB** (254 nm).



Fonte: o autor.

Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H de **AT-EB** (CD_3OD , 300 MHz)

Fonte: o autor.

4.1.2 Avaliação dos perfis químicos dos extratos brutos de *P. spiralis* em escala reduzida

Os cromatogramas (**Figura 24**) de PS-EBL, PS-EBM e PS-EBN indicaram a presença de picos ao longo de todo o gradiente exploratório. Além disso, é possível verificar a semelhança entre os mesmos, ou seja, mesmo usando técnicas diferentes para a obtenção do extrato bruto, não houve variação significativa nos perfis.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 25**) dos extratos brutos de *P. spiralis* evidenciaram, novamente, a semelhança entre os mesmos, com destaque para a presença dos sinais de hidrogênios carbinólicos (entre δ_{H} 3,4 e 4,0).

Sendo assim, optou-se em obter o extrato bruto de *P. spiralis* em escala ampliada utilizando a terceira metodologia, na qual a amostra é congelada com nitrogênio líquido e moída, e posteriormente, extraída com metanol, pois esta apresentou bom rendimento, além de fácil manuseio e amplo uso em nosso grupo de pesquisa para trabalhos, principalmente com plantas.

Figura 24 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min.; 254 nm) de **PS-EBL** (azul), **PS-EBM** (verde) e **PS-EBN** (vermelho)

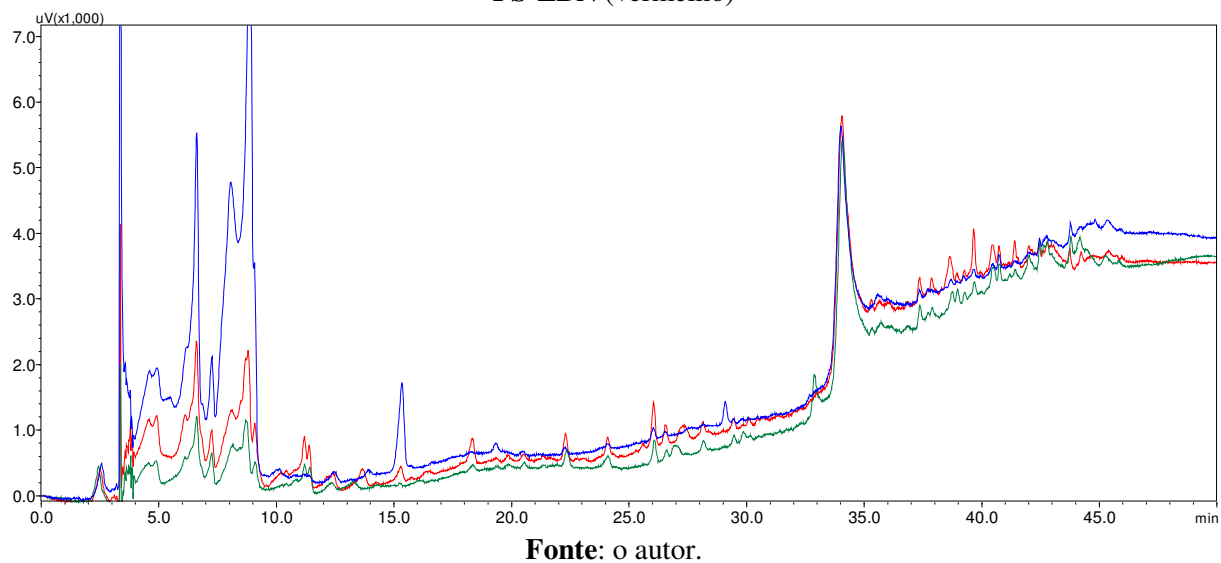
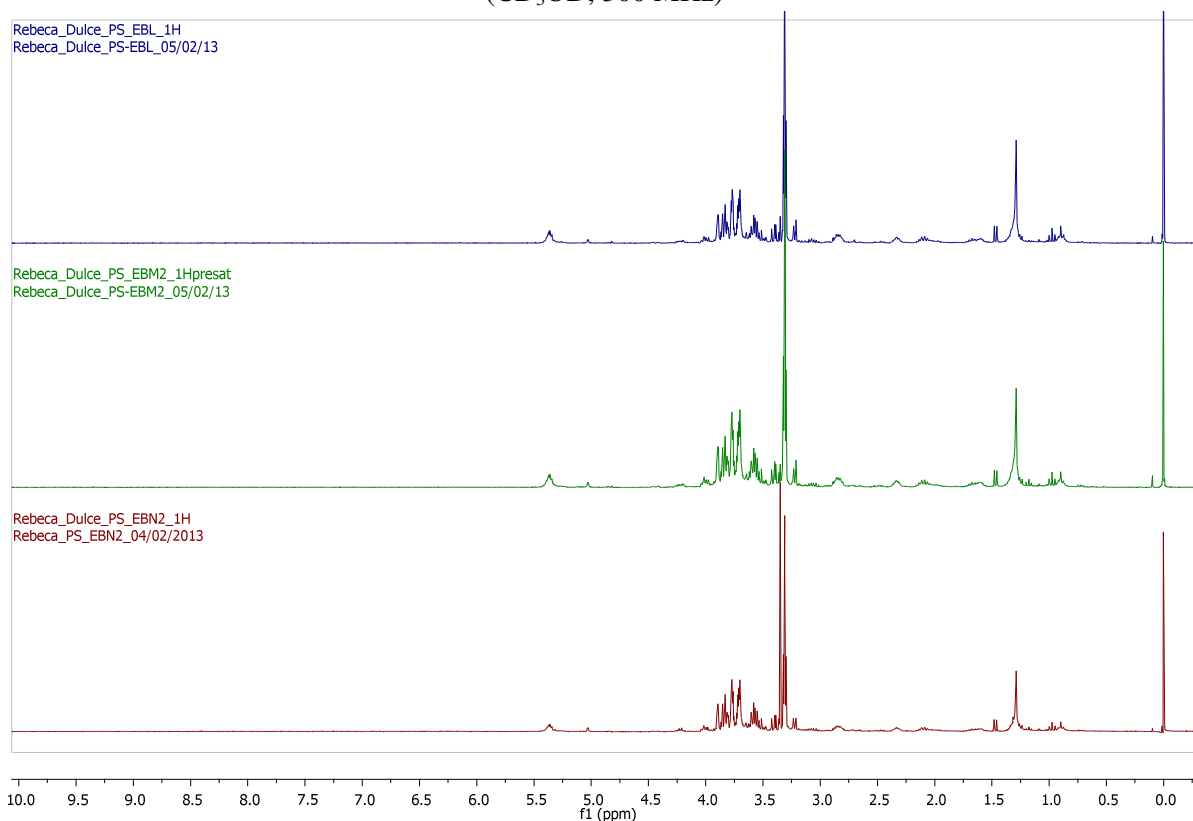
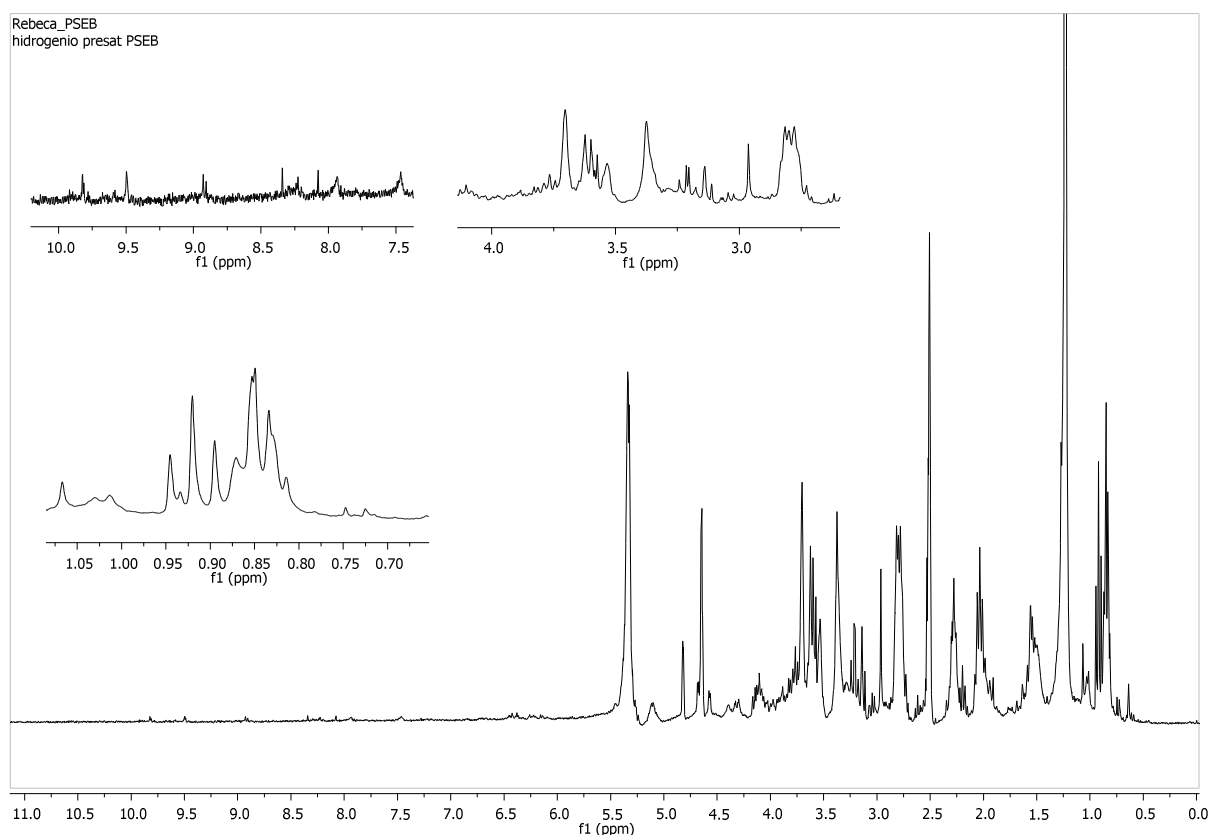


Figura 25 - Espectros de RMN de ¹H de **PS-EBL** (azul), **PS-EBM** (verde), **PS-EBN** (vermelho) (CD₃OD, 300 MHz)



A **Figura 26** mostra o espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. spiralis* em escala ampliada, no qual foi possível verificar maior quantidade de sinais do que no perfil do extrato bruto em escala reduzida, como por exemplo os sinais entre δ_{H} 7,4 e 10,0.

Figura 26 - Espectro e expansões de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. spiralis* em escala ampliada (DMSO- d_6 , 300 MHz)



Fonte: o autor.

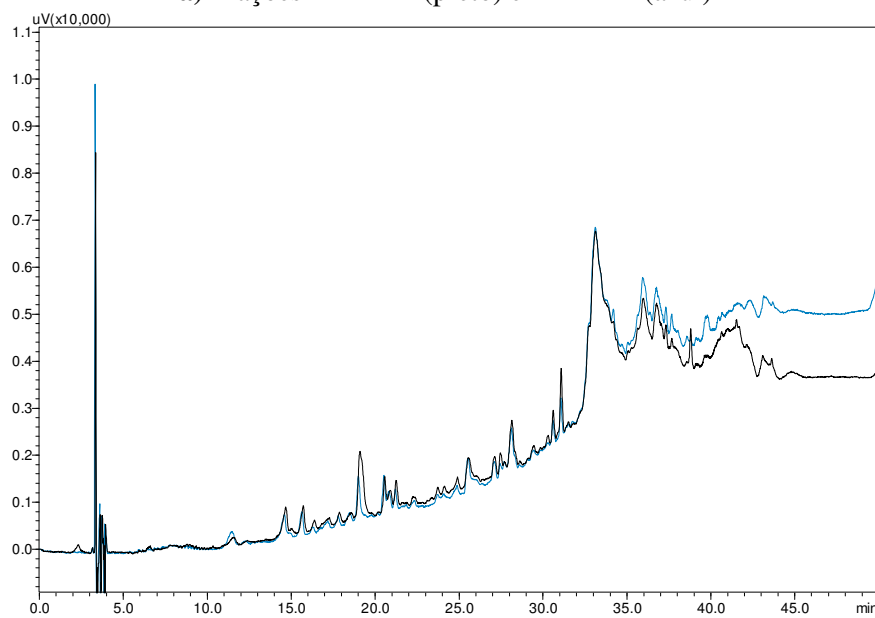
4.1.3 Avaliação dos perfis químicos das frações de *A. taxiformis* e *P. spiralis* em escala reduzida

As **Figuras 27** e **28** mostram os cromatogramas das frações de *A. taxiformis* obtidas pelas duas metodologias em escala reduzida. Ao comparar as frações AT-FH1 e AT-FH2, obtidas pelas metodologias 1 e 2 (**Figura 27 - a**), respectivamente, foi possível observar a semelhança de picos entre as mesmas, o mesmo ocorre quando comparamos as frações AT-FAc e AT-FD (**Figura 27 - b**).

Ao comparar as frações de maior polaridade, AT-FBu1 e AT-FBu2 (**Figura 28 - a**) e AT-FHm1, AT-FHm2 e AT-FAq (**Figura 28 - b**) também observamos que tratam-se de picos com tempos de retenção semelhantes, evidenciando a similaridade dos perfis químicos.

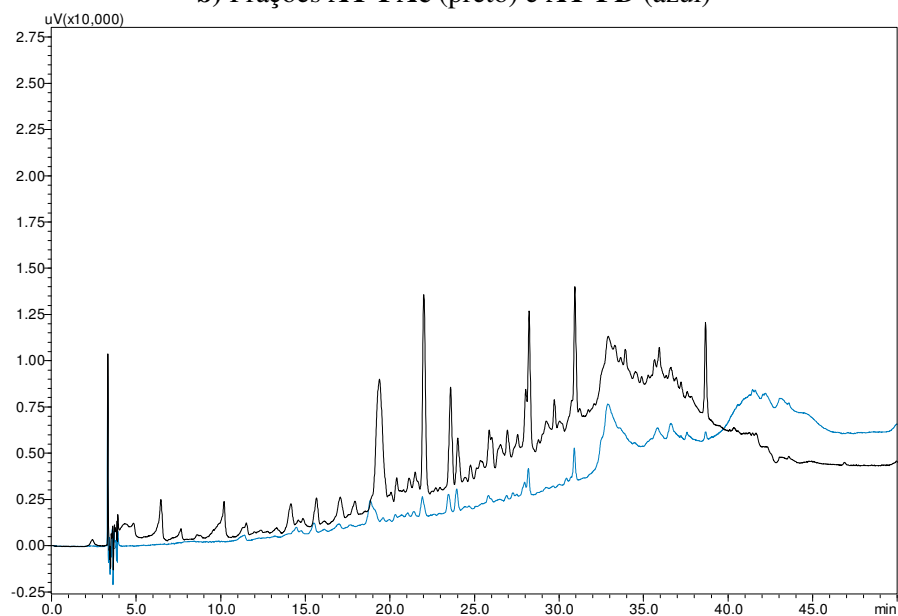
Figura 27 - Cromatogramas das frações de *A. taxiformis* (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 40 min.; 254 nm):

a) Frações **AT-FH1** (preto) e **AT-FH2** (azul)



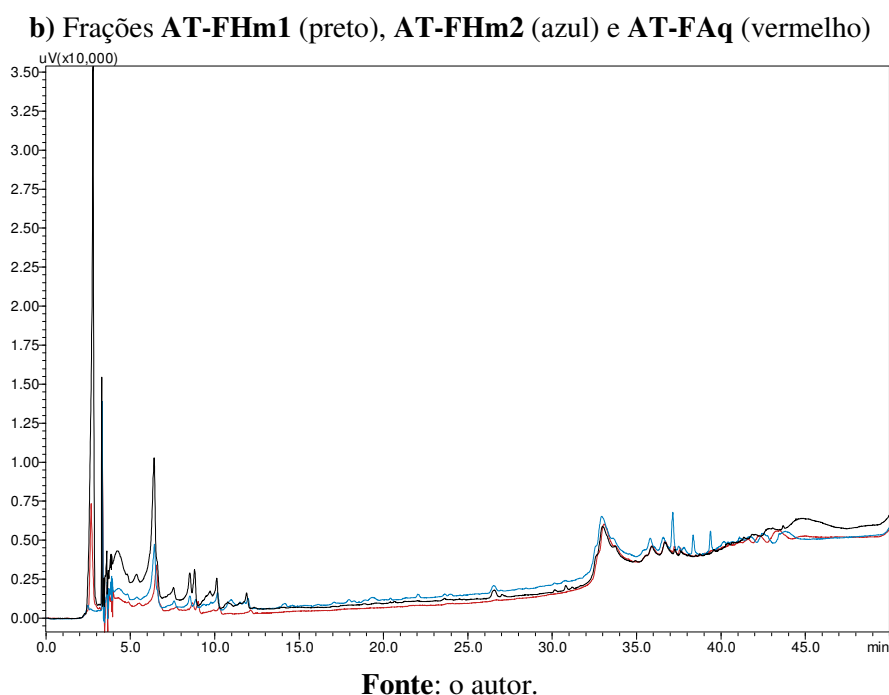
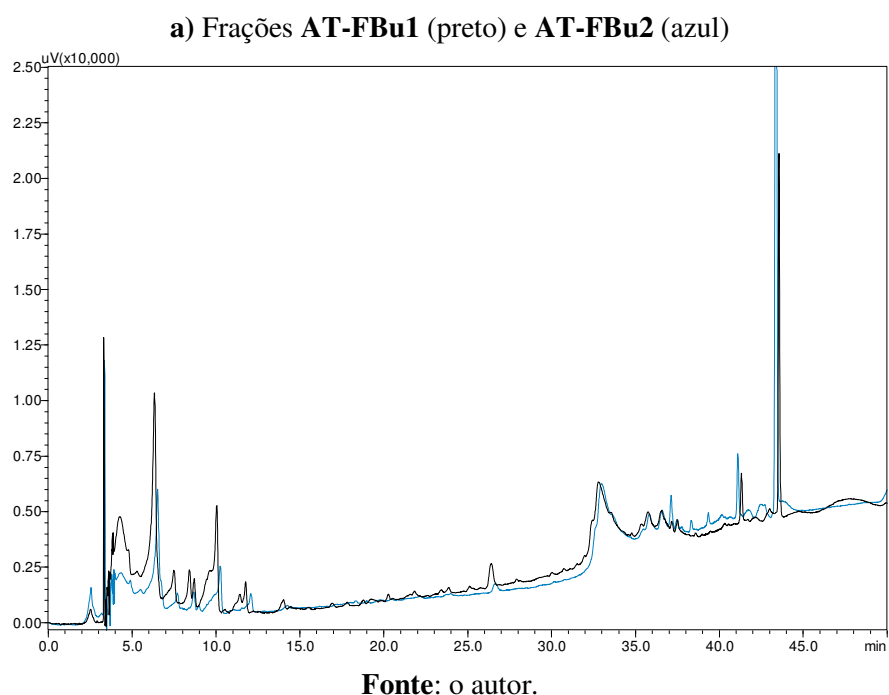
Fonte: o autor.

b) Frações **AT-FAc** (preto) e **AT-FD** (azul)



Fonte: o autor.

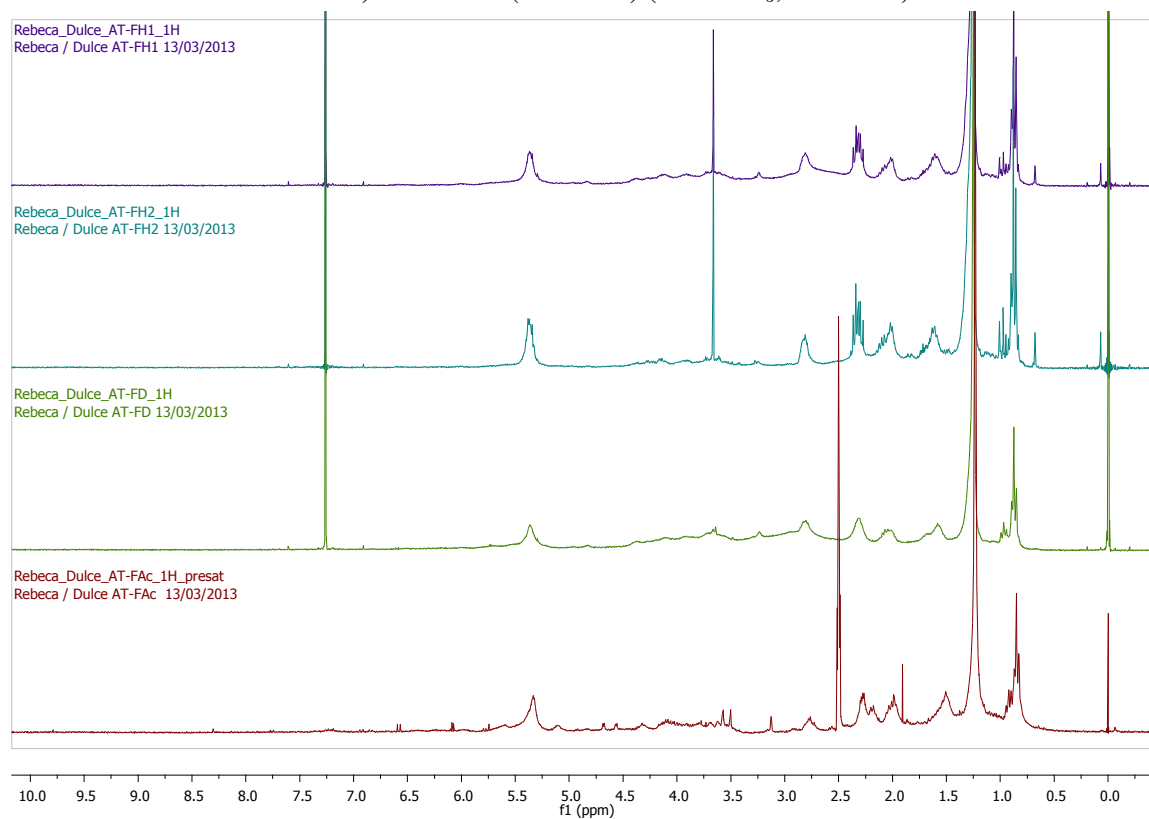
Figura 28 - Cromatogramas das frações de *A. taxiformis* (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 40 min.; 254 nm):



Os espectros de RMN de ¹H (**Figuras 29, 30 e 31**) evidenciaram novamente a semelhança entre as frações AT-FH1 e AT-FH2 e frações AT-FAc e AT-FD (**Figura 29**) e, também semelhança de sinais da fração AT-FD com a fração AT-FH1. No entanto, podemos

destacar a presença de sinais na região entre δ_H 6,0 e 6,8 na fração AT-FAc, sendo que estes não foram observados nas demais frações.

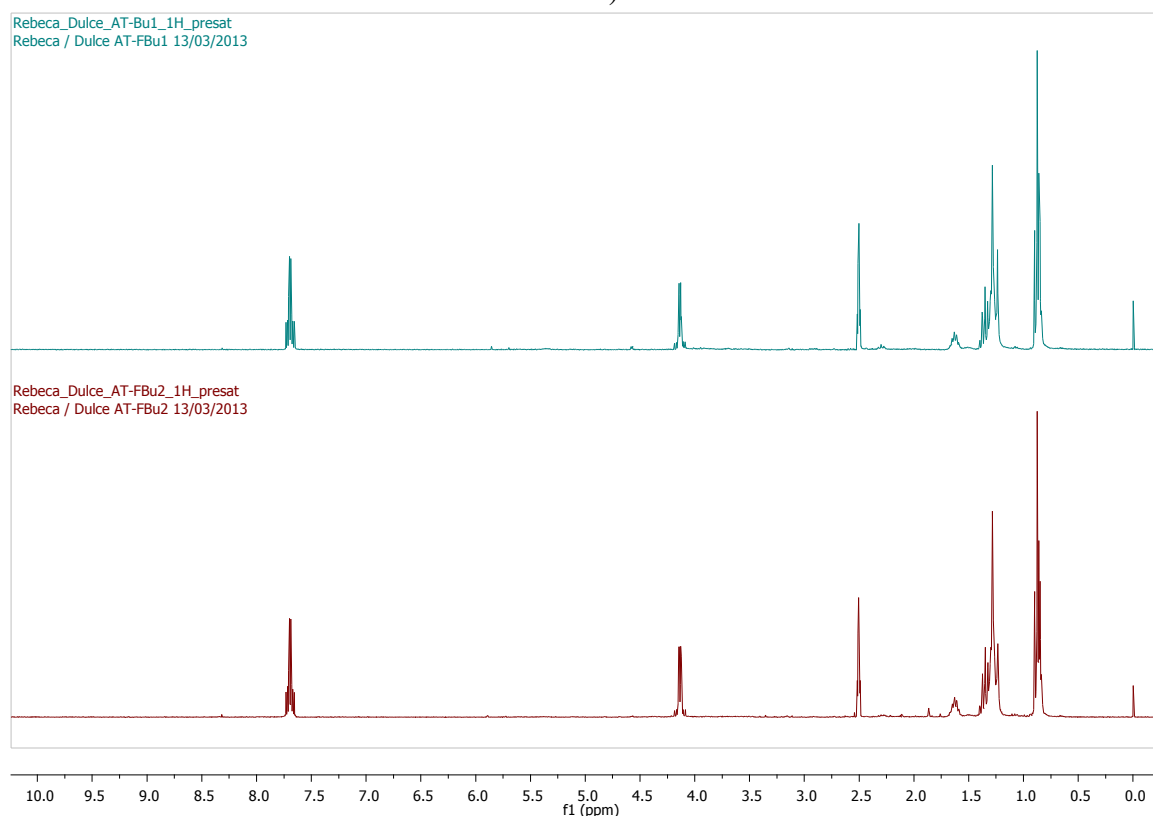
Figura 29 - Espectros de RMN de 1H de **AT-FH1** (roxo), **AT-FH2** (azul), **AT-FD** (verde) ($CDCl_3$, 300 MHz) e **AT-FAc** (vermelho) ($DMSO-d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

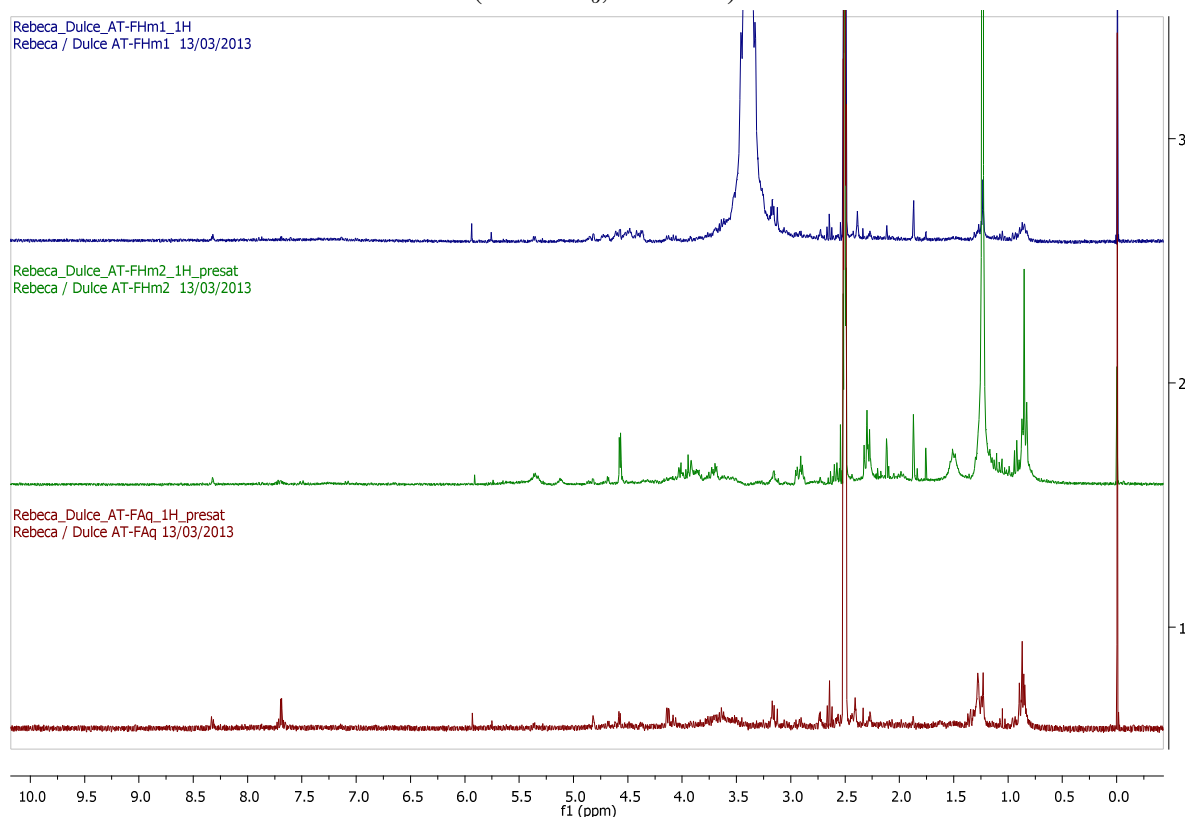
A **Figura 30** mostra os espectros de RMN de ^1H das frações AT-FBu1 e AT-FBu2, obtidas pelas metodologias 1 e 2, respectivamente, sendo que estes apresentaram alta similaridade. Já os espectros das frações AT-Fm1, AT-FHm2 e AT-FAq (**Figura 31**) mostraram algumas diferenças, sendo que a fração AT-FHm1 apresentou sinais presentes tanto na fração AT-FHm2 quanto os presentes na fração AT-FAq.

Figura 30 - Espectros de RMN de ^1H de **AT-FBu1** (azul) e **AT-FBu2** (vermelho) ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 31 - Espectros de RMN de ^1H de **AT-FHm1** (azul), **AT-FHm2** (verde) e **AT-FAq** (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

A partir da comparação dos cromatogramas (**Figura 32 e 33**) e espectros de RMN de ^1H (**Figura 34, 35 e 36**) das frações de *P. spiralis* obtidas pela metodologia 1, com as frações obtidas pela metodologia 2 e de polaridade similar foi possível verificar a semelhança entre as mesmas, assim como observado para as frações de *A. taxiformis*. Novamente, as frações PS-FH1 e PS-FH2 se apresentaram muito semelhantes (**Figura 32 - a e Figura 34**), assim como as frações PS-FBu1 e PS-FBu2 (**Figura 33 - a e Figura 35**).

Figura 32 - Cromatogramas das frações de *P. spiralis* (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 40 min.; 254 nm):

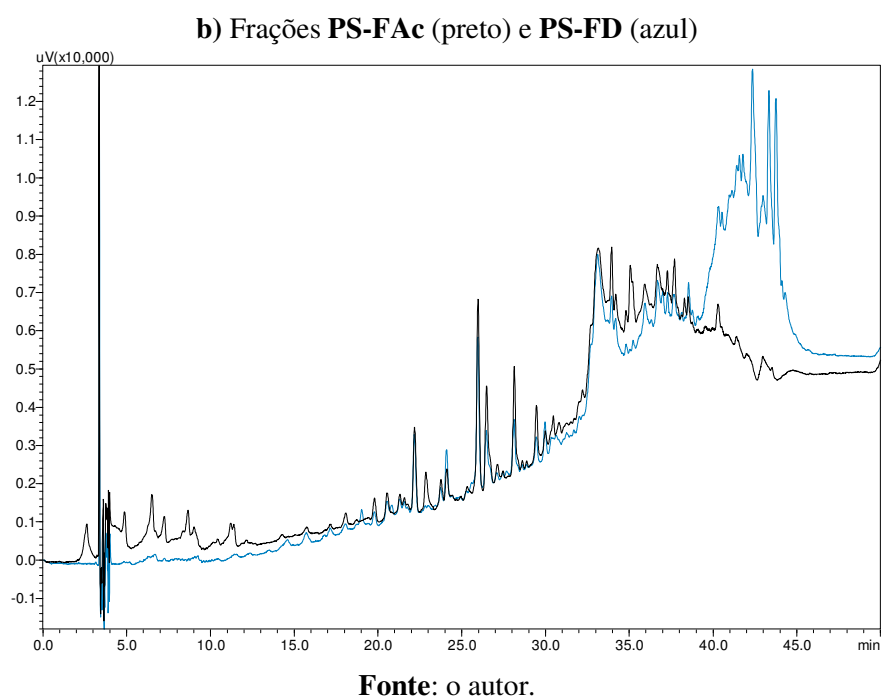
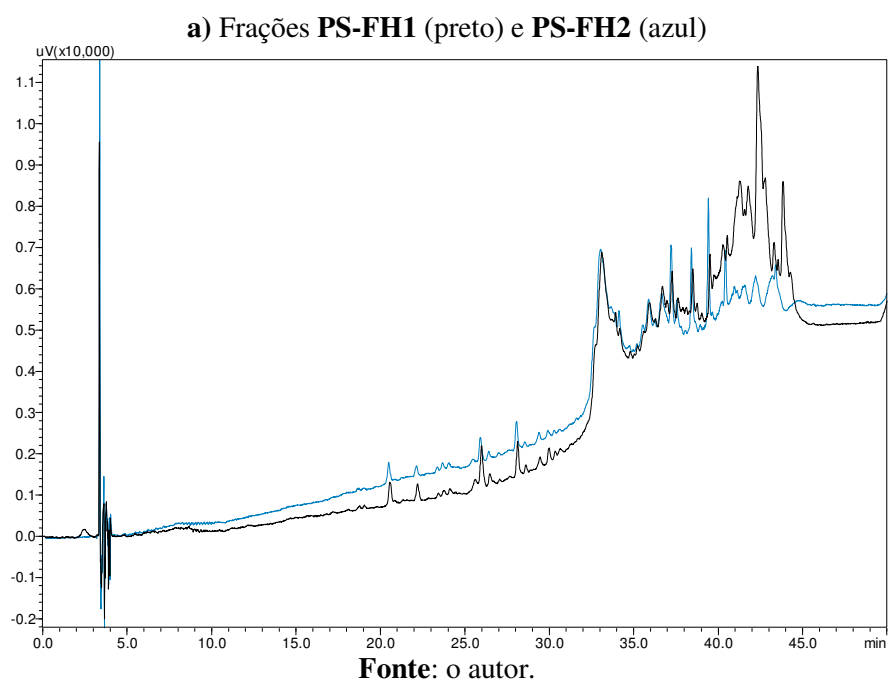
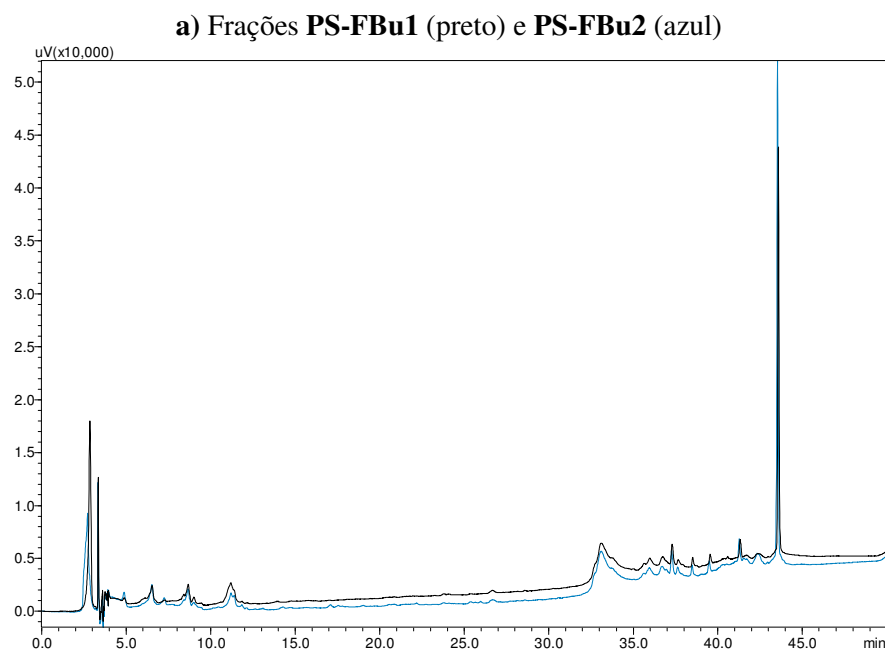
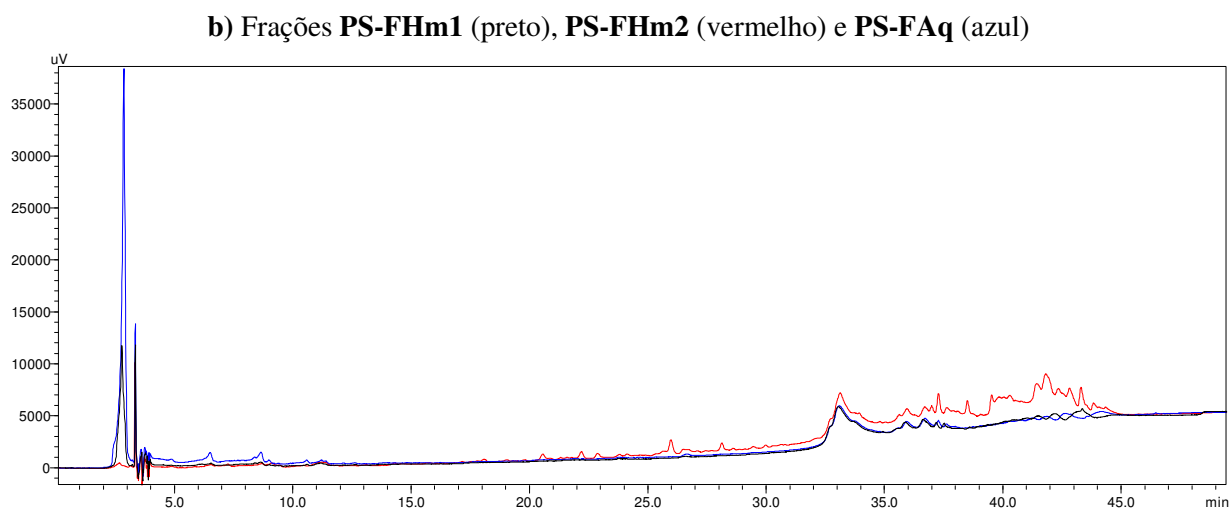


Figura 33 - Cromatogramas das frações de *P. spiralis* (escala reduzida) em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 40 min.; 254 nm):



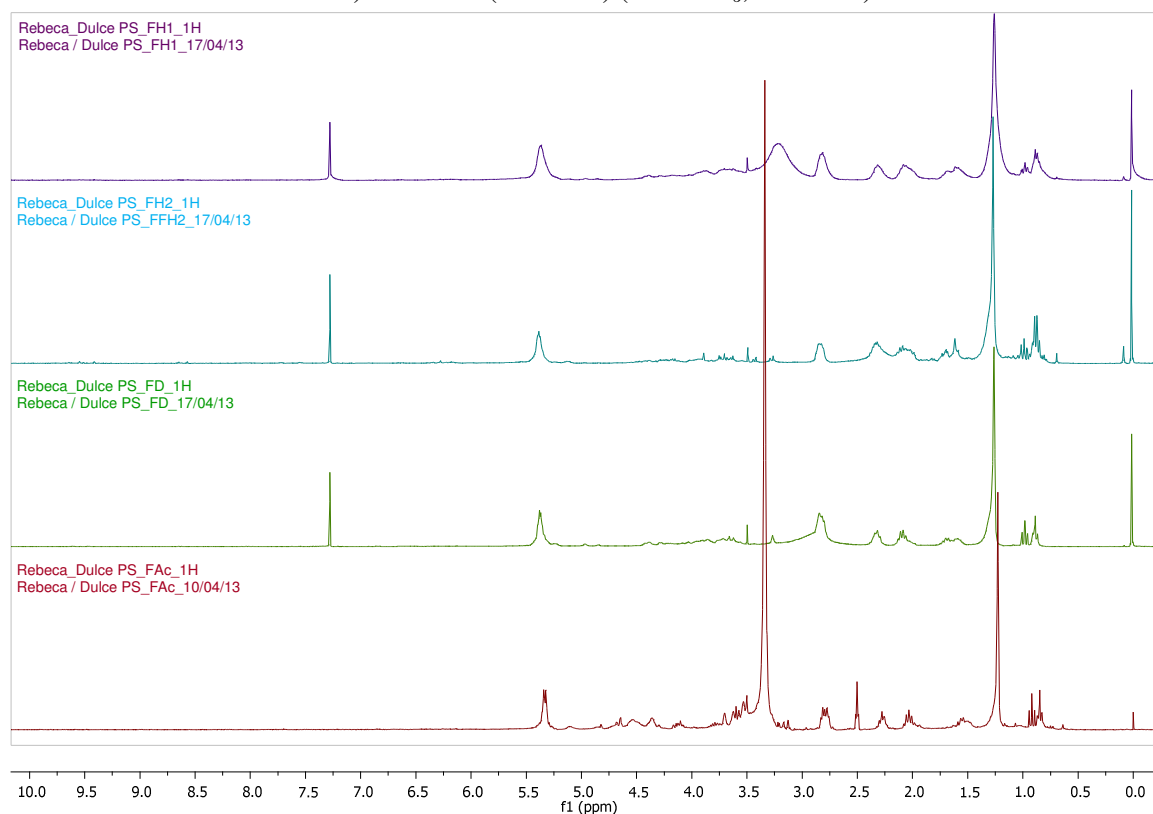
Fonte: o autor.



Fonte: o autor.

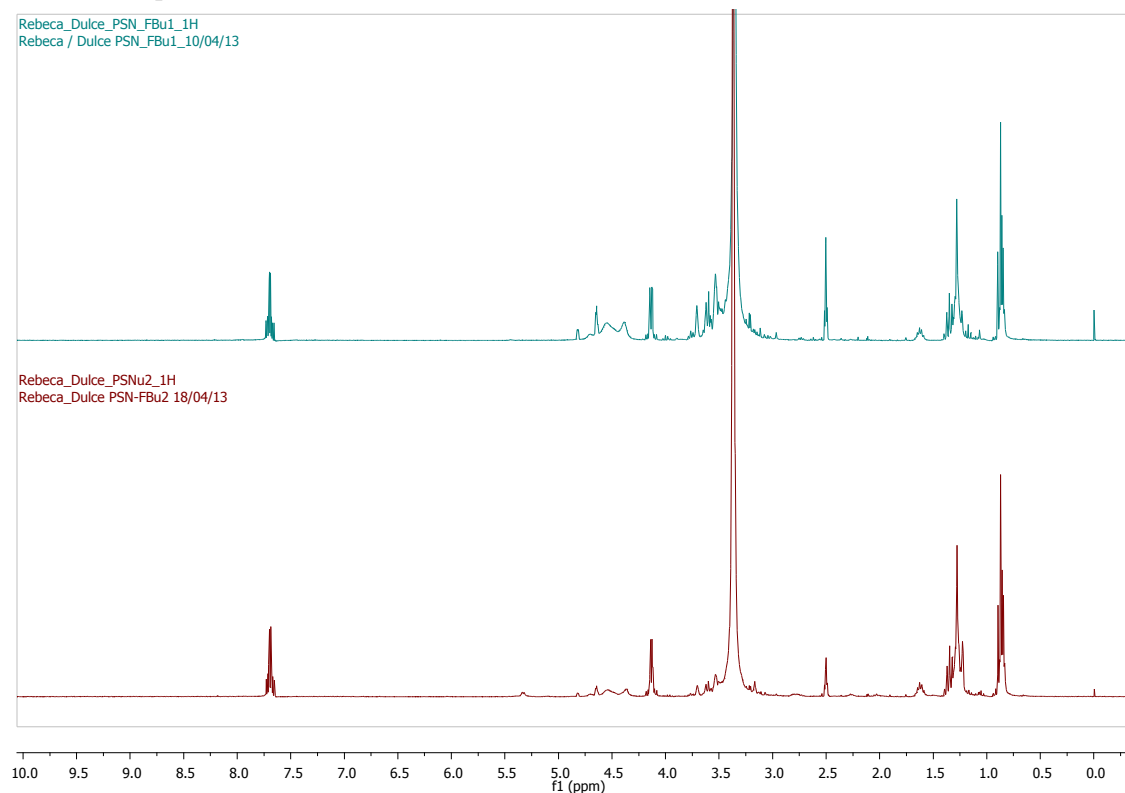
Além disso, foi possível verificar a semelhança da fração PS-FD com a fração PS-FH1, como mostram seus espectros de RMN de ¹H (**Figura 34**), bem como da fração PS-FHm1 com a fração PS-FAq (**Figura 36**).

Figura 34 - Espectros de RMN de ^1H de **PS-FH1** (roxo), **PS-FH2** (azul), **PS-FD** (verde) (CDCl_3 , 300 MHz) e **PS-FAc** (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz)



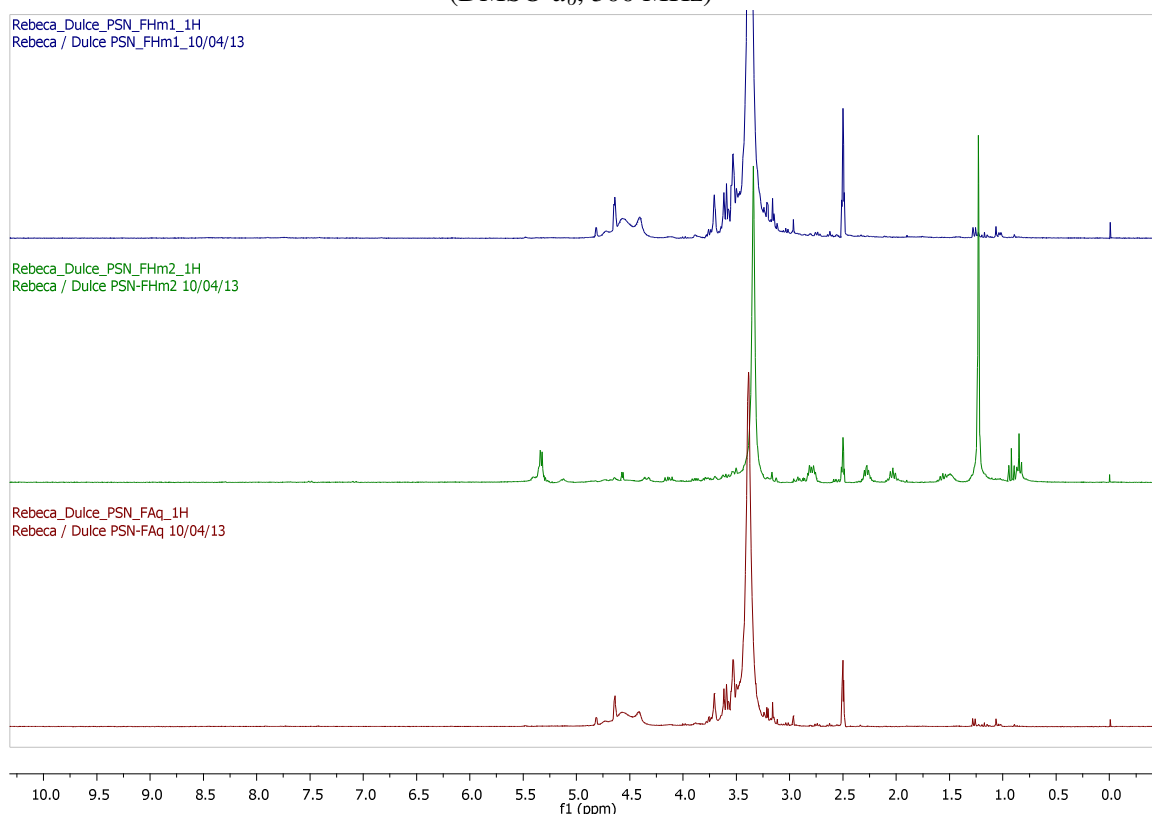
Fonte: o autor.

Figura 35 - Espectros de RMN de ^1H de **PS-FBu1** (azul) e **PS-FBu2** (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 36 - Espectros de RMN de ^1H de **PS-FHm1** (azul), **PS-FHm2** (verde) e **PS-FAq** (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

Sendo assim, podemos afirmar que a metodologia 2 não modificou, melhorou ou aprimorou o fracionamento dos extratos brutos de *A. taxiformis* e de *P. spiralis*. Além disso, acrescentou etapas ao processo e utilizou solvente clorado (diclorometano), confirmando sua menor eficiência.

Portanto, optou-se por realizar o fracionamento, em escala ampliada, dos extratos brutos das algas em estudo utilizando a metodologia 1.

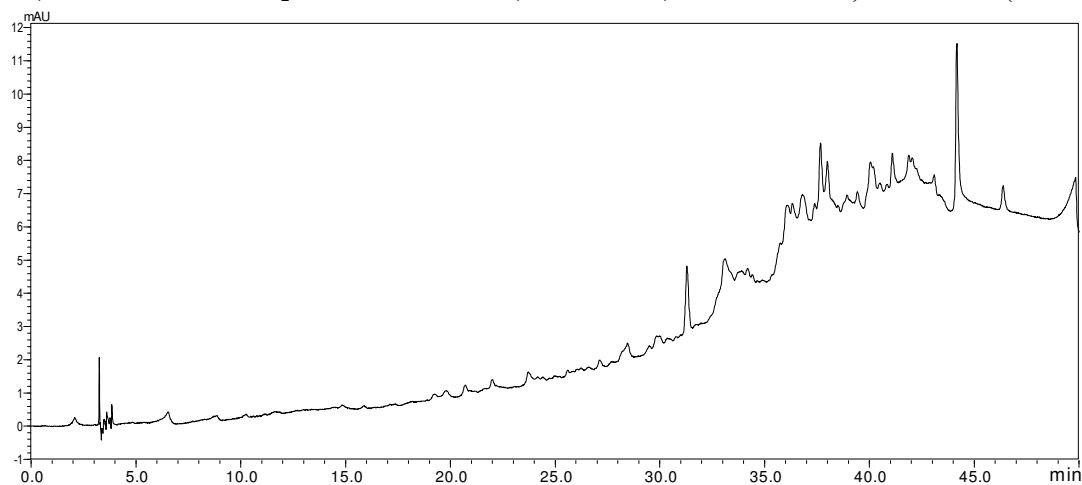
4.1.4 Estudo das frações, em escala ampliada, de *A. taxiformis* e *P. spiralis*

Após a obtenção das frações de *A. taxiformis* e *P. spiralis* em escala ampliada, as mesmas foram analisadas por CLAE-DAD, RMN de ^1H e foram submetidas a ensaios biológicos. Os resultados obtidos orientaram a seleção das frações a serem estudadas, para as quais foram estabelecidas diferentes estratégias.

4.1.4.1 Estudo das frações AT-FH e PS-FH

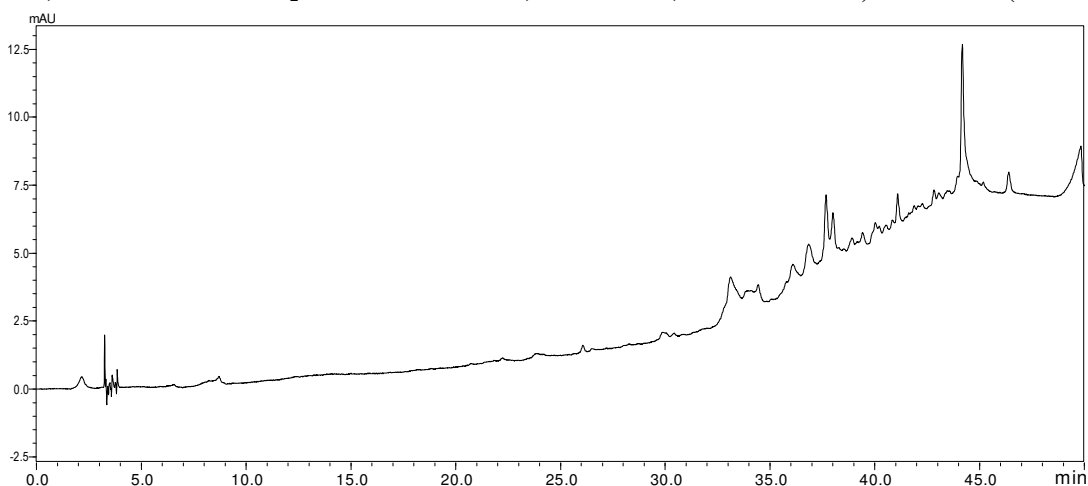
Como foi observado pelos cromatogramas das frações AT-FH (**Figura 37**) e PS-FH (**Figura 38**) as mesmas apresentaram compostos de menor polaridade, sendo que muitos picos cromatográficos foram observados ao final da corrida, após o gradiente linear utilizado, já na limpeza da coluna (entre 40 e 50 minutos).

Figura 37 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **AT-FH** (254 nm).



Fonte: o autor.

Figura 38 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **PS-FH** (254 nm).

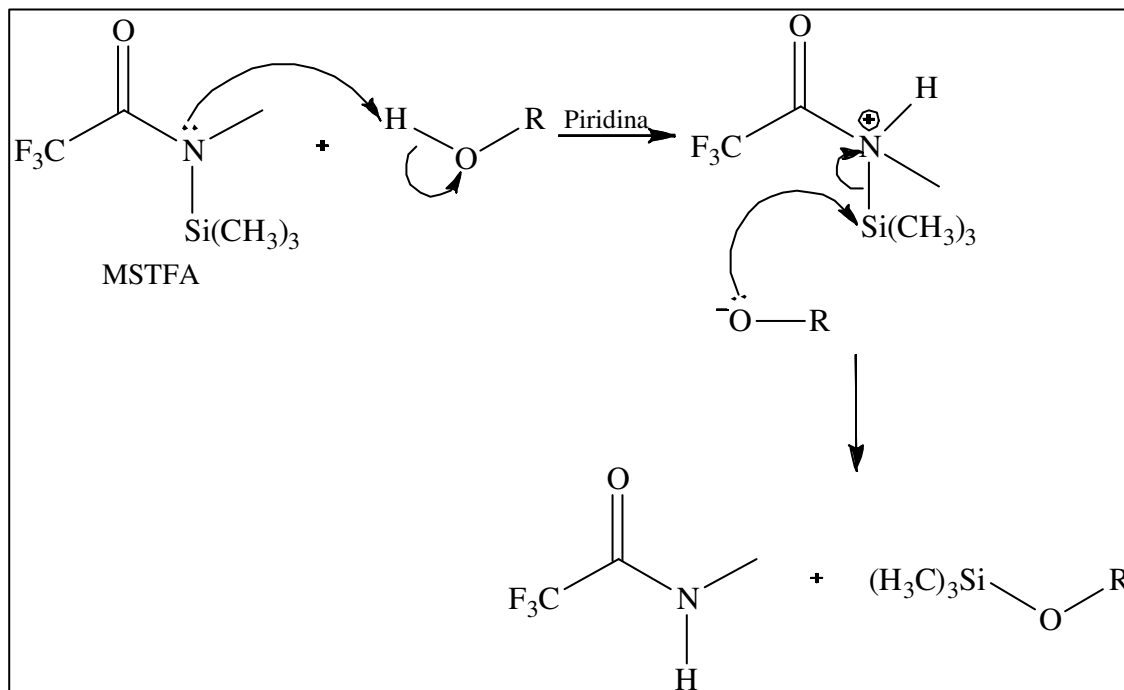


Fonte: o autor.

Estes resultados orientaram o uso de cromatografia gasosa para o estudo dessas frações. Durante o preparo das amostras foi realizada uma etapa de derivação (sililação), que consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupos -OH, -SH, -NH e -

COOH dos metabólitos por grupos trimetilsilil (TMS) (**Figura 39**), de forma a obter-se derivados com menor polaridade, maior volatilidade e estabilidade térmica (PELLATTI; BENVENUTI, 2007).

Figura 39 - Mecanismo para a reação de sililação (exemplificada para um álcool).



Fonte: o autor.

As **Figuras 40 e 41** apresentam os cromatogramas obtidos por CG-EM para as frações AT-FH e PS-FH, respectivamente.

Os resultados das análises por CG-EM permitiram a identificação dos constituintes de AT-FH e PS-FH por meio de análise e comparação dos espectros de massas com dados das bibliotecas Wiley7 e Nist através do software *GCMS solutions Ver. 2.5*. Além disso, foram calculados os índices de retenção ($\text{IR}_{\text{calc.}}$) de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz (1), utilizada em análises com variação de temperatura (rampa de temperatura ou temperatura programada), e que leva em consideração o tempo de retenção da substância de interesse (t_{Rx}) e os tempos de retenção de hidrocarbonetos de referência ($\text{C}_8\text{-C}_{20}$; $n=2$) que eluem antes (t_{Rz}) e após ($t_{\text{R(z+1)}}$) esta substância (TOMAZ, 2011). Estes foram comparados com os índices de retenção descritos na literatura ($\text{IR}_{\text{lit.}}$) (**Tabelas 28 e 29**).

$$\text{IR} = 100n + 100 \left(\frac{t_{\text{Rx}} - t_{\text{Rz}}}{t_{\text{R(z+1)}} - t_{\text{Rz}}} \right) \quad (1)$$

Para a comparação dos índices de retenção é necessário verificar ainda as colunas e variações de temperatura utilizadas, sendo que para as análises das frações AT-FH e PS-FH foi utilizada uma coluna Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm e uma rampa de temperatura de $3^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, iniciando em 140°C e terminando em 320°C (60 minutos).

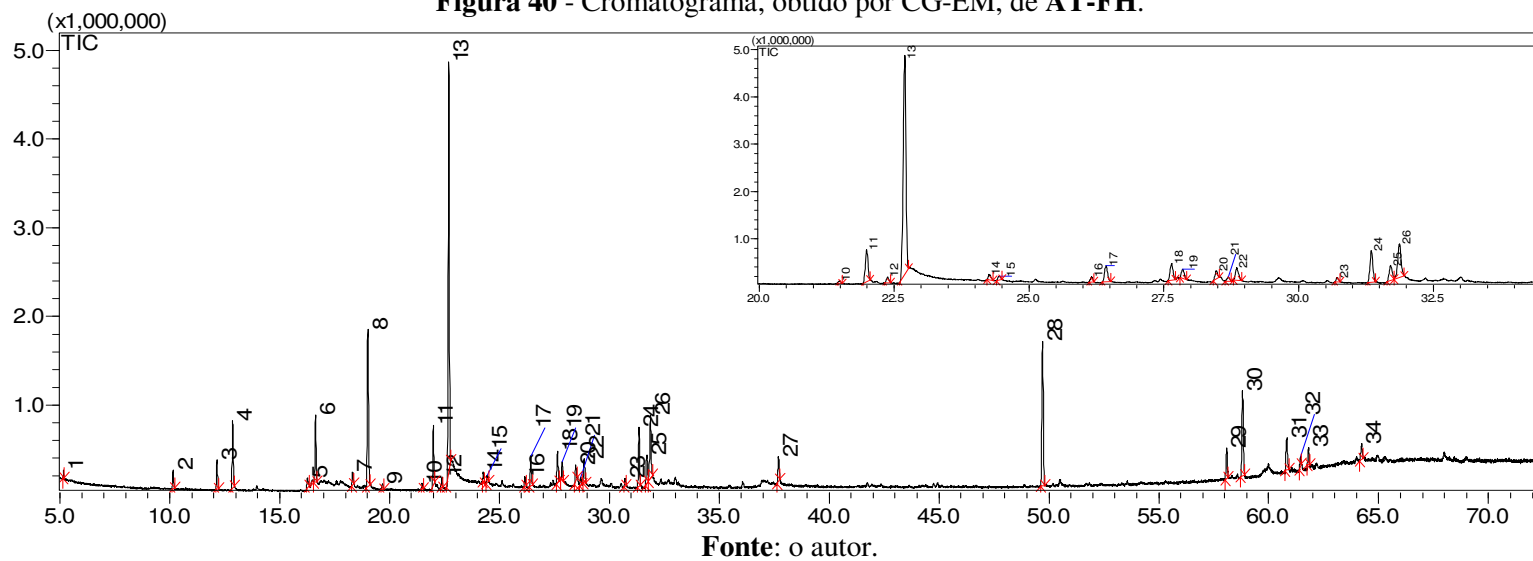
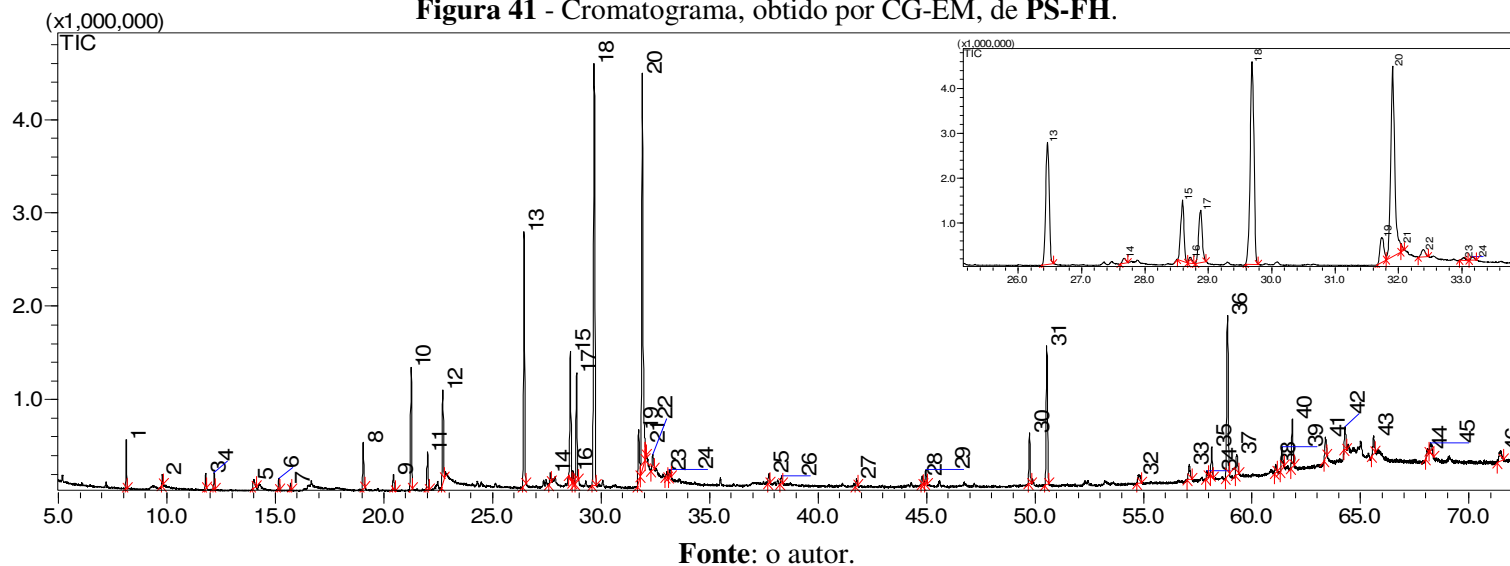
Figura 40 - Cromatograma, obtido por CG-EM, de AT-FH.**Figura 41** - Cromatograma, obtido por CG-EM, de PS-FH.

Tabela 28 - Identificação das substâncias presentes em **AT-FH** por CG-EM e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura*.

Pico	t _R (min)	IR _{calc.}	IR _{lit.}	Substância	Similaridade
3	12,15	1695	-	heptadecano	96%
4	12,86	1719	1726	Tetradecanoato de metila	95%
5	16,26	1832	1837	Neofitadieno	89%
6	16,63	1844	1844	Ácido tetradecanóico (TMS)	94%
7	18,32	1899	1912	(Z)-9-hexadecenoato de metila	90%
8	19,02	1922	1926	Hexadecanoato de metila	95%
11	21,99	2019	2022	Ácido palmitoléico (TMS)	95%
13	22,70	2042	2047	Ácido hexadecanóico (TMS)	96%
14	24,26	2094	2104	(Z)-6-octadecenoato de metila	85%
17	26,43	2169	2181	Fitol (TMS)	88%
18	27,65	2211	2215	Ácido <i>trans</i> -9-octadecenóico (TMS)	92%
20	28,48	2240	2248/2243	Ácido octadecanóico (TMS)	88%
25	31,71	2356	2359	Ácido araquidônico (TMS)	88%
26	31,88	2362	2380	Ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (TMS)	91%
27	37,7	2585	2606	1-Monopalmitin (TMS) ou palmitato de α -glicerila (TMS)	90%
28	49,72	3108	3120	Colesterol (TMS)	97%

*Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>; TMS - grupo trimetilsilil.

Fonte: o autor.

Tabela 29 - Identificação das substâncias encontradas em **PS-FH** por CG-EM e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura*.

Pico	T _R (min)	IR _{calc.}	IR _{lit.}	Substância	Similaridade
1	8,12	1544	1546**	Ácido 2,3,4-triidroxi-butírico (TMS) ou ácido treônico (TMS)	93%
3	11,79	1682	1682	1-heptadeceno	95%
4	12,17	1696	-	n-hexadecano	93%
5	13,99	1757	1744	Ácido α -glicerofosfórico (TMS)	89%
7	15,70	1814	1814	Ácido cítrico - TMS	90%
8	19,04	1923	1926	Hexadecanoato de metila	94%
11	22,01	2020	-	Scyllo inositol (TMS)	94%
12	22,72	2043	2047	Ácido hexadecanóico (TMS)	96%
13	26,46	2170	2181	Fitol (TMS)	91%
14	27,67	2211	2215	Ácido <i>trans</i> -9-Octadecenóico (TMS)	89%
18	28,59	2244	-	2-O-Glicerol- α -D-galactopiranosídeo (TMS)	90%
19	31,74	2357	2359	Ácido araquidônico (TMS)	91%
20	31,91	2364	2380	Ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (TMS)	91%
25	37,74	2587	2606	1-Monopalmitin (TMS) ou palmitato de α -glicerila (TMS)	85%
30	49,75	3110	3120	Colesterol (TMS)	96%
42	64,29	3875	3894	1,2-dipalmitato de glicerila	86%

*Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>; **Literatura: Golm Metabolome Database: <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>

TMS - grupo trimetilsilil.

Fonte: o autor.

Foram identificadas 16 substâncias para AT-FH e 16 para PS-FH, sendo que ambas apresentaram ácidos graxos como ácido hexadecanóico, ácido *trans*-9-octadecenóico ou elaídico (18:1, n-9), ácido araquidônico (20:4, n-6) e o ácido eicosapentaenóico (20:5, n-3) e, ainda, fitol, colesterol e palmitato de α -glicerila. AT-FH apresentou também os ácidos tetradecanóico (C-14:0) e octadecanóico (C-18:0). Já PS-FH apresentou os ácidos treônico e cítrico.

O estudo realizado por Kumari et al. (2013) evidenciou que as macroalgas apresentam baixa concentração de ácidos graxos. No entanto, ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), incluindo os ácidos graxos poli-insaturados ω 3 estavam presentes em quantidades significativas. Os AGPIs ω 3 apresentam atividades anti-inflamatória, anti-trombótica e anti-arritmia e apresentam uma importância particular, pois não podem ser sintetizados pelos humanos, sendo então, obtidos pela dieta.

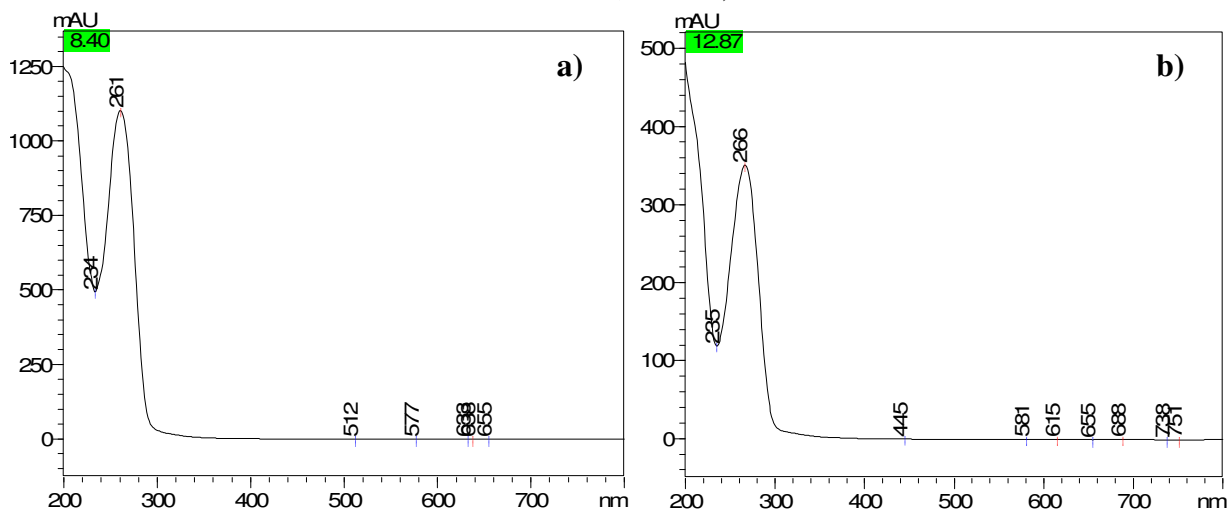
Sendo assim, as algas *A. taxiformis* e *P. spiralis* destacam-se como possíveis fontes de AGPIs, com destaque para o ácido eicosapentaenóico, por ser um AGPI ω 3, que apresenta benefícios relevantes para a saúde humana.

4.1.4.2 Estudo da fração AT-FAc

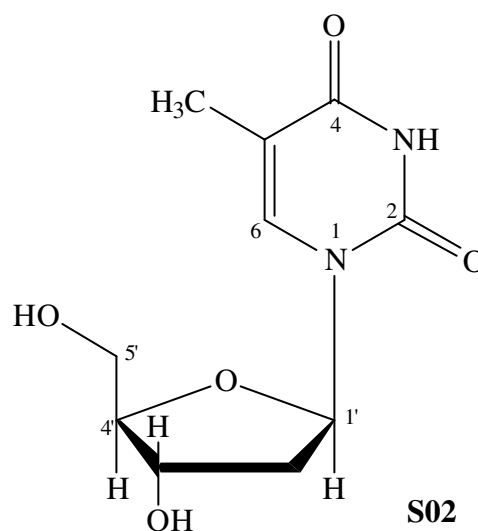
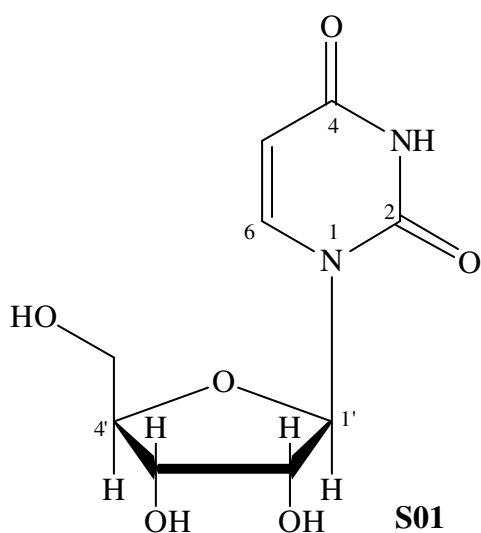
Após a análise do perfil químico obtido por CLAE-DAD da fração AT-FAc, optou-se por fracioná-la em coluna de C-18, utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O. Em seguida, as frações foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ¹H e a fração AT-FAc-F1 foi selecionada para fracionamento por CLAE-DAD preparativa, obtendo-se as substâncias **S01** e **S02**. Seus espectros no UV-Vis estão apresentados na **Figura 42**.

As comparações dos seus espectros no UV-Vis e dos dados de RMN com os dados descritos na literatura (YUAN, J. et al., 2008; YUAN, Z. et al., 2008; GATLIN; DAVIS, 1962; JONES et al., 1970) permitiram a elucidação estrutural de **S01** e **S02** como sendo os nucleosídeos uridina e timidina, respectivamente.

Figura 42 - Espectros no UV-Vis das substâncias: **a) S01** (25% MeOH:75% H₂O) e **b) S02** (35,6% MeOH:64,4% H₂O).



Fonte: o autor.



4.1.4.2.1 Elucidação estrutural de S01

O espectro no UV-Vis de **S01** (**Figura 42 - a**) apresentou banda de absorção máxima em 261 nm e, de acordo, com Yuan, J. et al. (2008) essa é compatível com a estrutura da uridina ($\lambda_{\text{máx.}}$ 261,5 nm).

O espectro de RMN de ¹H de **S01** (**Figura 43**) apresentou dubletos em δ_{H} 8,00 (1H) e δ_{H} 5,72 (1H), com constantes de acoplamento de 8,4 Hz, pois acoplam entre si e são referentes aos hidrogênios nas posições 6 e 5, respectivamente, e um dubleto em δ_{H} 5,90 (1H) referente ao hidrogênio 1' da unidade de ribose com constante de acoplamento de 4,8 Hz, uma vez que acopla com H-2' (δ_{H} 4,19; dd; $J_{2'-1'} = 4,8$ e $J_{2'-3'} = 4,8$ Hz; 1H) da unidade de ribose.

O mapa de contornos COSY (**Figura 44**) mostrou correlações entre H-5 e H-6, bem como correlações entre os hidrogênios da unidade de ribose, H-1' com H-2' e H-3' (δ_H 4,15; dd; $J_{3'-2'} = 4,8$ e $J_{3'-4'} = 4,8$ Hz; 1H); H-4' (δ_H 4,02; m; 1H) com H-3', H-5'a (δ_H 3,84; dd; $J_{5'a-4'} = 2,4$ e $J_{5'a-5'b} = 12,3$ Hz; 1H) e H-5'b (δ_H 3,74; dd; $J_{5'b-4'} = 3,0$ e $J_{5'b-5'a} = 12,3$ Hz; 1H).

A partir do mapa de contornos HSQC (**Figura 45**) foi possível verificar sinais de carbonos metínicos (representados em azul) em δ_C 142,6 (C-6), 102,4 (C-5), 90,4 (C-1'), 86,1 (C-4'), 75,4 (C-2') e 71,0 (C-3') e um sinal de carbono metilênico (representado em vermelho) em δ_C 61,9 (C-5').

No mapa de contornos HMBC (**Figura 46**) destacam-se as correlações do H-1' com o sinal de carbono quaternário em δ_C 152,6, referente ao C-2 e com o sinal de carbono metínico em δ_C 142,8 atribuído ao C-6, confirmando assim a ligação da unidade glicosídica à base nitrogenada. E ainda, foi observada a correlação do H-6 com o sinal de carbono quaternário em δ_C 166,4, referente ao C-4.

Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H de **S01** (CD_3OD ; 600 MHz)

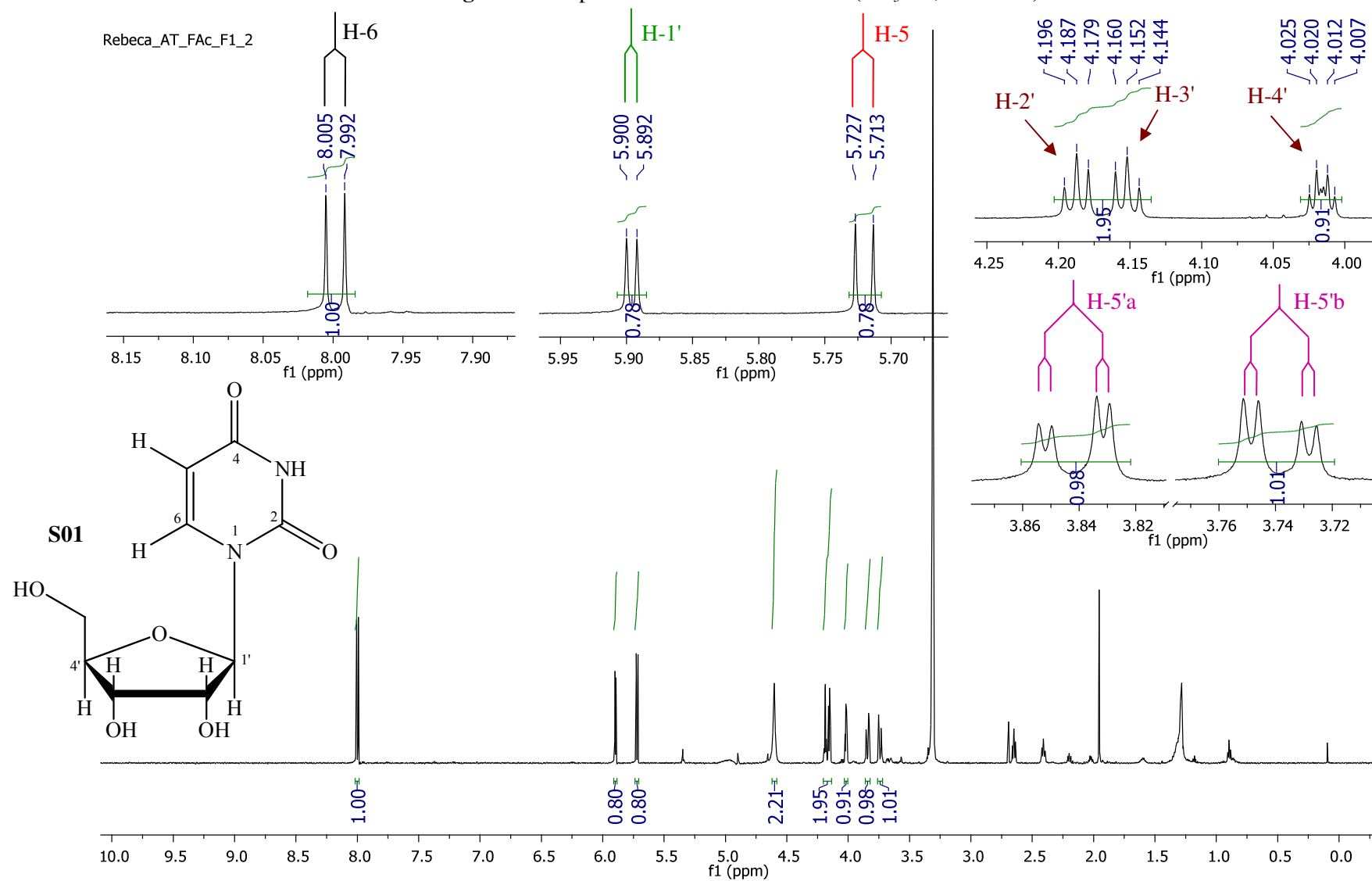


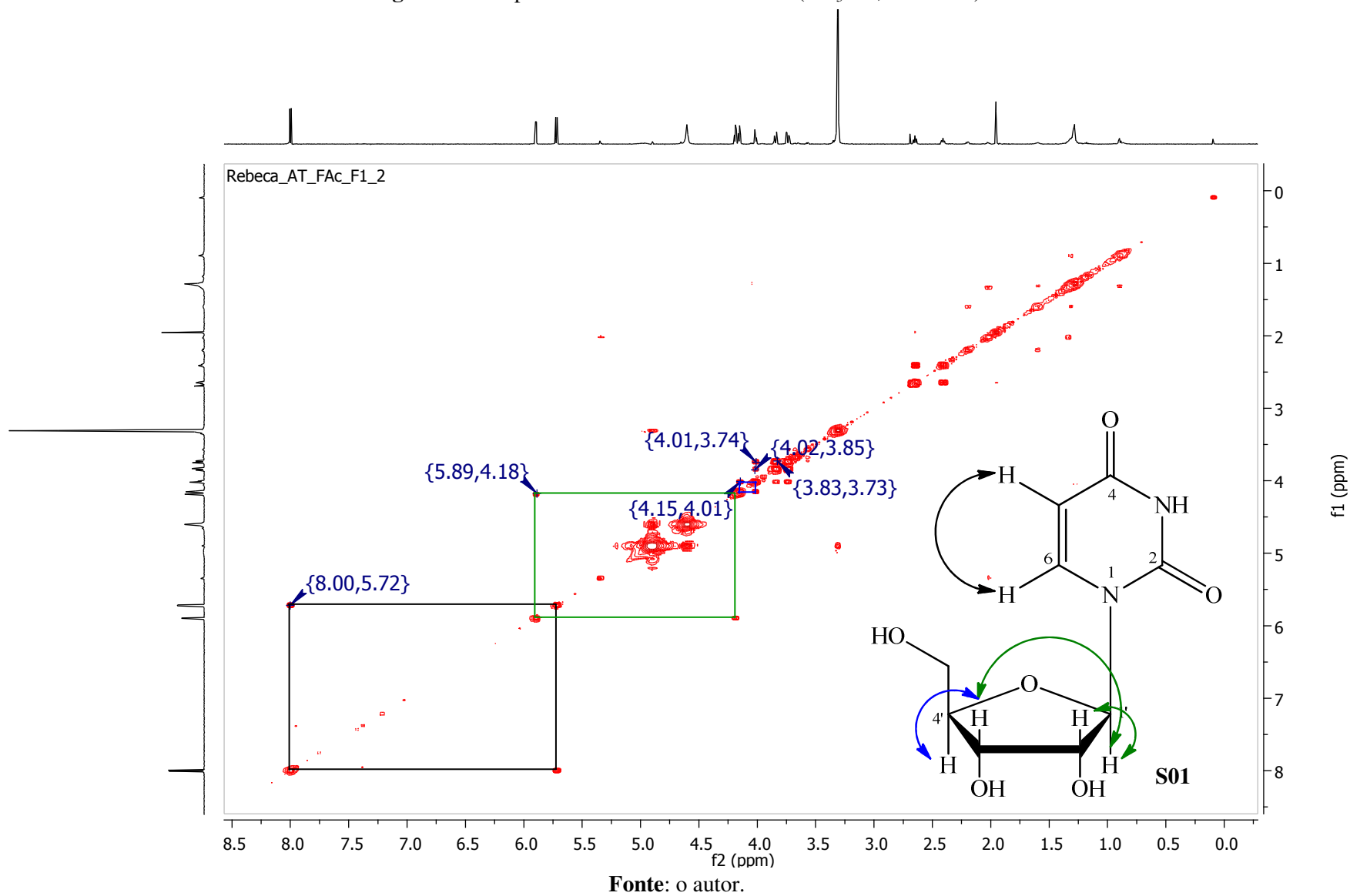
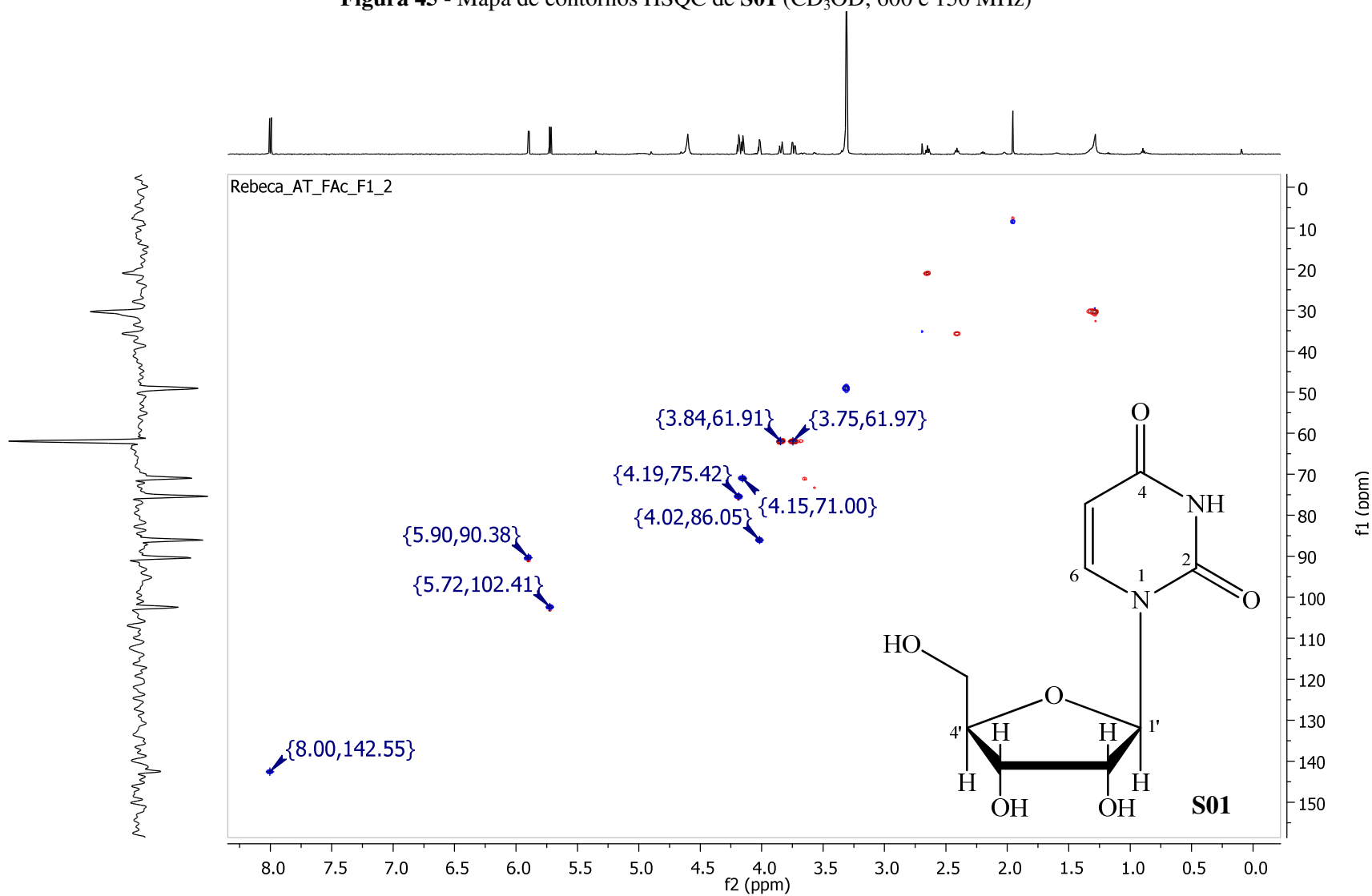
Figura 44 - Mapa de contornos COSY de **S01** (CD₃OD; 600 MHz)

Figura 45 - Mapa de contornos HSQC de **S01** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



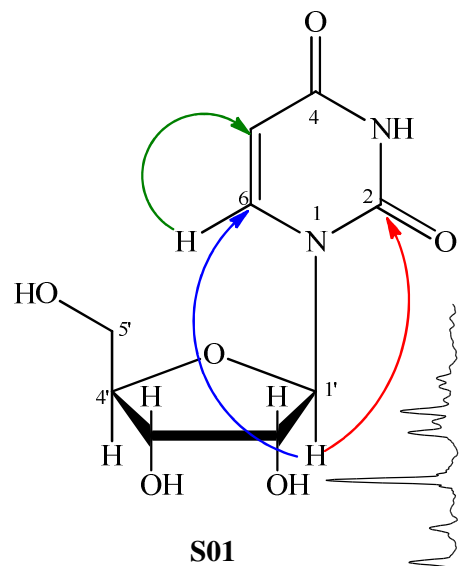
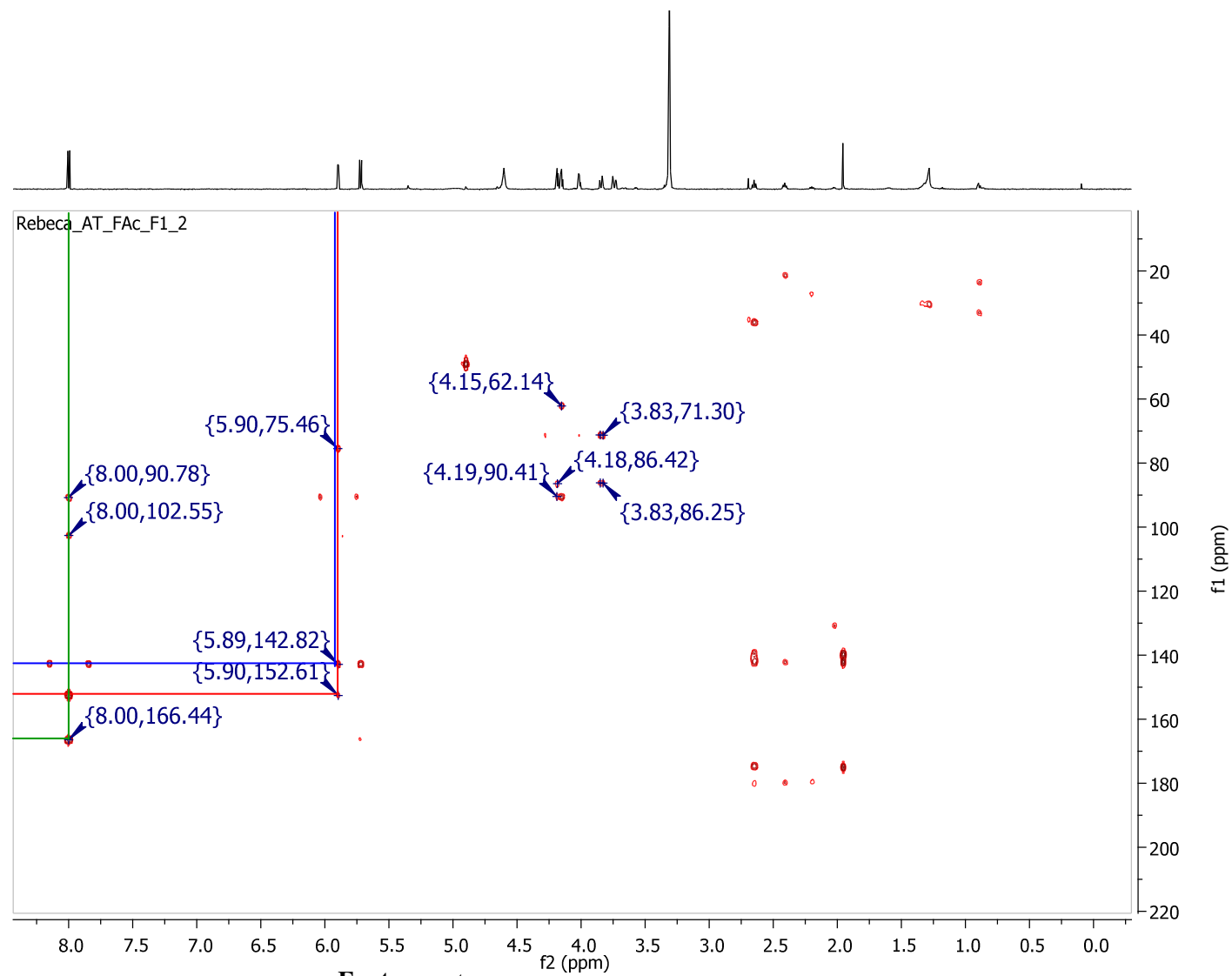


Figura 46 - Mapa de contornos HMBC de **S01** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Os dados espectrais da substância **S01** e sua comparação com os dados da literatura para a uridina (YUAN, Z. et al., 2008; JONES et al., 1970) estão descritos na **Tabela 30**.

Tabela 30 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S01** e para a uridina.

S01^a			Uridina	
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H}^b	δ_{C}^c
2	-	152,6	-	151,9
4	-	166,4	-	164,3
5	5,72 (d; 8,4)	102,4	5,63 (d; 8,0)	102,7
6	8,00 (d; 8,4)	142,6	7,87 (d; 8,0)	141,7
1'	5,90 (d; 4,8)	90,4	5,76 (d; 5,5)	88,7
2'	4,19 (dd; 4,8; 4,8)	75,4	4,0 (m)	70,7
3'	4,15 (dd; 4,8; 4,8)	71,0	3,95 (m)	74,5
4'	4,02 (m)	86,1	3,82 (m)	85,6
5'	3,84 (dd; 2,4; 12,3)	61,9	3,61 (d; 11,5)	61,8
	3,74 (dd; 3,0; 12,3)		3,53 (d; 11,0)	

^a δ -ppm; 600 e 125 MHz; CD_3OD ; ^b δ -ppm; 500 MHz; DMSO-d_6 (YUAN, Z. et al., 2008); ^c δ -ppm; 15,1 MHz; DMSO-d_6 (JONES et al., 1970).

Fonte: o autor.

Os sinais de carbono para C-2' e C-3' descritos na literatura são δ_{C} 70,7 e 74,5, respectivamente, ou seja, estão invertidos quando comparados com os valores observados para **S01**. Porém, é fácil comprovar que os valores de C-2' e C-3' corretos são aqueles apresentados para **S01**, já que o sinal de H-3' apresentou correlação com o sinal C-5' no mapa de contornos HMBC.

4.1.4.2.2 Elucidação estrutural de **S02**

A partir do espectro no UV-Vis de **S02** (**Figura 42 - b**) foi possível observar banda de absorção máxima em 266 nm, sendo que na literatura (YUAN, J. et al., 2008) o valor descrito para a banda de absorção da timidina é $\lambda_{\text{máx.}}$ 267,4 nm.

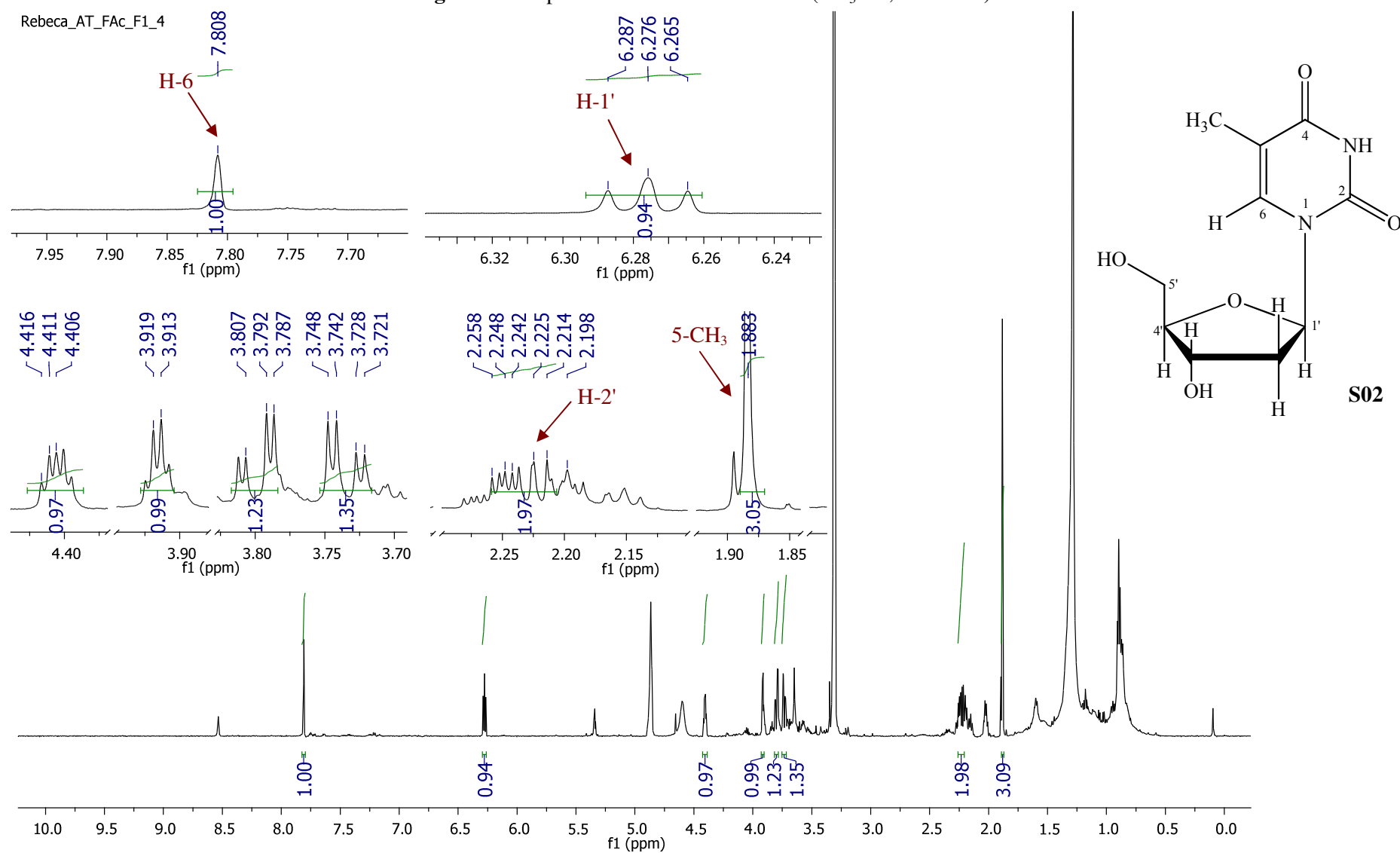
O espectro de RMN de ^1H de **S02** (**Figura 47**) apresentou algumas diferenças quando comparado ao espectro de RMN de ^1H de **S01**, como a presença de singletos em δ_{H} 7,81 (1H, H-6) e em δ_{H} 1,88 (3H, 5- CH_3) e de um multipeto em δ_{H} 2,22 (2H; H-2'). O último apresentou correlação no mapa de contornos COSY (**Figura 48**) com o multipeto em δ_{H} 4,41

(1H; H-3') e com o tripleto em δ_H 6,28 ($J_{2'-1'} = 6,6$ Hz; 1H; H-1'), indicando a presença de uma unidade de desoxirribose.

No mapa de contornos HSQC (**Figura 49**) foi possível verificar sinais de carbonos metínicos (representados em azul) em δ_C 138,0 (C-6), 88,4 (C-4'), 85,9 (C-1') e 71,8 (C-3'), sinais de carbono metilênicos (representado em vermelho) em δ_C 62,4 (C-5') e em δ_C 40,7 (C-2'), e ainda, um sinal de carbono metílico (também representado em azul) em δ_C 12,2 (5-CH₃).

No mapa de contornos HMBC (**Figura 50**) foram observadas as correlações do 5-CH₃ com os sinais de carbonos quaternários em δ_C 166,4 (C-4) e 111,5 (C-5) e, ainda, correlações que confirmaram a ligação da unidade de ribose à base nitrogenada, como aquelas entre os sinais de H-1' e os sinais em δ_C 152,2 (C-2) e 138,0 (C-6).

Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H de **S02** (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 48 - Mapa de contornos COSY de **S02** (CD₃OD; 600 MHz)

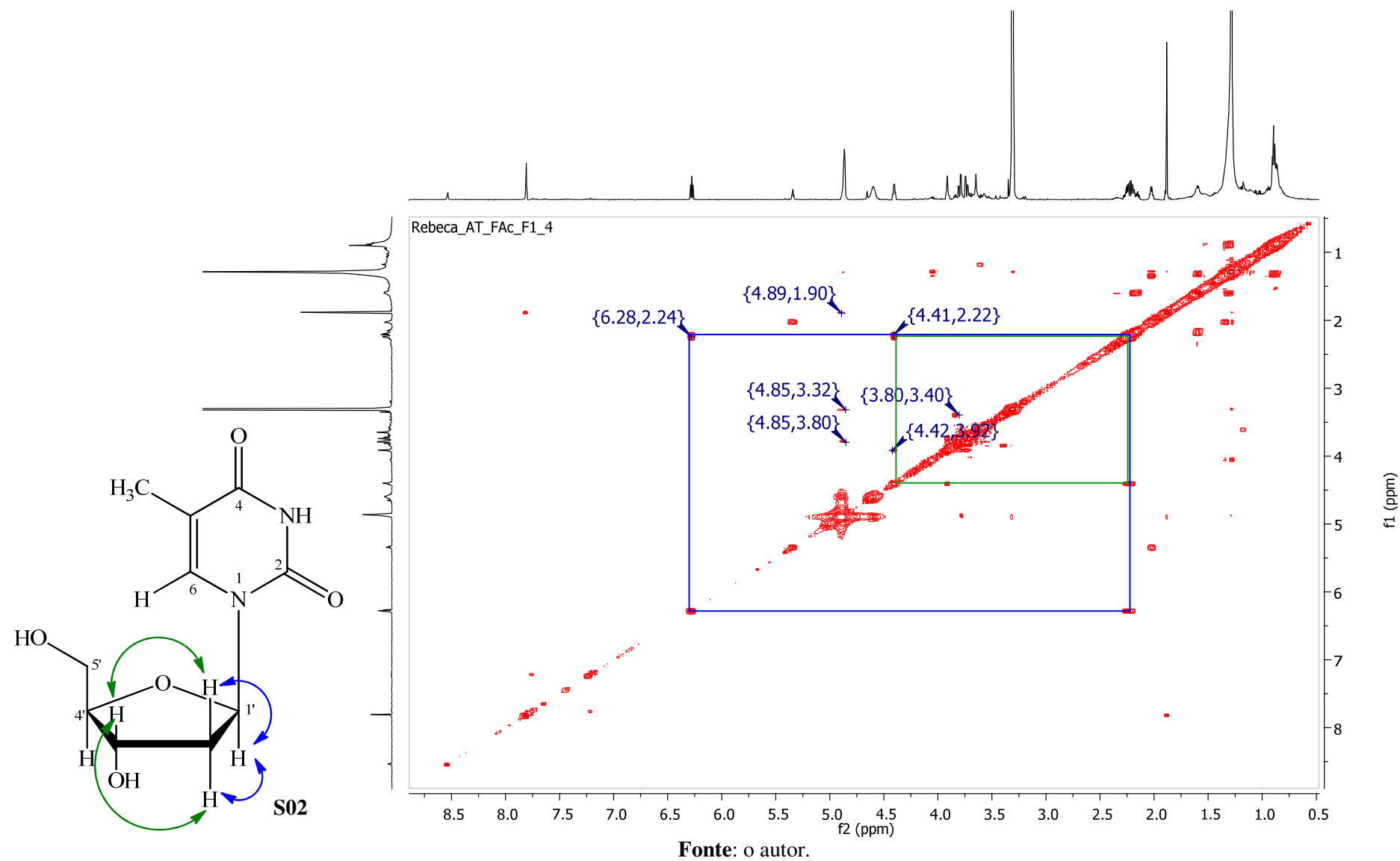
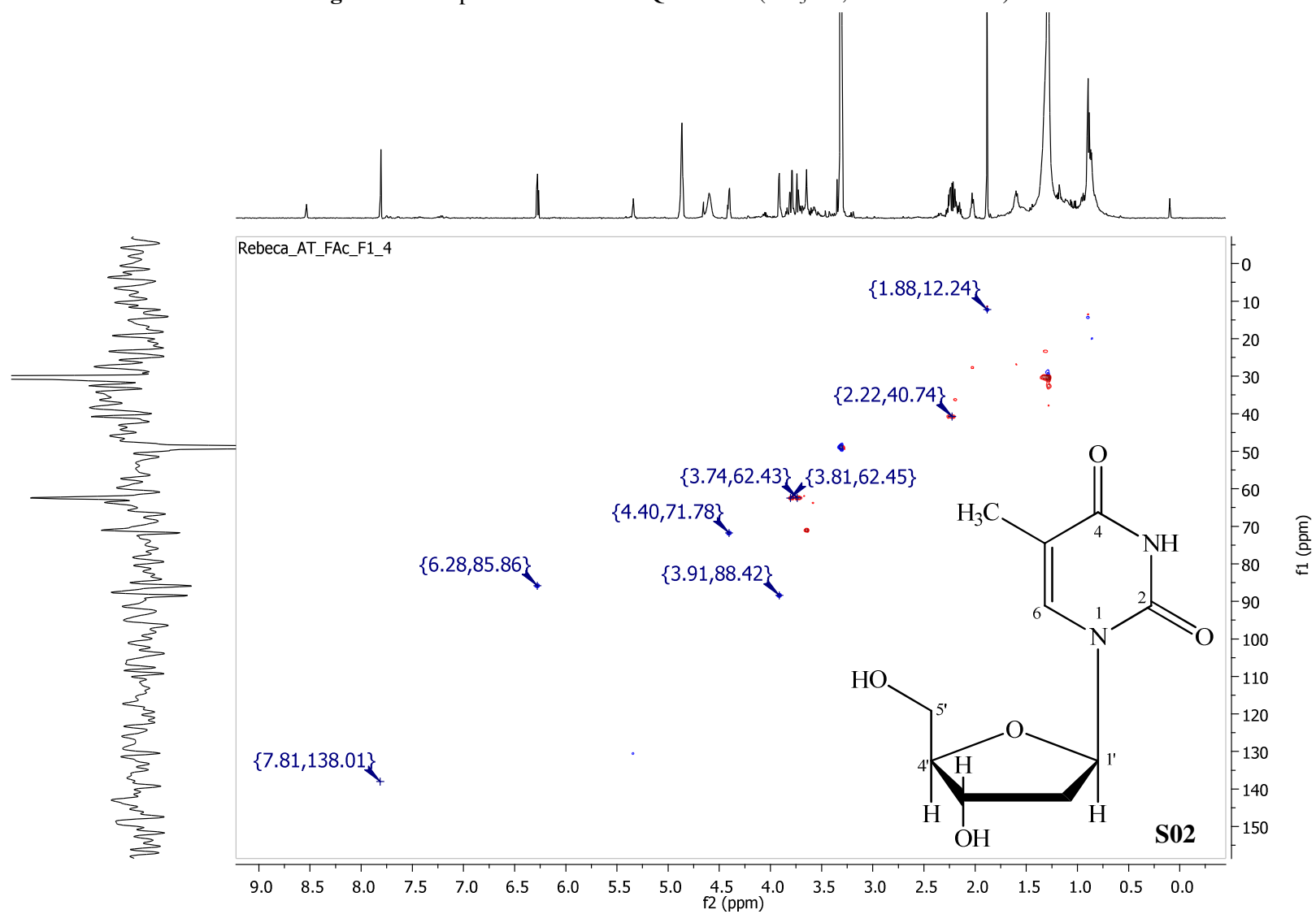


Figura 49 - Mapa de contornos HSQC de **S02** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

Fonte: o autor.

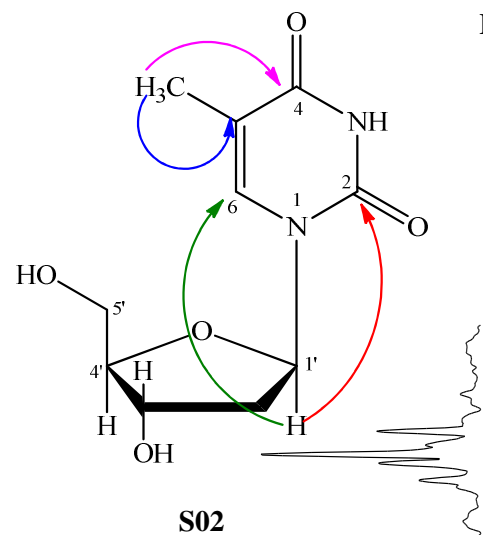
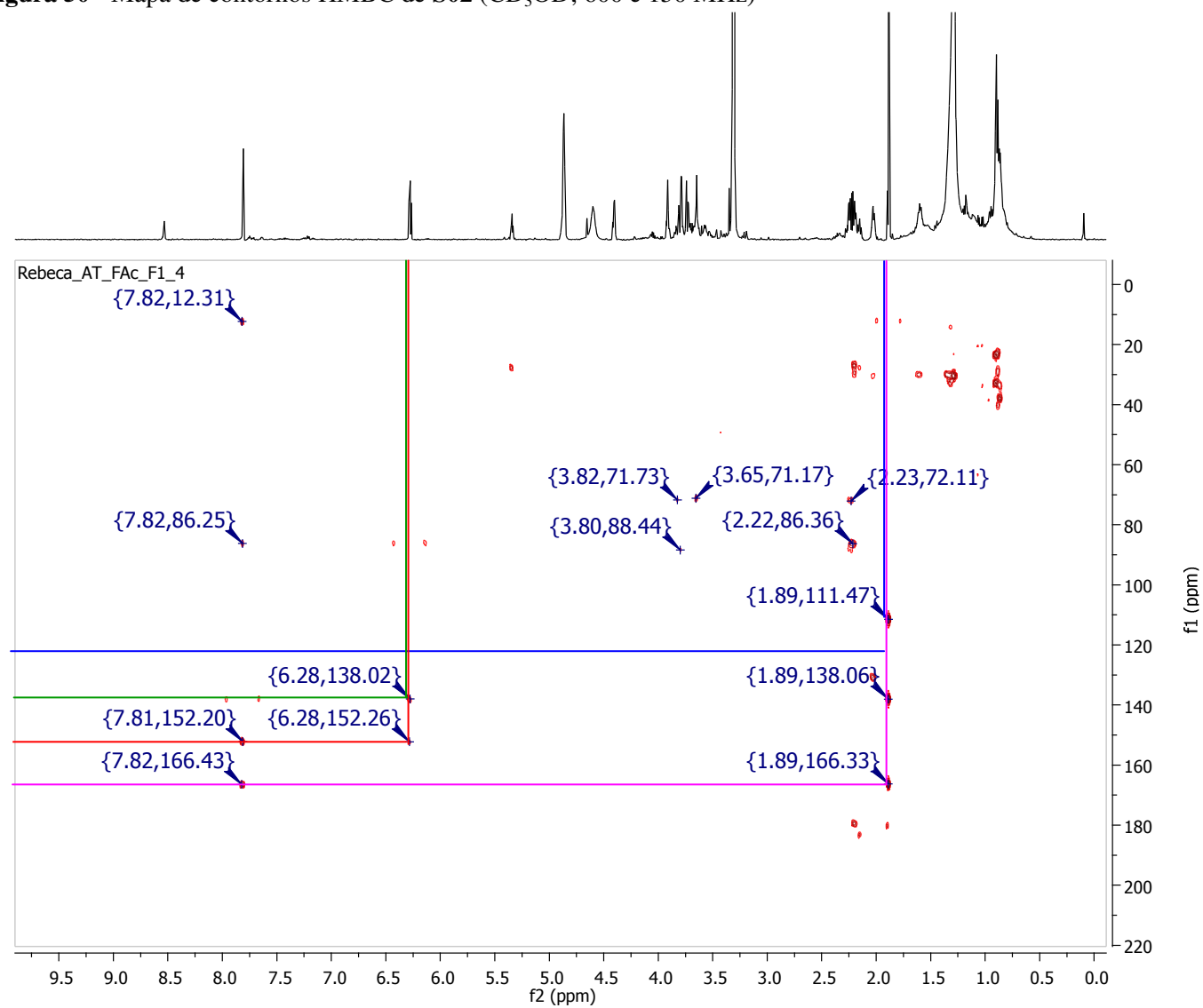


Figura 50 - Mapa de contornos HMBC de **S02** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados espectrais de **S02** e da timidina (GATLIN; DAVIS, 1962; JONES et al., 1970) estão descritos na **Tabela 31**.

Tabela 31 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S02** e para a timidina.

S02^a			Timidina	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)^b	δ_{C}^c
2	-	152,2	-	151,1
4	-	166,4	-	164,4
5	-	111,5	-	110,1
6	7,81 (s)	138,0	8,07	136,9
1'	6,28 (t; 6,6)	85,9	6,55	84,7
2'	2,22 (m)	40,7	2,46	40,0
3'	4,41 (m)	71,8	4,66	71,8
4'	3,91 (m)	88,4	4,16	88,0
5'	3,73 (dd; 3,0; 12,0)	62,4	4,06	62,0
	3,84 (dd; 3,0; 12,0)			
5-CH ₃	1,88 (s)	12,2	2,14	12,9

^a δ -ppm; 600 e 125 MHz; CD₃OD; ^b δ -ppm; 60 MHz; DMSO-*d*₆ (GATLIN; DAVIS, 1962); ^c δ -ppm; 15,1 MHz; DMSO-*d*₆ (JONES et al., 1970)

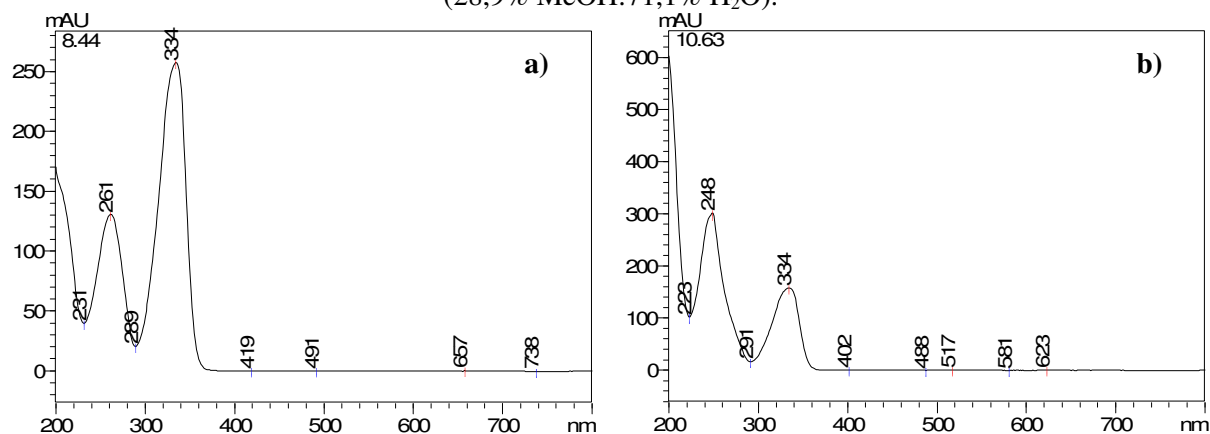
Fonte: o autor.

4.1.4.3 Estudo da fração PS-FHm

Após a análise do perfil químico obtido por CLAE-DAD da fração PS-FHm, a mesma foi submetida a um fracionamento em coluna de C-18, utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O, obtendo-se 3 novas frações.

A partir da análise dos perfis químicos obtidos para estas novas frações, a fração PS-FHm-F1 foi selecionada para purificação por CLAE-DAD preparativa, obtendo-se, novamente a substância **S01** e a substância **S03**. Seus espectros no UV-Vis estão apresentados na **Figura 51** e, é possível verificar a presença de uma banda em 334 nm, indicando que as substâncias se encontram em mistura, já que no espectro no UV-Vis da substância **S01** isolada da fração AT-FAc-F1, não existia tal banda.

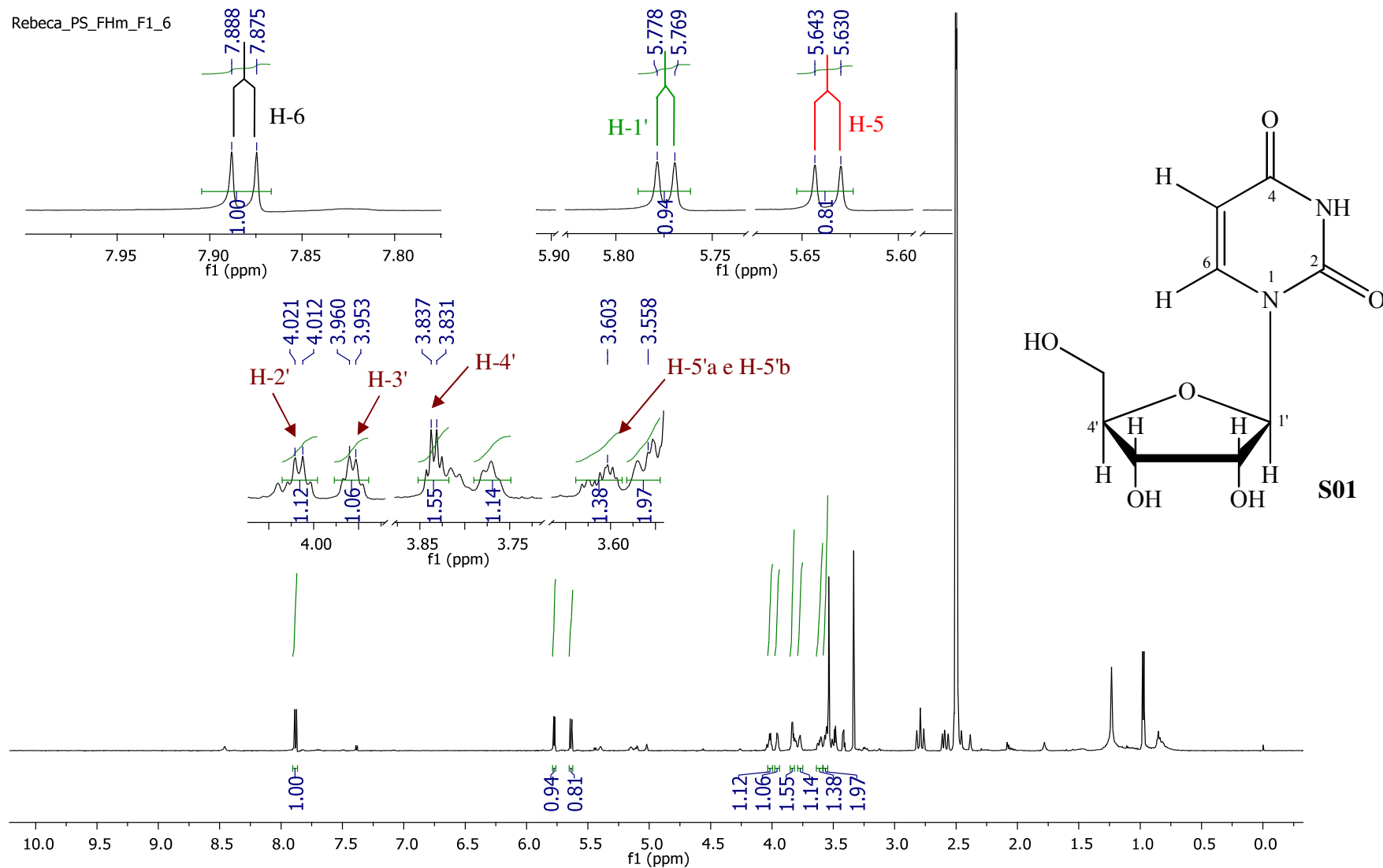
Figura 51 - Espectros no UV-Vis das substâncias: **a) S01** (23,9% MeOH:76,1% H₂O) e **b) S03** (28,9% MeOH:71,1% H₂O).



Fonte: o autor.

A **Figura 52** apresenta o espectro de RMN de ¹H da fração PS-FHm1-F1, no qual foi possível identificar sinais em δ_H 7,88 (d; $J_{6-5} = 7,8\text{Hz}$; 1H; H-6), 5,77 (d; $J_{1'-2'} = 5,4\text{ Hz}$; 1H; H-1') e 5,64 (d; $J_{5-6} = 7,8\text{ Hz}$; 1H; H-5), sendo que estes são característicos da uridina (**S01 - Tabela 30**) (YUAN, Z. et al., 2008; JONES et al., 1970).

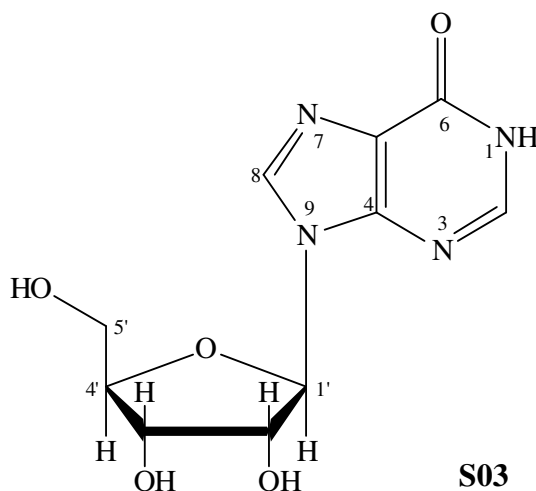
Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H da subfração PS-FHm-F1-6 e identificação de **S01** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)



Fonte: o autor.

4.1.4.3.1 Elucidação Estrutural de **S03**

As análises dos dados de RMN e comparações com dados da literatura (STOLARSKI; DUDYCZ; SHUGAR, 1980; JONES et al., 1970), bem como comparações com as substâncias anteriormente isoladas, permitiram a identificação da substância **S03** como outro nucleosídeo, a inosina.



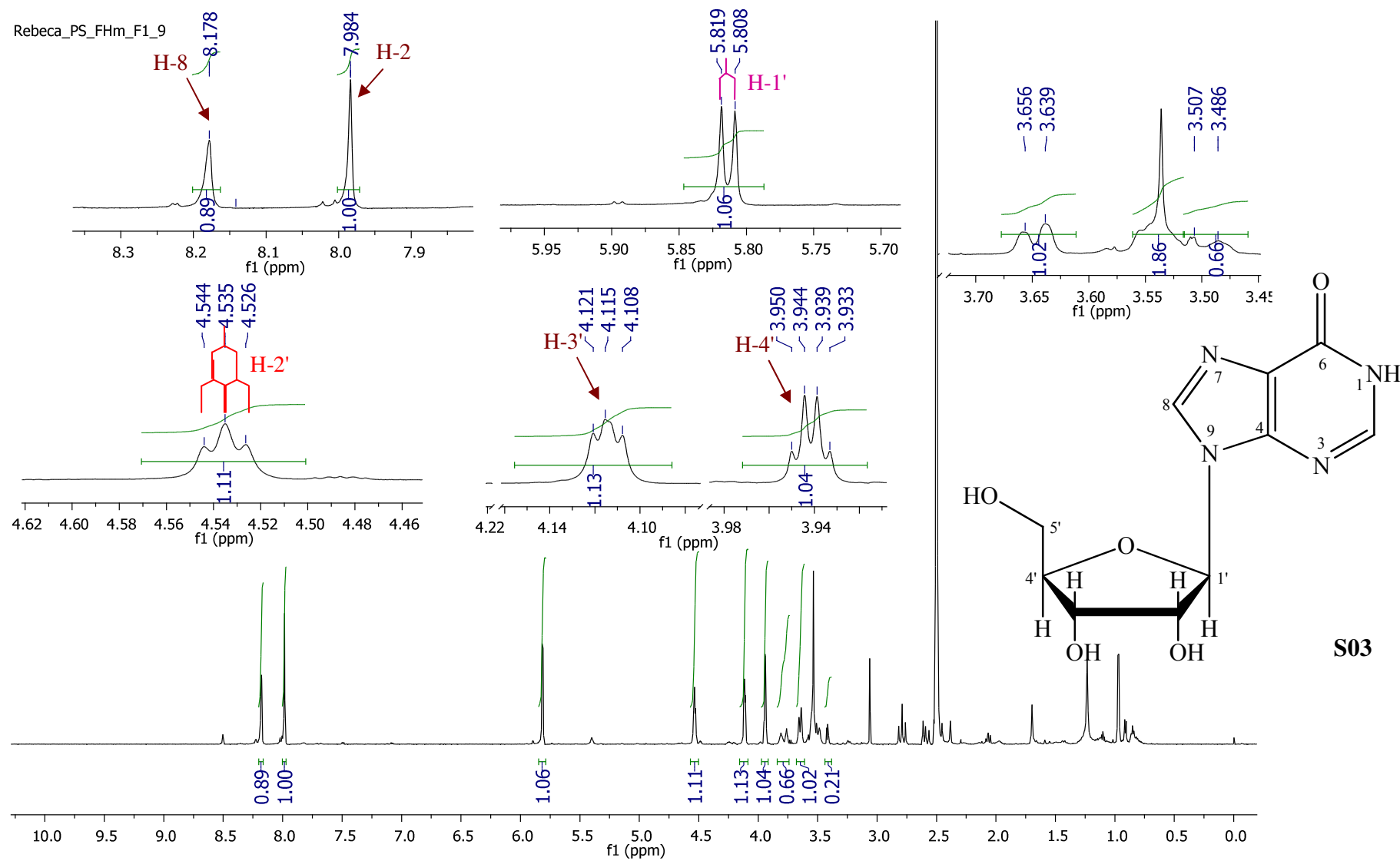
Seu espectro no UV-Vis apresentou a banda de absorção máxima em 248 nm que é característica da inosina ($\lambda_{\text{máx.}}$ 248,5 nm - YUAN, J. et al., 2008a).

