



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"

Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Química



JULIANA REGINA GUBIANI

Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico
***Camarops* sp. Isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**



Araraquara

2011

JULIANA REGINA GUBIANI

**Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico *Camarops* sp.
Isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

G921p Gubiani, Juliana Regina
 Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico
 Camarops sp. Isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) /
 Juliana Regina Gubiani. – Araraquara : [s.n], 2011
 175 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Angela Regina Araujo

 1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Atividades
 biológicas. 4. Fungos endofíticos. I. Título.

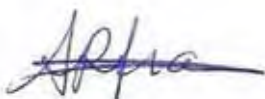
JULIANA REGINA GUBIANI

Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico *Camarops* sp.
Isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).

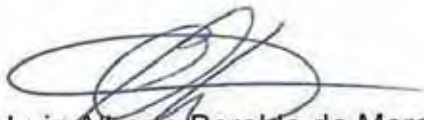
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 20 de junho de 2011.

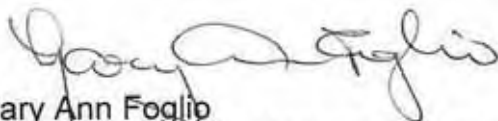
BANCA EXAMINADORA



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



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



Profª Drª Mary Ann Foglio
Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas– UNICAMP,
Campinas

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Juliana Regina Gubiani

Filiação: Genir José Gubiani e Ivani Maria Gubiani

Data de Nascimento: 29 de agosto de 1986

Naturalidade: Toledo - PR

Nacionalidade: Brasileira

ENDEREÇO PROFISSIONAL

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, s/nº – Araraquara-SP,

CEP: 14081-970, SP - Brasil

Telefone: 16 3301-9600 (ramal 9793)

e-mail: julianagubiani@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2009 - 2011

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista - UNESP – Araraquara, SP

Título: Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)

(Ano de obtenção: 2011)

Orientador: Angela Regina Araujo

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2008

Graduação em Licenciatura Química.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE – Toledo, Paraná

Título: Experimentação em Química Orgânica: uma Proposta de Caderno de Experimentos Formais e Informais (Ano de obtenção: 2008)

Orientador: Ricardo Mercadante

BOLSAS CONCEDIDAS

(1) Bolsista de Mestrado – CAPES (2009-2011)

Título do projeto: Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).

Orientação: Angela Regina Araujo

(2) Bolsista de Extensão – FINEP (2006-2007)

Título: Núcleo de Ensino de Ciências de Toledo – NECTO

Orientação: Cleber Antônio Lindino

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

(1). GUBIANI, J. R.; ARAUJO, A. R.; OLIVEIRA, C. M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. **Metabólitos produzidos pelo endófito AM-02 isolado das folhas de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).** In: 34^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

(2). LINDINO, C. A.; FRAPORTI, A. D.; AREND, G.; LEITCHWEIS, A. P.; GUBIANI, J. R. **Programa Web Rádio Ciência em Foco**, In: XXV SEURS - Seminário de Extensão Universitária da Região Sul, 2007, Unicentro Campus de Guarapuava, Guarapuava – PR.

(3). FREIRE, L. I. F.; DUTRA, B. C.; CUNHA, M. B.; ALEIXO, L. P.; GUBIANI, J. R.; HUNOFF, C. A.; LINDINO, C. A.; SILVA, G. C. C.; WOLFART, F. **Educação Científica no Ensino Fundamental**, In: V SEU - Seminário de Extensão da Unioeste, 2005, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR.

PRODUÇÃO TÉCNICA

Trabalhos técnicos

(1). BATISTA, C. E.; INÁCIO, L. H.; GUBIANI, J. R.; ARAUJO, A. R.; **Prospecção Química e Biológica em Fungos Endofíticos Associados a Espécies Vegetais de Cerrado e Mata Atlântica**, 2011. Duração: 6 meses (Supervisão científica de trabalho de Iniciação Científica Junior)

PRODUÇÃO ARTÍSTICA/CULTURAL

(1). AREND, G.; GUBIANI, J. R.; FRAPORTI, A. D.; LEITCHWEIS, A. P.; LINDINO, C. A. **Programa Web Rádio Ciência em Foco**, 2007.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

(1) Participou da comissão organizadora do **17º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, realizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Araraquara, 2009, totalizando 20 horas.

(2) Participou da comissão organizadora do **I Simpósio Regional de Gestão de Recursos Naturais e Educação Ambiental e IV Semana Acadêmica de Meio Ambiente** realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Toledo, 2007, totalizando 20 horas.

(3) Participou da comissão organizadora da **IX Semana Acadêmica do Curso de Química**, realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Toledo, 2006, totalizando 40 horas.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

(1). Monitora do Projeto de Extensão "Educação Científica para a Cidadania" sob orientação dos professores Cleber Antônio Lindino e Marcia Borin da Cunha, com duração de 640 horas no período de 01 de Março de 2007 a 28 de Fevereiro de 2008.

(2). Monitora do Curso de Capacitação de Agentes de Execução dos Laboratórios das Escolas Estaduais da Cidade de Toledo, realizado no período de 15 de Julho a 26 de Agosto de 2006 com participação de 20 horas, promovido pelo Núcleo de Ensino de Ciências de Toledo - NECTO.

(3). Estagiária do Núcleo de Ensino de Ciências de Toledo - NECTO, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007, recebendo bolsa referente ao convênio 075/2005 - Ciência para Todos - FINEP, com carga horária semanal de 12 horas.

(4). Monitora da disciplina de Bioquímica, atuando na elucidação de dúvidas dos alunos e na preparação de aulas práticas no período de agosto a novembro de 2008 com carga horária de 12 horas semanais.

Aos meus queridos pais Ilenir e Ivani que me deram à vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, iluminando os meus caminhos mais obscuros com afeto e dedicação para que pudesse trilhar sem medo e cheio de esperança, me dando força para continuar mesmo distante. Vocês são o sentido da minha vida e é por vocês que vivo.

À minha orientadora e professora Angela, pela amizade, carinho, compreensão, ensinamentos e dedicação. Por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e acreditado no meu potencial, me dando credibilidade para crescermos juntos. Sua garra, atenção e confiança foram de fundamental importância para meu crescimento pessoal e profissional. Considero-te como minha segunda mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – Unesp - Araraquara pela possibilidade de realização deste projeto.

Ao Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE, pelo aceite no grupo de pesquisa, pelo desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário de mais uma etapa importante da minha vida, as risadas, conversas e troca de experiências no laboratório sempre serão lembrados com um imenso carinho.

A querida e amiga Prof^a Angela, muito obrigado pela sua dedicação, compreensão, confiança, orientação, ensinamentos de química e de vida, carinho, amizade, por todos os conselhos dados, pela sabedoria e apoio, serei eternamente grata por ter me aceito em seu maravilhoso grupo de pesquisa e principalmente por ter me ajudado a ser a profissional que sou hoje.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica por todos os ensinamentos transmitidos, além das ricas discussões e, por toda a amizade.

As professoras Márcia Nasser e Lourdes Campaner que participaram do exame de qualificação e, contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos professores membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta dissertação.

A todos os funcionários do Instituto de Química da Unesp, principalmente funcionários da biblioteca e secretaria por sua dedicação e disposição em ajudar.

Ao Dr. Nivaldo Boralle pela realização dos espectros de RMN e por estar sempre disposto a compartilhar seus riquíssimos conhecimentos de espectroscopia e, ao Dr. Alberto Alécio, por ser tão prestativo, estando sempre presente e disposto a ajudar quando mais precisava.

A toda a galera do NuBBE, inclusive o pessoal do laboratório no qual desenvolvi este trabalho, por sempre estarem presentes nas discussões, troca de experiências e nas confraternizações realizadas, em especial agradeço ao querido amigo Luís Otavio, pessoa mais que especial, sempre disposto a ajudar e a descontraír o ambiente do laboratório com sua alegria que contagia.

Aos meus queridos irmãos da micose Camila, Néia, Vanessa, Carol, João, Miller, Andressa, Fernandinho e Thomas, pelas valiosas discussões, pelas ajudas, pela maravilhosa convivência dentro e fora do laboratório e pelos excelentes encontros e reuniões que sempre fizemos na casa da “mãe” Angela, sempre serão lembrados com um imenso carinho.

As meninas da República “Angel’s House” Néia e Michele, muito obrigada pela convivência, pela paciência, carinho, compreensão, amizade, trocas de idéias e conselhos recebidos, vocês são minhas irmãs de coração e agradeço eternamente por ter vocês do meu lado.

A toda a galera do Paraná que veio em peso da Unioeste para a Unesp e, a todos que fizeram parte das alegres rodas de tererê, em especial os queridos amigos Vanessa, Cristiana, João, Luciano, Michele, Néia, Blosson, Vorpinha, Silvana,

Mauricio, Carneiro, Caio e Thaís, pelas alegres churrascadas que fizemos e pelas deliciosas e maravilhosas gargalhadas que sempre demos. Amo vocês, galera do bem!!!!

E por fim, mas não menos importante...

A minha querida e amada família, mesmo estando tão longe de vocês sempre estiveram comigo, me apoiaram, me deram forças para continuar a vencer os obstáculos da vida com tanto amor e carinho. Obrigado paizinho, meu eterno guerreiro, obrigado mãezinha, meu grande exemplo de vida, obrigado meus queridos irmãos Éder e Danieli sem o apoio e a força de vocês não teria chego até aqui, vocês são minha força para continuar lutando e, finalmente, obrigada querida cunhada Geuza, pela sua experiência de vida muito semelhante a minha, deixou as pessoas que mais ama distante de ti para concretizar seus sonhos, você é um exemplo de garra, luta e determinação para mim. Família vocês são tudo na minha vida e é por vocês que vivo. Amo Incondicionalmente!!!

E, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Á CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo financiamento.



Um Sonho de Pícada.

Um mestre oriental viu que um escorpião
estava se afogando

E decidiu tirá-lo da água,

Mas quando o fez o escorpião o picou.

Pela reação de dor, o mestre o soltou

E o animal caiu de novo na água

E, estava se afogando de novo.

O mestre tentou tirá-lo novamente

E, novamente o animal o picou.

Alguém se aproximou do mestre e lhe
disse:

Desculpe-me, você é teimoso!

Não entende que todas às vezes que
tentar tirá-lo da água ele irá picá-lo?

O mestre respondeu:

A natureza do escorpião é picar, e isto não
vai mudar a minha, que é ajudar.

Com a ajuda de uma folha o mestre tirou o
escorpião da água e o salvou.

Quando tiveres algum problema,

Faça alguma coisa!

Se não puder passar por cima,

Passe por baixo, Passe através, Dê a volta,

Vá pela direita, Vá pela esquerda.

Se não puder obter o material certo, Vá
procurá-lo.

Se não puder encontrá-lo, Substitua-o.

Se não puder substituí-lo, Improvise.

Se não puder improvisar, Inove.

Mas acima de tudo,

Faça alguma coisa!

Há dois gêneros de pessoas que nunca
chegam a lugar nenhum:

As que não querem fazer nada

E as que só inventam desculpas.

(Autor desconhecido)



GUBIANI, Juliana Regina **Prospecção Química e Biológica do Fungo Endofítico *Camarops* sp. Isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)** 2011. Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

RESUMO

A busca por novos produtos para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas é um processo que requer otimização contínua. Apesar dos avanços nos processos envolvidos no planejamento racional de fármacos, incluindo química combinatória e ensaios em larga escala, os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novas drogas. Sendo assim, este trabalho foi idealizado, objetivando a obtenção de substâncias potencialmente bioativas a partir do estudo químico e biológico do extrato metanólico produzido pelo fungo endofítico *Camarops* sp. isolado das folhas de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). O endófito *Camarops* sp. foi cultivado em escala ampliada, utilizando meio de cultivo sólido milho, por 21 dias a temperatura ambiente no modo estático. Os extratos metanólico e acetonitrila obtidos foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos e por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, e submetidos aos ensaios para a avaliação da potencialidade antifúngica, antioxidante, anticolinesterásica e anticancerígena. Os resultados evidenciaram extrato e frações com uma variação metabólica intensa e potencialmente bioativos principalmente contra a inibição da enzima acetilcolinesterase. O extrato acetonitrila foi submetido a fracionamento cromatográfico e levou à identificação e determinação estrutural de oito substâncias, sendo estas, (S)-mevalonolactona (**1**), *para*-hidroxibenzaldeído (**2**), Ácido (E)-5-(1-hidroxiail)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-carboxílico (**3**), azepan-2-ona (**4**), xylarenona D (**5**), xylarenona F (**6**), xylarenona G (**7**), sendo as duas últimas substâncias inéditas, e xylarenona C (**8**). Este é o primeiro relato de mevalonolactona obtida de fungo endofítico, substância esta muito utilizada para fins cosméticos, e, também o primeiro relato de azepan-2-ona como produto natural, sendo este metabólito muito utilizado na fabricação do nylon-6. Os sesquiterpenos da classe dos eremofilanos são substâncias que possuem diversas propriedades biológicas como ação fitotóxica, mitotóxica e antifúngica. Alguns são considerados fitoalexinas, estudos já realizados demonstraram que as substâncias **5** (xylarenona D) e **8** (xylarenona C) apresentaram forte atividade inibitória de protease contra as enzimas subtilisina e pepsina, enzimas essas causadoras do vírus HIV. Neste trabalho, as substâncias **5** (xylarenona D) e **8** (xylarenona C) apresentaram resultados satisfatórios contra a inibição da enzima acetilcolinesterase e contra células tumorais.

Palavras-chave: Fungo endofítico. Atividades biológicas. *Camarops* sp. *Alibertia macrophylla*.

GUBIANI, Juliana Regina. **Chemical and Biological Evaluation of Endophytic Fungus *Camarops* sp. isolated from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).** 2010. Dissertation in Chemistry – Institute of Chemistry of Araraquara – UNESP.

ABSTRACT

The search for new products to the pharmaceutical and agrochemical industry is a process that requires continuous optimization. Despite advances in the processes involved in rational planning of drugs, including combinatorial chemistry and tests in large scale, the natural products constitute the most successful strategy for the discovery of new drugs. Thus, this work was idealized aiming the obtaining of potentially bioactive substances from the chemical and biological study of methanolic extract produced by the endophytic fungus *Camarops* sp. isolated from the leaves of *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). The endophyte *Camarops* sp. was cultivated in large scale using maize solid culture medium for 21 days at room temperature in the static mode. The methanolic and acetonitrile extracts obtained were evaluated by High Efficiency Liquid Chromatography with diode array detector and by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen, and submitted to tests for evaluation of antifungal, antioxidant, anticholinesterase and anticancer potenciality. The results showed extract and fractions with an intense metabolic variation and potentially bioactive principally against the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. The acetonitrile extract was submitted to chromatographic fractionation and led to the identification and structural determination of eight substances, being, (S)-mevalonolactone (**1**), *para*-hidroxybenzaldehyde (**2**), acid (E)-5-(1-hidroxyallylic)-4-(pent-1-enyl)-2,5-dihydrofuran-3-carboxylic (**3**), Azepan-2-one (**4**), xylarenone D (**5**), xylarenone F (**6**), xylarenone G (**7**), being the last two ones novel substances, and xylarenone C (**8**). This is the first report of mevalonolactone obtained from endophytic fungus, substance much used for cosmetics, and also the first report of Azepan-2-one as a natural product, which is much used in the making of nylon-6. The sesquiterpenes of the eremophilane class are substances that have several biological properties such as phytotoxic, mitotoxic and antifungal action. Some are considered phytoalexins. Previous studies have demonstrated that substances **5** (xylarenone D) and **8** (xylarenone C) showed strong inhibitory activity of protease against the enzymes subtilisin and pepsin, enzymes that cause the HIV virus. In this work, the substances **5** (xylarenone D) and **8** (xylarenone C) showed satisfactory results against the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase and against tumor cells.

Keywords: Endophytic fungi. Biological activities. *Camarops* sp. *Alibertia macrophylla*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quimioterápicos extraídos de plantas e de micro-organismos.	32
Figura 2 - Fotos de fungos (A) Cogumelos de solo; (B) Cogumelos de madeira	33
Figura 3 - Fotos de fungos endofíticos (A) Hifas de um fungo endofítico não identificado em células epidérmicas de <i>Picea pungens</i> ; (B) Hifa intracelular de <i>Rhizoctonia parkeri</i> (setas indicando) em <i>Pseudotsuga taxifolia</i> ; (C) Levedura endofítica no interior de estômatos de folhas de plântulas de citros.	36
Figura 4 - (A) Fungo endofítico <i>Penicillium chrysogenum</i> e estrutura molecular da penicilina, (B) Planta <i>Taxus brevifolia</i> e estrutura molecular do taxol.	38
Figura 5 - <i>Alibertia macrophylla</i> K. Schum	40
Figura 6 - Constituintes químicos isolados das folhas de <i>Alibertia macrophylla</i> .	41
Figura 7 - Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro	44
Figura 8 - Metodologia de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos	52
Figura 9 - Fungo endofítico <i>Camarops</i> sp. isolado de <i>Alibertia macrophylla</i>	54
Figura 10 - Fluxograma de obtenção e análise do extrato CH ₃ OH obtido em milho do endófito <i>Camarops</i> sp.	55
Figura 11 – Fluxograma de partição do extrato CH ₃ OH obtido do cultivo de <i>Camarops</i> sp.	56
Figura 12 - Fracionamento cromatográfico utilizando fase reversa do extrato CH ₃ CN	57
Figura 13 - Fracionamento cromatográfico utilizando fase normal e fase reversa de Fr1	59
Figura 14 - Fracionamento cromatográfico utilizando fase normal de Fr3.	60
Figura 15 - Fracionamento cromatográfico utilizando fase normal de Fr4.	62
Figura 16 - Nistatina, controle positivo nos ensaios de atividade antifúngica.	64
Figura 17 - Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição de AChE	65
Figura 18 - Quercetina controle positivo nos ensaios de atividade antioxidante	67
Figura 19 - Doxorrubicina controle positivo nos ensaios de atividade antitumoral	68

Figura 20 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato CH ₃ CN em milho produzido por <i>Camarops</i> sp.	72
Figura 21 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato CH ₃ CN (branco) em milho.	73
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato CH ₃ CN de milho-branco (CDCl ₃ , 500 MHz)	74
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato CH ₃ CN do endófito <i>Camarops</i> sp. (CDCl ₃ , 500 MHz)	75
Figura 24 - Frações obtidas do fracionamento do extrato CH ₃ CN: (A) 254nm, (B) 366nm e (C) visível.	76
Figura 25 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 1 (DMSO-d ₆ , 300 MHz)	77
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 3 (DMSO-d ₆ , 300 MHz)	77
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 4 (DMSO-d ₆ , 300 MHz)	78
Figura 28 - Cromatograma em CLAE-DAD da fração 1 registrado em 275nm.	78
Figura 29 - Cromatograma em CLAE-DAD da fração 3 registrado em 275nm.	79
Figura 30 - Cromatograma em CLAE-DAD da fração 4 registrado em 275nm.	79
Figura 31 - Cromatograma em CLAE _{prep.} da subfração Fr3-I registrado em 254nm.	80
Figura 32 - Cromatograma em CLAE _{prep.} da subfração Fr3-J registrado em 254nm.	81
Figura 33 - Atividade antifúngica dos extratos CH ₃ OH e CH ₃ CN (A) contra os fitopatógenos <i>C. cladosporioides</i> (B) <i>C. sphaerospermum</i>	82
Figura 34 - Atividade antifúngica das frações oriundas do fracionamento do extrato CH ₃ CN (A) Contra o fitopatógeno <i>C. cladosporioides</i> (B) Contra o fitopatógeno <i>C. sphaerospermum</i>	83
Figura 35 - Atividade anticolinesterásica (A) dos extratos CH ₃ OH e CH ₃ CN e, (B) das frações oriundas do fracionamento do extrato CH ₃ CN, ambas comparadas com o padrão fisostigmina (P).	84
Figura 36 - Reação de redução do DPPH	86
Figura 37 - Concentração versus % Seqüestro dos extratos obtidos do endófito <i>Camarops</i> sp. em comparação com o padrão quercetina.	87
Figura 38 - Concentração versus % Seqüestro das frações obtidas do endófito <i>Camarops</i> sp. em comparação com o padrão quercetina.	87

Figura 39 - Substâncias produzidas pelo endófito <i>Camarops</i> sp.	89
Figura 40 - Estrutura da Substância 1 ((S) - Mevalonolactona)	90
Figura 41 - Espectro de massas da substância 1 [ESI-MS (+)]	90
Figura 42 - Espectro de infravermelho da substância 1	91
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	92
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (CDCl_3 , 500 MHz)	93
Figura 45 - Mapa de contorno de gHMQC da substância 1 (CDCl_3 , 125 MHz)	94
Figura 46 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 1 (CDCl_3 , 125 MHz)	94
Figura 47 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 1	95
Figura 48 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC	95
Figura 49 - Estrutura da Substância 2 (<i>para</i> -Hidroxibenzaldeído)	96
Figura 50 - Espectro de massas da substância 2 [ESI-MS (+)]	97
Figura 51 - Espectro de infravermelho da substância 2	98
Figura 52 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 2 (CDCl_3 , 125 MHz)	99
Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (CDCl_3 , 500 MHz)	100
Figura 54 - Mapa de contorno de gHMQC da substância 2 (CDCl_3 , 125 MHz)	101
Figura 55 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC	102
Figura 56 - Estrutura da Substância 3 (Ácido (<i>E</i>)-5-(1-hidroxialil)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-carboxílico)	103
Figura 57 - Espectro de massas da substância 3 [ESI-MS (+)]	103
Figura 58 - Espectro de infravermelho da substância 3	104
Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CDCl_3 , 500 MHz)	105
Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (CDCl_3 , 500 MHz)	106
Figura 61 - Mapa de contorno de gHMBC da substância 3 (CDCl_3 , 125 MHz)	107
Figura 62 - Espectro de gCOSY da substância 3 (CDCl_3 , 125 MHz)	108
Figura 63 - Mapa de contorno de gHMQC da substância 3 (CDCl_3 , 125 MHz)	109
Figura 64 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 3	110

Figura 65 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de <i>g</i> HMBC	110
Figura 66 - Estrutura da Substância 4 (Azepan-2-ona)	111
Figura 67 - Espectro de massas da substância 4 [ESI-MS (+)]	112
Figura 68 - Espectro de infravermelho da substância 4	113
Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	114
Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	115
Figura 71 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMQC da substância 4 (DMSO- d_6 , 125 MHz)	116
Figura 72 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 4 (DMSO- d_6 , 125 MHz)	117
Figura 73 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de <i>g</i> HMBC	117
Figura 74 - Estrutura da Substância 5 (Xylarenona D)	118
Figura 75 - Espectro de massas da substância 5 [ESI-MS (+)]	119
Figura 76 - Espectro de infravermelho da substância 5	120
Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H da substância 5 (CDCl_3 , 500 MHz)	121
Figura 78 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (CDCl_3 , 500 MHz)	122
Figura 79 - Espectro de DEPT (A) 135 e (B) 90 da substância 5	123
Figura 80 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 5 (CDCl_3 , 125 MHz)	124
Figura 81 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMQC da substância 5 (CDCl_3 , 125 MHz)	125
Figura 82 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 5	126
Figura 83 - Espectro de NOESY da substância 5 (CDCl_3 , 500 MHz)	127
Figura 84 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de <i>g</i> HMBC	128
Figura 85 - Estrutura da Substância 6 (Xylarenona F)	129
Figura 86 - Espectro de massas da substância 6 [ESI-MS (+)]	130
Figura 87 - Espectro de infravermelho da substância 6	131
Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H da substância 6 (CDCl_3 , 500 MHz)	132
Figura 89 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (CDCl_3 , 500 MHz)	133
Figura 90 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMQC da substância 6 (CDCl_3 , 125 MHz)	134

Figura 91 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 6	135
Figura 92 - Espectro de NOESY da substância 6 (CDCl ₃ , 500 MHz)	136
Figura 93 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 6 (CDCl ₃ , 125 MHz)	137
Figura 94 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de <i>g</i> HMBC para a substância 6	137
Figura 95 - Estrutura da Substância 7 (Xylarenona G)	138
Figura 96 - Espectro de massas da substância 7 [ESI-MS (+)]	139
Figura 97 - Espectro de infravermelho da substância 7	140
Figura 98 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	141
Figura 99 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	142
Figura 100 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMQC da substância 7 (CDCl ₃ , 125 MHz)	143
Figura 101 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 7	144
Figura 102 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 7 (DMSO-d ₆ , 125 MHz)	145
Figura 103 - Cromatograma analítico (A) substância 6 e (B) substância 7	146
Figura 104 - Cromatograma analítico obtido da co-injeção das substâncias 6 e 7	146
Figura 105 - Nova estrutura proposta para a substância 6 (Xylarenona F)	147
Figura 106 - Nova estrutura proposta para a substância 7 (Xylarenona G)	148
Figura 107 - Espectro de NOESY da substância 7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	149
Figura 108 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de <i>g</i> HMBC para a substância 7	150
Figura 109 - Estrutura da Substância 8 (Xylarenona C)	151
Figura 110 - Espectro de massas da substância 8 [ESI-MS (+)]	152
Figura 111 - Espectro de infravermelho da substância 8	153
Figura 112 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 8 (DMSO-d ₆ , 500 MHz)	154
Figura 113 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 8 (DMSO-d ₆ , 500 MHz)	156
Figura 114 - Espectro de DEPT (A) 135 e (B) 90 da substância 8	157
Figura 115 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMQC da substância 8 (DMSO-d ₆ , 125 MHz)	158

Figura 116 - Mapa de contorno de <i>g</i> HMBC da substância 8 (DMSO- d_6 , 125 MHz)	158
Figura 117 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância 8	159
Figura 118 - Espectro de NOESY da substância 8 (CDCl ₃ , 500 MHz)	160
Figura 119 - Principais correlações observadas para a substância 8	161
Figura 120 - Concentração <i>versus</i> % Seqüestro das substâncias produzidas pelo endófito <i>Camarops</i> sp. em comparação com o padrão quercetina.	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungo endofítico isolado de <i>Alibertia macrophylla</i> .	71
Tabela 2 - Resultado da atividade antifúngica para os extratos CH ₃ OH e CH ₃ CN	83
Tabela 3 - Resultado da atividade antifúngica para as frações oriundas do fracionamento do extrato CH ₃ CN.	83
Tabela 4 - Resultado da atividade anticolinesterásica para os extratos CH ₃ OH e CH ₃ CN	85
Tabela 5 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as frações oriundas do fracionamento do extrato CH ₃ CN	85
Tabela 6 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 1 em CDCl ₃	96
Tabela 7 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 2 em CDCl ₃	102
Tabela 8 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 3 em CDCl ₃	111
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 4 em DMSO-d ₆	118
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 5 em CDCl ₃	128
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 6 em CDCl ₃	138
Tabela 12 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 7 em CDCl ₃	150
Tabela 13 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) da substância 8 em DMSO-d ₆	161
Tabela 14 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as substâncias testadas	162
Tabela 15 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL	164

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA – Ágar-ágar

a. C. – Antes de Cristo

AchE – Enzima acetilcolinesterase

AcOEt - Acetato de etila

CH₃CN – Acetonitrila

CH₃OH – Metanol

AM – *Alibertia macrophylla*

BDA – Batata-dextrose-ágar

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

C18 - Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano

CHCl₃ – Clorofórmio

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

CLAE_{prep.} - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência modo preparativo

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido Deuterado

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazina

d – Dubleto

dd – Duplo - dubleto

ddd – Duplo – duplo - dubleto

dt – Duplo-triplete

EM – Espectrometria de Massas

EM-ESI-QTOF – Espectrômetro de Massas de Alta Resolução por Ionização em *Eletrospray*

ESI-MS - Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry

Ext – Extrato

Fr – Fração

δ – Deslocamento químico

gCOSY – Gradient Correlated Spectroscopy

gHMBC - Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation

gHMQC - Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HIV - Human Immunodeficiency Virus

hrs - Horas

Hex – Hexano

H₂O – Água

IC₅₀ – Concentração Inibitória

IQAr – Instituto de Química de Araraquara

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

LC-MS – Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

m – Multiplete

MHz - Megahertz

min. – Minutos

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

m/z – Relação massa-carga

NaClO – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

NOESY 2D – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy em duas dimensões

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

pág. - Página

ppm – Parte por milhão

q – Quarteto

R_f - Fator de Retenção

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

Subs – Substância

s – Singleto

sl – Singleto largo

t – Tripleto

TMS – Tetrametilsilano

t_r – Tempo de retenção

UV – Ultravioleta

UV-Vis - Ultra Violeta – Visível

v/v – Volume/volume

λ – Comprimento de onda

μm – Micrômetro

[α]_D – Rotação Óptica

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	30
1.1 Produtos Naturais como Fontes de Substâncias Bioativas	30
1.2 Fungos, uma Fonte Promissora de Metabólitos Bioativos	33
1.3 Fungos Endofíticos	35
1.5 Espécie Vegetal Hospedeira: <i>Alibertia macrophylla</i>	39
1.6 Interação Fungo Endofítico – Planta Hospedeira	41
 2.0 OBJETIVOS	 46
2.1 Objetivo Geral	46
2.2 Objetivos Específicos	46
 3.0 PARTE EXPERIMENTAL	 48
3.1 Materiais, Equipamentos e Técnicas Utilizadas	48
3.1.1 Meios para Cultivo do Micro-organismo	48
3.1.2 Esterilização dos Materiais	48
3.1.3 Manipulação do Micro-organismo	48
3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	48
3.1.5 Cromatografia em Coluna (CC)	49
3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	49
3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	49
3.1.8 Espectrometria de Massas	50
3.1.9 Preparo das amostras para análise via CLAE (<i>clean-up</i>)	50
3.1.10 Análise de rotação óptica $[\alpha]_D^{25}$	51
3.1.11 Infravermelho	51
3.1.12 Solventes utilizados	51
3.1.13 Outros Equipamentos	51
3.2 Seleção e Classificação da Espécie Vegetal	51
3.3 Isolamento das Cepas Fúngicas	52
3.5 Classificação do Fungo Endofítico	53

3.6 Cultivo do Fungo Endofítico.....	54
3.6.1 Cultivo do fungo endofítico <i>Camarops</i> sp.....	54
3.7 Partição do Extrato CH ₃ OH Obtido do Cultivo em Milho de <i>Camarops</i> sp.	55
3.7.1 Fracionamento do extrato CH ₃ CN de <i>Camarops</i> sp.....	56
3.7.2 Purificação das frações obtidas do fracionamento do extrato CH ₃ CN produzido por <i>Camarops</i> sp. em milho	58
3.7.2.1 Fracionamento e Purificação da Fração Fr1	58
3.7.2.2 Fracionamento e Purificação da Fração Fr3	59
3.7.2.3 Fracionamento e Purificação da Fração Fr4	61
3.8 Análises Químicas e Avaliação do Perfil Químico do Extrato CH ₃ OH de <i>Camarops</i> sp.....	62
3.8.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	62
3.8.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	63
3.8.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H)	63
3.9 Avaliação do Perfil Biológico dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos de <i>Camarops</i> sp.....	63
3.9.1 Avaliação da Atividade Antifúngica Através de Bioautografia sobre Cromatogramas em Camada Delgada	63
3.9.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica	64
3.9.3 Ensaio preliminar com DPPH para detecção de substâncias antioxidantes.....	65
3.9.4 Avaliação da Atividade Antitumoral	67
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4. 1 Avaliação da Produção Metabólica do Fungo Endofítico <i>Camarops</i> sp. no Meio de Cultura Milho	70
4.1.1 Análise do Extrato CH ₃ CN Obtido do Cultivo em Milho do Fungo Endofítico <i>Camarops</i> sp. por CLAE-DAD.	71
4.1.2 Análise do Extrato CH ₃ CN Obtido em Milho-Branco por RMN de ¹ H	74
4.1.3 Análise do Extrato CH ₃ CN Obtido do Cultivo em Milho do Fungo Endofítico <i>Camarops</i> sp. por RMN de ¹ H	75

4.2 Fracionamento Cromatográfico do Extrato CH ₃ CN Obtido em Milho de <i>Camarops</i> sp. e Obtenção das Substâncias Puras.....	76
4.2.1 Fracionamento da Fração 1	79
4.2.2 Fracionamento da Fração 3	80
4.2.3 Fracionamento da Fração 4	81
4.3 Ensaios Químicos e Biológicos dos Extratos e Frações.....	81
4.3.1 Bioautografia com fungos do gênero <i>Cladosporium</i> – detecção de atividade antifúngica	82
4.3.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica	83
4.3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante	85
4.4 Substâncias Isoladas no Estudo Químico do Fungo Endofítico <i>Camarops</i> sp.	89
4. 4. Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas	90
4.4.1 Identificação Estrutural das Substâncias Produzidas pelo Fungo Endofítico <i>Camarops</i> sp.	90
4.4.1.1 Identificação Estrutural da Substância 1	90
4.4.1.2 Identificação Estrutural da Substância 2	96
4.4.1.3. Identificação Estrutural da Substância 3	103
4.4.1.4. Identificação Estrutural da Substância 4	111
4.4.1.5. Identificação Estrutural da Substância 5	118
4.4.1.6. Determinação Estrutural da Substância 6	129
4.4.1.7 Determinação Estrutural da Substância 7	138
4.4.1.8. Identificação Estrutural da Substância 8	151
4.5 Ensaio Biológico das Substâncias Puras.....	162
4.5.1 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica	162
4.5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante	163
4.5.3 Avaliação da Atividade Anti-tumoral	163
5.0 CONCLUSÕES	167
REFERÊNCIAS.....	170

1. INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais como Fontes de Substâncias Bioativas

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais.¹ Os primeiros relatos sobre o uso de plantas com finalidade terapêutica são oriundos da Mesopotâmia e datam aproximadamente 2.600a.C. Dentre as substâncias utilizadas nessa época destacam-se os óleos de *Cedrus* sp., *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* sp. e *Papaver somniferum*, sendo estas espécies vegetais ainda utilizadas na medicina atual para o tratamento de enfermidades que variam desde tosses e gripes até infecções e processos inflamatórios.²

As técnicas desenvolvidas e utilizadas no Egito para conservação de múmias, além de técnicas medicinais, como a descoberta de substâncias alucinógenas foi outro marco importante para o desenvolvimento de fármacos. Os povos antigos utilizavam largamente rapés e bebidas alucinógenas em suas práticas religiosas e mágicas. Na Grécia antiga, extratos vegetais eram utilizados em execuções, como no caso de Sócrates, que morreu após a ingestão de uma bebida à base de cicuta, que continha a coniina (**1**).¹ (**Figura 1**, pág. 32).

No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da Grande Guerra, foram causas marcantes no declínio do uso de plantas medicinais e conseqüentemente, no investimento em fármacos de origem vegetal.³

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais. Do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado para tingimento de roupas e como tinta de escrever, que já era conhecido e utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média.¹ Quando Portugal começou a perder suas fontes de especiarias, na Índia e na Ásia, que foram passando para as mãos de ingleses e holandeses, iniciou-se no Brasil a corrida às especiarias do sertão – canela, baunilha, cravo, anil, raízes aromáticas, urucum, puxurí, salsa, sementes oleaginosas, madeiras etc. Em 1793, só de anil, foram exportadas 1.400 arrobas para Portugal.⁴

É o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em micro-organismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação.³ Sendo assim, a variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas e micro-organismos ainda é inalcançável por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores.¹

Muitos desses metabólitos secundários isolados de plantas e micro-organismos possuem grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de fármacos imprescindíveis como, a vimblastina (2), vincristina (3), etoposídeo (4), teniposídeo (5), taxol (6), e mais recentemente a camptotecina (7), originada de fungos, todos importantes anticancerígenos.⁴ Pode-se citar também, a artemisina (8), útil no tratamento da malária; o peptídeo conotoxina MVIIA, isolado do caracol marinho *Conus magus* utilizado no tratamento de dor crônica severa, entre outros.⁵ (**Figura 1**, pág. 32)

Como contribuintes para a importância dos produtos naturais, os micro-organismos também começaram a serem investigados como fonte de princípios bioativos, devido à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas. O potencial químico dos organismos vivos estimula o interesse das indústrias farmacêuticas como fonte de fármacos (efedrina (9)), agroquímicas pelo fornecimento de fungicidas e inseticidas naturais (rotenona (10)), alimentícias para a obtenção de substâncias naturais usadas para sabor (mentol (11)) e cor dos alimentos e cosméticos pela necessidade de perfumes naturais (cânfora (12)), entre outros.⁶

De fato, a descoberta de produtos naturais bioativos constitui, portanto, não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas, principalmente, contribui para o conhecimento de novas substâncias químicas que podem ser usadas como matrizes para a descobertas de novos fármacos.³

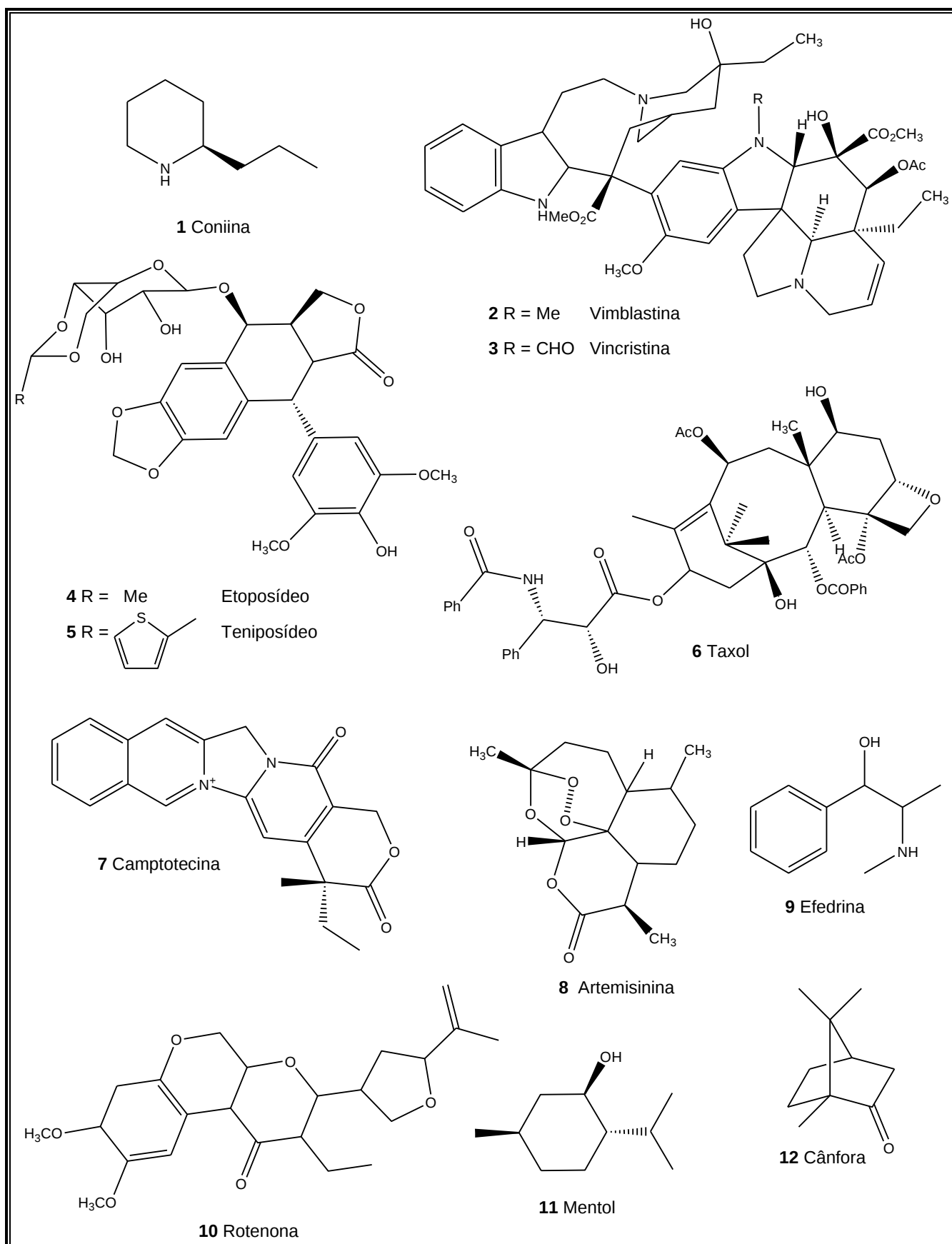


Figura 1 - Quimioterápicos extraídos de plantas e de micro-organismos.

Assim, a indiscutível diversidade química e propriedades dos produtos naturais, associada ao grande número de compostos derivados de fontes naturais já aprovados para uso na medicina terapêutica, evidenciaram que produtos naturais são uma importante fonte de estruturas líderes no processo de desenvolvimento de fármacos.

1.2 Fungos, uma Fonte Promissora de Metabólitos Bioativos

Os fungos são organismos eucariotos que têm parede celular rígida e podem ser uni ou multicelulares. Alguns podem ser microscópicos em tamanho, enquanto outros são muito maiores, como os cogumelos e fungos que crescem em madeira úmida ou solo (**Figura 2**, pág. 33). Eles não ingerem alimentos, mas devem absorver os nutrientes dissolvidos no ambiente. Entre os fungos classificados como micro-organismos estão aqueles que são multicelulares, produzem estruturas filamentosas microscópicas e são freqüentemente chamados de *bolores*, enquanto as *leveduras* são fungos unicelulares.⁷



Figura 2 - Fotos de fungos (A) Cogumelos de solo; (B) Cogumelos de madeira

Os fungos são descritos por uma característica universal que é a impossibilidade de realizar a fotossíntese e desprovidos de clorofila, portanto, eles são completamente heterotróficos, sendo assim, os fungos adquirem seus nutrientes no meio ambiente em que vivem ou de organismos mortos. Eles podem atacar diferentes hospedeiros e em alguns casos levá-los a morte absorvendo os nutrientes liberados. Além disso,

alguns fungos são capazes de desenvolver uma relação simbiótica com seus hospedeiros.⁸

A maioria dos fungos filamentosos é terrestre, contudo exigem geralmente elevado nível de umidade, sendo alguns grupos aquáticos.⁷ Eles são o segundo maior grupo de espécie sobre a Terra, perdendo apenas para os insetos, e apresentam cerca de 1,5 milhões de espécies. Destes, apenas 1% foram estudados quimicamente e tiveram os metabólitos secundários isolados e caracterizados.⁹

Os fungos ocorrem basicamente em três modos de vida, simbiótico, parasitismo e saprófita. Quando associados às plantas, assumem vários tipos de interações, sendo as simbióticas as que conferem a ambos os organismos diversas vantagens, produzindo ou induzindo a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros micro-organismos.¹⁰ Por outro lado, eles são capazes de seqüestrar os metabólitos produzidos pelas plantas que irão atuar como defesa química, ou produzi-los em resposta à pressão exercida por outros micro-organismos endofíticos ou fitopatógenos ou até mesmo por predadores.¹¹

Nas associações parasitárias o fungo vive dentro da planta, de onde obtém o alimento necessário para seu desenvolvimento. Neste caso, geralmente o metabolismo secundário do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas às plantas. O parasitismo está relacionado à patogenicidade e pode, eventualmente, levar a planta à morte.¹²

Já, os fungos que vivem na forma de saprófitas, obtêm seus alimentos decompondo substâncias orgânicas em decomposição, eles criam estruturas reprodutoras a partir do micélio, sendo de grande importância no ecossistema, pois são decompositores, reciclando os elementos químicos.⁷

O desenvolvimento da resistência de alguns micro-organismos patógenos, tais como *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Tuberculosis* e *Streptococcus*, devido à utilização indiscriminada e abusiva de antibióticos e antifúngicos, como resultado de um sistema imunológico comprometido, reforça a necessidade de pesquisas em busca de novas drogas com ação terapêutica.¹³

Entre os 20 medicamentos mais prescritos no mundo, seis são originários de fungos,¹⁴ estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de fungos, dos quais apenas 5% das espécies estão descritas, sendo que a maioria destas não foi avaliada em

bioensaios para descoberta de fármacos.¹⁵ Entre as espécies descritas (69.000), somente 16% (11.500) têm sido cultivadas.¹⁴

Vários produtos naturais com propriedades terapêuticas foram isolados de espécies de fungos, especialmente agentes quimioterápicos, como penicilinas e cefalosporinas usadas até hoje como antibióticos; mevinolina, um agente redutor de colesterol; bleomicinas, daunorubicinas e análogos, como agentes antitumorais; avermectina B, um anti-helmíntico de largo espectro, entre outros.¹⁶

Metabólitos de fungos são fontes renováveis, uma vez que métodos para produção em larga escala podem ser desenvolvidos usando técnicas previamente estabelecidas. A derivatização do metabólito e a otimização da produção do mesmo podem ser acompanhadas através da mutação da linhagem, da variação do meio e da alteração das condições de cultura.¹⁷

Visto a grande riqueza e importância de produtos naturais, micro-organismos começaram a ser investigados como fonte de produtos bioativos, pois são, juntamente com as plantas, organismos marinhos e insetos, a principal fonte para novas substâncias bioativas.¹⁸ A origem de 30.000 produtos naturais bioativos pode ser dividida entre animais (13%), bactérias (33%), fungos (26%) e plantas (27%).¹⁹

Assim, há um enorme potencial a ser explorado, pois esses micro-organismos possuem uma das mais fascinantes e importantes propriedades, que é a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, com amplo aspecto de atividade biológica, como antibióticos, micotoxinas, antivirais, antitumorais, etc.²⁰

1.3 Fungos Endofíticos

Ao longo dos anos o termo endofítico tem sofrido várias modificações. De acordo com a etimologia da palavra, **endo** significa “dentro” e **phyte** significa “planta” (**Figura 3**, pág.36), entretanto, este conceito tem sido bastante modificado conforme a necessidade de cada autor para aplicar o termo. Micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi De Barry (1896) quem primeiro definiu endofítico como “um organismo vivendo dentro de outro organismo” delineando uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas.²¹ Entretanto, foi no final dos anos 70, que micro-organismos endofíticos começaram a adquirir importância, quando foi verificado que eles apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de mamíferos

herbívoros. Possuem também a capacidade de produzir alterações fisiológicas e muitos outros efeitos nos vegetais que os albergam.²² Desde então o termo endofítico ganhou várias definições.

Petrini (1991) afirma que endofítico são micro-organismos que colonizam os tecidos sadios de partes aéreas da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhe causar danos aparentes.²³ Em adição, Strobel (2003) informa que endofíticos são micro-organismos (principalmente fungos e bactérias) que vivem em espaços intracelulares dos tecidos das plantas.²⁴ Gunatilaka (2005), refere-se a endofítico como sendo um micro-organismo (bactéria ou fungo), que colonizam os órgãos internos de plantas, mas que não causam efeitos patogênicos ao hospedeiro.²⁵ Silva, et al. (2006) cita que endofíticos estão presentes no interior de órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules e raízes de várias plantas, aparentemente saudáveis, podendo em alguns casos produzir danos à planta quando as condições ambientais e estado fisiológico do hospedeiro se tornarem favoráveis.²⁶ Guo, et al. (2008) definem que endofíticos são micro-organismos que residem internamente no tecido de plantas vivas sem causar qualquer efeito negativo de imediato.²⁷ Posteriormente, E, atualmente, Faeth, et al. (2010) definem endofítico como micro-organismos simbióticos abundantes e diversificados que habitam a parte aérea e interna das plantas.²⁸

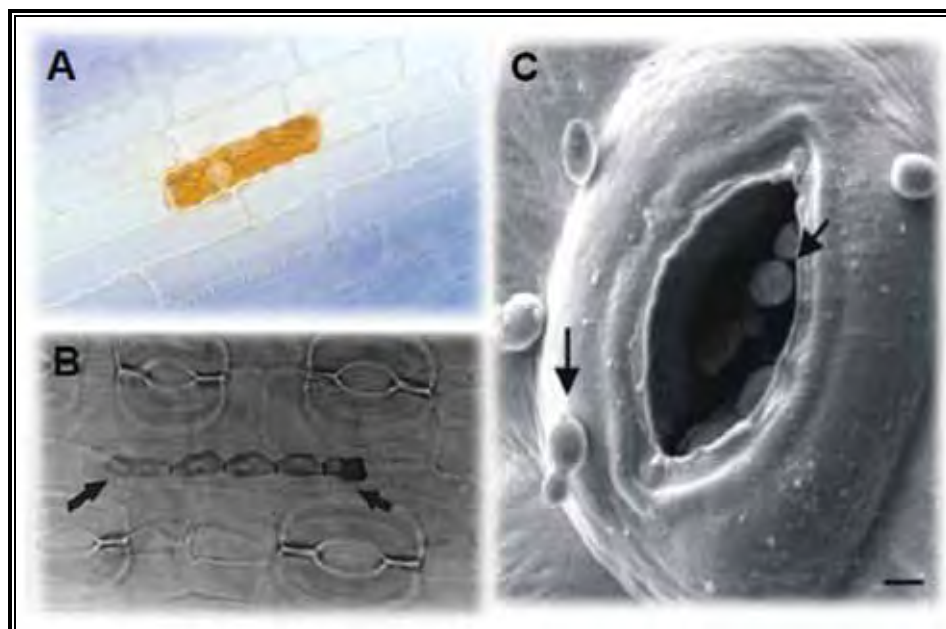


Figura 3 - Fotos de fungos endofíticos (A) Hifas de um fungo endofítico não identificado em células epidérmicas de *Picea pungens*; (B) Hifa intracelular de *Rhabdocline parkeri* (setas indicando) em *Pseudotsuga taxifolia*; (C) Levedura endofítica no interior de estômatos de folhas de plântulas de citros.

Um fungo endofítico encontra-se em um processo de relacionamento biológico com a planta hospedeira, sem causar danos aparentes para a mesma. Seu papel na vida das plantas permanece obscuro, alguns autores são da opinião que os endófitos podem ser patógenos, mas, que estão em estado latente, no entanto, o que decide se um endófito é inofensivo ou prejudicial é o equilíbrio entre as demandas da invasão de fungos e a resposta da planta, sendo que uma vez desequilibradas, o endófito pode se transformar em um patógeno.¹⁰

Cerca de 300.000 espécies de plantas terrestres na Terra habitam uma ou mais espécies de endófitos. Apesar desta diversidade, relativamente poucos desses organismos têm sido caracterizados. Muitos endófitos produzem produtos naturais bioativos que inibem o crescimento de outros organismos e, em alguns casos, eles adquirem a capacidade de sintetizar os mesmos produtos, defensivos naturais produzidos pela planta. Eles tiram três benefícios básicos da planta hospedeira: nutrição, água e proteção física contra adversidades biótica e abiótica. Em contrapartida, a planta hospedeira pode ser protegida pelo endófito que pode produzir metabólitos secundários, por exemplo, alcalóides, antibióticos, ou toxinas. Estes metabólitos podem ser tóxicos impedindo o ataque de outros fungos patógenos contra a planta hospedeira, ou ser de dissuasão contra os nemátodos, insetos, e herbívoros.²⁹

Os micro-organismos endofíticos, que são aqueles que colonizam órgãos e tecidos internos das plantas, como folhas, caules e raízes, aparentemente saudáveis, e, sob circunstâncias normais, não lhes causam doenças, se diferenciam dos micro-organismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintos dos micro-organismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais.³⁰ E, diferenciam-se também, dos micro-organismos da micorriza que vivem em associação com as raízes das plantas.⁷

Portanto, os fungos que formam nódulos nas raízes das plantas as quais estão associados são bastante estudados devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas. Ao contrário, os endófitos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras.³⁰

Foi em 1911 que publicou-se a primeira referência sobre metabólitos potencialmente ativos isolados de fungos endofíticos,³¹ mas em menos de 100 anos, até o segundo trimestre de 2007, haviam sido cadastrados nos bancos de dados cerca de 11.376 publicações sobre esse tema, inclusive patentes, evidenciando o crescente interesse por essa área.⁶

Atualmente, os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse,³⁰ sendo que o primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina (**Figura 4**, pág. 38), substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenun*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberto acidentalmente por Fleming, em 1928.³¹ Hoje, o metabólito de maior interesse isolado de um fungo endofítico é o taxol (**Figura 4**, pág. 38), importante anticancerígeno, inicialmente isolado da planta *Taxus brevifolia* e, em seguida do endófito *Taxomyces andreana*, isso nos sugere um relacionamento entre plantas e micro-organismos que devem ser melhor explorados.³⁰

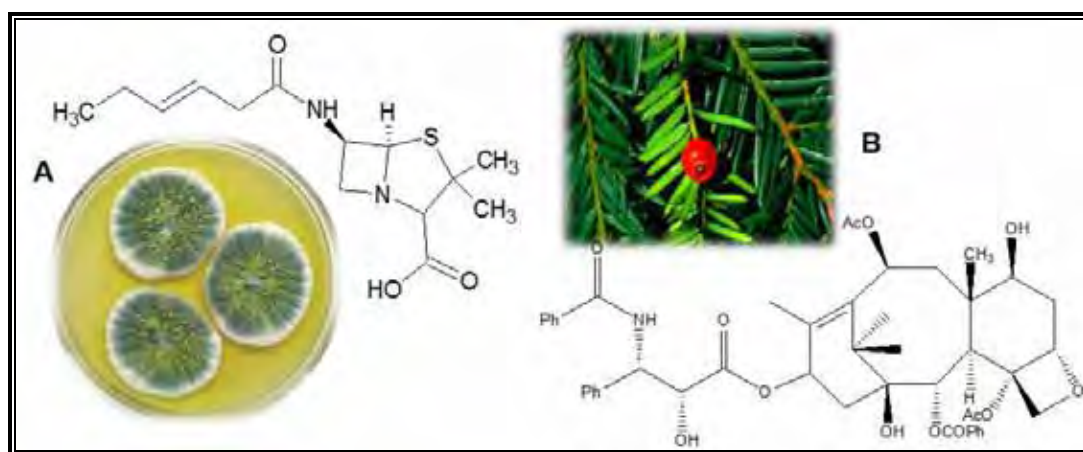


Figura 4 - (A) Fungo endofítico *Penicillium chrysogenun* e estrutura molecular da penicilina, **(B)** Planta *Taxus brevifolia* e estrutura molecular do taxol.

Em 2008 foram relatados centenas de produtos naturais, de diversas classes de substâncias produzidas por endófitos como: alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, etc. Até agora, a maioria dos produtos naturais oriundos de endófitos são: antibióticos, agentes anticancerígenos, agentes de controle biológico, e outros compostos bioativos identificados por suas diferentes funções.²⁴

Assim, tem-se constatado nos últimos anos uma urgente necessidade em se estudar a química dos fungos, temendo-se a perda da biodiversidade, demonstrando um interesse crescente não apenas pela consciência da grande diversidade encontrada em plantas superiores, mas também pela potencialidade destes fungos em produzir substâncias de classes e estruturas diversas, muito freqüentemente com atividades biológicas de grande interesse comercial.³²

1.5 Espécie Vegetal Hospedeira: *Alibertia macrophylla*

A família Rubiaceae Juss., pertencente a ordem Gentianales e compreendendo cerca de 637 gêneros e 10.700 espécies. Tem distribuição predominantemente tropical e subtropical e é constituída essencialmente de espécies lenhosas, entretanto, observa-se a ocorrência de alguns representantes herbáceos e arbustivos.³³ Apenas 20% de seus gêneros são plantas herbáceas que habitam regiões temperadas e frias da Europa, e norte do Canadá.³⁴

Considerada a quarta maior família de angiospermas do Brasil, com 1.010 espécies (10% das espécies em relação ao total mundial), está amplamente distribuída nos biomas mais representativos: Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado. Neste último, são encontrados no gênero *Alibertia*.³⁵

A importância econômica e terapêutica de algumas espécies de Rubiaceae é bem conhecida no Brasil, onde a família é muito bem representada, estando descritas 125 gêneros por todo o país,³⁶ e só no estado de São Paulo 228 espécies, incluídas em 47 gêneros. As espécies são encontradas nas regiões de cerrado de Mogi-Guaçu, São Carlos, Botucatu, e na Mata Atlântica.³⁷

A família se destaca por apresentar espécies de considerável expressão econômica, como o café (*Coffea arábica*) e, também, espécies de interesse farmacológico, como *Cinchona ledgeriana*, de onde é extraído o antimalárico quinina, e *Cephaelis ipecuanha*, onde se extrai ipeca, utilizada como expectorante na medicina popular.³⁸ Destacam-se também espécies empregadas na ornamentação e paisagismo, como o gênero *Gardenia* e na alimentação, como *Genipa americana*, conhecida como jenipapo, cujo fruto é utilizado na preparação de doce e licor.⁴⁵

Dentre as famílias de angiospermas, algumas espécies de Rubiaceae são consideradas como plantas que apresentam um alto grau de toxicidade. Uma delas é a

Palicourea marcgravii vulgarmente conhecida como erva de rato, esta planta que vitima o gado bovino sendo muito abundante em pastagens no Brasil.⁴⁸

A constituição química de espécies de Rubiaceae é bem diversificada, pois apresenta classes de substâncias como: alcalóides, flavonóides, antraquinonas, lignóides, monoterpénóides (iridóides), diterpenóides, triterpenóides e esteróides.³

Dentro da família Rubiaceae escolheu-se o gênero *Alibertia* para desenvolvimento do projeto de pesquisa. Os poucos relatos químicos encontrados na literatura sobre o gênero *Alibertia*, pertencente à subfamília Ixoroideae, faz destaque a sua rica constituição terpenoídica. Espécies de *Alibertia* são conhecidas como fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano.⁴⁵

A espécie vegetal *Alibertia macrophylla* é uma árvore conhecida popularmente como marmelo ou marmelada. É encontrada em ambiente de cerrado (**Figura 5**, pág. 40), e não apresenta qualquer uso popular descrito na literatura.³⁹



Figura 5 - *Alibertia macrophylla* K. Schum

Estudos fitoquímicos realizados com folhas da espécie *Alibertia macrophylla* pela Professora Vanderlan da Silva Bolzani do Instituto de Química – Unesp – Araraquara, levaram ao isolamento dos iridóides não glicosilados: loganetina (**1**), 1-epiloganetina (**2**), 1- β -hidroxi-diidrocornina (**3**) e 1- α -hidroxi-diidrocornina (**4**), sendo que (**2**), (**3**) e (**4**) foram descritos pela primeira vez de fontes naturais.⁴⁷ (**Figura 6**, pág. 41).

Dos extratos polares das folhas foram isolados o ácido cafeico (**25**), cafeoato de 2-feniletina (**6**) e cafeoato de 2-metil-4-hidroxibutíla (**7**), e dos caules os triterpenos: α -

amirina (**8**), β -amirina (**9**), α -amirenona (**10**), β -amirenona (**11**), lupeol (**12**), lupenona (**13**) e germaniconada (**14**). Estes extratos foram submetidos à bioensaios com os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, e *Colletotrichum gloeosporioides*, e mostraram uma forte ação fungitóxica. Esta atividade foi atribuída à presença dos derivados de ácido cafeico, das agliconas iridoidais, e ao éster cafeoato de 2-metil-4-hidroxibutila, constatado pela inibição do crescimento dos respectivos fungos.⁴⁰ (**Figura 6**, pág. 41).

