

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Química

AIRTON DAMASCENO SILVA



Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*
associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*:
potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2016

AIRTON DAMASCENO SILVA

Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*
associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*:
potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral

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

Orientador: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S586b Silva, Airton Damasceno
Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxyton investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral / Airton Damasceno Silva – Araraquara : [s.n], 2016
150 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Compostos bioativos. 3. Análise espectral. 4. Prospeção. 5. Alga marinha. I. Título.

AIRTON DAMASCENO SILVA

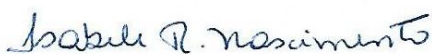
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 18 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



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



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



Prof. Dr. Paulo César Vieira
Centro de Ciências e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Airton Damasceno Silva

Nome em citações bibliográficas: SILVA, A. D.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.
Laboratório NuBBE 3. Departamento de Química Orgânica. Instituto de Química.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Instituto de Química de Araraquara.

Rua Professor Francisco Degni, nº 55 - Araraquara - SP. CEP: 14081-970, SP - Brasil.
Telefone: (16) 3301-9793.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2014-2016

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara - SP

Título: Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxyton investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral
(Ano de obtenção: 2016)

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Bolsa: CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2010-2014

Graduação em Química, Licenciatura

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG

Título: A Inclusão de Alunos Surdos em Aulas de Química Experimental
no Ensino Superior

(Ano de obtenção: 2014)

Orientadora: Profa. Dra. Regina Simplício Carvalho

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1. SILVA, A. D.; MEDINA, R. P.; AMBROZIN, A. R. P.; SANTOS, L. C. dos; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S. Antifungal and antitumoral activity of extracts and fractions from an endophytic fungus isolated from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. In: 5th Brazilian Conference on Natural Products (5th BCNP) and the XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXXI RESEM), 2016. Atibaia - SP.
2. AMBROZIN, A. R. P.; SILVA, A. D.; FONSECA, V.; FERREIRA, J. R.; NOGUEIRA, S. N. S. Influence of the extraction method on the chlorophylls obtained from spinach leaves. In: 5th Brazilian Conference on Natural Products (5th BCNP) and the XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXXI RESEM), 2016. Atibaia - SP.
3. SILVA, A. D.; AMBROZIN, A. R. P.; SILVA, A. F. de S.; ROSA, W.; SALOMÃO, L. C. C.; BELATTO, C. R. Quantificação por HPLC-DAD de ácido caféico em amostras de bananeira. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (XXVIII ERSBQ-MG), 2014. Poços de Caldas - MG.
4. AMBROZIN, A. R. P.; SILVA, A. F. de S.; ROSA, W.; BOFFO, E. F.; SILVA, A. D.; SALOMÃO, L. C. C.; RIBEIRO, S. M. R. Aplicação de métodos multivariados a dados de HPLC na classificação de cultivares de bananeiras brasileiras. In: 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (36^a ERSBQ), 2013. Águas de Lindóia - SP.

PARTICIPAÇÃO EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

1. 5th Brazilian Conference on Natural Products (5th BCNP) and the XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXXI RESEM), 2016. Atibaia - SP.
2. First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics, 2015. Ribeirão Preto - SP.
3. XXXV Escola de Verão em Química "Prof. Dr. José T. B. Ferreira", 2015. UFSCAR, São Carlos - SP.
4. XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (XXVIII ERSBQ-MG), 2014. Poços de Caldas - MG.
5. 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (36^a ERSBQ), 2013. Águas de Lindóia - SP.

6. XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (XXIV ERSBQ-MG), 2010. Viçosa - MG.
7. II Semana Acadêmica de Química e Engenharia Química - Tecnologia e Sociedade, 2008. Viçosa - MG.

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS DE CURTA DURAÇÃO

1. Curso Teórico Prático "RMN de Líquidos"
Módulo 1: Parte Teórica, 2014. São Carlos - SP. (16h)
Módulo 3: Parte Teórico-Prática. Processamento de Espectros 1D e 2D. 2014, São Carlos - SP. (16h)
2. Minicurso - O Desenvolvimento da Química Orgânica durante os 35 anos de Escola de Verão; alguns aspectos importantes (Prof. Dr. Peter Bakuzis - Universidade de Brasília) - XXXV Escola de Verão em Química, 2014. UFSCar, São Carlos - SP. (16h)
3. Minicurso - Green Chemistry (Rajender S. Varma - U. S. Environmental Protection Agency). XXXV Escola de Verão em Química, 2014. UFSCar, São Carlos - SP. (16h)
4. Minicurso - Cromatografia Gasosa: Fundamentos e Estado da Arte (Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso - UFLA). XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014. Poços de Caldas - MG. (4h)
5. Minicurso - Síntese de Fármacos: da Química Medicinal à Indústria (Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima). 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013. Águas de Lindóia - SP.
6. Minicurso - Termodinâmica Estatística: Princípios e Aplicações (Prof. Dr. João Pedro Braga - UFMG). XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2010. Viçosa - MG. (4h)

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS DE LONGA DURAÇÃO

1. Aperfeiçoamento em Cromatografia Líquida (128/180 horas) - em andamento. Instituto Internacional de Cromatografia, 2015. São Carlos - SP.
Disciplinas cursadas:
 - Introdução às técnicas cromatográficas: GC, SFC, HPLC (32h)
 - Cromatografia Líquida Básica (HPLC ou CLAE): Fundamentos, Instrumentação e Aplicações (24h)
 - Cromatografia Líquida Moderna (Teoria e Prática) (24h)
 - Acoplamento LC-MS e LC-MS/MS (32h)
 - Como desenvolver e otimizar um método em HPLC (Teoria e Prática) (16h)
2. MEO - My English Online, Curso de Inglês online do Programa Inglês Sem Fronteiras - Ministério da Educação (MEC) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) destinado aos alunos de graduação e pós-graduação. 2014. (180h)
Level 2 (básico), Level 3 (pré-intermediário) e Level 4 (intermediário).

ENSINO E EXTENSÃO

1. Monitor Nível I
Carga horária semanal: 12 - Regime Parcial
Disciplina: Físico-Química I e II (QUI150 e QUI151)
Período de atuação: 2013.
2. Monitor Nível I
Carga horária semanal: 12 - Regime Parcial
Disciplina: Química Orgânica I e II (QUI131 e QUI132)
Período de atuação: 2011-2012.
3. Minicurso - Modelagem Molecular Com a Utilização do Programa ACD/CHEMSKETCH FREEWARE.
Ministrante. 27 horas. Universidade Federal de Viçosa, 2013. Viçosa - MG.

Ao meu pai, Romildo Rodrigues Silva, homem íntegro,
de caráter irretocável.

À minha mãe, Arlete Estevão Damasceno.

À minha amada noiva, Alessandra Regina Pepe Ambrozin.

Aos meus queridos irmãos, Arthur, Amanda, Aline e Adriele.

À família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, por ter me guiado e me mostrado o caminho quando estava perdido. Obrigado pela amizade, sensibilidade, expertise, profissionalismo e por todos os ensinamentos.

À minha noiva Alessandra, por seu amor, cuidado e paciência. Obrigado por ter ficado ao meu lado durante esses dois anos de muitas renúncias e ausências, inevitáveis para a realização desse sonho que se concretiza. Da mesma forma, gostaria de agradecer por toda imensa ajuda e aprendizado. O seu conhecimento na área da Química de Produtos Naturais bem como o seu altruísmo foram essenciais para a minha formação e para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos que gentilmente abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse iniciar o trabalho de fracionamento. Obrigado por ter me ajudado, pelos conselhos e pelas valiosas contribuições!

Ao Doutores Nivaldo Boralle, Lucineia Vizzotto Marconcini, Juliana Rodrigues e ao Mestre João Luiz Bronzel Junior. Competência, profissionalismo, eficiência, dedicação, perfeccionismo, enfim, são muitos os adjetivos para descrevê-los. Meus sinceros agradecimentos por todas as análises cuidadosas que foram realizadas. Se todos os grupos de pesquisa tivessem a sorte de ter profissionais como vocês a pesquisa no nosso país seria infinitamente melhor!

Aos meus colegas de grupo e também aos colegas do NuBBE 3 pela amizade e pela boa convivência, em especial ao Gustavo Monteiro e ao Celso Yassuo Okada. Obrigado por toda ajuda e prestatividade.

Ao NuBBE pela oportunidade de desenvolver a minha pesquisa junto a um grupo forte, cuja excelente infra-estrutura me possibilitou imenso crescimento profissional e também pessoal.

Ao meu pai, Romildo Rodrigues Silva, por ser o meu exemplo, pelo homem que é e que eu gostaria de ser, por todo suporte emocional e também financeiro. À minha mãe Arlete Estevão Damasceno e aos meus queridos irmãos, Arthur, Amanda, Aline e Adriele. Essa conquista é de todos vocês!

À minha família que tanto amo e aos amigos que ficaram em Eunápolis e que me recordo com imensa saudade!

Por fim, os meus agradecimentos à CAPES pela bolsa concedida, ao CNPQ e a FAPESP pelo suporte e apoio financeiro.

*“Fui para os bosques viver de livre vontade
Para sugar todo o tutano da vida
Para aniquilar tudo o que não era vida
para quando morrer
não descobrir que não vivi.”*

Henry Thoreau

*"Duas coisas que me enchem a alma de crescente admiração e respeito
quanto mais intensa e freqüentemente o pensamento dela se ocupa:
o céu estrelado sobre mim e a lei moral dentro de mim."*

Immanuel Kant

*“Quem de três milênios, não é capaz de se dar conta,
vive na ignorância, na sombra,
à mercê dos dias, do tempo.”*

Johan Goethe

SILVA, A. D. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral.** 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2016.

RESUMO

O fungo *Hypoxylon investiens* ocorre em ambientes terrestres e aquáticos, sendo que a maior parte dos estudos já realizados com o gênero *Hypoxylon* refere-se aos fungos terrestres. Diversas substâncias e atividades biológicas foram determinadas para o gênero e o presente estudo é o primeiro a realizar a bioprospecção de *H. investiens* associado à alga marinha. Neste trabalho, foram estudados os constituintes químicos produzidos pelo fungo *H. investiens* e avaliadas algumas atividades biológicas promissoras (antifúngica e citotóxica). O extrato bruto dos metabólitos produzidos em meio líquido de PDB obtido em escala ampliada apresentou forte atividade frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e mostrou-se ativo (75,7% de inibição) frente à linhagem tumoral HCT-116 (carcinoma de cólon). O seu fracionamento por CC em Sephadex[®] LH-20 eluída com metanol resultou em 6 frações (**G1** a **G6**): a fração **G4** mostrou forte atividade antifúngica contra linhagens de *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, além de alto potencial de inibição (97,3%) de células tumorais HCT-116. As frações **G5** e **G6** também se mostraram ativas frente à linhagem tumoral HCT-116 apresentando, respectivamente, 104,8% e 99,4% de inibição dessa linhagem de células tumorais. A fração **G5** apresentou ainda atividade (inibição de 84,5%) contra a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama metastático). No entanto, as frações **G4** e **G6** mostraram-se inativas contra esta linhagem, o que evidenciou a seletividade dessas frações frente às linhagens tumorais testadas. Estes resultados indicaram elevado potencial de produção de metabólitos bioativos por *H. investiens*. Os procedimentos cromatográficos levaram ao isolamento de 14 substâncias da fração **G5**, 3 substâncias da fração **G6** e de outras 2 substâncias da fração inativa **G3**. A análise estrutural preliminar por RMN das 17 substâncias isoladas das frações bioativas **G5** e **G6** indica que devam se tratar de compostos inéditos, derivados do BNT (4,4',5,5'-tetraidroxi-1,1'-binaftila), sendo que três delas, isoladas da fração **G5**, tiveram seus esqueletos carbônicos completamente caracterizados, utilizando-se experimentos uni e bidimensionais de RMN e espectrometria de massas de alta resolução. Experimentos adicionais estão em andamento para se determinar a estereoquímica dos centros de quiralidade das substâncias elucidadas, e as demais estruturas estão sob processo de investigação estrutural. Uma das substâncias isoladas da fração não-ativa **G3** foi o ácido 3-nitropropanóico, uma toxina mitocondrial produzida por fungos para sua defesa e que foi produzido com alto rendimento (304,5 mg a partir de 605,4 mg da fração **G3**) por *H. investiens*. Os resultados obtidos foram promissores, evidenciando a destacada quimiodiversidade de fungos obtidos do ambiente marinho e elevado potencial de bioatividade de seus extratos e frações. Sinalizam ainda para a necessidade de estudos mais aprofundados da química e das propriedades biológicas do fungo *H. investiens* contribuindo para a exploração sustentável da biodiversidade marinha brasileira.

Palavras-chave: fungo endofítico, *Hypoxylon*, *Asparagopsis*, bioprospecção, alga marinha.

SILVA, A. D. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral.** 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2016.

ABSTRACT

The fungus *Hypoxylon investiens* occurs in terrestrial and aquatic environments, and most studies carried out so far on genus *Hypoxylon* refer to the terrestrial fungal strains. Many compounds and biological activities were determined for the genus and the present study is the first to carry out the bioprospection of *H. investiens* associated to marine algae. In this work, the chemical constituents produced by a fungal strain of *H. investiens* were investigated and some promising biological activities were evaluated (antifungal and cytotoxicity). The crude extract of the metabolites produced in PDB liquid medium by *H. investiens* was obtained in large scale and showed strong activity against the phytopathogenic fungi *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. It also showed inhibitory activity (75.7% of inhibition) on colon carcinoma tumor cell line HCT-116. Its fractionation by column chromatography over Sephadex[®] LH-20 eluted with methanol afforded 6 fractions, (**G1-G6**). Fraction **G4** showed strong antifungal activity against *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum* strains, in addition to high inhibitory potential (97,3%,) towards tumor cells HTC-116. Fractions **G5** and **G6** were also active against tumor cell line HCT-116, showing 104,8% and 99,4% inhibition, respectively. Additionally, fraction **G5** inhibited metastatic breast adenocarcinoma cell line MVF-7 whereas fractions **G4** and **G6** were inactive, which evidenced selectivity of such fractions towards the tested tumor cells lines. These results evidenced a high potential of production of bioactive metabolites by *H. investiens*. The chromatographic procedures led to the isolation of 14 compounds from fraction **G5**, 3 compounds from fraction **G6** and 2 compounds from the non-active fraction **G3**. The preliminary analysis of the 17 isolated compounds from the bioactive fraction **G5** and **G6** by NMR spectroscopy indicated they are novel compounds structurally related to BNT (*4,5,4',5'-tetrahydroxy-1,1'-BiNaphThyl*). From those, three compounds were isolated from fraction **G5** and had their carbon skeletons fully characterized and consistent with uni and bidimensional ¹H and ¹³C NMR spectral data and high-resolution mass spectrometry. Additional experiments are being developed to determine the stereochemistry of asymmetric centers in the elucidated structures. Additionally, the non-active fraction **G3** afforded high yield (304,5 mg from 605,4 mg of **G3** fraction) of 3-nitropropanoic acid, a mitochondrial toxin wide spread among fungi and produced for their own defense. The results obtained were promising, pointing out the need for further in-depth investigations on the chemistry and biological properties of the fungus *H. investiens*. Such promising results evidence the outstanding chemodiversity of marine-derived fungi and highlight the bioactivity potencial of their extracts and fractions. They also point out the need for further studies of *H. investiens* chemistry and biological properties, which may contribute for the sustainable exploration of Brazilian marine biodiversity.

Key-words: endophytic fungus, *Hypoxylon*, *Asparagopsis*, bioprospection, marine algae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Algumas substâncias orgânicas voláteis identificadas em extratos da alga *Asparagopsis taxiformis*..... 28
- Figura 2** - Algumas substâncias orgânicas não-voláteis identificadas em extratos da alga *Asparagopsis taxiformis*..... 29
- Figura 3** - Substâncias isoladas do fungo *H. investiens*. 51
- Figura 4** - Etapas sintéticas para obtenção do ácido 3-nitropropanóico a partir do ácido acrílico 54
- Figura 5** - Esquema de coleta, esterilização e isolamento das cepas fúngicas..... 61
- Figura 6** - Prospecção química e biológica dos metabólitos produzidos em escala reduzida por linhagem do fungo *Hypoxylon investiens*. 63
- Figura 7** - Prospecção química e biológica dos metabólitos produzidos em escala ampliada por linhagem do fungo *Hypoxylon investiens*. 65
- Figura 8** - Fracionamento por cromatografia de exclusão do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala ampliada pelo fungo *H. investiens*. 66
- Figura 9** - Cromatograma representando o perfil do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala reduzida pelo fungo *H. investiens* isolado da alga marinha *A. taxiformis*. 73
- Figura 10** - Cromatograma representando o perfil do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala ampliada pelo fungo *H. investiens* isolado da alga marinha *A. taxiformis*. 74
- Figura 11** - Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extratos brutos AcOEt dos metabólitos produzidos por *H. investiens* em escalas reduzid e ampliada 75
- Figura 12** - Espectro de RMN de ^1H -presat (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens* em escala reduzida. 76
- Figura 13** - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens* em escala ampliada. 76

Figura 14 - Sobreposição dos espectros de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) dos extratos brutos AcOEt dos metabólitos produzidos pelo fungo <i>Hypoxyylon investiens</i> em escalas reduzida e ampliada.	77
Figura 15 - Cromatograma da fração G3 proveniente da CC com Sephadex [®] LH-20	81
Figura 16 - Ácido 3-Nitropropanóico.....	82
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H da substância G3.1 em MeOD, 300 MHz.	83
Figura 18 - Mapa de contorno de HSQC da substância G3.1 (7,1 Tesla, MeOD).....	84
Figura 19 - Correlações entre hidrogênios e carbonos a 2 ou 3 ligações.	84
Figura 20 - Mapa de contorno de HMBC da substância G3.1 (7,1 Tesla, MeOD).	85
Figura 21 - Espectro de massas por ESI-TOF (<i>full scan</i> - modo negativo) da substância G3.1	86
Figura 22 - CCDC das subfrações G4.1-G4.20 reunidas da fração G4	89
Figura 23 - Cromatograma representando o perfil cromatográfico, em modo reverso, da fração G5 obtida do extrato bruto dos metabólitos produzidos em escala ampliada por <i>H. investiens</i>	91
Figura 24 - Cromatograma otimizado da fração G5 em coluna semipreparativa.	92
Figura 25 - Substâncias isoladas da fração G5	92
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H da substância G5.2 em acetona- d_6 , 600 MHz.....	94
Figura 27 - Ampliação na região de 6,4-8,10 ppm do espectro de RMN ^1H da substância G5.2	94
Figura 28 - Ampliação na região de 4,10-5,20 ppm do espectro de RMN ^1H da substância G5.2	95
Figura 29 - Espectro de COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ da substância G5.2 em acetona- d_6 , 600 MHz.....	96
Figura 30 - Sistemas de hidrogênios aromáticos e alifático da substância G5.2	96
Figura 31 - Correlações observadas no mapa de contorno de HSQC da substância G5.2	97
Figura 32 - Mapa de contorno de HSQC da substância G5.2 (14,1 Tesla, acetona- d_6).	98

Figura 33 - Mapa de contorno de HMBC da substância G5.2 (14,1 Tesla, acetona- d_6).....	99
Figura 34 - Correlações importantes de HMBC que permitiram propor as sub-estruturas associadas a dois sistemas de <i>spin</i> aromáticos.....	100
Figura 35 - Correlações de HMBC que permitiram propor a conexão entre os sistemas de <i>spin</i> verificados para a substância G5.2	101
Figura 36 - Estrutura proposta para a substância G5.2	102
Figura 37 - Estruturas do Hypoxylonol A-F (1-6), Daldidona C-D (7-8) e BNT.....	102
Figura 38 - Espectro de massas por ESI-TOF (<i>full scan</i> - modo negativo) da substância G5.2	104
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H da substância G5.3 em acetona- d_6 , 600 MHz.....	105
Figura 40 - Espectros no UV-Vis das substâncias G5.2 e G5.3	106
Figura 41 - Espectro de massas por ESI-TOF (<i>full scan</i> - modo negativo) da substância G5.3	107
Figura 42 - Espectro de massas TOF-MS ² da substância G5.2 em m/z 351.....	108
Figura 43 - Espectro de massas TOF-MS ² da substância G5.3 em m/z 351.....	108
Figura 44 - Espectro de massas por ESI-TOF (<i>full scan</i> - modo negativo) da substância G5.4	109
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H da substância G5.4 em acetona- d_6 , 600 MHz.....	110
Figura 46 - Atribuição dos deslocamentos químicos de hidrogênio da substância G5.4	111
Figura 47 - Ampliação na região de 1,8-5,15 ppm do espectro de RMN ^1H da substância G5.4	111
Figura 48 - Mapa de contorno de HSQC da substância G5.4 (14,1 Tesla, acetona- d_6).....	112
Figura 49 - Correlações observadas no mapa de contorno de HSQC da substância G5.4	113
Figura 50 - Mapa de contorno de HMBC da substância G5.4 (14,1 Tesla, acetona- d_6).....	114
Figura 51 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância G5.4 centrado na região de aromático.....	114

Figura 52 - Correlações no espectro de HMBC da substância G5.4 essenciais para o estabelecimento da ligação entre C-1 e C-4'.....	115
Figura 53 - Correlação no espectro de HMBC da substância G5.4 que permitiu a confirmação da conexão da unidade alifática com o anel benzênico.	116
Figura 54 - Atribuições dos carbonos quaternários do anel binaftalênico a partir de correlações no espectro de HMBC da substância G5.4	117
Figura 55 - Atribuições dos carbonos quaternários do anel benzênico a partir de correlações no espectro de HMBC da substância G5.4	118
Figura 56 - Estrutura proposta para a substância G5.4	119
Figura 57 - Espectro de massas TOF-MS ² da substância G5.4 em <i>m/z</i> 351.	119
Figura 58 - Cromatograma representando o perfil cromatográfico, em modo reverso, da fração G6 obtida do extrato bruto dos metabólitos produzidos em escala ampliada, por <i>H. investiens</i>	121
Figura 59 - Cromatograma otimizado da fração G6 em coluna semi preparativa.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias isoladas e atividades biológicas de fungos do gênero <i>Hypoxylon</i>	34
Tabela 2 - Resultados obtidos para atividades antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos, em escalas reduzida e ampliada, dos metabólitos produzidos pelo fungo <i>H. investiens</i>	78
Tabela 3 - Ensaio citotóxico dos extratos brutos, em escalas reduzida e ampliada, dos metabólitos produzidos pelo fungo <i>H. investiens</i>	79
Tabela 4 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos experimentalmente para a substância G3.1 com dados da literatura para o ácido 3-nitropropanóico.	86
Tabela 5 - Atividade citotóxica do extrato bruto AcOEt, obtido em escala ampliada, das frações G1-G6 e do ácido 3-nitropropanóico.	87
Tabela 6 - Atividades antifúngica e anticolinesterásica do extrato bruto AcOEt, obtido em escala ampliada, das frações G1-G6 e do ácido 3-nitropropanóico.	88
Tabela 7 - Massas das subfrações G4.1-G4.20 reunidas da fração G4	90
Tabela 8 - Substâncias isoladas da fração G5 e suas respectivas massas.	93
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz) e HMBC (14,1 Tesla) da substância G5.2 em acetona- d_6	103
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz) e HMBC (14,1 Tesla) da substância G5.4 em acetona- d_6	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-NPA: Ácido 3-nitropropanóico

a.C.: Antes de Cristo

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de Etila

BNT: 4,4',5,5-tetraidroxí-1,1'-binaftila

C18: Fase Estacionária Quimicamente Ligada Tipo Octadecil Silano

CC: Cromatografia em Coluna

CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

CLAE-EM-ESI-QTOF: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrômetro de Massas com Ionização Por Eletrospray e Analisadores em Série, Quadrupolo/Tempo de Vôo

COSY: Correlated Spectroscopy

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido Deuterado

EacOEt (esc. amp.): Extrato bruto Acetato de Etila em Escala Ampliada

EacOEt (esc. red.): Extrato bruto Acetato de Etila em Escala Reduzida

EAcOEt: Extrato bruto Acetato de Etila

EM: Espectrometria de Massas

EM-ESI-QTOF: Espectrometria de Massas com Ionização Por Eletrospray e Analisadores em Série, Quadrupolo/Tempo de Vôo.

ESI-TOF: Ionização por Eletrospray e Analisador por Tempo de Vôo.

HCT-116: Célula Tumoral Carcinoma de Cólon Humano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

LC-MS: Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

MCF-7: Célula Tumoral Adenocarcinoma de Mama Metastático

MeOH: Metanol

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiozol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NaOCl: Hipoclorito de Sódio

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

OVCAR-8: Célula Tumoral Carcinoma de Ovário

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB - Potato Dextrose Broth

PTFE: Polytetrafluoroethylene

RMN de ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SF-295: Célula Tumoral Glioblastoma Humano

SPE: Solid Phase Extraction

TFA: Ácido Trifluoroacético

TMS: Tetrametilsilano

TOF-MS²: Seqüencial, Analisador por Tempo de Voo

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Radiação na Região do Ultravioleta e do Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

δ : Deslocamento químico em partes por milhão

ϕ : Diâmetro

[M - H]⁻: Molécula desprotonada

μ : micro

Å: Angström

d: Duplete

dd: Duplo duplete

h: Altura

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

m/z: Relação massa/carga

m: Multiplete

MHz: Megahertz

ppm: Partes por milhão

rpm: Rotações por minuto

s: Singleto

sl: Singleto largo

t_r: Tempo de retenção

v/v: volume/volume

λ : Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Importância de Produtos Naturais Marinhos.....	24
1.1.1. A Alga Vermelha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	25
1.2. Fungos Endofíticos de Organismos Marinhos.....	30
1.3. Fungos do Gênero <i>Hypoxylon</i>	33
1.3.1. A Espécie <i>Hypoxylon investiens</i>	50
1.4. Produção de Ácido 3-nitropropanóico.....	52
2. OBJETIVOS	55
2.1. Principal	55
2.2. Específicos	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1. Materiais.....	56
3.1.1. Solventes, Meios de Cultivo e Equipamentos Gerais.....	56
3.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	57
3.1.3. Cromatografia em Coluna	57
3.1.4. Cromatografia de Exclusão.....	57
3.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	58
3.1.6. Análises por Ressonância Magnética Nuclear	59
3.1.7. Análises por Espectrometria de Massas.....	59
3.2. Métodos	59
3.2.1. Obtenção do Material Algal, Isolamento e Cultivo das Cepas Fúngicas	59
3.2.2. Prospecção Química e Biológica em Escala Reduzida dos Metabólitos Produzidos pelo Fungo <i>Hypoxylon investiens</i>	62
3.2.3. Prospecção Química e Biológica em Escala Ampliada dos Metabólitos Produzidos pelo Fungo <i>Hypoxylon investiens</i>	64
3.2.4. Fracionamento do Extrato Bruto por Cromatografia de Exclusão	66
3.2.5. Estudo Químico da Fração G3	66
3.2.6. Estudo Químico da Fração G4	67
3.2.7. Estudo Químico da Fração G5	67
3.2.8. Estudo Químico da Fração G6	68

3.2.9.	Análises Por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa.....	68
3.2.10.	Análises em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência.....	69
3.2.11.	Atividade Antifúngica.....	69
3.2.12.	Atividade Anticolinesterásica	70
3.2.13.	Atividade Citotóxica.....	70
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1.	Prospecção Química e Biológica em Escalas Reduzida e Ampliada: Comparação da Produção Metabólica	72
4.2.	Fracionamento do Extrato Bruto, Escala Ampliada, por Cromatografia de Exclusão ...	79
4.3.	Estudo da Fração G3 : Isolamento dos Compostos Majoritários.....	80
4.3.1.	Identificação Estrutural da Substância G3.1	82
4.4.	Resultado dos Ensaios Biológicos do Extrato Bruto dos Metabólitos Produzidos em Escala Ampliada por <i>H. investiens</i> , das Frações G1-G6 e do ácido 3-nitropropanóico.	87
4.5.	Estudo da Fração G4	88
4.6.	Estudo da Fração G5 : Isolamento dos Compostos Majoritários.....	91
4.6.1.	Elucidação Estrutural da Substância G5.2	93
4.6.2.	Proposta Estrutural da Substância G5.3	105
4.6.3.	Elucidação Estrutural da Substância G5.4	109
4.7.	Estudo da Fração G6 : Isolamento dos Compostos Majoritários.....	121
5.	CONCLUSÕES	123
	Referências	124
	Material Complementar	134

1. INTRODUÇÃO

Qualquer sociedade humana acumula um acervo de informações sobre a natureza que a cerca, possibilitando sua interação a fim de suprir suas necessidades de sobrevivência. Nesse acervo, insere-se o conhecimento relativo ao mundo vegetal no qual estas sociedades estão imersas (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004). No seu processo evolutivo, o homem utilizou a natureza de diversas formas, com o intuito de assegurar sua existência e sua adaptação ao meio em que se encontra (DI STASI, 1996).

A utilização de espécies vegetais para o tratamento ou cura de doenças e outros males têm sido relatada há mais de 5.000 anos. Os babilônios e sumerianos (2600 a.C.) usavam frutos, folhas, flores, cascas e raízes de lótus, oliveira e alho como medicamentos. Entre os anos de 2500-2000 a.C. os chineses já haviam descrito 365 preparados terapêuticos, oriundos de plantas como o ginseng (*Panax ginseng*), cinamomo (*Melia azedarach*), ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*), podofilo (*Podophyllum peltatum*) e efedra (*Ephedra sínica*) (GROTHAUS; CRAGG; NEWMAN, 2010).

O estudo sistemático de plantas medicinais, segundo uma metodologia científica utilizando-se da química concebida como uma disciplina moderna se desenvolveu por volta de 1800, período que se encontra historicamente entre os trabalhos de Lavoisier (considerado o pai da química moderna) e Berzelius (um dos pioneiros da química orgânica). Nesse período, os químicos estudavam as plantas medicinais se dedicando ao isolamento e determinação estrutural de substâncias ativas de plantas muito bem conhecidas e experimentadas pelo uso popular.

Com essa abordagem, potentes fármacos foram descobertos, como por exemplo, a morfina (isolada em 1803), a codeína (isolada em 1932) e a papaverina (isolada em 1948) oriundas da papoula (*Papaver somniferum*). Da *Ephedra sinica*, planta conhecida pelos chineses desde 2800 a.C., foi isolada a efedrina em 1887. Pode-se ainda citar o alcalóide hiosciamina oriundo da *Atropa beladonna*, conhecida desde o século XVI por suas propriedades antiespasmódica e antiarrítmica, e os alcalóides emetina e cefalina, encontrados na *Cephalis ipecauanha* (YUNES; CALIXTO, 2001) que apresentam atividades emética e amebicida.

Os produtos naturais e seus derivados também têm se mostrado uma fonte importantíssima de novos agentes anticâncer. Dentre esses fármacos, destacam-se aqueles produzidos por microrganismos, dentre os quais pode-se citar agentes quimioterápicos como doxorubicina, daunomicina, mitomicina C e bleomicina, todos obtidos de bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces* (EVIDENTE et. al., 2014).

Produtos naturais oriundos de fungos também têm se mostrado uma excelente fonte de fármacos (STROBEL, 2003; STROBEL et. al, 2004; SCHULZ, 2002) e há muito tempo têm se revelado como uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos (NEWMAN; CRAGG, 2010). Desde a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming, em 1928, que resultou em um avanço no tratamento de infecções bacterianas, fungos se tornaram uma fonte importante de princípios ativos para o tratamento de uma variedade imensa de doenças (KJER et al., 2010). Substâncias como a penicilina, o anti hipercolesterolêmico lovastatina, além do antifúngico equinocandina B e do imunossupressor ciclosporina-A justificam a importância da investigação química e biológica desses microorganismos na busca por moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Fungos produzem substâncias químicas pertencentes a classes estruturais altamente diversificadas, incluindo substâncias aromáticas, antracenas, butanolídeos, citocalasinas, naftalenonas, terpenos, entre outros (EVIDENTE et al., 2014).

1.1. Importância de Produtos Naturais Marinhos

Os produtos naturais oriundos de organismos marinhos são, reconhecidamente, as fontes mais promissoras de substâncias candidatas a novos fármacos na atualidade, uma vez que 34 dos 36 filos descritos podem ser encontrados em ecossistemas marinhos (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009) e os organismos marinhos produzem substâncias bioativas pertencentes a classes químicas totalmente novas e que não são encontradas em fontes terrestres. Esses organismos são produtores de metabólitos bioativos de esqueletos carbônicos únicos, cuja produção deve ser incrementada devido às condições adversas de sobrevivência a que os organismos marinhos são submetidos, tais como, escassez de recursos (OLIVEIRA; FELÍCIO;

DEBONSI, 2012), mudanças de salinidade, temperatura, irradiação UV-Vis (PLAZA et al., 2008).

A primeira descoberta de um produto natural marinho biologicamente ativo foi relatada na década de 1950 por Bergmann e Feeney (BERGMANN; FEENEY, 1951), que isolaram dois nucleosídeos (espongouridina e espongotimidina) da esponja *Tectitethya crypta*. A subsequente modificação química destes nucleosídeos permitiu o desenvolvimento dos derivados ara-A (Vidarabina[®]) e ara-C (Citarabina[®]), que possuem expressivas propriedades antiviral e anticâncer, respectivamente (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012) e continuam sendo usados clinicamente (IMHOFF; LABES; WIESE, 2011).

Atualmente, várias substâncias de origem marinha estão sob testes clínicos, sendo que dois fármacos de origem marinha (*Yondelis*[®] e *Prialt*[®]) foram aprovados para uso nos Estados Unidos e na Europa. *Prialt*[®] é um peptídeo usado para o tratamento de dor crônica, enquanto *Yondelis*[®] é um alcalóide tetraidroisoquinolínico usado para tratar sarcoma avançado de tecidos moles (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

1.1.1. A Alga Vermelha *Asparagopsis taxiformis*

As algas são organismos que podem viver em ambiente marinho, lagos, rios, solos e plantas e que contêm clorofilas, sendo os principais seres fotossintetizantes responsáveis pelo suprimento de oxigênio em nosso planeta. São classificadas em dois grandes grupos: macroalgas (algas verde, marrom e vermelha) e microalgas (fitoplancton) (EL GAMAL, 2010). Só as algas marinhas compreendem 9.200 a 12.500 espécies (GARZOLI et al., 2015) e constituem fonte promissora de metabólitos secundários bioativos (EL GAMAL, 2010) com potencial farmacêutico para o tratamento de doenças como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e várias infecções fúngicas e bacterianas (GENOVESE et al., 2013). Seus metabólitos incluem fármacos de alto valor agregado como o sulfato de propileno glicol-alginato de sódio (*propylene glycol alginate sodium sulfate - PPS*) disponível comercialmente e oriundo de uma alga marinha, que é usado para tratamento de doenças do coração e do cérebro e movimenta cerca de US\$140 milhões por ano (RENGASAMY et al., 2014).

As macroalgas marinhas foram um dos primeiros organismos marinhos a serem estudados para fins medicinais (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012). As algas vermelhas, que compreendem cerca de 8.000 espécies (das quais 98% são marinhas), são consideradas as principais produtoras de metabólitos secundários biologicamente ativos, em especial, de substâncias halogenadas, em comparação com outras classes de algas (EL GAMAL, 2010). A variedade estrutural é imensa, sendo produzidos desde halometanos a triterpenoides (TEIXEIRA; KELECOM; GOTTLIEB, 1991). De fato, as algas vermelhas apresentam uma química muito rica de metabólitos secundários, tanto em termos de abundância quanto de diversidade, sendo que já foram identificados mais de 1.500 substâncias, das quais, 90% contêm bromo ou cloro em sua composição (MASCHEK; BAKER, 2008).

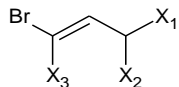
Embora ainda não haja um fármaco derivado de algas vermelhas, elas são uma fonte potencial de moléculas bioativas, com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatória, citotóxica, inseticida, dentre outras (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012; EL GAMAL; 2010).

A alga vermelha do gênero *Asparagopsis* pertence à família Bonnemaisoniaceae (filo Rhodophyta) e é conhecida por produzir compostos halogenados. Ela apresenta várias propriedades biológicas interessantes, sendo atualmente usada para fins farmacêuticos e dermocosméticos na França, Portugal, Irlanda, Havaí, Indonésia, Filipinas e Nova Zelândia (GENOVESE et al., 2013).

A espécie *A. taxiformis* (Delile) Trevisan é uma alga vermelha comestível, amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais do globo (CHUALÁIM et al., 2004). Ela é considerada uma das 100 piores espécies invasoras no mar Mediterrâneo, uma vez que pode prejudicar sua biodiversidade por competição (GARZOLI et al., 2015). Entretanto, é uma espécie que produz uma variedade muito grande de substâncias, especialmente as substâncias voláteis halogenadas, tais como o bromofórmio (BURRESON; MOORE, 1975; BURRESON et al., 1976) e o bromocloroiodometano, de ocorrência raríssima (MOORE, 1977). Dibromoclorometano e bromofórmio foram produzidos em grandes quantidades por *A. taxiformis* coletada no Cabo de São Lucas, juntamente com o dibromo e o tribromoacetato de etila (McCONNELL; FENICAL, 1977).

Dezoito ácidos halogenados, especialmente os derivados do ácido acético e acrílico (WOOLARD; MOORE; ROLLER, 1979), além de tricloroeteno e percloroeteno (ABRAHAMSSON et al., 1995) também foram identificados em *A. taxiformis*. Ainda, tribromoeteno, *cis*- e *trans*-1,2-dibromoeteno foram isolados pela primeira vez como produtos naturais desta alga (MARSHALL et al., 1999). Algumas das substâncias orgânicas voláteis produzidas por esta alga estão ilustradas na **Figura 1**, com suas respectivas referências bibliográficas.

Figura 1 - Algumas substâncias orgânicas voláteis identificadas em extratos da alga *Asparagopsis taxiformis*.



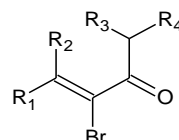
1,1,3,3-tetrabromopropeno; $X_1=X_2=X_3=Br$

1,1,3-tribromo-3-cloropropeno; $X_1=X_3=Br$; $X_2=Cl$

1,1-dibromo-3,3-dicloropropeno; $X_3=Br$; $X_1=X_2=Cl$

1,3,3-tribromo-1-iodopropeno; $X_3=I$; $X_1=X_2=Br$

Fonte: Burreson; Moore (1975).



cis-1,1,3,4-tetrabromobut-3-en-2-ona; $R_1=R_3=R_4=Br$; $R_2=H$

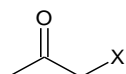
cis-3,4-dibromobut-3-en-2-ona; $R_1=Br$; $R_2=R_3=R_4=H$

trans-3,4-dibromobut-3-en-2-ona; $R_2=Br$; $R_1=R_3=R_4=H$

cis-1,3,4-tribromobut-3-en-2-ona; $R_1=R_3=Br$; $R_2=R_4=H$

cis-3,4-dibromo-1-iodobut-3-en-2-ona; $R_1=Br$; $R_3=I$; $R_2=R_4=H$

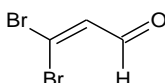
Fonte: Burreson; Moore (1975)



Bromoacetona; $X=Br$

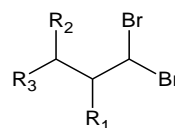
Iodoacetona; $X=I$

Fonte: Burreson; Moore (1975)



3,3-dibromoacroleína; $X=Br$

Fonte: Burreson; Moore (1975)

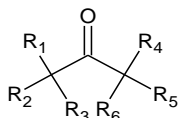


1,1,3-tribromopropan-2-ol; $R_1=OH$; $R_2=Br$; $R_3=H$

Acetato de 1,1,3-tribromopropan-2-ila; $R_1=OAc$; $R_2=Br$; $R_3=H$

Acetato de 1,1,3,3-tetrabromopropan-2-ila; $R_1=OAc$; $R_2=R_3=Br$

Fonte: Burreson et al. (1976)



1,1-dibromoacetona; $R_1=R_2=Br$; $R_3=R_4=R_5=R_6=H$

1,3-dibromoacetona; $R_1=R_4=Br$; $R_2=R_3=R_5=R_6=H$

1-bromo-3-iodoacetona; $R_1=Br$; $R_4=I$; $R_2=R_3=R_5=R_6=H$

1,1,1-tribromoacetona; $R_1=R_2=R_3=Br$; $R_4=R_5=R_6=H$

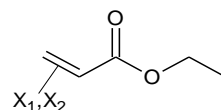
1,1-dibromo-1-cloroacetona; $R_1=R_2=Br$; $R_3=Cl$; $R_4=R_5=R_6=H$

1,1,3-tribromoacetona; $R_1=R_2=R_4=Br$; $R_3=R_5=R_6=H$

1,1-dibromo-3-iodoacetona; $R_1=R_2=Br$; $R_4=I$; $R_3=R_5=R_6=H$

1,1,3,3-tetrabromoacetona; $R_1=R_2=R_4=R_5=Br$; $R_3=R_6=H$

Fonte: Burreson et al. (1976)



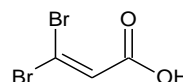
Bromoiodoacrilato de etila; $X_1=Br$; $X_2=I$

E-2,3-dibromoacrilato de etila; $X_1=X_2=Br$

Iodoacrilato de etila; $X_1=I$; $X_2=H$

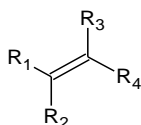
Diiodoacrilato de etila; $X_1=X_2=I$

Fonte: McConnell; Fenical (1977).



Ácido 3,3-dibromoacrilico

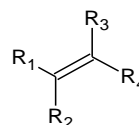
Fonte: Woolard et al. (1979)



Tricloroetileno, $R_1=R_2=R_3=Cl$, $R_4=H$

Percloroetileno, $R_1=R_2=R_3=R_4=Cl$

Fonte: Abrahamsson et al. (1995)



cis-1,2-dibromoetileno, $R_1=R_3=Br$, $R_2=R_4=H$

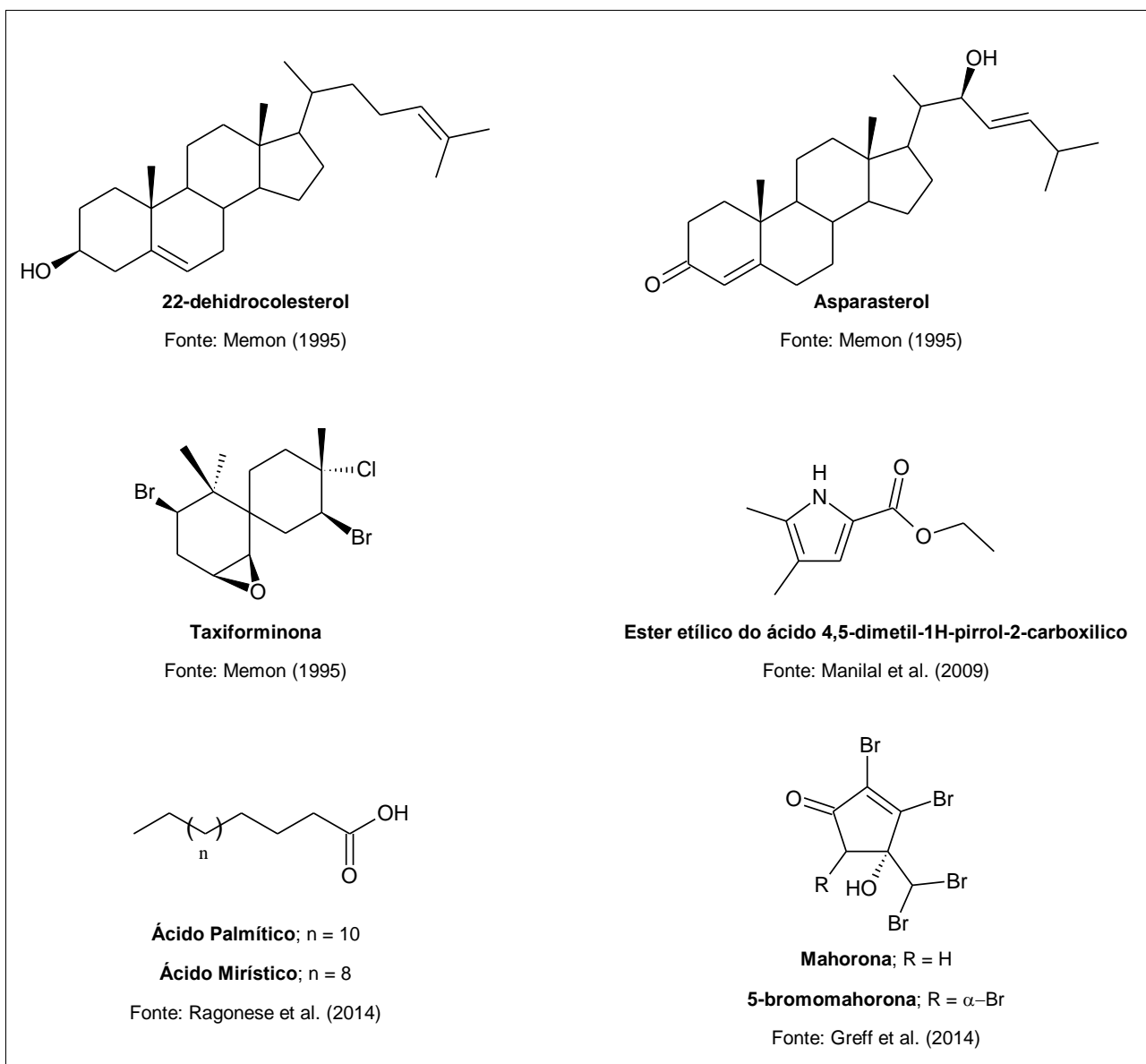
trans-1,2-dibromoetileno, $R_1=R_4=Br$, $R_2=R_3=H$

Tribromoetileno, $R_1=R_2=R_3=Br$, $R_4=H$

Fonte: Marshall et al. (1999)

Uma diversidade muito grande de constituintes não-voláteis também foi identificada na alga vermelha *A. taxiformis*. Alguns exemplos são apresentados na **Figura 2**.

Figura 2 - Algumas substâncias orgânicas não-voláteis identificadas em extratos da alga *Asparagopsis taxiformis*.



Em uma ampla pesquisa envolvendo algas vermelhas, foram isolados 9 ácidos graxos, 4 esteróides e a taxiforminona de *A. taxiformis* (HAYEE-MEMON; SHAMEEL, 1996). Clorobenzeno e os ésteres metílico, etílico e propílico também foram isolados desta espécie e parecem estar envolvidos com a atividade antimicrobiana do extrato metanólico do qual foram obtidos (MANILAL et al., 2009). Ácidos graxos saturados e insaturados, especialmente ácido palmítico, mirístico, eicosapentenóico e linoleico, além de um lipídio polar (RAGONESE et al., 2014), mahorona e 5-bromomahorona (GREFF et al. 2014) foram alguns dos constituintes também identificados em *A. taxiformis*.

Várias atividades biológicas foram relatadas para extratos, frações ou substâncias oriundas da alga vermelha *A. taxiformis*, podendo-se ressaltar as atividades antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, dentre outras. Esta alga apresentou, por exemplo, alto potencial como fonte de metabólitos com atividade *in vitro* contra *Leishmania* (GENOVESE et. al., 2009). Entretanto, a atividade antibacteriana foi a mais pesquisada e, desta forma, esta alga pode vir a fornecer novos compostos antibacterianos que sejam mais efetivos contra as cepas resistentes de certas bactérias do que os antibióticos atualmente utilizados. Genovese et al. (2012) determinaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *A. taxiformis* contra bactérias patogênicas de peixes e apontaram seu uso potencial na aquicultura. Atividade similar ao antibiótico dodiciclina foi obtida para uma fração de *A. taxiformis*, constituída por ésteres e clorobenzeno (VEDAGHI et al., 2009).