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 53**) de **S03** apresentou singletos em δ_{H} 7,98 (1H) e em δ_{H} 8,18 (1H), que foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-8, respectivamente. Verificou-se também a presença de um dubleto em δ_{H} 5,81 ($J_{1'-2'} = 6,6$ Hz; 1H), referente ao hidrogênio 1' da unidade de ribose, que foi confirmada pelo mapa de contornos COSY (**Figura 54**), já que foram observadas correlações entre os hidrogênios H-1' e H-2' (δ_{H} 4,54; tl; 1H), H-2' e H-3' (δ_{H} 4,12; tl; 1H), e entre H-4' (δ_{H} 3,94; dd; $J_{4'-3'} = 3,6$ e $J_{4'-5'} = 6,6$ Hz; 1H), e H-5'a (δ_{H} 3,65; m; 1H), e H-5'b (δ_{H} 3,55; m; 1H).

No mapa de contornos HSQC (**Figura 55**) foi possível verificar sinais de carbonos metínicos (representados em azul) em δ_{C} 146,7 (C-2), 137,6 (C-8), 87,5 (C-1'), 85,6 (C-4'), 73,7 (C-2') e 70,3 (C-3') e um sinal de carbono metilênico (representado em vermelho) em δ_{C} 61,3 (C-5').

No mapa de contornos HMBC (**Figura 56**) foram observadas as correlações entre H-2 e os sinais de carbonos quaternários em δ_{C} 148,5 e 158,2, referentes a C-4 e C-6, respectivamente, e correlações entre H-8 e C-4 e com o sinal em δ_{C} 124,8, atribuído ao C-5, confirmando que a base nitrogenada deste nucleosídeo é a timina. Já a ligação desta base com a unidade glicosídica foi confirmada através das correlações de H-1' com C-4 e C-8.

Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de **S03** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 54 - Mapa de contornos COSY da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de **S03** (DMSO- d_6 ; 600 MHz)

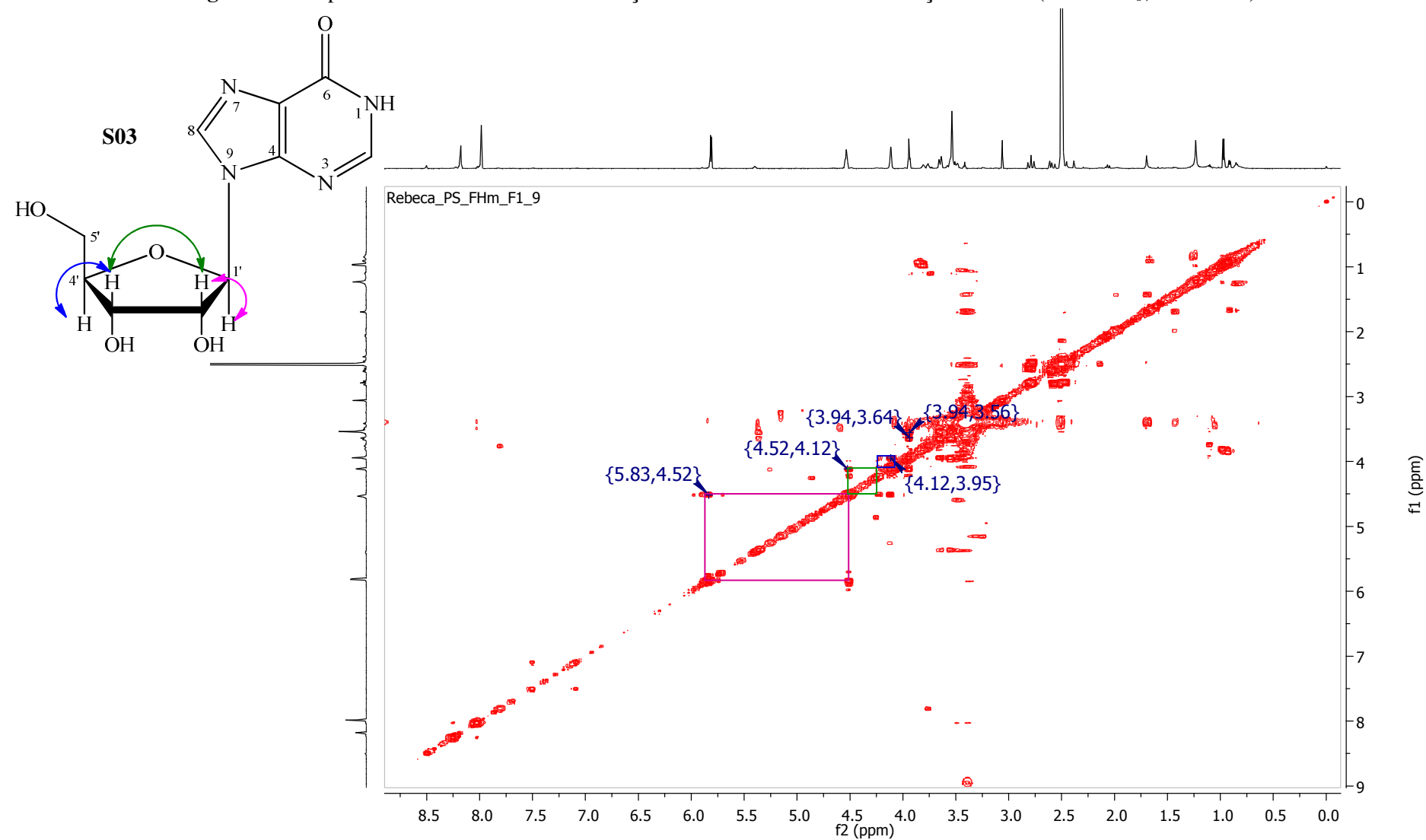


Figura 55 - Mapa de contornos HSQC da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de **S03** (DMSO- d_6 ; 600 MHz)

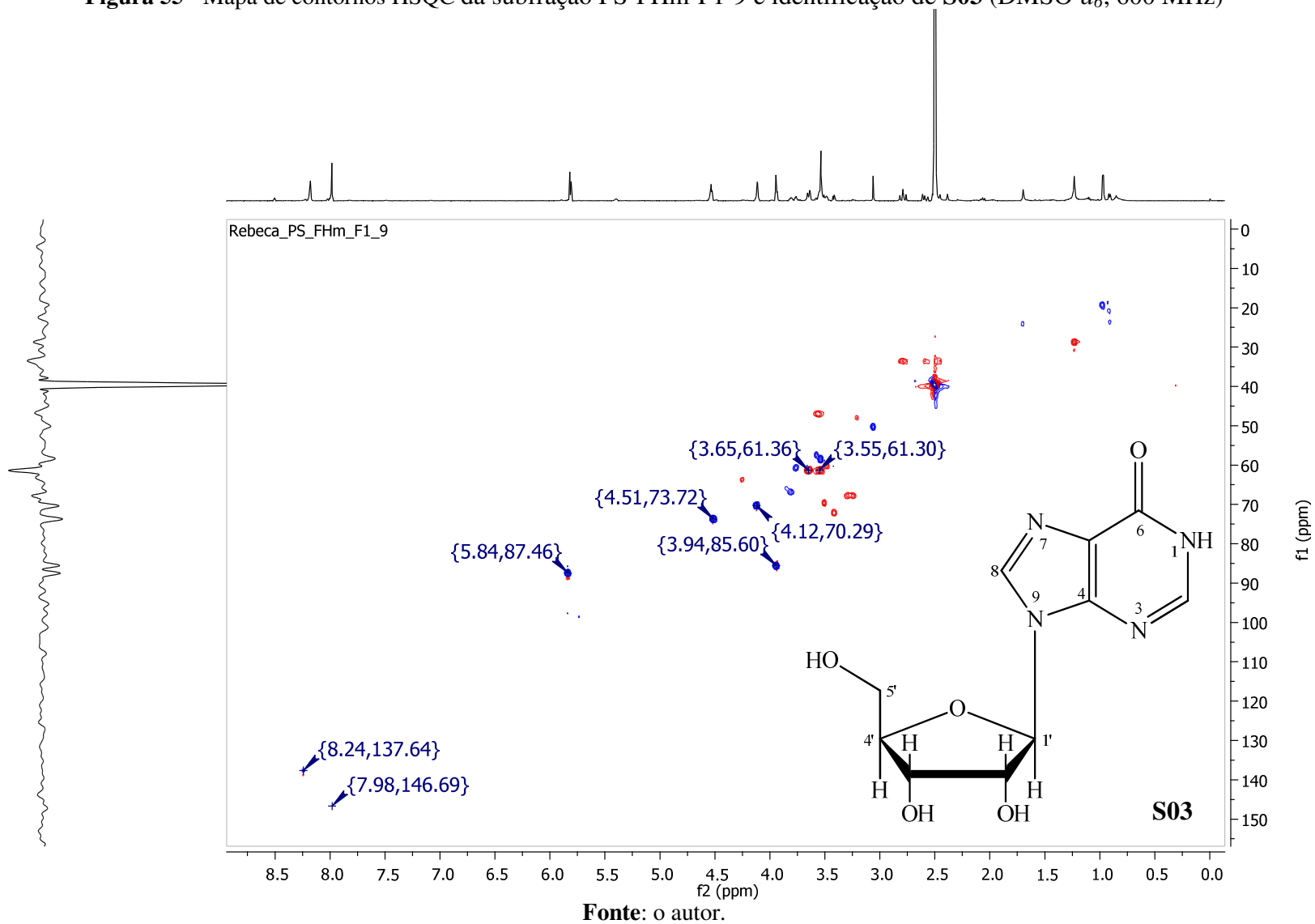
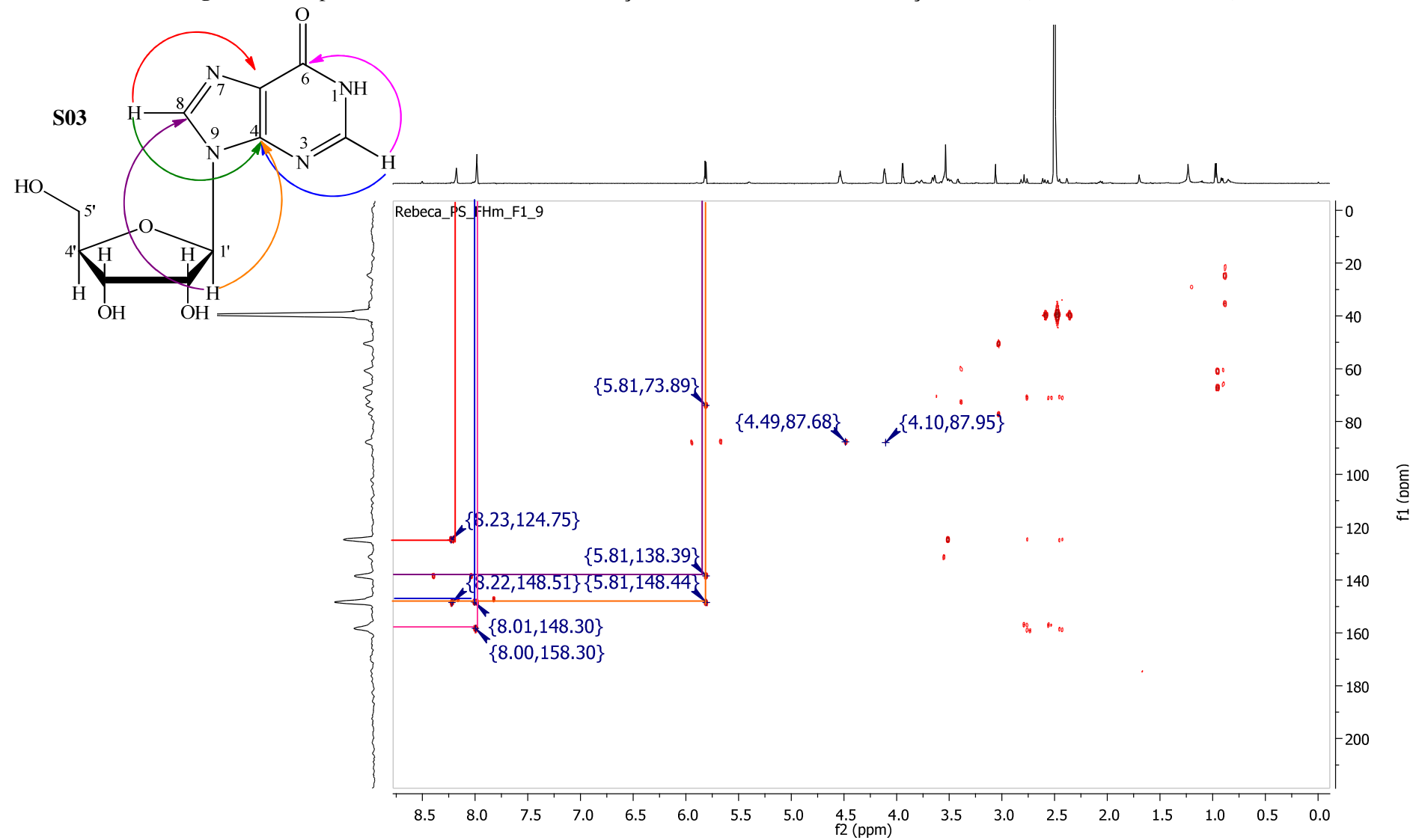


Figura 56 - Mapa de contornos HMBC da subfração PS-FHm-F1-9 e identificação de **S03** (DMSO- d_6 ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados espectrais da substância **S03** e sua comparação com a inosina (STOLARSKI; DUDYCZ; SHUGAR, 1980; JONES et al., 1970) estão descritos na **Tabela 32**.

Tabela 32 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S03** e para a inosina.

S03^a			Inosina	
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)^b	δ_{C}^c
2	7,98 (s)	146,7	8,05 (s)	148,7
4	-	148,5	-	146,5
5	-	124,8	-	125,0
6	-	158,2	-	157,2
8	8,18 (s)	137,6	8,31	139,4
1'	5,81 (d; 6,6)	87,5	5,88 (5,7)	88,4
2'	4,54 (tl)	73,7	4,49 (5,0)	70,9
3'	4,12 (tl)	70,3	4,14 (3,3)	74,8
4'	3,94 (dd; 3,6; 6,6)	85,6	3,86 (3,3; 4,0)	86,3
5'	3,65 (m)	61,3	3,61 (12,0)	61,9
	3,55 (m)		3,53 (12,0)	

^a δ -ppm; 600 e 125 MHz; DMSO- d_6 ; ^b δ -ppm; DMSO- d_6 (STOLARSKI, 1980); ^c δ -ppm; 15,1 MHz; DMSO- d_6 (JONES, 1970).

Fonte: o autor.

Assim como em **S01**, os sinais de carbono para C-2' e C-3' descritos na literatura estão invertidos quando comparados com os valores observados para **S03**. Provavelmente a atribuição dos sinais ficou comprometida, uma vez que foi utilizado um equipamento pouco sensível (15,1 MHz para ^{13}C) quando comparado com o equipamento utilizado para obtenção dos espectros de **S01** e **S03** (150 MHz para ^{13}C).

Os nucleosídeos e nucleotídeos já foram isolados e/ou identificados em algas, principalmente em algas pardas (CAO et al., 2014) e em algumas algas vermelhas, como *Gymnogongrus flabelliformis* Harv. (YUAN, Z. et al., 2008) e *Pyropia perforata* (SU; HASSID, 1962).

Os nucleosídeos e seus análogos possuem diversas atividades biológicas, como anticancerígena, anti-agregação plaquetária e antioxidante, além de desempenharem funções de regulação e modulação de processos fisiológicos em nosso organismo (CAO et al., 2014; IYÚ et al., 2011; SENANAYAKE; WARREN; VINOGRADOV, 2011; SPANOU et al.,

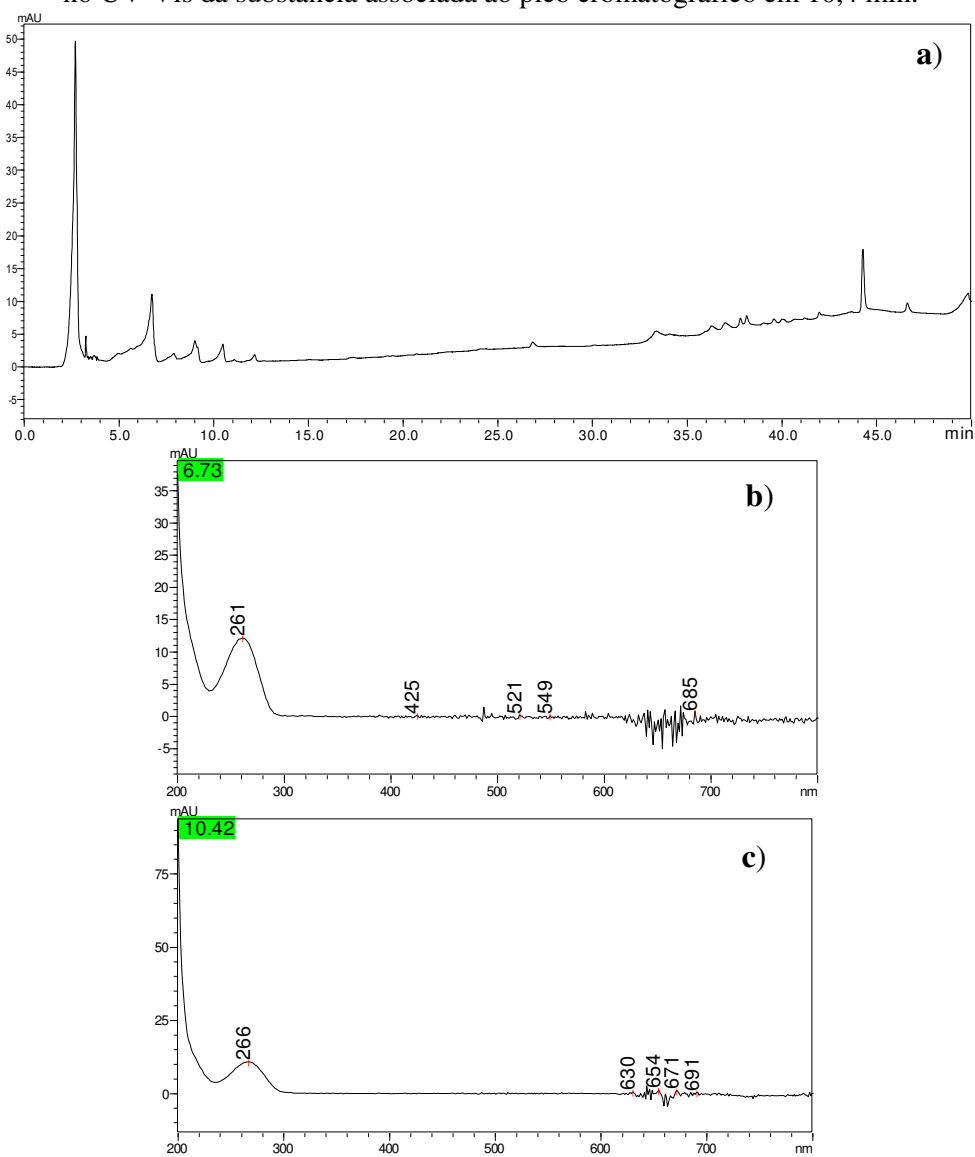
2007). Chen, T. et al. (2000) revelaram, ainda, que a ingestão da mistura nucleosídeo-nucleotídeo pode prevenir a perda de memória.

4.1.4.4 Estudo das demais frações

As demais frações (AT-FBu; AT-FHm, PS-FAc e PS-FBu) não foram estudadas mais detalhadamente como as frações AT-FAc e PS-FHm, pois as análises dos seus cromatogramas indicaram a presença de nucleosídeos, como podemos observar a seguir.

A **Figura 57** mostra o cromatograma em gradiente exploratório da fração AT-FBu e os espectros no UV-Vis das substâncias associadas aos picos cromatográficos em 6,7 e 10,4 min., evidenciando a semelhança com os espectros no UV-Vis das substâncias **S01** e **S02** (uridina e timidina, respectivamente).

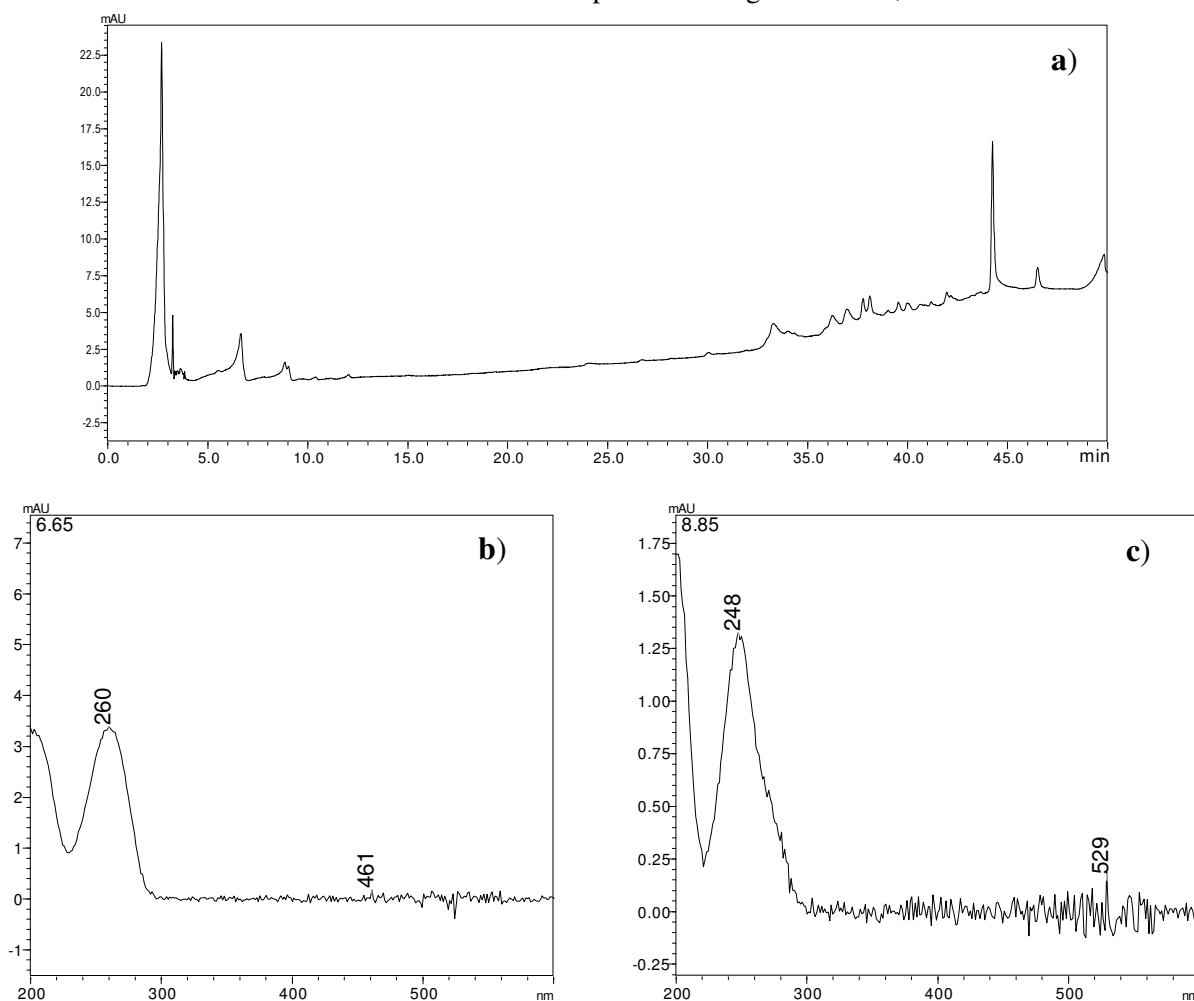
Figura 57 - a) Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **AT-FBu** (254 nm); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,7 min; c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 10,4 min.



Fonte: o autor.

A **Figura 58** mostra o cromatograma em gradiente exploratório da fração AT-FHm e os espectros no UV-Vis das substâncias associadas aos picos cromatográficos em 6,7 e 8,9 min., sendo que é possível observar a semelhança com os espectros no UV-Vis das substâncias **S01** e **S03** (uridina e inosina, respectivamente).

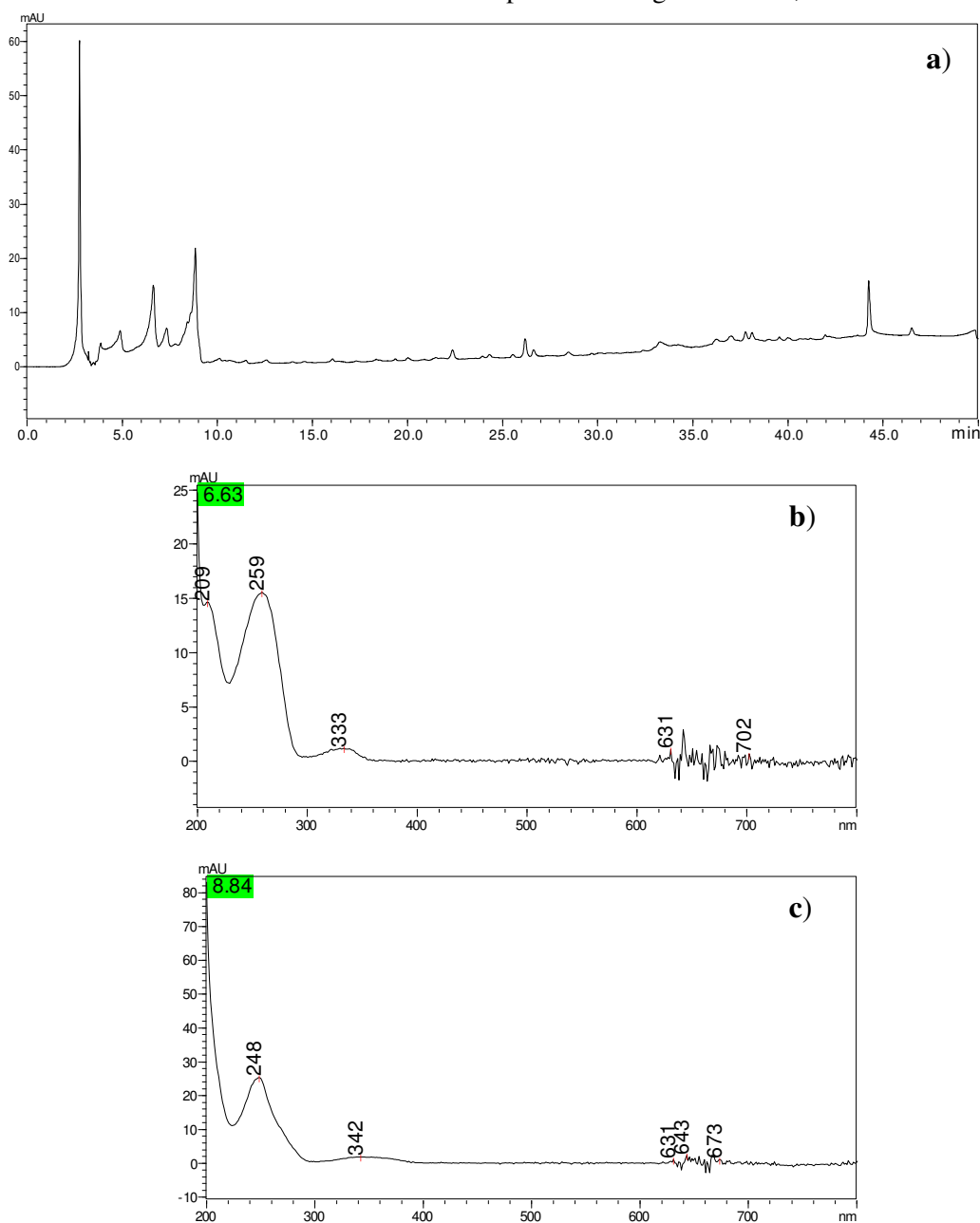
Figura 58 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **AT-FHm** (254 nm); **b)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,7 min; **c)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 8,9 min.



Fonte: o autor.

A partir do cromatograma da fração PS-FAc foi possível verificar um pico cromatográfico em 6,6 min. e que apresentou uma banda de absorção máxima no espectro no UV-Vis em 259 nm (**Figura 59**) que, de acordo com Yuan, J. et al. (2008), é característica tanto da uracila ($\lambda_{\text{máx.}}$ 259,1 nm) como da adenosina (259,1 nm). Já a substância associada ao pico cromatográfico em 8,8 min. apresentou um espectro no UV-Vis semelhante a substância **S03** (inosina).

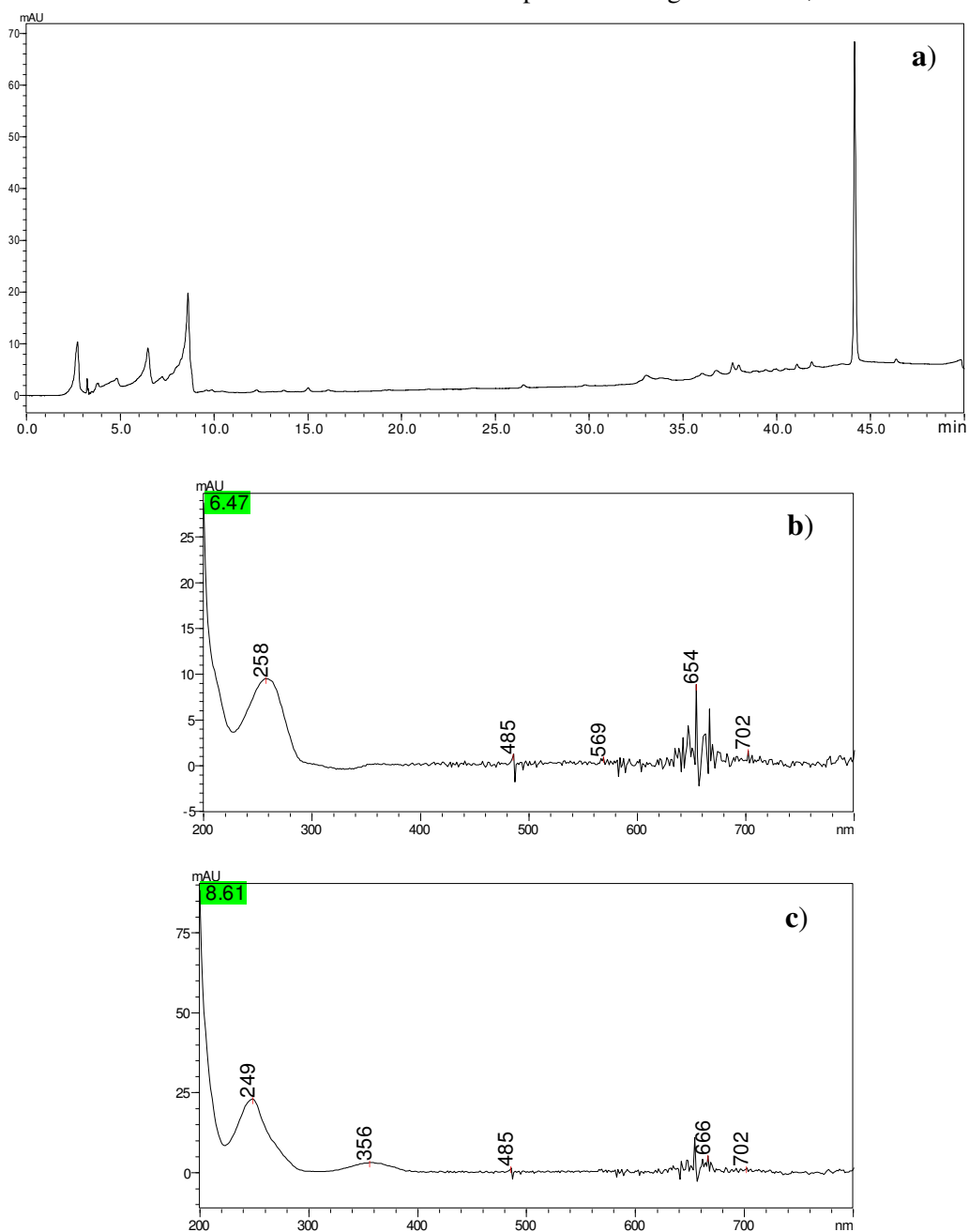
Figura 59 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **PS-FAc** (254 nm); **b)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,6 min; **c)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 8,8 min.



Fonte: o autor.

A **Figura 60** apresenta o cromatograma em gradiente exploratório da fração PS-FBu e os espectros no UV-Vis das substâncias associadas aos picos cromatográficos em 6,5 e 8,6 min., sendo que é possível verificar as semelhanças com os espectros no UV-Vis obtidos para as substâncias associadas aos picos cromatográficos da fração PS-FAc e da substância **S03**.

Figura 60 - Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) de **PS-FBu** (254 nm); **b)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico cromatográfico em 6,5 min; **c)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao do pico cromatográfico em 8,6 min.



Fonte: o autor.

4.1.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das algas *A. taxiformis* e *P. spiralis*

4.1.5.1 Atividades antifúngica e anticolinesterásica

A **Tabela 33** mostra os resultados obtidos para a atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações das algas *A. taxiformis* e *P. spiralis*. Podemos observar que apenas a fração AT-FAc apresentou fraca atividade antifúngica, enquanto a fração PS-FH apresentou fraca atividade anticolinesterásica.

Tabela 33 - Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações de *A. taxiformis* e *P. spiralis*^a.

Amostra	Atividade antifúngica		Atividade anticolinesterásica	
	Atividade	Rf	Atividade	Rf
AT-EB	-	-	-	-
AT-FH	-	-	-	-
AT-FAc	-	-	-	-
AT-FBu	-	-	-	-
AT-FHm	-	-	-	-
PS- EB	-	-	-	-
PS- FH	-	-	*	0,28
PS-FAc	*	0,95	-	-
PS- FBu	-	-	-	-
PS-FHm	-	-	-	-
Padrão	***	Origem	***	0,80

^a os valores indicam os fatores de retenção em CCD; *atividade fraca/ **atividade moderada/ ***atividade forte

Fonte: o autor.

4.1.5.2 Potencial citotóxico

O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos e frações das algas foi realizado pelo método do MTT contra três linhagens de células tumorais: OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano) e SF-295 (glioblastoma - humano).

O método do MTT é um método rápido, sensível, barato e tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE, 1996).

A **Tabela 34** apresenta os resultados obtidos para as amostras testadas. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico: amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%) (ALMEIDA, 2014).

Tabela 34 - Potencial citotóxico dos extratos brutos e frações de *A. taxiformis* e *P. spiralis*.

Amostra	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	GI% (média)	SD (%)	GI% (média)	SD (%)	GI% (média)	SD (%)
AT-EB	2,3	1,38	15,2	7,84	37,4	2,28
AT-FH	6,7	17,98	51,2	17,01	52,9	19,02
AT-FAc	47,4	25,79	34,7	18,27	47,3	10,77
AT-FBu	19,6	30,42	31,5	13,35	62,9	3,50
AT-FHm	9,9	42,80	4,4	8,17	48,0	1,03
PS- EB	31,5	15,83	45,3	10,70	46,4	13,10
PS- FH	13,5	5,60	47,1	1,40	59,8	8,30
PS-FAc	5,8	26,07	18,5	3,45	44,5	0,28
PS- FBu	16,2	4,36	45,1	10,10	70,7	2,52
PS-FHm	43,4	14,38	15,5	16,08	55,9	18,42

Fonte: o autor.

Sendo assim, os extratos e frações de *A. taxiformis* e *P. spiralis* apresentaram atividade citotóxica de moderada a fraca. Os melhores resultados foram obtidos para as frações AT-FH, AT-FBu, PS-FH e PS-FBu, que apresentaram atividade moderada frente à linhagem de glioblastoma humano, sendo que a porcentagem de inibição da PS-FBu foi de 70,7%.

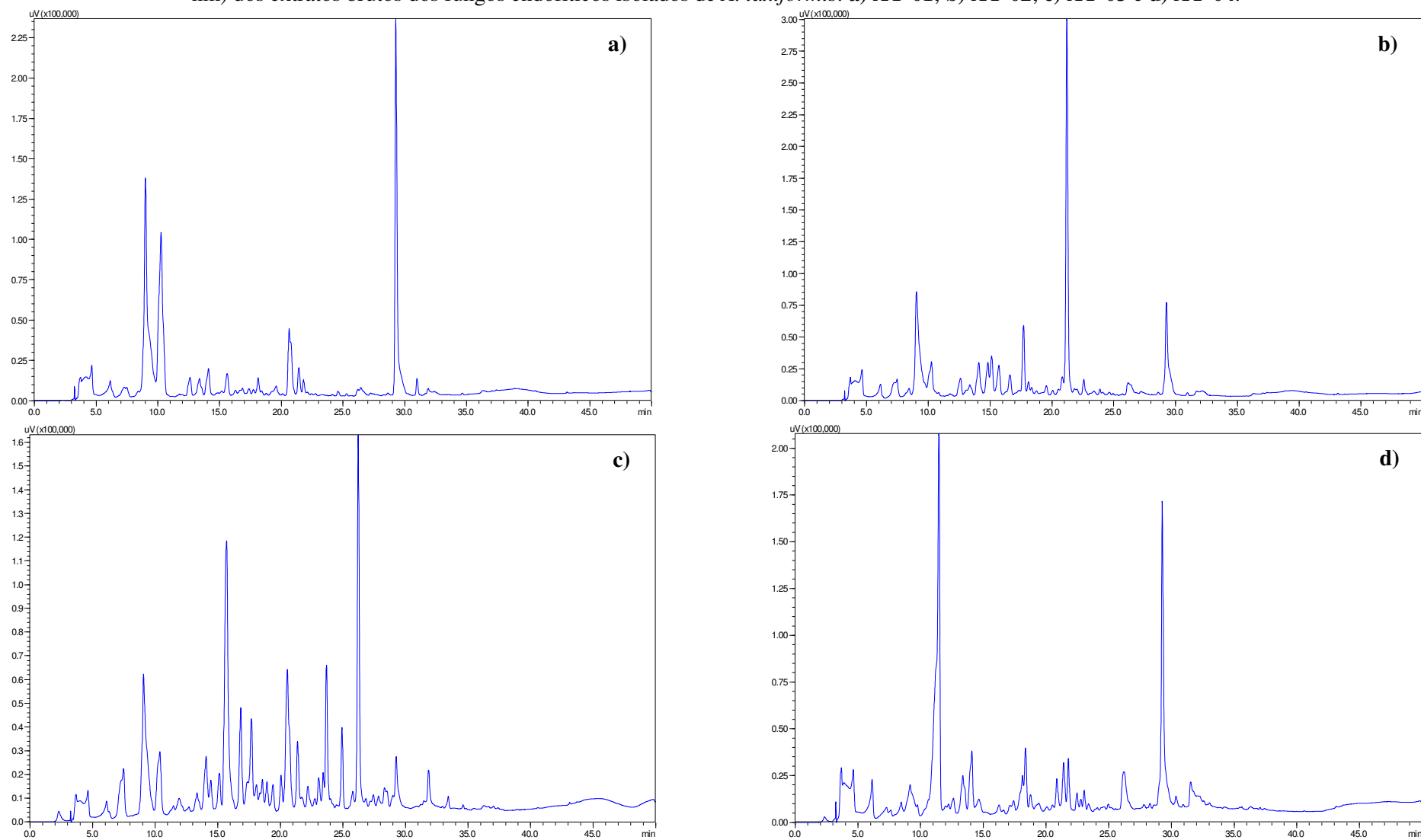
4.2 ESTUDO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS ALGAS *A. taxiformis* E *P. spiralis*

Como descrito na seção 3.2.2.1, foi possível isolar 7 linhagens de fungos endofíticos (AT-01 – AT-07) da alga *A. taxiformis* e 3 linhagens (PS-01 – PS-03) da alga *P. spiralis*. Os extratos brutos obtidos a partir do crescimento dessas linhagens em meio líquido foram avaliados quanto ao seus perfis químicos e biológicos.

4.2.1 Avaliação dos perfis químicos dos extratos brutos dos fungos endofíticos de *A. taxiformis* e *P. spiralis*

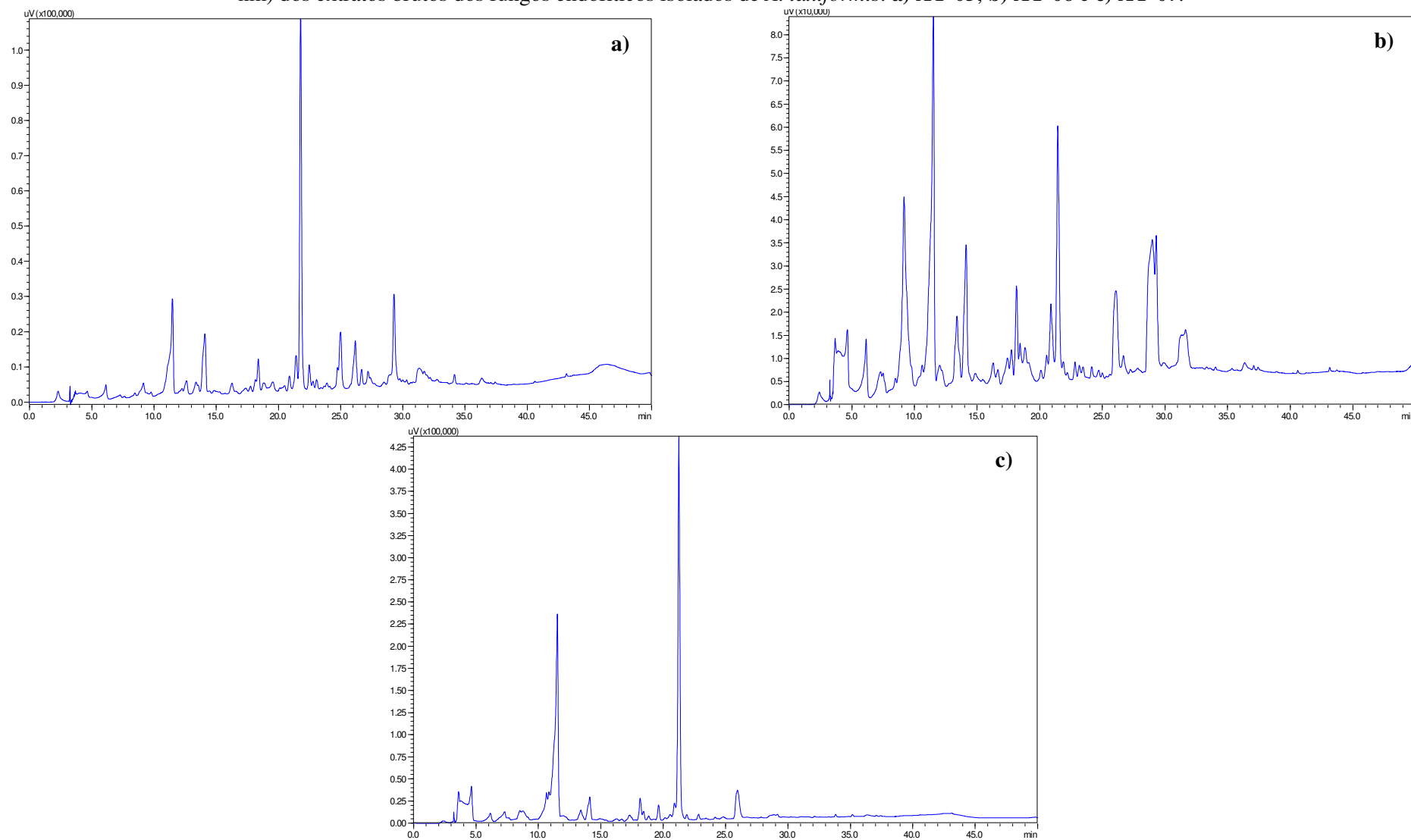
Os perfis químicos, obtidos por CLAE-DAD, dos extratos dos fungos endofíticos de *A. taxiformis* estão apresentados nas **Figuras 61 e 62** e dos fungos endofíticos de *P. spiralis* na **Figura 63**. Vale destacar os perfis dos extratos dos fungos AT-03 (**Figura 61 - c**) e AT-06 (**Figura 62 - b**), que apresentaram um número maior de picos intensos, enquanto os demais apresentaram poucos picos intensos, como é o caso do perfil químico dos fungos AT-05 (**Figura 62 - a**), PS-01, PS-02 e PS-03 (**Figura 63 - a, b e c**). A presença de poucos picos intensos pode estar relacionado a pouca massa obtida dos extratos, já que se trata de uma produção em escala reduzida, ou ainda, ser uma característica da produção metabólica do fungo.

Figura 61 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *A. taxiformis*: **a) AT-01; b) AT-02; c) AT-03 e d) AT-04.**



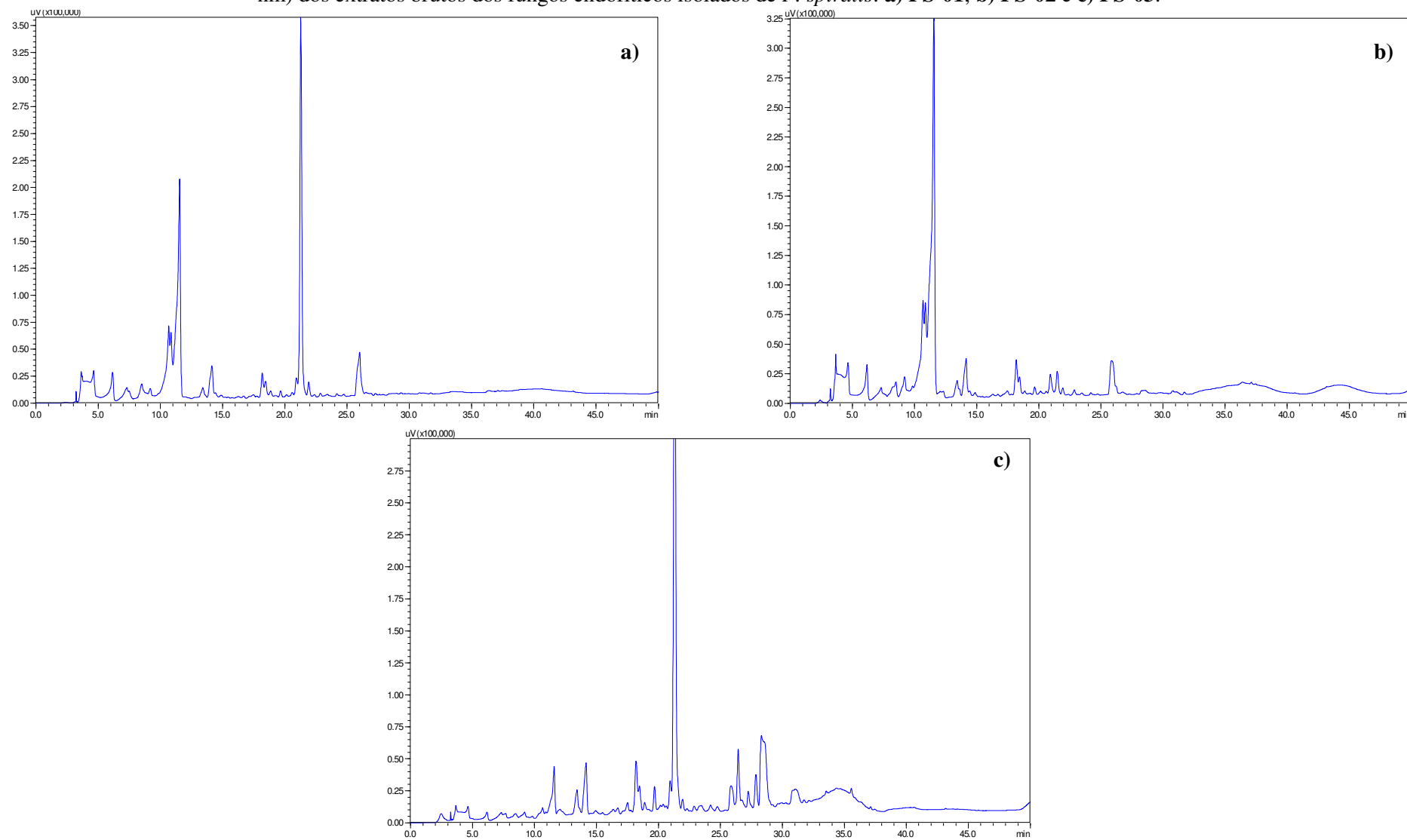
Fonte: o autor.

Figura 62 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *A. taxiformis*: **a) AT-05; b) AT-06 e c) AT-07.**



Fonte: o autor.

Figura 63 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *P. spiralis*: a) PS-01; b) PS-02 e c) PS-03.



Fonte: o autor.

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H dos extratos dos fungos (**Figura 64, 65 e 66**) é possível verificar a presença de sinais na região entre 6 e 8 ppm em todos os espectros, assim como a presença de sinais na região de hidrogênios metílicos (entre 0,8 a 1,5 ppm).

Além disso, o espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de AT-01 (**Figura 64**) mostrou a presença do ácido 3-nitropropiónico (**S04**) como constituinte majoritário. Esta substância apresenta sinais característicos em δ_{H} 2,88 (*t*, $J_{2-3} = 6,0$ Hz; H-2) e δ_{H} 4,70 (*t*, $J_{3-2} = 6,0$ Hz; H-3) (FLORES et al., 2013) e é encontrada em diversos fungos endofíticos de plantas (CHOMCHEON et al., 2005), enquanto de fungos de origem marinha, já foi isolada de *Humicola fuscoatra*, associado a uma colônia de ascídias coletadas no arquipélago de Kuril (SMETANINA et al., 2004). E ainda, estudos mostraram que este composto apresenta atividade antibacteriana (FLORES et al., 2013; CHOMCHEON et al., 2005; SMETANINA et al., 2004).

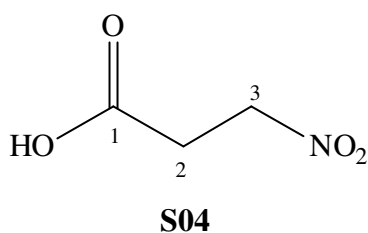
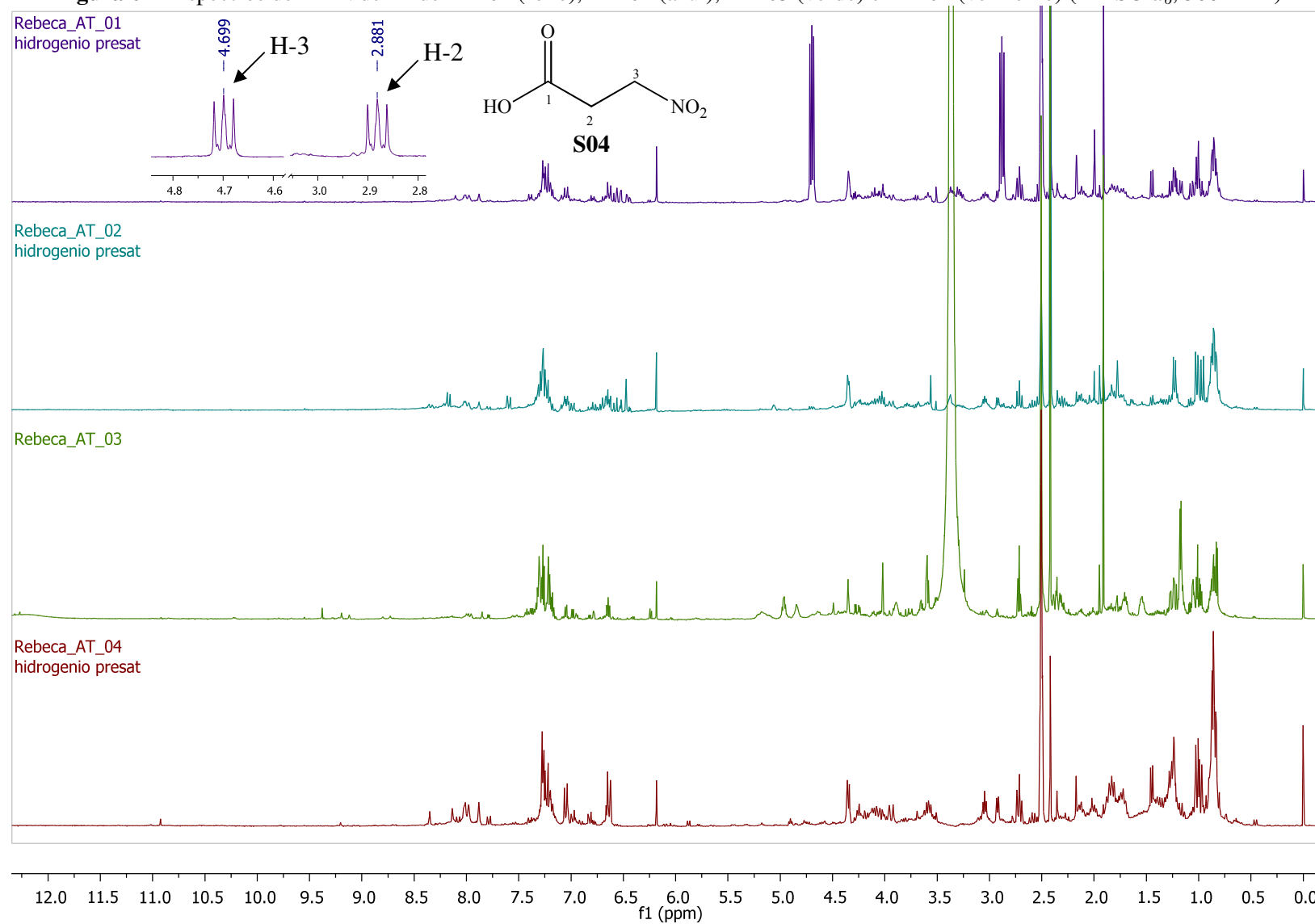
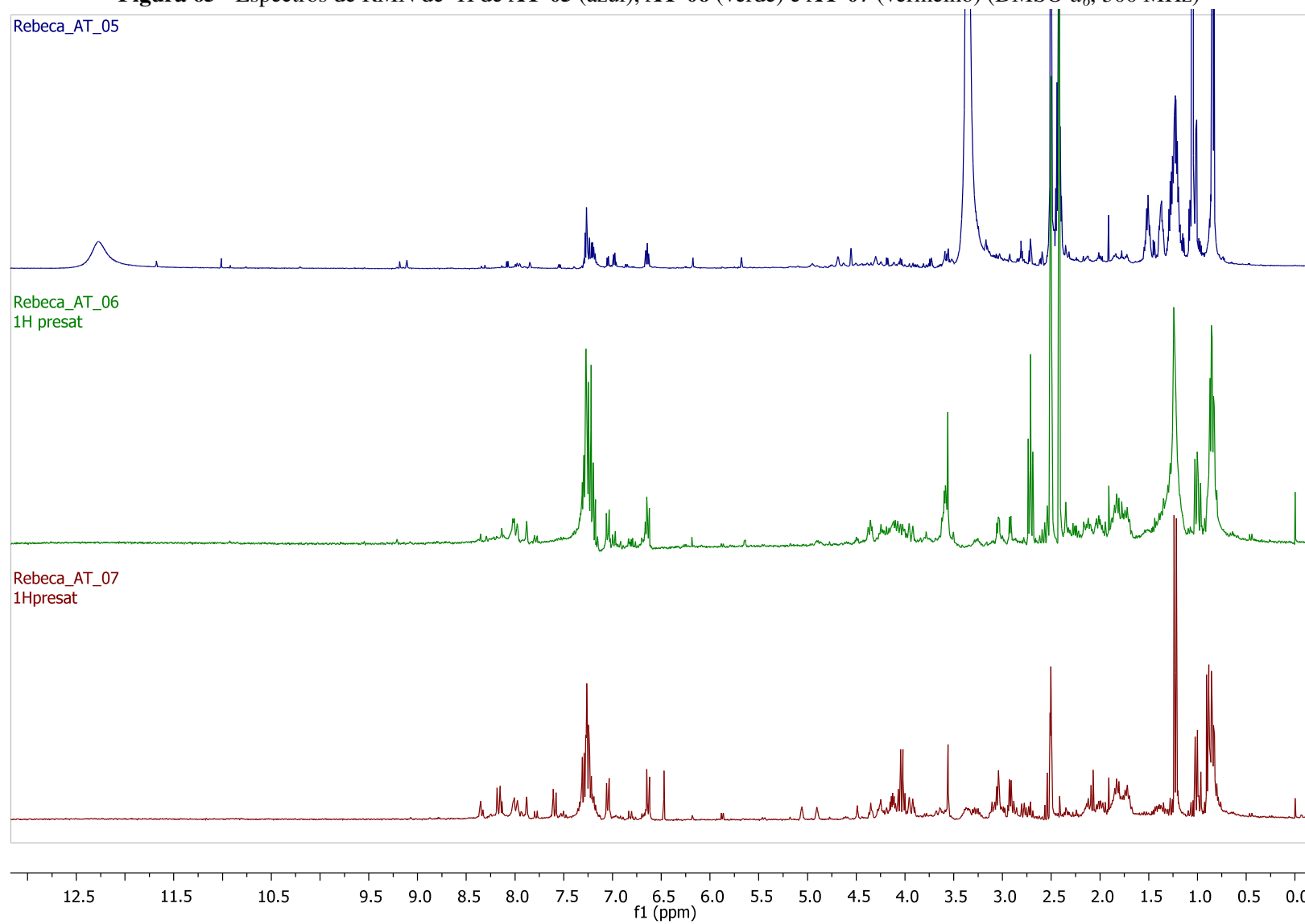


Figura 64 - Espectros de RMN de ^1H de **AT-01** (roxo), **AT-02** (azul), **AT-03** (verde) e **AT-04** (vermelho) ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz)



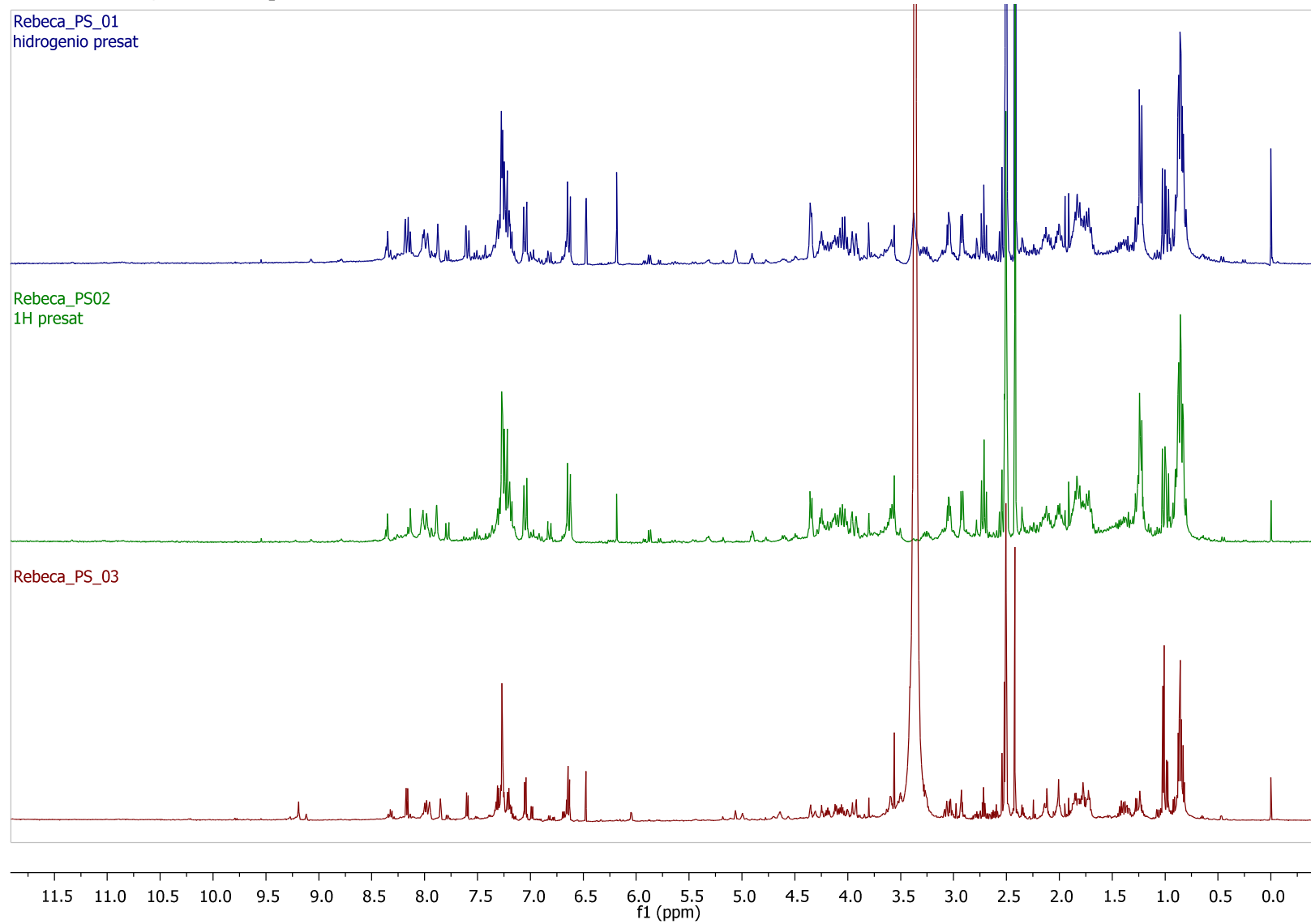
Fonte: o autor.

Figura 65 - Espectros de RMN de ^1H de **AT-05** (azul), **AT-06** (verde) e **AT-07** (vermelho) ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 66 - Espectros de RMN de ^1H de **PS-01** (azul), **PS-02** (verde) e **PS-03** (vermelho) ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz)



Fonte: o autor.

4.2.2 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos dos fungos endofíticos de *A. taxiformis* e *P. spiralis*

4.2.2.1 Atividades antifúngica e anticolinesterásica

Os resultados das atividades antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos dos fungos endofíticos estão descritos na **Tabela 35**. Pode-se verificar que todos os extratos apresentaram potencial antifúngico frente ao fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*, sendo que os fungos AT-01, AT-07, PS-01, PS-02 e PS-03 mostraram forte atividade. No entanto, estes mesmos extratos não demonstraram resultados significativos para o ensaio anticolinesterásico, sendo que apenas o fungo AT-05 mostrou fraca atividade.

Tabela 35 - Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos dos fungos endofíticos de *A. taxiformis* e *P. spiralis*^a.

Amostra	Atividade antifúngica		Atividade anticolinesterásica	
	Atividade	Rf	Atividade	Rf
AT-01	***/**	0,47/0,92	-	-
AT-02	***	0,53	-	-
AT-03	**/**	0,51/0,74	-	-
AT-04	*		-	-
AT-05	*	0,4	*	RASTRO
AT-06	**	0,51	-	-
AT-07	***	0,49	-	-
PS-01	***	0,51	-	-
PS-02	***	0,51	-	-
PS-03	***	0,55	-	-
Padrão	***	Origem	***	0,50

^a os valores indicam os fatores de retenção em CCD; *atividade fraca/ **atividade moderada/ ***atividade forte

Fonte: o autor.

4.2.2.2 Potencial citotóxico

O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos brutos dos fungos endofíticos de *A. taxiformis* e *P. spiralis* também foi realizado pelo método do MTT contra três linhagens de

células tumorais: OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), e os resultados estão apresentados na **Tabela 36**.

Tabela 36 - Potencial citotóxico dos extratos brutos dos fungos endofíticos de *A. taxiformis* e *P. spiralis*.

Amostra	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	GI% (média)	SD (%)	GI% (média)	SD (%)	GI% (média)	SD (%)
AT-01	66,6	2,77	55,4	34,88	70,8	1,45
AT-02	5,3	16,18	45,0	19,86	54,7	10,26
AT-03	36,9	5,46	91,6	0,20	44,1	5,46
AT-04	17,8	10,65	31,0	8,44	41,1	6,53
AT-05	0,4	13,90	23,5	1,99	21,5	2,42
AT-06	32,2	16,39	96,2	0,66	78,8	1,40
AT-07	2,0	8,02	24,5	21,66	48,5	2,89
PS -01	8,2	21,02	68,5	37,34	43,1	3,31
PS-02	19,7	14,38	20,1	34,41	43,6	1,59
PS-03	7,0	5,39	61,6	9,04	58,5	2,94

Fonte: o autor.

Podemos destacar as linhagens fúngicas AT-01 que mostrou atividade moderada frente às três linhagens testadas, AT-03 que apresentou forte atividade (91,6%) frente à linhagem de carcinoma de ovário e AT-06 que mostrou forte atividade frente às linhagens de carcinoma de ovário e atividade moderada frente à linhagem de glioblastoma humano, com porcentagens de inibição de 96,2 e 78,8%, respectivamente.

Os resultados de perfis químicos e de bioatividade orientaram a seleção das linhagens fúngicas AT-03, AT-05, AT-06 e PS-01 para estudos mais detalhados.

4.2.3 Estudo químico do fungo *Nemania bipapillata* (AT-05)

A linhagem fúngica AT-05 apresentou maior produção de extrato bruto em escala reduzida (216 mg) e foi o único extrato que apresentou atividade anticolinesterásica, sendo assim, foi a primeira linhagem a ser estudada.

Parte do extrato bruto foi submetido a CLAE-DAD preparativo, levando ao isolamento de 4 compostos que, após as análises de RMN uni e bidimensionais e comparações com dados

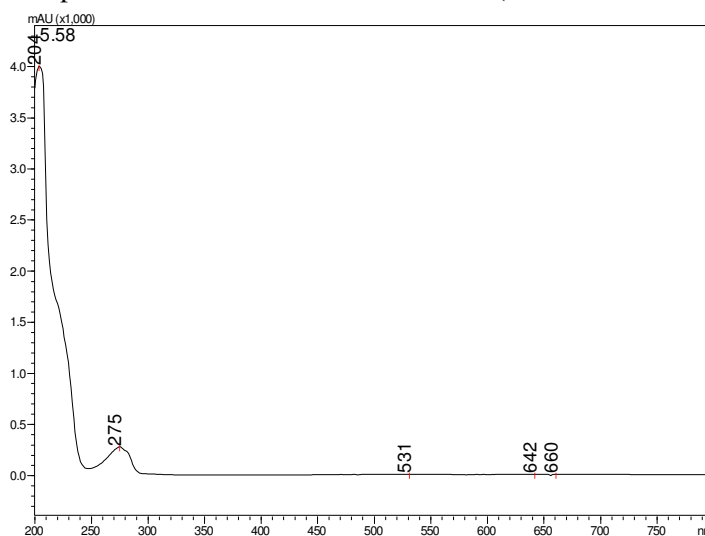
da literatura, foram identificados como a 2,5-dicetopiperazina ciclo-(Pro-Tir) (**S05**), tirosol (**S06**), e as isocumarinas (-)-5-hidroximetil-meleína [(-)-(3*R*)-3,4-diidro-8-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-isocumarina] (**S07**) e (-)-5-carboxi-meleína [(-)-(3*R*)-5-carboxi-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-isocumarina] (**S08**).

4.2.3.1 Elucidação Estrutural de **S05**

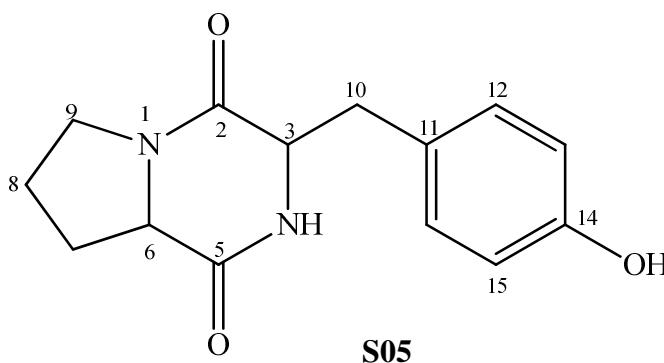
A substância **S05** (3,5 mg) foi obtida como um sólido amarelo. Após as análises dos seus dados espectroscópicos e espectrométricos, a mesma foi identificada como a 2,5-dicetopiperazina ciclo-(Pro-Tir).

A **Figura 67** mostra seu espectro no UV-Vis, no qual é possível verificar bandas de absorção em 275 e 204 nm. Sugiyama et al. (2009) descreveram que o espectro no UV da ciclo(L-Pro-L-Tir) apresentava bandas de absorção em 277,5, 251,0, 225,0, 218,5 e 205,0 nm (MeOH).

Figura 67 - Espectro no UV-Vis da substância **S05** (48,4% MeOH:51,6% H₂O).



Fonte: o autor.



Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{14}H_{16}N_2O_3$, através da análise dos dados de RMN, bem como do seu espectro de massas de alta resolução (ESI-Q-TOF) no modo positivo (**Figura 68**), o qual apresentou o pico base em m/z 261,1230 e que se refere ao $[M + H]^+$ (calculado 261,1234 - erro de 1,5 ppm).

O espectro de RMN de 1H (**Figura 69**) de **S05** mostrou um singlete em δ_H 7,88 (4-NH, 1H), dois dubletos em δ_H 7,03 ($J_{12-13} = 8,6$ Hz; H-12 e H-16, 2H) e δ_H 6,63 ($J_{13-12} = 8,6$ Hz; H-13 e H-15, 2H), um triplete em δ_H 4,24 ($J_{3-10} = 5,0$ Hz; H-3, 1H) e um dubleto em δ_H 2,91 ($J_{10-3} = 4,8$ Hz; H-10, 1H), indicando o aminoácido tirosina.

Já no mapa de contornos COSY (**Figura 70**) foram observadas as correlações entre H-12/-16 e H-13/-15 e entre H-3 e H-10. Além das correlações entre o duplo dubleto em δ_H 4,03 ($J_{6-7a} = 7,2$ Hz e $J_{6-7b} = 10,1$ Hz; H-6, 1H) com os multipletos em δ_H 2,00 (H-7a, 1H) e δ_H 1,31 (H-7b, 1H), sendo que o último se correlaciona com o multipletos em δ_H 1,71 (H-8, 2H), que por sua vez se correlaciona com os multipletos em δ_H 3,37 (H-9a, 1H) e δ_H 3,24 (H-9b, 1H), indicando assim o aminoácido prolina.

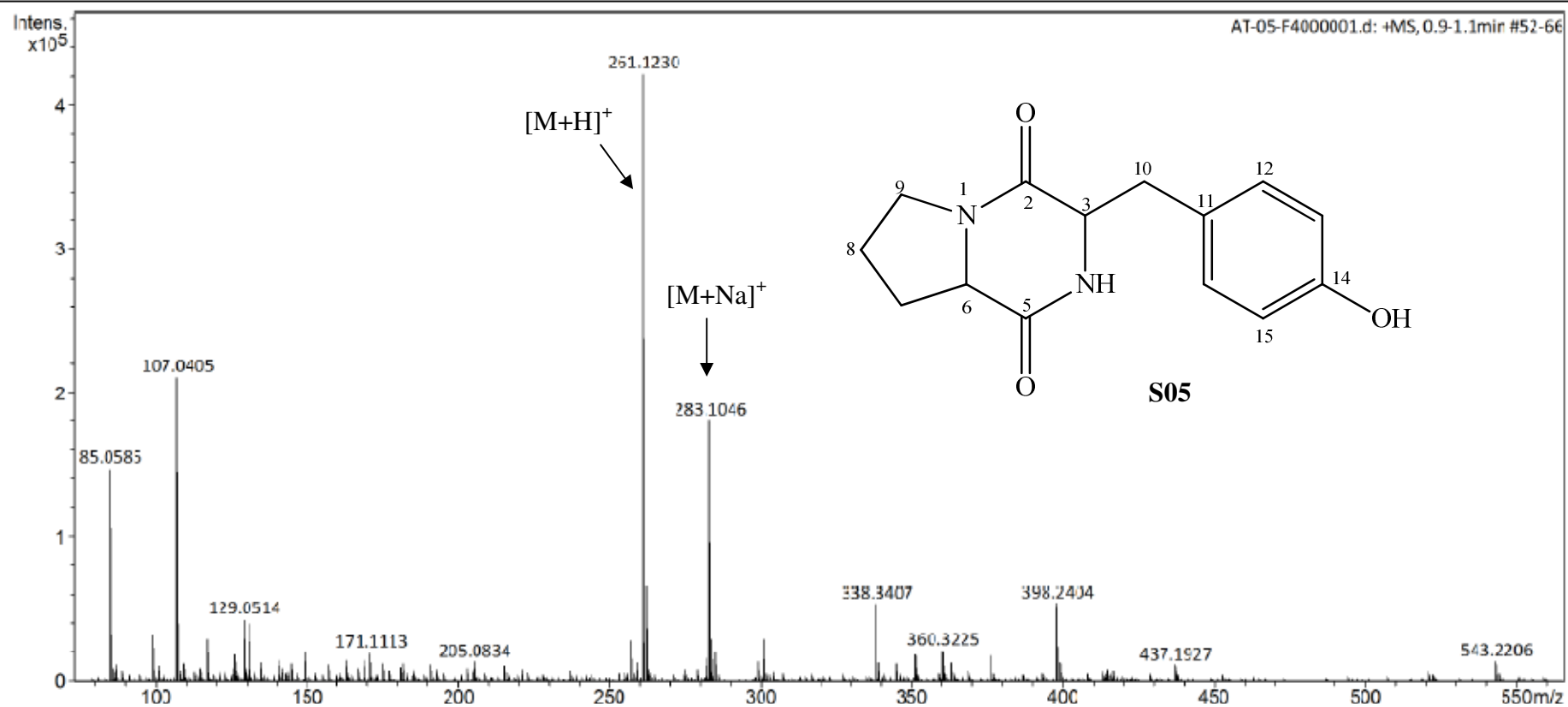
A partir do mapa de contornos HSQC (**Figura 71**), juntamente com os valores das integrações no espectro de 1H , foi possível identificar 4 carbonos metilênicos em δ_C 44,7 (C-9), 34,9 (C-10), 28,1 (C-7) e δ_C 21,9 (C-8), além dos carbonos metínicos em δ_C 131,1 (C-12/-16), 115,1 (C-13/-15), 58,4 (C-6) e em δ_C 56,1 (C-3), sendo estes dois últimos característicos de carbonos ligados a nitrogênio. O nitrogênio é um elemento eletronegativo e atrai a carga do carbono diretamente ligado a ele, desblindando os mesmos, que então apresentam deslocamentos químicos próximos a 55 ppm.

No mapa de contornos HMBC (**Figura 72**) foram observadas as correlações do 4-NH com o carbono quaternário em δ_C 165,4 (C-2) e com o sinal referente ao C-6; a correlação entre H-12/-16 e o carbono quaternário em δ_C 156,2 (C-14) e entre H-6 e o carbono quaternário em δ_C 169,2 (C-5) e, ainda, as correlações do H-10 com C-2 e C-12/-16 e com o carbono quaternário em δ_C 127,3 (C-11).

Figura 68 - Espectro de Massas de alta resolução de **S05** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

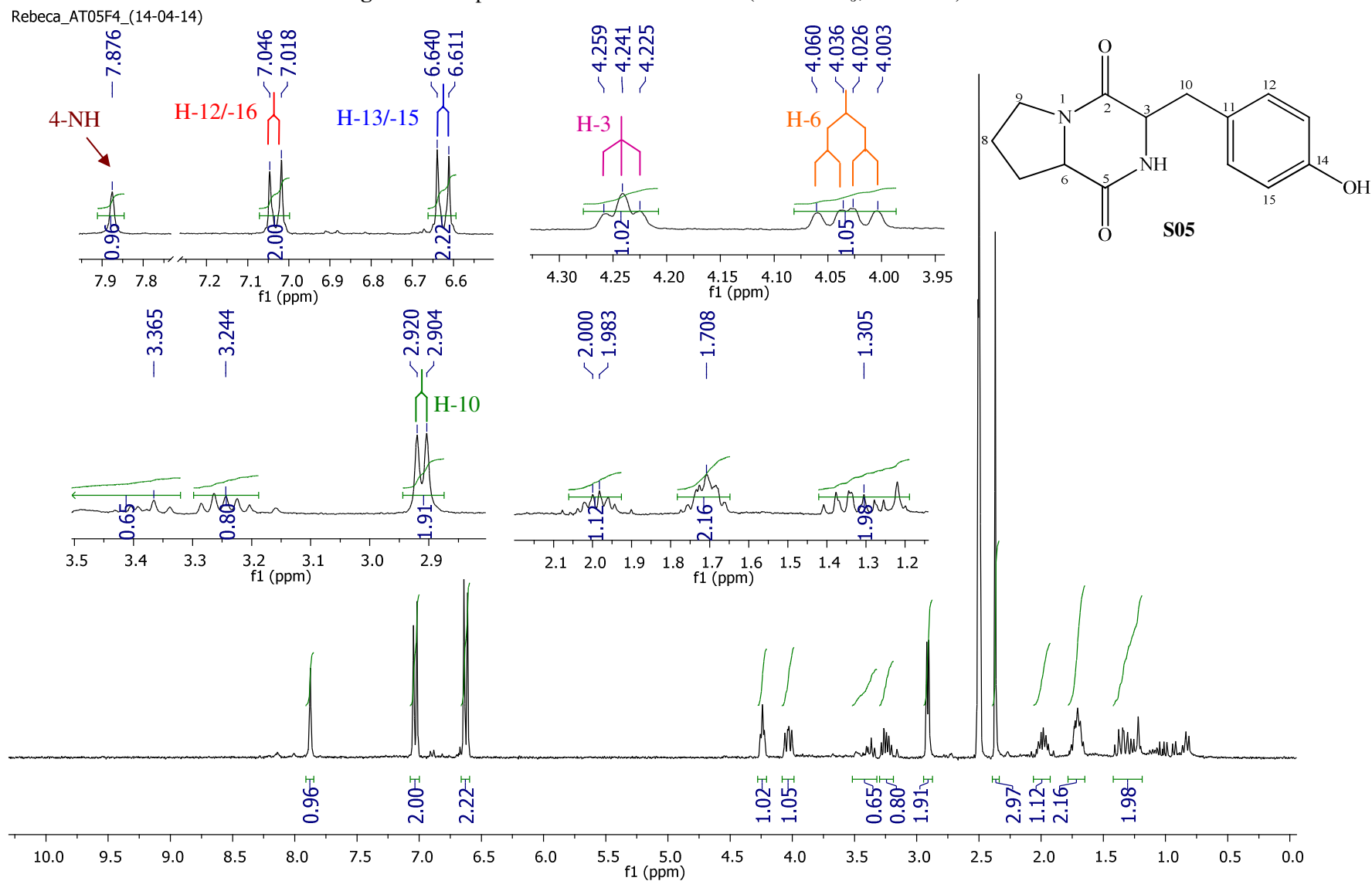
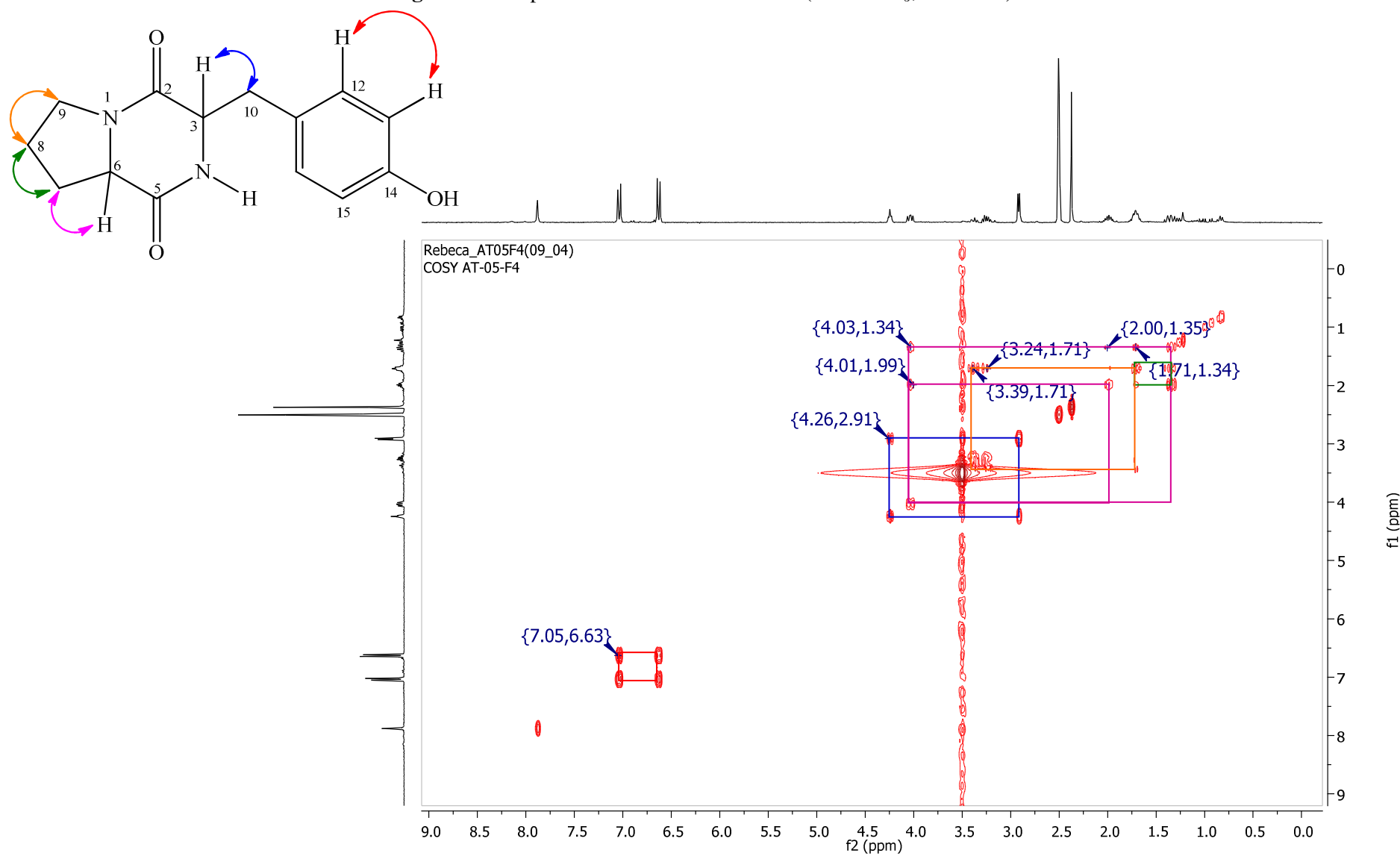
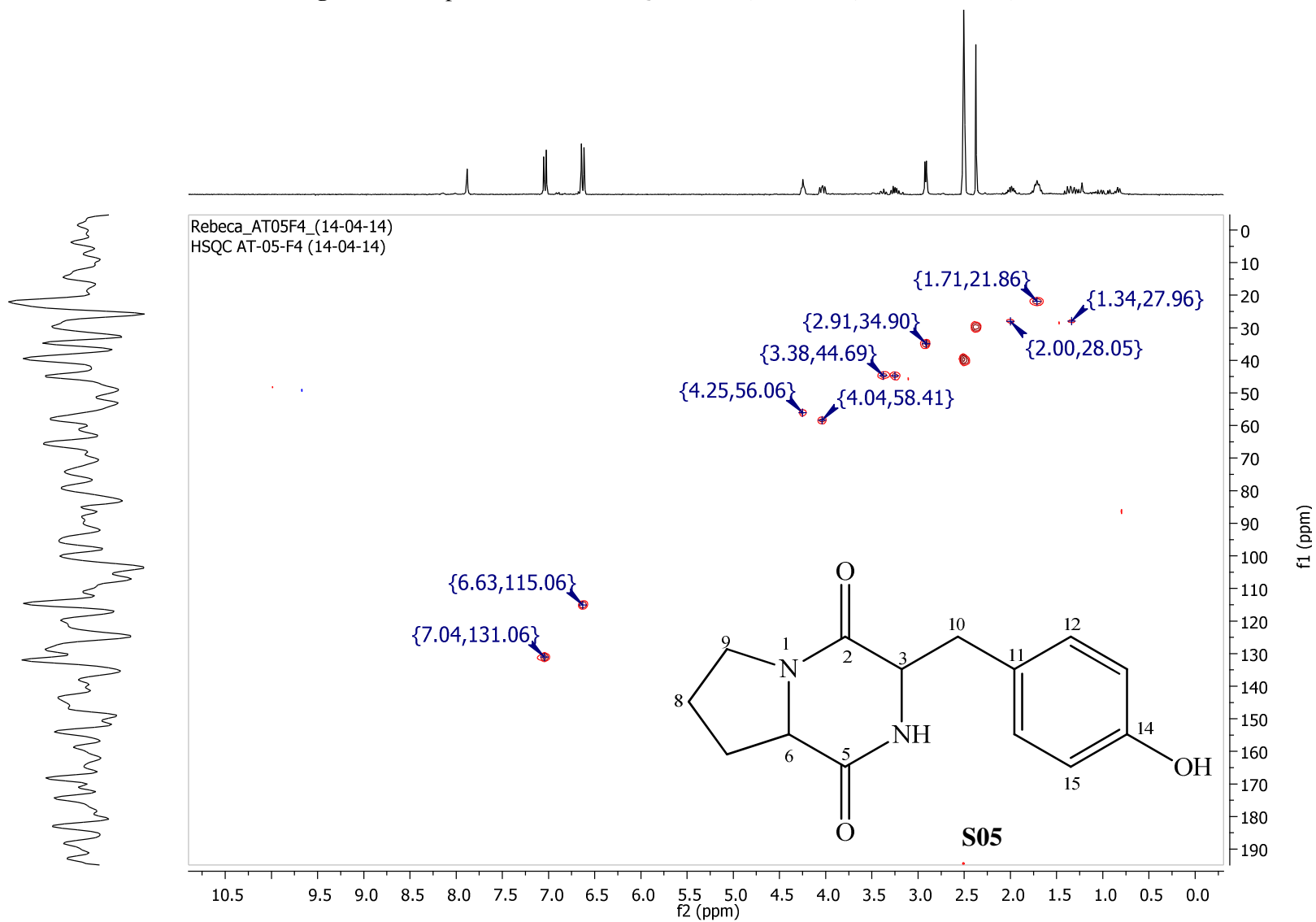
Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H de **S05** (DMSO - d_6 ; 300 MHz)

Figura 70 - Mapa de contornos COSY de **S05** (DMSO - d_6 ; 300 MHz)

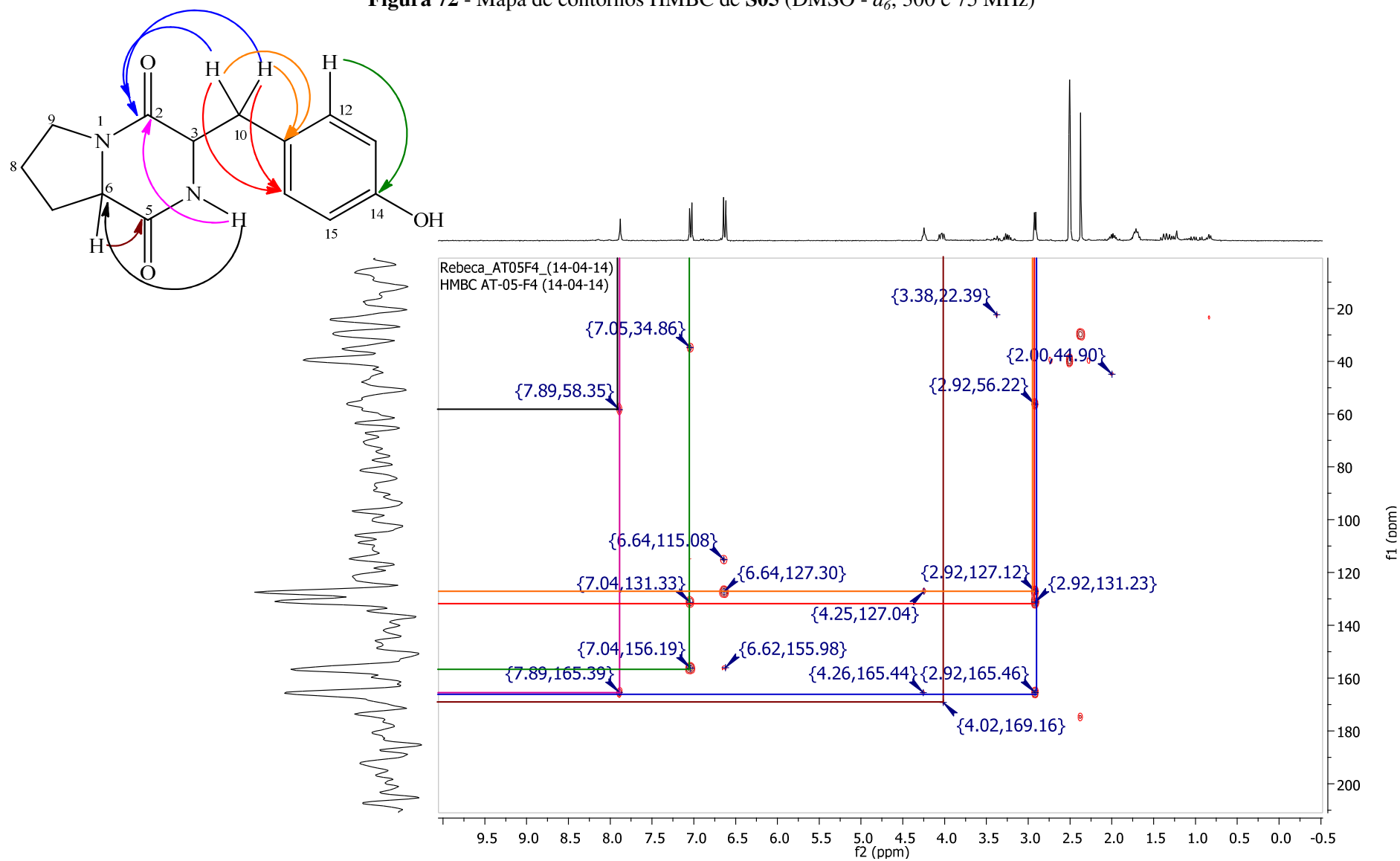


Fonte: o autor.

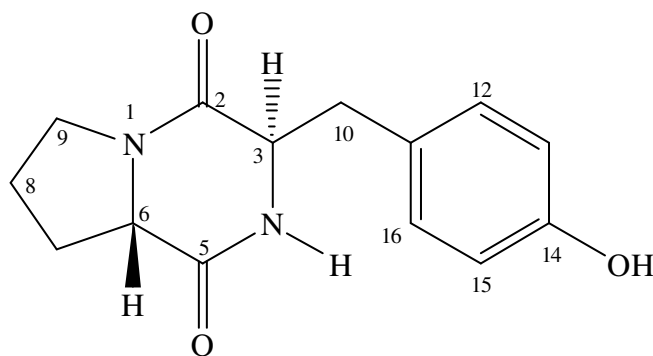
Figura 71 - Mapa de contornos HSQC de **S05** (DMSO - d_6 ; 300 e 75 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 72 - Mapa de contornos HMBC de **S05** (DMSO - d_6 ; 300 e 75 MHz)



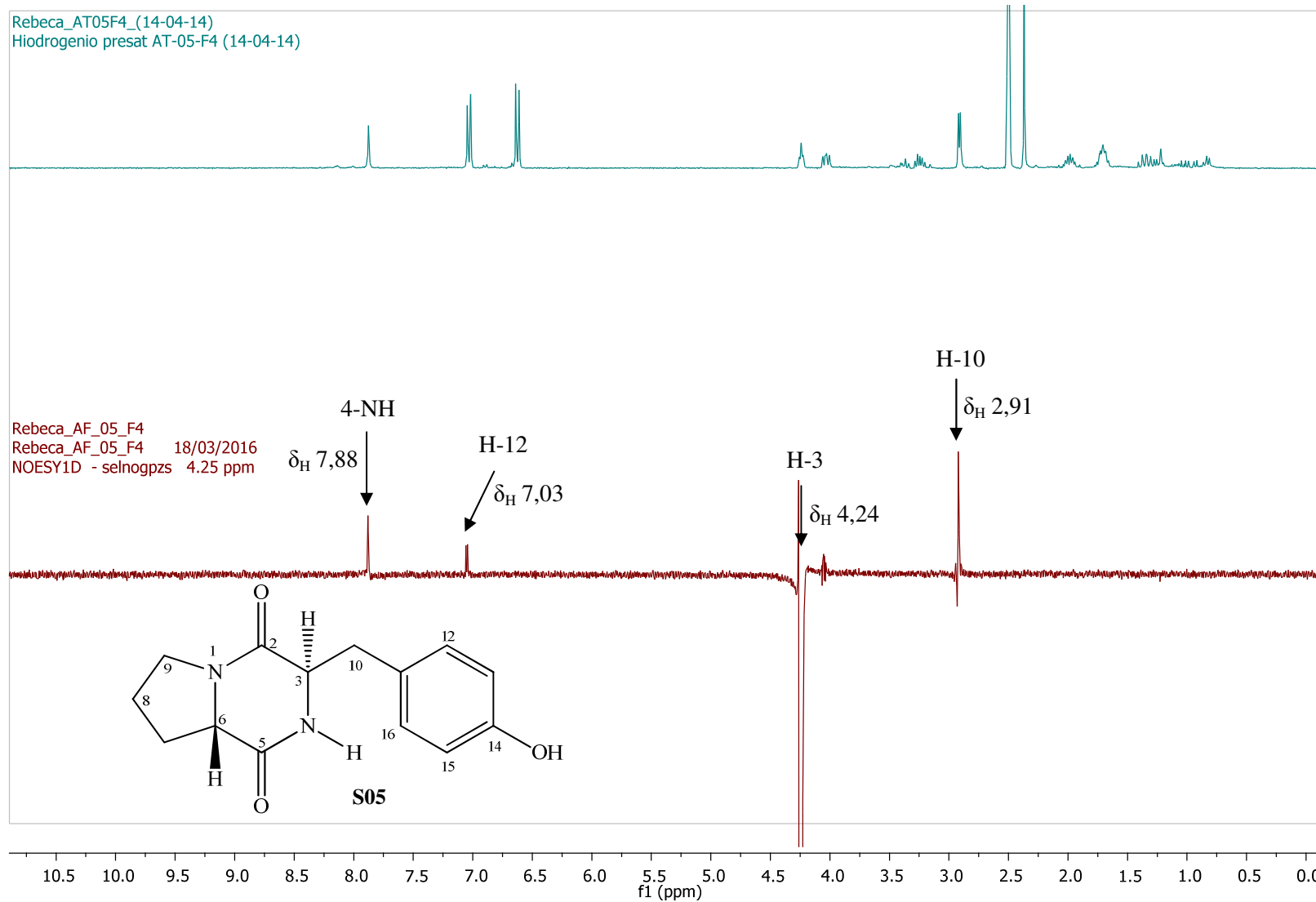
Pelo espectro de NOESY-1D (**Figura 73**) de **S05**, não foi observada a correlação espacial entre H-3 e H-6 ao irradiar o sinal de H-3 (δ_H 4,24), indicando que, possivelmente, esses hidrogênios se encontram em lados opostos da molécula e que a substância **S05** é um diastereoisômero da ciclo(L-Pro-L-Tir) (SUGIYAMA et al., 2009).



S05

O valor obtido para a rotação óptica específica de **S05** foi de $[\alpha]_D^{23} = -23,5^\circ$ (c 0,31 em CH_3OH), enquanto o valor descrito na literatura para a ciclo(L-Pro-L-Tir) é de $[\alpha]_D^{23} = -66,7^\circ$ (c 0,3 em CH_3OH) (SUGIYAMA et al., 2009).

Figura 73 - Espectros de RMN de ^1H de **S05** (azul claro) e NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,24 (vermelho) ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados espectrais da substância **S05** e sua comparação com a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir) (SUGIYAMA et al., 2009) estão descritos na **Tabela 37**.

Tabela 37 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S05** e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).

S05^a			Ciclo(L-Pro-L-Tir)^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
2		165,4		166,9
3	4,24 (t; 5,0)	56,1	4,36 (m)	57,9
4	7,88 (s; NH)	-	*	-
5	-	169,2		170,8
6	4,03 (dd; 7,2; 10,1)	58,4	4,04 (m)	60,0
7	2,00 (m)	28,1	2,09 (m)	29,4
	1,31 (m)		1,21 (m)	
8	1,71 (m)	21,9	1,80 (m)	22,7
9	3,37 (m)	44,7	3,54 (m)	45,9
	3,24 (m)		3,35 (m)	
10	2,91 (d; 4,8)	34,9	3,08 (dd; 4,6; 9,8)	37,6
			3,02 (dd; 4,6; 9,8)	
11	-	127,3	-	127,6
12 e 16	7,03 (d; 8,4)	131,1	7,04 (d; 8,0)	132,1
13 e 15	6,63 (d; 8,7)	115,1	6,70 (d; 8,0)	116,2
14	-	156,1	-	157,7

^a δ -ppm; 300 e 75 MHz; DMSO-*d*₆; ^b δ -ppm; 500 e 125 MHz; CD₃OD (SUGIYAMA et al., 2009); *sinal não citado pelo autor.

Fonte: o autor.

A 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir) foi anteriormente isolada da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, associada a esponja antártica *Isodictya setifera* Topsent (família Esperiopsidae) (JAYATILAKE et al., 1996) e da levedura *Pichia membranifaciens* derivada da esponja *Halichondria okadai* (SUGIYAMA et al., 2009). Também já foi isolada da esponja *Callyspongia* sp. (HUANG, R. et al., 2010) e do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da planta *Litsea akoensis* HAYATA var. *chitouchiaoensis* LIAO (CHANG, C. et al., 2014).

O estudo realizado por Puopolo et al. (2014) mostrou que a cyclo(L-Pro-L-Tyr) isolada da bactéria *Lysobacter capsici* AZ78, foi efetiva contra os esporos de *Phytophthora infestans*,

patógeno que causa a ferrugem tardia na batata e tomate, e contra os esporos de *Plasmopara viticola*, patógeno que causa o bolor felpudo da videira. E ainda, impediu o surgimento de lesões de ferrugem tardia quando aplicada nas folhas de tomate.

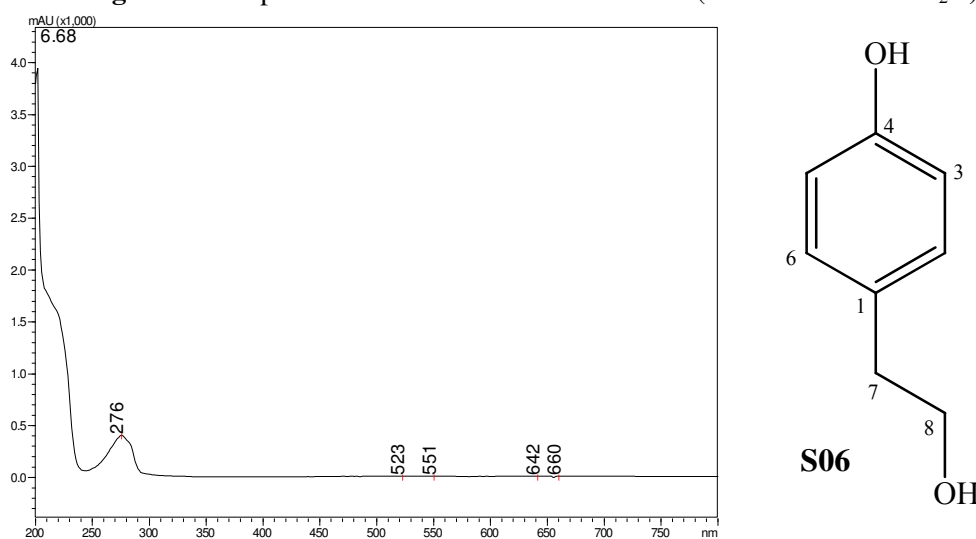
Já o estudo realizado por Kumar et al. (2013) levou ao isolamento da cyclo(L-Pro-L-Tyr) e cyclo(L-Pro-D-Tyr) a partir de *Bacillus* sp. linhagem N, isolado do nematodo entopatógeno *Rhabditis* sp, sendo que ambas apresentaram forte atividade antifúngica.

4.2.3.2 Elucidação estrutural de S06

A substância **S06** (3,6 mg) foi isolada como um óleo amarelado. Após as análises dos seus dados espectroscópicos e espectrométricos, a mesma foi identificada como o tirosol.

Seu espectro no UV-Vis está apresentado na **Figura 74** e pode-se observar uma banda de absorção máxima em 276 nm. Já o espectro no UV-Vis do tirosol descrito na literatura apresenta bandas de absorção em 263 e 223 nm (MeOH) (CHU et al., 2014).

Figura 74 - Espectro no UV-Vis da substância **S06** (50% MeOH:50% H₂O).

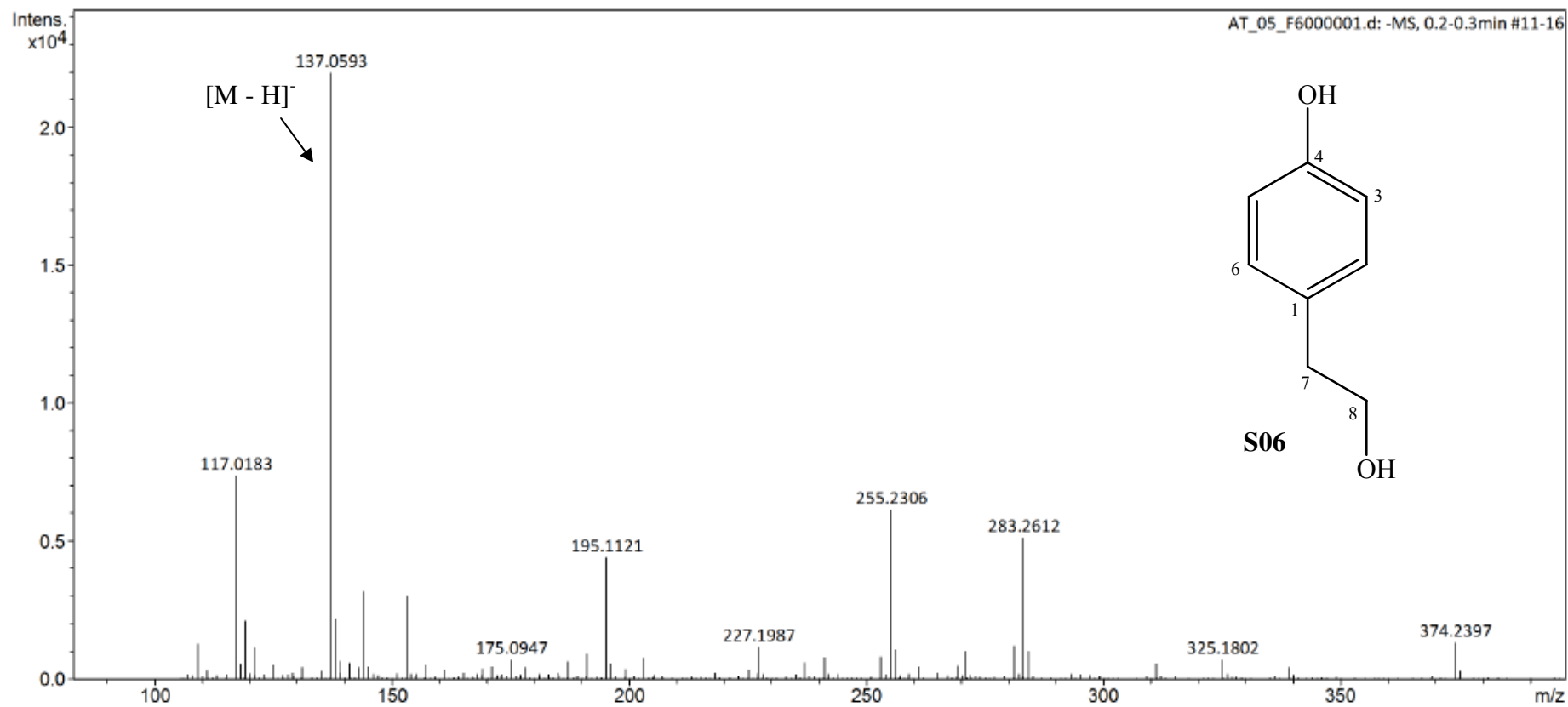


Fonte: o autor.

A fórmula molecular de **S06** foi determinada através das análises dos dados de RMN e do seu espectro de massas de alta resolução (ESI-Q-TOF) no modo negativo (**Figura 75**), no qual foi possível verificar o pico base em m/z 137,0593 e que se refere ao $[M - H]^-$ (calculado 137,0603 - erro de 7,3 ppm), indicando a fórmula C₈H₁₀O₂ para a substância **S06**.

Figura 75 - Espectro de Massas de alta resolução de **S06** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 76**) do composto **S06** mostrou dois dubletos, na região de hidrogênios aromáticos, em δ_{H} 7,02 (2H; H-2/H-6) e 6,69 (2H; H-3/H-5), com constantes de acoplamento J_{2-3} ou $3-2 = 9,0$ Hz, indicando acoplamento *orto* entre os mesmos, que foi confirmado pelo mapa de contornos COSY (**Figura 77**) através da correlação entre esses hidrogênios. O sinal em δ_{H} 6,69 indica a presença de um substituinte doador de elétrons (como uma hidroxila) na posição *orto* a esse hidrogênio, o que causa um aumento da nuvem eletrônica ao redor do mesmo, tornando-o blindado e deslocando o sinal para a direita no espectro.

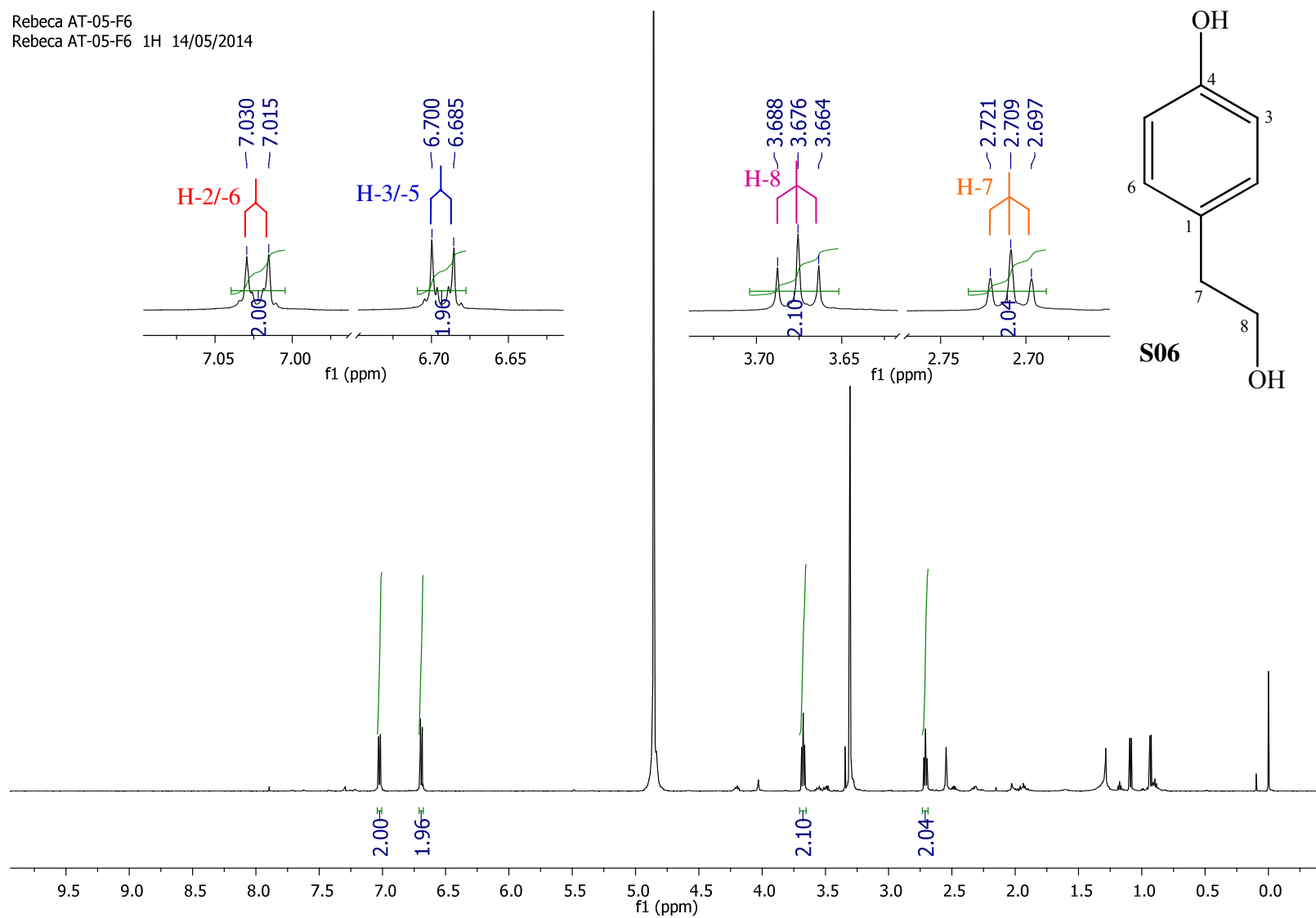
Além disso, foi possível observar no espectro de RMN de ^1H dois tripletos em δ_{H} 3,68 ($J_{8-7} = 7,2$ Hz; 2H) e 2,71 ($J_{7-8} = 7,2$ Hz; 2H), que também mostraram correlação entre si no mapa de contornos COSY e foram atribuídos ao H-8 e H-7, respectivamente.

O mapa de contornos HSQC (**Figura 78**) mostrou sinais de carbonos metínicos (representados em azul) em δ_{C} 130,9 (C-2 e C-6) e 116,2 (C-3 e C-5) e de carbonos metilênicos (representados em vermelho) em δ_{C} 64,6 (C-8) e 39,4 (C-7), sendo que o valor do deslocamento químico de C-8 indica um carbono carbinólico, ou seja, um carbono ligado a oxigênio, já que o mesmo é eletronegativo e desblinda o carbono ligado diretamente a ele.

Já o mapa de contornos HMBC (**Figura 79**) indicou as correlações do H-2/-6 com o carbono quaternário em δ_{C} 156,8 (C-4) e com o sinal referente ao C-7, assim como a correlação entre H-8 e o carbono quaternário δ_{C} 131,0 (C-1).

Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H de **S06** (CD_3OD ; 600 MHz)

Rebeca AT-05-F6
Rebeca AT-05-F6 ^1H 14/05/2014



Fonte: o autor.

Figura 77 - Mapa de contornos COSY de **S06** (CD₃OD; 600 MHz)

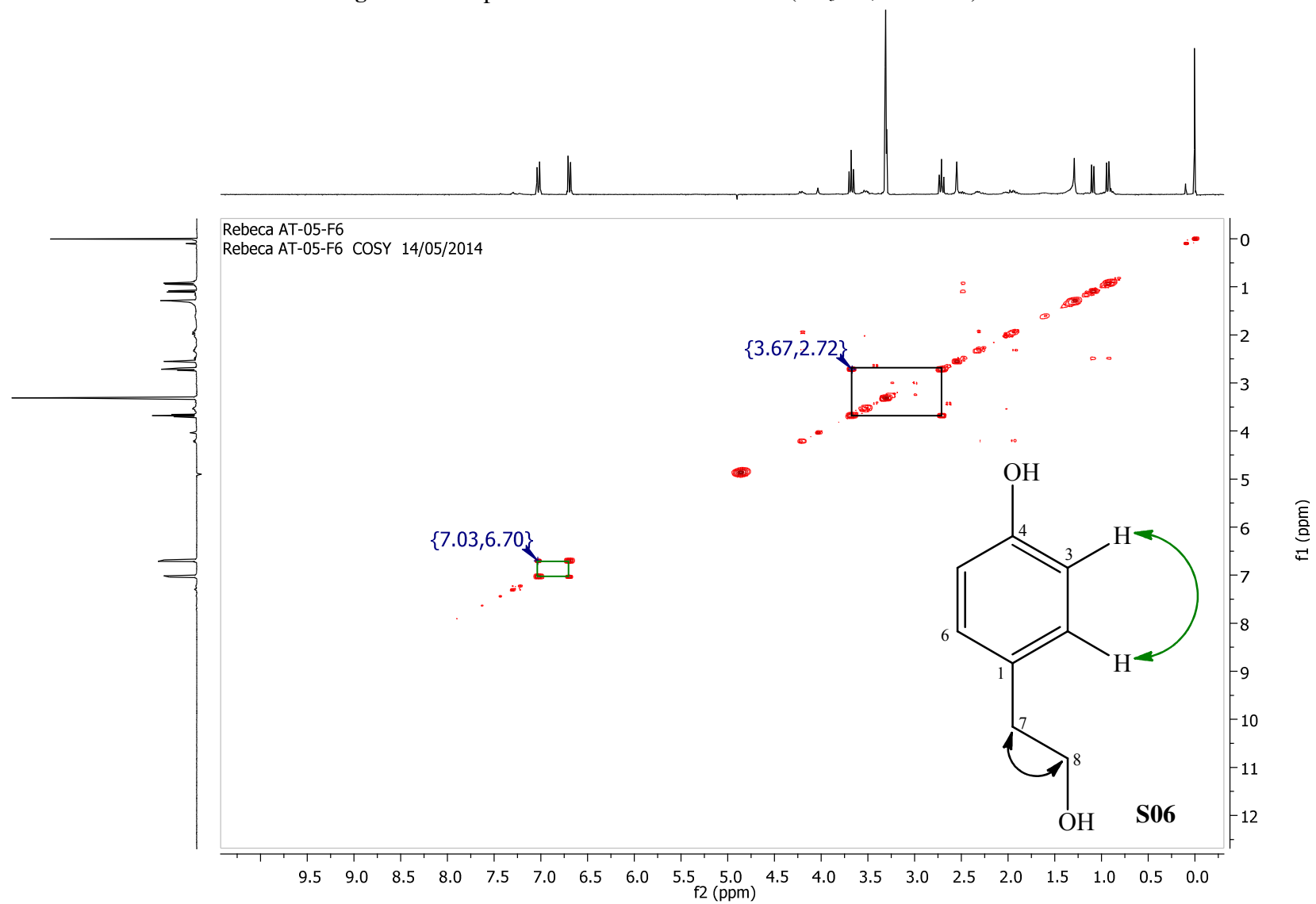


Figura 78 - Mapa de contornos HSQC de **S06** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

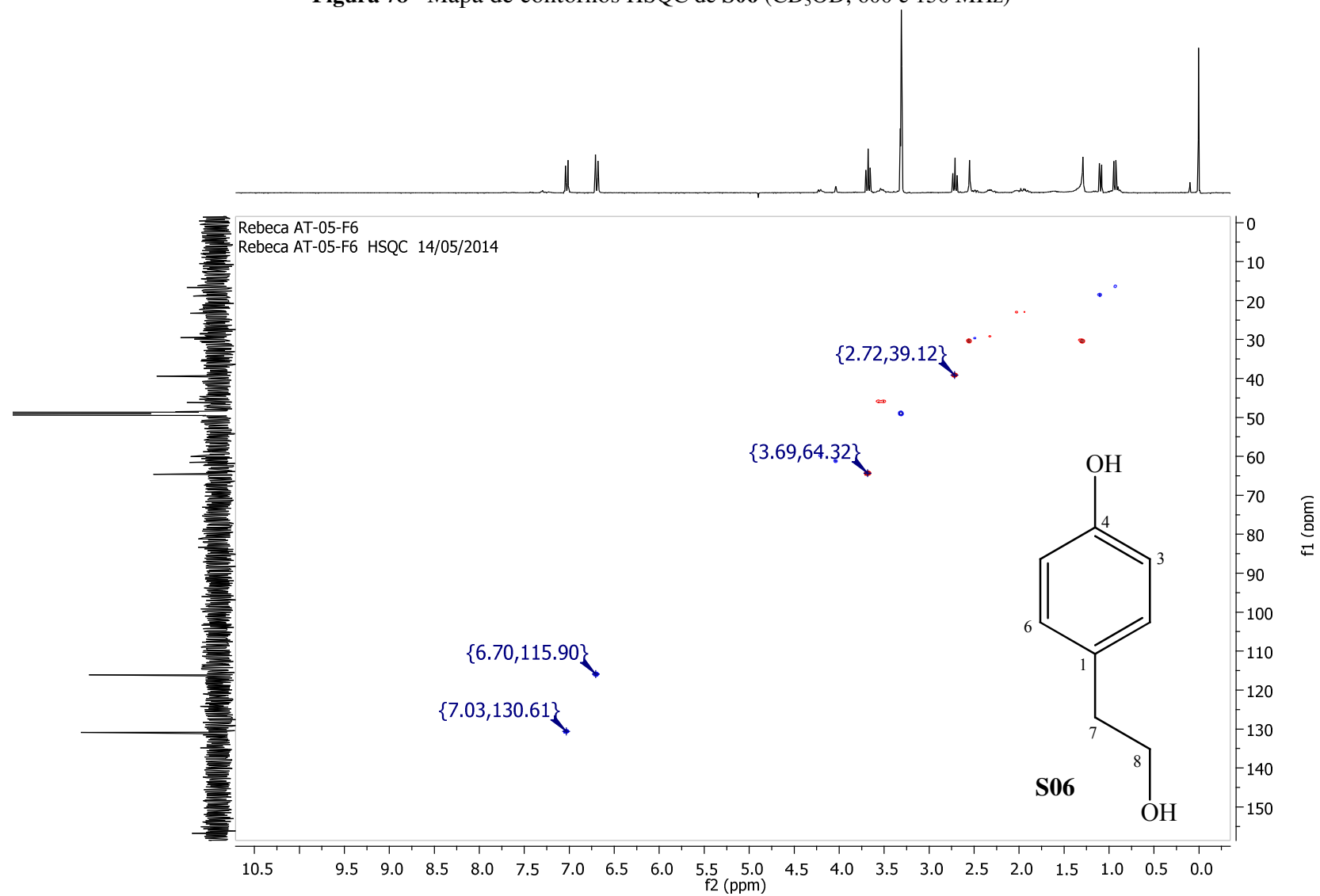
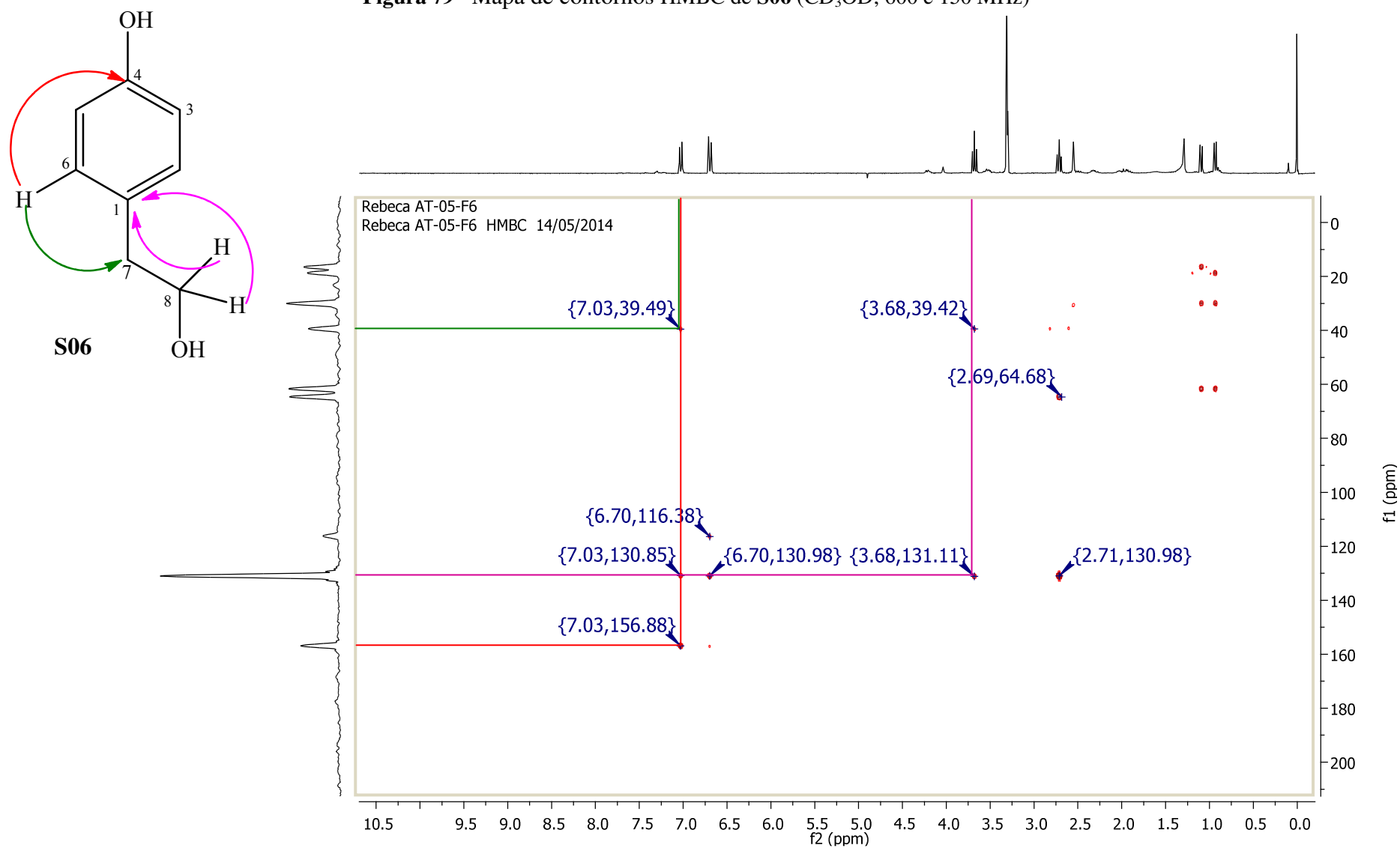


Figura 79 - Mapa de contornos HMBC de **S06** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Os dados espectrais para a substância **S06**, bem como sua comparação com o tirosol (CHU et al., 2014) estão descritos na **Tabela 38**.