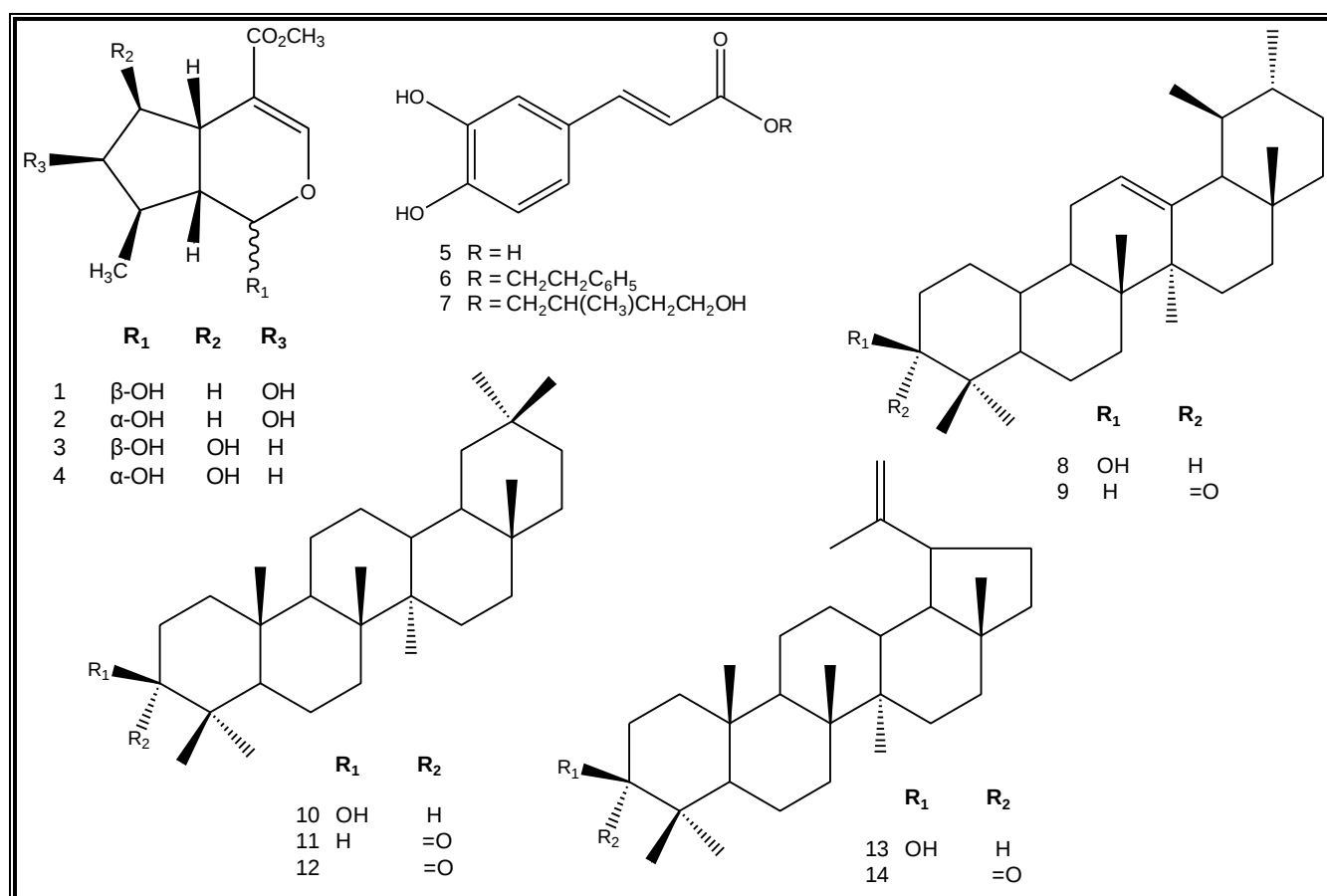


Figura 6 - Constituintes químicos isolados das folhas de *Alibertia macrophylla*.

1.6 Interação Fungo Endofítico – Planta Hospedeira

Tem-se conhecimento de que micro-organismos endofíticos existem em praticamente todas as plantas, e também se sabe que ocorrem variações dentro das espécies, inclusive tornando-as patogênicas ou não. Entretanto, não existem ainda muitas informações sobre a variabilidade dentro de espécies ou gêneros que ocorrem no interior de uma mesma planta, em seus diferentes órgãos ou tecidos, ou entre

endófitos isolados da mesma espécie vegetal, porém em diferentes épocas do ano ou locais distintos. Sabe-se que a variação fenotípica é comum entre isolados de uma mesma espécie de fungo.⁴¹

As interações de plantas com fungos endofíticos são pouco conhecidas.⁴² Simbiose entre um fungo e uma planta é um fenômeno generalizado na natureza, e desempenha um papel importante na estruturação de comunidades vegetais que afetam a colonização, a concorrência dinâmica de nutrientes do solo e a convivência. A maioria, senão todas as plantas estudadas no ecossistema natural estão infestadas por fungos sem qualquer manifestação externa de doença.⁸ Ecologistas têm reconhecido por muito tempo que a população biológica de uma espécie é determinada pela interação com predadores, patógenos, competidores e mutualistas.⁴³

Essas interações dos fungos endofíticos com o hospedeiro podem ser simbióticas (mutualismo e comensalismo) ou tróficas (predação e parasitismo). Nas interações mutualísticas os fungos são capazes de produzir metabólitos que possam conferir diversas vantagens as plantas, como resistência aos estresses bióticos e abióticos, sendo que essas substâncias podem apresentar diversas atividades: hormônios, antibióticos, antitumorais e outras funções biológicas. Também podem produzir metabólitos que não interferem no metabolismo do vegetal, e sim na autodefesa contra outros micro-organismos (comensalismo). Nessa associação a planta hospedeira protege e alimenta o endófito, que em resposta produz metabólitos bioativos para aumentar o crescimento e competitividade do hospedeiro e protegê-lo contra herbívoros e fitopatógenos.²⁷

Exemplos de metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de micro-organismos ou de agentes estressantes. Da parte dos fungos pode-se citar a produção de micotoxinas, metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais.²⁸

Entretanto mudanças no hospedeiro causadas por fatores de estresse podem induzir a transição de um estado simbiótico (mutualismo e comensalismo) a trófico (parasitismo), deste modo, o endófito passaria a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro,²³ um exemplo são os fungos saprófitas que são considerados patógenos fracos, pois continuam a esporular após sua morte no tecido vegetal do hospedeiro.⁴⁴ No entanto, uma série de estudos publicados ainda são com base na metodologia convencional de que interações mutualísticas entre fungos e plantas leva a defesa da

mesma. Neste contexto, uma gama de ajustes planta-fungo são necessários para o estabelecimento de uma interação equilibrada, incluindo reprodução do endófito, o custo de energia em abrigar o endófito, a demanda de nutrientes do endófito, a supressão do sistema imune do hospedeiro pode aumentar a susceptibilidade a outros fungos, e o controle do crescimento do hospedeiro. O equilíbrio que envolve a relação planta-endófito pode ser modificado sob condições de estresse do hospedeiro ou alterações fisiológicas em um dos organismos envolvidos. Se este equilíbrio é alterado o micro-organismo pode desenvolver uma condição de doença.⁸

Como resultado dessas interações em longo prazo, é razoável imaginar que alguns micro-organismos endofíticos podem ter desenvolvido sistemas genéticos que permitam a transferência de informações entre si e da planta hospedeira. Como consequência, os micro-organismos associados podem trocar caminhos bioquímicos a fim de produzir substâncias comuns aos seus hospedeiros, ou vice-versa, que podem ter aplicações no exterior da planta hospedeira em que normalmente residem. Tais metabólitos secundários podem ser importantes para muitas interações metabólicas entre fungos e suas plantas hospedeiras, incluindo defesa e regulamentação da relação simbiótica. As interações metabólicas de um endófito com seu hospedeiro, também podem favorecer a biossíntese de diferentes produtos naturais bioativos.⁸

O modo de reprodução dos fungos endofíticos para outros hospedeiros é de fundamental importância para a virulência e agressividade que esses micro-organismos podem causar à planta hospedeira. A maioria dos endófitos são, provavelmente, transmitidos horizontalmente por esporos de planta para planta. Também podem ser transmitidos verticalmente através das sementes, e neste caso a interação mutualística é acentuada através do aumento da adaptação da planta hospedeira com o estágio de germinação e também na fase adulta (**Figura 7**, pág. 44). Porém, a transmissão vertical pode reduzir a habilidade do fungo endofítico em infectar uma planta não infectada, tanto assexuadamente ou sexuadamente via esporos.⁴⁵

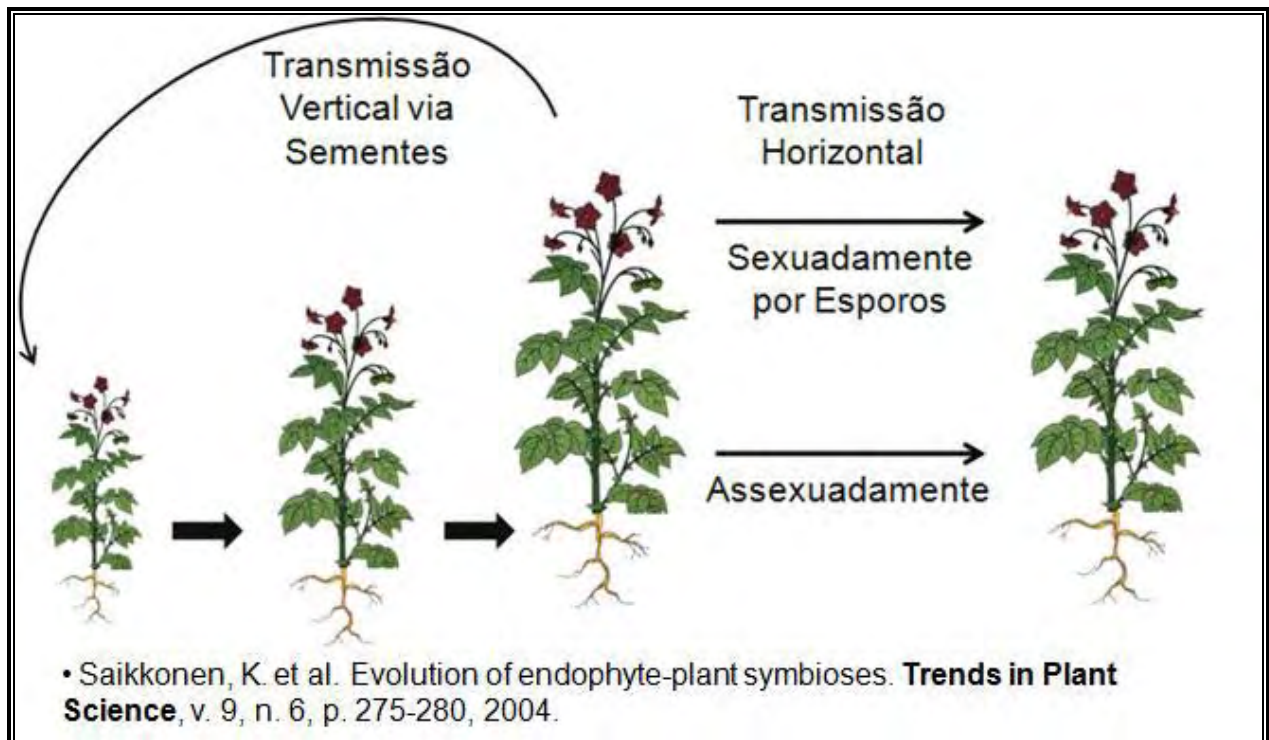


Figura 7 - Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro

No entanto, fungos endofíticos têm sido considerados um importante componente do mecanismo de defesa das plantas contra herbívoros e na tolerância ao estresse, estando associados em nível do ecossistema, um exemplo é o papel que esses endófitos podem desempenhar na degradação do lixo gerado pela planta, pois endófitos foram descritos como os primeiros micro-organismos envolvidos na decomposição de folhas.¹¹

2. OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Isolamento, identificação e avaliação das atividades antifúngica, antioxidante, anticolinesterásica e antitumoral dos metabólitos secundários produzidos pelo endófito *Camarops* sp..

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Cultivo em escala ampliada do fungo endofítico *Camarops* sp. em meio sólido (milho) para a obtenção do extrato CH₃OH;
- ✓ Fracionamento do extrato CH₃OH por técnicas cromatográficas convencionais até o isolamento de metabólitos secundários;
- ✓ Elucidação ou determinação estrutural das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas (RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, EM, UV, IV);
- ✓ Avaliação das substâncias puras isoladas aos ensaios para verificação do potencial antioxidante, antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral;
- ✓ Fornecer subsídios para uma melhor compreensão da relação ecológica entre os fungos endofíticos e as espécies vegetais hospedeiras.

3. PARTE

EXPERIMENTAL

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS

3.1.1 Meios para Cultivo do Micro-organismo

O micro-organismo foi cultivado em meio de cultura sólido comercial a temperatura controlada (25°C).

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

Milho tipo canjica (Yoki[®]): 90g / 80mL de água;

3.1.2 Esterilização dos Materiais

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

3.1.3 Manipulação do Micro-organismo

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

3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas comerciais da Merck, com sílica de fase normal (sílica G TLC Plates W/UV 254, 200µm) e sílica de fase reversa (C18 sílica TLC Plates w/UV; 150µm). Os solventes utilizados nos sistemas cromatográficos foram selecionados de acordo com a fase estacionária.

As revelações foram obtidas por: irradiação ultravioleta (UV 254 e 366nm); nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento.

3.1.5 Cromatografia em Coluna (CC)

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

Fases estacionárias utilizadas:

- ✓ Sílica gel C18 (tamanho da partícula: 40-63µm; Merck);
- ✓ Sílica gel fase normal (tamanho da partícula: 0,060–0,200µm; diâmetro do poro 6nm; ACROS organics)

3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as análises do perfil químico, otimização e isolamento das substâncias por CLAE foram utilizados equipamentos Varian ProStar com detectores de arranjos de diodo (DAD) e UV-Vis, Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A₃ e injetor automático Shimadzu SIL-20A e, Shimadzu (CBM-20A) com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A). O tratamento dos dados foi obtido através de um microcomputador com processador Intel[®] Celeron[®], utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

Colunas utilizadas:

- Analíticas:
 - Gemini Phenomenex C18 (250,0 x 4,60mm; 5µm; 110A);
 - Luna Phenomenex C18 (250,0 x 4,60mm; 5µm; 100A)
- Semi-preparativa:
 - Luna Phenomenex C18 (60,0 x 21,20mm, 10µm)
- Preparativa:
 - Luna Phenomenex C18 (150,0 x 21,20mm, 5µm)

3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetros Varian INOVA-500 operando em 500 MHz para o núcleo de ¹H e em 125 MHz para o núcleo de ¹³C (Campo magnético 11,4T), e Bruker INOVA-300

operando em 300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C . Foi utilizado TMS como referência interna.

3.1.8 Espectrometria de Massas

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

Condições do Experimento: Bomba de infusão.

Fluxo 250 $\mu\text{L/h}$.

Fase móvel para a solubilização: CH_3CN 100%.

Modo de detecção: positivo e negativo para as amostras.

Os espectros de baixa resolução foram obtidos em:

1. Espectrômetro de massas Varian LC 1200L com injetor automático, triplo-quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o controle do equipamento, aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software *Varian MS Workstation 6.8*.
2. Espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Analitica, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Finigan®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

3.1.9 Preparo das amostras para análise via CLAE (*clean-up*)

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos e sólidos em pequena escala foram submetidos aos ensaios biológicos e à análise em RMN de ^1H e CLAE-DAD em gradiente exploratório. Antes das análises por CLAE-DAD as amostras foram solubilizadas em $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 mm). Após este procedimento, as amostras ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foram armazenadas em “vial”, para posterior injeção.

3.1.10 Análise de rotação óptica $[\alpha]_D^{25}$

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

3.1.11 Infravermelho

Os espectros de IV foram obtidos no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer, Série 1600 sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 32 varreduras, com resolução de 1 cm^{-1} , na faixa de absorção de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, utilizando pastilhas de KBr.

3.1.12 Solventes utilizados

Deuterados: Merck, Aldrich e Fluka.

Não-Deuterados: Merck, J.T. Baker, Synth, Mallinckrodt P.A. e H₂O MilliQ.

3.1.13 Outros Equipamentos

Evaporador rotatório - Buchi

Balança analítica – Mettler Toledo AG 245

3.2 SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

As folhas de *A. macrophylla* foram coletadas na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha, e identificadas pela Prof^a. Dr^a. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo. A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo (Nº SP 370.915).

3.3 ISOLAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS*

O isolamento dos fungos endofíticos a partir do material vegetal foi realizado tendo como base o procedimento experimental citado por Maier (1997).⁴⁶ As superfícies das folhas saudáveis de *A. macrophylla* foram esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 minutos) e etanol 70% (1 minuto), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (1 minuto). A água da segunda lavagem foi plaqueada para verificação da presença de fungos remanescentes. Pedacos de folhas seccionadas assepticamente (3 a 4 de aproximadamente 1cm²) foram inseridos em meio de cultura sólido contendo batata-dextrose-água (BDA) e ágar-água (AA), preparados com antibiótico (sulfato de gentamicina 50mg/mL), para evitar o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em frascos com água esterilizada,⁴⁷ conforme pode ser visualizado na **Figura 8** (pág. 52).

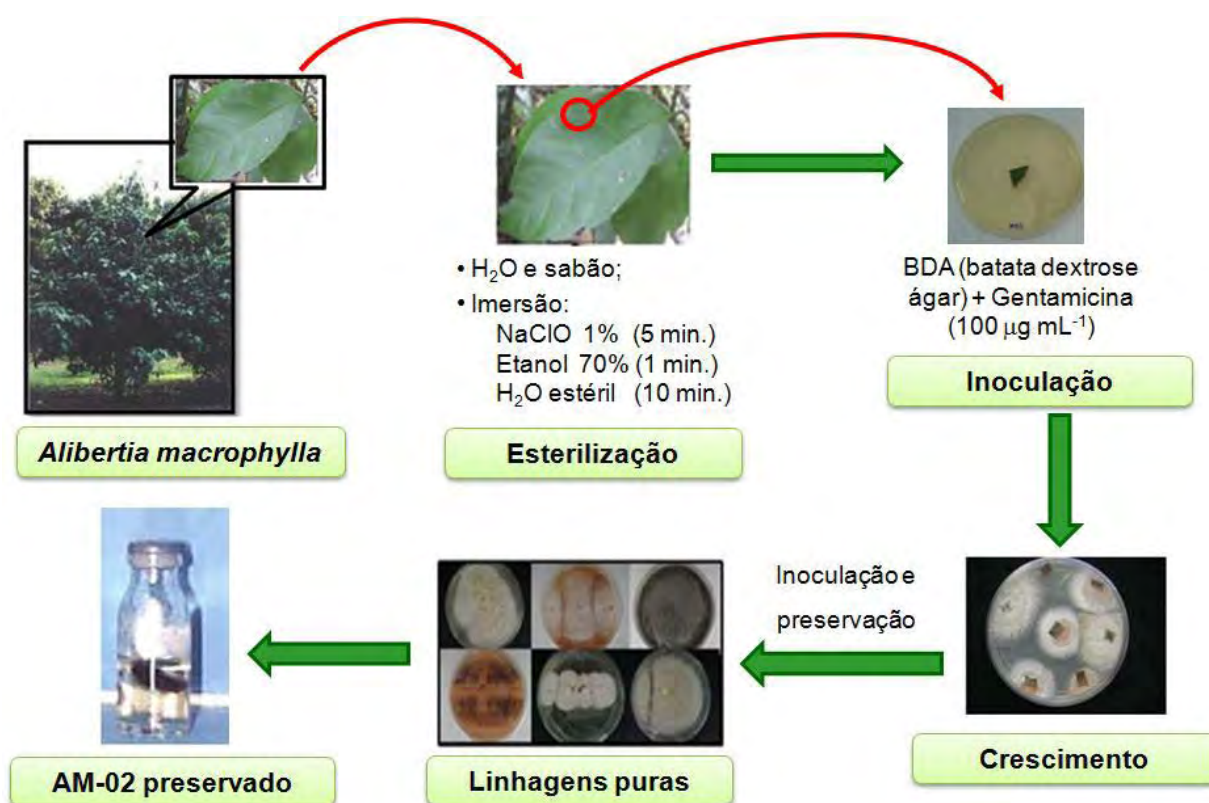


Figura 8 - Metodologia de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos

Das folhas de *A. macrophylla* foram isolados quatro linhagens puras que foram codificadas como AM-01, 02, 03, 04 e que após estudos de identificação obteve-se

Penicillium sp1 (AM-01), *Camarops* sp. (AM-02) e *Penicillium* sp2 (AM-04) e, estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica/IQAr-SP.

Para realização deste projeto, o fungo *Camarops* sp. foi selecionado para avaliação do potencial químico e biológico.

* O processo de isolamento e preservação das cepas fúngicas foi realizado pelo Dr. Geraldo H. Silva.

3.5 CLASSIFICAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO

A cultura pura de *Camarops* sp. foi enviada para o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Divisão de Recursos Microbianos da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP) e foi classificada pela Prof^a. Dr^a. Lara Durães Sette e pelo Prof. Dr. André Rodrigues.

Inicialmente, a identificação foi realizada por taxonomia convencional, que é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados citados na literatura de referência, possibilitando assim a identificação do micro-organismo. Como essa metodologia foi infrutífera em nível de espécie, passou-se então, para uma metodologia de identificação mais avançada.

Em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou um gênero. Nesse aspecto, técnicas moleculares (seqüenciamento de genes), de classificação e identificação contribuem para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos. Neste contexto, passou-se então, a utilizar a biologia molecular para identificar-se a espécie fúngica estudada. Este estudo quimio-genético-taxonômico viabiliza uma identificação segura de fungos filamentosos utilizados na busca de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Desta forma, este procedimento de identificação nos assegura a correta identificação da espécie estudada.

3.6 CULTIVO DO FUNGO ENDOFÍTICO

3.6.1 Cultivo do fungo endofítico *Camarops* sp.

O isolado fúngico *Camarops* sp. (**Figura 9**, pág. 54) preservado em “slants” foi repicado em placas de Petri contendo meio BDA e incubado por quinze dias a 25°C. O cultivo em meio sólido foi realizado em frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo 90g de milho e 80mL de água cada (num total de 25 frascos de Erlenmeyer, sendo um separado para o branco). Estes meios foram autoclavados três vezes (em dias alternados) à temperatura de 121°C, por 40 minutos. Após resfriamento os meios foram inoculados com o endófito e incubados a 25°C em modo estático por 21 dias. Terminado o período de incubação, as culturas sólidas foram trituradas, e extraídas com CH₃OH (7 x 350mL), em seguida o solvente foi evaporado fornecendo o extrato CH₃OH (**Figura 10**, pág. 55).

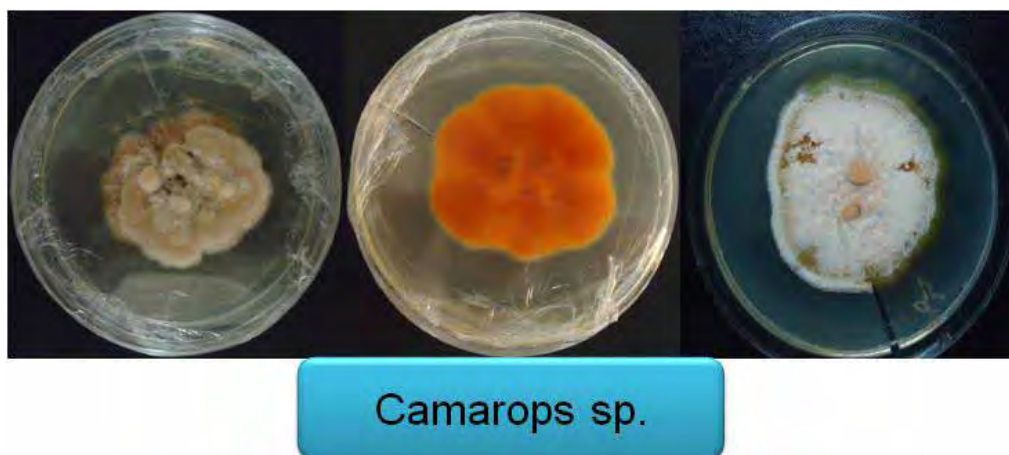


Figura 9 - Fungo endofítico *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla*

Utilizando as mesmas condições de cultivo descritas acima também foi obtido o extrato CH₃OH do milho (Branco) sem a inoculação do fungo com o objetivo de realizar uma comparação com os possíveis interferentes extraídos do meio de cultivo com metanol.

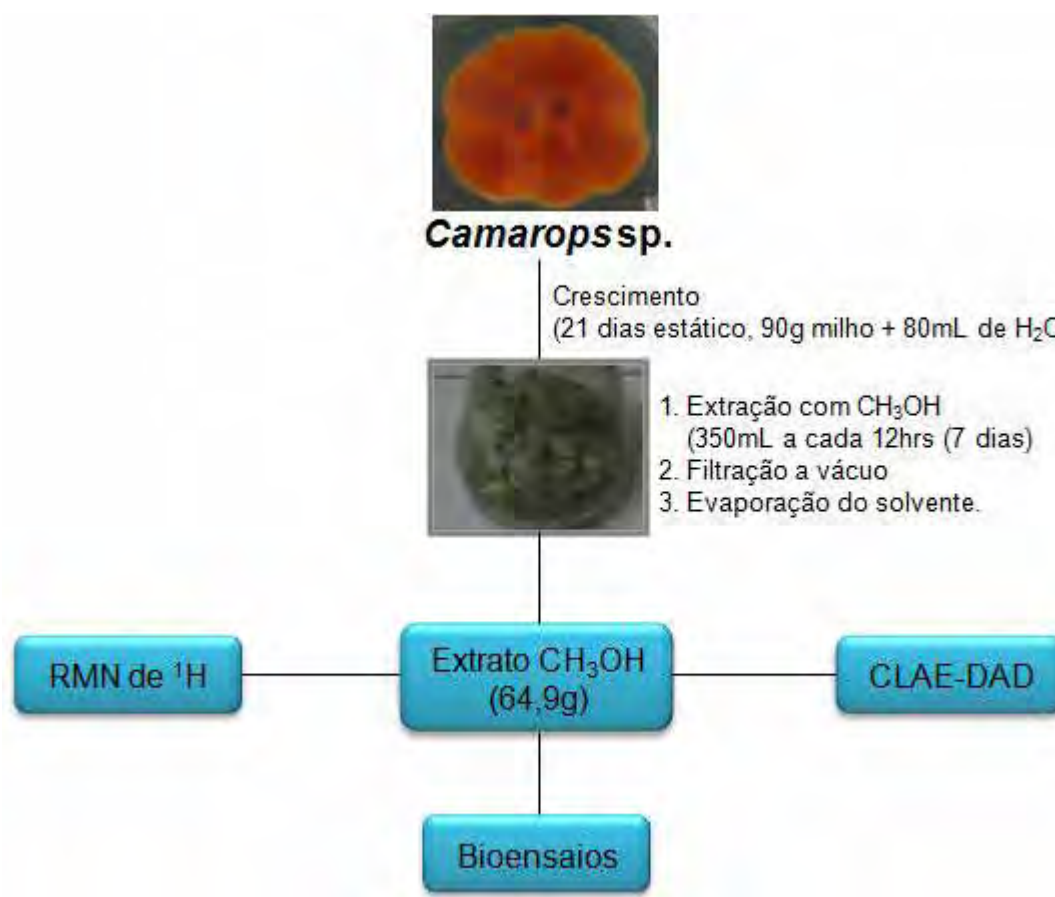


Figura 10 – Fluxograma de obtenção e análise do extrato CH₃OH obtido em milho do endófito *Camarops* sp.

O extrato CH₃OH obtido em milho foi submetido à análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD em gradiente exploratório e análise por RMN de ¹H. O sistema utilizado para análise em CLAE foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C18) e eluição em gradiente H₂O/CH₃OH (95:05→0:100) por 40min., permanecendo nesta condição por mais 10min., com fluxo de 1,0mL/min., e λ de 254nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda.

3.7 PARTIÇÃO DO EXTRATO CH₃OH OBTIDO DO CULTIVO EM MILHO DE *CAMAROPS* sp.

O extrato CH₃OH obtido em milho de *Camarops* sp. foi fracionado de acordo com a **Figura 11**, pág. 56.

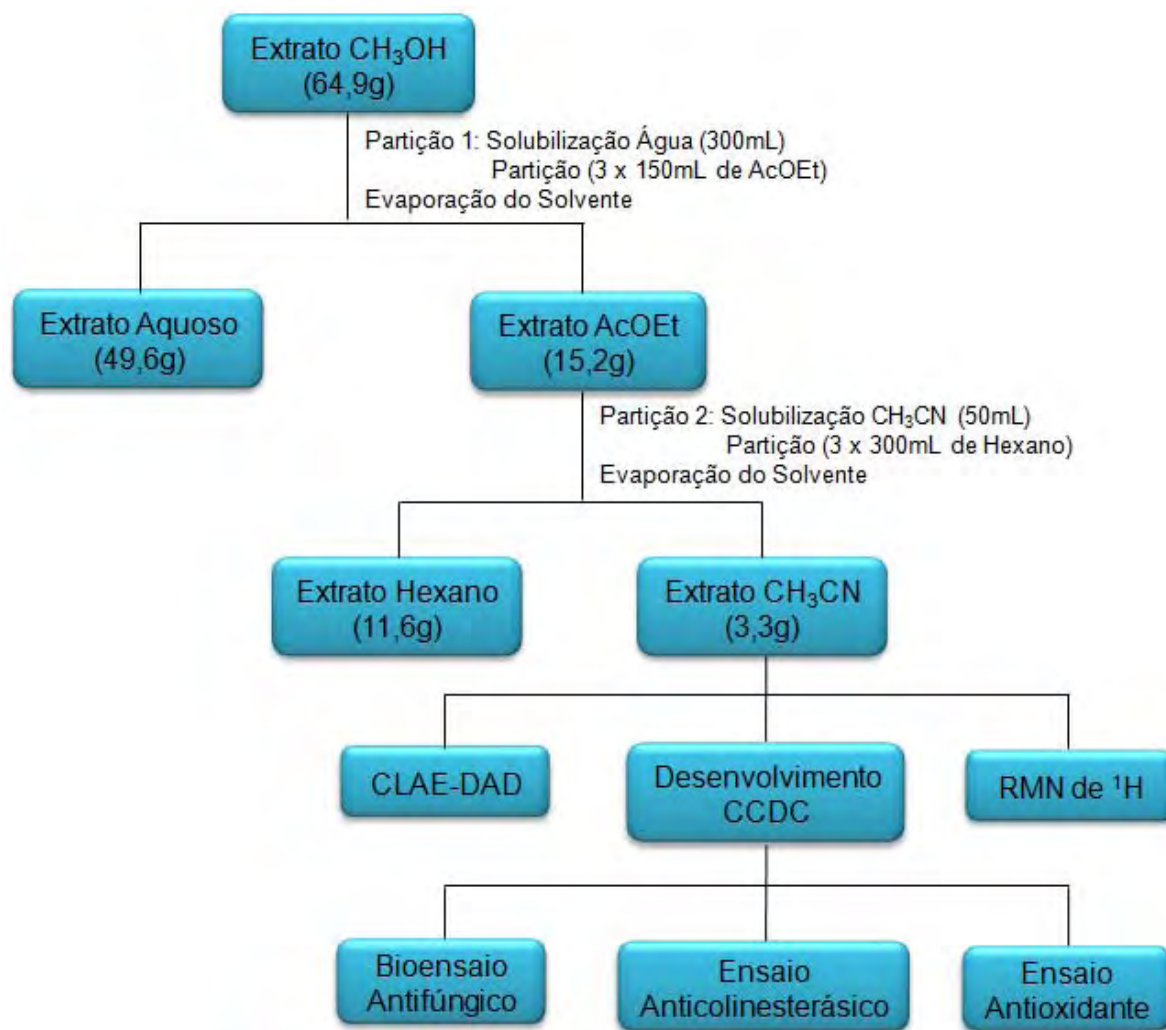


Figura 11 – Fluxograma de partição do extrato CH_3OH obtido do cultivo de *Camarops* sp.

O extrato CH_3CN foi submetido à análise do perfil químico por CLAE-DAD e RMN de ^1H . O sistema utilizado para análise em CLAE foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C18) e eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:05→0:100) por 40min., permanecendo nesta condição por mais 10min., com fluxo de 1,0mL/min. e λ de 254nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda.

3.7.1 Fracionamento do extrato CH_3CN de *Camarops* sp.

Após obtenção do extrato CH_3CN , este foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão, onde utilizou-se como fase estacionária sílica de fase reversa C18 e sistema de eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (70:30→0:100) e $\text{CH}_3\text{OH}/\text{AcOEt}$

(50:50→0:100). Foram obtidas oito frações como visualizado na **Figura 12** (pág. 57), de 315mL cada (Fr1 a Fr8).

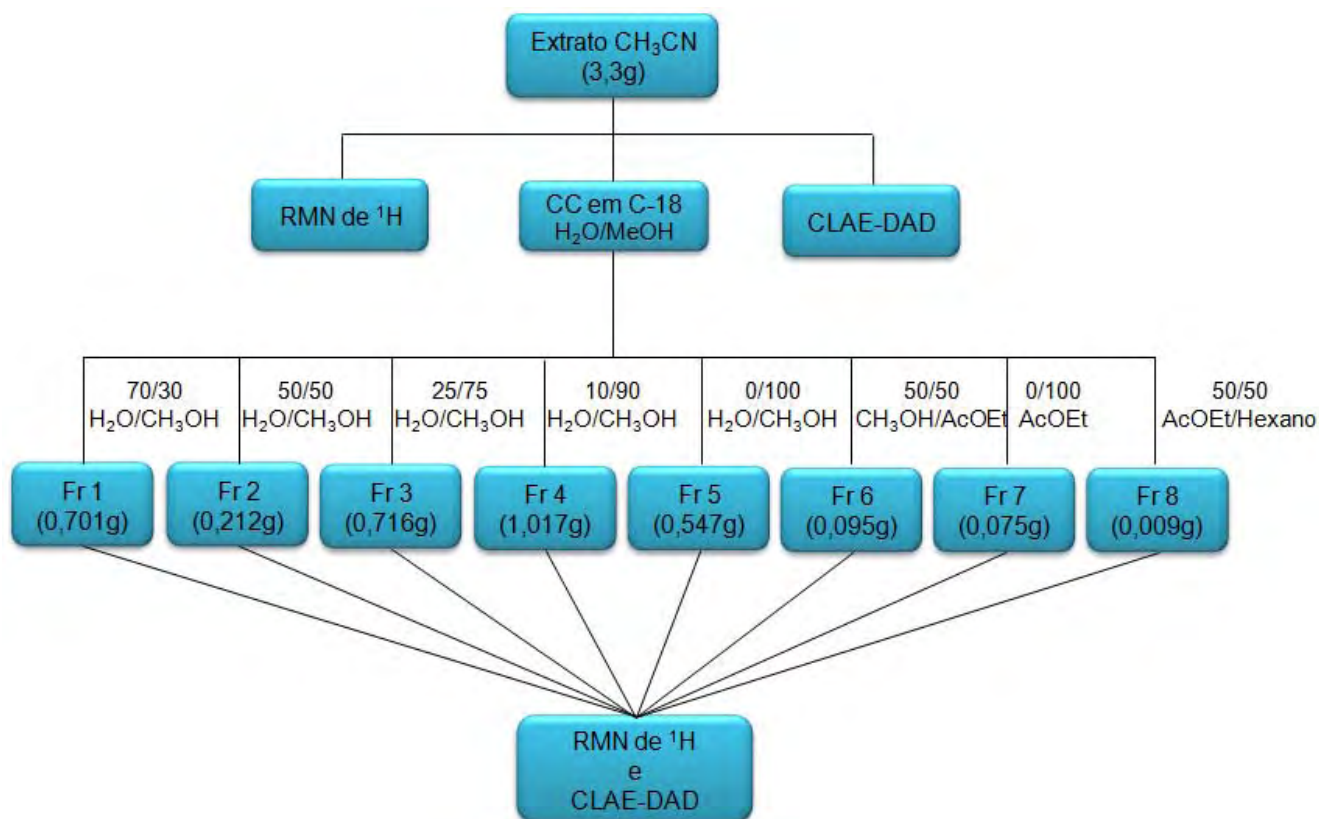


Figura 12 - Fracionamento cromatográfico utilizando fase reversa do extrato CH_3CN

O perfil químico destas frações foi avaliado por CLAE-DAD utilizando uma coluna analítica tipo Octadesil silano (C18) e eluição com gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (95:05v/v) a (0:100v/v) por 40min., permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, num fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Estas foram, cuidadosamente analisadas por CCDC utilizando $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:05 como fase móvel e como revelador luz ultra-violeta nos comprimentos de onda λ 254 e 366nm seguido de anisaldeído e aquecimento e RMN de ^1H objetivando uma avaliação do grau de pureza e do perfil químico. As massas obtidas destas frações, aliadas à resolução por CCDC e aos espectros de RMN de ^1H , conduziram a seleção das frações Fr1, Fr3 e Fr4 para o estudo químico.

3.7.2 Purificação das frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN produzido por *Camarops* sp. em milho

3.7.2.1 Fracionamento e Purificação da Fração Fr1

A fração Fr1 foi submetida à cromatografia em coluna sob pressão, onde utilizou-se como fase estacionária sílica de fase reversa C18 e eluentes H₂O/CH₃OH (80:20→0:100) e CH₃OH/AcOEt (50:50→0:100) em gradiente. Foram obtidas seis sub-frações de 240mL cada (Fr1-A a Fr1-F) como visualizado na **Figura 13** (pág. 58). Estas foram analisadas por RMN de ¹H e CCDC utilizando uma série de eluentes, e anisaldeído seguido de aquecimento como reveladores. Após esta análise, as frações Fr1-A e Fr1-B foram novamente fracionadas.

As frações Fr1-E e Fr1-F foram reunidas por apresentarem perfil idêntico por análise dos espectros de RMN de ¹H e forneceram a substância **4**.

As frações Fr1-A e Fr1-B foram fracionadas por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel um sistema ternário de eluentes Hex:AcOEt:CH₃OH (69:30:1→55:30:15).

Da Fr1-A foram obtidas oito sub-frações de 20mL cada (Fr1-A1 a Fr1-A8) e da Fr1-B quinze sub-frações de 20mL cada (Fr1-B1 a Fr1-B15) como visualizado na **Figura 13** (pág. 58).

A Fr1-A forneceu a substância **1**, e a Fr1-B as substâncias **2** e **3**.

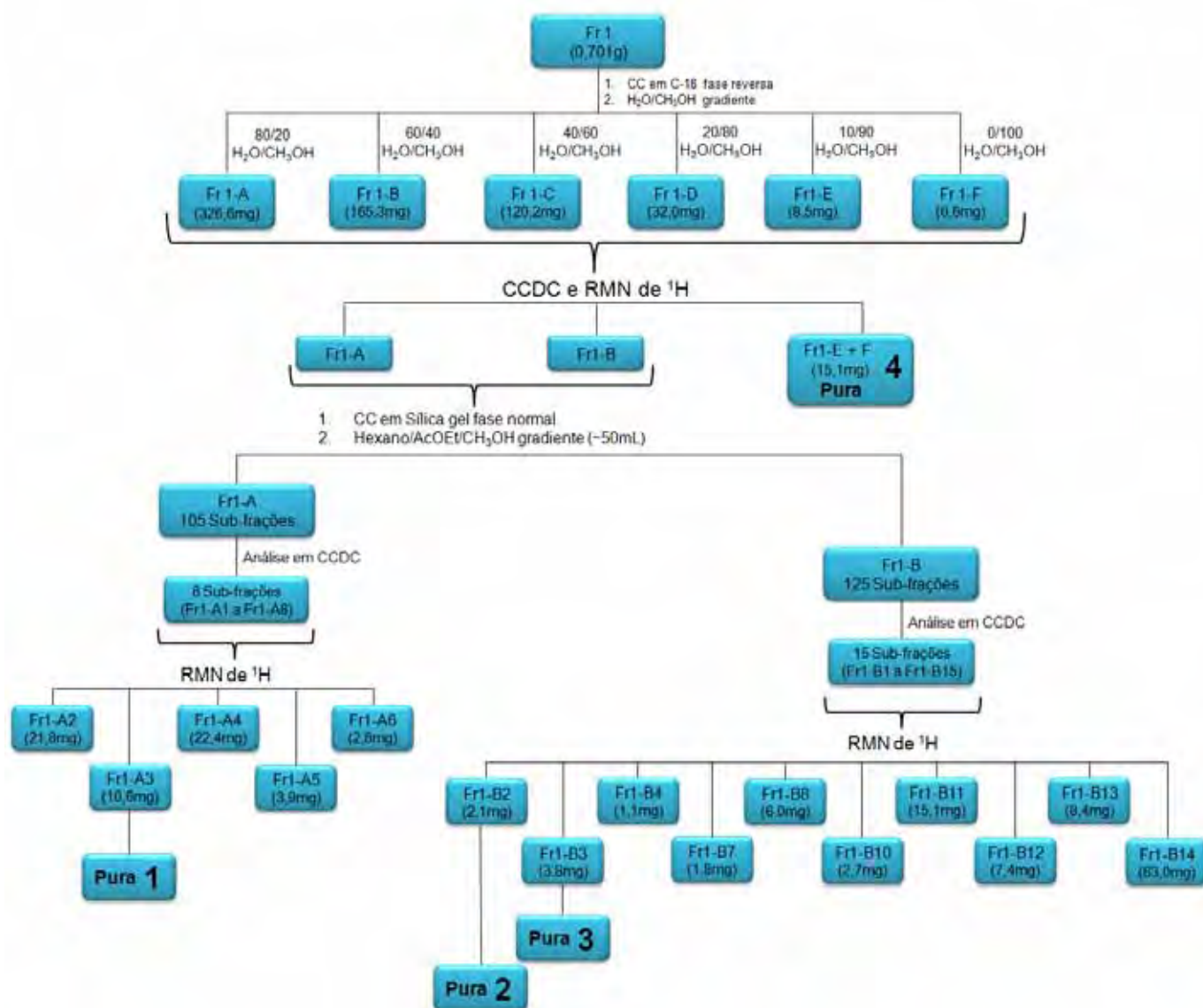


Figura 13 - Fracionamento cromatográfico utilizando fase normal e fase reversa de Fr1

3.7.2.2 Fracionamento e Purificação da Fração Fr3

A Fr3 foi fracionada por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e um sistema de eluentes como fase móvel Hex:AcOEt (95:05→0:100) em gradiente como mostrado na **Figura 14** (pág. 60) fornecendo 154 sub-frações de aproximadamente 20mL cada. Estas foram analisadas por CCDC utilizando uma série de eluentes, e analisado seguido de aquecimento como reveladores. As primeiras frações (ao redor de 55) não apresentaram massa e foram descartadas.

As demais frações foram reunidas de acordo com a semelhança evidenciada por CCDC resultando em 14 sub-frações que foram codificadas Fr3-A a Fr3-N.

3.7.2.3 Fracionamento e Purificação da Fração Fr4

A Fr4 foi fracionada por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e um sistema de eluentes como fase móvel Hex:AcOEt (95:05→0:100) em gradiente **Figura 15** (pág. 62) fornecendo 51 sub-frações de aproximadamente 50mL cada. Estas foram analisadas por CCDC utilizando uma série de eluentes, e anisaldeído seguido de aquecimento, como reveladores.

As frações foram reunidas de acordo com a semelhança evidenciada por CCDC resultando em 10 sub-frações que foram codificadas Fr4-A a Fr4-J.

A sub-fração Fr4-B foi novamente fracionada por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e um sistema de eluentes Hex:AcOEt (95:05→0:100) em gradiente como fase móvel. Foram obtidas 36 sub-frações de 50mL cada (Fr4-B1 a Fr4-B36) **Figura 15** (pág. 62). Estas foram analisadas por CCDC utilizando Hex:AcOEt 70:30 como eluente e luz ultra-violeta e anisaldeído seguido de aquecimento como reveladores e, conforme semelhança foram reunidas, resultando assim em 22 sub-frações (Fr4-B1 a Fr4-B22).

A subfração Fr4-B3 mostrou-se pura e foi submetida a análises por RMN de ^1H e ^{13}C , *g*HMQC, *g*HMBC e *g*COSY, sendo codificada como substância **8**. Das demais frações, algumas foram reunidas e devidamente armazenadas em freezer aguardando estudos posteriores.

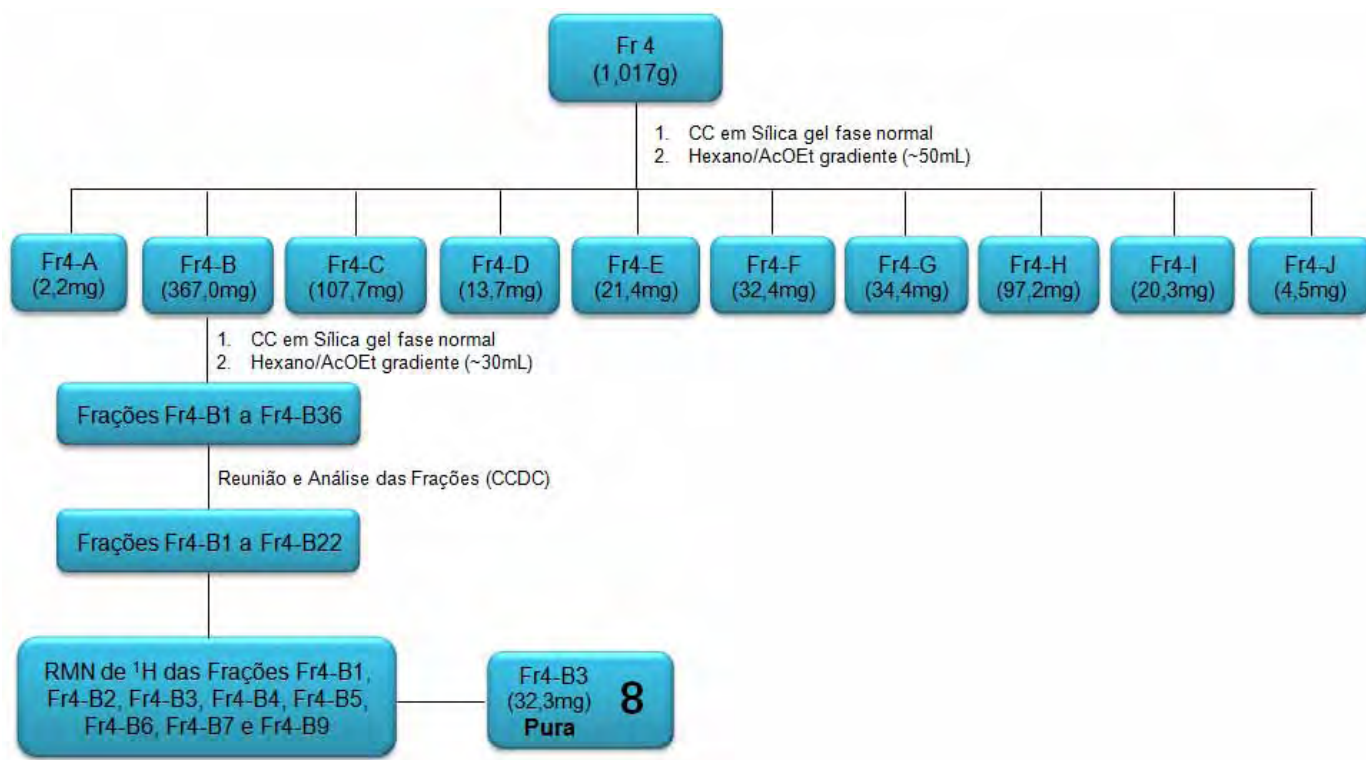


Figura 15 – Fracionamento cromatográfico utilizando fase normal de Fr4.

3.8 ANÁLISES QUÍMICAS E AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO CH₃OH DE *CAMAROPS* sp.

O extrato CH₃OH obtido do fungo endofítico *Camarops* sp. foi submetido à análises químicas utilizando as seguintes técnicas:

3.8.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Esta técnica tem o objetivo de estabelecer condições primárias de separação cromatográfica, obtendo indícios da natureza química das substâncias presentes no extrato.

As análises do extrato CH₃OH realizadas por CCDC foram otimizadas utilizando sílica de fase normal e fase reversa (C18) como fases estacionárias e misturas binárias dos solventes AcOEt, Hex, CH₃OH e CHCl₃ para a seleção da fase móvel. O sistema que apresentou melhor separação e resolução cromatográfica foi sílica de fase normal como fase estacionária e eluição com CHCl₃:CH₃OH (95:05 v/v).

3.8.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Considerando a natureza de média a alta polaridade das substâncias extraídas, foi de fundamental importância a submissão do extrato CH₃OH à CLAE-DAD, para se verificar a adequação desta técnica cromatográfica ao trabalho experimental, e também contribuir para o conhecimento da natureza química das substâncias presentes.

Nas análises do perfil químico do extrato CH₃OH realizadas por CLAE-DAD, as amostras foram submetidas à eluição em gradiente exploratório com coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C18) e eluição em gradiente H₂O/CH₃OH (95:05→0:100) por 40min., permanecendo nesta condição por mais 10min., com fluxo de 1,0 mL/min. e λ de 254nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda.

3.8.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H)

O objetivo desta técnica está direcionado a obtenção de indícios sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos pelo endófito e encontrados no extrato CH₃OH.

Para obtenção dos espectros de RMN de ¹H do extrato CH₃OH, as amostras foram submetidas à análise utilizando DMSO-d₆ e CDCl₃ como solventes deuterados.

3.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS PURAS OBTIDOS DE *CAMAROPS* sp.

As análises biológicas realizadas para os extratos CH₃OH, CH₃CN, frações oriundas do fracionamento do extrato CH₃CN e as substâncias puras obtidas do cultivo em milho do endófito *Camarops* sp. foram:

3.9.1 Avaliação da Atividade Antifúngica Através de Bioautografia sobre Cromatogramas em Camada Delgada

Os ensaios de atividade antifúngica foram desenvolvidos no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal, sob supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young.

A atividade antifúngica foi determinada por bioautografia pela nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

Os extratos CH₃OH e CH₃CN (400µg), e as substâncias puras (100µg, 50µg, 25µg, 10µg, 5µg e 1µg), foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel e eluídas com solventes adequados CHCl₃:CH₃OH (90:10). Em seguida foram evaporadas para completa remoção dos solventes. As cromatoplasmas foram borrifadas com uma suspensão de fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, na concentração de 5x10⁷ esporos/mL, 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 encontravam as substâncias ativas inibindo o crescimento do fungo, em comparação com o padrão positivo nistatina 1µg (**Figura 16**, pág. 64).⁴⁸

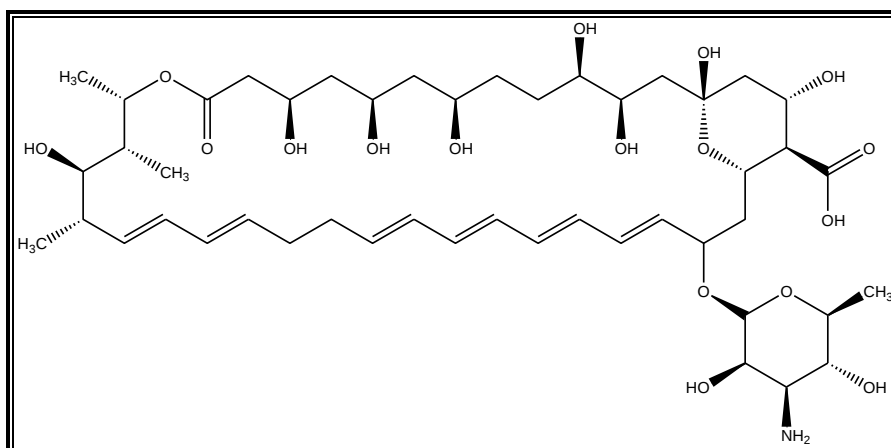


Figura 16 - Nistatina, controle positivo nos ensaios de atividade antifúngica.

3.9.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

Os ensaios de atividade anticolinesterásica foram desenvolvidos no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal, sob supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young.

O ensaio qualitativo e quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD) consiste na eluição de uma cromatoplasma da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), galantamina (**Figura 17**, pág. 65). As amostras e o controle foram aplicados em ordem decrescente de massa, e em placas de sílica com eluente adequado (CHCl₃:CH₃OH

(90:10)), objetivando encontrar a menor quantidade inibidora da AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66U) (**solução A**). A placa cromatográfica foi incubada em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a (**solução D**).⁴⁹

O aparecimento de manchas brancas sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Soluções:

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

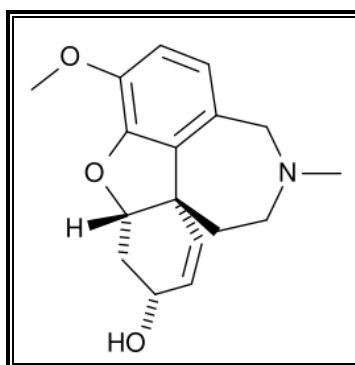


Figura 17 - Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição de AChE

3.9.3 Ensaio preliminar com DPPH para detecção de substâncias antioxidantes

Os ensaios antioxidantes foram desenvolvidos no Instituto de Química em Araraquara – Departamento de Química Orgânica.

A propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar, estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância, sendo esse modelo geralmente observado em estruturas fenólicas.³²

O padrão utilizado para comparar a atividade seqüestradora de radicais livres dos extratos CH_3OH , CH_3CN , das frações oriundas do fracionamento do extrato CH_3CN e das substâncias puras de *Camarops* sp. foi a quercetina diidratada (**Figura 18**, pág. 67), dissolvida em CH_3OH , nas seguintes concentrações: 33,3 μM ; 26,7 μM ; 20,0 μM ; 13,3 μM ; 6,7 μM ; 3,3 μM ; 1,7 μM .

A solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,04g/L, em CH_3OH . Os extratos, as frações e as substâncias puras foram diluídos em CH_3OH nas concentrações: 0,667mg/mL; 0,333mg/mL; 0,0100mg/mL; 0,0067mg/mL; 0,0033mg/mL; 0,0027mg/mL; 0,0017mg/mL. A análise foi feita em microplacas transparentes de 96 poços, com capacidade para 400 μL .

A primeira placa foi preenchida com o branco (300 μL de CH_3OH por poço), e sua leitura foi feita antes da placa contendo os extratos, as frações e as substâncias de interesse. A segunda placa foi preenchida com as sete diferentes concentrações do extrato (100 μL do extrato por poço), sendo que as três primeiras fileiras de poços continham o padrão. Então, foram adicionados 200 μL da solução de DPPH em cada poço. Todas as amostras foram analisadas em triplicada e tiveram seus desvios padrões calculados.

A placa foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos após a adição da solução de DDPH, posteriormente, foi feita a leitura em leitor de microplacas Synergy-HTS em λ 517nm. Os dados obtidos foram então processados empregando a fórmula a seguir que foi inserida no programa KC4, o qual calculou e gerou os gráficos da atividade seqüestradora de radicais livres.

Processamento dos dados:

Fórmula: % de seqüestro do radical livre estável DPPH

$$\% \Delta A = \frac{(\text{absorbância do CONTROLE-DPPH} - \text{absorbância da AMOSTRA ou PADRÃO}) \times 100}{\text{Absorbância do CONTROLE-DPPH}}$$

A atividade antioxidante foi expressa em termos de IC_{50} (concentração em mg/mL do extrato, necessário para seqüestrar 50% do radical livre DPPH). O radical DPPH tem um máximo de absorção em 515nm, o decréscimo na absorbância, devido à captura de um hidrogênio radicalar cedido pela espécie antioxidante e conseqüente estabilização do radical, é evidenciado pela mudança da cor violeta para amarelo.⁵⁰

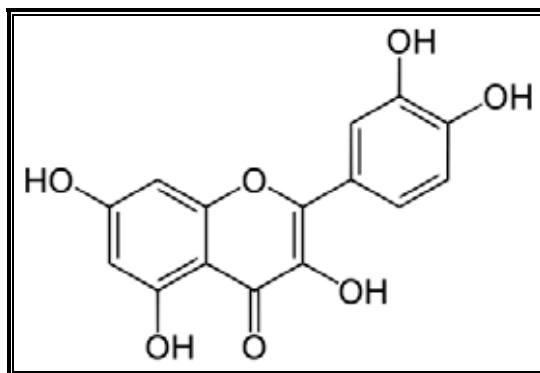


Figura 18 - Quercetina controle positivo nos ensaios de atividade antioxidante

3.9.4 Avaliação da Atividade Antitumoral

Os ensaios antitumorais e de hemólise foram desenvolvidos no Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa.

As linhagens tumorigênicas humanas utilizadas no ensaio de atividade antitumoral foram SF 295 (glioblastoma - humano), MDA-MB435 (mama - humano) e HCT-8 (cólon - humano) e, foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

As células foram cultivadas em meio de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, sendo mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT consiste em uma análise colorimétrica, pela qual ocorre a conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazana, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e os sobrenadantes, removidos. Em seguida, foram adicionados 150µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram estatisticamente validados, segundo suas médias, de acordo com o programa GraphPad Prism, empregando esse para a determinação do IC_{50} (concentração inibitória capaz de diminuir em 50% a viabilidade celular), o padrão utilizado foi o quimioterápico doxorrubicina (**Figura 19**, pág. 68).⁵¹

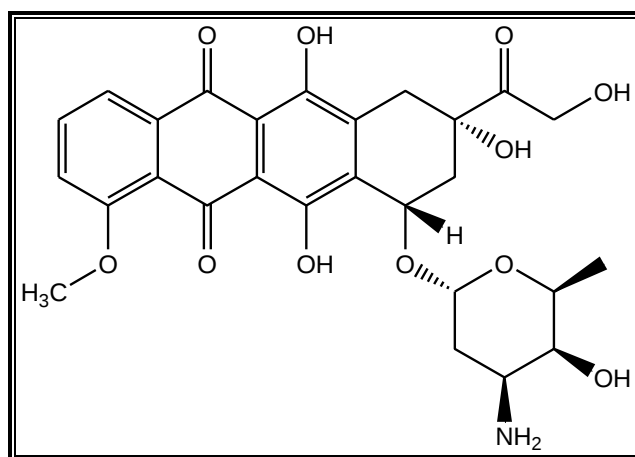


Figura 19 - Doxorrubicina controle positivo nos ensaios de atividade antitumoral

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO METABÓLICA DO FUNGO ENDOFÍTICO *CAMAROPS* sp. NO MEIO DE CULTURA MILHO

Os fungos absorvem nutrientes, em vez de ingeri-los. A absorção é auxiliada por enzimas secretadas no meio, que quebram as moléculas orgânicas em porções menores que podem ser transportadas mais facilmente para dentro da célula.⁷

Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Oligoelementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades. No entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial, vitaminas, como tiamina, biotina, riboflavina, ácido pantotênico etc.⁷

É importante salientar que as características fisiológicas de um micro-organismo em cultura, podem não ser as mesmas que as do seu crescimento na natureza. As culturas puras em laboratório crescem muito bem, porque normalmente têm uma abundância de nutrientes e não há competição com outros micro-organismos pelo alimento em disponibilidade. Assim, em laboratório eles podem crescer em uma mistura simples contendo açúcar, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns minerais. Alguns necessitam de vitaminas. Outros podem crescer somente em um meio complexo que contenha uma grande variedade de compostos orgânicos providos pela peptona e extratos de carne.⁷

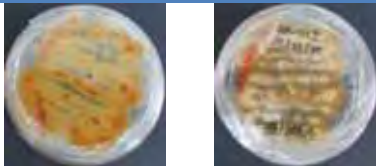
O cultivo do fungo em placas de Petri foi realizado somente em meio de BDA que é um meio rico em nutrientes primários essenciais ao crescimento de fungos e no qual AM-02 se desenvolve satisfatoriamente.

As condições para o cultivo do endófito (meio de cultura sólido, tempo de incubação de 21 dias em modo estático e ambiente climatizado a 25°C) foram adotadas com base nos resultados obtidos com o estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo de pesquisa.¹⁵

4.1.1 Análise do Extrato CH₃CN Obtido do Cultivo em Milho do Fungo Endofítico *Camarops* sp. por CLAE-DAD.

O extrato CH₃CN (**Tabela 1**, pág. 71) foi submetido à análise do perfil químico por CLAE-DAD para verificar a adequação desta técnica cromatográfica no trabalho experimental e, também contribuir para uma avaliação prévia da natureza química das substâncias presentes.

Tabela 1 - Fungo endofítico isolado de *Alibertia macrophylla*.

Fungo <i>Camarops</i> sp.	Massa Extratos (g)	<i>Camarops</i> sp. (cultivado em BDA)	
Extrato CH ₃ OH	64,9		
Extrato AcOEt	15,3		
Extrato CH ₃ CN	3,3		

No cromatograma do extrato CH₃CN obtido do endófito *Camarops* sp. (via CLAE-DAD em gradiente exploratório, (**Figura 19**, pág. 72) foi observada uma grande variedade metabólica, com bandas cromatográficas variando de média a alta polaridade e boa resolução cromatográfica em vários comprimentos de onda na região do UV, evidenciando esta técnica como um bom método de separação cromatográfica. Um estudo detalhado dos respectivos tempos de retenção associado com os espectros de UV permitiram uma avaliação das condições para o fracionamento por CC usando sílica de fase reversa C18.

Uma comparação com o cromatograma obtido do extrato CH₃CN branco (**Figura 20**, pág. 73) revelou que a variedade dos sinais corresponde somente aos metabólitos secretados pelo fungo, uma vez que o cromatograma do extrato CH₃CN branco apresentou picos não coincidentes com os do extrato CH₃CN obtido do endófito *Camarops* sp.