1.2. Fungos Endofíticos de Organismos Marinhos

As relações simbióticas entre microrganismos e invertebrados marinhos (esponjas, corais, etc.) estão sendo cada vez mais investigadas. Como resultado dessas pesquisas, um número crescente de substâncias obtidas de microrganismos marinhos tem merecido destaque por suas propriedades biológicas. Em 2012, das 20 substâncias de origem marinha (ou inspiradas em produto natural marinho) em fase final de triagem para aprovação como novos fármacos anti-câncer, 5 foram isoladas de microrganismos (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

No ambiente marinho, os fungos exercem várias funções ecológicas e estão, geralmente, associados com o parasitismo de animais marinhos, plantas e algas. Eles podem viver como epífitos ou endófitos e sintetizar substâncias que beneficiem seus hospedeiros, protegendo-os contra patógenos, por exemplo (GARZOLI et al., 2015).

Fungos endofíticos marinhos compreendem um pequeno grupo de ascomicetos filamentosos, leveduras e seus anamorfos (PANG; MITCHELL, 2005), que podem modificar seus hospedeiros fisiológica, química e ecologicamente, induzindo mudanças extremas em sua resposta e adaptação ao meio ambiente (DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2012). De todos os ambientes nos quais os fungos ocorrem, aqueles que crescem nos espaços inter ou intracelulares de organismos vivos e, aparentemente, não causam danos ao hospedeiro, são reconhecidos como mais promissores em termos de diversidade e potencial farmacêutico (GUBIANI et. al., 2014). Os ecossistemas mais biodiversos também apresentam a maior abundância e diversidade de populações de endofíticos, uma vez que diversidade biológica implica em diversidade química, já que ecossistemas muito competitivos requerem uma constante inovação química para a defesa dos organismos (TOMSHECK et al., 2010). A complexidade das relações ecológicas é refletida no grande potencial biológico e químico que as substâncias produzidas por fungos endofíticos possuem (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

Recentemente, metabólitos secundários obtidos de fungos endofíticos marinhos ganharam atenção considerável, por suas características estruturais únicas e por possuírem propriedades farmacológicas e biológicas interessantes. Entretanto, o crescimento nas pesquisas sobre a química de fungos endofíticos marinhos se deu somente nos últimos anos, o que é evidenciado pelo aumento expressivo de publicações científicas após o ano de 2008 (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012). Desde a descoberta da cefalosporina C por Bergmann, em 1949, produzida a partir de culturas de *Cephalosporium* sp., 30 anos se passaram até que fungos oriundos de organismos marinhos pudessem ser sistematicamente estudados e avaliados em função do seu potencial farmacológico e quimiodiversidade (RATEB; EBEL, 2011). A diversidade estrutural dos metabólitos produzidos por fungos marinhos é enorme, incluindo as mais variadas classes de substâncias. A maioria delas parece ser produzida pelos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que são altamente

tolerantes à grande quantidade de sal, crescem rápido e são facilmente obtidos de muito substratos (BUGNI; IRELAND, 2004). Além da imensa diversidade química, várias atividades biológicas estão associadas com os metabólitos produzidos por fungos endofíticos marinhos, podendo-se destacar as atividades citotóxicas, anti-infecciosa, antiparasitária, seqüestradora de radicais livres, inibidora de enzima, dentre outras (DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2012). Atualmente, substâncias produzidas por fungos endofíticos têm amplas aplicações na agricultura, na indústria e como fármacos por suas propriedades como antibióticos, antimicóticos, imunossupressores e anticâncer, dentre outras (STROBEL et al., 2004).

A associação entre fungos e algas é muito bem estabelecida (JONES; STANLEY; PINRUAN, 2008), mas poucas algas foram estudadas até o momento com o intuito de avaliar a presença de fungos. As pesquisas realizadas indicam que as algas vermelhas e marrons possuem as micobiotas mais diversas, apesar das algas vermelhas serem pouco colonizadas (GARZOLI et al., 2015). Em uma pesquisa recente, Felicio et al. (2015) isolaram 45 microorganismos endofíticos da alga vermelha marinha *Bostrychia tenella*, dentre os quais *Acremonium implicatum*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium decaturense*, *P. waksmanii*, *Trichoderma atroviride* e *Xylaria* sp. Neste trabalho foram avaliadas as atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica dos extratos fúngicos, sendo que os extratos de *Penicillium* foram ativos em todos os ensaios. A pesquisa permitiu ainda o isolamento da citocalasina D, uma substância antibiótica e antitumoral conhecida.

Poucos trabalhos foram realizados sobre os organismos simbióticos da alga vermelha *A. taxiformis*. Um trabalho recente relata que poucas espécies de fungos vivem associados com esta alga, incluindo os seguintes: *Alternaria* sp, um fungo não identificado de Xylariaceae, *Eurotium rubrum* (anamorfo de *Aspergillus ruber*), *Cladosporium cladosporioides* e *C. pseudocladosporioides*. Os dois primeiros ocorrem esporadicamente, enquanto os três últimos são encontrados realmente associados a *A. taxiformis* (GARZOLI et al., 2015).

Em relação às pesquisas sobre os metabólitos produzidos por fungos endofíticos de algas vermelhas, os resultados indicam uma diversidade estrutural muito grande associada a alto potencial biológico. Foram isolados oxilipinas, macrolídeos, esteroides,

terpenos, policetídeos e cumarinas de fungos endofíticos de algas vermelhas bem como foram determinadas diversas atividades biológicas importantes (inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica, citotóxica, etc) para essas substâncias (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

Na literatura, há somente um trabalho sobre a investigação química de um fungo endofítico de *A. taxiformis*, no qual foram isolados a isocumarina 5-hidroximetilmeleína e três compostos aromáticos. O extrato acetato de etila, do qual as substâncias foram isoladas, apresentou atividade antifúngica moderada contra *Cladosporium sphaerospermum* (MEDINA et al., 2014).

1.3. Fungos do Gênero *Hypoxylon*

O gênero *Hypoxylon*, juntamente com outros fungos que são produtores de metabólitos secundários únicos, pertence à família Xylariaceae e compreende atualmente cerca de 130 espécies, que podem ser divididas quimicamente em dois grandes grupos, as que produzem azafilonas (que recebem esse nome por reagirem espontaneamente com amônia e aminas) do tipo Mitorubrina e as que são produtoras de binaftilas (MUHLBAUER et al., 2002). Na América do Sul, foram relatadas e identificadas cerca de 49 espécies desse gênero (HLADKI & ROMERO, 2009).

Vários trabalhos na literatura descrevem os constituintes químicos e algumas atividades biológicas de fungos do gênero *Hypoxylon*, os quais estão resumidos na **Tabela 1**. Os policetídeos azafilonas são característicos somente de alguns gêneros da família Xylariaceae: *Daldinia*, *Entonaema* e *Hypoxylon*, enquanto o BNT (4,5,4',5'-tetrahydroxy-1,1'-BiNaphThyl, 4,4',5,5-tetraidroxi'-1,1'-binaftila) é amplamente distribuído em Xylariaceae, mas é raro em outros fungos e não foi relatado em plantas superiores (QUANG et al., 2005a). Dentre as atividades biológicas descritas para o gênero *Hypoxylon*, destacam-se as atividades citotóxica e antimicrobiana, especialmente a atividade antifúngica.

Dentre as substâncias apresentadas na **Tabela 1**, merecem destaque: a citocalasina isolada de *H. fragiforme*, que inibiu a atividade da enzima HIV-1 protease (ONDEYA et al., 1992); vários benzo[j]fluorantenos, denominados de Hypoxylonols A-F

e Daldenona C-D, isolados de *H. truncatum*, que apresentaram atividades antiproliferativa, antiangiogênica e citotóxica (FUKAI et al., 2012; FUKAI et al., 2014; GU et al., 2007; KOYAMA et al., 2002); lipodepsipeptídeos e poliésteres macrocíclicos do fungo marinho *H. oceanicum*, que apresentaram atividade antifúngica contra diversos fungos fitopatogênicos (SCHLINGMANN, MILNE, CARTER, 2002); as azafilonas coerinas A e B, que foram isoladas dos estômatos de *H. cohaerens* e parecem ser restritas a esta espécie (QUANG et al., 2005a); e, as substâncias antifúngicas hipoxisordarina e sordarina bem como a hipoxilactona que foram isoladas do fungo marinho *H. croceum* (DAFERNER et al., 1999).

Tabela 1 - Substâncias isoladas e atividades biológicas de fungos do gênero *Hypoxyylon*.

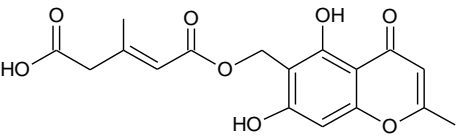
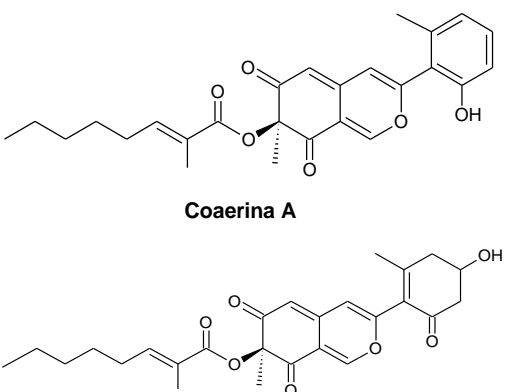
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. aeruginosum</i>	 <p style="text-align: center;">Ácido leprárico</p>	Não determinada	Lassoe et al., 2010.
<i>H. cohaerens</i>	 <p style="text-align: center;">Coerina A</p> <p style="text-align: center;">Coerina B</p>	Não determinada	Quang et al., 2005a.

Tabela 1 - Continuação.

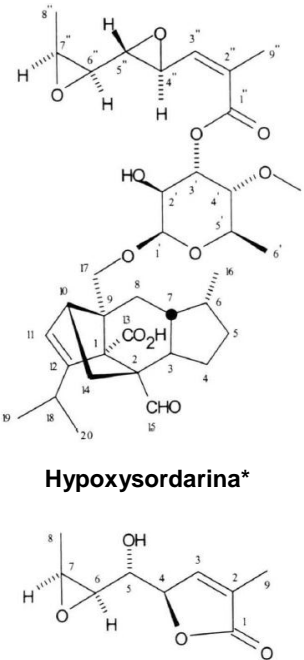
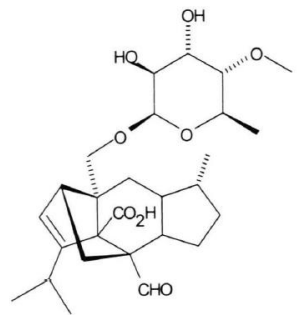
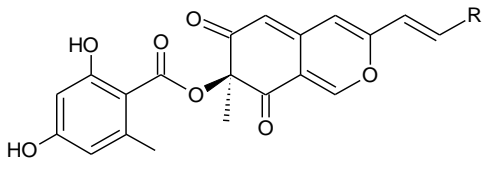
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. croceum</i>	 <p>Hypoxysordarina*</p>  <p>Sordarina*</p>	Antifúngica e fraca atividade citotóxica	Daferner et al., 1999.
<i>H. fragiforme</i>	 <p>(+)-Mitorubrina, R = Me (+)-Mitorubrinol, R = CH₂OH Aceto de (+)-mitorubrinol, R = CH₂OCOCH₃ Ácido mitorubrínic*, R = COOH</p>	Não determinada	Steglich; Klaar; Furtner, 1974.

Tabela 1 - Continuação.

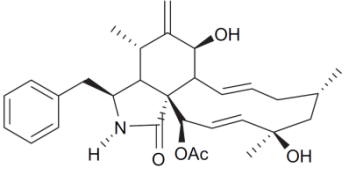
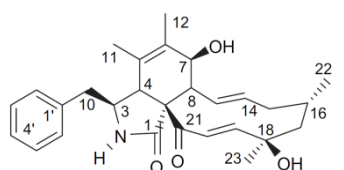
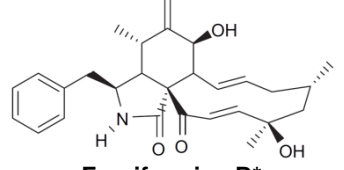
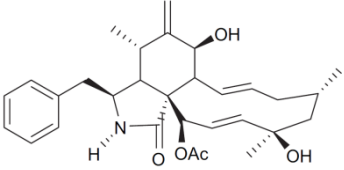
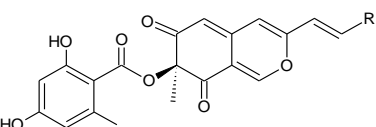
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. fragiforme</i>	 <p>Citocalasina H</p>	Inibição da HIV-1 protease	Ondeyka et al., 1992.
<i>H. fragiforme</i>	 <p>Fragiformina A*</p>  <p>Fragiformina B*</p>  <p>Citocalasina H*</p>  <p>Mitorubrinol, R = CH₂OH Mitorubrina, R = CH₃ Ácido mitorubrínico</p>	Nematicida, antibacteriana e antifúngica	Stadler et al., 2006.

Tabela 1 - Continuação.

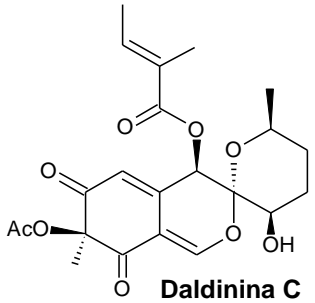
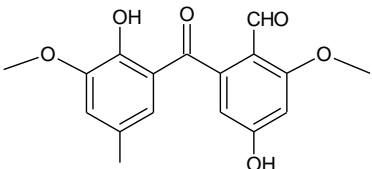
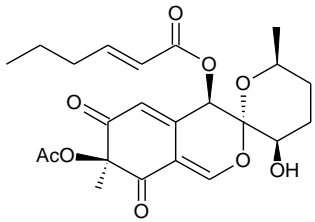
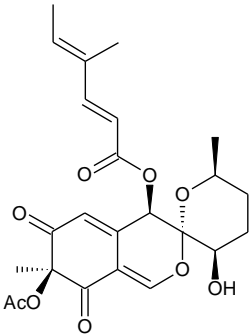
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. fuscopurpureum</i>	 <p>Daldinina C</p>	Não determinada	Muhlbauer et al., 2002.
<i>H. fuscum</i>	 <p>Daldinal A</p>	Não determinada	Muhlbauer et al., 2002.
<i>H. fuscum</i>	 <p>Daldinina E</p>  <p>Daldinina F</p>	Antioxidante	Quang et al., 2004a.

Tabela 1 - Continuação.

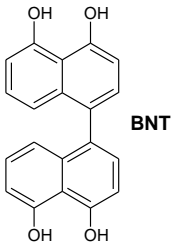
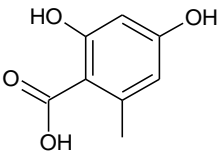
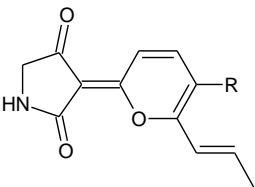
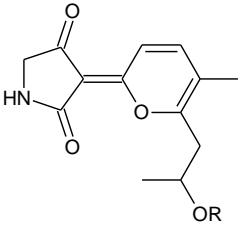
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. fuscum</i>	 <p style="text-align: center;">BNT</p> <p style="text-align: center;">Daldinina C</p>	Antioxidante	Quang et al., 2004a.
<i>H. howeianum</i>	 <p style="text-align: center;">Ácido orselínico</p>	Não determinada	Muhlbauer et al., 2002.
<i>H. lechatii</i>	 <p style="text-align: center;">Hypoxyvermelhotina A, R = Me Vermelhotina, R = H</p>  <p style="text-align: center;">Hypoxyvermelhotina C, R = Me Hypoxyvermelhotina B, R = H</p> <p style="text-align: center;">BNT</p>	Antimicrobiana e citotóxica	Kuhner et al., 2014.

Tabela 1 - Continuação.

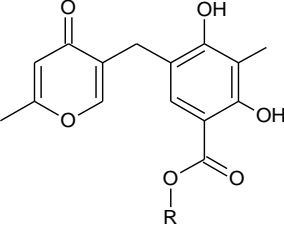
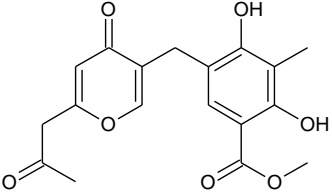
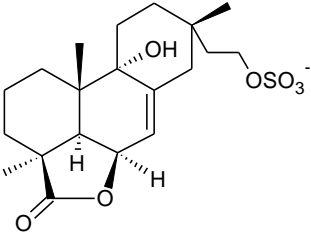
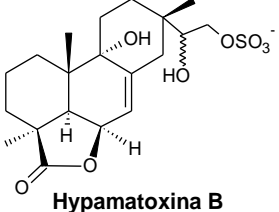
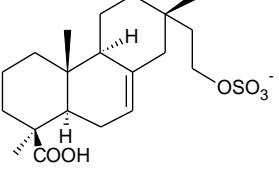
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. macrocarpum</i>	 <p>Macrocarpona A, R = H Macrocarpona B, R = Me</p>  <p>Macrocarpona C</p>	Não determinada	Muhlbauer et al., 2002.
<i>H. mammatum</i>	 <p>Hypamatoxina A</p>	Não determinada	Bodo et al., 1987.
<i>H. mammatum</i>	 <p>Hypamatoxina B</p>  <p>Hypamatoxina C</p>	Não determinada	Borgschulte et al., 1991.

Tabela 1 - Continuação.

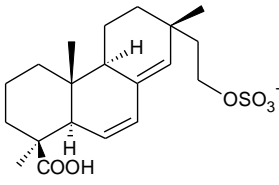
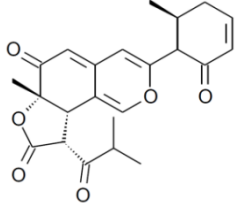
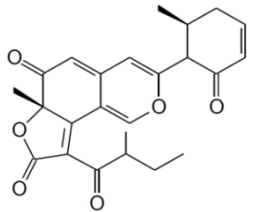
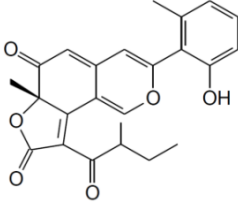
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. mammatum</i>	 <p>Hypamatoxina D</p>  <p>3,4,5-trihidroxi-naftalenona R¹ = H; R² = OH</p> <p>3,4,8-trihidroxi-naftalenona R¹ = OH; R² = H</p>	Não determinada	Borgschulte et al., 1991.
<i>H. multiforme</i>	<p>BNT</p>  <p>Multiformina A</p>  <p>Multiformina B</p>  <p>Multiformina C</p>	Antimicrobiana	Quang <i>et al.</i> , 2005b.

Tabela 1 - Continuação.

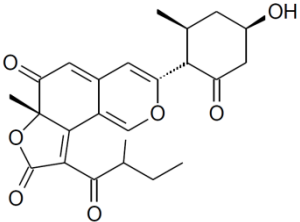
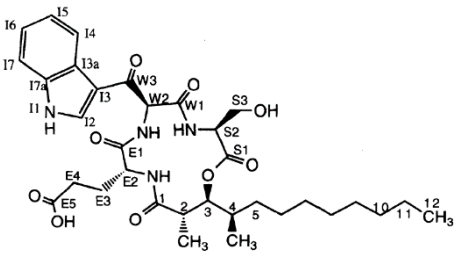
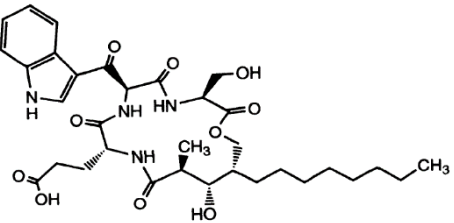
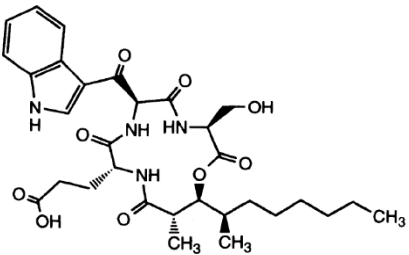
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. multiforme</i>	 <p style="text-align: center;">Multiformina D</p>	Antimicrobiana	Quang <i>et al.</i> , 2005b.
<i>H. oceanicum</i>	 <p style="text-align: center;">Lipodepsipeptide 15G256γ*</p>  <p style="text-align: center;">Lipodepsipeptide 15G256δ*</p>  <p style="text-align: center;">Lipodepsipeptide 15G256ϵ*</p>	Antifúngica	Schlingmann <i>et al.</i> , 1998.

Tabela 1 - Continuação.

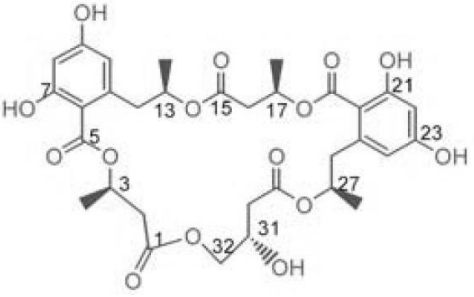
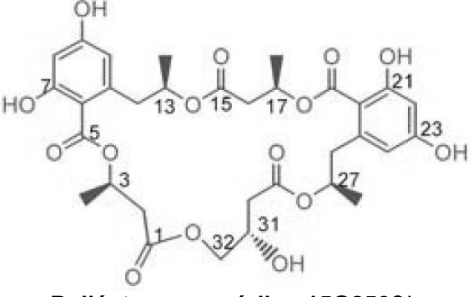
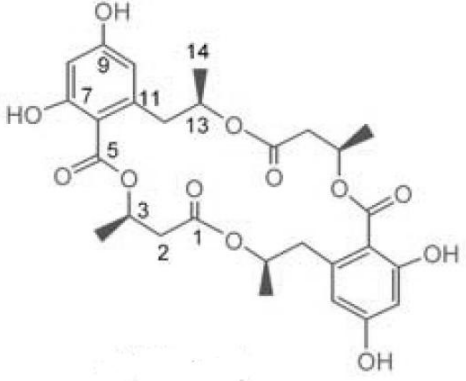
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. oceanicum</i>	 <p data-bbox="535 682 917 714">Poliéstermacrocíclico 15G256α-1*</p>	Antifúngica	Schlingmann et al., 2002.
	 <p data-bbox="535 1102 917 1134">Poliéstermacrocíclico 15G256β*</p>		
	 <p data-bbox="544 1585 909 1617">Poliéstermacrocíclico 15G256t*</p>		

Tabela 1 - Continuação.

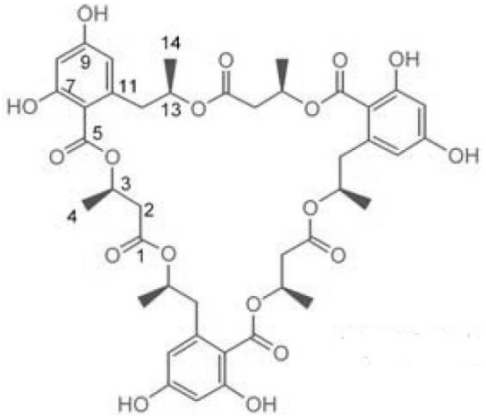
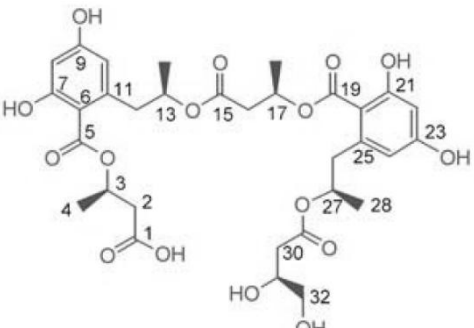
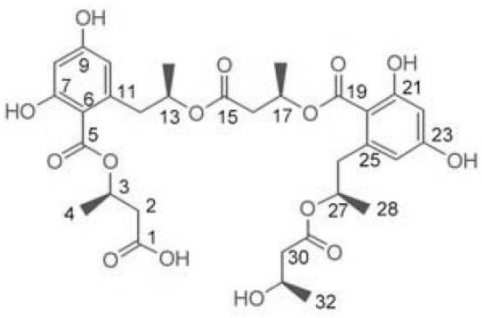
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. oceanicum</i>	 <p data-bbox="544 793 909 823">Poliéstermacrocíclico 15G256ω*</p>	Antifúngica	Schlingmann et al., 2002.
	 <p data-bbox="568 1239 885 1268">Poliéster linear 15G256α-2*</p>		
	 <p data-bbox="568 1669 885 1698">Poliéster linear 15G256β-2*</p>		

Tabela 1 - Continuação.

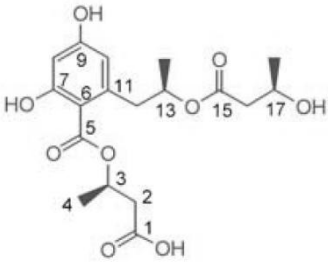
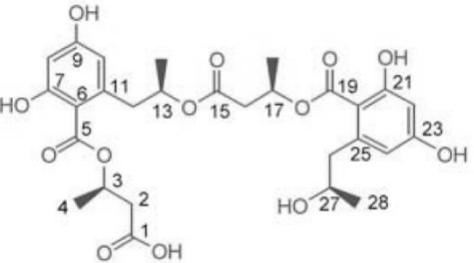
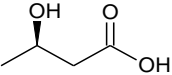
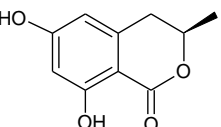
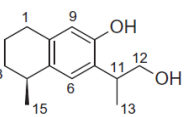
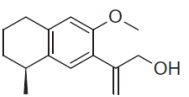
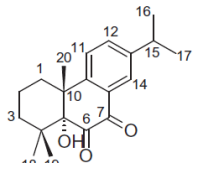
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. oceanicum</i>	 <p>Poliéster linear 15G256v*</p>  <p>Poliéster linear 15G256π*</p>  <p>Ácido 3R-hidroxibutírico</p>  <p>(R)-6-hidroximeleína</p>	Antifúngica	Schlingmann et al., 2002.
<i>H. rickii</i>	 <p>Hypoxyalinas A-B*</p>  <p>Hypoxyalina C*</p>  <p>Riquitina A*</p>	Citotóxica	Kuhnert et al., 2015a.

Tabela 1 - Continuação.

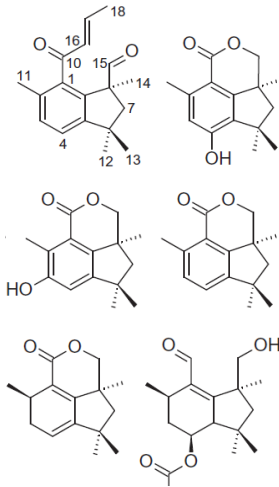
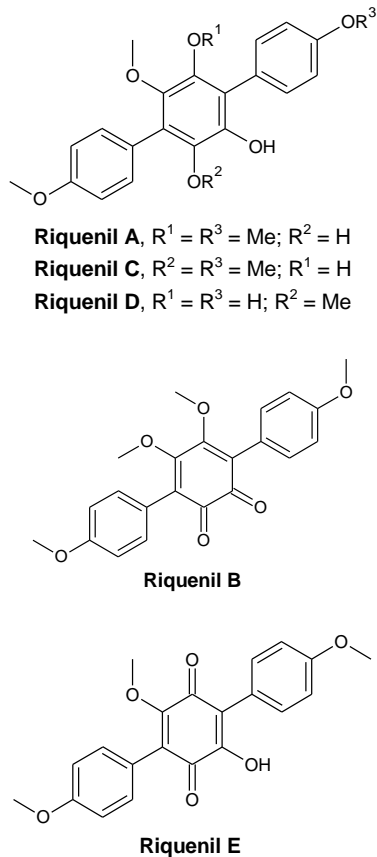
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. rickii</i>	 <p style="text-align: center;">Terpenóides botrianos*</p>	Citotóxica	Kuhnert et al., 2015a.
<i>H. rickii</i>	 <p style="text-align: center;"> Riquenil A, $R^1 = R^3 = \text{Me}$; $R^2 = \text{H}$ Riquenil C, $R^2 = R^3 = \text{Me}$; $R^1 = \text{H}$ Riquenil D, $R^1 = R^3 = \text{H}$; $R^2 = \text{Me}$ </p> <p style="text-align: center;">Riquenil B</p> <p style="text-align: center;">Riquenil E</p>	Citotóxica e antioxidante	Kuhnert et al., 2015b.

Tabela 1 - Continuação.

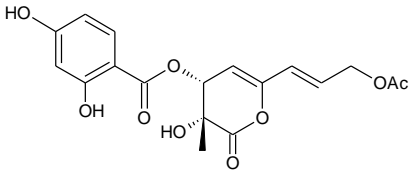
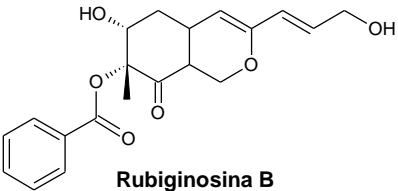
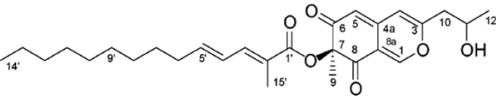
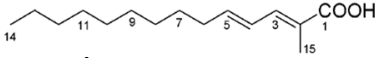
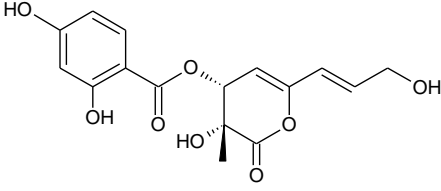
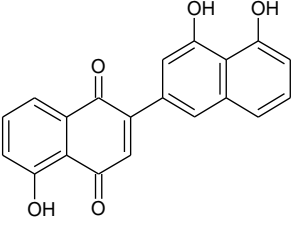
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. rubiginosum</i>	 <p style="text-align: center;">Rubiginosina A</p>  <p style="text-align: center;">Rubiginosina B</p>  <p style="text-align: center;">Rubiginosina C*</p>  <p style="text-align: center;">Ácido rubiginósico*</p>  <p style="text-align: center;">Entonaemina A</p> <p style="text-align: center;">Daldinina C</p>	Não determinada	Quang et al., 2004b.
<i>H. sclerophaeum</i>	 <p style="text-align: center;">Hypoxylona</p>	Não determinada	Bodo et al., 1983.

Tabela 1 - Continuação.

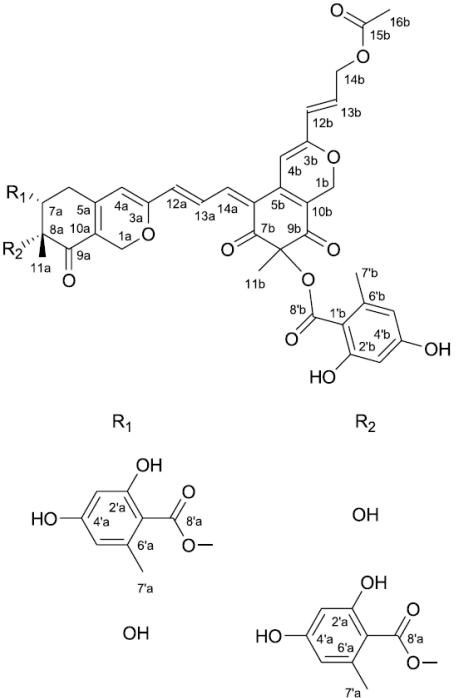
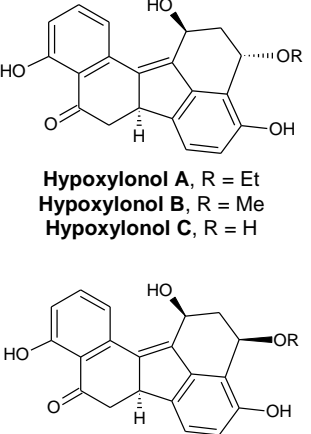
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. rutilum</i>	 <p style="text-align: center;"> Rutilina A* Rutilina B* Rubiginosina A Rubiginosina B Entonaemina A </p>	Não determinada	Quang et al., 2005c.
<i>H. truncantum</i>	 <p style="text-align: center;"> Hypoxylonol A, R = Et Hypoxylonol B, R = Me Hypoxylonol C, R = H </p> <p style="text-align: center;"> Hypoxylonol D, R = Et Hypoxylonol E, R = Me Hypoxylonol F, R = H </p>	Antiproliferativa	Fukai et al., 2002.
<i>H. truncantum</i>	Hypoxylonol C	Antiangiogênica	Fukai et al., 2004.

Tabela 1 - Continuação.

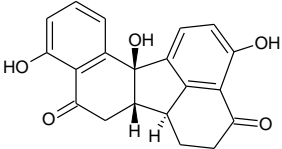
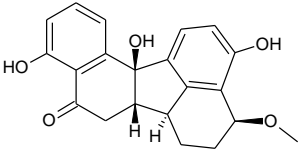
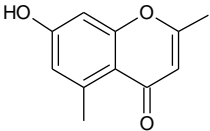
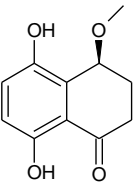
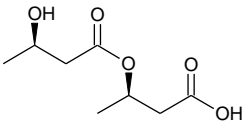
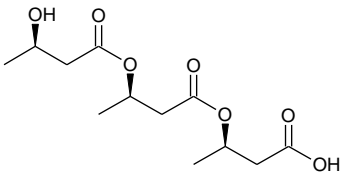
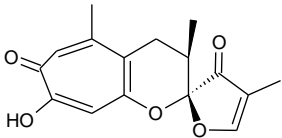
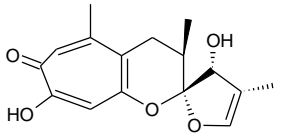
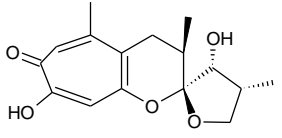
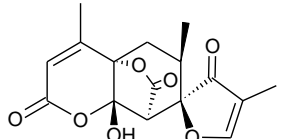
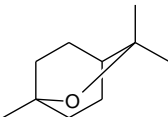
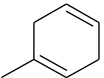
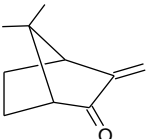
Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>H. truncantum</i>	 <p>Daldinona C</p>  <p>Daldinona D</p>  <p>Altecromona A</p>  <p>(4S)-5,8-dihidroxi-4-metoxi-α-tetralona</p>	Citotóxica	Gu et al., 2007.
<i>H. truncantum</i>	Hypoxylonol A e B	Não determinada	Koyama et al., 2002.
<i>H. truncantum</i>	<p>Ácido 3R-hidroxi-3-metilbutírico</p>  <p>Dímero do Ácido 3R-hidroxi-3-metilbutírico</p>  <p>Trímero do Ácido 3R-hidroxi-3-metilbutírico</p>	Não determinada	Quang et al., 2003.

Tabela 1 - Continuação.

Espécie	Substâncias	Atividade biológica	Referência
<i>Hypoxylon</i> sp.	 <p style="text-align: center;">Maletinina A</p>	Antifúngica	Angawi et al., 2003.
<i>Hypoxylon</i> sp.	 <p style="text-align: center;">Maletinina B</p>  <p style="text-align: center;">Maletinina C</p>  <p style="text-align: center;">Maletinina D</p>	Antifúngica e antibacteriana	Angawi et al., 2005.
<i>Hypoxylon</i> sp.	 <p style="text-align: center;">1,8-cineola</p>  <p style="text-align: center;">1-metil-1,4-ciclo-hexadieno</p>  <p style="text-align: center;">(+)-α-metileno-α-fenchocanforona</p>	Antifúngica e antibacteriana	Tomscheck et al., 2010.

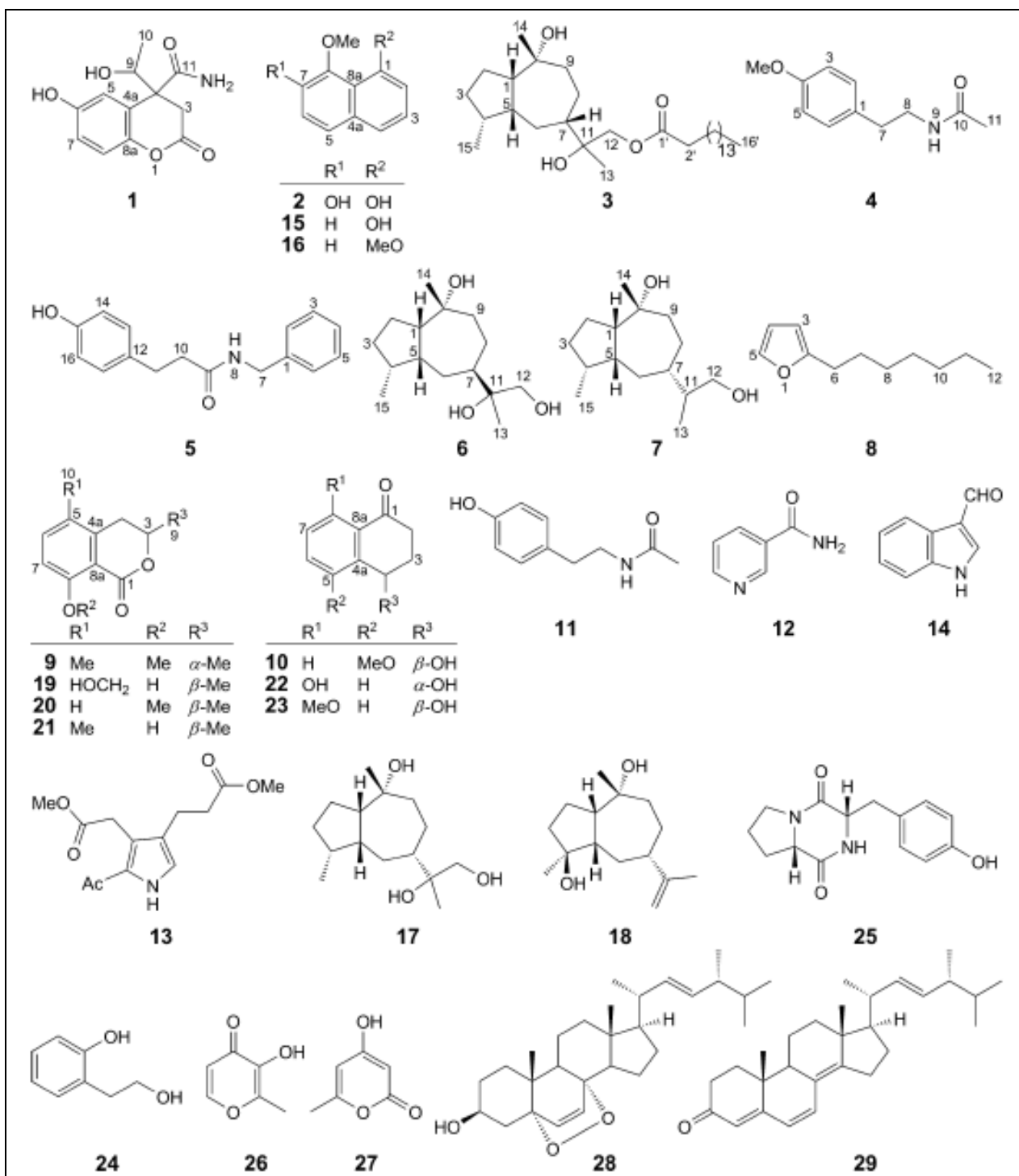
* estruturas extraídas da referência citada na última coluna.

1.3.1. A Espécie *Hypoxyylon investiens*

A espécie *H. investiens* foi primeiramente descrita no Paraguai, em 1884, quando, então, foi denominada de *H. subvinosum* e de *H. plumbeum*. Poucos anos mais tarde, em 1888, também foi descrita no Paraguai, com a sinonímia de *H. anthracoderma*. Mais recentemente, *H. subvinosum* foi incluída no táxon *H. lenormandii*, enquanto *H. anthracoderma* foi incluída em *H. monticulosum*, e *H. plumbeum* foi incluída em *H. perforatum* (HLADKI & ROMERO, 2009).

O fungo *H. investiens* geralmente está associado a organismos terrestres e foram encontrados apenas três trabalhos na literatura, sendo um deles um resumo de congresso (CHEN et al., 2014) e dois artigos (CHANG et al., 2014; CASELLA et al., 2013). CHEN et al. (2014) relataram estudos com 32 espécies de *Hypoxyylon*, que permitiram determinar uma ampla gama de atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anti-HIV, citotóxica e antioxidante) e isolar diversas classes de compostos (azafilonas, benzenóides, cromonas, diterpenos, isocumarinas, poliésteres macrocíclicos, tetralonas, citocalasinas e ácidos graxos). Ao estudarem o fungo endofítico *H. investiens* das raízes da planta *Ilex formosana* (Aquifoliaceae), CHEN et al. (2014) observaram a atividade do extrato acetato de etila deste fungo sobre a inibição da produção de mediadores proinflamatórios. O fracionamento biomonitorado deste extrato levou ao isolamento de 15 substâncias, sendo 3 delas inéditas: o benzenóide hipoxifenona, o derivado de azafilonahipoillexidiol e o alcalóide 1-hidroxi-isoindolinona. No trabalho de CHANG et al. (2014) foram descritos 10 compostos inéditos [3 deles completamente inéditos (**1-3**) e 7 deles sintetizados anteriormente (**4-10**), mas não descritos na natureza], juntamente com 19 já conhecidos, que foram isolados do extrato *n*-butanólico do fungo endofítico *H. investiens* obtido dos galhos da planta *Litsea akoensis* var. *chitouchiaoensis*. As substâncias isoladas estão ilustradas na **Figura 3**. Duas das substâncias já conhecidas isoladas [8-metoxinaftalen-1-ol (**15**) e 1,8-dimetoxinaftaleno (**16**)] inibiram a atividade do óxido nítrico mais que a quercetina (controle positivo), indicando sua potencial ação anti-inflamatória.

Figura 3 - Substâncias isoladas do fungo *H. investiens*.



Fonte: CHANG et al. (2014).

Casella et al. (2013) avaliaram 138 extratos de fungos endofíticos em relação à atividade antifúngica (*Candida albicans*), antibacteriana (*Staphylococcus aureus*) e citotóxica. Dentre todos os extratos testados, 24 apresentaram atividades promissoras, incluindo o extrato de *H. investiens*, endofítico das folhas de uma planta da Amazônia da Guiana Francesa.

1.4. Produção de Ácido 3-nitropropanóico

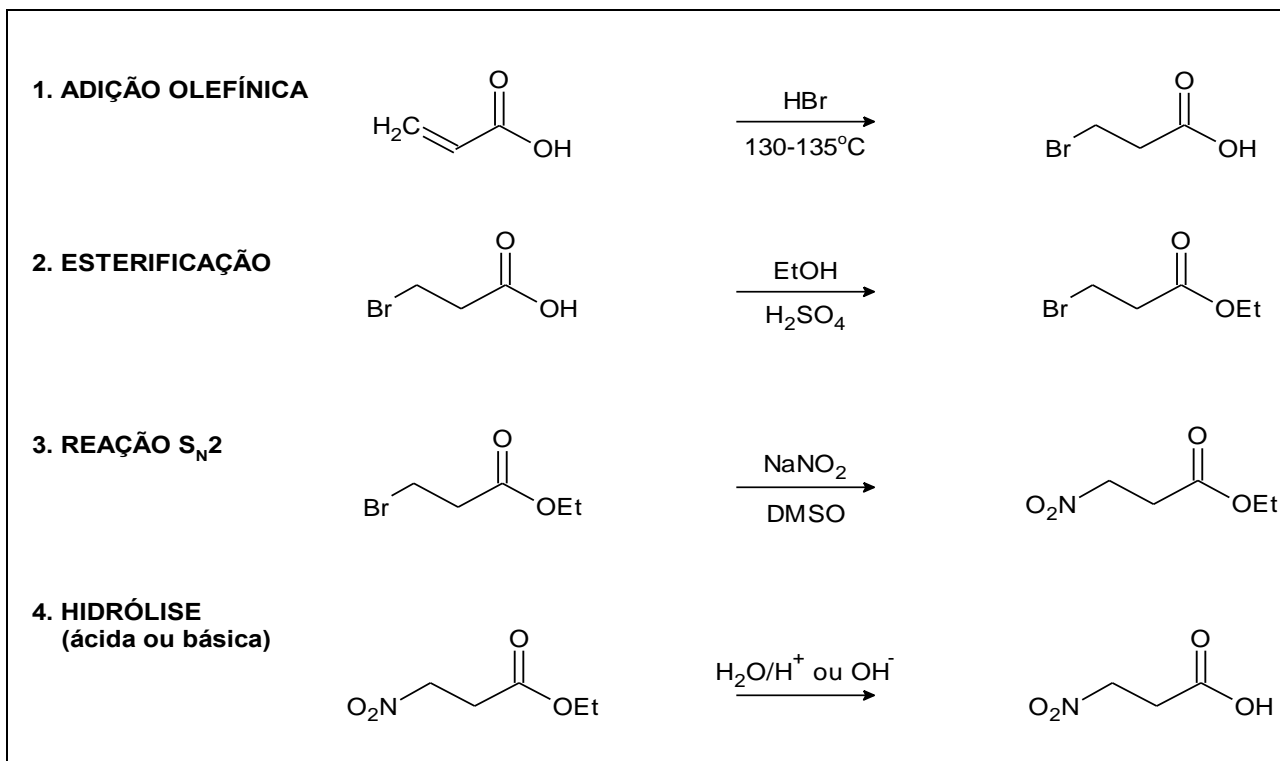
O ácido 3-nitropropanóico comumente descrito como um metabólito de planta, é amplamente encontrado em Fabaceae (SALEM et al., 1995; HIPKIN et al., 2004) e produzido por vários gêneros de fungos (BRÄSE et al. 2009), especialmente pelos endofíticos (FLORES et al., 2013). Quando é produzido por fungo endofítico, ele tem importância biológica e ecológica, já que está envolvido nos processos de nitrificação de Fabaceae (CHOMCHEON et al., 2009). O ácido 3-nitropropanóico é produzido por alguns fungos, especialmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (FLORES et al., 2013) e exerce um importante papel na defesa de certas plantas contra herbívoros. Acredita-se que ele seja produzido pelo fungo endofítico ou que seja o resultado entre a interação deste com a planta hospedeira (CHOMEHEON et al., 2005). O ácido 3-nitropropanóico também foi obtido do fungo endofítico *Phomopsis longicolla* de *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans*, sendo avaliado em ensaios antibacteriano, antifúngico e inseticida (FLORES et al., 2013).

Ele é um potente agente antimicobacteriano (CHOMCHEON et al., 2005), sendo forte inibidor de *Mycobacterium tuberculosis*, possuindo também atividade contra insetos fitófagos (FLORES et al., 2013). Atualmente é amplamente utilizado em estudos do mal de Huntington uma vez que, por se tratar de uma toxina mitocondrial, induz danos cerebrais similares àqueles causados pelo distúrbio neurológico degenerativo hereditário devido a mutação do gene *Htt* codificado como Huntington, seu descobridor, Dr. George Huntington (BROUILLET et al., 2005). Essa doença caracteriza-se, principalmente, por movimentos corporais anormais involuntários e redução da coordenação motora, distúrbios psiquiátricos e déficit cognitivo (MYERS et al., 1988). O ácido 3-nitropropanóico ocasiona aumento de espécies reativas de nitrogênio, danos

oxidativos ao DNA e aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo oriundos da peroxidação lipídica (SANDHIR; MEHROTHA; KAMBOJ; 2010). Na década de 50, o ácido 3-nitropropanóico foi relacionado a episódios de intoxicação em mamíferos nos Estados Unidos. Posteriormente, aproximadamente 100 casos de intoxicação foram reportados na China, associados ao consumo de cana-de-açúcar contaminada com o fungo *Arthrinium* (LUDOLPH et al., 1991), também produtor desta toxina.

Em escala industrial, o ácido 3-nitropropanóico é produzido atualmente apenas por síntese orgânica e é um importante intermediário sintético para a produção de aminoácidos. Há 4 métodos descritos na literatura para a síntese do ácido 3-nitropropanóico, mas um dos métodos utiliza o ácido acrílico como material de partida. Este método é realizado em 4 etapas (adição olefínica, esterificação, reações de substituição nucleofílica bimolecular e hidrólise, **Figura 4**) e tem como vantagens: utilizar material de partida de baixo custo e facilmente disponível; ter baixo custo e simplicidade de operação; envolver condições brandas e controláveis; e, apresentar alto rendimento (LIU; YAO, 2015).

Figura 4 - Etapas sintéticas para obtenção do ácido 3-nitropropanóico a partir do ácido acrílico.



