
LISINÉIA MARIA ZANARDI

**Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos
Associados a *Senna spectabilis***

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

Orientadora: Prof^a Dra. Ângela Regina
Araújo

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Z27e	Zanardi, Lisinéia Maria Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados a <i>Senna spectabilis</i> / Lisinéia Maria Zanardi. - Araraquara : [s.n], 2010 253 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Angela Regina Araujo 1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Metabólitos secundários. I. Título.
------	---

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome Lisinéia Maria Zanardi
Filiação Santo Darci Zanardi e Lídia Zanardi
Nascimento 28/11/1980 - Corbélia/PR - Brasil

Endereço profissional

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

Rua Prof. Francisco Degni, s/no – Araraquara-SP,
CEP: 14081-970, SP - Brasil
Telefone: 16 33016600 (ramal 6793)
lisineia@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2006 - 2010

Doutorado em Química pela Universidade Estadual Paulista- UNESP - Araraquara, São Paulo.

Título: Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis*

Orientador: Angela Regina Araújo

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2006

Mestrado em Química pela Universidade Estadual Paulista - UNESP – Araraquara, SP

Título: Prospecção química em *Phomopsis cassiae*, um fungo endofítico isolado de *Senna spectabilis* (Ano de obtenção: 2006)

Orientador: Angela Regina Araújo

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

1999 - 2003

Graduação em Licenciatura Química.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel, Brasil

Título: Polímeros, uma Proposta para Contextualizar Alguns Conceitos de Química com o Cotidiano do Aluno

Orientador: Conceição Fátima Alves Olguin

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, C. M., SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; ZANARDI, L. M.; EVANGELISTA, A. H.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2. Two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences.** , v. 64, p. 824 - 830, 2009.

2. SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (leguminosae). **Phytochemistry.** , v. 67, p. 1964 - 1969, 2006.

Últimos trabalhos publicados em anais de eventos

1. ZANARDI, L. M.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Citocalasina D produzida por *Acremonium* sp. isolado como fungo endofítico de *Senna spectabilis* In: 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.

-
2. CHAPLA, V. M.; ZANARDI, L. M.; LOPES, M. N.; CAMARA, M. P. S.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S. Citocalasinas produzidas pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Cassia spectabilis* In: 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.
 3. CHAPLA, V. M.; ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Diketopiperazines from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus in *Senna spectabilis* In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, 2009, Sao Pedro, SP.
 4. BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; ARAÚJO, A. R. Trichothecenes from endophytic fungus *Myrothecium gramineum* associated with *Senna spectabilis* In: 2nd Brazilian Conference On Natural Products and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, 2009, São Pedro, SP.
 5. ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Potencial químico e biológico de fungos endofíticos associados a *Cassia spectabilis* In: 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.
 6. ZANARDI, L. M.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ARAÚJO, A. R.; CASTRO-GAMBOA, I.; COSTA NETO, C. M.; TREVISAN, H. C. New bioactive chromone derivatives from the endophytic fungus *Phomopsis cassiae* In: 48th Annual Meeting American Society of Pharmacognosy, 2007, Portland, Maine.
 7. ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; PFENNING, L. H. Potencialidade de *Phomopsis cassiae* na produção de metabólitos novos e bioativos In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

Produção Técnica

Trabalhos técnicos

1. BIASETTO, C. R.; ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R.; **Prospecção de atividade antimicrobiana e biocatalítica em fungos endofíticos**, 2008-2009. Duração: 8 meses (Supervisão científica de trabalho de Iniciação científica)
2. BORGES, F. M.; ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R. **Prospecção de atividade antimicrobiana e biocatalítica em fungos endofíticos**, 2009-2010 Duração: 18 meses
3. PELLEGRINI, M. M.; ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R.; **Prospecção biológica do fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* (ALG-01) isolado de *Alchornea glandulosa***, 2008-2009, Duração:18 meses (Supervisão científica de trabalho de monografia)
4. HABECK, T. R.; ZANARDI, L. M.; ARAÚJO, A. R. **Triagem química e biológica dos fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis*, uma espécie vegetal do cerrado**, 2009-2009, Duração:12 meses (Supervisão científica de trabalho de monografia)

Demais produções técnicas

1. ZANARDI, L. M.

Estudo químico biológico de fungos endofíticos associados à *Senna spectabilis*, 2009.
(Palestra apresentada USP- São Carlos)

LISINÉIA MARIA ZANARDI

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

Araraquara, 24 de setembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA



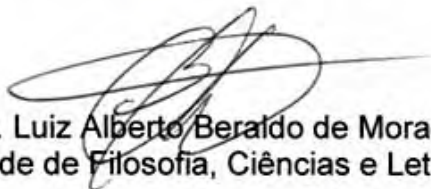
Profª Drª Angela Regina Araujo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



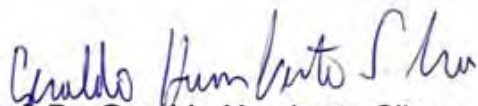
Profª Drª Marcia Nasser Lopes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Lourdes Campaner dos Santos
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto



Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva
Universidade Federal de Sergipe / UFS / Itabaiana

DEDICO ESTE TRABALHO...

Aos meus pais Lídia e Santo, por todo amor, carinho e dedicação, e principalmente, por terem “sempre” apoiado todas as minhas decisões, mesmo quando elas me levaram para longe de vocês. Vocês são o sentido da minha vida, e a força que me faz vencer.

À minha orientadora Angela, pela amizade e por todo carinho, paciência e dedicação. Por ter acreditado na minha capacidade e no meu trabalho. Sua confiança e entusiasmo foram fundamentais para minha formação.

Às minhas queridas amigas Silvana, Adriana e Josiane, por todo carinho, amizade e incentivo. Sem o apoio de vocês essa conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença suprema e constante em minha vida...

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional em toda a minha vida. Obrigada por todos os esforços que fizeram para dar a mim e meus irmãos a possibilidade de aproveitar todas as oportunidades para crescer e chegar onde sonhamos – AMO MUITO VOCÊS – Obrigada mãe pela doação, carinho e amor que dedica a sua família. Você é um exemplo de mãe, mulher e profissional. Obrigada pai pelo amor, carinho e dedicação, você é exemplo de luta e coragem. Com você aprendi que “não importa o quanto a vida pode ser dura, devemos sempre mostrar a ela que somos mais fortes”.

À Professora Angela, muito obrigada pela sua incansável dedicação e paciência. Por todos os conselhos, conversas e ensinamentos (de química e de vida), e principalmente por ter me ajudado a “moldar” a profissional que sou hoje. Muito mais que uma orientadora, uma amiga, obrigada por ter me acolhido em seu grupo e na sua vida, serei eternamente grata por tudo.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica, pelos ensinamentos transmitidos, pelas valiosas discussões e pela amizade.

Aos doutores Nivaldo Boralle e Alberto Alécio, por toda dedicação e compromisso. Obrigada por estarem sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos e por serem sempre tão prestativos, não medindo esforços para colaborar com o trabalho de todos.

Às funcionárias da biblioteca e da pós-graduação por serem sempre tão prestativas e dedicadas.

Às professoras Lúcia Xavier e Lourdes Campaner que participaram do exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

Aos funcionários do IQ pela dedicação e disposição em ajudar.

As minhas queridas amigas e colegas de grupo Camila Martins, Vanessa Chapla e Carolina Biasetto, pelo carinho, amizade, companheirismo, e valiosas discussões sobre o trabalho. Por estarem sempre dispostas a me ajudar e ouvir dentro e fora do laboratório.

Aos ex e atuais alunos de iniciação científica, Mariana Pellegrini, Fernando Borges, Alana Evangelista e Thomas Habeck, obrigada pelo carinho e confiança.

Aos amigos de grupo: Juliana, Vanessa, Carol, João, Miller, Lucimar, Fernando, Thomas pela convivência e colaboração dentro e fora do laboratório, e pelos agradáveis e divertidos jantares nas reuniões do grupo.

Aos meus amigos e ex-colegas de grupo: Dr. Geraldo H. Silva, Dr. Mariana C. Caffêu, Dr. Helder L. Teles e Ms. Renata Sordi, por terem me acolhido tão carinhosamente quando entrei para o grupo de pesquisa, sempre dispostos a me ajudar e transmitir seus conhecimentos.

A todos os amigos e colegas do IQ com quem convivi durante os anos de pós-graduação, em especial aos do Departamento de Química Orgânica e NuBBE, que de alguma maneira ou outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, e também pelos momentos de alegria compartilhados que fizeram a rotina do laboratório e no Instituto ainda mais agradável. As festas de defesas e final de ano, reuniões de grupo e congressos estarão sempre guardados.

À Prof. Dr. Conceição Olguin por ter despertando em mim a vontade de seguir o caminho da pesquisa. Por sempre ter me apoiado desde a graduação e me incentivado a vir para cá.

E por fim, mas não menos importante...

À minha família, que mesmo de longe sempre esteve presente e na torcida...

Meus irmãos Lisandro, Lislaine e Lismar que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente, em busca dos meus objetivos. Obrigada pelo amor, carinho e amizade e compreensão.

Meus sobrinhos Larissa, Ariel e Camila, por encherem a minha vida de alegria.

Minhas cunhadas Silvana, Mayara e meu cunhado Erlon, obrigada pelo carinho, pelo apoio e amizade.

Ao Renato, por todo amor, carinho e incentivo. Obrigada por tudo, por ter acreditado e insistido. Perto de você os dias são mais leves e alegres.

Às minhas queridas amigas Juliana Gubiani e Michele Souza, obrigada pela amizade, apoio, pela maravilhosa convivência e ilimitada paciência, e pela alegria que vocês transmitem a todos a sua volta.

Aos meus eternos grandes amigos – e anjos-da-guarda – Silvana, Adriana, Josiane e Rafael. Obrigada pela amizade tão especial, pelos maravilhosos momentos que passamos juntos e por sempre se fazerem presente. Eu não conseguiria ser justa, se tentasse citar aqui todos os motivos pelo qual sou grata a vocês, por isso: Obrigada por TUDO, e por serem estas pessoas tão especiais, que entraram na minha vida, cada um a sua maneira, para nunca mais sair.

“... Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, peder com classe
e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence
a quem se atreve...

E a vida é “muito” para ser insignificante...”

Charles Chaplin

ZANARDI, Lisinéia Maria. **Estudo Químico e Biológico dos Fungos Endofíticos Associados a *Senna spectabilis***. 2010. Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

RESUMO

Este trabalho descreve o isolamento de 43 fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Senna spectabilis*, e a triagem química e biológica destes. Os extratos brutos em AcOEt produzidos pelos fungos foram avaliados quimicamente por CCDC, CLAE-DAD e RMN de ^1H , e submetidos a bioensaios para avaliação da potencialidade antifúngica, antioxidante e anticolinesterásica, onde se mostram promissores. A partir dos resultados obtidos os fungos *Myrothecium gramineum* e *Acremonium* sp. foram selecionados para crescimento em escala ampliada, em meio de cultivo MBD, visando a obtenção do extrato bruto para isolamento e determinação estrutural dos metabólitos produzidos. Nesta etapa foram utilizados dois modos de incubação (estático e sob agitação) para avaliação da influência do modo de crescimento na produção metabólica, evidenciando que não ocorreram mudanças significativas na produção dos metabólitos secundários. Do extrato bruto obtido de *M. gramineum* foi isolada a Verrucarina A, como um precipitado, durante a solubilização do extrato em MeOH. O sobrenadante foi então submetido a fracionamento cromatográfico e levou ao isolamento de 3 dicetopiperazinas, sendo a ciclo (Pro-Tyr), ciclo (L-Pro-L-Leu) e a ciclo(D-Pro-D-Phe), e 4 tricotocenos, a Verrucarina A (já isolada como precipitado), Roridina A e Isororidina A e a Verrucarina L. Durante o processo de concentração para a obtenção do extrato bruto de *Acremonium* sp., ocorreu a formação de cristais em forma de filetes que ficaram aderidos ao balão. Os cristais foram separados e identificados como a Citocalasina D. O extrato bruto resultante da separação destes cristais foi submetido a fracionamento cromatográfico levando ao isolamento de 7 substâncias: uma xantona (Fusaridina), 4 isocumarinas [(R)-8-metoxi-meleína; (3S, 4S)-5-carbometoxi-4-hidroximeleína; (3R)-5-carbometoximeleína e (3S)-5-carboetoxi-meleína] e a Griseofulvina e Desclorogriseofulvina, sendo (3S, 4S)-5-carbometoxi-4-hidroximeleína e (3S)-5-carboetoxi-meleína substâncias inéditas.

Palavras-chave: fungos endofíticos, *Senna spectabilis*, *M. gramineum*, *Acremonium* sp., metabólitos especiais.

ZANARDI, Lisinéia Maria. Chemical and Biological Study of Endophytic Fungi Associated with *Senna spectabilis*. 2006. Thesis in Chemistry – Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

ABSTRACT

This work reports the isolation of 43 endophytic fungi associated with *Senna spectabilis*, and the chemical and biological screening of their extracts. The AcOEt crude extracts produced by fungi were submitted to chemical analysis by TLC, DAD-HPLC, NMR and bioassays to evaluation of antifungal, antioxidant and anticholinesterase potential, which showed promising. The results enabled us to select the fungi *Myrothecium gramineum* and *Acremonium* sp. to growth on a large scale for isolation and structural determination of metabolites produced. The fungal strains were cultivated in liquid media PDB to obtaining the crude extracts. In this stage, we used two modes of incubation (static mode and under agitation), to evaluate the influence of the growing mode in production of the secondary metabolites, showing that there were no significant changes in metabolic production. The crude extract of *M. gramineum* yielded the substance Verrucarín A, as a white precipitated during solubilization of the extract in MeOH. The supernatant was fractioned by CC and preparative HPLC yielding three diketopiperazines [(cicle (Pro-Tyr), cicle (L-Pro-L-Leu) and cicle (D-Pro-D-Phe)] and four trichothecenes [Verrucarín A (already isolated as substance), Roridin A and Isororidin A and Verrucarín L. During the process of concentration of solvents to obtain crude extract of *Acremonium* sp., there was the formation of crystals in the form of fillets that were attached to the balloon. The crystals were separated and identified like Citocalasin D. The resulting crude extract was submitted to chromatographic fractionation yielding seven substances: one xanthone [Fusaridin, four isocoumarins [(*R*)-8-methoxy-mellein, (3*S*, 4*S*)-5-carbomethoxy-4-hydroxymellein, (3*R*)-5-carbomethoxymellein and (3*S*)-5-carboethoxy-mellein] and the griseofulvin and 7-dechlorogriseofulvin. The substances (3*S*, 4*S*)-5-carbomethoxy-4-hydroxymellein and (3*S*)-5-carboethoxy-mellein are novel compounds.

Keywords: endophytic fungus; *Senna spectabilis*, *M. gramineum*, *Acremonium* sp., special metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Fotos microscópicas de fungos endofíticos	30
Figura 02 – Novos metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos	37
Figura 03 – Novos metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos (Continuação)	38
Figura 04 – Metabólitos Secundários Isolados de Fungos Endofíticos	41
Figura 05 – Metabólitos Secundários Isolados de Fungos Endofíticos (Continuação)	42
Figura 06 - Foto de <i>Senna spectabilis</i>	43
Figura 07 – Metabólitos secundários obtidos de <i>Senna spectabilis</i>	45
Figura 08 – Metabólitos secundários isolados de fungos do gênero <i>Myrothecium</i>	47
Figura 09 – Substâncias isoladas de <i>Acremonium</i> sp.	48
Figura 10 – Metodologia de isolamento dos fungos endofíticos	53
Figura 11 – Análise por CCDC dos extratos brutos	59
Figura 12 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-f(3e/f), Cs-f(14a) e Cs-f(14c).	60
Figura 13 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-f(23), Cs-f(25) e Cs-f(26).	60
Figura 14 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-f(27), Cs-c(2a) e Cs-f(2b).	60
Figura 15 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-c(3b), Cs-c(3c/d) e Cs-c(16).	61
Figura 16 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-c(17/22), Cs-c(19/20).	61
Figura 17 – Avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos extratos brutos	63
Figura 18 – Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos	64
Figura 19 – Avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos.	66
Figura 20 – Resumo dos resultados obtidos na triagem dos fungos endofíticos selecionados para cultivo em escala ampliada e isolamento dos metabólitos secundários	70

Figura 21 – Identificação taxonômica de <i>Myrothecium gramineum</i>	71
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>M. gramineum</i> no modo estático (CDCl_3 , 500MHz)	73
Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>M. gramineum</i> sob agitação (CDCl_3 , 500MHz)	73
Figura 24 – Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto obtido de <i>M. gramineum</i> no modo estático em CLAE-DAD, $\lambda = 254 \text{ nm}$	74
Figura 25 – Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto obtido de <i>M. gramineum</i> sob agitação em CLAE-DAD, $\lambda = 254\text{nm}$	74
Figura 26 - Cromatogramas em CLAE-DAD das frações Cs-f(23)Fr01 – Cs-f(23)Fr03	76
Figura 27 – Cromatogramas em CLAE-DAD das frações Cs-f(23)Fr04 – Cs-f(23)Fr06	77
Figura 28 – Perfil cromatográfico de Cs-f(23)Fr01 em diversos comprimentos de onda	78
Figura 29 – Perfil cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-01 em diversos comprimentos de onda	79
Figura 30 – Perfil cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-02 em diversos comprimentos de onda	80
Figura 31 – Cromatograma em $\text{CLAE}_{\text{prep}}$ obtido no fracionamento de Cs-f(23)Fr01-01/02	81
Figura 32 – Cromatograma em $\text{CLAE}_{\text{prep}}$ obtido no fracionamento de Cs-f(23)Fr04	82
Figura 33 – Cromatograma em $\text{CLAE}_{\text{prep}}$ obtido no fracionamento de Cs-f(23)Fr05	84
Figura 34 – Estrutura da ciclo (L- Pro-L-Tyr)	85
Figura 35 – Principais correlações observadas em gHMBC para a substância 02	86
Figura 36 – Destaque para as unidades de resíduos dos aminoácidos Tirosina (vermelho) e Prolina (preto)	86
Figura 37 – Estrutura da ciclo (L-Pro-L-Leu)	88
Figura 38 – Correlações observadas em gCOSY e gHMBC para a substância 03	89
Figura 39 – Estrutura da Ciclo (D-Pro-D-Phe)	90

Figura 40 – Estrutura da substância 01 (Verrucarina A)	93
Figura 41 – Anel tetraciclo dos tricotocenos e correlações observadas em <i>g</i> HMBC e <i>g</i> HMQC	94
Figura 42 – Correlações <i>g</i> HMBC de H-7', H-8', H-9' e H-10' da substância 01	95
Figura 43 – Correlações de <i>g</i> HMBC, <i>g</i> HMQC e NOESY observadas para a substância 01	95
Figura 44 – Estrutura da substância 05 (Roridina A)	97
Figura 45 – Correlações observadas em <i>g</i> HMQC e <i>g</i> COSY para a substância 05	99
Figura 46 – Correlações observadas em <i>g</i> HMBC e <i>g</i> COSY	100
Figura 47 – Estrutura da substância 06 (Isororidina A)	102
Figura 48 – Estrutura da substância 08 (Verrucarina L)	105
Figura 49 – Principais correlações observadas por <i>g</i> HMBC da substância 08	106
Figura 50 – Ensaio qualitativo das atividades antifúngicas e anticolinesterásicas das substâncias 01 e 05	108
Figura 51 – Ensaio qualitativo do potencial antioxidante das substâncias isoladas	109
Figura 52 – Fotos do fungo <i>Acremonium</i> sp.	110
Figura 53 – Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>Acremonium</i> sp. no modo estático (CDCl ₃ , 500 MHz)	112
Figura 54 – Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>Acremonium</i> sp. sob agitação (claro) (CDCl ₃ , 500 MHz)	113
Figura 55 – Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>Acremonium</i> sp sob agitação (escuro) (CDCl ₃ , 500 MHz)	113
Figura 56 – Cromatogramas dos extratos brutos obtidos de <i>Acremonium</i> sp. em CLAE-DAD, λ= 254nm	114
Figura 57 – Cromatogramas em CLAE-DAD de Cs-c(17/22)Fr01 e Cs-c(17/22)Fr02 em diferentes comprimentos de onda	116
Figura 58 – Cromatogramas em CLAE-DAD de Cs-c(17/22)Fr03 e Cs-c(17/22)Fr04 em diferentes comprimentos de onda	116
Figura 59 – Perfil cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03 em diversos comprimentos de onda	118

Figura 60 – Cromatogramas das frações Cs-c(17/22)Fr03-01 e Cs-c(17/22)Fr03-02 em diferentes comprimentos de onda	119
Figura 61 – Cromatograma em CLAE _{prep.} obtido no fracionamento de Cs-c(17/22)Fr03-1/2	120
Figura 62 – Estrutura da Citocalasina D	121
Figura 63 – Correlações observadas em gHMBC dos hidrogênios de $\Delta^{13,14}$ e $\Delta^{19,20}$	123
Figura 64 – Dados de gHMBC dos hidrogênios benzílicos e da dupla terminal	124
Figura 65 – Estrutura da 1,3,6-Trihidroxi-8-metilxantona (fusaridina – Sub. 09)	126
Figura 66 – Estrutura geral de uma xantona	127
Figura 67 – Correlações em gHMBC observadas para a Subst. 09 (Anel A)	128
Figura 68 – Correlações em gHMBC observadas para a Subst. 10 (Anel B)	128
Figura 69 – Estrutura molecular da (3 <i>S</i>)-5-carboetoxi-meleína (substância 15)	130
Figura 70 – Correlações em gHMBC observadas para o hidrogênio δ_H 11,74	131
Figura 71 – Esqueleto básico da substância 15	131
Figura 72 – Correlações observadas em gHMBC do H-11	132
Figura 73 – Estrutura da (3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)-5-carbometoxi-4-hidroximeleína	133
Figura 74 – Correlações de gHMBC e gCOSY observadas para a substância 11	135
Figura 75 – Estrutura da (<i>R</i>)-8-metoxi-meleina	136
Figura 76 – Estrutura da (3 <i>R</i>)-5-carbometoximeleina	138
Figura 77 – Estrutura da Griseofulvina	140
Figura 78 – Estrutura da Descloro-griseofulvina	142
Figura 79 – Ensaios qualitativos das atividades antifúngicas e anticolinesterásicas da substância 08	144
Figura 80 – Ensaio qualitativo da do potencial antioxidante das substâncias isoladas de <i>Acremonium</i> sp.	145
Figura 81 – A) Preservação dos micro-organismos em “slants”; B) Fungos endofíticos preservados e mantidos a temperatura ambiente – Micoteca	155

Figura 82 – Crescimento dos fungos endofíticos em meio líquido (“shaker”).	156
Figura 83 – Reação de redução do DPPH	158
Figura 84 – Cultivo dos micro-organismos A) no modo estático; B) em incubadora rotatória	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Novos Produtos Naturais Isolados de Fungos Endofíticos	35
Tabela 02 – Metabólitos Secundários Isolados de Fungos Endofíticos	39
Tabela 03 – Fungos endofíticos isolados das folhas de <i>S. spectabilis</i>	54
Tabela 04 – Fungos endofíticos isolados dos ramos de <i>S. spectabilis</i>	55
Tabela 05 – Massas Obtidas dos Extratos Brutos dos Fungos Endofíticos	58
Tabela 06 – Resultados da avaliação das atividades antifúngicas dos extratos brutos	65
Tabela 07 – Resultados da avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos	67
Tabela 08 – Identificação dos Fungos Endofíticos	68
Tabela 09 – Gradiente programado para fracionamento de Cs-f(23)Fr01-01/02	80
Tabela 10 – Gradiente programado para fracionamento de Cs-f(23)Fr04	82
Tabela 11 – Gradiente programado para fracionamento de Cs-f(23)Fr05	83
Tabela 12 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 02 em DMSO-d ₆	87
Tabela 13 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 03 em CDCl ₃	90
Tabela 14 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 04 em DMSO-d ₆	92
Tabela 15 - Dados de RMN 1D e 2D da substância 01 em CDCl ₃	97
Tabela 16 - Dados de RMN 1D e 2D da substância 05 em CDCl ₃	101
Tabela 17 - Dados de RMN 1D e 2D da substância 06 em CDCl ₃	103
Tabela 18 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da Roridina A e Isororidina A com a literatura	104
Tabela 19 - Dados de RMN 1D e 2D da substância 07 em CDCl ₃	107
Tabela 20 – Avaliação qualitativa das atividades antifúngica e anticolinesterásica das substâncias isoladas	109
Tabela 21 – Gradiente programado para CLAE _{prep.} para fracionamento da fração Cs-c(17/22)Fr03-1/2	119
Tabela 22 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 08 em CDCl ₃	125
Tabela 23 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 09 em DMSO-d ₆	129

Tabela 24 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 15 em CDCl ₃	133
Tabela 25 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 11 em CDCl ₃	136
Tabela 26 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 10 em CDCl ₃	138
Tabela 27 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 14 em CDCl ₃	139
Tabela 28 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 13 em CDCl ₃ ^a	141
Tabela 29 – Dados de RMN 1D e 2D da substância 12 em CDCl ₃	143
Tabela 30 – Avaliação qualitativa das atividades antifúngica e anticolinesterásica das substâncias isoladas	145

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 – Metodologia de cultivo dos fungos e triagem dos extratos brutos para avaliação do perfil químico e biológico	57
Fluxograma 02 – Obtenção dos extratos brutos de <i>M. gramineum</i> em escala ampliada e triagem química	72
Fluxograma 03 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de C-f(23)	76
Fluxograma 04 – Fracionamento cromatográfico de Cs-f(23)Fr01	79
Fluxograma 05 – Obtenção dos extratos brutos de <i>Acremonium</i> sp. em escala ampliada	111
Fluxograma 06 - Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>Acremonium</i> sp.	115
Fluxograma 07 – Fracionamento cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03	118

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
² J	Acoplamento a duas ligações
³ J	Acoplamento a três ligações
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micra
[α] _D ²⁵	Rotação óptica
[M] ⁺	Íon molecular
Δ	Aquecimento
ACN	Acetonitrila
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
anal.	Analítico
BDA	Batata Dextrose Agar
<i>c</i>	Concentração
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cs-c	<i>Cassia spectabilis</i> - caule
Cs-f	<i>Cassia spectabilis</i> - folha
C-18	Sílica gel de fase reversa tipo octadesil silano
<i>d</i>	dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado

DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EM-IES	Espectro de massas – Ionização por Eletronspray
Fig.	Figura
Fr.	Fração
<i>g</i> COSY	“ <i>gradient</i> – Correlated Spectroscopy”
<i>g</i> HMBC	“ <i>gradient</i> – Heteronuclear Multiple Bond Coherence”
<i>g</i> HMQC	“ <i>gradient</i> – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
<i>g</i> HSQC	“ <i>gradient</i> - Heteronuclear Single Quantum Coherence”
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
<i>m</i>	multiplicidade
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
MBD	Meio de Batata Dextrose
MeOH	Metanol
min.	minutos
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
NOESY	“Nuclear overhauser Effect Spectroscopy”
Pág.	página
ppm	Parte por milha
prep	preparativo
<i>q</i>	quadruplete
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	singleto
Sub. ou Subst.	Substância
<i>t</i>	triplete
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	“Total Correlation Spectroscopy”
UV	Ultra violeta
UV-vis	Ultra violeta visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	28
I. INTRODUÇÃO	29
I.1 Fungos endofíticos: Distribuição e Interações com Hospedeiro	31
I.2 Produtos Naturais de Fungos Endofíticos	32
I.3 <i>Senna spectabilis</i>	43
I.4 <i>Myrothecium gramineum</i>	46
I.5 <i>Acremonium</i> sp.	47
OBJETIVOS	49
II. OBJETIVO	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
III. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E TRIAGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA	52
III.1 Seleção, Coleta e Classificação do Material Vegetal	52
III.2 Isolamento, Purificação e Preservação dos Fungos Endofíticos	52
III.3 Cultivo dos Micro-organismos para Obtenção dos Extratos Brutos	56
III.4 Avaliação do Perfil Químico	58
III.5 Avaliação do Perfil Biológico	62
III.6 Classificação dos Fungos Endofíticos	66
III.7 Considerações Preliminares	69
IV. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE <i>Myrothecium gramineum</i>	71
IV.1 Resultado da Identificação da Linhagem Fúngica Cs-f(23)	71
IV.2 Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada e Fracionamento Cromatográfico	72
IV.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias	77
IV.3.1 Isolamento da Substância <u>01</u>	77
IV.3.2 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr01	78
IV.3.2.1 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-01/02 e Isolamento das Substâncias <u>02</u> , <u>03</u> e <u>04</u>	80

IV.3.3 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr04 e Isolamento das Substâncias <u>01</u> e <u>06</u>	81
IV.3.4 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr05 e Isolamento das Substâncias <u>01</u> , <u>05</u> , <u>06</u> e <u>07</u>	83
IV.4 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas de <i>Myrothecium gramineum</i>	84
IV.4.1 Dicetopiperazinas – Características Gerais	84
IV.4.1.1 Determinação Estrutural da Substância <u>02</u>	85
IV.4.1.2 Determinação Estrutural da Substância <u>03</u>	88
IV.4.1.3 Determinação Estrutural da Substância <u>04</u>	90
IV.4.2 Tricotocenos – Características Gerais	92
IV.4.2.1 Determinação Estrutural da Substâncias <u>01</u>	93
IV.4.2.2 Determinação Estrutural da Substância <u>05</u>	98
IV.4.2.3 Determinação Estrutural da Substância <u>06</u>	102
IV.4.2.4 Determinação Estrutural da Substância <u>07</u>	105
IV.5 Ensaios Biológicos das Substâncias Isoladas de <i>Myrothecium gramineum</i>	107
V. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE <i>Acremonium</i> sp.	110
V.1 Resultado da Identificação da linhagem fúngica Cs-c(17/22)	110
V.2 Cultivo e Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada e Fracionamento Cromatográfico	111
V.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias	117
V.3.1 Isolamento da Substância <u>08</u>	117
V.3.2 Isolamento da Substância <u>09</u>	117
V.3.3 Fracionamento Cromatográfico da Fração Cs-c(17/22)Fr03	117
V.3.3.1 Fracionamento Cromatográfico da Fração Cs-c(17/22)Fr03-01/02 e Isolamento das substâncias <u>08</u> , <u>10</u> , <u>11</u> , <u>12</u> , <u>13</u> , <u>14</u> , e <u>15</u>	119
V.4 Determinação Estrutural das Substâncias isoladas de <i>Acremonium</i> sp.	121
V.4.1 Citocalasinas – Características Gerais	121
V.4.1.1 Determinação Estrutural da Substâncias <u>08</u>	121
V.4.2 Xantonas- Características Gerais	126
V.4.2.1 Determinação Estrutural da Substâncias <u>09</u>	126

V.4.3 Isocumarinas – Características Gerais	129
V.4.3.1 Determinação Estrutural da Substância <u>15</u>	130
V.4.3.2 Determinação Estrutural da Substâncias <u>11</u>	133
V.4.3.3 Determinação Estrutural da Substância <u>10</u>	136
V.4.3.4 Determinação Estrutural da Substâncias <u>14</u>	138
V.4.4 Griseofulvina e Descloro-griseofulvina	140
V.4.4.1 Determinação Estrutural da Substâncias <u>13</u>	140
V.4.4.2 Determinação Estrutural da Substâncias <u>12</u>	142
V.5 Ensaios Biológicos das Substâncias Isoladas de <i>Acremonium</i> sp.	143
CONCLUSÕES	146
VI. CONCLUSÕES	147
PARTE EXPERIMENTAL	150
VII. 1 MATERIAIS, INSTRUMENTOS E METODOLOGIA EXPERIMENTAL	151
VII.1 TÉCNICAS, MATERIAIS E INSTRUMENTOS	151
VII.1.1 Meios para Cultivo dos Micro-organismos	151
VII.1.2 Esterilização dos Materiais	151
VII.1.3 Manipulação dos Micro-organismos	151
VII.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	152
VII.1.5 Cromatografia em Coluna	152
VII.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	152
VII.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C	153
VII.1.8 Espectrometria de Massas	153
VII.1.9 Análise de rotação óptica $[\alpha]_{25}^D$	153
VII.1.10 Solventes utilizados	153
VII.1.11 Outros Equipamentos	153
VII.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	154
VII.2.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E TRIAGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA	154
VII.2.1.1 Seleção, Coleta e Classificação do Material Vegetal	154
VII.2.1.2 Isolamento, Purificação e Preservação dos Fungos Endofíticos	154

VII.2.1.3 Cultivo dos Micro-organismos para Obtenção dos Extratos Brutos	155
VII.2.1.4 Avaliação do Perfil Químico dos Extratos Brutos	156
VII.2.1.5 Avaliação do Perfil Biológico dos Extratos Brutos	157
VII.2.1.6 Classificação dos Fungos Endofíticos	160
VII.2.2 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE <i>Myrothecium gramineum</i>	160
VII.2.2.1 Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada	160
VII.2.2.2 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Bruto de <i>M. gramineum</i>	161
VII.2.2.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias	161
VII.2.2.3.1 Isolamento da substância <u>01</u>	161
VII.2.2.3.2. Fracionamento cromatográfico de Cs-f(23)Fr01	162
VII.2.2.3.2.1 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-01/02 e Isolamento das Substâncias <u>02</u> , <u>03</u> , e <u>04</u>	162
VII.2.2.3.3 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr04 e Isolamento das Substâncias <u>01</u> e <u>05</u>	162
VII.2.2.3.4 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr05 e Isolamento das Substâncias <u>01</u> , <u>05</u> , <u>06</u> e <u>07</u>	163
VII.2.2.4 Ensaio Biológico das substâncias isoladas de <i>Myrothecium gramineum</i>	163
VII.2.3 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE <i>Acremonium</i> sp.	163
VII.2.3.1 Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada	163
VII.2.3.2 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Bruto de <i>Acremonium</i> sp.	164
VII.2.3.3 Isolamento das Substâncias	165
VII.2.3.3.1 Isolamento da substância <u>08</u>	165
VII.2.3.3.2 Isolamento da substância <u>09</u>	165
VII.2.3.3.3 Fracionamento Cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03	165
VII.2.3.3.3.1 Fracionamento Cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03-1/2 e isolamento das substâncias <u>08</u> , <u>10</u> , <u>11</u> , <u>12</u> , <u>13</u> , <u>14</u> e <u>15</u>	166
VII.2.3.4 Ensaios Biológicos das Substâncias Isoladas de <i>Acremonium</i> sp.	166
REFERENCIAS	167
ANEXOS	177

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Plantas superiores são um complexo “habitat” que abrigam vários tipos de micro-organismos. Dentre estes, os fungos são componentes dominantes nas associações com as espécies vegetais, podendo ser encontrados colonizando superfícies vegetais (epifíticos), tecidos internos (endofíticos), o interior ou superfícies das raízes (micorrízicos) ou ainda desenvolvendo-se no solo próximo as raízes (rizosfera)¹.

Os fungos endofíticos são em sua grande maioria fungos filamentosos, que colonizam o interior dos tecidos vegetais (principalmente, folhas, ramos e raízes), sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro^{2,3}. Estes micro-organismos desenvolvem hifas microscópicas inter ou intra celulares e dificilmente são visíveis exteriormente aos tecidos (Figura 01, pág. 30). No entanto, este estado (intra ou intercelular) pode ser modificado eventualmente, da mesma forma que um fungo endofítico pode tornar-se fitopatógeno, se seu hospedeiro sofrer algum tipo de estresse ambiental^{2,3,4}.

De uma forma geral, os fungos são micro-organismos que apresentam a importante capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos especiais bioativos, o que está fortemente relacionado com as interações ecológicas entre eles e os demais organismos, seu habitat, e as possibilidades biossintéticas⁵. Interações estas que podem ser fundamentais ao equilíbrio do ecossistema.

Quando associados às plantas, assumem vários tipos de interações, sendo as simbióticas as que conferem a ambos os organismos diversas vantagens, produzindo ou induzindo a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros⁶, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros micro-organismos^{7,8}. Por outro lado, eles são capazes de sequestrar os metabólitos produzidos pelas plantas que irão atuar como defesa química, ou produzi-los em resposta à pressão exercida por outros micro-organismos endofíticos ou fitopatógenos ou até mesmo por predadores^{3,7,8}.

Algumas espécies de endofíticos apresentam uma alta especificidade aos hospedeiros, sendo encontrados com maior frequência em plantas que representam uma família em particular⁹. Porém, existem ainda algumas espécies em que esta especificidade se limita a apenas um hospedeiro.

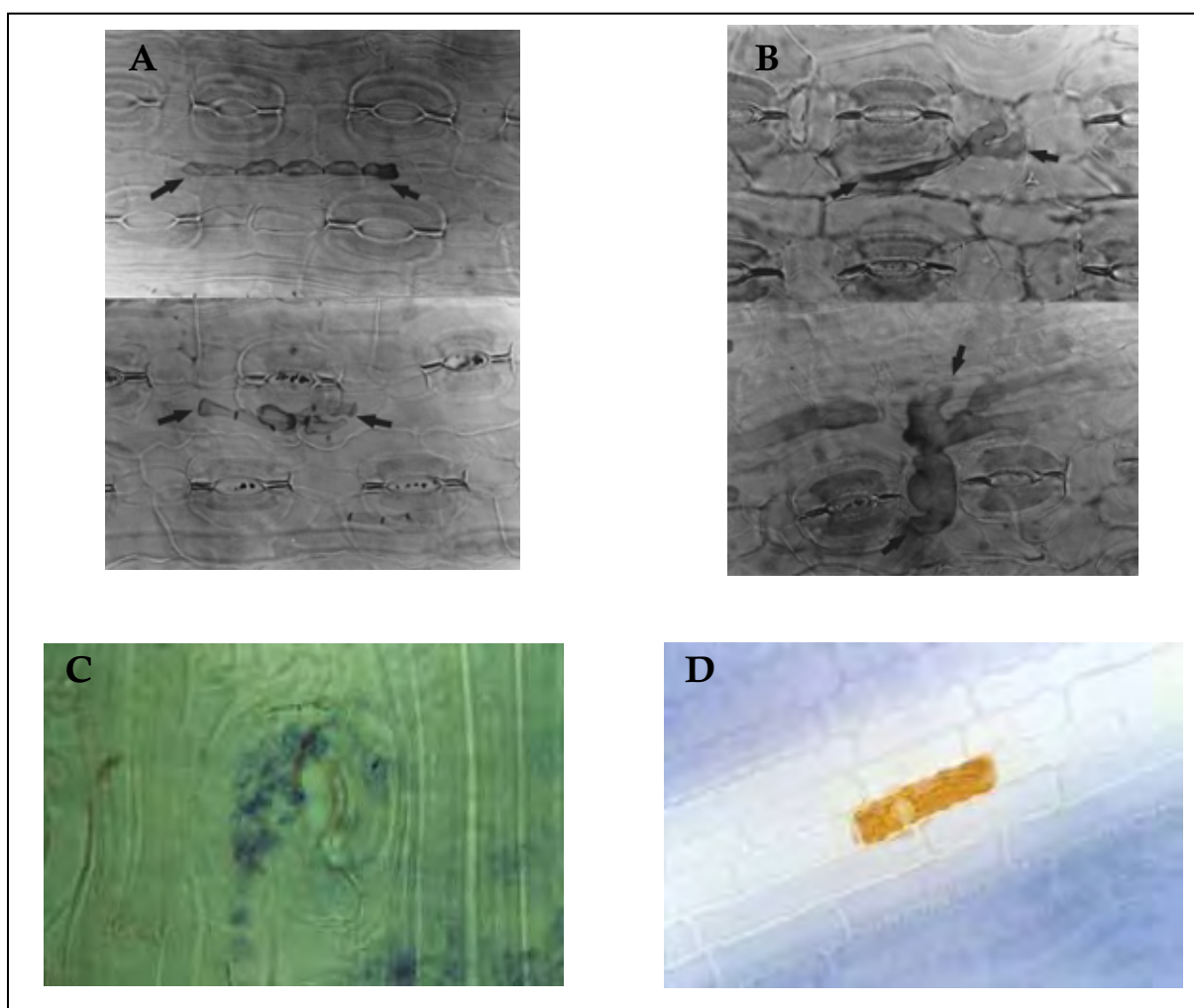


Figura 01 – Fotos microscópicas de fungos endofíticos; A) Hifa intracelular de *Rhabdocline parkeri* (setas indicando) em *Pseudotsuga taxifolia* (x500); B) Hifas intracelular de *Phyllosticta abietis* em *Abies grandis* (x500); C) Hifas de um fungo endofítico não identificado em células epidérmicas de *Picea pungens*; D) Hifas de *Stagonospora innumerosa* em células epidérmicas de *Juncus effuses* var *pacificus*¹.

Os estudos relacionados com esta classe de organismos têm demonstrado um interesse crescente não apenas pela consciência da grande diversidade encontrada em plantas superiores, mas também pela potencialidade destes fungos em produzir substâncias de classes e estruturas diversas, muito freqüentemente com atividades biológicas de grande interesse comercial (biotecnológico, farmacêutico e na indústria alimentícia).

Acrescido a tudo isso, o desenvolvimento ou aplicação de técnicas específicas de isolamento e manipulação de cultivo torna possível abrir outros caminhos para a

descoberta de novas fontes de metabólitos secundários bioativos e novas metodologias de obtenção de compostos de interesse.

I.1 Fungos endofíticos: Distribuição e Interações com Hospedeiro

As associações simbióticas entre fungos e plantas são diversas e há muito tempo evidenciadas. Algumas das interações resultantes destas associações são bem estudadas, como por exemplo, a relação entre fungos micorrízicos e seus hospedeiros⁶, enquanto outras, tais como as que envolvem fungos endofíticos são um pouco menos claras. De forma particular, nos últimos anos, tem-se dado muita atenção a este tipo de interações com o intuito de entender melhor esta interessante troca de benefícios entre hospedeiro e “hóspede”⁹.

Atualmente, em alguns estudos, o termo endofítico tem sido combinado com outros termos para definir um hospedeiro específico, um grupo taxonômico de hospedeiro ou um tipo de tecido ocupado¹ (como por exemplo, endófitos de casca, endófitos sistêmicos de gramíneas, endófitos foliares, entre outros). De um modo mais amplo estes microrganismos são definidos como fungos que colonizam tecidos vegetais vivos sem causar danos imediatos evidentes^{1,10}. Definição esta que circunda todos os debates a respeito desta classe de micro-organismos.

Embora não muito aceito por todos os estudiosos¹, alguns autores consideram como endófitos, fungos patógenos que vivem um período endofítico extremamente curto; patógenos latentes, cujo período assintomático pode levar semanas ou meses; decompositores, os quais a manifestação externa coincide com a morte dos tecidos; e fungos que nunca aparecem externamente ao seu hospedeiro^{1,3,6}.

Os fungos endofíticos são encontrados em todos os órgãos e tecidos vegetais em todas as espécies já examinadas, no entanto a diversidade e quantidade destes microrganismos varia de planta para planta¹¹. A diversidade de espécies também está presente entre os tecidos vegetais, e pode ser explicada pela habilidade de cada micro-organismo em usar diferentes substratos no seu metabolismo¹².

Apesar de não serem muito bem compreendidas, sabe-se que, as interações entre endófito e planta podem ser simbióticas, neutras ou até mesmo antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os micro-organismos são

beneficiados pelos nutrientes e proteção fornecidos pelo hospedeiro e em contra partida conferem diversas vantagens à planta com a produção de metabólitos secundários^{3,4}. Um exemplo é o isolamento de alcalóides, como metabólitos de fungos associados a gramíneas. Algumas classes de alcalóides são tóxicas para humanos e para o gado, e a produção destes compostos por algumas espécies de fungos endofíticos tais como *Neotyphodium*, *Achnatherum robustus* e *Aspergillus fumigatus* evidenciam o importante papel na proteção destas plantas ao ataque de herbívoros¹³.

Os endófitos podem também influenciar no desenvolvimento do seu hospedeiro, podendo as plantas infectadas, por exemplo, apresentar maior taxa de crescimento e área foliar em comparação com plantas não infectadas¹⁴.

Os mecanismos de interação fungo endofítico e planta hospedeira têm sido investigados e podem ser caracterizados por um equilíbrio entre o poder de virulência do fungo endofítico e a defesa da planta, onde a variabilidade da interação depende não só da adaptação do fungo endofítico a um hospedeiro ou órgão em particular, e dos estágios de desenvolvimento dos demais microrganismos, mas também da virulência inata do endofítico, da resposta do hospedeiro a este microrganismo e das condições ambientais. Se o balanço é perturbado por ambos, uma diminuição da defesa da planta ou o aumento de virulência do micro-organismo pode se desenvolver^{4, 13}.

Toda esta especificidade, diversidade e potencialidade biológica dos fungos endofíticos, faz destes microrganismos promissoras fontes de metabólitos especiais bioativos.

I.2 Produtos Naturais de Fungos Endofíticos

Diversos estudos sugerem que o número de espécies de fungos existentes é muito superior às espécies já conhecidas, e levando em consideração a proposta mais aceita de que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos¹⁵, alguns autores consideram que mais de um milhão de espécies permanecem desconhecidas e que, uma parte substancial destas são o que consideramos fungos endofíticos¹.

Dentro deste contexto, os estudos realizados com esta classe de microrganismos, voltados a entender os benefícios e interações endófito/planta, a utilização do seu arsenal biológico nos processos de obtenção de compostos, e principalmente na

busca por substâncias novas e com potencial biológico de interesse, tem demonstrado cada vez mais a importância da exploração dos fungos endofíticos como fonte de novas drogas.

Desde 1991, um crescente número de pesquisas tem gerado um grande interesse a respeito das contribuições dos fungos associados a espécies vegetais para as relações sistêmicas de fungos, ecologia, relação fungos-plantas, biologia evolucionária, e pesquisas aplicadas que vão desde controle biológico a bioprospecção⁹.

Os estudos relacionados à classe dos fungos endofíticos, até pouco tempo praticamente inexplorada, e que foram iniciadas, desde a década de 70⁹ por Carrol, Fisher, Petrini, Sieber, Stone, entre outros, têm demonstrado um grande avanço e entusiasmo. Este interesse é observado nas análises de publicações existentes, que enfocam a abundância e diversidade das espécies de fungos associados a tecidos vegetais hospedeiros. A frequência de publicações nesta área aumentou de 1,2 artigos/ano (1971-1990) para mais de 15 artigos/ano (2001-2007), apenas com relação aos artigos publicados em inglês⁹.

Concomitantemente com a explosão das pesquisas com relação a diversidade de endofíticos, há um rápido aumento nos trabalhos direcionados à interações com plantas hospedeiras, estudos sobre mecanismos de colonização, busca e caracterização de novos metabólitos, e outros tópicos relacionados^{1,12}. Estes estudos mostram um aumento de 0.8 artigos/ano, na década de 70, para mais de 200 artigos só entre os anos de (2001-2007)⁹. Em um levantamento realizado por Arnold⁹ em 2007, uma das linhas que tem se destacado são os trabalhos focados na diversidade bioquímica destes microrganismos^{10,16,17,18}.

Durante as últimas duas décadas, mais de 100 micro-organismos endofíticos foram cultivados e submetidos a investigações para caracterização química e avaliação biológica de um grande número de produtos naturais, os quais têm demonstrado novas estruturas químicas e atividades biológicas interessantes¹⁰. Segundo Schulz e Boyle¹³, aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem metabólitos biologicamente ativos, sendo estes provenientes de diversas vias biossintéticas, incluindo alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, entre outros¹⁰. E até agora, algumas das principais atividades encontradas para as substâncias são antibióticas, antifúngicas, anticancerígenas, substâncias utilizadas no controle biológico e outras atividades¹⁸.

A Tabela 01(pág. 35) mostra a diversidade química dos novos metabólitos produzidos por fungos endofíticos com suas atividades biológicas. Grande parte destes dados foram reunidos por Borges et al.¹⁷, em um trabalho que apresenta informações a respeito das pesquisas realizadas com esta classe de micro-organismos, abrangendo o isolamento de novos metabólitos, a produção de enzimas e seu uso em reações de biotransformação.

Através da sua evolução dentro dos hospedeiros, os fungos endofíticos são capazes de adaptar-se aos microambientes específicos por variação genética, incluindo a utilização do DNA da planta em seu próprio genoma¹⁷. Isto pode induzir a produção de metabólitos secundários que auxiliem a sobrevivência do micro-organismos nas associações com a planta hospedeira¹⁷, como já descrito anteriormente. Adicionalmente, alguns estudos mostram que os endófitos podem adquirir a habilidade de biossintetizar os mesmos compostos produzidos por seu hospedeiro^{10,19}.

Um exemplo importante é o taxol (Paclitaxel®) [(1), Figura 02, pág. 37], que se tornou um agente chave no tratamento de câncer mamário e de útero que foi isolado de *Taxomyces andreanae*, fungo endofítico associado a *Taxus brevifolia*, também conhecida pela capacidade de produção deste metabólito^{19,20}. Um outro exemplo, não menos importante, é a camptotecina [(2), Figura 02, pág. 37] , produzida por várias espécies de plantas, entre elas *Nothapodytes foetida* e que possui alta atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer humano, *in vitro*, apresentando-se como um importante precursor na produção de drogas anticancer. Camptotecina foi recentemente identificada em cultura de *Entrophospora infrequens*, fungo endofítico isolado de *N. foetida*²¹.

Na tabela 02 apresentamos alguns dos principais metabólitos isolados de fungos endofíticos, citados nos últimos anos, e que apresentaram atividade anticancerígena, antifúngica, antimalárica, antibiótica, entre outras.

Tabela 01 – Novos Produtos Naturais Isolados de Fungos Endofíticos

Novos Produtos Naturais				
Produtos Naturais	Atividade biológica	Fungo	Planta hospedeira	Ref.
11-hidroximonocerina (3) (Fig.02)	Antimalárica	<i>Exserohilum rostraum</i>	<i>Stemona</i> sp.	17
2-cloro-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (4) (Fig.02)	Antimalárica e citotóxica	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Sandoricum koetjape</i>	17
Epichlicina (5) (Fig.02)	Antifúngica contra <i>Cladosporium phlei</i>	<i>Epichloe typhina</i>	<i>Phleum pretense</i> L	17
Fomoeuforbinas A (6) e C (7) (Fig.02)	Efeito inibitório contra replicação de células HIV	<i>Phomopsis euphorbiae</i>	<i>Trewia nudiflora</i>	17
Citosporonas D (8) e E (9) (Octacetídeos) (Fig.02)	Atividade contra bactéria Gram positiva	<i>Cystospora</i> sp.	<i>Conocarpus erecta</i> L	17
Derivados oxazinanos clorados (10) e (11) (Fig. 02)	Atividade nematocida contra <i>Panagrellus redivivus</i> e <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	17
Nigerasperona A (12) e B (13) (Fig. 02)	-	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Colpomenia sinuosa</i> (alga marrom)	17
Nigerasperona C (14) (Fig. 02)	Antioxidante e antifúngica	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Colpomenia sinuosa</i> (alga marrom)	17
Neoplaeter (15) (Fig. 02)	Citotóxica e antifúngica	<i>Neoplaconema napellum</i>	<i>Hopea hainanensis</i>	2
3,9,12-triidroxicalamenos (16) e (17)	Antifúngica	<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia spectabilis</i>	22

Novos Produtos Naturais				
Produtos Naturais	Atividade biológica	Fungo	Planta hospedeira	Ref.
3,12-diidroxicalameneno (18) (Fig. 03) 3,12-diidroxicadaleneno (19) (Fig. 03)	Citotóxica	<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia spectabilis</i>	22
3,11,12-triidroxicadaleneno (20) (Fig. 03)	Citotóxica e antifúngica	<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia spectabilis</i>	22
6,8-dimetoxi-3-(2'-oxo-propil)-cumarina (21) (Fig. 03) 2,4-diidroxi-6-[(1'E, 3'E)-penta-1',3'-dienil]-benzaldeído (22) (Figura 03)	Antifúngica	<i>Periconia atropurpurea</i>	<i>Xylopiá aromática</i>	23
1-(2-hidroxi-6-metoxifenil)-butan-1-ona (23) (Fig. 03)	Antifúngica	<i>Nosulosporium</i> sp.	<i>Juniperus cedre</i>	17
4-acetilpirenoforol (24) (Fig. 03) 4'-acetildihidropirenoforina (25) (Fig. 03) <i>cis</i> -diidropirenoforina (26) (Fig. 03) 7'-acetil- <i>seco</i> -diidropirenoforina (27) (Fig. 03)	Antibacteriana, antifúngica e antialgal	<i>Phoma</i> sp.	<i>Lycium intricatum</i>	17
8 α -acetoximultiplolide A (28) (Fig.03)	Antifúngica	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Azadirachta indica</i>	17
Chaetopiranina (29) (Fig. 03)	Citotóxica e antioxidante	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Polysiphonia urceolata</i>	17

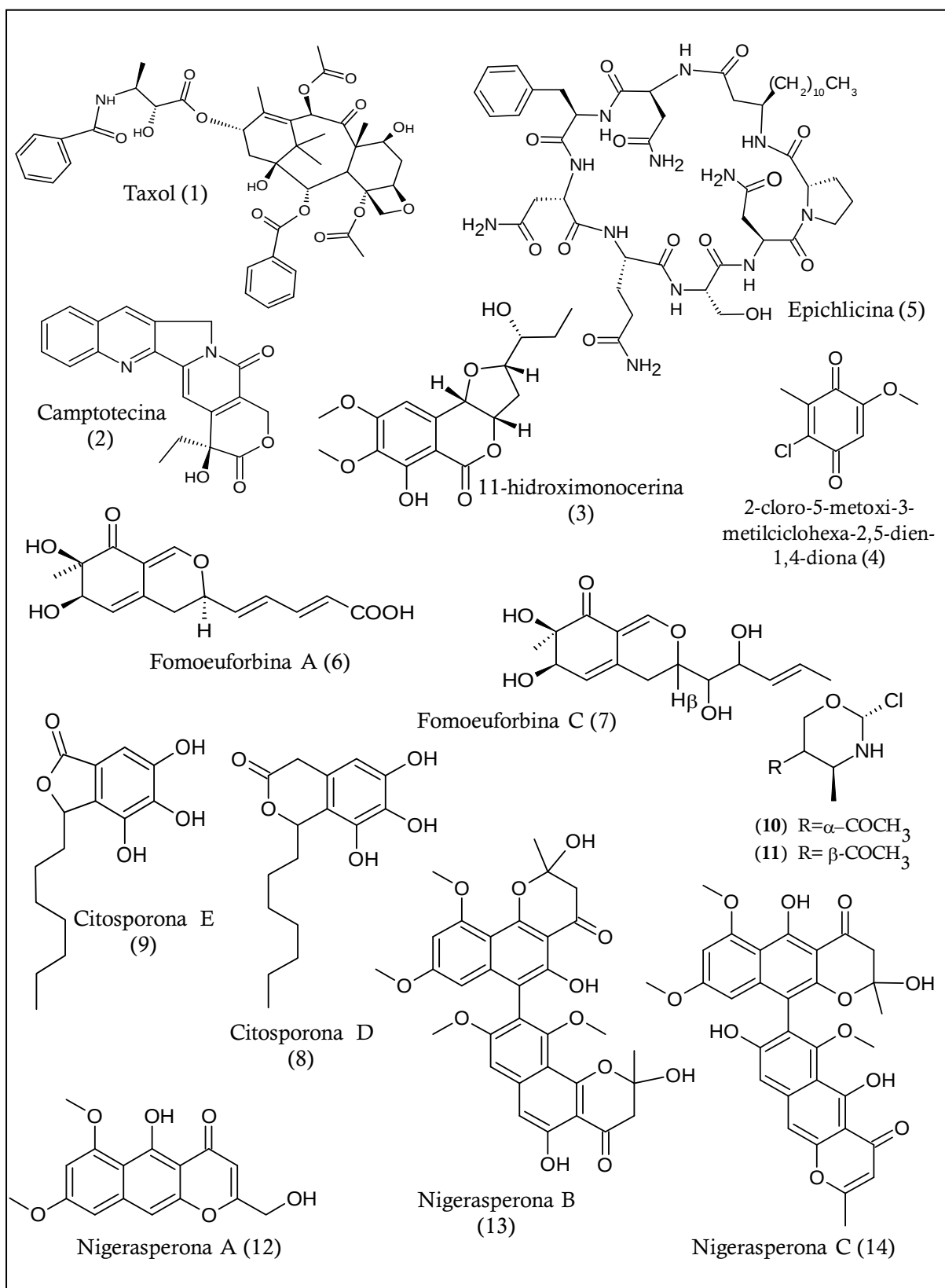


Figura 02 – Novos metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos

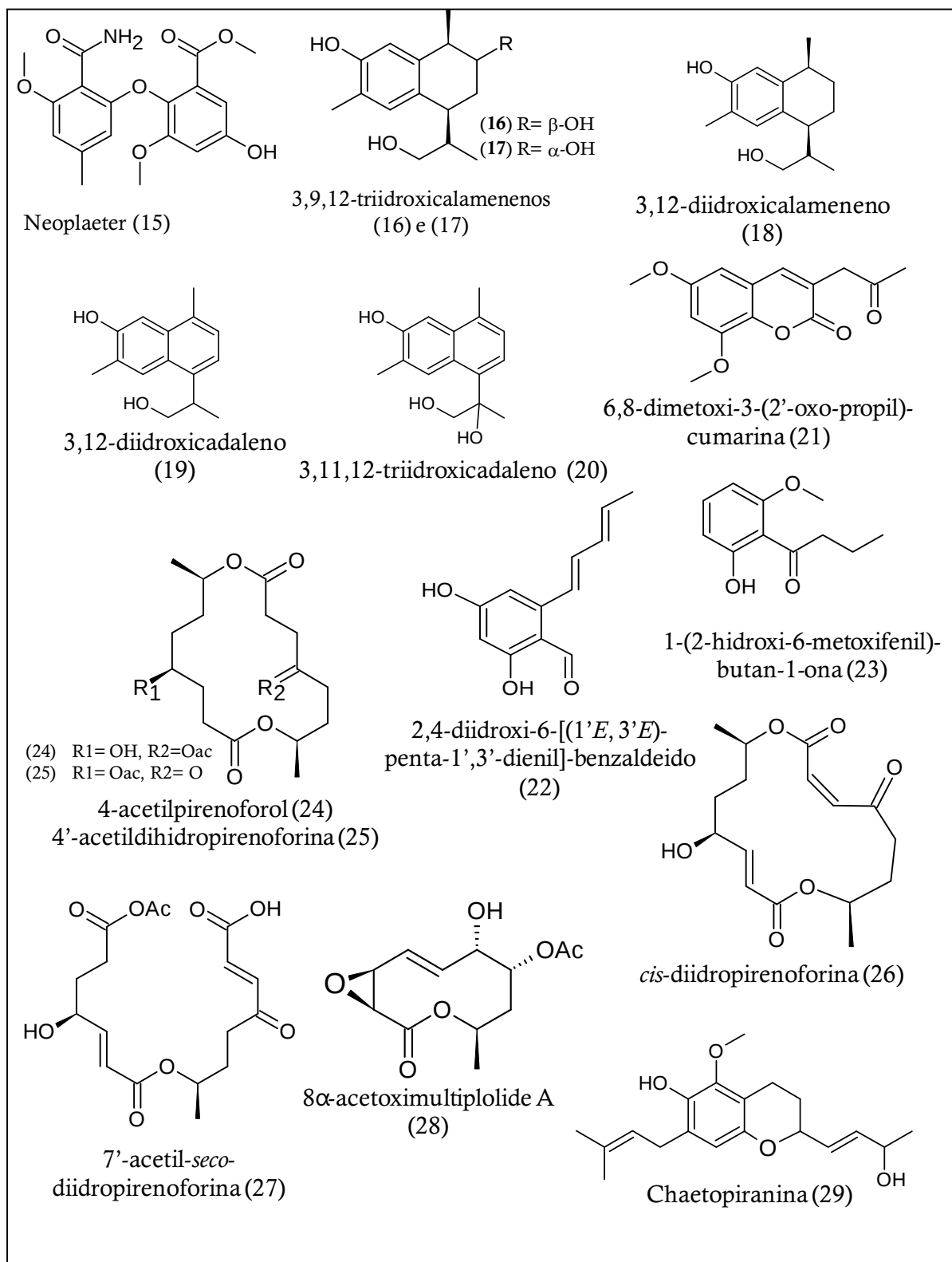


Figura 03 – Novos metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos (Continuação)

Tabela 02 – Metabólitos Secundários Isolados de Fungos Endofíticos

	Produto Natural	Fungo	Planta Hospedeira	Ref.
Atividade Anticancerígena	Taxol (1) (Fig.02)	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	18,21
	Camptotecina (2) (Fig. 02)	<i>Entrophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	21
	22-oxa-12-citocalasina (30) (Fig.04)	<i>Rhinocladiella</i> sp.	-	24
	Brefeldina A (31) (Fig. 04)	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i>	10
	Fomol (32) (Fig. 04)	<i>Phomopsis species</i>	<i>Erythrina crista-galli</i>	10
Atividade Antibacteriana	Periconicinas A(33) e B (34) (Fig. 04)	<i>Periconia</i> sp.	<i>Taxus cuspidata</i>	18
	Fusarusida (35) (Fig. 04)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Quercus variabilis</i>	10
	Guanacastepeno A (36) (Fig. 04) Guanacastepeno I (37) (Fig. 04)	Linhagem CR115	<i>Daphnopsis americana</i>	10
	Pirroclidiina A (38) (Fig. 04)	<i>Acremonium zeae</i>	<i>Zea mays</i> L.	10
	Citosporona E (9) (Fig. 02)	<i>Colletotricum</i> sp.	<i>Ginkgo biloba</i>	10
	Preussomerina G (39) (Fig. 04)	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Atropa belladonna</i> L.	10

Atividade Antifúngica	Citotoxicidade	Brefeldina A (31) (Fig. 04)	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i>	10
		Fumigaclavina C (40) (Fig. 04)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	10
		Fomol (32) (Fig. 04)	<i>Phomopsis species</i>	<i>Erythrina crista-galli</i>	10
		Pestacina (41) (Fig. 04)	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	10
		Isopestacina (42) (Fig. 04)			
		5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina (43) (Fig. 04)	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	<i>Zingiber officinale</i>	10
		5,6-dimetoxi-4-(<i>p</i> -metoxi-fenil)-cumarina (44)			
		Glonosumona A (45) e B (46) (Fig. 04)	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ephedra fasciculata</i>	
		Aspernigrina A (47) (Fi. 05)	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	10
		Graphislactona A(48) (Fi. 05)	<i>Microspphaeropsis olivacea</i>	<i>Pligerodentron uviferum</i>	10
Inibição da Enzima Acetilcolinesterase (AChE)		Botralina (49) (Fi. 05)			
		Coletoclorina B (50) (Fi. 05)	<i>Nectria galligena</i>	<i>Malus x domestica</i>	10
		Illicicolina C (51) (Fi. 05)	<i>Nectria galligena</i>	<i>Malus x domestica</i>	10
		Illicicolina E (52) (Fi. 05)	<i>Nectria galligena</i>	<i>Malus x domestica</i>	10
		Pullularina (53) – Antimalárica (Fi. 05)	<i>Pullularia sp.</i>	<i>Culophyllum sp.</i>	18
Outras atividades		Fomol (32) – Antiinflamatória (Fi. 05)	<i>Phomopsis species</i>	<i>Erythrina crista-galli</i>	10
		Pestacin (41) e isopestacin (42) - Antioxidante	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	10
		Ácido 3-hidroxipropionico – Nematocida	<i>Melanconium betulinum</i>	<i>Betula pendula</i> Roth.	10

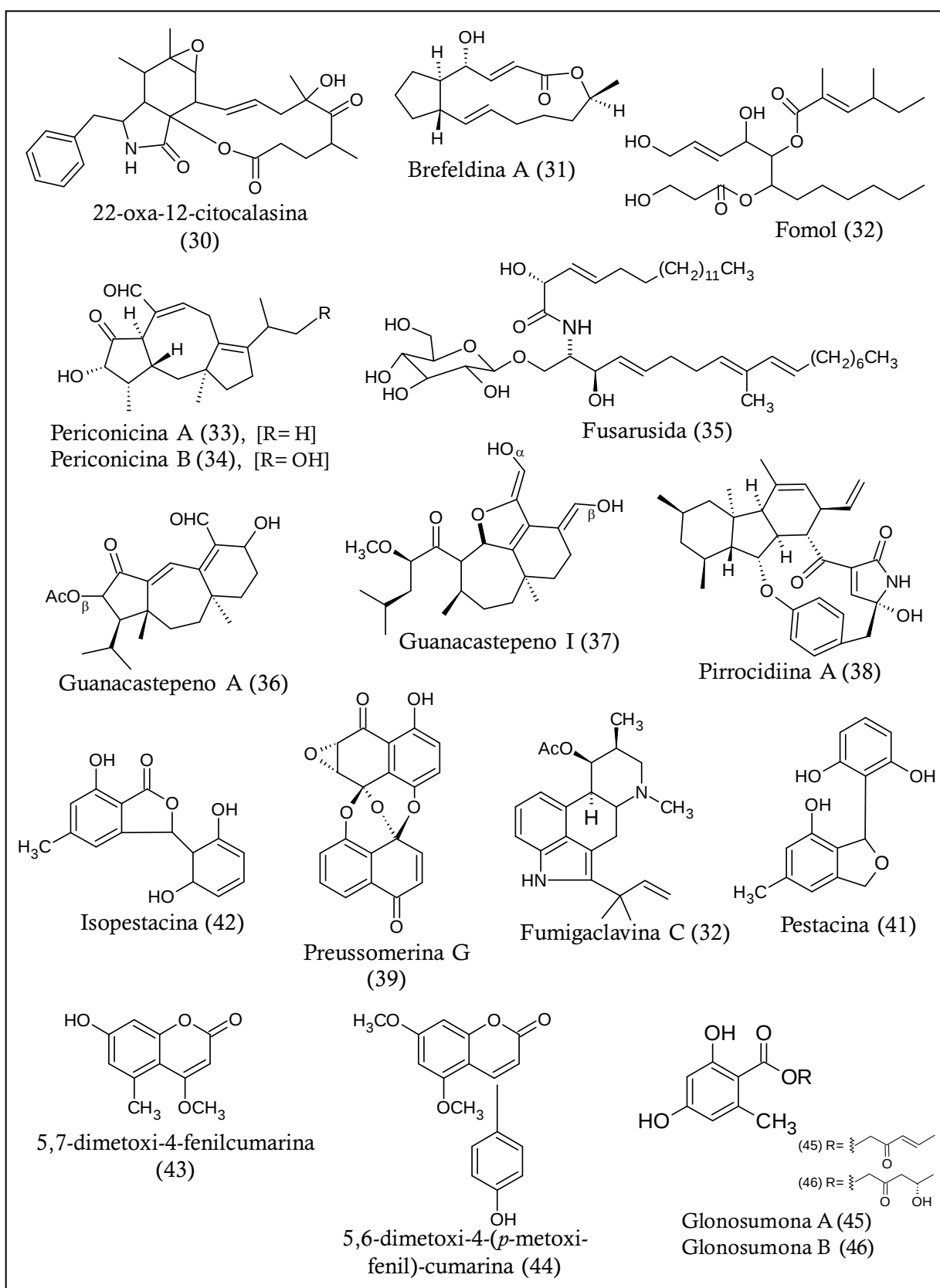


Figura 04 – Metabólitos Secundários Isolados de Fungos Endofíticos

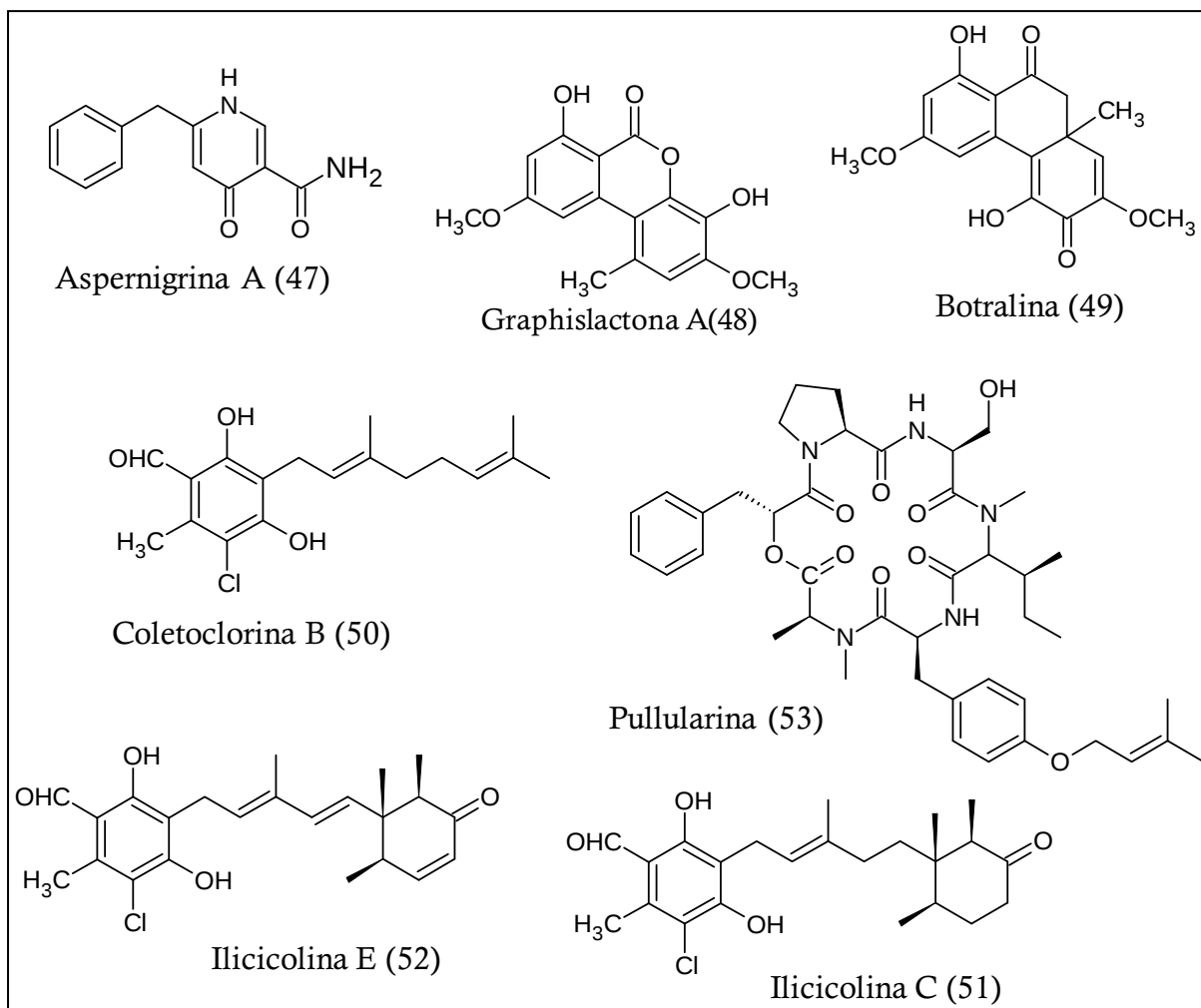


Figura 05 – Metabólitos Secundários Isolados de Fungos Endofíticos (Continuação)

I.3 *Senna spectabilis*



Figura 06 - Foto de *Senna spectabilis*

A seleção da espécie hospedeira garante melhores oportunidades no isolamento de fungos endofíticos de novos gêneros e espécies. Devido ao enorme número de espécies de plantas no mundo, algumas estratégias de seleção podem ser utilizadas na busca por endofíticos bioativos²⁵, tais como: plantas com história etnobotânica que relata o uso e a aplicação específica de partes do vegetal; plantas endêmicas que ocupam solos mais antigos e plantas nativas de áreas com grande biodiversidade.

Sendo assim, a potencialidade biológica apresentada por *Senna spectabilis*^{26,27} e os bons resultados obtidos nos estudos realizados com fungos endofíticos associados à esta espécie^{28,27,22}, levaram a seleção de *S. spectabilis* para isolamento dos fungos endofíticos e triagem química e biológica.

A espécie vegetal selecionada foi inicialmente identificada como *Cassia spectabilis* (sin. *Senna spectabilis*), no entanto, mudanças no sistema de classificação taxonômica foram adotadas para a família Leguminosae, em que várias espécies de *Cassia* foram incluídas no grupo *Senna*, outras continuaram como *Cassia* e algumas continuam como sinônima de *Senna*. Pela nova classificação, esta família passou a ser denominada Fabaceae e está subdividida em três subfamílias: Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinioideae. Nesta última estão incluídos os gêneros *Cassia* e *Senna*²⁶, sendo que a espécie selecionada passa a chamar *Senna spectabilis* (Sin. *Cassia spectabilis*).

Ambos os gêneros são bastante estudados, devido à importância na medicina popular, pois apresentam um amplo espectro de propriedades farmacológicas, especialmente associadas com potencial anti-inflamatório²⁹.

Senna é um gênero de grande porte, amplo e diversificado, e caracteriza-se por sua morfologia floral distinta em várias espécies que colonizam uma ampla variedade de habitats em diferentes climas e latitudes. Compreende aproximadamente 600 espécies distribuídas por todo o mundo. É bem conhecida por sua diversidade biológica e propriedades farmacológicas e tem sido usada na medicina tradicional brasileira para o tratamento de resfriados e também como laxativo e purgativo²⁸.

As plantas desta espécie têm aproximadamente 8 a 10 m de altura e caule com 30-40 cm de diâmetro; as folhas são compostas com 8 a 12 pares de folíolos pontiagudos na extremidade. Florescem em buquês de flores amarelas na ponta dos ramos, sendo os frutos em favas. Ocorrem no Brasil nos estados do Paraná e Santa Catarina, na floresta de pinhais, em forma nativa, mas desenvolvem-se bem sob cultivo na região sudeste.

Revisões bibliográficas demonstraram que foram isoladas mais de 350 metabólitos secundários de diversas classes de substâncias de mais de 30 espécies, e além do estudo químico, propriedades etnofarmacológicas e algumas propriedades farmacológicas já foram validadas para vários extratos³⁰.

De forma particular, o estudo fitoquímico de *Senna spectabilis*, mostrou a presença dos alcalóides piperinídicos (-)-espectralina (54), leptofilina A (55), 3-*O*-acetil-leptofilina A (56), leptofilina B (57), (-)-espectalinina (58), carnavalina (59) e 6-*iso*-carnavalina (60) nas folhas desta espécie, sendo que (-)-espectralina, leptofilina A, 3-*O*-acetil-leptofilina A, apresentaram atividade citotóxica seletiva em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com deficiência no reparo do DNA, sendo indicativo de atividade antitumoral potencial²⁶. Estudos recentes realizados por Viegas Junior et al.³⁰, estudando as flores de *C. spectabilis*, resultaram no isolamento de três novos alcalóides, chamados de (-)-3-*O*-acetil-espectralina (61), (-)-7-hidroxi-espectralina (62) e 6-*iso*-espectralina (63), além da (-)-espectralina já conhecida (Figura 07, pág. 45).

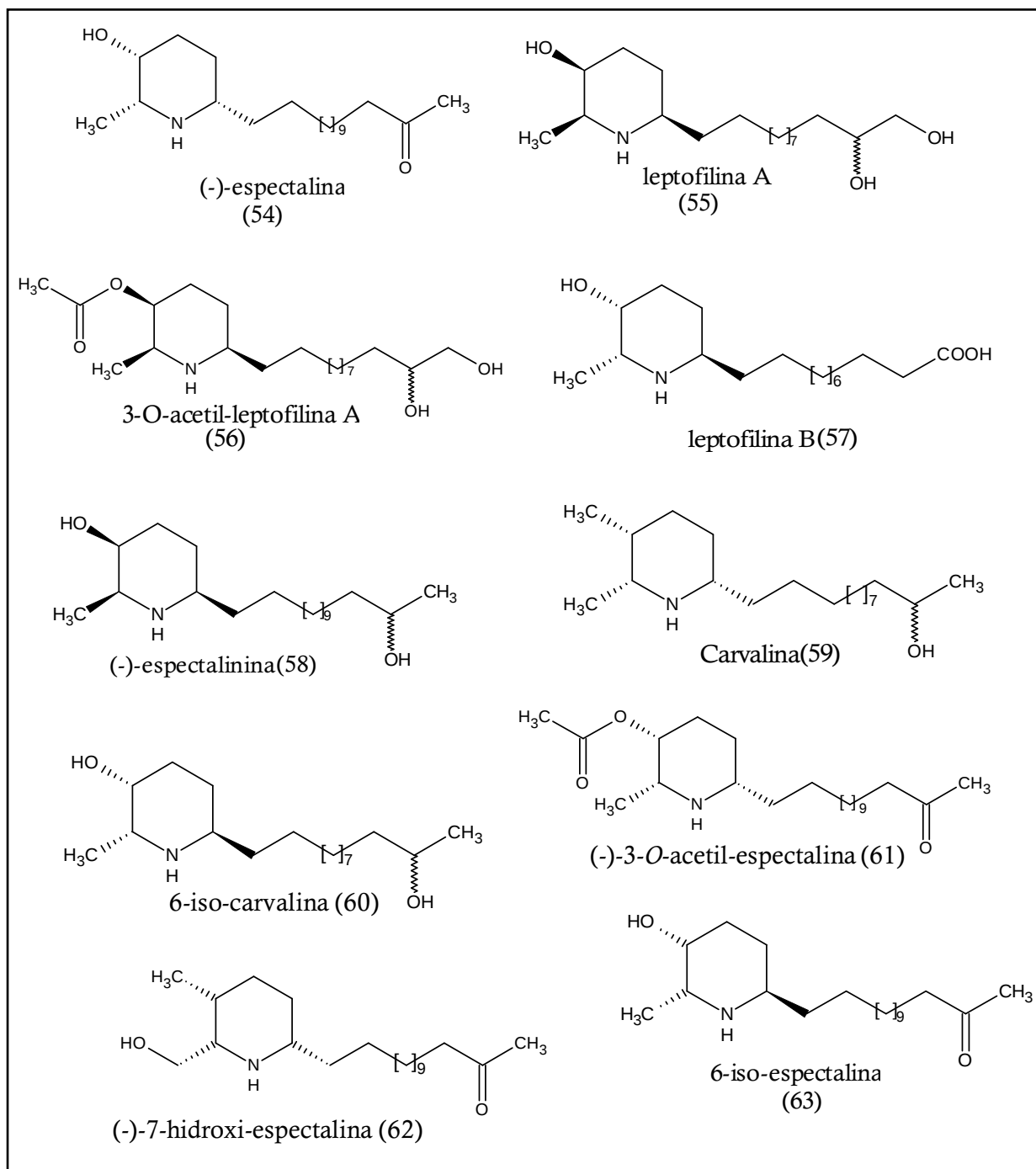


Figura 07 – Metabólitos secundários obtidos de *Senna spectabilis*

I.4 *Myrothecium gramineum*

Myrothecium gramineum é um fungo filamentoso da classe dos Ascomicetos, pertencente a subclasse dos Sordariomycetidae. O gênero *Myrothecium* foi primeiramente descrito por Tode em 1790^{31,32}, como um fungo com esporos na forma de taça que tornam-se levemente viscosos. A maioria das espécies são saprófitas e somente *M. roridum* pode ser considerado fitopatógeno grave, responsável por doenças em folhas. Um levantamento bibliográfico realizado para *M. gramineum* (SciFinder e Web of Science), evidenciou poucos estudos relacionado ao isolamento e identificação dos metabólitos produzidos por esta espécie, e nestes foram encontrados a prevalência de isolamento de tricotocenos, tais como Verrucarina A (64) e Roridina A (65) (Figura 08, pág. 47).

Espécies do gênero *Myrothecium* são capazes de degradar celulose, como por exemplo, *M. verrucaria* utilizado como organismo padrão em testes de degradação textil³¹. Pesquisas mostram ainda que este gênero é utilizado com um hospedeiro de expressão genética³³, e como bioerbicida para uma grande variedade de espécies de plantas agronomicamente importantes, pastos e sistemas de horticultura³⁴.

Numerosos antibióticos têm sido isolados de *M. roridum* e *M. verrucaria*, tais como roridinas, mirotecinas e verrucarinas, sendo os compostos pertencentes à classe dos tricotocenos, os mais citados nos estudos realizados com espécies deste gênero³⁵.

Em um trabalho realizado por Liu et al.³⁶, onde foram ensaiados 16 linhagens fúngicas isoladas de *Argyrosomus argentatus* (espécie de peixe de água salgada) que foram testadas contra os patógenos humanos *Candida albicans*, *Aspergillus Niger* e *Trichophyton rubrum*. Uma destas linhagens identificada como *Myrothecium* sp. foi selecionada para estudos e isolamento dos metabólitos produzidos, devido a alta atividade dos extratos contra estes patógenos e também por estes extratos terem provocado alergia na pele dos pesquisadores.

Como resultado deste trabalho,³⁶ foram isolados o ácido 4,5-ditrideciloctanodióico (66), Roridina A (65), verrucarina A (64), 8 β -acetoxi-roridina H (67), (22*E*, 24*R*)-cervisterol (68) e *N*-fenil- β -amino-naftaleno (69), entre os quais (64), (65) e (67) apresentaram forte atividade contra os patógenos testados. (Figura 08, pág. 47)

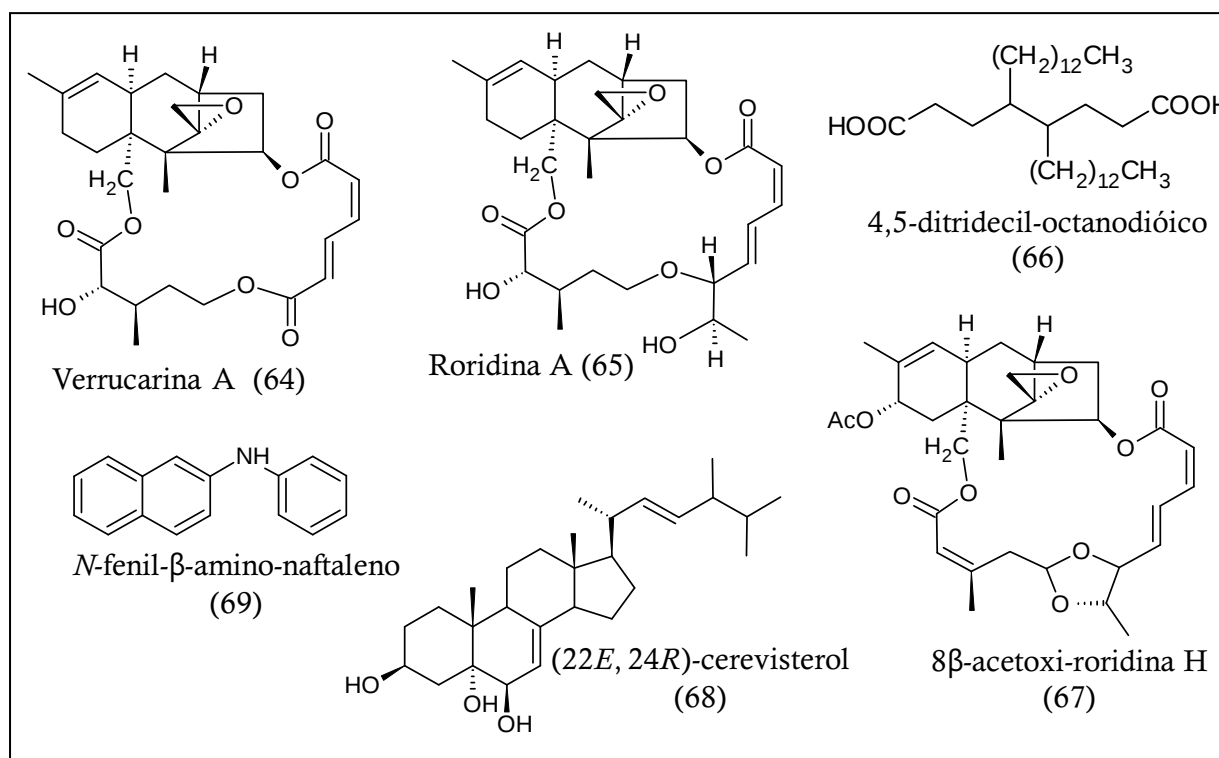


Figura 08 – Metabólitos secundários isolados de fungos do gênero *Myrothecium*

I.5 *Acremonium* sp.

Fungos do gênero *Acremonium* são fungos filamentosos comumente isolados de plantas, solo e organismos marinhos. São classificados como pertencentes à classe dos Ascomicetos mitospóricos e suas características macroscópicas são crescimento moderadamente rápido em BDA, com colônias brancas aveludadas e ocasionalmente levantadas ao centro. No verso da colônia pode ser observada pigmentação rosa.³⁷

Este gênero é conhecido por produzir vários metabólitos secundários de estruturas e bioatividades diversas, tais como policetídeos, terpenóides, esteróides, peptídeos e glicosídeos fenólicos³⁸. Podemos destacar substâncias como xenovuleno A (70) (*Acremonium strictum*)³⁹ com atividade tranqüilizante e anticonvulsiva em potencial, derivados de hidroquinonas (71, 72 e 73) (*Acremonium* sp.) com atividade antioxidante⁴⁰, os sesquiterpenóides Ascofuranona (74) e Ascoclorina (75) (*Acremonium* sp, isolado de esponja marinha), com atividade antiinflamatória³⁸, entre outros (Figura 09, pág. 48).

Um recente estudo realizado com *Acremonium* sp.⁴¹ evidenciou o isolamento de duas novas acremoxantonas (Acremoxantona A (76) e Acremoxantona B (77) e dois

compostos conhecidos Acremonidia A (78) e Acremonidina C (79) (Figura 09, pág. 48). Estes metabólitos apresentaram atividade antibacteriana, acremoxantona A apresentou forte atividade antifúngica contra *Candida albicans*, e acremoxantona B e acremonidina C apresentaram atividade antimalárica.

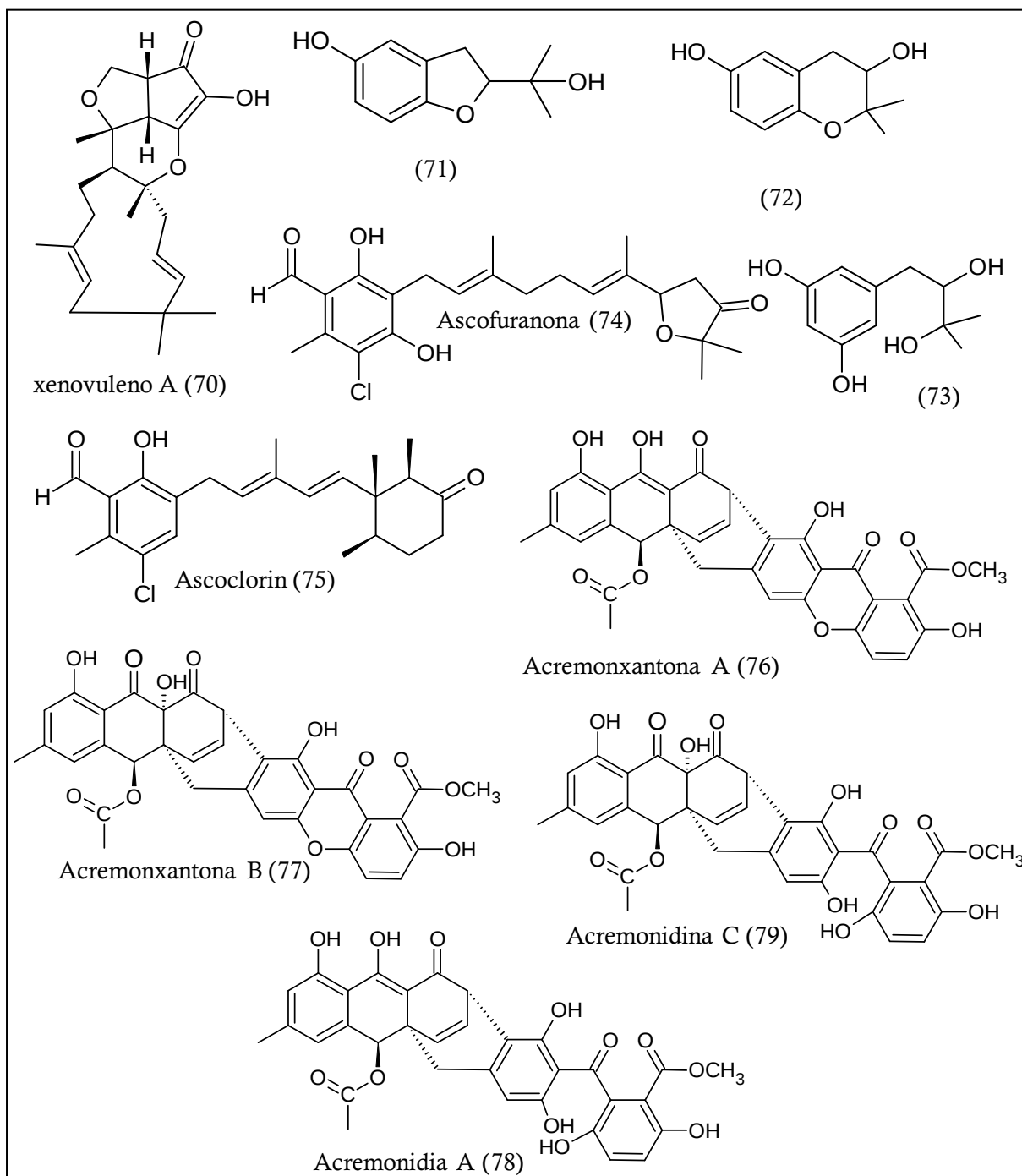


Figura 09 – Substâncias isoladas de *Acremonium* sp.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Os estudos fitoquímicos realizados com *Senna spectabilis*, a grande diversidade metabólica observada nos micro-organismos associados a esta espécie vegetal e seu vasto potencial biológico, nos conduziu ao desenvolvimento deste trabalho, que tem como objetivos estudar os fungos endofíticos associados a esta espécie vegetal, analisar o potencial químico e biológico dos micro-organismos isolados.

Para isto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Isolar, purificar e preservar os fungos endofíticos associados com *Senna spectabilis*;
- Cultivar os fungos endofíticos isolados de *S. spectabilis* e obter os respectivos extratos brutos;
- Realizar a triagem química e biológica dos extratos brutos obtidos por RMN de ^1H e CLAE-DAD e contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, ensaios da atividade anticolinesterásica e antioxidante, respectivamente;
- Selecionar os extratos bioativos e promissores para realizar o isolamento, elucidação ou determinação estrutural das substâncias isoladas;
- Submeter as substâncias puras isoladas aos respectivos ensaios químicos e biológicos para verificar a potencialidade biológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E TRIAGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA

Diversos estudos, nos últimos anos, têm demonstrado que um número significativo de fungos exibem múltiplos papéis ecológicos, podendo ser encontrados em diversos habitats inclusive associados à espécies vegetais. Dentre estes estão os fungos endofíticos que assumem interações simbióticas, entre outras, com as plantas, sendo responsáveis pela produção de diversas substâncias com atividades biológicas que irão resultar em vantagens tanto ao micro-organismo quanto ao seu hospedeiro. Neste tópico estão apresentados os resultados do isolamento de alguns fungos endofíticos associados à *S. spectabilis* e a diversidade química e biológica dos metabólitos produzidos por estes micro-organismos.

III.1 Seleção, Coleta e Classificação do Material Vegetal

O isolamento dos fungos endofíticos foi realizado a partir de folhas e ramos jovens e saudáveis de um espécime de *S. spectabilis* localizado nas proximidades do Instituto de Química da Unesp-Araraquara, devidamente geo-referenciado e as exsicatas estão depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo, classificadas como SP 384109.

III.2 Isolamento, Purificação e Preservação dos Fungos Endofíticos

A metodologia empregada para o isolamento dos fungos endofíticos foi baseada no procedimento citado por Maier et al. (1997)⁴² (Tópico VII.2.1.2, Pág. 154), e está resumidamente apresentado na Figura 10 (pág. 53).

Este procedimento possibilitou o isolamento de 43 linhagens fúngicas, das quais 28 foram selecionadas para estudos químicos e biológicos a serem realizados pelo grupo de pesquisa e estão apresentados na Tabela 03 e 04 (págs. 54 e 55).

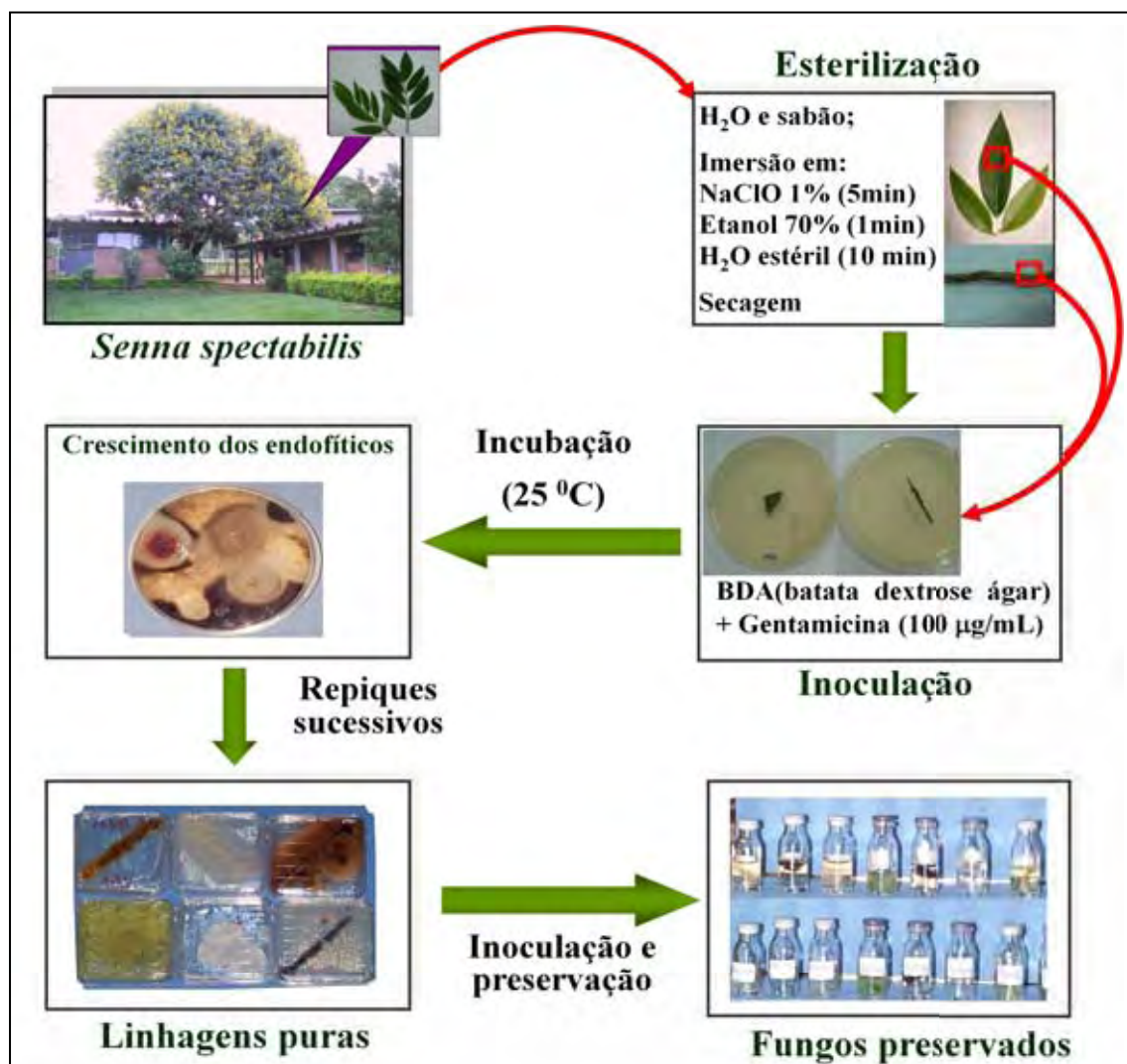
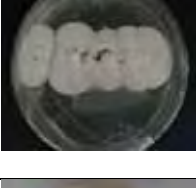
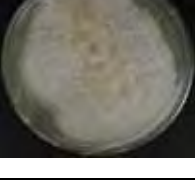
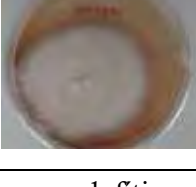


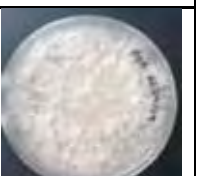
Figura 10 – Metodologia de isolamento dos fungos endofíticos

Tabela 03 – Fungos endofíticos isolados das folhas de *S. spectabilis*

Folha					
Fungo	Foto	Fungo	Foto	Fungo	Foto
Cs-f (1) [#]		Cs-f(2) [#]		Cs-f (3e/f)	
Cs-f(4) [#]		Cs-f(7) [#]		Cs-f(13) [#]	
Cs-f (14a)		Cs-f (14c)		Cs-f(16) [#]	
Cs-f(17) [#]		Cs-f(19) [#]		Cs-f(21) [#]	
Cs-f (23)		Cs-f (25)		Cs-f (26)	
Cs-f (27)					

[#] Fungos endofíticos estudados com colaboração do aluno Thomas Rafael Habeck

Tabela 04 – Fungos endofíticos isolados dos ramos de *S. spectabilis*

Ramos					
Fungo	Foto	Fungo	Foto	Fungo	Foto
Cs-c (2a)		Cs-c (2b)		Cs-c (3b)	
Cs-c (3c/d)		Cs-c(6) #		Cs-c(8) #	
Cs-c(10) #		Cs-c(11) #		Cs-c(12) #	
Cs-c (16)		Cs-c(17/22)		Cs-(19/20)	

Fungos endofíticos estudados com colaboração do aluno Thomas Rafael Habeck

O meio de cultivo utilizado para o isolamento dos fungos endofíticos foi BDA que é um meio rico em nutrientes primários essenciais ao crescimento de fungos. No entanto, devemos considerar que algumas espécies precisam de condições especiais e nutrientes específicos para se desenvolver, o que pode ter interferido no crescimento destas impedindo assim o seu isolamento. Desta forma, os fungos isolados foram os que melhor se adaptaram às condições de crescimento empregadas.