Tabela 38 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S06** e para o tirosol.

S06^a			Tirosol^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1	-	131,0	-	131,1
2 e 6	7,02 (d; 9,0)	130,6	7,04 (d; 8,6)	131,2
3 e 5	6,69 (d; 9,0)	115,9	6,71 (d; 8,6)	116,3
4	-	156,9	-	154,9
7	2,71 (t; 7,2)	39,1	2,73 (t)	39,6
8	3,68 (t; 7,2)	64,3	3,70 (t)	64,8

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD_3OD ; ^b δ -ppm; 500 e 125 MHz; CDCl_3 (CHU et al., 2014).

Fonte: o autor.

O tirosol é produzido a partir do aminoácido tirosina, e é uma substância biologicamente ativa, que se destaca como antioxidante presente em nossa dieta. Sua principal fonte na dieta humana é o azeite de oliva, mas pode ser encontrado em muitos outros alimentos (DEWAPRIYA et al., 2013). Também já foi isolado de fungos associados a plantas (IÓCA; ALLARD; BERLINCK, 2014) e de fungos marinhos como de *Nigrospora* sp., isolado da gorgônia leque (*Annella* sp.) (RUKACHAISIRIKUL et al., 2010; TRISUWAN et al., 2009).

Tirosol foi identificado como uma substância reguladora com importante implicação na dinâmica de crescimento e morfogênese em *Candida albicans* (CHEN, H. et al., 2004). Além disso, seu isolamento a partir de fungos endofíticos de plantas da família Asteraceae indicou que, possivelmente, é uma molécula sinalizadora (quorum sensing) (GUIMARÃES, 2009).

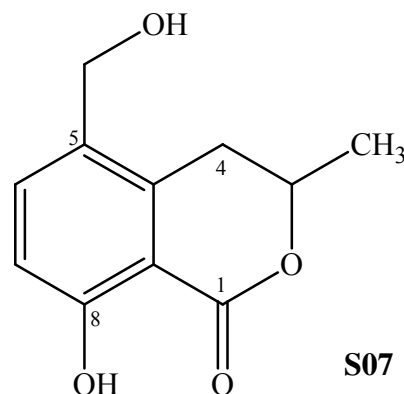
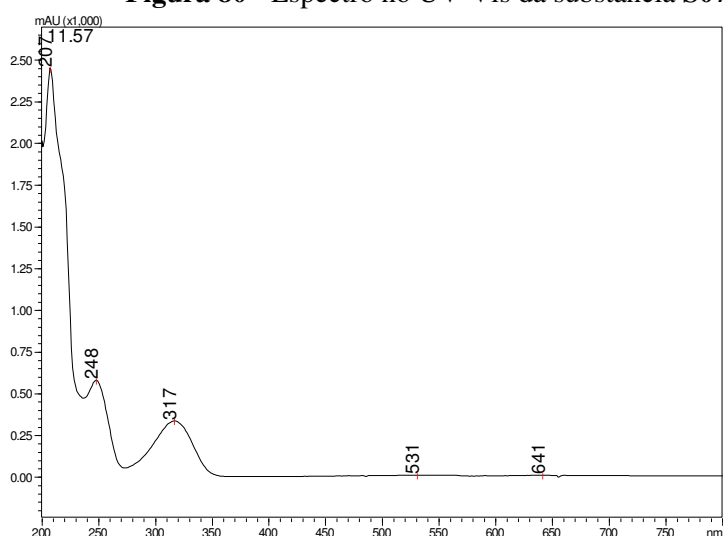
Estudos revelaram ainda, que este metabólito secundário possui efeito sequestrador de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que estão relacionadas a patologias humanas, como doenças cardiovasculares e trombóticas (GUIMARÃES et al., 2009), e também possui efeito protetor contra a morte de células neuronais dopaminérgicas em um modelo *in vitro* da doença de Parkinson (DEWAPRIYA et al., 2013).

4.2.3.3 Elucidação estrutural de S07

A substância **S07** (0,9 mg) foi obtida como um sólido amarelo. A partir dos seus dados espectroscópicos e espectrométricos, foi possível identificá-la como a 5-hidroximetil-meleína.

A **Figura 80** mostra seu espectro UV-Vis, no qual podem ser observadas bandas de absorção em 317, 248 e 207 nm. Para a 5-hidroximetil-meleína descrita na literatura (OKUNO et al., 1986), seu espectro no UV-Vis apresentou bandas de absorção em 319, 246 e 216 nm (EtOH).

Figura 80 - Espectro no UV-Vis da substância **S07** (57,4% MeOH:42,6% H₂O).

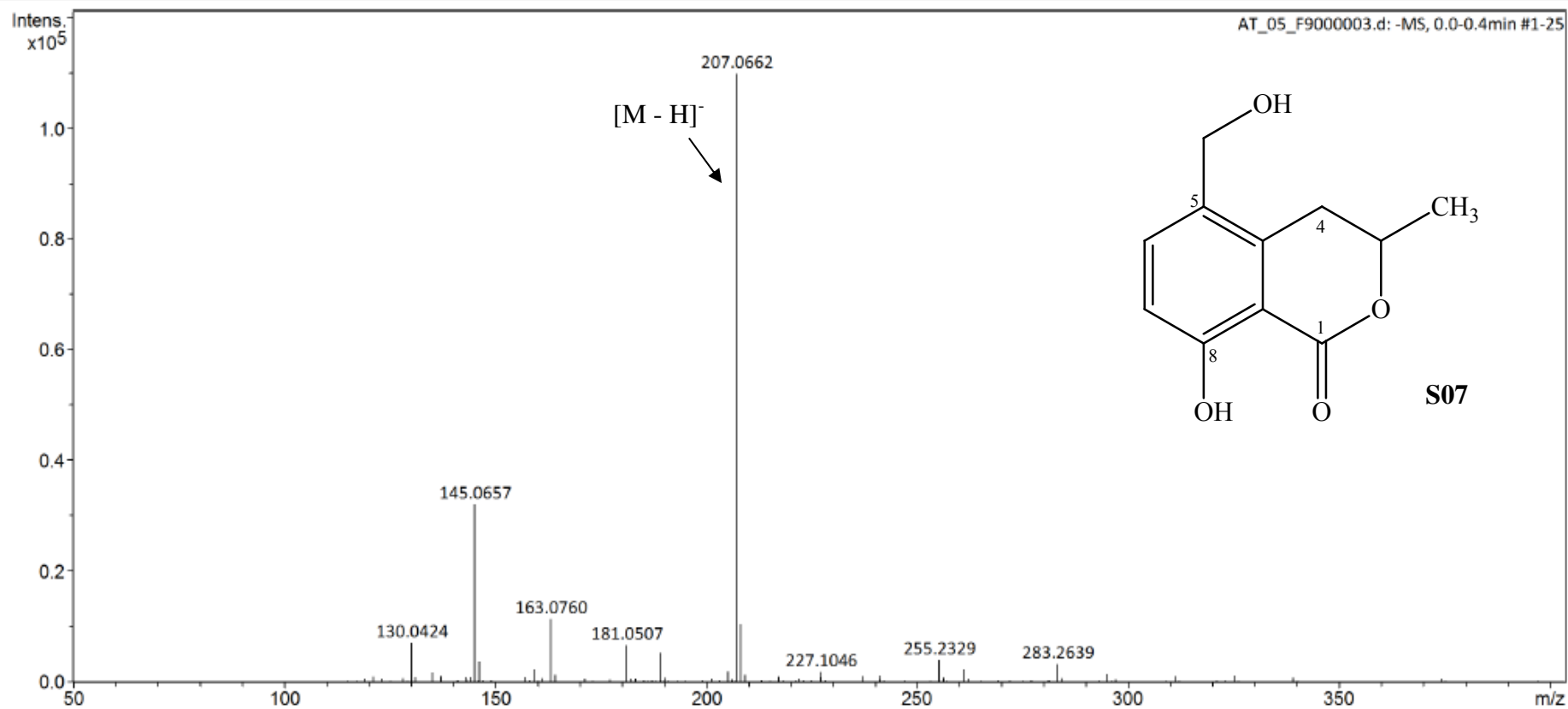


Fonte: o autor.

A fórmula molecular de **S07**, C₁₁H₁₂O₄, foi determinada através das análises dos dados de RMN e do seu espectro de massas de alta resolução (ESI-Q-TOF) no modo negativo (**Figura 81**), no qual foi possível observar o pico base em m/z 207,0662 e que se refere ao [M - H]⁻, (calculado 207,0663 - erro de 0,5 ppm).

Figura 81 - Espectro de Massas de alta resolução de **S07** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

Seu espectro de RMN de ^1H (**Figura 82**) revelou dois dubletos em δ_{H} 7,52 ($J_{6-7} = 8,4$ Hz; 1H) e 6,84 ($J_{7-6} = 8,4$ Hz; 1H), que foram atribuídos aos hidrogênios do sistema aromático H-6 e H-7, respectivamente; um multiplete em δ_{H} 4,72 (H-3, 1H) e um dubleto em δ_{H} 4,55 ($J_{\text{CH}_2\text{-OH}} = 3,0$ Hz, 5- CH_2OH , 2H); dois duplos dubletos em δ_{H} 3,21 ($J_{4a-3} = 3,6$; $J_{4a-4b} = 16,8$ Hz, H-4a, 1H) e 2,84 ($J_{4b-3} = 12,0$; $J_{4b-4a} = 16,8$ Hz, H-4b) e um dubleto em δ_{H} 1,51 ($J_{\text{CH}_3-3} = 6,6$ Hz, 3H) que foi associado ao grupo metílico ligado ao C-3.

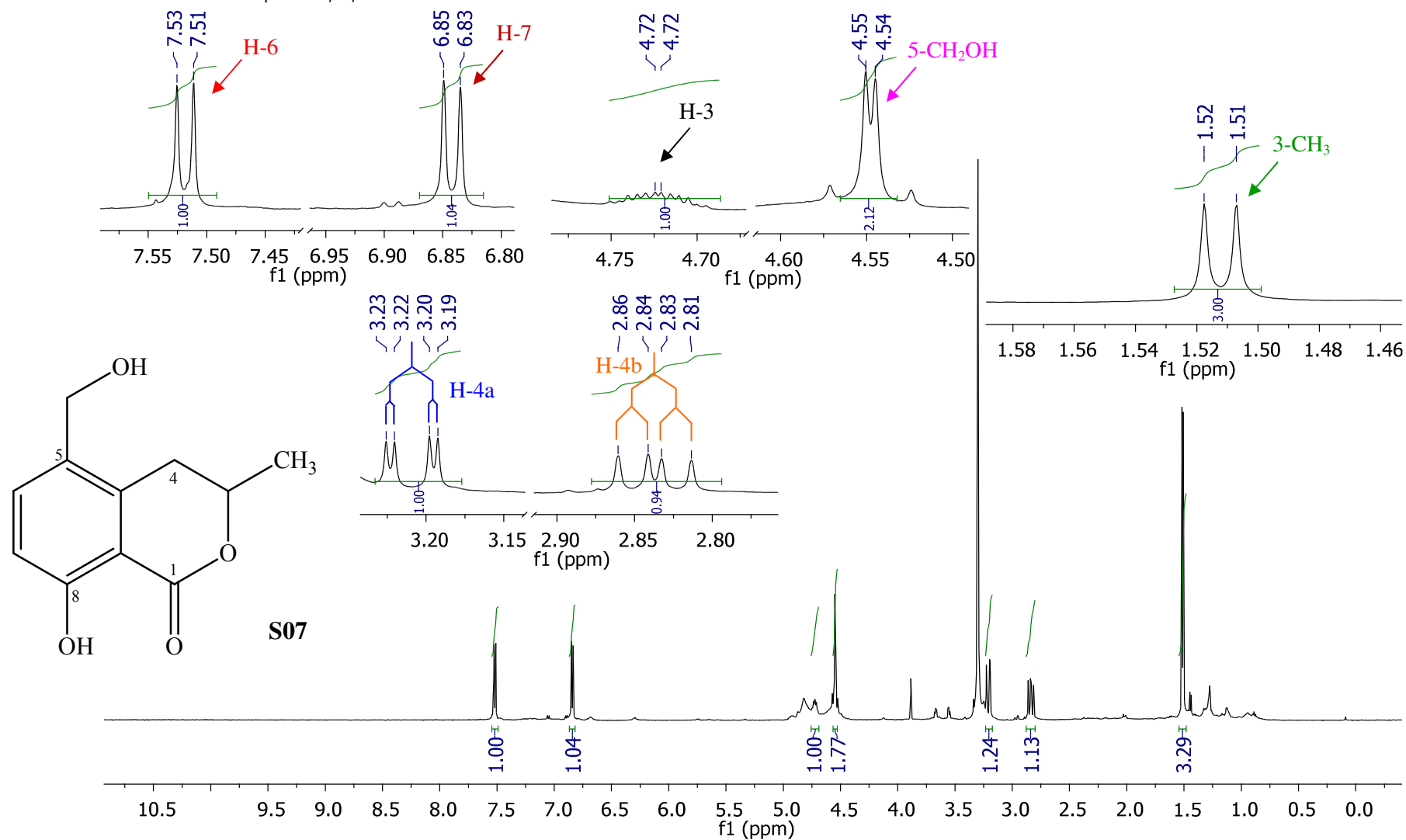
O mapa de contornos COSY (**Figura 83**) mostrou correlações entre os hidrogênios do sistema aromático H-6 e H-7, e correlações entre o sinal de H-3 com os sinais referentes a H-4_b e 3- CH_3 .

A partir do mapa de contornos HSQC (**Figura 84**) foi possível verificar a presença de carbonos metínicos (representados em vermelho) em δ_{C} 138,0 (C-6), 116,1 (C-7) e em δ_{C} 77,1 (C-3), carbonos metilênicos (representados em azul) em δ_{C} 61,9 (5- CH_2OH) e 31,7 (C-4), além de um carbono metílico (também representado em vermelho) em δ_{C} 20,8 (3- CH_3).

O mapa de contornos HMBC (**Figura 85**) mostrou as correlações entre H-6 e os carbonos quaternários em δ_{C} 162,3 (C-8), 139,7 (C-4a) e, com o carbono metilênico em δ_{C} 61,9 (5- CH_2OH), evidenciando assim a ligação desta unidade ao anel aromático. Foram observadas, ainda, a correlação do H-7 com os carbonos quaternários em δ_{C} 108,9 (C-8a) e em δ_{C} 129,7 (C-5) e as correlações entre os hidrogênios metílicos (3- CH_3) e os carbonos C-3 (δ_{C} 77,0) e C-4 (δ_{C} 31,6).

Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de **S07** (CD_3OD ; 600 MHz)

Rebeca AT-05-F9

Rebeca AT-05-F9 ^1H presat 08/04/2014

Fonte: o autor.

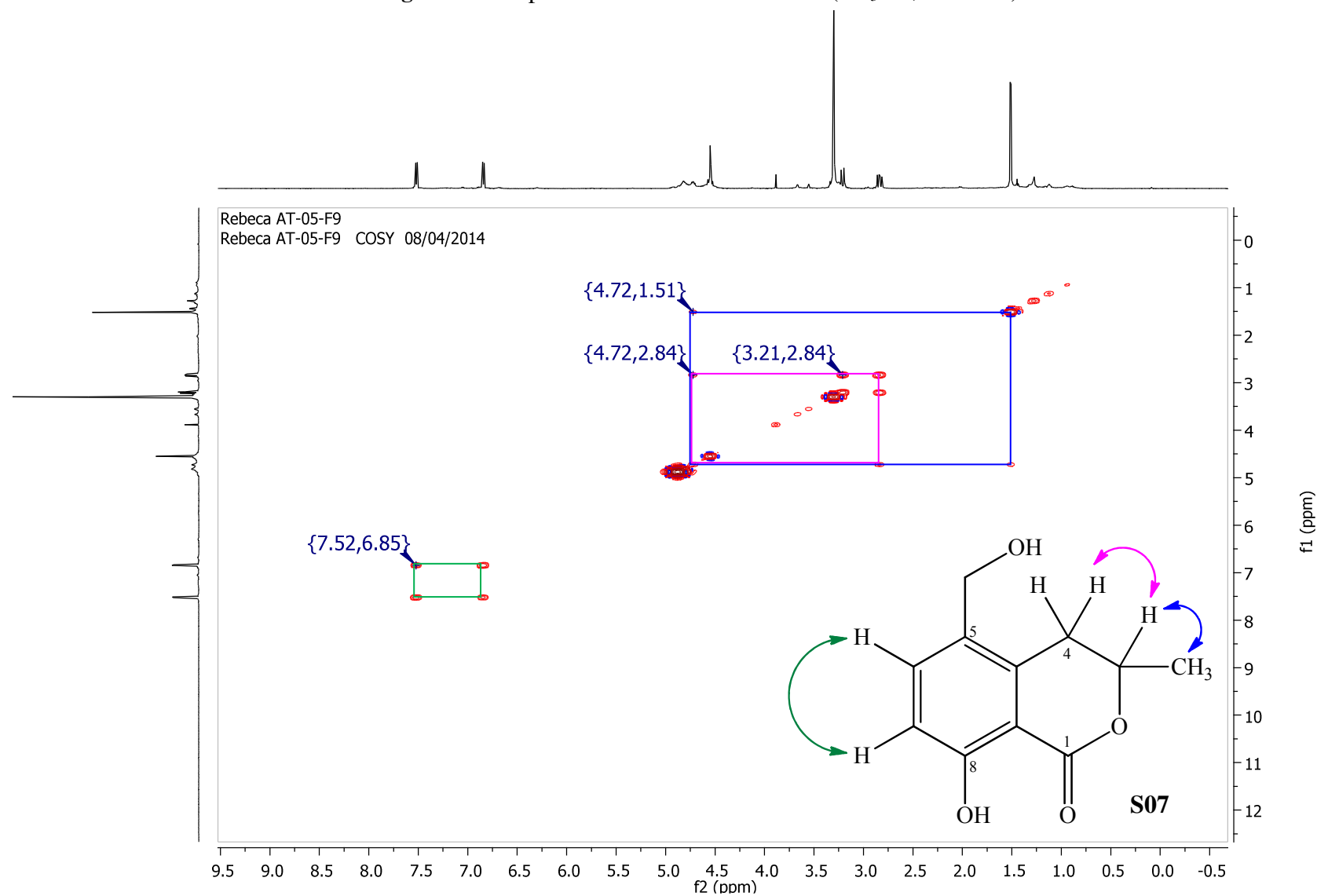
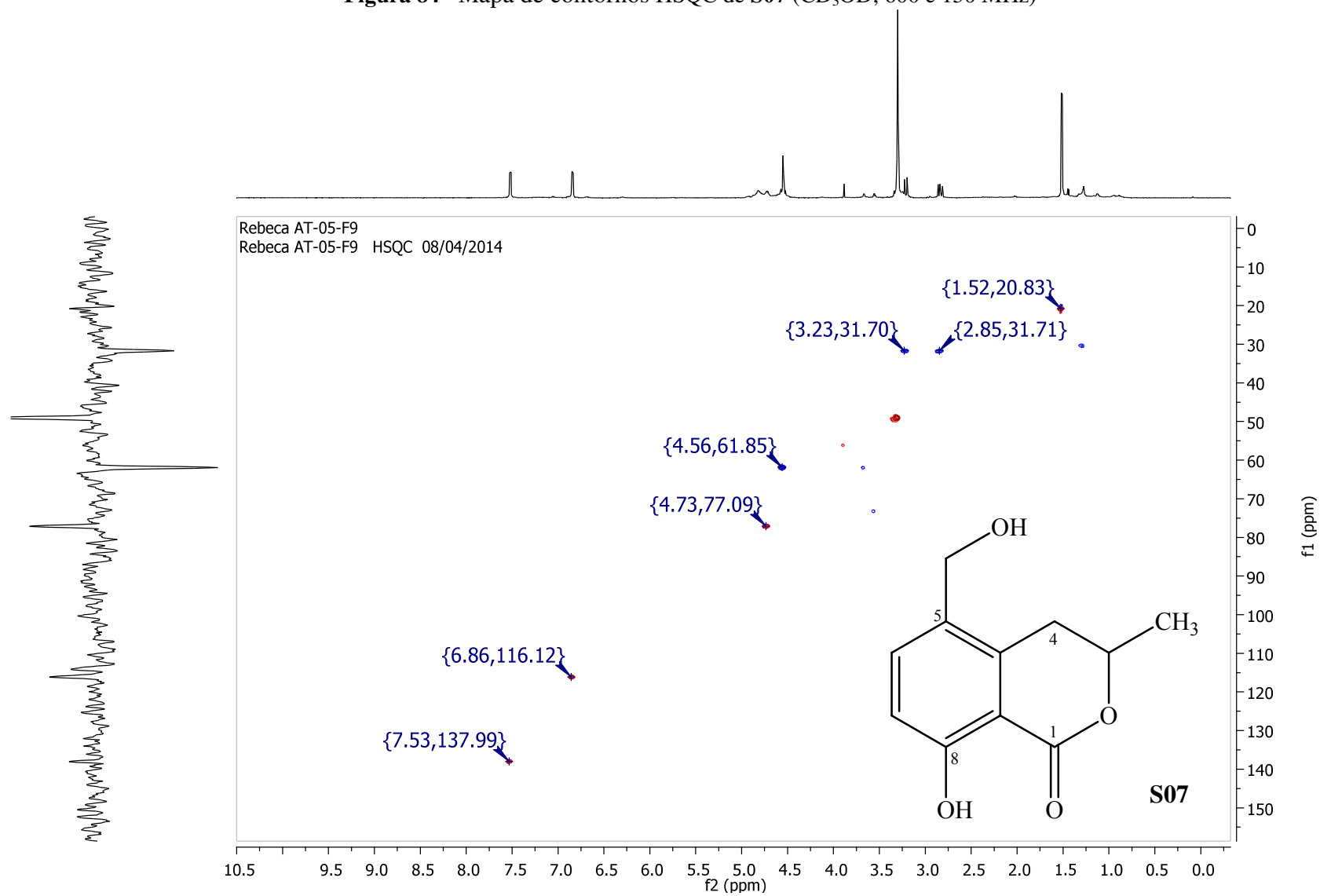
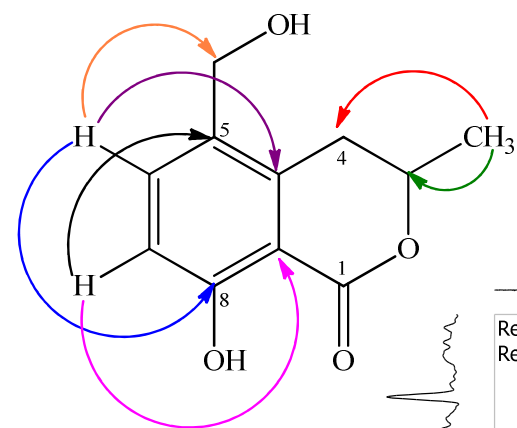
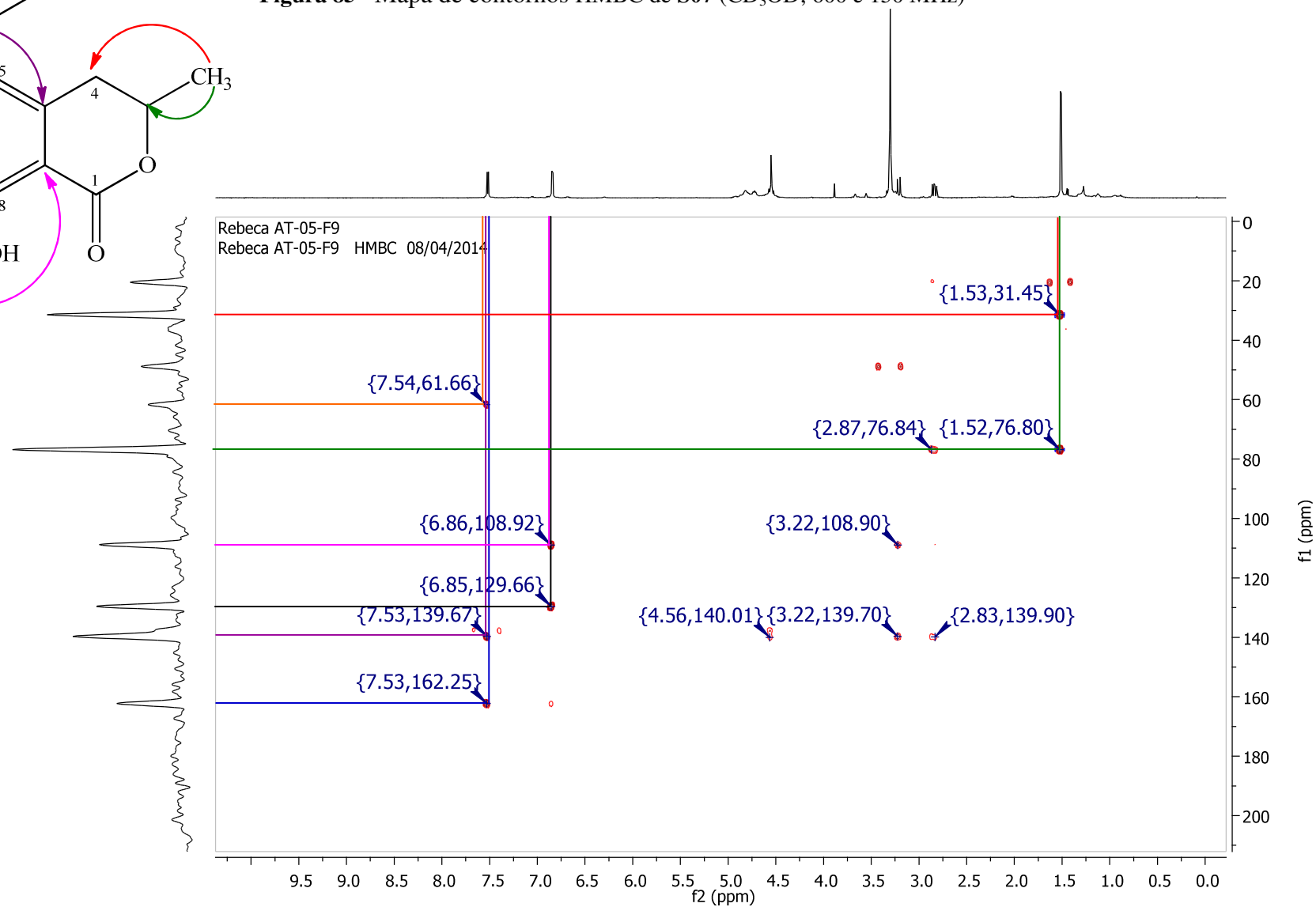
Figura 83 - Mapa de contornos COSY de **S07** (CD₃OD; 600 MHz)

Figura 84 - Mapa de contornos HSQC de **S07** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

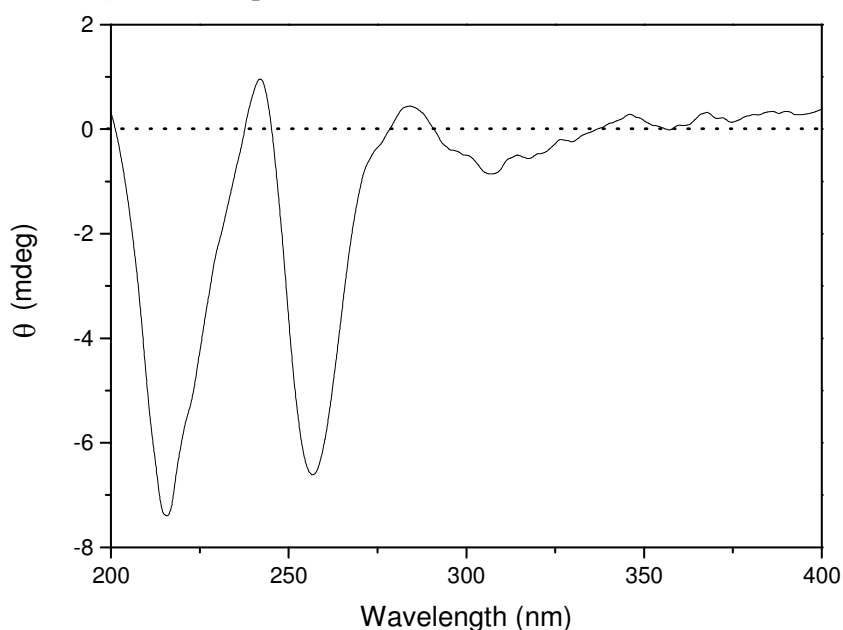
Fonte: o autor.

**S07****Figura 85** - Mapa de contornos HMBC de **S07** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

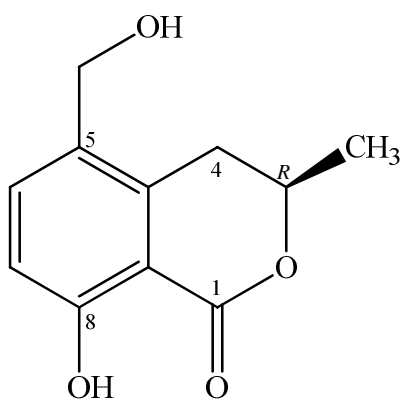
Fonte: o autor.

A **Figura 86** apresenta o espectro de dicroísmo circular de **S07**, no qual podem ser verificados efeitos Cotton negativos em 257 ($\Delta\epsilon = -1,72$) e 214 nm ($\Delta\epsilon = -2,17$) e efeito Cotton positivo em 244 nm ($\Delta\epsilon = 0,29$). Esses resultados em comparação com os dados descritos na literatura (258 nm - $\Delta\epsilon = -2,30$; 243 nm - $\Delta\epsilon = 0,72$; 220 nm - $\Delta\epsilon = -2,42$) (OKUNO et al., 1986), indicam a configuração *R* para C-3. Além disso, sua rotação específica foi de $[\alpha]^{23} = -42^\circ$ (*c* 0,09 em EtOH), enquanto na literatura o valor descrito é de $[\alpha]^{20} = -97,9^\circ$ (*c* 0,56 em EtOH) (OKUNO et al., 1986). Portanto a substância **S07** é nomeada como: (-)-(3*R*)-3,4-diidro-8-hidroxi-5-hidroximetil-3-metil-isocumarina.

Figura 86 - Espectro de dicroísmo circular de **S07** (200-400 nm).



Fonte: o autor.



S07

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **S07** e para a 5-hidroxi-metilmeleína (OKUNO et al., 1986) estão descritos na **Tabela 39**.

Tabela 39 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S07** e para a 5-hidroxi-metilmeleína.

S07^a			5-hidroxi-metilmeleína^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1	-	N/O ^c	-	170,1
3	4,72 (m)	77,1	4,69 (m)	75,6
4	3,21 (dd; 3,6; 16,8)	31,7	3,20 (dd; 3,5; 16,5)	31,1
	2,84 (dd; 12,0; 16,8)		2,76 (dd; 10,5; 16,5)	
4a	-	139,7	-	138,4
5	-	129,7	-	127,9
6	7,52 (d; 8,4)	138,0	7,43 (d; 8,5)	136,6
7	6,84 (d; 8,4)	116,1	6,81 (d; 8,5)	115,7
8	-	162,3	-	161,6
8a	-	108,9	-	108,3
3-CH ₃	1,51 (d; 6,6)	20,8	1,52 (d; 6,0)	20,7
5-CH ₂ OH	4,55 (d; 3,0)	61,9	4,57 (s)	62,3

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD₃OD; ^b δ -ppm; 60 e 15 MHz; CDCl₃ (OKUNO et al., 1986); ^c sinal não observado.

Fonte: o autor.

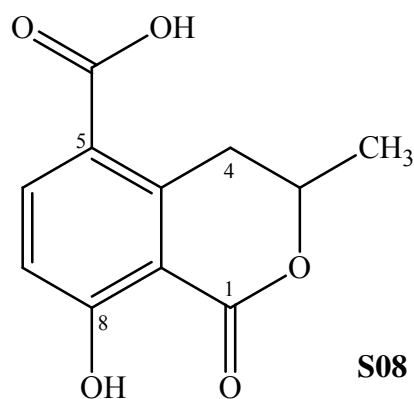
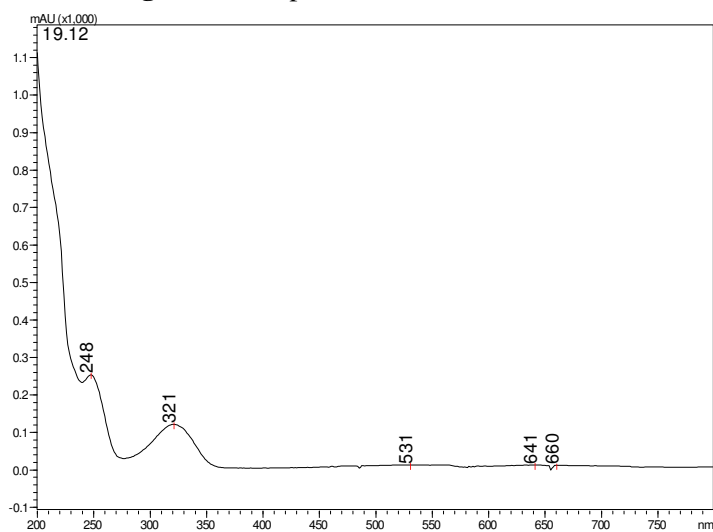
Este composto é normalmente encontrado em fungos terrestres (CHENG et al., 2011b; KOKUBUN et al., 2003; OKUNO et al., 1986), porém já foi isolado de fungos de origem marinha, como de *Xylaria* sp., isolado da gorgônia leque *Annella* sp. (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009), e também de uma espécie desconhecida de fungo que foi isolado da alga verde *Codium fragile* (Suringar) Hariot (EL-BEIH et al., 2007).

Outros estudos indicaram que a 5-hidroxi-metilmeleína apresenta moderada atividade contra a praga agrícola *Spodoptera littoralis* (curuquerê africano) (KOKUBUN et al., 2003) e moderada atividade antibacteriana contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009).

4.2.3.4 Elucidação estrutural de S08

Após as análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos, a substância **S08** (3,9 mg) foi identificada como a 5-carboxi-meleína. Seu espectro no UV-Vis (**Figura 87**) apresentou bandas de absorção em 321 e 248 nm, similares às da substância **S07**. OKUNO et al. (1986) descreveram que o espectro no UV da 5-carboxi-meleína apresentava bandas de absorção com máximos em 315, 246 e 228 nm (EtOH).

Figura 87 - Espectros no UV-Vis da substância **S08** (68,7% MeOH:31,3% H₂O).

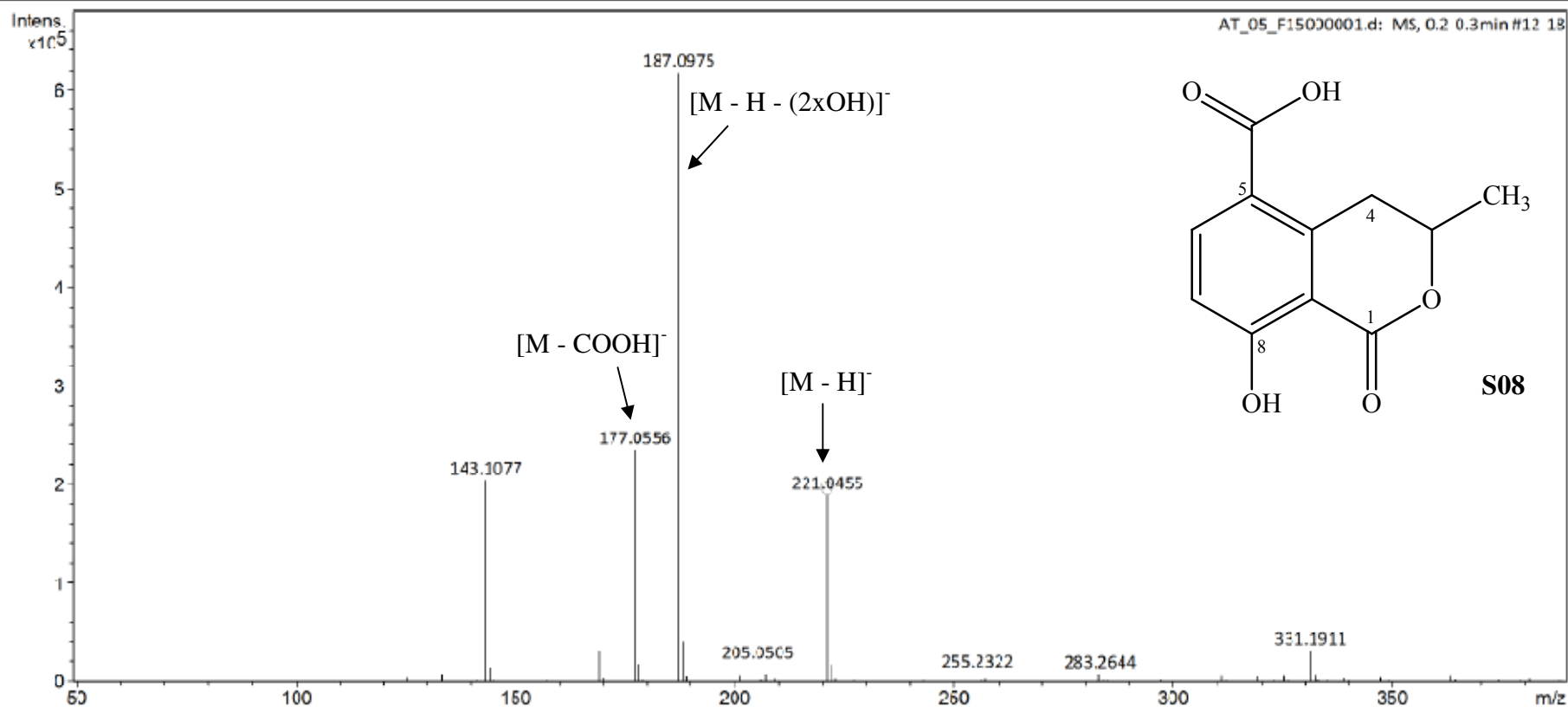


Fonte: o autor.

Sua fórmula molecular foi determinada como C₁₁H₁₀O₅, através da análise dos dados de RMN, bem como do seu espectro de massas de alta resolução (ESI-Q-TOF) no modo negativo (**Figura 88**), o qual apresentou o pico em m/z 221,0455 e que se refere ao [M - H]⁻ (calculado 221,0455- erro de 0 ppm).

Figura 88 - Espectro de Massas de alta resolução de **S07** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

A partir do espectro de RMN de ^1H (**Figura 89**) foi possível verificar que a substância **S08** apresentava sinais semelhantes à substância **S07**, como por exemplo, a presença de sinais de hidrogênios do sistema aromático em δ_{H} 8,11 (d, $J_{6-7} = 9,0$ Hz, H-6, 1H) e em δ_{H} 6,92 (d, $J_{7-6} = 9,0$ Hz, H-7, 1H), um multiplete em δ_{H} 4,70 (H-3, 1H), dois duplos dubletos em δ_{H} 3,88 ($J_{4a-3} = 3,0$; $J_{4a-4b} = 17,7$; H4a, 1H) e 3,02 ($J_{4b-3} = 12,0$; $J_{4b-4a} = 17,7$; H-4b; 1H) e um dubleto em δ_{H} 1,51 ($J_{\text{CH}_3-3} = 6,6$ Hz, 3-CH₃, 3H). O sinal em δ_{H} 8,11, indica que o anel aromático apresenta um substituinte retirador de elétrons, desblindando assim o hidrogênio próximo a ele.

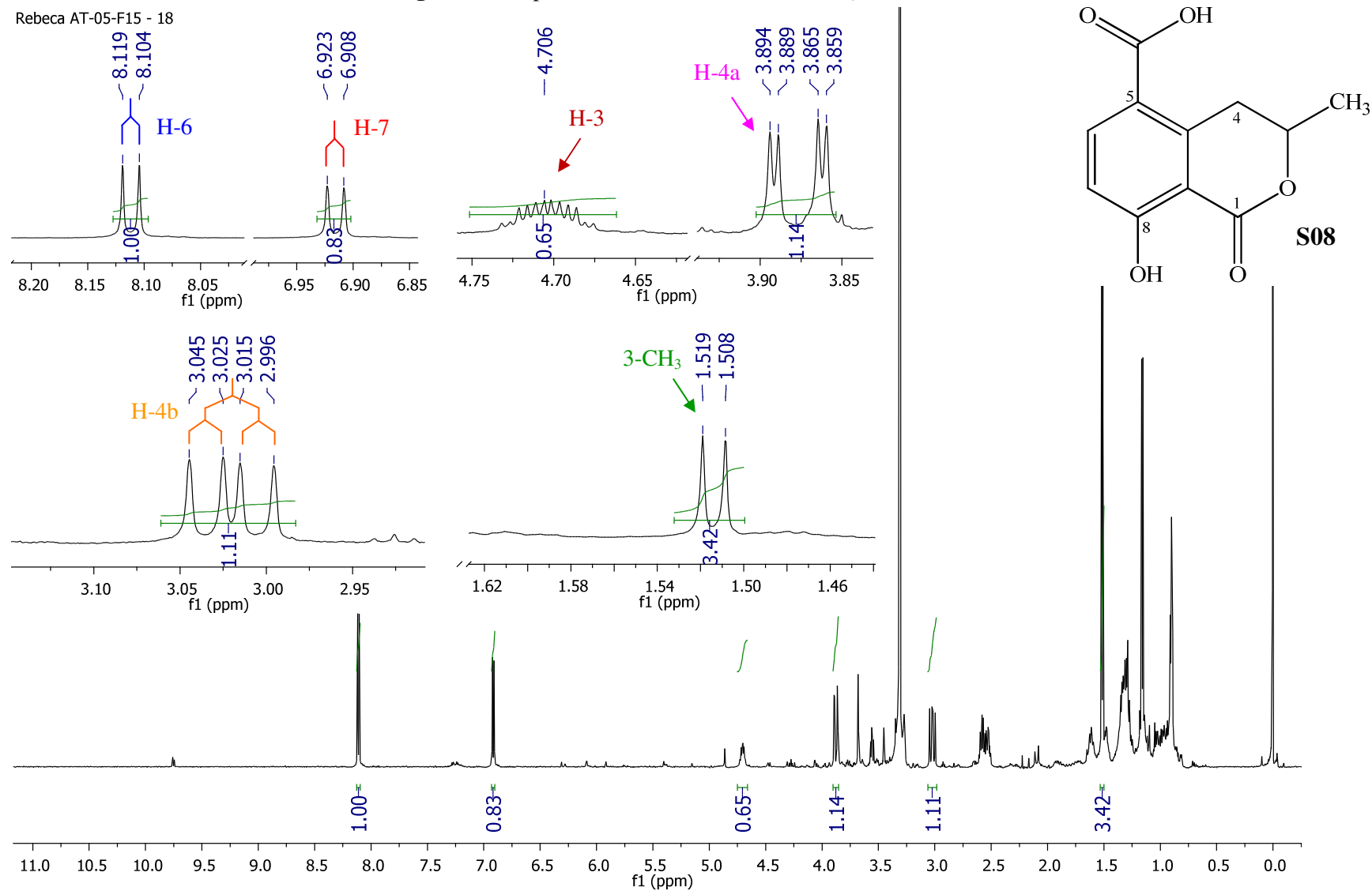
No mapa de contornos COSY (**Figura 90**) foi possível verificar a correlação entre H-6 e H-7, bem como as correlações entre H-3 e H-4b e o sinal referente ao grupo metílico na posição 3.

O mapa de contornos HSQC (**Figura 91**) indicou a presença de um carbono metilênico (representado em vermelho) em δ_{C} 33,5 (C-4), carbonos metínicos (representados em azul) em δ_{C} 139,4 (C-6), 116,3 (C-7) e em δ_{C} 76,9 (C-3) e um carbono metílico (também representado em azul) em δ_{C} 20,7 (3-CH₃).

No mapa de contornos HMBC (**Figura 92**) foi possível confirmar a presença de um grupo retirador de elétrons como substituinte no anel aromático, devido a correlação entre H-6 com o carbono quaternário em δ_{C} 169,7 (5-COOH). Além disso, foram observadas as correlações do H-6 com outros dois carbonos quaternários em δ_{C} 165,7 (C-8) e 143,9 (C-4a), além de outras correlações observadas anteriormente para a substância **S07**.

Figura 89 - Espectro de RMN de ^1H de **S08** (CD_3OD ; 600 MHz)

Rebeca AT-05-F15 - 18



Fonte: o autor.

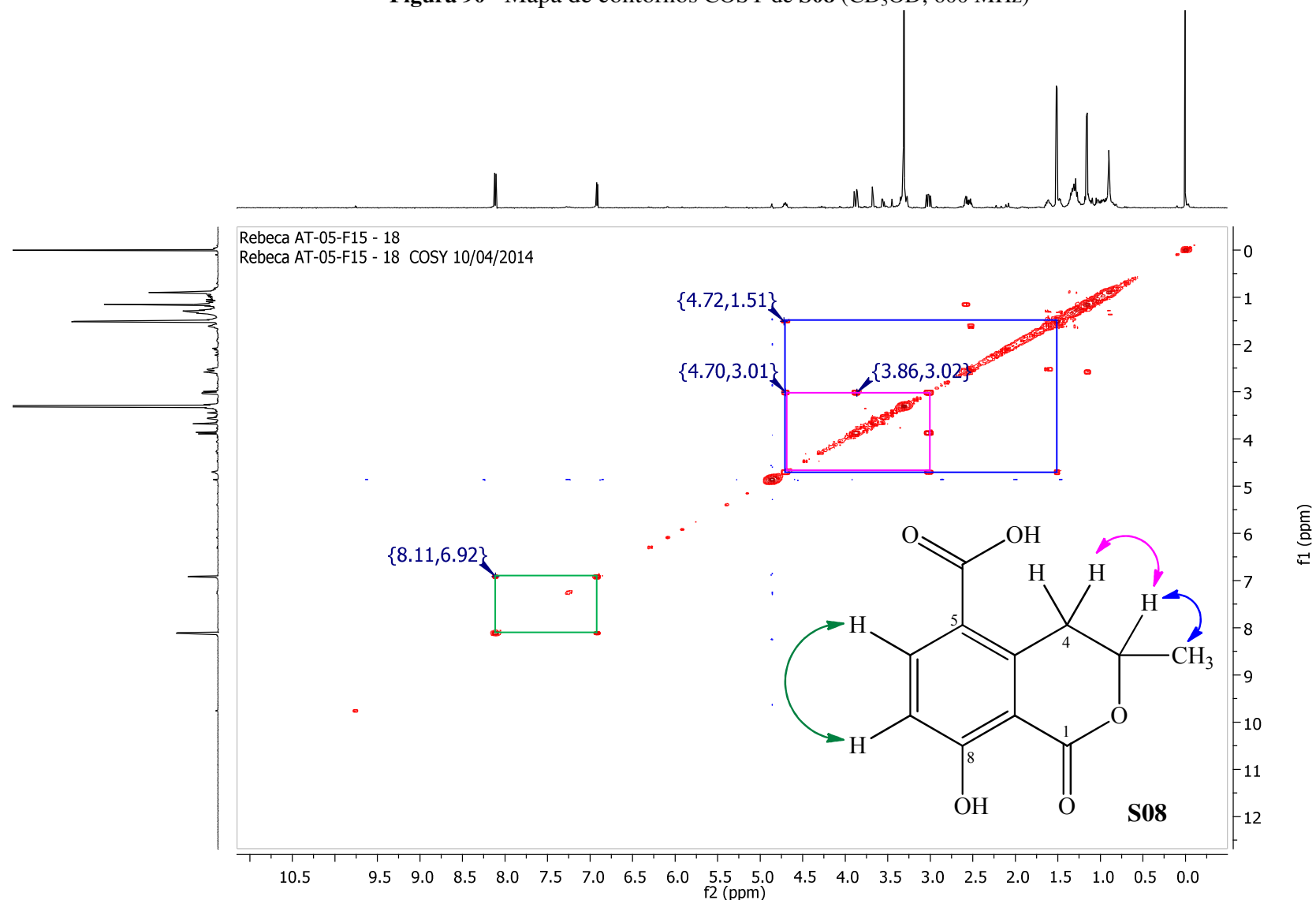
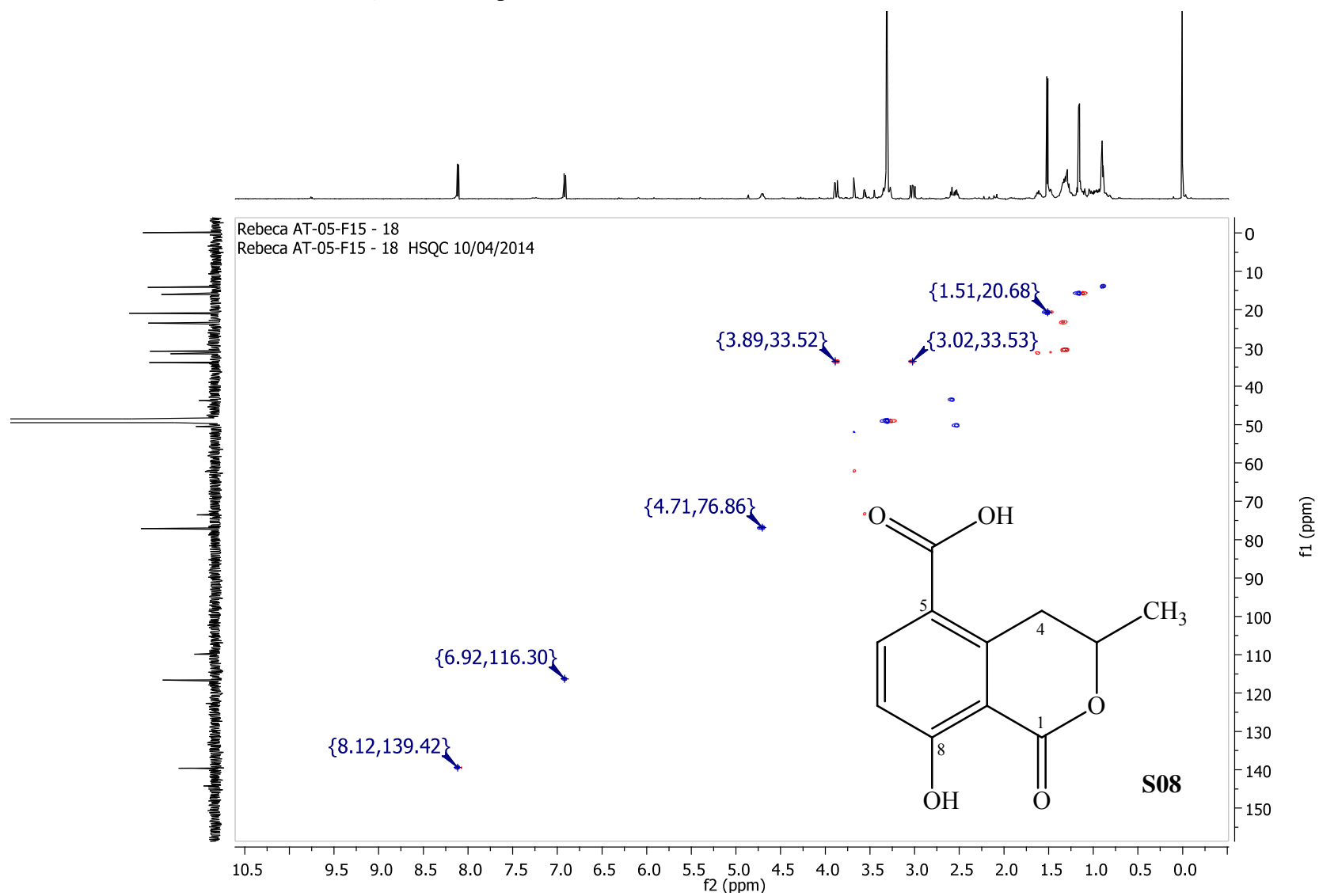
Figura 90 - Mapa de contornos COSY de **S08** (CD₃OD; 600 MHz)

Figura 91 - Mapa de contornos HSQC de **S08** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

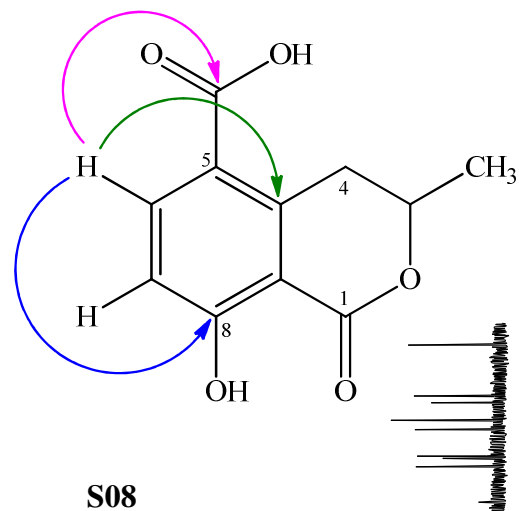
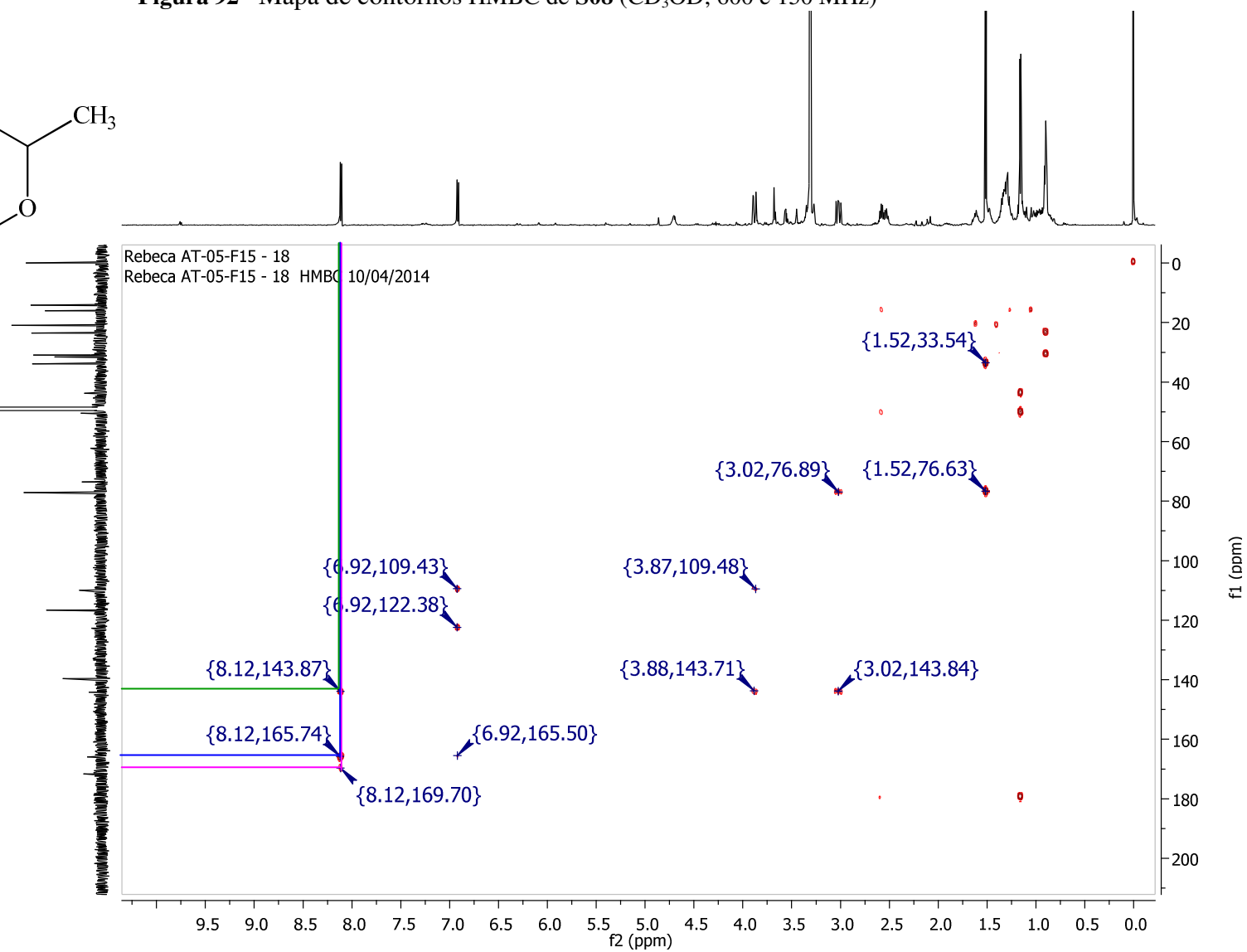


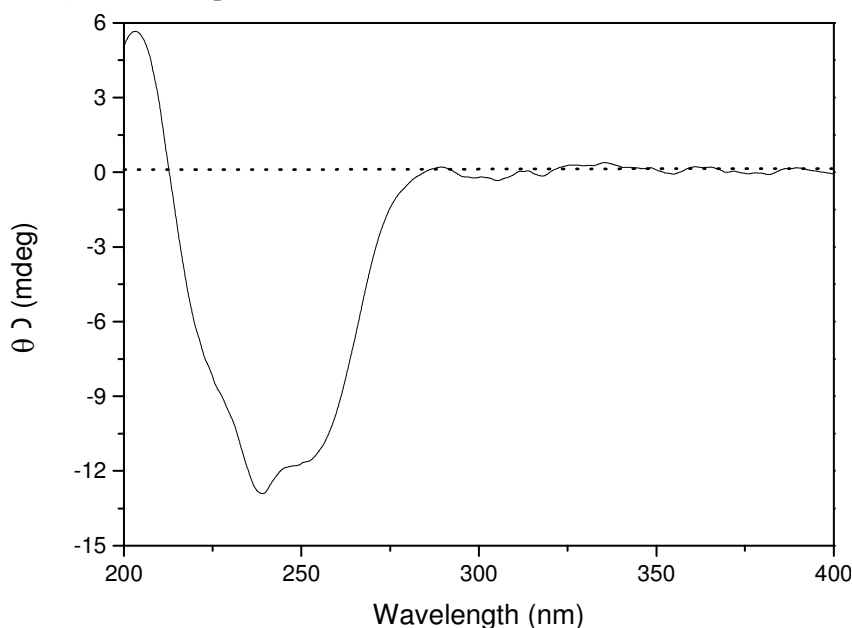
Figura 92 - Mapa de contornos HMBC de **S08** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



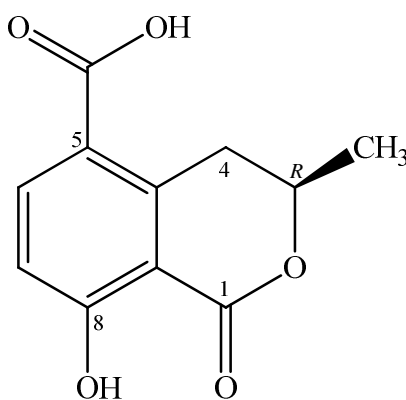
Fonte: o autor.

O espectro de dicroísmo circular de **S08** (**Figura 93**) apresentou efeitos Cotton negativos em 253 ($\Delta\epsilon = -1,55$) e 238 nm ($\Delta\epsilon = -1,80$) e efeito Cotton positivo em 205 nm ($\Delta\epsilon = 0,86$). Novamente, a comparação com os dados descritos na literatura (255 nm - $\Delta\epsilon = -5,12$; 240 nm - $\Delta\epsilon = -5,69$; 208 nm - $\Delta\epsilon = 2,48$) (OKUNO et al., 1986), indicaram a configuração *R* para C-3. Sendo assim, a substância **S08** é nomeada como: (3*R*)-5-carboxi-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-isocumarina.

Figura 93 - Espectro de dicroísmo circular de **S08** (200-400 nm).



Fonte: o autor.



S08

Os dados espectrais para a substância **S08**, bem como sua comparação com a 5-carboxi-meleína (OKUNO et al., 1986) estão descritos na **Tabela 40**.

Tabela 40 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S08** e para a 5-carboxi-meleína.

S08^a			5-carboxi-meleína^b	
Nº	δ_{H} (mult., J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J, Hz)	δ_{C}
1	-	N/O ^c	-	N/O ^c
3	4,70 (m)	76,9	4,72 (m)	75,1
4	3,88 (dd; 3,0; 17,7)	33,5	3,82 (dd; 3,0; 18,0)	32,0
	3,02 (dd; 12,0; 17,7)		2,96 (dd; 12,0; 18,0)	
4a	-	143,9	-	143,2
5	-	122,4	-	119,4
6	8,11 (d; 9,0)	139,4	8,15 (d; 9,6)	138,6
7	6,92 (d; 9,0)	116,3	6,94 (d; 9,6)	115,3
8	-	165,7	-	163,7
8a	-	109,4	-	108,8
3-CH ₃	1,51 (d; 6,6)	20,7	1,44 (d; 6,0)	20,1
5-COOH	-	169,7	-	169,2

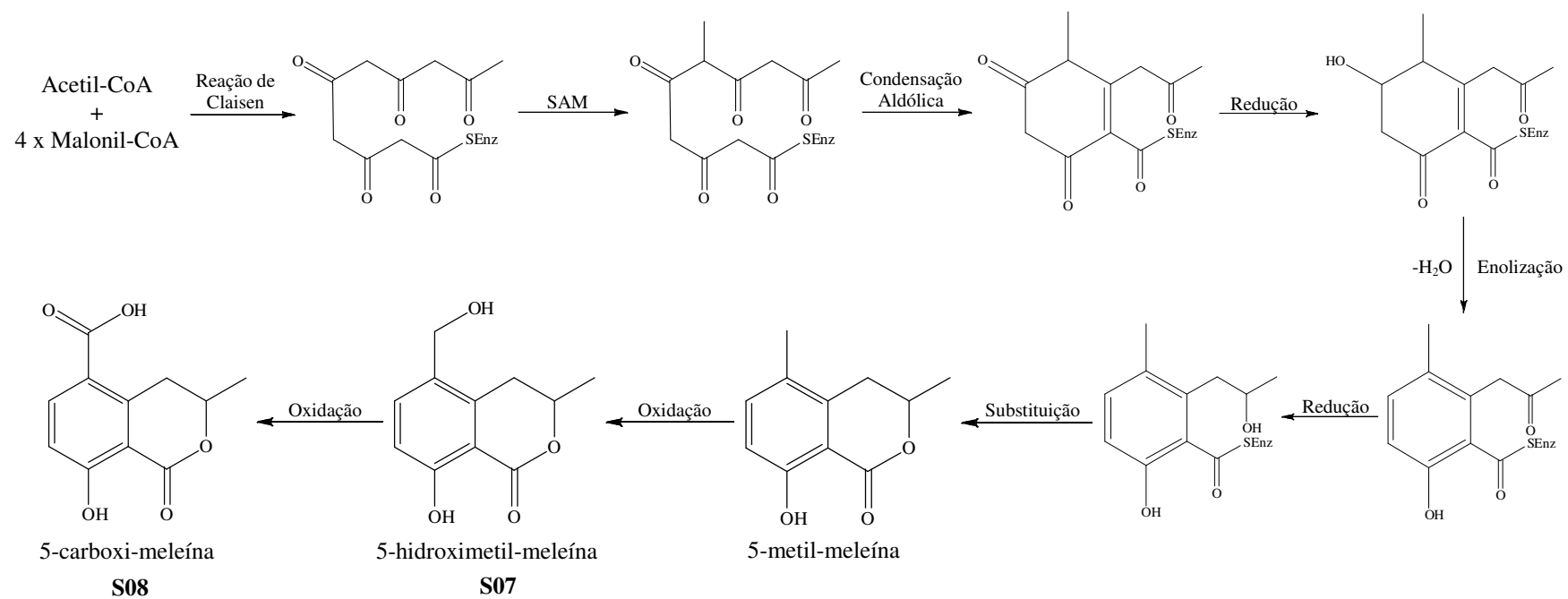
^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD₃OD; ^b δ -ppm; 60 e 15 MHz; DMSO-*d*₆ (OKUNO et al., 1986); ^c sinal não observado.

Fonte: o autor.

Esta substância foi isolada do extrato de *Valsa ceratosperma*, um fungo patogênico associado ao cancro da maçã (OKUNO et al., 1986) e, também do extrato de fungos marinhos como *Halorosellinia oceanica*, que apresentou moderada atividade anti-malárica (CHINWORRUNGSEE et al., 2001). Foi também isolada do fungo *Xylaria* sp., obtido da gorgônia leque *Annella* sp. e apresentou moderada atividade antibacteriana contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009).

As isocumarinas são derivados de policetídeos e, portanto, são biossintetizadas a partir de Acetil-CoA e 4 unidades de Malonil-CoA, como representado na **Figura 94**. Após reações de Claisen, ocorre uma metilação na presença de *S*-adenosilmetionina (SAM), seguida de uma condensação aldólica, redução e enolização com perda de água. Em seguida, ocorre outra redução e uma reação de substituição, formando a 5-metil-meleína. Esta pode então sofrer duas oxidações sequenciais, gerando a 5-hidroximetil-meleína (**S07**). e a 5-carboxi-meleína (**S08**) (DEWICK, 2002; CHAPLA, 2014).

Figura 94 - Proposta biossintética para as isocumarinas isoladas.



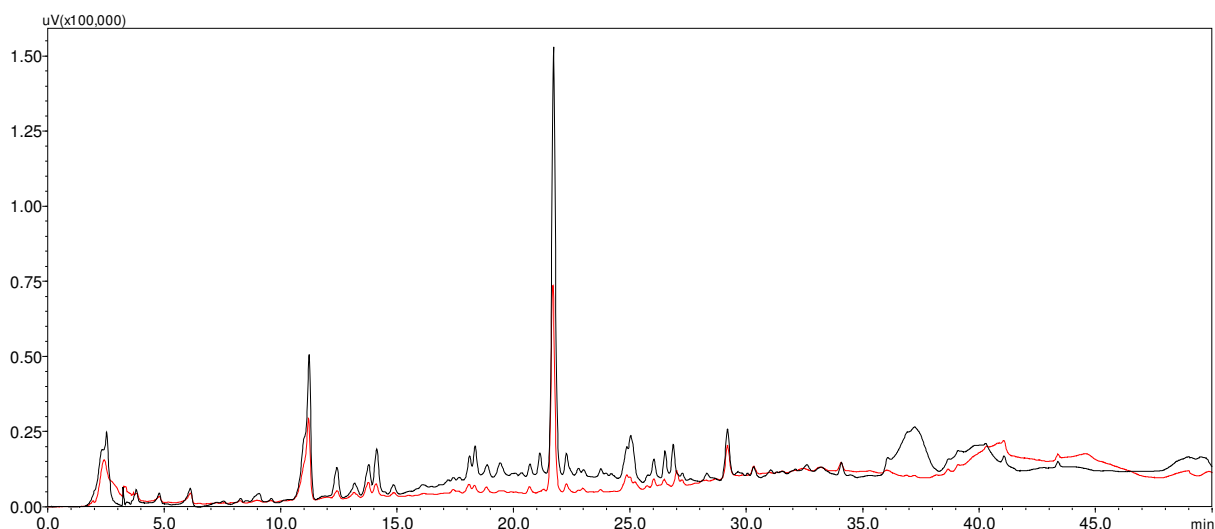
Fonte: o autor.

4.2.4 Avaliação da produção metabólica através de variações do meio de cultivo e/ou preservação de *Nemania bipapilatta* (AT-05)

Após o estudo do extrato bruto do fungo codificado como AT-05, foram realizadas variações do seu meio de cultivo, sendo obtidos 6 novos extratos (BM-M; BM-Mi; BMi-M; BMi-Mi; CM-M; CM-Mi) como descrito na seção 3.2.2.5.

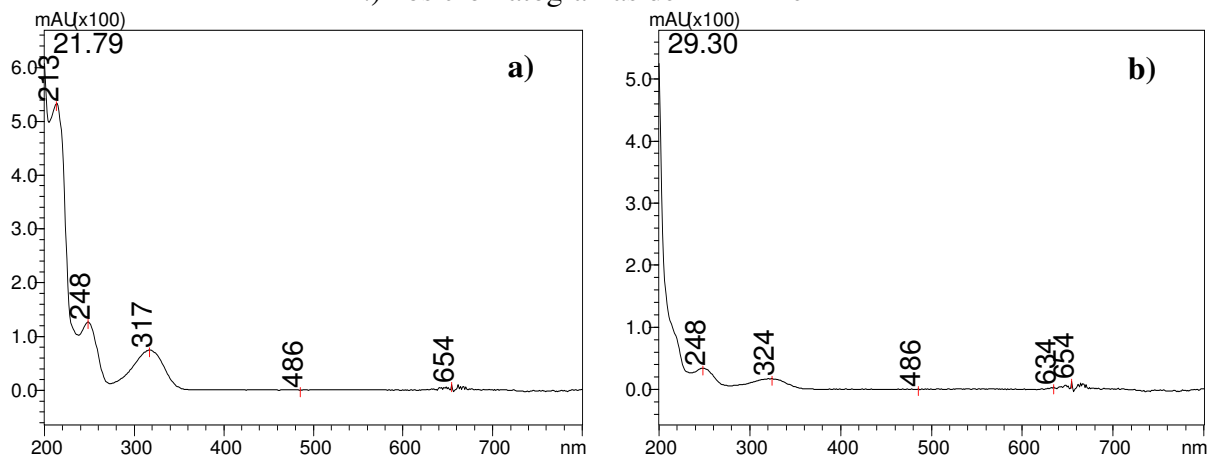
A fim de se verificar se houve mudança no perfil metabólico ao preservar a linhagem fúngica na água do mar (BM) ou água ultra pura (BMi), fez-se uma comparação entre os cromatogramas dos extratos BM-M e BMi-M, obtidos das linhagens preservadas nos dois tipos de água (**Figura 95**). Observou-se perfil cromatográfico similar para ambos os extratos, sendo possível detectar, através de análise dos espectros no UV-Vis (**Figura 96**), as substâncias **S07** ($t_R = 21,8$ min) e **S08** ($t_R = 29,3$ min), assim como no extrato original de AT-05. A partir dos espectros de RMN de 1H dos extratos BMi-M e BM-M (**Figura 97**) foi possível, novamente, notar a semelhança entre os perfis dos dois extratos. Portanto, podemos dizer que a linhagem fúngica AT-05 pode ser preservada tanto em slants preparados com água do mar ou em slants preparados com água ultra pura que sua produção metabólica será majoritariamente mantida.

Figura 95 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos **BMi-M** (preto) e **BM-M** (vermelho)



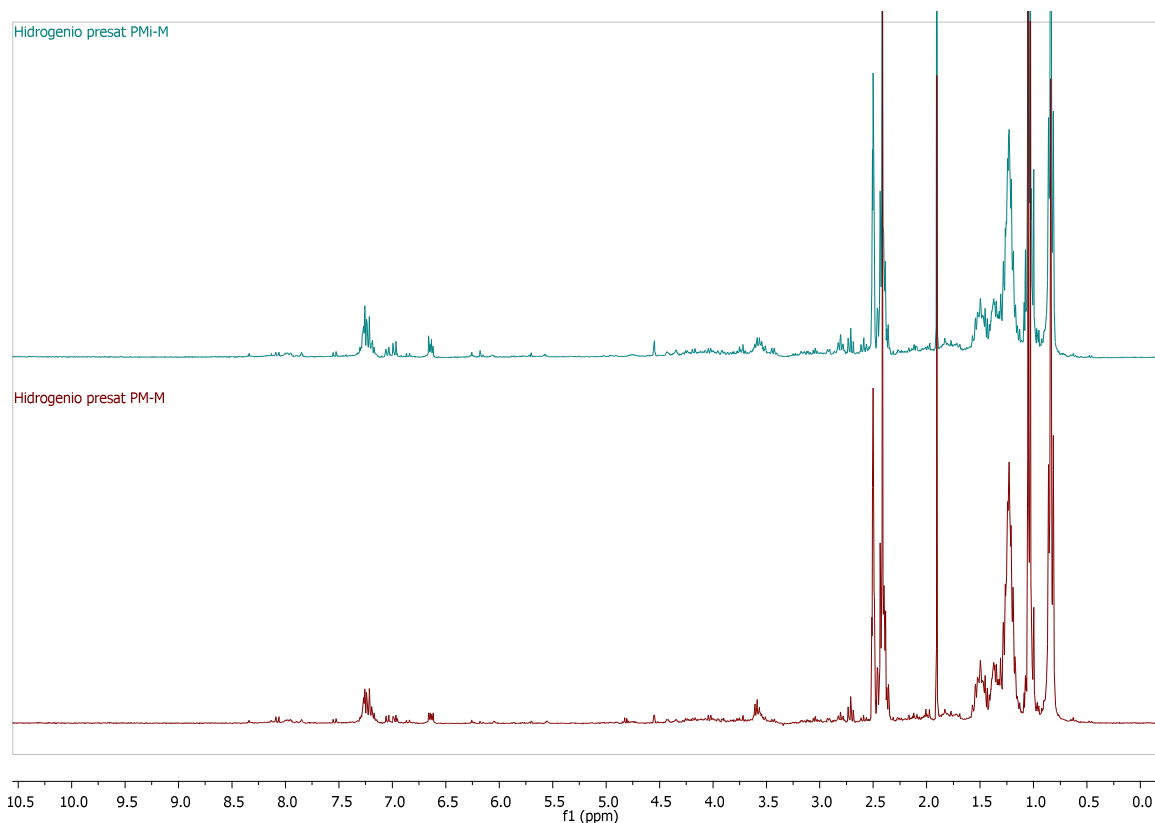
Fonte: o autor.

Figura 96 - Espectros no UV-Vis das substâncias: **a) S07** ($t_R = 21,8$ min.) e **b) S08** ($t_R = 29,3$ min.) nos cromatogramas de BMi-M e BM-M



Fonte: o autor.

Figura 97 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos **BMi-M** (azul) e **BM-M** (vermelho)



Fonte: o autor.

Foi também realizada comparação da produção metabólica frente ao tipo de água utilizada para o preparo dos meios de cultivo (BM-M - água do mar; e BM-Mi - água ultra pura) (**Figura 98**). Diferença significativa foi observada na produção metabólica ao se utilizar água ultra pura (BM-Mi), com o surgimento de picos associados a novas substâncias em

quase todo o cromatograma. Vale ressaltar, ainda, que no cromatograma de BM-Mi (vermelho) o pico com tempo de retenção de 21,7 min. apresentou espectro de UV (**Figura 99**) diferente daquele observado para a substância **S07** ($t_R = 21,8$ min) no cromatograma de BM-M (preto).

Figura 98 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos **BM-M** (preto) e **BM-Mi** (vermelho), obtidos em água do mar e água ultra pura, respectivamente

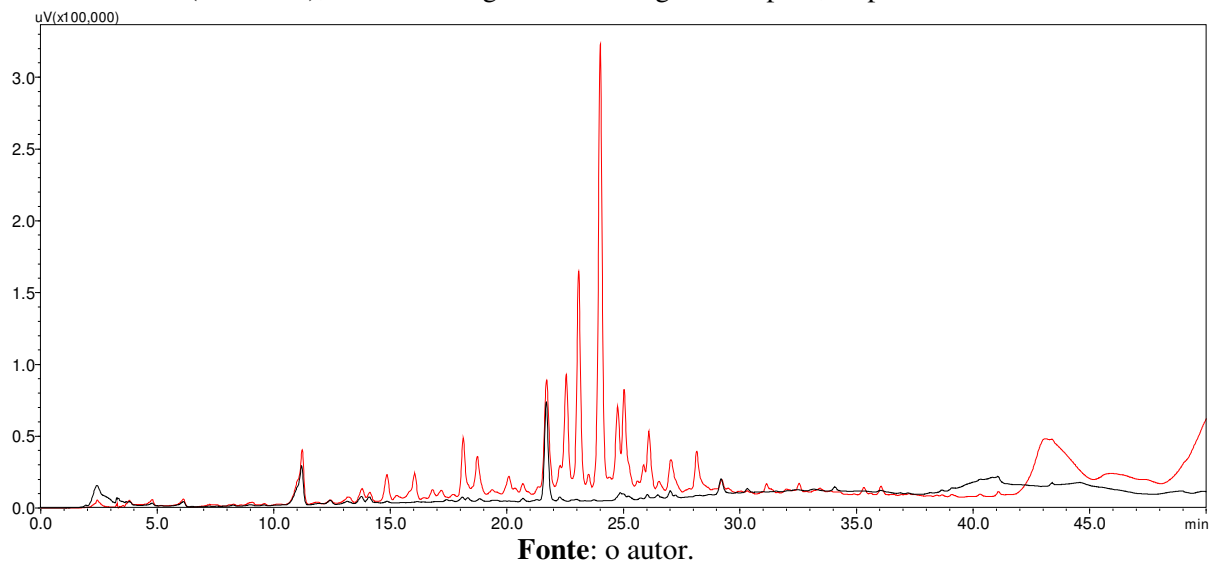
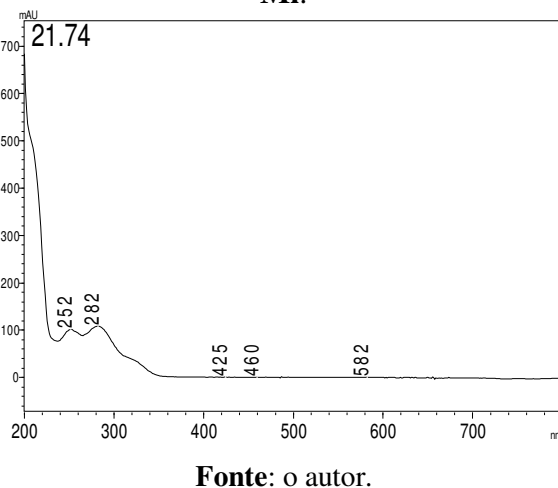


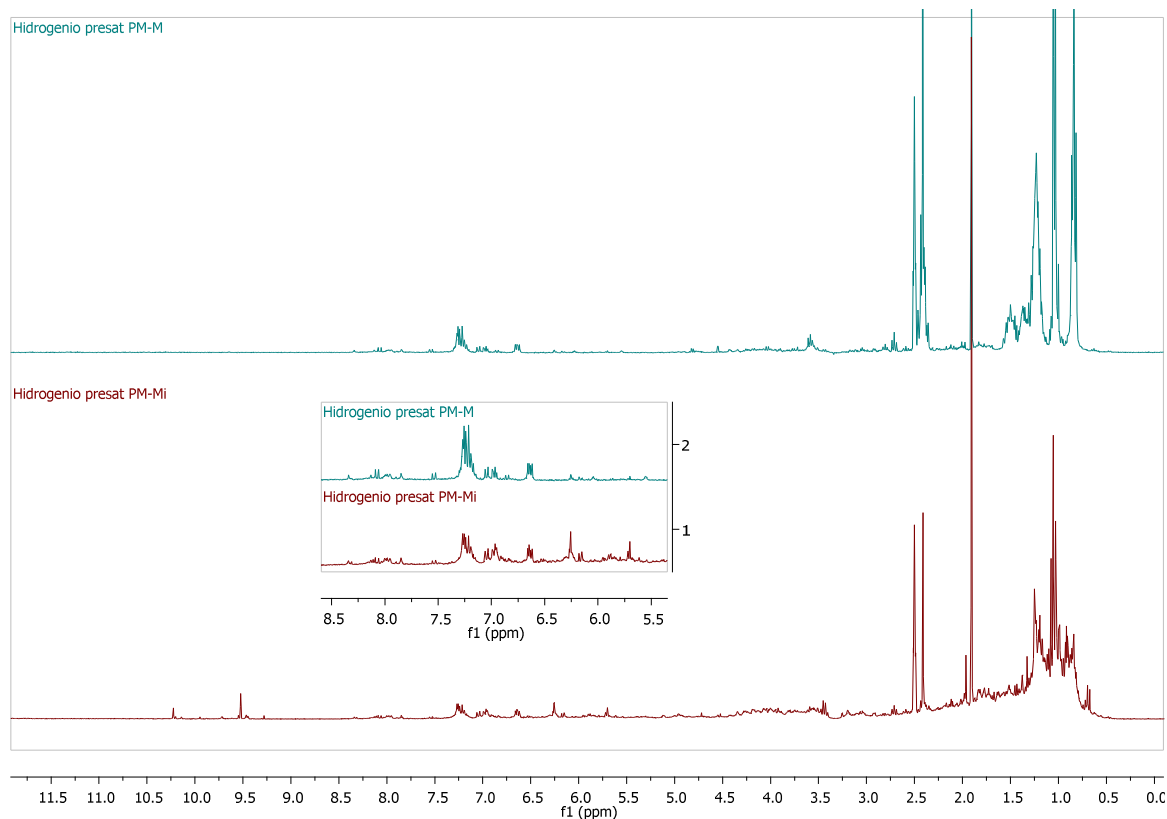
Figura 99 - Espectro no UV-Vis associado ao pico em 21,7 min. no cromatograma de **BM-Mi**.



Verificou-se ainda diferença entre os dois extratos, BM-M e BM-Mi, a partir dos seus espectros de RMN de ¹H (**Figura 100**), com destaque para sinais na região de hidrogênios metílicos (entre 0,5 e 1,5 ppm) e na região de hidrogênios do sistema aromático (entre 6,0 e

8,5 ppm), como observado na ampliação do espectro. Além disso, o espectro de BM-Mi apresentou sinais acima de 9,5 ppm, que não foram observados no espectro de BM-M.

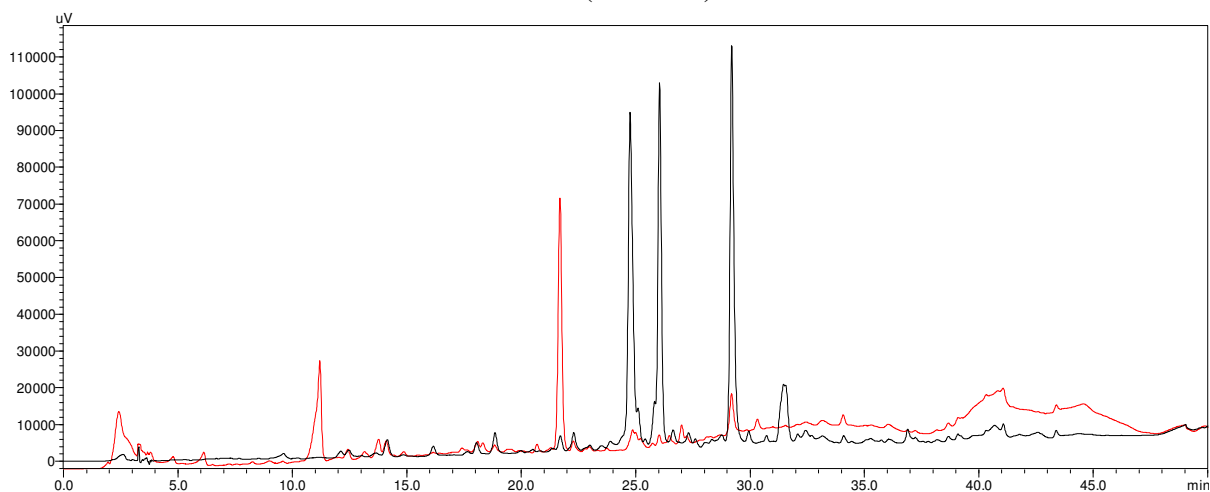
Figura 100 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos **BM-M** (azul) e **BM-Mi** (vermelho)



Fonte: o autor.

Fez-se também a comparação dos extratos preparados com água do mar e meio líquido de MDB (BM-M) e Czapeck (CM-M) (**Figura 101**), que evidenciou diferenças na produção metabólica ao variar o meio de cultivo utilizado para o crescimento do fungo. O cromatograma de CM-M apresentou de 3 picos mais intensos na região entre 25 a 30 minutos, enquanto o cromatograma de BM-M mostrou dois picos mais intensos ($t_R = 11,2$ e $21,7$ min.).

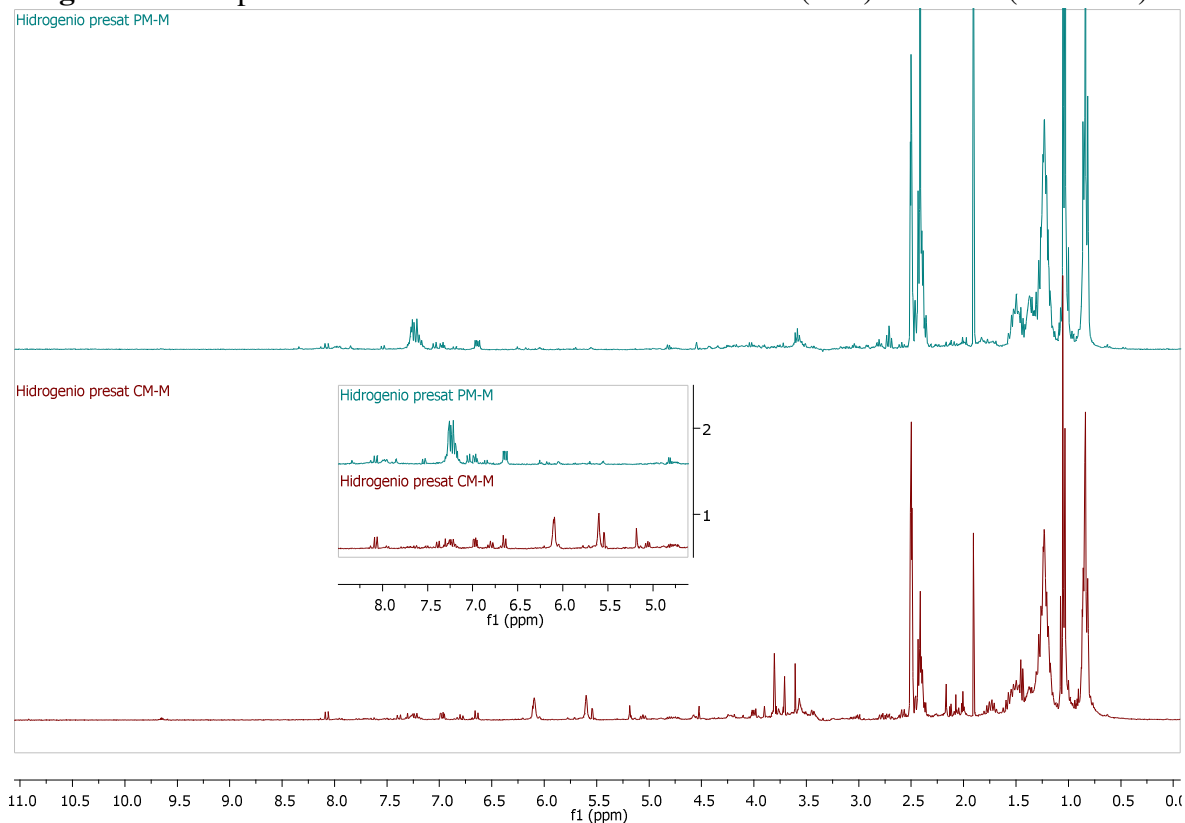
Figura 101 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos **CM-M** (preto) e **BM-M** (vermelho).



Fonte: o autor.

Novamente podemos verificar diferenças na produção metabólica entre os extratos BM-M e CM-M ao comparar seus espectros de RMN de ¹H (**Figura 102**), com destaque para as regiões entre 3,5 e 4 ppm e entre 5 e 8 ppm.

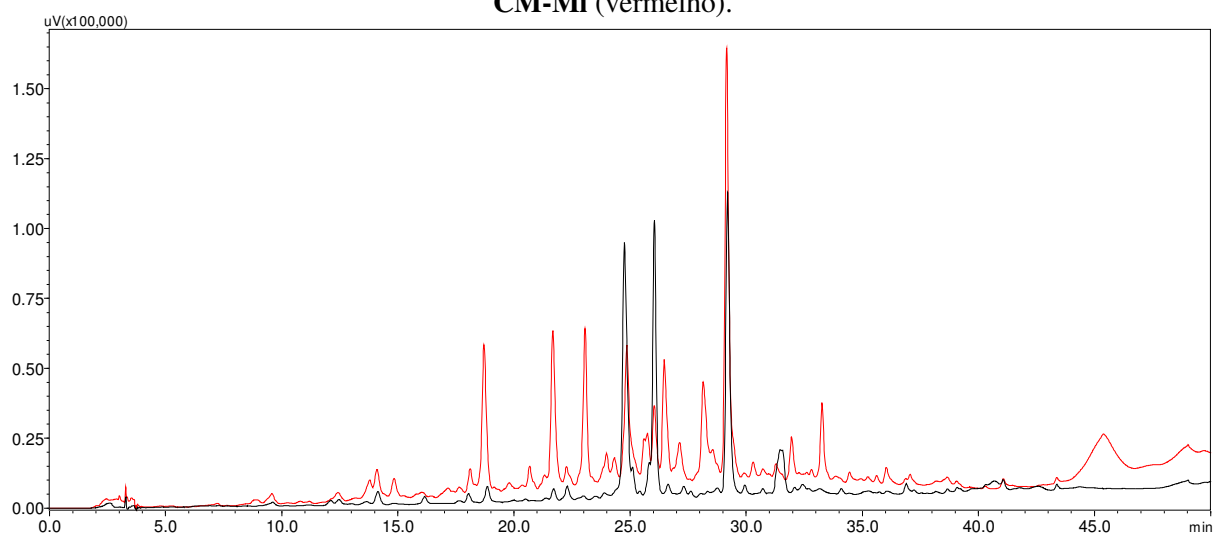
Figura 102 - Espectros de RMN de ¹H dos extratos **BM-M** (azul) e **CM-M** (vermelho)



Fonte: o autor.

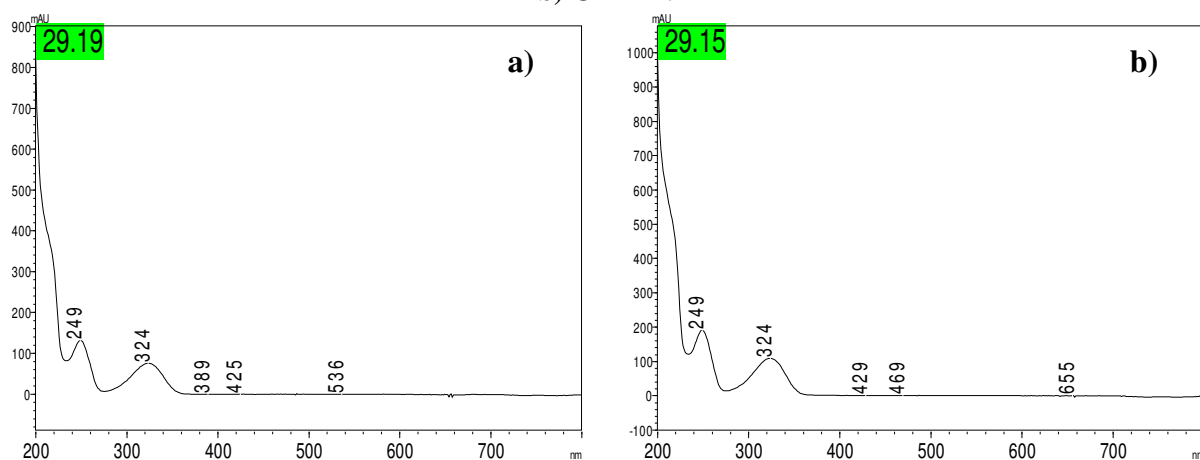
E por último, foram comparados os extratos preparados com meio de Czapeck e diferentes tipos de água (água do mar - CM-M; água ultra pura - CM-Mi) (**Figura 103**). E, novamente, é possível verificar diferenças entre os dois extratos, com destaque para o pico majoritário em 29,2 min., presente em ambos os cromatogramas e que apresenta espectros no UV-Vis (**Figura 104**) similares e característicos de isocumarinas, como apresentado para as substâncias **S07** e **S08**.

Figura 103 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹; 40 min; 254 nm) dos extratos **CM-M** (preto) e **CM-Mi** (vermelho).



Fonte: o autor.

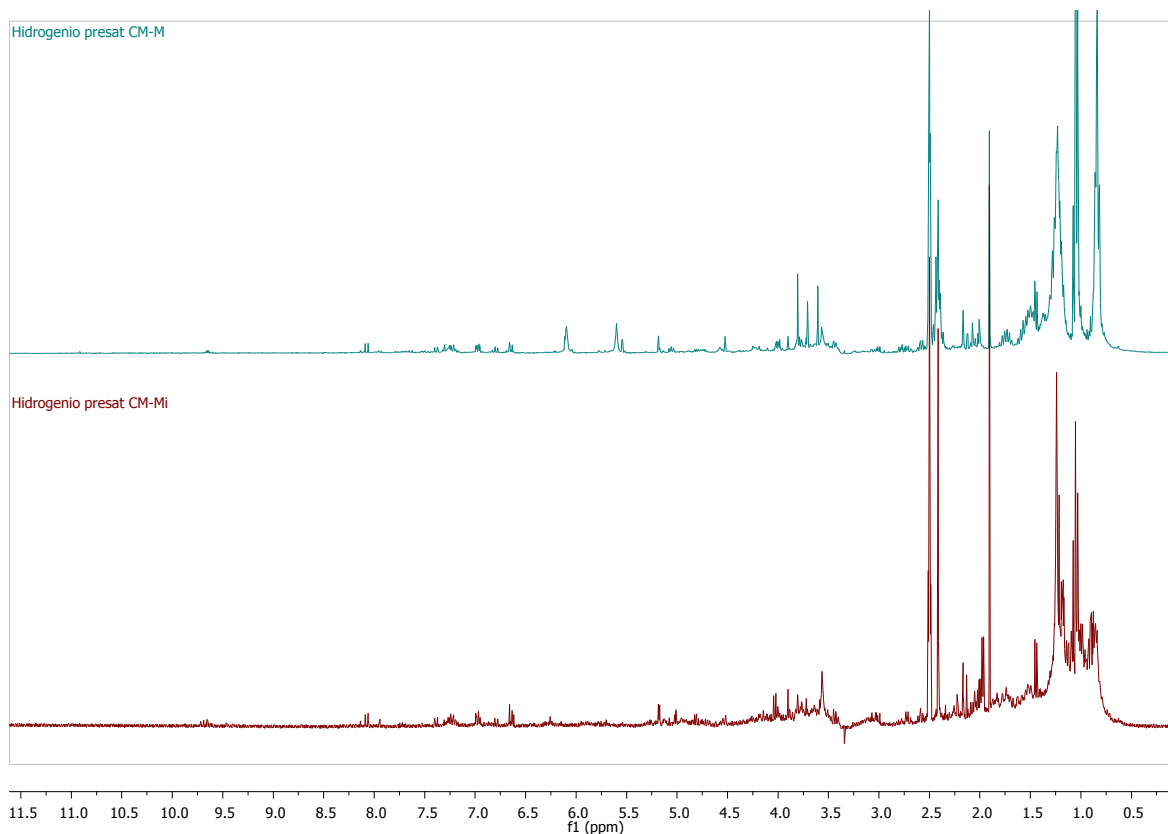
Figura 104 - Espectros no UV-Vis associados ao pico em 29,2 min. no cromatograma de: a) **CM-M**; b) **CM-Mi**.



Fonte: o autor.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 105**) evidenciam que o extrato CM-Mi não apresentou os sinais entre 5 e 6 ppm, observados para o extrato de CM-M, além de diferenças marcantes na região entre 0,5 e 1,5 ppm.

Figura 105 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos CM-M (azul) e CM-Mi (vermelho)



Fonte: o autor.

Ao comparar a quantidade de extrato obtido para cada variação estudada (**Tabela 11** - seção 3.2.2.5), verificou-se que os extratos obtidos a partir do crescimento do fungo em meios preparados com água ultra pura renderam maior massa, enquanto aqueles obtidos a partir dos meios preparados com Czapeck mostraram baixa produção, sendo que a massa do extrato CM-Mi foi cerca de 10% daquela obtida para o extrato BM-Mi.

4.2.4.1 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo e/ou preservação de *Nemania bipapillata* (AT-05)

4.2.4.1.1 Atividades antifúngica e anticolinesterásica

Os resultados das atividades antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05 estão descritos na **Tabela 41**. Vale ressaltar que para a atividade antifúngica foram usadas duas linhagens de fitopatógenos, *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*.

Tabela 41 - Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05^a.

Amostra	Atividade antifúngica				Atividade	
	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>		Anticolinesterásica	
	Atividade	Rf	Atividade	Rf	Atividade	Rf
CM-M	*	0,69 - 0,81	***	0,69 - 0,78	**	Origem - 0,47
CM-Mi	**	0,64 - 0,78	**	0,65 - 0,79	***	origem
BM-M	*	0,71	*	0,68	***	0,47
BM-Mi	**	0,60 - 0,75	**	0,54 - 0,74	***	0,15
BMi-M	*	0,71	*	0,67	***	0,39 - 0,53
BMi-Mi	**	0,64 - 0,78	**	0,62 - 0,72	i	
padrão	***	origem	***	origem	***	0,36

^a os valores indicam os fatores de retenção em CCD; * atividade fraca / ** atividade moderada / *** atividade forte / i = inativo.

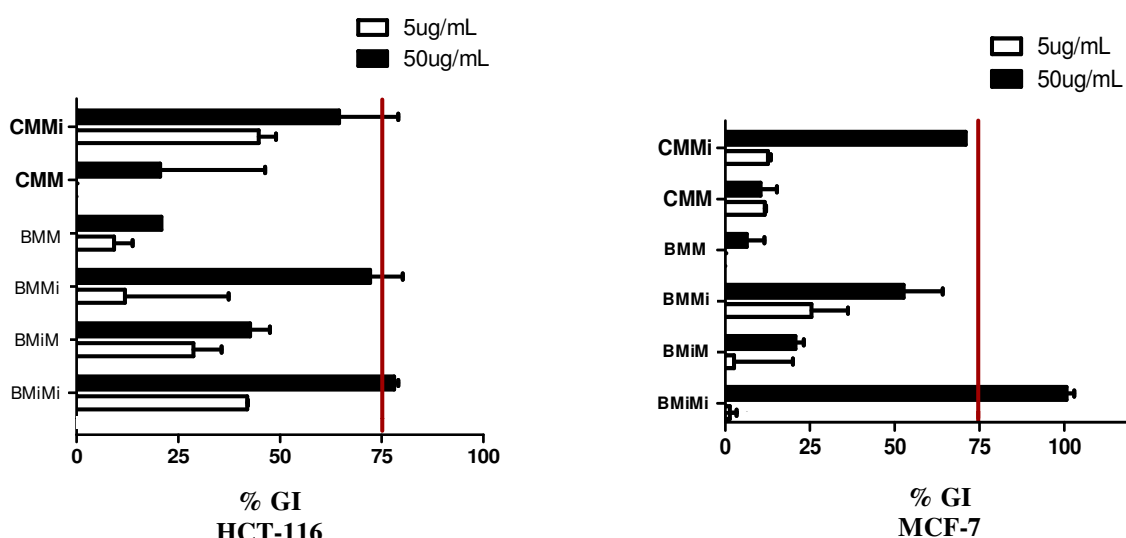
Fonte: o autor.

Foi possível verificar que todos os extratos apresentaram potencial antifúngico frente aos dois fitopatógenos testados, sendo que CM-M apresentou forte atividade frente a *C. sphaerospermum*, enquanto BM-Mi apresentou atividade moderada frente aos dois fungos. Em relação a atividade anticolinesterásica, todos os extratos foram ativos, com exceção do extrato BMi-Mi.

4.2.4.1.2 Potencial citotóxico

O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05 também foi avaliado pelo método do MTT, sendo utilizadas apenas duas linhagens de células tumorais, HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano), usada anteriormente para avaliar outras amostras, e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Os resultados estão apresentados na **Figura 106**.

Figura 106 - Potencial citotóxico dos extratos brutos obtidos a partir da variação do meio de cultivo de AT-05 frente às linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7.



Fonte: o autor.

Podemos verificar que o extrato BMi-Mi apresentou porcentagem de inibição superior a 75% frente às duas linhagens testadas (concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto, o extrato BM-Mi apresentou atividade citotóxica moderada. O valor de CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento da linhagem de célula tumoral) de BMi-Mi foi calculado por regressão não linear utilizando o GraphPadPrism 4.0 (Intuitive Software for Science), e apresentou-se superior a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Considerando os resultados de perfil químico por CLAE-DAD e RMN de ^1H , bem como de bioatividade, obtidos com a variação dos meios de cultivo da linhagem AT-05, o extrato BM-Mi foi selecionado para estudos cromatográficos ainda em escala reduzida por ter apresentado boa produção metabólica e pelo perfil químico diferente dos demais, além de ter apresentado atividade antifúngica e anticolinesterásica relevante e moderada atividade citotóxica.

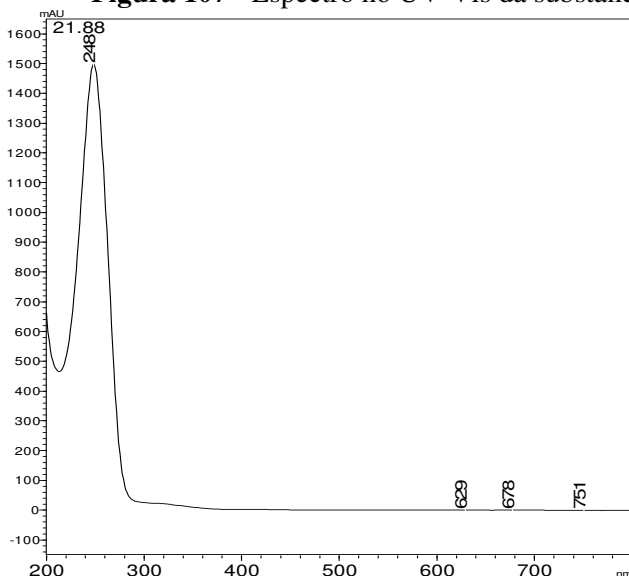
4.2.5 Estudo químico do extrato bruto BM-Mi de *Nemania bipapillata* (AT-05)

Após a análise do perfil químico obtido por CLAE-DAD do extrato bruto de BM-Mi, fez-se o fracionamento do mesmo em coluna de C-18, utilizando como eluente diferentes proporções de MeOH:H₂O. As frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ¹H e optou-se por fracionar a fração BM-Mi-F2 por CLAE-DAD em escala semi-preparativa, obtendo-se as substâncias **S09** e **S10**, que foram identificadas como sesquiterpenos do tipo botriano inéditos na literatura.

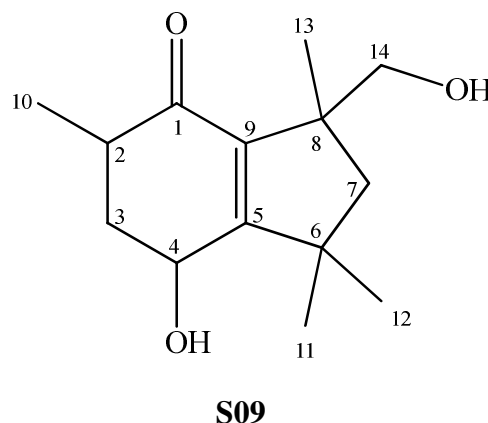
4.2.5.1 Elucidação estrutural de **S09**

A substância **S09** (1,3 mg) foi obtida como um óleo amarelado. Seu espectro no UV-Vis (**Figura 107**) apresentou uma banda de absorção em 248 nm. A rotação específica determinada para esta substância foi de $[\alpha]_D^{23} = +6,86^\circ$ (*c* 0,14 em CH₃OH).

Figura 107 - Espectro no UV-Vis da substância **S09** (57,3% MeOH:42,7% H₂O).



Fonte: o autor.



A fórmula molecular de **S09** foi determinada após as análises dos dados de RMN, bem como dos seus espectros de massas. A **Figura 108** mostra seu espectro de massas de baixa resolução (ESI-Ion Trap) no modo positivo, no qual é possível observar o pico base em *m/z* 261,2, referente ao $[M+Na]^+$.

Já a **Figura 109** mostra o espectro de massas (de baixa resolução e no modo positivo / ESI-Ion Trap) quando a amostra foi preparada utilizando metanol deuterado, a fim de se

verificar a presença de hidrogênios lábeis, ou seja, hidrogênios que podem ser facilmente trocados por deutério, como os presentes em hidroxilas ou aminas. Este apresentou, então, o pico base em m/z 263,2 ($[M-2H+2D+Na]^+$), indicando assim a presença de dois hidrogênios lábeis.

A **Figura 110** mostra o espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-TOF) de **S09**, no qual é possível verificar o pico em m/z 261,1466 referente ao $[M+Na]^+$ (calculado 261,1467 - erro de 0,4 ppm), indicando a fórmula molecular de **S09** como $C_{14}H_{22}O_3$.

Os espectros de massas da substância **S09** foram obtidos no Department of Chemistry, University of British Columbia, durante estágio PDSE-CAPES.

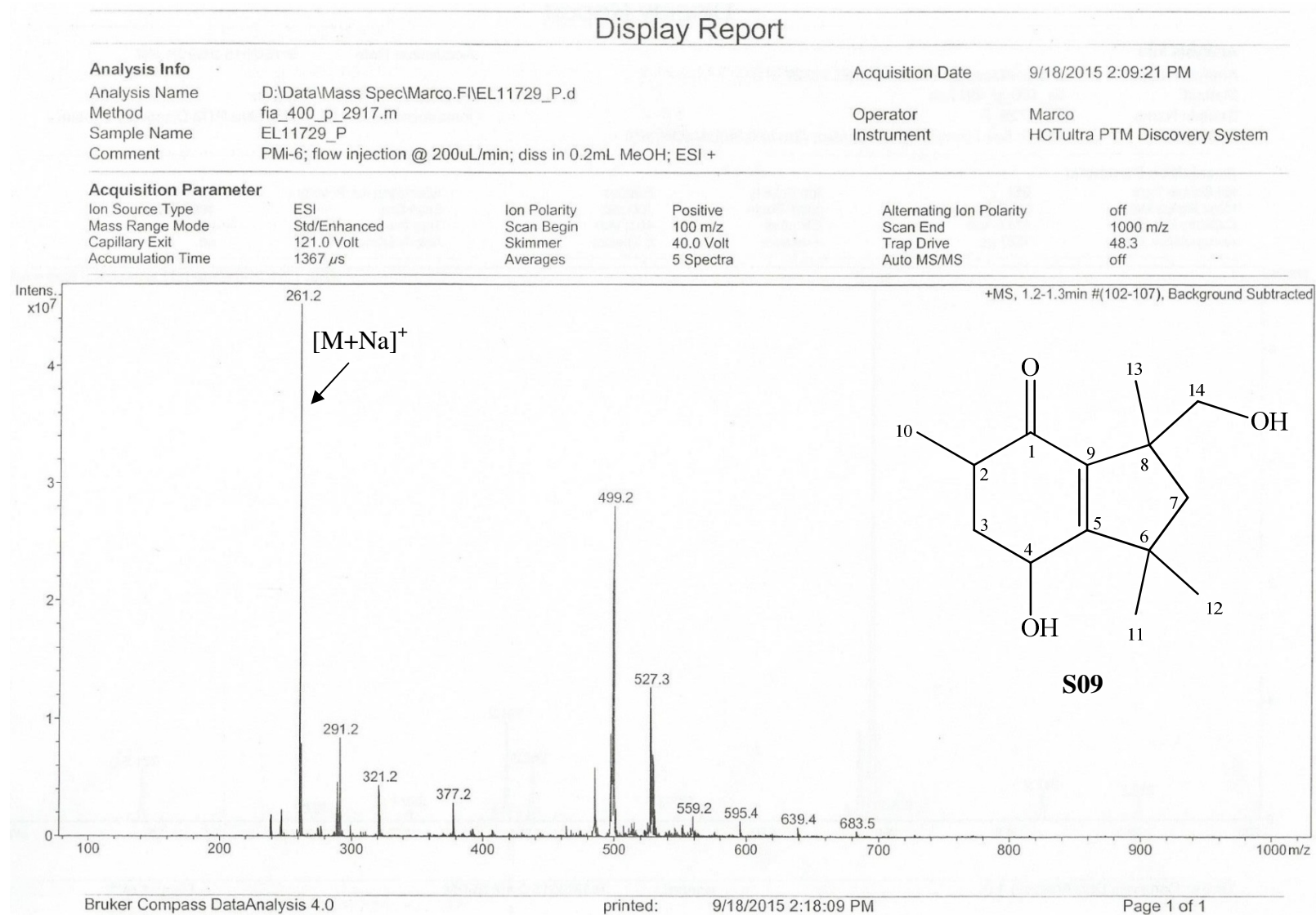
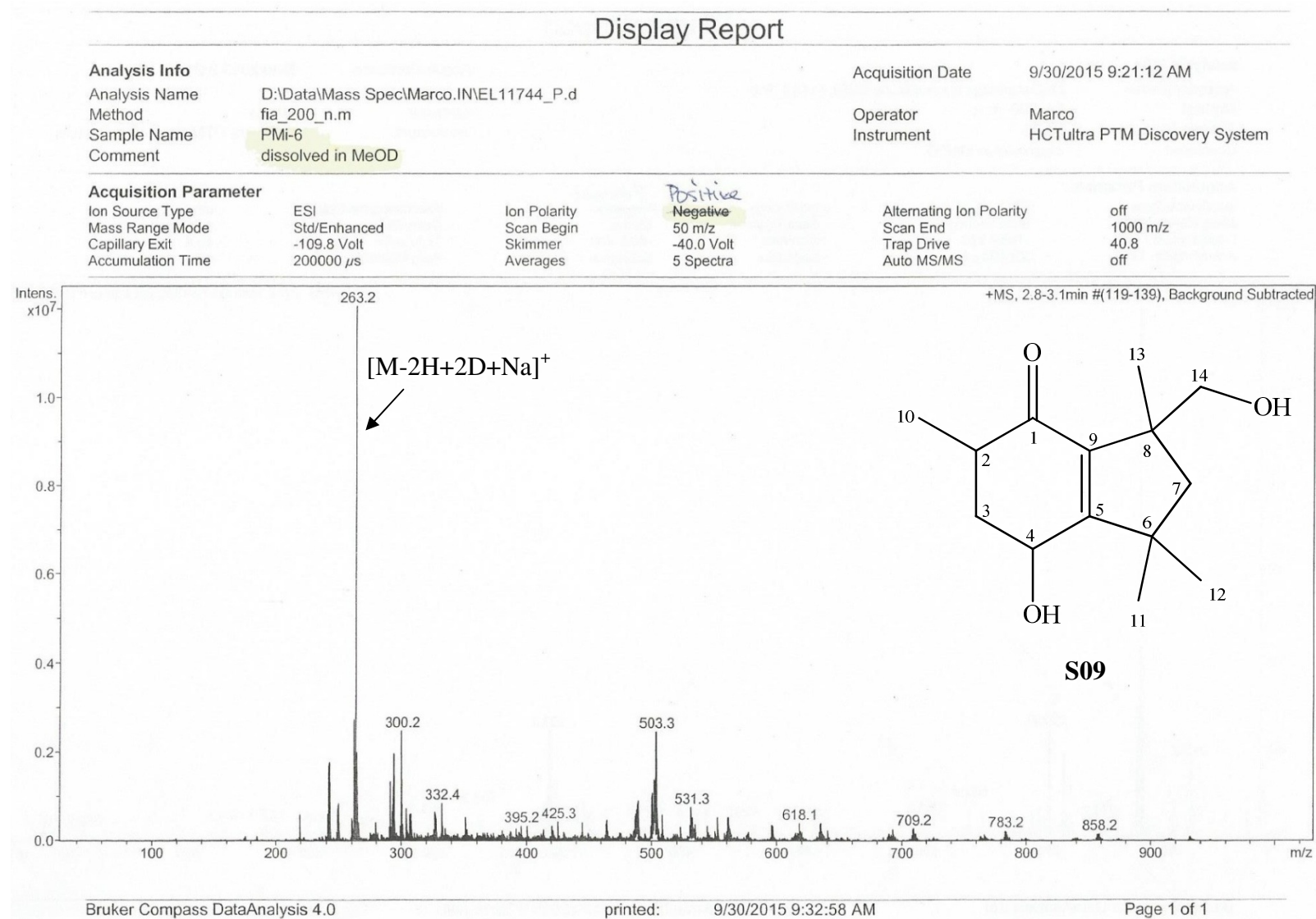
Figura 108 - Espectro de Massas de baixa resolução de **S09** (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap)**Fonte:** o autor.

Figura 109 - Espectro de Massas de baixa resolução de **S09** com CD₃OD (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap)

Fonte: o autor.

Figura 110 - Espectro de Massas de alta resolução de **S09** (Waters/Micromass - LCT - ESI-TOF)**Elemental Composition Report****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -3.0, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

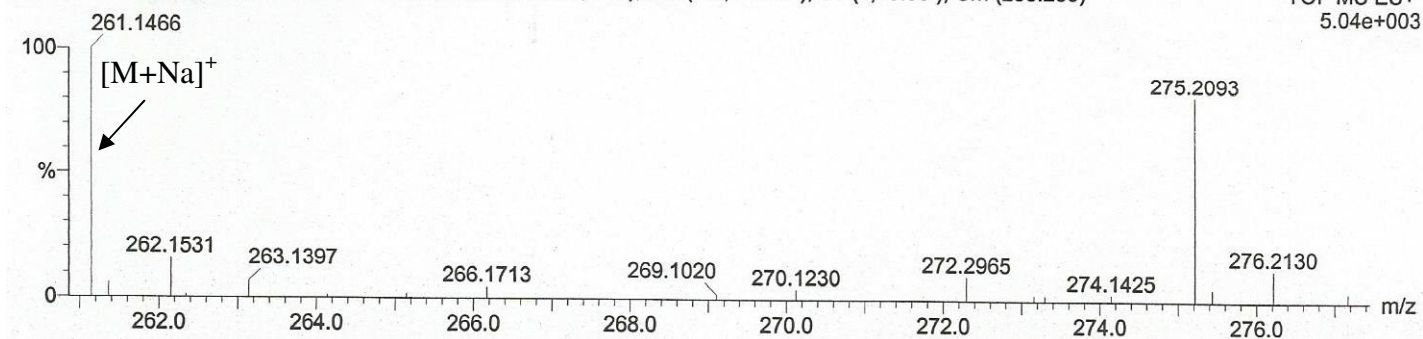
623 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-80 N: 0-10 O: 0-10 Na: 0-1

PMi-6

EH9297-2 236 (4.332) AM (Cen,4, 50.00, Ar,5000.0,275.21,1.00); Sm (SG, 1x1.00); Sb (1,40.00); Cm (235:239)



Minimum:

Maximum:

-3.0
100.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
261.1466	261.1467	-0.1	-0.4	3.5	85.5	C14 H22 O3 Na
	261.1464	0.2	0.8	7.5	100.9	C12 H17 N6 O

Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 111**) de **S09** mostrou um dubleto em δ_{H} 1,10 ($J_{10-2} = 7,2$ Hz; 3H) e singletos em δ_{H} 1,32 (3H), 1,20 (3H) e δ_{H} 1,19 (3H), que foram atribuídos aos hidrogênios metílicos de C-10, C-11, C-12 e C-13, respectivamente. Além disso, foi observado um tripleto em δ_{H} 4,43 (t, $J_{4-3} = 3,0$ Hz, 1H), que foi atribuído ao hidrogênio metínico H-4.

No mapa de contornos COSY (**Figura 112**) o sinal de H-10 mostrou correlação com o sinal em δ_{H} 2,78 (m; H-2), que por sua vez mostrou correlação com o sinal em δ_{H} 1,95 (m; H-3b, 1H). Já o sinal de H-4 mostrou correlação com os sinais de H-3a em δ_{H} 2,09 (m; 1H) e H-3b. Além disso, foram observadas as correlações entre H-3a e H-3b, entre H-7a (δ_{H} 1,97; m; 1H) e H-7b (δ_{H} 1,53; d; $J_{7b-7a} = 13,8$ Hz; 1H) e entre H-14a (δ_{H} 3,63; d; $J_{14a-14b} = 10,8$ Hz; 1H) e H-14b (δ_{H} 3,41; d; $J_{14ba-14a} = 10,8$ Hz; 1H).

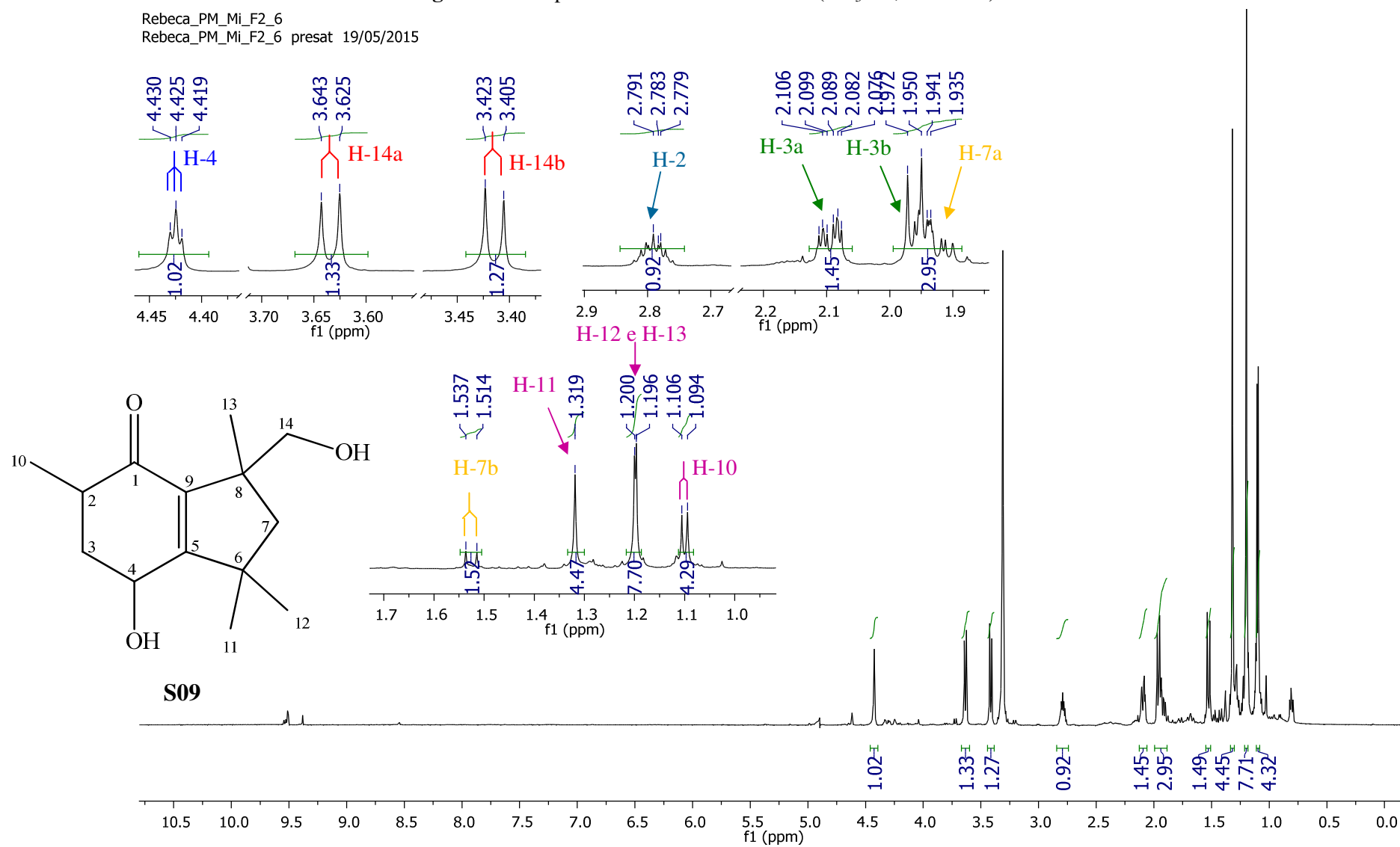
A partir do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 113**), juntamente com o mapa de contornos HSQC (**Figura 114**) foi possível observar sinais de 5 carbonos quaternários (não hidrogenados) em δ_{C} 203,9 (C-1), 170,3 (C-5), 140,5 (C-9), 50,2 (C-8) e em δ_{C} 46,0 (C-6), 2 carbonos metínicos em δ_{C} 62,4 (C-4) e 38,3 (C-2), 3 metilênicos em δ_{C} 69,6 (C-14), 51,8 (C-7) e em δ_{C} 42,1 (C-3) e sinais de 4 carbonos metílicos em δ_{C} 30,1 (C-11), 28,5 (C-12), 23,7 (C-13) e em δ_{C} 15,1 (C-10).

