

Iatã do Carmo Mendonça

Prospecção química e biológica do endófito *Humicola fuscoatra* associado a alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de metabólitos secundários bioativos

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara-SP, Outubro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

M539p Mendonça, Iatã do Carmo
Prospecção química e biológica do endófito *Humicola fuscoatra* associado a alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de metabolitos secundários bioativos / Iatã do Carmo Mendonça. – Araraquara : [s.n.], 2018
98 f. : il.

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

1. Fungos marinhos. 2. Algas marinhas. 3. Citotoxicidade.
4. Inibidores de colinesterase. 5. Compostos bioativos. I. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

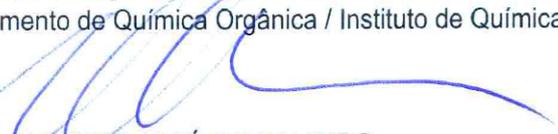
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Prospecção química e biológica do endófito *Humicola fuscoatra* associado a alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de metabólitos secundários bioativos"

AUTOR: IATÃ DO CARMO MENDONÇA

ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.^a. Dr.^a. TAÍCIA PACHECO FILL
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 05 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Iatã do Carmo Mendonça

Filiação: Oscar José Vaz Mendonça e Vera Regina do Carmo Mendonça

Nascimento: 15/05/1994 – Volta Redonda-RJ-Brasil.

Endereço Profissional: NuBBE “*Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais*”. Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: iata.mendonca@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2012-2016

Graduação: Bacharel em Química

Instituição: Universidade Federal Fluminense-RJ

2016-2018

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

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

Dissertação: Prospecção química e biológica do endófito *Humicola fuscoatra* associado a alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de metabólitos secundários bioativos.

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos ou resumos em eventos científicos:

IATÃ DO CARMO MENDONÇA.; ALANA EVANGELISTA HONÓRIO.; REBECA PREVIA TE MEDINA.; DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA. OPTIMIZATION OF GROWTH CONDITIONS AND CHEMICAL PROSPECTION OF *Nodulisporium sp.*, AN ENDOPHYTE OF *Asparagopsis taxiformis*. 6TH BCNP Brazillian Conference On Natural Products/XXXII RESEM. Victoria-ES, 2017.

IATÃ DO CARMO MENDONÇA.; ALANA EVANGELISTA HONÓRIO.; REBECA PREVIA TE MEDINA.; DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA. CHEMICAL PROSPECTION OF *Humicola fuscoatra*, AN ENDOPHYTE OF MARINE RED ALGA *Asparagopsis taxiformis*. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Foz do Iguaçu-PR, 2018.

Atividades extracurriculares:

Iniciação Científica: Introdução a Modelagem Molecular. Bolsista Jovens Talentos da Ciência. Universidade Federal Fluminense. Juliane Yoneda, 2013-2014.

Iniciação Científica: Modelagem Molecular de Compostos com Atividade frente ao Trypanossoma cruzi e Leishmania sp. Bolsista da FAPERJ. Universidade Federal Fluminense. Juliane Yoneda, 2014-2015.

Ao meu avô Guilherme (*in memoriam*)

e aos meus pais Oscar e Vera,

pelo apoio durante toda a jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos de infância, que apesar da distância neste momento, sempre estiveram presentes e me recebem de braços abertos a cada volta para casa.

Aos meus amigos da graduação pelas risadas e por todo o apoio. Em especial à Bruna, Ariane, Amanda, Erica e Larissa que compartilharam momentos incríveis durante a graduação e contribuíram muita para minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos e colegas de pesquisa do NuBBE, por todo o aprendizado. Em especial agradeço imensamente a Alana por me acolher, me auxiliar na pesquisa e estar presente em todos os momentos desta jornada.

Aos professores do IQ-UNESP por todo conhecimento e ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do IQ-UNESP pelo trabalho exemplar, em especial ao Nivaldo, responsável pelo laboratório de RMN, pela paciência e por todos os ensinamentos.

À minha orientadora, professora Dulce, por me aceitar como aluno e pelos ensinamentos em todos os âmbitos da vida, contribuindo muito para minha formação profissional e pessoal, sendo um exemplo de caráter e profissionalismo.

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

Por fim agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para minha formação pessoal e profissional, me ajudando a concluir mais uma etapa da minha vida.

De volta ao motivo

Não

De volta ao motivo do motivo

Mil voltas no mundo

Em buscas e buscas

Depois mais mil voltas em círculo

Um circo num cerco de insanidade

A fim de recuperar o que “cê” já tinha no início.

Don L

RESUMO

Considerando a variedade de compostos encontrados em produtos de origem natural, o estudo da biodiversidade de um país é de interesse tanto científico quanto econômico. Sendo possível destacar os ecossistemas marinhos que apresentam biodiversidade comparável às florestas tropicais. Devido ao ambiente diferenciado, muitas vezes inóspito, os habitantes do ambiente marinho exibem características bioquímicas diferenciadas, mostrando grande potencial para bioprospecção. A importância do estudo de organismos marinhos na busca por metabólitos secundários bioativos levou à proposta de aprofundar a prospecção química do fungo endofítico *Humicola fuscoatra*, isolado da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*. A partir de seu extrato foi possível purificar por técnicas cromatográficas, e identificar 7 substâncias com base nos dados de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , TOCSY-1D, COSY, HSQC, HMBC) e espectrometria de massas (EM). Dentre estes foram identificados um composto da classe das dicetopiperazinas (P01), duas isocumarinas (P02 e P05), além de 4 substâncias não relatadas na literatura, incluindo três valerolactamas (P03, P06 e P07) e uma cicloexadienona (P04). Além dos compostos purificados por CLAE, foi possível identificar duas substâncias por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) sendo elas uma dicetopiperazina e um ftalato. A variedade estrutural dos compostos isolados e a grande quimiodiversidade do extrato de *Humicola fuscoatra* reforçam a necessidade de se realizar estudos químicos de fungos endofíticos de origem marinha, visto que estes são uma fonte de metabólitos com grande potencial para contribuir na busca por protótipos para novos agentes terapêuticos, além de enfatizar a importância da preservação dos biomas aquáticos, sob constante ameaça por impactos ambientais e mudanças climáticas.

Palavras-chaves: Fungos Marinhos, Algas Marinhas, Citotoxicidade, Inibidores de Colinesterase, Compostos Bioativos.

ABSTRACT

Seeing the variety of compounds obtained from natural products, study a country biodiversity have a scientific interest as well as economic. It is possible to highlight marine ecosystems that present biodiversity comparable to rainforests. Due to the unique environment, often inhospitable, the organisms of the marine environments display uncommon biochemical characteristics, showing great potential for bioprospecting. The importance of the study of marine organisms in the search for bioactive compounds led to the proposal to deepen the prospection of the endophytic fungus *Humicola fuscoatra*, isolated from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. Its extract led to the purification by chromatographic methods, and identification of 7 compounds based on their NMR spectral data obtained by uni and bidimensional experiments (^1H NMR, ^{13}C NMR, TOCSY-1D, COSY, HSQC, HMBC) and mass spectrometry (MS). One diketopiperazine (P01), two isocoumarins (P02 and P05) in addition to four novel compounds, including three valerolactams (P03, P06 and P07) and one cyclehexadienone (P04) were isolated. Moreover another diketopiperazine and one phthalate derivative were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The structural variety of the identified compounds associated to the rich chemodiversity observed for the *Humicola fuscoatra* extract reinforces the need to develop additional chemical studies of endophytic fungal strains of marine origin, since they have been providing metabolites with great potential to the development of novel therapeutic agents, in addition to emphasize the importance of aquatic biomes preservation, as they have been continuously threatened by environmental and climate change impacts.

Key-words: Marine fungi, Marine Algae, Cytotoxicity, Cholinesterase inhibitors, Bioactive Compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção científica associada aos diferentes filos em pesquisas sobre produtos naturais de origem marinha de 1963 a 2013.....	21
Figura 2: Alga marinha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	22
Figura 3: Fórmulas estruturais da penicilina F e da mevinolina.	23
Figura 4: Metabólitos secundários isolados do fungo endofítico <i>Humicola fuscoatra</i> (Smetanina et al., 2004).	24
Figura 5: Metabólitos secundários isolados do fungo endofítico <i>Humicola fuscoatra</i> (Wicklów et al., 1998).	25
Figura 6: Série homóloga de hidrocarbonetos C13-C40.	30
Figura 7: Substâncias isoladas do fungo <i>Humicola fuscoatra</i> em um trabalho realizado anteriormente no grupo de pesquisa.....	32
Figura 8: Cromatogramas dos extratos selecionados com os melhores tempos de cultivo para cada meio utilizado.	32
Figura 9: Cromatograma das frações AT02-1 a AT02-6 em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; fase móvel com 5 a 100% ACN:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 45 min.; 254 nm).....	34
Figura 10: Cromatograma da fração AT02-3 em gradiente por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; fase móvel com 15 a 40% ACN:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 45 min.; 254 nm).....	35
Figura 11: Espectro no UV-Vis da substância P1.....	35
Figura 12: Estrutura da substância P01 , Ciclo (Phe-Pro).	37
Figura 13: Espectro de RMN de ¹ H da substância P01 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	38
Figura 14: Espectro de RMN de ¹³ C da substância P01 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz).....	39
Figura 15: Mapa de contorno de COSY da substância P01 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	40
Figura 16: Mapa de contorno de HSQC da substância P01 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz). ...	41
Figura 17: Mapa de contorno de HMBC da substância P01 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz). ...	42
Figura 18: Espectro no UV-Vis da substância P02	43
Figura 19: Estrutura da substância P02 , 3-metil-6,8-diidróxi-3,4-diidroisocumarina. ...	44
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H da substância P02 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	45
Figura 21: Espectro de RMN de ¹³ C da substância P02 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz).....	46
Figura 22: Mapa de contorno de COSY da substância P02 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	47
Figura 23: Mapa de contorno de HSQC da substância P02 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz). ...	48
Figura 24: Mapa de contorno de HMBC da substância P02 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz). ...	49
Figura 25: Espectro no UV-Vis da substância P03	50

Figura 26: Proposta estrutural para a substância P03	51
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H da substância P03 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	53
Figura 28: Mapa de contorno de COSY da substância P03 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	54
Figura 29: Mapa de contorno de HSQC da substância P03 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	55
Figura 30: Mapa de contorno de HMBC da substância P03 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	56
Figura 31: Mapa de contorno de HMBC de Nitrogênio da substância P03 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	57
Figura 32: Espectro no UV-Vis da substância P04	58
Figura 33: Proposta estrutural para a substância P04	59
Figura 34: Correlações observadas pelo experimento NOESY com irradiação em 6,34 e 7,18 ppm, deslocamentos referentes aos hidrogênios H-3 e H-4.	60
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H da substância P04 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	61
Figura 36: Mapa de contorno de COSY da substância P04 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	62
Figura 37: Mapa de contorno de HSQC da substância P04 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	63
Figura 38: Mapa de contorno de HMBC da substância P04 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	64
Figura 39: Espectro de NOESY da substância P04 com irradiação em 6,34 ppm (DMSO- d_6 , 600 MHz).	65
Figura 40: Espectro de NOESY da substância P04 com irradiação em 7,18 ppm (DMSO- d_6 , 600 MHz).	66
Figura 41: Cromatograma da fração AT02-5 em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% ACN:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 45 min.; 254 nm)	67
Figura 42: Espectro no UV-Vis da substância P05	68
Figura 43: Estrutura da substância P05 (3,5-dimetil-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina)	69
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H da substância P05 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	70
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da substância P05 (DMSO- d_6 , 150 MHz).	71
Figura 46: Mapa de contorno de COSY da substância P05 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	72
Figura 47: Mapa de contorno de HSQC da substância P05 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	73
Figura 48: Mapa de contorno de HMBC da substância P05 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	74
Figura 49: Cromatograma da fração AT02-4-1 em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 40 a 70% ACN:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 40 min.; 254 nm)	75
Figura 50: Espectro no UV-Vis da substância P06.....	76
Figura 51: Estrutura da substância P06	77

Figura 52: Espectro de RMN de ^1H da substância P06 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	78
Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C da substância P06 (DMSO- d_6 , 150 MHz).	79
Figura 54: Mapa de contorno de COSY da substância P06 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	80
Figura 55: Mapa de contorno de HSQC da substância P06 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	81
Figura 56: Mapa de contorno de HMBC da substância P06 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	82
Figura 57: Mapa de contorno de HMBC de Nitrogênio da substância P06 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	83
Figura 58: Espectro no UV-Vis da substância P07.	84
Figura 59: Estrutura da substância P07	85
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H da substância P07 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	86
Figura 61: Espectro de RMN de ^{13}C da substância P07 (DMSO- d_6 , 150 MHz).	87
Figura 62: Mapa de contorno de COSY da substância P07 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	88
Figura 63: Mapa de contorno de HSQC da substância P07 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	89
Figura 64: Mapa de contorno de HMBC da substância P07 (DMSO- d_6 , 600 MHz). ...	90
Figura 65: Mapa de contorno de HMBC de (N \rightarrow H) da substância P07 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	91
Figura 66: Cromatograma em CG-MS do extrato AT02.	92
Figura 67: Estruturas das substâncias identificadas por GC-MS.	93
Figura 68: Comparação do perfil químico do fungo <i>Humicola fuscoatra</i> em diferentes tempos de crescimento em meio de malte em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 45 min.; 254 nm)	99
Figura 69: Comparação do perfil químico do fungo <i>Humicola fuscoatra</i> em diferentes tempos de crescimento em meio de Czapek em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 45 min.; 254 nm)	99
Figura 70: Comparação do perfil químico do fungo <i>Humicola fuscoatra</i> em diferentes tempos de crescimento em meio de arroz em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O a 1 mL.min ⁻¹ , 45 min.; 254 nm)	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância P01	37
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância P02	44
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância P03	52
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C para a substância P04	60
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C para a substância P05	69
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância P06	77
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância P07	85
Tabela 8: Substâncias identificadas por GC-MS.....	92
Tabela 9: Atividades citotóxicas para MCF-7.....	93
Tabela 10: Atividades citotóxicas para HCT-116.....	94
Tabela 11: Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas AChEe e BChEh.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
ICERs	Biorreatores
C18	Sílica Gel de Fase Reversa Tipo Octadecil Silano
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AChE-ee	Enzima Acetilcolinesterase de Enguia Elétrica
AChE-hu	Enzima Acetilcolinesterase Humana
BChE-hu	Enzima Butirilcolinesterase Humana
EM	Espectrometria de Massas
<i>HMBC</i>	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<i>HSQC</i>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HCT-116	Linhagem de Célula Tumoral de Cólon Humano
MCF-7	Linhagem de Célula Tumoral de Mama Humana
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
MBD	Meio de Batata e Dextrose
min.	Minutos
nm	Nanômetro
PDA	Potato-Dextrose-Agar
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ^1H

Ressonância Magnética Nuclear de
Hidrogênio

TOCSY

Total Correlation Spectroscopy

NOESY

Nuclear Overhauser Effect
Spectroscopy

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produtos Naturais	19
1.2 Algas	20
1.3 Algas vermelhas	21
1.4 Fungos	22
1.5 <i>Humicola fuscoatra</i>	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 Coleta do material	26
3.2 Obtenção e cultivo do endófito	26
3.3 Preparação e partição do extrato bruto	26
3.4 Fracionamento do extrato bruto e posterior isolamento dos constituintes químicos	27
3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	27
3.4.2 Cromatografia em coluna (CC)	27
3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	28
3.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ¹H e RMN de ¹³C)	28
3.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	28
3.6 Perfil Biológico	30
3.6.1 Ensaio Anticolinesterásico	30
3.6.2 Ensaio Citotóxico	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Análise da variação de cultivo	32
4.2 Perfil químico e fracionamento do extrato bruto	33
4.3 Isolamento dos metabólitos da fração AT02-3	34

4.3.1 Elucidação estrutural da substância P01.....	35
4.3.2 Elucidação estrutural da substância P02.....	43
4.3.3 Elucidação estrutural da substância P03.....	50
4.3.4 Elucidação estrutural da substância P04.....	58
4.4 Isolamento dos metabólitos da fração AT02-5.....	67
4.4.1 Elucidação estrutural da substância P05.....	68
4.5.1 Elucidação estrutural da substância P06.....	76
4.6 Análise do extrato AT02 por GC-MS	92
4.7 Testes de atividade biológica.....	93
5 CONCLUSÃO.....	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
7 ANEXO.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Desde os primórdios a humanidade recorreu à natureza para suprir suas necessidades, dentre as quais está o combate a enfermidades que venham a acometer a população. O registro mais antigo do uso de recursos naturais para o tratamento de problemas de saúde é de aproximadamente 2600 a.c., encontrado na região da mesopotâmia, e descreve o uso de mais de 1000 extratos derivados de plantas. Outro documento importante é o papiro de Ebers que relata o uso de produtos de origem natural pelo povo egípcio, datando de aproximadamente 1500 a.c. Este manuscrito documenta mais de 700 extratos que em grande maioria são derivados de plantas. (CRAGG, 2013)

A grande diversidade estrutural e bioatividade de substâncias obtidas a partir de produtos de origem natural representam fatores importantes para seu uso no desenvolvimento de fármacos e outros bioprodutos. Sendo a natureza esta fonte renovável de compostos variados, o profundo conhecimento da biodiversidade de um país pode levar a avanços significativos em diversos setores, como alimentício, farmacêutico e cosmético, podendo apresentar importantes contribuições para a economia nacional se bem aproveitado. (BOLZANI, 2016)

Além das plantas, outros organismos como fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são também fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de ou inspirada em produtos naturais. (BARREIRO, 2009).

Os organismos marinhos vêm ganhando espaço como fonte de produtos de origem natural. Apesar de não existirem registros de uso histórico significativo na medicina tradicional, estes biomas apresentam enorme diversidade biológica. Dos 33 filos animais, 15 são exclusivamente marinhos. Com o desenvolvimento de técnicas de exploração aquática a coleta de amostras de origem marinha foi facilitada intensificando as pesquisas, entre os anos de 1977 e 1987 foram reportados aproximadamente 2500 novos compostos de organismos marinhos e apenas em 2010 foram relatadas 1003 novas substâncias. Evidenciando a importância dos organismos de origem marinha como fonte de compostos bioativos. (CRAGG, 2013)

Outra fonte de compostos bioativos que passou a se destacar nos últimos anos são os microrganismos, devido principalmente a facilidade de manipulação e crescimento dos mesmos e a grande variedade de metabolitos que estes apresentam.

Além disso, com os avanços das técnicas de análise genômica, tornou-se possível estudar de uma perspectiva biosintética os genes responsáveis pela produção de substâncias bioativas, sendo possível confirmar em alguns casos as fontes de determinados metabolitos, identificados anteriormente nos hospedeiros de microrganismos endofíticos por exemplo. Sendo possível também desenvolver estudos que busquem induzir ou otimizar a produção de compostos de interesse por suplementação do meio de cultivo com extratos de partes da fonte original do microrganismo, ou realizando crescimentos em cocultura, levando a modificação de vias biosintéticas. (NEWMAN, 2016)

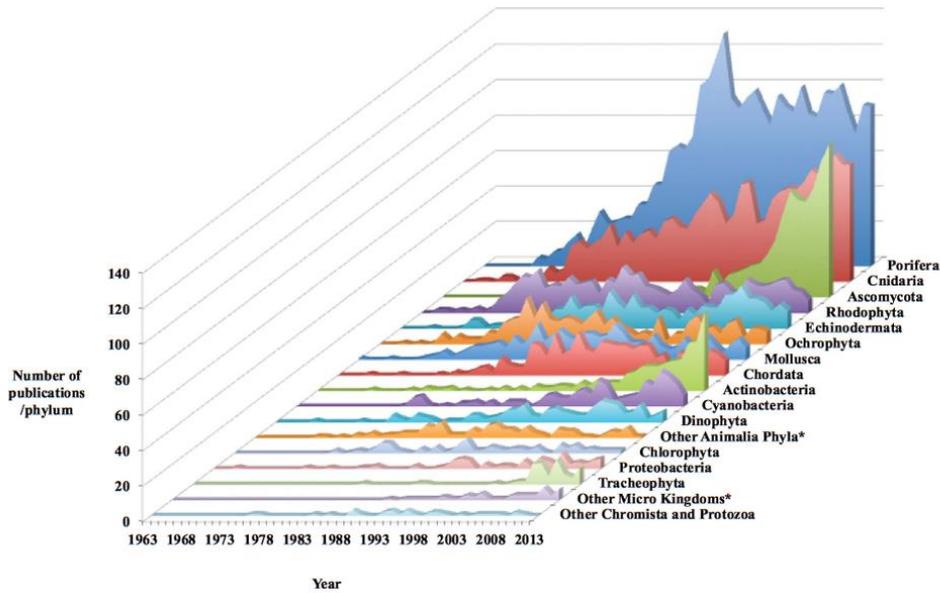
1.2 Algas

As algas podem ser definidas como organismos fotossintéticos uni ou pluricelulares, apresentando formas procarióticas (como as cianobactérias) ou eucarióticas. Com morfologias simples e baixo nível de diferenciação se comparadas aos demais organismos fotossintetizantes, podem variar de formas unicelulares isoladas, agregados de células, colônias e filamentos simples ou ramificados podendo ser móveis pela presença de flagelos. Já os representantes multicelulares apresentam maior nível de organização com a presença de tecidos e divisão de trabalho. (BICUDO, 2010)

Sua biodiversidade é comparável à observada nas florestas tropicais, sendo esta riqueza de espécies capaz de produzir substâncias com enorme variedade de estruturas químicas com potencial elevado para descoberta de novos fármacos (MOLINSKI, 2009).

As algas do tipo bento (macroalgas) podem ser divididas principalmente em três grupos, as algas verdes (*Chlorophyta*), apresentando cerca de 4500 espécies, as pardas (*Phaeophyta*), compostas por aproximadamente 2000 espécies e as vermelhas (*Rhodophyta*), sendo o grupo mais representativo, apresentando cerca de 7000 espécies. (GUIRY, 2012). Em função de sua enorme biodiversidade e quimiodiversidade, grande parte das pesquisas sobre organismos marinhos realizadas nos últimos anos focalizaram as algas, com destaque para as rodófitas (Figura 1).

Figura 1: Produção científica associada aos diferentes filos em pesquisas sobre produtos naturais de origem marinha de 1963 a 2013.



Fonte: BLUNT, 2015.

1.3 Algas vermelhas

As algas vermelhas (*Rhodophyta*) são reconhecidas como as maiores produtoras de substâncias halogenadas no meio marinho, destacando-se como uma fonte de novos produtos naturais. Amplamente distribuídas em mares temperados-quentes e tropicais do mundo, o filo compreende mais de 130 espécies morfologicamente complexas. (PEREIRA, 1999)

A alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (Figura 2), da qual o endófito estudado neste trabalho foi isolado, apresenta diversos metabólitos secundários com variadas atividades biológicas, como por exemplo antibacteriana e anti-incrustante, além de se mostrar tóxica para peixes e crustáceos. (MANILAL, 2010)

Figura 2: Alga marinha *Asparagopsis taxiformis*.



Fonte: Fotografia fornecida pela Dra. Rebeca Previante, integrante deste grupo de pesquisa

Devido à frequente competição entre organismos marinhos e a necessidade de sobrevivência em um ambiente inóspito, com limitações de nutrientes e espaço, estes seres desenvolveram sistemas de defesa buscando a preservação da própria espécie. Dentre estes pode-se citar a produção de uma maior diversidade de metabólitos, se comparado a organismos terrestres. Além disso, é comum o compartilhamento destes mecanismos, por exemplo entre seres que habitam o mesmo ecossistema, como ocorre em recifes de corais, ou pela simbiose entre macro e micro-organismos. (FELÍCIO, 2012)

Um exemplo de simbiose é a relação entre algas e fungos endofíticos, sendo estes, microrganismos que em alguma fase de seu ciclo de vida habitam o interior dos tecidos do hospedeiro, sem lhe causar nenhum dano aparente e desempenhando funções importantes, como por exemplo, a produção de substâncias que protegem o hospedeiro contra patógenos ou auxiliam no desenvolvimento do mesmo. Para o microrganismo, a simbiose também é vantajosa pois estes encontram no hospedeiro um habitat rico em nutrientes e com menor competição por parte de outros microrganismos. (NETO, 2004)

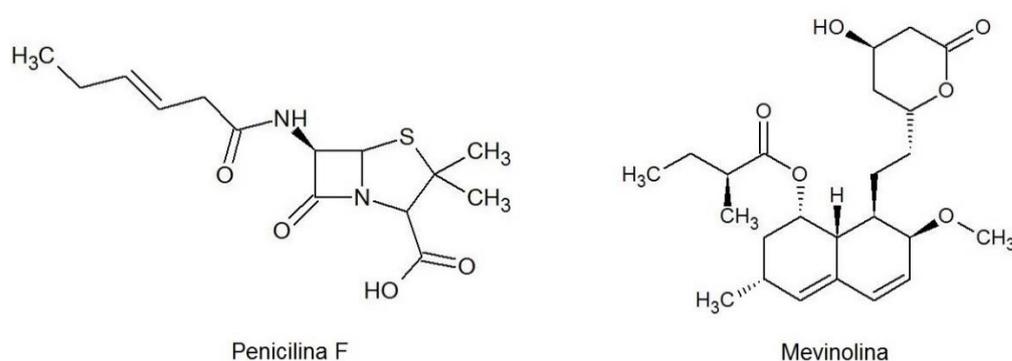
1.4 Fungos

Estes organismos são seres eucariontes, podendo se apresentar nas formas unicelular (leveduriformes) ou multicelular (filamentosos). São encontrados em praticamente todo o ambiente que nos cerca, sendo responsáveis principalmente por decompor resíduos orgânicos, transformando em substâncias assimiláveis pelas plantas. Além disso apresentam grande interesse econômico, sendo estudados e

utilizados por diversas áreas, como medicina, farmácia, nutrição agricultura, biotecnologia, entre outras. (MORAES, 2010)

Diversas substâncias naturais de uso terapêutico já foram identificadas e isoladas de espécies de fungos, como, penicilinas e cefalosporinas, utilizadas como antibióticos, a mevinolina, um agente redutor de colesterol, bleomicinas, daunorubicinas e análogos, utilizados como agentes antitumorais, dentre outras. Além disso os fungos filamentosos, grupo no qual estão incluídos os fungos endofíticos, têm como característica a capacidade de biossintetizar uma grande quantidade de metabólitos secundários. (CAFÊU, 2005)

Figura 3: Fórmulas estruturais da penicilina F e da mevinolina.



Fonte: Autor

Os fungos endofíticos, encontrados em simbiose com plantas e algas, têm-se destacado na produção de metabólitos bioativos. Apesar dos mecanismos envolvidos na relação endófito-hospedeiro ainda não serem bem elucidados, sabe-se que alguns destes micro-organismos são capazes de produzir metabólitos característicos de seus hospedeiros, sendo uma propriedade importante para a utilização de produtos naturais já que pode levar a redução da coleta de plantas ou algas que apresentem crescimento lento ou ameaça de extinção. Além disso a fermentação microbiana como meio de produção de substâncias bioativas apresenta muitas vantagens sobre a utilização de plantas ou algas, em vista da possibilidade de variações nas condições de cultivo, buscando otimizar vias biossintéticas desejadas, maior facilidade em aumentar a produção e melhor resposta a técnicas rotineiras de cultura. (SPECIAN, 2015)

Os fungos endofíticos representam um grupo de microrganismos ainda pouco estudados, sendo uma importante fonte de metabólitos secundários que costumam apresentar as mais variadas características estruturais, como esteroides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, peptídeos, terpenoides, policetídeos, alcaloides, dentre outras classes de compostos. Além disso, é possível cultivar estes microrganismos em

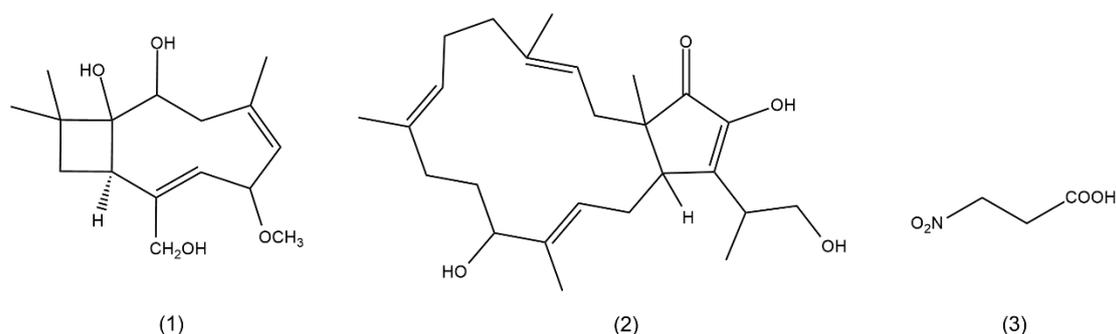
larga escala buscando uma maior produção de compostos bioativos comercialmente importantes, não só para aplicações em medicina como na agricultura e na indústria. (RAJAMANIKYAM, 2017)

1.5 *Humicola fuscoatra*

O fungo endofítico utilizado neste trabalho pertence ao gênero *Humicola*, que engloba microrganismos conhecidos por produzirem diferentes enzimas extracelulares, como amilase (BARNETT, 1971), celulases (YOSHIOCA, 1982), xilanases (MONTI, 1991), entre outras. Apesar de fungos do gênero *Humicola* apresentarem diversos estudos de interesse biotecnológico e industrial devido à produção enzimática dos mesmos, são poucos os estudos voltados à avaliação do potencial biológico de seus metabólitos secundários.

Pode-se citar o estudo publicado por Smetanina e colaboradores (2004), que apresenta três metabólitos secundários do fungo endofítico *Humicola fuscoatra* isolado de uma colônia de ascídias. Os compostos isolados incluíram um sesquiterpeno conhecido como fuscoatrol A (**1**), um sesterpeno denominado 11-*epi*-terpestacina (**2**) e o ácido β -nitro propiônico (**3**) (Figura 4).

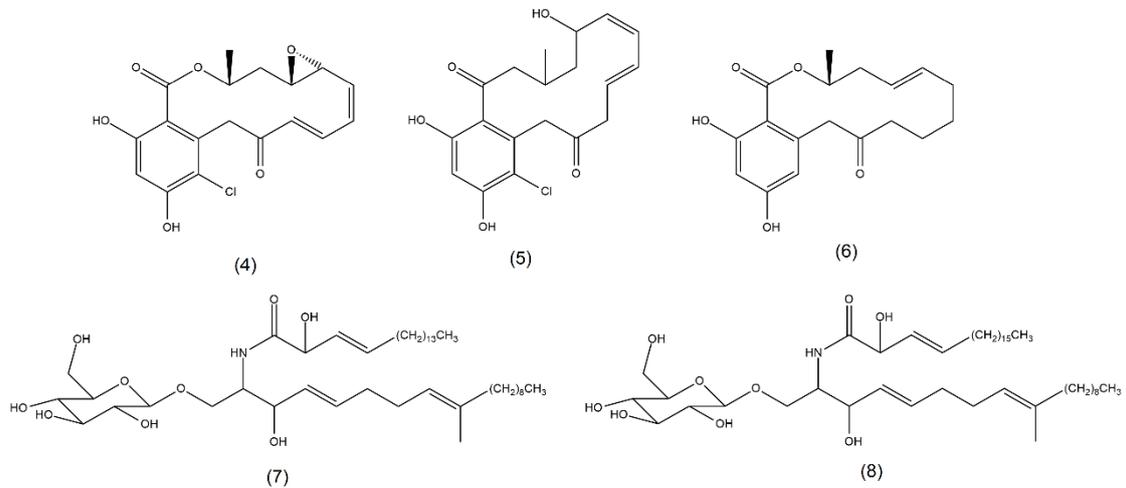
Figura 4: Metabólitos secundários isolados do fungo endofítico *Humicola fuscoatra* (Smetanina et al., 2004).



Fonte: Autor

Outro estudo de metabólitos secundários do fungo *Humicola fuscoatra* foi realizado por Wicklow e colaboradores (1998), que isolaram 5 compostos com atividade antifúngica, sendo eles o monorden (**4**) e um análogo (**5**), a monocillina IV (**6**), o cerebrosídeo C (**7**) e o cerebrosídeo D (**8**), cujas estruturas estão representadas na figura 5.