A eficácia da esterilização superficial do material vegetal foi verificada pelo monitoramento da última água de lavagem que não demonstrou nenhum tipo de crescimento de micro-organismos, quando plaqueada, o que comprova a eficiência no processo de esterilização.

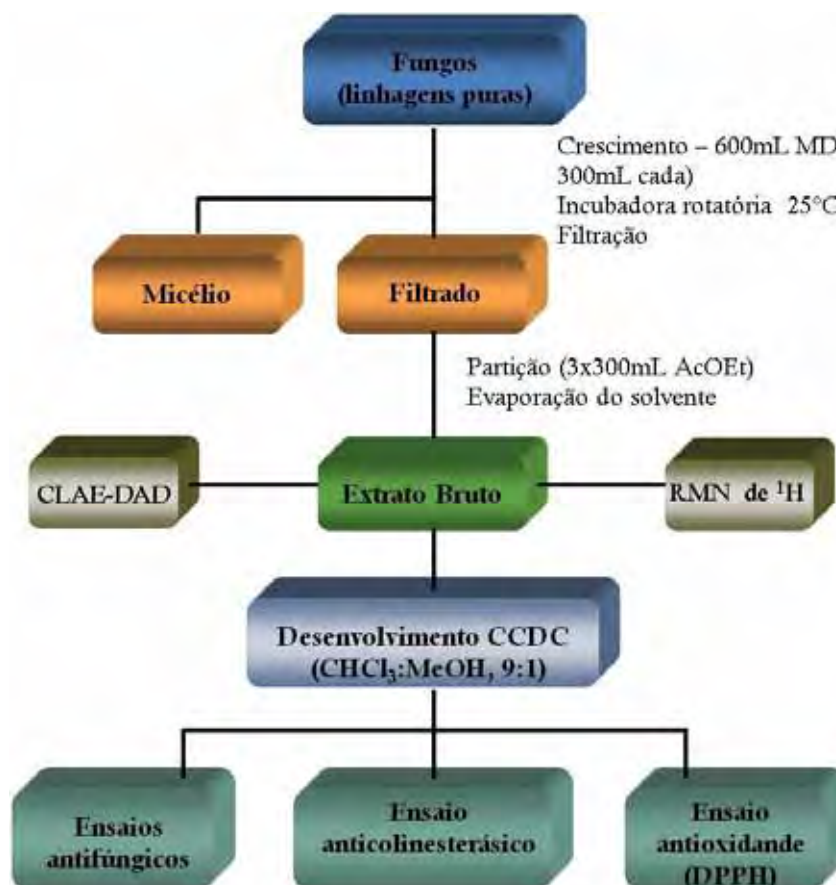
III.3 Cultivo dos Micro-organismos para Obtenção dos Extratos Brutos

Dos fungos isolados, 28 foram selecionados para cultivo em meio líquido, obtenção dos respectivos extratos brutos e posteriores análises químicas e biológicas (Fluxograma 01, pág. 57).

Esta seleção prévia dos micro-organismos foi necessária como tentativa de evitar a triagem de uma mesma espécie repetidamente, uma vez que não foi possível a identificação de todos os fungos isolados. Para isso, foram adotadas como critérios de seleção as diferenças macroscópicas de cada cultura. No entanto, algumas diferenças são muito sutis e podem estar relacionadas apenas ao modo de crescimento e de reprodução de cada micro-organismo (sexuada ou assexuada).

Sendo assim, inicialmente as culturas fúngicas que apresentaram maiores diferenças macroscópicas (14 culturas), foram submetidas a crescimento em escala reduzida em meio líquido (MBD) para obtenção dos extratos brutos, e os resultados estão apresentados neste tópico. As demais culturas selecionadas (14 restantes marcadas com #) foram submetidas aos mesmos procedimentos de cultivo e análises químicas e biológicas, no decorrer deste trabalho, estando os resultados apresentados como parte do trabalho de monografia do aluno Thomas R. Habeck⁴³.

A metodologia utilizada para crescimento em pequena escala e obtenção dos extratos brutos está descrita no Tópico VII.2.1.3 (pág 155).



Fluxograma 01 – Metodologia de cultivo dos fungos e triagem dos extratos brutos para avaliação do perfil químico e biológico

As massas de extratos brutos obtidas foram consideradas satisfatórias (Tabela 05 pág. 58.). A maior quantidade de massa observada para os fungos Cs-c (17/22) e Cs-c(19/20) pode ser explicada pelo fato de que cada micro-organismo requer diferentes “condições ótimas de cultivo”, e neste trabalho foi empregada a mesma metodologia para todos os endófitos.

Tabela 05 – Massas dos Extratos Brutos Obtidas dos Fungos Endofíticos

Folhas		Ramos	
Fungo	Massa do Extrato Bruto ^a (mg)	Fungo	Massa do Extrato Bruto ^a (mg)
Cs-f (3e/f)	16,3	Cs-c (2a)	14,8
Cs-f (14a)	25,2	Cs-c (2b)	14,5
Cs-f (14c)	26,3	Cs-c (3b)	12,6
Cs-f (23)	46,4	Cs-c (3c/d)	14,2
Cs-f (25)	21,1	Cs-c (16)	16,4
Cs-f (26)	29,2	Cs-c (17/22)	67,3
Cs-f (27)	30,6	Cs-c (19/20)	72,9

^aMassa de extrato bruto obtida em 600 mL de meio de cultivo

III.4 Avaliação do Perfil Químico dos Extratos Brutos

Os extratos brutos obtidos foram submetidos à análises por CCDC, CLAE-DAD e RMN de ¹H.

✓ *Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC):*

Visando estabelecer condições primárias de separação cromatográfica como etapa inicial para os ensaios de detecção de substâncias bioativas e uma prévia comparação dos metabólitos produzidos, os extratos brutos foram submetidos a separação cromatográfica em CCDC com sílica de fase normal, num sistema de eluição com CHCl₃:MeOH (9:1 V/V) [procedimento experimental Tópico VII.2.1.4, pág. 156]. Este sistema propiciou uma boa resolução para todos os extratos (Figura 11, pág. 59), mostrando uma produção variada de substâncias, possivelmente de classes diferentes nos extratos de cada fungo.

Os extratos brutos obtidos de Cs-c(2a) e Cs-c(2b), mostraram-se praticamente idênticos por CCDC sugerindo assim, tratar-se da mesma linhagem fúngica. Esta suposição foi posteriormente reforçada pelas análises por CLAE-DAD.

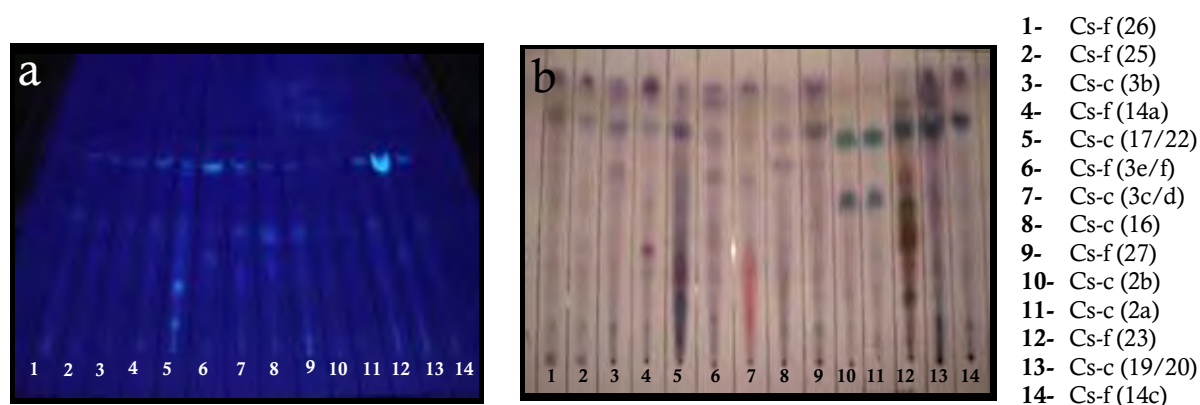


Figura 11 – Análise por CCDC dos extratos brutos; a) revelação em UV 365 nm; b) revelação com anisaldeído + Δ .

✓ *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD):*

Considerando a natureza de média a alta polaridade das substâncias extraídas pela partição com AcOEt, os extratos brutos foram submetidos à CLAE-DAD para verificar a adequação desta técnica cromatográfica no trabalho experimental, e também contribuir para uma avaliação prévia da natureza química das substâncias presentes.

Os cromatogramas foram obtidos em coluna de fase reversa, em gradiente exploratório, conforme análise descrita no Tópico VII.2.1.4 (pág. 156), e revelaram para todos os extratos brutos, um perfil químico com grande variedade metabólica, com bandas cromatográficas variando de média a alta polaridade e boa resolução cromatográfica em vários comprimentos de onda (Anexos 01 a 14, págs. 178 a 182). Estes cromatogramas evidenciaram também a técnica por CLAE como boa técnica de separação cromatográfica para estes extratos, com exceção dos extratos Cs-c(2a) e Cs-c(2b) que demonstraram poucas substâncias com absorção no ultravioleta.

Nas Figuras 12-16 (págs. 60 e 61), estão apresentados os cromatogramas de cada extrato bruto no comprimento de onda em que foi possível observar a maior quantidade de sinais referentes aos metabólitos secundários.

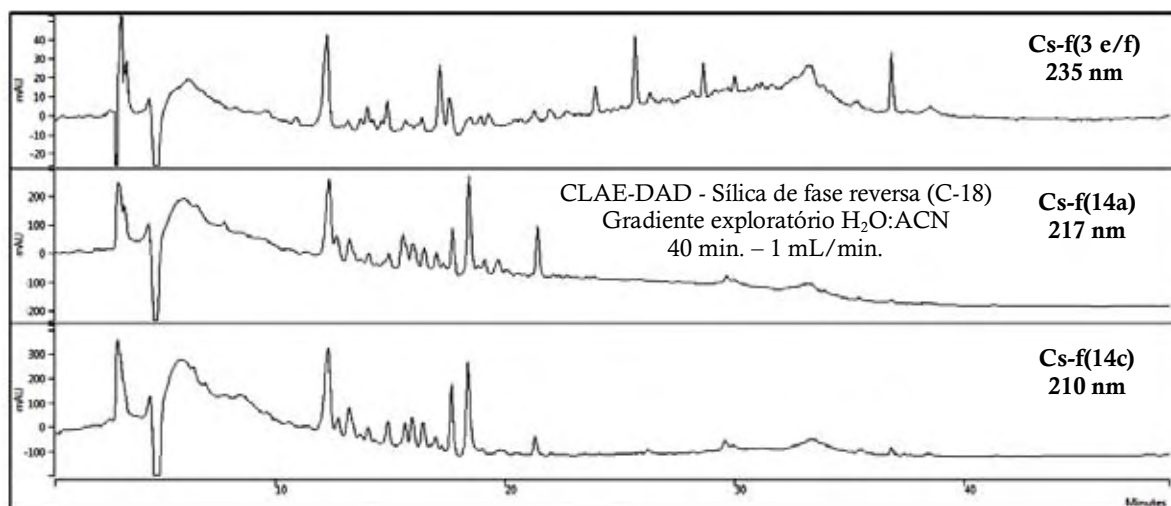


Figura 12 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-f(3e/f), Cs-f(14a) e Cs-f(14c).

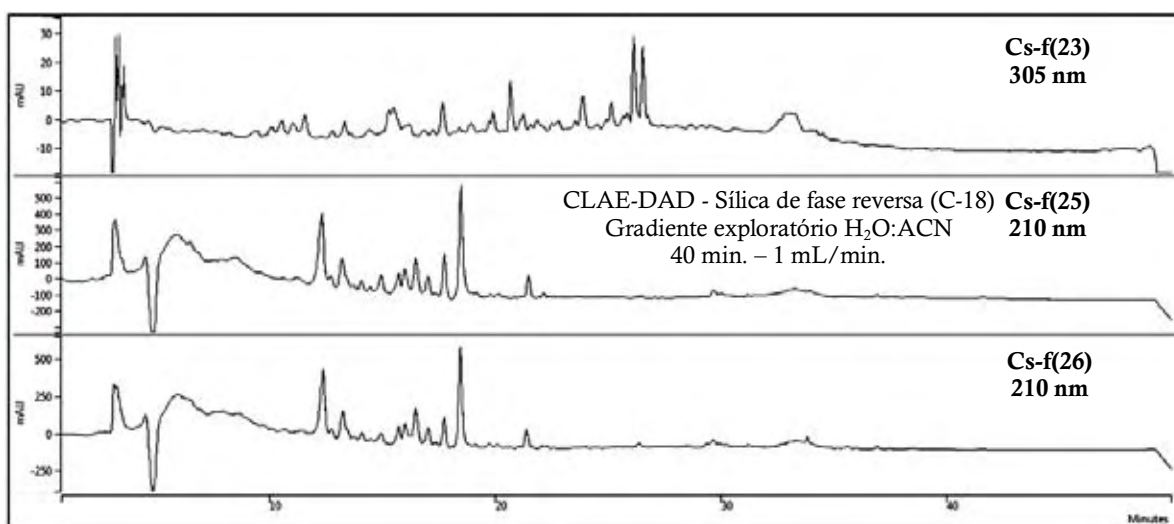


Figura 13 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-f(23), Cs-f(25) e Cs-f(26).

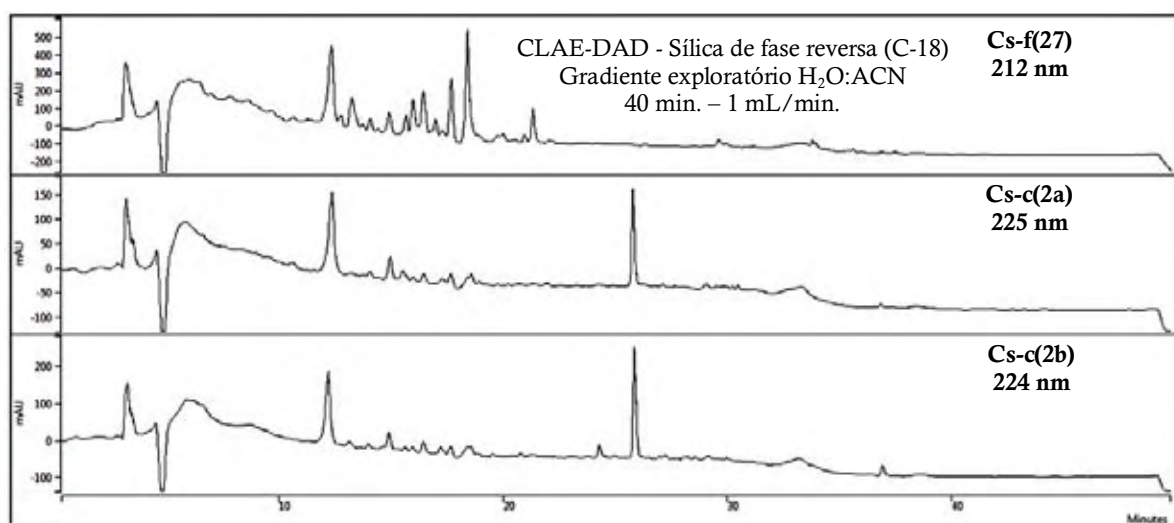


Figura 14 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-f(27), Cs-c(2a) e Cs-f(2b).

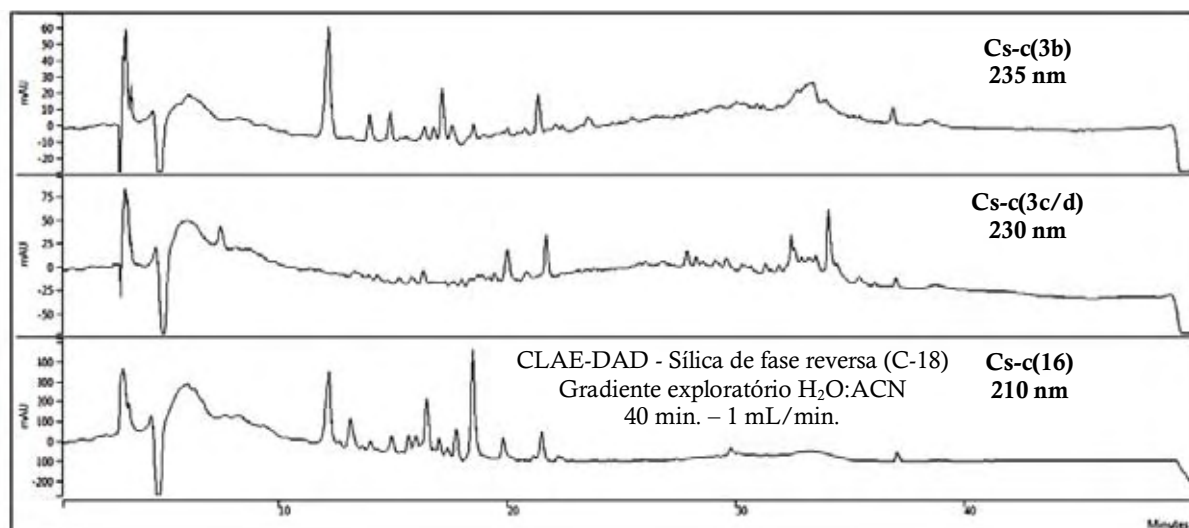


Figura 15 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-c(3b), Cs-c(3c/d) e Cs-c(16).

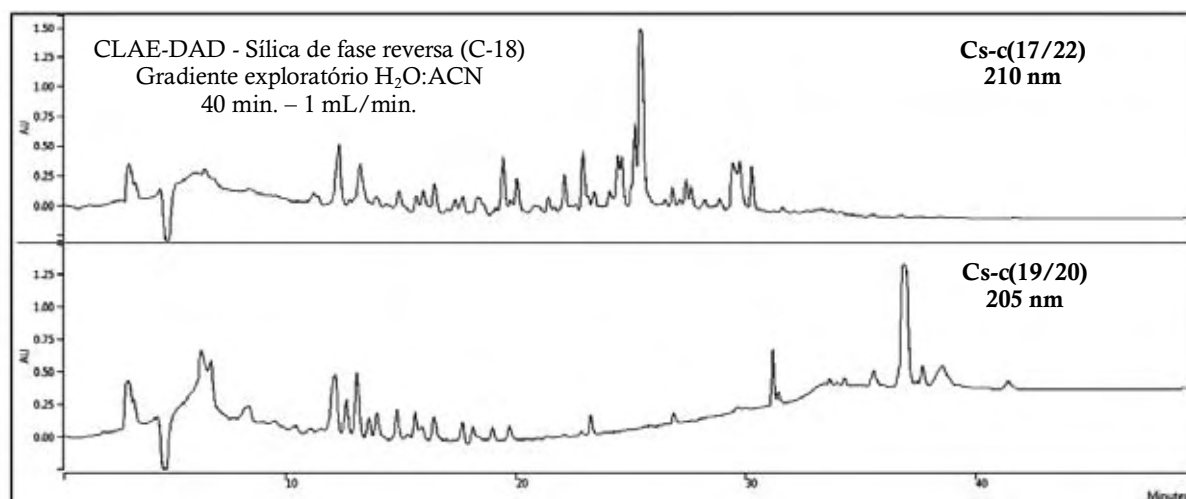


Figura 16 – Perfil cromatográfico em gradiente exploratório dos extratos brutos de Cs-c(17/22), Cs-c(19/20).

✓ *Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H):*

Os extratos brutos foram submetidos a esta análise com o objetivo de obter indícios sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos por cada fungo endofítico.

Nos espectros de hidrogênio foram observados extratos com uma produção metabólica muito rica, evidenciando sinais por toda largura espectral, variando de 0,5 até aproximadamente δ_H 10,0 ppm e sugerindo a possibilidade de várias classes de metabólitos secundários diferentes (Anexos 15 a 28, págs. 183 a 189), com exceção dos extratos obtidos de Cs-c(19/22) e Cs-c(3b). O primeiro apresentando poucos sinais de

hidrogênio apesar da alta concentração da amostra, o que contradiz os resultados obtidos por CLAE- DAD e CCDC onde foi possível observar diversas bandas cromatográficas, e o segundo [Cs-c(3b)] que apresentou poucos sinais de hidrogênio e estes na sua maioria pouco intensos quando comparados com o sinal do solvente.

De um modo geral, todos os espectros apresentaram sinais de hidrogênio abrangendo toda a faixa espectral, sendo observados diversos sinais de hidrogênios aromáticos, metílicos, metilênicos e olefínicos. A diversidade de sinais ressalta a grande diversidade química de cada extrato produzido pelos fungos endofíticos.

III.5 Avaliação do Perfil Biológico dos Extratos Brutos

A propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar, estabilizando facilmente o elétron desparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância, sendo esse modelo geralmente observado em estruturas fenólicas.

Utilizando as condições cromatográficas pré-estabelecidas na análise em CCDC [sílica de fase normal e eluentes CHCl_3 :MeOH (9:1 V/V)], os extratos brutos foram novamente submetidos a essa separação cromatográfica, em duplicata, e reveladas com DPPH seguindo a metodologia descrita no Tópico VII.1.5 (pág.157).

A revelação da placa com DPPH indicou a presença de substâncias com potencial atividade antioxidante, em todos os extratos, pelo aparecimento de manchas claras nos locais onde as substâncias foram localizadas (Figura 17, pág. 63). Estes resultados são qualitativos e indicam a presença de substâncias capazes de reduzir o composto difenilpicril-hidrazina (DPPH) doando um hidrogênio radicalar, o que pode ser um indicativo de atividade antioxidante destas substâncias.

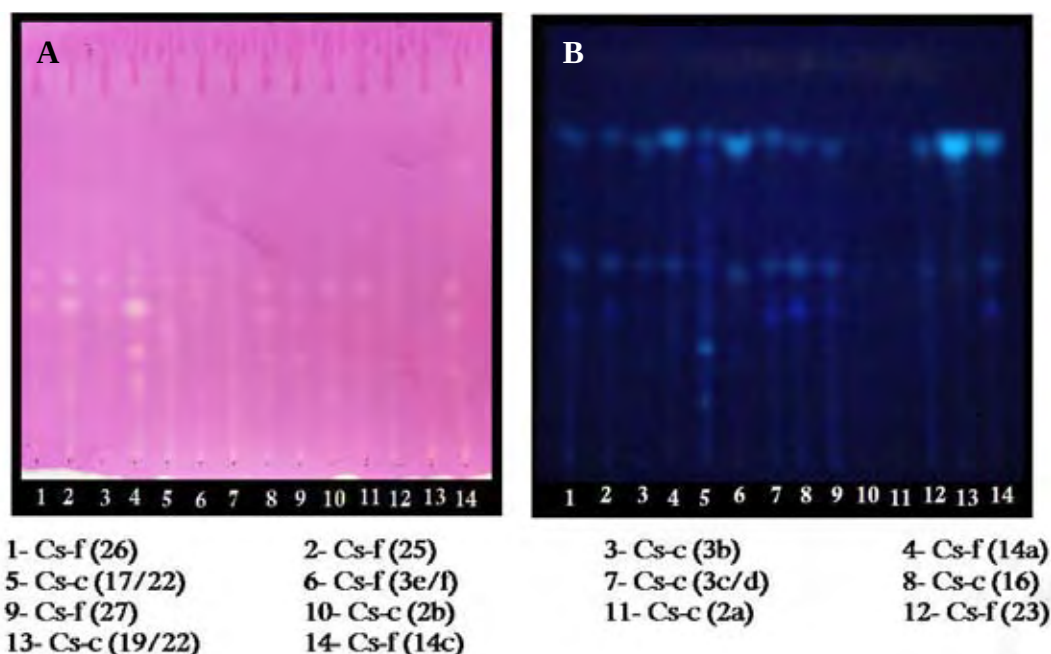


Figura 17– Avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos extratos brutos: A) revelação com DPPH; B) revelação em luz UV 365 nm

✓ *Ensaio Preliminar para Avaliação da Atividade Antifúngica Através de Bioautografia sobre Cromatogramas em Camada Delgada*

Todos os extratos brutos dos endofíticos foram submetidos ao ensaio antifúngico contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* seguindo a metodologia descrita no Tópico VII.2.1.5 (pág.157), e utilizando as condições cromatográficas pré-estabelecidas na análise em CCDC (sílica de fase normal e eluentes CHCl_3 :MeOH 9:1 V/V).

O aparecimento de zonas de inibição indicaram a presença de substâncias com potencial antifúngico (Figura 18, pág. 64, Tabela 06, pág. 65), mostrando diversas substâncias com esta atividade para todos os extratos brutos. Estes resultados evidenciaram assim um forte potencial biológico para estes micro-organismos, e sugerem que estes estejam exercendo uma função ecológica na espécie hospedeira, protegendo-as contra possíveis fitopatógenos.

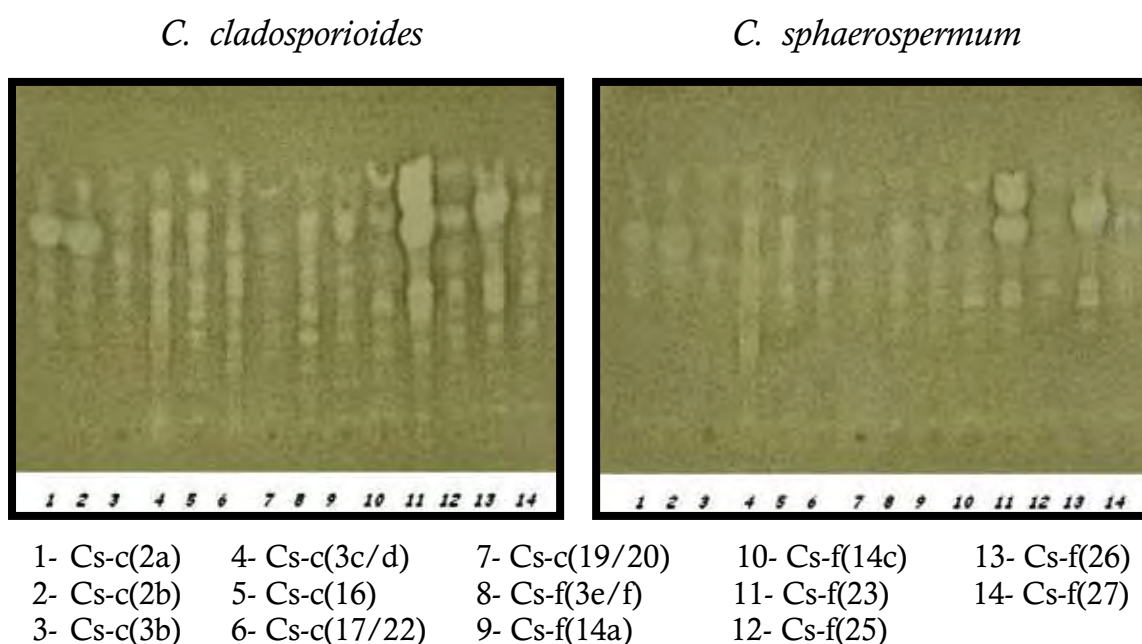


Figura 18 – Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos.

Na tabela 06, estão apresentados os resultados qualitativos das atividades antifúngicas de cada substância, juntamente com sua localização na placa cromatográfica por meio dos Rf.

Tabela 06 – Resultados da avaliação das atividades antifúngicas dos extratos brutos

Extratos	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>	
	Rf	Potencial	Rf	Potencial
1- Cs-c (2a)	0,85	*	--	i
2- Cs-c (2b)	0,85	*	--	i
3- Cs-c (3b)	0,81/0,96	*/*	--	i
4- Cs-c (3c/d)	0,84/0,94	***/**	0,38 a 0,55/0,91	**/*
5- Cs-c (16)	0,83/0,94	***/**	0,84/0,94	*/*
6- Cs-c (17/22)	0,85	*	--	i
7- Cs-c (19/20)	--	i	--	i
8- Cs-f (26)	0,77/0,90	**/**	0,75/0,90	**/**
9- Cs-f (3e/f)	0,64/0,78	*/*	--	i
10- Cs-f (14a)	0,61/0,74/0,84	*/**/*	--	i
11- Cs-f (14c)	0,7	**	0,75	*
12- Cs-f (23)	0,76/0,91	**/**	0,60/0,80/0,92	*/**/**
13- Cs-f (25)	0,77/0,84	*/**	--	i
14- Cs-f (27)	0,75/0,83	*/**	0,80/0,91	*/**

Atividade fraca = * , Média atividade = ** , Atividade forte = ***, Inativo

✓ Ensaio Preliminar para Avaliação da Atividade Anticolinesterásica por Bioautografia sobre Cromatogramas em Camada Delgada

O ensaio qualitativo da atividade anticolinesterásica por bioautografia foi realizado seguindo o protocolo descrito no Tópico VII.2.1.5 (pág.157) e utilizando as condições cromatográficas pré-estabelecidas na análise em CCDC (sílica de fase normal e eluentes CHCl₃:MeOH 9:1 V/V).

Após a nebulização com os reagentes adequados, manchas brancas foram observadas evidenciando assim a inibição da enzima acetil-colinesterase o que indica a atividade anticolinesterásica dos metabólitos (Figura 19, pág. 66, Tabela 07, pág. 67).

Estes resultados são surpreendentes, evidenciando que todos os extratos brutos testados apresentaram, em geral, substâncias com uma forte atividade anticolinesterásica

quando comparada com o padrão galantamina, principalmente considerando tratar-se de substância pura (padrão) *versus* extratos brutos.

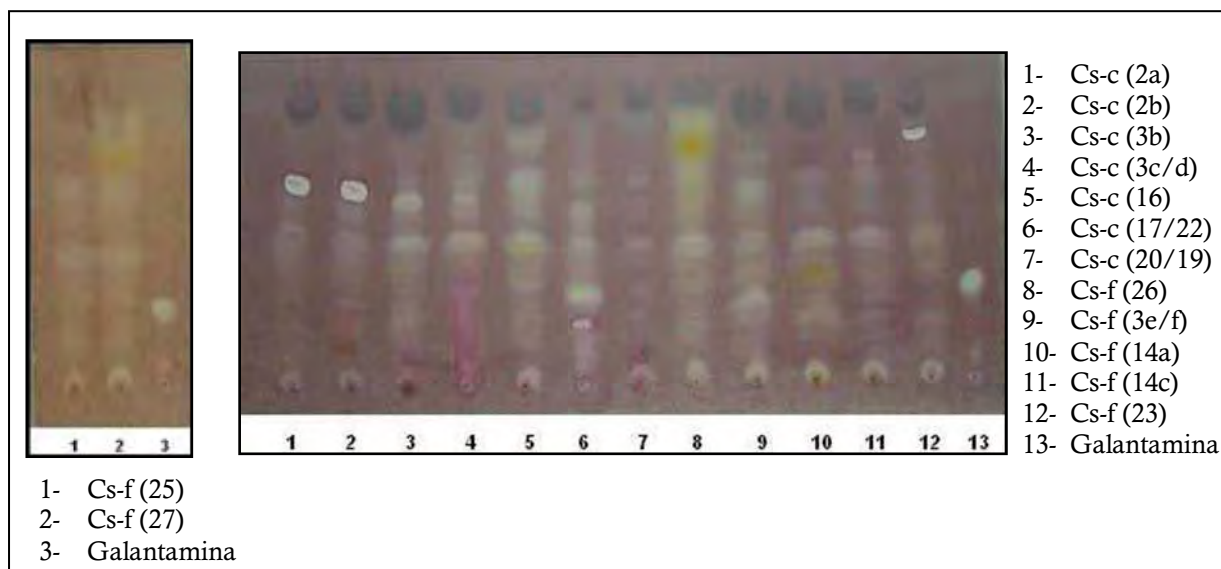


Figura 19 – Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos brutos.

Na Tabela 07 (pág. 67) estão apresentados os Rfs das substâncias que apresentaram atividade anticolinesterásica.

III.6 Classificação dos Fungos Endofíticos

A grande quantidade de fungos endofíticos isolados impossibilitou a identificação de todos para a apresentação neste trabalho. No entanto, alguns dos micro-organismos que apresentaram resultados mais promissores tanto nas análises químicas quanto nas análises biológicas, foram selecionados para classificação taxonômica e posteriores estudos neste e em outros trabalhos de pesquisa

As linhagens codificadas como Cs-c(17/22), Cs-c(2b). Cs-c(16), Cs-f(14a), Cs-f(23) e Cs-f(26) foram selecionadas e classificadas por taxonomia convencional, conforme especificado no Tópico VII.2.1.6 (pág. 160) e suas classificações estão apresentadas na Tabela 08 (págs. 68 e 69).

Tabela 07 – Resultados da avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos

Extratos	Rf das respectivas manchas em CCDC
1- Cs-c (2a)	0,62/0,49
2- Cs-c (2b)	0,60/0,47
3- Cs-c (3b)	0,56/0,45
4- Cs-c (3c/d)	0,63/0,56/0,45
5- Cs-c (16)	0,76/0,63/0,54/0,45/0,30
6- Cs-c (17/22)	0,54/0,43/0,28/0,19
7- Cs-c (19/20)	0,62/0,42/0,28/0,21
8- Cs-f (26)	0,79/0,73/0,63/0,53/0,45/0,22
9- Cs-f (3e/f)	0,69/0,60/0,53/0,45/0,27
10- Cs-f (14a)	0,65/0,54/0,43/0,29/0,22
11- Cs-f (14c)	0,69/0,63/0,54/0,45/0,30
12- Cs-f (23)	0,74/0,53/0,43/0,29
13- Cs-f (25)	0,66/0,40/0,27
14- Cs-f (27)	0,76/0,68/0,54/0,39/0,26

Tabela 08 – Identificação dos Fungos Endofíticos

Código	Classificação	Foto
Cs-f(14a)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stonem.) Spauld & Scherenk. Anamórfico: <i>Colletotrichum</i> grupo <i>gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc.	
Cs-f(23)	<i>Myrothecium gramineum</i>	
Cs-f(26)	<i>Glomerella cingulata</i> (Stonem.) Anamórfico: <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> (Penzig)	
Cs-c(2b)	<i>Phomopsis</i> sp. (Sacc.) Bubák	
Cs-c(16)	<i>Colletotrichum</i> sp.	
Cs-c(17/22)	<i>Acremonium</i> sp.	

III.7 Considerações Preliminares

Os resultados obtidos permitiram a seleção das espécies *Myrothecium gramineum* (Cs-f(23)) e *Acremonium* sp. (Cs-c(17/22)) para continuação deste trabalho, com o objetivo de isolar e identificar os metabólitos produzidos por estes micro-organismos e avaliar o potencial biológico das substâncias isoladas.

Estas espécies foram selecionadas devido à grande produção e diversidade metabólica apresentada nas análises químicas (CCDC, CLAE-DAD e RMN de ^1H), e reforçadas pelas massas de extratos brutos obtidas quando cultivados em escala reduzida, e principalmente, pelos resultados promissores nos ensaios biológicos, que evidenciaram a presença de diversas substâncias com atividades antifúngica, anticolinesterásica e antioxidante (Figura 20, pág. 70).

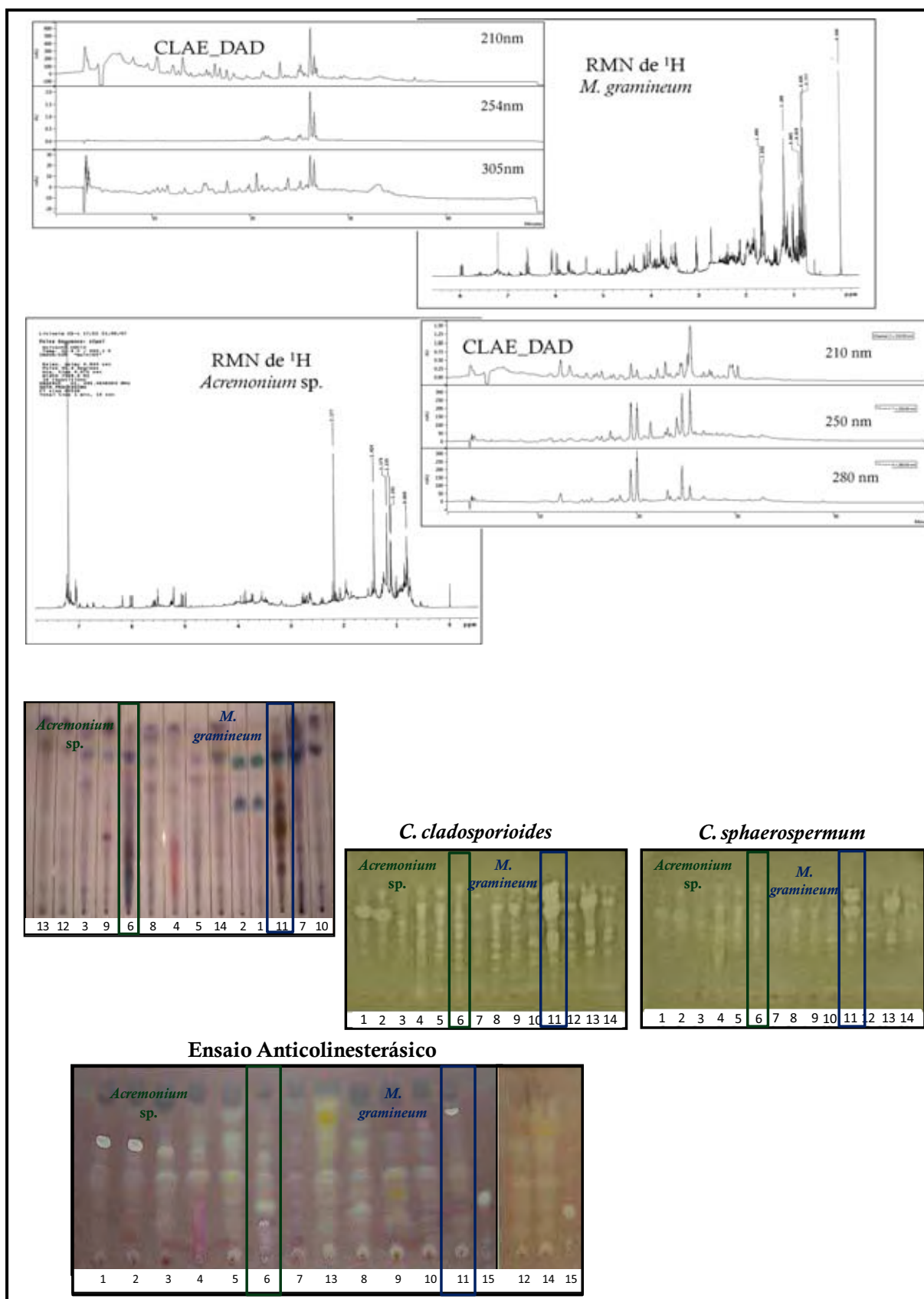


Figura 20 – Resumo dos resultados obtidos na triagem dos fungos endofíticos selecionados para cultivo em escala ampliada e isolamento dos metabólitos secundários

IV. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Myrothecium gramineum*

M. gramineum é um fungo filamentoso da classe dos ascomicetos. Em sua maioria as espécies deste gênero são saprófitas, mas algumas já foram identificadas em associações com vegetais. Fungos do gênero *Myrothecium* são produtores de diversos antibióticos como roridinas, mirotecinas e verrucarinas (Figura 08, pág. 47). Também são relatadas a produção de outras micotoxinas. Neste tópico estão apresentados os resultados obtidos com o estudo químico do extrato bruto produzido por *M. gramineum*, alguns metabólitos secundários isolados e suas atividades biológicas.

IV.1 Resultado da Identificação da Linhagem Fúngica Cs-f(23)

A identificação do fungo endofítico Cs-f(23) foi realizada por taxonomia convencional, que possibilitou identificar o micro-organismo como sendo *Myrothecium gramineum*, e a descrição está apresentada na Figura 21 (pág. 71).

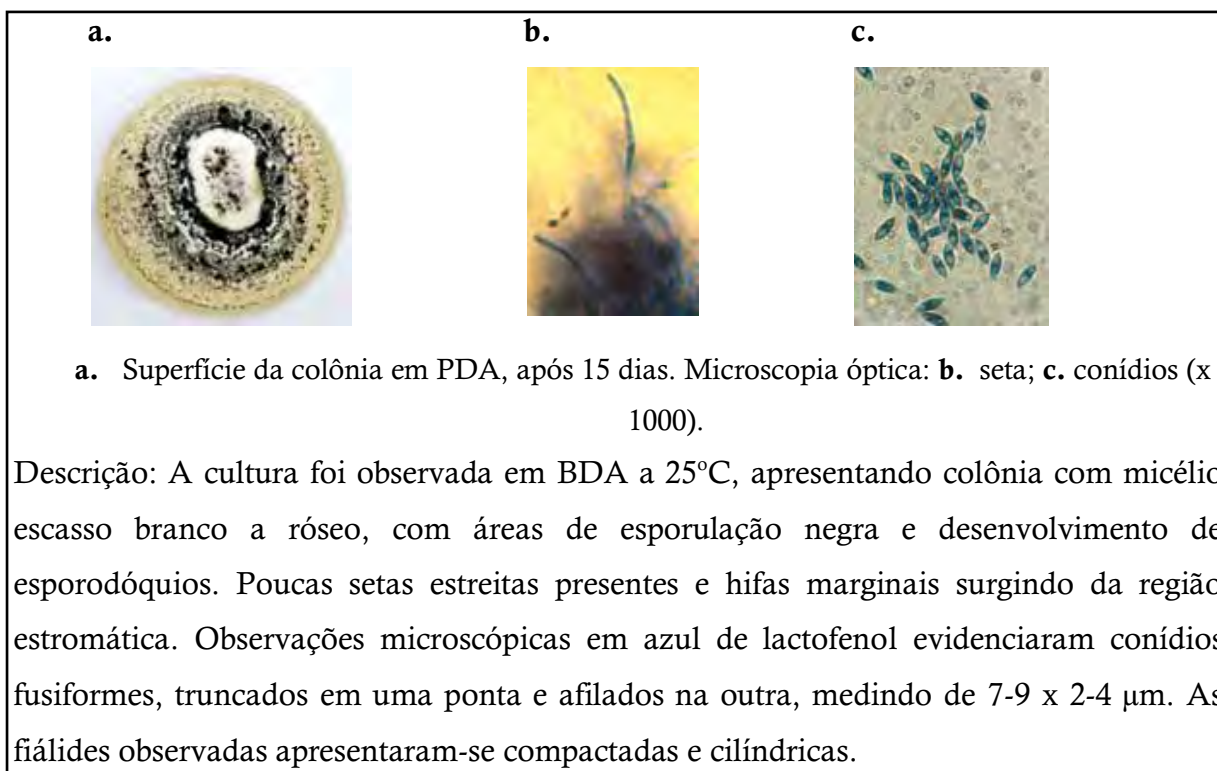
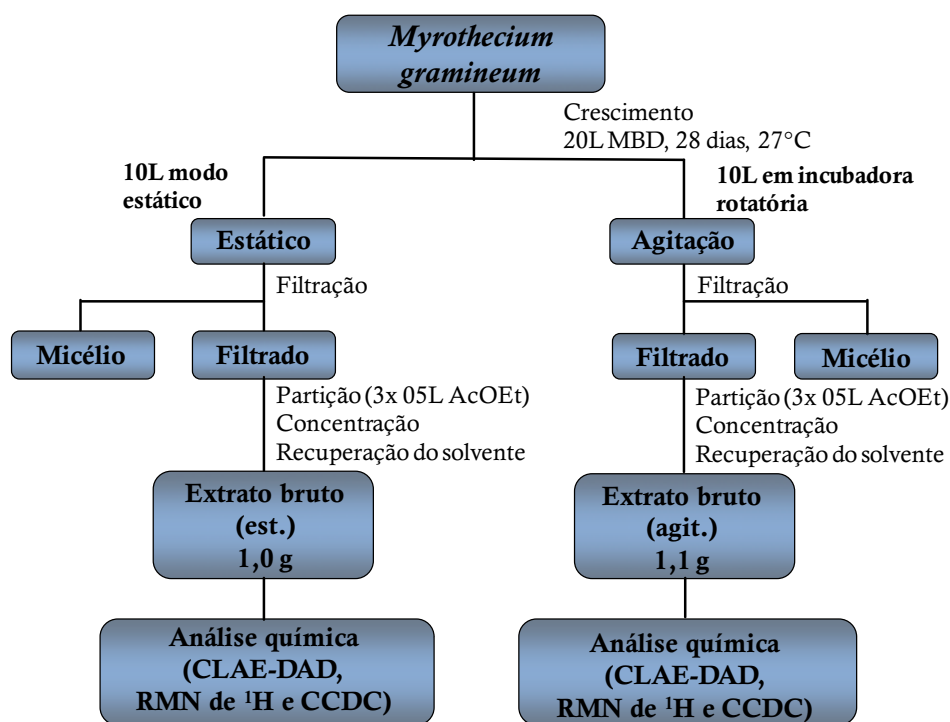


Figura 21 – Identificação taxonômica de *Myrothecium gramineum*

IV.2 Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada e Fracionamento Cromatográfico

O crescimento de *M. gramineum* em escala ampliada (20L) foi realizado seguindo o mesmo procedimento aplicado para escala reduzida, no entanto, utilizando dois modos de incubação (crescimento estático e crescimento sob agitação), para verificar a diversidade metabólica e o rendimento dos extratos brutos (Fluxograma 02, pág. 72; Tópico VII.2.2.1, pág. 160).



Fluxograma 02 – Obtenção dos extratos brutos de *M. gramineum* em escala ampliada e triagem química

Os extratos brutos obtidos (1,1 g crescimento sob agitação; 1,0 g crescimento estático), foram submetidos à análises por RMN de ^1H e CLAE-DAD, em gradiente exploratório [Tópico VII.2.2.1, pág. 160], e mostraram perfis químicos muito semelhantes (Figura 22, 23 e 24, 25 págs. 73 e 74), evidenciando apenas diferenças na intensidade de alguns sinais nos espectros de RMN de ^1H , como por exemplo os sinais na região entre 2 e 3 ppm e na região dos aromáticos (δ_{H} 6,5 - δ_{H} 7,5) ou ainda a presença ou ausência de alguns sinais correspondendo a produção ou não de algumas substâncias, como por exemplo os singletos em δ_{H} 4,53; δ_{H} 6,12, entre outros. Nos cromatogramas foram observadas apenas diferenças nas intensidades de absorção de algumas bandas cromatográficas.

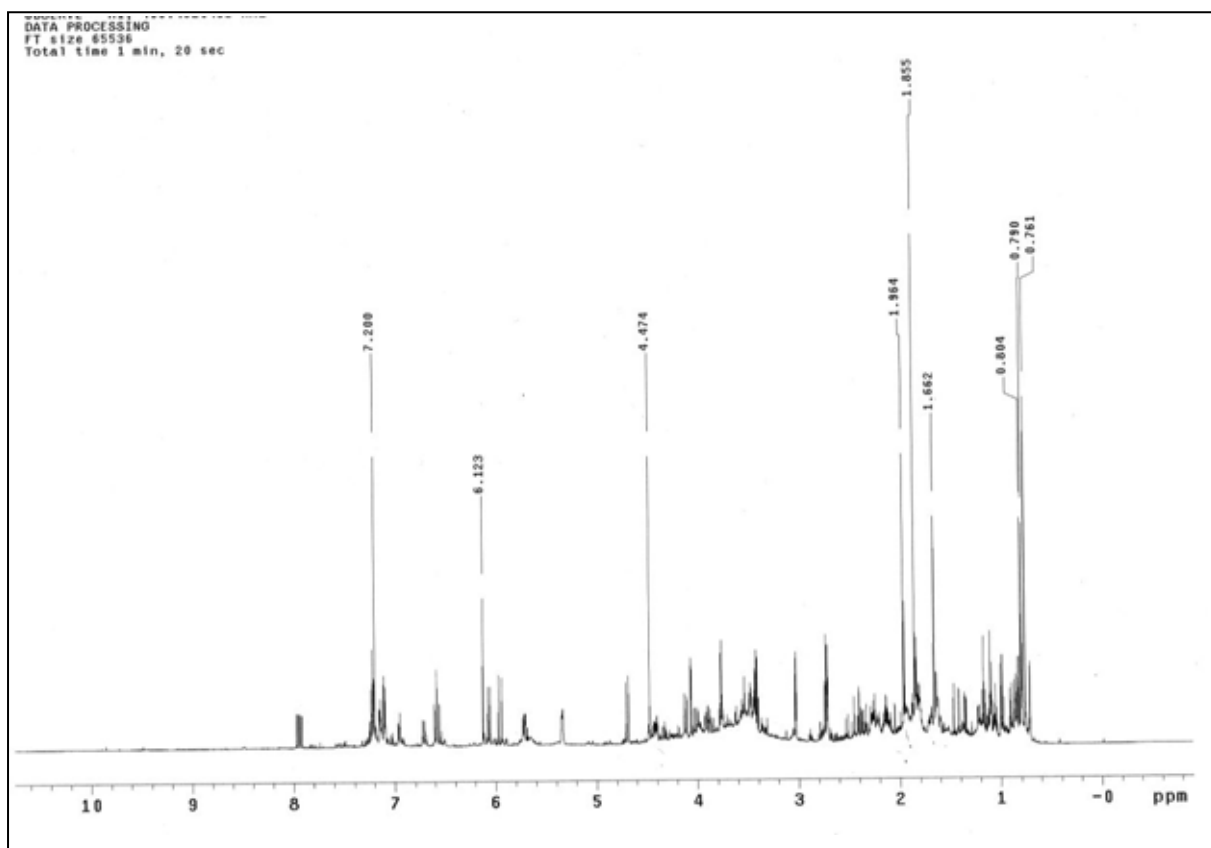


Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *M. gramineum* no modo estático (CDCl_3 , 500MHz)

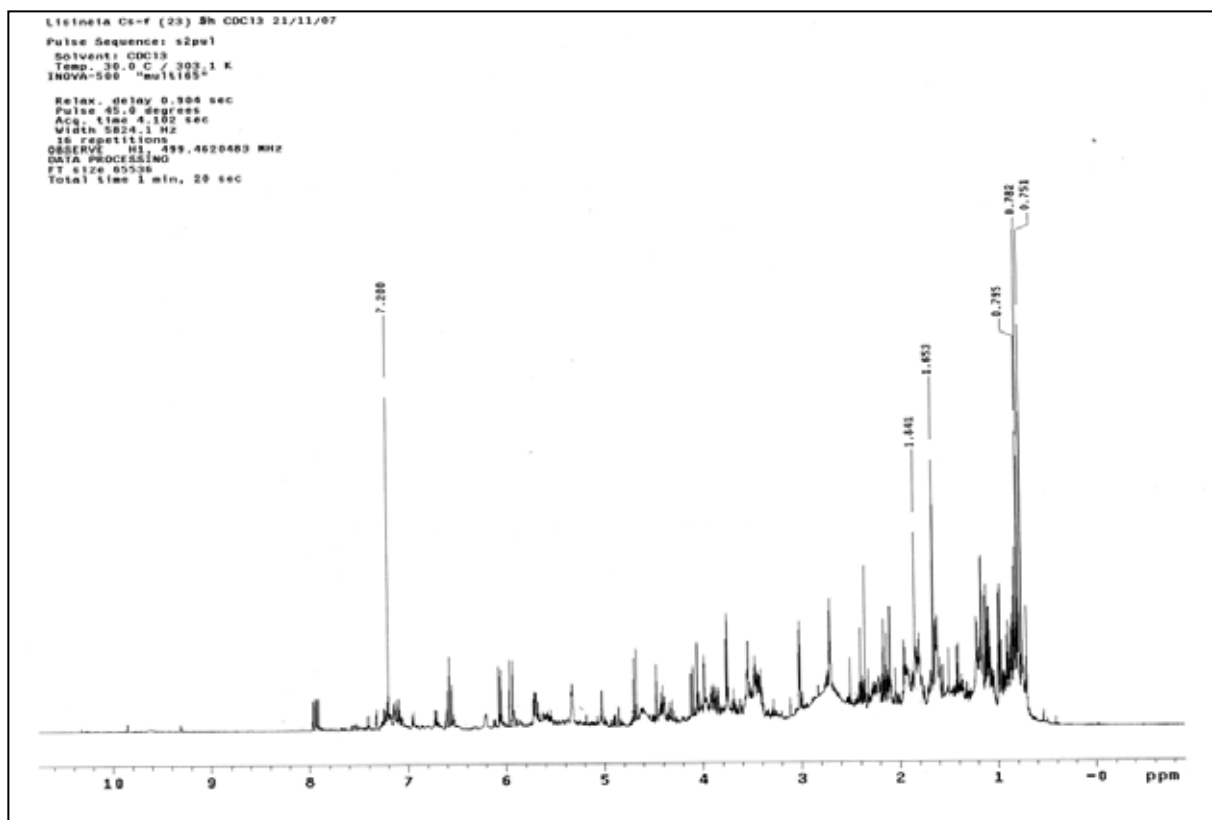


Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *M. gramineum* sob agitação (CDCl_3 , 500MHz)

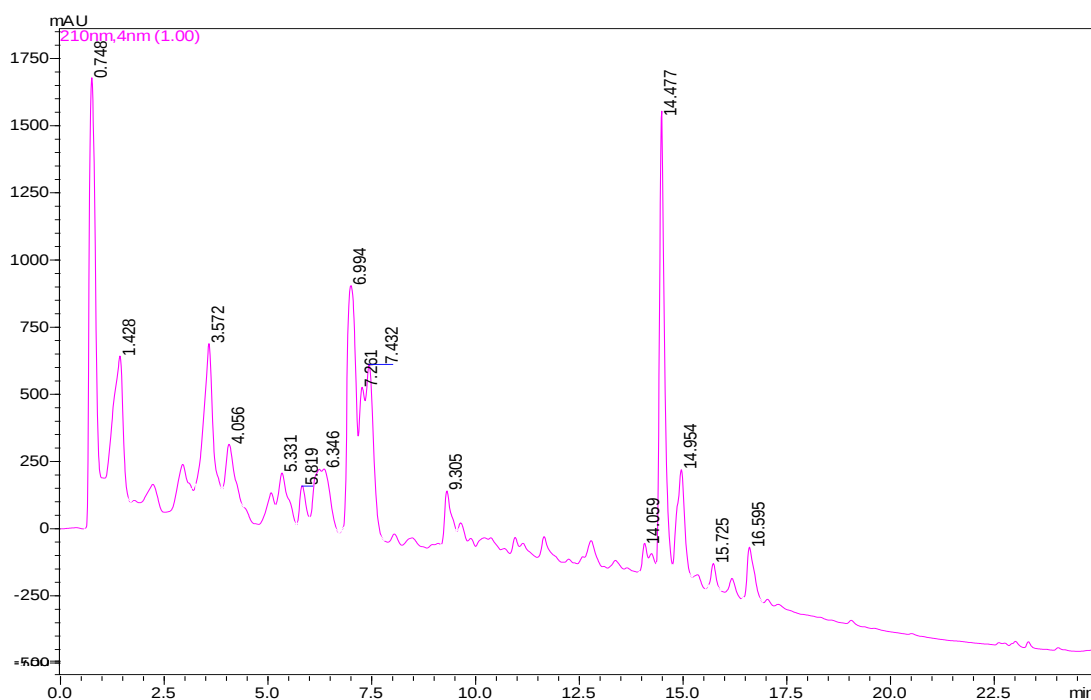


Figura 24 – Cromatograma em gradiente exploratório (H₂O:ACN) do extrato bruto obtido de *M. gramineum* no modo estático em CLAE-DAD, $\lambda = 254$ nm

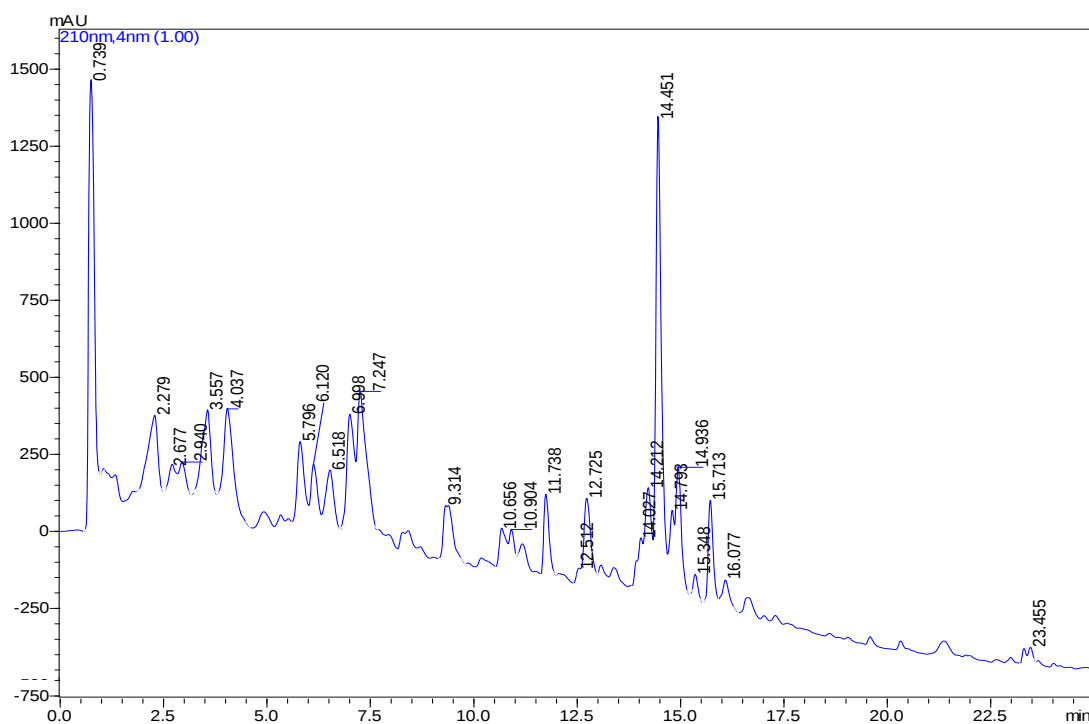


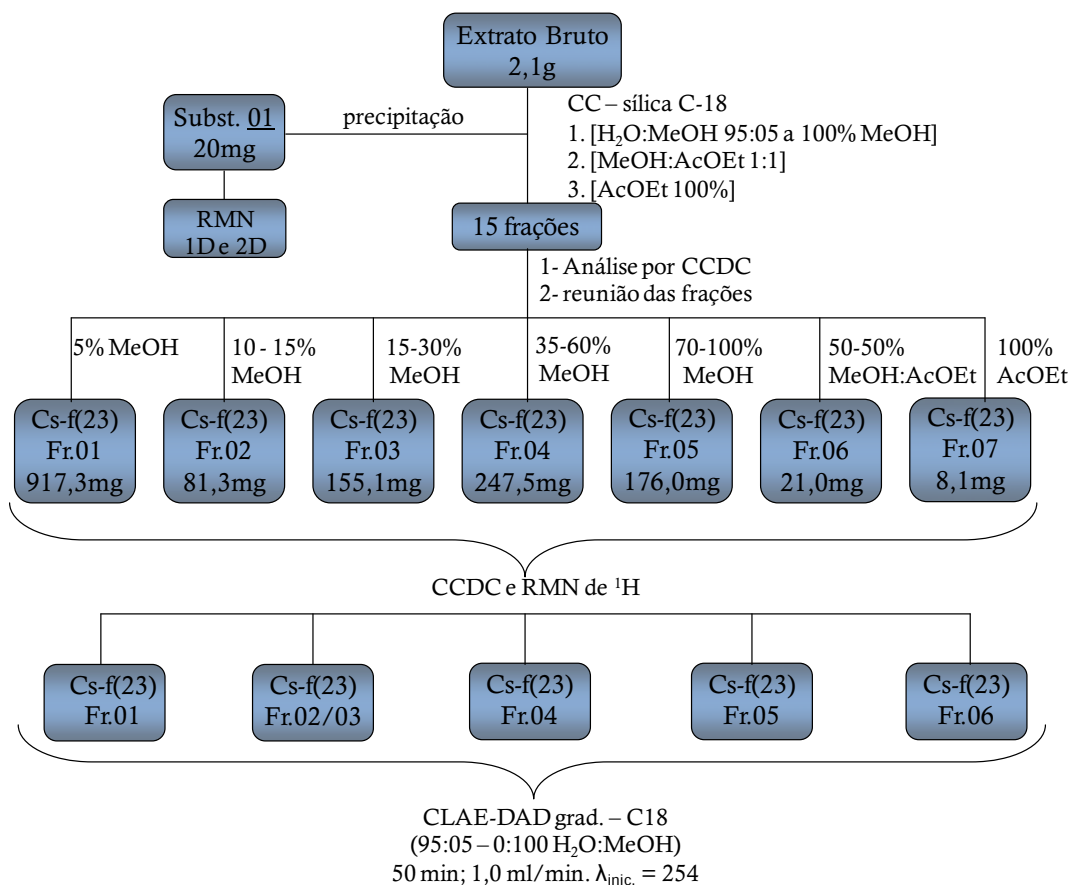
Figura 25 – Cromatograma em gradiente exploratório (H₂O:ACN) do extrato bruto obtido de *M. gramineum* sob agitação em CLAE-DAD, $\lambda = 254$ nm

Estes resultados mostraram que a produção metabólica foi reprodutiva nos dois modos de crescimento (estático ou sob agitação). Sendo assim, os extratos brutos foram reunidos e fracionados por cromatografia líquida sob pressão, utilizando sílica C-18 e um sistema de eluição em gradiente [H₂O:MeOH (5:95 até 100:00), em seguida MeOH:AcOEt (1:1) e AcOEt 100%] (Fluxograma 03, pág. 76; Tópico VII.2.2.2, pág. 161).

O fracionamento cromatográfico resultou em 15 frações, que após análises por CCDC, foram reagrupadas em 7 novas frações e suas respectivas massas estão apresentadas no Fluxograma 03.

As novas frações foram avaliadas por CCDC e RMN de ¹H e conduziram a seleção de Cs-f(23)Fr01 a Cs-f(23)Fr06 para análise do perfil químico por CLAE-DAD (Figuras 26 e 27, págs. 76 e 77), utilizando as mesmas condições aplicadas para os extratos brutos. Com estes resultados foi possível a seleção dos melhores comprimentos de onda e iniciar a otimização do sistema de eluição para isolamento das substâncias por CLAE_{prep}.

Toda a metodologia de cultivo, obtenção dos extratos brutos e fracionamento cromatográfico está resumida nos Fluxogramas 02 e 03, e descrita detalhadamente nos Tópicos VII.2.2.1 e VII.2.2.2. (págs. 160 e 161).



Fluxograma 03 – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *M. gramineum* [Cs-f(23)]

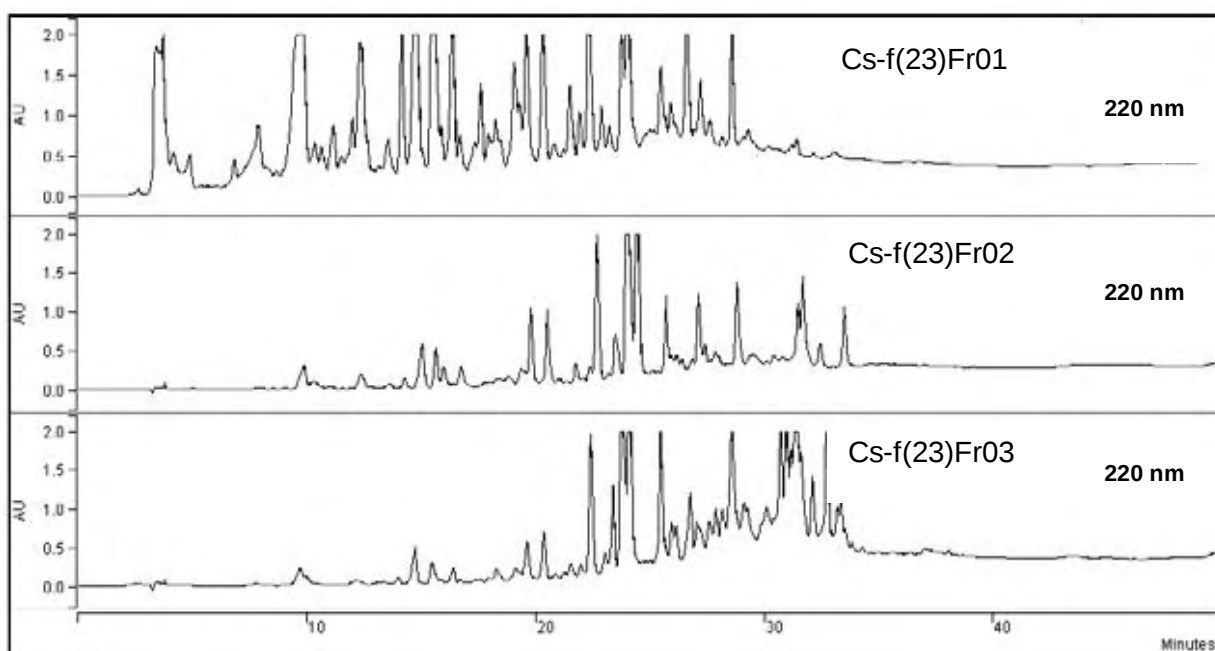


Figura 26 - Cromatogramas em CLAE-DAD das frações Cs-f(23)Fr01 – Cs-f(23)Fr03

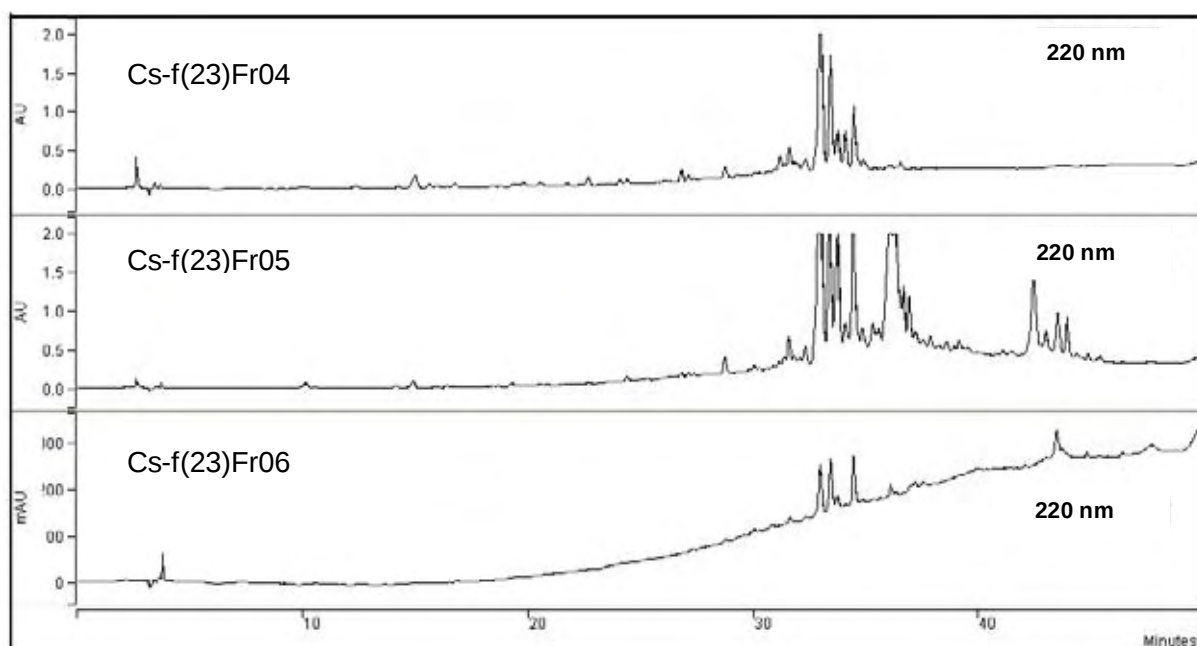


Figura 27 – Cromatogramas em CLAE-DAD das frações Cs-f(23)Fr04 – Cs-f(23)Fr06

IV.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias

A descrição dos procedimentos experimentais realizados para os fracionamentos cromatográficos das frações obtidas e isolamentos das substâncias estão descritos detalhadamente no Tópico VII.2.2.3 (págs. 161- 163).

IV.3.1 Isolamento da Substância 01

Ao solubilizar o extrato bruto com MeOH para aplicação na coluna cromatográfica, ocorreu a formação de um precipitado branco em grande quantidade. Após resfriamento da fração em banho de gelo e centrifugação, o precipitado foi separado do sobrenadante resultando em 20,0 mg de uma substância pura (Sub. **01**). Esta foi submetida a análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bi dimensionais, para determinação ou identificação estrutural (Anexos 52 e 53, págs. 206 e 207).

Uma comparação com os espectros de RMN de ^1H das frações obtidas da coluna cromatográfica (Fluxograma 03, pág. 76) mostrou que a substância precipitada estava presente em grande quantidade nas frações Cs-f(23)Fr04 e Cs-f(23)Fr05, considerando a

intensidade dos sinais observada para os hidrogênios desta substância, quando comparados com os demais presentes nas frações, o que sugere que seja um metabólito majoritário produzido pelo fungo.

IV.3.2 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr01

Na análise por CLAE-DAD da fração Cs-f(23)Fr01 (920,0 mg) foram observadas várias bandas cromatográficas em diversos comprimentos de onda (Figura 28, pág. 78), evidenciando uma fração muito complexa. No entanto, o perfil cromatográfico demonstrou boa resolução das bandas em sílica de fase reversa, o que conduziu a um novo fracionamento em coluna sob pressão (Fluxograma 04, pág. 79, Tópico VII.2.2.3.2, pág. 162) para posterior isolamento das substâncias por CLAE_{prep}.

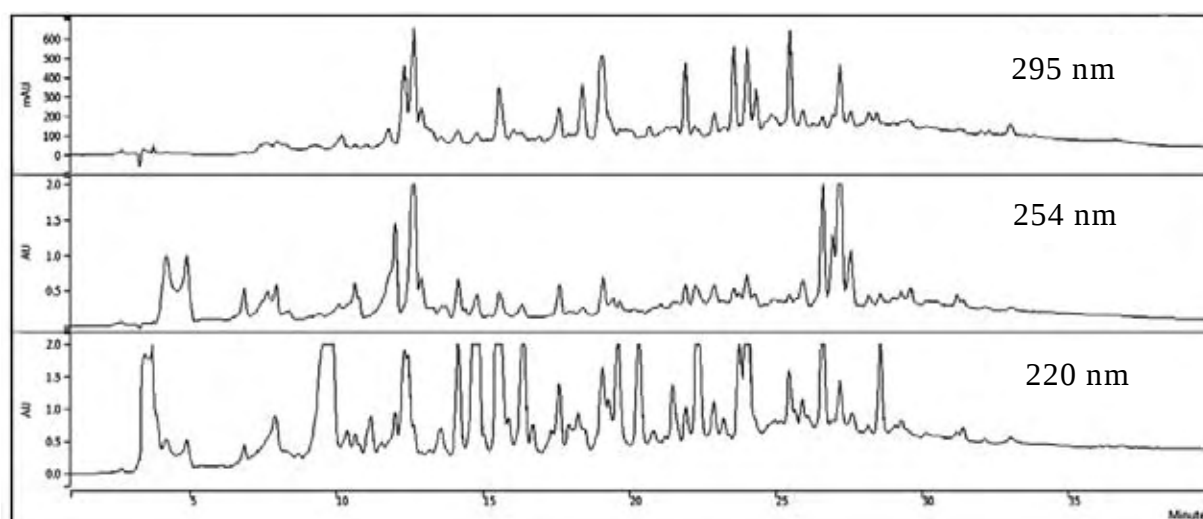
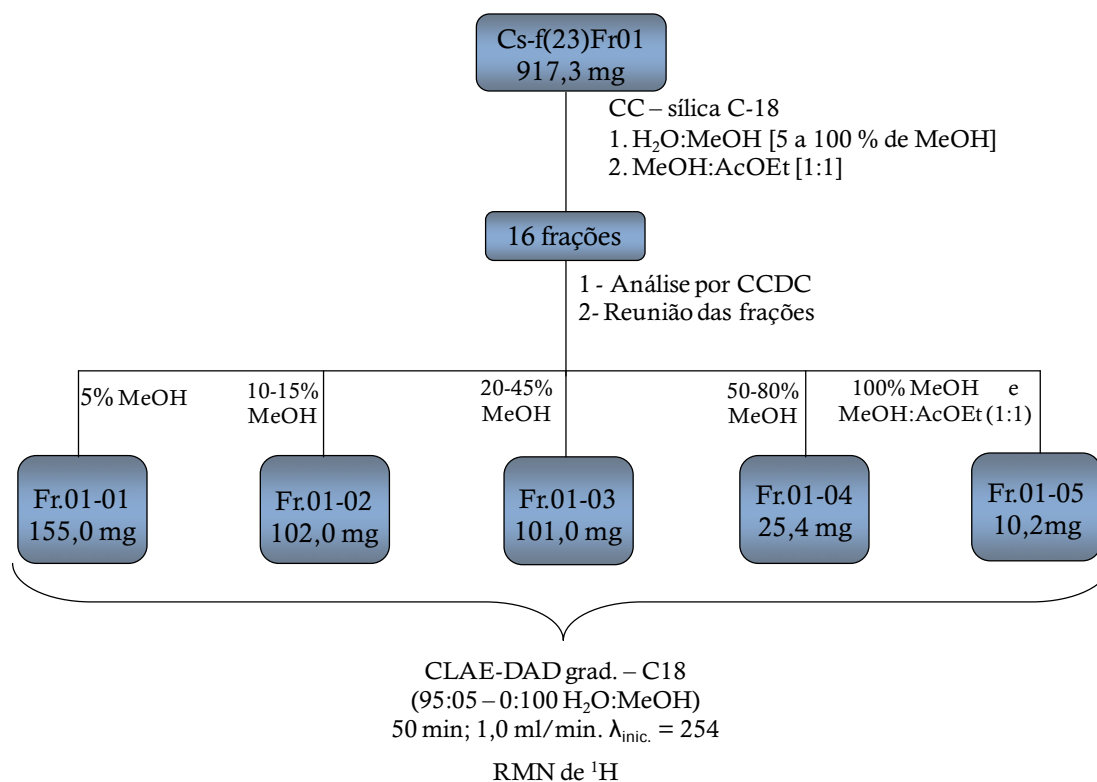


Figura 28 – Perfil cromatográfico de Cs-f(23)Fr01 em diversos comprimentos de onda



Fluxograma 04 – Fracionamento cromatográfico de Cs-f(23)Fr01 [Procedimento experimental VII.2.2.3.2, pág. 162]

Após análises em CLAE-DAD (Figuras 29 e 30, págs. 79 e 80) e RMN de ¹H (Anexos 29 e 30, pág. 190), as frações Fr01-01 e Fr01-02, foram reunidas para otimização em CLAE_{anal.} e isolamento das substâncias em CLAE_{prep.}

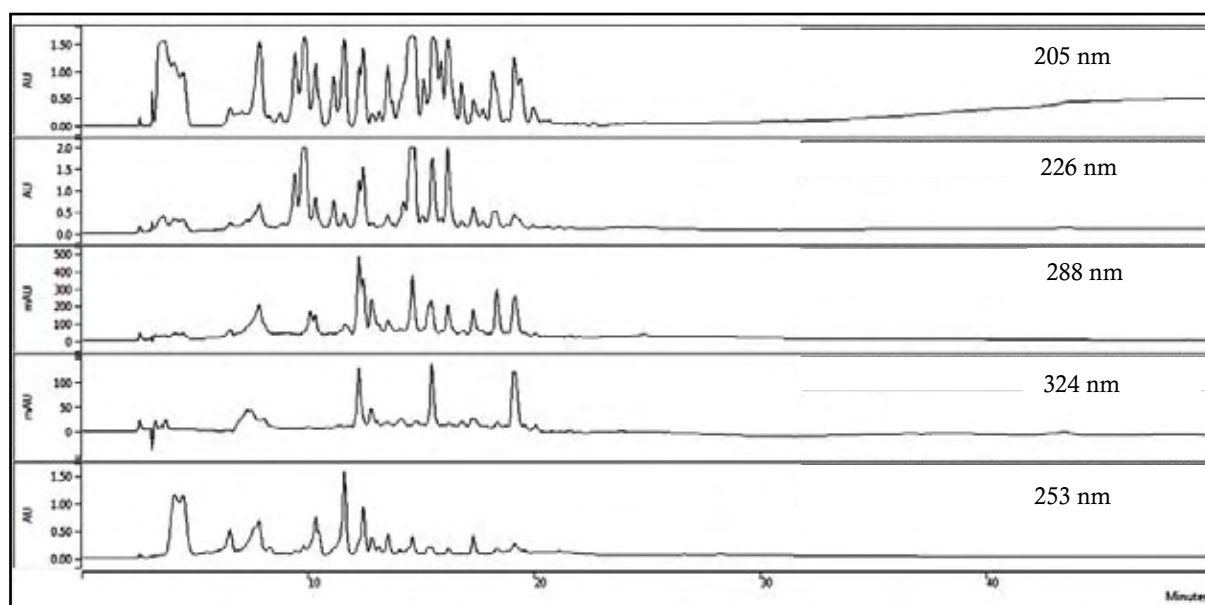


Figura 29 – Perfil cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-01 em diversos comprimentos de onda

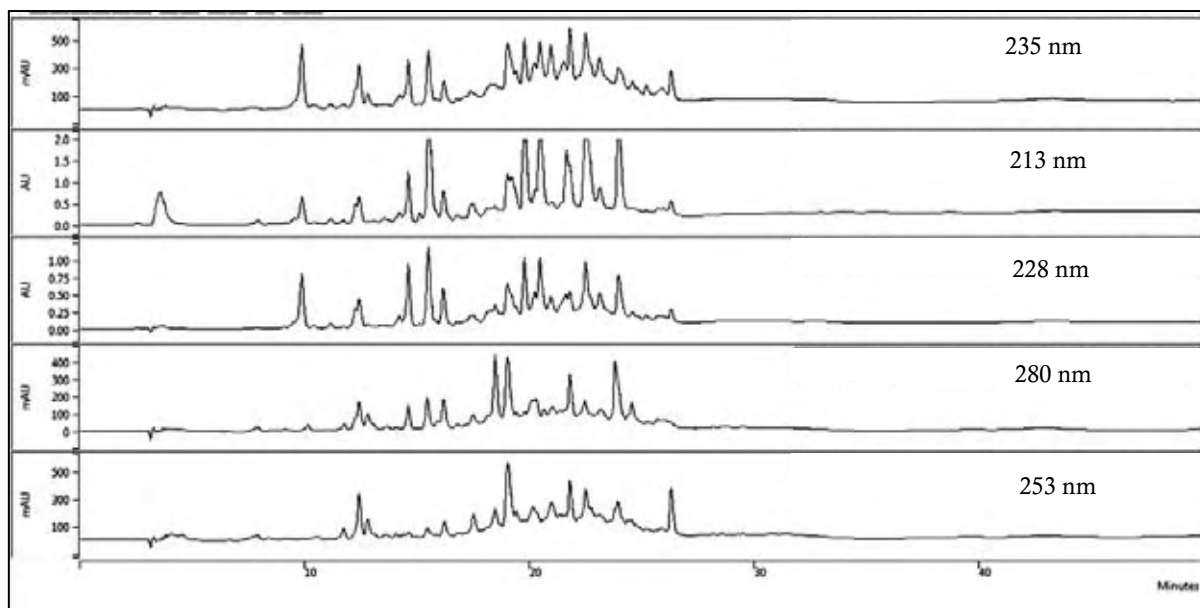


Figura 30 – Perfil cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-02 em diversos comprimentos de onda

IV.3.2.1 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-01/02 e Isolamento das Substâncias 02, 03 e 04

Para o isolamento das substâncias de Cs-f(23)Fr01-01/02 (257,0 mg), a fração foi submetida a CLAE_{prep.}, utilizando como fase estacionária sílica do tipo fenil e um sistema de eluição em gradiente não linear de H₂O:MeOH, conforme mostrado na Tabela 09 (pág. 80), e descrito no Tópico VII.2.2.3.2.1 (pág. 162).

Tabela 09 – Gradiente programado para fracionamento de Cs-f(23)Fr01-01/02

Tempo de corrida (min.)	% da fase móvel (MeOH em H ₂ O)
00	05% MeOH
50	50% MeOH
55	100% MeOH
60	100% MeOH

Da separação foram coletadas 28 frações (Figura 31, pág. 81), sendo que destas as frações Cs-f(23)Fr01-1/2-15 (Subst. **02**, 10,0 mg), Cs-f(23)Fr01-1/2-21 (Subst. **03**, 5,0 mg), e Cs-F(23)Fr01-1/2-27 (Subst. **04**, 3,0mg) foram identificadas como substâncias puras.

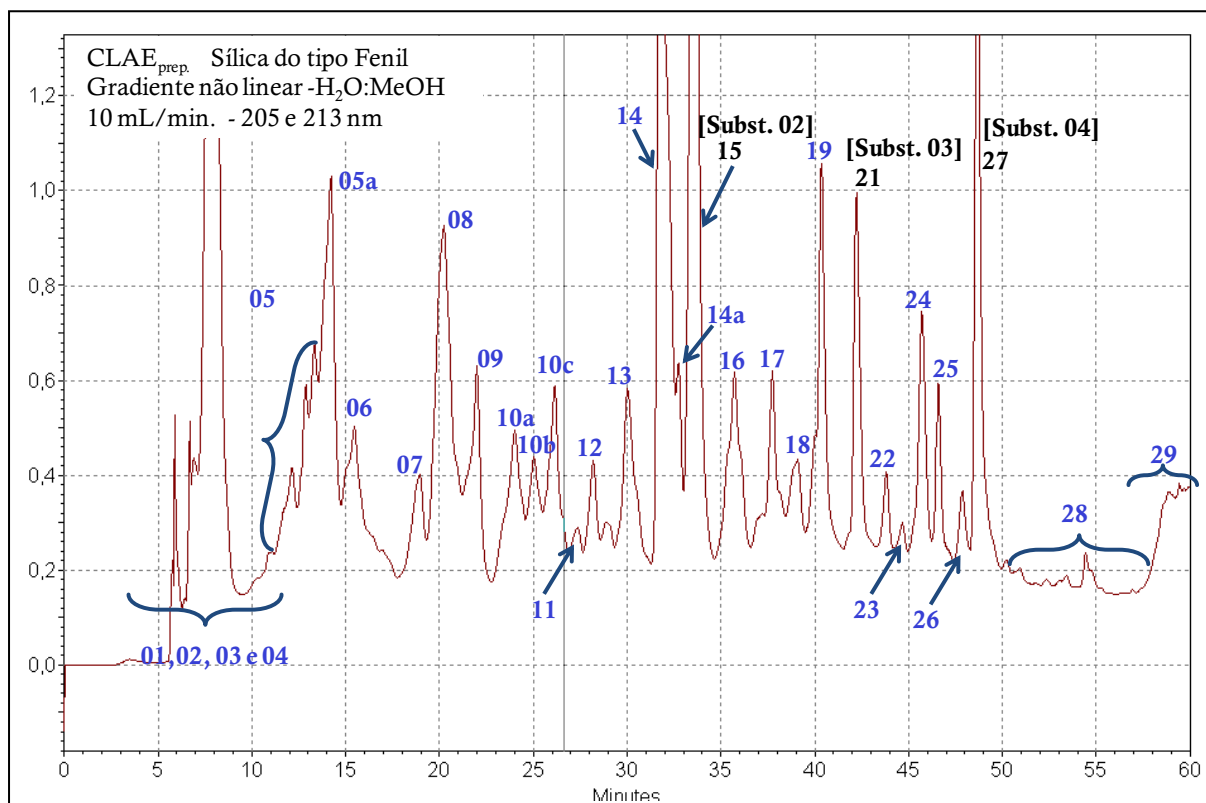


Figura 31 – Cromatograma em CLAE_{prep}. obtido no fracionamento de Cs-f(23)Fr01-01/02

As substâncias isoladas foram submetidas às análises por RMN uni e bi dimensionais para determinação estrutural, e os espectros estão apresentados nos Anexos 31 - 50 (págs. 191 - 204).

IV.3.3 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr04 e Isolamento das Substâncias 01 e 05

A fração foi submetida a fracionamento cromatográfico em CLAE_{prep} otimizado em coluna com fase estacionária de sílica de fase reversa do tipo C-18 e um sistema de

eluição em gradiente não linear de H₂O:MeOH como mostra a Tabela 10 (pág. 82) [Tópico VII.2.2.3.3, pág. 162].

Tabela 10 – Gradiente programado para fracionamento de Cs-f(23)Fr04

Tempo de corrida (min.)	% da fase móvel (MeOH em H ₂ O)
00	50% MeOH
10	50% MeOH
60	90% MeOH
65	100% MeOH

Deste procedimento foram coletadas 8 frações (Figura 32, pág. 82) sendo de que destas, Cs-f(23)Fr04-05 (Subst. **01**, já isolada como precipitado no extrato bruto) e Cs-f(23)Fr04-06 (Subst. **05**) são substâncias puras com 28,0 e 18,8 mg, respectivamente. Estas substâncias foram submetidas a análises de RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural e os espectros de RMN de ¹H e ¹³C estão apresentados nos Anexos 52, 53 e 58, 59 (págs. 206, 207 e 211, 212).

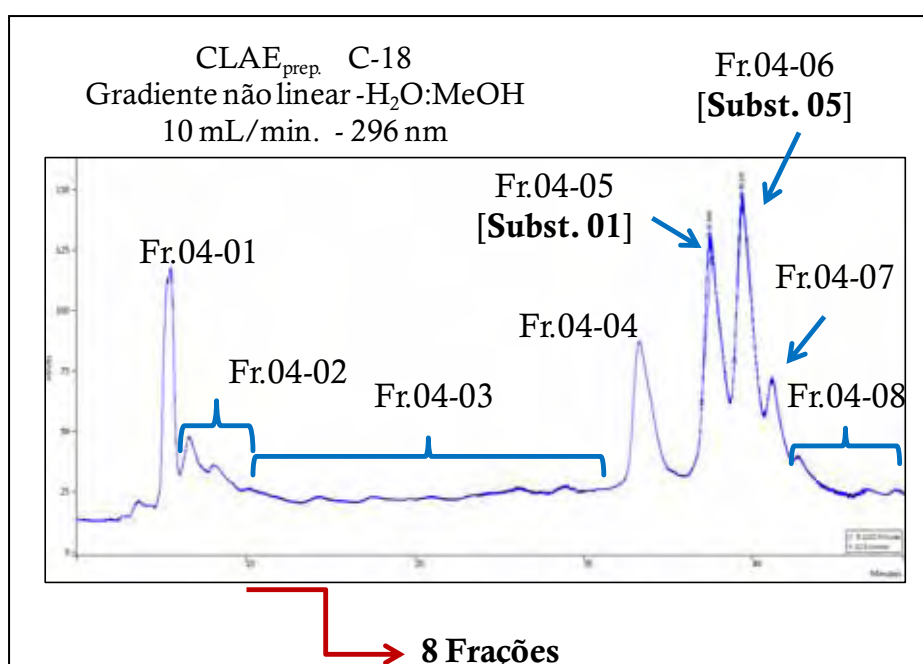


Figura 32– Cromatograma em CLAE_{prep.} obtido no fracionamento de Cs-f(23)Fr04

IV.3.4 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr05 e Isolamento das Substâncias 01, 05, 06 e 07

Para o fracionamento cromatográfico de Cs-f(23)Fr05 em CLAE_{prep}, foi otimizado um sistema cromatográfico utilizando sílica de fase reversa (C-18) como fase estacionária e sistema de eluição H₂O:ACN em gradiente não linear, como mostrado na Tabela 11 (pág. 83) [Tópico VII.2.2.3.4, pág. 163].

Tabela 11 – Gradiente programado para fracionamento de Cs-f(23)Fr05

Tempo de corrida (min.)	% da fase móvel (MeOH em H ₂ O)
00	45% ACN
20	45% ACN
25	60% ACN
35	100% ACN
40	100% ACN

Deste procedimento foram coletadas 10 frações (Figura 33, pág. 84), sendo que destas, Cs-f(23)Fr05-05 (Subst.**06**), Cs-f(23)Fr05-07 (Subst.**05**, já isolada na fração 04), Cs-f(23)Fr05-08 (Subst.**01**, também isolada como precipitado e na fração 04) e Cs-f(23)Fr05-09 (Subst.**07**) foram coletadas puras e com 1,3; 0,8; 3,4; 6,4 e 1,1 mg, respectivamente.

As substâncias isoladas foram submetidas à análise por RMN uni e bidimensionais, e os espectros de RMN de ¹H e ¹³C evidenciaram que as substâncias Cs-f(23)Fr05-07 e Cs-f(23)Fr05-08 são as substâncias **05** e **01**, respectivamente, já isoladas na fração Cs-f(23)Fr04, o que foi confirmado pela determinação estrutural. As demais substâncias isoladas desta fração apresentaram sinais de hidrogênio e carbono (Anexos 64, 65 e 69,70; págs. 216, 217 e 220, 221) muito semelhantes às Subst. **01** e **05**, evidenciando assim que todas pertencem a mesma classe estrutural.

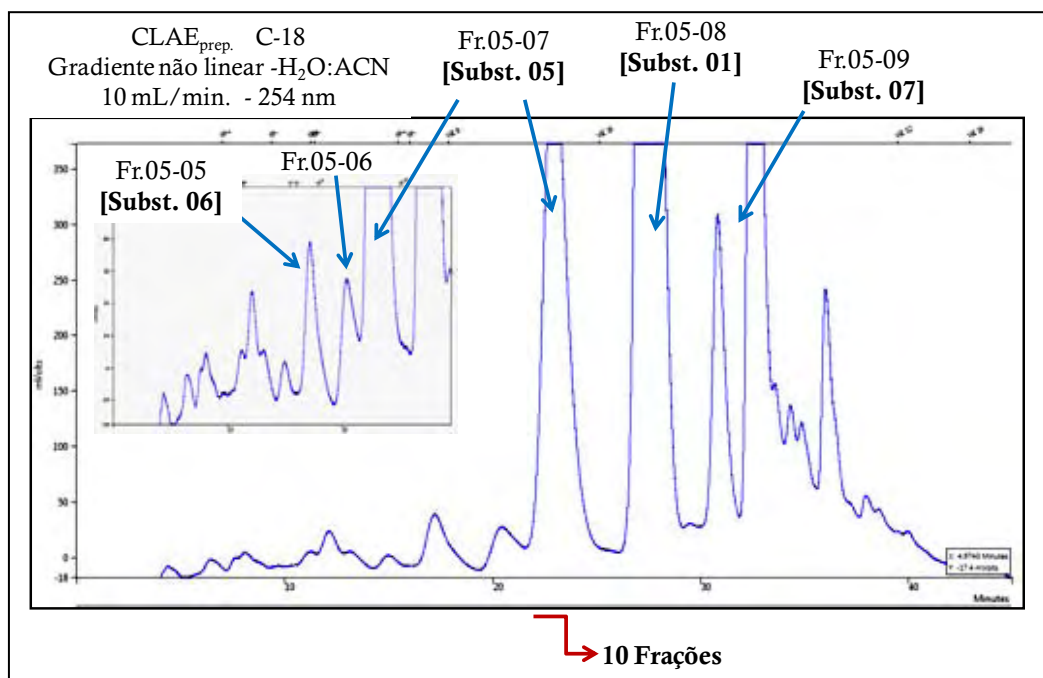


Figura 33 – Cromatograma em CLAE_{prep.} obtido no fracionamento de Cs-f(23)Fr05

IV.4 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas de *Myrothecium gramineum*

Para facilitar a discussão sobre a determinação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho, as mesmas foram separadas por classe de metabólitos, sendo estas, pertencentes à classe dos tricotocenos e dicetopiperazinas.

IV.4.1 Dicetopiperazinas – Características Gerais

As dicetopiperazinas são compostos bioativos comumente encontrados em fungos da classe dos deuteromicetos, ascomicetos e basidiomicetos^{44,45} tais como, *Penicillium* sp., *P. verrucosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium chlamydosporum*, *Gliocladium virens*, *Rhodotorula pilimanae*, *Phoma lingan*, *Streptomyces* sp., entre outros⁴⁶.

São metabólitos secundários conhecidos por diversas atividades biológicas, tais como antibiótica, antitumoral, imunossupressante⁴⁷, sendo que antitumoral e citotóxicas

são as mais encontradas⁴⁸. Algumas destas atividades antifúngicas e citotóxicas foram associadas à defesa contra fungos competidores ou fitopatógenos⁴⁴.

Mais de 40 substâncias dicetopiperazínicas são relatadas como metabólitos de fungos e são normalmente formados pela condensação de dois ou mais aminoácidos. Os aminoácidos se ligam por ligações peptídicas estabelecidas entre os grupos carboxila de um e o grupo amino do ácido subsequente formando a cadeia^{48,49,50}.

IV.4.1.1 Determinação Estrutural da Substância **02**

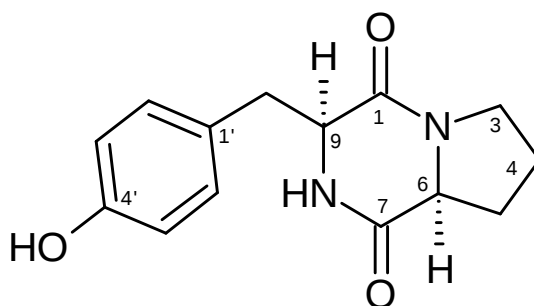


Figura 34 – Estrutura da ciclo (L- Pro-L-Tyr)

A substância **02** foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]^{25}_D -19,71^\circ$ (c 0,1; MeOH) e submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais e espectrometria de massas de baixa resolução.