O mapa de contornos HMBC (**Figuras 115 e 116**) mostrou diversas correlações, das quais vale destacar: a correlação entre H-10 e o sinal de C-1; entre o sinal de H-7b e os sinais de C-9 e C-5; entre os sinais de H-14a e H-14b e o sinal de C-7; entre os sinais de H-11 e H-12 com os sinais de C-6 e C-7, e entre o sinal de H-13 e os sinais de C-8 e C-9. As demais correlações observadas nesse mapa de contornos estão descritas na **Tabela 42**.

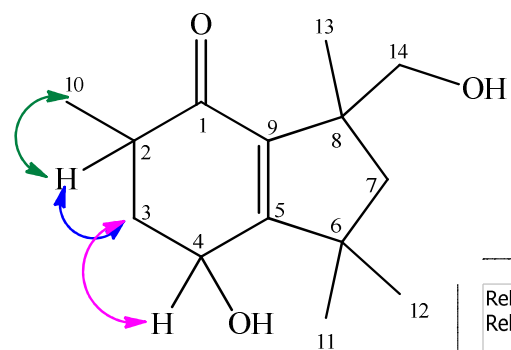
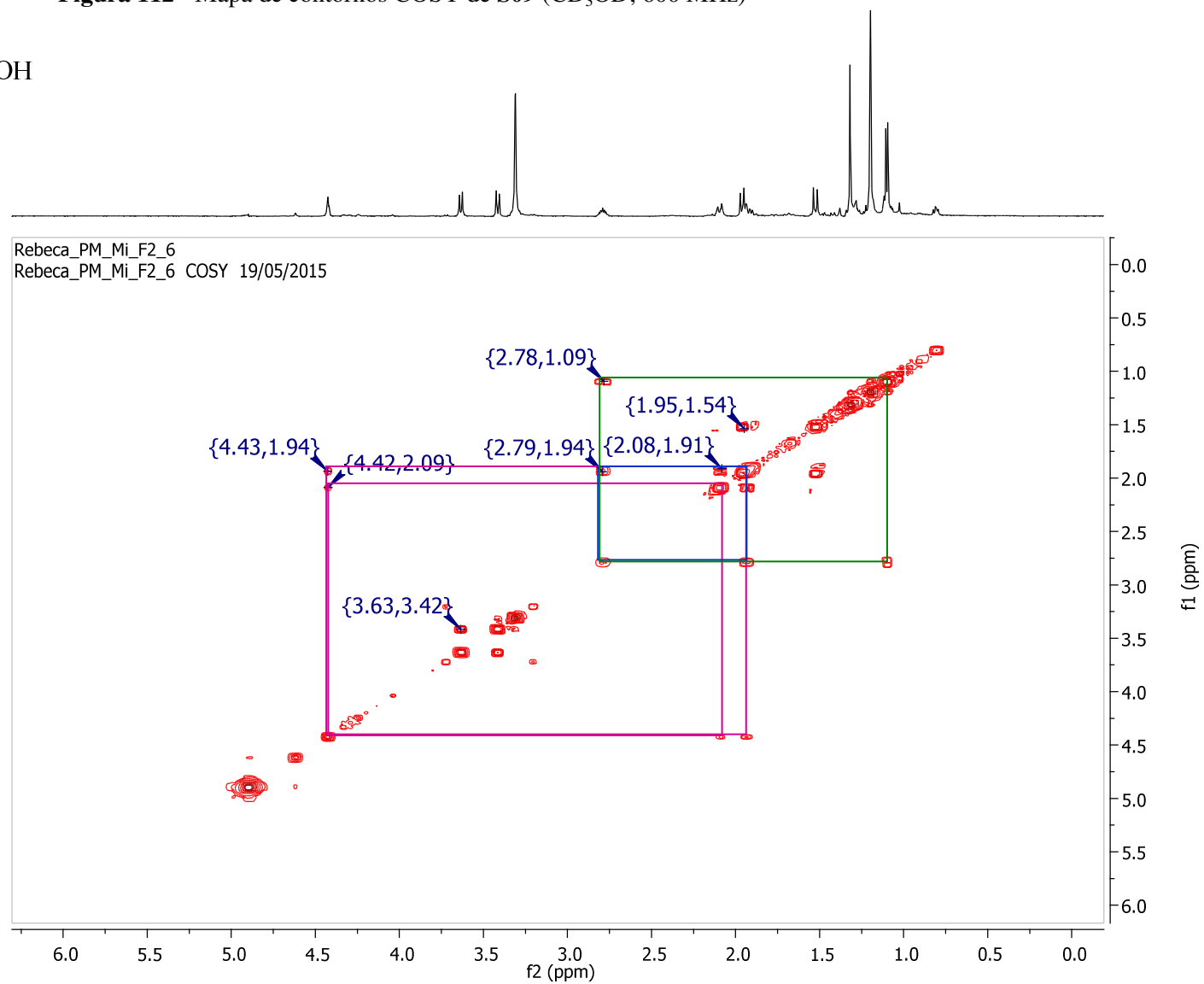
Figura 111 - Espectro de RMN de ^1H de **S09** (CD_3OD ; 600 MHz)

Rebeca_PM_Mi_F2_6

Rebeca_PM_Mi_F2_6 presat 19/05/2015



Fonte: o autor.

**S09****Figura 112** - Mapa de contornos COSY de **S09** (CD₃OD; 600 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 113 - Espectro de ^{13}C de **S09** (CD_3OD ; 150 MHz)

Rebeca_PM_Mi_F2_6
Rebeca_PM_Mi_F2_6 13C 19/05/2015

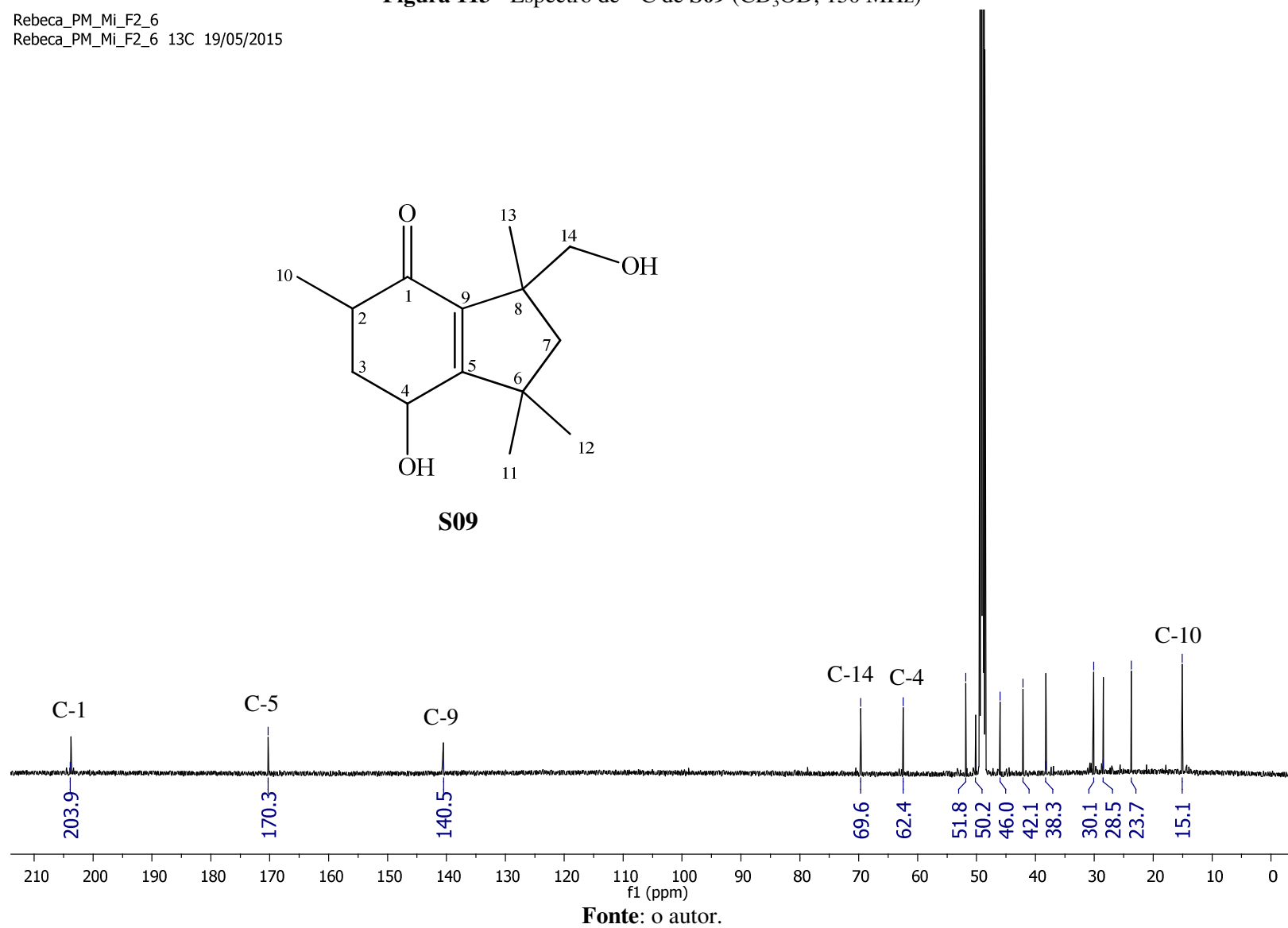
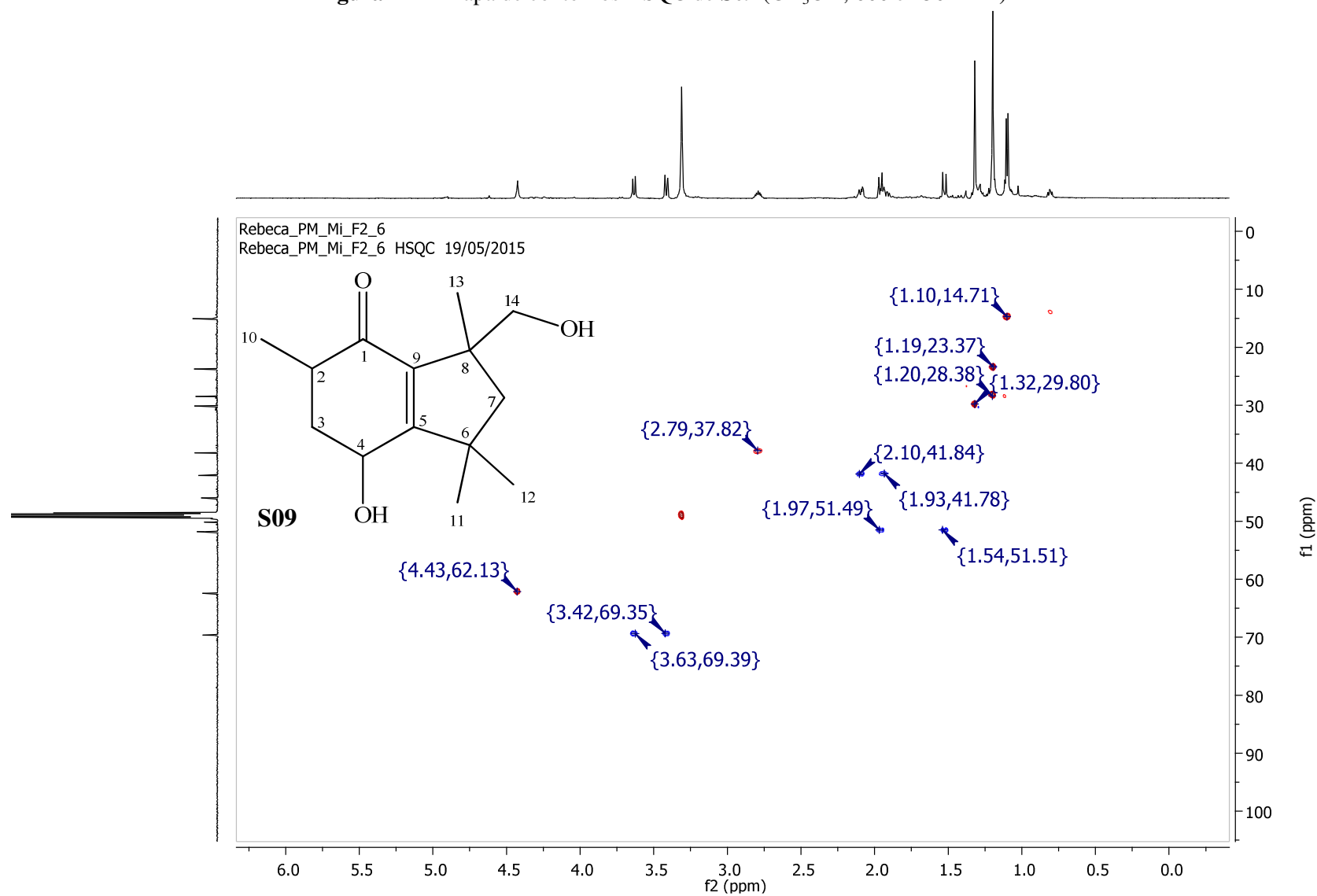
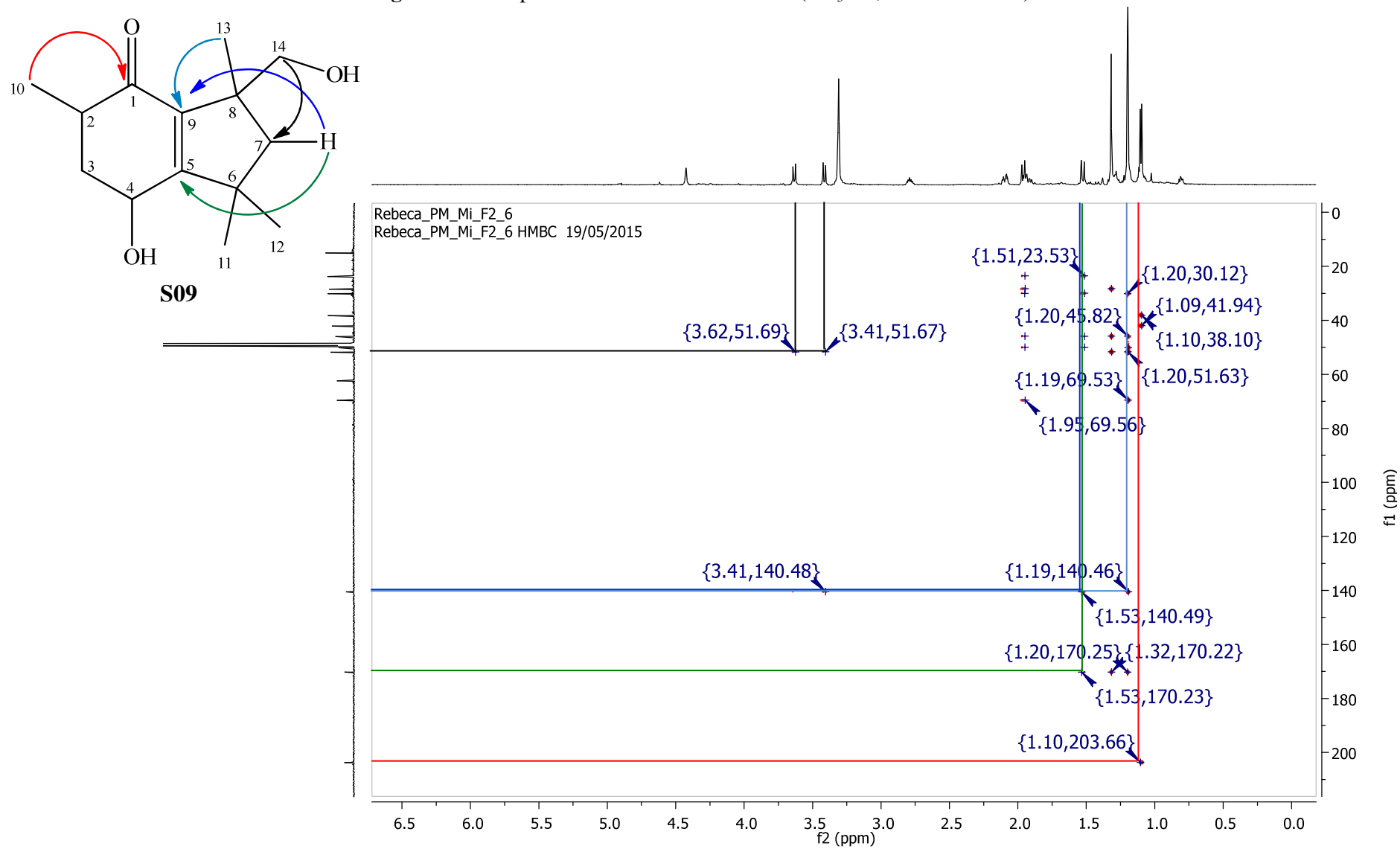


Figura 114 - Mapa de contornos HSQC de **S09** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

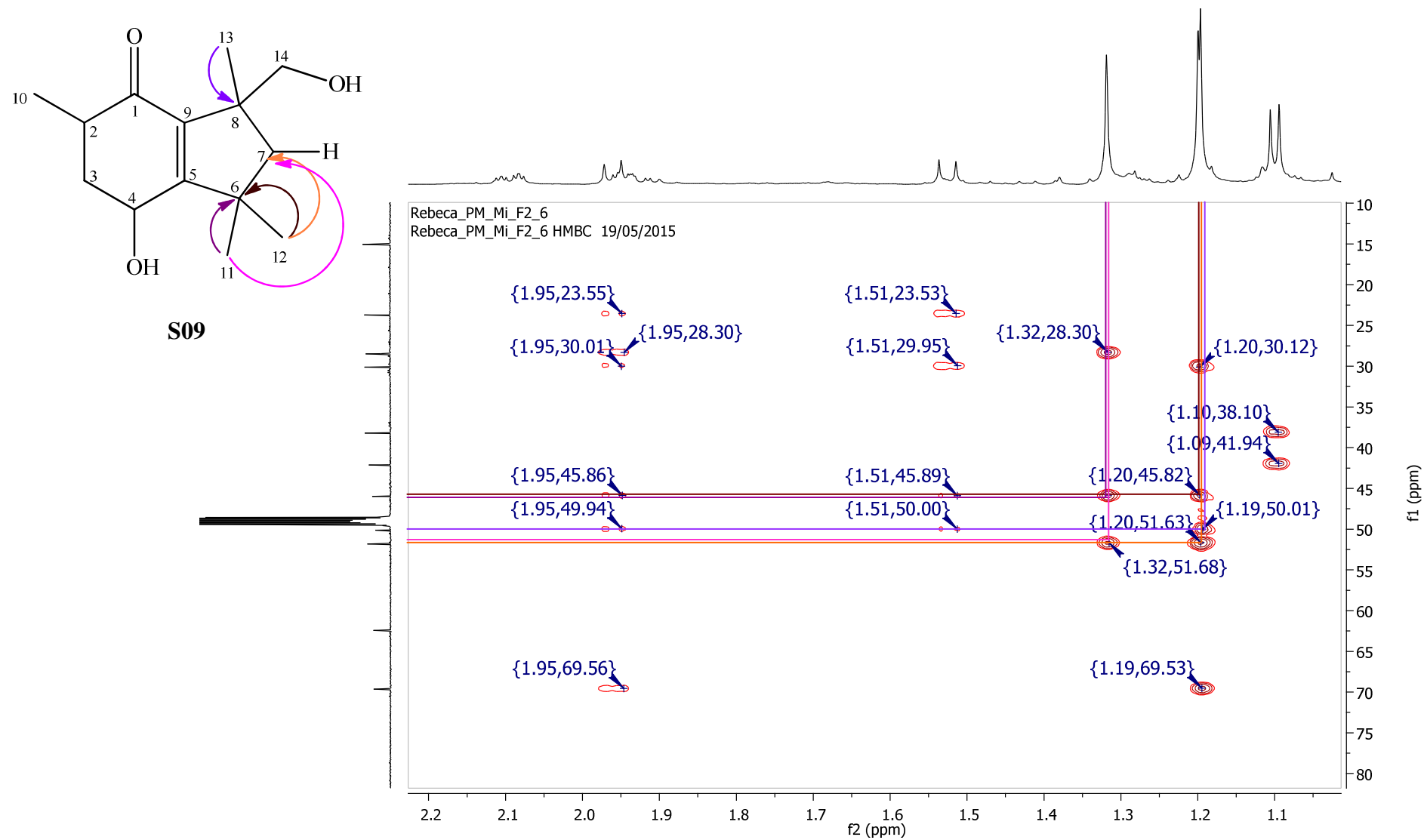
Fonte: o autor.

Figura 115 - Mapa de contornos HMBC de **S09** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



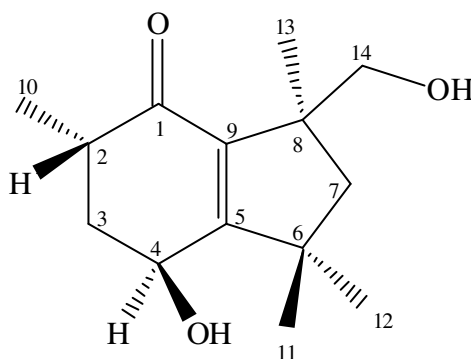
Fonte: o autor.

Figura 116 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de **S09** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



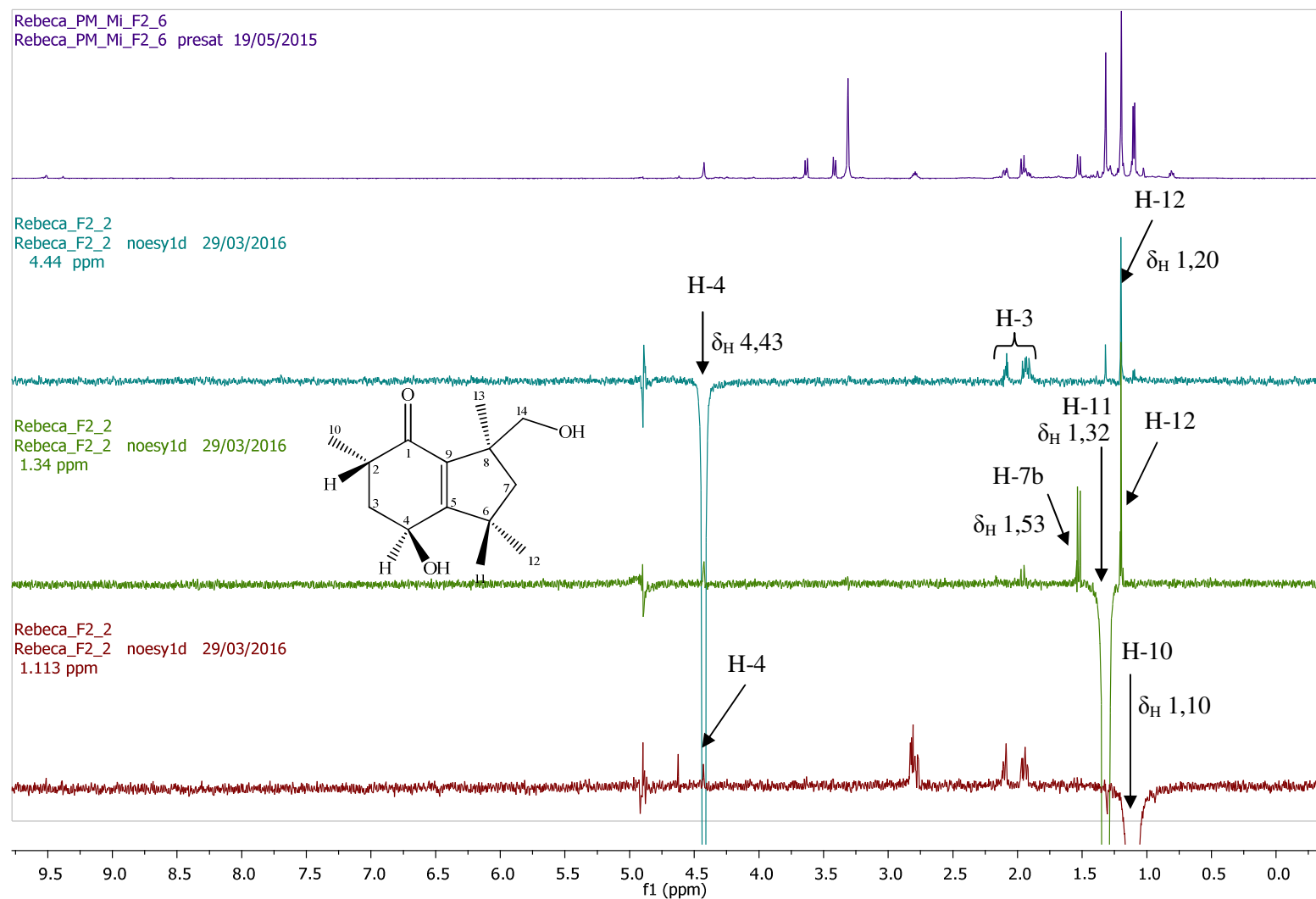
Fonte: o autor.

Para verificar a configuração relativa de **S09** foram obtidos alguns espectros de NOESY-1D (**Figura 117**). Ao irradiar o sinal de H-4 (δ_H 4,43) foi possível verificar a correlação espacial com os hidrogênios metílicos das posições 12 (sinal intenso) e 11, porém não foi observada correlação com H-2. Como o sinal dos hidrogênios do grupo metila da posição 12 se apresentou mais intenso que o sinal dos hidrogênios do grupo metila da posição 11 é possível propor que H-4 e H-12 estão do mesmo lado do plano médio da molécula, enquanto H-4 e H-2 (que não apresentou correlação) e H-4 e H-11 (sinal pouco intenso) estão em lados opostos. Ao irradiar o sinal dos hidrogênios metílicos da posição 11 (δ_H 1,32) foi observada sua correlação espacial com H-7b, enquanto a correlação de H-11 com os hidrogênios metílicos da posição 13 não foi verificada, indicando que H-11 e H-7b estão do mesmo lado da molécula, enquanto H-11 e H-13 estão em lados opostos. Ao irradiar os hidrogênios metílicos H-10 (δ_H 1,10) verificou-se a correlação espacial com H-4, confirmando que estão do mesmo lado do plano médio da molécula.



S09

Figura 117 - Espectros de RMN de ^1H de **S09** (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,43 (azul claro); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,32 (verde); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,10 (vermelho); (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Esses resultados indicaram que a substância **S09** se tratava de um norsesquiterpeno com esqueleto botriano inédito na literatura. Os dados de RMN da substância **S09** estão descritos na **Tabela 42**.

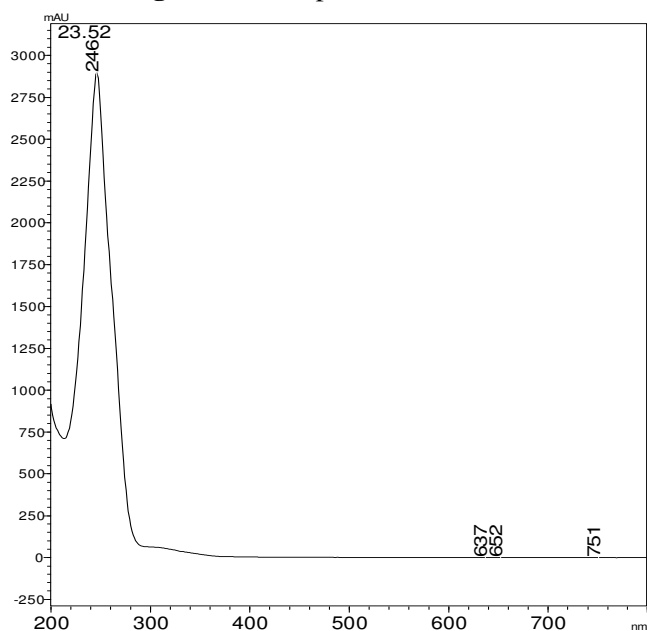
Tabela 42 - Dados de RMN da substância **S09** (600 e 150 MHz; CD₃OD)

Nº	δ _H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ _C	COSY	HMBC
1		203,9		
2	2,78 (m)	38,3	10-CH ₃ ; H-3b	
3	2,09 (m) 1,95 (m)	42,1	H-3b	
4	4,43 (t; 3,0)	62,4	H-3a; H-3b	
5		170,3		
6		46,0		
7	1,97 (m) 1,53 (d; 13,8)	51,8	H-7b	C-14; C-8; C-6; C-11; C-12; C-13 C-5; C-9; C-8; C-6; C-11; C-13
8		50,2		
9		140,5		
10	1,10 (d; 7,2)	15,1		C-1; C-3; C-2
11	1,32 (s)	30,1		C-5; C-7; C-6; C-12
12	1,20 (s)	28,5		C-5; C-7; C-6; C-13
13	1,19 (s)	23,7		C-9; C-8; C-14
14	3,63 (d; 10,8) 3,41 (d; 10,8)	69,7	H-14b	C-7 C-9; C-7

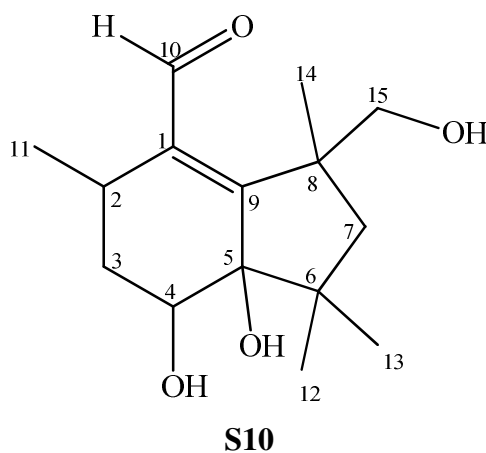
Fonte: o autor.

4.2.5.2 Elucidação estrutural de **S10**

A substância **S10** (1,7 mg) foi obtida como um óleo amarelado. Seu espectro no UV-Vis (**Figura 118**) apresentou uma banda de absorção em 246 nm. Sua rotação específica foi determinada como $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +55,9^\circ$ (*c* 0,2 em CH₃OH).

Figura 118 - Espectro no UV-Vis da substância **S10** (59,4% MeOH:40,6% H₂O).

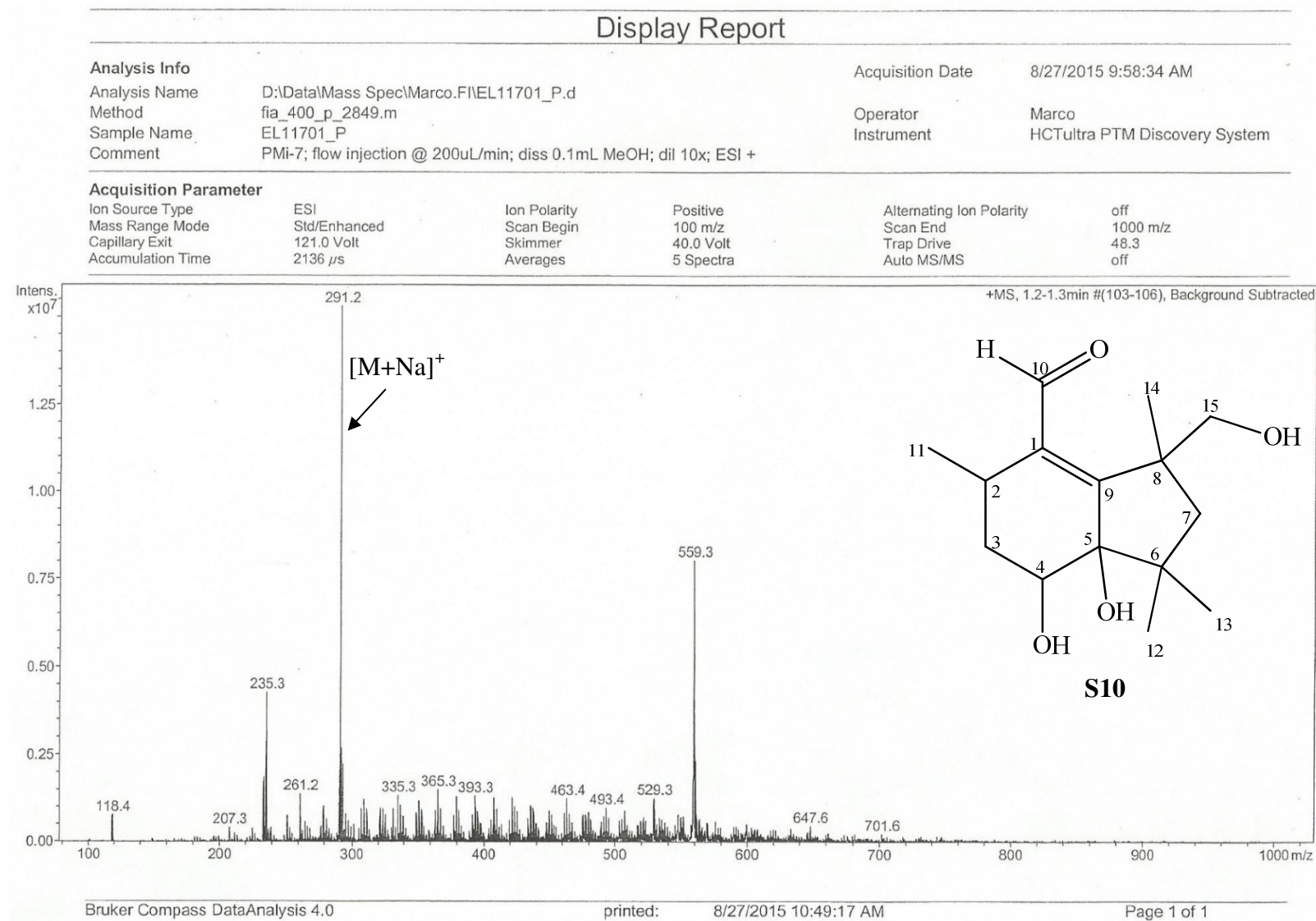
Fonte: o autor.



A fórmula molecular de **S10** foi determinada após as análises dos dados de RMN, bem como dos seus espectros de massas. A **Figura 119** mostra o espectro de massas de baixa resolução (ESI-Ion Trap) no modo positivo, no qual é possível observar o pico base em m/z 291,2, referente ao íon $[M+Na]^+$. A **Figura 120** apresenta o espectro de massas (de baixa resolução e no modo positivo / ESI-Ion Trap) quando a amostra foi preparada utilizando metanol deuterado, e é possível verificar o pico base em m/z 294,2 ($[M-3H+3D+Na]^+$), indicando assim a presença de três hidrogênios lábeis.

A **Figura 121** mostra o espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-TOF) de **S10**, no qual é possível verificar o pico em m/z 291,1576 referente ao íon $[M+Na]^+$ (calculado 291,1572 - erro de 1,4 ppm), indicando a fórmula molecular de **S10** como C₁₅H₂₄O₄.

Os espectros de massas da substância **S10** também foram obtidos no Department of Chemistry, University of British Columbia, durante estágio PDSE-CAPES.

Figura 119 - Espectro de massas de baixa resolução de **S10** (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap)

Fonte: o autor.

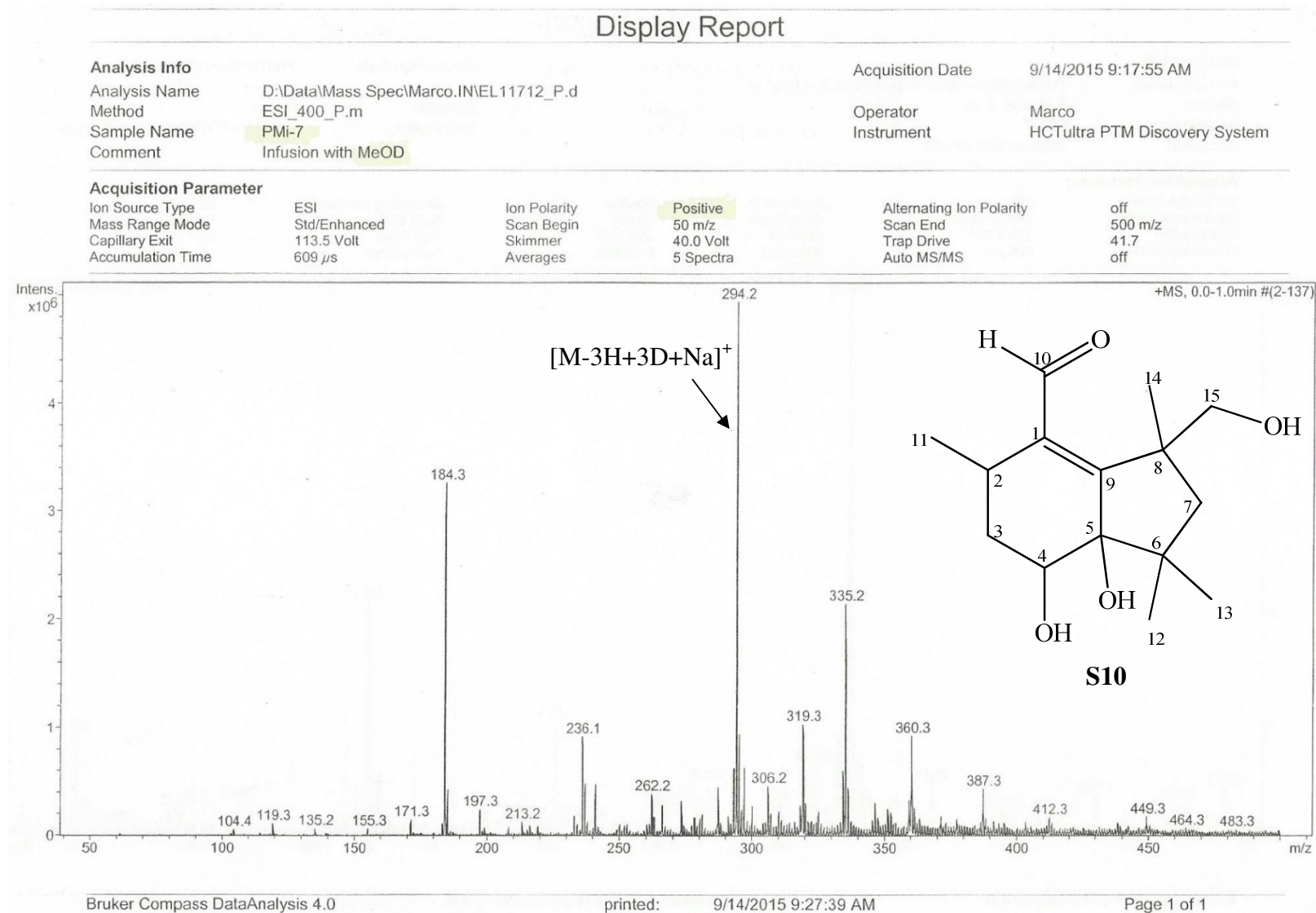
Figura 120 - Espectro de massas de baixa resolução de **S10** com CD₃OD (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap)**Fonte:** o autor.

Figura 121 - Espectro de massas de alta resolução de **S10** (Waters/Micromass - LCT - ESI-TOF)**Elemental Composition Report****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -3.0, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

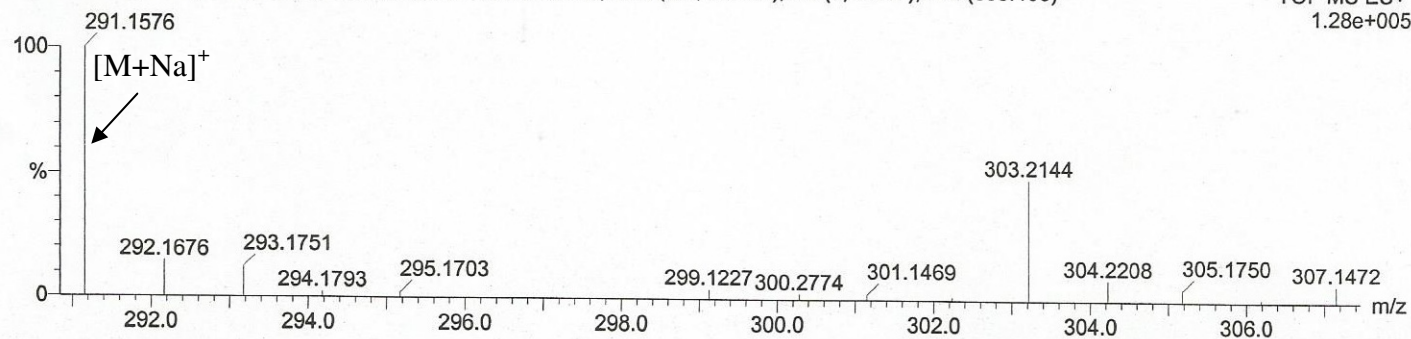
735 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-80 N: 0-10 O: 0-10 Na: 0-1

PMI-7

EH9281 384 (7.045) AM (Cen,4, 50.00, Ar,5000.0,303.21,1.00); Sm (SG, 1x1.00); Sb (1,40.00); Cm (358:403)

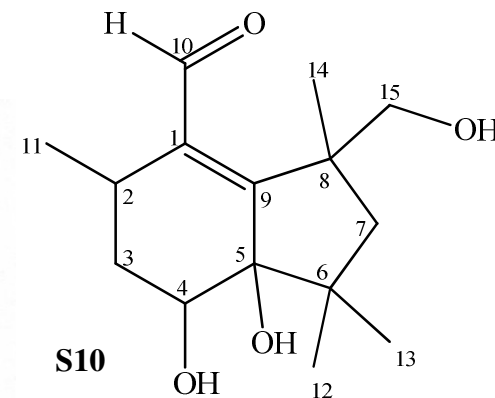


Minimum:

Maximum:

5.0 5.0 -3.0
100.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
291.1576	291.1572	0.4	1.4	3.5	5498.7	C15 H24 O4 Na
	291.1569	0.7	2.4	7.5	5927.3	C13 H19 N6 O2
	291.1586	-1.0	-3.4	8.5	6602.4	C16 H20 N4 Na



16-Sep-2015
TOF MS ES+
1.28e+005

Fonte: o autor.

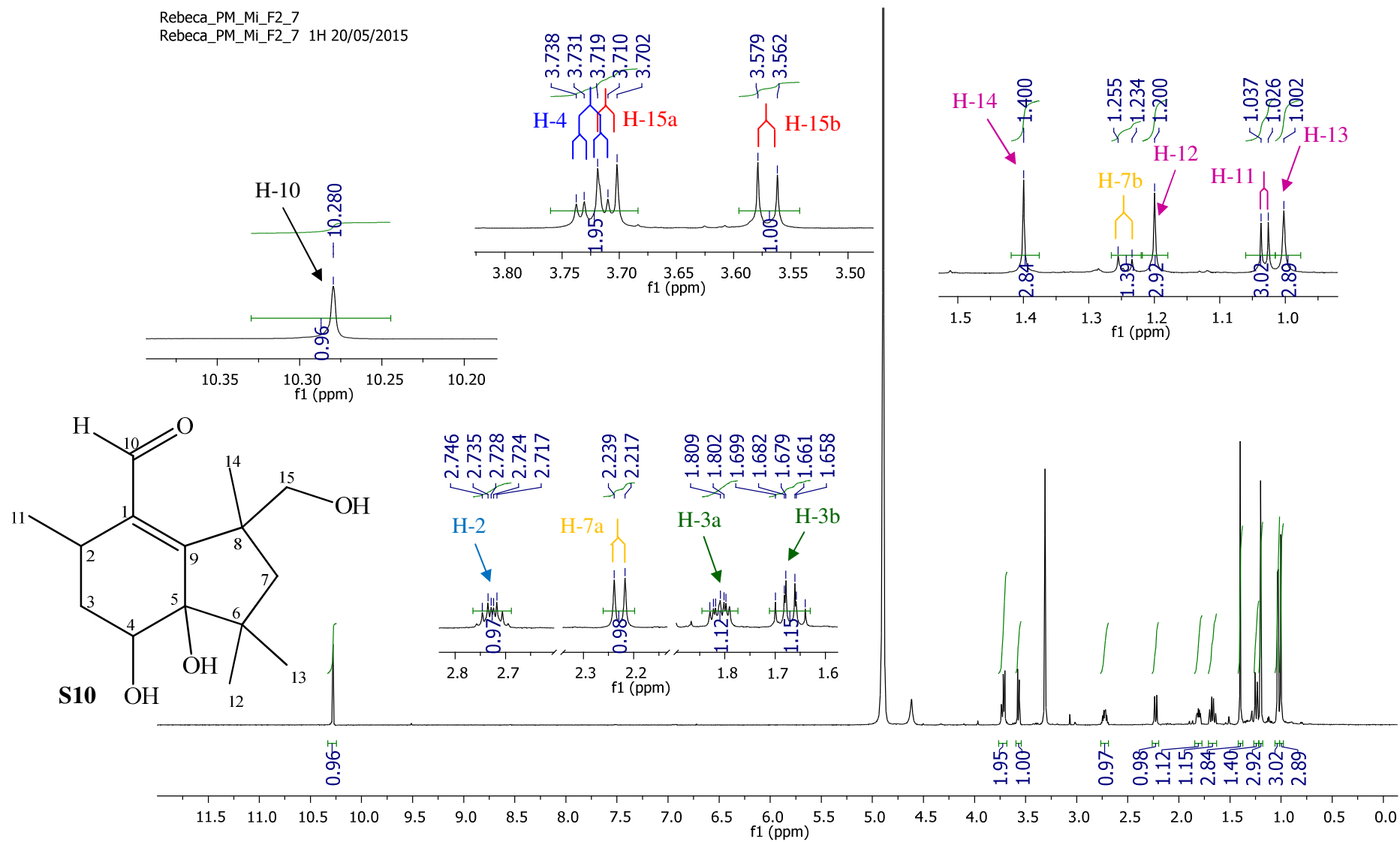
A partir do espectro de RMN de ^1H (**Figura 122**) de **S10** foi possível notar semelhanças com o espectro de RMN de ^1H de **S09**, como os singletos em δ_{H} 1,40 (3H), 1,20 (3H) e δ_{H} 1,00 (3H) e o dubleto em δ_{H} 1,03 ($J_{11-2} = 6,6$ Hz; 3H) que foram atribuídos aos hidrogênios metílicos de C-14, C-12, C-13 e C-11, respectivamente. Além do duplo dubleto em δ_{H} 3,73 ($J_{4-3a} = 4,2$ Hz; $J_{4-3b} = 12,0$ Hz 1H) e dos dubletos em 3,71 ($J_{15a-15b} = 10,2$ Hz, 1H) e 3,57 ($J_{15b-15a} = 10,2$ Hz, 1H) atribuídos ao H-4, H-15a e H-15b, respectivamente. Adicionalmente, verificou-se um singlete em δ_{H} 10,28 (1H), característico de hidrogênio de aldeído e que foi atribuído ao H-10.

O mapa de contornos COSY (**Figura 123**) mostrou as correlações entre o sinal de H-4 com o sinal de H-3b em δ_{H} 1,67 (m; 1H), e entre o multiplete em δ_{H} 2,73 (H-2; 1H) e o sinal de H-11, além de outras correlações também observadas no mapa de contornos COSY de **S09** e que estão descritas na **Tabela 43**.

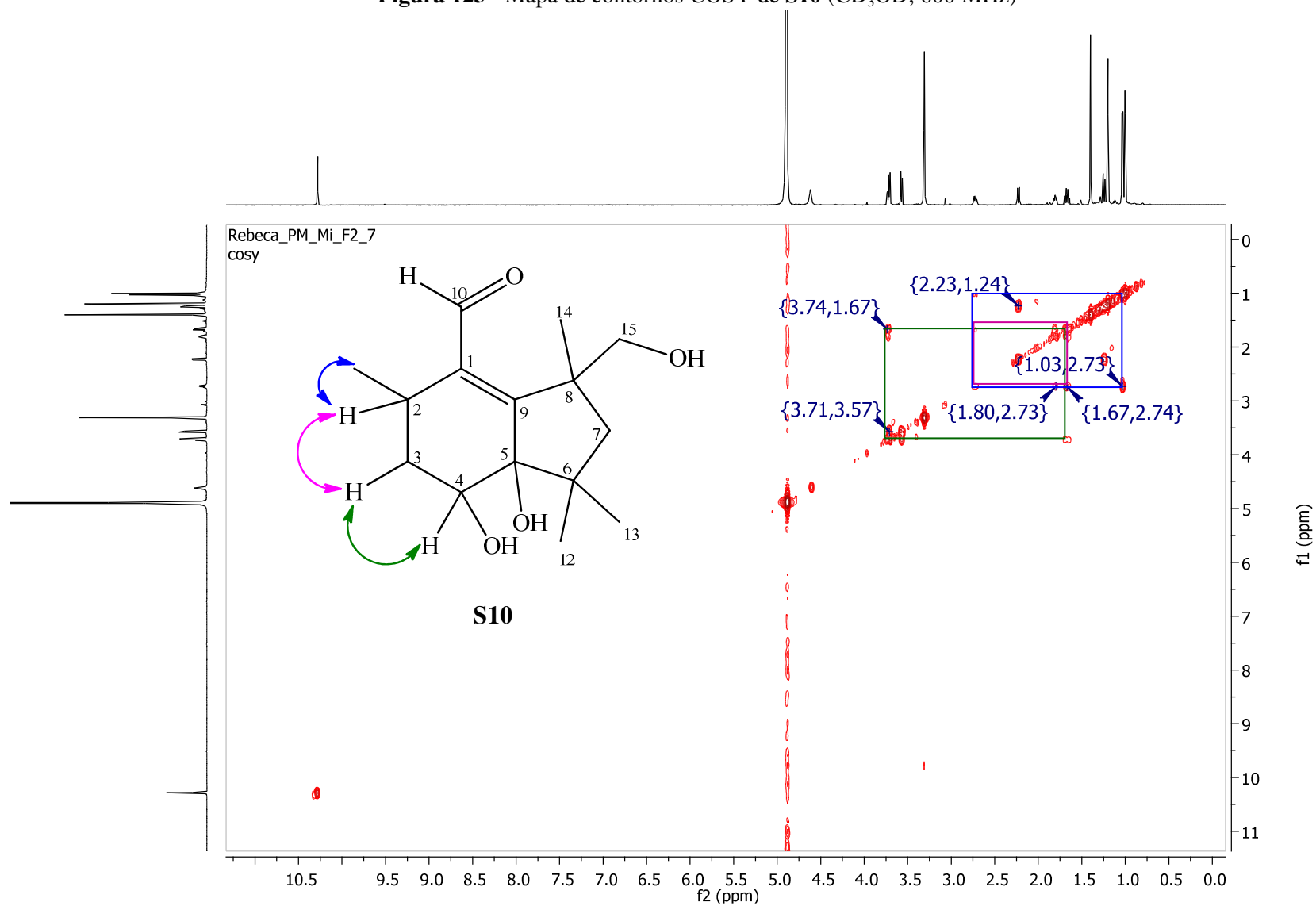
A partir do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 124**) e do mapa de contornos HSQC (**Figura 125**) foi possível identificar, assim como para **S09**, sinais para 5 carbonos quaternários (não hydrogenados) em δ_{C} 164,7 (C-9), 141,7 (C-1), 83,0 (C-5), 47,9 (C-8) e em δ_{C} 44,6 (C-6); 3 metilênicos em δ_{C} 71,7 (C-15), 53,4 (C-7) e em δ_{C} 36,5 (C-3), além de sinais para 4 carbonos metílicos em δ_{C} 30,4 (C-14), 26,6 (C-13), 23,6 (C-12) e em δ_{C} 20,9 (C-11). Por outro lado, para **S10** foi observado um sinal para carbono metínico em δ_{C} 197,1, característico de aldeído e que foi atribuído ao C-10, além de outros 2 sinais para carbono metínico em δ_{C} 69,9 (C-4) e 31,5 (C-2).

No mapa de contornos HMBC (**Figura 126 e 127**) foi possível verificar as correlações entre H-10 e os sinais de C-1 e C-2, entre o multiplete em δ_{H} 1,81 (H-3a, 1H) e C-1 e C-5, além de correlações do sinal de H-14 com os sinais de C-7, C-8 e C-9, de H-15a e H-15b com os sinais de C-7 e C-9, e ainda dos sinais de H-12 e H-13 com C-5, C-6 e C-7. As demais correlações observadas no mapa de contornos HMBC estão descritas na **Tabela 43**.

Figura 122 - Espectro de RMN de ^1H de **S10** (CD_3OD ; 600 MHz)



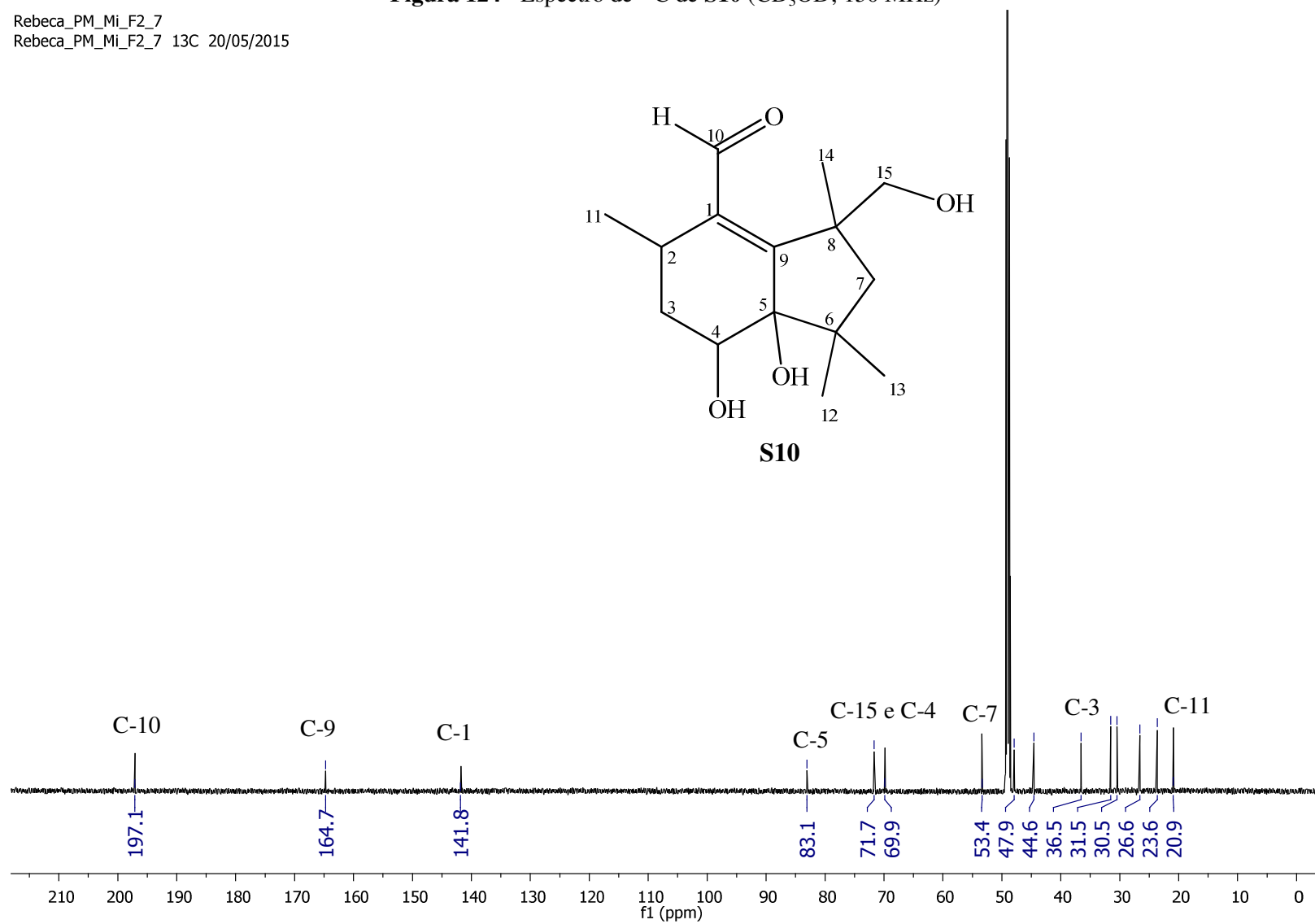
Fonte: o autor.

Figura 123 - Mapa de contornos COSY de **S10** (CD₃OD; 600 MHz)

Fonte: o autor.

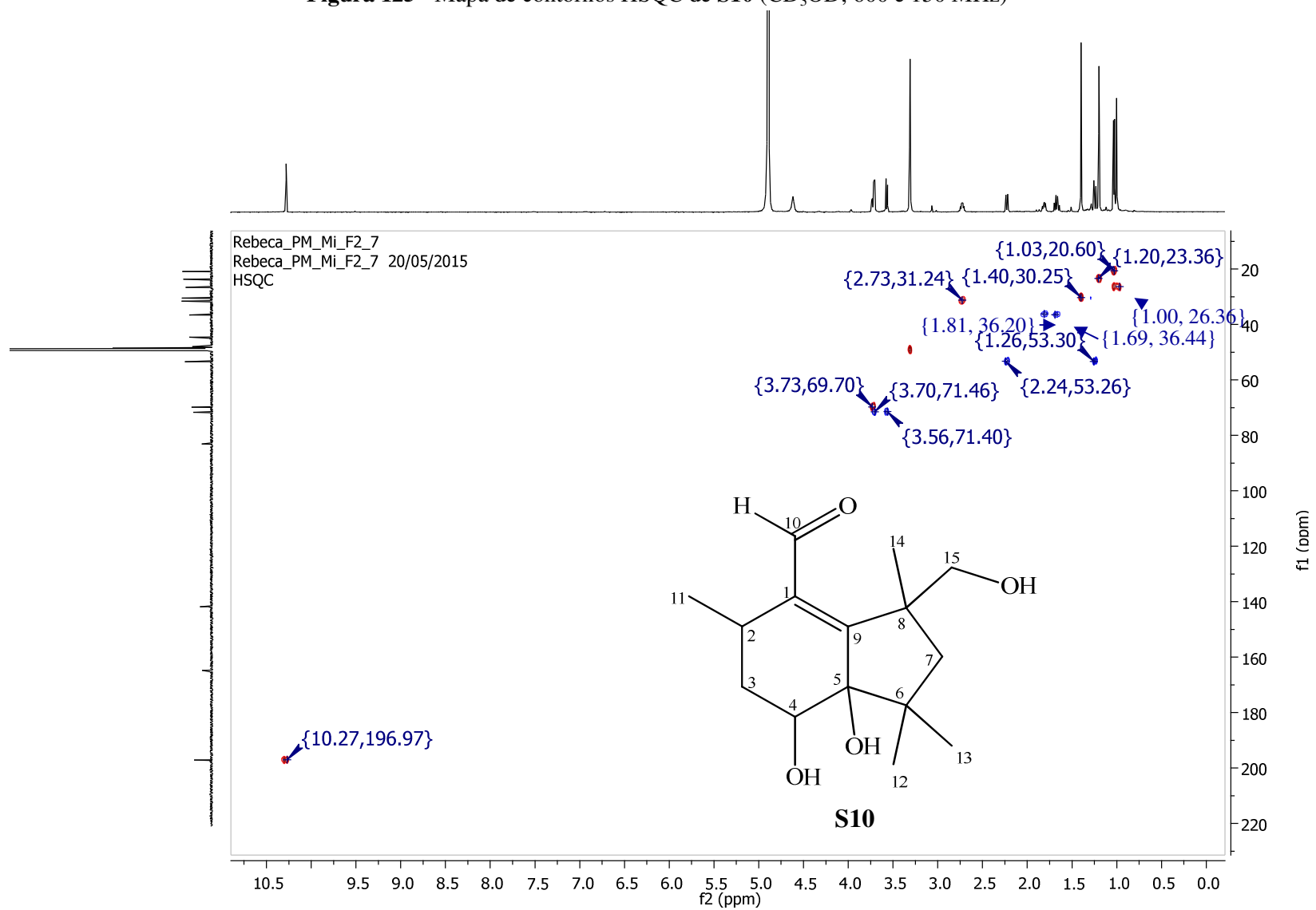
Figura 124 - Espectro de ^{13}C de **S10** (CD_3OD ; 150 MHz)

Rebeca_PM_Mi_F2_7
Rebeca_PM_Mi_F2_7 13C 20/05/2015



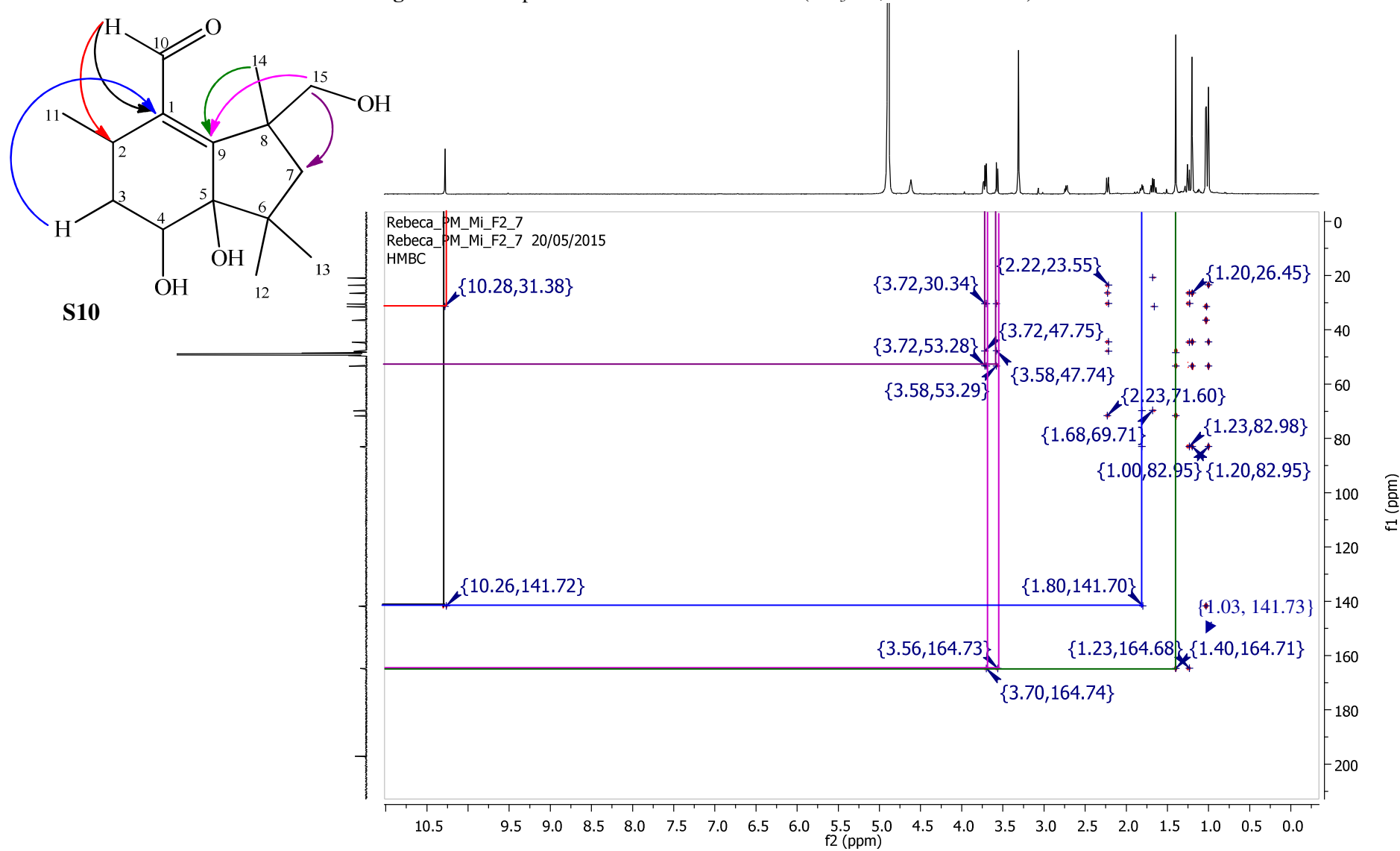
Fonte: o autor.

Figura 125 - Mapa de contornos HSQC de **S10** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

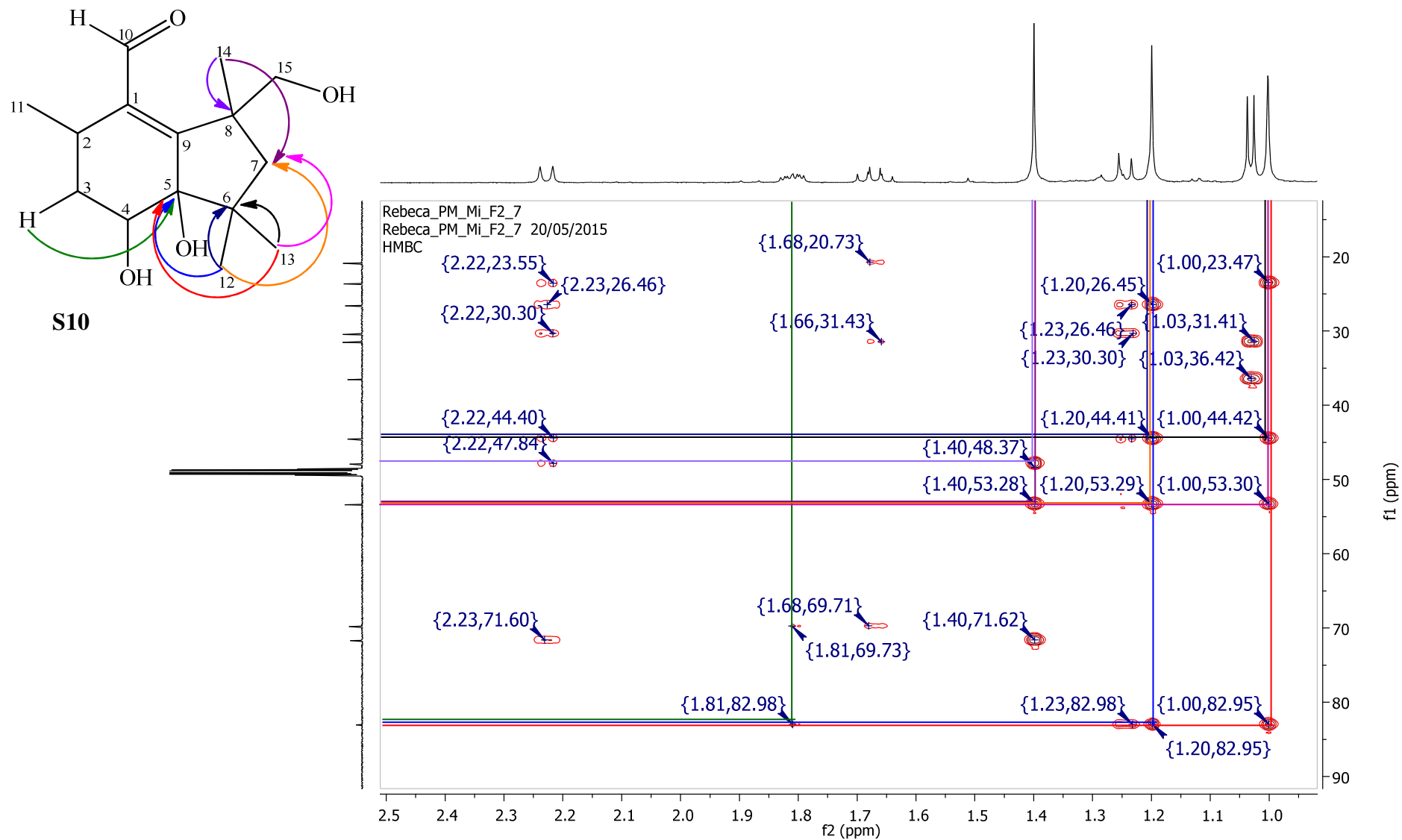


Fonte: o autor.

Figura 126 - Mapa de contornos HMBC de **S10** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



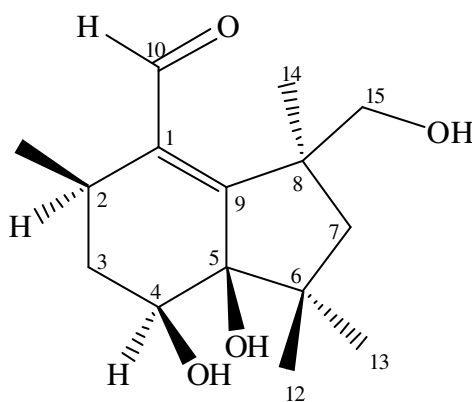
Fonte: o autor.

Figura 127 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de **S10** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

Fonte: o autor.

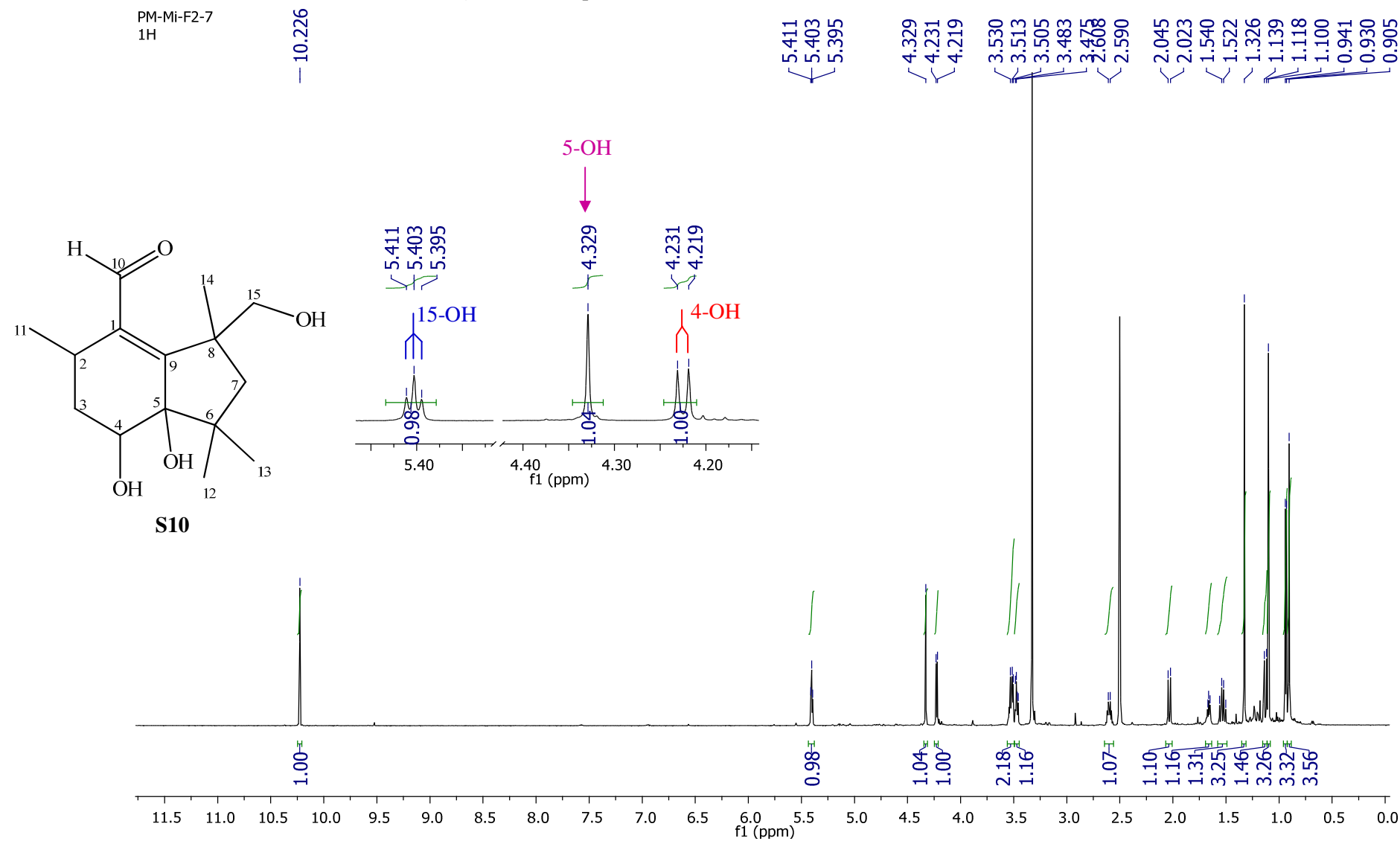
Durante o estágio PDSE-CAPES no Department of Chemistry, University of British Columbia, foram adquiridos espectros de RMN de ^1H e mapa de contornos ROESY para **S10**. A amostra foi inicialmente solubilizada em metanol (grau CLAE) e colocada no tubo de RMN. Após a completa secagem em evaporador rotatório e liofilizador, a amostra foi solubilizada em DMSO deuterado (d_6) e foram realizados os experimentos.

A partir do espectro de RMN de ^1H (**Figura 128**) foi possível verificar os sinais característicos das hidroxilas presentes na molécula em δ_{H} 5,40 (t; $J_{\text{OH-15}} = 4,8$ Hz; 15-OH; 1H), 4,33 (s; 5-OH; 1H) e em δ_{H} 4,23 (d; $J_{\text{OH-4}} = 7,2$ Hz, 4-OH; 1H). Já pelo mapa de contornos ROESY (**Figura 129**) foram observadas as correlações espaciais dos sinais das hidroxilas nas posições 4 e 5 com o sinal dos hidrogênios metílicos H-12 (δ_{H} 1,09), bem como as correlações do sinal de H-4 (δ_{H} 3,52) com os sinais de H-13 (δ_{H} 0,89) e H-2 (δ_{H} 2,60), e ainda, entre os hidrogênios metílicos H-13 e H-14 (δ_{H} 1,32), indicando que esses hidrogênios estão do mesmo lado do plano médio da molécula e assim, confirmando a configuração relativa de **S10**.

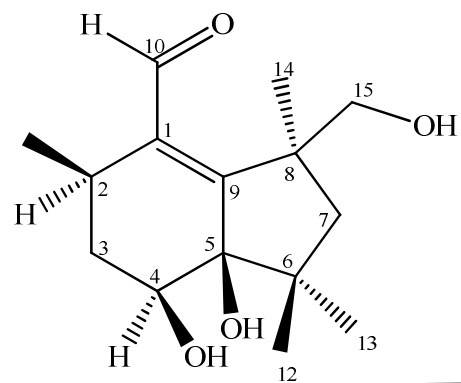
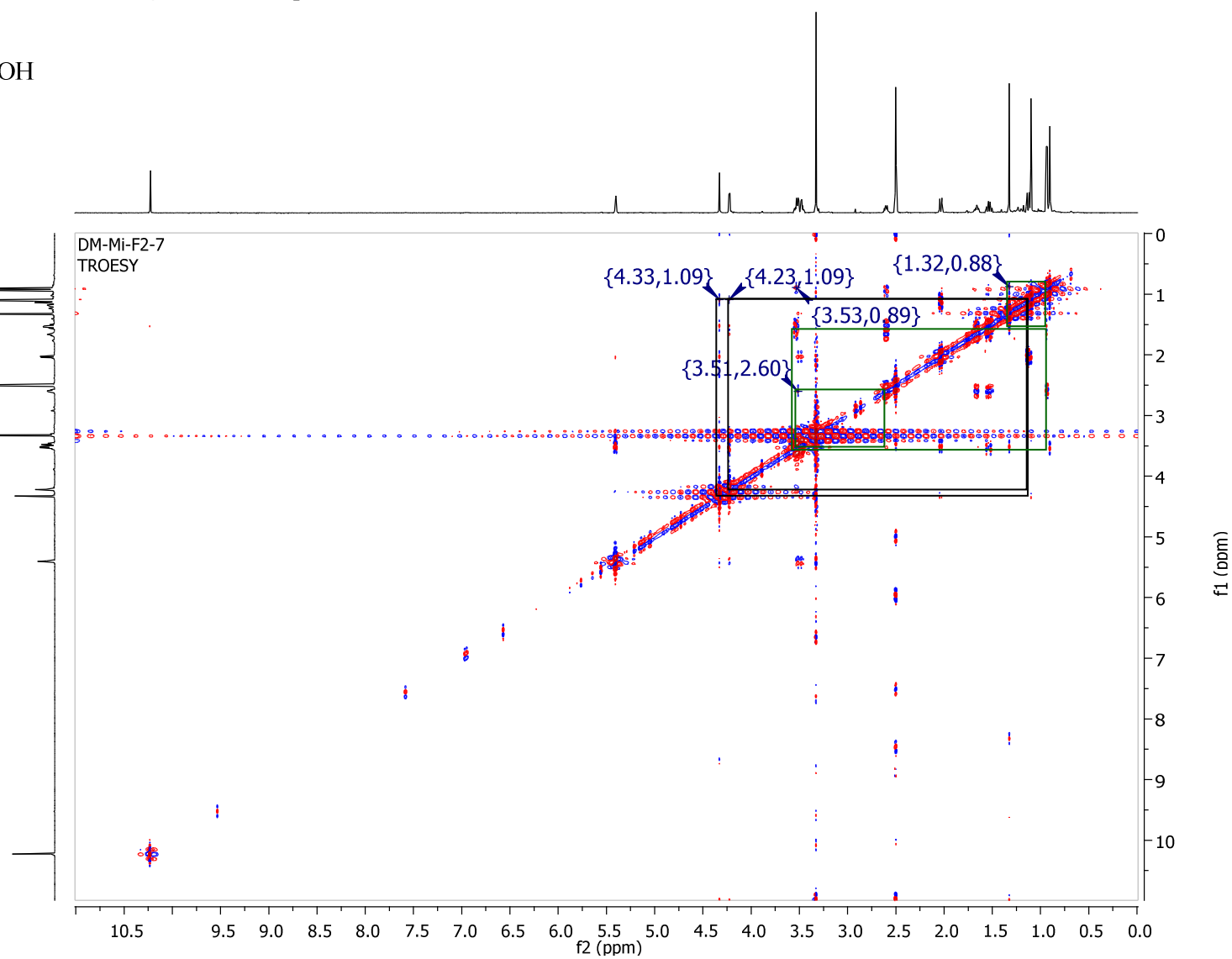


S10

Figura 128 - Espectro de RMN de ^1H de **S10** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)



Fonte: o autor.

**S10****Figura 129** - Mapa de contornos ROESY de **S10** (DMSO- d_6 ; 600 MHz)

Fonte: o autor.

Esses resultados indicaram que a substância **S10** se tratava de um sesquiterpeno do tipo botriano, também inédito na literatura. Seus dados de RMN estão descritos na **Tabela 43**.

Tabela 43 - Dados de RMN da substância **S10** (600 e 150 MHz; CD₃OD)

Nº	δ _H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ _C	COSY	HMBC
1		141,7		
2	2,73 (m)	31,5	11-CH ₃ ; H-3a e H-3b	
3	1,81 (m) 1,67 (m)	36,5	H-3b	C-1; C-5; C-4 C-4; C-2; C-11
4	3,73 (dd; 4,2; 12,0)	69,9	H-3b	
5		83,0		
6		44,6		
7	2,23 (d; 13,2) 1,24 (d; 12,6)	53,4	H-7b	C-8; C-6; C-15; C-14; C-13; C-12 C-9; C-5; C-6; C-14; C-13
8		47,9		
9		164,7		
10	10,28 (s)	197,1		C-1; C-2
11	1,03 (d; 6,6)	20,9		C-1; C-3; C-2
12	1,20 (s)	23,6		C-5; C-7; C-6; C-13
13	1,00 (s)	26,6		C-5; C-6; C-7; C-12
14	1,40 (s)	30,4		C-9; C-7; C-8; C-15
15	3,71 (d; 10,2) 3,57 (d; 10,2)	71,7	H-15b	C-9; C-7; C-8; C-14 C-9; C-7; C-8; C-14

Fonte: o autor.

4.2.6 Re-estudo do extrato bruto BM-Mi de *Nemania bipapillata* (AT-05)

Após o isolamento das substâncias **S09** e **S10**, optou-se por re-estudar o extrato bruto BM-Mi do fungo endofítico AT-05, a fim de se obter maior quantidade dessas substâncias e também isolar outras, que foram detectadas juntamente com **S09** e **S10**, porém em mistura ou em pouca quantidade.

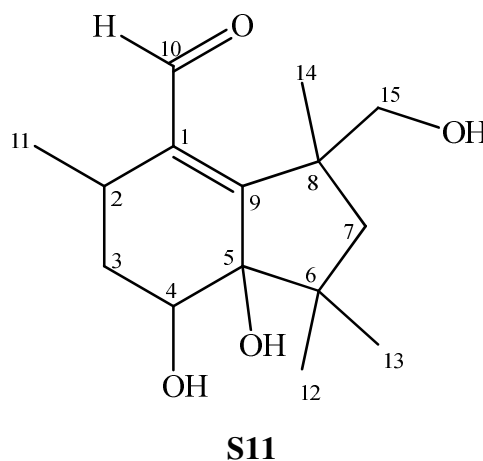
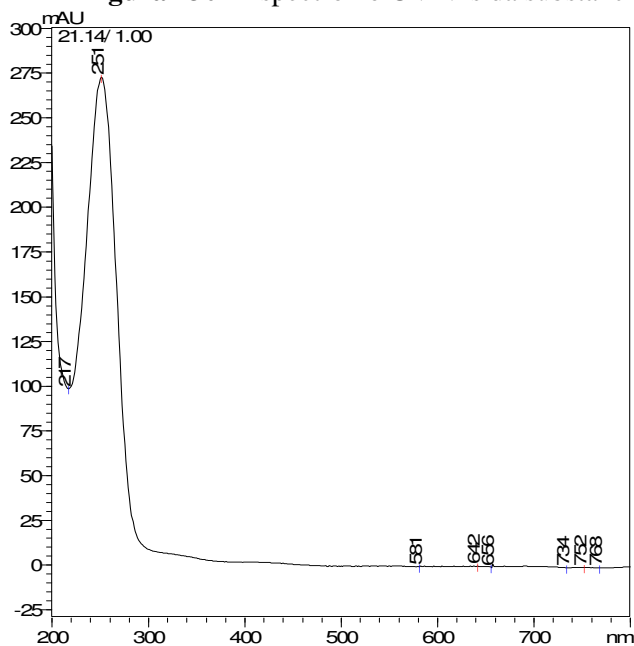
Sendo assim o fungo AT-05 foi cultivado em escala ampliada utilizando água ultra pura para o preparo dos meios de cultivo, obtendo-se uma maior quantidade do extrato BM-

Mi, que apresentou mesmo perfil cromatográfico do extrato obtido em escala reduzida (seção 3.2.2.8 - **Figura 11**). Este extrato foi então novamente fracionado por cromatografia em coluna utilizando sílica derivatizada C-18 eluída com diferentes proporções de MeOH:H₂O. Em seguida, foi realizado o fracionamento da fração BM-Mi-F2 por CLAE-DAD em escala semi-preparativa, obtendo-se novamente as substâncias **S09** e **S10** e ainda, as substâncias **S11**, **S12**, **S13** e **S14**, pertencentes a mesma classe dos sesquiterpenos botrianos.

4.2.6.1 Elucidação estrutural de **S11**

A substância **S11** (1,3 mg) foi obtida como um óleo amarelado. A **Figura 130** apresenta seu espectro UV-Vis, no qual é possível verificar uma banda de absorção em 251 nm. Sua rotação específica foi determinada como $[\alpha]_D^{23} = +33,7^\circ$ (*c* 0,13 em CH₃OH).

Figura 130 - Espectro no UV-Vis da substância **S11** (56,4% MeOH:43,6% H₂O).

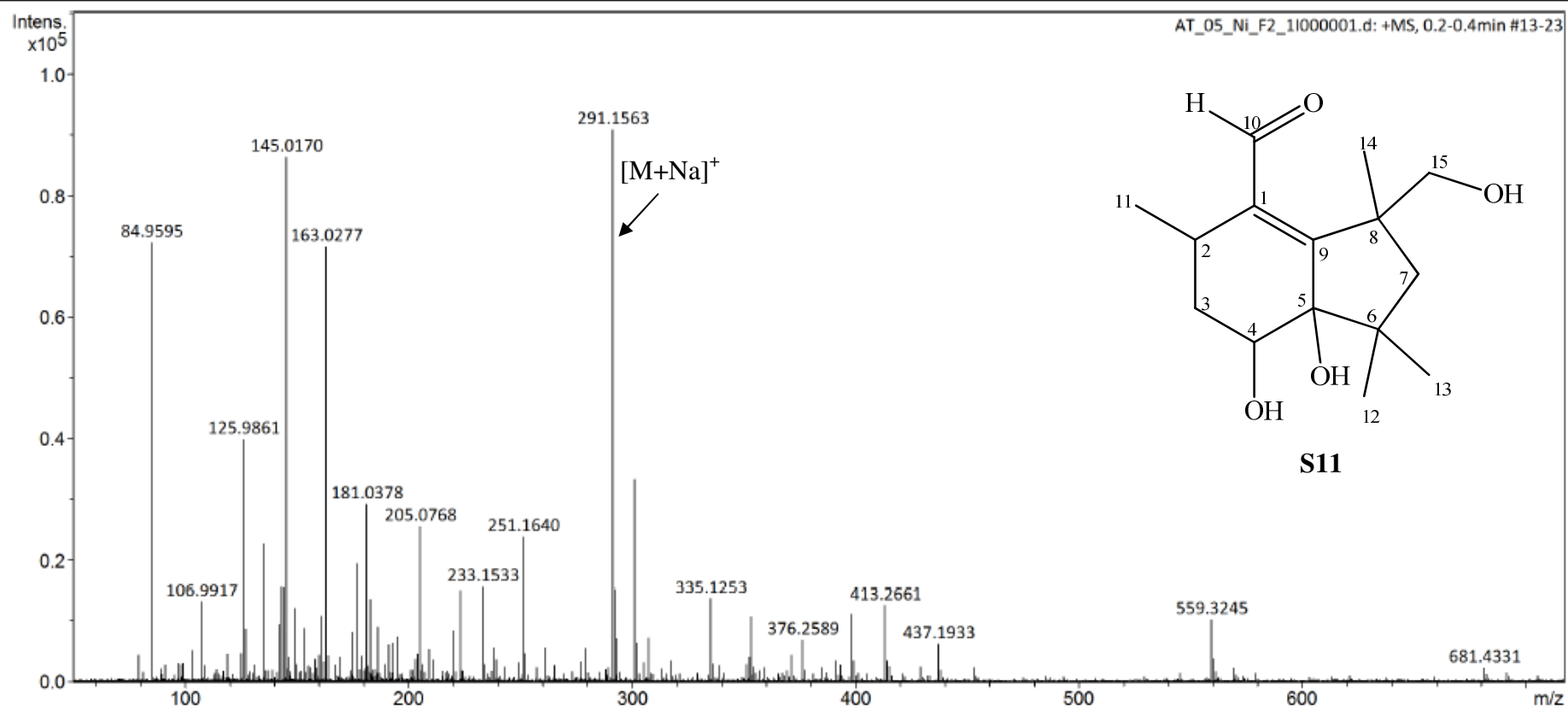


Fonte: o autor.

Seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 131**) apresentou o pico base em m/z 291,1563, referente ao íon $[M+Na]^+$ (calculado 291,1572 - erro de 3,1 ppm), indicando a fórmula molecular de **S11** como C₁₅H₂₄O₄.

Figura 131 - Espectro de Massas de alta resolução de **S11** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

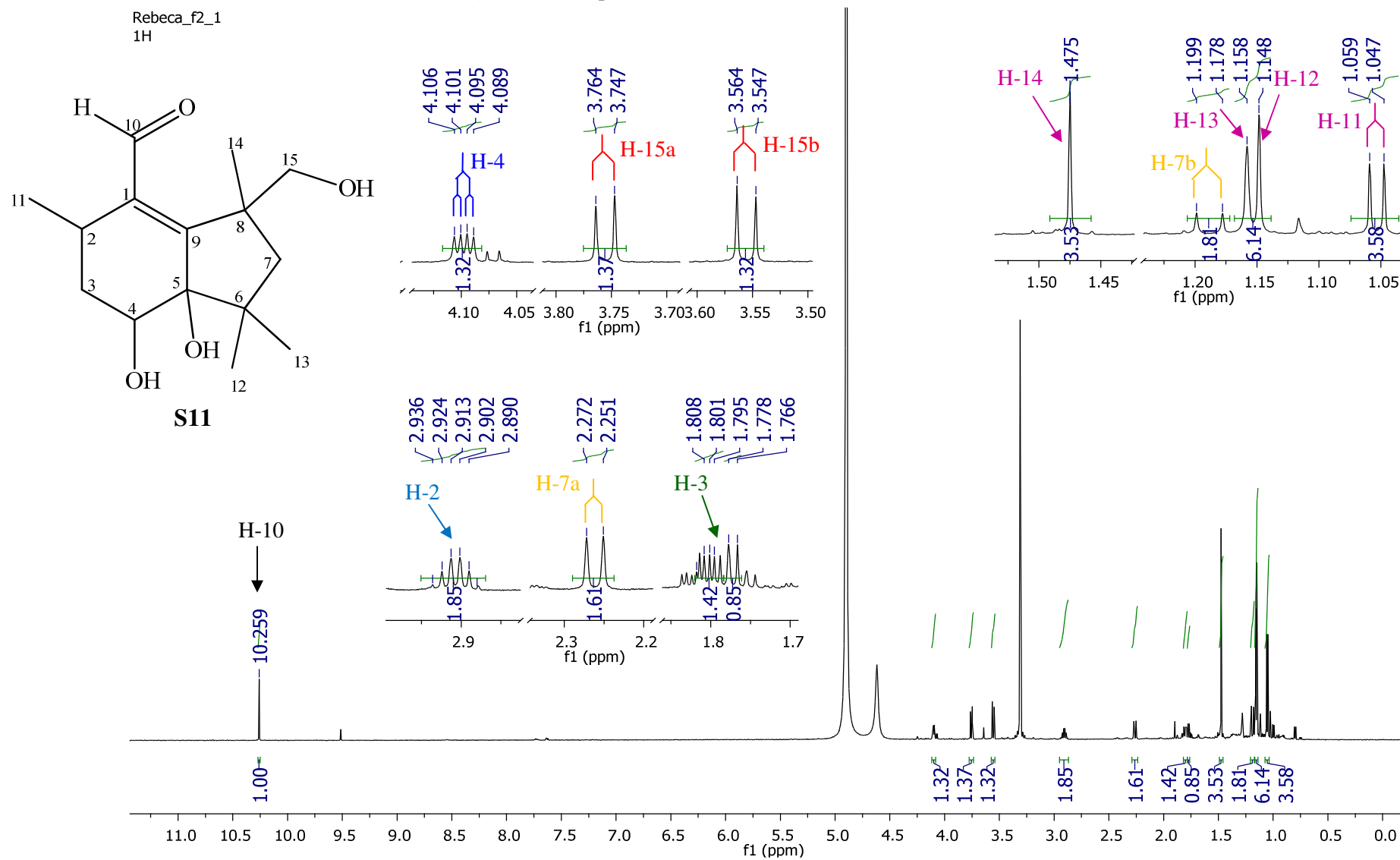
A partir do espectro de RMN de ^1H (**Figura 132**) de **S11** foi possível notar semelhanças com o espectro de RMN de ^1H de **S10**. No entanto, alguns sinais apresentaram valores de deslocamentos químicos maiores, como por exemplo, o sinal de H-4 que foi observado em δ_{H} 4,10 ($J_{4-3a} = 3,3$; $J_{4-3b} = 6,9$ Hz; 1H) e o sinal de H-2 em δ_{H} 2,91 (m; 1H).

O mapa de contornos COSY (**Figura 133**) mostrou mais uma vez as correlações entre o sinal de H-4 e H-3 em δ_{H} 1,80 (m; 2H) e entre o sinal de H-2 com os sinais de H-11 (δ_{H} 1,05; d; $J_{11-2} = 7,2$ Hz; 3H) e H-3.

A partir dos mapas de contornos HSQC (**Figura 134**) e HMBC (**Figura 135 e 136**) foi possível identificar, assim como para **S10**, 5 carbonos quaternários (não hidrogenados) em δ_{C} 166,0 (C-9), 141,8 (C-1), 83,6 (C-5), 47,2 (C-8) e em δ_{C} 44,8 (C-6); 3 metínicos em δ_{C} 197,1 (C-10), 71,7 (C-4) e 26,9 (C-2), 3 metilênicos em δ_{C} 71,5 (C-15), 53,8 (C-7) e em δ_{C} 37,6 (C-3) e, ainda, 4 carbonos metílicos em δ_{C} 30,3 (C-14), 27,2 (C-13), 22,6 (C-12) e em δ_{C} 19,6 (C-11).

No mapa de contornos HMBC foi possível verificar, ainda, as correlações entre H-10 e os sinais de C-1 e C-2, bem como entre o H-3 e C-1, C-5 e C-4, entre o sinal de H-14 e os sinais de C-7, C-8 e C-9 e, ainda, entre H-12 e C-5, C-6, C-7 e C-13. As demais correlações observadas estão descritas na **Tabela 44**.

Figura 132 - Espectro de RMN de ^1H de **S11** (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

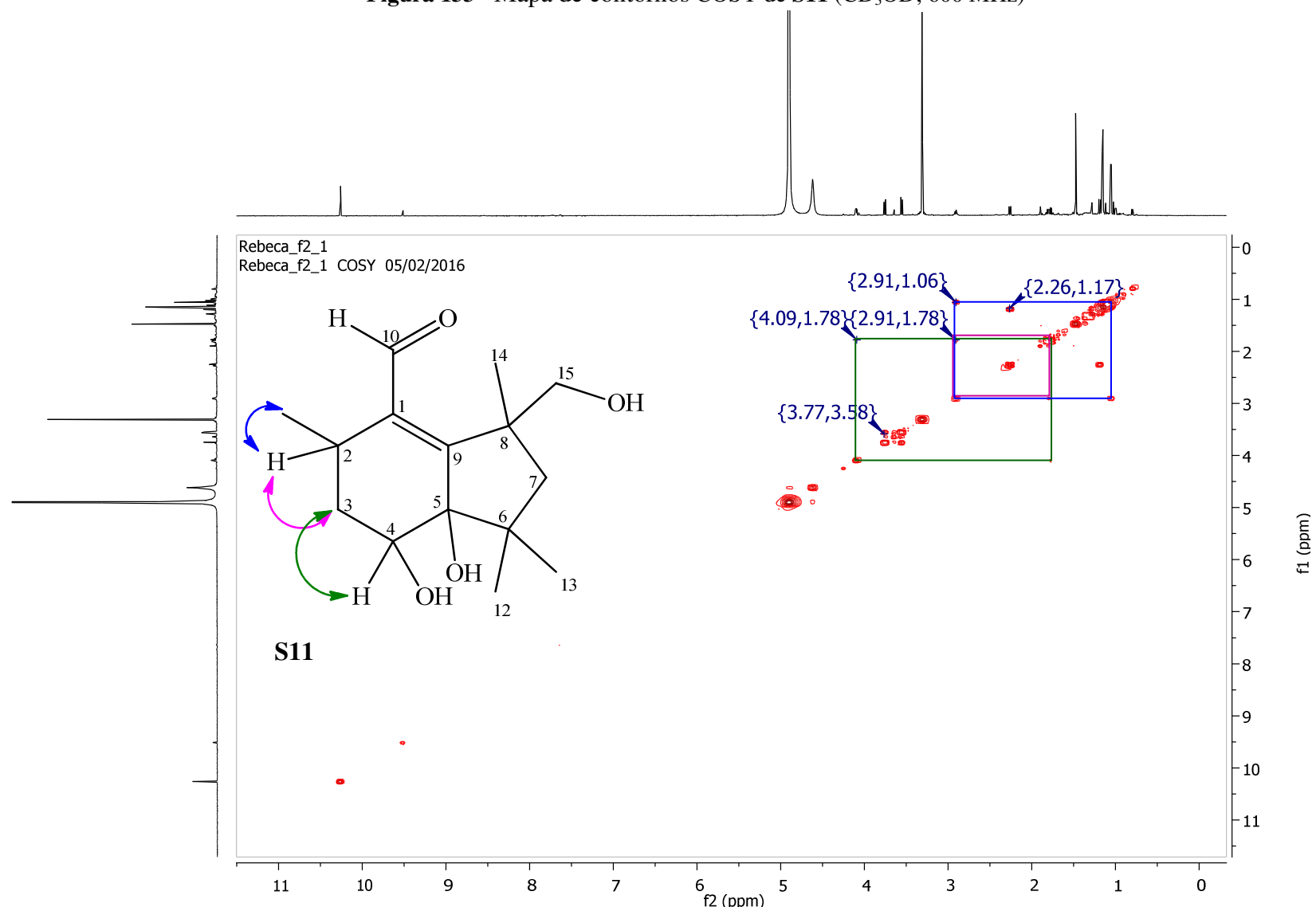
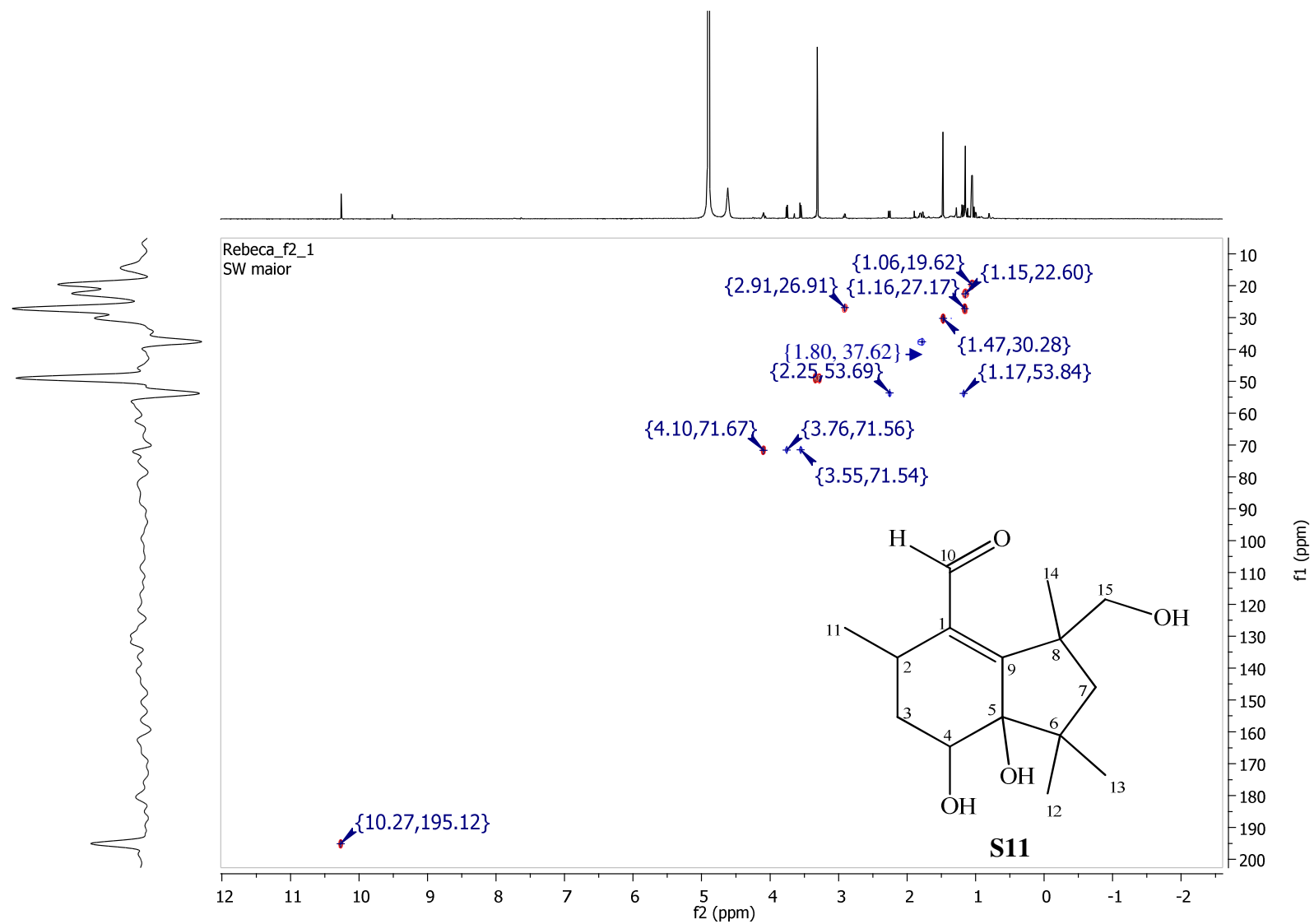
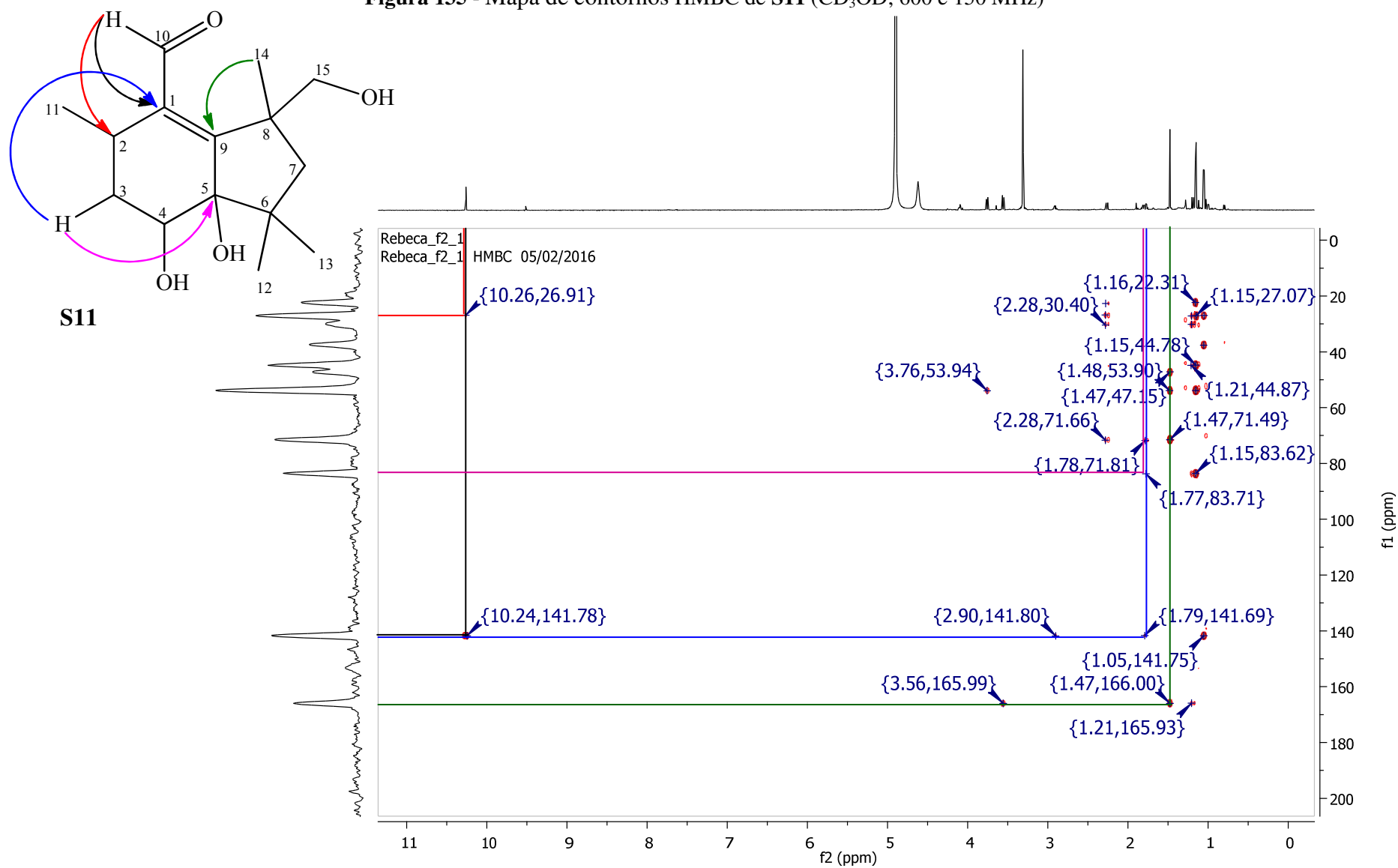
Figura 133 - Mapa de contornos COSY de **S11** (CD₃OD; 600 MHz)

Figura 134 - Mapa de contornos HSQC de **S11** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

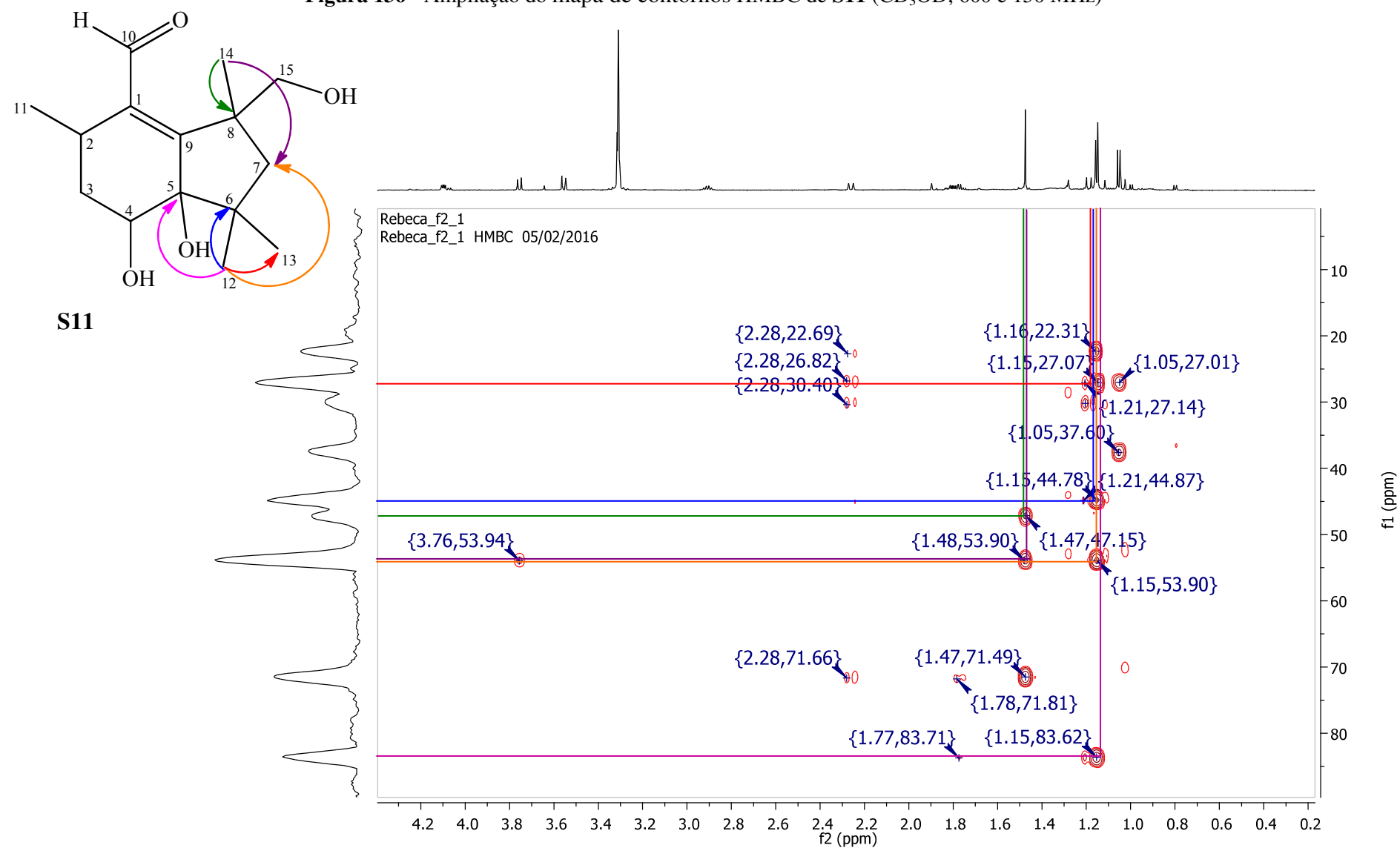
Fonte: o autor.

Figura 135 - Mapa de contornos HMBC de **S11** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 136 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de **S11** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

A partir dos espectros de NOESY-1D (**Figura 137**) foi possível verificar que **S11** é um diastereoisômero de **S10**, uma vez que ao irradiar o sinal de H-4 (δ_H 4,10) foi observado sua correlação espacial com o sinal dos hidrogênios metílicos da posição 11, correlação esta não observada para **S10**. Além disso, verificou-se a correlação espacial entre H-4 e os hidrogênios metílicos da posição 12 e, ao irradiar o sinal dos hidrogênios metílicos da posição 14 (δ_H 1,48) foi possível observar sua correlação espacial com H-13, indicando que esses hidrogênios estão do mesmo lado do plano médio da molécula.

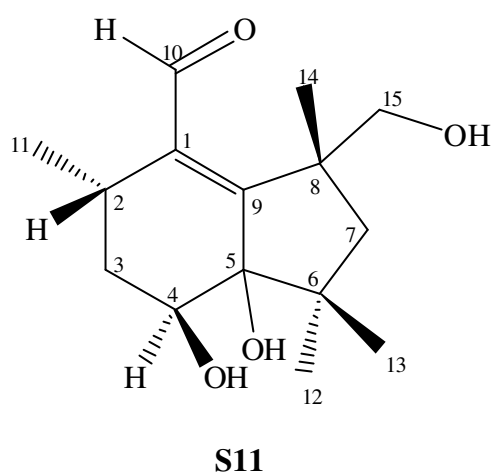
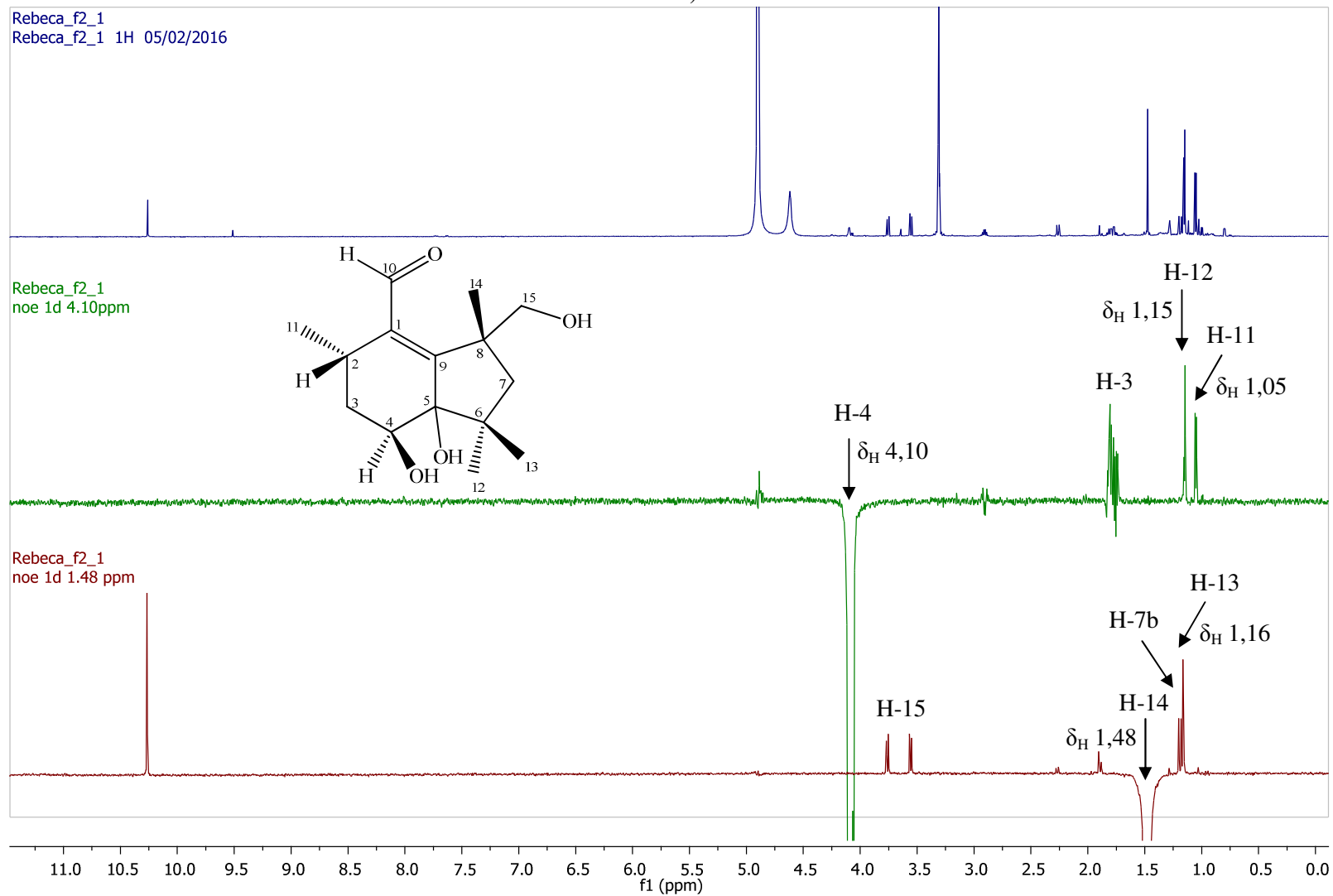


Figura 137 - Espectros de RMN de ^1H de **S11** (azul); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,10 (verde); NOESY 1D irradiado em δ_{H} 1,48 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Esses resultados indicaram que a substância **S11** também é inédita na literatura. Seus dados de RMN estão descritos na **Tabela 44**.

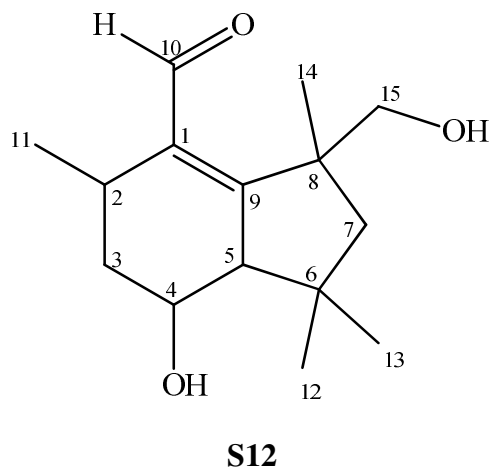
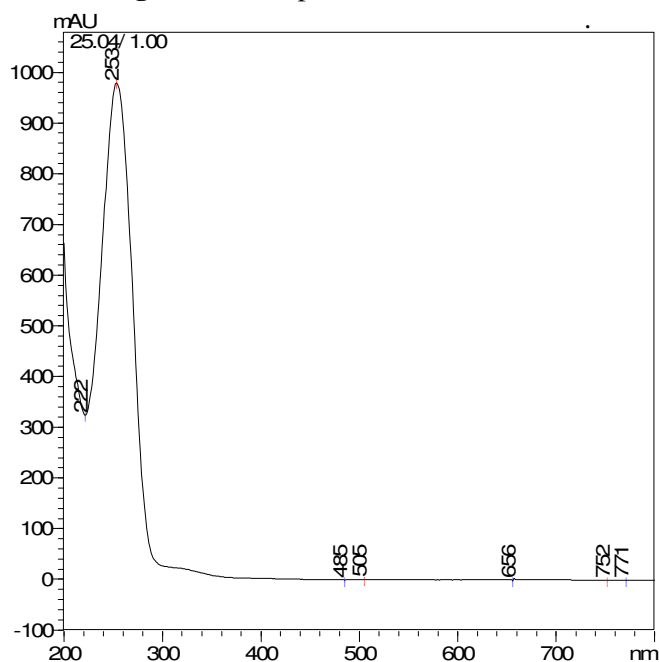
Tabela 44 - Dados de RMN da substância **S11** (600 e 150 MHz; CD₃OD).

Nº	δ_H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1		141,8		
2	2,91 (m)	26,9	11-CH ₃ ; H-3	C-1
3	1,80 (m)	37,6		C-1; C-5; C-4
4	4,10 (dd; 3,6; 6,9)	71,7	H-3	
5		83,6		
6		44,8		
7	2,26 (d; 12,6) 1,19 (d; 12,6)	53,8	H-7b	C-15; C-14; C-13; C-12 C-9; C-14
8		47,2		
9		166,0		
10	10,26 (s)	195,1		C-1; C-2
11	1,05 (d; 7,2)	19,6		C-1; C-3; C-2
12	1,15 (s)	22,6		C-7; C-6; C-13
13	1,16 (s)	27,2		C-12
14	1,48 (s)	30,3		C-9; C-15; C-7; C-8
15	3,71 (d; 10,2) 3,57 (d; 10,2)	71,5	H-15b	C-7 C-9

Fonte: o autor.

4.2.6.2 Elucidação estrutural de **S12**

A substância **S12** (3,0 mg) foi obtida como um óleo amarelado. Seu espectro no UV-Vis (**Figura 138**) apresentou uma banda de absorção com máximo em 253 nm e sua rotação específica foi determinada como $[\alpha]_D^{23} = +22,2^\circ$ (*c* 0,2 em CH₃OH).

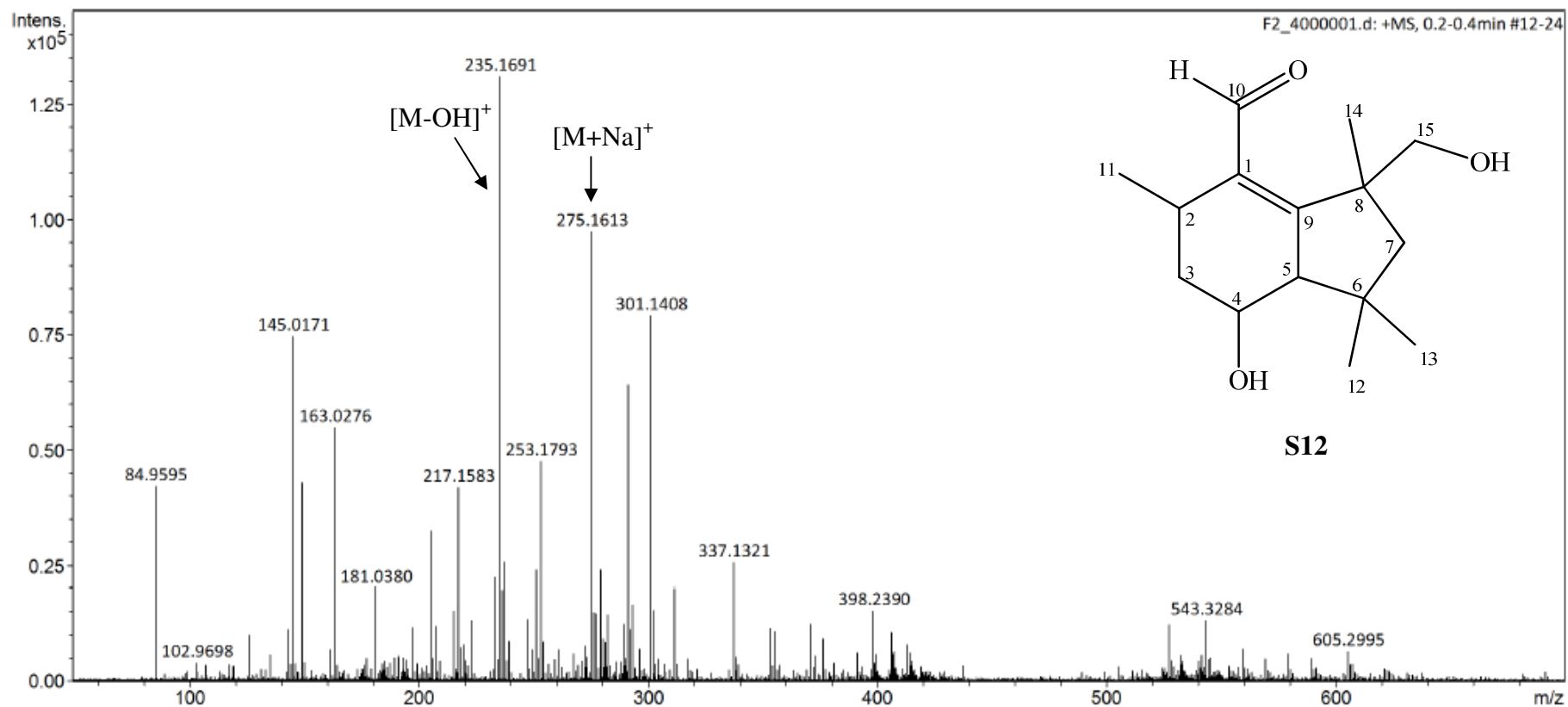
Figura 138 - Espectro no UV-Vis da substância **S12** (61,3% MeOH:38,7% H₂O).

Fonte: o autor.

Após a análise dos dados de RMN e de Espectrometria de Massas, a fórmula molecular de **S12** foi determinada como C₁₅H₂₄O₃. Seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 139**) mostrou o pico base em m/z 275,1613, referente ao íon [M+Na]⁺ (calculado 275,1623 - erro de 3,6 ppm).

Figura 139 - Espectro de Massas de alta resolução de **S12** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 140**) de **S12** mostrou-se semelhante ao espectro de RMN de ^1H de **S10** e **S11**. No entanto, apresentou um duplo dubleto em $\delta_{\text{H}} 2,33$ ($J_{5-2} = 3,3$; $J_{5-4} = 8,7$ Hz; 1H), não observado para **S10** e **S11**, e que foi atribuído ao H-5. Além disso, no mapa de contornos COSY (**Figura 141**), o mesmo apresentou correlação com o duplo dubleto em $\delta_{\text{H}} 3,62$ ($J_{4-3a} = 3,9$; $J_{4-5} = 8,7$; $J_{4-3b} = 11,1$ Hz; 1H), que foi atribuído ao H-4, e no mapa de contornos HSQC (**Figura 142**), mostrou correlação com o carbono metínico em $\delta_{\text{C}} 62,6$ (C-5). Já no mapa de contornos HMBC (**Figuras 143 e 144**), foram observadas as correlações desse sinal de carbono ($\delta_{\text{C}} 62,6$) com os sinais de H-3, H-12 e H-13.

O mapa de contornos COSY mostrou ainda as correlações entre o sinal de H-4 e H-3b ($\delta_{\text{H}} 1,29$; m; 1H) e entre o sinal de H-2 com os sinais de H-11 ($\delta_{\text{H}} 1,06$; d; $J_{11-2} = 7,2$ Hz; 3H) e H-3a ($\delta_{\text{H}} 2,00$; ddd; $J_{3a-4} = 3,9$; $J_{3a-2} = 6,5$; $J_{3a-3b} = 12,8$ Hz; 1H).