Figura 5: Metabólitos secundários isolados do fungo endofítico *Humicola fuscoatra* (Wicklow et al., 1998).



Fonte: Autor

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar o estudo químico de *Humicola fuscoatra*, e avaliar o potencial anticolinesterásico e citotóxico dos extratos, frações e substâncias puras.

2.2 Objetivos específicos

- Fracionar os extratos de *Humicola fuscoatra* e analisar o perfil químico das frações obtidas através de CLAE-UV-DAD e RMN de ^1H , e avaliar as suas bioatividades através de bioensaios in vitro;
- Fracionar e purificar as substâncias presentes nas frações de *Humicola fuscoatra*.
- Avaliar o potencial citotóxico e anticolinesterásico das frações semipurificadas e substâncias isoladas.
- Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas através da combinação de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C , mono e bidimensionais, UV) e espectrométricos (EM, CLAE/EM e CG/EM), conforme suas características estruturais.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do material

Espécimes da fase diploide (estado *Falkenbergia*) de *Asparagopsis taxiformis* foram coletados em setembro de 2011, no litoral norte do estado de São Paulo, no costão direito da praia da Fortaleza, (Ubatuba, SP). A macroalga foi identificada pela Dr^a Nair Yokoga (Instituto de Botânica- Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) e uma exsicata (SP 401747) foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica.

3.2 Obtenção e cultivo do endófito

O isolamento dos fungos associados a alga marinha *Asparagopsis taxiformis* foi realizado anteriormente pela Dra. Rebeca Previante Medina, em trabalhos do grupo. Foram utilizados os seguintes procedimentos:

Método 1: a superfície do material vegetal foi esterilizada por imersão em etanol 70% por 10 segundos.

Método 2: imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos.

Ambos os procedimentos foram seguidos de uma dupla lavagem em água estéril por 10 minutos.

A alga foi seccionada com ajuda de um bisturi e inserida em meio de cultura sólido PDA, auto-clavado e ao qual foi adicionado antibiótico para evitar o crescimento bacteriano. O desenvolvimento dos fungos foi monitorado até observação de pequenas colônias, retirando então uma parte de cada linhagem, e inoculada separadamente em outra placa.

A linhagem utilizada no trabalho, identificada no nível de gênero anteriormente pela empresa *Genotyping Biotecnologia* (Botucatu-SP) como *Nodulisporium sp.* foi enviada para uma nova avaliação, realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares (UFMT, Cuiabá, MT), por taxonomia molecular e morfológica. Dessa forma o fungo foi re-identificado como pertencente ao gênero *Humicola* e a espécie *fuscoatra*

3.3 Preparação e partição do extrato bruto

O fungo foi inoculado em três diferentes meios, sendo um sólido, arroz, e dois líquidos, extrato de malte (meio rico) e Czapeck (meio pobre), sendo mantidos sob temperatura de 25°C, em modo estático, por quatro períodos distintos de fermentação,

7, 14, 21 e 28 dias. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de boca larga (5 cm de diâmetro) e com volume de 200 ml de cultivo.

Ao final dos períodos de fermentação dos fungos, o micélio foi separado do caldo fermentado através do processo de filtração a vácuo. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido/líquido com AcOEt e o meio sólido foi submetido a maceração com AcOEt utilizando etapas de 100 ml por 3 dias seguido da evaporação do solvente para obtenção dos extratos brutos. Estes foram submetidos a análises de RMN de ^1H e CLAE-DAD visando obter seus perfis químicos.

Após a análise desses resultados, foi escolhida a metodologia que apresentou maior produção das substâncias de interesse para crescimento em escala ampliada visando a obtenção de maior massa de extrato bruto para facilitar o isolamento, identificação/elucidação estrutural e avaliação de atividades biológicas dos extratos e substâncias purificadas.

3.4 Fracionamento do extrato bruto e posterior isolamento dos constituintes químicos

3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC utilizaram-se placas comerciais com fase estacionária sílica gel e fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ em diferentes proporções. As placas foram reveladas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguido de nebulização com anisaldeído e aquecimento.

3.4.2 Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílica de modo reverso do tipo octadesil silano (C-18) (Sorbent Technologies), porosidade 60 Å, tamanho das partículas 40-75 μm (200-400 mesh). Utilizou-se como fase móvel misturas dos solventes $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ para análise em modo reverso.

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

Para análises por CLAE-DAD foi utilizado equipamento com duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de arranjos de diodos SPD-M20A (Shimadzu®).

O sistema utilizado para análise em CLAE foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) de dimensão 250 x 4,6 mm, e eluição em gradiente H₂O/MeOH (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com vazão de 1,0 mL/min. e comparado em diferentes comprimentos de onda.

3.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ¹H e RMN de ¹³C)

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em dois espectrômetros, Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,0 T e Bruker Ascend III 600 com campo magnético de 14,1 T. O TMS foi utilizado como referência interna. As amostras foram solubilizadas nos solventes, dimetilsulfóxido (DMSO-d₆) ou metanol-d₄.

3.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos foram submetidos a análises por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) para identificação das substâncias por análise qualitativa.

Inicialmente o extrato foi submetido às reações de derivatização:

Metoximação: 5-10 mg da amostra foram solubilizados em 80 µl de uma solução de metoxiamina em piridina (20 mg/ml) e em seguida adicionou-se mais 100 µl de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30 °C por 90 min.

Sililação: À amostra metoximada adicionou-se 200 µl de MSTFA [N-metil-N (trimetilsilil) trifluoroacetamida], homogeneizou-se bem e aqueceu-se a 37°C por 30 min. Após esses procedimentos a amostra foi filtrada com microfiltro de 0,22 µm e transferida para vial com *insert* de 350 µl.

Estas reações são necessárias para que as substâncias desconhecidas presentes se tornem mais voláteis e com maior estabilidade térmica. Essa técnica consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupamentos –OH, -SH, -NH e –COOH por unidades de trimetilsilano (TMS) ou *tert*-butildimetilsilano (TBDMS).

Para as análises por CG-EM foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu CGMS-QP2020 equipado com injetor automático AOC-20i, com coluna capilar Restek® SH-RTx-5MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano) de 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, GCMS solution version 4.41.

A temperatura do forno foi ajustada da seguinte forma:

$$60\text{ °C (1 min)} \xrightarrow{5\text{ °C / min}} 320\text{ °C (10 min)}$$

A temperatura do injetor foi de 270 °C em modo *splitless*, gás de arraste He (99,999%) com vazão constante de 1 mL/min e volume de amostra injetado de 1 µL. A pressão foi de 57,4 KPa, velocidade linear do gás de arraste de 36,5 cm/seg e fluxo total de 104 mL/min. Para as condições de detecção por EM, foram utilizadas temperatura da fonte de íons de 270 °C e temperatura de interface de 280 °C, e faixa da massa de aquisição de *m/z* 35-700 Daltons. A aquisição dos dados foi obtida e analisada através do software CGMS Analysis.

Para a identificação das substâncias presentes nas amostras, utilizaram-se duas metodologias para assegurar a confiabilidade dos resultados. Foram comparados os espectros de fragmentação dos extratos testados com a base de dados NIST 69™ *Library* utilizando apenas os valores encontrados acima de 80% de similaridade.

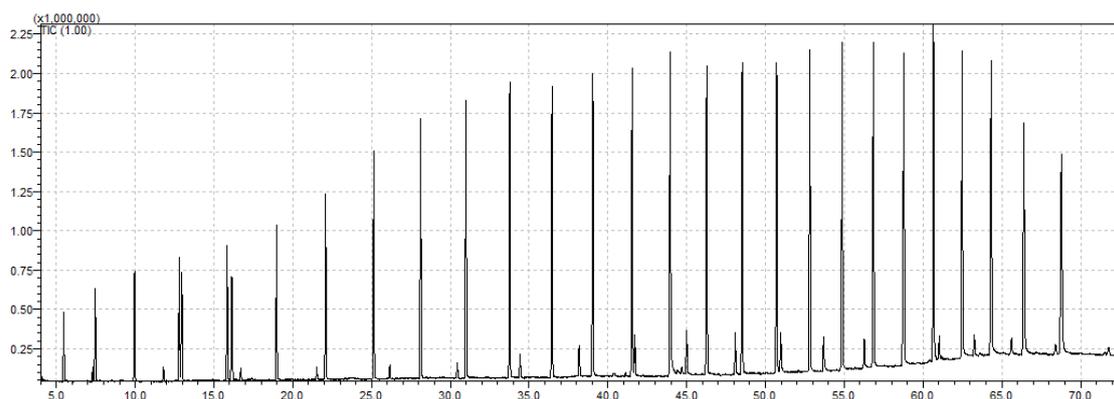
Em seguida as substâncias tiveram seus índices de retenção calculados pela equação de Van Den Dool e Kratz (**Equação 1**), através da interpolação do tempo de retenção da banda cromatográfica de interesse com as bandas imediatamente anterior e posterior da série homóloga de alcanos (C₈-C₄₀) (**Figura 6**).

Equação 1: Equação de Van Den Dool e Kratz

$$IR = 100.n + 100.\left(\frac{tRx - tRn}{tRn + 1 - tRn}\right)$$

onde *n* é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior ao pico de interesse, *tRx* é o tempo de retenção da substância de interesse, *tRn* é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído antes do analito e *tRn+1* o tempo de retenção do *n*-alcano posterior ao pico de interesse.

Figura 6: Série homóloga de hidrocarbonetos C13-C40.



Fonte: Autor

Os índices de retenção encontrados foram comparados com os dados de índice de retenção teórico, encontrados na literatura, confirmando ou não a presença dos compostos sugeridos pelo banco de dados.

3.6 Perfil Biológico

3.6.1 Ensaio Anticolinesterásico

As amostras foram submetidas ao ensaio de inibição para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e para a enzima butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}). Utilizou-se as enzimas AChE_{ee} e a BChE_{hu} imobilizadas em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375mm x 100 µm d.i.) denominadas ICER (Immobilized Capillary Enzyme Reactor) ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}, respectivamente. Os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu} foram utilizados como biorreatores enzimáticos acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e um espectrômetro de massas (EM) formando um sistema *on-flow* para a realização de ensaios de triagem de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática é monitorada pela quantificação direta do produto de hidrólise enzimática *m/z* 104 e utilizando a galantamina como inibidor padrão. Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (P_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (P_0), de acordo com a **Equação 2**.

Equação 2: Cálculo referente a inibição da enzima acetilcolinesterase.

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{P_i - Sb}{P_0 - Sb} \right] \times 100$$

As amostras de extratos foram preparadas na concentração de 1,5 mg mL⁻¹, enquanto as substâncias puras na concentração de 1,0 mg mL⁻¹, solubilizadas em 100% metanol.

A partir de cada solução estoque de cada um dos compostos (2 mg.mL⁻¹) foram utilizadas alíquotas de 10 µL (200 µg.mL⁻¹ concentração final) e adicionados 20 µL da solução estoque de acetilcolina (ACh) 350 µM (70 µM concentração final) e 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de 100 µL. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 10 µL foram injetadas no sistema CLAE-UV contendo os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{nu}¹.

3.6.2 Ensaio Citotóxico

Utilizaram-se placas de 96 poços para plaquear 1 x 10⁴ células por poço, a partir de uma solução de concentração igual a 5 x 10⁴ células/ 200 µL de meio. Após 24h adicionaram-se as substâncias a serem testadas em duas concentrações distintas, 5 µM e 50 µM, realizando cada aplicação em duplicata com tempo de incubação de 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após a incubação o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas após o procedimento, o sobrenadante foi removido. Após a secagem das placas, o precipitado de azul de formazana do MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e então a absorbância da solução foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983). Foram realizados dois experimentos independentes para células de carcinoma colorretal (HCT 116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7)².

¹ Ensaio realizado em parceria com Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso (GCBPN) USP-RP

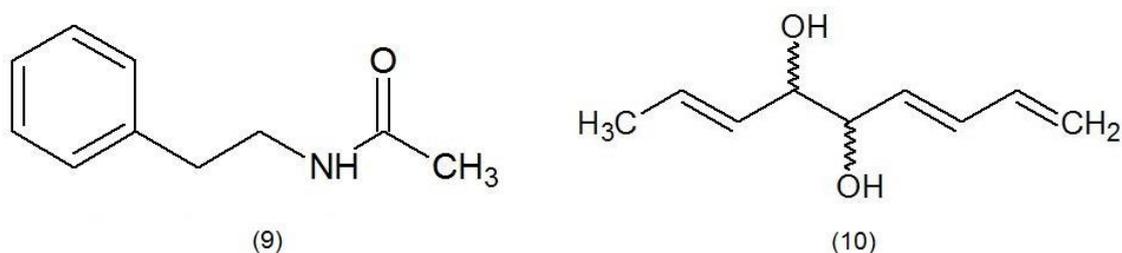
² Ensaio realizado em parceria com Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo (ICB) USP-SP

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da variação de cultivo

Inicialmente realizou-se o crescimento da linhagem fúngica em diferentes tempos e meios de cultivo buscando otimizar a produção de dois compostos isolados anteriormente no trabalho realizado no nosso grupo de pesquisa, a N-(2-feniletil)acetamida (**9**) e o (2E, 6E) Nona-2,6,8-trieno-4,5-diol (**10**). (Santos, 2016)

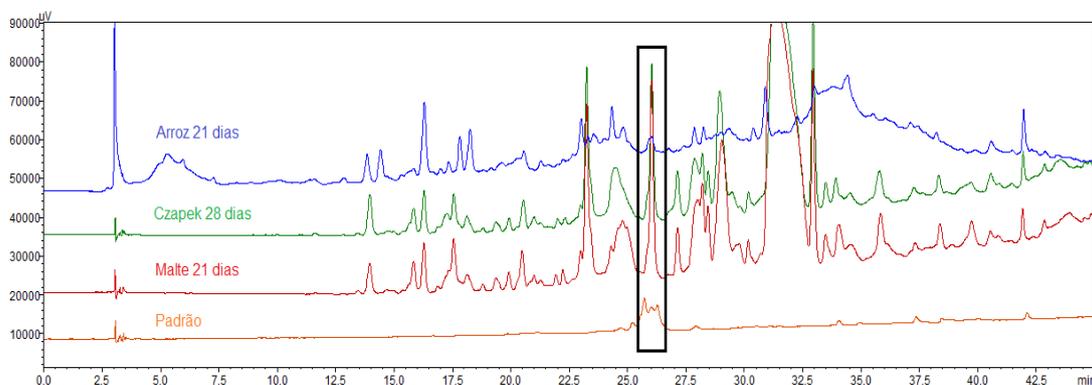
Figura 7: Substâncias isoladas do fungo *Humicola fuscoatra* em um trabalho realizado anteriormente no grupo de pesquisa.



Fonte: Autor

Assim, foi possível analisar os perfis cromatográficos de cada extrato obtido rastreando as bandas cromatográficas referentes às substâncias de interesse por comparação com um padrão composto pelas mesmas (Figuras 68 - 70, em anexo). A figura 8 evidenciou os melhores tempos de cultivo para cada meio utilizado, sendo essa escolha realizada com base na massa de extrato obtida e na intensidade da banda correspondente às substâncias de interesse, que apresentaram um tempo de retenção de 26,05 min.

Figura 8: Cromatogramas dos extratos selecionados com os melhores tempos de cultivo para cada meio utilizado.



Fonte: Autor

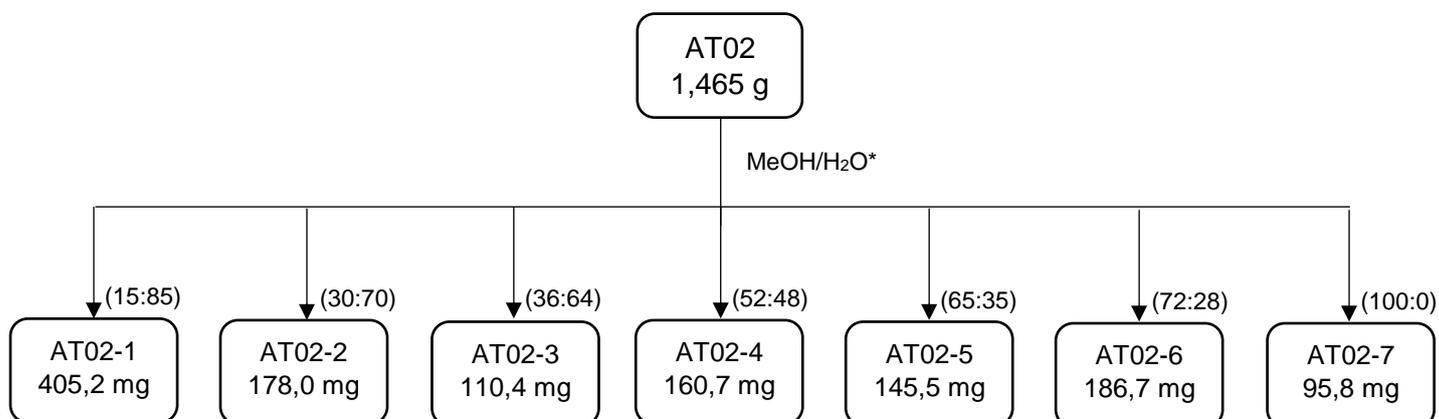
Dessa forma a metodologia escolhida para o crescimento da linhagem fúngica em escala ampliada se deu pela utilização do meio de cultivo de extrato de malte em um tempo de desenvolvimento de 21 dias (linha vermelha). A massa de extrato seco produzido por esta metodologia foi de aproximadamente 17 mg por Erlenmeyer. Dessa forma, para garantir a quantidade de extrato adequada para isolamento dos metabólitos secundários com massa suficiente para elucidação estrutural e posteriores testes biológicos, foram utilizados 85 Erlenmeyers no crescimento do fungo endofítico em escala ampliada, sendo obtidos após partição líquido/líquido e evaporação do solvente 1,465 g de extrato bruto codificado como AT02.

4.2 Perfil químico e fracionamento do extrato bruto

O cromatograma do extrato AT02 apresentou uma grande quantidade de metabólitos secundários espalhados em grande parte da sua extensão, o que evidencia a variedade estrutural dos compostos, além deles apresentarem absorção na região de radiação UV/Vis, característica de metabólitos possivelmente com ligações duplas conjugadas e/ou heteroátomos, muitas vezes observadas em substâncias com atividade biológica.

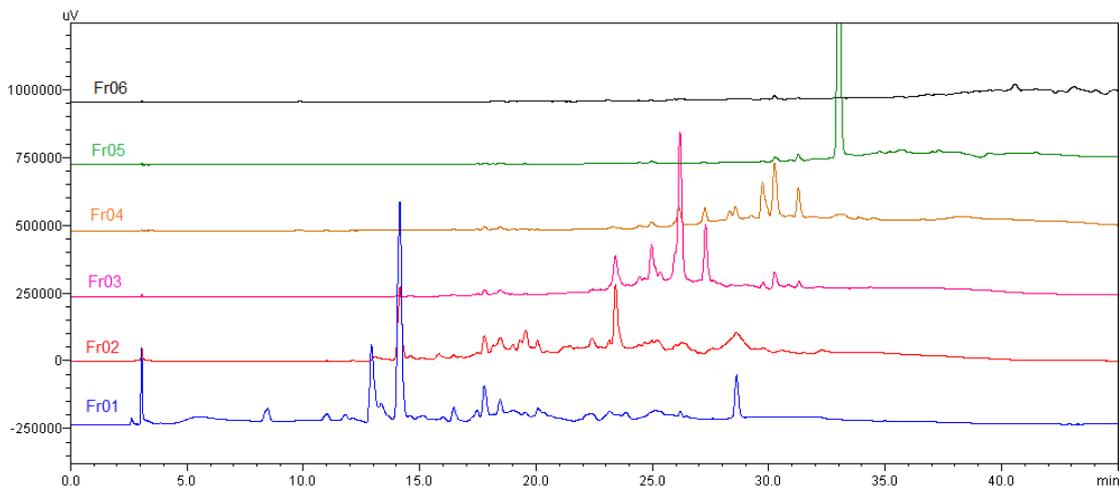
O fracionamento do extrato AT02 foi realizado em CC em modo reverso (C18) buscando separar os metabólitos secundários por polaridade, resultando em 7 frações (Figura 9). O esquema 1 mostra a composição das fases móveis utilizadas e a massa de cada fração após a evaporação dos solventes.

Esquema 1: Fracionamento de AT02 em CC (C18) eluída com MeOH/H₂O em diferentes composições de fase móvel.



- Cada fração foi eluída com 200 mL de MeOH/H₂O nas proporções indicadas em %, apresentado as massas indicadas nos balões.

Figura 9: Cromatograma das frações AT02-1 a AT02-6 em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; fase móvel com 5 a 100% ACN:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 45 min.; 254 nm)

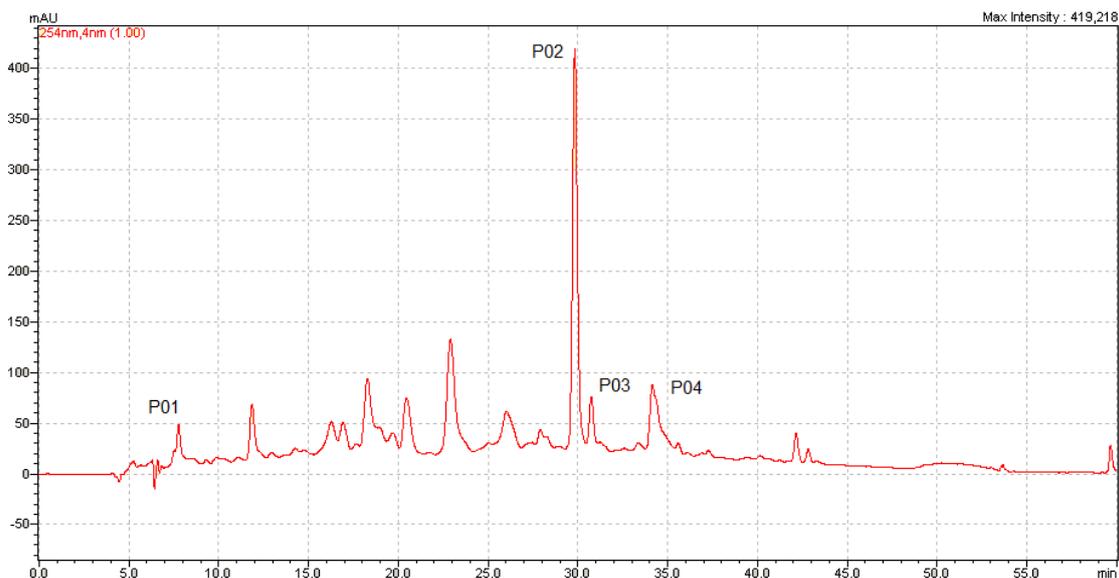


Fonte: Autor

4.3 Isolamento dos metabólitos da fração AT02-3

Após analisar o perfil cromatográfico das frações obtidas optou-se por trabalhar primeiramente com a fração AT02-3 (Figura 10), visto que a mesma apresentava melhor resolução entre as bandas cromatográficas, sendo possível seguir para o isolamento das substâncias por CLAE semipreparativo sem fracionamentos intermediários. Dessa forma foi possível isolar 10 substâncias, sendo que 4 apresentaram pureza e massa suficiente para a realização dos experimentos espectroscópicos necessários para a elucidação de suas estruturas. Estes compostos foram codificados como **P01**, **P02**, **P03** e **P04**.

Figura 10: Cromatograma da fração AT02-3 em gradiente por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; fase móvel com 15 a 40% ACN:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 45 min.; 254 nm)

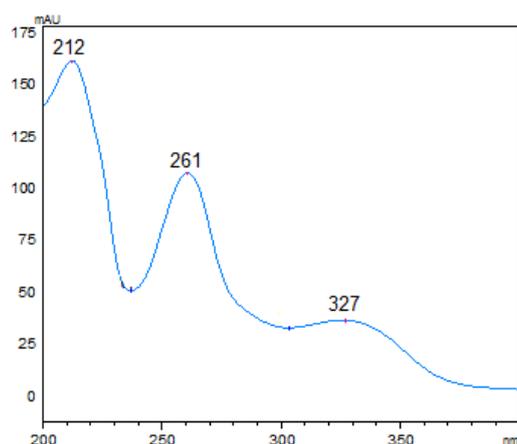


Fonte: Autor

4.3.1 Elucidação estrutural da substância P01

A substância **P01** foi obtida como um sólido marrom, sendo possível observar em seu espectro no UV-Vis, bandas de absorção em 212, 261 e 327 nm (Figura 11).

Figura 11: Espectro no UV-Vis da substância P1.



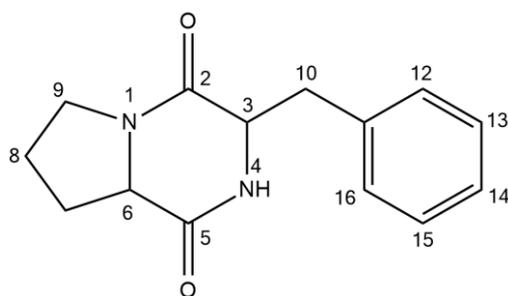
Fonte: Autor

No espectro de RMN de H¹ de **P01** (Figura 13) foi possível observar a presença de um singlete característico de hidrogênio ligado a heteroátomo em δ_H 8,00, dois sinais na região de hidrogênios aromáticos: um multipeto com integral para 1 H em δ_H 7,19 e um multipeto com integral para 4 H em δ_H 7,26, sugerindo um anel aromático

monossubstituído. O espectro apresentou também sinais em δ_H 4,35 e δ_H 4,08 referentes a H alifáticos, desblindados possivelmente devido a presença de heteroátomos (Tabela 1). O mapa de contorno HSQC (Figura 16) mostrou correlações dos sinais de hidrogênio com seus respectivos carbonos. O mapa de contorno HMBC (Figura 16) evidenciou a presença de C quaternários, sendo um deles aromático e dois C carbonílicos. A presença de duas carbonilas com deslocamentos característicos de éster ou amida e os sinais para C-3 e C-6 em δ_C 56,2 e δ_C 58,7 respectivamente, característicos de carbonos ligados a nitrogênio, sugeriu que esta substância pertence à classe das 2-5 dicetopiperazinas. Dessa forma, analisando as demais correlações nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figuras 15 e 17), e comparando com estruturas de alguns aminoácidos, foi possível identificar a substância **P01** como a dicetopiperazina Ciclo(Phe-Pro) (Figura 12), pois é formada pela junção de dois aminoácidos, a prolina e a fenilalanina.

Esta substância foi anteriormente isolada de *Bacillus cereus subsp. thuringiensis* apresentou atividade antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* (KUMAR, 2014)

Figura 12: Estrutura da substância **P01**, Ciclo (Phe-Pro).



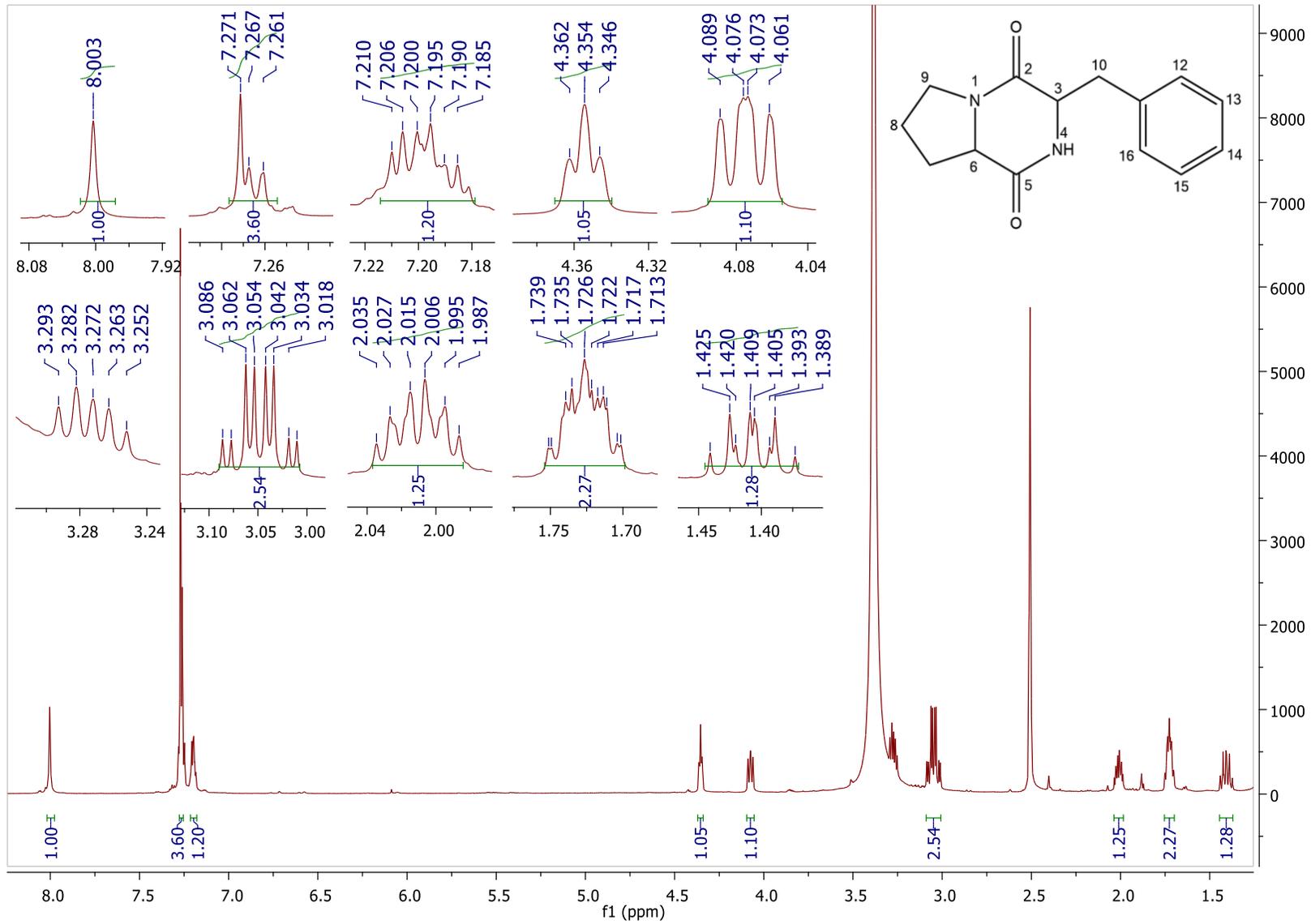
Fonte: Autor

Tabela 1: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **P01**.

Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	HMBC
2	---	165,5	---
3	4,35 (t, 4,8);	56,1	35,8; 137,7; 165,5
4	8,00 (s)	---	58,7; 165,5
5	---	169,5	---
6	4,08 (dd, 9,0; 7,5)	58,7	28,2; 169,5
7	1,41 (m) 2,01 (dt, 11,7; 4,8)	28,2	22,3; 45,0; 58,7; 169,5
8	1,72 (td, 4,8; 1,6)	22,3	28,2; 45,0
9	3,27 (td, 11,7; 6,2) 3,39 (dt, 11,7; 8,1)	45,0	22,3; 28,2; 58,7
10	3,05 (dq, 14,2; 5,3)	35,8	56,2; 130,3; 137,7; 165,5
11	---	137,7	---
12	7,24 - 7,28 (m)	130,2	
13	7,24 - 7,28 (m)	128,4	
14	7,18 - 7,21 (m)	126,8	
15	7,24 - 7,28 (m)	128,4	
16	7,24 - 7,28 (m)	130,2	

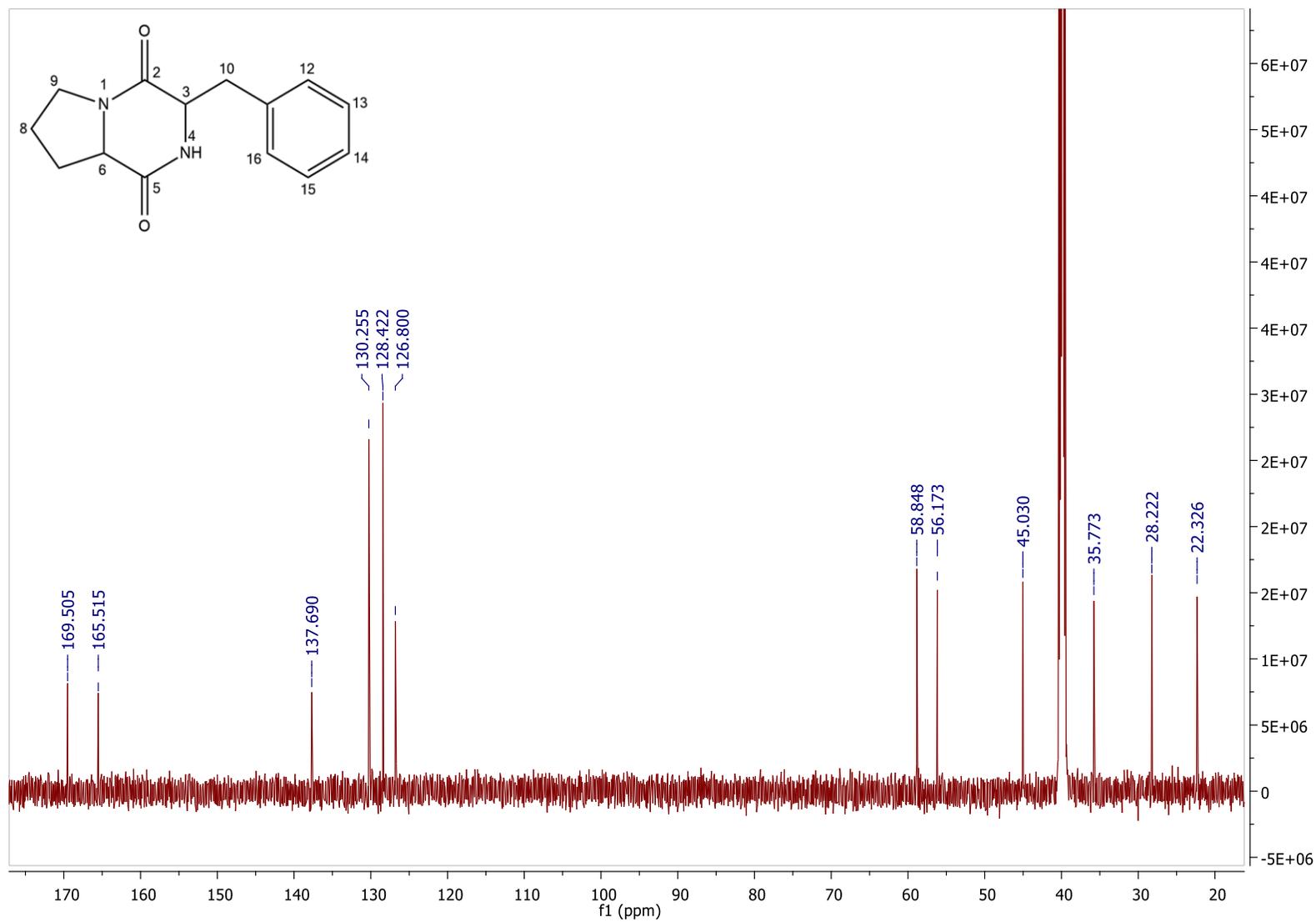
(δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO- d_6)

Figura 13: Espectro de RMN de ^1H da substância P01 (DMSO- d_6 , 600 MHz).



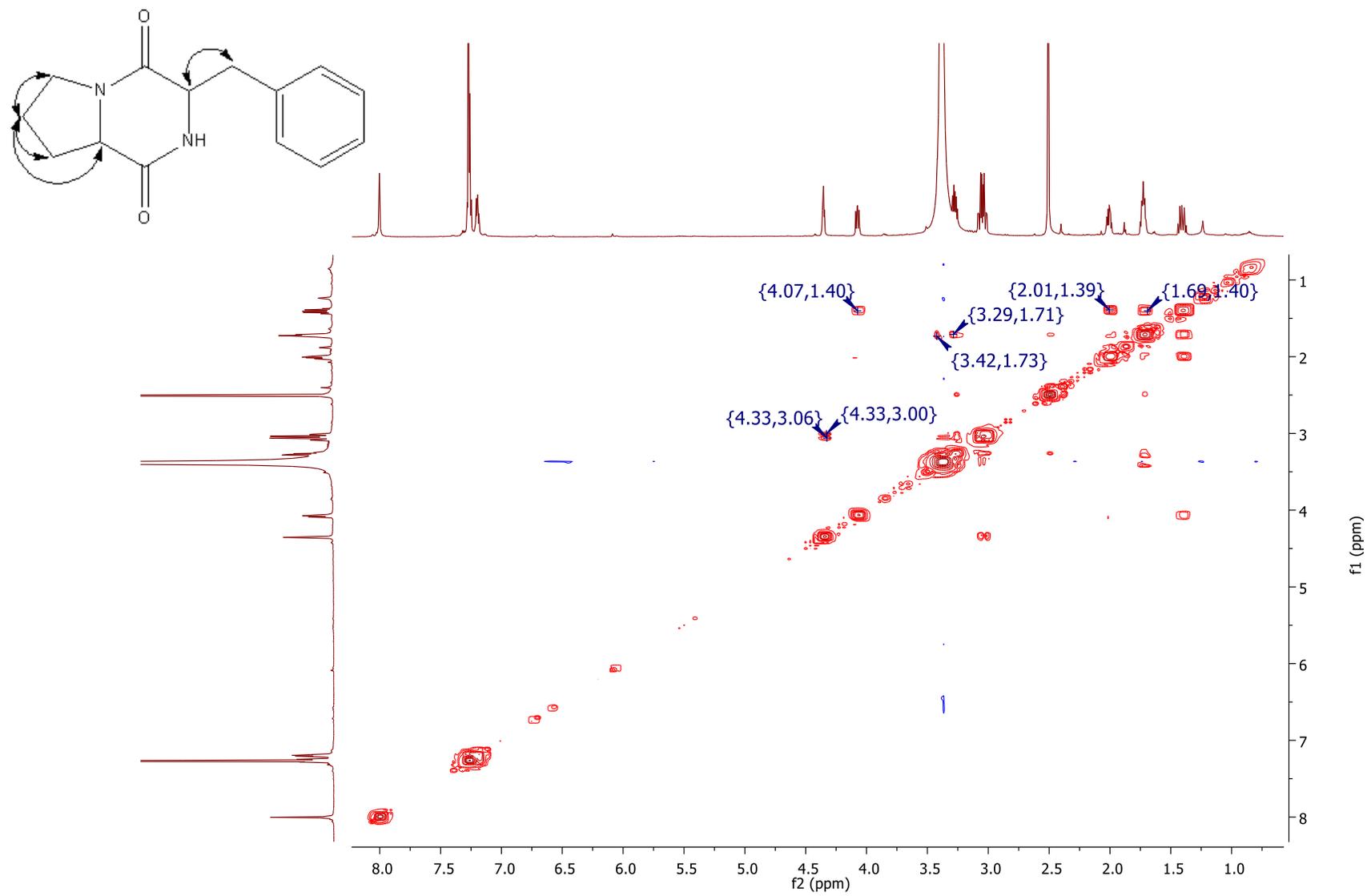
Fonte: Autor

Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P01** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



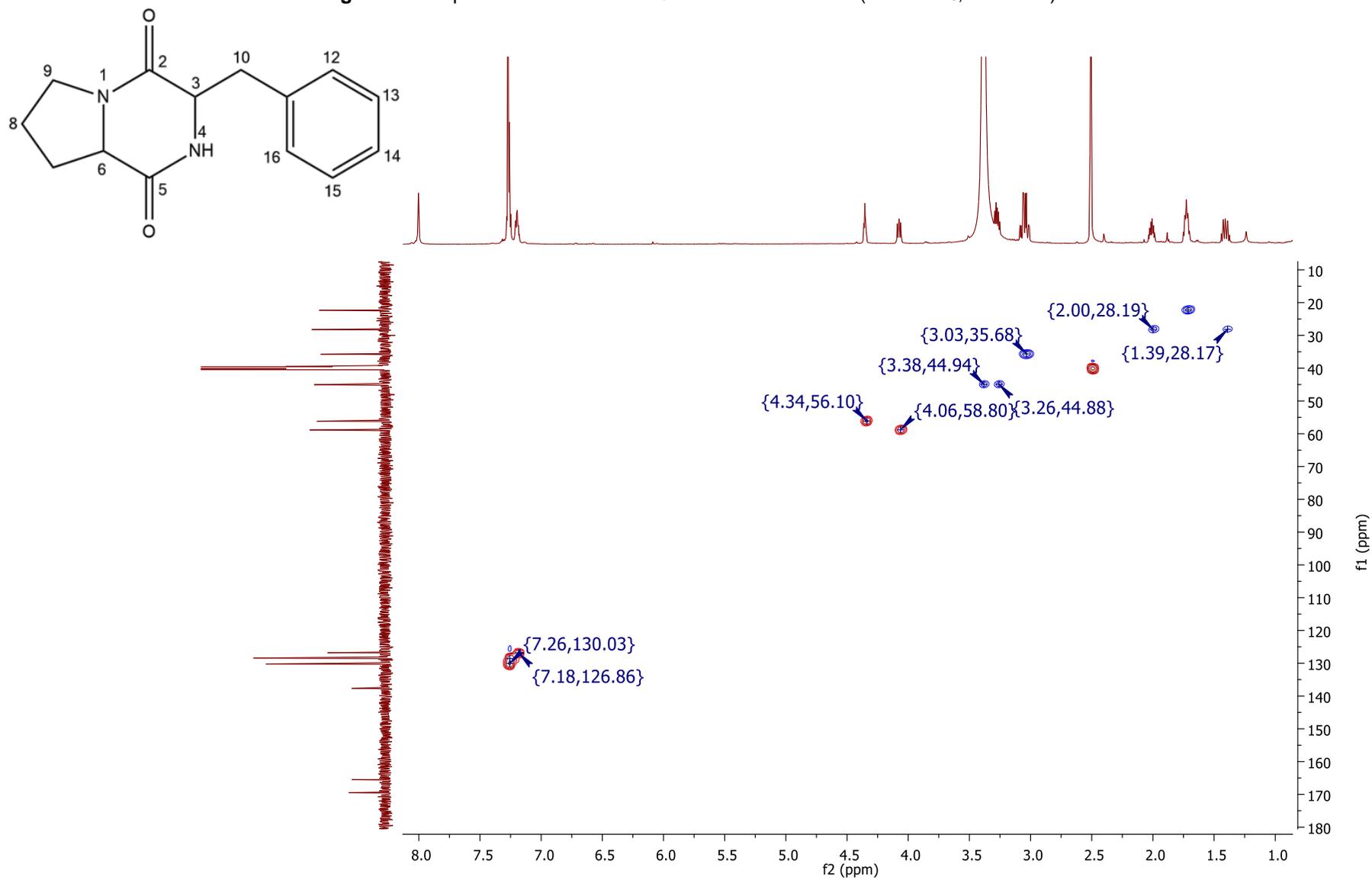
Fonte: Autor

Figura 15: Mapa de contorno de COSY da substância P01 (DMSO- d₆, 600 MHz).



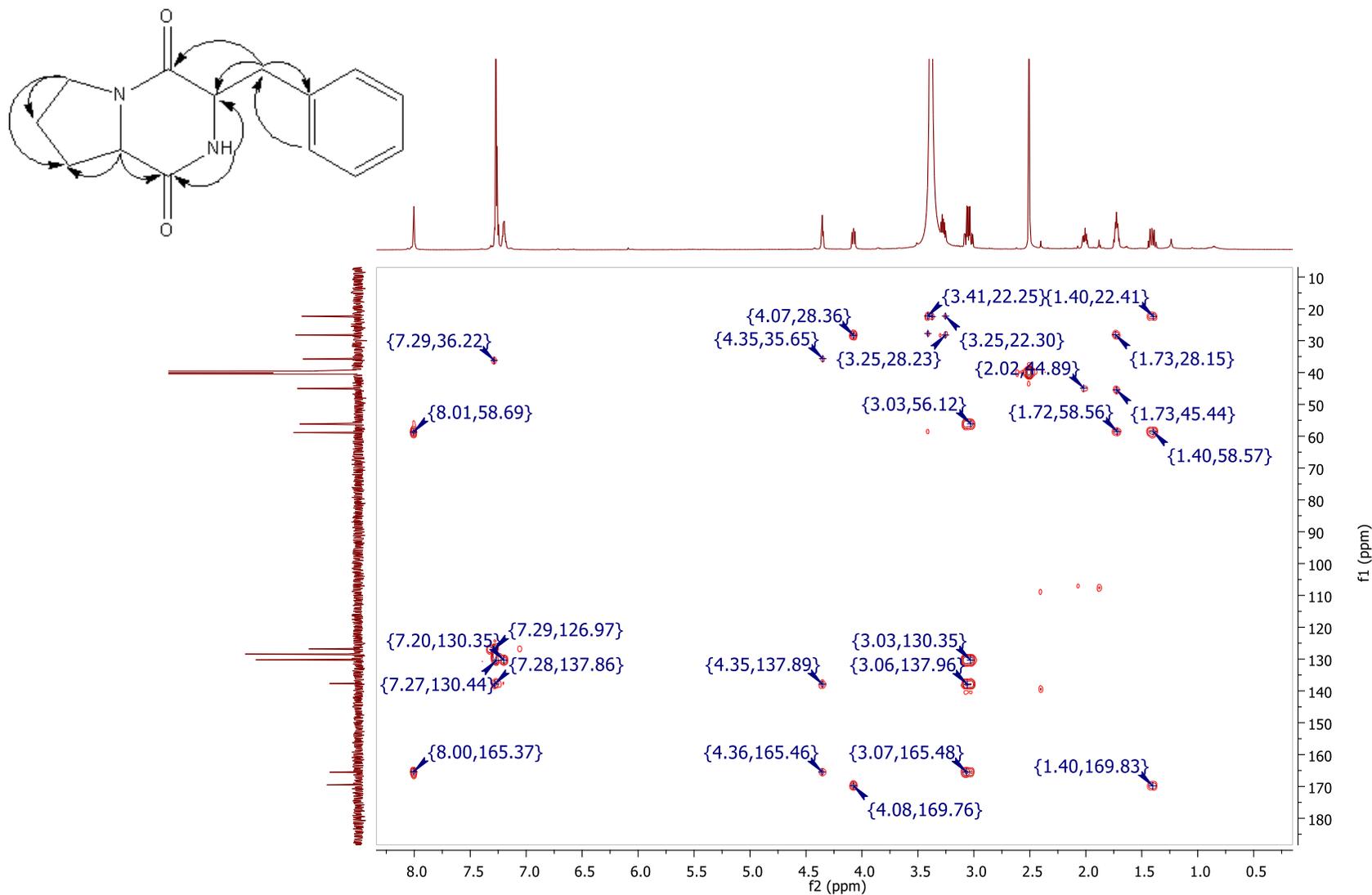
Fonte: Autor

Figura 16: Mapa de contorno de HSQC da substância P01 (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 17: Mapa de contorno de HMBC da substância P01 (DMSO- d_6 , 600 MHz).

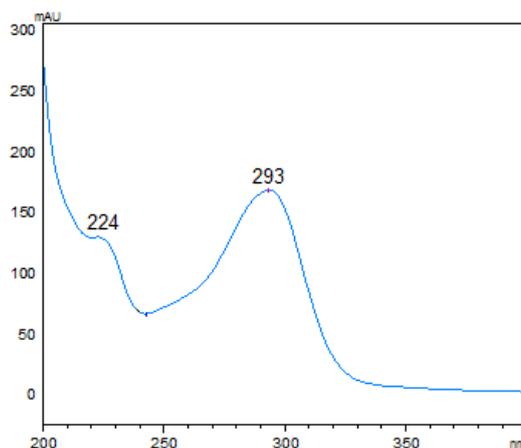


Fonte: Autor

4.3.2 Elucidação estrutural da substância P02

Para a substância **P02** foi possível observar em seu espectro no UV-Vis bandas de absorção em 224 e 293 nm (Figura 18)

Figura 18: Espectro no UV-Vis da substância **P02**.

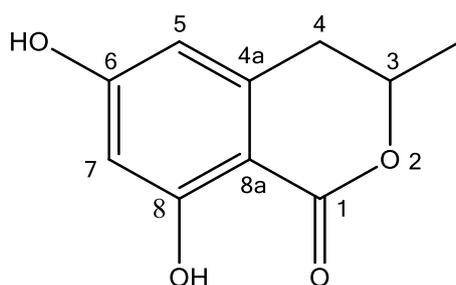


Fonte: Autor

Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 20) mostrou um sinal para H desblindado em δ_{H} 11,13 e integral referente a um único H, possivelmente ligado a átomo eletronegativo. Além disso, observaram-se dois sinais, um multipletto em δ_{H} 6,23 e um dubleto em δ_{H} 6,18 com constante de acoplamento de 2,1 Hz, possivelmente pertencentes a um anel aromático 1,2,3,4 tetra-substituído, visto que suas integrais correspondem a um H para cada sinal e a constante de acoplamento de 2,1 Hz observada é característica de hidrogênios em posição *meta*. O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda um multipletto em δ_{H} 4,68, atribuído ao hidrogênio oximetínico H-3, bem como dois duplos dupletos em δ_{H} 2,80 e 2,92, atribuídos aos hidrogênios metilênicos benzílicos H-4a e H-4b. A comparação com dados de RMN de ^1H de trabalhos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa permitiu inferir que esta substância pertence à classe das isocumarinas. A comparação dos demais sinais, incluindo os referentes aos substituintes do esqueleto padrão da classe, como os carbonos quaternários aromáticos com sinais em δ_{C} 165,20 e δ_{C} 163,87 que podem ser associados à presença de ligantes eletronegativos, além das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC (Figuras 22, 23 e 24), permitiu propor a estrutura a seguir para a substância **P02** (Figura 19).

Esta substância foi anteriormente isolada de *Daldinia concentrica* e apresentou atividade citotóxica moderada frente células de câncer de pele, mama, pulmão e fígado e atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus*. (QUANG, 2013)

Figura 19: Estrutura da substância **P02**, 3-metil-6,8-diidroxi-3,4-diidroisocumarina.



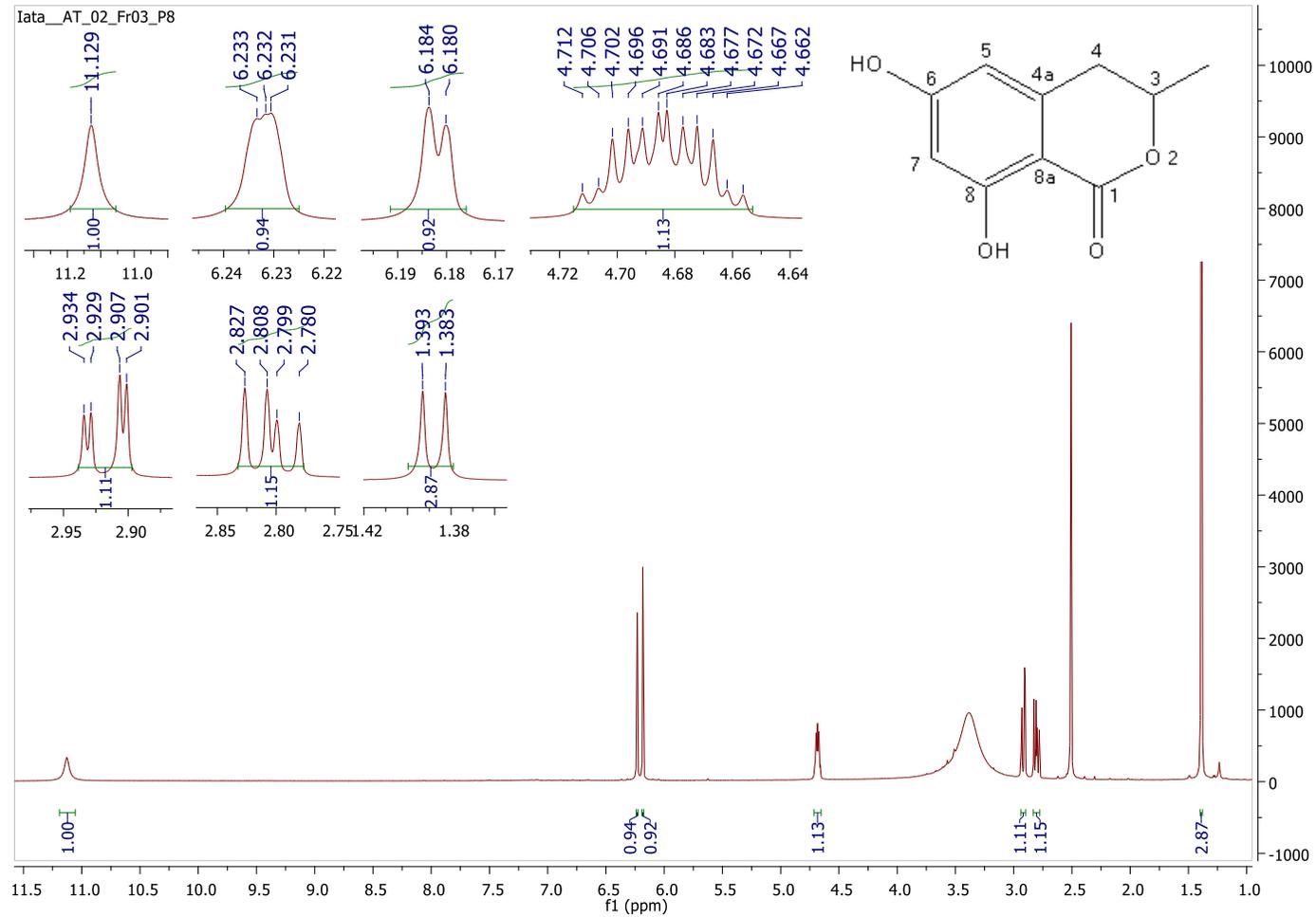
Fonte: Autor

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **P02**.

Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1	---	170,0	---
3	4,68 (m)	75,8	---
4	2,80 (dd, 16,1; 11,4) 2,92 (dd, 16,1; 3,2)	34,2	20,7; 75,8; 100,4; 107,4; 142,7
4a	---	100,4	---
5	6,23 (m)	107,4	34,2; 100,4; 101,3; 165,2
6	---	165,2	---
7	6,18 (d, 2,1)	101,3	100,4; 107,4; 163,9; 165,2
8	---	163,9	---
8a	---	142,7	---
-CH₃	1,39 (d, 6,2)	20,7	34,2; 75,8
6-OH	---	---	---
8-OH	11,13 (s)	---	---

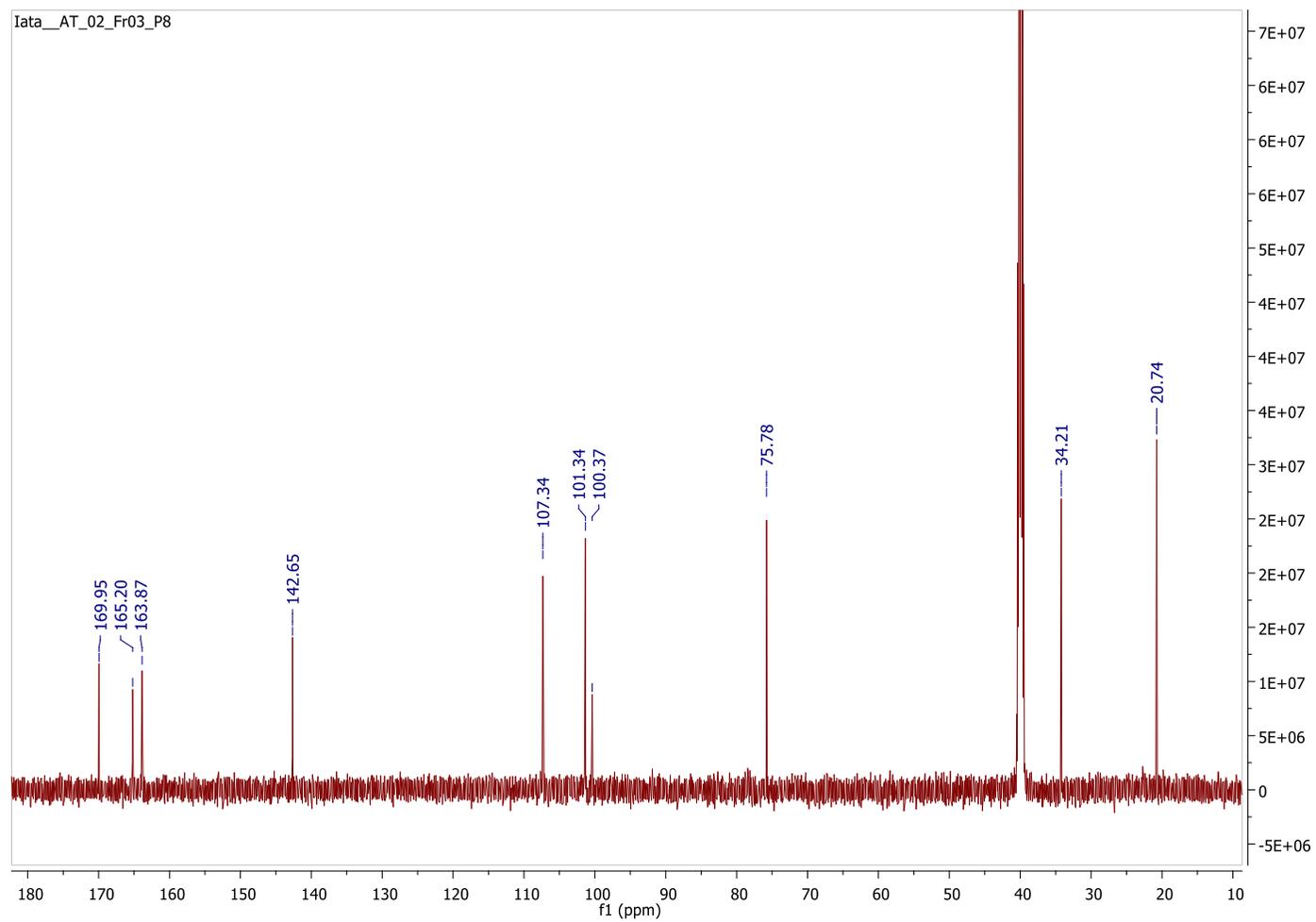
(δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO- d_6)

Figura 20: Espectro de RMN de ^1H da substância **P02** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



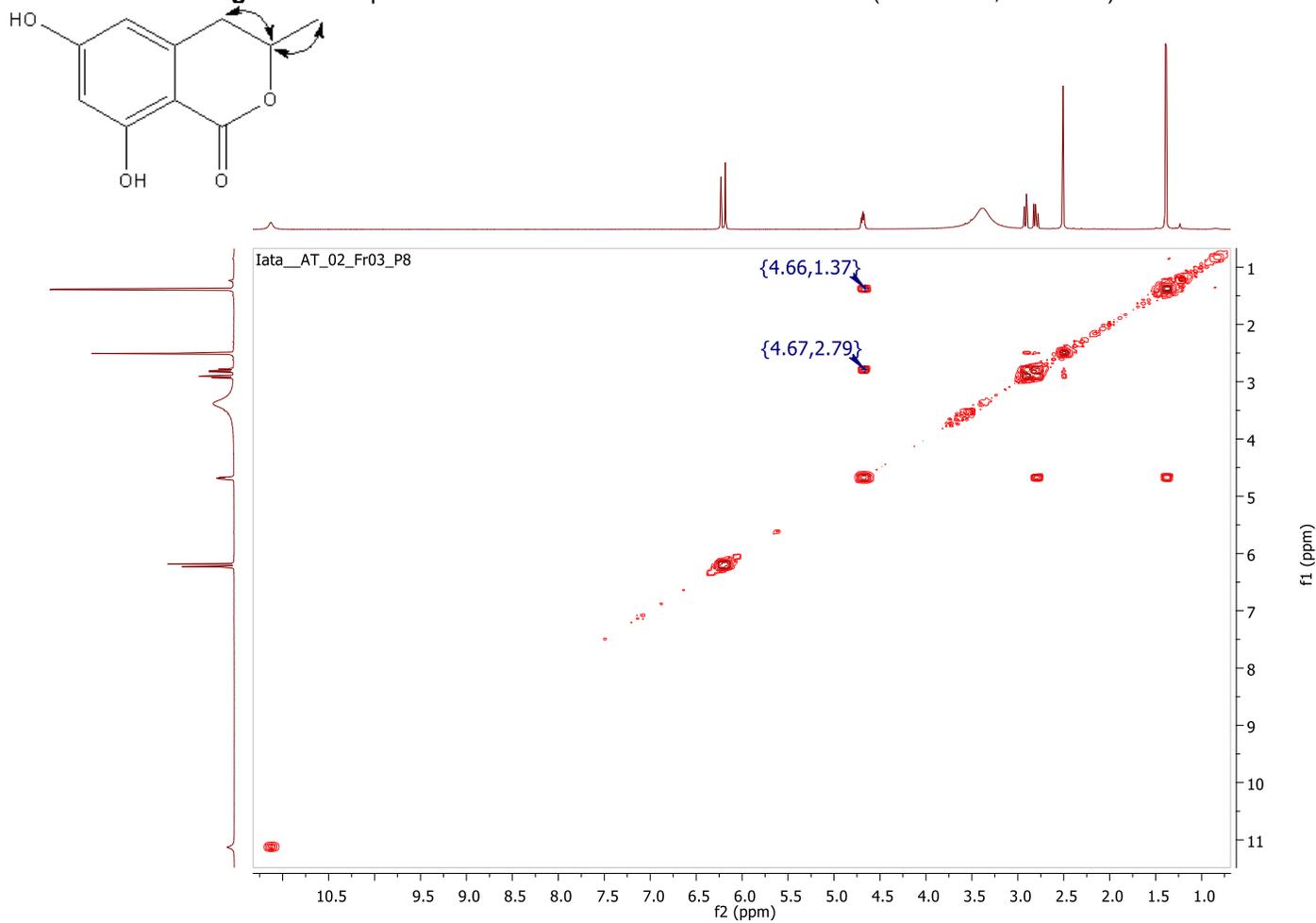
Fonte: Autor

Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P02** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



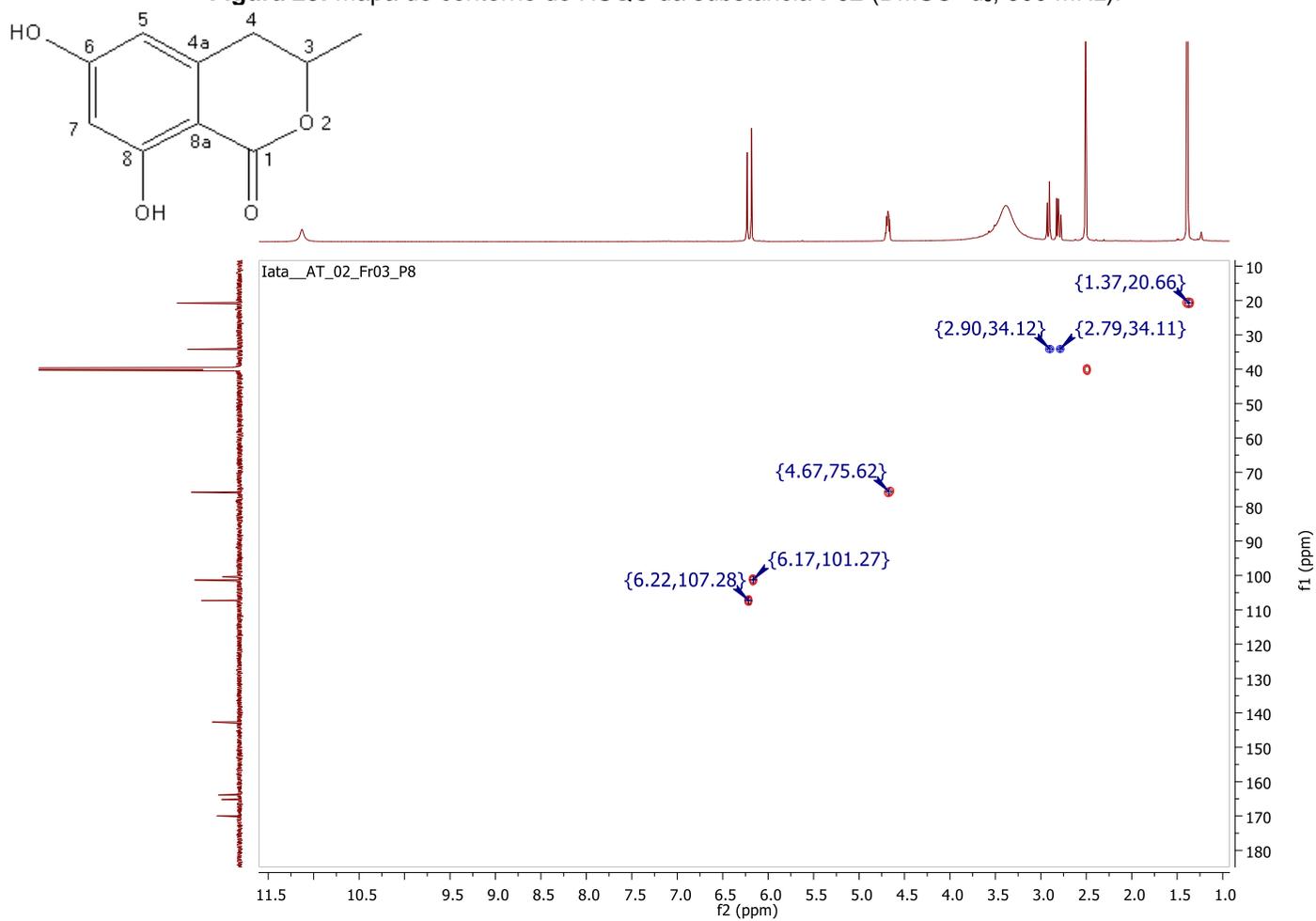
Fonte: Autor

Figura 22: Mapa de contorno de COSY da substância **P02** (DMSO- d₆, 600 MHz).