O espectro de massas EM-IES (+) (Anexo 31, pág. 191) apresentou sinal da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 261,1302 (100%) e o sinal de m/z 283,1090 (85,0%) indicando a formação do aduto $[M + Na]^+$. Estes dados aliados ao experimento de RMN de ^{13}C (Anexo 33, pág.193), permitiram sugerir para **02**, a fórmula estrutural $C_{14}H_{16}N_2O_3$.

Nas análises dos mapas de contorno dos experimentos de gHMBC foi possível observar sinais em δ_C 165,0 (C-1) e δ_C 168,8 (C-7), sugerindo, a presença de grupos CONH. Estes dados associados aos deslocamentos químicos de RMN de 1H (Tabela 12, pág. 87; Anexo 32, pág. 192) em δ_H 4,05 (t ; 8,5 Hz; 1H; δ_C 58,3; C-6) e δ_H 4,21 (dl ; 7,5 Hz; 1H; δ_C 55,9; C-9) e a correlação de H-10 com δ_C 165,0 (C-1), sugeriram a presença de um anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN de 1H apresentou dois dubletos em δ_H 7,05 ($J=8,0$ Hz; 2H; δ_C 130,7) e δ_H 6,80 ($J=8,0$ Hz; 2H; δ_C 114,7) indicando um acoplamento *orto* em um anel

aromático *para*-dissubstituído. O deslocamento químico em δ_C 155,8 observado no espectro de RMN de ^{13}C , indicou um grupo -OH ligado ao anel aromático.

Foram observados ainda, sinais de hidrogênios benzílicos em δ_H 2,76 (*dd*; 10,0; 14,5 Hz; 1H; δ_C 34,7; C-10) e δ_H 3,41 (*dd*; 3,5; 14,5 Hz; 1H; δ_C 34,7; C-10), que juntamente com as correlações observadas nos espectros de *g*HMBC (Tabela 12, Anexos 35 e 36, págs. 194 e 195), principalmente: H-10a/H-10b $\leftrightarrow$ C-9/C-1; H-9 $\leftrightarrow$ C-1/C-10/C-1'(127,0) e e *g*COSY, principalmente: H-10a/H-10b $\leftrightarrow$ H-9 (Figura 35, pág. 86), permitiram atribuir para a molécula, a presença de resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr) (Figura 36, pág. 86)

Em continuidade às análises dos espectros de RMN de 1H foram observados multipletos em δ_H 3,53 e δ_H 3,60 (δ_C 44,5; C-3), δ_H 1,88 e δ_H 1,99 (δ_C 21,8; C-4), δ_H 1,84 e δ_H 2,30 (δ_C 27,8; C-5), o que em associação com as correlações observadas em *g*HMBC e *g*COSY, evidenciaram a presença de resíduo do aminoácido Prolina (Pro) (Figura 36).

O sinal em δ_H 6,10 no experimento de RMN de 1H foi atribuído ao hidrogênio NH-8, uma vez que não apresentou correlação direta com átomo de carbono em *g*HMQC e mostra correlação a longa distância (3J) em *g*HMBC com C-6 e C-1.

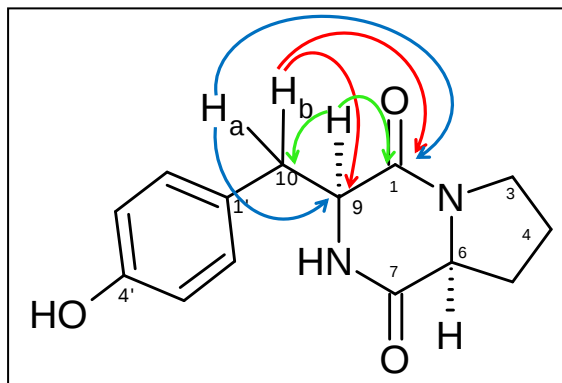


Figura 35 – Principais correlações observadas em *g*HMBC para a substância **02**

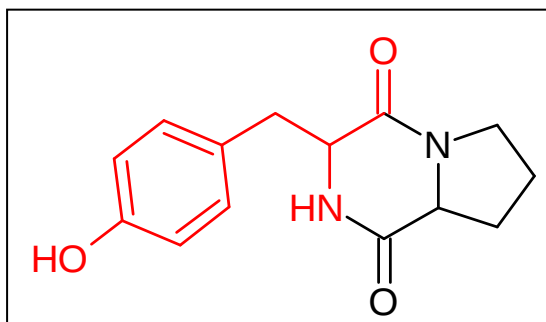


Figura 36 – Destaque para as unidades de resíduos dos aminoácidos Tirosina (vermelho) e Prolina (preto)

A configuração relativa de **02** foi aferida com base na interação espacial observada no experimento NOESY-2D (Anexo 37, pág. 195) entre H-9 (δ_H 4,21) e H-6 (δ_H 4,05), colocando-os no mesmo plano da molécula. Esta observação foi corroborada por comparação com a literatura⁵¹. Os valor obtido na análise de rotação óptica da substância, juntamente com os dados obtidos nos experimentos espectroscópicos foram comparados com a literatura^{50,52,53}, e nos permitiram determinar a configuração absoluta da molécula, sendo esta formada pelos aminoácidos L-Pro e L-Tyr, conforme indicado por Jayatilake⁵² que apresenta esta substância com $[\alpha]^{25}_D$ -126,1° (c 0,36; EtOH).

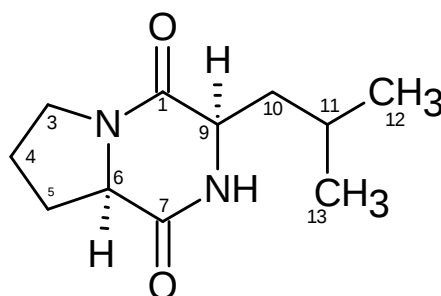
Esta substância é relatada como metabólito de diversos fungos e bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria associada à esponja marinha *Isodictya seteira*⁵⁰, e também isolada como metabolito do fungo endofítico *Colletotrichum crassipes* isolado de *Casearia sylvestris*⁵³.

Tabela 12 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **02** em DMSO-d₆^a

	H δ (m, J _{Hz}) ^a	C δ (gHMQC)	gHMBC (δ)	gCOSY
1	C=O	165,0	-	-
3_a	3,53 (m)	44,5	27,8	3,60; 1,99; 1,85
3_b	3,60 (m)		58,3; 21,8; 165,0	3,53; 1,99; 1,85
4_a	1,88 (m)	21,8	44,5; 27,8	1,99; 3,53; 3,60
4_b	1,99 (m)		58,3	1,88; 3,53; 3,60
5_a	1,84 (m)	27,8	168,8; 58,3; 21,8	2,30; 4,05; 4,21
5_b	2,30 (m)		168,8; 58,3; 44,5; 21,8	1,88; 1,99; 3,60; 3,35; 4,05
6	4,05 (t; 8,5)	58,3	168,8; 27,8	2,30; 1,84
7	C=O	168,8	-	-
8	6,10 (s)	N-H	165,0; 58,3	NO
9	4,21 (dl; 7,5)	55,9	165,0; 127,0; 34,7	2,76; 3,41
10_a	2,76 (dd; 10,0; 14,5)	34,7	165,0; 130,7; 127,0; 55,9	3,41; 4,21
10_b	3,41 (dd; 3,5; 14,5)		165,0; 130,7; 127,0; 55,9	2,76; 4,21
1'	C ₀	127,0	-	-
2'e 6'	7,05 (d; 8,0)	130,7	155,8; 114,7; 34,6	6,80
3'e 5'	6,80 (d; 8,0)	114,7	155,8; 127,0	7,05
4'	C ₀	155,8	-	-

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO = correlações não observadas

IV.4.1.2 Determinação Estrutural da Substância **03****Figura 37** – Estrutura da ciclo (L-Pro-L-Leu)

A substância **03** foi isolada como um sólido amorfo amarelo, $[\alpha]_D^{25} -6,97$ (*c* 0,1; MeOH), submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas de baixa resolução EM-IES (+). No EM (Anexo 38, pág. 196) foram observados o sinal de m/z 233,1303 (100 %) indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e o sinal de m/z 211,1481 (57,7%), indicando a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$. Estes dados aliados ao experimento de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram propor para **03**, a fórmula estrutural $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 13, pág.90, Anexos 39 e 40, págs. 197 e 198) permitiu observar sinais de dois hidrogênios, um em δ_{H} 4,04 (t; 8,0; 8,0; δ_{C} 59,0; C-6) e outro em δ_{H} 3,94 (*dd*; 4,5; 9,5; δ_{C} 53,4; C-9), correlacionando-se por *g*HMBC (Tabela 13; Anexo 41 pág. 199) com os carbonos carbonílicos δ_{C} 166,1 (C-1) e δ_{C} 170,0 (C-7), sugerindo um anel dicetopiperazínico, assim como para a substância **02**.

Foram observados ainda nos espectros de RMN de ^1H multipletos em δ_{H} 3,45 e δ_{H} 3,53 (*m*; δ_{C} 45,5; C-3); δ_{H} 1,83 e δ_{H} 1,92 (*m*; δ_{C} 22,7; C-4); δ_{H} 2,28 e δ_{H} 2,03 (*m*; δ_{C} 28,1; C-5), que foram atribuídos a hidrogênios metilênicos baseando-se nos dados da substância **02**. As correlações observados nos experimentos de *g*COSY entre H-6 $\leftrightarrow$ H-5_a/H-5_b, H-5_a/H-5_b $\leftrightarrow$ H-4, e H-4 $\leftrightarrow$ H-3, e *g*HMBC entre H-6 $\leftrightarrow$ C-7 e H-6 $\leftrightarrow$ C-5 (Figura 38, pág. 89) reafirmaram nossa suposição e indicaram a presença do resíduo prolina, na estrutura de **03**.

Adicionalmente, foram observados nos espectros de RMN de ^1H (Anexo 39, pág. 197) dubletos em δ_{H} 0,93 (H-12; δ_{C} 23,2; *d* 6,5Hz) e δ_{H} 0,89 (H-13; δ_{C} 21,2; *d* 6,5 Hz),

além de dois sinais na região dos hidrogênios alifáticos sendo um metilênico em δ_H 1,45 [H-10; δ_C 38,7; *ddd* 5,0; 9,5; 14,5 Hz) e δ_H 1,99 (*m*), um metínico em δ_H 1,66 (H-11; δ_C 24,7, *m*). Estes dados, juntamente com os dados observados nos espectros de *g*HMBC e *g*COSY, principalmente as correlações em *g*HMBC entre, H-10_a↔C-1, H-10_a/H-10_b↔C-9 e H-9↔C-10/C-11/C-13, e *g*COSY entre, H-9↔H-10_a/H-10_b↔H-11, permitiram posicionar um grupamento isobutílica na posição 9, inferindo a presença um resíduo leucina.

O sinal observado em δ_H 5,78 (*s*) com ausência de correlação no experimento em *g*HMQC, permitiu atribuir este deslocamento ao H-8 (N-H).

Desde modo a substância **03**, foi definida como a dicetopiperazina constituída pelos aminoácidos Prolina (Pro) e Leucina (Leu).

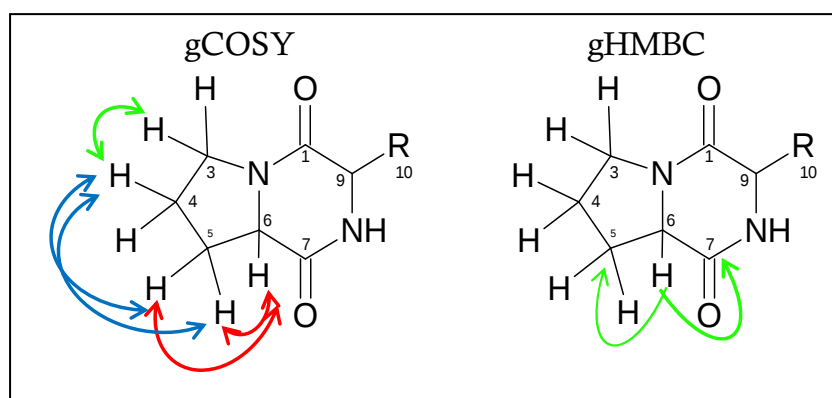


Figura 38 – Correlações observadas em *g*COSY e *g*HMBC para a substância **03**

A configuração relativa de **03** foi realizada pela análise do espectro de NOESY-1D (Anexo 44, pág. 200) onde foi possível observar interação espacial entre os hidrogênios em H-9 (δ_H 3,94) e H-6 (δ_H 4,04), colocando-os no mesmo plano espacial da molécula. Este valores, juntamente com os dados de rotação óptica de **03** ($[\alpha]^{25}_D$ -6,97°) e comparação com a literatura^{50,54,55}, confirmam esta proposta indicando ser a substância ciclo (L-Pro-L-Leu)

Este metabólito é relatado como produto de outros organismos tais como a esponja marinha *Calyx cf. podatypa*⁵⁵ e uma bactéria associada ao molusco *Pecten*

*maximus*⁵⁶. Foi também isolada como metabólito do fungo endofítico *Colletotrichum crassipes* isolado de *Casearia sylvestris*⁵³.

Tabela 13 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **03** em CDCl₃^a

	H _δ (m, J _{Hz})	C _δ (gHMQC)	gHMBC (δ)	gCOSY
1	C=O	166,1	-	-
3_a	3,45 (<i>m</i>)	45,5	22,7	1,83
3_b	3,53 (<i>m</i>)		28,1; 22,7	1,83
4_a	1,83 (<i>m</i>)	22,7	NO	2,28; 2,03
4_b	1,92 (<i>m</i>)		NO	NO
5_a	2,28 (<i>m</i>)	28,1	NO	1,83; 1,92; 4,04
5_b	2,03 (<i>m</i>)		NO	1,83; 2,28; 4,04
6	4,04 (<i>t</i> ; 8,0; 8,0)	59,0	170,0; 28,1	2,28; 1,92
7	C=O	170,0	-	-
8	5,78 (<i>sl</i>)	N-H	-	-
9	3,94 (<i>dd</i> ; 4,0; 9,5)	53,4	166,1; 21,2; 24,7; 38,7	1,99; 1,45
10_a	1,45 (<i>ddd</i> ; 5,0; 9,5; 14,5)	38,7	24,7; 53,4; 166,1; 21,2	1,66; 1,99; 3,94
10_b	1,99 (<i>m</i>)		53,4; 59,0; 24,7	NO
11	1,66 (<i>m</i>)	24,7	NO	1,99; 1,45; 0,93
12	0,93 (<i>d</i> ; 6,5)	23,2	38,7; 24,7; 21,1	1,66
13	0,89 (<i>d</i> ; 6,5)	21,1	38,7; 23,2	NO

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO = correlações não observadas

IV.4.1.3 Determinação Estrutural da Substância **04**

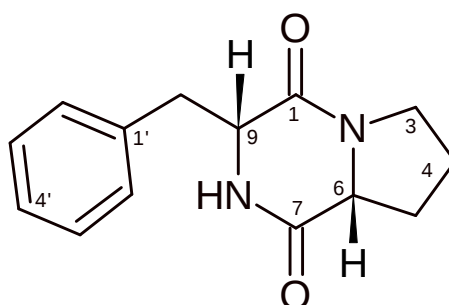


Figura 39– Estrutura da Ciclo (D-Pro-D-Phe)

A substância **04** foi isolada como um sólido amorfo amarelo, $[\alpha]_D^{25} +9,57^\circ$ (*c* 0,1; MeOH) e submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e espectrometria de massas de baixa resolução EM-IES (+). Devido a pequena massa obtida para esta substância, os dados de ^{13}C foram obtidos dos experimentos bidimensionais gHSQC e gHMBC (Tabela 14, pág. 92, Anexos 47 e 48, pág. 203).

No EM-IES (+) (Anexo 45, pág. 201), foram observados o sinal de m/z 245,1283 (100%) indicando a molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$, e o sinal de m/z 267,1108 (83,2 %) indicando a formação do aduto $[\text{M} + \text{Na}]^+$ permitindo sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ para a substância **04**.

O espectro de RMN de ^1H (Anexo 46, pág. 202), apresentou um perfil muito parecido com o da substância **02**, diferindo apenas nos deslocamentos químicos dos sinais da região dos hidrogênios aromáticos e novamente evidenciando uma substância da classe das dicetopiperazinas.

O espectro de RMN de ^1H na região de hidrogênios aromáticos, foram visualizados multipletos em δ_{H} 7,17 (δ_{C} 128,7), δ_{H} 7,23 (δ_{C} 127,1) e δ_{H} 7,29 (δ_{C} 128,9) integrando para 2, 1 e 2 hidrogênios, respectivamente, indicando um anel aromático monossustituído e sugerindo a presença do resíduo de aminoácido fenilalanina para a substância **04**.

Com base nos dados de RMN de ^1H , gHSQC, gHMBC e gCOSY (Tabela 14, pág. 92) e comparação com a literatura^{53,56}, foi possível atribuir todos os átomos de hidrogênio aos respectivos carbonos. A configuração relativa de **04**, foi realizada com base nas interações espaciais observadas no experimento de NOESY-1D, onde foi observada interação espacial entre os hidrogênios em δ_{H} 4,01 (H-6) e δ_{H} 4,21 (H-9), colocando-os no mesmo plano espacial da molécula.

Os dados espectrais, juntamente com os dados da literatura sugeriram, inicialmente, para a substância a estrutura da *Rel.ciclo* (*S-Pro-S-Phe*), que é relatada como constituída dos aminoácidos L, sendo estes encontrados na natureza com valores de rotação óptica negativo⁵⁷. No entanto, alguns autores relatam metabólitos dicetopiperazínicos com sinais de rotação óptica opostos, indicando a presença dos menos comuns enantiômeros DD⁵⁶.

Com base nestes dados, e comparando os dados de rotação óptica de **04** $\{[\alpha]^{25}_D +9,57^\circ$ (*c* 0,1; MeOH)}, com os dados encontrados na literatura $\{[\alpha]^{25}_D +88,7^\circ$ (*c* 0,22, EtOH)}, a substância **04** foi identificada como Ciclo (D-Pro-D-Phe).

A substância **04** foi previamente relatada como metabólito de fungos do gênero *Colletotrichum* entre outros fungos como *Trydiomycetes formicarum*, associado a uma espécie de formiga *Cyphomyrmex minutus*^{44,53}, e são relatadas com atividade antifúngica contra *Candida* 406⁵³.

Tabela 14 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **04** em CDCl₃^a

	H δ (m, J _{Hz})	C δ (gHMQC)	gHMBC (δ)	gCOSY
1	C=O	165,0	-	-
3_a	3,50 (<i>m</i>)	45,0	27,9; 22,0	3;58; 1,97; 1,84
3_b	3,58 (<i>m</i>)		165,0; 55,6; 22,0	3,50; 1,97; 1,84
4_a	1,84 (<i>m</i>)	22,0	58,7; 45,0; 27,9	1,94; 2,28; 3,58; 3,50
4_b	1,97 (<i>m</i>)		169,0; 27,9; 58,7	NO
5_a	1,94 (<i>m</i>)	27,9	169,0; 22,0	1,84; 2,28; 4,01
5_b	2,28 (<i>m</i>)		58,7; 45,0; 22,0	1,94; 1,84; 4,01
6	4,01 (<i>t</i> ; 7,5)	58,7	169,0; 27,9; 22,0	2,28; 1,94; 1,84
7	C=O	169,0	-	-
8	5,56 (<i>s</i>)	-	165,0; 58,7	NO
9	4,21 (<i>dd</i> ; 3,0; 10,5)	55,6	165,0; 135,4; 36,3	2,70
10_a	2,70 (<i>dd</i> ; 10,5; 14,5)	36,3	165,0; 135,4; 128,9; 55,6	3,56; 4,21
10_b	3,56 (<i>m</i>)		135,4; 128,7	2,70
1'	C ₀	135,4	-	-
2'e 6'	7,29 (<i>m</i>)	128,9	135,4; 128,7	7,17; 7,23
3'e 5'	7,17 (<i>m</i>)	128,7	36,3; 128,9; 127,1	7,29
4'	7,23 (<i>m</i>)	127,1	135,4; 128,9	7,29

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO= Correlações não observadas

IV.4.2 Tricotocenos – Características Gerais

Tricotocenos são micotoxinas produzidas por diversos gêneros de fungos, dentre estes, algumas espécies de *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Trichothecium* além de algumas espécies pertencentes ao gênero *Myrothecium*⁵⁸. Estas substâncias são responsáveis por vários problemas de intoxicação em animais e humanos e também algumas doenças que afetam plantas apresentando um efeito fitopatogênico³⁵. No entanto, alguns metabólitos

pertencentes a esta classe tem demonstrado um papel importante na prevenção do câncer, controle biológico e em alguns estudos relacionados à malária^{59,60}.

Os tricotoceno pertencem a uma família de sesquiterpenóides, com peso molecular variando de 250 a 550, um núcleo característico (sistema rígido de 4 anéis condensados) e funções ésteres e alcoóis nas cadeias laterais, podendo estas possuir algumas unidades de carbono, ou ainda formar macrocíclos. Uma característica distinta deste núcleo (Figura 41, pág. 94) é uma dupla ligação nos carbonos 9 e 10 e ainda um grupo epóxido entre os carbonos 12 e 13 que constituem o sistema tetracíclico^{35,58}.

IV.4.2.1 Determinação Estrutural da Substâncias **01**

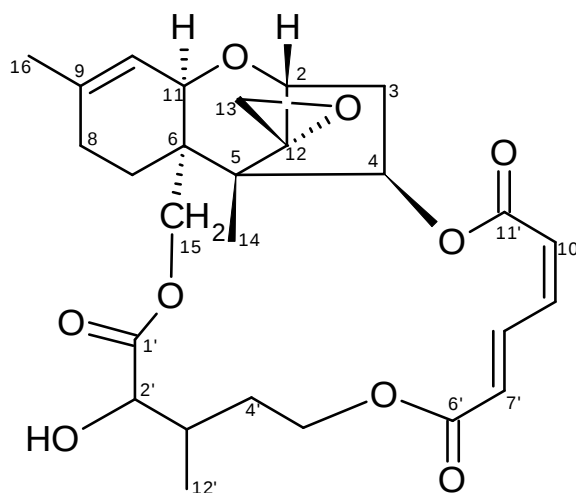


Figura 40 – Estrutura da substância **01** (Verrucarina A)

A substância **01** foi isolada como um pó branco, $[\alpha]_D^{25} +123,42$ (c 0,1; CHCl_3) e submetida a espectrometria de massas de alta resolução EM-IES- (+) e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

O espectro de massas (Anexo 51, pág. 205) apresentou um sinal de m/z 503,2273 (100 %) e o sinal de m/z 525,2092 (45,6 %) indicando a molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ e a formação do aduto $[\text{M} + \text{Na}]^+$. A massa para $[\text{M}]^+$ foi calculada como 502,5535 DA o que, associado aos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , confirmou a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_9$.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexos 52 e 53, págs. 206 e 207; Tabela 15, pág. 97) foram analisados e os sinais de hidrogênios geminais em δ 2,73 (d , 4,0 Hz, H-13a) e δ 3,04 (d , 4,0 Hz, H-13b) correlacionando-se por gHMQC (Anexo 54, pág. 208),

com o carbono em δ 47,8 (CH_2 , C-13) e por gHMBC (Anexo 55, pág. 208), com o carbono em δ 65,2 (C_0 , C-12), aliados à uma ligação oleofínica em δ 141,1 (C_0 , C-9) e δ 117,9 (CH , C-10), este último correlacionando-se por gHMQC com um sinal de hidrogênio em δ 5,36 (d , 5,0 Hz, H-10), sugeriram a presença de um núcleo tricotoceno (Figura 41, pág. 94), que foram confirmados após comparação com a literatura^{35,61}.

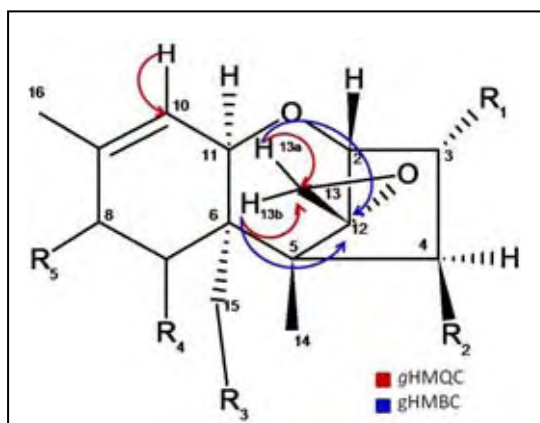


Figura 41 – Anel tetraciclo dos tricotocenos e correlações observadas em gHMBC e gHMQC

Com todos os dados de RMN de ^1H e ^{13}C associados com os dados de gHMBC, gHMQC e gCOSY (Anexos 54, 55 e 56, págs. 208 e 209), foi possível atribuir os valores dos deslocamentos aos respectivos carbonos e hidrogênios do núcleo tricotoceno (Tabela 15, pág. 97).

A cadeia lateral foi determinada como um macrociclo de 18 membros, ligado ao núcleo tricotoceno em C-4 (δ_{C} 75,5) e C-15 (δ_{C} 63,5) (Figura 41). A posição em C-4 da cadeia foi fixada pela correlação observada do H-4 [δ_{H} 5,74 (dd , 4,0; 8,0 Hz)], correlacionando-se por gHMBC com um sinal de carbono carbonílico em δ_{C} 166,1 (C-11') e este, por sua vez, correlacionando-se por gHMBC com um hidrogênio em δ_{H} 6,08 (dd , 1,0; 11,25 Hz; C-10', δ 125,7) pertencente a um sistema de duplas ligações conjugadas (Figura 42, pág. 95).

Os sinais de hidrogênios em δ_{H} 6,60 (ddd , 1,0; 11,12; 11,5 Hz; H-9'), δ_{H} 7,96 (ddd , 1,0; 11,5; 15,5 Hz, H-8') e δ_{H} 5,97 (d , 15,5 Hz, H-7') correlacionando-se por gHMQC com os carbonos em δ_{C} 138,9; δ_{C} 138,8 e δ_{C} 127,5, respectivamente, foram atribuídos aos demais hidrogênios pertencentes a estas duplas ligações (Tabela 15, pág. 97).

As posições dos hidrogênios foram estabelecidas pelas constantes de acoplamento e as correlações observadas por gHMBC e gCOSY (Tabela 15, pág. 97; Anexos 55 e 56).

A correlação observada pelo H-7' com o carbono de função éster em δ_c 165,4 fixou este carbono na posição 6'.

A ligação da cadeia lateral com o núcleo tricotoceno, na posição 15, foi determinada com base na correlação observada do H-15b' [δ_H 4,72 (d ;12,0 Hz)] por 3J com o carbono carbonílico, característico de função éster em δ_c 174,4 (C-1') (Figura 43, pág. 95).

Foi observado sinal de hidrogênio carbinólico, correlacionando-se por gHMQC com o carbono em δ_c 74,1 e por gHMBC com o carbono carbonílico em δ_c 174,4, (C-1') determinando assim sua posição como sendo em 2'. Foram ainda observados sinais de carbonos e hidrogênios metílico, metilênicos e metínico, que foram posicionados no anel macrocíclico com base nas constates de acoplamento dos hidrogênios e as correlações observadas por gHMBC, gHMQC e gCOSY.

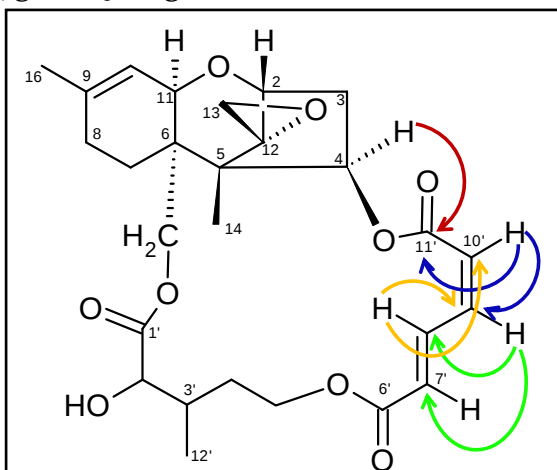


Figura 42 – Correlações gHMBC de H-7', H-8', H-9'e H-10' da substância **01**

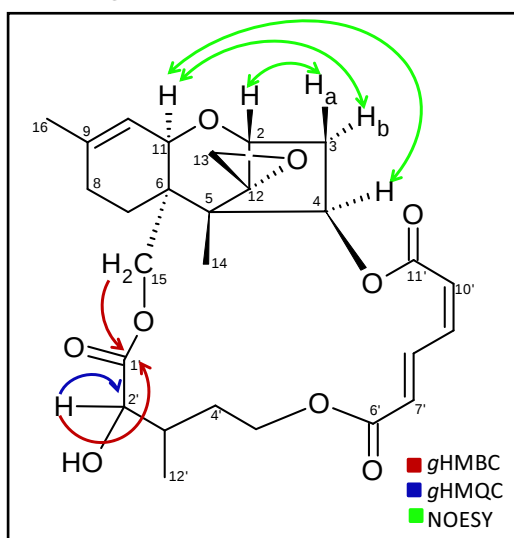


Figura 43 – Correlações de gHMBC, gHMQC e NOESY observadas para a substância **01**

As posições dos carbonos e hidrogênios em 2', 3', 4' e 5' foram confirmadas pelo experimento em TOCSY (Anexo 56a, pág. 209) que confirmou a porção alquila do anel macrociclo.

A posição dos hidrogênios H-3a e H-3b (δ_c 34,9), foi determinada a partir das constantes de acoplamento características de anéis pentacíclicos, de H-2 $\leftrightarrow$ H-3a ($J=5,0$ Hz), indicando um acoplamento em *cis*, e $J=0$ para H-2 $\leftrightarrow$ H-3b indicando acoplamento *trans*. A constante de acoplamento de H-4 $\leftrightarrow$ H-3b de 8,0 Hz indica estes dois hidrogênios posicionados em *trans* e $J=4,0$ Hz de H-4 $\leftrightarrow$ H-3a confirma a posição do H-3a no mesmo plano que o H-2. Estes dados foram confirmados pelas correlações observadas no experimento de NOESY 1D onde foram observadas as interações espaciais de H-11 $\leftrightarrow$ H-3b/H-4 (Tabela 15, pág. 96).

A partir dos dados obtidos nos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D, foi possível atribuir os valores de todos os hidrogênios e carbonos da molécula e suas respectivas posições. Estes dados, juntamente com os dados de $[\alpha]^{25}_D$ e comparação com a literatura, permitiram identificar a substância **01** como Verrucarina A ($[\alpha]^{25}_D + 260$, CHCl_3)⁶¹.

Verrucarina A é considerada como uma das substâncias mais tóxicas dos tricotocenos macrocíclicos⁶². No entanto, alguns estudos relatam atividades biológicas interessantes para esta substância, como por exemplo, a inibição do crescimento radial de *Echinochloa crusgalli* (capim-arroz), demonstrando uma atividade fitotóxica consideravelmente mais potente que os controles biológicos utilizados⁶⁰.

Tabela 15 - Dados de RMN 1D e 2D da substância **01** em CDCl₃^a

	H δ (<i>m</i> , J _{Hz})	C δ (gHMQC)	gHMBC	gCOSY	NOESY
1	-O-	-	-	-	
2	3,78 (<i>d</i> ; 5,0)	78,9	49,5; 65,2; 66,9; 75,5	2,15	0,78; 2,15; 3,04
3a	2,15 (<i>ddd</i> ; 4,0; 5,0; 15,5)	34,9	75,5	2,41; 3,78; 5,74	
3b	2,41 (<i>dd</i> ; 8,0; 15,5)		49,5; 65,2; 78,9	2,15; 5,74	
4	5,74 (<i>dd</i> ; 4,0; 8,0)	75,5	44,2; 65,2; 166,1	2,15; 2,41	
5	C ₀	49,5	-	-	
6	C ₀	44,2	-	-	
7	1,63 (<i>m</i>)	19,9	66,9; 141,1	1,82; 1,89; 5,36	
8	1,82 (<i>m</i>)	27,5	44,2; 118,0; 141,1	1,68	
	1,89 (<i>m</i>)		-	-	
9	C ₀	141,1	-	-	
10	5,36 (<i>d</i> ; 5,00)	118,0	23,2; 44,2	1,68; 3,49	
11	3,49 (<i>d</i> ; 5,00)	66,9	20,0; 63,5; 118,0; 141,1	5,36	2,41; 4,13; 5,74; 4,72
12	C ₀	65,2	-	-	
13a	2,73 (<i>d</i> ; 4,00)	47,9	65,2	3,04	
13b	3,04 (<i>d</i> ; 4,00)		65,2; 78,9	2,73	
14	0,78 (<i>s</i>)	7,3	44,2; 49,5; 65,2; 75,5	-	1,63; 2,29; 2,73; 7,96
15a	4,13 (<i>d</i> ; 12,00)	63,5	44,2; 49,5; 20,0	4,72; 4,07	2,29; 1,89; 0,82; 0,78
15b	4,72 (<i>d</i> ; 12,00)		44,2; 49,5; 66,9; 174,7	4,13	3,49; 1,89
16	1,68 (<i>s</i>)	23,2	27,5; 118,0; 141,1	1,89; 5,53	
1'	OC(=O)	174,7	-	-	
2'	4,07 (<i>sl</i>)	74,1	10,0; 174,7	4,13	
3'	1,71 (<i>m</i>)	33,2	-	-	
4'	1,85 (<i>m</i>)	32,2	-	2,29; 3,92; 4,43	
5a'	3,92 (<i>ddd</i> ; 3,5; 11,75; 11,75)	61,1	-	1,85; 4,43	
5b'	4,43 (<i>ddd</i> ; 2,5; 5,0; 11,75)			1,85; 3,92	
6'	OC(=O)	165,4	-	-	
7'	5,97 (<i>d</i> ; 15,5)	127,5	138,9; 165,4	6,60; 7,96	
8'	7,96 (<i>ddd</i> ; 1,0; 11,5; 15,5)	138,8	125,7; 138,9	5,97; 6,60	
9'	6,60 (<i>ddd</i> ; 1,0; 11,25; 11,5)	138,9	127,5; 138,9	6,08; 7,96	
10'	6,08 (<i>dd</i> ; 1,0; 11,25)	127,7	138,9; 166,1	5,97; 6,60	
11'	OC(=O)	166,1	-	-	
12'	0,82 (<i>d</i> ; 7,0)	10,0	32,2; 74,1		
2'-OH	2,29			0,82; 1,71	

^adeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

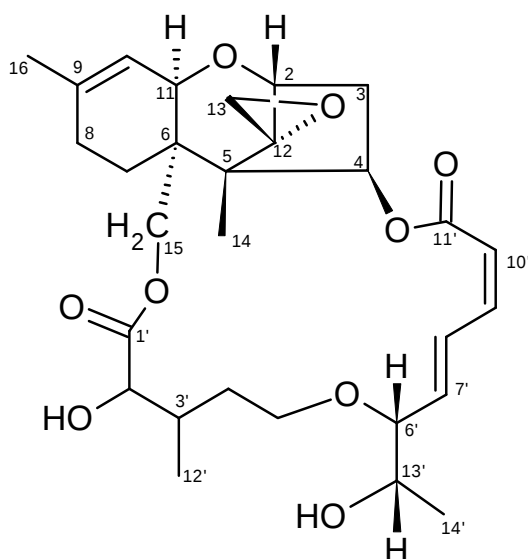
IV.4.2.2 Determinação Estrutural da Substância **05**

Figura 44 – Estrutura da substância **05** (Roridina A)

A substância **05** foi isolada como sólido amorfo amarelo claro, $[\alpha]_D^{25} +125,43^\circ$ (c 0,1; MeOH) e submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas de alta resolução EM-IES (+).

O espectro de Massas (Anexo 57, pág. 210), apresentou um sinal de m/z 555,2556 (100 %) indicando a formação do aduto $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e os sinais de m/z 533,2739 (29,0 %) e m/z 571,2300 (19,1 %) indicando a molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ e a formação do aduto $[\text{M} + \text{K}]^+$. A massa para $[\text{M}]^+$ foi calculada como 532,6225 DA o que, associada aos dados de RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_9$.

Os espectros de RMN de C^{13} e ^1H (Anexos 58 e 59, págs. 211 e 212; Tabela 16, pág. 101) evidenciaram o mesmo perfil espectroscópico da substância **01**, diferindo nos pontos mostrados a seguir.

- a. No espectro de RMN de ^{13}C a substância **01** apresentou 27 sinais de carbonos, para a substância **05** foram observados 29 sinais. Entre estes, foi observada a ausência de um sinal de carbono carbonílico, a presença de um sinal em δ_{C} 84,0, se correlacionando por gHMQC com o hidrogênio em δ_{H} 3,58 (m), que por sua vez apresentou correlação nos experimentos de gCOSY (Anexos 60 e 62, págs. 213 e 214, Tabela 16, pág. 101), com o sinal em δ_{H} 5,92 (dd , 3,5; 15,5 Hz) (Figura

45, pág.99) atribuído ao H-7' e pertencente ao sistema de duplas ligações conjugadas. Este dado permitiu atribuir o carbono em δ_C 84,0 (CH) na posição 6', diferentemente da substância **01** a qual apresentou na posição 6' uma carbonila.

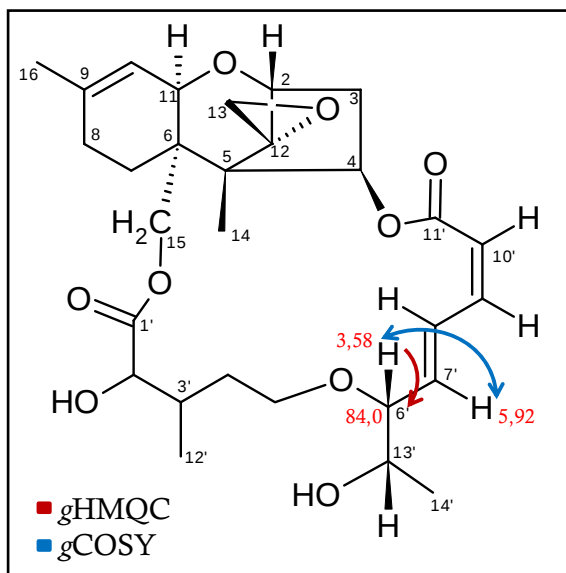


Figura 45 – Correlações observadas em gHMQC e gCOSY para a substância **05**

- b. Na região dos hidrogênios alifáticos, foram observados 4 sinais característicos de metilas em δ_H 0,74 (s); δ_H 1,01 (d; 7,0 Hz); δ_H 1,12 (d, 6,5 Hz) e δ_H 1,66 (s), e não 3 como observados para a substância **01**. A partir dos dados de gHMBC, gHMQC e gCOSY (Tabela 16, Anexos 60, 61 e 62, págs. 213 e 214) foram atribuídas as respectivas posições para as metilas C-14 [δ_C 0,74; (s)], C-16 (δ_C 1,66; (s)] e C-12' (δ_C 1,01; (d; 7,0 Hz)].
- c. A metila em δ 1,12, foi atribuída ao C-14' de um grupo acoplado a C-6'. Os dados observados por gHMBC evidenciam uma correlação em 2J com o um sinal de carbono carbonílico em (C-13'), e 3J Os dados de RMN de 1H , ^{13}C , gHMQC, gHMBC e gCOSY permitiram atribuir os sinais de carbono e hidrogênio deste grupo evidenciando assim a diferença estrutural da substância **05** com relação à substância **01**.
- d. Os experimentos em gHMBC da metila δ_H 1,12 (d; 6,5 Hz; δ_C 18,2) evidenciaram uma correlação em 2J com um carbono carbonílico em δ_C 70,8 [δ_H 3,55 (m)] e 3J com C-6' (δ_C 84,0). Estes dados, juntamente com as correlações em gCOSY de δ_H 1,12 $\leftrightarrow$ δ_H 3,55 e δ_H 1,12 $\leftrightarrow$ δ_H 3,58; e de δ_H 3,46 (H-5') $\leftrightarrow$ δ_H 3,55, permitiram

atribuir as respectivas posições da metila e do carbono carbinólico, acoplados a C-6' (Figura 46, pág. 100), determinando assim a porção da molécula que difere da substância **01**.

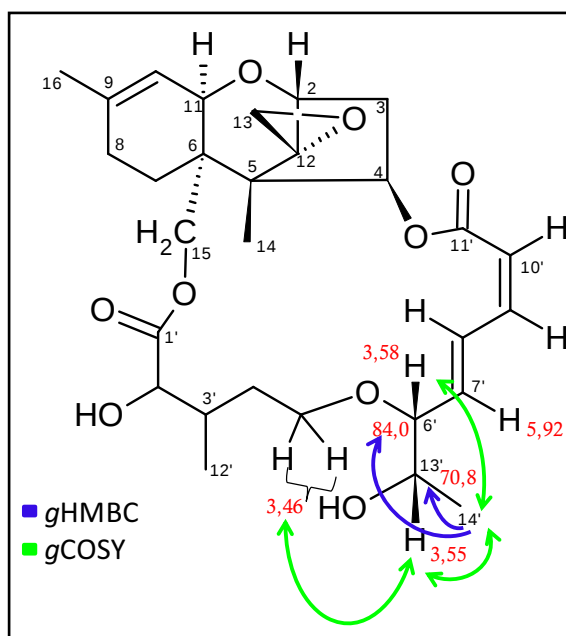


Figura 46 – Correlações observadas em gHMBC e gCOSY

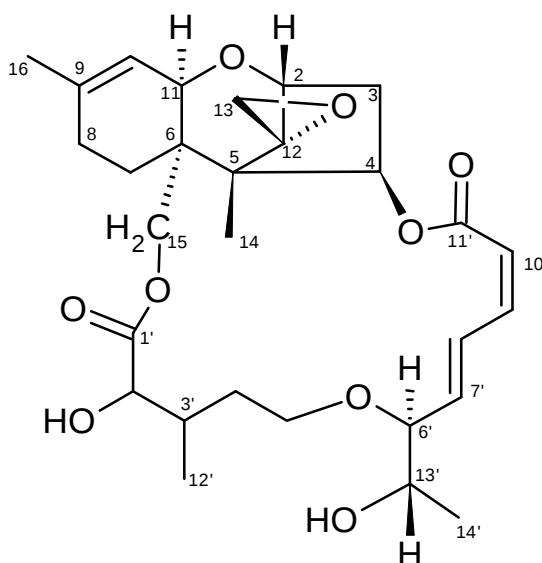
Com base em todos os dados de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D, foi possível atribuir os valores de todos os hidrogênios e carbonos da molécula. Estes dados, juntamente com os dados de $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ e a comparação com a literatura⁶¹, permitiram identificar a substância **05** como sendo Roridina A $\{[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 168,5$ ($c = 1,108$, CHCl_3) $\}$.

Tabela 16 - Dados de RMN 1D e 2D da substância **05** em CDCl₃^a

	H _δ (<i>m</i> , J _{Hz})	C _δ (gHMQC)	gHMBC	gCOSY
1	-O-	-	-	-
2	3,78 (<i>d</i> ; 5,0)	79,0	49,3; 65,2; 67,2; 74,3	2,14
3	2,14 (<i>ddd</i> ; 4,5; 5,0; 15,5) 2,38 (<i>dd</i> ; 8,5; 15,5)	34,8	74,3 49,3; 65,2; 79,0	2,38; 3,78; 5,72 2,14; 5,72
4	5,72 (<i>dd</i> ; 4,5; 8,5)	74,3	65,2; 166,5	2,14; 2,38
5	C ₀	49,3	-	-
6	C ₀	43,7	-	-
7	1,71 (<i>m</i>)	20,2	NO	1,95
8	1,95 (<i>m</i>)	27,7	67,2	1,71
9	C ₀	140,9	-	-
10	5,35 (<i>d</i> ; 5,0)	118,2	23,2	3,52
11	3,52 (<i>d</i> ; 5,0)	67,2	20,2; 118,2; 140,9	5,35
12	C ₀	65,2	-	-
13 ^a	2,72 (<i>d</i> ; 4,0)	47,7	65,2	3,04
13b	3,04 (<i>d</i> ; 4,0)		65,2	2,72
14	0,74 (<i>s</i>)	7,5	43,7; 49,3; 65,2; 74,3	NO
15	4,37 (<i>d</i> ; 12,0; 2Hs)	64,5	20,2; 43,7; 49,3; 67,2; 174,8	NO
16	1,67 (<i>s</i>)	23,2	27,7; 118,2; 140,9	1,71; 1,95
1'	OC(=O)	174,8	-	-
2'	4,02 (<i>d</i> ; 3,0)	75,5	NO	NO
3'	1,58 (<i>m</i>)	37,1	NO	3,46
4'	1,80 (<i>m</i>)	33,1	NO	1,01; 1,58
5'	3,46 (<i>dd</i> ; 5,0; 7,5; 2H)	69,8	37,1; 33,1; 84,0	1,58; 1,80; 3,55; 3,58
6'	3,58 (<i>m</i>)	84,0	NO	5,92; 1,12
7'	5,92 (<i>dd</i> ; 3,5; 15,5)	139,2	NO	3,58; 7,59
8'	7,59 (<i>dd</i> ; 11,5; 15,5)	126,1	NO	NO
9'	6,58 (<i>dd</i> ; 11,5; 11,5)	143,9,9	139,1	7,59
10'	5,73 (<i>d</i> ; 11,5)	117,5	126,1; 166,5	6,58; 5,73
11'	OC(=O)	166,5	-	-
12'	1,01 (<i>d</i> ; 7,0)	14,7	33,1; 37,1; 75,3	NO
13'	3,55 (<i>m</i>)	70,8	84,0	NO
14'	1,12 (<i>d</i> ; 6,5)	18,2	84,0; 70,8	3,55
OH	2,54	-	-	3,46

^adeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO = Correlações não observadas

IV.4.2.3 Determinação Estrutural da Substância **06**Figura 47 – Estrutura da substância **06** (Isororidina A)

A substância **06** foi isolada como um sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25} +32,00^\circ$ (c 0,1 em MeOH) e submetida a espectrometria de massas de alta resolução EM-IES (+), onde o espectro (Anexo 63, pág. 215), apresentou um sinal de m/z 555,2564 (100 %) resultante da formação do aduto $[M + Na]^+$ e os sinais de m/z 533,2627 (4,0 %) e m/z 571,2397 (4,0 %) indicando a molécula protonada $[M + H]^+$ e a formação do aduto $[M + K]^+$. A massa para $[M]^+$ foi calculada como 532,6225 DA o que, associada aos dados de RMN de 1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) confirmou a fórmula molecular $C_{29}H_{40}O_9$.

Devido a pequena massa da substância obtida no isolamento não foi possível realizar as análises de RMN de ^{13}C , no entanto os dados referentes aos carbonos foram obtidos a partir dos espectros de gHSQC e gHMBC (Anexos 65, e 66, pág. 217).

Os sinais de carbono e hidrogênio observados nos espectros (Tabela 17, pág. 103, Anexo 64, pág. 216) evidenciaram um perfil espectroscópico igual ao da substância **05**, e como **05** foi isolada na mesma fração que **06**, porém com tempos de retenção diferentes, sugerimos tratar-se de isômeros.

Tabela 17- Dados de RMN 1D e 2D da substância **06** em CDCl₃^a

	H _δ (<i>m</i> , J _{Hz})	C _δ (gHMOC)	gHMBC	gCOSY
1	-O-	-	-	-
2	3,78 (<i>d</i> ; 4,5)	79,2	74,4; 76,0; 49,0	2,14
3	2,14 (<i>ddd</i> ; 4,5; 4,5; 15,1) 2,38 (<i>dd</i> ; 15,1; 8,0)	35,0	NO 49,0; 65,0; 79,2	2,38; 3,78; 5,71 2,14; 5,71
4	5,71 (<i>m</i>)	74,4	NO	
5	C ₄	49,0	-	-
6	C ₄	43,5	-	-
7	1,70 (<i>m</i>) 1,83 (<i>m</i>)	20,4	NO NO	1,83
8	1,81 (<i>m</i>) 1,94 (<i>m</i>)	27,8	NO NO	NO NO
9	C ₄	141,2	-	-
10	5,36 (<i>d</i> ; 5,0)	118,4	27,5; 23,4	3,52; 1,66
11	3,52 (<i>m</i>)	67,0	NO	NO
12	C ₄	65,0	-	-
13a	2,72 (<i>d</i> ; 4,0)	48,2	NO	NO
13b	3,04 (<i>d</i> ; 4,0)		NO	NO
14	0,74 (<i>s</i>)	7,6	43,5; 49,0; 65,0	NO
15	4,37 (<i>sl</i>)	64,7	175,3; 67,0; 49,0; 43,7	NO
16	1,66 (<i>s</i>)	23,4	27,8; 118,4; 141,2	3,52
1'	C=O	175,3	-	-
2'	4,02 (<i>d</i> ; 3,0)	75,8	NO	
3'	1,95 (<i>m</i>)	37,2	175,3	
4'	1,72 (<i>m</i>)	32,4	NO	
5'	3,46 (<i>m</i>)	70,1	37,2; 32,4	NO
6'	3,58 (<i>m</i>)	84,0	70,9	NO
7'	5,92 (<i>dd</i> ; 3,0; 15,5)	139,4	144,1; 84,0	3,56; 7,59
8'	7,59 (<i>dd</i> ; 11,5; 15,5)	126,2	NO	5,93; 6,57
9'	6,57 (<i>dd</i> ; 11,0; 11,5)	144,1	166,1; 139,4	5,72; 7,59
10'	5,72 (<i>d</i> ; 11,0)	117,5	126,2	6,57
11'	C=O	166,1	-	-
12'	1,01 (<i>d</i> ; 7,0)	14,8	32,4; 37,2; 75,8	1,95
13'	3,53 (<i>m</i>)	70,9	NO	1,12
14'	1,12(<i>d</i> ; 6,0)	18,3	84,0	3,53

^adeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO = Correlações não observadas

Considerando que os dados de RMN de ¹H e ¹³C da roridina A e da Isororidina A estão de acordo com os dados encontrados na literatura⁶¹ (Tabela 18, pág. 104) para as duas substâncias, e que **05** e **06** foram isoladas da mesma fração, no entanto, com tempos de retenção distintos (Figura 33, pág. 84, e que a Roridina A isolada apresenta [α]_D²⁵

+125,43° (c 0,1 em MeOH), próximo ao da Rodidina A da literatura $\{[\alpha]^{25}_D + 130^\circ$ (c 1,36, CHCl_3), e que a Isororidina isolada apresenta $[\alpha]^{25}_D + 32,00^\circ$ (c 0,1 em MeOH) que é próximo ao valor encontrado na literatura $\{[\alpha]^{25}_D + 6,7^\circ$ (c 3,3, CHCl_3), propomos que a substância **05** trata-se da Roridina A e **06** da Isoridina A.

Tabela 18 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Roridina A e Isororidina A com a literatura

	Roridina A (CDCl_3)				Isororidina A (CDCl_3)			
	Isolada		Literatura ⁵⁹		Isolada		Literatura ⁵⁹	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	-O-	-	-	-	-O-	-	-	-
2	3,78	79,0	3,86	78,8	3,78	79,2	3,86	79,1
3	2,14	34,8		34,6	2,14	35,0		34,9
	2,38				2,38		2,48	
4	5,72	74,3	5,85	74,2	5,71	74,4	5,80	74,4
5	C_4	49,3		49,1	C_4	49,0		49,4
6	C_4	43,7		43,6	C_4	43,5		43,8
7	1,71	20,2		20,0	1,70	20,4		20,3
					1,83			
8	1,95	27,7		27,5	1,81	27,8		27,7
					1,94			
9	C_4	140,9		140,4	C_4	141,2		140,9
10	5,35	118,2	5,44	118,2	5,36	118,4	5,41	118,3
11	3,52	67,2		66,9	3,52	67,0	3,60	67,2
12	C_4	65,2		64,9	C_4	65,0		65,3
13a	2,72	47,7	2,96	47,4	2,72	48,2	2,96	47,8
13b	3,04				3,04			
14	0,74	7,5	0,80	7,2	0,74	7,6	0,83	7,5
15	4,37	64,5	4,44	64,2	4,37	64,7	4,44	64,4
16	1,67	23,2	1,74	22,9	1,66	23,4	1,75	23,3
1'	$\text{OC}=\text{O}$	174,8	$\text{OC}=\text{O}$	174,5	$\text{OC}=\text{O}$	175,3	$\text{OC}=\text{O}$	174,9
2'	4,02	75,5	4,09	75,3	4,02	75,8	4,11	75,2
3'	1,58	37,1		36,7	1,95	37,2		37,0
4'	1,80	33,1		33,0	1,72	32,4		33,3
5'	3,46	69,8		69,5	3,46	70,1		69,4
6'	3,58	84,0		83,7	3,58	84,0		82,6
7'	5,92	139,2	6,00	139,0	5,92	139,4	6,00	139,0
8'	7,59	126,1	7,68	126,0	7,59	126,2	7,64	126,4
9'	6,58	143,9	6,66	143,6	6,57	144,1	6,66	143,9
10'	5,73	117,5	5,78	117,2	5,72	117,5	5,80	117,3
11'	$\text{OC}=\text{O}$	166,5	$\text{OC}=\text{O}$	166,3	$\text{OC}=\text{O}$	166,1	$\text{OC}=\text{O}$	166,6
12'	1,01	14,7	1,08	14,4	1,01	14,8	1,09	14,4
13'	3,55	70,8		70,4	3,53	70,9		70,0
14'	1,12	18,2	1,17	18,0	1,12	18,3	1,16	17,9
OH	2,54	-						

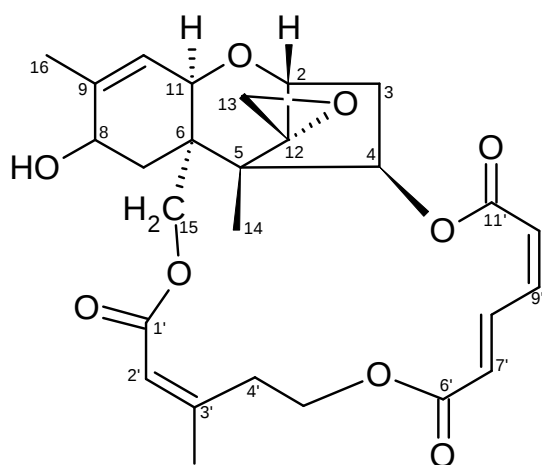
IV.4.2.4 Determinação Estrutural da Substância **07**

Figura 48 – Estrutura da substância **07** (Verrucarina L)

A substância **07** foi isolada como um sólido amorfo amarelo claro e submetida a análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectrometria de massas de alta resolução os quais evidenciaram que esta substância encontra-se em mistura com outro metabólito, no entanto com identificação estrutural viável.

O espectro de massas de alta resolução EM-IES (+) (Anexo 68, pág. 219), apresentou um pico base m/z 523,2073 (100 %) indicando o aduto $[\text{M} + \text{Na}]^+$, e os picos m/z 501,2274 (33,6 %) indicando a formação do íon *quasi* molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$. O pico intenso m/z 553,2536 foi atribuído a segunda substância presente em menor quantidade na fração porém, possivelmente com maior facilidade de ionização. A massa para $[\text{M}]^+$ foi então calculada como m/z 500,2041 o que, associado aos dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (Tabela 19, pág. 107), confirmou a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_9$.

Os espectros de RMN de C^{13} e ^1H (Anexos 79 e 69, págs. 220 e 221), evidenciaram um perfil espectroscópico muito parecido com o da substância **01**, diferindo em alguns dados correspondentes ao anel macrocíclico, como mostrado a seguir:

- No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar dois sinais característicos de dupla ligação, em δ_{C} 118,8 [δ_{H} 5,49 (*d*; 5,0)] e δ_{C} 118,2 [δ_{H} 5,75 (*s*)] e não apenas um sinal, como observado para a substância **01**. As correlações observadas em gHMBC entre δ_{H} 5,49 $\leftrightarrow$ δ_{C} 23,2 (C-16), permitiu atribuir este hidrogênio e seu respectivo carbono na posição C-10 (Figura 49, pág. 106).

- b. O espectro de *g*MHBC evidenciou correlação de δ_H 5,75 (δ_C 118,2) com δ_C 17,3 [δ_H 2,19 (*s*)]. Adicionalmente, foram observadas as correlações em *g*HMBC de δ_H 2,19 com os carbonos δ_C 118,2 e δ_C 156,8 (C_4). Estes dados, juntamente com uma análise detalhada da literatura⁶³ nos permitiram posicionar os carbonos δ_C 118,2 e δ_C 156,8 na dupla ligação em C-2' e C-3', respectivamente.
- c. O espectro de *g*HMQC apresentou ainda um sinal de carbono carbinólico em δ_C 68,2 correlacionando-se com o hidrogênio em δ_H 4,12 (*m*), e este por sua vez, correlacionando-se por *g*HMBC com os carbonos δ_C 21,1(C-7); δ_C 118,8 (C-10) e δ_C 140,1(C-16). Estes dados possibilitaram posicionar o carbono δ_C 68,2 em C-8.

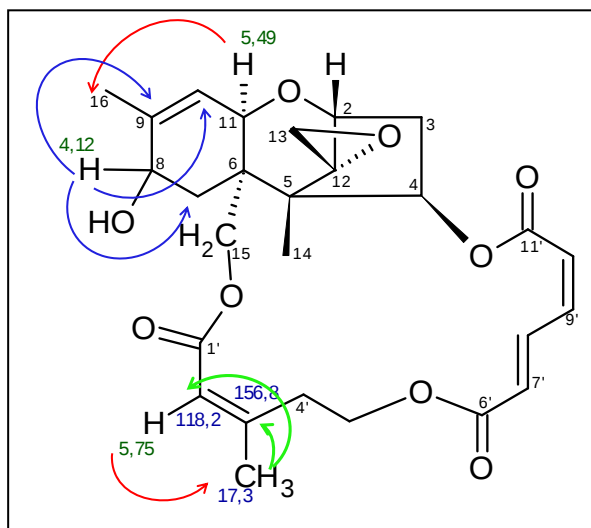


Figura 49 – Principais correlações observadas por *g*HMBC da substância **08**

Com base nos dados obtidos nos experimento de RMN 1H e ^{13}C uni e bidimensionais, foi possível atribuir os valores aos demais hidrogênios e carbonos da molécula e suas respectivas posições. Uma comparação detalhada dos dados de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas com a literatura, foi possível identificar a substância **08** como sendo Verrucarina L⁶³.

Tabela 19- Dados de RMN 1D e 2D da substância **07** em CDCl₃^a

	H _δ (m, J _{Hz})	gHMQC	gHMBC	gCOSY
1	-O-	-	-	-
2	3,61 (<i>d</i> ; 4,5)	79,2	84,0; 68,2; 64,4; 49,0	4,34
3	2,48 (<i>m</i>)	40,2	79,2; 65,4	4,34; 5,72
4	5,68 (<i>d</i> ; 3,5)	84,0	NO	NO
5	C ₄	49,0	-	-
6	C ₄	43,7	-	-
7	1,96 (<i>m</i>)	21,1	63,5	-
8	4,12 (<i>m</i>)	68,2	140,1; 118,8; 21,1	NO
9	C ₄	140,1	-	-
10	5,49 (<i>d</i> ; 5,0)	118,8	23,2	NO
11	4,34 (<i>m</i>)	64,4	49,0	NO
12	C ₄	65,4	-	-
13a	2,72 (<i>d</i> ; 4,0)	47,3	65,4	2,98
13b	2,98 (<i>d</i> ; 4,0)		NO	2,72
14	0,74 (<i>s</i>)	6,9	84,0; 64,4; 49,0; 43,7	NO
15a	3,97 (<i>d</i> ; 13,0)	63,5	68,2; 49,0	4,29
15b	4,30 (<i>d</i> ; 13,0)		165,3	3,97
16	1,66 (<i>s</i>)	23,2	27,7; 118,8; 140,1	NO
1'	C=O	165,3	-	-
2'	5,75 (<i>sl</i>)	118,2	17,3	2,35
3'	C ₄	156,8	-	-
4'	NO	43,2	NO	NO
5'				
6'	C=O	166,1	-	-
7'	5,93 (<i>d</i> ; 15,5)	127,5	166,1	NO
8'	7,91 (<i>ddd</i> ; 1,0; 11,5; 15,5)	139,3	NO	6,55; 5,93
9'	6,55 (<i>dd</i> ; 11,0; 11,5)	138,9	127,5	6,09
10'	6,09 (<i>dd</i> ; 1,0; 11,0)	125,5	NO	6,55
11'	C=O	165,5	-	-
12'	2,19 (<i>s</i>)	17,3	156,8; 118,2	NO

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO= Correlações não observadas

IV.5 Ensaios Biológicos das Substâncias Isoladas de *Myrothecium gramineum*

✓ *Ensaio Preliminar para Avaliação das Atividades Antifúngicas e Anticolinesterásicas das Substâncias Isoladas*

Por apresentarem maior quantidade de massa, as substâncias **01** e **05** foram submetidas aos ensaios qualitativos da atividade antifúngica e anticolinesterásica [Tópico VII.2.2.4, pág. 163].

Na avaliação da atividade anticolinesterásica as amostras foram analisadas na concentração de 50µg, por ponto de aplicação, e para os ensaios antifúngicos na concentração de 400 µg, por ponto de aplicação.

Os resultados mostraram uma forte atividade destas substâncias para ambos os ensaios (Figura 50, pág. 108).

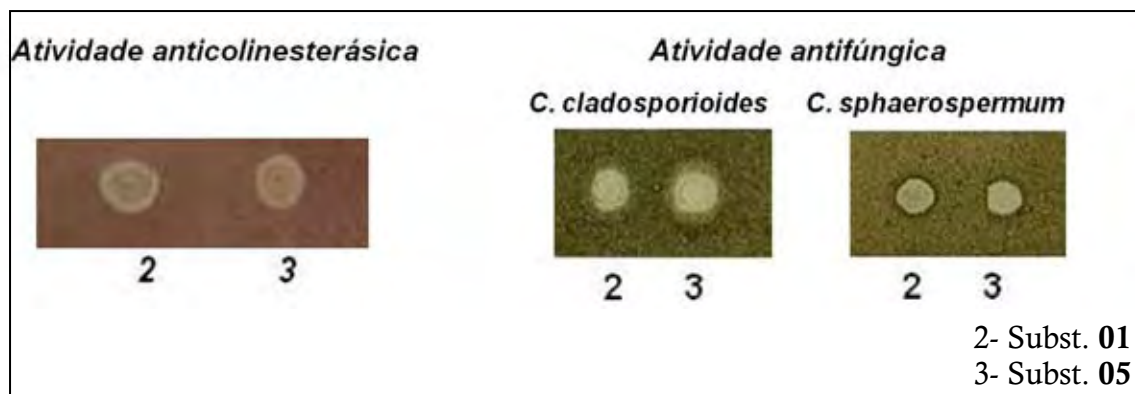


Figura 50 – Ensaios qualitativos das atividades antifúngicas e anticolinesterásicas das substâncias **01** e **05**

Posteriormente, todas as substâncias isoladas foram submetidas aos mesmos ensaios qualitativos da atividade antifúngica e anticolinesterásica. Para estes ensaios foram aplicadas 100 µg de cada substância em placas cromatográficas que foram então submetidas aos mesmos procedimentos citados no Tópico VII.2.1.5 (pág. 157).

Os resultados estão apresentados na Tabela 20 (pág. 109), evidenciando novamente atividade antifúngica e anticolinesterásica para as substâncias **01** (Verrucarina A) e **05** (Roridina A), e atividade anticolinesterásica para a substância **03** [Ciclo (L-Pro-L-Leu)]. Sendo assim, foram solicitadas análises para a determinação dos limites de detecção nos ensaios disponíveis na rede BIOprospecTA inserido no programa BIOTA-FAPESP.

Tabela 20 – Avaliação qualitativa das atividades antifúngica e anticolinesterásica das substâncias isoladas

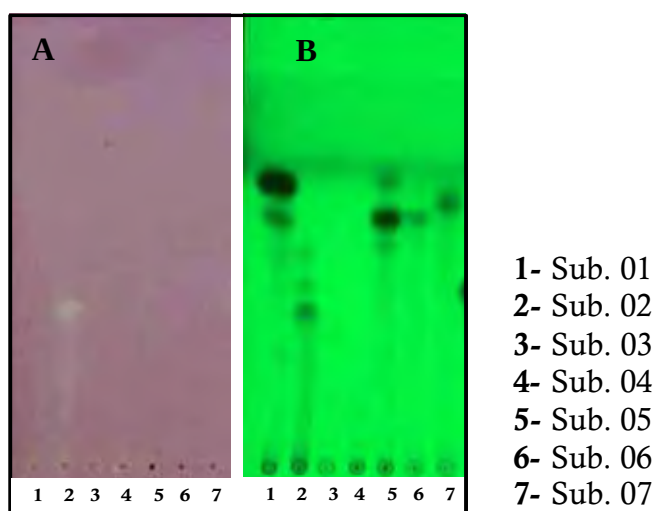
	Atividade Antifúngica		Atividade Anticolinesterásica
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
Subst. 01	**	**	**
Subst. 02	NT	-	**
Subst. 03	NT	-	**
Subst. 04	NT	-	-
Subst. 05	**	**	-
Subst. 06	NT	-	-
Subst. 07	NT	-	-

(**) = Ativo; (-) = Inativo; (NT) = Não testado

✓ *Ensaio preliminar com DPPH para Detecção do Potencial Antioxidantes das Substâncias Isoladas*

Todas as substâncias foram submetidas ao ensaio qualitativo do potencial antioxidante, seguindo o mesmo procedimento realizado para os extratos brutos (Tópico VII.2.1.5, pág. 157), e utilizando as mesmas condições cromatográficas estabelecidas [Sílica de fase normal, e eluentes CHCl_3 :MeOH 9:1 V/V].

Neste ensaio foi possível observar apenas uma mancha branca na placa quando revelada com DPPH, esta mancha referente a substância **02** [Ciclo (L-Pro-L-Leu)], evidencia que esta reduziu o composto DPPH, indicando uma possível atividade antioxidante para esta substância (Figura 51, pág. 109).

**Figura 51** – Ensaio qualitativo do potencial antioxidante das substâncias isoladas: A) revelação com DPPH; B) revelação em luz UV 254 nm

V. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Acremonium* sp.

Fungos do gênero *Acremonium* são fungos filamentosos comumente isolados de plantas, solo e organismos marinhos. São classificados como pertencentes ao grupo dos Ascomicetos devido as suas propriedades estruturais semelhantes a este grupo³⁷. Este gênero é conhecido por produzir vários metabólitos secundários de estruturas e bioatividades diversas e ainda muitos metabólitos inéditos dentre os quais alguns com atividades biológicas importantes, como por exemplo, policetídeos pentacíclicos com atividade antibiótica e antitumoral, espirobenzofurando que possui atividade antibacteriana e acremolactonas que são inibidores de crescimento vegetal, entre outras atividades⁶⁴. Neste tópico está apresentado o estudo químico realizado com o extrato bruto obtido do cultivo de *Acremonium* sp., alguns metabólitos secundários isolados e as atividades biológicas.

V.1 Resultado da Identificação da linhagem fúngica Cs-c(17/22)

A identificação do micro-organismo foi realizada por taxonomia convencional, identificando o fungo endofítico Cs-c(17/22) como pertencente ao gênero *Acremonium*. No entanto, não foi possível a identificação da espécie deste micro-organismo, sendo então definida a linhagem isolada como *Acremonium* sp.

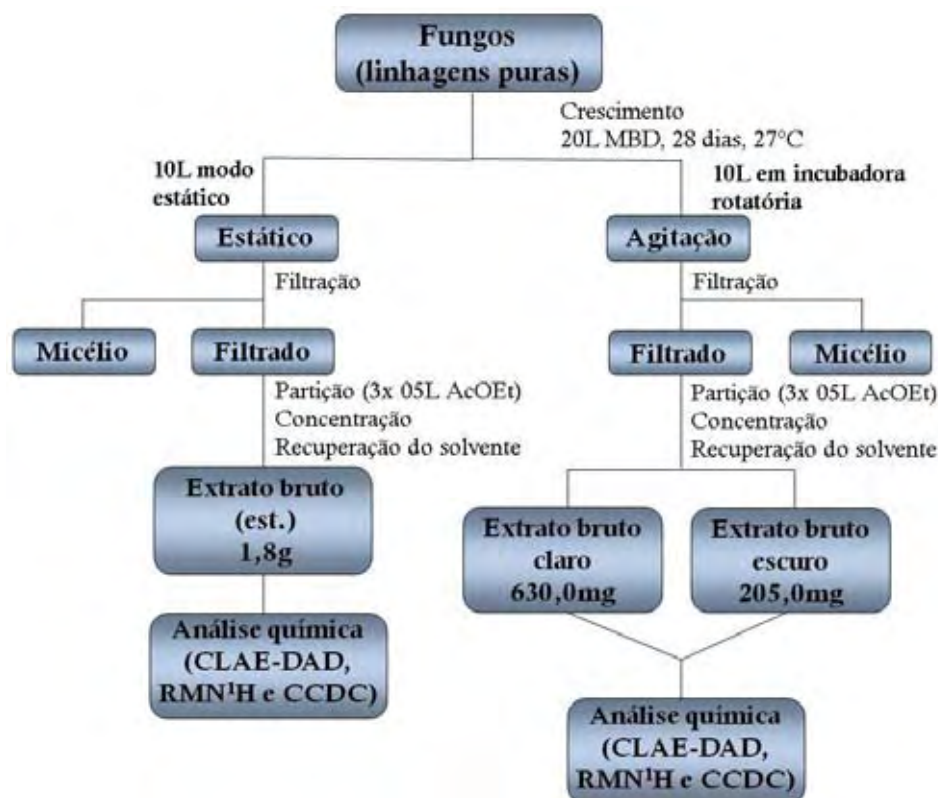


Figura 52 – Fotos do fungo *Acremonium* sp. A) Foto do fungo endofítico Cs-c(17/22) ; B) Foto microscópica de *Acremonium* sp. mostrando longas fiálides em forma de produção de conídios, cilíndrico unicelular principalmente agregados no ápice de cada phialide⁶⁵.

V.2 Cultivo e Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada e Fracionamento Cromatográfico

O cultivo de *Acremonium* sp. em escala ampliada (20L) foi realizado em meio MBD seguindo o mesmo procedimento utilizado para crescimento em escala ampliada de *M. gramineum* (Tópico VII.2.2.1, pág. 160). Novamente a diversidade de produção de metabólitos e os rendimentos dos extratos brutos obtidos foram avaliados com relação ao modo de incubação, sendo utilizados crescimento no modo estático e crescimento com agitação em incubadora rotatória.

Durante o período de incubação foram observadas mudanças na coloração dos inóculos de alguns frascos mantidos sob agitação. Sendo assim optou-se por realizar a extração destes separadamente como mostrado no Fluxograma 05 (pág. 111) e descrito no Tópico VII.2.3.1 (pág. 163).



Fluxograma 05 – Obtenção dos extratos brutos de *Acremonium* sp. em escala ampliada [Tópico VII.2.3.1, pág. 163]

Os extratos brutos obtidos (1,8g para cultivo no modo estático ; 630,0 mg para o cultivo sob agitação – claro e 205,0 mg para cultivo sob agitação – escuro), foram submetidos a análise por CLAE-DAD e RMN de ^1H (Figuras 53 – 56, pág. 112-114) para avaliação e comparação dos perfis químicos.

Foi possível observar que o espectro de RMN de ^1H do extrato obtido no modo estático apresentou uma maior quantidade de sinais na faixa espectral, sugerindo uma maior diversidade metabólica que os extratos obtidos sob agitação. Esta diferença na diversidade metabólica foi confirmada pelo perfil cromatográfico em CLAE-DAD que mostrou uma maior quantidade de bandas no mesmo comprimento de onda.

Uma comparação dos dados de RMN de ^1H e CLAE-DAD dos extratos brutos obtidos sob agitação (Figuras 54 e 55, 56, pág. 113 e 114) mostrou que, apesar da mudança na coloração dos inóculos durante o período de fermentação, não houve diferença considerável na produtividade metabólica. A mudança de coloração pode ter sido influenciada pela esporulação do fungo durante o cultivo.

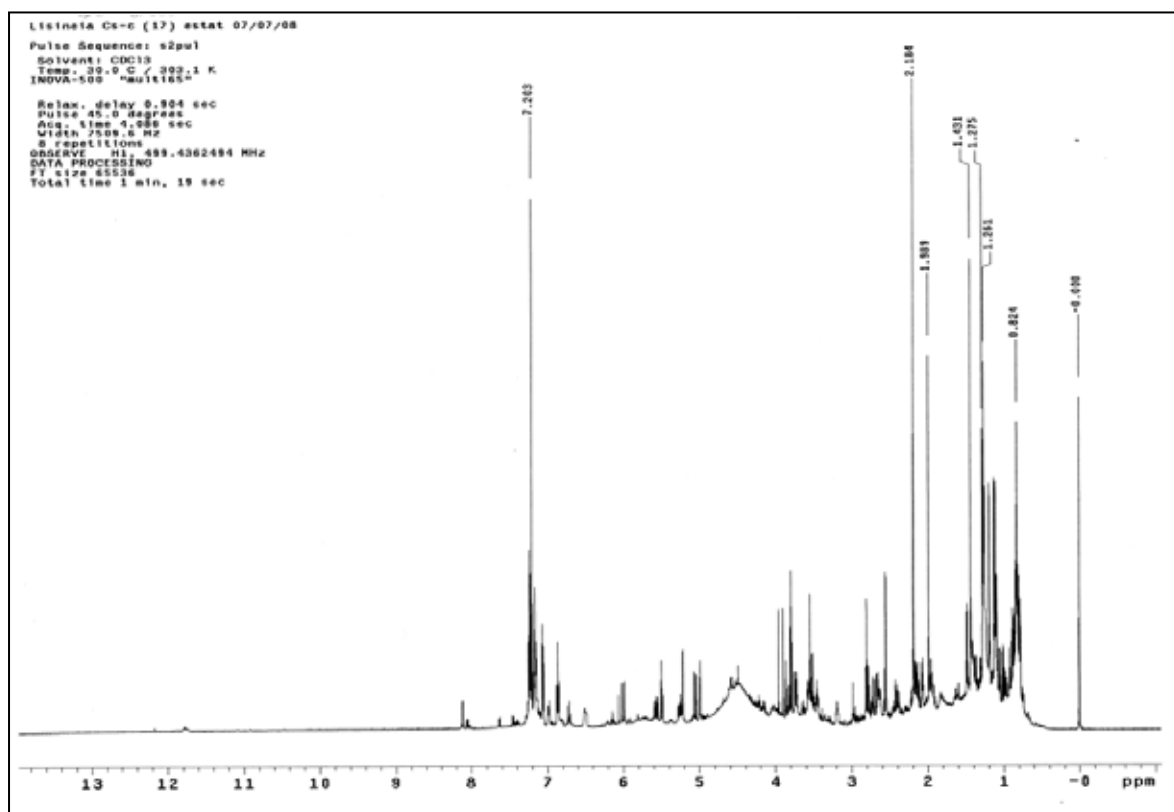


Figura 53 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *Acremonium* sp. no modo estático (CDCl₃, 500 MHz)

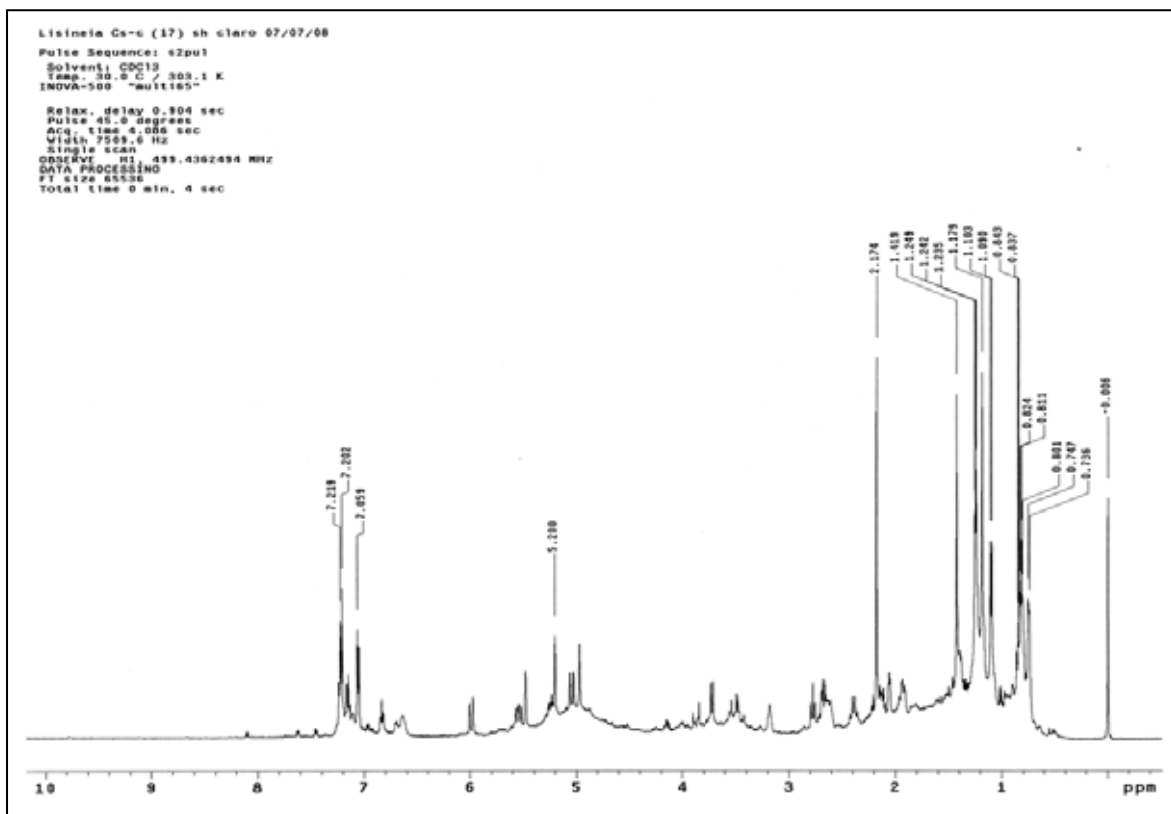


Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *Acremonium* sp. sob agitação (claro) (CDCl_3 , 500 MHz)

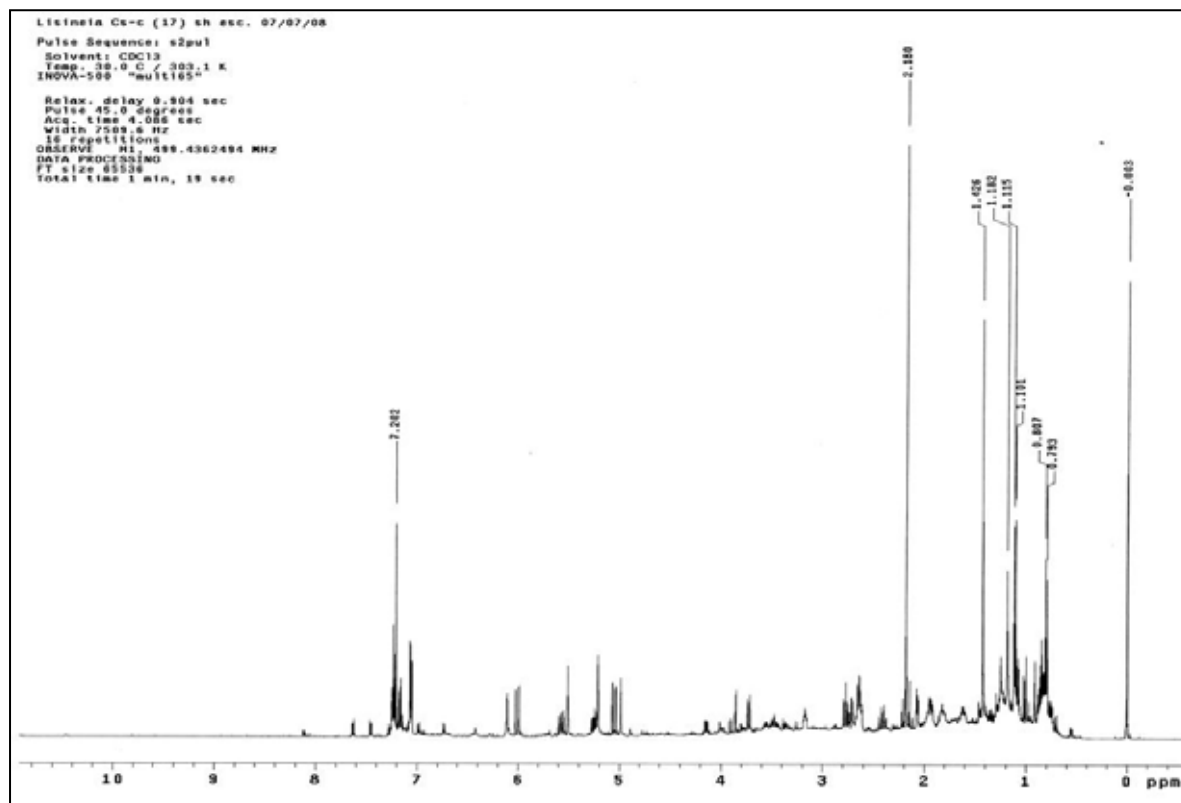


Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *Acremonium* sp sob agitação (escuro) (CDCl_3 , 500 MHz)

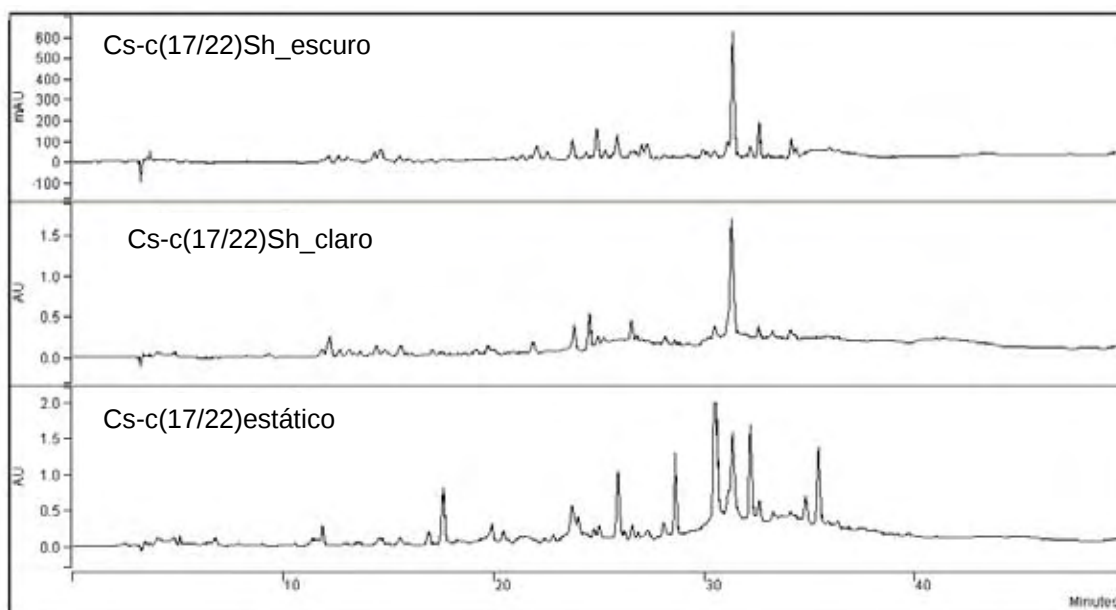


Figura 56 – Cromatogramas dos extratos brutos obtidos de *Acremonium* sp. em CLAE-DAD, $\lambda = 254\text{nm}$

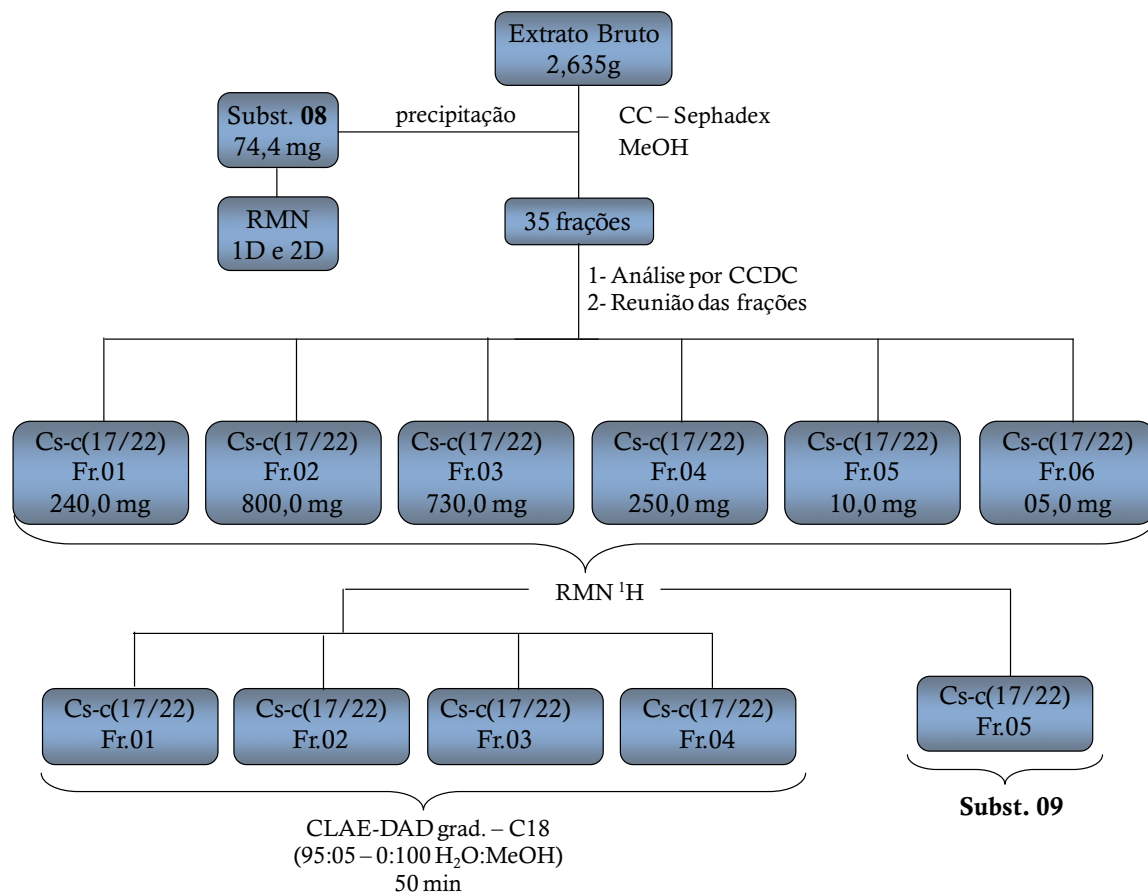
Apesar do modo de incubação ter influenciado na produção de alguns metabólitos, os extratos brutos foram reunidos para evitar a replicação das substâncias isoladas.

Tendo em vista que durante o processo de evaporação do solvente dos extratos brutos, foi observada a precipitação da substância **08**, e esta identificada como sendo uma citocalasina (Anexo 74, pág. 224), o extrato bruto resultante da separação deste precipitado foi inicialmente fracionado utilizando cromatografia em coluna por exclusão, utilizando Sephadex LH-20 com fase estacionária e MeOH como fase móvel (Fluxograma 06, pág 115, procedimento descrito no Tópico VII.2.3.2, pág. 164).

Como as citocalasinas são moléculas de peso molecular consideravelmente elevado, Sephadex foi selecionada com fase estacionária com o intuito de particionar o extrato bruto pela diferença de tamanho das moléculas.

Deste procedimento foram coletadas 35 frações, que após análises por CCDC foram reunidas em 6 frações e suas respectivas massas estão apresentadas no Fluxograma 06 (pág. 115). Estas frações foram analisadas por RMN de ^1H , e as frações Cs-c(17/22)Fr01 a Cs-c(17/22)Fr04 foram selecionadas para análise por CLAE-DAD em gradiente exploratório (Figuras 57 e 58 , pág. 116 ;), para otimização e purificação em

CLAE preparativo. O espectro de RMN de ^1H da fração Cs-c(17/22)Fr05 evidenciou uma substância pura (Subst. **09**) (Anexo 81, pág. 230).



Fluxograma 06- Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *Acremonium* sp.

Os cromatogramas obtidos em CLAE-DAD as frações Cs-c(17/22)Fr02 a Cs-c(17/22)Fr04 (Figuras 57 e 58, pág. 116) evidenciaram perfis com diversas bandas cromatográficas e boa resolução, evidenciando esta metodologia uma boa ferramenta para isolamento das substâncias. A Fração Cs-c(17/22)Fr01 apresentou poucas bandas cromatográficas referentes a substâncias com absorção no ultravioleta, apesar da quantidade considerável de massa obtida no fracionamento.

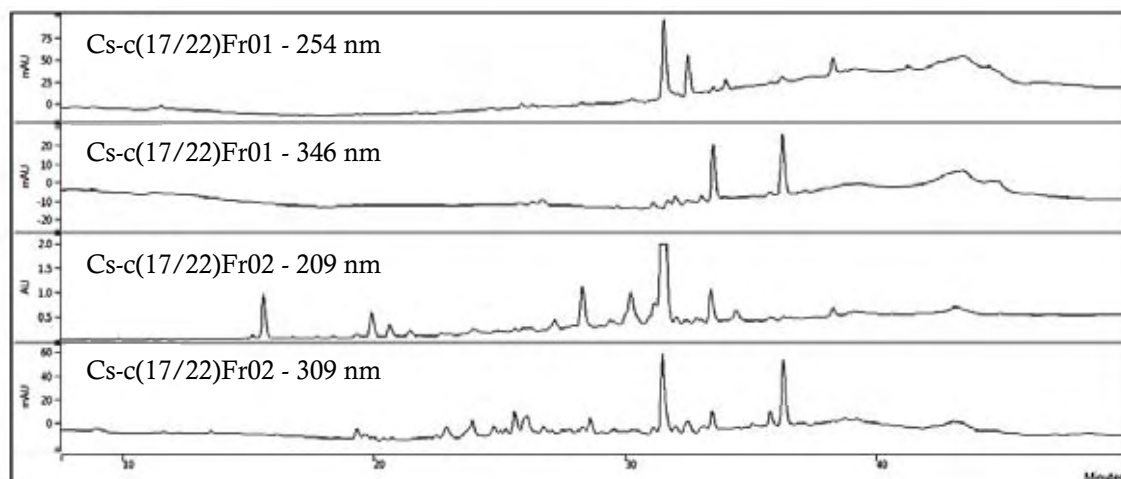


Figura 57 – Cromatogramas em CLAE-DAD de Cs-c(17/22)Fr01 e Cs-c(17/22)Fr02 em diferentes comprimentos de onda

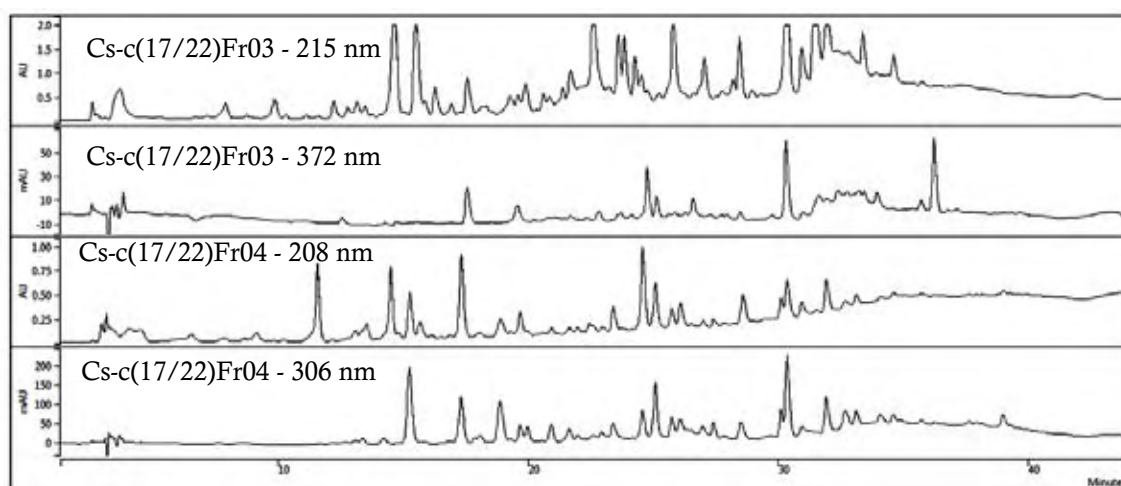


Figura 58 – Cromatogramas em CLAE-DAD de Cs-c(17/22)Fr03 e Cs-c(17/22)Fr04 em diferentes comprimentos de onda

Todo o procedimento de cultivo, obtenção dos extratos brutos e fracionamento cromatográfico estão descrito detalhadamente nos Tópicos VII.2.3.1 e VII.2.3.2 (págs. 163 e 164).

V.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias

O procedimento experimental para fracionamento, purificação das frações e isolamento das substâncias esta apresentado detalhadamente no Tópico VII.2.3.3, pág. 165.

V.3.1 Isolamento da Substância 08

Durante o processo de obtenção do extrato bruto, na extração e evaporação do solvente, foi observada a formação de pequenos cristais na forma de filetes nas paredes dos balões. Estes cristais foram separados dos extratos brutos resultando em 16,4 mg do precipitado de Cs-c(17/22) sob agitação-(escuro), 33,0 mg do precipitado de Cs-c(17/22) sob agitação-(claro) e 25,0 mg do precipitado de Cs-c(17/22)estático. Os precipitados foram analisados por RMN de ^1H constatando-se tratar da mesma substância. Sendo assim, estes foram reunidos e submetidos às análises de RMN uni e bi dimensionais, para determinação e/ou identificação estrutural (Anexos 74 –79, págs. 224-228).

V.3.2 Isolamento da Substância 09

A substância **09** foi isolada no fracionamento cromatográfico do extrato bruto (como a fração Cs-c(17/22)Fr05) (Fluxograma 06, pág. 115), obtendo-se 8,0 mg da substância. Esta foi submetida a análises de RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural (Anexos 80 – 84, págs. 229 - 232).

V.3.3 Fracionamento Cromatográfico da Fração Cs-c(17/22)Fr03

Na análise por CLAE-DAD da fração Cs-c(17/22)Fr03 (730,0 mg) (Figura 59, pág. 118), foram observadas diversas bandas cromatográficas evidenciando uma fração muito complexa e inviabilizando a separação dos constituintes utilizando esta técnica. Sendo assim, a otimização de separação cromatográfica em CCDC (CHCl_3 :MeOH – 9:1)

foi realizada, e a fração foi submetida a fracionamento em coluna utilizando sílica flash, em um sistema de eluição CHCl_3 :MeOH em gradiente (Tópico VII.2.3.3.3, pág. 165).

Foram obtidas 23 frações que após análises por CCDC foram reunidas em 13 frações Fluxograma 07 (pág. 118). Estas, foram analisadas por RMN de ^1H , CLAE-DAD e CCDC para avaliação da eficiência do fracionamento e posterior otimização de sistemas para isolamento das substâncias.