Fonte: LIU; YAO (2015).

O ácido 3-nitropropanóico está disponível comercialmente por diversas empresas em alto grau de pureza e possui elevado valor econômico agregado: 10 g de ácido 3-nitropropanóico (97% de pureza) são comercializados pela Sigma-Aldrich por R\$685,00 (SIGMA-ALDRICH, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Principal

Bioprospecção e estudo químico biomonitorado por ensaios antifúngico e citotóxico do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*.

2.2. Específicos

- ✓ Cultivo em larga escala do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* em meio líquido de PDB para obtenção do extrato bruto com massa suficiente para investigação biológica e estrutural de metabólitos secundários;
- ✓ Obtenção do perfil químico do extrato bruto utilizando RMN de ^1H e CLAE-DAD e investigação das atividades antifúngica, antitumoral e anticolinesterásica;
- ✓ Fracionamento do extrato bruto e isolamento biomonitorado de metabólitos secundários utilizando técnicas cromatográficas convencionais ou sofisticadas;
- ✓ Elucidação e/ou identificação estrutural por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, Ultravioleta, Infravermelho) e espectrométricas (EM, CLAE-EM e CG-EM) dos metabólitos isolados;
- ✓ Submeter as frações oriundas do extrato bruto e os metabólitos isolados a ensaios biológicos para avaliar suas atividades antifúngica, antitumoral e anticolinesterásica;
- ✓ Contribuir para uma melhor compreensão da relação ecológica entre os fungos endofíticos e o seu hospedeiro por meio de sua produção metabólica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Solventes, Meios de Cultivo e Equipamentos Gerais

Os processos de extração, fracionamento e cromatografia em camada delgada comparativa foram realizados utilizando solventes padrão analítico (PA), como metanol, acetato de etila, acetona, diclorometano, clorofórmio e hexano das marcas Synthlab[®], Dinâmica[®], Vetec[®] e Merck[®].

As análises cromatográficas feitas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência foram realizadas com solventes grau HPLC. Foram utilizados metanol (Baker[®]), acetonitrila (Baker[®]), água ultrapura purificada em sistema Milli Q (Millipore[®]) e ácido trifluoroacético (Mallinckrodt[®]).

Para o cultivo dos fungos foram utilizados o meio de cultivo sólido PDA - *Potato Dextrose Agar* (DIFCO[®] e Acumedia[®]), em uma concentração de 39 g.L⁻¹ e o meio de cultivo líquido PDB - *Potato Dextrose Broth* (Himedia[®]), em uma concentração de 24 g.L⁻¹.

Os extratos, frações e substâncias isoladas foram concentrados em evaporador rotatório Buchi[®] R-114 (banho termostático B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo Schwabach[®] D-91126 da Heidolph Instruments[®] e refrigeração Marconi[®] BTC-9090 e evaporador rotativo (Heidolph[®], Laborota 4001 - efficient) equipado com bomba de vácuo (Heidolph[®], Rotavac[®] valve control).

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos microrganismos, e também dos meios de cultivo preparados, foi realizada em autoclave vertical do fabricante Phoenix Luferto[®]. No processo de isolamento, repique e cultivo dos fungos foi utilizada uma câmara de fluxo laminar vertical Pachane[®] PA 310-Serie 172-99.

As amostras foram pesadas em balanças Mettler Toledo[®] AG245 e AG204, Marte[®] AL200, Shimatzu[®] AY220 (analíticas) e Marconi[®] BG2000 (semi-analítica).

3.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 Whatman® e Sorbent Technologies®, base de alumínio 200 µm e 0,20 mm de espessura, reveladas em câmara de UV (comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm), vapor de iodo, anisaldeído/ácido sulfúrico ou ácido fosfomolibidico.

3.1.3. Cromatografia em Coluna

Essa técnica cromatográfica foi realizada utilizando-se suporte de vidro, empregando como fase estacionária sílica gel, tamanho da partícula na faixa de 230-400 mesh (40-63 µm) e tamanho do poro de 60 Å (Sorbent Technologies®). As dimensões da coluna (diâmetro e comprimento), assim como o sistema de eluente utilizado, variaram em função da massa e das características cromatográficas da amostra aplicada. O sistema de eluente consistiu de uma combinação dos solventes hexano, acetona, diclorometano e metanol em diversas proporções.

3.1.4. Cromatografia de Exclusão

A cromatografia de exclusão foi desenvolvida em um suporte de vidro com 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno, cuja capacidade de carga é de 2,0 g, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia®) suspensa em metanol (PA), acoplada à bomba peristáltica GE Healthcare® P1 18-1110-91 e a um coletor automático de frações GE Healthcare® Frac-920, com capacidade para 95 frações. No preparo da amostra, foi utilizada uma centrífuga CELM®, COMBATE®.

3.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises por CLAE-DAD foram realizadas nos seguintes cromatógrafos:

Analítico:

- Cromatógrafo Shimadzu[®] contendo duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A3, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno modelo CTO-20A. Software Shimadzu[®] LC solution[®] (versão 1.23).

- Cromatógrafo Jasco[®], modelo PU-2089, acoplado a detector de arranjo de foto diodos MD-2010, injetor Rheodyne[®] 7125, loop de 100 µL. Software EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec[®]).

Analítico e Preparativo:

- Cromatógrafo Shimadzu[®] contendo duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático (modo analítico) SIL-10AF, detector de arranjos de diodos SPD-M20A, injetor Rheodyne[®], loope de 500 µL. Software Shimadzu LC solution[®] (versão 1.23 SP1)

- Cromatógrafo Jasco[®] modelo PU-2086, acoplado a detector de arranjo de diodos MD-2010, injetor Rheodyne[®] 7125, loop de 500 µL. Software Chromnav[®].

Foram utilizadas colunas C-18 Gemini (Phenomenex[®]) e Luna (Phenomenex[®]) (250 x 4,60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico e colunas C-18 Luna (Phenomenex[®]) (250 x 10,0 mm; 5 µm; 110Å) e Luna 2 (Phenomenex[®]) (250 x 10,0 mm; 10 µm; 100Å) protegida com uma coluna guarda (Phenomenex[®]) de 4,0 x 3,0 mm no modo preparativo.

3.1.6. Análises por Ressonância Magnética Nuclear

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foram realizadas em dois instrumentos: Bruker Ascend III[®] 600 MHz (14.1T) e Bruker Fourier[®] 300 MHz (7.0 T). Foram usados os solventes deuterados acetona- d_6 (Cambridge Isotope Laboratories[®]), CD_3OD (Sigma-Aldrich[®]) e $\text{DMSO-}d_6$ (Sigma-Aldrich[®]) de acordo com a solubilidade das amostras analisadas, sendo empregado TMS como padrão interno.

3.1.7. Análises por Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas utilizando-se um Espectrômetro de Massas Q-TOF MaXis[™] Impact. As amostras foram injetadas por inserção direta.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção do Material Algal, Isolamento e Cultivo das Cepas Fúngicas

Em junho de 2013 foram coletadas, no costão direito da praia da Ponta da Fortaleza, Ubatuba - São Paulo, pequenas quantidades da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (At), estágio *Falkenbergia*, para o isolamento dos seus fungos endofíticos. A macroalga foi identificada pela Dra. Nair Yokoga do Instituto de Botânica - Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e uma exsicata (SP 401.747) foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica (SP). Foram escolhidos espécimes saudáveis, os quais foram lavados cuidadosamente em água do mar e armazenados em 3 frascos contendo água do mar esterilizada em autoclave e o antibiótico cloranfenicol (concentração de $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados para o Instituto de Química de Araraquara - UNESP. Já no laboratório, as algas foram esterilizadas superficialmente a partir da sua imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos.

Os processos de isolamento, purificação e cultivo dos fungos foram feitos pela doutoranda Rebeca Previante Medina no Laboratório de Microorganismos do NuBBE. Foram preparadas quatro placas de Petri contendo o meio de cultivo sólido PDA e o antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}). Duas das placas foram preparadas com PDA em água do mar e as outras duas foram preparadas com PDA em água ultrapura (água MilliQ). Após o processo de esterilização, as algas foram seccionadas com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis e transferidas para duas placas de Petri (uma cujo meio de cultivo foi feito em água do mar e a outra em água ultrapura). Em cada placa foram colocados quatro fragmentos de algas. Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada nas outras duas placas restantes. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em *slants* (frascos contendo água do mar ou água MilliQ estéril e o fungo em meio sólido PDA), lacrados e mantidos à temperatura ambiente, como mostrado na **Figura 5**. A partir da alga *A. taxiformis* foi possível isolar 7 linhagens de fungos endofíticos (inicialmente, codificados como **At01-At07**).

Figura 5 - Esquema de coleta, esterilização e isolamento das cepas fúngicas.

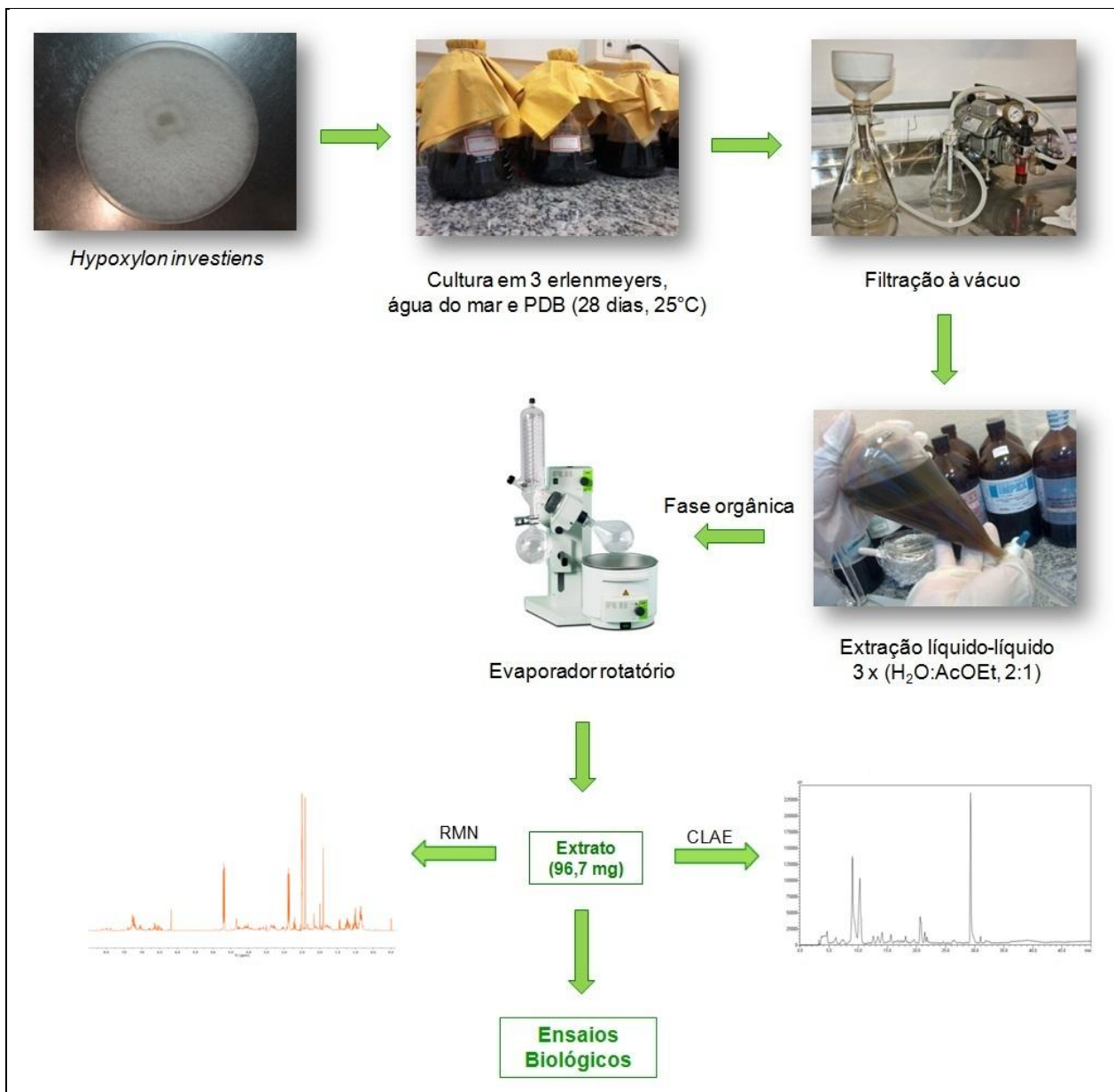


Fonte: O autor (2016).

3.2.2. Prospecção Química e Biológica em Escala Reduzida dos Metabólitos Produzidos pelo Fungo *Hypoxylon investiens*

De todos os fungos endofíticos isolados da alga *A. taxiformis* disponíveis para bioprospecção, *H. investiens* apresentou características interessantes que justificavam o seu estudo imediato. Esse isolado fúngico foi posto a crescer em escala reduzida a fim de se obter um extrato com massa suficiente para uma investigação preliminar do seu perfil químico e de possíveis atividades biológicas. A linhagem fúngica isolada e preservada foi repicada pela doutoranda Rebeca Previante Medina em placas de Petri contendo PDA. Após o crescimento desse fungo (cerca de 7 dias), aproximadamente um terço do micélio crescido foi inoculado em meio líquido PDB (meio de batata dextrose). O meio líquido foi preparado esterilizando-se 6 erlenmeyers de 500 mL em autoclave por aproximadamente 40 minutos, sendo que 3 deles continham 300 mL de solução de PDB em água do mar e os outros 3 continham 300 mL de solução de PDB em água ultrapura (água MilliQ). A variação do solvente no preparo do meio de cultivo líquido foi feita com o intuito de se comparar em qual meio o fungo produz mais massa além de metabólitos com maior quimiodiversidade e bioatividades mais promissoras. Os erlenmeyers foram conservados estáticos por 28 dias a 25 °C. Após o período de incubação, o caldo aquoso foi separado do micélio por filtração a vácuo e o filtrado aquoso foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. A fase aquosa foi descartada e, após evaporação do solvente orgânico, foi obtido o extrato bruto contendo os metabólitos produzidos pelo fungo, como mostrado na **Figura 6**.

Figura 6 - Prospecção química e biológica dos metabólitos produzidos em escala reduzida por linhagem do fungo *Hypoxyton investiens*.



Fonte: O autor (2016).

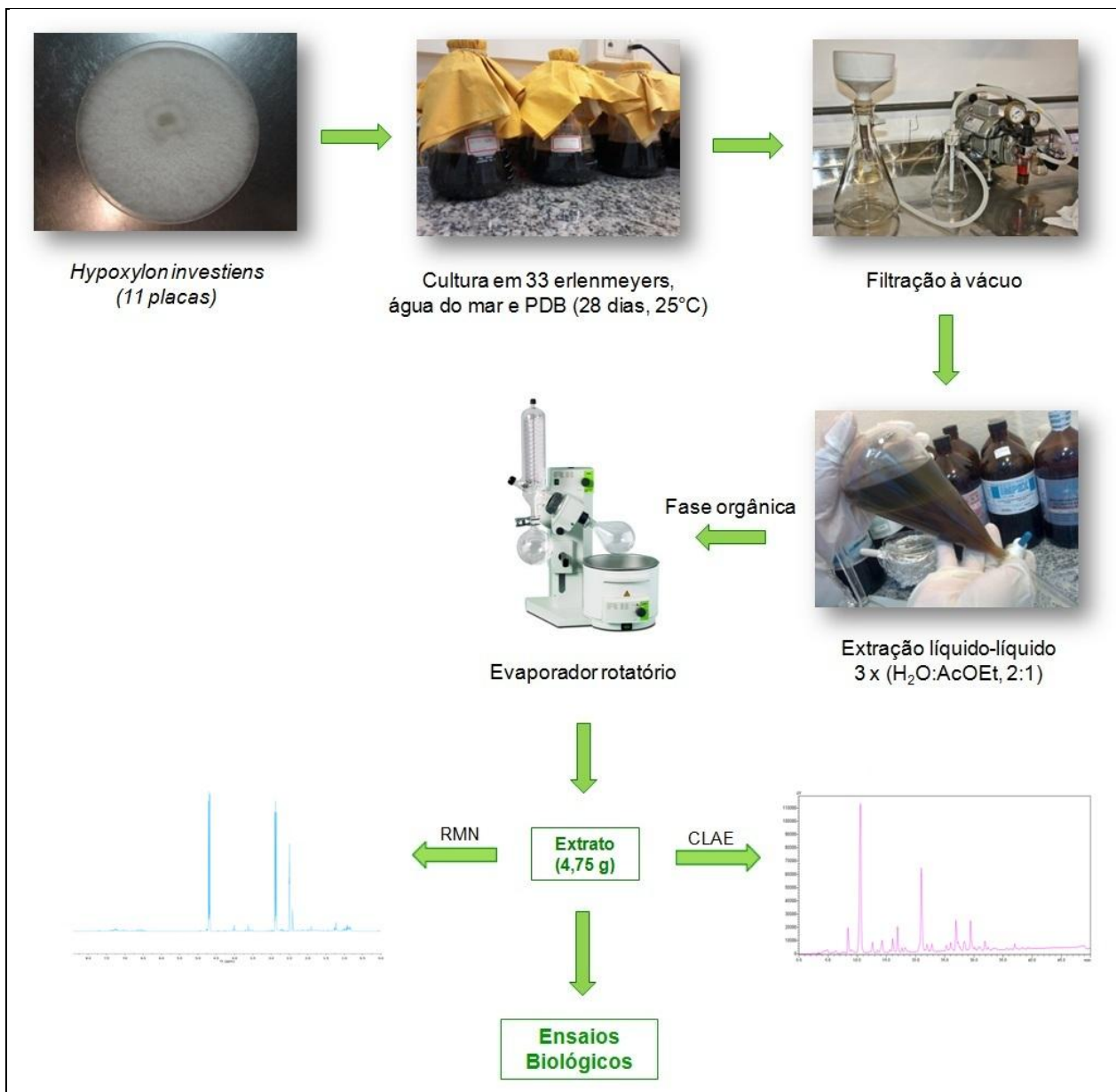
3.2.3. Prospecção Química e Biológica em Escala Ampliada dos Metabólitos Produzidos Pelo Fungo *Hypoxylon investiens*

O isolado fúngico foi repicado em 13 placas de Petri contendo o meio sólido (PDA), para a obtenção de massa micelar em maior quantidade. Foram usadas 11 das 13 placas para o crescimento em escala ampliada dos fungos, uma placa foi usada para conservar os fungos em *slants* para uso posterior e, por fim, a última placa foi cultivada por precaução, caso alguma apresentasse contaminação.

Como cada micélio crescido na placa de Petri pode ser dividido em 3 partes iguais para inoculação em meio líquido e cada parte é inoculada em 1 erlenmeyer, foram necessários 33 erlenmeyers, cada um contendo 7,2 g de PDB dissolvidos em 300 mL de água do mar filtrada. A produção em escala reduzida acusou que, nessas condições de cultivo, 3 erlenmeyers produziram 96,7 mg de extrato bruto. Desta forma, 33 erlenmeyers deveriam produzir 1063,7 mg (ou 1,0637 g) de extrato bruto, suficiente para se trabalhar durante todo o projeto. Após inoculado, o fungo ficou sob modo estático por 28 dias a temperatura controlada (25 °C).

Ao final do período de fermentação dos fungos endofíticos, a suspensão micelar foi filtrada a vácuo e o micélio foi separado do filtrado. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Para cada litro do filtrado aquoso foram usados 1,5 L de acetato de etila. Desta forma, foram necessários 14,85 L de acetato de etila para a partição de todo o filtrado. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica concentrada com auxílio de evaporador rotativo (**Figura 7**). O AcOEt recuperado foi devidamente armazenado em frascos de solvente para posterior aproveitamento.

Figura 7 - Prospecção química e biológica dos metabólitos produzidos em escala ampliada por linhagem do fungo *Hypoxyylon investiens*.

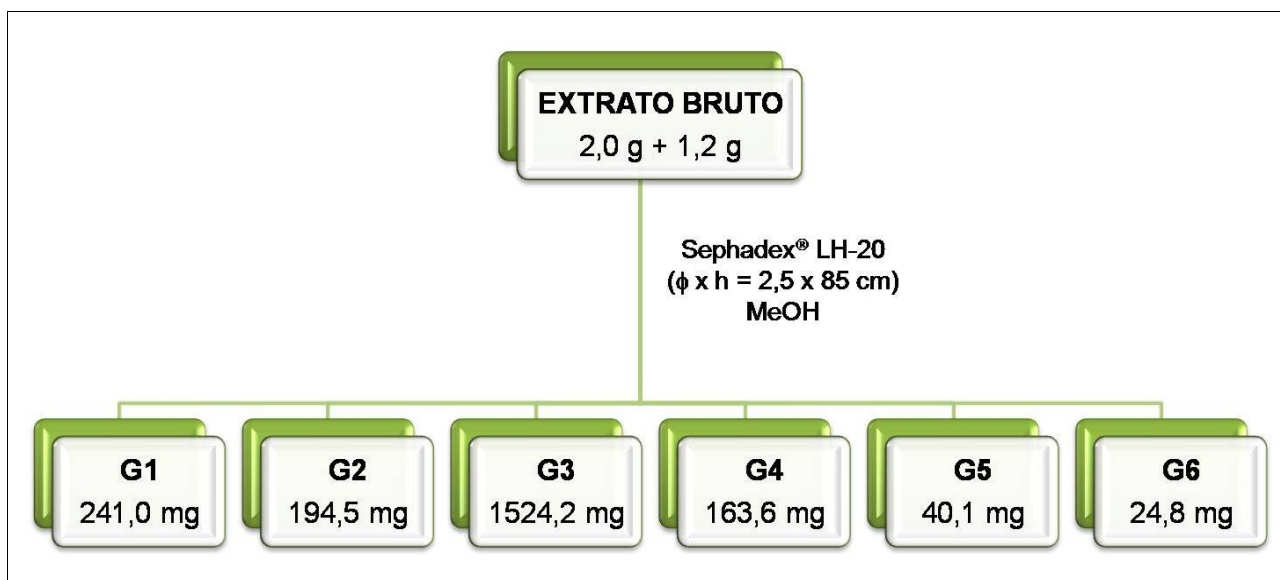


Fonte: O autor (2016).

3.2.4. Fracionamento do Extrato Bruto por Cromatografia de Exclusão

O extrato bruto foi fracionado utilizando-se cromatografia de exclusão. Foram feitas duas corridas em Sephadex[®] LH-20, uma com 2,0 g e outra com 1,2 g de amostra. Em ambas as corridas, as amostras foram solubilizadas em metanol (a menor quantidade possível) e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm, separando-se o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado com algodão, aplicado na coluna e eluído com metanol. As frações foram coletadas a cada 3 minutos de corrida (aproximadamente 10 mL cada fração) e reunidas após análise por CCDC, resultando em 6 frações, **G1-G6**, como mostrado na **Figura 8**.

Figura 8 - Fracionamento por cromatografia de exclusão do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala ampliada pelo fungo *H. investiens*.



Fonte: O autor (2016).

3.2.5. Estudo Químico da Fração **G3**

A fração **G3** foi submetida à análise do seu perfil cromatográfico em gradiente exploratório por CLAE-DAD utilizando-se um cromatógrafo Jasco[®] e coluna analítica Luna (Phenomenex[®]) C18, 250 x 4,60 mm, diâmetro de partícula de 5 μm (110 Å). O solvente A foi composto por H₂O+TFA (0,01%) e o solvente B foi composto por MeOH+TFA (0,01%). Foi feito um gradiente de 5-100% do solvente B em 60 minutos de

desenvolvimento com uma vazão de 1,00 mL.min⁻¹. O perfil cromatográfico foi otimizado e, utilizando-se uma coluna Luna 2 (Phenomenex[®]) C18, 250 x 10,0 mm, diâmetro de partícula de 10 µm (100 Å) protegida com coluna guarda Luna 2 (Phenomenex[®]) de 4,0 x 3,0 mm, foi possível isolar duas substâncias nomeadas **G3.1** e **G3.2**.

3.2.6. Estudo Químico da Fração **G4**

A fração **G4** foi submetida a um processo de partição líquido-líquido utilizando-se diclorometano e água. A amostra, 163,6 mg, foi solubilizada em 25 mL de água (algumas gotas de acetona foram adicionadas para melhorar a solubilização da amostra) e extraída 3 vezes com igual quantidade de diclorometano. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e o solvente foi evaporado com auxílio de evaporador rotativo. Foram obtidos 36,8 mg de fase orgânica.

Em seguida, a fase orgânica foi submetida a cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária sílica gel do tipo *flash*, com tamanho médio de partícula de 230-400 mesh (40-63µm) e tamanho do poro de 60 Å (Sorbent Technologies[®]). Como suporte, foi utilizada uma coluna de vidro de 60 cm de comprimento e raio de 2,5 cm. A fase estacionária foi empacotada em forma de suspensão no próprio eluente, uma solução de hexano, diclorometano e acetona (25:60:15, v/v/v), sob pressão, durante a passagem de 2 volumes mortos. Após empacotada, a coluna foi mantida estática durante 6 horas. A forma de eluição foi um gradiente iniciado com hexano, diclorometano e acetona (25:60:15 v/v/v), cuja força de eluição foi aumentada até MeOH 100%, sob pressão atmosférica. As frações foram coletadas a cada 3 mL e reunidas por CCDC, resultando em 20 frações nomeadas **G4.1-G4.20**.

3.2.7. Estudo Químico da Fração **G5**

A fração **G5** foi submetida à análise do seu perfil cromatográfico em gradiente exploratório por CLAE-DAD utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu[®] e coluna analítica Luna (Phenomenex[®]) C18, 250 x 4,60 mm, diâmetro de partícula de 5 µm (110Å). O solvente A foi composto por H₂O e o solvente B foi composto por ACN. Foi

feito um gradiente de 5-100% do solvente B em 50 minutos de desenvolvimento com uma vazão de $1,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O perfil cromatográfico foi otimizado e, utilizando-se uma coluna semipreparativa Luna (Phenomenex[®]) C18, 250 x 10,0 mm, diâmetro de partícula de $5 \mu\text{m}$ (110Å) protegida com coluna guarda Luna (Phenomenex[®]) de 4,0 x 3,0 mm, foi possível isolar 14 substâncias nomeadas **G5.1-G5.14**.

3.2.8. Estudo Químico da Fração **G6**

A fração **G6** foi submetida à análise do seu perfil cromatográfico em gradiente exploratório por CLAE-DAD utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu[®] e coluna analítica Luna (Phenomenex[®]) C18, 250 x 4,60 mm, diâmetro de partícula de $5 \mu\text{m}$ (110Å). O solvente A foi composto por H_2O e o solvente B foi composto por MeOH. Foi feito um gradiente de 5-100% do solvente B em 50 minutos de desenvolvimento com uma vazão de $1,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O perfil cromatográfico foi otimizado e, utilizando-se uma coluna semipreparativa Luna (Phenomenex[®]) C18, 250 x 10,0 mm, diâmetro de partícula de $5 \mu\text{m}$ (110Å) protegida com coluna guarda Luna (Phenomenex[®]) de 4,0 x 3,0 mm, foi possível isolar 3 substâncias nomeadas **G6.1-G6.3**.

3.2.9. Análises Por Cromatografia Em Camada Delgada Comparativa

As análises preliminares dos perfis cromatográficos do extrato, das frações obtidas do fracionamento por Sephadex[®] LH-20 e por coluna cromatográfica de sílica foram realizadas utilizando-se placas de sílica gel. Cada fração obtida das etapas de fracionamento e purificação foi aplicada em placas de sílica de 20 x 5 cm ou 10 x 5 cm ou mesmo 2 x 5 cm, em função do número de amostras a serem eluídas. Foram utilizados sistemas ternários ou binários de eluentes. Após a eluição, foram utilizados como reveladores câmara de UV, solução de anisaldeído/ H_2SO_4 , vapor de iodo e/ou ácido fosfomolibdico. Anisaldeído ácido e ácido fosfomolibdico necessitam de aquecimento da placa depois de aplicados. Neste caso, as placas foram levadas a uma estufa a 130°C por alguns minutos. Após revelação das cromatoplasmas, as frações que apresentaram perfis cromatográficos similares foram reunidas. As frações reunidas

foram concentradas até a secura em evaporador rotativo, pesadas em balança analítica e armazenadas ao abrigo da luz e umidade em frascos apropriados.

3.2.10. Análises Em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

Antes da análise em CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência), extrato bruto e frações passaram por um processo cuidadoso de preparo de amostra. As amostras foram submetidas a um *clean-up* em cartuchos de SPE (*Solid Phase Extraction* - Extração em Fase Sólida) (55 μm , Strata-X[®], Phenomenex[®]) de 1000 mg, preenchidos com fase estacionária C18. Os cartuchos foram primeiramente ativados e condicionados com MeOH (100%, 2,0 mL, 3 vezes). Foram preparadas soluções de concentração de 10 mg.mL⁻¹ em MeOH 100%. As soluções foram aplicadas no cartucho de SPE e eluídas com excesso de MeOH. O eluato foi levado a capela até a secura, solubilizado na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ em uma solução cuja força de eluição é a mesma da condição inicial da análise e, por fim, filtrado em membrana de PTFE de 0,22 μm (Millex[®], Merck[®], Millipore[®]), coletado em *vial* de 1,5 mL. Em modo analítico, o volume de injeção foi de 10 μL e a vazão do eluente foi de 1 mL.min⁻¹. Em modo preparativo, as amostras foram preparadas em concentração de 15 mg.mL⁻¹, o volume de injeção foi de 150 μL e a vazão do eluente foi de 3,5 mL.min⁻¹. As condições cromatográficas utilizadas em cada análise estão descritas nas figuras correspondentes aos cromatogramas obtidos em cada análise.

3.2.11. Atividade Antifúngica

Estes ensaios de bioautografia foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto de Botânica, SMA/São Paulo, SP. Os extratos brutos e as frações, nas concentrações de 40 $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$, respectivamente, foram aplicados em cromatoplasmas de sílica gel e eluídos com sistemas de solventes otimizados. As cromatoplasmas, após total evaporação do eluente, foram borrifadas com uma suspensão dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, na concentração de 5×10^7 esporos.mL⁻¹, em solução de glicose e sais. As placas

aspergidas com suspensão de fungos foram incubadas em câmara úmida a 25 °C, durante 48 horas, na ausência de luz. Decorrido o período de incubação, o fungo cresceu por toda placa, exceto nas regiões onde se encontram as substâncias bioativas, inibindo o crescimento do fungo. Também foi aplicada na placa o padrão positivo nistatina (1 µg) para comparação dos resultados (HOMANS, 1970; RAHALISON, 1994).

3.2.12. Atividade Anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição do extrato bruto e das frações, nas concentrações de 20 µg.µL⁻¹ e 10 µg.µL⁻¹, respectivamente, em placas de sílica gel, utilizando sistemas de eluentes otimizados. Nestas cromatoplasas foi borrifada uma solução da enzima acetilcolinesterase e, em seguida, as placas foram incubadas em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos. Após este período, foi borrifada uma solução C (contém 10 mL da solução A e 40 mL da solução B. Solução A: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400 mg do sal *Fast Blue B* em 160 mL de água destilada). Como padrão positivo foi utilizado o composto fisostigmina (0,05 µg mL⁻¹) (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002). Este ensaio também foi realizado sob a supervisão da Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto de Botânica, SMA, SP.

3.2.13. Atividade Citotóxica

O estudo citotóxico *in vitro* do extrato bruto e das frações foi realizado pelo método do **MTT** (*MethylThiazolyldiphenyl-Tetrazolium bromide* - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiozol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983), utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* (Instituto Nacional do Câncer) dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (MONKS, 1991). Este ensaio pode ser utilizado para determinar citotoxicidade e proliferação celular. Trata-se de uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT;

Sigma), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase, presente somente nas mitocôndrias das células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et. al., 1996). As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (carcinoma de cólon humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama metastático) e SF-295 (glioblastoma humano), foram cedidas pelo NCI, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. As células foram plaqueadas na concentração de 1,0x10⁵ cél.mL⁻¹ para as linhagens OVCAR-8 e SF-295 e 7,0x10⁴ cél.mL⁻¹ para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste período, foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha - LABMAR, da universidade Federal do Ceará (UFC), sob supervisão do Prof. Dr. Diego Veras Wilke, e analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão da média da porcentagem de inibição do crescimento celular. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Para as amostras ensaiadas em duplicatas das doses testadas, o valor da absorbância encontrado foi transformado em porcentagem, relativo ao controle, utilizando o software *GraphPad Prism 5.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Prospecção Química e Biológica em Escalas Reduzida e Ampliada: Comparação da Produção Metabólica

Em junho de 2013 foram coletadas, no costão direito da praia da Ponta da Fortaleza, Ubatuba - SP, pequenas quantidades da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, estágio *Falkenbergia*, para o isolamento dos seus fungos endofíticos. Os processos de seleção, obtenção e classificação do material algal, bem como o isolamento, purificação e cultivo dos fungos endofíticos foram descritos no item 3.2.1. Foram isoladas 7 linhagens fúngicas, codificadas inicialmente como **At01-At07**.

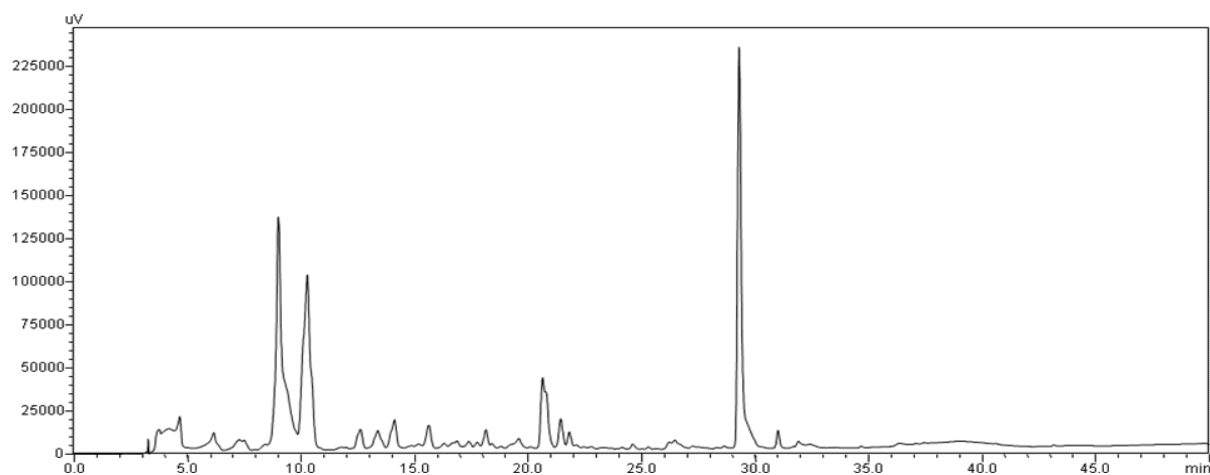
O estudo em escala reduzida de cada linhagem fúngica foi feito com o intuito de avaliar a quantidade de massa produzida por cada espécie em diferentes meios de cultivo e o potencial biológico frente a diversos ensaios. O crescimento em escala reduzida foi discutido no item 3.2.2. A massa, obtida em escala reduzida, do extrato bruto dos metabólitos produzidos pelo fungo *Hypoxylon investiens* foi de 32,23 mg por erlenmeyer.

A partir da informação da quantidade de massa produzida em escala reduzida foi planejado o experimento, como descrito no item 3.2.3, para obtenção do extrato bruto em escala ampliada. Seguindo rigorosamente as condições experimentais do cultivo em escala reduzida, esperava-se obter aproximadamente 1,0 g de extrato bruto. No entanto, foram obtidos 4,758 g. Uma justificativa para esse resultado está, possivelmente, no uso de água do mar diferente daquela utilizada quando do estudo em escala reduzida. O crescimento do fungo em escala ampliada foi feito com água do mar coletada na praia Martin de Sá, município de Caraguatatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, no mês de dezembro de 2014. Imediatamente após sua coleta, a água foi filtrada com papel de filtro comum e estocada em câmara fria. O crescimento do fungo em escala reduzida foi feito com a água coletada na praia da Ponta da Fortaleza, município de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, no mês de junho de 2013 e o cuidado com a filtração e armazenamento em baixas temperaturas não foram devidamente tomados, o que pode ter contribuído para o crescimento e proliferação de microorganismos que podem ter alterado o pH da água e influenciado no metabolismo

da linhagem fúngica. Essa variação experimental sutil pode ter sido decisiva na alteração da produção metabólica do fungo, como será evidenciado pela comparação dos perfis cromatográficos obtidos em CLAE em escalas reduzida e ampliada (**Figuras 9-11**), bem como pela comparação dos seus espectros de RMN de ^1H (**Figuras 12-14**).

Uma vez obtido o extrato bruto em escala reduzida, um perfil cromatográfico em CLAE foi adquirido (**Figura 9**). O preparo da amostra para análise em CLAE foi discutido no item 3.2.10. A análise foi realizada usando gradiente exploratório, em modo reverso, utilizando uma coluna analítica Phenomenex[®] Gemini C18 de 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho médio de partículas de 5 μm . Como fase móvel foram utilizados os solventes água e metanol. O gradiente foi desenvolvido de 5-100% de metanol em 50 minutos.

Figura 9 - Cromatograma representando o perfil do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala reduzida pelo fungo *H. investiens* isolado da alga marinha *A. taxiformis*.

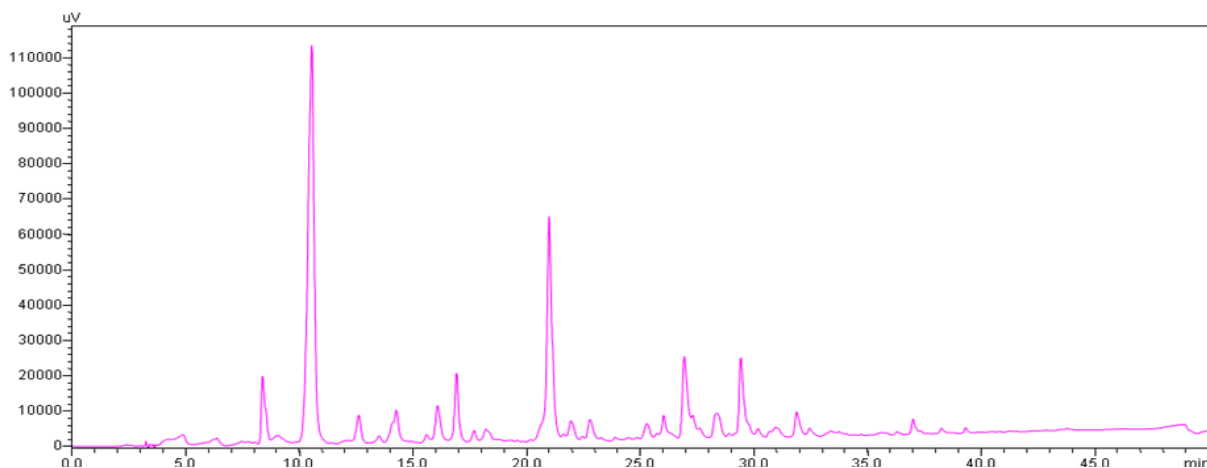


Coluna Analítica Phenomenex[®] Gemini C18, (250 x 4,60 mm), d.p. de 5 μm ; Solvente A: H_2O ; Solvente B: MeOH. Gradiente exploratório de 5-100% de B em 50 minutos de desenvolvimento; vazão de 1,00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Fonte: O autor (2016).

Da mesma forma, um perfil cromatográfico foi adquirido para o extrato bruto produzido em escala ampliada na mesma coluna e nas mesmas condições experimentais que o obtido em escala reduzida, como mostrado na **Figura 10**, a fim de se comparar se houve variações na produção metabólica das substâncias produzidas pelo fungo.

Figura 10 - Cromatograma representando o perfil do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala ampliada pelo fungo *H. investiens* isolado da alga marinha *A. taxiformis*.

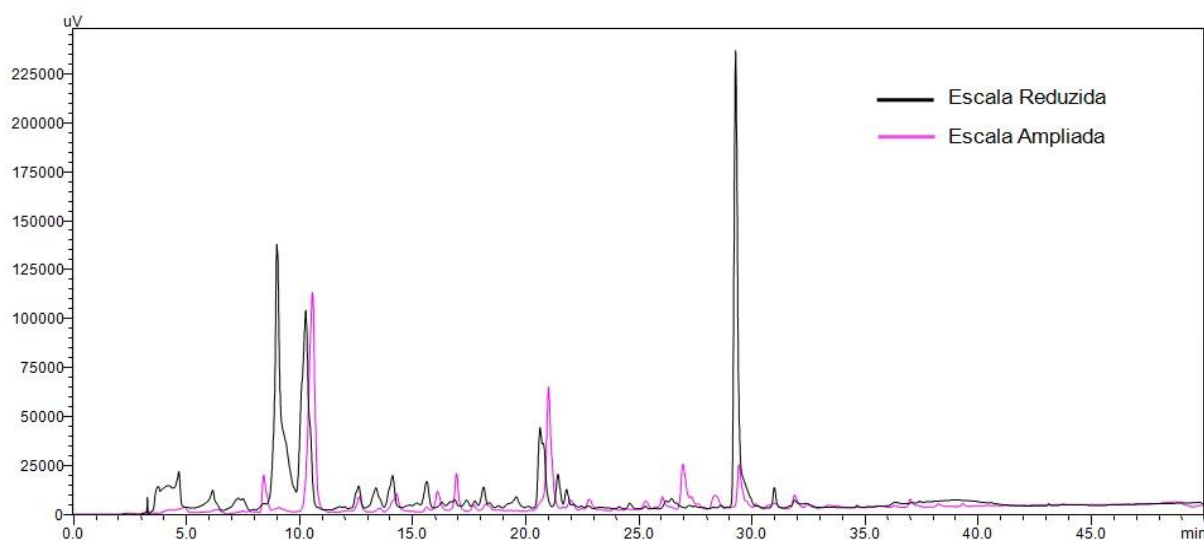


Coluna Analítica Phenomenex® Gemini C18, (250 x 4,60 mm), d.p. de 5 μ m; Solvente A: H₂O; Solvente B: MeOH. Gradiente exploratório de 5-100% de B em 50 minutos de desenvolvimento; vazão de 1,00 mL.min⁻¹; λ = 280 nm.

Fonte: O autor (2016).

A comparação dos dois cromatogramas, dos extratos brutos dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens* em escalas reduzida e ampliada, sobrepostos permitiu-nos inferir que houve variação na produção metabólica do fungo no que concerne à identidade e, principalmente, às quantidades relativas dos metabólitos produzidos, como mostrado na **Figura 11**. A substância cujo tempo de retenção é de aproximadamente 10 minutos foi produzida majoritariamente em escala ampliada, enquanto que a produção da substância cujo tempo de retenção é de aproximadamente 29 minutos foi praticamente suprimida.

Figura 11 - Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extratos brutos AcOEt dos metabólitos produzidos por *H. investiens* em escalas reduzida e ampliada.

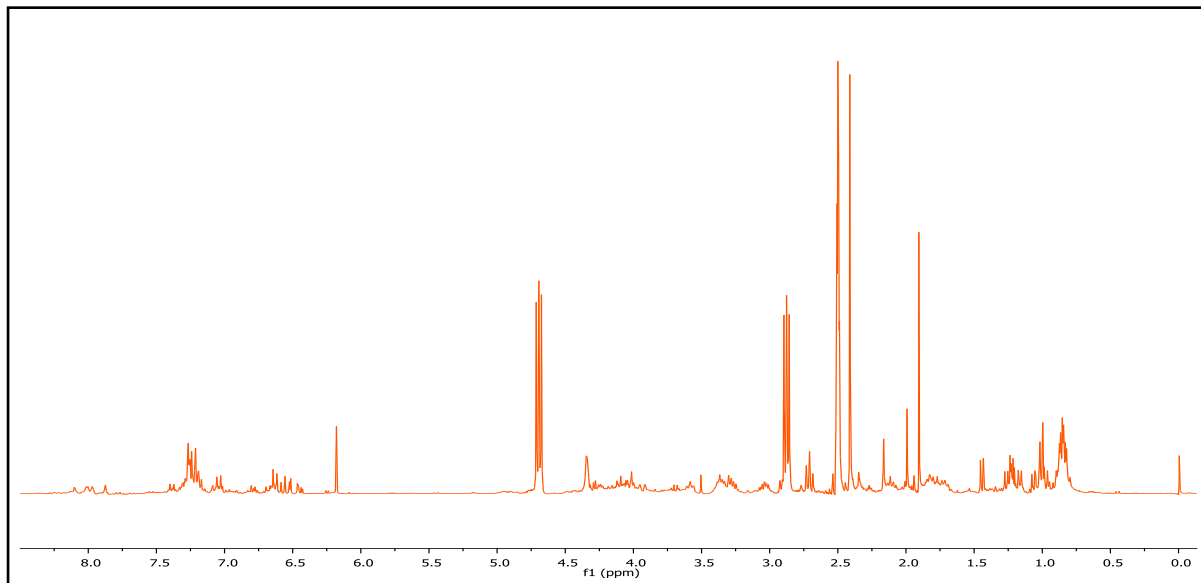


Coluna Analítica Phenomenex® Gemini C18, (250 x 4,60 mm), d.p. de 5 μm ; Solvente A: H_2O ; Solvente B: MeOH. Gradiente exploratório de 5-100% de B em 50min de desenvolvimento; vazão de 1,00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Fonte: O autor (2016).

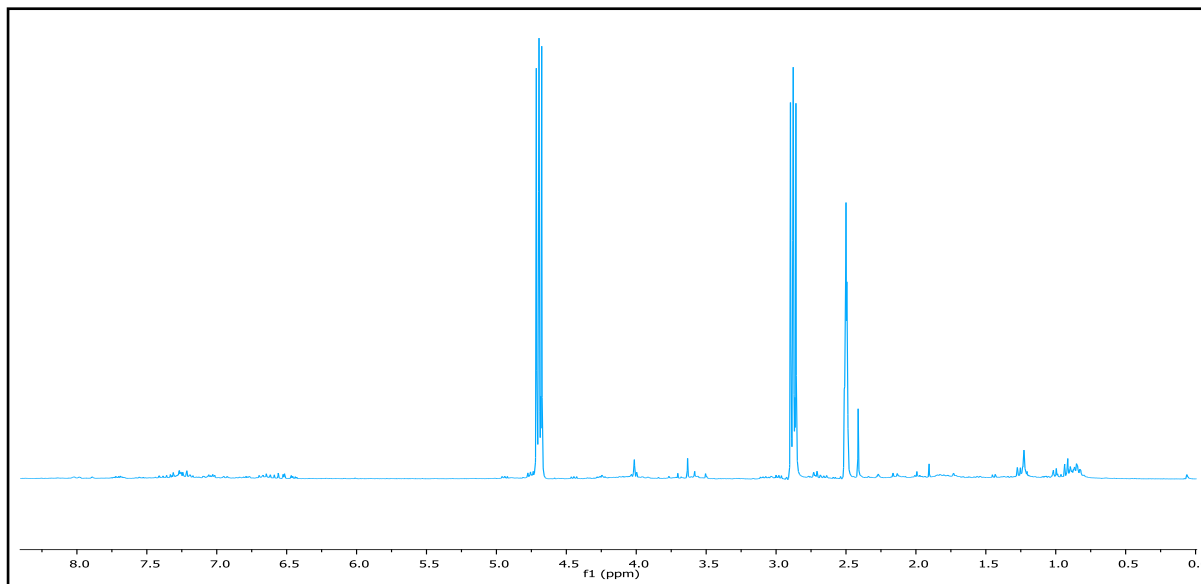
A comparação qualitativa da variação metabólica dos extratos brutos obtidos em escalas reduzida e ampliada também foi feita a partir da comparação dos seus espectros de RMN de ^1H (**Figuras 12-14**).

Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H -presat (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens* em escala reduzida.



Fonte: O autor (2016).

Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens* em escala ampliada.