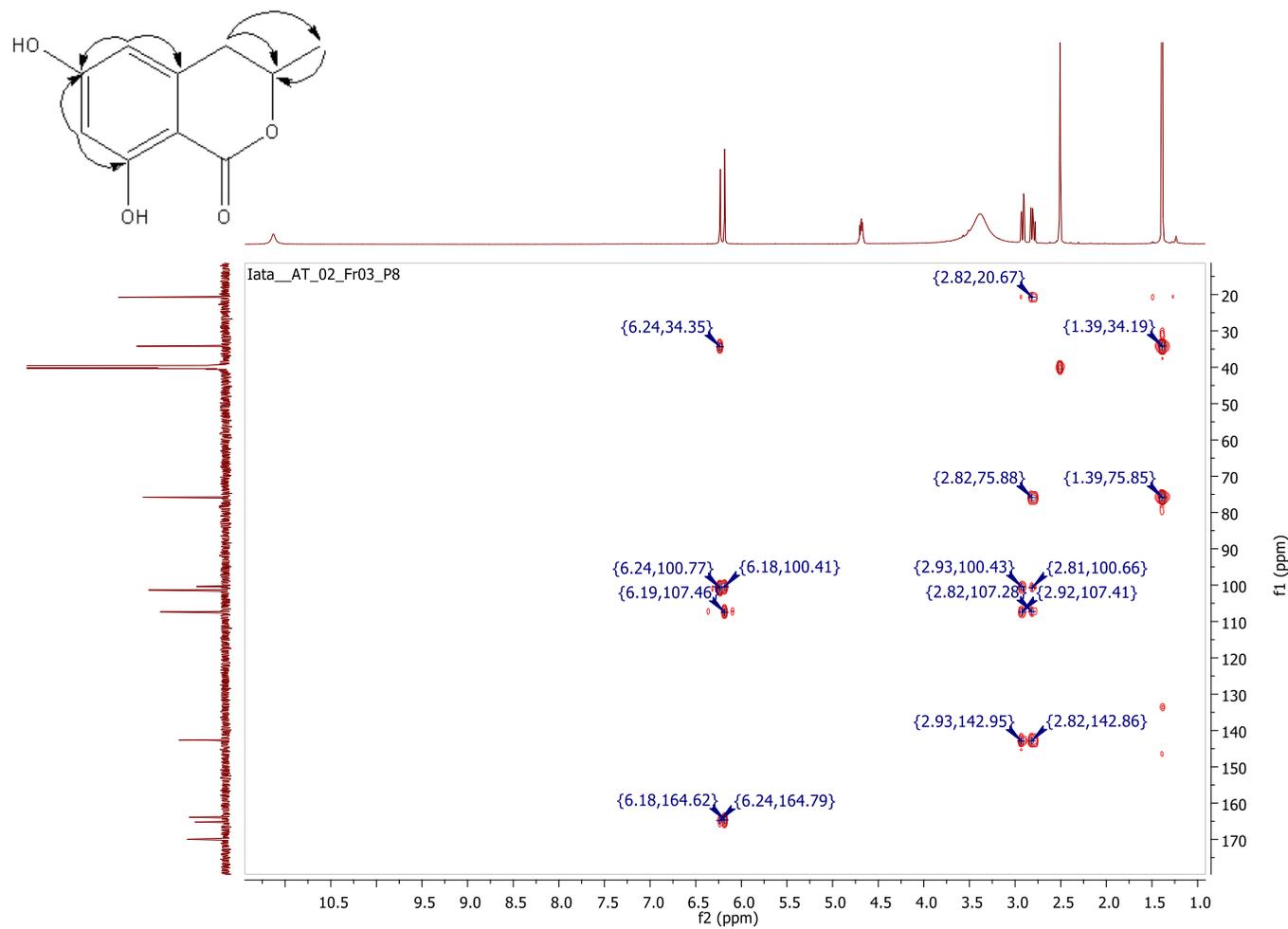
Fonte: Autor

Figura 23: Mapa de contorno de HSQC da substância P02 (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 24: Mapa de contorno de HMBC da substância P02 (DMSO- d₆, 600 MHz).

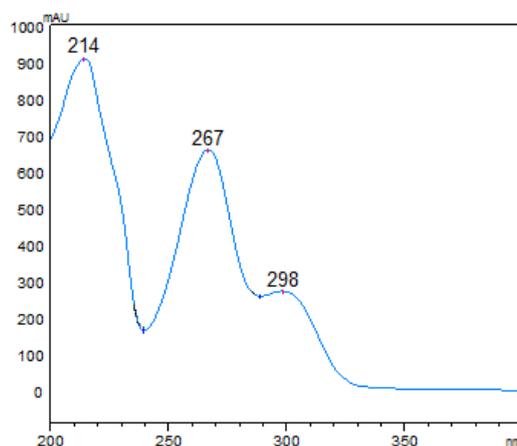


Fonte: Autor

4.3.3 Elucidação estrutural da substância P03

A substância P03 foi obtida na forma de sólido amarelo apresentando em seu espectro de UV-Vis bandas de absorção em 214, 267 e 298 nm (Figura 25).

Figura 25: Espectro no UV-Vis da substância P03.



Fonte: Autor

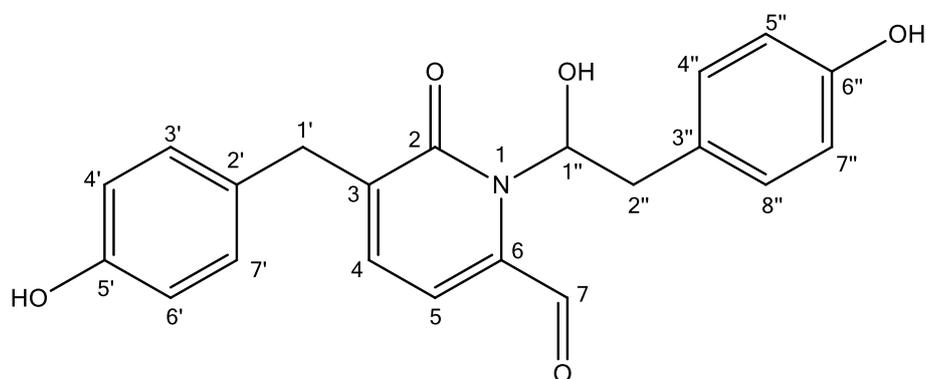
O espectro de RMN de ^1H da substância P03 (Figura 27) mostrou um singlete em δ_{H} 9,52 que apresentou correlação no mapa de contorno HSQC (Figura 29) com o sinal em δ_{C} 179,4 sugerindo a presença do grupo funcional aldeído na estrutura desta substância. Este espectro mostrou também dois dupletos integrando para 2 hidrogênios cada um, em δ_{H} 6,50 e (J 8,4 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3'/H-7' e δ_{H} 6,57 (J 8,6 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-4"/H-8", e um duplete em δ_{H} 6,61 (J 8,6 Hz) que foi atribuído aos hidrogênios H-5"/H-7" e sobrepõem o duplete atribuído aos hidrogênios e H-4'/H-6' resultando a integral para 4 hidrogênios, referentes a dois anéis aromáticos *para*-dissubstituídos. Além disso, foi observado um duplo duplete em δ_{H} 5,78, atribuído ao hidrogênio hidroximetínico H-1', desprotegido adicionalmente pela proximidade ao N do anel lactâmico.

Observaram-se também dois sinais com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios olefínicos (δ_{H} 6,16 e δ_{H} 7,19), porém com constantes de acoplamento de 4 Hz, incomum tanto para isomerias *trans* quanto *cis*. Esta condição indica que estes hidrogênios possam ser vizinhos, mas não compartilham a mesma instauração, sugerindo uma sub-estrutura de dieno conjugado em conformação *s-cis*. Com o objetivo de investigar a presença de átomos de nitrogênio neste composto foram realizados experimentos HSQC e HMBC de núcleos de nitrogênio que permitiram observar as correlações entre núcleos de ^1H e núcleos de ^{15}N a uma ligação (HSQC) bem como a duas ou mais ligações de distância (HMBC). Não foi observada nenhuma correlação de

hidrogênio ligado diretamente a nitrogênio no mapa de contorno HSQC. Porém, observando o mapa de contorno HMBC (Figura 31) foi possível constatar a presença de um N terciário que apresentou correlação com sinais para quatro hidrogênios (δ_H 7,19, δ_H 6,16, δ_H 5,23 e δ_H 3,22). A partir destas informações e das correlações observadas no mapa de contorno HMBC de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ((Figura 30), foi possível propor a seguinte estrutura para a substância **P03** (Figura 26).

As pesquisas nas bases de dados SciFinder e PubChem indicaram que P03 é uma substância inédita.

Figura 26: Proposta estrutural para a substância **P03**



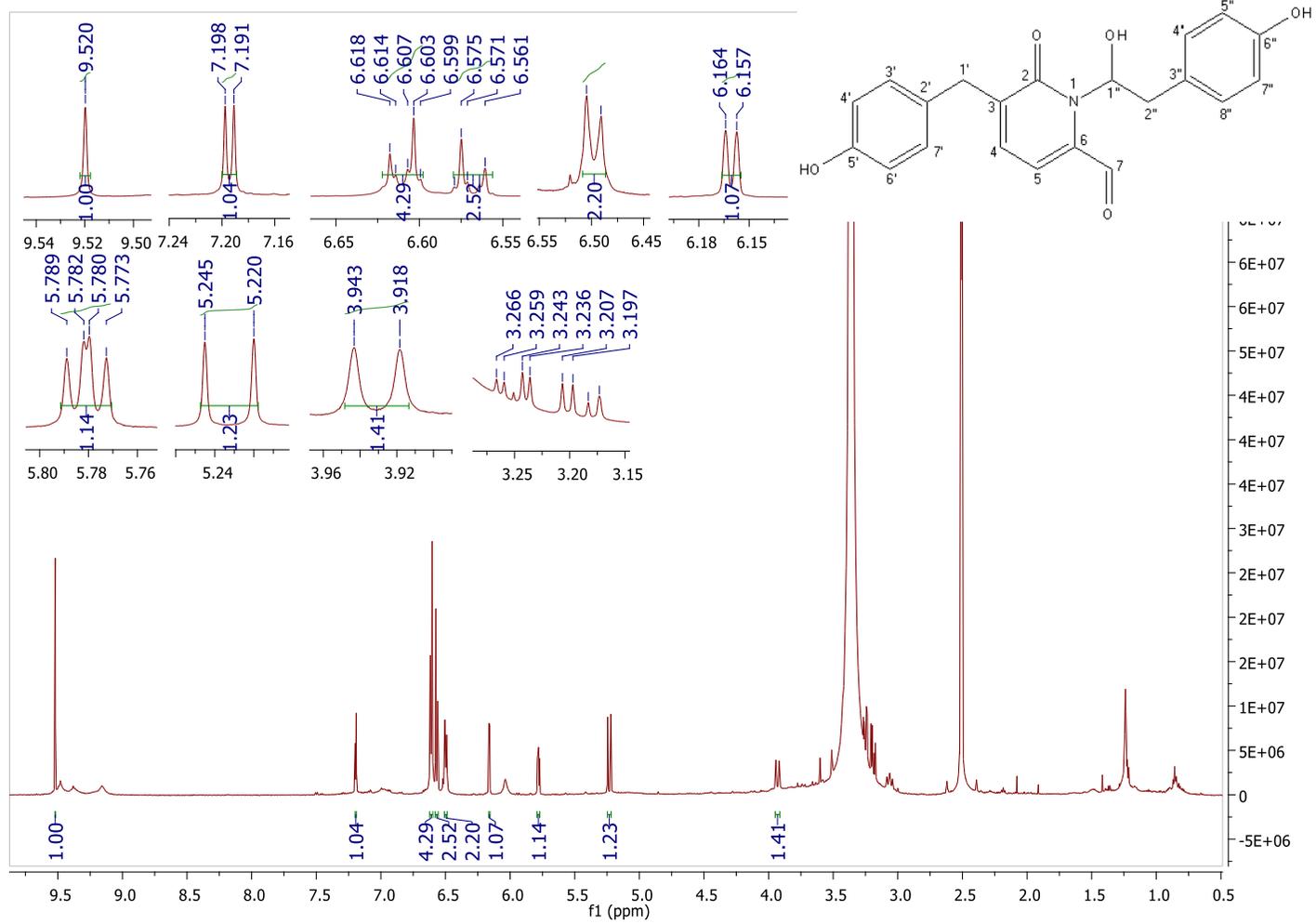
Fonte: Autor

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **P03**.

Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	HMBC
2	---	167,4	---
3	---	131,7	---
4	6,16 (d, 4,0)	106,2	131,6
5	7,19 (d, 4,0)	124,8	131,6
6	---	130,5	---
7	9,52 (s)	179,4	130,5
1'	3,93 (d, 15,0) 5,23 (d, 15,0)	62,9	106,2; 131,7; 167,4
2'	---	128,7	---
3'	6,50 (d, 8,4)	114,7	114,7; 128,7; 156,3
4'	6,61 (d, 8,4)	115,1	115,1
5'	---	156,3	---
6'	6,61 (d, 8,4)	115,1	115,1
7'	6,50 (d, 8,4)	114,7	114,7; 128,7; 156,3
1''	5,78 (dd, 4,2; 5,7)	58,5	123,9; 167,5
2''	3,19 (dd, 14,1; 5,7) 3,25 (dd, 14,1; 4,2)	38,3	58,5; 123,9; 130,2; 167,5
3''	---	123,9	---
4''	6,57 (d, 8,6)	130,2	38,3; 130,2; 157,4
5''	6,61 (d, 8,6)	129,9	
6''	---	157,4	---
7''	6,61 (d, 8,6)	129,9	
8''	6,57 (d, 8,6)	130,2	38,3; 130,2; 157,4

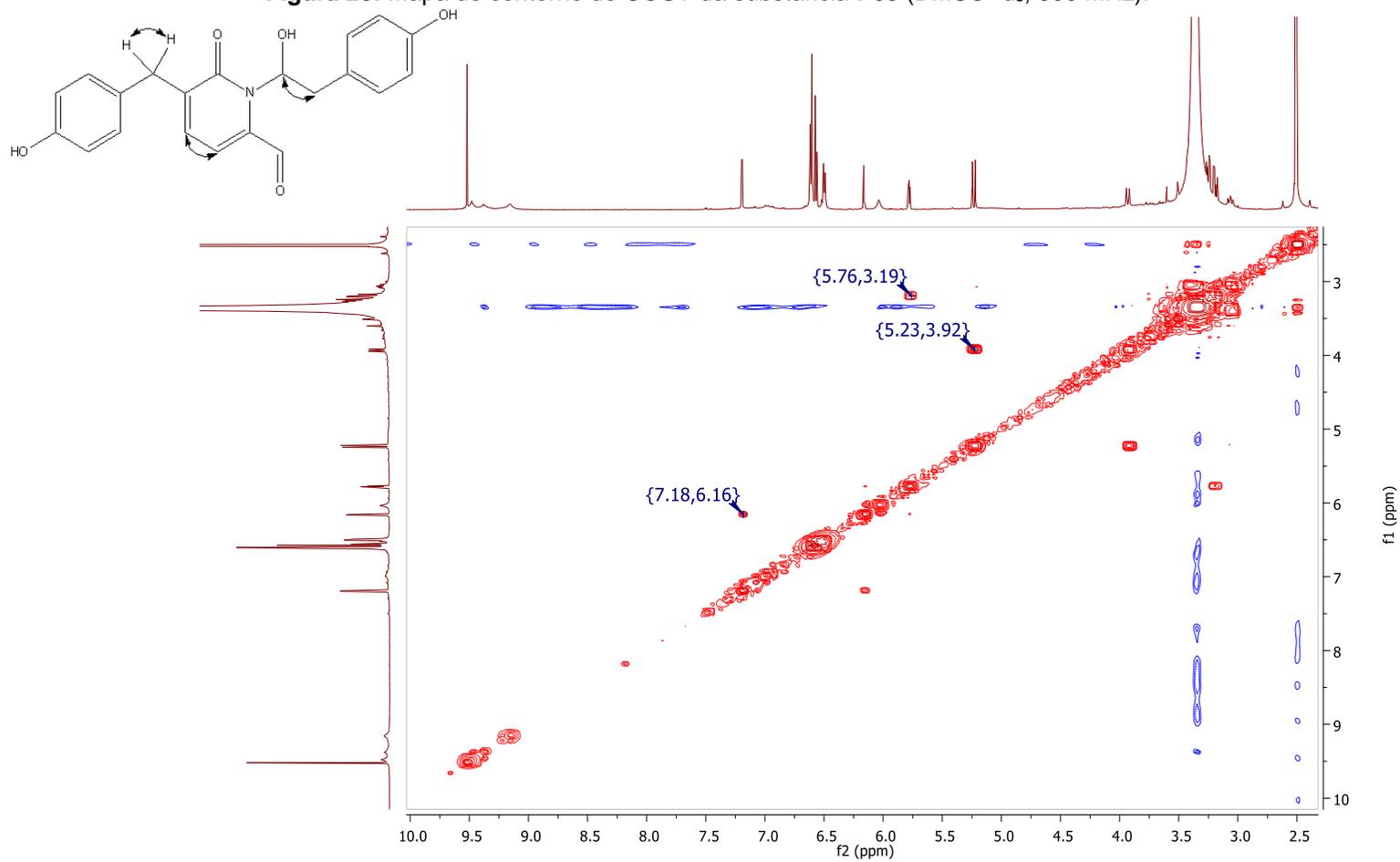
(δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO- d_6)

Figura 27: Espectro de RMN de ^1H da substância **P03** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



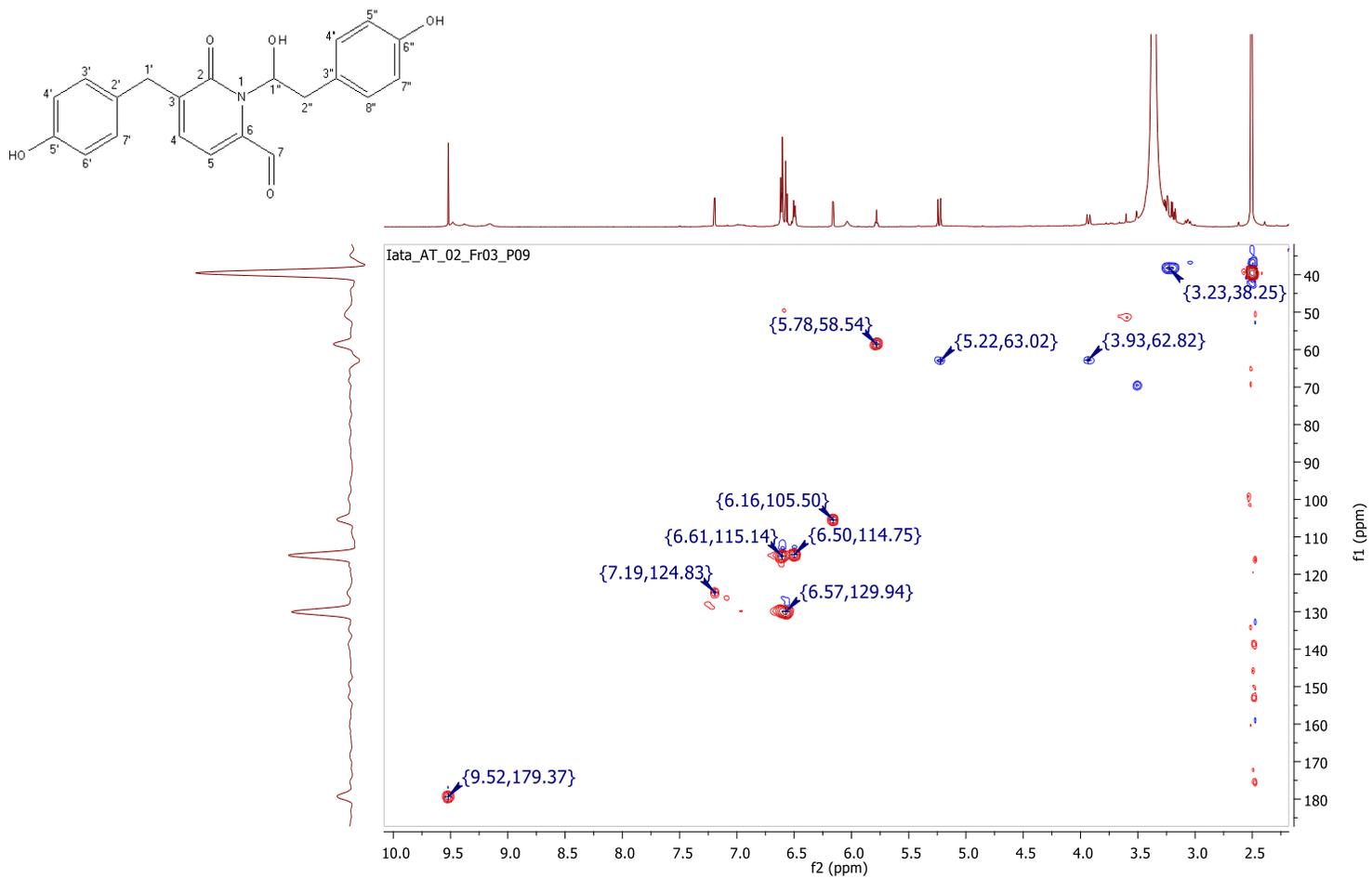
Fonte: Autor

Figura 28: Mapa de contorno de COSY da substância P03 (DMSO- d₆, 600 MHz).



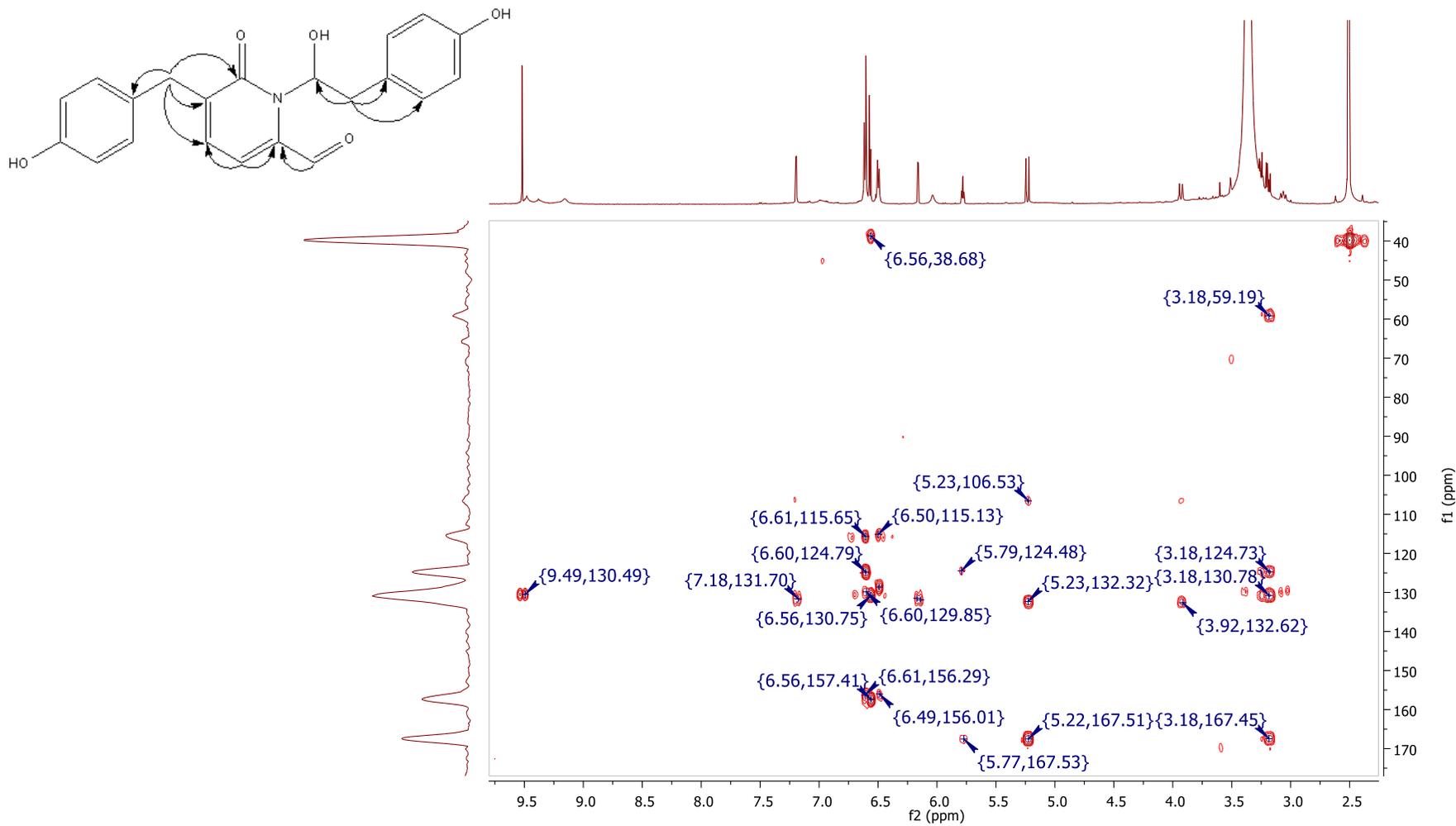
Fonte: Autor

Figura 29: Mapa de contorno de HSQC da substância P03 (DMSO- d₆, 600 MHz).



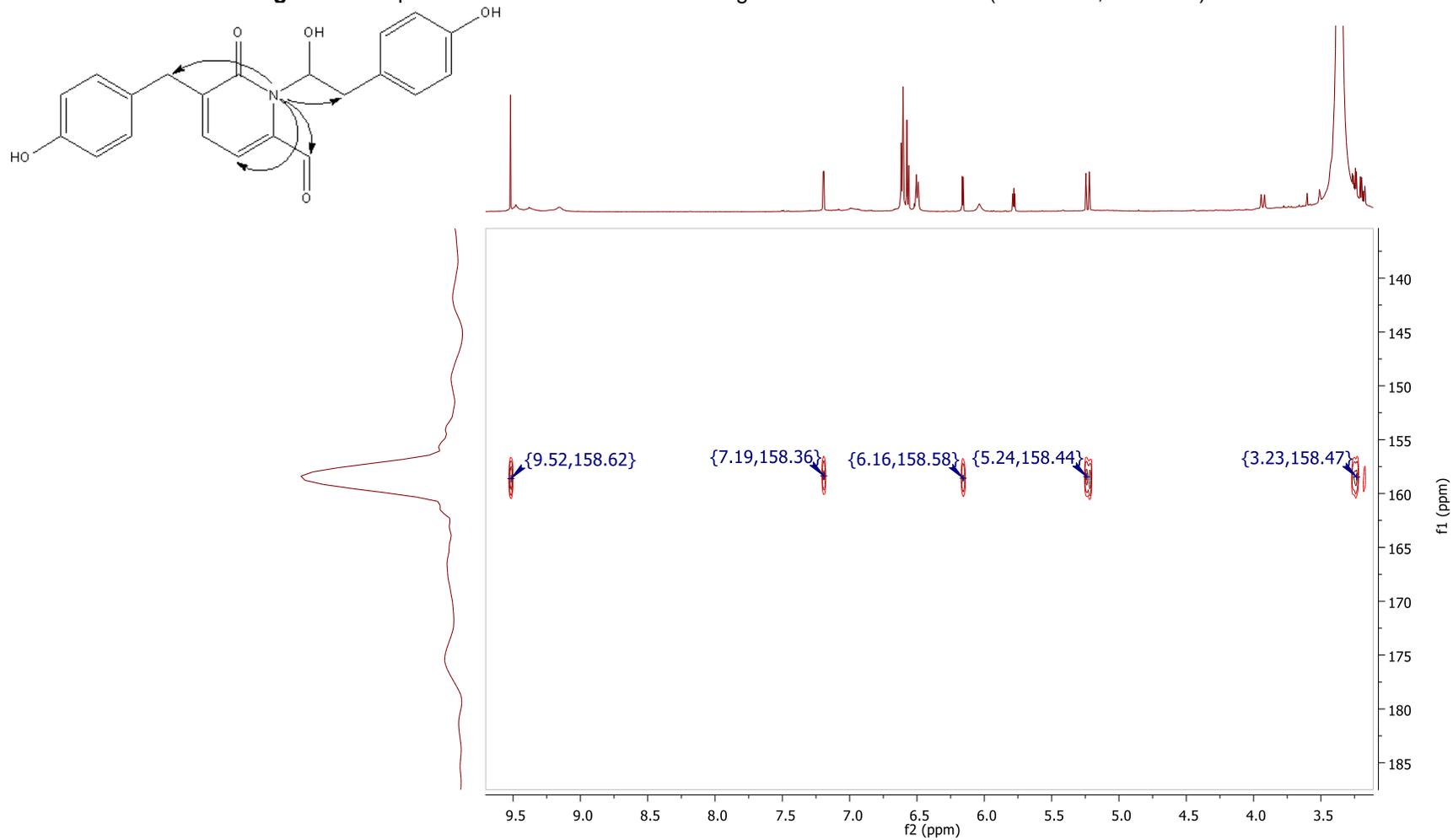
Fonte: Autor

Figura 30: Mapa de contorno de HMBC da substância P03 (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 31: Mapa de contorno de HMBC de Nitrogênio da substância **P03** (DMSO- d₆, 600 MHz).

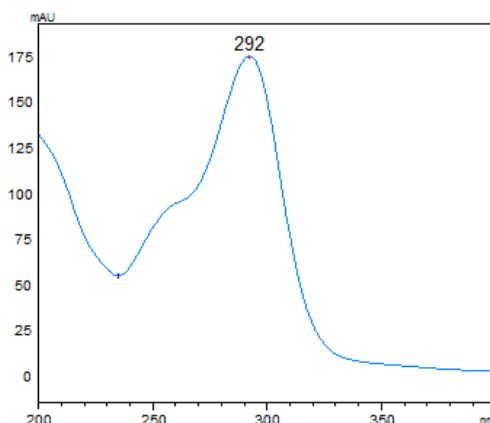


Fonte: Autor

4.3.4 Elucidação estrutural da substância P04

A substância **P04** foi obtida na forma de um sólido amarelo, sendo possível observar em seu espectro de UV-Vis bandas de absorção em 260 e 292 nm (Figura 32).

Figura 32: Espectro no UV-Vis da substância **P04**.