A partir dos mapas de contornos HSQC e HMBC foi possível identificar os demais sinais dos carbonos, sendo 4 carbonos quaternários (não hidrogenados) em $\delta_{\text{C}} 169,3$ (C-9), $139,4$ (C-1), $48,9$ (C-8) e em $\delta_{\text{C}} 40,0$ (C-6); outros 3 carbonos metínicos em $\delta_{\text{C}} 195,8$ (C-10), $69,1$ (C-4) e $31,1$ (C-2), 3 metilênicos em $\delta_{\text{C}} 71,7$ (C-15), $55,8$ (C-7) e em $\delta_{\text{C}} 42,4$ (C-3) e, ainda, 4 carbonos metílicos em $\delta_{\text{C}} 30,2$ (C-13), $30,1$ (C-14), $23,9$ (C-12) e em $\delta_{\text{C}} 21,0$ (C-11).

Outras correlações observadas no mapa de contornos HMBC foram: entre H-10 e os sinais de C-1 e C-2, entre o sinal de H-14 e os sinais de C-7, C-8 e C-9 e, ainda, de H-12 e H-13 com os sinais de C-6 e C-7. As demais correlações observadas estão descritas na **Tabela 45**.

Ao comparar os dados de RMN de **S12** com dados descritos na literatura, foi possível verificar sua semelhança com a substância conhecida como botrienalol (COLLADO et al., 1996), que apresenta um grupo acetil na posição 4, diferentemente de **S12**. No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do botrienalol, o sinal de H-4 foi observado em $\delta_{\text{H}} 4,90$ (ddd; $J_{4-3a} = 4,1$; $J_{4-5} = 8,2$; $J_{4-3b} = 9,4$ Hz; 1H), de H-5 em $\delta_{\text{H}} 2,50$ (dd; $J_{5-2} = 3,1$; $J_{5-4} = 8,2$ Hz; 1H) e de H-2 em $\delta_{\text{H}} 2,94$ (m; 1H), e também foi observado um singlete em $\delta_{\text{H}} 2,04$ (3H), referente aos hidrogênios metílicos do grupo acetil. No espectro de ^{13}C do botrienalol foi observado o sinal do carbono da carbonila do grupo acetil em $\delta_{\text{C}} 179,5$, enquanto os sinais de C-5 e C-3 foram observados em $\delta_{\text{C}} 58,4$ e $36,7$, respectivamente.

Figura 140 - Espectro de RMN de ^1H de **S12** (CD_3OD ; 600 MHz)

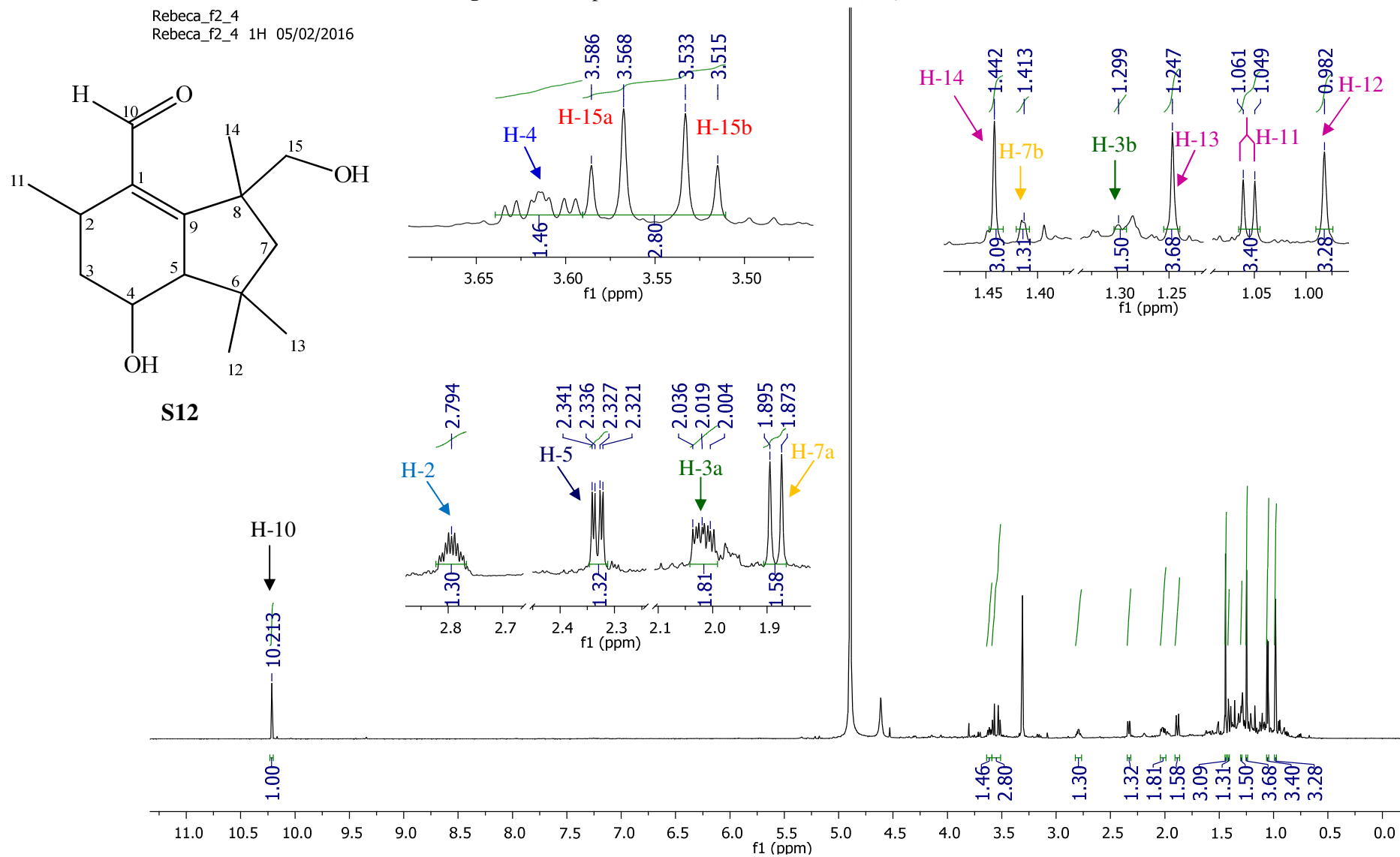
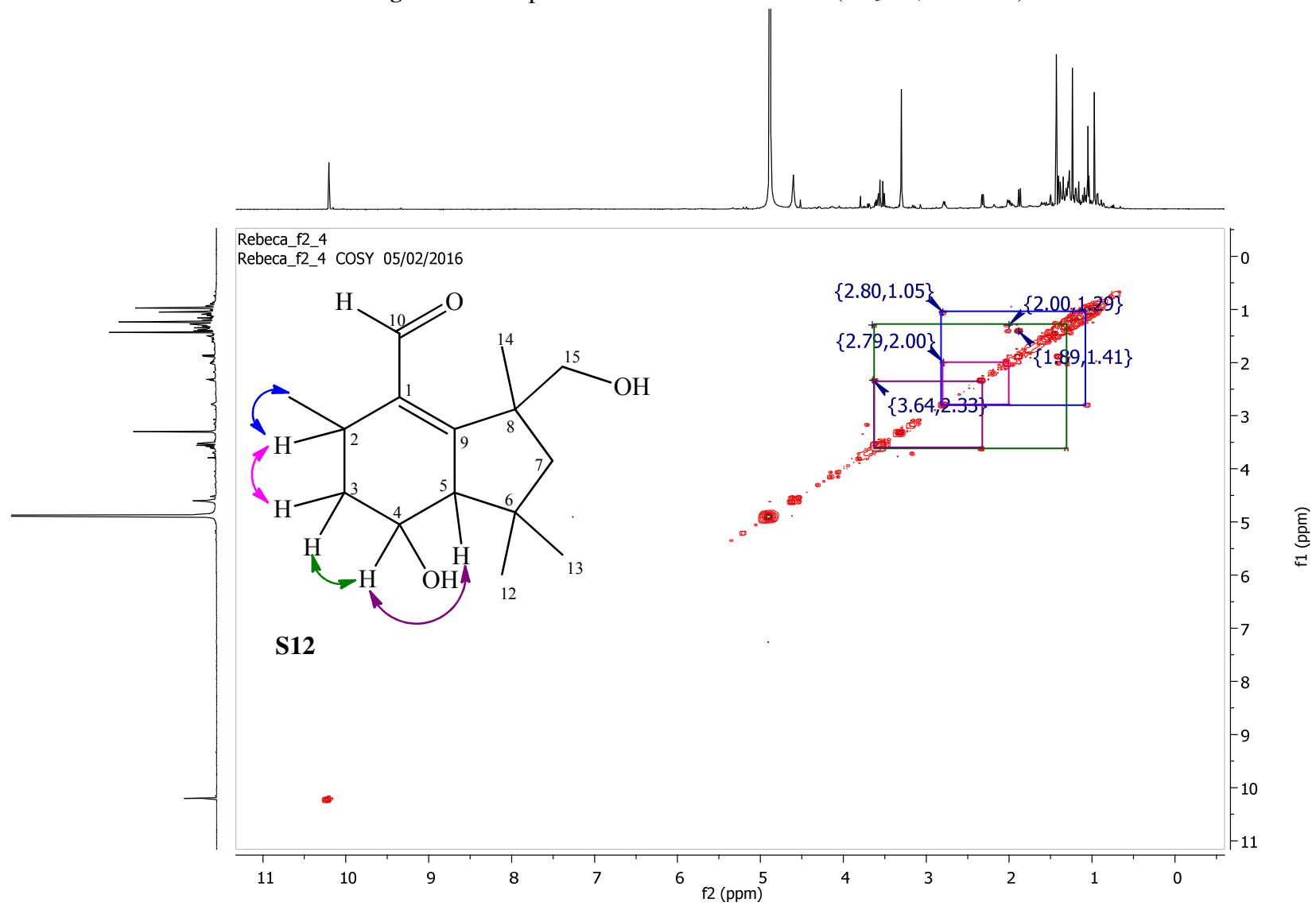
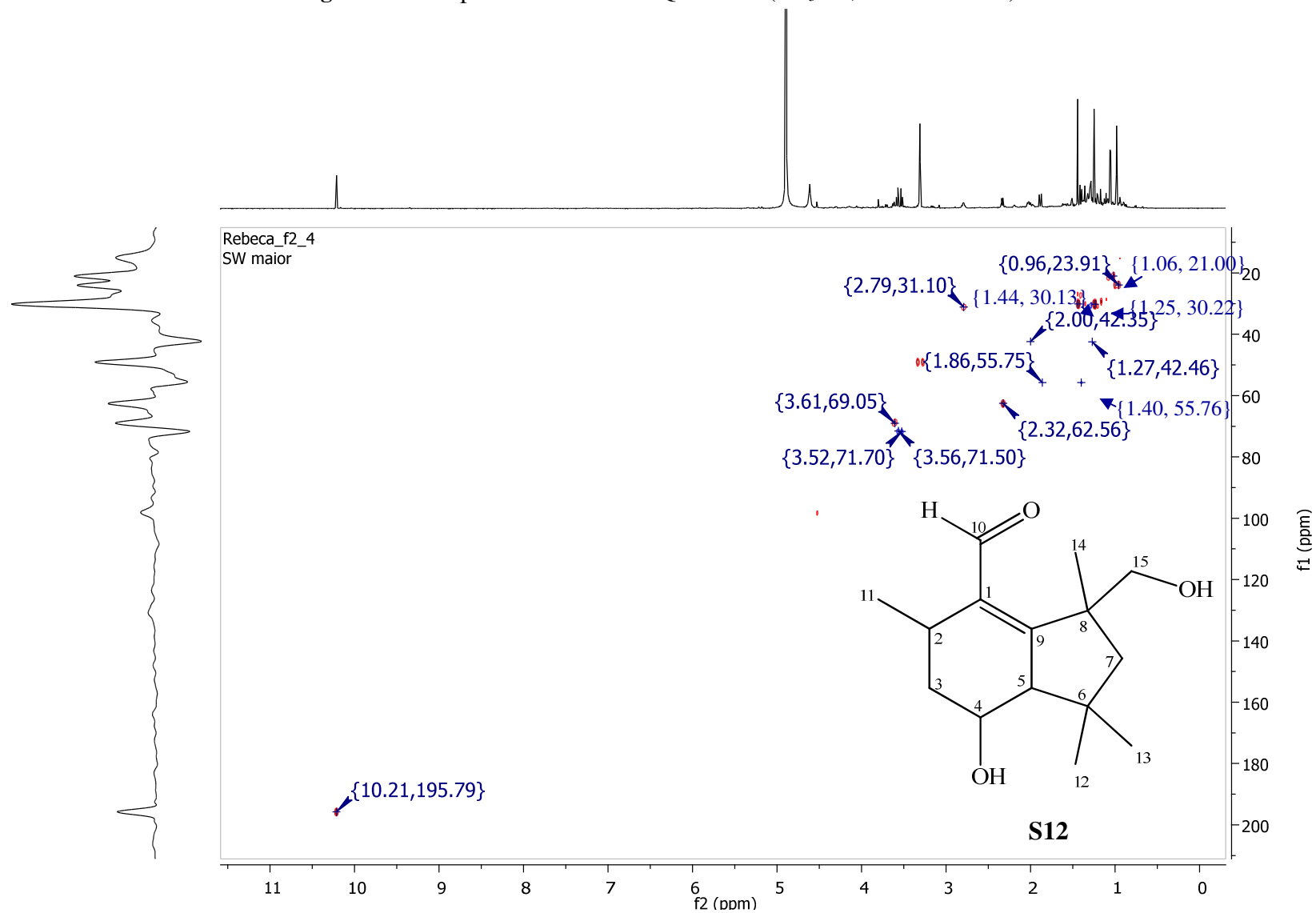


Figura 141 - Mapa de contornos COSY de **S12** (CD₃OD; 600 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 142 - Mapa de contornos HSQC de **S12** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



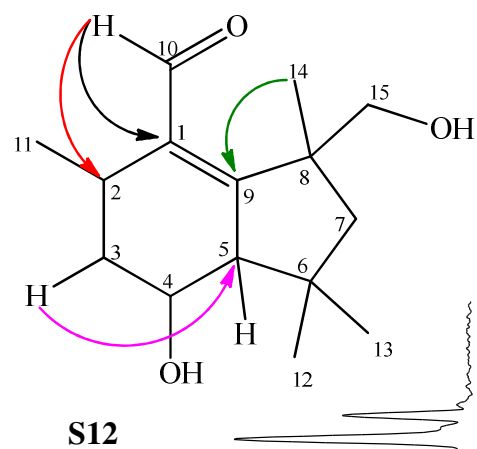
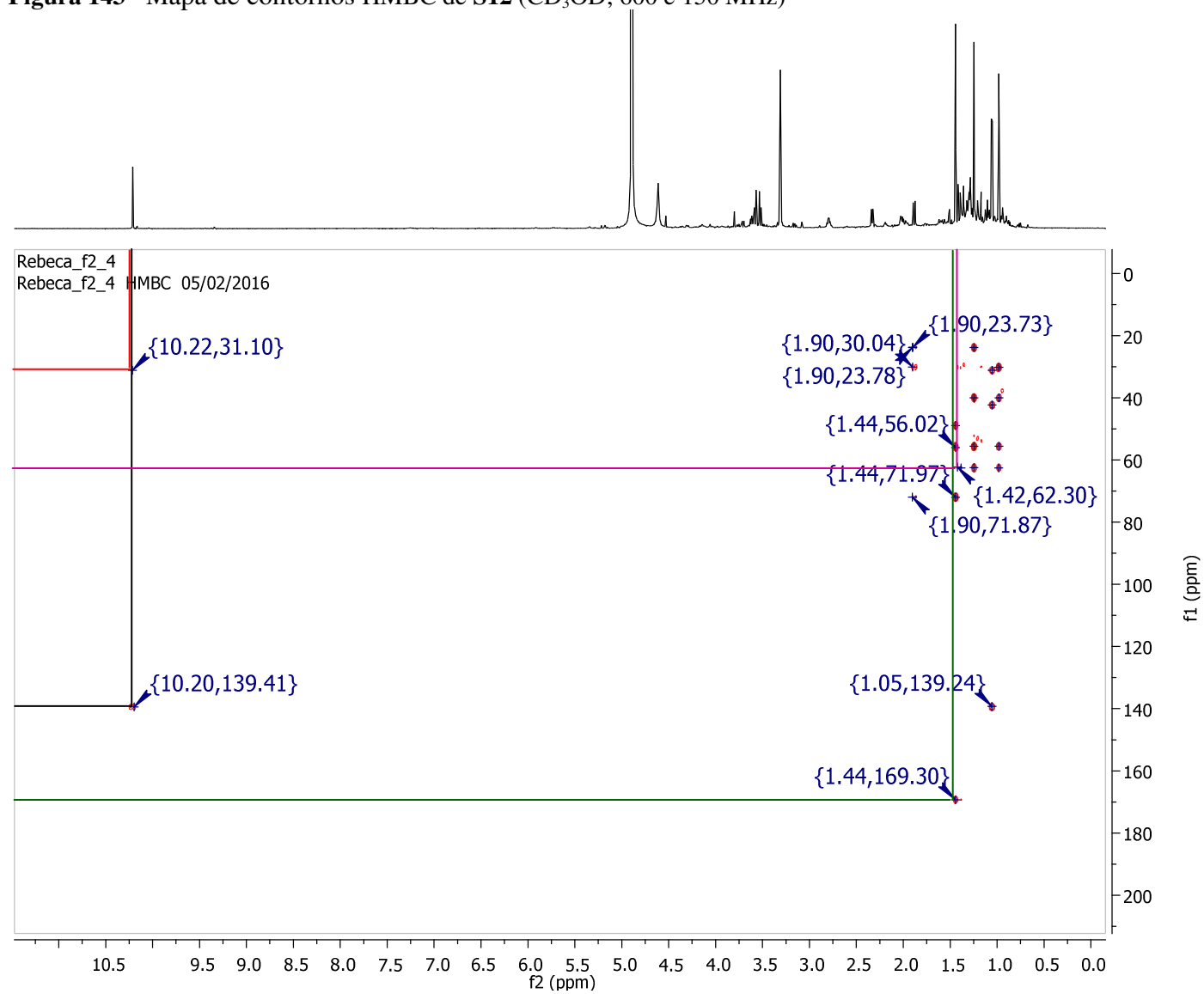
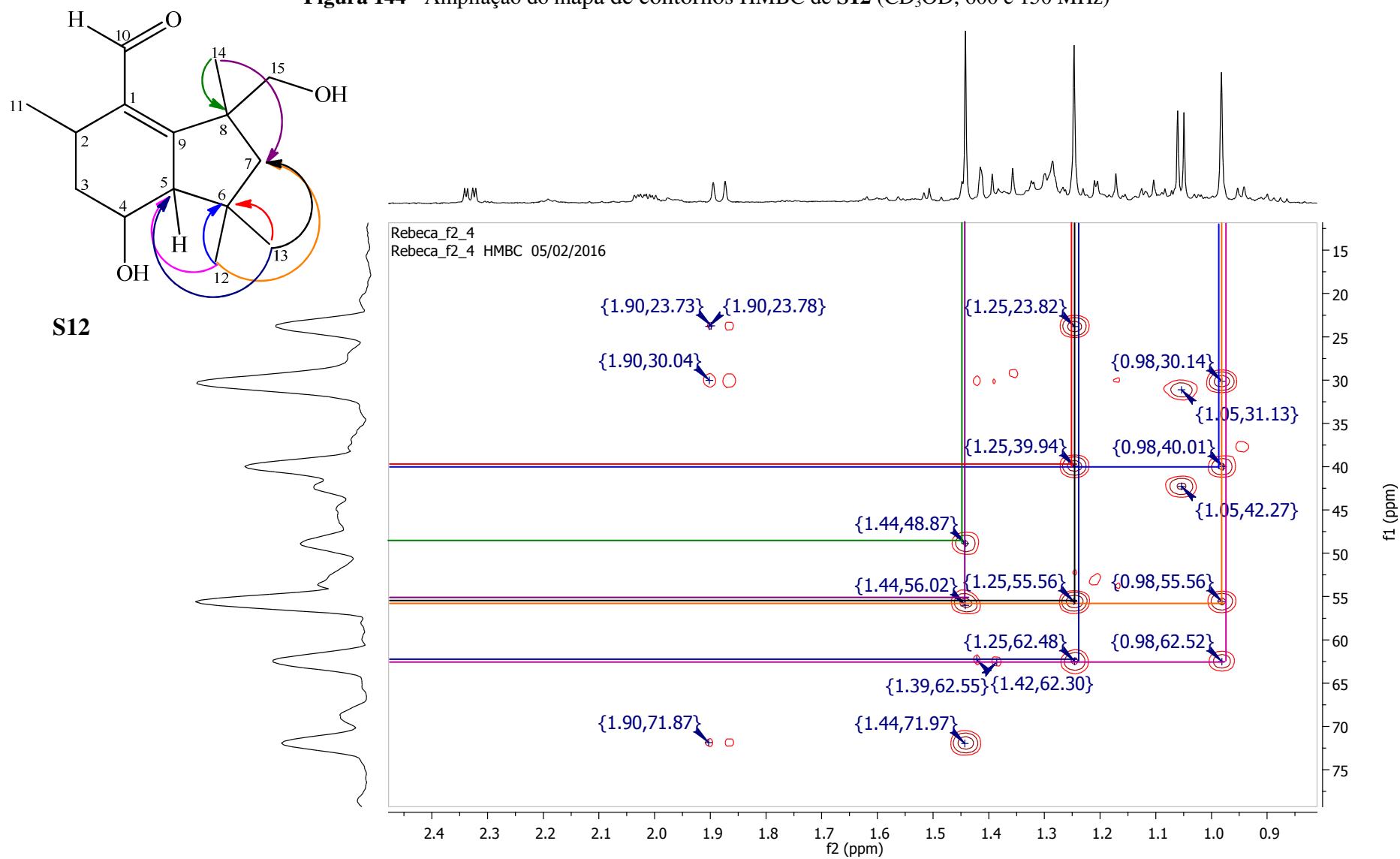


Figura 143 - Mapa de contornos HMBC de **S12** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 144 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de **S12** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Para confirmar as constantes de acoplamento do sinal de H-5 em δ_H 2,33 foram obtidos espectros de HOMODEC da substância **S12**. Portanto, foi possível verificar que o sinal (H-5) se apresentava como um duplo dubleto ($J_{5-2} = 3,3$; $J_{5-4} = 8,7$ Hz), pois acoplava a longa distância com H-2 (δ_H 2,79), já que ao irradiar o sinal de H-2 (**Figura 145**) o sinal de H-5 se apresentou como um dubleto com constante de acoplamento de 9 Hz (J_{5-4}). E ao irradiar o sinal em δ_H 1,06 (**Figura 146**), referente aos hidrogênios metílicos na posição 11, foi possível verificar algumas constantes de acoplamento do sinal de H-2 (ddd; $J_{2-5} = 3,3$; $J_{2-3a} = 6,6$; $J_{2-3b} = 9,9$ Hz), confirmando assim o acoplamento a longa distância entre H-2 e H-5.

Rebeca_F2_4
Rebeca_F2_4 16/06/2016
HOMODEC 2.81 ppm

3.655
3.649
3.640
3.636
3.634
3.630
3.622
3.616

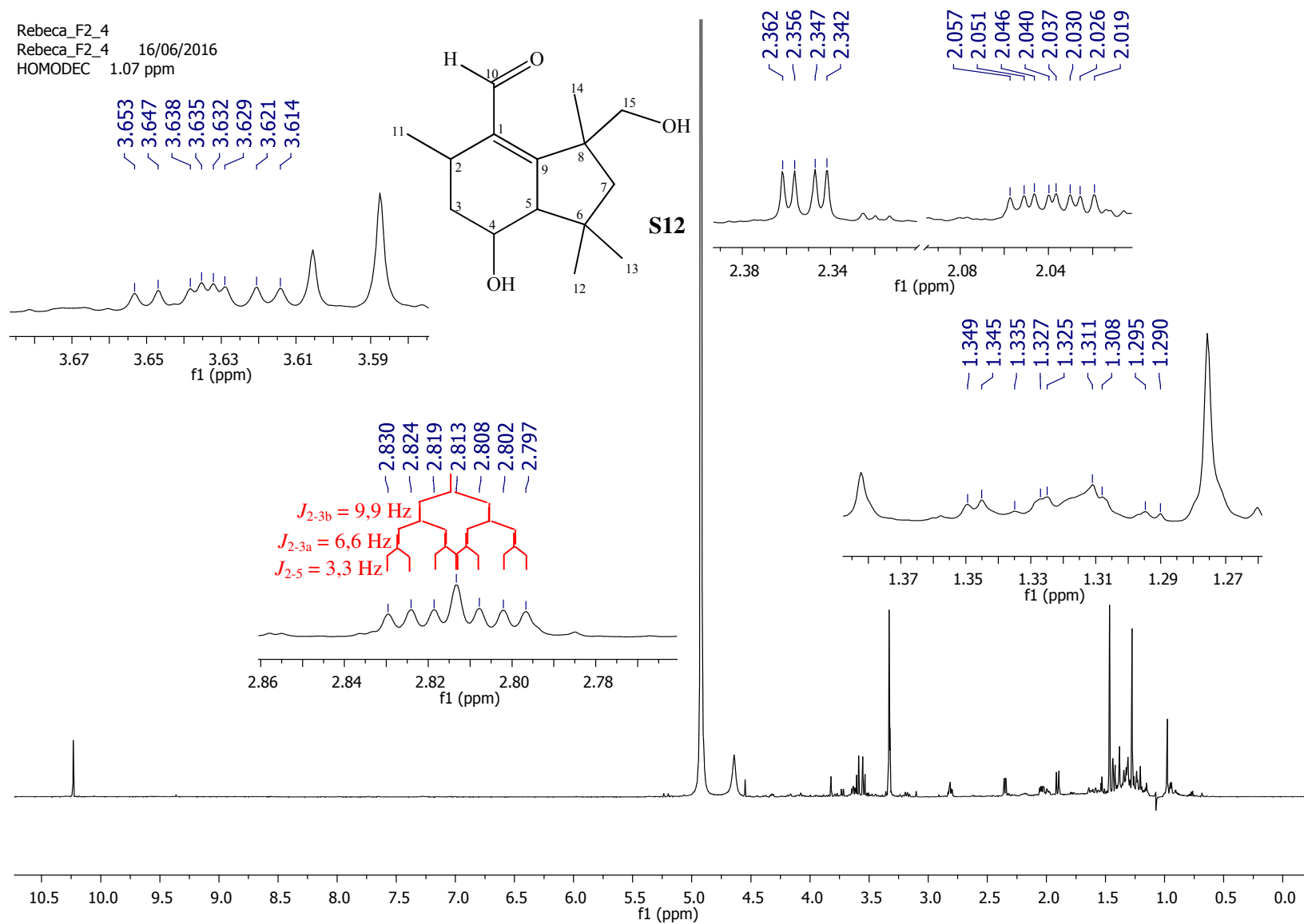
1.341
1.336
1.326
1.307
1.287
1.284
1.264
1.072

2.353
2.338
 $J_{5-4} = 9 \text{ Hz}$
2.047
2.040
2.026
2.020

S12

11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0

f1 (ppm)

Figura 146 - Espectro de HOMODEC de **S12** - irradiado em δ_H 1,06.

Os espectros de NOESY-1D (**Figura 147**) de **S12** mostraram as correlações espaciais entre H-5 e H-4, H-2 e H-13 ao irradiar o sinal de H-5 (δ_{H} 2,33), e a correlação espacial dos hidrogênios metílicos das posições 14 e 12, ao irradiar o sinal de H-14 (δ_{H} 1,44), indicando que esses hidrogênios estão do mesmo lado da molécula. Ao irradiar o sinal de H-11 (δ_{H} 1,06), foi possível confirmar que o mesmo se encontra em lado oposto da molécula relativo a H-4 e H-5, já que não foram observadas correlações espaciais de H-11 com os mesmos.

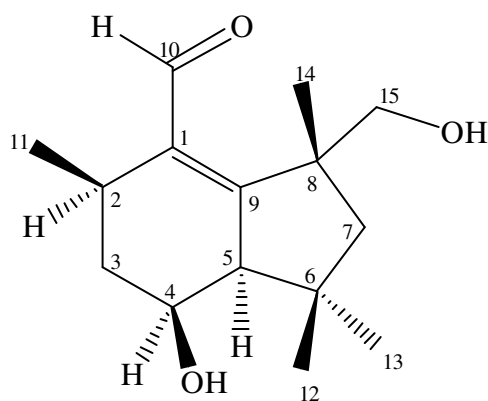
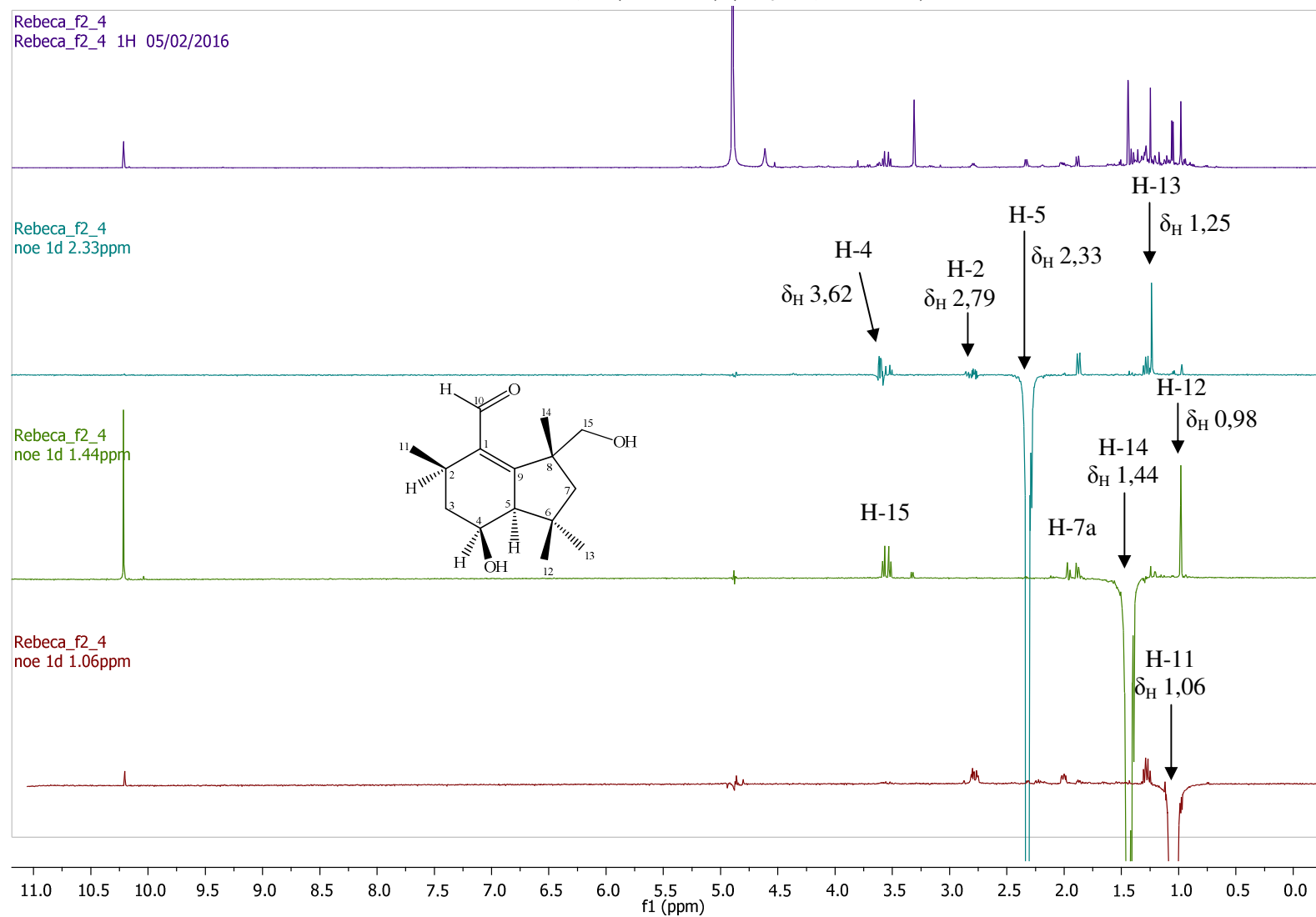
**S12**

Figura 147 - Espectros de RMN de ^1H de **S12** (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 2,33 (azul claro); NOESY 1D irradiado em δ_{H} 1,44 (verde); NOESY 1D irradiado em δ_{H} 1,06 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

A substância **S12** também é inédita na literatura e seus dados de RMN estão descritos na **Tabela 45**.

Tabela 45 - Dados de RMN da substância **S12** (600 e 150 MHz; CD₃OD)

Nº	δ _H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ _C	COSY	HMBC
1		139,4		
2	2,79 (m)	31,1	11-CH ₃ ; H-3a	
	2,02 (ddd; 3,9; 6,5;		H-3b	
3	12,8)	42,4		
	1,29 (m)			
4	3,62 (ddd; 3,9; 8,7;	69,1	H-3b; H-5	
	11,1)			
5	2,33 (dd; 3,3; 8,7)	62,6		
6		40,0		
7	1,88 (d; 13,2)	55,8	H-7b	C-15; C-14; C-12
	1,40 (m)			C-5
8		48,9		
9		169,3		
10	10,21 (s)	195,8		C-1; C-2
11	1,06 (d; 7,2)	21,0		C-1; C-3; C-2
12	0,98 (s)	23,9		C-5; C-7; C-6; C-13
13	1,25 (s)	30,2		C-5; C-7; C-6; C-12
14	1,44 (s)	30,1		C-9; C-15; C-7; C-8
15	3,58 (d; 10,8)	71,7		
	3,52 (d; 10,8)			

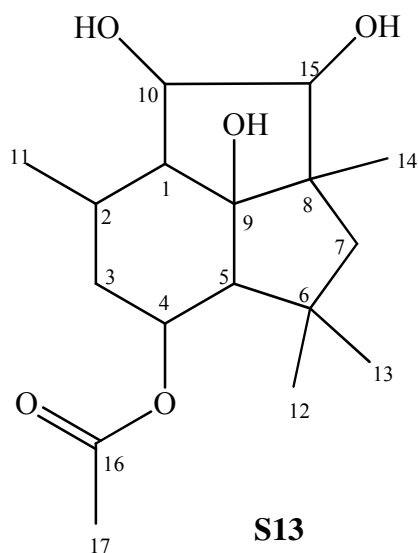
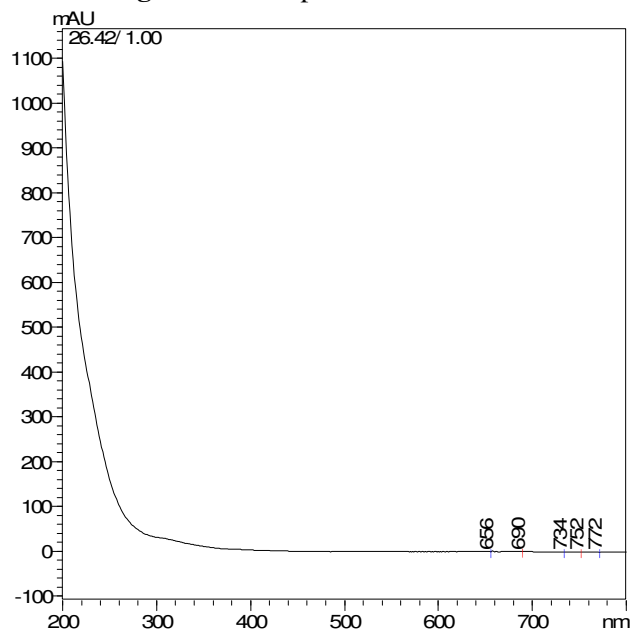
Fonte: o autor.

4.2.6.3 Elucidação estrutural de **S13**

A substância **S13** (13,8 mg) foi obtida como um óleo amarelado. A análise dos dados de RMN e espectrometria de massas e sua comparação com dados da literatura (COLLADO et al., 1995) permitiram sua identificação como o sesquiterpeno 4β-acetoxi-9β,10β,15α-tri-hidroxiprotodrial.

Seu espectro no UV-Vis (**Figura 148**) não apresentou banda de absorção no intervalo entre 200 a 700 nm. A rotação específica determinada para esta substância foi de $[\alpha]_D^{23} = +12,2^\circ$ (c 0,2 em CH_3OH).

Figura 148 - Espectro no UV-Vis da substância **S13** (63% MeOH:37% H_2O).

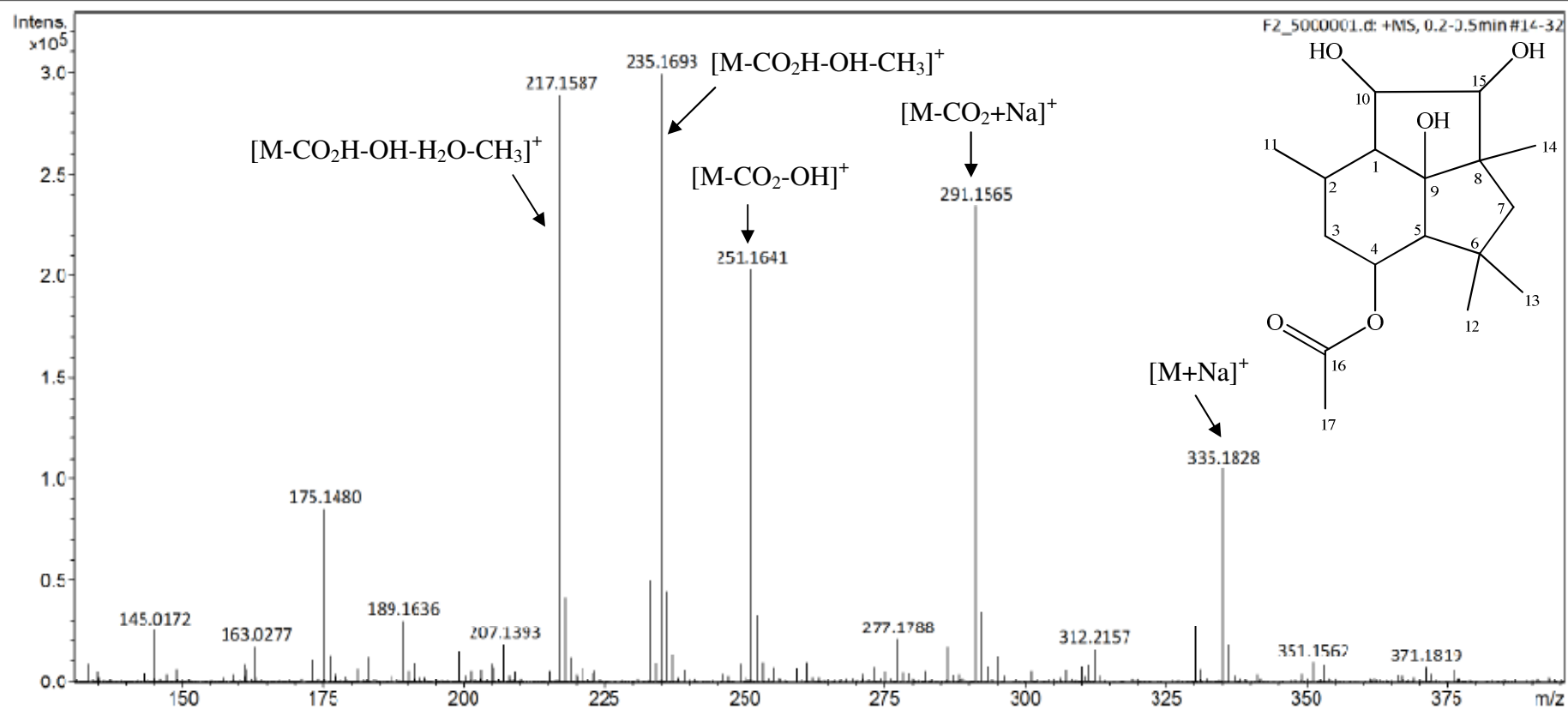


Fonte: o autor.

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) de **S13** (**Figura 149**) apresentou o pico em m/z 335,1828, referente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado 335,1834 - erro de 1,8 ppm), indicando sua fórmula molecular como $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_5$.

Figura 149 - Espectro de Massas de alta resolução de **S13** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 150**) de **S13** mostrou um duplo duplo dubleto em δ_{H} 5,12 ($J_{4-3a} = 3,9$; $J_{4-3b} = 11,0$ Hz, $J_{4-5} = 11,0$ Hz; 1H), um dubleto em δ_{H} 4,38 ($J_{15-10} = 5,7$ Hz; 1H) e um duplo dubleto em δ_{H} 4,02 ($J_{10-1} = 3,2$; $J_{10-15} = 5,7$ Hz; 1H), que foram atribuídos a H-4, H-15 e H-10, respectivamente. Além disso, verificou-se um dubleto largo em δ_{H} 1,75 (1H) e um duplo dubleto em δ_{H} 1,31 ($J_{1-10} = 3,2$; $J_{1-2} = 11,7$ Hz) referentes a H-5 e H-1, respectivamente.

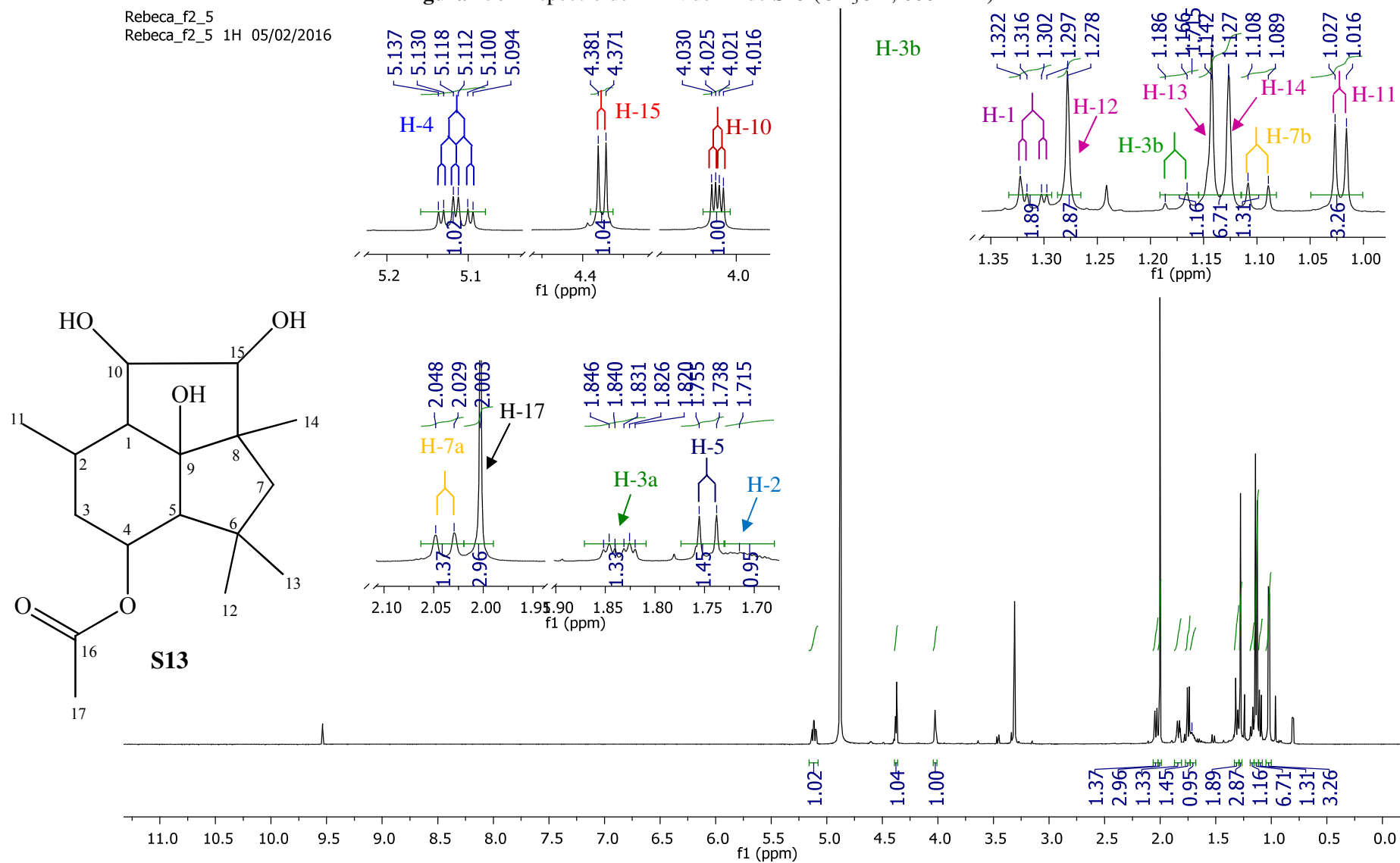
No mapa de contornos COSY (**Figura 151**) o sinal de H-4 mostrou correlação com os sinais de H-3a (δ_{H} 1,83; m; 1H), H-3b (δ_{H} 1,18; dl; 1H) e H-5. Já o sinal de H-15 mostrou correlação com H-10, enquanto H-2 (δ_{H} 1,71; m; 1H) mostrou correlação com H-1 e H-3b.

A partir do mapa de contornos HSQC (**Figura 152**), juntamente com o mapa de contornos HMBC (**Figura 153 e 154**), foram observados sinais de 4 carbonos quaternários (não hidrogenados) em δ_{C} 172,1 (C-16), 95,2 (C-9), 57,9 (C-8) e em δ_{C} 47,1 (C-6), 6 metínicos em δ_{C} 88,9 (C-10), 83,7 (C-15), 74,0 (C-4), 60,0 (C-1), 58,7 (C-5) e 34,9 (C-2), 2 metilênicos em δ_{C} 49,5 (C-7) e 40,6 (C-3), além de sinais de 5 carbonos metílicos em δ_{C} 36,4 (C-12), 27,8 (C-13), 22,6 (C-14), 21,6 (C-11) e em δ_{C} 21,0 (C-17).

O mapa de contornos HMBC mostrou as correlações entre H-4 e H-17 e o sinal de C-16, entre H-15 e C-8 e C-14, entre o sinal de H-7a (δ_{H} 2,04; d; $J_{7a-7b} = 11,4$ Hz; 1H) e o sinal de C-14 e, ainda, entre o sinal de H-12 (δ_{H} 1,28; s; 3H) e os sinais de C-5, C-6 e C-7, entre H-13 (δ_{H} 1,14; s; 3H) e C-6, e entre H-14 (δ_{H} 1,13; s; 3H) e C-9.

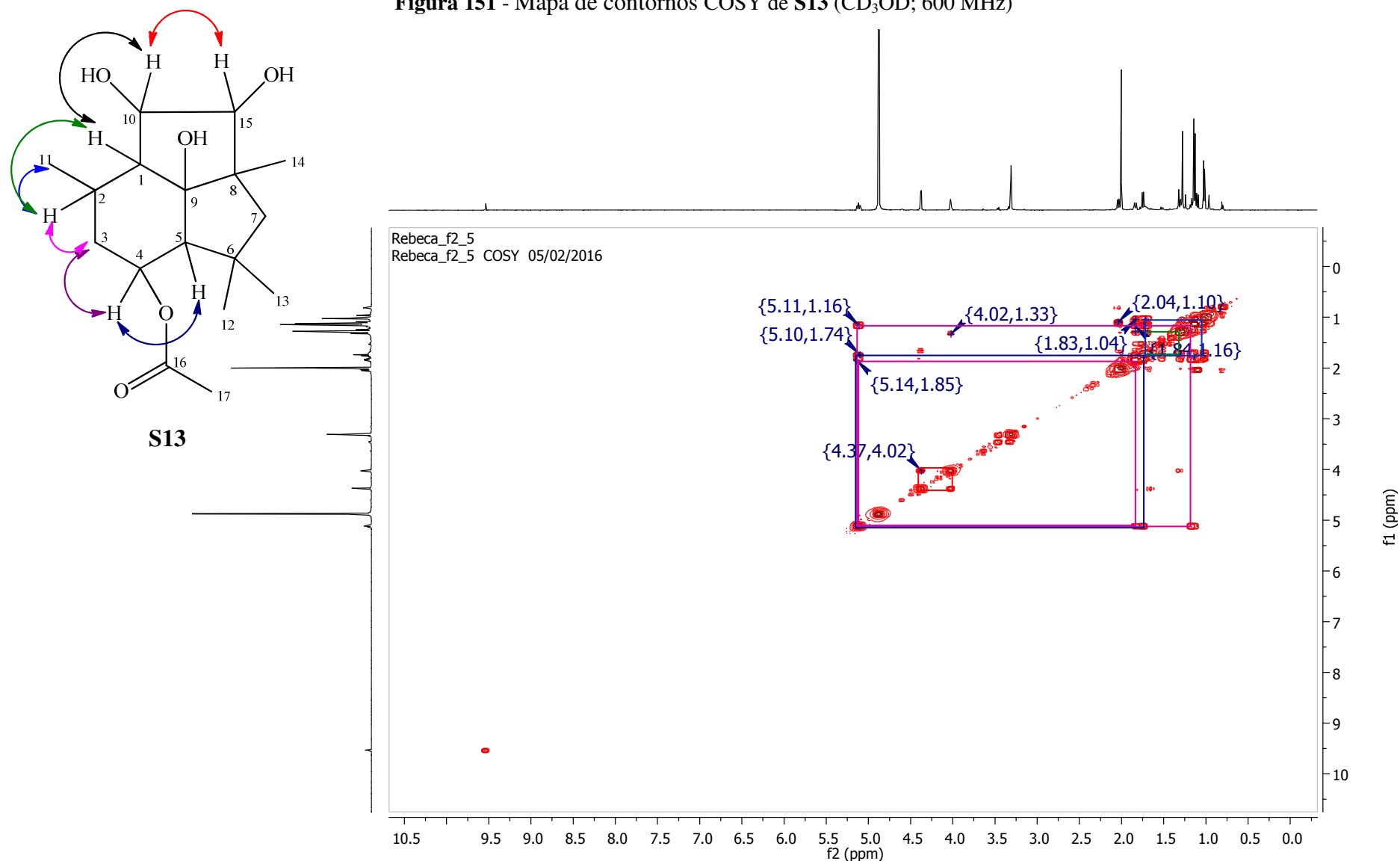
Figura 150 - Espectro de RMN de ^1H de **S13** (CD_3OD ; 600 MHz)

Rebeca_f2_5
Rebeca_f2_5 1H 05/02/2016



Fonte: o autor.

Figura 151 - Mapa de contornos COSY de **S13** (CD₃OD; 600 MHz)



Fonte: o autor.

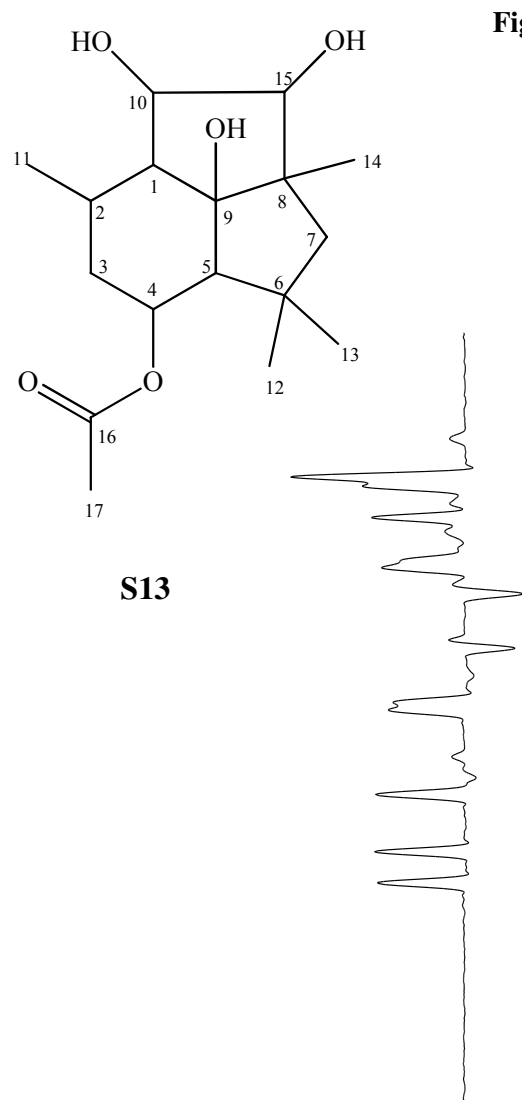


Figura 152 - Mapa de contornos HSQC de **S13** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

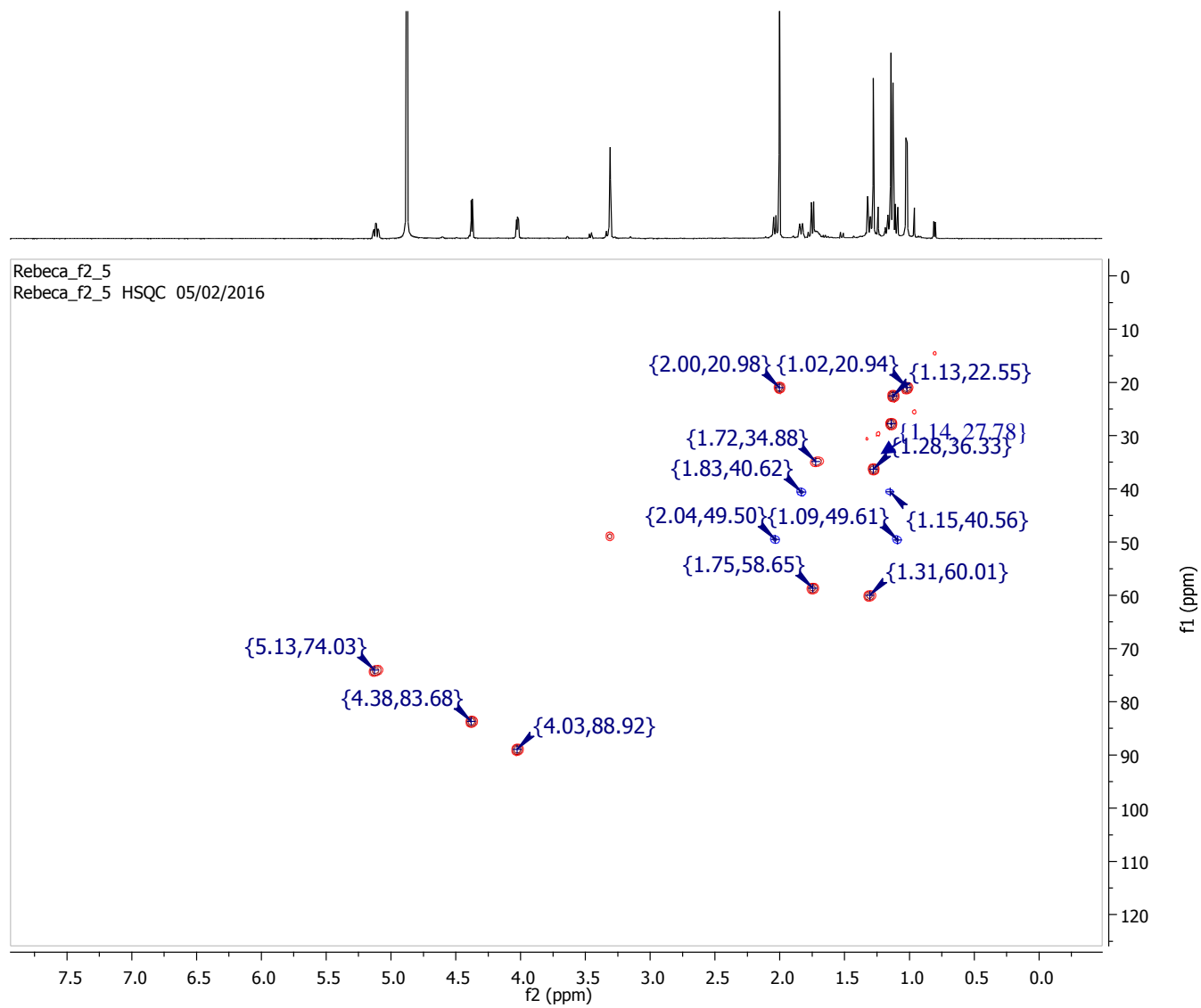


Figura 153 - Mapa de contornos HMBC de **S13** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

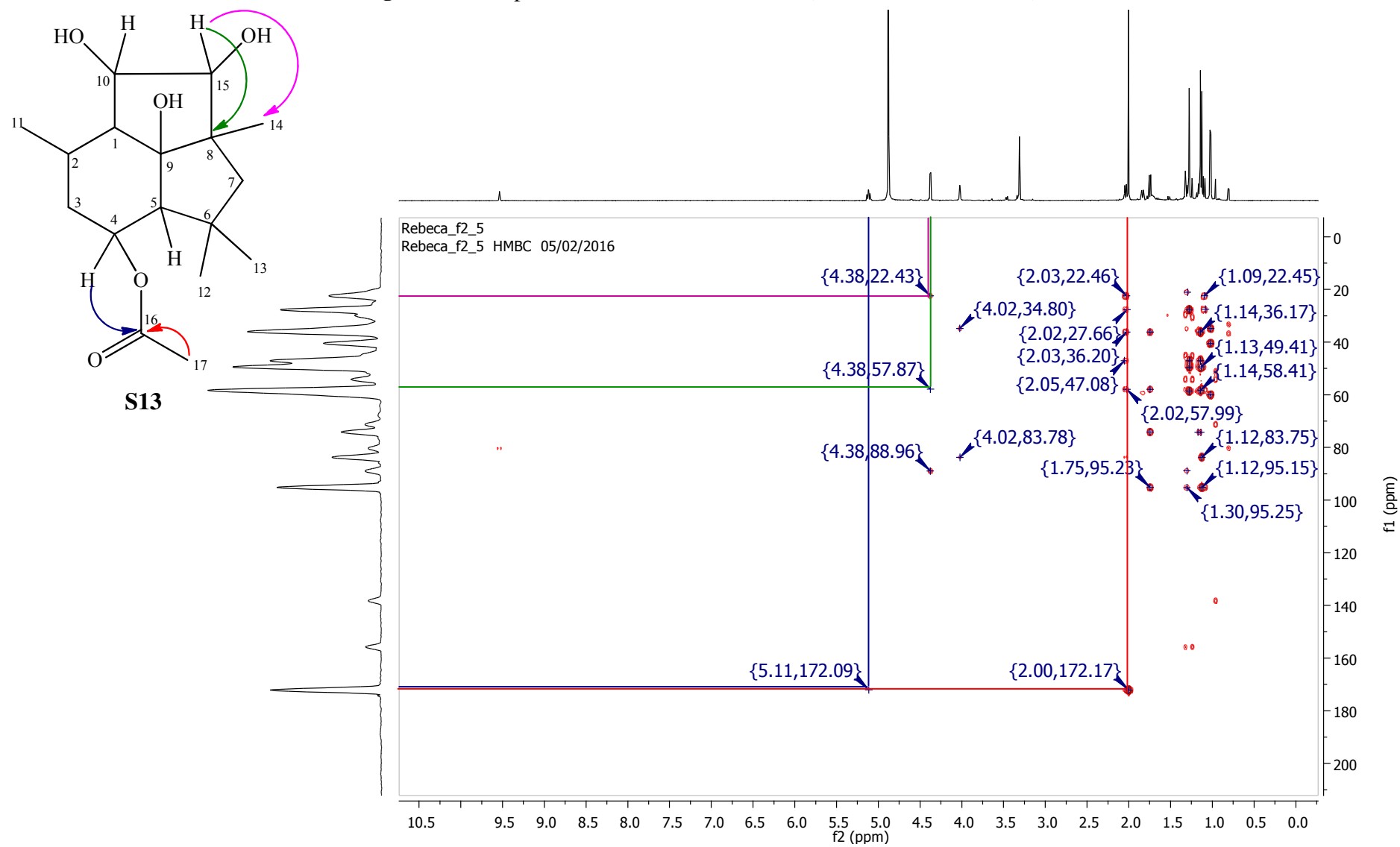
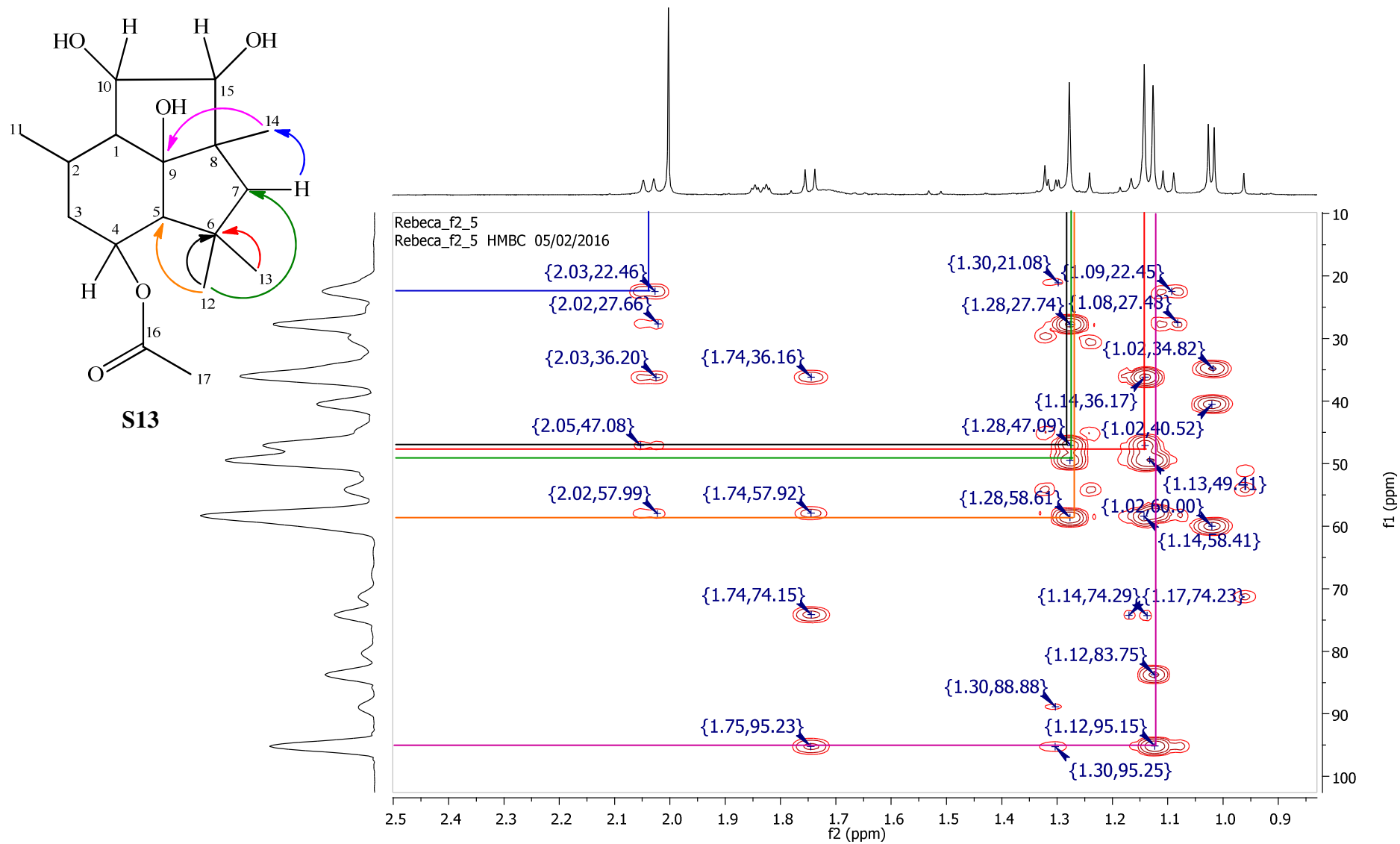


Figura 154 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de **S13** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

A partir dos espectros de NOESY-1D (**Figura 155**) foi possível verificar a configuração relativa de **S13**. Ao irradiar o sinal de H-10 (δ_H 4,02) foram observadas as correlações espaciais do mesmo com H-2 e H-14, indicando que esses hidrogênios estão do mesmo lado do plano médio da molécula e não foi verificada a correlação com H-15, mostrando assim que H-10 e H-15 estão em lados opostos da molécula. Ao irradiar o sinal dos hidrogênios metílicos da posição 12 (δ_H 1,28) verificou-se apenas a correlação com o sinal de H-5 e como não foi observada a correlação com H-4, podemos dizer que H-12 e H-4 encontram-se em lados opostos da molécula. A correlação entre H-11 e H-1 foi evidenciada ao irradiar o sinal de H-11 (δ_H 1,02). Então, concluímos que H-2, H-4, H-10, H-13 e H-14 estão de um mesmo lado do plano médio da molécula, enquanto H-5, H-11, H-12 e H-15 estão do outro lado.

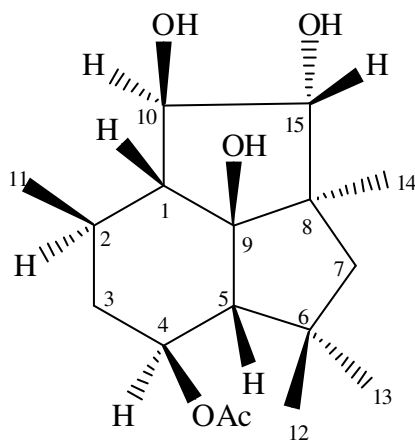
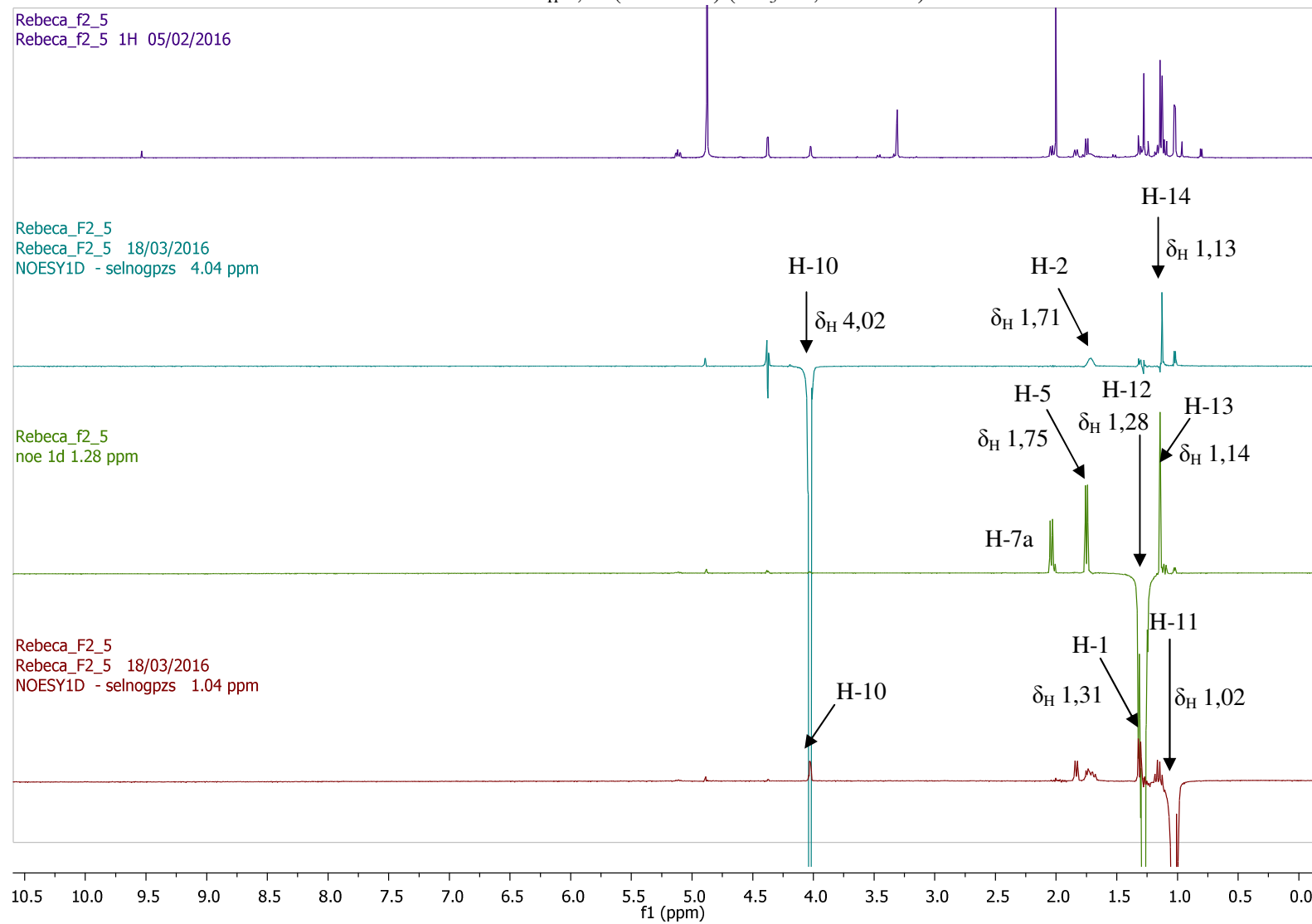
**S13**

Figura 155 - Espectros de RMN de ^1H de **S13** (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,02 (azul claro); NOESY 1D irradiado em δ_{H} 1,28 (verde); NOESY 1D irradiado em δ_{H} 1,02 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **S13** e da substância 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -triidroxiprobodridial (COLLADO et al., 1995) estão descritos na **Tabela 46**.

Tabela 46 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S13** e para a 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -triidroxiprobodridial.

S13^a			4β-acetoxi-9β,10β,15α-triidroxiprobodridial^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1	1,31 (dd; 3,2; 11,7)	60,0	1,25 (m)	58,1
2	1,71 (m)	34,9	1,73 (m)	22,2
3	1,83 (m)	40,6	1,95 (ddd; 3,4; 3,8; 10,7)	39,6
	1,18 (dl)		1,10 (m)	
4	5,12 (ddd; 3,9; 11,0; 11,0)	74,0	5,09 (ddd; 3,8; 10,7; 10,7)	72,7
5	1,75 (dl)	58,7	1,70 (d; 10,7)	59,7
6		47,1		46,6
7	2,04 (d; 11,4)	49,5	2,00 (d; 11,7)	48,5
	1,10 (d; 11,4)		1,20 (d; 11,7)	
8		57,9		57,2
9		95,2		95,9
10	4,02 (dd; 3,2; 5,7)	88,9	4,12 (dd; 2,9; 5,2)	89,1
11	1,02 (d; 6,6)	21,6	1,02 (d; 6,4)	20,9
12	1,28 (s)	36,4	1,29 (s)	36,4
13	1,14 (s)	27,8	1,16 (s)	27,5
14	1,13 (s)	22,6	1,17 (s)	33,5
15	4,38 (d; 5,7)	83,7	4,43 (d; 5,2)	84,1
16		172,1		170,5
17	2,00 (s)	21,0	2,02 (s)	21,4

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD_3OD ; ^b δ -ppm; 400 e 200 MHz; CDCl_3 (COLLADO et al., 1995).

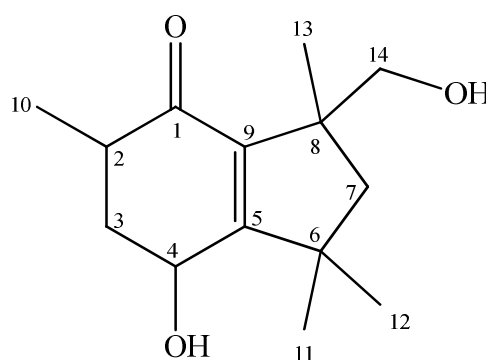
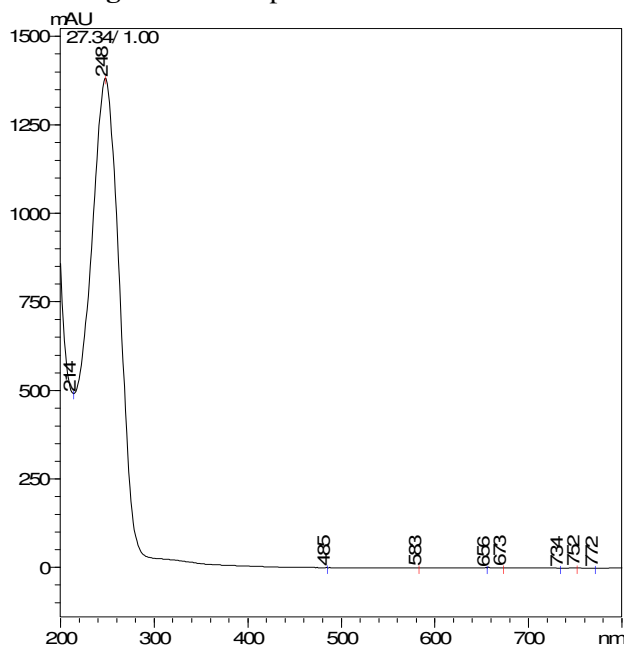
Fonte: o autor.

Os sinais de C-2 (δ_{C} 22,2) e C-14 (δ_{C} 33,5) descritos na literatura para a 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -triidroxiprobodridial foram atribuídos erroneamente, pois ao analisar o mapa de contornos HMBC de **S13**, é possível verificar a correlação do sinal dos hidrogênios metílicos da posição 11 (δ_{H} 1,02) com o sinal de C-2 (δ_{C} 34,9) e a correlação do sinal de H-15 (δ_{H} 4,38) com o sinal de C-14 (δ_{C} 22,6).

4.2.6.4 Elucidação estrutural de **S14**

A substância **S14** (3,6 mg) foi obtida como um óleo amarelado. A **Figura 156** apresenta seu espectro no UV-Vis, em que é possível observar uma banda de absorção com máximo em 248 nm. Já sua rotação específica apresentou um valor de $[\alpha]_D^{23} = +8,6^\circ$ (c 0,2 em CH_3OH).

Figura 156 - Espectro no UV-Vis da substância **S14** (64,1% MeOH:35,9% H_2O).



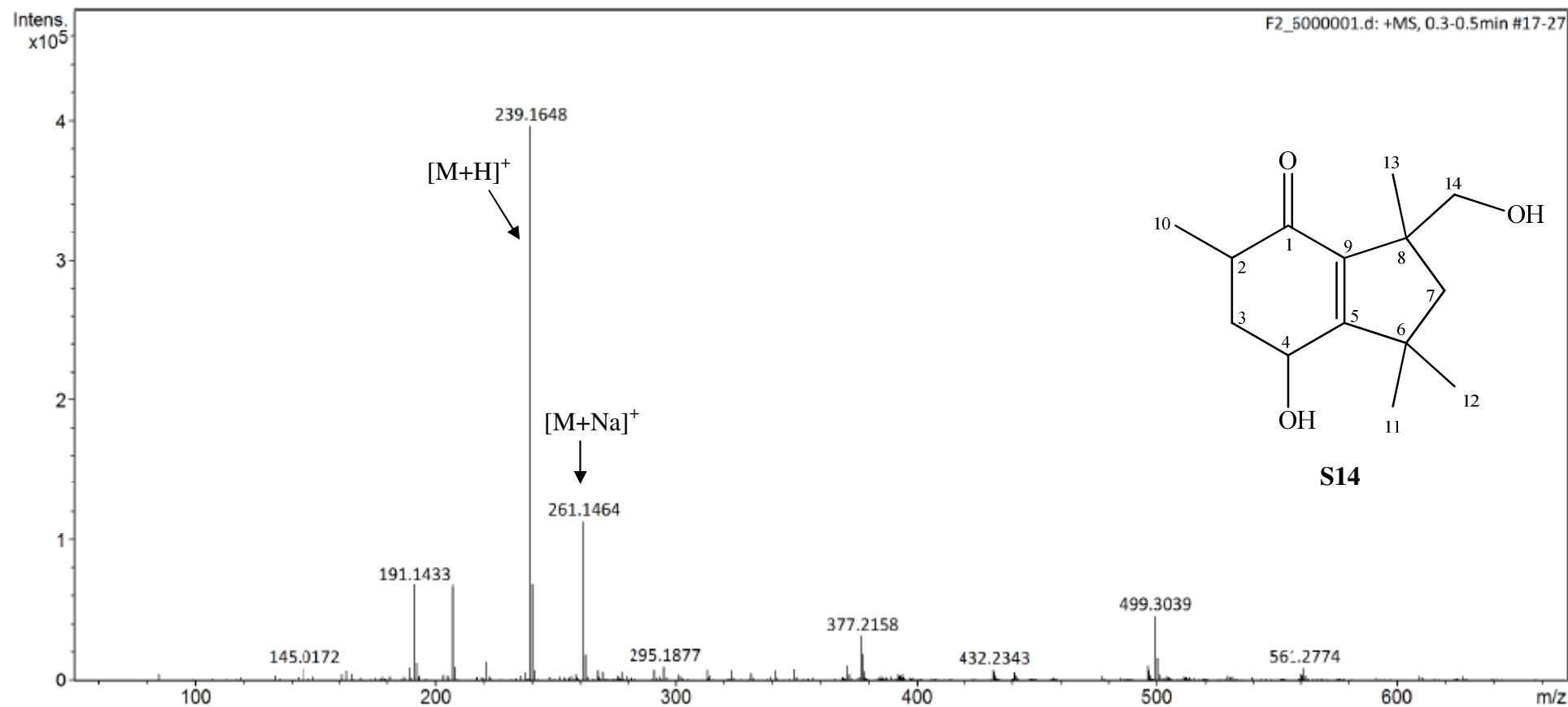
S14

Fonte: o autor.

A fórmula molecular de **S14** foi determinada após as análises dos dados de RMN e do seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 157**), no qual foi observado o pico base em m/z 239,1648, referente ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado 239,1642 - erro de 2,5 ppm), indicando a fórmula molecular de **S14** como $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3$.

Figura 157 - Espectro de Massas de alta resolução de **S14** (Bruker - MaXis Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 158**) de **S14** mostrou-se semelhante ao de **S09**, sendo que as principais diferenças notadas foram o sinal de H-4 mais desprotegido e com multiplicidade diferente (δ_{H} 4,69; dd; $J_{4-3a} = 4,8$; $J_{4-3b} = 10,2$ Hz, 1H) e o sinal de H-2, mais protegido, em δ_{H} 2,43 (m; 1H).

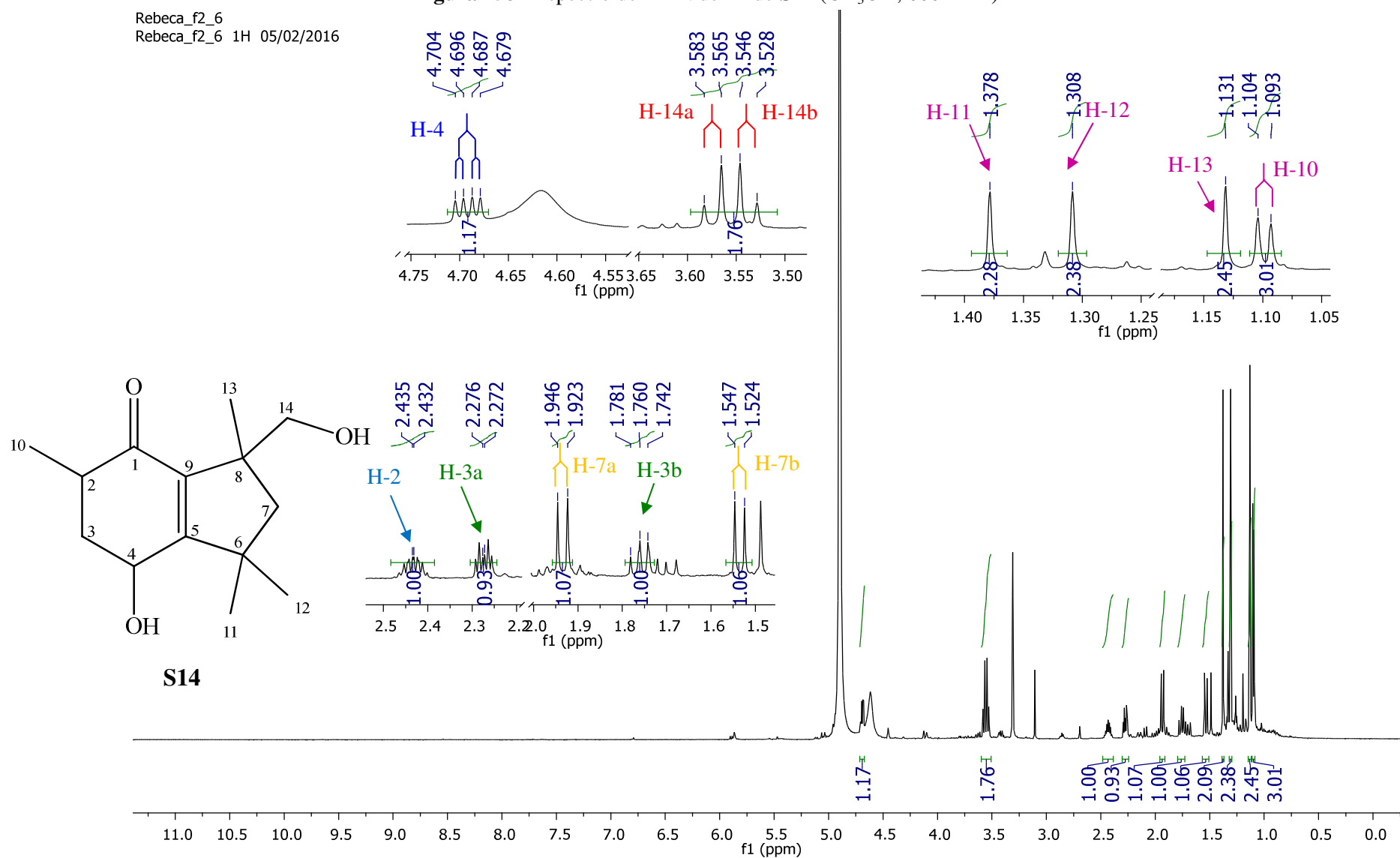
No mapa de contornos COSY (**Figura 159**) o sinal de H-4 mostrou correlação com os sinais de H-3a (δ_{H} 2,27; m; 1H) e H-3b (δ_{H} 1,76; m; 1H), e o sinal de H-2 mostrou correlação com H-3b e com os hidrogênios metílicos de C-10 em δ_{H} 1,10 (d; $J_{10-2} = 6,6$ Hz; 3H).

A partir do mapa de contornos HSQC (**Figura 160**), juntamente com o mapa de contornos HMBC (**Figura 161 e 162**), foi possível observar, assim como para **S09**, sinais de 5 carbonos quaternários (não hidrogenados) em δ_{C} 203,2 (C-1), 174,5 (C-5), 140,1 (C-9), 49,8 (C-8) e em δ_{C} 46,9 (C-6), 2 carbonos metínicos em δ_{C} 67,8 (C-4) e 43,3 (C-2), 3 metilênicos em δ_{C} 69,8 (C-14), 52,7 (C-7) e em δ_{C} 43,4 (C-3), e sinais de 4 carbonos metílicos em δ_{C} 30,5 (C-11), 28,8 (C-12), 23,5 (C-13) e em δ_{C} 15,0 (C-10).

O mapa de contornos HMBC mostrou, ainda, a correlação entre H-10 e o sinal de C-1; entre o sinal de H-7a (δ_{H} 1,93; d; $J_{7a-7b} = 13,8$ Hz; 1H) e os sinais de C-5 e C-9; entre os sinais de H-14a (δ_{H} 3,57; d; $J_{14a-14b} = 10,8$ Hz; 1H) e H-14b (δ_{H} 3,54; d; $J_{14b-14a} = 10,8$ Hz; 1H) e o sinal de C-7; entre o sinal de H-13 (δ_{H} 1,13; s; 3H) e os sinais de C-8 e C-9 e entre os sinais de H-11 (δ_{H} 1,38; s; 3H) e H-12 (δ_{H} 1,31; s; 3H) com os sinais de C-6 e C-7. As demais correlações observadas nesse mapa de contornos estão descritas na **Tabela 47**.

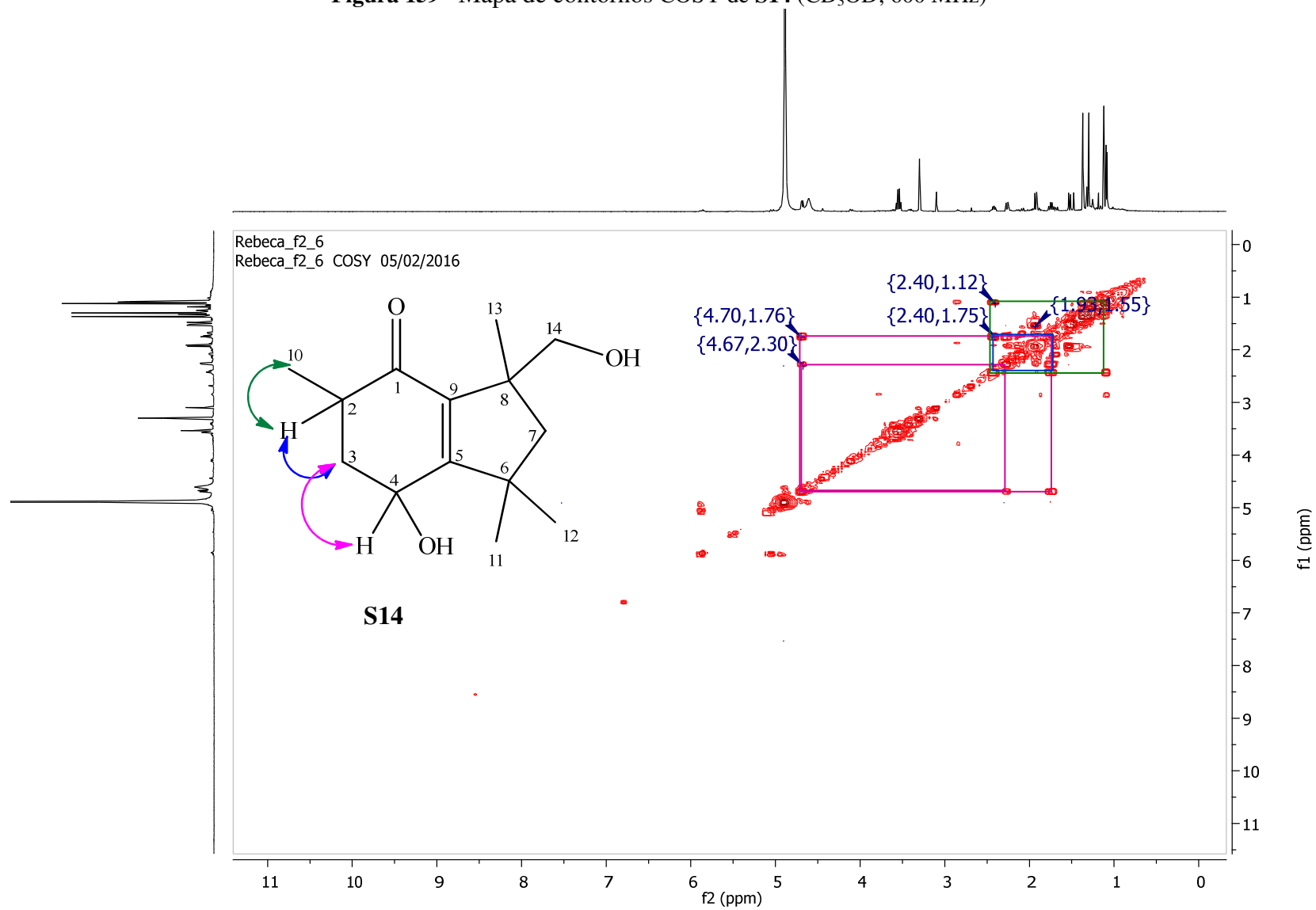
Figura 158 - Espectro de RMN de ^1H de **S14** (CD_3OD ; 600 MHz)

Rebeca_f2_6
Rebeca_f2_6 1H 05/02/2016



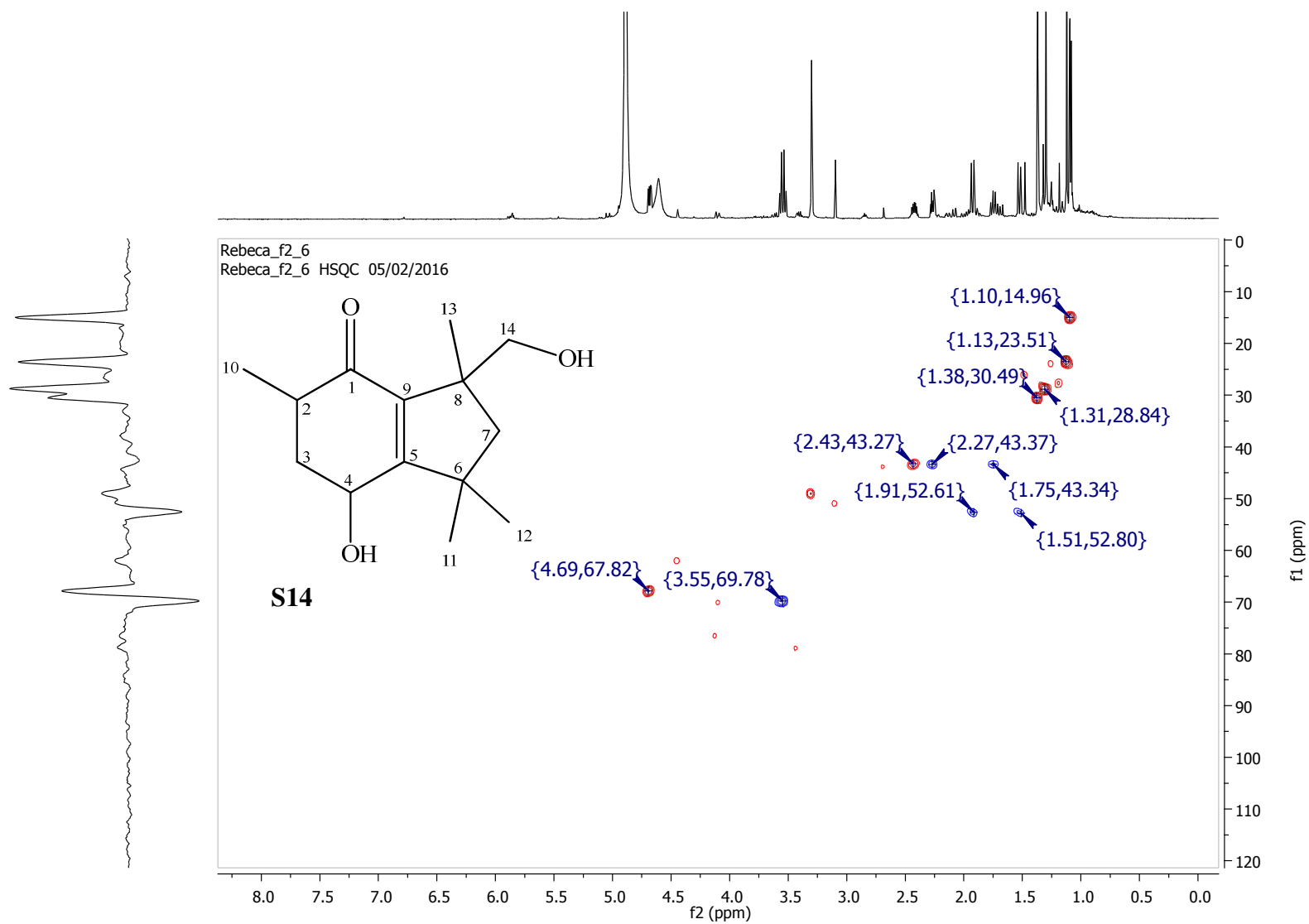
Fonte: o autor.

Figura 159 - Mapa de contornos COSY de **S14** (CD₃OD; 600 MHz)



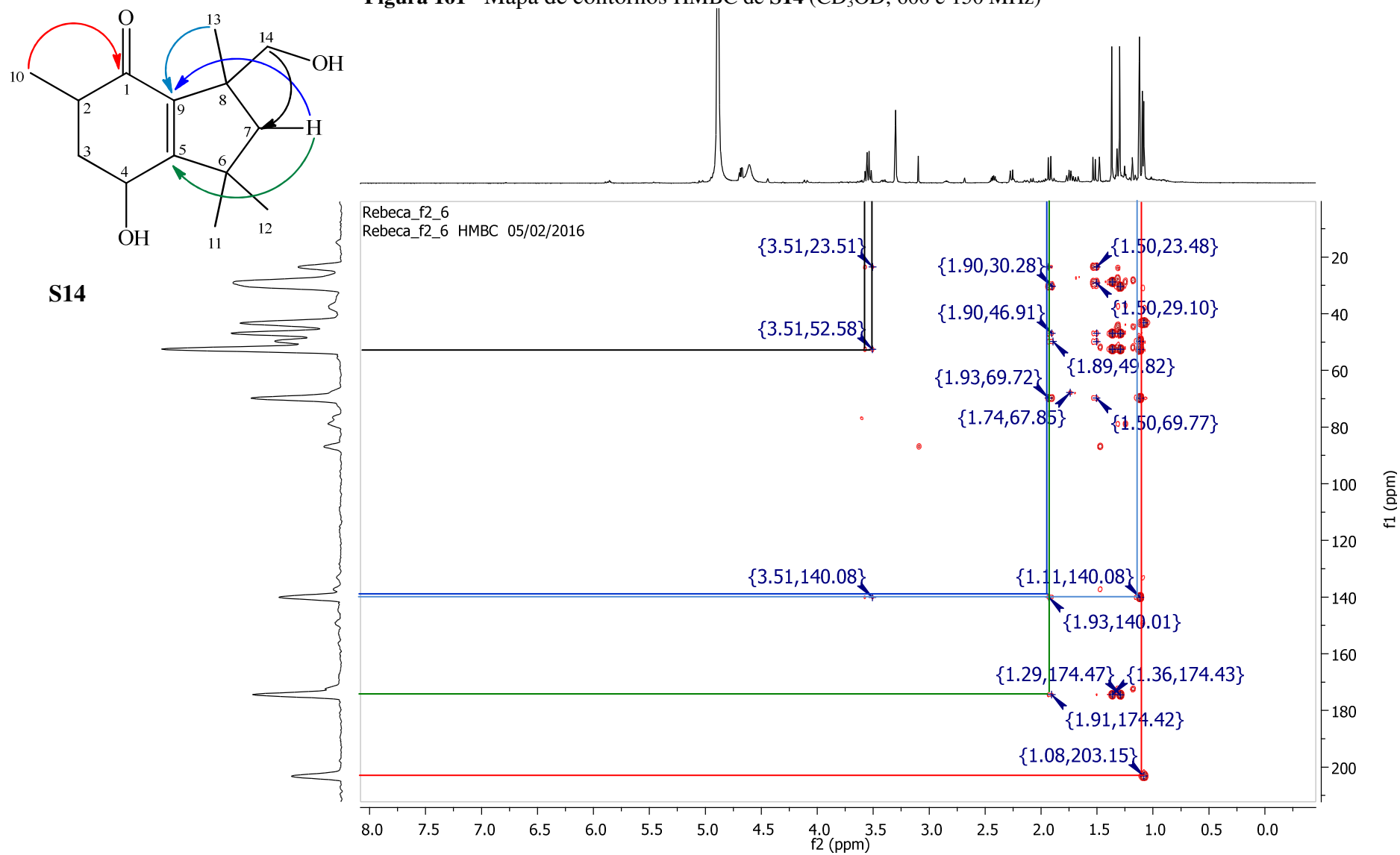
Fonte: o autor.

Figura 160 - Mapa de contornos HSQC de **S14** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



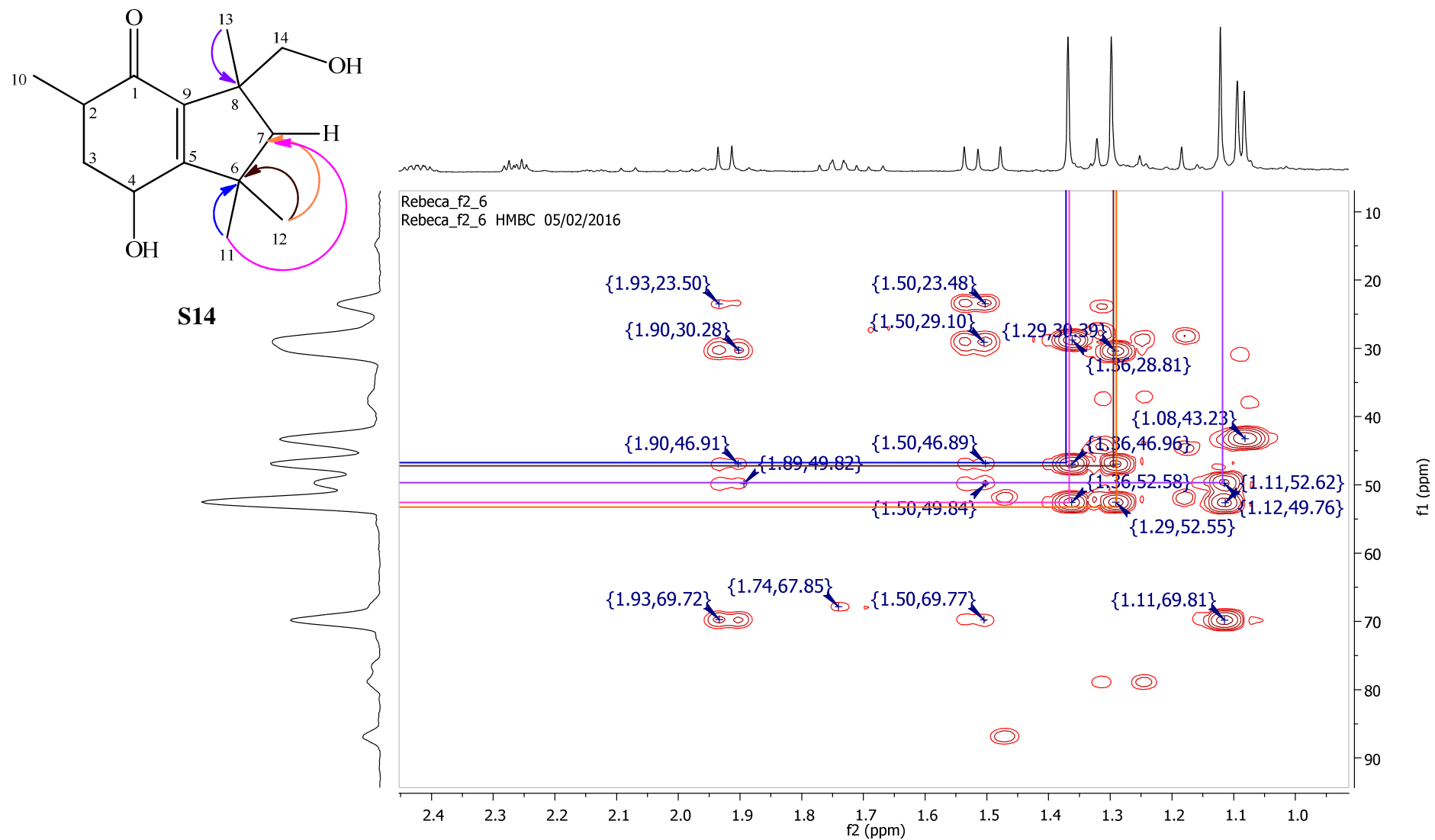
Fonte: o autor.

Figura 161 - Mapa de contornos HMBC de **S14** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 162 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de **S14** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

A partir dos espectros de NOESY-1D (**Figura 163**), juntamente com as diferenças de multiplicidade observadas para H-4, foi possível verificar que **S14** tratava-se de um diastereoisômero de **S09**, já que ao irradiar o sinal dos hidrogênios metílicos da posição 10 (δ_H 1,10) não foi observada a correlação espacial com H-4, indicando assim que H-10 e H-4 estão em lados opostos da molécula. Além disso, ao irradiar o sinal dos hidrogênios metílicos da posição 12 (δ_H 1,31) foi observada sua correlação espacial com H-4 e com H-13, sendo que a última foi confirmada ao irradiar o sinal de H-13. Sendo assim, podemos dizer que H-2, H-4, H-12 e H-13 estão do mesmo lado do plano médio da molécula.

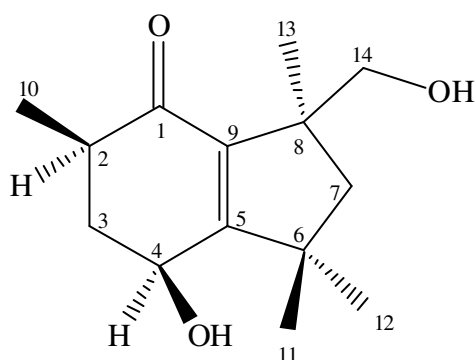
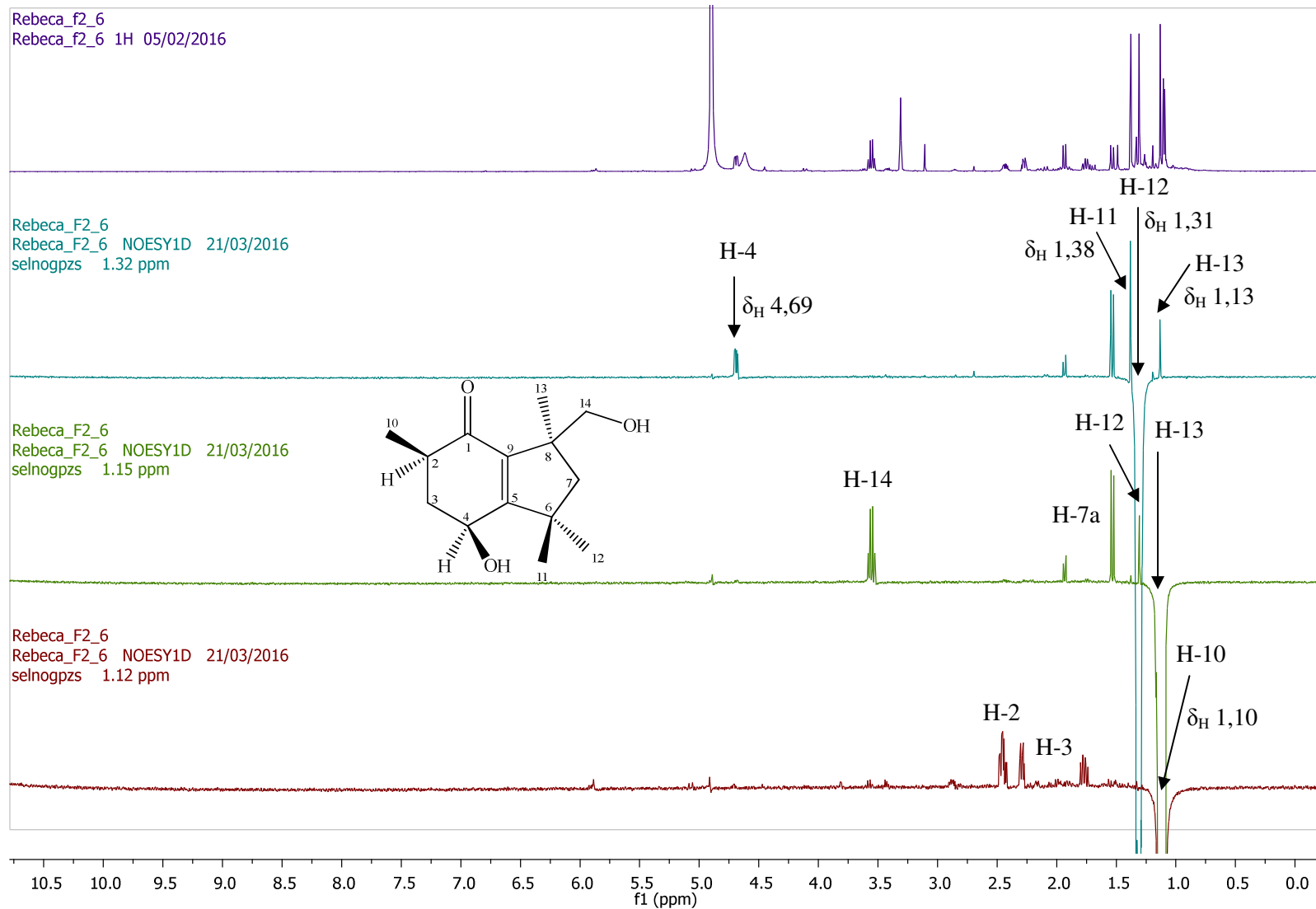
**S14**

Figura 163 - Espectros de RMN de ^1H de **S14** (roxo); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,31 (azul claro) NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,13 (verde); NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 1,10 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

Esses resultados indicaram que a substância **S14** também é inédita na literatura. Seus dados de RMN estão descritos na **Tabela 47**.

Tabela 47 - Dados de RMN da substância **S14** (600 e 150 MHz; CD₃OD)

Nº	δ _H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ _C	COSY	HMBC
1		203,2		
2	2,43 (m)	43,3	10-CH ₃ ; H-3b	
3	2,27 (m) 1,75 (m)	43,4	H-3b	C-4
4	4,69 (dd; 4,8; 10,2)	67,8	H-3a; H-3b	
5		174,5		
6		46,9		
7	1,93 (d; 13,8) 1,53 (d; 13,8)	52,7	H-7b	C-5; C-9; C-14; C-8; C-6 C-13; C-11 C-14; C-8; C-6; C-12; C-11
8		49,8		
9		140,1		
10	1,10 (d; 6,6)	15,0		C-1; C-2
11	1,38 (s)	30,5		C-5; C-7; C-6; C-12
12	1,31 (s)	28,8		C-5; C-7; C-6; C-11;
13	1,13 (s)	23,5		C-9; C-14; C-7; C-8
14	3,57 (d; 10,8) 3,54 (d; 10,8)	69,8		C-9; C-7; C-11

Fonte: o autor.

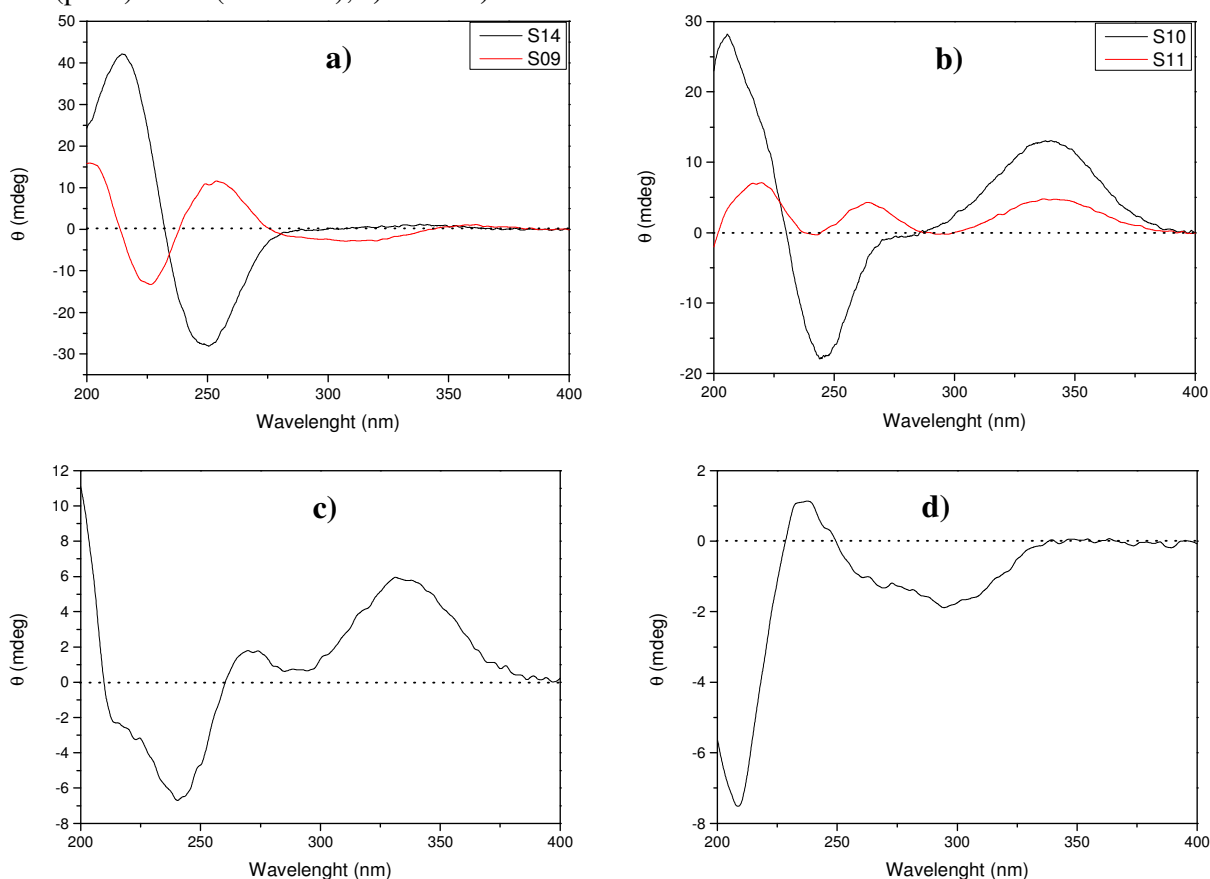
Os sesquiterpenos com esqueleto botriano foram isolados pela primeira vez do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, por isso apresentam essa denominação. Estudos revelaram que alguns botrianos apresentaram atividade fitotóxica, como o botridial (COLLADO et al., 1995), além de atividade antibacteriana e citotóxica frente a diferentes linhagens de células (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007; KUHNERT et al., 2015a).

O fungo marinho Diaporthaceae sp. PSU-SP2/4, associado a uma esponja marinha, foi estudado por Khamthong et al. (2014), sendo isolada a substância 4β-acetoxi-9β,10β,15α-triidroxiprobodridial (**S13**), que não apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e uma linhagem de *S. aureus* resistente a metilicina, e também não apresentou citotoxicidade frente a uma linhagem de células não cancerígenas (células Vero).

Já o estudo do fungo endofítico *Geniculosporium* sp., isolado da alga vermelha *Polysiphonia* sp., levou a obtenção e caracterização de 11 novas substâncias com esqueleto botriano (KROHN et al., 2005).

Foram obtidos os espectros de dicroísmo circular das substâncias **S09**, **S10**, **S11**, **S12**, **S13** e **S14** (**Figura 164**). Porém, não foram encontrados modelos na literatura com estruturas semelhantes e espectros de dicroísmo circular que auxiliassem na comparação e determinação das configurações absolutas das substâncias isoladas. No entanto, foi possível verificar que **S09** e **S14** são diastereoisômeros, assim como **S10** e **S11**, como proposto anteriormente. A substância **S09** apresentou efeito Cotton positivo em 254 nm ($\Delta\epsilon = +1,69$), enquanto **S14** apresentou efeito Cotton negativo em 250 nm ($\Delta\epsilon = -4,06$). Já **S10** apresentou efeito Cotton negativo em 246 nm ($\Delta\epsilon = -2,87$), enquanto **S11** apresentou efeito Cotton positivo em 264 nm ($\Delta\epsilon = 0,72$). A substância **S12** apresentou efeitos Cotton positivos em 330 ($\Delta\epsilon = +0,91$), 270 ($\Delta\epsilon = +0,29$) e 214 nm ($\Delta\epsilon = -2,42$) e efeito Cotton negativo em 237 nm ($\Delta\epsilon = -0,93$). Já a substância **S13** apresentou efeitos Cotton negativos em 293 ($\Delta\epsilon = -0,37$) e 210 nm ($\Delta\epsilon = -1,44$) e efeito Cotton positivo em 239 nm ($\Delta\epsilon = +0,23$).

Figura 164 - Espectros de dicroísmo circular (200-400 nm) de: **a)** **S09** (vermelho) e **S14** (preto); **b)** **S10** (preto) e **S11** (vermelho); **c)** **S12** e **d)** **S13**.



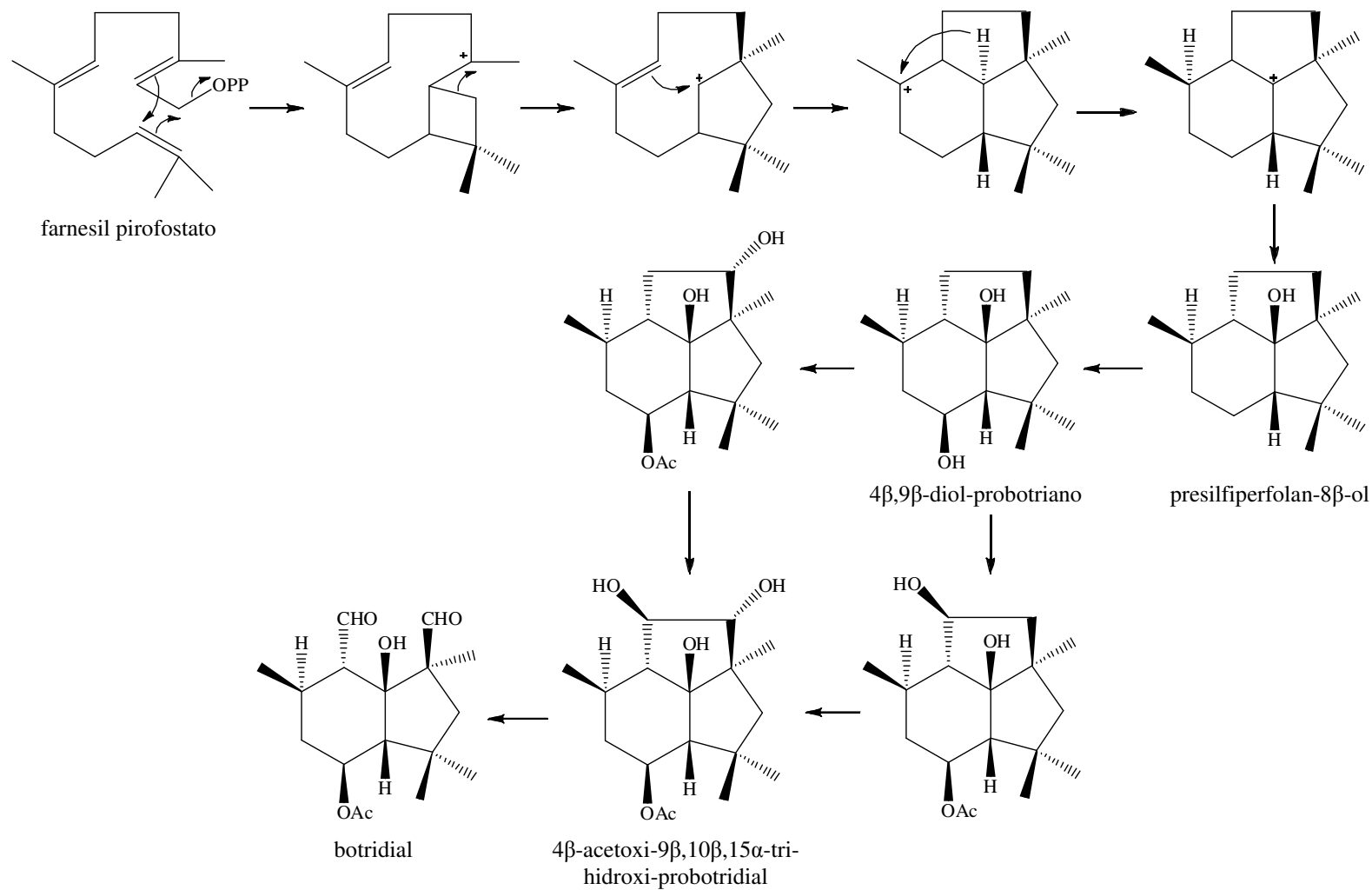
Fonte: o autor.

Vale ressaltar que até o momento não foram realizados estudos a fim de se determinar a configuração absoluta dos sesquiterpenos do tipo botriano. As discussões são sempre baseadas em configurações relativas, principalmente associadas aos espectros de NOESY 1D, e propostas biogenéticas ou estudos de biossíntese.

Esses sesquiterpenoides são biossintetizados pela via do mevalonato. O farnesil pirofostato é ciclizado por um mecanismo via carbocátion e, após sucessivos rearranjos e uma reação de hidroxilação, o presilfiperfolan-8 β -ol é formado. Esse, por sua vez, é hidroxilado e passa por uma reação de acetilação, seguida de outras reações de hidroxilação, formando o 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -trihidroxirobotridial (**S13**), que é então oxidado, formando o botridial (**Figura 165**).

O botridial é então reduzido e passa por uma reação de desidratação, formando o botrienalol, que por sua vez é desacetilado, resultando na formação da substância **S12**. Essa, pode passar por uma desidratação, seguida de hidroxilação, formando as substâncias **S10** e **S11**. Ou ainda, pode passar por uma desidratação, seguida de redução e posterior oxidação, formando as substâncias **S9** e **S14** (**Figura 166**) (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007).

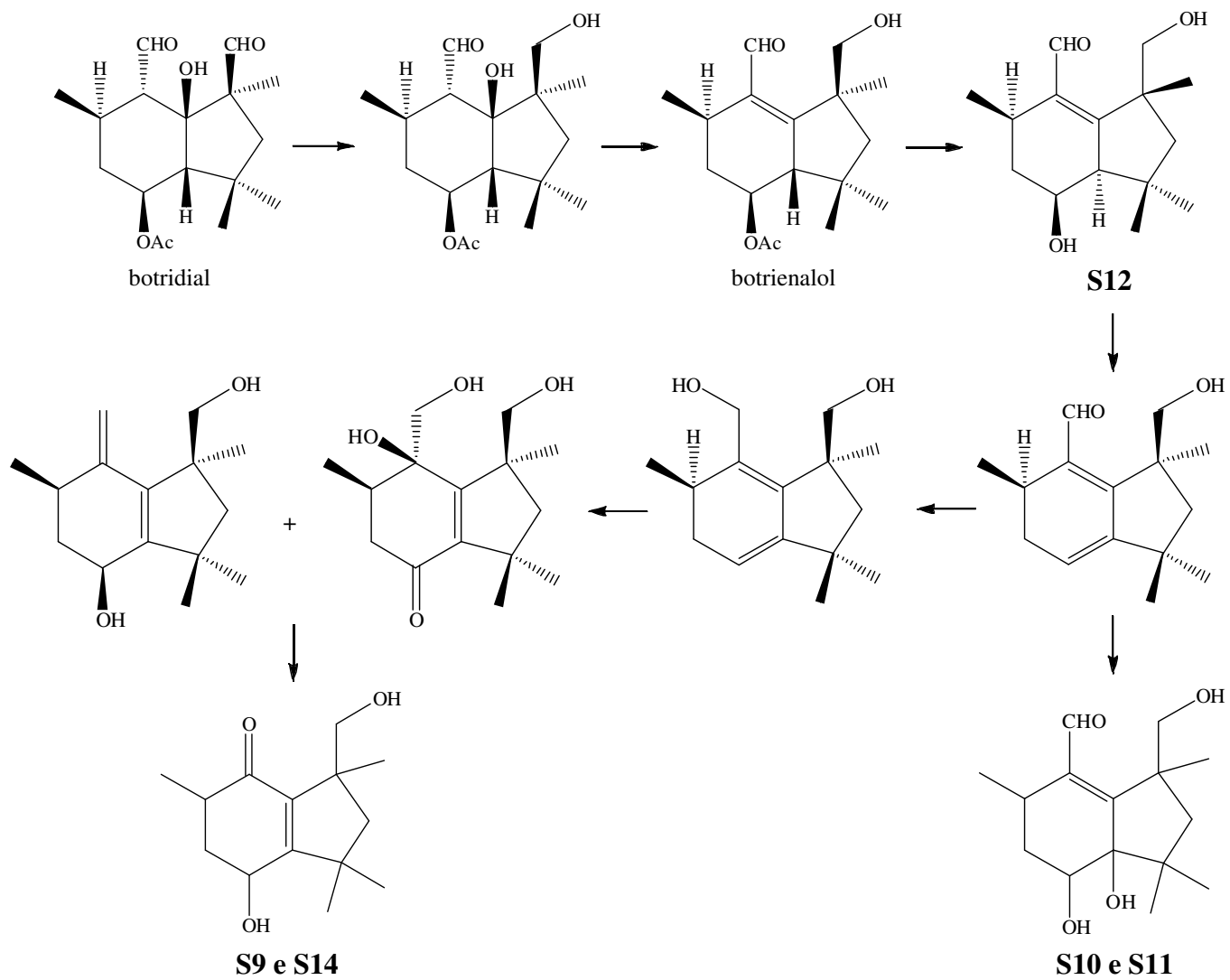
Figura 165 - Rota biossintética para a formação do botridial.



S13

Fonte: Collado, Sánchez e Hanson (2007); adaptado pelo autor.

Figura 166 - Proposta biossintética para a formação dos derivados do botridial.



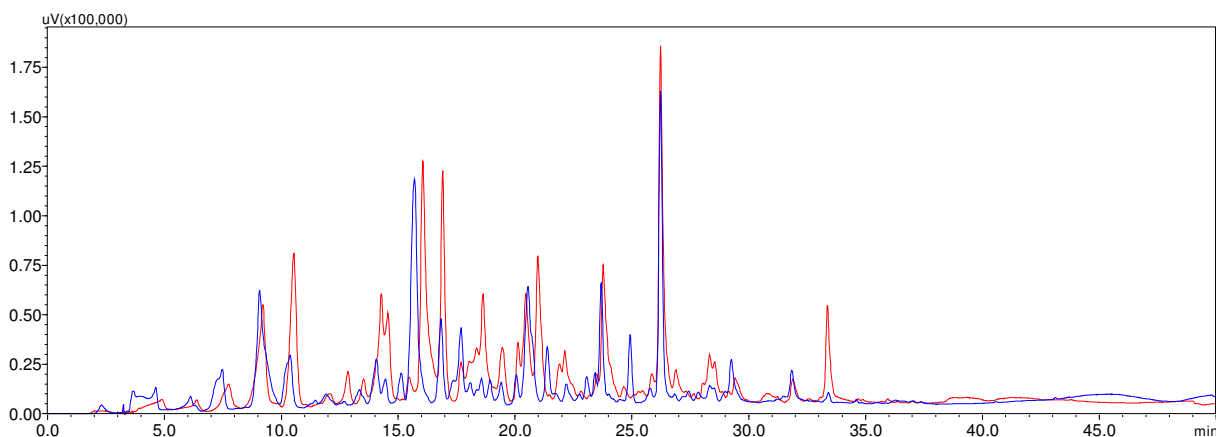
Fonte: Collado, Sánchez e Hanson, 2007; adaptado pelo autor.