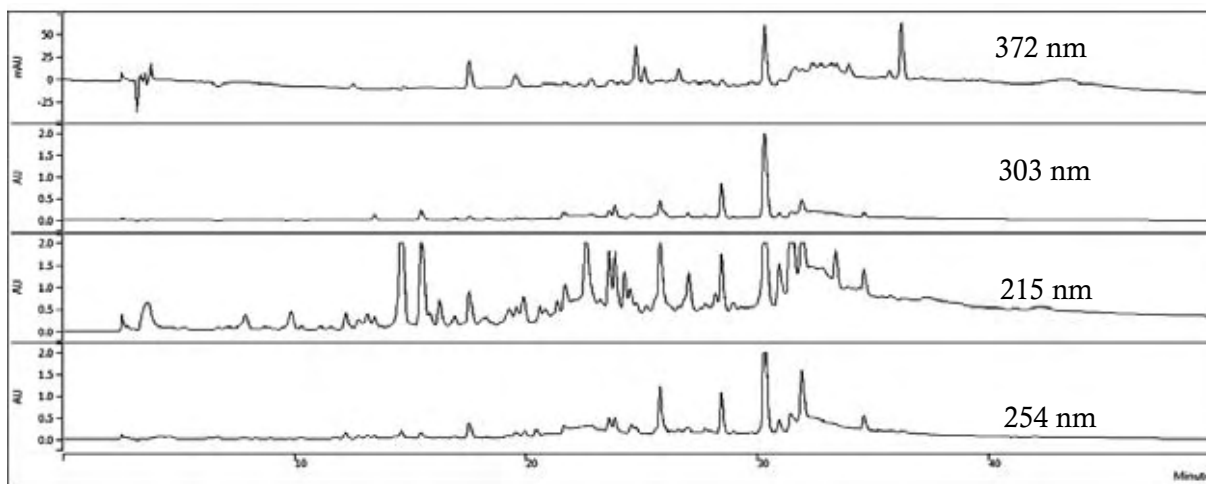
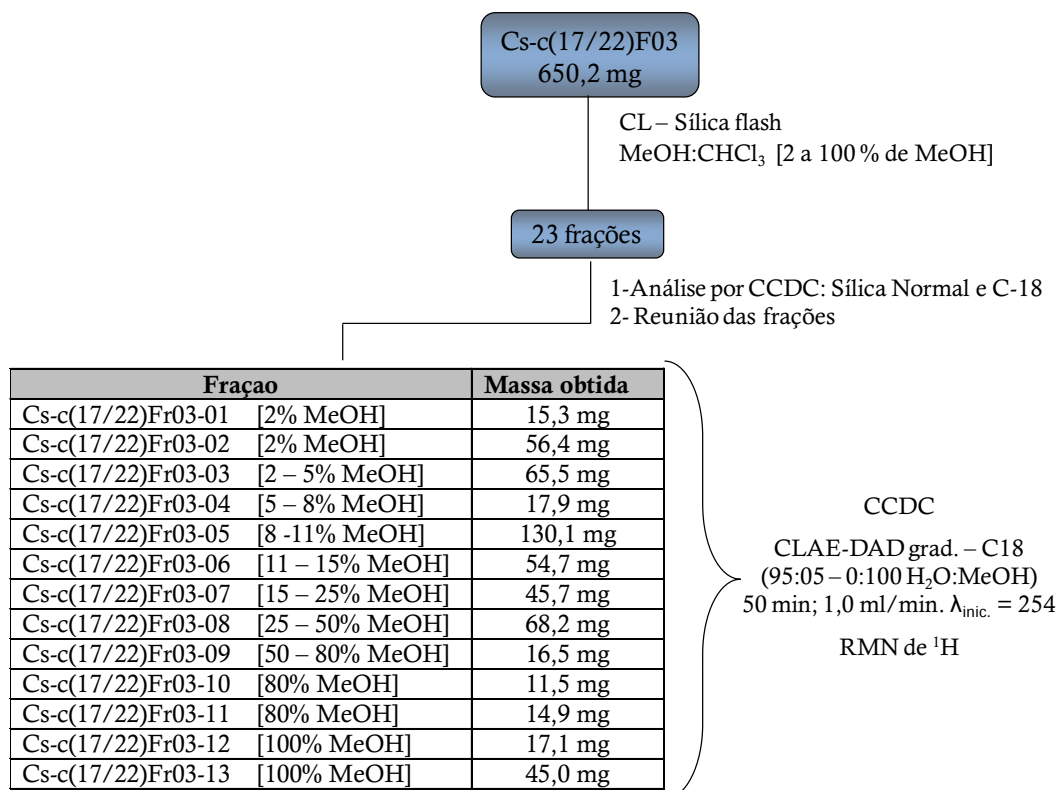


Figura 59 – Perfil cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03 em diversos comprimentos de onda



Fluxograma 07 – Fracionamento cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03

V.3.3.1 Fracionamento Cromatográfico da Fração Cs-c(17/22)Fr03-01/02 e Isolamento das substâncias 08, 10, 11, 12, 13, 14, e 15

As análises em CLAE-DAD (Figura 60, pág. 119), RMN de ^1H e CCDC evidenciaram um perfil químico muito semelhante para as frações Cs-c(17/22)Fr03-01 e Cs-c(17/22)Fr03-02, sendo assim estas foram reunidas e submetidas a CLAE_{anal.} para otimização da separação das substâncias em CLAE_{prep.}

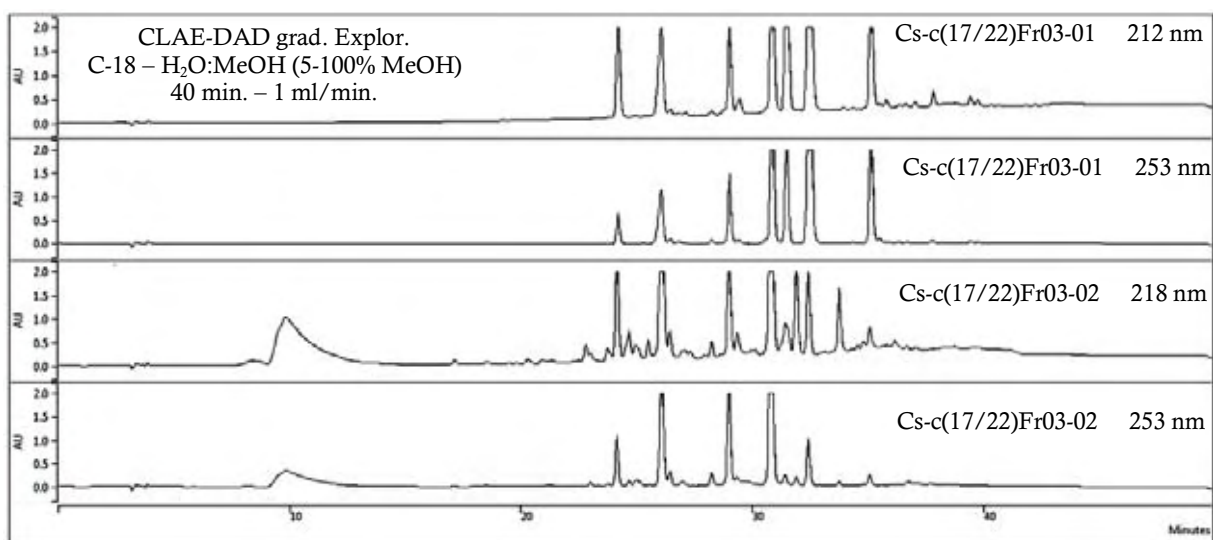


Figura 60 – Cromatogramas das frações Cs-c(17/22)Fr03-01 e Cs-c(17/22)Fr03-02 em diferentes comprimentos de onda

A condição otimizada para isolamento foi um sistema cromatográfico utilizando sílica de fase reversa como fase estacionária (Coluna semi-preparativa) e $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente não linear como mostrado na Tabela 21 (pág. 119).

Tabela 21– Gradiente programado para CLAE_{prep.} para fracionamento da fração Cs-c(17/22)Fr03-1/2

Tempo de corrida (min.)	% da fase móvel (MeOH em H_2O)
00	40% MeOH
05	40% MeOH
30	100% MeOH
35	100% MeOH

Desta separação foram coletadas 14 frações (Figura 61, pág. 120) e destas, 07 foram identificadas como substâncias puras, sendo elas: Cs-c(17/22)Fr03-1/2-05 (Subst. 10; 3,0 mg), Cs-c(17/22)Fr03-1/2-08 (Subst. 11; 1,9 mg), Cs-c(17/22)Fr03-1/2-09 (Subst. 12; 2,2 mg), Cs-c(17/22)Fr03-1/2-10 (Subst. 13; 4,4 mg), Cs-c(17/22)Fr03-1/2-11 (Subst. 08; 2,3 mg), Cs-c(17/22)fr03-1/2-12 (Subst. 14; 3,2 mg) e Cs-c(17/22)Fr03-1/2-13 (Subst. 15; 1,9 mg).

Todas as substâncias foram analisadas por RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural (Anexos 85 - 110, págs. 233 - 253).

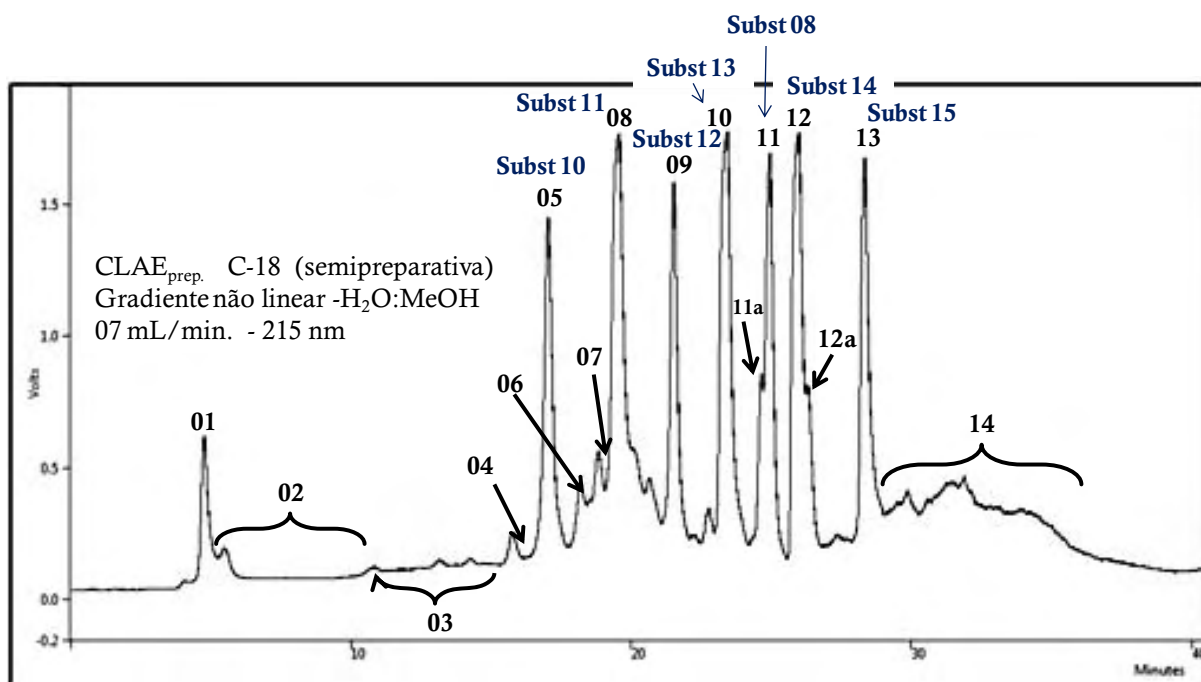


Figura 61 – Cromatograma em CLAE_{prep.} obtido no fracionamento de Cs-c(17/22)Fr03-1/2

V.4 Determinação Estrutural das Substâncias isoladas de *Acremonium* sp.

Para facilitar a discussão sobre a determinação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho, as mesmas foram separadas por classe de metabólitos, sendo estas, pertencentes à classe das citocalasinas, xantonas e isocumarinas.

V.4.1 Citocalasinas – Características Gerais

Citocalasinas são substâncias de origem biossintética mista, sendo formadas por uma unidade do aminoácido fenilalanina, que é incorporado a uma cadeia policetídica alquilada.

Estas substâncias têm sido isoladas como metabólitos de diferentes gêneros de fungos tais como *Phomopsis*, *Chaetomium*, *Hyposylon*, *Xylaria* e *Daldinia*⁶⁶ e são de grande importância por apresentam atividades biológicas relevantes, como bactericida, fitotóxica, inibição de HIV-1 protease⁶⁶, antibiótica, anticancerígena, entre outras. Nesta última, apresentando ação citostática em culturas de células, porém sua aplicação terapêutica é limitada pela alta toxicidade apresentada²⁴.

. V.4.1.1 Determinação Estrutural da Substância 08

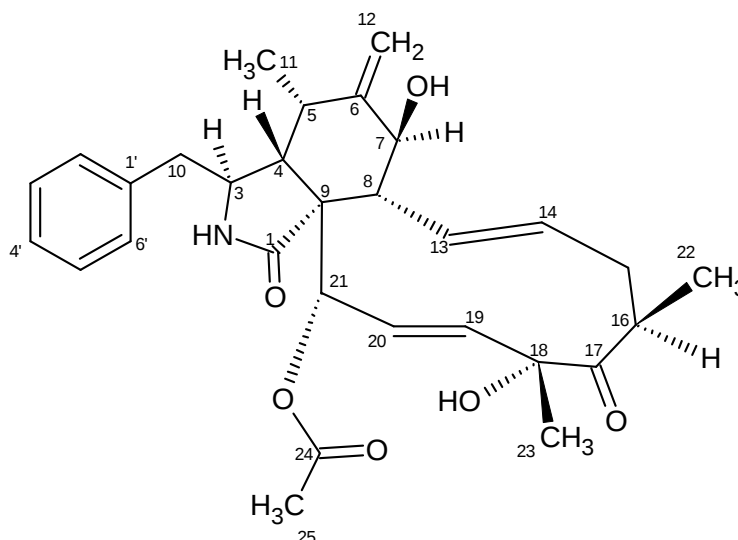


Figura 62 – Estrutura da Citocalasina D

A substância foi isolada como cristais brancos em forma de filetes, $[\alpha]_D^{25} +18,57^\circ$ (c 0,1; MeOH) e submetida à análise detalhada de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução.

O espectro de massas (Anexo 74, pág. 224) apresentou um sinal de m/z 530,2527 (100%) indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e os sinais de m/z 508,2713 (4,8%) e m/z 546,2344 (7,2%) indicando a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ e a formação do aduto $[\text{M}+\text{K}]^+$, respectivamente. A massa para $[\text{M}]^+$ foi calculada com 507,6179 DA, o que com os dados de RMN de ^{13}C sugeriu a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_6$.

O perfil do espectro de RMN de ^{13}C (Anexos 76, pág. 226), evidenciou 30 átomos de carbono, com a presença de um anel benzênico, um carbono benzílico, ligação dupla terminal, carbonila de cetona, duas carbonilas de éster ou amida e 4 carbonos olefinicos (CH). Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base nos dados dos espectros de gHMQC (Anexo 77, pág. 227)

A determinação estrutural de **08** foi realizada pela análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , gHMQC, gHMBC e gCOSY (Tabela 22, pág.125, Anexos 77, 78 e 79, págs. 227 e 228) e comparação com a literatura^{53,67}.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais em δ_{H} 5,60 (dd ; 10,0 15,5 Hz) e δ_{H} 5,27 (ddd ; 5,0; 10,5; 15,5 Hz) característico dos hidrogênios olefinicos H-13 e H-14, respectivamente. A geometria *trans* foi atribuída à dupla $\Delta^{13,14}$ [C-13 (δ_{C} 130,6) e C-14 (δ_{C} 134,1)], devido a constante de acoplamento de 15,5 Hz, apresentadas pelos hidrogênios correspondentes. A posição da dupla ligação $\Delta^{13,14}$ foi confirmada pelas correlações observadas no experimento de gHMBC, onde foi possível observar as correlações do H-13 com o carbono carbinólico δ_{C} 69,9 (C-7) e com δ_{C} 47,0 (C-8) (Figura 63, pág. 123).

Os sinais de hidrogênios em δ_{H} 5,06 (dd ; 2,5; 15,5 Hz) e δ_{H} 6,03 (dd ; 3,0 e 2,5; 15,5 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios *trans* H-19 e H-20, as posições destes hidrogênios foram confirmadas com base nas correlações observadas nos experimentos de gHMBC, onde foi observado correlações de H-23 $\leftrightarrow$ C-17, H-23 $\leftrightarrow$ C-19 e H-23 $\leftrightarrow$ C-18, e ainda H-19 $\leftrightarrow$ C-23, H-19 $\leftrightarrow$ C-21 e H-20 $\leftrightarrow$ C-18 (Figura 63, pág. 123). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou os sinais em δ_{C} 137,2 (C-1'); δ_{C} 129,1 (C-2'e 6'); δ_{C} 128,9 (C-3' e 5'); δ_{C} 127,4 (C-4'); que foram atribuídos aos carbonos aromáticos e sinais em δ_{C} 130,6; δ_{C} 134,1 e δ_{C} 127,6; δ_{C} 132,2 característicos das ligações duplas $\Delta^{13,14}$ e $\Delta^{19,20}$.

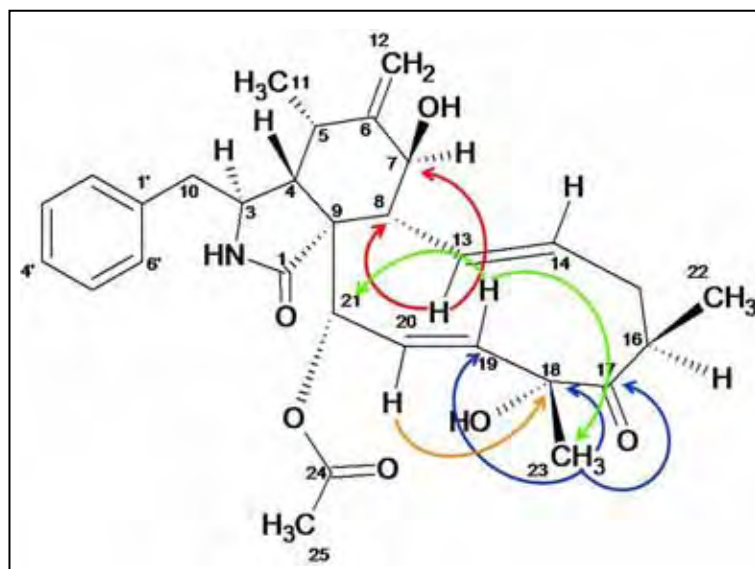


Figura 63 – Correlações observadas em gHMBC dos hidrogênios de $\Delta^{13,14}$ e $\Delta^{19,20}$

Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,06 (*m*, H-2' e 6'); δ_H 7,17 (*m*, H-4') e δ_H 7,24 (*m*, H-3' e 5'), foram atribuídos aos seus respectivos carbonos por gHMQC. Foram também observados os sinais característicos de metilas em δ_H 0,85 (*d*; 7,0 Hz), δ_H 1,12 (*d*; 6,5 Hz), δ_H 1,43 (*s*) e δ_H 2,19 (*s*) que foram atribuídos à H₃C-11, H₃C-22, H₃C-23 e H₃C-25, respectivamente.

Os sinais em RMN de ^{13}C em δ_C 210,0; δ_C 169,6 e δ_C 174,0 foram determinados como sendo as carbonilas da cetona macrocíclica (C-17), acetato (C-24) e de uma lactama de 5 membros (C-1), respectivamente. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais em δ_H 3,74 (*dd*; 1,0; 10,5 Hz) e δ_H 5,54 (*dd*; 2,5; 3,0 Hz), atribuídos aos hidrogênios carbinólicos H-7 e H-21, respectivamente. As constantes de 1,0 e 10,5 Hz do H-7 sugerem um acoplamento com o hidrogênio da hidroxila (-OH) e um ângulo de ligação de aproximadamente 180° entre H-7 e H-8. Para o H-21, as constantes de acoplamento de 2,5 e 3,0 Hz sugerem um acoplamento em “*w*” com H-8 e um ângulo de ligação próximo de 90° com H-20, respectivamente⁶⁸.

Os sinais em δ_H 2,62 (*m*) e δ_H 2,73 (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios benzílicos H-10a e H-10b. As correlações a longa distância (gHMBC) com C-1', C-2' e C-3 e correlações apresentadas em gCOSY com H-3, confirmaram a posição destes hidrogênios ligados ao anel lactâmico (Figura 64, pág. 124).

Os hidrogênios observados em δ_H 5,01 (s) e δ_H 5,22 (s) foram atribuídos a um metileno terminal. A análise do espectro de gHMBC mostrou as correlações a longa distância H-11 $\leftrightarrow$ C-6, H-5 $\leftrightarrow$ C-6, H-5 $\leftrightarrow$ C-12 e H-12a/H-12b $\leftrightarrow$ C-5 e C-7, permitindo fixar a posição desta ligação dupla em $\Delta^{6,12}$ (Figura 64, pág. 124).

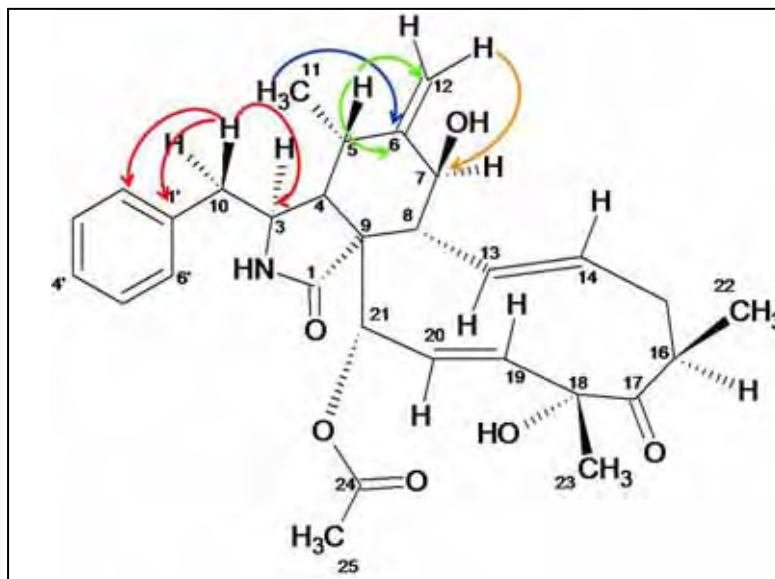


Figura 64 – Dados de gHMBC dos hidrogênios benzílicos e da dupla terminal

Análise dos dados espectrométricos e comparação com a literatura^{51,64} permitiu identificar a substância **08** como Citocalasina D. A configuração relativa foi determinada por comparação dos deslocamentos em RMN de ^1H e ^{13}C e constantes de acoplamentos com dados da literatura^{53,28,51}.

A citocalasina do tipo D foi descrita na literatura como metabólito do fungo endofítico *Xylaria* sp. apresentando forte atividade anticancerígena e antifúngica⁵³.

Tabela 22 – Dados de RMN 1D e 2D da Substância **08** em CDCl₃^a

	H _δ (<i>m</i> , J _{Hz})	C _δ (gHMQC)	gHMBC (δ)	gCOSY
1	C=O	174,0	-	-
2	5,74 (<i>sl</i>)	NH	50,0; 53,4; 174,0	NO
3	3,17 (<i>ddd</i> ; 4,0; 4,5; 8,5)	53,6	32,6; 50,0; 137,2; 174,0	2,62; 2,08
4	2,08 (<i>dd</i> ; 3,5; 4,5)	50,0	32,6; 45,2; 53,6; 147,6; 174,0	2,64; 3,17
5	2,64 (<i>m</i>)	32,6	13,6; 114,4; 147,6	0,85
6	C ₀	147,6	-	-
7	3,74 (<i>dd</i> ; 1,0; 10,5)	69,8	32,6; 114,4; 130,6	2,77
8	2,77 (<i>dd</i> ; 10,0; 10,5)	47,0	53,4; 50,0; 69,8; 77,7; 147,6; 174,0	3,74; 5,60
9	C ₀	53,4	-	-
10a	2,62 (<i>m</i>)	45,2	50,0; 53,6; 129,1; 137,2	2,73; 3,17
10b	2,73 (<i>m</i>)		50,0; 53,6; 129,1; 137,2	2,62; 3,17
11	0,85 (<i>d</i> ; 7,0)	13,6	32,6; 50,0; 147,6	2,64
12a	5,01 (<i>sl</i>)	114,4	32,6; 69,8; 147,6	2,64; 3,74
12b	5,22 (<i>sl</i>)		32,6; 69,8; 147,6	2,64; 3,74; 5,60;
13	5,60 (<i>dd</i> ; 10,0; 15,5)	130,6	37,7; 47,0; 69,8	5,26; 2,77
14	5,26 (<i>ddd</i> ; 5,0; 10,5; 15,5)	134,1	37,7; 47,0	5,60; 2,44; 1,93
15a	1,93 (<i>m</i>)	37,7	19,3; 42,3; 130,6; 134,1; 210,0	2,44; 5,26
15b	2,44 (<i>ddd</i> ; 1,5; 12,5; 23,0)		42,3; 130,6; 134,1; 210,0	2,66; 1,93; 5,26
16	2,66 (<i>m</i>)	42,3	19,3; 37,7; 134,1; 210,0	2,44; 1,12
17	C=O	210,0	-	-
18	C ₀	77,1	-	-
19	5,06 (<i>dd</i> ; 2,5; 15,5)	127,6	24,1; 77,7; 132,3	5,54; 6,03
20	6,03 (<i>dd</i> ; 3,0; 15,5)	132,3	77,1; 127,6	5,54; 5,06
21	5,54 (<i>dd</i> ; 2,5; 3,0)	77,7	47,0; 53,4; 127,6; 132,3; 169,6	6,03
22	1,12 (<i>d</i> ; 6,5)	19,3	37,7; 42,3; 210,0	2,66
23	1,43 (<i>s</i>)	24,1	127,6; 210,0	NO
24	C=O	169,6	-	-
25	2,19 (<i>s</i>)	20,8	77,7; 169,6	NO
1'	C ₀	137,2	-	-
2'e 6'	7,06 (<i>m</i>)	129,1	127,6; 128,9; 45,2	7,24
3'e 5'	7,24 (<i>m</i>)	128,9	129,1; 137,2	7,06
4'	7,17 (<i>m</i>)	127,4	128,9; 137,2	NO

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

V.4.2 Xantona – Características Gerais

Xantonas são metabólitos secundários que comumente ocorrem em algumas famílias de plantas superiores, fungos e líquens. Seu elevado valor taxonômico nestas famílias e suas propriedades farmacológicas tem provocado grande interesse⁶⁹.

A xantona, ou 9H-xanten-9-ona, é estruturalmente formada por dois anéis benzênicos (A e B) e uma γ -pirona central (C), conferindo um arranjo simétrico a este tipo de composto⁷⁰ (Figura 66, pág. 127).

São relatados cerca de mil metabólitos naturais desta classe, com diferentes tipos de substituintes em diferentes posições, levando a uma grande variedade de atividades biológicas⁷¹. Estes compostos são classificados e subdivididos de acordo com a natureza de seus substituintes em seis grandes grupo: xantonas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas, xantonas lignoides, bisxantonas e xantonas miscelâneas⁷².

V.4.2.1 Determinação Estrutural da Substâncias 09

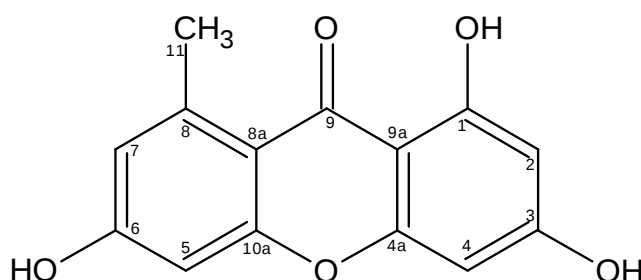


Figura 65 – Estrutura da 1,3,6-Triidroxi-8-metilxantona (fusaridina – Sub. **09**)

A substância foi isolada como um sólido amorfo marrom, e submetida à análise por RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, e espectrometria de massas de alta resolução.

O espectro de massas obtido por EM-IES (-) (Anexo 80, pág. 229), apresentou o sinal de m/z 257,0455 (100 %) indicando a molécula desprotonada $[\text{M-H}]^-$. A massa para $[\text{M}]^-$ foi calculada como 258,2262 DA, confirmando assim a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

Os espectros de RMN de ^1H (Anexo 81, pág. 230) evidenciaram sinais de 4 hidrogênios aromáticos, uma metila em δ_{H} 2,72 (s), e um sinal de hidrogênio em δ_{H} 13,38

(s). Estes dados, juntamente com os sinais de RMN de ^{13}C (Anexo 82, pág. 231) em δ_{C} 181,4, característico de carbonila de xantonas e sinais de carbonos aromáticos sugeriram a estrutura de uma xantona (Figura 66).

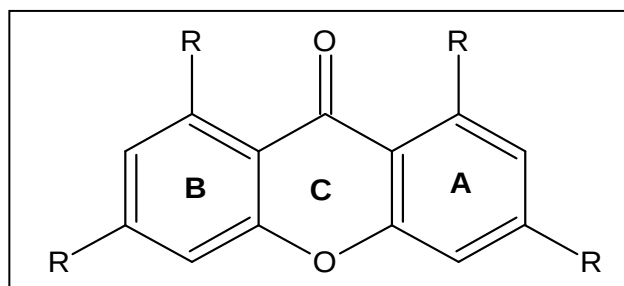


Figura 66– Estrutura geral de uma xantona

Com os dados de gHMBC, gHMQC e gCOSY (Tabela 23, pág. 129, Anexos 83 e 84, pág. 232), juntamente com as constantes de acoplamentos dos hidrogênios, foi possível determinar as substituições dos anéis aromáticos e atribuir os valores aos seus respectivos carbonos e hidrogênios.

Os sinais de hidrogênios em δ_{H} 6,11 (d ; 2,0Hz; H-2; δ_{C} 97,8) e δ_{H} 6,26 (d ; 2,0Hz; H-4; δ_{C} 93,2) foram atribuídos a dois hidrogênios acoplados em posição *meta* correlacionando-se por gHMBC com os carbonos em δ_{C} 163,0 (C-1) e δ_{C} 164,7 (C-3) (Figura 67, pág. 128) evidenciaram um anel aromático di-hidroxilado.

O sinal em δ_{C} 102,1 foi atribuído ao C-9a pela da correlação por gHMBC observada com os hidrogênios em δ_{H} 6,11 (H-2) e δ_{H} 6,26 (H-4) (Figura 67). Estes mesmos hidrogênios correlacionando-se com o sinal em δ 156,5 permitiram fixar a posição 4a para este carbono.

O sinal em δ_{H} 13,4, característico de um hidrogênio de hidroxila com interações intramoleculares com a carbonila, foi atribuído à hidroxila na posição 1 pelas correlações observadas em gHMBC com os carbonos em δ_{C} 163,0 (C-1) e δ_{C} 97,2 (C-2) (Figura 67, pág. 128).

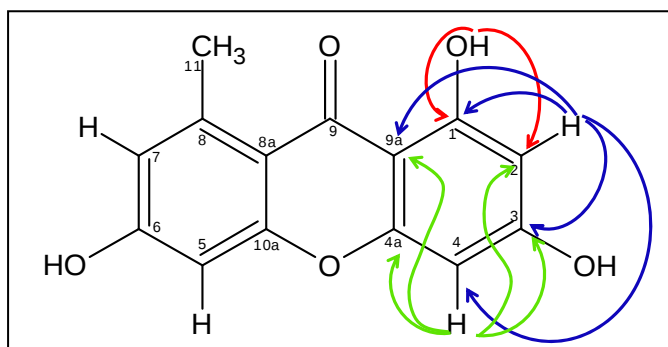


Figura 67 – Correlações em gHMBC observadas para a Subst. **09** (Anel A)

Os sinais de hidrogênios em δ_H 6,64 (*d*; 2,5Hz) e δ_H 6,63 (*m*), evidenciando acoplamento em *meta*, entre si e, correlacionando-se por gHMQC (Tabela 23, pág. 129 Anexo 83, pág. 232) com os carbonos δ_C 116,1 e δ_C 100,5, respectivamente, foram fixados às posições 7 e 5. As correlações destes hidrogênios em gHMBC (Figura 68, pág. 128; Tabela 23, pág. 129) permitiram determinar as posições dos carbonos em C-8a (δ_C 110,8); C-10a (δ_C 162,0); C-6 (δ_C 158,8) e C-8 (δ_C 142,8).

A metila foi determinada como substituinte no carbono da posição 8 devido as correlações observadas por gHMBC, do sinal do hidrogênio em δ_H 2,72 (*s*) com os carbonos δ_C 110,8; δ_C 116,1 e δ_C 142,8 (Figura 68). O carbono em δ_C 158,8 (C-6) foi atribuído como sendo um carbono hidroxilado.

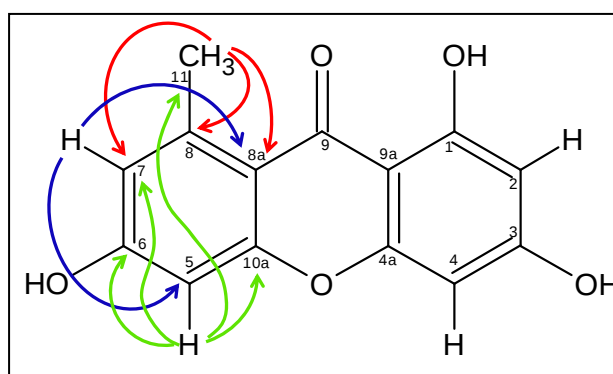


Figura 68 – Correlações em gHMBC observadas para a Subst. **09** (Anel B)

Tabela 23 – Dados de RMN 1D e 2D da Substância **09** em DMSO-d₆^a

	H δ (<i>m</i> , <i>J</i> _{Hz})	C δ (<i>g</i> HMQC)	<i>g</i> HMBC (δ)	<i>g</i> COSY
1	C ₀	163,0	-	-
2	6,11 (<i>d</i> ; 2,0 Hz)	97,8	164,7; 163,0; 102,1; 93,2	6,26
3	C ₀	164,7	-	-
4	6,26 (<i>d</i> ; 2,0 Hz)	93,2	97,8; 102,1; 156,5; 164,7	6,11
4a	C ₀	156,5	-	-
5	6,64 (<i>d</i> ; 2,5 Hz)	100,5	22,9; 116,1; 158,8; 162,8	-
6	C ₀	158,8	-	-
7	6,63 (<i>m</i>)	116,1	110,5; 110,8	-
8	C ₀	142,8	-	-
8a	C ₀	110,8	-	-
9	C(=O)	181,4	-	-
9a	C ₀	102,1	-	-
10	C ₀	162,8	-	-
11	2,72 (<i>s</i>)	22,9	142,8; 116,1; 110,8	-
OH	13,4 (<i>s</i>)	-	97,8; 100,5; 163,0	-

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

A substância foi identificada como sendo 1,3,6-triidroxi-8-metilxantona (fusaridina), que é classificada como uma xantona simples⁷² e tem sido isolada tanto de plantas quanto de fungos, como por exemplo alguns fungos do gênero *Penicillium*^{70,73}. Sendo relatadas atividade antibiótica, contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*⁷³ e antimalárica⁷⁴.

V.4.3 Isocumarinas – Características Gerais

Isocumarinas são benzopironas que ocorrem em uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias, fungos e líquens⁷⁵. Esta classe de substâncias apresenta diversas atividades biológicas, como inibidores de proteases, antimicrobiana, antialérgica, antimalárica⁷⁶ e reguladores de crescimento⁷⁷.

Estudos comprovam que algumas isocumarinas como a meleína, são precursores para diversos derivados, que apresentam atividades antifúngica, antimicrobiana e inseticida⁷⁸.

V.4.3.1 Determinação Estrutural da Substância **15**

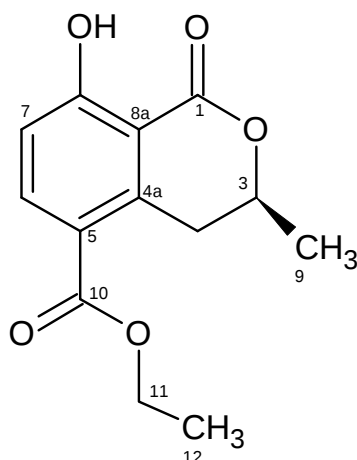


Figura 69 – Estrutura molecular da (3*S*)-5-carboetoxi-meleína (substância **15**)

A substância **15** foi isolada como sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25} +1,00$ (c 0,04; MeOH), e submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

O espectro de massas obtidos por EM-IES (+) (Anexo 106, pág. 250) apresentou o sinal de m/z 249,0768 (100%), indicando a molécula desprotonada $[\text{M}-\text{H}]^-$. A massa para $[\text{M}]^-$ foi calculada como 250,2473 DA, o que associado aos dados de RMN de ^{13}C sugeriu a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$.

A pequena quantidade de massa da substância impossibilitou a obtenção dos dados de RMN de ^{13}C , deste modo, estes foram obtidos com base nos experimentos de $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ (Anexos 108 e 109, pág. 252; Tabela 24, pág. 133). Foram visualizados seis carbonos aromáticos, dois carbonos metilênicos (um carbinólico e outro benzílico), um metínico carbinólico e duas metilas, além de sinais em δ_{C} 170,1; δ_{C} 165,7, característicos de carbonilas de éster.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 107, pág. 251) foram observados, na região dos aromáticos, a presença de dois sinais em δ_{H} 6,86 (d ; 9,0 Hz, 1H; δ_{C} 116,2) e δ_{H} 8,06 (d ; 9,0 Hz; 1H; δ_{C} 138,4), característicos de hidrogênios acoplados em posição *orto* e um singlete em δ_{H} 11,74 (s , 1H), atribuído a hidrogênio de hidroxila com interação intramolecular com carbonila.

No experimento de gHMBC (Anexo 109, pág. 252) foram observadas correlações entre uma hidroxila fenólica com os carbonos em δ_C 108,9, δ_C 116,2 e δ_C 165,4 (Figura 70, pág. 131), o que permitiu posicionar a hidroxila no anel aromático em C-8, (δ_C 165,4), β a uma carbonila.

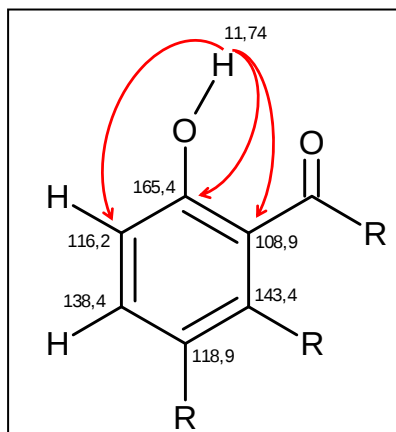


Figura 70 – Correlações em gHMBC observadas para o hidrogênio δ_H 11,74

No espectro de RMN de 1H , foram observados ainda, sinais em δ_H 2,98 (*dd*; 12,0; 17,5 Hz; δ_C 32,6) e δ_H 3,82 (*dd*; 3,0; 17,5 Hz; δ_C 32,6) atribuídos a hidrogênios diastereotópicos benzílicos, um multipletto em δ_H 4,59 (*m*; δ_C 75,6) e um dubleto em δ_H 1,49 (*d*; 6,5 Hz; δ_C 20,8) atribuídos a hidrogênio carbinólico metínico e uma metila, respectivamente.

As atribuições de todos os hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbono, foram realizadas após análise em gHSQC (Anexo 108, pág. 252, Tabela 24, pág. 133). Estes dados, adicionados aos observados em gHMBC e gCOSY (Anexos 109 e 110) permitiram sugerir o esqueleto básico de uma isocumarina (Figura 71, pág. 131).

A correlação observada em gHMBC entre δ_H 6,86 (H-7) $\leftrightarrow$ δ_C 170,1 nos permitiu posicionar a carbonila em C-1.

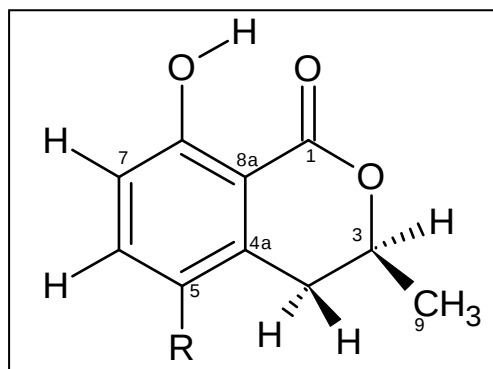


Figura 71 – Esqueleto básico da substância 15

O substituinte em C-5 foi definido como um éster etílico, tendo como base os dados de RMN de ^1H onde foram visualizados um tripleto em δ_{H} 1,32 (*t*; 7,0 Hz; 3H; δ_{C} 14,3; C-10) e um quarteto em δ_{H} 4,27 (*q*; 7,0 Hz; 2H; δ_{C} 61,0; C-11), evidenciando um radical etil. A correlação a longa distância (gHMBC) de H-11 com δ_{C} 165,7 (C-10) e com δ_{C} 14,3 (C-12) corroborou para a presença de um éster etílico.

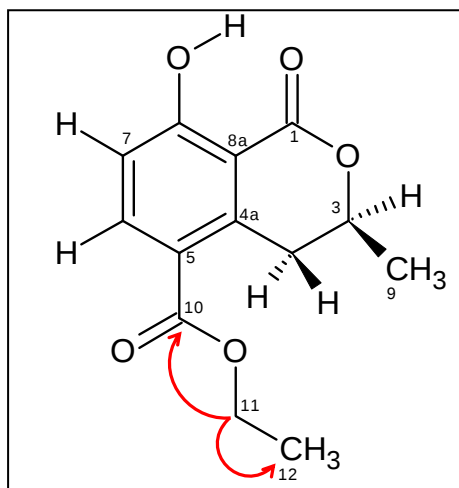


Figura 72 – Correlações observadas em gHMBC do H-11

Pelas multiplicidades dos hidrogênios aromáticos, o posicionamento de $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ poderia ser em C-5 ou C-7, no entanto os valores de deslocamento químico dos carbonos 6 e 5 não seriam compatíveis com os encontrados na literatura no caso do éster estar em C-7.⁴⁵

A estereoquímica em C-3 foi definida pela comparação dos dados de rotação óptica de **15** $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 1,0$ (*c* 0,04; MeOH) $\}$ com os dados da literatura dos análogos (3*R*)-5-carbometóxi-melleína $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} -151$ (*c* 1, CHCl_3) $\}$ ⁷⁹ e (*S*)-(+)-meleína $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} +88,6$ (*c* 0,27, MeOH) $\}$ ⁸⁰. Estes dados e a comparação dos dados de RMN 1D e 2D permitiram identificar a substância como (3*S*)-5-carboetoxi-meleína (5-carboetoxi-3,4-diidro-8-hidroxi-(3*S*)-metilisocumarina) **15**.

Levantamento realizado no SciFinder e Dictionary of Natural Product indicou tratar-se de uma substância inédita.

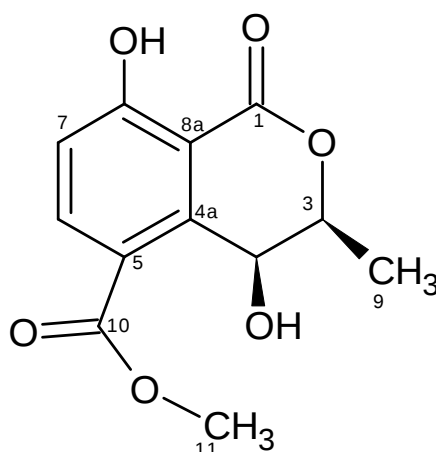
Tabela 24 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **15** em CDCl_3 ^a

	$H \delta (m, J_{Hz})$	$gHMQC$ (δ)	$gHMBC (\delta)$	$gCOSY$
1	C=O	170,1	-	-
3	4,59 (<i>m</i>)	75,6	NO	2,98; 1,49
4_a	3,82 (<i>dd</i> ; 3,0; 17,5)	32,6	108,8; 118,9; 143,4	2,98; 4,59
4_b	2,98 (<i>dd</i> ; 12,0; 17,5)		20,8; 75,6; 118,9; 143,6; 108,8	3,82; 4,59
4a	C ₄	143,4	-	-
5	C ₄	118,9	-	-
6	8,06 (<i>d</i> ; 9,0)	138,4	165,4; 143,4; 108,8	6,86
7	6,86 (<i>d</i> ; 9,0)	116,2	170,1; 165,4; 118,9; 108,8	8,06
8	C ₄	165,4	-	-
8a	C ₄	108,9	-	-
9	1,49 (<i>d</i> ; 6,3)	20,8	75,6; 32,6	4,59
10	C=O	165,7	-	-
11	4,27 (<i>q</i> ; 7,0)	61,0	165,7; 14,3	1,32
12	1,32 (<i>t</i> ; 7,0)	14,3	61,0	4,27
8-OH	11,74 (<i>s</i>)	-	165,4; 116,2; 108,8	NO

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO= Correlações não observadas

V.4.3.2 Determinação Estrutural da Substâncias **11**

**Figura 73** – Estrutura da (3*S*, 4*S*)-5-carbometoxi-4-hidroximeleína

A substância foi isolada como sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25} +59,29^\circ$ (0,1; MeOH), e submetida a espectrometria de massas de alta resolução, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

O espectro de massas obtido por EM-ESI (-) (Anexo 91, pág. 237), apresentou o sinal de m/z 251,0562 (100%), indicando a molécula desprotonada $[\text{M}-\text{H}]^-$. A massa para $[\text{M}]^-$ foi calculada como 252,2201 DA o que associado aos dados de RMN de ^{13}C permitiu sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6$.

A pequena quantidade de massa da substância impossibilitou a obtenção dos dados de RMN de ^{13}C , deste modo, estes foram obtidos com base nos experimentos de $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ (Anexo 93 e 94; pág. 239; Tabela 25, pág. 136).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D de **11** (Anexo 92, pág. 238) evidenciaram um perfil espectroscópico muito parecido com os da substância **15**, diferindo nos pontos mostrados a seguir:

- O espectro de RMN de ^1H (Anexo 92) evidenciou a ausência dos hidrogênios metilênicos benzílicos e a presença de um hidrogênio metínico oxibenzílico em δ_{H} 3,84 (sl);
- Os dados de hidrogênio e carbono evidenciaram também a ausência dos sinais característicos de éster etílico e o aparecimento de um éster metílico.

Pela análise detalhada do $g\text{COSY}$ (Anexo 95, pág. 240) foi visualizada correlação de $\text{H}-4 \leftrightarrow \text{H}-3 \leftrightarrow \text{H}-9$, corroborando para a suposição de oxidação do carbono benzílico, o que também foi confirmado pela correlação observada em HMQC de $\text{H}-3 \leftrightarrow \delta_{\text{C}}$ 65,3. As correlações observadas em $g\text{HMBC}$ (Anexo 94, pág. 239) entre δ_{H} 5,03 $\leftrightarrow$ δ_{C} 107,8 (C-8a)/ δ_{C} 120,0 (C-5), δ_{H} 4,98 (H-3) $\leftrightarrow$ δ_{C} 65,3 e δ_{H} 1,29 (H-9) $\leftrightarrow$ δ_{C} 65,3, nos permitiram inequivocamente posicionar a hidroxila em C-4. (Figura 74, pág. 135).

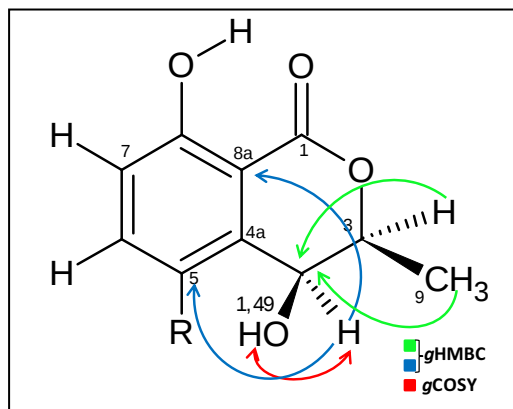


Figura 74 – Correlações de gHMBC e gCOSY observadas para a substância **11**

A função éster metílico foi posicionada em C-5 pelo mesmo motivo discutido para a substância **15**.

A estereoquímica relativa de **11** foi definida com base nas constantes de acoplamento entre H-3 e H-4 de 1,9 Hz, colocando-os em uma posição axial/equatorial (Tabela 25, pág. 136) e a configuração absoluta foi determinada por comparação com os dados de rotação óptica de **11** com a (3*R*,4*R*)-4,7-diidroximeleina, um $[\alpha]_D^{25} - 70,5$ (*c* 0.13, MeOH)⁴⁵.

A substância foi determinada como sendo a (3*S*,4*S*)-5-carbometoxi-4-hidroximeleína, e o levantamento bibliográfico realizado no SciFinder e Dictionary of Natural Products indicou tratar-se de uma substância inédita.

Análogos da substância **11**, como 4-hidroximeleína apresentam forte atividade antifúngica contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e moderada inibição da enzima acetilcolina (AChE)⁴⁵.

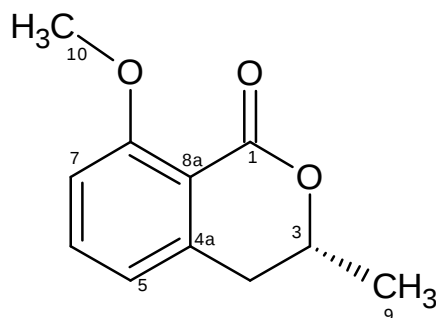
Tabela 25 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **11** em CDCl₃^a

	H δ (<i>m</i> , J _{Hz})	C δ (<i>g</i> HMQC)	<i>g</i> HMBC (δ)	<i>g</i> COSY
1	C=O	168,3	-	-
3	4,98 (<i>qd</i> ; 1,9; 7,0)	79,7	65,3; 18,9; 142,3; 168,3	1,29
4	5,03 (<i>d</i> ; 1,9)	65,3	120,0; 107,8	3,84
4a	C ₀	142,3	-	-
5	C ₀	120,0	-	-
6	8,06 (<i>d</i> ; 9,0)	138,6	142,3; 165,7	6,99
7	6,99 (<i>d</i> ; 9,0)	118,2	107,8; 120,0; 165,7	8,06
8	C ₀	165,7	-	-
8a	C ₀	107,8	-	-
9	1,29 (<i>d</i> ; 7,0)	18,9	79,7; 65,3	4,98
10	C=O	167,3	-	-
11	3,87 (<i>s</i>)	53,0	167,5	NO
8-OH	11,91 (<i>s</i>)	-	165,7; 118,2; 107,8	NO
4-OH	3,84 (<i>sl</i>)	-	79,7; 65,3	5,03

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO = Correlações não observadas

V.4.3.3 Determinação Estrutural da Substância **10**

**Figura 75** – Estrutura da (*R*)-8-metoxi-meleina

A substância **10** foi isolada como sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25}$ -12.57° (*c* 0,1; MeOH) e submetida a espectrometria de massas de alta resolução, RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais.

O espectro de massas obtido por EM-IES (+) (Anexo 85, pág. 233) apresentou o sinal de *m/z* 215,0676 (100%), indicando a formação do aduto [M+Na]⁺, além dos sinais de *m/z* 193,0859 (78,6%) e *m/z* 231,0444 (5,52%) indicando a molécula protonada

$[M+H]^+$ e a formação do aduto $[M+K]$. A massa para $[M]^+$ foi calculada como 192,2112 DA, o que associado aos dados de RMN de 1H e ^{13}C confirmou a fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_3$.

Estas informações aliadas aos dados de RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais, evidenciaram tratar-se de uma isocumarina assim como **15**, sendo que as diferenças observadas foram o padrão de substituição aromático no espectro de RMN de 1H (Anexo 86, pág. 234) que apresentou sinais em δ_H 6,72 (1H, *d*; 8,0 Hz), δ_H 6,85 (1H; *d*; 8,0 Hz) e em δ_H 7,38 (1H; *dd*; 8,0; 8,0 Hz) indicando um sistema aromático trissubstituído com hidrogênios acoplados em posição *orto/meta*, atribuídos às posições 7, 5 e 6 respectivamente.

Para esta substância, foi observado também, um singlete (3H) em δ 3,88 e correlação em gHSQC (Anexo 87, pág. 235) com o carbono δ_C 56,0 (C-10), atribuído a uma metoxila aromática. A correlação observada em gHMBC (Anexo 88, pág. 235) entre H-10 e δ_C 160,8 (C-8) confirmou a posição da metoxila. As correlações observadas no experimento de gHMBC de H-5 com δ_C 113,4 (C-8a) e δ_C 119,1 (C-7), de H-6 com δ_C 141,7 (C-4a) e δ_C 160,8 (C-8) e H-7 com δ_C 113,4 (C-8a) e δ_C 110,8 (C-5), permitiram atribuir os carbonos aromáticos em suas respectivas posições (Tabela 26, pág. 138).

No espectro de RMN de 1H , foram observados ainda, sinais em δ_H 2,78 (*dd*; 2,5; 15,5 Hz; δ_C 36,2) e δ_H 2,84 (*m*; δ_C 36,2), atribuídos aos hidrogênios H-4_a e H-4_b, além de um multiplete em δ_H 4,47 (*m*, δ_C 74,1, 1H) característico de hidrogênio carbinólico que foi conferido à posição 3, e um dubleto em δ_H 1,41 (*d*; 6,0Hz; 3H; δ_C 20,7) que foi atribuído a uma metila em C-3.

Estes dados permitiram identificar a substância como a 8-metoxi meleína⁸⁰ com fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_3$. A comparação dos dados de rotação óptica de **10** $\{[\alpha]^{25}_D - 12.5714$ (0,1; MeOH) $\}$ com dados de (*R*)-8-*O*-metilmeleína $\{[\alpha]^{25}_D - 259,0$ (*c* 0,50, $CHCl_3$) $\}$ e da (*S*)-(+)-meleína $\{[\alpha]^{25}_D + 88,6$ (*c* 0,27, MeOH) $\}$ encontrados na literatura⁸⁰, nos permitiram determinar a substância como sendo (*R*)-8-metoxi-meleína.

Esta substância foi relatada como um produto natural isolado do fitopatógeno *Septoria nodorum*⁸⁰ e mais recentemente foi isolada do fungo endofítico *Penicillium* sp., isolado de *Alibertia macrophylla* apresentando atividade antifúngica contra s fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*⁴⁵.

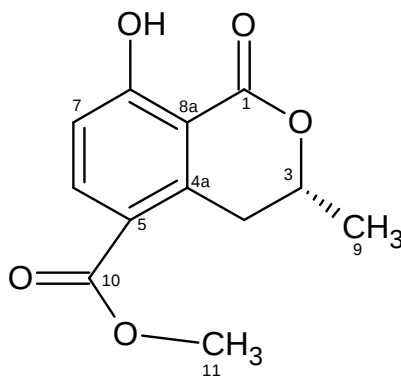
Tabela 26 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **10** em CDCl₃^a

	H δ (<i>m</i> , J _{Hz})	H δ (gHMQC)	gHMBC (δ)	gCOSY
1	C=O	NO	-	-
3	4,47 (<i>m</i>)	74,1	NO	2,84; 1,41
4α	2,78 (<i>dd</i> ; 2,5; 15,5)	36,2	141,7; 113,4; 20,7	NO
4β	2,84 (<i>m</i>)		141,7; 74,1	4,47
4a	C ₀	141,7	-	-
5	6,72 (<i>d</i> ; 8,0)	119,1	113,4; 110,8; 36,2	7,38
6	7,38 (<i>dd</i> ; 8,0; 8,0)	134,4	160,8; 14,7	6,85; 6,72
7	6,85 (<i>d</i> ; 8,0)	110,8	119,1; 113,4	7,38
8	C ₀	160,8	-	-
8a	C ₀	113,4	-	-
9	1,41 (<i>d</i> ; 6,0)	20,7	74,1; 36,2	4,47
10	3,88 (<i>s</i>)	56,0	160,8	NO

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO= Correlações não observadas

V.4.3.4 Determinação Estrutural da Substâncias **14**

**Figura 76** – Estrutura da (3*R*)-5-carbometoimeleina

Os dados espectrométricos obtidos para a substância **14** mostraram-se muito parecidos com os da substância **15**, sendo que a única diferença observada foi um éster metílico ao invés de éster etílico em C-5.

A substância foi isolada como sólido amorfo branco, $[\alpha]_D^{25}$ -16,00° (*c* 0,03; MeOH) e o espectro de massas obtido por EM-IES (-) (Anexo 101, pág. 246) apresentou o sinal de *m/z* 235,0611 (100%), indicando a molécula desprotonada $[M-H]^-$. Estes dados aliados à massa calculada para $[M]^-$ como 236,2207 DA, e os dados de RMN de ¹³C,

permitiram sugerir a fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_5$, corroborando para a presença de uma isocumarina.

Análise detalhada dos experimentos de gHMBC (Anexo 104, pág. 248) evidenciaram a presença de uma carbonila em δ_C 165,5, correlacionando-se a longa distância (J^3) com uma metila em δ_H 3,80 (s; δ_C 51,3), confirmando novamente a presença de um éster metílico em C-5.

Os dados obtidos nos experimentos de RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais (Tabela 27, pág. 139), associados com os da literatura⁷⁹ permitiram identificar a substância como sendo a 5-carbometoxi-meleina (5-carbometoxi-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina).

A estereoquímica de C-3 foi determinada por comparação com os dados de rotação óptica obtidos da literatura para a (3*R*)-5-carbometoximeleina $\{[\alpha]^{25}_D -151$ (c 1,0; $CHCl_3$)⁷⁹, estabelecendo assim a substância como sendo (3*R*)-5-carbometoximeleina.

Tabela 27 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **14** em $CDCl_3$ ^a

	H_δ (<i>m</i> , J_{Hz})	C_δ (gHMQC)	gHMBC (δ)	gCOSY
1	C=O	NO	-	-
3	4,60 (<i>m</i>)	75,1	NO	3,80; 2,98; 1,49
4_a	2,98 (<i>dd</i> ; 12,0; 18,0)	31,8	20,3; 75,1; 108,3; 118,0; 142,9	3,80; 4,60
4_b	3,81 (<i>dd</i> ; 3,0; 18,0)		108,3; 118,0; 142,9	4,60; 2,98
4^a	C_0	142,9	-	-
5	C_0	118,0	-	-
6	8,06 (<i>d</i> ; 9,0)	137,9	142,9; 165,0	6,87
7	6,87 (<i>d</i> ; 9,0)	115,5	108,3; 118,0; 165,0	8,06
8	C_0	165,0	-	-
8^a	C_0	108,3	-	-
9	1,49 (<i>d</i> ; 6,5)	20,1	31,8; 75,1	4,60
10	C=O	165,5	-	-
11	3,80 (<i>s</i>)	51,3	165,5	NO
8-OH	11,76 (<i>s</i>)	-	108,3; 115,5; 137,9; 165,0	NO

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

NO= Correlações não observadas

A substância **14** foi isolada como metabólito do fungo fitopatogêno *Hypoxylon mammatum*⁵³ e mais recentemente isolada de um fungo endofítico associado com *Picea glauca*, apresentando significativa toxicidade contra larvas de *Choristoneura fumiferana* (uma espécie de borboleta) e células de levedura⁷⁹.

V.4.4 Determinação Estrutural da Griseofulvina e Descloro-griseofulvina

V.4.4.1 Determinação Estrutural da Substâncias 13

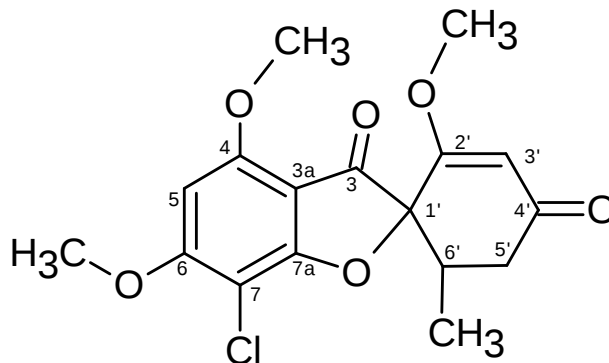


Figura 77 – Estrutura da Griseofulvina

A substância foi isolada como sólido branco, $[\alpha]_D^{25} + 15,98^\circ$ (c 0,29, MeOH), e submetida a análises por espectrometria de massas de baixa resolução e RMN de ^1H e ^{13}C . A determinação estrutural foi realizada com base nos dados obtidos nestes experimentos e comparação com os dados da literatura^{51, 81}.

O espectro de massas obtido por EM-IES (+) (Anexo 98, pág. 243) apresentou o sinal de m/z 353,0786 (100%), indicando a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$, além do sinal de m/z 375,0605 (57,7%) indicando a formação do aduto $[\text{M} + \text{Na}]^+$. A massa para $[\text{M}]^+$ foi calculada como 352,0714 DA o que, associado aos dados de RMN de ^1H e ^{13}C sugeriu a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClO}_6$.

Os espectros de RMN de ^1H (Tabela 28, pág. 141; Anexo 99, pág. 244) apresentou sinais característicos de metoxilas em δ_{H} 3,96, δ_{H} 3,91 e δ_{H} 3,55, um sinal em δ_{H} 5,47 atribuído ao hidrogênio olefínico e um sinal na região de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,06) indicando um anel aromático pentassubstituído. Foram observados ainda sinais de uma metila em δ_{H} 0,89, um hidrogênio metínico [δ_{H} 2,77 (m)] e dois hidrogênios metilênicos [δ_{H} 2,36 (dd ; 7,5; 27,0 Hz) e δ_{H} 2,96 (dd ; 22,0; 27,0 Hz)]

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 28; Anexo 100, pág. 245) foi possível observar a presença de 17 átomos de carbono, dentre estes, seis carbonos aromáticos (δ_{C} 105,2, δ_{C} 164,6, δ_{C} 89,5, δ_{C} 157,8, δ_{C} 97,3 e δ_{C} 169,6), dois carbonos sp^2 de uma enona (δ_{C} 170,8 e δ_{C} 104,9), duas carbonilas conjugadas (δ_{C} 192,4 e δ_{C} 197,0), três

metoxilas (δ_C 57,0, δ_C 56,4 e δ_C 56,6), uma metila em δ_C 14,2, um metino em δ_C 36,4, um carbono metilênico em δ_C 40,1 e um carbono quaternário em δ_C 90,8.

Com estes dados, juntamente com os dados de espectrometria de massas e uma detalhada comparação com a literatura⁵³, foi possível identificar a substâncias **13** como sendo Griseofulvina.

Tabela 28 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **13** em $CDCl_3$ ^a

	H δ (<i>m</i>, J_{Hz})	C(δ)
3	C=O	192,4
3a	C ₀	105,2
4	C ₀	164,6
5	6,06 (<i>s</i>)	89,5
6	C ₀	157,8
7	C ₀	97,3
7a	C ₀	169,6
1'	C ₀	90,8
2'	C ₀	170,8
3'	5,47 (<i>s</i>)	104,9
4'	C=O	197,0
5'	2,36 (<i>dd</i> ; 7,5; 27,0) 2,96 (<i>dd</i> ; 22,0; 27,0)	40,1
6'	2,77 (<i>m</i>)	36,4
4-OCH₃	3,96 (<i>s</i>)	57,0
6-OCH₃	3,91 (<i>s</i>)	56,4
6'-CH₃	0,89 (<i>d</i> ; 11,5)	14,2
2'-OCH₃	3,55 (<i>s</i>)	56,6

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

A griseofulvina é um metabólito produzido por várias espécies de fungos e é utilizada como um poderoso antifúngico na medicina, em animais domésticos e como fungicida utilizado na agricultura⁸². É empregada comercialmente nos medicamentos Fulcin® (Zeneca) e Sporostatin® (Shering Plough) e o seu mecanismo de ação acontece pela inibição da mitose celular fúngica, impedindo a divisão celular. Este agente fungicida apresenta atividade *in vitro* contra várias espécie de *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*⁸³.

V.4.4.2 Determinação Estrutural da Substâncias 12

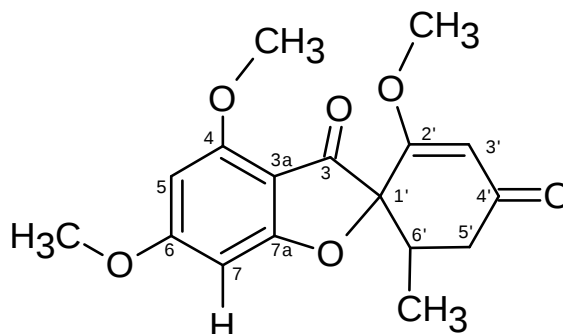


Figura 78 – Estrutura da Descloro-griseofulvina

A substância foi isolada como sólido branco $[\alpha]_D^{25} 14,4^\circ$ (c 0,11, MeOH) e submetida espectrometria de massas de baixa resolução e RMN de ^1H . A determinação estrutural foi realizada com base nos dados obtidos nestes experimentos e comparação com os dados da literatura⁵³.

O espectro de massas obtido por EM-IES (+) (Anexo 96, pág. 241) apresentou o sinal de m/z 319,1176 (100%), indicando a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$, além do sinal de m/z 341,0995 (74,0%) indicando a formação do aduto $[\text{M} + \text{Na}]^+$. A massa para $[\text{M}]^+$ foi calculada como 318,1103 DA e estes dados, associado aos dados de RMN sugeriram a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 29, pág. 143, Anexo 97, pág. 242) apresentou um perfil semelhante ao da substância **13** (griseofulvina), tendo com principal diferença os sinais na região dos hidrogênios aromáticos: foram identificados dois sinais em δ_{H} 6,16 (s; H-5) e δ_{H} 5,98 (s; H-7), indicando um padrão de substituição *meta*, em um anel aromático tetrassubstituído.

Foram ainda observados outros sinais referentes aos demais hidrogênios: um singleto em δ_{H} 5,47 indicando a presença de um hidrogênio oleofínico; três singletos em δ_{H} 3,55, δ_{H} 3,84 e δ_{H} 3,83 característico de metoxilas, sendo duas aromáticas e uma sobre sistema insaturado; um dubleto em δ_{H} 0,90 (11,0 Hz) e um mutipletto em δ_{H} 2,68 que foram atribuídos à metila e ao hidrogênio metínico na posição 6', respectivamente.

Estes dados amparados pelos descritos na literatura^{53,81,84} evidenciaram a substância como 7-desclorogriseofulvina. Por tratar-se de uma substância com dados estruturais completos descritos na literatura, os espectros de RMN de ^{13}C e outros experimentos bidimensionais não foram realizados.

Tabela 29 – Dados de RMN 1D e 2D da substância **12** em CDCl₃^a

	H δ (m, J_{Hz})	¹H δ (m, J_{Hz}) CAFEU et al, 2005	¹³C(δ) CAFEU et al, 2005
3	C=O	-	192,4
3a	C ₄	-	104,4
4	C ₄	-	159,1
5	6,16 (s)	6,15 (d; 1,5)	88,6
6	C ₄	-	170,4
7	5,98 (s)	5,97 (d; 1,5)	93,3
7a	C ₄	-	176,1
1'	C ₄	-	89,9
2'	C ₄	-	171,3
3'	5,47 (s)	5,47 (s)	104,8
4'	C=O	-	107,3
5'	2,33 (dd; 7,0; 27,0) 3,00 (dd; 22,5; 27,0)	2,33 (dd; 5,0; 17,0) 2,99 (dd; 13,0; 27,0)	40,1
6'	2,68 (m)	2,68 (m)	36,6
4-OCH₃	3,84 (s)	3,83 (s)	56,1
6-OCH₃	3,83 (s)	3,82 (s)	56,1
6'-CH₃	0,90 (d; 11, 0)	0,89 (d; 6,5)	14,2
2'-OCH₃	3,55 (s)	3,55 (s)	56,6

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

A griseofulvina é produzida por vários fungos como *Penicillium griseofulvum*, *P. janczewskii*⁸⁴, *P. patulum*, enquanto que o seu derivado 7-desclorogriseofulvina já foi produzido por *P. griseofulvum*, *P. janczewskii*, *Coriolus vernicipes*, *Aspergillus versicolor*⁸⁵.

Ambas as substâncias (griseofulvina e 7-desclorogriseofulvina) foram isoladas como metabólitos secundários de *Xylaria* sp., um fungo endofítico associado a *Pauliurea marcgravi*⁵³.

V.5 Ensaios Biológicos das Substâncias Isoladas de *Acremonium* sp.

✓ Ensaio Preliminar para Avaliação das Atividades Antifúngicas e Anticolinesterásicas das Substâncias Isoladas

Por apresentar maior quantidade de massa, a substância **08** foi submetida aos ensaios qualitativos da atividade antifúngica e anticolinesterásica [Tópico VII. 2.3.4, pág.

166. Na avaliação da atividade anticolinesterásica a amostra foi analisada na concentração de 50µg, e para os ensaios antifúngico na concentração de 400 µg .

Os resultados mostraram uma forte atividade desta substâncias para o ensaio anticolinesterásico e não apresentou atividade antifúngica frente os micro-organismos testados, embora seja descrita na literatura com esta atividade (Figura 79, pág. 144).

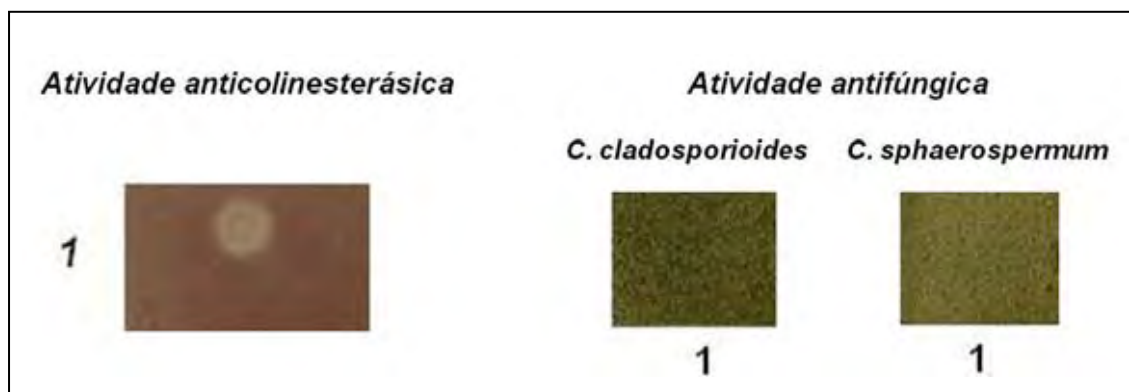


Figura 79 – Ensaio qualitativos das atividades antifúngicas e anticolinesterásica da substância **08**

Posteriormente, todas as substâncias isoladas foram submetidas aos mesmos ensaios qualitativos da atividade antifúngica e anticolinesterásica. Para estes ensaios foram aplicadas 100 µg de cada substância em placas cromatográficas que foram então submetidas aos mesmos procedimentos citados no Tópico VII.2.1.5 (pág. 157).

Os resultados estão apresentados na Tabela 30 (pág. 145), evidenciando atividade anticolinesterásica para as substâncias **09** (1,3,6-triídrosi-8-metilxantona) e **10** (8-metoxi-meleína).

Sendo assim, foram solicitadas a análises par a determinação dos limites de detecção nos ensaios disponíveis na rede BIOprospecTA inserido no programa BIOTA-FAPESP.

Tabela 30 – Avaliação qualitativa das atividades antifúngida e anticolinesterásica das substâncias isoladas

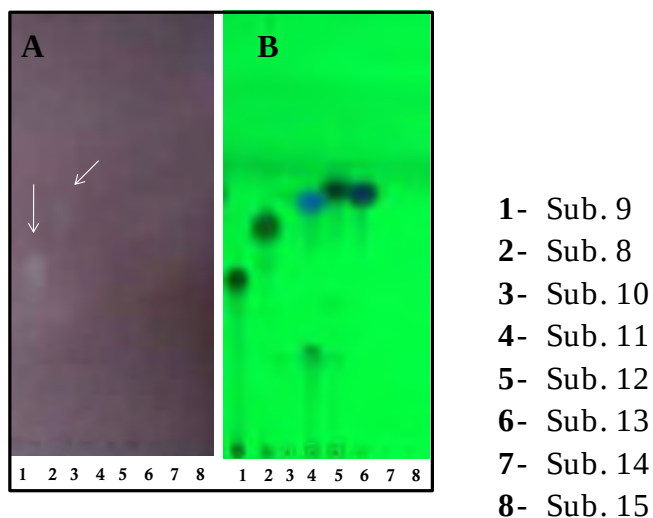
	Atividade Antifúngica		Atividade Anticolinesterásica
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
Subst. 08	-	-	-
Subst. 09	NT	-	**
Subst. 10	NT	-	**
Subst. 11	NT	-	-
Subst. 12	NT	-	-
Subst. 13	NT	-	-
Subst. 14	NT	-	NT
Subst. 15	NT	-	NT

(**) = Ativo; (-) = Inativo; (NT) = Não testado

✓ *Ensaio preliminar com DPPH para Detecção do Potencial Antioxidantes das Substâncias Isoladas*

Todas as substâncias foram submetidas ao ensaio qualitativo do potencial antioxidante, seguindo o mesmo procedimento realizado para os extratos brutos (Tópico VII.2.1.5, pág.157), e utilizando as mesmas condições estabelecidas para os extratos [Sílica de fase normal, e eluentes CHCl_3 :MeOH 9:1 V/V].

O ensaio evidenciou uma mancha clara na posição referente a substância **09** (1,3,6-triidroxi-8-metilxantona) e uma mancha levemente clara na posição referente a substância **08** (Citocalasina D), sugerindo uma possível atividade oxidante para estas duas substâncias (Figura 80, pág. 145).

**Figura 80**– Ensaio qualitativo da do potencial antioxidante das substâncias isoladas: A) revelação com DPPH; B) revelação com luz UV 254 nm

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

O trabalho de isolamento dos fungos endofíticos de folhas e caules de *Senna spectabilis* conduziu ao isolamento de 43 linhagens fúngicas, sendo 16 obtidas das folhas e 27 do caule. A avaliação prévia das características macroscópicas de cada fungo endofítico isolado possibilitou a seleção de 28 linhagens para triagem química e biológica.

A variação metabólica observada pela análise dos dados de RMN de ^1H e CLAE-DAD dos extratos brutos das linhagens cultivadas foi muito distinta, evidenciando diversas classes de metabólitos especiais. Esta observação sugere que essas espécies estejam desempenhando um possível papel ecológico de cada linhagem em associação com a espécie vegetal.

A potencialidade destes extratos frente aos ensaios anticolinesterásicos e antifúngicos contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e os resultados qualitativos do potencial antioxidante foram surpreendentes, considerando que todas as linhagens apresentaram uma ou mais substâncias com potencial atividade.

Estes resultados contribuem com os estudos de fungos endofíticos de espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica, contribuindo com mais linhagens para a micoteca.

A diferença no modo de cultivo (estático e sob agitação) para obtenção do extrato bruto de *M. gramineum* em escala ampliada, evidenciou que esta modificação não influenciou consideravelmente a produção metabólica deste micro-organismo.

O estudo do extrato bruto produzido por *M. gramineum* resultou no isolamento de 7 substâncias, sendo 3 pertencente a classe das dicetopiperazinas e 4 da classe dos tricotocenos.

As dicetopiperazinas são substâncias produzidas por várias espécies de fungos e apresentam as mais diversas atividades biológicas, como antibiótica, ansiolítica, citotóxicas entre outras, o que sugere um papel ecológico deste micro-organismo quando associado à espécie vegetal, protegendo-a de possíveis patógenos ou predadores ou ainda letal a estes. Adicionalmente, os tricotocenos isolados neste trabalho apresentam uma alta complexidade estrutural, e apesar da alta toxicidade de alguns, esta classe apresenta

atividades biológicas importantes, o que tem estimulado os estudos de relação estrutura/atividade para redução da toxicidade e potencialização das atividades biológicas.

É importante salientar que, embora algumas espécies do gênero *Mytothecium* sejam relatadas como fitopatógenos, *M. gramineum* foi isolado como fungo endofítico de folhas saudáveis de *S. spectabilis* o que sugere uma provável relação de simbiose entre estas duas espécies.

A obtenção do extrato bruto em larga escala de *Acremonium* sp. nos dois modos de cultivo evidenciou diferenças na produção metabólica e na quantidade de extrato bruto obtido, sugerindo que o modo de incubação pode influenciar a produção de algumas das substâncias produzidas por este micro-organismo.

O estudo do extrato bruto produzido por *Acremonium* sp. resultou no isolamento de 8 substâncias, sendo 1 citocalasina, 1 xantona e 4 isocumarinas, entre estas, duas inéditas [(3*S*, 4*S*)-5-carbometoxi-4-hidroximeleína (11) e (3*S*)-5-carboetoxi-meleína (15)] e a Griseofulvina (13) e desclorogriseofulvina (12).

Xantonas são substâncias isoladas de espécies de *Senna*, e o isolamento desta substância de um fungo endofítico associado a *Senna* é muito interessante, pois é o primeiro relato da co-produção de um metabólito por *Senna* e o endófito associado a esta. Esta observação é intrigante, pois xantonas são marcadores de *Senna* e não podemos, então, sugerir que as xantonas isoladas deste gênero em outros trabalhos pudessem ser produtos dos fungos associados.

Deve-se ressaltar também que todas as substâncias isoladas de *Acremonium* sp. são relatadas com atividades biológicas além de apresentarem alto valor agregado e interesse comercial, como é o caso da griseofulvina, utilizada comercialmente como um poderoso antifúngico na medicina, em animais domésticos e como fungicida para agricultura.

Estas observações são condizentes com a teoria ecológica que sugere que, micro-organismos submetidos a alto nível de “stress” ambiental ou intensas interações com outros micro-organismos apresentam alta diversidade metabólica com potencial bioatividade.

Os ensaios biológicos realizados com as substâncias isoladas, para avaliação das atividades antifúngicas, de inibição da enzima acetilcolinesterase e do potencial antioxidante evidenciaram que: Verrucarina A (**01**) e Roridina A (**05**), apresentam atividades antifúngicas frente os fungos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e anticolinesterásica; Ciclo (L-Pro-L-Leu) (**03**), Citocalasina D (**08**) e 1,3,6-triidroxi-8-metilxantona (**09**) apresentam atividade anticolinesterásica; e Ciclo (L-Pro-L-Tyr) (**02**), Citocalasina D (**08**) e 1,3,6-triidroxi-8-metilxantona (**09**) potencial atividade antioxidante.

Os resultados obtidos deste trabalho são muito encorajadores, pois reforçam o conhecimento da grande diversidade química e potencialidade biológica dos metabólitos produzidos por micro-organismos associados à espécies vegetais, e de forma particular aos endófitos associados à *S. spectabilis*.

PARTE EXPERIMENTAL

VII. MATERIAIS, INSTRUMENTOS E METODOLOGIA EXPERIMENTAL

VII.1 TÉCNICAS, MATERIAIS E INSTRUMENTOS

VII.1.1 Meios para Cultivo dos Micro-organismos

Os micro-organismos foram cultivados em meios de cultura sólidos e líquidos comerciais a temperatura controlada (25°C), utilizando, para os meios líquidos, incubadoras rotatórias dos fabricantes Marconi e Tecnal:

BDA (meio de cultivo sólido) – Batata Dextrose Agar (SIGMA): 39 g/L de água. [Fécula de batata (4 g); dextrose (20 g), agar (15 g)]

MBD (meio de cultivo líquido) – Meio de Batata Dextrose (DIFCO): 24 g/L de água. [Fécula de batata (4 g); dextrose (20 g)]

Durante o processo de isolamento dos micro-organismos foi adicionado ao meio de cultivo sólido o antibiótico Gentamicina (100 mg/mL).

VII.1.2 Esterilização dos Materiais

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave do fabricante Quimis, sendo mantidos à temperatura de 121°C por aproximadamente 20 minutos.

VII.1.3 Manipulação dos Micro-organismos

Todo o procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação dos micro-organismos foram realizados em Capela de Fluxo Laminar Pachame PA 310-Série 172-99.

VII.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas comerciais da Merck, com sílica de fase normal (sílica G TLC Plates W/UV 254, 200 µm) e sílica de fase reversa (C-18

sílica TLC Plates w/UV; 150 μm). Os solventes utilizados nos sistemas cromatográficos foram selecionados de acordo com a fase estacionária.

As revelações foram obtidas por: irradiação ultravioleta (UV 254 e 366 nm); nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento, Dragendorff ou exposição a iodo sublimado.

VII.1.5 Cromatografia em Coluna (CC)

Nas separações cromatográficas em coluna aberta ou sob pressão foram utilizadas colunas de vidro de diferentes diâmetros interno e comprimentos.

Fases estacionárias utilizadas:

- ✓ Sílica gel C-18 (tamanho da partícula: 40-63 μm ; Merck);
- ✓ Sílica gel fase normal (tamanho da partícula: 0,060–0,200 mm; diâmetro do poro 6 nm; ACROS organics)
- ✓ Sephadex LH-20 (tamanho da partícula: 18-111 μm (seca); 30-100 μm (em MeOH); Amersham Biosciences).
- ✓ Sílica flash (tamanho da partícula: 40-63 μm ; Silicycle)

VII.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as análises do perfil químico, otimização e isolamento das substâncias por CLAE foram utilizados equipamentos Varian ProStar com detectores de arranjos de diodo (DAD) e UV-Vis e Shimadzu UV-VIS (SPD-10Avp).

Colunas utilizadas:

- ✓ Analíticas:
 - Phenomenex (Luna) com sílica do tipo C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm);
 - Phenomenex (Luna) com sílica do tipo Fenil-hexil (250 x 4,6 mm, 5 μm);
 - Supelco com sílica do tipo C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm);
 - Shimadzu Fenil (Shimpack CLC-Phenyl (M); 250 mm x 4,5 mm);
- ✓ Monolítica:
 - Phenomenex Onyx – ODS (100 x 4,60 mm)
- ✓ Semi-preparativas:
 - Phenomenex com sílica do tipo C-18 (150 x 21,2 mm, 5 μm);
- ✓ Preparativas:

- Phenomenx (Luna) com sílica do tipo C-18 (250 x 21,20 mm, 10 μ m);
- Shimadzu Fenil (Shimpack CLC-Phenyl (M); (250 mm x 21,2 mm).

VII.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C , os experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-300 e 500 MHz e Bruker AVANCE, Ultra Shield-Plus - 600 MHz, operando a 300, 500 e 600 MHz, e TMS como referência interna.

VII.1.8 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta e baixa resolução foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo UltrOTOFG (ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics), operando no modo positivo ou negativo.

VII.1.9 Análise de rotação óptica $[\alpha]_D^{25}$

As análises de rotação óptica das substâncias isoladas foram realizadas em um Polarímetro JASCO P-1020, com lâmpada de sódio operando a 589 nm e cela de 1,0 ml.

VII.1.10 Solventes utilizados

Deuterados: Merck, Aldrich e Fluka.

Não-Deuterados: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt p.a. e H₂O MilliQ.

VII.1.11 Outros Equipamentos

Evaporador rotatório - Buchi

Balança analítica – Mettler Toledo AG 245

VII.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

VII.2.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E TRIAGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA

VII.2.1.1 Seleção, Coleta e Classificação do Material Vegetal

Para o isolamento dos fungos endofíticos foram selecionadas folhas e ramos de um espécime de *S. spectabilis* escolhido anteriormente pelo grupo de pesquisa para estudos fitoquímicos.

A classificação foi realizada pela Prof. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica da USP (exsicata SP 384109).

VII.2.1.2 Isolamento, Purificação e Preservação dos Fungos Endofíticos

O isolamento dos fungos endofíticos a partir do material vegetal foi realizado tendo como base o procedimento experimental citado por Maier (1997)⁴²: a superfície do material vegetal foi lavada com água e sabão, e esterilizada por imersão sucessiva em NaClO 1% (5 minutos), água estéril (10 minutos) e etanol 70% (1 minuto), seguida de dupla lavagem em água estéril (10 minutos) e posterior secagem em ambiente estéril. As folhas e ramos foram seccionados assépticamente em 3 ou 4 pedaços, de aproximadamente 1 cm². Cada pedaço foi inoculado em meio de cultura sólido BDA (Batata Dextrose Agar) ao qual foi adicionado, após ser autoclavado, o antibiótico sulfato de gentamicina (100 mg/mL), para evitar o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado até suas hifas apresentarem aproximadamente 1-2 cm de diâmetro, sendo então retirada uma pequena massa micelar de cada linhagem, e inoculada separadamente em outra placa. Este procedimento foi realizado até obtenção da cultura pura.

A avaliação quanto à pureza das linhagens foi realizada através da aparência uniforme nas placas, sendo posteriormente preservadas em “slants”, preparados com água estéril, e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica/IQAr-SP (Figura 81, pág. 155).



Figura 81 – A) Preservação dos micro-organismos em “slants”; B) Fungos endofíticos preservados e mantidos a temperatura ambiente – Micoteca

Para verificação da eficiência da esterilização externa do material vegetal, a última água de lavagem foi plaqueada em placas de petri contendo BDA e mantidas sob as mesmas condições de incubação dos micro-organismos, para verificação de crescimento microbiológico.

VII.2.1.3 Cultivo dos Micro-organismos para Obtenção dos Extratos Brutos

As linhagens selecionadas foram repicadas para placas de Petri contendo BDA para obtenção de maior massa micelar e posterior cultivo em meio líquido. Após o período de incubação, estas foram inoculadas em 600 mL de meio líquido MDB (dois frascos de 500 mL contendo 300 mL de meio líquido para cada fungo), e mantidas em incubadora rotatória, sob temperatura controlada (25°C) por 28 dias (Figura 82, pág. 156).



Figura 82 – Crescimento dos fungos endofíticos em meio líquido (“shaker”).

Ao final do período de fermentação os meios de cultivos foram filtrados, separando-se os micélios do caldo fermentado. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3 x ½ do volume total de caldo fermentado), que após a evaporação dos solventes resultou nos respectivos extratos brutos.

VII.2.1.4 Avaliação do Perfil Químico dos Extratos Brutos

Os extratos brutos obtidos de cada fungo endofítico foram submetidos à análises químicas utilizando as seguintes técnicas:

✓ *Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC):*

As análises dos extratos brutos realizadas por CCDC foram otimizadas utilizando sílica de fase normal e fase reversa (C-18) como fases estacionárias e misturas binárias dos solventes AcOEt, Hexano, MeOH e CHCl₃ para a seleção da fase móvel. O sistema que apresentou melhor separação e resolução cromatográfica foi sílica de fase normal como fase estacionária e eluição com CHCl₃:MeOH (90:10 V/V).

✓ *Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos:*

Nas análises do perfil químico dos extratos brutos realizadas por CLAE-DAD, as amostras foram submetidas à eluição em gradiente exploratório com coluna analítica C-18 (Supelco; 250 x 4,6 mm, 5 µm), eluída com ACN:H₂O (5:95 V/V) até (1:0 V/V) em 40 min., permanecendo 15 min. nesta condição, num fluxo de 1,0 mL/min.. Estas

análises foram realizadas em um equipamento Varian ProStar com detectores de arranjos de diodo (DAD) operando inicialmente a 254 nm.

✓ *Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H):*

Para obtenção dos espectros de RMN de H^1 dos extratos brutos, as amostras foram submetidas à análise utilizando DMSO-d_6 ou CDCl_3 como solventes deuterados.

VII.2.1.5 Avaliação do Perfil Biológico dos Extratos Brutos

As análises biológicas realizadas para os extratos brutos foram:

✓ *Ensaio Preliminar com DPPH para Detecção de Substâncias Antioxidantes.*

A propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar, estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância, sendo esse modelo geralmente observado em estruturas fenólicas.

Utilizando as condições cromatográficas pré-estabelecidas para análise em CCDC, os extratos brutos foram submetidos à separação cromatográfica, em duplicata. Uma das placas cromatográficas foi revelada em luz UV 254 nm e 366 nm e com anisaldeído para localização das manchas e outra nebulizada com solução de DPPH 0,02% em MeOH permanecendo toda rosa. Após um tempo exposta a luz manchas claras surgem nos locais onde as substâncias com potencial antioxidante foram localizadas. O surgimento destas manchas é resultante da redução e conseqüente queda na absorbância do DPPH, causada por interrupção no sistema conjugado, após a reação com uma substância antioxidante, como apresentado na Figura 83 (pág. 158).

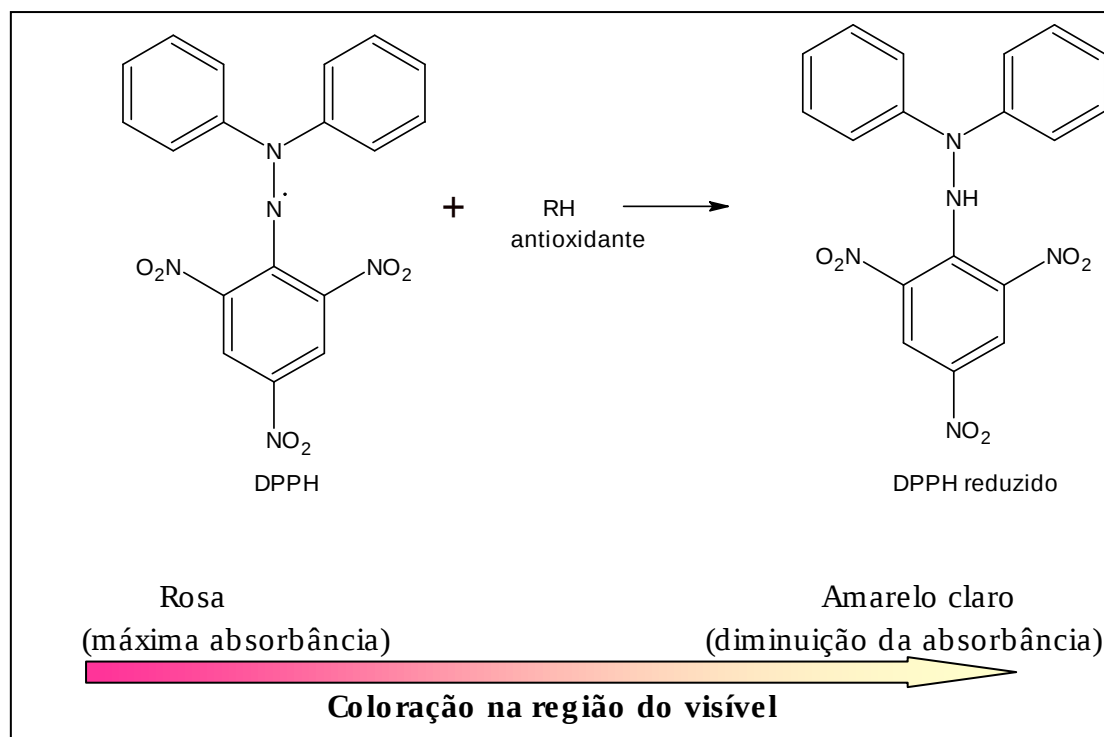


Figura 83 – Reação de redução do DPPH

✓ *Ensaio Preliminar para a Avaliação da Atividade Antifúngica Através de Bioautografia sobre Cromatogramas em Camada Delgada**

A bioautografia consiste da associação entre a cromatografia em camada delgada e um ensaio biológico *in situ*⁸⁶, possibilitando localizar constituintes biologicamente ativos presentes em uma matriz complexa ou indicar o potencial biológico de substâncias puras.

O método fundamenta-se na aplicação de um micro-organismo sobre um cromatograma e incubação deste visando o aparecimento de possíveis zonas de inibição por constituintes ativos⁸⁷.

Todos os extratos brutos dos endofíticos foram submetidos a este bioensaio, sendo aplicados (em duplicatas) 400 µg de cada extrato em placas cromatográficas pré-prontas, e posteriormente eluídos empregando-se o sistema de solventes pré-estabelecido à temperatura de ~ 30°C.

Após a evaporação dos solventes e localização das manchas (substâncias) por meio de absorção no UV, nebulizou-se os cromatogramas com uma suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* em um

meio preparado no momento de proceder ao ensaio (10 mL de solução aquosa de glicose a 30% e 60 mL da solução estoque). Após nebulização, procedeu-se a incubação das placas em atmosfera úmida por 2 a 3 dias a 25 °C. O aparecimento de zonas de inibição indicaram a presença de substâncias com potencial antifúngico.

* ensaio realizado no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

✓ *Ensaio Preliminar para a Avaliação da Atividade Anticolinesterásica por Bioautografia sobre Cromatogramas em Camada Delgada**

O ensaio qualitativo por bioautografia foi realizado juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os extratos brutos foram solubilizados em solvente adequado e cada amostra foi aplicada, numa concentração de 50 µg, em duas placas que foram eluídas nas condições determinadas para análise por CCDC (eluentes CHCl₃:MeOH - 9:1 v/v). Galantamina foi utilizada com padrão positivo numa concentração de 1,0 µg. A localização das substâncias foi observada com a revelação de uma das placas inicialmente com luz UV 254 nm e 366 nm e posteriormente com ácido sulfúrico. Na segunda placa foi borrifada a solução da enzima AChE (6,66 U) (solução A). Após a evaporação do solvente a placa foi incubada em câmara úmida fechada, a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a solução⁸⁸.

Caso existam substâncias com atividade sobre acetilcolinesterase a reação enzimática será observada. À medida que a reação acontece, manchas brancas vão surgindo e aumentando de tamanho de acordo com a intensidade da inibição enzimática.

Soluções:

- ✓ Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto n° C2880) foi dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9), a solução estoque foi armazenada a 4 °C e no momento do uso foi adicionado 0,1% de albumina de soro bovino;
- ✓ Solução B: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol;
- ✓ Solução C: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada;
- ✓ Solução D: mistura de 10 mL da solução B + 40 mL da solução C.

* ensaio realizado no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young

VII.2.1.6 Classificação dos Fungos Endofíticos

As linhagens codificadas como Cs-c(17/22), Cs-c(2b), Cs-f(23) e Cs-f(26) foram enviadas para a Fundação André Tosello para identificação. As linhagens codificadas como Cs-f(14a) e Cs-c(16) foram identificadas pelo Prof. Dr. Marcos Câmara da Universidade Federal de Pernambuco.

As identificações foram realizadas por taxonomia convencional, que é baseada na análise comparativa das características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem, com dados citados na literatura, possibilitando assim a identificação dos micro-organismos.

VII.2.2 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Myrothecium gramineum*

VII.2.2.1 Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada

Para o cultivo do micro-organismo em escala ampliada foram utilizados 20 L de meio de cultivo MBD, seguindo a mesma metodologia empregada para crescimento em escala reduzida (Tópico VII.2.1.3, pág. 155). No entanto, foram estipulados dois modos de incubação, modo estático, e sob agitação.

No modo estático os frascos contendo os inóculos foram mantidos em bancada com agitação manual esporádica para oxigenação do meio. No modo sob agitação, os inóculos foram colocados em incubadora rotatória (“Shaker”), que foi programada para temperatura (25 °C) e rotação constantes (Figura 84, pág. 160).

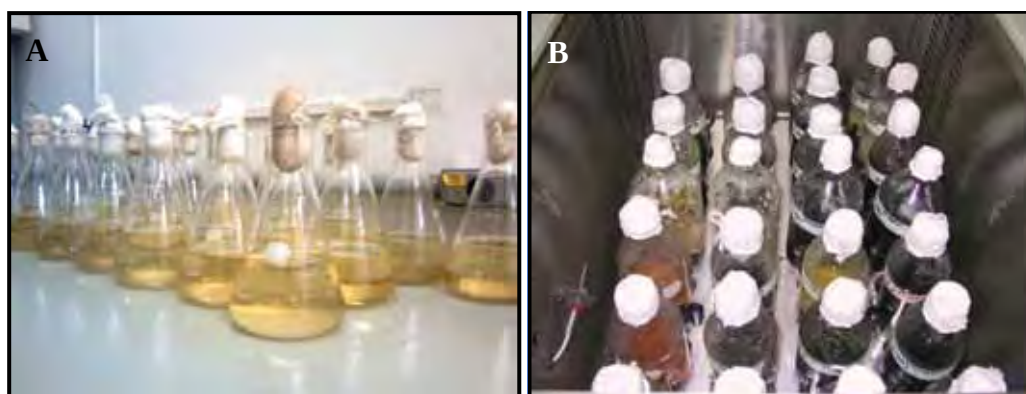


Figura 84 – Cultivo dos micro-organismos A) no modo estático; B) em incubadora rotatória

Ao final do período de fermentação os meios de cultivos foram filtrados, separando-se os micélios do caldo fermentado. O filtrado aquoso foi submetido à

partição líquido/líquido com AcOEt (3x ½ volume total do filtrado), que após a evaporação dos solventes resultou nos respectivos extratos brutos.

