



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Química



JULIANA REGINA GUBIANI

**Bioprospecção de fungos endofíticos *Camarops* sp.,
Periconia atropurpurea e *Pseudofusicoccum stromaticum*
e avaliação epigenética de *Phoma* sp.**



Araraquara
2015

JULIANA REGINA GUBIANI

**Bioprospecção de fungos endofíticos *Camarops* sp.,
Periconia atropurpurea e *Pseudofusicoccum stromaticum*
e avaliação epigenética de *Phoma* sp.**

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

Orientadora: Angela Regina Araujo

Araraquara
2015

JULIANA REGINA GUBIANI

Bioprospecção de fungos endofíticos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma* sp.

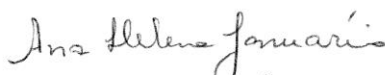
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 24 de julho de 2015.

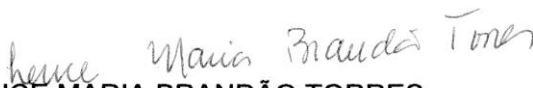
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. ANGELA REGINA ARAUJO (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. ANA HELENA JANUÁRIO
Universidade de Franca / UNIFRAN / Franca - SP



Prof^a. Dr^a. LUCE MARIA BRANDÃO TORRES
Centro de Pesquisa em Ecologia e Fisiologia / IB / São Paulo - SP



Prof. Dr. GERALDO HUMBERTO SILVA
Universidade Federal de Viçosa / UFV / Rio Paranaíba - MG



Prof. Dr. AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA
Instituto de Ciências Exatas / UFA / Manaus - AM

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS:

Nome: Juliana Regina Gubiani

Filiação: Genir José Gubiani e Ivani Maria Gubiani

Data de Nascimento: 29 de agosto de 1986

Naturalidade: Toledo - PR

Nacionalidade: Brasileira

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

Rua Prof. Francisco Degni, s/no – Araraquara-SP,
CEP: 14081-970, SP - Brasil
Telefone: 16 3301-9600 (ramal 9793)
e-mail: julianagubiani@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

(1) Doutorado em Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química – Araraquara – SP (2011 - 2015), com período sanduíche na The University of Arizona (2014-2015 - Orientador: Leslie A. A. Gunatilaka).

(2) Mestrado em Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química – Araraquara – SP (2009 - 2011).

(3) Graduação em Química Licenciatura - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Toledo – PR (2004 - 2008).

BOLSAS CONCEDIDAS

(1) Bolsista de Doutorado – CAPES (2011-2015)

Título do projeto: Prospecção de substâncias com potencial anticâncer produzidas por fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado.

Orientação: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

(2) Bolsista de estágio de doutoramento – CAPES (2014-2015)

Título do projeto: Utilização de modificadores epigenéticos e avaliação do potencial citotóxico no estudo de fungos de plantas e líquens associados a espécies vegetais do Deserto de Sonora.

Orientação: Prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka

(3) Bolsista de Mestrado – CAPES (2009 – 2011)

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

Orientação: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

(4) Bolsista de Extensão Universitária – FINEP (2006 – 2007)

Estagiária do Núcleo de Ensino de Ciências de Toledo – NECTO

Orientação: Prof. Dr. Cleber Antônio Lindino e Profa. Dra. Marcia Borin da Cunha.

TRABALHOS PUBLICADOS E/OU SUBMETIDOS A PERIÓDICOS INDEXADOS:

Gubiani, J. R.; Zeraik, M. L.; Oliveira, C. M.; Ximenes, V. F.; Fonseca, L. M.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Araujo, A. R. Biologically Active Eremophilane-type Sesquiterpenes from *Camarops* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 668-672, 2014.

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES:

Monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

(1) Gustavo Morandi Rahmé, bolsista CNPq/PIBIC e monografista, com o projeto intitulado: **“Prospecção Química e Biológica de *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo Endofítico de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)”** no período de setembro de 2012 a dezembro de 2013.

Iniciação científica

(2) Carlos Eduardo Batista e Leonardo Henrique Inácio: bolsistas CNPq/PIBIC/Júnior, pelo projeto intitulado: **“Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica”** no período de setembro de 2010 a dezembro de 2011.

(3) Murilo de Souza Brighenti, bolsista CNPq/PIBIC, com o projeto intitulado: **“Prospecção do potencial antitumoral do endófito *Periconia atropurpurea* isolado de *Xylopiá aromática*”** no período de setembro de 2011 a dezembro de 2012.

(4) Fernanda Uliana, bolsista CNPq/PIBIC, com o projeto intitulado: “**Prospecção do potencial antitumoral do endófito *Pseudofusicoccum stromaticum* isolado de *Eugenia jambolana***” no período de fevereiro de 2013 a fevereiro de 2014.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

- (1) J. R. Gubiani, V. M. Chapla, A. A. da Silva, A. J. Cavalheiro, V. S. Bolzani, A. R. Araujo. **Identification of volatile compounds produced by *Pseudofusicoccum stromaticum* an endophytic fungus in *Eugenia jambolana***. In: 66th Southeastern Regional Meeting of the American Chemical Society – SEMARCS 2014, realizado no período de 16 a 19 de outubro de 2014, Nashville – TN
- (2) Fernanda Uliana, Angela Regina Araujo, Juliana Regina Gubiani, Vanessa Mara Chapla, Vanderlan da Silva Bolzani. **Bioprospecção em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana***. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 15 a 16 de outubro de 2014, em Araraquara - SP.
- (3) Angela R. Araujo, Juliana R. Gubiani, Alberto J. Cavalheiro, Vanderlan da S. Bolzani, Claudio R. Nogueira. **A new compound from *Camarops* sp. an endophytic fungus in *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. In: American Society of Pharmacognosy – ASP 2014 Annual Meeting, realizado no período de 2 a 6 de agosto de 2014, Oxford – MS.
- (4) J. R. Gubiani, F. Passareli, C. da Silva, O. Treu-Filho, A. V. G. Netto, A. J. Cavalheiro, V. da S. Bolzani, and A. R. Araujo. **An unprecedented dihydrofuran derivative from *Camarops* sp., an endophyte in *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, realizado no período de 28 de outubro a 31 de novembro de 2013, Natal - RN.
- (5) Gustavo Morandi Rahmé, Fernanda Uliana, Juliana Regina Gubiani, Angela Regina Araujo, Alberto José Cavalheiro, Vanderlan da Silva Bolzani. **Estudo da variação metabólica do fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* isolado de *Eugenia jambolana***. In: XXV Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 25 de setembro de 2013, em Araraquara - SP.
- (6) Fernanda Uliana, Gustavo Morandi Rahmé, Juliana Regina Gubiani, Angela Regina Araujo, Alberto José Cavalheiro, Vanderlan da Silva Bolzani. **Prospecção química do endófito *Periconia atropurpurea* isolado de *Xylopia aromatica* utilizando resina adsorvente**. In: XXV Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 25 de setembro de 2013, em Araraquara - SP.

- (7) Araujo, A. R.; Habeck, T. R.; Gubiani, J. R.; Silva, D. S.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S. **Phenolics compounds produced by *Camarops* sp. an endophytic fungus from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. In: 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, realizado no período de 01 a 05 de setembro de 2013, Münster – GE.
- (8) J. R. Gubiani, M. L. Zeraik, V. F. Ximenes, D. H. S. Silva, V. da S. Bolzani, P. M. P. Ferreira, D. J. B. Lima, C. Pessoa, M. O. Moraes, M. C. M. Young and A. R. Araujo. **Two new bioactive eremophilane sesquiterpenes and an unprecedented dihydrofuran derivative from *Camarops* sp., an endophyte in *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. In: São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry, realizado no período de 01 a 05 de julho de 2013, Araraquara – SP.
- (9) Alana E. Honório, Juliana R. Gubiani, Vanessa M. Chapla, Vanderlan da S. Bolzani, Alberto J. Cavalheiro, Angela R. Araújo. ***Saccharicola* sp. um endófito de *Eugenia jambolana*, um prolífico produtor de metabólitos bioativos**. In: 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada no período de 25 a 28 de maio de 2013, Águas de Lindóia - SP.
- (10) Murilo de Souza Brighenti, Juliana Regina Gubiani, Angela Regina Araujo, Dulce Helena Siqueira Silva, Vanderlan da Silva Bolzani. **Potencial Biológico dos Extratos Obtidos do Endófito *Periconia atropurpurea* isolado de *Xylopia aromatica***. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 26 de setembro de 2012, em Araraquara - SP.
- (11) Maria L. Zeraik, Juliana R. Gubiani, Vanessa M. Chapla, Angela R. Araujo, Luiz M. Fonseca, Valdecir F. Ximenes, Vanderlan S. Bolzani. **Substâncias ativas no metabolismo oxidativo de neutrófilos produzidas pelos fungos endofíticos *Camarops* sp. e *Phomopsis* sp.** In: 35^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada no período de 28 a 31 de maio de 2012, Águas de Lindóia - SP.
- (12) Juliana R. Gubiani, Camila M. de Oliveira, Dulce H. S. Silva, Vanderlan da S. Bolzani, Paulo M. P. Ferreira, Daisy J. B. Lima, Claudia do Ó Pessoa, Manoel O. Moraes and Angela R. Araujo. **Cytotoxic eremophilane sesquiterpenes from *Camarops* sp., an endophyte in *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products, realizado no período de 29 de outubro a 02 de novembro de 2011, Ouro Preto - MG.

- (13) Carlos E. Batista, Leonardo H. Inácio, Juliana R. Gubiani, Vanderlan da S. Bolzani e Angela R. Araujo. **Prospecção química de *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) por CCDC e RMN.** In: XXIII Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 18 a 19 de outubro de 2011, em Araraquara - SP.
- (14) Araujo, A. R., Gubiani, J. R., Oliveira, Camila Martins, Silva, D. H. S., Bolzani, V. S. **Two New Eremophilane Sesquiterpenes Produced by *Camarops* sp., An Endophytic Fungi of *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).** In: American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, 2011, San Diego, California - EUA
- (15) Gubiani, J. R.; Araujo, A. R.; Oliveira, C. M.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S. **Metabólitos produzidos pelo endófito AM-02 isolado das folhas de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).** In: 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
- (16) Lindino, C. A.; Fraporti, A. D.; Arend, G.; Leitchweis, A. P.; Gubiani, J. R. **Programa Web Rádio Ciência em Foco.** In: XXV SEURS - Seminário de Extensão Universitária da Região Sul, 2007, Unicentro Campus de Guarapuava, Guarapuava – PR.
- (17) Freire, L. I. F.; Dutra, B. C.; Cunha, M. B.; Aleixo, L. P.; Gubiani, J. R.; Hunoff, C. A.; Lindino, C. A.; Silva, G. C. C.; Wolfart, F. **Educação Científica no Ensino Fundamental.** In: V SEU - Seminário de Extensão da Unioeste, 2005, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

- (1) Participou da comissão organizadora do 17º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, realizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Araraquara, 2009, totalizando 20 horas.
- (2) Participou da comissão organizadora do I Simpósio Regional de Gestão de Recursos Naturais e Educação Ambiental e IV Semana Acadêmica de Meio Ambiente realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Toledo, 2007, totalizando 20 horas.
- (3) Participou da comissão organizadora da IX Semana Acadêmica do Curso de Química, realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Toledo, 2006, totalizando 40 horas.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

- (1) Mesa Redonda intitulada "A importância e as dificuldades do uso de Química de Micro-organismo como Tema em Dissertações e Teses." In: IV Bionatural & III Workshop de Química de Micro-organismos, realizado no período de 09 a 12 de abril de 2013. Belém – PA.
- (2) Estágio docência na disciplina de Química Orgânica Experimental para os alunos do 2º ano do curso de Farmácia e Bioquímica/Noturno, no primeiro semestre de 2012.
- (3) Estágio docência na disciplina de Química Orgânica II para os alunos do 3º ano do curso de Licenciatura em Química, no segundo semestre de 2012.
- (4) Monitora do Projeto de Extensão "Educação Científica para a Cidadania" sob orientação dos professores Cleber Antônio Lindino e Marcia Borin da Cunha, com duração de 640 horas no período de 01 de Março de 2007 a 28 de Fevereiro de 2008.
- (5) Monitora do Curso de Capacitação de Agentes de Execução dos Laboratórios das Escolas Estaduais da Cidade de Toledo, realizado no período de 15 de Julho a 26 de Agosto de 2006 com participação de 20 horas, promovido pelo Núcleo de Ensino de Ciências de Toledo - NECTO.
- (6) Estagiária do Núcleo de Ensino de Ciências de Toledo - NECTO, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007, recebendo bolsa referente ao convênio 075/2005 - Ciência para Todos - FINEP, com carga horária semanal de 12 horas.
- (7) Monitora da disciplina de Bioquímica, atuando na elucidação de dúvidas dos alunos e na preparação de aulas práticas no período de agosto a novembro de 2008 com carga horária de 12 horas semanais.

A minha família,
que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e,
sempre me deu forças para nunca desistir desta árdua caminhada.

AGRADECIMENTOS

A UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química - Araraquara, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário importante de mais uma etapa da minha vida.

A The University of Arizona pela possibilidade da realização do estágio de doutoramento.

A prof. Dra. Angela R. Araujo pela orientação, dedicação, compreensão, carinho, amizade, muito obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

Ao prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão e pela amizade.

A profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos e a Dra. Adriana Aparecida Lopes que participaram do exame de qualificação, e contribuíram para a finalização deste trabalho.

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

Aos professores, técnicos e alunos do NuBBE e do departamento de Química Orgânica, pelos ensinamentos, valiosas discussões e amizade.

A todos os funcionários do IQ da Unesp.

Aos meus queridos alunos de IC que estiveram comigo desde o início do meu doutorado: Leonardo, Carlos Eduardo, Murilo, Gustavo e Fernanda, meu muito obrigada por toda a ajuda.

Ao meu grande amigo André (Chico) você sim me proporcionou muitos e muitos momentos bons, rimos, brigamos, choramos, reclamamos, ficamos bêbados, nos divertimos você foi um dos poucos que nunca me abandonou mesmo estando longe, meu muito obrigada e, saiba que nossa amizade será para sempre.

Ao meu querido amigo Nerilson, você foi, é e será meu grande companheiro eterno, rimos, choramos, discutimos, conversamos, trocamos ideias, nos aventuramos juntos pela América, momentos esses que serão inesquecíveis. Obrigada por todos os momentos que me proporcionou e por ter me aguentado desabafar e chorar por muitas e muitas vezes.

Ao meu querido Juliano, a você eu não tenho nem palavras para descrever o quanto sou grata por tudo o que você sempre fez por mim, seus conselhos, sua opinião, sua preocupação, sua disposição em me ajudar desde o primeiro até o

último dia do meu doutorado, sempre me dando forças para continuar, me apoiando, você foi uma das melhores e mais importantes pessoas que surgiu na minha vida, obrigada por ser essa pessoa tão especial.

As minhas eternas amigas e companheiras Vanessa, Cristiana e Raquel pelos maravilhosos momentos que vivemos, pelas aventuras que tivemos, por essa amizade verdadeira que existe entre nós, como eu sinto falta de vocês e, que possamos sempre honrar o grupo das bandidas independente do lugar em que viveremos.

As minhas queridas amigas Daniela, Juliana, Terezinha, Aline, Alana, Lucy, Thais, Lorena Lucileine, Eliane e, Fernanda não sei o que seria da minha vida sem a amizade de vocês, obrigada por sempre estarem presentes e fazerem parte dela.

Ao Cláudio Rodrigo amigo esse que devo inclusive parte dessa tese, se não fosse toda a sua ajuda, não teria chegado à metade deste trabalho, muito obrigada de coração por toda a sua ajuda, que possamos publicar todo nosso trabalho em breve.

Ao Dr. Kitshiri pelos ensinamentos, pela amizade, pelo carinho e por toda a preocupação, você foi o pai “americano” que eu tive, “I miss you!”

Aos funcionários e colegas do NPC (Natural Product Center) pela dedicação e disposição em ajudar todas as vezes que precisei.

A Paula e a Jing que tornaram meu ano em Tucson maravilhoso, tudo seria muito mais difícil se vocês não tivessem aparecido. Obrigada pela amizade e pelo carinho.

Aos amigos que “ganhei” nos EUA e toda a galera do CsF.

E, por fim, aqueles que são as pessoas mais importantes da minha vida, a minha família, mesmo que de longe sempre me apoiaram. Dedico a vocês esse meu trabalho, não fosse por vocês não teria chegado ao lugar que cheguei. Pai,

Mãe, meus irmãos Éder e Danieli, minha cunhada Geuza e, meus amados sobrinhos Miguel e Alice, a distância é complicada, mas a força e o amor que sempre recebi de vocês me deram forças para nunca desistir. Amo vocês mais que tudo!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelas bolsas concedidas e a FAPESP pelo financiamento.

“...Quero um dia, dizer as pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, e que vale a pena se doar as amizades verdadeiras...
Que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
Talvez não tenha conseguido fazer o melhor...
Mas lutei para que o melhor fosse feito...
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes...
E, que valeu a pena...”

Mario Quintana
Martin Luther King

RESUMO

Os fungos são considerados fontes promissoras de compostos bioativos com potencial aplicação na indústria alimentícia, agricultura e medicina, e de fato, diversos medicamentos utilizados na saúde pública são originárias de fungos. Estes são encontrados em vários ecossistemas, entre os quais podemos citar os que vivem no interior das espécies vegetais. Estes micro-organismos são denominados de endófitos e tem se revelado uma fonte promissora de metabólitos bioativos. Dentro deste contexto, este trabalho foi idealizado, objetivando a obtenção de substâncias potencialmente bioativas a partir do estudo químico e biológico dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* isolados de espécies vegetais do Cerrado e, o estudo epigenético de *Phoma* sp. isolado de espécie vegetal do Deserto de Sonora, utilizando no cultivo o modificador epigenético SAHA. Estes endófitos foram cultivados em escala reduzida em meios de cultivo líquidos e sólidos para obtenção dos extratos brutos, os quais foram submetidos a análises químicas (CCDC, HPLC e RMN de ^1H) e biológicas (antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico). Todos os extratos brutos apresentaram pelo menos uma atividade biológica, o que adicionado às análises químicas permitiram selecionar os meios de cultivo adequados para o crescimento em escala ampliada e, isolamento dos metabólitos secundários. Do cultivo de *Camarops* sp. no meio sólido de Milho isolou-se cinco substâncias, das quais quatro são inéditas 3-((1*S*,2*S*)-1,2-dihidroxibut-3-enil)-4-((*E*)-pent-1-enil)furan-2(5*H*)-ona (**1**), 3, 5, 9-trihidroxi presilfiperfolano (**2**), deacetilbotridial (**3**), ácido (*E*)-2,4-dimetilocta-2-enóico (**4**) e, ácido (*E*)-2,4-dimetilnon-2-enóico (**5**), os compostos **4** e **5** foram ativos na inibição da enzima acetilcolinesterase. Do extrato, obtido do meio líquido de Malte, de *P. atropurpurea* foram isoladas duas substâncias, 4,5-dietil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[*c*][1,6]dioxecina-1,8-diona (**6**) e, periconicina B (**7**). Do cultivo de *P. stromaticum* em meio líquido Czapek[®] foram identificadas duas substâncias, ácido succínico (**8**) e, álcool gentisil (**9**). E, no cultivo em escala reduzida de *Phoma* sp., em meio líquido de PDB, o modificador epigenético aumentou o rendimento do extrato bruto, e pela análise em HPLC foi possível observar a produção de compostos diferentes. Este endófito foi cultivado em escala ampliada na presença e ausência do modificador epigenético e após realizar o isolamento dos metabólitos secundários foram isoladas as substâncias fenilacetamida (**10**), vermistatina (**11**), dihidrovermistatina (**12**), (*R*)-6,8-dihidroxi-5-((2*E*,6*E*)-10,11-dihidroxi-3,7,11-trimetildodeca-2,6-dienil)-3-metilisocroman-1-ona (**13**), nafuredina (**14**) e, 7,8-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olideo (**15**), sendo **13** e **15** inéditas. A configuração absoluta das substâncias **1**, **13** e **15** foi determinada utilizando-se o método de ésteres de Mosher e, Dicroísmo Circular.

Palavras Chaves: Fungos endofíticos, Espécies Vegetais do Cerrado e do Deserto, Atividades Biológicas, Epigenética.

ABSTRACT

Fungi are considered promising sources of bioactive compounds with potential application in the food, agriculture and medicine industry, and in fact, many drugs used in public health originate from fungi. These are found in various ecosystems, among which we can mention those who live inside the plant species. These microorganisms are called endophytes and have proved to be a promising source of bioactive metabolites. Within this context, this work was carried out, aiming to obtain potentially bioactive substances from chemical and biological study of extracts produced by the endophytic fungi *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* and *Pseudofusicoccum stromaticum* isolated from plant species of the Cerrado and epigenetic studies of *Phoma* sp. isolated from plant species of the Sonoran Desert using in cultivation the epigenetic modifier SAHA. These endophytes were grown on small scale in liquid culture media and solid to obtain the crude extract. These were subjected to chemical analysis (TLC, HPLC and ^1H NMR) and biological (antifungal, anticholinesterase and cytotoxic). All crude extracts showed at least one biological activity, which added the chemical analysis allowed to select the culture medium of appropriate for growth in large scale and isolation of secondary metabolites. The growing of *Camarops* sp. in solid medium of corn were isolated five compounds of which four are new 3-((1*S*,2*S*)-1,2-dihydroxybut-3-enyl)-4-((*E*)-pent-1-enyl)furan-2(5*H*)-one (**1**), 3, 5, 9-trihydroxy presilphiperfolane (**2**), deacetyl-botrydial (**3**), (*E*)-2, 4-dimetilocta-2-enoic acid (**4**), and (*E*)-2, 4-dimetilnon-2-enoic acid (**5**), compounds **4** and **5** were active in inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. From the extract obtained from the liquid medium Malt, of *P. atropurpurea* were isolated the compounds 4,5-diethyl-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[*c*][1,6]dioxecine-1,8-dione (**6**) and periconicina B (**7**). From the cultivation of *P. stromaticum* in the liquid medium Czapek[®] led to the identified two compounds, succinic acid (**8**) and gentisil alcohol (**9**). And, in the small scale cultivation of *Phoma* sp. in PDB liquid medium the epigenetic modifiers increased the yield of the crude extract and by HPLC analysis it was possible to observe the production of different compounds. This endophyte was grown on an large scale in the presence and absence of epigenetic modifier and after carrying out isolation of secondary metabolites were identified the compounds phenylacetamide (**10**), vermistatin (**11**), dihydrovermistatin (**12**), (*R*)-6,8-dihydroxy-5-((2*E*, 6*E*)-10,11-dihydroxy-3,7,11-trimethyldodeca-2,6-dienyl)-3-methylisocroman-1-one (**13**), nafuredin (**14**) and 7,8-dihydroxy-2-propyl-2,4-octadien-4-olide (**15**), with **13** and **15** are the new compounds. The absolute configuration of the compounds **1**, **13** and **15** was determined using the method of Mosher esters and Circular Dichroism.

Keywords: Endophytic fungi, Cerrado and Desert Plant Species, Biological Activities, Epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabólitos secundários de fungos endofíticos idênticos aos da planta hospedeira.....	42
Figura 2: Metabólitos secundários com potencialidade biológica produzidos por fungos endofíticos.	46
Figura 3: Mecanismo de metilação do DNA catalisado por enzimas DNA metiltransferases.	49
Figura 4: Mecanismo de acetilação-desacetilação de histonas.	51
Figura 5: Exemplos de moléculas utilizadas como modificadores epigenéticos	52
Figura 6: Compostos isolados do cultivo de fungos com modificadores epigenéticos. ...	53
Figura 7: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos extratos <i>Camarops</i> sp.	75
Figura 8: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos extratos de <i>P. atropurpurea</i>	76
Figura 9: Espectros de RMN de ^1H em DMSO-d_6 (300 MHz; para os extratos líquidos) e, em CDCl_3 (300 MHz; para os extratos sólidos) dos extratos de <i>P. stromaticum</i>	77
Figura 10: Espectros de RMN de ^1H em DMSO-d_6 (300 MHz; para os extratos líquidos) e, em CDCl_3 (300 MHz; para os extratos sólidos) dos extratos controle.....	79
Figura 11: Resultado da atividade antifúngica frente ao fitopatógeno <i>C. cladosporioides</i> , dos extratos brutos, para os diferentes meios de cultivo dos endófitos.	81
Figura 12: Resultado da atividade antifúngica frente ao fitopatógeno <i>C. sphaerospermum</i> , dos extratos brutos, para os diferentes meios de cultivo dos endófitos.	81
Figura 13: Atividade anticolinesterásica, dos extratos brutos, para os diferentes meios de cultivo dos endófitos.	82
Figura 14: CCDc dos extratos obtidos do crescimento do endófito <i>Phoma</i> sp. nos meios de cultivo líquidos com e sem modificador epigenético (A) fase normal e (B) fase reversa.	84
Figura 15: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB sem a adição do modificador epigenético SAHA em 250 nm.....	85
Figura 16: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB com a adição do modificador epigenético SAHA em 250 nm.....	85
Figura 17: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB sem a adição do modificador epigenético SAHA em 280 nm.....	86

Figura 18: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB com a adição do modificador epigenético SAHA em 280 nm.....	86
Figura 19: <i>Camarops</i> sp. (A) Superfície e, (B) Parte inferior do endófito.....	88
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato CH_3CN em Milho (A) Escala Ampliada e, (B) Escala Reduzida.	90
Figura 21: Atividade anticolinesterásica das frações obtidas do fracionamento do extrato CH_3CN do endófito <i>Camarops</i> sp.	97
Figura 22: Estrutura da 3-((1S,2S)-1,2-dihidroxibut-3-enil)-4-((E)-pent-1-enil)furan-2(5H)-ona	97
Figura 23: Espectro de massas de alta resolução da substância 1	98
Figura 24: Espectro de infravermelho da substância 1	98
Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância 1	99
Figura 26: Espectro de RMN DEPT 135 (600 MHz, CDCl_3) da substância 1.....	99
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 1.	100
Figura 28: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância 1	101
Figura 29: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância 1	101
Figura 30: Espectro de COSY (600 MHz, CDCl_3) da substância 1	102
Figura 31: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—)	103
Figura 32: Estrutura do reagente de derivação (R)-MPA e modelo para determinação da configuração de dióis.....	105
Figura 33: Processo para a atribuição da configuração de (S,S)-lactona	106
Figura 34: Proposta biossintética para a formação da substância 1.....	107
Figura 35: Estrutura do 3,5,9-trihidroxi presilfiperfolano	108
Figura 36: Espectro de massas de alta resolução da substância 2	108
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2.	110
Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da substância 2.	111
Figura 39: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	111
Figura 40: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	112
Figura 41: Espectro de ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância 2	112

Figura 42: Mapa de correlação ^1H - ^1H através do espaço (NOESY, 600 MHz, CDCl_3) da substância 2	113
Figura 43: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—)	114
Figura 44: Estrutura do Deacetilbotridial	115
Figura 45: Espectro de massas de alta resolução da substância 3	115
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 3	117
Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância 3	118
Figura 48: Espectro de RMN DEPT 135° (600 MHz, CDCl_3) da substância 3	118
Figura 49: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância 3	119
Figura 50: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância 3	119
Figura 51: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$).	120
Figura 52: Mapa de correlação ^1H - ^1H através do espaço (NOESY, 600 MHz, CDCl_3) da substância 3	120
Figura 53: Proposta biossintética para a formação das substâncias 2 e 3	122
Figura 54: Estrutura do Ácido (<i>E</i>)-2,4-dimetilocta-2-enóico.	122
Figura 55: Espectro de massas de alta resolução da substância 4	123
Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 4	124
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância 4	125
Figura 58: Espectro de RMN DEPT 135 (600 MHz, CDCl_3) da substância 4	125
Figura 59: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância 4	126
Figura 60: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—)	126
Figura 61: Estrutura do Ácido (<i>E</i>)-2,4-dimetilnon-2-enóico	127
Figura 62: Espectro de massas de alta resolução da substância 5	128
Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância 5	129
Figura 64: Espectro de RMN DEPT 135 (600 MHz, CDCl_3) da substância 5	129
Figura 65: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância 5	130
Figura 66: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância 5	130

Figura 67: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹ H- ¹ H COSY (—)	131
Figura 68: <i>Periconia atropurpurea</i> (A) Superfície e, (B) Parte inferior do endófito.....	133
Figura 69: Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do extrato AcOEt em Extrato de Malte (A) Escala Ampliada e, (B) Escala Reduzida.....	135
Figura 70: Cromatograma HPLC _{prep} de Fr4-Pe registrado em 254 nm.	137
Figura 71: Resultado da atividade antifúngica das frações obtidas do cultivo do endófito <i>Periconia atropurpurea</i> (A) <i>C. cladosporioides</i> , (B) <i>C. sphaerospermum</i>	140
Figura 72: Estrutura do 4,5-dietil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona ..	140
Figura 73: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância 6.	141
Figura 74: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a uma ligação (600 MHz, CDCl ₃) da substância 6	142
Figura 75: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (600 MHz, CDCl ₃) da substância 6	143
Figura 76: Espectro de COSY (600 MHz, CDCl ₃) da substância 6	143
Figura 77: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹ H- ¹ H COSY (—)	144
Figura 78: Estrutura da Periconicina B	145
Figura 79: Espectro de massas de alta resolução da substância 7	145
Figura 80: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância 7.	147
Figura 81: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹ H- ¹ H COSY (—)	148
Figura 82: <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> superfície do endófito.	150
Figura 83: Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do extrato AcOEt em Czapek®, (A) Escala Reduzida, (B) Escala Ampliada	152
Figura 84: Resultado da atividade antifúngica das frações obtidas do cultivo do endófito <i>P. stromaticum</i> (A) <i>C. cladosporioides</i> e, (B) <i>C. sphaerospermum</i>	156
Figura 85: Valores de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos na literatura para o ácido succínico. .	156
Figura 86: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) da fração Fr1-Ps-AcOEt. ...	157
Figura 87: Espectro de RMN de ¹³ C (600 MHz, DMSO-d ₆) da fração Fr1-Ps-AcOEt mostrando a intensidade dos sinais observados.	157
Figura 88: Espectro de massas de alta resolução da fração Fr1-Ps-AcOEt.	158
Figura 89: Estrutura do Álcool Gentisil	159
Figura 90: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância 9.	161
Figura 91: Espectro de RMN de ¹³ C (600 MHz, CDCl ₃) da substância 9.	162

Figura 92: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹ H- ¹ H COSY (—)	162
Figura 93: <i>Phoma</i> sp. parte inferior do endófito	164
Figura 94: CCDC em fase normal das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto.	167
Figura 95: Cromatograma HPLC _{prep} de Fr6-LG-SAHA registrado em 254 nm	169
Figura 96: Cromatograma HPLC _{prep} de Fr8-LG-SAHA, registrado em 254 nm	170
Figura 97: CCDC em fase normal das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto.	172
Figura 98: Cromatograma HPLC _{prep} de Fr6-LG-PDB registrado em 254 nm	173
Figura 99: Cromatograma HPLC _{prep} de Fr11-LG-PDB registrado em 254 nm	174
Figura 100: Estrutura da Fenilacetamida	176
Figura 101: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 10	176
Figura 102: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) da substância 10	177
Figura 103: Estrutura da Vermistatina	178
Figura 104: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 11	179
Figura 105: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) da substância 11	180
Figura 106: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a uma ligação (600 MHz, CDCl ₃) da substância 11	180
Figura 107: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl ₃) da substância 11	182
Figura 108: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (400 MHz, CDCl ₃) da substância 11	182
Figura 109: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹ H- ¹ H COSY (—).....	183
Figura 110: Estrutura da Dihidrovermistatina.....	184
Figura 111: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 12	185
Figura 112: Estrutura da (<i>R</i>)-6,8-dihidroxi-5-((2' <i>E</i> , 6' <i>E</i>)-10',11'-dihidroxi-3',7',11'-trimetildodeca-2',6'-dienil)-3-metilisocroman-1-ona	186
Figura 113: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 13	188
Figura 114: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) da substância 13	189
Figura 115: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl ₃) da substância 13	189
Figura 116: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (400 MHz, CDCl ₃) da substância 13	190
Figura 117: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a uma ligação (400 MHz, CDCl ₃) da substância 13	190

Figura 118: Mapa de correlação ^1H - ^1H através do espaço (NOESY, 400 MHz, CDCl_3) da substância 13 .	191
Figura 119: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—).	191
Figura 120: Curva de dicroísmo circular da substância 13 .	193
Figura 121: Proposta biossintética para formação da isocumarina 13 .	194
Figura 122: Estrutura da Nafuredina.	195
Figura 123: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	196
Figura 124: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	197
Figura 125: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	198
Figura 126: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	199
Figura 127: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância 14 .	200
Figura 128: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—).	200
Figura 129: Estrutura do 7,8-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olideo.	201
Figura 130: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	202
Figura 131: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	203
Figura 132: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	204
Figura 133: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	204
Figura 134: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da substância 15 .	205
Figura 135: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}\rightarrow\text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—).	206
Figura 136: Valores de $\Delta\delta$ [$(\Delta\delta \text{ em ppm}) = \delta_S - \delta_R$] para a substância 15 .	207
Figura 137: Atividade antifúngica (A) <i>C. cladosporioides</i> e, (B) <i>C. sphaerospermum</i> das substâncias puras isoladas.	210
Figura 138: Atividade anticolinesterásica das substâncias puras isoladas.	211

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos em meio líquido em escala reduzida.	65
Fluxograma 2: Fluxograma de obtenção dos extratos líquidos em escala reduzida dos endófitos utilizando modificador epigenético.	67
Fluxograma 3: Fluxograma de obtenção dos extratos sólidos em escala reduzida dos endófitos	68
Fluxograma 4: Fluxograma do fracionamento do extrato CH ₃ CN em milho de <i>Camarops</i> sp.	91
Fluxograma 5: Fluxograma de purificação da fração Fr2-Ca.	92
Fluxograma 6: Fluxograma de purificação da fração Fr2-Ca por placa preparativa.	92
Fluxograma 7: Fluxograma de purificação da fração Fr3-Ca.	93
Fluxograma 8: Fluxograma de purificação da fração Fr3-Ca-6.	94
Fluxograma 9: Fluxograma de purificação da fração Fr4-Ca.	95
Fluxograma 10: Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt em malte de <i>Periconia atropurpurea</i>	136
Fluxograma 11: Fluxograma de purificação da fração Fr4-Pe.	137
Fluxograma 12: Fluxograma de purificação da fração Fr5-Pe.	138
Fluxograma 13: Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt em malte de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	153
Fluxograma 14: Fluxograma de purificação da fração Fr1-Ps-AcOEt.	154
Fluxograma 15: Obtenção dos extratos brutos AcOEt produzido pelo endófito <i>Phoma</i> sp.	166
Fluxograma 16: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt em PDB de <i>Phoma</i> sp.	167
Fluxograma 17: Fluxograma de purificação da fração Fr4-LG-SAHA.	168
Fluxograma 18: Fluxograma de purificação da fração Fr6-LG-SAHA.	169
Fluxograma 19: Fluxograma de purificação da fração Fr8-LG-SAHA.	170
Fluxograma 20: Fluxograma da partição líquido/líquido do extrato bruto AcOEt cultivado sem a adição de SAHA.	171
Fluxograma 21: Fluxograma de fracionamento da fração CHCl ₃ obtida do cultivo do endófito na ausência do modificador epigenético.	172
Fluxograma 22: Fluxograma de purificação da fração Fr6-LG-PDB.	174
Fluxograma 23: Fluxograma de purificação da fração Fr11-LG-PDB.	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.....	43
Tabela 2: Especificações dos meios de cultura utilizados no crescimento dos endófitos....	64
Tabela 3: Massas dos extratos AcOEt obtidas nos meios de cultivo líquidos dos endófitos.....	73
Tabela 4: Massas dos extratos CH ₃ CN obtidas nos meios de cultivo sólidos dos endófitos.....	73
Tabela 5: Percentual de inibição do crescimento celular (IC ₅₀ %) dos extratos em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL	80
Tabela 6: Massas dos extratos AcOEt obtidas nos meios de cultivo líquidos do endófito...83	
Tabela 7: Percentual de inibição do crescimento celular (IC ₅₀ %) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL	96
Tabela 8: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 1 (300 MHz, CDCl ₃).....	103
Tabela 9: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃).....	114
Tabela 10: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 3 (600 MHz, CDCl ₃).....	121
Tabela 11: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 4 (600 MHz, CDCl ₃).....	127
Tabela 12: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 5 (600 MHz, CDCl ₃).....	131
Tabela 13: Percentual de inibição do crescimento celular (IC ₅₀ %) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL	139
Tabela 14: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 6 (600 MHz, CDCl ₃).....	144
Tabela 15: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 7 (600 MHz, CDCl ₃).....	148
Tabela 16: Percentual de inibição do crescimento celular (IC ₅₀ %) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL	155
Tabela 17: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 9 (600 MHz, CDCl ₃).....	162
Tabela 18: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 10 (400 MHz, CDCl ₃).....	178
Tabela 19: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 11 (400 MHz, CDCl ₃).....	183
Tabela 20: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	191
Tabela 21: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 13 (400 MHz, CDCl ₃).....	201
Tabela 22: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 14 (400 MHz, CDCl ₃).....	206
Tabela 23: Percentual de inibição do crescimento celular (IC ₅₀ %) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL	209
Tabela 24: Atividade antifúngica das substâncias isoladas.....	210
Tabela 25: Atividade anticolinesterásica das substâncias isoladas.....	211

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ágar-ágar
Abs	Absorbância
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
ACP	Acyl Carrier Protein
AM	<i>Alibertia macrophylla</i>
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
BDA	Batata Dextrose Ágar
C	Concentração
Ca	<i>Camarops</i> sp.
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
C18	Sílica Gel de Fase Reversa tipo Octadecil Silano
cél/mL	Célula por Mililitro
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
COSY	Correlated Spectroscopy
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DBP	Dibutilftalato
DC	Dicroísmo Circular
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMTs	DNA methyltransferases
DPM	Desvio Padrão da Média
EDC	1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida
<i>Ejfm</i>	<i>Eugenia jambolana</i> fruto maduro
EM	Espectrometria de Massas
ESI-TOF	Electrospray Ionisation – Time-of-Flight
EUA	Estados Unidos da América

eV	Elétron volt
Ext.	Extrato
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvel
FPP	Farnesyl Diphosphate ou Farnesyl Pyrophosphate
Fr	Fração
g/L	Gramas por Litro
HCT-116	Linhagem Tumoral de Cólon Humano
HAT	Histone Acetyltransferases
HDAC	Histone Deacetylase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC-DAD	High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection
HPLC-DAD_{anal}	High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection in the Analytical Mode
HPLC-DAD_{prep}	High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection in the Preparative Mode
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
h	Horas
Hex	Hexano
IC₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
IQ	Instituto de Química
IQAr	Instituto de Química de Araraquara
IV	Infravermelho
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LC-MS-TOF	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Time-of-Flight
LG	Leslie Gunatilaka
MEA	Malt Extract Agar
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
MHz	Megahertz
min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MPA	α -metoxifenilacético
MTPA-Cl	Methoxytrifluoromethylphenylacetic Acid-Chloride
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
NOESY 1D	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy em uma Dimensão
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OSMAC	One Strain Many Compounds
OVCAR-8	Linhagem Tumoral de Carcinoma de Ovário
pág.	Página
PDB	Potato Dextrose Broth
Pe	<i>Periconia atropurpurea</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por Milhão
Ps	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>
PVA	Polyvinyl Acetate
rf	Radiofrequência
Rf	Fator de Retenção
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RP18	Reversed Phase Octadecylsilan
rpm	Rotação por minuto
RPMI 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium (Cultura de Células)
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
SBHA	Ácido Suberohidroxâmico
SAM	S-adenosyl methionine
SF-295	Linhagem Tumoral de Glioblastoma Humano
Si	Sílica Gel de Fase Normal
SP	São Paulo
SPE	Solid Fase Extraction
Subst.	Substância
TMS	Tetrametilsilano
t_r	Tempo de Retenção
UFLA	Universidade Federal de Lavras

UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
XYA	<i>Xylopiá aromática</i>
YM	Yeast Medium

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dupleto
dd	Duplo-dupleto
ddd	Duplo-duplo-dupleto
dq	Duplo-quarteto
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação Massa-Carga
s	Simpleto
t	Triplete
λ	Comprimento de Onda
λ_{max}	Comprimento de Onda Máximo
$[\alpha]_D$	Rotação Óptica
$\Delta\delta$	Variação de Deslocamento Químico
$[M]^+$	Íon Molecular
μ	Micro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Fluxogramas	x
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas	xii
Lista de Símbolos	xvi
 CAPITULO 1	 36
1.0 Introdução Geral	36
1.1 Fungos Endofíticos	36
1.2 Produtos Naturais de Fungos Endofíticos	41
1.3 Epigenética	47
 CAPITULO 2	 55
2.0 Objetivos	56
2.1 Objetivo Geral	56
2.2 Objetivos Específicos	56
 CAPITULO 3	 57
3.0 Parte Experimental	58
3.1 Materiais, Equipamentos e Técnicas Utilizadas	58
3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	58
3.1.2 Cromatografia em Coluna (CC)	58
3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD)	58
3.1.4 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C (RMN de ¹ H e ¹³ C)	59
3.1.5 Espectrometria de Massas (EM)	59
3.1.6 Preparo das amostras para análise via HPLC-DAD (<i>clean-up</i>)	60
3.1.7 Análise de rotação óptica ([α] _D ²⁵)	60
3.1.8 Espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV)	61
3.1.9 Solventes utilizados	61
3.1.10 Outros Equipamentos	61
3.1.11 Esterilização dos Materiais	61

3.1.12 Manipulação do Micro-organismo	61
3.2 Seleção e Classificação das Espécies Vegetais	62
3.3 Isolamento das Cepas Fúngicas	62
3.4 Classificação dos Fungos Endofíticos	62
3.5 Cultivo dos Fungos Endofíticos em Escala Reduzida	63
3.5.1 Avaliação da produção metabólica dos endófitos em diferentes meios de cultura.	63
3.5.2 Cultivo dos endófitos em meios líquidos e sólidos	64
3.5.2.1 Avaliação do cultivo dos endófitos nos meios líquidos	64
3.5.2.2 Avaliação do cultivo do endófito isolado de espécie vegetal do Deserto de Sonora nos meios líquidos na presença e ausência de modificador epigenético	65
3.5.2.3 Cultivo dos endófitos nos meios sólidos	67
3.6 Avaliação das Atividades Biológicas	68
3.6.1 Ensaio Citotóxico	68
3.6.2 Ensaio Antifúngico	69
3.6.2 Ensaio Anticolinesterásico	70
CAPITULO 4	71
4.0 Avaliação da Produção Metabólica dos Endófitos	72
4.1 Estudo da variação metabólica dos endófitos isolados de espécies vegetais do Cerrado.	72
4.1.1 Obtenção dos extratos brutos	72
4.1.1.1 Obtenção dos extratos em meios de cultivo líquido	72
4.1.1.2 Obtenção dos extratos brutos em meios de cultivo sólido	73
4.1.2 Análise química	74
4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	74
4.1.2.2.1 Extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos do fungo <i>Camarops</i> sp.	74
4.1.2.2.2 Extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos do fungo <i>Periconia</i> <i>atropurpurea</i>	74

4.1.2.2.3 Extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos do fungo <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	74
4.1.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos pelos endófitos em comparação com os extratos controle. ...	80
4.1.3.1 Ensaio Citotóxico	80
4.1.3.2 Ensaio Antifúngico	81
4.1.3.3 Ensaio Anticolinesterásico	82
4.2 Estudo da Variação Metabólica do Endófito isolado de espécie vegetal do Deserto de Sonora	83
4.2.1 Obtenção dos extratos brutos	83
4.2.1.1 Obtenção dos extratos em meios de cultivo líquido com e sem adição de modificador epigenético	83
4.2.2 Análises químicas	83
4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	83
4.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)	84
CAPITULO 5	87
5.0 Estudo Químico e Biológico de <i>Camarops</i> sp.	88
5.1 Introdução	88
5.1.1 Endófito em Estudo: <i>Camarops</i> sp.	88
5.2 Metodologia	90
5.2.1 Cultivo de <i>Camarops</i> sp. em escala ampliada	90
5.2.2 Fracionamento do extrato CH ₃ CN em milho de <i>Camarops</i> sp. obtido em escala ampliada	91
5.2.3 Purificação da Fração Fr2-Ca	92
5.2.4 Purificação da Fração Fr3-Ca	93
5.2.5 Purificação da Fração Fr4-Ca	94
5.2.6 Esterificação de Mosher	95
5.3 Resultados e Discussão	96
5.3.1 Avaliação da atividade biológica das frações obtidas do fracionamento do extrato CH ₃ CN em Milho de <i>Camarops</i> sp.	96

5.3.1.1 Ensaio Citotóxico.....	96
5.3.1.2 Ensaio Antifúngico.....	96
5.3.1.3 Ensaio Anticolinesterásico.....	97
5.3.2 Determinação estrutural da substância <u>1</u>	97
5.3.2.1 Determinação da configuração absoluta de C-7 da substância <u>1</u>	104
5.3.2.2 Compostos furânicos derivados de poliacetatos	107
5.3.2.2.1 Rota biossintética para a substância <u>1</u>	107
5.3.3 Determinação estrutural da substância <u>2</u>	108
5.3.4 Determinação estrutural da substância <u>3</u>	115
5.3.4.1 Rota biossintética para as substâncias <u>2</u> e <u>3</u>	121
5.3.5 Identificação estrutural da substância <u>4</u>	122
5.3.6 Determinação estrutural da substância <u>5</u>	127
 CAPITULO 6	 132
6.0 Estudo Químico e Biológico de <i>Periconia atropurpurea</i>	133
6.1 Introdução	133
6.1.1 Endófito em Estudo: <i>Periconia atropurpurea</i>	133
6.2 Metodologia	135
6.2.1 Cultivo de <i>Periconia atropurpurea</i> em escala ampliada	135
6.2.2 Fracionamento do extrato AcOEt em extrato de malte de <i>P. atropurpurea</i> obtido em escala ampliada.....	136
6.2.3 Purificação da Fração Fr4-Pe.....	136
6.2.4 Purificação da Fração Fr5-Pe.....	138
6.3 Resultados e Discussão	139
6.3.1 Avaliação da atividade biológica das frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt em Extrato de Malte de <i>P. atropurpurea</i>	139
6.3.1.1 Ensaio Citotóxico.....	139
6.3.1.2 Ensaio Antifúngico.....	139
6.3.1.3 Ensaio Anticolinesterásico.....	140
6.3.2 Determinação estrutural da substância <u>6</u>	140
6.3.3 Identificação estrutural da substância <u>7</u>	145

CAPITULO 7	149
7.0 Estudo Químico e Biológico de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	150
7.1 Introdução	150
7.1.1 Endófito em Estudo: <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	150
7.2 Metodologia	152
7.2.1 Cultivo de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> em escala ampliada	152
7.2.2 Fracionamento do extrato AcOEt em Czapek® de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> obtido em escala ampliada.	153
7.2.3 Purificação da Fração Fr1-Ps	153
7.3 Resultados e Discussão	155
7.3.1 Avaliação da atividade biológica das frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt em Czapek® de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	155
7.3.1.1 Ensaio Citotóxico	155
7.3.1.2 Ensaio Antifúngico	155
7.3.1.3 Ensaio Anticolinesterásico	156
7.3.2 Identificação estrutural da substância 8	156
7.3.3 Identificação estrutural da substância 9	159
 CAPITULO 8	 163
8.0 Estudo Químico e Biológico de <i>Phoma</i> sp.	164
8.1 Introdução	164
8.1.1 Endófito em Estudo: <i>Phoma</i> sp.	164
8.2 Metodologia	166
8.2.1 Cultivo de <i>Phoma</i> sp. em escala ampliada com e sem utilização de SAHA... ..	166
8.2.2 Fracionamento do extrato AcOEt obtido em escala ampliada com utilização de SAHA de <i>Phoma</i> sp.	167
8.2.3 Purificação da Fração Fr4-LG-SAHA	168
8.2.4 Purificação da Fração Fr6-LG-SAHA	168
8.2.5 Purificação da Fração Fr8-LG-SAHA	169
8.2.6 Fracionamento do extrato AcOEt obtido em escala ampliada sem a utilização de SAHA de <i>Phoma</i> sp.	170
8.2.7 Purificação da Fração Fr6-LG-PDB	173
8.2.8 Purificação da Fração Fr11-LG-PDB	174

8.2.9 Esterificação de Mosher	175
8.3 Resultados e Discussão	176
8.3.1 Identificação estrutural da substância 10	176
8.3.2 Identificação estrutural da substância 11	178
8.3.3 Identificação estrutural da substância 12	184
8.3.4 Determinação estrutural da substância 13	186
8.3.4.1 Determinação da Configuração Absoluta de C-3 da substância 13	192
8.3.4.2 Isocumarinas derivadas de poliacetatos.....	193
8.3.4.2.1 Proposta biossintética para a formação da isocumarina 13	193
8.3.5 Identificação estrutural da substância 14	195
8.3.6 Determinação estrutural da substância 15	201
8.3.6.1 Determinação da configuração absoluta de C-7 da substância 15	206
 CAPITULO 9	 208
9.0 Atividade Biológica das Substâncias Isoladas.....	209
9.1 Ensaio Citotóxico.....	209
9.2 Atividade Antifúngica	210
9.3 Atividade Anticolinesterásica	210
 CAPITULO 10	 212
10.0 Conclusão	213
 REFERÊNCIAS.....	 215

CAPITULO 1

CAPITULO 1

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Fungos Endofíticos

Durante séculos micro-organismos têm fascinado pesquisadores que logo perceberam a importância de bactérias, fungos e vírus para a saúde humana, animal e, vegetal, com a produção de compostos bioquímicos úteis, tais como vitaminas e antibióticos, assim como na promoção de processos como a fermentação, a transformação e a decomposição da matéria orgânica¹.

Atualmente há uma visão amplamente aceita de que os micro-organismos constituem se não o mais, mas, sem dúvida, uma das mais importantes formas de vida que fornecem ferramentas biotecnológicas que auxiliam na transformação da matéria orgânica, assim como na fabricação de produtos químicos e bioquímicos¹.

A enorme diversidade gerada pela presença de vida microbiana é amplificada pela sua capacidade em habitar novos nichos. Fungos endofíticos habitam um nicho biológico e são categorizados como um grupo altamente diversificado, capazes de colonizar tecidos de plantas de forma assintomática².

O termo endofítico passou a existir em 1866, quando De Bary apresentou ao mundo que “um fungo endofítico é qualquer organismo que ocorre dentro dos tecidos vegetais”. No entanto, a definição mais amplamente referida foi dada por Petrini em 1991 afirmando que endófitos são “todos os organismos que habitam os órgãos da planta que, em algum momento de sua vida, podem colonizar tecidos internos da planta sem causar dano aparente para o hospedeiro”. Mais tarde, Bacon e White propuseram uma definição mais conclusiva e amplamente aceita: “endófitos são micro-organismos que colonizam tecidos internos das plantas, sem causar efeitos negativos imediatos”^{2, 3}. Atualmente, a definição dada por Strobel (2013) é que “fungos endofíticos são encontrados em toda a natureza e, habitam os espaços intersticiais dos tecidos vegetais sem provocar nenhuma evidência externa aparente de sua presença na planta”⁴.

Embora, o primeiro relato de isolamento de um micro-organismo endofítico a partir das sementes de *Lolium temulentum* data de 1898 foi, apenas em 1904, que surgiram os primeiros detalhes da história de vida planta-endófito, observada através da colonização de *Lolium temulentum* pelo micro-organismo *Neotyphodium*

occultans muito antes da maturação das sementes². No entanto, eles não receberam muita atenção nesse período, até que o recente avanço no reconhecimento de sua importância ecológica e farmacêutica se tornasse eficaz⁵.

Os endófitos representam uma pequena fração de cerca de 500.000 espécies de fungos conhecidos. Por outro lado, estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem na terra, cada uma hospede no interior de seus tecidos um ou mais fungos endofíticos, podendo-se talvez chegar a um milhão de espécies de fungos, considerando-se apenas os endofíticos. Consequentemente são grandes as chances de se encontrar novos micro-organismos endofíticos dentre as milhares de plantas nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se numa fonte rica, de diversidade genética e, possivelmente, de novos produtos naturais².

Os micro-organismos endofíticos estão associados às raízes, caules, folhas, flores e frutos de plantas e, geralmente um ou mais destes tecidos vai dar origem a um endófito. Eles diferem dos epifíticos, que vivem na superfície dos vegetais, dos micorrizos que vivem em associação com as raízes das plantas e, dos fitopatógenos, que causam doenças a espécie vegetal que habitam⁴.

Um fungo endofítico encontra-se em um processo de relacionamento biológico com a planta hospedeira, no entanto, seu papel na vida das plantas permanece obscuro, alguns autores são da opinião que os endófitos podem ser patógenos, mas, que estão em estado latente, no entanto, o que decide se um endófito é inofensivo ou prejudicial é o equilíbrio entre as demandas da invasão de fungos e a resposta da planta, sendo que uma vez desequilibradas, o endófito pode se transformar em um patógeno³.

Embora a relação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros varie de organismo para organismo, eles constituem um componente importante da biodiversidade microbiana. Eles ocorrem basicamente em três modos de vida, simbiótico, parasitismo e saprófita. Quando associados às plantas, assumem vários tipos de interações, sendo as simbióticas as que conferem a ambos os organismos diversas vantagens^{6, 7}.

Nas associações simbióticas o endófito acaba produzindo ou induzindo a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros micro-organismos². Por outro lado, eles são capazes de sequestrar os metabólitos produzidos pelas plantas que irão atuar como defesa

química, ou produzi-los em resposta à pressão exercida por outros micro-organismos endofíticos ou fitopatógenos ou até mesmo por predadores^{6, 8}. Dois tipos principais de interações simbióticas (planta-fungo) são observados: relações mutualísticas e antagonísticas.

As relações mutualísticas são as que garantem a sobrevivência do fungo pela absorção de alimentos fornecidos pela planta, e do hospedeiro pela proteção contra insetos, animais ou patógenos, garantida por substâncias de defesa produzidas pelos endófitos. Como exemplo desta associação, observou-se que plantas infectadas por fungos endofíticos podem apresentar maior taxa de crescimento e área foliar além de um aumento do número de perfilhos, em comparação com plantas não infectadas⁹.