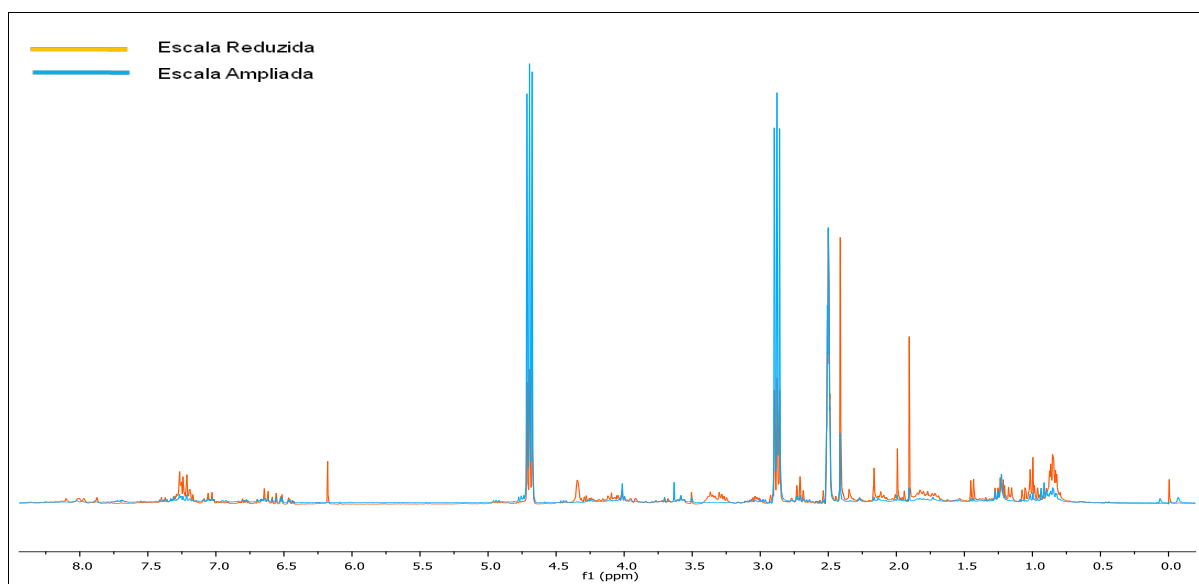


Fonte: O autor (2016).

O aumento na produção da substância (t_r de aproximadamente 10 minutos) produzida majoritariamente no extrato bruto obtido em escala ampliada coincide com a intensificação dos sinais de RMN de ^1H em 2,9 ppm e 4,7 ppm. A produção desse

metabólito foi tão pronunciada que os demais sinais de ressonância foram praticamente suprimidos. Da mesma forma que foi evidenciado por CLAE, a análise por RMN evidenciou, pela comparação dos espectros de RMN de ^1H sobrepostos para os extratos brutos em escala reduzida e ampliada (**Figura 14**), que houve variação na produção metabólica do fungo.

Figura 14 - Sobreposição dos espectros de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) dos extratos brutos AcOEt dos metabólitos produzidos pelo fungo *Hypoxylon investiens* em escalas reduzida e ampliada.



Fonte: O autor (2016).

A investigação da atividade antifúngica dos extratos brutos, obtidos em escalas reduzida e ampliada, dos metabólitos produzidos pelo fungo *Hypoxylon investiens* mostrou forte atividade contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium cladosporioides*. No entanto, não foi evidenciada atividade anticolinesterásica, como mostrado na **Tabela 2**. Esses resultados indicam que, mesmo havendo variação sutil na produção metabólica dos dois extratos, essa variação foi irrelevante no que se refere ao potencial biológico da amostra, que se manteve fortemente ativa frente ao fungo fitopatogênico *C. cladosporioides*.

Tabela 2 - Resultados obtidos para atividades antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos, em escalas reduzida e ampliada, dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens*.

Amostra	Atividade Antifúngica	Anticolinesterásico
EAcOEt - escala reduzida ¹	***	-
EAcOEt - escala ampliada	***	-

¹ Resultado obtido por MEDINA (2014).

* fraca atividade, ** atividade moderada, *** forte atividade.

Nistatina foi utilizado como padrão positivo no ensaio antifúngico contra o fungo *C. Cladosporioides*.

Fisostigmina foi utilizado como padrão positivo no ensaio anticolinesterásico.

Fonte: O autor (2016).

Em relação aos ensaios citotóxicos, a única linhagem de célula tumoral em que os ensaios foram realizados em escalas reduzida e ampliada, podendo ser comparados diretamente, foi a linhagem HCT-116. Em virtude das amostras terem sido enviadas para o ensaio citotóxico em épocas diferentes, os ensaios dos extratos em escala reduzida e ampliada foram realizados com as linhagens tumorais que estavam disponíveis e, portanto, com diferentes linhagens de células, dificultando a comparação.

A comparação dos resultados dos ensaios realizados em escalas reduzida e ampliada (**Tabela 3**) mostrou que houve aumento da atividade do extrato bruto obtido em escala ampliada frente a linhagem tumoral HCT-116. Este resultado indica que a variação na produção metabólica no extrato bruto obtido em escala ampliada comparada ao obtido em escala reduzida ocorreu no sentido da produção de metabólitos ainda mais ativos (ou produção em maior quantidade das substâncias bioativas) frente a essa linhagem tumoral. O valor estimado em 75,7% expressa

resultado positivo, ou seja, o extrato bruto em escala ampliada foi considerado ativo frente a linhagem tumoral HCT-116.

Tabela 3 - Ensaio citotóxico dos extratos brutos, em escalas reduzida e ampliada, dos metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens*.

	HCT-116	OVCAR-8	SF-295	MCF-7
Amostra	Inibição média (%)	Inibição média (%)	Inibição média (%)	Inibição média (%)
EAcOEt (esc. red.) ¹	66,6 ± 2,8	55,4 ± 34,9	70,8 ± 1,5	nr
EAcOEt (esc. amp.)	75,7 ± 1,7	nr	nr	53,6 ± 0,4

¹ Resultado obtido por MEDINA (2014).

EAcOEt (esc.red.), extrato bruto obtido em escala reduzida.

EAcOEt (esc.amp.), extrato bruto obtido em escala ampliada.

Amostras com percentual de inibição ≥ 75,0 são consideradas ativas.

HCT-116, carcinoma de cólon; OVCAR-8, carcinoma de ovário; SF-295, glioblastoma humano; MCF-7, adenocarcinoma de mama metastático.

nr, não realizado.

Doxorrubicina foi utilizado como padrão positivo.

Fonte: O autor (2016).

4.2. Fracionamento do Extrato Bruto, Escala Ampliada, por Cromatografia de Exclusão

O extrato bruto, obtido em escala ampliada, foi submetido a um fracionamento em Sephadex[®] LH-20, como descrito no item 3.2.4. O trabalho inicial de fracionamento foi desenvolvido por essa modalidade de cromatografia por alguns motivos: o fungo ainda não havia sido identificado e, por isto, não foi possível uma revisão cuidadosa da literatura com o intuito de conhecer melhor os constituintes e a complexidade da amostra a ser trabalhada; por se tratar de um mecanismo de exclusão, é possível conseguir frações compostas por substâncias com polaridades e, conseqüentemente, tempos de retenção completamente distintos, o que torna sua otimização cromatográfica menos trabalhosa, facilitando o isolamento daquelas substâncias de interesse; por não envolver (teoricamente) forças de interação molecular de nenhum

tipo entre o soluto e a fase estacionária (como ocorre nos mecanismos de adsorção ou partição) o risco de perdas de material é minimizado.

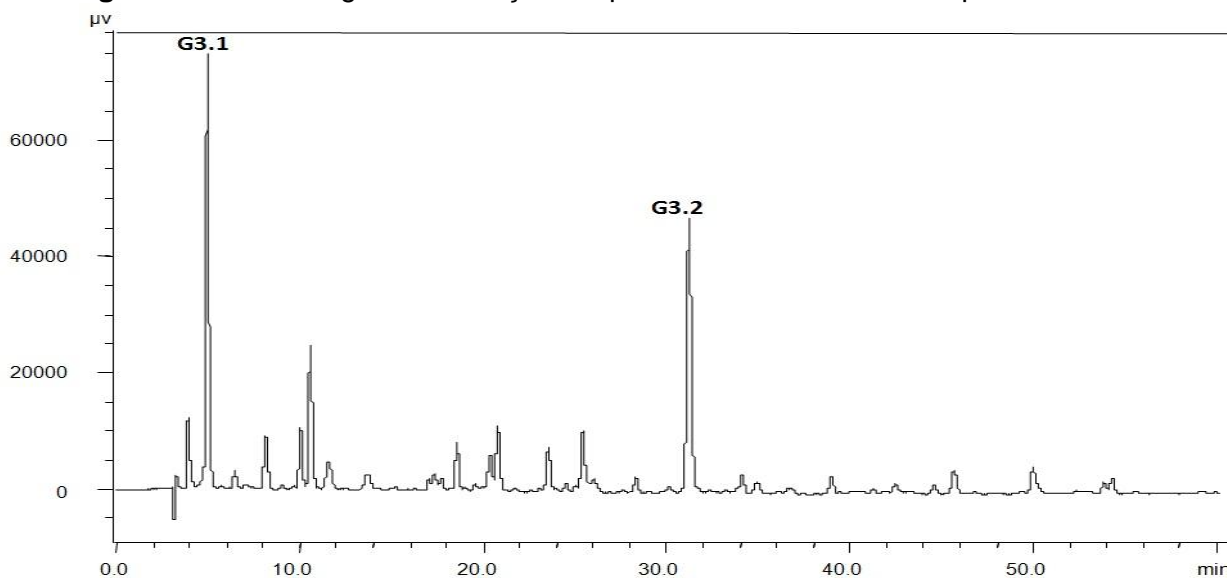
Desta forma, foram feitas duas aplicações: uma com aproximadamente 2,0 g, sendo coletadas 98 frações e outra com aproximadamente 1,2 g, onde foram coletadas 85 frações. As análises qualitativas dos perfis cromatográficos das frações eluídas da CC com Sephadex[®] foram feitas por CCD comparativa (item 2.2.8) e aquelas frações de perfil cromatográfico similar foram reunidas, resultando em 6 frações, denominadas de **G1-G6**.

4.3. Estudo da Fração **G3**: Isolamento dos Compostos Majoritários

Para realização dos ensaios antifúngico e anticolinesterásico, aproximadamente 3,0 mg de cada fração foram transferidos para *ependorfs* devidamente rotulados e enviados para o Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Fisiologia e Bioquímica das Plantas, sob supervisão da Profa. Dra. Maria Cláudia Young Marx e os ensaios foram realizados como descrito nos itens 3.2.11 e 3.2.12. Da mesma forma, para o ensaio citotóxico (item 3.2.13), 3,0 mg de cada fração foram enviados para o Laboratório de Bioprospeccção e Biotecnologia Marinha - LABBMAR, da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob supervisão do Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Enquanto os ensaios estavam sendo realizados, a fração **G3** foi investigada quimicamente. Um gradiente exploratório da fração foi obtido, como mostrado na **Figura 15**.

Figura 15 - Cromatograma da fração **G3** proveniente da CC com Sephadex[®] LH-20.



Coluna Analítica Phenomenex[®] Luna C18, (250 x 4,60 mm), d.p. de 5 μm ; Solvente A: H_2O + TFA (0,01%); Solvente B: MeOH + TFA (0,01%). Gradiente exploratório de 5-100% de B em 60 minutos de desenvolvimento; vazão de 1,00 mL min^{-1} ; $\lambda = 295 \text{ nm}$.

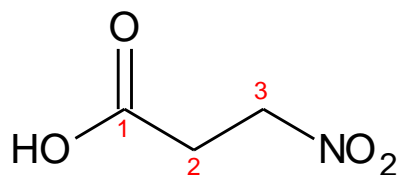
Fonte: O autor (2016).

Uma alíquota da fração **G3** (605,4 mg) foi submetida ao fracionamento, como descrito no item 3.2.5, e as substâncias **G3.1** e **G3.2** (t_r de 5,01 e t_r de 31,17 minutos, respectivamente) foram isoladas, sendo obtidos 304,5 mg da substância **G3.1** e 1,9 mg da substância **G3.2**.

4.3.1. Identificação Estrutural da Substância **G3.1**

Técnicas de RMN uni e bidimensionais em conjunto com a análise de espectrometria de massas de alta resolução permitiram identificar a estrutura da substância **G3.1** como sendo o ácido 3-nitropropanóico (**Figura 16**).

Figura 16 - Ácido 3-nitropropanóico.

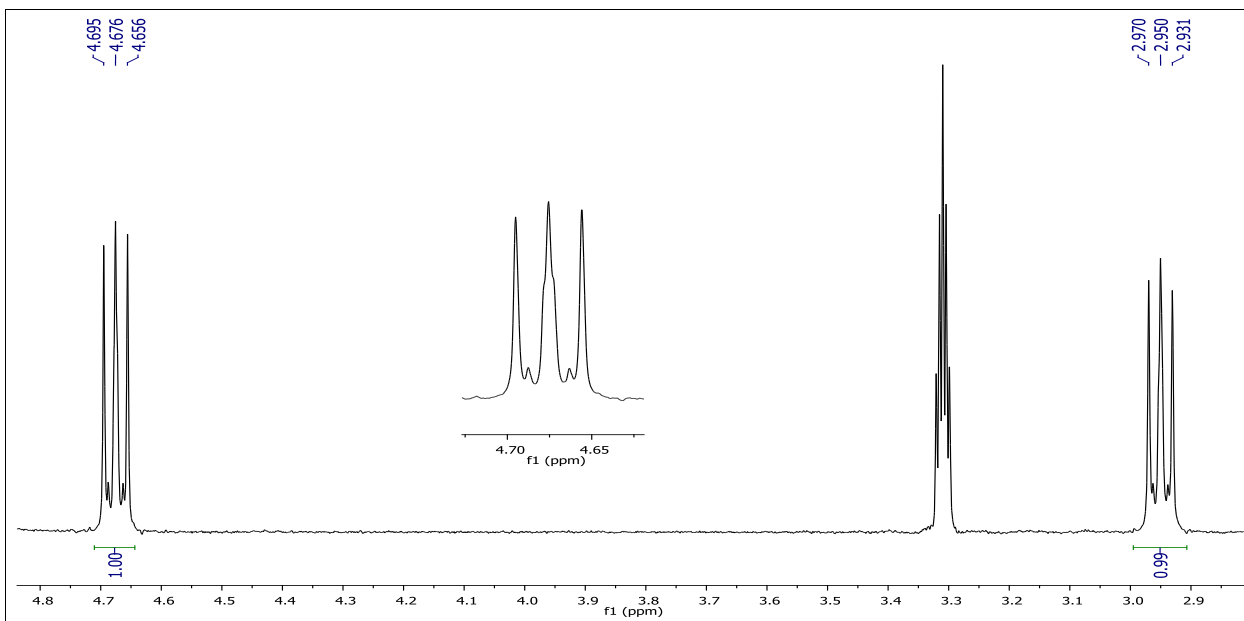


Fonte: O autor (2016).

Essa substância foi relatada na literatura e, por isto, a comparação dos dados espectrais obtidos com aqueles já descritos (FLORES et al., 2013; CHOMCHEON et al., 2005) permitiu sua identificação.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 17**) da substância **G3.1** apresenta apenas 2 sinais sendo dois tripletos ($^3J_{H-H} = 6,0$ Hz), um em 2,95 ppm e outro em 4,67 ppm, este último característico de hidrogênio geminal a grupo nitro, altamente desblindado pelo efeito fortemente retirador de densidade eletrônica do grupo NO_2 , aparecendo na região de 4,1-4,4 ppm (PAVIA et al., 2010).

Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G3.1** em MeOD, 300 MHz.

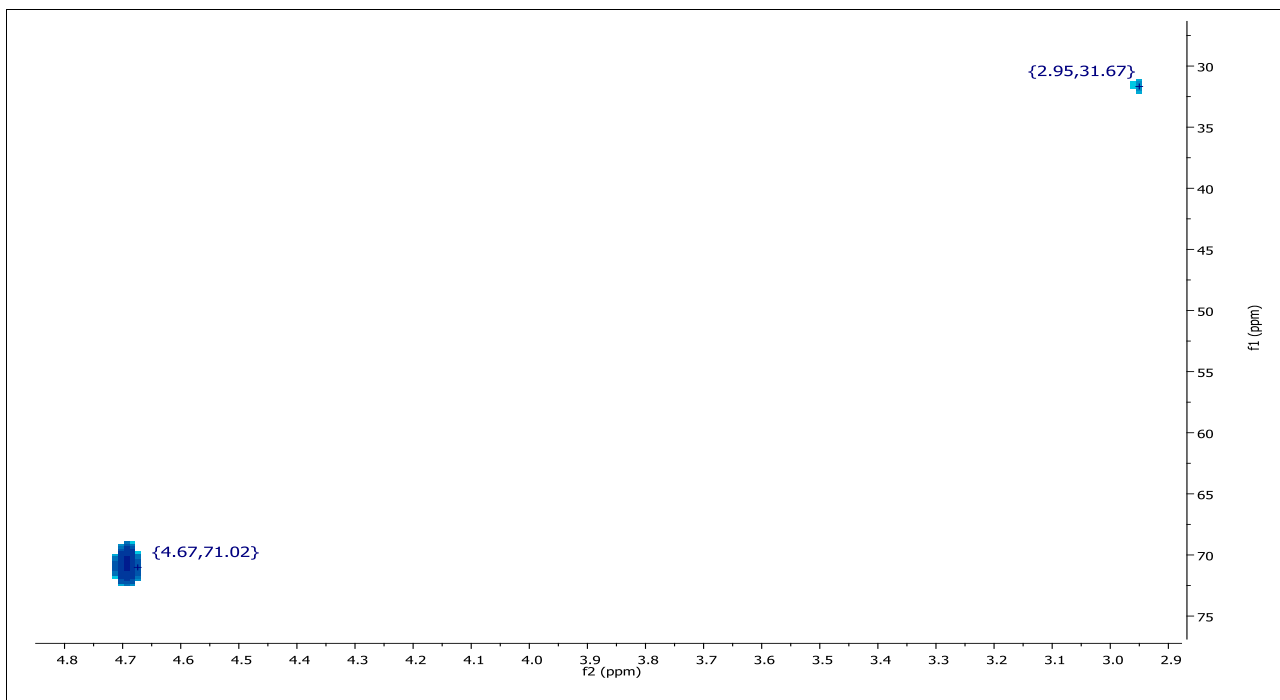


Fonte: O autor (2016).

A constante de acoplamento $^3J_{\text{H-H}}$ de 6,0 Hz entre os dois tripletos em 2,95 e 4,67 ppm e o ligeiro desdobramento das suas multiplicidades são característicos do ácido 3-nitropropanóico. Os hidrogênios metilênicos, marcados na **Figura 16** como **2** e **3**, não possuem equivalência química nem magnética. No entanto, a interação eletrostática existente entre o nitrogênio eletrodeficiente do grupo nitro e a densidade eletrônica dos elétrons não ligantes do átomo de oxigênio da carbonila não é forte o suficiente para impedir a rotação em torno da ligação σ entre os carbonos **2** e **3**, fazendo com que os ambientes químicos se aproximem muito da equivalência, sendo impossível distinguir esses sinais nas condições experimentais realizadas. Isso justifica a forma ligeiramente desdobrada do tripleto ampliado na **Figura 17**.

Pela análise das correlações no mapa de contorno de HSQC (**Figura 18**) dessa substância foram atribuídos os deslocamentos químicos dos carbonos metilênicos anteriormente discutidos.

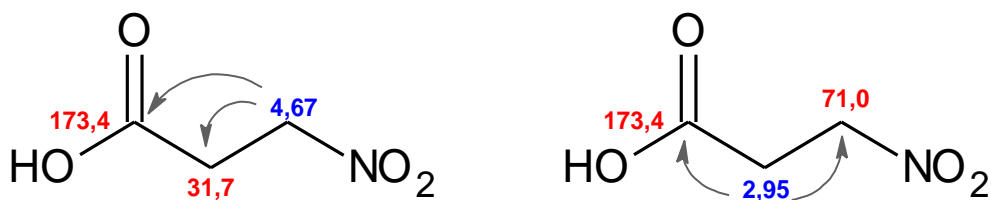
Figura 18 - Mapa de contorno de HSQC da substância **G3.1** (7,1 Tesla, MeOD).



Fonte: O autor (2016).

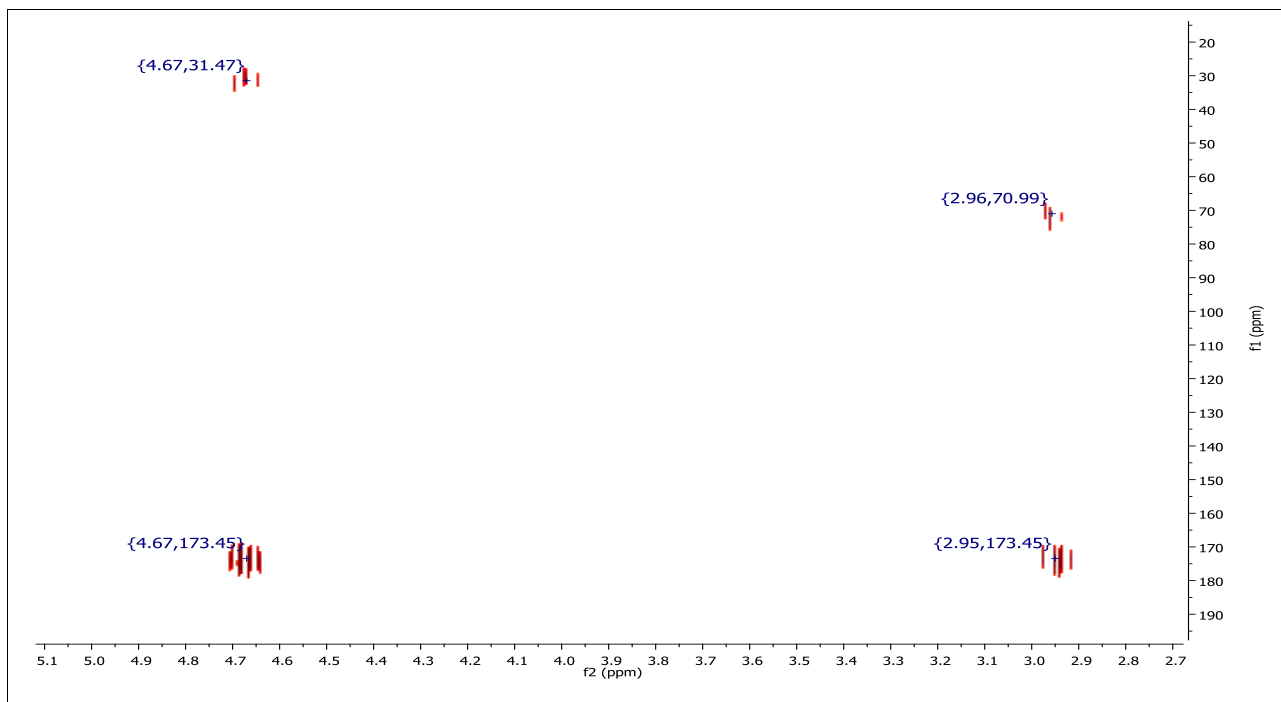
As correlações entre hidrogênio e carbono a 2J e 3J exibidas na **Figura 19** foram observadas no mapa de contorno de HMBC (**Figura 20**) salientando-se a presença de correlações com um carbono em 173,5 ppm, característico de carbonila de ácido carboxílico, o que corrobora a estrutura proposta para a substância **G3.1**.

Figura 19 - Correlações entre hidrogênios e carbonos a 2 ou 3 ligações.



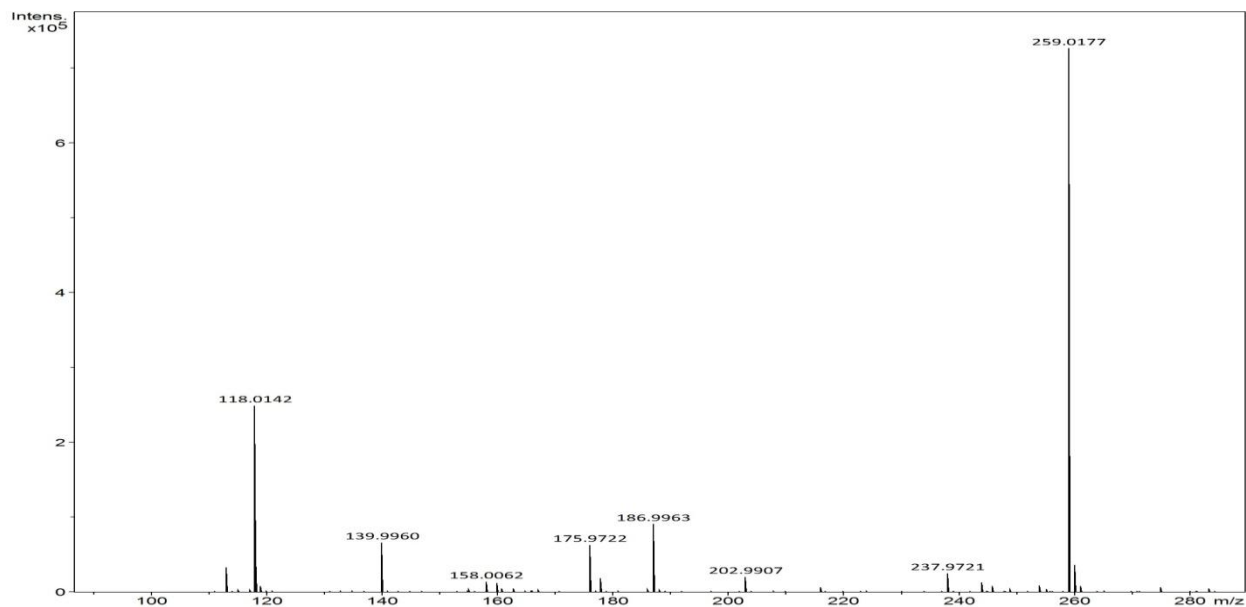
Fonte: O autor (2016).

Figura 20 - Mapa de contorno de HMBC da substância **G3.1** (7,1 Tesla, MeOD).



Fonte: O autor (2016).

O espectro de massas ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) (**Figura 21**), evidenciou o íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 118,0142, correspondente à fórmula molecular $C_3H_5NO_4$, confirmando a identidade da substância proposta.

Figura 21 - Espectro de massas por ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) da substância **G3.1**.

Fonte: O autor (2016).

A comparação dos dados de RMN obtidos experimentalmente com aqueles encontrados na literatura confirmam a identidade da substância proposta (**Tabela 4**), bem como o espectro de massas ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) da substância **G3.1** acusando o pico no espectro de massas de alta resolução com m/z $[M-H]^-$ 118,0142, enquanto que o valor obtido por Chomcheon et al. (2012) foi de m/z $[M-H]^-$ 118,0143.

Tabela 4 - Comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C obtidos experimentalmente para a substância **G3.1** com dados da literatura para o ácido 3-nitropropanóico.

Posição	Experimental		FLORES et al. 2013	
	$\delta^{13}C$	δ^1H (mult., J/Hz)	$\delta^{13}C$	δ^1H (mult., J/Hz)
1	173,4 (CO)	-	175,8 (CO)	-
2	31,7 (CH ₂)	2,95 (t, 6,0)	33,8 (CH ₂)	2,84 (t, 6,4)
3	71,0 (CH ₂)	4,67 (t, 6,0)	72,2 (CH ₂)	4,64 (t, 6,3)

*ambos os dados foram obtidos em MeOD.

Fonte: O autor (2016).

4.4. Resultado dos Ensaio Biológicos do Extrato Bruto dos Metabólitos Produzidos em Escala Ampliada por *H. investiens*, das Frações **G1-G6** e do Ácido 3-nitropropanóico

O resultado dos ensaios antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico do extrato bruto AcOEt dos metabólitos produzidos em escala ampliada por *H. investiens* e das suas frações, **G1-G6**, obtidas por cromatografia por exclusão, bem como do ácido 3-nitropropanóico (3-NPA) são apresentados nas **Tabelas 5 e 6**.

A fração **G5** mostrou-se ativa frente as linhagens testadas HCT-116 e MCF-7, enquanto as frações **G4** e **G6** mostraram-se ativas frente apenas a linhagem HCT-116, apresentando seletividade contra essa linhagem tumoral.

Tabela 5 - Atividade citotóxica do extrato bruto AcOEt, obtido em escala ampliada, das frações **G1-G6** e do ácido 3-nitropropanóico.

Amostra	HCT-116		MCF-7	
	5 µg/mL	50 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL
	Inibição média (%)	Inibição média (%)	Inibição média (%)	Inibição média (%)
G6	8,1 ± 0,6	99,4 ± 0,7	12,6 ± 0,9	37,9 ± 15,1
G5	9,9 ± 0,1	104,8 ± 0,1	21,3 ± 1,1	84,5 ± 2,2
G4	2,0 ± 0,7	97,3 ± 2,1	-7,8 ± 17,7	53,7 ± 20,1
G3	10,8 ± 2,0	50,3 ± 1,7	10,3 ± 20,3	1,6 ± 6,9
G2	6,5 ± 1,6	34,7 ± 1,1	20,0 ± 2,4	35,6 ± 1,0
G1	3,2 ± 0,2	19,0 ± 1,1	11,9 ± 8,1	29,6 ± 0,7
3-NPA	9,8 ± 2,8	31,8 ± 0,5	3,1 ± 11,6	2,7 ± 11,5
EAcOEt (esc. amp.)	5,8 ± 1,4	75,7 ± 1,7	8,0 ± 10,5	53,6 ± 0,4

EAcOEt (esc. amp.), extrato bruto obtido em escala ampliada.

3-NPA, ácido 3-nitropropanóico.

Amostras com percentual de inibição ≥ 75,0 são consideradas ativas.

HCT-116, carcinoma de cólon humano; MCF-7, adenocarcinoma de mama metastático.

Doxorrubicina foi utilizado com padrão positivo.

Fonte: O autor (2016).

Em relação ao ensaio antifúngico, a fração que apresentou maior potencial contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foi a fração **G4**, mostrando-se fortemente ativa.

Tabela 6 - Atividades antifúngica e anticolinesterásica do extrato bruto AcOEt, obtido em escala ampliada, das frações **G1-G6** e do ácido 3-nitropropanóico.

Amostra	3-NPA	EAcOEt (esc. amp.)	G1	G2	G3	G4	G5	G6	Padrão
<i>C. cladosporioides</i>	i	***	i	**	**	***	*	**	***
<i>C. sphaerospermum</i>	i	***	i	i	*	***	**	**	***
Ensaio anticolinesterásico	**	*	*	i	i	i	i	i	***

*fraca atividade, **atividade moderada, ***forte atividade, i = inativo.

EAcOEt (esc. amp.), extrato bruto obtido em escala ampliada.

3-NPA, ácido 3-nitropropanóico.

Nistatina foi utilizado como padrão positivo nos ensaios antifúngicos.

Fisostigmina foi utilizado como padrão positivo no ensaio anticolinesterásico.

Fonte: O autor (2016).

4.5. Estudo da Fração **G4**

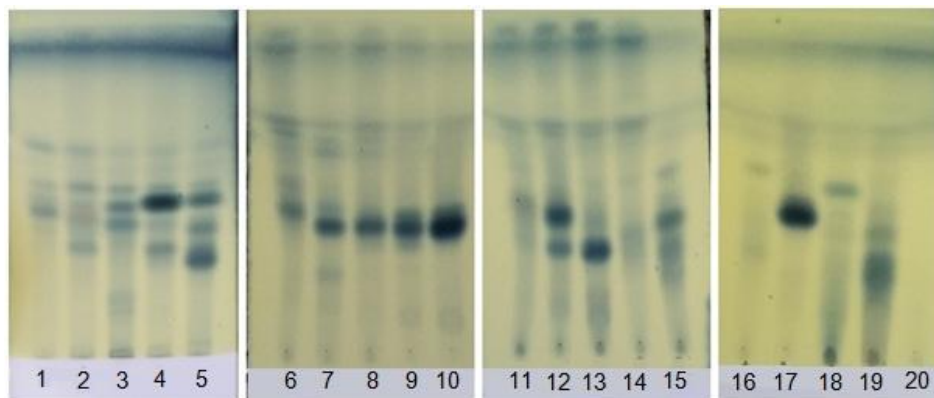
O ácido 3-nitropropanóico, isolado em grande quantidade da fração **G3**, tornou-se um grande inconveniente nos processos de fracionamento e isolamento. A teoria da cromatografia por exclusão de tamanho prevê que moléculas grandes terão um caminho cromatográfico menor a percorrer e por isso eluirão primeiro em relação àquelas moléculas menores, que percorrerão, além do espaço intersticial, o espaço intrasticial (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). As diferenças relativas de velocidade e, portanto, o processo de separação cromatográfico acontece em virtude da existência de uma infinidade de caminhos diferentes a serem percorridos. Caso duas substâncias distintas (tamanhos consideravelmente diferentes) percorram o mesmo caminho cromatográfico (ou caminhos cromatográficos equivalentes), a separação cromatográfica não ocorrerá porque elas eluirão com a mesma velocidade. Probabilisticamente é um evento pouquíssimo provável. Isso é verdade desde que as populações dessas substâncias sejam aproximadamente equitativas (WU, 2004).

O ácido 3-nitropropanóico era o componente majoritário do extrato e os demais componentes ocorriam em quantidades significativamente menores. Assim, como a sua população era muito maior que a dos outros componentes e, também, por ele ser uma substância relativamente pequena e, que, portanto, tem uma grande mobilidade no meio cromatográfico, o caminho percorrido pelo ácido 3-nitropropanóico probabilisticamente foi o mesmo que o de uma infinidade de substâncias, sendo que a ocorrência desse evento pode ser expresso como uma dispersão normal centrada na fração **G3**, o que significa que essa fração encerra a maior quantidade dessa substância, sendo também possível encontrá-la em todas as outras (frações **G1**, **G2**, **G4**, **G5** e **G6**), em menor quantidade.

Uma alternativa para se isolar ou diminuir a quantidade do ácido 3-nitropropanóico na fração **G4** foi fazer uma partição líquido-líquido, como descrito no item 3.2.6. Foram obtidos 36,8 mg da fase orgânica, cujo perfil cromatográfico foi otimizado em CCDC com o intuito de se avaliar a diversidade química e a complexidade da amostra. A tentativa de isolamento dos metabólitos constituintes da fração foi feita por coluna aberta de sílica tipo *flash* (item 3.3.6), uma vez que a amostra não solubilizava em metanol e água em nenhuma proporção sendo, portanto, inapropriada para uso em modo reverso.

Nenhuma substância foi isolada aplicando essa técnica cromatográfica. Entretanto, a complexidade das subfrações foi reduzida, como mostrado na **Figura 22**.

Figura 22 - CCDC das subfrações **G4.1-G4.20** reunidas da fração **G4**.



Fonte: O autor (2016).

As subfrações de 1 a 5 foram eluídas em hexano:acetona (65:35 v/v), de 6 a 10 foram eluídas em hexano:acetona (35:65 v/v) e as subfrações de 11 a 20 foram eluídas em hexano:acetona:metanol (55:40:5 v/v/v), reveladas em ácido fosfomolibdico.

Futuramente será feito um cromatograma de íons totais utilizando CLAE-EM-ESI-QTOF (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas com Ionização Por Eletrospray e Analisadores em Série, Quadrupolo/Tempo de Vôo) de cada subfração. Uma vez obtido o espectro de massas de alta resolução de cada substância em mistura, as subfrações serão enviadas para ensaios biológicos. Aquelas que apresentarem potencial biológico frente a algum ensaio serão selecionadas para estudos futuros por desreplicação, a partir do *scale up* do extrato visando o isolamento dos metabólitos bioativos em maior quantidade.

As massas de cada subfração estão descritas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Massas das subfrações **G4.1-G4.20** reunidas da fração **G4**.

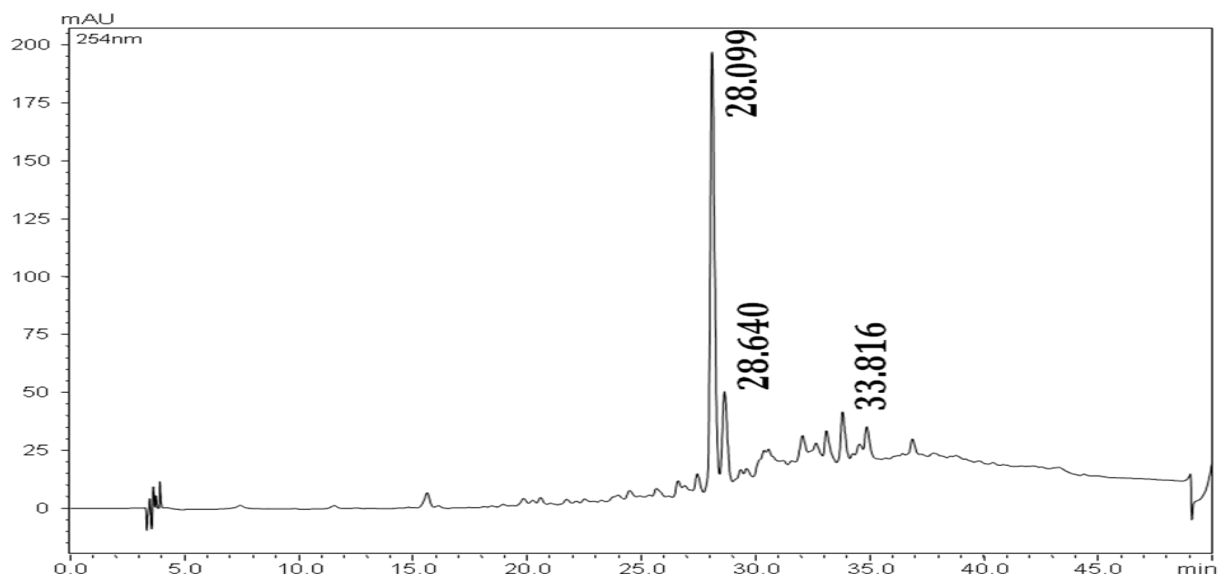
Subfração	Massa/mg	Subfração	Massa/mg
G4.1	1,1	G4.11	2,6
G4.2	1,9	G4.12	3,8
G4.3	1,1	G4.13	3,1
G4.4	1,7	G4.14	3,0
G4.5	1,7	G4.15	1,8
G4.6	1,4	G4.16	1,1
G4.7	0,9	G4.17	2,5
G4.8	1,4	G4.18	6,8
G4.9	0,5	G4.19	7,6
G4.10	0,9	G4.20	1,7

Fonte: O autor (2016).

4.6. Estudo da Fração **G5**: Isolamento dos Compostos Majoritários

Após a tentativa de isolamento dos metabólitos contidos na fração **G4** por coluna aberta, uma nova estratégia foi usada no isolamento dos compostos majoritários da fração **G5**. Foi feito um gradiente exploratório em CLAE analítico operando em modo reverso com o objetivo de se obter um perfil cromatográfico da amostra (**Figura 23**).

Figura 23 - Cromatograma representando o perfil cromatográfico, em modo reverso, da fração **G5** obtida do extrato bruto dos metabólitos produzidos em escala ampliada por *H. investiens*.

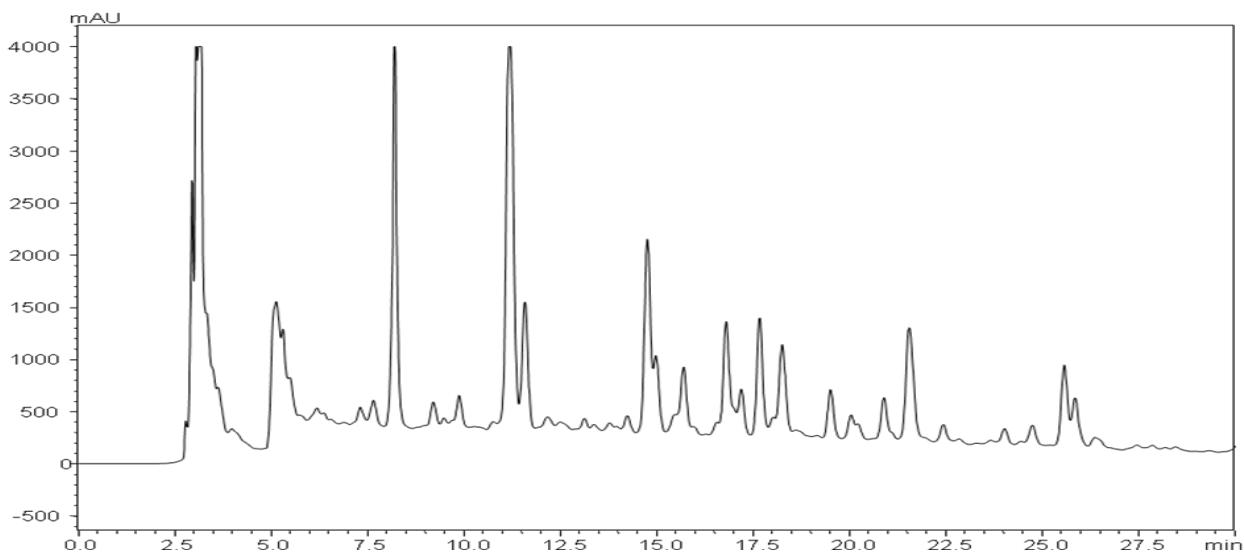


Coluna Analítica Phenomenex® Luna C18, (250 x 4,60 mm), d.p. de 5 μm ; Solvente A: H_2O ; Solvente B: ACN. Gradiente exploratório de 5-100% de B em 50min de desenvolvimento; vazão de 1,00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Fonte: O autor (2016).

Foram reservados 6 mg e destinados a ensaios biológicos. Após o *clean up* da amostra em cartucho de SPE, como descrito no item 3.2.10, restaram 25,5 mg da amostra que foram dissolvidos em 1,7 mL de solução $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (3:2) e analisados em CLAE com injeções de 150 μL . O cromatograma otimizado em coluna semipreparativa segue como mostrado na **Figura 24**.

Figura 24 - Cromatograma otimizado da fração **G5** em coluna semipreparativa.

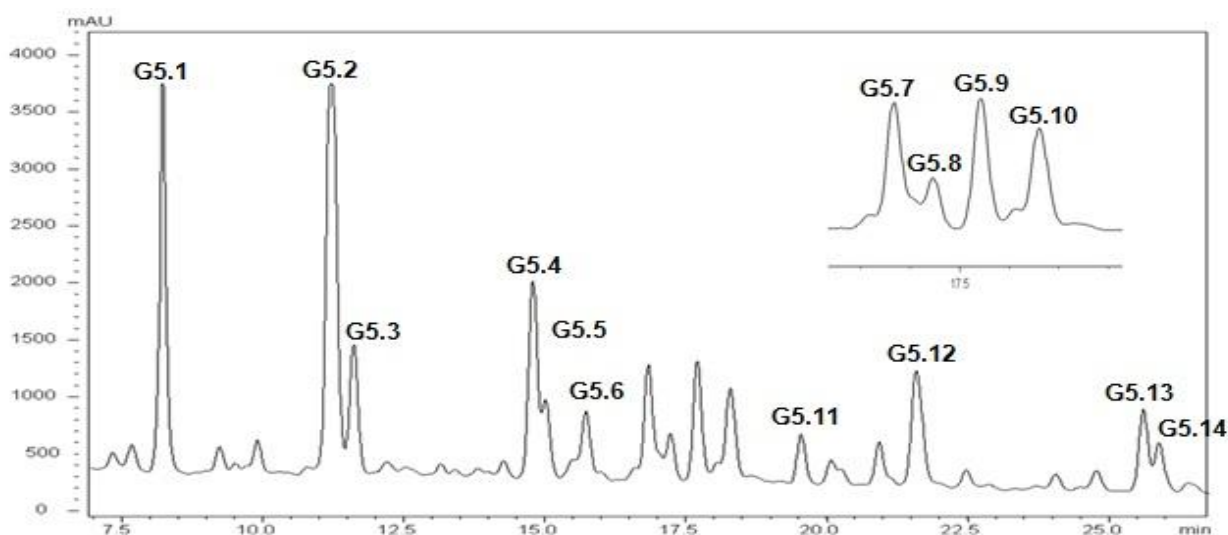


Coluna Analítica Phenomenex® Luna C18, (250 x 10,0 mm), d.p. de 5 μm ; Solvente A: H_2O ; Solvente B: ACN. Gradiente de 40-75% de B em 30 minutos de desenvolvimento; injeção de 150 μL ; vazão de 3,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Fonte: O autor (2016).

A **Figura 25** é uma ampliação da **Figura 24**, com as substâncias isoladas devidamente identificadas em seus respectivos picos cromatográficos.

Figura 25 - Substâncias isoladas da fração **G5**.



Os respectivos espectros no UV-Vis de cada pico identificado no cromatograma encontram-se na seção **Material Complementar (1-2)**

Fonte: O autor (2016).

Da fração **G5** foi possível isolar 14 substâncias, cujas massas estão descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Substâncias isoladas da fração **G5** e suas respectivas massas.

Substância	Massa/mg	Substância	Massa/mg
G5.1	0,7	G5.8	0,3
G5.2	1,2	G5.9	0,5
G5.3	0,3	G5.10	0,3
G5.4	0,7	G5.11	0,6
G5.5	0,3	G5.12	0,4
G5.6	0,2	G5.13	nd
G5.7	0,6	G5.14	nd

nd = não determinado

Fonte: O autor (2016).

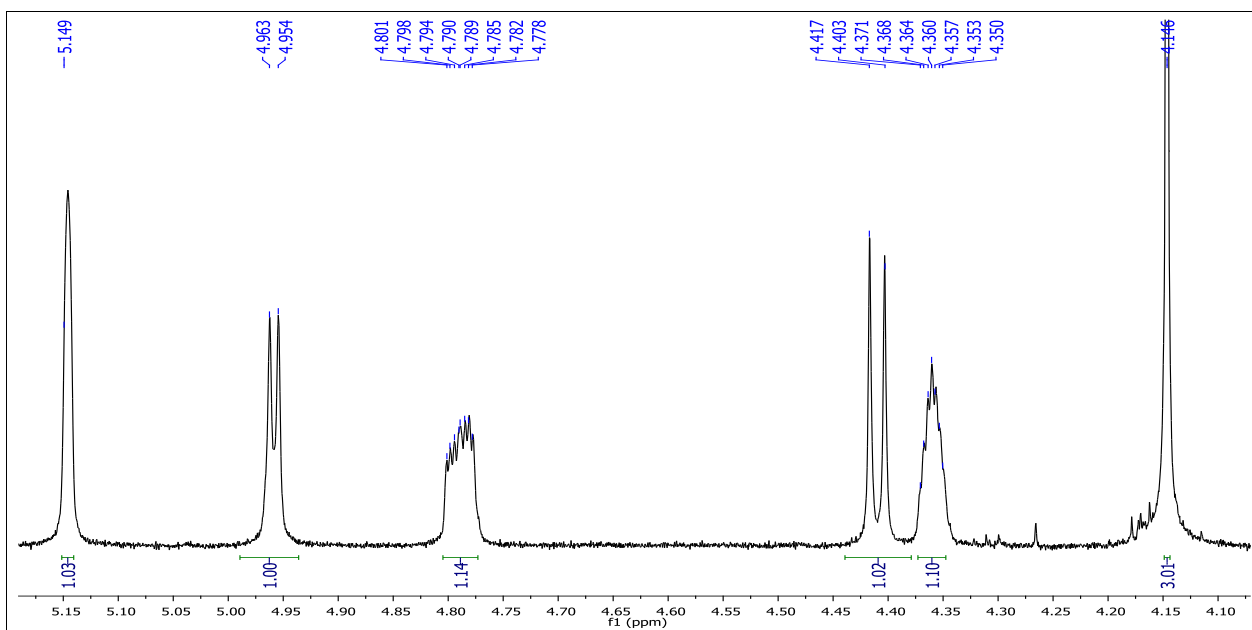
4.6.1. Elucidação Estrutural da Substância **G5.2**

Conforme descrito no item 4.6, os procedimentos cromatográficos realizados com a fração **G.5** permitiram o isolamento de 14 substâncias (**Tabela 8**). Dentre estas substâncias, a **G5.2** foi submetida às análises espectroscópicas e espectrométricas, visando a sua elucidação estrutural. Foram realizados experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais bem como análise por espectrometria de massas de alta resolução, utilizando-se ionização branda por *electrospray* no modo negativo (ESI-MS).