Os extratos brutos foram analisados por RMN de ^1H e CLAE-DAD em gradiente exploratório [coluna monolítica C-18 (Supelco), eluição com $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (5:95 V/V até 1:0 V/V) em 30 min., fluxo: 1,0 mL/min. e $\lambda_{\text{inic.}}=254\text{ nm}$].

VII.2.2.2 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Bruto de *M. gramineum*

Os extratos brutos foram reunidos e fracionados por cromatografia líquida sob pressão, utilizando sílica de fase reversa (C-18) empacotada em coluna de vidro com 15 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro, e um sistema de eluição em gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ que variou de 5 a 100% de MeOH, em seguida $\text{MeOH}:\text{AcOEt}$ (1:1) e AcOEt 100%.

Deste procedimento foram coletadas 15 frações, que foram analisadas por CCDC ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ - 9:1, com revelação utilizando luz ultra violeta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, anisaldeído seguido de aquecimento e Iodo sublimado) e reunidas em 7 novas frações,. Estas foram analisadas por RMN de ^1H e CLAE-DAD em gradiente exploratório [C-18 (Phenomenex), eluição com $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (5:95 V/V até 1:0 V/V) em 45 min., permanecendo 5 min. nesta condição, fluxo: 1,0 mL/min. e $\lambda_{\text{inic.}}=254\text{ nm}$], para posterior isolamento das substâncias.

VII.2.2.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias

VII.2.2.3.1 Isolamento da substância 01

A substância 01 foi isolada como um precipitado branco após solubilização do extrato bruto em MeOH.

Ao ser observada a precipitação de flocos brancos, o extrato solubilizado em MeOH foi mantido em banho de gelo por aproximadamente 10 min., em seguida foi centrifugado e separado do sobrenadante. Este procedimento foi repetido 4 vezes, até não ser mais observada precipitação da substância.

VII.2.2.3.2.Fracionamento cromatográfico de Cs-f(23)Fr01

A fração Cs-f(23)Fr01 foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna sob pressão, utilizando sílica de fase reversa como fase estacionária (19 cm de altura e 3,0

cm de diâmetro), e H₂O:MeOH como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente e variou de 5 a 100% de MeOH, em seguida MeOH:AcOEt (1 :1) para limpeza da coluna.

Foram coletadas 16 frações e estas, submetidas a análise por CCDC em sílica de fase normal que foram eluídas com MeOH :CHCl₃ (15 :85) para avaliação da eficiência da separação.

As frações reunidas foram analisadas por CLAE-DAD em gradiente exploratório e RMN de ¹H, utilizando os mesmos parâmetros para as análises dos extratos brutos [C-18 (Phenomenex), eluição com H₂O:MeOH (5:95 V/V até 1:0 V/V) em 45 min., permanecendo 5 min. nesta condição, fluxo: 1,0 mL/min. e λ_{inic.}=254 nm].

VII.2.2.3.2.1 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr01-01/02 e Isolamento das Substâncias 02, 03, e 04

Para o fracionamento cromatográfico de Cs-f(23)Fr01/02 em CLAE foi otimizado um sistema de eluição em coluna Fenil da Shimadzu (shimpack CLC-Phenyl), com H₂O:MeOH como fase móvel. A eluição foi realizada no modo isocrático em 50 min., numa proporção de 1:1 (V/V), em seguida passando a 100% MeOH em 5 minutos e permanecendo nesta condição por mais 5 minutos para limpeza da coluna. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. e λ=205 e 213 nm.

Após otimizado, o sistema foi transferido para CLAE preparativo utilizando o 'par' da coluna Fenil (shimpack CLC-Phenyl), em um fluxo de 10 mL/min.

VII.2.2.3.3 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr04 e Isolamento das Substâncias 01 e 05

A separação cromatográfica de Cs-f(23)Fr04 foi otimizada em CLAE analítico utilizando uma coluna do tipo C-18 da Phenomenex e um sistema de eluição em gradiente programado de H₂O:MeOH iniciando com 50% de MeOH durante 10 min. em seguida variou de 50% a 90% de MeOH em 50 min., passando para 100% de MeOH em 5 min. (Tabela 10, pág. 82). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. e λ=296 nm. Após a otimização, a fração foi submetida a separação cromatográfica em CLAE preparativo em uma coluna C-18 Phenomenex, em um fluxo de 10 mL/min.

VII.2.2.3.4 Fracionamento Cromatográfico de Cs-f(23)Fr05 e Isolamento das Substâncias 01, 05, 06 e 07

O fracionamento de Cs-f(23)fr05 foi otimizado em CLAE analítico, em coluna de fase reversa C-18 (Phenomenex), em um sistema de eluição em gradiente de H₂O :ACN, iniciando com 45% de ACN durante 20 min., em seguida variou de 45% a 60% de ACN em 5 min., e de 60% a 100% de ACN em 10 min., permanecendo nesta condição por mais 5 min. para limpeza da coluna (Tabela 11, pág. 83). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. e $\lambda=254$ nm. O sistema otimizado foi transferido para CLAE preparativo para separação cromatográfica utilizando uma coluna preparativa Phenomenex (C-18) em um fluxo de 10 mL/min.

VII.2.2.4 Ensaio Biológico das substâncias isoladas de *Myrothecium gramineum*

As substâncias **01** e **05** foram submetidas aos ensaios qualitativos das atividades antifúngicas contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerosperum*, e anticolinesterásica.

As substâncias foram aplicadas em placas cromatográficas nas concentrações de 50 µg, por ponto de aplicação, para o ensaio anticolinesterásico e 400 µg para os ensaios antifúngicos. Após a aplicação das substâncias nas placas, estas foram reveladas seguindo os mesmos procedimentos utilizados para a avaliação da atividade antifúngica e anticolinesterásia dos extratos brutos (Tópico VII.2.1.5, pág. 157).

Para a avaliação do potencial antioxidante, todas as substâncias foram aplicadas em duas placas cromatográfica e eluídas utilizando um sistema de MeOH:CHCl₃ (1:9) como fase móvel. Uma das placas cromatográficas foi revelada em luz UV 254 nm e 366 nm e com anisaldeído seguido de aquecimento, para localização das manchas, e outra nebulizada com solução de DPPH 0,02% em MeOH.

VII.2.3 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Acremonium* sp.

VII.2.3.1 Obtenção do Extrato Bruto em Escala Ampliada

Para cultivo de *Acremonium* sp. em escala ampliada foram utilizados 20 L do meio de cultivo MBD seguindo o mesmo procedimento descrito para o cultivo de *M. gramineum* (Tópico VII.2.2.1, pág. 160)

Novamente forma estipulados dos modos de cultivo, o modo estático e o modo sob agitação, no entanto, durante o período de incubação foram observadas mudanças na coloração dos cultivos mantidos em incubadora rotatória. Sendo assim, a extração foi realizada separadamente com 5,2 L de meio de cultivo que permaneceram com a coloração normal e 2,5 L que apresentaram coloração escura. Alguns frascos contendo os meios de cultivo foram descartados devido a contaminação.

Ao final do período de fermentação (28 dias) os meios de cultivo foram filtrados e o filtrado aquoso foi submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3 x ½ do volume total de caldo fermentado), que após a evaporação dos solventes resultou nos respectivos extratos brutos.

Os extratos foram analisados por RMN de ^1H e CLAE-DAD em gradiente exploratório [coluna analítica C-18 (Supelco), eluição com $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (5:95 V/V até 0:1 V/V) em 40 min. e permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo: 1,0 mL/min. e $\lambda_{\text{inic.}}=254\text{ nm}$].

VII.2.3.2 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Bruto de *Acremonium* sp.

Os extratos brutos foram reunidos e fracionados por cromatografia de exclusão, utilizando resina de sephadex LH-20 como fase estacionária em uma coluna montada com 90 cm de altura e 3,4 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando MeOH como fase móvel.

Foram coletadas 35 frações de aproximadamente 100 mL cada, que foram analisadas por CCDC em sílica de fase normal e um sistema de eluição de $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (1:9) e reveladas, após eluição, com UV 256 e 366 nm e anisaldeído. Com os dados de CCDC as frações foram reunidas em 6 novas frações.

Todas as frações resultantes foram submetidas a análise por RMN de ^1H e as frações Cs-c(17/22)Fr04-01 até Cs-c(17/22)Fr04-04 foram analisadas por CLAE-DAD em gradiente exploratório utilizando o mesmo sistema cromatográfico dos extratos brutos.

VII.2.3.3 Fracionamento Cromatográfico e Isolamento das Substâncias

VII.2.3.3.1 Isolamento da substância **08**

A substância **08** foi isolada durante o processo de obtenção dos extratos brutos. Pequenos cristais na forma de filetes foram observados nas paredes do balão durante a evaporação dos solventes.

Após obter os extratos secos, os cristais presentes na borda do balão foram lavados com solventes de diferentes polaridades (evitando sempre a solubilização destes), e a porção solúvel foi coletada como extrato bruto. Permanecendo apenas os cristais no balão, estes foram solubilizados em AcOEt e separados resultando na substância pura.

Como todos os extratos (extrato no modo estático, extrato sob agitação claro e extrato sob agitação escuro), apresentaram o precipitado cristalino durante a evaporação do solvente, estes cristais foram analisados por RMN de ^1H separadamente para confirmar que se tratava da mesma substância e em seguida foram reunidas e analisadas por RMN uni e bi dimensionais para determinação estrutural.

VII.2.3.3.2 Isolamento da substância **09**

A substância **09** foi isolada durante o fracionamento por exclusão como a fração Cs-c(17/22)Fr05. Esta foi então enviada para análise de RMN uni e bidimensional para determinação estrutural.

VII.2.3.3.3 Fracionamento Cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03

A fração foi submetida à cromatografia líquida em sílica flash 60G (22,0 x 2,5 cm) e um sistema de eluição em gradiente de MeOH:CHCl₃ iniciando com 2% de MeOH até 100% de MeOH, tendo como base para variação da porcentagem de MeOH, as bandas cromatográficas obtidas em gradiente exploratório por CLAE – DAD.

Foram coletadas 23 frações de aproximadamente 55 mL, estas foram analisadas por CCDC e reunidas em 13 novas frações e estas, submetidas a análises por RMN de ^1H , CLAE-DAD em gradiente exploratório [coluna analítica C-18 (Supelco), eluição com H₂O:MeOH (5:95 V/V até 0:1 V/V) em 40 min. e permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo: 1,0 mL/min. e $\lambda_{\text{inc.}}$ =254 nm] e CCDC.

VII.2.3.3.3.1 Fracionamento Cromatográfico de Cs-c(17/22)Fr03-1/2 e Isolamento das substâncias 08, 10, 11, 12, 13, 14 e 15

As frações Cs-c(17/22)Fr03-01 e Cs-c(17/22)Fr03-02 foram reunidas para isolamento das substâncias em CLAE, utilizando coluna semi-preparativa C-18 (Phenomenex), e um sistema de eluição com H₂O:MeOH otimizado em gradiente não linear (Tabela 20, pág. 119), iniciando com 40% de MeOH durante 5 min., passando de 40 % a 100% de MeOH em 25 min. e permanecendo nesta condição por mais 5 min. O fluxo utilizado foi de 7 mL/min. e $\lambda = 215$ nm.

As substâncias isoladas foram analisadas por RMN uni e bidimensionais para determinação estrutural.

VII.2.3.4 Ensaios Biológicos das Substâncias Isoladas de *Acremonium* sp.

A substância **08** foi submetida aos ensaios qualitativos das atividades antifúngicas contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e anticolinesterásica.

A amostra foi aplicada em placas cromatográficas nas concentrações de 50 µg para o ensaio anticolinesterásico e 400 µg para os ensaios antifúngicos. Após a aplicação nas placas, estas foram reveladas seguindo os mesmos procedimentos utilizados para a avaliação da atividade antifúngica e anticolinesterásia dos extratos brutos (Tópico VII.2.1.5, pág. 157)

Para a avaliação do potencial antioxidante, todas as substâncias foram aplicadas em duas placas cromatográfica e eluídas utilizando um sistema de CHCl₃:MeOH (9:1) como fase móvel. Uma das placas cromatográficas foi revelada em luz UV 254 nm e 366 nm e com anisaldeído seguido de aquecimento, para localização das manchas, e outra nebulizada com solução de DPPH 0,02% em MeOH.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. Jr. Endophytic fungi. In: FOSTER, M.; MULLER, G.; BILLS, G. (Ed.). **Biodiversity of fungi – Inventory and monitoring methods**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. Cap. 12, p. 241-270.
- 2 PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. Cap. 9, p. 179-197.
- 3 AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.
- 4 SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Br. Mycol. Soc.**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- 5 ANDRADE, S. F. **Avaliação das atividades analgésicas, antiinflamatórias, antiúlvera, antifertilidade e antibacteriana sobre *streptococcus mutans* do extrato bruto, frações e substâncias isoladas das cascas do caule de *Austroplenckia populnea* (Reiss) Lund (celastrácea)**. 2005. 125 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- 6 HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 54, p. 323-342, 2009.
- 7 ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1990.
- 8 GLOER, L. B. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. 1265, 1995.
- 9 ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biol. Review**, v. 2, p. 51-66, 2007.
- 10 GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

- 11 STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, F. F. Jr. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON C. W.; WHITE JR, J. F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Macel Dekker, 2000. v. 1, p. 3-9.
- 12 GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZÁLES COLOMA, A. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Curr. Org. Chem.**, v. 11, p. 707-720, 2007.
- 13 SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Resear.**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- 14 BULTMAN, T. L.; BELL, G. D. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. **OIKOS**, v. 103, p. 182-190, 2003.
- 15 HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycol. Res.**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- 16 GRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.
- 17 BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Curr. Org. Chem.**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.
- 18 GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Appl. Biochem.Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- 19 STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomices andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 269, p. 214-216, 1993.
- 20 STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- 21 SPITELLER, M.; PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.
- 22 SILVA, G., H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

- 23 TELES, H. L.; SORDI, R.; SILVA, G. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOSZANI, V. S.; PFENNING, L. H.; ABREU, L. M.; COSTA-NETO, C. M.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an fungus associated wiht *Xylopi aromatic*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2686-2690, 2006.
- 24 WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.
- 25 STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.
- 26 PIVATTO, M. **Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla***. 2005. 153 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 27 ZANARDI, L. M. **Prospecção química em *Phomopsis cassiae*, um fungo endofítico isolado de *Senna spectabilis***. 2006. 147 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 28 SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados com espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 29 RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. da C.; SILVA, C. F. da; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1999. 800 p.
- 30 VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive peperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 908-910, 2004.
- 31 AHRAZEM, O.; GÓMEZ MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. Heterogeneity of the genus *Myrothecium* as reveaked by cell wall polysaccharides. **Arch. Microbial.**, v. 173, p. 296-302, 2000.

- 32 TULLOCH, M. The genus *Myrothecium* Tode ex FR. **Mycol. Pap.**, v. 130, p. 1-44, 1972.
- 33 DE MAESENEIRE, S. L.; DE GROEVE, M. R. M.; THIERRY, D.; DE MEY, M.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. M. C. Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the *Myrothecium gramineum* orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 261, p. 262-271, 2006.
- 34 GIOPPO, N. M. R.; MOREIRA-GASPARIN, F. B.; COSTA, A. M.; ALEXANDRINO, A. M.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 705-711, 2009.
- 35 WANNEMACHER, W. T. Trichothecene mycotoxins. In: SIDEL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANS, D. R. (Ed.). **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Borden Institute, 1997. Cap. 34, p. 655-676. (TMM series, Part I, Warfare, weaponry, and the casualty). 721 p.
- 36 LIU, J. Y.; HUANG, L. L.; YE, Y. H.; ZOU, W. X.; GUO, Z. J.; TAN, R. X. Antifungal and new metabolites of *Myrothecium* sp. Z16, a fungus associated with white croaker *Argyrosomus argentatus*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p. 195-200, 2006.
- 37 COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. 9th ed. New York: Hodder Arnold Publication, 1998. v. 4. 744 p.
- 38 ZHANG, P.; BAO, B.; DANG, H. T.; HONG, J.; LEE, H. J.; YOO, E. S.; BAE, K. S.; JUNG, J. H. Anti-inflamatory sesquiterpenoids from a sponge-derived fungus *Acremonium* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 270-275, 2009.
- 39 AINSWORTH, M.; CHICARELLI-ROBINSON, M. I.; COPP, B. R.; FAUTH, U.; HYLANDS, P. J.; HOLLOWAY, J. A.; LATIF, M.; O'BEIRENE, G. B.; POTER, N.; RENNO, D. V.; RICHARDS, M.; ROBINSON, N. Xenovulene A, a novel GABA-Benzodiazepine receptor binding compound produced by *Acremonium strictum*. **J. Antibiot.**, v. 48, n. 7, p. 568-573, 1995.
- 40 ABDEL-LATEFF, A.; KÖNIG, G. M.; FISCH, K. M.; HÖLLER, U.; JONES, P. G.; WRIGHT, A. D. New antioxidant hydroquinone derivatives from the Algicolous marine fungus *Acremonium* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 1605-1611, 2002.

- 41 ISAKA, M.; PALASARN, S.; AUNCHAROEN, P.; KOMWIJIT, W.; JONES, E. B. G. Acremoxanthones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806. **Tetrahedron Lett.**, v. 50, p. 284-287, 2009.
- 42 MAIER, W.; HAMMER, K.; DAMMANN, U.; SCHULZ, B.; STRACK, D. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the *Poaceae*. **Planta**, v. 202, p. 36-42, 1997.
- 43 HABECK, T. R. **Triagem química e biológica dos fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis*, uma espécie vegetal do Cerrado**. 2009. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 44 WANG, Y.; MULLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant. *Cyphomyrmex minutes*. **J. Chem. Ecol.**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1999.
- 45 OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 46 GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica de fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 208 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- 47 GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F.; SILVA, C. H. T. P.; LOPES, N. P.; DIAS, L. G.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; PUPO, M. T. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1423-1429, 2010.
- 48 COLLADO, I. G.; GARCÍA-PAJON, C. M.; HERNÁNDES-GALÁN, R. Biotransformations by *Colletotrichum* species. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 1229-1239, 2003.
- 49 GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from endophytic fungi. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 1, p. 188-194, 2009.
- 50 CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Senna spectabilis***. 2010. 174 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

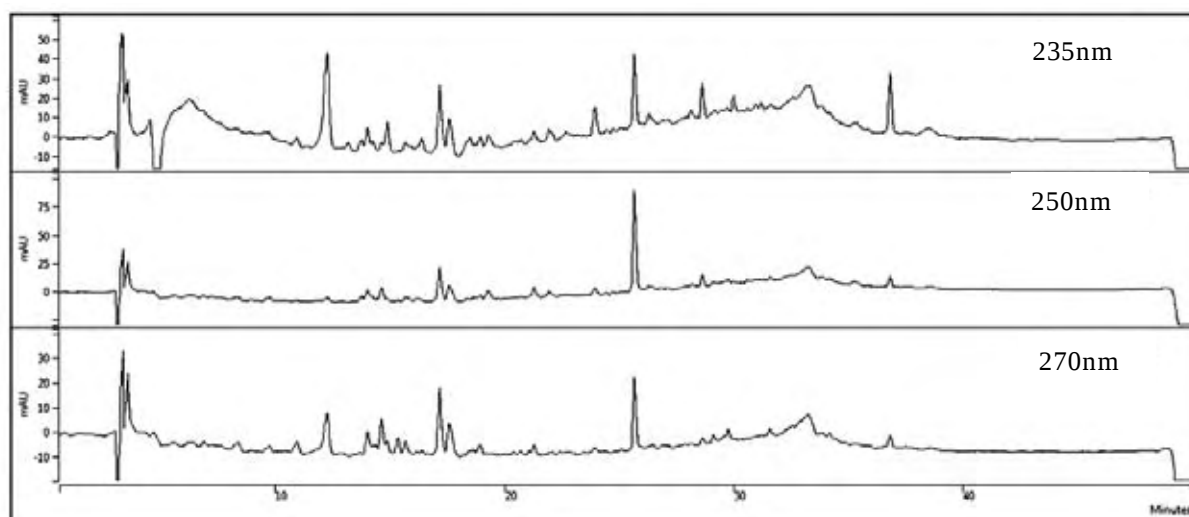
- 51 CAFFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- 52 JAYATILAKE, G. S.; THORNTON, M. P.; LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E.; BAKER, B. J. Metabolites from Antarctic sponge-associated bacterium *Pseudomonas aeruginosai*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 293-296, 1996.
- 53 CAFFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolado de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 255 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- 54 DE ROSA, S.; MITOVA, M.; TOMMONARO, G. Marine bactéria associated with sponge as source of cyclic peptides. **Biomol. Eng.**, v. 20, p. 311-316, 2003.
- 55 ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx* cf. *Podatypa*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 201-208, 2003.
- 56 FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marina bactéria associated with cultures of *Pecten maximus*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.
- 57 SETO, Y.; KOGAMI, Y.; SHIMANUKI, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Production of phleichrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperadines of *Epichloe typhina*. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 69, n. 8, p. 1515-1519, 2005.
- 58 STEINMETZ, W. E.; ROBUSTELLI, P.; EDENS, E.; HEINEMAN, D. Structure and conformational dynamics of trichothecene mycotoxins. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 589-594, 2008.
- 59 SHEN, L.; JIAO, R. H.; YE, Y. H.; WANG, X. T.; XU, C.; SONG, Y. C.; ZHU, H. L.; TAN, R. X. Absolute configuration of new cytotoxic and other bioactive trichothecene macrolides. **Chem. Eur. J.**, v. 12, p. 5596-5602, 2006.
- 60 GE, H. M.; JIAO, R. H.; ZHANG, Y. F.; ZHANG, J.; RONG WANG, Y.; TAN, R. X. Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene macrolides from *Myrothecium gramminum*. **Lett. Plant. Med.**, v. 75, p. 227-229, 2009.

- 61 COLE, R. J.; SHEWEIKERT, M. A. **Handbook of secondary fungal metabolites**. San Diego: Elsevier Science, 2003. v. 3, 672 p.
- 62 FRAGAKI, G.; STEFANAKI, I.; DAIS, P.; MIKROS, E. Conformational properties of the macrocyclic trichothecene mycotoxin verrucarin A in solution. **Magn. Reson. Chem.**, v. 46, p. 1102-1111, 2008.
- 63 JARVIS, B. B.; STAHL, P.; PAVANASASIVAM, G.; MIDIWO, J. O.; DESILVA, T.; HOLMLUND, E.; MAZZOLA, E. P.; GEOGHEGAN, R. F. Jr. Isolation and characterization of the trichoverroids and new roridins and verrucarins. **J. Org. Chem.**, v. 47, p. 1117-1124, 1982.
- 64 BUNYAPAIBOONSRI, T. Phenolic glycosides from the filamentous fungus *Acremonium* sp. BBC 14080. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 892-895, 2008.
- 65 THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. **Mycology Online – Acremonium sp.**. Adelaide, 2010. Disponível em:
<[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Acremonium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Acremonium/)>. Acesso em: 26 Ago. 2010.
- 66 ESPADA, A.; RIVERA-SAGREDP, A.; DE LA FUENTE, J. M.; HUESO-RODRIGUES, J. A.; ELSON, S. W. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6485-6492, 1997.
- 67 COLE, R. J.; SHEWEIKERT, M. A. **Handbook of secondary fungal metabolites**. San Diego: Elsevier Science, 2003. v. 1, 1006 p.
- 68 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. Cap. 4, p. 174
- 69 PERES, V.; NAGEM, T. J. Trioxxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-214, 1997.
- 70 CORRÊA, R. S. **Xantonas oxigenadas bioativas**: cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares. 2009. 182 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 71 SOUSA, M. E.; PINTO, M. M. M. Synthesis of xanthenes: an overview. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2447-2479, 2005.
- 72 VIEIRA, L. M. M.; KIJJOA, A. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2413-2446, 2005.

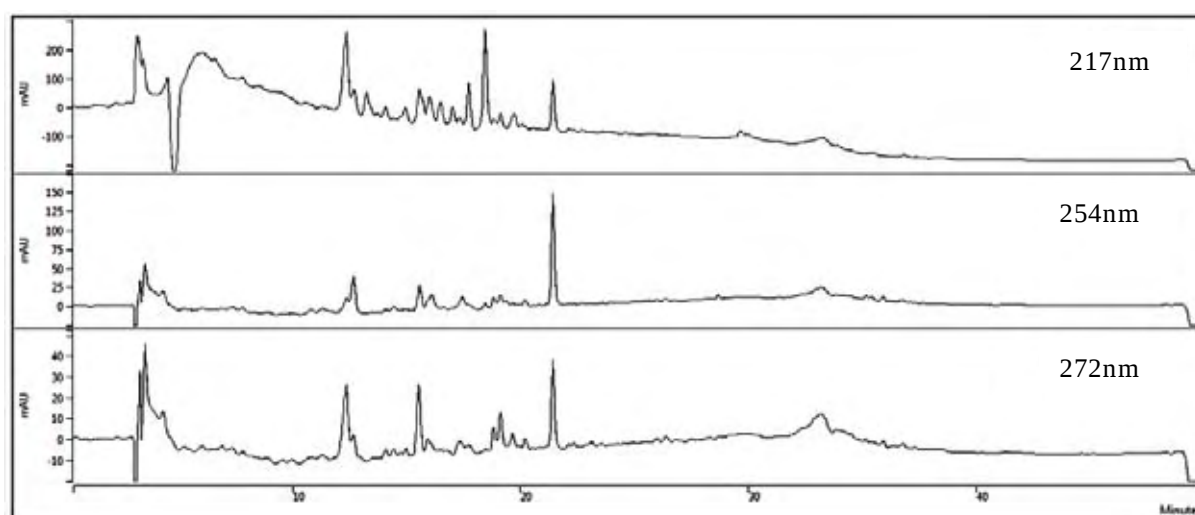
- 73 PASTRE, R. Ç.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.
- 74 FOTIE, J.; NKNGFACK, A. E.; RUKUNGA, G.; TOLO, F.; PETER, M. G.; HEYDENREICH, M.; FOMUM, Z. T. *In vivo* antimalarial activity of some oxygenated xanthenes. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 7, p. 683-688, 2003.
- 75 KUTSCHERA, G. L.; ENGELMEIER, D.; HADACEK, F.; WERNER, A.; GREGER, H.; HOFER, O. Synthesis of side chain substituted 3-butylisocoumarins and absolute configuration of natural isocoumarins from *Artemisia dracunculus*. **Monatsh. Chem.**, v. 134, p. 1195-1206, 2003.
- 76 ÖZCAN, S.; SAHIN, E.; BALCI, M. The synthesis of unusual isocoumarin derivatives: the chemistry of homophthalic acid. **Tetrahedron Lett.**, v. 48, p. 2151-2154, 2007.
- 77 KURAMATA, M.; FUJIOKA, S.; SHIMADA, A.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Citronolactones A, B and C, and sclerotinin C, plant growth regulators from *Penicillium citrinum*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 71, n. 2, p. 499-503, 2007.
- 78 SANTOS, L. F. A. **Contribuição ao estudo do metabolismo micromolecular de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Sapindus saponaria***. 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- 79 SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; BLACKWELL, A.; MILLER, J. D. Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1393-1398, 2008.
- 80 DIMITRIADIS, C.; GILL, M.; HARTE, M. F. The first stereospecific approach to both enantiomers of mellein. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 13, p. 2153-2158, 1997.
- 81 PARK, H. H.; CHOI, G. L.; LEE, H. B.; KIM, K. M.; JUNG, H. S.; LEE, S. W.; JANG, K. S.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antigungal activity against plant pathogenic fungi. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 112-117, 2005.
- 82 MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York: Oxford University Press, 1994. 92 p.

- 83 PEREA, S.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G. Comparasion of *in vitro* activities of voriconazoles and established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 385-388, 2001.
- 84 MacMILLAN, J. Griseofulvin: 7-Dechlorogriseofulvin. **J. Chem. Soc.**, p. 1697-1702, 1953.
- 85 TURNER, W. B.; ALDRIDGE, D. C. **Fungal metabolites**. New York: Academic Press, 1983. 631 p.
- 86 HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.
- 87 HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **J. Chromatogr.**, v. 51, 327-329, 1970.
- 88 MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- 89 DAMAS, A. M.; GALES, L. Xanthones: a structural perspective. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2499-2515, 2005.

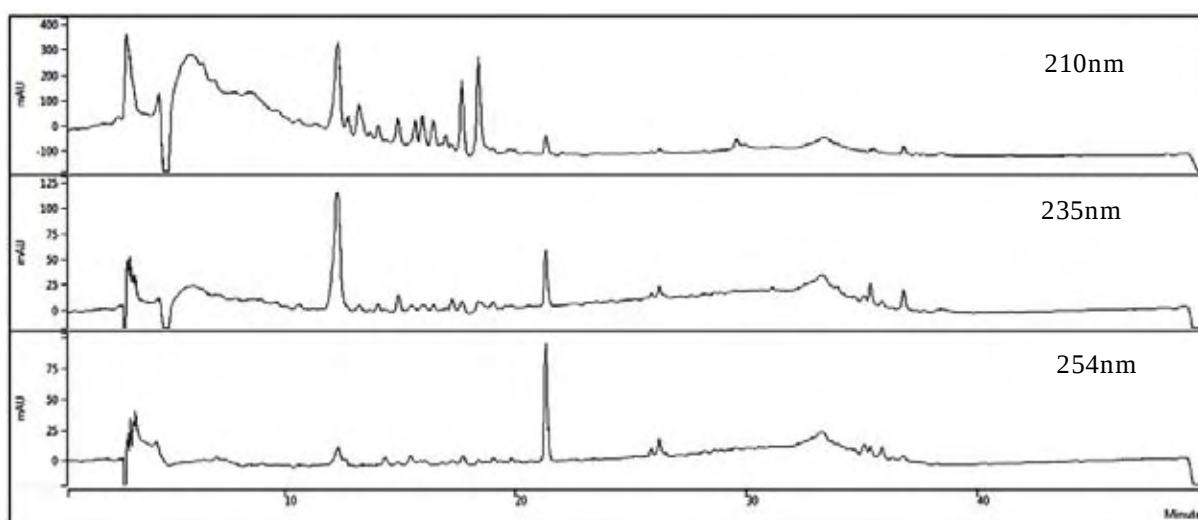
ANEXOS



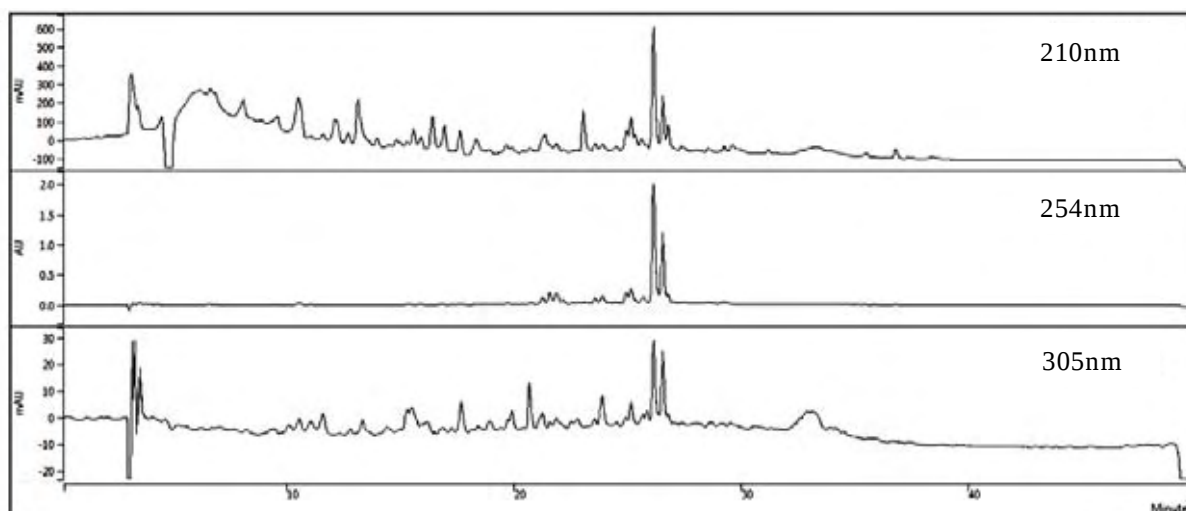
Anexo 01 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(3e/f) em diferentes λ .



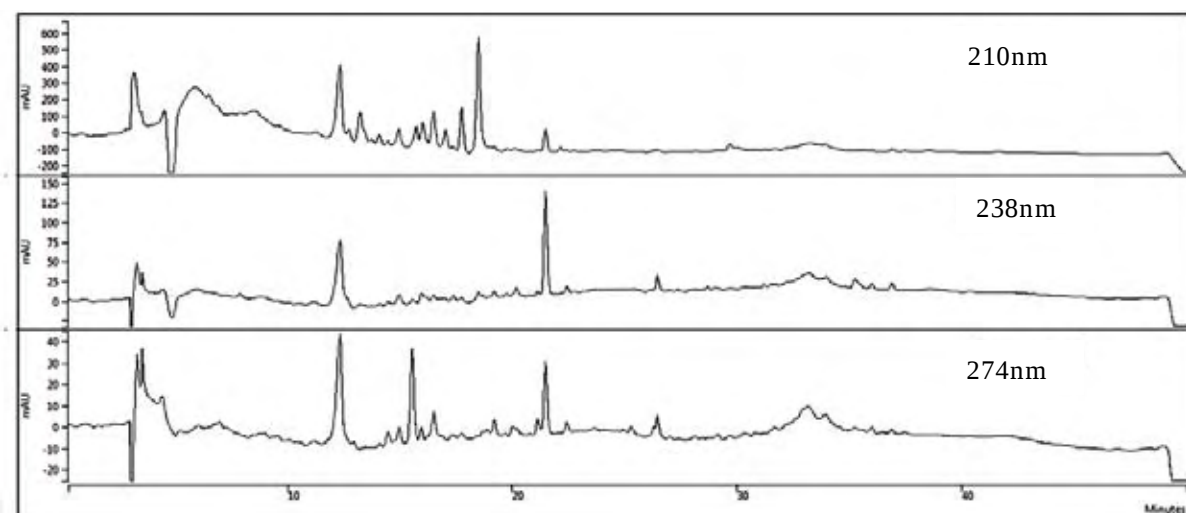
Anexo 02 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(14a) em diferentes λ .



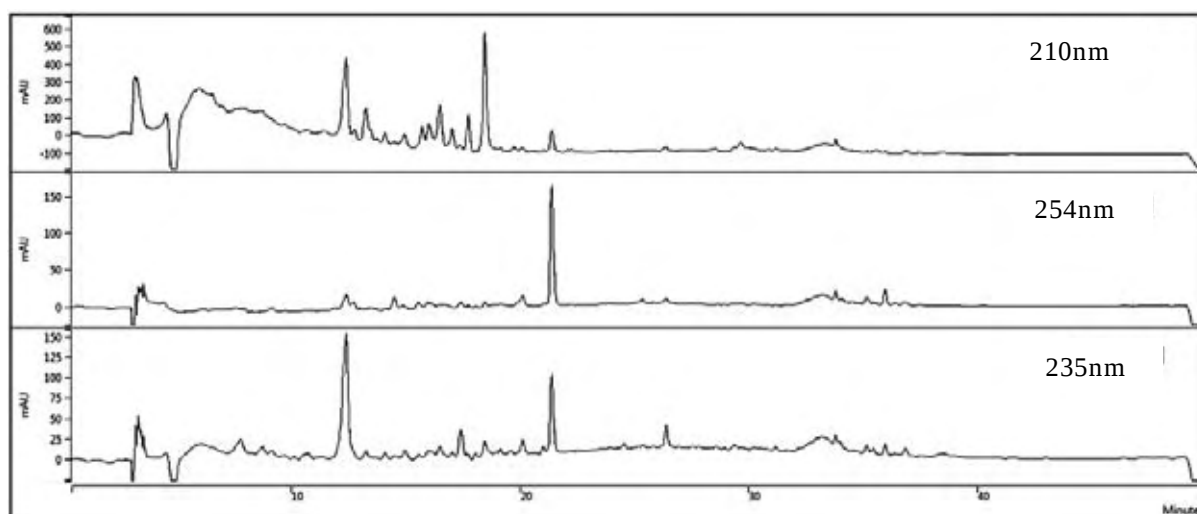
Anexo 03 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(14c) em diferentes λ .



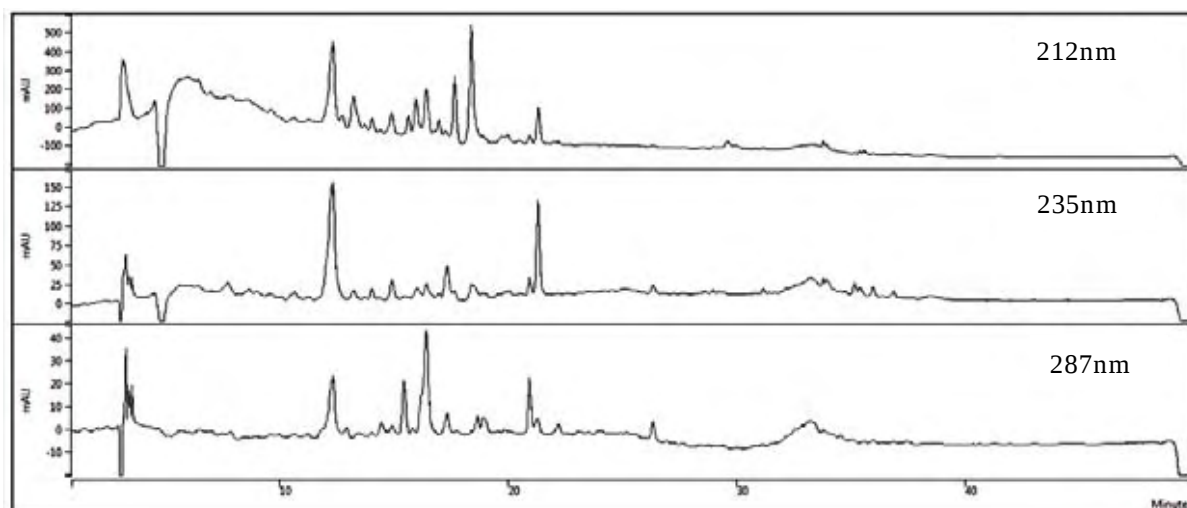
Anexo 04 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(23) em diferentes λ .



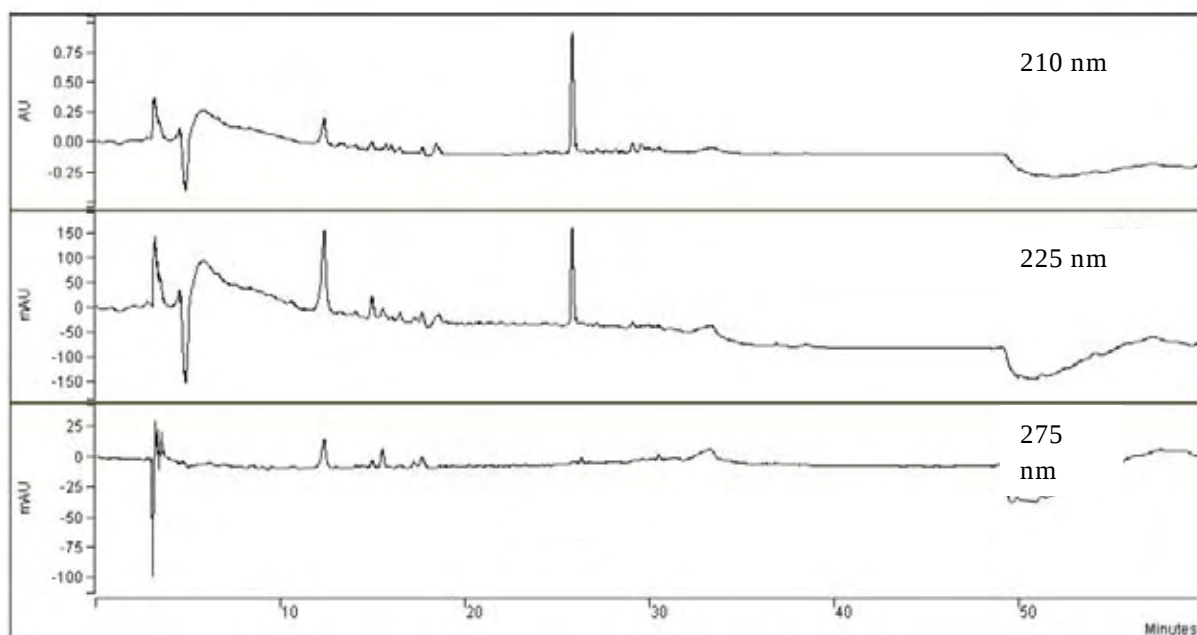
Anexo 05 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(25) em diferentes λ .



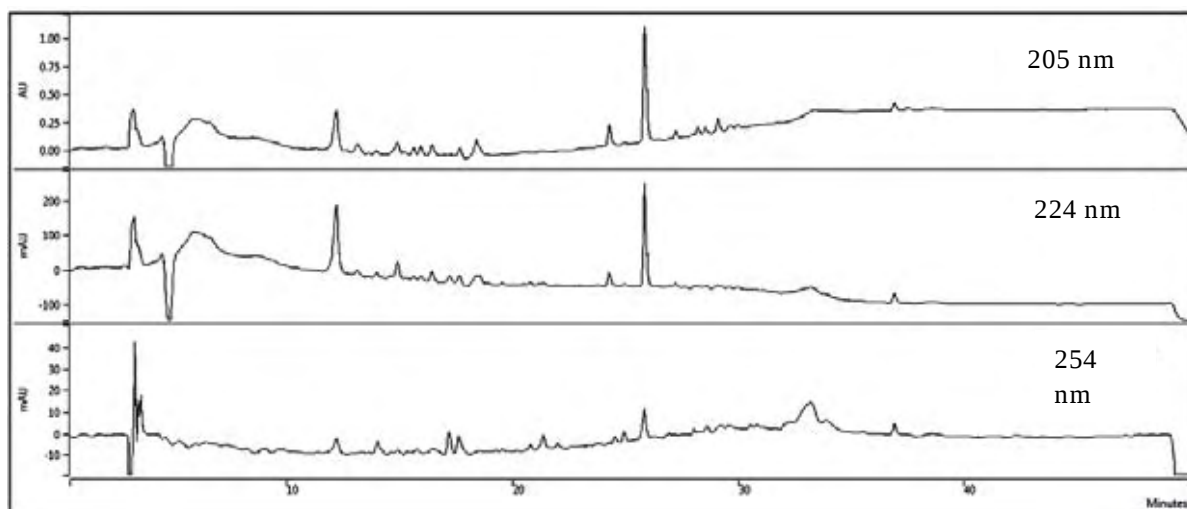
Anexo 06 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(26) em diferentes λ .



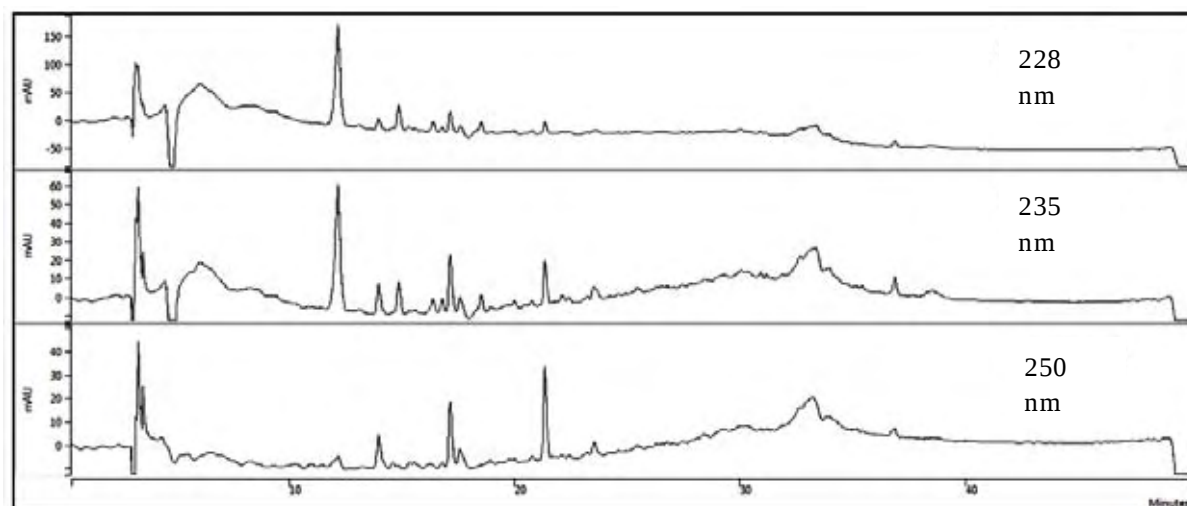
Anexo 07 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-f(27) em diferentes λ .



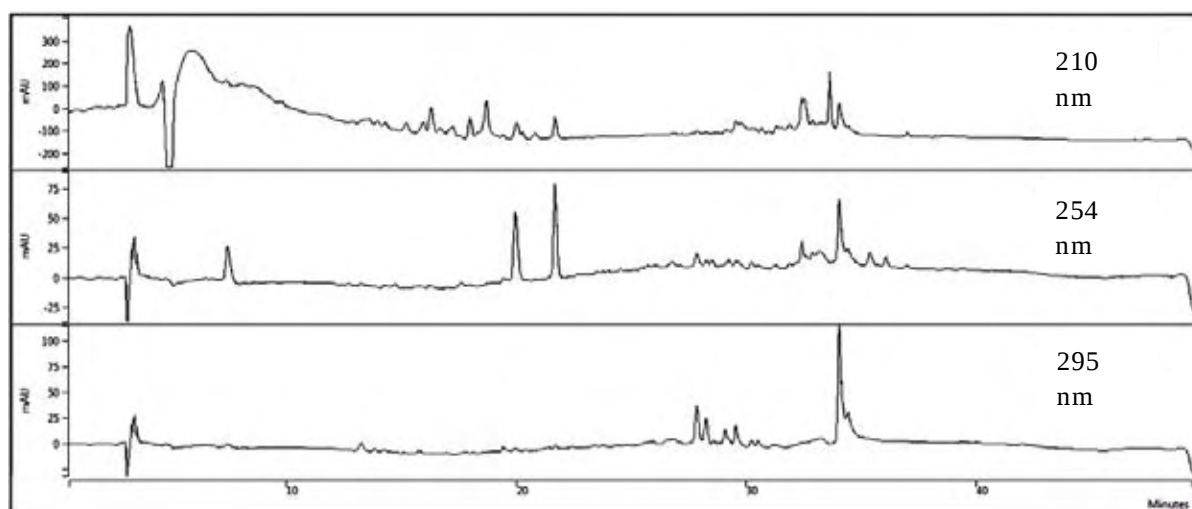
Anexo 08 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(2a) em diferentes λ .



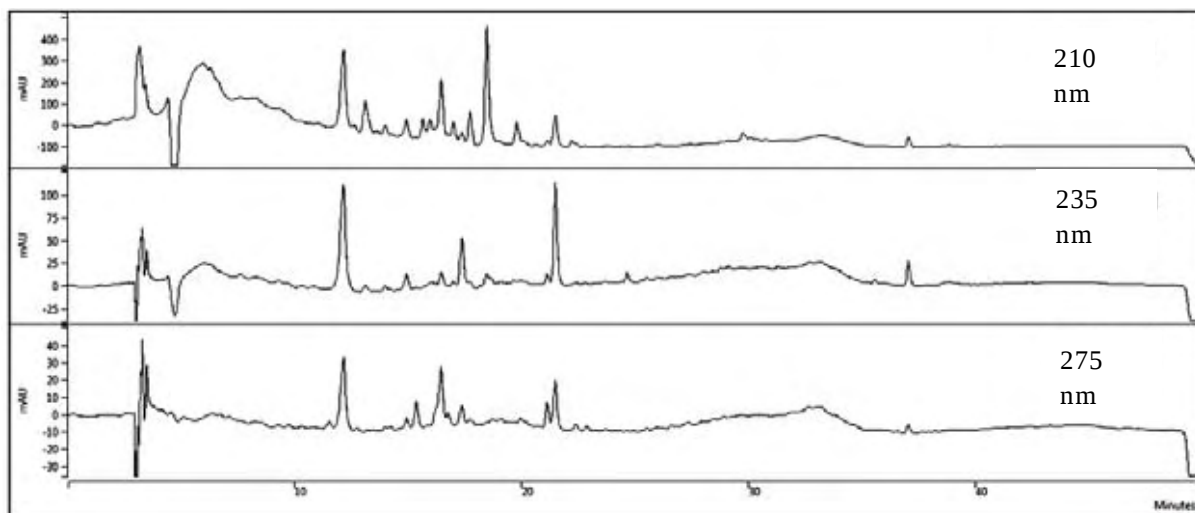
Anexo 09 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(2b) em diferentes λ .



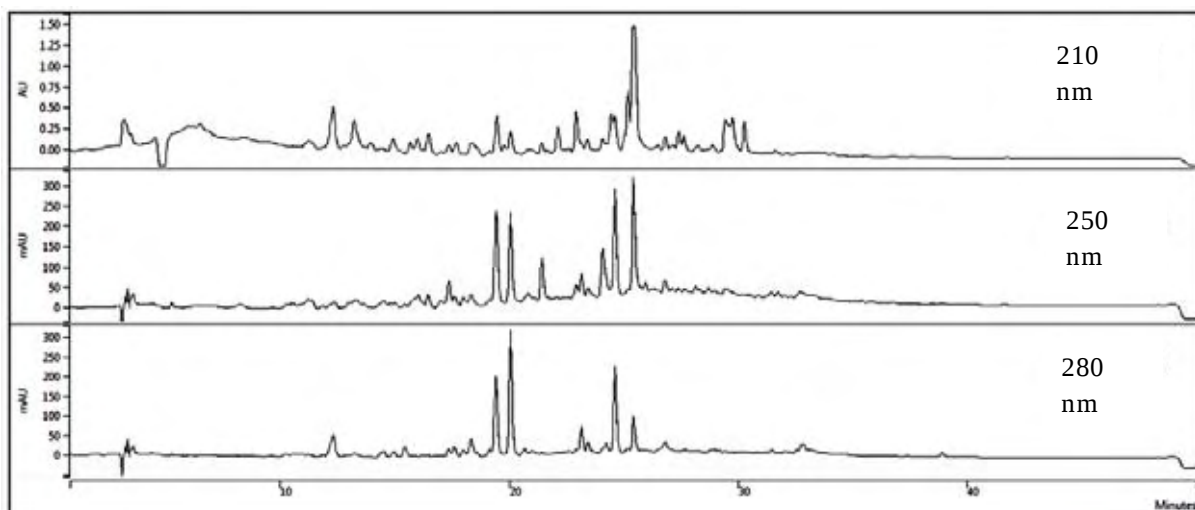
Anexo 10 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(3b) em diferentes λ .



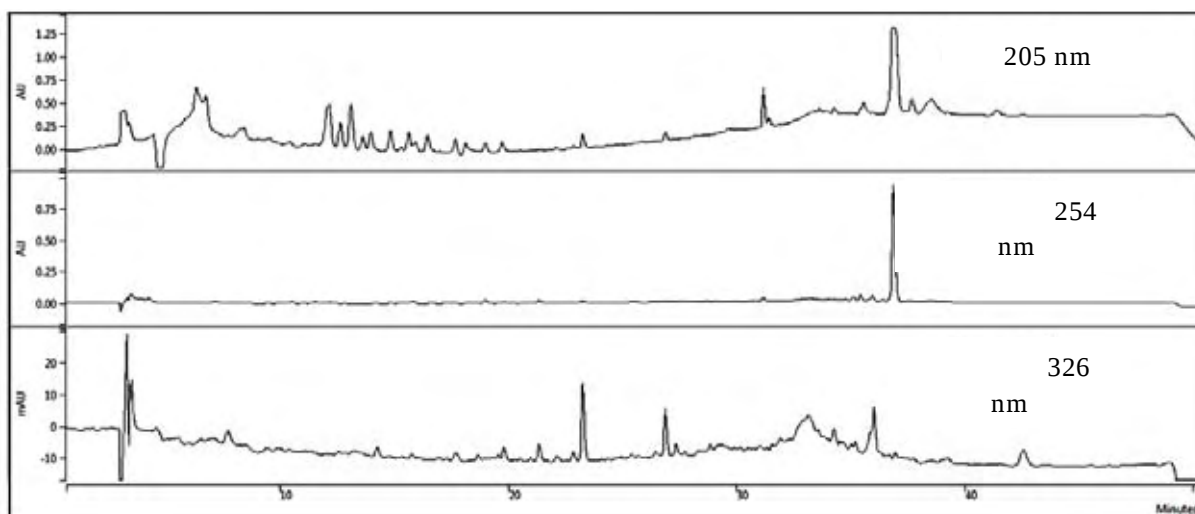
Anexo 11 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(3c/d) em diferentes λ .



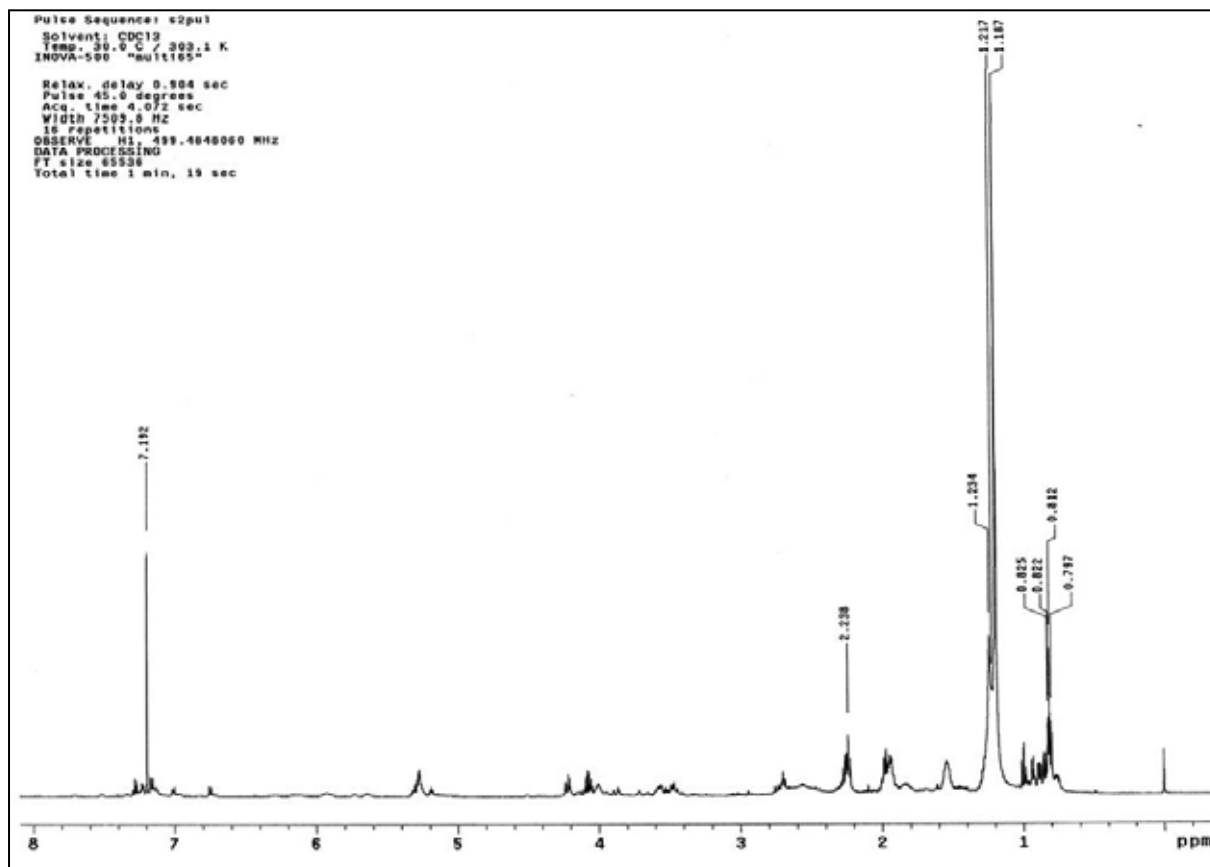
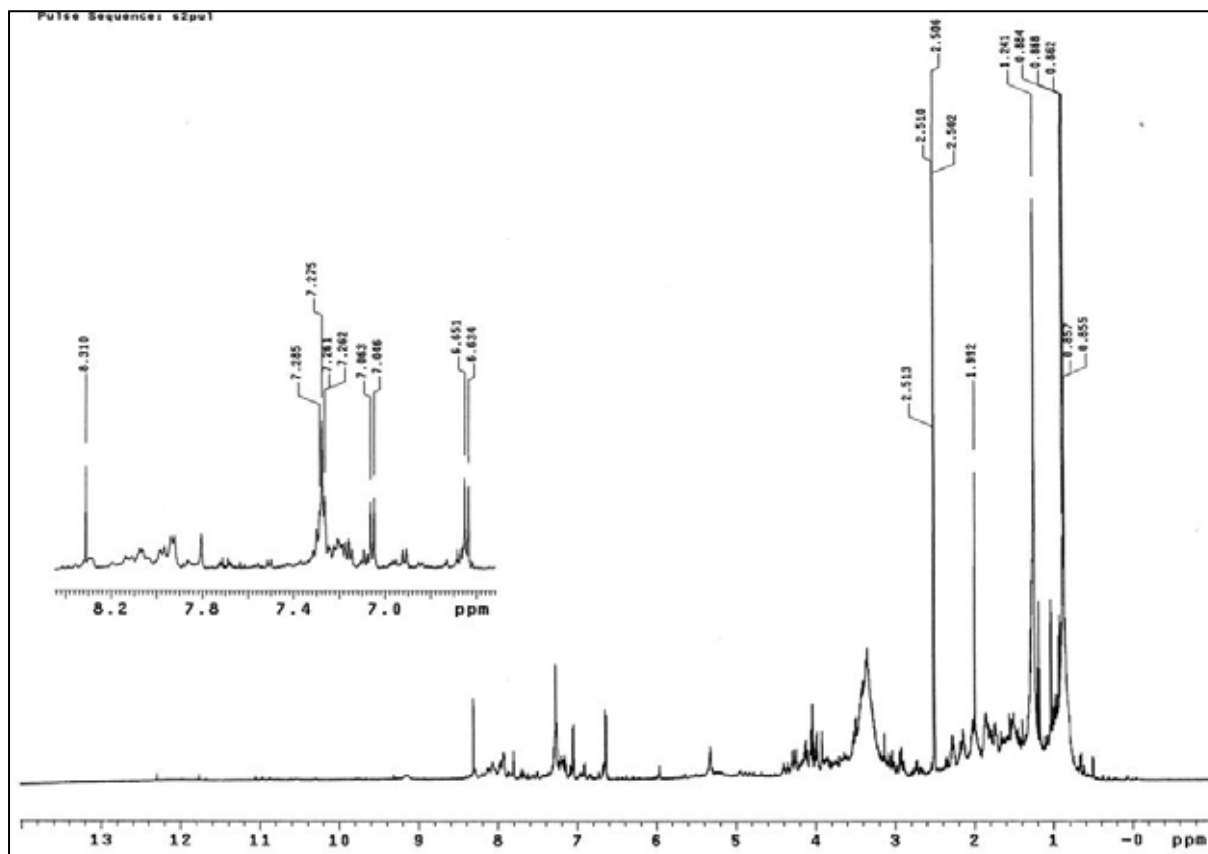
Anexo 12 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(16) em diferentes λ .

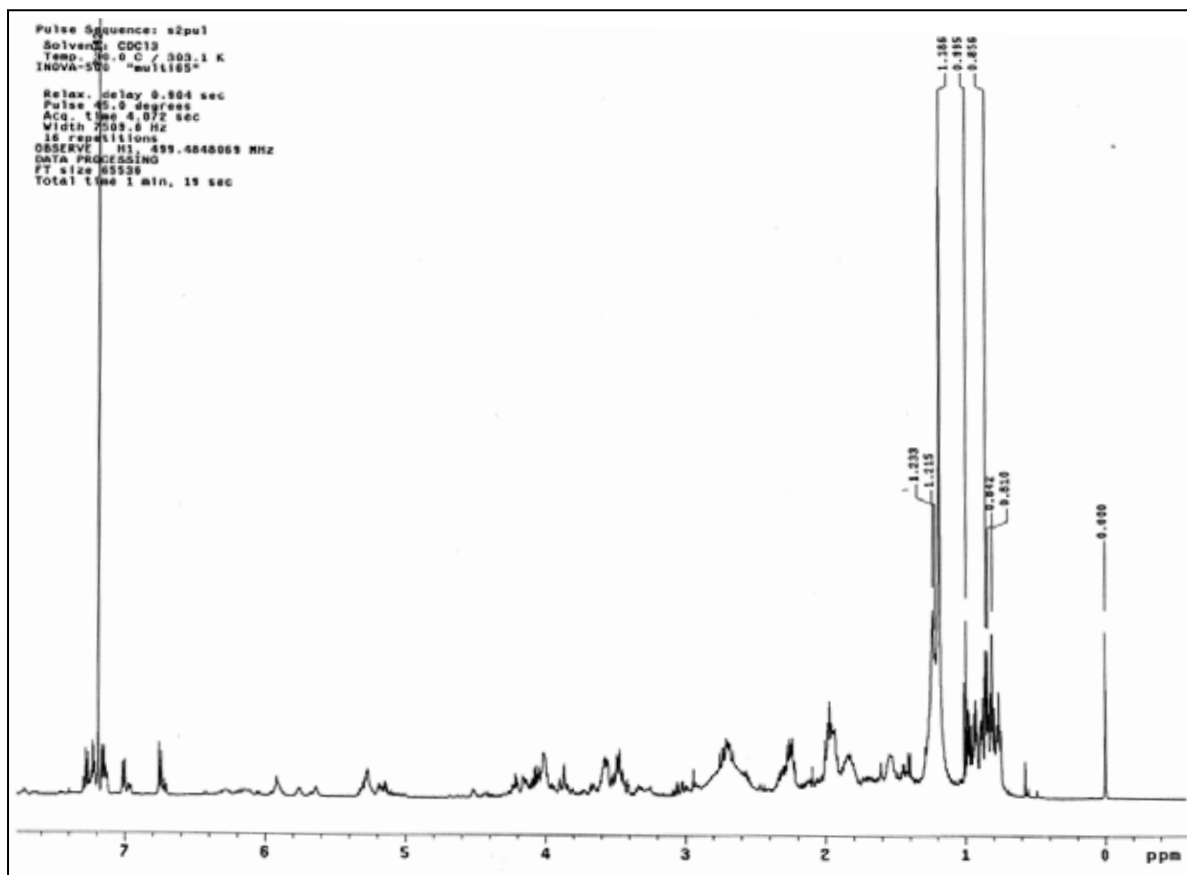


Anexo 13 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(17/22) em diferentes λ

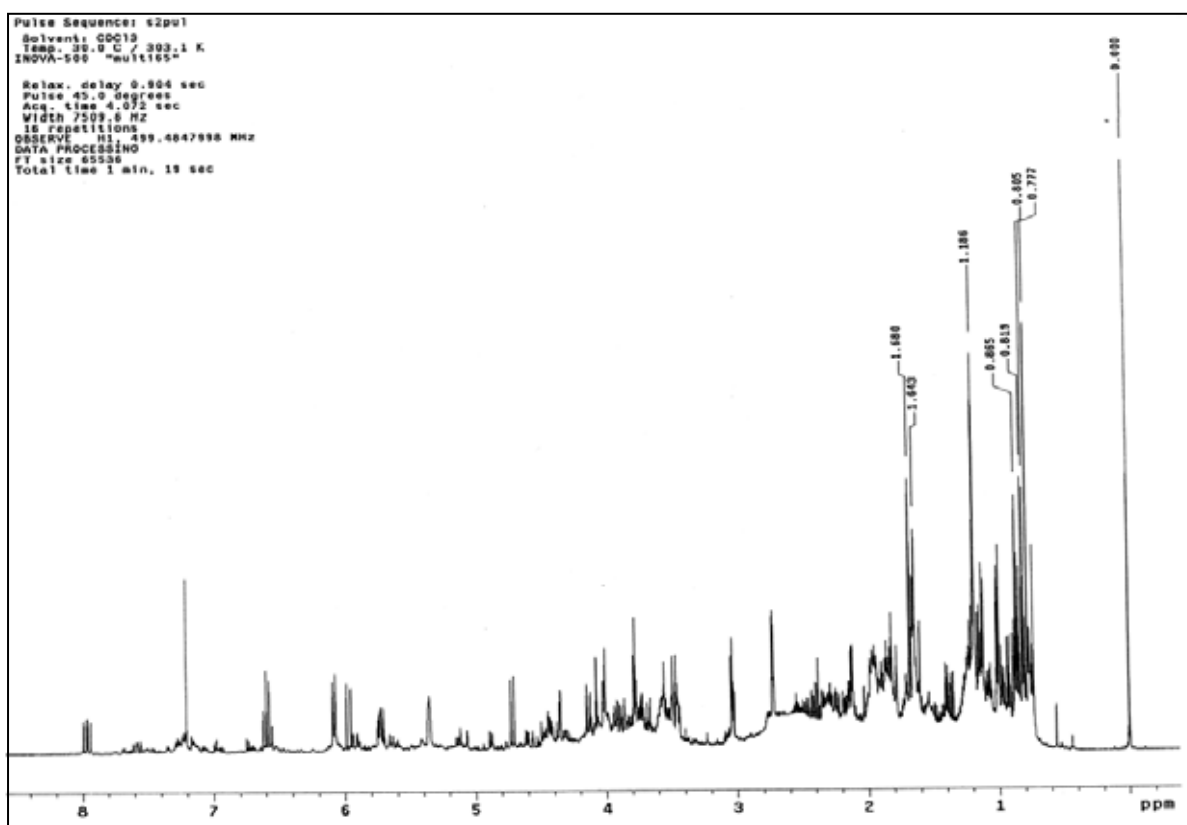


Anexo 14 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos de Cs-c(19/20) em diferentes λ

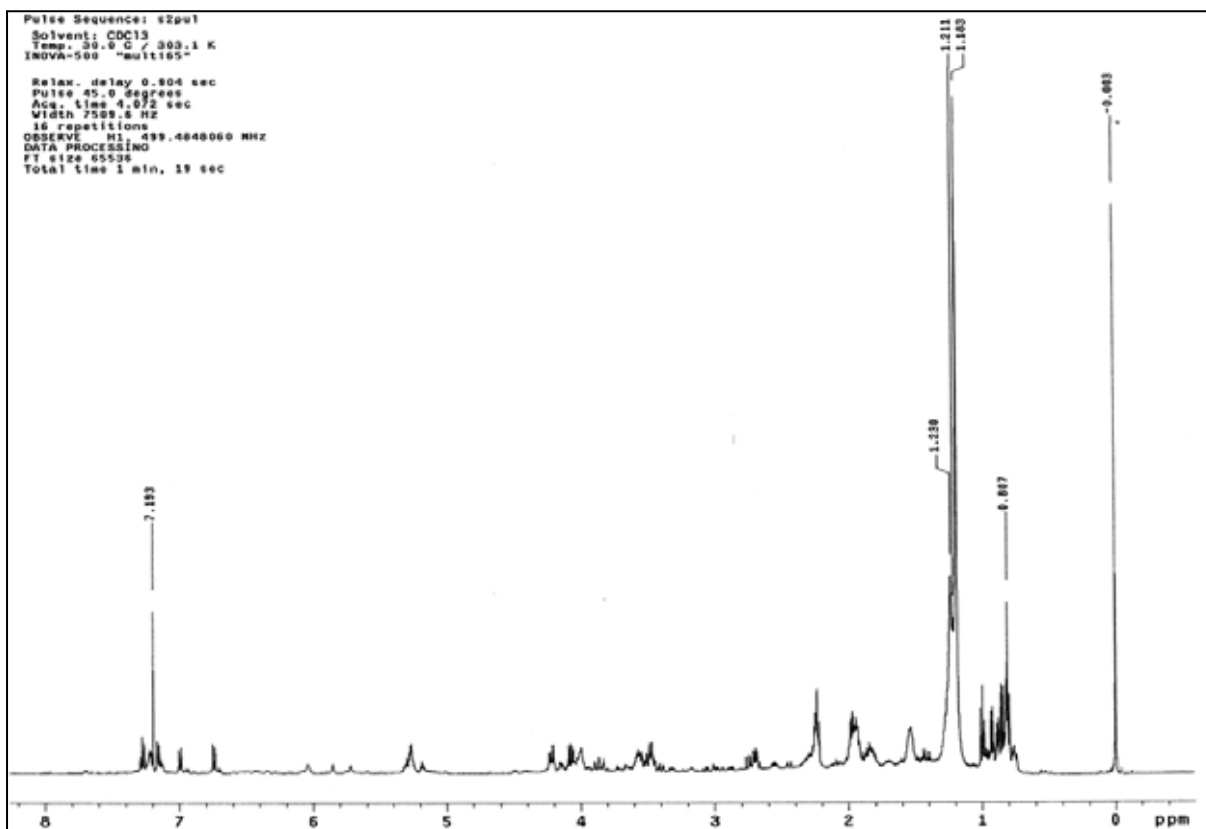




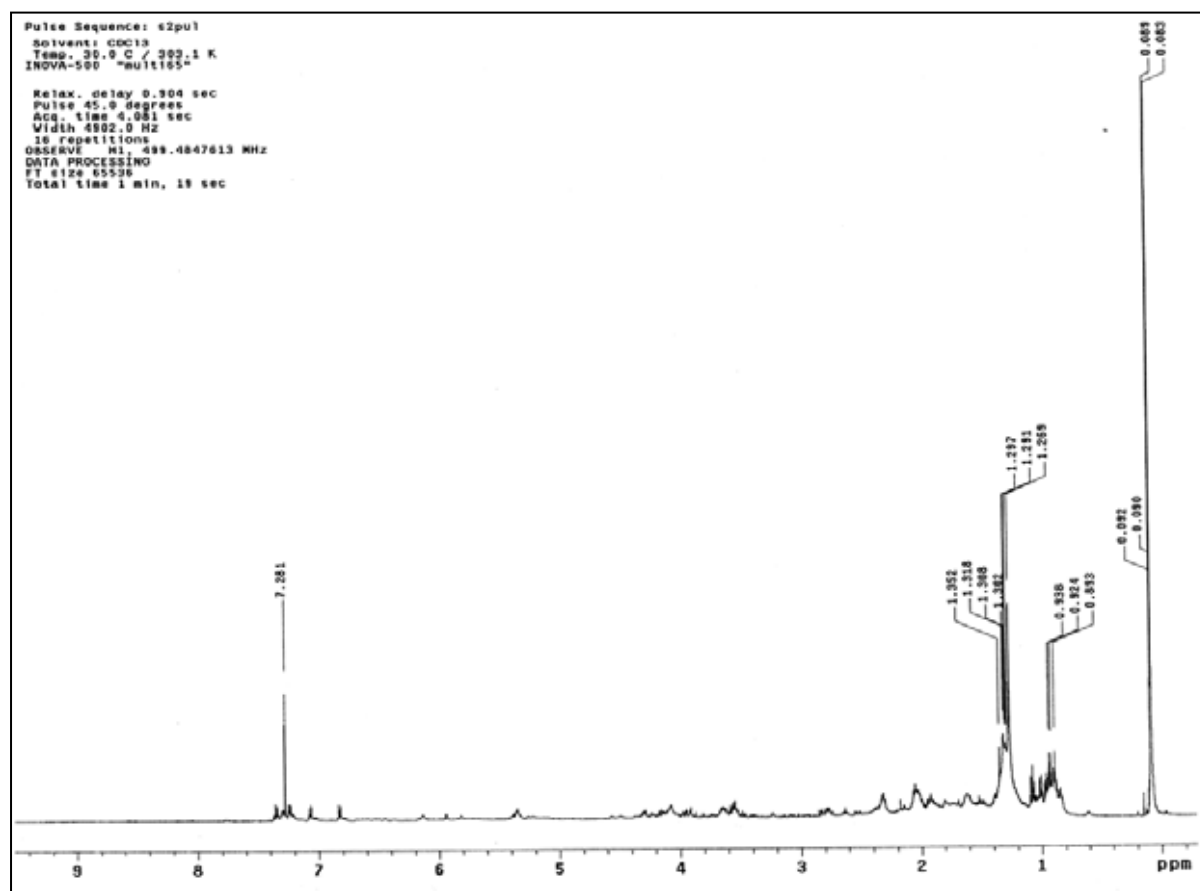
Anexo 17 – Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de Cs-f (14c) (CDCl₃, 500 MHz).



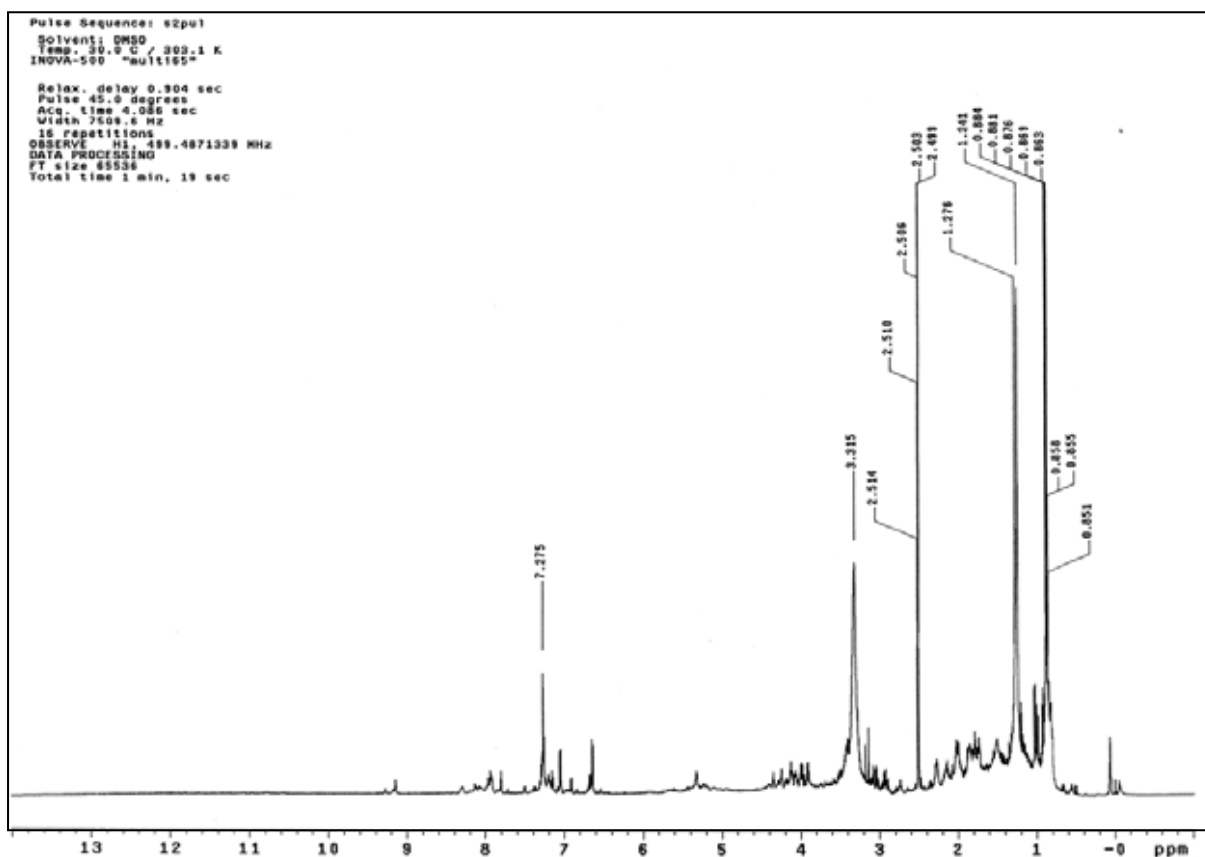
Anexo 18 – Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de Cs-f (23) (CDCl₃, 500 MHz).



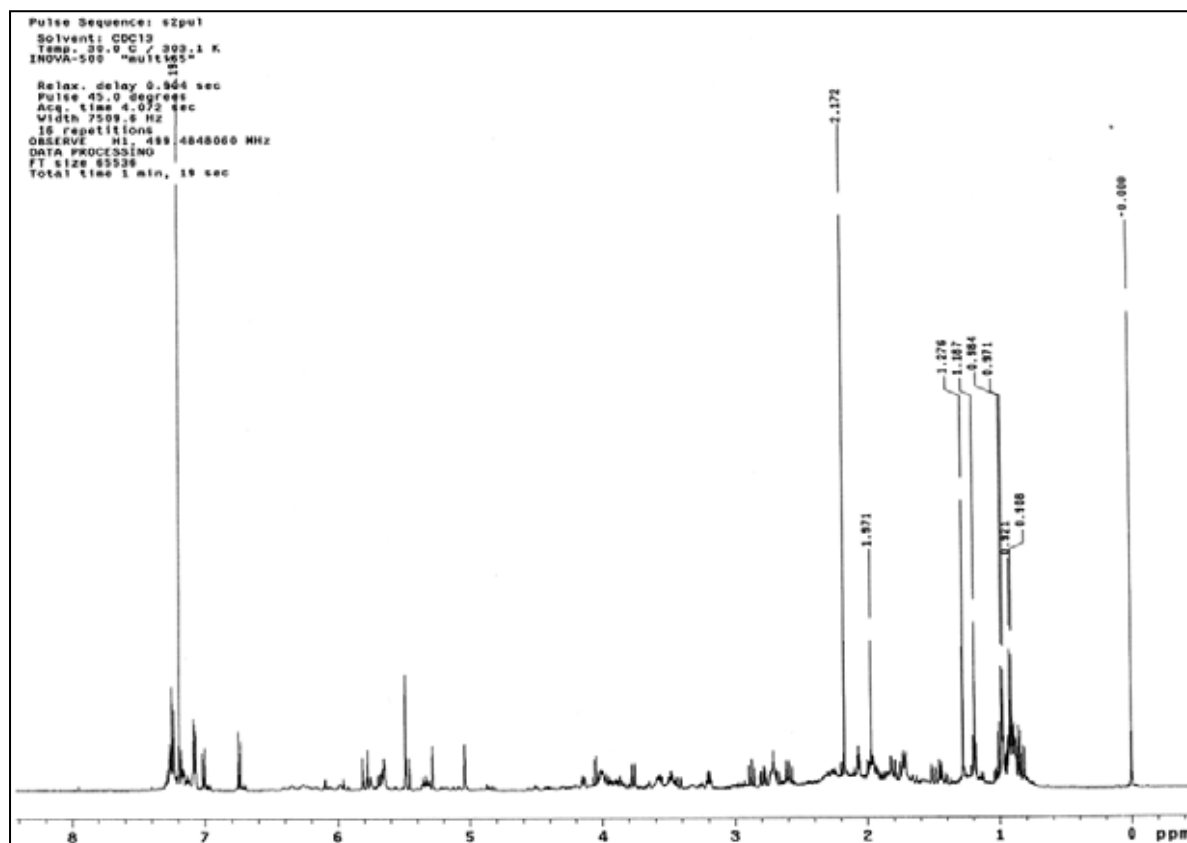
Anexo 19– Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de Cs-f (25) (CDCl₃, 500 MHz).



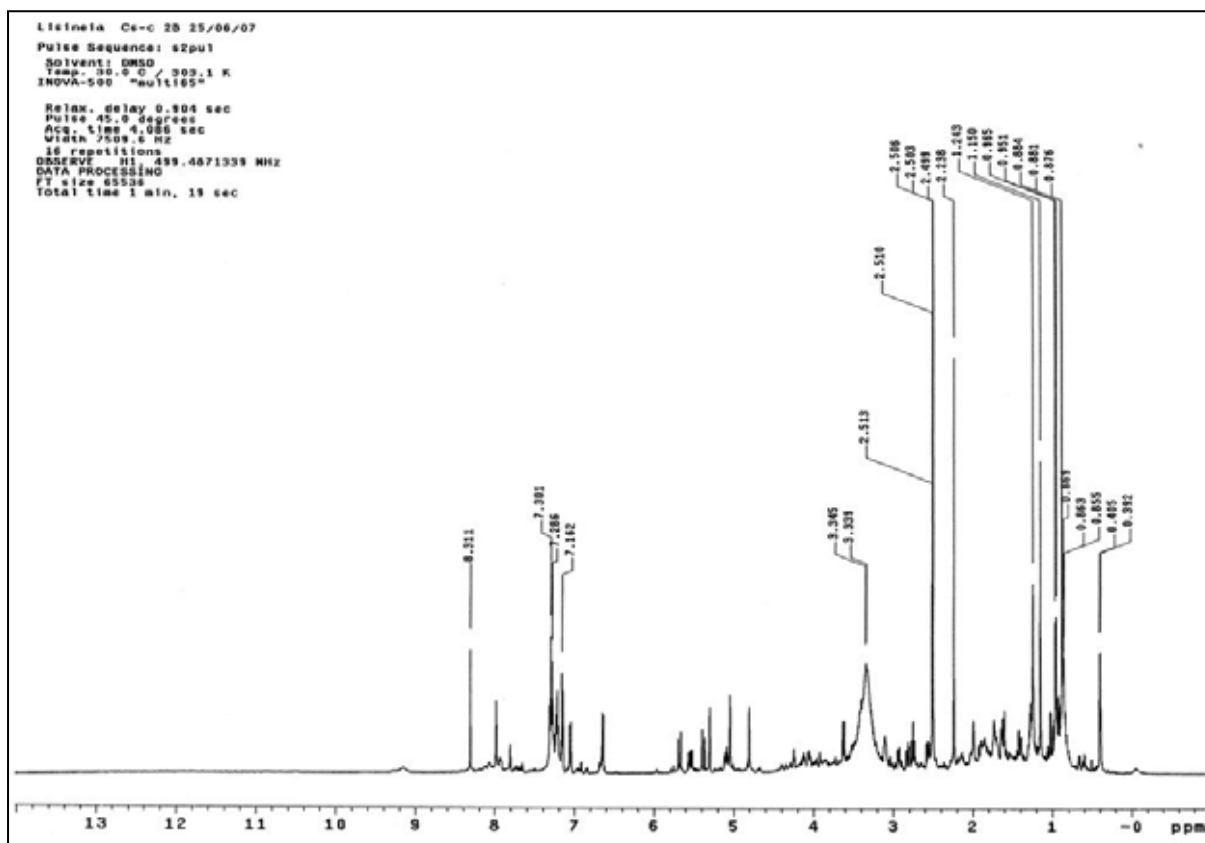
Anexo 20 – Espectro de RMN ¹H do extrato bruto de Cs-f (26) (CDCl₃, 500 MHz).



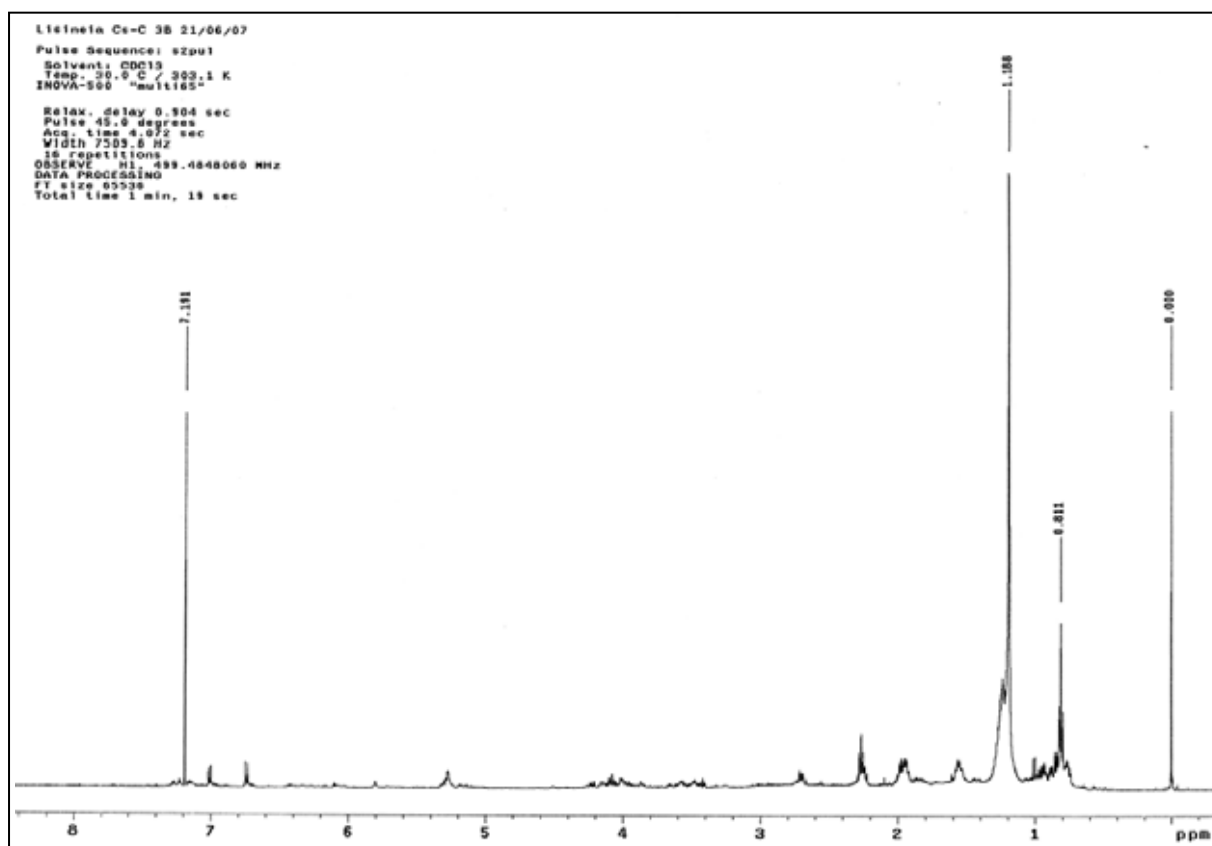
Anexo 21 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-f (27) (DMSO- d_6 , 500 MHz).



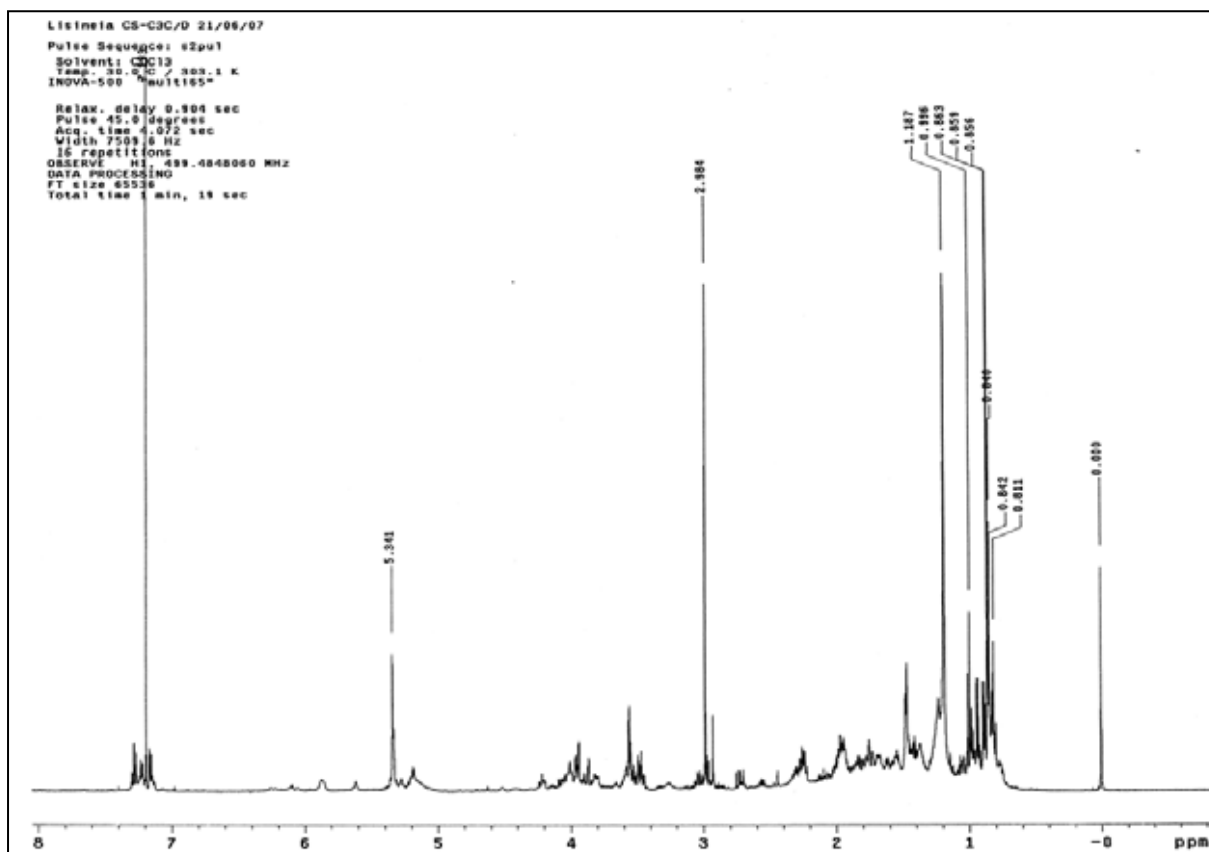
Anexo 22 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-c (2a) (CDCl_3 , 500 MHz).



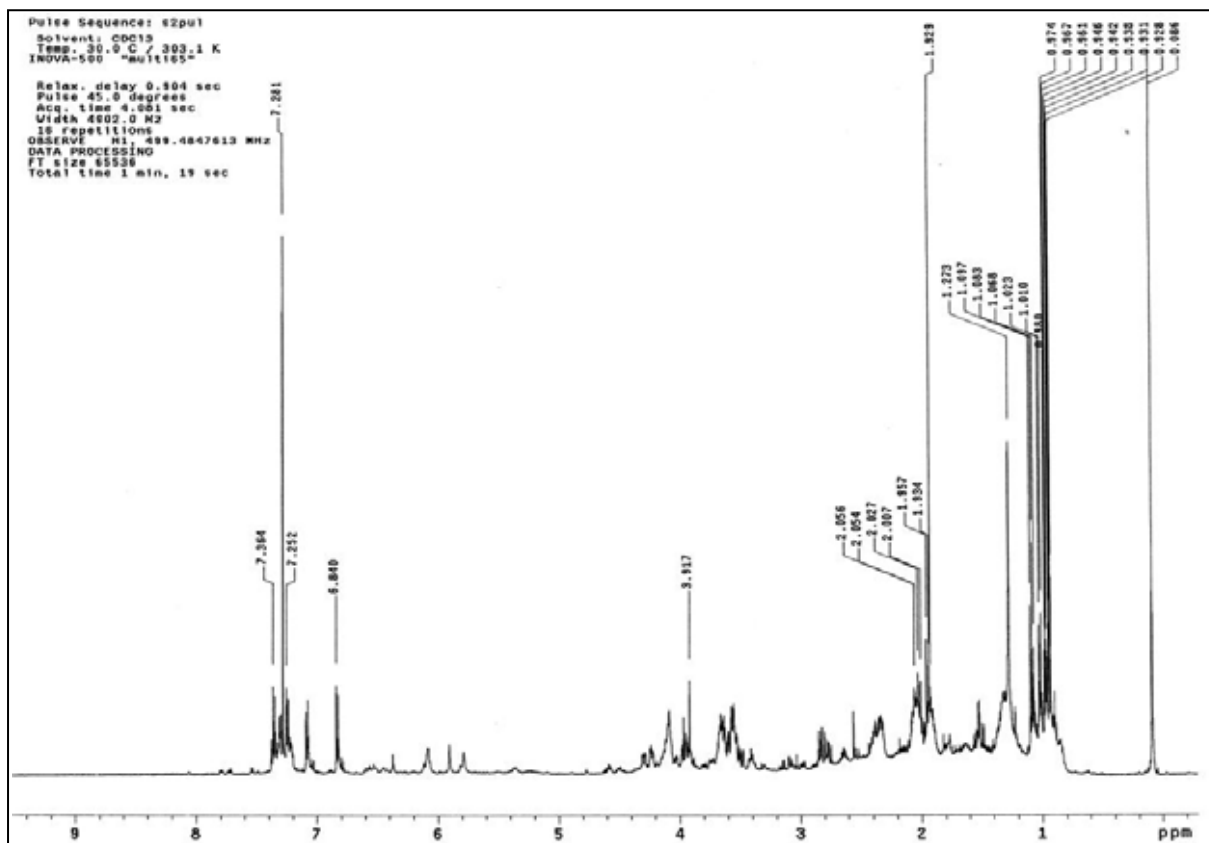
Anexo 23 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-c (2b) (DMSO- d_6 , 500 MHz).



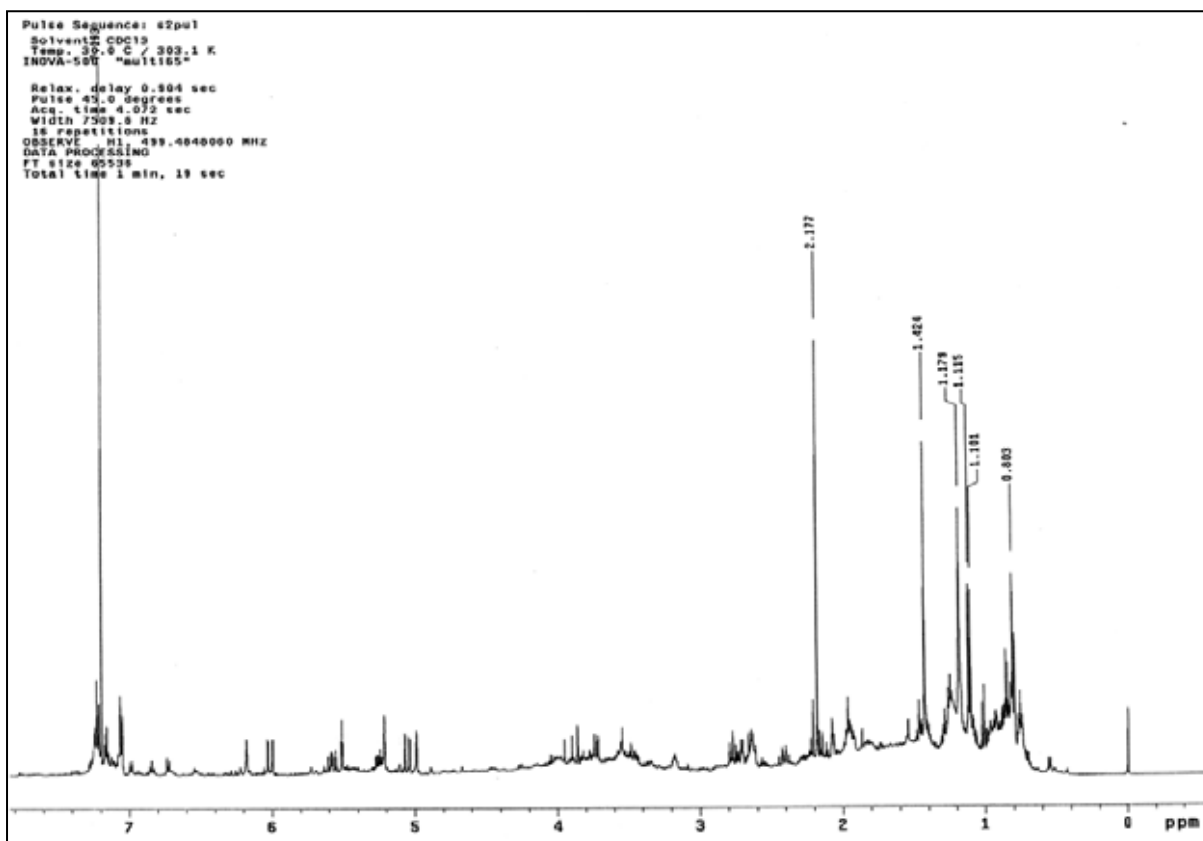
Anexo 24 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-c (3b) (CDCl_3 , 500 MHz).