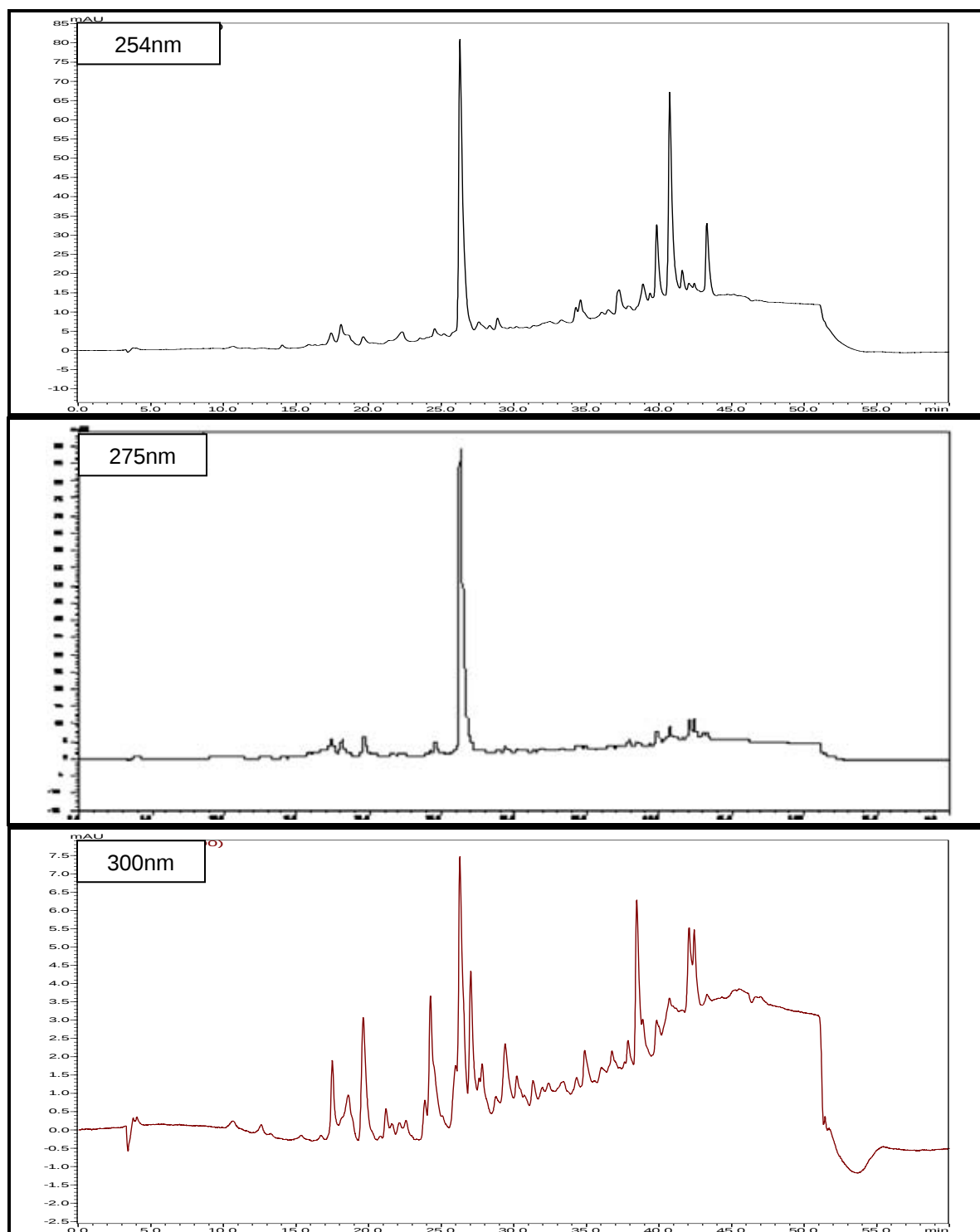


Figura 20 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato CH_3CN em milho produzido por *Camarops* sp.

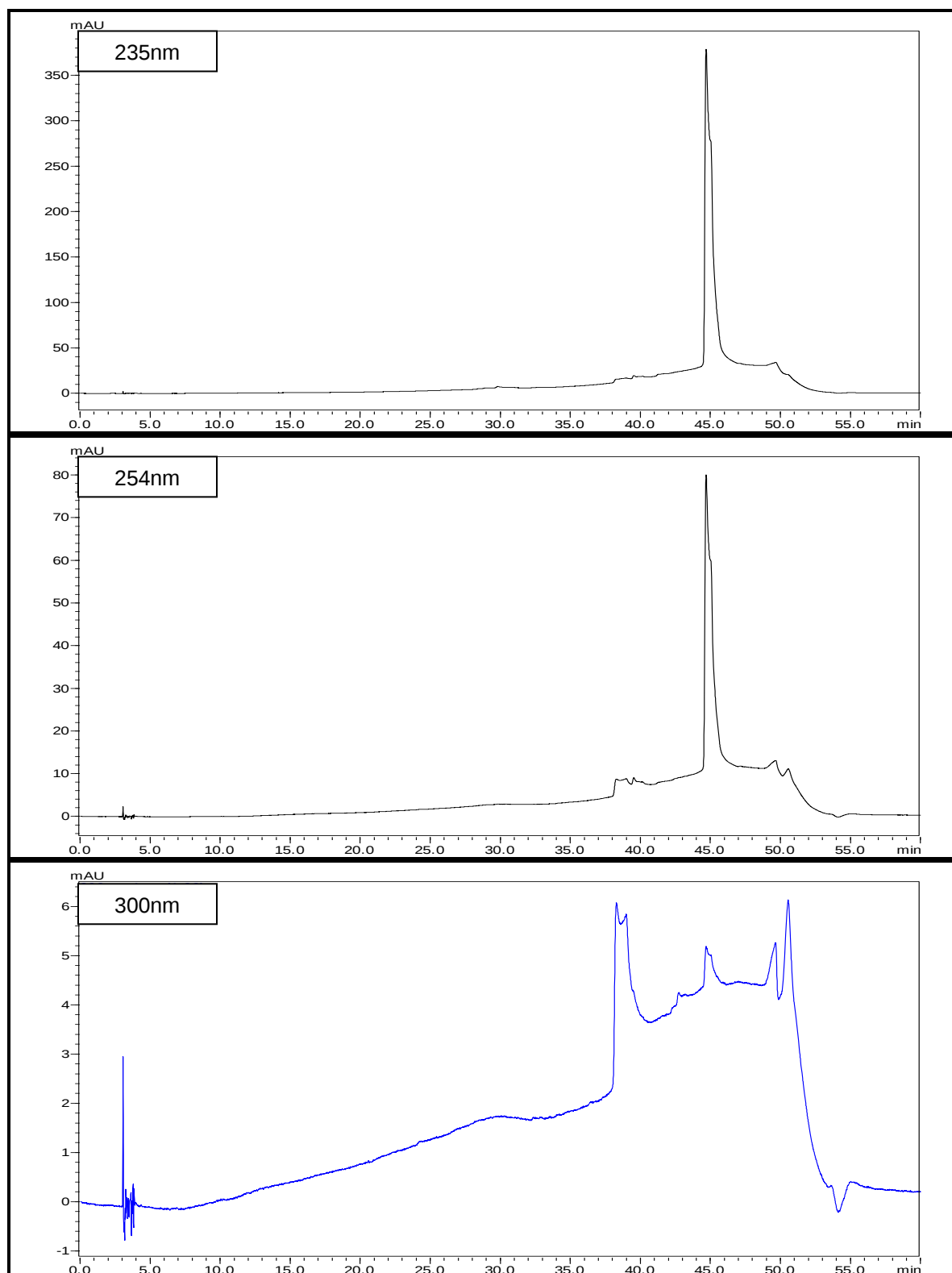


Figura 21 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato CH_3CN (branco) em milho.

4.1.2 Análise do Extrato CH₃CN Obtido em Milho-Branco por RMN de ¹H

A fim de diminuir ou eliminar os interferentes provenientes do meio de cultivo (milho) o extrato CH₃OH produzido por *Camarops* sp. foi particionado duas vezes. A primeira partição foi realizada com AcOEt/H₂O objetivando a eliminação dos açúcares oriundos do meio de cultivo e, a segunda foi realizada com CH₃CN/Hex objetivando a eliminação das graxas, também provenientes do meio de cultivo sólido em milho. Este procedimento foi adotado após avaliação do espectro de RMN de ¹H (**Figura 22**, pág. 74) do milho sem inoculação do endófito (branco), que se mostrou rico em açúcares e substâncias graxas.

Deste modo, nos asseguramos que os metabólitos isolados foram produzidos pelo micro-organismo e não procedentes do meio de cultivo em milho.

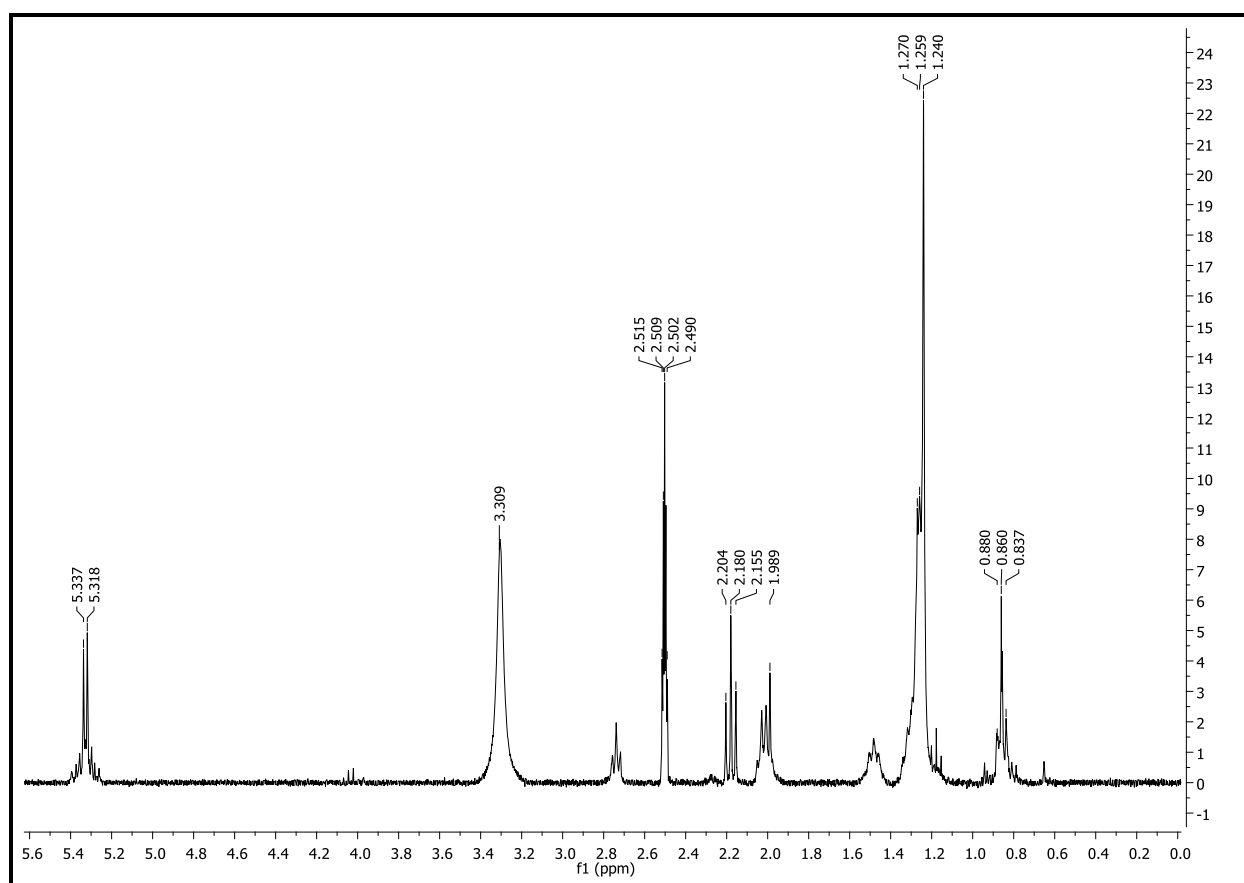


Figura 22 - Espectro de RMN de ¹H do extrato CH₃CN de milho-branco (CDCl₃, 500 MHz)

4.1.3 Análise do Extrato CH₃CN Obtido do Cultivo em Milho do Fungo Endofítico *Camarops* sp. por RMN de ¹H

O extrato CH₃CN foi submetido à análise de RMN de ¹H com o objetivo de obter indícios sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos pelo fungo endofítico.

De um modo geral, o espectro de RMN de ¹H (**Figura 23**, pág. 75) do extrato CH₃CN obtido em milho de *Camarops* sp., evidenciou sinais em uma vasta largura espectral (0,8 a 7,0ppm) demonstrando a presença de substâncias aromáticas, sinais de hidrogênios olefinicos, carbinólicos, metílicos, metilênicos, metínicos e fenólicos. Também foram observados os sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos do anel B dos sesquiterpenos eremofilanos, na região de aproximadamente δ 5,9 a 6,52ppm. A diversidade de sinais ressalta a grande diversidade química do extrato CH₃CN produzido pelo fungo endofítico *Camarops* sp.

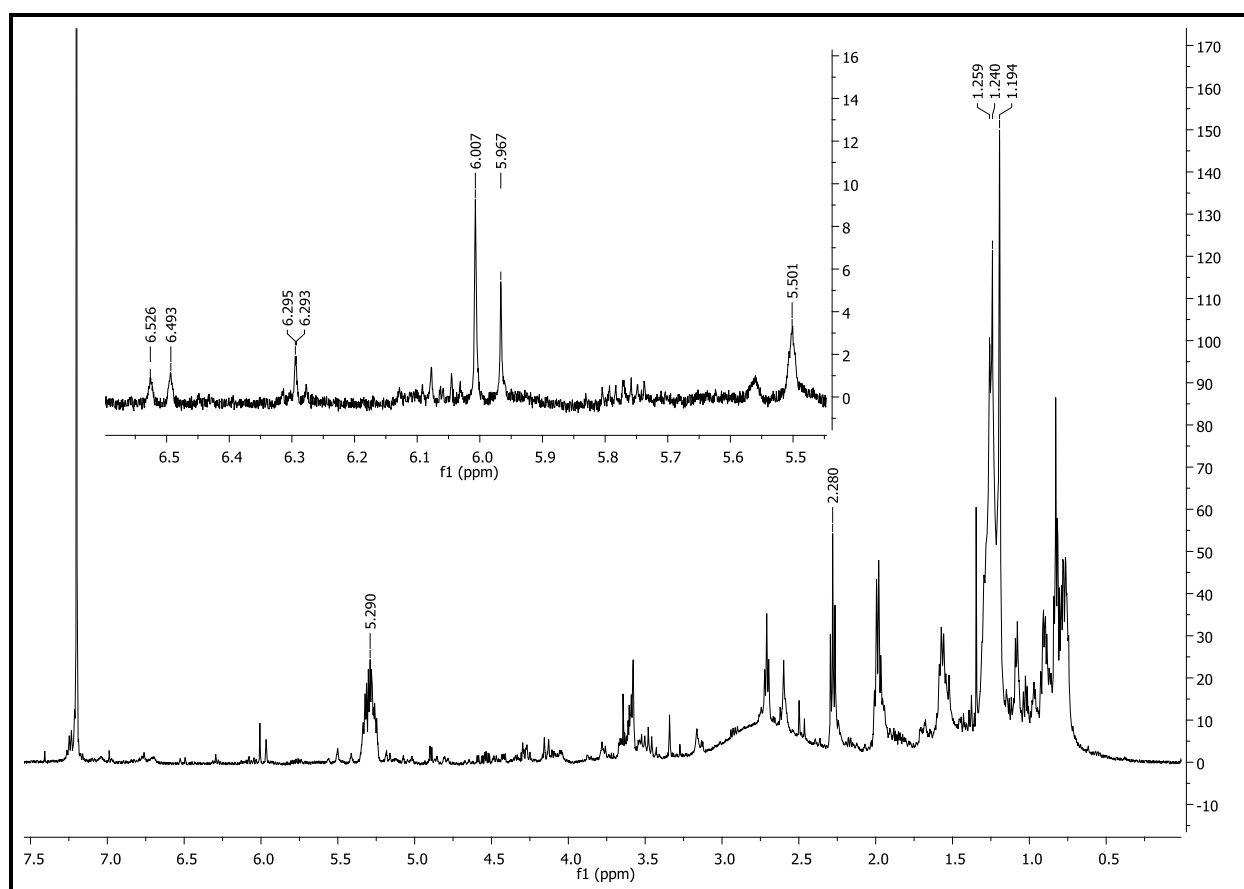


Figura 23 - Espectro de RMN de ¹H do extrato CH₃CN do endófito *Camarops* sp. (CDCl₃, 500 MHz)

4.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO CH₃CN OBTIDO EM MILHO DE *CAMAROPS* sp. E OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PURAS

O extrato CH₃CN obtido em milho de *Camarops* sp. apresentou por CLAE-DAD uma boa resolução cromatográfica, mesmo sendo observada uma diminuição de picos em determinados comprimentos de onda. Após análise por CLAE-DAD, o extrato CH₃CN foi fracionado em coluna cromatográfica sob pressão, utilizando sílica C18 como fase estacionária e sistema de eluição H₂O:CH₃OH em gradiente, levando a obtenção de 8 frações (Fr1 a Fr8). Estas frações foram analisadas por CCDC (**Figura 24**, pág. 76) para avaliar o grau de pureza. Todas as frações foram analisadas por CLAE-DAD e por espectroscopia de RMN de ¹H, as frações que apresentaram maior massa e espectros de RMN de ¹H promissores, Fr1, Fr3 e Fr4 (**Figuras 25-27**, pág. 77-78), foram analisadas por CLAE-DAD (**Figuras 28-30**, pág. 78-79) e, posteriormente purificadas através de cromatografia em coluna sob pressão e/ou cromatografia em coluna utilizando sílica gel normal e/ou CLAEprep.

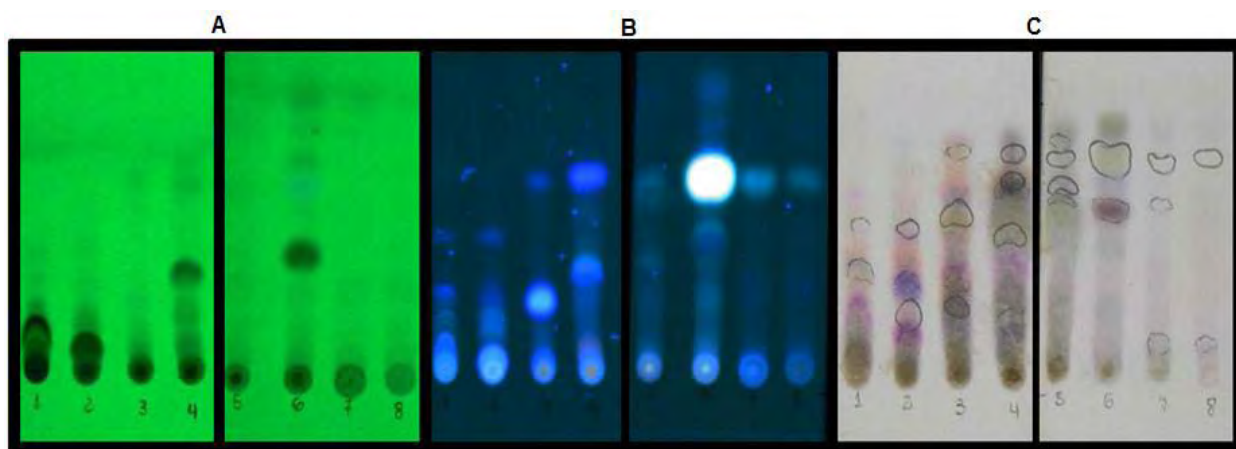


Figura 24 - Frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN: (A) 254nm, (B) 366nm e (C) visível.

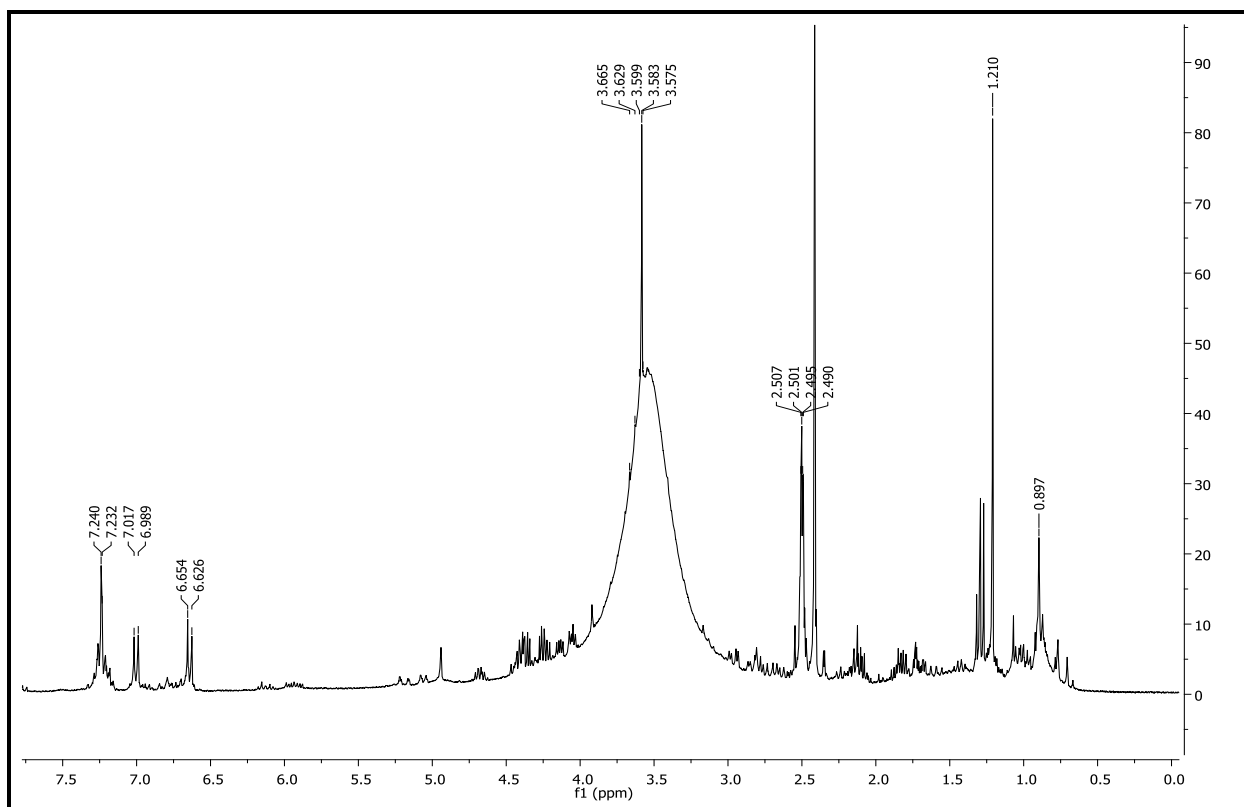


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H da fração 1 (DMSO-d₆, 300 MHz)

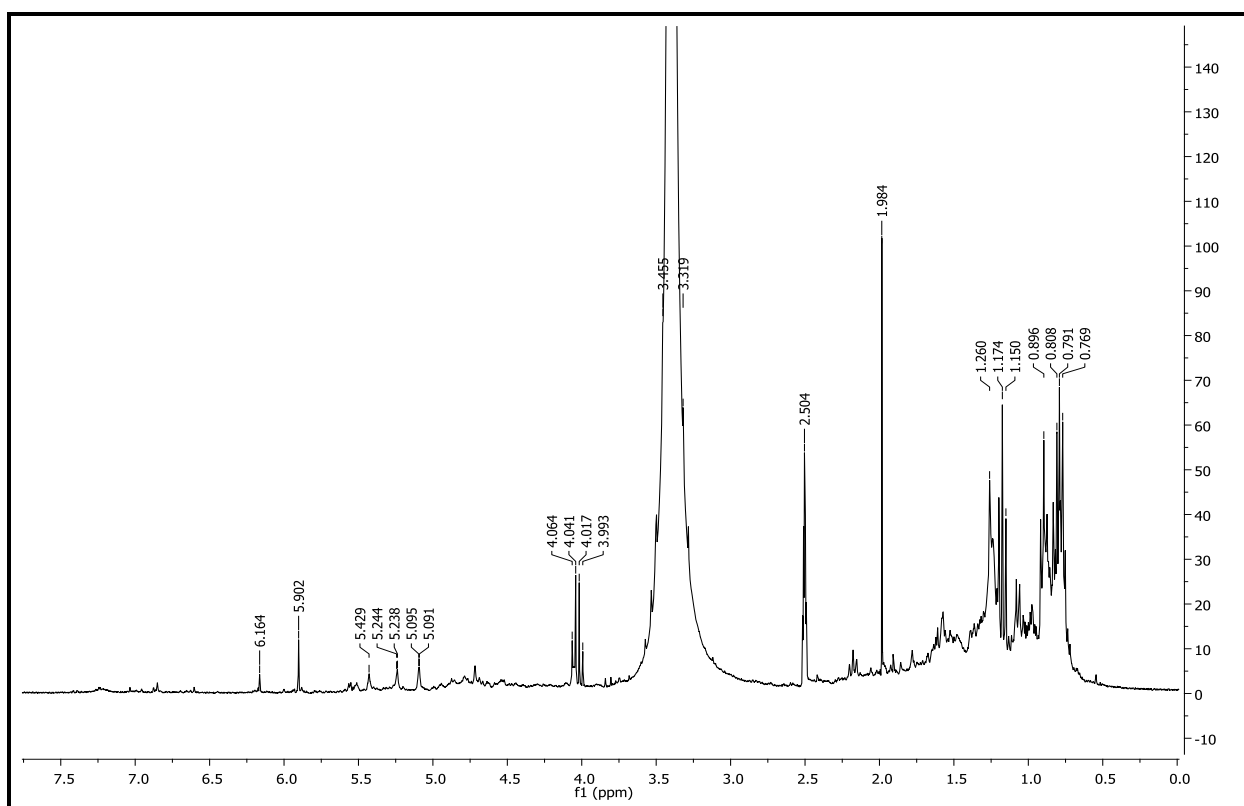


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 (DMSO-d₆, 300 MHz)

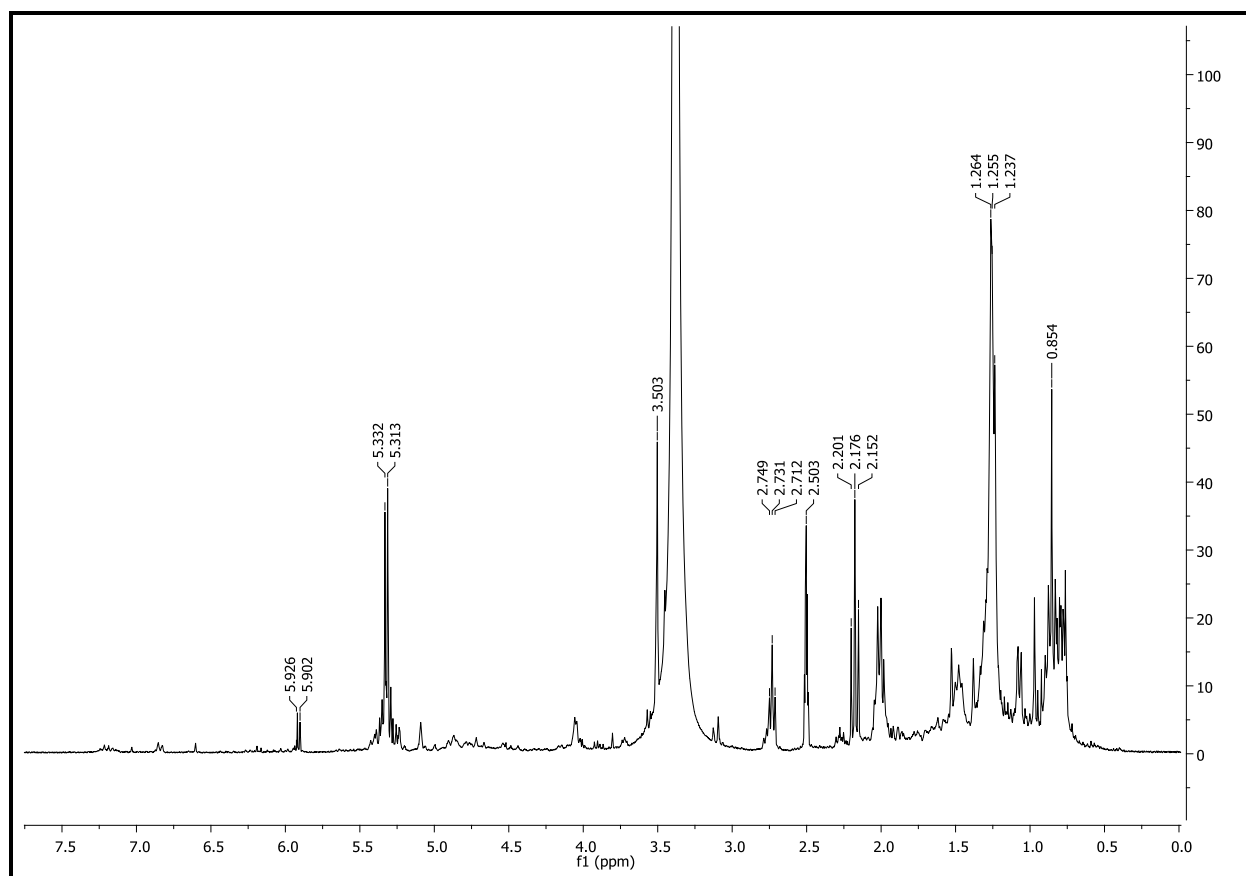


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H da fração 4 (DMSO-d_6 , 300 MHz)

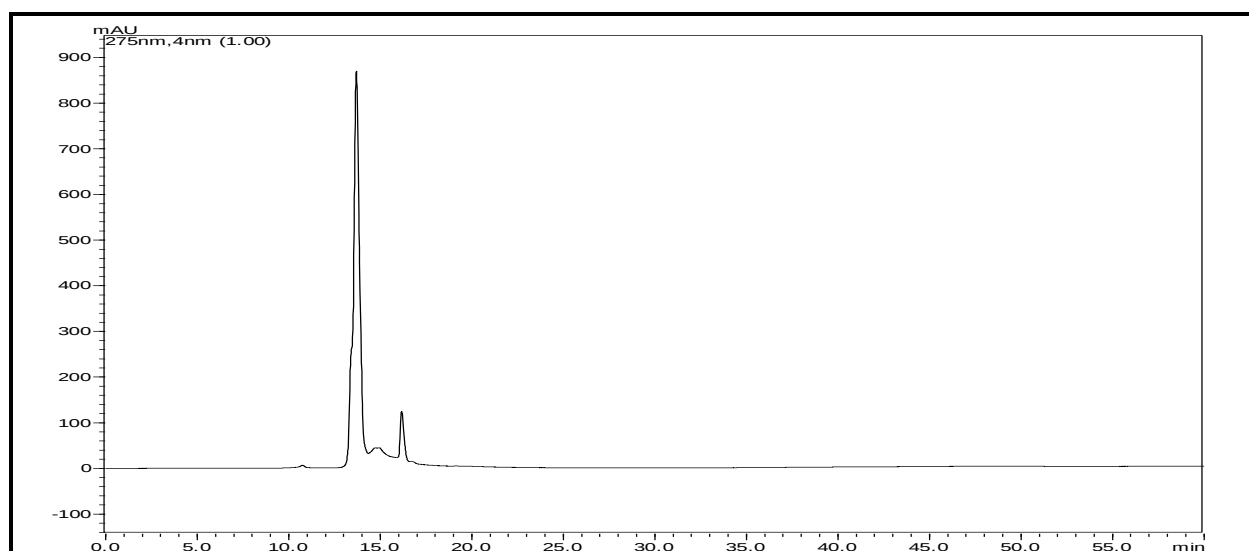


Figura 28 - Cromatograma em CLAE-DAD da fração 1 registrado em 275nm.

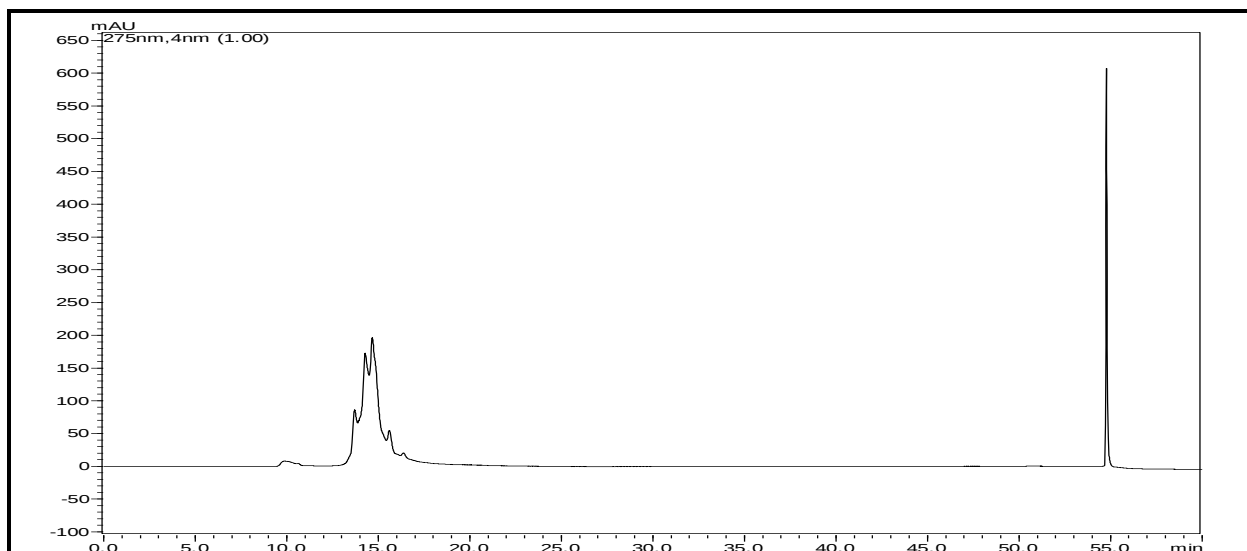


Figura 29 - Cromatograma em CLAE-DAD da fração 3 registrado em 275nm.

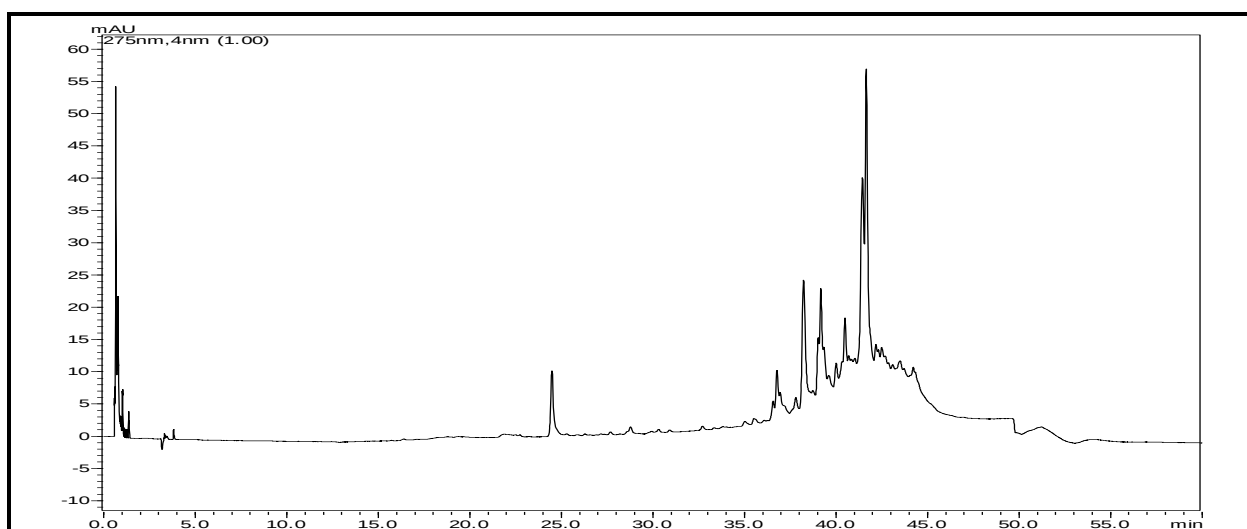


Figura 30 - Cromatograma em CLAE-DAD da fração 4 registrado em 275nm.

4.2.1 Fracionamento da Fração 1

A Fração 1 foi purificada por sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna como visualizado na **Figura 13** (pág. 59) e conduziu ao isolamento das substâncias **1**, **2** e **3**, já descritas na literatura e, a substância **4**, também descrita na literatura, no entanto, relatada pela primeira vez como produto natural e isolada de um fungo endofítico.

4.2.2 Fracionamento da Fração 3

Esta fração foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC) como visualizado na **Figura 14** (pág. 60) e posteriores separações por CLAE_{prep.} como mostrado nas (**Figuras 31** e **32**, pág. 80 e 81) e conduziu ao isolamento das substâncias **5**, **6** e **7** sendo as duas últimas inéditas.

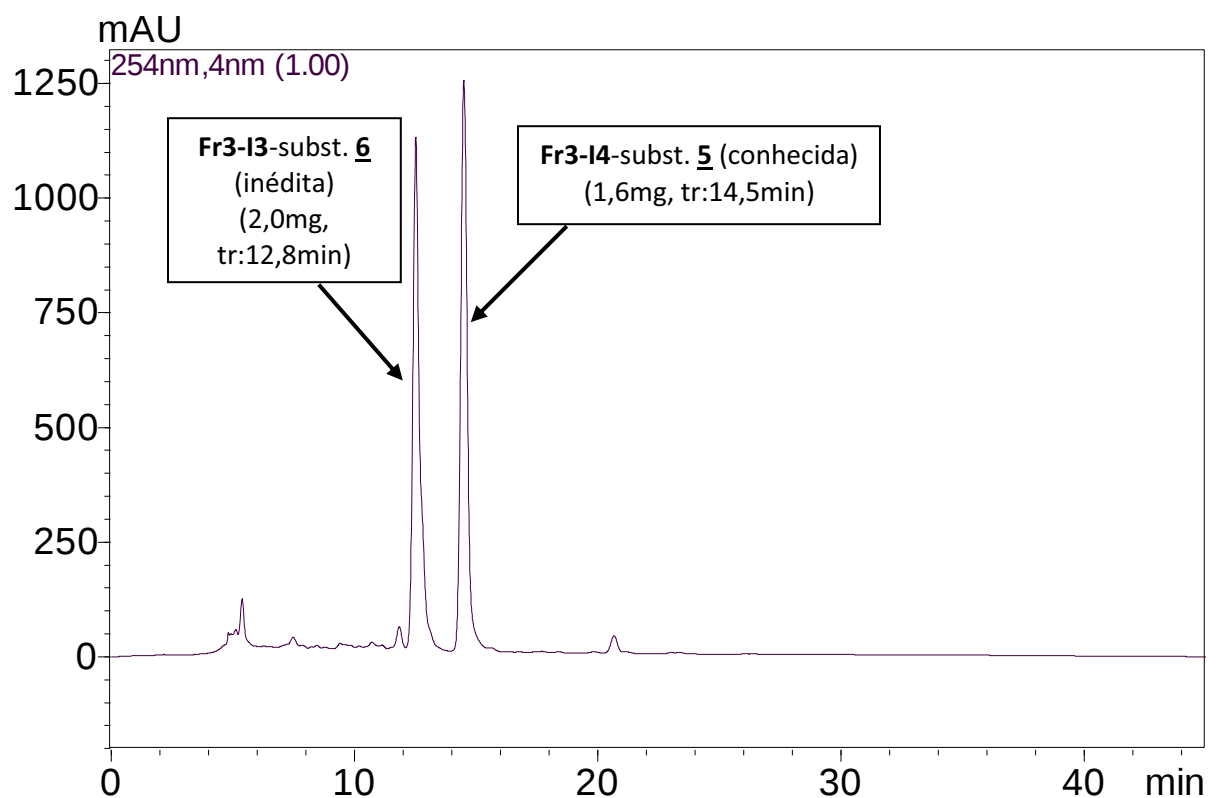


Figura 31 - Cromatograma em CLAE_{prep.} da subfração Fr3-I registrado em 254nm.

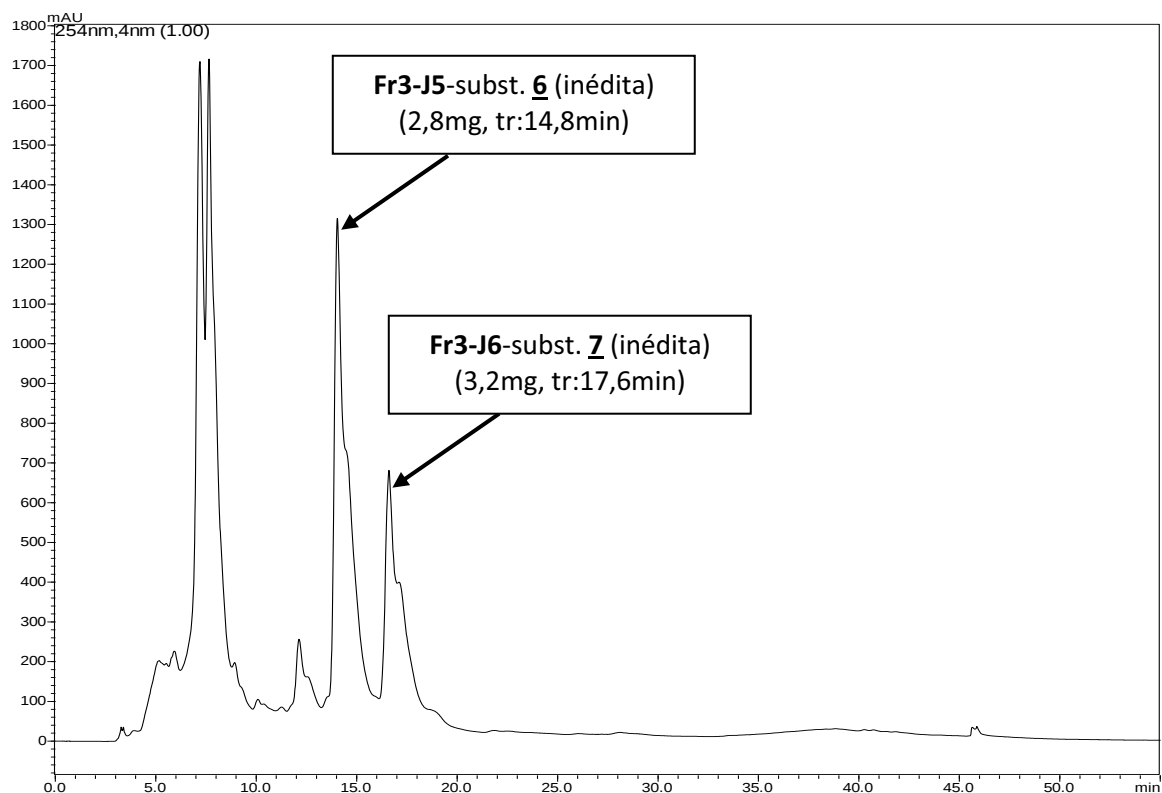


Figura 32 - Cromatograma em CLAE_{prep.} da subfração Fr3-J registrado em 254nm.

4.2.3 Fracionamento da Fração 4

A Fração 4 foi purificada por sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna como visualizado na **Figura 15** (pág. 62) e, conduziu ao isolamento da substância **8**.

4.3 ENSAIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os extratos CH₃OH e CH₃CN, juntamente com as frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN tiveram o seu potencial biológico avaliado por ensaios químicos (atividade antioxidante), biológicos (atividade antifúngica e antitumoral) e bioquímicos (atividade anticolinesterásica).

4.3.1 Bioautografia com fungos do gênero *Cladosporium* – detecção de atividade antifúngica

Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente. Tal fato tem incentivado pesquisas que busquem novas substâncias antifúngicas de origem natural.⁵²

Considerando esta necessidade e a ecologia química relacionada com os fungos endofíticos que habitam ambientes propícios ao ataque de fitopatógenos, foi realizado ensaios de atividade antifúngica com os extratos CH_3OH e CH_3CN e, as frações produzidas por *Camarops* sp.

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (**Figuras 33 e 34**, pág. 82 e 83 e, **Tabelas 2 e 3**, pág. 83) evidenciaram que as frações Fr2, Fr3 e Fr4 apresentaram um fraco potencial antifúngico, sendo que as substâncias responsáveis por estas atividades devem ser as mesmas observadas no extrato CH_3CN .

Estas observações podem estar diretamente relacionadas à ecologia química onde este micro-organismo produz substâncias bioativas como autodefesa e defesa da espécie hospedeira contra outros micro-organismos fitopatógenos.

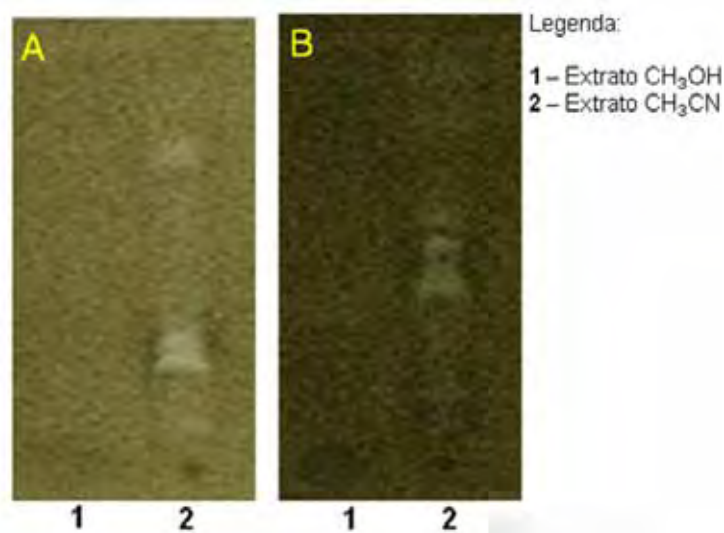


Figura 33 - Atividade antifúngica dos extratos CH_3OH e CH_3CN (A) contra os fitopatógenos *C. cladosporioides* (B) *C. sphaerospermum*

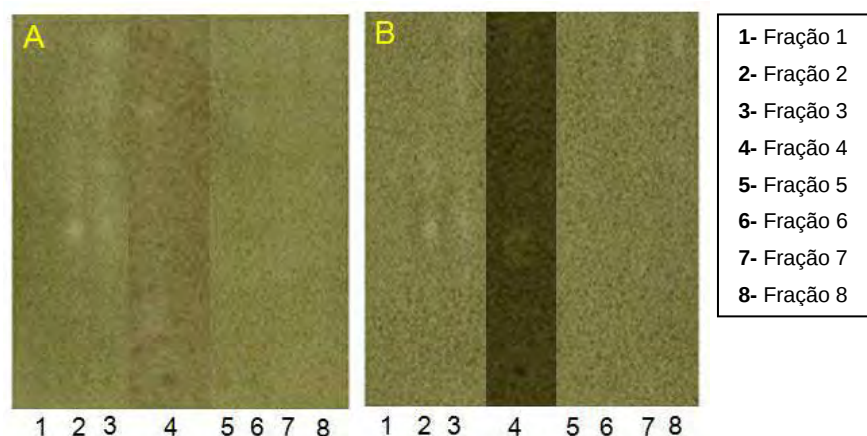


Figura 34 - Atividade antifúngica das frações oriundas do fracionamento do extrato CH₃CN (A) Contra o fitopatógeno *C. cladosporioides* (B) Contra o fitopatógeno *C. sphaerospermum*

Tabela 2 - Resultado da atividade antifúngica para os extratos CH₃OH e CH₃CN.

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	Rf	<i>C. sphaerospermum</i>	Rf
1	—	—	—	—
2	*/**	0,72/0,27	*/*	0,5/0,42

*Atividade Fraca, **Atividade Média, ***Atividade Forte

Tabela 3 - Resultado da atividade antifúngica para as frações oriundas do fracionamento do extrato CH₃CN.

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	Rf	<i>C. sphaerospermum</i>	Rf
1	—	—	—	—
2	*	0,44	*	0,39
3	*/**	0,92/0,58/0,41	*/**	0,92/0,80/0,41
4	*	0,74	—	—
5	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—

*Atividade Fraca, **Atividade Média, ***Atividade Forte

4.3.2 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

A etiologia da Doença de Alzheimer permanece desconhecida, mas estudos têm mostrado que a doença é caracterizada pela diminuição da função colinérgica no cérebro. Os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas da

Doença de Alzheimer elevam os níveis de acetilcolina pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Ensaio desenvolvidos para detectar esta atividade estão sendo amplamente utilizados para avaliar um grande número de plantas utilizadas popularmente para melhorar a memória.⁵³

Com o crescente impacto da doença de Alzheimer e os poucos agentes terapêuticos seguros, os extratos CH_3OH e CH_3CN e as frações obtidas do extrato CH_3CN obtidos em milho de *Camarops* sp. foram testados para se avaliar a potencialidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

O ensaio anticolinesterásico realizado em CCDC é qualitativo e é definido através do halo branco em fundo roxo, para atividade inibitória positiva. De acordo com o observado nas cromatoplacas da **Figura 35** (pág. 84) e nas **Tabelas 4 e 5** (pág. 85), os extratos e as frações apresentaram atividade moderada evidenciando, a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade anticolinesterásica. Observou-se também, a variação metabólica, mostrando a presença de substâncias iguais nos extratos e nas frações, pois em muitos casos as manchas em CCDC referentes às substâncias com atividade apresentaram o mesmo R_f

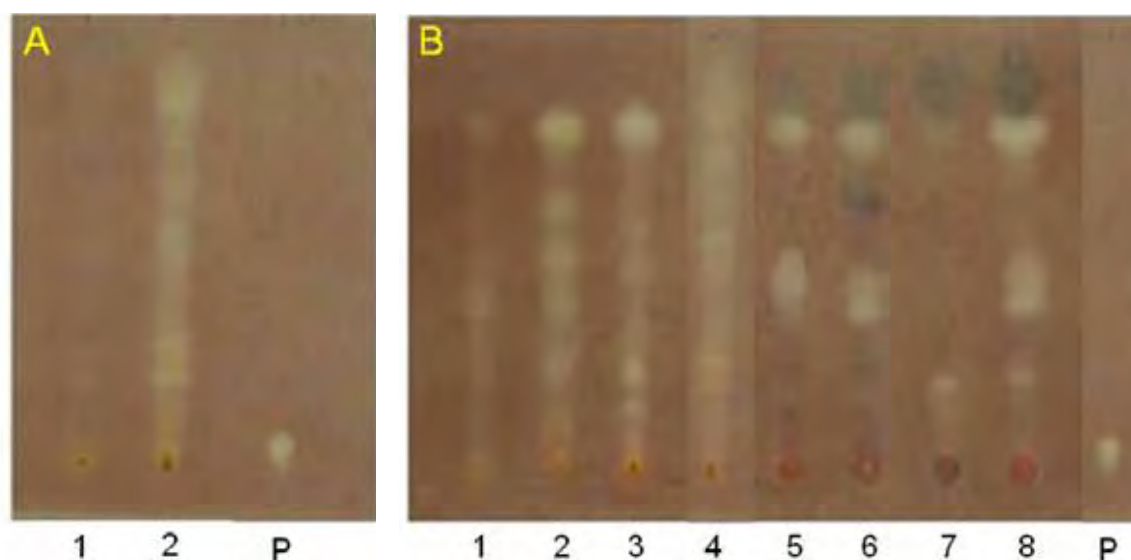


Figura 35 - Atividade anticolinesterásica **(A)** dos extratos CH_3OH e CH_3CN e, **(B)** das frações oriundas do fracionamento do extrato CH_3CN , ambas comparadas com o padrão fisostigmina (P).

Tabela 4 - Resultado da atividade anticolinesterásica para os extratos CH₃OH e CH₃CN.

<i>Amostra</i>	<i>Rf</i>
Extrato CH ₃ OH	—
Extrato CH ₃ CN	0,8/0,5/0,3
Fisostigmina	0,3

Tabela 5 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as frações oriundas do fracionamento do extrato CH₃CN.

<i>Amostra</i>	<i>Rf</i>
Fração 1	—
Fração 2	0,8
Fração 3	0,7/0,2/0,1
Fração 4	0,85/0,5/0,2
Fração 5	0,7/0,4
Fração 6	0,7/0,3
Fração 7	0,2
Fração 8	0,7/0,4/0,3/0,2
Fisostigmina	Base

4.3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

Os radicais livres desempenham papel importante no organismo, mas o efeito cumulativo desses radicais está implicado em doenças, tais como câncer, ateroscleroses, isquemia cerebral e envelhecimento. Antioxidantes que seqüestram os radicais livres, tanto previnem como apresentam alto potencial terapêutico em doenças que apresentam estes radicais. Estas observações levam à busca de novos potenciais antioxidantes derivados de plantas utilizadas na medicina popular.⁵⁴

Dentre estes métodos destacam-se o seqüestro de radicais livres com DPPH, que se baseia no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta, que na presença de substâncias antioxidantes, faz com que o radical DPPH se estabilize, o que é indicado pela mudança de cor violeta para amarelo (**Figura 36**, pág. 86).⁵⁵

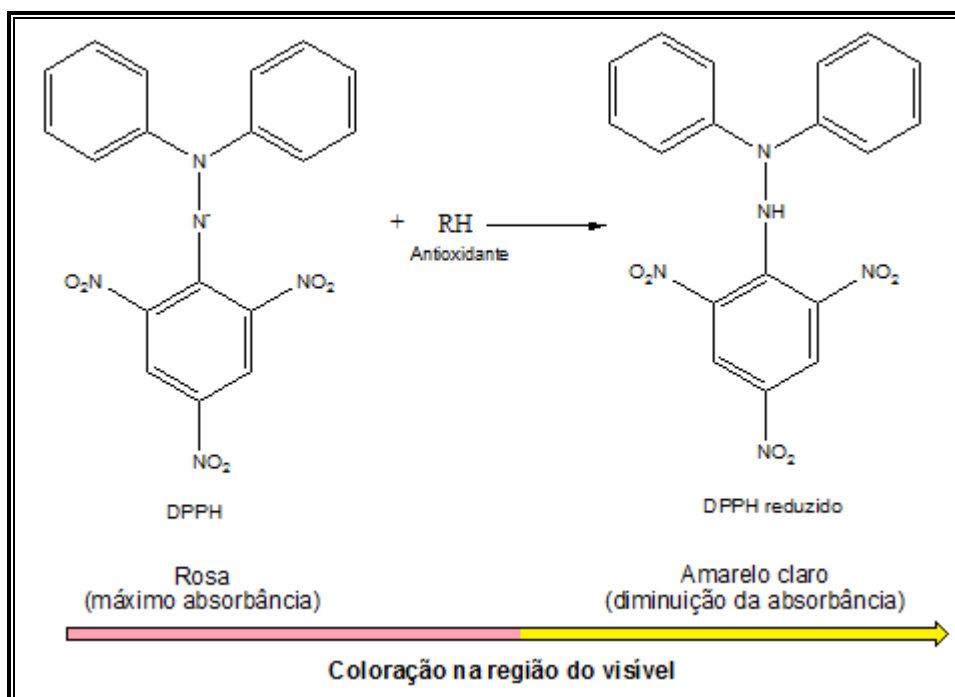


Figura 36 - Reação de redução do DPPH

A atividade antioxidante de compostos orgânicos depende de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros aromáticos são os principais alvos na procura por antioxidantes.⁵⁶

O padrão utilizado foi quercetina nas concentrações: 33,3 μ M; 26,7 μ M; 20,0 μ M; 13,3 μ M; 6,7 μ M; 3,3 μ M; 1,7 μ M. Neste contexto, os extratos CH₃OH e CH₃CN e as frações obtidas de *Camarops* sp., foram testados com DPPH e os resultados estão demonstrados nas **Figuras 37 e 38** (pág. 87).

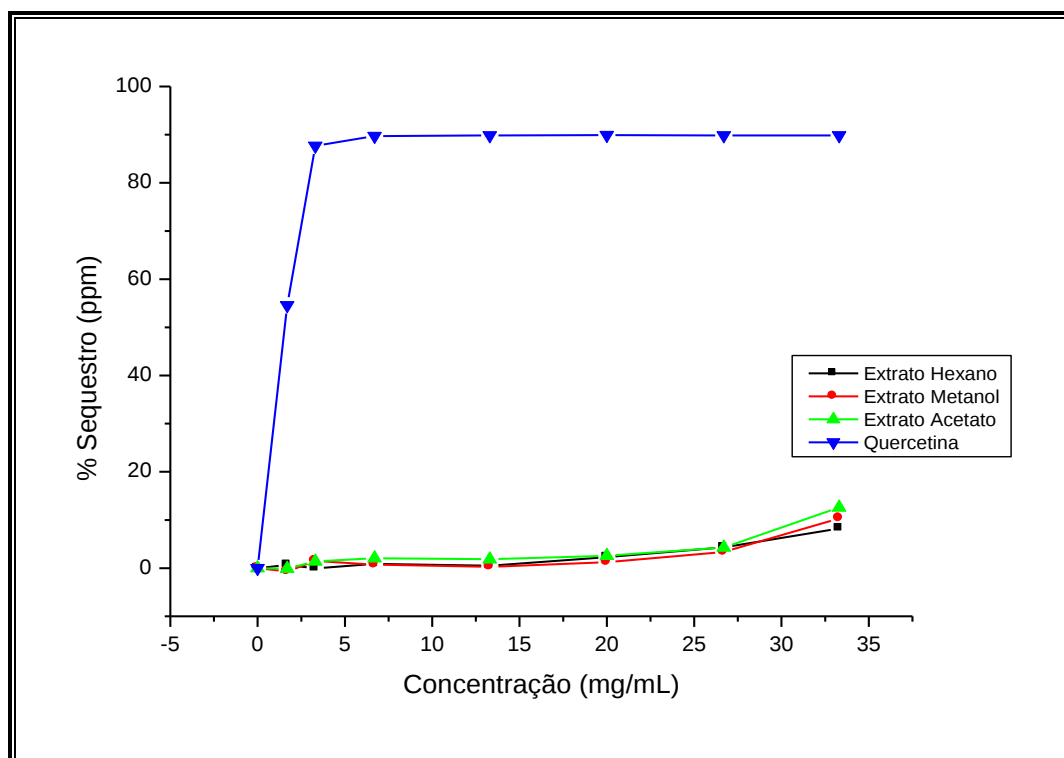


Figura 37 - Concentração *versus* % Sequestro dos extratos obtidos do endófito *Camarops* sp. em comparação com o padrão quercetina.

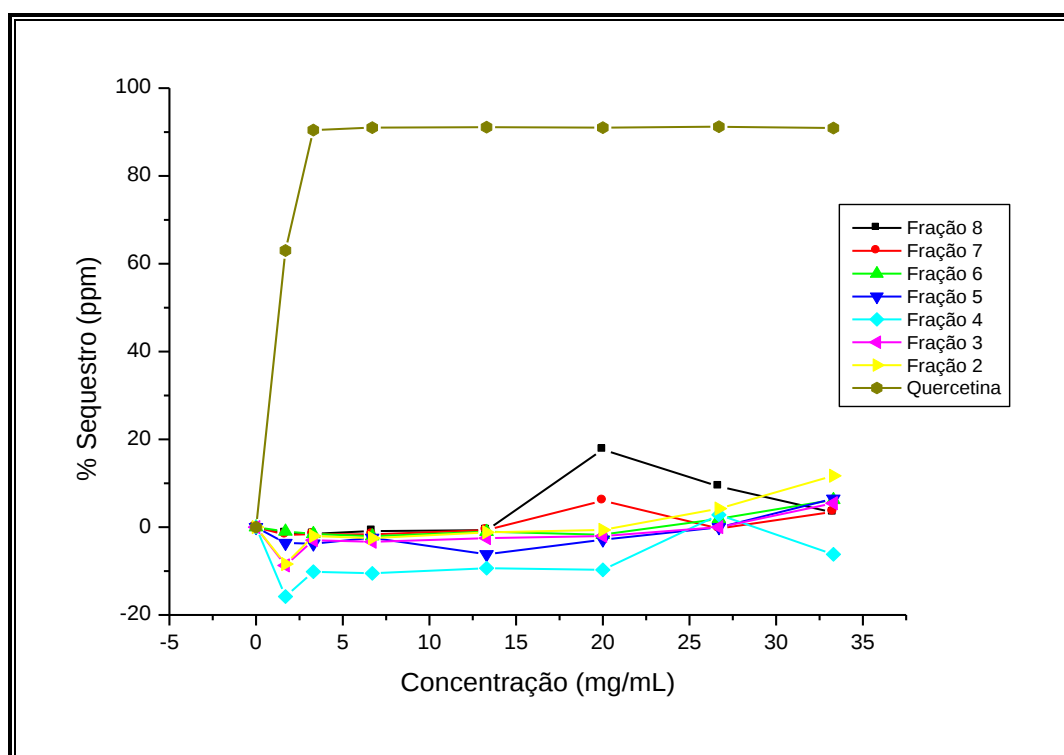


Figura 38 - Concentração *versus* % Sequestro das frações obtidas do endófito *Camarops* sp. em comparação com o padrão quercetina.