O espectro de RMN de ^1H da substância **G5.2** (**Figura 26**) apresentou sinais na região de 6,44 a 8,01 ppm, indicando a presença de hidrogênios aromáticos. A integração desses sinais indicou a presença de oito hidrogênios aromáticos e uma hidroxila (**Figura 27**).

Ainda neste espectro, observaram-se sinais de hidrogênios alifáticos, cujos deslocamentos químicos na região de 4,25 a 5,15 ppm indicavam a presença de hidrogênios alifáticos muito desprotegidos, provavelmente ligados a carbonos unidos a heteroátomos (carbono hidroximetínico) ou a regiões altamente anisotrópicas (**Figura 28**). O sinal em 4,14 ppm integrando para 3 hidrogênios indicou a presença de uma metoxila e na região mais protegida, observou-se um sinal de hidrogênios metilênicos, próximo de 2 ppm.

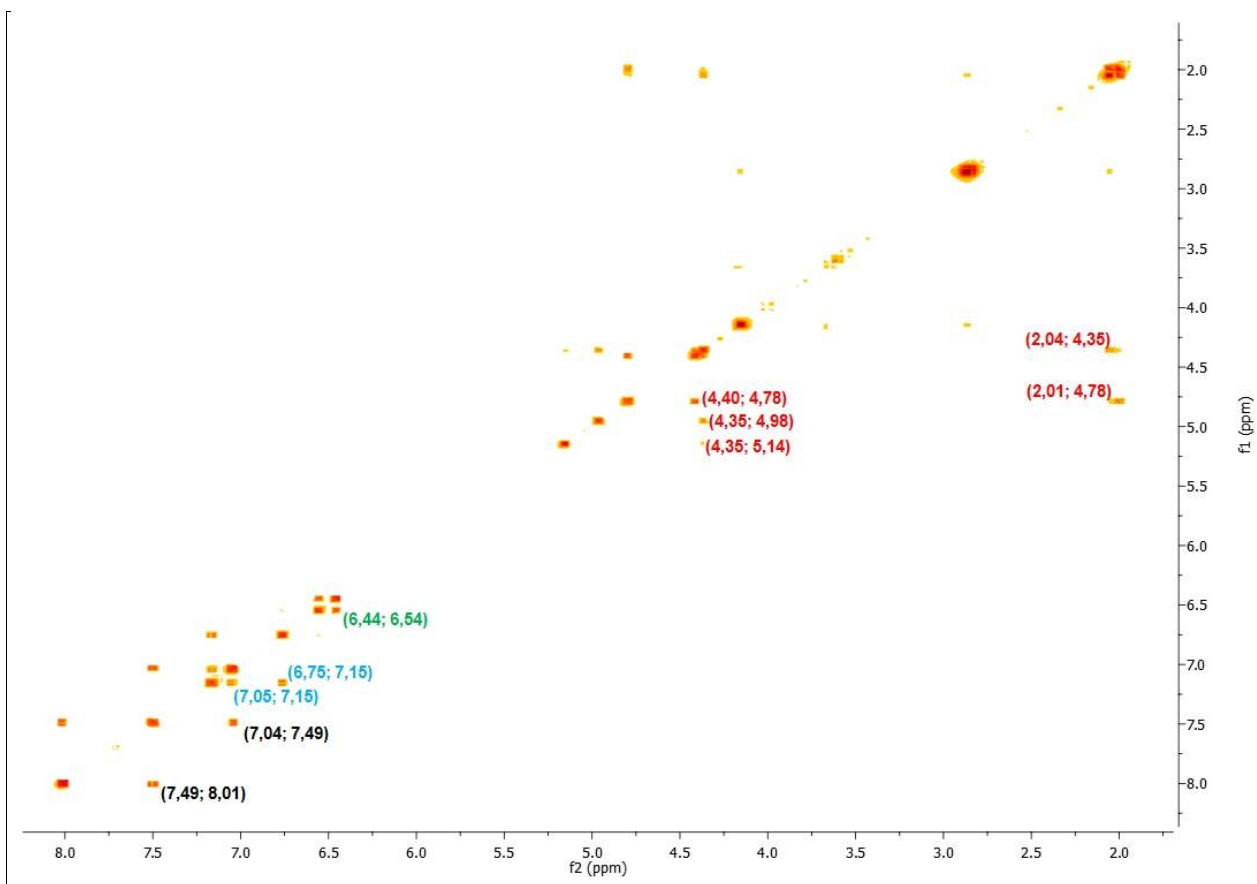
Figura 28 - Ampliação na região de 4,10-5,20 ppm do espectro de RMN ^1H da substância **G5.2**.



Fonte: O autor (2016).

Através da análise da multiplicidade dos sinais dos hidrogênios aromáticos e alifáticos no espectro de RMN de ^1H (**Figura 26**) e da análise do espectro de COSY ^1H - ^1H (**Figura 29**), foi possível determinar a existência de 3 sistemas de *spin* de hidrogênios aromáticos diferentes constituídos por anéis contendo 3, 3 e 2 hidrogênios, e de 1 sistema de *spin* de hidrogênios alifáticos, constituído por 5 hidrogênios (**Figura 30**). Essas informações foram confirmadas através da análise de diversos espectros TOCSY-1D (**Material Complementar 3-5**).

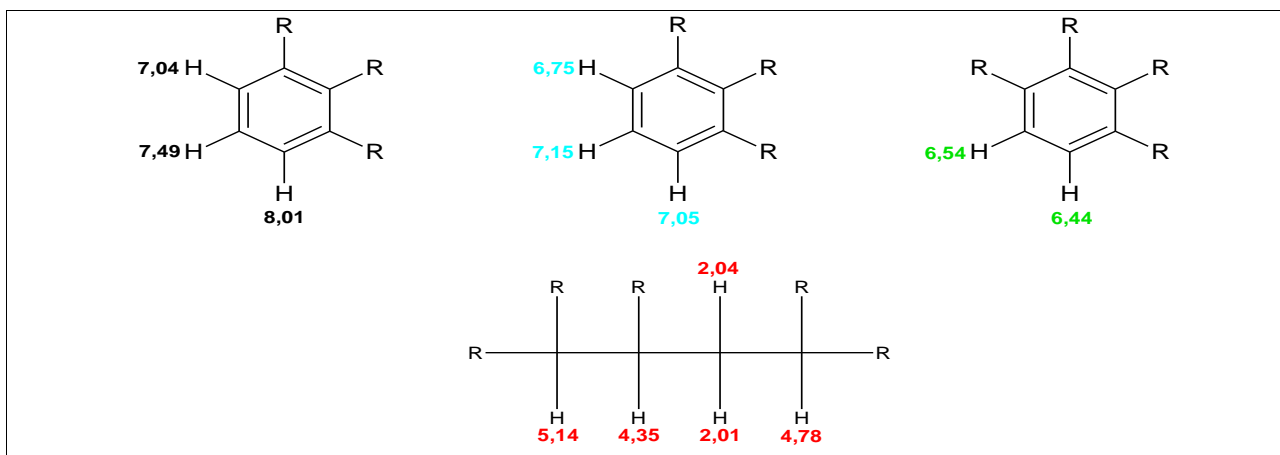
Figura 29 - Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância **G5.2** em acetona- d_6 , 600 MHz..



Aqueles pares ordenados de mesma cor correspondem a acoplamentos de hidrogênios no mesmo sistema de spin.

Fonte: O autor (2016).

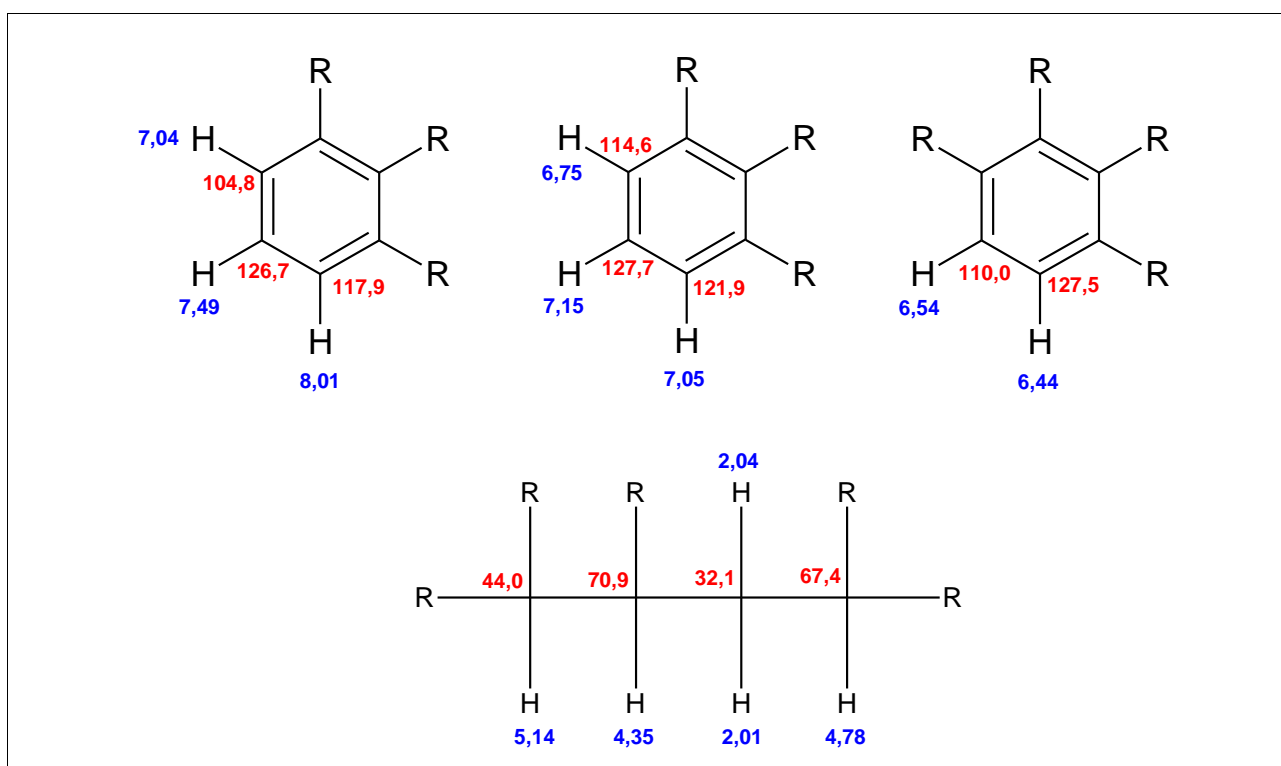
Figura 30 - Sistemas de hidrogênios aromáticos e alifático da substância **G5.2**.



Fonte: O autor (2016).

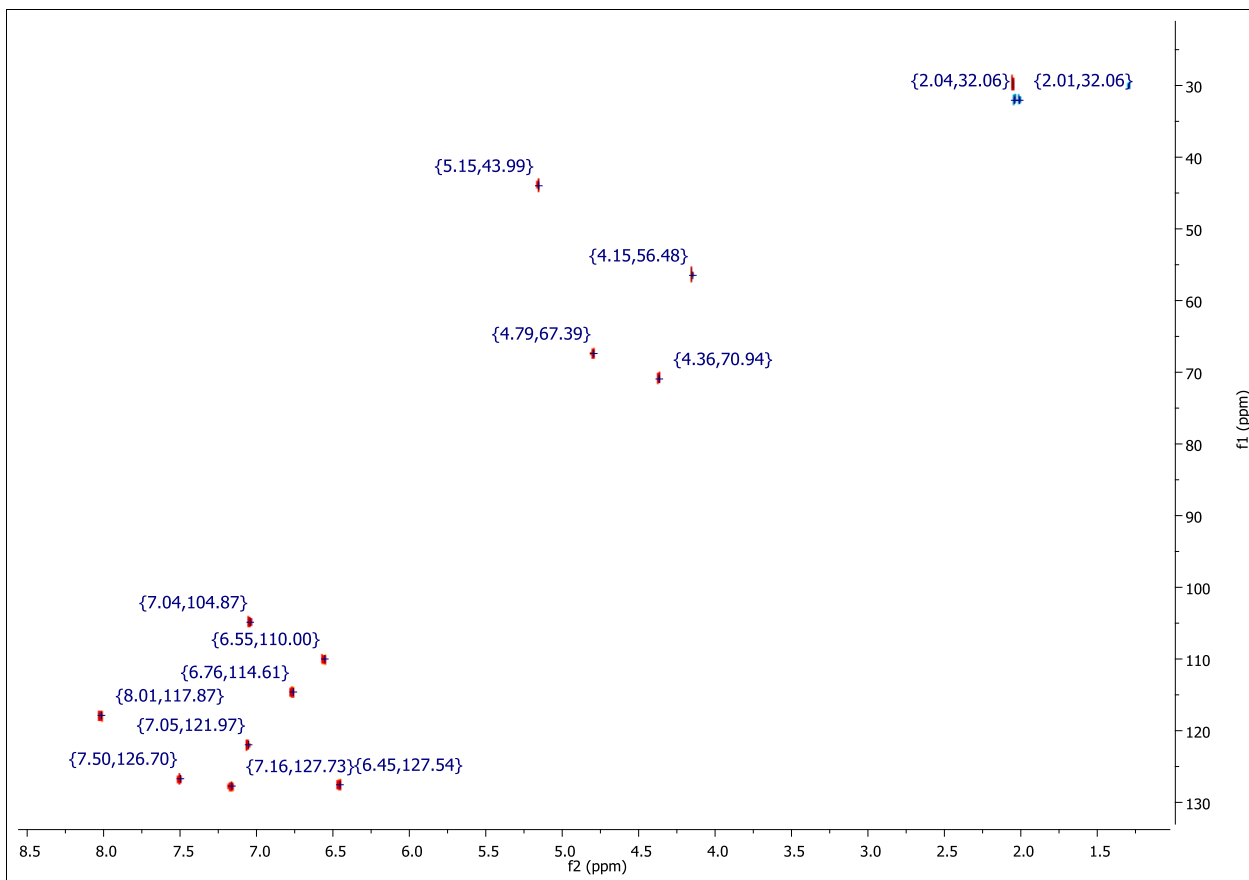
Uma vez identificados os hidrogênios pertencentes aos mesmos sistemas de *spin*, atribuiu-se os deslocamentos químicos dos respectivos carbonos ligados a esses hidrogênios (**Figura 31**) através da análise do mapa de contorno de HSQC (**Figura 32**). Também pela análise deste mapa de contorno e do espectro de RMN de ^1H (**Figura 26**), verificou-se que os sinais em 4,40, 4,98, 7,99 e 9,40 ppm não possuíam correlação entre hidrogênio e carbono (**Figura 32**), evidenciando que esses hidrogênios não estavam ligados a carbono. Assim, eles foram atribuídos a hidrogênios de grupos hidroxila. O hidrogênio atribuído ao sinal em 4,14 ppm correlacionava com o carbono com o sinal em 56,5 ppm, confirmando a presença de uma metoxila na estrutura desta substância.

Figura 31 - Correlações observadas no mapa de contorno de HSQC da substância **G5.2**.



Fonte: O autor (2016).

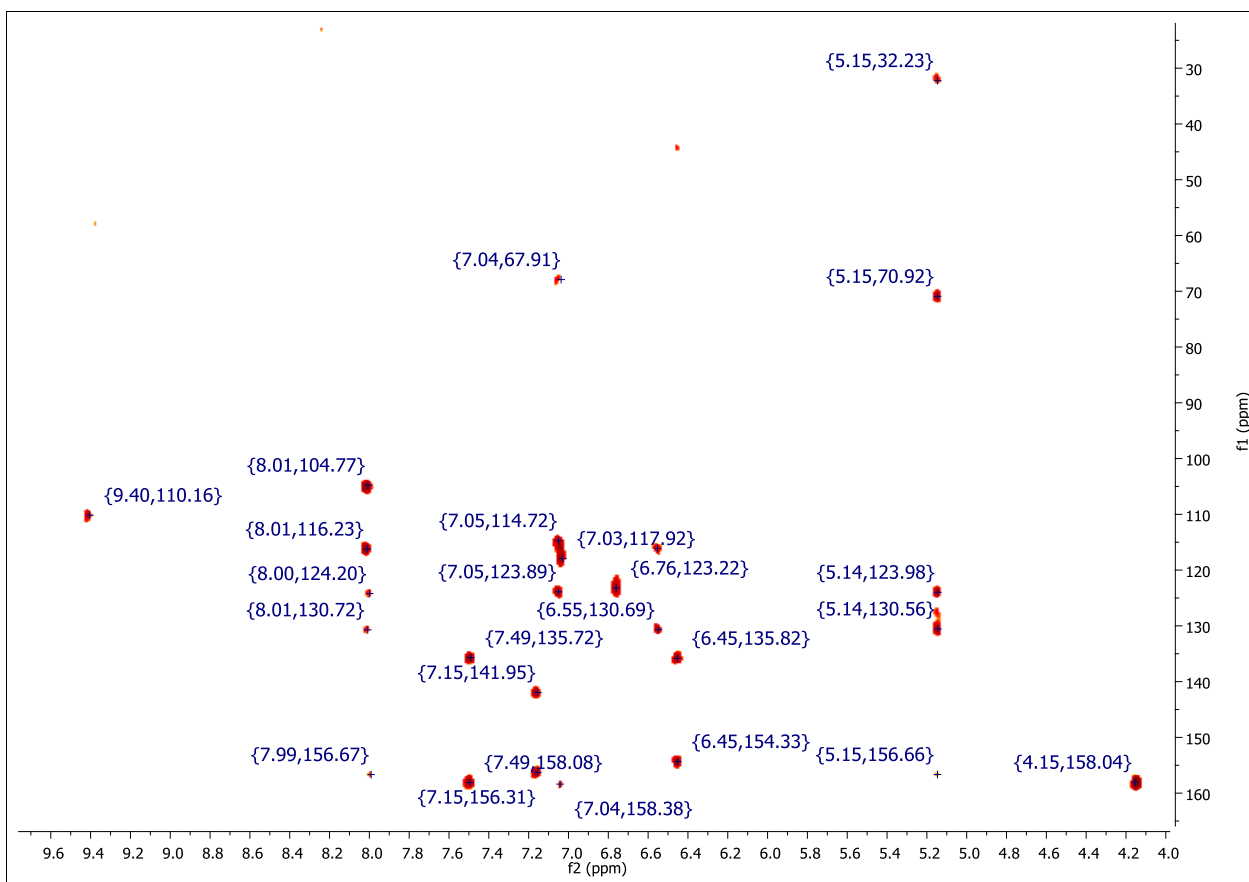
Figura 32 - Mapa de contorno de HSQC da substância **G5.2** (14,1 Tesla, acetona- d_6).



Fonte: O autor (2016).

As correlações a 2J e 3J entre hidrogênio e carbono observadas no mapa de contorno de HMBC (**Figura 33**) permitiram a atribuição dos sinais dos carbonos quaternários e, principalmente, da ordem de conectividade dos átomos nos sistemas de *spins* para a substância **G5.2**.

Figura 33 - Mapa de contorno de HMBC da substância **G5.2** (14,1 Tesla, acetona- d_6).

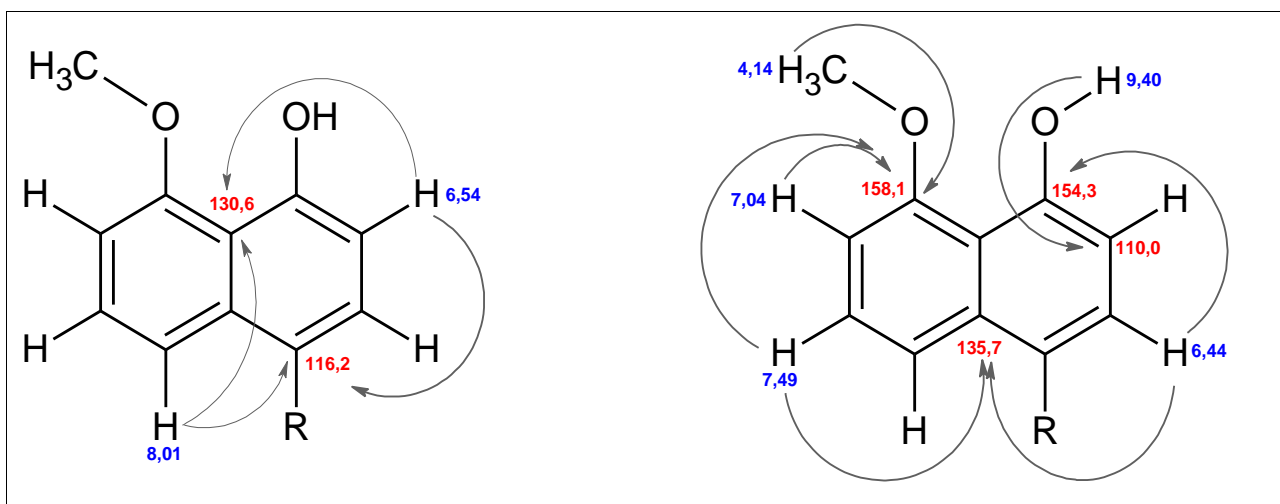


Fonte: O autor (2016).

A junção do anel aromático contendo o sistema de 3 hidrogênios em 8,01, 7,49 e 7,04 ppm, com o anel aromático com 2 hidrogênios em 6,54 e 6,44 ppm, foi realizada através das correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (**Figura 33**) mostradas na **Figura 34**. O sinal em 116,2 ppm foi atribuído ao carbono quaternário C-1' através de sua correlação com H-8' e H-3' (numeração na **Figura 36**), em 8,01 e 6,54 ppm, respectivamente. Ambos hidrogênios também correlacionaram com um carbono quaternário em 130,6 ppm, o qual foi atribuído a C-5'. Os hidrogênios associados aos sinais em 6,44 e 7,49 ppm, pertencentes a sistemas de *spins* diferentes, correlacionaram com um mesmo carbono quaternário, com sinal em 135,7 ppm, o qual foi atribuído a C-8'a. O hidrogênio atribuído ao sinal em 7,49 ppm correlacionou ainda com carbono quaternário com sinal em 158,1 ppm, que também correlacionava com os hidrogênios metoxílicos associados ao sinal em 4,14 ppm e com H-6', com sinal em

7,04 ppm. Adicionalmente, através da correlação entre o hidrogênio atribuído ao sinal em 6,44 ppm e o carbono quaternário com sinal em 154,3 ppm, pode-se atribuir a posição da hidroxila no carbono 4'.

Figura 34 - Correlações importantes de HMBC que permitiram propor as sub-estruturas associadas a dois sistemas de *spin* aromáticos.



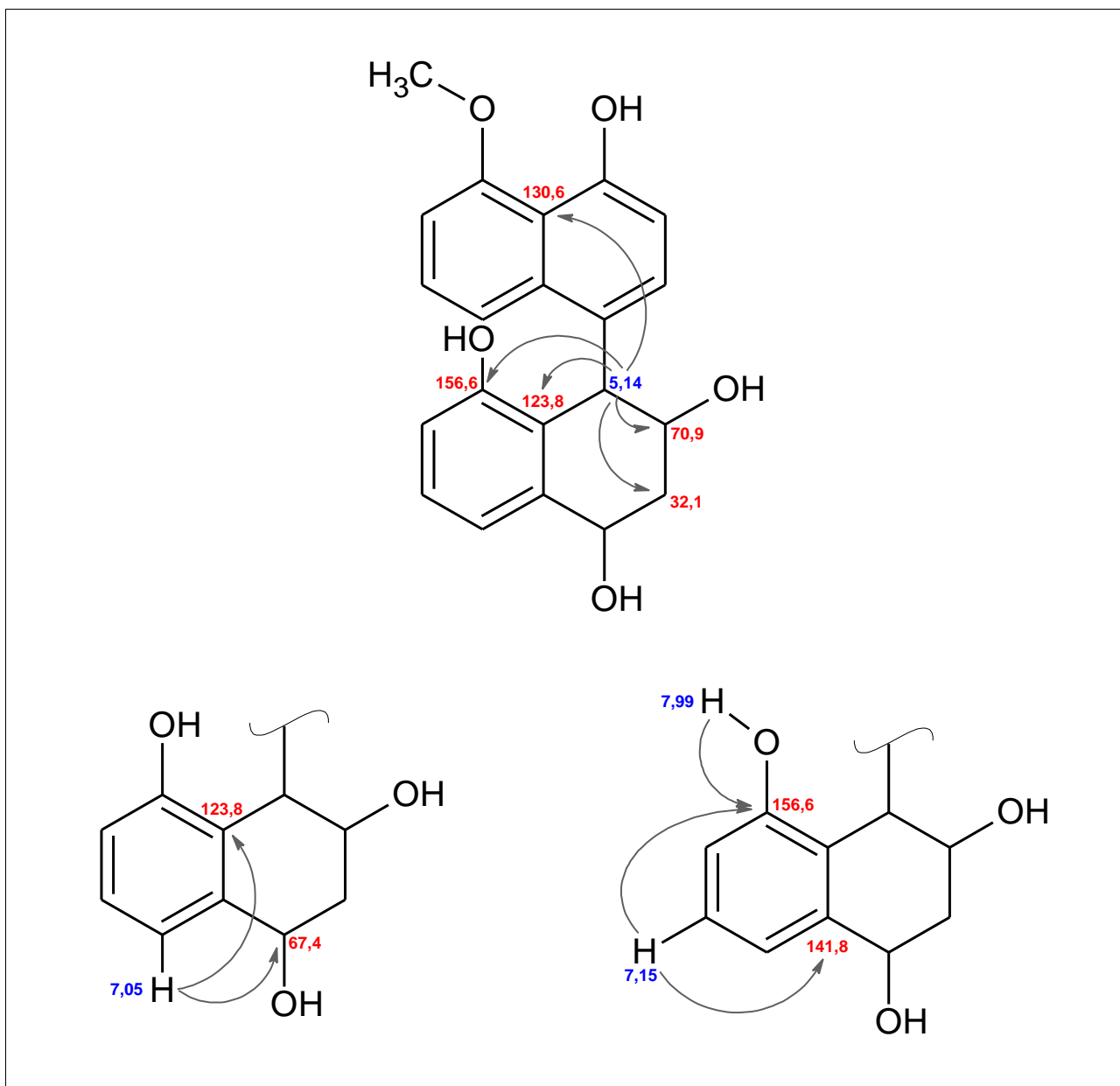
Fonte: O autor (2016).

As correlações observadas entre o hidrogênio com sinal em 5,14 ppm e diversos carbonos no experimento de HMBC (**Figura 33**) foram determinantes para estabelecer a ligação entre os dois anéis aromáticos anteriormente descritos (**Figura 34**) e o sistema de *spin* de hidrogênios alifáticos com o outro sistema aromático de 3 hidrogênios, contendo os hidrogênios atribuídos aos sinais em 6,75, 7,05 e 7,15 ppm. O hidrogênio em 5,14 ppm correlacionou com o carbono em 130,6 ppm, atribuído anteriormente a C-5'a e com mais dois carbonos quaternários com sinais em 123,8 e 156,6 ppm. Como o carbono em 123,8 ppm também correlacionava com o hidrogênio em 7,05 ppm, ele foi atribuído a C-8a. Por sua vez, o carbono associado ao sinal em 156,6 ppm também correlacionava com o hidrogênio com sinal em 7,15 ppm e os hidrogênios hidroxílicos em 7,99 ppm, o que permitiu atribuí-lo a C-8. A proposta de junção entre o sistema aromático de 3 hidrogênios e o sistema alifático também foi confirmada através da correlação entre o sinal para o hidrogênio em 7,05 ppm e o carbono hidroximetínico em 67,4 ppm, atribuído à C-4. O sinal para o carbono

quaternário em 141,8 ppm foi atribuído a C-5a através de sua correlação com o hidrogênio em 7,15 ppm.

Essas correlações observadas no mapa de contorno de HMBC foram decisivas para a elucidação estrutural da substância **G5.2** e estão mostradas na **Figura 35**.

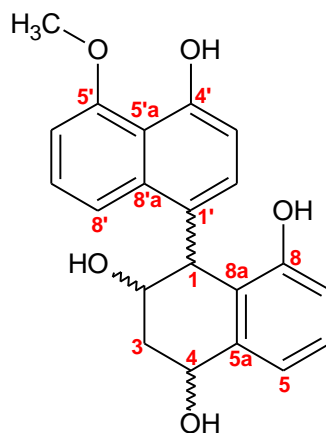
Figura 35 - Correlações de HMBC que permitiram propor a conexão entre os sistemas de *spin* verificados para a substância **G5.2**.



Fonte: O autor (2016).

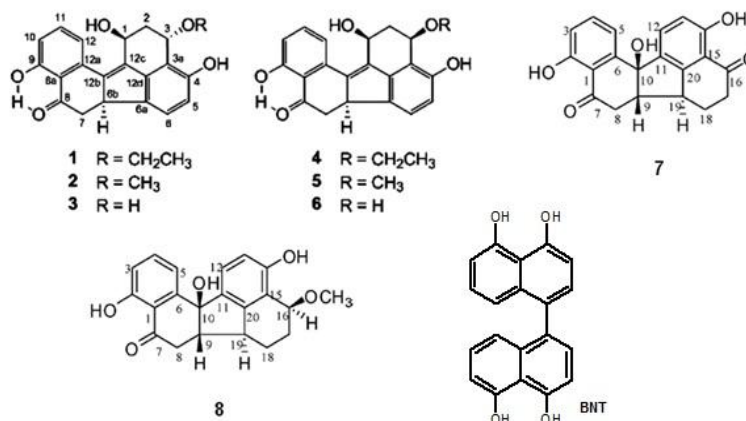
Desta forma, a análise minuciosa dos dados de RMN permitiu inferir sobre a estrutura da substância **G5.2 (Figura 36)** como sendo a 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol, sendo esta estrutura inédita na literatura. Pelos experimentos realizados, não foi possível determinar a estereoquímica dos carbonos 1, 2 e 4. Essa substância assemelha-se estruturalmente com compostos anteriormente isolados de *H. truncatum*, denominados de Hypoxylonol A-F e Daldenona C-D (**Figura 37**) (FUKAI et al., 2012; FUKAI et al., 2014; GU et al., 2007; KOYAMA et al., 2002) e também com o BNT, de ampla ocorrência na família Xylariaceae (QUANG et al., 2005a). Os dados de RMN da substância **G5.2** estão apresentados na **Tabela 9**.

Figura 36 - Estrutura proposta para a substância **G5.2**.



Fonte: O autor (2016).

Figura 37 - Estruturas do Hypoxylonol A-F (1-6), Daldidona C-D (7-8) e BNT.



Fonte: FUKAI et al. (2012); GU et al. (2007); QUANG et al. (2005a).

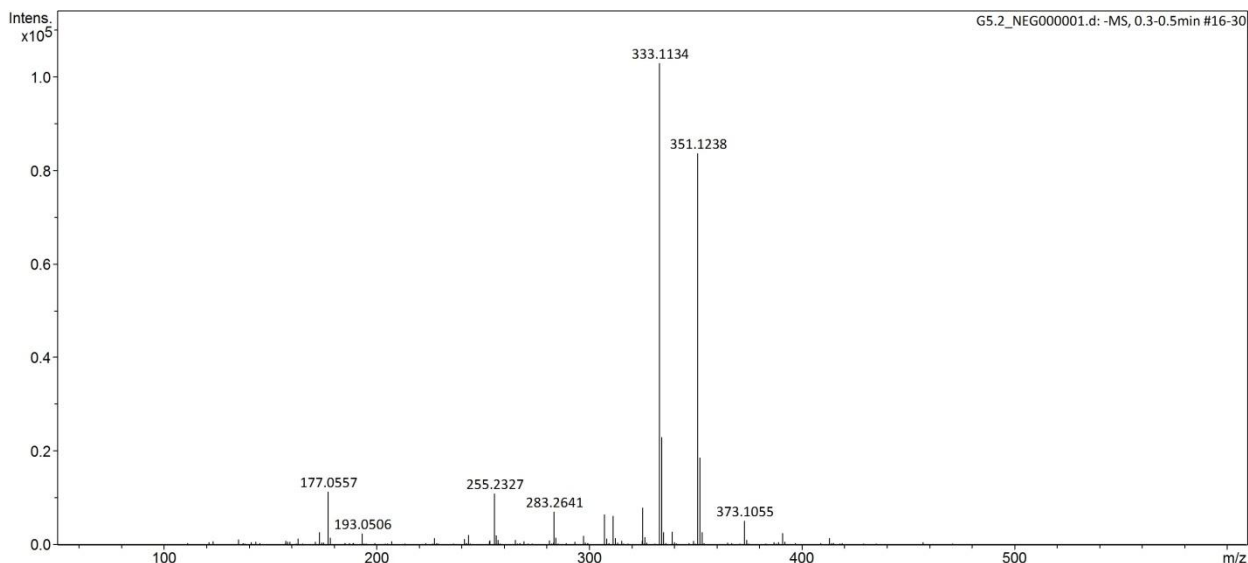
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz) e HMBC (14,1 Tesla) da substância **G5.2** em acetona- d_6 .

Posição	HSQC		HMBC		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$^2J_{\text{H-C}}$	$^3J_{\text{H-C}}$	$^4J_{\text{H-C}}$
1	44,0	5,14 (s)	70,9 e 123,8	32,1 e 156,6	130,6
2	70,9	4,35 (m)	-	-	-
3	32,1	2,01 e 2,04 (m)	-	-	-
4	67,4	4,78 (m)	-	-	-
5	121,9	7,05(dd, 7,8 e 1,2 Hz)	-	67,4, 114,6 e 123,8	-
5a	141,8	-	-	-	-
6	127,7	7,15 (dd, 7,8 e 7,8 Hz)	-	141,8 e 156,6	-
7	114,6	6,75 (dd, 7,8 e 1,2 Hz)	-	123,8	-
8	156,6	-	-	-	-
8a	123,8	-	-	-	-
1'	116,2	-	-	-	-
2'	127,5	6,44 (d, 8,4 Hz)	-	135,7 e 154,3	-
3'	110,0	6,54 (d, 8,4 Hz)	-	116,2 e 130,6	-
4'	154,3	-	-	-	-
5'	158,1	-	-	-	-
5'a	130,6	-	-	-	-
6'	104,8	7,04 (d, 8,4 Hz)	158,1	117,9	-
7'	126,7	7,49 (dd, 9,0 e 8,4 Hz)	-	135,7 e 158,1	-
8'	117,9	8,01 (d, 9,0 Hz)	-	104,8, 116,2 e 130,6	-
8'a	135,7	-	-	-	-
C5'-OCH ₃	56,5	4,14 (s)	-	158,1	-
C2-OH	-	4,98 (d, 4,8 Hz)	-	-	-
C4-OH	-	4,40 (d, 8,4 Hz)	-	-	-
C8-OH	-	7,99 (s)	156,6	123,8	-
C4'-OH	-	9,40 (s)	-	110,0	-

Fonte: O autor (2016).

A estrutura da substância **G5.2**, estabelecida através da análise dos dados de RMN, foi confirmada através do seu espectro de massas ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) (**Figura 38**), que evidenciou o íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 351,1238, correspondente à sua fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_5$.

Figura 38 - Espectro de massas por ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) da substância **G5.2**.



Fonte: O autor (2016).

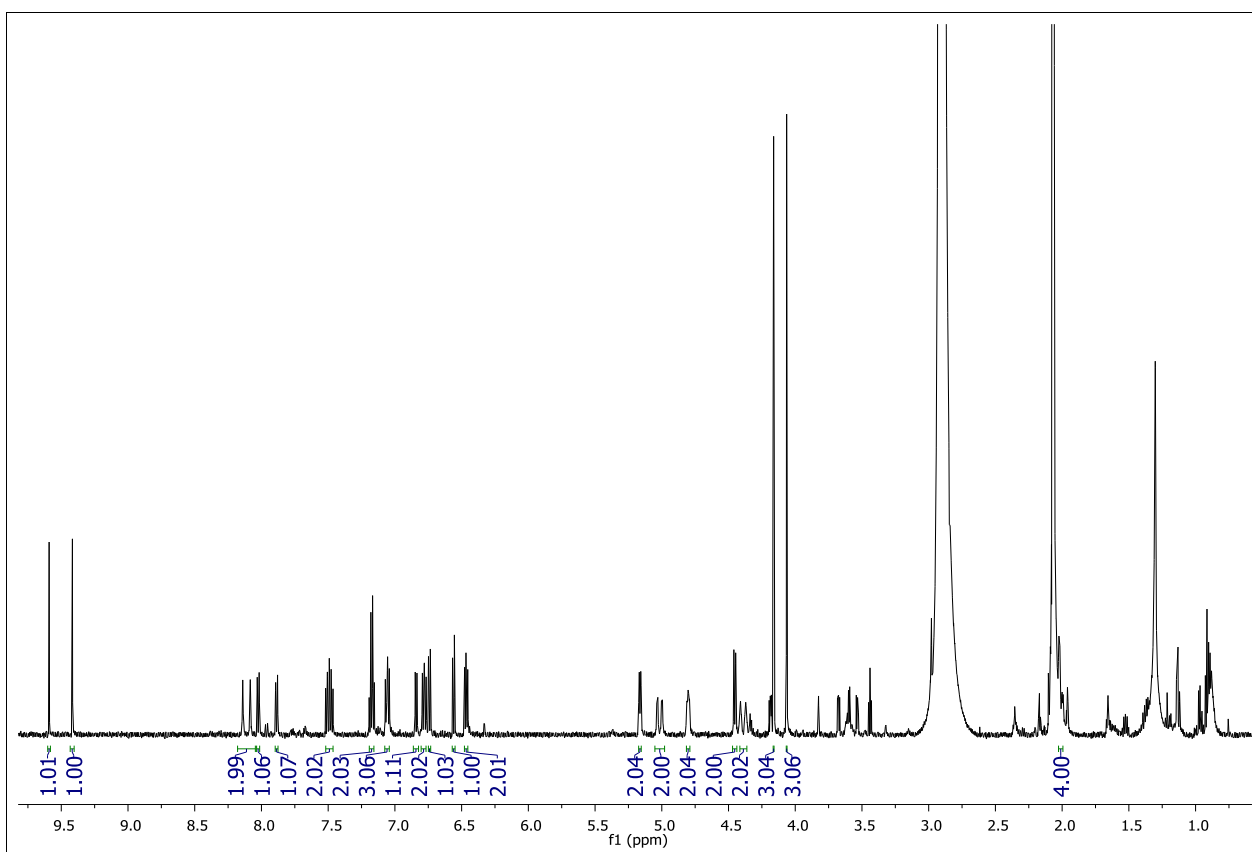
Visando investigar sobre a estereoquímica dos carbonos C-1, C-2 e C-4 da substância **G5.2**, realizou-se uma análise mais detalhada das multiplicidades e das constantes de acoplamentos dos sinais no espectro de RMN de 1H (**Figuras 26-28**). Entretanto, essa análise foi inconclusiva uma vez que não foi possível medir com exatidão as constantes de acoplamento e essas grandezas são imprescindíveis para a análise adequada e conclusão sobre a estereoquímica relativa. A única observação que se pode fazer é que a relação entre os hidrogênios alifáticos dos centros de quiralidade deve ser *axial-equatorial* ou *equatorial-equatorial*, uma vez que as constantes de acoplamento entre os hidrogênios parecem ser muito próximas e muito pequenas e, por isto, os desdobramentos coalescem em multipletos complexos, o que impossibilitou sua descrição por diagramas de árvores adequados. De fato, segundo PAVIA et al. (2010), essas constantes de acoplamento estão entre 5 e 3 Hz. Desta forma, uma estratégia experimental para contornar esse problema deve ser isolar uma maior quantidade da

substância **G5.2** para então se tentar obter um cristal dessa substância que pudesse ser analisado por difração de Raios-X.

4.6.2. Proposta Estrutural da Substância **G5.3**

Analisando-se o espectro de RMN de ^1H da substância **G5.3**, observou-se forte semelhança com o espectro de RMN de ^1H da substância **G5.2** no que concerne aos deslocamentos químicos, multiplicidades e intensidades dos sinais. Aparentemente, os hidrogênios estavam duplicados, o que foi confirmado com a integração dos sinais no espectro de RMN de ^1H , cuja soma resultou em 40 hidrogênios. (**Figura 39**).

Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.3** em acetona- d_6 , 600 MHz.



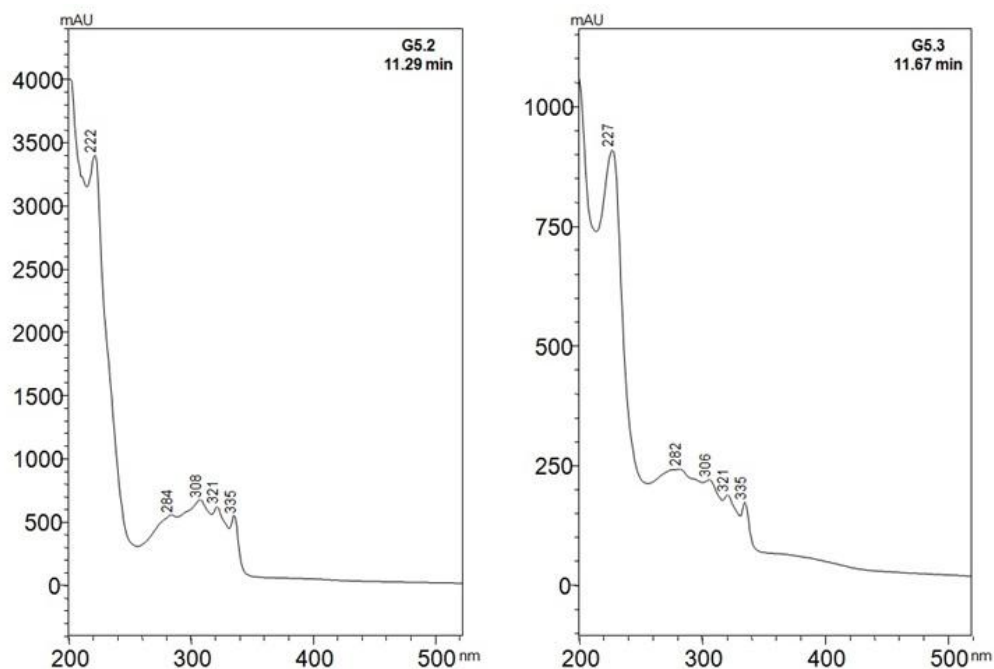
Fonte: O autor (2016).

Desta forma, inferiu-se que a substância **G5.2** coeluiu com a substância **G5.3** numa proporção de 1:1 e que essas substâncias apresentam alguma relação

estereoisomérica, uma vez que a substância **G5.2** possui 3 carbonos quirais e ainda pode existir na forma de atropoisômeros.

A semelhança estrutural dessas substâncias pode ser evidenciada pelos espectros no UV-Vis (**Figura 40**), mostrando que essas substâncias possuem o mesmo grupo cromóforo.

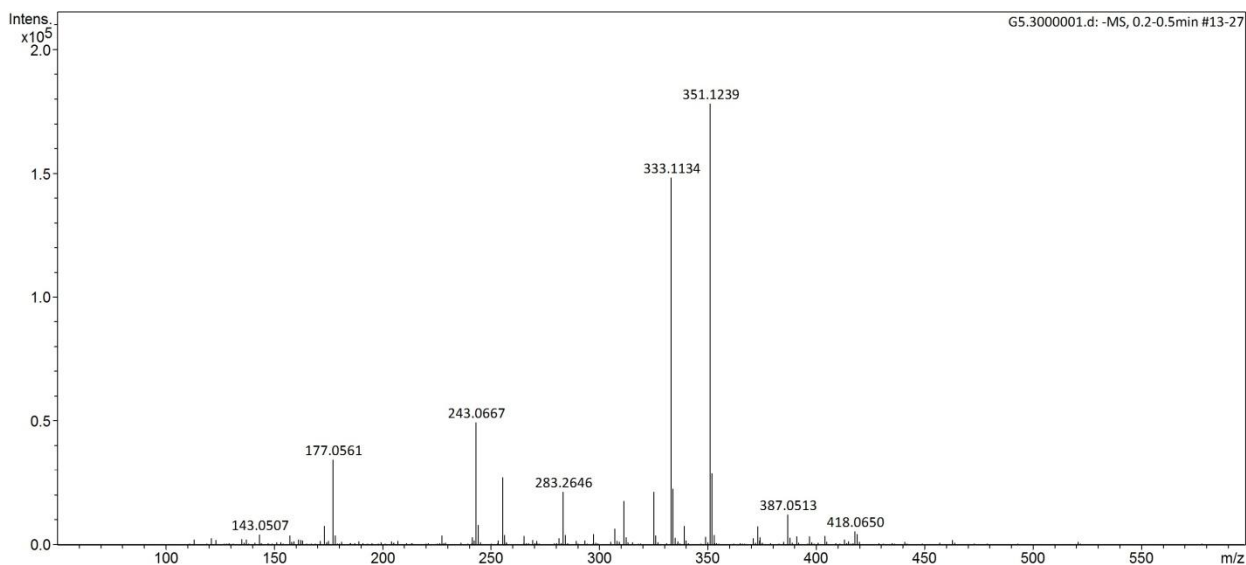
Figura 40 - Espectros no UV-Vis das substâncias **G5.2** e **G5.3**.



Fonte: O autor (2016).

Foi feita uma análise de EM-ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) da substância **G5.3** que evidenciou o íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 351,1239 (**Figura 41**). Em relação a substância **G5.2**, suas massas diferem uma da outra com uma exatidão de massas igual a 0,28 ppm. Como o analisador permite diferenciar duas massas com uma exatidão a partir de 3 ppm pode-se afirmar que as substâncias **G5.2** e **G5.3** são isômeros.

Figura 41 - Espectro de massas por ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) da substância **G5.3**.



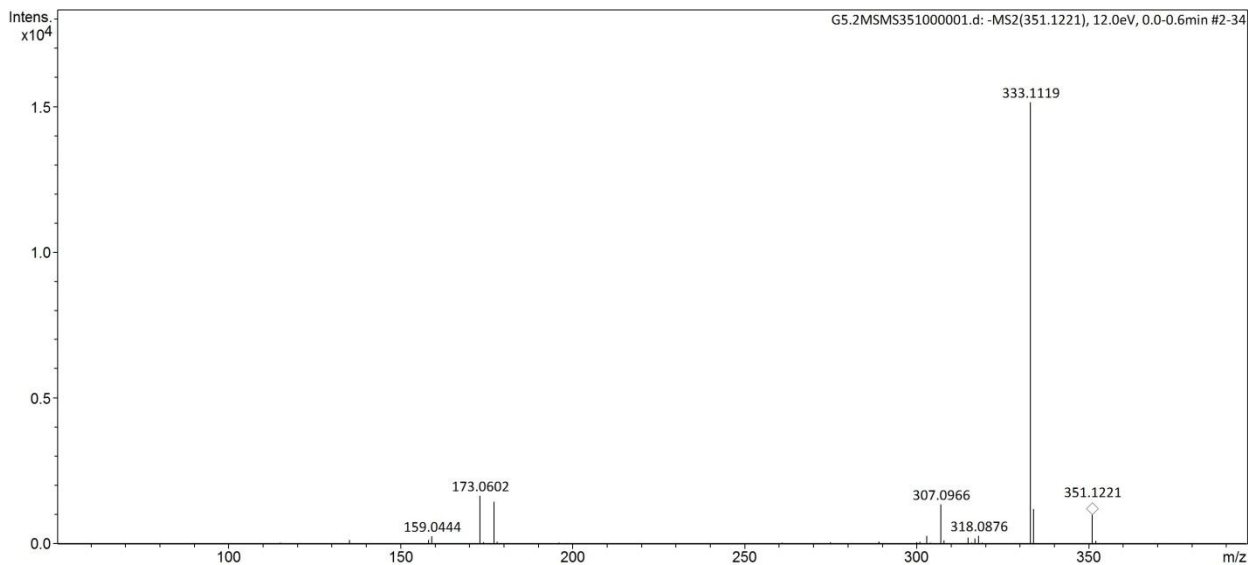
Fonte: O autor (2016).