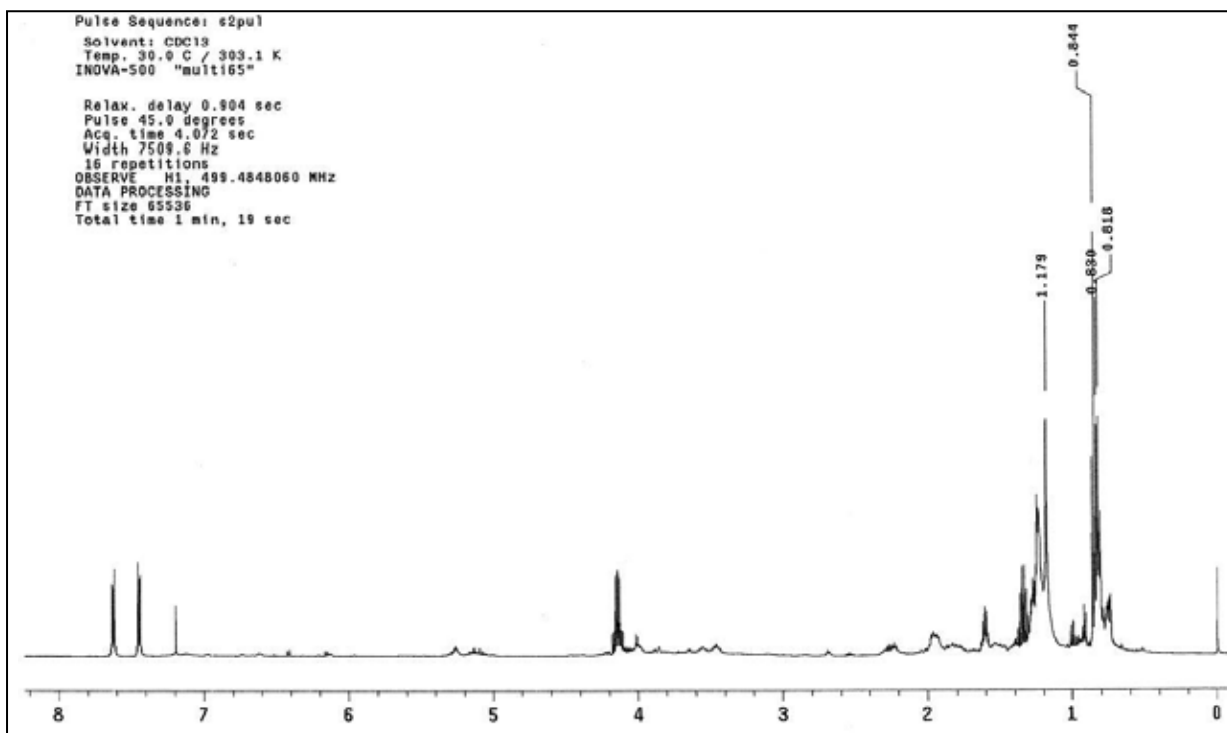
Anexo 25 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-c (3c/d) (CDCl_3 , 500 MHz).



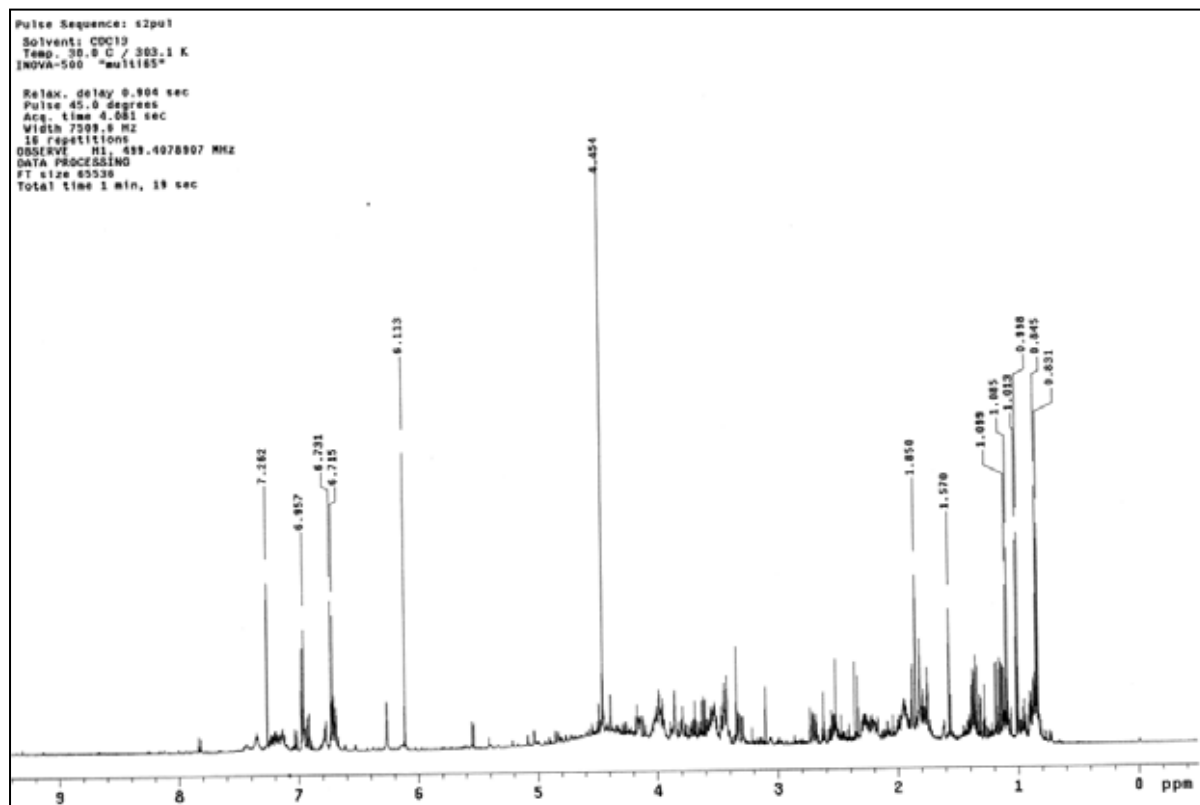
Anexo 26 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-c (16) (CDCl_3 , 500 MHz).



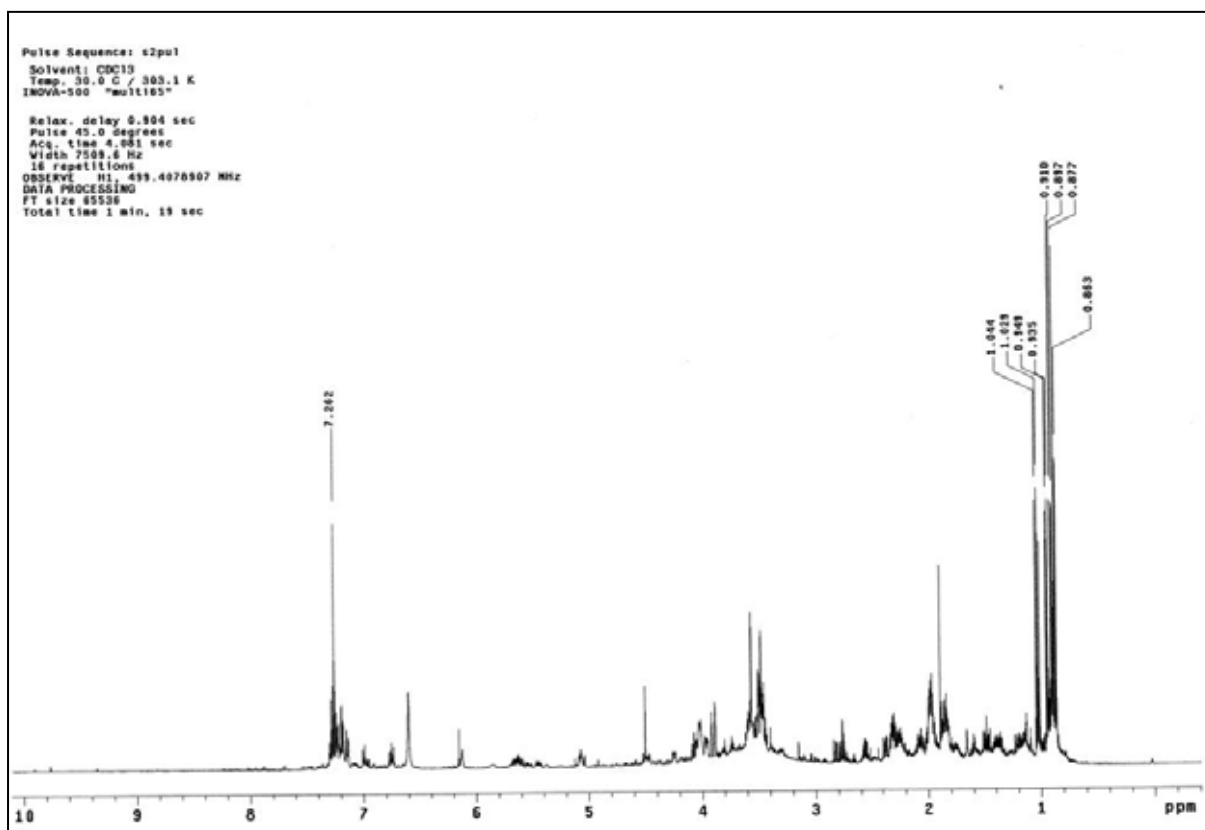
Anexo 27 – Espectro de RMN ^1H do extrato bruto de Cs-c (17/22) (CDCl_3 , 500 MHz).



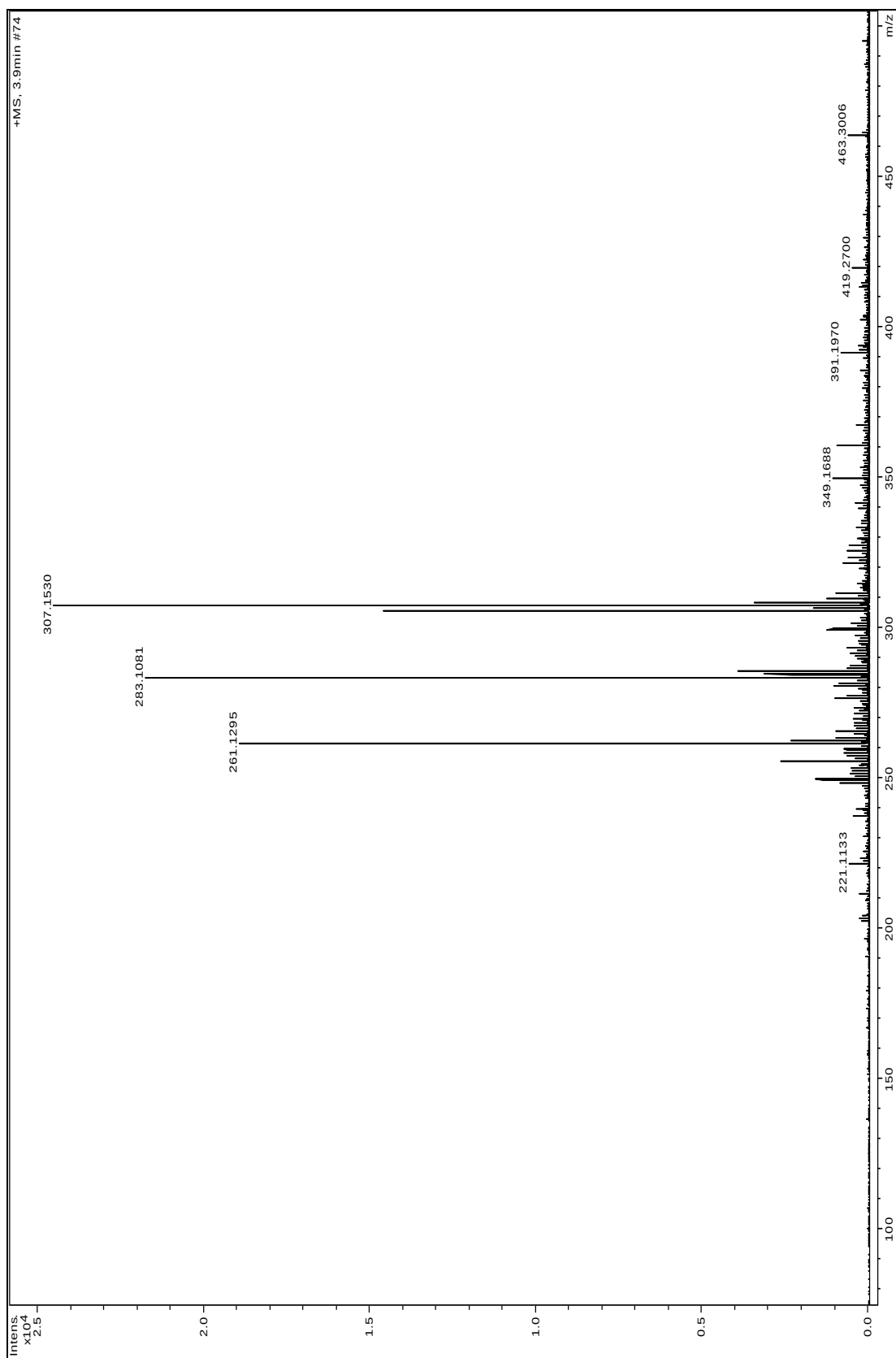
Anexo 28 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de Cs-c (19/22) (CDCl_3 , 500 MHz).



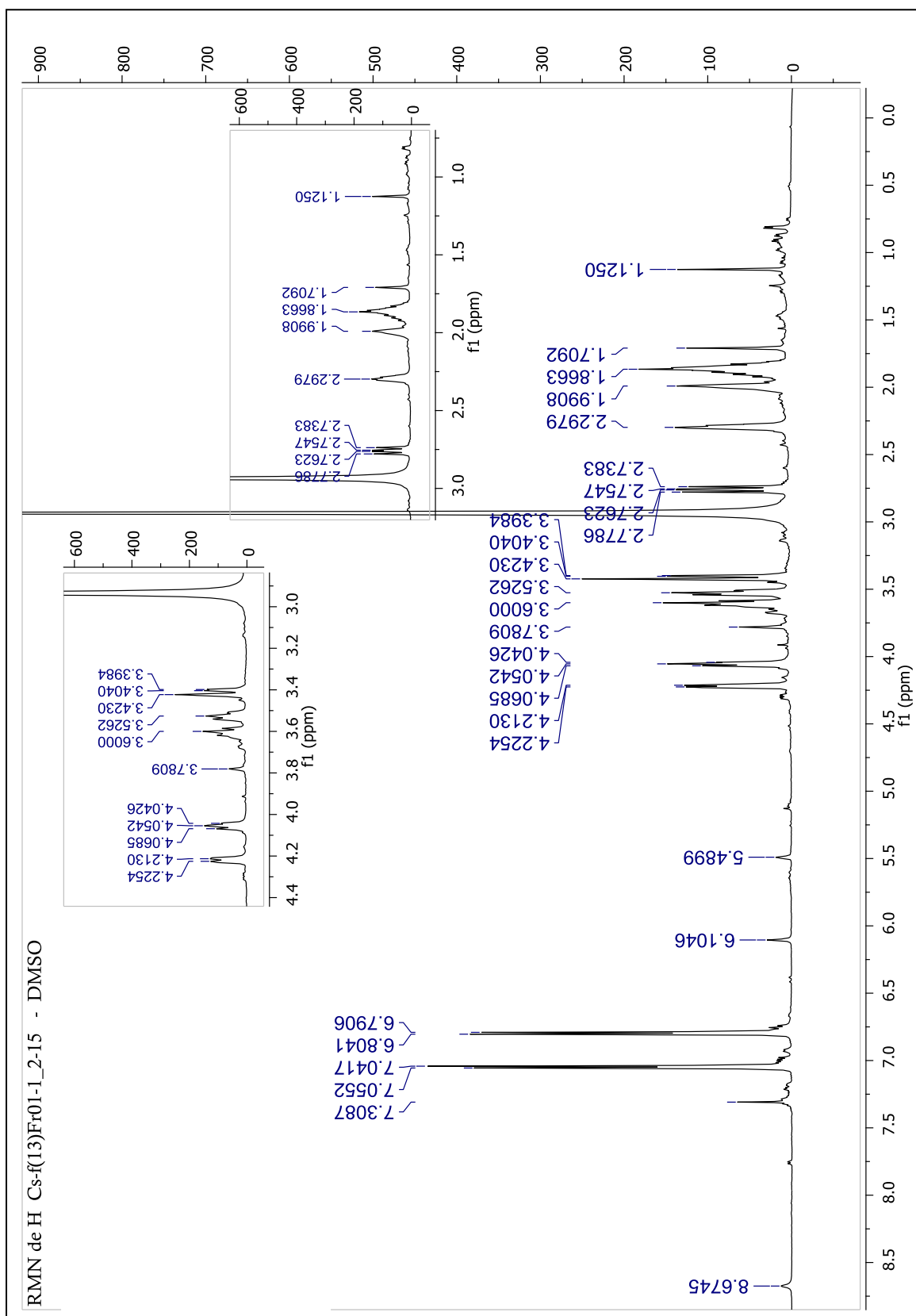
Anexo 29 – Espectro de RMN de ¹H da fração Cs-f(23)Fr01-01 (CDCl₃, 500 MHz)



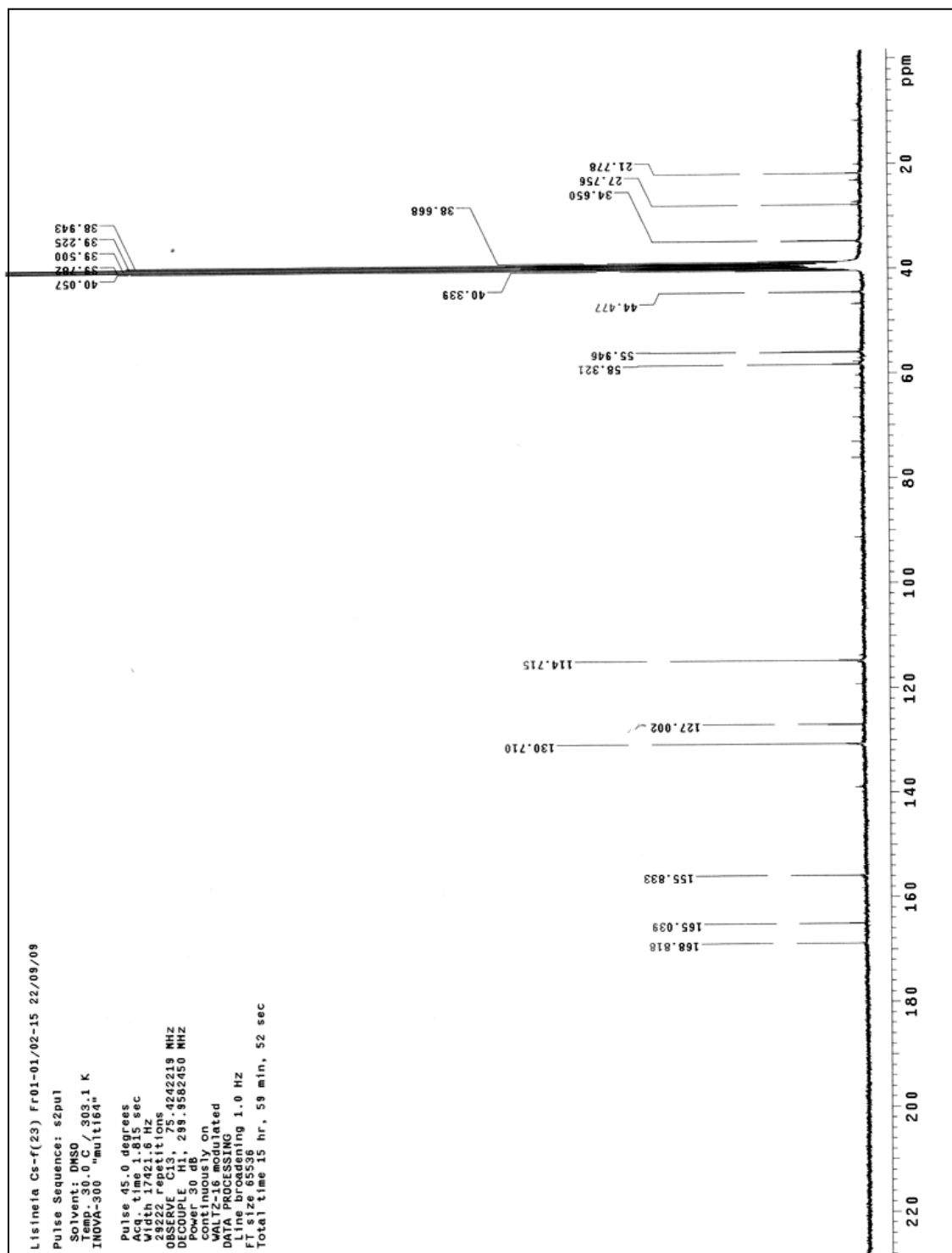
Anexo 30 - Espectro de RMN de ¹H da fração Cs-f(23)Fr01-02 (CDCl₃, 500 MHz)



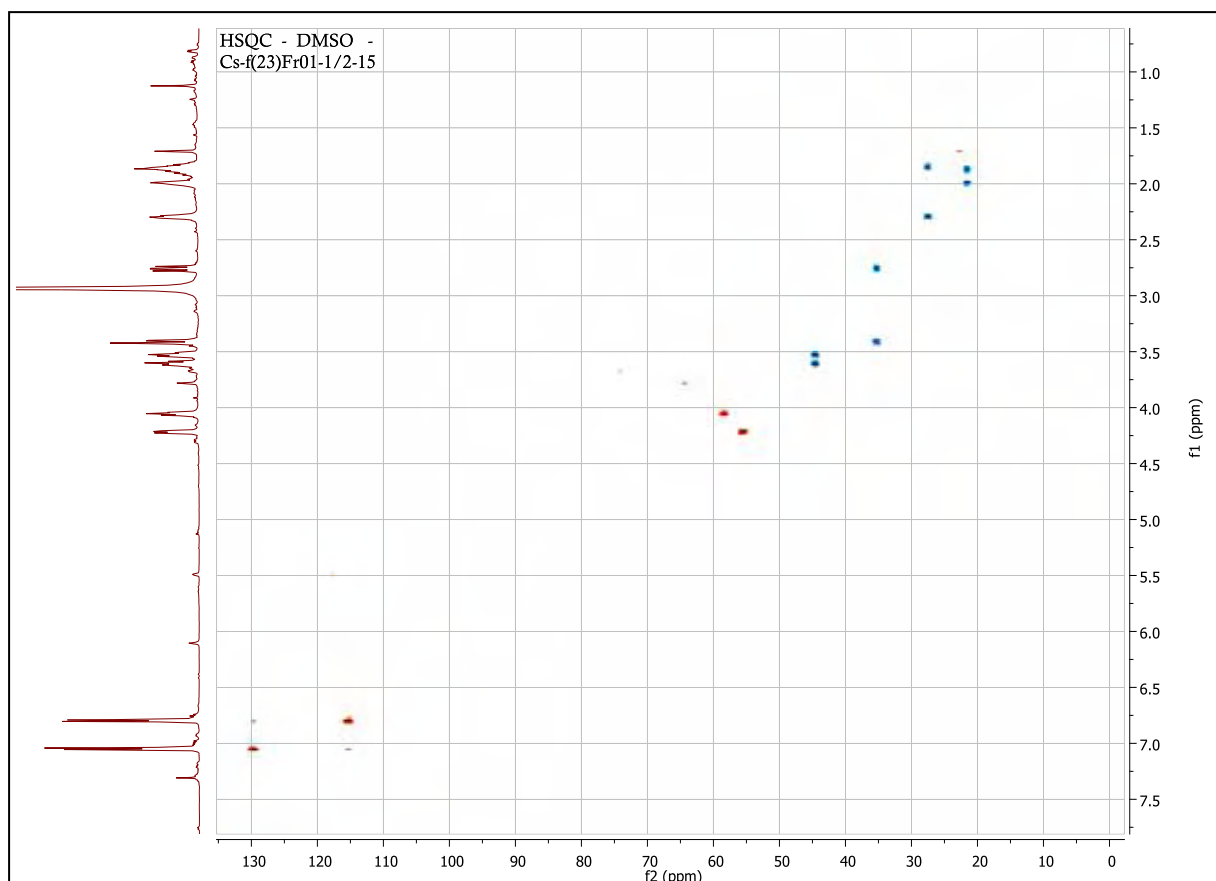
Anexo 31 – Espectro de Massas da Substância **02** [EM-IES (+)]



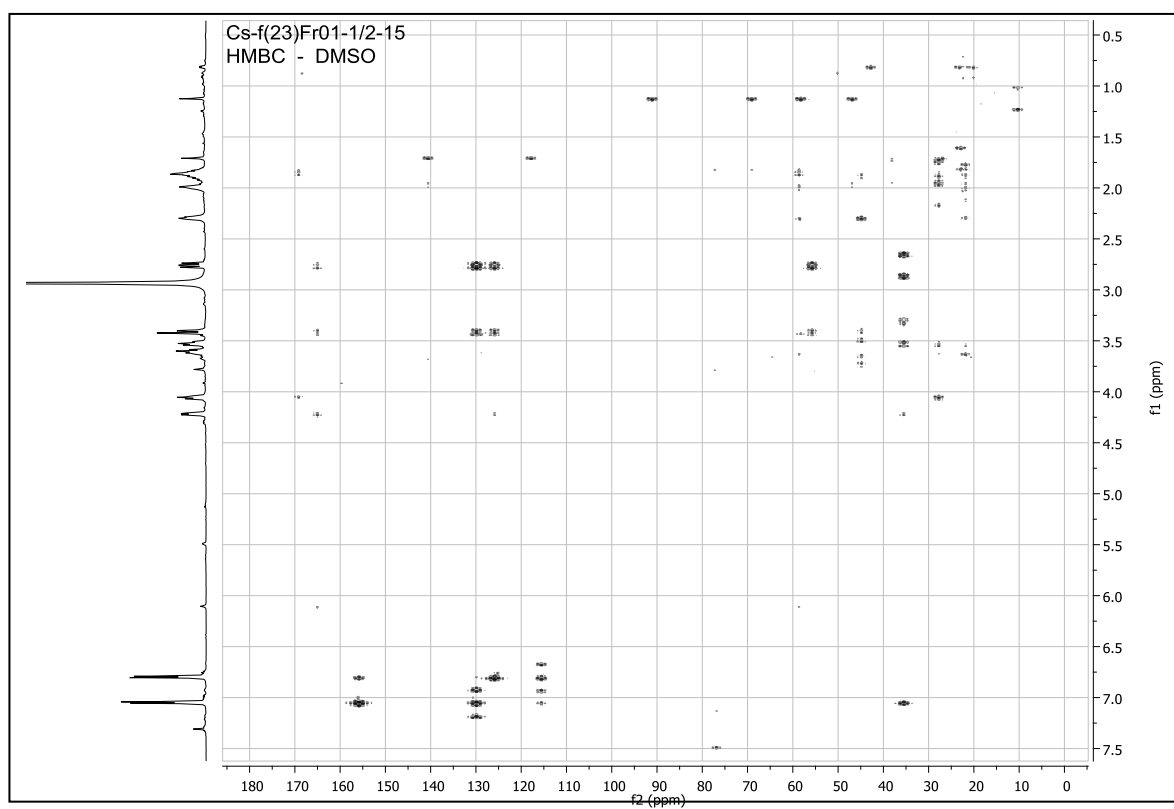
Anexo 32 – Espectro de RMN de ^1H da Substância **02** (DMSO- d_6 , 600 Hz)



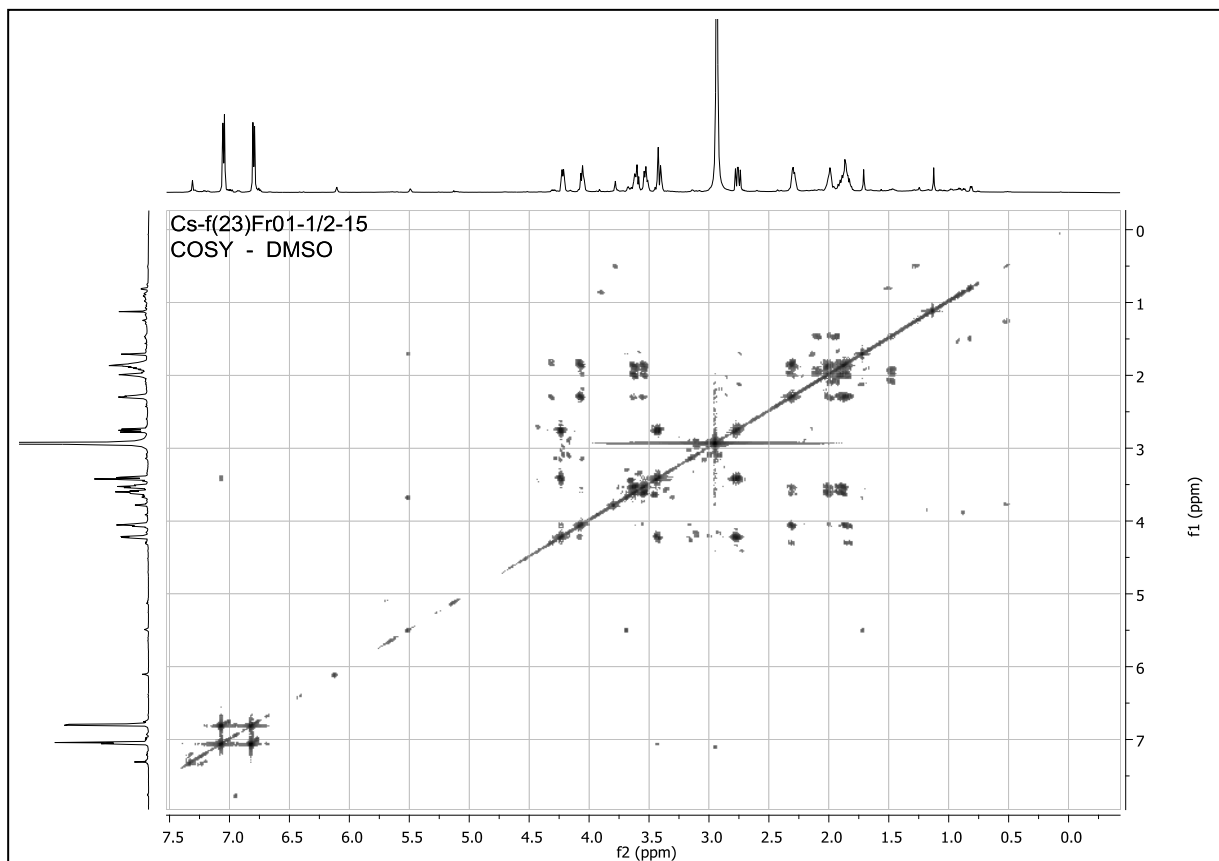
Anexo 33 – Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 02 (DMSO- d_6 , 600 Hz)



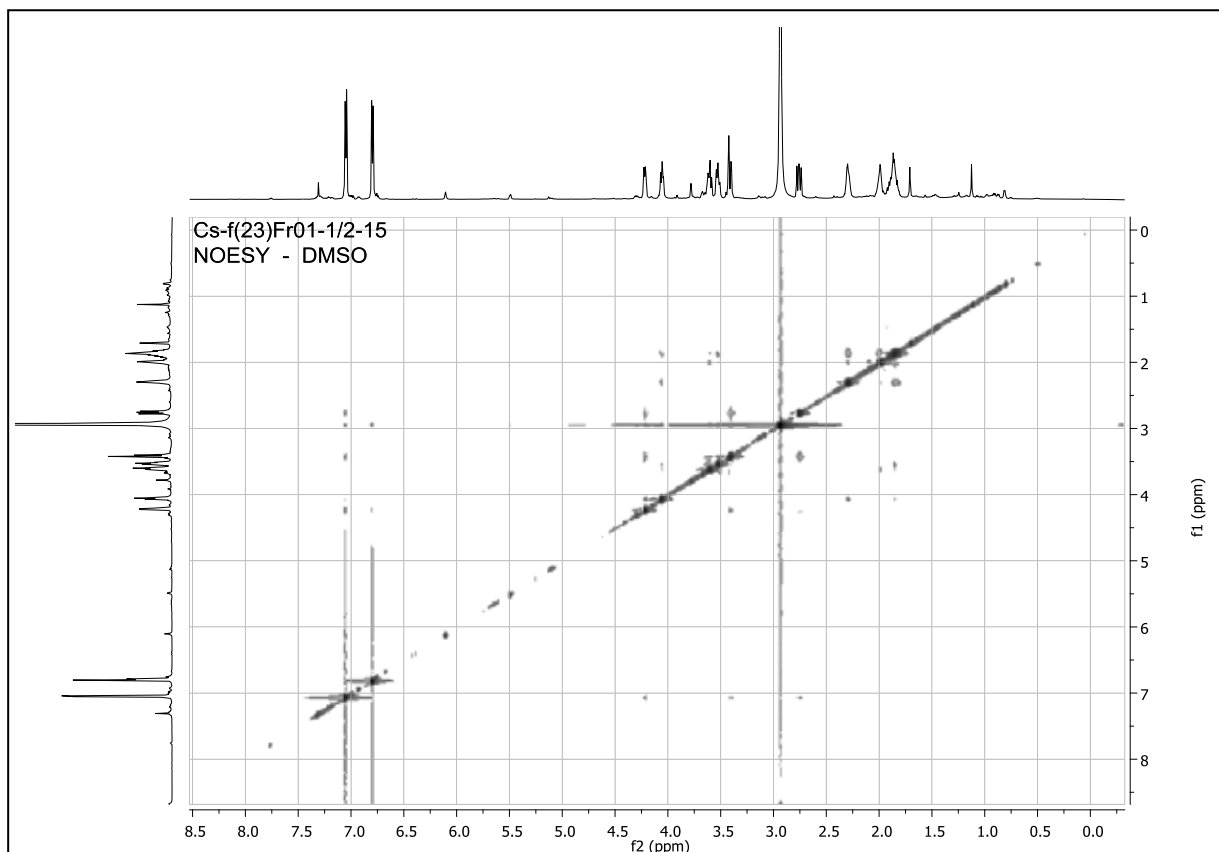
Anexo 34 – Mapa de contorno de g HSQC da Substância **02** (DMSO- d_6 , 125Hz)



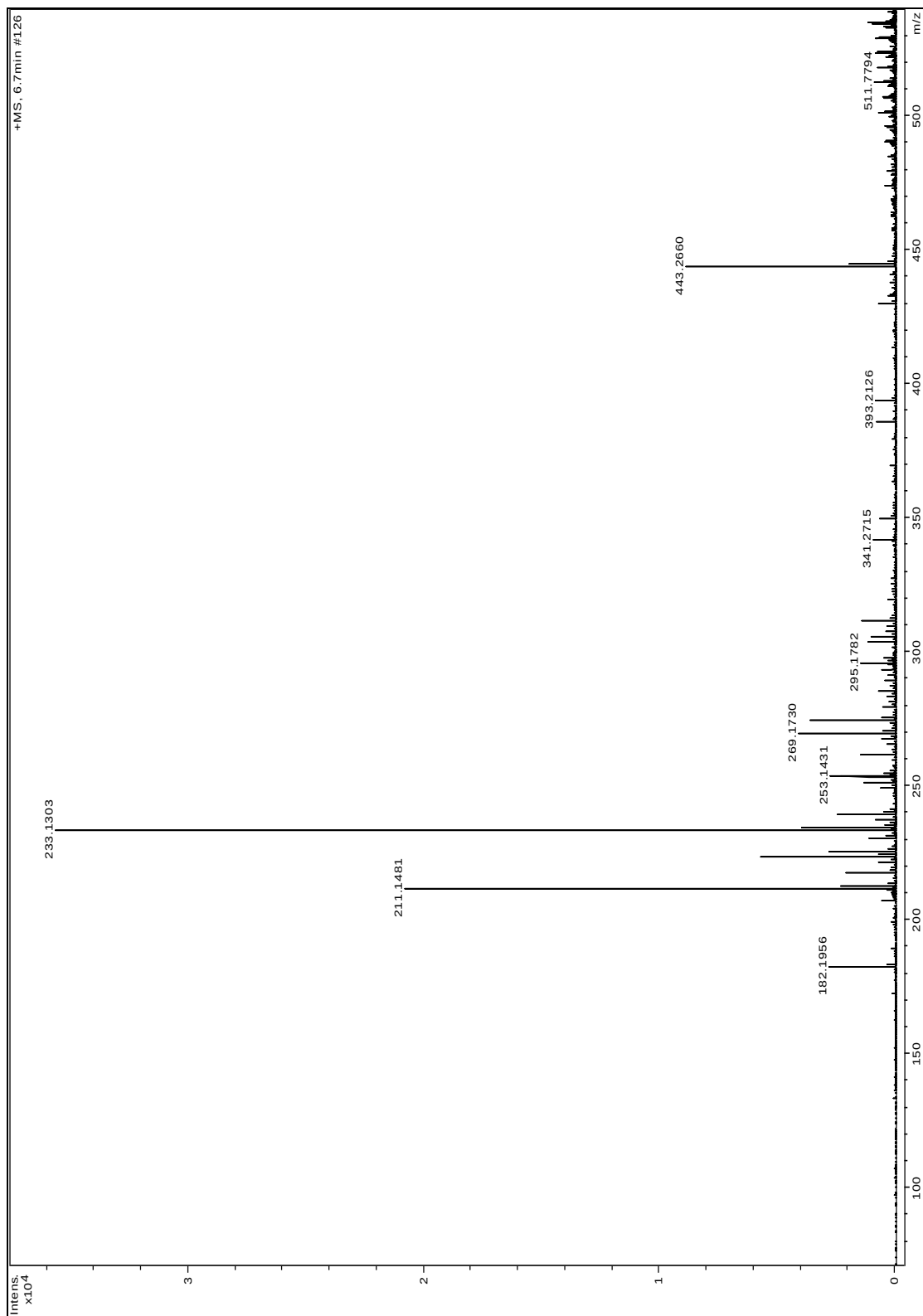
Anexo 35 – Mapa de contorno de g HMBC da Substância **02** (DMSO- d_6 , 125 Hz)



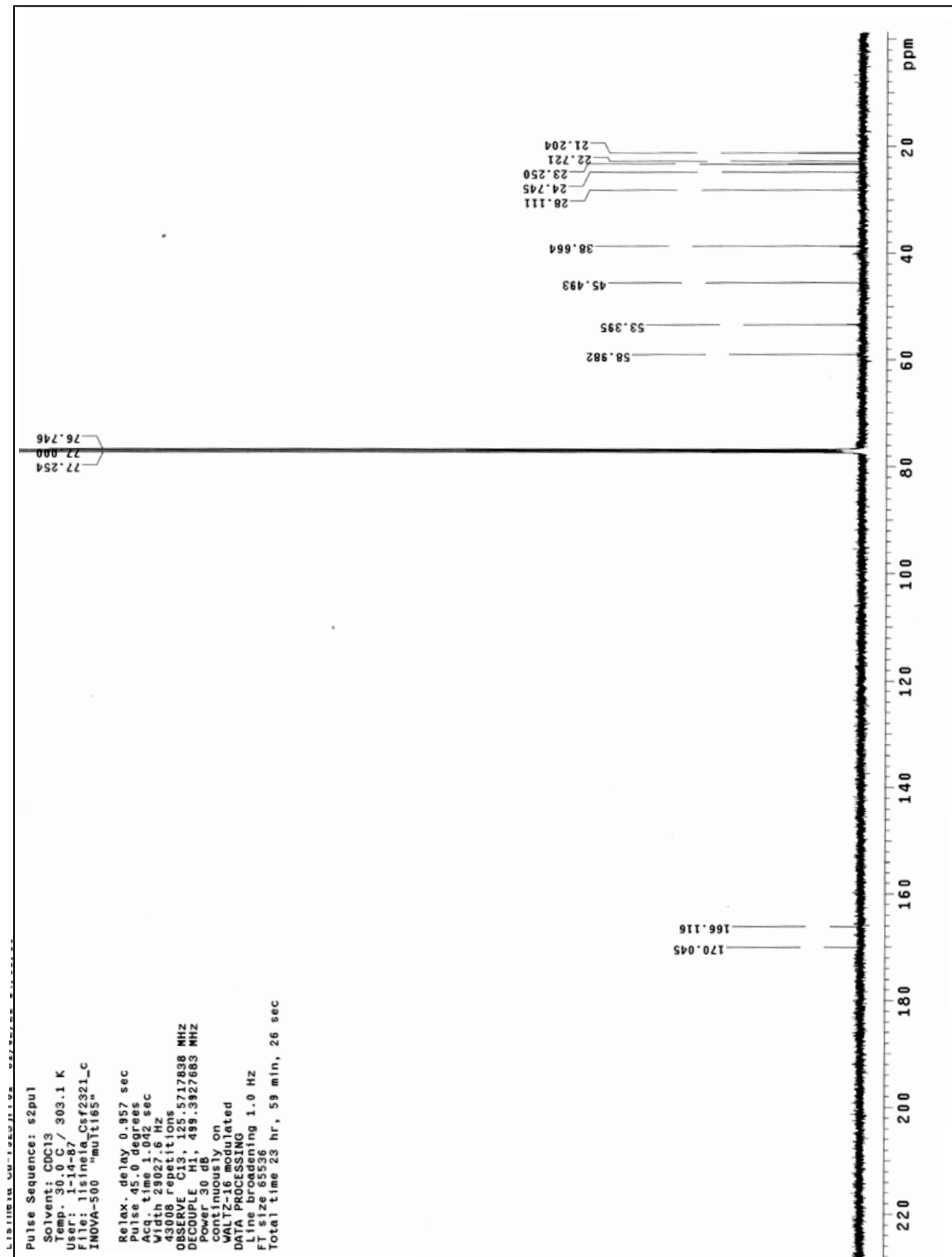
Anexo 36 – Espectro de gCOSY da Substância **02** (DMSO-d₆, 600 Hz)



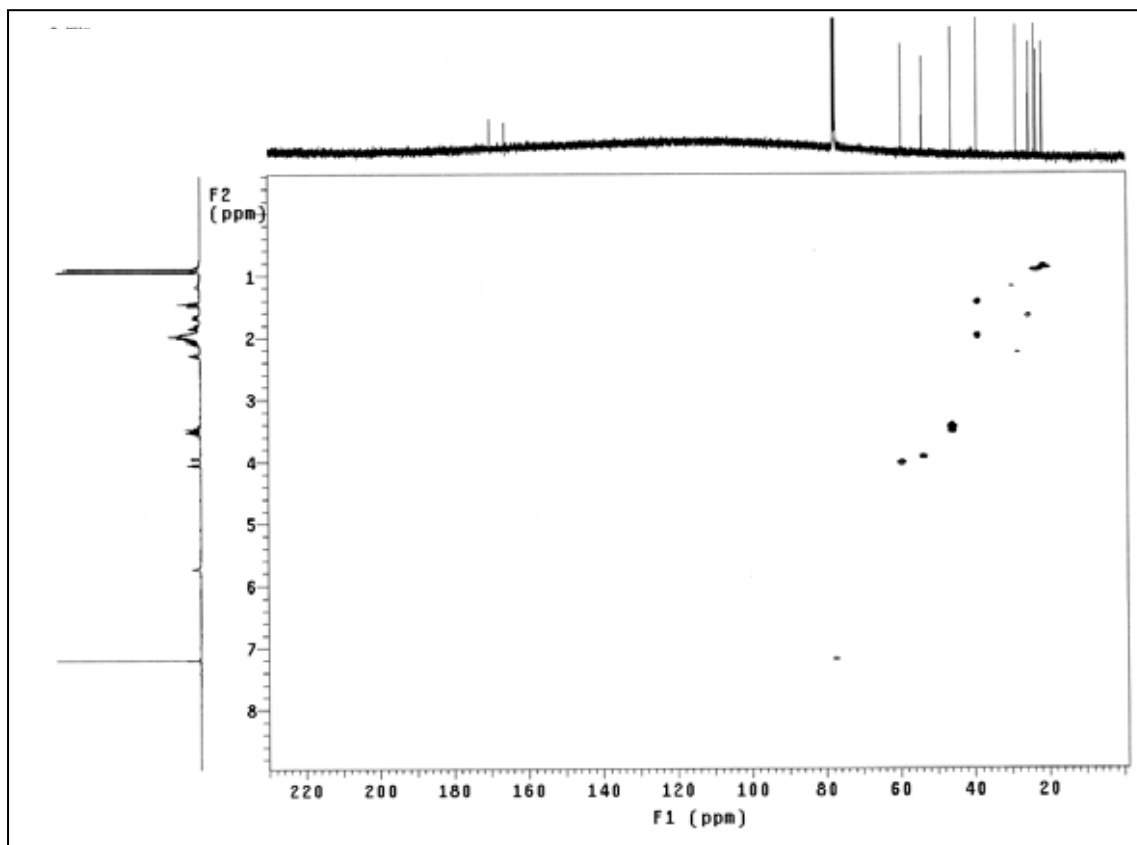
Anexo 37 – Espectro de NOESY 2D da Substância **02** (DMSO-d₆, 600 Hz)



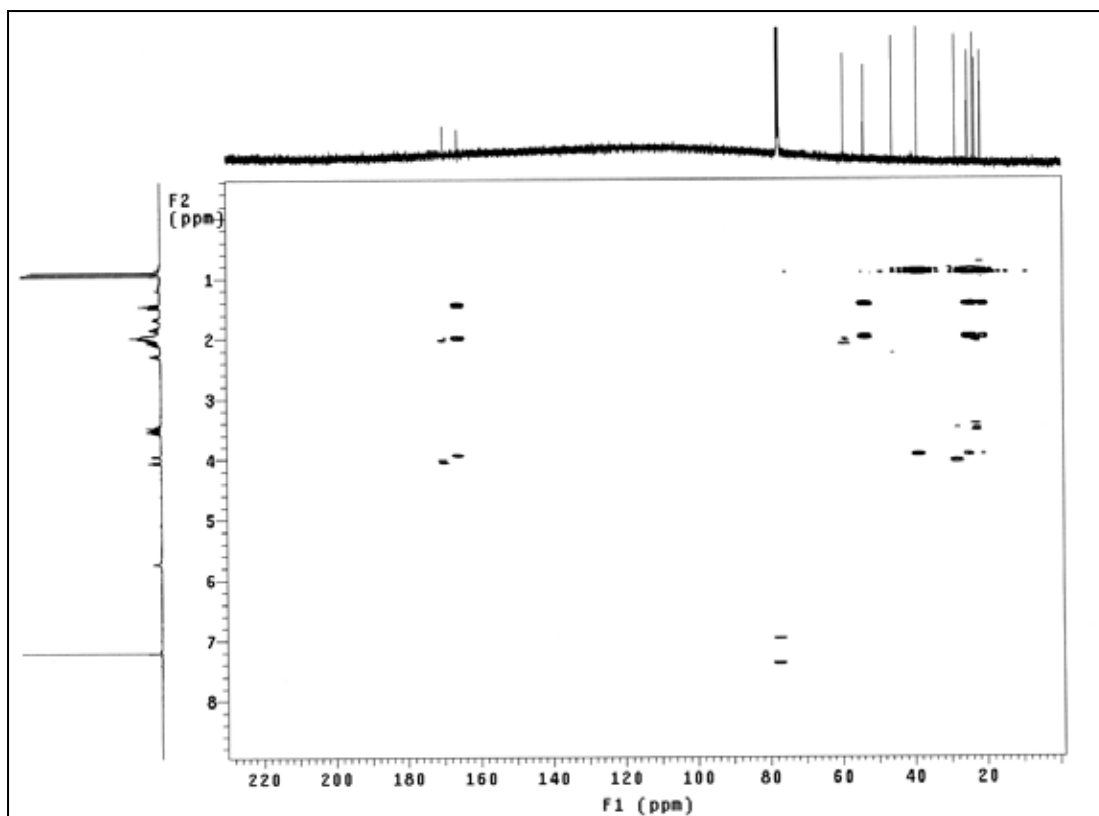
Anexo 38 – Espectro de Massas da Substância **03** [EM-IES (+)]



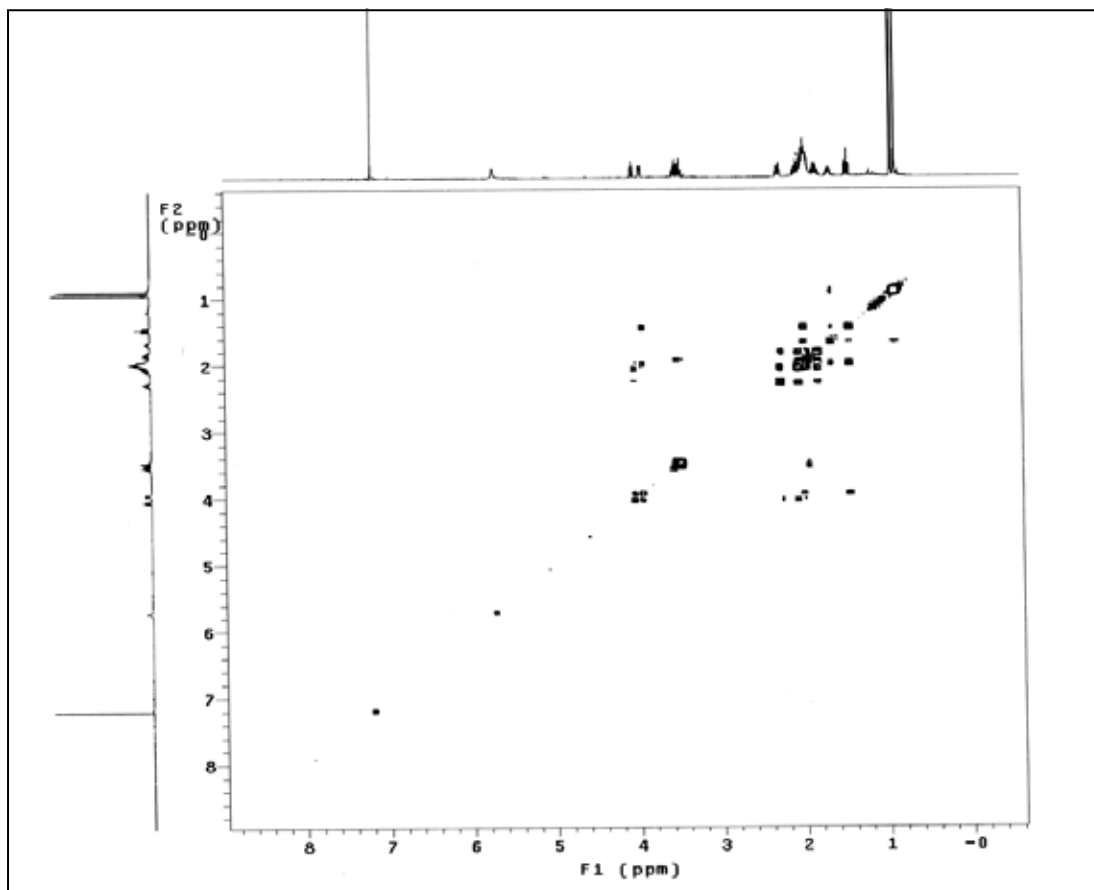
Anexo 40 – Espectro de RMN de ¹³C da Substância 03 (CDCl₃, 125 Hz)



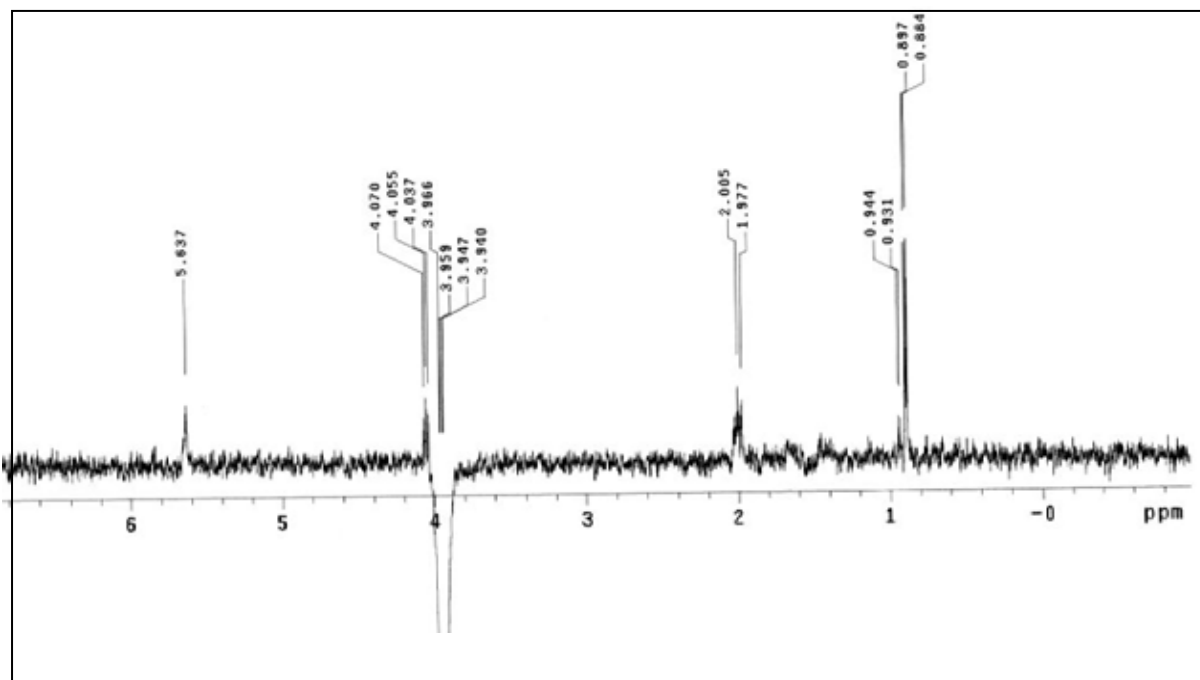
Anexo 41 – Mapa de contorno de gHMQC da substância **03** (CDCl₃, 125 Hz)



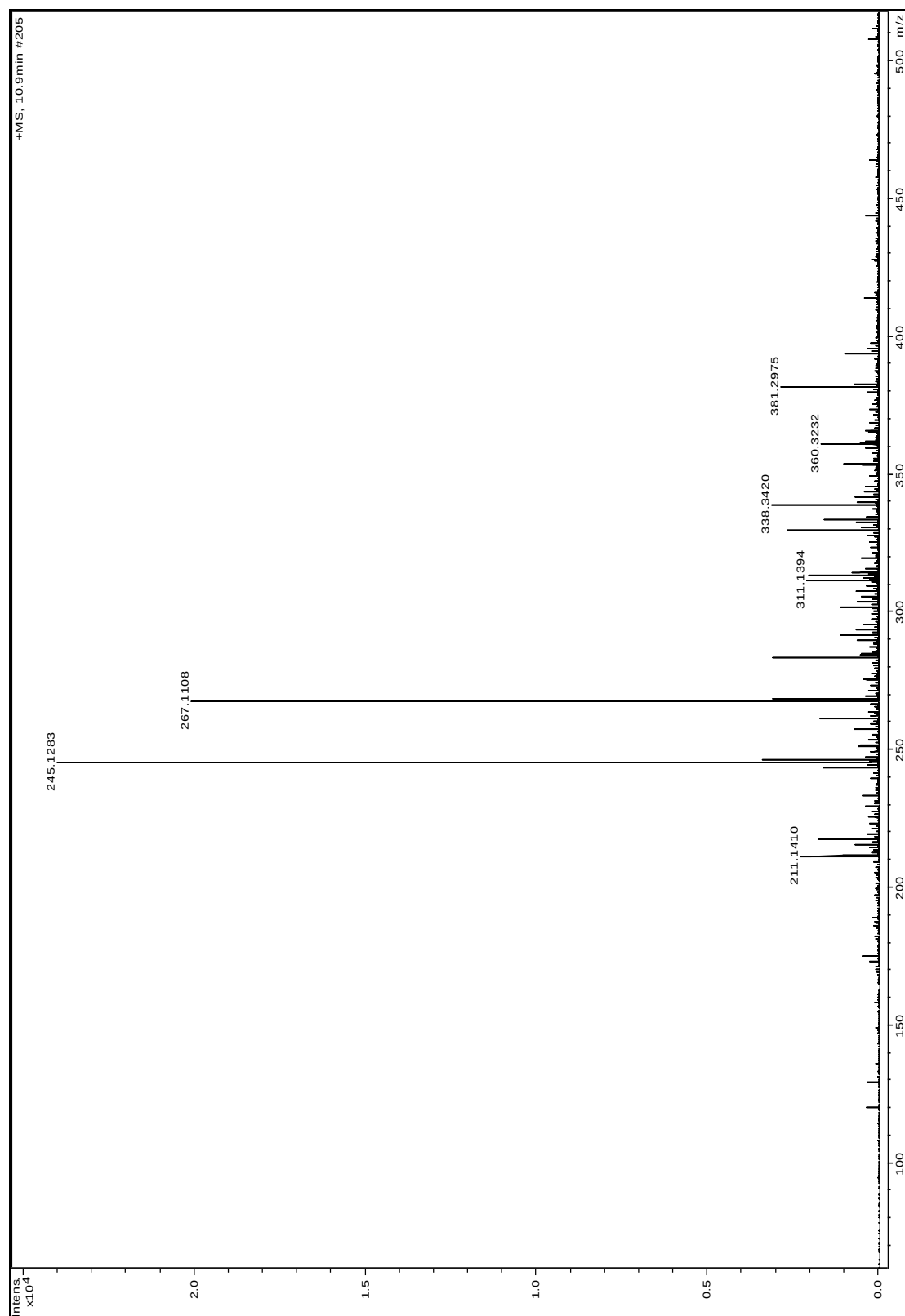
Anexo 42 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **03** (CDCl₃, 125 Hz)



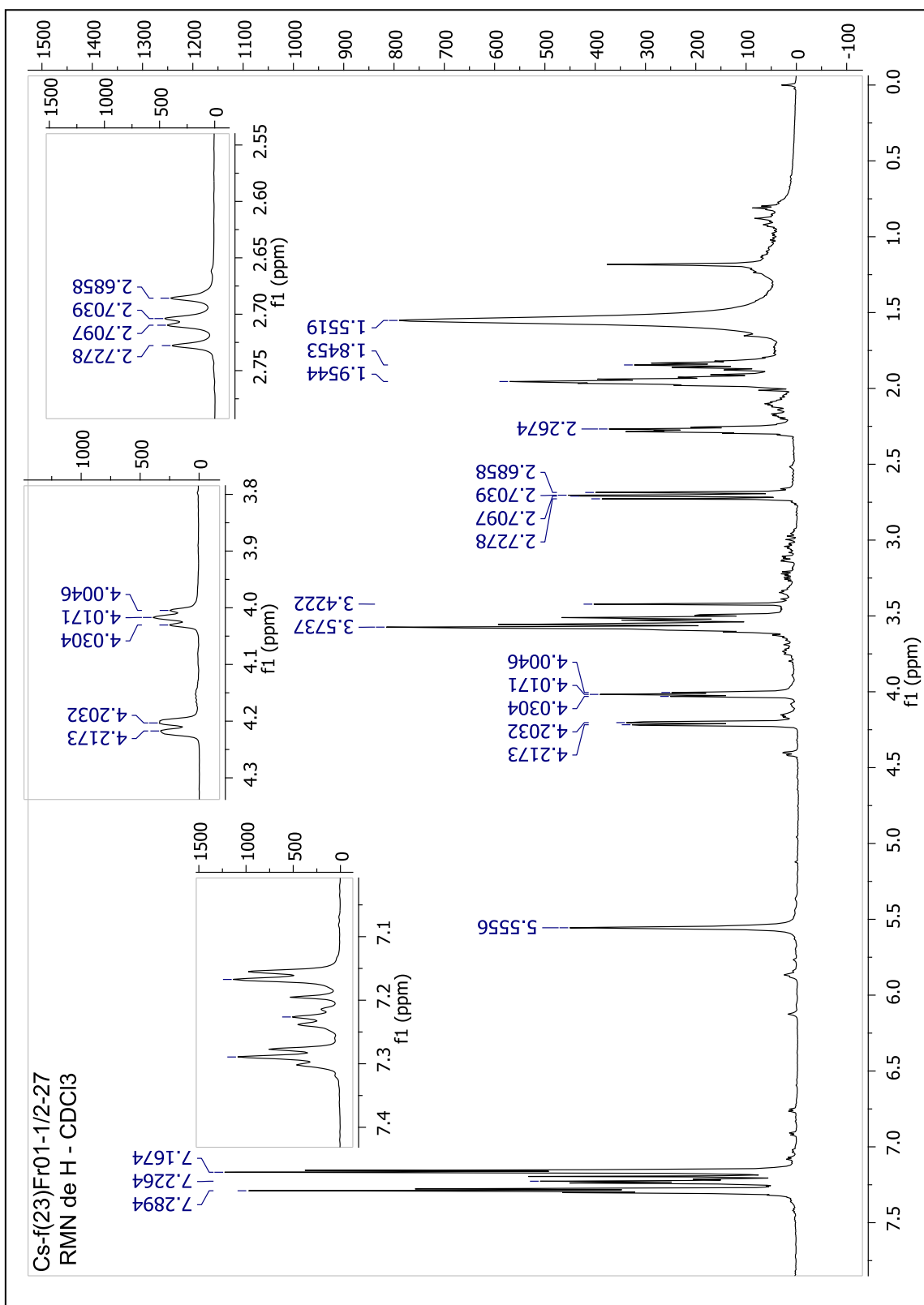
Anexo 43 – Espectro de $g\text{COSY}$ da substância **03** (CDCl_3 , 500 Hz)



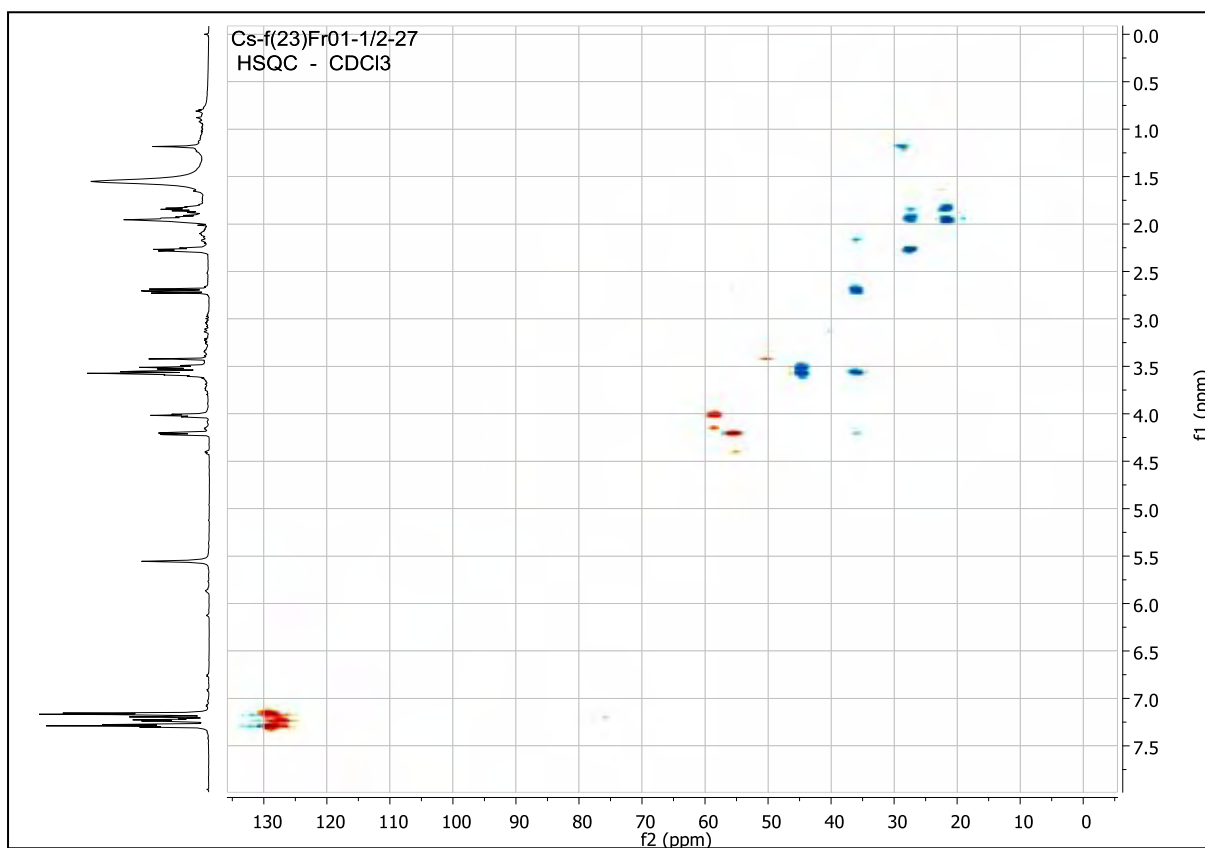
Anexo 44 – Espectro de NOESY 1D da substância **03** (CDCl₃, 500 Hz)



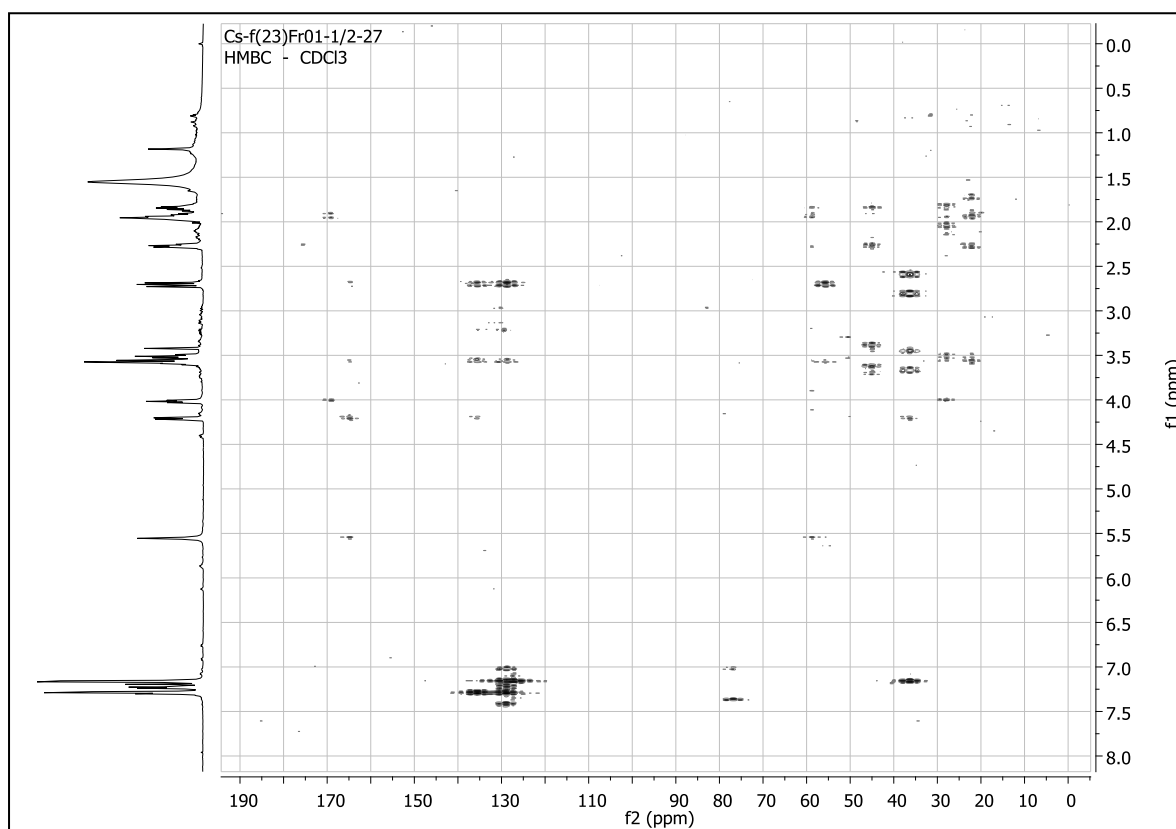
Anexo 45 – Espectro de Massas da Substância **04** [EM-IES (+)]



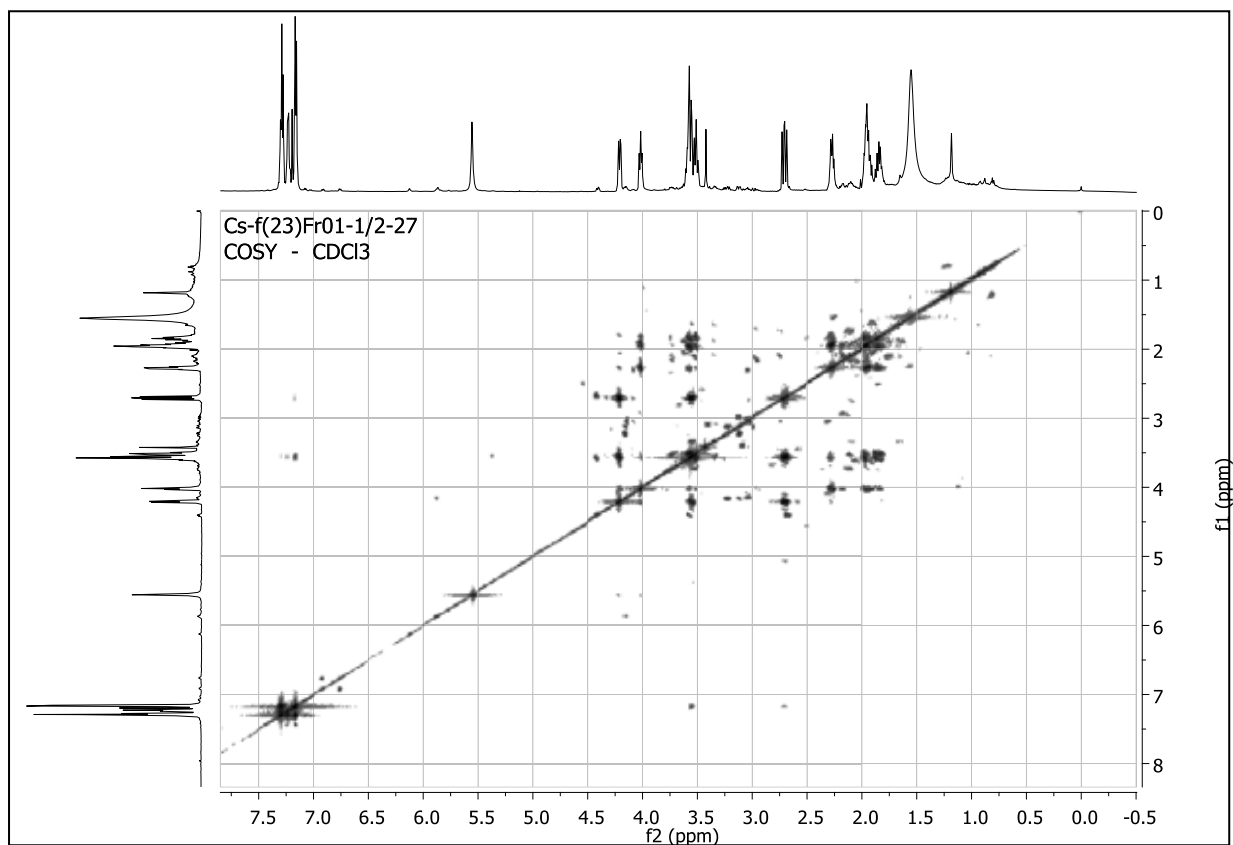
Anexo 46 – Espectro de RMN de ^1H da Substância **04** (CDCl_3 , 600 Hz)



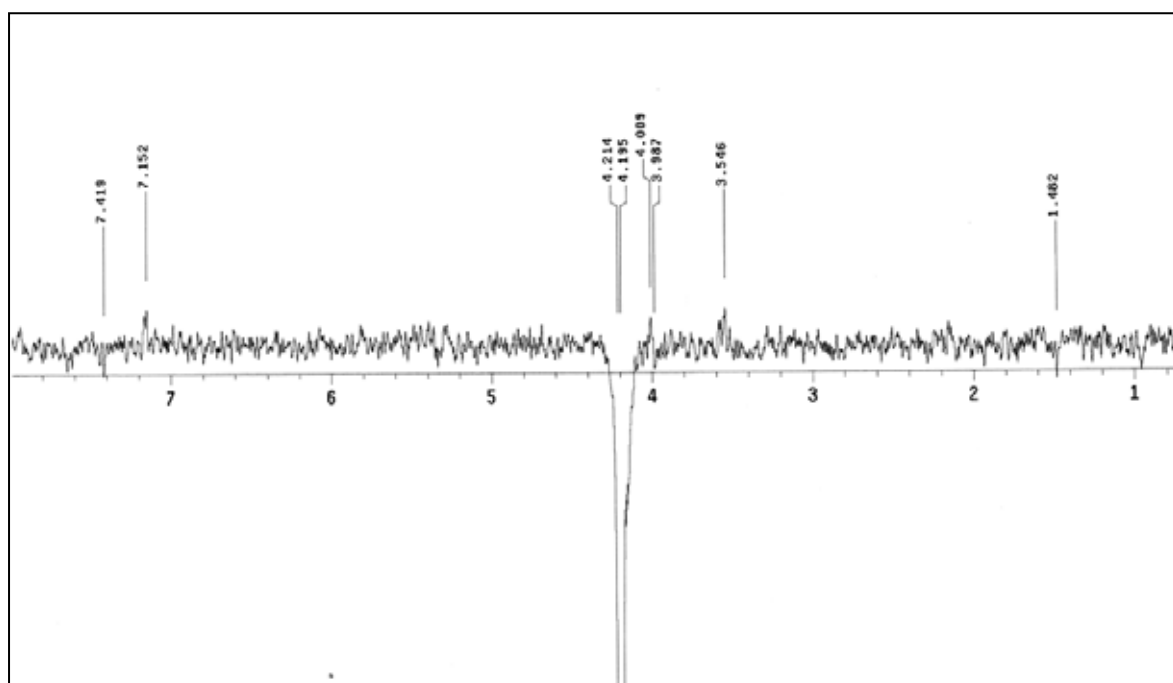
Anexo 47 –Mapa de contorno de gHSQC da substância **04** (CDCl₃, 125 Hz)



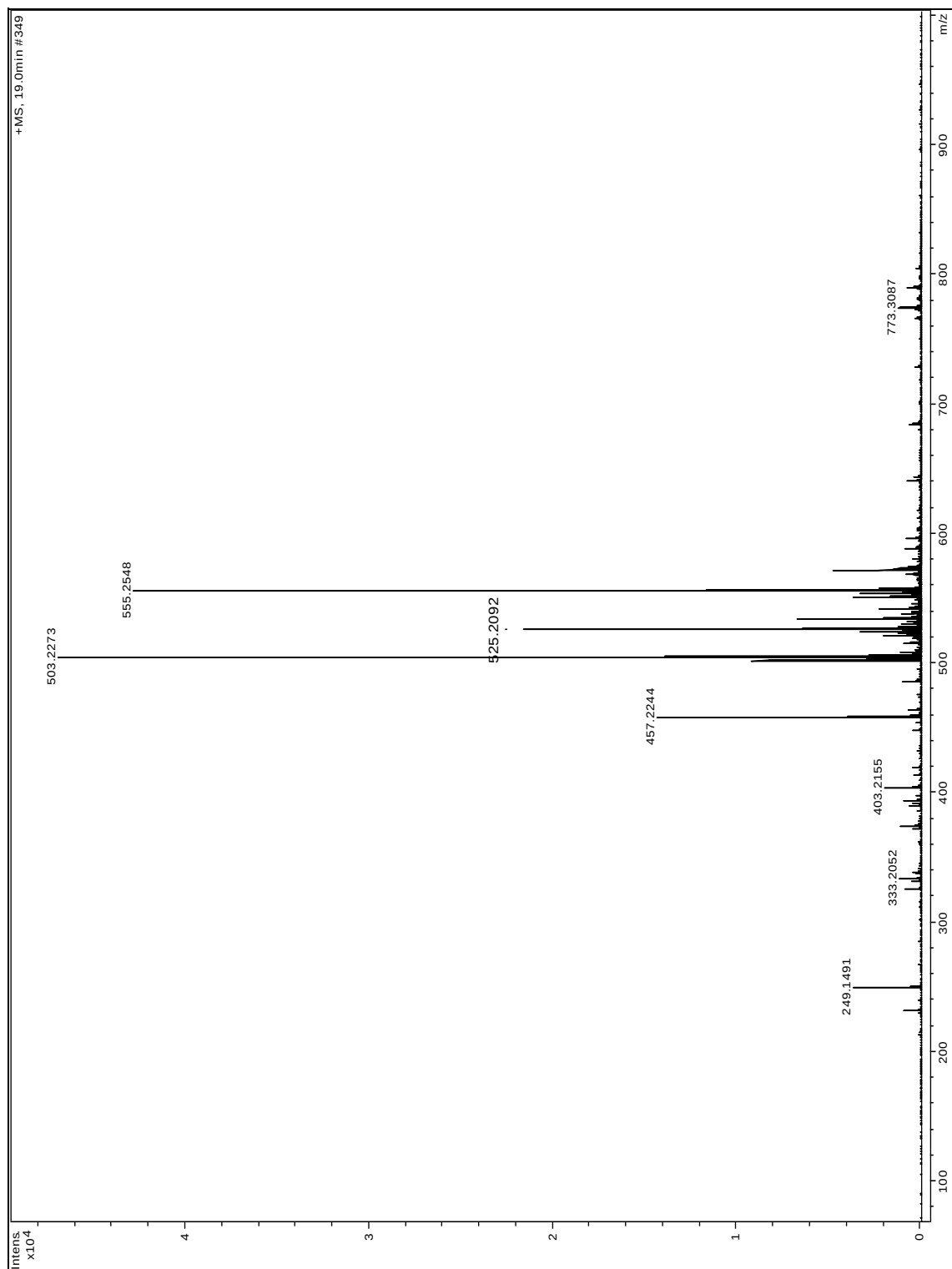
Anexo 48 –Mapa de contorno de gHMBC da substância **04** (CDCl₃, 125 Hz)



Anexo 49 – Espectro de gCOSY da Substância **04** (CDCl₃, 600 Hz)



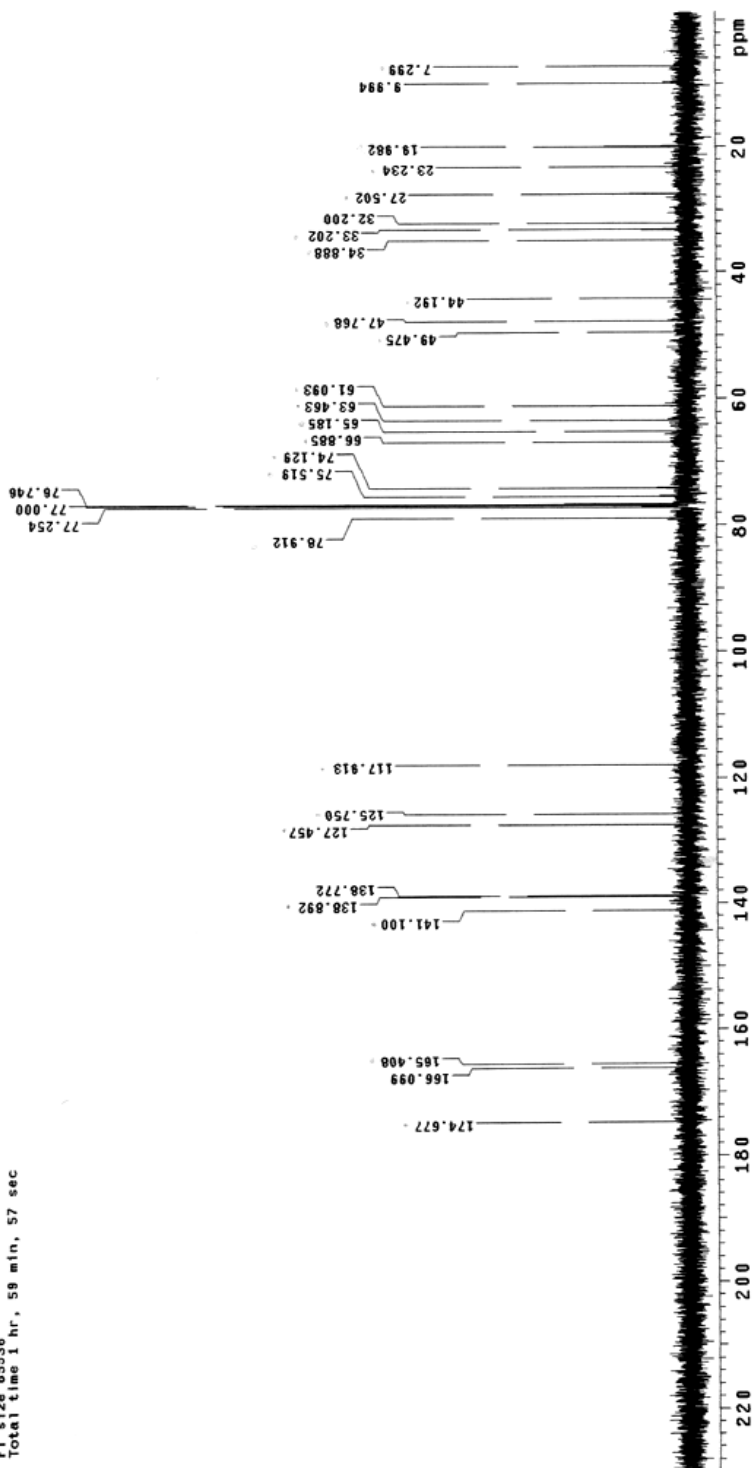
Anexo 50 – Espectro de NOESY da Substância **04** (CDCl₃, 500 Hz)



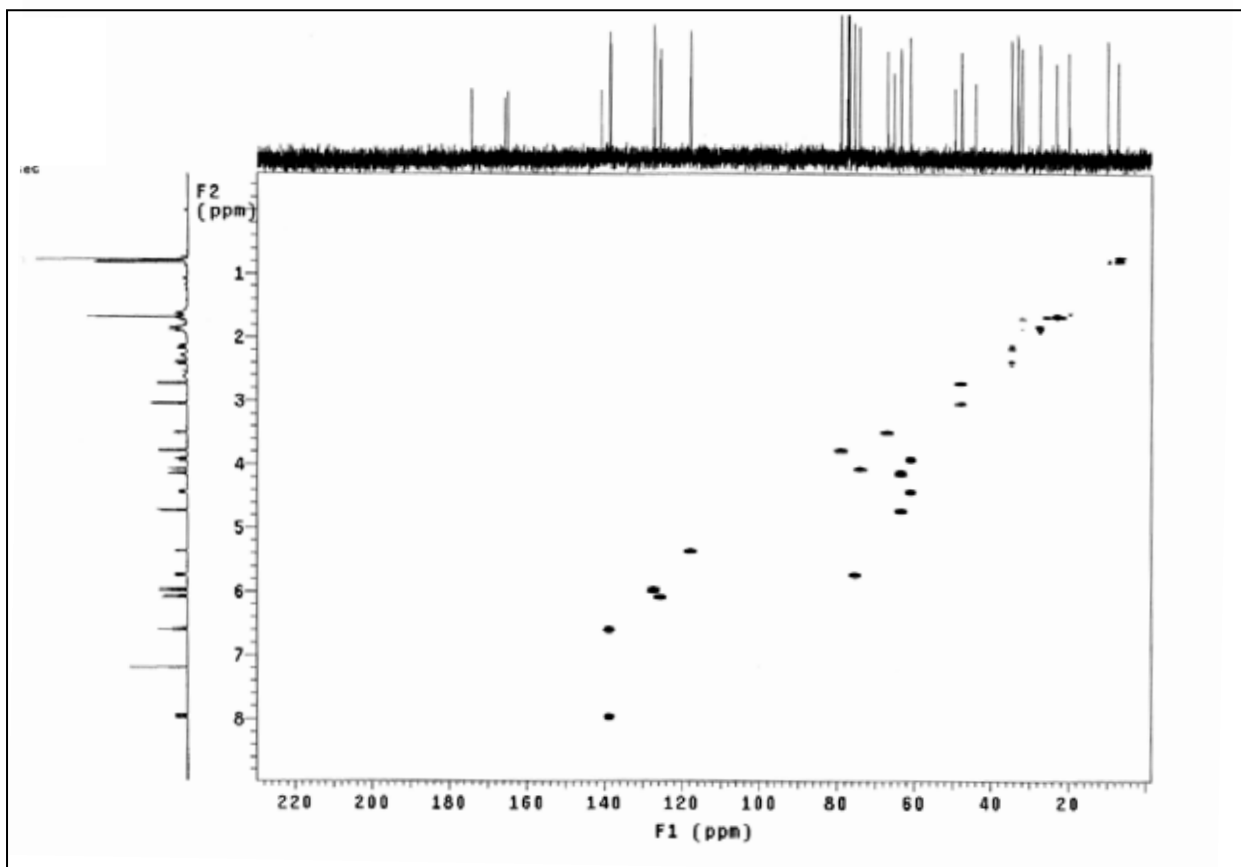
Anexo 51 – Espectro de Massas da Substância 01 [EM-IES (+)]

Lisina Cs-f(23) Fr04-05 25/04/08

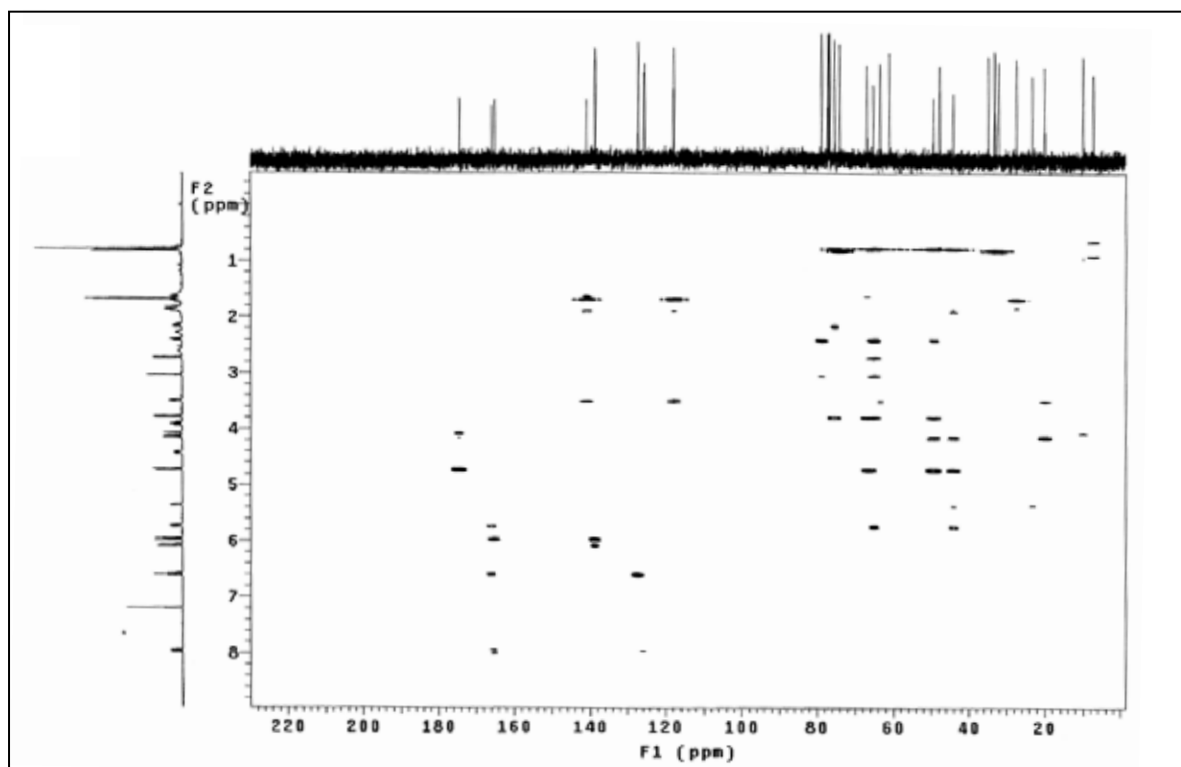
Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CDCl3
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: Lisina
 File: lisina.fr0405.c
 INOVA-500 "mult165"
 Relax. delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.042 sec
 Width 29027.6 Hz
 409 repetitions
 OBSERVE CH1, 125.584918 MHz
 DECOUPLE CH2, 439.445286 MHz
 Power 30 dB,
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 F1 125.584918 MHz
 Total time 1 hr, 59 min, 57 sec



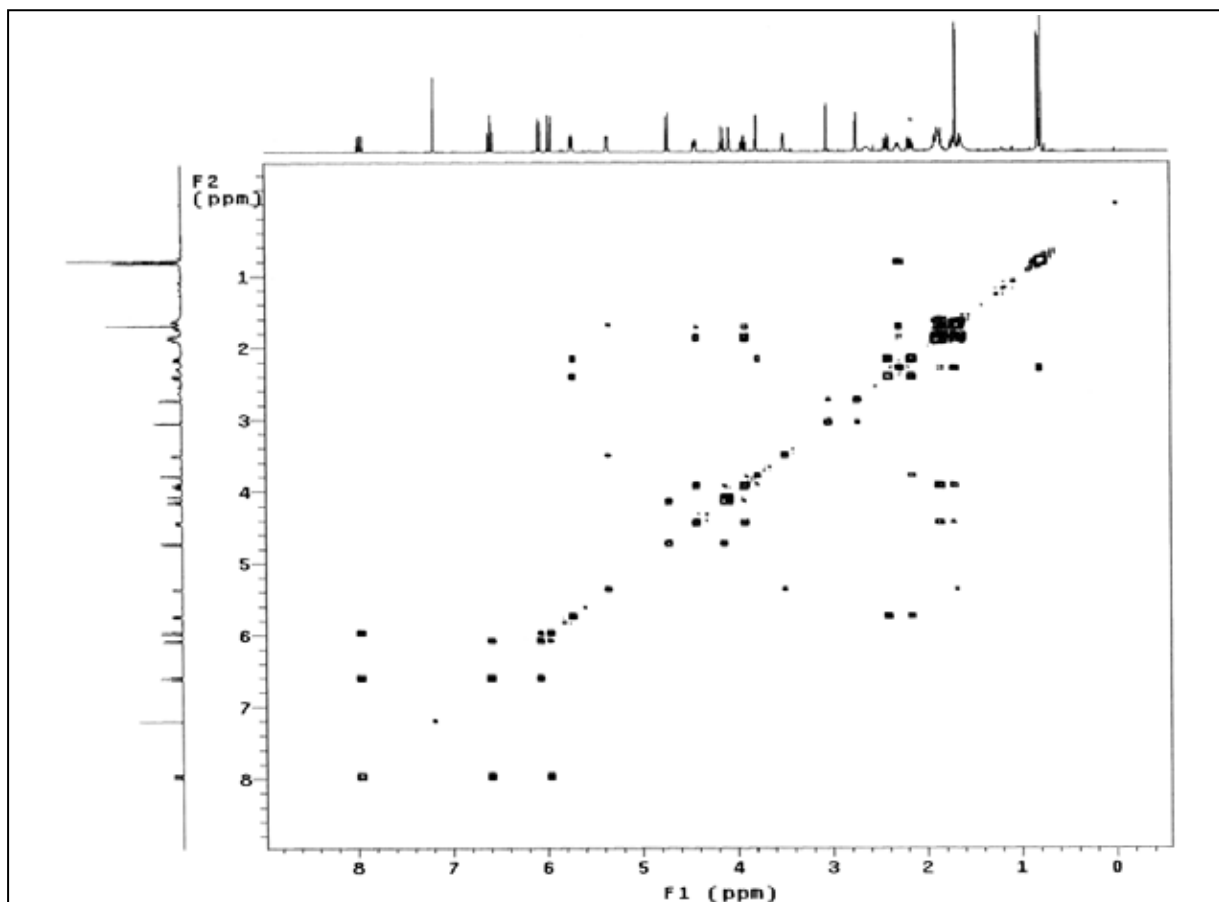
Anexo 53 – Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 01 (CDCl_3 , 125 Hz)



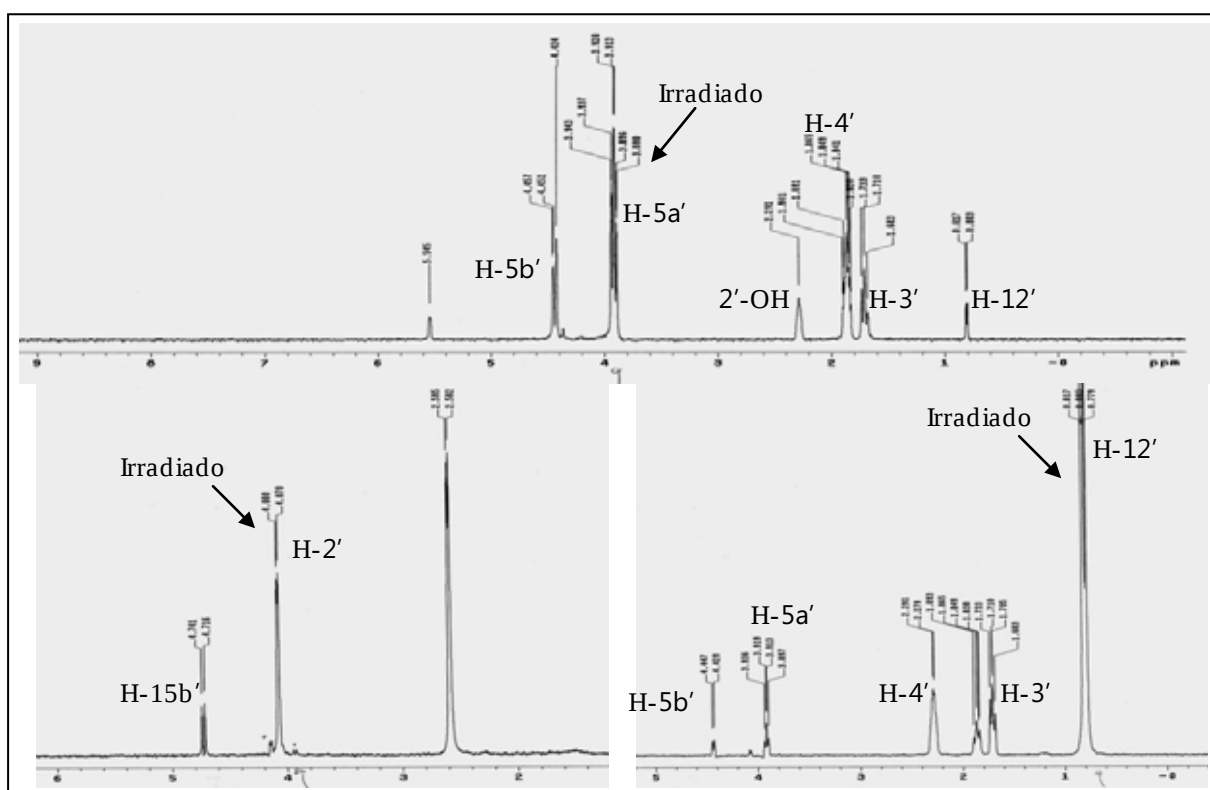
Anexo 54–Mapa de contorno de gHMQC da substância **01** (CDCl₃, 125 Hz)