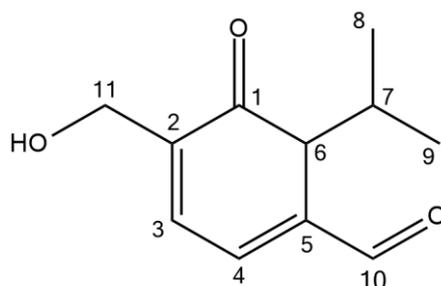
Fonte: Autor

O espectro de RMN de H^1 da substância **P04** (Figura 35) mostrou um singlete em δ_H 9,51, que apresentou correlação no mapa de contorno HSQC (Figura 37) com um sinal em δ_C 180,3, indicando a presença de um grupo aldeído. Assim como no espectro de RMN de H^1 da substância P03, foi possível observar dois dupletos para hidrogênios olefínicos (δ_H 6,34 e δ_H 7,18) acoplado com $J = 4$ Hz, sugerindo que este composto também apresenta H em carbonos vizinhos que não compartilham a mesma instauração e caracterizando uma sub-estrutura de dieno com conformação *s-cis*. O espectro de RMN de H^1 mostrou também dois dupletos em δ_H 5,36 e δ_H 5,53, que acoplam no mapa de contorno HSQC com o mesmo carbono, com sinal em δ_C 64,0, evidenciando que são hidrogênios hidroximetilênicos geminais sobre C_{sp^3} , o que também pode ser confirmado pela sua constante de acoplamento de 15,5 Hz. Estes hidrogênios encontram-se desblindados pela presença de um grupo hidroxila ligado ao C-11, devido à alta eletronegatividade do oxigênio. Este espectro mostrou ainda um multipletto em δ_H 2,34 e dois dupletos em δ_H 0,92 (J 6,3 Hz) e δ_H 0,97 (J 6,8 Hz), atribuídos a H-7 e aos hidrogênios metílicos H-8 e H-9, caracterizando um grupo isopropila conectado ao carbono assimétrico C-6, compatível com os sinais atribuídos aos grupos metílicos diastereotópicos. O sinal para H-6 apareceu como dupletto desprotegido em δ_H 5,37, por situar-se em posição alílica e α -carbonílica simultaneamente. O experimento HSQC evidenciou correlações diretas entre os sinais para H e C, que permitiram a atribuição da maioria dos sinais observados nos espectros de RMN de H^1 e RMN de ^{13}C . Adicionalmente, experimentos de RMN bidimensionais forneceram dados complementares para a definição das conectividades de P04. A estrutura desta

substância foi proposta também com base na análise das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, no qual destacam-se as correlações de H-3 com H-4, e de H-7 com H-6, H-8 e H-9, bem como HMBC, em que destacam-se as correlações dos hidrogênios hidroximetilênicos H-11 com C-2 e C-1, e ainda de H-6 com C-1, C-7 e C-8 (Figuras 36 e 38). Além destes experimentos foram realizadas análises de NOESY 1D através da irradiação nas frequências referentes aos H-3 e H-4, que mostraram interações espaciais entre si, bem como de H-3 com H-11, e de H-4 com H-10 (Figuras 34, 39 e 40). Estes dados mostraram-se compatíveis com o sistema cíclico carbonílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -di-insaturado, caracterizando a unidade dienona com extensão adicional da conjugação com a carbonila em C-10, e permitiram confirmar a estrutura proposta para a substância **P04** (Figura 33).

As pesquisas nas bases de dados SciFinder e PubChem indicaram que P03 é uma substância inédita.

Figura 33: Proposta estrutural para a substância **P04**.



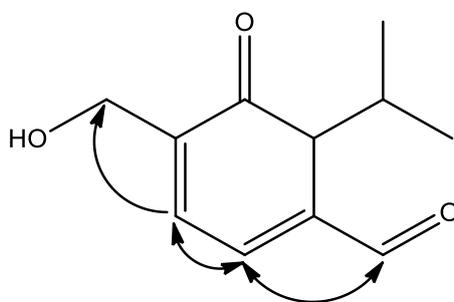
Fonte: Autor

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C para a substância **P04**.

Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1	---	166,4	---
2	---	132,3	---
3	6,34 (d, 4,0)	107,1	---
4	7,18 (d, 4,0)	125,1	---
5	---	132,1	---
6	5,37 (d, 8,0)	63,0	18,6; 32,1; 132,1; 166,4
7	2,34 (m)	32,1	19,1; 63,0; 166,4
8	0,92 (d, 6,3)	19,1	18,6; 32,1; 63,0
9	0,97 (d, 6,8)	18,6	19,1; 63,0; 166,4
10	9,51 (s)	180,3	---
11	5,64 (d, 15,5) 5,53 (d, 15,5)	64,0	132,3; 166,4
-OH	---	---	---

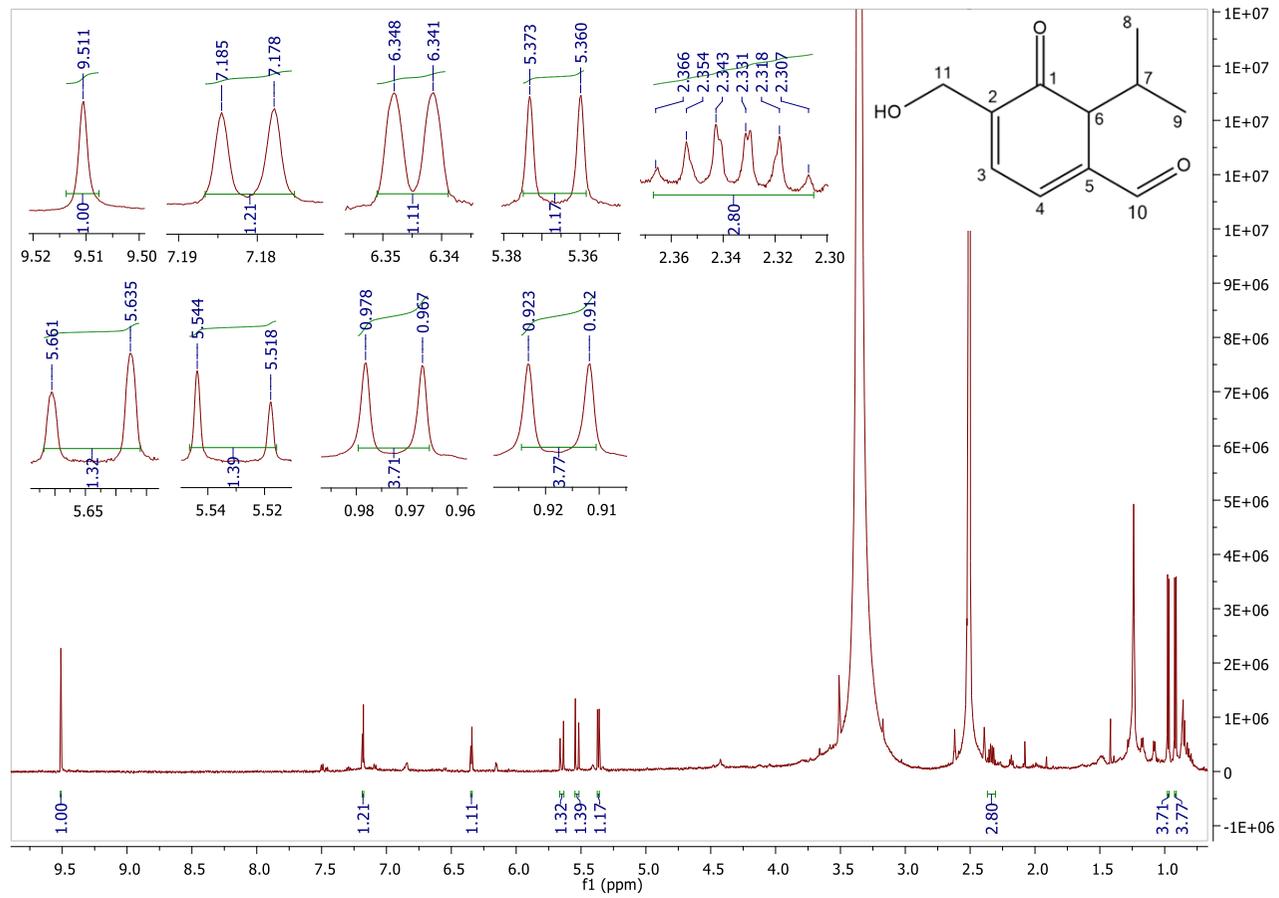
(δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO-d_6)

Figura 34: Correlações observadas pelo experimento NOESY com irradiação em 6,34 e 7,18 ppm, deslocamentos referentes aos hidrogênios H-3 e H-4.



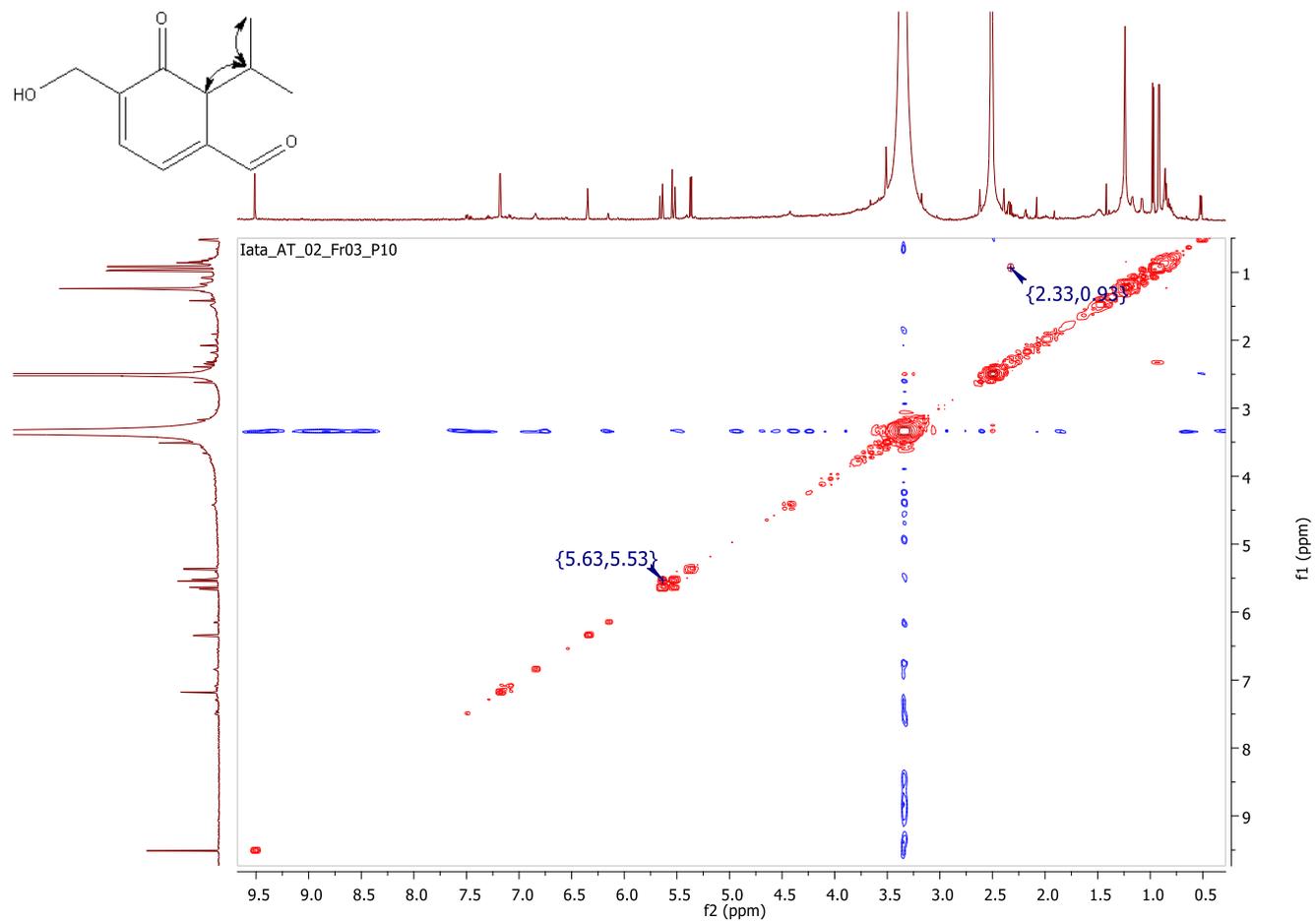
Fonte: Autor

Figura 35: Espectro de RMN de ^1H da substância **P04** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



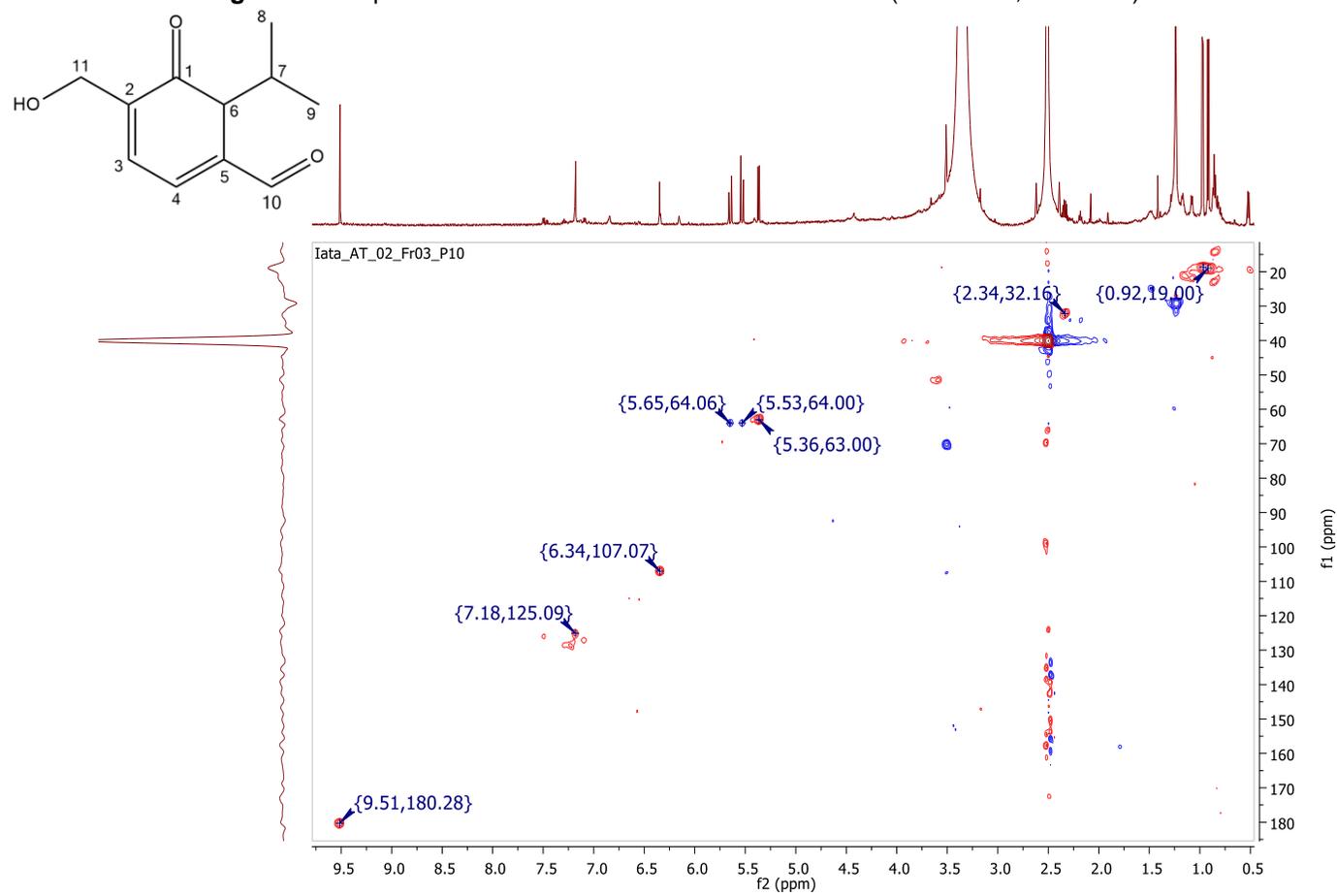
Fonte: Autor

Figura 36: Mapa de contorno de COSY da substância P04 (DMSO- d₆, 600 MHz).



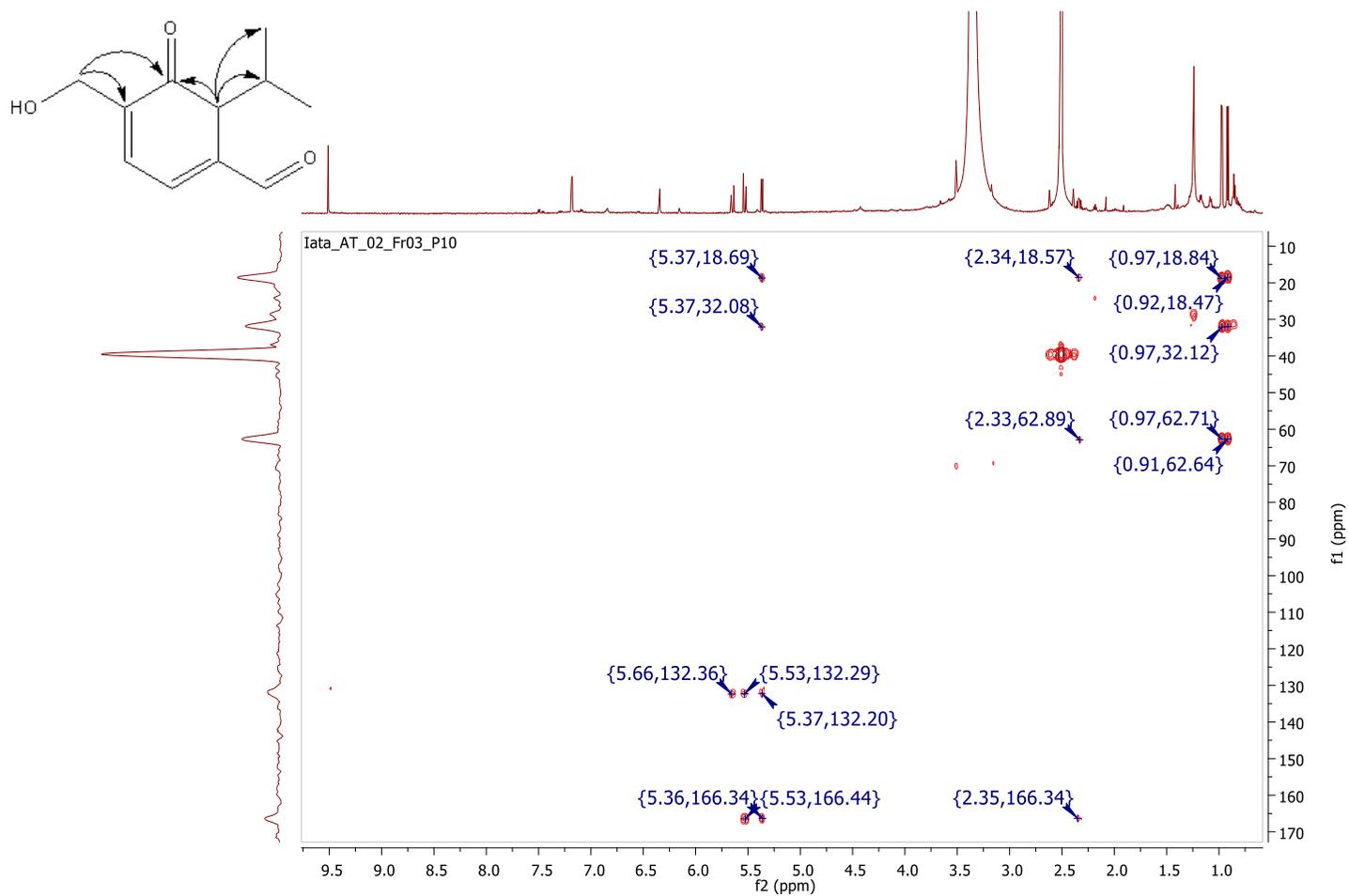
Fonte: Autor

Figura 37: Mapa de contorno de HSQC da substância **P04** (DMSO- d₆, 600 MHz).



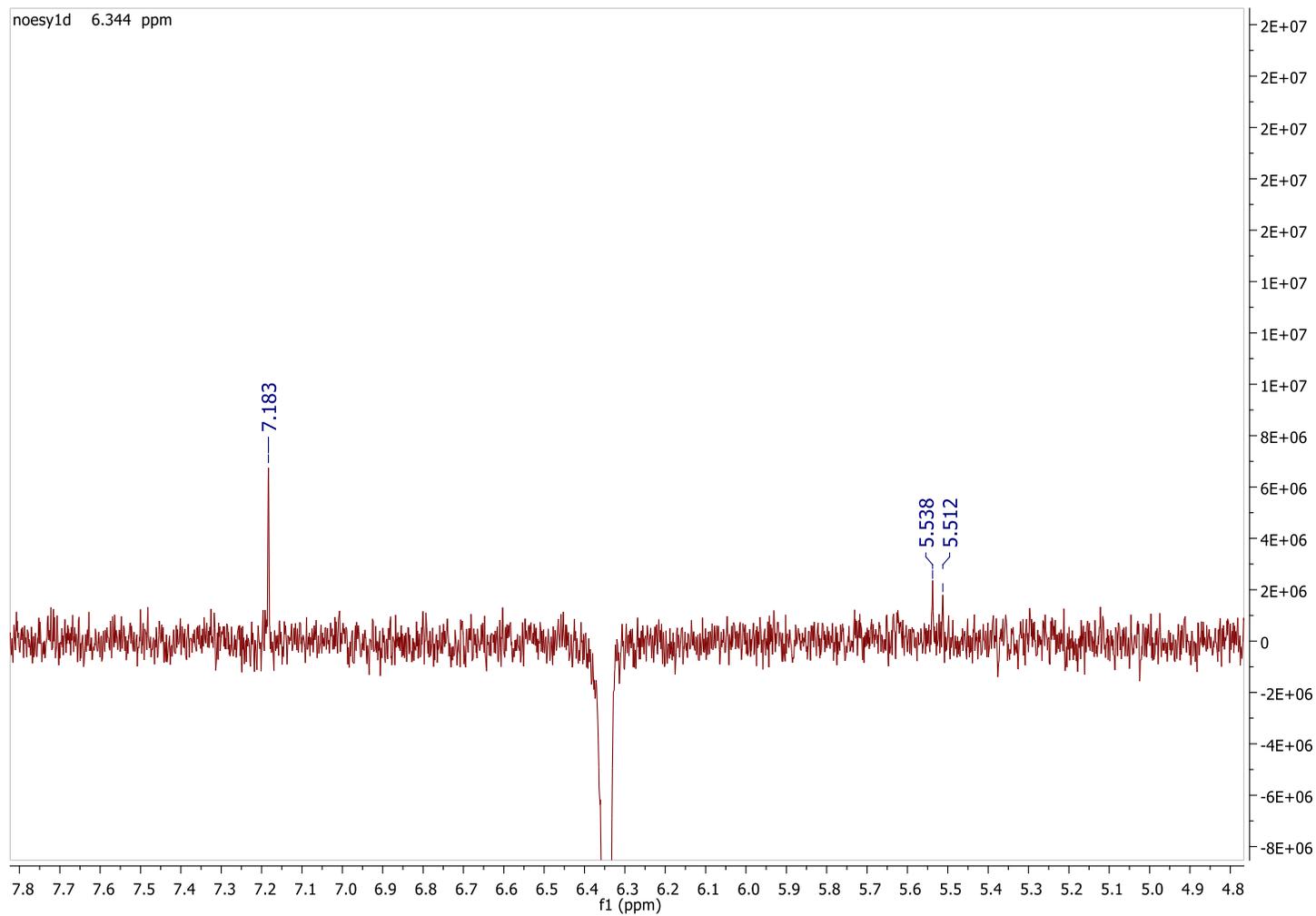
Fonte: Autor

Figura 38: Mapa de contorno de HMBC da substância P04 (DMSO- d₆, 600 MHz).



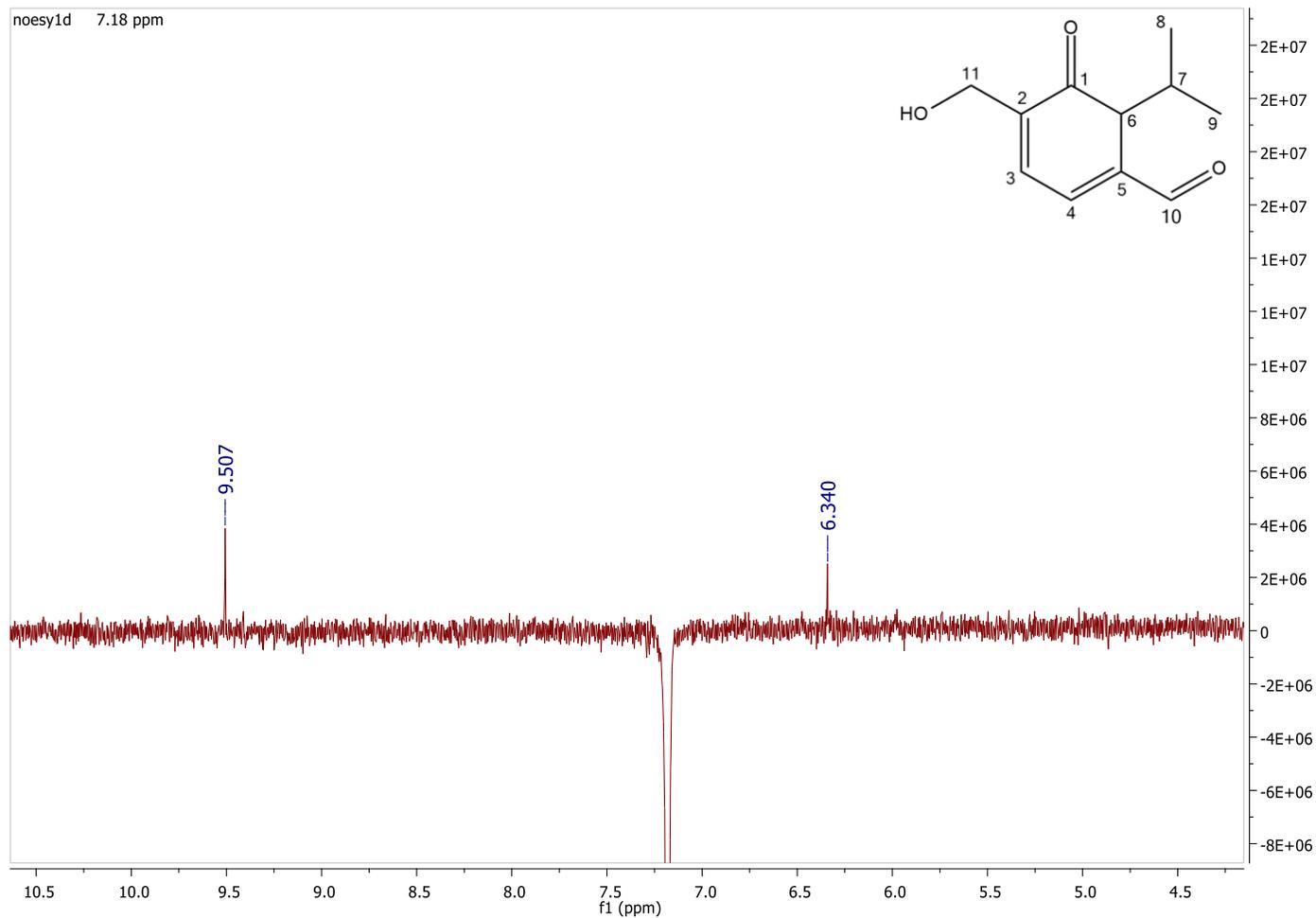
Fonte: Autor

Figura 39: Espectro de NOESY da substância **P04** com irradiação em 6,34 ppm (DMSO- d6, 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 40: Espectro de NOESY da substância **P04** com irradiação em 7,18 ppm (DMSO- d6, 600 MHz).

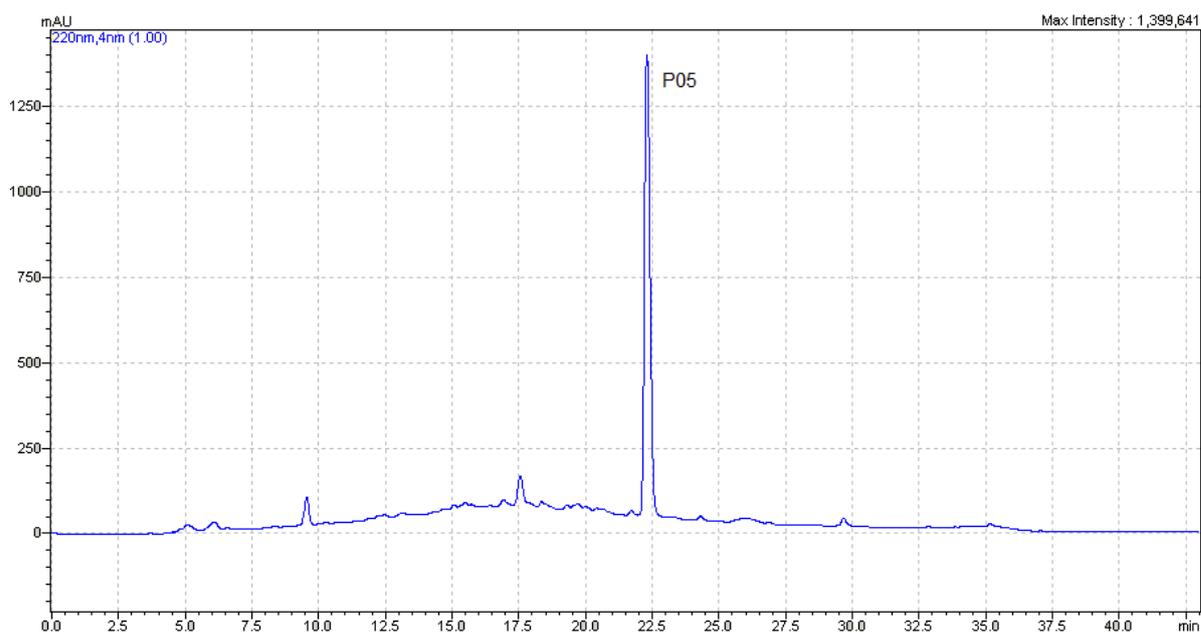


Fonte: Autor

4.4 Isolamento dos metabólitos da fração AT02-5

A fração AT02-5 apresentou em seu cromatograma um composto majoritário, sendo possível seguir diretamente para o isolamento por CLAE-DAD em modo preparativo (Figura 41). A substância em questão foi codificada como **P05**.

Figura 41: Cromatograma da fração AT02-5 em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% ACN:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 45 min.; 254 nm)

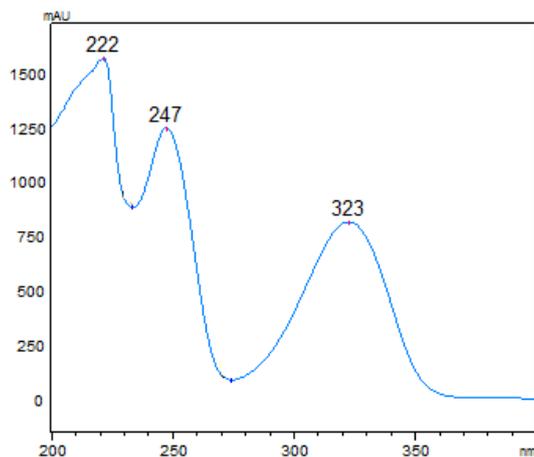


Fonte: Autor

4.4.1 Elucidação estrutural da substância P05

O composto foi obtido na forma de um sólido marrom, apresentando em seu espectro de UV-Vis bandas de absorção em 222, 247 e 323 nm (Figura 42).

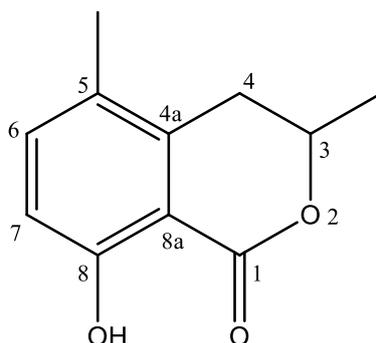
Figura 42: Espectro no UV-Vis da substância P05.