E, as relações antagonísticas são as que ocorrem um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta. Sendo assim, a variabilidade da interação depende não só da adaptação do fungo endofítico a um hospedeiro ou órgão em particular e dos estágios de desenvolvimento dos parceiros, mas também da virulência inata do endofítico, da resposta de defesa do hospedeiro e das condições ambientais. No entanto, este balanço não exclui a possibilidade dos endofíticos em produzir metabólitos secundários biologicamente ativos sem seu hospedeiro¹⁰.

Nas associações parasitárias o fungo vive dentro da planta, de onde obtém o alimento necessário para seu desenvolvimento. Neste caso, geralmente o metabolismo secundário do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas às plantas. O parasitismo está relacionado à patogenicidade e pode, eventualmente, levar a planta à morte³.

Já, os fungos que vivem na forma de saprófitas, obtêm seus alimentos decompondo substâncias orgânicas em decomposição, eles criam estruturas reprodutoras a partir do micélio, sendo de grande importância no ecossistema, pois são decompositores, reciclando os elementos químicos⁵.

Muitos autores já comprovaram que o tipo de interação entre um endófito e uma planta é controlado pelos genes de ambos os organismos e modulado pelo meio ambiente, no entanto essa interação é pouco conhecida¹¹. Existe a possibilidade de micro-organismos trocarem material genético com a planta quando ocorre a penetração de suas organelas no interior das células do hospedeiro, ou

quando libera parte deste material genético para fora da célula, existem relatos que demonstram a ocorrência desta transferência genética¹². Como exemplo vale citar a constatação de sequências de bases no DNA de espécies de Bambusoideae (Bambu) contaminadas com DNA de fungos endofíticos^{13, 14}.

Essas interações devem envolver um conjunto complexo de passos onde os genes em ambos os parceiros são ativados ou desativados por sinais específicos. Esses sinais são frequentemente efetivos em determinados estágios ou condições fisiológicas a uma dada condição ambiental¹⁵.

A espécie hospedeira pode ser infectada pelos endófitos horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida. O modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não-sistêmica) essa interação tende a ser antagônica. Uma vez no hospedeiro o endófito permanece, geralmente, em um estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado, até que as condições ambientais lhe sejam favoráveis. Neste caso, o endófito pode assumir uma função patogênica^{5, 16}.

Uma característica importante de fungos endofíticos é que eles são generalizados e diversificados na sua ocorrência e são conhecidos por colonizar plantas que crescem em diferentes regiões ambientais, como o Ártico e a Antártida, os solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas, mangues e florestas costeiras¹¹. Além disso, eles têm sido isolados de uma variada gama de hospedeiros, que incluiu algas, esponjas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas^{2, 17}.

As florestas tropicais são consideradas ecossistemas com grande diversidade biológica quando comparadas às florestas temperadas, pois compreendem mais de 60% da biodiversidade terrestre do mundo. Diversidade biológica implica em diversidade química, pois no contexto da corrida evolucionária, sobrevive o organismo capaz de estar em constante inovação química. Florestas tropicais são excelentes exemplos desse tipo de ambiente. A competição é constante, os recursos são limitados e a pressão seletiva está em seu ápice. Isto faz com que seja alta a probabilidade das florestas tropicais serem fontes de novas estruturas moleculares e combinações biologicamente ativas. De fato, os mesmos autores mostram que

endofíticos de ambientes tropicais, fornecem um maior número de produtos naturais quando comparados com endofíticos de regiões temperadas, além disso, notaram que é significativamente alto o número de endofíticos tropicais produzindo um grande número de metabólitos secundários ativos, se comparado com os fungos de florestas temperadas. Esta observação sugere a importância do ambiente em que a planta hospedeira está inserida sobre o metabolismo dos endofíticos⁴.

Atualmente, os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse^{17, 18}, além disso, a produção de produtos naturais de fungos endofíticos tem um amplo espectro de atividade biológica e podem ser agrupadas em várias categorias, incluindo: alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, glicosídeos, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenil propanoides, lignanas, metabólitos alifáticos, lactonas, etc. Fungos endofíticos são um grupo pouco estudado de micro-organismos que representam uma fonte abundante e confiável de compostos novos e quimicamente bioativos^{6, 19, 20}.

A literatura recente citou que dos 23.000 compostos ativos produzidos por micro-organismos, tais como antimicrobianos, antivirais, citotóxicos, e imunossupressores, 42% são produzidas por fungos e 32% por bactérias filamentosas e, deste percentual ainda, 51% destas substâncias isoladas de endófitos são metabólitos inéditos e desconhecidas em comparação a 38% das substâncias bioativas isoladas de fungos do solo. Assim, fungos endofíticos devem ser submetidos à exploração exaustiva como grande maioria deles permanecem ainda desconhecidos e obscuros^{2, 4}.

As bases de dados atuais revelam o crescente aumento das pesquisas com micro-organismos endofíticos, nos últimos 20 anos observou-se que a publicação de trabalhos relacionados com isolamento, determinação estrutural e caracterização de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos endofíticos cresceram drasticamente. Estas evidências atraem a atenção dos químicos de produtos naturais e de biólogos, conforme indicado pelo aumento constante de publicações dedicadas a este tema nos últimos anos.

Considerando a relevância evidente da investigação sobre o metabolismo secundário microbiano durante os últimos 60 anos, é bastante surpreendente que o

primeiro produto natural oriundo de micro-organismos descoberto por pesquisadores brasileiros no Brasil só foi relatado apenas em 2000¹.

Assim, há um enorme potencial a ser explorado, pois esses micro-organismos possuem uma das mais fascinantes e importantes propriedades, que é a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, com amplo aspecto de atividade biológica, podendo servir como uma fonte alternativa de princípios bioativos derivados de plantas, levando a conservação e preservação do meio ambiente.

1.2 Produtos Naturais de Fungos Endofíticos

A primeira referência sobre metabólitos fúngicos parece ter sido publicada em 1911²¹, desde então, até o primeiro trimestre de 2015, foram cadastradas nos bancos de dados Caplus e Medline 33.896 publicações sobre este tema, inclusive patentes, evidenciando o crescente interesse por esta área.

Dentro deste contexto, uma grande vantagem da prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes é o fato de que micro-organismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais²¹.

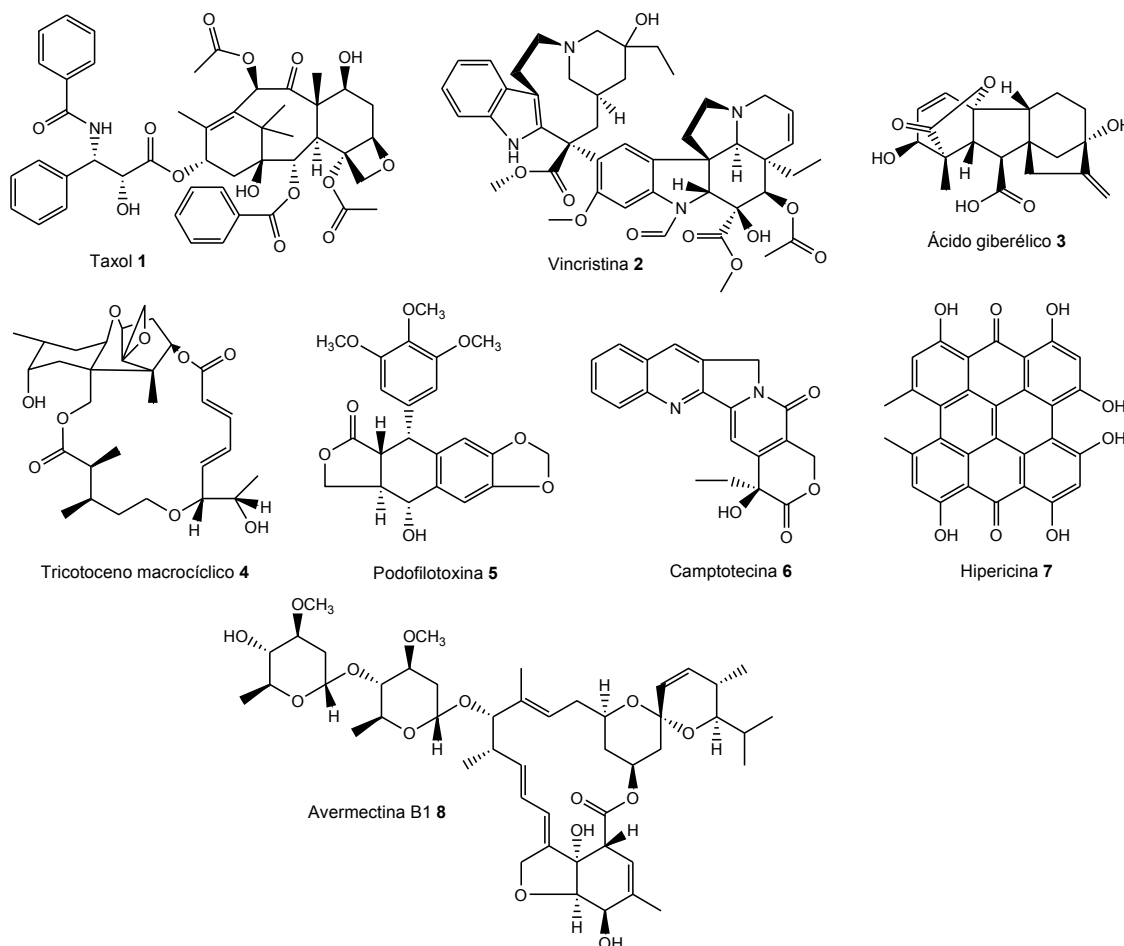
No entanto, os produtos naturais oriundos de micro-organismos associados a plantas, são em grande parte inexplorados. Esses compostos são de interesse na medicina, agricultura e indústria alimentícia, sendo que, estudos com culturas de fungos endofíticos já renderam uma ampla variedade de produtos naturais bioativos tais como antimicrobianos, antiparasitários, citotóxicos, neuroprotetores, imunossuppressores, entre outros^{3, 22-24}.

Alguns dados da literatura têm reportado a habilidade dos fungos endofíticos em produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira. O primeiro exemplo e o mais marcante foi o isolamento do paclitaxel (taxol, **1**, **Figura 1**) do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* a partir de *Taxus brevifolia* (Taxane). O taxol é um potente agente terapêutico antineoplásico e foi identificado inicialmente em *Taxus brevifolia*. Outro exemplo é a vincristina (**2**), substância anticâncer, foi isolada a partir do fungo endofítico *Mycellia sterilia* associado à *Catharanthus*

roseus. Outros exemplos de micro-organismos endofíticos produtores dos mesmos metabólitos que a planta hospedeira podem ser ilustrado pelo fungo *Gibberela fugikuroi*, associado a planta *Curcubita maxima* (Cucurbitaceae) que produz derivados do ácido giberélico (3), e pelos fungos *Fusarium* e *Myrothecium*, produtores de tricotocenos macrocíclicos (4) os quais foram isolados das plantas *Baccharis megapotamica* e *Baccharis cordifolia*. Os anticancerígenos podofilotoxina (5) obtido a partir do endófito *Trametes hirsuta*, associado ao hospedeiro *Podophyllum hexandrum*; camptotecina (6), isolada do fungo *Entrophospora infrequens* encontrado em associação com *Camptotheca acuminata* e a hipericina (7) isolada do fungo INFU/Hp/KF/34B associado a *Hypericum perforatum*^{6, 25}.

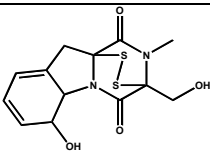
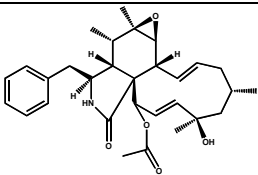
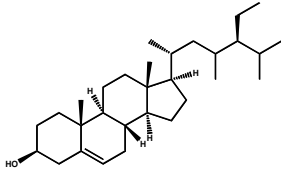
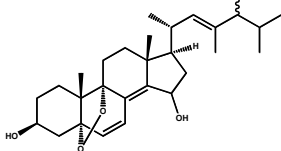
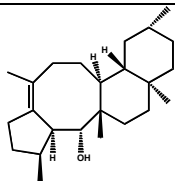
Diversos metabólitos secundários com importantes propriedades farmacológicas foram isolados de espécies de bactérias e fungos. A avermectina B1 (8), um macrolídeo isolado de *Streptomyces* sp., é um agente anti-helmíntico potente com amplo espectro de ação sendo recomendado, inclusive, para o combate ao *Schistosoma mansoni*²⁶.

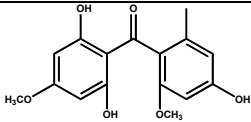
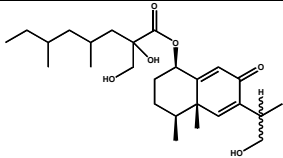
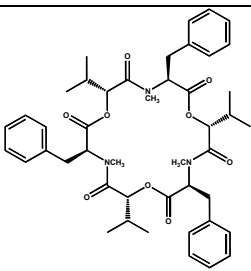
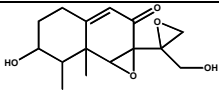
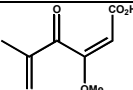
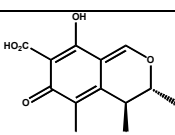
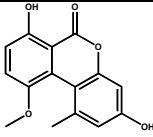
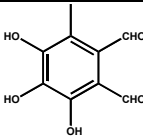
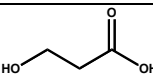
Figura 1: Metabólitos secundários de fungos endofíticos idênticos aos da planta hospedeira.

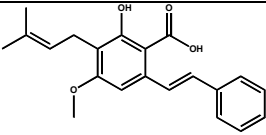


A diversidade química obtida a partir de fungos endofíticos contempla diversas classes químicas incluindo policetídeos, derivados do ácido chiquímico, terpenos, alcalóides e peptídeos. Alguns artigos de revisão tem destacado a ampla diversidade de produtos naturais produzidos por endófitos, eles ilustram uma ampla variedade de novos compostos, bem como substancias bioativas isoladas recentemente de fungos endofíticos²⁵. A **Tabela 1** ilustra alguns metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos nos últimos cinco anos (2010-2014).

Tabela 1: Alguns metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

Fungo endofítico	Hospedeiro	Metabolito secundário/ Atividade biológica	Referencia
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	 Gliotoxina (Antifúngico)	Li et al. (2011) ²⁷
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Gossypium hirsutum</i>	 Epoxicitocalasina H (Antifúngico)	Fu et al. (2011) ²⁸
<i>Phoma</i> sp.	<i>Arisaema erubescens</i>	 β-sitosterol (Antifúngico)	Wang et al. (2012) ²⁹
<i>Aspergillus niger</i> MA-132	<i>Avicennia marina</i>	 Nigerasterol A (Citotóxico)	Liu et al. (2013) ³⁰
<i>Aspergillus</i> sp. 085242	<i>Acanthus ilicifolius</i>	 Asperterpenol (Inibidor AChE)	Huang et al. (2013) ³¹

<i>Nigrospora</i> sp. MA75	<i>Pongamia pinnata</i>	 Griseofenona C (Antibacteriano)	Shang et al. (2012) ³²
<i>Camarops</i> sp.	<i>Alibertia macrophylla</i>	 Xylarenona G (Antinflamatório e Antioxidante)	Gubiani et al. (2014) ³³
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	 Beauvericina (Citotóxico)	Nascimento et al. (2012) ³⁴
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Piper aduncum</i>	 Faseolinona (Citotóxico)	Silva et al. (2010) ³⁵
<i>Aspergillus</i> sp	<i>Eudistoma vannamei</i>	 Ácido Penicílico (Inibidor AChE e Citotóxico)	Montenegro et al. (2012) ³⁶
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Melia azedarach</i>	 Citrinina (Bactericida)	Marinho and Rodrigues-Fo (2011) ³⁷
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Capsicum annum</i>	 Alternariol-10-metil éter (Citotóxico)	Devari et al. (2014) ³⁸
<i>Chaetomium globosum</i> CDW7	<i>Ginkgo biloba</i>	 Flavipina (Antioxidante)	Ye et al. (2013) ³⁹
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Laguncularia racemosa</i>	 Ácido 3-Hidroxi propionico (Antibacteriano)	Sebastianes et al. (2012) ⁴⁰

<i>Fusarium</i>	<i>Cajanus cajan</i>	 Ácido Cajaninstilbeno (Antioxidante)	Zhao et al. (2012) ^{41, 42}
-----------------	----------------------	--	---

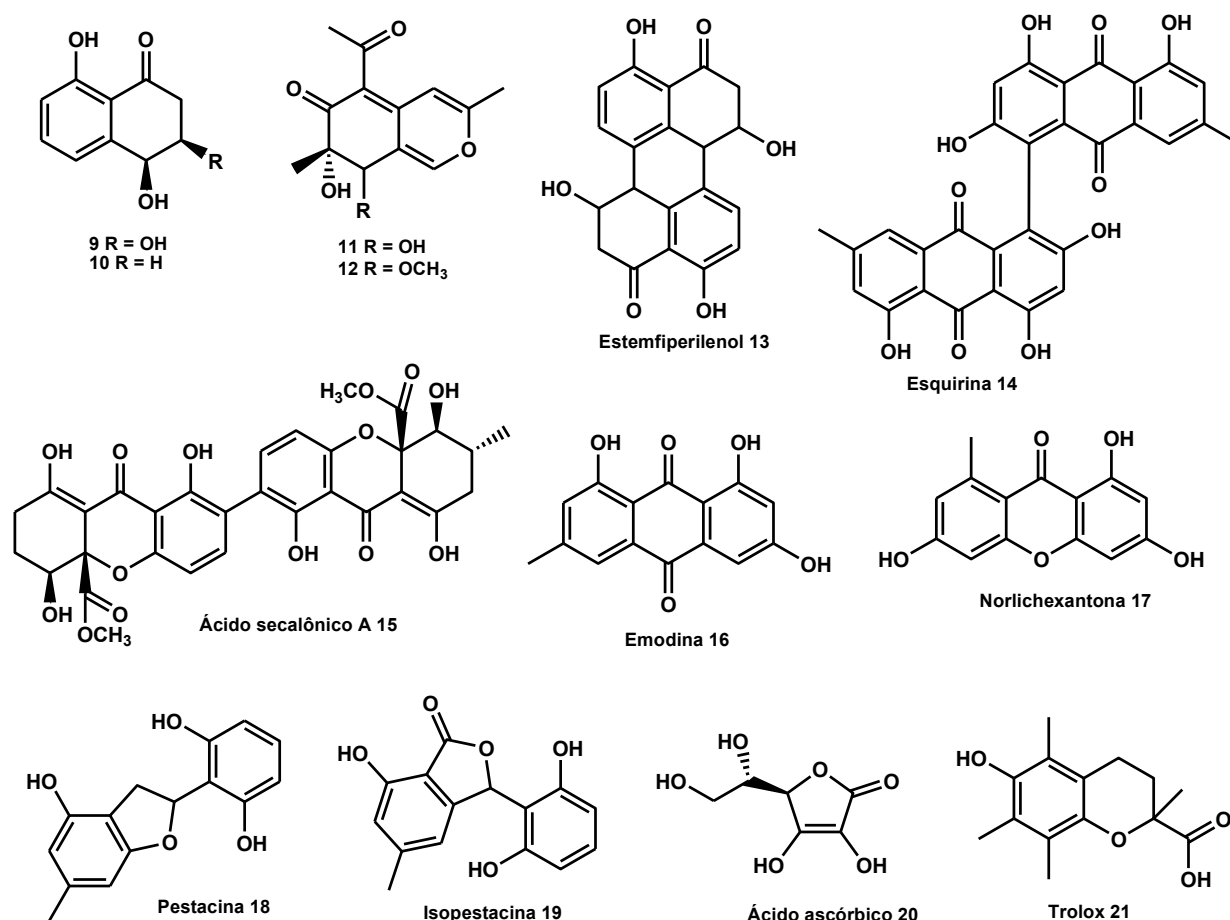
No Brasil estudos realizados com folhas saudáveis de *Cryptocarya mandioccana*, planta típica da Floresta Atlântica brasileira, levou ao isolamento do endófito *Colletotrichum gloeosporioides*, que foi cultivado em caldo de batata dextrosado levando ao isolamento de (-)-*cis*-4-hidroxi-6-deoxiscitalona (**9**, **Figura 2**) e (4*R*)-4,8-*di*-hidroxi- α -tetralona (**10**). Estas substâncias apresentaram atividade antifúngica significativa pelo teste de bioautografia contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, comparável com a atividade da nistatina. Os autores sugerem que a atividade apresentada pelos metabólitos secundários produzidos *C. gloeosporioides* esteja relacionada à função de proteção da planta hospedeira contra fitopatógenos, demonstrando o significado ecológico do estudo deste tipo de micro-organismo^{22, 43}.

Em estudo com plantas do mangue, extratos obtidos de culturas de endófitos, apresentaram atividade antimicrobiana, o endófito *Talaromyces* sp. foi o micro-organismo isolado que produziu metabólitos com maior atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Sarcina ventriculi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense. Investigação química do extrato do endófito, isolado da casca do caule de *Kandelia candel* (L.) Druce (Rhizophoraceae), conduziu ao isolamento de sete metabólitos: 7-epiaustdiol (**11**), 8-O-metilepiaustdiol (**12**), estemfiperilenol (**13**), esquirina (**14**), ácido secalônico A (**15**), emodina (**16**) e norlichexantona (**17**). Notavelmente, todos os compostos isolados mostraram significativa atividade inibitória de *Pseudomonas aeruginosa*, que é uma bactéria multi-resistente e, um patógeno clínico oportunista altamente relevante⁴⁴.

Outra aplicação dos produtos naturais obtidos de fungos endofíticos é a pronunciada atividade antioxidante dos metabólitos pestacina (**18**) e isopestacina (**19**), isolados de *Pestalotiopsis microspora* associado à planta *Terminalia morobensis*^{23, 43, 45}. A isopestacina tem ação pela conversão de radicais livres como superóxido e hidroxil, demonstrando ser tão efetiva quanto o ácido ascórbico (**20**). A pestacina, por sua vez, mostrou ser capaz de clivar radicais livres reativos, como as

ligações C-H e O-H. A atividade antioxidante de pestacina é pelo menos 1 ordem de magnitude mais potente do que a de Trolox® (**21**), um derivado de vitamina E⁴⁵.

Figura 2: Metabólitos secundários com potencialidade biológica produzidos por fungos endofíticos.



Adicionalmente à produção de metabolitos bioativos, os fungos endofíticos apresentam vantagens sobre outras fontes naturais, pois são recursos renováveis e a produção em escala ampliada dos metabolitos bioativos pode ser realizada usando a tecnologia existente, como variação do meio e otimização das condições de cultivo. Outra vantagem está relacionada com a conservação ambiental uma vez que requerem uma única e pequena remoção do ambiente natural²¹.

A identificação de novas substâncias e as atividades biológicas já estabelecidas com o cultivo de fungos endofíticos indicam que esses micro-organismos constituem uma fonte potencial de substâncias bioativas e novas entidades químicas que ainda são pouco exploradas.

1.3 Epigenética

O termo epigenética origina-se do prefixo grego epi, que significa “acima ou sobre algo” e estuda as mudanças herdadas nas funções dos genes, observadas na genética, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA. Inclui o estudo de como os padrões de expressão são passados para os descendentes; como ocorre a mudança de expressão espaço temporal de genes durante a diferenciação de um tipo de célula e como fatores ambientais podem mudar a maneira como os genes são expressos. A pesquisa na área da epigenética alcança implicações na agricultura, na biologia e doenças humanas, incluindo o entendimento sobre células tronco, câncer e envelhecimento^{46, 47}.

Os fungos filamentosos são uma importante fonte de metabólitos farmacologicamente ativos, e uma grande diversidade de produtos naturais tem sido isolada a partir deles. Análise da sequência do genoma fúngico revelou que os fungos têm potencial para produzir uma variedade de novos metabólitos secundários. No entanto, a maioria dos genes que codificam a biossíntese desses metabólitos secundários permanecem não expressa sob condições de cultura de laboratório⁴⁸.

Os métodos tradicionais para a busca de substâncias bioativas a partir de fungos endofíticos envolvem o cultivo de coleções de micro-organismos, métodos de fermentação como agitação em “shaker”, culturas estáticas ou artificialmente definidas e, procedimentos de extração, isolamento e identificação de moléculas, que na maioria das vezes são monitoradas por ensaios de atividade biológica são pobres em mimetizar o habitat natural dos fungos endofíticos e, a utilização desta abordagem tem sido limitada quanto à descoberta de novas moléculas^{48, 49}.

Como consequência apenas um subconjunto de vias biossintéticas que codificam a produção de metabólitos secundários são expressas ou pode ocorrer dos metabólitos serem produzidos em baixas quantidades devido às condições de cultivo utilizadas, que não estimulam a biossíntese destes compostos, ou seja, os sinais químicos ou ambientais necessários para a produção destes metabólitos podem estar ausentes, limitando assim as perspectivas para realizar uma completa busca no potencial de descoberta de novos metabólitos bioativos em micro-organismos. Esta constatação sugere que novas alternativas sejam utilizadas de

modo a mimetizar, de forma mais precisa, o habitat natural dos micro-organismos^{50, 51}.

A produção metabólica dos micro-organismos endofíticos pode ser alterada dependendo das condições de cultivo utilizadas, um método para alterar o metabolismo secundário dos fungos é conhecido como OSMAC (do inglês *one strain many compounds*). A abordagem desse método resulta na observação de que pequenas alterações nas condições de cultivo podem mudar completamente o perfil metabólico de muitos micro-organismos⁵². Com esta variação metabólica novas entidades químicas podem ser produzidas e possivelmente com potencial a ser utilizados na terapêutica.

Outro método de modificar a produção metabólica de endófitos é a utilização de manipuladores de genes, também conhecidos como modificadores epigenéticos. Esses modificadores atuam na transcrição do DNA alterando as rotas biossintéticas, ou ativando as rotas biossintéticas silenciosas⁵⁰.

Recentemente, a adição de modificadores químicos epigenéticos tais como, modificadores de histona (HDAC) ou inibidores da enzima DNA metil-transferase no meio de cultura de fungos, provou ser uma técnica eficaz para estimular a transcrição dos agrupamentos de genes biossintéticos silenciosos, resultando na produção de uma variedade de novos metabólitos secundários⁵³.

A regulação baseada na modificação da cromatina é também um importante mecanismo de controle utilizado por fungos para modular a transcrição de genes envolvidos na produção de metabolitos secundários⁵⁴.

A cromatina é o complexo formado por DNA nuclear e proteínas em que o material genético dos eucariontes está empacotado. A principal subunidade da cromatina é o nucleossomo. Ele consiste em cerca de 165 pares de bases de DNA envolvidos em duas voltas superhelicais em torno de um octamero formado por oito unidades de diferentes proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) com duas cópias. Este arranjo físico em nucleossomos resulta numa compactação de aproximadamente 10 vezes da cromatina, que é adicionalmente aumentada pelas interações com os nucleossomos vizinhos para formar uma fibra de 30 nm da cromatina⁵⁵.

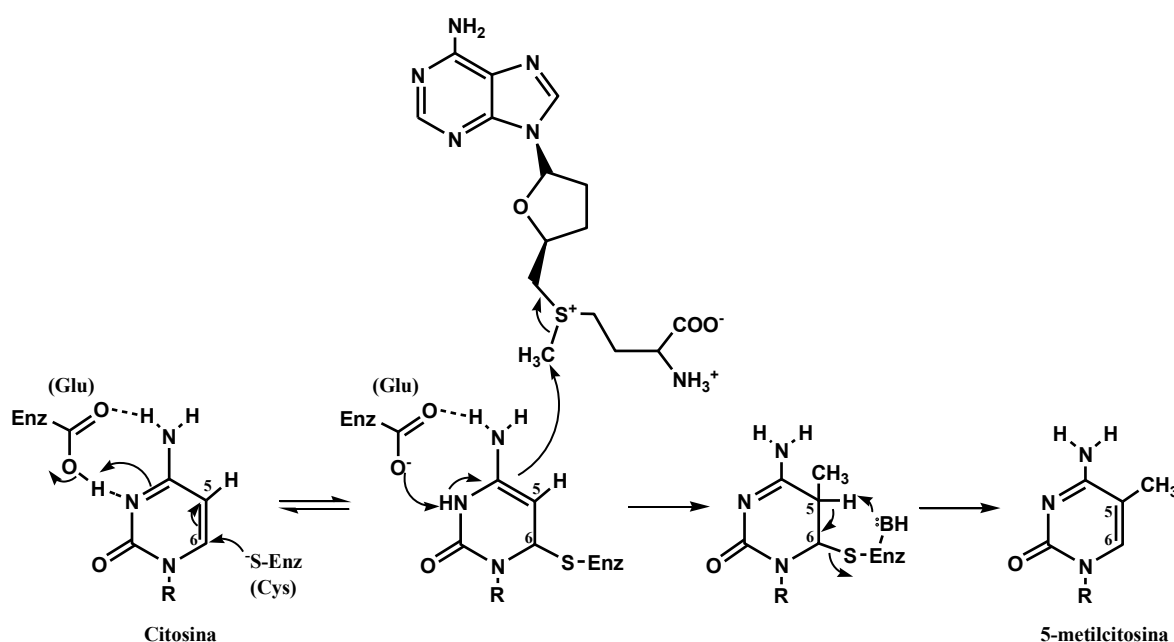
Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão de genes. Quando a cromatina está na forma condensada, os genes são inativos e quando a

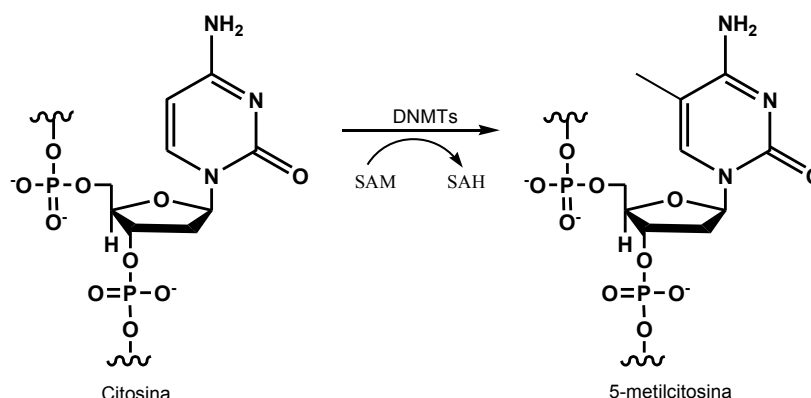
cromatina está descondensada os genes são expressos. Estes estados dinâmicos da cromatina são controlados por padrões de fatores epigenéticos^{55, 56}.

Os mecanismos epigenéticos estão envolvidos nas alterações no epigenoma, que está envolvido no controle da acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas^{54, 57}. Existem dois principais mecanismos de alterações epigenéticas: metilação do DNA e modificações nas histonas, estes podem atuar interferindo na transcrição de genes. Os padrões de metilação de DNA são os mais estudados e melhor entendidos dentre estes mecanismos, embora modificações de histonas também sejam bastante discutidas⁵⁴.

A metilação do DNA é um processo catalisado por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) que utilizam S-adenosilmetionina (SAM) como doador de grupo metílico para adição do grupo metílico ao carbono da posição 5' da citosina, resultando na formação de um composto chamado 5-metilcitosina. Este processo está correlacionado com o silenciamento gênico^{47, 54, 58}. O mecanismo deste processo inicia com o grupamento tiol do resíduo de cisteína que ataca a posição 6 da citosina e gera um intermediário DNA-proteína, que possui propriedade nucleofílica na posição 5. O intermediário aceita o grupamento metila de SAM, em seguida o hidrogênio da posição 5 é abstraído por um resíduo básico e eliminado por β eliminação na posição 6 e formando o composto 5-metilcitosina (**Figura 3**)⁵⁸.

Figura 3: Mecanismo de metilação do DNA catalisado por enzimas DNA metiltransferases.



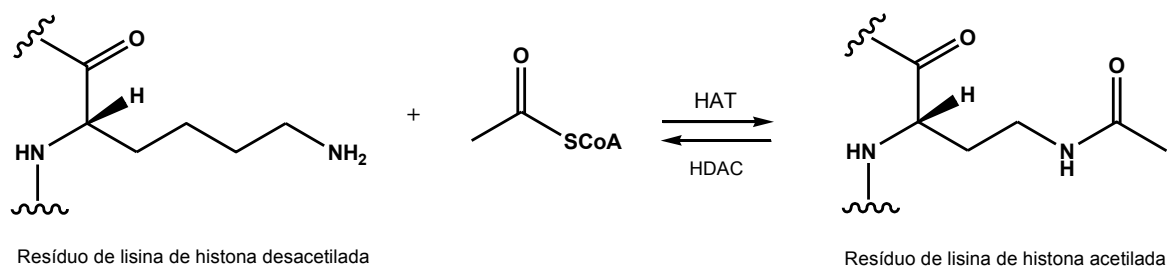


A metilação do DNA opera um número de funções vitais, como na regulação da expressão gênica e, é considerada um traço hereditário, mas não altera a sequência original de DNA. Manipulações genéticas resultando na alteração nos níveis da metilação do DNA têm sido estudadas, e essas mudanças tem como resultado os fenótipos modificados dramaticamente, incluindo desenvolvimento sexual alterado e comportamento cromossômico irregular (replicação do DNA anormal ou segregação cromossômica)^{54, 59}.

As modificações de histonas melhor estudadas e mais encontradas são as acetilações, metilações e fosforilações⁵⁷, que ocorrem nos resíduos *N*-terminais de aminoácidos presentes nas histonas.

A acetilação é a modificação em histonas mais estudada em fungos, este processo provoca um desenrolamento da cromatina que torna possível a transcrição dos genes. A acetilação de histonas é realizada por enzimas histona-acetiltransferases (HATs). A cauda *N*-terminal das histonas contem grandes quantidades de aminoácidos básicos, como lisinas e argininas, resultando em uma carga positiva e possibilitando sua ligação com o DNA, carregado negativamente. Após a acetilação, as cargas positivas do grupo NH₃⁺ dos aminoácidos básicos são neutralizadas, eliminando assim sua interação com o grupo fosfato do DNA, resultando em uma estrutura da cromatina menos condensada, o que facilita o acesso dos fatores regulatórios ao DNA. O processo contrário, a desacetilação da cromatina, resulta na cromatina mais condensada e o silenciamento gênico. A desacetilação de histonas é realizada por enzimas histona-desacetilases (HDACs)^{47, 55, 60}. O mecanismo de acetilação-desacetilação das histonas encontra-se descrito na **Figura 4**.

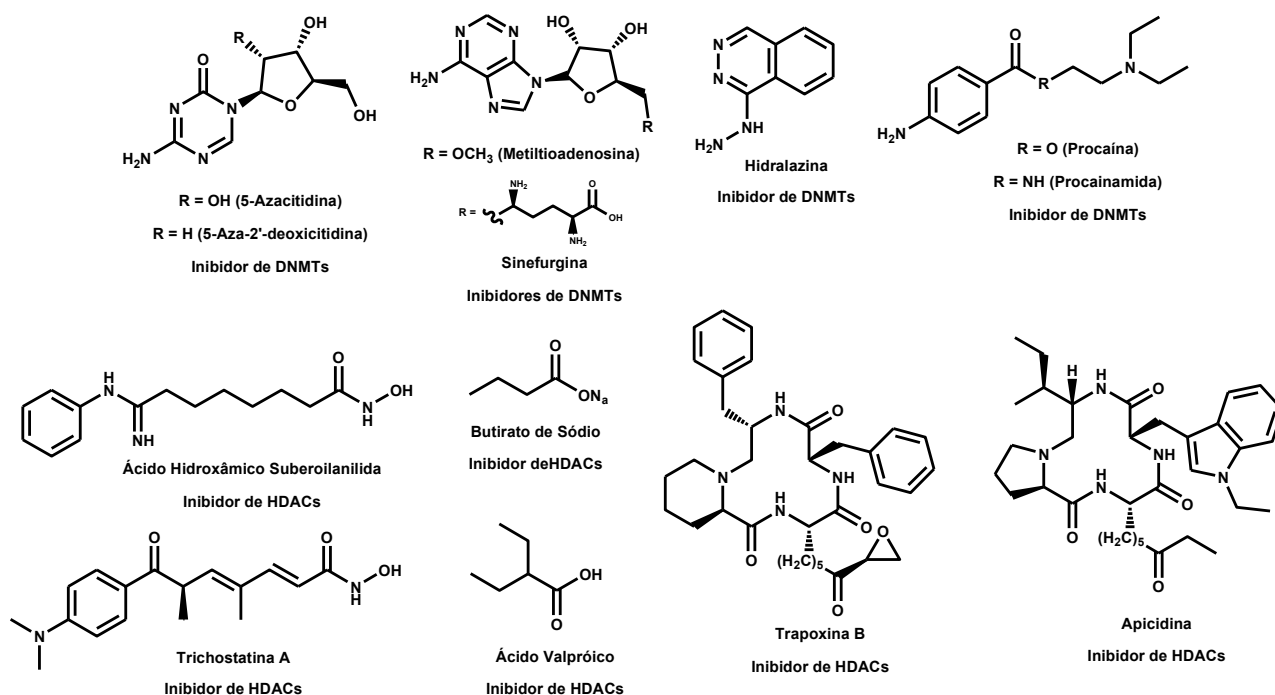
Figura 4: Mecanismo de acetilação-desacetilação de histonas.



As histonas são proteínas associadas à cromatina e possuem duas importantes funções, encontram-se sob a forma da estrutura básica de condensação do DNA, o nucleossomo, e participam no controle da regulação transcricional, que é essencial para o bom funcionamento celular^{54, 59}.

Uma série de pequenas moléculas surgiram como ferramentas e tem permitido o desenvolvimento de técnicas epigenéticas químicas (**Figura 5**), essas moléculas são capazes de seletivamente ou semi-seletivamente inibir a DNA metiltransferase (DNMT) ou a histona deacetilase (HDAC) alterando o processo de transcrição do DNA⁵⁴. O ácido hidroxâmico suberoilânida SAHA (Vorinostat) foi clinicamente aprovado pelo FDA para o tratamento de linfoma cutâneo de células T. SAHA bloqueia a atividade enzimática de HDACs Classe I (HDAC 1, 2 e 3) e Classe II (HDAC6) em concentrações nanomolar, interagindo no sítio ativo das enzimas. Em concentrações que não são tóxicas para as células normais, SAHA altera dramaticamente os padrões de acetilação e provoca interrupção e morte do crescimento de células cancerígenas tanto *in vitro* como em modelos animais. A inibição das HDACs por SAHA resulta na acumulação de histonas acetiladas, o que leva a ativação da expressão de genes^{47, 61, 62}.

Figura 5: Exemplos de moléculas utilizadas como modificadores epigenéticos

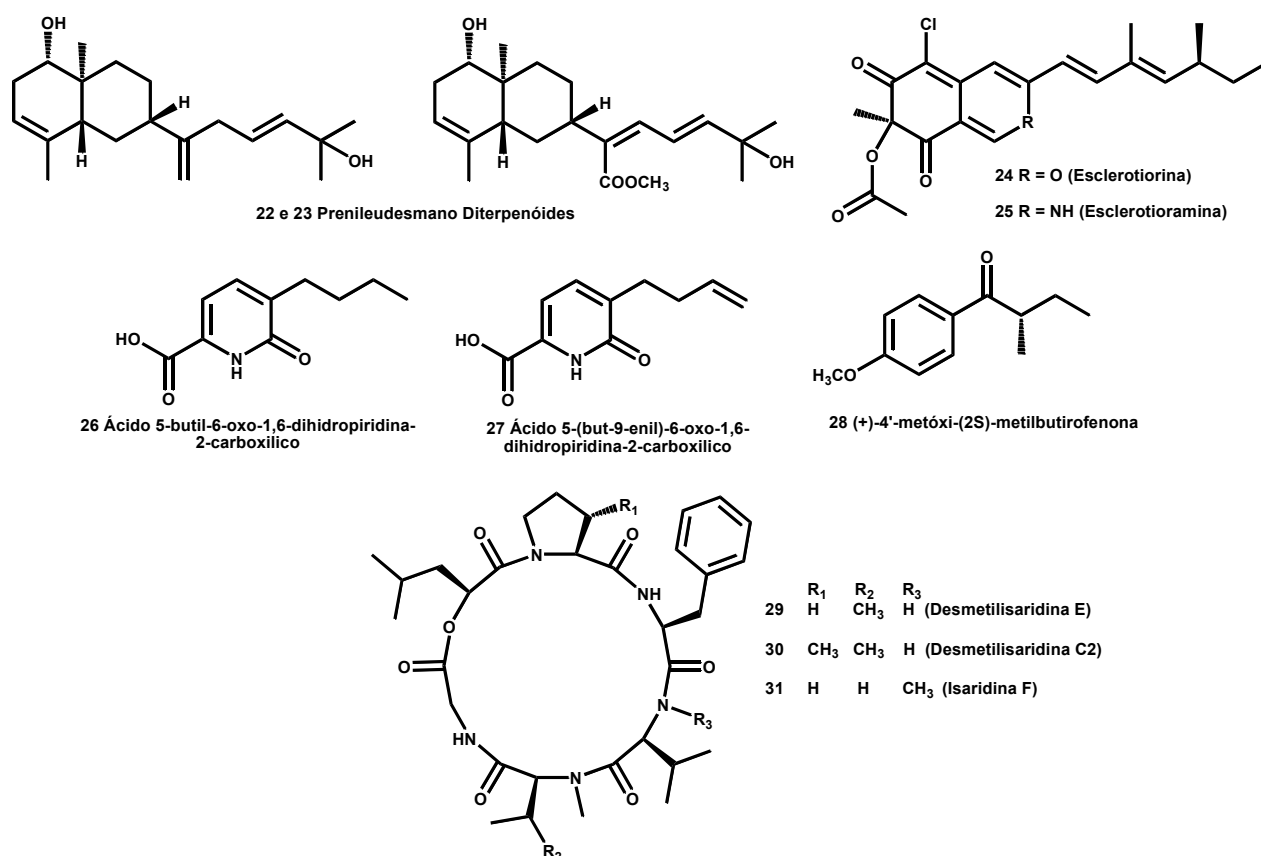


Os modificadores epigenéticos podem ser empregados racionalmente para expressar vias biossintéticas silenciosas e melhorar a produção normal de metabólitos secundários de fungos⁵⁰. As vias silenciosas são uma fonte rica de diversos compostos químicos (características stereoquímicas, incorporação de heteroátomo, etc.) com excelente potencial para a geração de novos derivados terapêuticos⁵⁷. Esses modificadores epigenéticos são também, componentes críticos no desenvolvimento normal e no crescimento das células. A regulação epigenética do gene colabora com as alterações genéticas do desenvolvimento do câncer isso por que, os genes supressores tumorais atuam normalmente reprimindo o crescimento celular e metilações nestes genes leva ao seu silenciamento e, por conseguinte, a sua perda de função⁴⁶.

A técnica da epigenética tem sido utilizada por diversos grupos de pesquisa e tem-se comprovado a sua eficiência. Liu e colaboradores (2014)⁶³ isolaram dois novos compostos (**Figura 6, 22 e 23**) no cultivo de *Penicillium funiculosum* tratado com 5-azacytidina (inibidor de DNMTs). Wang e colaboradores (2010)⁶⁴ observaram a mudança da produção metabólica do fungo *Penicillium citreonigrum* cultivado com 5-azacytidina, isolando dez compostos diferentes, sendo dois inéditos e, dois apresentaram atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* e *Candida* (**24 e 25**). Chen e colaboradores (2013)⁶⁵ introduziram SBHA

(inibidor de HDACs) no meio de cultivo do endófito *Fusarium oxysporum* f. sp. e, isolaram dois novos compostos não encontrados no controle (**26** e **27**). Yang e colaboradores (2013)⁶⁶ obtiveram alteração do perfil da produção metabólica do fungo patogênico *Stagonospora nodorum* no cultivo com os dois modificadores epigenéticos concomitantemente SAHA e nicotinamida (inibidor de HDACs) e isolaram três compostos aromáticos, sendo um destes inédito (**28**). Chung e colaboradores (2013)¹⁹ induziram a produção de três novos compostos (**29** a **30**) pertencentes à classe dos ciclodepsipeptídeos e, que apresentaram atividade anti-inflamatória utilizando SAHA como modificador epigenético no cultivo do endófito *Beauveria felina*.

Figura 6: Compostos isolados do cultivo de fungos com modificadores epigenéticos.



Essa técnica exibe várias vantagens em relação às técnicas existentes disponíveis. A principal é que fornece uma ferramenta para o acesso rápido aos produtos naturais de fungos presentes apenas em seus hospedeiros nativos. Essa metodologia pode ser facilmente implantada na maioria dos laboratórios sem a necessidade de equipamentos caros e, os custos e esforços para obter informações

sobre as vias metabólicas silenciosas são reduzidos, uma vez que não é necessário fazer uma varredura pré-selecionando fungos utilizando diferentes condições de cultivo⁵⁰. E, a obtenção de uma variedade de produtos naturais disponíveis através destes conjuntos de genes silenciosos provou ser um desafio maior para qualquer grupo de pesquisa.

CAPITULO 2

CAPITULO 2

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar o estudo químico dos extratos brutos, com potencial biológico, produzidos pelos endófitos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum*, em meios de cultivo líquidos e sólidos e, avaliar a produção metabólica do fungo endofítico *Phoma* sp., no cultivo com e sem modificador epigenético.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a triagem química e biológica dos extratos brutos obtidos em escala reduzida por RMN de ^1H , HPLC-DAD e, de inibição de linhagens de células tumorais, da enzima acetilcolinesterase e contra fungos fitopatogênicos respectivamente;
- Selecionar os extratos brutos bioativos obtidos em escala reduzida e, realizar o cultivo em escala ampliada;
- Realizar o fracionamento dos extratos brutos obtidos do cultivo dos endófitos em escala ampliada;
- Realizar o isolamento, elucidação ou determinação estrutural dos metabólitos secundários utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas, respectivamente;
- Submeter as substâncias puras isoladas aos ensaios biológicos, respectivamente;
- Emprego da técnica de epigenética na avaliação da produção metabólica do fungo endofítico *Phoma* sp.
- Isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários produzidos por *Phoma* sp.

CAPITULO 3

CAPITULO 3

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, Equipamentos e Técnicas Utilizadas.

3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nestas análises foram utilizadas placas comerciais de sílica gel de fase normal da Whatman® (AL SIL G/UV 254, 200 µm, 20 x 20 cm) e, placas de Alunina (Agela Technologies, 20 x 20 cm) além de, placas de fase reversa C18 (EDM Chemicals Inc, Silica gel 60 RP-18, 20 x 20 cm) e, C18 (TLC Plates W/UV; 150 µm). Os solventes utilizados nos sistemas cromatográficos foram selecionados de acordo com a fase estacionária.

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

3.1.2 Cromatografia em Coluna (CC)

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

Fases estacionárias utilizadas:

- ✓ Sílica gel C18 (tamanho da partícula: 40-63 µm; Merck);
- ✓ Sílica gel fase normal (tamanho da partícula: 0,060–0,200 µm; diâmetro do poro 6 nm; ACROS organics);
- ✓ Sílica gel flash (tamanho da partícula: 40 µm; Baker);
- ✓ Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences).

3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD)

Para as análises do perfil químico, otimização e isolamento das substâncias por HPLC-DAD foram utilizados equipamentos:

- Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20A;
- Waters Delta Prep. 4000 acoplado ao detector Waters 996 Photodiode Array;
- HITACHI D-6000: bomba HITACHI L-6200; auto injetor AS-4000; detector Ultravioleta em arranjo de diodos, L-4500.

O tratamento dos dados foi obtido através de um microcomputador com processador Intel® Celeron®, utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

As colunas utilizadas foram:

- Analíticas:
 - Luna Phenomenex C18 (250,0 x 4,60 mm; 5 μ m; 100 Å).
- Semi-preparativa:
 - Luna Phenomenex C18 (250,0 x 10,0 mm x 5 μ m).
- Preparativa:
 - Luna Phenomenex C18 (150,0 x 21,20 mm, 5 μ m)

3.1.4 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetros:

- Varian Inova 300 operando em 300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C .
- Bruker Fourier 300 a 7 Tesla, usando sonda dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm.
- Bruker Avance 600, usando sonda direta, multinuclear BBO 600 MHz S3.
- Bruker Avance III 400 operando em 400 MHz para o núcleo de ^1H e em 100 MHz para o núcleo de ^{13}C .

Todos os espectros foram registrados em CDCl_3 e DMSO-d_6 como solventes deuterados, e, usando TMS e solvente residual como padrão de referência nos espectrômetros:

3.1.5 Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de alta resolução micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) calibrado com NA-TFA a 10 mg/mL (TOF) e, equipado com dispositivo de inserção direta da amostra com bomba de infusão (COLE PARMER), utilizando um fluxo de 300 $\mu\text{L/h}$ e fase móvel $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$. Modo de detecção negativo e positivo para as amostras. A faixa de aquisição foi de m/z 50-2000. O software Data Analysis Shortcut (Bruker Daltonik®) foi utilizado durante a aquisição dos dados e processamento dos dados espectrométricos. As condições de análise do aparelho foram:

End Plate: 500 Volts

Capillary: 3500 Volts

Dry Gas Temp: 180 °C

Dry Gas Flow: 4 L/min

Neb Gas Pressure: 0.4 Bar

Gás: Nitrogênio

Os espectros de baixa resolução foram obtidos em equipamento Shimadzu LCMS-8000 QPα e, em um espectrômetro de massas Varian LC 1200L com injetor automático, triplo-quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o controle do equipamento, aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software *Varian MS Workstation 6.8*.

3.1.6 Preparo das amostras para análise via HPLC-DAD (*clean-up*)

Na etapa de “*clean-up*” dos extratos, uma pequena massa (4,0 mg da amostra) foi aplicada nos cartuchos SPE de RP18. O cartucho foi ativado com CH₃OH (4,0 mL) e o material a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em aproximadamente 1,0 mL de CH₃OH com auxílio de ultrassom. Após a filtração, foi adicionado mais 5,0 mL de CH₃OH no cartucho. O material recuperado foi seco e, a massa obtida foi preparada em uma concentração de 4,0 mg/mL e armazenadas em “vials” acoplados com “inserts”, os quais foram injetadas em HPLC-DAD analítico.

Para as frações, as amostras foram solubilizadas em CH₃OH:H₂O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de SPE de RP18 acoplado em membrana Millipore® (0,22 µm). Após este procedimento, as amostras (1,5 mg/mL) foram armazenadas em “vials” para posterior injeção.

3.1.7 Análise de rotação óptica ([α]_D²⁵)

As análises de rotação óptica das substâncias isoladas foram realizadas em um Polarímetro JASCO P-1020, com lâmpada de sódio operando a 589 nm e cela de 1,0 mL e software Jasco Spectra Manager e, em um polarímetro digital JASCO Dip-370, com medidas em CHCl₃, com lâmpada de sódio operando a 589 nm e cela de 1,0 mL.

3.1.8 Espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer, Série 1600 sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 32 varreduras, com resolução de 1 cm⁻¹, na faixa de absorção de 4000-400 cm⁻¹ e, em espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300, na região de 4000-400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr.

3.1.9 Solventes utilizados

Deuterados: Merck, Aldrich e Fluka.

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

3.1.10 Outros Equipamentos

- Evaporador rotatório - Buchi
- Balança analítica – METLER TOLEDO AG 245 e SHIMADZU
- Balança semi-analítica – OHAUS.
- Vortex – VWR Scientific Products.
- Linha de vácuo – VWR Scientific Products.
- Incubadora vertical - VWR Scientific Products (modelo 1925).
- Incubadora rotatória (“Shaker”) – New Brunswick Scientific (série I26).
- Espectrofotômetro – SHIMADZU UV-1601.

3.1.11 Esterilização dos Materiais

A esterilização de todo material utilizado na manipulação do micro-organismo, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclaves dos fabricantes QUIMIS® e MARKET FORGE Industries INC, sendo mantidos à temperatura de 121 °C por aproximadamente 20 minutos.

3.1.12 Manipulação do Micro-organismo

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

3.2 Seleção e Classificação das Espécies Vegetais

As folhas de *Alibertia macrophylla* e *Xylopia aromatica* foram coletadas pela Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo durante o período de 15/05/2001 a 13/06/2001 das mesmas espécimes obtidas anteriormente para estudos fitoquímicos, já geo-referenciadas, na Reserva Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha) e, identificadas pela Prof^a. Dr^a. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo. As exsiccatas dos materiais vegetais encontram-se depositadas no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo.

Os frutos maduros de *Eugenia jambolana* foram coletados pela Prof^a. Dr^a Vanessa M. Chapla da mesma espécime de *E. jambolana* obtida anteriormente para estudos fitoquímicos, e já geo-referenciadas, localizada na cidade de Araraquara, São Paulo-Brasil, em abril 2010 e dezembro 2010.

O caule de *Parkinsonia microphylla* foi coletado de um indivíduo adulto localizado nas encostas de montanhas ao redor de Tucson, Arizona-Estados Unidos.

3.3 Isolamento das Cepas Fúngicas

As linhagens de *A. macrophylla* e *X. aromatica*, foram isoladas pelos Prof. Dr. Geraldo H. Silva e Prof. Dr. Helder L. Teles, as linhagens de *E. jambolana* foram isoladas pela Prof^a. Dr^a. Vanessa M. Chapla e estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica IQ-Ar. As linhagens de *P. microphylla* foram isoladas por A. Elizabeth Arnold da Universidade do Arizona e, estão depositados no Herbário Micológico Robert L. Gilbertson da Universidade do Arizona (EUA)⁶⁷⁻⁷².

3.4 Classificação dos Fungos Endofíticos

O endófito AM-02 foi identificado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Divisão de Recursos Microbianos da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP - SP) pela Prof^a. Dr^a. Lara Durães Sette e pelo Prof. Dr. André Rodrigues.

O endófito *XYA-04* foi classificado pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning do Departamento de Fitopatologia/Universidade Federal de Lavras - MG.

O endófito *Ejfm-01* foi classificado pelo técnico Rodrigo Vela do Genotyping Biotecnologia Ltda – Prospecta/Botucatu - SP.