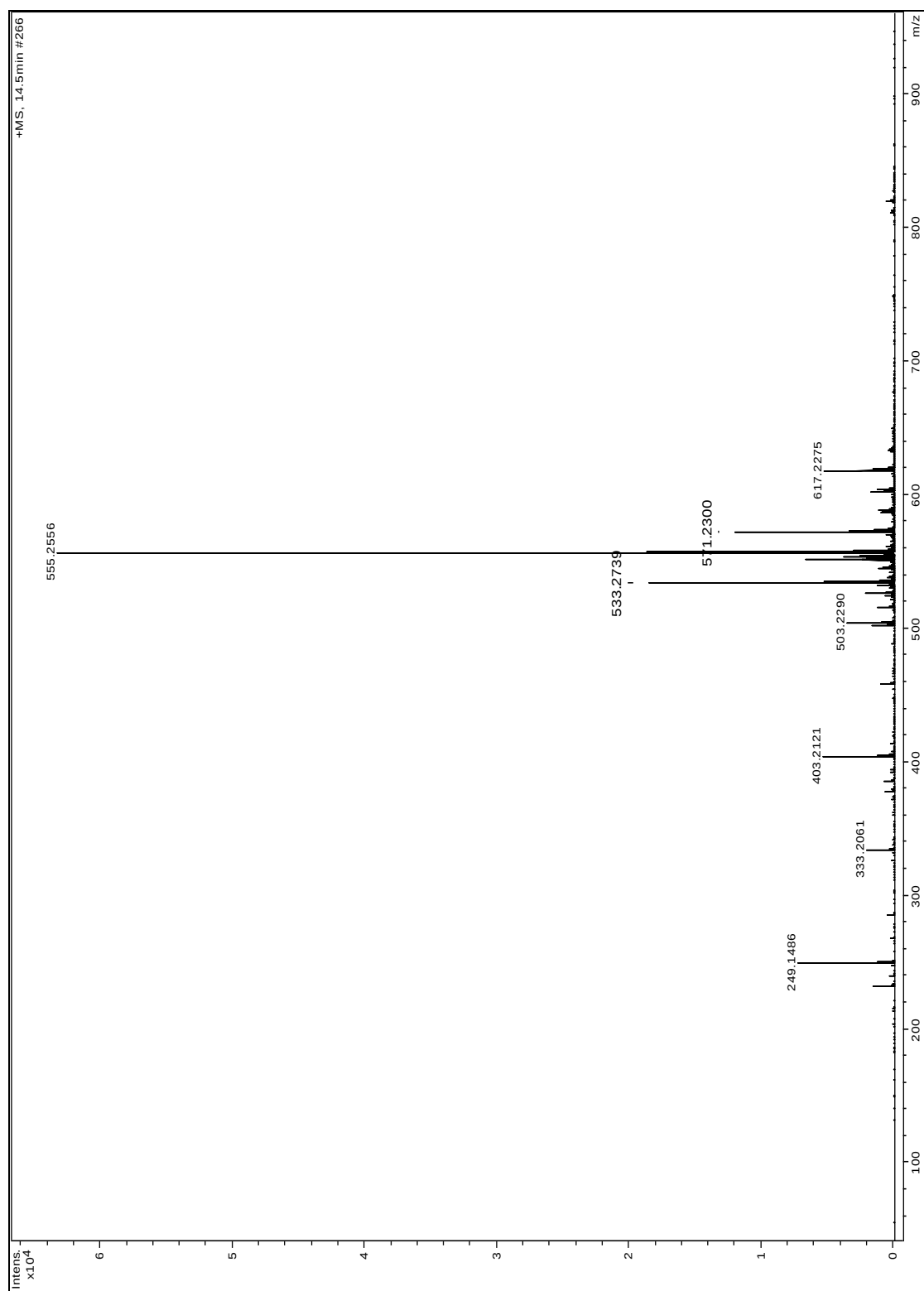
Anexo 55–Mapa de contorno de gHMBC da substância **01** (CDCl₃, 125 Hz)



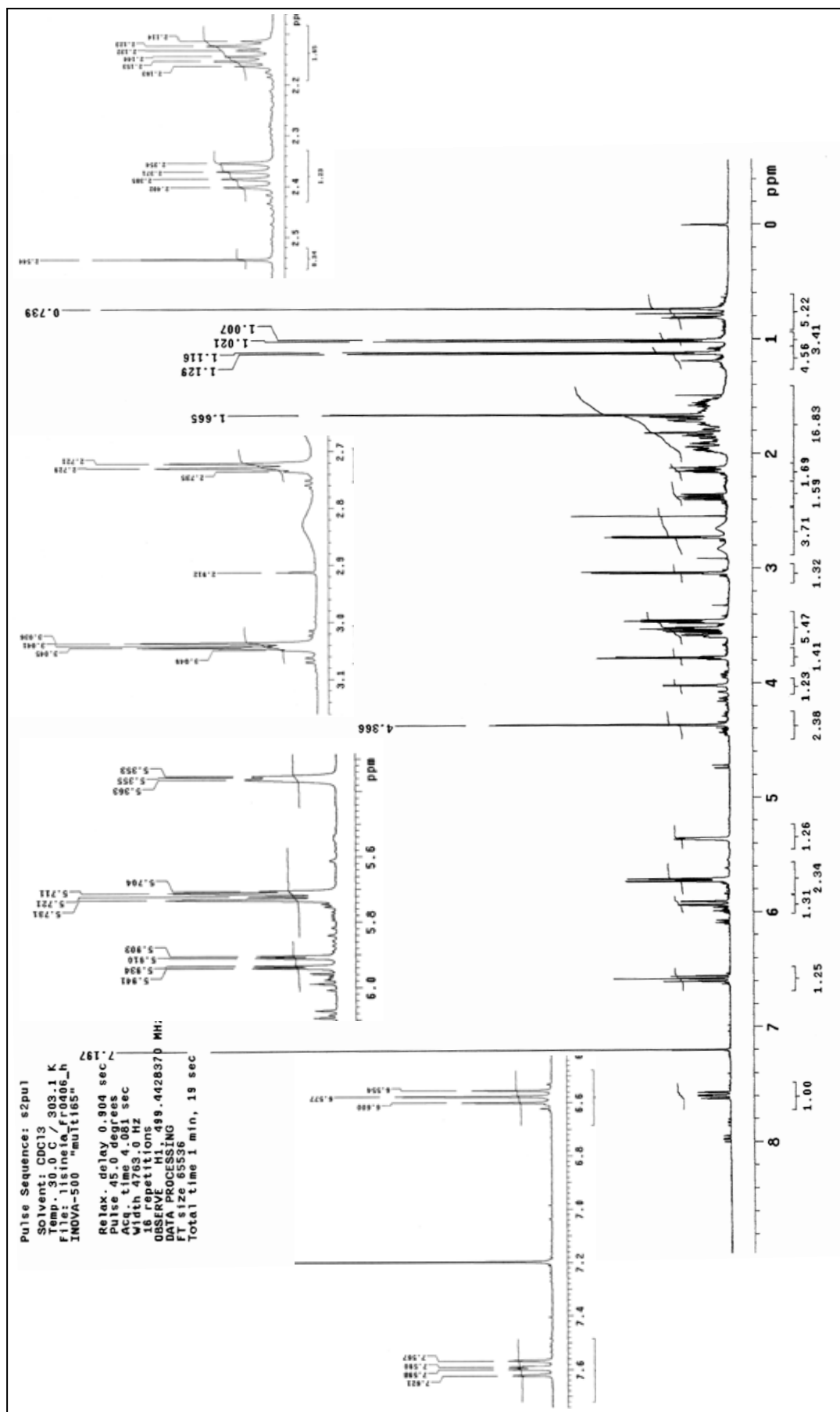
Anexo 56 – Espectro de gCOSY da Substância **01** (CDCl₃, 500 Hz)

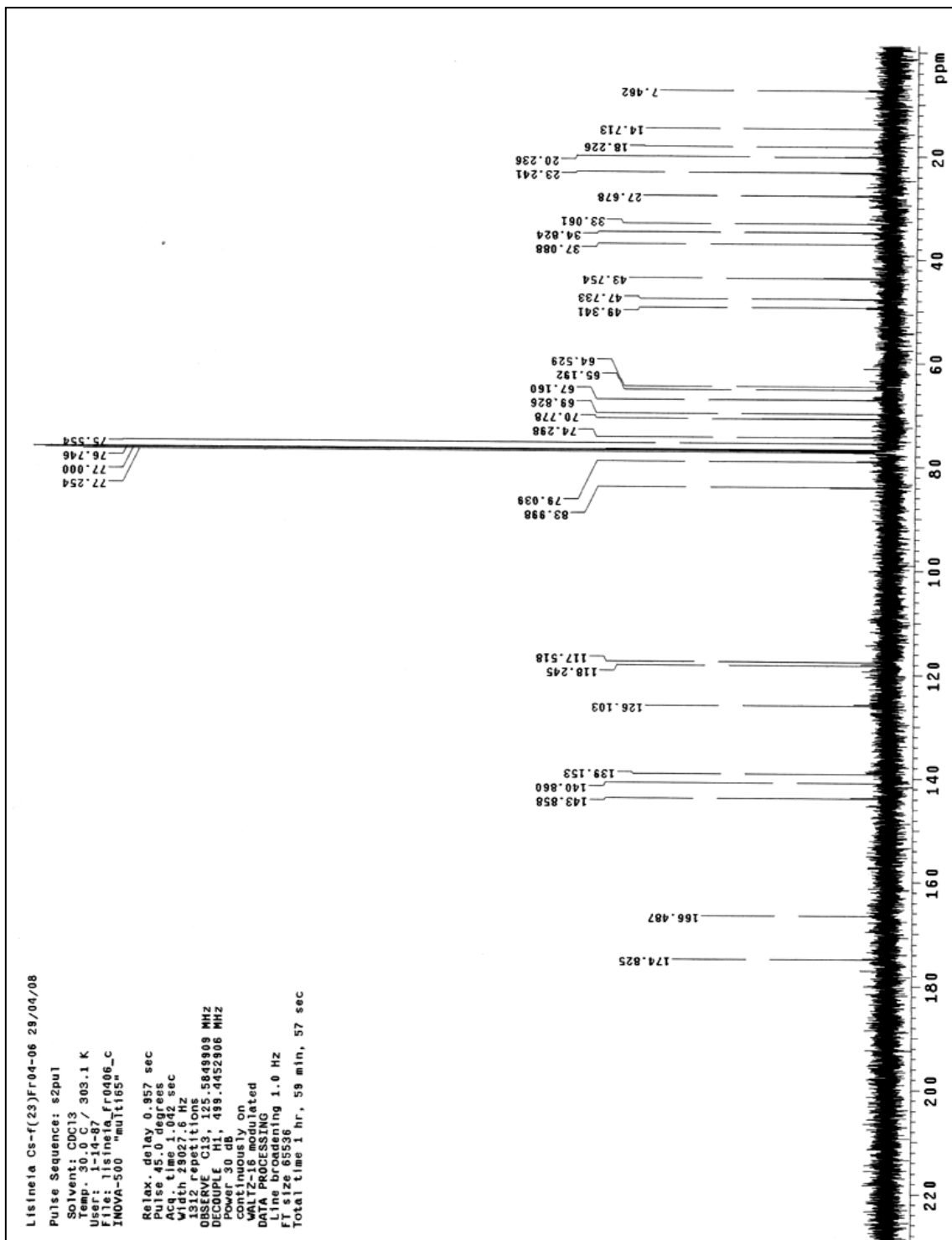


Anexo 56a – Espectro de Tocsy da Substância **01** (CDCl₃, 500 Hz)

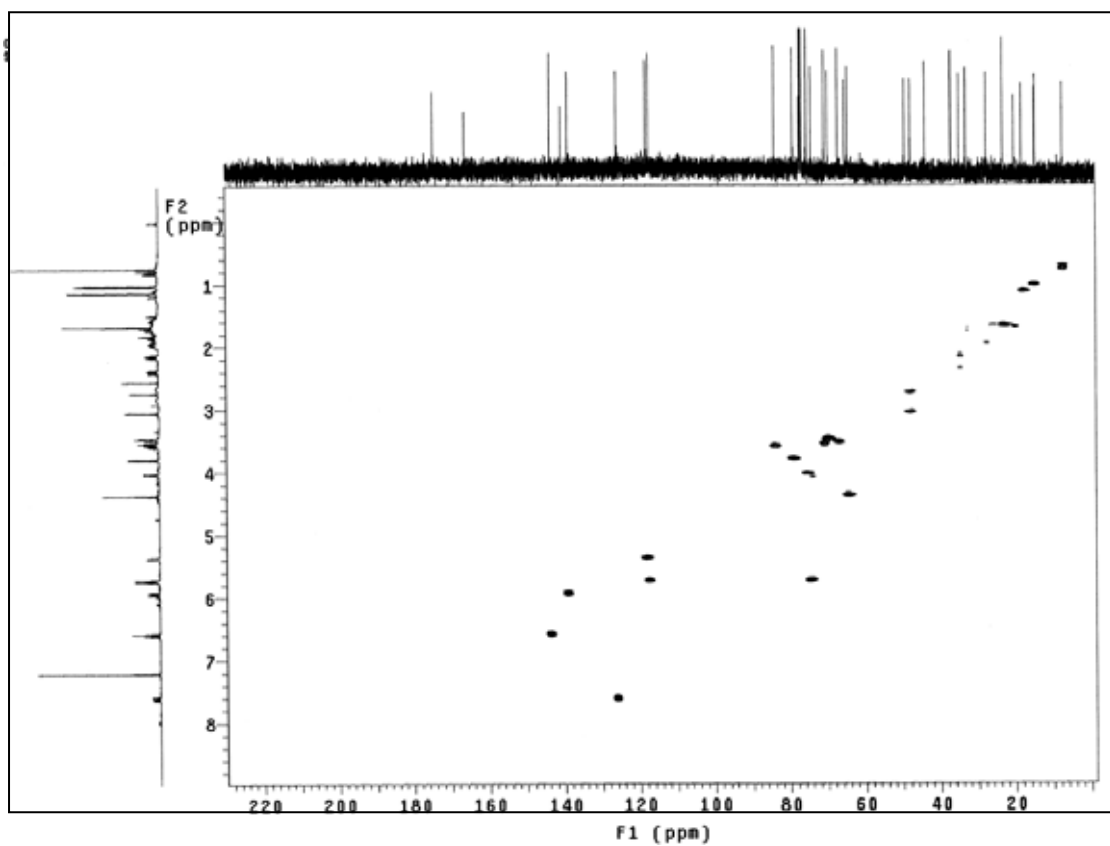


Anexo 57– Espectro de Massas da Substância **05** [EM-IES (+)]

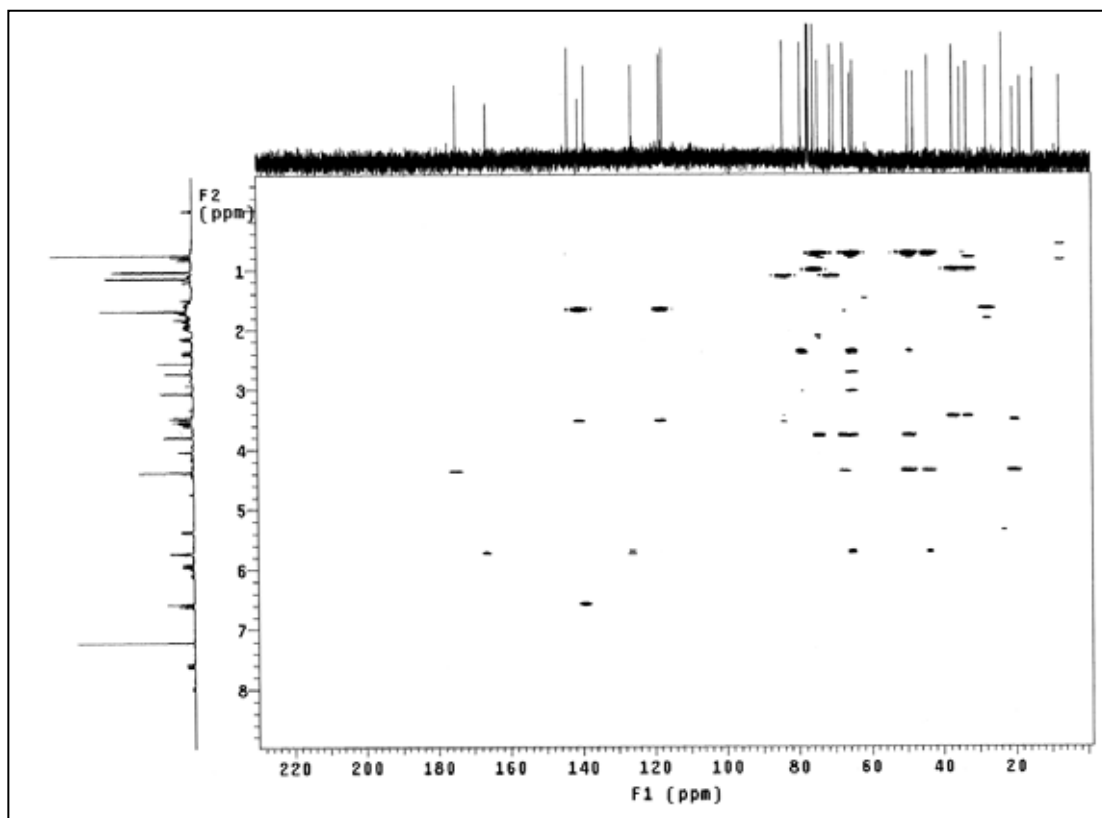




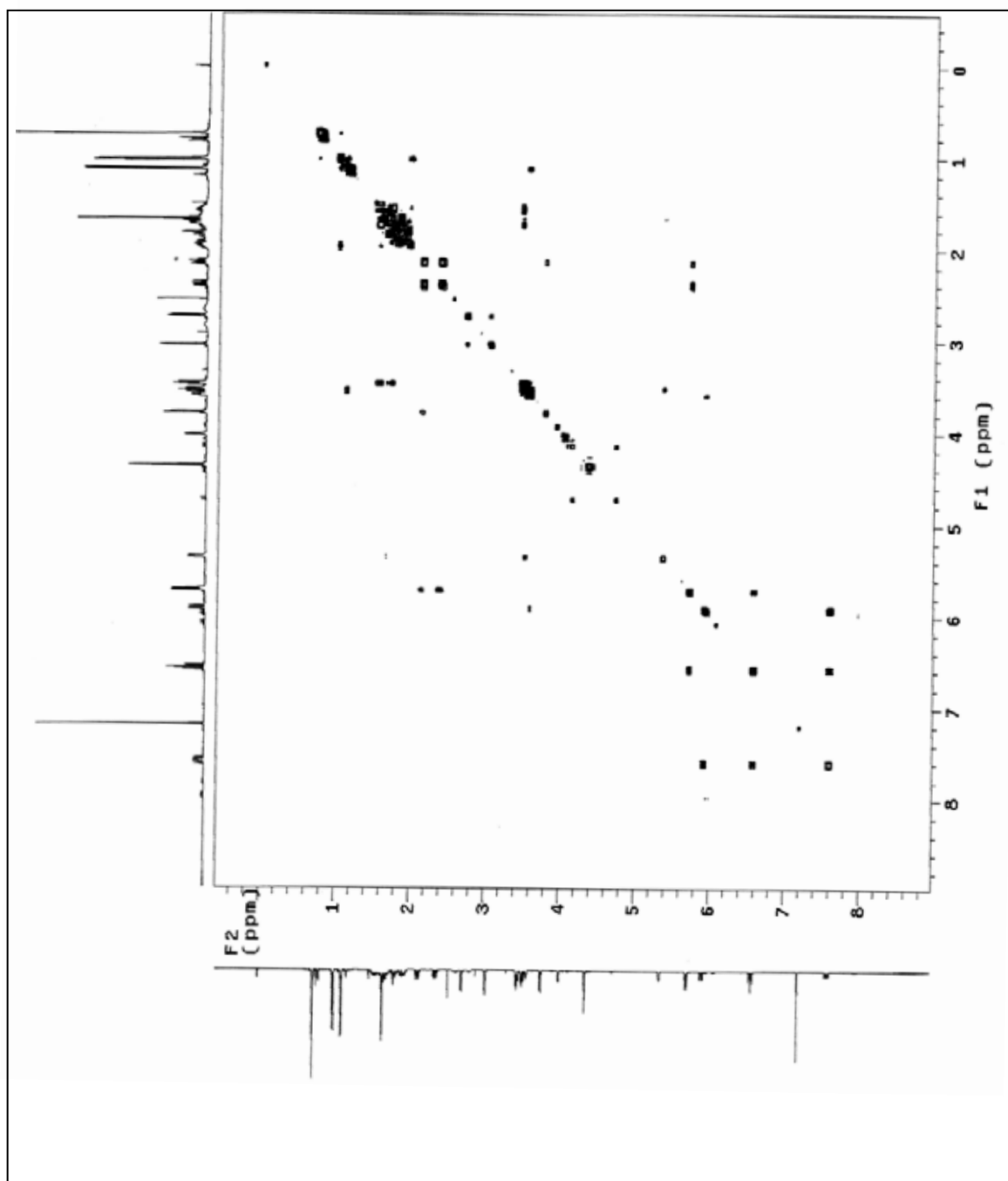
Anexo 59 – Espectro de RMN de ¹³C da Substância 05 (CDCl₃, 500 Hz)



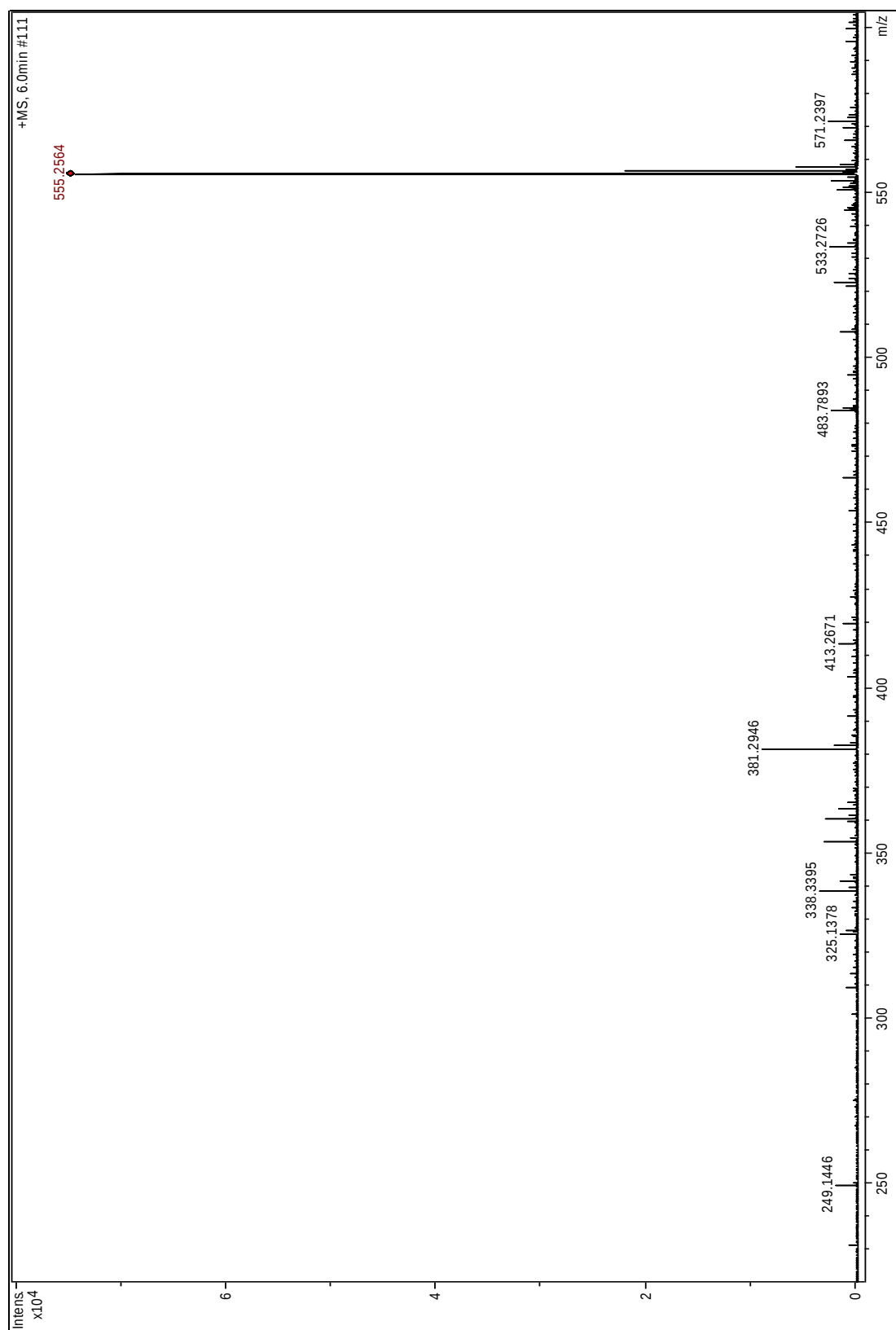
Anexo 60 – Mapa de contorno de *g*HMQC da Substância **05** (CDCl₃, 125 Hz)



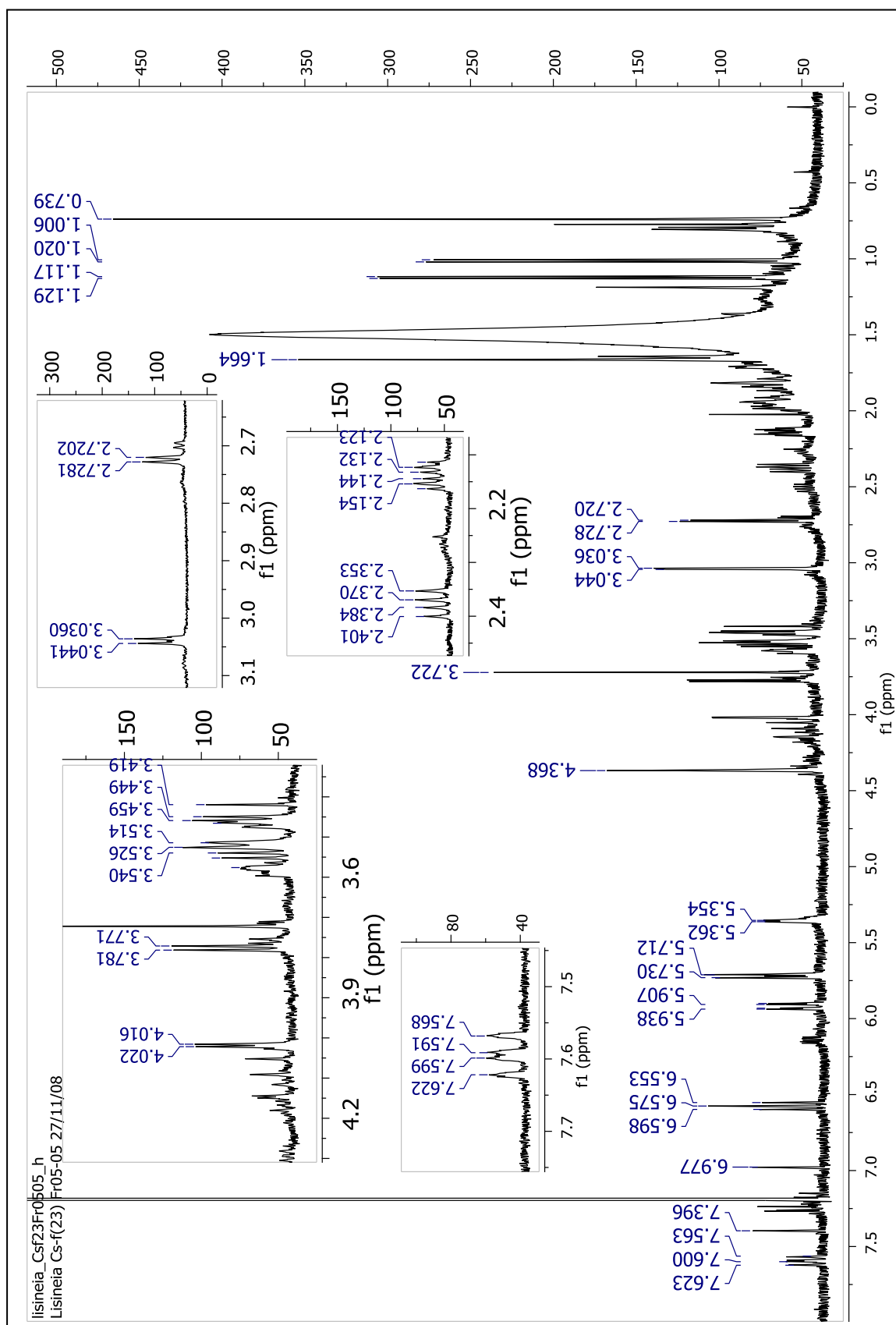
Anexo 61 – Mapa de contorno de *g*HMBC da Substância **05** (CDCl₃, 125 Hz)



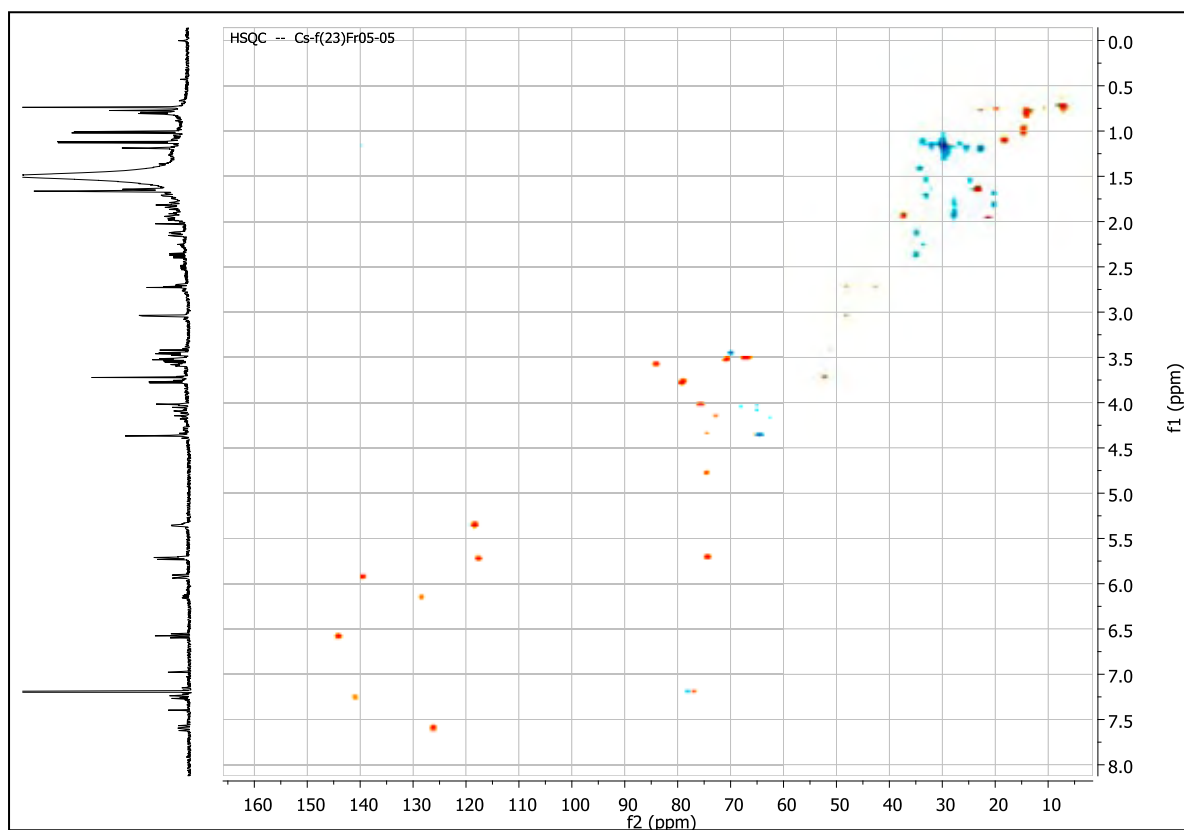
Anexo 62 – Espectro gCOSY da Substância **05** (CDCl₃, 500 Hz)



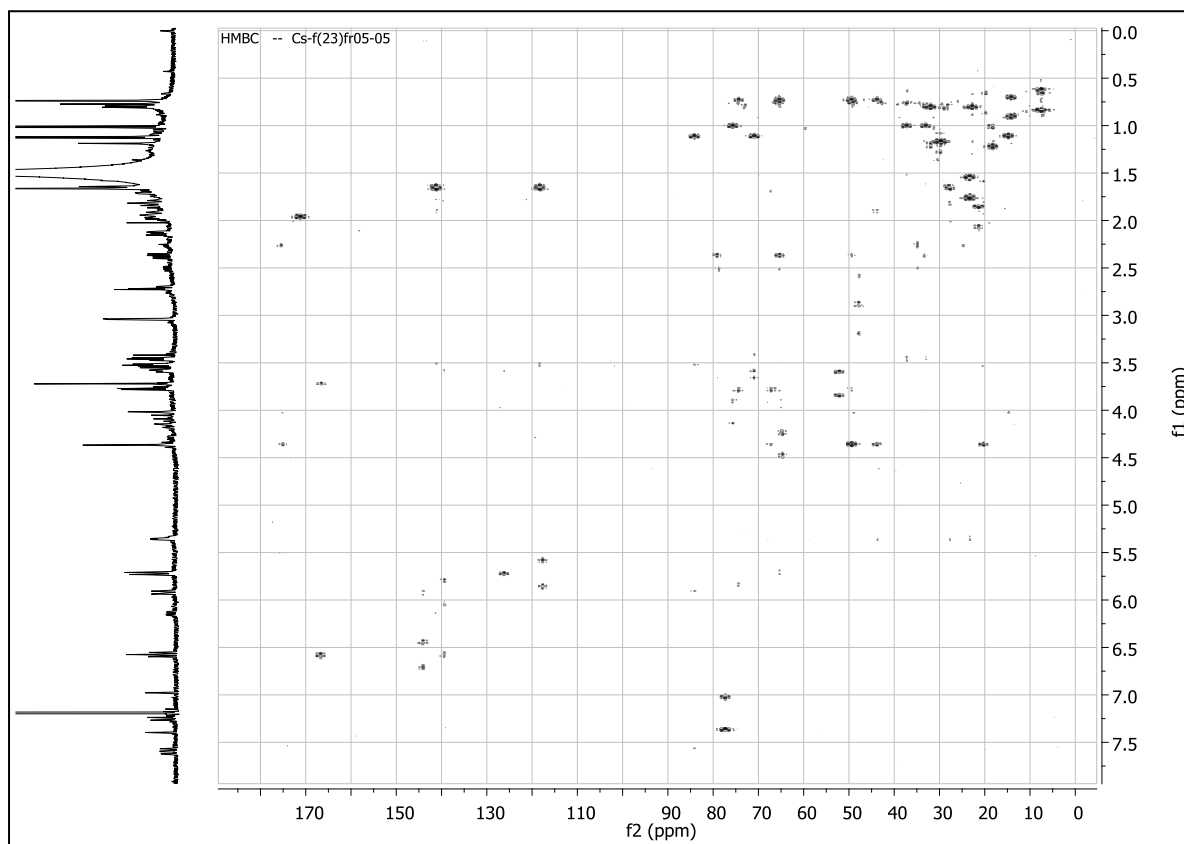
Anexo 63 – Espectro de Massas da Substância **06** [EM-IES (+)]



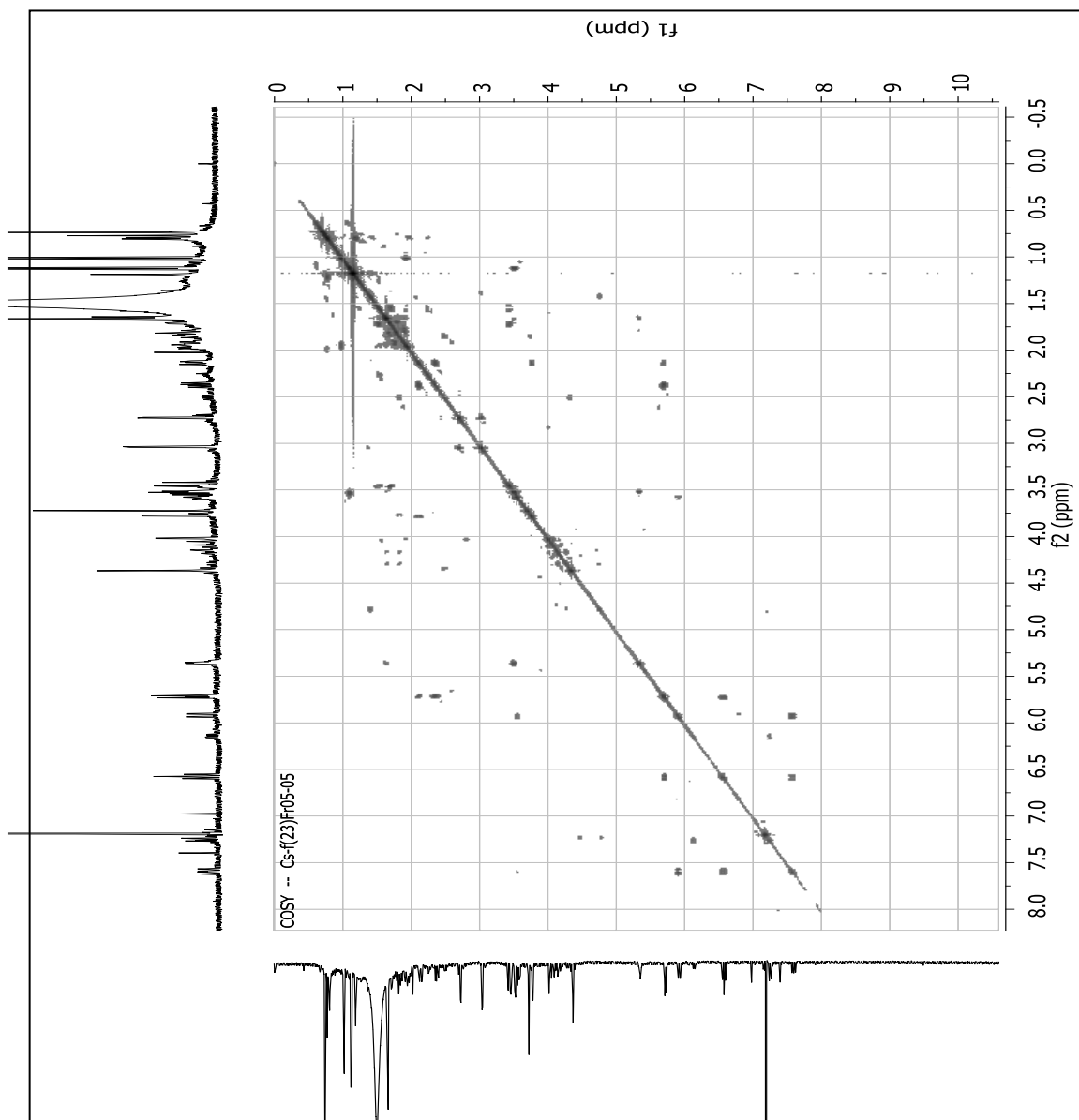
Anexo 64 – Espectro de RMN de ^1H da Substância **06** (CDCl_3 , 600 Hz)



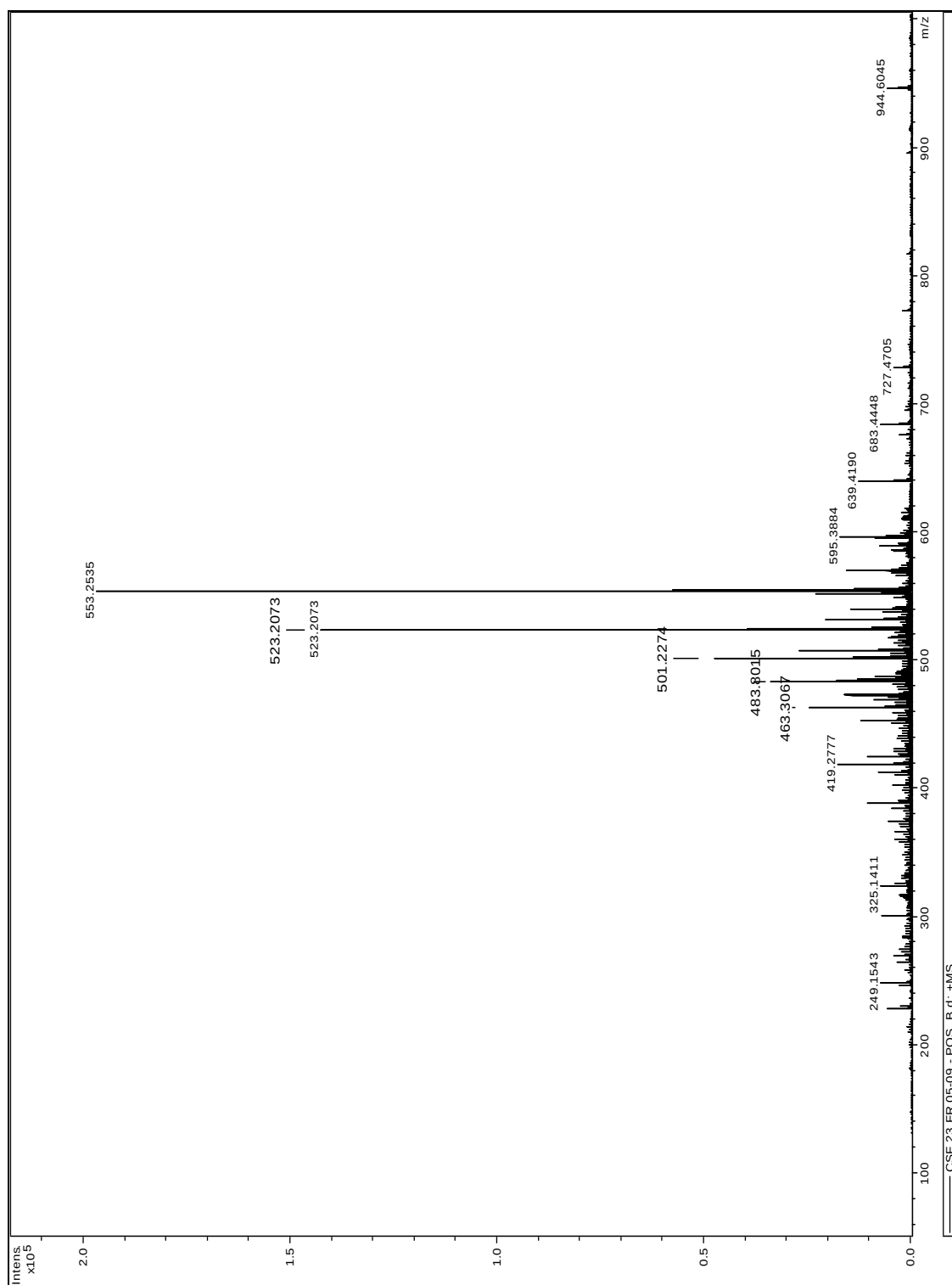
Anexo 65– Mapa de contorno de gHSQC da substância **06** (CDCl_3 , 125 MHz)



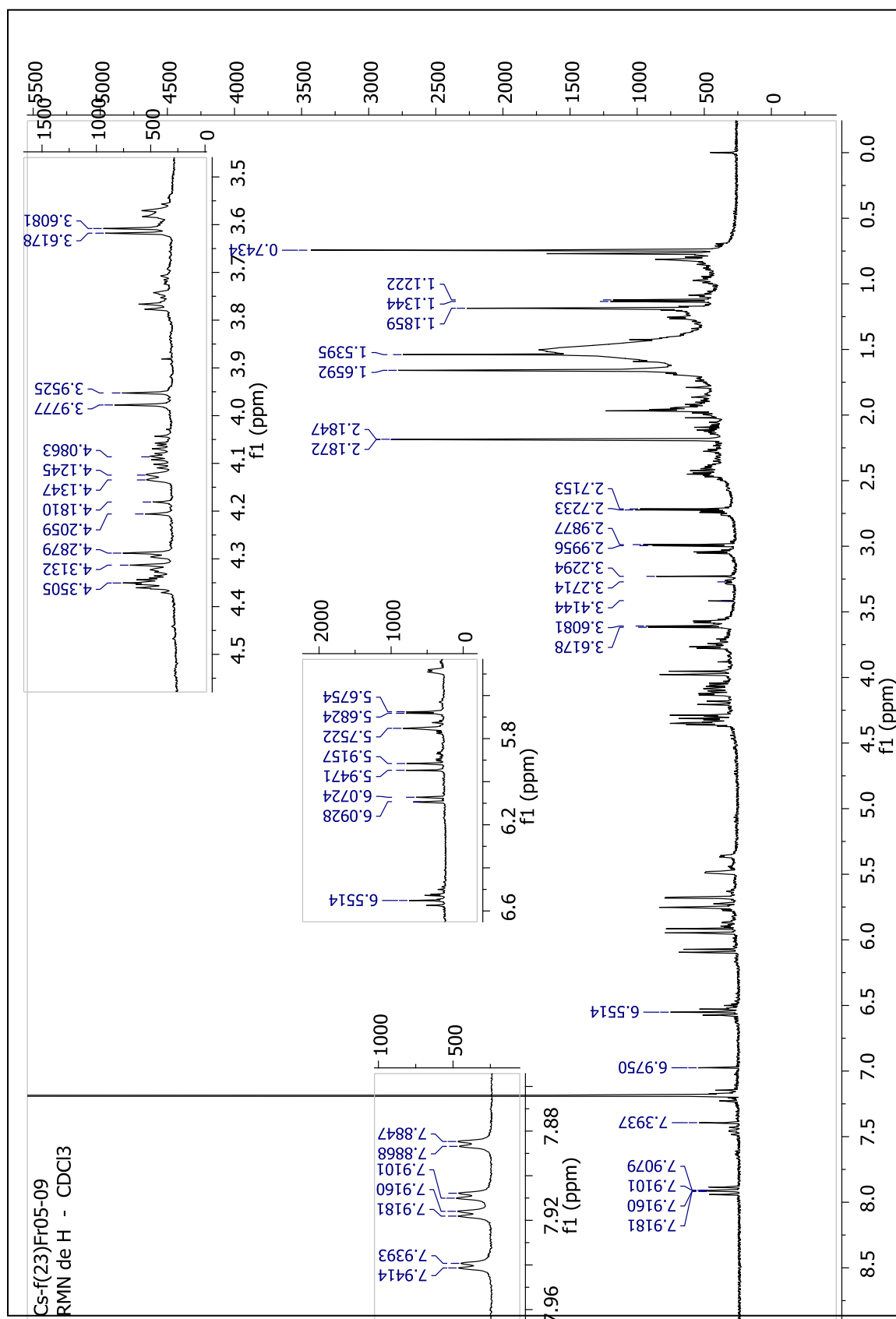
Anexo 66 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **06** (CDCl_3 , 125 MHz)



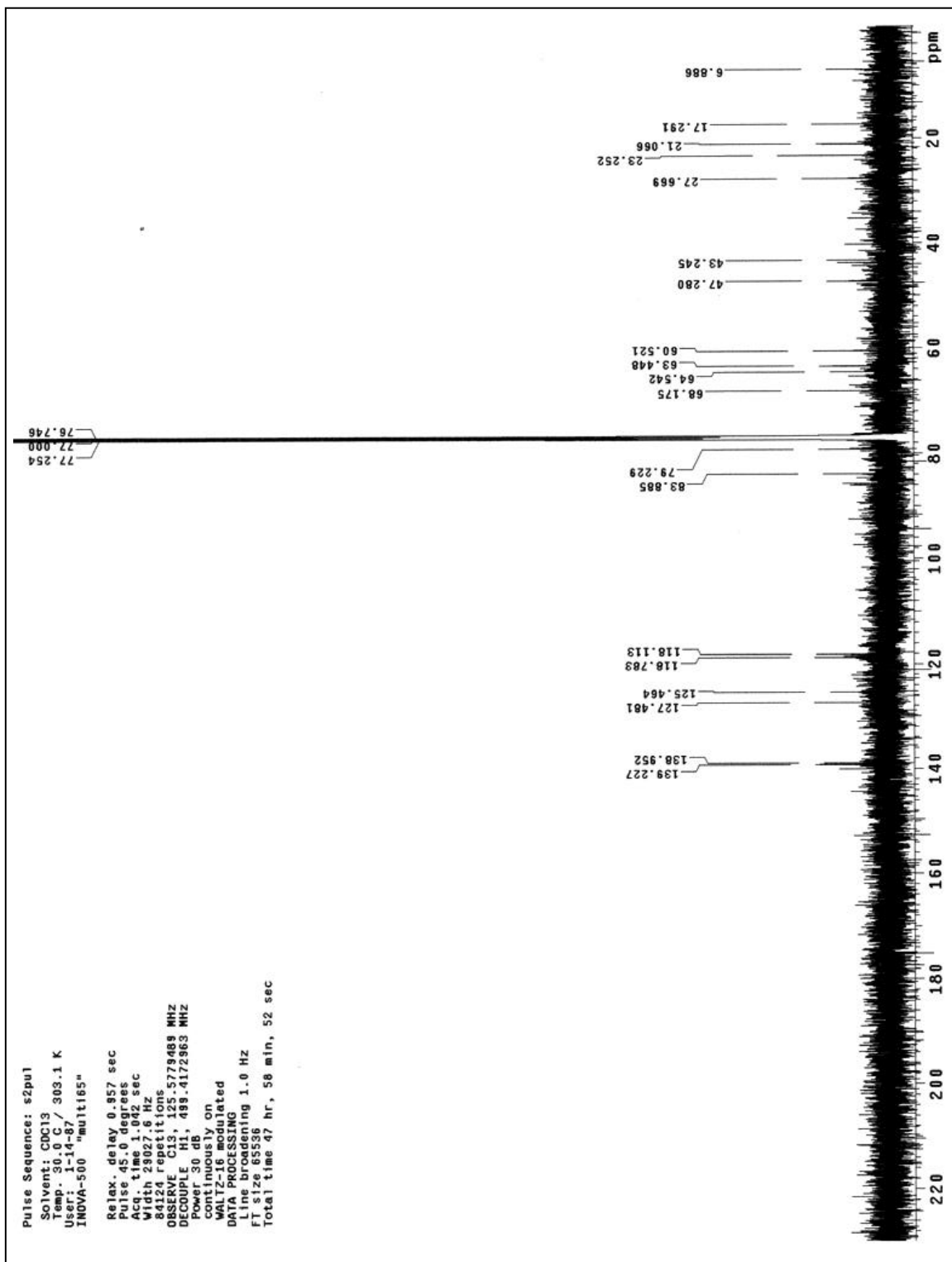
Anexo 67 – Espectro de gCOSY da Substância **06** (CDCl_3 , 600 Hz)



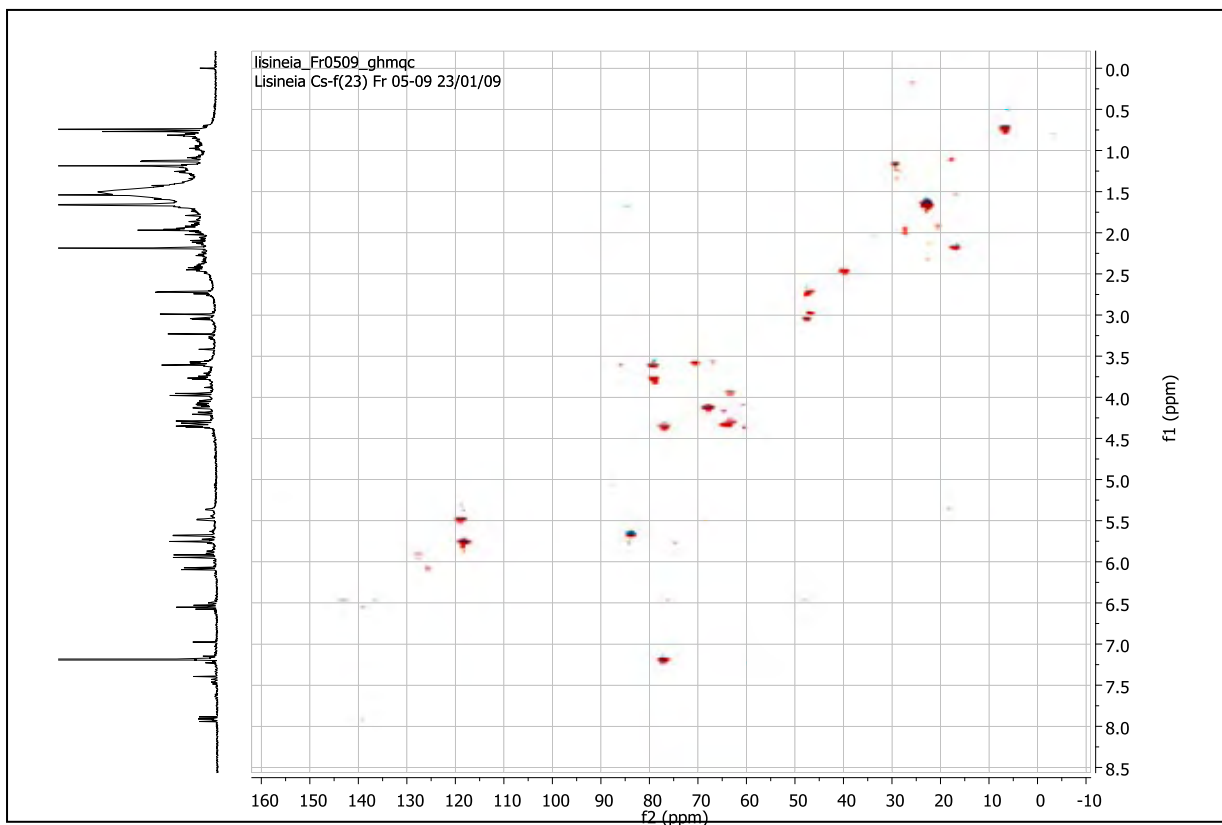
Anexo 68 – Espectro de Massas da Substância **07** [EM-IES (+)]



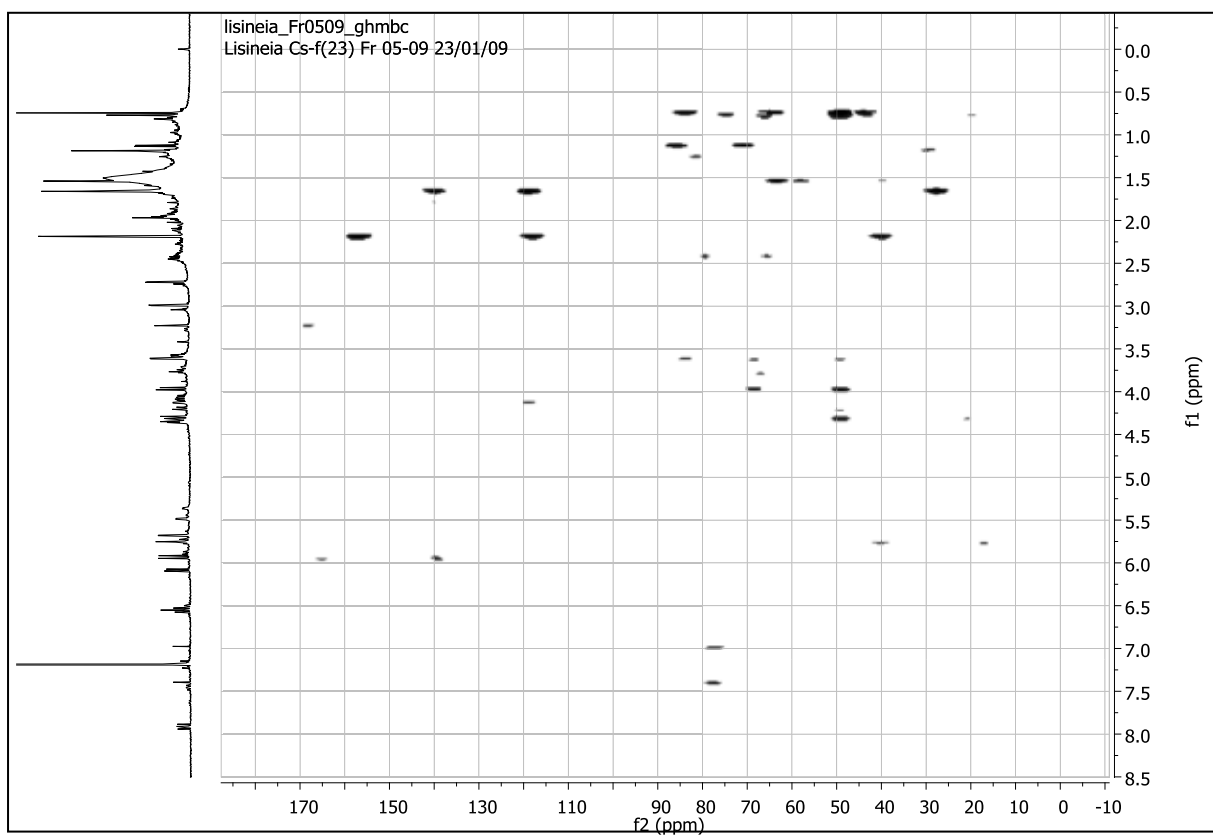
Anexo 69 – Espectro de RMN de ^1H da Substância **07** (CDCl_3 , 500MHz)



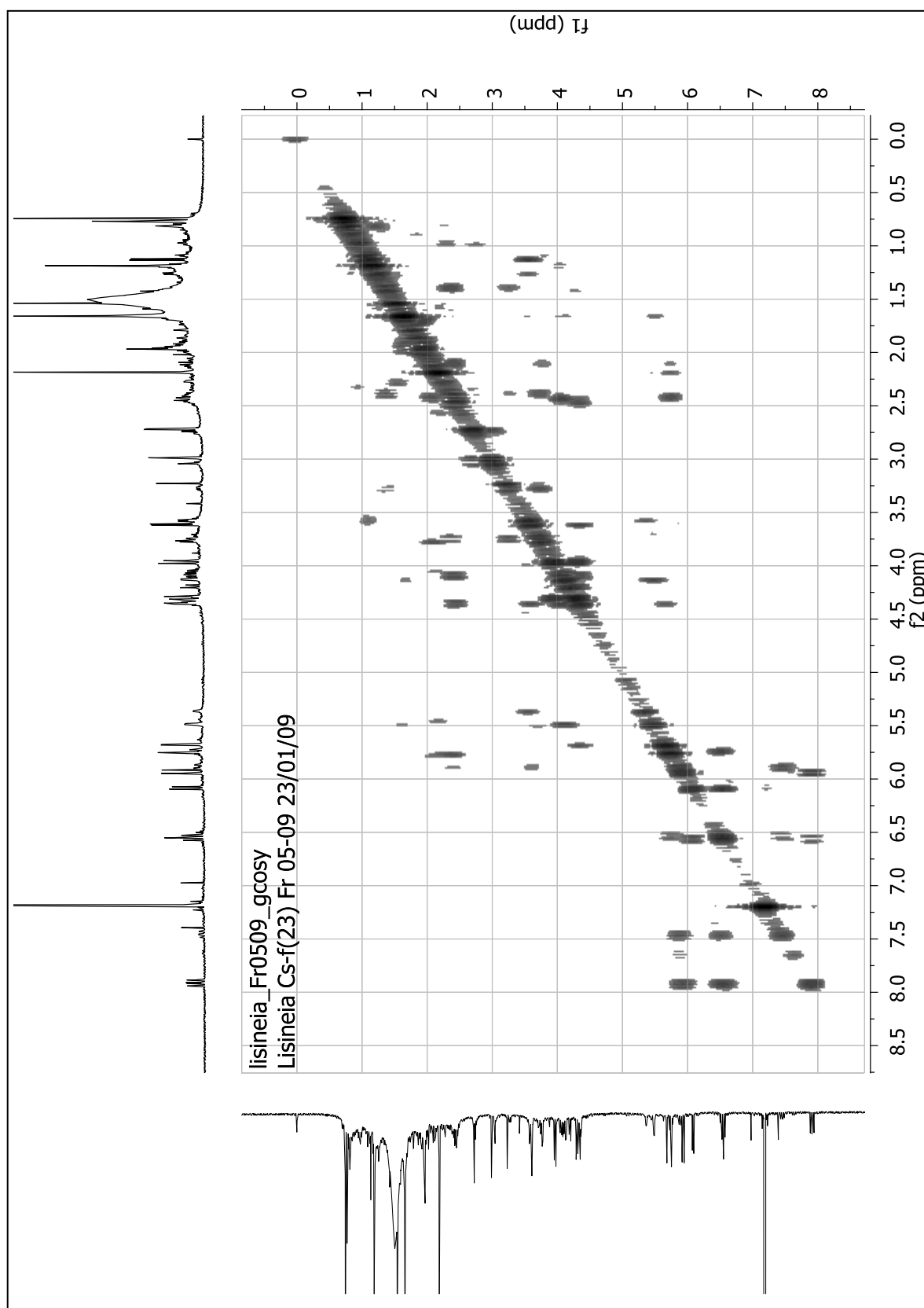
Anexo 70 – Espectro de RMN de ¹³C da Substância 07 (CDCl₃, 125MHz)



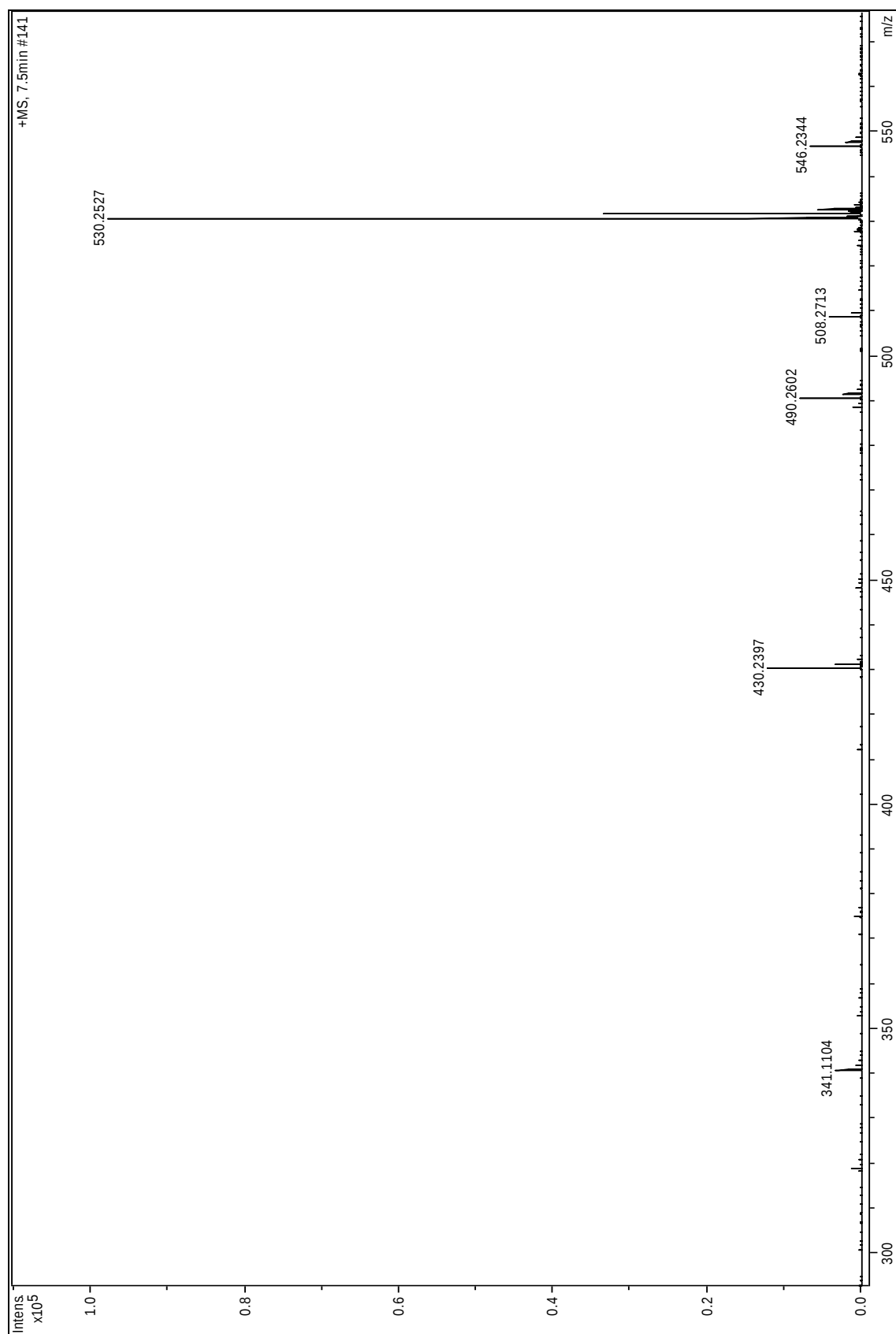
Anexo 71 – Mapa de contorno de gHMQC da substância **07** (CDCl₃, 125 MHz)



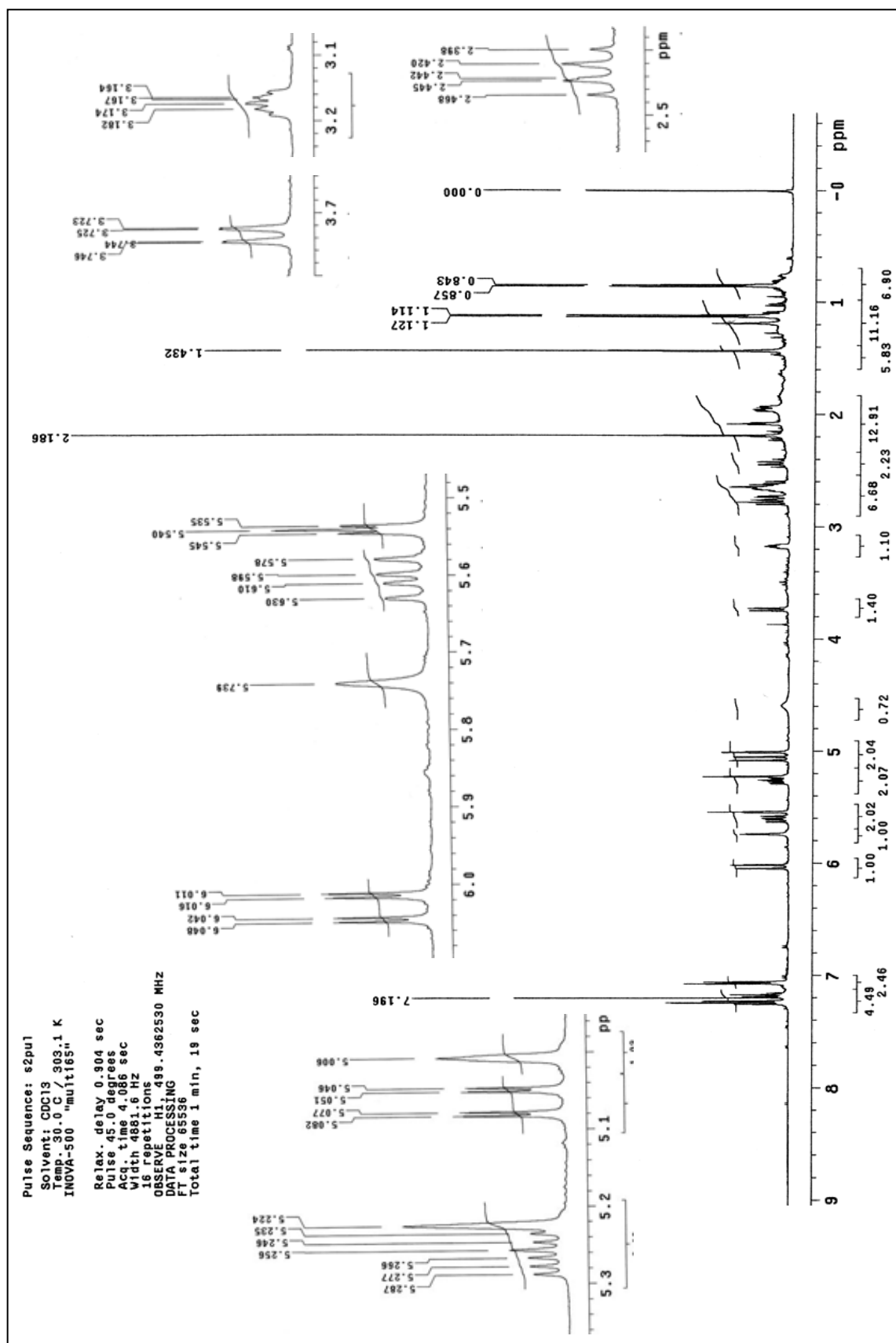
Anexo 72 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **07** (CDCl₃, 125 MHz)



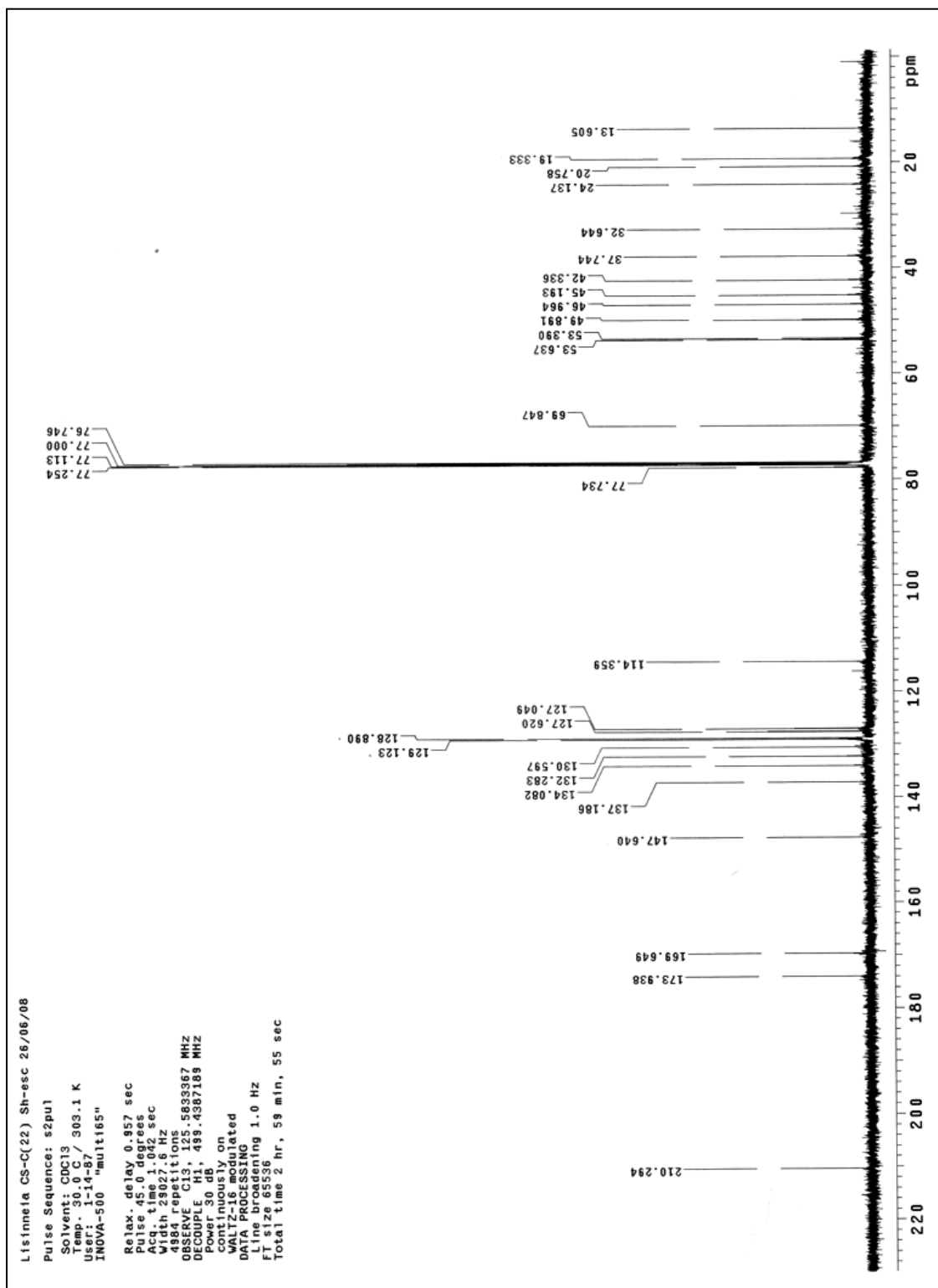
Anexo 73 – Espectro de gCOSY da Substância **07** (CDCl₃, 125MHz)



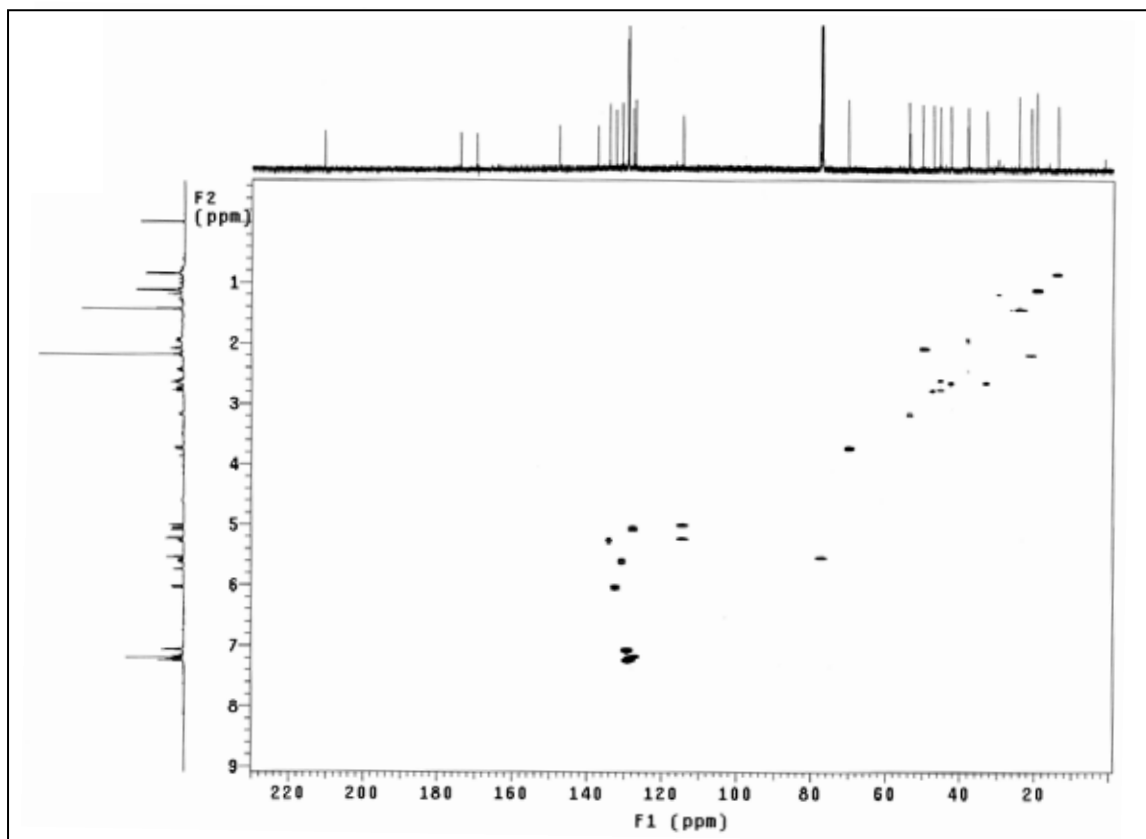
Anexo 74 – Espectro de Massas da Substância **08** [EM-IES (+)]



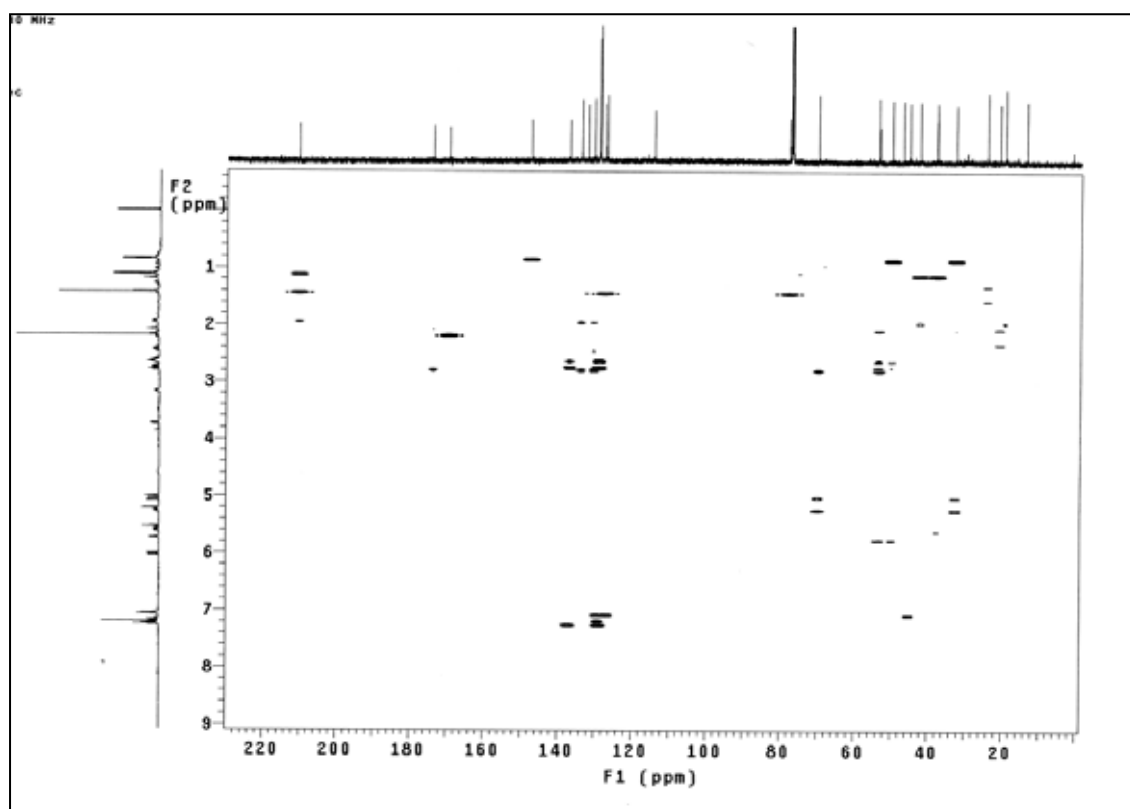
Anexo 75– Espectro de RMN de ¹H da Substância **08** (CDCl₃, 500MHz)



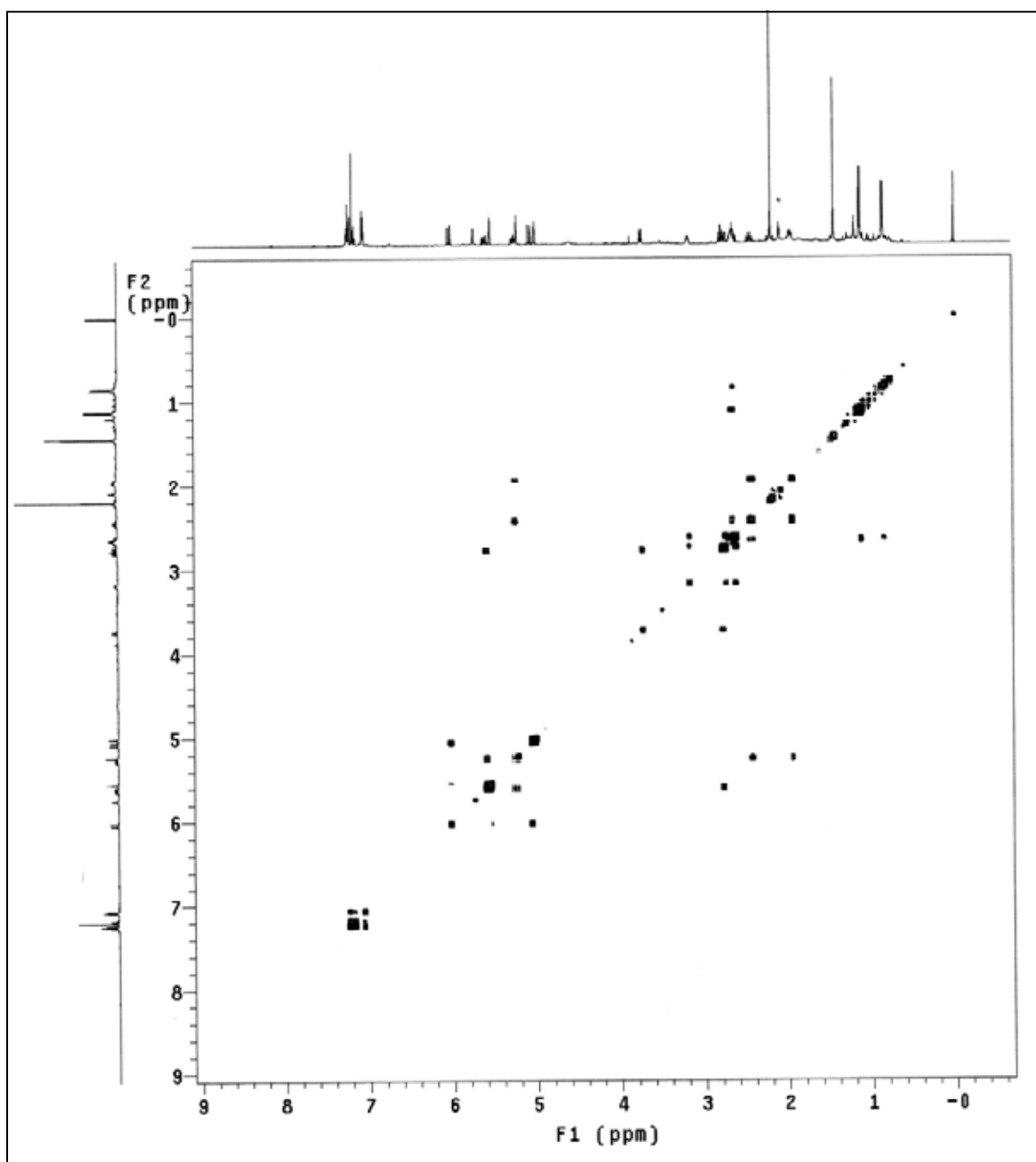
Anexo 76 – Espectro de RMN de ¹³C da Substância 08 (CDCl₃, 125 MHz)



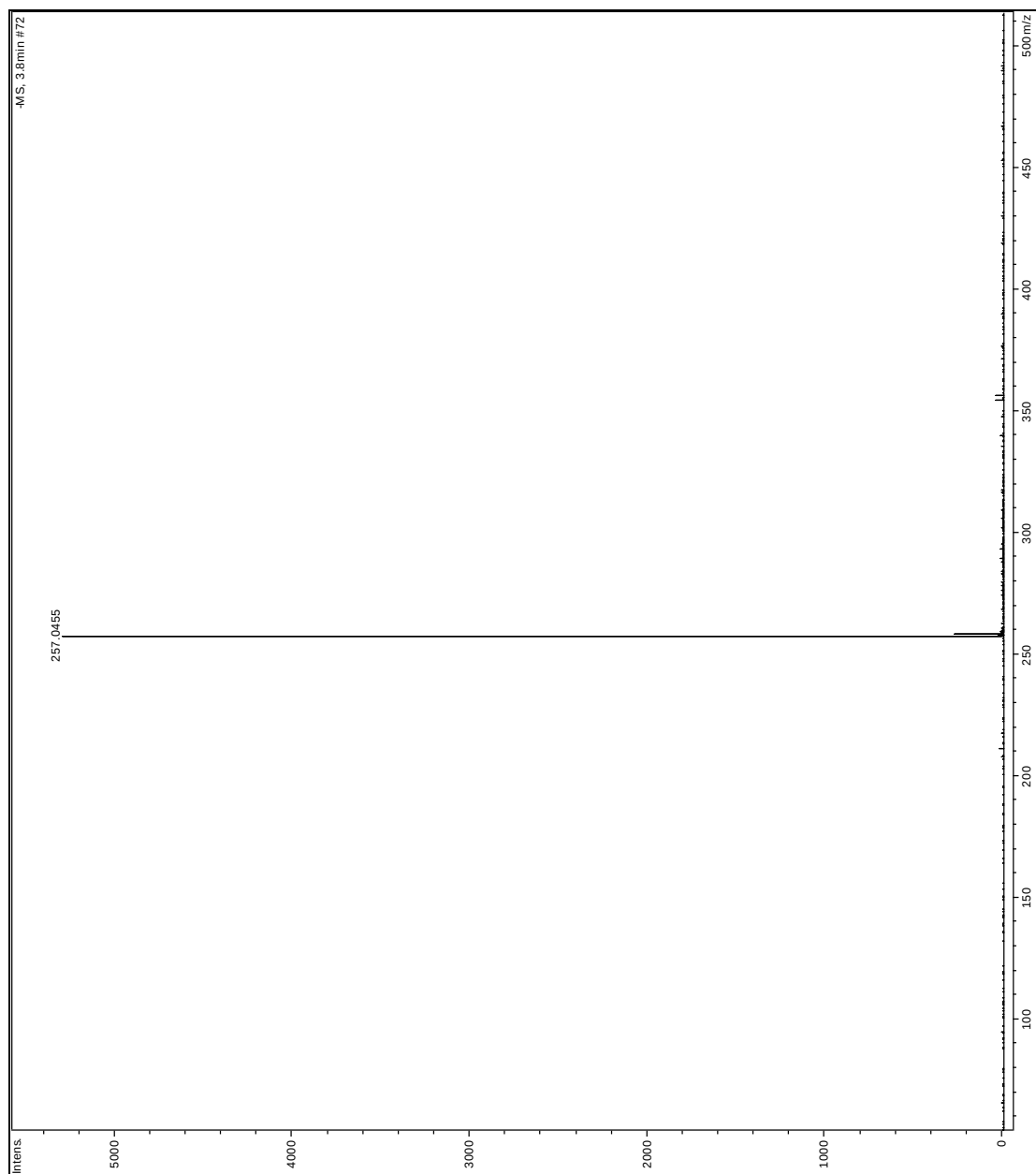
Anexo 77 – Mapa de contorno de gHMQC da substância **08** (CDCl₃, 125 MHz)



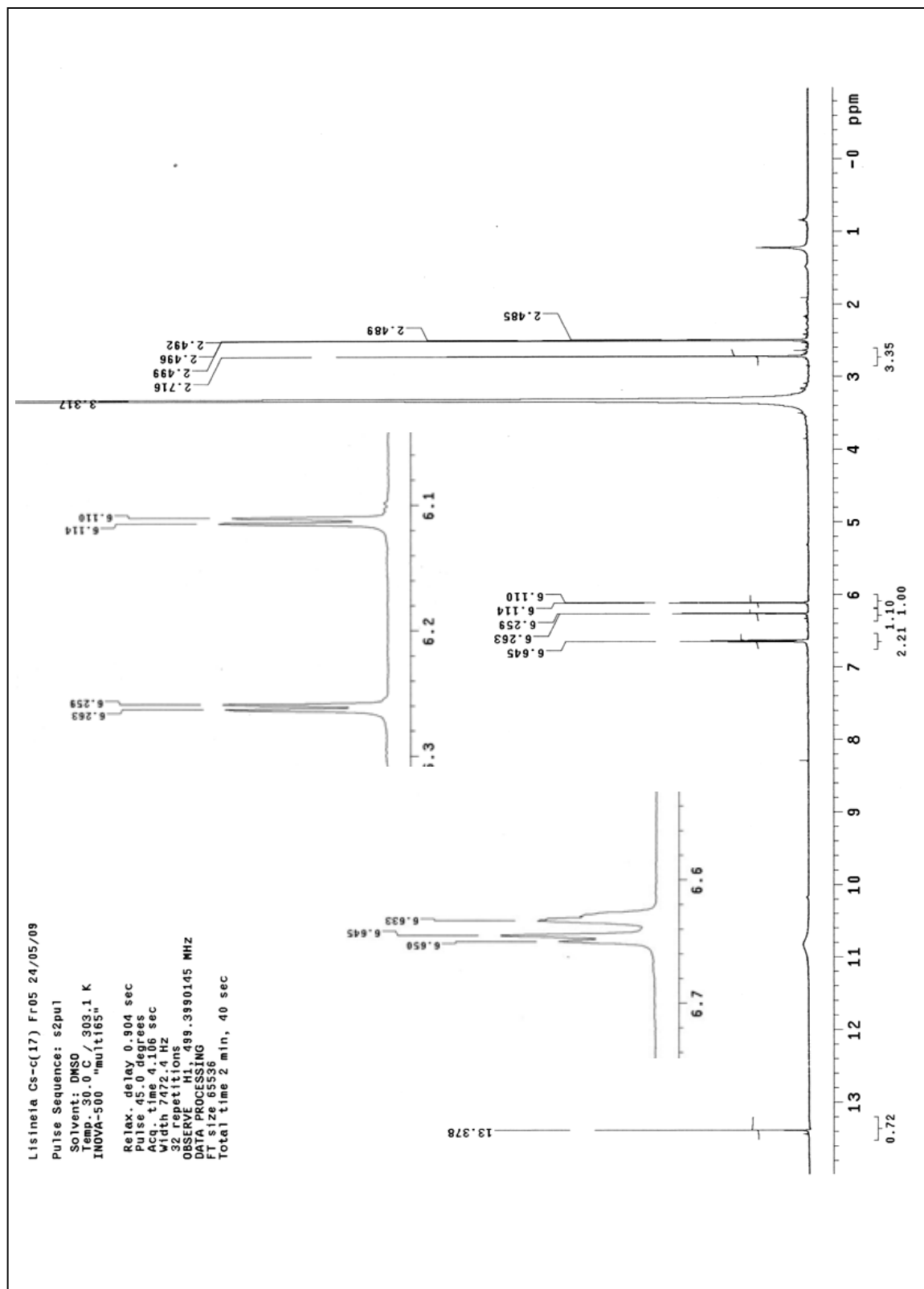
Anexo 78 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **08** (CDCl₃, 125 MHz)



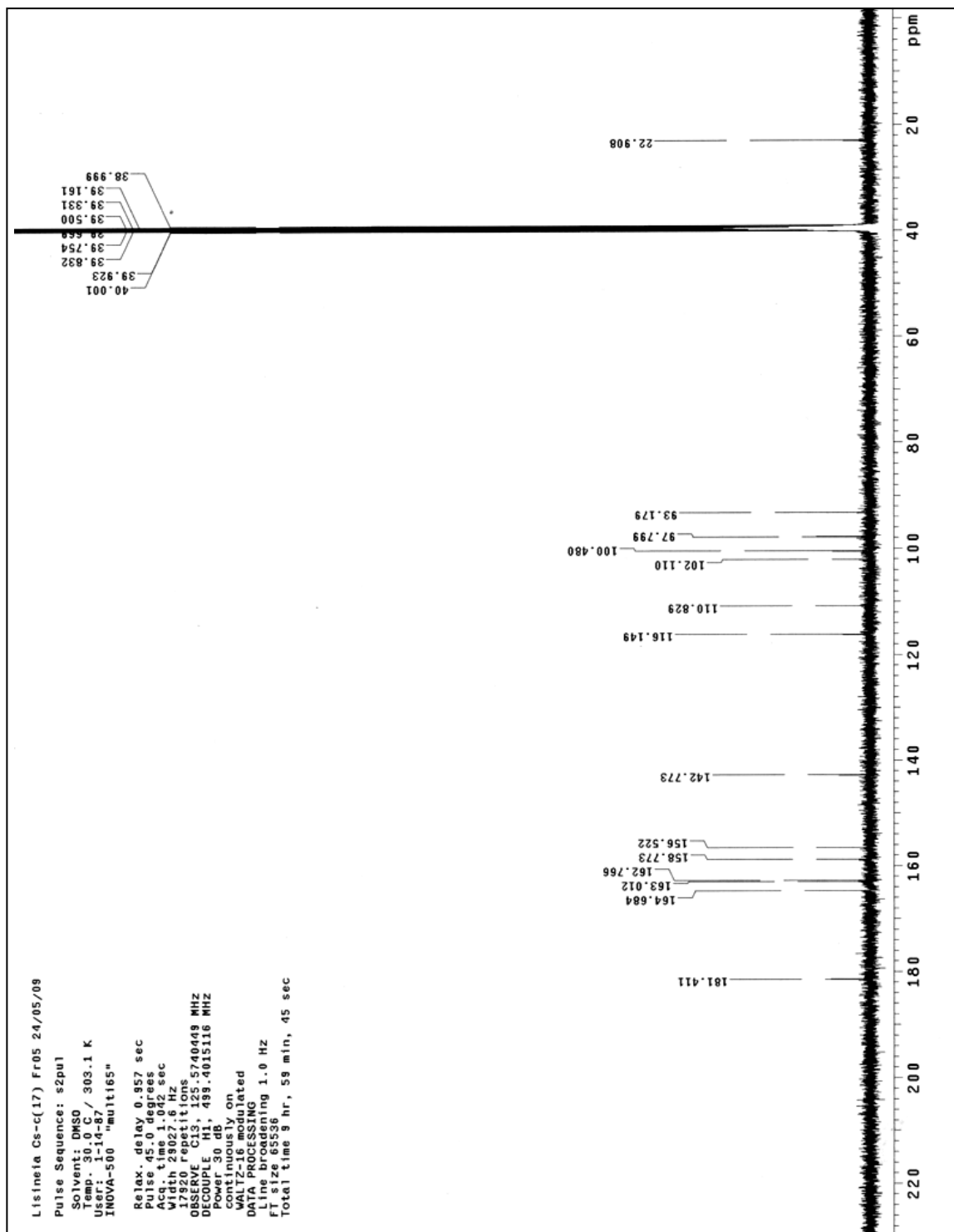
Anexo 79– Espectro de gCOSY da Substância **08** (CDCl₃, 500MHz)



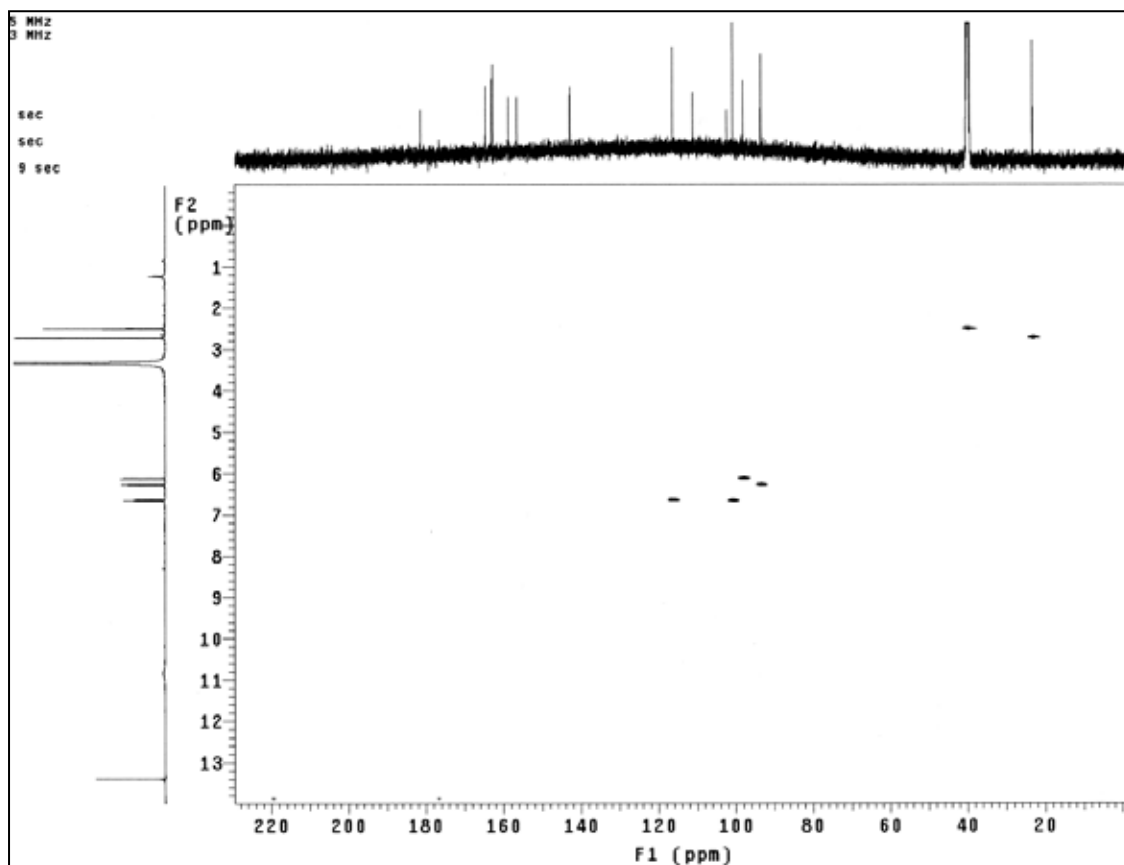
Anexo 80 – Espectro Massas da Substância 09 [EM-IES (-)]