Análise deste ensaio evidenciou que os extratos e frações foram inativos, desqualificando este micro-organismo para a produção de substâncias com atividade antioxidante, quando cultivado em milho.

4.4 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NO ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO *CAMAROPS* sp.

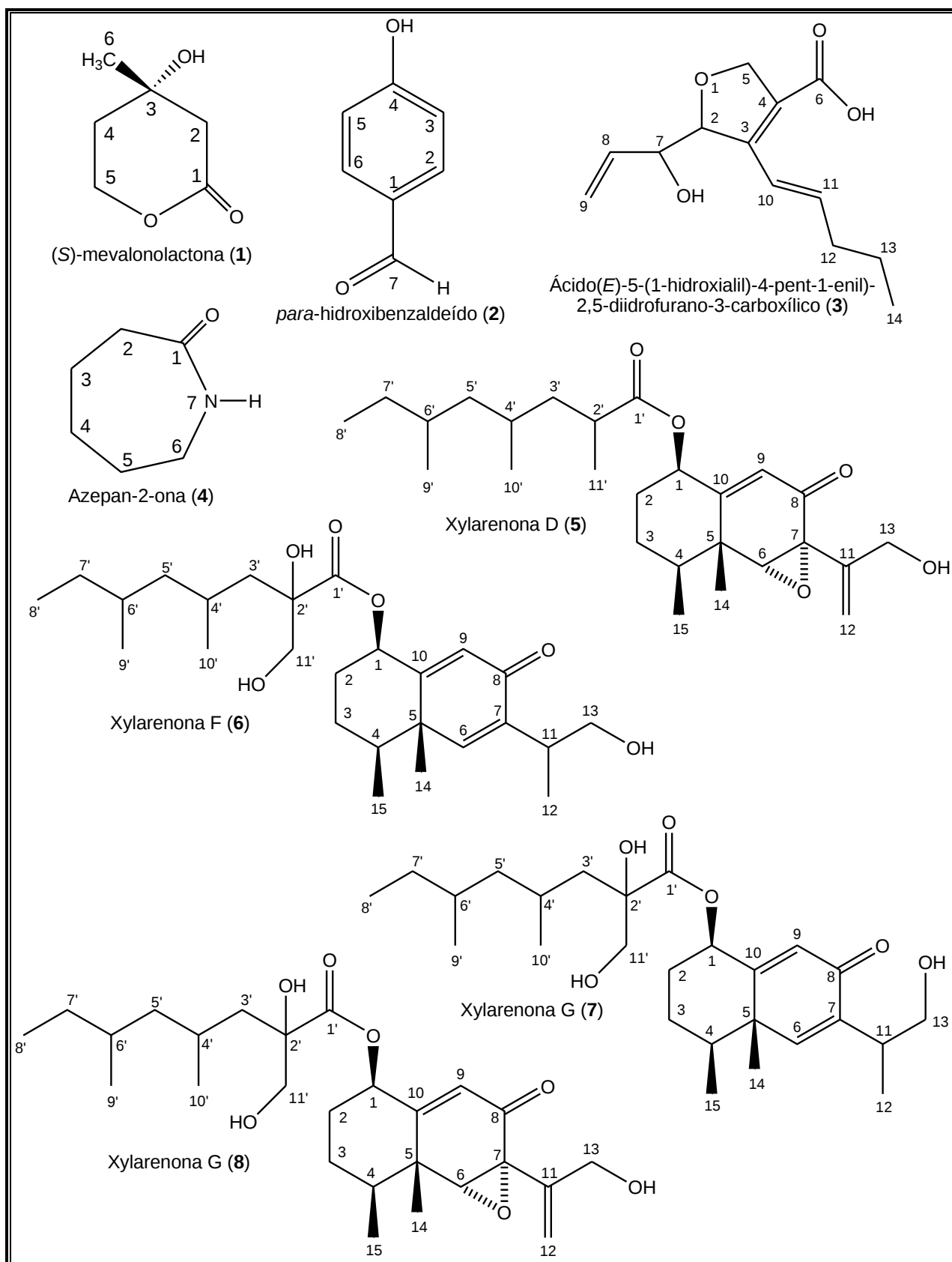


Figura 39 - Substâncias produzidas pelo endófito *Camarops* sp.

4. 4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

4.4.1 Identificação Estrutural das Substâncias Produzidas pelo Fungo Endofítico *Camarops* sp.

4.4.1.1 Identificação Estrutural da Substância 1

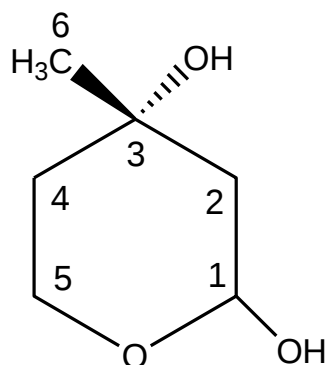


Figura 40 - Estrutura da Substância 1 ((S) - Mevalonolactona)

A substância 1 (**Figura 40**, pág. 90) foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]^{18}_D +21,0$ (c 0,1, CH₃OH) e a fórmula molecular foi estabelecida após análise do espectro de massas de baixa resolução por ionização em *eletrospray* (ESI-MS) onde foi visualizado o sinal de m/z 131,40 referente à molécula protonada $[M+H]^+$ (**Figura 41**, pág. 90). Esta informação com auxílio dos espectros de RMN de ¹³C permitiu propor a fórmula molecular C₆H₁₀O₃.

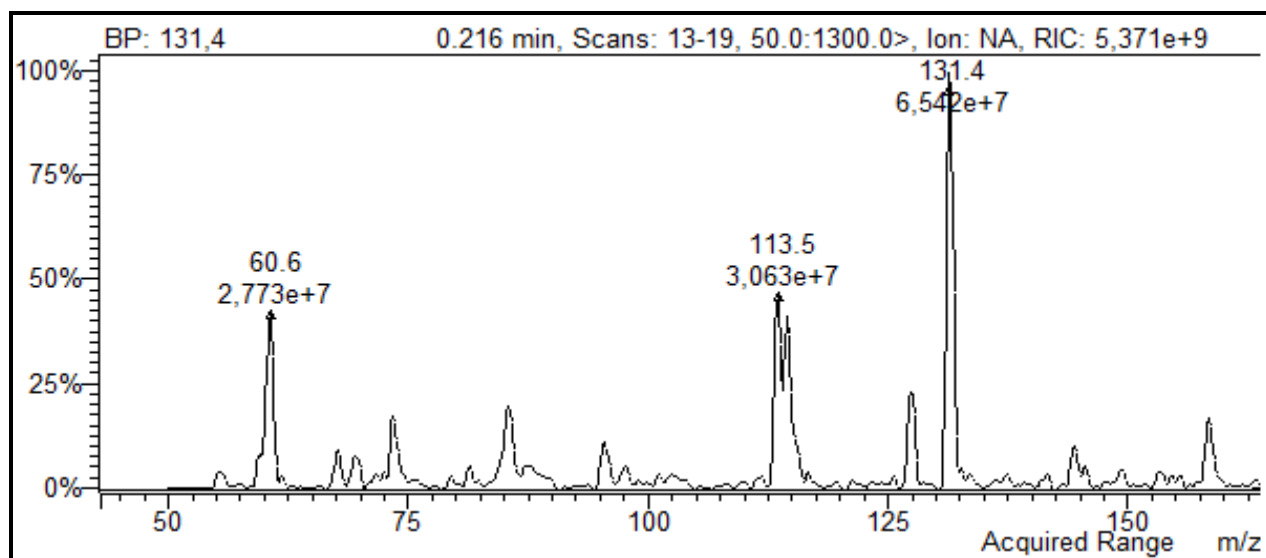


Figura 41 - Espectro de massas da substância 1 [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 42**, pág. 91) exibiu uma banda larga em 3415 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada à carbonila de um éster em 1719 cm^{-1} e, uma banda forte de absorção na faixa de 1269 cm^{-1} devido à vibração do grupo $\text{C}=\text{C}(\text{=O})-\text{O}$.

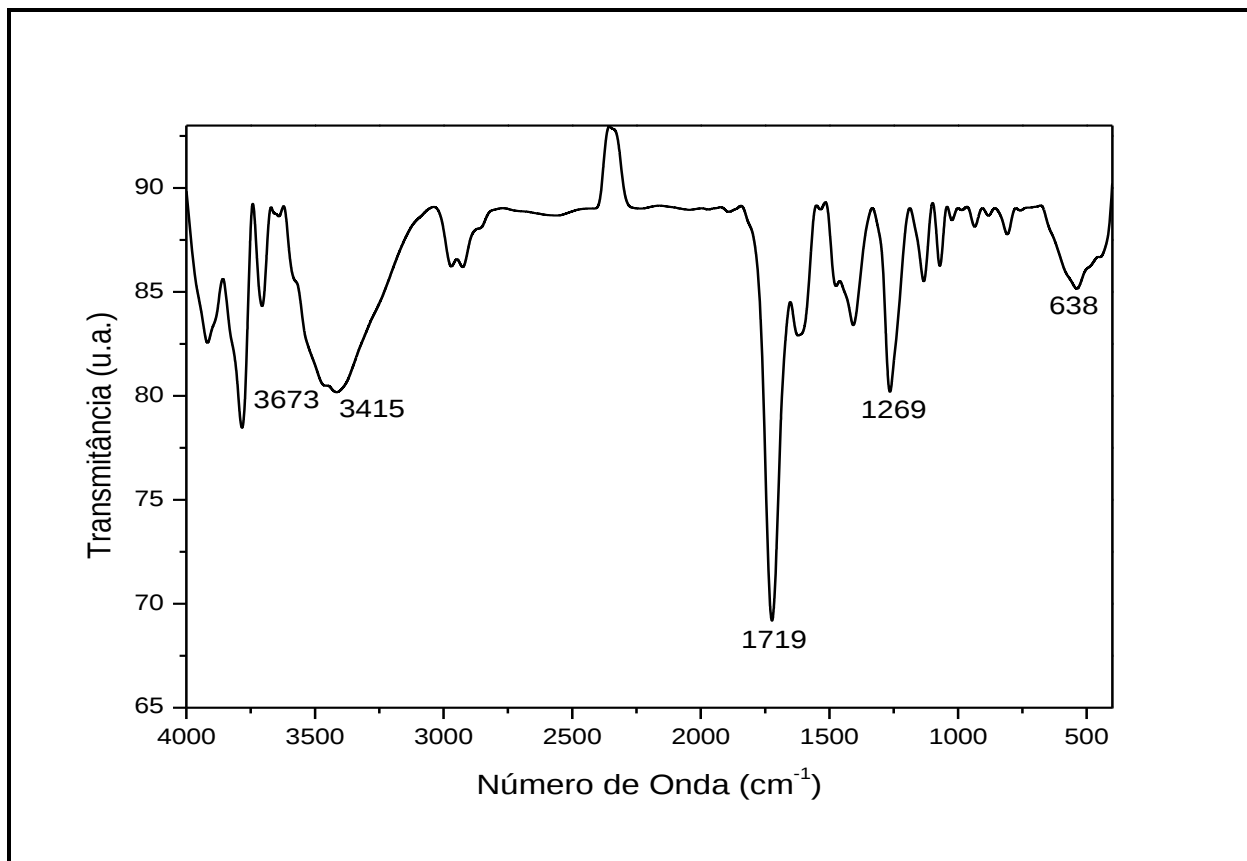


Figura 42 - Espectro de infravermelho da substância **1**

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 43**, pág. 92) e de ^{13}C (**Figura 44**, pág. 93) evidenciaram uma metila em δ_{H} 1,33 (s, δ_{C} 29,8, H-6), três carbonos metilênicos sendo um carbinólico δ_{H} 4,27/4,53 (ddd, 65,9, H-5) e outros dois em δ_{H} 1,83 (m, δ_{C} 35,9, H-4) e δ_{H} 2,54/2,59 (d, δ_{C} 44,7, H-2). Por RMN de ^{13}C , foi observado um sinal em δ_{C} 170,3 característico de uma carbonila de éster.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos *g*HMQC (**Figura 45**, pág. 94).

Pelas análises do mapa de contorno *g*HMBC (**Figura 46**, pág. 94) de **1**, foi visualizado correlação entre a metila em $1,33 \leftrightarrow 68,3/44,7/35,9$ e os metilenos em $2,54/2,59 \leftrightarrow 68,3/170,3$. Estes dados, associados aos dados encontrados na literatura, nos permitiram atribuir para a substância **1** à estrutura da mevalonolactona.

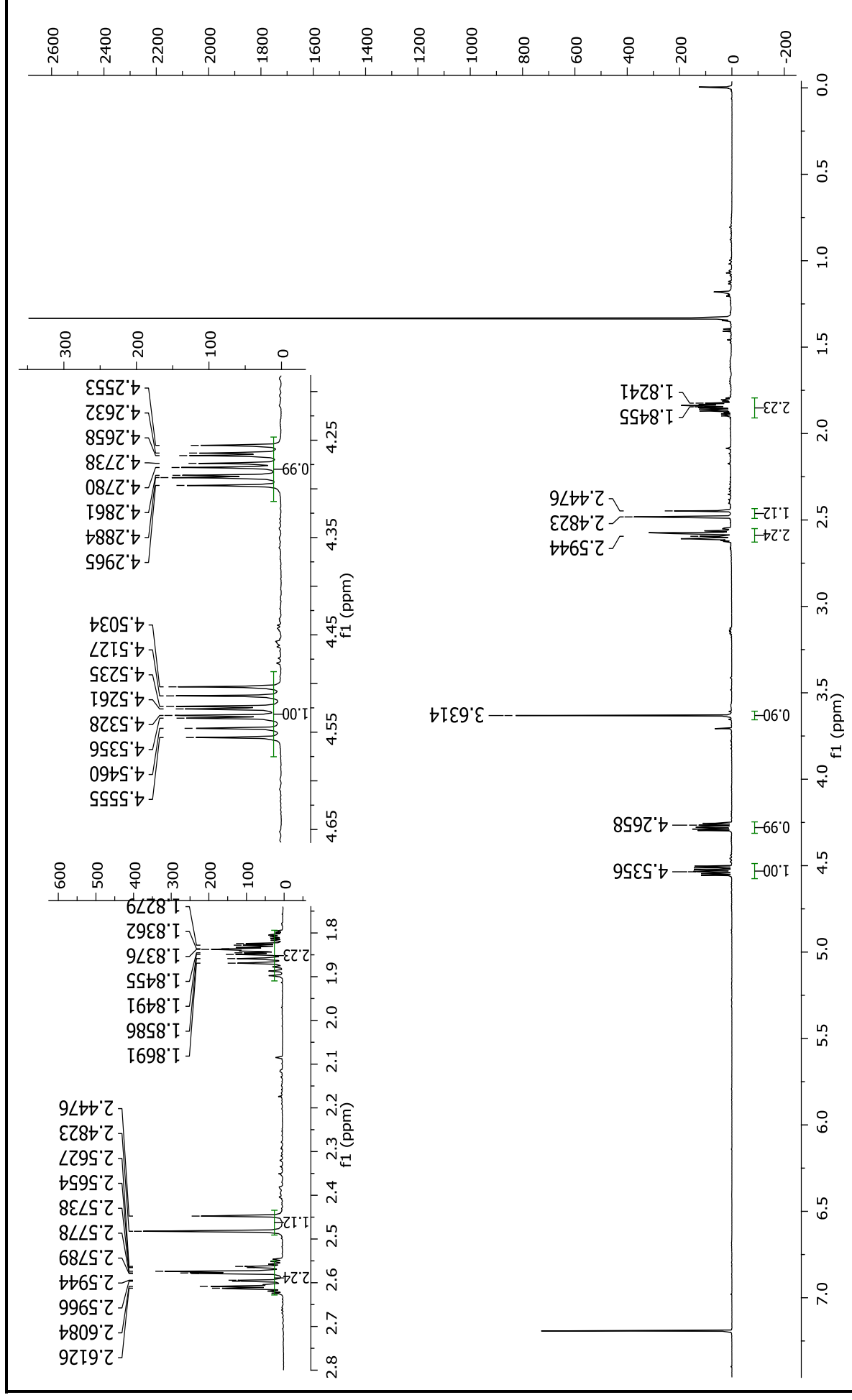


Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (CDCl_3 , 500 MHz)

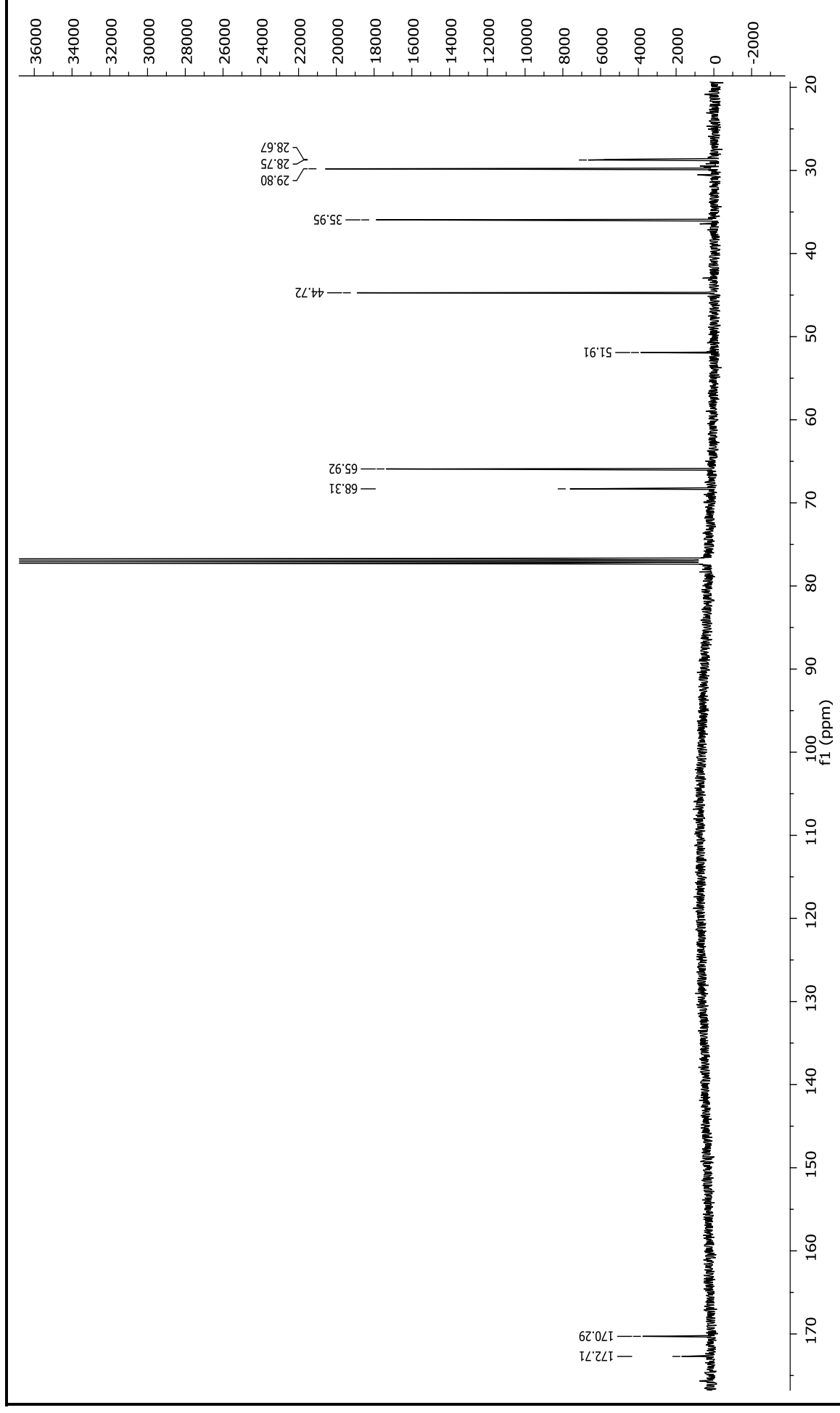


Figura 44 - Espectro de RMN de ¹H da substância **1** (CDCl₃, 500 MHz)

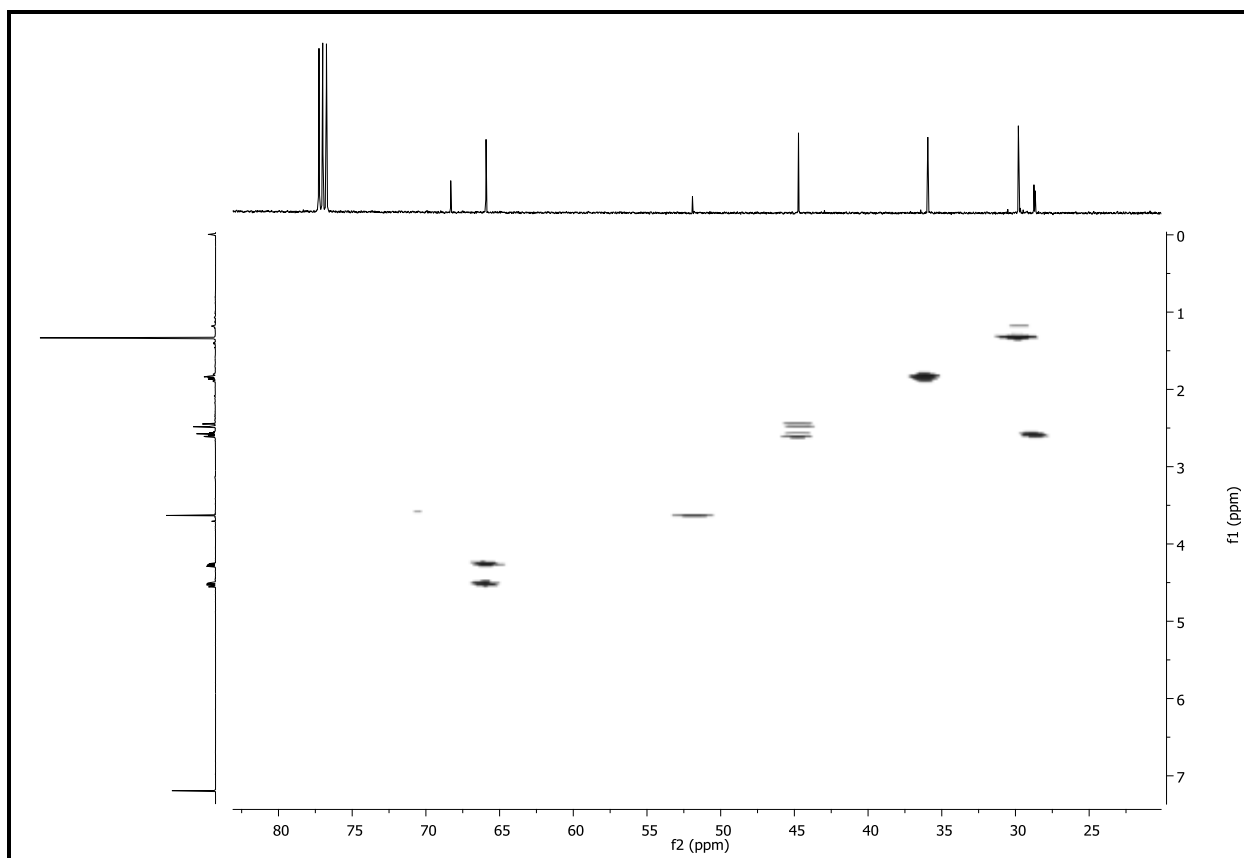


Figura 45 - Mapa de contorno de gHMQC da substância **1** (CDCl₃, 125 MHz)

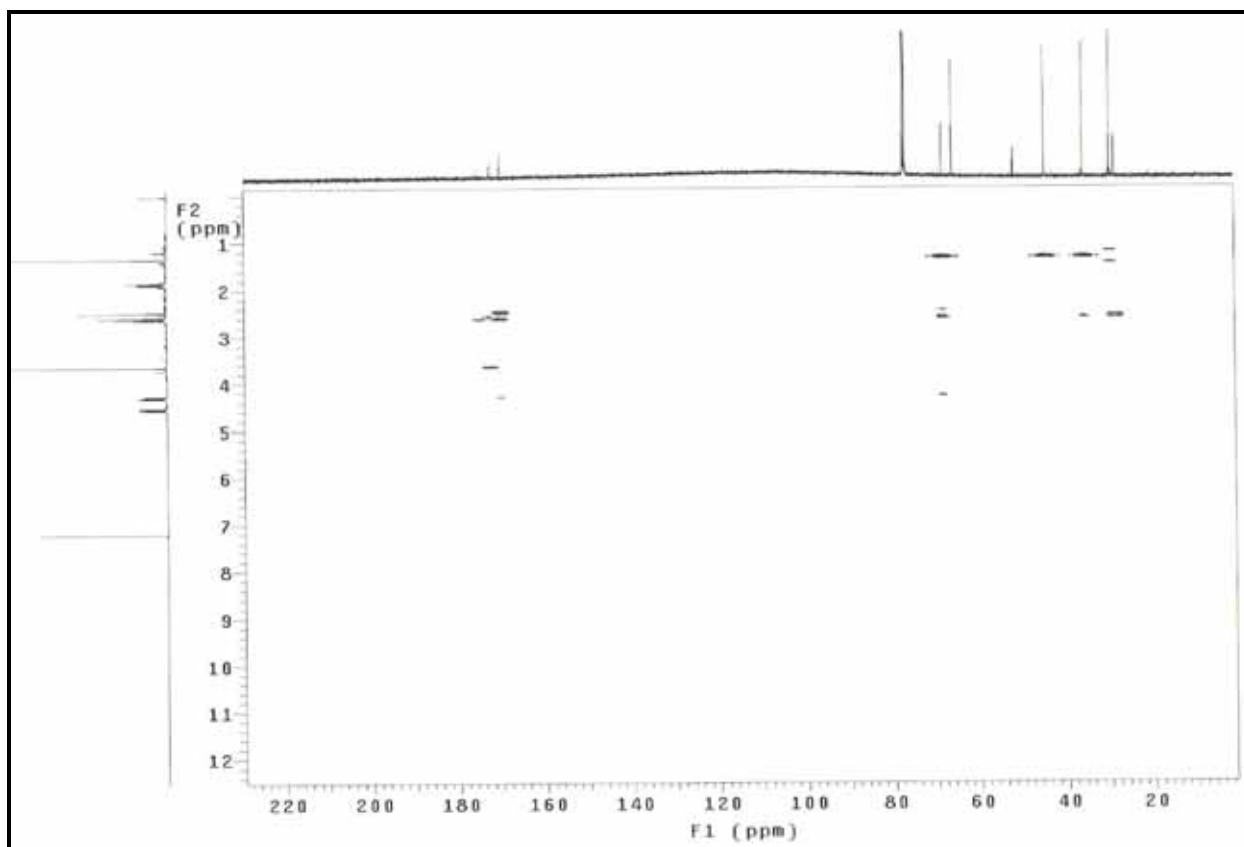


Figura 46 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **1** (CDCl₃, 125 MHz)

No espectro de UV em CH₃OH da substância **1** (**Figura 47** pág. 95) observamos um máximo de absorção em 251nm que são característicos de lactonas, reforçando o sugerido por RMN de ¹³C.

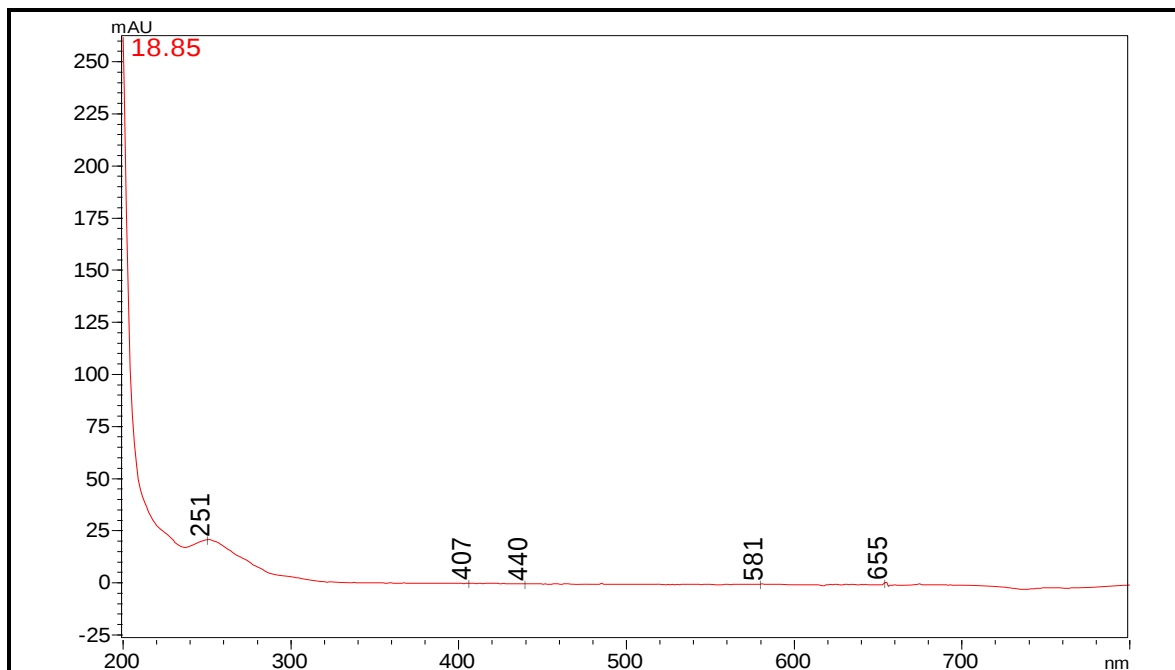


Figura 47 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **1**

(S)-Mevalonolactona é um importante precursor de terpenos e esteróides sendo uma substância muito comercializada para fins cosméticos no tratamento “antienvelhecimento”. Esta substância está sendo isolada pela primeira vez por nosso grupo de pesquisas, sendo também o primeiro relato em fungos endofíticos.^{57,58}

Os deslocamentos químicos em comparação com os dados da literatura encontram-se na **Tabela 6** (pág. 96).

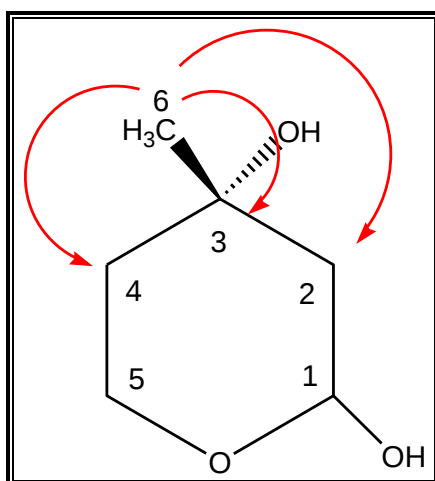


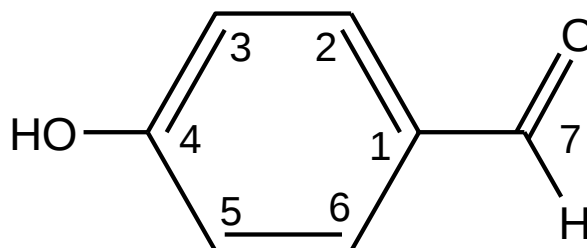
Figura 48 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **1** em CDCl_3^{a} .

Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	$g\text{HMBC}$
1	-	170,3	-
2 _a	2,54 (d, 17 Hz)	44,7	C-6; C-3; C-4
2 _b	2,59 (d, 17 Hz)		
3	-	68,3	
4	1,83 (m)	35,9	C-2; C-6
5 _a	4,53 (ddd, 17,0; 10,0; 6,0 Hz)	65,9	-
5 _b	4,27 (ddd, 17,0; 8,0; 5,0 Hz)		
6	1,33 (s)	29,8	C-2; C-3; C-4

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

4.4.1.2 Identificação Estrutural da Substância **2**

**Figura 49** - Estrutura da Substância **2** (*para*-Hidroxibenzaldeído)

A substância **2** apresentou-se na forma de mistura, no entanto, devido a pequena massa optamos pela determinação estrutural desta em mistura.

A substância **2** (**Figura 49**, pág. 96) foi isolada como um óleo de cor amarela e a fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de baixa resolução por ionização em *eletrospray* (ESI-MS) onde foi visualizado o sinal de m/z 121,0 referente à formação da molécula protonada $[\text{M-H}]^+$ (**Figura 50**, pág. 97). A massa para $[\text{M-H}]^+$ foi calculada em 121,03, o que com auxílio dos dados de $g\text{HMQC}$ nos permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$.

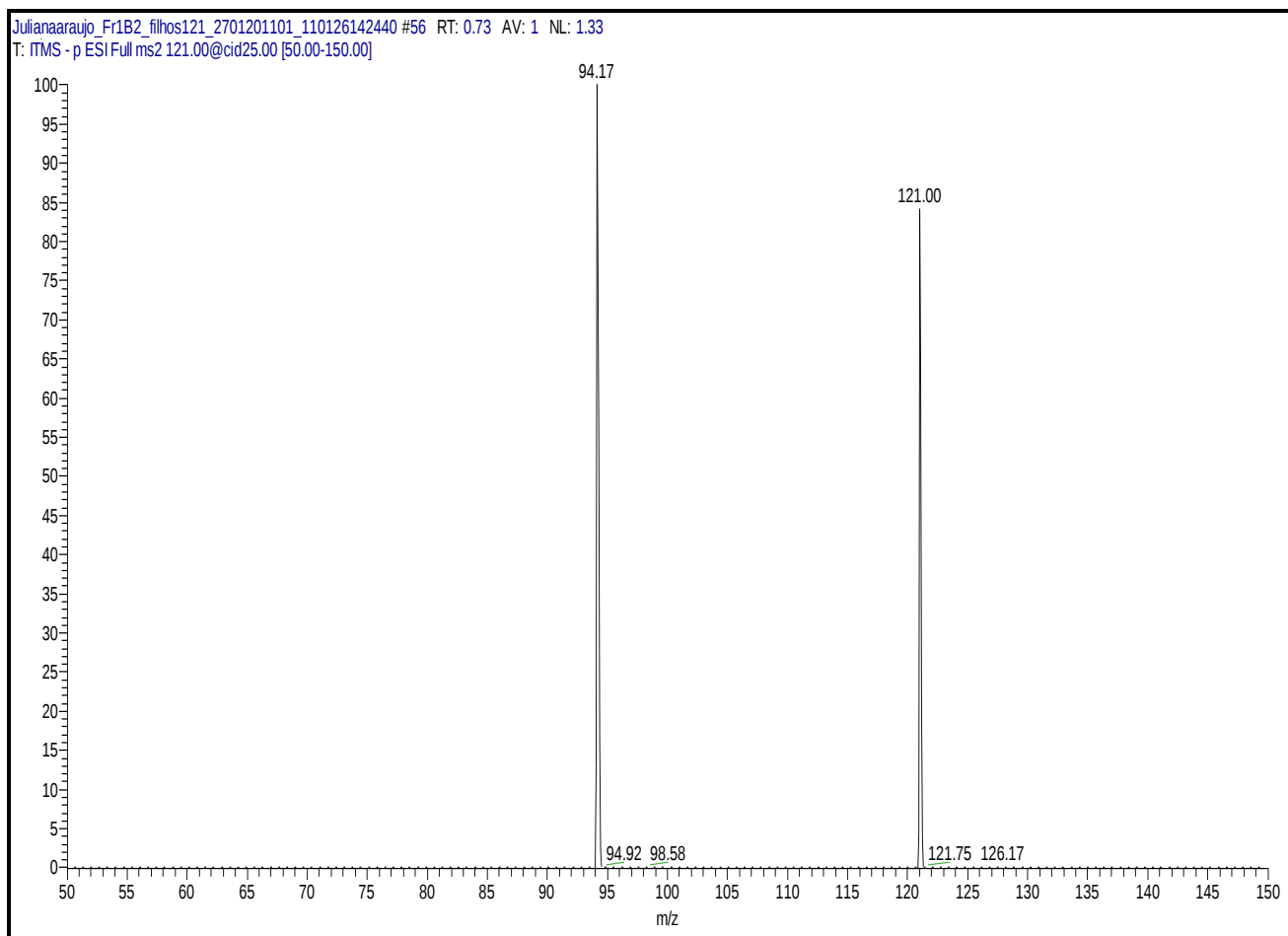


Figura 50 - Espectro de massas da substância **2** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 51**, pág. 98) exibiu uma banda associada à carbonila de um aldeído em 1602 cm^{-1} , além das bandas de Ressonância de Fermi para o grupo C(=O)H , que estão bem nítidas a 2858 cm^{-1} e 2924 cm^{-1} .

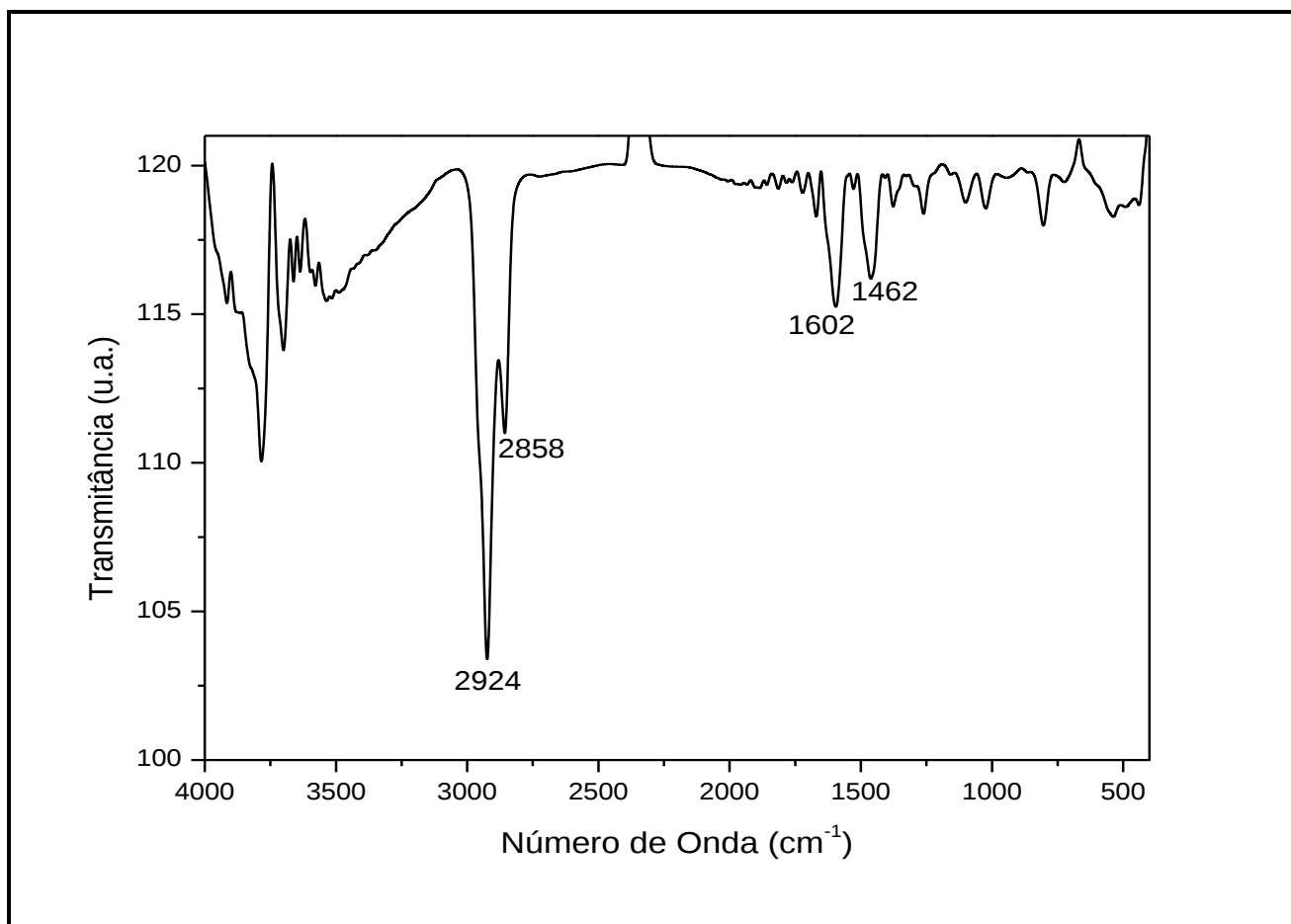


Figura 51 - Espectro de infravermelho da substância **2**

Na análise do espectro de RMN de ¹H (**Figura 53**, pág. 100) foi observada a presença de um singlete desblindado em δ_H 9,80, reforçando a presença de uma função aldeído. Também, foi possível visualizar sinais característicos de hidrogênios de um anel benzênico *para*-dissubstituído: δ_H 6,87 e δ_H 7,73, dois dubletos integrados para dois hidrogênios cada, com constantes de acoplamento característicos de hidrogênios acoplando em relação *orto* ($J = 8,5$ Hz).

A pequena quantidade de massa da substância impossibilitou a obtenção dos dados de RMN de ¹³C, deste modo, estes foram obtidos com base nos experimentos de *g*HMBBC (**Figura 52**, pág. 99) *g*HMQC e (**Figura 54**, pág. 101). Foram visualizados seis carbonos aromáticos com os seguintes deslocamentos: δ_C 132,1 (CH; C-2 e C-6); δ_C 160,1 (C_o, C-4); δ_C 116,1 (CH, C-3 e C-5); δ_C 130,1 (C_o, C-1) e, um sinal em δ_C 190,1 (C_o, CHO), característico de uma carbonila de aldeído. A observação da proteção da carbonila corroborou para a proposta de uma função aldeídica evidenciada pelo efeito diamagnético resultante da conjugação com o anel aromático (δ_C 190,1).

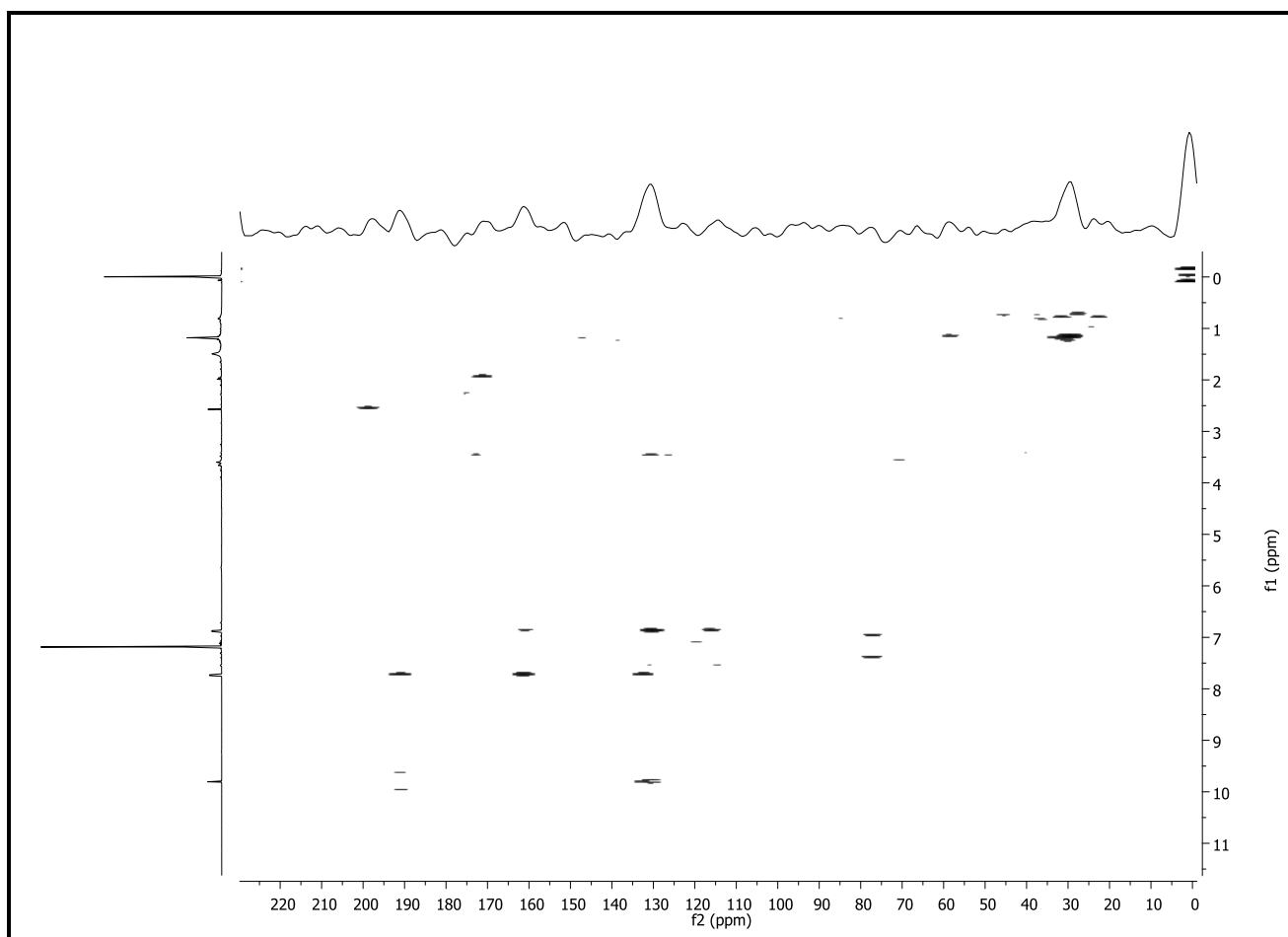


Figura 52 - Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **2** (CDCl₃, 125 MHz)

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos *g*HMQC (**Figura 54**, pág. 101).

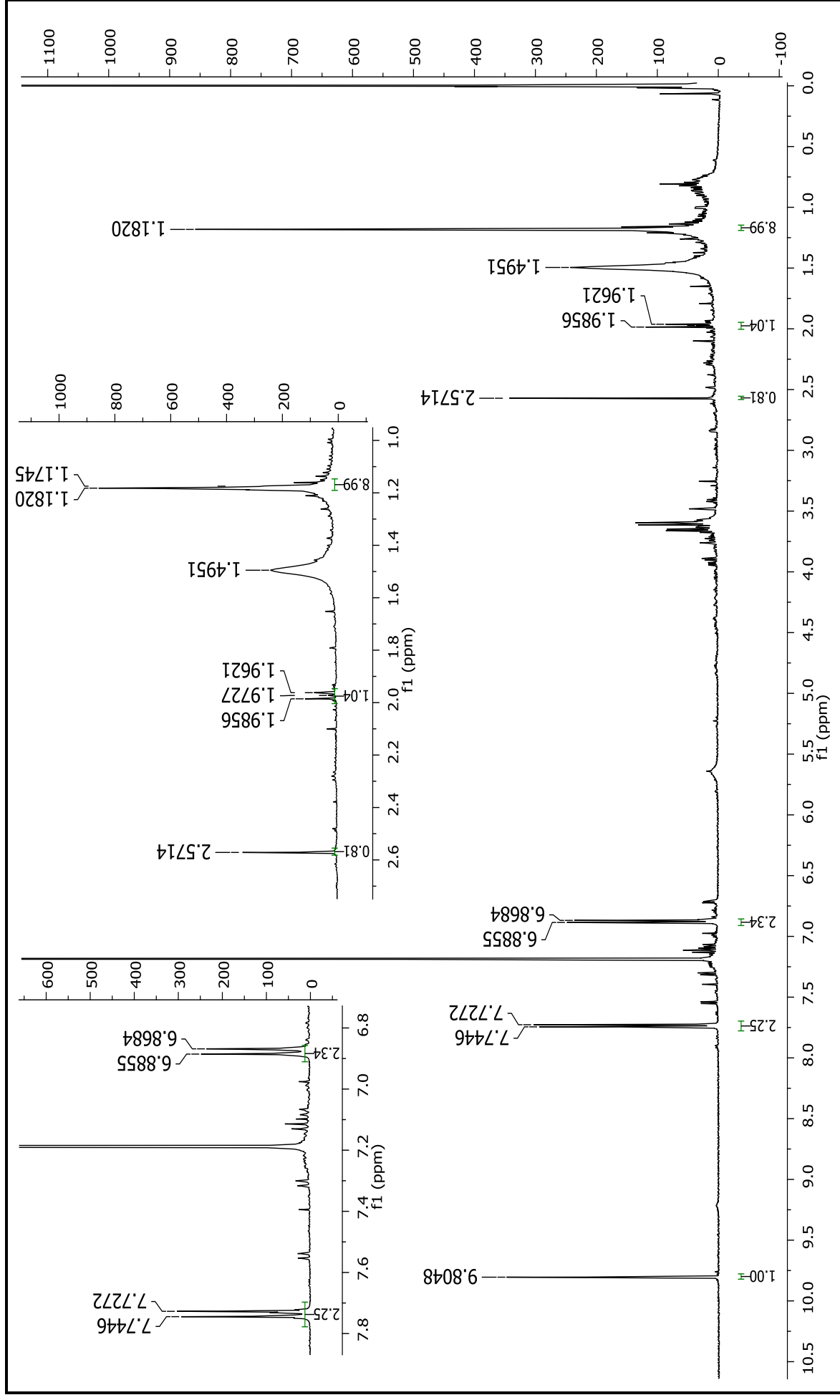


Figura 53 - Espectro de RMN de ¹H da substância **2** (CDCl₃, 500 MHz)

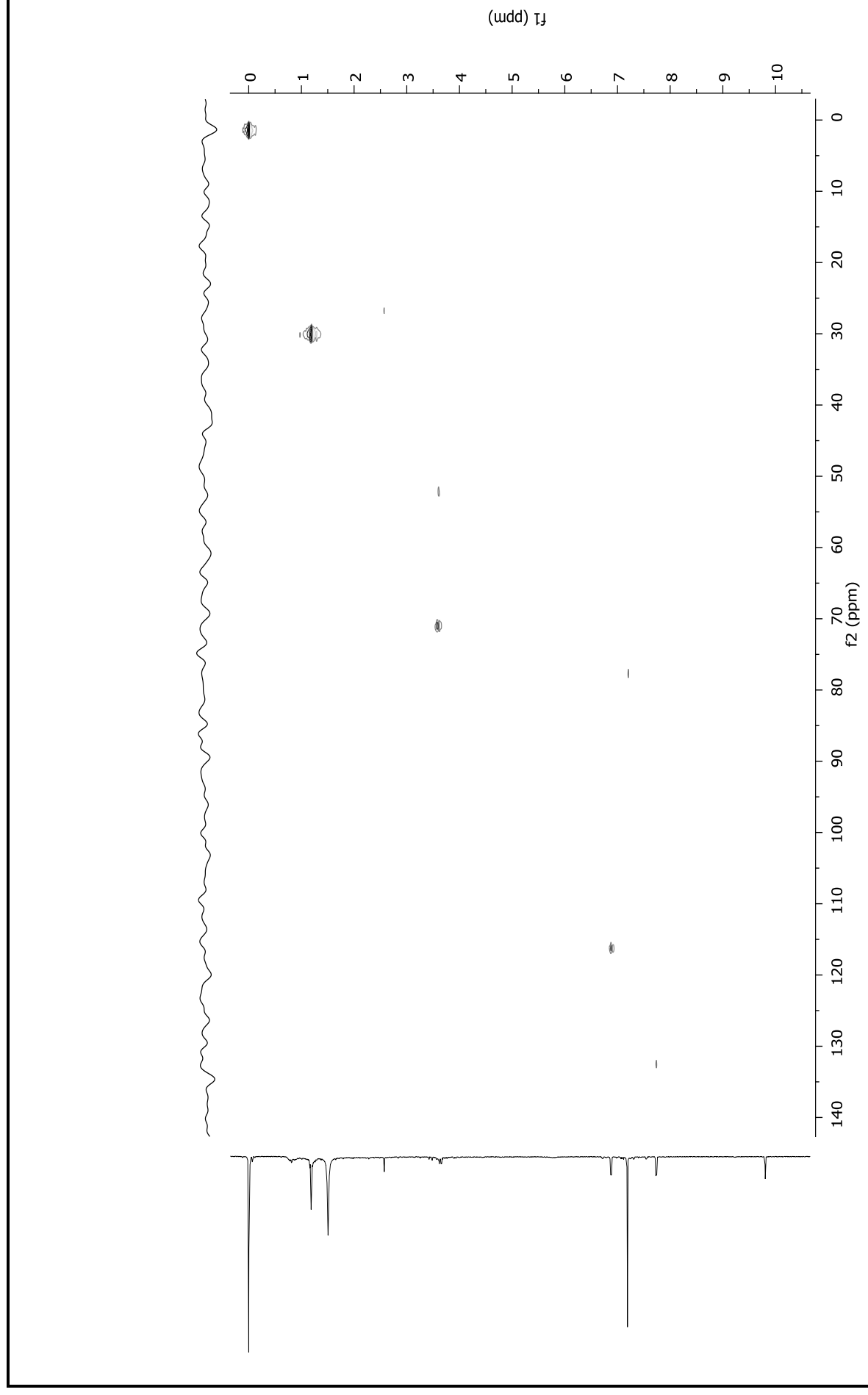


Figura 54 - Mapa de contorno de gHMQC da substância **2** (CDCl₃, 125 MHz)

Pelas análises do mapa de contorno *g*HMBC de **2**, foi visualizado correlação entre os H-2/H-6↔C-3/C-4/C-5/C-7; dos H-3/H-5↔C-1/C-2/C-4/C-6 e do H-7↔C-1 (**Figura 55**, pág. 102). Estes dados, associados aos dados encontrados na literatura, nos permitiram atribuir para a substância **2** à estrutura da *para*-hidroxibenzaldeído.

Os deslocamentos químicos em comparação com os dados da literatura encontram-se na **Tabela 7** (pág. 102). Esta substância é descrita como metabólito de *Pestalotiopsis* sp. um endófito dos frutos de *Gustavia* cf. *elliptica* e apresenta atividade antioxidante, antibacteriana e fungicida.⁵⁹

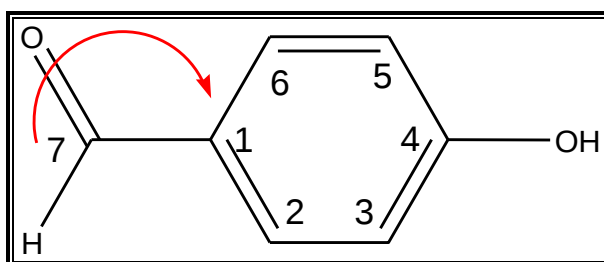


Figura 55 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de *g*HMBC

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **2** em CDCl_3^{a} .

Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	<i>g</i> HMBC
1	-	130,1	-
2	7,73 (d, 8,5Hz)	132,1	C-3; C-4; C-5; C-7
3	6,87 (d, 8,5Hz)	116,1	C-1; C-2; C-4; C-6
4	-	160,1	-
5	6,87 (d, 8,5Hz)	116,1	C-1; C-2; C-4; C-6
6	7,73 (d, 8,5Hz)	132,1	C-3; C-4; C-5; C-7
7	9,80 (s)	190,1	C-1

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

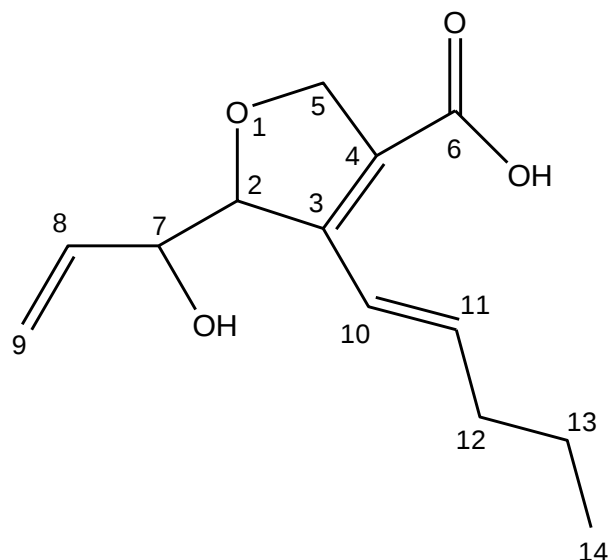
4.4.1.3. Identificação Estrutural da Substância **3**

Figura 56 - Estrutura da Substância **3** (Ácido (*E*)-5-(1-hidroxiail)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-carboxílico)

A substância **3** (**Figura 56**, pág. 103) foi isolada como um óleo de cor amarela, $[\alpha]_D^{23}$ -22,6 (c 0,1, CH₃OH). No espectro de massas de baixa resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray* (ESI-MS) no modo positivo, foi visualizado o sinal de m/z 261,50 referente à formação de aduto $[M+Na]^+$ (**Figura 57**, pág. 103). A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 261,10, o que com auxílio dos dados de RMN de ¹³C permitiu propor a fórmula molecular C₁₃H₁₈NaO₄.

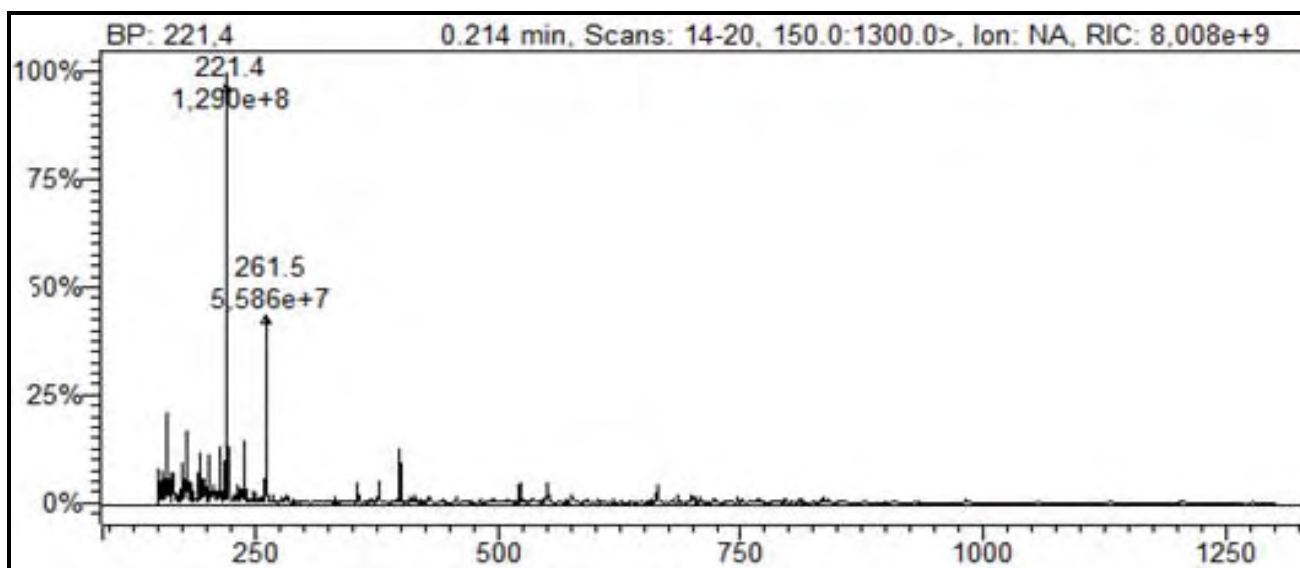


Figura 57 - Espectro de massas da substância **3** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 58**, pág. 104) exibiu uma banda intensa e larga em 3431 cm^{-1} característico de hidroxila de ácido carboxílico, uma banda associada a $\text{C}=\text{O}$ em 1734 cm^{-1} e uma banda em 2957 cm^{-1} característico de C-H sp^3 .