E, o endófito *LG0217* foi classificado pela professora Dra. A. Elizabeth Arnold da Universidade do Arizona – EUA.

Todas as linhagens estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica/IQAr – SP, no CPQBA (*AM-02*), no Departamento de Fitopatologia, da UFLA (*XYA-04*), no Genotyping Biotecnologia Ltda (*Ejfm-01*) e, no Natural Products Center – Tucson, Arizona (*LG0217*).

3.5 Cultivo dos Fungos Endofíticos em Escala Reduzida

3.5.1 Avaliação da produção metabólica dos endófitos em diferentes meios de cultura.

O cultivo dos endófitos em placas de Petri foi realizado somente em meio de BDA. As condições para o cultivo dos micro-organismos (meio de cultura sólido, tempo de incubação de 21 dias em modo estático e ambiente climatizado a 25 °C, meio de cultura líquido para os endófitos isolados de espécies vegetais do Cerrado, tempo de incubação de 28 dias em modo estático e ambiente climatizado a 25 °C⁷³ e, para os endófitos isolados de espécies vegetais do Deserto de Sonora, o tempo de incubação foi de 14 dias com medidas do nível de glicose nesse período, em “shaker” (160 rpm) e ambiente climatizado a 28 °C foram adotadas com base nos resultados obtidos, anteriormente, pelo grupo de pesquisa.

Para a análise da produção metabólica foram utilizados cinco meios líquidos e dois meios sólidos. O meio líquido Czapek® “quimicamente definido”, e os outros meios complexos (Nutrient®, PDB, YM, Extrato de Malte, Arroz e Milho) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Especificações dos meios de cultura utilizados no crescimento dos endófitos.

Meios de Cultura	Tipo	Composição	Especificações	Fabricante
Arroz	Sólido	Arroz	Arroz parboilizado	MARCON
BDA	Sólido	Fécula de batata (4g); Dextrose (20g), Agar (15g)	Base para cultivo de fungos e bactérias	SIGMA e DIFCO
Czapek-Dox Broth®	Líquido	Sacarose (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	Base para cultivo de fungos e bactérias capazes de utilizar nitrogênio inorgânico	DIFCO
Extrato de Malte	Líquido	Extrato de Malte (20g)	Base para cultivo de fungos e bactérias	Acumedia
Milho	Sólido	Milho	Milho tipo canjica	YOKI
PDB	Líquido	Batata (4g), Dextrose (20g)	Base para cultivo de fungos	Acumedia e DIFCO
Nutrient®	Líquido	Extrato de Carne (3g), Peptona (5g)	Base para cultivo de micro-organismos não-fastidiosos	DIFCO
YM	Líquido	Extrato de Levedura (3g), Extrato de Malte (3g), Peptona (5g), Dextrose (10g)	Base para cultivo de fungos, leveduras e outros micro-organismos acidúricos	Acumedia

3.5.2 Cultivo dos endófitos em meios líquidos e sólidos

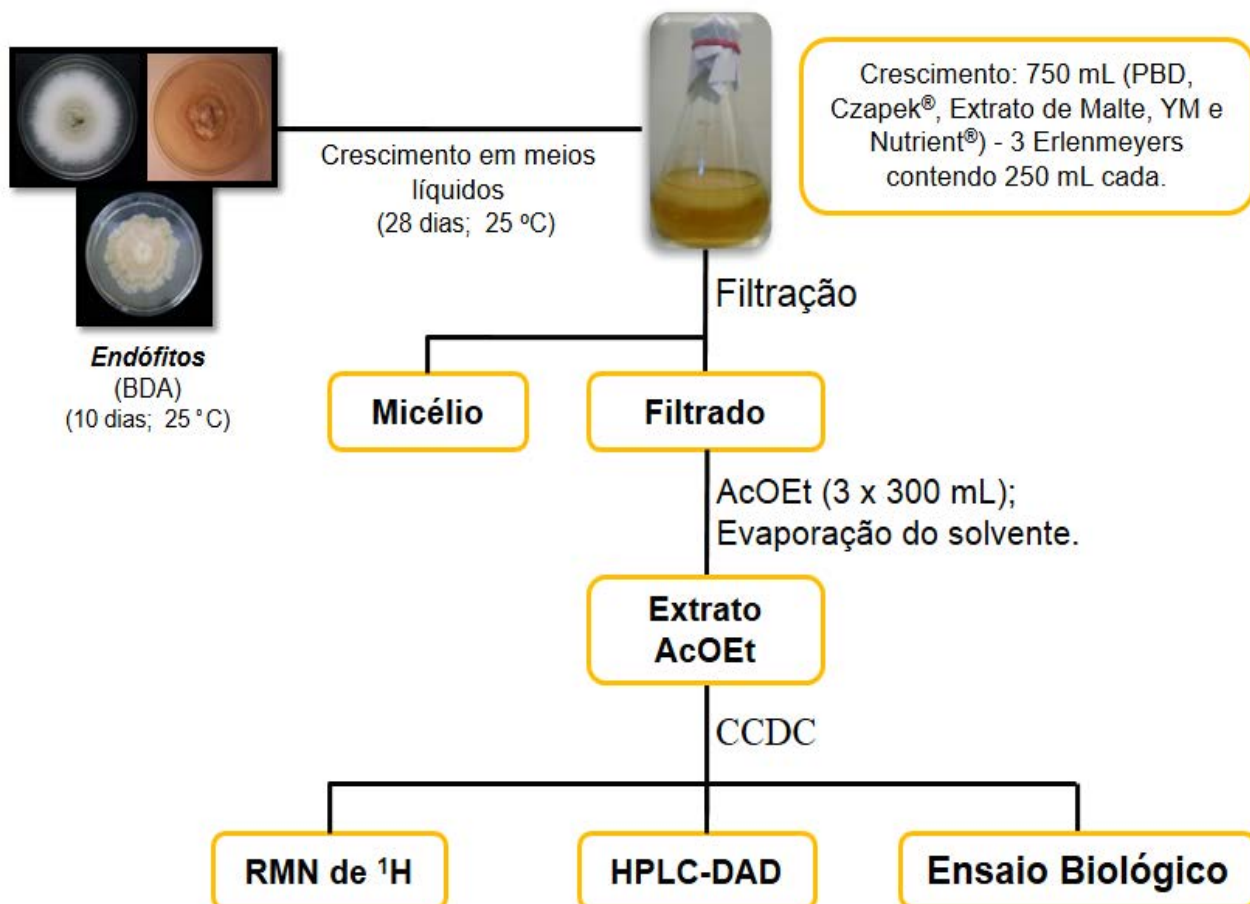
3.5.2.1 Avaliação do cultivo dos endófitos nos meios líquidos

A obtenção dos extratos AcOEt, nos meios de cultivo líquido dos micro-organismos isolados de espécies vegetais do Cerrado, foi realizado de acordo a metodologia mostrada no **Fluxograma 1**.

Os extratos AcOEt obtidos dos meios líquidos, em escala reduzida, foram submetidos à análise em RMN de ¹H e HPLC-DAD em gradiente exploratório. O sistema utilizado para análise em HPLC-DAD foi como fase estacionária uma coluna analítica tipo Octadesil silano (C18) e eluição em gradiente H₂O/CH₃OH (95:05 v/v) até 100% de CH₃OH em 40 min., e permaneceu por mais 10 min., num fluxo de 1,0 mL/min., e λ de 254 nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda. Além de análise dos espectros de RMN de ¹H e, otimização cromatográfica em placas de CCDC utilizando Hex/AcOEt 70:30 e, CHCl₃/CH₃OH 95:05 como fase

móvel e, como revelador luz ultravioleta nos comprimentos de onda $\lambda = 254$ e 366 nm seguido de anisaldeído e aquecimento.

Fluxograma 1: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos em meio líquido em escala reduzida.



3.5.2.2 Avaliação do cultivo do endófito isolado de espécie vegetal do Deserto de Sonora nos meios líquidos na presença e ausência de modificador epigenético

O fungo endofítico *Phoma* sp. foi repicado para placas de Petri contendo BDA e incubado por 5 dias. Em seguida, preparou-se uma solução de esporos, que foi preparada adicionando esporos do fungo em água destilada estéril, agitando-se em vortex e filtrando-se em separador celular. Nesta solução de esporos mediu-se a absorbância em espectrofotômetro (Abs 1,0). A solução de esporos foi adicionada (1,2 mL) em frascos de Erlenmeyer (125 mL) que continham meio de cultivo PBD e YM (20 mL) os quais foram chamados de controle, e em frascos de Erlenmeyer (125 mL) que continha ambos os meios de cultivo (20,0 mL) mais o modificador

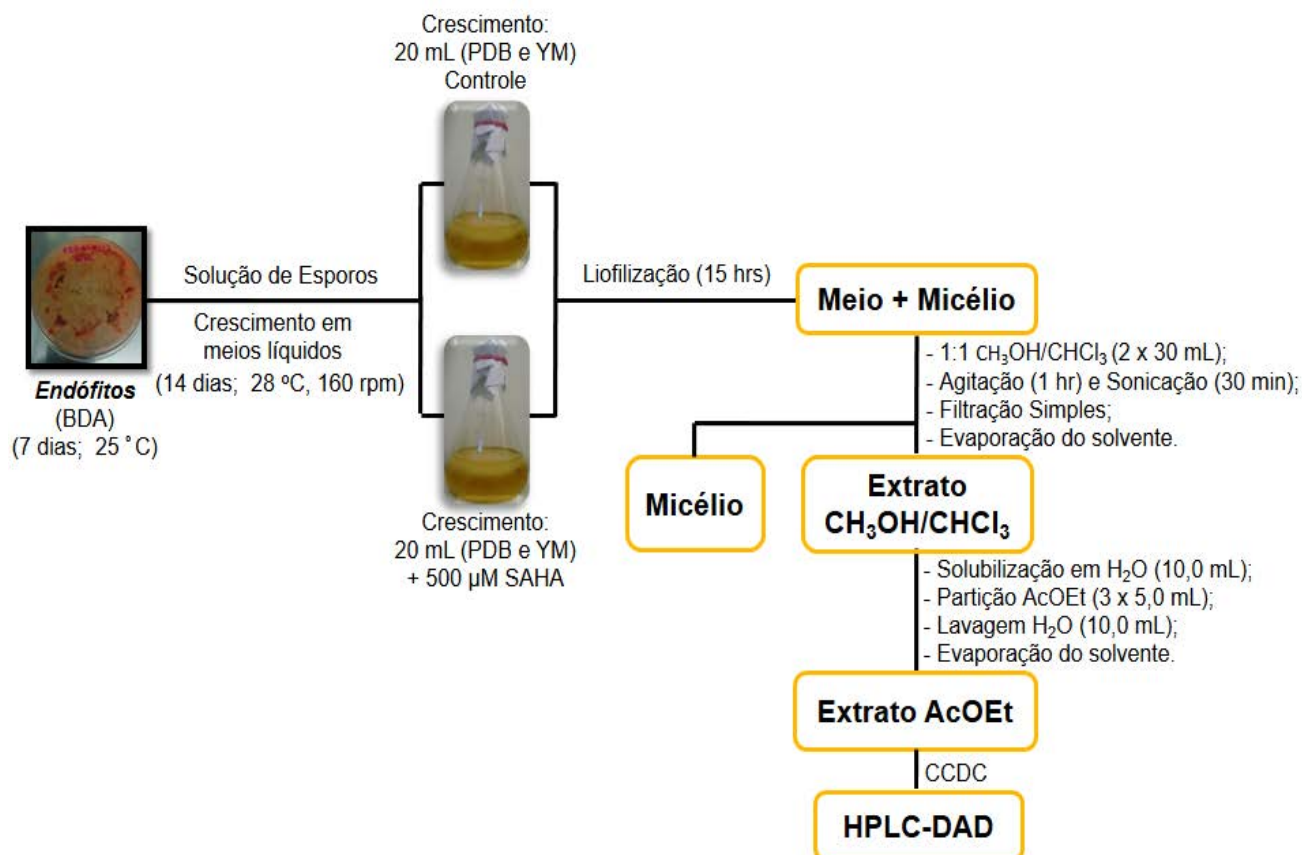
epigenético SAHA (500 μ M). Os fungos foram incubados em “shaker” durante 14 dias, a 28 °C e 160 rpm e, durante esse período medidas do nível de glicose foram realizados.

A obtenção dos extratos AcOEt, nos meios de cultivo líquido dos micro-organismos isolados de espécies vegetais do Deserto de Sonora, foi realizado de acordo a metodologia mostrada no **Fluxograma 2**.

Os extratos AcOEt obtidos dos meios líquidos, em escala reduzida, foram submetidos à análise em HPLC-DAD em gradiente exploratório.

O sistema utilizado para análise em HPLC-DAD foi realizado em gradiente exploratório, utilizando como fase estacionária uma coluna analítica Phenomenex (tipo Luna, C18) e eluição em gradiente de H₂O:CH₃CN 0,1% CH₂O₂ (70:30 v/v durante 10 minutos, diminuindo a polaridade até 0:100% em 40 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 min.), com uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e λ de 280 nm para posterior escolha do melhor comprimento de onda. Além de otimização cromatográfica em placas de CCDC de fase normal (sílica gel) utilizando 5% de CH₃OH em CH₂Cl₂ como fase móvel e, em placas de CCDC de fase reversa (C18) utilizando 80% de CH₃OH em H₂O, sendo utilizado como revelador luz ultravioleta nos comprimentos de onda λ = 254 e 366 nm seguido de anisaldeído e aquecimento.

Fluxograma 2: Fluxograma de obtenção dos extratos líquidos em escala reduzida dos endófitos utilizando modificador epigenético.

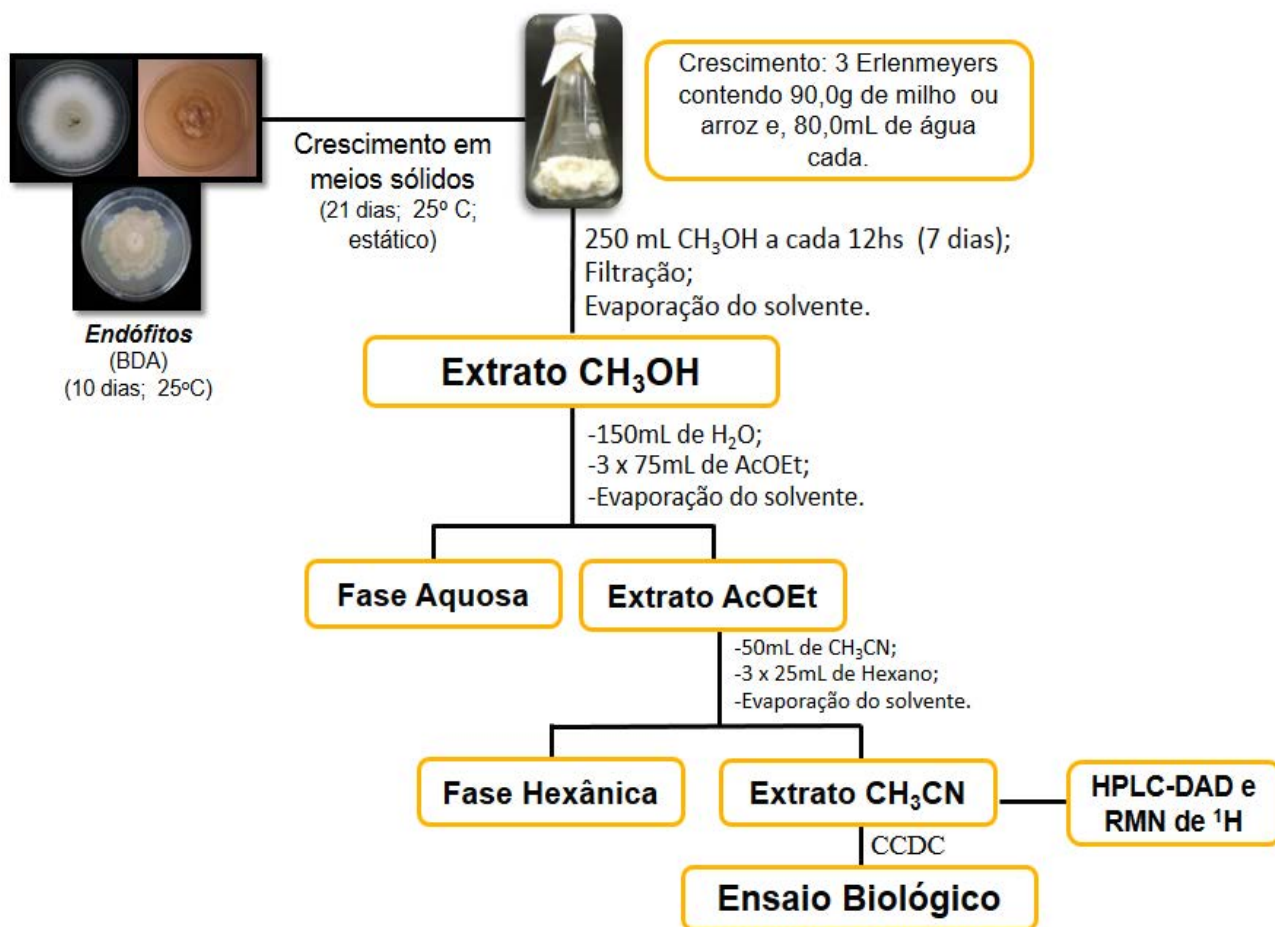


3.5.2.3 Cultivo dos endófitos nos meios sólidos

A obtenção dos extratos CH₃CN, nos meios de cultivo sólido dos micro-organismos selecionados, foi realizado de acordo a metodologia mostrada no **Fluxograma 3**.

Os extratos CH₃CN obtidos dos meios sólidos, em escala reduzida, foram submetidos à análise em RMN de ¹H, HPLC-DAD e CCDC nas mesmas condições dos extratos obtidos nos meios líquidos descrito no item 3.5.2.1 página 64.

Fluxograma 3: Fluxograma de obtenção dos extratos sólidos em escala reduzida dos endófitos



3.6 Avaliação das Atividades Biológicas

As análises biológicas realizadas para os extratos AcOEt, CH₃CN, frações oriundas do fracionamento do extrato CH₃CN e, as substâncias puras obtidas do cultivo dos endófitos em estudo foram: citotóxico, antifúngico e anticolinesterásico.

3.6.1 Ensaio Citotóxico*

Material

Células: As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 20 mg mL⁻¹ (extratos), 10 mg mL⁻¹ (frações) ou 5 mg mL⁻¹ (substâncias puras).

Método

O método descrito primeiramente por Mosman (1983)⁷⁴, tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação⁷⁵.

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Análise Estatística

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

*Ensaios realizados pelas Prof^{as}. Dr^{as} Cláudia Pessoa e Paulo Michel P. Ferreira, UFC, LOE.

3.6.2 Ensaio Antifúngico**

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

Os extratos CH₃OH e CH₃CN (400 µg), e as substâncias puras (100 µg, 50 µg, 25 µg, 10 µg, 5 µg e 1 µg), foram aplicadas em cromatoplasas de sílica gel e eluídas com solventes adequados CHCl₃:CH₃OH (90:10). Em seguida foram evaporadas para completa remoção dos solventes. As cromatoplasas foram borrifadas com uma suspensão de fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, na concentração de 5 x 10⁷ esporos/mL, em solução de glicose e sais. As placas aspergidas com suspensão de fungos foram incubadas em câmara úmida a 25 °C, durante 48 horas, na ausência de luz. Decorrido o período de incubação, o fungo

cresceu por toda placa, exceto nas regiões onde se encontravam as substâncias ativas inibindo o crescimento do fungo, em comparação com o padrão positivo nistatina 1 μg ⁷⁶.

**Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

3.6.2 Ensaio Anticolinesterásico***

Os extratos de interesse foram submetidos à constatação da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann⁷⁷, utilizando cromatoplasas.

O ensaio qualitativo e quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa – CCDC) consiste na eluição de uma cromatoplasa da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), galantamina. Foram aplicados 100 μg dos extratos de interesse em uma cromatoplasa de sílica gel. A placa foi eluída com eluentes adequados ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:05) e Hex/AcOEt (70:30)), objetivando encontrar a menor quantidade inibidora da AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66 U) (**solução A**). A placa cromatográfica foi incubada em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a (**solução D**).

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

Soluções:

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

***Ensaio biológico realizado pela Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

CAPITULO 4

CAPITULO 4

4.0 Avaliação da Produção Metabólica dos Endófitos

4.1 Estudo da variação metabólica dos endófitos isolados de espécies vegetais do Cerrado.

4.1.1 Obtenção dos extratos brutos

Os fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado têm demonstrado um grande potencial na produção de metabólitos secundários bioativos, a qual é dependente dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo.

Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Oligoelementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades, no entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial, vitaminas, como tiamina, biotina, riboflavina, ácido pantotênico etc⁷⁸.

É importante salientar que as características fisiológicas de um micro-organismo em cultura, podem não ser as mesmas que as do seu crescimento na natureza. As culturas puras em laboratório crescem muito bem, porque normalmente têm uma abundância de nutrientes e não há competição com outros micro-organismos pelo alimento em disponibilidade. Assim, em laboratório podem crescer em uma mistura simples contendo açúcar, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns minerais. Alguns necessitam de vitaminas, outros podem crescer somente em um meio complexo que contenha uma grande variedade de compostos orgânicos providos pela peptona e extratos de carne⁷⁸.

4.1.1.1 Obtenção dos extratos em meios de cultivo líquido

Os extratos brutos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita na seção 3.5.2.1, pág. 64.

Os rendimentos dos extratos obtidos no crescimento em 750 mL de meio líquido estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Massas dos extratos AcOEt obtidas nos meios de cultivo líquidos dos endófitos.

Meios de Cultivo	<i>Camarops</i> sp. (mg)	<i>Periconia atropurpurea</i> (mg)	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> (mg)
PDB	153,9	110,0	59,2
Nutrient®	28,5	31,0	124,1
YM	33,7	377,7	165,3
Czapek®	187,5	165,8	255,7
Extrato de Malte	102,4	268,2	92,2

Esta diversidade pode ser explicada pela presença de diferentes componentes nutricionais em cada meio de cultivo.

4.1.1.2 Obtenção dos extratos brutos em meios de cultivo sólido

Os extratos brutos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita na seção 3.5.2.3, pág. 67.

A fim de diminuir ou eliminar os interferentes provenientes do meio de cultivo sólido, o extrato CH₃OH produzido pelos endófitos foi particionado duas vezes. A primeira partição foi realizada com AcOEt/H₂O objetivando a eliminação dos açúcares oriundos do meio de cultivo e, a segunda foi realizada com CH₃CN/Hexano objetivando a eliminação das graxas, também provenientes do meio de cultivo sólido em milho e arroz. Este procedimento foi adotado após avaliação dos espectros de RMN de ¹H dos meios sólidos sem inoculação dos endófitos (extrato controle), que se mostrou rico em açúcares e substâncias graxas.

Deste modo, evitou-se isolar os metabólitos procedentes do meio de cultivo em milho.

Os rendimentos dos extratos obtidos no crescimento em 270 g de meio sólido estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Massas dos extratos CH₃CN obtidas nos meios de cultivo sólidos dos endófitos.

Meios de Cultivo	<i>Camarops</i> sp. (mg)	<i>Periconia atropurpurea</i> (mg)	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> (mg)
Arroz	379,9	300,3	713,0
Milho	524,9	727,5	240,9

A alta massa obtida pode estar associada a alta produção metabólica dos fungos em estudo. A metodologia empregada nesse trabalho foi à mesma para todos os fungos.

4.1.2 Análise química

4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Todos os extratos brutos obtidos foram submetidos à análise de RMN de ^1H (**Figuras 7 a 9**) com o objetivo de obter indícios sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos por cada fungo.

4.1.2.2.1 Extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos do fungo *Camarops* sp.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 7**) dos extratos obtidos em escala reduzida apresentaram sinais, variando de δ_{H} 0,8 até aproximadamente δ_{H} 9,5 demonstrando a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos e, metínicos sugerindo várias classes de substâncias e evidenciando a diversidade metabólica nestes extratos.

4.1.2.2.2 Extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos do fungo *Periconia atropurpurea*.

Foram observados sinais no espectro de RMN de ^1H (**Figura 8**) em uma ampla faixa espectral, como sinais de hidrogênios aromáticos, olefínicos e carbinólicos, metilênicos e metílicos.

4.1.2.2.3 Extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos do fungo *Pseudofusicoccum stromaticum*.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 9**) dos extratos brutos do fungo *P. stromaticum* apresentaram uma vasta produção de metabólitos secundários, pois foi possível visualizar sinais em uma ampla faixa espectral (0,5 a 11 ppm), diversos sinais de hidrogênios aromáticos, olefínicos, carbinólicos, metilênicos e metílicos, evidenciando a produção de muitos constituintes químicos.

Figura 7: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos extratos *Camarops* sp.

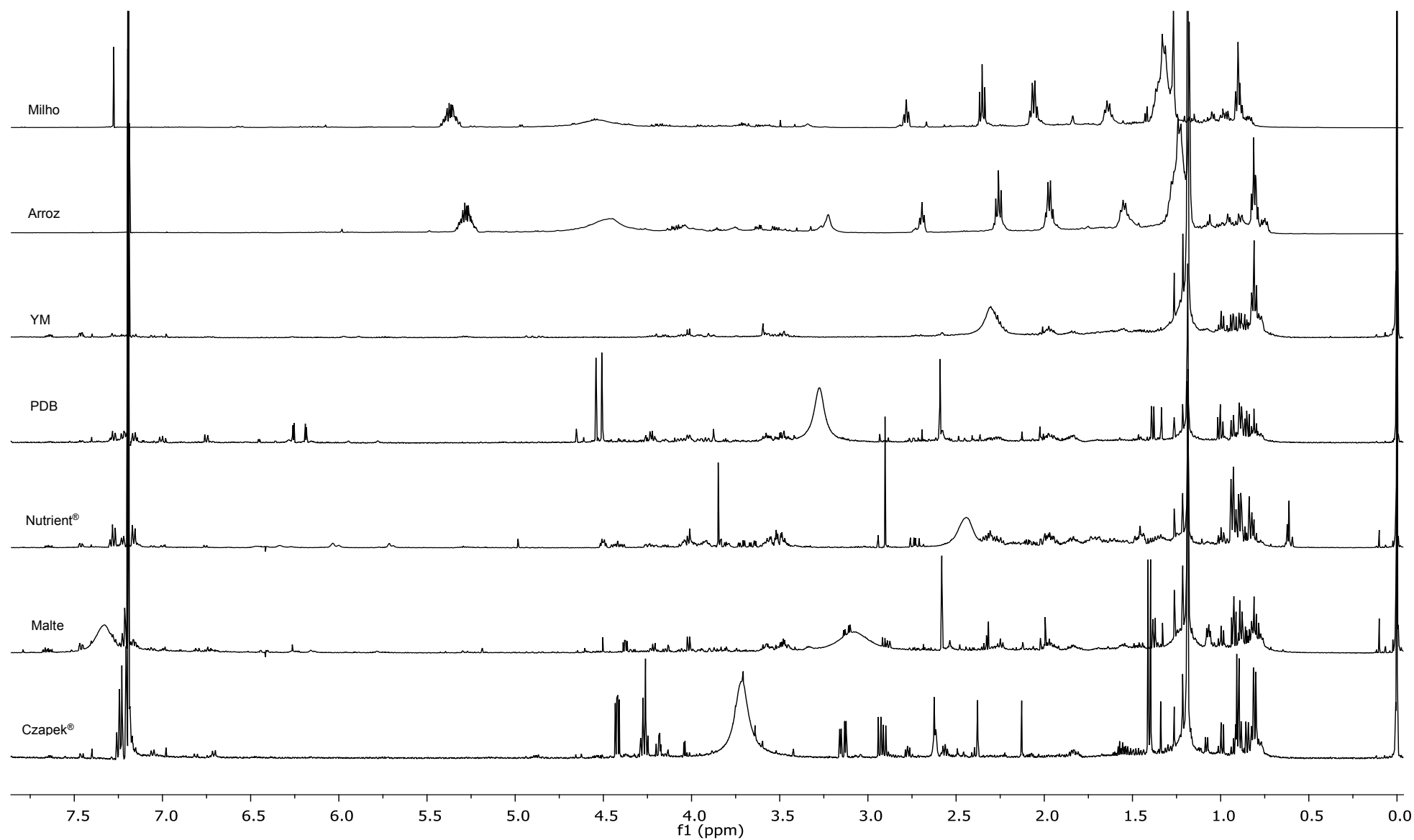


Figura 8: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos extratos de *P. atropurpurea*.

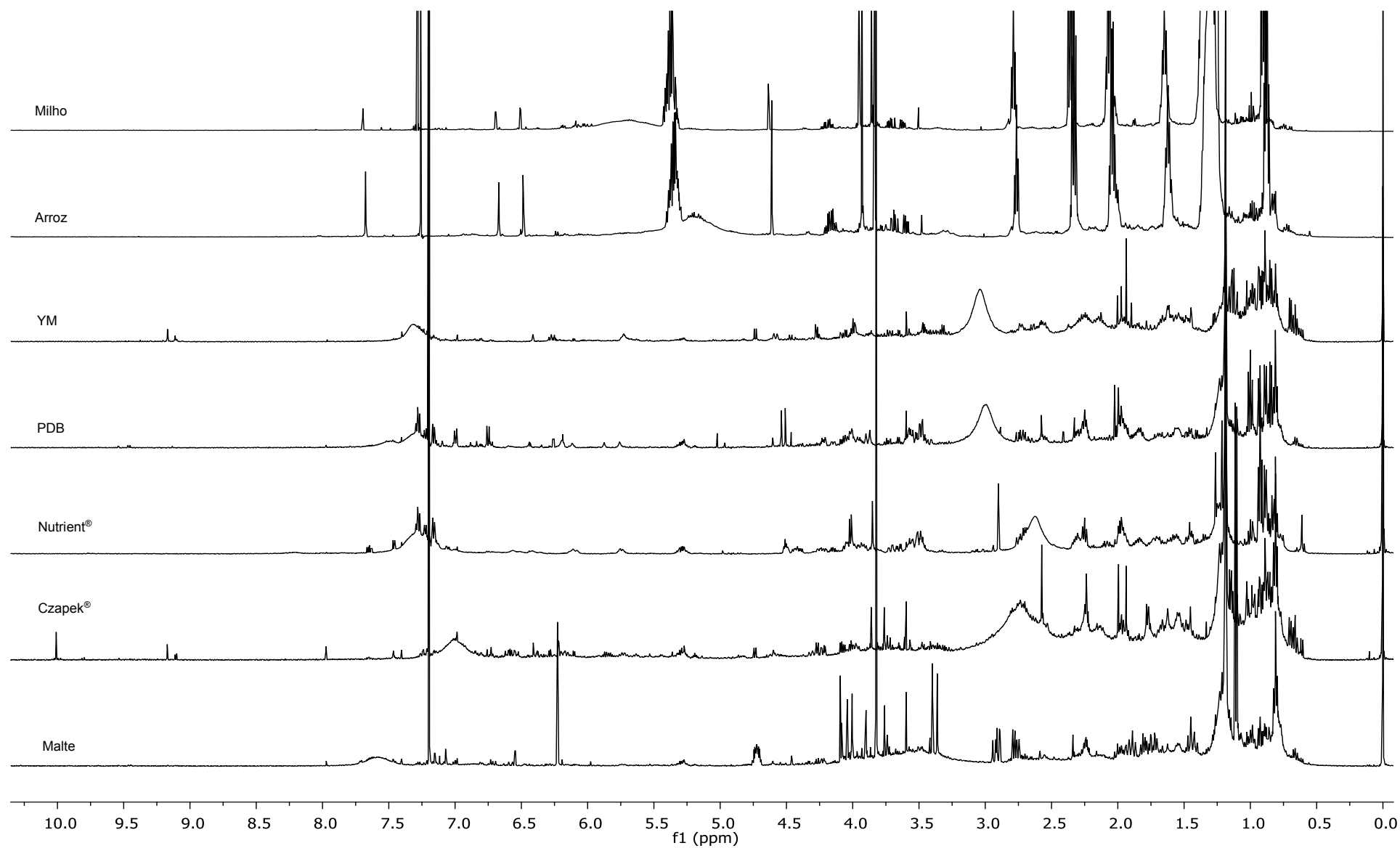
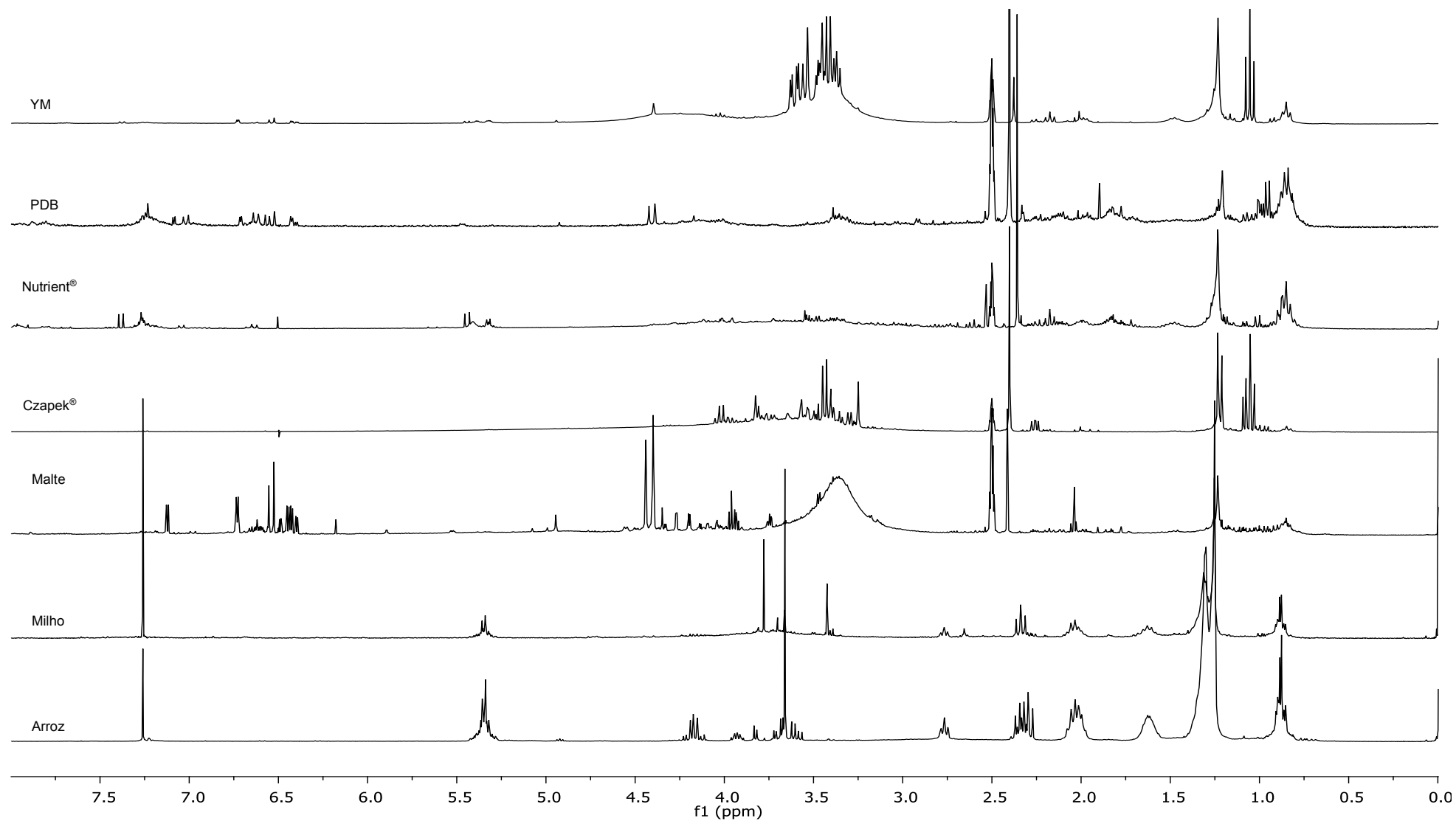


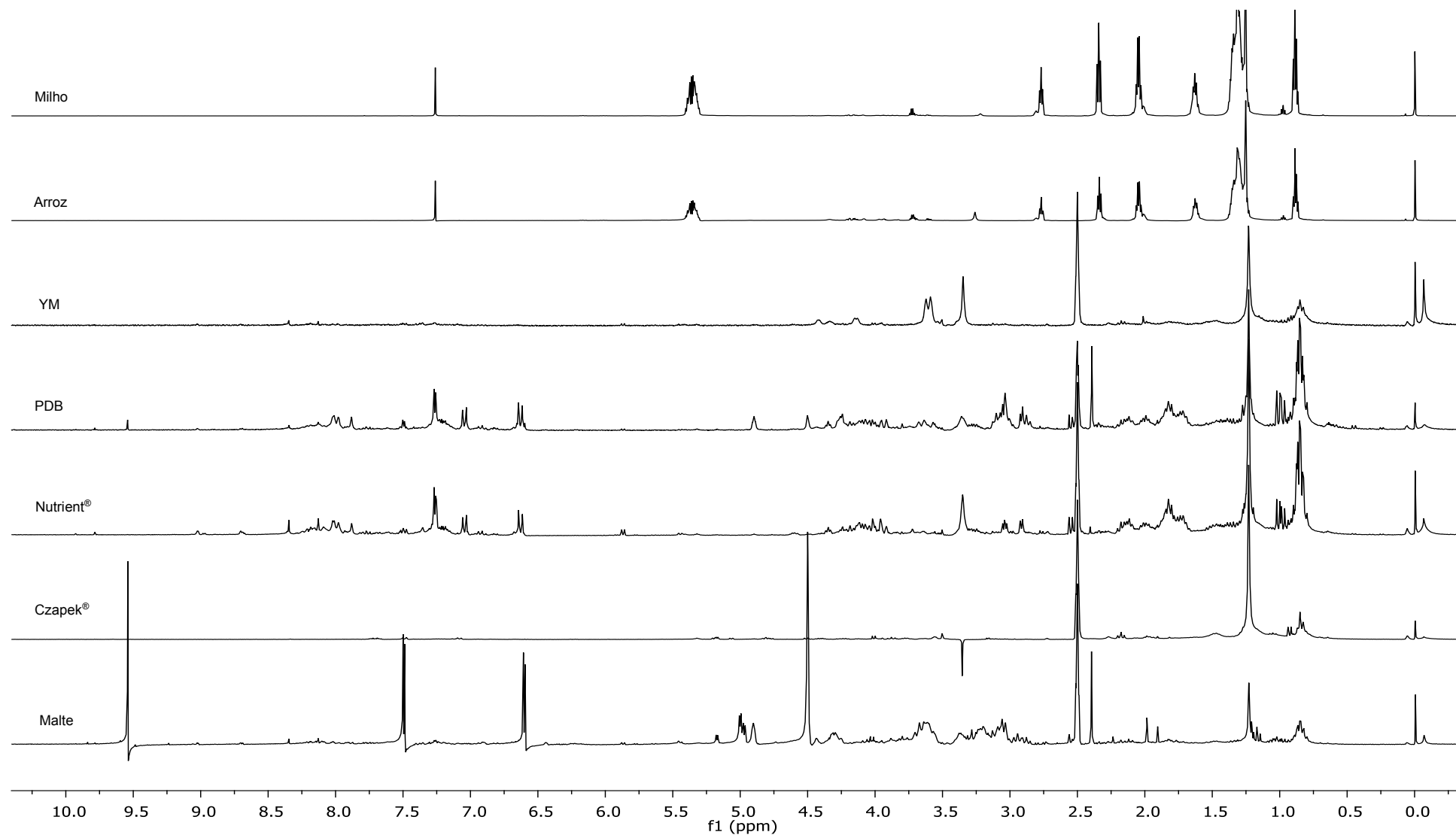
Figura 9: Espectros de RMN de ^1H em DMSO- d_6 (300 MHz; para os extratos líquidos) e, em CDCl_3 (300 MHz; para os extratos sólidos) dos extratos de *P. stromaticum*.



Pela análise dos espectros de RMN de ^1H , notou-se uma variação na produção metabólica dos endófitos, em função do meio de cultivo, evidenciando a dependência dos nutrientes na produção destes. Análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H dos extratos em milho e arroz sugeriu que muitas substâncias de caráter graxo ainda encontram-se presentes, prejudicando as análises e comparações.

Para fim de comparação, obteve-se o extrato controle de cada um dos meios de cultivo utilizados, tanto líquido quanto sólido. Comparação com os espectros de RMN de ^1H (**Figura 10**) obtidos dos extratos controle revelaram que a variedade dos sinais corresponde somente aos metabólitos secretados pelos fungos, uma vez que os espectros de RMN de ^1H dos extratos controle apresentaram picos não coincidentes com os dos extratos brutos obtidos dos endófitos. Deste modo, nos asseguramos que os metabólitos isolados foram produzidos pelos micro-organismos e não procedentes dos meios de cultivo.

Figura 10: Espectros de RMN de ^1H em DMSO- d_6 (300 MHz; para os extratos líquidos) e, em CDCl_3 (300 MHz; para os extratos sólidos) dos extratos controle.



4.1.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos pelos endófitos em comparação com os extratos controle.

4.1.3.1 Ensaio Citotóxico

A atividade citotóxica dos extratos testados está apresentada na **Tabela 5** com seus respectivos percentuais de inibição. Somente os extratos que apresentaram valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 5: Percentual de inibição do crescimento celular ($IC_{50}\%$) dos extratos em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 $\mu\text{g/mL}$

Nº	Amostra Identificação	HCT-116*	SD	OVCAR 8**	SD	SF-295***	SD
		GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
1	Arroz- <i>Camarops</i> sp.	21,98%	12,32%	52,56%	1,06%	51,76%	6,76%
2	PDB- <i>Camarops</i> sp.	4,20%	4,97%	17,06%	2,61%	38,80%	4,94%
3	Malte- <i>Camarops</i> sp.	7,30%	2,64%	4,44%	4,44%	35,49%	2,60%
4	YM- <i>Camarops</i> sp.	1,46%	2,13%	14,27%	0,97%	59,75%	3,77%
5	Nutrient- <i>Camarops</i> sp.	5,11%	1,87%	8,87%	10,52%	37,70%	2,60%
6	Milho-<i>Camarops</i> sp.	93,39%	9,87%	103,69%	3,48%	64,94%	6,95%
7	Czapek- <i>Camarops</i> sp.	8,34%	0,26%	-4,37%	1,64%	49,55%	1,69%
8	PDB- <i>P. atropurpurea</i>	5,52%	4,64%	20,27%	3,09%	29,06%	0,52%
9	Nutrient- <i>P. atropurpurea</i>	13,13%	7,29%	24,85%	2,03%	51,44%	0,45%
10	Milho- <i>P. atropurpurea</i>	0,50%	1,42%	33,79%	4,44%	31,86%	1,10%
11	Czapek- <i>P. atropurpurea</i>	8,76%	1,35%	48,81%	0,58%	50,70%	2,66%
12	Arroz- <i>P. atropurpurea</i>	16,14%	2,52%	32,22%	8,40%	37,61%	3,51%
13	Malte-<i>P. atropurpurea</i>	84,22%	1,03%	78,50%	18,44%	77,49%	2,99%
14	YM- <i>P. atropurpurea</i>	71,50%	32,44%	66,89%	13,03%	73,95%	30,08%
15	PDB- <i>P. stromaticum</i>	3,32%	9,34%	-11,68%	1,62%	38,62%	6,89%
16	YM- <i>P. stromaticum</i>	13,62%	1,35%	-0,14%	1,02%	38,96%	2,62%
17	Czapek®- <i>P. stromaticum</i>	11,70%	3,55%	0,29%	1,07%	38,71%	1,30%
18	Malte-<i>P. stromaticum</i>	89,35%	0,14%	80,86%	3,33%	91,06%	0,15%
19	Nutrient®- <i>P. stromaticum</i>	-6,10%	5,84%	-20,86%	0,39%	27,97%	11,81%
20	Arroz- <i>P. stromaticum</i>	81,82%	3,27%	37,13%	3,74%	63,39%	5,89%
21	Milho-<i>P. stromaticum</i>	75,10%	2,89%	81,62%	8,88%	60,02%	2,60%

*OVCAR 8 (carcinoma de ovário); **HCT-116 (cólon - humano); ***SF-295 (glioblastoma - humano)

Assim, pode-se concluir que os extratos de Milho obtido do endófito *Camarops* sp. o Extrato de Malte obtido do endófito *P. atropurpurea* e, o Extrato de

Malte e de Milho obtidos do endófito *P. stromaticum* demonstraram forte potencial citotóxico frente às três linhagens tumorais testadas. Os extratos bioativos produzidos pelos endófitos *Camarops* sp. e *P. atropurpurea* foram selecionados para o crescimento e cultivo em escala ampliada, já o endófito *Pseudofusicoccum stromaticum* foi crescido no meio líquido de Czapek® devido a esta linhagem ter apresentado potencial anticâncer em estudos preliminares.

4.1.3.2 Ensaio Antifúngico

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica contra os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Figuras 11 e 12) são interessantes e, sugerem que a maioria dos extratos apresentaram atividade antifúngica.

Figura 11: Resultado da atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *C. cladosporioides*, dos extratos brutos, para os diferentes meios de cultivo dos endófitos.

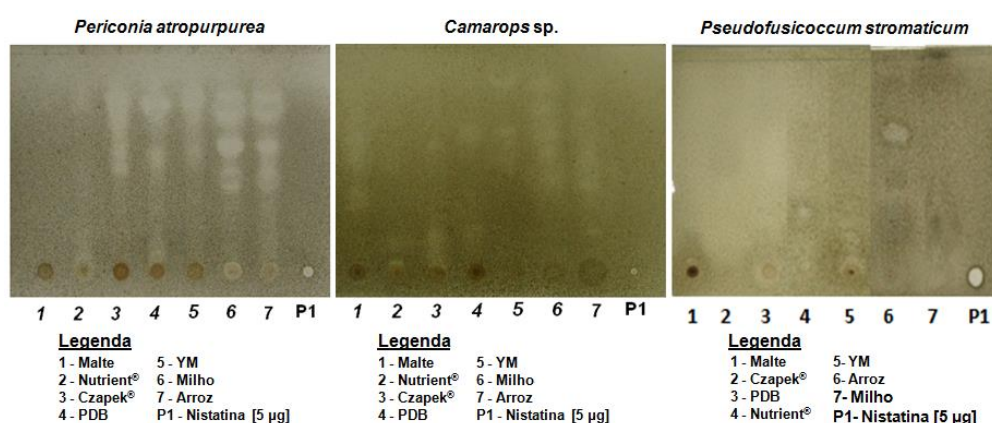
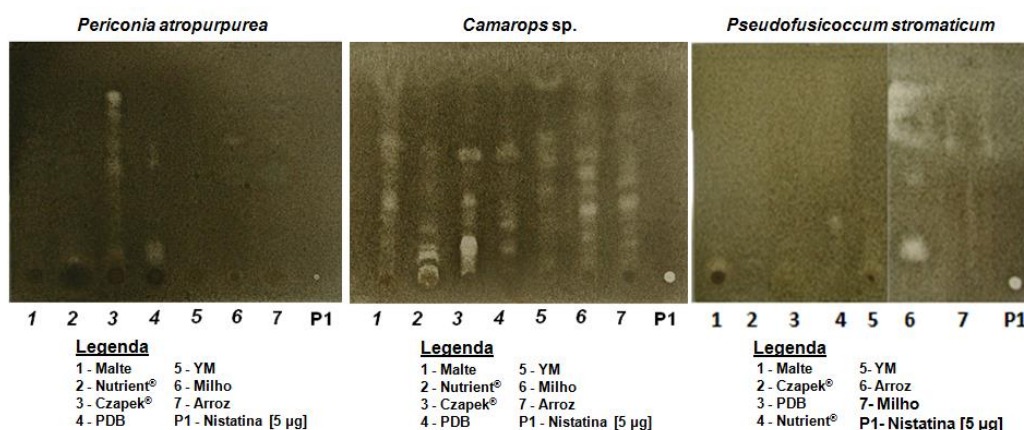


Figura 12: Resultado da atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum*, dos extratos brutos, para os diferentes meios de cultivo dos endófitos.

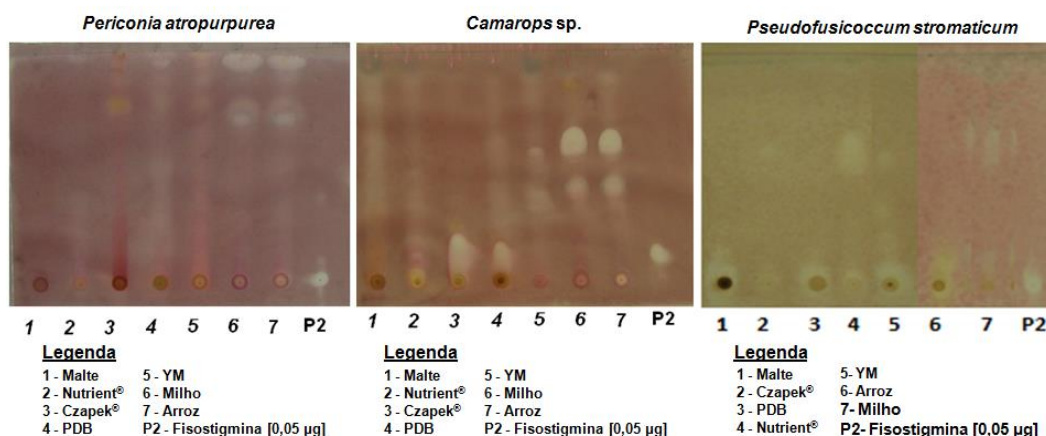


Esses dados podem estar diretamente relacionados à ecologia química, onde os micro-organismos endofíticos produzem substâncias bioativas como autodefesa e contra micro-organismos fitopatógenos. Deste modo, os fungos associados a espécies vegetais são promissoras fontes na busca por novos metabólitos secundários com atividade antifúngica.

4.1.3.3 Ensaio Anticolinesterásico

O ensaio anticolinesterásico realizado em CCDC é qualitativo e é definido através do halo branco em fundo roxo, para atividade inibitória positiva. Os resultados obtidos na avaliação da atividade anticolinesterásica (**Figura 13**) foram muito bons, demonstrando que a maioria dos extratos inibiu a ação da enzima acetilcolinesterase. Pode-se destacar os extratos de milho e arroz obtidos do cultivo do endófito *Camarops* sp. que apresentaram uma forte inibição da enzima acetilcolinesterase sendo comprovada pelo forte halo de inibição quando comparado com o padrão fisostigmina.

Figura 13: Atividade anticolinesterásica, dos extratos brutos, para os diferentes meios de cultivo dos endófitos.



4.2 Estudo da Variação Metabólica do Endófito isolado de espécie vegetal do Deserto de Sonora.

4.2.1 Obtenção dos extratos brutos

4.2.1.1 Obtenção dos extratos em meios de cultivo líquido com e sem adição de modificador epigenético

Os extratos brutos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita na seção 3.5.2.2, pág. 66. Os rendimentos dos extratos obtidos no crescimento em 20 mL de meio líquido foram satisfatórios e, estão mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Massas dos extratos AcOEt obtidas nos meios de cultivo líquidos do endófito.

Meios de Cultivo	<i>Phoma</i> sp. (mg)
PDB	7,7
PDB + SAHA	16,9
YM	3,8
YM + SAHA	4,8

Pode-se observar que a adição do modificador epigenético SAHA aumentou a produção metabólica do endófito tanto no meio de cultivo de PDB como no meio de cultivo de YM. Esses resultados evidenciam que o modificador epigenético SAHA empregado no cultivo exerceu uma alteração na produção metabólica do fungo, o que nos motivou a cultivar o fungo em escala ampliada com adição do modificador epigenético (4 L) e sem a adição do modificador epigenético (9 L) para avaliação da produção metabólica.

4.2.2 Análises químicas

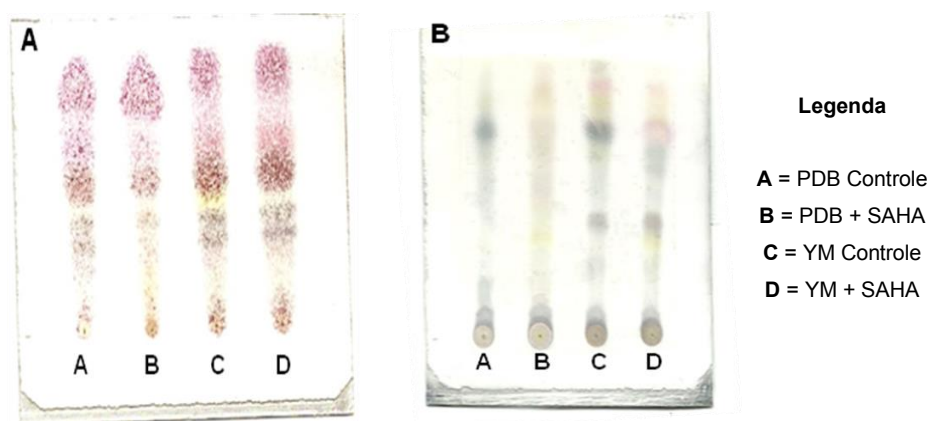
4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Visando estabelecer condições primárias de separação cromatográfica como etapa inicial para os ensaios de detecção de substâncias bioativas e uma prévia comparação dos metabólitos produzidos, os extratos brutos foram submetidos à separação cromatográfica em CCDC.

O cultivo do fungo *Phoma* sp. com e sem modificador epigenético apresentou mudanças significativas na produção metabólica, sendo esta avaliada por CCDC (**Figura 14**), no entanto o cultivo no meio líquido de YM não apresentou alterações

significativas, diferente do cultivo no meio líquido de PDB onde notou-se o desaparecimento de compostos apolares e polares, e também variação na coloração das manchas após a revelação com anisaldeído.

Figura 14: CCDC dos extratos obtidos do crescimento do endófito *Phoma* sp. nos meios de cultivo líquidos com e sem modificador epigenético (A) fase normal e (B) fase reversa.



Esses resultados evidenciam que o modificador epigenético SAHA empregado no cultivo exerceu uma alteração na produção metabólica do fungo quando este foi crescido no meio líquido de PDB. Para comprovar essa alteração realizou-se a análise química por HPLC-DAD analítico.

4.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

Os extratos brutos AcOEt do endófito isolado de uma espécie vegetal do Deserto de Sonora foram submetidos a uma avaliação do perfil cromatográfico por HPLC-DAD em gradiente exploratório, utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C18.