Fonte: Autor

A comparação do espectro de RMN de H^1 da substância P05 (Figura 44) com o espectro de P02 mostrou diversas semelhanças, como um singlete em δ_H 10,93, referente a um hidrogênio fenólico, dois sinais característicos de hidrogênios aromáticos de um anel 1, 2, 3, 4 tetra-substituído, dois duplos dupletos em δ_H 3,04 e δ_H 2,72, atribuídos aos hidrogênios benzílicos H-4, e um multiplete em δ_H 4,75, atribuído ao hidrogênio oximetínico H-3. Adicionalmente, a substância P5 apresentou um sinal em δ_H 2,16 referente a uma metila ligada a anel aromático, que não foi observado no espectro da substância P02. Desta forma foi possível inferir que a substância P05 também pertence à classe das isocumarinas, e propor sua estrutura com base na análise dos dados de RMN uni e bidimensionais (Figuras 44-48). Seus deslocamentos químicos de RMN de 1H e ^{13}C foram também comparados com a literatura (Tabela 5) e são compatíveis com a estrutura da 3,5-dimetil-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina (BI, 2007).

Figura 43: Estrutura da substância P05 (3,5-dimetil-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina)



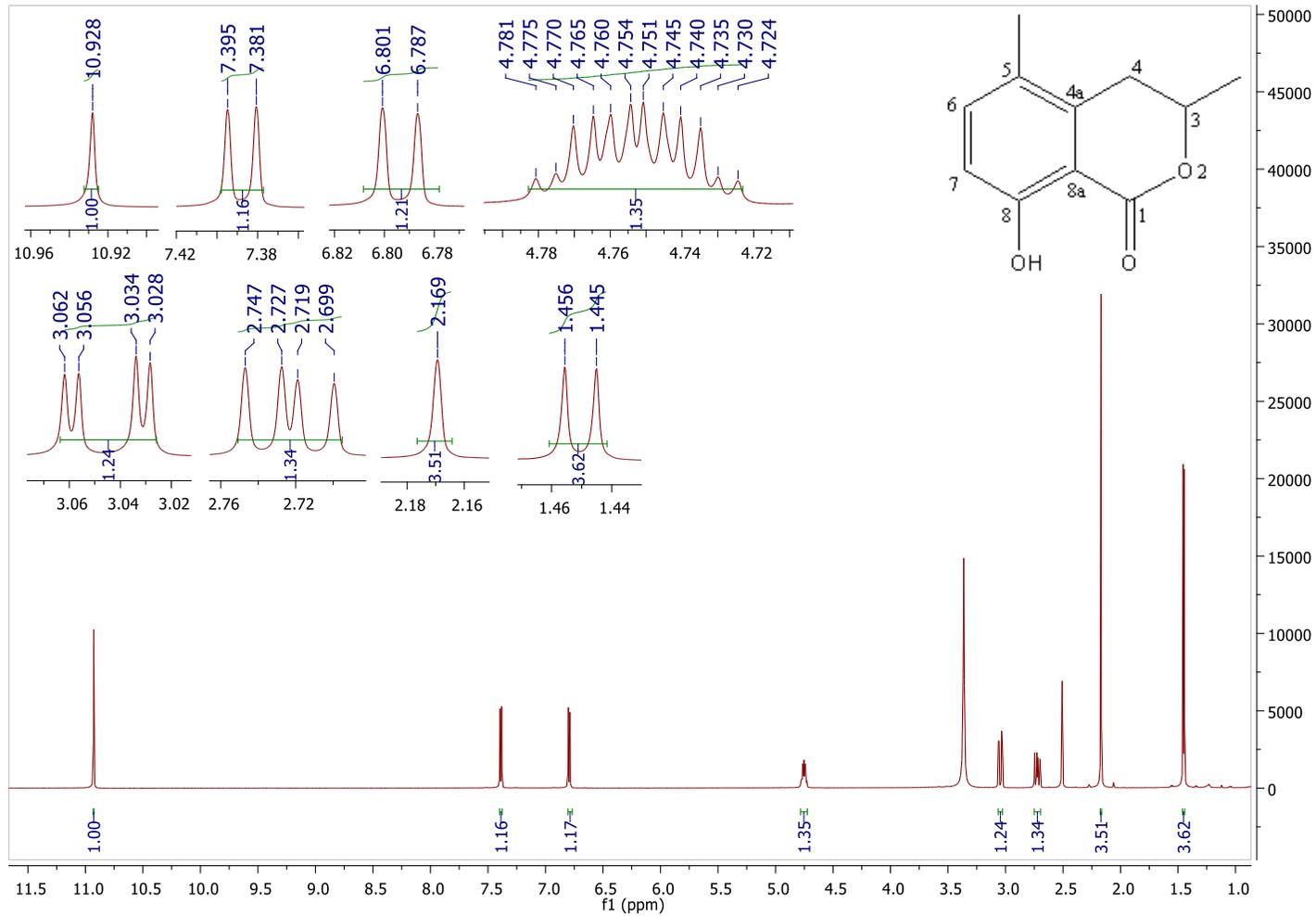
Fonte: Autor

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C para a substância **P05**.

Posição	$^a\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz)	$^a\delta_{\text{C}}$ (mult., J em Hz)	$^b\delta_{\text{H}}$ (mult., J em Hz) (Bi et al, 2007)	$^b\delta_{\text{C}}$ (mult., J em Hz) (Bi et al, 2007)
1	---	170,3	---	169,2
3	4,75 (m)	75,9	4,68 (m)	77,8
4	3,04 (dd, 6,3; 3,2); 2,72 (dd, 6,3; 11,6)	31,4	2,95 (dd, 16,5; 3,7); 2,80 (dd, 16,5; 11,7)	29,6
4a	---	138,7	---	140,6
5	---	125,7	---	126,2
6	7,38 (d, 8,4)	138,2	7,21 (d, 8,6)	134,6
7	6,79 (d, 8,4)	115,3	6,75 (d, 8,6)	112,8
8	---	159,8	---	154,4
8a	---	108,4	---	106,4
Ar-CH₃	2,16 (s)	18,1	2,18 (s)	19,7
-CH₃	1,44 (d, 6,3)	20,9	1,56 (d, 6,5)	20,8
-OH	10,93	---	10,97	---

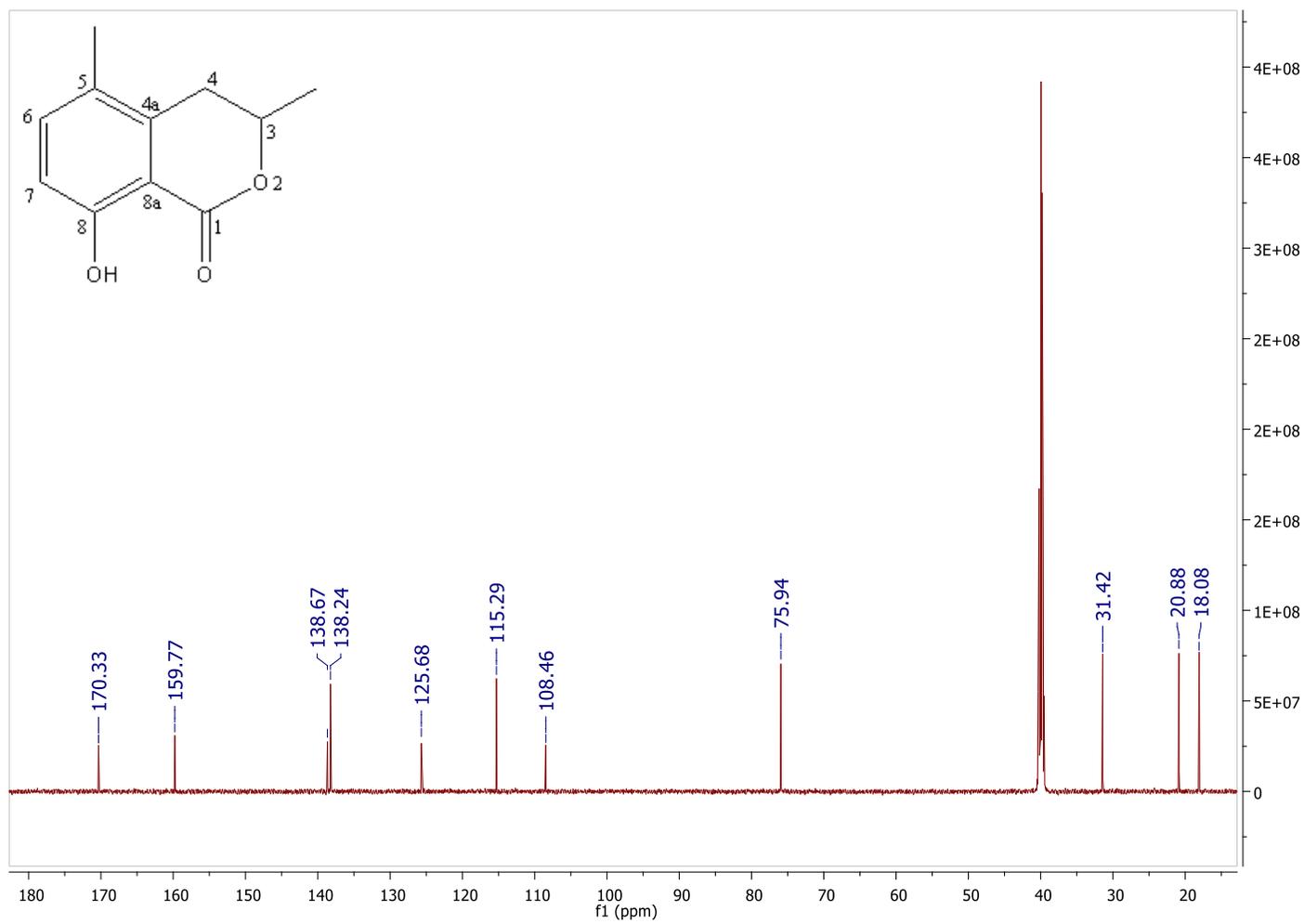
a (δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO- d_6 ; b (δ -ppm: 500 e 125 MHz; CDCl_3)

Figura 44: Espectro de RMN de ^1H da substância P05 (DMSO- d_6 , 600 MHz).



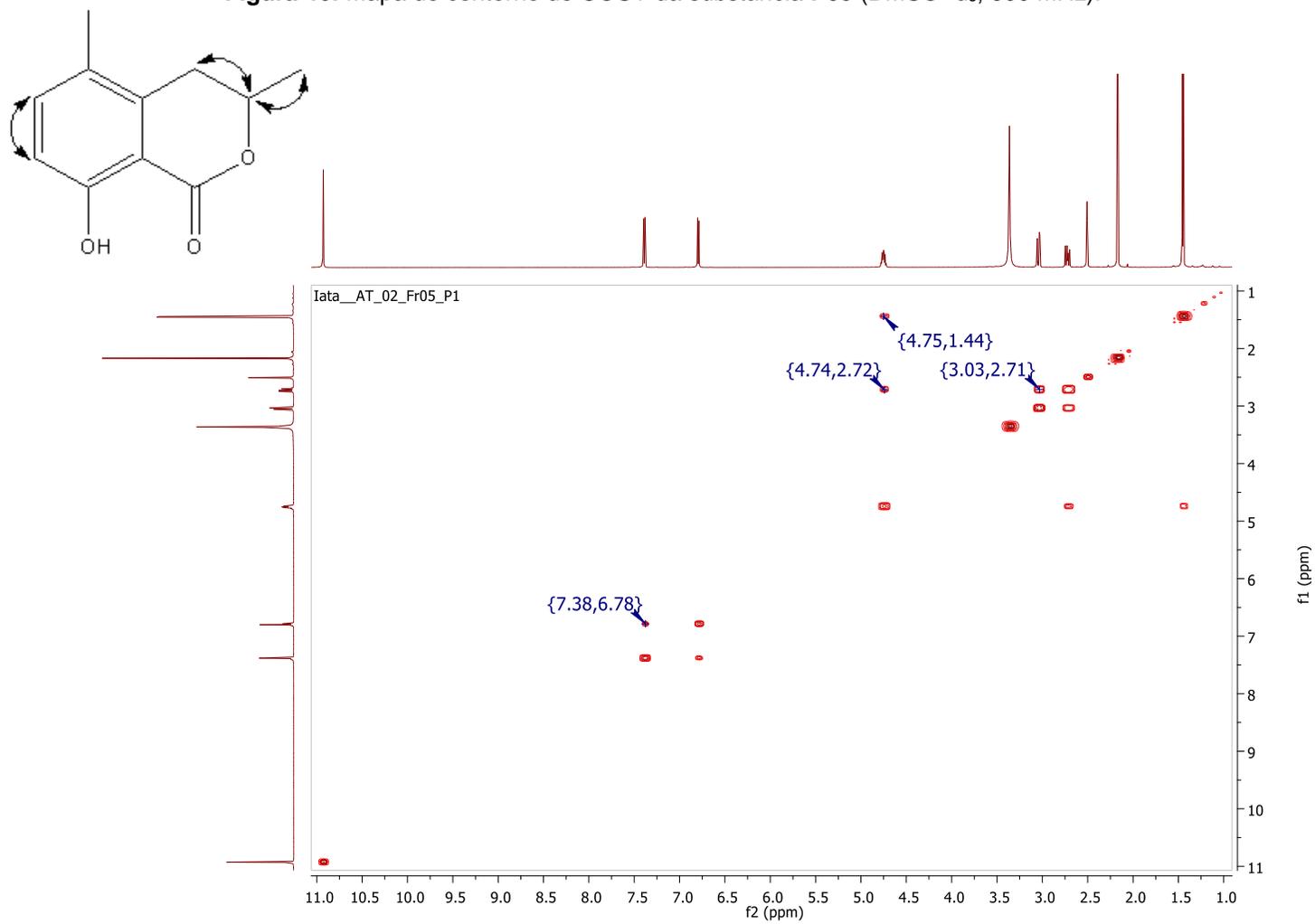
Fonte: Autor

Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P05** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



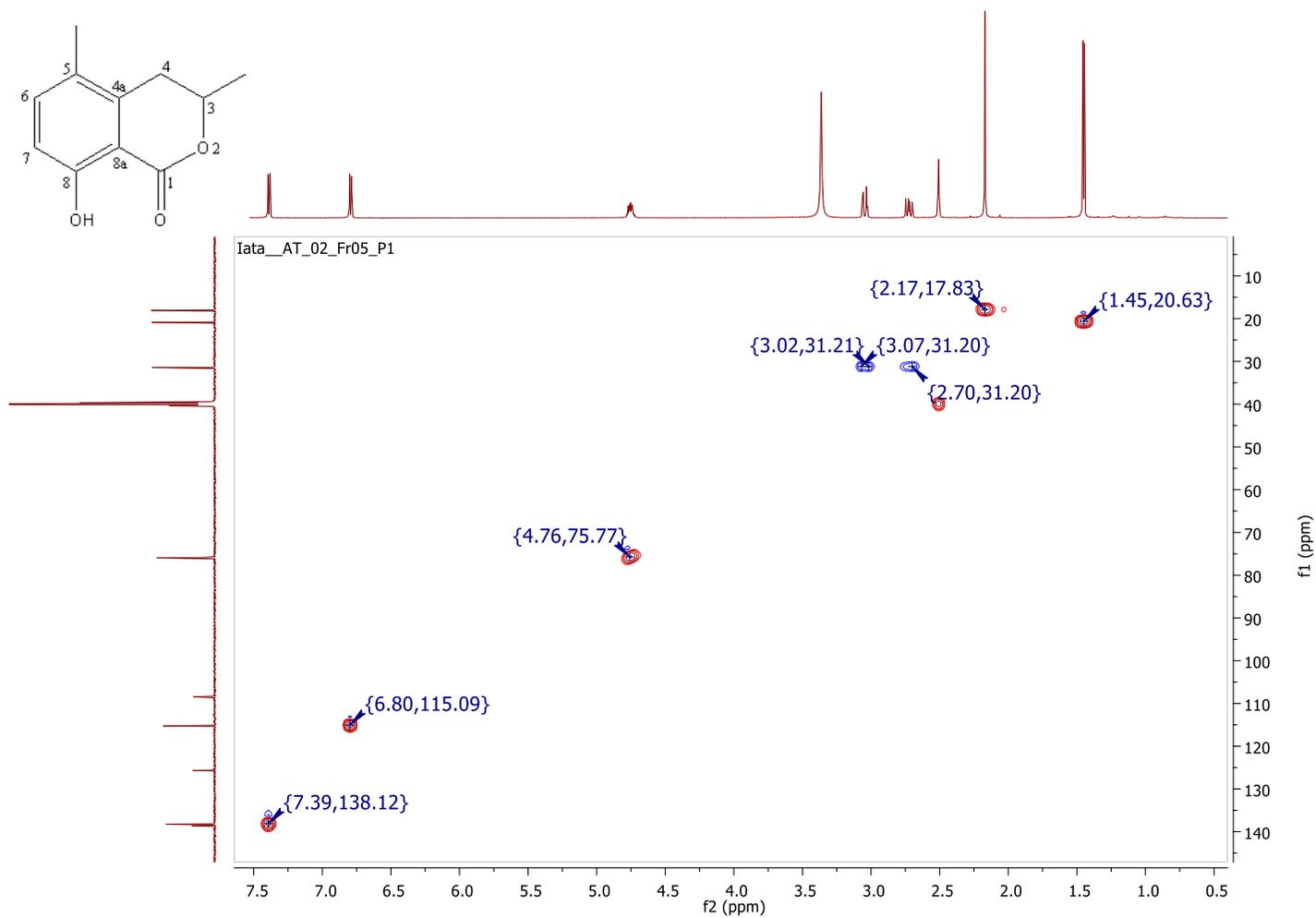
Fonte: Autor

Figura 46: Mapa de contorno de COSY da substância P05 (DMSO- d₆, 600 MHz).



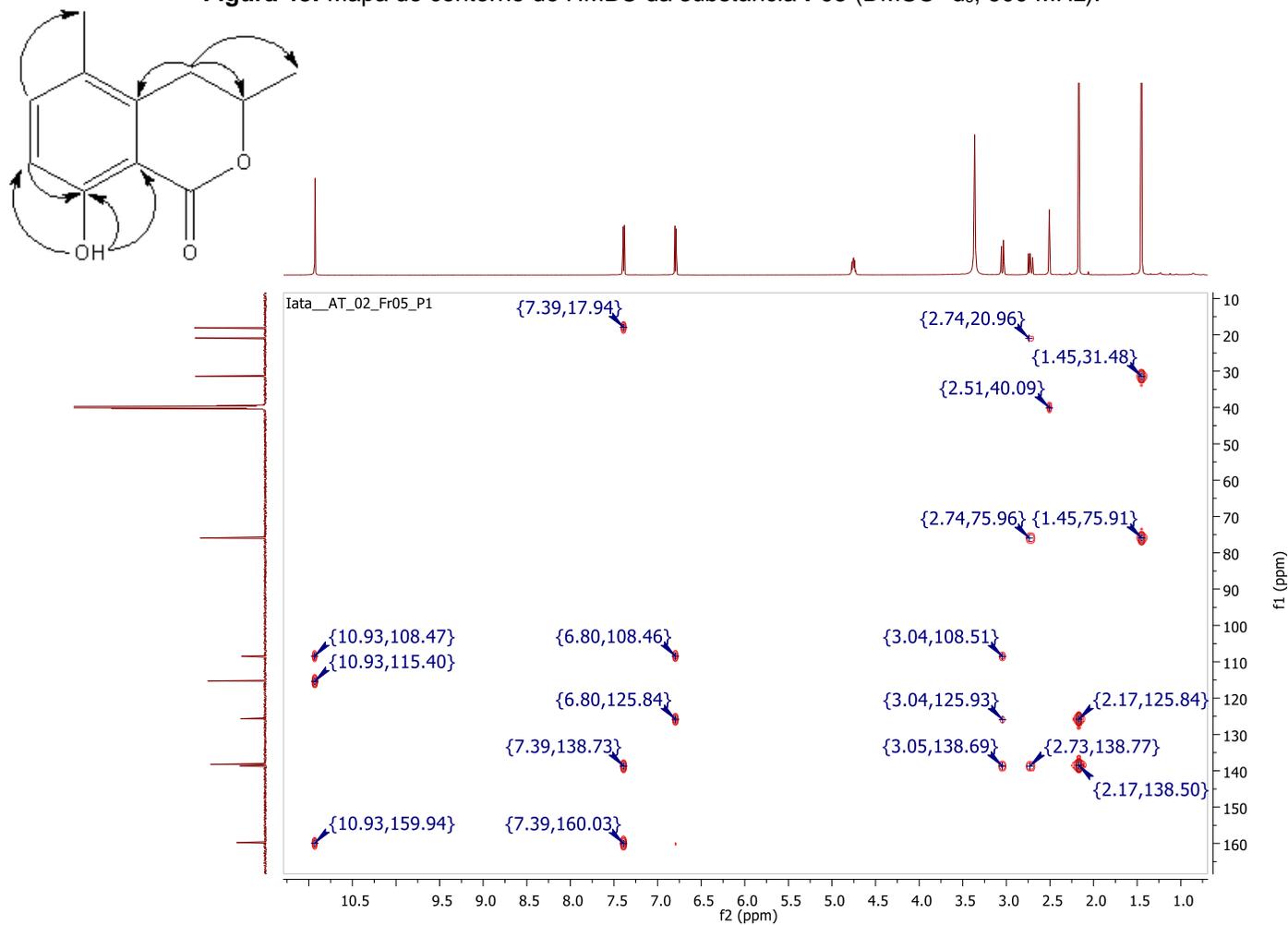
Fonte: Autor

Figura 47: Mapa de contorno de HSQC da substância P05 (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 48: Mapa de contorno de HMBC da substância P05 (DMSO- d₆, 600 MHz).

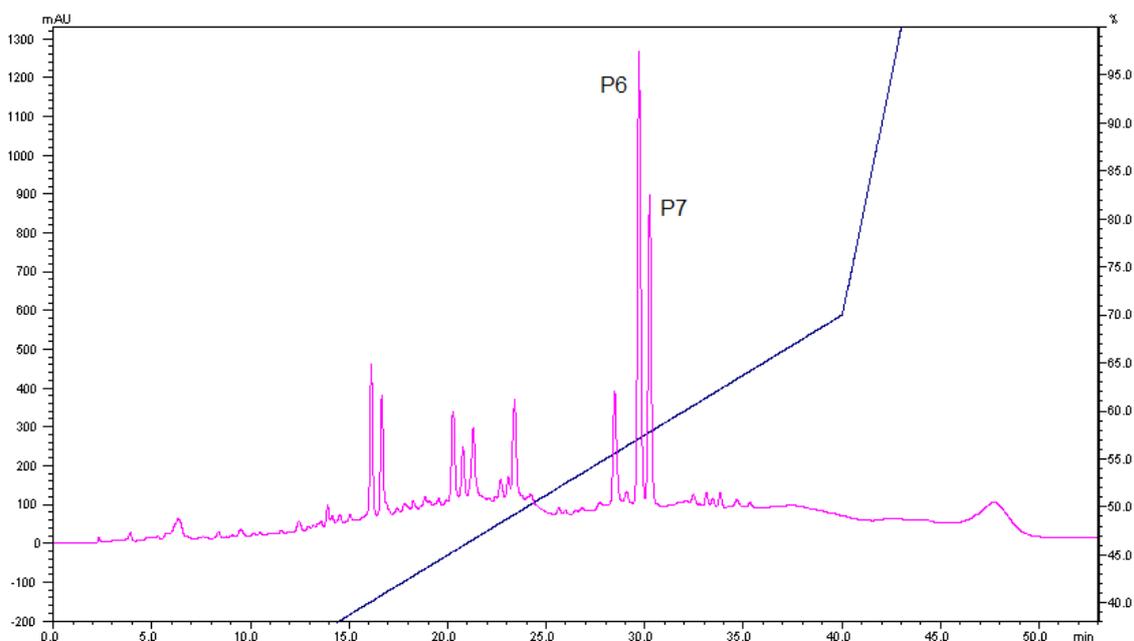


Fonte: Autor

4.5 Isolamento dos metabólitos da fração AT02-4

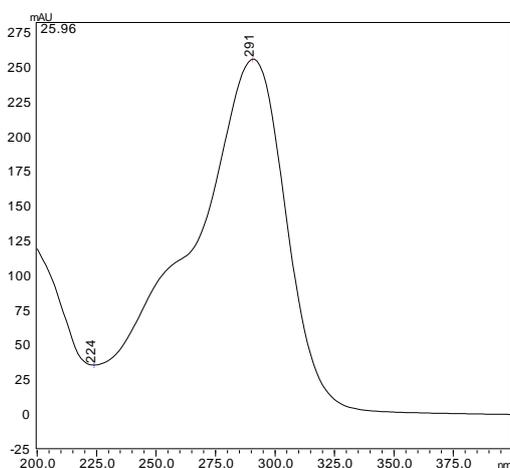
Devido à complexidade do perfil cromatográfico da fração 4 e sua pouca massa foi realizado um novo fracionamento utilizando um cartucho SPE com fase estacionária de sílica C-18 e metanol/água como fase móvel, originando duas novas subfrações denominadas AT02-4-1 e AT02-4-2. Escolheu-se para a purificação das substâncias em CLAE-DAD modo preparativo a subfração AT02-4-1, visto que apresentou duas substâncias majoritárias com boa resolução no cromatograma para separação (Figura 49). Foram obtidas 9 substâncias, das quais duas apresentaram massa suficiente para a realização dos experimentos necessários para a elucidação de suas estruturas. Os compostos foram codificados como P6 e P7.

Figura 49: Cromatograma da fração AT02-4-1 em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 40 a 70% ACN:H2O a 1 mL.min⁻¹, 40 min.; 254 nm)



4.5.1 Elucidação estrutural da substância P06

Figura 50: Espectro no UV-Vis da substância P06.



Fonte: Autor

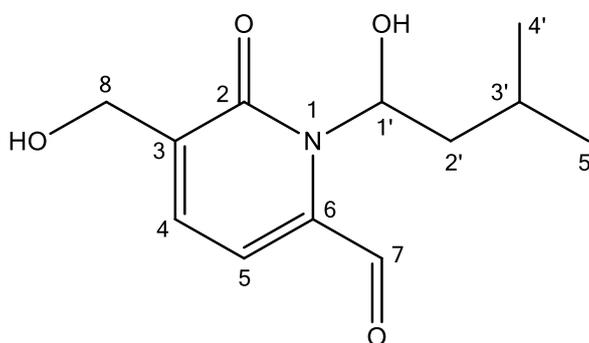
O espectro de RMN de ^1H da substância **P06** (Figura 52) mostrou um singlete em δ_{H} 9,50 apresentando correlação no mapa de contorno HSQC (Figura 55) com o sinal em δ_{C} 180,1 sugerindo a presença do grupo funcional aldeído. Este espectro mostrou também dois dubletos em δ_{H} 5,52 e δ_{H} 5,71 (J 15,2 Hz), atribuídos aos hidrogênios hidroximetínicos H8, além de um duplo dubleto em δ_{H} 5,66, atribuído ao hidrogênio oximetínico H-1', que mostrou acoplamento no espectro COSY, com os sinais em δ_{H} 2,00 e δ_{H} 1,61, atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-2'. O espectro COSY mostrou também correlação do multiplete observado em δ_{H} 1,66, atribuído a H-3', com o dubleto em δ_{H} 1,01, atribuído aos hidrogênios metílicos H-5'. A análise do mapa de correlações HSQC permitiu a atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C , sugerindo um substituinte com sub-estrutura alquílica hidroxilada ramificada (Figura 51).

Observaram-se também dois sinais com deslocamentos químicos δ_{H} 6,32 e δ_{H} 7,15 e constante de acoplamento de 4 Hz, sugerindo uma sub-estrutura semelhante a descrita para a substância **P03**. Dessa forma buscou-se investigar a presença de átomos de nitrogênio neste composto, realizando os experimentos HSQC e HMBC para núcleos de nitrogênio. Não foi observada correlação de hidrogênios ligados diretamente a nitrogênios no mapa de contorno HSQC, porém o mapa de contorno HMBC (Figura 57) apresentou correlações correspondentes a um nitrogênio terciário em acoplamento com sinais para 7 hidrogênios (δ_{H} 9,50, δ_{H} 7,15, δ_{H} 6,32, δ_{H} 5,71, δ_{H} 5,52, δ_{H} 2,00 e δ_{H} 1,60).

Estes dados mostraram-se compatíveis com o sistema cíclico carbonílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -di-insaturado, caracterizando a unidade lactama com extensão adicional da conjugação com a carbonila em C-7. A partir destas informações e das correlações observadas no mapa de contorno HMBC de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (Figura 53) foi possível propor a estrutura para a substância **P06** (Figura 48).

As pesquisas nas bases de dados SciFinder e PubChem indicaram que P06 é uma substância inédita.

Figura 51: Estrutura da substância **P06**.



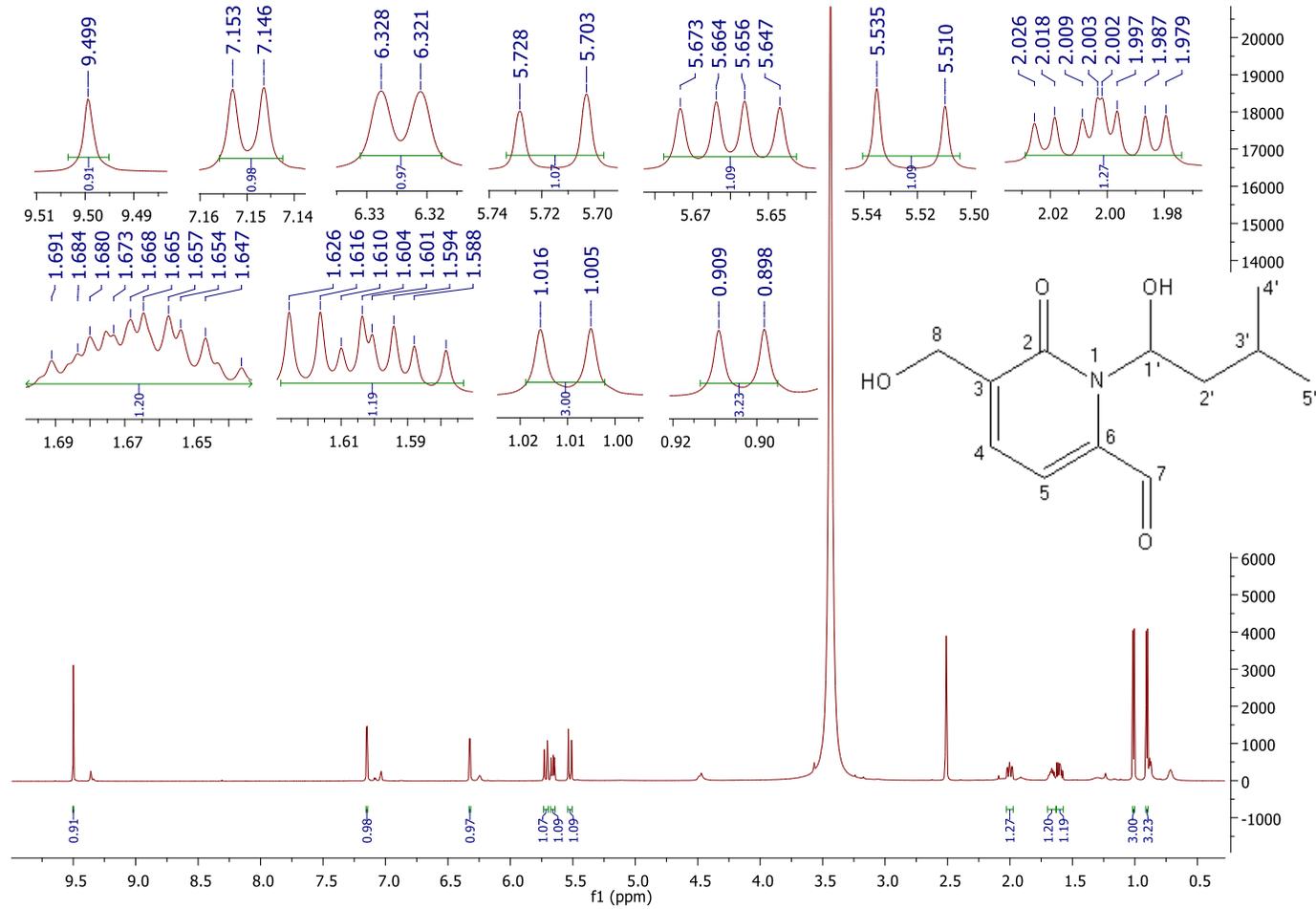
Fonte: Autor

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **P06**.

Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	HMBC
2	-	167,5	---
3	-	132,5	---
4	6,32 (d, 4,0)	107,2	125,2; 130,6; 132,5
5	7,15 (d, 4,0)	125,2	107,2; 130,6; 132,6
6	-	130,6	---
7	9,50 (s)	180,1	130,6
8	5,52 (d, 15,2) 5,71 (d, 15,2)	63,7	107,2; 125,2; 132,5; 167,5
1'	5,66 (dd, 10,2; 5,8)	56,4	24,7; 41,3; 132,5; 167,5
2'	2,00 (m) 1,61 (m)	41,3	21,6; 23,3; 24,7; 56,4; 167,5
3'	1,66 (m)	24,7	---
4'	0,90 (d, 6,5)	23,3	21,6; 41,3
5'	1,01 (d, 6,4)	21,6	23,3; 41,3

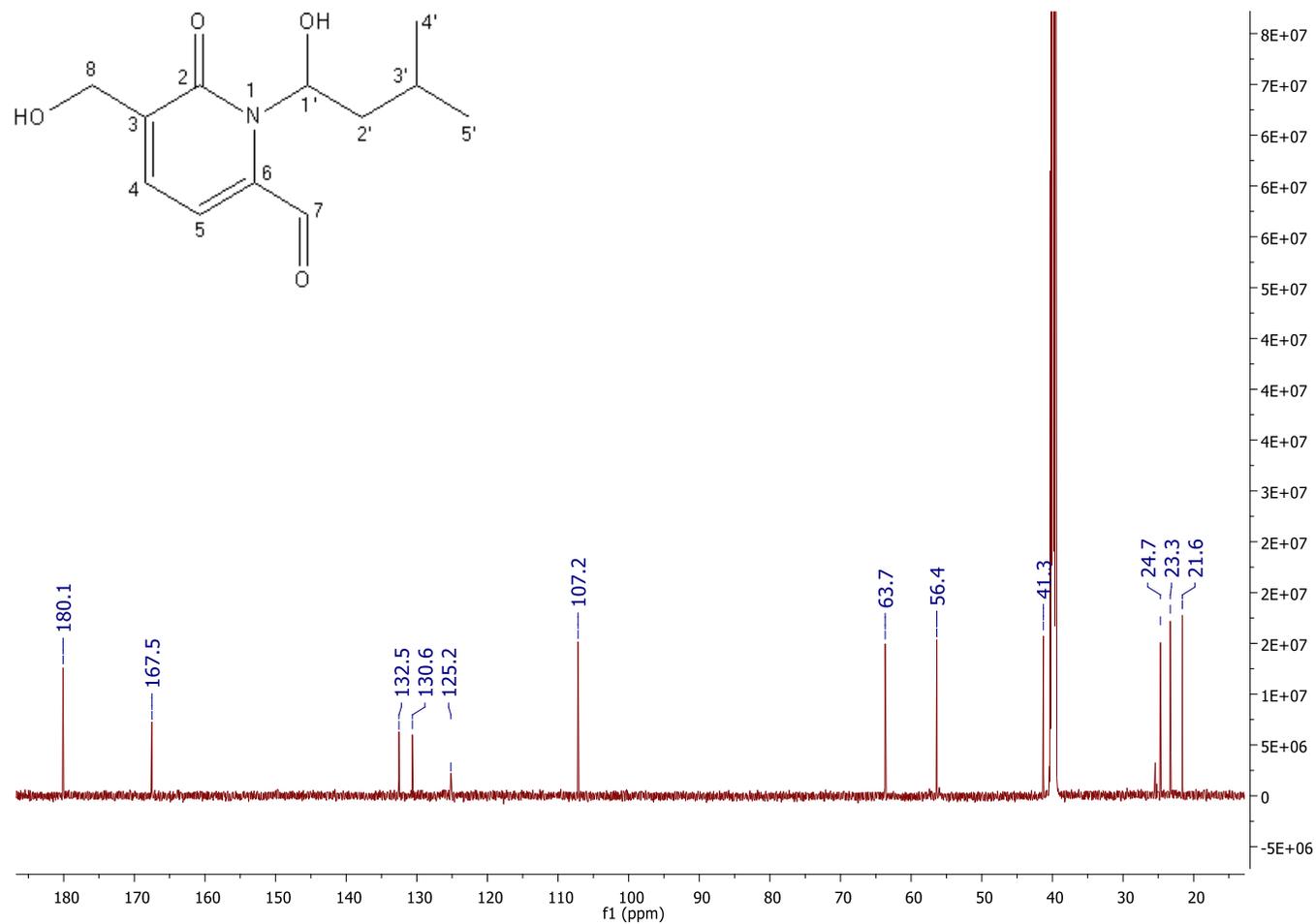
(δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO- d_6)

Figura 52: Espectro de RMN de ^1H da substância **P06** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



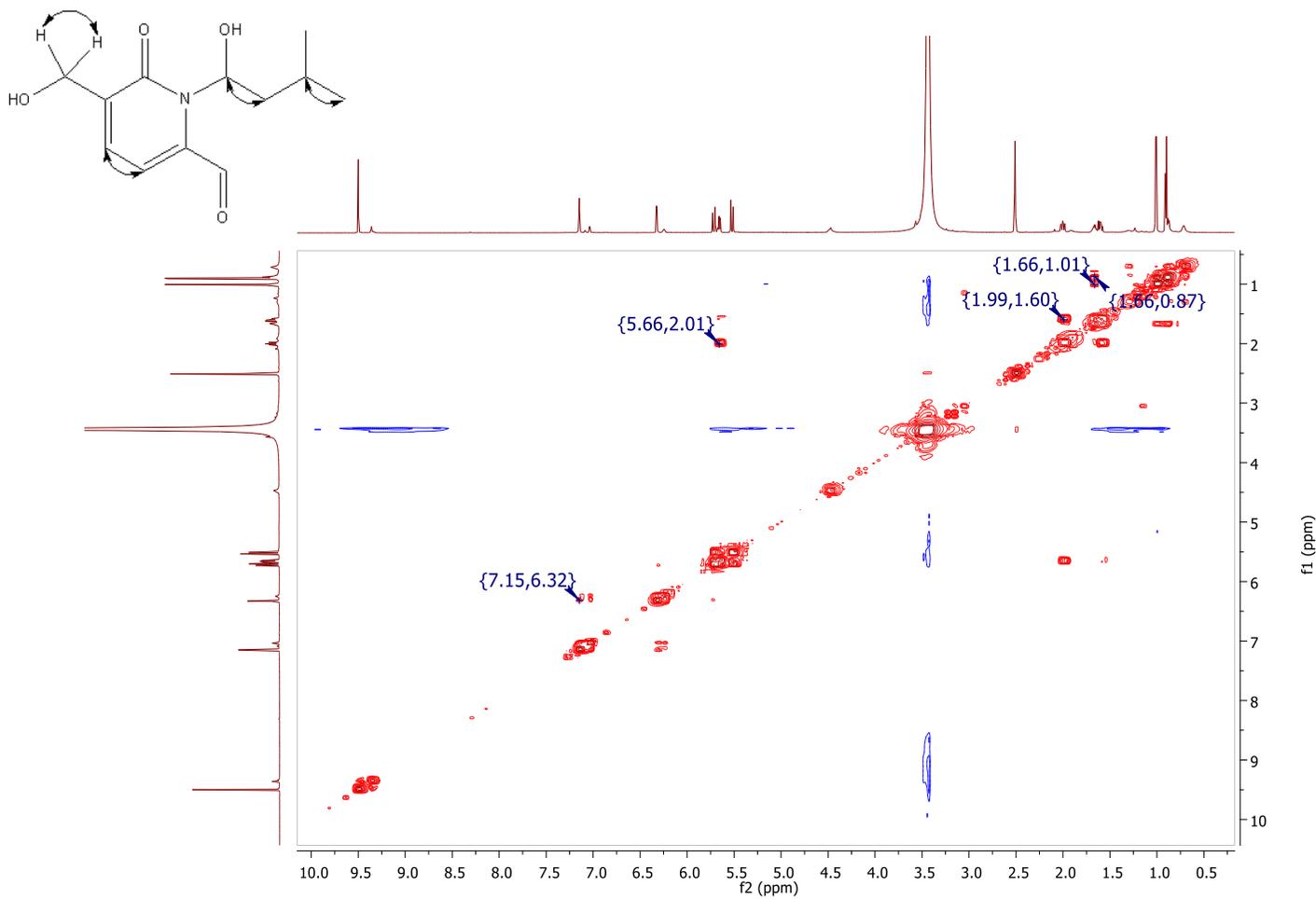
Fonte: Autor

Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P06** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



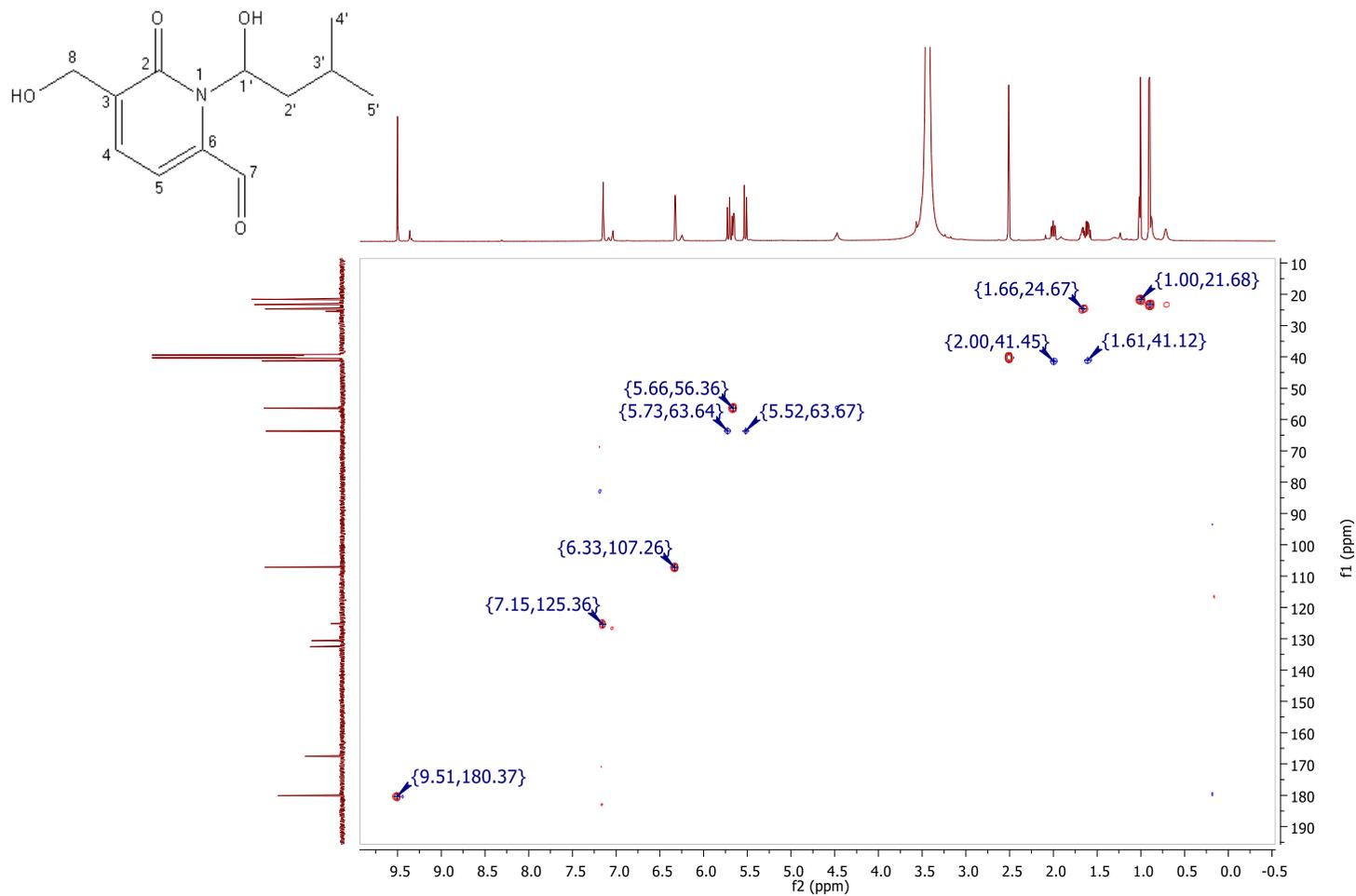
Fonte: Autor

Figura 54: Mapa de contorno de COSY da substância P06 (DMSO- d_6 , 600 MHz).



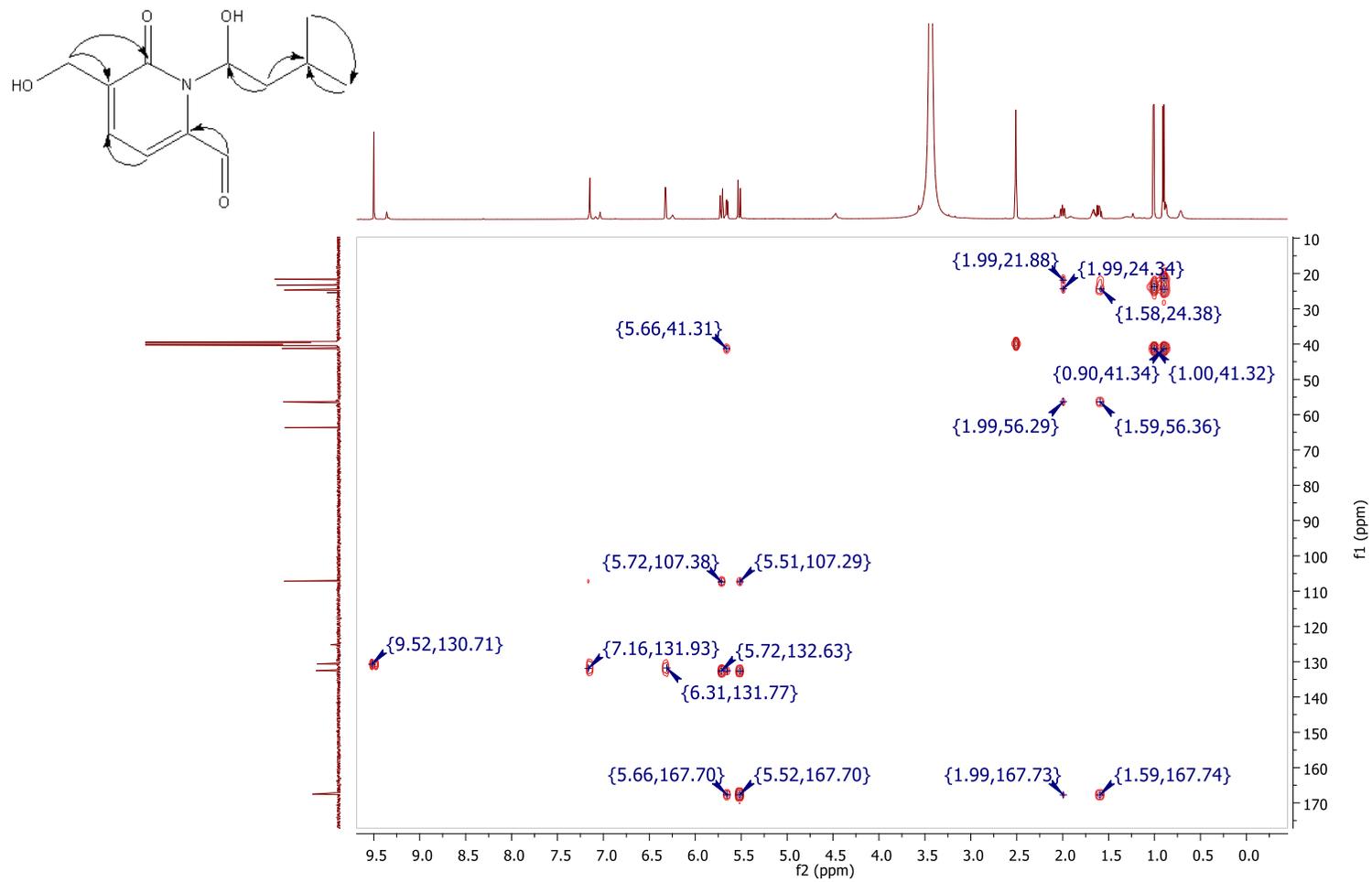
Fonte: Autor

Figura 55: Mapa de contorno de HSQC da substância P06 (DMSO- d₆, 600 MHz).



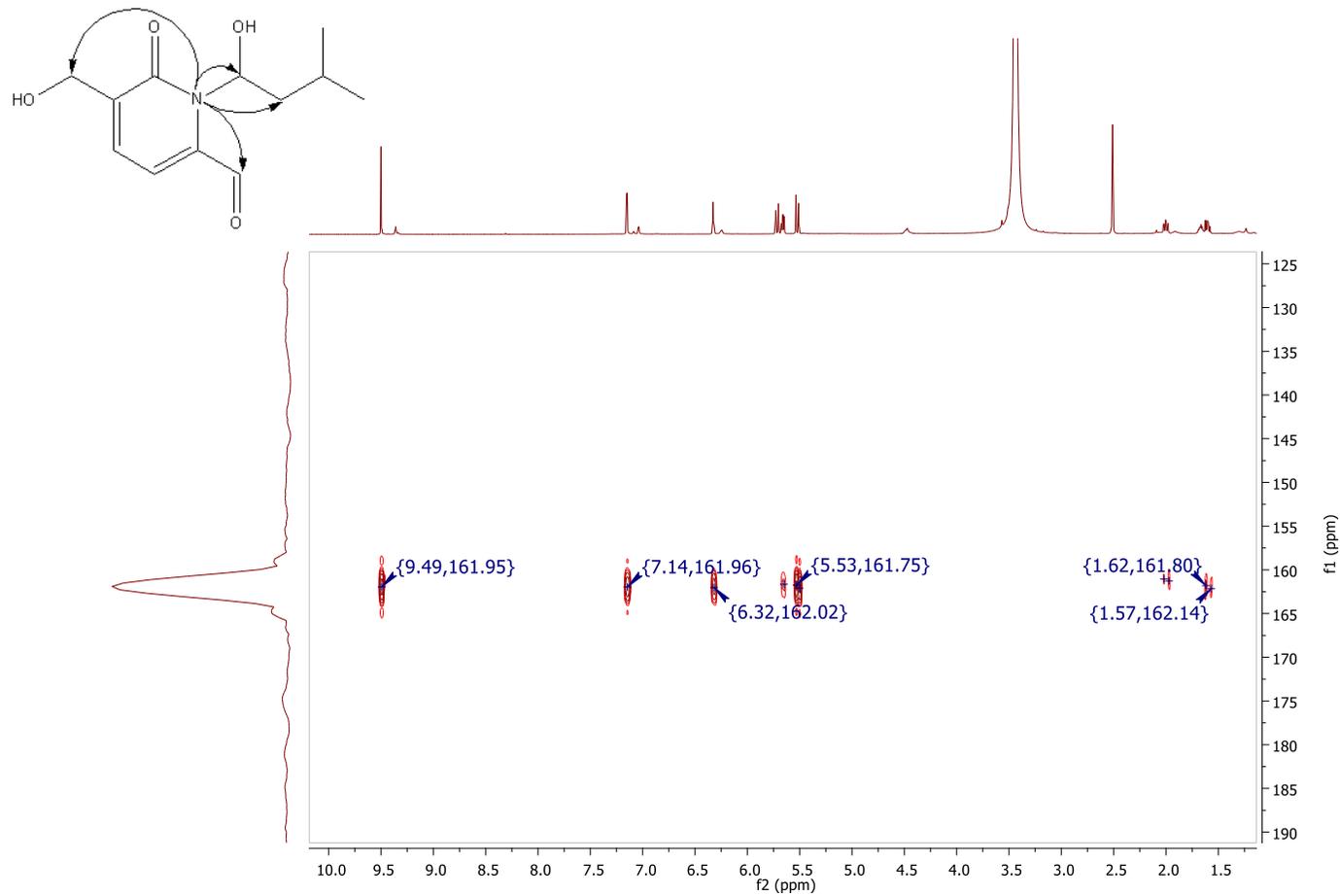
Fonte: Autor

Figura 56: Mapa de contorno de HMBC da substância P06 (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

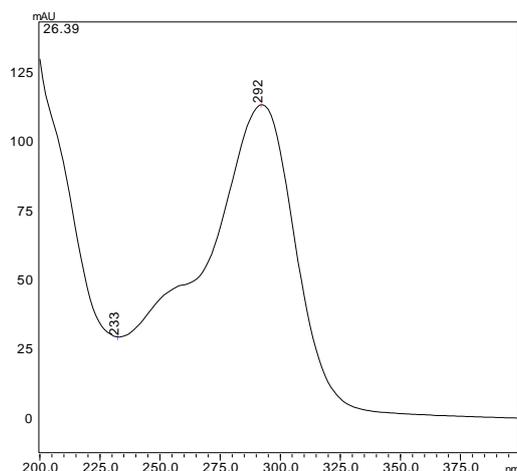
Figura 57: Mapa de contorno de HMBC de Nitrogênio da substância **P06** (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

4.5.2 Elucidação estrutural da substância P07

Figura 58: Espectro no UV-Vis da substância P07.



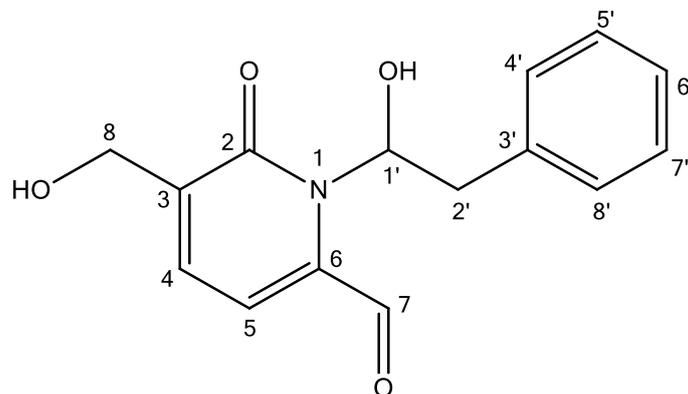
Fonte: Autor

Assim como para a substância **P06**, este composto apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 60), um singlete em δ_{H} 9,52 correlacionando, no mapa de contorno HSQC (Figura 63), com um sinal em δ_{C} 180,1, o que sugere a presença do grupo funcional aldeído. Outra semelhança observada são os dois dubletos com constante de acoplamento de 4 Hz que apresentaram deslocamentos químicos δ_{H} 6,32 e δ_{H} 7,15, indicando a presença dos hidrogênios olefínicos com conformação *s-cis*. Com base nas similaridades observadas nos espectros de RMN de **P06** e **P07**, buscou-se confirmar a existência de um átomo de nitrogênio no fragmento central do composto, através de experimentos HSQC e HMBC para núcleos de nitrogênio. Confirmando a semelhança estrutural entre os compostos purificados dessa fração, não foi possível observar nenhuma correlação de hidrogênio ligados diretamente a nitrogênio no mapa de contorno HSQC, enquanto no mapa de contorno HMBC (Figura 65) observaram-se correlações de um sinal correspondente a um nitrogênio terciário com os hidrogênios nas posições 4, 5, 7, 8, 1' e 2' (δ_{H} 6,17, δ_{H} 7,20, δ_{H} 9,51, δ_{H} 5,24, δ_{H} 5,84 e δ_{H} 3,33, respectivamente). A comparação dos dados de RMN de **P07** com os das substâncias **P03** e **P06** evidenciou similaridades que permitiram propor a subestrutura de δ -valerolactama di-insaturada com substituinte aldeído no C- δ . O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda um tripleto em δ_{H} 5,84, atribuído a H-1', acoplado com o sinal em δ_{H} 3,34, atribuído aos hidrogênios H-2', conforme evidenciado no experimento COSY. Adicionalmente, o mapa de correlações HMBC mostrou acoplamento de H-1' com o sinal em δ_{C} 135,1, atribuído a C-3', compatível com a unidade hidroxi-etil-benzeno ligada ao N do anel lactâmico. A partir destas informações e das demais correlações

observadas no mapa de contorno HMBC de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ((Figura 64) foi possível propor a estrutura para a substância **P07** (Figura 59).

As pesquisas nas bases de dados SciFinder e PubChem indicaram que P07 é uma substância inédita.

Figura 59: Estrutura da substância **P07**



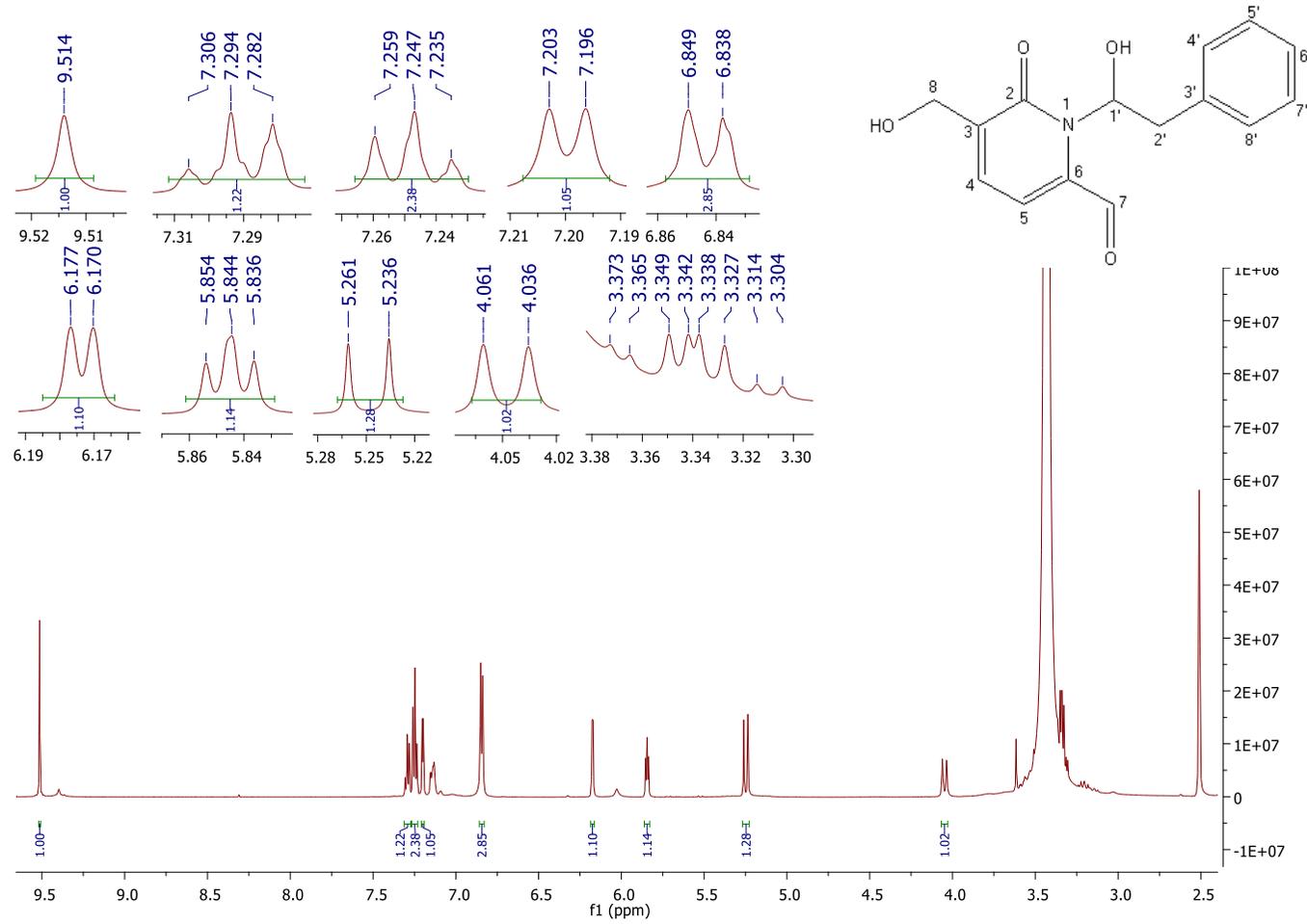
Fonte: Autor

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **P07**.