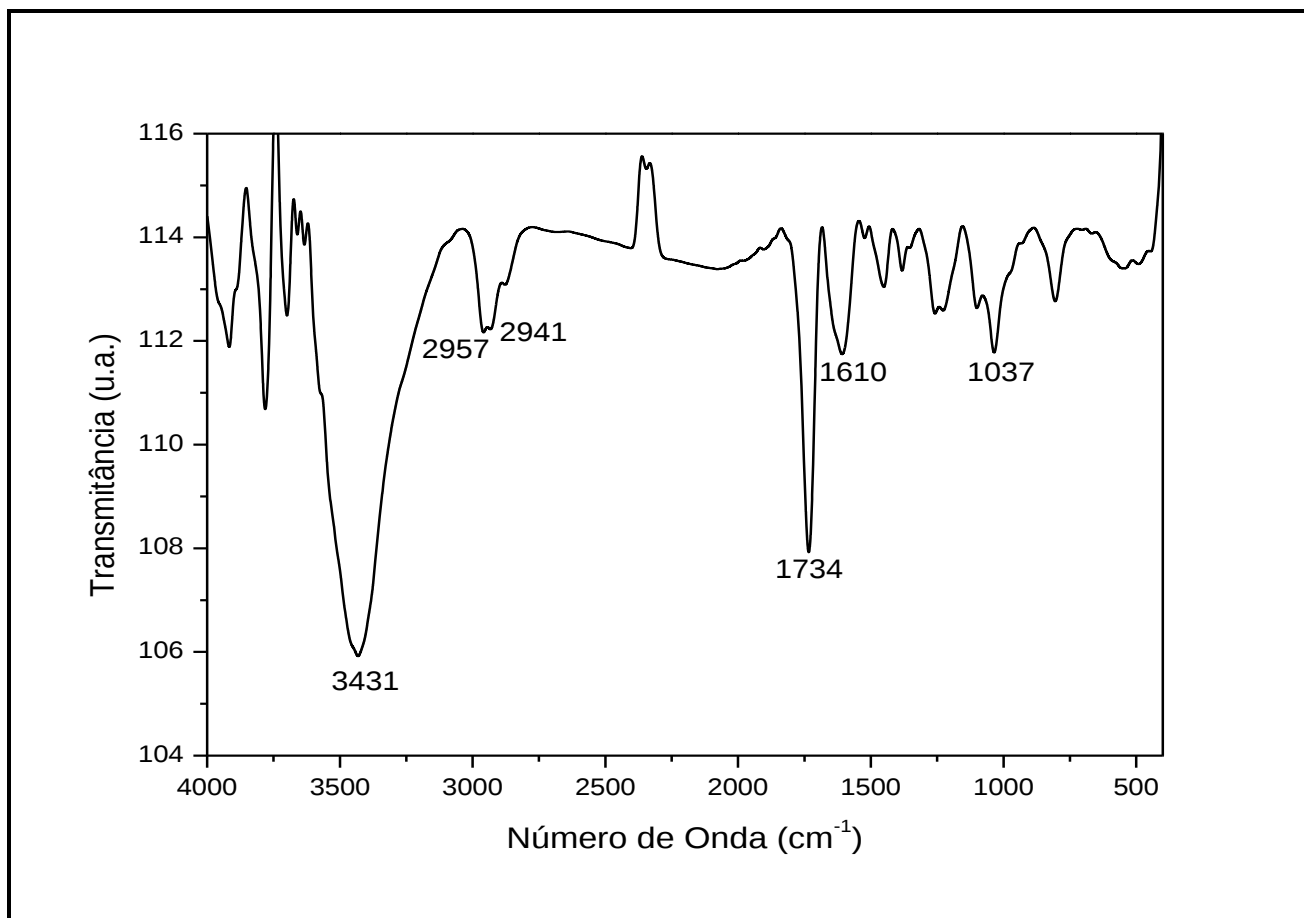


Figura 58 - Espectro de infravermelho da substância **3**

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 59**, pág. 105) registrou 13 átomos de carbono, consistentes com seis olefínicos (dois quaternários, três metínicos e um metilênico), três metilênicos (um vinílico, um oxivinílico e um alílico), dois metínicos (um oxivinílico e um oxialílico), uma metila e um carbono atribuído a um ácido carboxílico.

Através da análise dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 60**, pág. 106) em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 aliado às correlações observadas no experimento de gHMBC (**Figura 61**, pág. 107), foi possível sugerir um anel diidrofurânico para a substância **3**.

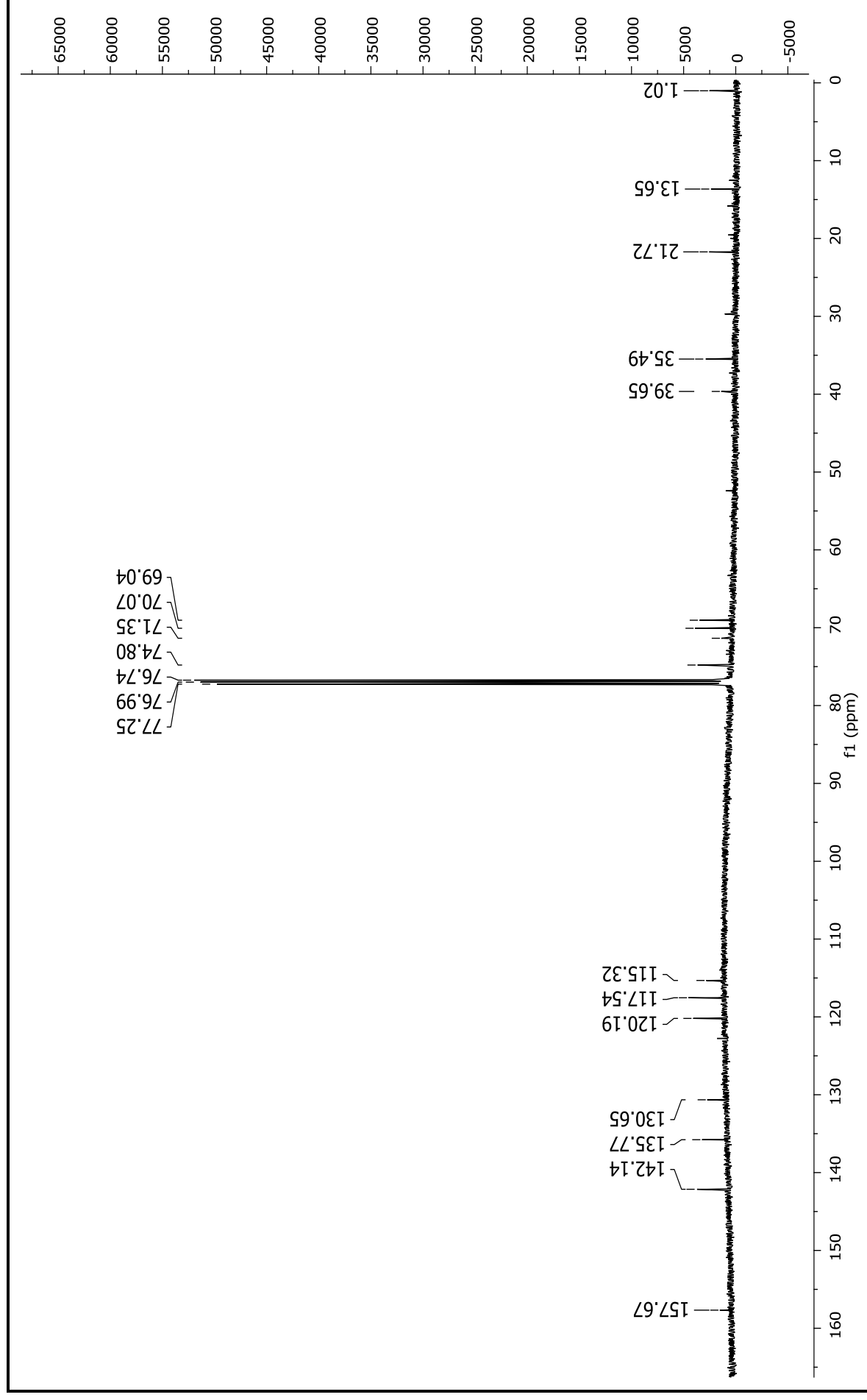


Figura 59 - Espectro de RMN de ¹³C da substância **3** (CDCl₃, 500 MHz)

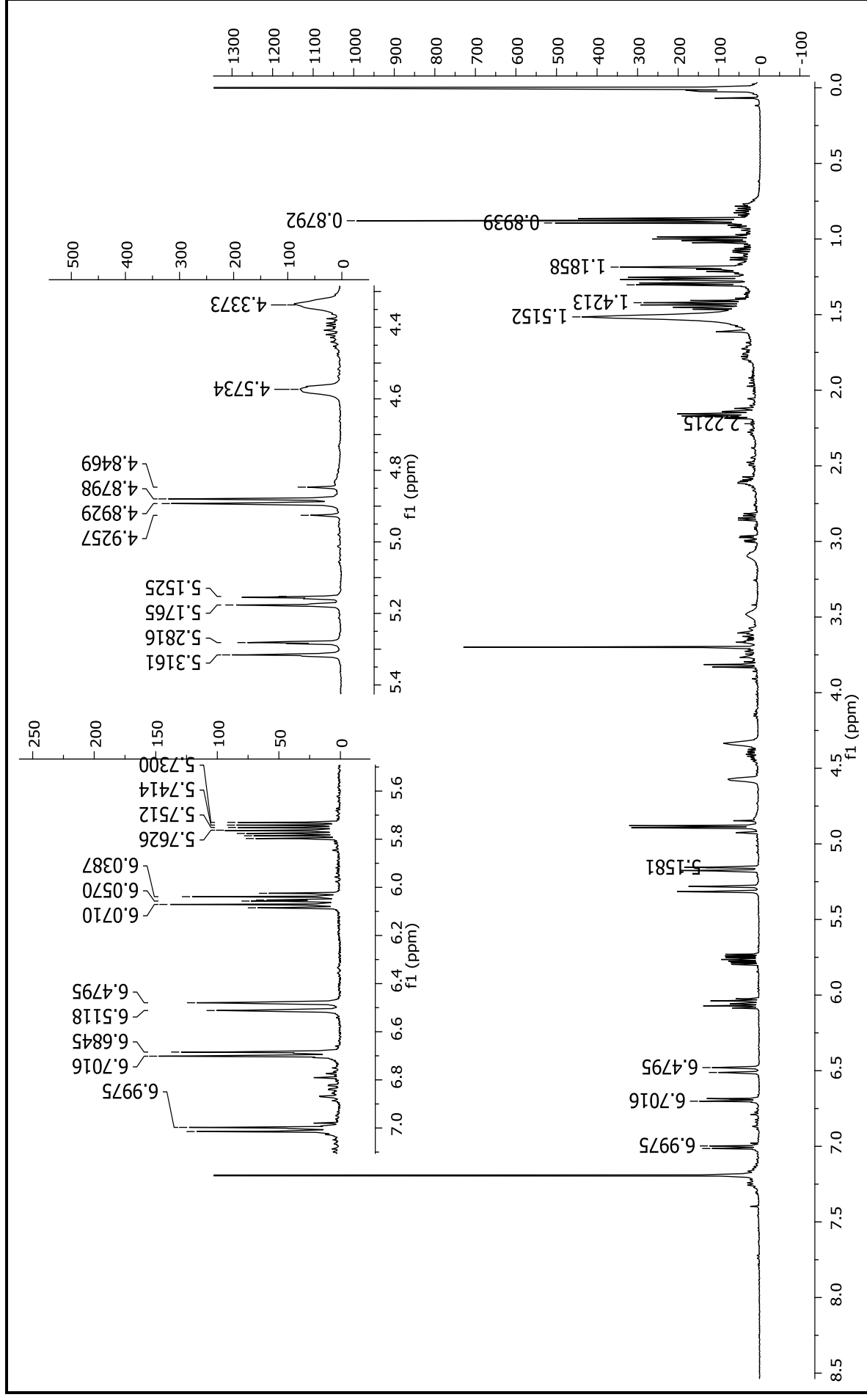


Figura 60 - Espectro de RMN de ¹H da substância **3** (CDCl₃, 500 MHz)

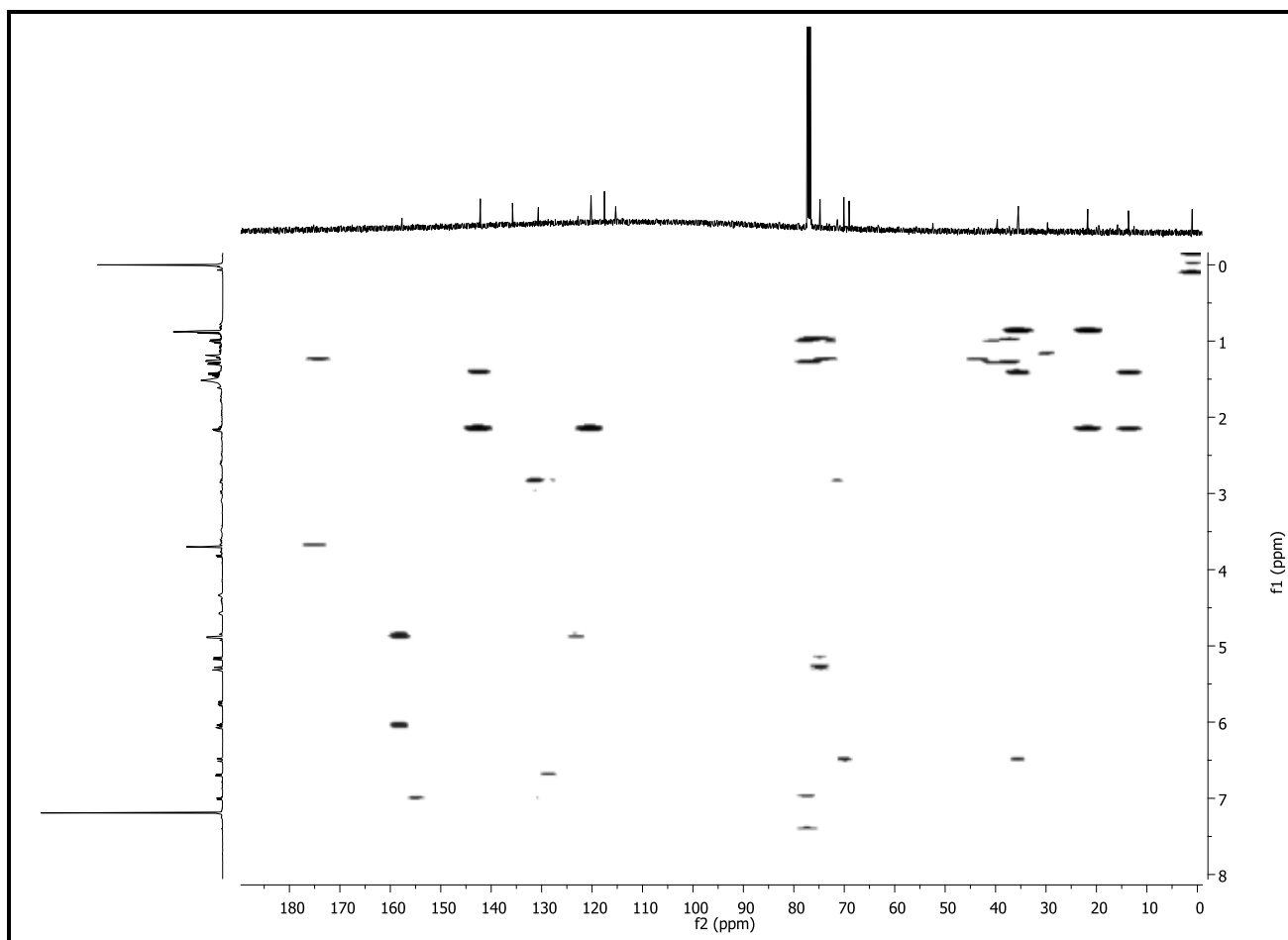


Figura 61 - Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **3** (CDCl₃, 125 MHz)

Na interpretação cuidadosa e detalhada do experimento *g*COSY (**Figura 62**, pág. 108) foi possível definir dois sistemas contíguos e independentes de spins. No primeiro caso as interações visualizadas entre H-14↔H-13↔H-12↔H-11↔H-10 permitiram estabelecer um substituinte 1-pentenila, —CH=CHCH₂CH₂CH₃ (subunidade **A**). A configuração *trans* da ligação dupla foi estabelecida pelo valor da constante de acoplamento de 16,0Hz entre H-10 (δ_{H} 6,49, d) e H-11 (δ_{H} 6,05, dt)

No segundo caso, as interações dos spins ¹H-¹H entre H-7↔H-8↔H-9 conduziu a subunidade 1-hidroxi-2-propenila, H₂C=CHCHOH—(subunidade **B**).

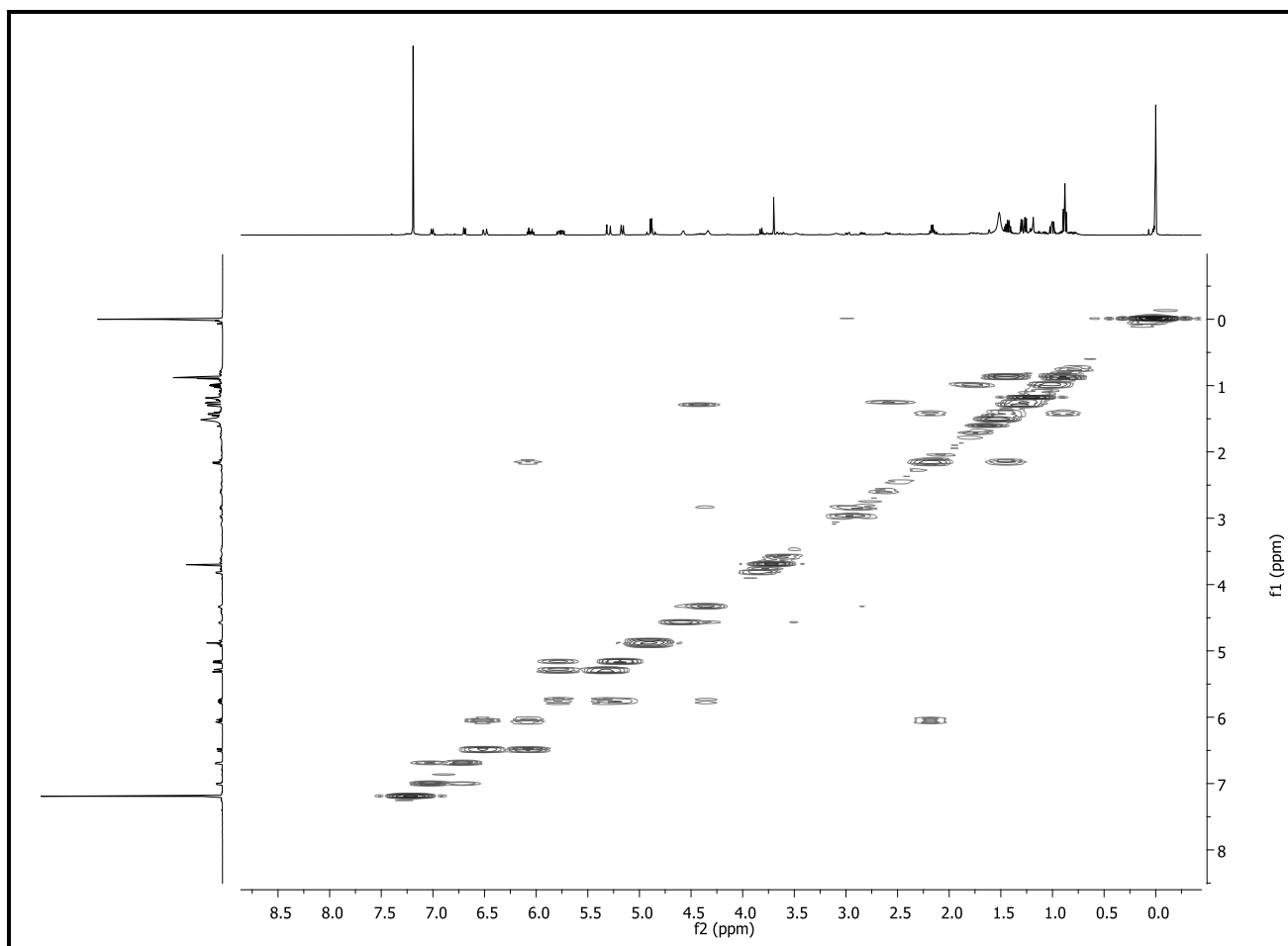


Figura 62 - Espectro de *g*COSY da substância **3** (CDCl₃, 125 MHz)

Estas subunidades foram ratificadas pelas correlações observadas a longa distância 3J nos experimentos de *g*HMBC, pelos deslocamentos químicos em RMN de 1H e ^{13}C , assim como as respectivas multiplicidades dos hidrogênios.

Análise do mapa de contorno do experimento *g*HMBC foi decisivo na determinação estrutural desta substância, fornecendo subsídio para posicionar os substituintes no anel furânico. A subunidade **A** foi conectada em C-3, devido às correlações à longa distância observada entre H-10 $\leftrightarrow$ C-4/C-5, assim como de H-5 $\leftrightarrow$ C-4/C-10.

A subunidade **B** foi posicionada em C-2, devido às correlações a longa distância observada no experimento de *g*HMBC entre H-2 $\leftrightarrow$ C-7/C-8 e H-7 $\leftrightarrow$ C-2/C-3/C-8/C-9.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos *g*HMQC (**Figura 63**, pág. 109).

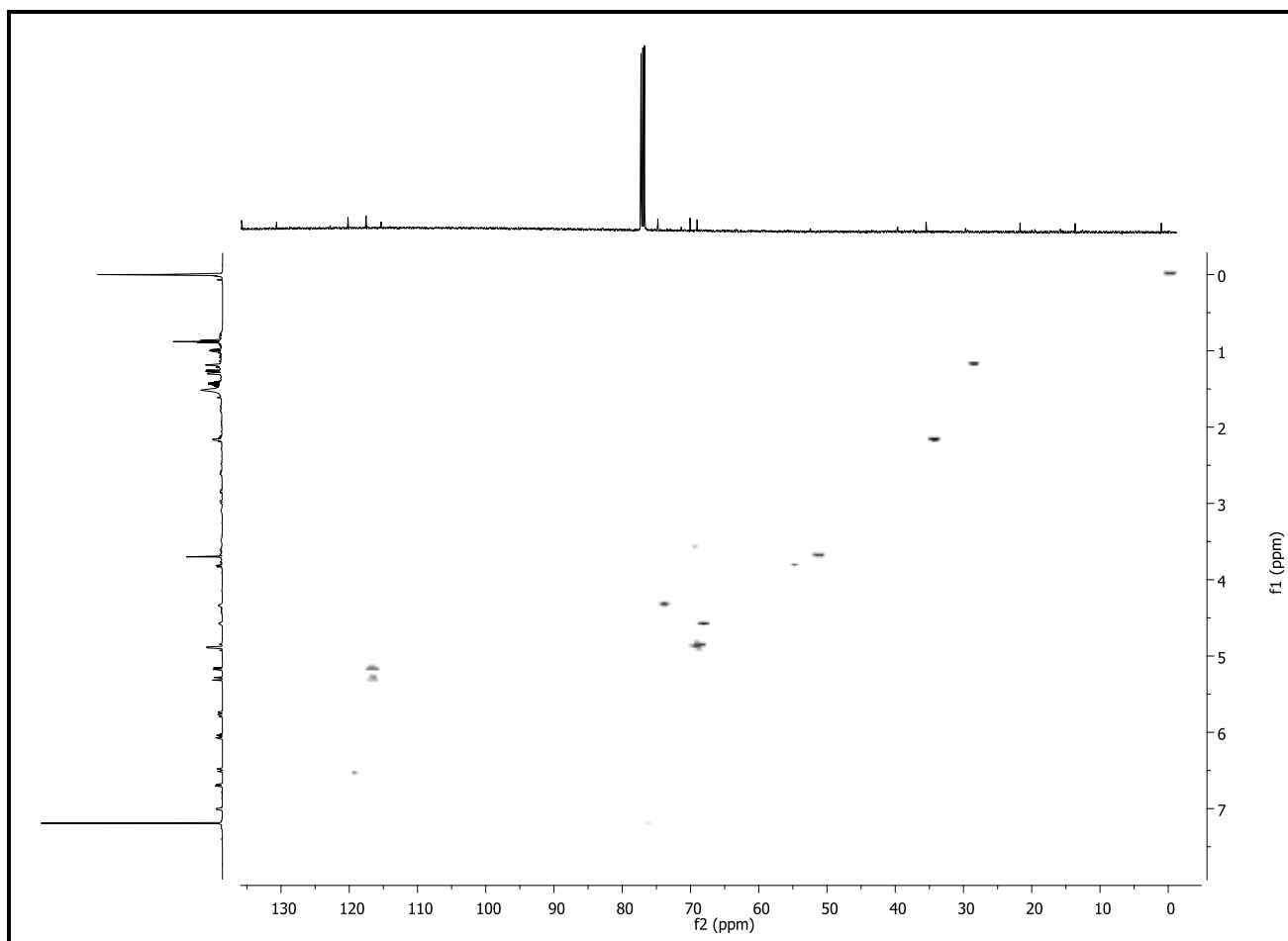


Figura 63 - Mapa de contorno de gHMQC da substância **3** (CDCl₃, 125 MHz)

Essas análises nos permitiram determinar a estrutura **3** como Ácido (*E*)-5-(1-hidroxiálil)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-carboxílico.

No espectro de UV em CH₃OH (**Figura 64**, pág. 110) da substância **3** podemos observar um máximo de absorção em 266nm que são característicos de compostos furânicos, reforçando nossa proposta.

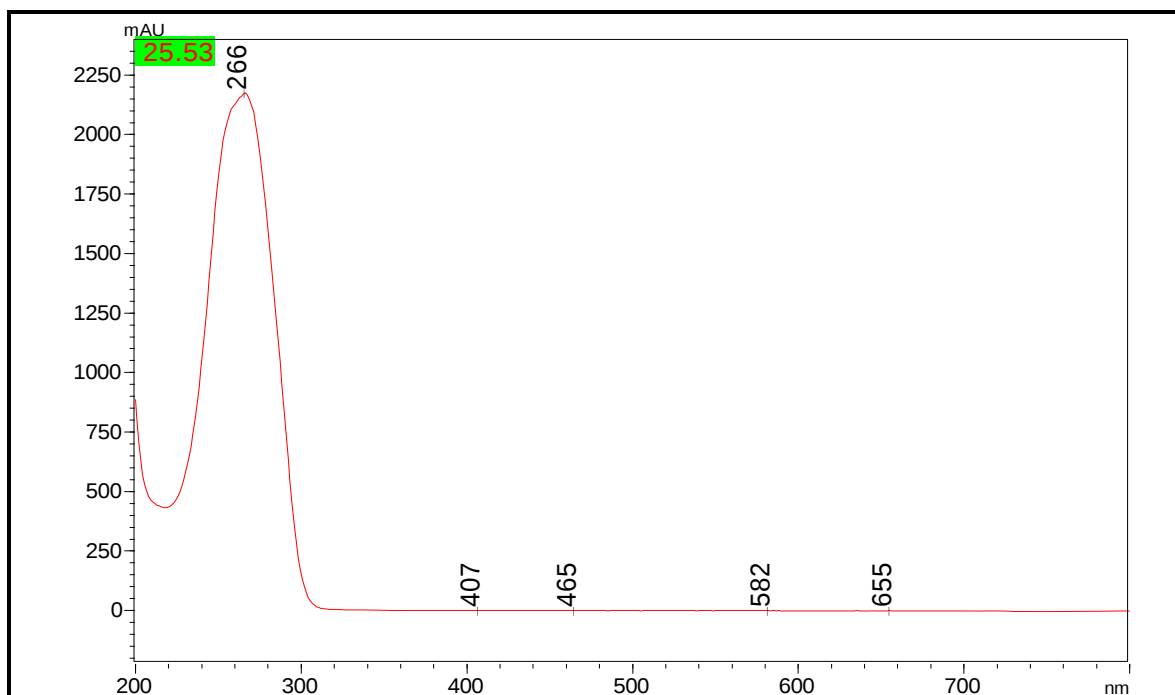


Figura 64 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **3**

Os deslocamentos químicos para a substância **3** encontram-se na **Tabela 8** (pág. 111).

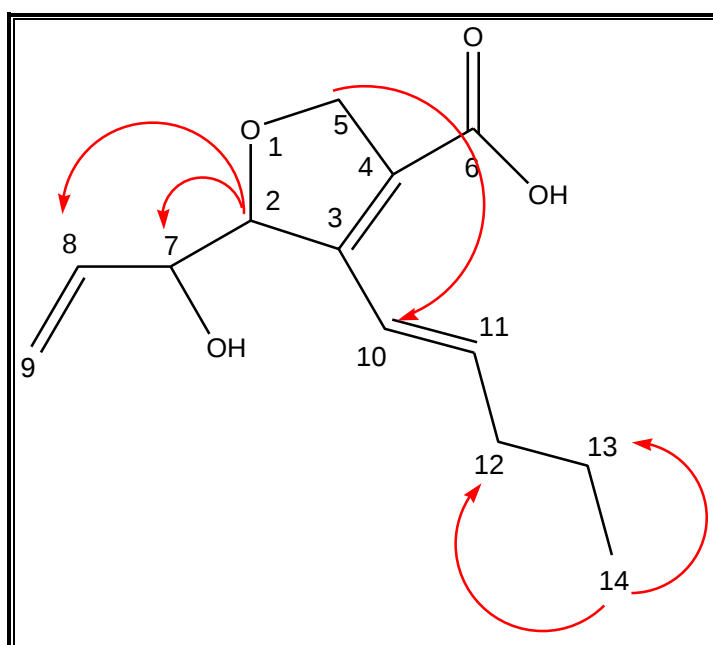


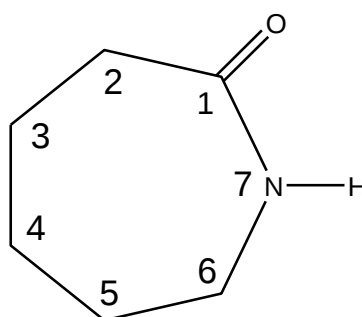
Figura 65 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **3** em CDCl_3^a

Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	$g\text{HMBC}$
2	4,57 (s)	69,0	C-4; C-5; C-6; C-7; C-8
3	-	122,8	-
4	-	157,7	-
5	4,90 (d; $W_{1/2}$; 16,2) 4,86 (d; $W_{1/2}$; 16,2)	70,1	C-4; C-6; C-10
6	-	175,1	-
7	4,33 (sl)	74,8	C-2; C-3; C-8; C-9
8	5,76 (ddd, 17,0; 10,5; 6,0)	135,8	C-7
9	5,29 (ddd, 17,0; 3,0; 1,5) 5,16 (ddd, 10,5; 3,0; 1,5)	117,5	C-7; C-8 C-4; C-5; C-12
10	6,49 (d; 16,0)	120,2	C-4; C-12; C-13
11	6,05 (dt; 16,0; 7,0)	142,1	C-4
12	2,16 (ddd; 14,5; 7,5; 1,5)	35,5	C-10; C-11; C-13; C-14
13	1,43 (q; 7,5)	21,7	C-11; C-12; C-13
14	0,88 (t; 7,5)	13,6	C-12; C-13

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

4.4.1.4. Identificação Estrutural da Substância **4**

**Figura 66** - Estrutura da Substância **4** (Azepan-2-ona)

Esta substância apesar de não encontrar-se pura, teve a estrutura determinada, em mistura.

A substância **4** (**Figura 66**, pág. 111) foi isolada como um óleo de cor amarela e a fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de baixa resolução por ionização em *eletrospray* (ESI-MS) onde foi visualizado o sinal de m/z 114,5 referente à formação da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 67**, pág. 112). A

massa para $[M+H]^+$ foi calculada em 114,08, o que com auxílio dos dados de RMN de ^{13}C nos permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}$.

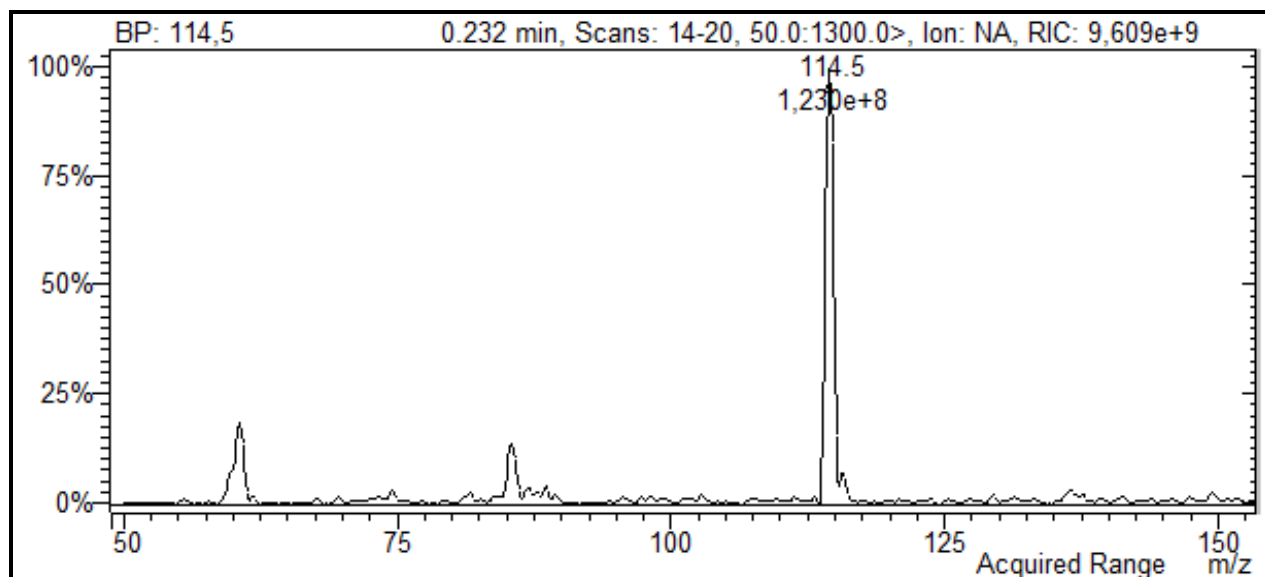


Figura 67 - Espectro de massas da substância **4** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 68**, pág. 113) exibiu uma banda larga e intensa em 3439 cm^{-1} devido à vibração axial do grupo N—H, uma banda em 1719 cm^{-1} característico da carbonila, seguido da absorção a 1628 cm^{-1} da vibração angular no plano do grupo N—H e, uma banda associada à vibração dos grupos metilenos em 2924 e 2858 cm^{-1} .

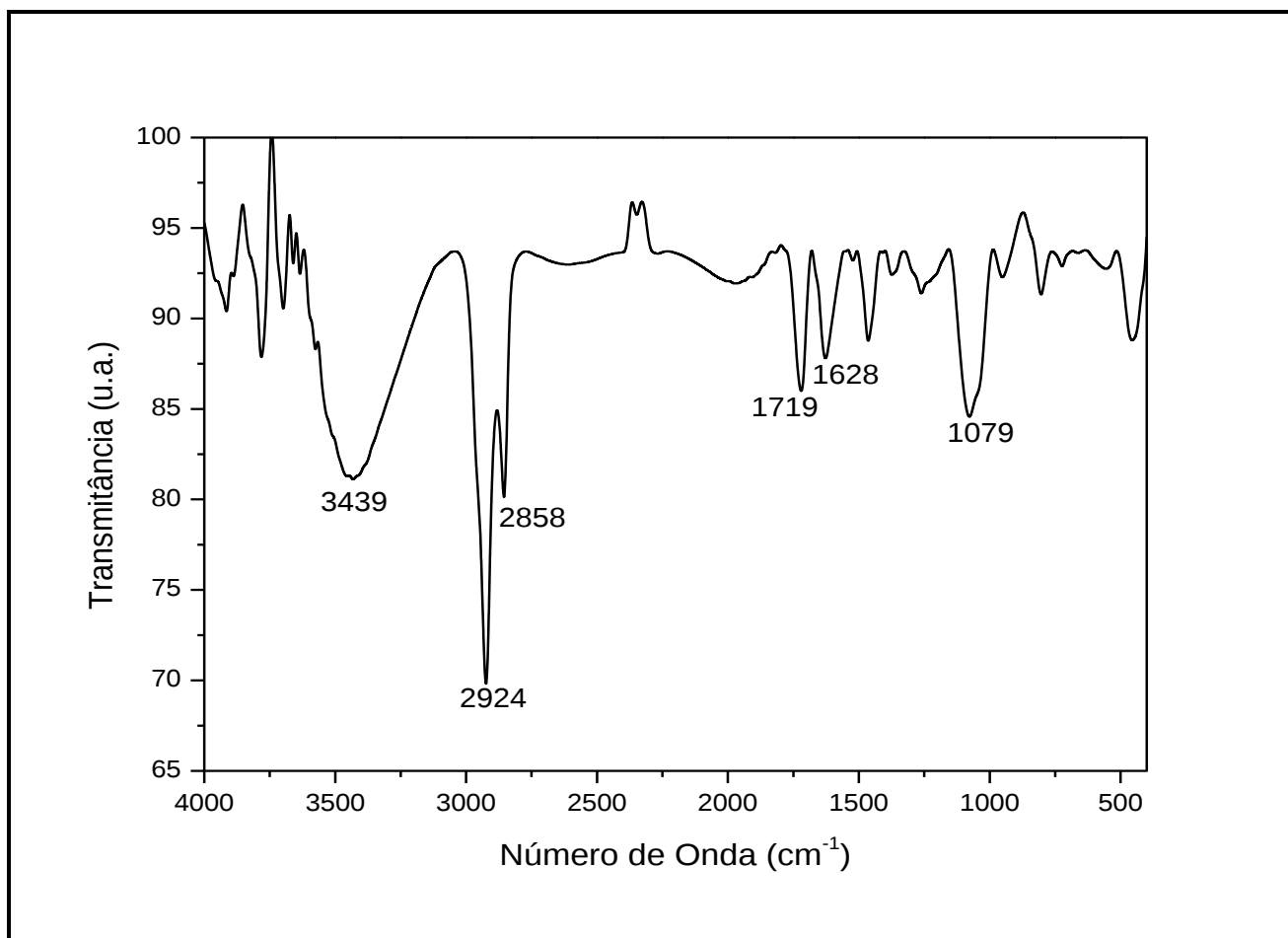


Figura 68 - Espectro de infravermelho da substância **4**

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 69**, pág. 114) e de ^{13}C (**Figura 70**, pág. 115) evidenciaram a presença de cinco carbonos metilênicos em δ_{H} 2,28 (m, δ_{C} 36,7); δ_{H} 1,53 (m, δ_{C} 22,9); δ_{H} 1,65 (m, δ_{C} 29,9); δ_{H} 1,53 (m, δ_{C} 29,7) e, δ_{H} 3,04 (dt, 10,0; 6,0; δ_{C} 41,4) e, um sinal em δ_{C} 176,9 característico de uma carbonila de amida.

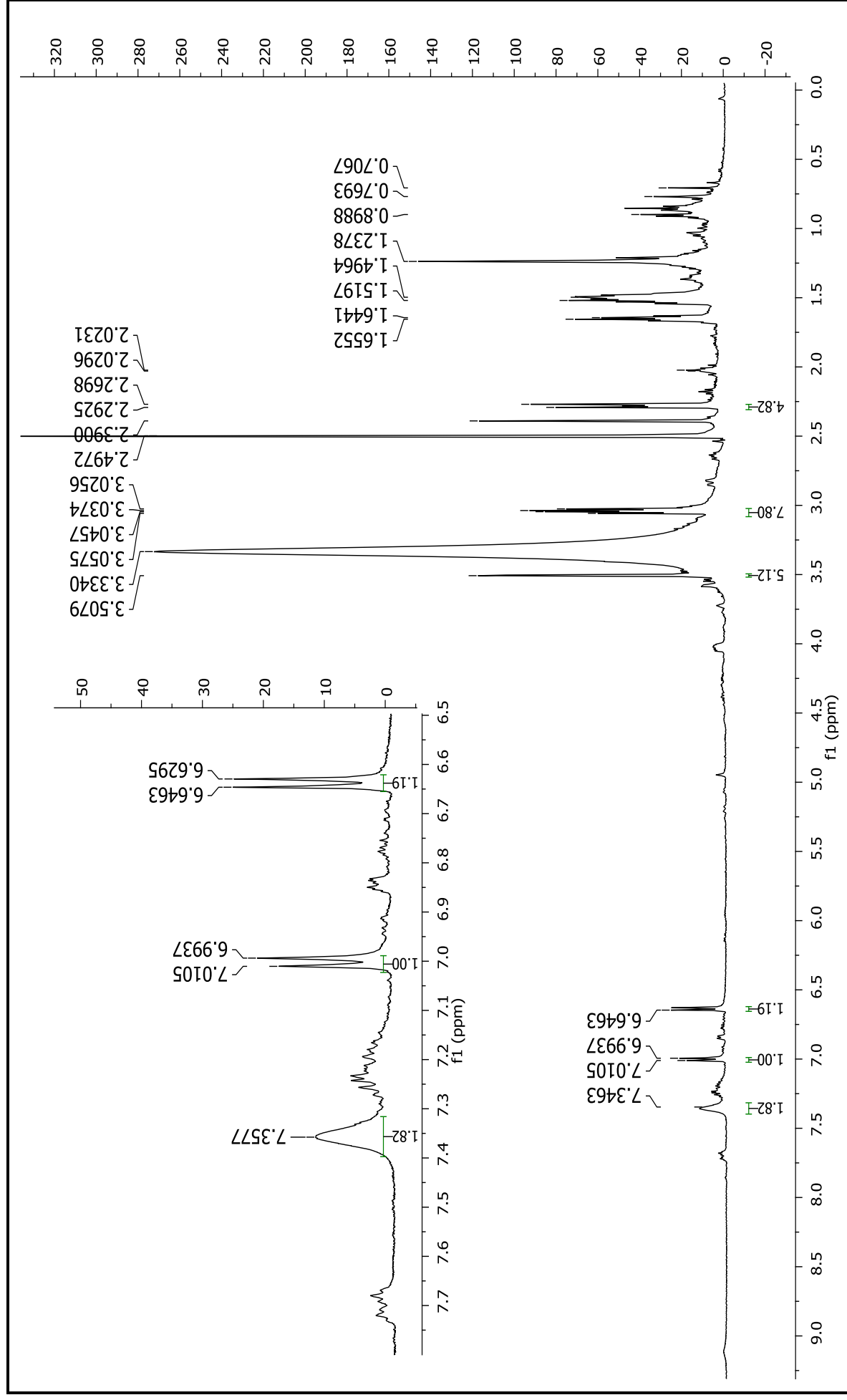


Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (DMSO-d₆, 500 MHz)

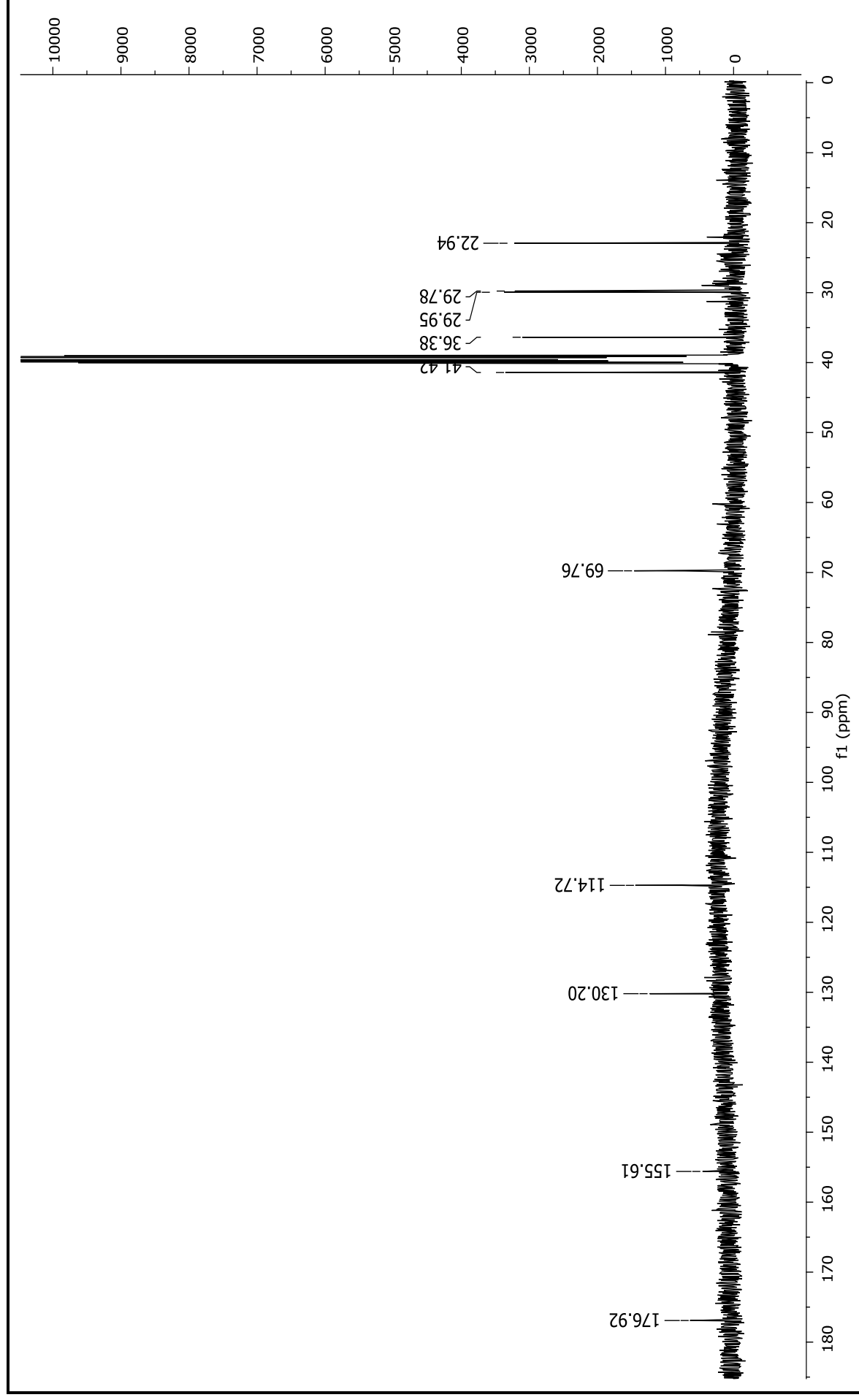


Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4** (DMSO-d_6 , 500 MHz)

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos de *g*HMQC (**Figura 71**, pág. 116).

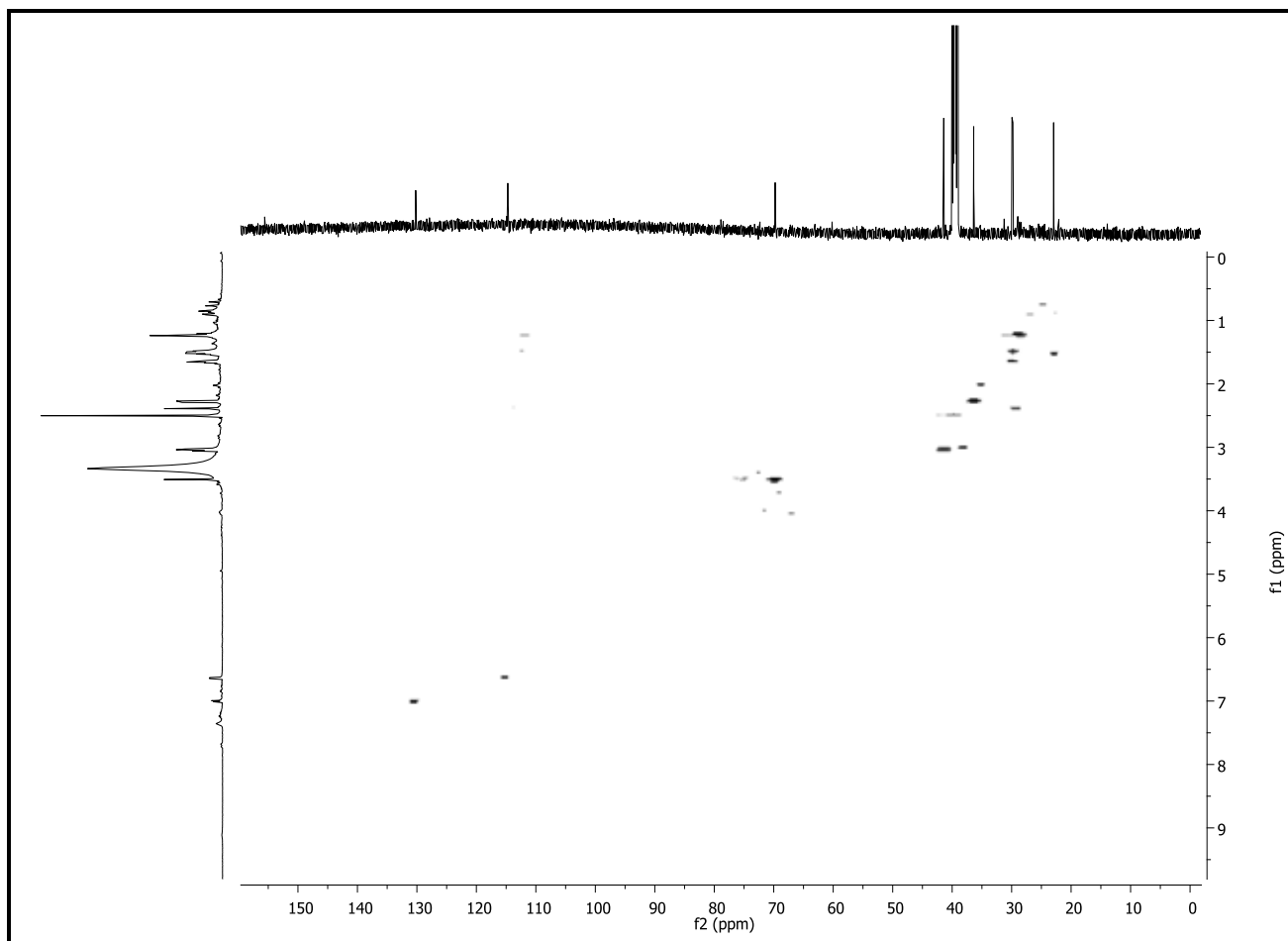


Figura 71 - Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **4** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

Pelas análises do mapa de contorno de *g*HMBC (**Figura 72**, pág. 117) de **4**, foi visualizado correlação entre o H-2↔C-1/C-3/C-4; H-3↔C-1/C-2/C-4/C-5; H-4↔C-2/C-6; H-5↔C-3/C-4 e H-6↔C-1/C-4/C-5. Estes dados, associados aos dados encontrados na literatura, nos permitiram atribuir para a substância **4** à estrutura do azepan-2-ona.

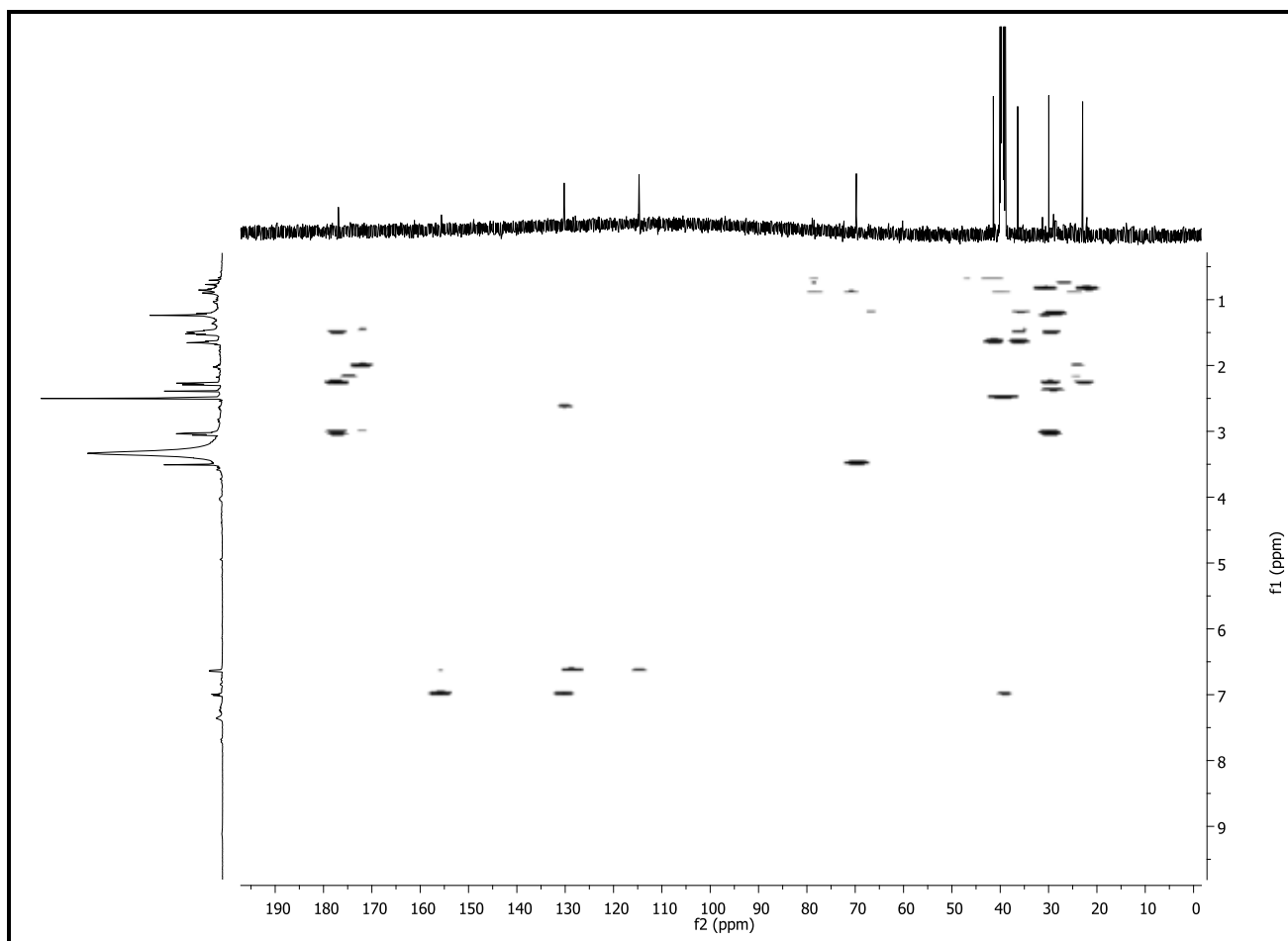


Figura 72 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **4** (DMSO-d₆, 125 MHz)

Azepan-2-ona é comercialmente conhecida como ϵ -caprolactama e, é um monômero precursor de polímeros na fabricação de nylon 6. É uma substância irritante e tóxica por ingestão, inalação ou absorção através da pele.⁶⁰ Esta substância está sendo isolada pela primeira vez por nosso grupo de pesquisas, sendo também, o primeiro relato do isolamento como produto natural.

Os deslocamentos químicos encontram-se na **Tabela 9** (pág. 118).

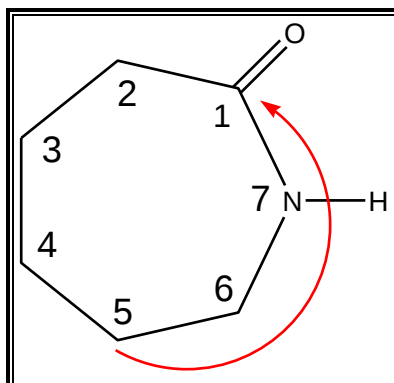
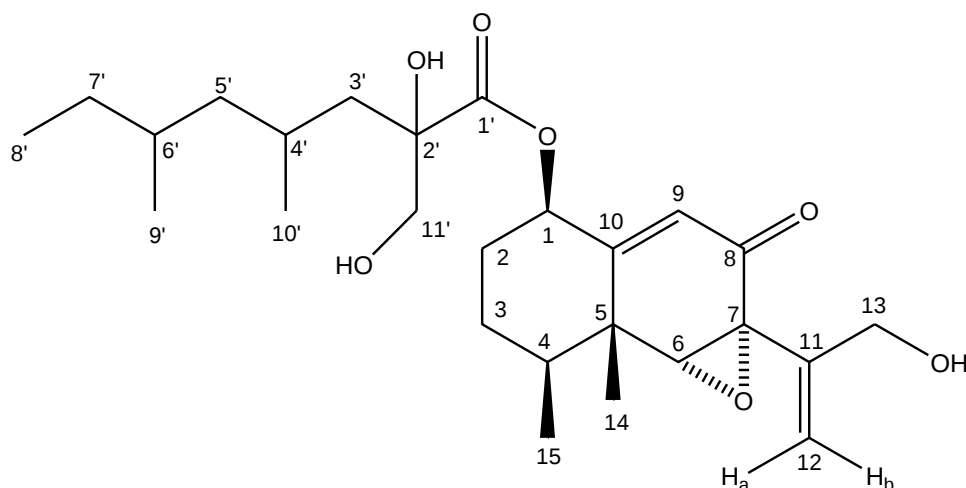


Figura 73 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **4** em DMSO-d_6 .

Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	$g\text{H}^{\text{MBC}}$
1	-	176,9	-
2	2,28 (m)	36,7	C-1; C-3; C-4
3	1,53 (m)	22,9	C-1; C-2; C-4; C-5
4	1,65 (m)	29,9	C-2; C-6
5	1,53 (m)	29,7	C-3; C-4
6	3,04 (dt, 10,0; 6,0Hz)	41,6	C-1; C-4; C-5

4.4.1.5. Identificação Estrutural da Substância **5**

**Figura 74** - Estrutura da Substância **5** (Xylarenona D)

A substância **5** (**Figura 74**, pág. 118) foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]_D^{24} + 43,2$ (c 0,1, CH_3OH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* (EM-ESI-QTOF) onde foi visualizado o sinal de m/z 487,2668 referente à formação de aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**Figura 75**, pág. 119). A massa para $[\text{M}+\text{Na}]^+$ foi calculada em 487,2666 o que com o auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_7$.

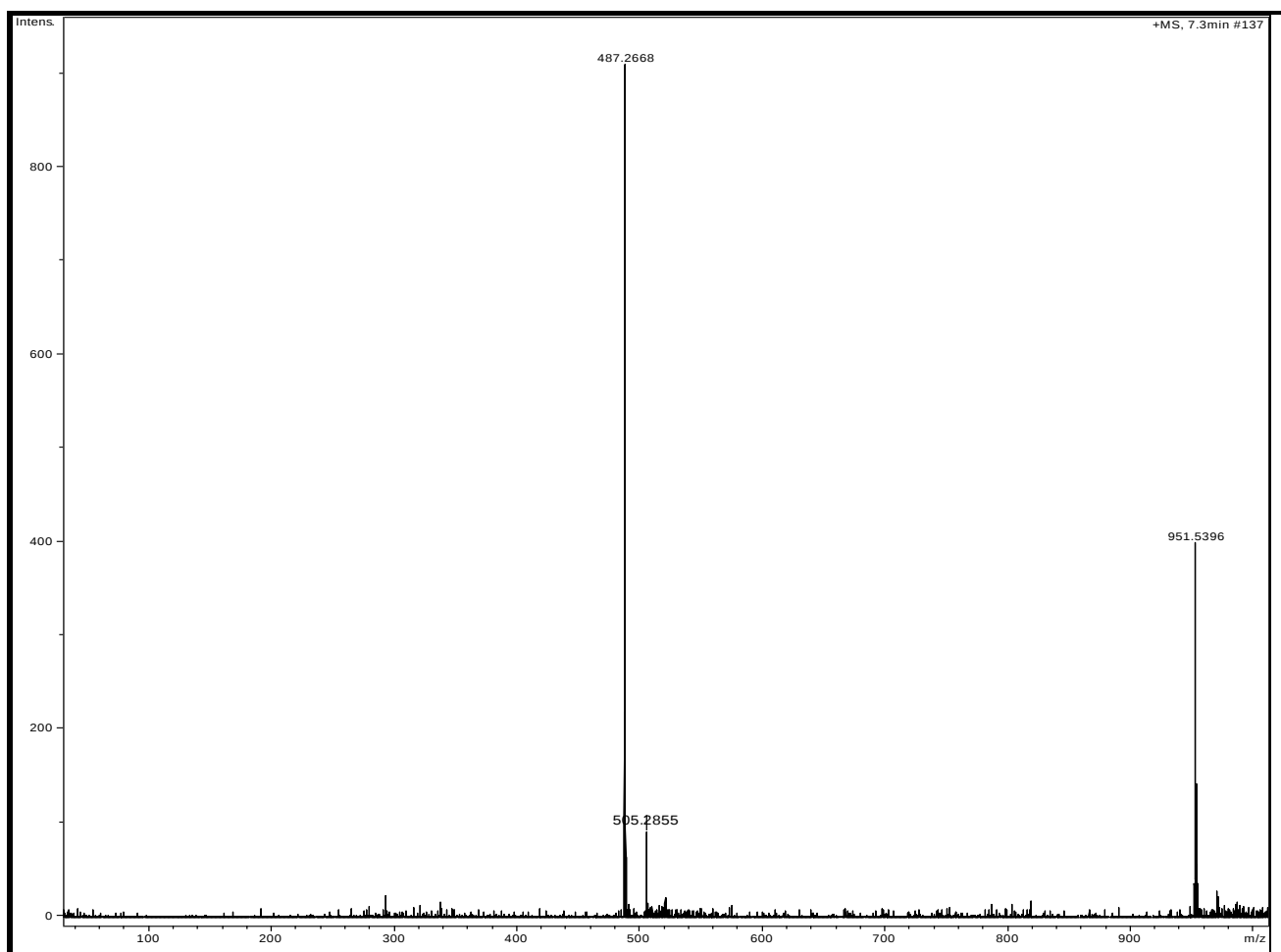


Figura 75 - Espectro de massas da substância **5** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 76**, pág. 120) exibiu uma banda larga em 3448 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada à cetona α, β - insaturada em 1677 cm^{-1} e outra associada a um éster alifático em 1734 cm^{-1} .