As intensidades dos íons quasi-moleculares nos espectros de massas das substâncias **G5.2** e **G5.3** fornecem uma informação importante: o íon quasi-molecular no espectro de massas da substância **G5.2** não é o pico base. Aquele espectro (**Figura 38**) mostra que a perda de água foi um processo altamente favorável e o pico base corresponde à massa do íon quasi-molecular desidratado. O processo de desidratação é favorecido quando o grupo abandonador encontra-se anti coplanar em relação ao orbital com energia e simetria adequada para formação da ligação π (SOLOMONS; FRYHLE, 2011). A **Figura 41** mostra que o íon quasi-molecular da substância **G5.3** é o pico base: o processo de desidratação ainda ocorre (evidenciado pelo íon de m/z 333,1134), no entanto, de maneira menos favorável uma vez que o grupo abandonador não deve possuir simetria adequada em relação ao orbital que formará a ligação π . A análise das intensidades dos íons quasi-moleculares nos espectros das substâncias **G5.2** e **G5.3** fornece mais uma evidência de que essas substâncias são estereoisoméricas.

Sendo verdadeira a suposição de que as substâncias **G5.2** e **G5.3** são estereoisômeros, evidenciada pelos espectros de RMN de ^1H , de UV-Vis e pelos espectros de massa de alta resolução, as fragmentações dos seus íons quasi-

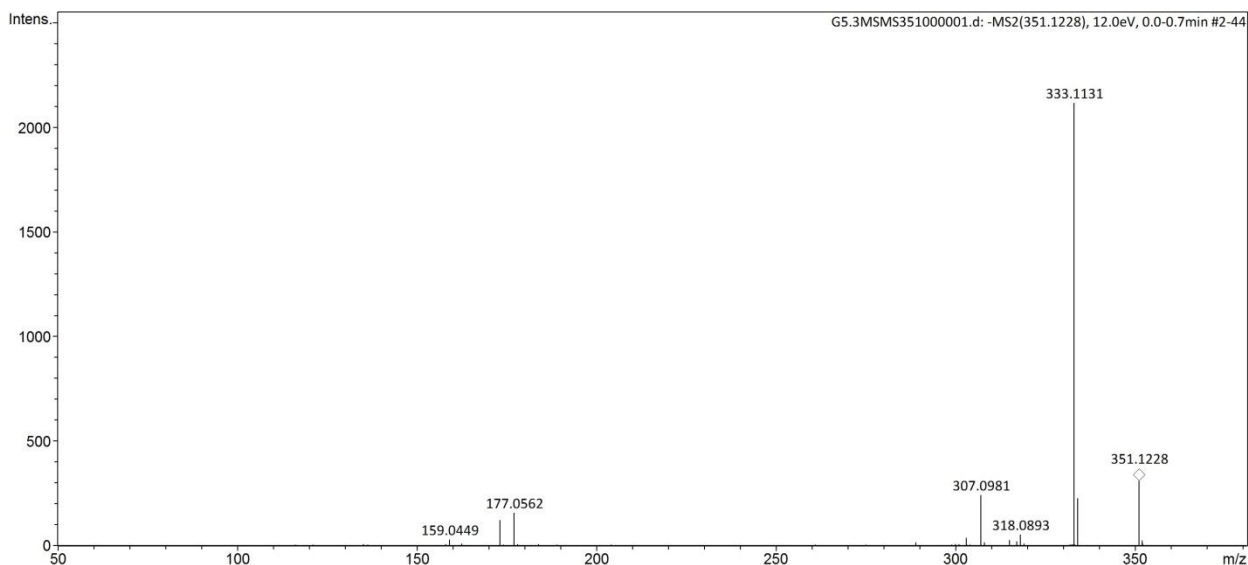
moleculares devem ser idênticas, o que é confirmado pelo espectro de massas em tandem TOF-MS² (modo negativo) de cada substância para m/z 351 (**Figuras 42-43**).

Figura 42 - Espectro de massas TOF-MS² (modo negativo) da substância **G5.2** em m/z 351.



Fonte: O autor (2016).

Figura 43 - Espectro de massas TOF-MS² (modo negativo) da substância **G5.3** em m/z 351.



Fonte: O autor (2016).

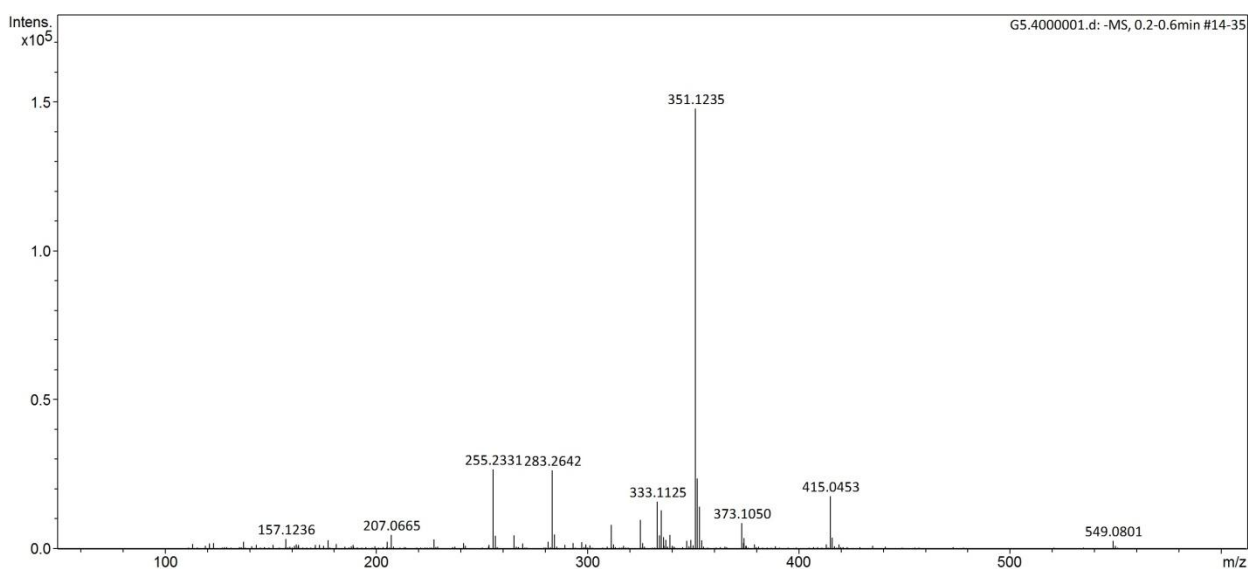
Como as substâncias **G5.2** e **G5.3** foram isoladas em coluna de C18, é muito provável que elas encerram uma relação diastereoisomérica (caso fossem enantiômeros

a separação não seria possível, a menos que seletores quirais fossem usados, tais como colunas quirais e solventes).

4.6.3. Elucidação Estrutural da Substância **G5.4**

O espectro de massas ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) (**Figura 44**) da substância **G5.4** apresentou um pico em m/z 351,1235, que foi considerado como o íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$. Em relação a substância **G5.2**, suas massas diferem uma da outra com uma exatidão de massas igual a 0,85 ppm. Como o analisador permite diferenciar duas massas com uma exatidão a partir de 3 ppm pode-se afirmar que as substâncias **G5.2** e **G5.4** são isômeros.

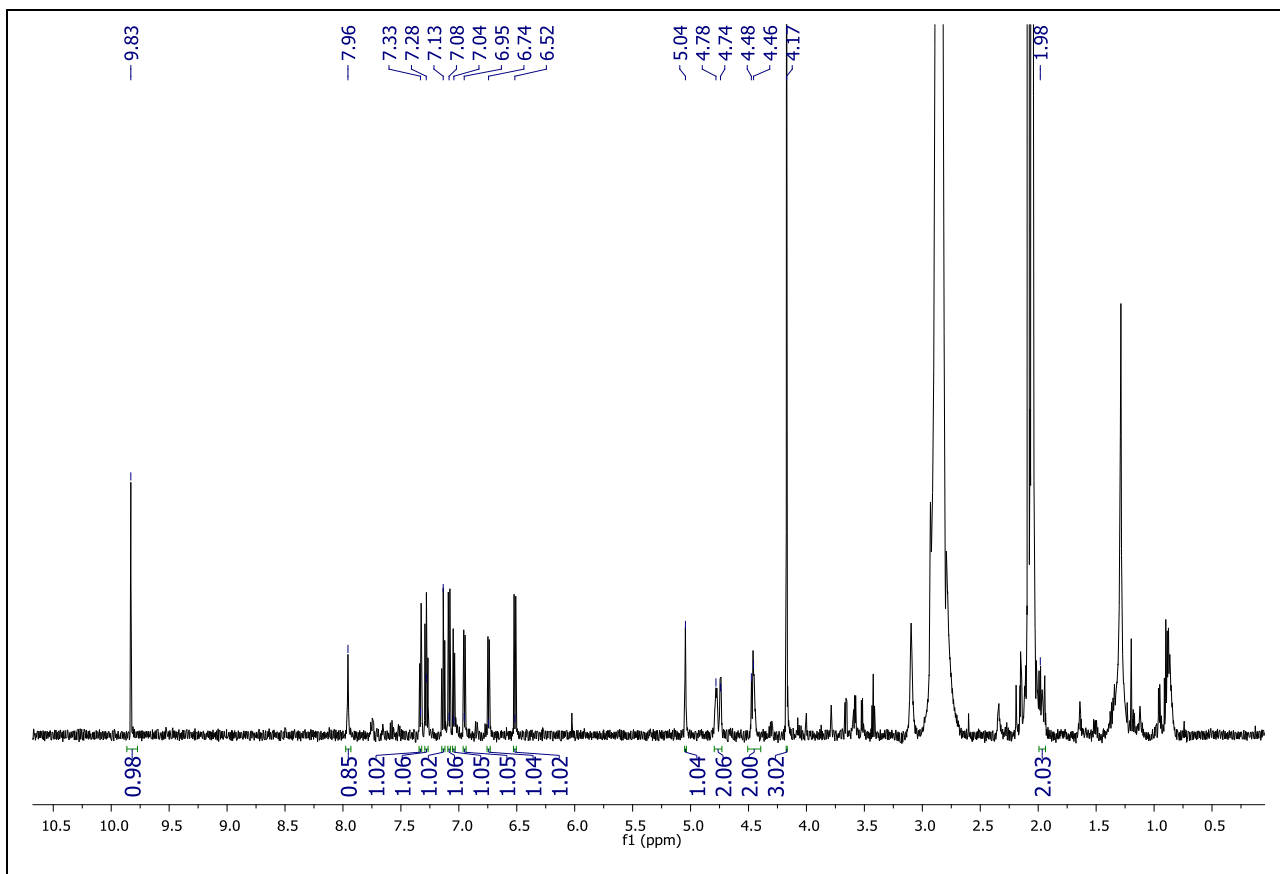
Figura 44 - Espectro de massas por ESI-TOF (*full scan*, modo negativo) da substância **G5.4**.



Fonte: O autor (2016).

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **G5.2** (**Figura 26**) e **G5.4** (**Figura 45**) mostraram forte semelhança, no que concerne ao número de hidrogênios, intensidades e multiplicidades dos sinais, diferindo apenas de maneira sutil em alguns deslocamentos químicos.

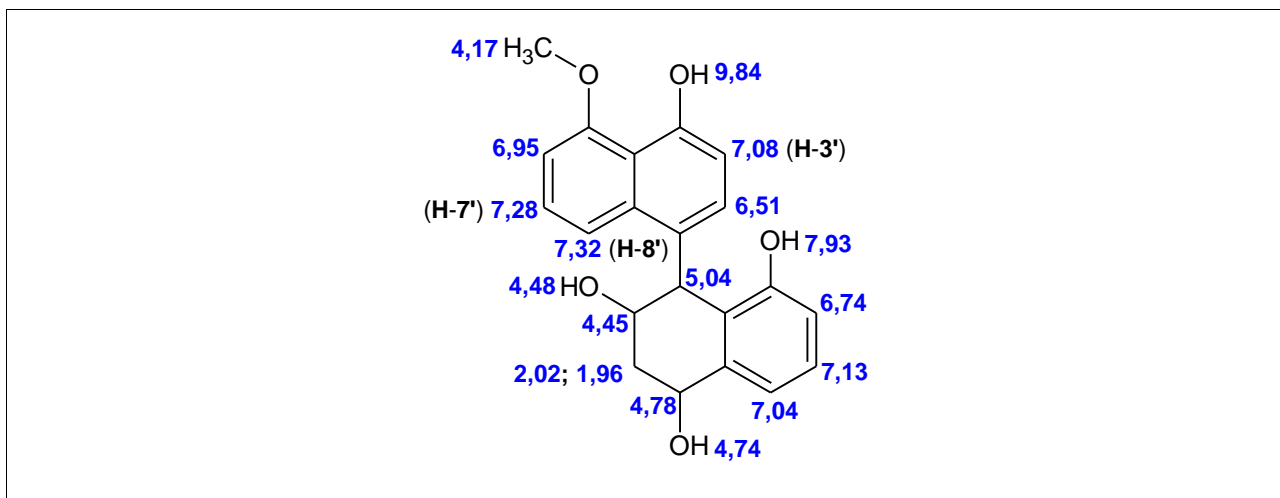
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.4** em acetona- d_6 , 600 MHz.



Fonte: O autor (2016).

O espectro de RMN de ^1H da substância **G5.4** apresentou 8 sinais na região de hidrogênios aromáticos. As multiplicidades desses sinais, indicaram que, assim como a substância **G5.2**, a substância **G5.4** apresentava 3 sistemas de *spins* aromáticos, constituídos por 3, 3 e 2 hidrogênios cada. As atribuições desses hidrogênios na estrutura da substância **G5.4** (**Figura 46**) foram realizadas através da análise das multiplicidades dos sinais no espectro de RMN de ^1H (**Figura 45**) e também pela comparação com o espectro de RMN de ^1H da substância **G5.2** (**Figura 26**). Entretanto, verificou-se que os deslocamentos químicos do anel naftalênico diferiam significativamente da substância **G5.2**, especialmente os hidrogênios que corresponderiam a H-3', H-7' e H-8'. Os dados de RMN de ^1H (**Figura 45**) da substância **G5.4** evidenciaram, portanto, diferenças estruturais entre as substâncias **G5.2** e **G5.4**.

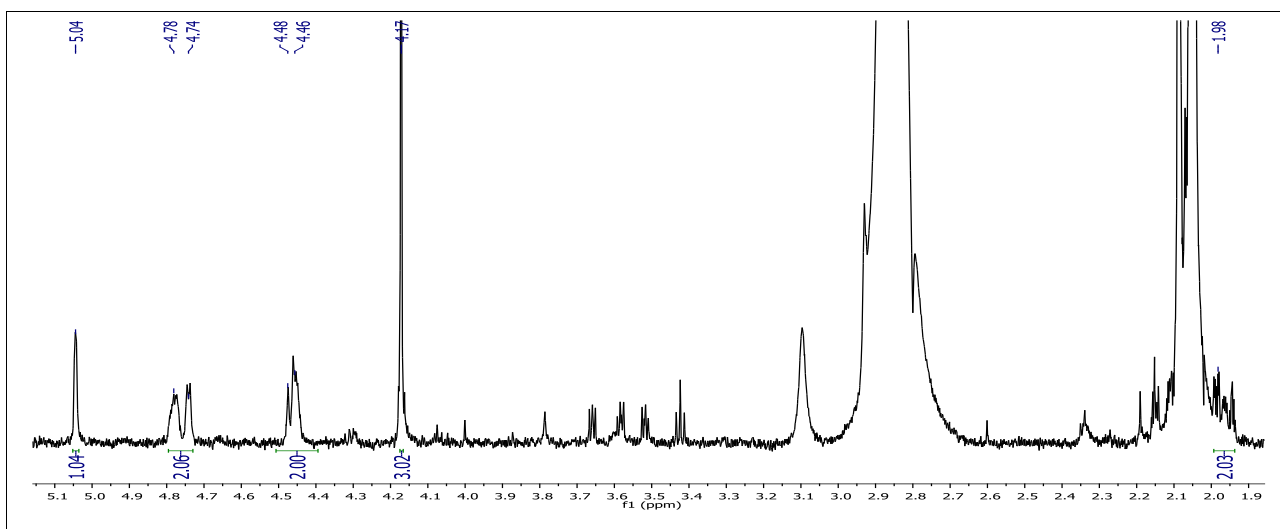
Figura 46 - Atribuição dos deslocamentos químicos de hidrogênio da substância **G5.4**.



Fonte: O autor (2016).

Em relação aos sinais dos hidrogênios alifáticos no espectro de RMN de ^1H (**Figura 47**), o anel alifático da substância **G5.4** parecia conter o mesmo número de hidroxilas que o da substância **G5.2**. O sinal do hidrogênio dibenzílico ocorreu em 5,04 ppm, enquanto os sinais para os hidrogênios metínicos oxigenados ocorreram em 4,45 e 4,78 ppm e os sinais dos hidrogênios hidroxílicos praticamente coalesceram nessa região (4,48 e 4,74 ppm). A presença de uma metoxila na substância **G5.4** foi evidenciada através do singleto em 4,17 ppm.

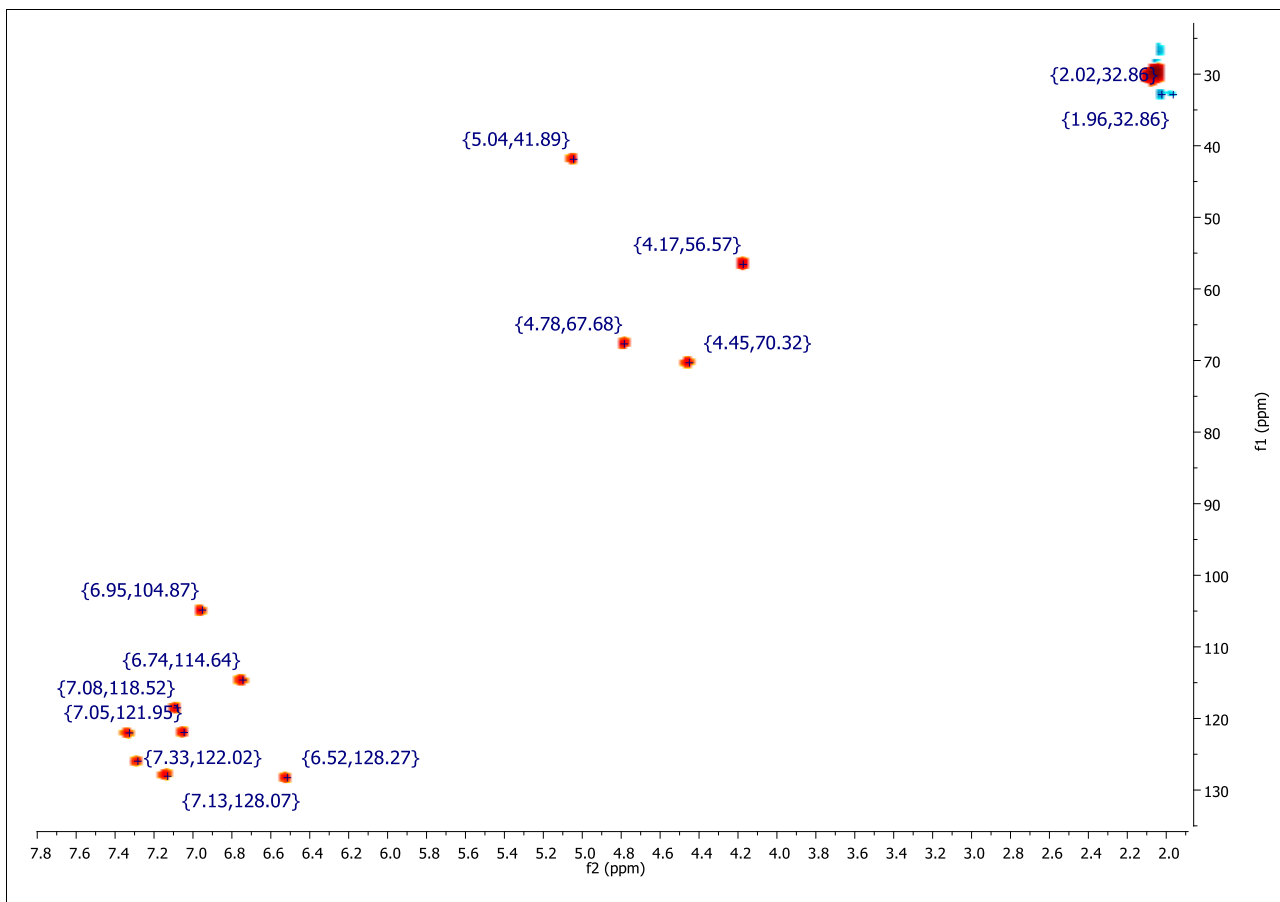
Figure 47 - Ampliação na região de 1,8-5,15 ppm do espectro de RMN ^1H da substância **G5.4**



Fonte: O autor (2016).

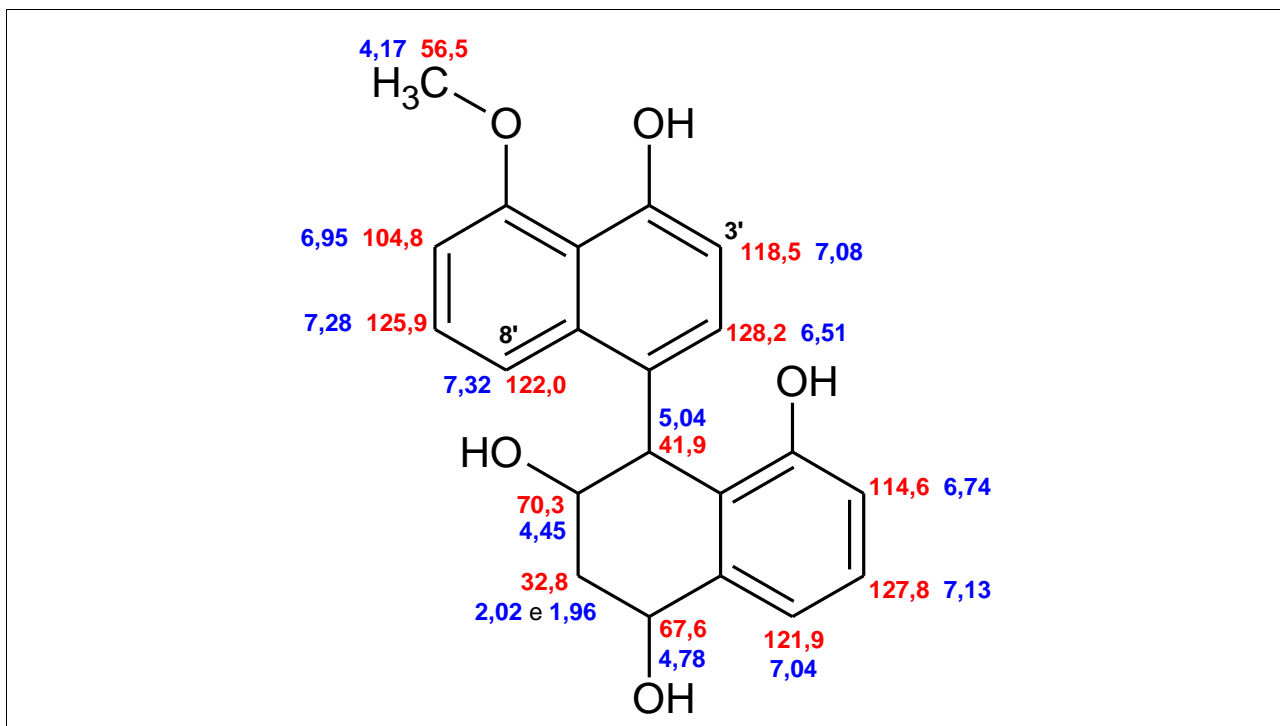
As correlações do mapa de contorno de HSQC da substância **G5.4** (Figura 48) permitiram atribuir todos os sinais dos carbonos hidrogenados da molécula (Figura 49). Novamente, os carbonos 3' e 8', em 118,5 e 122,0 ppm, diferiram significativamente dos respectivos carbonos na substância **G5.2**, cujos sinais ocorreram em 110,0 e 117,9 ppm. Estes dados constituíram mais uma evidência de alguma alteração estrutural da substância **G5.4** em relação à **G5.2**.

Figura 48 - Mapa de contorno de HSQC da substância **G5.4** (14,1 Tesla, acetona- d_6).



Fonte: O autor (2016).

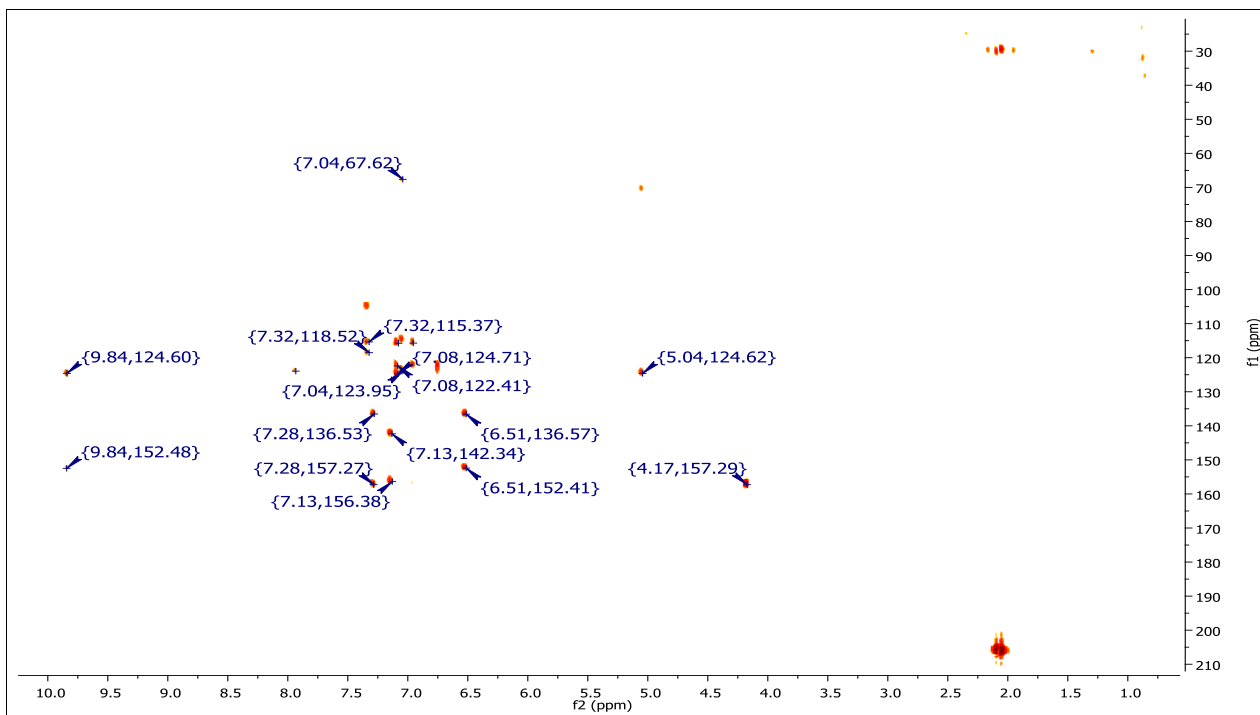
Figura 49 - Correlações observadas no mapa de contorno de HSQC da substância **G5.4**.



Fonte: O autor (2016).

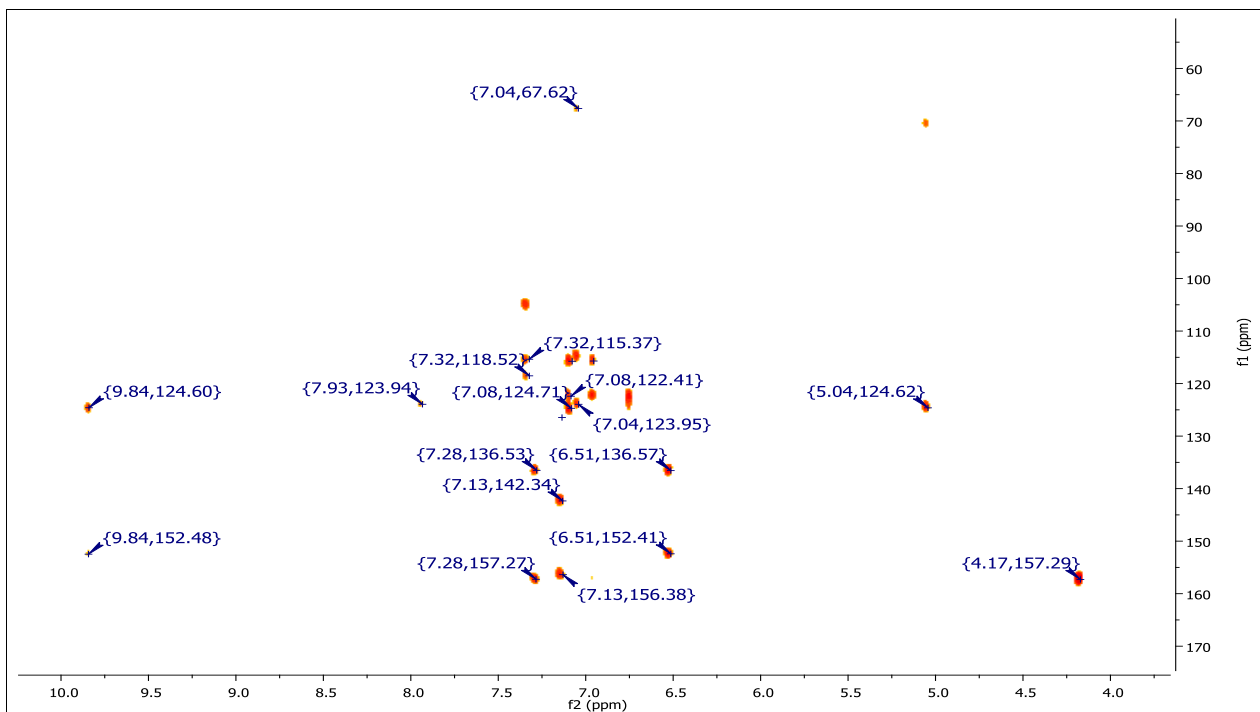
A análise das correlações do mapa de contorno de HMBC (**Figura 50**) da substância **G5.4** foi determinante para o estabelecimento das diferenças entre sua estrutura e da **G5.2**. Através da ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância **G5.4** (**Figura 51**), centrada na região de aromático, também puderam ser estabelecidos os valores de deslocamentos químicos dos carbonos quaternários desta substância, como descrito posteriormente.

Figura 50 - Mapa de contorno de HMBC da substância **G5.4** (14,1 Tesla, acetona- d_6).



Fonte: O autor (2016).

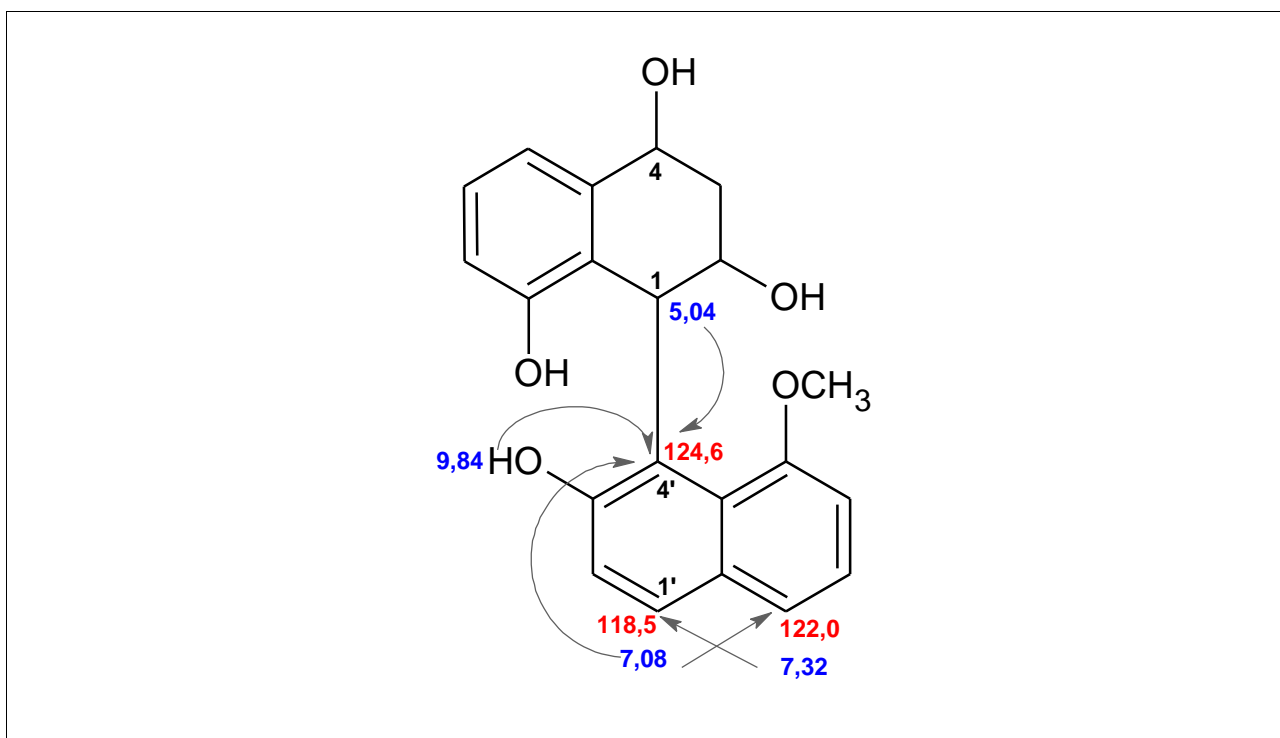
Figura 51 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância **G5.4** centrado na região de aromático.



Fonte: O autor (2016).

As correlações evidenciadas no mapa de contorno de HMBC (**Figura 51**) entre o sinal para o hidrogênio em 7,32 ppm e o sinal para o carbono em 118,5 ppm (atribuídos a H-8' e C-3' na **Figura 49**) bem como entre o hidrogênio em 7,08 ppm e o carbono em 122,0 ppm (atribuídos a H-3' e C-8' na **Figura 49**) indicaram que a ligação entre o anel naftalênico e o anel alifático (ligado ao anel benzênico) não acontece entre os carbonos 1 e 1', mas sim entre os carbonos 1 e 4' (**Figura 52**). Esta proposta foi confirmada através da observação da correlação entre o hidrogênio hidroxílico em 9,84 ppm e o sinal para o carbono quaternário em 124,6 ppm, que também correlacionava com os hidrogênios em 7,08 e 5,04 ppm, atribuídos a H-1' e H-1, respectivamente (**Figura 52**).

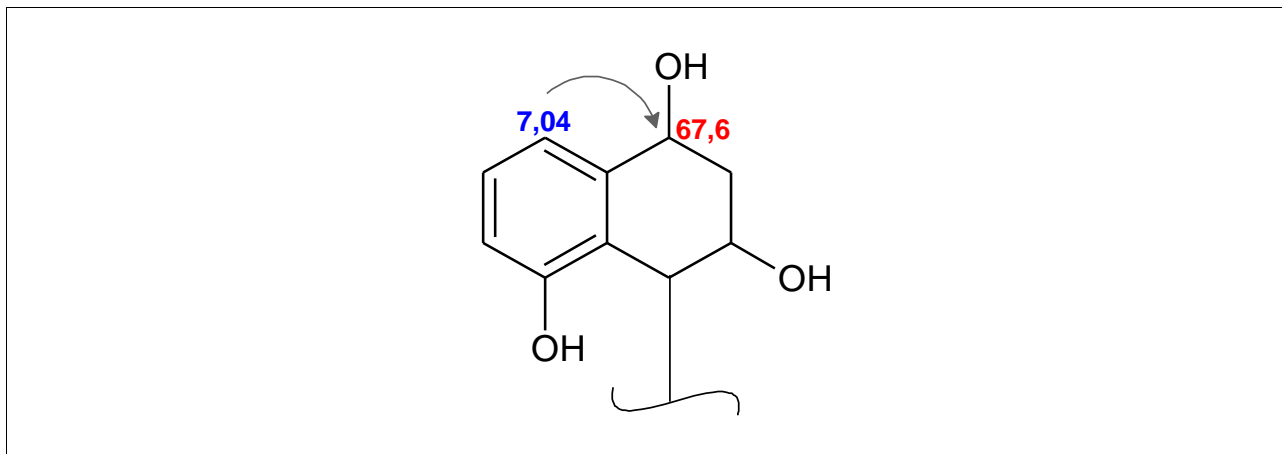
Figura 52 - Correlações no espectro de HMBC da substância **G5.4** essenciais para o estabelecimento da ligação entre C-1 e C-4'.



Fonte: O autor (2016).

A correlação 3J entre o hidrogênio em 7,04 ppm e o carbono em 67,6 ppm (**Figura 53**) no mapa de contorno de HMBC (**Figura 51**), permitiu confirmar como o anel alifático estava ligado ao anel aromático na substância **G5.4**.

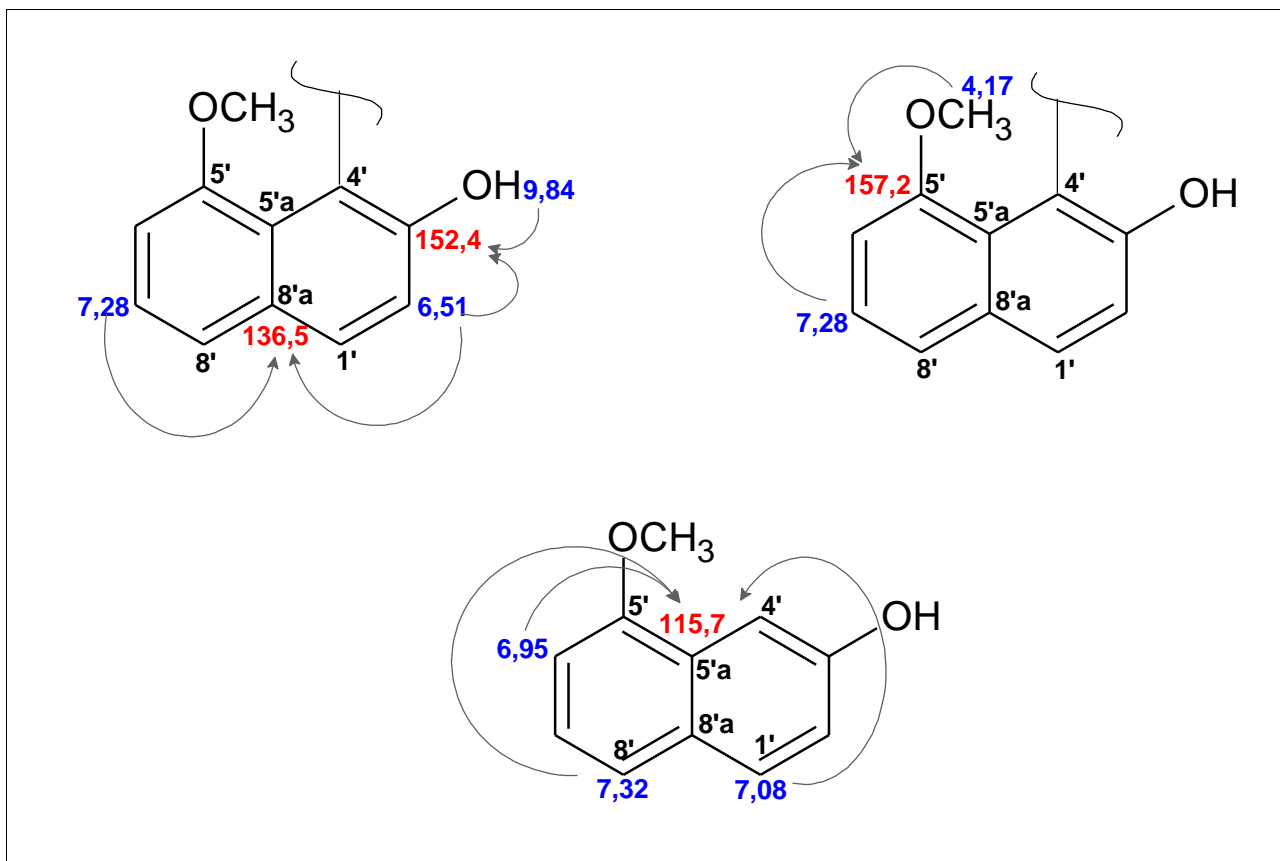
Figura 53 - Correlação no espectro de HMBC da substância **G5.4** que permitiu a confirmação da conexão da unidade alifática com o anel benzênico.



Fonte: O autor (2016).

A análise do mapa de contorno de HMBC (**Figura 51**) da substância **G5.4** permitiu ainda a atribuição dos carbonos quaternários da molécula. O carbono C-3', em 152,4 ppm, foi atribuído através de sua correlação com o sinal para o hidrogênio hidroxílico em 9,84 ppm e com H-2', em 6,51 ppm (**Figura 54**). Este último juntamente com H-7', em 7,28 ppm, também correlacionaram com o sinal para o carbono em 136,5 ppm, o qual foi atribuído a C-8'a (**Figura 54**).

Figura 54 - Atribuições dos carbonos quaternários do anel binaftalênico a partir de correlações no espectro de HMBC da substância **G5.4**.

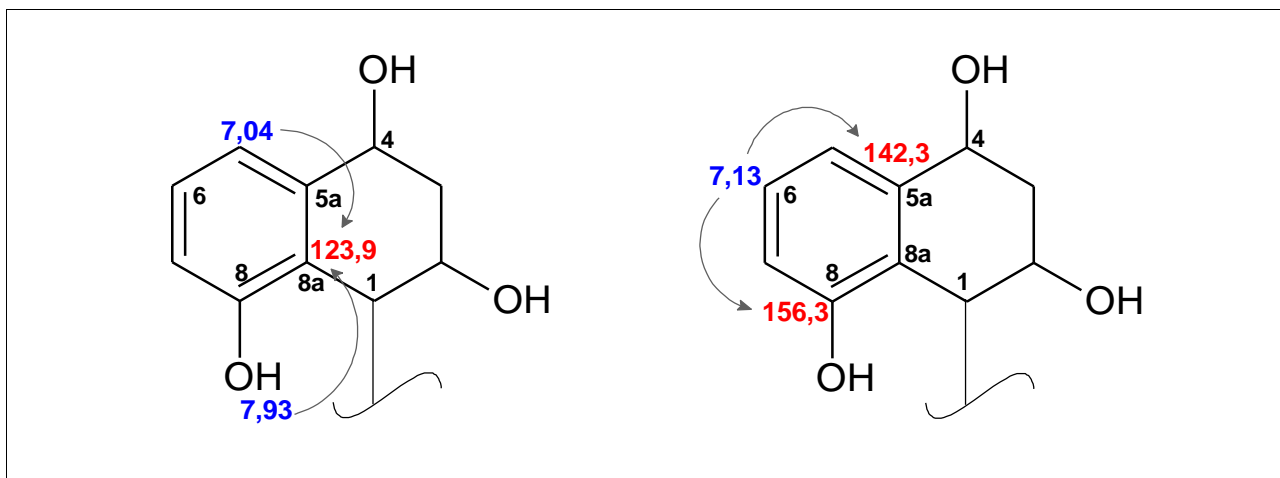


Fonte: O autor (2016).

As correlações entre os sinais para hidrogênios metoxílicos (em 4,17 ppm) e os hidrogênios aromáticos H-7' (em 7,28 ppm) e H-6' (em 6,95 ppm) com um carbono em 157,2 ppm, permitiu atribuí-lo a C-5' (**Figura 54**). O sinal para o carbono 5'a, em 115,70 ppm, foi atribuído através das suas correlações com os sinais para hidrogênios em 7,32 (H-8'), 7,08 (H-1') e 6,95 ppm (H-6') (**Figura 54**).

O sinal para o carbono quaternário C-8a, em 123,9 ppm, foi atribuído através da observação de sua correlação com os hidrogênios em 7,93 (OH em C-8) e 7,04 ppm (H-5) (**Figura 55**). Os dois carbonos quaternários remanescentes da substância **G5.4** foram atribuídos aos sinais em 156,3 (C-8) e 142,3 ppm (C-5a) através das suas correlações com H-6, em 7,13 ppm (**Figura 55**).

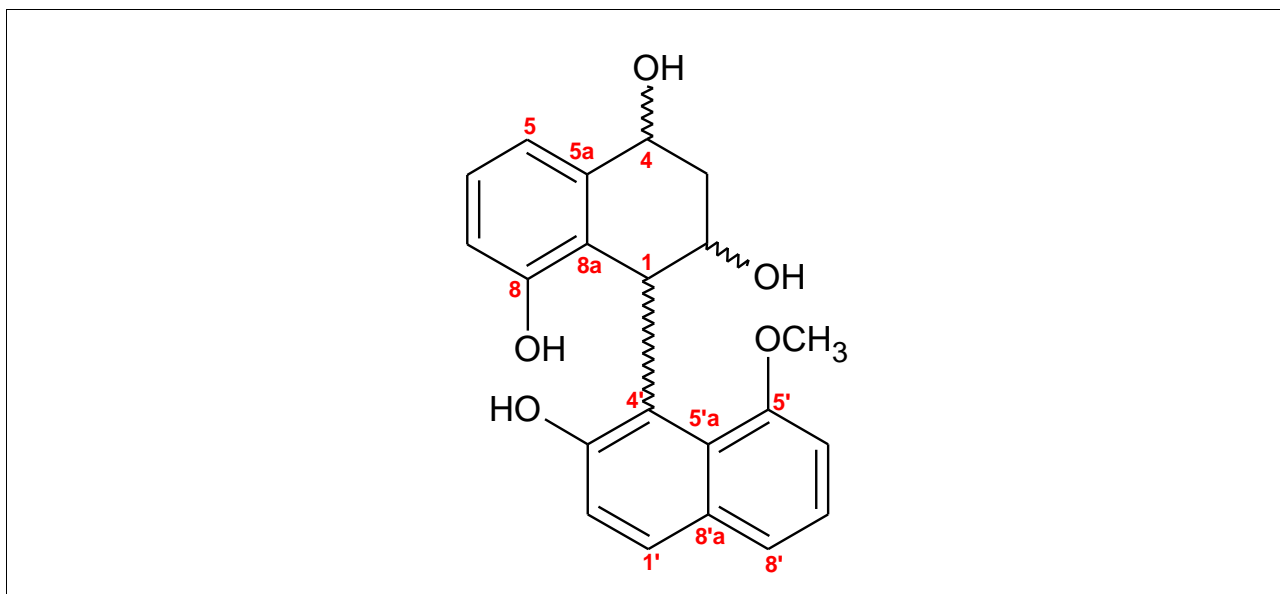
Figura 55 - Atribuições dos carbonos quaternários do anel benzênico a partir de correlações no espectro de HMBC da substância **G5.4**.



Fonte: O autor (2016).

Desta forma, a análise minuciosa dos dados de RMN e EM bem como a comparação com os dados espectroscópicos e espectrométricos da substância **G5.2** permitiram estabelecer a estrutura da substância **G5.4** como sendo o 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (**Figura 56**), um isômero constitucional da substância **G5.2** e também inédito na literatura. Assim como para a substância **G5.2**, não foi possível determinar a estereoquímica dos carbonos 1, 2 e 4 na substância **G5.4** através da análise das multiplicidades e constantes de acoplamento dos hidrogênios alifáticos, sendo necessária a realização de análises complementares como LC-CD e comparação com modelos similares da literatura.