O perfil por HPLC-DAD do extrato bruto AcOEt obtido do cultivo na presença de 500 μ M de SAHA, mostrou o aparecimento de novos picos entre os tempos de retenção de 20 a 40 minutos, além do aumento da produção de alguns destes, indicando a presença de novas substâncias produzidos apenas na adição do modificador epigenético, confirmando que este influencia a produção metabólica.

Nas Figuras 15 a 18 estão ilustrados os cromatogramas em $\lambda = 254$ nm e 280 nm dos extratos brutos AcOEt obtidos nos meios de cultivo líquido com e sem adição do modificador epigenético do fungo isolado de uma espécie vegetal do Deserto de Sonora.

Figura 15: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB sem a adição do modificador epigenético SAHA em 250 nm.

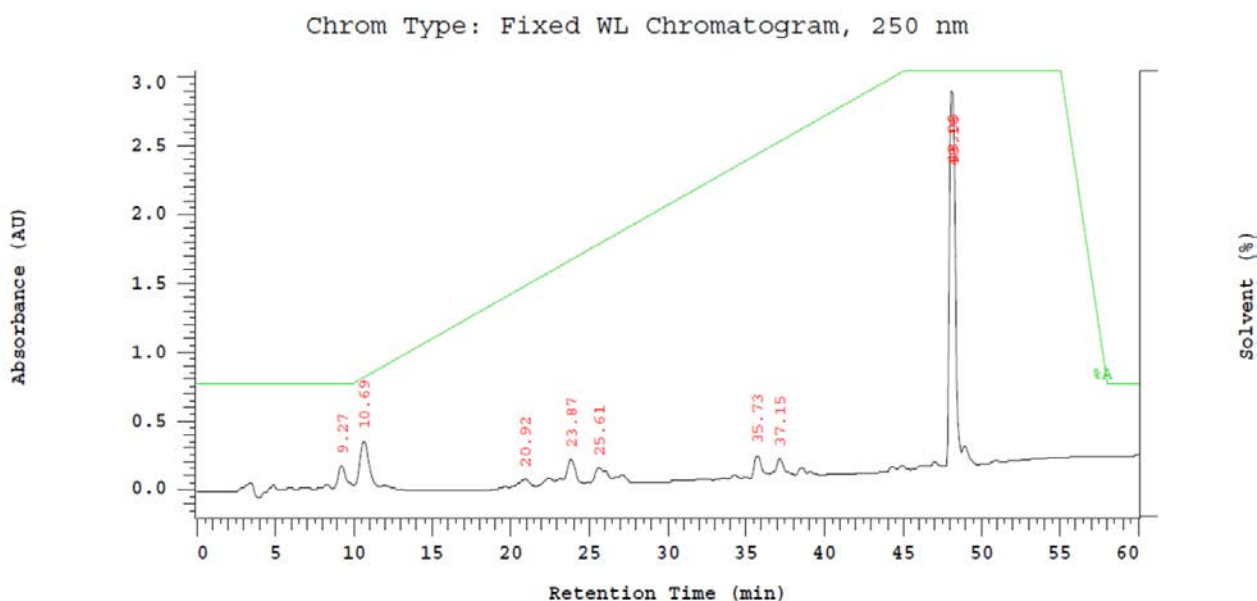


Figura 16: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB com a adição do modificador epigenético SAHA em 250 nm.

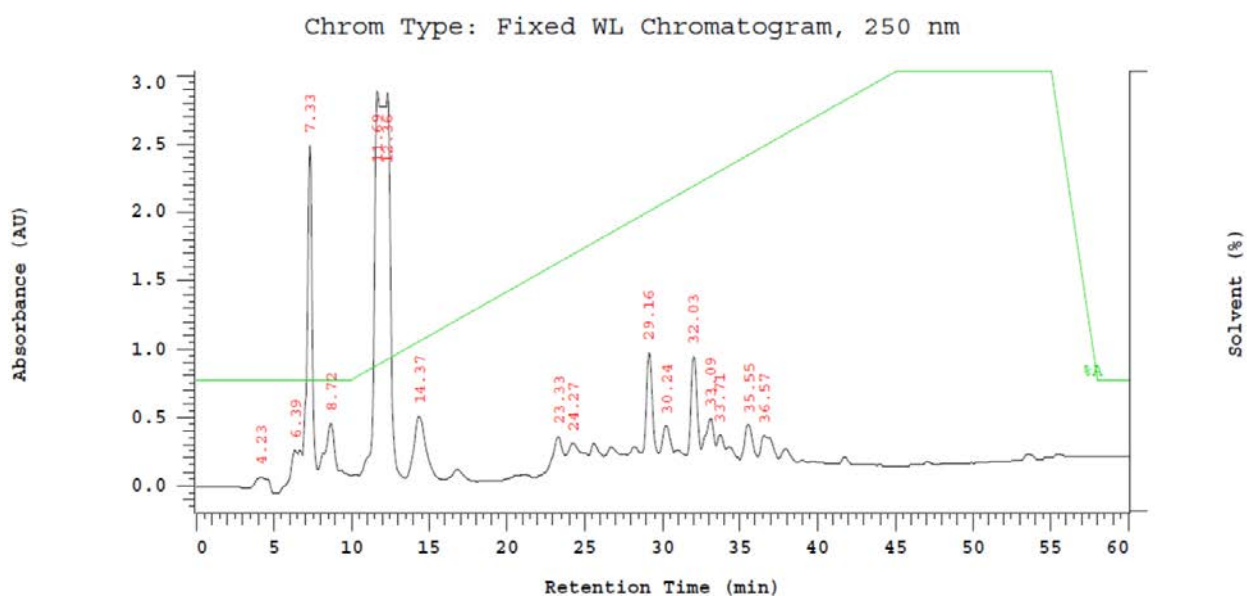


Figura 17: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB sem a adição do modificador epigenético SAHA em 280 nm.

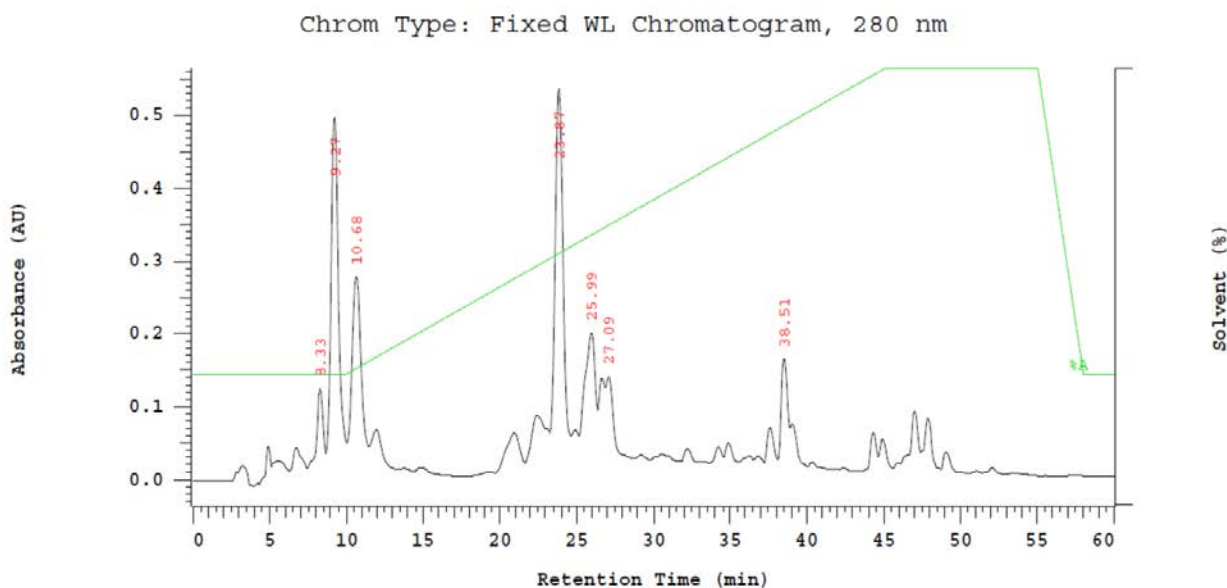
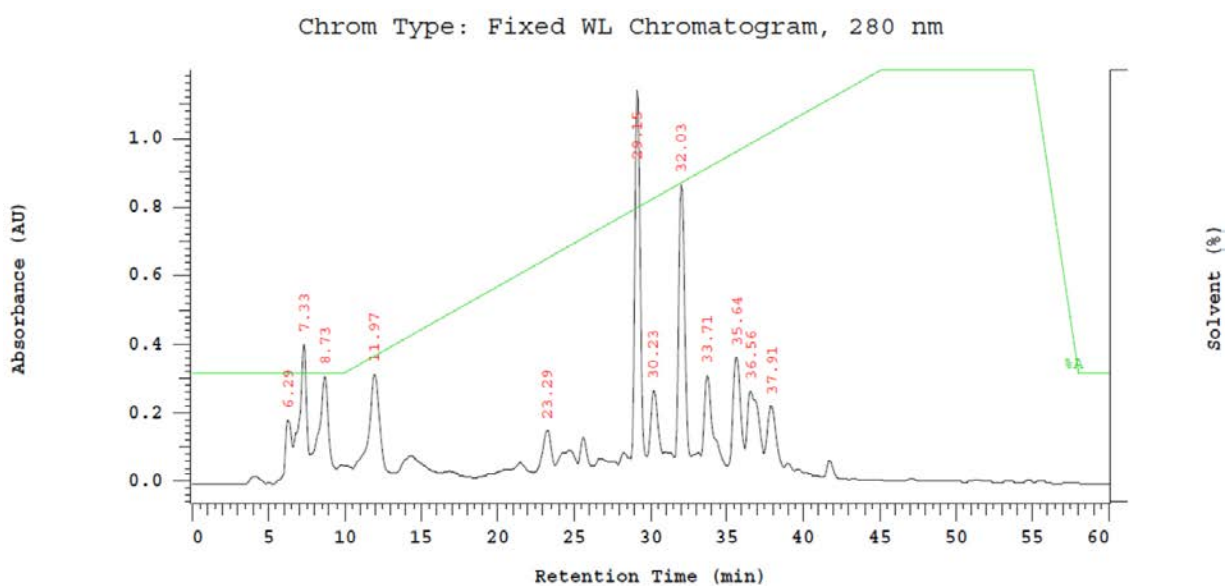


Figura 18: Cromatograma do extrato AcOEt em PDB com a adição do modificador epigenético SAHA em 280 nm.



Após o resultado obtido das análises químicas, o micro-organismo *Phoma* sp. foi cultivado em escala ampliada com e sem a adição do modificador epigenético (SAHA), afim de isolar os metabólitos produzidos por este micro-organismo e, comparar se a produção metabólica foi modificada ou não com a utilização do modificador epigenético.

CAPITULO 5

CAPITULO 5

5.0 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Camarops* sp.

5.1 INTRODUÇÃO

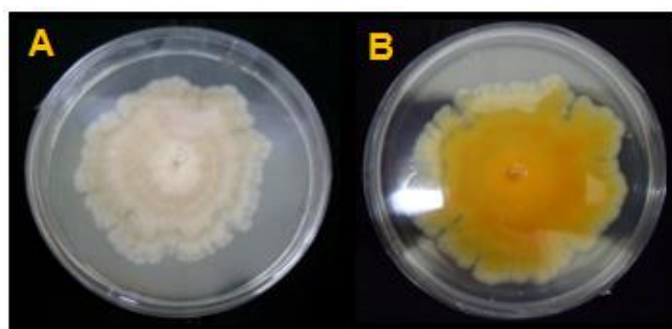
5.1.1 Endófito em Estudo: *Camarops* sp.

Fungo endofítico pertencente à classe *Sordariomycetes*, a ordem *Boliniales* e, a família *Boliniaceae*. É considerado um fungo que habita madeira e, são encontrados em regiões de clima temperado e tropical⁶⁷.

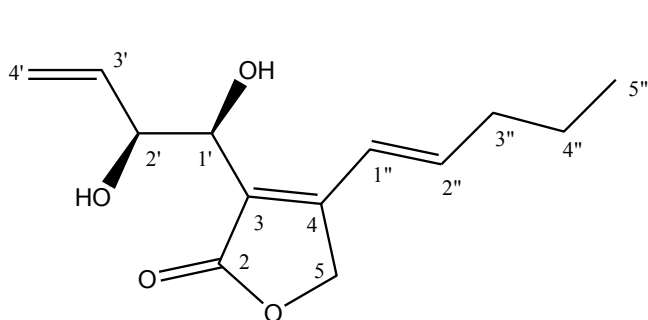
A cultura de *Camarops* sp. forma micélio abundante, na superfície, de coloração branca e, o reverso da colônia torna-se laranja acastanhado após o envelhecimento (**Figura 19**). O gênero *Camarops* é caracterizado por apresentar ascósporos marrons, uniformes e pequenos, hifas de parede fina e estruturas reprodutivas não assexuadas⁶⁷.

Os estudos descritos para este endófito são os realizados por nosso grupo de pesquisa e indicam-no com enorme potencial biológico como, inibidores da enzima acetilcolinesterase, das enzimas pepsina e subtilisina e considerável potencial citotóxico frente a três células cancerígenas^{67, 79}.

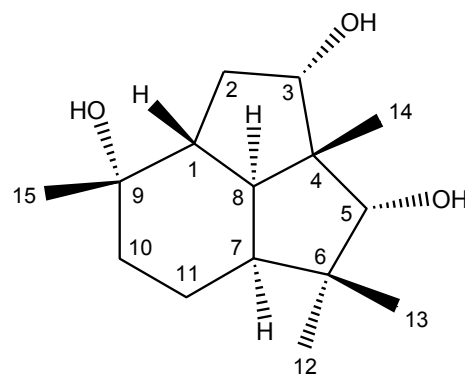
Figura 19: *Camarops* sp. (A) Superfície e, (B) Parte inferior do endófito.



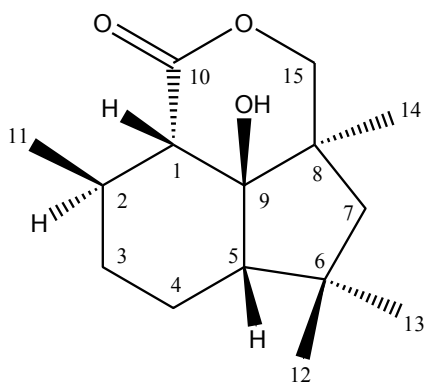
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO ENDÓFITO *Camarops* sp.



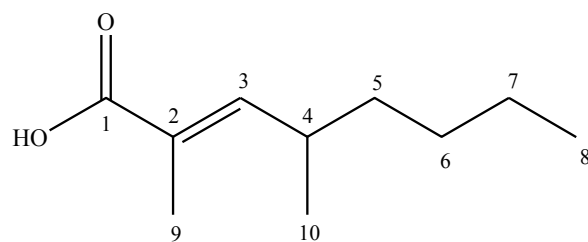
1 - 3-((1S,2S)-1,2-dihidroxi-but-3-enil)-4-((E)-pent-1-enil)furan-2(5H)-one



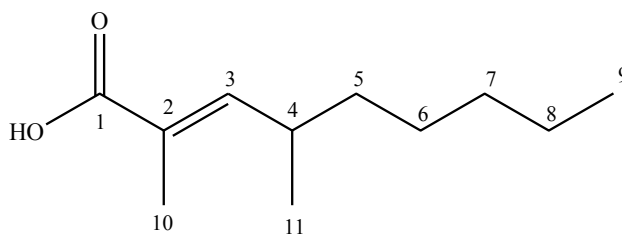
2 - 3,5,9-trihidroxi presilfiperfolano



3 - Deacetilbotridial



4 - Ácido 2,4-dimetilocta-2-enóico



5 - Ácido 2,4-dimetilnon-2-enóico

5.2 METODOLOGIA

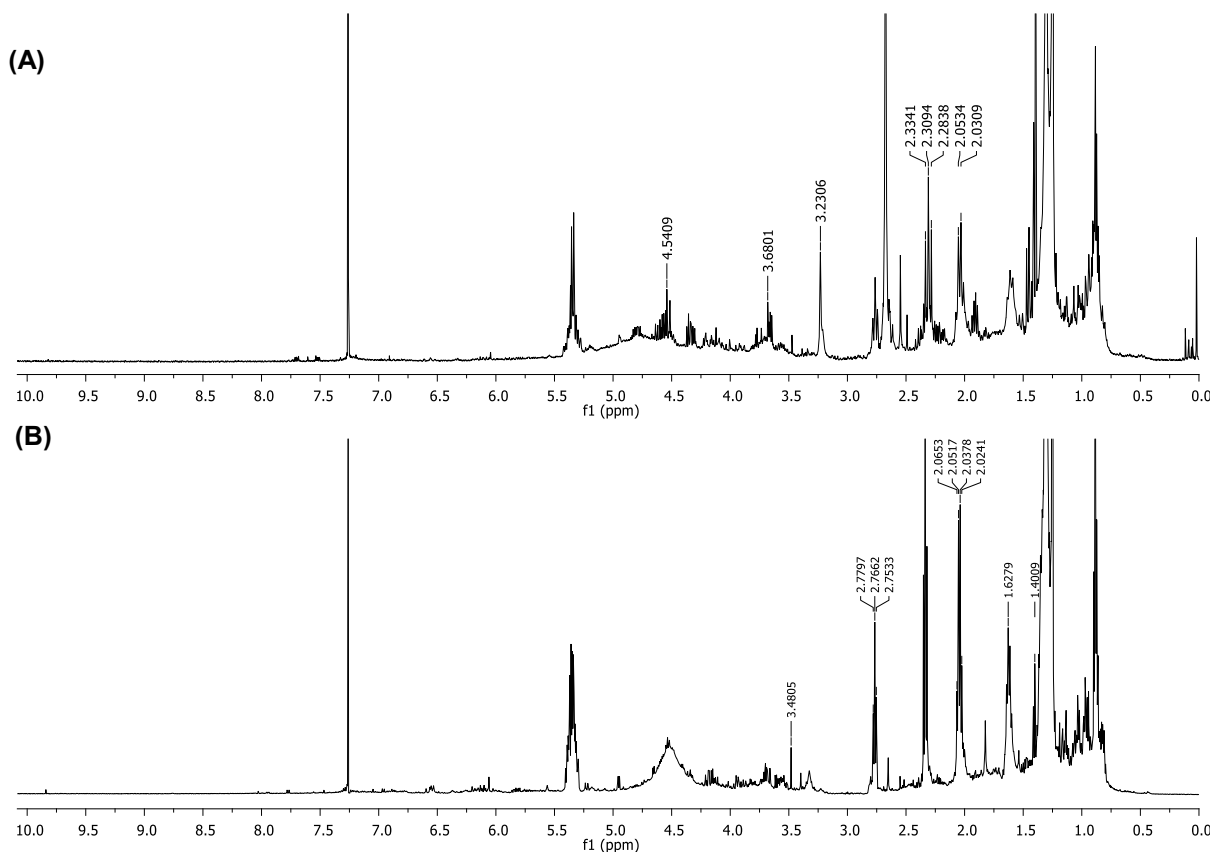
5.2.1 Cultivo de *Camarops* sp. em escala ampliada

Toda discussão apresentada até o momento, nos conduziu à seleção do meio sólido de Milho para o cultivo em escala ampliada do endófito *Camarops* sp.

Considerando o perfil químico, cromatográfico e as atividades anticancerígena, antifúngica e anticolinesterásica apresentadas pelo extrato CH₃CN, em escala reduzida em Milho, este foi cultivado em escala ampliada para o isolamento das substâncias potencialmente bioativas, conforme metodologia descrita no **Fluxograma 3**.

O extrato bruto obtido foi submetido à análise por RMN de ¹H (**Figura 20**) e HPLC-DAD em gradiente exploratório (Item 3.5.2.3, pág. 67), e mostrou perfil químico muito semelhante ao extrato cultivado em pequena escala, evidenciando apenas diferenças na intensidade de alguns sinais.

Figura 20: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do extrato CH₃CN em Milho (A) Escala Ampliada e, (B) Escala Reduzida.



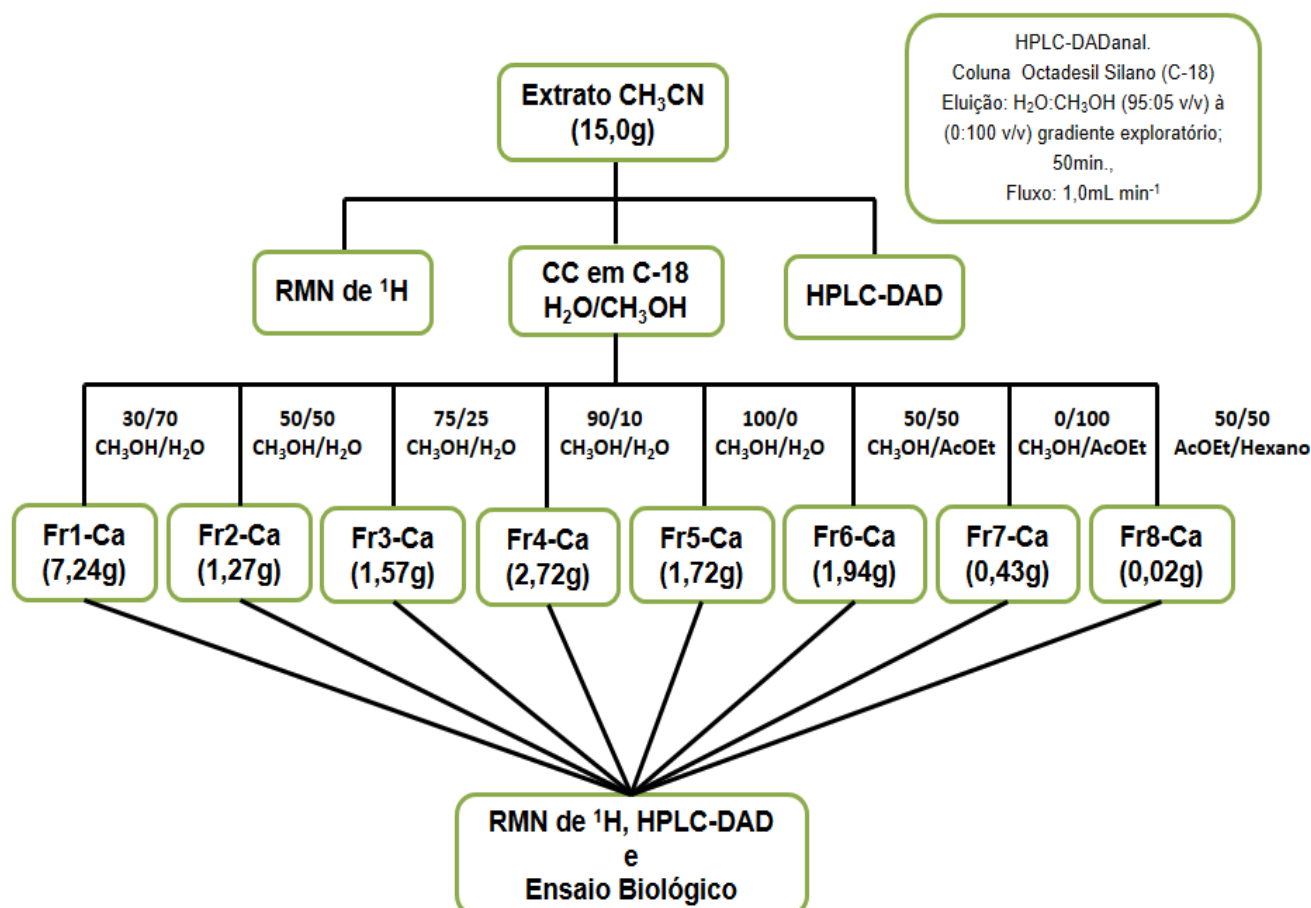
Estes resultados mostraram que a produção metabólica foi reprodutiva quando este endófito foi crescido em escala ampliada e o extrato bruto obtido comparado com o extrato obtido em escala reduzida.

5.2.2 Fracionamento do extrato CH₃CN em milho de *Camarops* sp. obtido em escala ampliada

Após obtenção do extrato CH₃CN, este foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão, onde foram obtidas oito frações como visualizado no **Fluxograma 4**, de 1,6 L cada (Fr1-Ca a Fr8-Ca).

O perfil químico destas frações foi avaliado por HPLC-DAD e RMN de ¹H. As massas obtidas destas frações, aliadas à resolução por CCDC, aos espectros de RMN de ¹H e aos resultados dos ensaios biológicos, conduziram a seleção das frações Fr2-Ca, Fr3-Ca e Fr4-Ca para o estudo químico.

Fluxograma 4: Fluxograma do fracionamento do extrato CH₃CN, em milho, de *Camarops* sp.

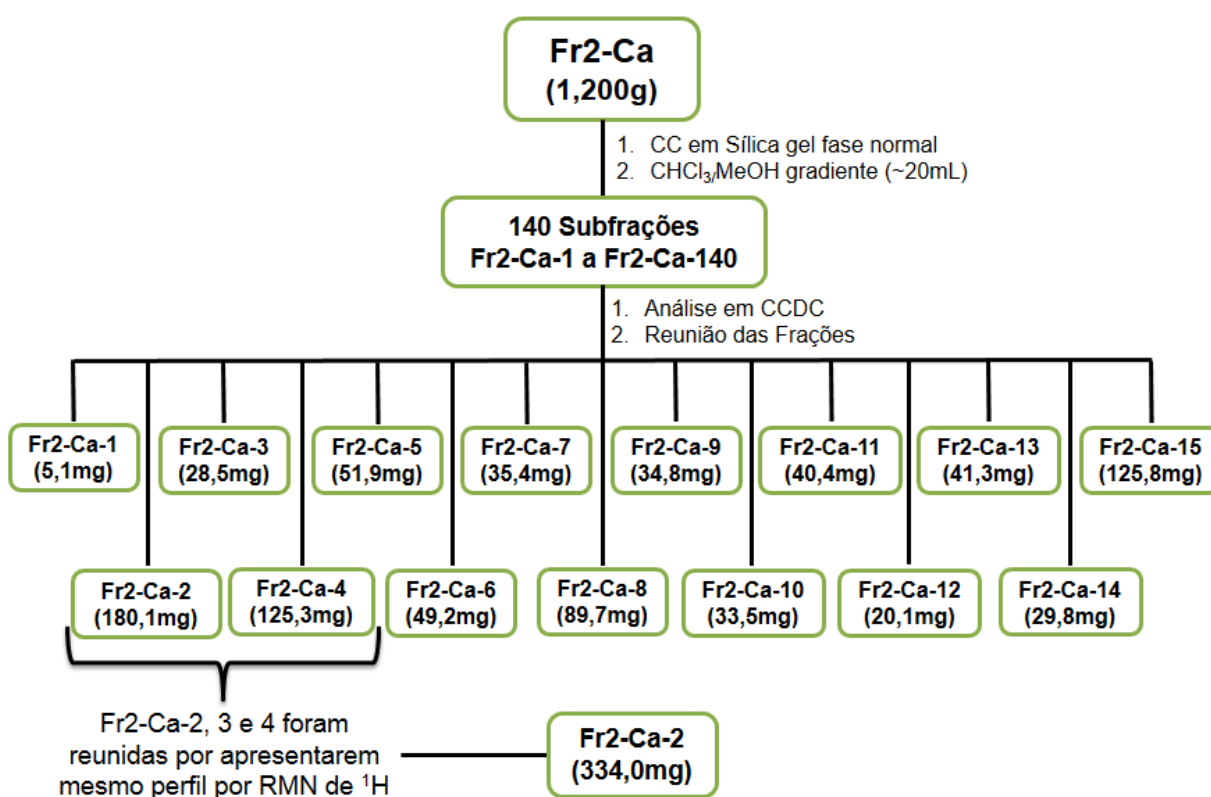


5.2.3 Purificação da Fração Fr2-Ca

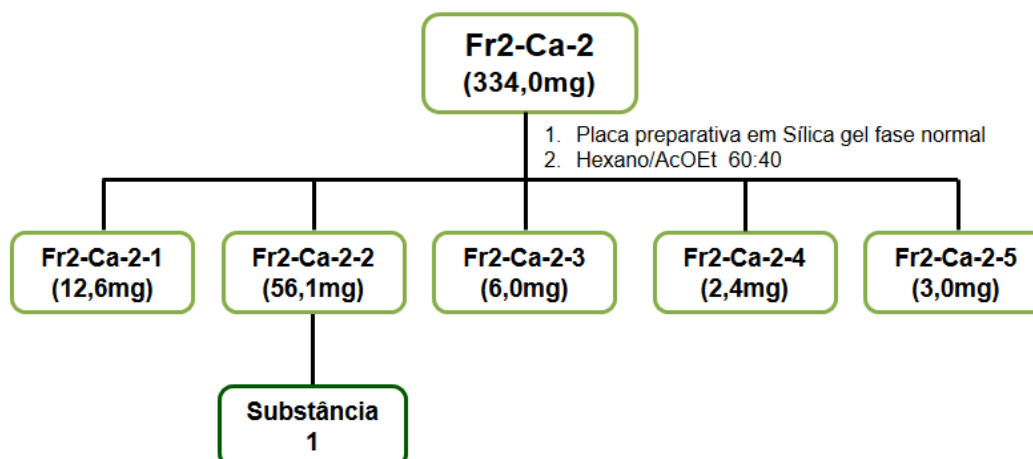
Após análise dos resultados químicos e biológicos das frações oriundas do extrato em Milho obtido do endófito *Camarops* sp., a fração Fr2-Ca apresentou uma massa considerável, boa resolução por CCDC e, inibição da enzima acetilcolinesterase o que possibilitou a seleção desta para fracionamento por coluna cromatográfica como mostrado nos **Fluxogramas 5 e 6**.

A subfração Fr2-Ca-2-2 forneceu a substância **1**.

Fluxograma 5: Fluxograma de purificação da fração Fr2-Ca.



Fluxograma 6: Fluxograma de purificação da fração Fr2-Ca por CCDC.

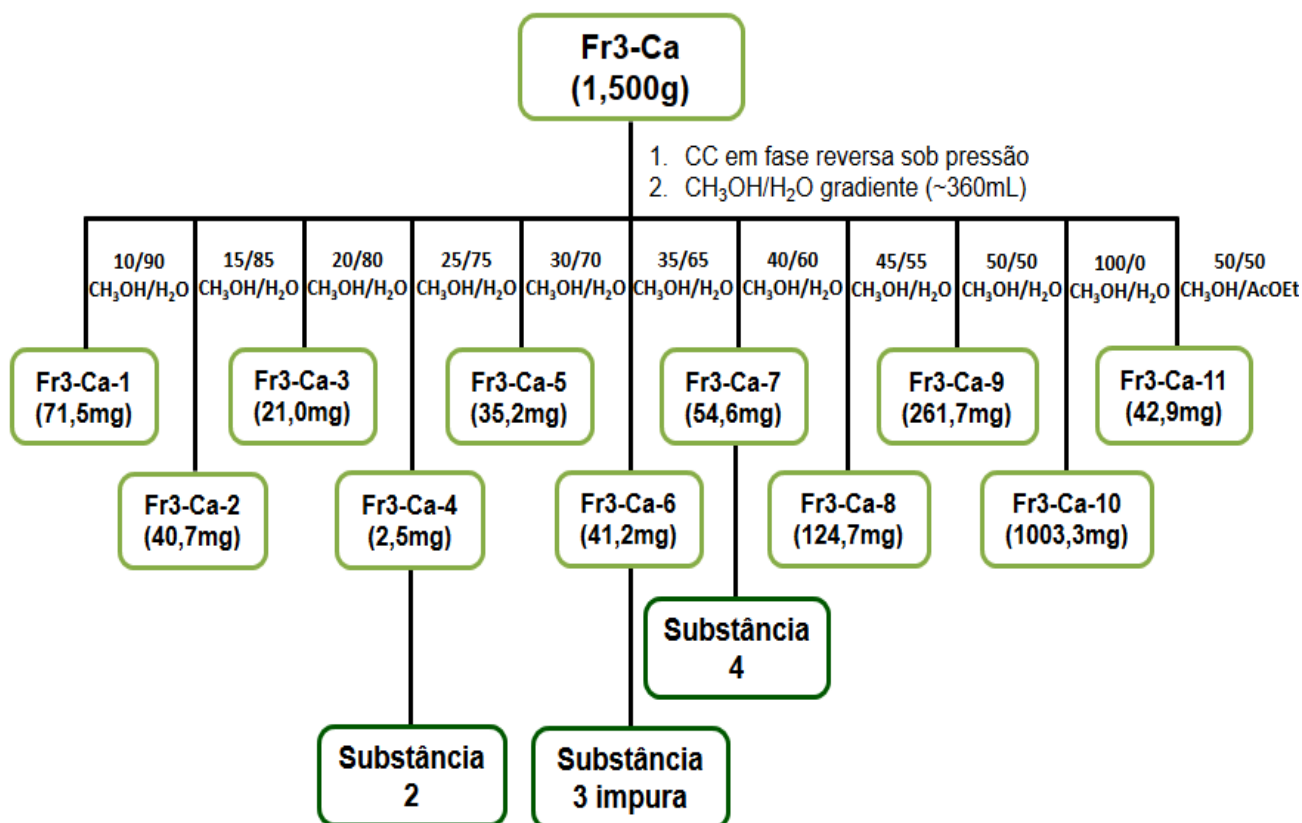


5.2.4 Purificação da Fração Fr3-Ca

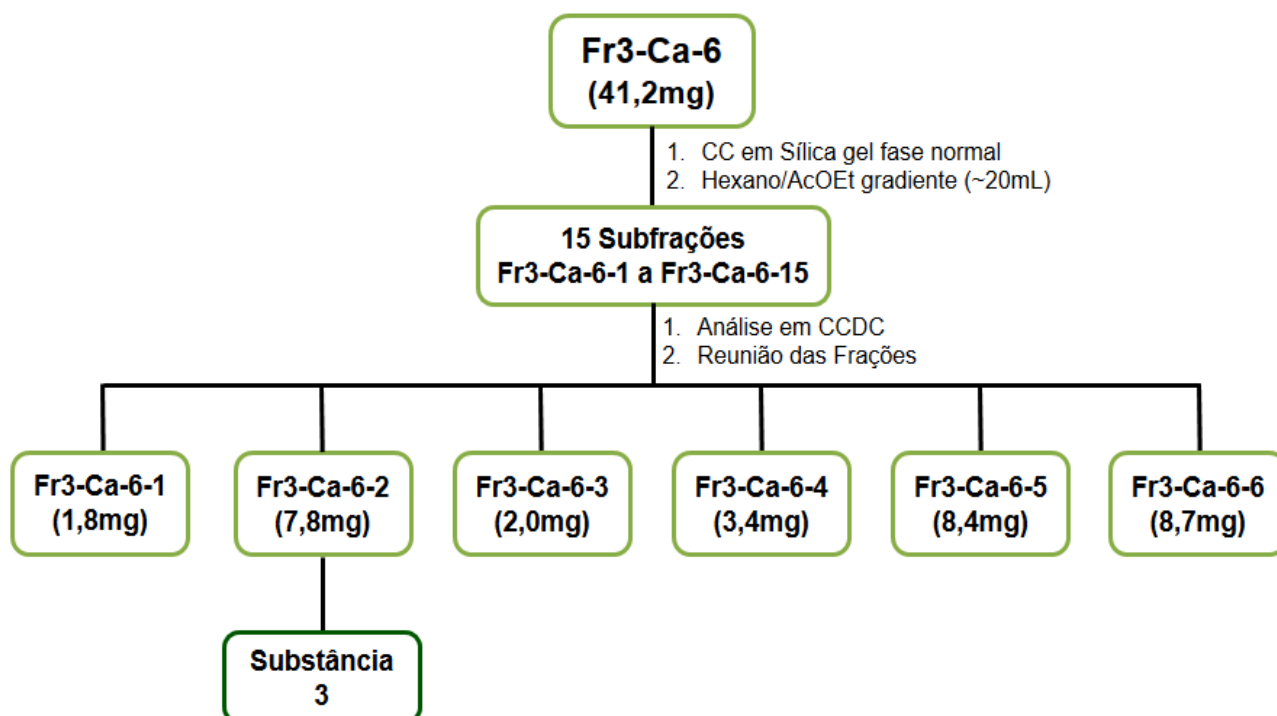
A fração Fr3-Ca apresentou massa considerável, boa resolução por CCDC e, inibição da enzima acetilcolinesterase, o que possibilitou a seleção desta para separação e purificação da mesma por cromatografia em coluna sob pressão como visualizado nos **Fluxogramas 7 e 8**.

Após análise por RMN de ^1H e ^{13}C a subfração Fr3-Ca-4 forneceu a substância **2**, a subfração Fr3-Ca-7 a substância **4** e, a subfração Fr3-Ca-6-3 forneceu a substância **3**.

Fluxograma 7: Fluxograma de purificação da fração Fr3-Ca.



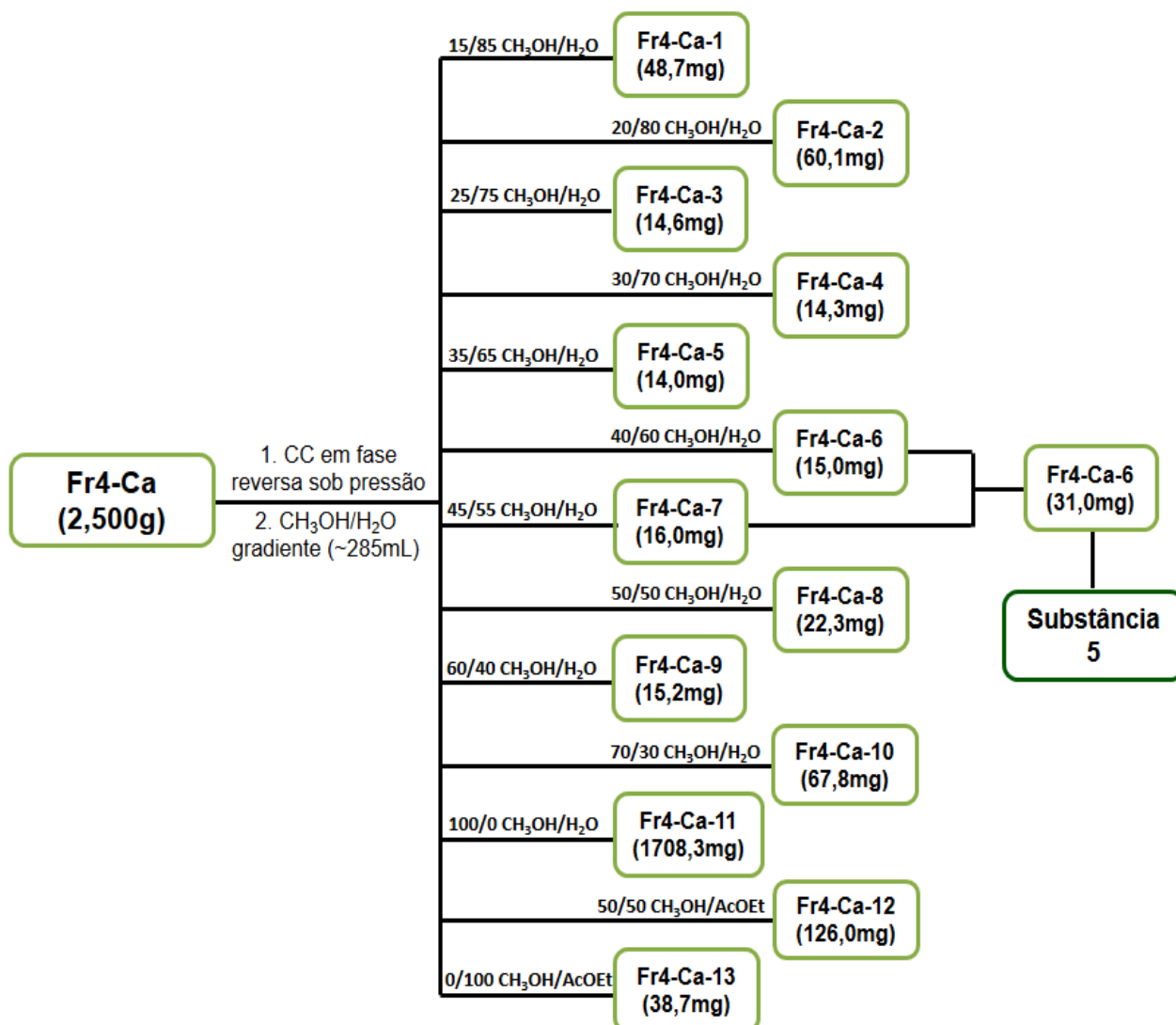
Fluxograma 8: Fluxograma de fracionamento da fração Fr3-Ca-6.



5.2.5 Purificação da Fração Fr4-Ca

A fração Fr4-Ca apresentou uma massa considerável, boa resolução por CCDC e, inibição da enzima acetilcolinesterase, o que possibilitou a seleção desta para separação por CC como visualizado no **Fluxograma 9**.

As subfrações Fr4-Ca-6 e Fr4-Ca-7 foram reunidas por apresentarem perfil idêntico por análise dos espectros de RMN de ^1H e forneceu a substância **5**.

Fluxograma 9: Fluxograma de purificação da fração Fr4-Ca.

5.2.6 Esterificação de Mosher

O ácido 2,5-dihidro-2-(1-hidroxialil)-4-((E)-pent-1-enil) furano-3-carboxílico foi esterificado com ácido (*R*) e (*S*) α -metoxifenilacético (MPA). Resumidamente, a solução do furano (1 equiv) em presença de cloridrato de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida (EDC) (1 equiv para cada hidroxila) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) catalítico em diclorometano seco sob atmosfera de N_2 foi adicionada uma solução de MPA (1 equiv para cada hidroxila) diclorometano seco. A mistura foi mantida sob agitação por 3-8 horas. A seguir, a fase orgânica foi lavada com uma solução de HCl (1 M), água, $NaHCO_3$ (sat) e água, então seca com Na_2SO_4 e concentrada a vácuo em rota evaporador⁸⁰. O composto foi caracterizado por RMN (1D e 2D).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Avaliação da atividade biológica das frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN em Milho de *Camarops* sp.

Todas as frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN em Milho de *Camarops* sp. foram avaliadas nos ensaios citotóxico, anticolinesterásico e antifúngico.

5.3.1.1 Ensaio Citotóxico

A atividade citotóxica de todas as frações está apresentada na **Tabela 7** com seus respectivos percentuais de inibição.

Observa-se que a fração Fr4-Ca demonstrou moderado potencial citotóxico frente às linhagens tumorais testadas, no entanto, esta não é considerada potencialmente citotóxica, pois apenas frações que apresentam valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas. Assim, nenhuma fração apresentou citotoxicidade frente às linhagens tumorais testadas.

Tabela 7: Percentual de inibição do crescimento celular (IC₅₀%) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL

Amostra	SF- 295	DPM	OVCAR	DPM	HCT-116	DPM
Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
Fr1-Ca	25,821%	3%	27,368%	6%	21,358%	3%
Fr2-Ca	19,015%	10%	21,392%	1%	6,947%	16%
Fr3-Ca	44,248%	6%	53,768%	1%	42,125%	3%
Fr4-Ca	57,173%	3%	75,585%	6%	63,325%	1%
Fr5-Ca	36,175%	3%	31,505%	13%	36,600%	12%
Fr6-Ca	27,740%	3%	15,942%	2%	17,597%	0%
Fr7-Ca	27,306%	9%	22,706%	5%	13,271%	9%
Fr8-Ca	35,017%	15%	43,064%	10%	16,199%	15%

*Valores são média $\pm$ DPM (Desvio Padrão da Média)

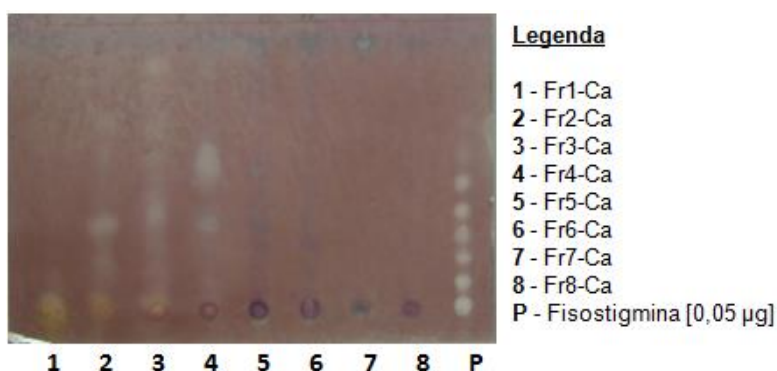
5.3.1.2 Ensaio Antifúngico

As frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN do cultivo em Milho de *Camarops* sp. não apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

5.3.1.3 Ensaio Anticolinesterásico

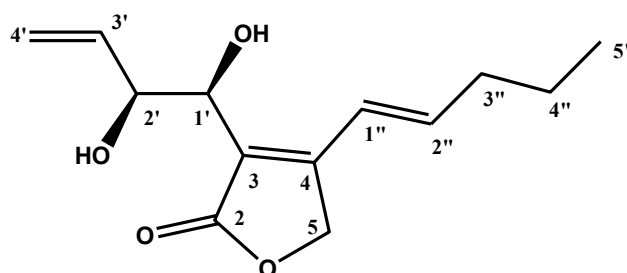
De acordo com o observado na **Figura 21** as frações Fr2-Ca, Fr3-Ca e Fr4-Ca apresentaram atividade inibitória variando de fraca a moderada da enzima acetilcolinesterase, sendo selecionadas para fracionamento e purificação dos metabólitos responsáveis pela atividade.

Figura 21: Atividade anticolinesterásica das frações obtidas do fracionamento do extrato CH₃CN do endófito *Camarops* sp.



5.3.2 Determinação estrutural da substância 1

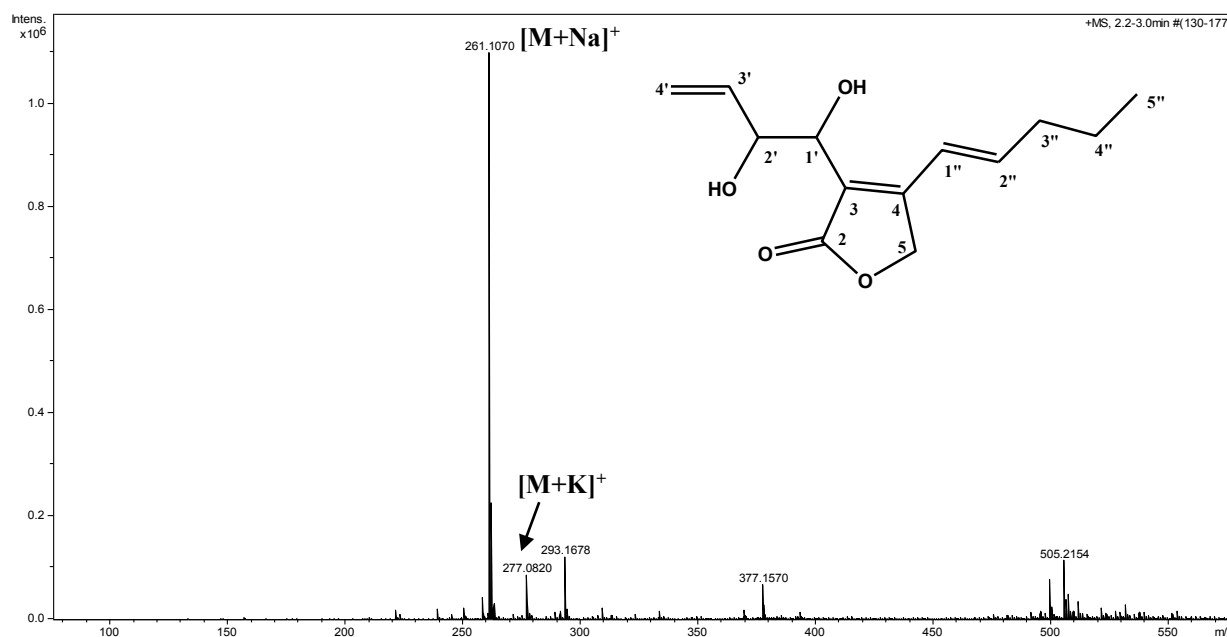
Figura 22: Estrutura da 3-((1S,2S)-1,2-dihidroxibut-3-enil)-4-((E)-pent-1-enil)furan-2(5H)-ona



A substância 1 foi isolada como um óleo de cor amarela [α]_D²³ -22,6 (c 0,1, CH₃OH) e, com 56,1 mg de massa.

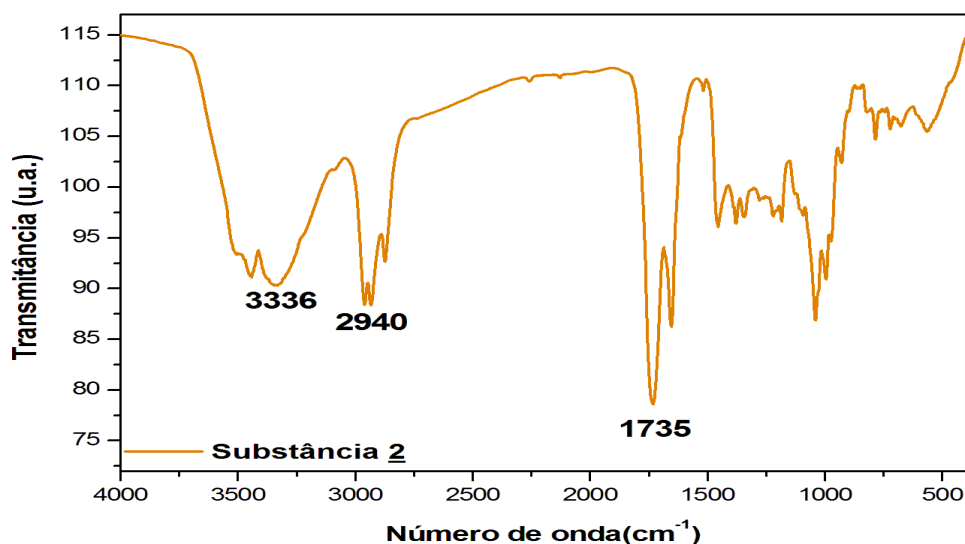
No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray*, no modo positivo (LC-MS-TOF), foi visualizado o sinal de m/z 261,1070 (Erro calculado: 13,0213 ppm) referente à formação de aduto [M-Na]⁺ (**Figura 23**), o que com auxílio dos dados de RMN de ¹H e ¹³C foi possível propor a fórmula molecular C₁₃H₁₈O₄.

Figura 23: Espectro de massas de alta resolução da substância **1**



O espectro de IV (**Figura 24**) exibiu uma banda intensa e larga em 3336 cm^{-1} característico de hidroxila, uma banda associada a $C=O$ conjugada em 1735 cm^{-1} e uma banda em 2940 cm^{-1} característico de $C-H\text{ sp}^3$.

Figura 24: Espectro de infravermelho da substância **1**



Pelos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (**Figuras 25 e 26**) foi possível observar a presença de 13 átomos de carbono, consistentes com seis olefínicos (dois quaternários, três metínicos e um metilênico), três metilênicos (um vinílico, um oxivinílico e um alílico), dois metínicos (um oxivinílico e um oxialílico), uma metila e um carbono atribuído a uma carbonila de lactona.

Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância **1**

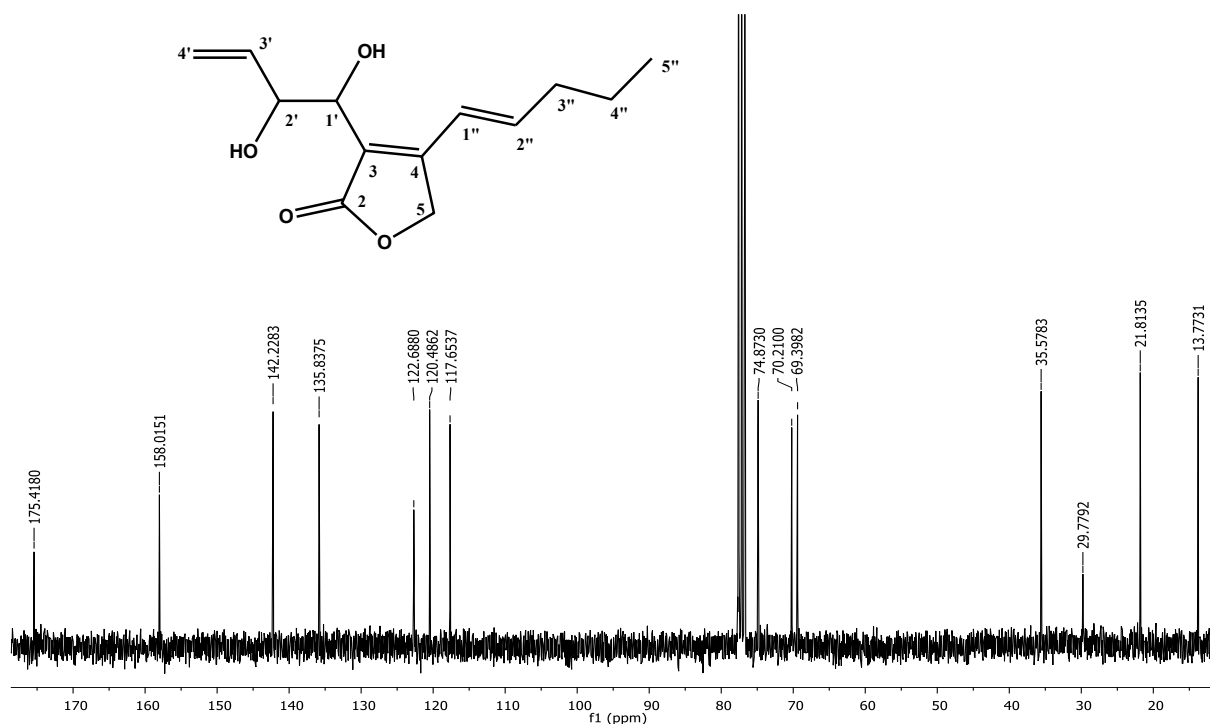
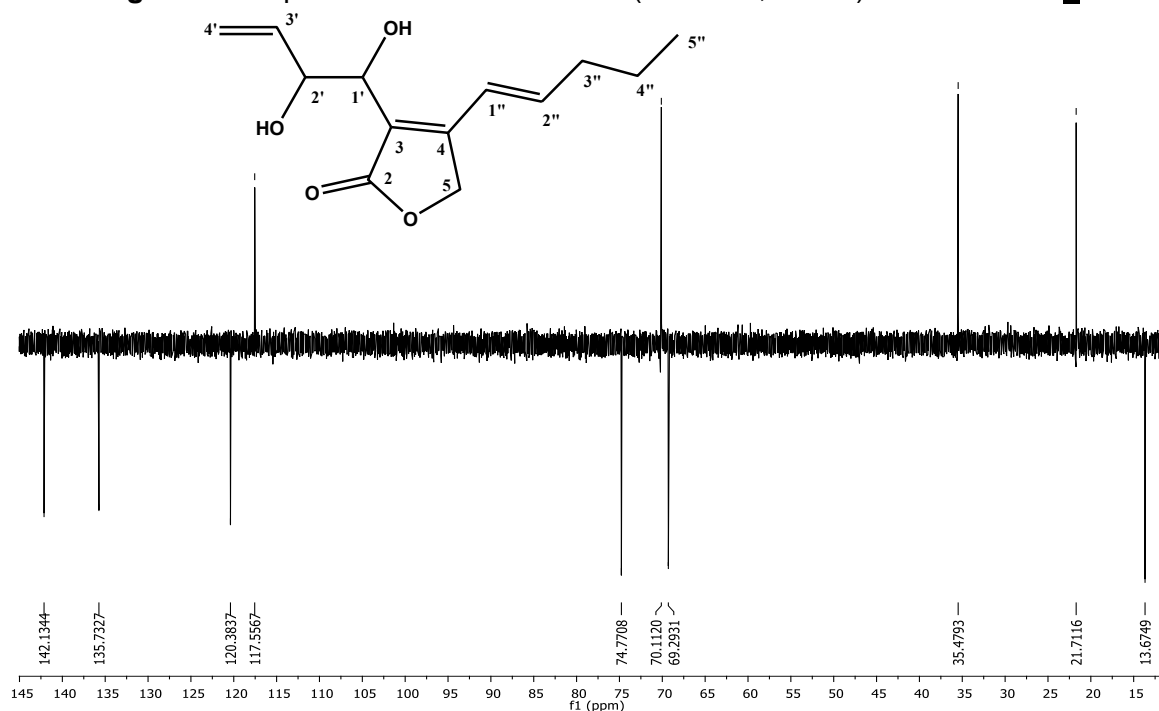


Figura 26: Espectro de RMN DEPT 135 (600 MHz, CDCl_3) da substância **1**.



Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos HSQC e RMN de ^1H (Figuras 27 e 28).

Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

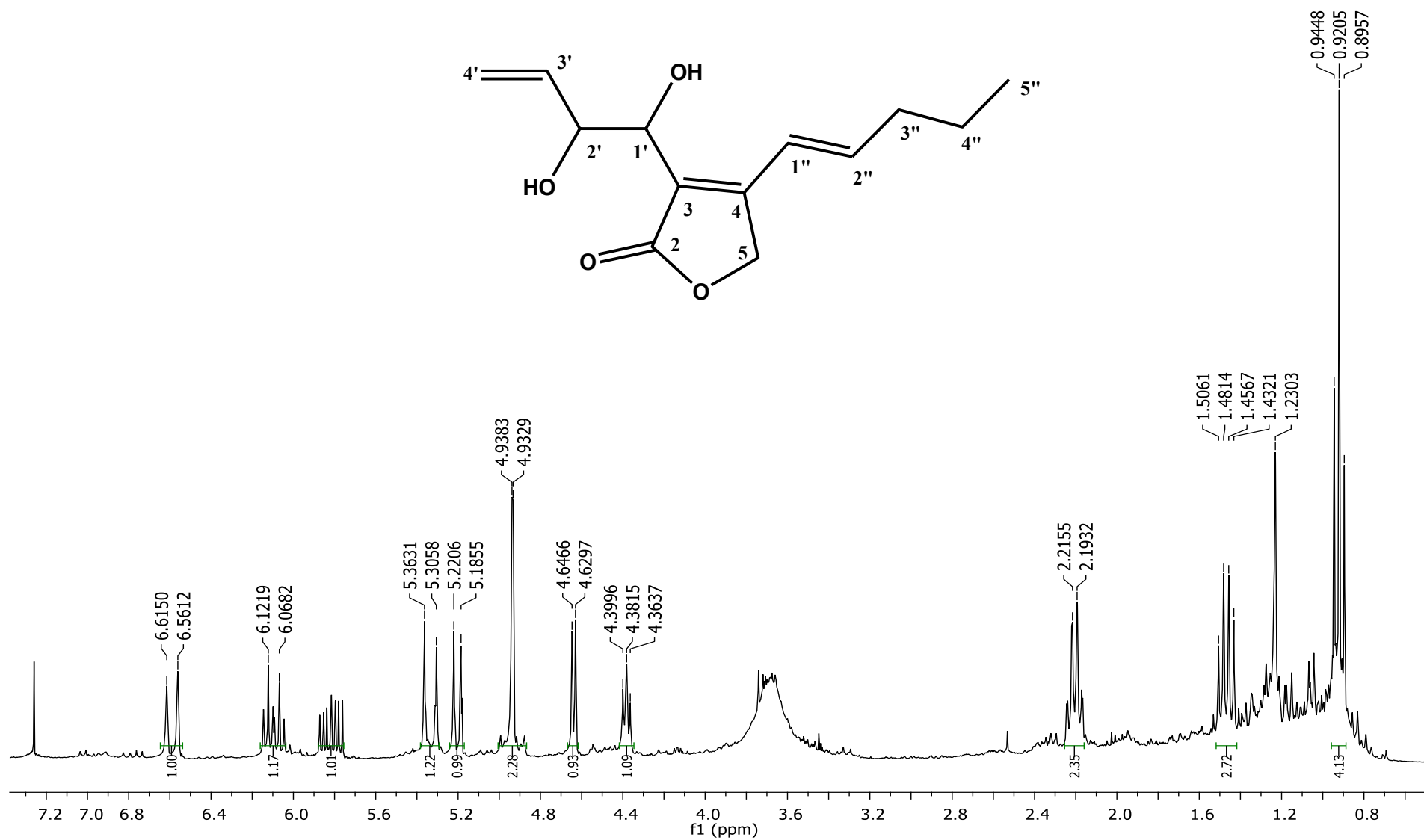
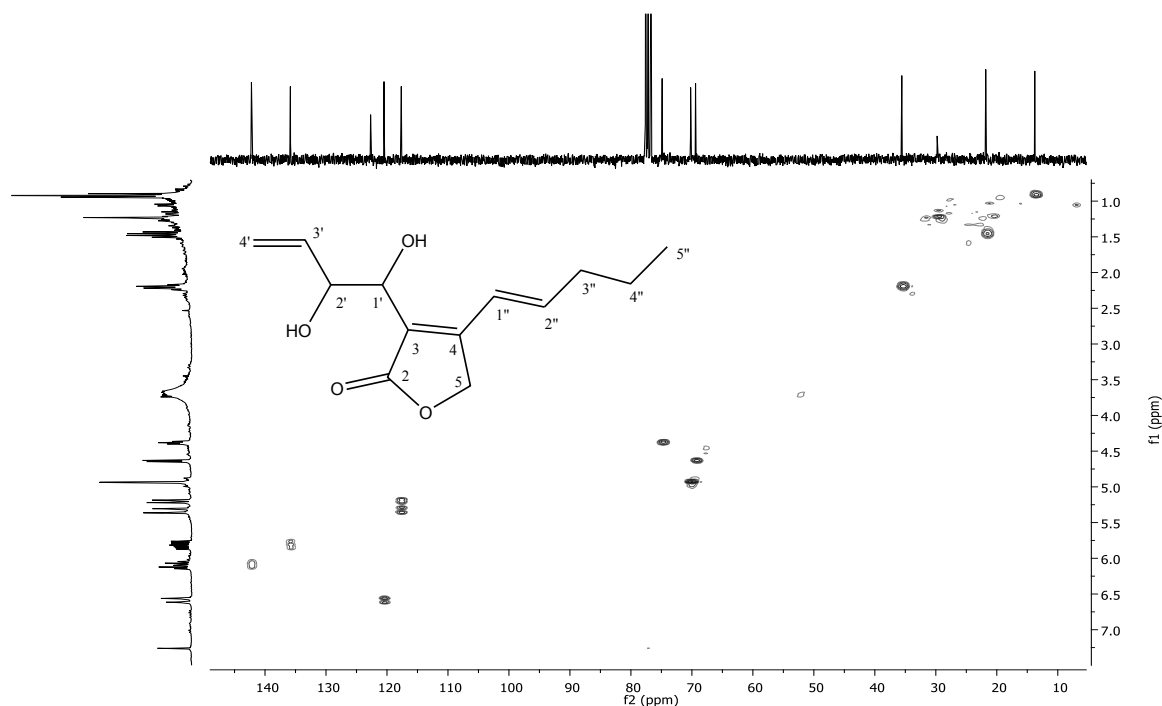
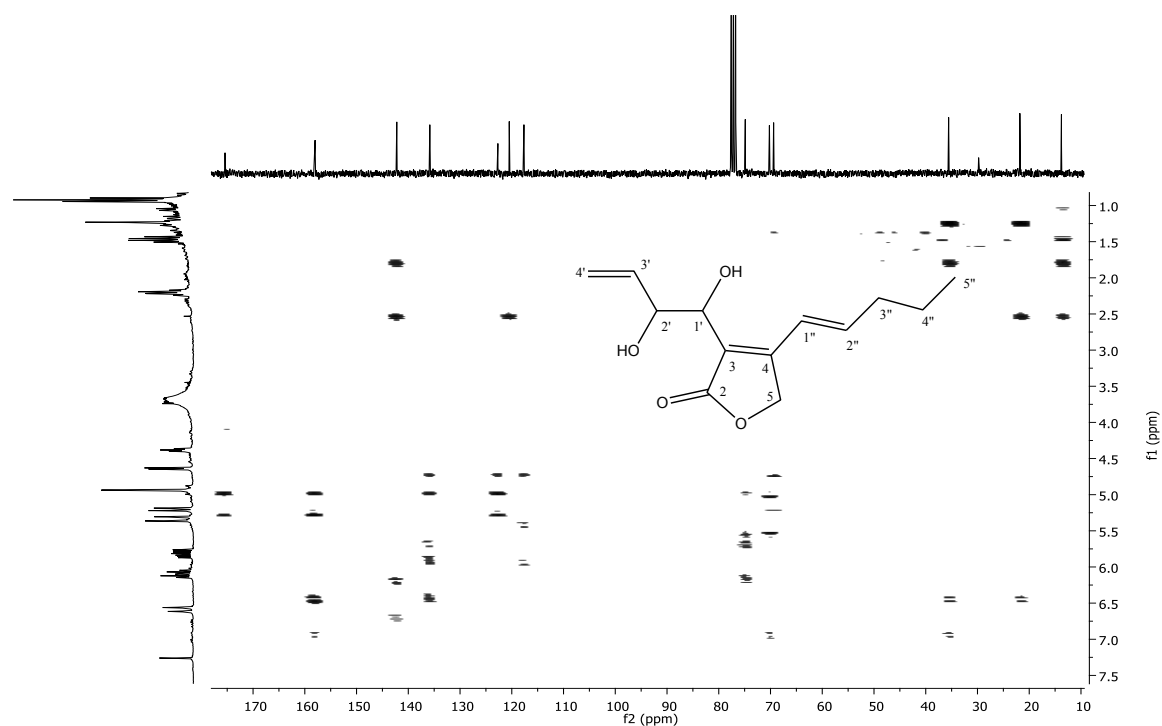


Figura 28: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância **1**



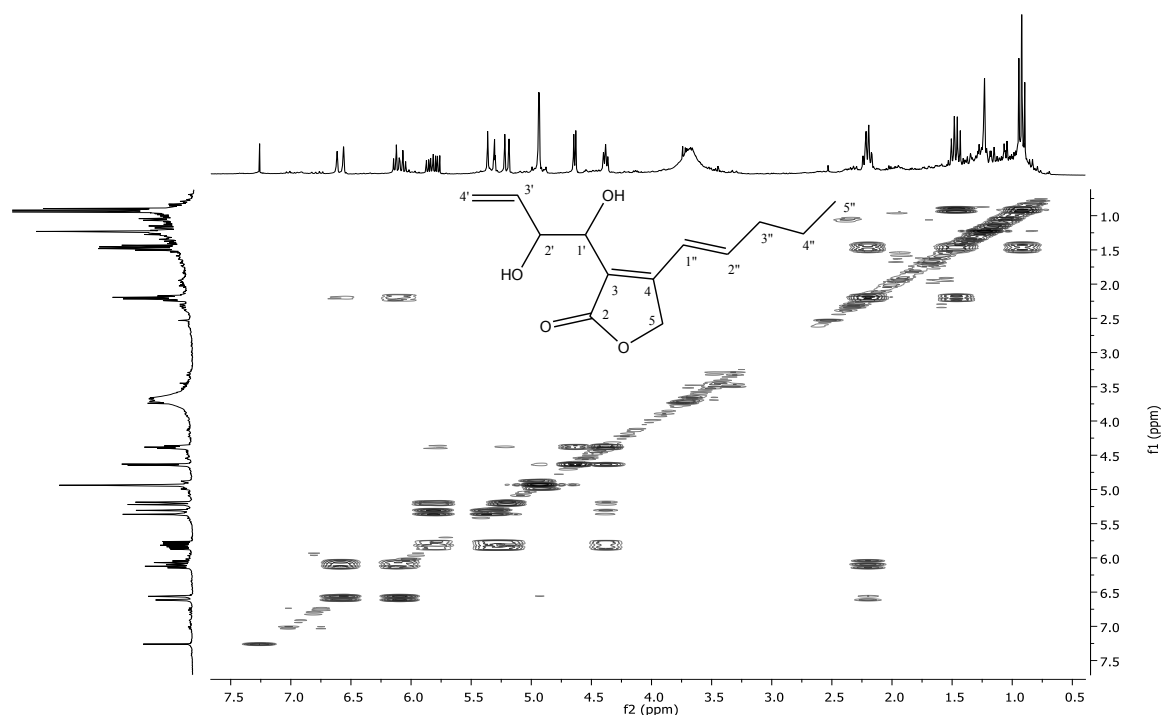
Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 29**), foi possível sugerir um anel característico de lactona para a substância **1**.

Figura 29: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância **1**



Na interpretação cuidadosa e detalhada do experimento COSY (**Figura 30**) foi possível definir dois sistemas contíguos e independentes de spins. No primeiro caso as interações visualizadas entre $H-5'' \leftrightarrow H-4'' \leftrightarrow H-3'' \leftrightarrow H-2'' \leftrightarrow H-1''$ permitiram estabelecer um substituinte 1-pentenila, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (**subunidade A**). A configuração *trans* da ligação dupla foi estabelecida pelo valor da constante de acoplamento de 16,0 Hz entre $H-1''$ (δ_H 6,59, d) e $H-2''$ (δ_H 6,09, dt).

Figura 30: Espectro de COSY (600 MHz, CDCl_3) da substância **1**



No segundo caso, as interações dos spins $^1\text{H}-^1\text{H}$ entre $H-1' \leftrightarrow H-2' \leftrightarrow H-3' \leftrightarrow H-4'$ conduziu a subunidade but-3'-ene-1',2'-diol, $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})-$ (**subunidade B**).

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

Análise do mapa de contorno do experimento HMBC foi decisivo na determinação estrutural desta substância, fornecendo subsídio para posicionar os substituintes no anel lactônico. A subunidade **A** foi conectada em C-4, devido às correlações a longa distância observada entre $H-1'' \leftrightarrow \text{C-4/C-5}$, assim como de H-

2''↔C-4. A análise dos espectros de NOESY confirmou a posição da subunidade **A** em C-4, devido à interação espacial observada entre H-1'' e H-1'.

A subunidade **B** foi posicionada em C-3 devido às correlações a longa distância observada no experimento HMBC entre H-1'↔C-2/C-3/C-4 e H-2'↔C-3. As demais correlações observadas no experimento de HMBC podem ser visualizadas na **Figura 31**. Os deslocamentos químicos para a substância **1** encontram-se na **Tabela 8**.

Essas análises nos permitiram determinar a substância **1** como 3-((1S,2S)-1,2-dihidroxibut-3-enil)-4-((*E*)-pent-1-enil)furan-2(5*H*)-ona e, inédita na literatura. Substâncias dessa classe conhecidas como 2(5*H*)-furanona ou pestalofuranonas apresentam inúmeras atividades biológicas tais como: atividade citotóxica, antibiótica, antifúngica e inibidora da replicação do HIV-1 em células C8166⁸¹⁻⁸⁴.

Figura 31: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹H-¹H COSY (—)

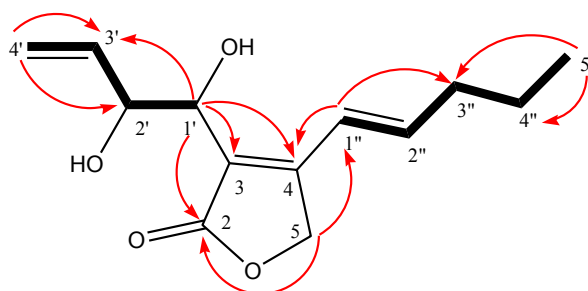


Tabela 8: Dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância **1** (600 MHz, CDCl₃^a)

Posição	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	HMBC
2	-	175,4; C	-
3	-	122,7; C	-
4	-	158,0; C	-
5	4,97 (d; 16,2) 4,91 (d; 16,2)	70,2; CH ₂	C-2; C-4; C-1'
1'	4,64 (d; 5,0)	69,3; CH	C-2; C-3; C-4; C-5; C-3'
2'	4,38 (ddt; 5,5; 5,5; 1,5)	74,9; CH	C-3; C-1'; C-3'; C-4'
3'	5,82 (ddd; 17,0; 10,5; 6,0)	135,8; CH	C-2'
4'	5,33 (ddd; 17,0; 3,0; 1,5) 5,20 (ddd; 10,5; 3,0; 1,5)	117,6; CH ₂	C-2'; C-3' C-4; C-5; C-12
1''	6,59 (d; 16,0)	120,4; CH	C-4; C-2''; C-3''
2''	6,09 (dt; 16,0; 7,0)	142,2; CH	C-4
3''	2,20 (ddd; 14,5; 7,5; 1,5)	35,6; CH ₂	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''
4''	1,47 (dt; 7,5)	21,8; CH ₂	C-2''; C-3''; C-5''
5''	0,92 (t; 7,5)	13,8; CH ₃	C-3''; C-4''

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

5.3.2.1 Determinação da configuração absoluta de C-7 da substância 1

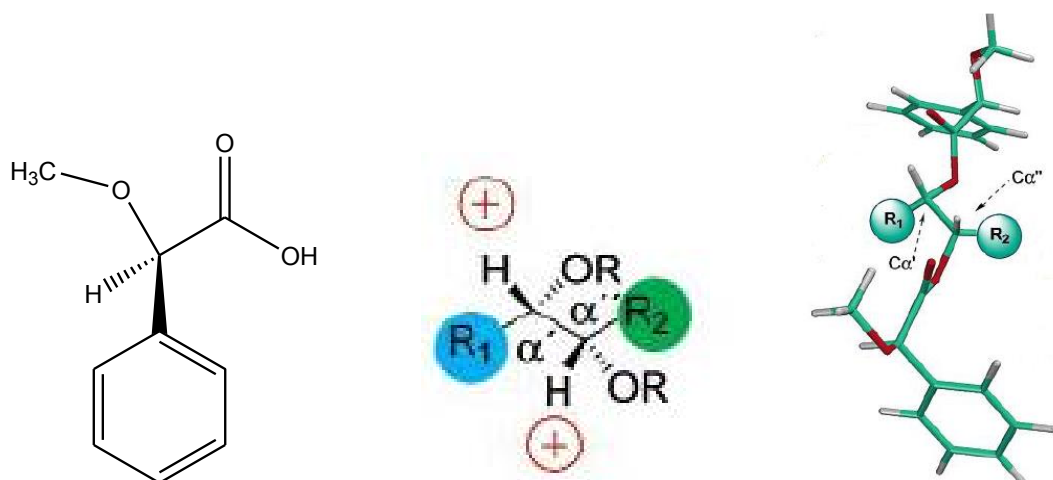
O método de Mosher utiliza reagentes de derivatização quiral e posterior análise por RMN de ^1H . O interesse despertado por este método baseia-se tanto na possibilidade de trabalhar com amostras em pequenas quantidades, quanto devido a sua simplicidade. Entretanto, este método requer a presença de grupos funcionais específicos, tais como $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$, necessários para ligar o substrato ao reagente, mostrando-se útil apenas para álcoois primários e secundários, aminas primárias e secundárias e para ácidos carboxílicos^{85, 86}.

O método é baseado na dupla derivatização ou na simples derivatização. A dupla derivatização consiste na esterificação do álcool de configuração absoluta desconhecida com os dois enantiômeros (*R*) e (*S*) do reagente auxiliar quiral, enquanto que a simples derivatização consiste na esterificação do álcool com apenas um dos enantiômeros do reagente auxiliar, (*R*) ou (*S*). Nos dois métodos, são registrados os espectros dos dois diastereoisômeros resultantes da reação e comparados, sendo realizada a medida da diferença dos deslocamentos químicos $\Delta\delta^{\text{R, S}}$. A determinação da configuração *R/S* no centro quiral do álcool é feita através da correlação entre esse centro e o centro quiral do reagente auxiliar que é de configuração absoluta conhecida, de acordo com o efeito de proteção e/ou desproteção que o grupo aromático do reagente auxiliar produzirá nos hidrogênios dos substituintes L1 e L2 do álcool⁸⁶.

O reagente MPA (ácido α -metoxi-fenil acético) foi introduzido por Raban e Mislow e, é comercialmente encontrado na forma de ácido ou cloreto de ácido nas duas configurações enantiomericamente puras, sendo também um dos reagentes mais utilizados para determinação da configuração absoluta de dióis⁸⁷.

A **Figura 32** apresenta o modelo proposto por Seco e colabs. (2004)⁸⁷ para determinação da configuração de dióis. Quando um sin-1,2-diol é considerado, cuidado deve ser tomado, porque apenas os sinais devidos aos prótons em posições *R* são úteis para a atribuição. A **Figura 32** mostra que R_1 e R_2 estão ambos protegidos pelo diéster bis-(*R*) e (*S*)-MPA, o que torna a previsão do sinal de $\Delta\delta^{\text{R, S}}$ um valor impossível. Por sua vez, o $\text{Ca}'\text{H}$ e $\text{Ca}''\text{H}$ são protegidos somente no diéster bis-(*S*)-MPA; Assim, um $\Delta\delta^{\text{R, S}}$ positivo deve ser esperado para ambos os prótons $\text{Ca}'\text{H}$ e $\text{Ca}''\text{H}$. Este modelo pode perfeitamente ser aplicado à substância 1.

Figura 32: Estrutura do reagente de derivação (*R*)-MPA e modelo para determinação da configuração de dióis.

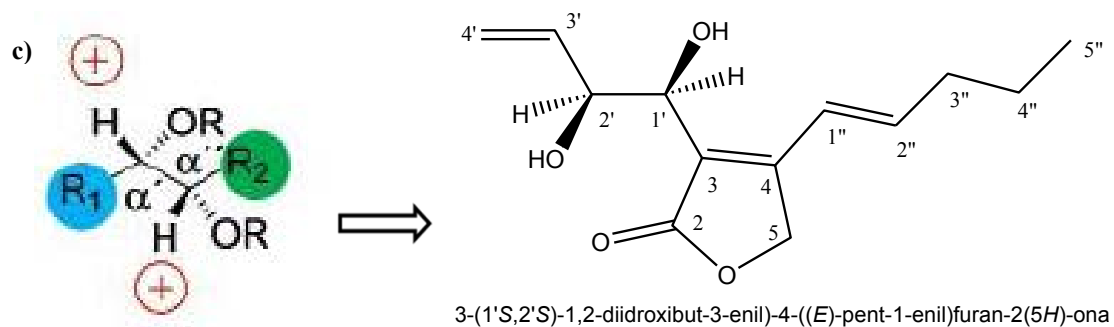
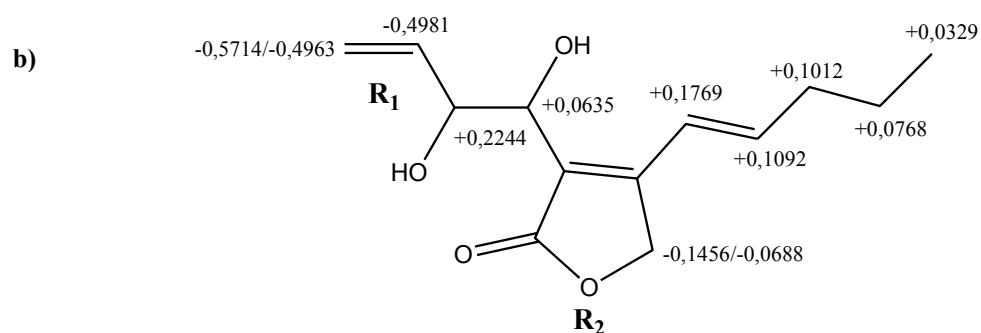
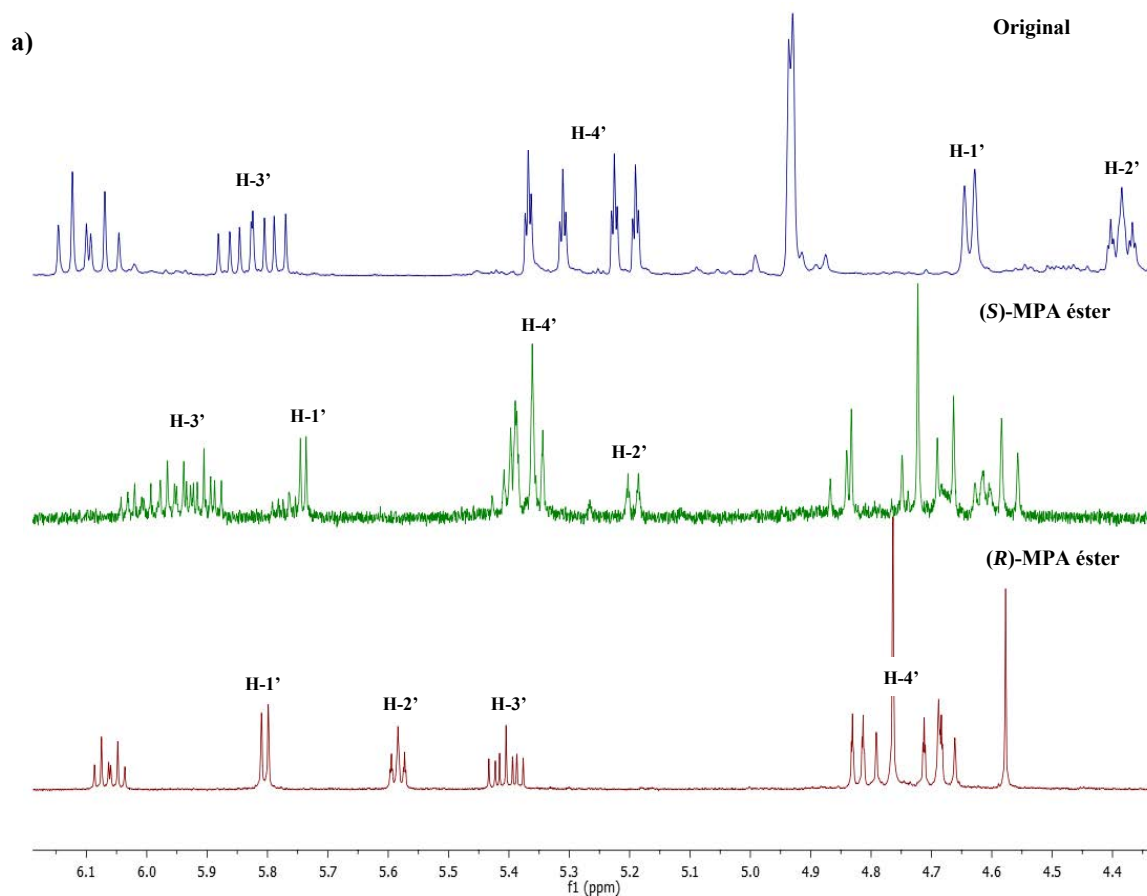


Levando em consideração a análise configuracional, a aplicação mais geral para assinalar a configuração absoluta por espectroscopia de RMN está baseada na comparação do espectro de RMN de ¹H de dois derivados do substrato, que são preparados com dois enantiômeros de um reagente de derivação quiral apropriado. Assim, os dois derivados apresentam diferentes deslocamentos químicos para prótons que estão ao redor do carbono assimétrico (R₁/R₂)^{85, 87}.

A **Figura 33** apresenta os espectros de RMN de ¹H da substância **1** após derivação com o *R* e *S*-MPA, a atribuição dos sinais do espectro foi feita com o auxílio dos experimentos de HSQC, HMBC e COSY.

De acordo com o modelo (**Figura 33 c**), os prótons com $\Delta\delta^{R,S} > 0$ são posicionados para frente do plano. A variação de deslocamento químico para os prótons Cα'H-2' e Cα''H-1' é positiva. Assim, aplicando as regras de ordem de prioridade para o sistema *R* e *S*, a substância **1** tem configuração *S,S* em C-1' e C-2'.

Figura 33: Processo para a atribuição da configuração de (S,S)-lactona

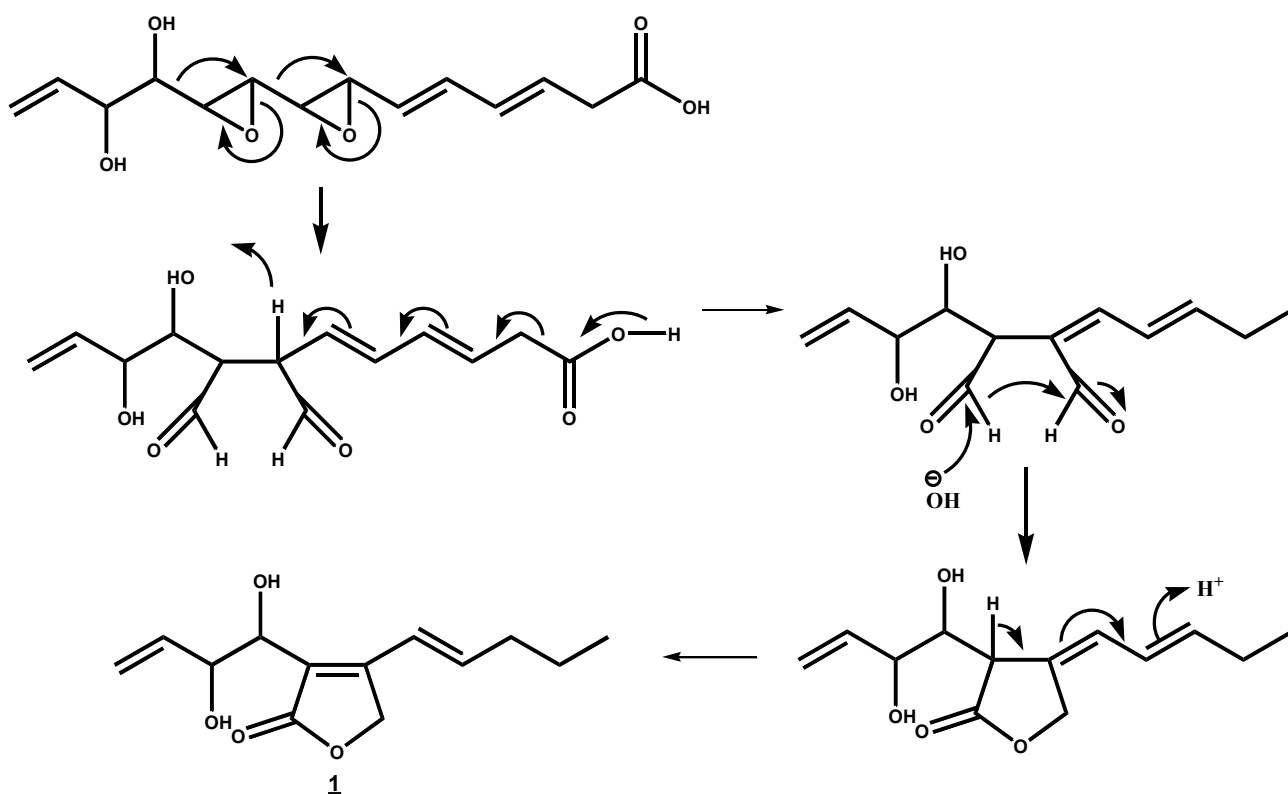


5.3.2.2 Compostos furânicos derivados de poliacetatos

5.3.2.2.1 Rota biossintética para a substância **1**

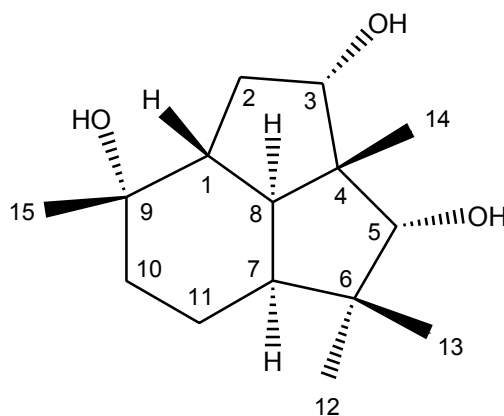
A proposta biossintética para a formação do derivado lactônico segue o precedente do rearranjo de epóxidos proposto para a formação da aspirona⁸⁸. Neste caso, para a formação da substância **1**, um diepóxido composto por uma cadeia ácida insaturada com um total de 14 carbonos sofre um rearranjo com a formação de dois grupos aldeídos. Em seguida, as duplas ligações movem-se em conjugação sofrendo descarboxilação. Uma reação interna de Cannizzaro pode gerar a lactona e, por fim, uma migração de dupla ligação gera a substância **1** (Figura 34)⁸⁹.

Figura 34: Proposta biossintética para a formação da substância **1**.



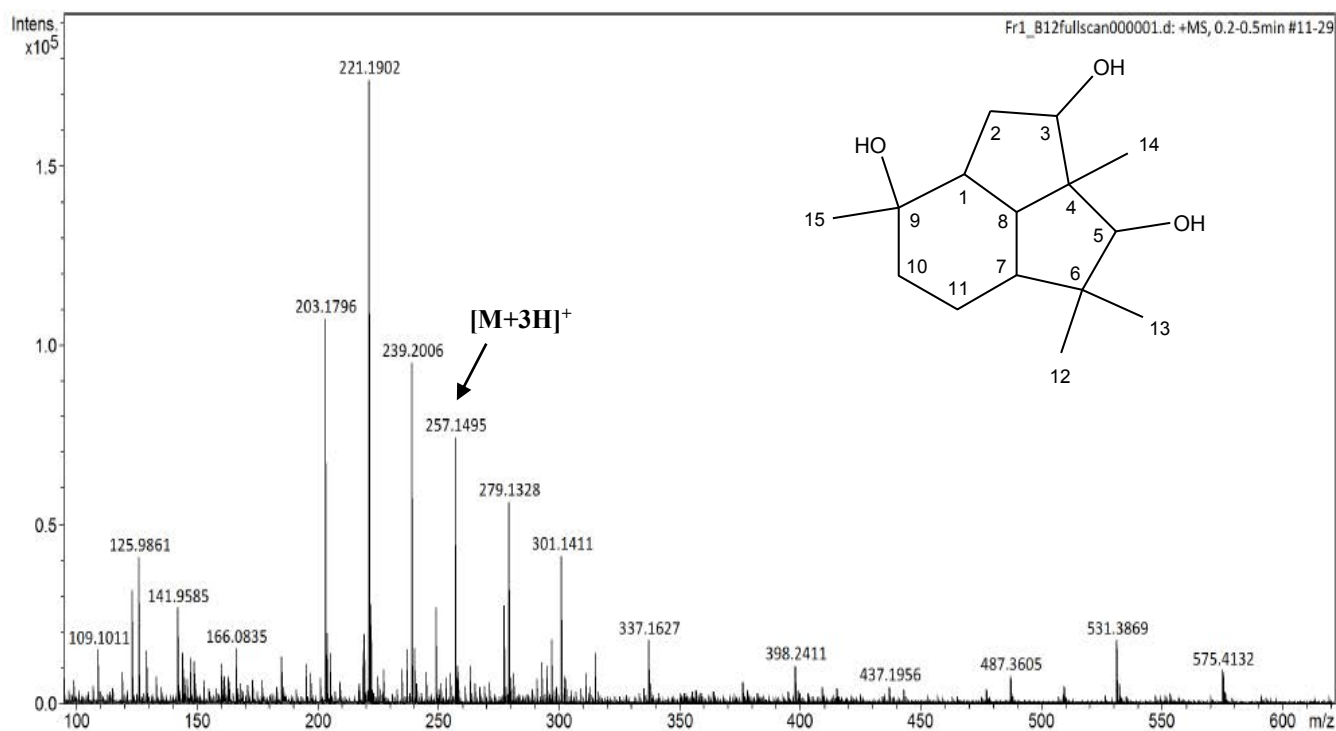
5.3.3 Determinação estrutural da substância 2

Figura 35: Estrutura do 3,5,9-trihidroxi presilfiperfolano



A substância 2 foi isolada como um óleo amarelo e 2,5 mg. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de baixa resolução por ionização em *eletrospray* no modo positivo (LC-MS-TOF) (**Figura 36**), onde foi visualizado o sinal de m/z 239,2006 referente à formação de aduto $[M+3H]^+$ e auxílio dos dados de RMN de 1H e ^{13}C permitindo propor a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$.

Figura 36: Espectro de massas de alta resolução da substância 2



Na análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 37**) foi observada a presença de quatro metilas quaternárias em δ_{H} 1,09 (s, H-15, δ_{C} 23,2), δ_{H} 1,03 (s, H-13, δ_{C} 27,0), δ_{H} 0,92 (s, H-12, δ_{C} 24,4) e, δ_{H} 0,86 (d, $J = 0,5$ Hz, H-14, δ_{C} 13,7), dois hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,38 (dd, $J = 9,5$ e $1,0$ Hz, H-5) e δ_{H} 3,30 (dd, $J = 11,2$ e $4,0$ Hz, H-3), três hidrogênios metínicos em δ_{H} 1,92 (ddd, $J = 14,1$; $7,0$ e $1,5$ Hz, H-8); δ_{H} 1,45 (m, H-7) e, δ_{H} 1,28 (d, $J = 8,6$ Hz, H-1) e, um grupo de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,36 – 1,78 (m, H-2; H-10 e H-11).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 38**) observou-se 15 átomos de carbono, o que com auxílio dos experimentos de HSQC (**Figura 39**), foram atribuídos a cinco metínicos (δ_{C} 47,7, 41,6 e 40,7) dos quais, dois carbinólicos (δ_{C} 80,6 e 79,9), três metilênicos (δ_{C} 35,7, 29,1 e 29,2), quatro metilas (δ_{C} 13,7, 27,0, 24,4 e 23,2) e três carbonos quaternários, sendo um carbinólico (δ_{C} 72,8, 41,8 e 36,4). Estes valores de deslocamentos químicos associados às multiplicidades e constantes de acoplamento, fortemente sugeriram a presença de um sesquiterpeno da classe dos botrianos.

No mapa de correlação do experimento HMBC (**Figura 40**) foi possível visualizar as correlações a longa distância entre os átomos de hidrogênio H-1 $\leftrightarrow$ C-7/C-15, H-3 $\leftrightarrow$ C-7/C-8/C-14 e de H-7 $\leftrightarrow$ C-4/C-5/C-10. Estes dados aliados às correlações observadas no experimento de ^1H - ^1H COSY (**Figura 41**) entre H-7 $\leftrightarrow$ H-11 e H-1 $\leftrightarrow$ H-8 nos conduziram a estabelecer a estrutura de um sesquiterpeno do tipo botriano.

A atribuição de todos os hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbono foi realizada após análise das interações a curta distância 1J , no experimento bidimensional HMQC. Os valores de deslocamentos químicos observados em RMN de ^1H e ^{13}C confirmaram tratar-se de um sesquiterpeno botriano.

A configuração relativa de **2** foi determinada pela análise dos espectros de NOESY-1D (**Figura 42**), onde a irradiação de H-3 mostrou correlação espacial com H-1, irradiação de H-5 mostrou correlação espacial com H-1 e H-13, irradiação de H-13 mostrou correlação espacial com H-1, H-5 e H-14 e, irradiação de H-14 mostrou correlação espacial com H-7 e H-13 indicando que estes hidrogênios encontram-se em uma relação *cis*.

Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2.

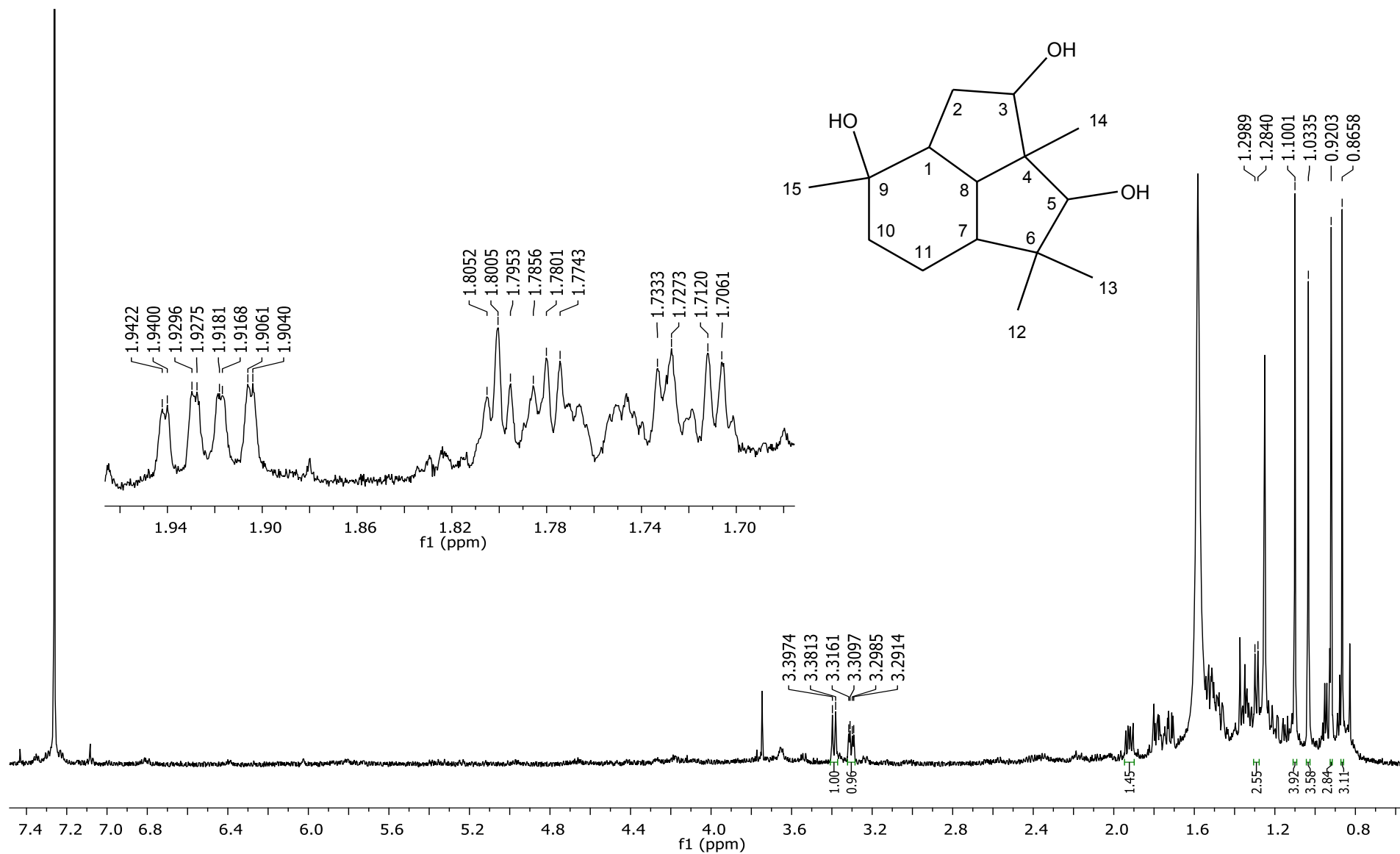


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da substância 2.

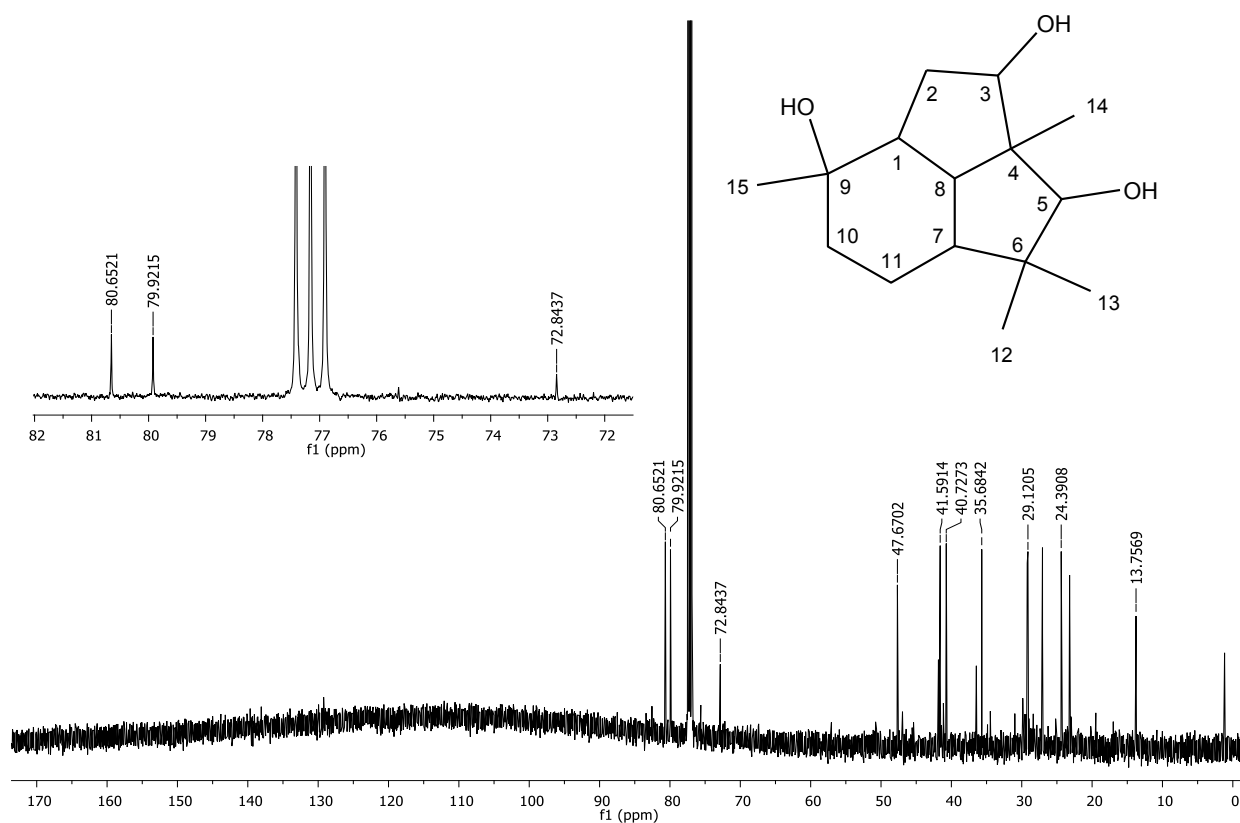


Figura 39: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (500 MHz, CDCl_3) da substância 2

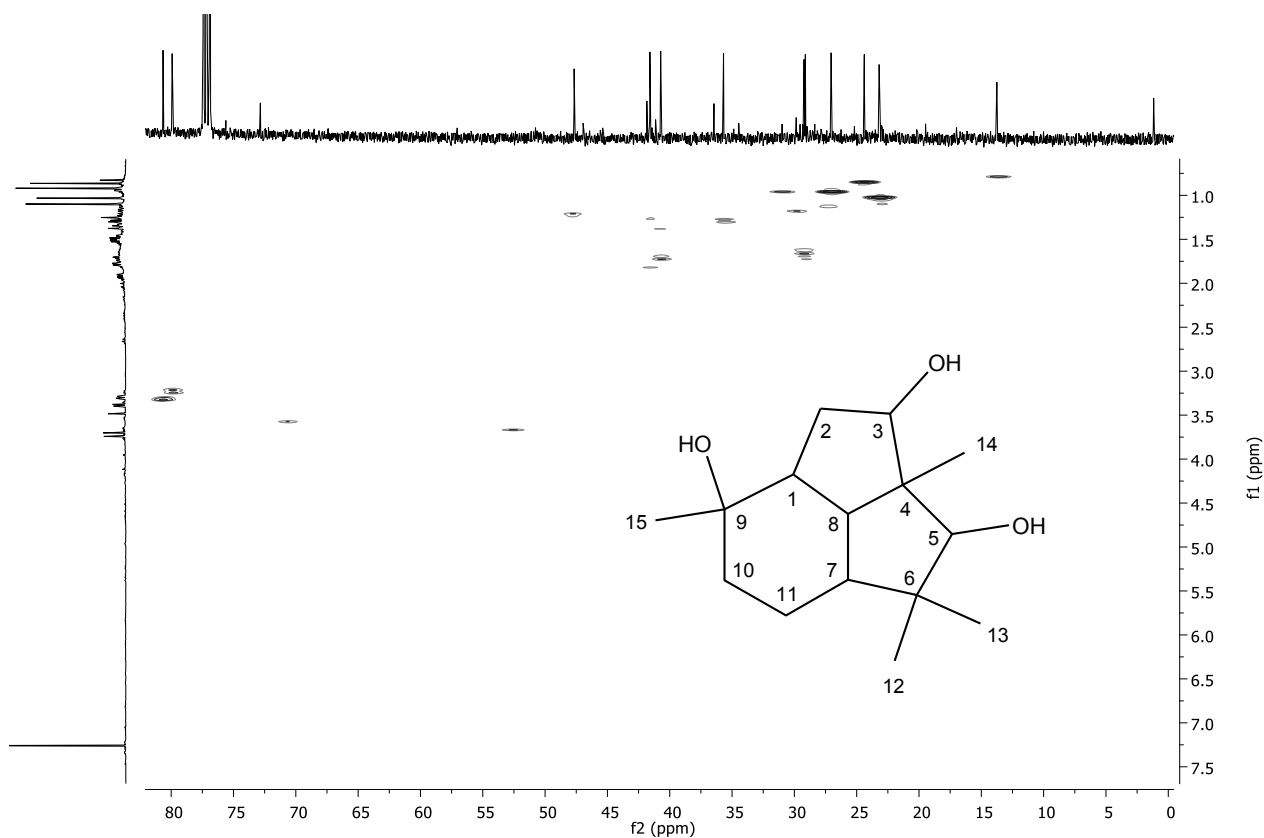


Figura 40: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**

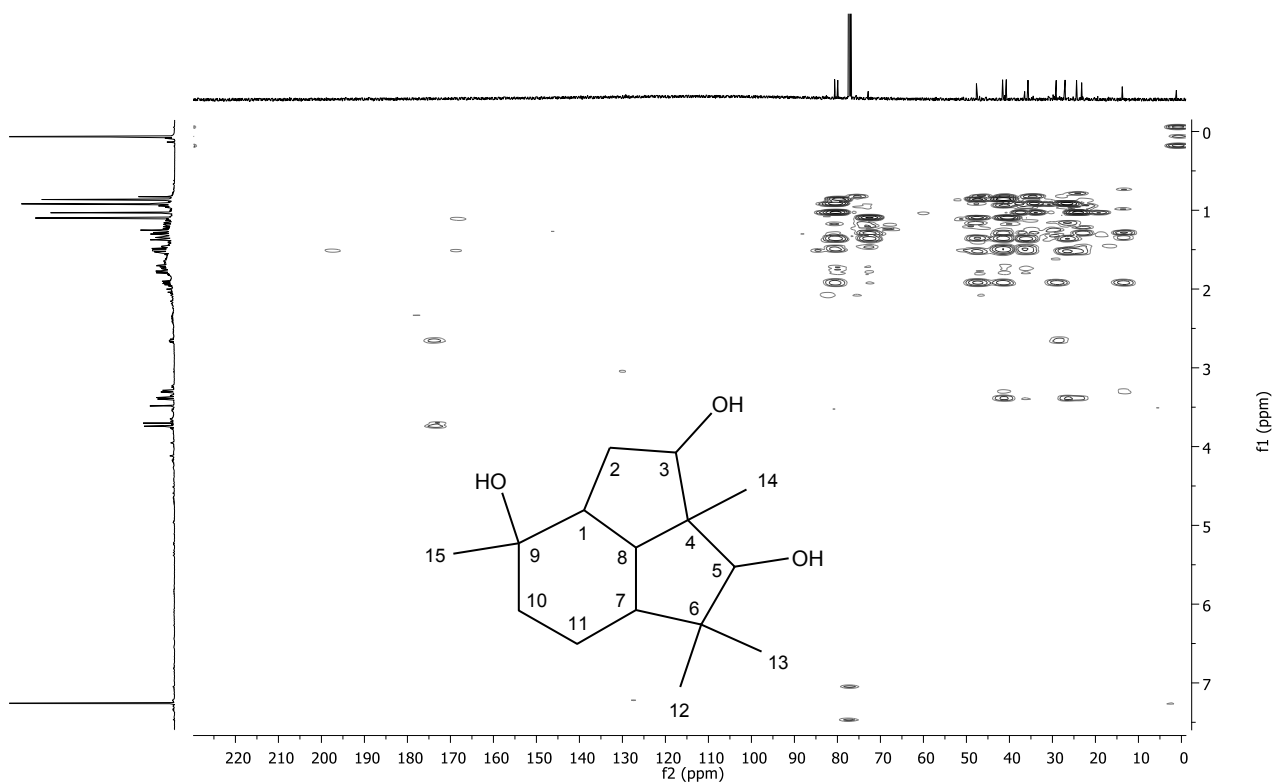


Figura 41: Espectro de ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**

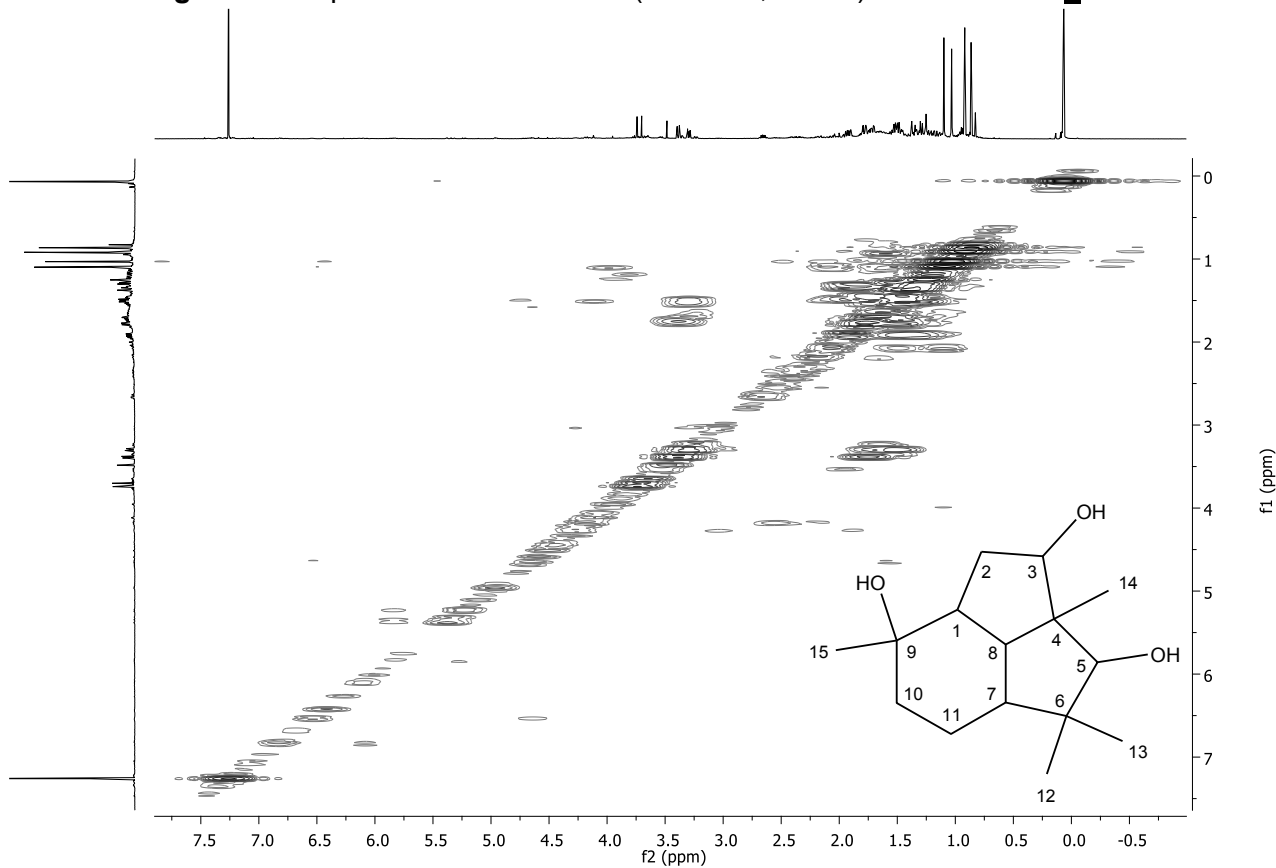
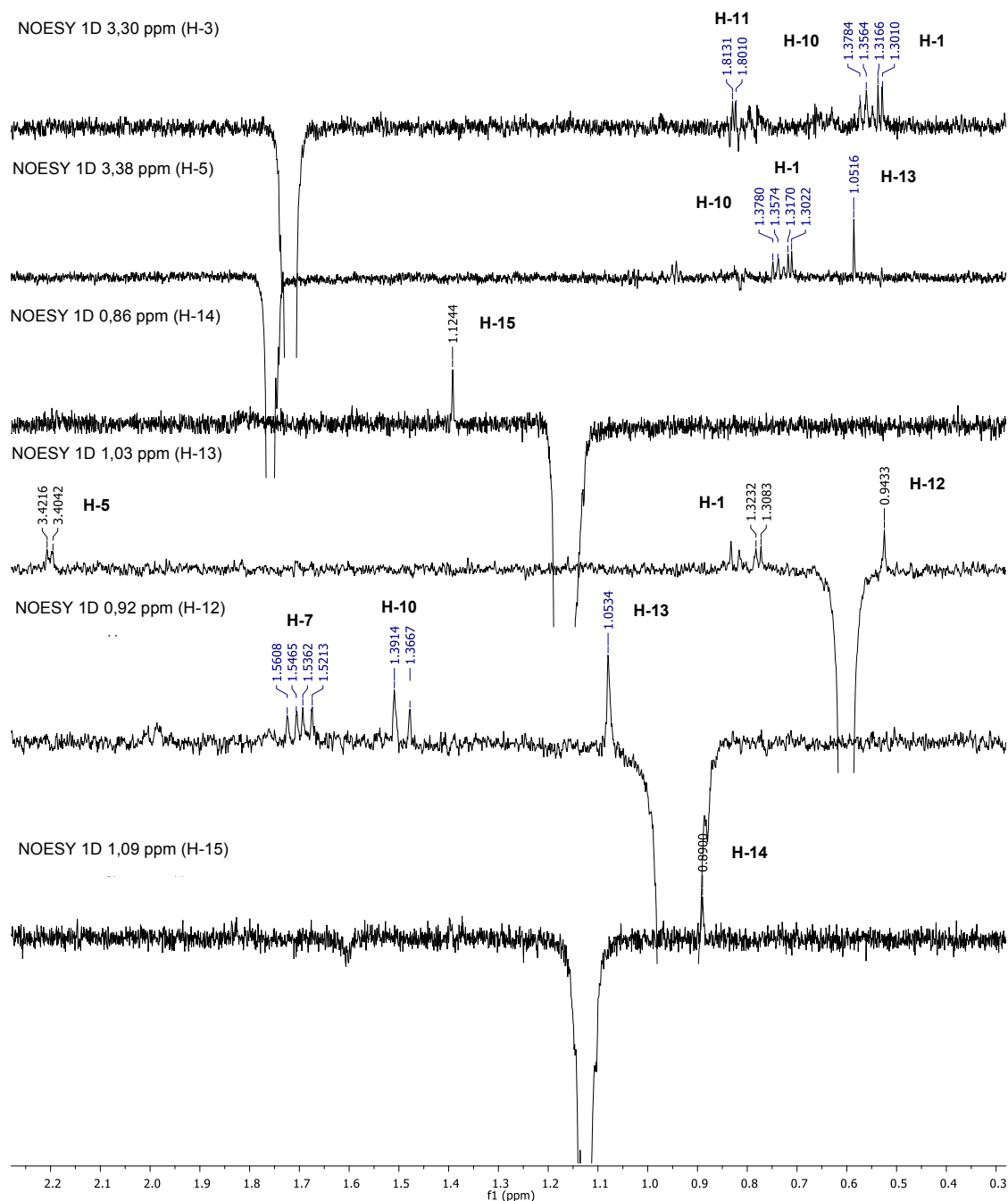


Figura 42: Mapa de correlação ^1H - ^1H através do espaço (NOESY, 600 MHz, CDCl_3) da substância **2**.