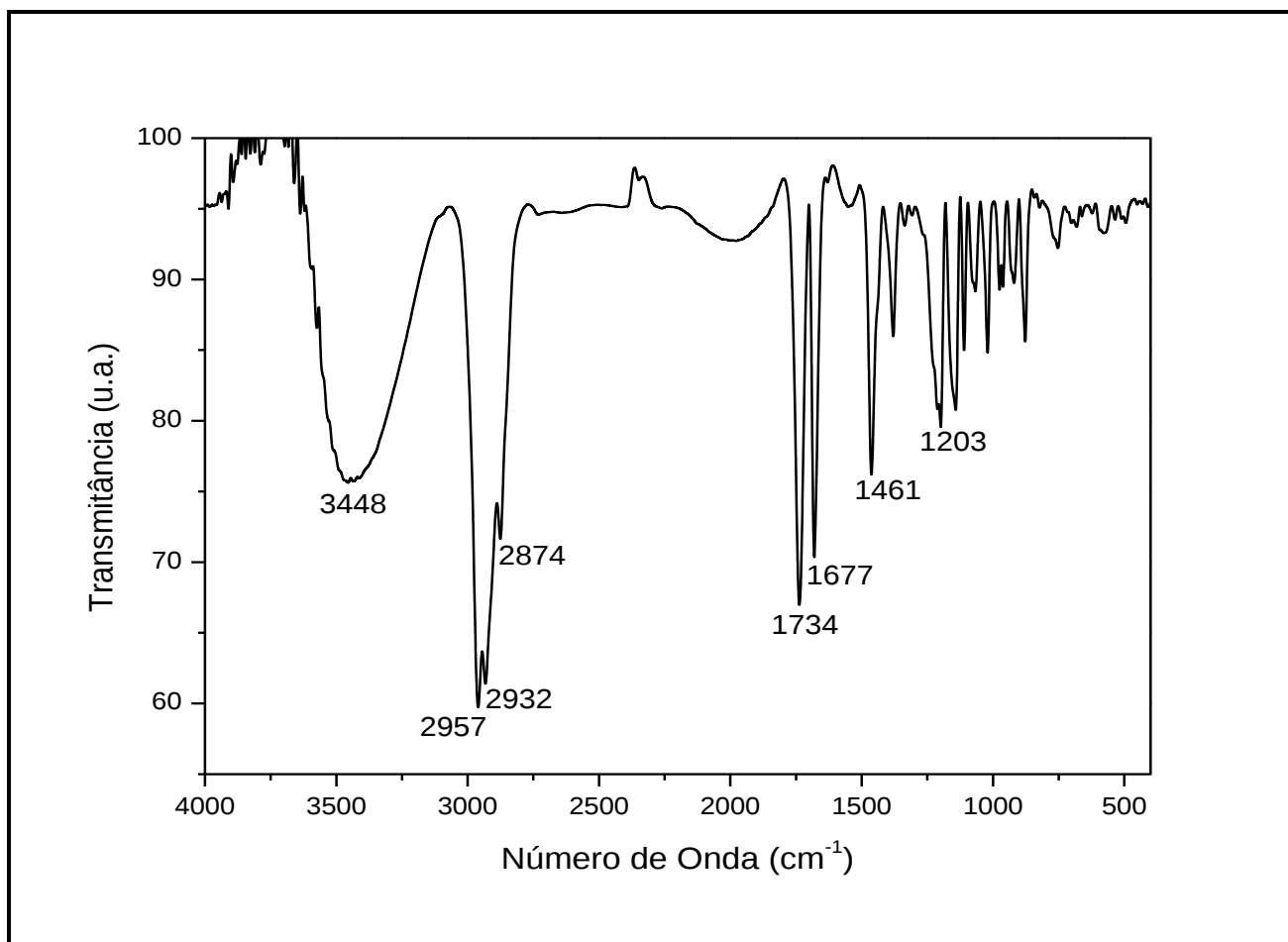


Figura 76 - Espectro de infravermelho da substância **5**

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 77**, pág. 121) apresentou sinais de dois hidrogênios olefínicos e carbinólicos em δ_{H} 5,22_a/5,25_b (sl, δ_{C} 115,4, H-12) e δ_{H} 4,26/4,10 (d; $J = 13,0\text{Hz}$, δ_{C} 63,4, H-13), respectivamente. Também foram visualizados dois singletos em 3,32 (sl, δ_{C} 69,1; H-6) e 5,99 (sl; δ_{C} 126,3; H-9), atribuídos a um hidrogênio carbinólico e olefínico, respectivamente. Por RMN de ^{13}C (**Figura 78**, pág. 122) foi visualizado uma cetona α , β - insaturada (enona) com carbonos em 194,4, 126,3 e 156,6. Estes sinais e suas respectivas multiplicidades nos sugeriram um sesquiterpeno da classe dos eremofilanos.³⁷

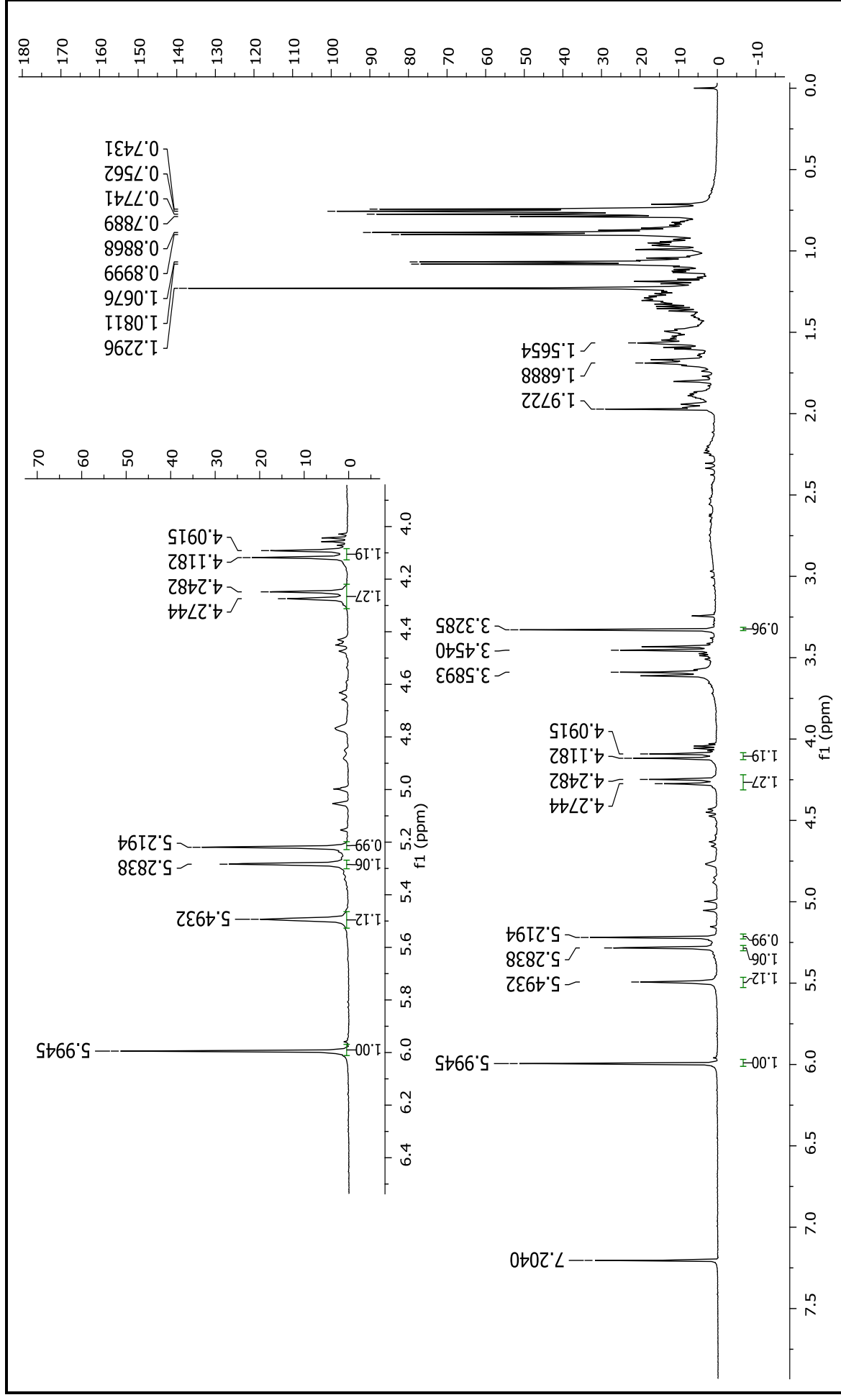
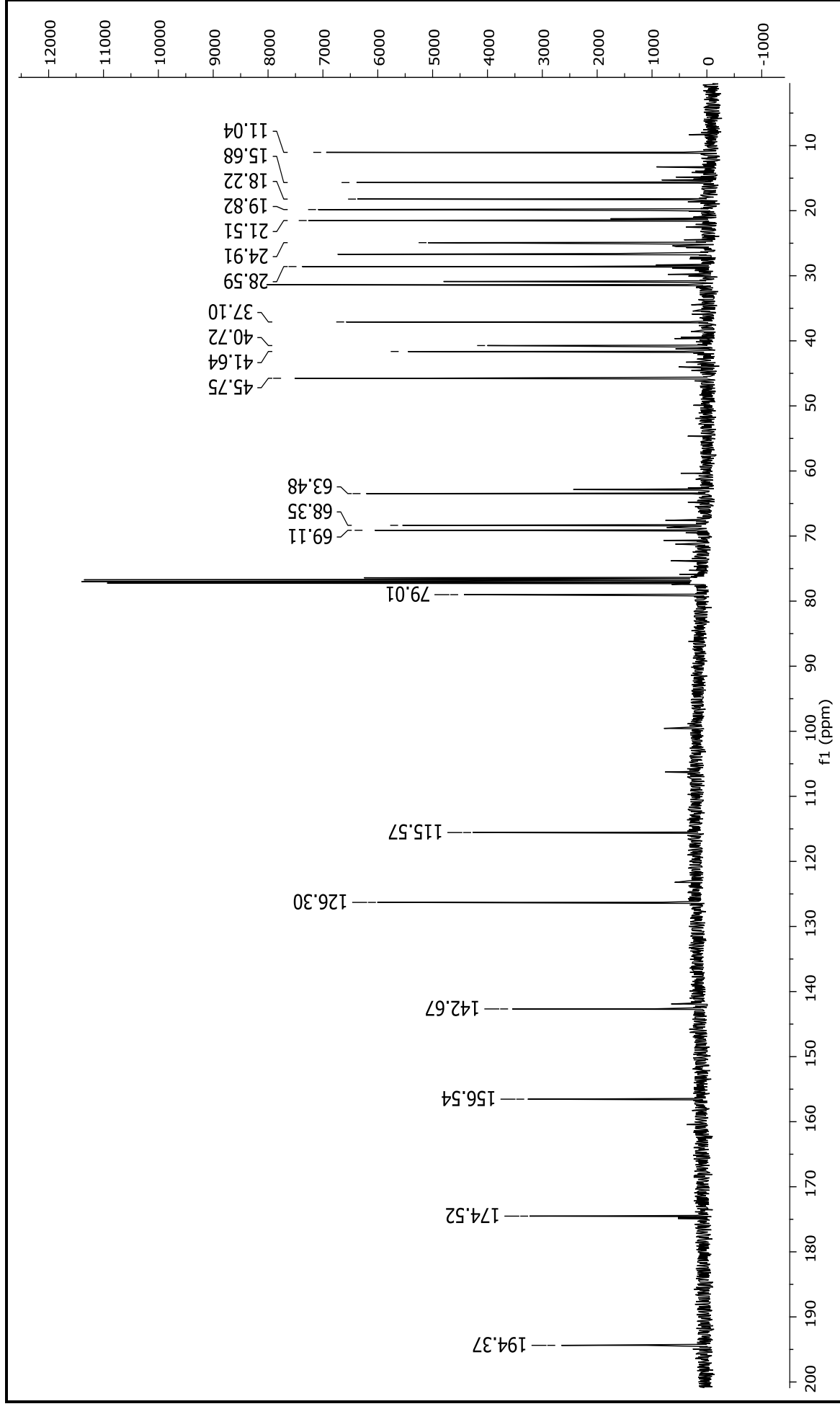


Figura 77 - Espectro de RMN de ¹H da substância **5** (CDCl₃, 500 MHz)



Pelas análises dos experimentos de RMN de ^{13}C (**Figura 78**, pág. 122) e DEPT (**Figura 79**, pág. 123) foi observado à presença de cinco carbonos metílicos, oito metilênicos, seis metínicos e sete quaternários, sendo que o carbono com δ_{C} 174,5 foi atribuído a um éster. Pela análise do experimento de gHMBC (**Figura 80**, pág. 124), as correlações observadas entre H-1' com o carbono em δ_{C} 174,5 nos sugeriram a esterificação de C-1.

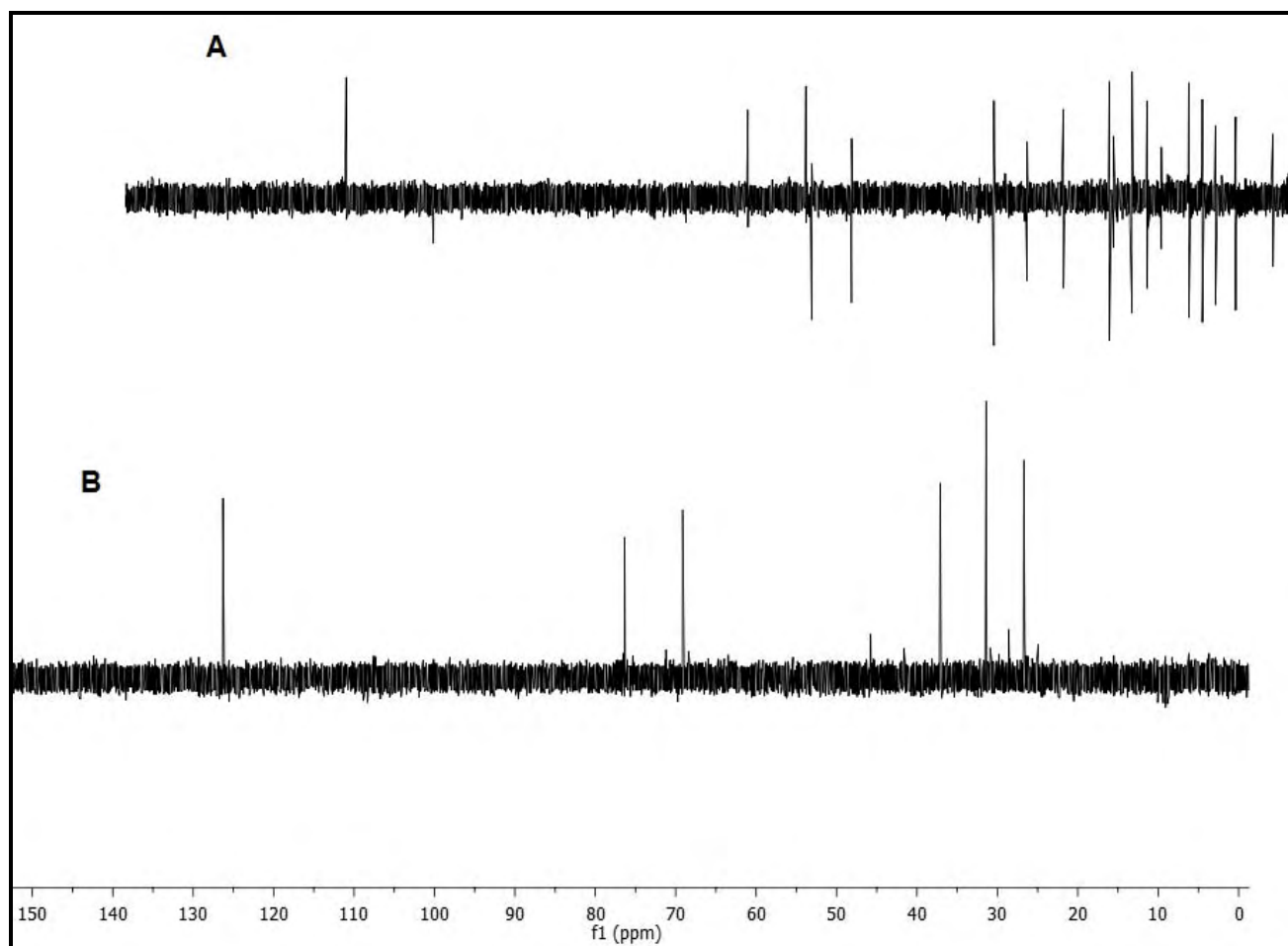


Figura 79 - Espectro de DEPT (A) 135 e (B) 90 da substância **5**

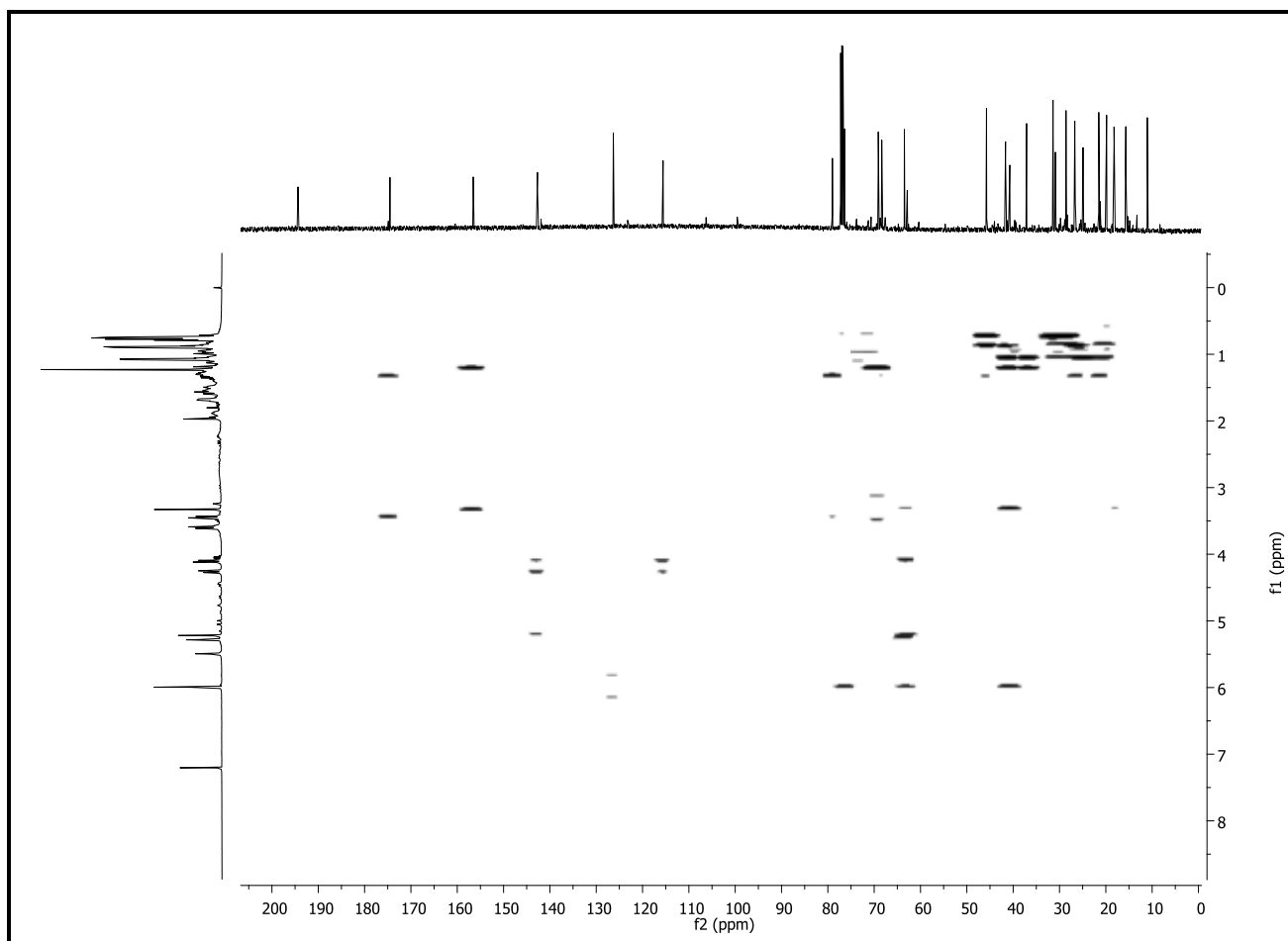


Figura 80 - Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **5** (CDCl₃, 125 MHz)

Pelas análises dos mapas de contorno de **5** foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

Na análise detalhada dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C da substância **5** observou-se a presença de 2 hidrogênios metilênicos na região carbinólica δ_H 3,44/3,60 (d; J = 11,0Hz, δ_C 68,4, H-11') ligado ao carbono δ_C 68,4 por *g*HMQC (**Figura 81**, pág. 125). Adicionalmente estes átomos de hidrogênio mostraram correlação por *g*HMBC (²J) com um carbono em δ_C 79,0 evidenciando a presença de dois carbonos hidroxilados. O carbono em δ_C 79,0 não evidenciou correlação em *g*HMQC assegurando tratar-se de um carbono carbinólico sp³ quaternário.

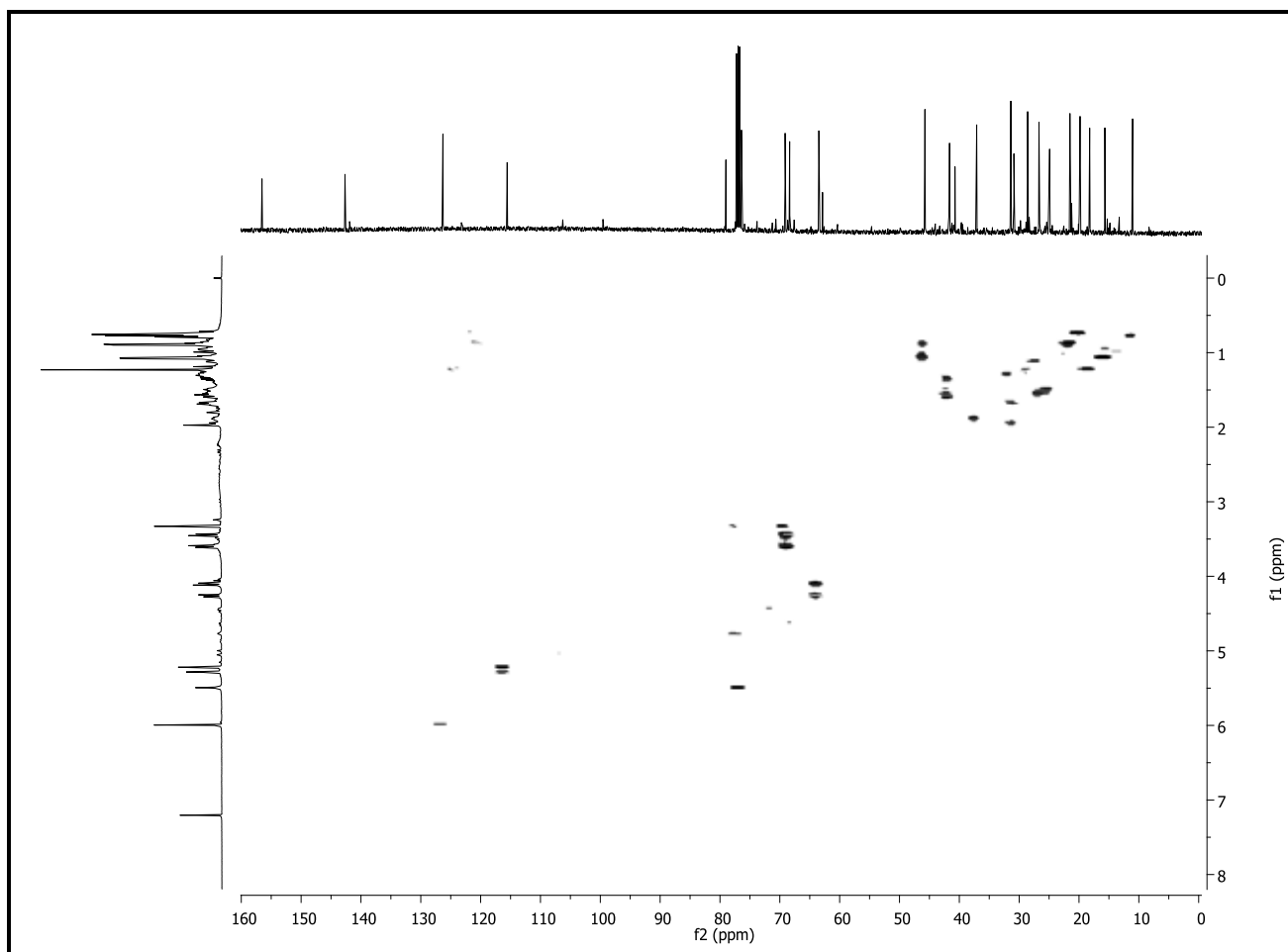


Figura 81 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **5** (CDCl₃, 125 MHz)

Nos experimentos de gHMBC foi possível observar as correlações 2J entre H-11' (H_a 3,44; d, J = 11,0Hz) e (H_b 3,60; d, J = 11,0Hz) com o carbono carbinólico em δ_C 79,0 e 3J com o carbono em δ_C 174,5 característico de função éster, o que permitiu posicionar este grupo.

No espectro de UV em CH₃OH (**Figura 82**, pág. 126) da substância **5** podemos observar um máximo de absorção em 234nm que são característicos de enonas, reforçando a proposta de um sesquiterpeno da classe dos eremofilanos.

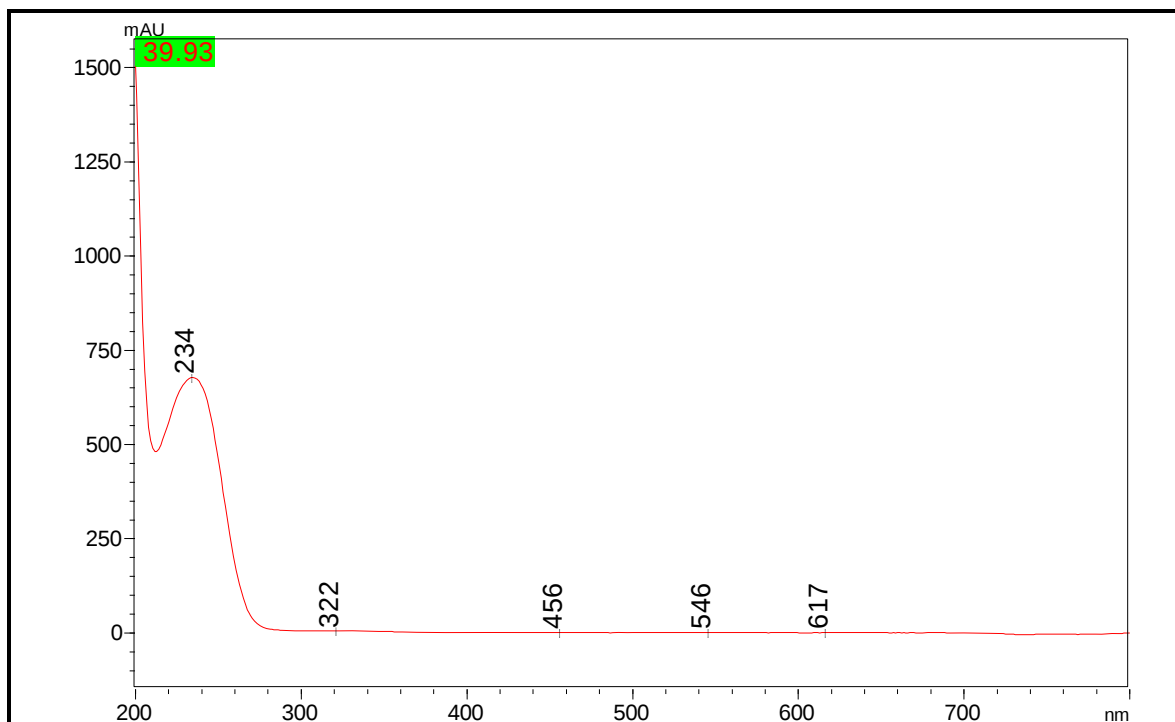


Figura 82 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **5**

A configuração relativa de **5** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY 2D (**Figura 83**, pág. 127), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*. Deste modo a configuração relativa de **5** foi estabelecida como (1R*, 4S*, 5R*, 6R*, 7R*), o que esta de acordo com a configuração relativa estabelecida para outros sesquiterpenos eremofilanos obtidos de fungos³⁷.

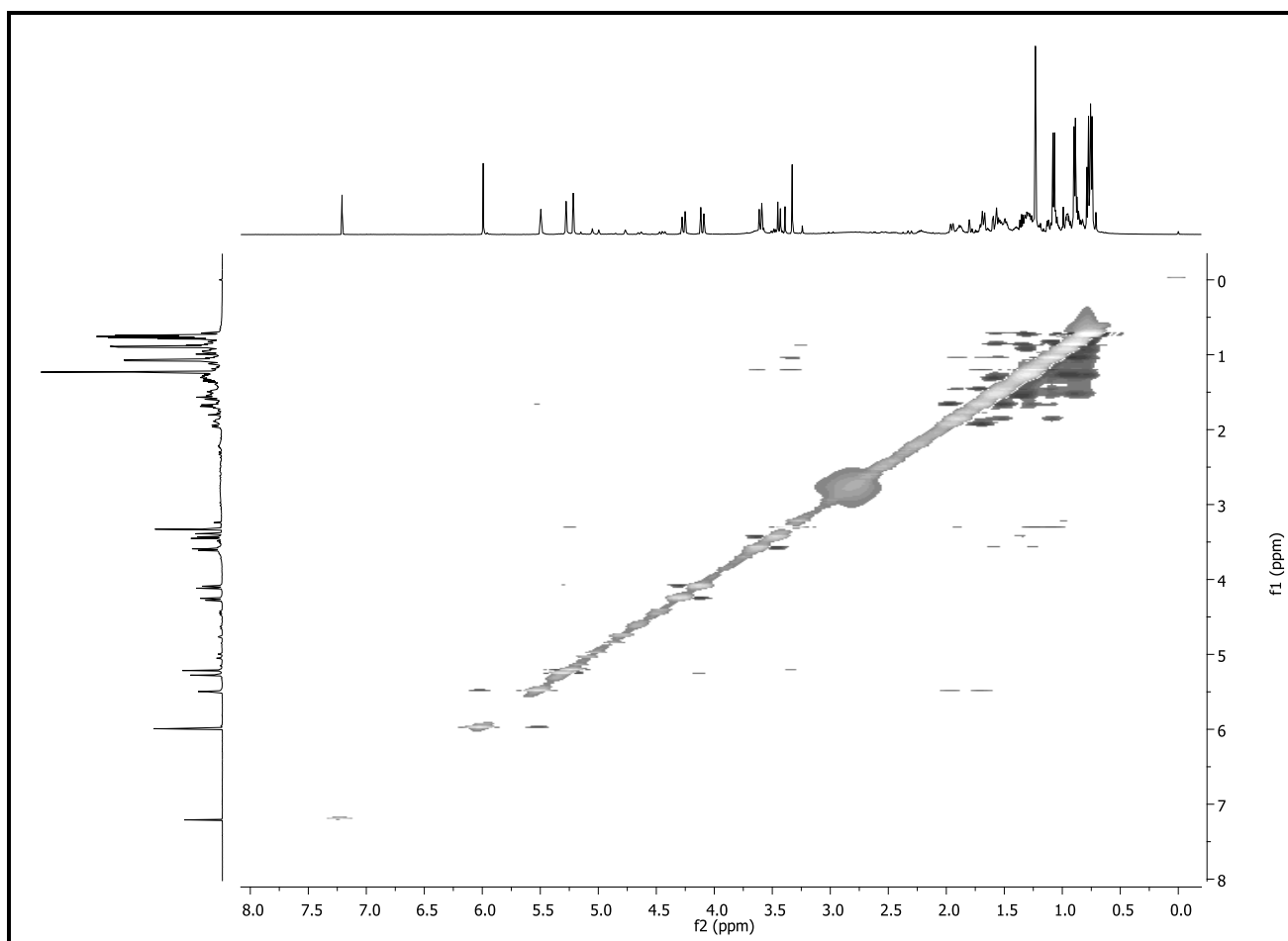


Figura 83 - Espectro de NOESY da substância **5** (CDCl_3 , 500 MHz)

Estas análises aliadas aos dados reportados Oliveira et al., 2009, nos permitiram propor para **5** a Xylarenona D, também descrita por apresentar potente atividade inibitória de protease contra as enzimas subtilisina e pepsina (causadora do vírus HIV).³⁷ Os deslocamentos químicos em comparação com os dados da literatura encontram-se na **Tabela 10** (pág. 128).

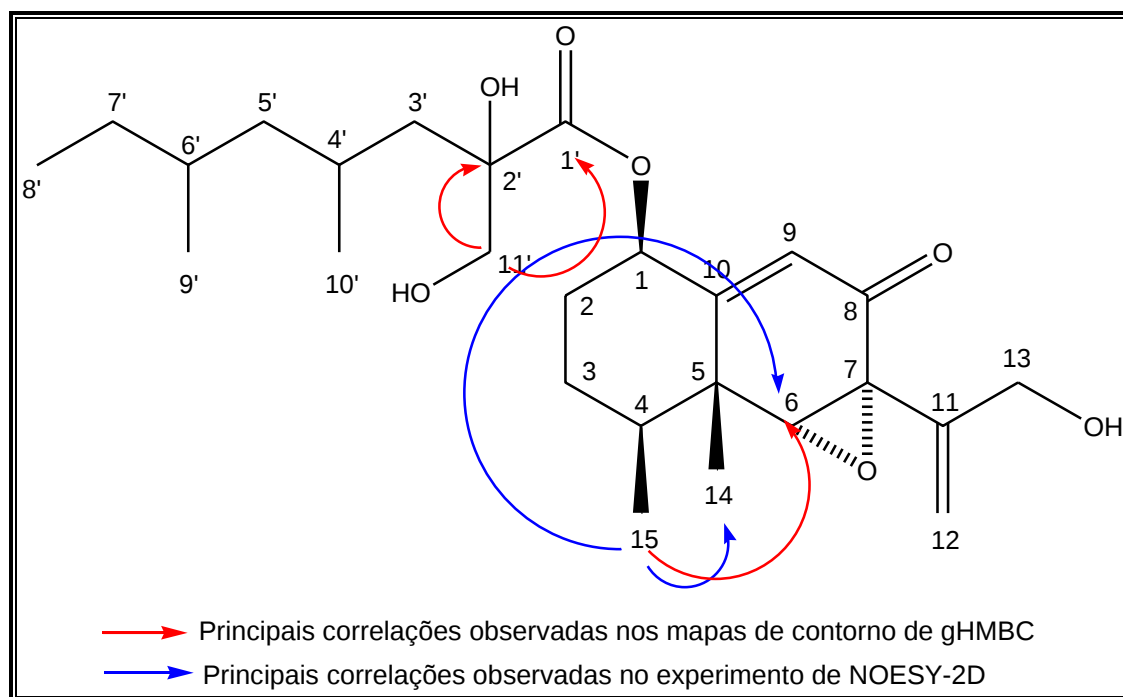
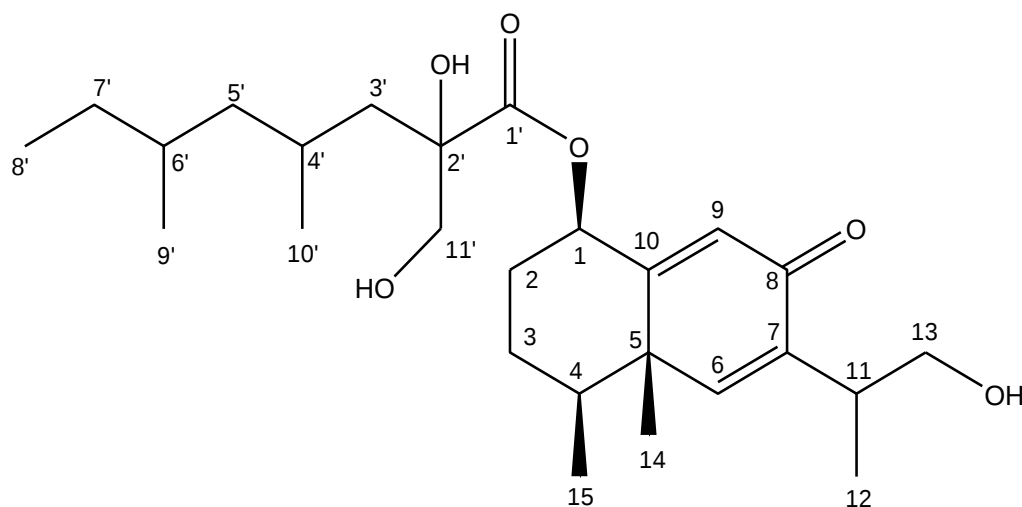


Figura 84 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **5** em CDCl_3^a .

Posição				Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC		^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	5,49 (sl)	76,3	-	14	1,23 (s)	18,2	C-4; C-5; C-6; C-10
2	1,48 (m)	24,9	-	15	1,07 (d; 6,5)	15,7	C-2; C-4; C-5
3	1,67 (m)	30,8	-	1'	-	174,5	-
4	1,88 (m)	37,1	-	2'	-	79,0	-
5	-	40,7	-	3'	1,34 (dd, 11,0) 1,56 (d, 11,0)	41,6	C-2'; C-4'; C-10'; C-11'
6	3,32 (s)	69,1	C-7; C-5; C-10; C-14	4'	1,53 (m)	26,6	-
7	-	62,8	-	5'	0,89 (d; 6,5) 1,07 (d; 6,5)	45,7	C-3'; C-7' C-9'
8	-	194,4	-	6'	1,28 (m)	31,4	-
9	5,99 (s)	126,3	C-1; C-5; C-7	7'	1,23 (s)	28,6	-
10	-	156,6	-	8'	0,77 (t; 7,5)	11,0	C-5'; C-6'; C-7'
11	-	142,7	-	9'	0,77 (t; 7,5)	19,8	C-5'; C-6'; C-7'
12	5,22 _a (s) 5,25 _b (s)	115,4	C-7; C-11 C-13	10'	0,89 (d; 6,5)	21,5	C-3'; C-5'
13	4,10 (d; 13,0) 4,26 (d; 13,0)	63,4	C-7; C-11; C-12	11'	3,44 (d; 11,0) 3,60 (d; 11,0)	68,4	C-1'; C-2'

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

4.4.1.6. Determinação Estrutural da Substância **6****Figura 85** - Estrutura da Substância **6** (Xylarenona F)

A substância **6** (**Figura 85**, pág. 129) foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]_D^{24} + 1,5$ (c 0,1, CH₃OH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* (EM-ESI-QTOF) onde foi visualizado o sinal de m/z 451,3054 referente à molécula protonada $[M+H]^+$ (**Figura 86**, pág. 130). A massa para $[M+H]^+$ foi calculada em 451,3054 o que com o auxílio dos espectros de RMN de ¹³C permitiu confirmar a fórmula molecular C₂₆H₄₂O₆.

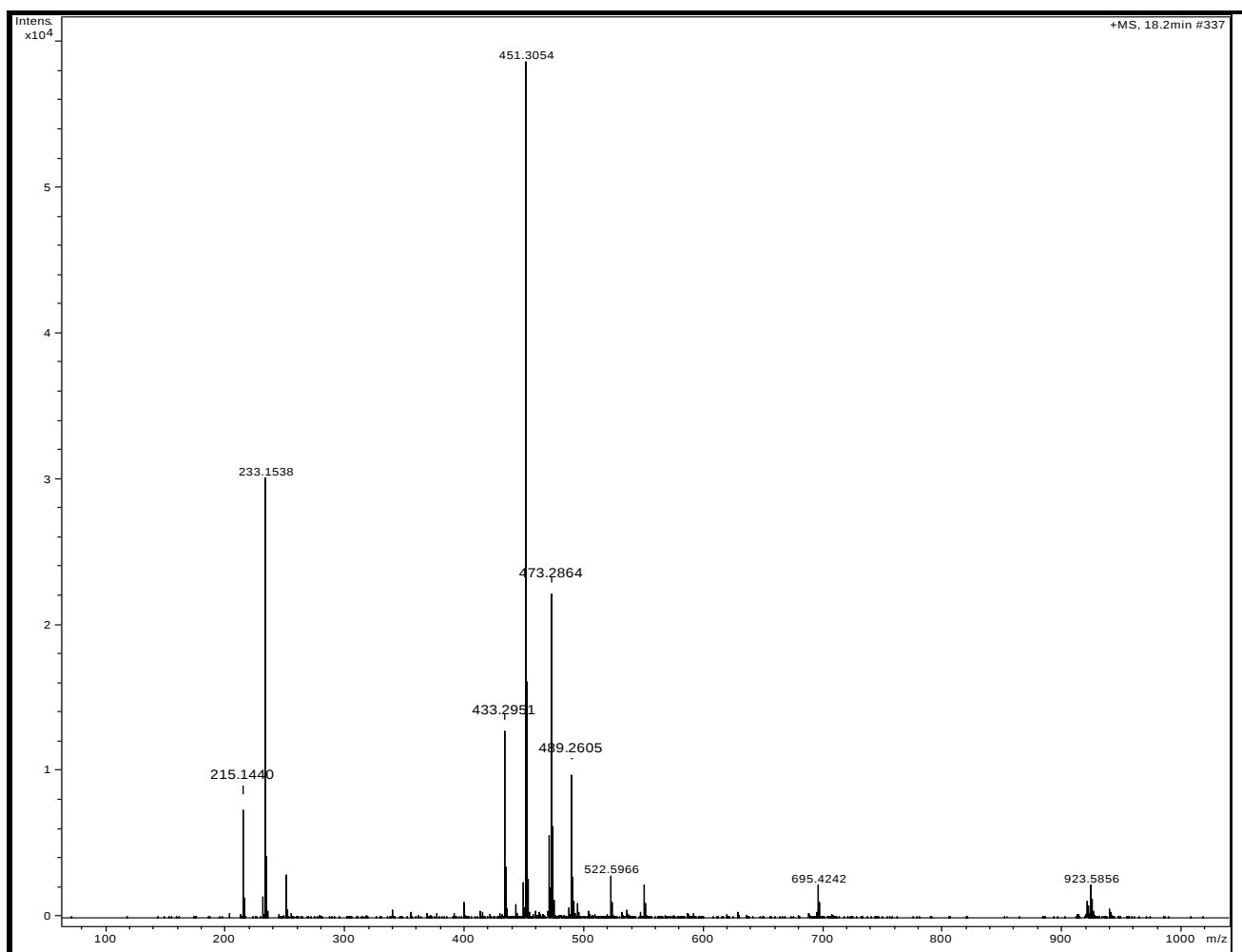


Figura 86 - Espectro de massas da substância **6** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 87**, pág. 131) exibiu uma banda larga em 3464 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada à cetona α, β – insaturada em 1618 cm^{-1} e outra associada a um éster alifático em 1734 cm^{-1} .

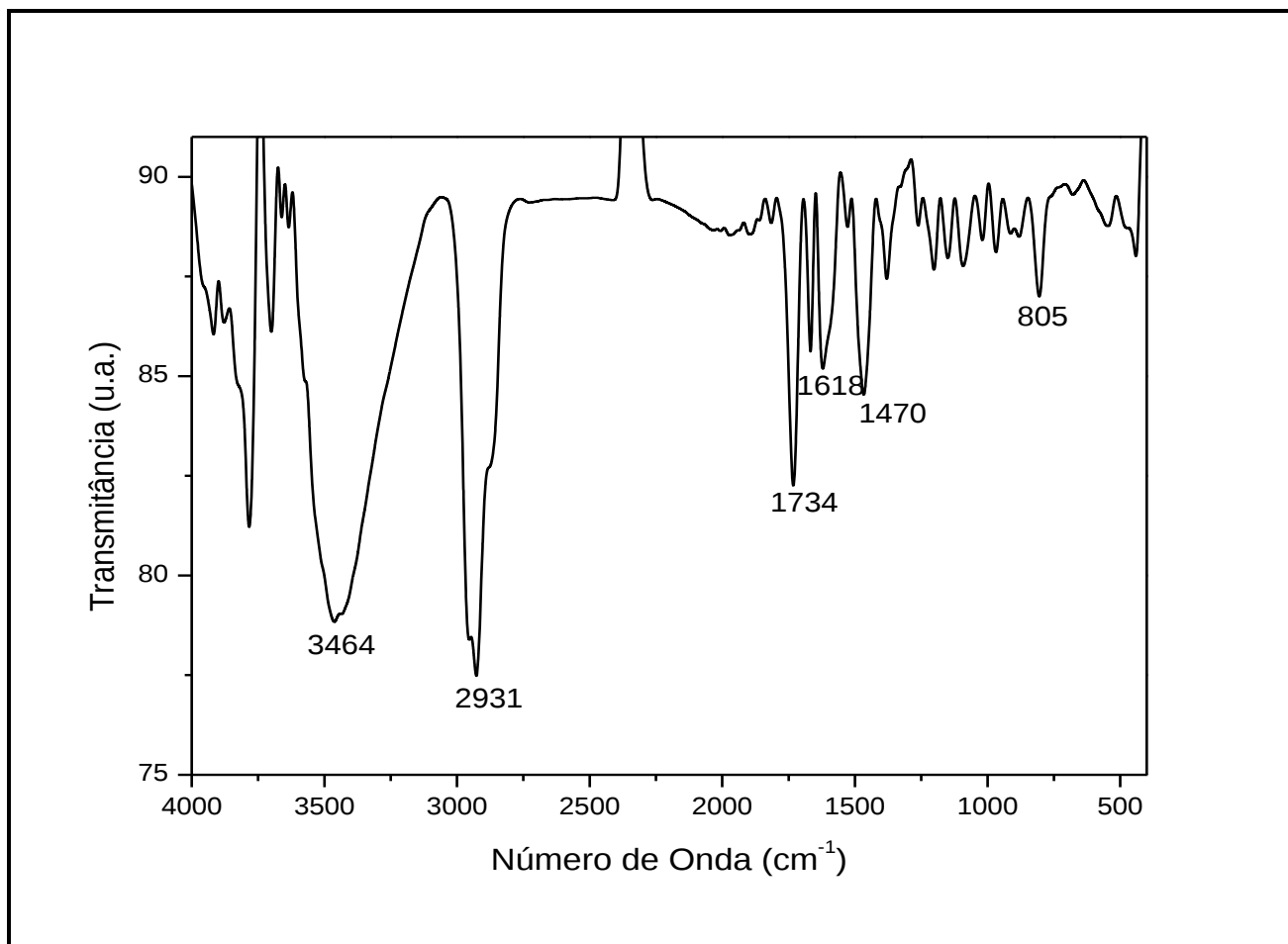


Figura 87 - Espectro de infravermelho da substância **6**

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 88**, pág. 132) apresentou sinais de dois hidrogênios olefínicos em δ_H 6,29 (s, δ_C 129,1; C-9) e δ_H 6,75 (s, δ_C 151,8; C-6), além de seis metilas em δ_H 0,76 (t, 7,0 Hz; δ_C 18,1); 0,79 (d, 7,0 Hz; δ_C 11,1); 0,90 (d, 6,5 Hz; 21,6); 1,06 (d, 7,5 Hz, δ_C 15,6); 1,07 (d, 7,0 Hz, δ_C 16,1); 1,20 (s, δ_C 19,8). Também foi observada por RMN de ¹H (**Figura 88**, pág. 132) e ¹³C (**Figura 89**, pág. 133) uma cetona α , β , α' , β' insaturada com carbonos em δ_C 186,7; 129,1 (s, 1H δ_H , 6,29), 158,9, 139,1 e 151,8 (s, 1H, δ_H 6,75).

Os deslocamentos químicos encontram-se na **Tabela 11** (pág. 138).

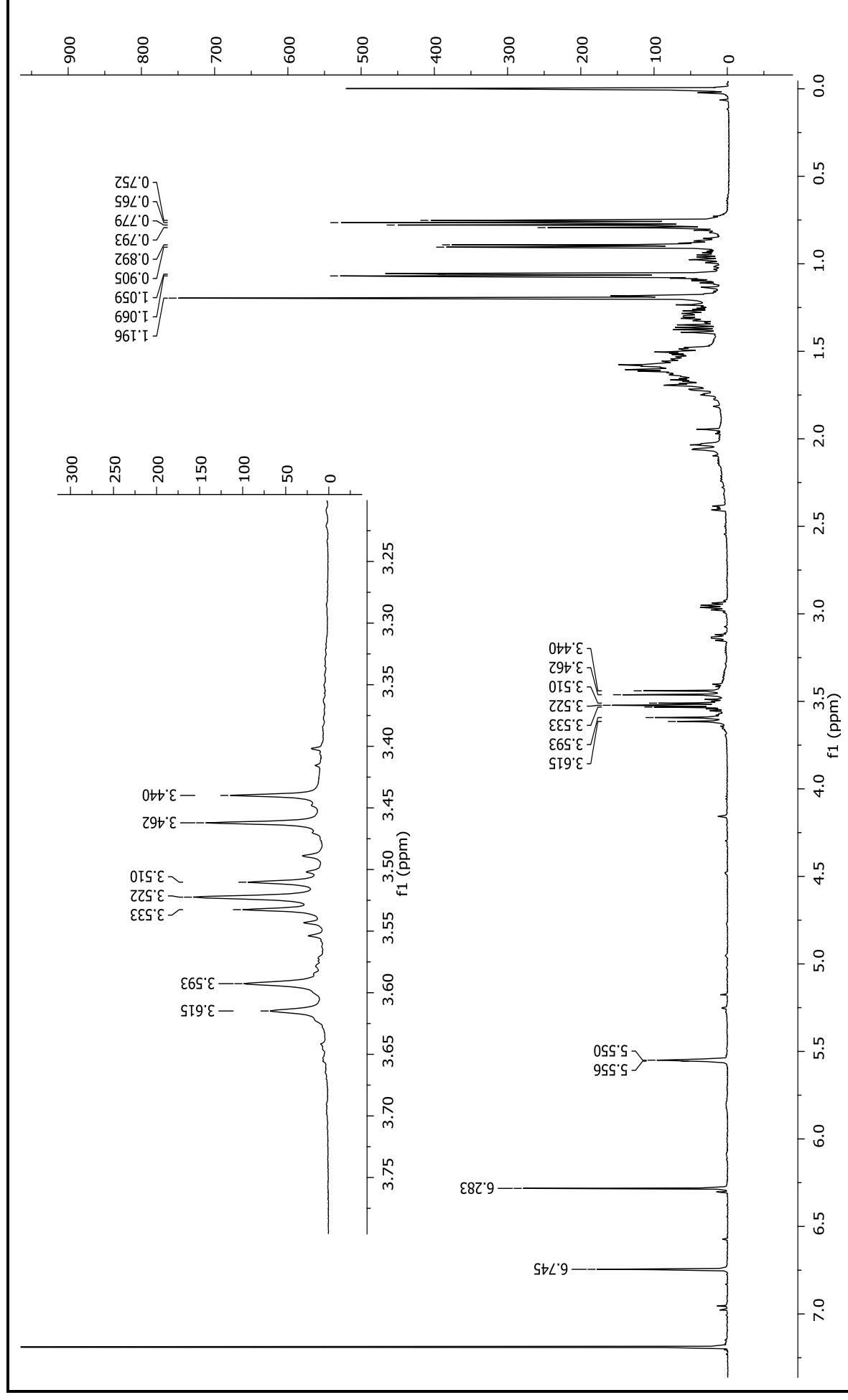


Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H da substância **6** (CDCl₃, 500 MHz)

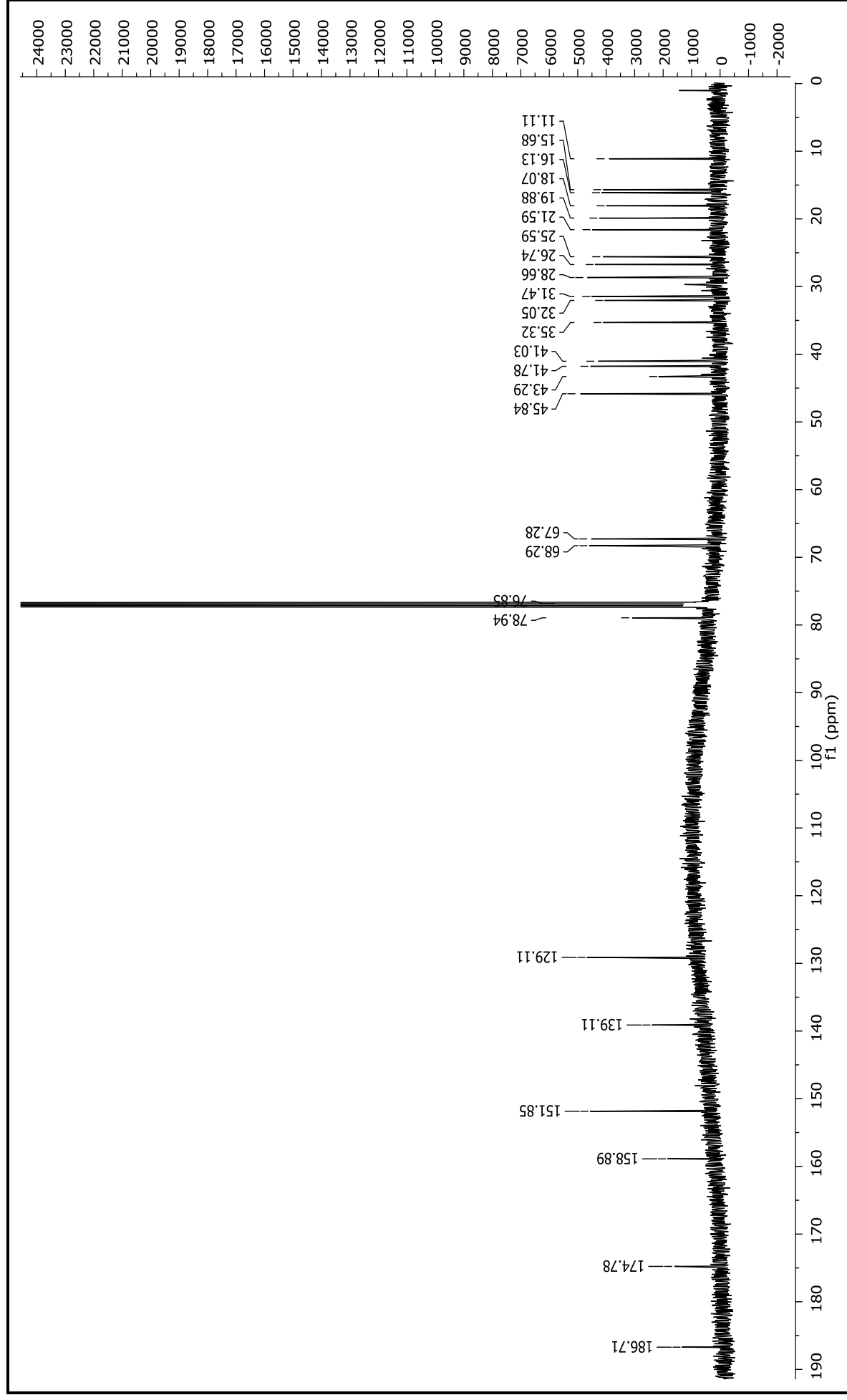


Figura 89 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6** (CDCl_3 , 500 MHz)

Pelas análises dos mapas de contorno de *g*HMQC (**Figura 90**, pág. 134) de **6** foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

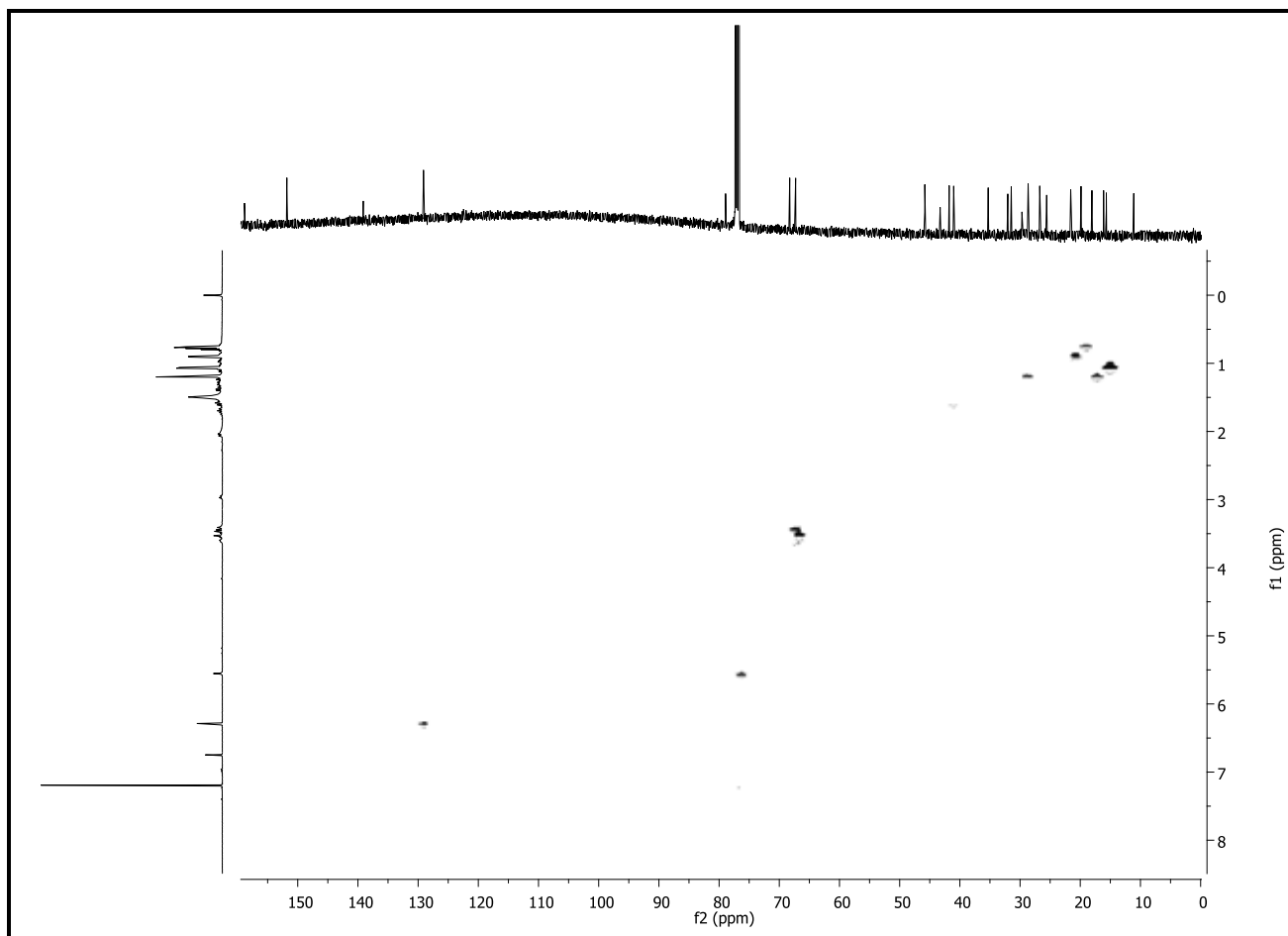


Figura 90 - Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **6** (CDCl₃, 125 MHz)

A análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** e comparação com **5** evidenciou semelhança entre as duas substâncias, sendo que a principal diferença observada foi à ausência do epóxido entre C-6/C-7 e da ligação dupla terminal em C-11/C-12. Adicionalmente, foi observada a presença de uma metila se desdobrando como um dubleto e de uma cetona α , β , α' , β' -insaturada.