Posição	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	HMBC
2	-	167,3	---
3	-	132,4	---
4	6,17 (d, 4,0)	106,4	130,6; 132,4
5	7,20 (d, 4,0)	125,4	130,6; 132,4
6	-	130,6	---
7	9,51 (s)	179,9	130,6
8	4,05 (d, 15,1) 5,25 (d, 15,1)	63,6	106,4; 132,4; 167,3
1'	5,84 (t, 5,6)	59,0	39,5; 135,1; 167,3
2'	3,34 (m)	39,5	59,0; 129,8; 135,1
3'	-	135,1	---
4'	6,85	129,8	39,5; 128,2
5'	7,25	129,1	129,11; 135,1
6'	7,29	128,2	129,8
7'	7,25	129,1	129,1; 135,1
8'	6,84	129,8	39,5; 128,2

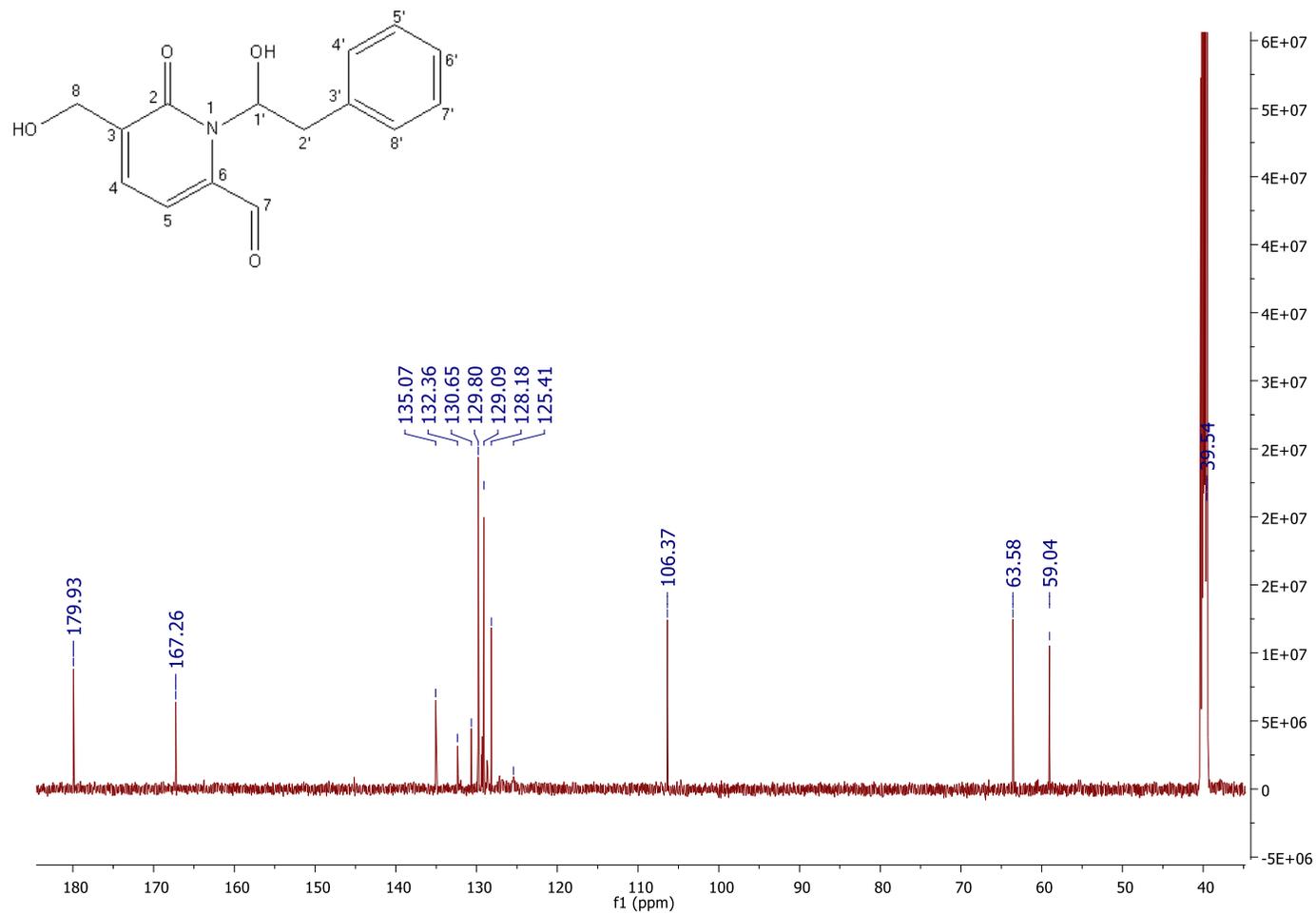
(δ -ppm: 600 e 150 MHz; DMSO- d_6)

Figura 60: Espectro de RMN de ^1H da substância **P07** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



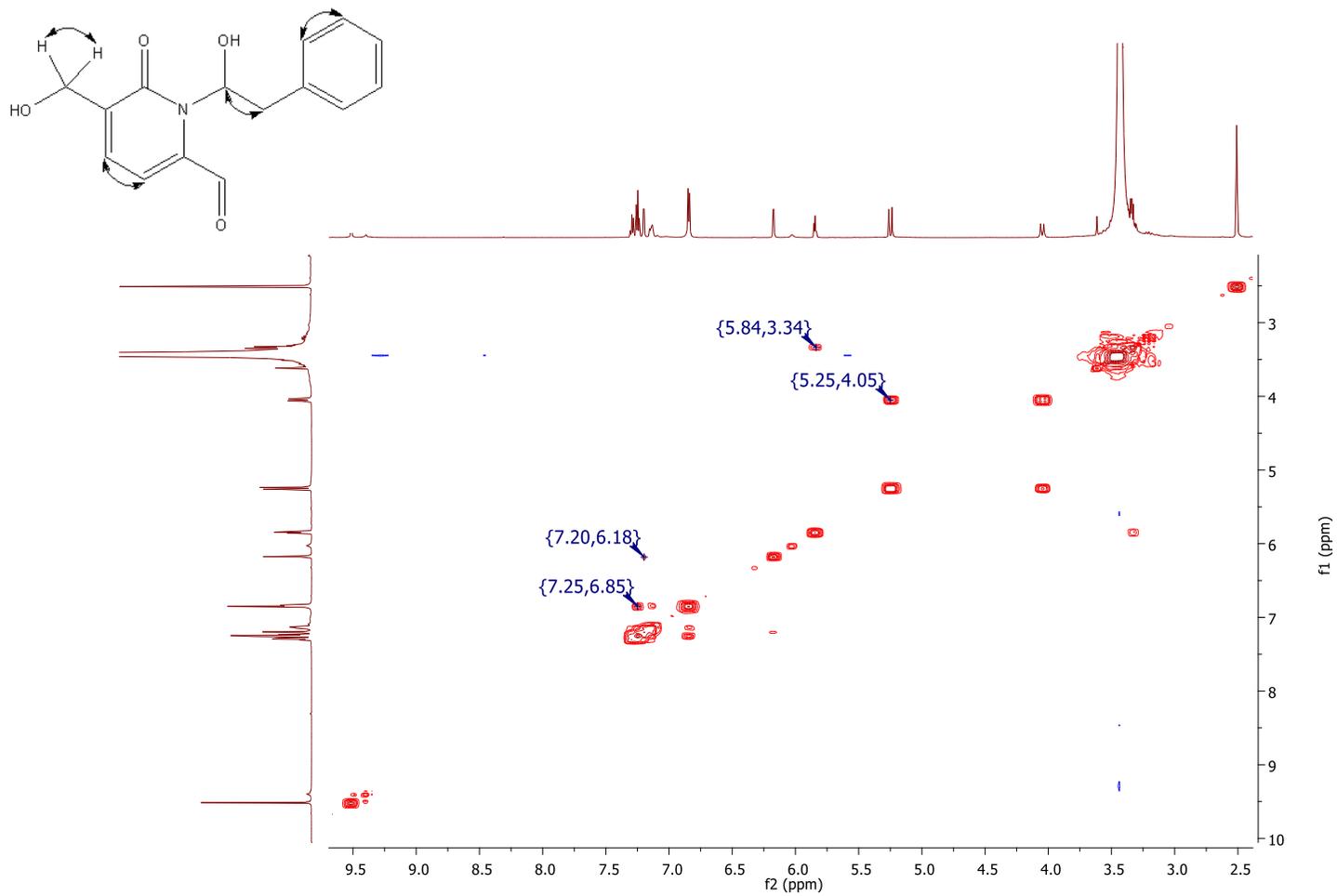
Fonte: Autor

Figura 61: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **P07** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



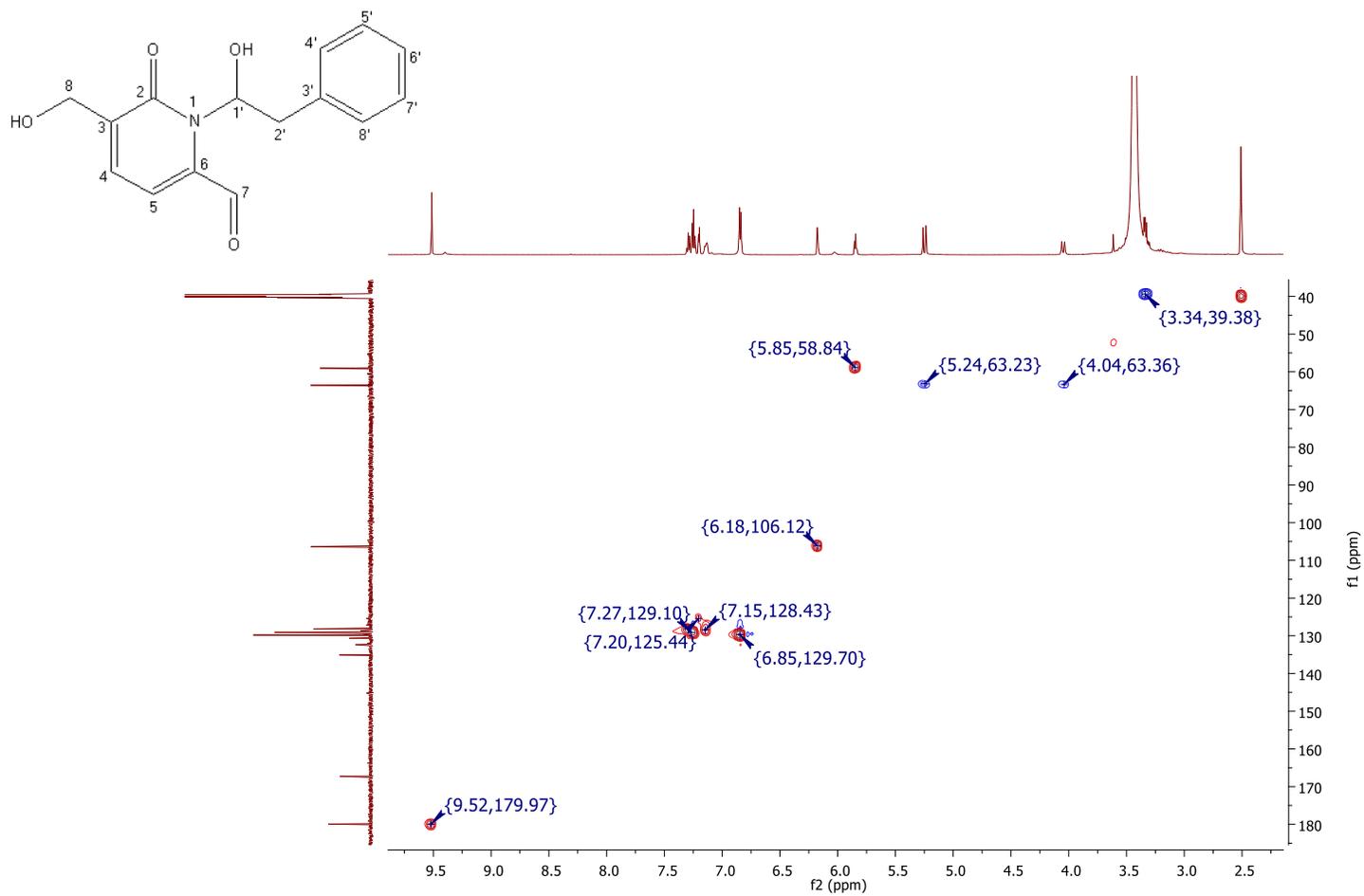
Fonte: Autor

Figura 62: Mapa de contorno de COSY da substância P07 (DMSO- d₆, 600 MHz).



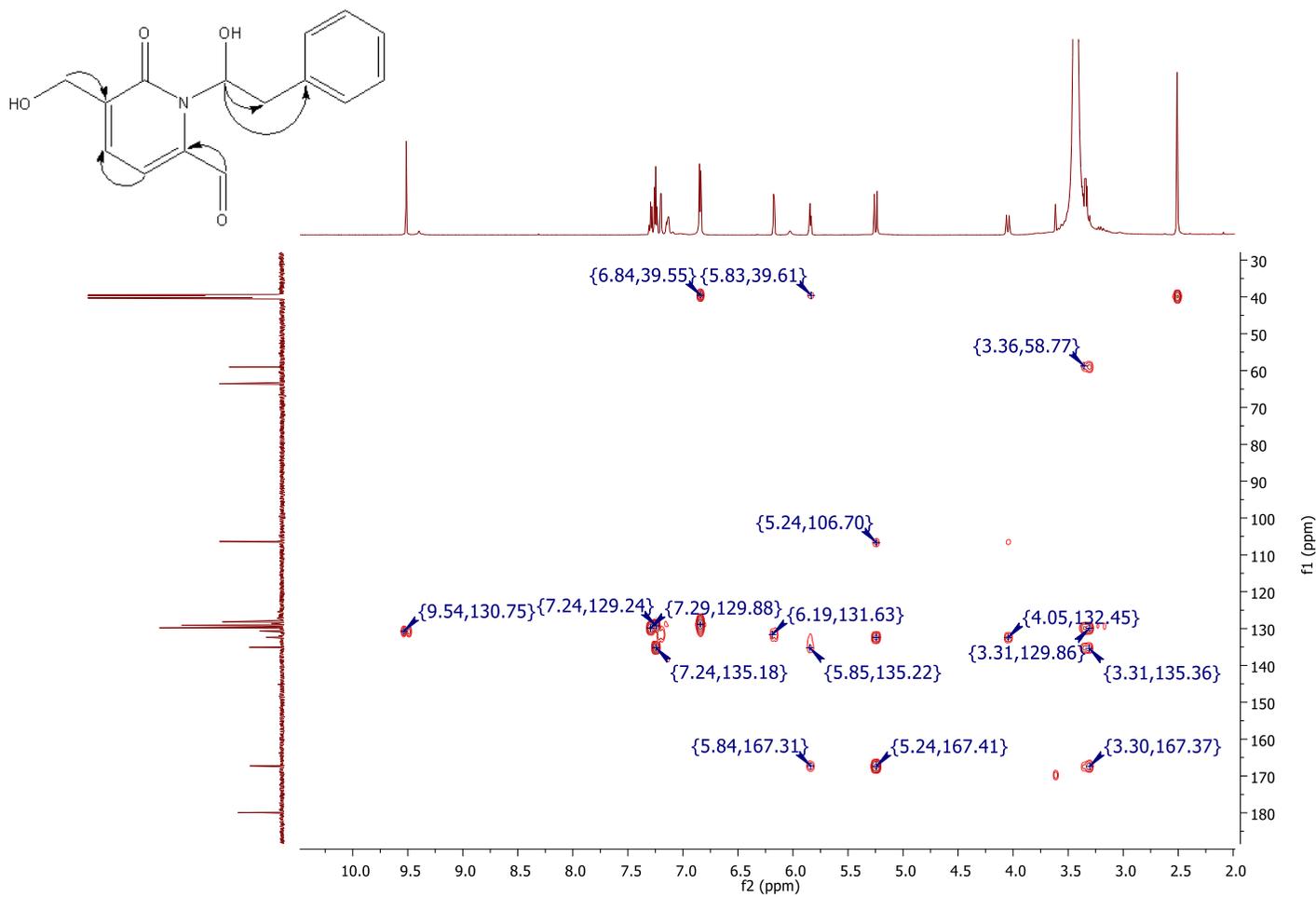
Fonte: Autor

Figura 63: Mapa de contorno de HSQC da substância P07 (DMSO- d₆, 600 MHz).



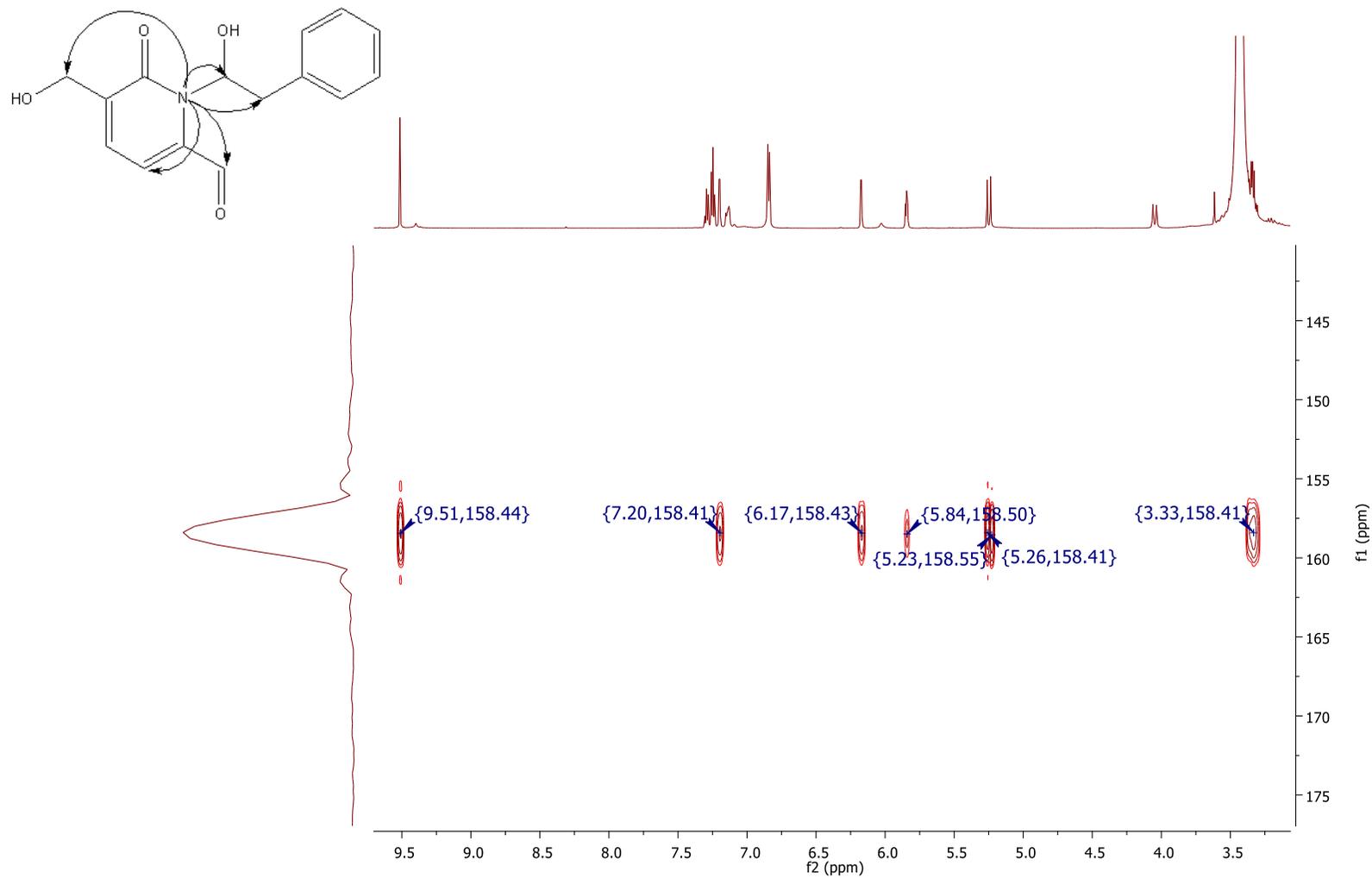
Fonte: Autor

Figura 64: Mapa de contorno de HMBC da substância P07 (DMSO- d₆, 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 65: Mapa de contorno de HMBC de (N→H) da substância P07 (DMSO- d₆, 600 MHz).

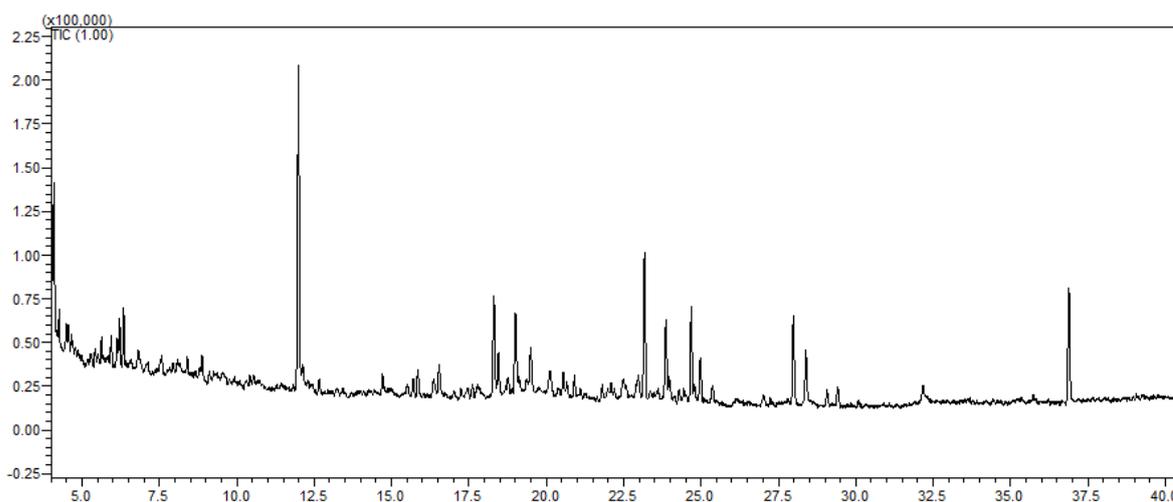


Fonte: Autor

4.6 Análise do extrato AT02 por GC-MS

Realizou-se a análise do extrato AT02 por GC-MS (Figura 66), comparando em seguida os espectros de massas das bandas cromatográficas observadas com a base de dados NIST, que permitiu a seleção das possíveis estruturas dos constituintes deste extrato pela similaridade entre as fragmentações e a semelhança entre o índice de retenção (IR) observado e o teórico.

Figura 66: Cromatograma em CG-MS do extrato AT02.



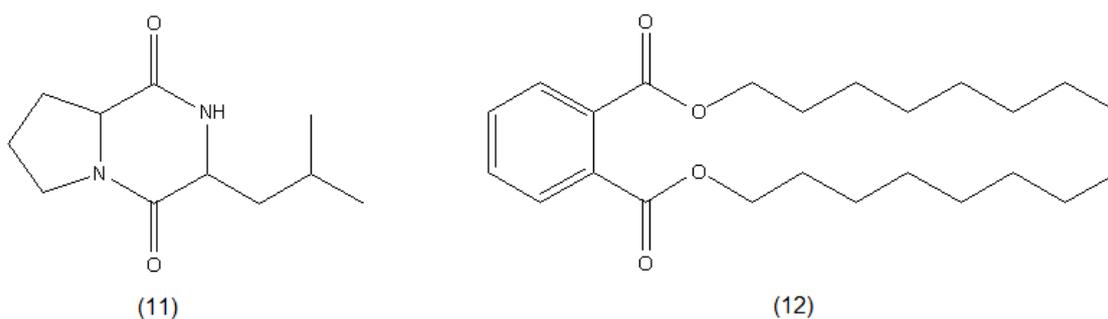
Fonte: Autor

Foi possível estabelecer as estruturas para dois constituintes químicos, a dicetopiperazina Ciclo-Leu-Pro- (**11**) e o ftalato de di-n-octila (**12**), visto que os demais sinais não apresentaram similaridade igual ou superior ao nível considerado confiável (85%). A Tabela 8 indica o número #CAS dos compostos identificados, e seus valores de tempo de retenção (TR), IR teórico e experimental e índice percentual de similaridade da fragmentação por EM.

Tabela 8: Substâncias identificadas por GC-MS

Nome	#CAS	TR	IR teórico	IR exp.	Similaridade
Ciclo-Leu-Pro-dicetopiperazina	5654 - 86 - 4	19,002	1908	1929	86%
Di-n-octil ftalato	117 - 84 - 0	36,892	2545	2552	94%

Figura 67: Estruturas das substâncias identificadas por GC-MS.



Fonte: Autor

4.7 Testes de atividade biológica

O extrato AT02 e as frações obtidas a partir do seu fracionamento cromatográfico foram avaliados em teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, realizados em parceria com o grupo da Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso (GCBPN, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto/SP) e em teste de atividade antitumoral usando as linhagens de câncer humano MCF-7 (mama) e HCT-116 (colon), em parceria com o grupo da Profa. Dra. Leticia Lotufo (ICB-USP, São Paulo/SP). As amostras analisadas não apresentaram atividade citotóxica significativa (maior que 85%) frente às duas linhagens de células testadas (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Atividades citotóxicas para MCF-7

Amostra	GI (%) 5 ug/mL		GI (%) 50 ug/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
At-02 Extrato	15,17	2,39	40,06	6,57
At-02 Fr03	7,68	2,45	9,34	2,32
At-02 Fr05	13,81	0,14	7,90	3,40
At-02 Fr01	5,50	9,24	5,50	5,47
At-02 Fr02	11,59	5,31	24,53	2,51
At-02 Fr04	8,27	3,79	3,39	1,81
At-02 Fr06	7,11	3,69	6,27	7,18

Tabela 10: Atividades citotóxicas para HCT-116.

Amostra	GI (%) 5 ug/mL		GI (%) 50 ug/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
At-02 Extrato	10,75	7,20	13,73	9,10
At-02 Fr03	10,06	3,61	4,76	3,22
At-02 Fr05	-3,76	3,09	2,75	0,72
At-02 Fr01	2,49	1,03	-3,75	2,58
At-02 Fr02	1,37	7,16	-7,63	8,61
At-02 Fr04	-6,55	1,55	3,10	1,85
At-02 Fr06	-5,15	0,88	-17,41	2,77

O extrato e frações analisadas apresentaram fraca inibição das enzimas AChE de enguia elétrica e BChE humana, com exceção da fração At-02 Fr06, que inibiu a BChE humana de forma moderada (37%), quando comparada ao controle positivo galantamina (inibição de 80%).

Tabela 11: Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas AChE_{ee} e BChE_{hu}.

Amostras	% inibição ± EPM ²	% inibição ± EPM ²
	ICER-AChE _{ee}	ICER-BChE _{hu}
Galantamina¹	87,4 ± 1,8	80,6 ± 2,4
AT-02 Ext	28,95 ± 0,3	19,27 ± 3
AT-02 Fr01	46,51 ± 5	0
AT-02 Fr02	18,82 ± 1,5	0
AT-02 Fr03	ND	ND
AT-02 Fr04	26,09 ± 2	9,89 ± 1
AT-02 Fr05	0	11,02 ± 1
AT-02 Fr06	32,14 ± 1	37,66 ± 1

¹ Inibidor padrão de AChE e BChE; ² Erro padrão da média. ND - Não foi possível determinar de acordo com o método proposto.

5 CONCLUSÃO

A variação de parâmetros como o meio de cultura e tempo de cultivo empregados na metodologia de crescimento da linhagem em estudo do fungo *Humicola fuscoatra* mostrou-se relevante ao se analisar os perfis metabólicos dos extratos obtidos. A busca das condições de crescimento que apresentassem as melhores respostas em termos de massa de extrato produzido e variabilidade metabólica, importantes para os objetivos do trabalho, evidenciou que o emprego de tempo de cultivo de 21 dias rendeu melhores resultados para os meios de cultivo sólido – arroz e líquido - malte. Por outro lado, o uso de meio líquido Czapek rendeu maior massa de extrato e variabilidade metabólica para o tempo de cultivo de 28 dias.

Foi possível também constatar a capacidade da linhagem estudada do fungo *Humicola fuscoatra* de produzir metabólitos secundários com estruturas químicas variadas, que incluíram cumarinas, dicetopiperazinas, um ftalato, além de três valerolactamas (P03, P06 e P07) e uma cicloexadienona (P04) inéditas na literatura. No contexto da pesquisa de bioprospecção, foram avaliadas as atividades citotóxicas frente a linhagens tumorais humanas MCF-7 (mama) e HCT-116 (colon), e anticolinesterásica do extrato investigado e frações semipurificadas, usando AChE de enguia e humana. Os resultados mostraram inibição moderada da enzima AChE humana para a fração At-02 Fr06.

O elevado potencial de quimiodiversidade observado para esta linhagem reforça a necessidade de intensificar os estudos de microrganismos obtidos a partir do ambiente marinho, em função do seu potencial de produção de compostos possivelmente bioativos e do número de artigos científicos ainda baixo envolvendo estes organismos, o que evidencia um potencial ainda sub-explorado do bioma marinho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT, E. A.; FERGUS, C. L. The Relation of extracellular amylase, mycellum, and time, in some thermophilic and mesophilic *Humicola* species. **Mycopathology Applied**. n. 44, p. 131-141, 1971.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BI, Y.; BI, X.; FANG, A.; ZHAO, Q. Metabolites from the fungus *Cephalosporium* sp. AL031. **Archives of Pharmacal Research**. v. 30, p. 267-269, 2007.
- BICUDO, C. E. M., MENEZES, M.; Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, RC., org., *et al.* INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 49-60, 2010.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.
- BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.68, n.1, março. 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 5–30, 1995.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.** n. 25, p. 475-516, 2008.
- CAFÊU, Mariana C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991, 2005.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug lead. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1830, p. 3670 – 3695, 2013.
- FAHEY, J. W.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. **Methods in Enzymology**, v. 382, p. 243-258, 2004.
- FELÍCIO, R. de; OLIVEIRA, A. L. L. de; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012.
- FUCHS; HOMANS, A. L. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungi toxic substances. **Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.
- GUIRY, M. D., How many species of alga are there?. **Journal of Phycology**, v. 48, p. 1057-1063, 2012.

KUMAR, S. N.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Purification and identification of two antifungal cyclic dipeptides from *Bacillus cereus subsp. thuringiensis* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode especially against *Fusarium oxysporum*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29(2), p. 190-197, 2014.

MANILAL, A.; et al. Bioactivity of the red algae *Asparagopsis taxiformis* collected from the southwestern coast of India. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, p. 93-100, 2010.

MOLINSKI T.F., et al. Drug development from marine natural products. **Natural Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 69-85, 2009.

MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea var thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 37, p. 675-681, 1991.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Introdução à Micologia: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde, **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**, Fundação Oswaldo Cruz, v.04. 2010.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. Santiago, v. 3, p. 69-72, 2004.

NEWMAN, D. J. Predominately Uncultured Microbes as Sources of Bioactive Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1832, p. 1–15, 2016.

PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Cerámiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. **Química Nova**, v. 22, p. 369-374, 1999.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. **Analytical Biochemistry**, v. 169, p.328-336, 1988.

QUANG, D. N. et al. Cytotoxic constituents from the fungus *Daldinia concentrica* (Xylariaceae). **Natural Product Research**, v. 27, p. 486-490, 2013.

RAJAMANIKYAM, Maheshwari et al. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 60, e17160542, 2017.

SANTOS, C. S. Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos *Microascus sp.* e *Nodulisporium sp.* associados à alga vermelha *Asparagopsis Taxiformis*. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

SMETANINA, O. F. et al. Metabolites of the marine fungus *Humicola fuscoatra* KMM 4629. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**. v. 53, n. 11, p. 2643-2646, 2004.

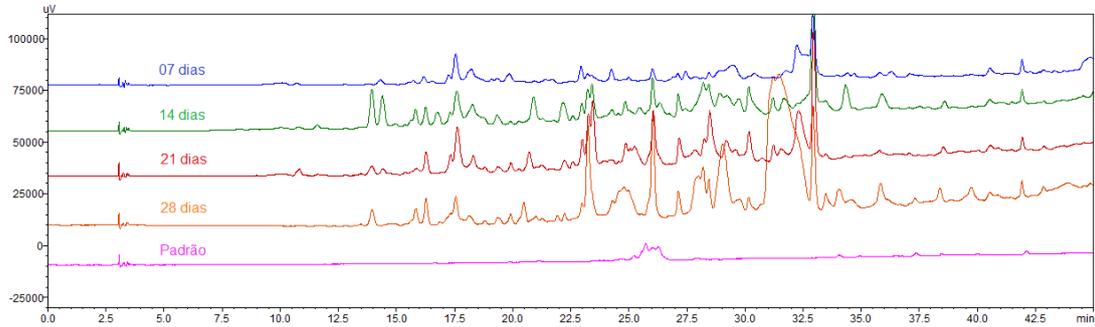
SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2015.

WICKLOW, D. T. et al. Antifungal Metabolites (Monorden, Monocillin IV, and Cerebrosides) from *Humicola fuscoatra* Traaen NRRL 22980, a Mycoparasite of *Aspergillus flavus* Sclerotia. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 11, p. 4482-4484, 1998.

YOSHIOKA, H.; ANRAKU, S. I.; HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CM-case from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. **Agricultural and Biological Chemistry**. n. 46, p. 75-82, 1982.

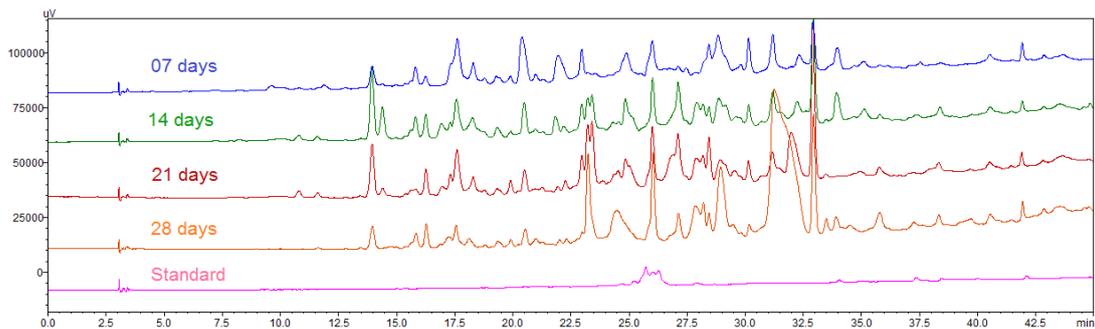
7 ANEXO

Figura 68: Comparação do perfil químico do fungo *Humicola fuscoatra* em diferentes tempos de crescimento em meio de malte em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 45 min.; 254 nm)



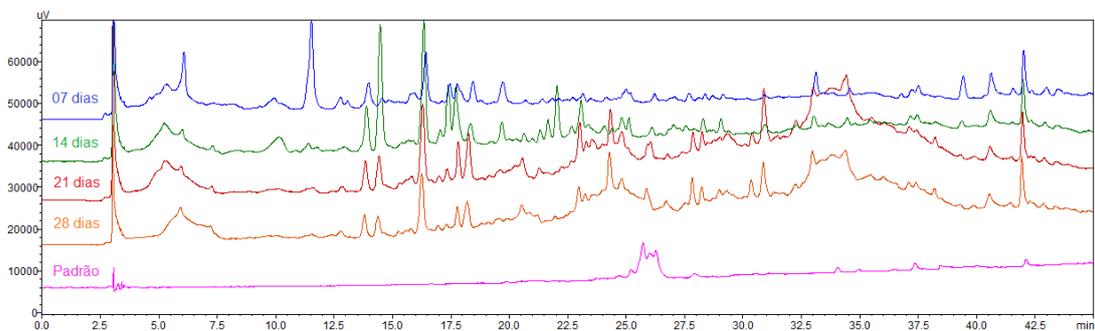
Fonte: Autor

Figura 69: Comparação do perfil químico do fungo *Humicola fuscoatra* em diferentes tempos de crescimento em meio de Czapek em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 45 min.; 254 nm)



Fonte: Autor

Figura 70: Comparação do perfil químico do fungo *Humicola fuscoatra* em diferentes tempos de crescimento em meio de arroz em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O a 1 mL.min⁻¹, 45 min.; 254 nm)



Fonte: Autor