4.2.7 Avaliação dos perfis químicos e biológicos dos extratos brutos de *Annulohypoxylon stygium* (AT-03), *Hypoxylon* sp. (AT-06) e *Sarocladium strictum* (PS-01) obtidos em escala ampliada

As linhagens dos fungos AT-03 e AT-06 foram cultivadas em escala ampliada utilizando água do mar para o preparo dos meios de cultivo. Os extratos brutos obtidos foram então comparados com os extratos obtidos em escala reduzida (**Figuras 167 e 168**), e foi possível observar que os extratos em escala ampliada apresentaram perfis metabólicos similares aos perfis em escala reduzida.

No cromatograma do extrato em escala ampliada de AT-06 (azul - **Figura 168** alguns picos tiveram seus tempos de retenção deslocados em relação aos picos do extrato em escala reduzida, e a partir da comparação dos seus espectros no UV-Vis foi possível confirmar que se tratavam das mesmas substâncias. Por exemplo, em escala reduzida verificou-se um pico em 21,4 min., enquanto em escala ampliada, o pico com mesmo espectro no UV-Vis foi observado em 21,9 min. O mesmo ocorre com o pico em 29 min. em escala reduzida, que em escala ampliada foi observado em 28,5 min (**Figura 169**).

Figura 167 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de **AT-03** obtido em escala reduzida (azul) e em escala ampliada (vermelho) (254 nm).



Fonte: o autor.

Figura 168 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v à 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de **AT-06** obtido em escala reduzida (preto) e em escala ampliada (azul) (254 nm).

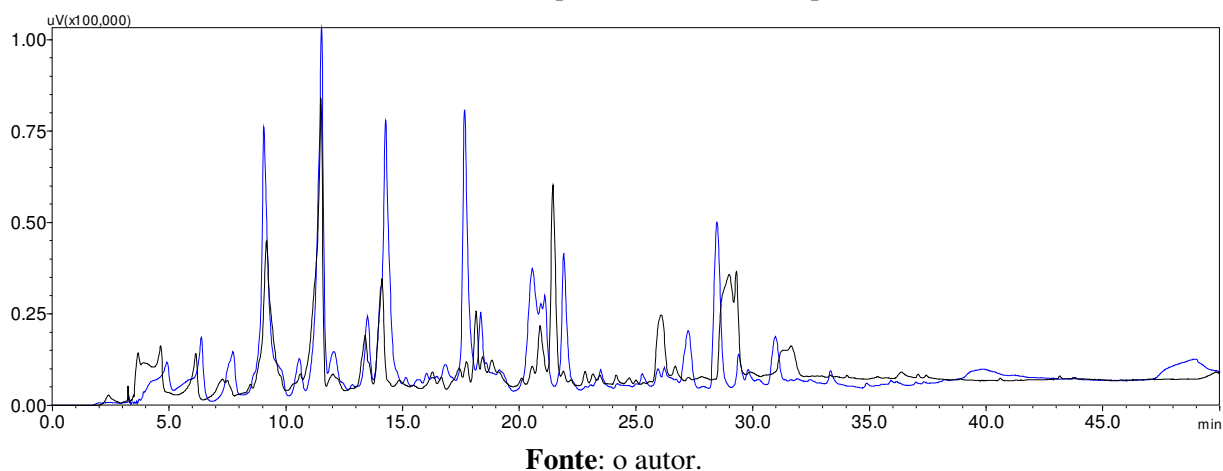
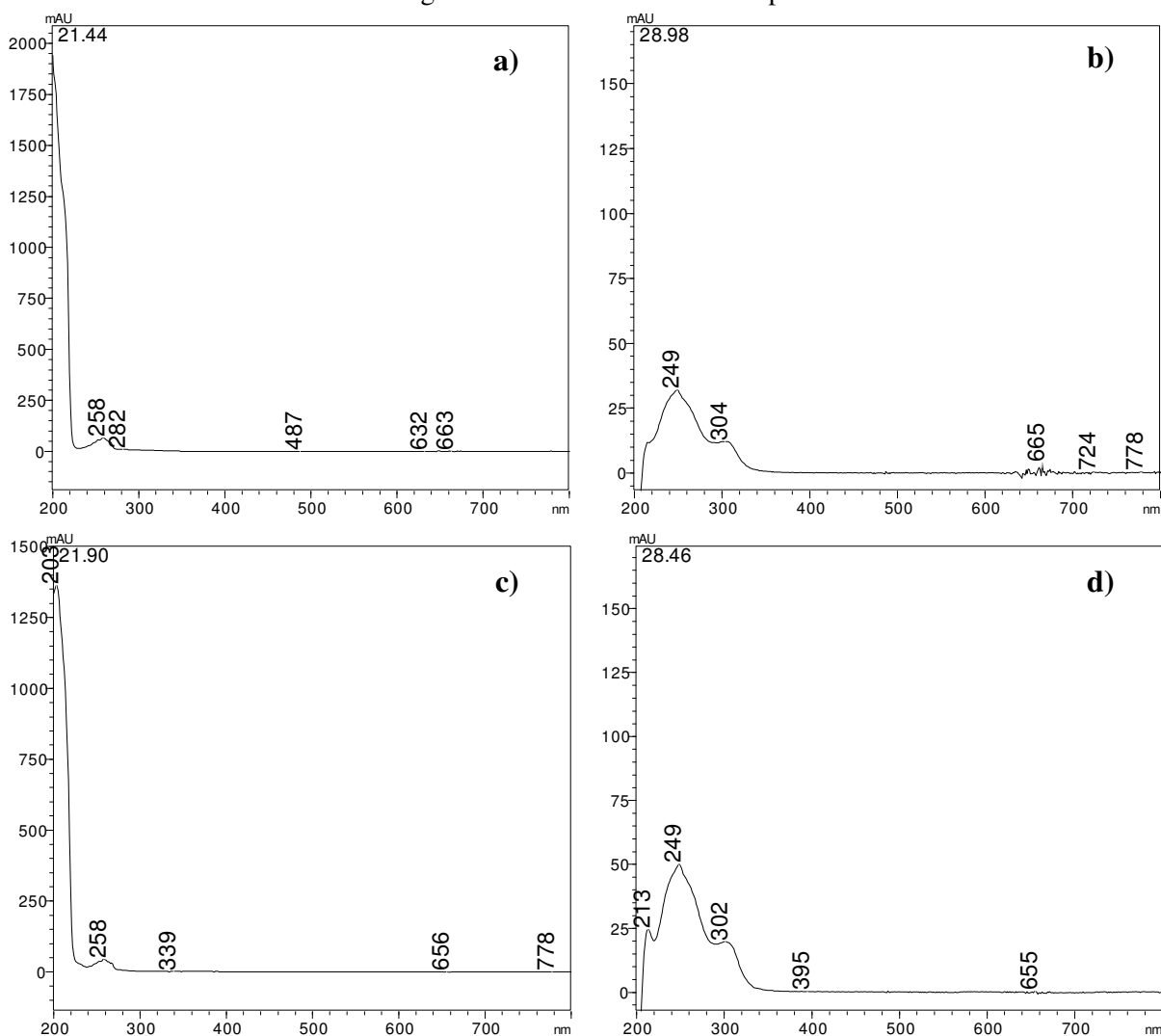
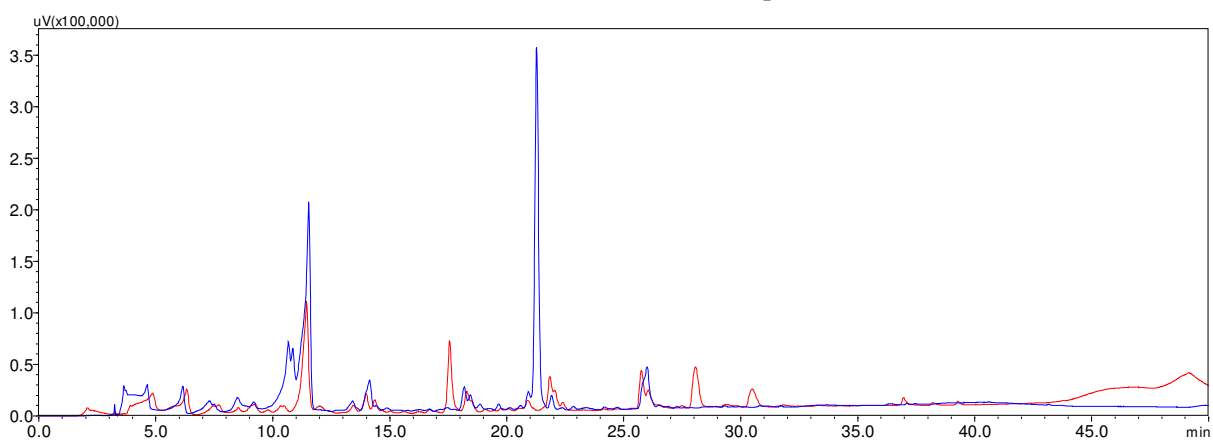


Figura 169 - Espectros no UV-Vis das substâncias associadas aos picos cromatográficos em: **a)** 21,4 min. e **b)** 29 min. no cromatograma de **AT-06** em escala reduzida; **c)** 21,9 min. e **d)** 28,5 min. no cromatograma de **AT-06** em escala ampliada.



O fungo PS-01 foi cultivado em escala ampliada utilizando água ultra pura para o preparo dos meios de cultivo. Após a obtenção do extrato, o mesmo foi comparado com o extrato PS-01 obtido em escala reduzida (**Figura 170**). Podemos observar que houve variação na produção metabólica, sendo que em escala reduzida o cromatograma do extrato apresentava um pico cromatográfico em 21,3 min., enquanto para o extrato obtido em escala ampliada esse pico cromatográfico não foi observado.

Figura 170 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Gemini C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de **PS-01** obtido em escala reduzida (azul) e em escala ampliada (vermelho) (254 nm).



Fonte: o autor.

4.2.7.1 Avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica

Os resultados das atividades antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos de AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada estão descritos na **Tabela 48**. Vale ressaltar que para a atividade antifúngica foram usadas duas linhagens de fitopatógenos, *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*.

Todos os extratos apresentaram potencial antifúngico frente a *C. sphaerospermum*, assim como observado anteriormente para escala reduzida, e também foram ativos contra a *C. cladosporioides*. Em relação a atividade anticolinesterásica, todos os extratos foram inativos, assim como observado para os extratos em escala reduzida.

Tabela 48 - Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos de AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada^a.

Amostra	Atividade antifúngica				Atividade	
	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>		Anticolinesterásica	
	Atividade	Rf	Atividade	Rf	Atividade	Rf
AT-03	**	0,11 - 0,17				
	***	0,33 - 0,43	***	0,35 - 0,40	i	
	***	0,52 - 0,58	***	0,71 - 0,77		
	***	0,68 - 0,75				
AT-06	**	0,17 - 0,28	***	0,36 - 0,45		
	***	0,31 - 0,45	**	0,60 - 0,66	i	
	***	0,58 - 0,62	*	0,74		
PS-01	**	0,37 - 0,46	**	0,39 - 0,48	i	
	*	0,59 - 0,63				
padrão	***	origem	***	origem	***	origem

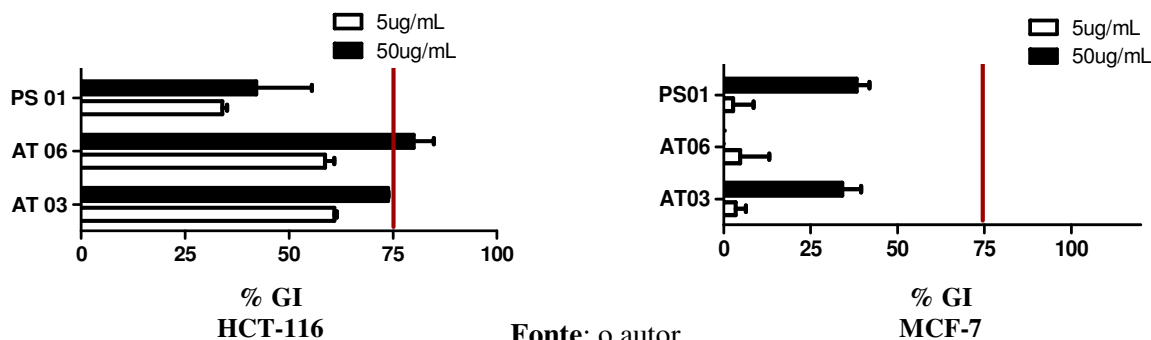
^a os valores indicam os fatores de retenção em CCD; * atividade fraca / ** atividade moderada / *** atividade forte / i = inativo.

Fonte: o autor.

4.2.7.2 Avaliação do potencial citotóxico

O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos brutos de AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada foi avaliado pelo método do MTT, sendo testadas apenas duas linhagens de células tumorais, HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano), usada anteriormente para avaliar outras amostras, e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Os resultados estão apresentados na **Figura 171**.

Figura 171 - Potencial citotóxico dos extratos brutos de AT-03, AT-06 e PS-01 obtidos em escala ampliada frente às linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7.



Fonte: o autor.

Pode-se verificar que os extratos AT-03 e AT-06 apresentaram porcentagem de inibição superior a 75% (forte atividade citotóxica) frente a linhagem HCT-116 (concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto o extrato PS-01 apresentou pouca atividade (porcentagem de inibição inferior a 50%) frente a essa linhagem. Já para MCF-7 todos os extratos testados foram pouco ativos. O valor de CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento da célula tumoral) dos extratos AT-03 e AT-06 para a linhagem HCT-116 foi calculado por regressão não linear utilizando o GraphPadPrism 4.0 (Intuitive Software for Science), no entanto, foi superior a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos.

Em escala reduzida, os extratos de AT-03 e AT-06 mostraram forte atividade frente à linhagem de carcinoma de ovário, que não foi utilizada nesse segundo teste. Já para a linhagem HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano) os mesmos tinham apresentado pouca atividade citotóxica. O extrato de PS-01 em escala reduzida apresentou pouca atividade citotóxica para todas as linhagens testadas, assim como em escala ampliada.

4.2.8 Estudo químico do fungo *Sarocladium strictum* (PS-01)

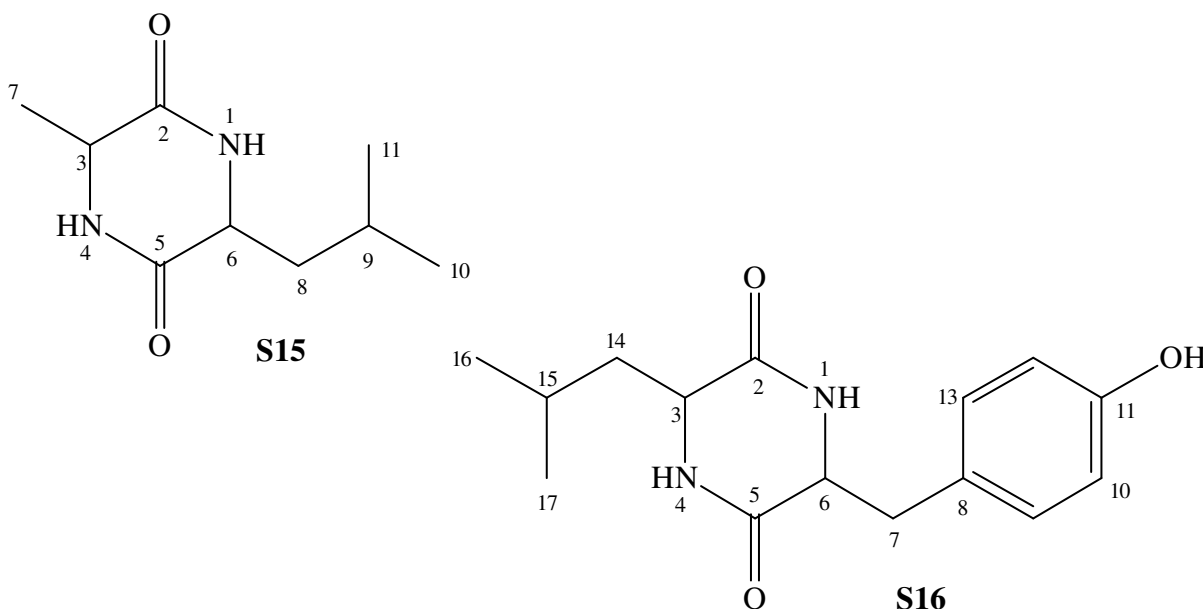
Apesar das diferenças apontadas nos perfis químicos dos extratos de PS-01 optou-se por estudar seu extrato bruto em escala ampliada, já que o mesmo também apresentou potencial antifúngico contra fitopatógenos.

O extrato bruto de PS-01 foi fracionado por cromatografia em coluna utilizando C-18 e diferentes proporções de MeOH:H₂O. Em seguida, fez-se o fracionamento das frações PS-01-F1 e PS-01-F2 por CLAE-DAD em escala preparativa, sendo que a primeira forneceu novamente a substância **S01** (uridina) e uma subfração na qual foram identificadas duas 2,5-dicetopiperazinas, a ciclo(Ala-Leu) (**S15**) e a ciclo(Leu-Tir) (**S16**), enquanto da segunda

fração foi isolada a substância **S17**, identificada como a isoflavona daidzeína. A fração PS-01-F6 foi fracionada por CLAE-DAD em escala semi-preparativa, sendo isolados 6 ftalatos: ftalato de diisobutila (**S18**), ftalato de dibutila (**S19**), ftalato de isobutil-isopentila (**S20**), ftalato de butil-isopentila (**S21**), ftalato de diisopentila (**S22**) e o ftalato de bis-(2-etil-hexila) (**S23**).

4.2.8.1 Elucidação estrutural de **S15** e **S16**

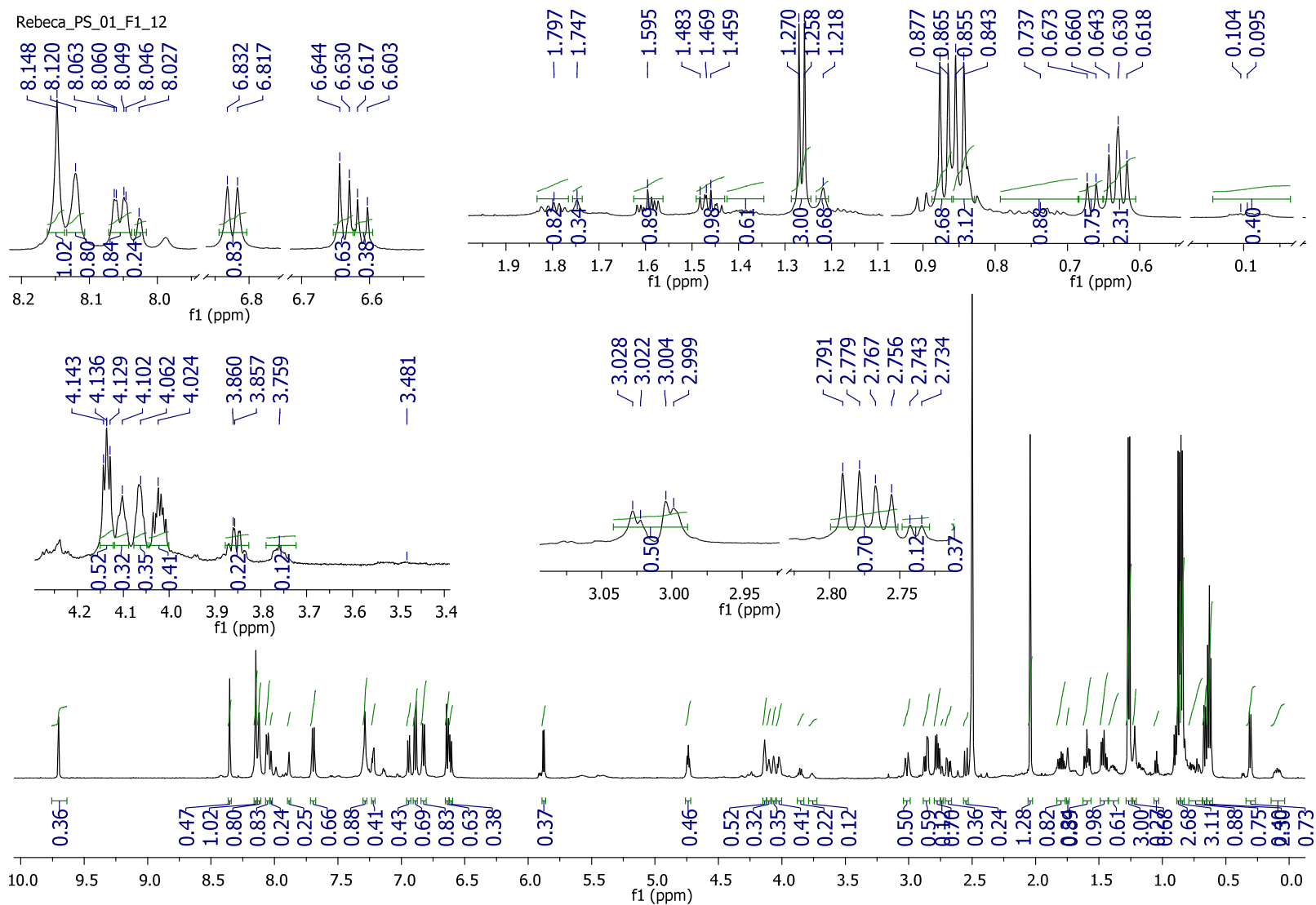
As substâncias **S15** [ciclo(Ala-Leu)] e **S16** [ciclo(Leu-Tir)] foram identificadas em mistura na subfração PS-01-F1-12.



A partir do espectro de RMN de ^1H (**Figura 172**), bem como do mapa de contornos HSQC (**Figura 173**) dessa subfração foi possível verificar os sinais característicos da substância **S15** em δ_{H} 8,15 (s; 4-NH; 1H); δ_{H} 8,12 (s; 1-NH; 1H), δ_{H} 3,86 (m; H-3; 1H) / δ_{C} 49,9 (C-3); δ_{H} 3,76 (m; H-6; 1H) / δ_{C} 52,6 (C-6); δ_{H} 1,26 (d; $J_{7-3} = 7,2$ Hz; 3H) / δ_{C} 19,7 (C-7); δ_{H} 0,87 (d; $J_{11-9} = 7,2$ Hz; H-11; 3H) / δ_{C} 23,0 (C-11) e δ_{H} 0,85 (d; $J_{10-9} = 7,2$ Hz; H-10; 3H) / δ_{C} 21,9 (C-10). Já para a substância **S16** foi possível observar os sinais em δ_{H} 8,06 (s; 1-NH; 1H); δ_{H} 8,05 (s; 4-NH; 1H); δ_{H} 6,89 (d; $J_{9-10} = 8,4$ Hz; H-9/H-13; 2H) / δ_{C} 131,4 (C-9/C-13); δ_{H} 6,64 (d; $J_{10-9} = 8,4$ Hz; H-10/H-12; 2H) / δ_{C} 115,0 (C-10/C-12); δ_{H} 4,06 (m; H-6; 1H) / δ_{C} 55,7 (C-6); δ_{H} 3,44 (m; H-3; 1H) / δ_{C} 52,6 (C-3); δ_{H} 0,73 (m; H-14a; 1H) e 0,09 (m; H-14b; 1H) / δ_{C} 43,8 (C-14); δ_{H} 0,64 (d; $J_{17-15} = 7,8$ Hz; H-17; 3H) / δ_{C} 22,8 (C-17) e δ_{H} 0,62 (d; $J_{16-15} = 7,2$ Hz; H-16; 3H) / δ_{C} 21,5 (C-16).

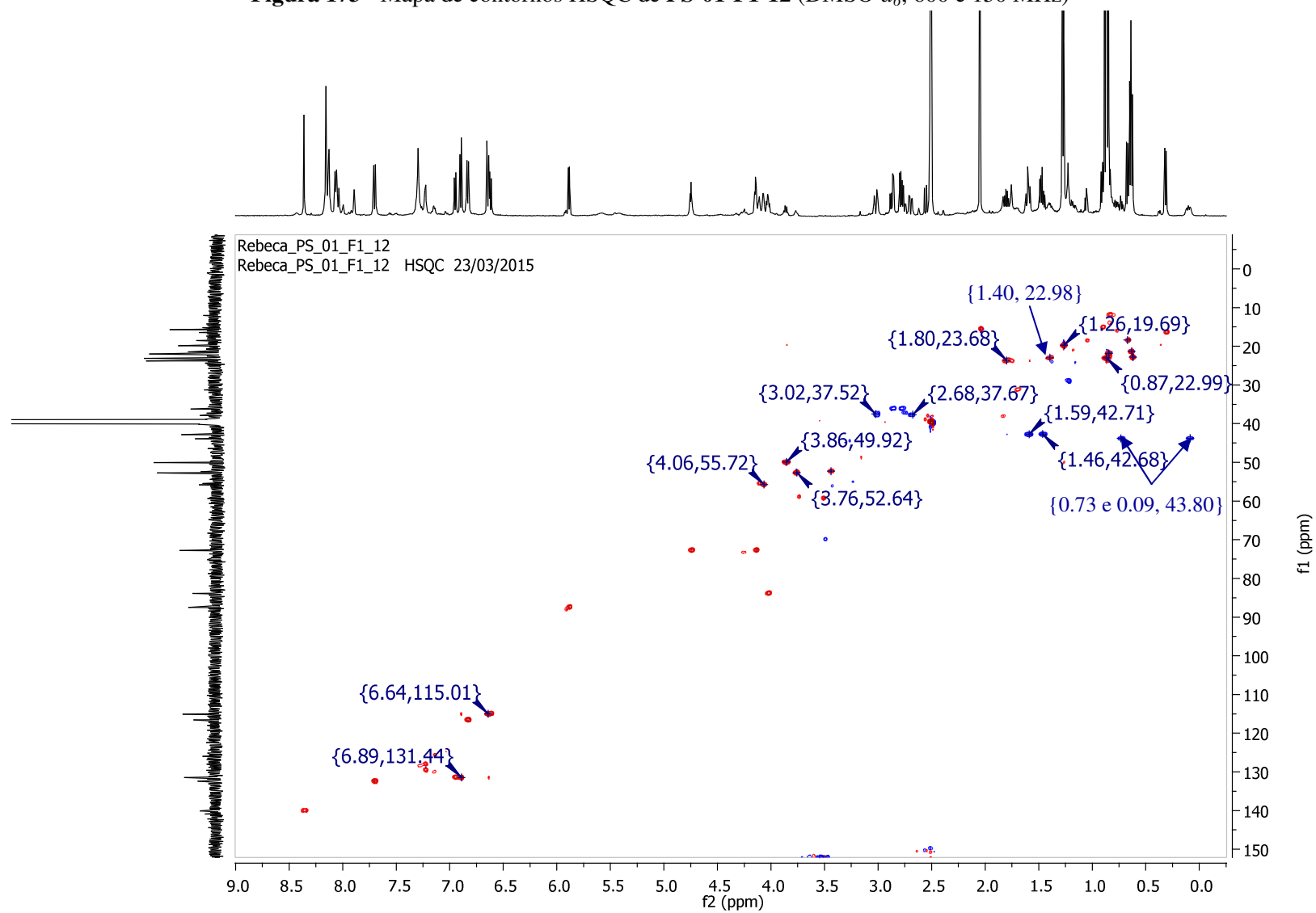
Pelo mapa de contornos COSY (**Figura 174**) foi possível verificar, para a substância **S15**, as correlações de H-3 com 4-NH e H-7, bem como as correlações entre H-6 e H-8a (δ_H 1,60; m; 1H) e H-8b (δ_H 1,47; m; 1H), e entre H-9 (δ_H 1,80; m; 1H) e H-10 (**Figura 175 - a**). Para a substância **S16** observaram-se as correlações de H-3 com 4-NH, H-14a e H-14b, entre H-6 e 1-NH, H-7a (δ_H 3,01; dd; $J_{7a-6} = 3,6$; $J_{7a-7b} = 13,5$ Hz; 1H) e H-7b (δ_H 2,69; dd; $J_{7a-6} = 4,2$; $J_{7a-7b} = 13,5$ Hz; 1H) e, ainda, entre H-15 (δ_H 1,37; m; 1H) e H-16 (**Figura 175 - b**).

Figura 172 - Espectro de RMN de ^1H de **PS-01-F1-12** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)



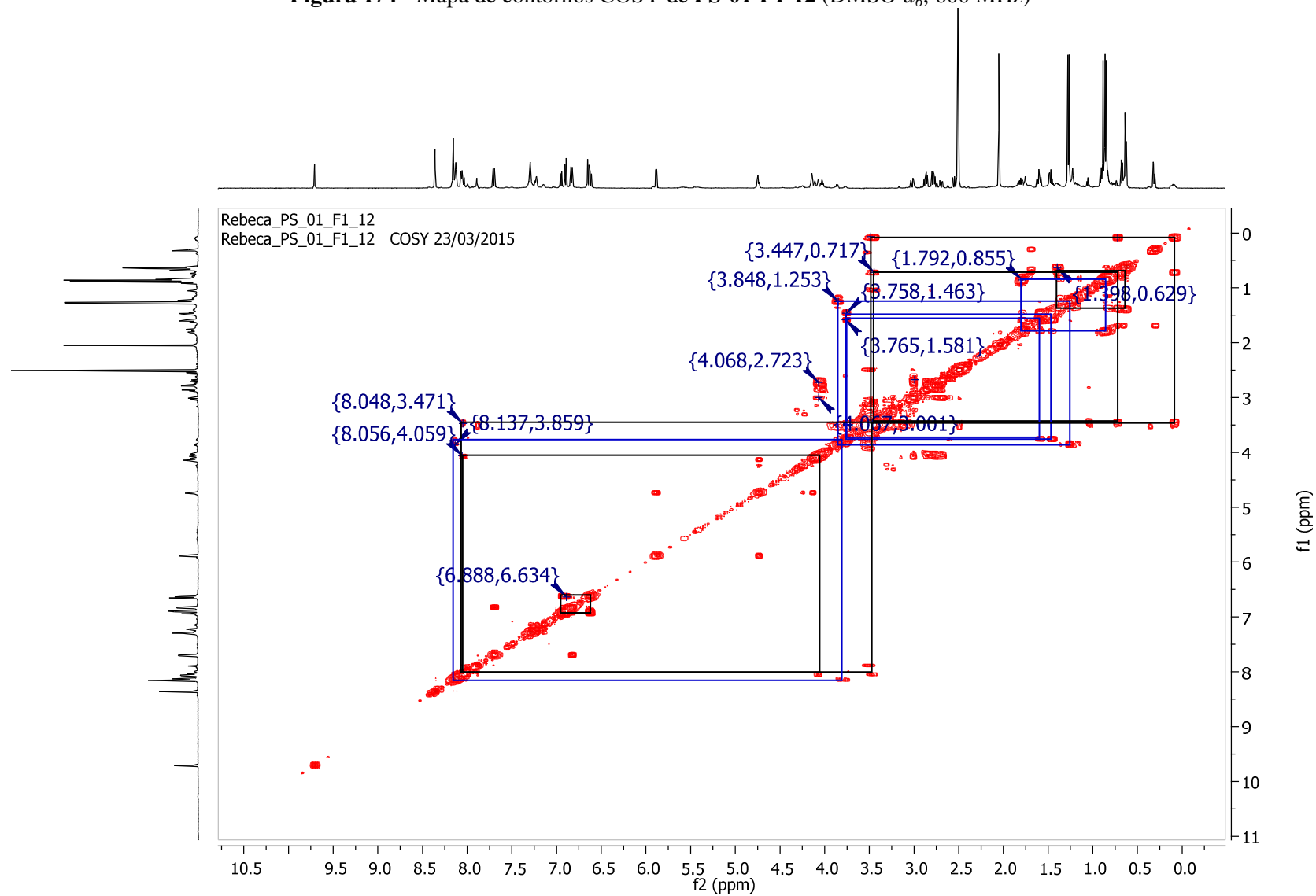
Fonte: o autor.

Figura 173 - Mapa de contornos HSQC de **PS-01-F1-12** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

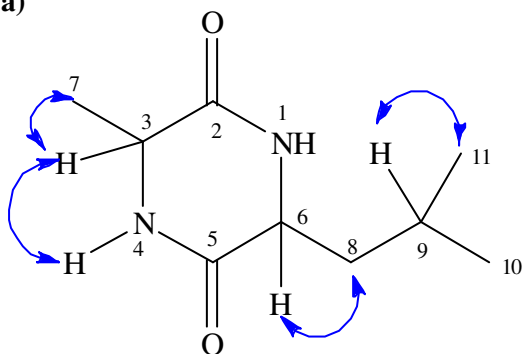
Figura 174 - Mapa de contornos COSY de **PS-01-F1-12** (DMSO- d_6 ; 600 MHz)



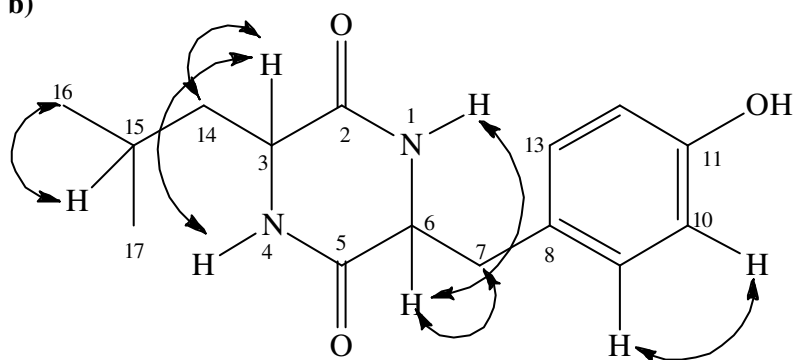
Fonte: o autor.

Figura 175 - Correlações observadas no mapa de contornos COSY para as substâncias: **a) S15**; **b) S16**.

a)



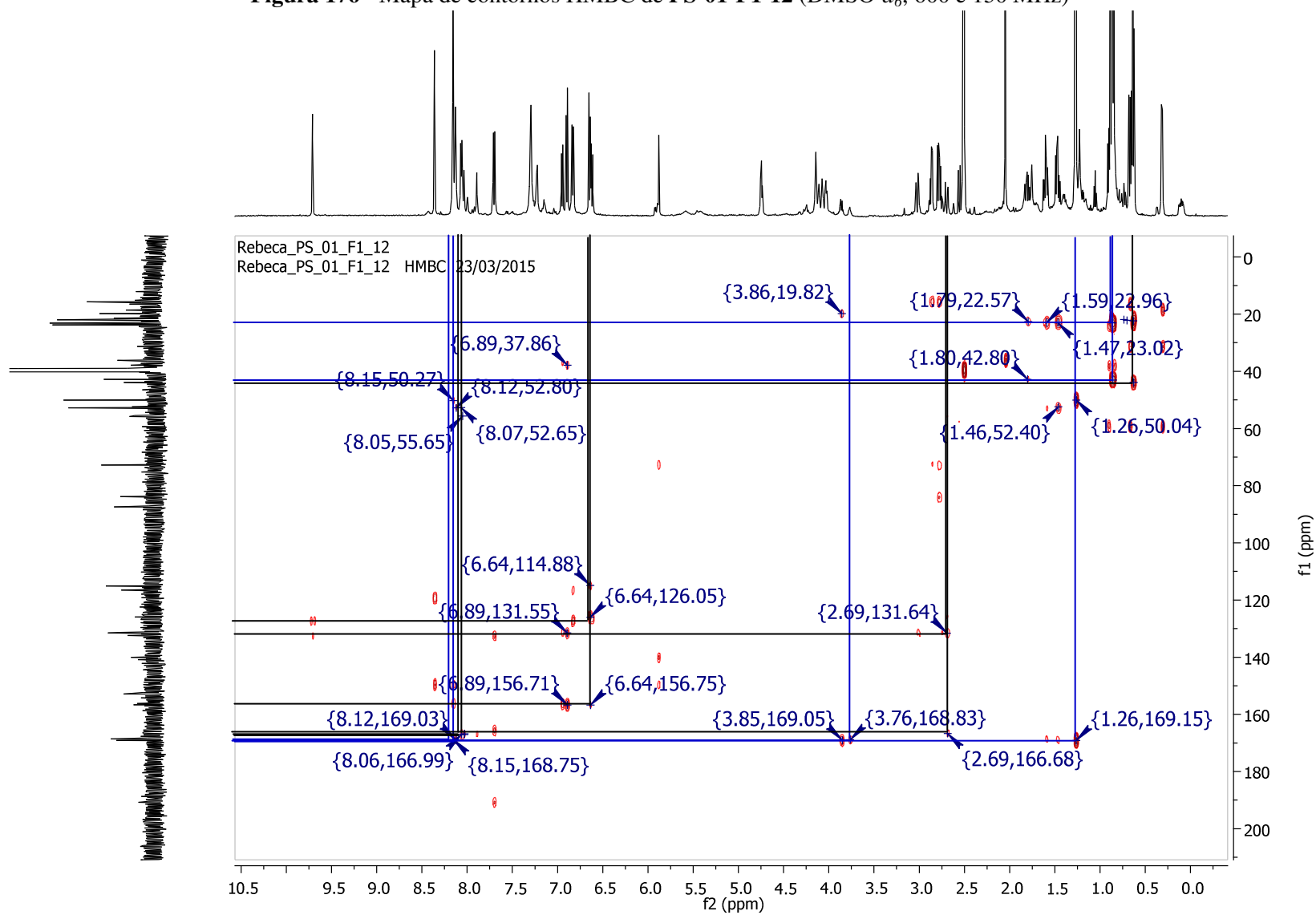
b)



Fonte: o autor.

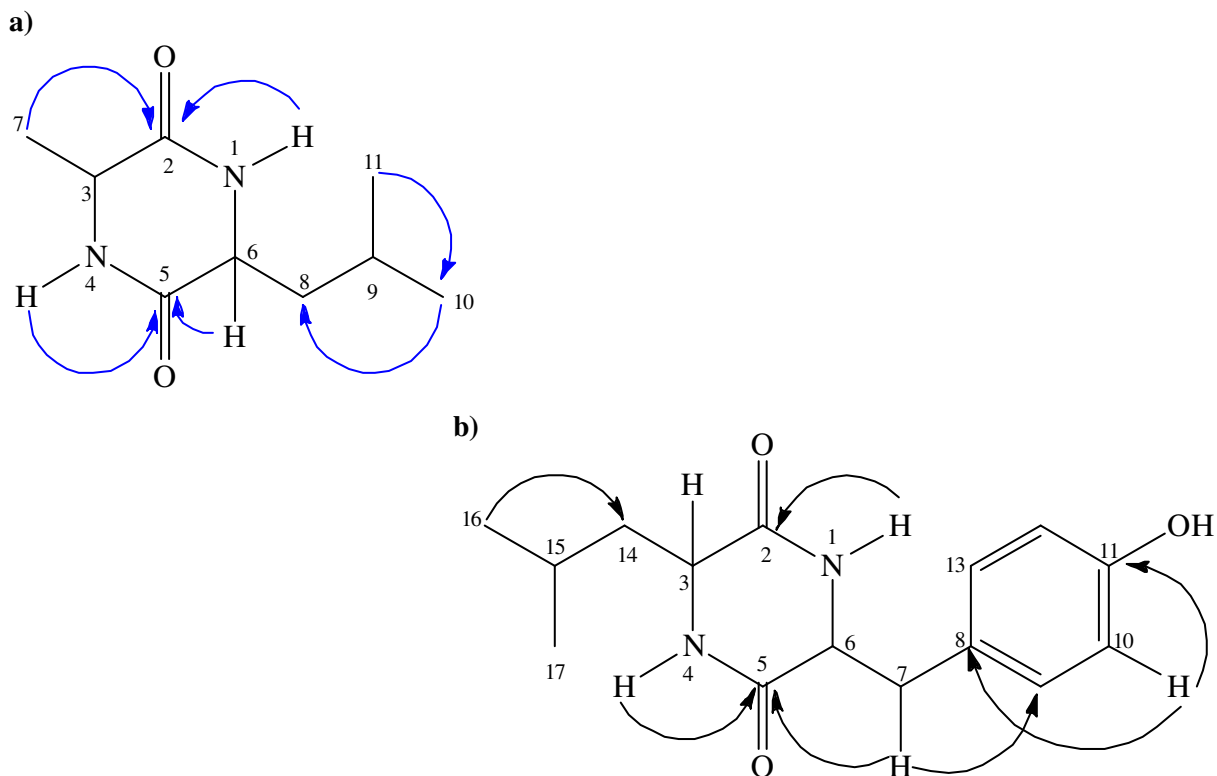
Já pelo mapa de contornos HMBC (**Figura 176**) foi possível observar, para a substância **S15**, as correlações entre 1-NH e H-7 e o sinal de C-2 (δ_C 169,1), bem como as correlações de 4-NH e H-6 com C-5 (δ_C 169,1) e entre H-10 e os sinais de C-11 e C-8 (**Figura 177 - a**). Para a substância **S16** foi possível verificar as correlações entre 1-NH e C-2 (δ_C 167,0), entre H-4 e C-5 (δ_C 166,7), entre H-7a e C-5 e C-9 (δ_C 131,4) e, ainda, entre H-10 e os sinais de C-8 (δ_C 126,0) e C-11 (δ_C 156,6) e entre H-16 e C-14 (**Figura 177 - b**).

Figura 176 - Mapa de contornos HMBC de **PS-01-F1-12** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 177 - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para as substâncias: **a) S15**; **b) S16**.



Fonte: o autor.

Como se trata de uma mistura, não foi possível verificar a rotação óptica específica dos constituintes, e optou-se por não obter espectros de NOESY-1D para verificar a configuração relativa, já que os mesmos seriam de difícil interpretação, devido a sobreposição de sinais.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S15** e para a ciclo(L-Ala-L-Leu) (STARK; HOFMANN, 2005) estão descritos na **Tabela 49**, e os dados para **S16** e para a ciclo(L-Leu-L-Tir) (LIU et al., 2014) estão descritos na **Tabela 50**.

Tabela 49 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S15** e para a dicetopiperazina ciclo(L-Ala-L-Leu).

S15^a			ciclo(L-Ala-L-Leu)^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1	8,15 (s; NH)	-	8,07 (s; NH)	-
2	-	169,1	-	169,0
3	3,85 (m)	49,9	3,86 (m)	50,1
4	8,12 (s; NH)	-	8,06 (s; NH)	-
5	-	168,6	-	168,5
6	3,76 (m)	52,6	3,77 (m)	52,8
7	1,26 (d; 7,2)	19,7	1,27 (d; 7,0)	19,7
8	1,60 (m)	42,7	1,62 (m)	42,7
	1,47 (m)		1,47 (m)	
9	1,80 (m)	23,7	1,83 (m)	23,8
10	0,85 (d; 7,2)	21,9	0,88 (d; 6,6)	22,0
11	0,87 (d; 7,2)	23,0	0,86 (d; 6,6)	23,1

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO-*d*₆; ^b δ -ppm; 400 e 100 MHz; DMSO-*d*₆ (STARK; HOFMANN, 2005).

Fonte: o autor.

A 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Ala-L-Leu) já foi isolada da bactéria *Psychrobacter* sp., obtida da esponja marinha *Stelletta* sp. (LI, H. et al., 2008) e também do fungo *Penicillium* sp. obtido do mar (ZHUANG et al., 2012). O estudo feito por Cho et al. (2012) descreveu seu isolamento da bactéria *Streptomyces praecox* 291-11, associada a alga *Undaria pinnatifida*, e sua atividade anti-incrustante contra a alga *Ulva pertusa* e contra a diatomácea *Naviculla anexa*. Além disso, Stark e Hofmann (2005) mostraram que essa dicetopiperazina pode ser encontrada em cacau torrado e moído e está relacionada ao seu sabor metálico.

Tabela 50 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S16** e para a dicetopiperazina ciclo(L-Leu-L-Tir).

S16^a			ciclo(L-Leu-L-Tir)^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1	8,06 (m; NH)	-	7,84 (s; NH)	-
2	-	167,0	-	166,3
3	3,44 (m)	52,6	4,11 (m)	58,3
4	8,05 (m; NH)	-	8,00 (s; NH)	-
5		166,7	-	167,4
6	4,06 (m)	55,7	3,58 (m)	55,6
7	3,01 (dd; 3,6; 13,5)	37,5	3,05 (dd; 4,2; 13,2)	37,8
	2,69 (dd; 4,2; 13,5)		2,73 (dd; 4,2; 13,2)	
8	-	126,0	-	125,8
9 e 13	6,89 (d; 8,4)	131,4	6,91 (d; 7,8)	114,8
10 e 12	6,64 (d; 8,4)	115,0	6,62 (d; 7,8)	131,2
11	-	156,6	-	156,3
14	0,73 (m)	43,8	0,69 (m)	43,6
	0,10 (m)		0,14 (m)	
15	1,37 (m)	23,0	1,41 (m)	23,1
16	0,62 (d; 7,2)	21,3	0,62 (d; 6,0)	22,7
17	0,64 (d; 7,8)	22,8	0,60 (d; 6,0)	21,3

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO-*d*₆; ^b δ -ppm; 300 e 75 MHz; DMSO-*d*₆ (LIU et al., 2014).

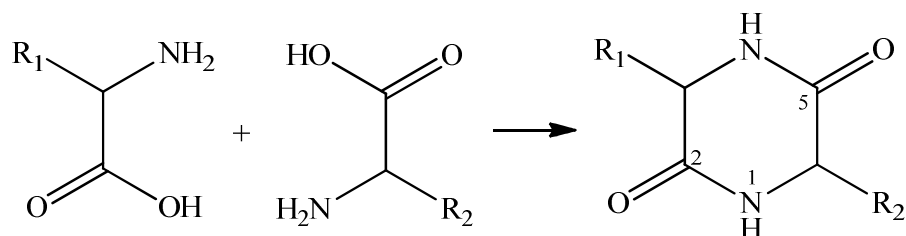
Fonte: o autor.

A ciclo(L-Leu-L-Tir) foi anteriormente isolada de um fungo endofítico, obtido de uma folha de *Kandelia candel* (mangue estuário) (HUANG, H. et al., 2007), e também da bactéria *Bacillus subtilis*, isolada de uma amostra de solo da Tunísia (ELKAHOUI et al., 2013). Já o estudo realizado por MITSUI-SAITOH et al. (2011) mostrou os efeitos cardioprotetores dessa dicetopiperazina em corações de porquinhos da Índia que sofreram isquemia e reperfusão, sendo que o pre-tratamento com a ciclo(L-Leu-L-Tir) promoveu ótima recuperação após o dano.

As 2,5-dicetopiperazinas são biossintetizadas a partir da junção de dois aminoácidos, através de reações de substituição nucleofílica. O grupo amina do primeiro aminoácido promove um ataque nucleofílico à carboxila do segundo aminoácido, liberando água e, em seguida, o grupo amina do segundo aminoácido promove o mesmo tipo de ataque à carboxila

do primeiro aminoácido, formando assim um dipeptídeo conhecido como 2,5-dicetopiperazina (**Figura 178**) (THOMASI, 2014).

Figura 178 - Biogênese das 2,5-dicetopiperazinas



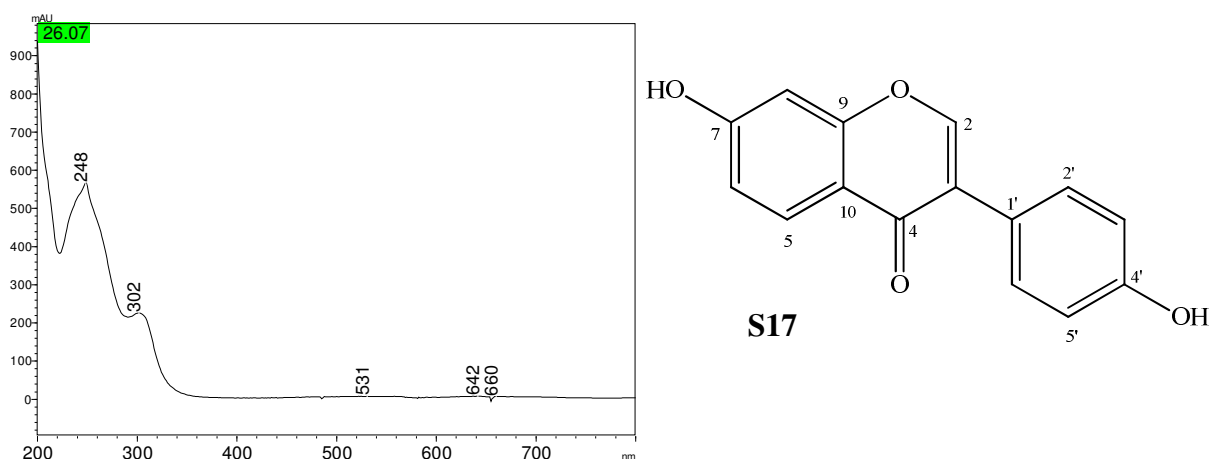
Fonte: o autor.

4.2.8.2 Elucidação estrutural de **S17**

A substância **S17** (1,9 mg) foi obtida como um sólido amarelo. Após as análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos, bem como comparações com dados da literatura, **S17** foi identificada como a isoflavona daidzeína.

Seu espectro no UV-Vis (**Figura 179**) apresentou bandas de absorção com máximos em 302 e 248 nm, enquanto o espectro no UV-Vis da daidzeína descrita na literatura apresentou bandas de absorção em 300 e 255 nm (MeOH) (KALE; LADDHA, 2014), consistentes com nossos dados experimentais.

Figura 179 - Espectro de UV da substância **S17** (62,5% MeOH:37,5% H₂O).



Fonte: o autor.

A fórmula molecular de **S17**, $C_{15}H_{10}O_4$, foi determinada após as análises dos dados de RMN e do seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 180**), no qual foi observado o pico base em m/z 255,0649, referente a $[M+H]^+$ (calculado 255,0652 - erro de 1,2 ppm).

O espectro de RMN de 1H (**Figura 181**) de **S17** apresentou sinais apenas na região de hidrogênios aromáticos e olefínicos, como os singletos em δ_H 8,24 (H-2; 1H) e em δ_H 6,77 (H-8; 1H); os dubletos em δ_H 7,91 ($J_{5-6} = 8,4$ Hz; H-5, 1H), δ_H 7,37 ($J_{2'-3'} = 8,4$ Hz; H-2'/H-6'; 2H) e em δ_H 6,80 ($J_{3'-2'} = 8,4$ Hz; H-3'/H-5'; 2H), sendo esses dois últimos característicos de um anel *para*-dissubstituído; e o duplo dubleto em δ_H 6,86 ($J_{6-8} = 1,8$; $J_{6-5} = 8,4$ Hz; H-6; 1H), sendo que o mapa de contornos COSY (**Figura 182**) mostrou as correlações entre os sinais em δ_H 7,91 e δ_H 6,86 e entre δ_H 7,37 e 6,80.

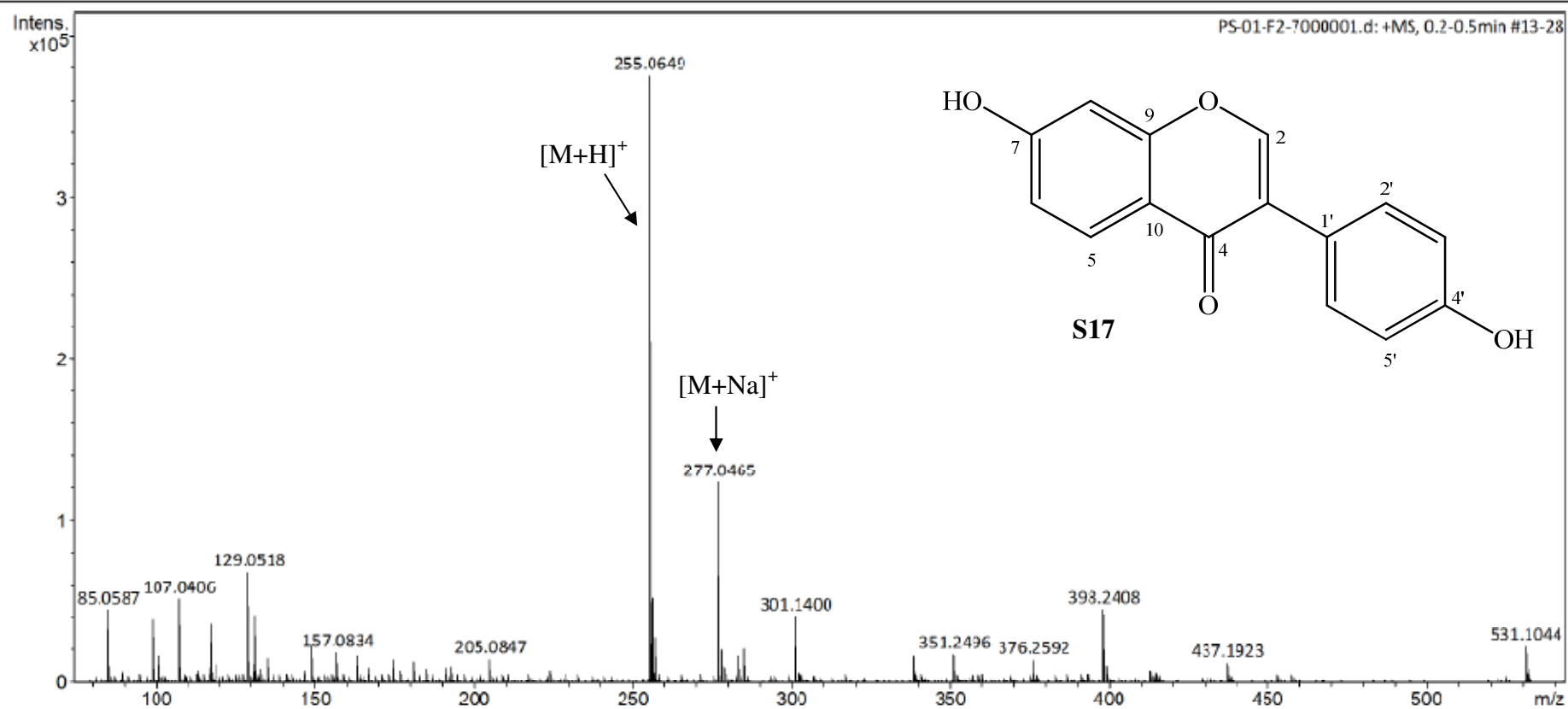
Os sinais em δ_H 6,86, 6,80 e 6,77 indicaram a substituição do anel em *orto* a esses hidrogênios por um grupo doador de elétrons, como hidroxilas (confirmado pelo espectro de massas). Já o sinal em δ_H 7,91, indicou a substituição do anel em *orto* a esse hidrogênio por um grupo retirador de elétrons, como a carbonila em C-4. O sinal de H-2, hidrogênio de uma dupla ligação, apresentou valor de deslocamento químico em δ_H 8,24, indicando forte desproteção, já que está ligado a um oxigênio, retirador de elétrons por efeito indutivo, e devido a presença da carbonila em β , que por efeito de ressonância, também exerce efeito desprotetor.

A partir do espectro de ^{13}C (**Figura 183**) e do mapa de contornos HSQC (**Figura 184**), foi possível verificar sinais de 7 carbonos quaternários (não hidrogenados) em δ_C 174,8 (C-4), 164,7 (C-7), 157,8 (C-9), 157,2 (C-4'), 123,4 (C-3), 122,6 (C-1') e em δ_C 116,2 (C-10) e 6 sinais de carbonos metínicos em δ_C 152,7 (C-2), 130,2 (C-2'/C-6'), 127,2 (C-5), 115,9 (C-6), 115,0 (C-3'/C-5') e em δ_C 102,1 (C-8). Os sinais em δ_C 130,2 e 115,0 apresentavam-se intensos, indicando que os mesmos estavam relacionados a 2 carbonos equivalentes, confirmando assim o anel *para* dissubstituído.

O mapa de contornos HMBC (**Figura 185**) mostrou as correlações entre H-2 e C-3, C-4 e C-9, entre H-5 e C-4, C-7 e C-9, entre H-6 e C-8 e C-10, entre H-2'/H-6' e C-3 e entre H-3'/H-5' e C-1' e C-4'.

Figura 180 - Espectro de Massas de alta resolução de **S17** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

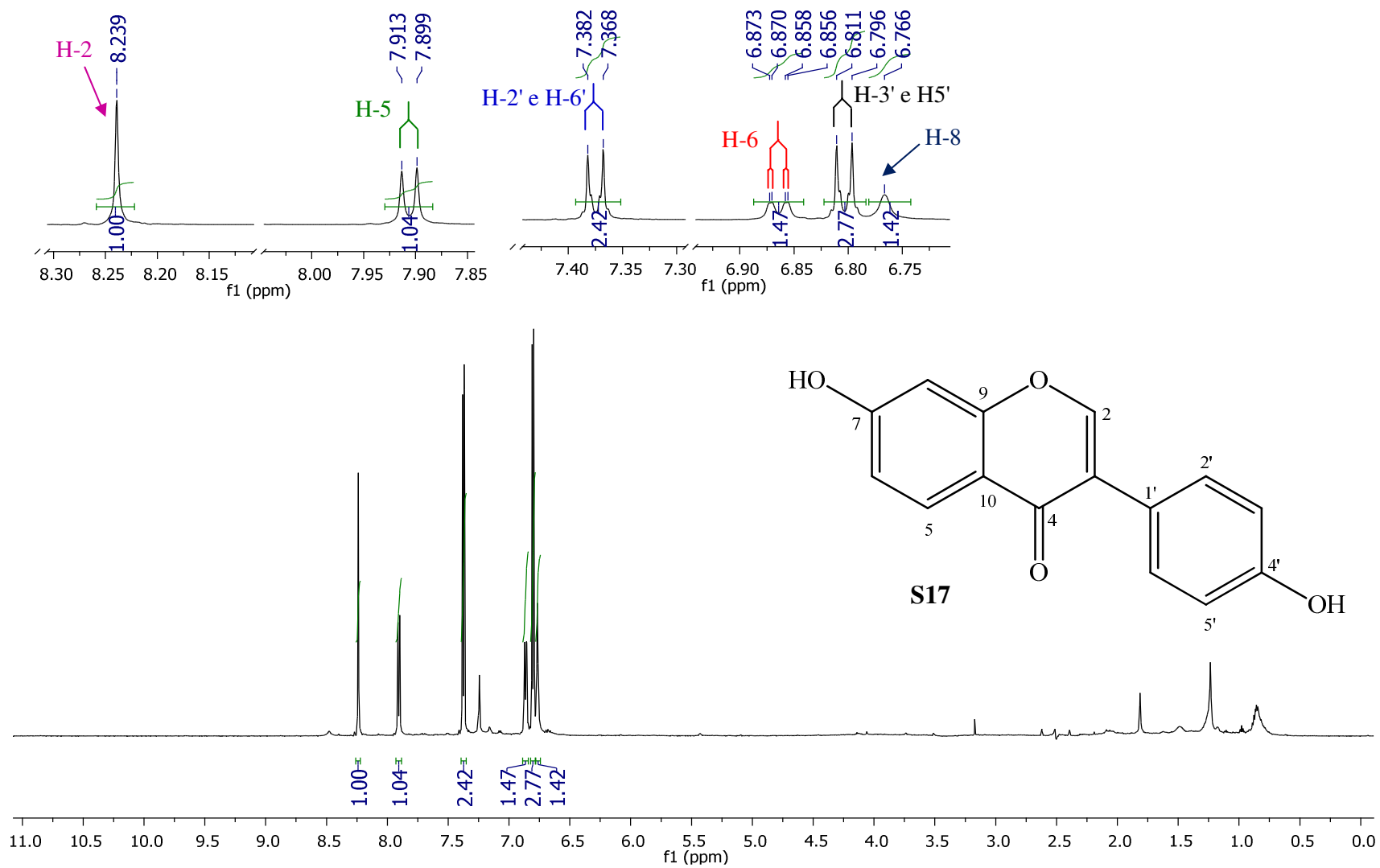
Source Type	E3I	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

Figura 181 - Espectro de RMN de ^1H de **S17** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

Rebeca_PS_01_F2_7



Fonte: o autor.

Figura 182 - Mapa de contornos COSY de **S17** (DMSO-*d*₆; 600 MHz)

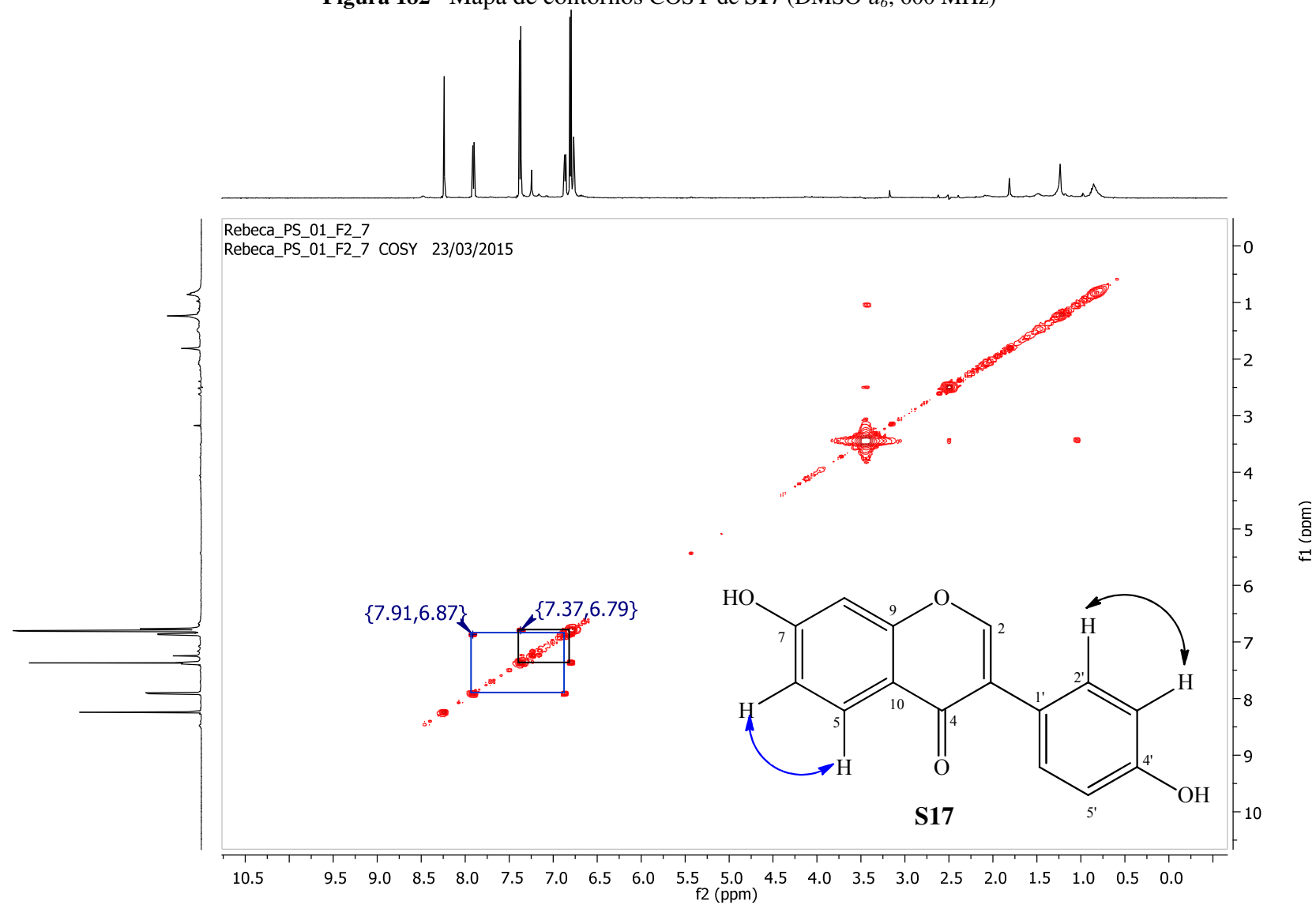
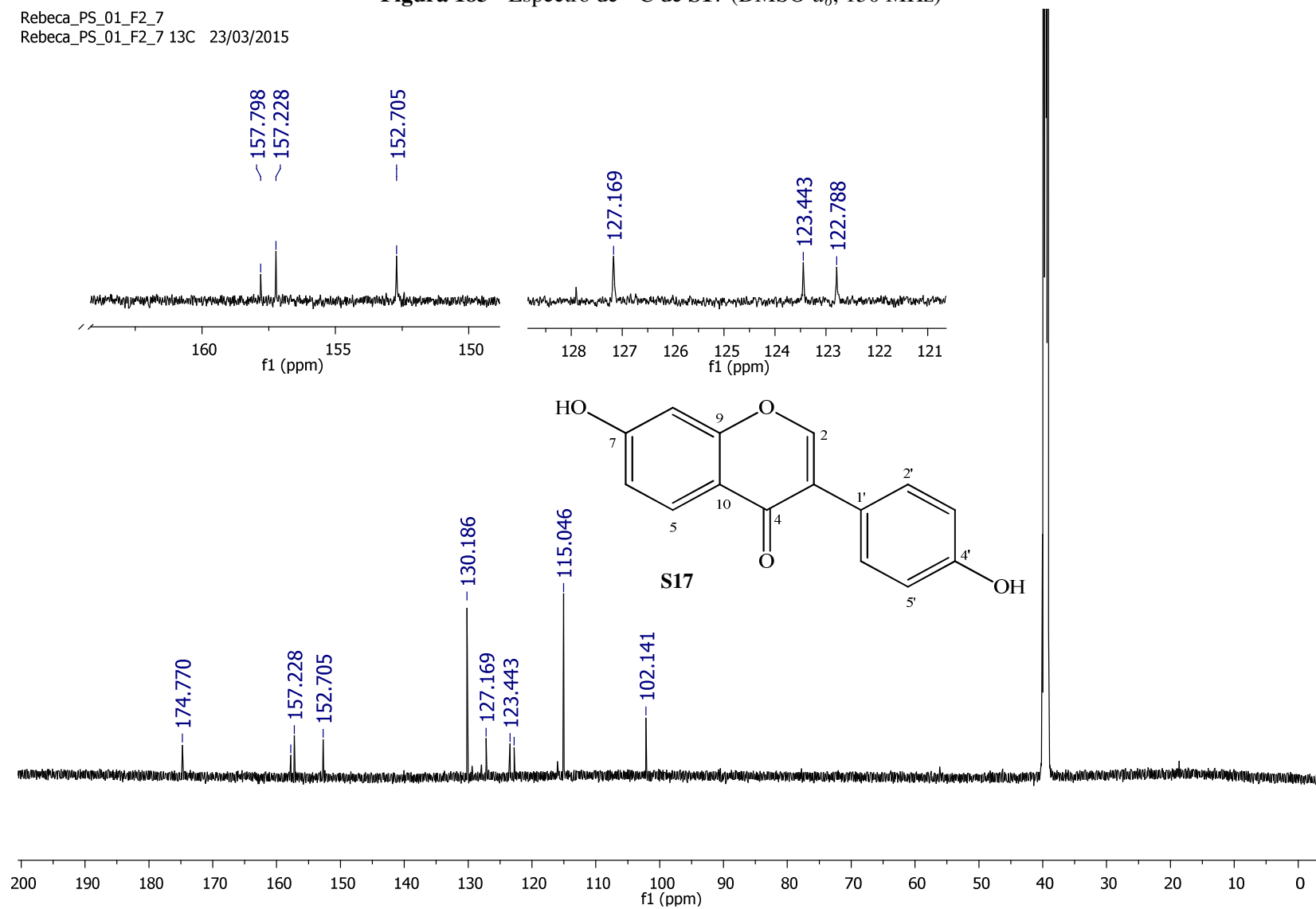


Figura 183 - Espectro de ^{13}C de **S17** ($\text{DMSO-}d_6$; 150 MHz)

Rebeca_PS_01_F2_7
Rebeca_PS_01_F2_7 ^{13}C 23/03/2015



Fonte: o autor.

Figura 184 - Mapa de contornos HSQC de **S17** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

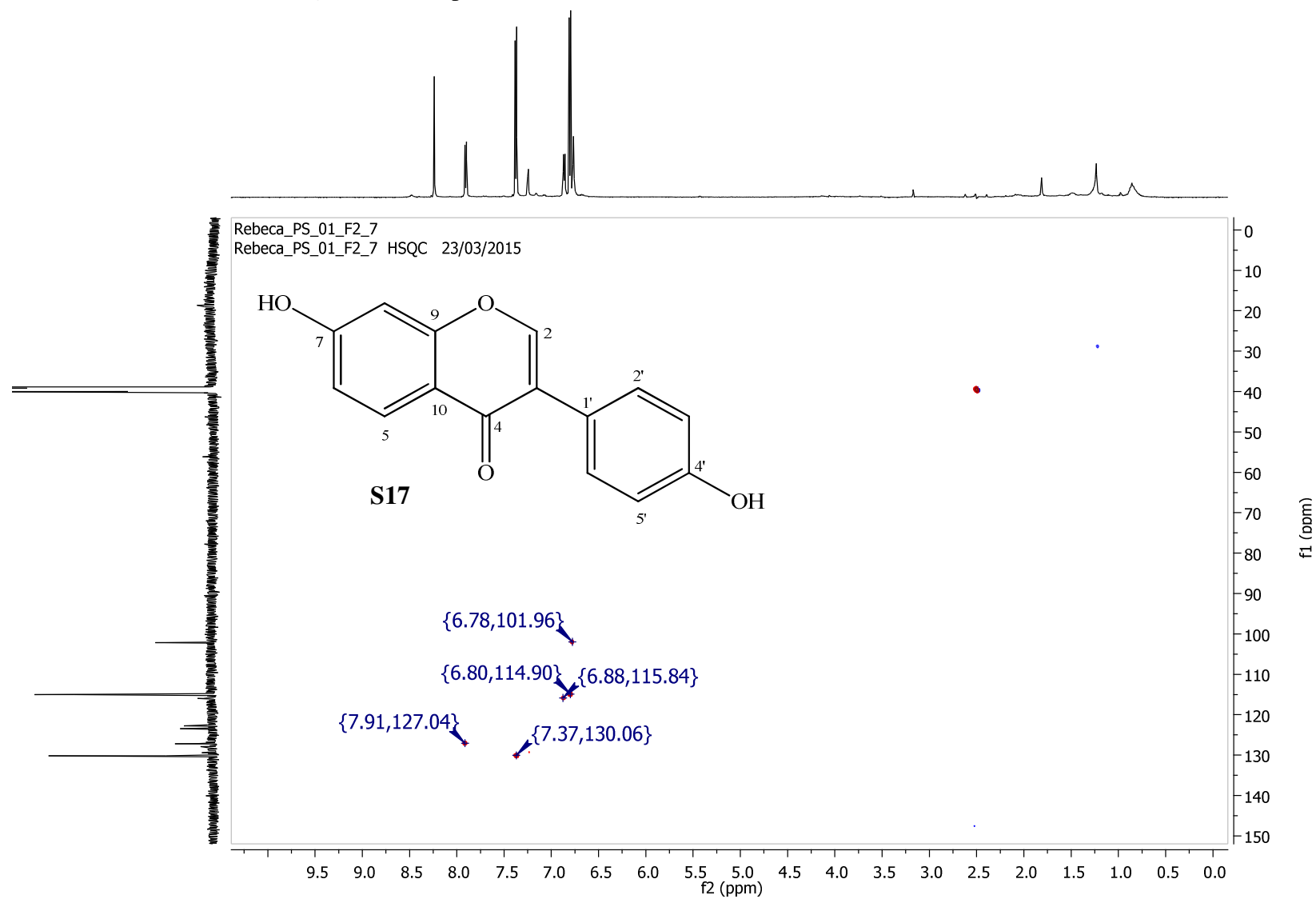
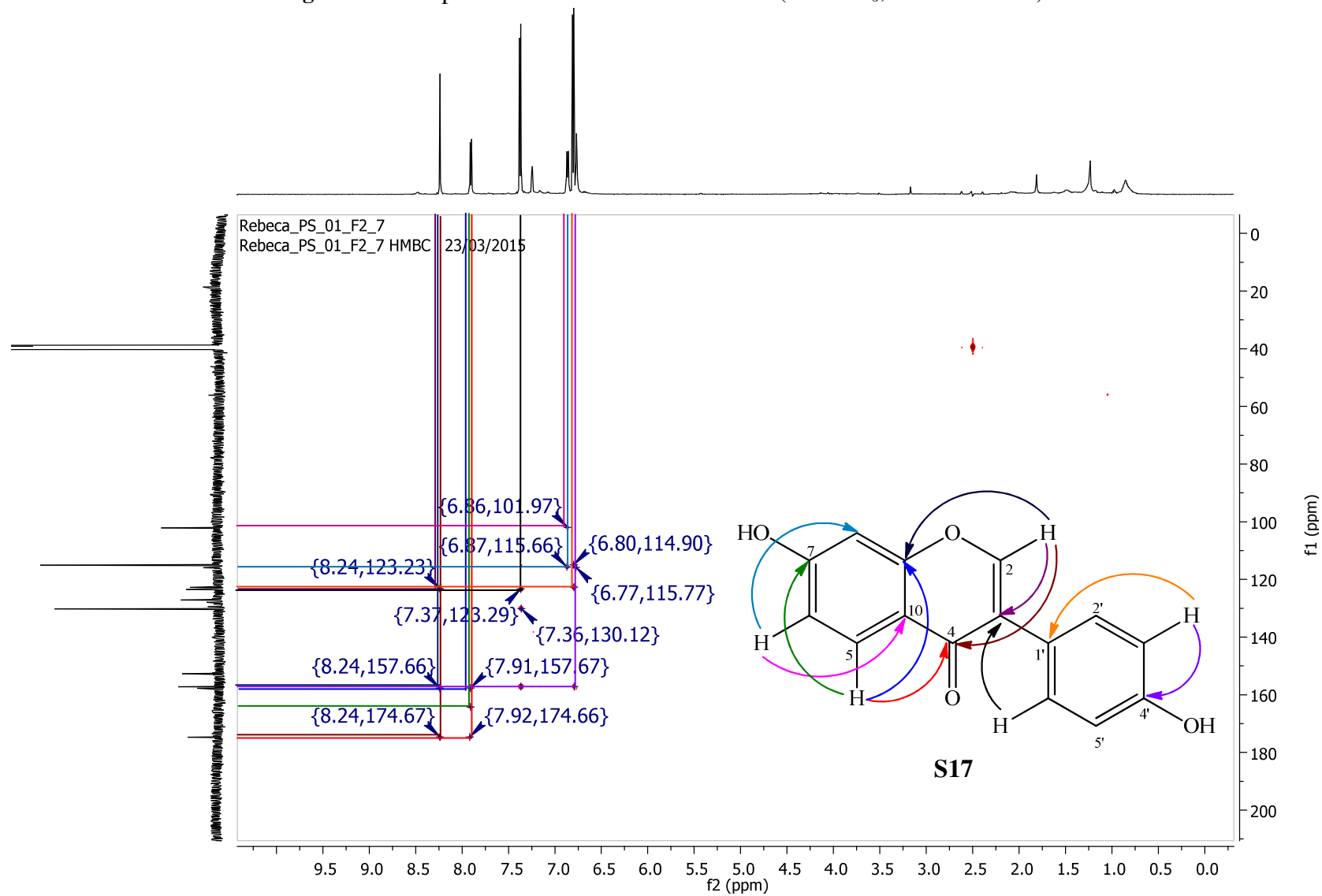


Figura 185 - Mapa de contornos de HMBC de **S17** (DMSO-*d*₆; 600 e 150 MHz)

Fonte: o autor.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **S17** e da daidzeína (HUANG, R. et al., 2013) estão descritos na **Tabela 51**.

Tabela 51 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S17** e para a daidzeína.

S17^a			Daidzeína^b	
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
2	8,24 (s)	152,7	8,28 (s)	152,8
3	-	123,4	-	123,5
4	-	174,8	-	174,7
5	7,91 (d; 8,4)	127,2	7,95 (d; 8,8)	127,3
6	6,86 (dd; 1,8; 8,4)	115,9	6,92 (d; 8,8)	115,1
7	-	164,7	-	162,6
8	6,77 (s)	102,1	6,85 (s)	102,1
9	-	157,8	-	157,4
10	-	116,2	-	116,6
1'	-	122,6	-	122,6
2' e 6'	7,37 (d; 8,4)	130,2	7,37 (d; 7,3)	130,0
3' e 5'	6,80 (d; 8,4)	115,0	6,80 (d; 7,3)	114,9
4'	-	157,2	-	157,1

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO- d_6 ; ^b δ -ppm; 500 e 125 MHz; DMSO- d_6 (HUANG, R. et al., 2013).

Fonte: o autor.

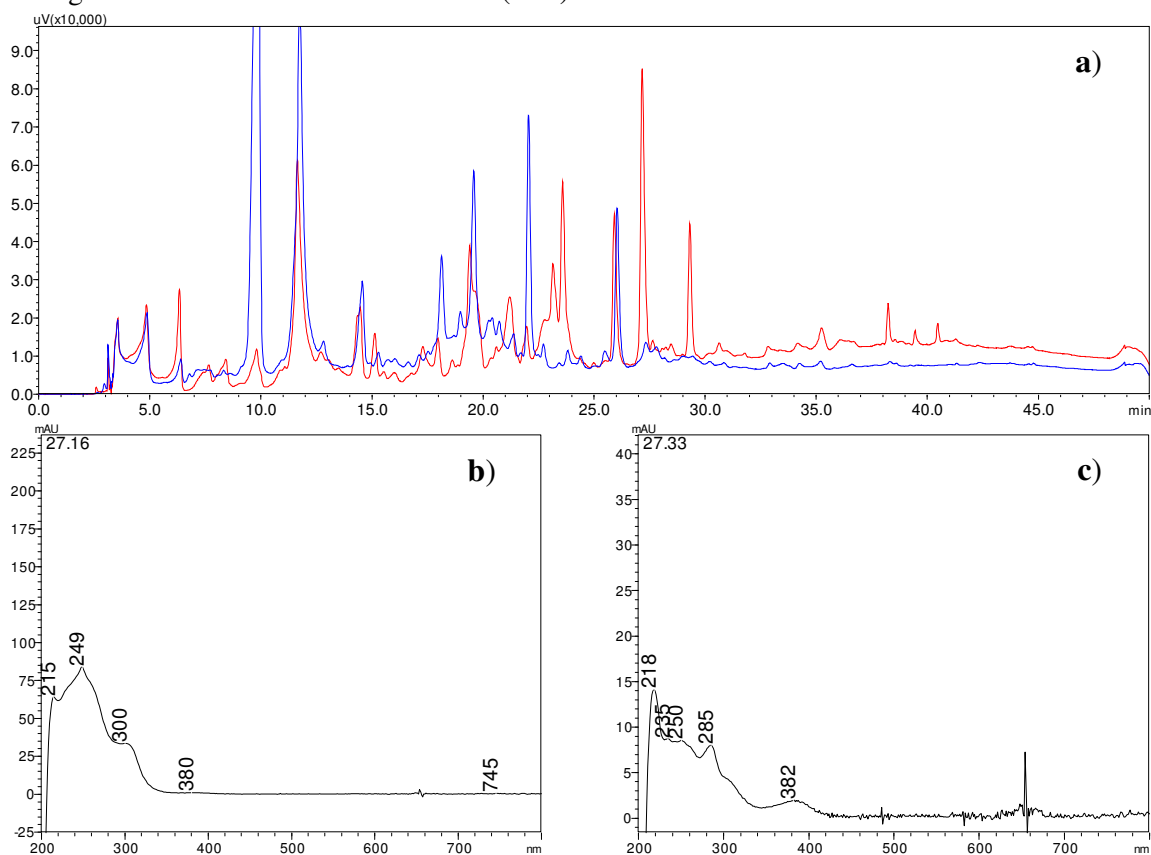
A daidzeína é normalmente encontrada em plantas, principalmente em espécies da família Fabaceae, como a soja (*Glycine max*) (MURAKAMI et al., 2014), e apresenta efeito inibitório contra linhagens de células tumorais, incluindo células de câncer de mama (GUO et al., 2004a; 2004b; CHOI; KIM, 2008).

Estudos demonstraram que espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* são capazes de produzir isoflavonas, como a daidzeína, a partir da biotransformação de componentes do meio de cultivo provenientes de soja (HUANG, R. et al., 2013; DONG et al., 2005; HU, J. et al., 2003). Já o estudo realizado por Chang, T. et al. (2007) mostrou que fungos usados no preparo de alimentos fermentados de soja são capazes de metabolizar a daidzeína e a genisteína (outra isoflavona) e produzir 8-hidroxi-daidzeína e 8-hidroxi-genisteína. Por outro lado, o extrato acetato de etila do fungo endofítico *Ascochyta salicorniae*, obtido da alga

verde *Ulva* sp. e cultivado em um meio sólido de biomalte e sal artificial do mar, forneceu a genisteína (OSTERHAGE et al., 2000).

Vale ressaltar que para a cultura de PS-01 foi utilizado meio líquido de batata-dextrose (MDB) e portanto, para verificar se a daidzeína estava presente no meio de cultura utilizado foi preparado um extrato acetato de etila do meio. Um frasco de Erlenmeyer contendo MDB, do mesmo lote usado para o preparo do meio de cultura de PS-01, e 300 mL de água ultra pura foi mantido incubado a 25°C e 28 dias, da mesma forma que aqueles preparados para o cultivo de PS-01. O processo de extração foi o mesmo utilizado para a obtenção dos extratos dos fungos, sendo que foi eliminada a etapa de filtração, já que não havia a presença de micélios. Foi obtido 20,8 mg de extrato do meio de cultura, que foi então analisado, juntamente com o extrato de PS-01, por CLAE-DAD no modo analítico usando gradiente exploratório. Os cromatogramas estão apresentados na **Figura 186** e mostram o pico referente a daidzeína ($t_R = 27,2$ min.) está presente apenas no extrato de PS-01.

Figura 186 - a) Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) do extrato bruto de **PS-01** obtido em escala ampliada (vermelho) e do extrato do meio de cultura (azul); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,2 min. (daidzeína) no cromatograma do extrato de **PS-01** (vermelho); c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,3 min. no cromatograma do extrato do meio de cultura (azul).



Fonte: o autor.

4.2.8.3 Elucidação estrutural de **S18** e **S19**

A substância **S18** (2,5 mg) foi obtida como um óleo incolor. Após as análises dos dados de Espectrometria de Massas e de RMN, **S18** foi identificada como o ftalato de diisobutila.

A **Figura 187** apresenta seu espectro no UV-Vis, no qual foram observadas bandas de absorção com máximos em 274 e 235 nm. Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{16}H_{22}O_4$, a partir do seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 188**) que mostrou o pico base em m/z 301,1416, referente ao íon $[M+Na]^+$ (calculado 301,1416 - erro de 0 ppm).

O espectro de RMN de 1H (**Figura 189**) e o mapa de contornos HSQC (**Figura 190**) mostrou os sinais em δ_H 7,73 (m; H-3/H-6; 2H) / δ_C 128,7 (C-3/C-6); δ_H 7,67 (m; H-4/H-5; 2H) / δ_C 131,6 (C-4/C-5); δ_H 4,00 (d; $J_{1'-2'} = 6,6$ Hz; H-1'/H-1"; 2H) / δ_C 71,0 (C-1'/C-1"); δ_H 1,95 (m; H-2'/H-2"; 2H) / δ_C 27,1 (C-2'/C-2") e em δ_H 0,92 (d; $J_{3'-2'} = 7,2$ Hz; H-3'/H-3"/H-4'/H-4"; 12H) / δ_C 18,7 (C-3'/C-3"/C-4'/C-4").

O mapa de contornos HMBC (**Figura 191**) mostrou as correlações entre H-3/H-6 e os sinais de C-1/C-8 (δ_C 167,2) e de C-4/C-5, entre H-1'/H-1" e C-1/C-8 e, ainda, entre o sinal de H-3'/H-3"/H-4'/H-4" e os sinais de C-1'/C-1" e de C-2'/C-2", comprovando assim que se tratava do ftalato de diisobutila.

Figura 187 - Espectro no UV-Vis da substância **S18** (83,6% MeOH:16,4% H_2O).

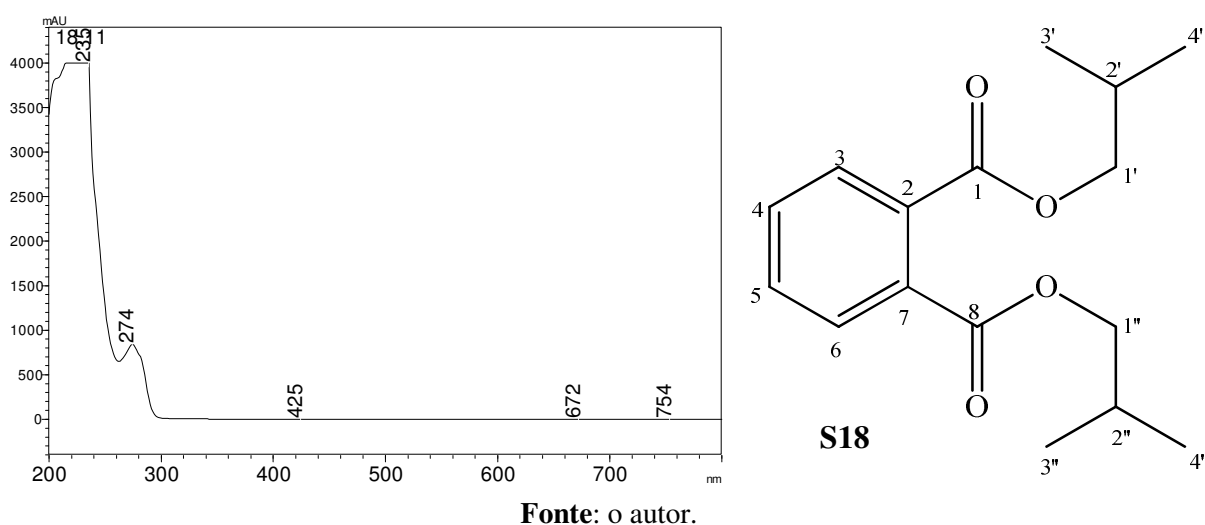
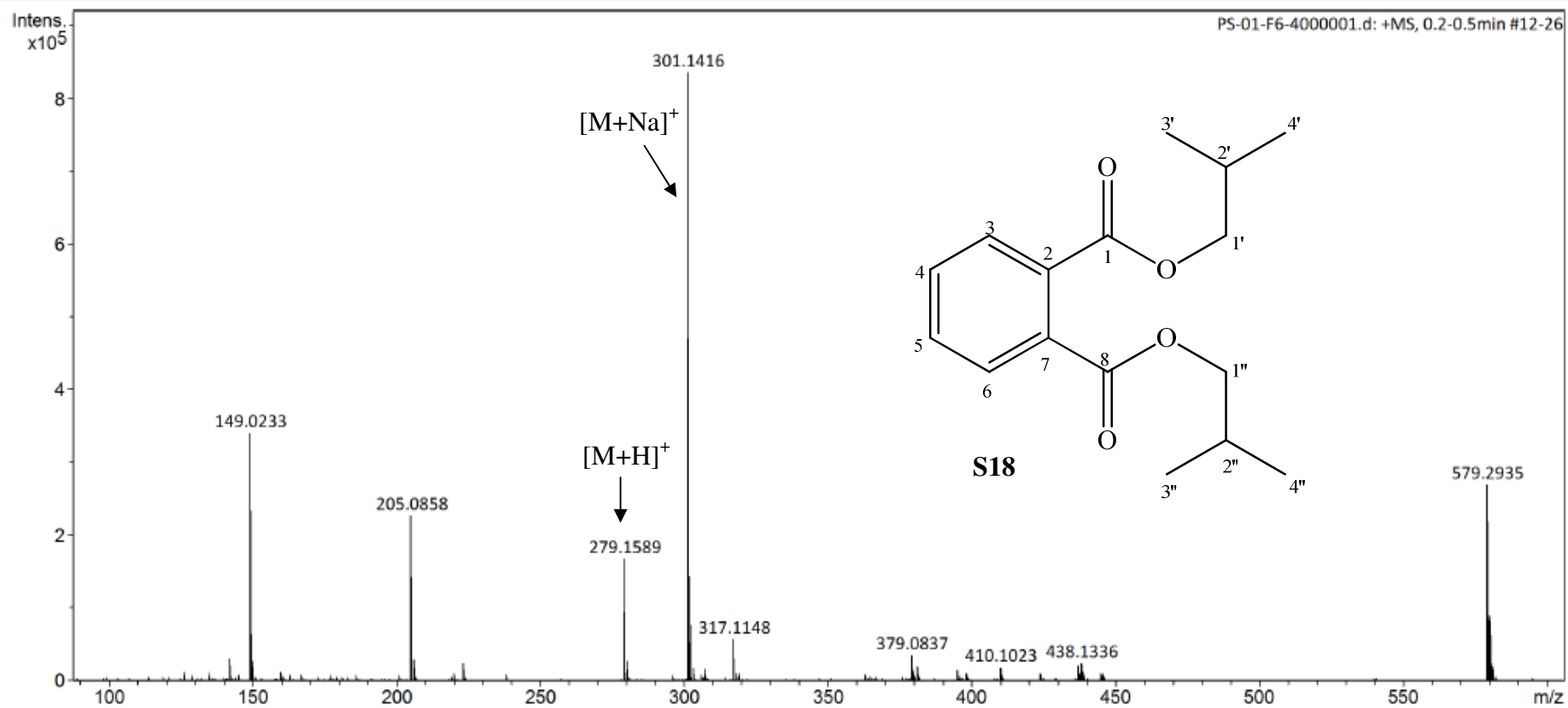


Figura 188 - Espectro de Massas de alta resolução de **S18** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	3500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

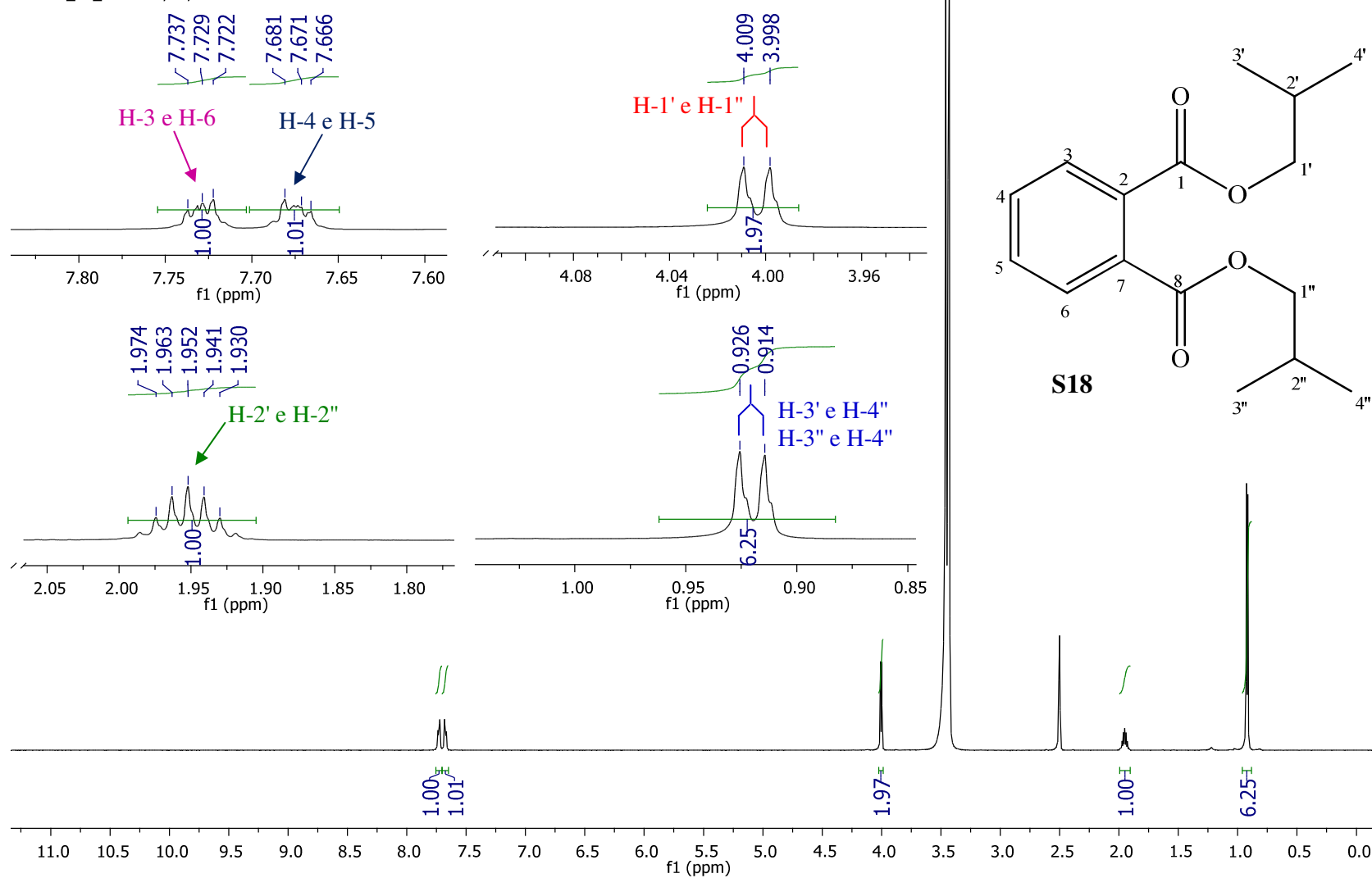


Fonte: o autor.

Figura 189 - Espectro de RMN de ^1H de **S18** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

Rebeca_F6_4

Rebeca_F6_4 1H 27/04/2015



Fonte: o autor.

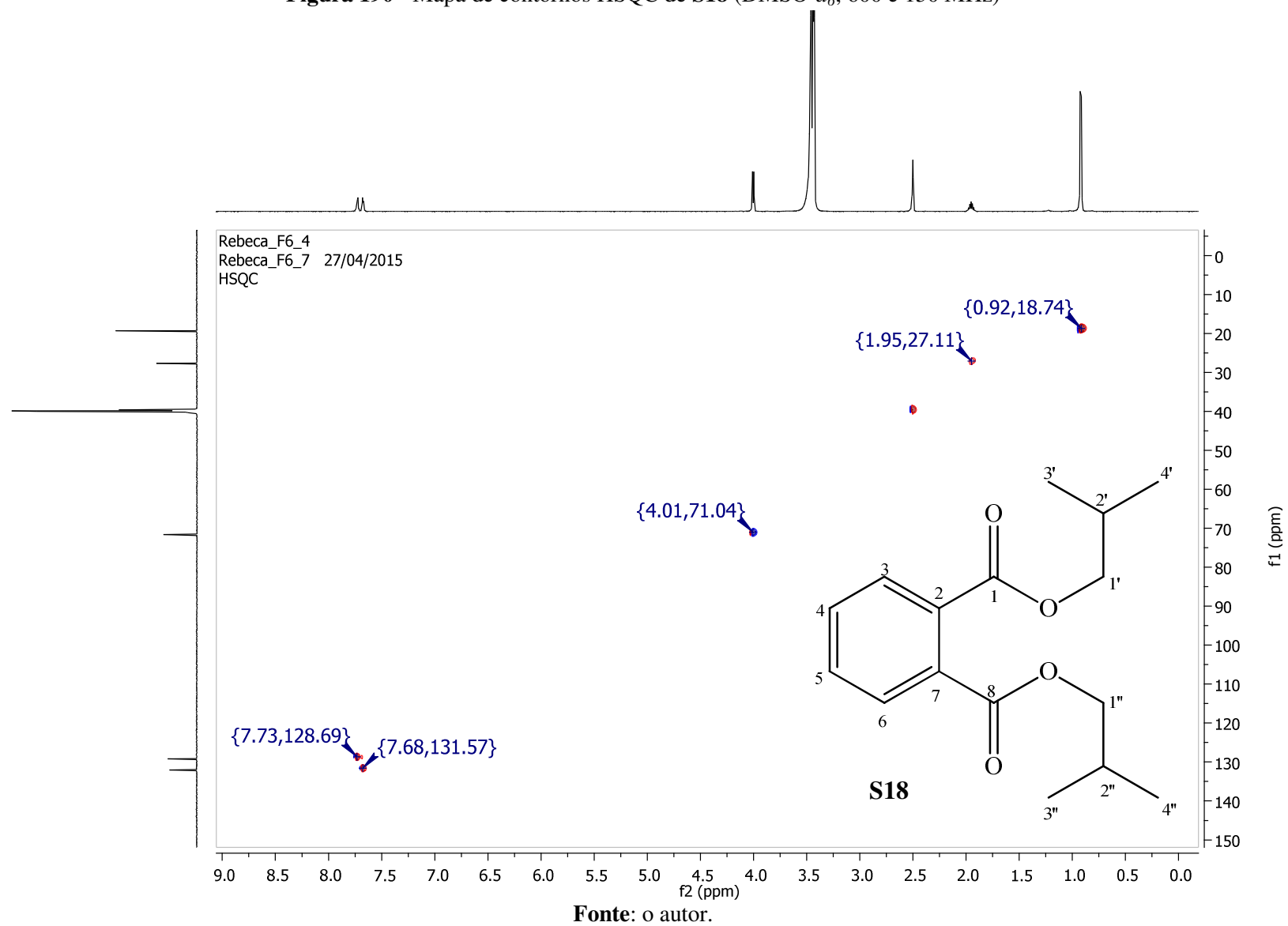
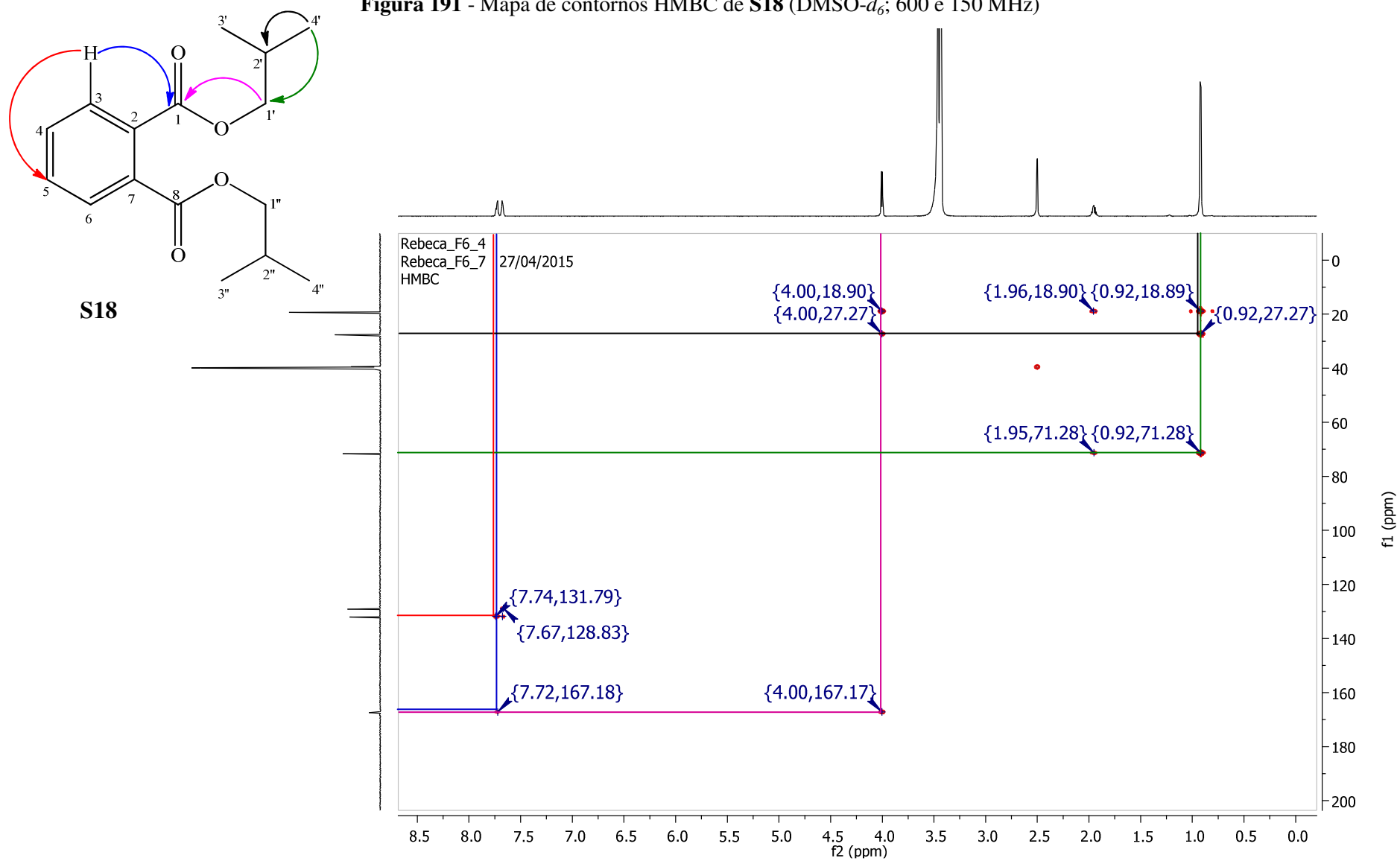
Figura 190 - Mapa de contornos HSQC de **S18** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

Figura 191 - Mapa de contornos HMBC de **S18** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

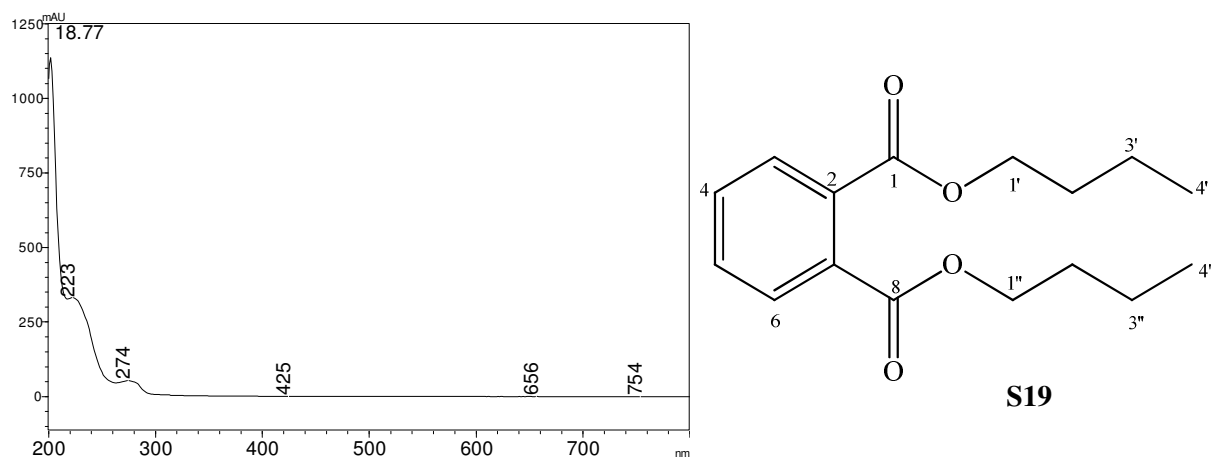


Fonte: o autor.

A substância **S19** (0,9 mg) também foi obtida como um óleo incolor. Após as análises dos dados espectrométricos, **S19** foi identificada como o ftalato de dibutila.

Seu espectro no UV-Vis (**Figura 192**) apresentou bandas de absorção com máximos em 274 e 223 nm.

Figura 192 - Espectro no UV-Vis da substância **S19** (84,1% MeOH:15,9% H₂O).



Fonte: o autor.

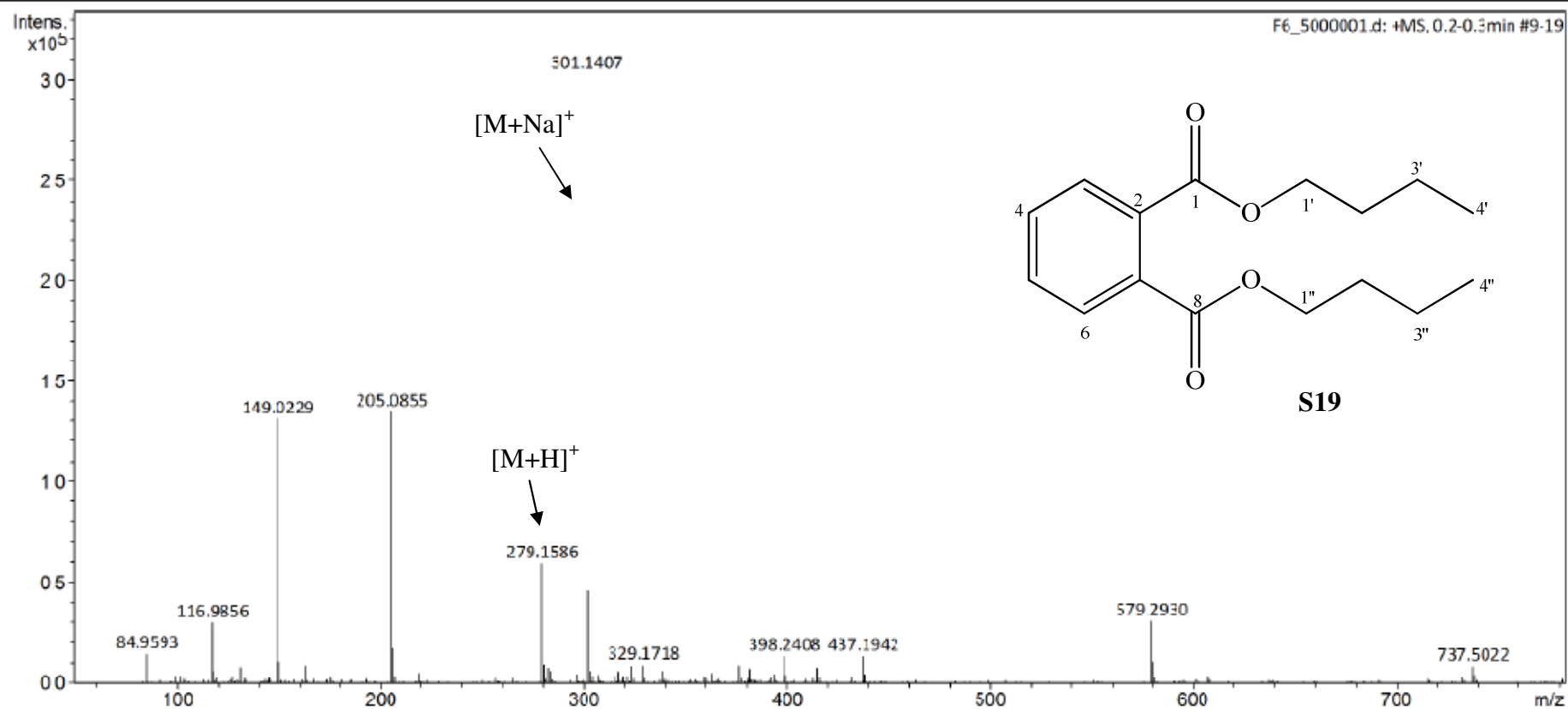
Seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 193**) mostrou o pico base em m/z 301,1407, referente ao íon $[M+Na]^+$ (calculado 301,1416 - erro de 3 ppm). Portanto, a fórmula molecular de **S19** é igual a de **S18**, C₁₆H₂₂O₄.

No entanto, seu espectro de RMN de ¹H (**Figura 194**) e mapa de contornos HSQC (**Figura 195**) apresentaram sinais diferentes daqueles observados para **S18**, como o sinal referente a H-1'/H-1'' que se apresentou como um tripleto em δ_H 4,21 ($J_{1'-2'} = 6,6$ Hz; 4H) e o sinal de C-1'/C-1'', observado em δ_C 64,9. Além disso, foi observado um sinal de carbono metilênico adicional em δ_C 18,5, atribuído a C-3'/C-3'', que mostrou correlação com o sinal em δ_H 1,37 (sex; $J = 7,2$ Hz; H-3'/H-3''; 4H) no mapa de contornos HSQC. O tripleto em δ_H 0,90 teve integração para 6 hidrogênios ($J_{4'-3'} = 7,2$ Hz; 6H) e portanto foi atribuído a H-4'/H-4'', e mostrou correlação com o sinal em δ_C 13,4 (C-4'/C-4''), confirmando assim que a substância **S19** é o ftalato de dibutila.

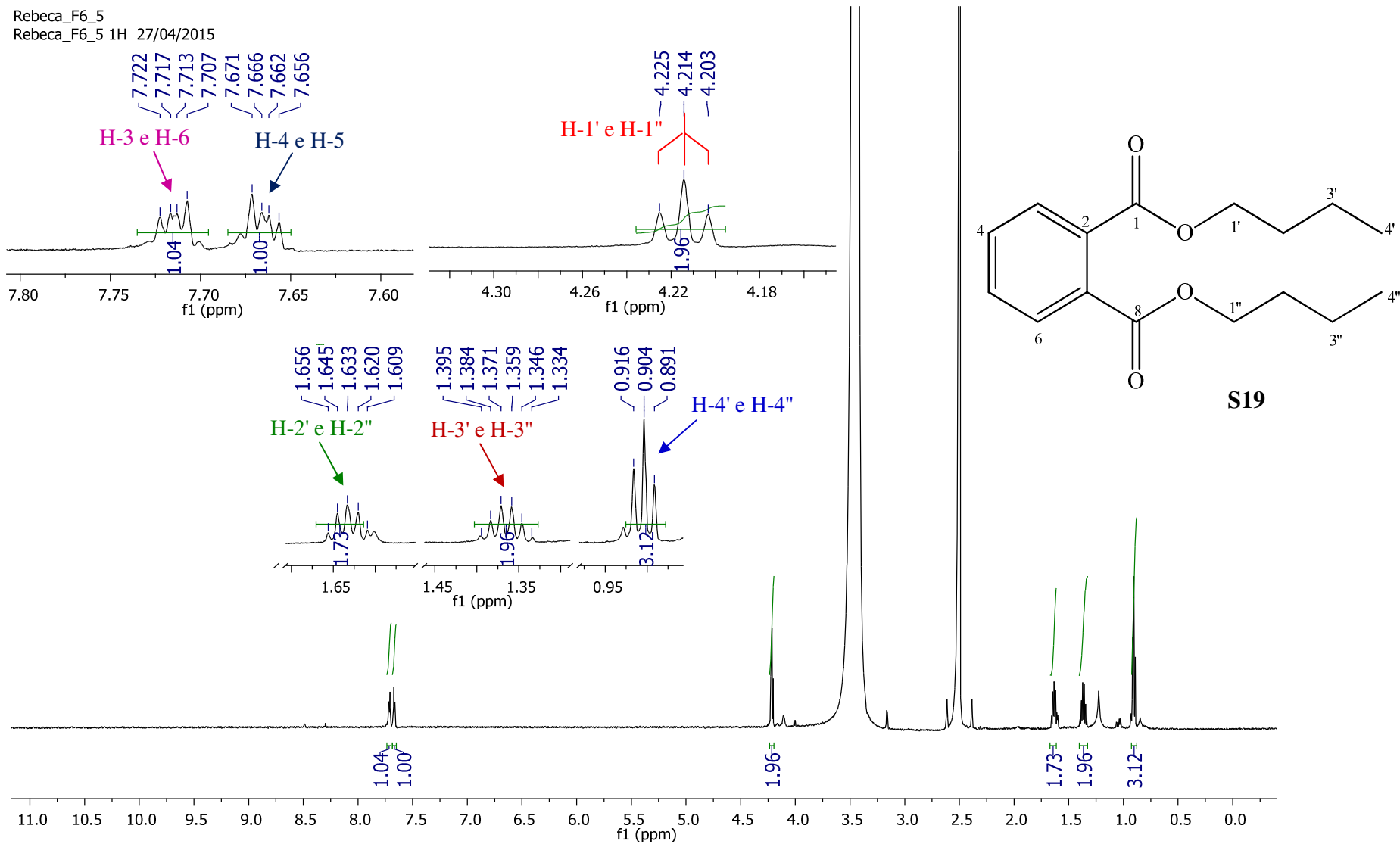
O mapa de contornos HMBC (**Figura 196**) mostrou as correlações entre H-1'/H-1'' e C-1/C-8 (δ_C 167,2) e, ainda, do sinal de H-4'/H-4'' com os sinais de C-2'/C-2'' e de C-3'/C-3''.

Figura 193 - Espectro de Massas de alta resolução de **S19** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

Figura 194 - Espectro de RMN de ^1H de **S19** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 195 - Mapa de contornos HSQC de **S19** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

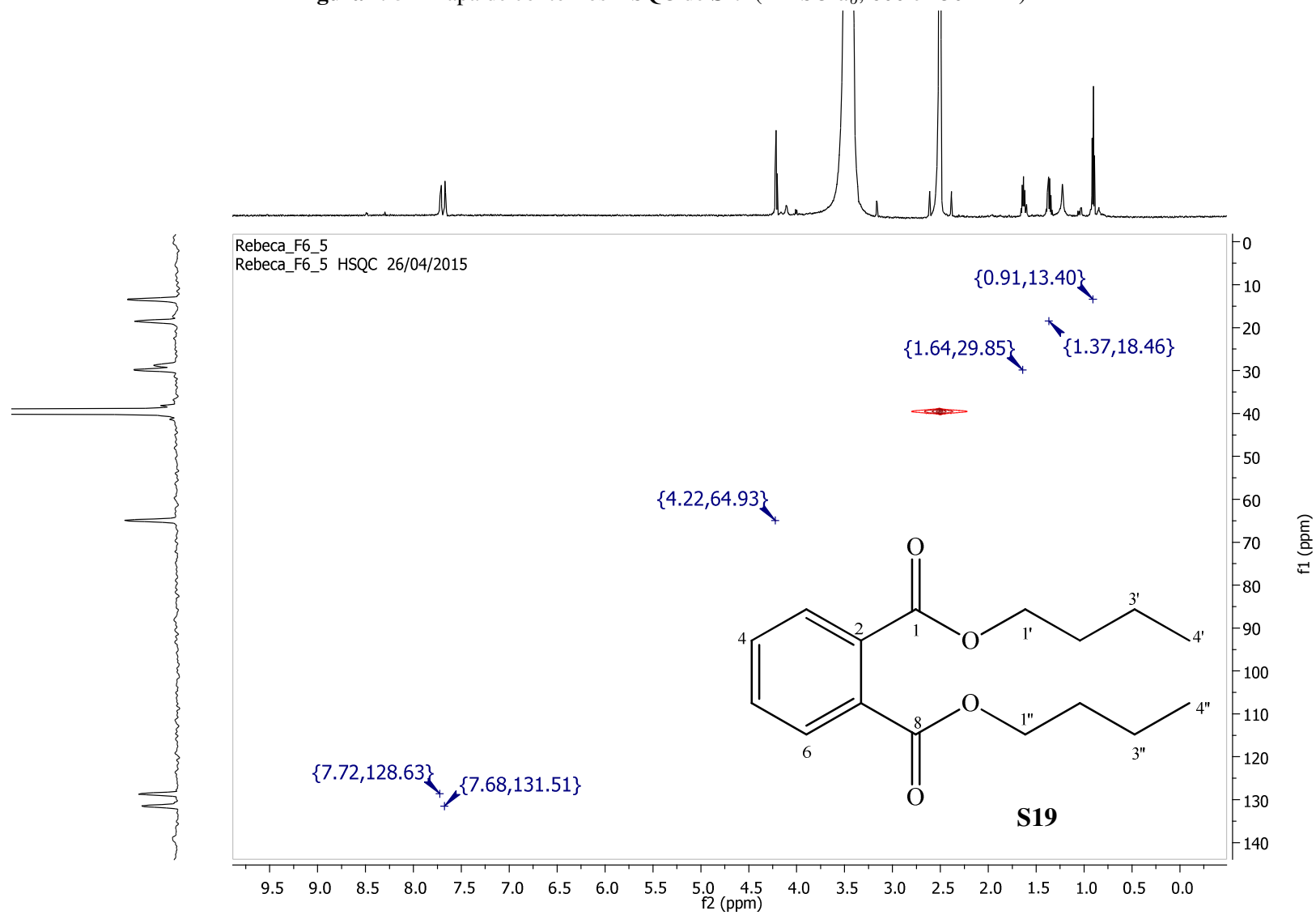
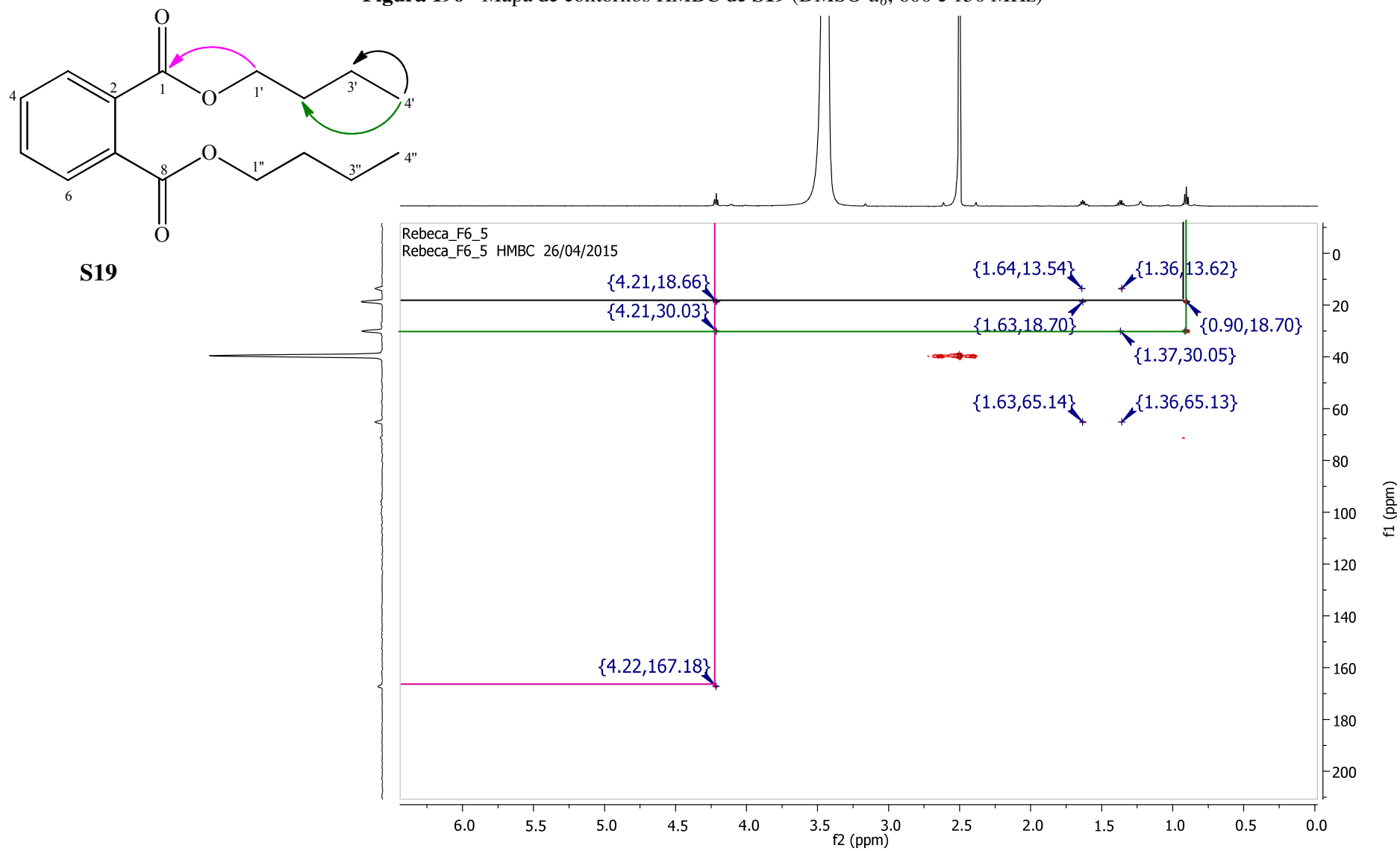


Figura 196 - Mapa de contornos HMBC de **S19** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para **S18**, **S19** e a comparação com o ftalato de dibutila descrito na literatura (HOANG et al., 2008) estão mostrados na **Tabela 52**.

Tabela 52 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S18**, **S19** e para o ftalato de dibutila.

S18^a			S19^a		Ftalato de dibutila^b	
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1 e 8		167,2	-	167,2	-	166,4
2 e 7		N/O [*]	-	N/O [*]	-	131,7
3 e 6	7,73 (m)	128,7	7,71 (m)	128,6	7,47 (dd; 2,6; 9,2)	127,9
4 e 5	7,67 (m)	131,6	7,66 (m)	131,5	7,25 (dd; 2,6; 8,8)	130,0
1' e 1''	4,00 (d; 6,6)	71,0	4,21 (t; 6,6)	64,9	4,06 (t; 6,6)	64,3
2' e 2''	1,95 (m)	27,1	1,64 (qui; 6,6)	29,9	1,45 (tt; 6,6; 8,3)	29,7
3' e 3''			1,37 (sex; 7,2)	18,5	1,19 (q; 7,5)	18,4
4' e 4''	0,92 (d; 7,2)	18,7	0,90 (t; 7,2)	13,4	0,70 (t; 7,5)	12,7

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO- d_6 ; ^b δ -ppm; 400 e 100 MHz; CDCl₃ (HOANG et al., 2008).

Fonte: o autor.