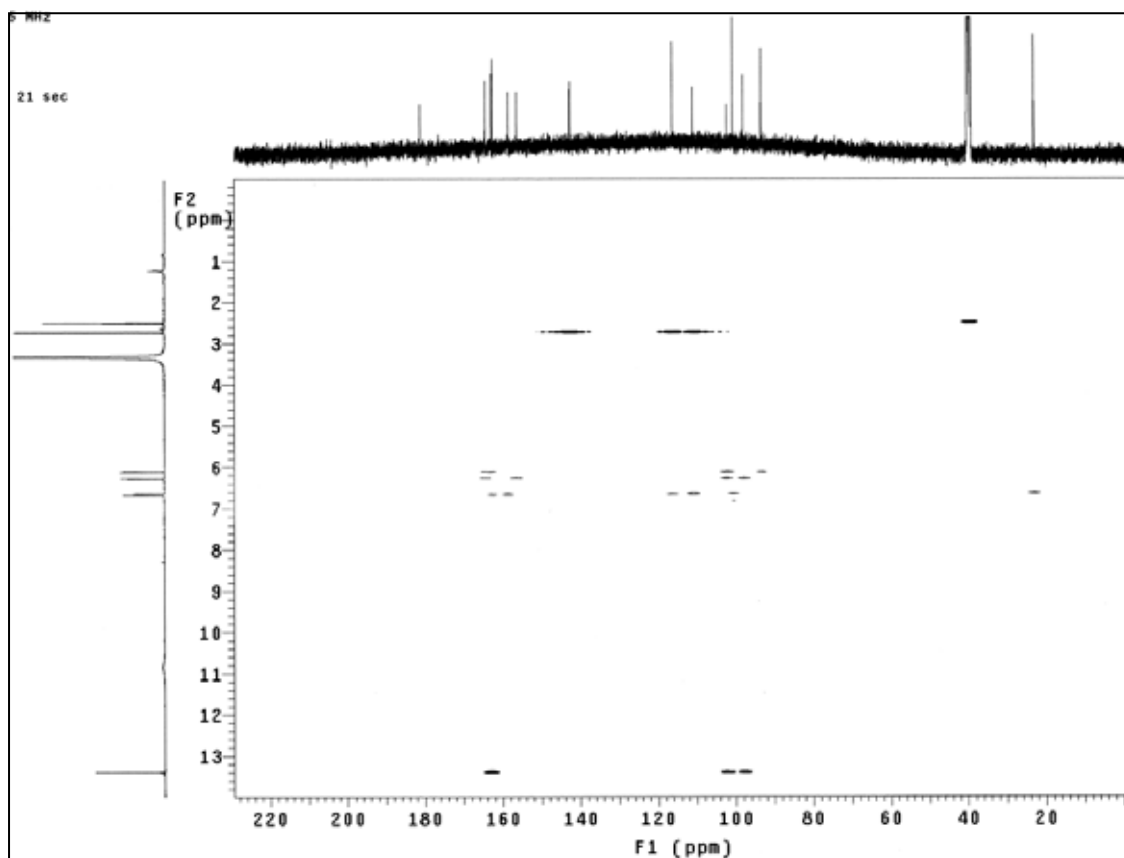
Anexo 81 – Espectro de RMN de ^1H da Substância **09** (DMSO- d_6 , 500MHz)



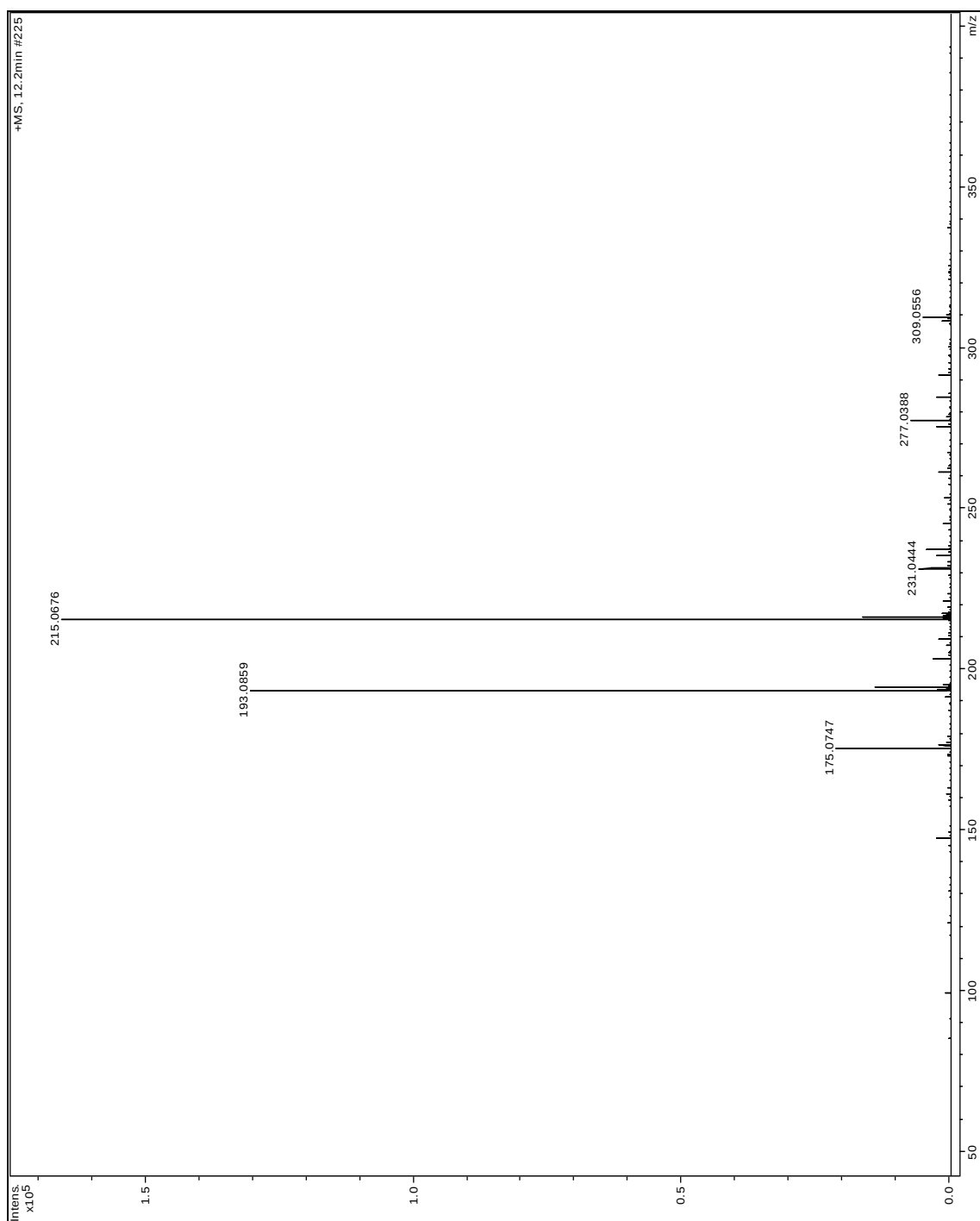
Anexo 82 – Espectro de RMN de ^{13}C da Substância **09** (DMSO- d_6 , 125 MHz)



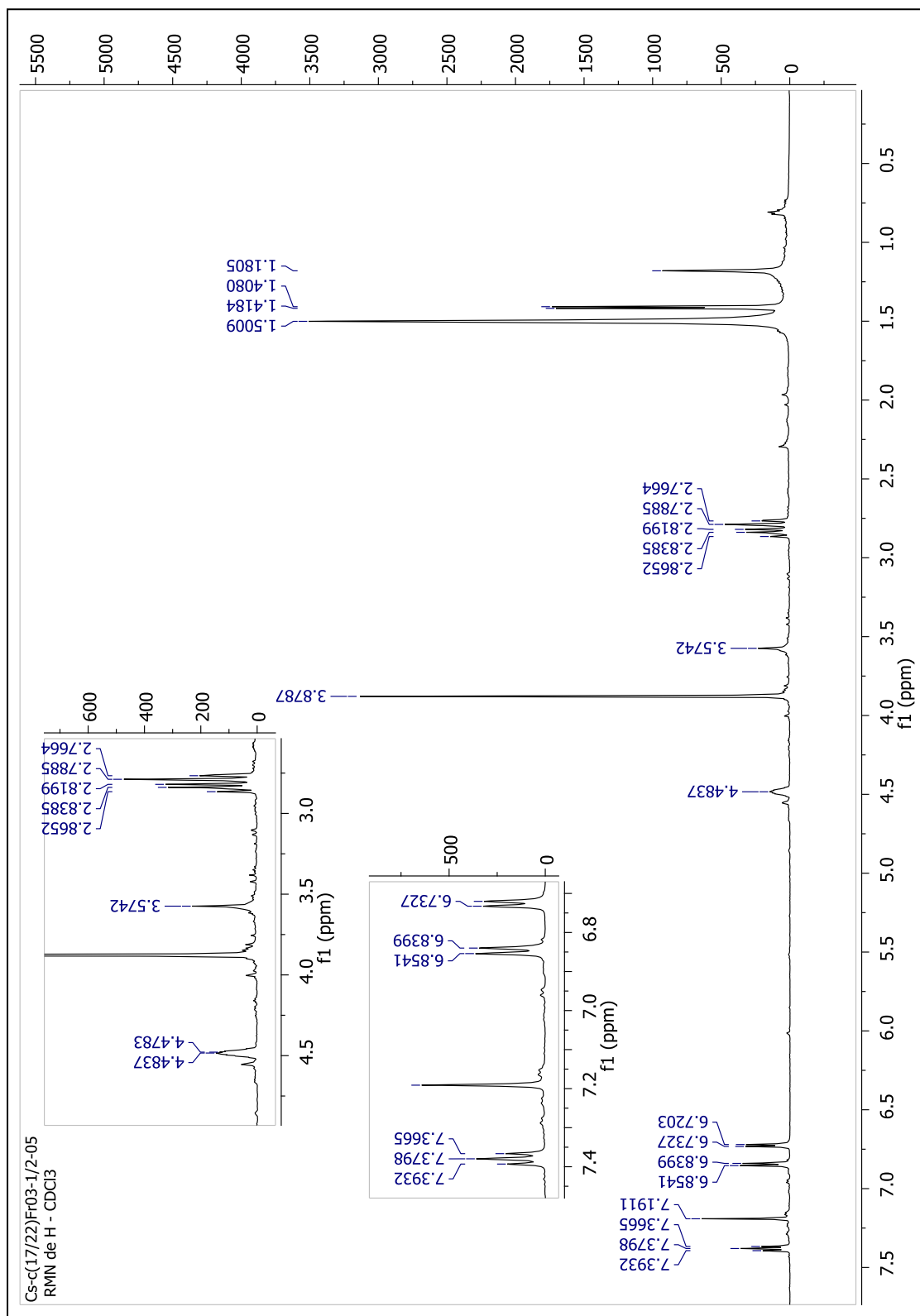
Anexo 83– Mapa de contorno de gHMQC da Substância **09** (DMSO-d₆, 125 MHz)



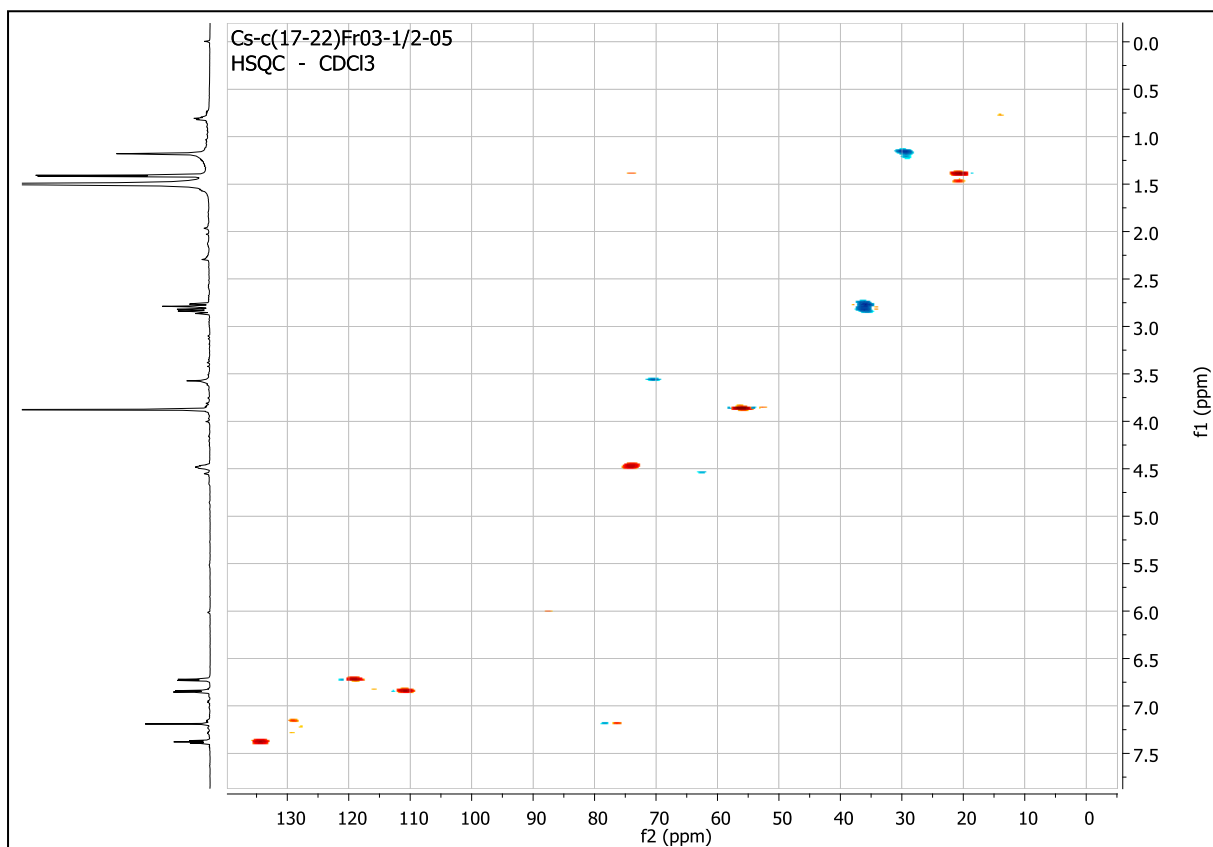
Anexo 84 – Mapa de contorno de gHMBC da Substância **09** (DMSO-d₆, 125 MHz)



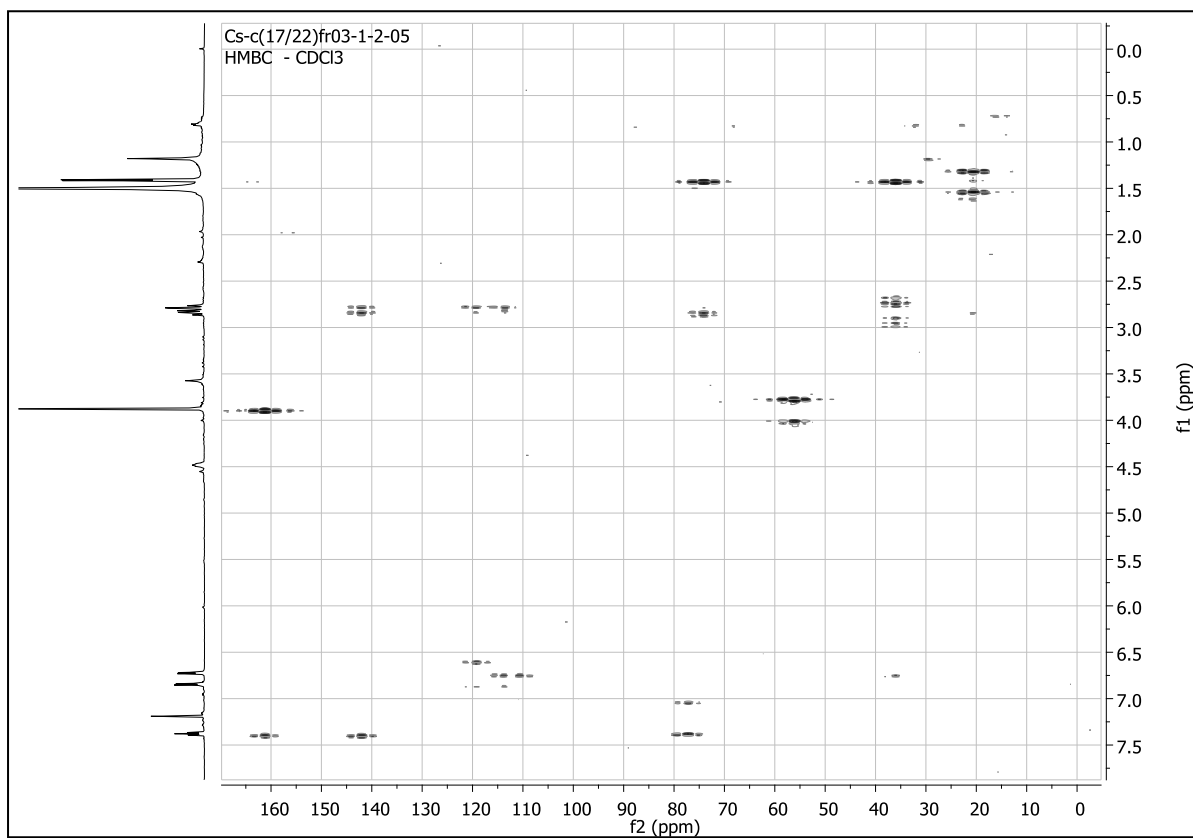
Anexo 85 – Espectro Massas da Substância 10 [EM-IES (+)]



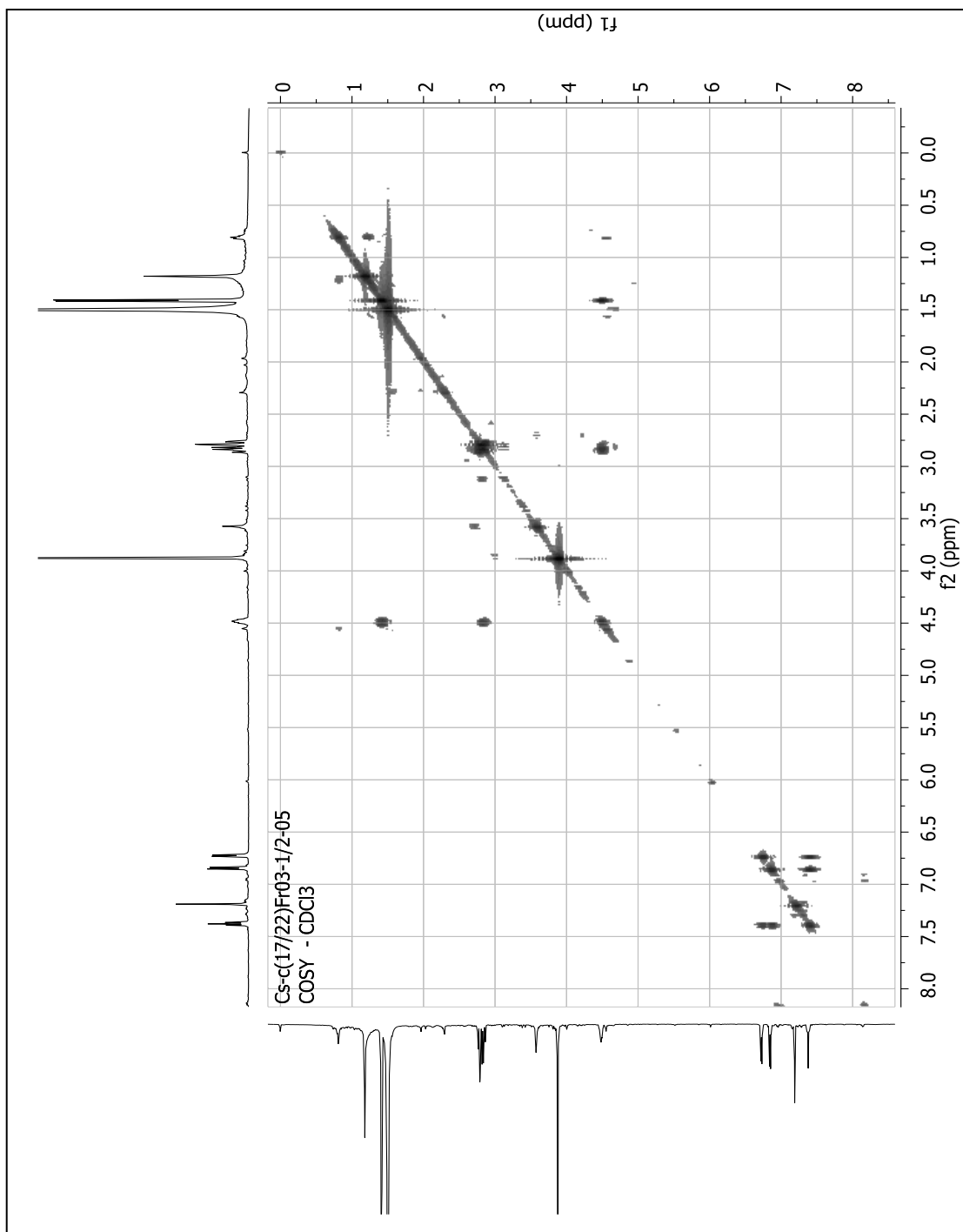
Anexo 86 – Espectro de RMN de ^1H da Substância **10** (CDCl_3 , 600MHz)



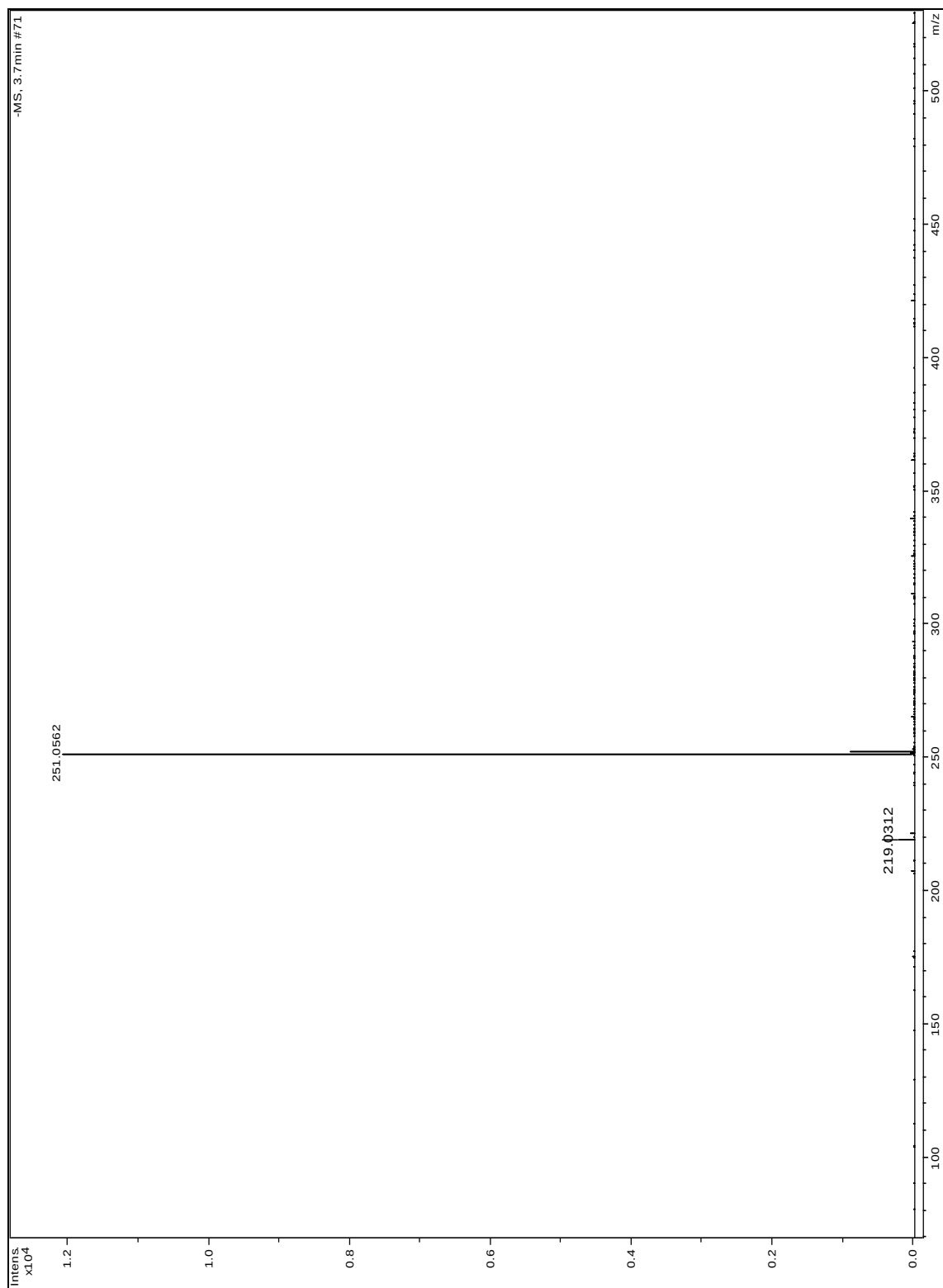
Anexo 87 – Mapa de contorno de g HMQC da substância **10** (CDCl₃, 125 MHz)



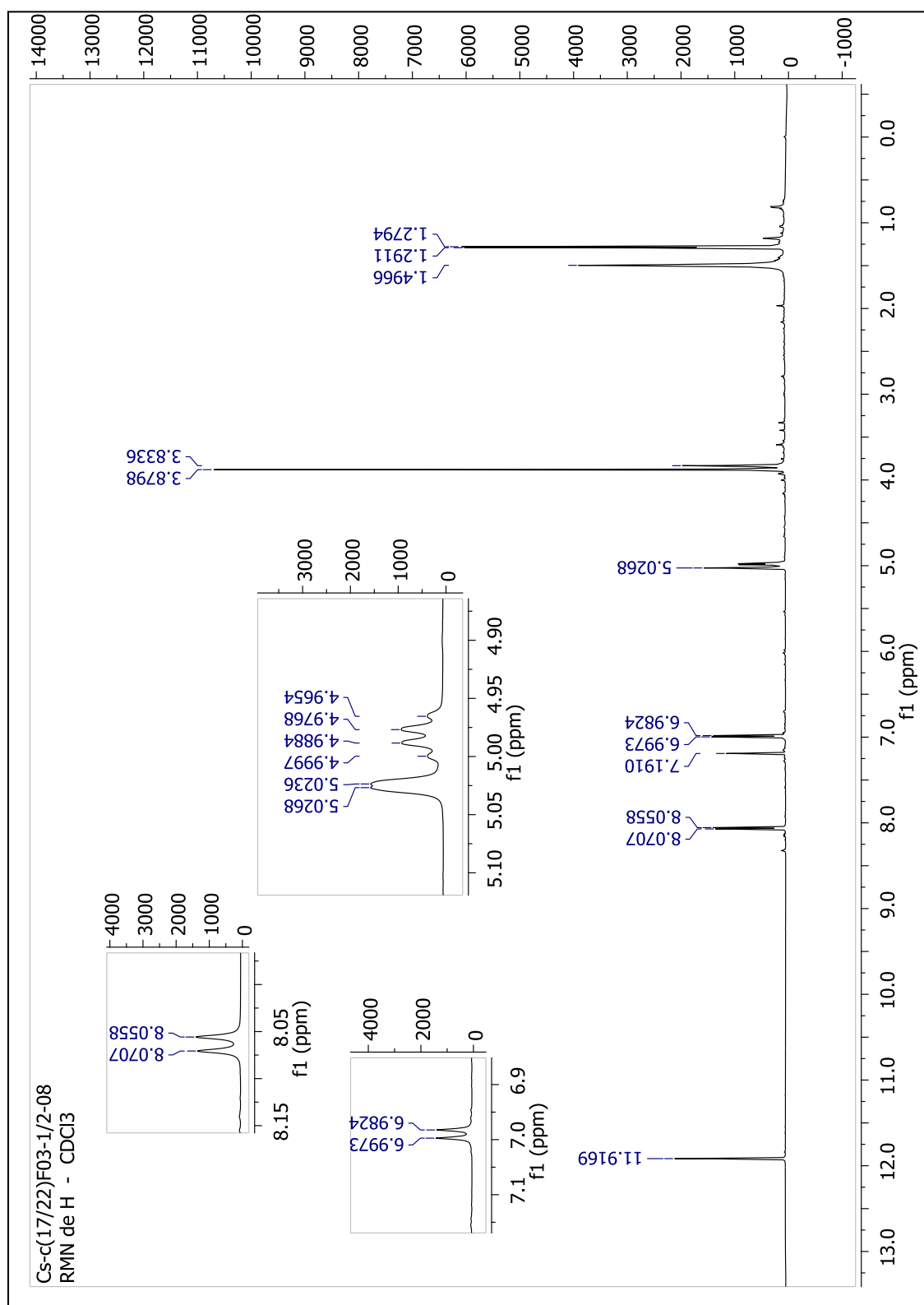
Anexo 89 – Mapa de contorno de g HMBC da substância **10** (CDCl₃, 125 MHz)



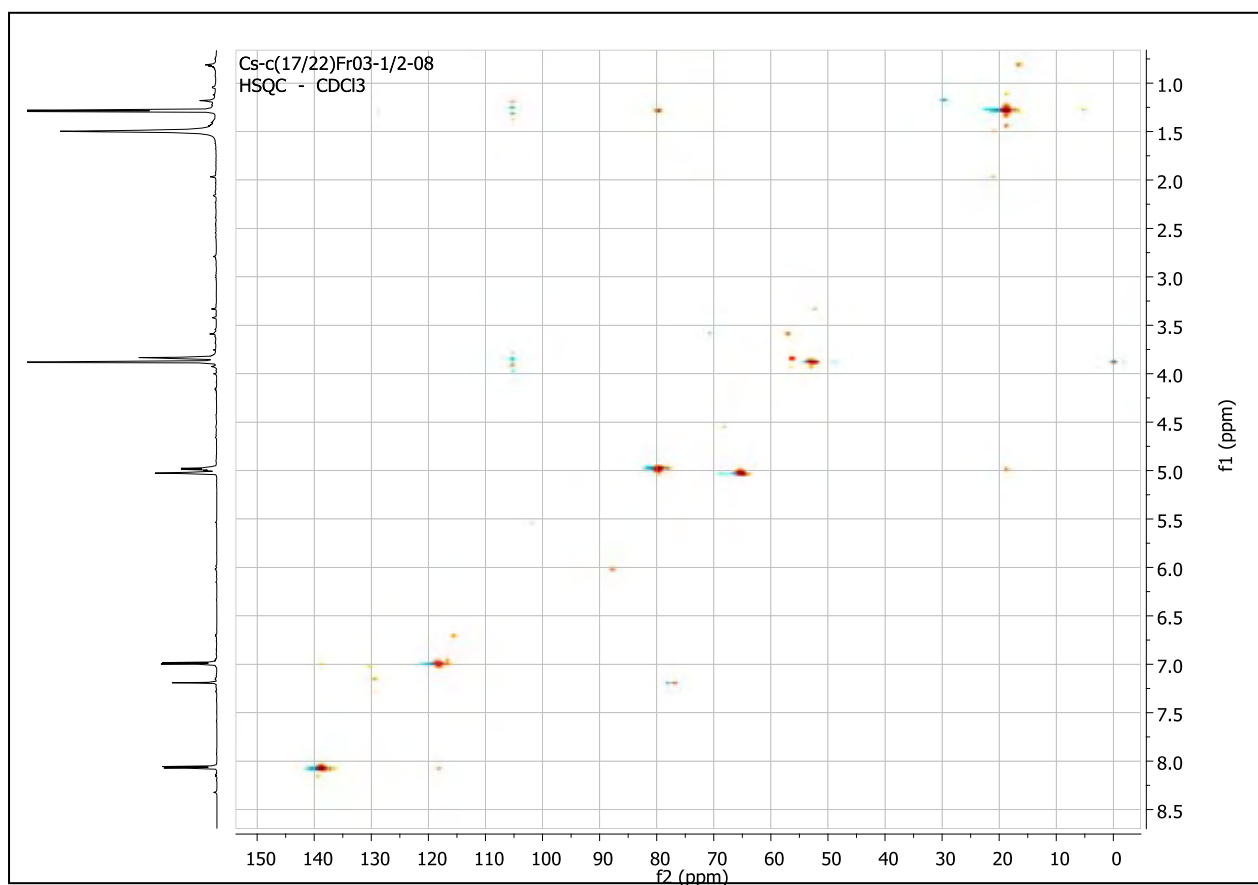
Anexo 90 – Espectro de gCOSY da substância **10** (CDCl₃, 600 MHz)



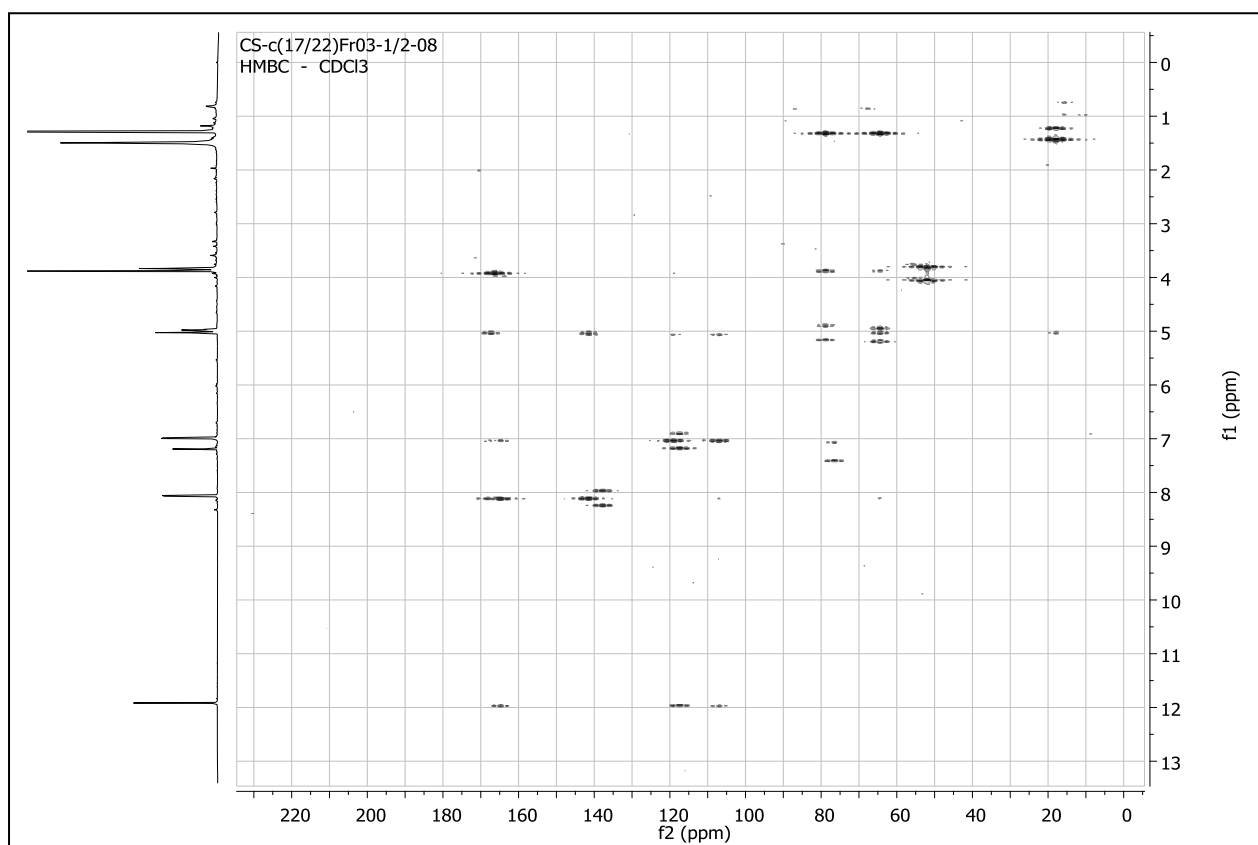
Anexo 91 – Espectro Massas da Substância 11 [EM-IES (-)]



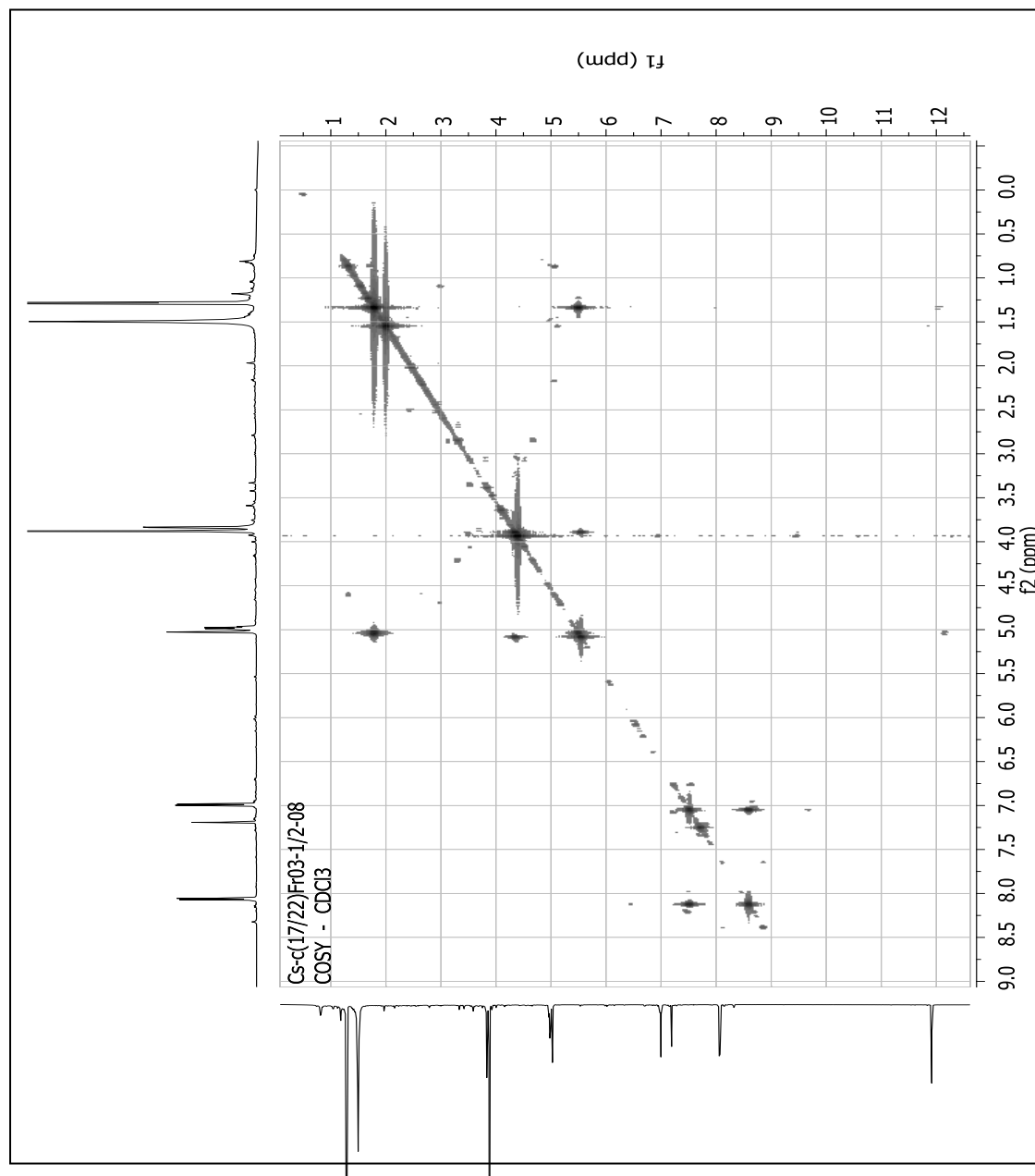
Anexo 92 – Espectro de RMN de ^1H da Substância 11 (CDCl_3 , 600MHz)



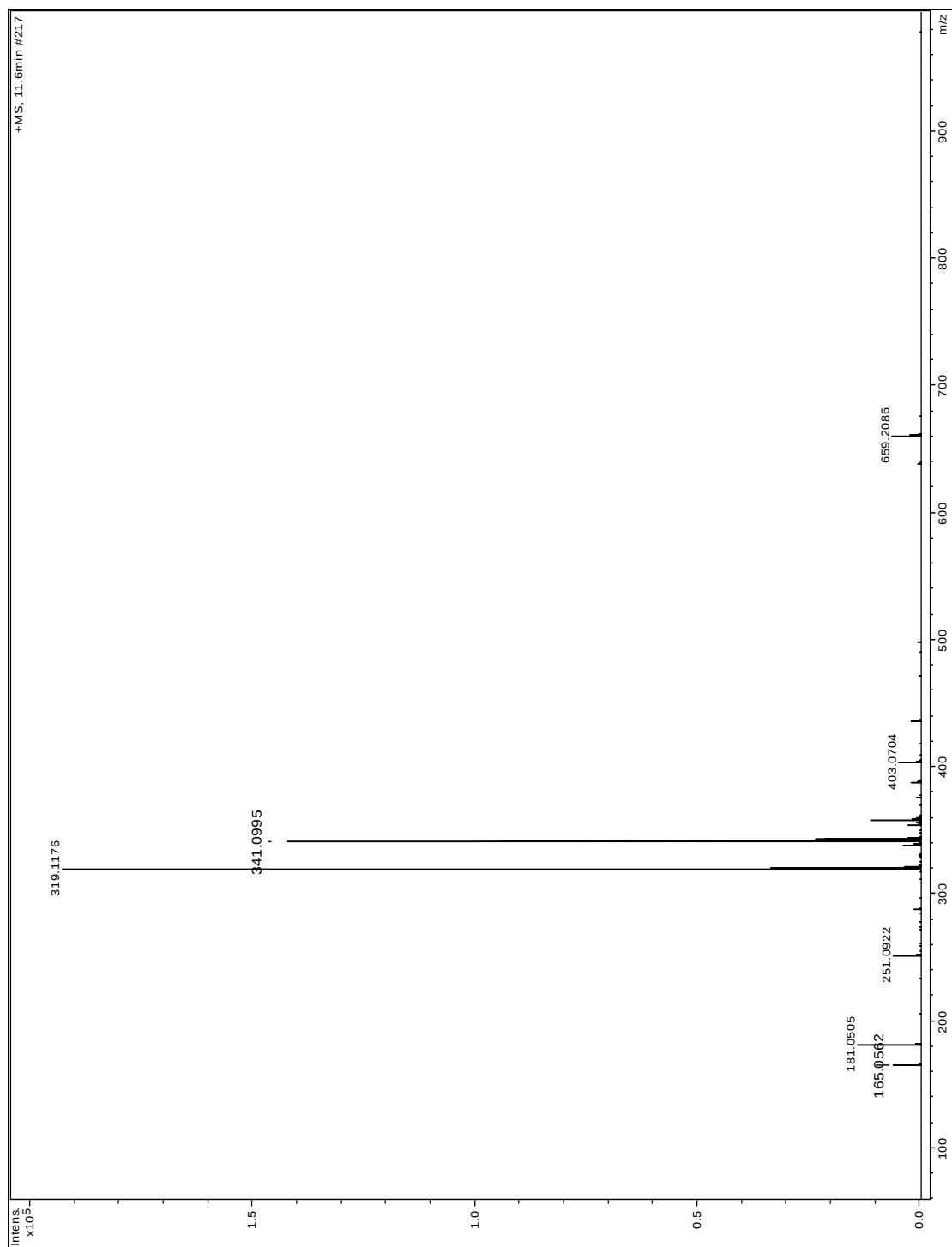
Anexo 93 – Mapa de contorno de gHSQC da substância **11** (CDCl₃, 125 MHz)



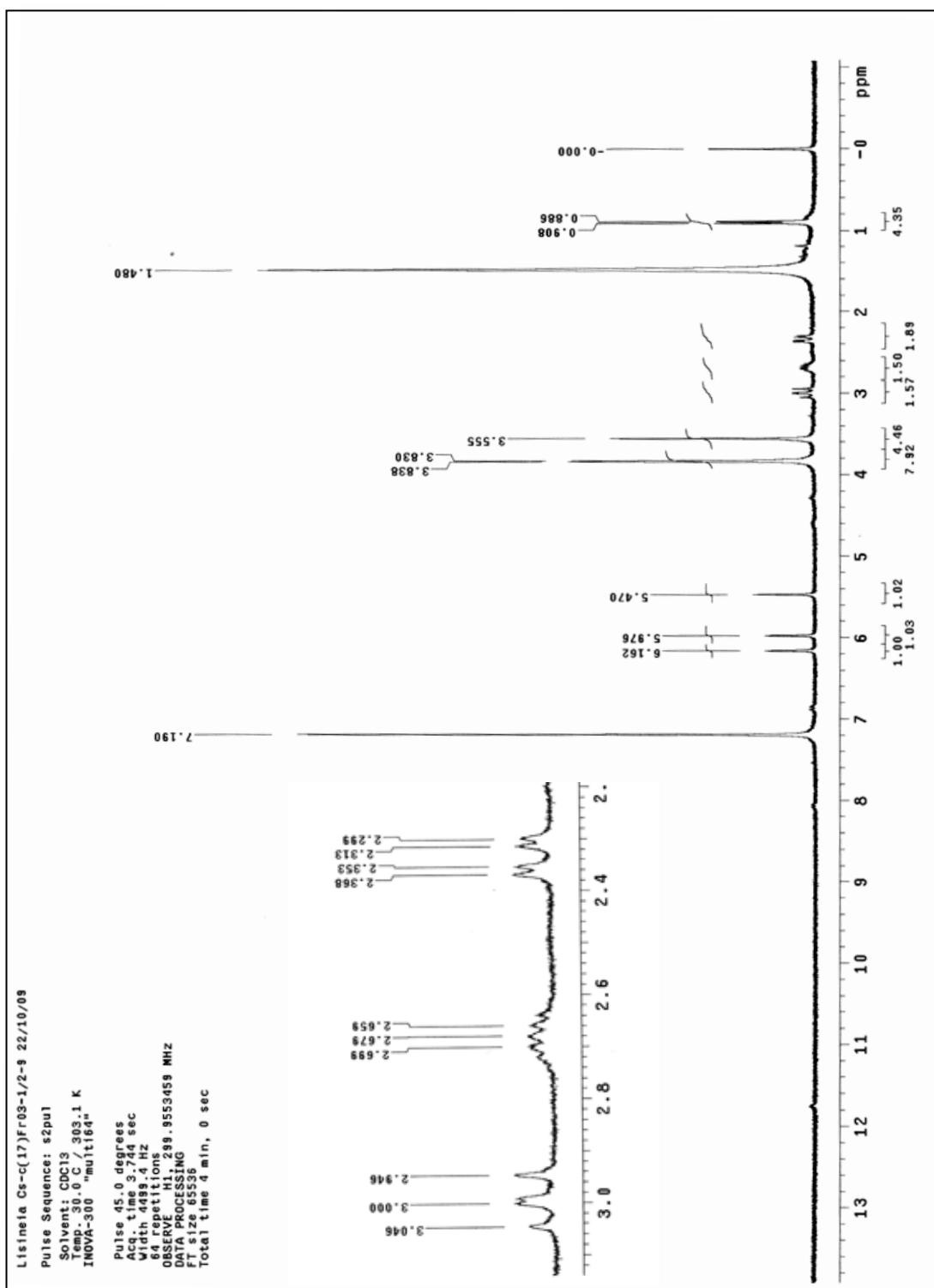
Anexo 94 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **11** (CDCl₃, 125 MHz)



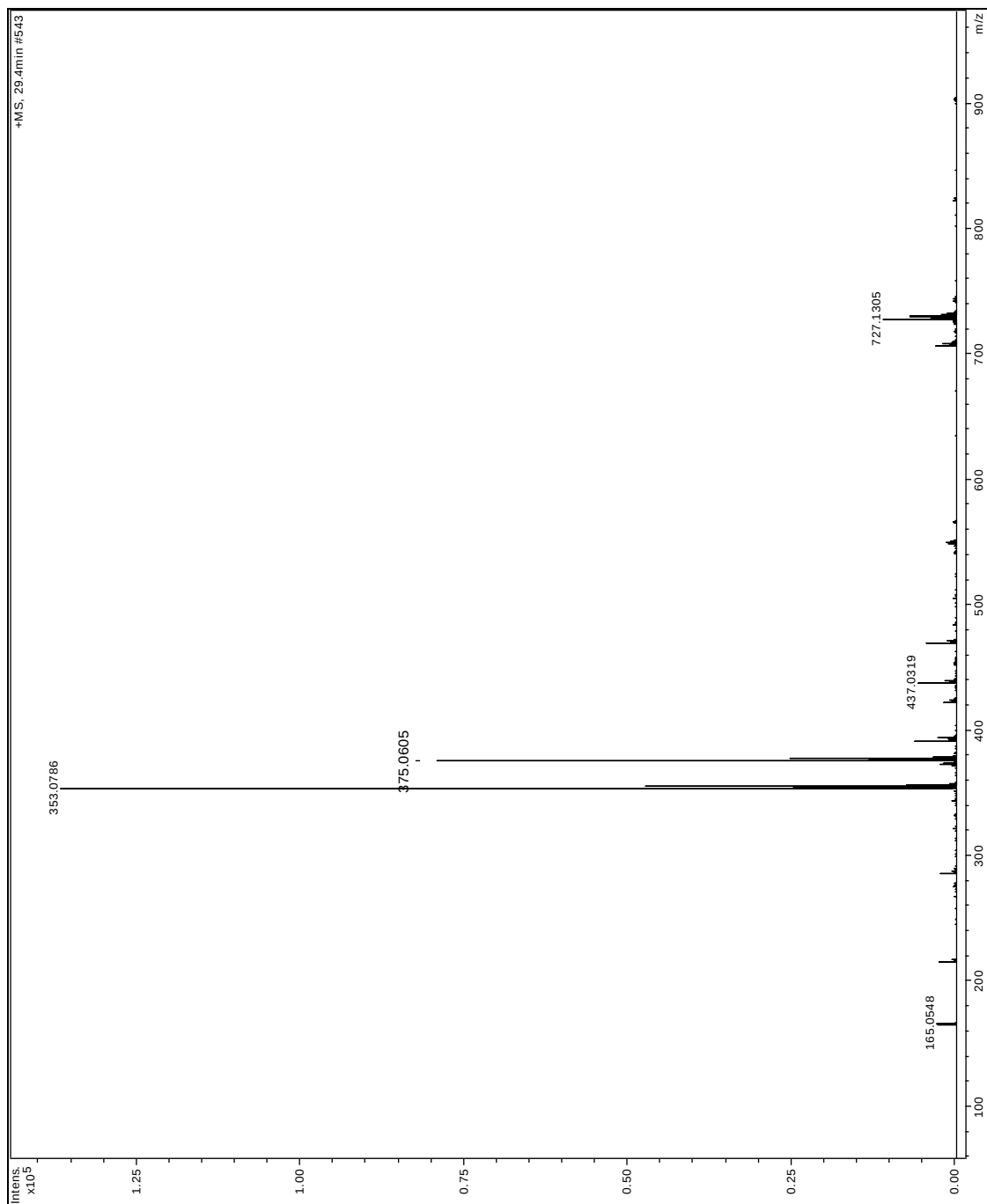
Anexo 95 – Espectro de gCOSY da Substância 11 (CDCl₃, 600MHz)



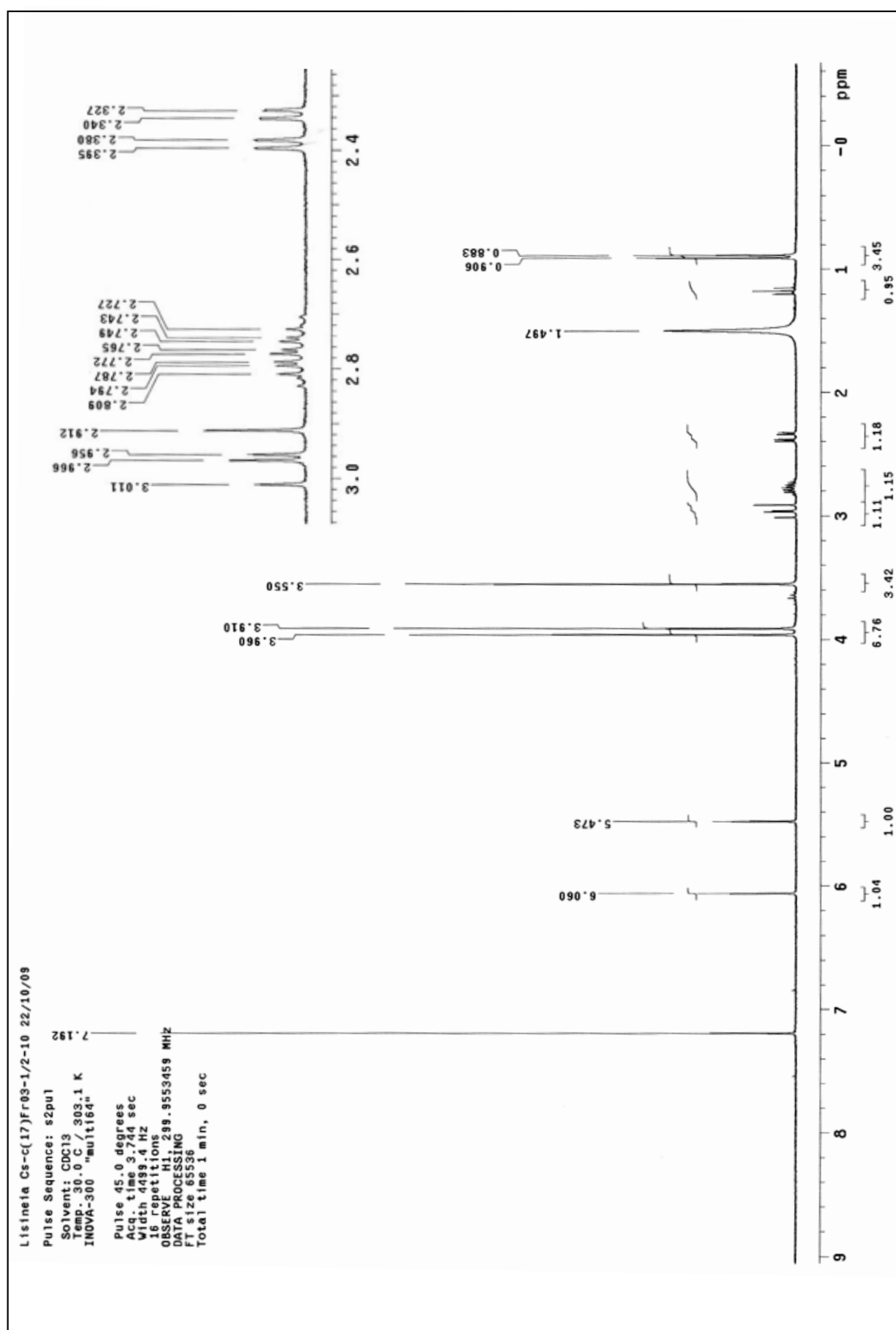
Anexo 96– Espectro Massas da Substância 12 [EM-IES (+)]



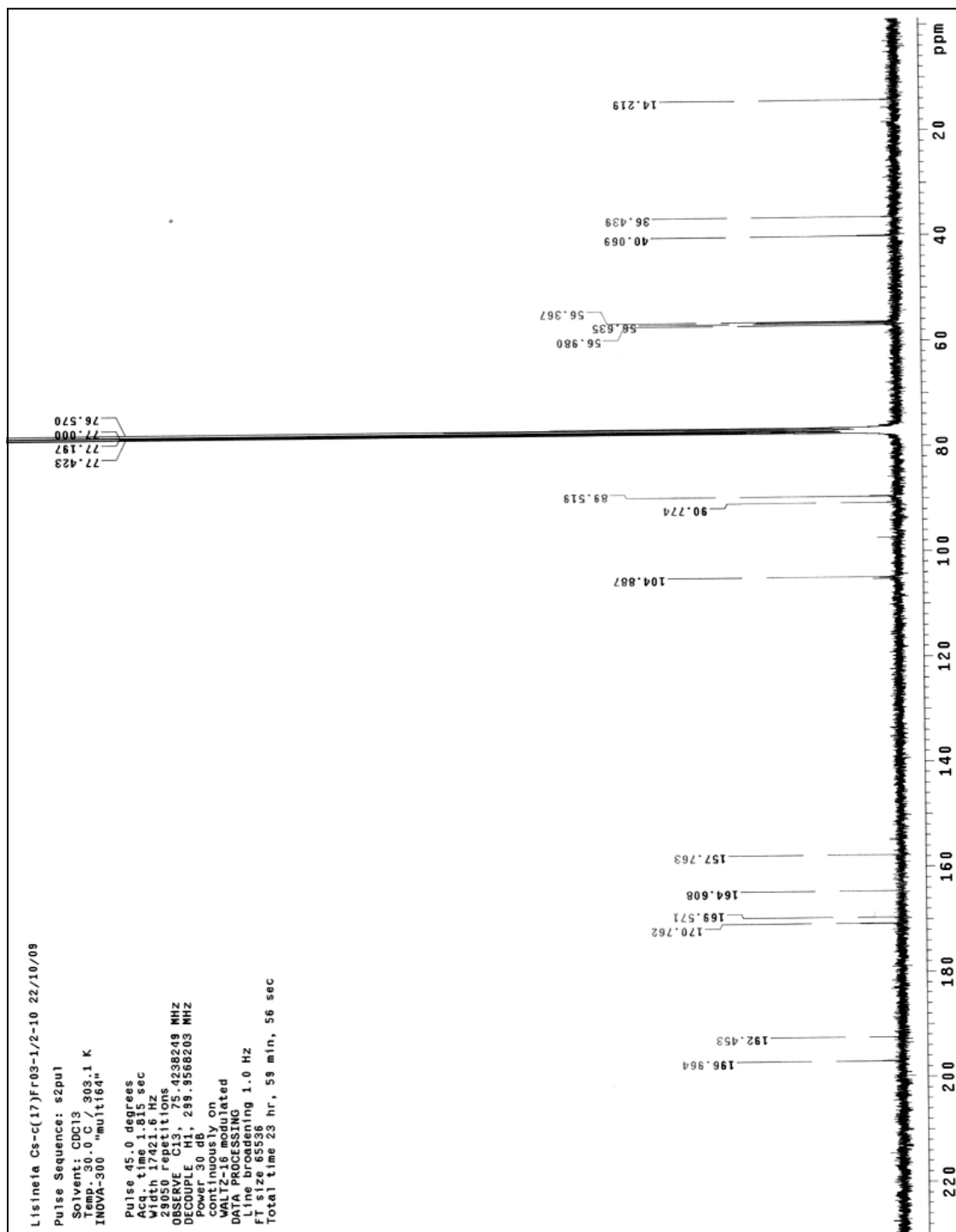
Anexo 97 – Espectro de RMN de ¹H da Substância 12 (CDCl₃, 300MHz)



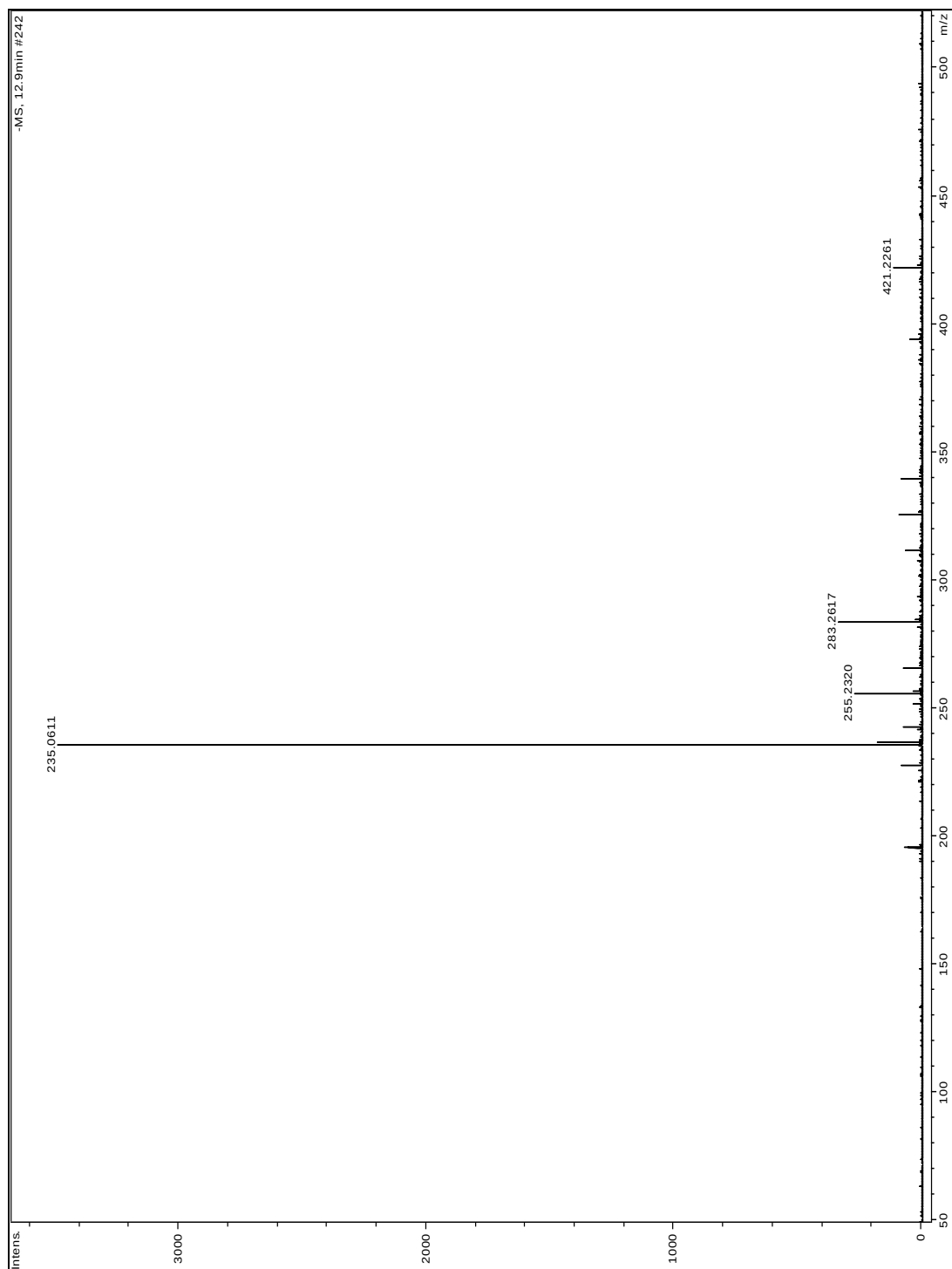
Anexo 98 – Espectro Massas da Substância 13 [EM-IES (+)]



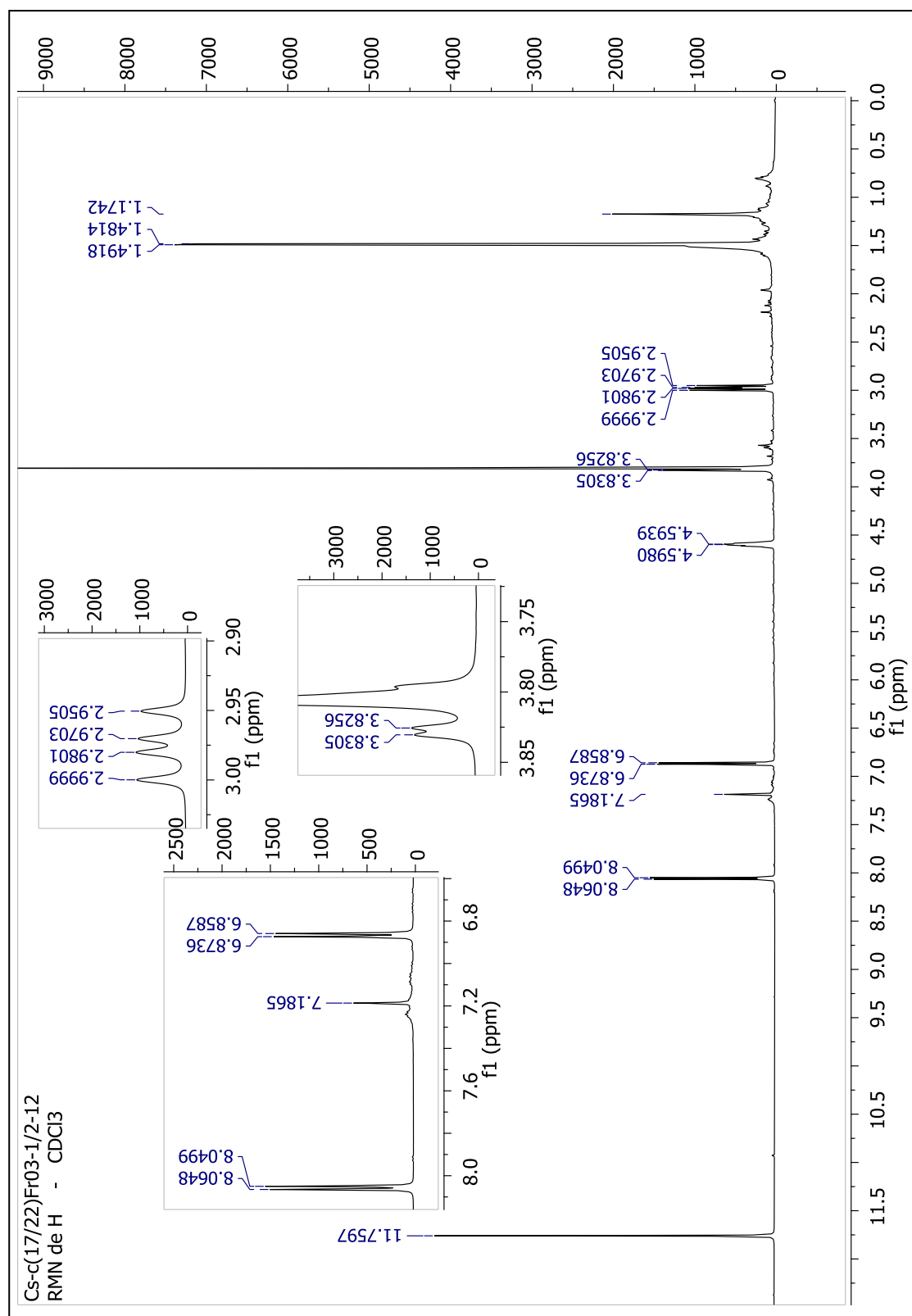
Anexo 99 – Espectro de RMN de ¹H da Substância 13 (CDCl₃, 300MHz)

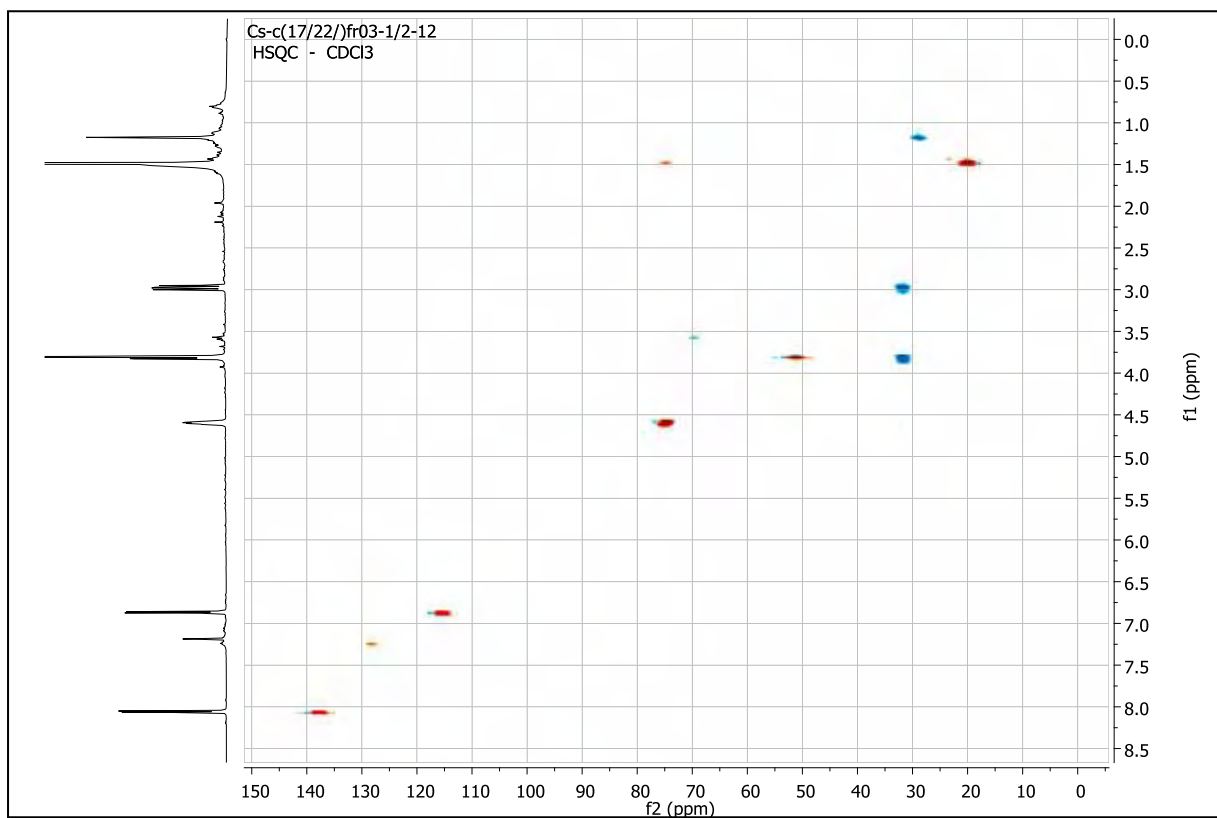


Anexo 100 – Espectro de RMN de ¹H da Substância 13 (CDCl₃, 75 MHz)

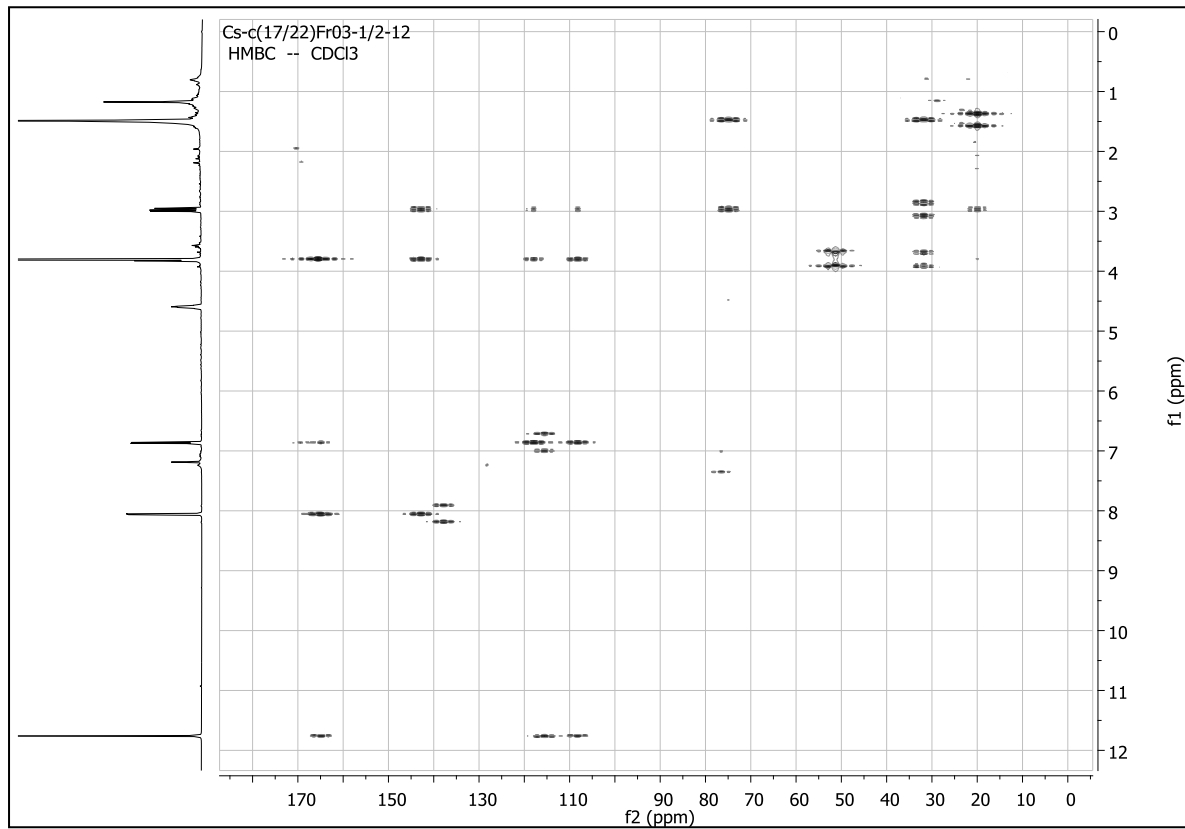


Anexo 101 – Espectro Massas da Substância 14 [EM-IES (-)]

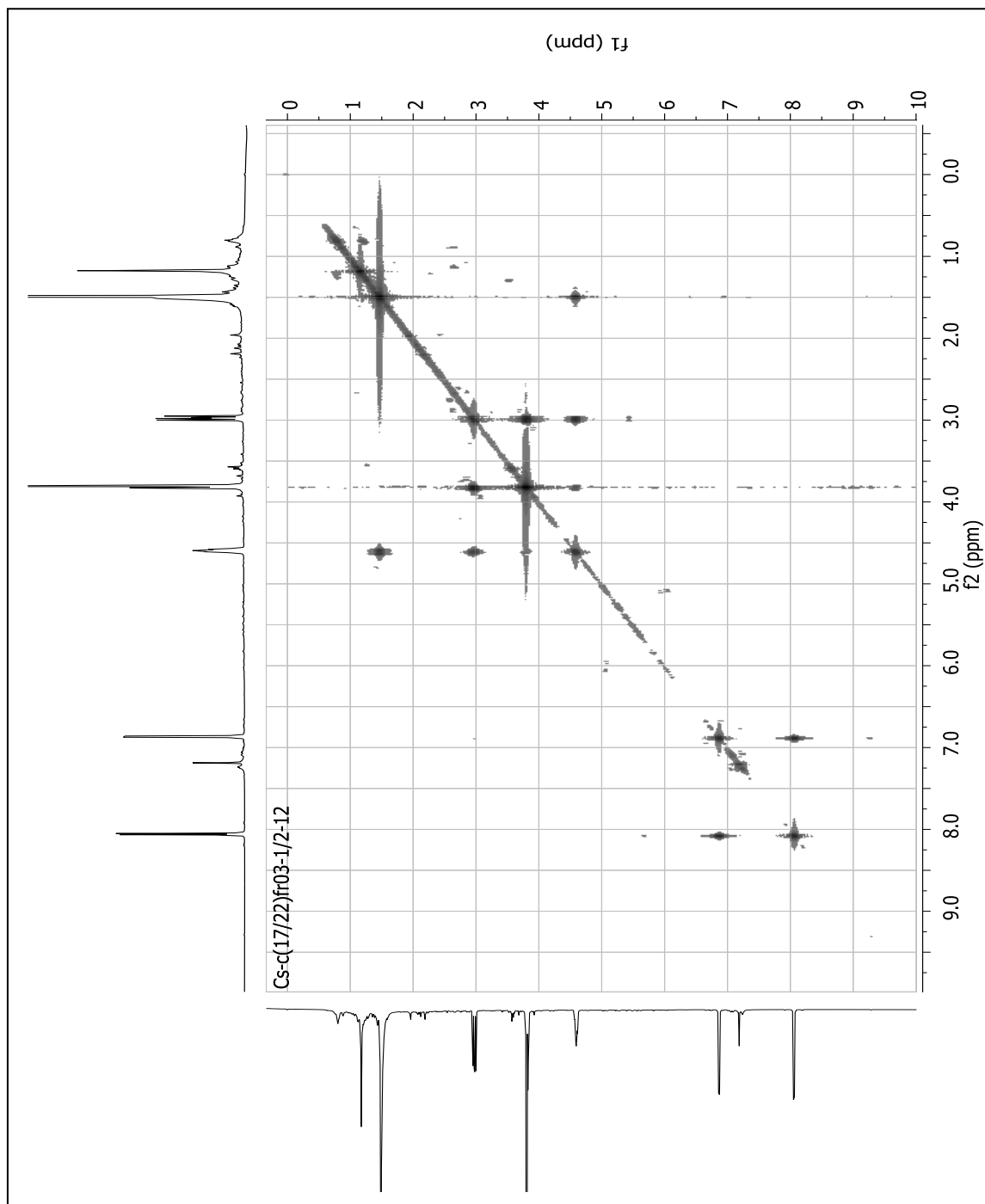




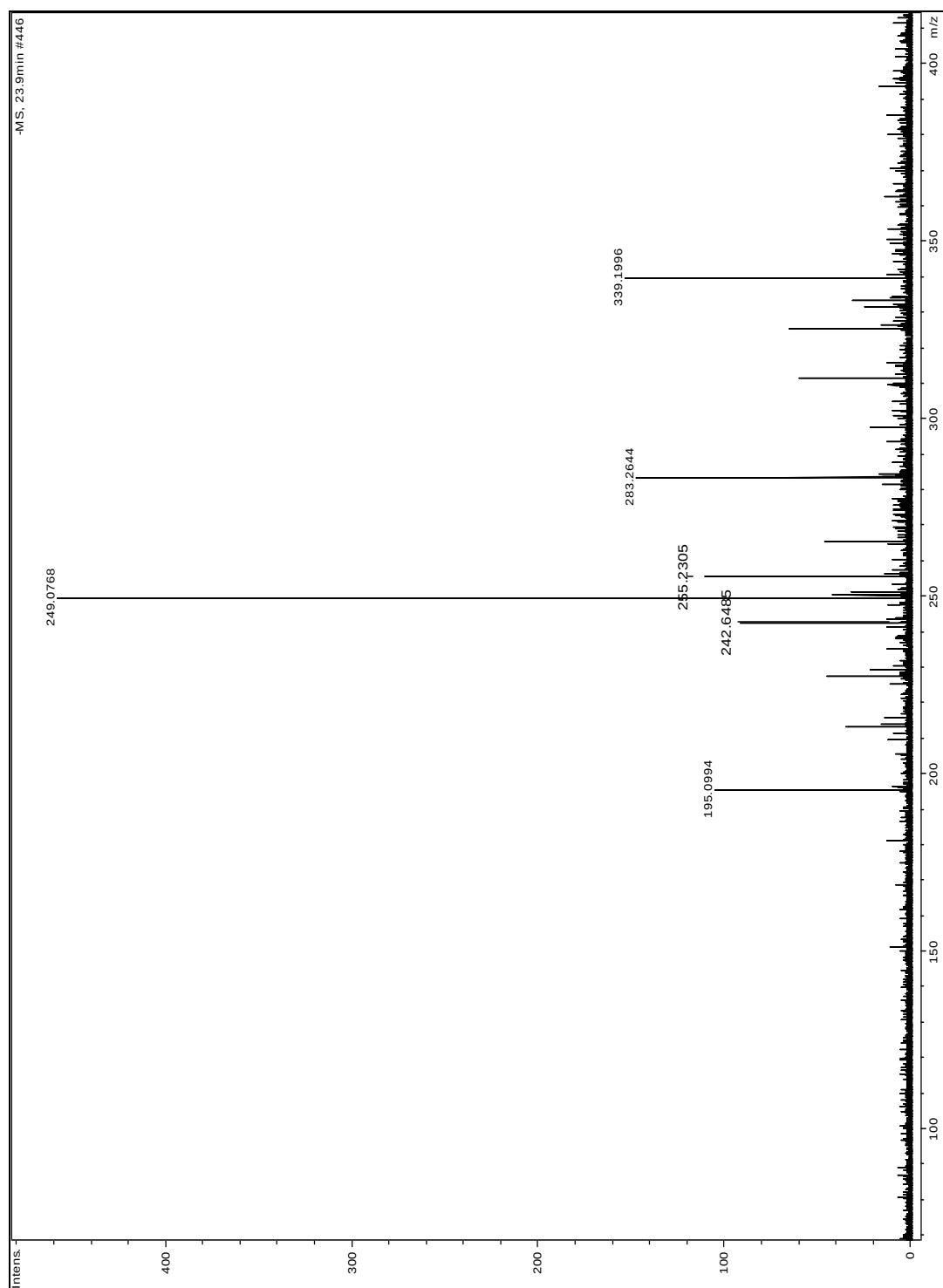
Anexo 103 – Mapa de contorno de gHSQC da substância **14** (CDCl₃, 125 MHz)



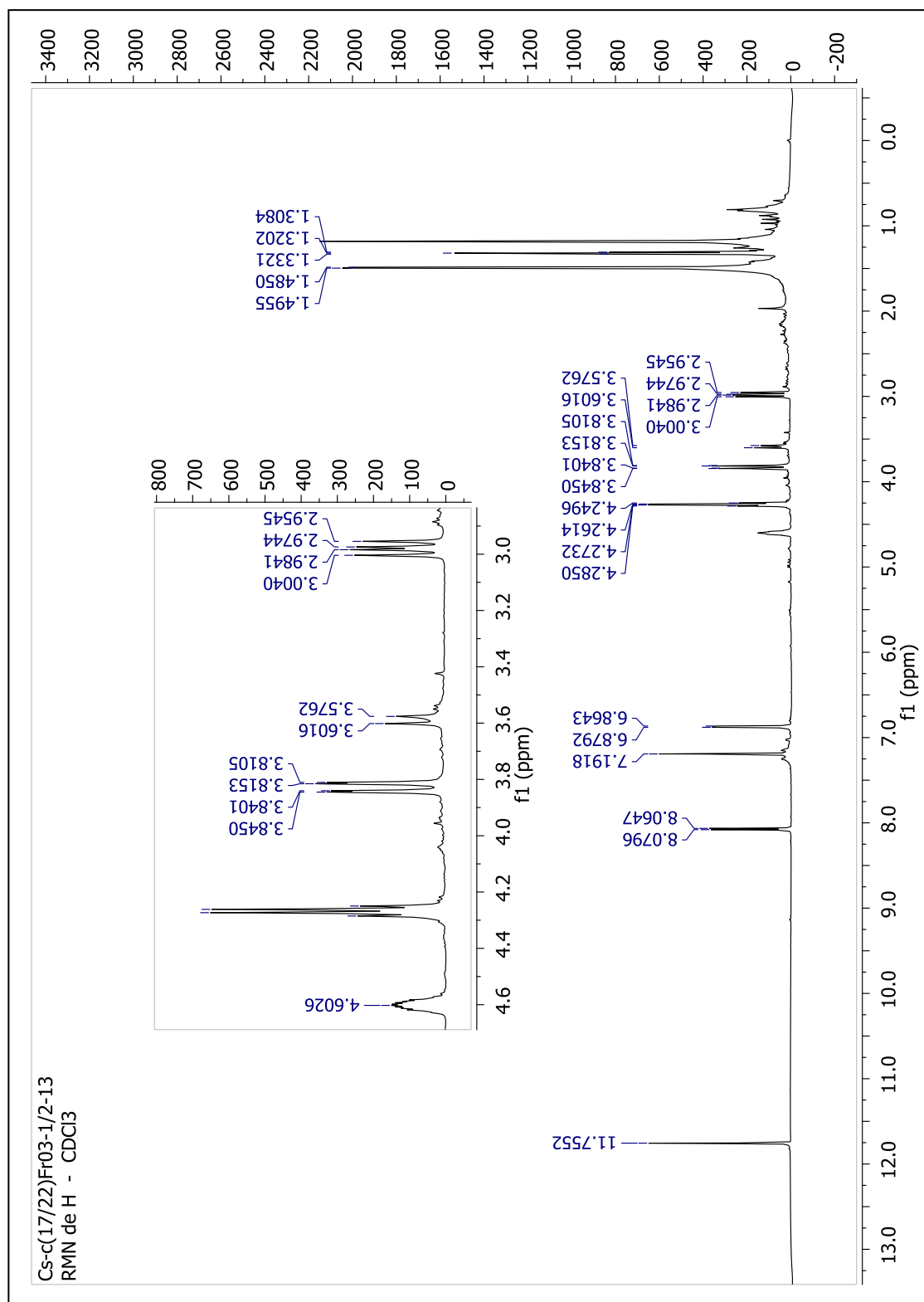
Anexo 104 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **14** (CDCl₃, 125 MHz)



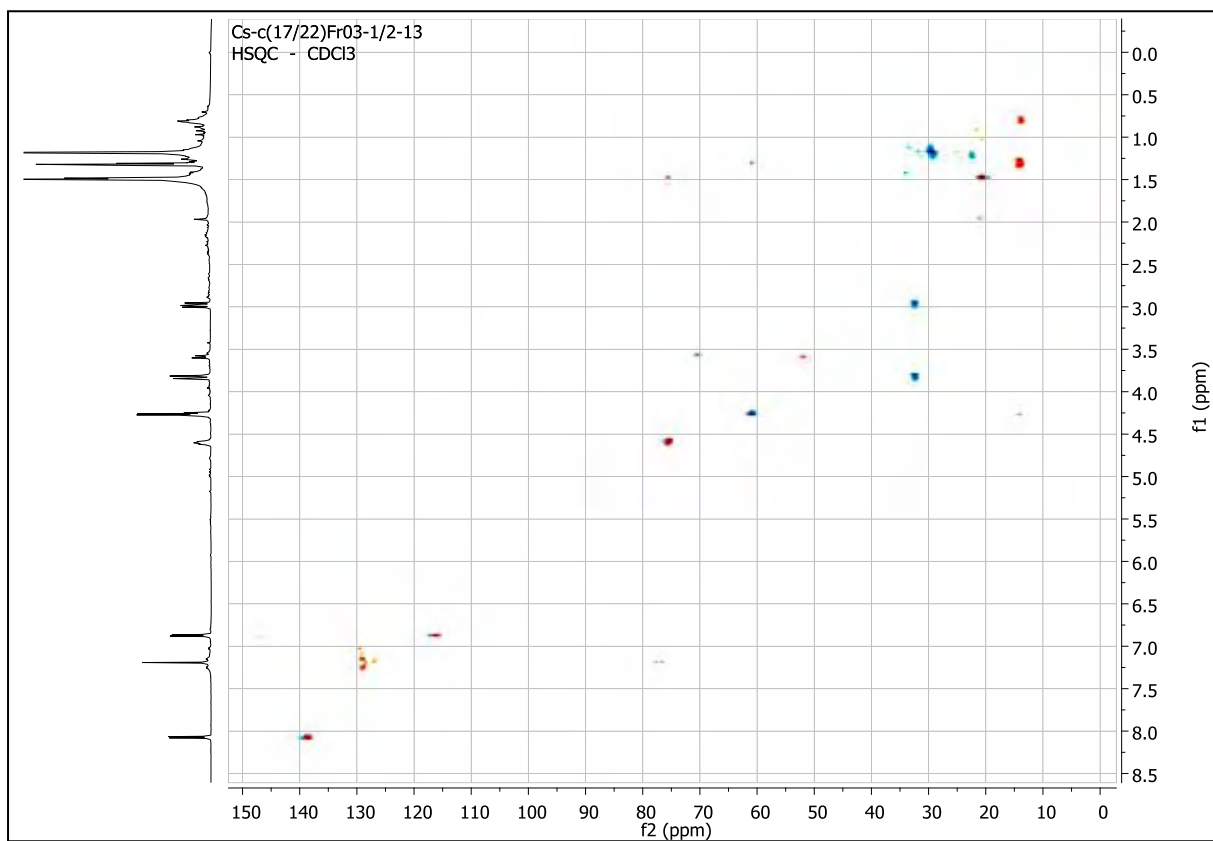
Anexo 105 – Espectro de gCOSY da Substância **14** (CDCl_3 , 600MHz)



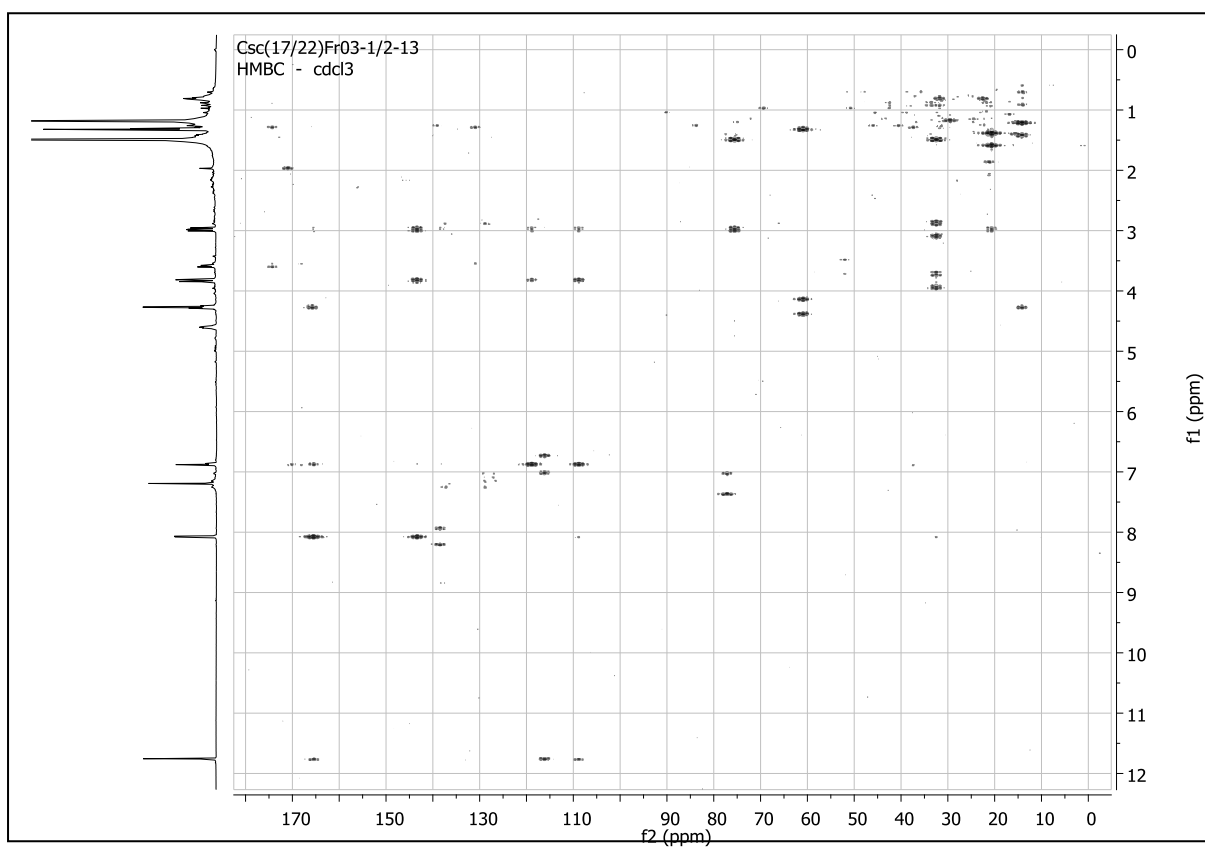
Anexo 106 – Espectro Massas da Substância 15 [EM-IES (-)]



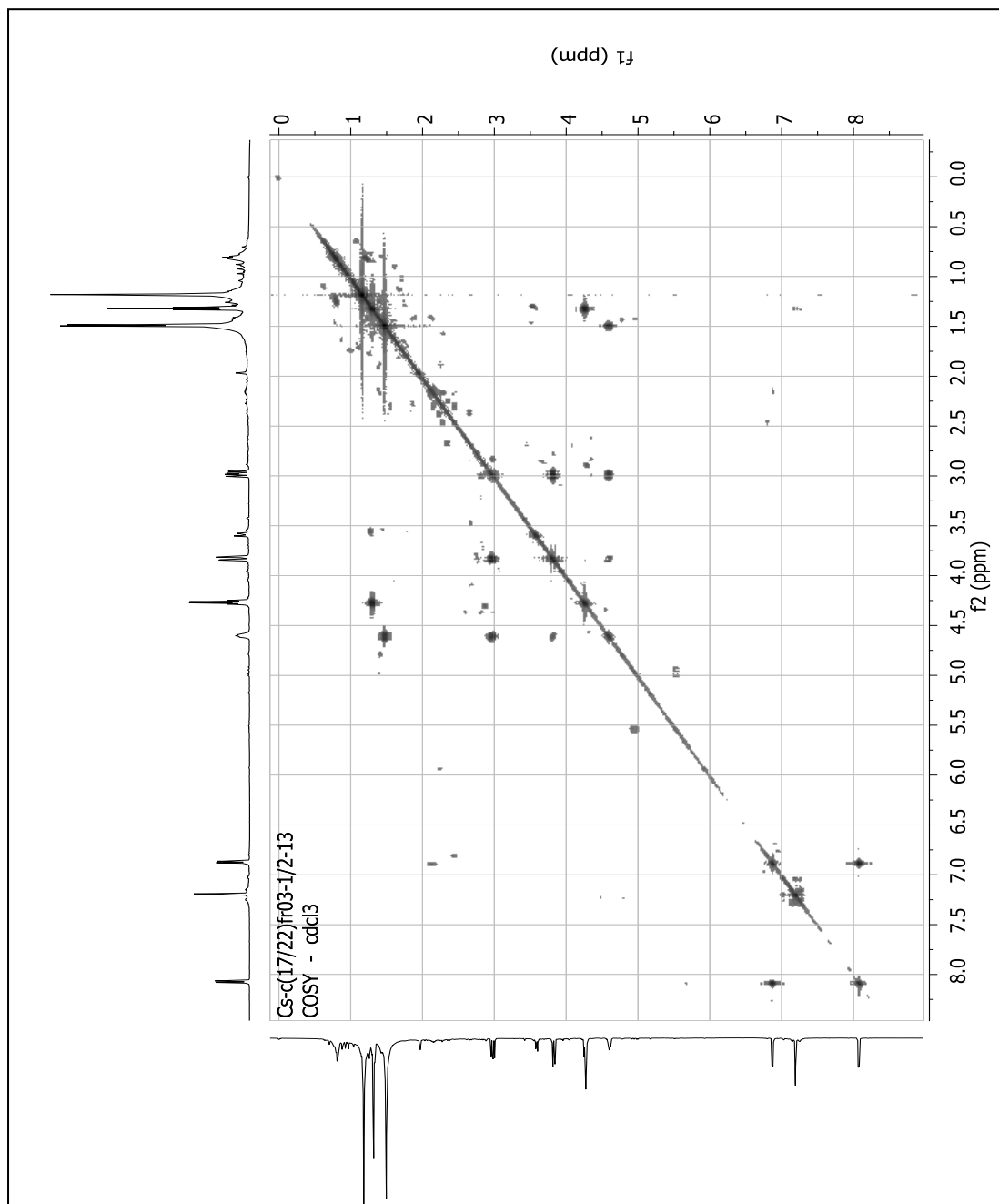
Anexo 107 – Espectro de RMN de ^1H da Substância 15 (CDCl_3 , 600 MHz)



Anexo 108 – Mapa de contorno de gHSQC da substância **15** (CDCl₃, 600 MHz)



Anexo 109 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **15** (CDCl₃, 600 MHz)



Anexo 110 – Espectro de gCOSY da Substância **15** (CDCl₃, 600MHz)