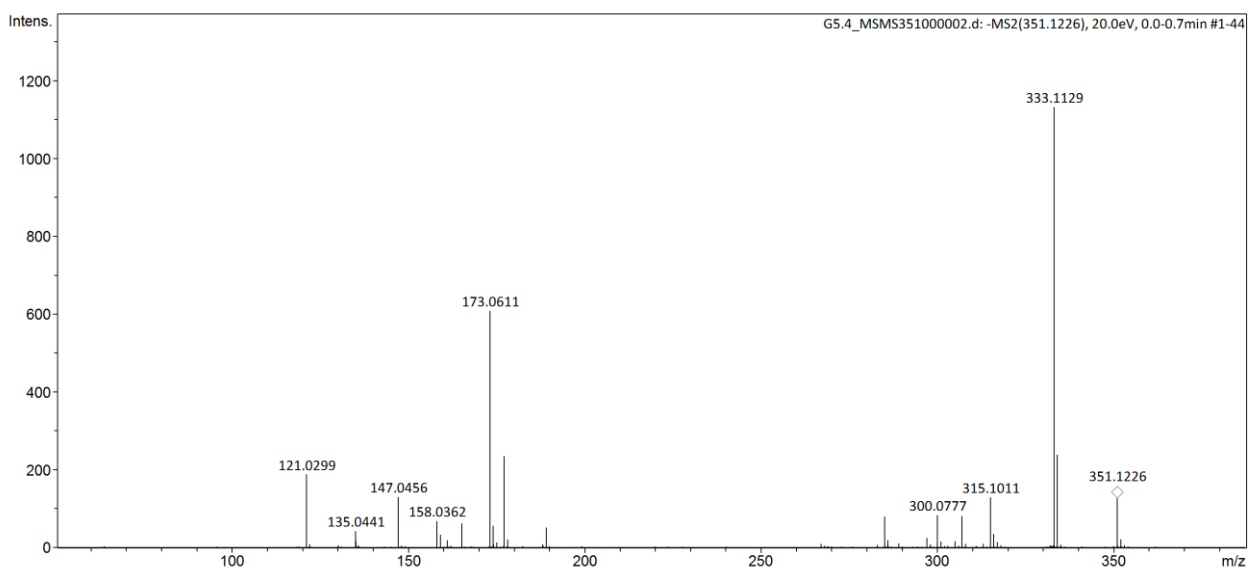
Figura 56 - Estrutura proposta para a substância **G5.4**.



Fonte: O autor (2016).

A fragmentação do íon quasi-molecular (m/z 351,1224) da substância **G5.4** (**Figura 57**) associada aos dados de RMN corrobora que essa substância seja um isômero constitucional da substância **G5.2** (**Figura 42**), de fragmentação distinta, nas mesmas condições experimentais.

Figura 57 - Espectro de massas TOF-MS² (modo negativo) da substância **G5.4** em m/z 351.



Fonte: O autor (2016).

Os dados de RMN para a substância **G5.4** estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz) e HMBC (14,1 Tesla) da substância **G5.4** em acetona- d_6 .

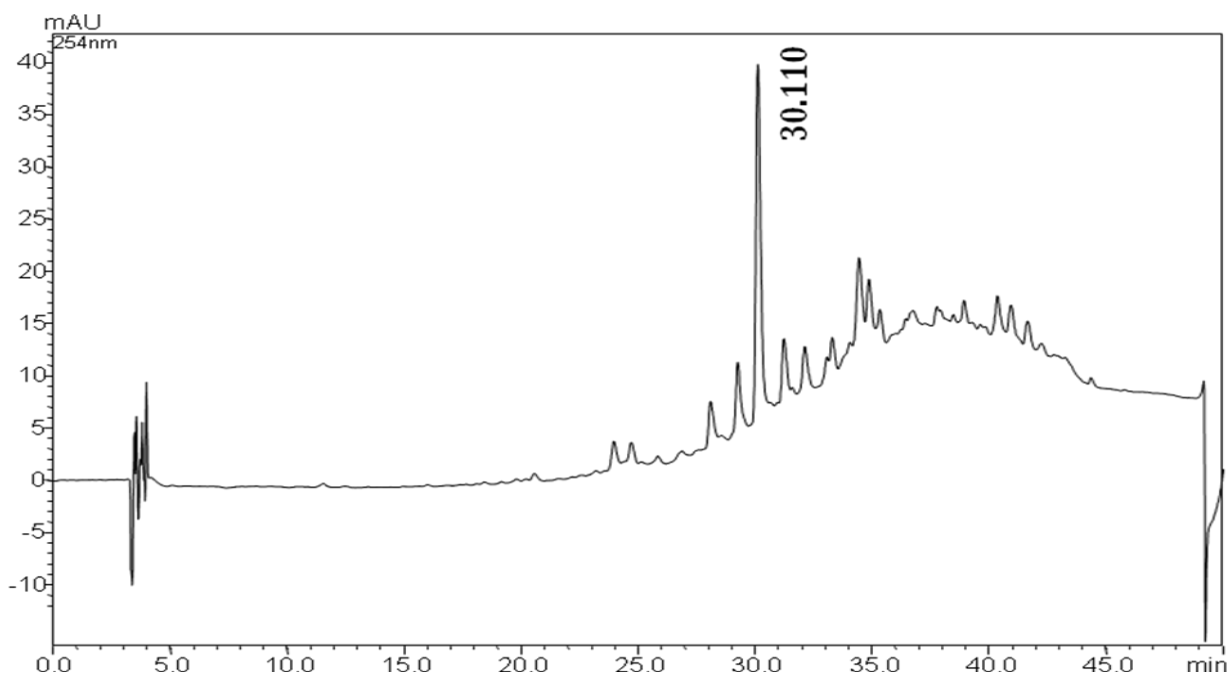
Posição	HSQC			HMBC	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$^2J_{\text{H-C}}$	$^3J_{\text{H-C}}$	$^4J_{\text{H-C}}$
1	41,9	5,04 (sl)	70,3 e 124,6	-	-
2	70,3	4,45 (d, J = 7,8 Hz)	-	-	-
3	32,8	2,02 e 1,96 (m)	-	-	-
4	67,6	4,78 (m)	-	-	-
5	121,9	7,04 (dd, 7,8 e 1,2 Hz)	-	67,6, 114,6 e 123,9	-
5a	142,3	-	-	-	-
6	127,8	7,13 (dd, 7,8 e 7,8 Hz)	-	142,3 e 156,3	-
7	114,6	6,74 (dd, 7,8 e 1,2 Hz)	-	121,9	-
8	156,3	-	-	-	-
8a	123,9	-	-	-	-
1'	118,5	7,08 (d, 8,4 Hz)	-	115,7 e 122,0	124,6
2'	128,2	6,51 (d, 8,4 Hz)	152,4	136,5	-
3'	152,4	-	-	-	-
4'	124,6	-	-	-	-
5'	157,2	-	-	-	-
5'a	115,7	-	-	-	-
6'	104,8	6,95 (dd, 7,8 e 0,6 Hz)	157,2	115,7 e 122,0	-
7'	125,9	7,28 (dd, 7,8 e 7,8 Hz)	-	136,5 e 157,2	-
8'	122,0	7,32 (dd, 7,8 e 0,6 Hz)	-	104,8, 115,7 e 118,5	-
8'a	136,5	-	-	-	-
C5'-OCH ₃	56,5	4,17 (s)	-	157,2	-
C2-OH	-	4,74* (d, 4,8 Hz)	-	-	-
C4-OH	-	4,48* (sl)	-	-	-
C8-OH	-	7,93 (s)	-	123,9	-
C3'-OH	-	9,84 (s)	152,4	124,6	-

Fonte: O autor (2016).

4.7. Estudo da Fração **G6**: Isolamento dos Compostos Majoritários

Para o estudo e isolamento dos compostos majoritários dessa fração, foi feito um gradiente exploratório em CLAE operando em modo reverso com o intuito de se obter um perfil cromatográfico da amostra, como mostrado na **Figura 58**. Foram reservados 6 mg e destinados a ensaios biológicos e, após o *clean up* da amostra em cartucho de SPE, como descrito no item 3.2.10, restaram 13,0 mg da amostra que foram dissolvidos em 870 μ L de solução água:metanol (1:1 v/v) e analisados em HPLC, coluna semipreparativa com injeções de 150 μ L.

Figura 58 - Cromatograma representando o perfil cromatográfico, em modo reverso, da fração **G6** obtida do extrato bruto dos metabólitos produzidos em escala ampliada, por *H. investiens*.

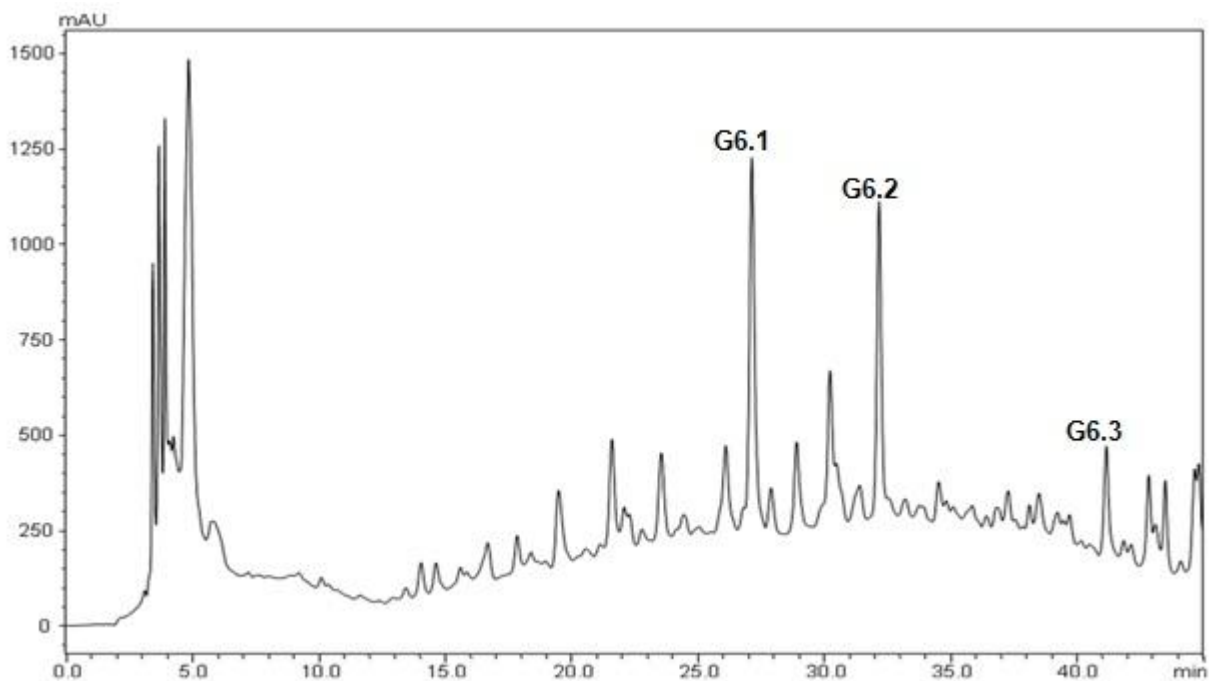


Coluna Analítica Phenomenex® Luna C18, (250 x 4,60 mm), d.p. de 5 μ m; Solvente A: H₂O; Solvente B: MeOH. Gradiente exploratório de 5-100% de B em 50 minutos de desenvolvimento; vazão de 1,00 mL.min⁻¹; λ = 254 nm.

Fonte: O autor (2016).

Após otimização da corrida cromatográfica, o cromatograma obtido em coluna semi preparativa segue como mostrado na **Figura 59**.

Figura 59 - Cromatograma otimizado da fração **G6** em coluna semi preparativa.



Coluna Analítica Phenomenex® Luna C18, (250 x 10,0 mm), d.p. de 5 μm ; Solvente A: H_2O ; Solvente B: MeOH. Gradiente exploratório de 40-75% de B em 30min de desenvolvimento; injeção de 150 μL ; vazão de 3,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Fonte: O autor (2016).

As substâncias **G6.1**, **G6.2** e **G6.3** foram isoladas em quantidades tão diminutas que suas massas não puderam ser determinadas. Também por esse motivo, seus espectros de RMN de ^1H obtidos com o uso da sonda *BBFO-Z plus SmartProbe Broadband* apresentaram relação sinal/ruído tão baixa que não foi possível obter espectros com a resolução adequada e, portanto, eles não foram incluídos no **Material Complementar**. Uma estratégia para contornar esse inconveniente experimental é analisar as amostras utilizando-se a sonda criogênica *Triple inverse TCI Cryo-probehead*. Os espectros no UV-vis desses compostos seguem no **Material Complementar** e permitem inferir que eles possuem semelhança estrutural com a substância **G5.2**. Espera-se que, após análise utilizando-se a sonda criogênica, uma proposta coerente para essas substâncias possa ser feita baseada apenas nos sinais de RMN de ^1H , uma vez que será extremamente difícil a aquisição de espectros a partir dos experimentos de RMN bidimensionais.

5. CONCLUSÕES

O potencial biológico promissor do fungo *H. investiens* foi confirmado com os resultados obtidos no presente trabalho, frente a ensaios antifúngicos contra os fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, bem como ensaios citotóxicos frente as linhagens tumorais HCT-116 e MCF-7. A fração identificada como **G5** apresentou forte atividade antifúngica, além de atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais HCT-116 e MCF-7, enquanto as frações **G4** e **G6** mostraram-se fortemente ativas apenas frente a linhagem tumoral HCT-116, demonstrando atividade citotóxica seletiva. Todos esses resultados obtidos até o momento reforçam a importância da investigação dos microorganismos associados a algas marinhas visando à obtenção de novas moléculas bioativas.

Quanto à diversidade química, o isolamento de 19 substâncias, 18 delas aparentemente inéditas oriundas de frações bioativas, indica que *H. investiens* é uma fonte promissora de novos compostos bioativos. As substâncias **G5.2**, **G5.3** e **G5.4** tiveram seus esqueletos carbônicos completamente elucidados. Experimentos adicionais estão em andamento para determinação da estereoquímica dos centros de quiralidade presentes em cada substância. De fato, a quimiodiversidade apresentada pelo gênero *Hypoxylon* justifica a continuidade de investigação mais aprofundada da linhagem fúngica *H. investiens* em trabalhos futuros. O isolamento do ácido 3-nitropropanóico com grande rendimento (50,3% em massa da fração estudada) por *H. investiens* sinaliza para a possibilidade de uma rota biotecnológica de produção alternativa economicamente viável e ambientalmente mais verde dessa substância que é um precursor sintético versátil importante, muito utilizado industrialmente e de alto valor agregado.

De forma mais abrangente, os resultados apresentados confirmam a importância de estudos de microrganismos do ambiente marinho por evidenciar sua destacada quimiodiversidade, bem como fonte de novas substâncias bioativas, potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, contribuindo para agregar valor e exploração sustentável da biodiversidade marinha brasileira.

Referências

- ABRAHAMSSON, K.; EKDAHL, A.; COLLÉN, J.; PEDERSÉN, M. Marine algae - a source of trichloroethylene and perchloroethylene. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 7, p. 1321-1326, 1995.
- ANGAWI, R. F.; SWENSON, D. C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Malettin A: a new antifungal tropolone from an unidentified fungal colonist of *Hypoxylon stromata* (NRRL 29110). **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 41, p. 7593-7596, Oct. 2003.
- ANGAWI, R. F.; SWENSON, D. C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Malettinins B-D: new polyketide metabolites from an unidentified fungal colonist of *Hypoxylon stromata* (NRRL 29110). **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 2, p. 212-216, Feb. 2005.
- BERGMANN, W.; FEENEY R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981-987, June 1951.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 1, p.14-19, 1996.
- BODO, B.; TIH, R. G.; DAVOUST, D.; JACQUEMIN, H. Hypoxylone, a naphthyl-naphthoquinone pigment from the fungus *Hypoxylon sclerophaeum*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2579-2581, 1983.
- BODO, B.; DAVOUST, D.; LECOMMANDEUR, D.; REBUFFAT, S.; GENETET, I.; PIMON, J. Hymatoxin A, a diterpene sulfate phytotoxin of *Hypoxylon mammatum*, parasite of Aspen. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 21, p. 2355-2358, 1987.
- BORGSCHULTE, K.; REBUFFAT, S.; TROWITZCH-KIENAST, W.; SCHORNBURG, D.; PINON, J.; BODO, B. Isolation and structure elucidation of hymatoxins B-E and other phytotoxins from *Hypoxylon mammatum* fungal pathogen of leuce poplars. **Tetrahedron**, v. 47, n. 39, p. 8351-8360, Sept. 1991.
- BRÄSE, S.; ENCINAS, A.; KECK, J.; NISING, C. F. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 3903-3990, Sept. 2009.
- BROUILLET, E.; JACQUARD, C.; BIZAT, N.; BLUM, D. 3-nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, n. 6, p. 1521-1540, Dec. 2005.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 141-163, Feb. 2004.

BURRESON, B. J.; MOORE, R. E. Haloforms in the essential oil of the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). **Tetrahedron Letters**, n. 7, p. 473-476, Jan. 1975.

BURRESON, B. J.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 856-861, 1976.

CASELLA, T. M.; EPARVIER, V.; MANDAVID, H.; BENDELAC, A.; ODONNE, G.; DAYAN, L.; DUPLAIS, C.; ESPINDOLA, L. S.; STIEN, D. Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. **Phytochemistry**, v. 96, p. 370-377, Dec. 2013.

CHANG, C. W.; CHANG, H. S.; CHENG, M. J.; LIU, T. W.; HSIEH, S. Y.; YUAN, G. F.; CHEN, I. S. Inhibitory effects of constituents of an endophytic fungus *Hypoxylon investiens* on nitric oxide and interleukin-6 production in RAW264.7 macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 6, p. 949-961, June 2014.

CHEN, Y. S.; CHANG, H. S.; CHENG, M. J.; HSIEH, S. Y.; LIU, T. W.; YUAN, G. F.; CHEN, I. S. Secondary metabolites of *Hypoxylon investiens*, an endophytic fungus derived from *Ilex formosana*. **Planta Medica**, v. 80, p. 1541-1542, 2014.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 7, p. 1103-1105, June 2005.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; MAHDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Metabolites from the endophytic mitosporic *Dothideomycete* sp. LRUB20. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 121-127, Jan. 2009.

CHUALÁIM, F. N.; MAGGS, C. A.; SAUNDERS, G. W.; GUIRY, M. D. Molecular systematics, morphology and ecophysiology of *Falkenbergia* isolates. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 6, p. 1112-1126, Dec. 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed.Unicamp, 2006. 456 p.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

DAFERNER, M.; MENSCH, S.; ANKE, T.; STERNER, O. Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, n. 7/8, p. 474-480, July/Aug. 1999.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Endophytes and associated marine derived fungi - ecological and chemical perspectives. **Fungal Diversity**, v. 57, n. 1, p. 45-83, Nov. 2012.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p.

EDWARDS, R. L.; ANDERSON, J. R.; WHALLEY, A. J. S. Chestersiene, 4-(4-methoxyphenoxy)buta-1,2-diene: an allenic ether from the fungus *Hypoxylon chestersii*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1721-1723, 1982.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-25, Jan. 2010.

EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; LEFRANC, F.; MATHIEU, V.; KISS, R. Fungal metabolites with anticancer activity. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 5, p. 617-627, Mar. 2014.

FELÍCIO, R. de; PAVÃO, G. B.; OLIVEIRA, A. L. L. de; ERBERT, C.; CONTI, R.; PUPO, M. T.; FURTADO, N. A. J. C.; FERREIRA, E. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 641-650, nov./dez. 2015.

FLORES, A. C.; PAMPHILE, J. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; CLEMENTE, E. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 29, p. 923-932, June 2013.

FUKAI, M.; TSUKADA, M.; MIKI, K.; SUZUKI, T.; SUGITA, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; SHIRO, M.; KOYAMA, K. Hypoxylonols C-F, Benzo[*j*]fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 22-25, Jan. 2012.

FUKAI, M.; SUZUKI, T.; NAGASAWA, I.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; KOYAMA, K. Antiangiogenic activity of hypoxylonol C. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 1065-1068, Apr. 2014.

GARZOLI, L.; GNAVI, G.; VARESE, G. C.; PICCO, A. M. Mycobiota associated with the rhodophyte alien species *Asparagopsis taxiformis* (Delille) Trevisan de Saint-Léon in the Mediterranean Sea. **Marine Ecology**, v. 36, n. 4, p. 959-968, 2015.

GENOVESE, G.; TEDONE, L.; HAMANN, M. T.; MORABITO, M. The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: a source of compounds against *Leishmania*. **Marine Drugs**, v. 7, n. 3, p. 361-366, Aug. 2009.

GENOVESE, G.; FAGGIO, C.; GUGLIANDOLO, C.; TORRE, A.; SPANO, A.; MORABITO, M.; MAUGERI, T. L. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. **Marine Environmental Research**, v. 73, n. 1, p. 1-6, 2012.

GENOVESE, G.; ROMEO, O.; MORABITO, M.; ALESSI, D.; CRISEO, G.; FAGGIO, C. Activity of ethanolic extracts of *Asparagopsis taxiformis* against the major molecular types of *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* complex. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 21, p. 2662-2667, May 2013.

GREFF, S.; ZUBIA, M.; GENTA-JOUVE, G.; MASSI, L.; PEREZ, T.; THOMAS, O. P. Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 1150-1155, Apr. 2014.

GROTHAUS, P. G.; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1781-1791, 2010.

GU, W.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; DING, H.; ZHU, H. L.; ZHAO, X. A.; TAN, R. X. Cytotoxic benzo[*j*]fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an endophyte of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 114-117, Feb. 2007.

GUBIANI, J. R.; ZERAIK, M. L.; OLIVEIRA, C. M.; XIMENES, V. F.; NOGUEIRA, C. R.; FONSECA, L. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Biologically active eremophilane-type sesquiterpenes from *Camarops* sp., an endophytic fungus isolated from *Albertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 668-672, Mar. 2014.

HAYEE-MEMON, A.; SHAMEEL, M. A taxonomic study of some red algae commonly growing on the coast of Karachi. **Pakistan Journal of Marine Sciences**, v. 5, n. 2, p. 113-137, 1996.

HIPKIN, C. R.; SIMPSON, D. J.; WAINWRIGHT, S. J.; SALEM, M. A. Nitrification by plants that also fix oxygen. **Nature**, v. 430, p. 98-101, July 2004.

HLADKI, A. I.; ROMERO, A. I. Taxonomic and nomenclatural aspects of *Hypoxylon* taxa from southern South America proposed by Spegazzini. **Mycologia**, v. 101, n. 5, p. 733-744, Apr. 2009.

HOMANS, A. L. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungi toxic substances. **Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, p.468-482, 2011.

JONES, E. B. G.; STANLEY, S. J.; PINRUAN, U. Marine endophyte sources of new chemical natural products: a review. **Botanica Marinha**, v. 51, n. 3, p. 163-170, June 2008.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, p. 479-490, 2010.

KOYAMA, K.; KURAMOCHI, D.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K. Hypoxylonols A and B, novel reduced benzo[*g*]fluoranthene derivatives from the mushroom *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, p. 1489-1490, Oct. 2002.

KUHNERT, E.; HEITKAMPER, S.; FOURNIER, J.; SURUP, F.; STADLER, M. Hypoxyvermelhotins A-C, new pigments from *Hypoxylon lechatti* sp. nov. **Fungal Biology**, v. 118, n. 2, p. 242-252, Feb. 2014.

KUHNERT, E.; SURUP, F.; WIEBACH, V.; BERNECKER, S.; STADLER, M. Botryane, noreudesmane and abietane terpenoids from the ascomycete *Hypoxylon rickii*. **Phytochemistry**, v. 117, p. 116-122, Sept. 2015a.

KUHNERT, E.; SURUP, F.; HERMANN, J.; HUCH, V.; MULLER, R.; STADLER, M. Rickenyls A-E, antioxidative terphenyls from the fungus *Hypoxylon rickii* (Xylariaceae, Ascomycota). **Phytochemistry**, v. 118, p. 68-73, Oct. 2015b.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. 382 p.

LASSOE, T.; SRIKITIKULCHAI, P.; FOURNIER, J.; KOPCKE, B.; STADLER, M. Lepralic acid derivatives as chemotaxonomic markers in *Hypoxylon aeruginosum*, *Chlorostroma subcubisporum* and *C. cyaninum*, sp. nov. **Fungal Biology**, v. 114, n. 5/6, p. 481-489, May/June 2010.

LUDOLPH, A. C.; HE, F.; SPENCER, P. S.; HAMMERSTAD, J.; SABRI, M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 492-498, Nov. 1991.

MANILAL, A.; SUJITH, S.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; SHAKIR, C.; GANDHIMATHI, R.; LIPTON, A. P. Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from the south west coast of India tested against shrimp, human and phytopathogens. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 207-219, 2009.

MARSHALL, R. A.; HARPER, D. B.; McROBERTS, W. C.; DRING, M. J. Volatile bromocarbons produced by *Falkenbergia* stages of *Asparagopsis* spp. (Rhodophyta). **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 5, p. 1348-1352, 1999.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The chemistry of algal secondary metabolism. In: ASMLER, C. D. (Ed.). **Algal chemical ecology**. Berlin: Springer, 2008. Chap. 1, p. 1-24.

McCONNELL, O.; FENICAL, W. Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 367-374, 1977.

MEDINA, R. P. **Bioprospecção das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e de seus fungos endofíticos: potencial antifúngico, citotóxico, quimiopreventivo e tripanocida**. 2014. 58 f. Qualificação (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

MEDINA, R.; BIASETTO, C.; SOEMNSI, A.; YOKOYA, N.; LOPES, M.; ARAÚJO, A.; SILVA, D. 5-Hydroxymethylmellein: an isocoumarin derivative from an endophytic fungus from red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. 1395-1396, 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUHLBAUER, A.; TRIEBEL, D.; PERSON, D.; WOLLWEVER, H.; SEIP, S.; STADLER, M. Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. **Mycological Progress**, v. 1, n. 3, p. 235-248, Aug. 2002.

MYERS, R. H.; VONSATTEL, J. P.; STEVENS, T. J.; CUPPLES, L. A.; RICHARDSON, E. P.; MARTIN, J. B.; BIRD, E. D. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. **Neurology**, v. 38, n. 3, p. 341-347, Mar. 1988.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, A. L. L. de; FELÍCIO, R. de; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, jul./ago. 2012.

ONDEYKA, J.; HENSENS, O. D.; ZINK, D.; BALL, R.; LINGHAM, R. B.; BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; GOETZ, M. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. II. Isolation and structure. **Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 5, p. 679-685, May 1992.

PANG, K. L.; MITCHELL, J. I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marinha**, v. 48, p. 332-347, Dec. 2005.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n.1, p. 31-39, Jan. 2008.

PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia-Hypogoea*). **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 61, p. 1064-1067, 1984.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; TOYOTA, M.; ASAKAWA, Y. Ocurrence of high concentration of spider pheromones in the Ascomycete fungus *Hypoxylon truncantum*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1613-1614, Dec. 2003.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; TANAKA, M.; STADLER, M.; ASAKAWA, Y. Cyclic azaphilones daldinins E and F from the ascomycete fungus *Hypoxylon fuscum* (Xylariaceae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 4, p. 469-473, Fev. 2004a.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; STADLER, M.; ASAKAWA, Y. New azaphilones from the inedible mushroom *Hypoxylon rubiginosum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 7, p. 1152-1155, Aug. 2004b.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; STADLER, M.; RADULOVIC, N.; ASAKAWA, Y. Antimicrobial azaphilones from the fungus *Hypoxylon multiforme*. **Planta Medica**, v. 71, n. 11, p. 1058-1062, Dec. 2005a.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; NOMURA, Y.; WOLLWEBER, H.; HELLWIG, V.; FOURNIER, J.; STADLER, S.; ASAKAWA, Y. Coharins A e B, azaphilones from the fungus *Hypoxylon coharens*, and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 7, p. 797-809, Apr. 2005b.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; STADLER, M.; ASAKAWA, Y. Dimeric azaphilones from the xylariaceous ascomycete *Hypoxylon rutilum*. **Tetrahedron**, v. 61, n. 35, p. 8451-8455, 2005c.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2015. 213 p.

QUFU DELU BIOTECHNOLOGY (China). T. Liu; L. Yao. **Method for preparing 3-nitropropionic acid**. CN 104447346 A, 9 Dec. 2014, 25 Mar. 2015.

Disponível em: <<http://www.google.com/patents/CN104447346A?cl=en>>.

Acesso em: 26 jan. 2016.

RAGONESE, C.; TEDONE, L.; BECCARIA, M.; TORRE, G.; CICHELO, F.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Characterization of lipid fraction of marine macroalgae by means of chromatography techniques coupled to mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 145, p. 932-940, 2014.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; MONOD, M.; FRENK, E. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-203, 1991.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; HOSTETTMANN, K. Antifungal testes in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, v. 60, p. 41-44, 1994.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 290-344, 2011.

RENGASAMY, K. R. R.; KULKARNI, M. G.; STRIK, W. A.; VAN STADEN, J. Advances in algal drug research with emphasis on enzyme inhibitors. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1364-1381, Sept. 2014.

SALEM, M. A.; WILLIAMS, J. M.; WAINWRIGHT, S. J.; HIPKIN, C. R. Nitroaliphatic compounds in *Hippocrepis comosa* and other legumes in the European flora. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 89-91, Sept. 1995.

SANDHIR, R.; MEHROTRA, A.; KAMBOJ, S. S. Lycopene prevents 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in nervous system. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 5, p. 579-587, Nov. 2010.

SCHLINGMANN, G.; MILNE, L.; CARTER, G. T. Isolation and identification of antifungal polyesters from the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. **Tetrahedron**, v. 58, p. 6825-6835, Aug. 2002.

SCHLINGMANN, G.; MILNE, L.; WILLIAMS, D. R.; CARTER, G. T. Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. II. Isolation and structure determination. **The Journal of Antibiotics**, v. 5, n. 3, p. 303-316, Mar. 1998.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, Sept. 2002.

SIGMA-ALDRICH. **3-nitropropionic acid**. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/n22908?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em: 5 jan. 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New Jersey: Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 9th ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011. v. 1, 675 p.

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

STEGLICH, W.; KLAAR, M.; FURTNER, W. (+)-Mitorubrin derivatives from *Hypoxylon fragiforme*. **Phytochemical Reports**, v. 13, n. 12, p. 2874-2875, Dec. 1974.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infections**, v. 5, p. 535-544, 2003.

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

TAKAHASHI, K.; SHIRO, M.; KOYAMA, K. Hypoxylonols C-F, Benzo[*j*]fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 22-25, Jan. 2012.

TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, v. 14, p. 83-90, 1991.

TOMSHECK, A. R.; STROBEL, G. A.; BOOTH, E.; GEARY, B.; SPAKOWICZ, D.; KNIGHTON, B.; FLOERCHINGER, C.; SEARS, J.; LIARZI, O.; EZRA, D. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-Cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 903-914, Oct. 2010.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBEG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 5, p. 271-289, 1956.

VEDHAGIRI, K.; MANILAL, A.; VALLIYAMMAI, T.; SHANMUGHAPRIYA, S.; SUJITH, S.; SELVIN, J.; NATARAHASEENIVASAN, K. Antimicrobial potential of a marine seaweed *Asparagopsis taxiformis* against *Leptospira javanica* isolated of rodent reservoirs. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 431-437, 2009.

WOOLARD, F. X.; MOORE, R. E.; ROLLER, P. P. Halogenated acetic and acrylic acids from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 617-620, 1979.

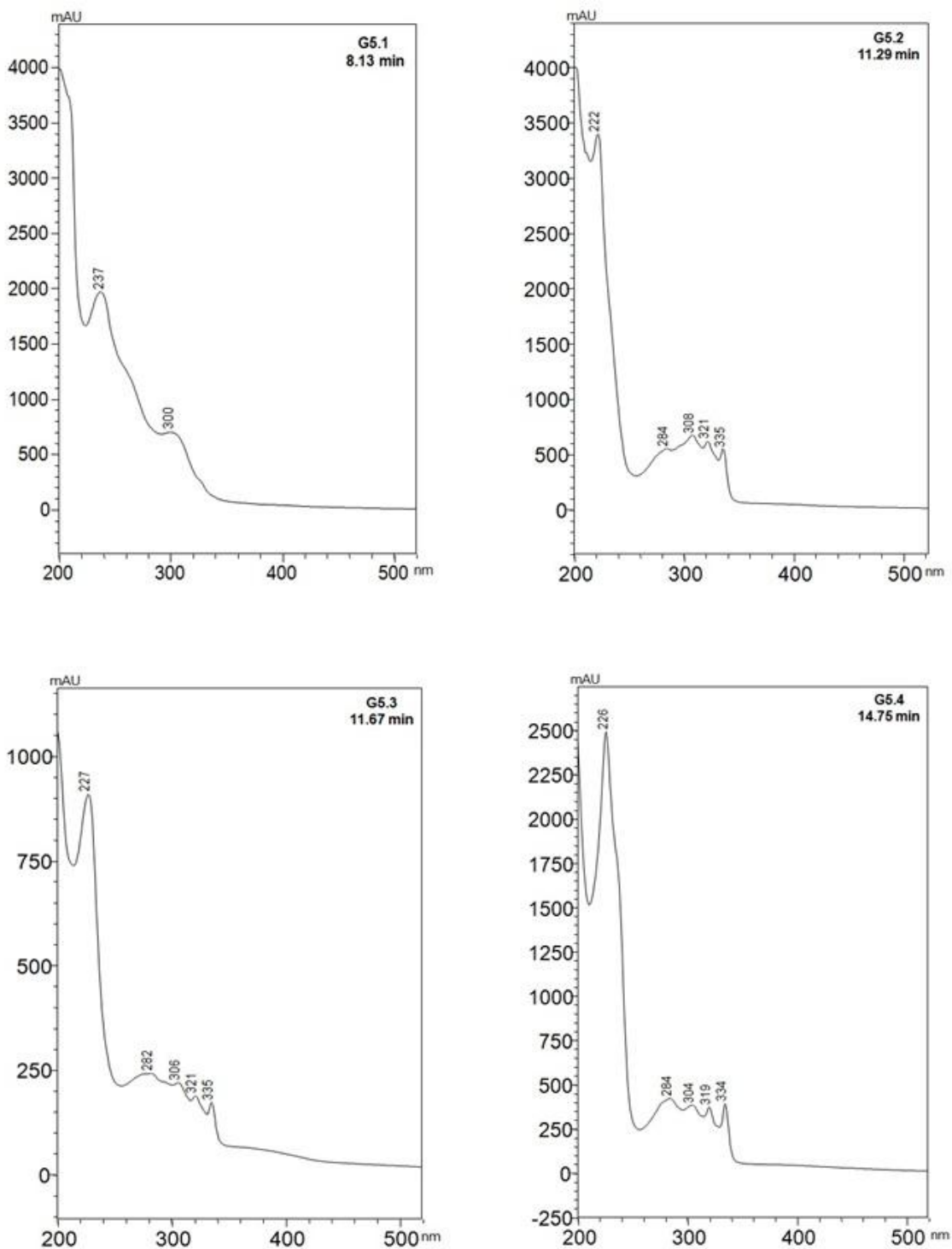
WU, C-s (Ed.). **Handbook of size exclusion chromatography and related techniques**: revised and expanded. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 694 p.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.

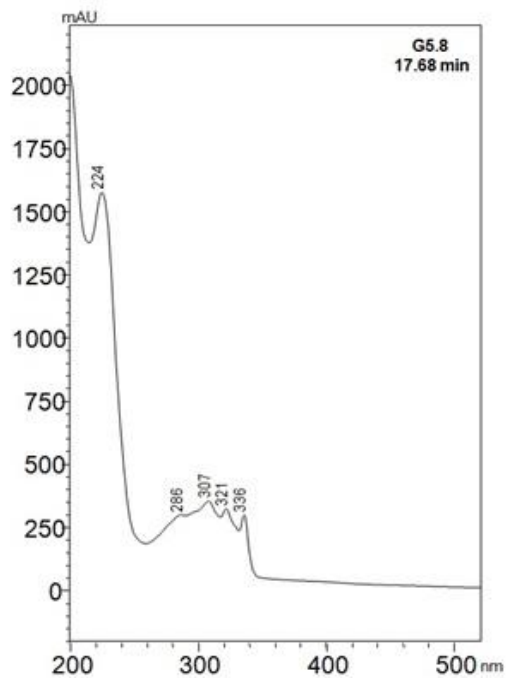
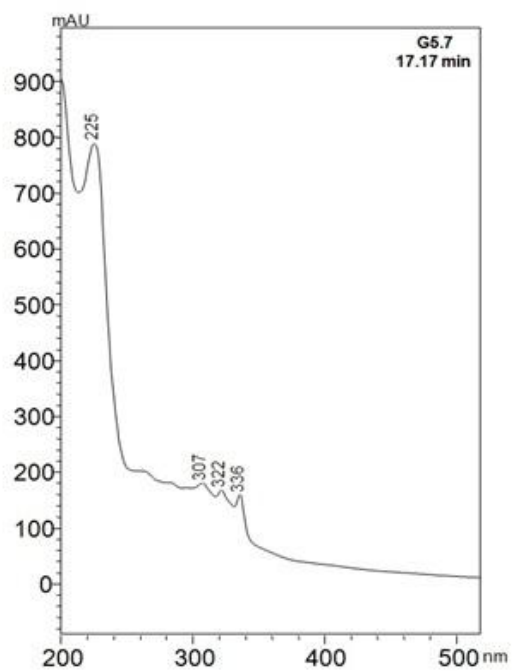
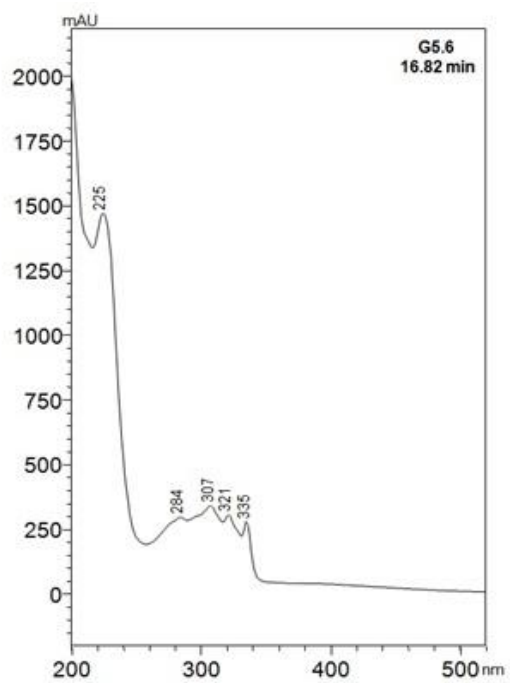
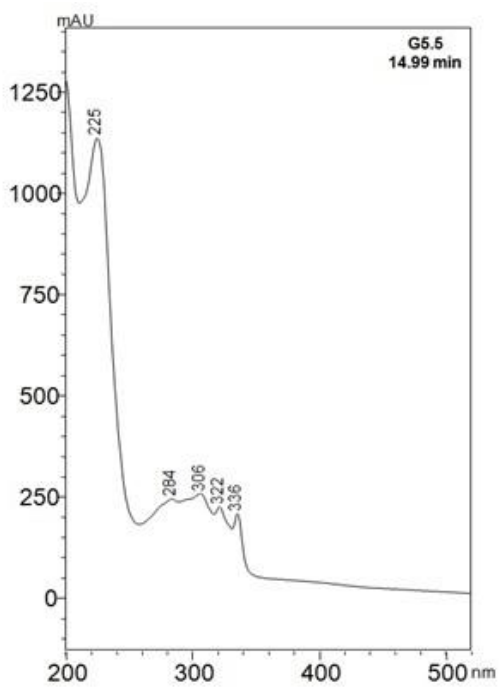
Material Complementar

1 - Espectros no UV-Vis das substâncias isoladas da fração **G5**. Note a similaridade dos espectros, o que indica fortemente que essas substâncias devem possuir estruturas muito similares, possuindo a mesma estrutura base (mesmo grupo cromóforo).



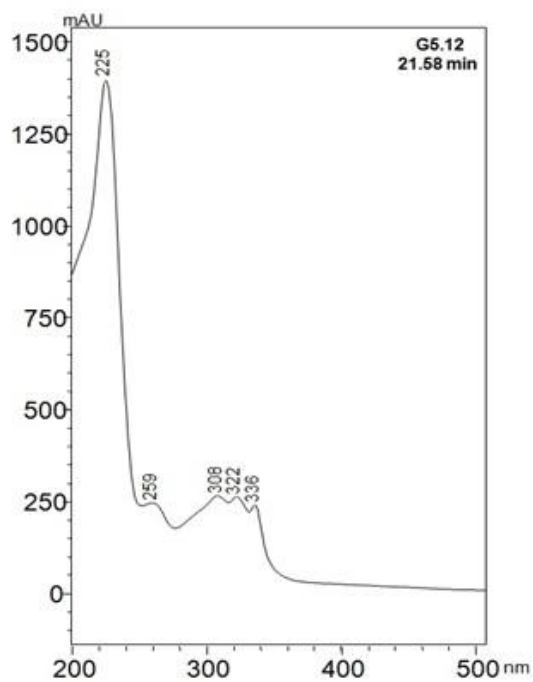
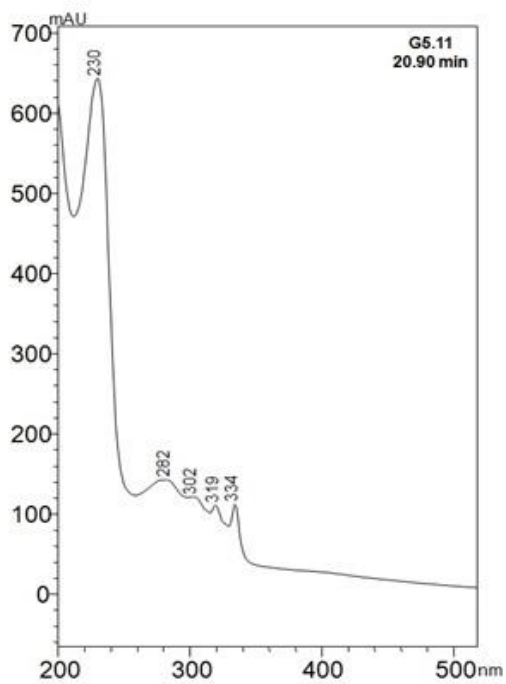
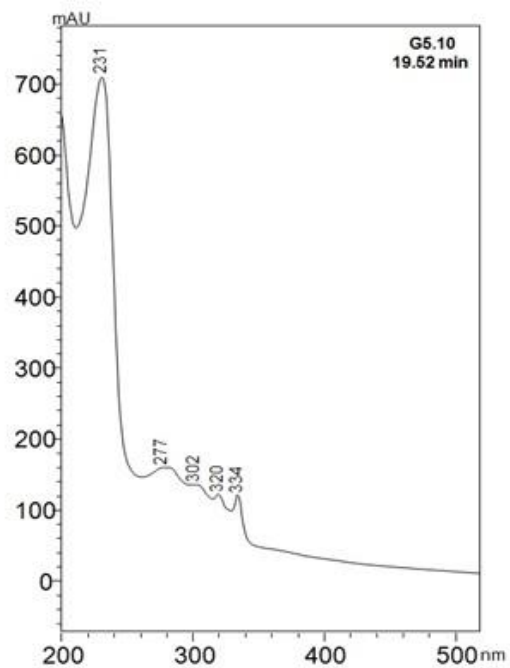
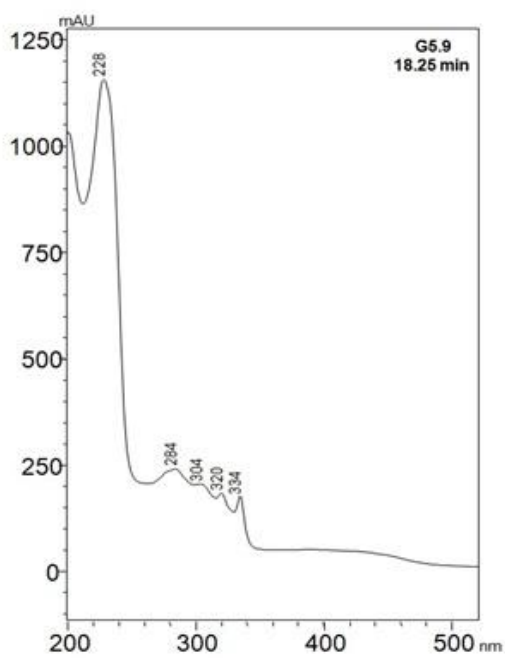
Fonte: O autor (2016).

1 - Continuação.



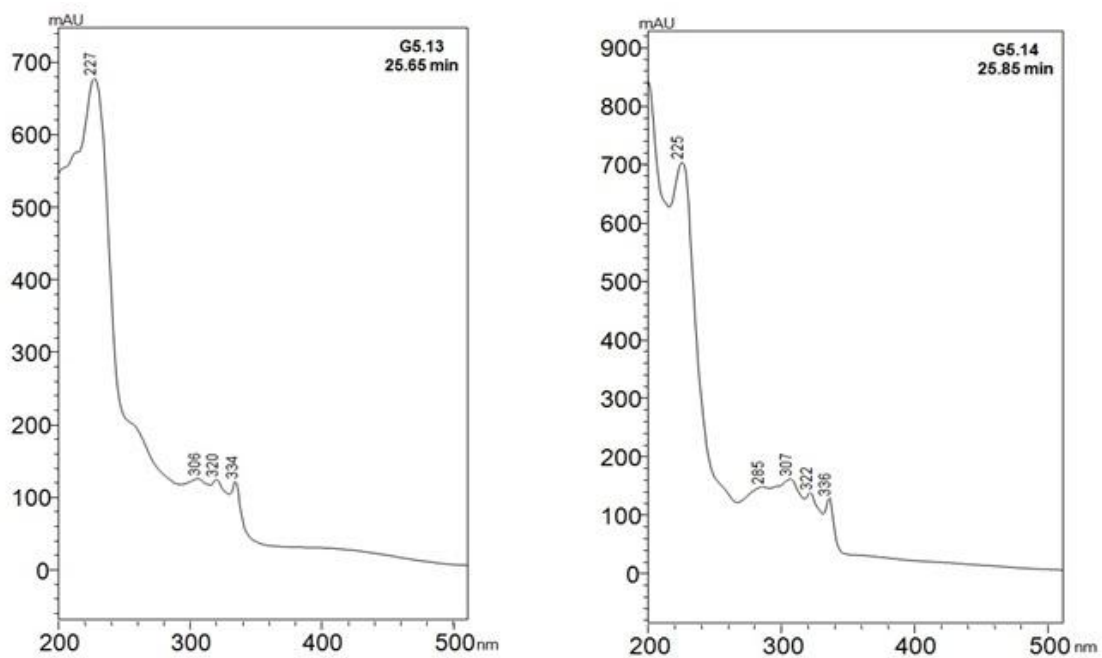
O autor (2016).

1 - Continuação.



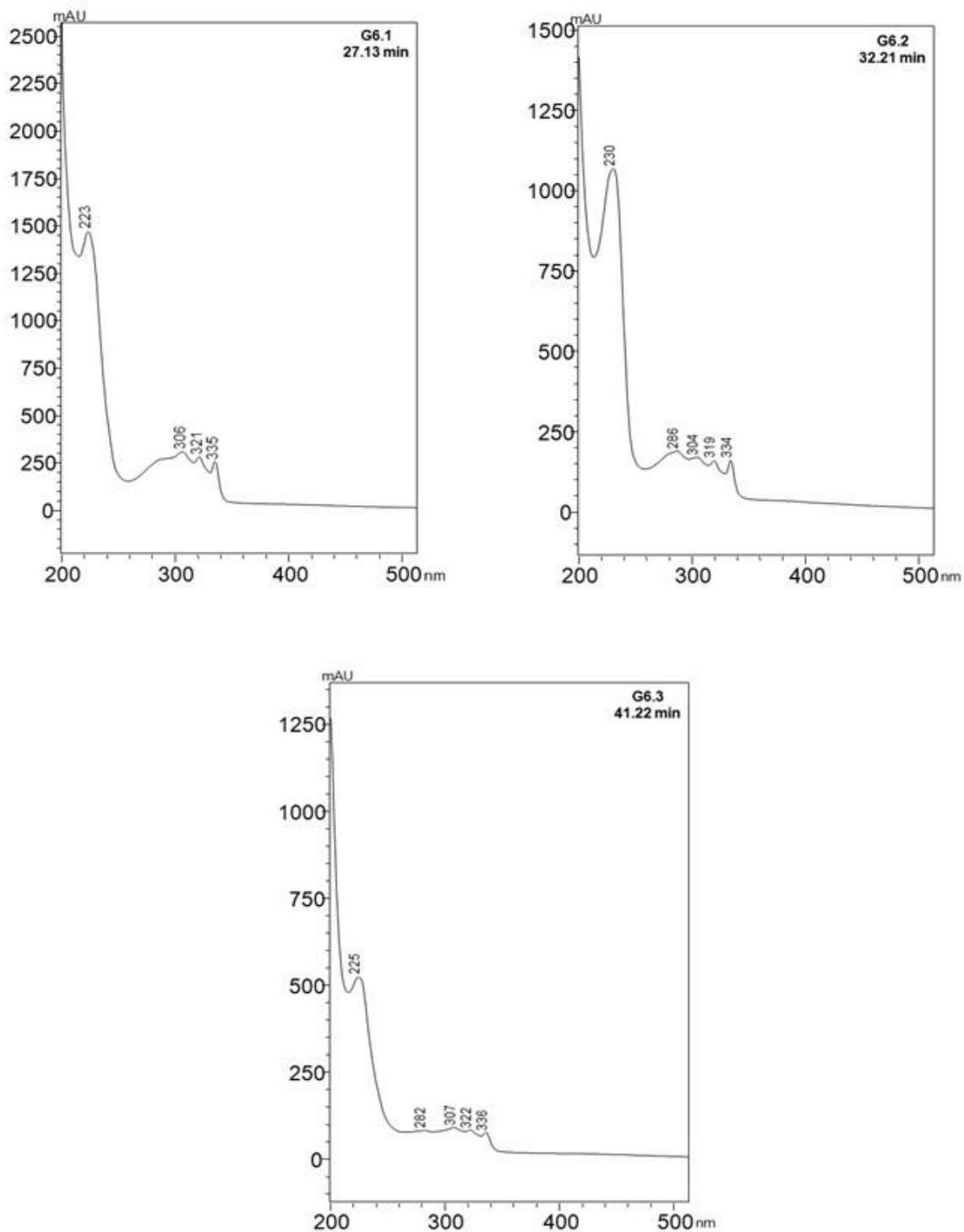
Fonte: O autor (2016).