No espectro de UV em CH₃OH (**Figura 91**, pág. 135) da substância **6** observou-se um máximo de absorção em 240nm que são característicos de cetonas α , β , α' , β' - insaturadas, corroborando com os dados visualizados em RMN de ^1H e ^{13}C .

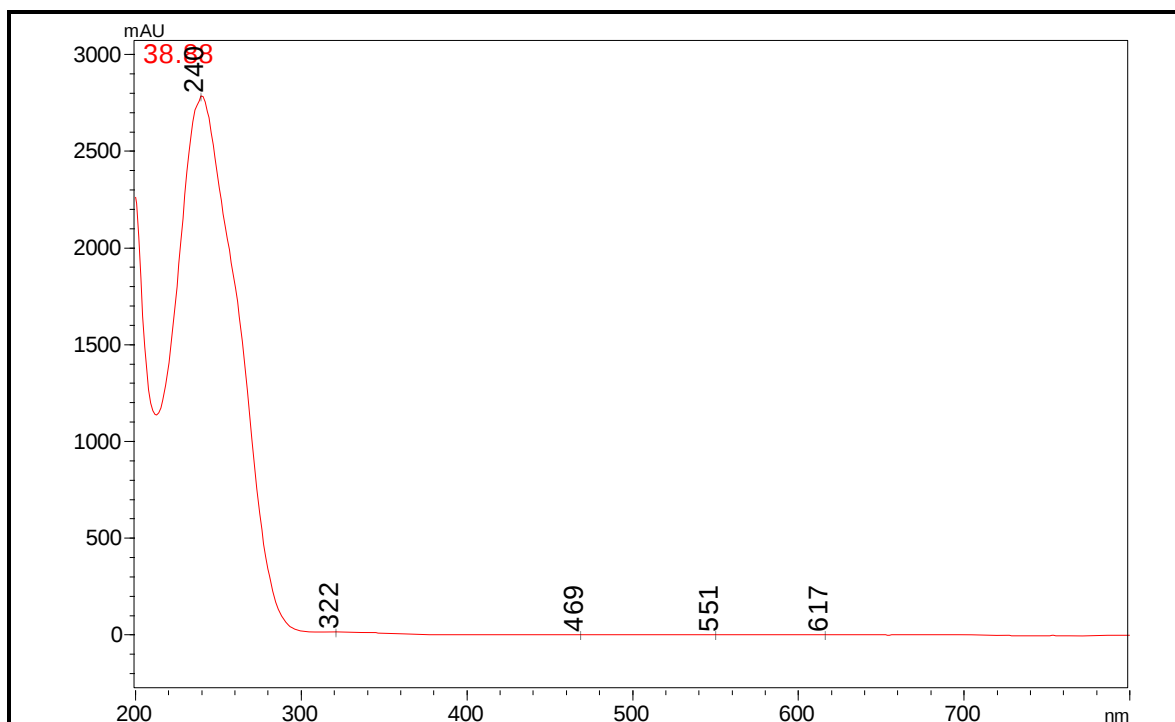


Figura 91 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **6**

A configuração relativa de **6** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY 2D (**Figura 92**, pág. 136), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis* e comparação com os dados reportados para a substância **5**. Deste modo a configuração relativa de **6** foi estabelecida como (1R*, 4S*, 5S*), o que esta de acordo com a configuração relativa estabelecida para outros sesquiterpenos eremofilanos obtidos de fungos³⁷.

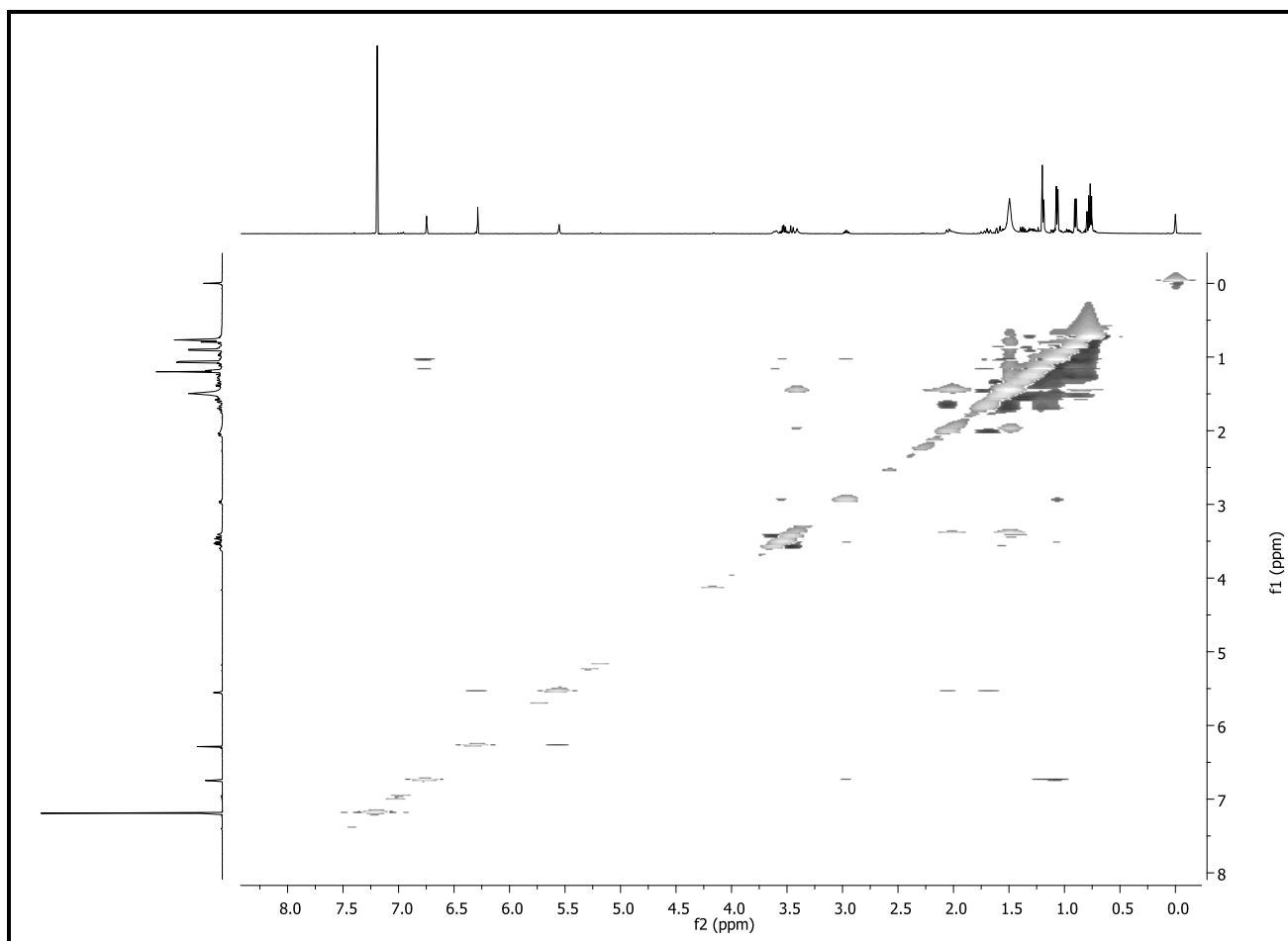


Figura 92 - Espectro de NOESY da substância **6** (CDCl₃, 500 MHz)

Estas observações associadas à massa molecular e as correlações observadas em *g*HMBC (**Figura 93**, pág. 137) nos permitiram propor a estrutura da substância **6**, como um novo sesquiterpeno eremofilano denominado Xylarenona F.

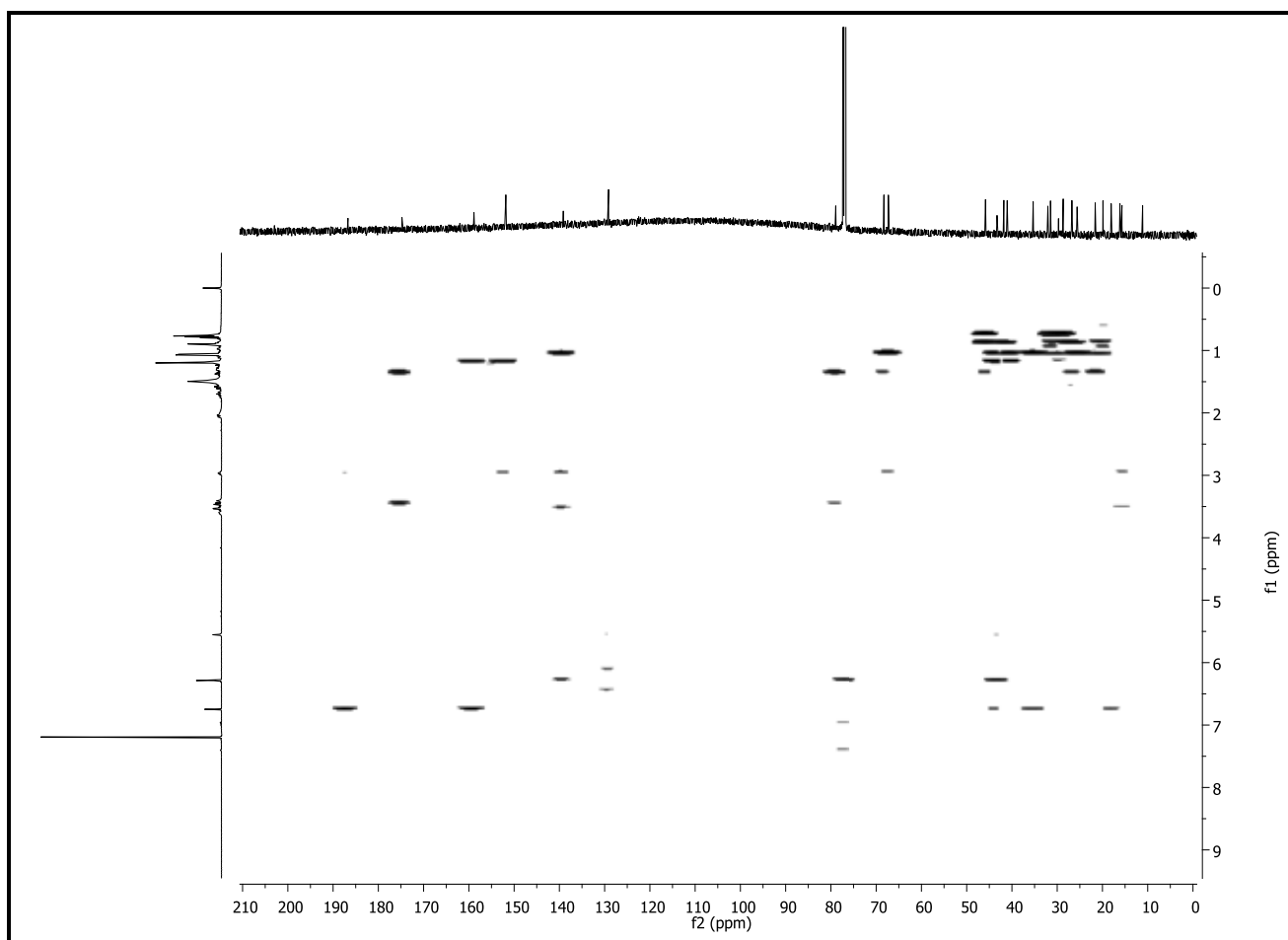


Figura 93 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **6** (CDCl₃, 125 MHz)

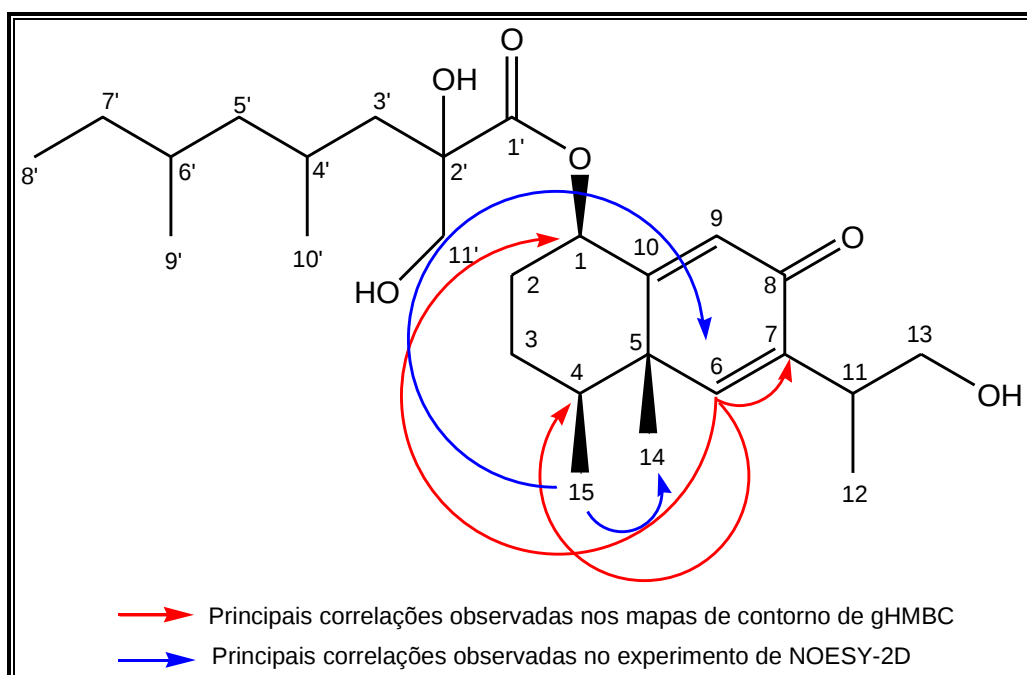


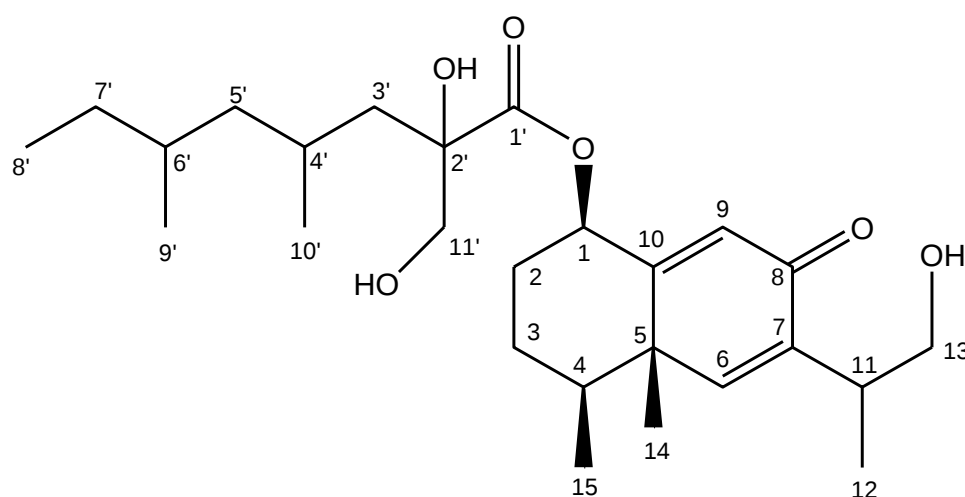
Figura 94 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC para a substância **6**

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **6** em CDCl_3^{a} .

Posição			Posição		
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC		
1	5,55 (s)	76,8		14	1,19 (s)
2	N Ob	31,4		15	1,06 (d; 7,5)
3	1,50 (m)	25,5		1'	-
4	2,96 (m)	35,2	C-6; C-15	2'	-
5	N Ob	43,2		3'	1,40 (m)
6	6,75 (s)	151,8	C-4; C-8; C-10	4'	1,62 (m)
7	-	139,1		5'	1,56 (m)
8	-	186,7		6'	0,83 (m)
9	6,28 (s)	129,1	C-1; C-5; C-7	7'	1,38 (m)
10	-	158,8		8'	2,05 (m)
11	1,51 (m)	41,0	C-6; C-7	9'	1,23 (s)
12	1,07 (d; 7,0))	16,1	C-13	10'	0,76 (t; 7,0)
13	3,52 (dd; 6,0)	67,2		11'	0,76 (t; 7,0)
					0,90 (d; 6,5)
					3,45 (d 11,0)
					3,60 (d; 11,0)

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

4.4.1.7 Determinação Estrutural da Substância **7**

**Figura 95** - Estrutura da Substância **7** (Xylarenona G)

A substância **7** (**Figura 95**, pág. 138) foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]_{\text{D}}^{18} +35,3$ (c 0,1, CH_3OH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* (EM-ESI-QTOF)

onde foi visualizado o sinal de m/z 451,3062 referente à molécula protonada $[M+H]^+$ (**Figura 96**, pág. 139). A massa para $[M+H]^+$ foi calculada em 451,3054 o que com o auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C permitiu confirmar a fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_6$.

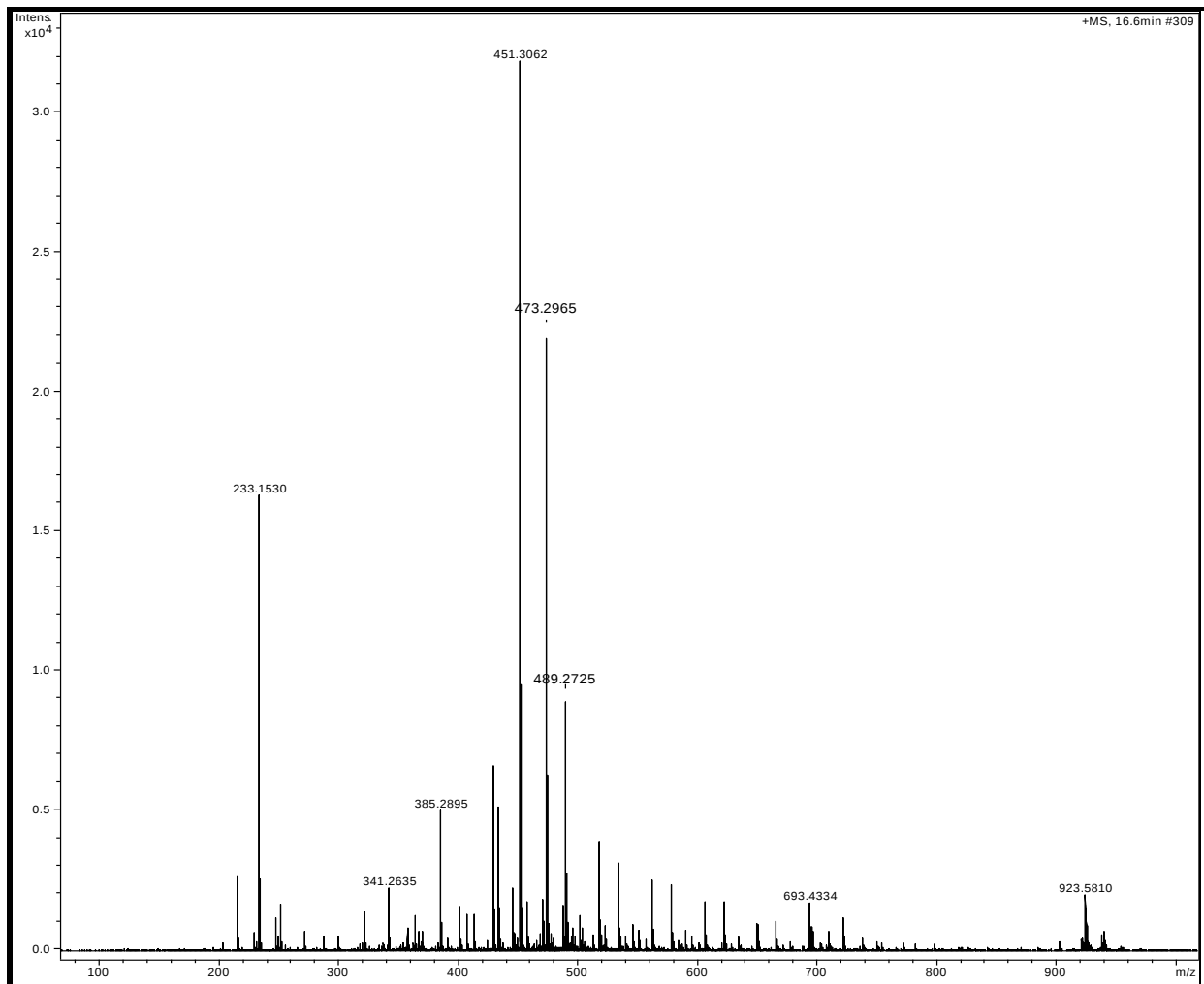


Figura 96 - Espectro de massas da substância **7** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 97**, pág. 140) exibiu uma banda larga em 3427 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada à cetona α , β – insaturada em 1662 cm^{-1} e outra associada a um éster alifático em 1736 cm^{-1} .

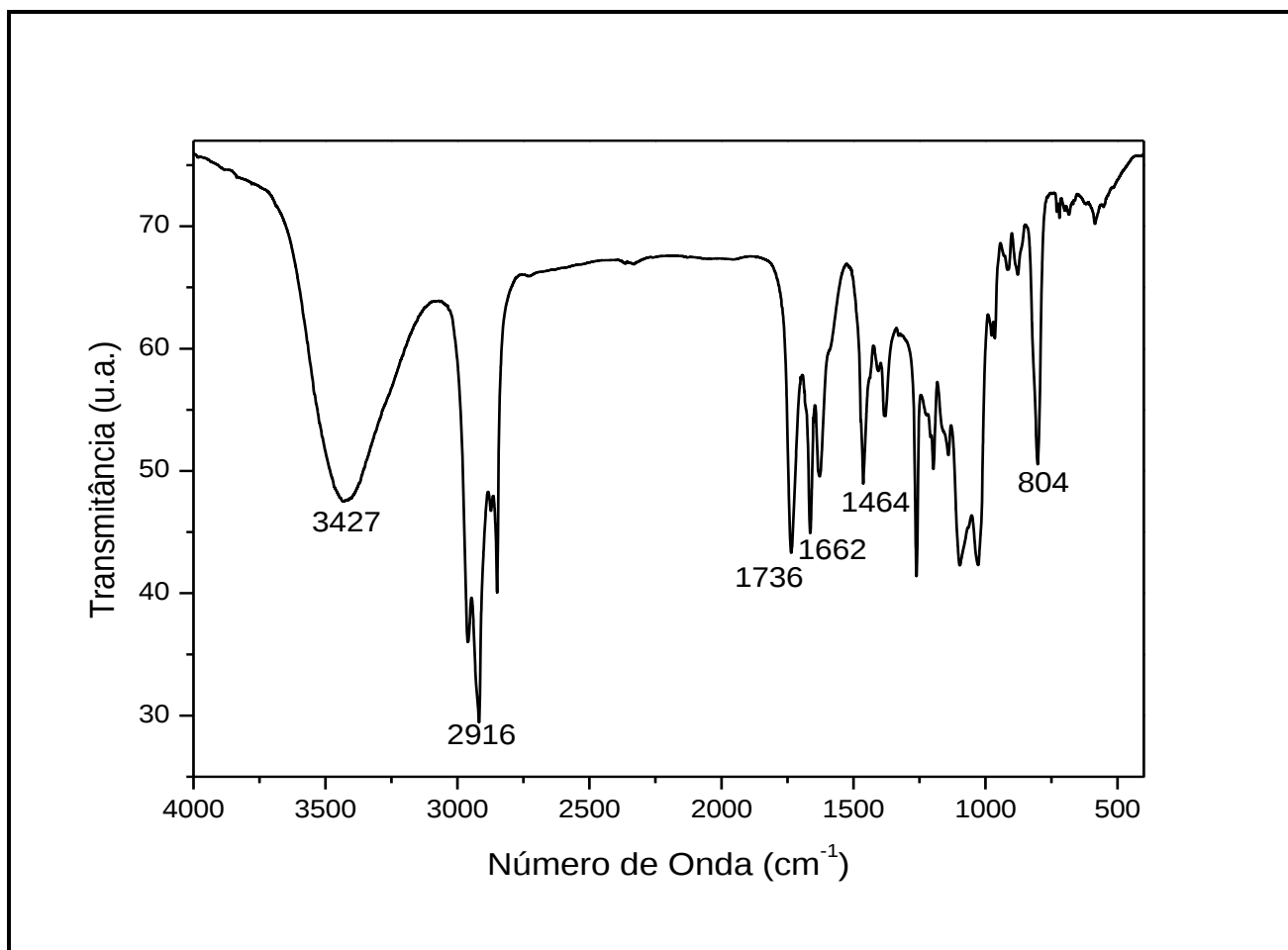


Figura 97 - Espectro de infravermelho da substância **7**

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 98**, pág. 141) apresentou sinais de dois hidrogênios olefínicos em δ_H 6,28 (s, δ_C 129,3; C-9) e δ_H 6,77 (s, δ_C 152,2; C-6), além de seis metilas em δ_H 0,79 (d 5,0 Hz, δ_C 20,1); 0,77 (t, δ_C 11,3); 0,89 (d, 6,0 Hz δ_C 21,8); 1,06 (d, 7,0 Hz, δ_C 15,9); 1,07 (d, 6,5 Hz, δ_C 16,3); 1,18 (s, δ_C 18,2). Também foi observada por RMN de ¹H (**Figura 98**, pág. 141) e ¹³C (**Figura 99**, pág. 142) uma cetona α , β , α' , β' - insaturada com carbonos em δ_C 186,9; 129,3 (s, 1H δ_H , 6,28), 159,1; 139,3 e 152,2 (s, 1H, δ_H 6,77).

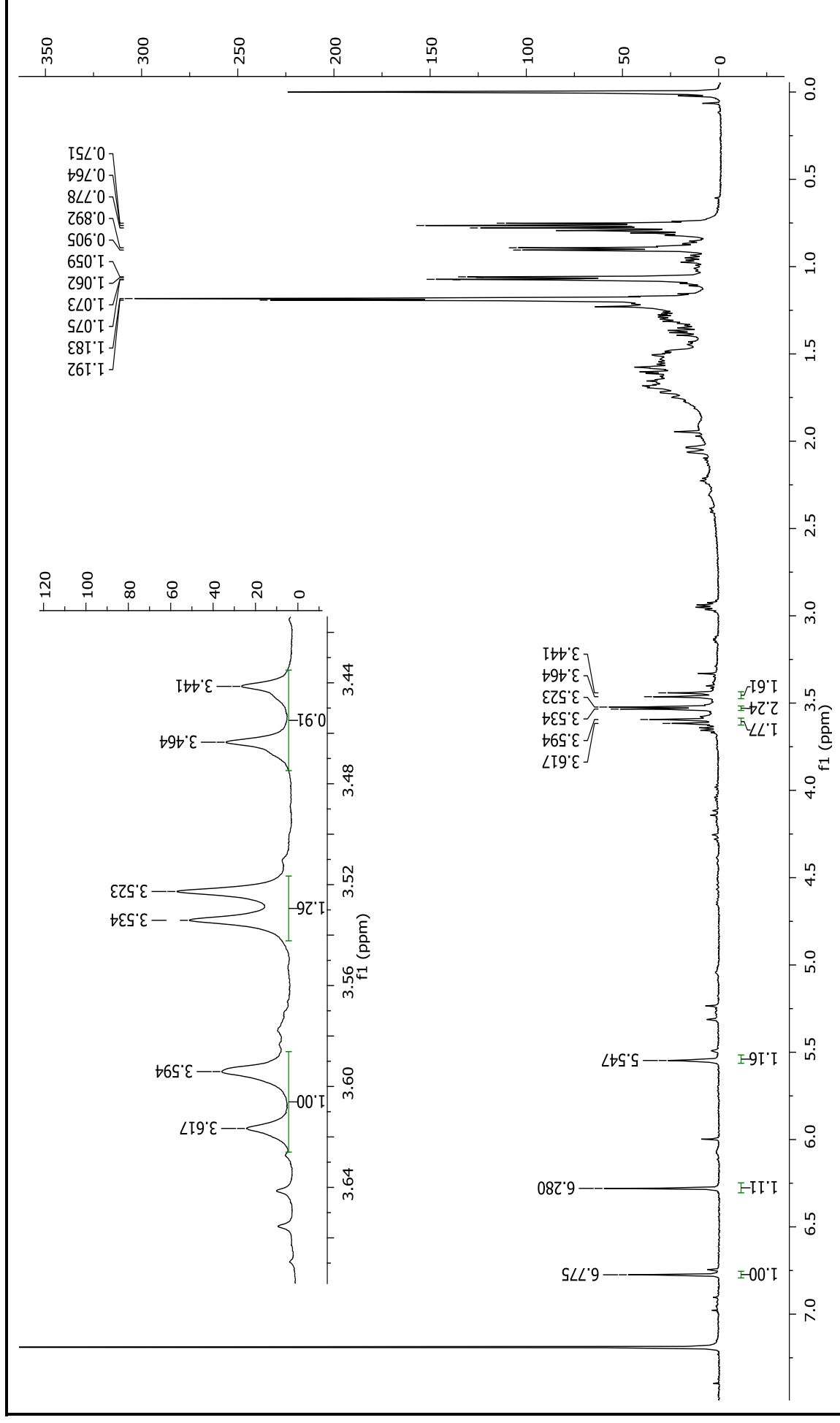


Figura 98 - Espectro de RMN de ¹H da substância **Z** (CDCl₃, 500 MHz)

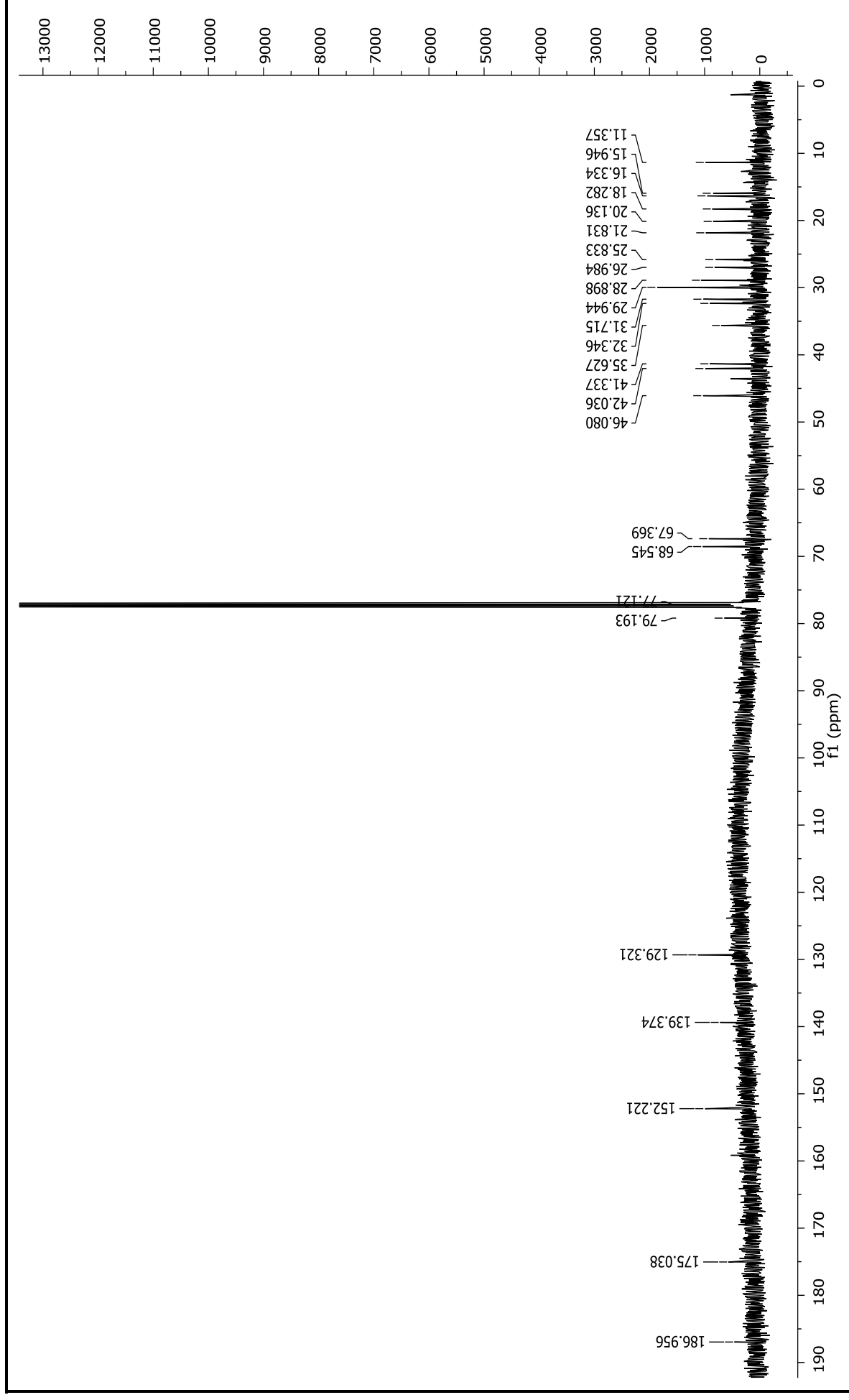


Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Z** (CDCl_3 , 500 MHz)

Pelas análises dos mapas de contorno de *g*HMQC (**Figura 100**, pág. 143) de **7** foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono.

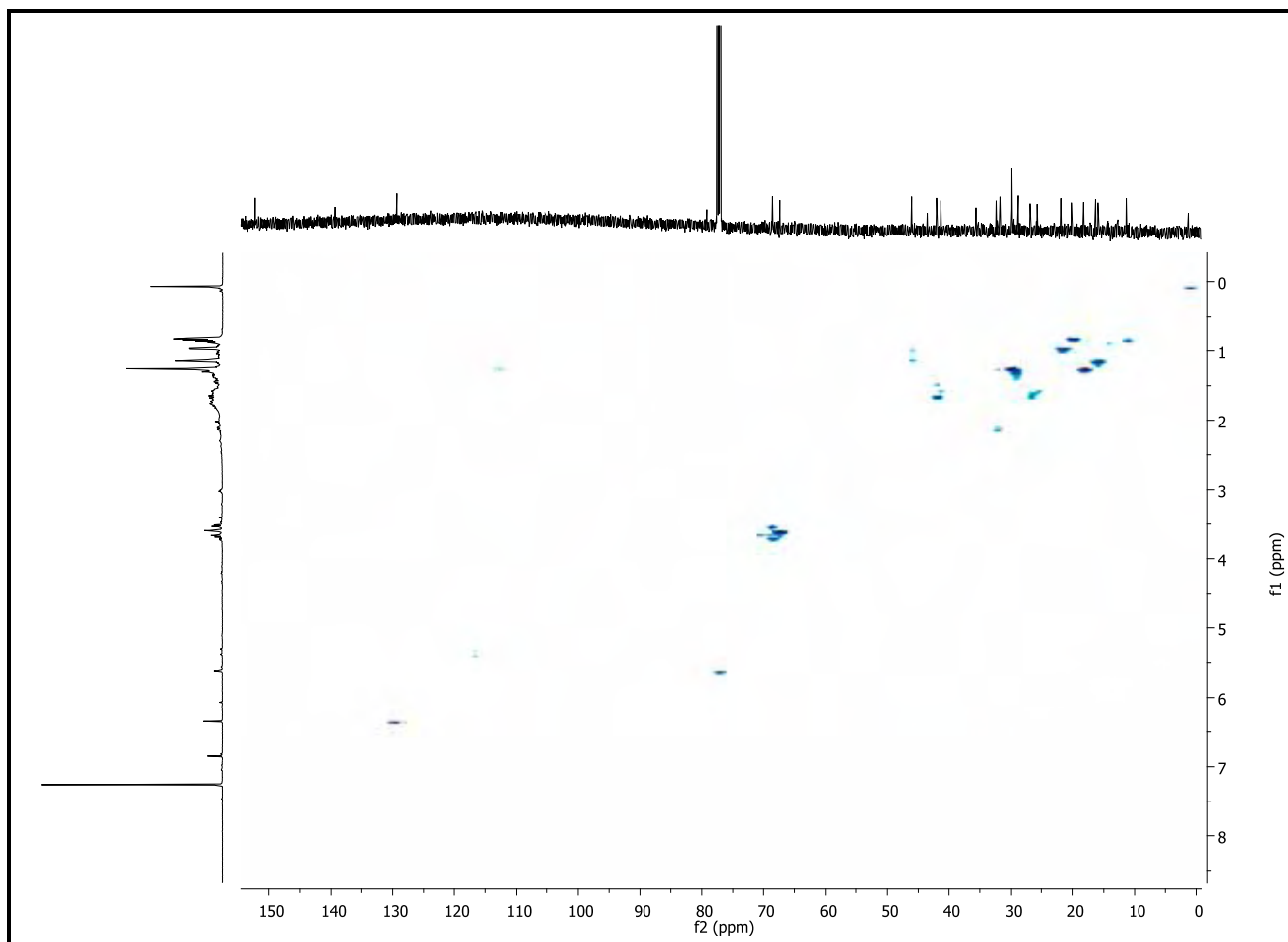


Figura 100 - Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **7** (CDCl₃, 125 MHz)

No espectro de UV em CH₃OH da substância **7** (**Figura 101**, pág. 144), podemos observar um máximo de absorção em 246nm que são característicos de cetonas α , β , α' , β' - insaturadas.

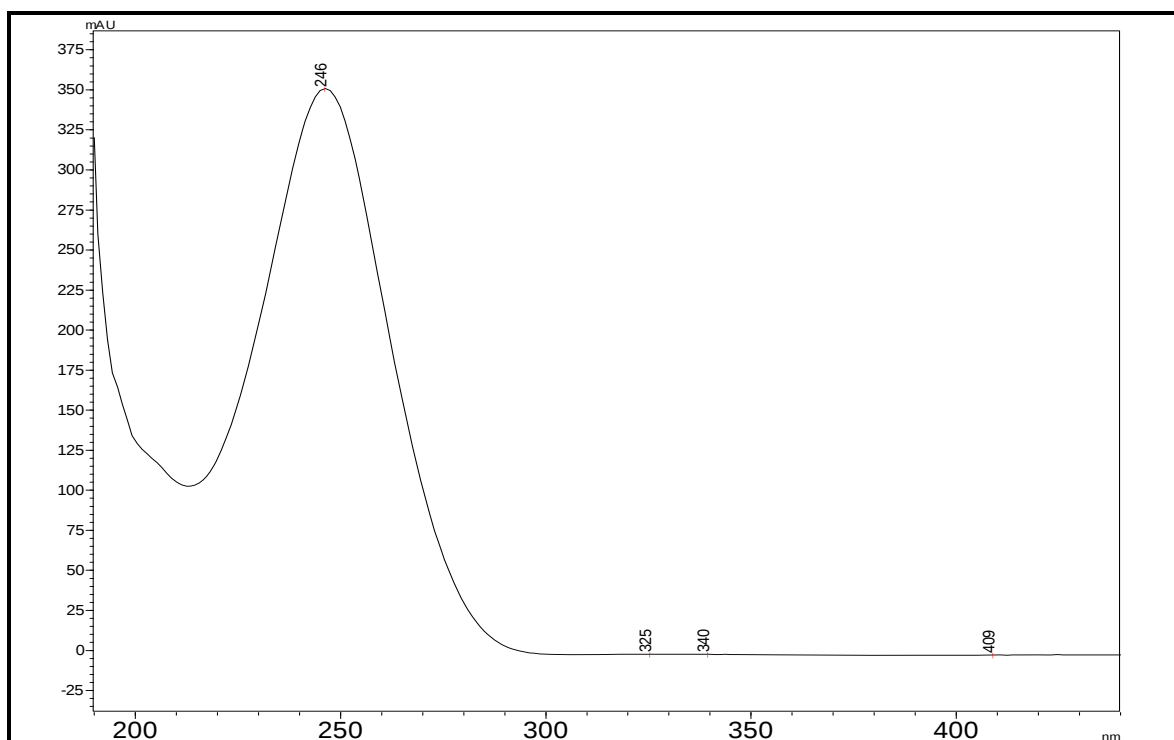


Figura 101 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **7**

A análise detalhada e cuidadosa dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMQC e gHMBC (**Figura 102**, pág. 145) de **7** e comparação com **6** evidenciou semelhança entre as duas substâncias.

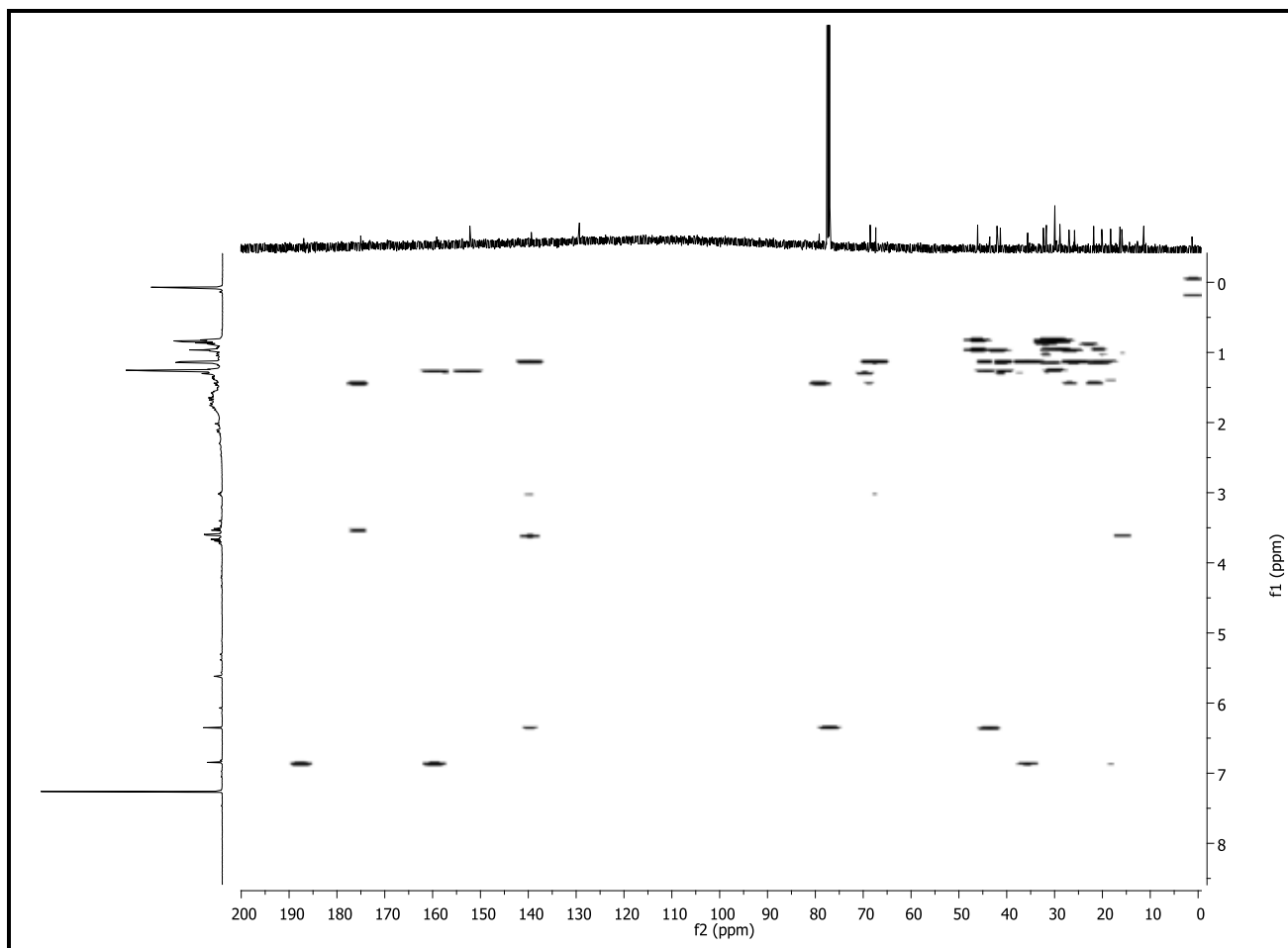


Figura 102 - Mapa de contorno de gHMBC da substância **7** (DMSO-d₆, 125 MHz)

A única diferença observada entre as substâncias **6** e **7** foi a multiplicidade dos hidrogênios H-13. Na substância **6**, H-13 apresentou-se na forma de um duplo dubleto (tripleto aparente) e em **7** como um dubleto. Esta multiplicidade sugere que a estereoquímica de C-11 é diferente nas duas substâncias, sendo uma R e a outra S.

Objetivando a confirmação desta suposição, as substâncias **6** e **7** foram submetidas a CLAE_{anal} utilizando uma coluna de sílica de fase reversa C18 e como eluente CH₃CN/H₂O. As substâncias **6** e **7** apresentaram tr distintos (**Figura 104**, pág. 146) o que foi confirmado com a co-injeção (**Figura 103**, pág. 146).

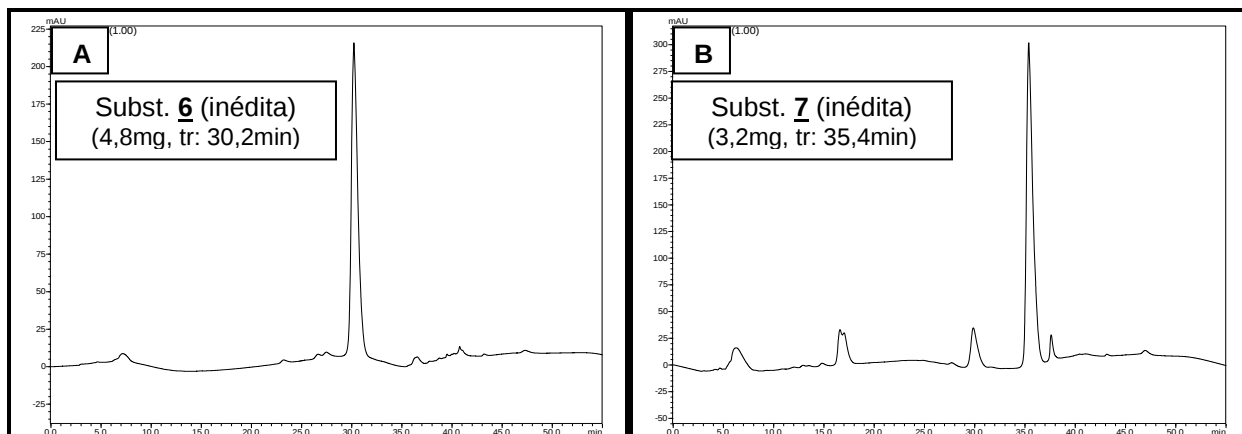


Figura 103 - Cromatograma analítico (A) substância 6 e (B) substância 7

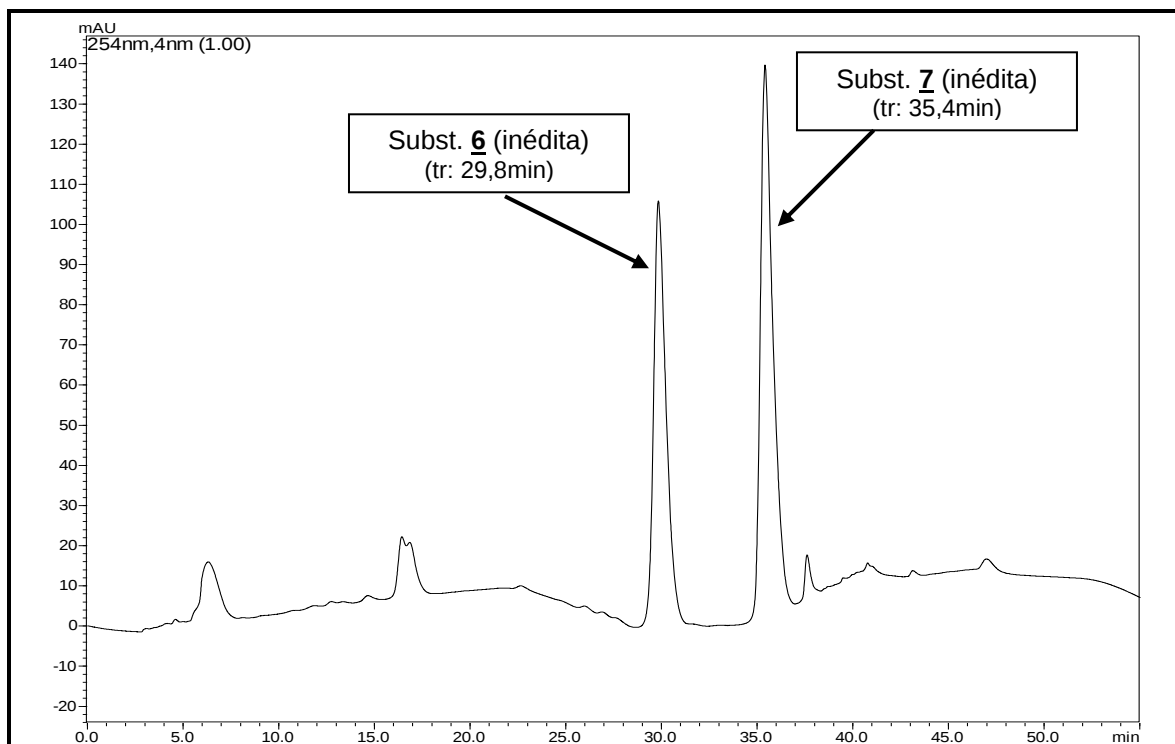


Figura 104 - Cromatograma analítico obtido da co-injeção das substâncias 6 e 7

Para justificar esta observação, estudos da configuração do C-11 para 6 e 7 foram realizados para se compreender a diferença de multiplicidade dos H-13 das substâncias 6 e 7.

Neste estudo propomos duas situações para C-11 em 6 e 7:

1- C-11 com configuração *S*

Para o primeiro caso temos que na substância **6** (Xylarenona F), demonstrada na **Figura 105** (pág. 147), a carbonila em C-8 dificulta a livre rotação da ligação C-11/C-13 devido ao forte impedimento estérico, colocando H-13a e H-13b em uma vizinhança diferente o que os conduzem a diferentes deslocamentos químicos, no entanto com a mesma multiplicidade, desdobrando-os como duplos dubletos que coalecem em um tripleto aparente ($J = 6,0$ Hz).

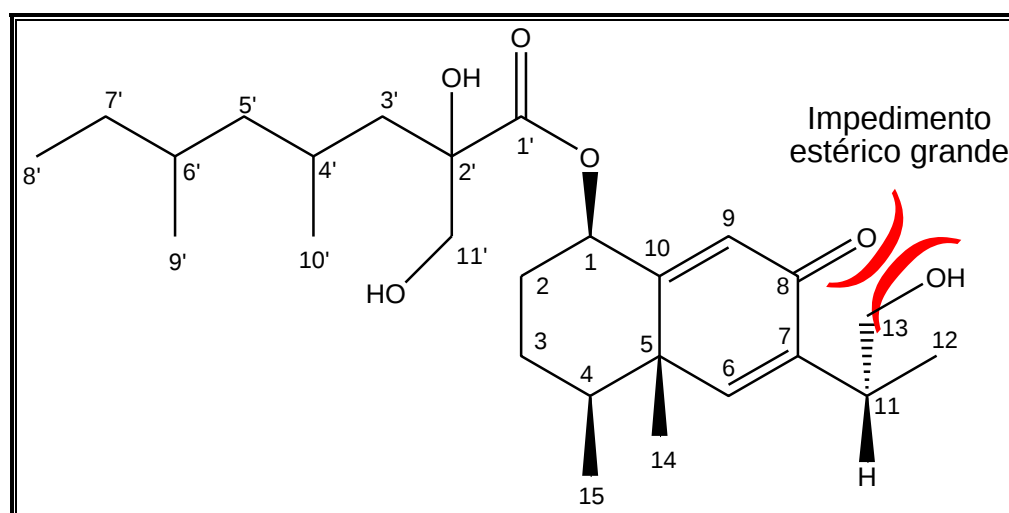


Figura 105 – Nova estrutura proposta para a substância **6** (Xylarenona F)

2- C-11 com configuração *R*

Para o segundo caso, temos que a substância **7** (Xylarenona G), demonstrada na **Figura 106** (pág. 148), o impedimento estérico causado pelo H-6 é menor quando comparado com o impedimento estérico da carbonila observado na substância **6**, sugere-se que esta é a conformação preferencial para a hidroxila. A livre rotação desta em função do baixo impedimento estérico de H-6 não distingue a vizinhança química de H-13a e H-13b, deixando-os em uma mesma vizinhança química semelhante e, mesmo deslocamento químico, conduzindo-os ao desdobramento de um dubleto ($J = 6,0$ Hz).

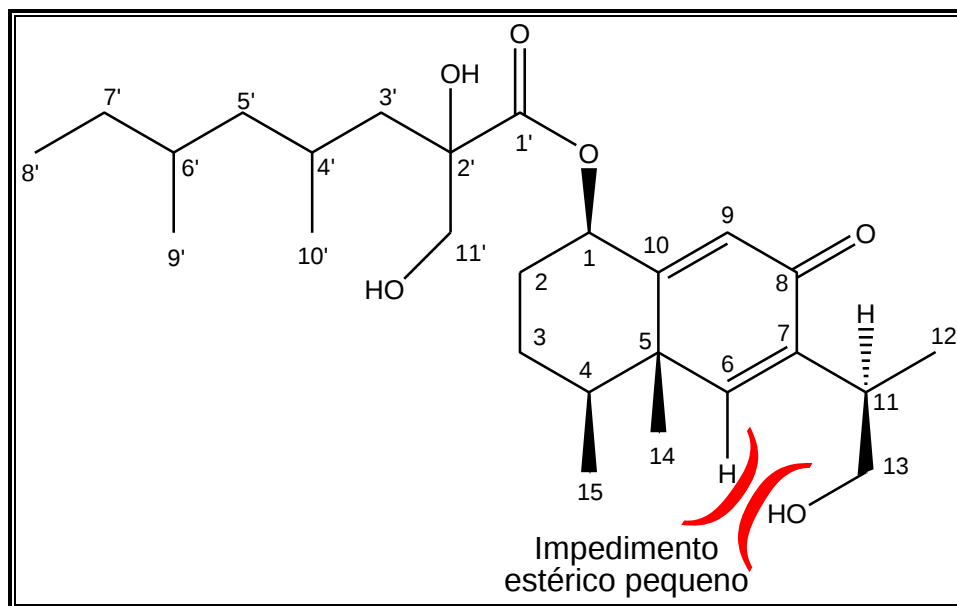


Figura 106 – Nova estrutura proposta para a substância **7** (Xylarenona G)

Assim, conclui-se pelo estudo da configuração do C-11 em ambas as substâncias que, a configuração absoluta do C-11 na substância **6** é *S* e a configuração absoluta do C-11 na substância **7** é *R*, sendo esta diastereoisômeros, pois não se relacionam como um objeto e sua imagem especular.

A configuração relativa de **7** assim como para a substância **6** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY 2D (**Figura 107**, pág. 149), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis* e comparação com os dados reportados³⁷ para a substância **5**. Deste modo a configuração relativa de **7** foi estabelecida como (1*R**, 4*S**, 5*S**), o que esta de acordo com a configuração relativa estabelecida para outros sesquiterpenos eremofilanos obtidos de fungos³⁷.

Estudos para a determinação da configuração absoluta de C-13 de **6** e **7** encontram-se em andamento.

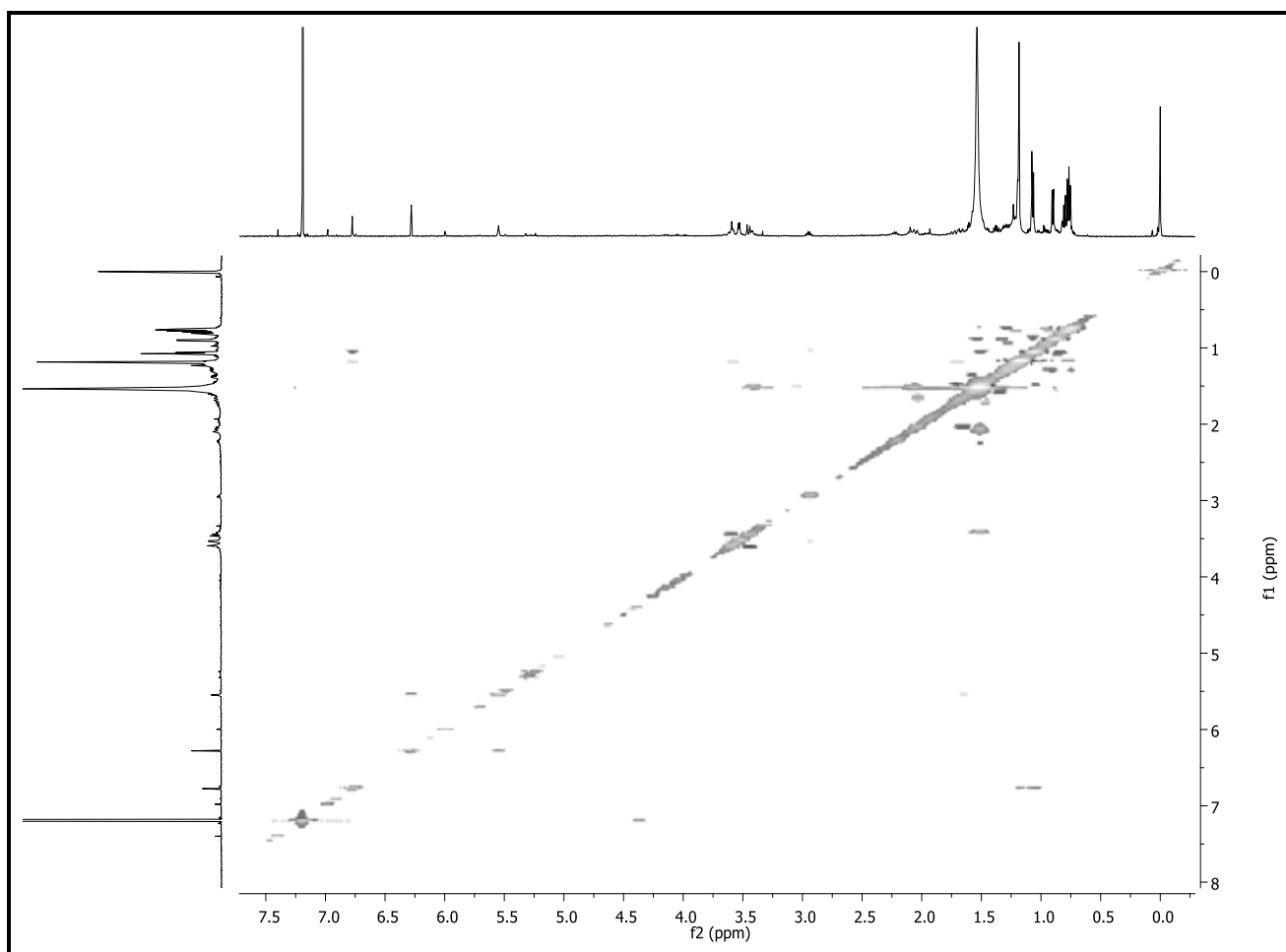


Figura 107 - Espectro de NOESY da substância **7** (CDCl₃, 500 MHz)

Estas observações associadas à massa molecular e as correlações observadas em *g*HMBC nos permitiram propor a estrutura da substância **7**, como um novo sesquiterpeno eremofilano denominado Xylarenona G.

Os deslocamentos químicos encontram-se na **Tabela 12** (pág. 150).