Estes dados sugeriram que a substância **2** trata-se de sesquiterpenóide tricarbocíclico saturado do tipo botriano, exibindo hidroxila terciária e secundária, sendo a estrutura determinada como 3, 5, 9-trihidroxi persilfiperfolano inédita na literatura.

Essa classe de metabólitos com esqueleto botriano é característico do fungo *Botrytis cinerea* do qual já foram isolados inúmeros compostos similares a

substância **2**. Compostos estes que foram eficazes no controle de lesões causadas por infecções fúngicas em organismos vivos e, também apresentaram atividade fitotóxica, fitopatogênica, antibiótica e citotóxica contra linhagens tumorais e não tumorais^{90, 91}.

Figura 43: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹H-¹H COSY (—)

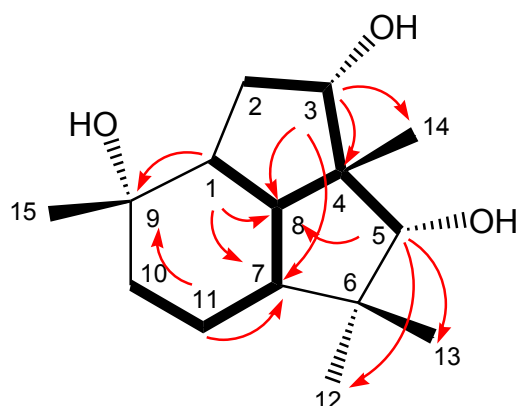


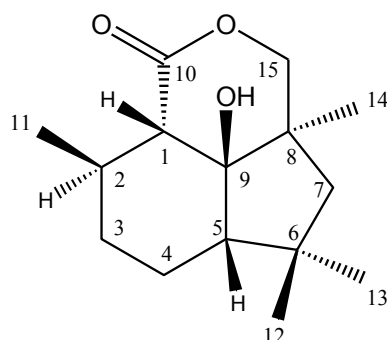
Tabela 9: Dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância **2** (500 MHz, CDCl₃^a)

Posição	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	HMBC
1	1,28 (<i>d</i> , 8,6)	47,7; CH	C-4; C-7; C-8; C-10; C-15
2	1,72 (<i>m</i>)	29,2; CH ₂	C-3; C-4; C-8; C-9
3	3,30 (<i>dd</i> , 11,2, 4,0)	79,9; CH	C-4; C-8; C-14
4	-	41,8; C	-
5	3,38 (<i>dd</i> , 9,5, 1,0)	80,6; CH	C-4; C-7; C-9; C-12; C-13
6	-	36,4; C	-
7	1,45 (<i>m</i>)	40,7; CH	C-4; C-5; C-6; C-8; C-10
8	1,92 (<i>ddd</i> , 14,1, 7,0, 1,5)	41,6; CH	C-1; C-2; C-3; C-4; C-5; C-11; C-14
9	-	72,8; C	-
10	1,36 (<i>d</i> , 14,7)	35,7; CH ₂	C-1; C-7; C-9
11	1,78 (<i>m</i>)	29,1; CH ₂	C-6; C-7; C-8; C-9
12	0,92 (<i>s</i>)	24,4; CH ₃	C-5; C-6; C-13
13	1,03 (<i>s</i>)	27,0; CH ₃	C-5; C-6; C-12
14	0,86 (<i>d</i> , 0,5)	13,7; CH ₃	C-3; C-4; C-5; C-8;
15	1,09 (<i>s</i>)	23,2; CH ₃	C-1; C-9

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

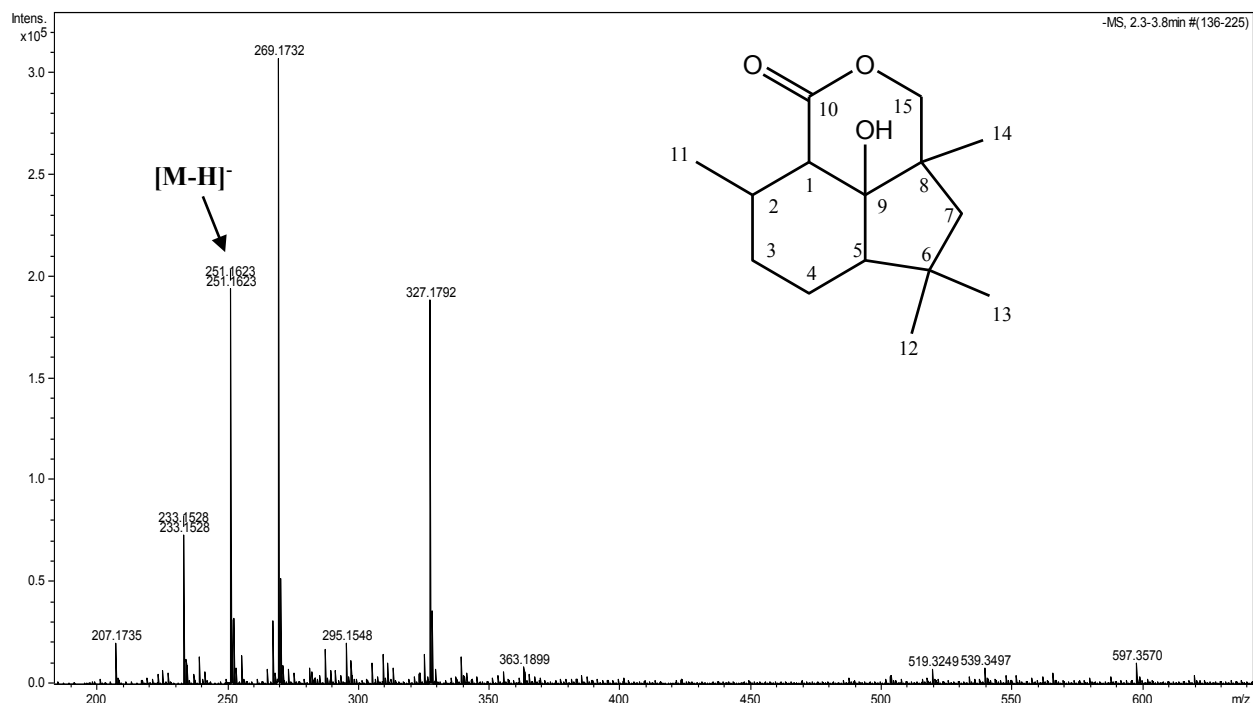
5.3.4 Determinação estrutural da substância 3

Figura 44: Estrutura do Deacetilbotridial



A substância 3 foi isolada como um óleo de coloração amarela. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* no modo negativo (LC-MS-TOF) (**Figura 45**), sendo visualizado o sinal de m/z 251,1623 (Erro Calculado: 10,1 ppm) referente à formação de $[M-H]^-$. Esta informação com auxílio dos dados de RMN de 1H e ^{13}C permitiu propor a fórmula $C_{15}H_{24}O_3$.

Figura 45: Espectro de massas de alta resolução da substância 3



O espectro de RMN de 1H (**Figura 46**) de 3 apresentou dois dupletos em δ_H 4,75 e 3,90 (d , $J = 9,6$ Hz, δ_C 78,0) integrados para 1H cada e que baseados nos deslocamentos de RMN de ^{13}C foram conferidos aos hidrogênios carbinólicos H-15,

vizinhos de um centro estereogênico. Também, foram observados dois dupletos em δ_H 2,27 (*d*, *J* = 11,4 Hz, δ_C 58,8) e δ_H 1,62 (*d*, *J* = 7,1 Hz, δ_C 58,4) integrados para 1H cada, os quais foram conferidos a H-1 e H-5, além de quatro sinais atribuídos a quatro metilas em δ_H 1,32 (*s*, H-14, δ_C 24,0), δ_H 1,27 (*d*, *J* = 6,2 Hz, H-11, δ_C 22,3), δ_H 1,25 (*s*, H-12, δ_C 36,2) e δ_H 1,13 (*s*, H-13, δ_C 27,7).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 47**) foi possível observar 15 sinais de carbono, que associado ao DEPT 135° (**Figura 48**) permitiu atribuir a quatro metilas, quatro carbonos metilênicos sendo um carbinolico, três metínicos e quatro quaternários, sendo um atribuído a uma carbonila (δ_C 172,1, C-10) característico de δ -lactona.

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das interações a curta distância 1J , no experimento bidimensional HMQC (**Figura 49**).

Nos mapas de correlação a longa distância de HMBC (**Figura 50**) foi possível visualizar as correlações entre os átomos de hidrogênio H-1 $\leftrightarrow$ C-5/C-11 de H-5 $\leftrightarrow$ C-8/C-12/C-13 e de H-15 $\leftrightarrow$ C-9/C-12/C-14. Estes dados aliados às correlações observadas em 1H - 1H COSY entre H-5 $\leftrightarrow$ H-4 e H-2 $\leftrightarrow$ H-11 nos conduziram a estabelecer a estrutura de um sesquiterpeno da classe dos botrianos para **3**.

A configuração relativa de **3** foi determinada pela análise dos espectros de NOESY-1D (**Figura 52**), onde a irradiação de H-12 mostrou correlação espacial com H-1 e H-5 e, irradiação de H-13 mostrou correlação espacial com H-2 e H-14 indicando que estes hidrogênios também, encontram-se em uma relação *cis*.

Estes resultados indicaram **3** como um novo sesquiterpeno da classe dos botrianos. Substâncias similares a esta já foram isoladas de micro-organismos endofíticos tais como, *Phomopsis* sp.⁹² e *Botrytis cinerea*⁹³, no entanto, não há relatos de atividade biológica para os análogos de **3**.

Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

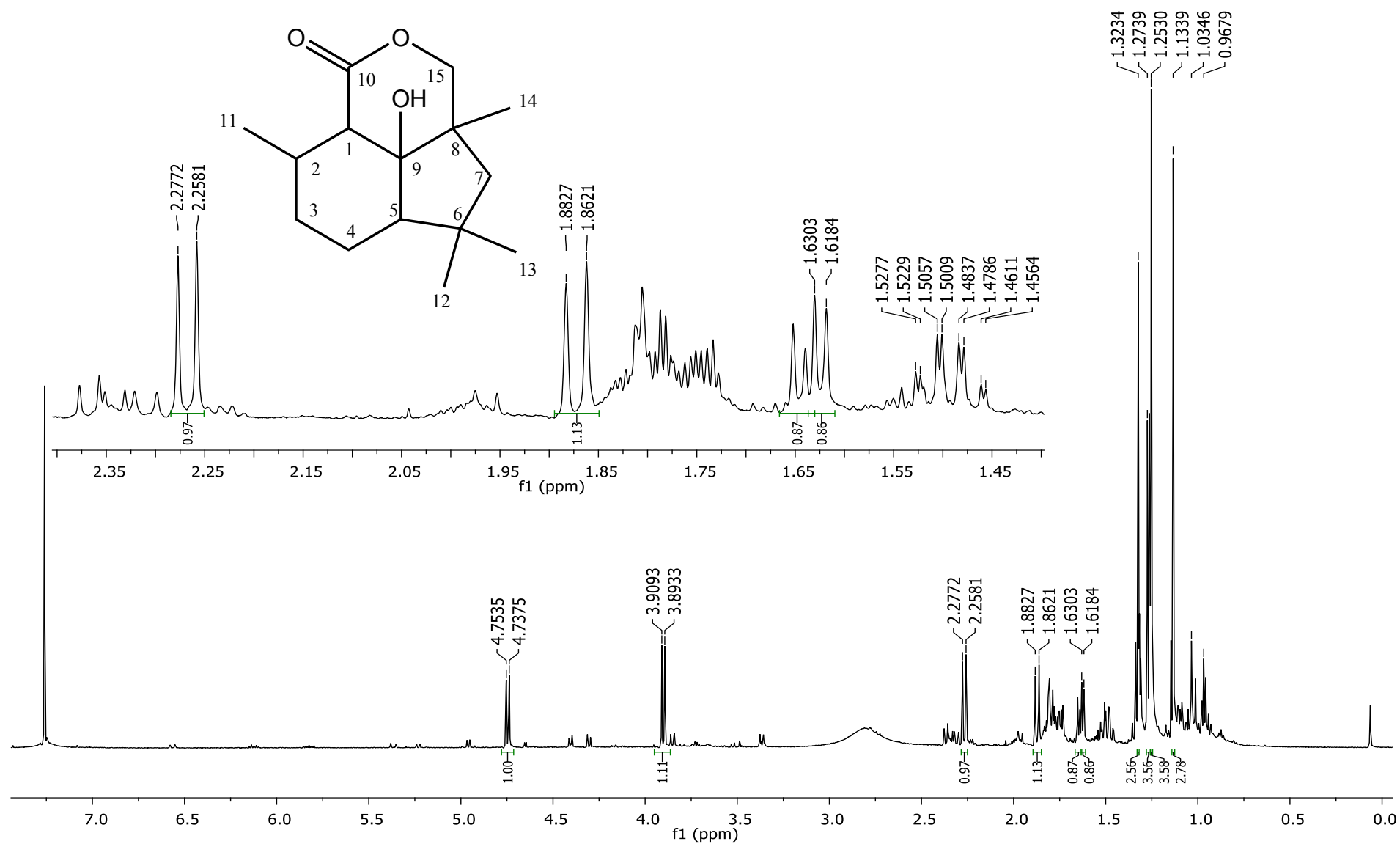


Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

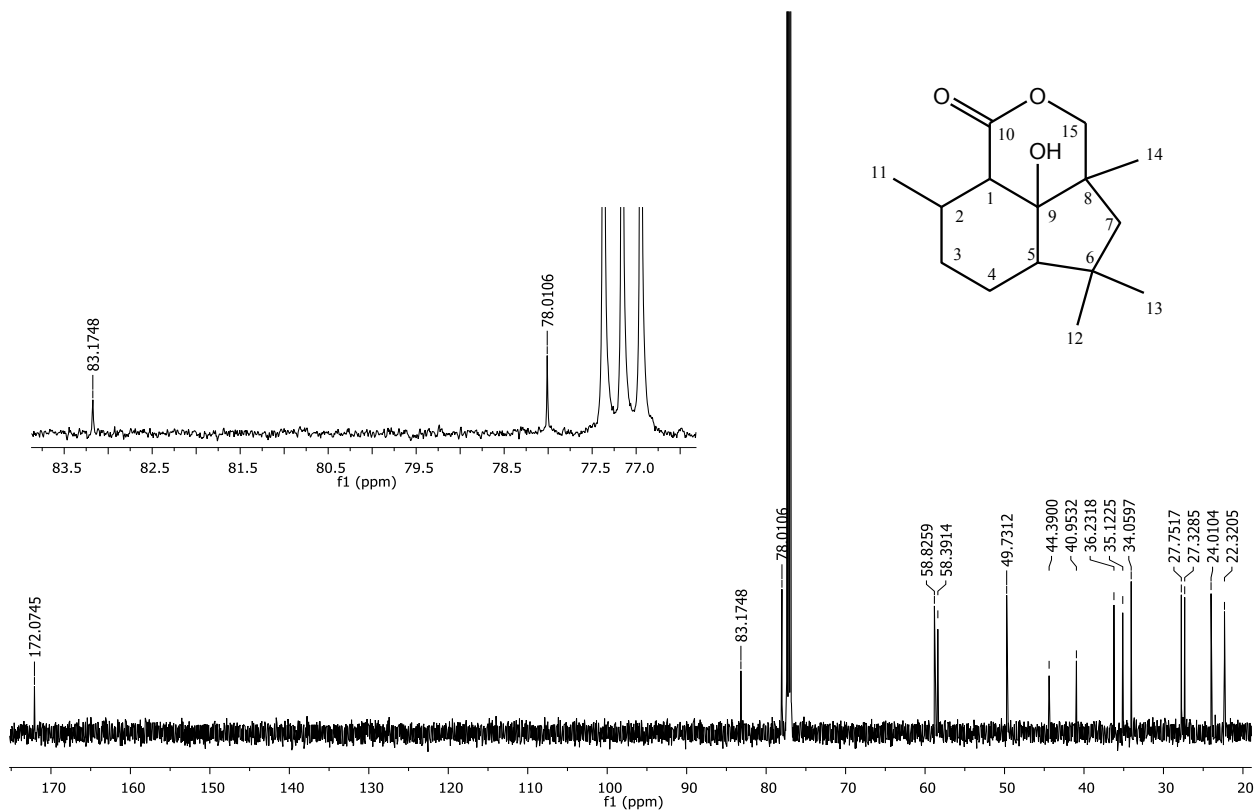


Figura 48: Espectro de RMN DEPT 135° (600 MHz, CDCl₃) da substância **3**.

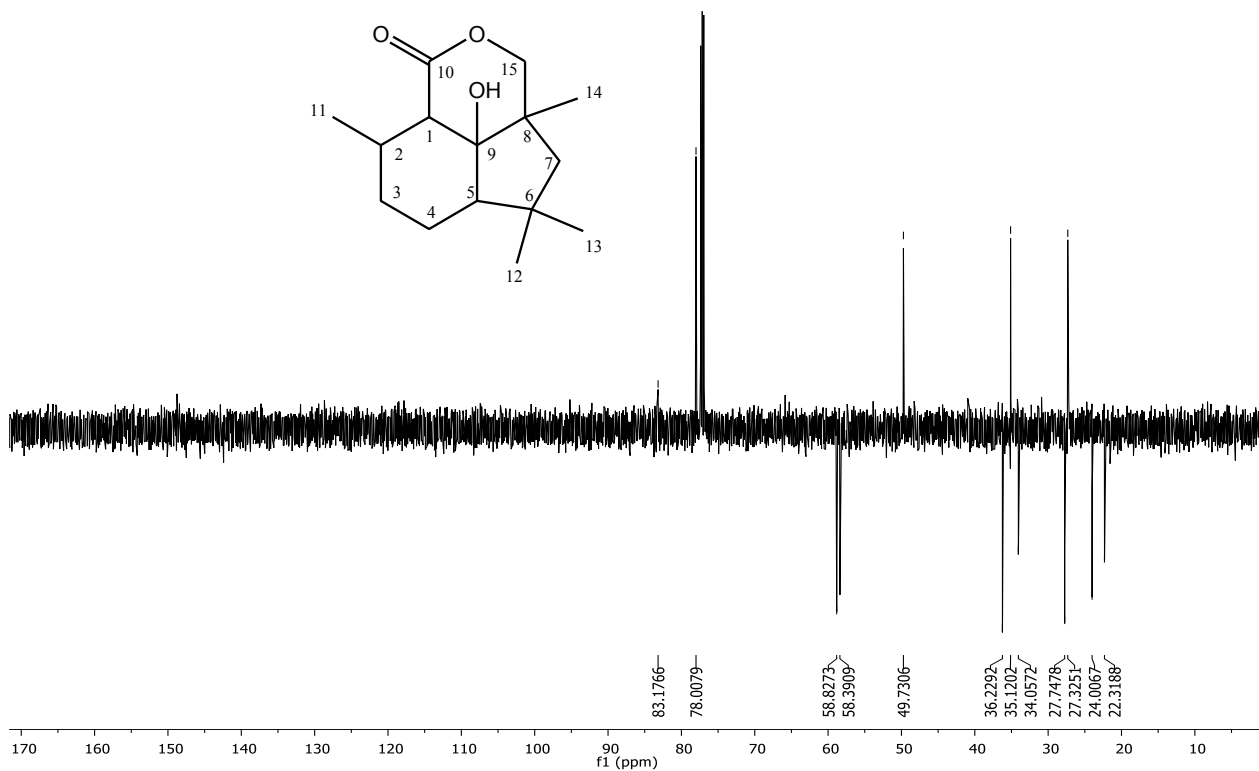


Figura 49: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância **3**

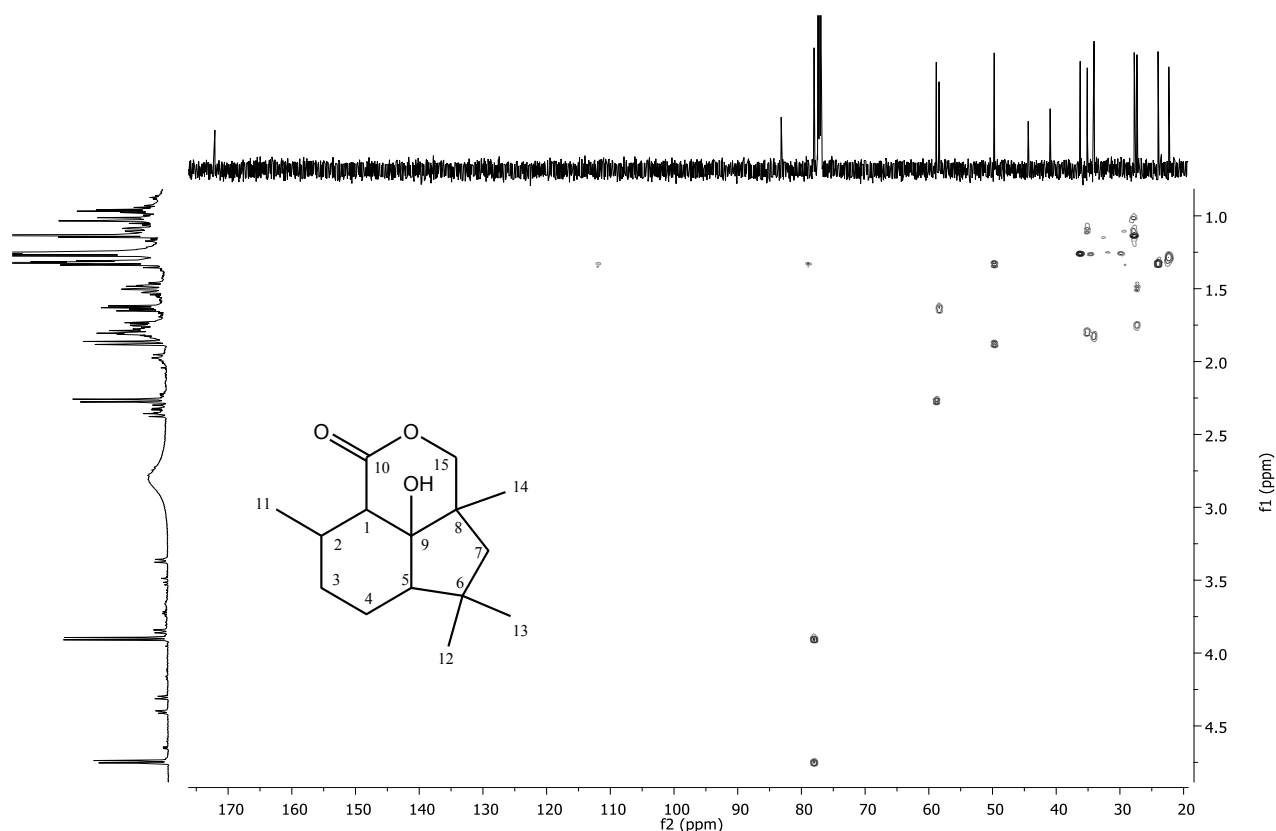


Figura 50: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância **3**

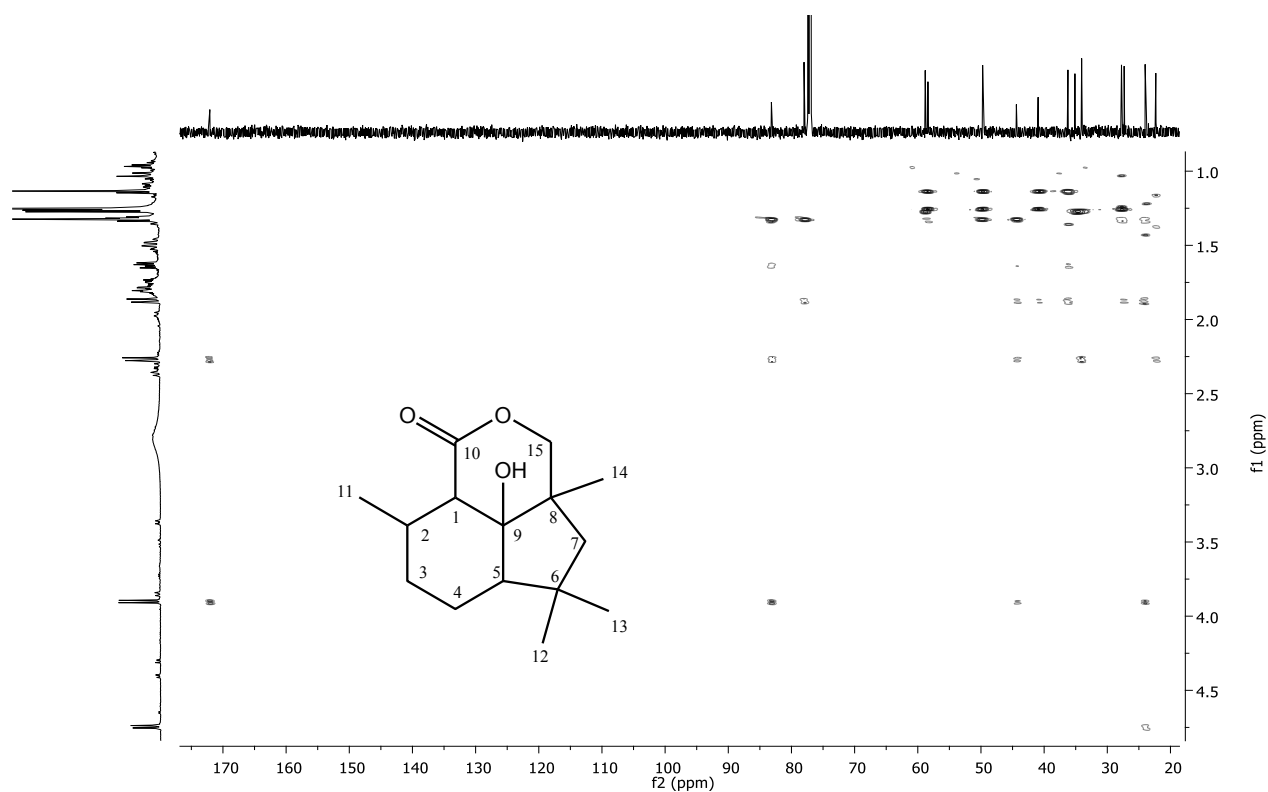


Figura 51: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C).

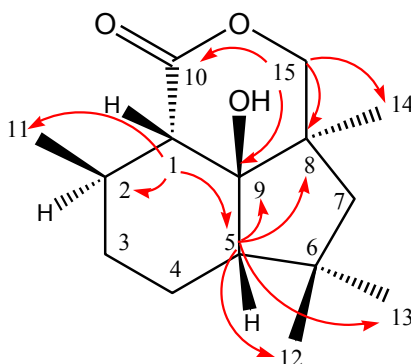


Figura 52: Mapa de correlação ^1H - ^1H através do espaço (NOESY, 600 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

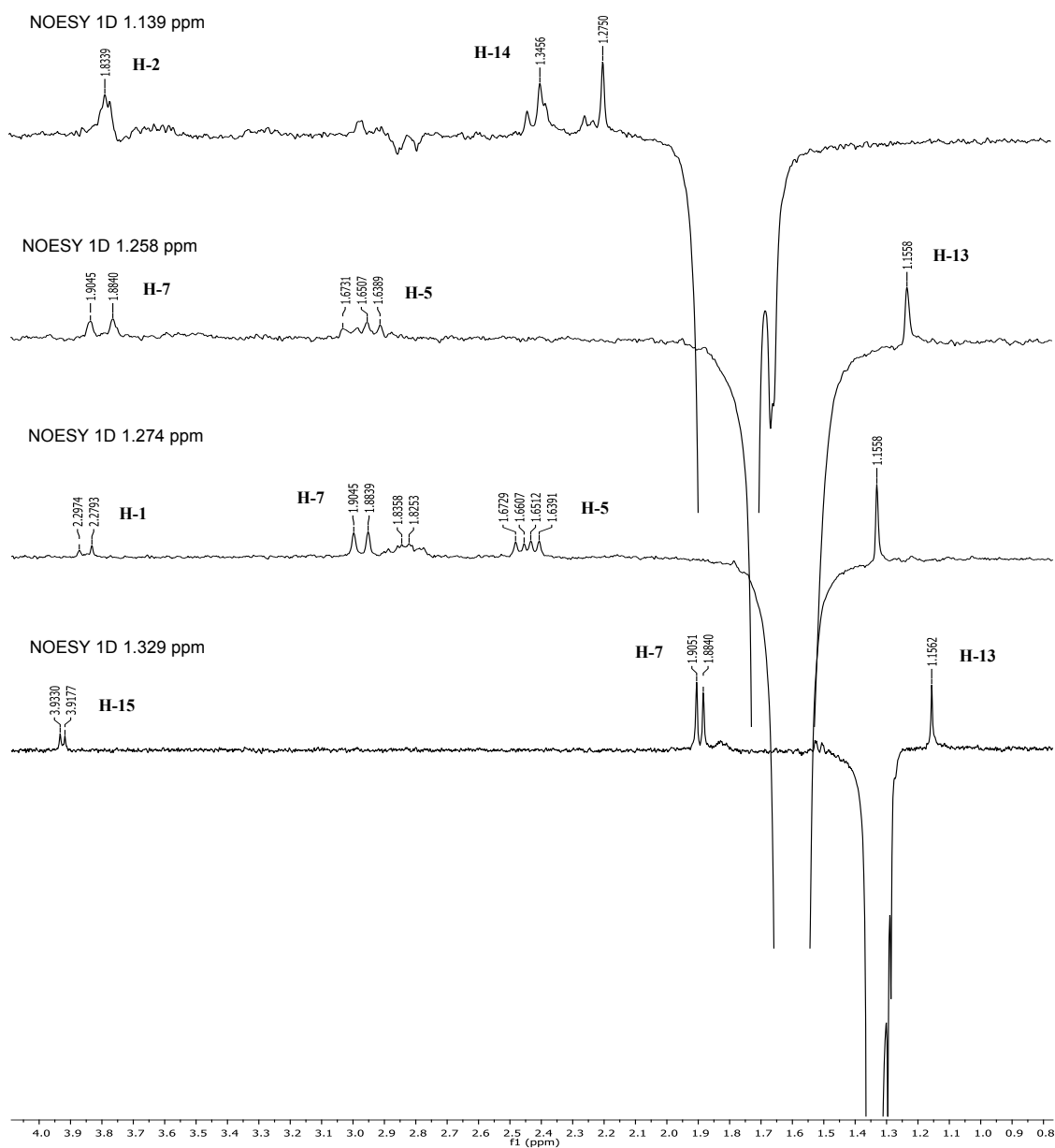


Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **3** (600 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1	2,27 (<i>d</i> , 11,4)	58,8; CH	C-2; C-8; C-9; C-10; C-11
2	1,82 (<i>m</i>)	34,0; CH	C-1
3	1,09 (<i>m</i>)	35,1; CH_2	C-2; C-4
4	1,74 (<i>m</i>); 1,49 (<i>m</i>)	27,3; CH_2	C-1; C-2; C-3; C-5; C-6; C-9
5	1,62 (<i>d</i> , 7,1)	58,4; CH	C-4; C-8; C-9; C-12
6	-	40,9; C	-
7	1,87 (<i>d</i> , 12,3)	49,7; CH_2	C-4; C-6; C-8; C-12; C-13; C-14; C-15
8	-	44,4; C	-
9	-	83,2; C	-
10	-	172,1; C	-
11	1,27 (<i>d</i> , 6,2)	22,7; CH_3	C-1; C-2; C-3
12	1,25 (<i>s</i>)	36,2; CH_3	C-4; C-5; C-6; C-7; C-13
13	1,13 (<i>s</i>)	27,7; CH_3	C-4; C-5; C-6; C-7; C-12
14	1,32 (<i>s</i>)	24,0; CH_3	C-1; C-5; C-7; C-9; C-15
15	4,75 (<i>d</i> , 9,6); 3,90 (<i>d</i> , 9,6)	78,0; CH_2	C-8; C-9; C-10; C-14

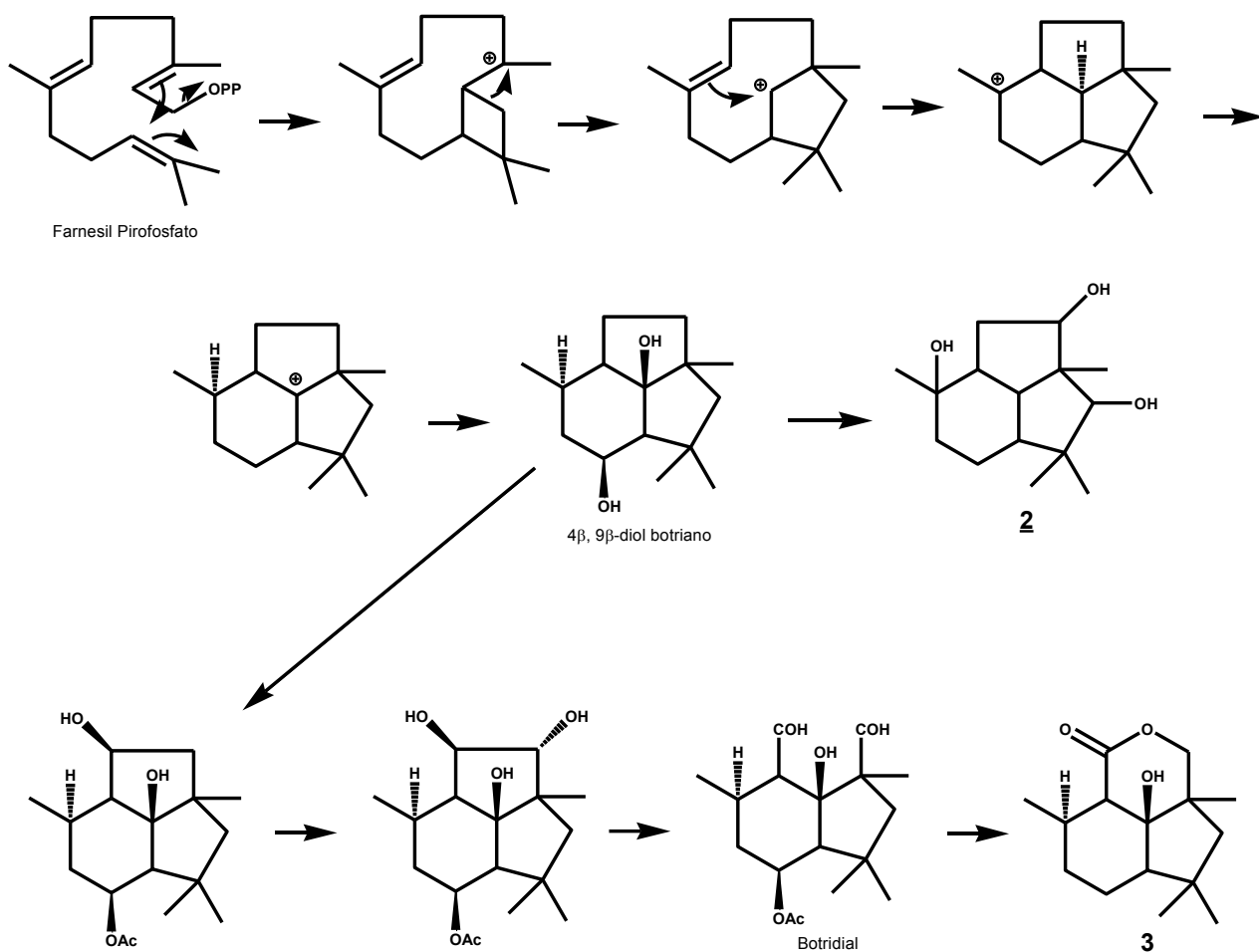
^adeslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

5.3.4.1 Rota biossintética para as substâncias **2** e **3**

As substâncias **2** e **3** são biossintetizados a partir do farnesil pirofostato, sendo este oriundo do acetato pela via do mevalonato.

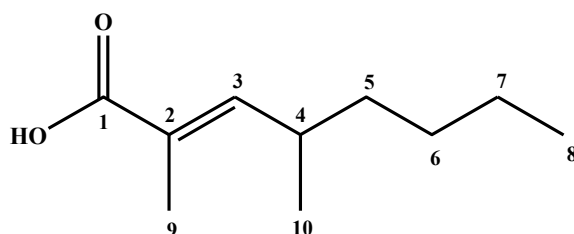
A biossíntese inicia-se com um mecanismo via carbocátion através de um sistema enzimático, até a formação do 4- β , 9- β -diol botriano. Este composto é então hidroxilado originando a substância **2** e, também, segue um caminho para a formação do botridial que por um processo de redução da origem a substância **3** (Figura 53)^{93, 94}.

Figura 53: Proposta biossintética para a formação das substâncias **2** e **3**.



5.3.5 Identificação estrutural da substância **4**

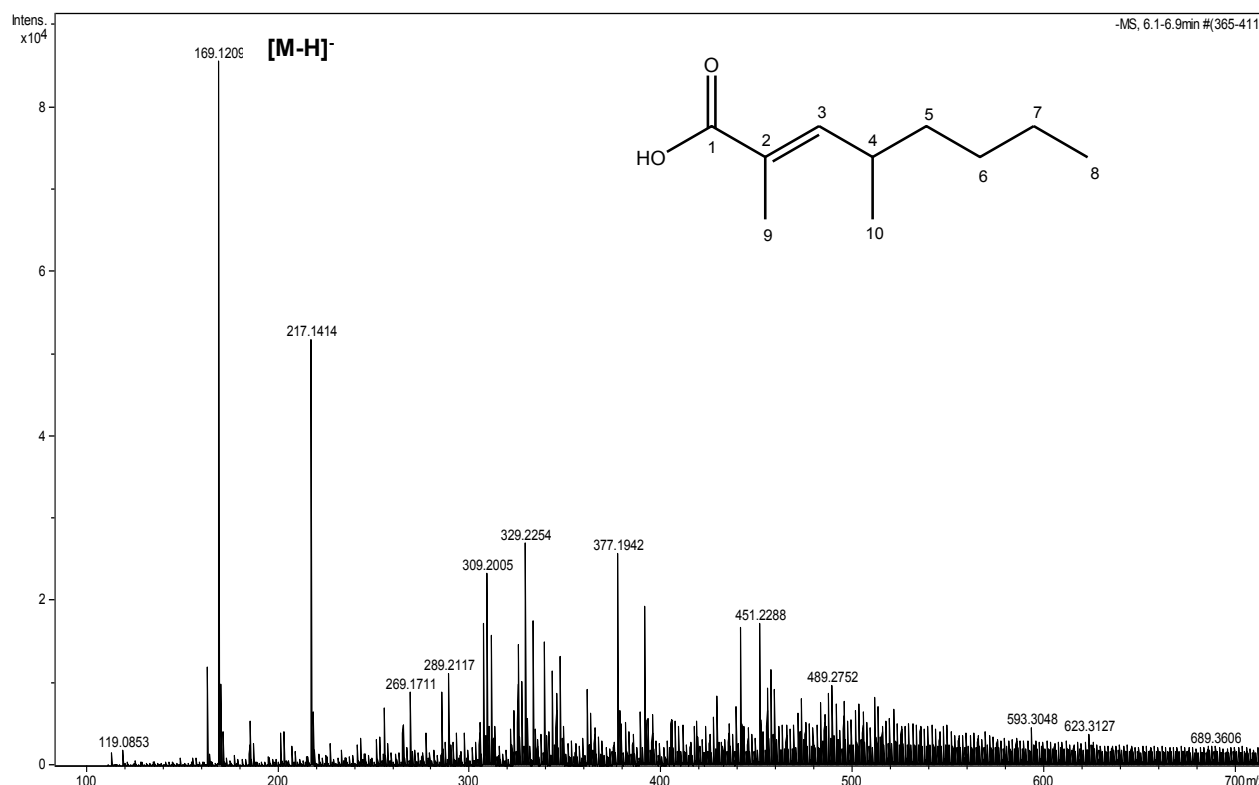
Figura 54: Estrutura do Ácido (*E*)-2,4-dimetilocta-2-enóico.



A substância **4** foi isolada como um óleo amarelo. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* no modo negativo (LC-MS-TOF) (**Figura 55**), onde foi visualizado o sinal de m/z 169,1209 (Erro calculado: 12,1 ppm) referente à formação

de $[M-H]^-$. Com auxílio dos dados de RMN de 1H e ^{13}C permitiu propor a fórmula $C_{10}H_{18}O_2$.

Figura 55: Espectro de massas de alta resolução da substância **4**



Os espectros de RMN de 1H (**Figura 56**), de ^{13}C (**Figura 57**) e de DEPT 135° (**Figura 58**) evidenciaram a presença de três metilas em δ_H 0,86 (*t*, 7,0 Hz; δ_C 14,1); δ_H 0,99 (*d*, 6,5 Hz; δ_C 20,0) e δ_H 1,82 (*d*, 1,4 Hz; δ_C 12,3); três carbonos metilênicos em δ_H 1,28 (*m*, δ_C 22,8); δ_H 1,25 (*m*, δ_C 29,8) e δ_H 1,39 (*m*, δ_C 36,5); dois carbonos metínicos em δ_H 2,51 (*m*, δ_C 33,5) e δ_H 6,65 (*dq*, 1,4; 10,1 Hz; δ_C 150,8), um carbono quaternário em δ_C 125,6 e um sinal em δ_C 172,7 característico de uma carbonila de ácido carboxílico.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise do mapa de correlação dos experimentos de HSQC (**Figura 59**) (**Tabela 11**).

Pela análise do mapa de correlação de HMBC de **4**, foi visualizado correlação entre o $H-3 \leftrightarrow C-9/C-10$; $H-5 \leftrightarrow C-3$; $H-8 \leftrightarrow C-6/C-7$; $H-9 \leftrightarrow C-2/C-3$ e $H-10 \leftrightarrow C-3/C-4/C-5$. Adicionalmente, o experimento de COSY evidenciou um sistema de spins de $H-3 \leftrightarrow H-4 \leftrightarrow H-5$, de $H-4 \leftrightarrow H-10$ e de $H-6 \leftrightarrow H-8$. Estas informações associadas aos dados encontrados na literatura, nos permitiram atribuir para a substância **4** a estrutura do ácido (*E*)-2,4-dimetilocta-2-enóico.

Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 4.

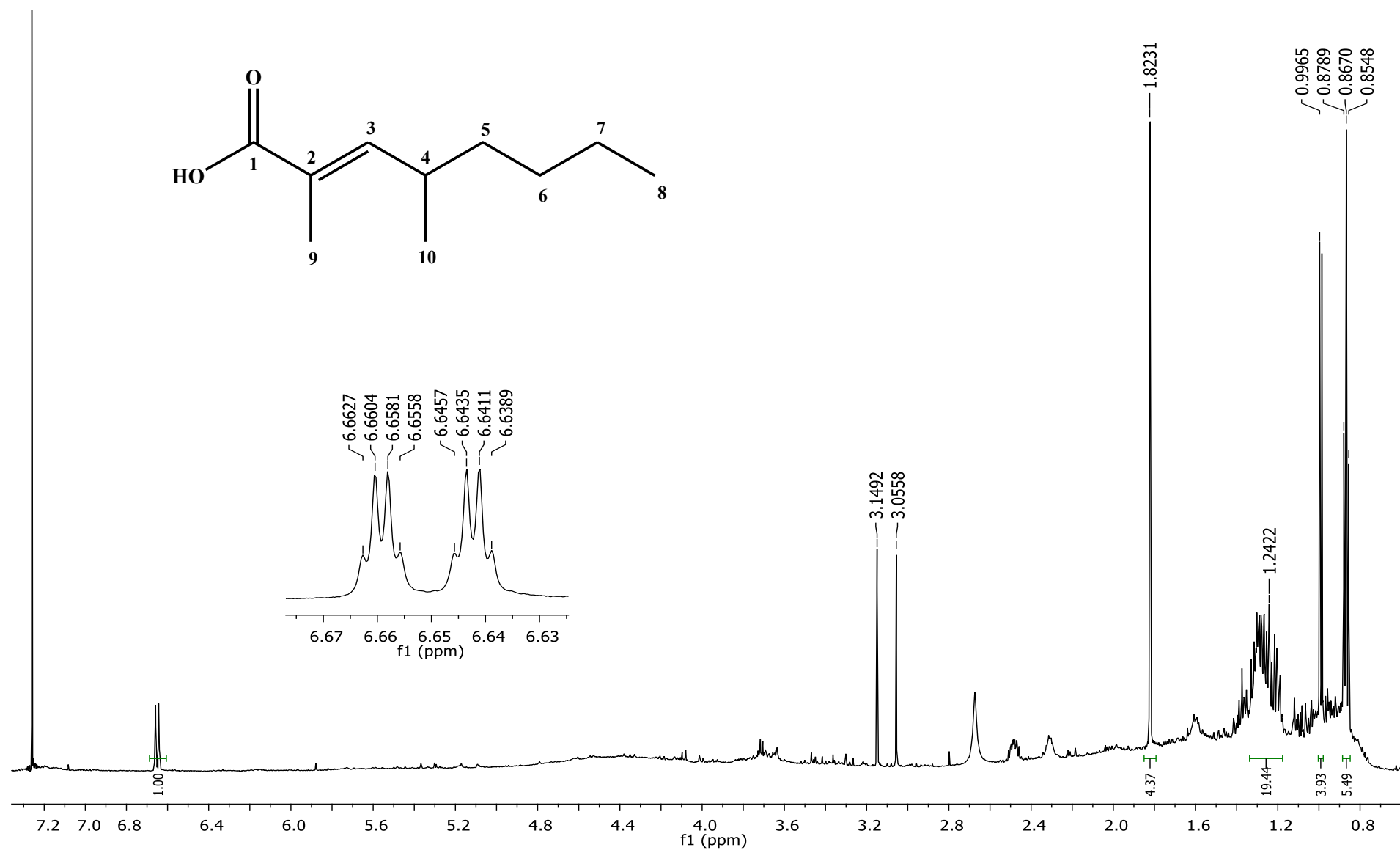


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância **4**.