4.2.8.4 Elucidação estrutural de **S20** e **S21**

A substância **S20** (1,4 mg) foi obtida como um óleo incolor. Após as análises dos dados de RMN e de Espectrometria de Massas, **S20** foi identificada como o ftalato de isobutil-isopentila.

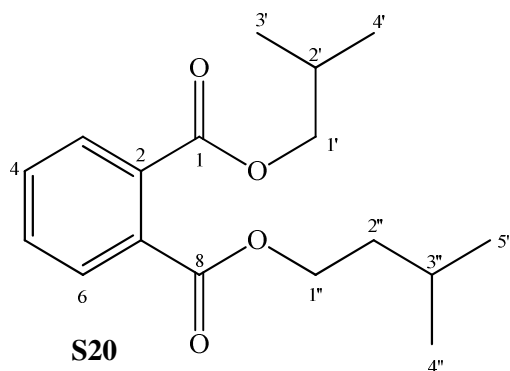
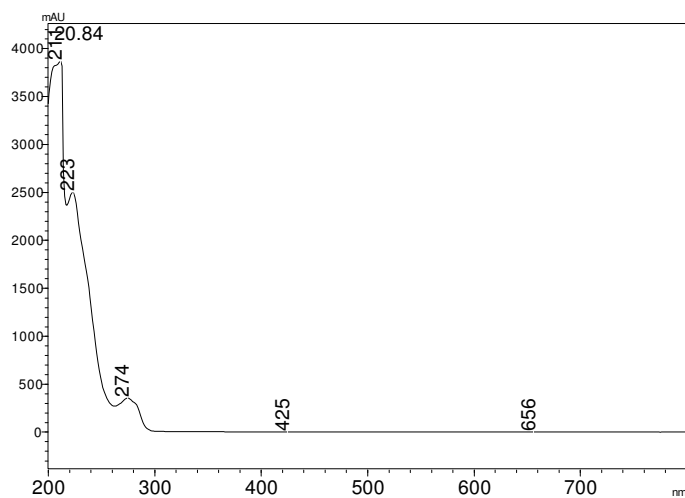
Seu espectro no UV-Vis (**Figura 197**) apresentou bandas de absorção com máximos em 274, 223 e 211 nm. Sua fórmula molecular, C₁₇H₂₄O₄, foi determinada a partir do espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 198**), que mostrou o pico base em m/z 315,1568, referente ao íon [M+Na]⁺ (calculado 315,1572 - erro de 1,3 ppm).

De acordo com os valores das integrais e valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H (**Figura 199**) e no mapa de contornos HSQC (**Figura 200**), foi possível propor a estrutura de um ftalato misto, composto pelos grupos isobutila e isopentila. Foram observados os sinais em δ_{H} 7,71 (m; H-3/H-6; 2H) / δ_{C} 128,7 (C-3/C-6); δ_{H} 7,67 (m; H-4/H-5; 2H) / δ_{C} 131,6 (C-4/C-5); δ_{H} 4,24 (t; $J_{1''-2''} = 7,2$ Hz; H-1'') / δ_{C} 63,7 (C-1''); δ_{H} 4,00 (d; $J_{1'-2'} = 6,6$ Hz; H-1'; 2H) / δ_{C} 71,1 (C-1'); δ_{H} 1,96 (m; H-2'; 1H) / δ_{C} 27,1 (C-2'); δ_{H} 1,66 (m; H-3''; 1H) / δ_{C} 24,4 (C-3''); δ_{H} 1,55 (q; $J = 6,6$ Hz; H-2''; 2H) / δ_{C} 36,5 (C-2''); δ_{H} 0,92

(d; $J_{3'-2'} = 6,6$ Hz; H-3'/H-4'; 6H) / δ_C 18,8 (C-3'/C-4') e em δ_H 0,89 (d; $J_{4''-3''} = 6,6$ Hz; H-4''/H-5''; 6H) / δ_C 22,1 (C-4''/C-5'').

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 201**) entre H-1' e C-1/C-8 (δ_C 167,0), entre H-1'' e os sinais de C-1/C-8 e C-3'', entre o sinal de H-3'/H-4' e os sinais de C-1' e C-2' e, ainda, entre o sinal de H-4''/H-5'' e o sinal de C-2'' confirmaram a proposta de ftalato misto.

Figura 197 - Espectro no UV-Vis da substância **S20** (85,6% MeOH:14,4% H₂O).

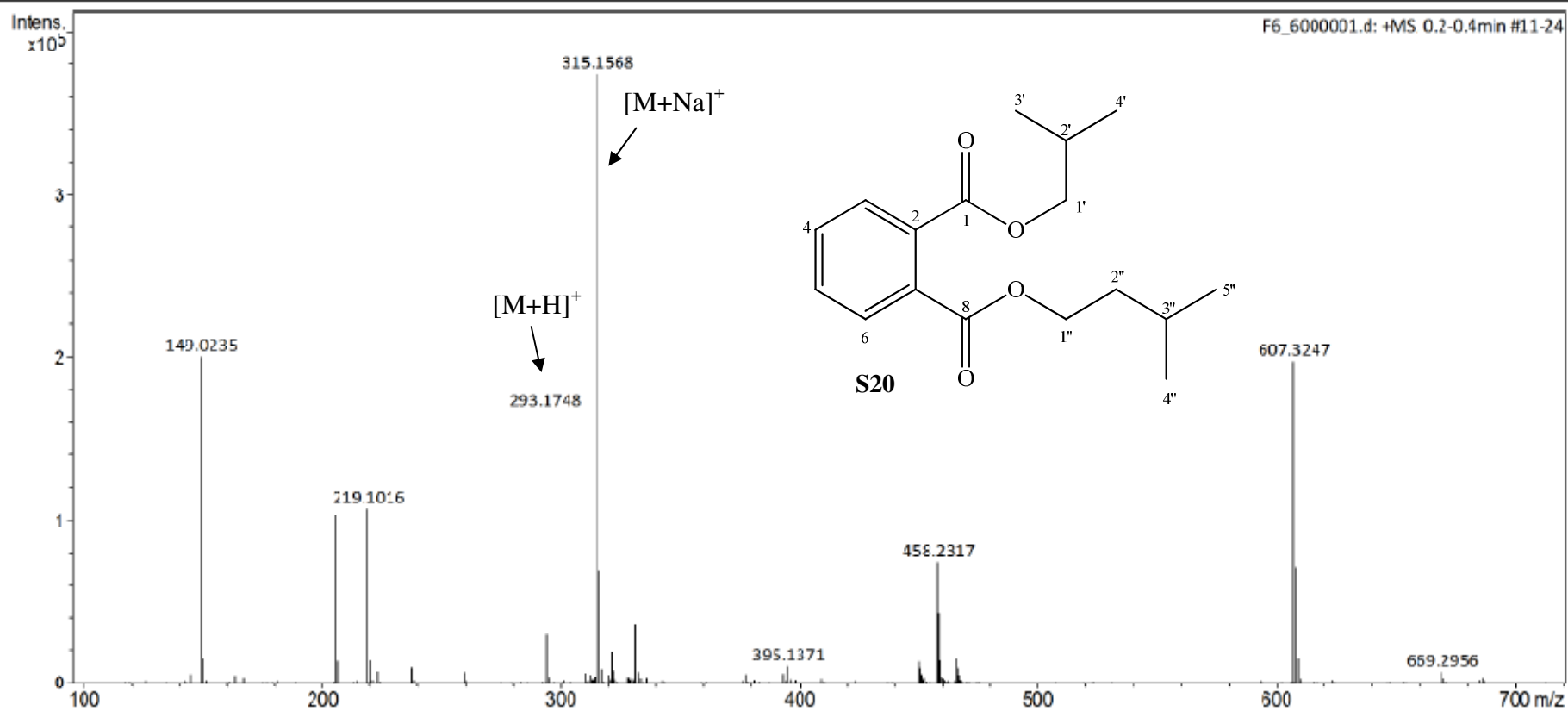


Fonte: o autor.

Figura 198 - Espectro de Massas de alta resolução de **S20** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	3000 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

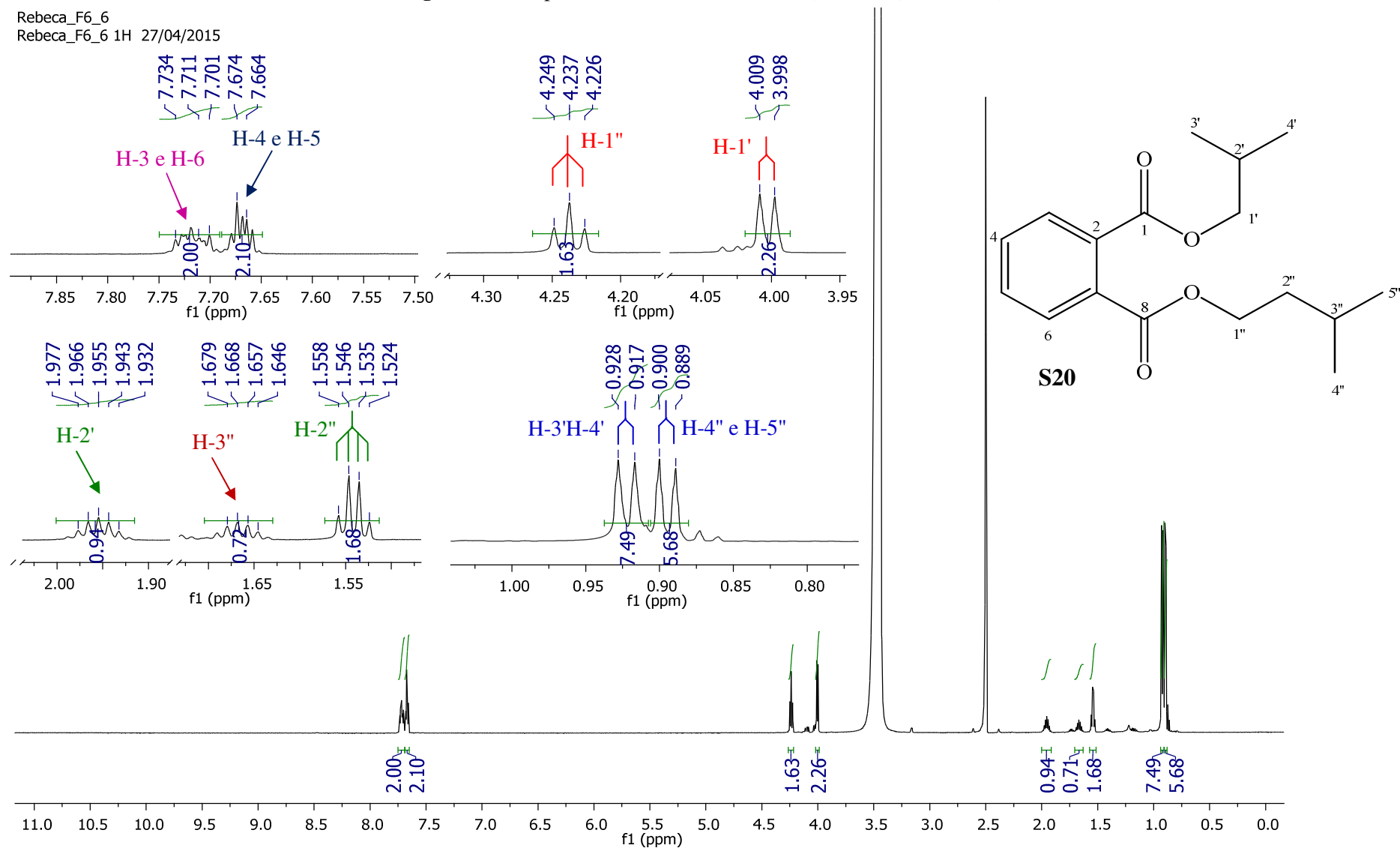


Fonte: o autor.

Figura 199 - Espectro de RMN de ^1H de **S20** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

Rebeca_F6_6

Rebeca_F6_6 1H 27/04/2015



Fonte: o autor.

Figura 200 - Mapa de contornos HSQC de **S20** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

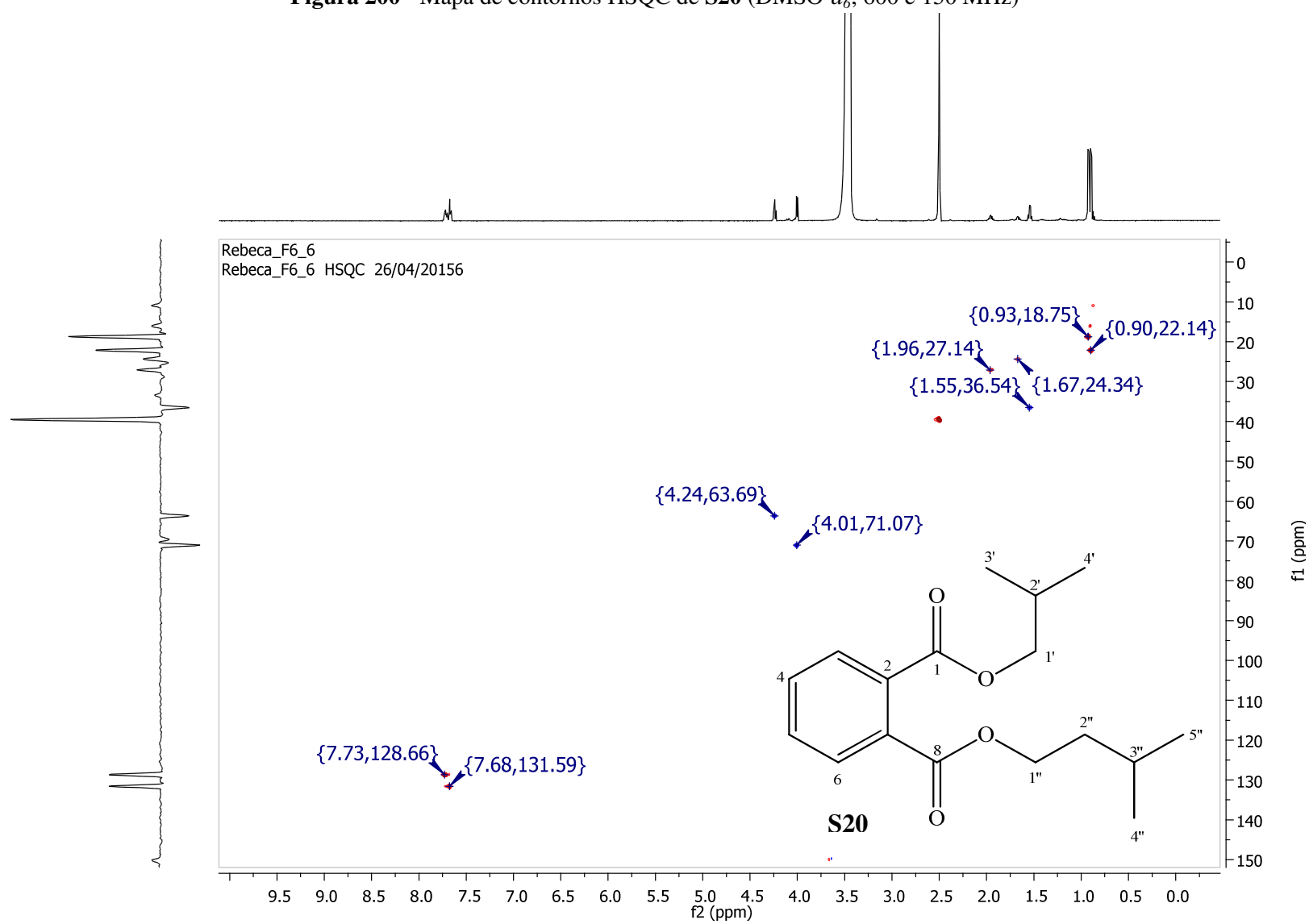
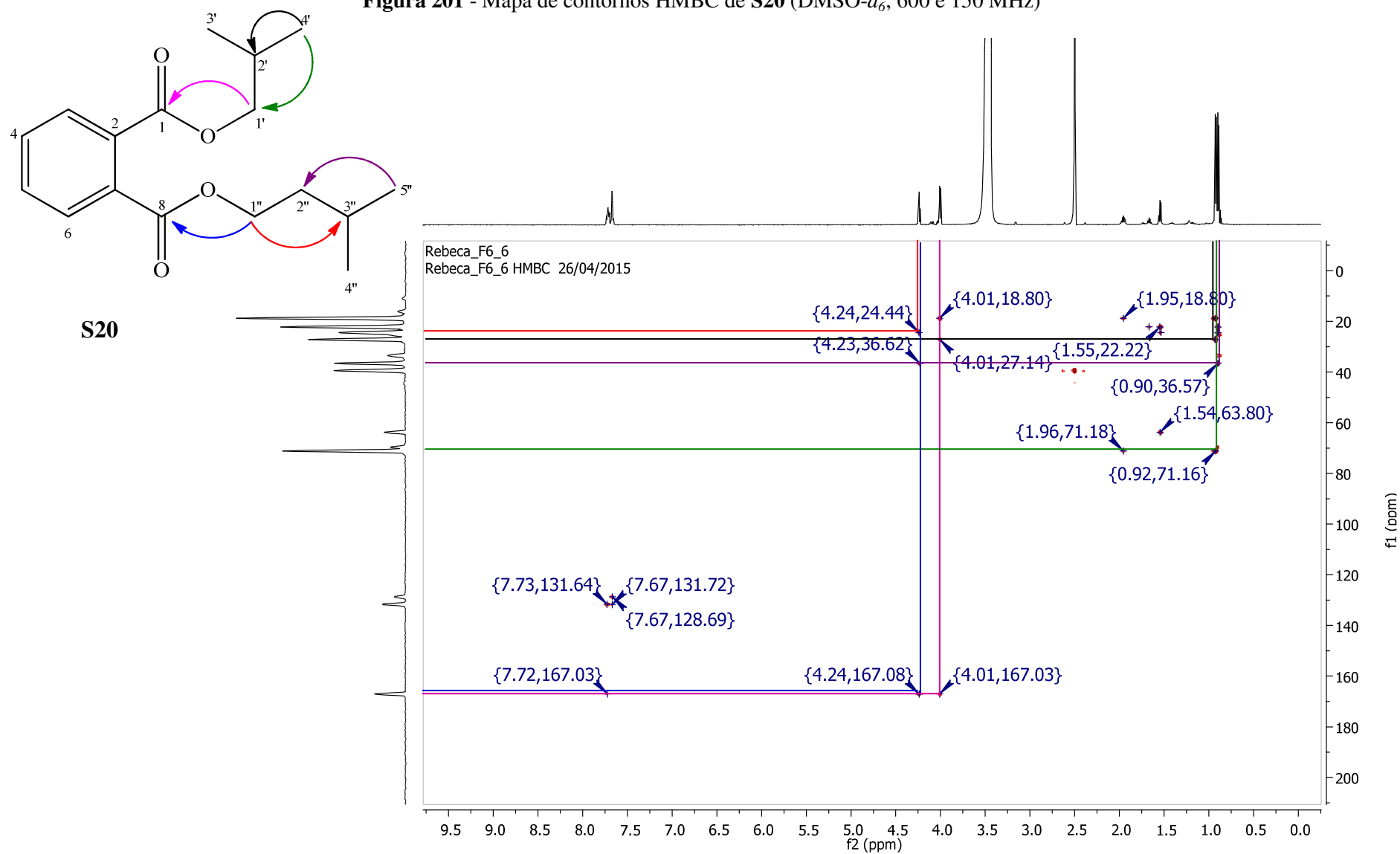


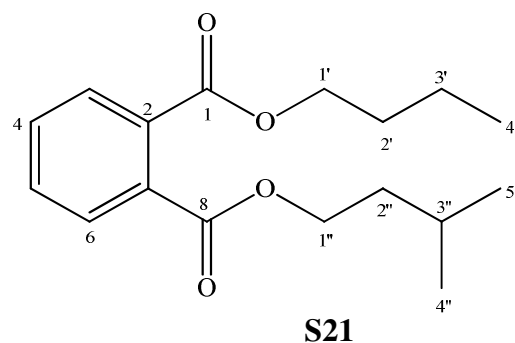
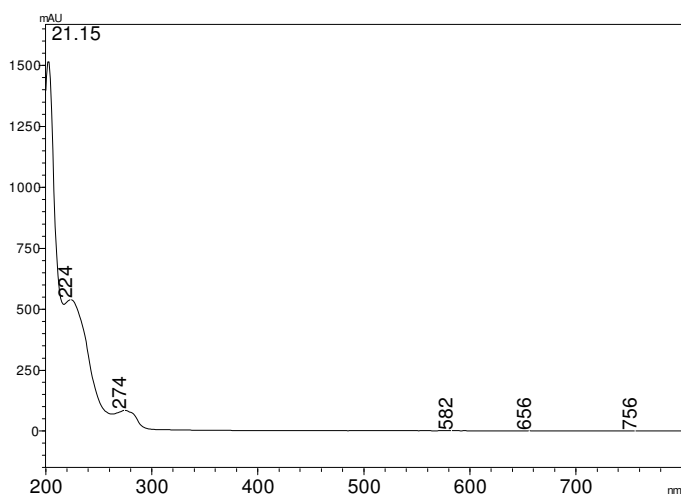
Figura 201 - Mapa de contornos HMBC de **S20** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

A substância **S21** (0,9 mg) apresentou um espectro no UV-Vis (**Figura 202**) similar ao espectro de **S20**, com bandas de absorção com máximos em 274, 224 e 211 nm. Seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 203**) mostrou-se idêntico ao espectro de **S20** (pico base em m/z 315,1568, referente ao íon $[M+Na]^+$).

Figura 202 - Espectro no UV-Vis da substância **S21** (85,9% MeOH:14,1% H₂O).



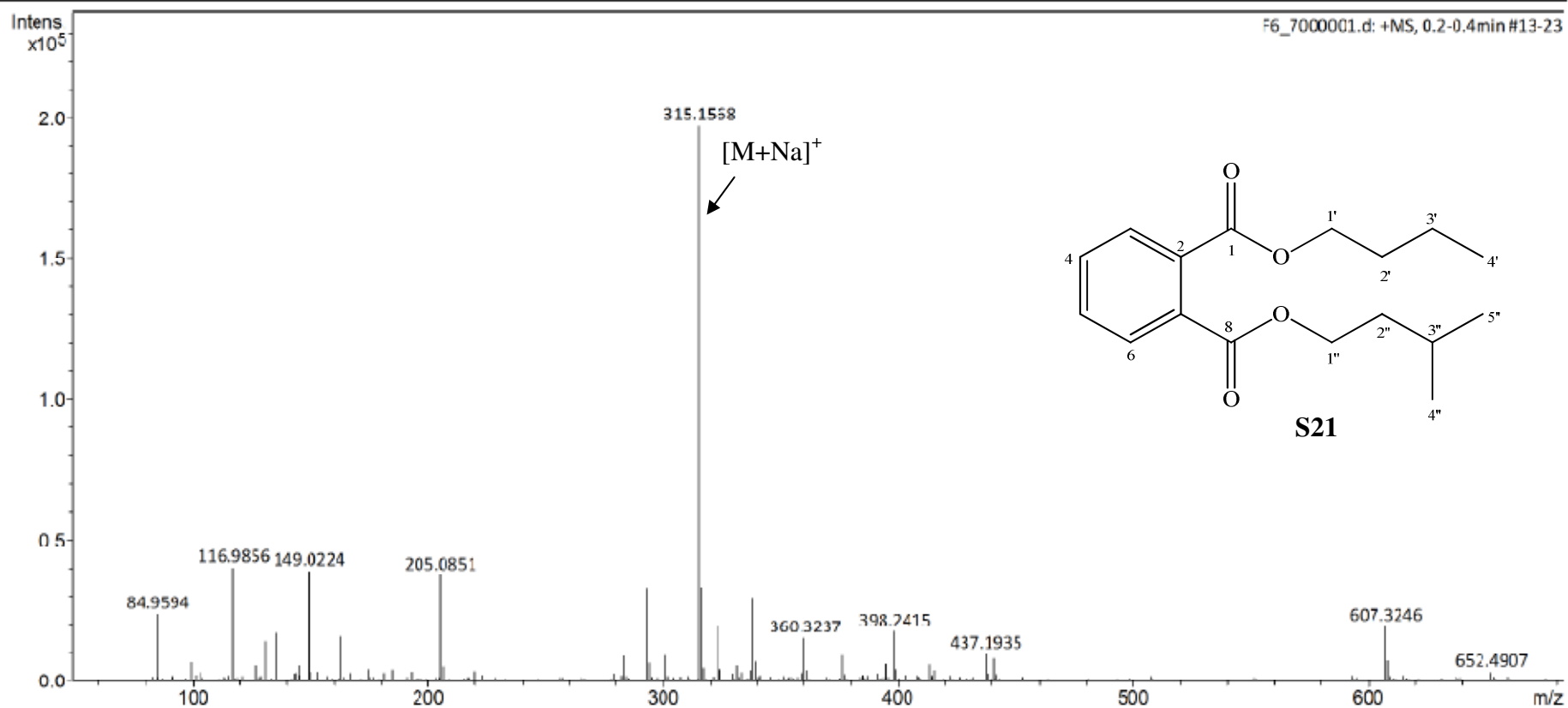
Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 204**) e mapa de contornos HSQC (**Figura 205**) de **S21** apresentaram valores de integrais e de deslocamentos químicos que indicaram também se tratar de um ftalato misto, no entanto, com sinais e correlações diferentes de **S20**, como em δ_{H} 4,21 (t; $J_{1'-2'} = 6,6$ Hz; H-1'; 2H) / δ_{C} 64,9 (C-1'); δ_{H} 1,63 (m; H-2'; 2H) / δ_{C} 29,9 (C-2') e em δ_{H} 1,37 (m; H-3'; 2H) / δ_{C} 18,5 (C-3'), que são característicos do grupo butila, como mostrado na substância **S19**.

O mapa de contornos HMBC (**Figura 206**) mostrou as correlações entre H-1' e C-1/C-8 (δ_{C} 167,1), entre H-1'' e os sinais de C-1/C-8 e C-3'', entre H-4' e C-2' e C-3' e, ainda, entre o sinal de H-4''/H-5'' e o sinal de C-2'', confirmando que **S21** é resultante da esterificação pelos grupos butila e isopentila.

Figura 203 - Espectro de Massas de alta resolução de **S21** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

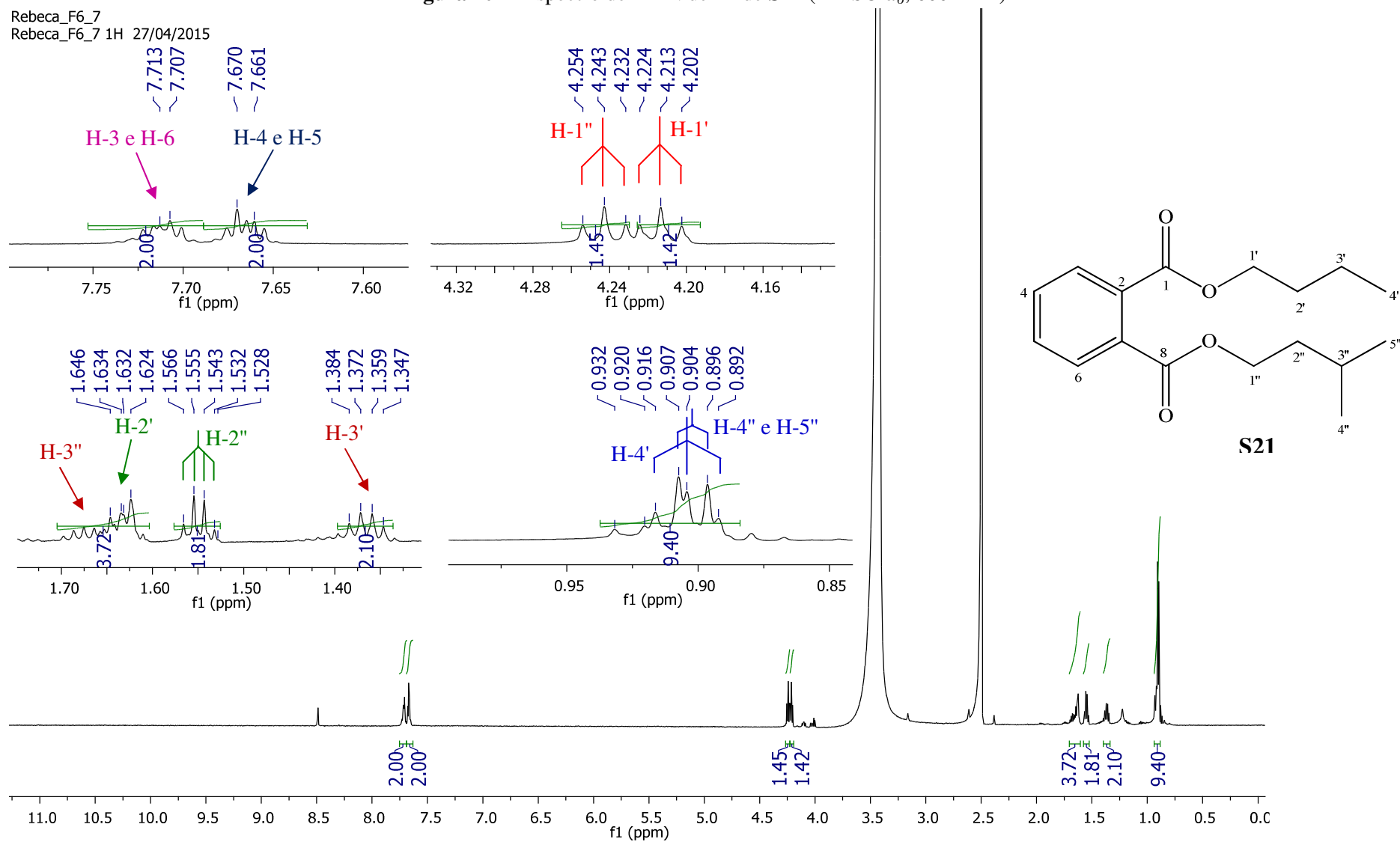
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



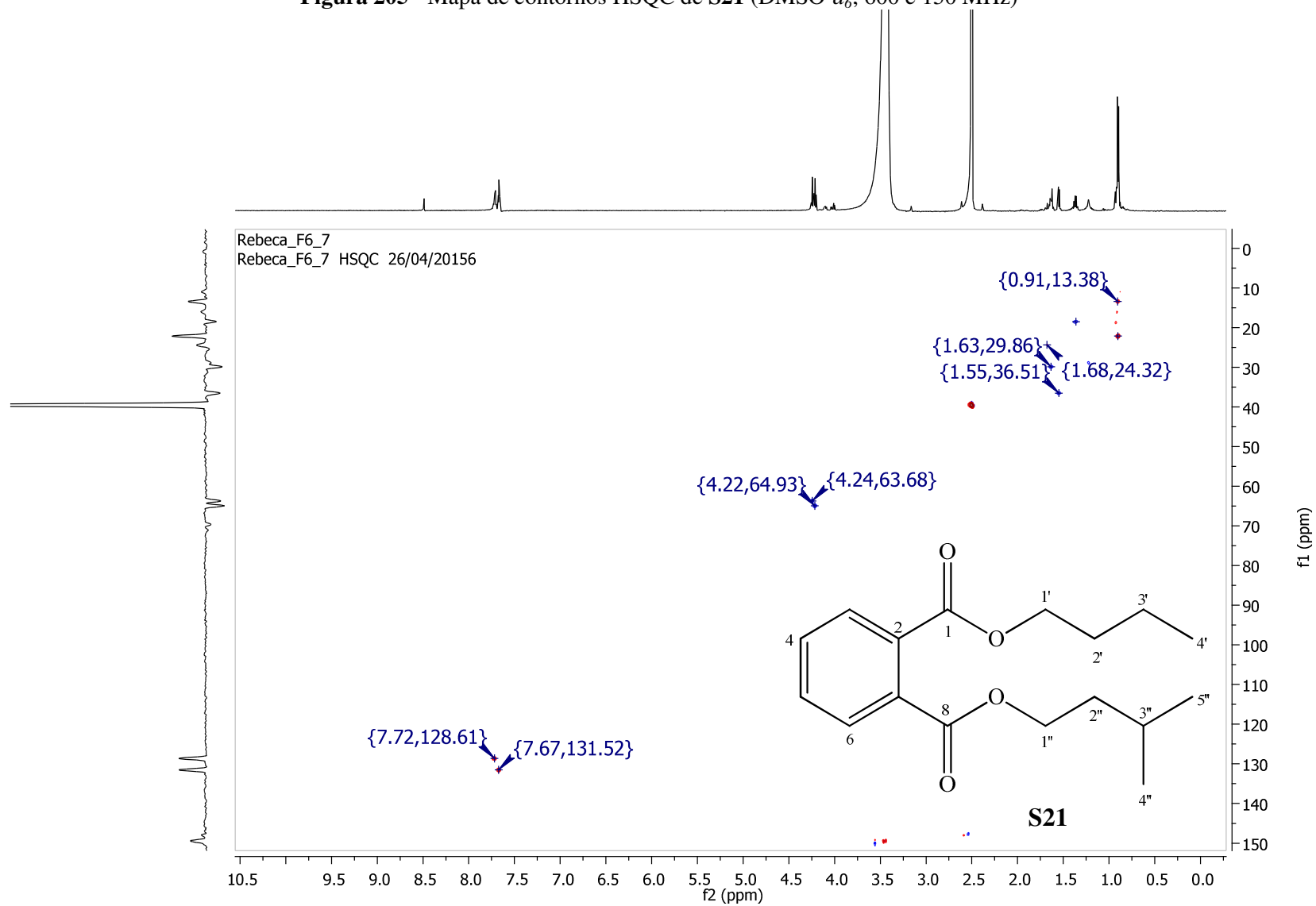
Fonte: o autor.

Figura 204 - Espectro de RMN de ^1H de **S21** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

Rebeca_F6_7
Rebeca_F6_7 1H 27/04/2015

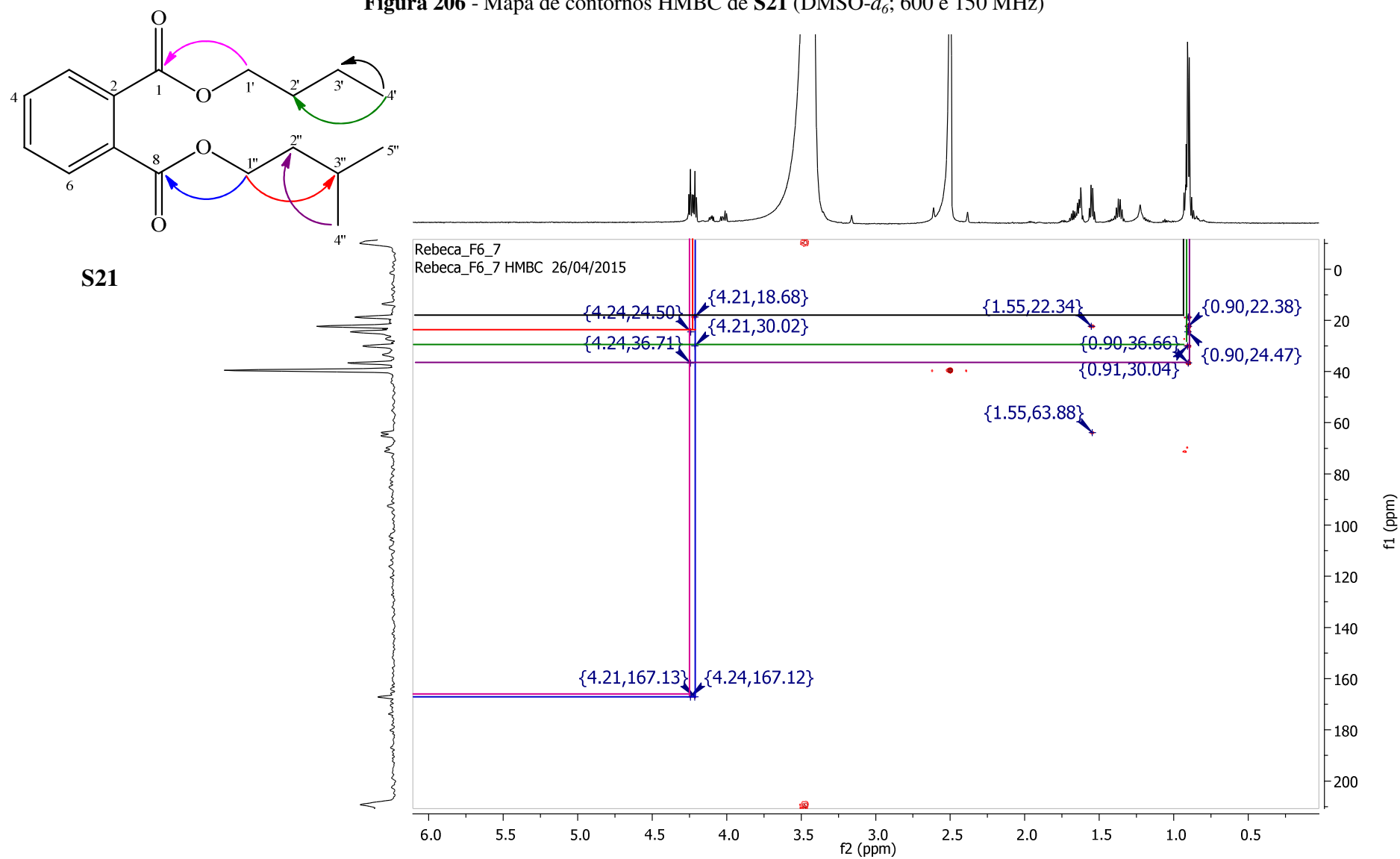


Fonte: o autor.

Figura 205 - Mapa de contornos HSQC de **S21** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 206 - Mapa de contornos HMBC de **S21** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para **S20** e **S21** estão descritos na **Tabela 53**.

Tabela 53 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S20** e **S21** (600 e 150 MHz; DMSO- d_6).

S20^a			S21^a	
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1 e 8		167,0		167,1
2 e 7		N/O *		N/O *
3 e 6	7,71 (m)	128,7	7,71 (m)	128,6
4 e 5	7,67 (m)	131,6	7,67 (m)	131,5
1'	4,00 (d; 6,6)	71,1	4,21 (t; 6,6)	64,9
2'	1,96 (m)	27,1	1,63 (m)	29,9
3'			1,37 (m)	18,5
4'	0,92 (d; 6,6)	18,8	0,90 (t; 7,2)	13,4
1''	4,24 (t; 7,2)	63,7	4,23 (t; 6,6)	63,7
2''	1,55 (q; 6,6)	36,5	1,55 (q; 6,6)	36,5
3''	1,66 (m)	24,4	1,67 (m)	24,3
4''				
5''	0,89 (d; 6,6)	22,1	0,90 (d; 6,6)	22,1

Fonte: o autor.

4.2.8.5 Elucidação estrutural de **S22** e **S23**

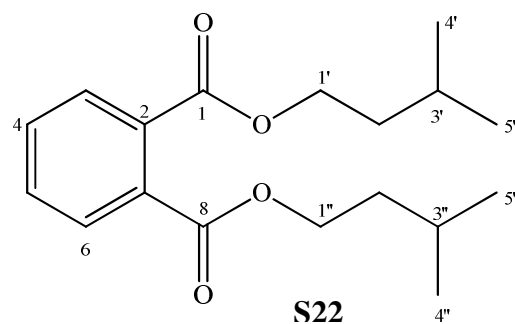
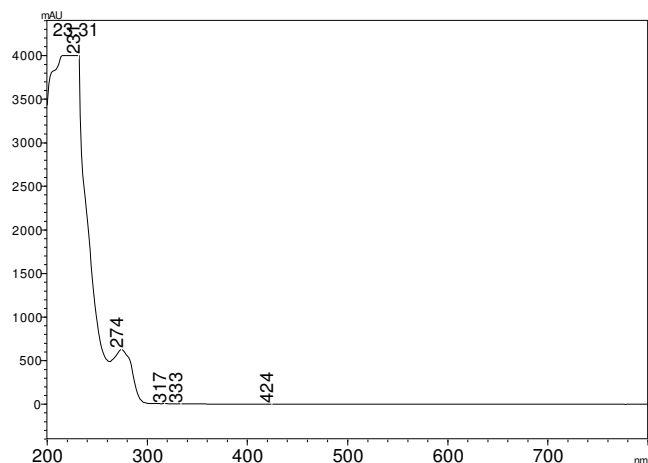
A substância **S22** (2,4 mg) foi obtida como um óleo incolor. Após as análises dos dados de Espectrometria de Massas e de RMN, **S22** foi identificada como o ftalato de diisopentila.

Seu espectro no UV-Vis (**Figura 207**) apresentou bandas de absorção com máximos em 274 e 231 nm. Sua fórmula molecular foi determinada como $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4$, já que seu espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI-Q-TOF) (**Figura 208**) mostrou um pico em m/z 307,1902, referente ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado 307,1909 - erro de 2,3 ppm).

Seu espectro de RMN de ^1H (**Figura 209**) e o mapa de contornos HSQC (**Figura 210**) mostraram sinais similares aos observados anteriormente para a unidade isopentila nas substâncias **S20** e **S22**, porém os valores das integrais no espectro de RMN de ^1H , bem como o espectro de massas, indicaram se tratar de duas unidades isopentila.

O mapa de contornos HMBC (**Figura 211**) mostrou as correlações entre H-1'/H-1'' e os sinais de C-1/C-8 (δ_C 167,2) e C-3'/C-3'', entre o sinal de H-4'/H-4''/H-5'/H-5'' e os sinais de C-2'/C-2'' e de C-4'/C-4''/C-5'/C-5''.

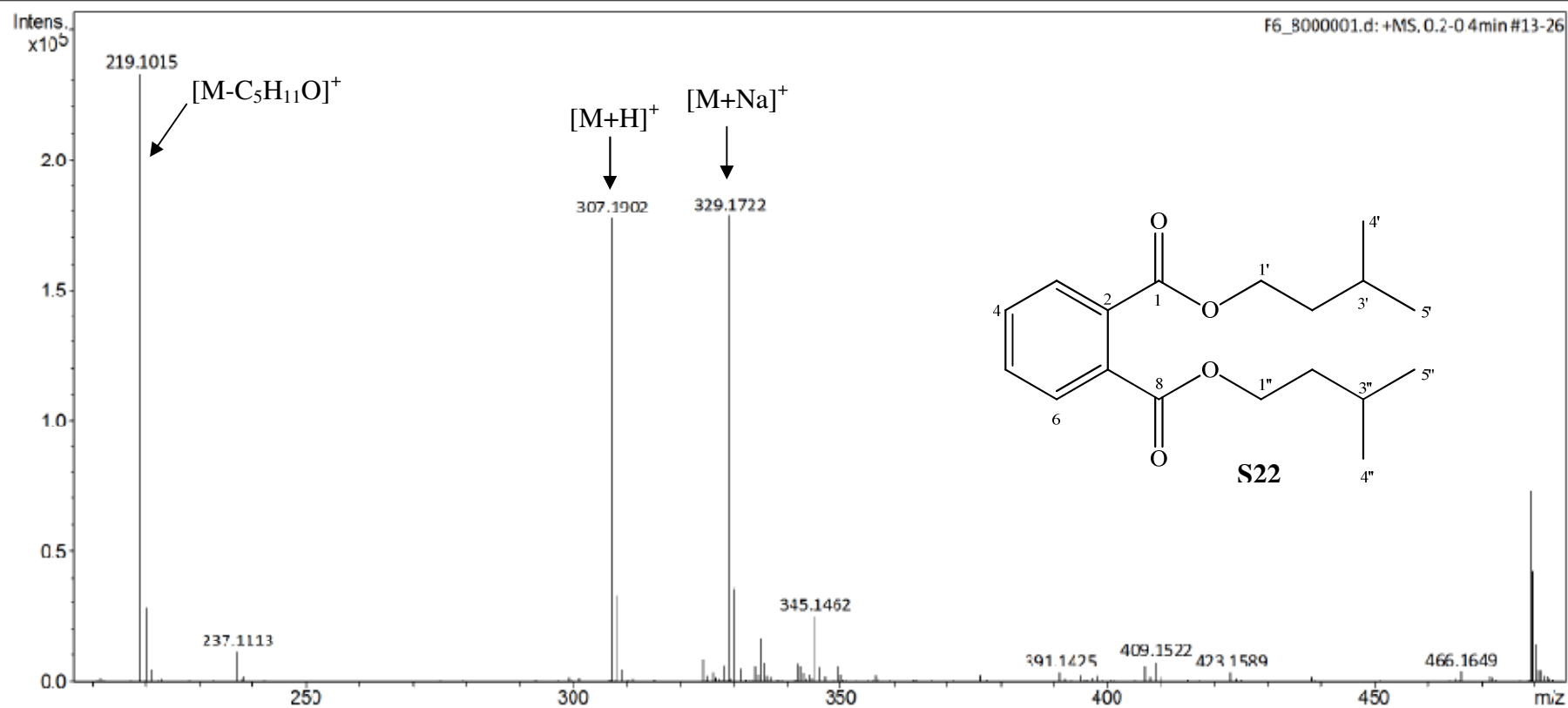
Figura 207 - Espectro no UV-Vis da substância **S22** (87,5% MeOH:12,5% H₂O).



Fonte: o autor.

Figura 208 - Espectro de Massas de alta resolução de **S22** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	3000 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

Figura 209 - Espectro de RMN de ^1H de S22 (DMSO- d_6 ; 600 MHz)

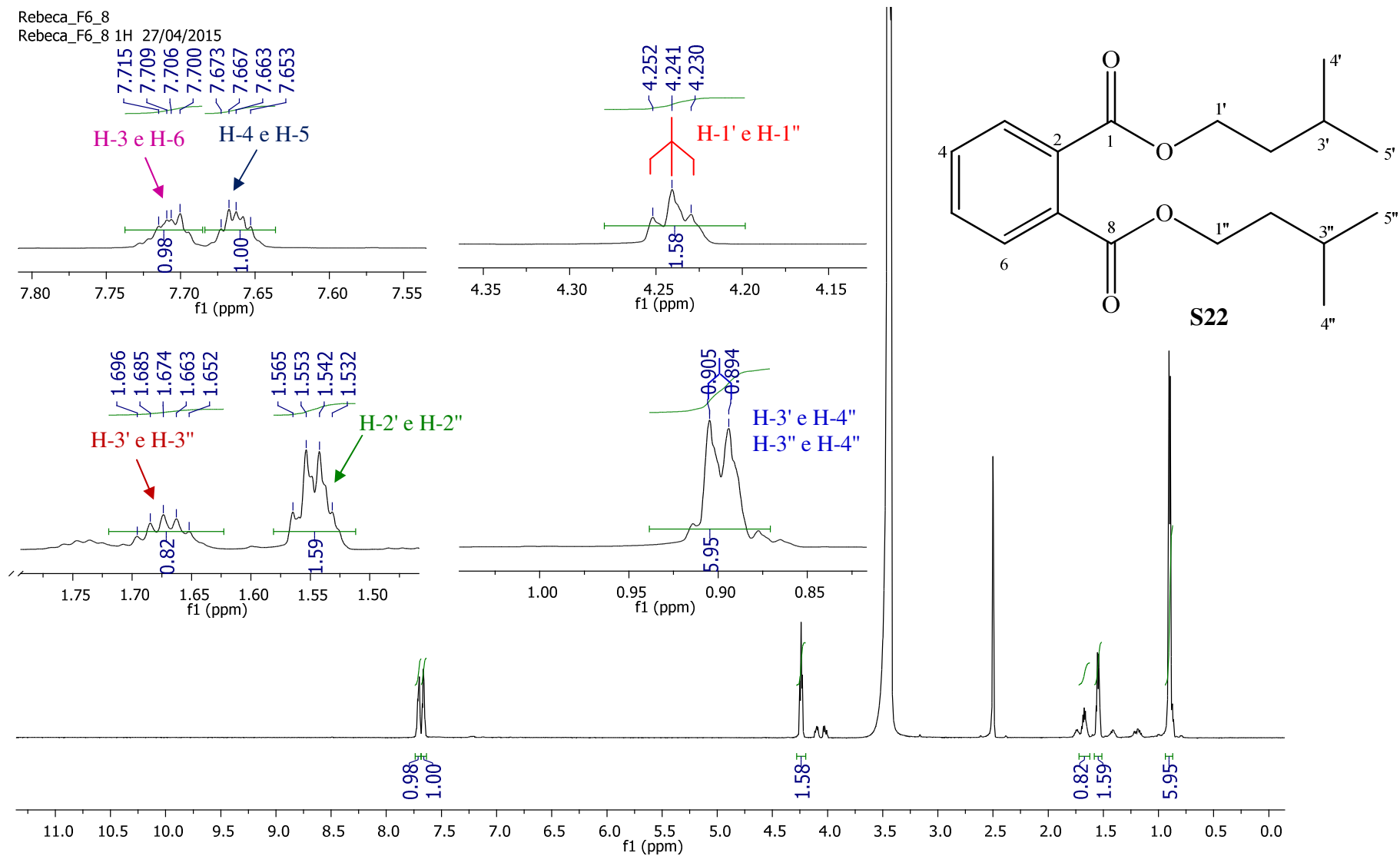


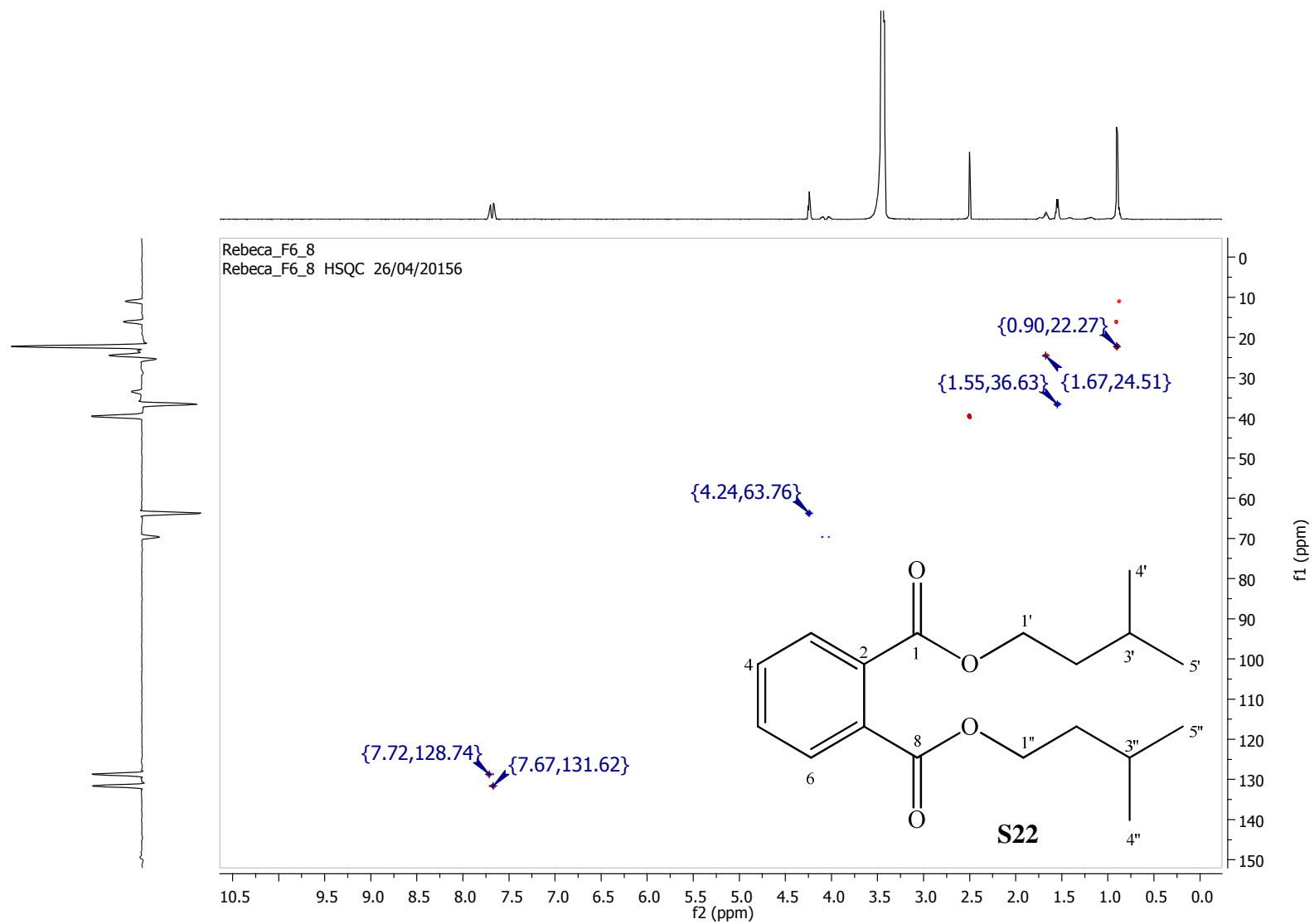
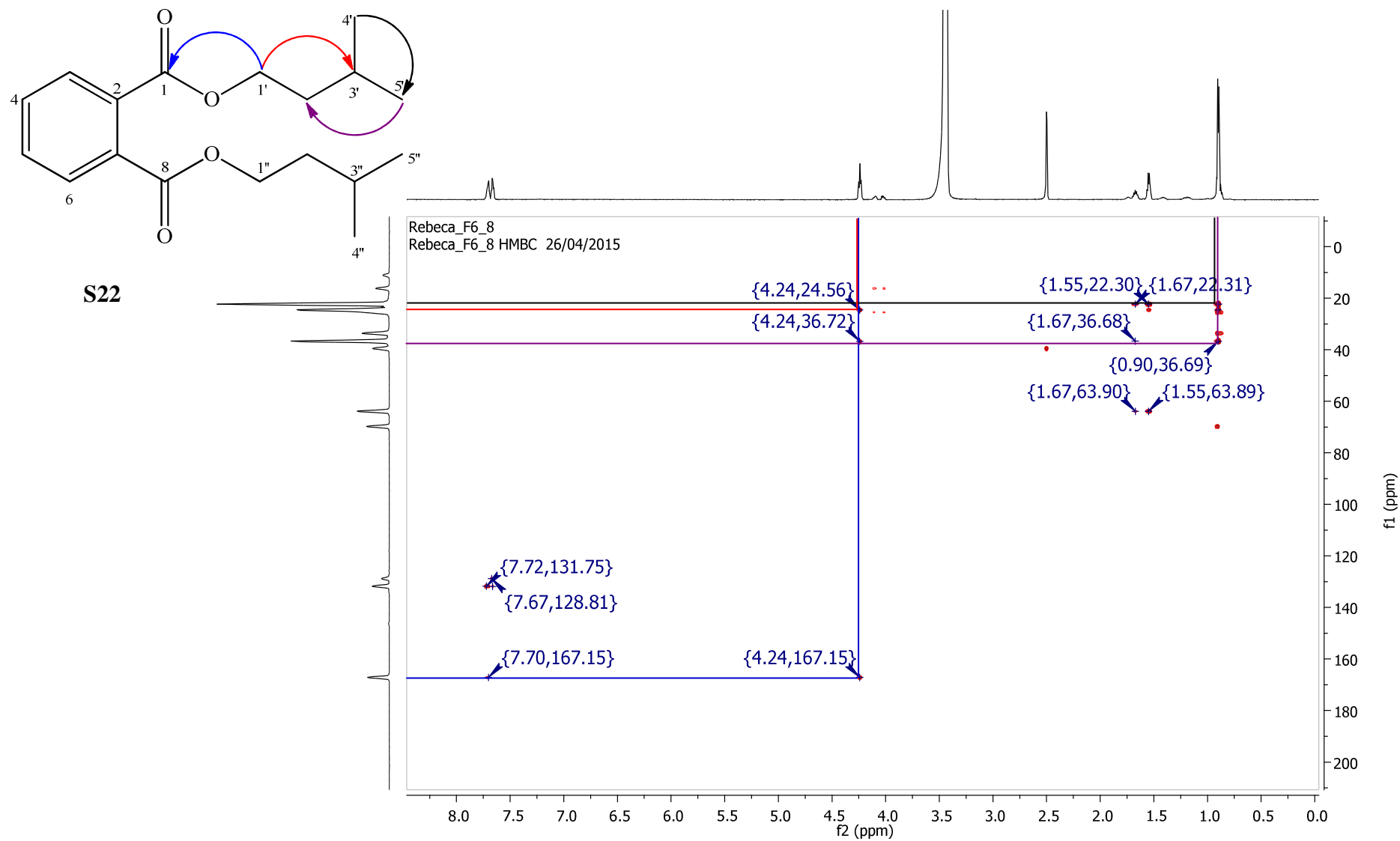
Figura 210 - Mapa de contornos de **S22** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)**Fonte:** o autor.

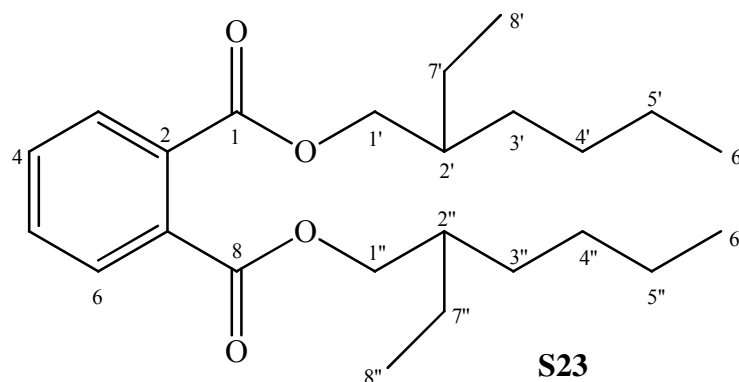
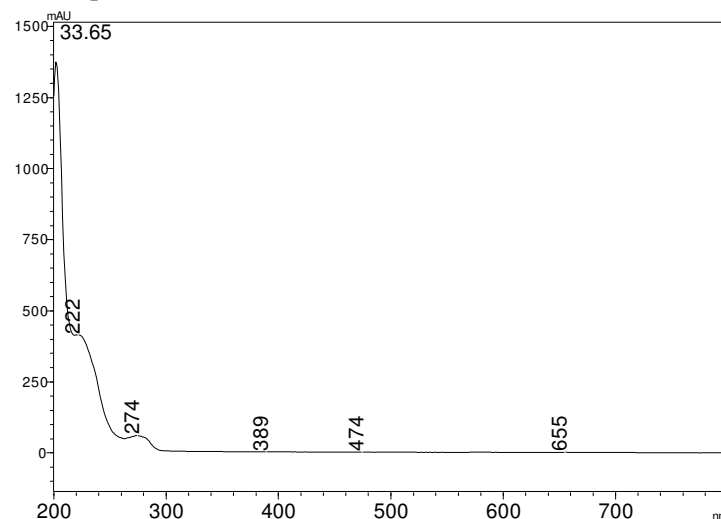
Figura 211 - Mapa de contornos HMBC de **S22** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

A substância **S23** (1,2 mg) foi identificada como o ftalato de bis-(2-etil-hexila). Seu espectro no UV-Vis (**Figura 212**) apresentou bandas de absorção com máximos em 274 e 222 nm.

Figura 212 - Espectro no UV-Vis da substância **S23** (95,3% MeOH:4,7% H₂O).



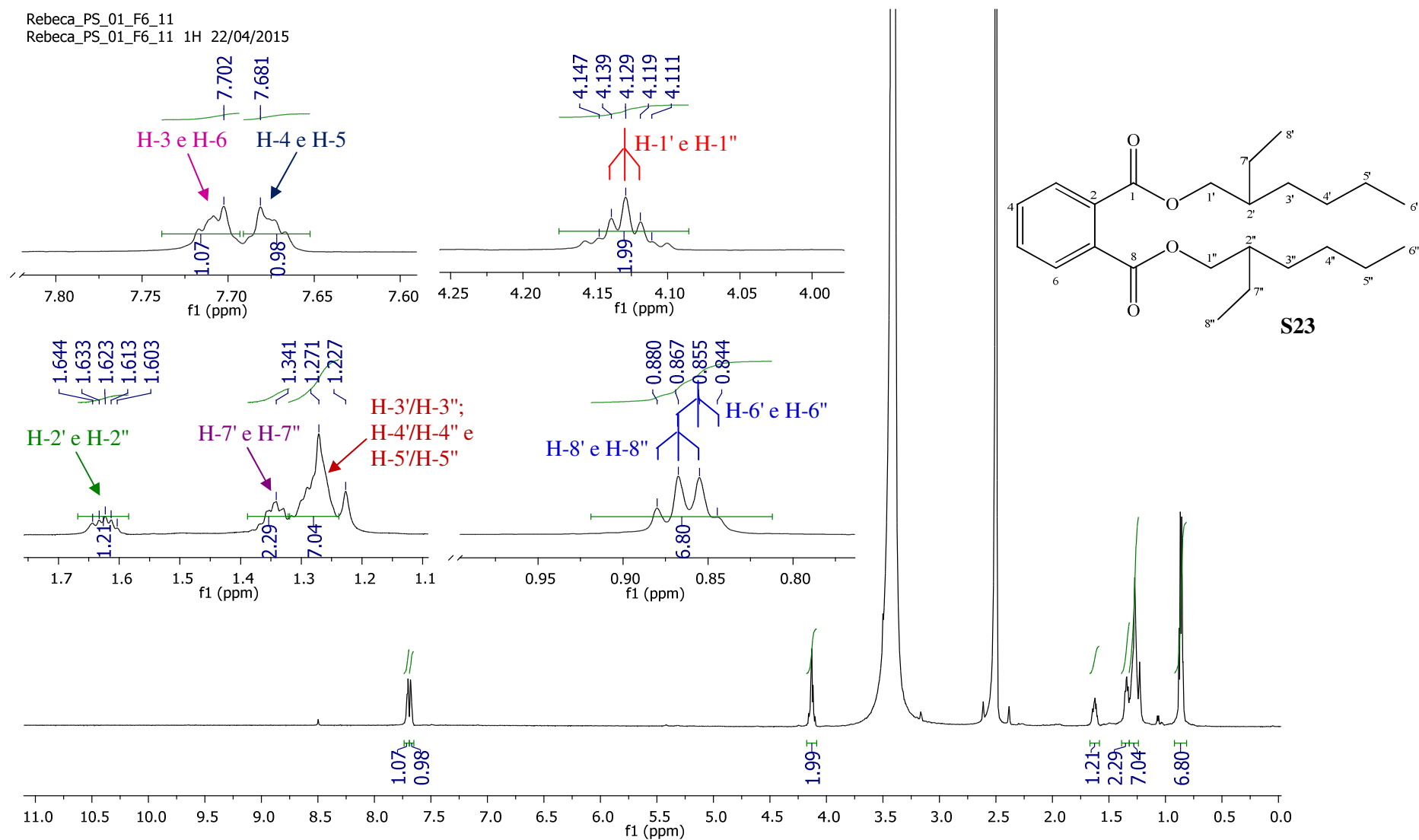
A partir do seu espectro de RMN de ¹H (**Figura 213**) e do mapa de contornos HSQC (**Figura 214**) foi possível verificar os sinais e correlações em δ_H 7,71 (m; H-3/H-6; 2H) / δ_C 128,6 (C-3/C-6); δ_H 7,68 (m; H-4/H-5; 2H) / δ_C 131,6 (C-4/C-5); δ_H 4,13 (t; $J_{1'-2'} = 6,6$ Hz; H-1'/H-1''; 4H) / δ_C 67,3 (C-1'/C-1''); δ_H 1,62 (m; H-2'/H-2''; 2H) / δ_C 37,9 (C-2'/C-2''); δ_H 1,35 (m; H-7'/H-7''; 4H) / δ_C 23,0 (C-7'/C-7'') δ_H 1,29 (m; H-3'/H-3''; 4H) / δ_C 29,6 (C-3'/C-3''); δ_H 1,27 (m; H-4'/H-4''; 4H) / δ_C 22,1 (C-4'/C-4''); δ_H 1,27 (m; H-5'/H-5''; 4H) / δ_C 28,3 (C-5'/C-5''); δ_H 0,87 (t; $J_{8'-7'} = 7,5$ Hz; H-8'/H-8''; 6H) / δ_C 10,6 (C-8'/C-8'') e em δ_H 0,86 (t; $J_{6'-5'} = 6,9$ Hz; H-6'/H-6''; 6H) / δ_C 13,7 (C-6'/C-6'').

O mapa de contornos HMBC (**Figura 215**) mostrou as correlações entre H-1'/H-1'' e C-1/C-8 (δ_C 167,2) bem como do sinal de H-4'/H-4'' com os sinais de C-2'/C-2'' e de C-3'/C-3''.

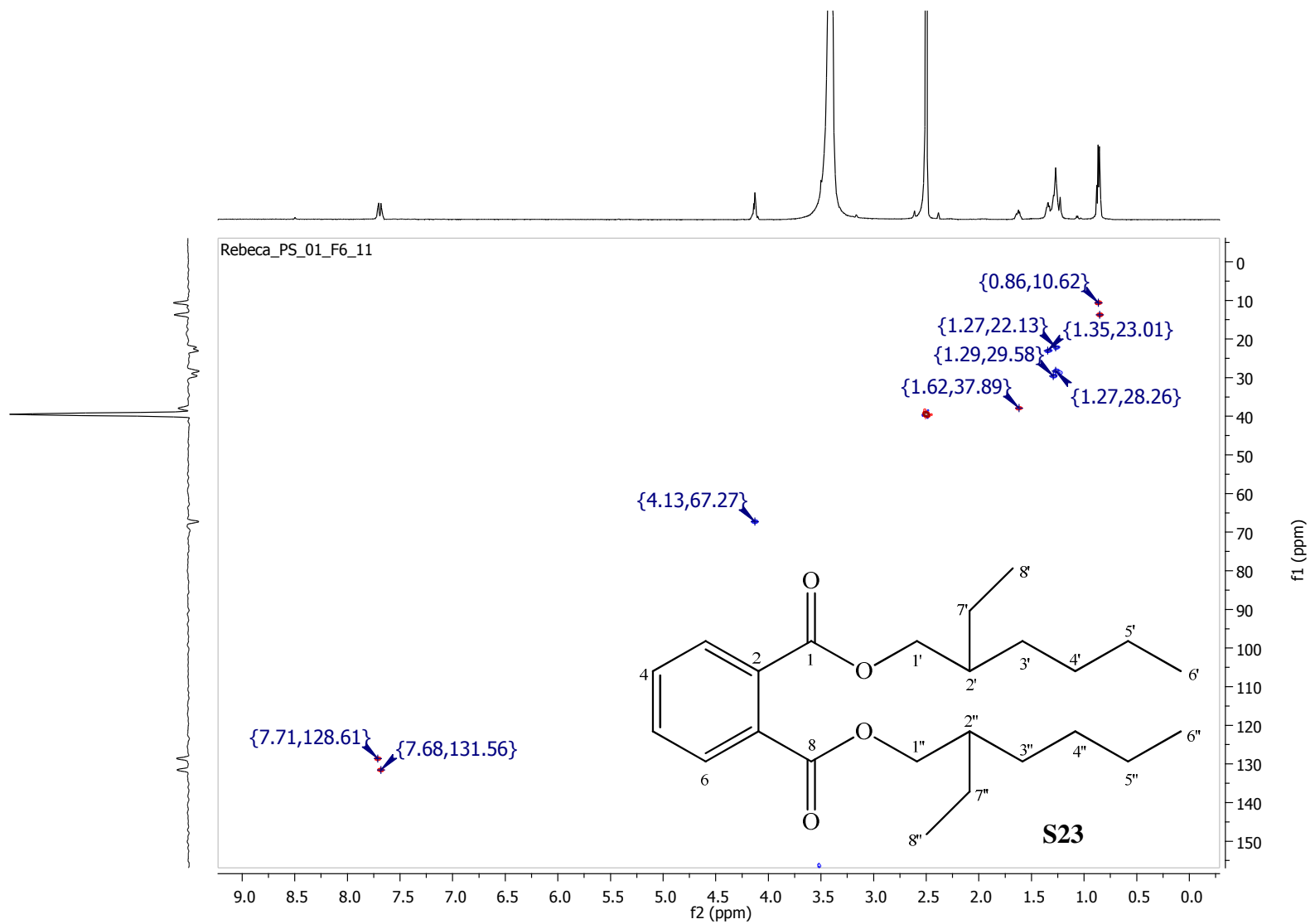
Figura 213 - Espectro de RMN de ^1H de **S23** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

Rebeca_PS_01_F6_11

Rebeca_PS_01_F6_11 1H 22/04/2015

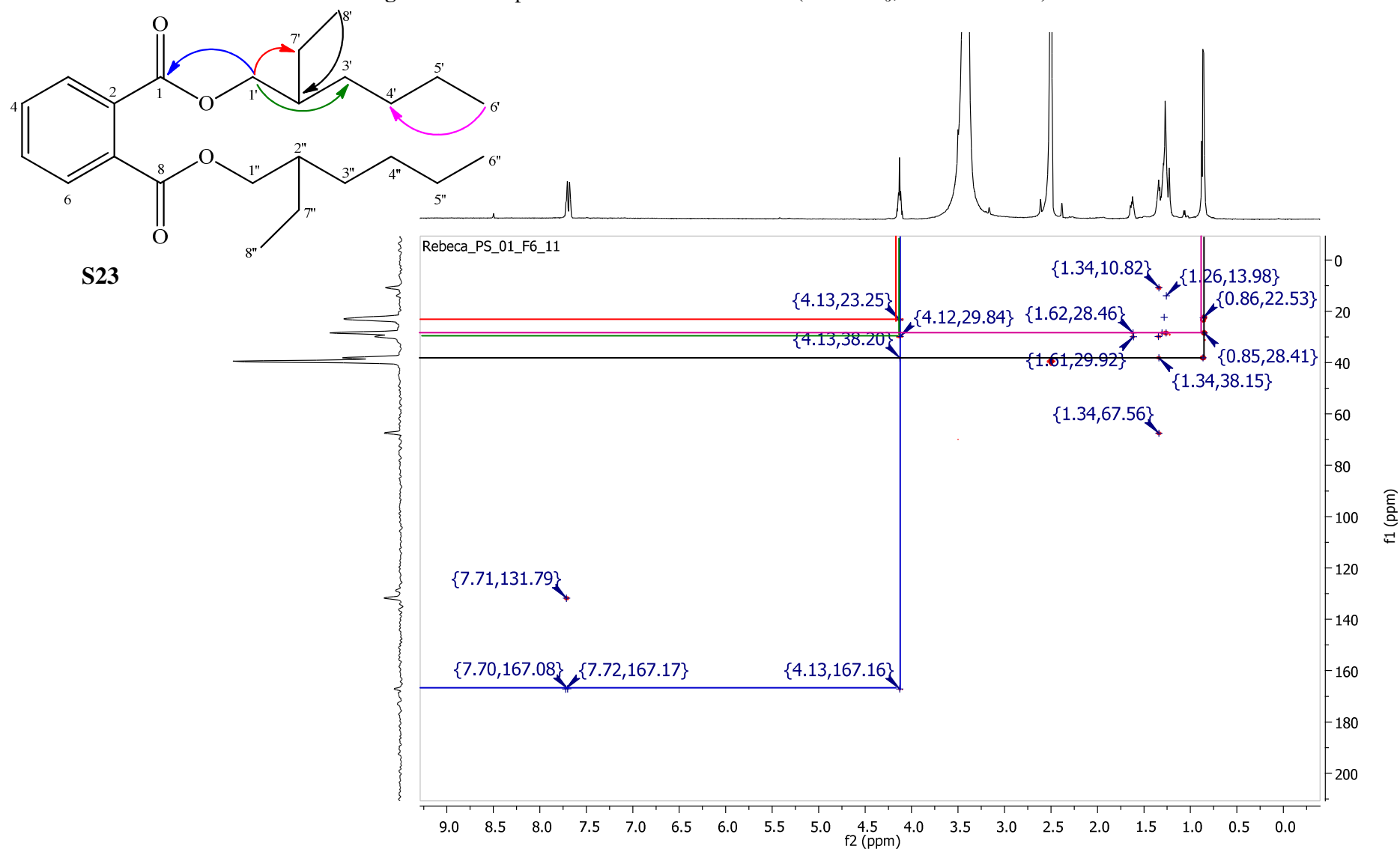


Fonte: o autor.

Figura 214 - Mapa de contornos HSQC de **S23** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 215 - Mapa de contornos HMBC de **S23** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para **S22**, **S23** e para o ftalato de bis-(2-etil-hexila) descritos na literatura (HOANG et al.; 2008) estão mostrados na **Tabela 54**.

Tabela 54 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S22**, **S23** e para ftalato de bis-(2-etil-hexila).

	S22^a		S23^a		Ftalato de bis-(2-etil-hexila)^b	
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1 e 8	-	167,2	-	167,1	-	167,5
2 e 7	-		-		-	132,3
3 e 6	7,71 (m)	128,7	7,71 (m)	128,6	7,67 (dd; 2,6; 9,2)	128,5
4 e 5	7,67 (m)	131,6	7,68 (m)	131,6	7,47 (dd; 2,2; 8,8)	130,7
1' e 1''	4,24 (t; 6,6)	63,8	4,13 (t; 6,6)	67,3	4,20 (t; 5,9)	67,8
2' e 2''	1,55 (m)	36,6	1,62 (m)	37,9	1,65 (m)	38,6
3' e 3''	1,67 (m)	24,5	1,29 (m)	29,6	1,28 (m)	30,2
4' e 4''	0,90 (d; 6,6)	22,3	1,27 (m)	28,3	1,28 (m)	28,7
5' e 5''			1,27 (m)	22,1	1,28 (m)	22,8
6' e 6''			0,86 (t; 6,9)	13,7	0,86 (m)	13,8
7' e 7''			1,35 (m)	23,0	1,39 (m)	23,6
8' e 8''			0,87 (t; 7,5)	10,6	0,90 (m)	10,7

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO- d_6 ; ^b δ -ppm; 400 e 100 MHz; CDCl_3 (HOANG et al., 2008)

Fonte: o autor.

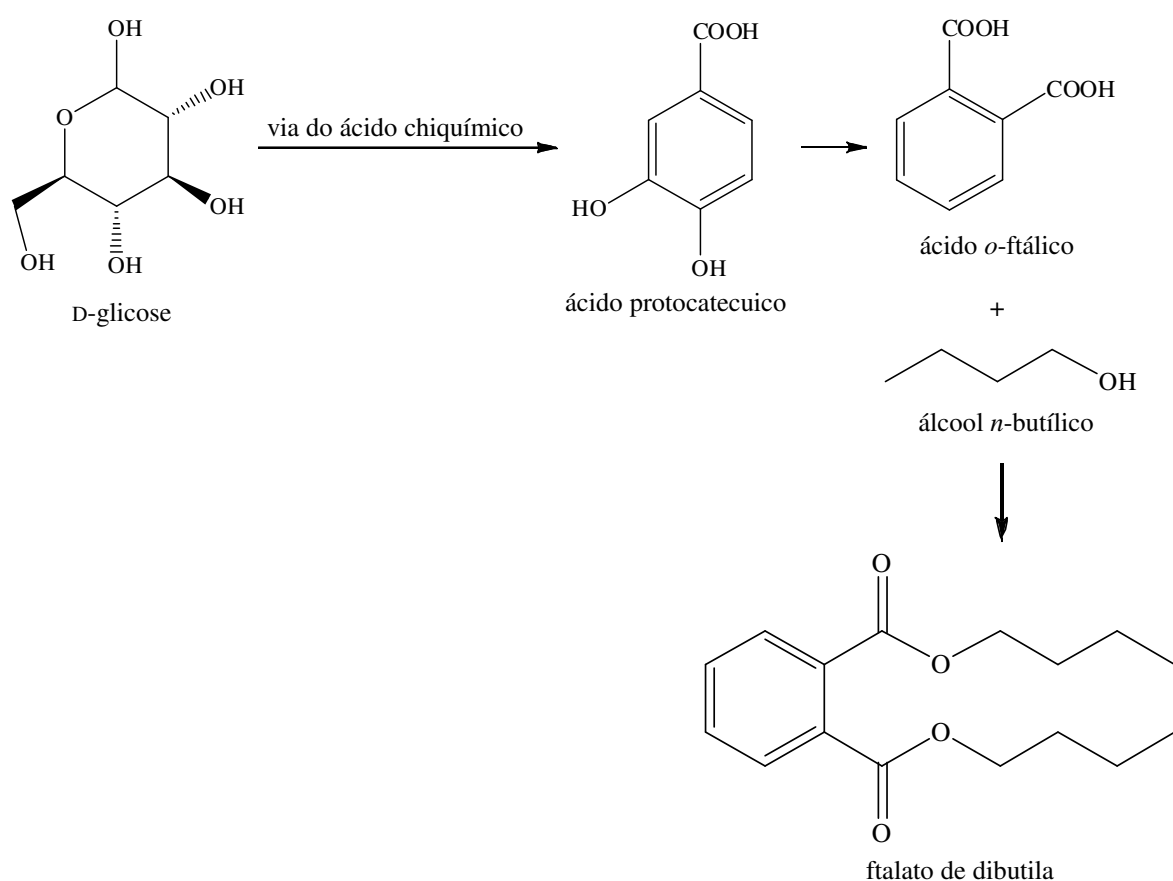
Os ftalatos são usados na indústria como aditivos em plásticos para melhorar a flexibilidade, como solventes na produção de tintas, colas e lubrificantes, ou ainda na produção de medicamentos, cosméticos ou pesticidas (ROSLEV et al., 2007). O ftalato de dibutila e o ftalato de bis-(2-etil-hexila) podem causar alterações no sistema reprodutor e no desenvolvimento em humanos por um distúrbio endócrino (FOSTER et al. 2001). São, portanto, classificados como poluentes, sendo determinadas algumas restrições quanto ao seu uso, principalmente na produção de brinquedos e cosméticos.

Alguns ftalatos já foram isolados de plantas, como de *Aloe vera* (LEE et al. 2000), de algas marinhas (NAMIKOSHI et al., 2006), da bactéria marinha *Pseudomonas* sp. (HOANG; LIB; KIMA, 2008) e do fungo marinho *Penicillium olsonii* (AMADE; MALLEA; BOUAÏCHA, 1994).

Apesar do seu extenso uso na indústria e de terem sido isolados de diversos organismos, não foram encontrados estudos, até mesmo estudos de determinação de ftalatos como contaminantes de efluentes, que relatassem os ftalatos de isobutil-isopentila (**S20**) e de butil-isopentila (**S21**), indicando assim que são inéditos na literatura.

Recentemente, Tian et al. (2016) mostraram que o ftalato de dibutila pode ser biossintetizado por culturas de fungos filamentosos, tanto em meio de água destilada como em meio de água natural coletada em três diferentes regiões na China, e que o mesmo é produzido a partir da glicose pela via do ácido chiquímico (**Figura 216**). A importância dos ftalatos como Produtos Naturais ainda é inconclusiva, no entanto, acredita-se que possam fazer parte da membrana celular e garantir flexibilidade para a célula (CHEN, C., 2004).

Figura 216 - Proposta biossintética para ftalato de dibutila.

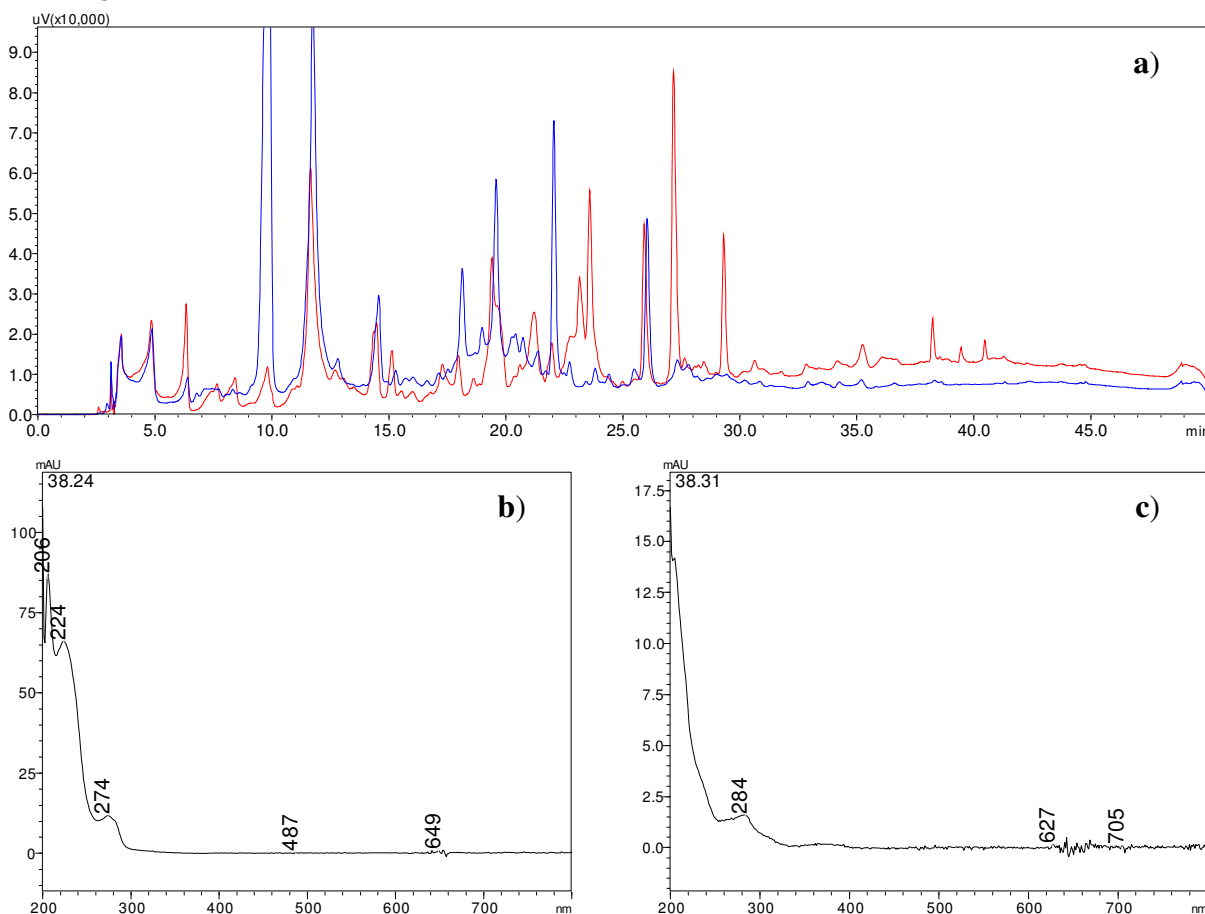


Fonte: Tian et al. (2016); adaptado pelo autor.

Para verificar se os ftalatos foram produzidos por PS-01, foi realizada novamente a comparação dos cromatogramas e dos espectros no UV-Vis dos extratos AcOEt de PS-01 e do

do meio de cultivo (**Figura 217**). Essa análise indicou que os picos referentes aos ftalatos estão presente apenas no extrato de PS-01.

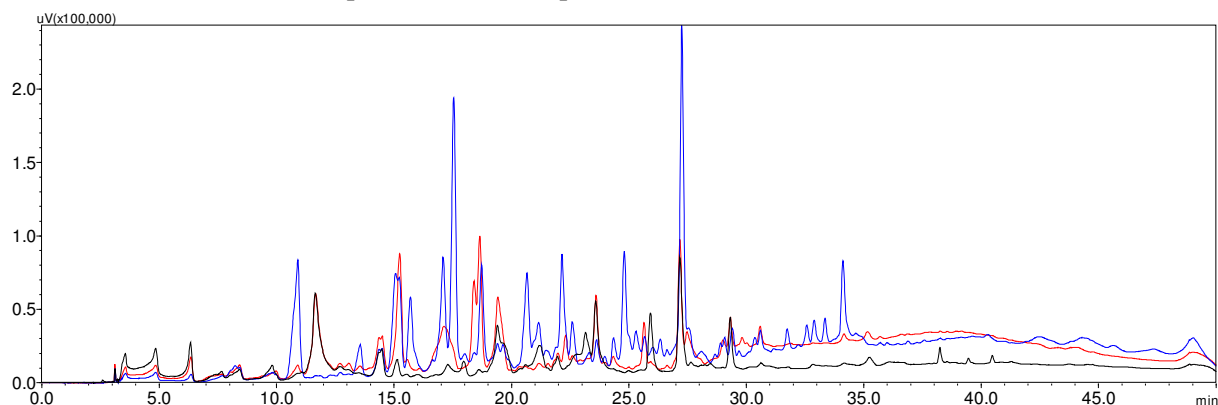
Figura 217 - **a)** Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) do extrato bruto de **PS-01** obtido em escala ampliada (vermelho) e do extrato do meio de cultura (azul); **b)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 38,2 min. (ftalato) no cromatograma do extrato de **PS-01** (vermelho); **c)** Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 38,3 min. no cromatograma do extrato do meio de cultura (azul).



Fonte: o autor.

Além disso, fez-se a comparação dos extratos ACOEt, obtidos em escala ampliada, das linhagens fúngicas AT-03 e AT-06 com o extrato ACOEt de PS-01, também obtido em escala ampliada (**Figura 218**), já que esses foram obtidos durante o mesmo período. E novamente ficou evidente que os picos dos ftalatos (tempos de retenção entre 38 e 41 min.) estão presentes apenas no extrato de PS-01, sugerindo que sejam Produtos Naturais e de ocorrência restrita, neste estudo, à linhagem PS-01.

Figura 218 - Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) dos extratos brutos, obtidos em escala ampliada, de **PS-01** (preto), **AT-03** (azul) e **AT-06** (vermelho).



Fonte: o autor.

4.2.9 Resultados obtidos durante estágio PDSE-CAPES na University of British Columbia - Department of Chemistry

Os extratos obtidos em escala ampliada das linhagens fúngicas AT-03 e AT-06 foram selecionados para estudo durante o estágio PDSE, desenvolvido na University of British Columbia sob a supervisão do Prof. Dr. Raymond Andersen.

Após o fracionamento desses extratos por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma solução de MeOH:CH₂Cl₂ 8:2 v/v, as frações obtidas foram testadas quanto a sua atividade antimicrobiana.

4.2.9.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir dos extratos brutos de *Annulohypoxylon stygium* (AT-03) e *Hypoxylon sp.* (AT-06)

Os extratos brutos e frações de AT-03 e AT-06 foram testados pelo ensaio de difusão em disco de papel e frente aos patógenos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina - MRSA, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Dos resultados obtidos (**Tabela 55**), podemos destacar as frações AT-03-F8 e AT-06-F9, que foram ativas contra MRSA e a linhagem de *E. coli*, enquanto a fração AT-06-F8 foi ativa apenas contra *E. coli*. A fração AT-06-F9 apresentou uma zona de inibição (6 mm) maior que o controle positivo (3 mm) contra *E. coli*. Portanto, essas frações foram selecionadas para fracionamento e estudo químico subsequente.

Tabela 55 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das linhagens AT-03 e AT-06.

Zona de inibição - 40 µg/disco (mm)					
Amostra	<i>B. subtilis</i>	MRSA	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AT-03	0	0	0	0	0
AT-03-F1	0	0	0	0	0
AT-03-F2	0	0	0	0	0
AT-03-F3	0	0	0	0	0
AT-03-F4	0	0	0	0	0
AT-03-F5	0	0	0	0	0
AT-03-F6	0	0	0	0	0
AT-03-F7	0	0	0	0	0
AT-03-F8	0	2	0	2	0
AT-03-F9	0	0	0	0	0
AT-03-F10	0	0	0	0	0
AT-03-F11	0	0	0	0	0
AT-06	0	0	0	0	0
AT-06-F1	0	0	0	0	0
AT-06-F2	0	0	0	0	0
AT-06-F3	0	0	0	0	0
AT-06-F4	0	0	0	0	0
AT-06-F5	0	0	0	0	0
AT-06-F6	0	0	0	0	0
AT-06-F7	0	0	0	0	0
AT-06-F8	0	0	0	2	0
AT-06-F9	0	3	0	6	0
AT-06-F10	0	0	0	1	0
AT-06-F11	0	1	0	0	0
Controle					
Positivo	4	15	3	3	2

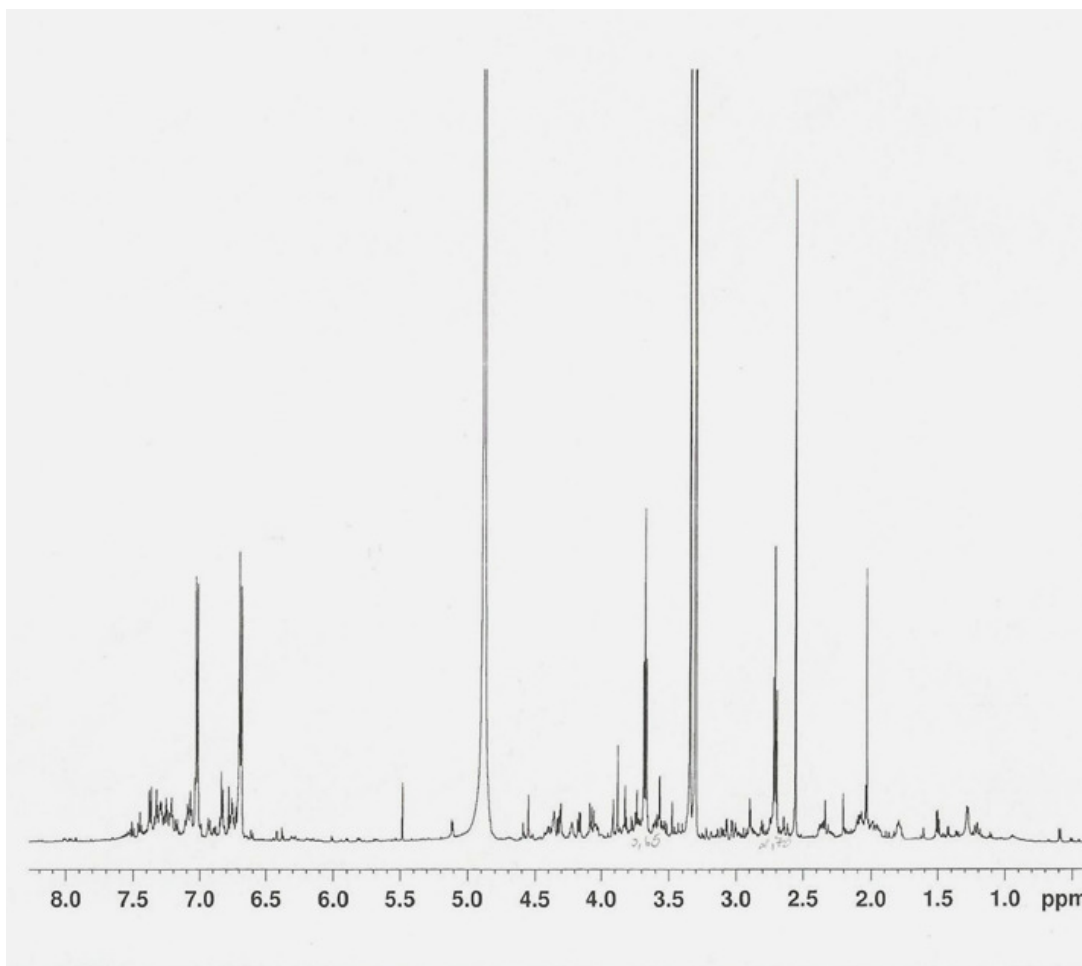
Fonte: o autor.

4.2.9.2 Estudo químico do fungo *Annulohypoxylon stygium* (AT-03)

A fração AT-03-F8 obtida a partir do extrato de AT-03 foi selecionada para fracionamento por CLAE-DAD em escala semi-preparativa, já que apresentou atividade antimicrobiana, sendo obtida a substância **S24**, identificada como o pirogalol.

Apesar da fração AT-03-F5 não ter apresentado atividade antimicrobiana, a mesma também foi fracionada por CLAE-DAD em escala semi-preparativa, devido ao perfil químico apresentado no espectro de RMN de ^1H (**Figura 219**), que mostrou uma substância majoritária, com sinais em δ_{H} 7,05, 6,65, 3,65 e em δ_{H} 2,70. A substância **S06** (tirosol) foi novamente isolada, além da substância **S25**, identificada como 3,4,5-triidroxi-1-tetralona.

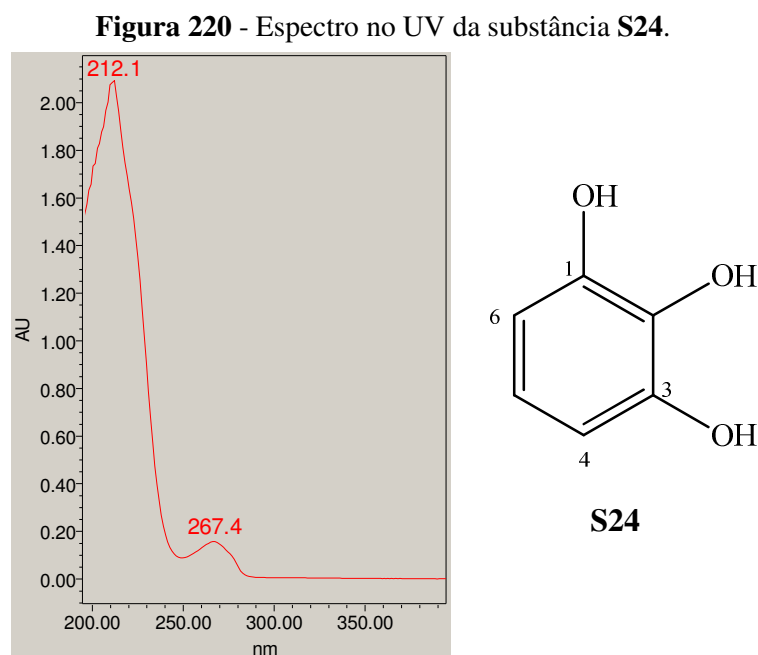
Figura 219 - Espectro de RMN de ^1H da fração **AT-03-F5** (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

4.2.9.2.1 Elucidação estrutural de **S24**

A substância **S24** (0,9 mg) foi obtida como um sólido amarelo e foi identificada como o pirogalol. Seu espectro no UV (**Figura 220**) apresentou bandas de absorção com máximos em 267 e 212 nm.



Fonte: o autor.

Seu espectro de massas de baixa resolução por impacto eletrônico (EI) mostrou o pico base em m/z 126 (**Figura 221**), referente ao íon $[M]^+$, indicando a fórmula molecular de **S24** como $C_6H_6O_3$.

Figura 221 - Espectro de Massas de baixa resolução de **S24** (Kratos MS-50 - EI)

File Name : C:\MASPEC\Data\L59670.ms2

Creation Date/Time : 9/30/15 at 10:55:32

File Type : Lo-Res Data - Ctd (Magnet)

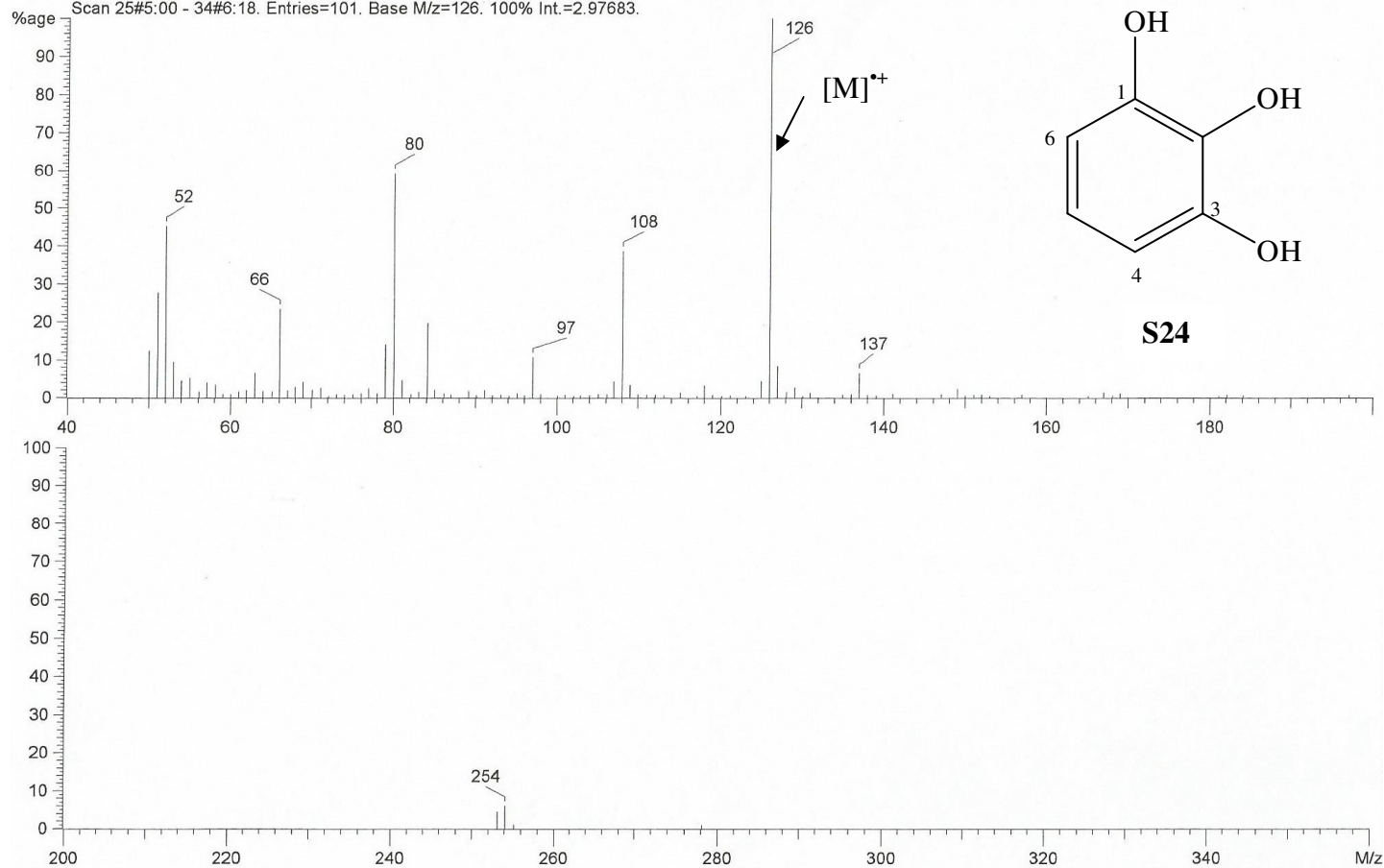
File Source : Acquired on MASPEC II system [I132/9949]

File Title : AT-03-F8-2

Instrument : MS50 EI

SCAN GRAPH. Flagging=Nom.M/z.

Scan 25#5:00 - 34#6:18. Entries=101. Base M/z=126. 100% Int.=2.97683.



Fonte: o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 222**) de **S24** apresentou um duplo dubleto em δ_{H} 6,40 ($J_{5-4} = 7,8$; $J_{5-6} = 7,8$ Hz; 1H) e um dubleto em δ_{H} 6,23 ($J_{4-5} = 7,8$ Hz; 2H), referentes a H-5 e H-4/H-6, respectivamente. Além dos singletos em δ_{H} 8,72 (2H) e em δ_{H} 8,00 (1H) atribuídos aos sinais de hidrogênios das hidroxilas 1-OH/3-OH e 2-OH, respectivamente.

O espectro de ^{13}C (**Figura 223**) mostrou os sinais em δ_{C} 146,3, 118,4 e em δ_{C} 107,0, que foram atribuídos a C-1/C-3, C-5 e C-4/C-6, respectivamente. O sinal referente a C-2 não foi observado. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **S24** estão descritos na **Tabela 56**.

Tabela 56 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S24** (δ -ppm; 600 e 150 MHz; DMSO- d_6).

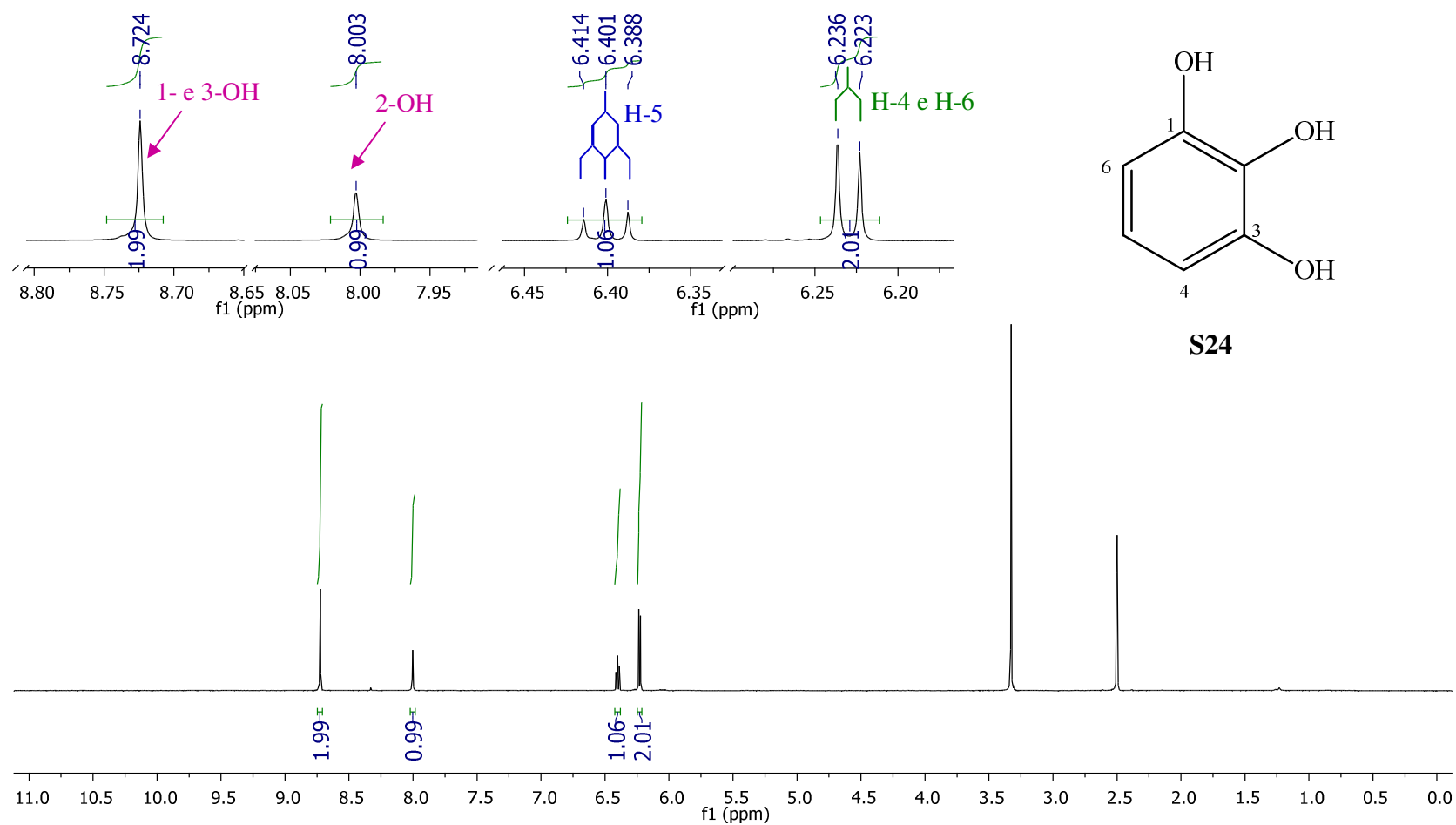
Nº	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1 e 3		146,3
2		N/O*
4 e 6	6,23 (d; 7,8)	107,0
5	6,40 (dd; 7,8; 7,8)	118,4
1- e 3-OH	8,72 (s)	
2-OH	8,00 (s)	

*N/O - sinal não observado.

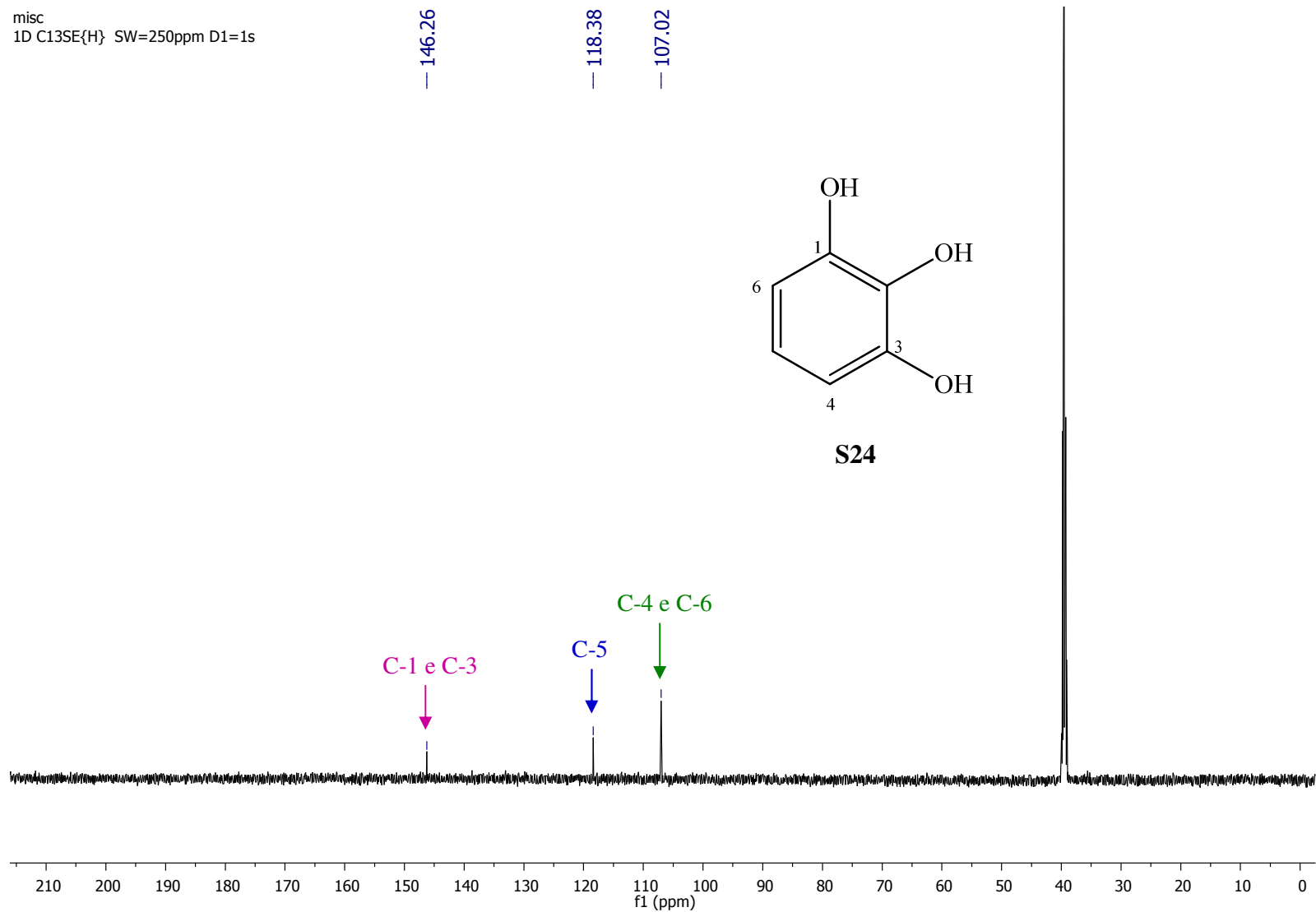
Fonte: o autor.

Figura 222 - Espectro de RMN de ^1H de **S24** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

misc
1D proton (sw=15ppm)
cryoprobe



Fonte: o autor.

Figura 223 - Espectro de ^{13}C de **S24** ($\text{DMSO-}d_6$; 150 MHz)

Fonte: o autor.

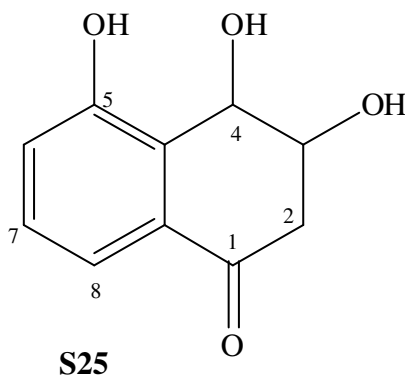
O pirogalol é utilizado em diversos setores da indústria, como na preparação de soluções coloidais metálicas, na fabricação de corantes, para desenvolver imagens na fotografia e para dar coloração ao couro. Além disso, é um intermediário químico para a fabricação de medicamentos e é usado para a absorção de oxigênio em análises de gás. Atualmente é obtido a partir da descarboxilação do ácido gálico, catalisada por alta temperatura e pressão, na presença de ácido clorídrico concentrado, o que pode resultar na contaminação de efluentes, com alta concentração de sais (LI, W; WANG, 2015).

Essa substância já foi identificada em corpos de frutificação e em micélios de *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*), um cogumelo nativo do Brasil e, apresentou atividade antioxidante pelos métodos de sequestro de radicais ABTS e DPPH (CARVAJAL et al., 2012). Também foi identificada no extrato do fungo *Aspergillus parasiticus* inoculado em uma noz (*Corylus arellana* L) (BASARAN; DEMIRBAS, 2010).

O estudo realizado por FARAG et al. (2015) mostrou que o pirogalol foi ativo contra a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*. Enquanto outros estudos mostraram que esta substância é tóxica contra leveduras e fungos (LEAL et al., 2009), é inibidora de quorum-sensing da bactéria *Vibrio haveyi* (NI et al., 2008), além de induzir a apoptose de células de câncer de pulmão (HAN et al., 2008).

4.2.9.2.2 Elucidação estrutural de **S25**

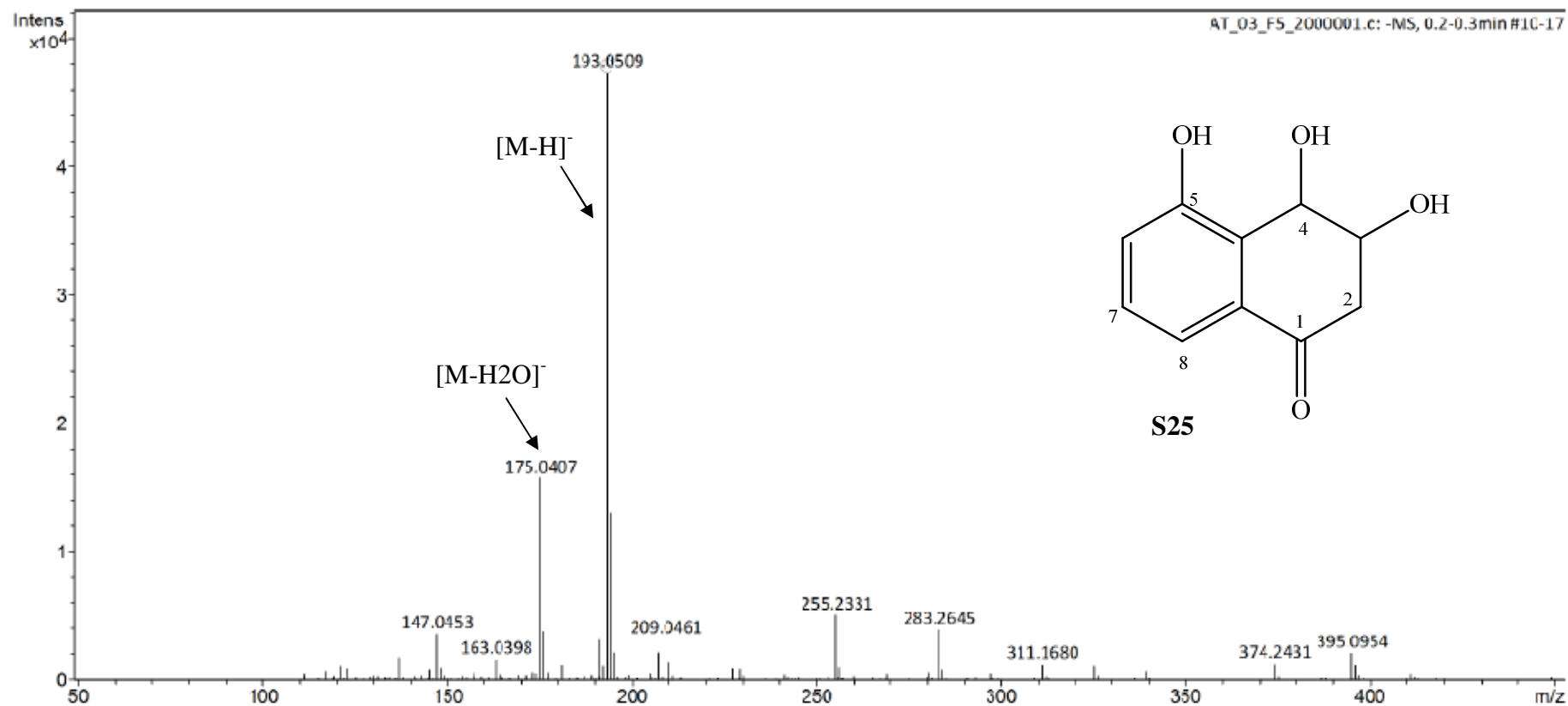
A substância **S25** (0,9 mg) foi obtida como um sólido amorfo branco/rosado. Após as análises dos dados de RMN, bem como de Espectrometria de Massas, **S25** foi identificada como a 3,4,5-triidroxi-1-tetralona (BORGSCULTE et al., 1991; FUJIMOTO et al., 1986).



A fórmula molecular de **S25** foi determinada como $C_{10}H_{10}O_4$, sendo que seu espectro de massas de alta resolução no modo negativo (ESI-Q-TOF) (**Figura 224**) apresentou o pico base em m/z 193,0509 referente ao íon $[M-H]^-$ (calculado 193,0506 - erro de 1,6 ppm).

Figura 224 - Espectro de Massas de alta resolução de **S25** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF)**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Fonte: o autor.

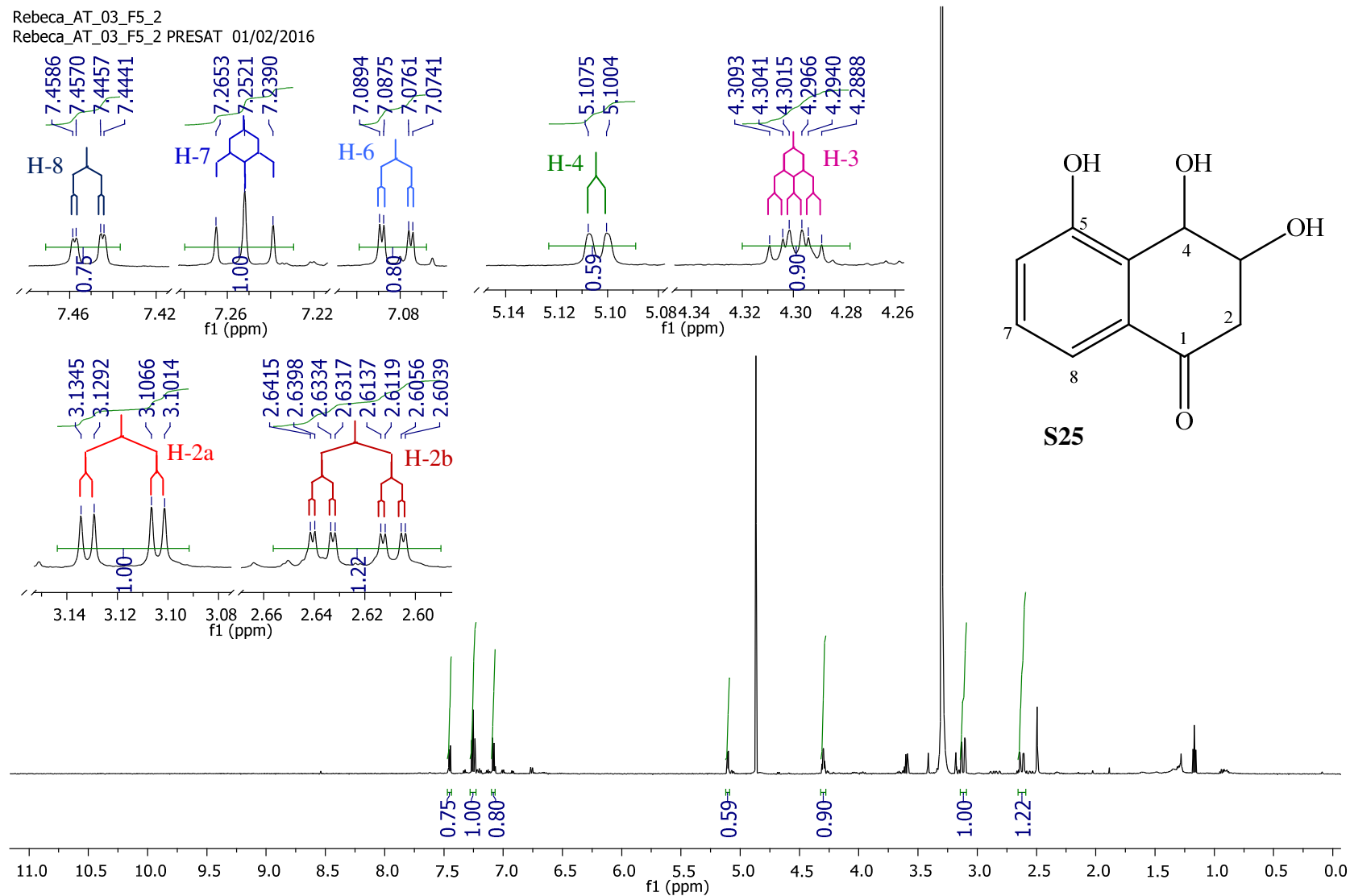
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 225**) de **S25** apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos, como os duplos dubletos em δ_{H} 7,45 ($J_{8-6} = 1,2$; $J_{8-7} = 7,8$ Hz; H-8; 1H), δ_{H} 7,25 ($J_{7-6} = 7,8$; $J_{7-8} = 7,8$ Hz; H-7; 1H) e em δ_{H} 7,08 ($J_{6-7} = 1,2$; $J_{7-8} = 7,8$ Hz; H-6; 1H). E ainda, foram observados os sinais em δ_{H} 5,10 (d; $J_{4-3} = 4,2$ Hz; H-4; 1H), 4,30 (ddd; $J_{3-2a} = 3,1$; $J_{3-2b} = 4,6$; $J_{3-4} = 4,6$ Hz; H-3; 1H), 3,12 (dd; $J_{2a-3} = 3,1$; $J_{2a-2b} = 16,8$ Hz; H-2a; 1H) e em δ_{H} 2,62 (ddd; $J_{2b-\text{OH}} = 1,0$; $J_{2b-3} = 4,8$; $J_{2b-2a} = 16,7$ Hz; H-2b; 1H).

O mapa de contornos COSY (**Figura 226**) mostrou as correlações entre os sinais de H-4 e H-3 e entre H-3 e H-2b.

O mapa de contornos HSQC (**Figura 227**) mostrou os sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 129,9 (C-7), 121,8 (C-6), 117,9 (C-8), 71,3 (C-3) e em δ_{C} 66,8 (C-4), além do carbono metilênico em δ_{C} 42,5 (C-2).

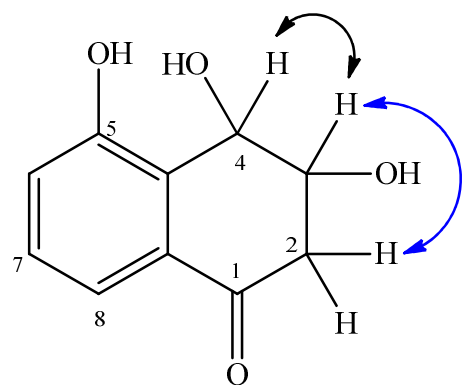
O mapa de contornos HMBC (**Figura 228**) mostrou as correlações de H-8 e H-2a com o sinal do carbono quaternário em δ_{C} 198,7 (C-1), entre H-7 e os sinais dos carbonos quaternários em δ_{C} 158,3 (C-5) e em δ_{C} 133,8 (C-8a) e, ainda, entre H-6 e o sinal de C-4a (δ_{C} 128,7), evidenciando as conectividades essenciais para a confirmação da estrutura de **S25**.