1 - Continuação.



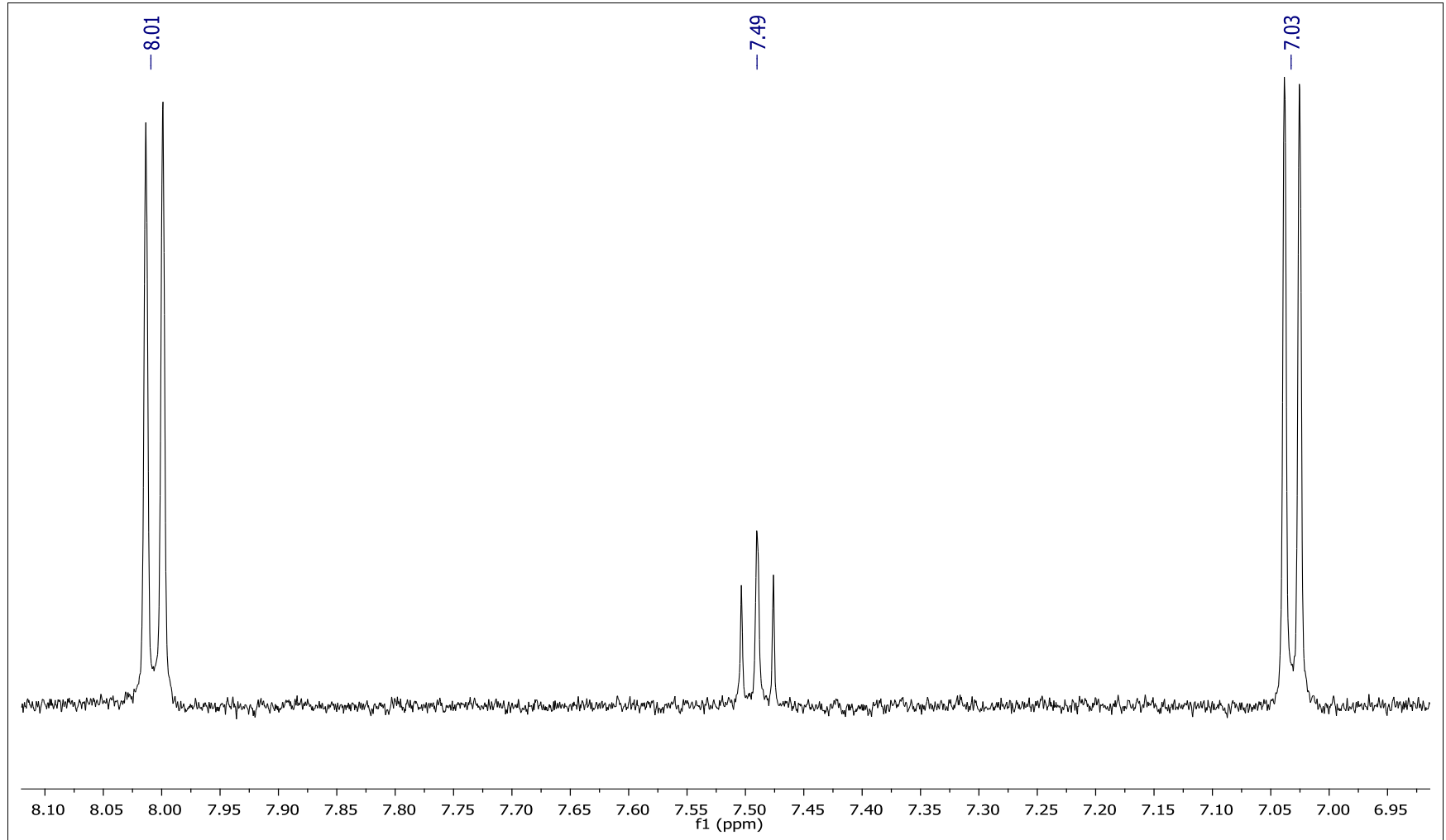
Fonte: O autor (2016).

2 - Espectros no UV-Vis das substâncias isoladas da fração **G6**. A grande similaridade entre os espectros das substâncias isoladas dessa fração e daquelas isoladas da fração **G5** indica que todas as 17 substâncias isoladas, das frações **G5** e **G6** devem ser similares, possuindo a mesma estrutura base.



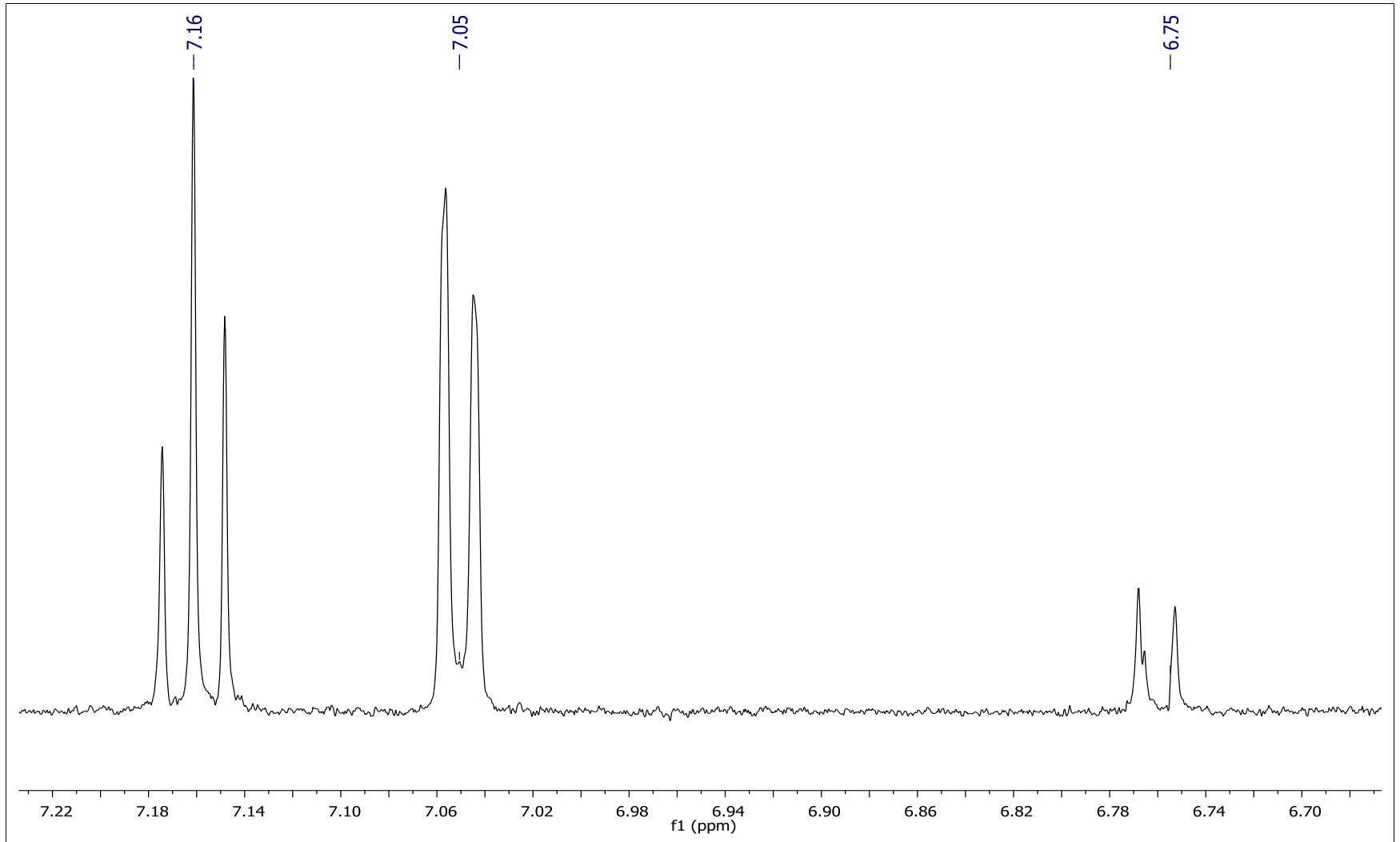
Fonte: O autor (2016).

3 - Espectro TOCSY-1D da substância **G5.2** irradiando-se em 4494 Hz (7,49 ppm) (600 MHz, acetona- d_6).



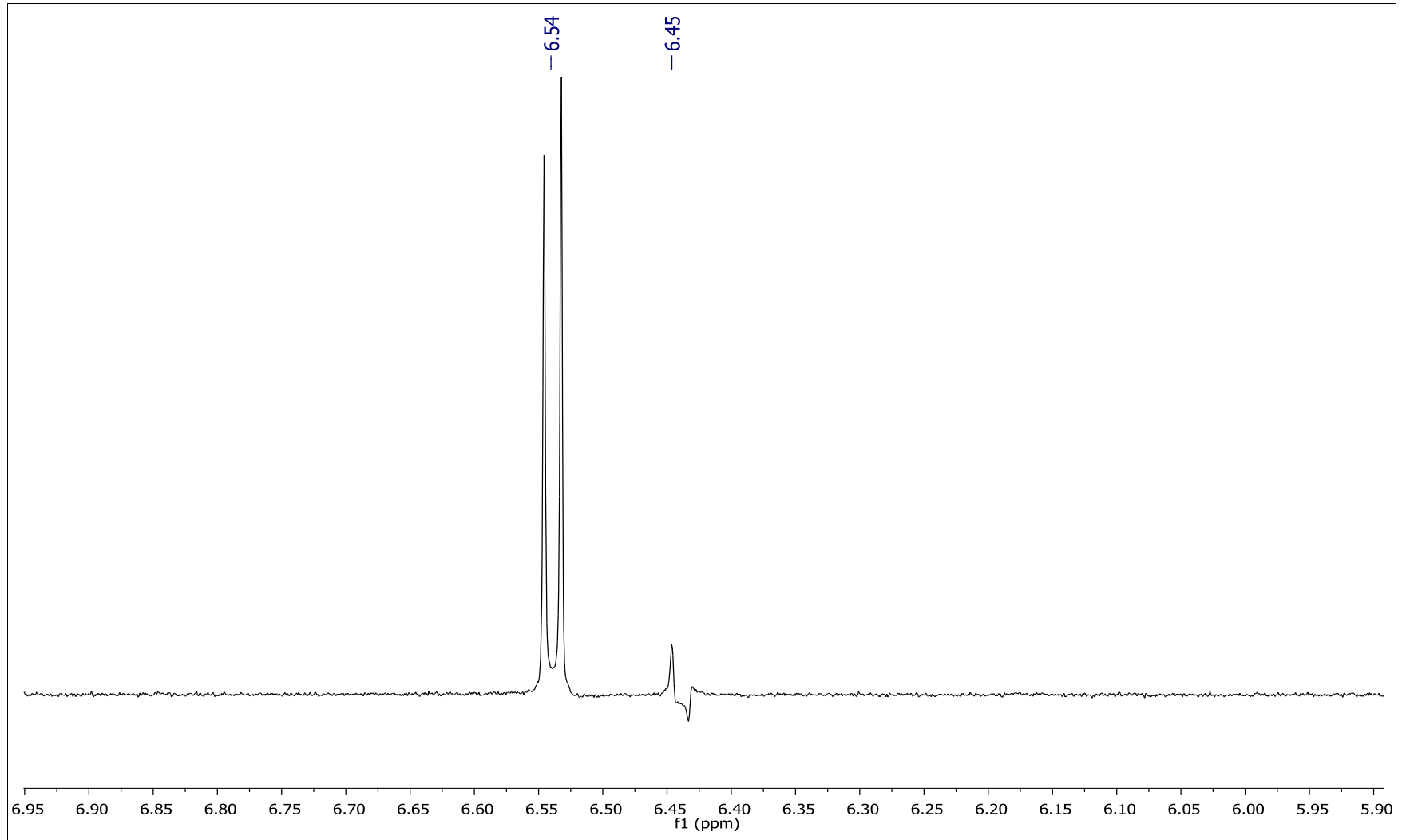
Fonte: O autor (2016).

4 - Espectro TOCSY-1D da substância **G5.2** irradiando-se em 4050 Hz (6,75 ppm) (600 MHz, acetona- d_6).



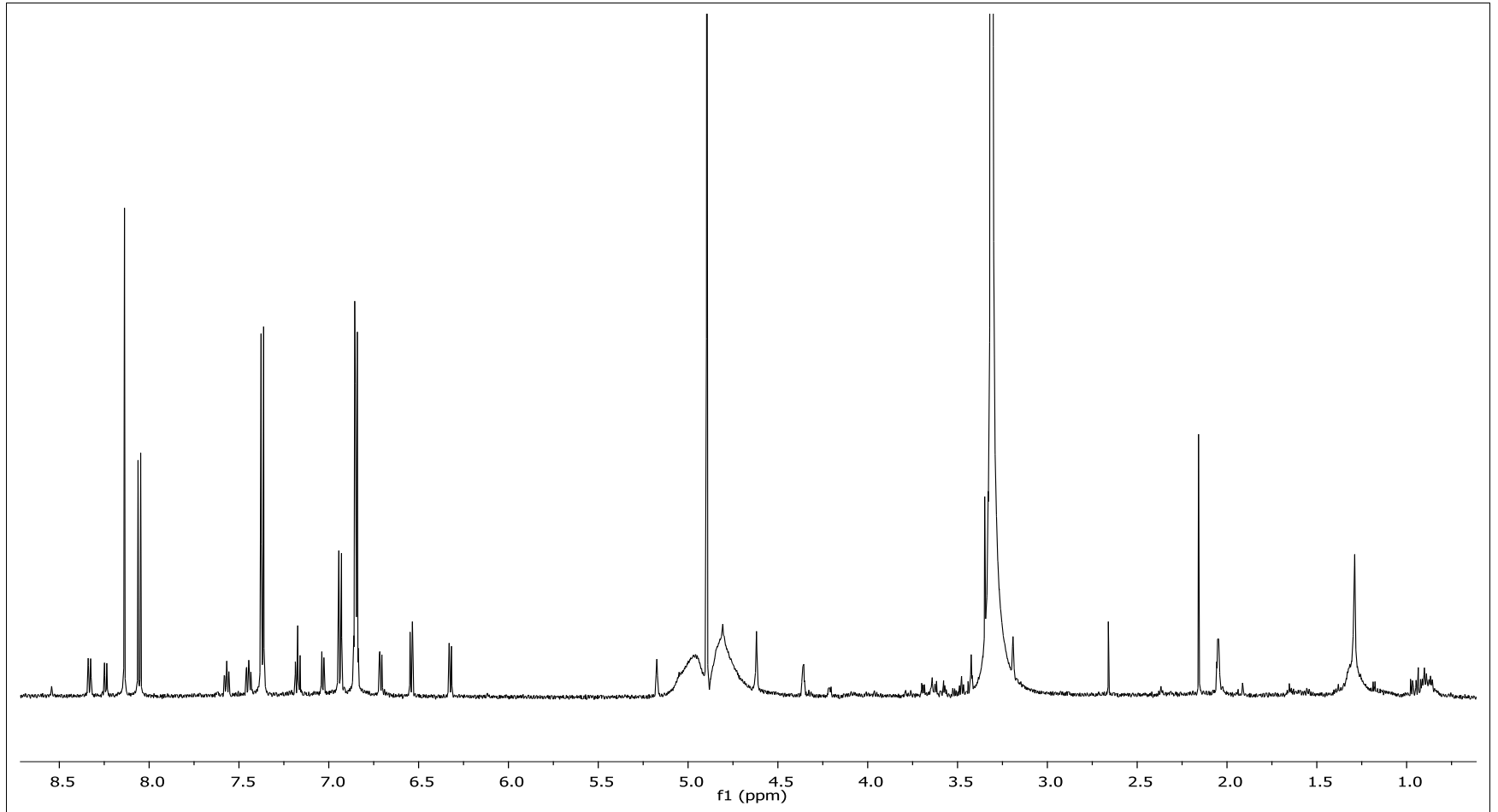
Fonte: O autor (2016).

5 - Espectro TOCSY-1D da substância **G5.2** irradiando-se em 3924 Hz (6,54 ppm) (600 MHz, acetona- d_6).



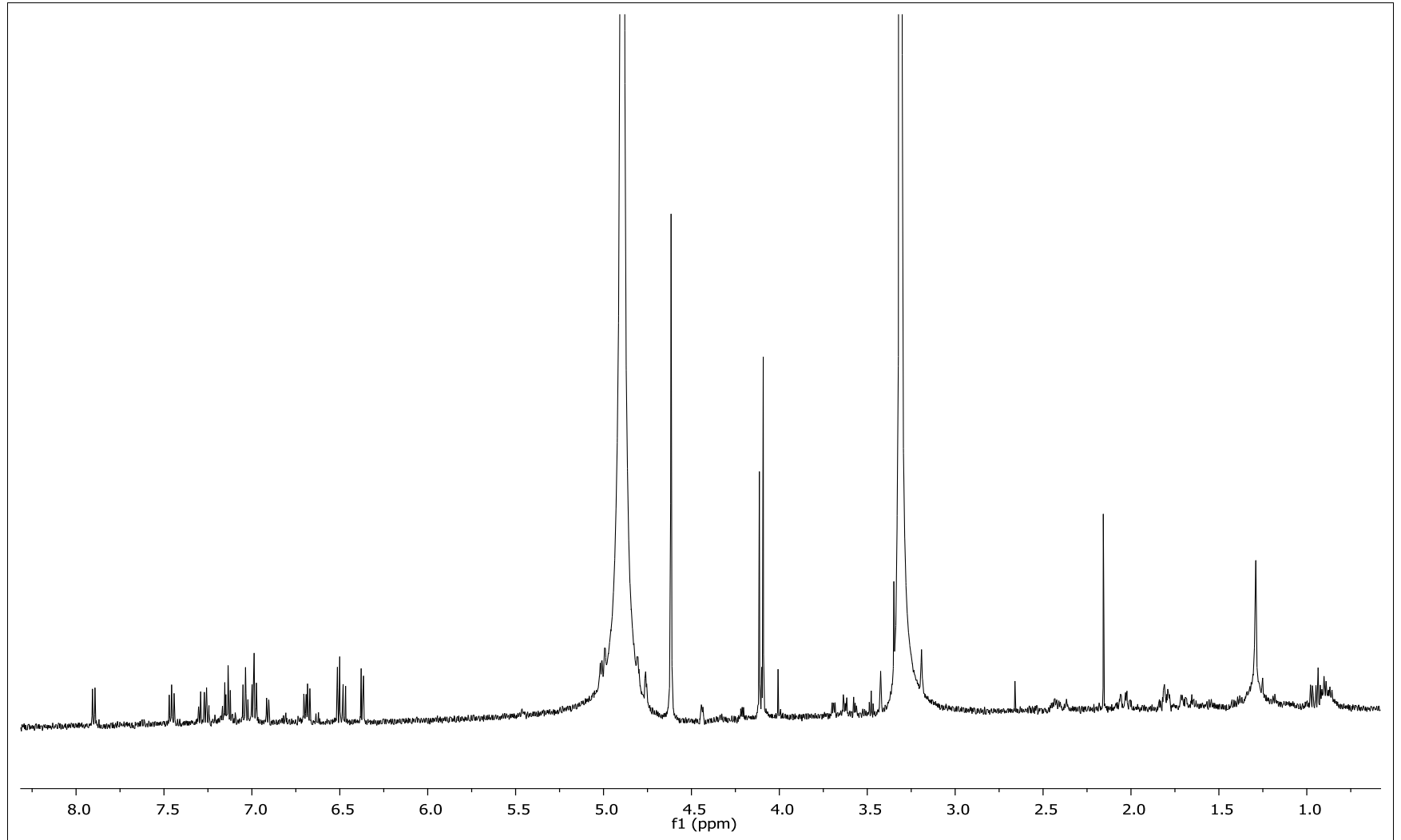
Fonte: O autor (2016).

6 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.1**, com supressão do sinal da água, em CD_3OD , 600 MHz.



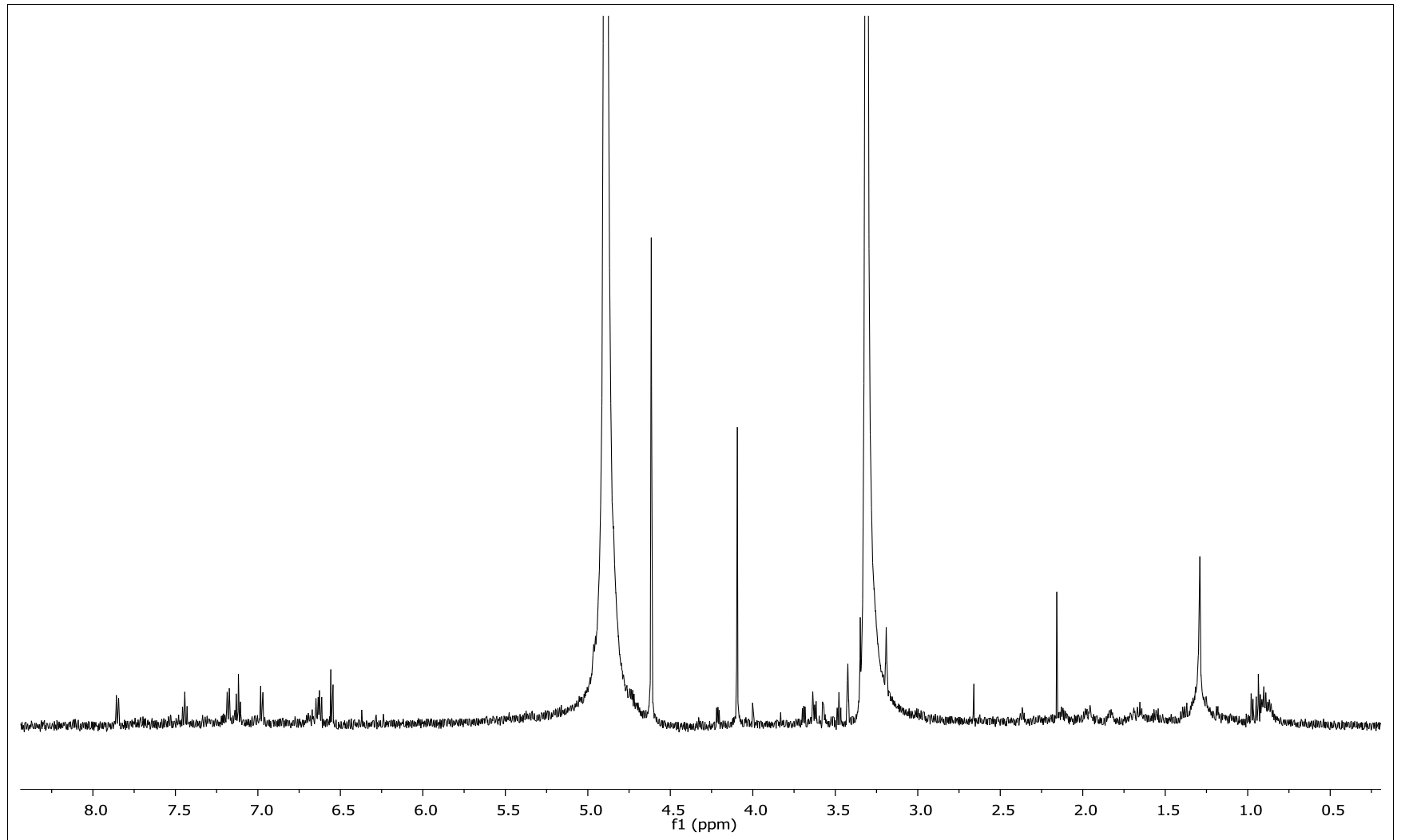
Fonte: O autor (2016).

7 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.5** em CD_3OD , 600 MHz.



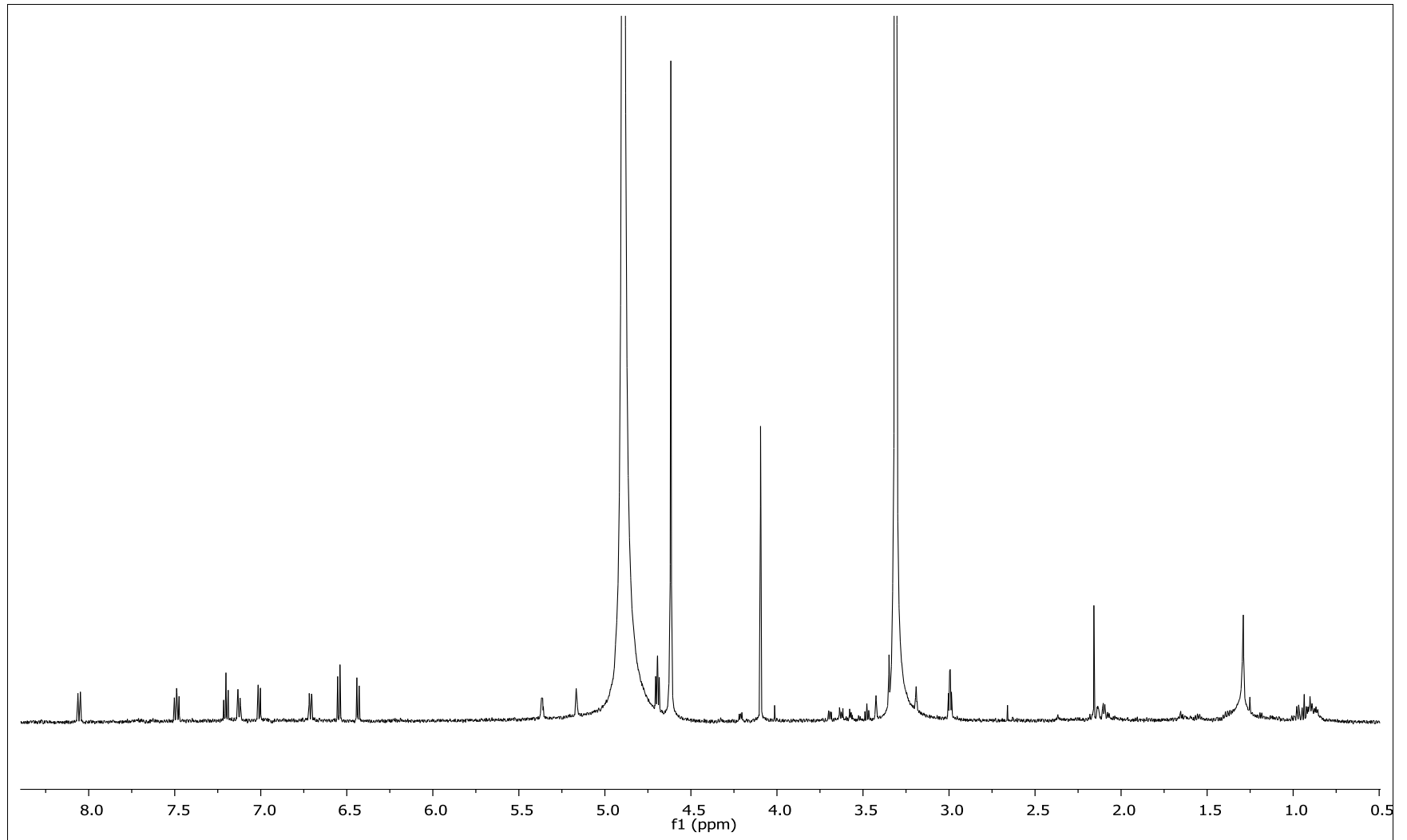
Fonte: O autor (2016).

8 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.6** em CD_3OD , 600 MHz.



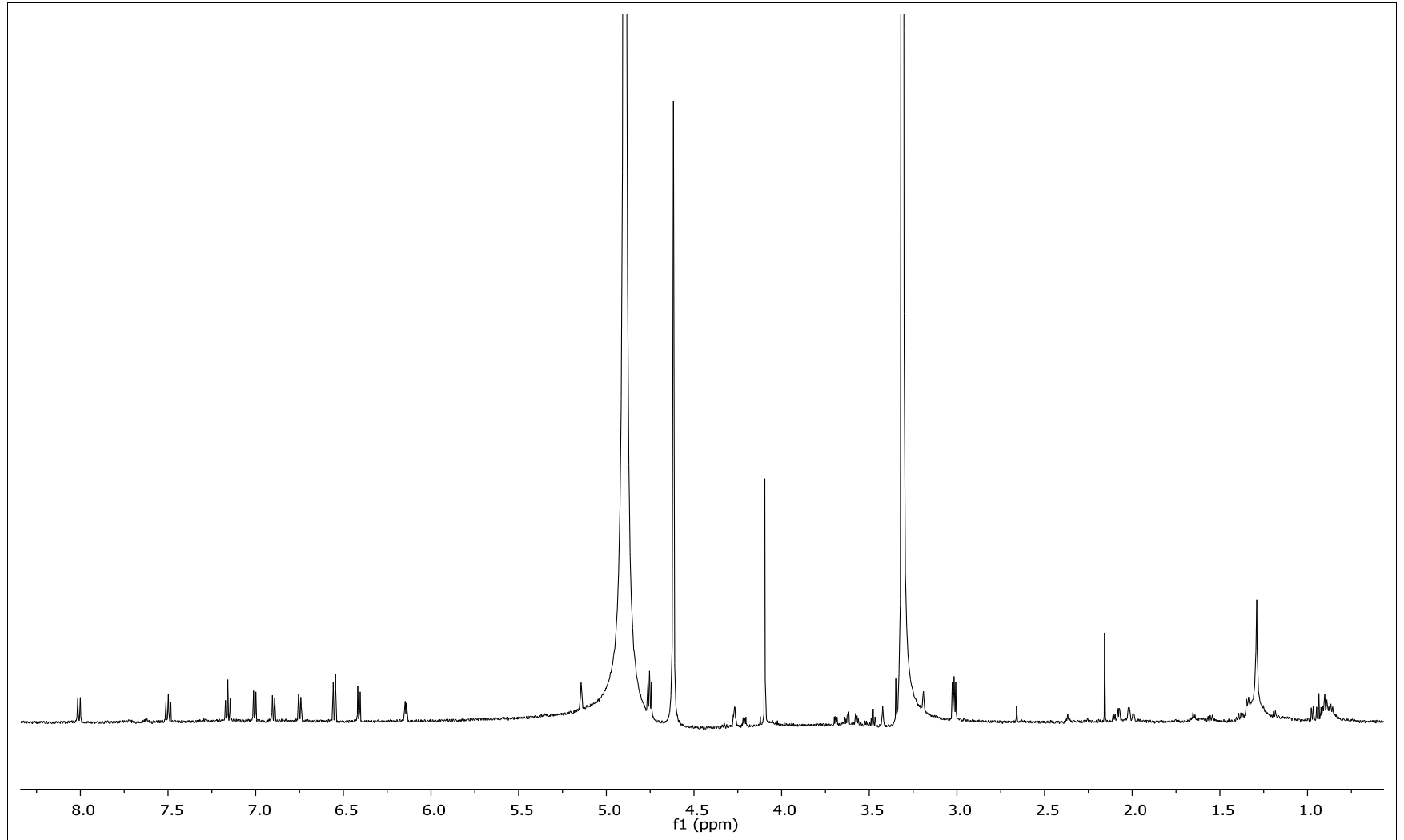
Fonte: O autor (2016).

9 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.7** em CD_3OD , 600 MHz.



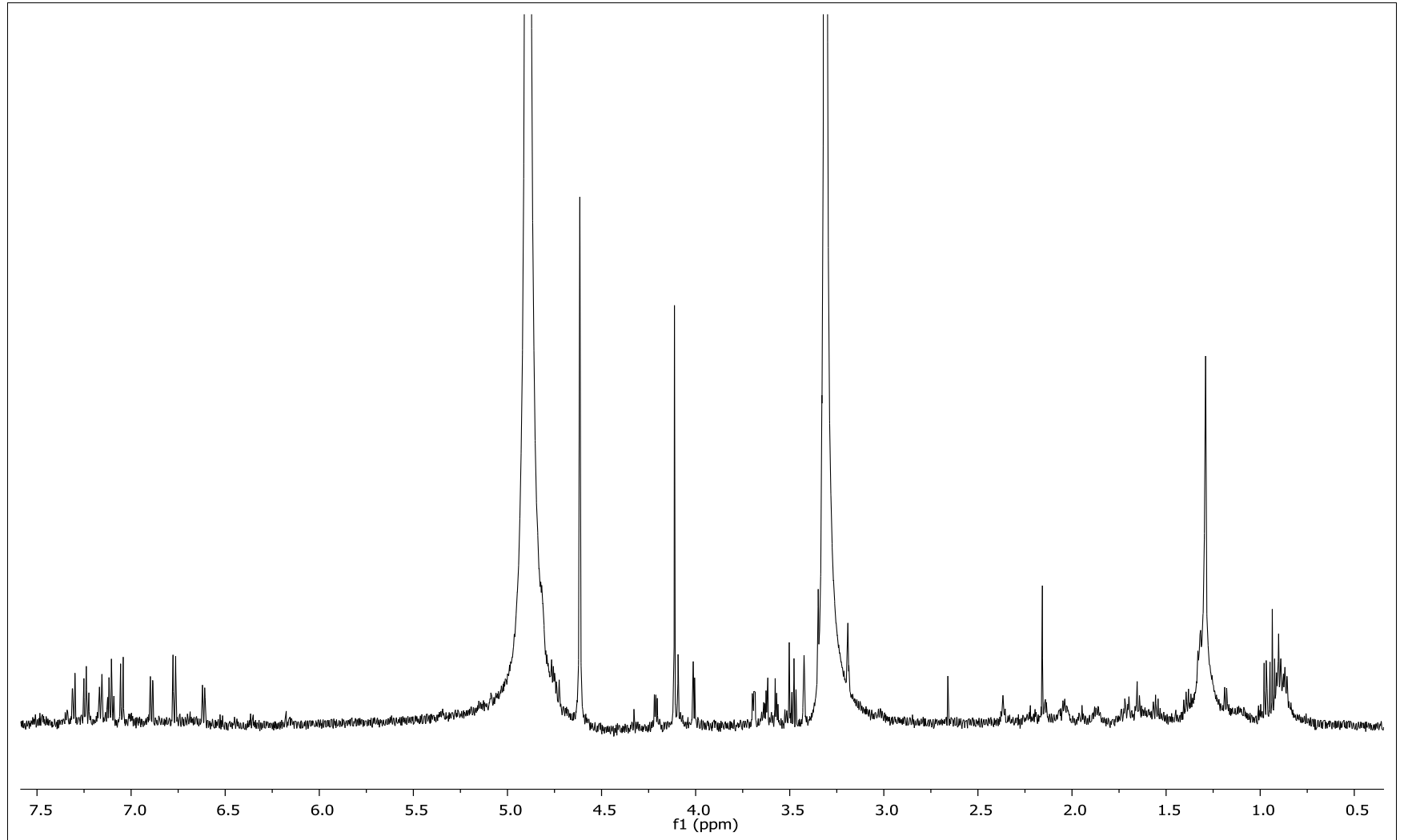
Fonte: O autor (2016).

10 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.8** em CD_3OD , 600 MHz.



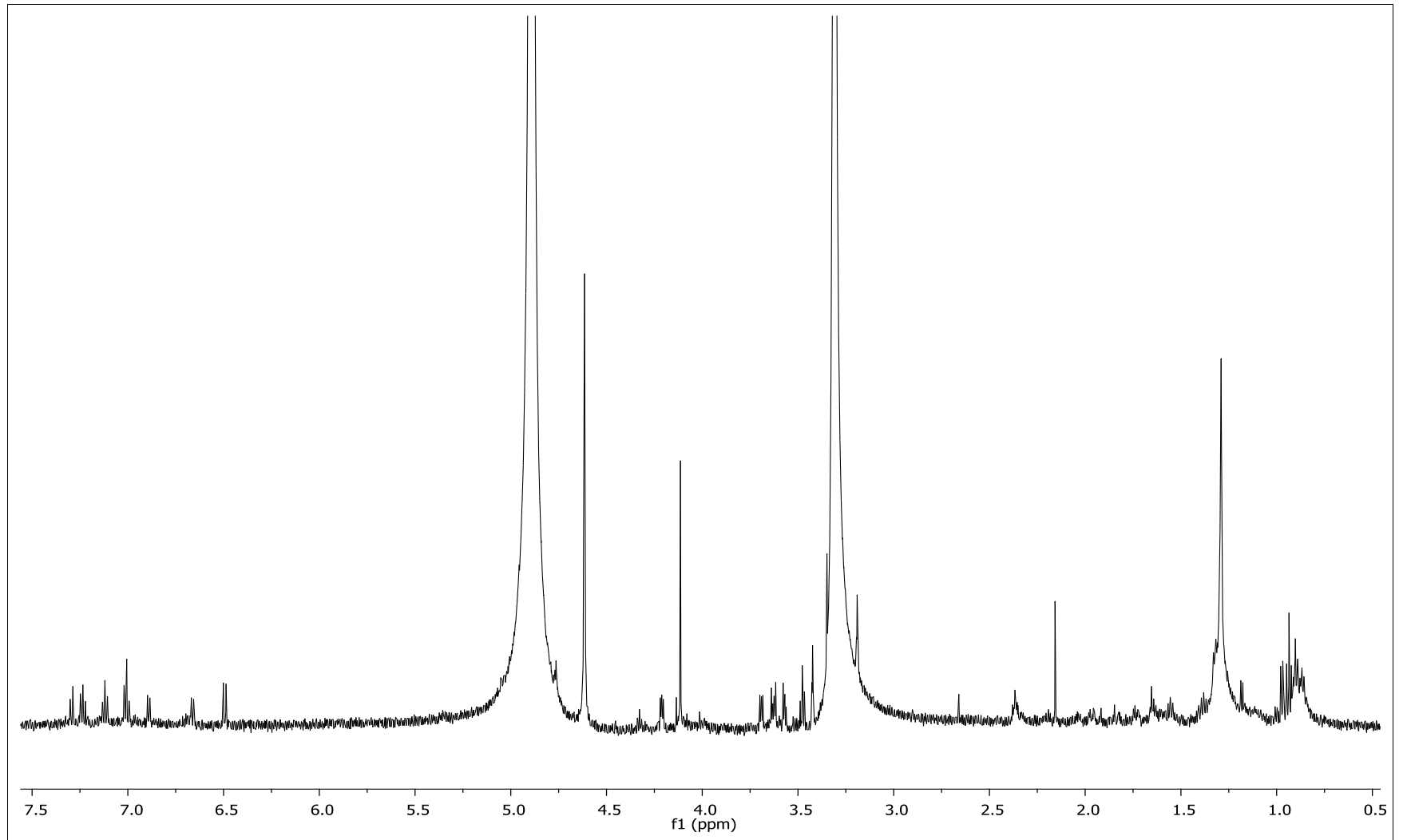
Fonte: O autor (2016).

11 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.9** em CD_3OD , 600 MHz.



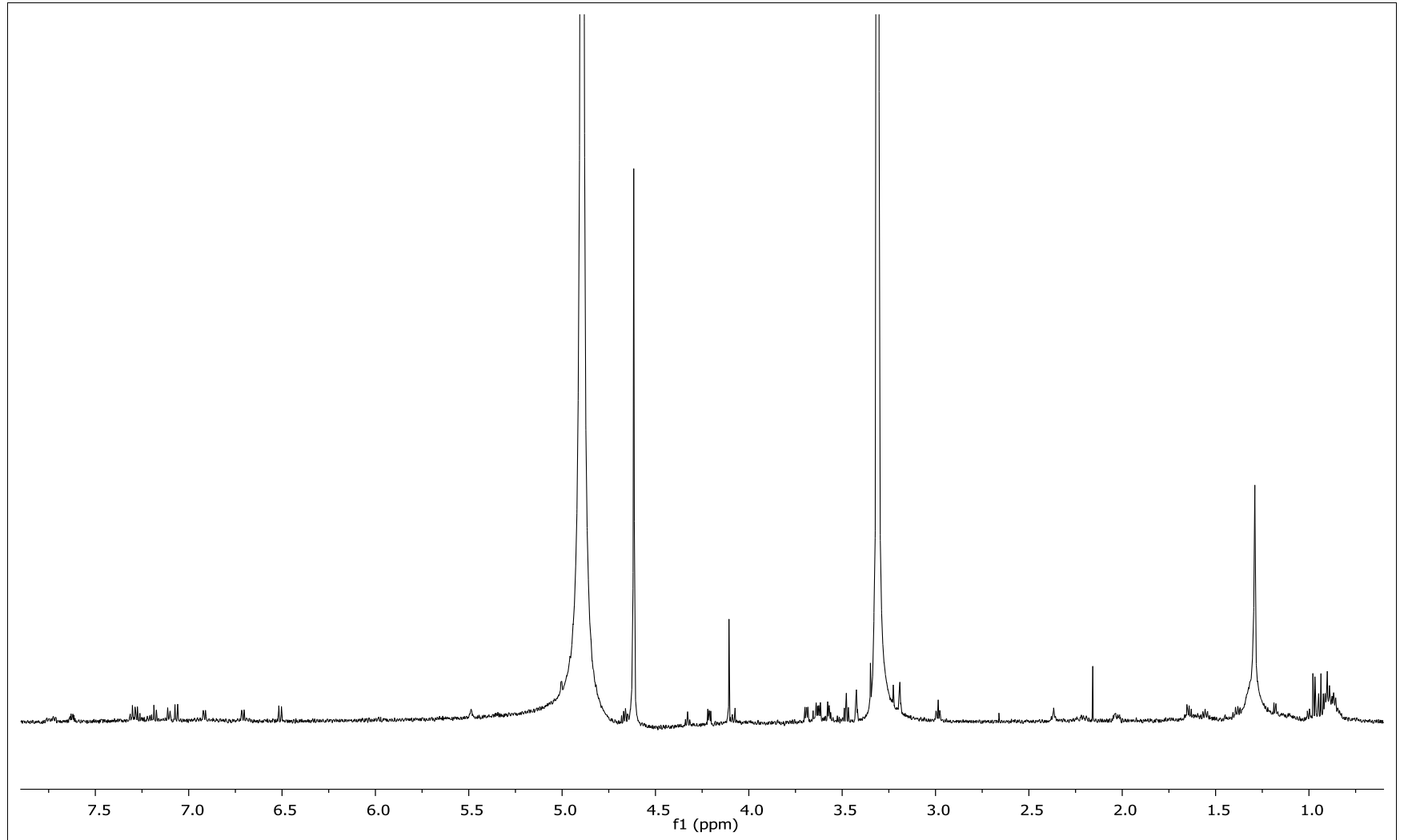
Fonte: O autor (2016).

12 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.10** em CD_3OD , 600 MHz.



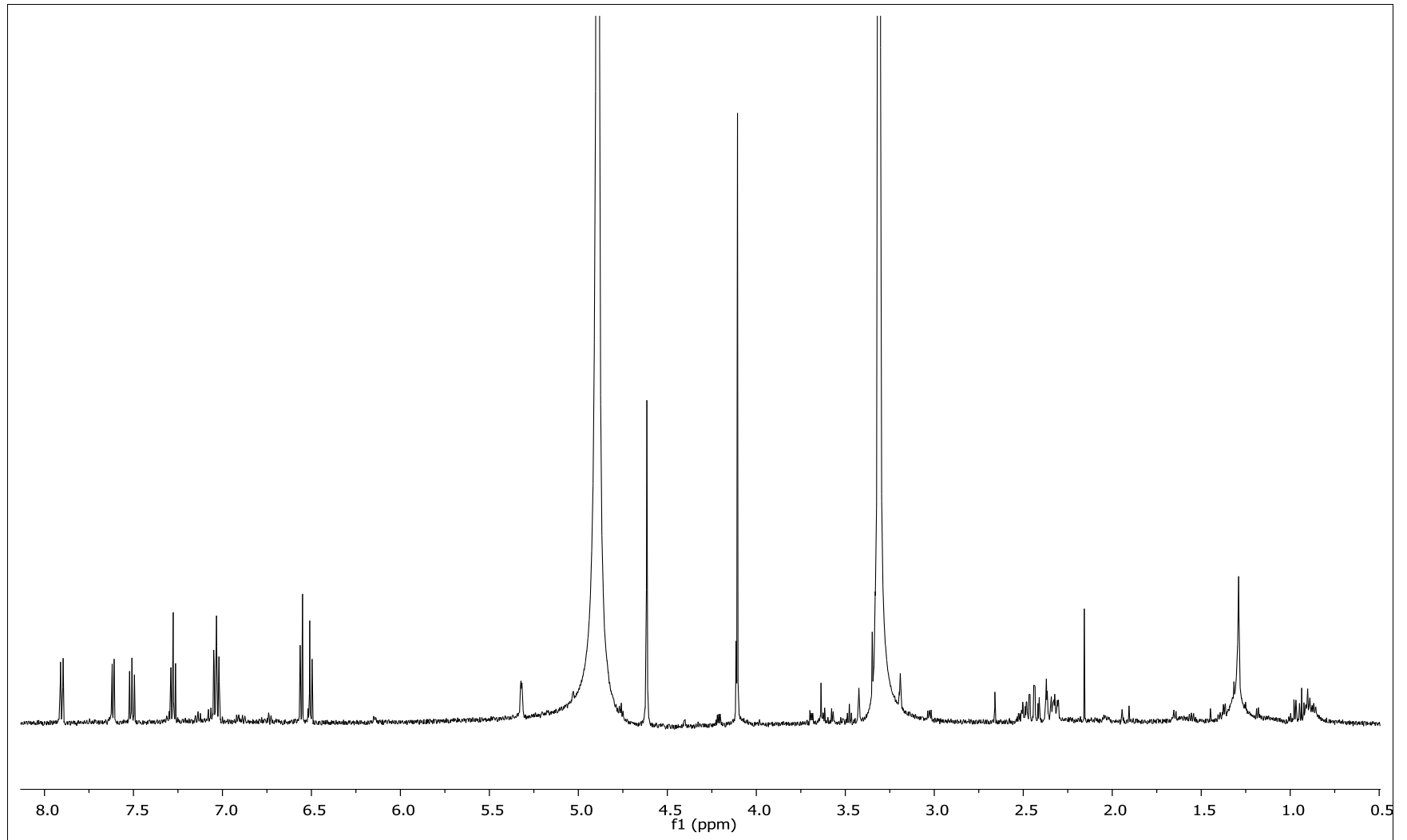
Fonte: O autor (2016).

13 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.11** em CD_3OD , 600 MHz.



Fonte: O autor (2016).

14 - Espectro de RMN de ^1H da substância **G5.12** em CD_3OD , 600 MHz.



Fonte: O autor (2016).