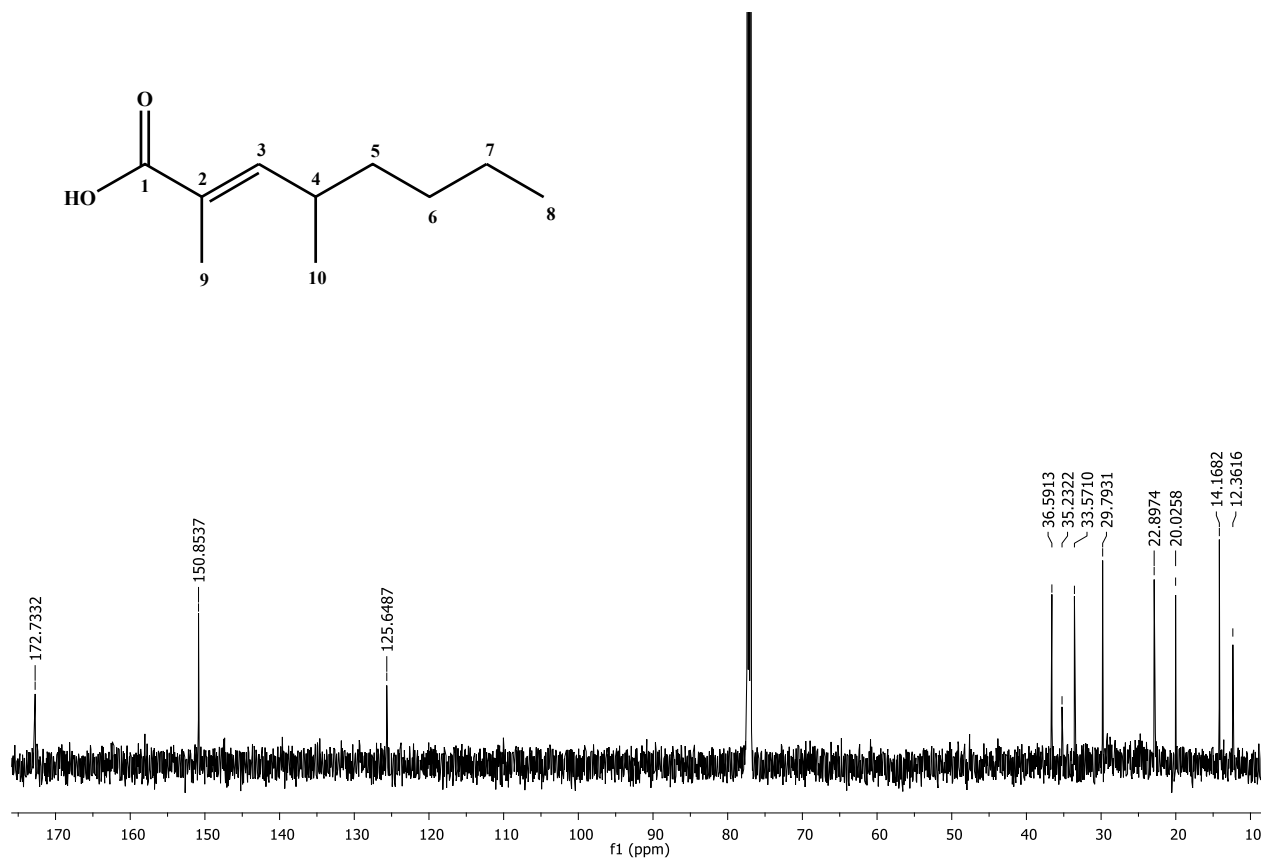


Figura 58: Espectro de RMN DEPT 135 (600 MHz, CDCl₃) da substância **4**.

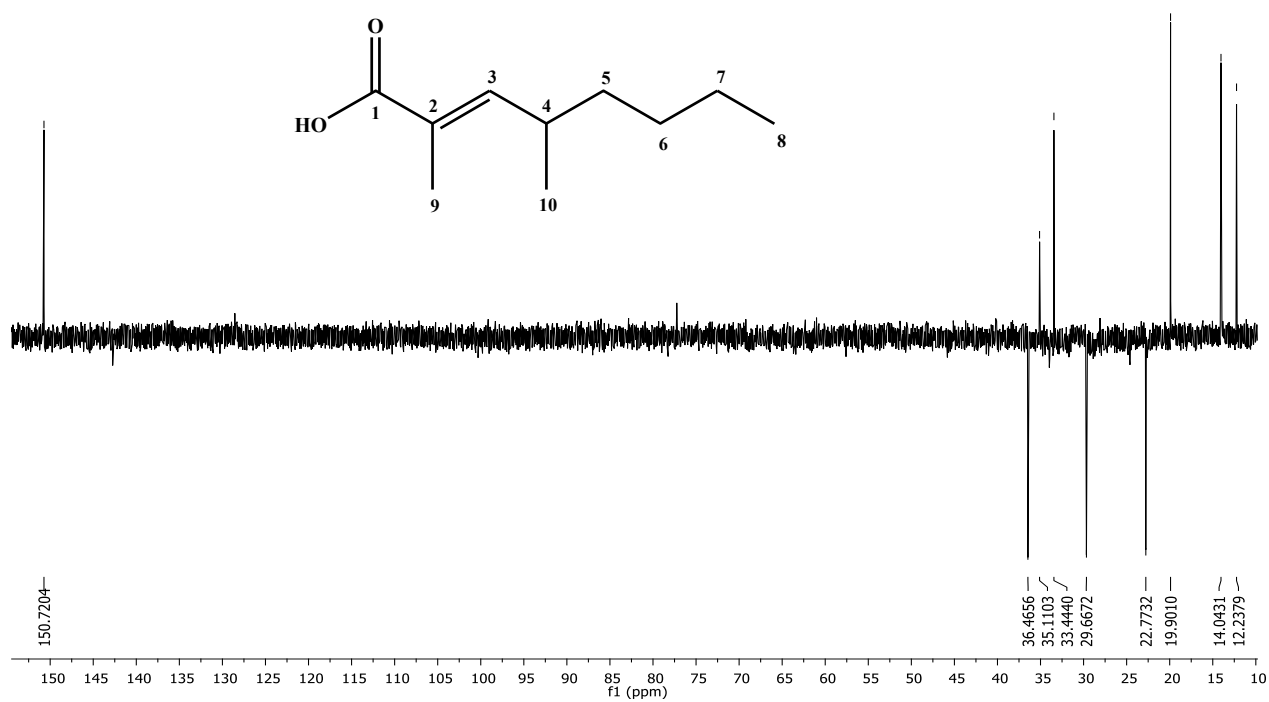
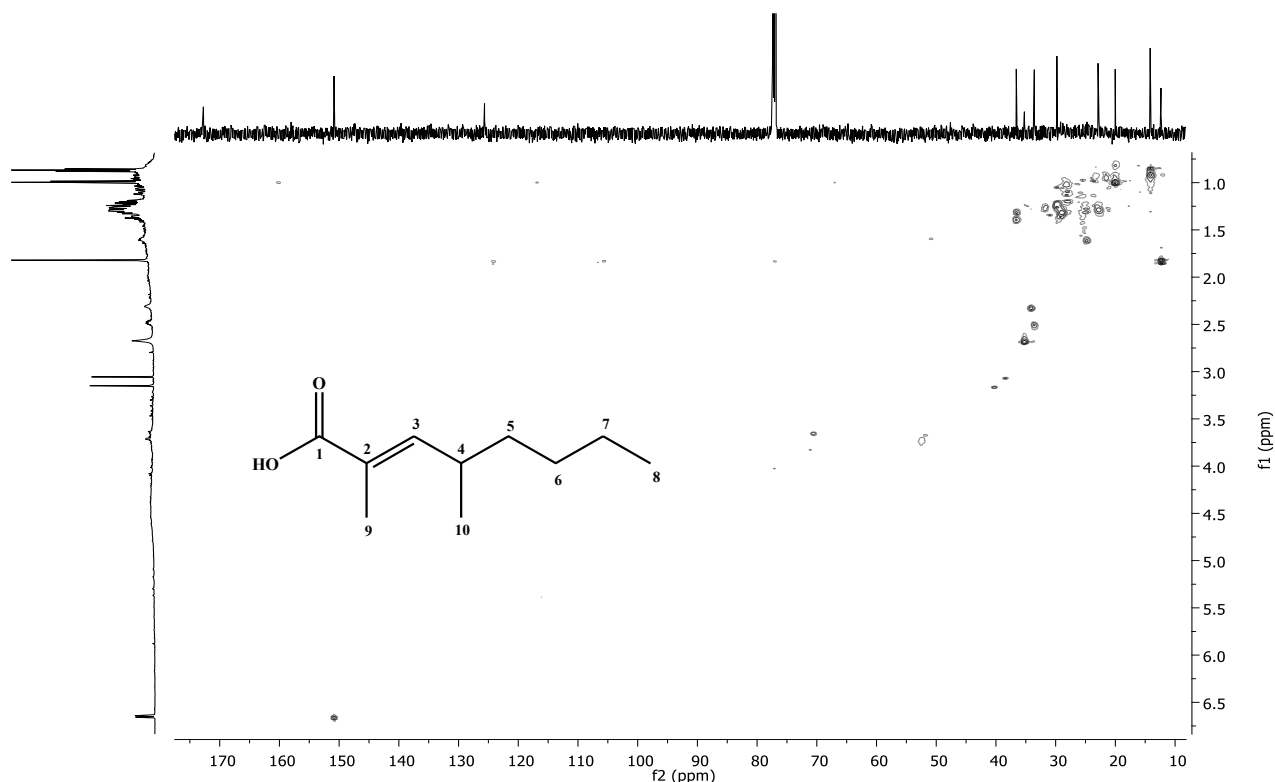


Figura 59: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância **4**



Esta substância já foi isolada como produto natural de *Xylaria* sp. um fungo endofítico isolado *Annella* sp. uma alga marinha e, apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*^{95, 96}.

Figura 60: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—)

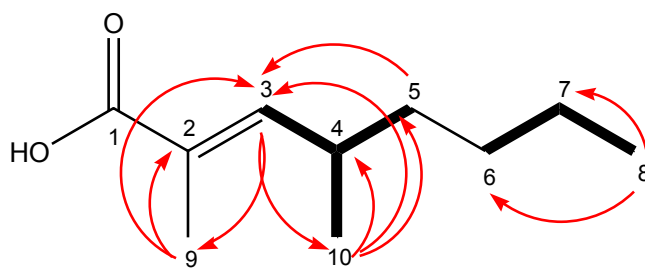
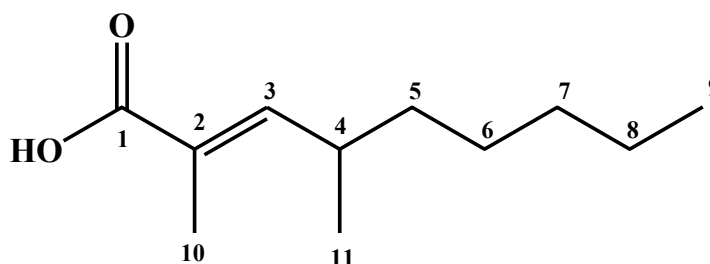


Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **4** (600 MHz, CDCl_3^a)

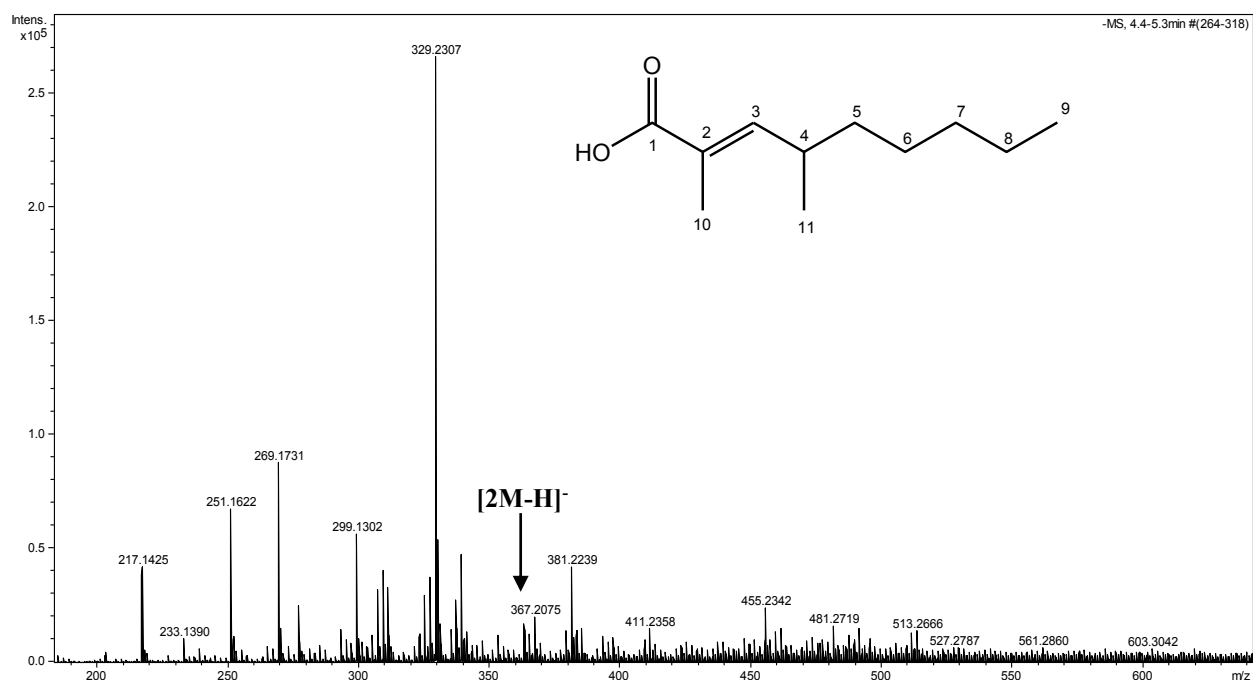
Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1	-	172,7; C	-
2	-	125,6; C	-
3	6,65 (<i>dq</i> , 1,4; 10,1)	150,8; CH	C-9; C-10
4	2,51 (<i>m</i>)	33,5; CH	-
5	1,39 (<i>m</i>)	36,5; CH_2	C-3
6	1,25 (<i>m</i>)	29,8; CH_2	-
7	1,28 (<i>m</i>)	22,8; CH_2	-
8	0,86 (<i>t</i> , 7,0)	14,1; CH_3	C-6; C-7
9	1,82 (<i>d</i> , 1,4)	12,3; CH_3	C-2; C-3
10	0,99 (<i>d</i> , 6,5)	20,0; CH_3	C-3; C-4; C-5

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

5.3.6 Determinação estrutural da substância **5**

Figura 61: Estrutura do Ácido (*E*)-2,4-dimetilnon-2-enóico

A substância **5** foi isolada como um óleo amarelo. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução por ionização em *eletrospray* no modo negativo (LC-MS-TOF) (**Figura 62**), onde foi visualizado o sinal de m/z 367,2075 referente à formação de dímero $[2\text{M-H}]^-$. Com auxílio dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu propor a fórmula $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_2$.

Figura 62: Espectro de massas de alta resolução da substância **5**

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (**Figura 63**) evidenciaram a presença de três metilas em δ_{H} 0,87 (*t*, 13,0 Hz; δ_{C} 14,1); δ_{H} 0,99 (*d*, 13,0 Hz; δ_{C} 20,0) e δ_{H} 1,82 (*s*; δ_{C} 12,3); quatro carbonos metilênicos em δ_{H} 1,25 (*m*, δ_{C} 22,9); δ_{H} 1,24 (*m*, δ_{C} 29,8), δ_{H} 1,23 (*m*, δ_{C} 29,9) e δ_{H} 1,31 (*m*, δ_{C} 36,6); dois carbonos metínicos em δ_{H} 2,33 (*m*, δ_{C} 33,5) e δ_{H} 6,66 (*dq*, 1,4; 10,1 Hz, δ_{C} 150,9), um carbono quaternário em δ_{C} 125,5 e um sinal em δ_{C} 172,5 característico de uma carbonila de ácido carboxílico.

No espectro de DEPT-135 (**Figura 64**) foi possível confirmar a presença de três carbonos metílicos, quatro metilênicos, dois metínicos e dois quaternários sendo um desses característico de carbonila, confirmando a estrutura com onze carbonos. Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise do mapa de correlação dos experimentos de HSQC (**Figura 65**) (**Tabela 12**).

Análise do experimento de COSY evidenciou um sistema de spins entre H-3 $\leftrightarrow$ H-4 $\leftrightarrow$ H-10, entre o hidrogênio H-4 $\leftrightarrow$ H-5 e, entre o hidrogênio H-9 $\leftrightarrow$ H-8 $\leftrightarrow$ H-7 $\leftrightarrow$ H-6 o que associado com as correlações observadas em HMBC, juntamente com os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C nos permitiram propor a estrutura do ácido (*E*)-2,4-dimetilnon-2-enóico.

Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância 5.

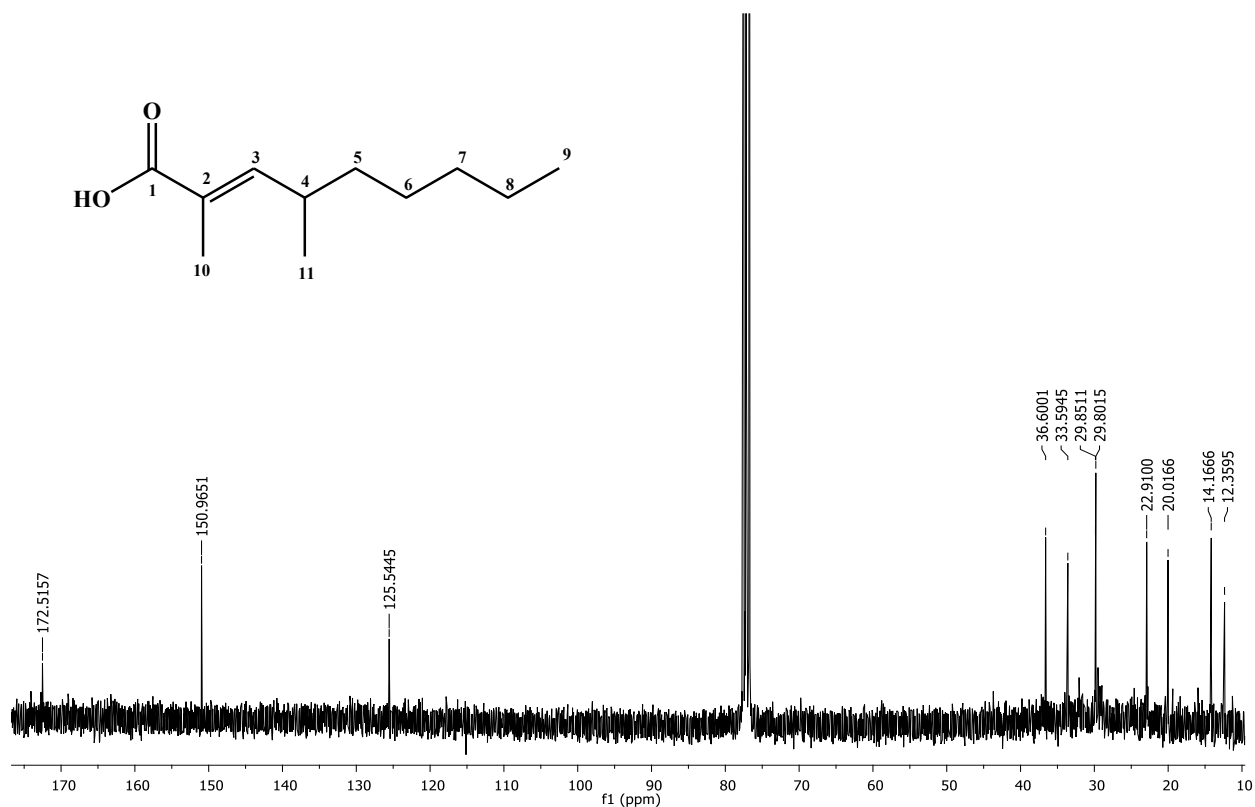


Figura 64: Espectro de RMN DEPT 135 (600 MHz, CDCl_3) da substância 5.

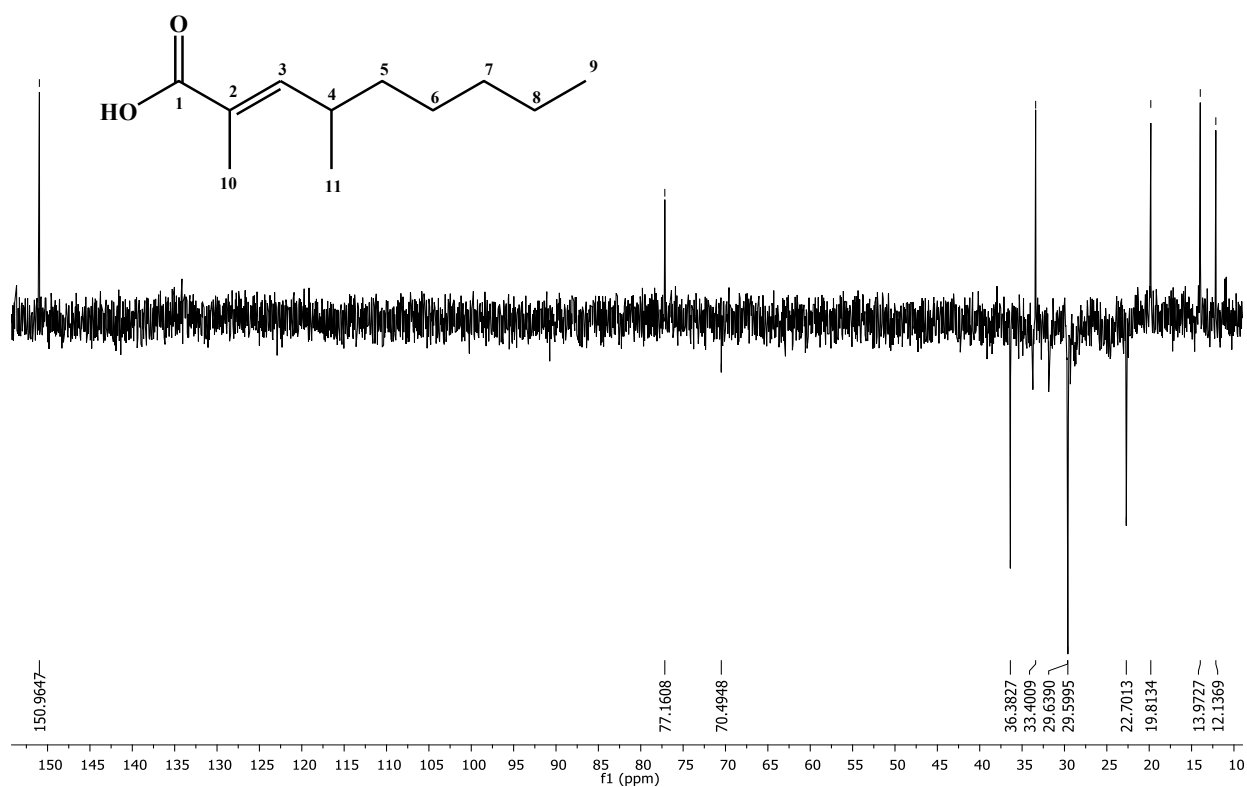
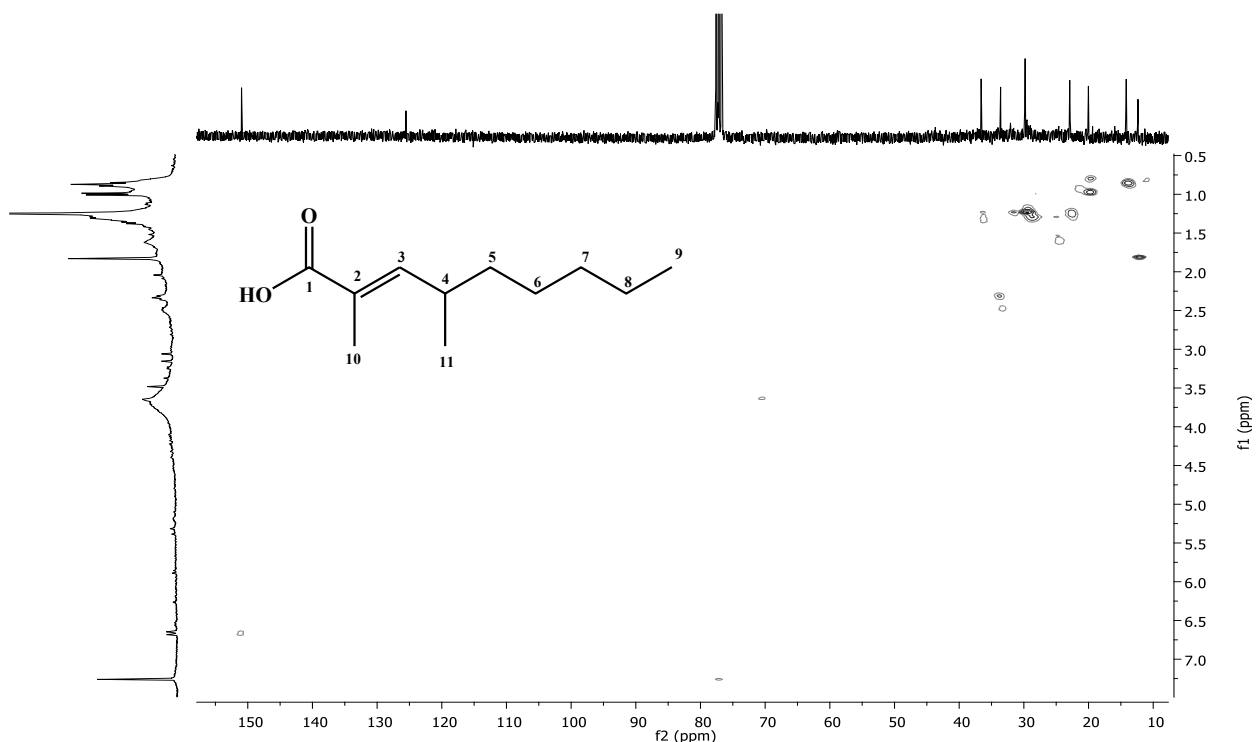
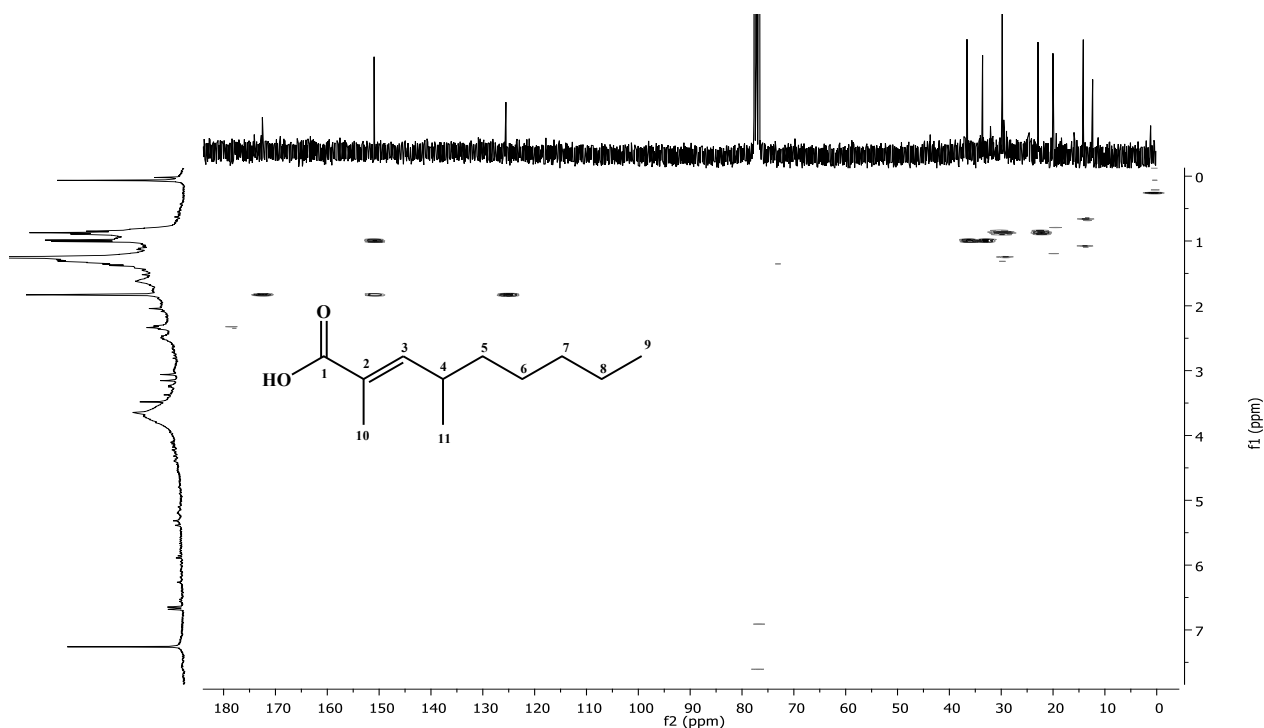


Figura 65: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância **5**



Pela análise do mapa de correlação de HMBC (**Figura 66**) de **5**, foi visualizado correlação entre o $\text{H-4} \leftrightarrow \text{C-1}$; $\text{H-5} \leftrightarrow \text{C-6/C-7}$; $\text{H-6} \leftrightarrow \text{C-7}$; $\text{H-9} \leftrightarrow \text{C-6/C-7/C-8}$; $\text{H-10} \leftrightarrow \text{C-1/C-2/C-3}$ e $\text{H-11} \leftrightarrow \text{C-1/C-4/C-5}$.

Figura 66: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância **5**



Estes dados, nos permitiram atribuir para a substância **5** a estrutura de um novo derivado de ácido graxo, o ácido (*E*)-2,4-dimetilnon-2-enóico. No entanto, não há relatos do isolamento desta substância na literatura.

Figura 67: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ^1H - ^1H COSY (—)

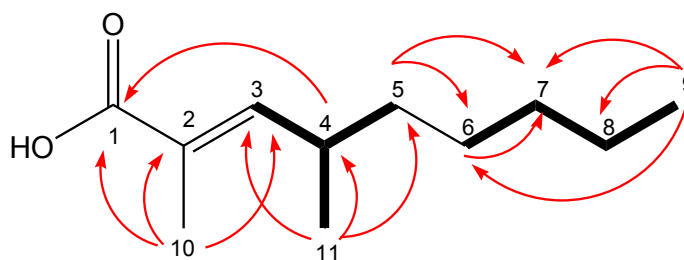


Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **5** (600 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1	-	172,7; C	-
2	-	125,5; C	-
3	6,66 (<i>d</i> , 21,0)	150,9; CH	-
4	2,33 (<i>m</i>)	33,5; CH	C-1
5	1,31 (<i>m</i>)	36,6; CH_2	C-6; C-7
6	1,24 (<i>m</i>)	29,8; CH_2	C-7
7	1,23 (<i>m</i>)	29,9; CH_2	-
8	1,24 (<i>m</i>)	22,9; CH_2	-
9	0,87 (<i>t</i> , 13,0)	14,1; CH_3	C-6; C-7; C-8
10	1,82 (<i>d</i> , 13,0)	12,3; CH_3	C-1; C-2; C-3
11	0,99 (<i>s</i>)	20,0; CH_3	C-1; C-4; C-5

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

As substâncias **4** e **5** são compostos derivados de ácidos graxos e, alguns ácidos graxos já foram encontrados como constituintes da cadeia lateral de substâncias da classe dos sesquiterpenos eremofilanos que foram isoladas deste mesmo micro-organismo durante o trabalho de mestrado. Esses sesquiterpenos eremofilanos são compostos altamente bioativos e, várias atividades biológicas foram encontradas tais como: atividade citotóxica frente a três linhagens tumorais, inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade anti-inflamatória e antioxidante⁷⁹.

CAPITULO 6

CAPITULO 6

6.0 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Periconia atropurpurea*

6.1 INTRODUÇÃO

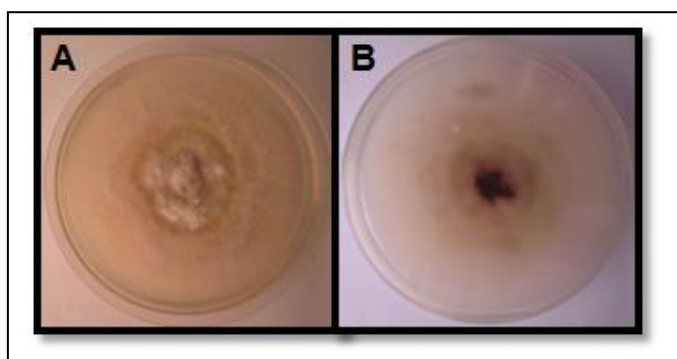
6.1.1 Endófito em Estudo: *Periconia atropurpurea*

Fungo endofítico pertencente à classe *Dothideomycetes* e, a ordem *Pleosporales*. A maioria das espécies desta classe são saprófitas de material vegetal, água doce e, ambientes marinhos ou terrestres, no entanto, várias espécies também se encontram associados a plantas que vivem como micro-organismos parasitas, epifíticos ou endofíticos⁹⁷.

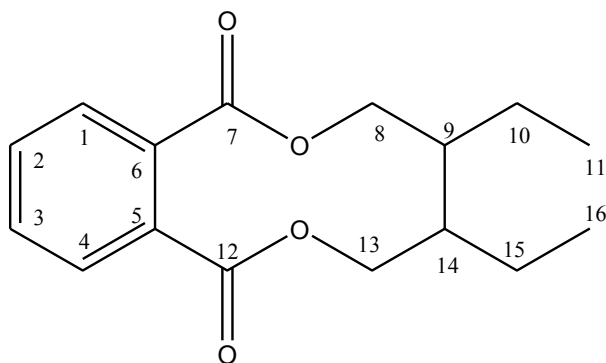
A cultura de *Periconia atropurpurea* forma micélios abundantes na superfície de coloração esbranquiçada e, o reverso das colônias torna-se rosa avermelhado após o envelhecimento (**Figura 68**).

Os poucos estudos químicos e biológicos realizados com este endófito foram os desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa onde foram isolados metabólitos secundários com forte potencial biológico, destacando principalmente o forte potencial citotóxico frente a três células cancerígenas e, atividade antifúngica⁹⁸.

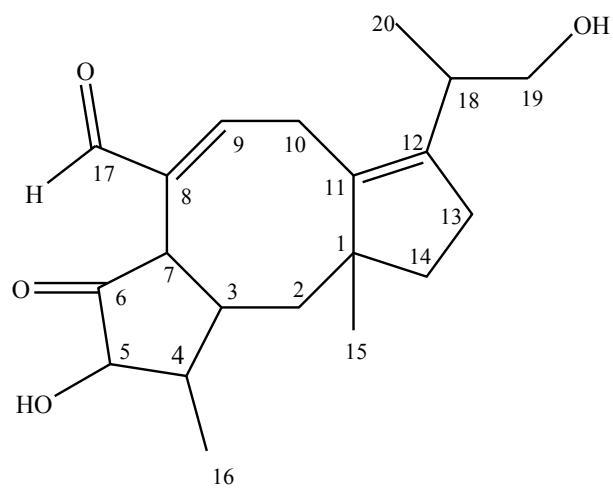
Figura 68: *Periconia atropurpurea* (A) Superfície e, (B) Parte inferior do endófito.



SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO ENDÓFITO *Periconia atropurpurea*



7 - 4,5-diethyl-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona



8 - Periconicina B

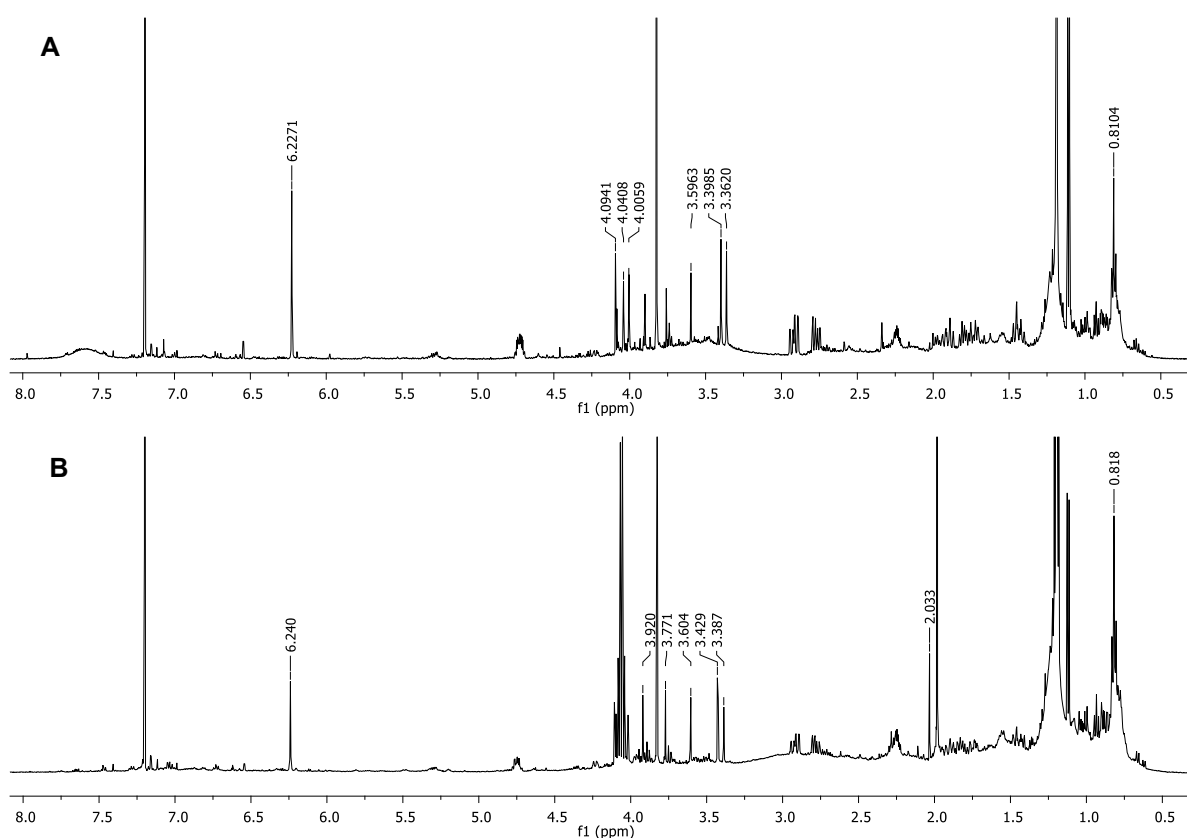
6.2 METODOLOGIA

6.2.1 Cultivo de *Periconia atropurpurea* em escala ampliada

O meio de cultivo líquido Extrato de Malte (EM) foi selecionado para o crescimento do fungo endofítico *P. atropurpurea* em escala ampliada (**Fluxograma 1**), pois o extrato AcOEt (escala reduzida), neste meio, apresentou ótimos resultados nos ensaios biológicos, principalmente no ensaio citotóxico frente as três linhagens tumorais testadas, evidenciando ser um prolífico produtor de metabólitos bioativos.

O extrato bruto AcOEt obtido em escala ampliada foi submetido a análise por HPLC-DAD em gradiente exploratório (Item 3.5.2.1, pág. 64) e por RMN de ^1H (**Figura 69**), e mostrou perfil químico semelhante ao obtido em escala reduzida, evidenciando diferenças na intensidade de alguns sinais.

Figura 69: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do extrato AcOEt em Extrato de Malte (**A**) Escala Ampliada e, (**B**) Escala Reduzida.

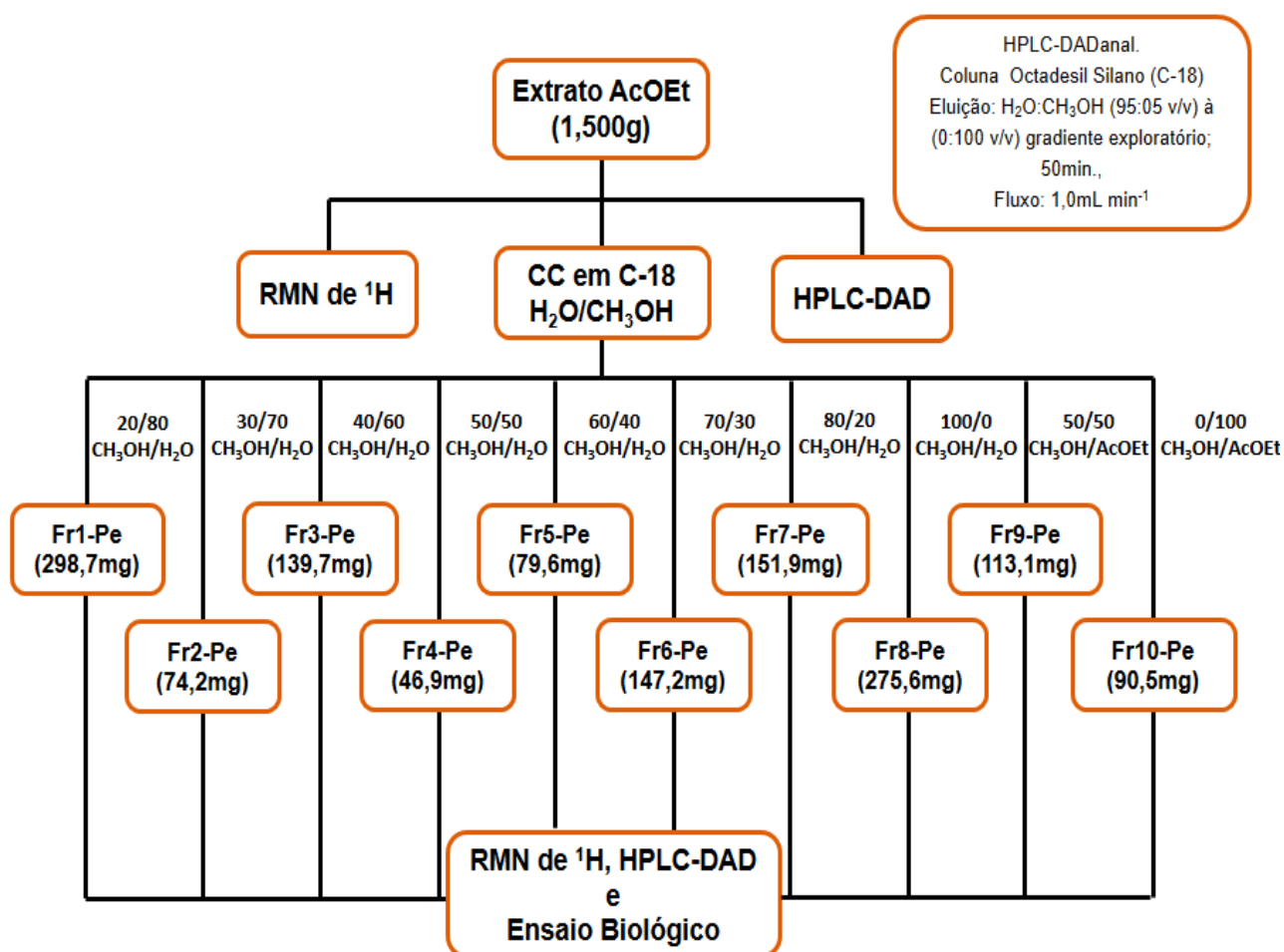


6.2.2 Fracionamento do extrato AcOEt em extrato de malte de *P. atropurpurea* obtido em escala ampliada.

O extrato AcOEt foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão, onde foram obtidas dez frações como visualizado na **Fluxograma 10**, de 159 mL cada (Fr1-Pe a Fr8-Pe).

O perfil químico destas frações foi avaliado por HPLC-DAD e, por RMN de ^1H . O perfil biológico de todas também foi avaliado com o envio das mesmas para os ensaios biológicos já citados.

Fluxograma 10: Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt em Malte de *P. atropurpurea*.



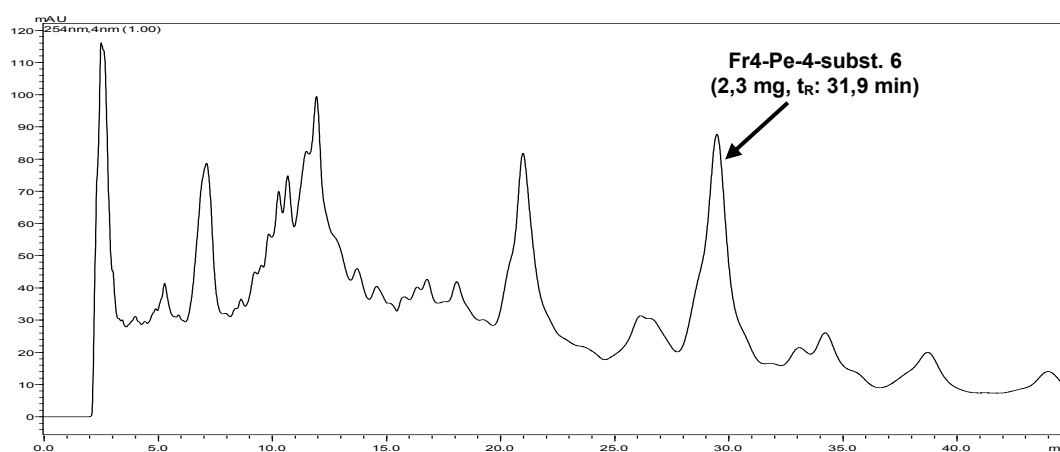
6.2.3 Purificação da Fração Fr4-Pe

Após análise dos resultados químicos e biológicos das frações oriundas do Extrato de Malte obtido do endófito *P. atropurpurea*, a fração Fr4-Pe apresentou uma massa considerável, boa resolução por CCDC e, por ter apresentado forte ação

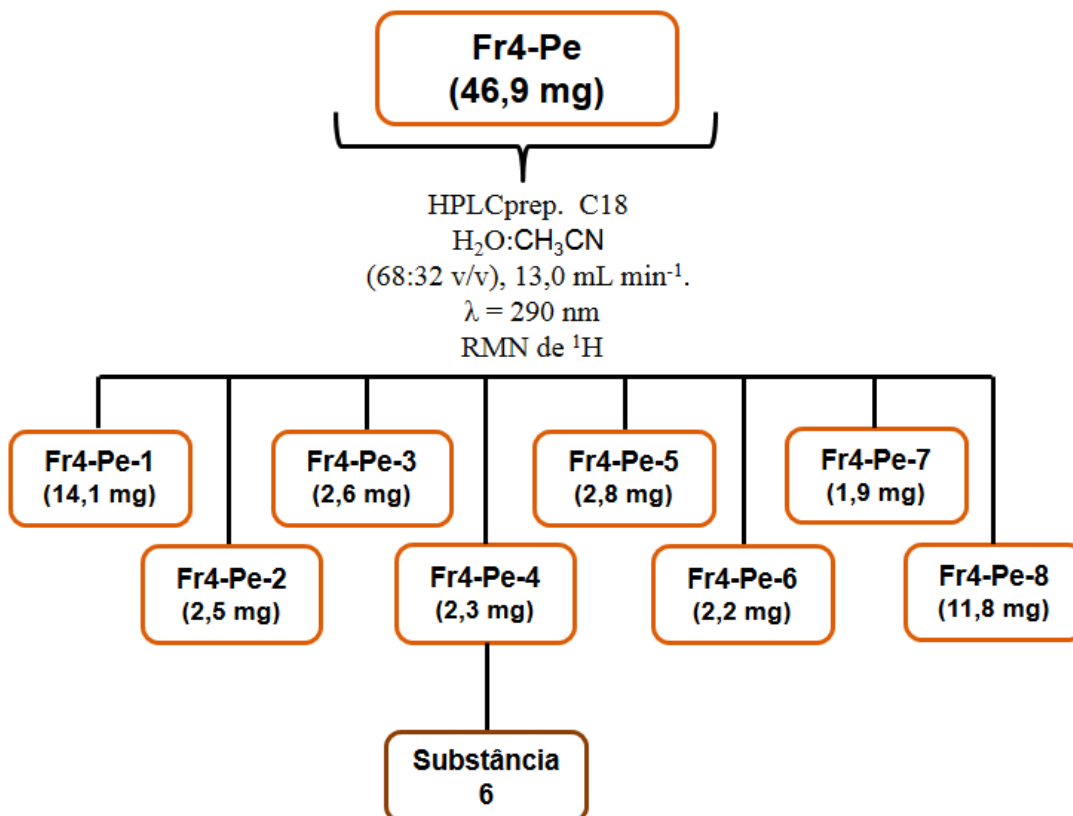
citotóxica contra as três linhagens tumorais testadas e fraco potencial antifúngico, o que possibilitou a seleção desta para separação por HPLC preparativo como visualizado no **Fluxograma 11**.

A amostra (fase orgânica) foi solubilizada na FM utilizada, filtrada em membrana (0,22 μ m) e injetada cinco vezes (8 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL. (**Figura 70**) Deste fracionamento, isolou-se a substância **6**.

Figura 70: Cromatograma HPLC_{prep} de Fr4-Pe registrado em 254 nm.



Fluxograma 11: Fluxograma de purificação da fração Fr4-Pe.

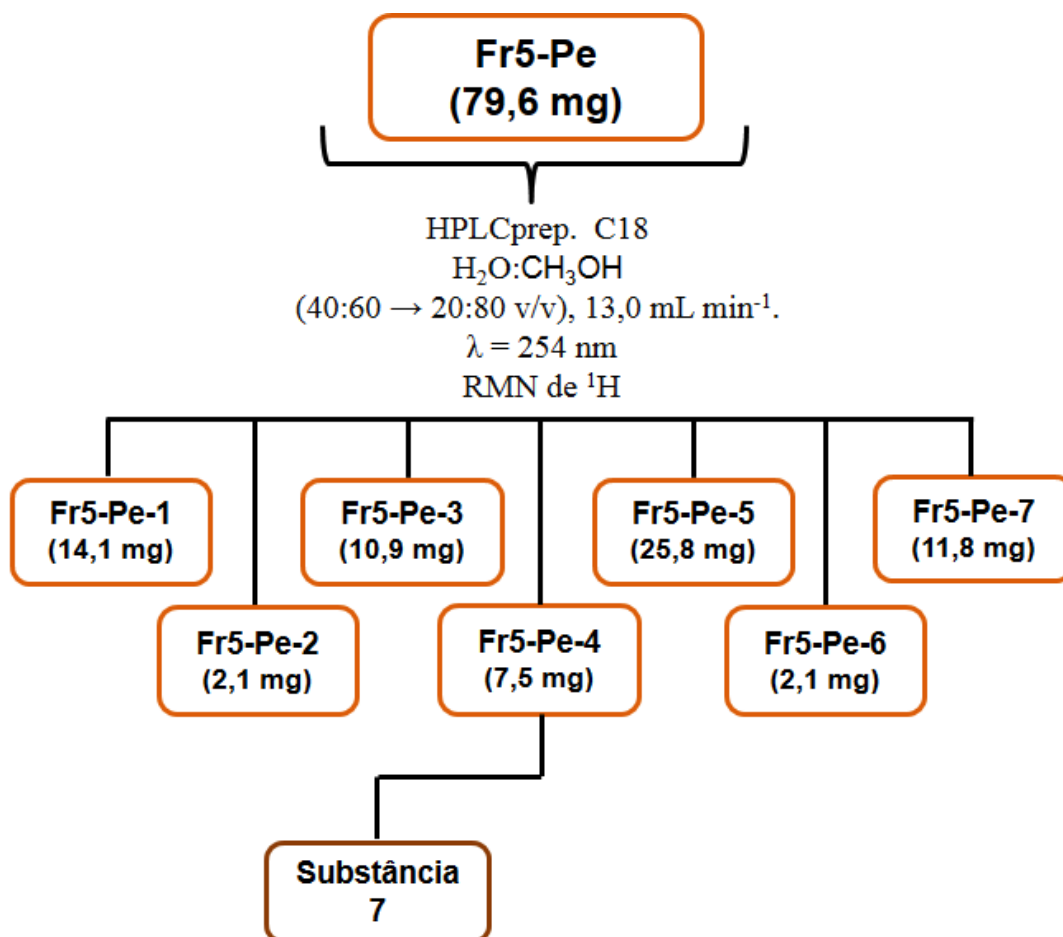


6.2.4 Purificação da Fração Fr5-Pe

A fração Fr5-Pe apresentou uma massa considerável e boa resolução por CCDC, foi analisada por HPLC-DAD, RMN de ^1H e pelo fato da mesma ter apresentado forte ação citotóxica contra as três linhagens tumorais testadas, esta foi selecionada para separação por HPLC preparativo como visualizado no **Fluxograma 12**.

A amostra (fase orgânica) foi solubilizada na FM, filtrada em membrana (0,22 μm) e injetada cinco vezes (14 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL. Deste fracionamento, isolou-se a substância 7.

Fluxograma 12: Fluxograma de purificação da fração Fr5-Pe.



6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Avaliação da atividade biológica das frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt em Extrato de Malte de *P. atropurpurea*

6.3.1.1 Ensaio Citotóxico

Todas as frações oriundas do fracionamento do extrato AcOEt tiveram seu poder citotóxico avaliado frente as três linhagens tumorais testadas.

A atividade citotóxica de todas as frações está apresentada na **Tabela 13** com seus respectivos percentuais de inibição. Observamos, que as frações Fr4-Pe, Fr5-Pe, Fr7-Pe e Fr8-Pe apresentaram forte atividade frente as três linhagens testadas, evidenciando assim, a produção de substâncias citotóxicas por este micro-organismo.

Tabela 13: Percentual de inibição do crescimento celular (IC₅₀%) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL

Amostra	OVCAR-8	SD	HCT-116	SD	SF-295	SD
Nº	Identificação	GI% (média)	GI% (média)	GI% (média)	GI% (média)	GI% (média)
1	Fr1-Pe	14,03%	2,17%	11,06%	0,10%	43,94%
2	Fr2-Pe	12,67%	1,93%	14,27%	1,09%	42,82%
3	Fr3-Pe	59,15%	4,46%	77,33%	1,09%	69,12%
4	Fr4-Pe	100,09%	4,46%	95,12%	6,51%	97,50%
5	Fr5-Pe	96,50%	1,33%	95,88%	0,89%	83,28%
6	Fr6-Pe	23,84%	9,05%	48,38%	22,49%	42,13%
7	Fr7-Pe	98,29%	0,96%	91,98%	0,69%	93,66%
8	Fr8-Pe	98,46%	5,79%	101,88%	0,30%	88,02%
9	Fr9-Pe	42,17%	3,38%	39,66%	0,49%	49,00%
10	Fr10-Pe	35,52%	3,14%	29,82%	16,18%	46,87%

*Valores são média ± DPM (Desvio Padrão da Média)

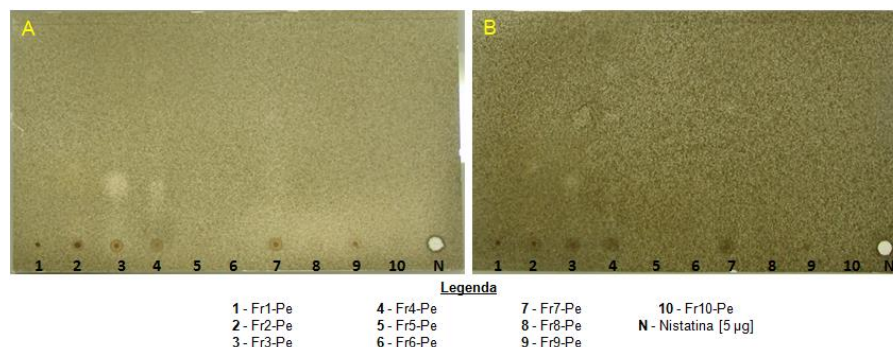
Os ótimos resultados obtidos do ensaio citotóxico, nos conduziram a seleção das frações Fr4-Pe e Fr5-Pe para o estudo químico.