Figura 225 - Espectro de RMN de ^1H de **S25** (CD_3OD ; 600 MHz)

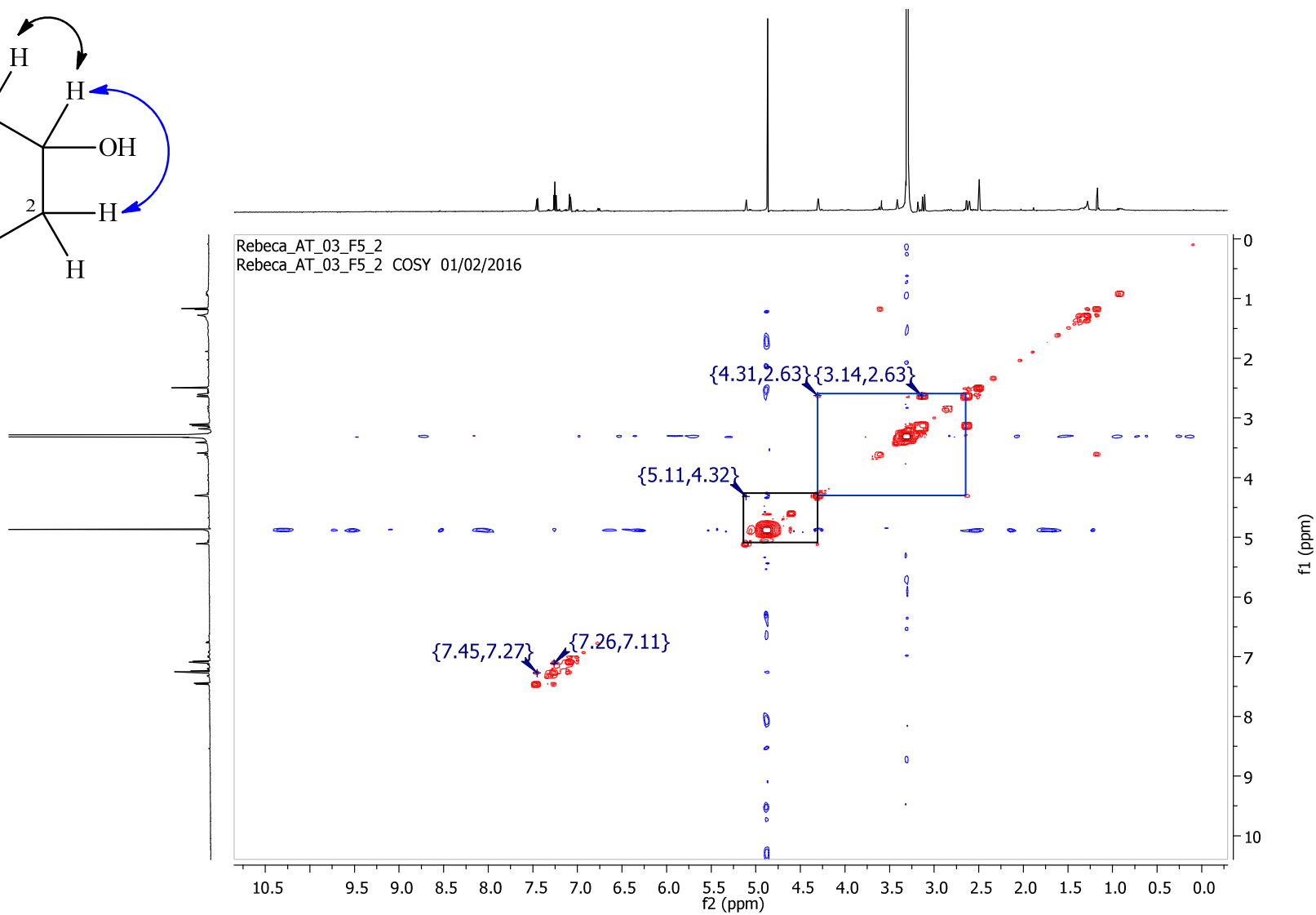


Fonte: o autor.

Figura 226 - Mapa de contornos COSY de **S25** (CD₃OD; 600 MHz)

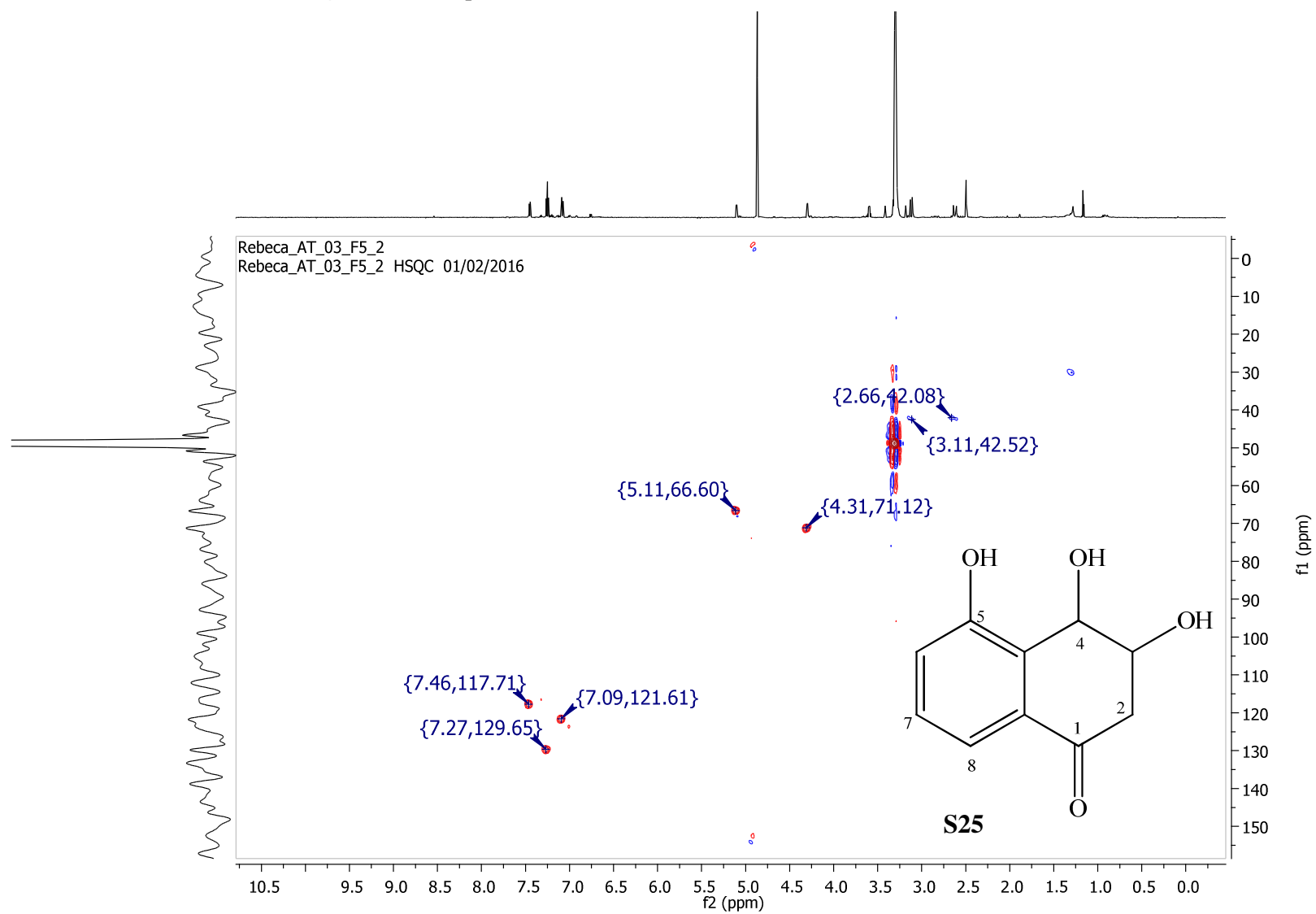


S25



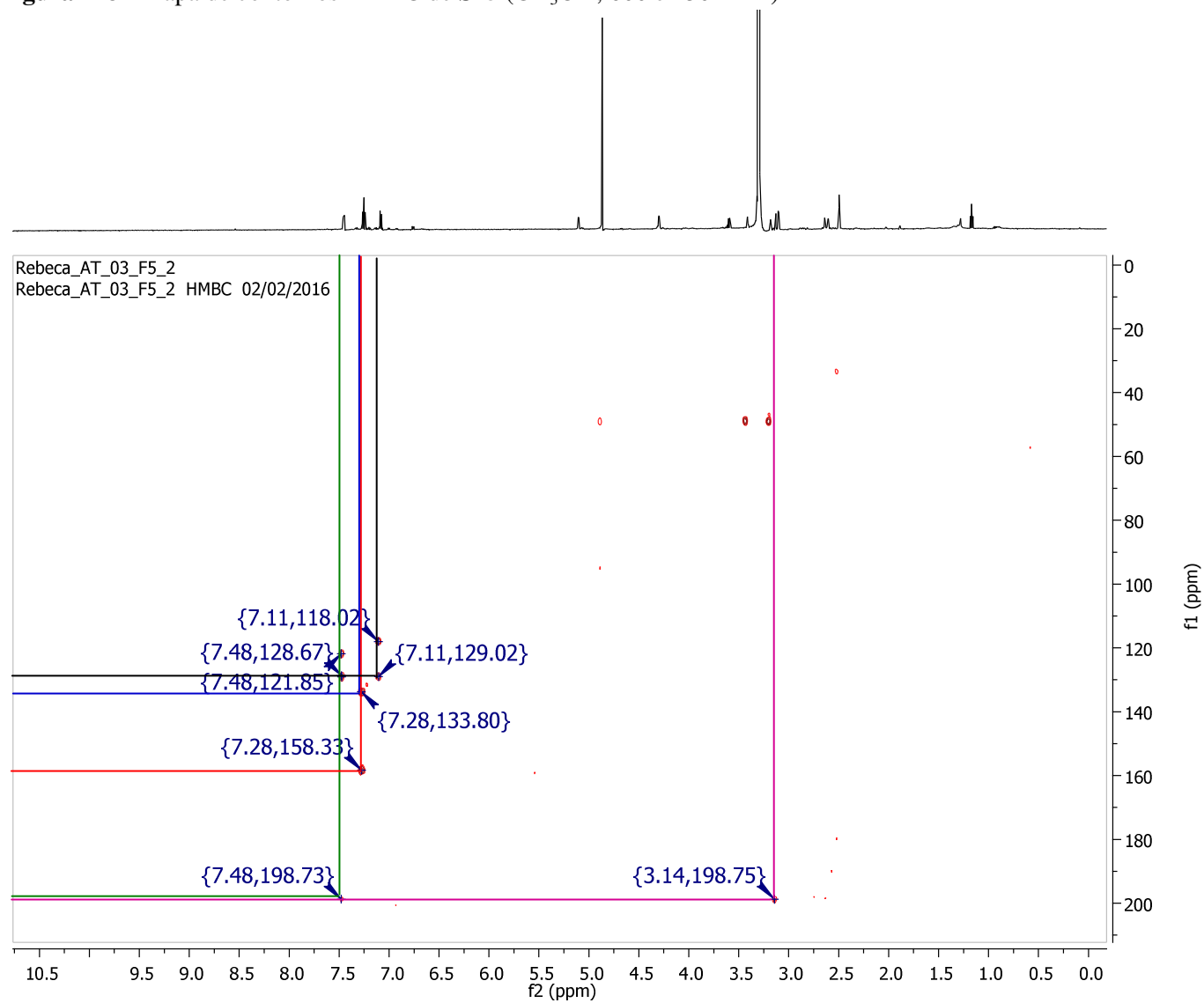
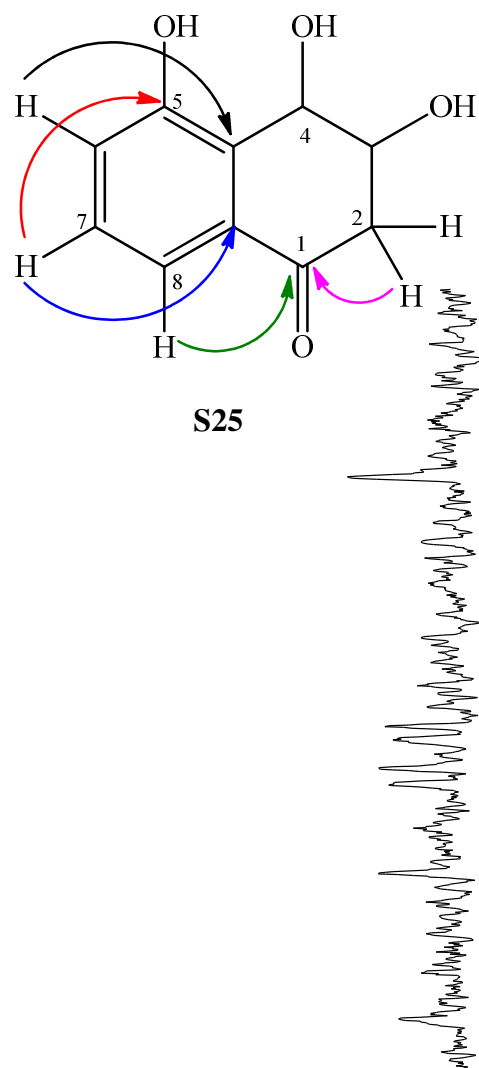
Fonte: o autor.

Figura 227 - Mapa de contornos HSQC de **S25** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

Figura 228 - Mapa de contornos HMBC de **S25** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

A partir do espectro NOESY-1D (**Figura 229**), foi possível verificar a configuração relativa de **S25**, já que ao irradiar o sinal de H-4 (δ_{H} 5,10) não foi observada correlação espacial entre H-4 e H-3, indicando que os mesmos encontram-se em lados opostos do plano médio da molécula. Além disso, os valores das constantes de acoplamento do sinal de H-4 ($J_{4-3}/J_{\text{eq-eq}} = 4,2$ Hz) e do sinal de H-3 ($J_{3-2a}/J_{\text{ax-eq}} = 3,1$; $J_{3-2b}/J_{\text{eq-eq}} = 4,6$; $J_{3-4}/J_{\text{eq-eq}} = 4,6$ Hz; H-3; 1H) indicam que esses hidrogênios se encontram em posições pseudo-equatorial. Portanto, a substância **S25** é a *trans*-3,4,5-triidroxi-1-tetralona.

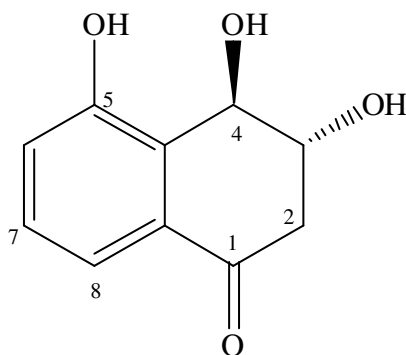
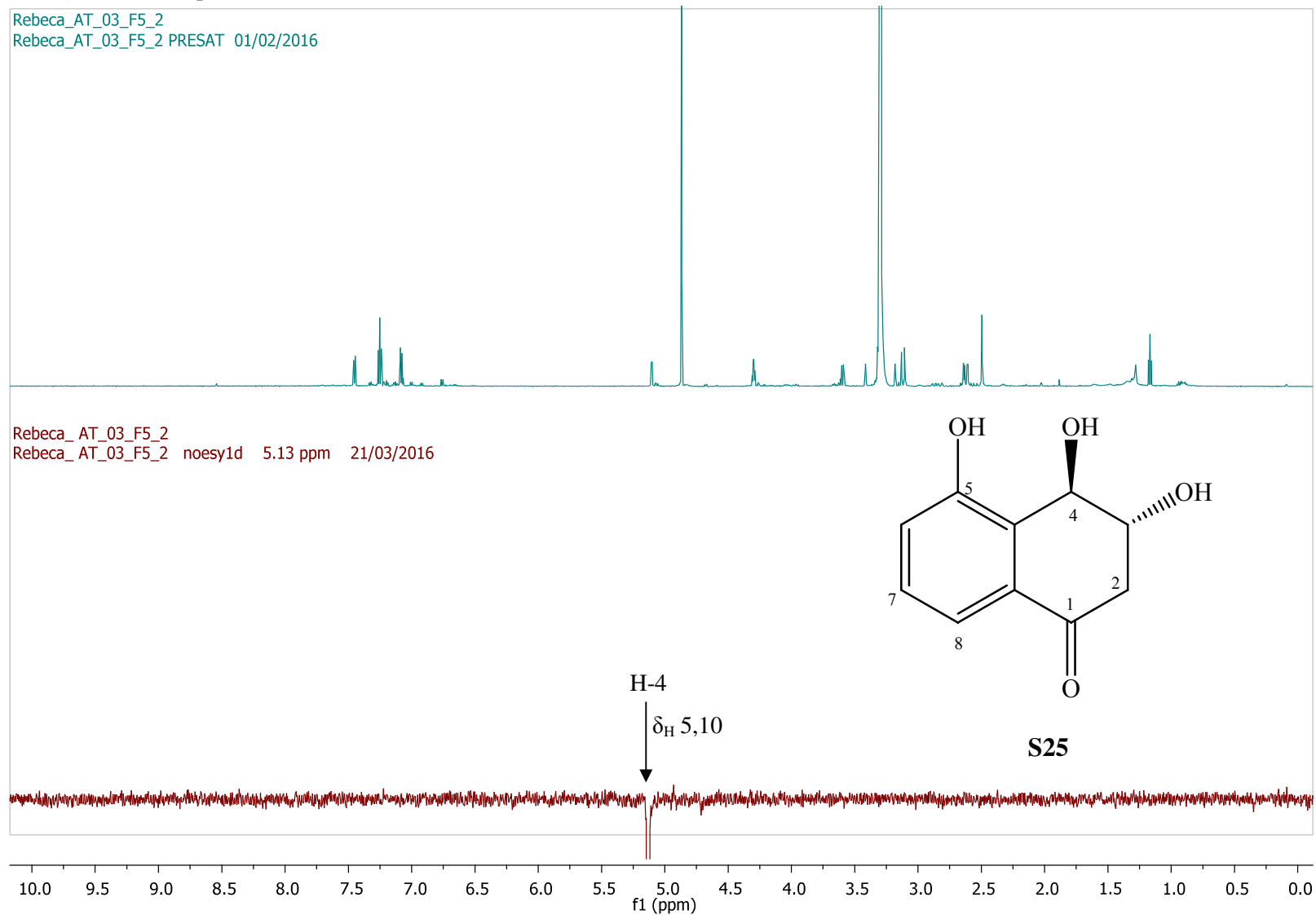
**S25**

Figura 229 - Espectros de RMN de ^1H de **S25** (azul claro) e NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 5,10 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz)

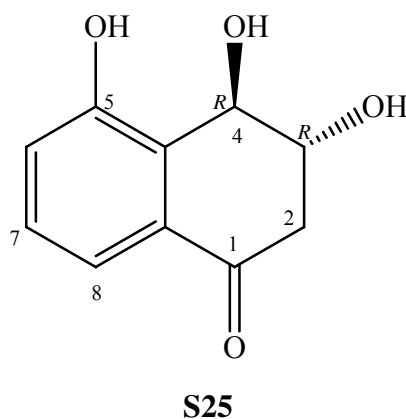
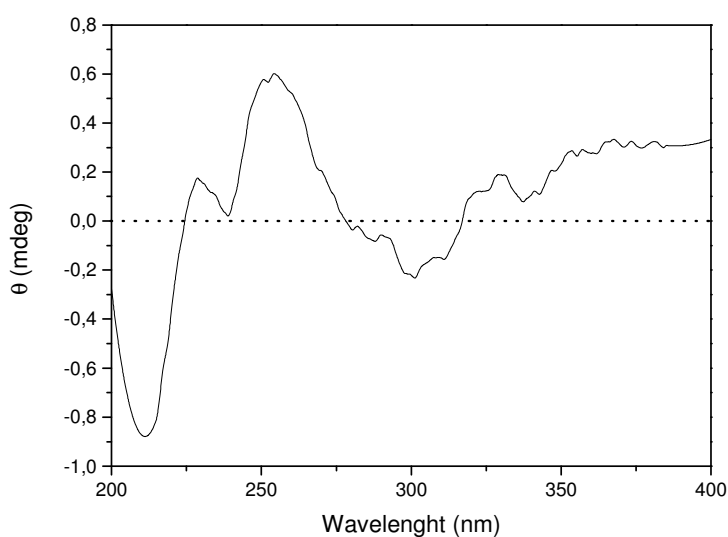


Fonte: o autor.

O espectro de dicroísmo circular da substância **S25** (**Figura 230**) apresentou efeitos Cotton positivos em 254 ($\Delta\epsilon = +0,071$) e em 229 nm ($\Delta\epsilon = +0,021$) e efeito Cotton negativo em 211 nm ($\Delta\epsilon = -0,103$), indicando a configuração *R* para o estereocentro C-4. Além disso, observou-se um efeito Cotton positivo em 329 nm ($\Delta\epsilon = +0,022$), indicando a configuração *R* para o estereocentro C-3 (BRINGMANN et al., 2001), que foi confirmada a partir da configuração *R* do estereocentro em C-4 e sua configuração relativa *trans*, definida pelo experimento NOESY-1D, em relação ao estereocentro em C-3.

Além disso, sua rotação específica foi de $[\alpha]_D^{23} = -9,9^\circ$ (*c* 0,05 em MeOH), compatível com o valor descrito na literatura para a *trans*-3,4,5-triidroxi-tetralona, $[\alpha]_D^{22} = -14,2^\circ$ (*c* 0,25 em MeOH) (FUJIMOTO et al., 1986). Portanto, a substância **S25** pode ser nomeada como: (-)-(3*R*,4*R*)-3,4,5-triidroxi-tetralona ou (-)-(3*R*,4*R*)-[3,4-diidro-3,4,5-triidroxi-1(2H)naftalenona].

Figura 230 - Espectro de Dicroísmo circular de **S25**



Fonte: o autor.

O espectro de massas, espectros de RMN e de dicroísmo circular foram adquiridos no Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **S25** e da 3,4,5-triidroxi-1-tetralona descritos na literatura (BORGSCULTE et al., 1991; FUJIMOTO et al., 1986) estão mostrados na **Tabela 57**.

Tabela 57 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S25** e para a 3,4,5-triidroxi-1-tetralona.

S25^a			3,4,5-triidroxi-1-tetralona	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)^b	δ_{C}^c
1		198,7		198,7
2	2,62 (ddd; 1,0; 4,8; 16,7)	42,5	2,67 (ddd; 1,1; 4,8; 16,8)	43,1
	3,12 (dd; 3,1; 16,8)		3,17 (dd; 3,1; 16,8)	
3	4,30 (ddd; 3,1; 4,6; 4,6)	71,3	4,32 (ddd; 3,1; 4,2; 4,8)	68,3
4	5,10 (d; 4,2)	66,8	5,15 (dd; 0,5; 4,2)	71,6
4a		128,7		128,8
5		158,3		157,9
6	7,08 (dd; 1,2; 7,8)	121,8	7,13 (dd; 1,1; 7,8)	118,3
7	7,25 (dd; 7,8; 7,8)	129,9	7,30 (dd; 7,8; 7,8)	129,9
8	7,45 (dd; 1,2; 7,8)	117,9	7,50 (ddd; 0,5; 1,1; 7,8)	122,2
8a		133,8		133,7

^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD_3OD); ^b(δ_{H} -ppm; 300 MHz; CD_3OD (BORGSCULTE et al., 1991); ^c δ_{C} -ppm; 22,5 MHz; CD_3OD (FUJIMOTO et al., 1986).

Fonte: o autor.

A 3,4,5-triidroxi-tetralona com estereoquímica relativa *trans* foi isolada pela primeira vez do fungo *Penicillium diversum* var. *aureum*, e inibiu o crescimento de células de sarcoma de Yoshida em cultura de tecido (FUJIMOTO et al., 1986). Também foi isolada do fungo fitopatogênico *Hypoxylon mammatum* (BORGSCULTE et al., 1991) e do corpo de frutificação de *Daldinia concentrica*, que também é um fungo da família Xylariaceae (QUANG et al., 2002).

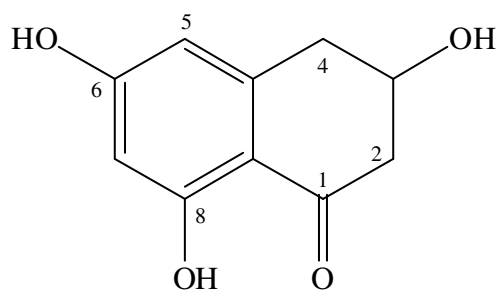
Enquanto a 3,4,5-triidroxi-tetralona com estereoquímica relativa *cis* foi isolada da linhagem de *Xylaria* sp. 638, obtida a partir de um cupinzeiro abandonado de *Odontotermes formosanus*, e teve sua estereoquímica determinada, sendo nomeada como (3*S*,4*R*)-3,4,5-triidroxi-1-tetralona ou (3*S*,4*R*)-3,4-diidro-3,4,5-triidroxi-naftalen-1(2*H*)-ona (YAN et al., 2011). Essa substância também foi isolada do fungo de habitat marinho *Xylariaceae* sp., isolado da gorgônia *Melitodes squamata*, sendo que não apresentou atividade anti-incrustante, quando testada contra larvas de *Bugula neritina* (NONG et al., 2013).

4.2.9.3 Estudo químico do fungo *Hypoxylon* sp. (AT-06)

As frações AT-06-F8 e AT-06-F9 obtidas a partir do extrato de AT-06 foram estudadas por CLAE-DAD em escala semi-preparativa, já que apresentaram atividade antimicrobiana. A primeira fração forneceu a substância **S26**, identificada como a scytalona, e a segunda fração forneceu a substância **S27**, identificada como *trans*-4-hidroxi-scytalona e, novamente, a substância **S17** (daidzeína).

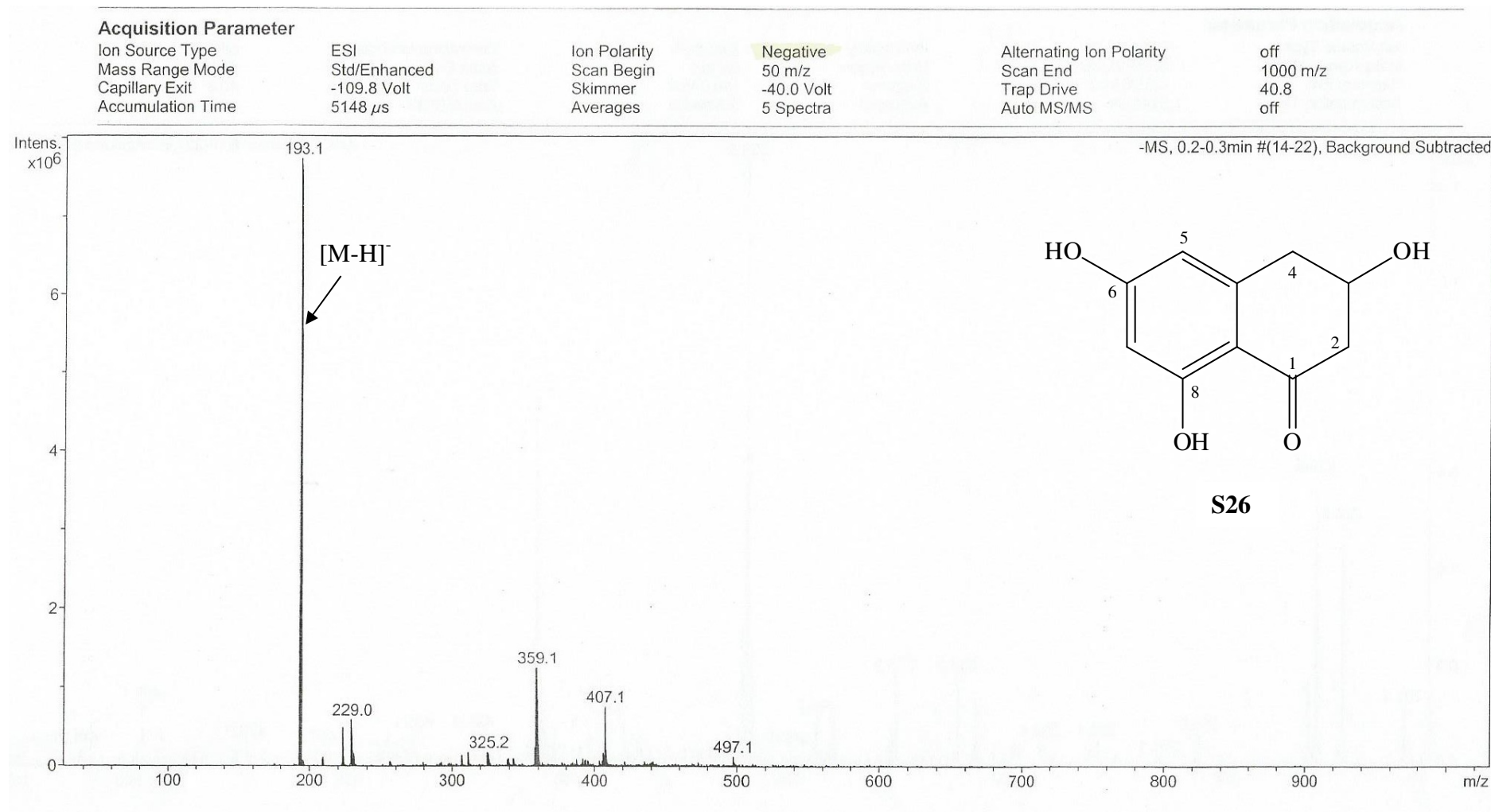
4.2.9.3.1 Elucidação estrutural de **S26**

A substância **S26** (4,5 mg) foi obtida como um sólido amorfo branco/rosado. Após as análises dos dados de RMN, bem como de Espectrometria de Massas, **S26** foi identificada como a scytalona (LI, X. et al., 2012).



S26

A fórmula molecular de **S26** foi determinada como C₁₀H₁₀O₄, sendo que seu espectro de massas de baixa resolução no modo negativo (ESI-Ion Trap) (**Figura 231**) apresentou o pico base em *m/z* 193,1 referente ao íon [M-H]⁻.

Figura 231 - Espectro de massas de baixa resolução de **S26** (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap)**Fonte:** o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 232**) de **S26** apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,21 (d; $J_{5-7} = 1,8$ Hz; H-5; 1H) e em δ_{H} 6,08 (d; $J_{7-5} = 1,8$ Hz; H-7; 1H), sendo que a constante de acoplamento dos mesmos indica que estão em posição *meta* um em relação ao outro. Além disso, foi possível verificar os duplos dubletos em δ_{H} 3,00 ($J_{4a-3} = 3,3$; $J_{4a-4b} = 16,1$ Hz; H-4a; 1H); 2,76 ($J_{4b-3} = 7,5$; $J_{4b-4a} = 16,1$ Hz; H-4b; 1H), 2,79 ($J_{2a-3} = 3,3$; $J_{2a-2b} = 16,8$ Hz; H-2a; 1H) e em δ_{H} 2,55 ($J_{2b-3} = 7,2$; $J_{2b-2a} = 16,8$ Hz; H-2b; 1H) e um multiplete em δ_{H} 4,16 (1H) que foi atribuído ao H-3.

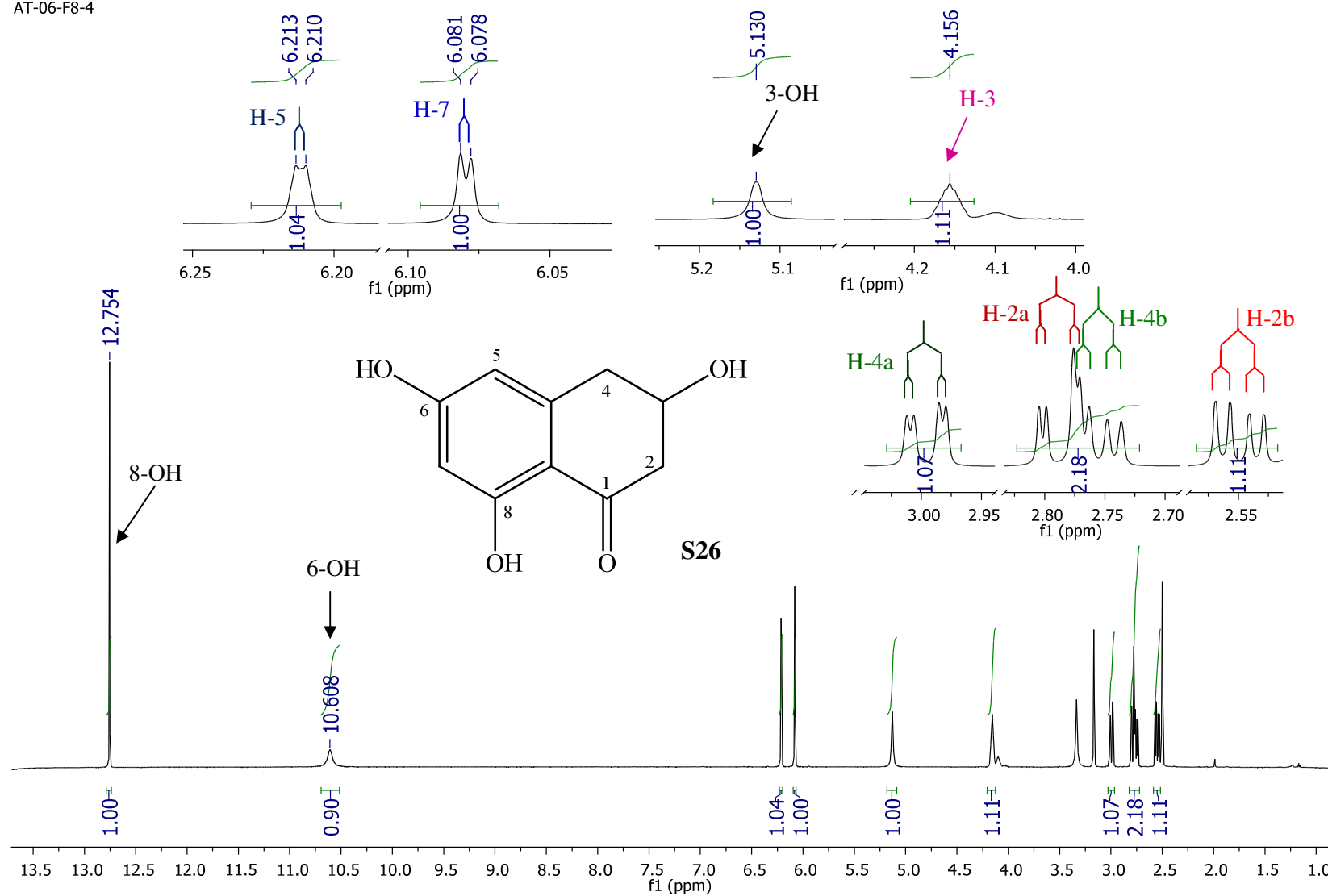
O mapa de contornos COSY (**Figura 233**) mostrou as correlações entre os sinais de H-3 e H-2a, H-2b, H-4a, H-4b e com o sinal de hidrogênio da hidroxila da posição 3 em δ_{H} 5,13 (1H; 3-OH).

A partir do mapa de contornos HSQC (**Figura 234**) verificaram-se os sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 108,1 (C-5), 100,0 (C-7) e em δ_{C} 64,5 (C-3) e para carbonos metilênicos em δ_{C} 46,2 (C-2) e em δ_{C} 37,7 (C-4).

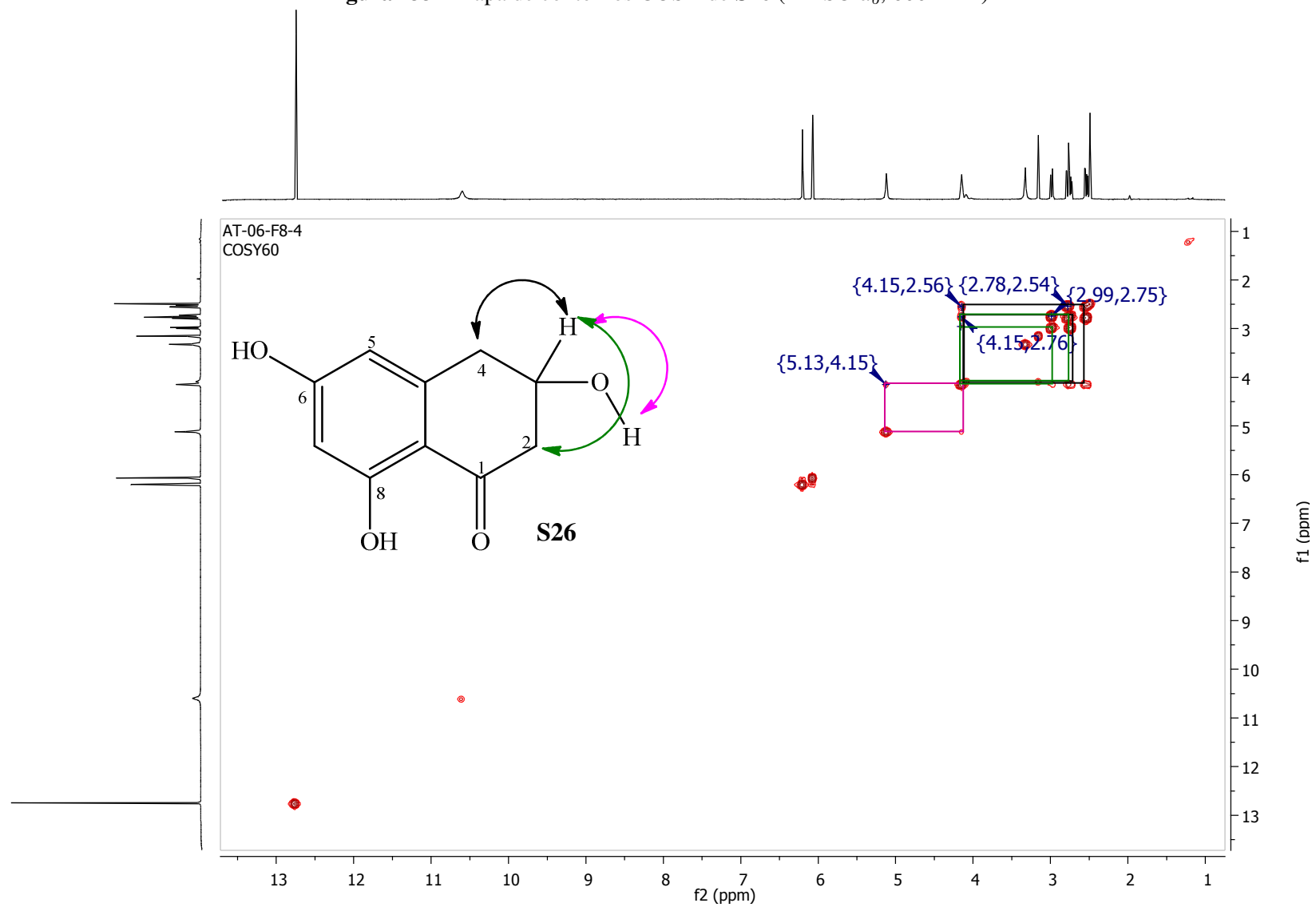
O mapa de contornos HMBC (**Figura 235**) mostrou as correlações do sinal de hidrogênio da hidroxila em C-8 (δ_{H} 12,75; s; 1H) com os carbonos quaternários em δ_{C} 201,8 (C-1) e em δ_{C} 164,4 (C-8), as correlações entre H-5 e os sinais de C-6 (δ_{C} 164,9) e de C-4, entre H-7 e o carbono quaternário em δ_{C} 110,1 (C-8a) e, ainda, entre H-4a e H-4b e o sinal em δ_{C} 145,3, referente ao C-4a.

Figura 232 - Espectro de RMN de ^1H de **S26** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz)

AT-06-F8-4

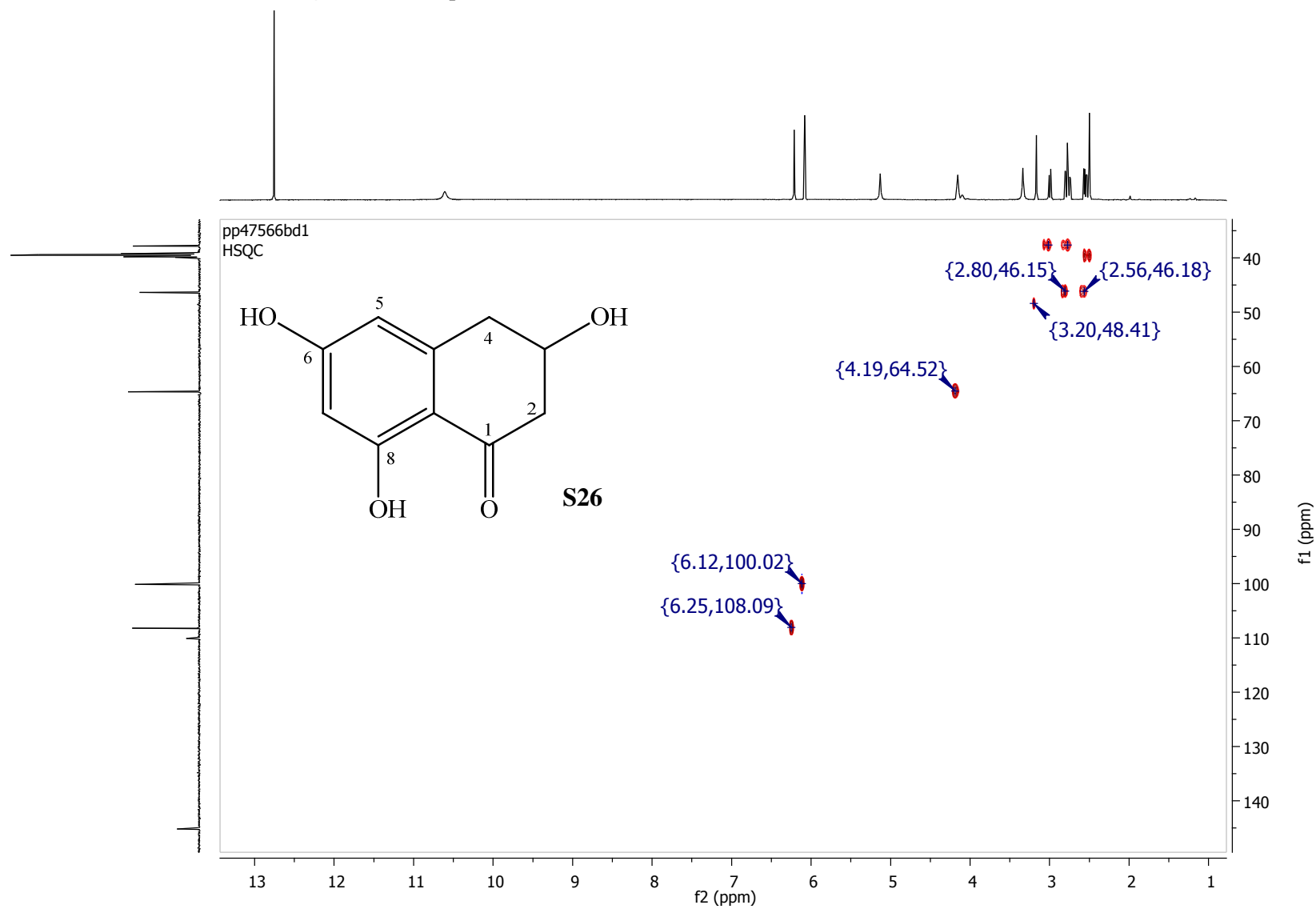


Fonte: o autor.

Figura 233 - Mapa de contornos COSY de **S26** (DMSO- d_6 ; 600 MHz)

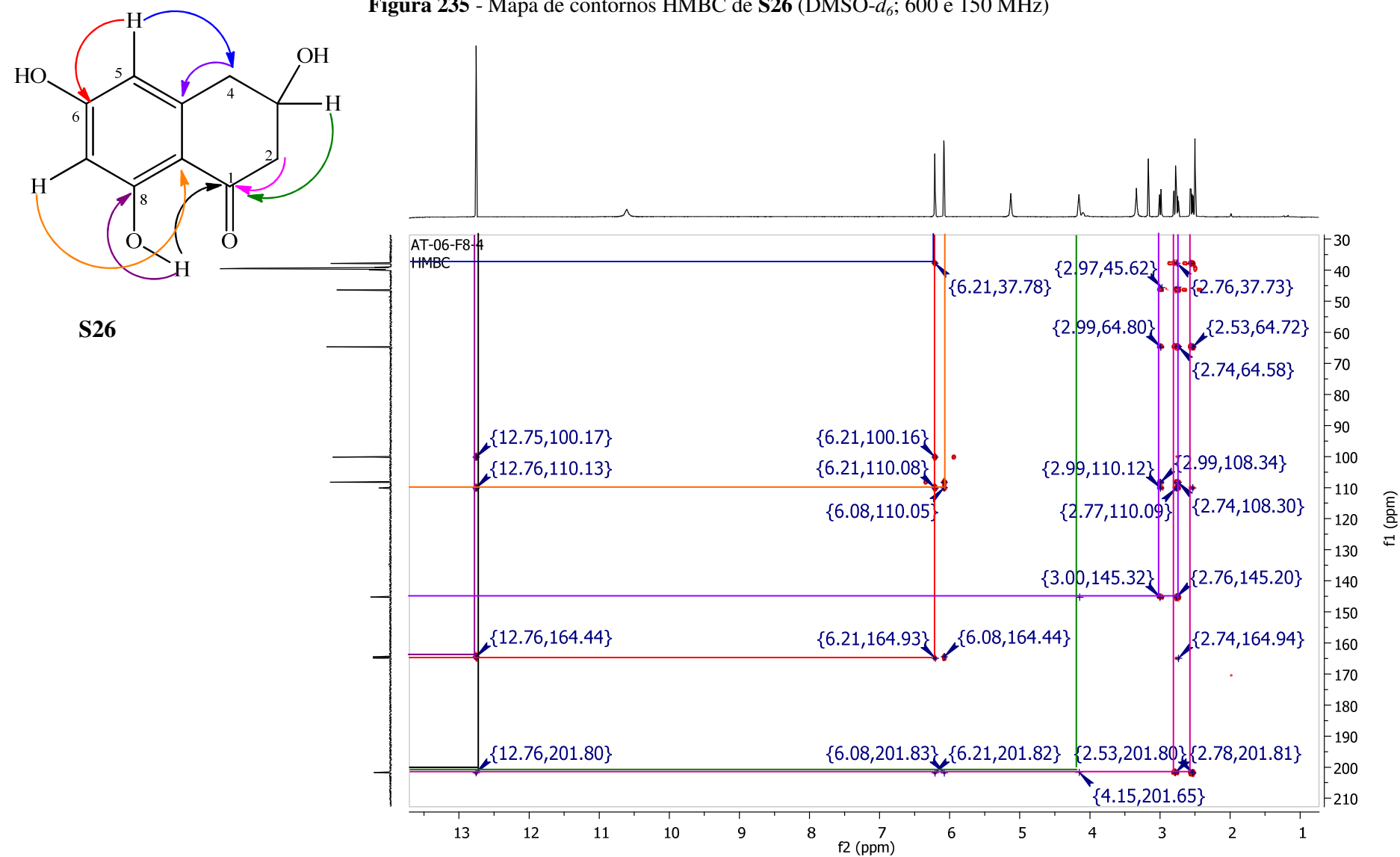
Fonte: o autor.

Figura 234 - Mapa de contornos HSQC de **S26** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



Fonte: o autor.

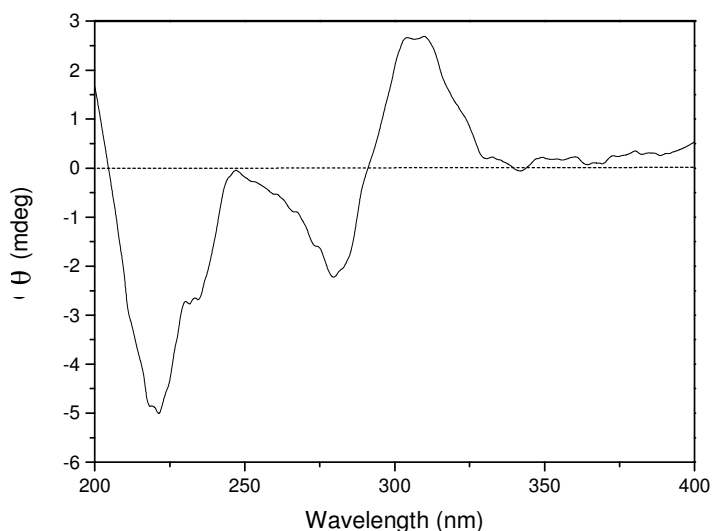
Figura 235 - Mapa de contornos HMBC de **S26** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)



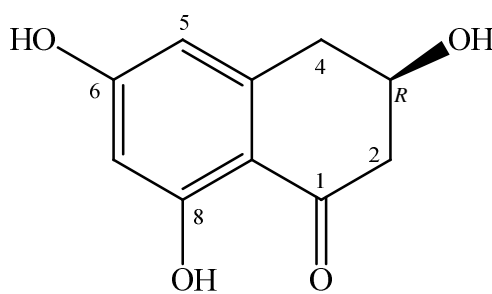
Fonte: o autor.

A **Figura 236** apresenta o espectro de dicroísmo circular de **S26**, no qual foi possível verificar um efeito Cotton positivo em 311 nm ($\Delta\epsilon = +0,65$) e um efeito Cotton negativo em 222 nm ($\Delta\epsilon = -1,24$), indicando assim a configuração *R* para o centro C-3 dessa substância (HUSAIN et al., 2014). Além disso, foi observado um efeito Cotton negativo em 282 nm ($\Delta\epsilon = -0,54$). Portanto, a substância **S26** pode ser nomeada como: (3*R*)-3,6,8-triidroxi-tetralona ou (3*R*)-[3,4-diidro-3,6,8-triidroxi-1(2H)naftalenona] ou (3*R*)-scytalona.

Figura 236 - Espectro de Dicroísmo circular de **S26**



Fonte: o autor.



S26

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **S26** e da scytalona, descritos na literatura (LI, X. et al., 2012), estão mostrados na **Tabela 58**.

Tabela 58 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S26** e para a scytalona.

S26^a			Scytalona^b	
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}
1		201,8		202,5
2	2,79 (dd; 3,3; 16,8)	46,2	2,83 (d; 5,0)	47,4
	2,55 (dd; 7,2; 16,8)		2,61 (dd; 7,8; 17,0)	
3	4,16 (m)	64,5	4,25 (sept.; 3,8)	66,9
4	3,00 (dd; 3,3; 16,1)	37,7	3,08 (dd; 3,8; 16,0)	39,1
	2,76 (dd; 7,5; 16,1)		2,86 (m)	
4a		145,3		146,0
5	6,21 (d; 1,8)	108,1	6,22 (d; 1,2)	109,4
6		164,9		166,5
7	6,08 (d; 1,8)	100,0	6,10 (d; 2,3)	101,6
8		164,4		166,6
8a		110,1		111,7
3-OH	5,13 (s)			
6-OH	10,61 (s)			
8-OH	12,75 (s)			

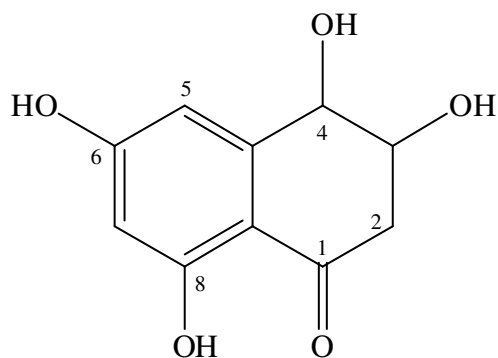
^a δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD_3OD ; ^b δ_{H} -ppm; 500 e 125MHz; CDCl_3 (LI, X. et al., 2012).

Fonte: o autor.

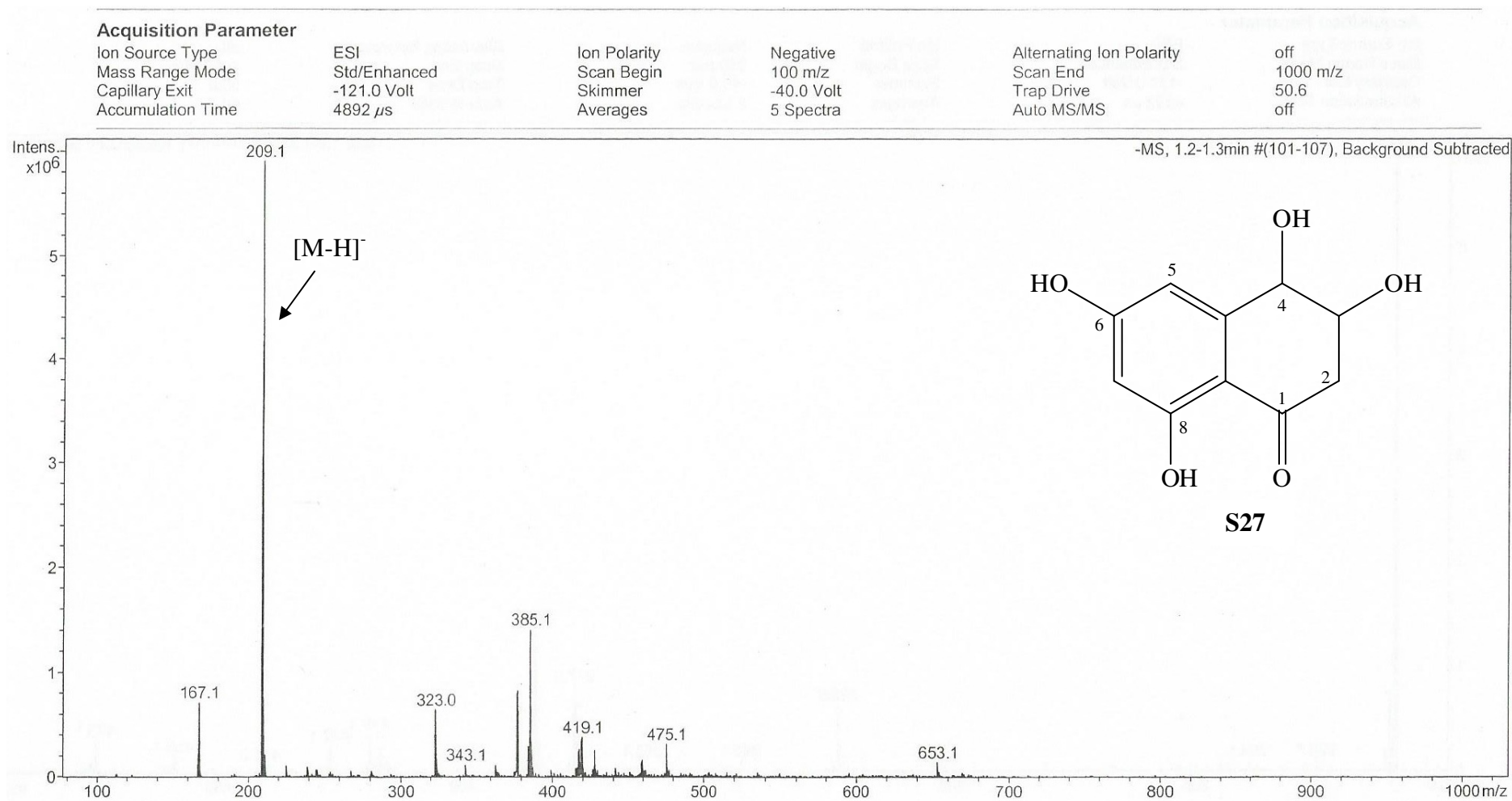
A scytalona foi isolada pela primeira vez de uma linhagem do fungo *Scytallidium* sp. (FINDLAY; KWAN, 1973). Também foi obtida a partir da cultura do fungo *Lachnellula* sp. A 32-89, isolado da planta *Polylepis sericea*, e apresentou moderada atividade citotóxica frente a células murinas de leucemia linfoblástica aguda (L1210) (SEMAR et al., 1996). O estudo realizado por Li, X. et al. (2012) mostrou que essa substância não foi fitotóxica para plântulas de *Pinus armandi*, sendo que foi isolada do fungo *Leptographium qinlingensis* associado ao besouro *Dendroctonus armandi*. O estudo do fungo marinho Xylariaceae sp., isolado da gorgônia *Melitodes squamata* também levou ao isolamento da scytalona, que não apresentou atividade anti-incrustante, quando testada contra larvas de *Bugula neritina* (NONG et al., 2013).

4.2.9.3.2 Elucidação estrutural de **S27**

A substância **S27** (1,4 mg) foi obtida como um sólido amorfo marrom avermelhado. Após as análises dos dados de RMN, bem como de Espectrometria de Massas, **S27** foi identificada como a 4-hidroxi-scytalona (ZHU et al., 2008).

**S27**

A fórmula molecular de **S27** foi determinada como $C_{10}H_{10}O_5$, sendo que seu espectro de massas de baixa resolução no modo negativo (ESI-Ion Trap) (**Figura 237**) apresentou o pico base em m/z 209,1 referente ao íon $[M-H]^-$.

Figura 237 - Espectro de massas de baixa resolução de **S27** com CD₃OD (Bruker - Esquire - ESI-Ion Trap)**Fonte:** o autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 238**) de **S27** apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos semelhantes aos observados no espectro de RMN de ^1H de **S26**, porém com valores de deslocamentos químicos maiores, como o sinal de H-5, observado em δ_{H} 6,60 (dd; $J_{5-\text{OH}} = 0,9$; $J_{5-7} = 2,1$ Hz; 1H) e o sinal de H-7, observado em δ_{H} 6,17 (d; $J_{7-5} = 2,4$ Hz; 1H). Além disso, o sinal de H-3 foi observado em δ_{H} 3,97 (ddd, $J_{3-2b} = 4,2$; $J_{3-4} = 7,5$; $J_{3-2b} = 8,7$ Hz; 1H) e o sinal de H-4 em δ_{H} 4,48 (d; $J_{4-3} = 7,2$ Hz; 1H), consistentes com a presença de um grupo retirador de elétrons por efeito indutivo em C-4, como uma hidroxila, que foi confirmada pelo mapa de contornos HSQC (**Figura 239**), pois o sinal de C-4 foi verificado em δ_{C} 73,5.

Os demais sinais observados no mapa de contornos HSQC confirmaram também a semelhança de **S27** com a substância **S26**, como o sinal de carbono metilênico em δ_{C} 43,9, referente ao C-2, e os sinais dos carbonos metínicos em δ_{C} 71,5, 108,4 e δ_{C} 102,4, referentes ao C-3, C-5 e C-7, respectivamente.

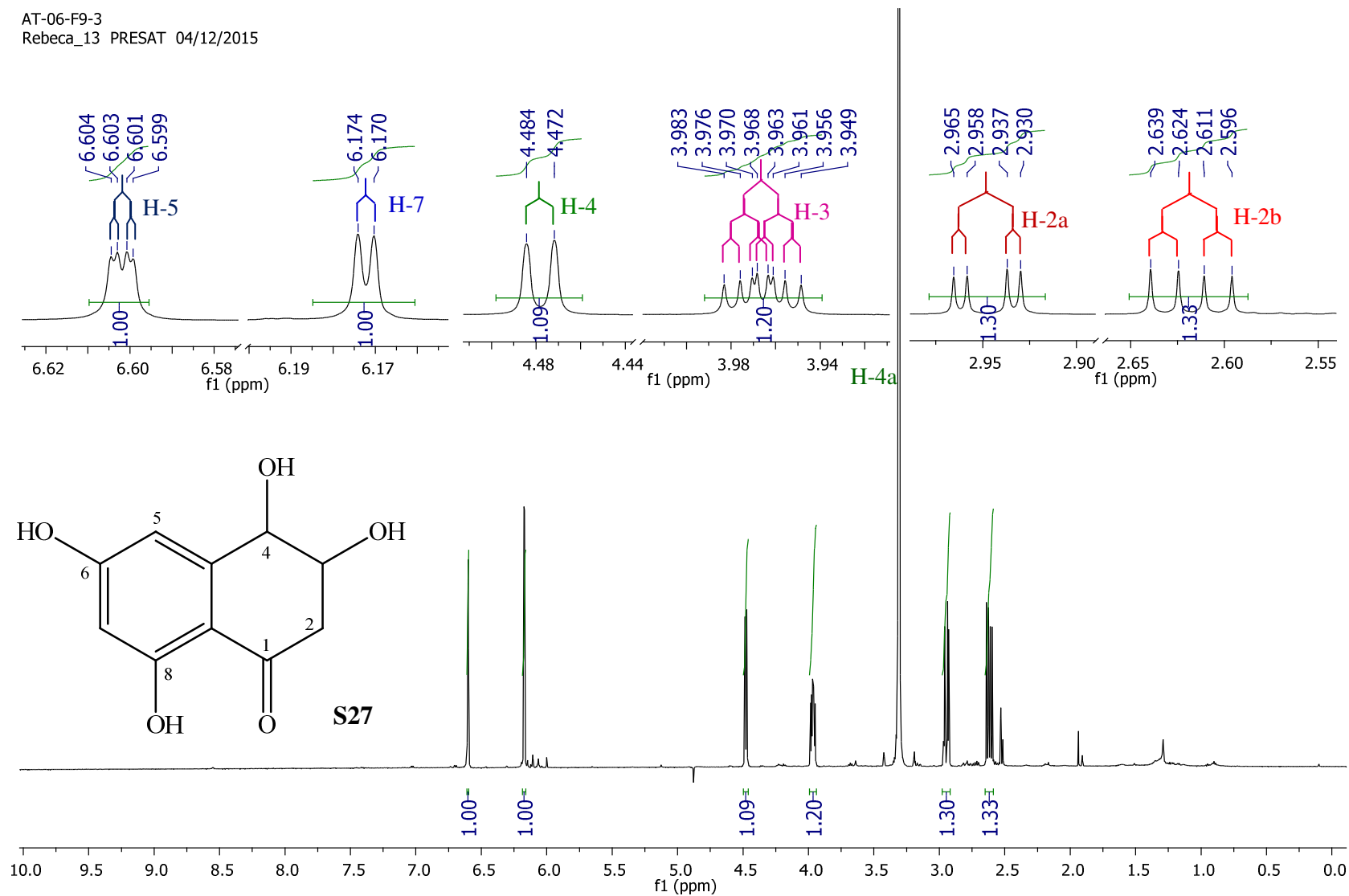
O mapa de contornos COSY (**Figura 240**) mostrou as correlações do sinal de H-3 com o sinal de H-2b (δ_{H} 2,62; dd; $J_{2b-3} = 9,0$; $J_{2b-2a} = 16,8$ Hz; 1H), e também com o sinal de H-4.

Já o mapa de contornos HMBC (**Figura 241**) mostrou as correlações de H-5 com C-6 (δ_{C} 167,3) e com C-4, de H-7 com C-8 (δ_{C} 166,8) e C-8a (δ_{C} 110,0); de H-4 com C-4a (δ_{C} 148,3) e, ainda, dos sinais de H-2a (δ_{H} 2,95; dd; $J_{2a-3} = 4,2$; $J_{2a-2b} = 16,8$ Hz; 1H), H-2b e H-3 com o sinal de carbono quaternário em δ_{C} 201,1, referente ao C-1.

Figura 238 - Espectro de RMN de ^1H de **S27** (CD_3OD ; 600 MHz)

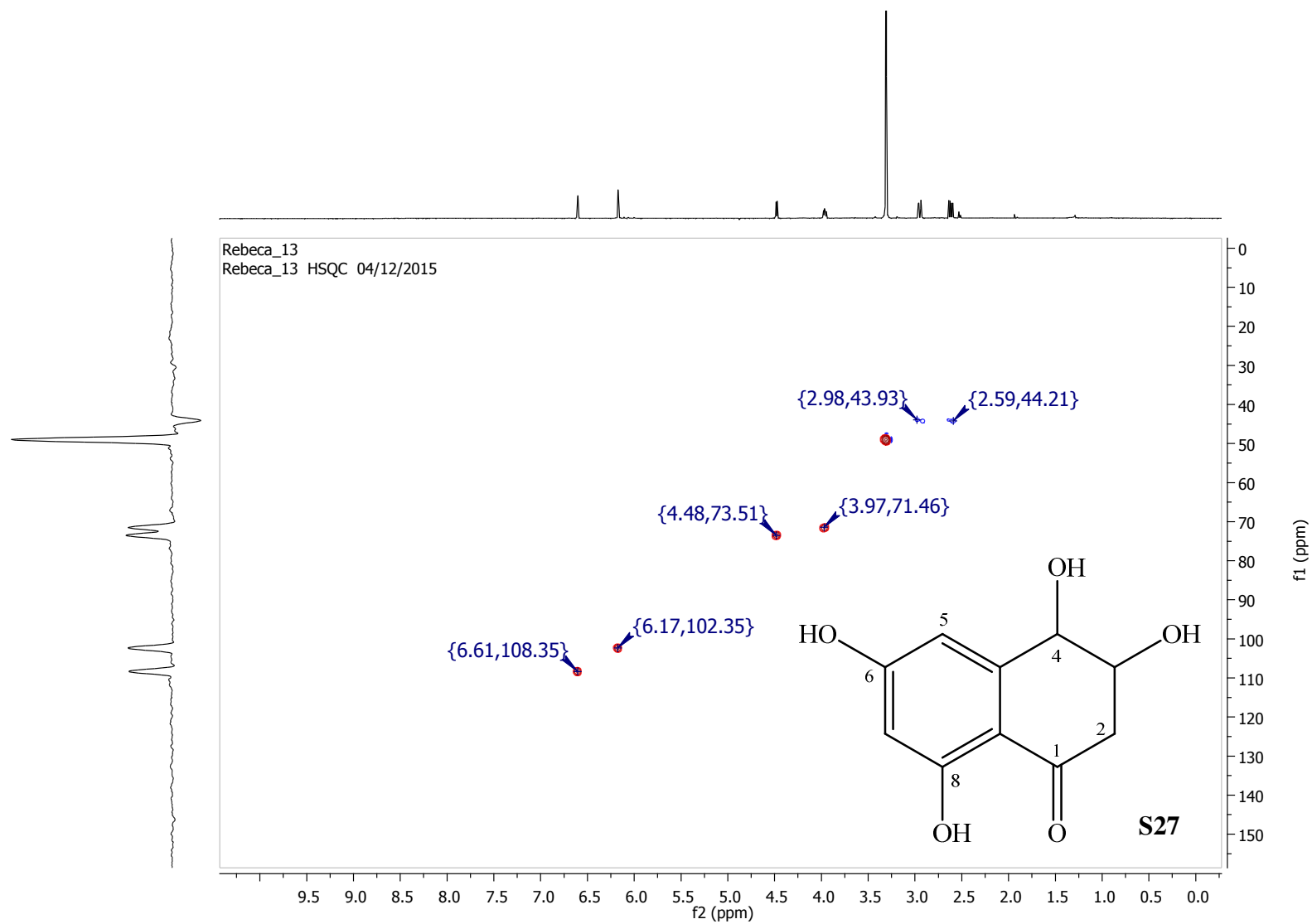
AT-06-F9-3

Rebeca_13 PRESAT 04/12/2015

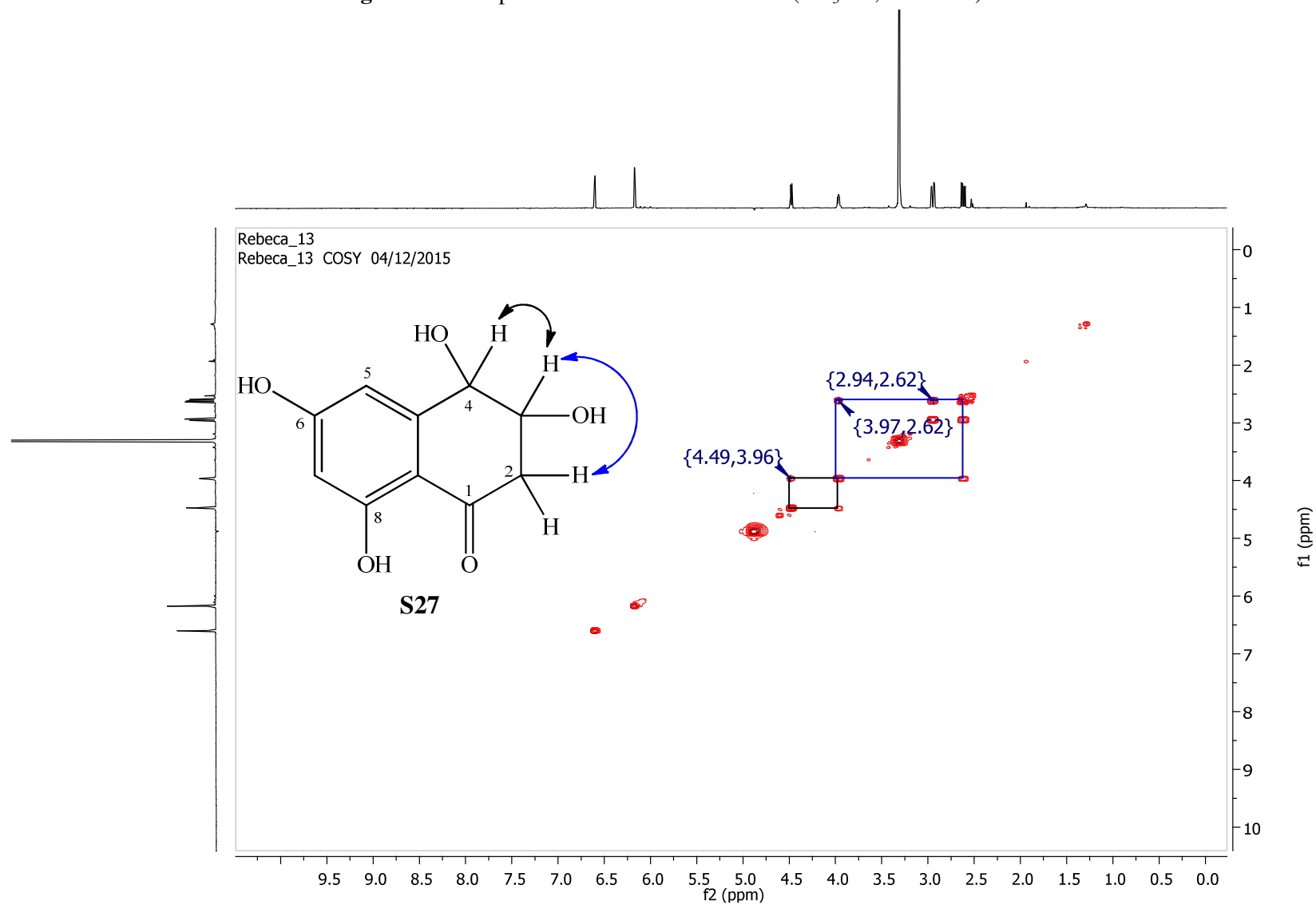


Fonte: o autor.

Figura 239 - Mapa de contornos HSQC de **S27** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)

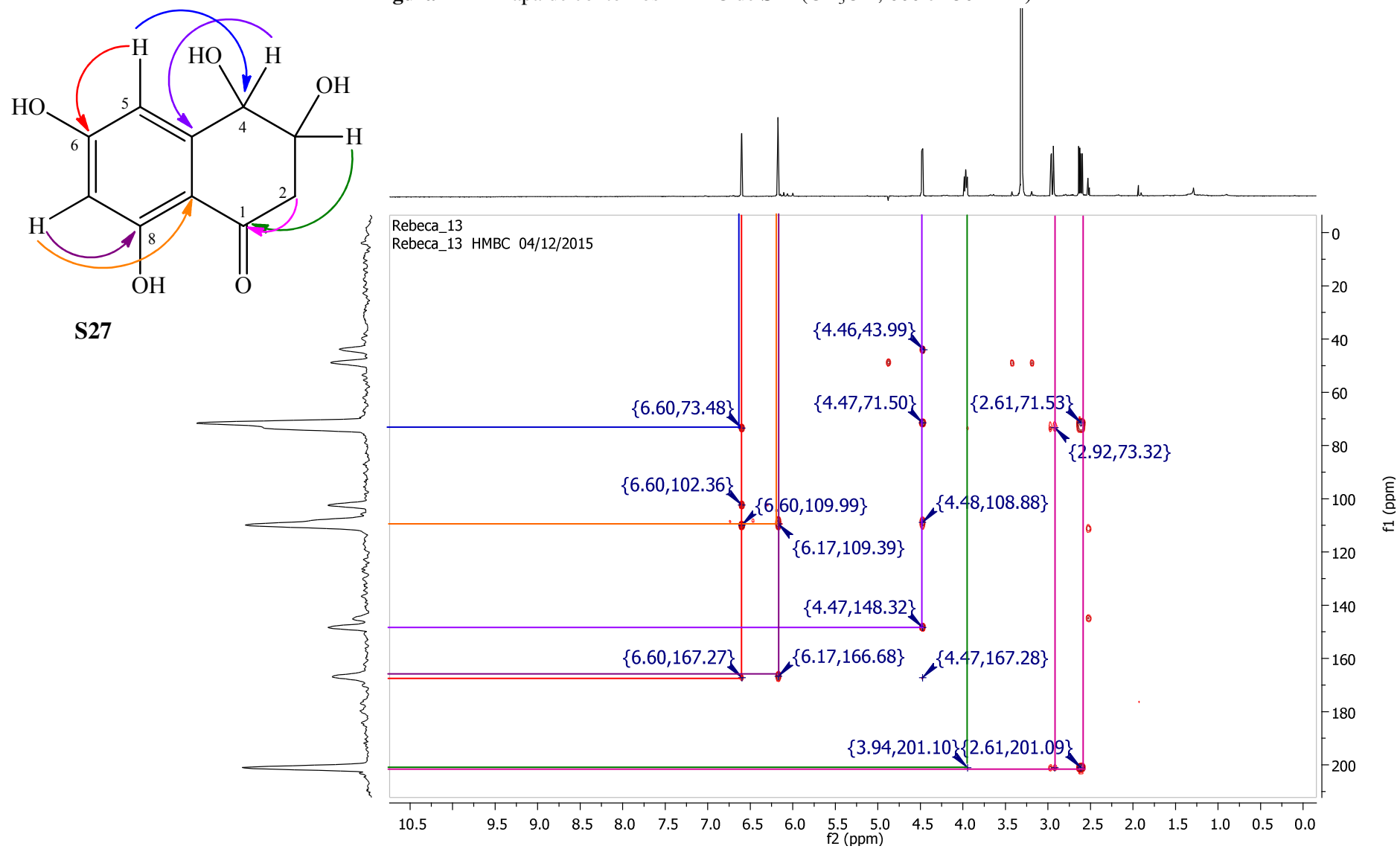


Fonte: o autor.

Figura 240 - Mapa de contornos COSY de **S27** (CD₃OD; 600 MHz)

Fonte: o autor.

Figura 241 - Mapa de contornos HMBC de **S27** (CD₃OD; 600 e 150 MHz)



O espectro de NOESY-1D (**Figura 242**), obtido a partir da irradiação do sinal de H-4 (δ_{H} 4,48), indicou que H-4 e H-3 estão em lados opostos da molécula, já que não foi observado efeito NOE entre os mesmos. Além disso, o valor das constantes de acoplamento do sinal de H-4 ($J_{4-3}/J_{\text{ax-ax}} = 7,2$ Hz; 1H) e do sinal de H-3 ($J_{3-2a}/J_{\text{ax-eq}} = 4,2$; $J_{3-4}/J_{\text{ax-ax}} = 7,5$; $J_{3-2b}/J_{\text{ax-ax}} = 8,7$ Hz; 1H) indicam que esses hidrogênios se encontram em posições pseudo-axiais. Portanto, a substância **S27** foi determinada como a *trans*-4-hidroxi-scytalona.

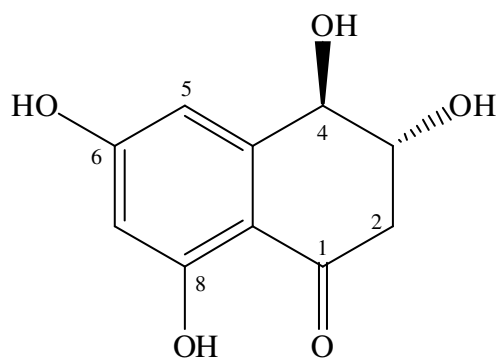
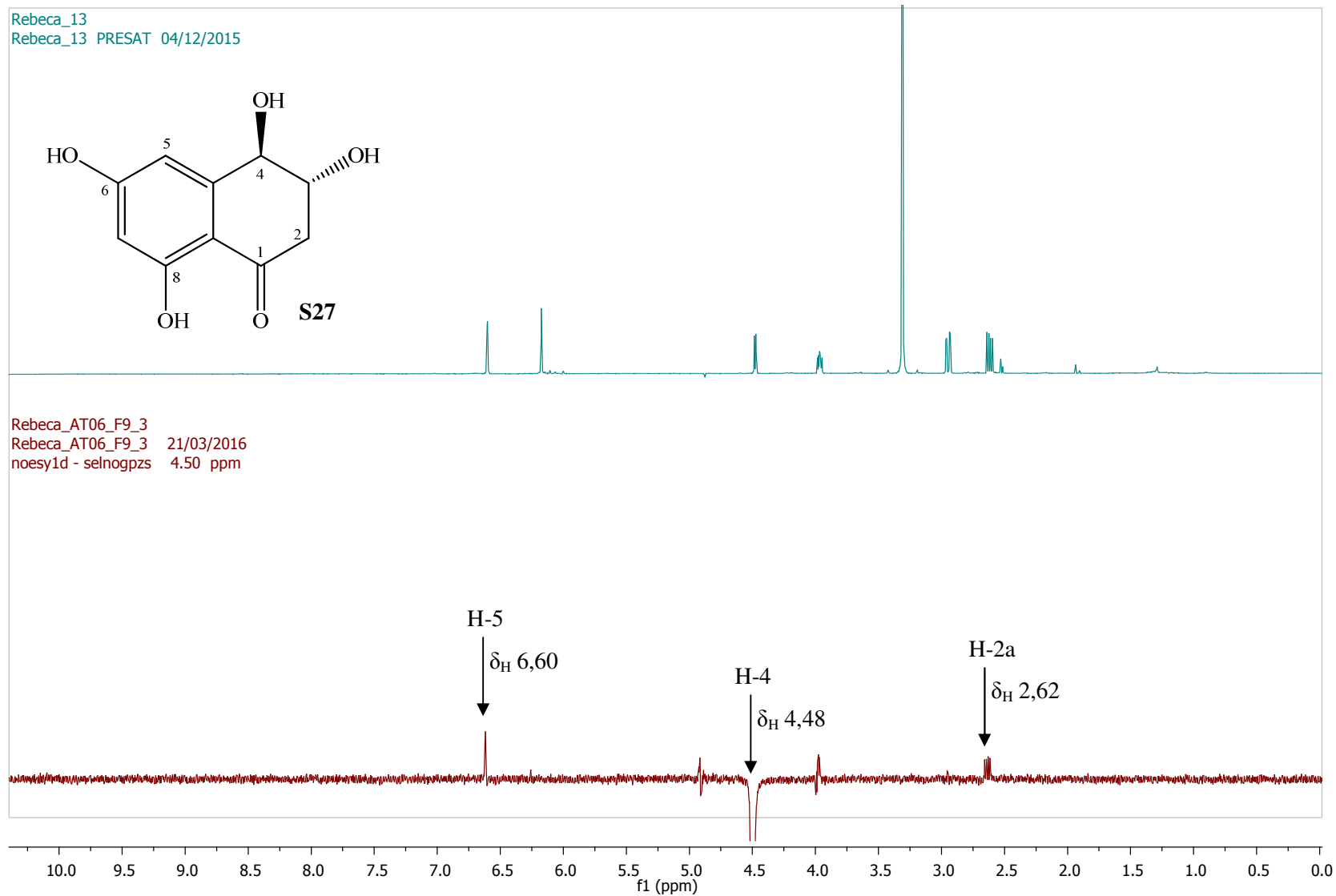
**S27**

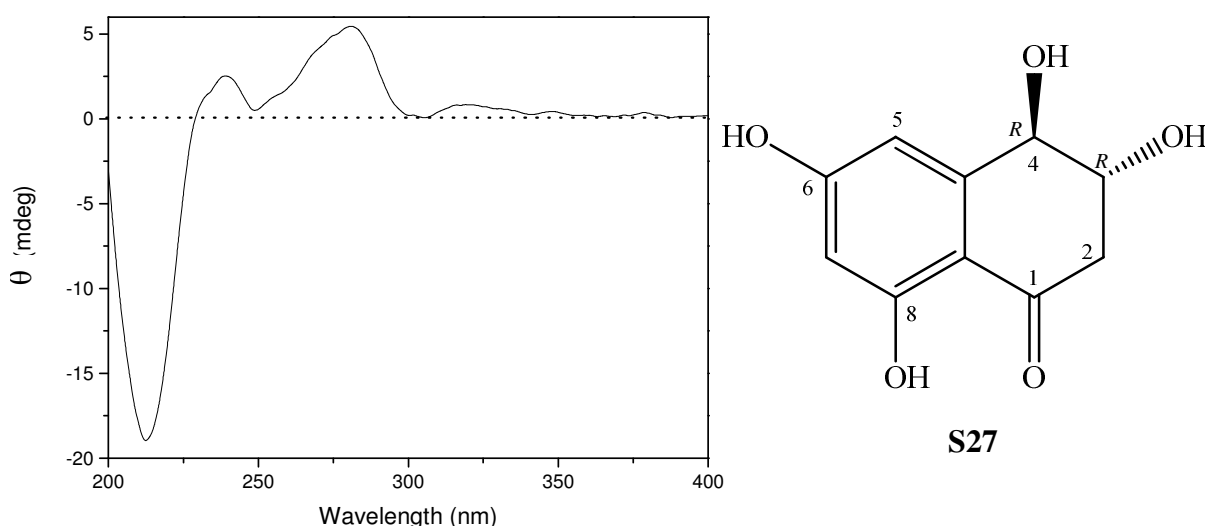
Figura 242 - Espectros de RMN de ^1H de **S27** (azul claro) e NOESY 1D - irradiado em δ_{H} 4,48 (vermelho) (CD_3OD ; 600 MHz)



Fonte: o autor.

O espectro de dicroísmo circular da substância **S27** (**Figura 243**) apresentou efeitos Cotton positivos em 279 ($\Delta\epsilon = +0,71$) e em 241 nm ($\Delta\epsilon = +0,40$) e efeito Cotton negativo em 214 nm ($\Delta\epsilon = -2,49$), indicando assim a configuração *R* para o estereocentro em C-4. Além disso, foi observado efeito Cotton positivo em 321 nm ($\Delta\epsilon = +0,14$) indicando a configuração *R* para o estereocentro em C-3 (BRINGMANN et al., 2001). Portanto, a substância **S27** pode ser nomeada como: (3*R*,4*R*)-3,4,6,8-tetraidroxi-tetralona ou (3*R*,4*R*)-[3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidroxi-l(2H)naftalenona] ou (3*R*,4*R*)-4-hidroxi-scytalona.

Figura 243 - Espectro de dicroísmo circular de **S27**



Fonte: o autor.

Os espectros de massas, de RMN e de dicroísmo circular foram adquiridos no Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **S27** e da *cis*-4-hidroxi-scytalona descritos na literatura (ZHU et al., 2008), bem como os dados de RMN de ^1H da *trans*-4-hidroxi-scytalona (BÜRCKI; MICHEL; TABACCHI, 2003) estão mostrados na **Tabela 59**.

Tabela 59 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para **S27** e para a *cis*-4-hidroxi-scytalona e de RMN de ^1H para a *trans*-4-hidroxi-scytalona.

S27^a			<i>cis</i>-4-hidroxi-scytalona^b		<i>trans</i>-4-hidroxi-scytalona^c
Nº	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)
1		201,1		201,7	
2	2,62 (dd; 9,0; 16,8)	43,9	2,67 (m)	44,9	2,60 (dd; 8,6; 17,0)
	2,95 (dd; 4,2; 16,8)		2,91 (m)		2,96 (dd; 4,2; 17,0)
3	3,97 (ddd; 4,2; 7,5; 8,7)	71,5	4,02 (m)	72,0	3,96 (ddd; 4,2; 7,4; 8,6)
4	4,48 (d; 7,2)	73,5	4,55 (d, 7,8)	74,2	4,48 (d; 7,4)
4a		148,3		149,2	
5	6,60 (dd; 0,9; 2,1)	108,4	6,71 (s)	108,0	6,60 (dd; 1,0; 2,2)
6		166,8		166,5	
7	6,17 (d; 2,4)	102,4	6,22 (s)	102,5	6,18 (d; 2,2)
8		166,8		166,5	
8a		109,0		110,8	
8-OH			12,75		12,80

^a(δ -ppm; 600 e 150 MHz; CD_3OD); ^b(δ_{H} -ppm; 500 e 125 MHz; acetona- d_6) (ZHU et al., 2008); ^c (δ_{H} -ppm; 400 MHz; CD_3OD) (BÜRCKI; MICHEL; TABACCHI, 2003).

Fonte: o autor.

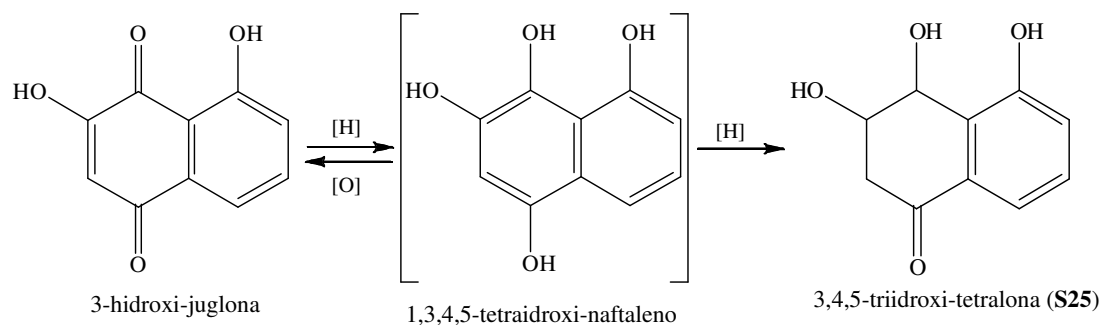
A *trans*-4-hidroxi-scytalona foi isolada pela primeira vez do fungo *Pyricularia orizae* Cavara, um fitopatógeno de plantas de arroz (IWASAKI et al., 1973). Já a *cis*-4-hidroxi-scytalona foi isolada do fungo *Verticillium dahliae* (BELL; STIPANOVIC; PUHALLA, 1976).

O estudo do fungo *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* realizado por Bürcki, Michel e Tabacchi (2003), levou ao isolamento da *cis* e *trans*-4-hidroxi-scytalona, sendo que ambas foram fitotóxicas para a planta *Platanus acerifolia*. Já o fungo *Caryospora callicarpa* YMF1.01026, isolado de um substrato lenhoso submerso em água doce, forneceu a *cis*-4-hidroxi-scytalona que apresentou atividade nematocida contra *Bursaphelenchus xylophilus* (ZHU et al., 2008).

As substâncias **S25**, **S26** e **S27** são biossintetizadas pela via dos policetídeos (**Figura 244**). A scytalona (**S26**) é formada durante a obtenção de 1,8-diidroxi-naftaleno (DHN) melanina. Inicialmente, uma unidade de acetil-CoA e 4 unidades de malonil-CoA ou apenas unidades de malonil-CoA são unidas e ciclizadas através de reações catalisadas pela enzima policetídeo sintase (PKS), formando o 1,3,6,8-tetraidroxi-naftaleno, que é então reduzido, produzindo a scytalona. A desidratação da scytalona leva à formação do 1,3,8-triidroxi-naftaleno, que por sua vez pode ser reduzido, produzindo a vermelona, e esta, ao sofrer uma desidratação fornece o 1,8-diidroxi-naftaleno, a unidade monomérica da DHN melanina (WHEELER et al., 2008).

A substância **S27** também é derivada do 1,3,6,8-tetraidroxi-naftaleno. Após sua oxidação, ocorre a formação da flaviolina, que pode ser reduzida, dando origem a um composto instável, o 1,2,4,5,7-pentaidroxi-naftaleno, que é então reduzido formando a 4-hidroxi-scytalona (**S27**) (WHEELER et al., 2008).

Já a substância **S25** é derivada do 1,3,8-triidroxi-naftaleno. Este é oxidado, formando a 2-hidroxi-juglona, que por sua vez é reduzida ao 1,2,4,5-tetraidroxi-naftaleno, um composto instável que ao sofrer redução forma a 3,4,8-triidroxi-tetralona. Após sua desidratação é produzido o 1,4,5-triidroxi-naftaleno, que é então oxidado dando origem a juglona, e esta pode ser oxidada formando a 3-hidroxi-juglona (WHEELER et al., 2008). Subsequentemente, a 3-hidroxi-juglona pode ser reduzida, produzindo o 1,3,4,5-tetraidroxi-naftaleno, que ao sofrer redução forma a 3,4,5-triidroxi-tetralona (**Figura 244 e 245**).

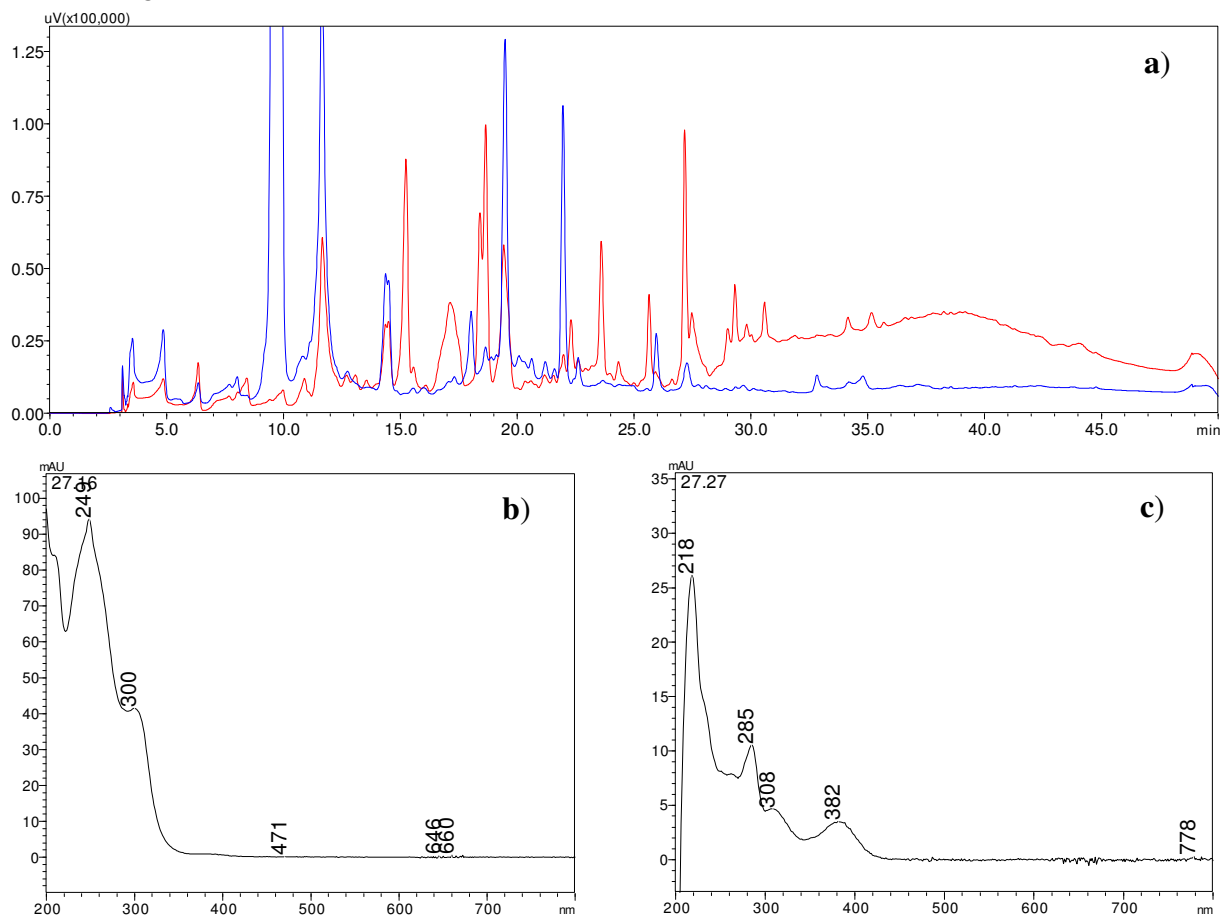
Figura 245 - Proposta biossintética da 3,4,5-tri-hidroxi-tetralona (**S25**) a partir da 3-hidroxi-juglona.

Fonte: o autor.

4.2.9.3.3 Substância **S17**

Para verificar, novamente, se a daidzeína (**S17**) estava presente no meio de cultura utilizado, foi preparado um extrato acetato de etila do mesmo. Um frasco de Erlenmeyer contendo MDB, do mesmo lote usado para o preparo do meio de cultura de AT-06, e 300 mL de água do mar foi mantido incubado a 25°C e 28 dias. Após o processo de extração com acetato de etila, foi obtido 20,4 mg de extrato do meio de cultura, que foi então analisado, juntamente com o extrato de AT-06, por CLAE-DAD no modo analítico usando um gradiente exploratório. Os cromatogramas estão apresentados na **Figura 246**, e evidenciam que o pico referente a daidzeína ($t_R = 27,2$ min.) está presente apenas no extrato de AT-06.

Figura 246 - a) Cromatogramas em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico; 254 nm) do extrato bruto de **AT-06** obtido em escala ampliada (vermelho) e do extrato do meio de cultura (azul); b) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,2 min. (daidzeína) no cromatograma do extrato de **AT-06** (vermelho); c) Espectro no UV-Vis da substância associada ao pico em 27,3 min. no cromatograma do extrato do meio de cultura (azul).



Fonte: o autor.

4.2.9.4 Avaliação da atividade antimicrobiana das subfrações e substâncias obtidas a partir do estudo de AT-03-F8, AT-06-F8 e AT-06-F9

As subfrações obtidas, bem como as substâncias isoladas, a partir do estudo das frações AT-03-F8, AT-06-F8 e AT-06-F9 foram avaliadas, pelo ensaio de difusão em disco de papel, frente aos patógenos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina - MRSA, já que as frações citadas foram ativas apenas contra esses patógenos (seção 4.2.10.1). Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 60**, e podemos verificar que, das substâncias isoladas, o pirogalol (**S24**) mostrou-se ativo contra os dois patógenos testados, enquanto a daidzeína (**S17**) mostrou fraca atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Podemos destacar, ainda, as subfrações AT-06-F9-2 e AT-06-F9-4, já que a primeira mostrou

atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enquanto a segunda foi ativa contra os dois patógenos testados, indicando assim, a necessidade de investigar mais detalhadamente essas subfrações.

Tabela 60 - Atividade antimicrobiana das subfrações e substâncias obtidas a partir do estudo das frações AT-03-F8, AT-06-F8 e AT-06-F9.

Amostra	Zona de inibição - 40 µg/disco (mm)	
	MRSA	<i>E. coli</i>
AT-03-F8-1	0	0
AT-03-F8-2 (S24)	4	3
AT-03-F8-3	0	0
AT-03-F8-4	0	0
AT-03-F8-5	2	3
AT-06-F8-1	0	0
AT-06-F8-2	0	0
AT-06-F8-3	2	1
AT-06-F8-4 (S26)	0	0
AT-06-F8-5	2	1
AT-06-F9-1	2	0
AT-06-F9-2	5	0
AT-06-F9-3 (S27)	0	0
AT-06-F9-4	6	4
AT-06-F9-5 (S17)	2	0
AT-06-F9-6	1	2
Controle Positivo	12	3

Fonte: o autor.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho ressaltam a importância da investigação dos organismos marinhos, bem como de seus micro-organismos associados, visando agregar valor aos produtos oriundos da biodiversidade brasileira.

A partir dos estudos realizados com as algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* (estágio *Falkenbergia*) e *Pyropia spiralis* foi possível identificar ácidos graxos poli-insaturados (poli-unsaturated fatty acid – PUFA) dentre seus constituintes de baixa polaridade, como o ácido eicosapentaenóico, classificado como ácido ômega-3 e considerado um ácido graxo essencial. Foram também isolados nucleosídeos que, juntamente com ácidos graxos poli-insaturados, têm apresentado potencial como agentes terapêuticos e quimiopreventivos, úteis, por exemplo, na prevenção de perda da memória. Esses dados confirmam, assim, a importância de algas marinhas como fonte de substâncias bioativas, e principalmente, seu papel de destaque como alimento nutracêutico, trazendo benefícios à saúde de populações que há centenas de anos as incorporaram em sua dieta. E ainda, garantem bases científicas que justificam a expansão do seu consumo para melhor aproveitamento de seus efeitos benéficos.

O isolamento de linhagens de fungos endofíticos dessas algas reforçaram o conceito de que as mesmas são nichos ecológicos relevantes para a obtenção de micro-organismos. E ainda, contribuiu para a preservação do ambiente marinho, uma vez que para a obtenção das linhagens foi necessária a coleta de pequena quantidade de exemplares das espécies em estudo.

A abordagem adotada para o estudo das linhagens de fungos endofíticos, que incluiu a avaliação preliminar do potencial de bioatividade do extrato bruto de cada linhagem e o estabelecimento do seu perfil químico por CLAE-DAD e por RMN de ^1H , mostrou-se eficiente para a seleção das amostras mais promissoras para prosseguimento dos estudos, e forneceu resultados de alta relevância tanto do ponto de vista químico, como biológico, reforçando a potencialidade desses micro-organismos como fonte de substâncias bioativas, já que mais de 50% dos extratos avaliados mostraram forte atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum*, enquanto cerca de 30% apresentaram atividade citotóxica, principalmente contra linhagens de células tumorais de carcinoma de ovário e glioblastoma humano.

O estudo bioguiado das linhagens *Annulohypoxylon stygium* e *Hypoxylon* sp. evidenciou também seu potencial antimicrobiano, bem como de seus constituintes, com

destacada atividade frente as linhagens de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Escherichia coli*, de alta relevância para a indústria farmacêutica.

A investigação química das linhagens *Nemania bipapillata*, *Sarocladium strictum*, *Annulohypoxylon stygium* e *Hypoxylon* sp., evidenciaram a diversidade estrutural dos constituintes químicos dos fungos endofíticos obtidos de algas marinhas, uma vez que foram isoladas substâncias de diferentes classes como isocumarinas, dicetopiperazinas, tetralonas, isoflavonas, derivados de tirosina e do ácido gálico, além de ftalatos naturais e sesquiterpenos do tipo botriano inéditos na literatura. Muitas dessas substâncias apresentaram bioatividades relatadas em estudos anteriores, principalmente atividades fitotóxica e antimicrobiana.

O isolamento de substâncias como o pirogalol e os ftalatos, indicaram o potencial biotecnológico desses micro-organismos, uma vez que são substâncias com destacada importância industrial.

A variação de parâmetros, como uso de diferentes meios de cultivo ou de diferentes tipos de água (água do mar x água ultra pura) induziu alterações marcantes na produção metabólica e garantiu a obtenção de diferentes compostos a partir de uma mesma linhagem de fungo endofítico, evidenciando o enorme potencial dos micro-organismos para estudos de bioprospecção, já que essas variações, ou co-cultivo de linhagens e/ou uso de eliciadores, podem garantir a diversidade de substâncias produzidas.

As substâncias pertencentes a classe das tetralonas, isoladas nesse estudo das linhagens *Annulohypoxylon stygium* e *Hypoxylon* sp., são características de fungos produtores de 1,8-diidroxinaftaleno melanina. Portanto, o estudo químico desses micro-organismos pode ainda auxiliar na sua classificação taxonômica, considerando que determinadas substâncias são específicas ou de ocorrência restrita a determinadas espécies, gêneros ou famílias de micro-organismos.

Esse estudo contribuiu, ainda, para o conhecimento da quimiodiversidade de organismos e micro-organismos de origem marinha da costa brasileira, já que é um ambiente ainda marcadamente subexplorado do ponto de vista químico.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, A. M. et al. Xenovulene A, a novel GABA-benzodiazepine receptor binding compound produced by *Acremonium strictum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 7, p. 568-573, July 1995.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, 2014. Edição especial.
- AMADE, P.; MALLEA, M.; BOUAÏCHA, N. Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartori. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 2, p. 201-207, Feb. 1994.
- ANDRADE, T. J. A. S. **Investigação química e biológica dos metabólitos secundários derivados de macroalgas marinhas e microrganismos associados**. 2014. 358 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- ANTONIO, J.; MOLINSKI, T. F. Screening of marine invertebrates for the presence of ergosterol-sensitive antifungal compounds. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 1, p. 54-61, Jan. 1993.
- BANERT, K. Acremolin, a stable natural product with an antiaromatic 1H-azirine moiety? A structural reorientation. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 47, p. 6443-6445, Nov. 2012.
- BANSEMIR, A. et al. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 79-84, Mar. 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASARAN, P.; DEMIRBAS, R. M. Spectroscopic detection of pharmaceutical compounds from anaflatoxigenic strain of *Aspergillus parasiticus*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 516-522, 2010.
- BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D.; PUHALLA, J. E. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*: identification of (+)-scytalone as a natural precursor to melanin. **Tetrahedron**, v. 32, n. 12, p. 1353-1356, 1976.
- BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 1, p. 14-19, 1996.
- BEYONDSRING PHARMACEUTICALS. Plinabulin (P) + docetaxel (D) vs D as 2nd-line chemo in patients with advanced NSCLC with at least 1 large lung lesion. **ClinicalTrials.gov**, 2015. Disponível em:
<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02504489?term=plinabulin&rank=1>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 1-49, 2004.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 2, p. 170-244, Feb. 2009.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116-211, Feb. 2015.

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

BORGSCULTE, K. et al. Isolation and structure elucidation of hymatoxins B - E and other phytotoxins from *Hypoxylon mammatum* fungal pathogen of leuce poplars. **Tetrahedron**, v. 47, n. 39, p. 8351-8360, Sept. 1991.

BRINGMANN, G. et al. The absolute configuration of (+)-isoshinanolone and in situ LC-CD analysis of its stereoisomers from crude extracts. **Phytochemistry**, v. 56, n. 4, p. 387-391, Feb. 2001.

BÜRCKI, N.; MICHEL, A.; TABACCHI, R. Naphthalenones and isocoumarins of the fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 191-198, 2003.

BURRESON, B. J.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Haloforms in the essential oil of the red alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). **Tetrahedron Letters**, v. 16, n. 7, p. 473-476, 1975.

BURRESON, B. J.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 856-861, July 1976.

BUSSEY, R. O. III et al. Comparison of the chemistry and diversity of endophytes isolated from wild-harvested and greenhouse-cultivated yerba mansa (*Anemopsis californica*). **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 202-208, Mar. 2015.

CAO, Y. et al. Rapid determination of nucleosides, nucleobases and free amino acids in brown seaweeds using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 675-686, Feb. 2014.

CARVAJAL, A. E. S. S. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. *blazei*) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 493-499, May 2012.

CHANG, C. W. et al. Inhibitory effects of constituents of an endophytic fungus *Hypoxylon investiens* on nitric oxide and interleukin-6 production in RAW 264.7 macrophages. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 6, p. 949-961, June 2014.

CHANG, T. S. et al. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein by fungi used in the preparation of various fermented soybean foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n.5, p. 1330-1333, May 2007.

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

CHEN, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga - *Bangia atropurpurea*. **Water Research**, v.38, n. 4, p. 1014-1018, Feb. 2004.

CHEN, H. et al. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 101, n. 14, p. 5048-5052, Apr. 2004.

CHEN, T. H. et al. A nucleoside-nucleotide mixture may reduce memory deterioration in old senescence-accelerated mice. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3085-3089, Dec. 2000.

CHEN, Y. S. et al. Chemical constituents of the endophytic fungus *Hypoxylon* sp. 12F 0687 isolated from taiwanese *Ilex formosana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 98, n. 8, p. 1167-1176, Aug. 2015.

CHENG, M. J. et al. Constituents of the endophytic fungus *Annulohypoxylon boveri* var. *microspora* BCRC 34012. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 6, p. 1108-1114, June 2011a.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites isolated from the fungus *Biscogniauxia cylindrospora* BCRC 33717. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 4, p. 527-530, Sept. 2011b.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Annulohypoxylon boveri* var. *microspora* BCRC 34012. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 4, p. 536-540, Sept. 2011c.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the endophytic fungus *Annulohypoxylon squamulosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 1, p. 219-223, Mar. 2012.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Annulohypoxylon stygium* BCRC 34024. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 2, p. 536-540, May 2014.

CHINWORRUNGSEE, M. et al. Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 15, p. 1965-1969, Aug. 2001.

CHO, J. Y. et al. Isolation and structural determination of the antifouling diketopiperazines from marine-derived *Streptomyces praecox* 291-11. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1116-1121, June 2012.

CHOI, E. J.; KIM, G. H. Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. **Phytomedicine**, v. 15, n. 9, p. 683-690, Sept. 2008.

CHOMCHEON, P. et al. 3-nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 7, p. 1103-1105, July 2005.

CHU, Y. H. et al. Inhibition of xanthine oxidase by *Rhodiola crenulata* extracts and their phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 17, p. 3742-3749, Apr. 2014.

CHUALÁIN, F. N. et al. The invasive genus *Asparagopsis* (Bonnemaisoniaceae, Rhodophyta): molecular systematics, morphology, and ecophysiology of *Falkenbergia* isolates. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 6, p. 1112-1126, Dec. 2004.

CLOUGH, S. et al. Structure elucidation and synthesis of (4*S*,5*S*,6*Z*,8*E*)-5-hydroxydeca-6,8-dien-4-olide [(*S,S*)-sapinofuranone B] - a novel γ -lactone metabolite of *Acremonium strictum*. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 15, p. 2475-2481, 2000.

COLLADO, I. G.; SÁNCHEZ, A. J. M.; HANSON, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 4, p. 674-686, 2007.

COLLADO, I. G. et al. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 647-650, Feb. 1995.

COLLADO, I. G. et al. Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 513-517, Feb. 1996.

CONTRERAS HERNÁNDEZ, C. A. **Caracterização de genes biossintéticos do antitumoral cosmomicina D**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703-723, Mar. 2014.

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

DALISAY, D. S.; SALUDES, J. P.; MOLINSKI, T. F. Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6654-6657, Nov. 2011.

DEWAPRIYA, P. et al. Tyrosol exerts a protective effect against dopaminergic neuronal cell death in in vitro model of Parkinson's disease. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1147-1157, Nov. 2013.

DEWICK, P. M. The acetate pathway: fatty acids and polyketides. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. Chap. 3, p. 35-120.

DING, L. et al. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. **Current Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 229-235, Mar. 2008.

DONG, Y. et al. New aldose reductase inhibitors N99-596 A and B from *Streptomyces*. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 11, p. 737-739, Nov. 2005.

DUARTE, K. et al. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 97-110, Apr. 2012.

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

EL-BEIH, A. A. et al. (3*R*,4*aR*,5*S*,6*R*)-6-hydroxy-5-methylramulosin: a new ramulosin derivative from a marine-derived sterile mycelium. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 6, p. 953-954, June 2007.

ELKAHOUI, S. et al. Cyclo-(His,Leu): a new microbial diketopiperazine from a terrestrial *Bacillus subtilis* strain B38. **Natural Product Research**, v. 27, n. 2, p. 108-116, Jan. 2013

FARAG, M. A. Structure-activity relationships of antimicrobial gallic acid derivatives from pomegranate and acacia fruit extracts against potato bacterial wilt pathogen. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, n. 6, p. 955-962, June 2015.

FERNÁNDEZ-SILVA, F. et al. Combination therapy in the treatment of experimental invasive fungal infection by *Sarocladium (Acremonium) kiliense*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 2, p. 136-139, Aug. 2014.

FINDLAY, J. A.; KWAN, D. Scytalone (3,6,8-trihydroxytetralone), a metabolite from a *Scytalidium* species. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1617-1619, May 1973.

FLEWILLING, A. J. et al. Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. **Current Science**, v. 109, n. 1, p. 88-111, July 2015.

FLORES, A. C. et al. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 923-932, May 2013.

FOSTER, P. M. D. et al. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 3, p. 231-235, May 2001.

FUJIMOTO, Y. et al. Studies on the metabolites of *Penicillium diversum* var. *aureum*. I. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 1497-1500, Apr. 1986.

GATLIN, L.; DAVIS, J. C. Comparison of ribose and deoxyribose nucleosides by NMR and deductions regarding ribose and deoxyribose nucleic acids. I. Tautomeric form. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 23, p. 4464-4470, Dec. 1962.

GENOVESE, G. et al. The mediterranean red alga *Asparagopsis*: a source of compounds against *Leishmania*. **Marine drugs**, v. 7, n. 3, p. 361-366, Sept. 2009.

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

GREFF, S. et al. Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 5, p. 1150-1155, May 2014.

GUIMARÃES, D. O. et al. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 188-194, 2009.

GUO, J. M. et al. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 6, p. 860-863, Mar. 2004a.

GUO, J. M. et al. Effect of daidzein on cell growth, cell cycle, and telomerase activity of human cervical cancer in vitro. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 14, n. 5, p. 882-888, Sept. 2004b.

HAMMERSCHMIDT, L. et al. Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 24, p. 3463-3468, June 2014.

HAN, Y. H. et al. Pyrogallol inhibits the growth of human lung cancer Calu-6 cells via arresting the cell cycle arrest. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1605-1609, Sept. 2008.

HOANG, V. L.T. et al. Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolated from a marine *Pseudomonas* strain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2083-2088, Mar. 2008.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

HSIEH, H. M.; JU, Y. M.; ROGERS, J. D. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. **Mycologia**, v. 97, n. 4, p. 844-865, July 2005.

HU, J. F. et al. New 2-*o*-methylrhamno-isoflavones from *Streptomyces* sp. **Natural Product Research**, v. 17, n. 6, p. 451-458, Nov. 2003.

HU, Y. et al. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 202-221, Jan. 2015.

- HUANG, H. et al. Cyclic peptides from an endophytic fungus obtained from a mangrove leaf (*Kandelia candel*). **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 11, p. 1696-1699, Nov. 2007.
- HUANG, R. et al. A new isoflavone derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 6, p. 966-969, Jan. 2013.
- HUANG, R. M. et al. A new 1,4-diazepine from South China Sea marine sponge *Callyspongia* species. **Molecules**, v. 15, n. 2, p. 871-877, Feb. 2010.
- HUSAIN, S. M. Unprecedented role of hydronaphthoquinone tautomers in biosynthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 37, p. 9806-9811, Sept. 2014.
- IÓCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 5, p. 646-675, May 2014.
- IWASAKI, S. et al. Isolations of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* Cavara. **Tetrahedron Letters**, v. 14, n. 37, p. 3537-3542, 1973.
- IYÚ, D. et al. Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a P2Y₁₂ antagonist. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 2, p. 416-422, Feb. 2011.
- JAYATILAKE, G. S. et al. Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 3, p. 293-296, Mar. 1996.
- JONES, A. J. et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance: naturally occurring nucleosides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 65, n. 1, p. 27-30, Jan. 1970.
- JULIANTI, E. et al. Acremostriectin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus *Acremonium strictum*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 12, p. 2592-2594, Dec. 2011.
- JULIANTI, E. et al. Acremolin, a new 1H-azirine metabolite from the marine-derived fungus *Acremonium strictum*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 23, p. 2885-2886, June 2012.
- KALE, M. S.; LADDHA, K. S. Isolation, characterization and quantification of isoflavone in *Momordica dioica* Roxb. Ex Wild (Cucurbitaceae) fruits. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 5, n. 4, p. 28-36, Oct. 2012.
- KHAMTHONG, N. et al. An antibacterial cytochalasin derivative from the marine-derived fungus Diaporthaceae sp. PSU-SP2/4. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 5-9, Dec. 2014.
- KJER, J. et al. P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 479-490, Mar. 2010.
- KOKUBUN, T. et al. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 5, p. 779-782, Mar. 2003.

- KONTANI, M.; SAKAGAMI, Y.; MARUMO, S. First β -1,6-Glucan biosynthesis inhibitor, bisvertinolone isolated from fungus, *Acremonium strictum* and its absolute stereochemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 16, p. 2577-2580, Apr. 1994
- KROHN, K. et al. Botryane metabolites from the fungus *Geniculosporium* sp. isolated from the marine red alga *Polysiphonia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 400-405, Mar. 2005.
- KUHNERT, E. et al. New *Hypoxylon* species from Martinique and new evidence on the molecular phylogeny of *Hypoxylon* based on ITS rDNA and β -tubulin data. **Fungal Diversity**, v. 64, n. 1 p. 181-203, Jan. 2014.
- KUHNERT, E. et al. Botryane, noreudesmane and abietane terpenoids from the ascomycete *Hypoxylon rickii*. **Phytochemistry**, v. 117, p. 116-122, Sept. 2015a.
- KUHNERT, E. et al. Lenormandins A-G, new azaphilones from *Hypoxylon lenormandii* and *Hypoxylon jaklitschii* sp. nov., recognised by chemotaxonomic data. **Fungal Diversity**, v. 71, n. 1, p. 165-184, Mar. 2015b.
- KUMAR, N. et al. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 355-364, Feb. 2013.
- KUMARI, P. et al. Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. **Phytochemistry**, v. 86, p. 44-56, Feb. 2013.
- LEAL, P. C. et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793-1796, Sept. 2009.
- LEE, K. H. et al. Anti-leukaemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 5, p. 593-598, May 2000.
- LI, H. et al. Bioactive cyclic dipeptides from a marine sponge-associated bacterium, *Psychrobacter* sp. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 16, n. 4, p. 356-363, Dec. 2008.
- LI, W.; WANG, C. Biodegradation of gallic acid to prepare pyrogallol by *Enterobacter aerogenes* through substrate induction. **BioResources**, v. 10, n. 2, p. 3027-3044, May 2015.
- LI, X. J. et al. Toxins from a symbiotic fungus, *Leptographium qinlingensis* associated with *Dendroctonus armandi* and their in vitro toxicities to *Pinus armandi* seedlings. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, n. 2, p. 239-247, Oct. 2012.
- LIU, K. W. et al. Chemical constituents of the rhizome of *Typhonium giganteum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 6, p. 1079-1081, Dec. 2014
- MANILAL, A. et al. Bioactivity of the red algae *Asparagopsis taxiformis* collected from the southwestern coast of India. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 2, p. 93-100, Apr. 2010.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, Jan. 2002.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-265, June 2010.

McCONNEL, O.; FENICAL, W. Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 3, p. 367-374, Mar. 1977.

MITSUI-SAITOH, K. et al. Protective effects of cyclo(L-Leu-L-Tyr) against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 335-342, Mar. 2011.

MIYAMOTO, E. et al. Characterization of vitamin B₁₂ compounds from korean purple laver (*Porphyra* sp.) products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2793-2796, Apr. 2009.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, Dec. 1983.

MURAKAMI, S. et al. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. **Metabolites**, v. 4, n. 3, p. 532-546, Sept. 2014.

NAMIKOSHI, M. et al. Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. **Marine Drugs**, v. 4, n. 4, p. 290-297, Dec. 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. 34, May 2015.
doi:10.3389/fchem.2015.00034.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, Mar. 2016.

NI, N. et al. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 5, p. 1567-1572, Mar. 2008.

NONG, X. H. et al. Polyketides from a marine-derived fungus *Xylariaceae* sp. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1718-1727, May 2013.

ODA, S. et al. Synthesis of (-)-β-caryophyllene oxide via regio- and stereoselective endocyclic epoxidation of β-caryophyllene with *Nemania aenea* SF 10099-1 in a liquid-liquid interface bioreactor (L-L IBR). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 561-565, Dec. 2011.

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

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

OSTERHAGE, C. et al. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 20, p. 6412-6417, Oct. 2000.

PAUL, N. A.; NYS, R.; STEINBERG, P. D. Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. **Marine Ecology Progress Series**, v. 306, p. 87-101, Jan. 2006.

PELLATTI, F.; BENVENUTI, S. Chromatographic and eletrophoretic methods for the analysis of phenetylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1/2, p. 71-88, Aug. 2007.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Supl. 1.

PUOPOLO, G. et al. *Lysobacter capsici* AZ78 produces cyclo(L-Pro-L-Tyr), a 2,5-diketopiperazine with toxic activity against sporangia of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 4, p. 1168-1180, Oct. 2014.

QUANG, D. N. et al. Chemical constituents of the ascomycete *Daldinia concentrica*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p. 1869-1874, Dec. 2002.

QUANG, D. N. et al. Cohaerins C-F, four azaphilones from the xylariaceous fungus *Annulohypoxylon cohaerens*. **Tetrahedron**, v. 62, n. 26, p. 6349-6354, June 2006.

RAHALISON, L. et al. Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopatogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, v. 60, n. 1, p. 41-44, Jan. 1994.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 2, p. 290-344, Feb. 2011.

RATEB, M. E. et al. Bioactive diterpene derivatives from the marine sponge *Spongionella* sp. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1471-1476, Aug. 2009.

ROSLEV, P. et al. Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 969-976, Mar. 2007.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. An [11]cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 12, p. 1409-1411, Dec. 2009.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Cyclohexene, diketopiperazine, lactone and phenol derivatives from the sea fan-derived fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 3, p. 375-380, Mar. 2010.

RYU, J. et al. Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 3, p. 796-803, Sept. 2014.

SALVADOR, N. et al. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. **Scientia Marina**, v. 71, n. 1, p. 101-113, Jan. 2007.

SEMAR, M. et al. Lachnellins A, B, C, D, and naphthalene-1,3,8-triol, biologically active compounds from a *Lachnellula* species (Ascomycetes). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 51, n. 7/8, p. 500-512, Aug. 1996.

SENANAYAKE, T. H.; WARREN, G.; VINOGRADOV, S. V. Novel anticancer polymeric conjugates of activated nucleoside analogues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 1983-1993, Oct. 2011.

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

SILVA, J. I. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 44- 52, Jan. 2013.

SMETANINA, O. F. et al. Metabolites of the marine fungus *Humicola fuscoatra* KMM 4629. **Russian Chemical Bulletin.**, v. 53, n. 11, p. 2643-2646, Nov. 2004.

SOBOLEVSKAYA, M. P. et al. New metabolites from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 7-12, Mar. 2016.

SPANOU, C. et al. Antioxidant activity of a series of fluorinated pyrano-nucleoside analogues of N⁴-benzoyl cytosine and N⁶-benzoyl adenine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 7, p. 695-704, July 2007.

STADLER, M. et al. The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the “One Fungus-One Name” (1F1N) concept. **Mycology**, v. 4, n. 1, p. 5-21, Jan. 2013.

STARK, T.; HOFMANN, T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7222-7231, Sept. 2005.

STOLARSKI, R.; DUDYCZ, L.; SHUGAR, D. NMR studies on the *syn-anti* dynamic equilibrium in purine nucleosides and nucleotides. **European Journal of Biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 111-121, July 1980.

SU, J. C.; HASSID, W. Z. Carbohydrates and nucleotides in the red alga *Porphyra perforata*. II. Separation and identification of nucleotides. **Biochemistry**, v. 1, n. 3, p. 474-480, May 1962.

- SUGIURA, R. et al. Acremomannolipin A, the potential calcium signal modulator with a characteristic glycolipid structure from the filamentous fungus *Acremonium strictum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6735-6739, 2012.
- SUGIYAMA, Y. Indole derivatives from a marine sponge-derived yeast as DPPH radical scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2069-2071, Nov. 2009.
- SUMMERBELL, R. C. et al. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 139-162, Mar. 2011.
- SUN, R. R. et al. Three new xanthone derivatives from an algicolous isolate of *Aspergillus wentii*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 65-68, Jan. 2013.
- SURUP, F. et al. Cohaerins G–K, azaphilone pigments from *Annulohyphoxylon cohaerens* and absolute stereochemistry of cohaerins C–K. **Phytochemistry**, v. 95, p. 252-258, Nov. 2013.
- SUTHERLAND, J. E. et al. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 47, n. 5, p. 1131-1151, Oct. 2011.
- TAKANO, S. et al. Isolation and structure of a 334 nm UV-absorbing substance, porphyrin-334 from the red alga *Porphyra tenera* Kjellman. **Chemistry Letters**, v. 8, n. 4, p. 419-420, Apr. 1979.
- TAMURA, Y. et al. Occurrence of anserine as an antioxidative dipeptide in a red alga, *Porphyra yezoensis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 561-563, Mar. 1998.
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, v. 14, n. 2, p. 83-90, 1991.
- THOMASI, S. S. **Aplicação de LC-SPE/NMR na caracterização de substâncias isoladas de cultivos da bactéria marinha *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2**. 2014. 193 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- TIAN, C. et al. Bio-source of di-n-butyl phthalate production by filamentous fungi. **Scientific Reports**, v. 6, Feb. 2016. doi:10.1038/srep19791.
- TOMAZ, P. R. U. **Desenvolvimento e validação de método de análise por cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO₂ atmosférico na composição de metabólitos polares de cana-de-açúcar**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- TRISUWAN, K. et al. Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 554-557, Mar. 2009.
- UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States). W. Fenical; P. R. Jensen; X. C. Cheng. **Avrainvillamide, a cytotoxic natural product, and derivatives thereof**. US 006066635A, 23 Mar. 1999, 23 May 2000a.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States). W. Fenical; P. R. Jensen; X. C. Cheng. **Halimide, a cytotoxic natural product, and derivatives thereof**. US 006069146A, 12 Nov. 1998, 30 May 2000b.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WHALLEY, A. J. S.; EDWARDS, R. L. Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 802-810, Dec. 1995.

WHEELER, M. H. et al. Identification of 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in *Monosporascus cannonballus* and the analysis of hexaketide and pentaketide compounds produced by wild-type and pigmented isolates of the fungus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4113-4120, June 2004.

WHEELER, M. H. et al. New biosynthetic step in the melanin pathway of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*: evidence for 2-Acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene as a novel precursor. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 10, p. 1699-1711, Oct. 2008.

WOOLARD, F. X.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Halogenated acetamides, but-3-en-2-ols, and isopropanols from *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trev. **Tetrahedron**, v. 32, n. 22, p. 2843-2846, 1976.

WOOLARD, F. X.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Halogenated acetic and acrylic acids from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 4, p. 617-620, 1979.

WU, M. D. et al. Phytochemical investigation of *Annulohypoxylon ilanense*, an endophytic fungus derived from *Cinnamomum* species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 493-505, Mar. 2013.

YAN, S. et al. Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 9, p. 1689-1700, Sept. 2011.

YOSHIKI, M. et al. Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, porphyra-334 by heat treatment. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1127-1132, Apr. 2009.

YUAN, J. P. et al. Distribution of nucleosides and nucleobases in edible fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 809-815, Feb. 2008.

YUAN, W. H. et al. Lasiodiplodin analogues from the endophytic fungus *Sarocladium kiliense*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 3, p. 363-365, Mar. 2013.

YUAN, Z. et al. The chemical constituents from red alga *Gymnogongrus flabelliformis* Harv. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 26, n. 2, p. 190-192, May 2008.

ZENG, P. Y. et al. In vitro antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3169-3179, 2011.

ZHANG, P. et al. New indole-diterpenoids from the algal-associated fungus *Aspergillus nidulans*. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 182-185, June 2015.

ZHANG, Q. et al. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 1, p. 105-111, Jan. 2004.

ZHANG, Z. et al. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1124-1129, Mar. 2010.

ZHOU, C. et al. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2046-2051, Feb. 2012.

ZHU, Y. et al. Screening and isolation of antinematodal metabolites against *Bursaphelenchus xylophilus* produced by fungi. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 375-380, Sept. 2008.

ZHUANG, P. et al. Two new compounds from marine-derived fungus *Penicillium* sp. F11. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 3, p. 197-203, Mar. 2012.