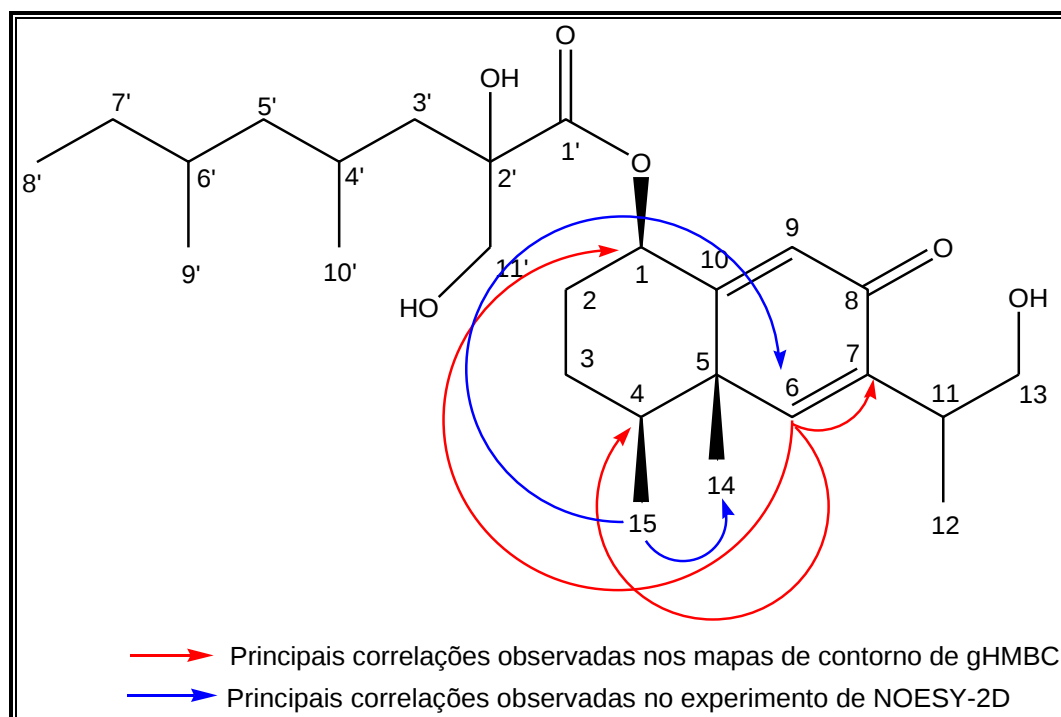
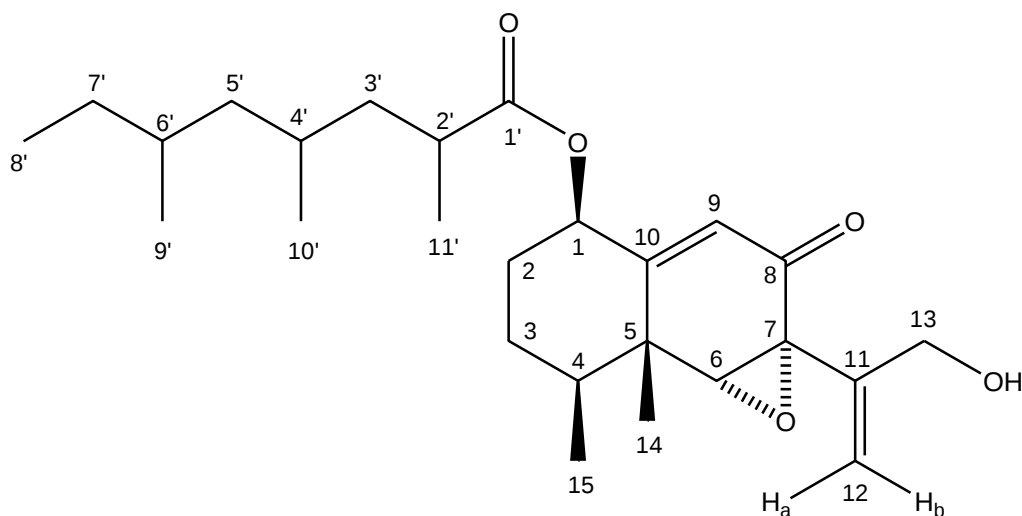


Figura 108 - Principais correlações observadas nos mapas de contorno de gHMBC para a substância **7**

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **7** em CDCl_3^a .

Posição				Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC		^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	5,55 (s)	77,1		14	1,18 (s)	20,1	C-5; C-6; C-10
2	N Ob	31,7		15	1,06 (d; 7,0)	15,9	C-3; C-4; C-5; C-7
3	1,52 (m)	25,8		1'	-	175,0	
4	N Ob	35,6	C-6; C-15	2'	-	79,1	
5	N Ob	43,5		3'	1,40 (m) 1,58 (m)	42,0	C-1'; C-2'
6	6,77 (s)	152,2	C-4; C-8; C-10	4'	1,54 (m)	26,9	
7	-	139,3		5'	0,86 (m) 1,38 (m)	46,0	
8	-	186,9		6'	2,06 (m)	32,4	
9	6,28 (s)	129,3	C-1; C-5; C-7	7'	1,23 (s)	28,8	
10	-	159,1		8'	0,76 (t; 7,0)	11,3	C-5'; C-6'; C-7'
11	1,52 (m)	41,3	C-6; C-7	9'	0,79 (d; 7,0)	18,2	C-5'; C-6'; C-7'
12	1,07 (d; 6,5))	16,3	C-13	10'	0,90 (d; 6,0)	21,8	C-3'; C-4'; C-5'
13	3,53 (d; 6,0)	67,3		11'	3,45 (d 11,0) 3,60 (d; 11,0)	68,5	C-1'; C-2'

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

4.4.1.8. Identificação Estrutural da Substância **8****Figura 109** - Estrutura da Substância **8** (Xylarenona C)

A substância **8** (**Figura 109**, pág. 151) foi isolada como um óleo amarelo, $[\alpha]_D^{25} + 108,8$ (c 0,1, CH₃OH). A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* (EM-ESI-QTOF) onde foi visualizado o sinal de m/z 455,2276 referente à formação de aduto $[M+Na]^+$ (**Figura 110**, pág. 152). A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 455,2765, o que aliado aos dados de RMN de ^{13}C confirmou a fórmula molecular C₂₆H₄₀NaO₅.

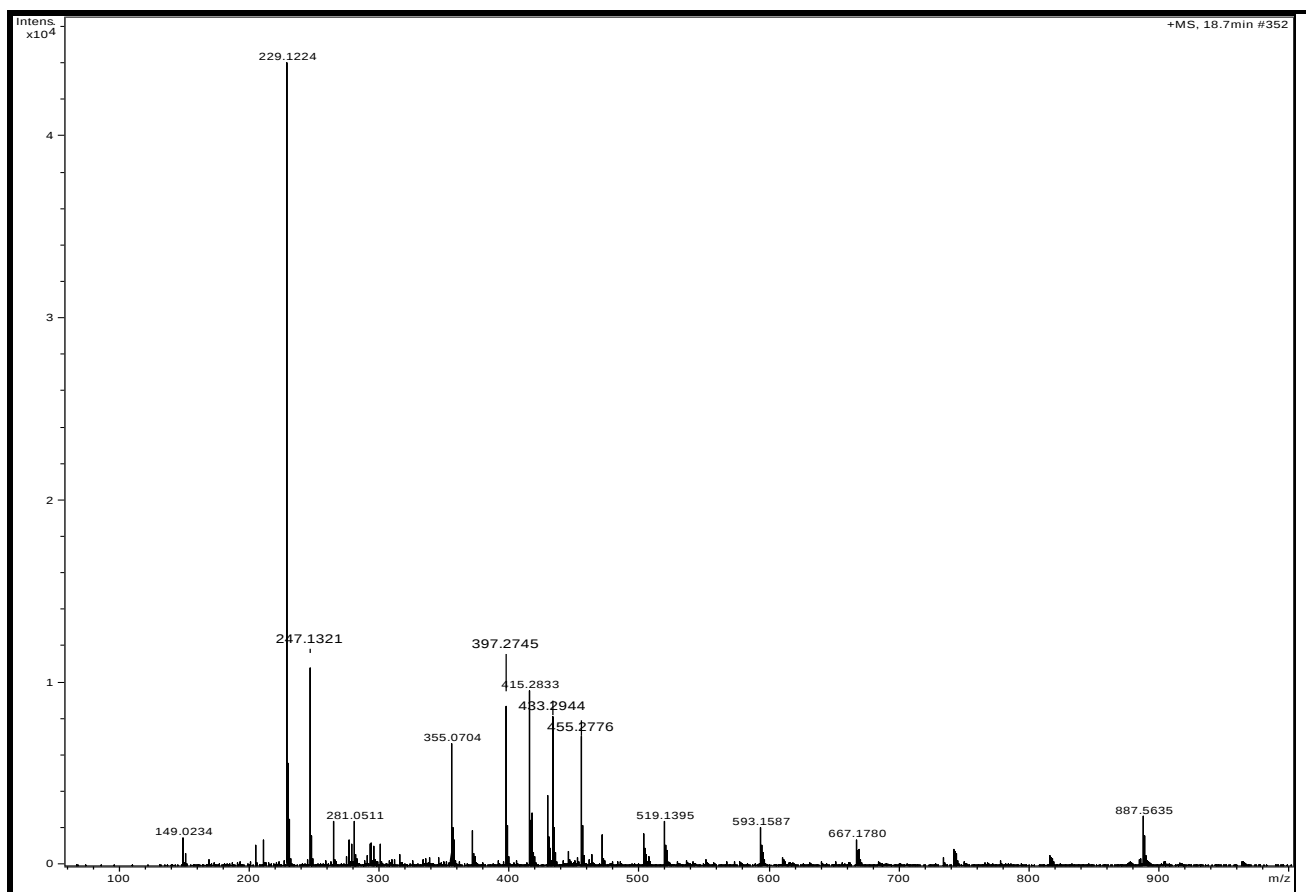


Figura 110 - Espectro de massas da substância **8** [ESI-MS (+)]

O espectro de IV (**Figura 111**, pág. 153) exibiu uma banda larga em 3481 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada à cetona α, β - insaturada em 1668 cm^{-1} e outra associada a um éster alifático em 1727 cm^{-1} .

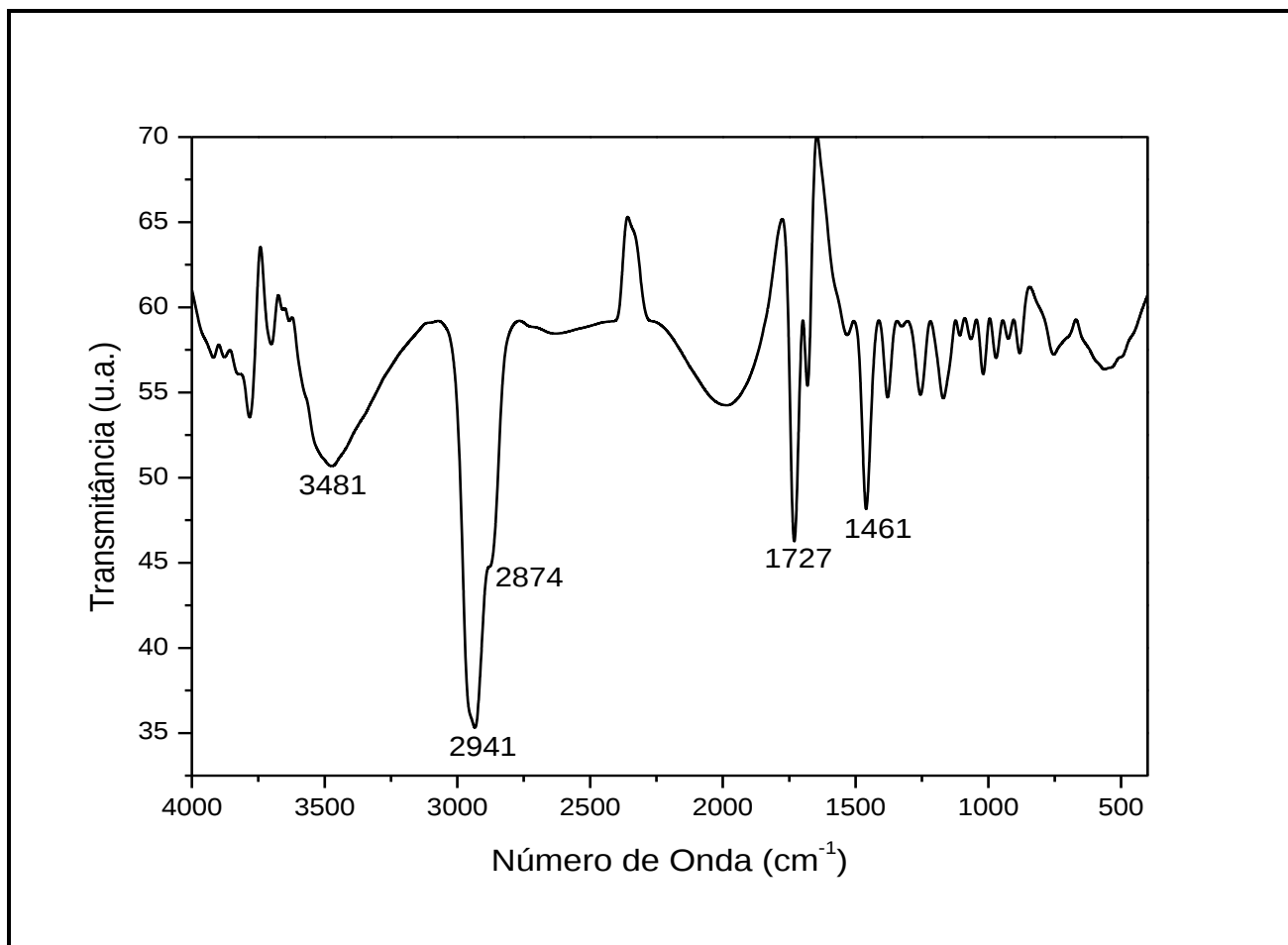


Figura 111 - Espectro de infravermelho da substância **8**

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 112**, pág. 154) exibiu a presença de dois hidrogênios oximetínicos em δ_H 3,44 (s, 1H, H-6,) e em δ_H 5,39 (s, 1H, H-1), três hidrogênios olefínicos: δ_H 5,91 (s, δ_C 125,2, H-9) e δ_H 5,07_a/5,21_b (s, H-12_a / d; H-12_b, J = 1,5Hz, δ_C 111,7), duas metilas, δ_H 1,24 (s, δ_C 18,1, H-14) e δ_H 1,05 (d; J = 6,5Hz, δ_C 15,5, H-15) e um metileno carbinólico em δ_H 4,25/4,13 (d, J = 13,0Hz, δ_C 61,5, H-13_a, H-13_b).

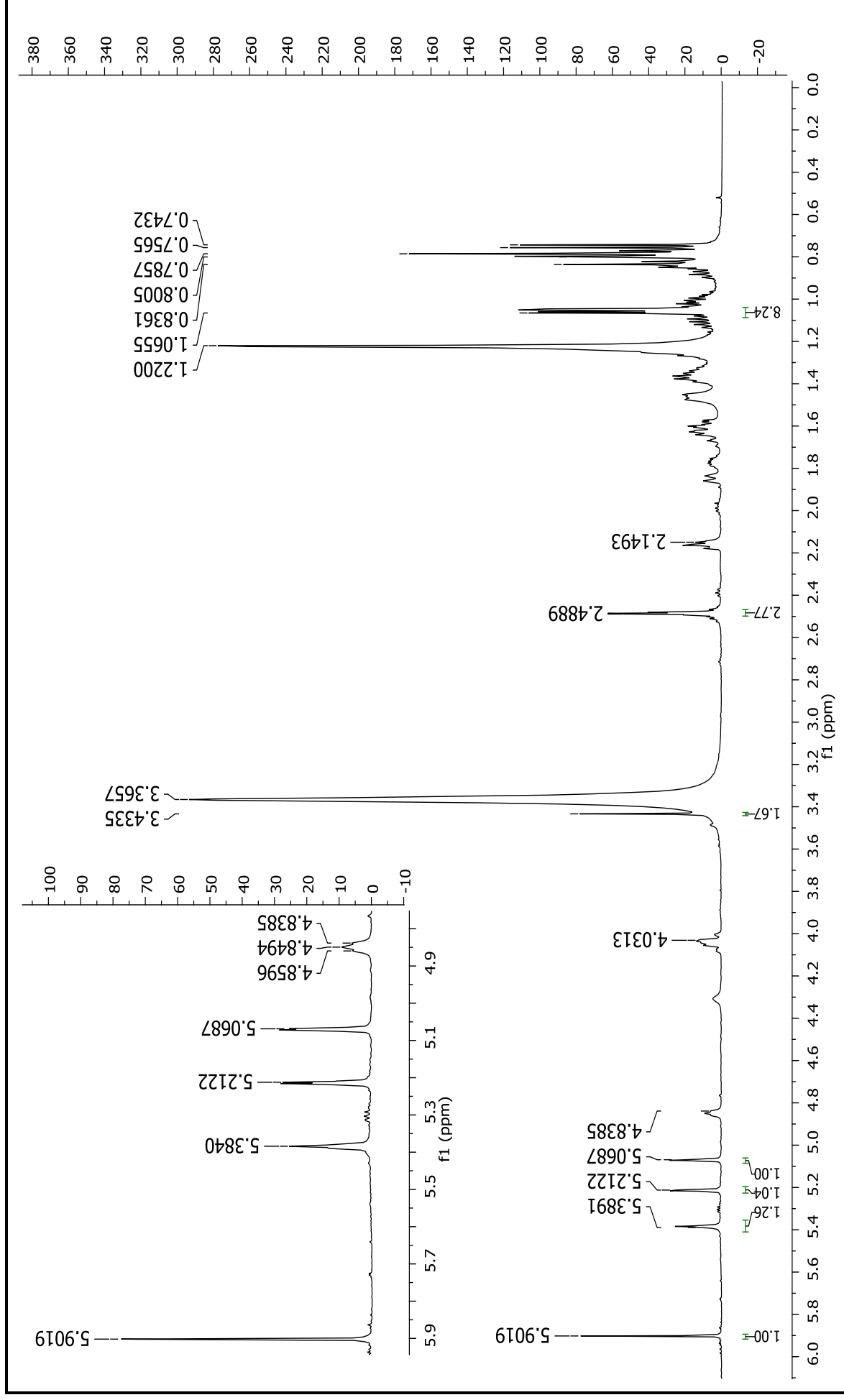


Figura 112 - Espectro de RMN de ¹H da substância **8** (DMSO-d₆, 500 MHz)

Estes dados evidenciaram uma grande semelhança entre **8** e **5**, sendo que a única diferença observada, foi à presença de uma metila desdobrando como um dubleto e ausência dos carbonos em $\delta_{C-11'}$ 68,4 (d, 3,44, $J = 11,0\text{Hz}$ / d, 3,60, $J = 11,0\text{Hz}$) e $\delta_{C-2'}$ 68,0 (carbono quaternário), revelando a redução de C-2' para C-H e C11' para CH₃.

A análise do espectro de RMN de ^1H associado aos espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 113**, pág. 156) e DEPT (**Figura 114**, pág. 157) revelou a presença de quatro metilas δ_{H} 0,79 (H-8', d; $J = 6,0\text{Hz}$), δ_{H} 0,75 (H-9', d; $J = 7,0\text{Hz}$), δ_{H} 0,77 (H-10', d; $J = 6,0\text{Hz}$) e δ_{H} 1,06 (H-11', d; $J = 6,5\text{Hz}$), sendo esta última não observada em **5** além de sete carbonos metilênicos e, sete carbonos metínicos. No espectro de RMN de ^{13}C foi observado sinais em δ_{C} 125,2 (δ_{H} 5,91, H-9, s) e δ_{C} 157,4 (C_o) que evidenciaram a presença de uma cetona α , β - insaturada, e um sinal em δ_{C} 174,6 sugerindo um éster, assim como para a substância **5**.

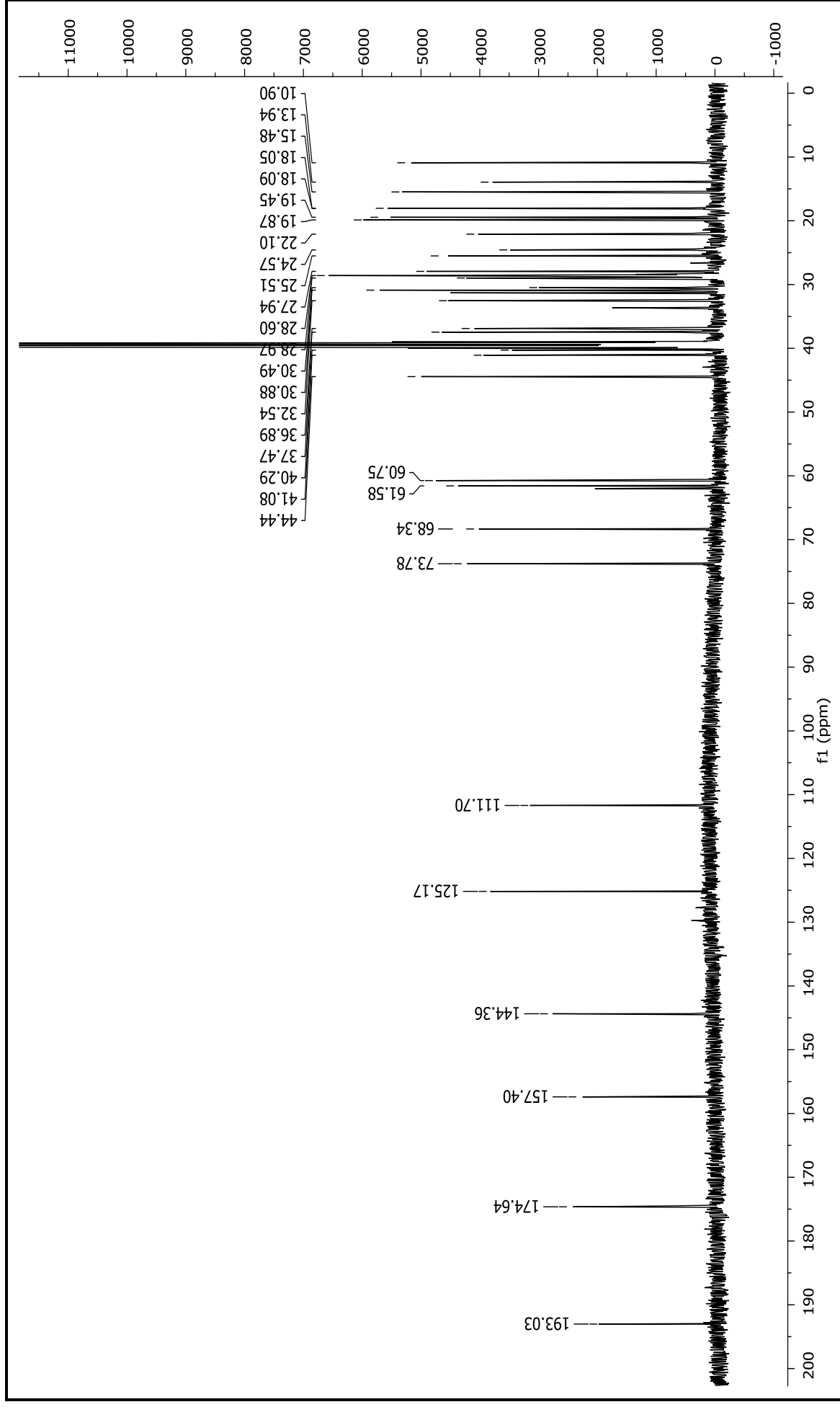


Figura 113 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (DMSO- d_6 , 500 MHz)

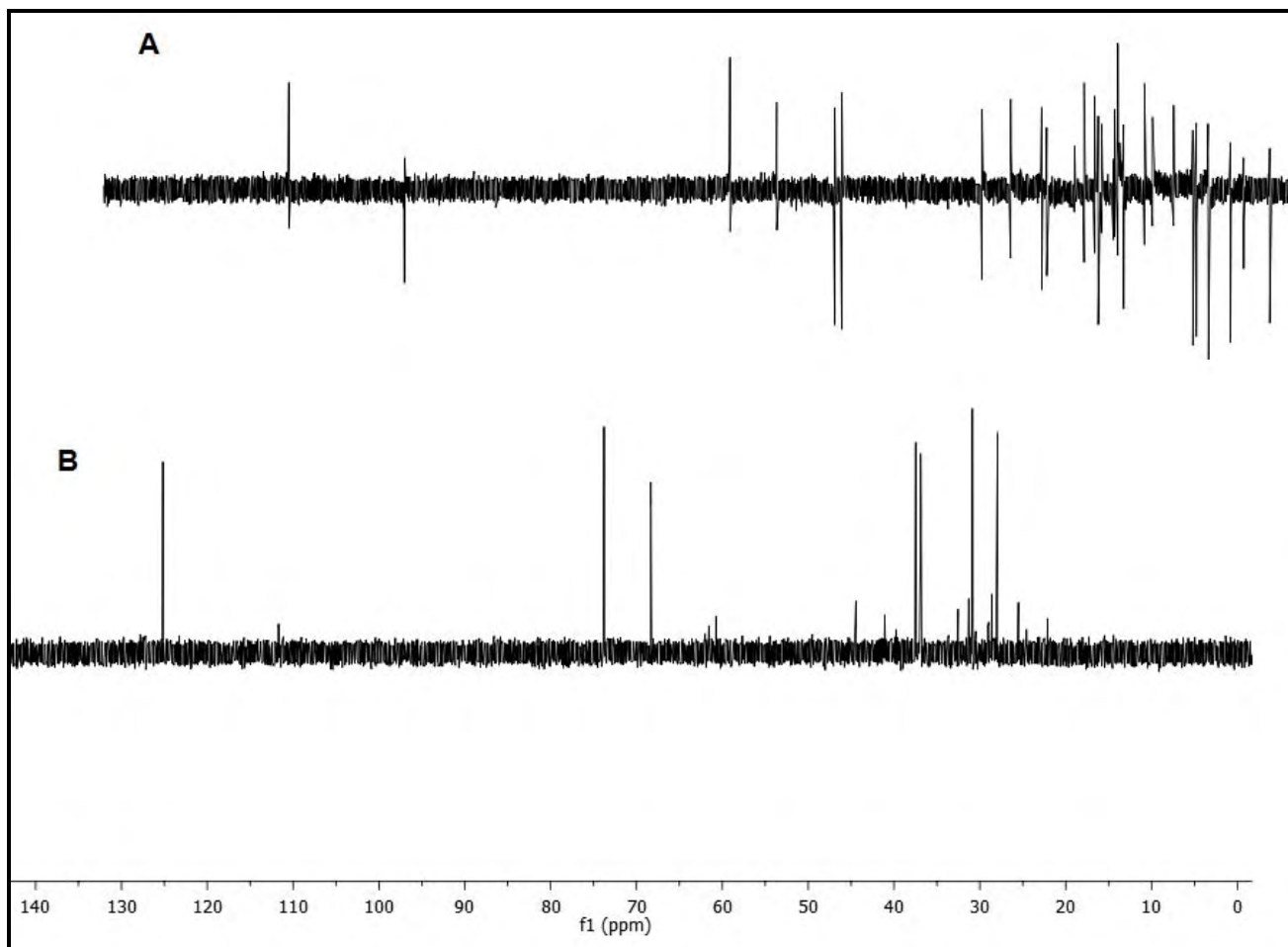


Figura 114 - Espectro de DEPT (A) 135 e (B) 90 da substância **8**

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono, foi realizada após avaliação das interações 1J , no experimento bidimensional *g*HMQC (**Figura 115**, pág. 158).

Observa-se pela análise do mapa de contorno de *g*HMBC (**Figura 116**, pág. 158) que ocorre uma esterificação em C-1 entre H-9 e C-1. A cadeia lateral do grupo acila foi definida através das multiplicidades de H-10', H-11', H-9' e H-8' e das correlações observadas no *g*HMBC.

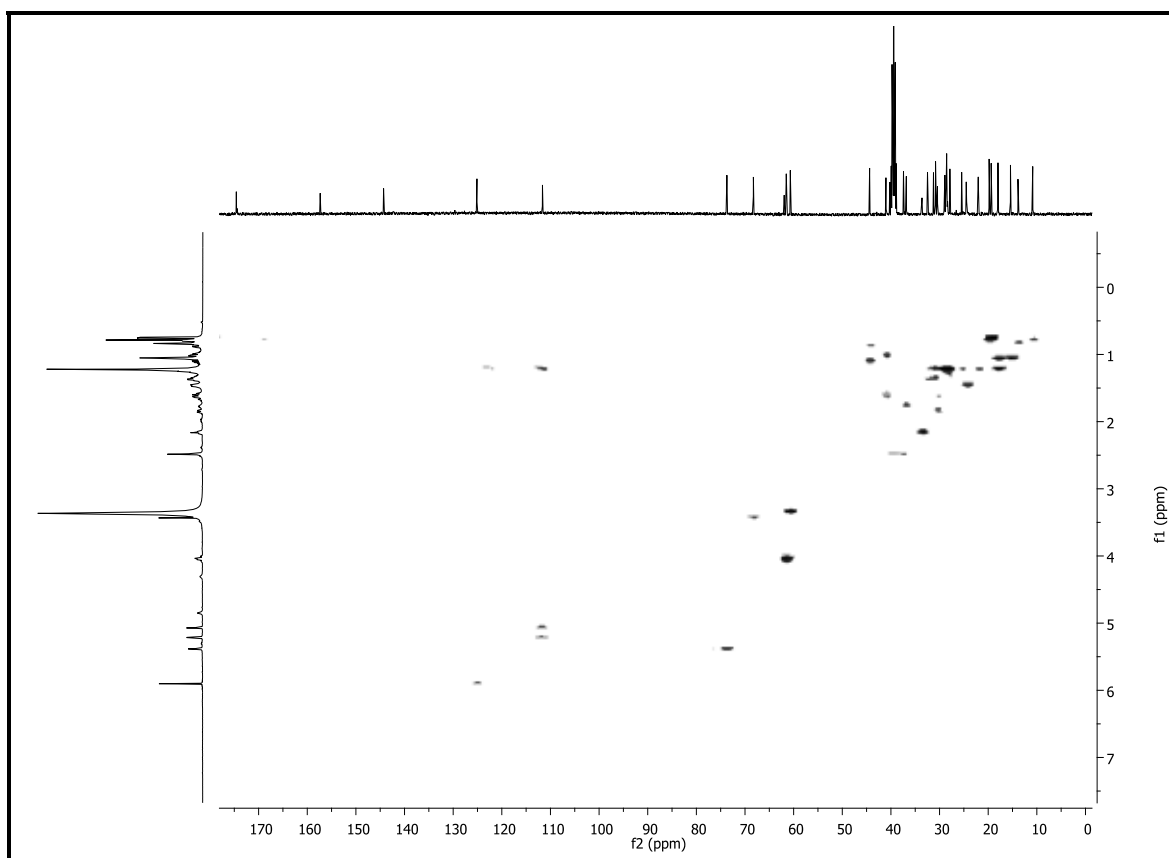


Figura 115 - Mapa de contorno de *g*HMQC da substância **8** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

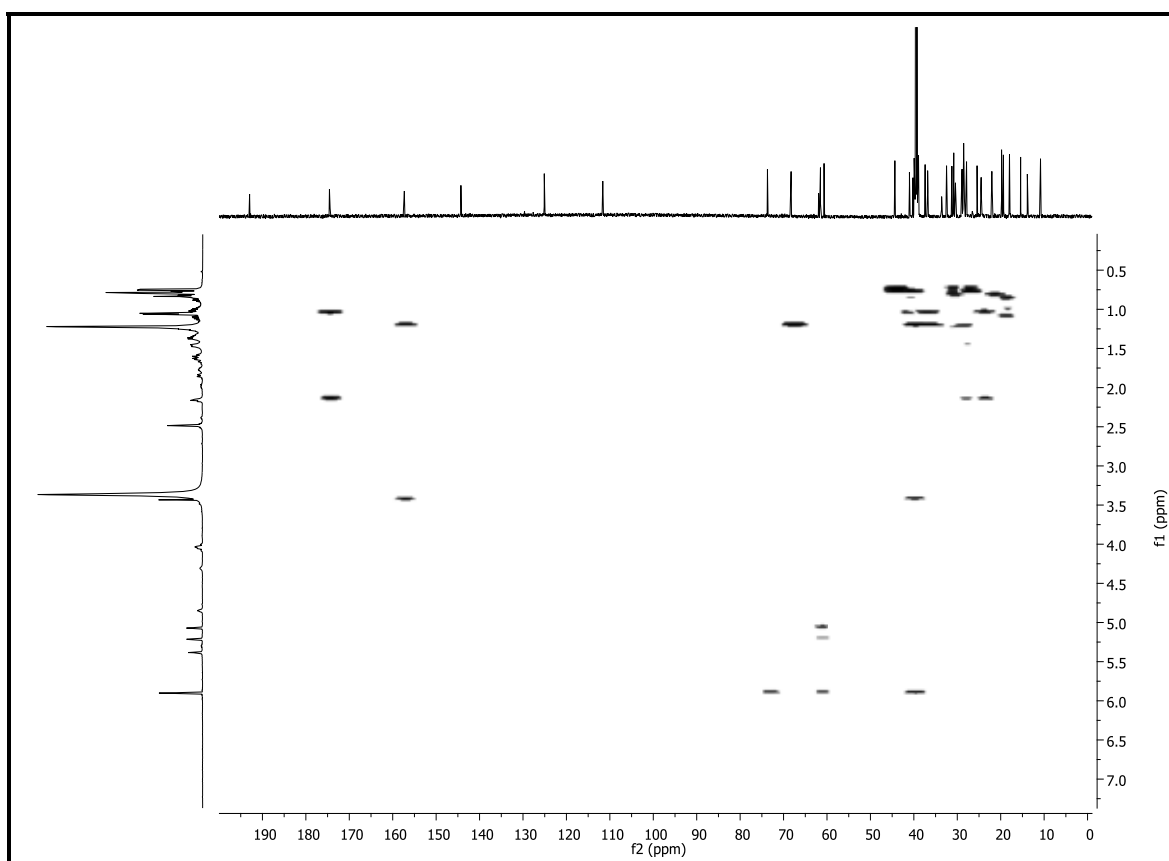


Figura 116 - Mapa de contorno de *g*HMBC da substância **8** (DMSO-*d*₆, 125 MHz)

No espectro de UV em CH₃OH da substância **8** (**Figura 117**, pág. 159) podemos observar um máximo de absorção em 235nm que são característicos de enonas.

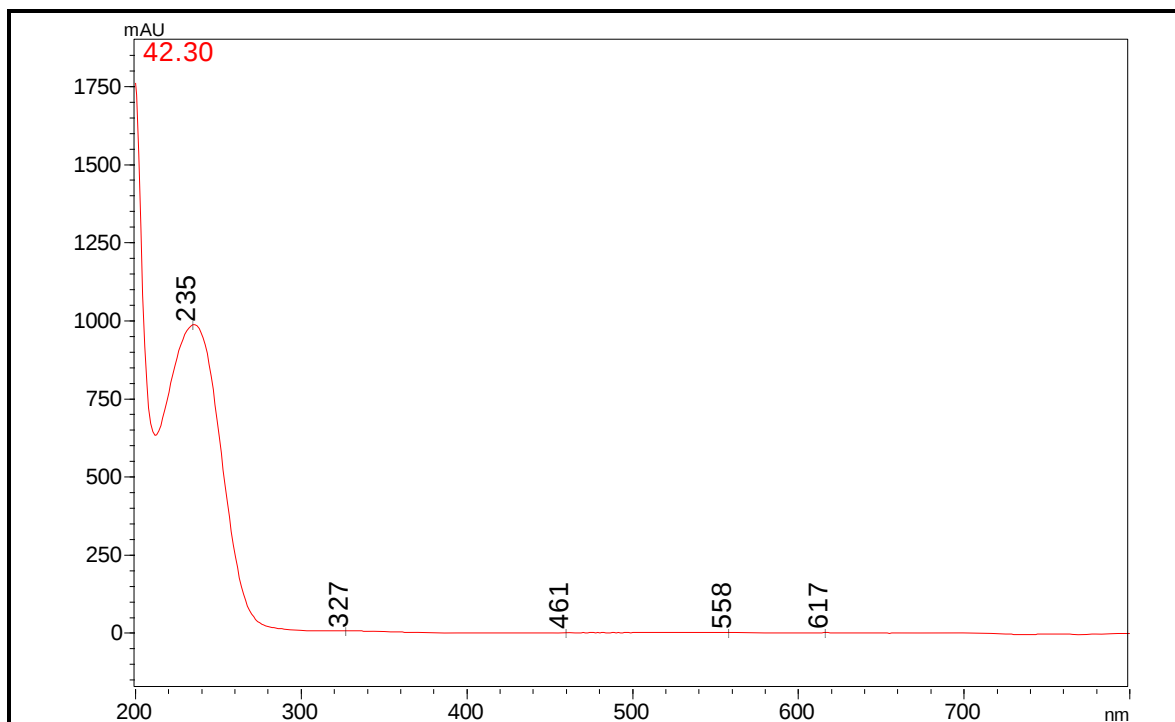


Figura 117 - Curvas de absorção no ultravioleta para a substância **8**

A configuração relativa de **8** foi determinada através da análise dos espectros de NOESY 2D (**Figura 118**, pág. 160), onde se verificou a interação entre a metila H-15 com H-6 e H-14 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*. Deste modo a configuração relativa de **8** foi estabelecida como (1R*, 4S*, 5R*, 6R*, 7R*), o que está de acordo com a configuração relativa estabelecida para outros sesquiterpenos eremofilanos obtidos de fungos³⁷.

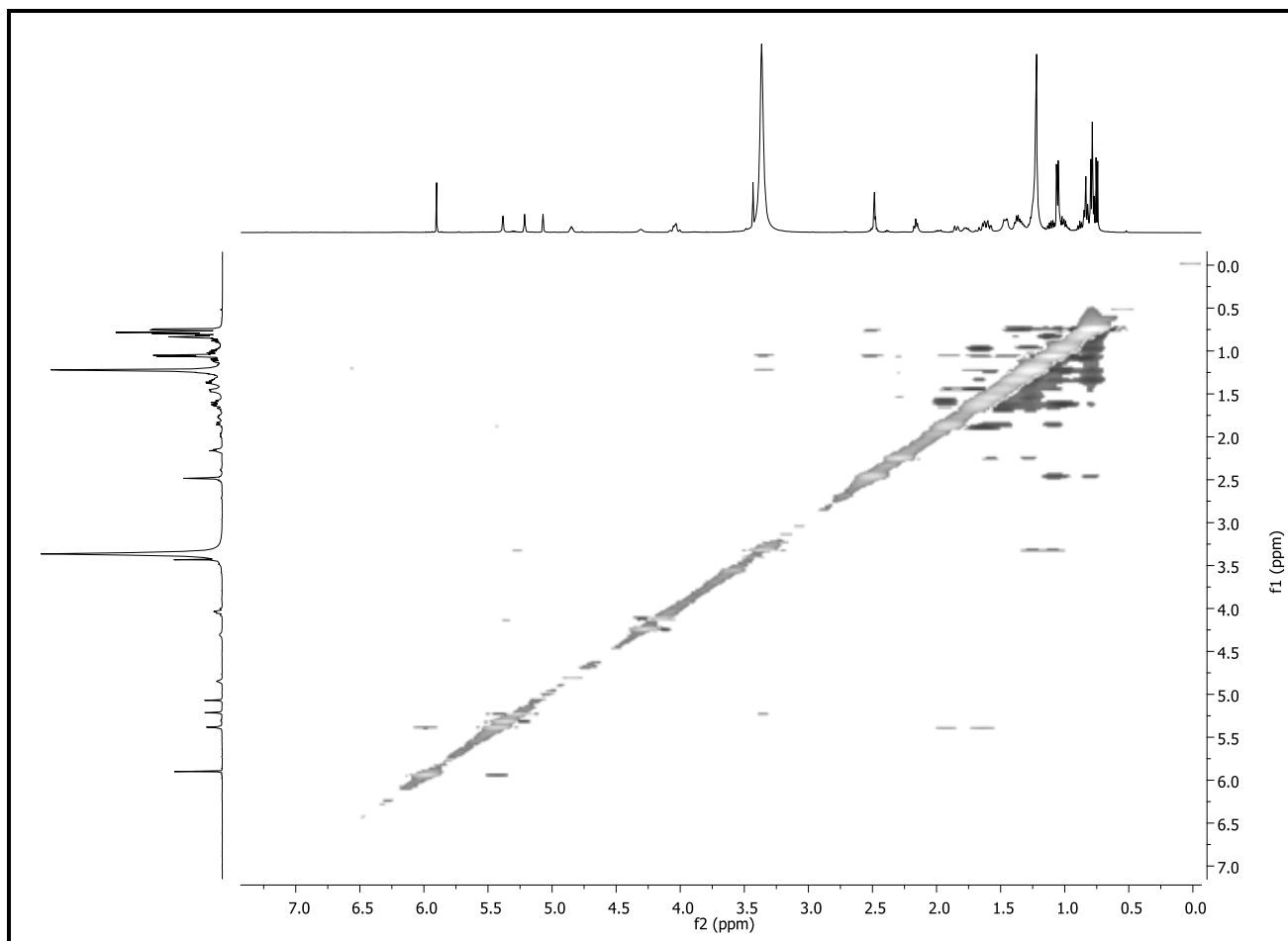


Figura 118 - Espectro de NOESY da substância **8** (CDCl_3 , 500 MHz)

Estas análises aliadas aos dados apresentados por Oliveira et al., 2009, permitiram determinar a estrutura de **8** como Xylarenona C, um sesquiterpeno eremofilano que apresentou uma potente atividade inibitória de protease contra as enzimas subtilisina e pepsina (causadora do vírus HIV).³⁷

Os deslocamentos químicos em comparação com os dados da literatura encontram-se na **Tabela 13** (pág. 161).

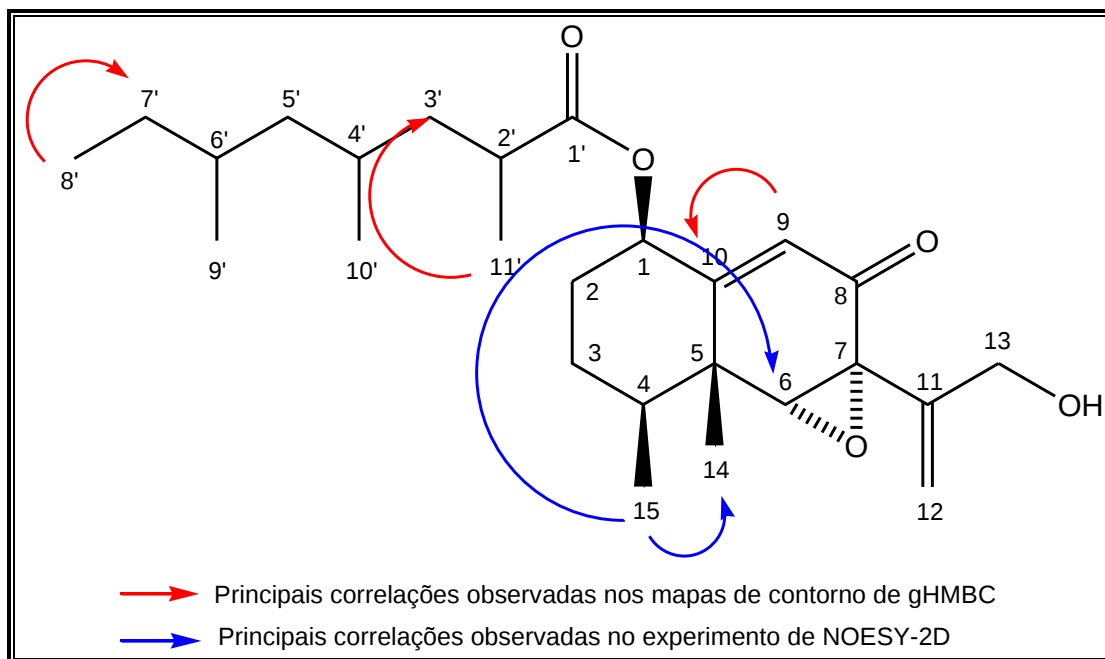


Figura 119 - Principais correlações observadas para a substância **8**

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância **8** em $\text{DMSO}-d_6^a$.

Posição				Posição			
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC		^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	5,39 (s)	73,8	-	14	1,24 (s)	18,1	C-4; C-5; C-6; C-10
2	1,24 (s)	25,5	-	15	1,05 (d; 6,5)	15,5	-
3	1,24 (s)	31,3	C-4; C-5; C-6; C-10	1'	-	174,6	-
4	1,77 (m)	36,9	-	2'	2,48 (m)	37,5	-
5	-	40,3	-	3'	1,60 (m) 1,01 (m)	41,1	-
6	3,44 (s)	68,3	C-5; C-10	4'	1,24 (s)	27,9	-
7	-	62,0	-	5'	0,81 (m) 1,08 (m)	44,4	-
8	-	193,4	-	6'	1,35 (m)	30,9	-
9	5,91 (s)	125,2	C-1; C-5	7'	1,24 (m)	29,1	-
10	-	157,4	-	8'	0,79 (d; 6,0)	10,9	C-5'; C-6'
11	-	144,4	-	9'	0,75 (d; 7,0)	19,4	C-4'; C-5'; C-6'
12	5,07 _a (s) 5,21 _b (d; 1,5)	111,7	C-13 C-13	10'	0,79 (d; 6,0)	19,9	C-3'; C-4'; C-5'
13	4,04 (m)	61,5	-	11'	1,06 (d; 6,5)	18,0	C-3', C-2'; C-1'

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

4.5 ENSAIO BIOLÓGICO DAS SUBSTÂNCIAS PURAS

As substâncias puras **2** e **7** não foram testadas nos ensaios biológicos, bioquímicos ou químicos por não apresentarem massa suficiente.

4.5.1 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

Neste ensaio as substâncias **1** (mevalonolactona), **4** (azepan-2-ona), **5** (xylarenona D), e **8** (xylarenona C) foram avaliadas diante a inibição da enzima acetilcolinesterase, as demais substâncias não apresentaram massa suficiente para realização dos ensaios.

O método utilizado está descrito no item 3.9.2 pág. 64. Manchas brancas na cromatoplaca são evidências de atividade anticolinesterásica em potencial.

Para as substâncias que apresentaram atividade positiva para 50µg/mL foi realizado o ensaio de limite de detecção (**Tabela 14**, pág. 162).

Tabela 14 - Resultado da atividade anticolinesterásica para as substâncias testadas

<i>Amostra</i>	<i>Rf</i>
Substância 1	—
Substância 4	0,1
Substância 5	0,4/0,3
Substância 8	Rastro (2cm)
Fisostigmina	0,3

As substâncias **5** (xylarenona D) e **8** (xylarenona C) apresentaram excelente atividade frente a inibição da enzima acetilcolinesterase, onde foi possível observar pelo limite de detecção obtido para a Xylarenona D sendo de 25µg e para a Xylarenona C de 6,25µg. Essas foram às únicas substâncias testadas que apresentaram atividade anticolinesterásica, evidenciando a potencialidade bioativa desses metabólitos produzidos pelo fungo *Camarops* sp.

4.5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Neste ensaio as substâncias **1** (mevalonolactona), **3** (Ácido (*E*)-5-(1-hidroxiailil)-4-(pent-1-enil)-2,5-diidrofurano-3-carboxílico), **4** (azepan-2-ona), **5** (xylarenona D), **6** (xylarenona F) e **8** (xylarenona C) foram avaliadas, as demais substâncias não apresentaram massa suficiente para realizar os ensaios. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 120** (pág. 163).

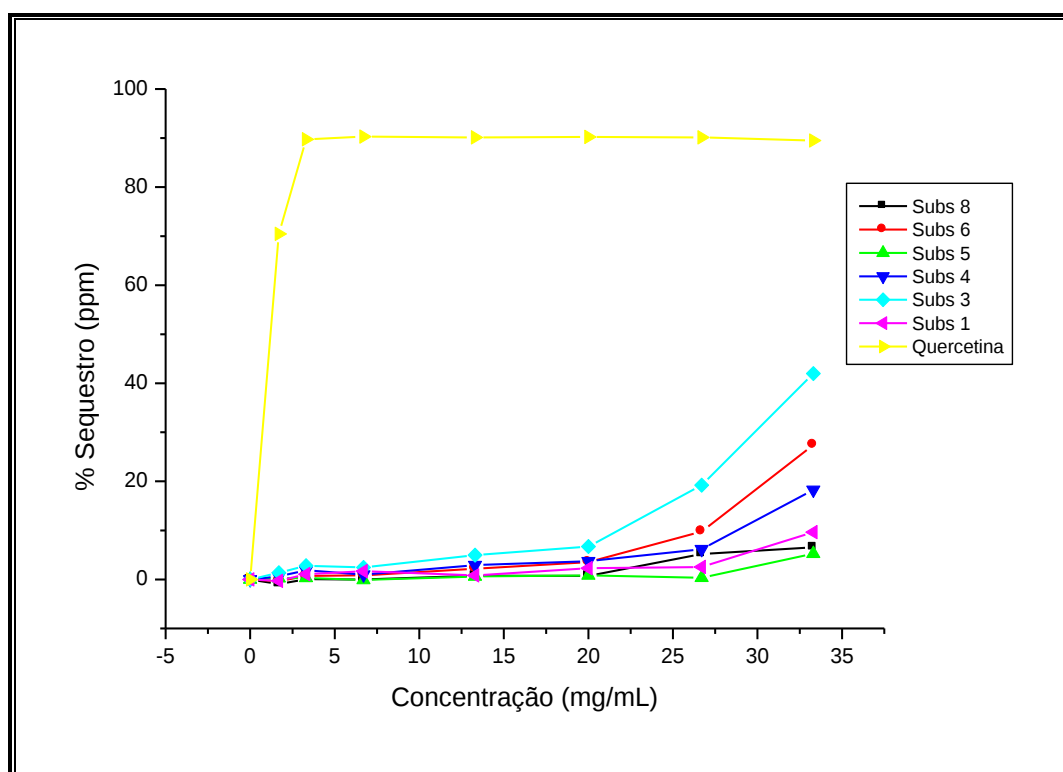


Figura 120 - Concentração versus % Seqüestro das substâncias produzidas pelo endófito *Camarops* sp. em comparação com o padrão quercetina.

Através da análise deste ensaio qualitativo foi possível observar que as substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Camarops* sp. foram inativos.

4.5.3 Avaliação da Atividade Anti-tumoral

Cancro ou Câncer é uma doença caracterizada por uma população de células que cresce e se dividem sem respeitar os limites normais, invadem e destroem tecidos adjacentes, e podem se espalhar para lugares distantes no corpo, através de um processo chamado metástase. Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam

dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes (embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornarem malignos). O câncer pode ser considerado uma doença genética uma vez que é desencadeado por alterações no DNA da célula. No entanto, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, o câncer não é necessariamente uma doença hereditária. Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais.⁶¹

O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o acréscimo da idade. O câncer causa cerca de 13% de todas as mortes no mundo, sendo os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama os que mais matam.⁶¹

Neste ensaio, somente as substâncias **5** (xylarenona D), e **8** (xylarenona C) foram avaliadas, as demais substâncias não apresentaram massa suficiente para realizar os ensaios, sendo que este ensaio requer uma quantidade maior de massa quando comparado com os outros ensaios realizados. O potencial antitumoral dos dois sesquiterpenos eremofilanos foi avaliado frente a quatro linhagens tumorigênicas humanas e comparadas com o controle positivo (doxorrubicina).

A atividade citotóxica das substâncias testadas está apresentada na **Tabela 15** (pág. 164) com seus respectivos percentuais de inibição. Somente as substâncias que apresentaram valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 15 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5µg/mL.

Amostras	HCT-8 (cólon)	SD	MDAMB-435 (mama)	SD	SF-295 (glioblastoma)	SD
Identificação	GI% (média)		GI%(média)		GI%(média)	
Substância 5	100,87	0,00%	99,75%	0,12%	100,59%	0,06%
Substância 8	100,95	0,12%	99,41%	0,60%	100,09%	0,51%

Inicialmente, as duas substâncias **5** e **8** foram ensaiadas em uma concentração única de 5µg/mL. As substâncias capazes de inibir 90% o crescimento das células

tumorais foram diluídas seriadamente com o intuito de determinar a concentração capaz de inibir em 50% do crescimento das células tumorais (IC_{50}). As duas substâncias avaliadas apresentaram uma porcentagem de inibição superior a 90% exibindo assim $IC_{50} < 5\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 16**, pág. 165)

Tabela 16 - Atividade citotóxica *in vitro* das substâncias **5** e **8** contra linhagens tumorais humanas após 72h de incubação quantificada através do ensaio de MTT

Substâncias	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*			
	HL-60 (leucemia)	MDA/MB-435 (mama)	HCT-8 (cólon)	SF-295 (glioblastoma)
Substância 5	1,2	2,1	1,5	1,9
	0,9 – 1,6	1,9 – 2,3	1,3 – 1,6	1,6 – 2,1
Substância 8	1,5	2,4	1,9	2,1
	1,3 – 1,9	2,2 – 2,7	1,8 – 2,1	1,9 – 2,5
Doxorrubicina	0,02	0,5	0,01	0,2
	0,01 – 0,02	0,3 – 0,7	0,01 – 0,02	0,2 – 0,3

*Os valores (n=2) correspondem à IC_{50} e intervalo de confiança de 95 % obtidos por regressão não-linear para as linhagens tumorais humanas de leucemia (HL-60), carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e de melanoma (MDA/MB-435).

Assim, podemos concluir que as substâncias **5** e **8** demonstraram forte potencial citotóxico frente às quatro linhagens tumorais testadas, com um IC_{50} variando de 1,2 a 2,4 μM , sendo que ambas as substâncias apresentaram uma maior atividade sobre células tumorais de mama (MDA/MB-435) com um IC_{50} de 2,1 μM para a substância **5** e, 2,4 μM para a substância **8**, valor correspondente à uma potência forte, comportando-se cerca de 5 vezes menos ativa que a doxorrubicina e, uma menor ação sobre células tumorais de cólon (HCT-8) com um IC_{50} de 1,5 μM para a substância **5** e, 1,9 μM para a substância **8**, valor correspondente à uma potência fraca, comportando-se cerca de 150 vezes menos ativa que a doxorrubicina.

Estudos do mecanismo de ação destas substâncias diante das quatro células tumorigênicas testadas encontram-se em andamento.

5. CONCLUSÕES

5.0 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu dar continuidade aos estudos com fungos endofíticos de espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica. Permitiu, também o isolamento, identificação e determinação estrutural de oito metabólitos secundários, sendo os sesquiterpenos Xylarenona F (**6**) e G (**7**), inéditos. Os metabólitos primários como a (S)-mevalonolactona (**1**) substância isolada pela primeira vez de um fungo endofítico e o azepan-2-ona (**4**) sendo este, relatado pela primeira vez como produto natural, o que evidencia a diversidade de metabólitos produzidos por micro-organismos endofíticos.

Com o cultivo e obtenção dos extratos CH₃OH e CH₃CN no meio sólido de milho e pela análise dos espectros de RMN de ¹H e dos cromatogramas por CLAE-DAD, notou-se uma variação na produção metabólica de *Camarops* sp. indicando uma produção metabólica muito rica e com um perfil químico promissor, além de que os extratos obtidos em meio sólido apresentaram um rendimento em massa satisfatório. Estas observações sugerem que essas espécies de micro-organismos estudados estejam desempenhando um possível papel ecológico de cada linhagem em associação com a espécie vegetal.

A potencialidade destes extratos frente aos ensaios anticolinesterásicos e antifúngicos contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e os resultados qualitativos do potencial antioxidante foram surpreendentes, principalmente frente ao ensaio anticolinesterásico, pois observou-se uma atividade moderada diante da inibição da enzima acetilcolinesterase.

Os ensaios biológicos realizados com as substâncias isoladas, para avaliação das atividades antitumoral, de inibição da enzima acetilcolinesterase e do potencial antioxidante evidenciaram que: Xylarenona D (**5**) e Xylarenona C (**8**), apresentam excelentes resultados de atividade antitumoral frente às linhagens de MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) sendo que, esses estudos encontram-se em andamento, com estudos do mecanismo de ação destas substâncias diante de cada uma das células tumorigênicas testadas. Apresentaram também resultados promissores diante da atividade anticolinesterásica. E, nem uma das substâncias testadas apresentou atividade antioxidante.

As demais substâncias identificadas são conhecidas e descritas por apresentarem potencialidades biológicas, como antifúngicas, antitumorais, antibacterianas, entre outras.

Os resultados encontrados até o momento reforçam a suposição das interações ecológicas entre estes micro-organismos como fontes de metabólitos secundários e a sua planta hospedeira. As informações contidas nesse trabalho demonstraram a importância do estudo com micro-organismos endofíticos, pois conduziram a significativos resultados, proporcionando o conhecimento da composição química dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Alibertia macrophylla*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

-
- 1 VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
 - 2 CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novels drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.
 - 3 MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
 - 4 PINTO, C. A. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
 - 5 BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
 - 6 BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-419, 1994.
 - 7 PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, p. 61-64; 258-271.
 - 8 BORGES, S. W. et al. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.
 - 9 SOUZA, A. D. L. et al. Koninginins, phospholipase A2 inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma koningii*. **Toxicon**, v. 51, p. 240-250, 2008.
 - 10 SUN, J. Q. et al. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 8, p. 751-759, 2008.
 - 11 AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 1998. p. 116-137.
 - 12 AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1998. p. 40.
 - 13 STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Product**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

-
- 14 DEMAİN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.
- 15 PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1-68. 1997.
- 16 CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- 17 SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados com espécies vegetais de Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 18 ZANARDI, L. M. **Prospecção química em *Phomopsis cassiae*, um fungo endofítico isolado de *Senna spectabilis***. 2006. 147 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 19 NASCIMENTO, A. M. **Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de duas espécies de *Calea* (Hermiantheae, Asteraceae)**. 2003. 181 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- 20 TELES, I. H. **Estudo químico de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e micoparasitas**. 2005. 251 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 21 COSTA, I. P. M. W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- 22 AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 225-229, out. 1999.
- 23 PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-197.
- 24 STROBEL, A. G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.

-
- 25 GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- 26 SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.
- 27 GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- 28 FAETH, S. H.; HAYES, C. J.; GARDNER, D. R. Asexual endophytes in a native grass: tradeoffs in mortality, growth, reproduction, and alkaloid production. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 496-504, 2010.
- 29 SMITH, S. A. et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. **Plos One**, v. 3, p. 1-4, 2008.
- 30 SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- 31 TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- 32 ZANARDI, L. M. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis***. 2010. 253 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 33 BOLZANI, V. S. et al. Secondary metabolites from brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Developments in Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.
- 34 BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: Ed. UFV, 1986. v. 3.
- 35 SILVA, C. V. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. 2007. 330 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

- 36 ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- 37 OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 38 TREVISAN, L. V. M. **A química micromolecular e a classificação de Rubiaceae**. 1993. 52 f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.
- 39 GOODLAND, R.; FERRI, M. G. **Ecologia do Cerrado**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1979. p. 61-79.
- 40 BOLZANI, V. S.; TREVISAN, M. V. L.; YOUNG, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.
- 41 BRUNNER, F.; PETRINI, O. Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. **Mycological Research**, v. 96, n. 9, p. 723-733, 1992.
- 42 ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **PNAS**, v. 100, n. 26, p. 15.449-15.654, 2003.
- 43 CLAY, K. Interactions among fungal endophytes grasses and herbivores. **Research Population Ecology**, v. 2, n. 38, p. 191-210, 1996.
- 44 SCHULZ, B. et al. The endophyte - host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, v. 10, n. 103, p. 1275-1283, 1999.
- 45 GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 236 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- 46 MAIER, W. et al. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the *Poaceae*. **Planta**, v. 202, p. 36-42, 1997.
- 47 LANDECKER, E. M. **Fundamental of the fungi**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

-
- 48 RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-201, 1991.
- 49 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.
- 50 PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glycosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samyoides*. **Journal Natural Product**, v. 66, p. 1384-1387, 2003.
- 51 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assys. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.
- 52 CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* dc. Prodr. (Rubiaceae)**. 2003. 224 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 53 GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008.
- 54 SILVA, D. A. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.
- 55 VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidantes de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase**. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 56 YOKOZAWA, T. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemistry Pharmacological**, v. 56, n. 2, p. 213-222, 1998.
- 57 SHIMOMURA, H. et al. A new mevalonolactone glucoside derivative from the bark of *Prunus buergeriana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 829-830, 1989.
- 58 WILSON, W. K.; SCALLEN, T. J.; MORROW, C. J. Determination of the enantiomeric purity of mevalonolactone via NMR using a chiral lanthanide shift reagent. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 645-652, 1982.

59 SILVA E SILVA, A. et al. Estudo químico do fungo *Pestalotiopsis* sp. isolado do fruto de *Gustavia* cf. *elliptica*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** São Paulo: SBQ, 2009.

60 BOMFIM, M. V. J.; ABRANTES, S. M. P.; ZAMITH, H. P. S. Estudos sobre a toxicologia da ϵ -caprolactama. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n.1, p. 21-35, 2009.

61 ALVES, L. C. et al. A influência das doenças crônicas na capacidade funcional dos idosos no município de São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 8, p. 1924-1930, 2007.