6.3.1.2 Ensaio Antifúngico

Todas as frações oriundas do fracionamento do extrato AcOEt foram analisadas frente aos fungos fitopatogênicos.

Os resultados obtidos deste bioensaio estão presentes na **Figura 71**, e evidenciaram que apenas as frações Fr3-Pe e Fr4-Pe apresentaram ação antifúngica contra os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Figura 71: Resultado da atividade antifúngica das frações obtidas do cultivo do endófito *Periconia atropurpurea* (A) *C. cladosporioides*, (B) *C. sphaerospermum*.

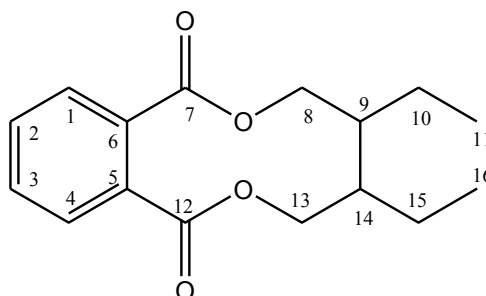


6.3.1.3 Ensaio Anticolinesterásico

As frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt do cultivo em EM de *P. atropurpurea* não apresentaram atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

6.3.2 Determinação estrutural da substância 6

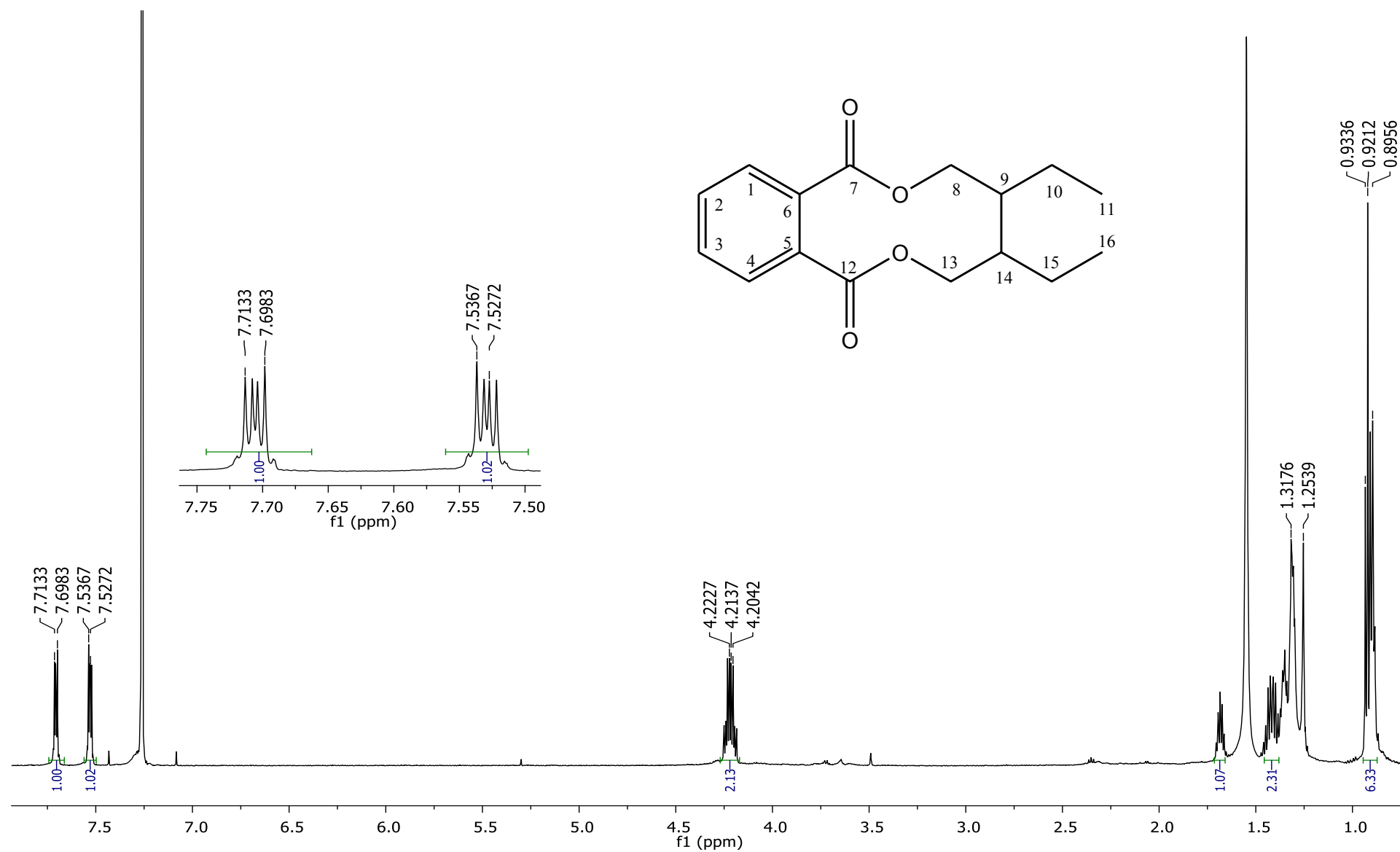
Figura 72: Estrutura do 4,5-dietil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[*c*][1,6]dioxecina-1,8-diona



A substância 6 foi isolada como um óleo amarelo (2,3 mg), e, sua fórmula molecular $C_{16}H_{20}O_4$ foi determinada utilizando os dados obtidos através das análises dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C .

O espectro de RMN de 1H (**Figura 73**) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,71 (*dd*, $J = 3,3$ e $5,7$ Hz, 2H, H-1 e H-4), e δ_H 7,53 (*dd*, $J = 3,3$ e $5,7$ Hz, 2H, H-2 e H-3) evidenciando um anel aromático dissustituído e simétrico, um sinal em δ_H 4,22 (*dq*, $J = 0,4$; $6,0$; $11,0$ e $22,1$ Hz, 4H, H-8 e H-13) característicos de hidrogênios metilênicos carbinólicos e, um sinal em δ_H 0,92 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 6H, H-11 e H-16) característico de hidrogênios de metila terminal. Com esses dados foi possível sugerir que esta substância é pertencente à classe dos ftalatos.

Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância **6**.



O espectro de HSQC (**Figura 74**) apresentou correlação direta dos hidrogênios aromáticos H-1, H-2, H-3 e H-4 com os carbonos em δ_c 130,3 e 128,3 respectivamente. Os hidrogênios H-8 e H-13 apresentaram correlação direta com o carbono em δ_c 67,5, os hidrogênios H-9 e H-14 com o carbono em δ_c 38,1, H-10 e H-15 com o carbono em δ_c 23,9 e, os hidrogênios das metilas H-11 e H-16 com o carbono em δ_c 11,1 (**Tabela 14**).

Os deslocamentos químicos em δ_c 132,6 (C-5 e C-6), δ_c 130,3 (C-2 e C-3) e, δ_c 128,3 (C-1 e C-4) observados no espectro de HMBC (**Figura 75**) indicaram a presença de um anel aromático. Foi possível observar também, a presença de carbonos metínicos e metilênicos em δ_c 38,1 (C-9 e C-14) e δ_c 23,9 (C-10 e C-15), além da presença de carbonilas de ésteres em δ_c 167,5 (C-7 e C-12) totalizando assim, a presença de dezesseis carbonos na estrutura da substância **6** e mostrando que esta substância possui uma estrutura simétrica.

No experimento de HMBC, também foi possível observar as correlações de H-1 $\leftrightarrow$ C-1/C-6/C-12 e, H-4 $\leftrightarrow$ C-3/C-5/C-7 confirmando a posição dos carbonos C-1, C-2, C-3 e C-4 com deslocamentos característicos de benzeno dissustituído.

Figura 74: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância **6**

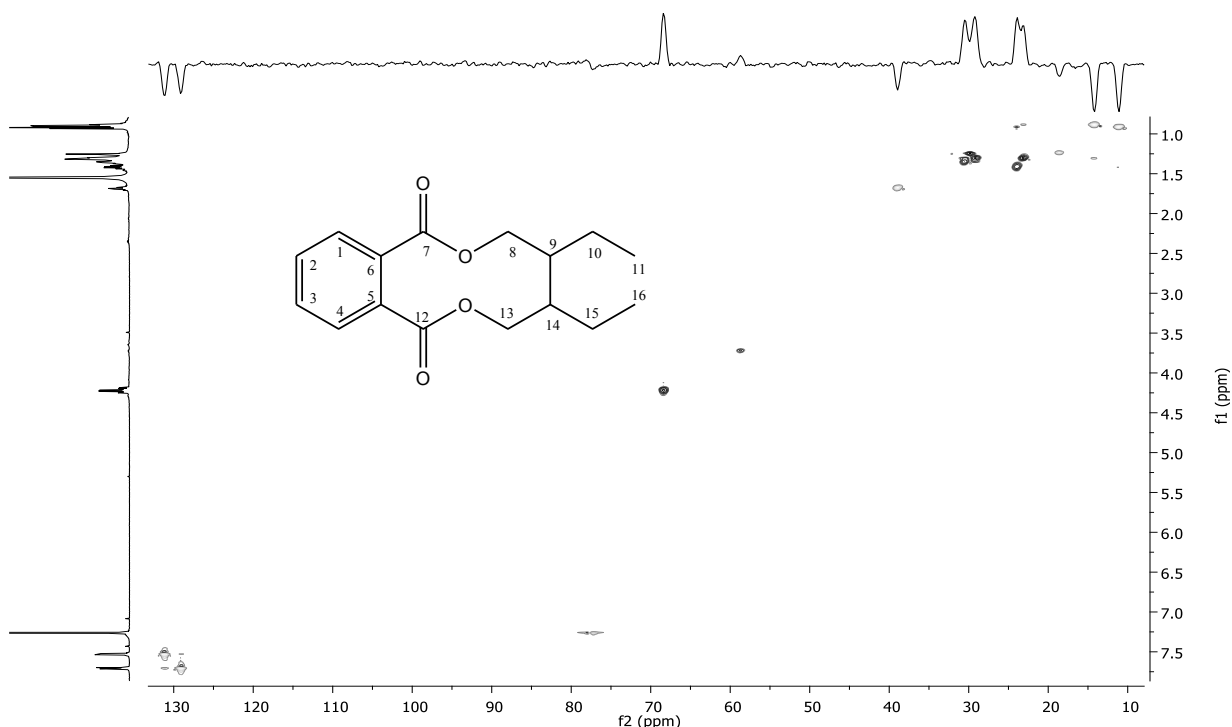
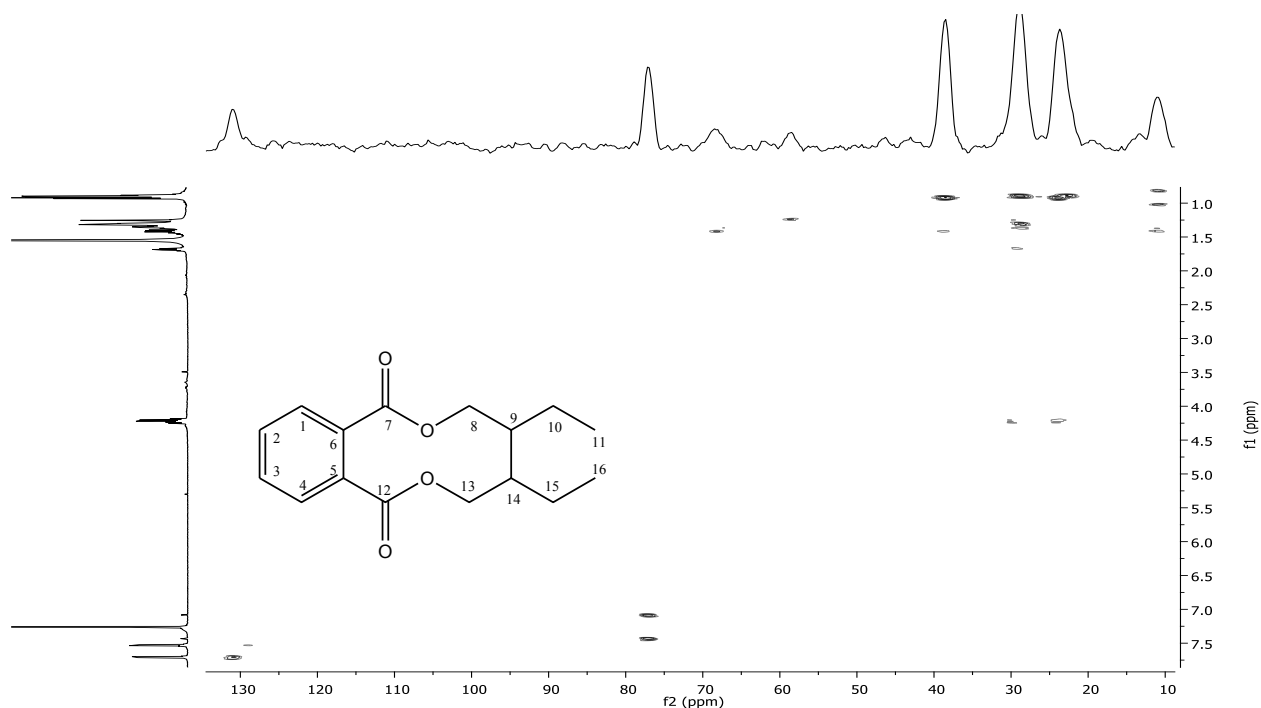
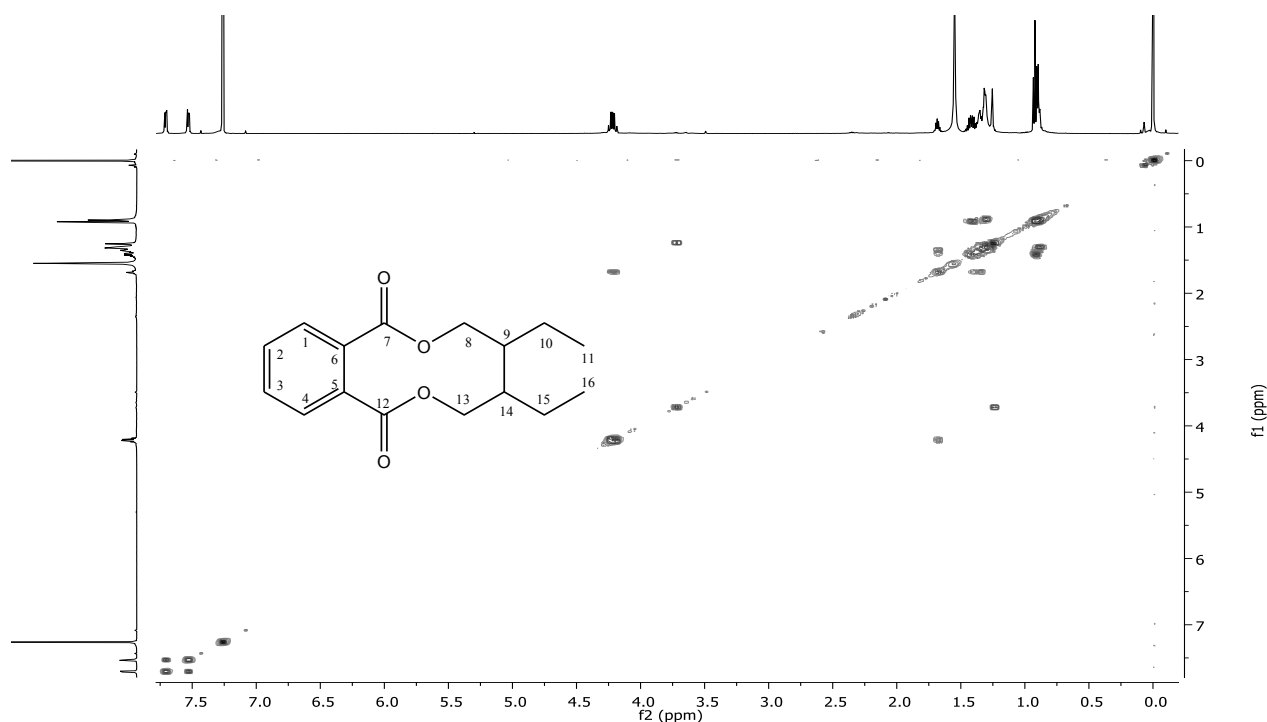


Figura 75: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) da substância **6**



No experimento de COSY (**Figura 76**) foi possível observar as interações ^1H - ^1H do $\text{H-1} \leftrightarrow \text{H-2}$; $\text{H-9} \leftrightarrow \text{H-8} \leftrightarrow \text{H-10}$ e interações ^1H - ^1H do $\text{H-10} \leftrightarrow \text{H-11}$, permitindo estabelecer a estrutura de um anel aromático dissustituído e simétrico para a substância **6**.

Figura 76: Espectro de COSY (600 MHz, CDCl_3) da substância **6**



Estas informações associadas aos dados da literatura sugerem a estrutura da substância **6** como sendo um novo ftalato, o 4,5-dietil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona.

Ftalatos como dibutilftalato (DBP), são muito utilizadas como plastificante em indústrias têxteis, de corantes, cosméticos e vidro, já foi identificado e isolado de extratos de fungos como, *Engyodontium album*⁹⁹, *Pestalotiopsis virgatula*¹⁰⁰, *Penicillium stoloniferum*¹⁰¹, *Alternaria* sp.¹⁰², *Curvularia senegalensis*¹⁰³, entre outros. Destes mesmos endófitos, outros ftalatos também foram isolados ou identificados.

Figura 77: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹H-¹H COSY (—)

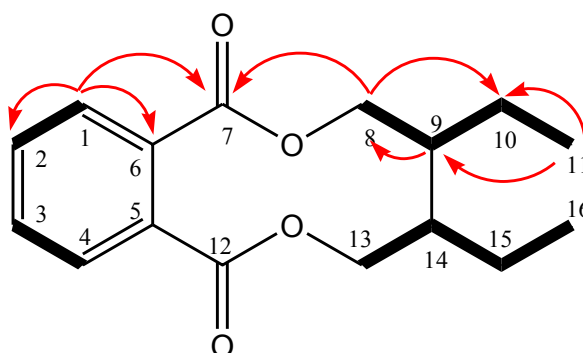


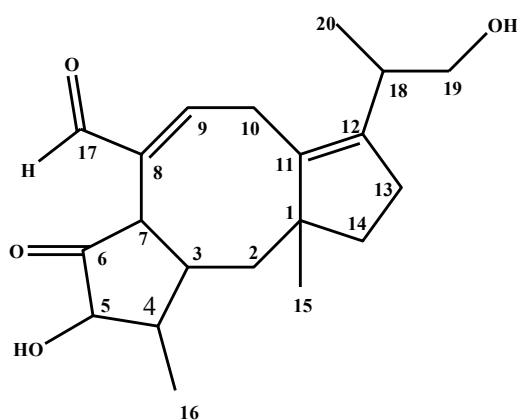
Tabela 14: Dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância **6** (600 MHz, CDCl₃^a).

Posição	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	HMBC
1 e 4	7,71 (<i>dd</i> , 3,3; 5,7)	128,3; CH	C-2; C-3; C-7; C-12
2 e 3	7,53 (<i>dd</i> , 3,3; 5,7)	130,3; CH	C-1; C-4
5 e 6	-	132,6; C	-
7 e 12	-	167,5; C	-
8 e 13	4,22 (<i>dq</i> , 0,4; 6,0; 11,0; 22,1)	67,5; CH ₂	C-7; C-10; C-12; C-15
9 e 14	1,68 (<i>dt</i> , 6,1)	38,1; CH	C-8; C-13
10 e 15	1,42 (<i>ddd</i> , 7,5)	23,9; CH ₂	C-8; C-9; C-13; C-14
11 e 16	0,92 (<i>t</i> , 7,5)	11,1; CH ₃	C-9; C-10; C-14; C-15

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

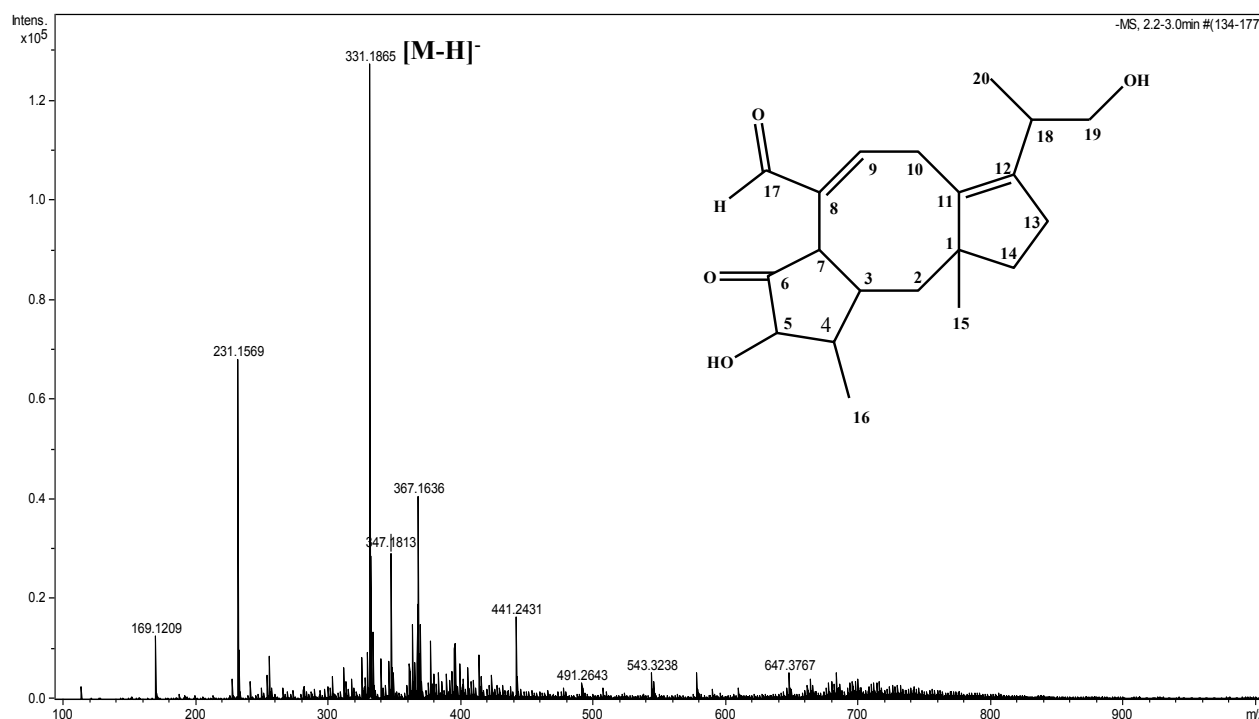
6.3.3 Identificação estrutural da substância 7

Figura 78: Estrutura da Periconicina B



No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray* no modo negativo (LC-MS-TOF) (**Figura 79**), foi visualizado o sinal de m/z 331,1865 (Erro calculado: 13,8 ppm) referente à formação de $[M-H]^-$. Com auxílio dos dados de RMN de 1H e ^{13}C permitiu propor a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$.

Figura 79: Espectro de massas de alta resolução da substância 7



O espectro de RMN de 1H de 7 a 600 MHz (**Figura 80**) (**Tabela 15**) apresentou dois sinais mais desblindados em δ 9,17 e δ 7,13, integrados para um hidrogênio e, correlacionados em ligação direta aos carbonos em, δ 192,6 e δ 156,7,

evidenciando serem hidrogênio de aldeído e de ligação dupla, respectivamente. Dois outros sinais registrados em δ_C 79,4 e δ 65,9 foram evidenciados como hidrogênios carbinólicos e atribuídos a C-5 e C-19, respectivamente. O espectro também apresentou um simpleto em δ 1,01 e dois dupletos δ 0,94 e δ 0,76 caracterizando a presença de uma metila sobre carbono quaternário e outras duas sobre carbonos metínicos, correlacionados por HSQC aos carbonos δ 26,5; δ 15,3 e δ 7,5, respectivamente. Os demais sinais do espectro sugeriram a presença de hidrogênios alifáticos, sendo necessário dados espectroscópicos auxiliares de correlações homo e heteronucleares.

Pelo mapa de correlação 1H - ^{13}C a longa distância observou-se a presença de vinte sinais de carbono, sugerindo inicialmente um esqueleto diterpênico. O espectro confirmou a presença da carbonila de aldeído em δ 192,6, do carbono sp^2 metínico em δ 156,7; das três metilas em δ 7,5; δ 15,3 e δ 26,5, e dos carbinólicos em δ 79,4 e δ 65,9, correlacionados diretamente a seus respectivos hidrogênios através do experimento HMQC. Foram registrados outros quatro sinais de carbonos quaternários em δ 141,2; δ 139,5; δ 143,2 e δ 216,5; evidenciando a presença de outra ligação dupla e uma carbonila cetônica. Outros nove sinais registrados entre δ 50,8 e δ 24,4, foram identificados como metilênicos e metínicos, sendo somente o carbono em δ 50,8 como quaternário.

As correlações observadas no experimento COSY foram coerentes com a estrutura identificada, auxiliando o estabelecimento da sequência de ligações H-18 $\leftrightarrow$ H-19 $\leftrightarrow$ H-20; e H-7 $\leftrightarrow$ H-3 $\leftrightarrow$ H-4 $\leftrightarrow$ H-2 $\leftrightarrow$ H-14 $\leftrightarrow$ H-13.

Correlações observadas no experimento HMBC entre H-9 e H-7 $\leftrightarrow$ C-17, e H-17 $\leftrightarrow$ C-7, formaram base para o posicionamento do aldeído. A cadeia isopropílica foi posicionada através das correlações entre H-20 e C-12 e entre H-18 e C-11. As demais correlações observadas para esta substância também suportaram a estrutura identificada (**Figura 81**). Desta forma, a análise dos dados espectroscópicos descritos possibilitou a identificação de um diterpeno com esqueleto fusicocânico.

Comparação de valores espectroscópicos obtidos na literatura^{104, 105} com aqueles obtidos experimentalmente, permitiu a identificação estrutural de **7** como periconicina B.

Esta substância já foi isolada deste mesmo micro-organismo em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Figura 80: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 7.

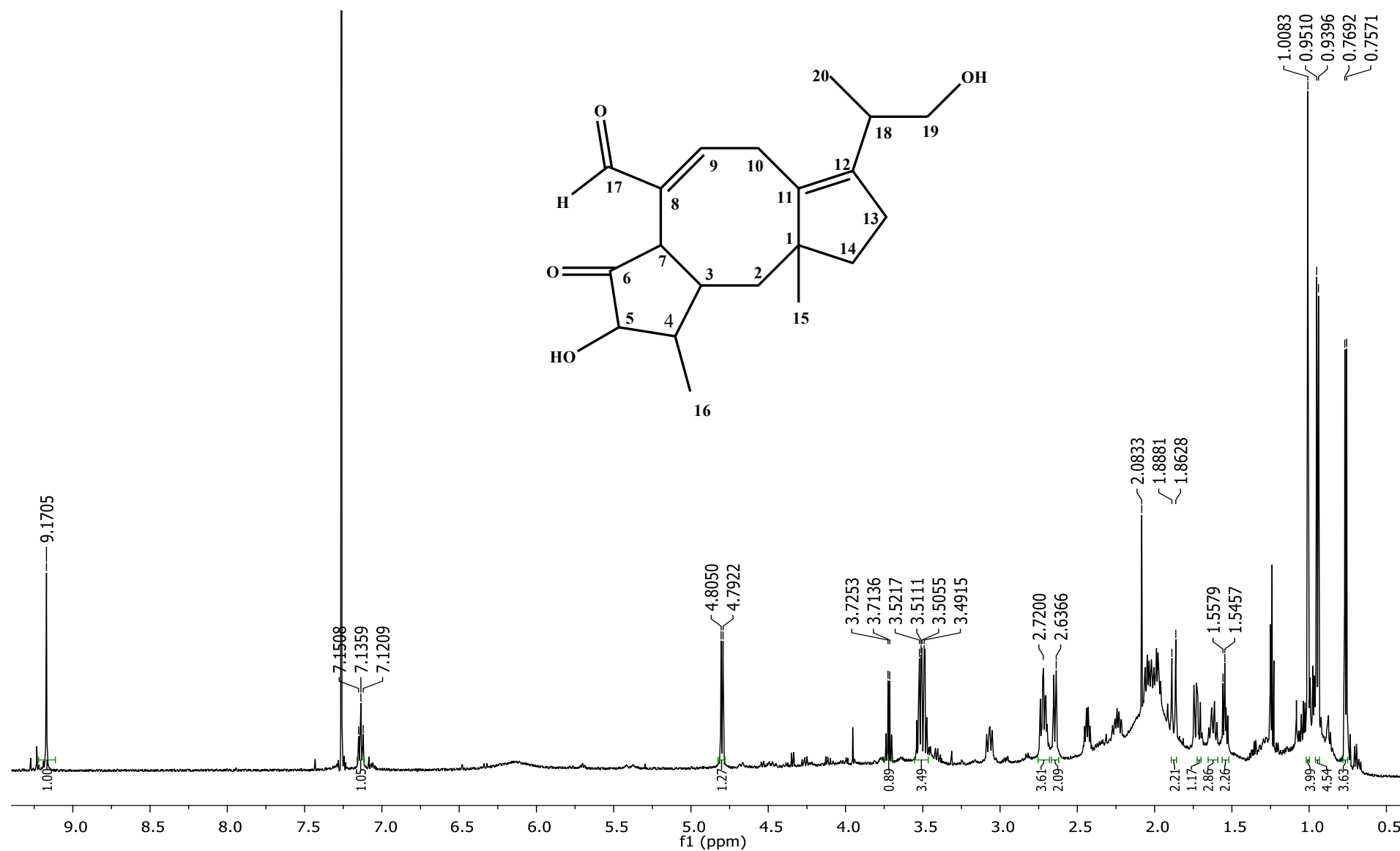
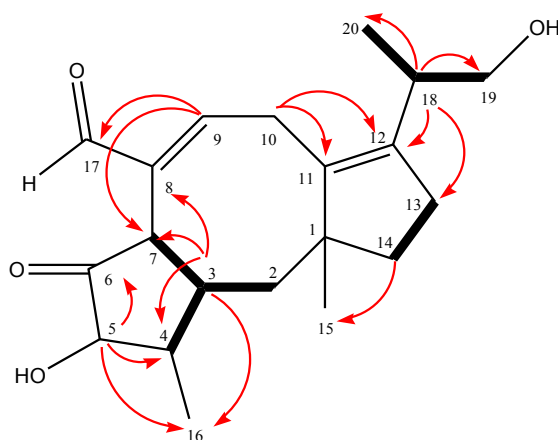


Figura 81: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ^1H - ^1H COSY (—)**Tabela 15:** Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **7** (600 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1	-	50,8; C	-
2	1,72 (dd; 15,0; 10,0) 1,87 (d; 15,0)	45,6; CH_2	C-1; C-3; C-4; C-7; C-12; C-14; C-15
3	1,99 (ddd; 6,0; 9,0; 15,0)	37,7; CH	C-4; C-7; C-8; C-16
4	2,43 (m)	39,1; CH	C-5; C-6; C-7; C-16
5	4,79 (d; 8,0)	79,4; CH	C-4; C-6; C-16
6	-	216,5; C	-
7	2,64 (d; 9,0)	48,1; CH	C-2; C-3; C-6; C-8; C-9; C-17
8	-	141,2; C	-
9	7,13 (t; 9,0)	156,7; CH	C-7; C-17
10	2,72 (dd; 9,5; 12,0) 3,07 (dd; 8,5; 12,0)	24,4; CH_2	C-1; C-8; C-9; C-11; C-12; C-13
11	-	139,5; C	-
12	-	143,2; C	-
13	2,03 (m) 2,25 (m)	26,7; CH_2	C-1; C-11; C-12; C-14
14	1,53 (m) 1,62 (m)	36,1; CH_2	C-11; C-12; C-13; C-15
15	1,01 (s)	26,5; CH_3	C-1; C-2; C-12; C-14
16	0,76 (d; 7,0)	7,5; CH_3	C-3; C-4; C-5
17	9,17 (s)	192,6; C	C-7; C-8
18	2,71 (m)	37,0; CH	C-11; C-12; C-13; C-19; C-20
19	3,50 (m)	65,9; CH_2	C-11; C-18; C-20
20	0,94 (d; 7,0)	15,3; CH_3	C-12; C-18; C-19

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

CAPITULO 7

CAPITULO 7

7.0 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Pseudofusicoccum stromaticum*

7.1 INTRODUÇÃO

7.1.1 Endófito em Estudo: *Pseudofusicoccum stromaticum*

Fungo endofítico pertencente ao gênero *Botryosphaeria* e, à família *Botryosphaeraceae*. Micro-organismos pertencentes a esta família são encontrados em uma grande diversidade de plantas. São saprófitas e se alimentam de cascas de madeira em decomposição, sendo algumas espécies desta família encontrados como patógenos primários em espécies lenhosas e espécies agrícolas¹⁰⁶.

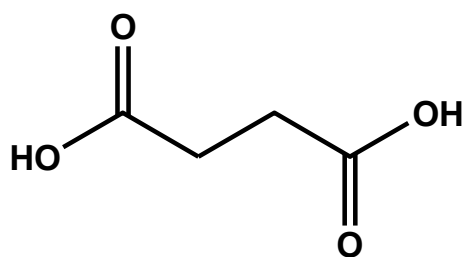
A cultura de *Pseudofusicoccum stromaticum* forma micélios abundantes na superfície de coloração esbranquiçada e, o reverso das colônias torna-se acinzentado escuro após o envelhecimento (**Figura 82**).

Estudos químicos e biológicos vêm sendo realizado por nosso grupo de pesquisa, e demonstraram o potencial citotóxico dos extratos brutos produzido no meio de cultivo líquido de Extrato de Malte, Czapek® e, no meio de cultivo sólido de Milho por este endófito, contra três células cancerígenas.

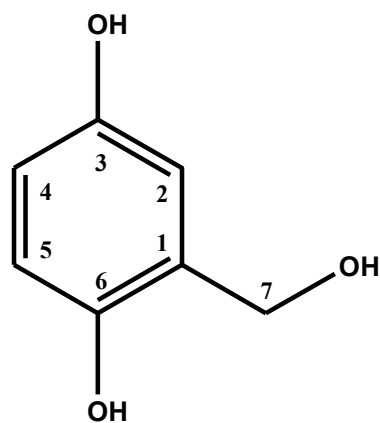
Figura 82: *Pseudofusicoccum stromaticum* superfície do endófito.



SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO ENDÓFITO *Pseudofusicoccum stromaticum*



8 - Ácido succínico



9 - Álcool Gentisil

7.2 METODOLOGIA

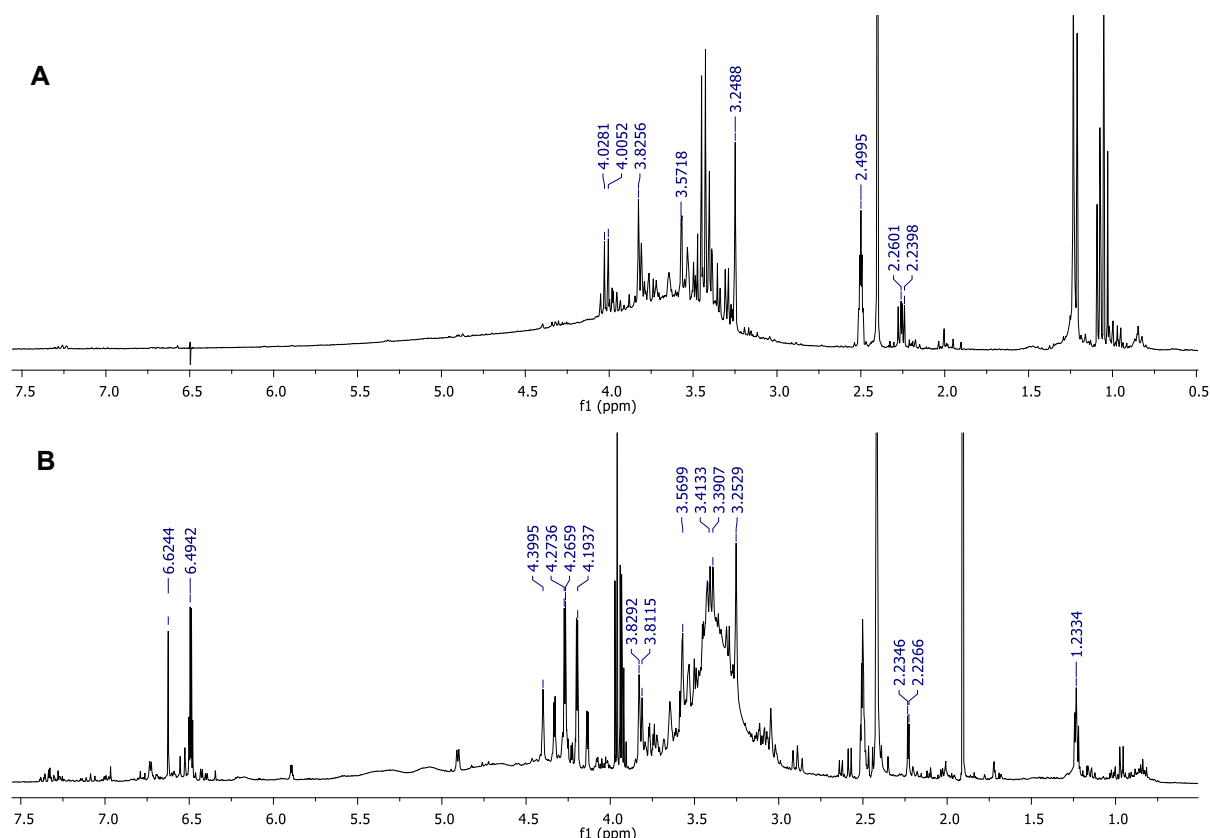
7.2.1 Cultivo de *Pseudofusicoccum stromaticum* em escala ampliada

O meio de cultivo líquido Czapek® foi selecionado para o crescimento do fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* em escala ampliada, pois o extrato AcOEt (escala reduzida, realizada pela Prof^a. Dr^a. Vanessa Mara Chapla) em Czapek® apresentou ótimos resultados nos ensaios biológicos, principalmente no ensaio citotóxico frente as três linhagens tumorais testadas, evidenciando ser um prolífico produtor de metabólitos bioativos.

O endófito foi inoculado em meio líquido de Czapek®, previamente esterilizado, em 50 frascos de Erlenmeyer contendo 250 mL de meio cada, como descrito na metodologia mostrada no **Fluxograma 1**.

O extrato bruto AcOEt obtido foi submetido a análise por HPLC-DAD em gradiente exploratório (Item 3.5.2.1, pág. 64) e por RMN de ¹H (**Figura 83**), e mostraram perfis químicos um pouco diferentes, evidenciando diferenças na intensidade de alguns sinais e na produção metabólica deste micro-organismos.

Figura 83: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) do extrato AcOEt em Czapek®, (**A**) Escala Reduzida, (**B**) Escala Ampliada



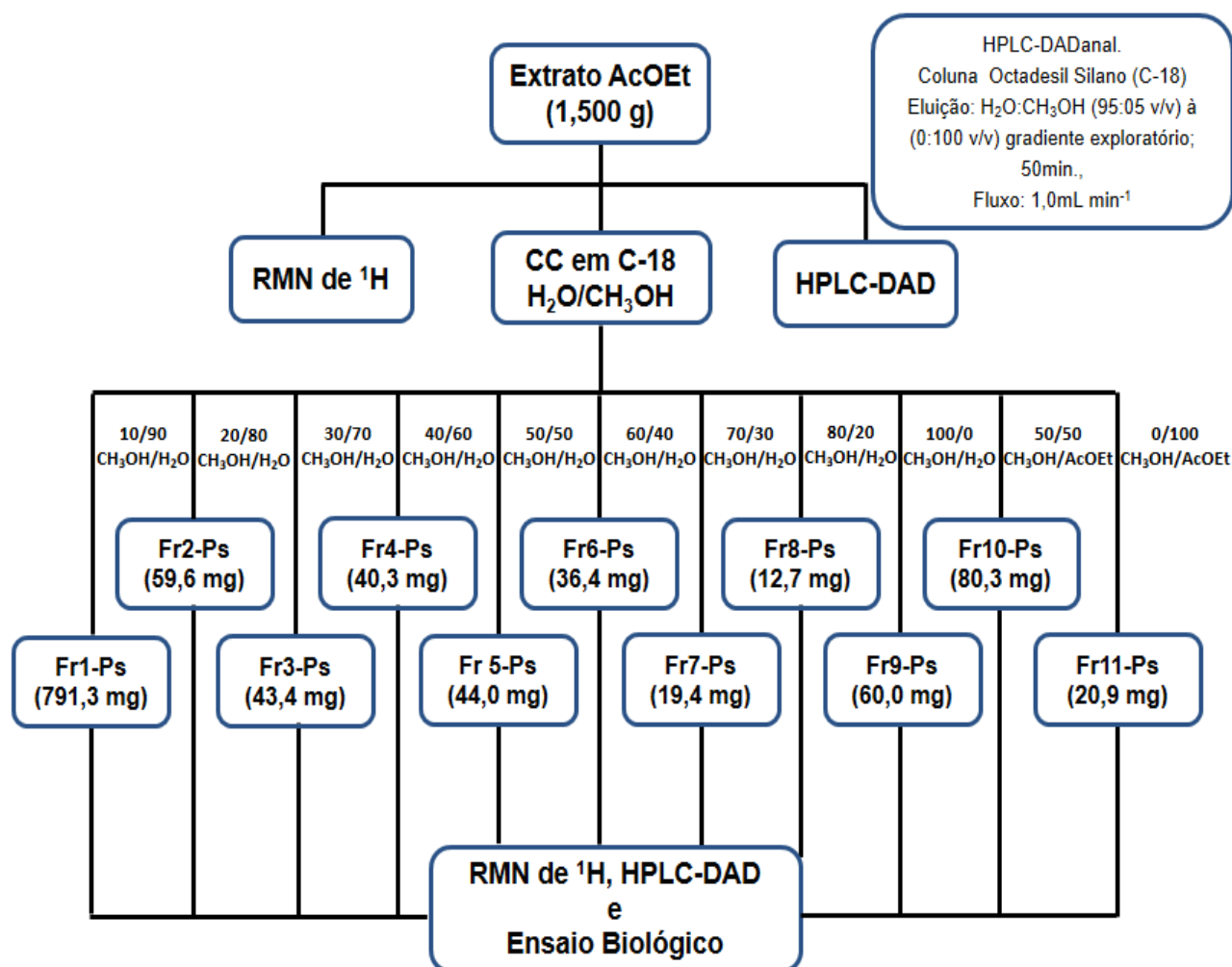
7.2.2 Fracionamento do extrato AcOEt em Czapek® de *Pseudofusicoccum stromaticum* obtido em escala ampliada.

O extrato AcOEt foi submetido à CC sob pressão, onde foram obtidas onze frações como visualizado na **Fluxograma 13**, de 360 mL cada (Fr1-Ps a Fr11-Ps).

O perfil químico destas frações foi avaliado por HPLC-DAD e, RMN de ^1H .

Todas as frações foram enviadas para avaliação do potencial biológico frente aos ensaios biológicos já citados.

Fluxograma 13: Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt em malte de *P. stromaticum*.



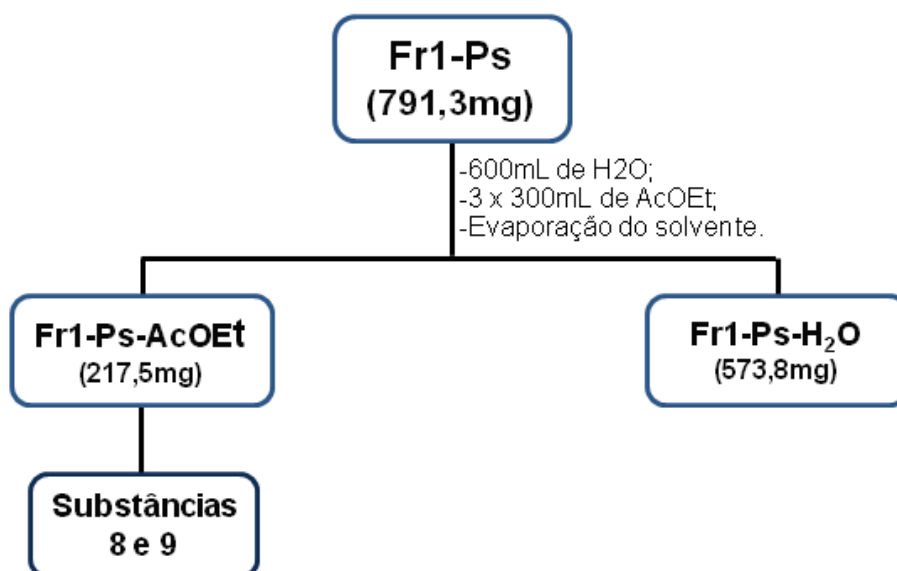
7.2.3 Purificação da Fração Fr1-Ps

Após análise dos resultados químicos e biológicos das frações oriundas do extrato em Czapek® obtido do endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*, a fração Fr1-Ps apresentou uma massa considerável e boa resolução por CCDC, no entanto,

apresentou um perfil químico encoberto de açúcares após análise do espectro de RMN de ^1H .

A fração Fr1-Ps passou por um processo de partição líquido/líquido utilizando AcOEt/H₂O afim de se remover esses açúcares oriundos do meio de cultivo (**Fluxograma 14**). Após a partição novos espectros de RMN de ^1H foram obtidos e, observou-se a eliminação dos açúcares, resultando em um espectro quase puro. Neste espectro foi possível observar a presença de quatro ou mais substâncias, sendo as substâncias **8** e **9** identificadas por análise dos dados de RMN de ^1H e EM.

Fluxograma 14: Fluxograma de purificação da fração Fr1-Ps-AcOEt.



7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Avaliação da atividade biológica das frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt em Czapek® de *Pseudofusicoccum stromaticum*.

7.3.1.1 Ensaio Citotóxico

As frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt foram avaliadas quanto ao poder citotóxico avaliado frente as três linhagens tumorais citadas anteriormente.

A atividade citotóxica de todas as frações está apresentada na **Tabela 16** com seus respectivos percentuais de inibição. Observamos, que as frações Fr4-Ps, Fr7-Ps, Fr8-Ps e Fr10-Ps apresentaram moderada citotoxicidade frente a linhagem SF-295 testada, no entanto, elas não são consideradas potencialmente citotóxica. Assim, nenhuma fração apresentou citotoxicidade frente às linhagens tumorais testadas.

Tabela 16: Percentual de inibição do crescimento celular (IC₅₀%) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 µg/mL

Amostra		OVCAR-8	SD	HCT-116	SD	SF-295	SD
Nº	Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
1	Fr1-Ps	-10,98%	1,57%	31,95%	0,87%	12,15%	14,91%
2	Fr2-Ps	-5,71%	0,86%	34,09%	4,62%	35,75%	8,05%
3	Fr3-Ps	-7,71%	2,44%	46,46%	4,34%	48,55%	12,19%
4	Fr4-Ps	30,62%	3,69%	62,80%	0,43%	78,00%	2,25%
5	Fr5-Ps	32,01%	3,14%	43,08%	2,46%	64,86%	1,66%
6	Fr6-Ps	34,01%	8,48%	59,89%	4,26%	48,38%	49,81%
7	Fr7-Ps	37,34%	10,06%	62,19%	7,51%	76,57%	13,73%
8	Fr8-Ps	22,40%	3,85%	65,10%	4,55%	82,10%	0,71%
9	Fr9-Ps	16,79%	10,21%	29,95%	0,07%	37,34%	8,64%
10	Fr10-Ps	-0,54%	2,67%	48,29%	7,66%	77,08%	0,71%
11	Fr11-Ps	-5,21%	0,94%	46,20%	10,77%	62,77%	11,00%

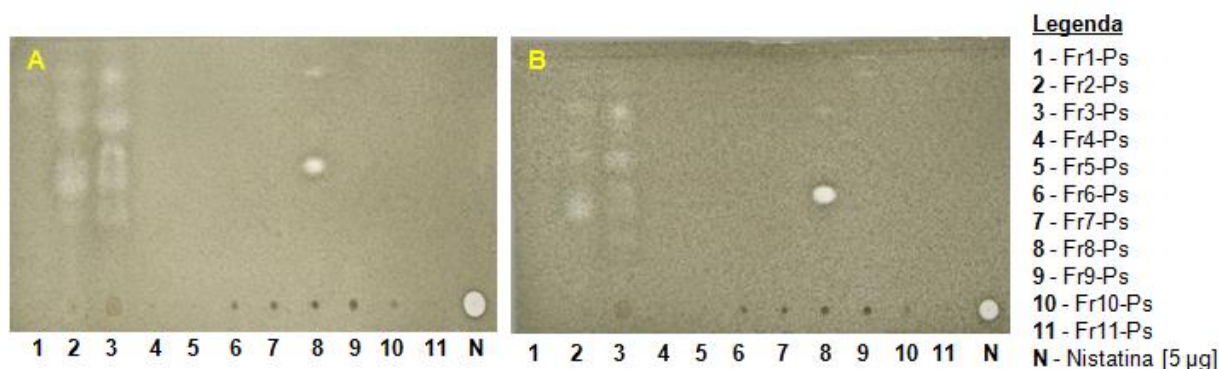
*Valores são média ± DPM (Desvio Padrão da Média)

7.3.1.2 Ensaio Antifúngico

As frações oriundas do fracionamento do extrato AcOEt foram avaliadas frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Os resultados da avaliação deste bioensaio mostrados na **Figura 84** evidenciaram que as frações Fr2-Ps, Fr3-Ps e Fr8-Ps são potencialmente antifúngicos, pois apresentaram inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos.

Figura 84: Resultado da atividade antifúngica das frações obtidas do cultivo do endófito *P. stromaticum* (A) *C. cladosporioides* e, (B) *C. sphaerospermum*.



7.3.1.3 Ensaio Anticolinesterásico

As frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt do cultivo em Czapek® de *Pseudofusicoccum stromaticum* não apresentaram atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase e, por isso optou-se em não colocar os resultados neste trabalho.

7.3.2 Identificação estrutural da substância 8

O que nos chamou a atenção, foi, que além da fração Fr1-Ps-AcOEt ter se apresentado com um espectro quase que puro, ela apresentou um sinal muito intenso e característico nos espectros de RMN de ^1H (simpleto em δ_{H} 2,41 e, um simpleto largo em δ_{H} 12,2) (Figura 85) e ^{13}C (δ_{C} 173,8 e δ_{C} 28,9) de ácido succínico (substância 8) o que nos levou a estudos utilizando dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Figura 86) e ^{13}C (Figura 87) além de espectrometria de massas (Figura 88) para comprovar se tal metabólito estava sendo produzido pelo endófito ou seria um artefato.

Figura 85: Valores de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos na literatura para o ácido succínico.

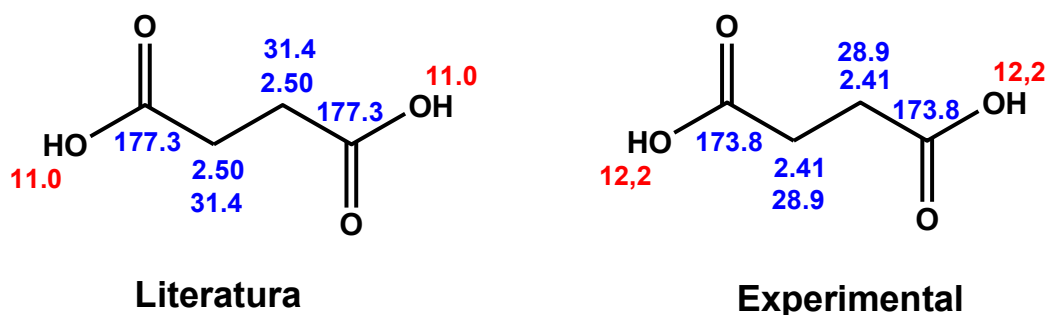


Figura 86: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da fração Fr1-Ps-AcOEt.

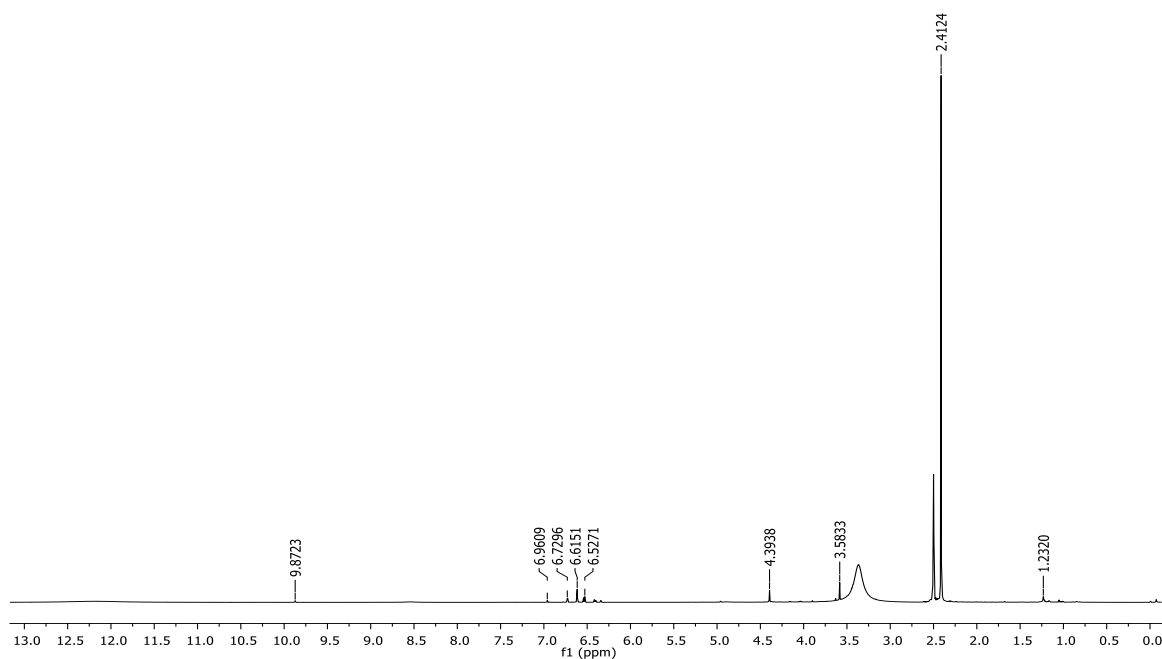
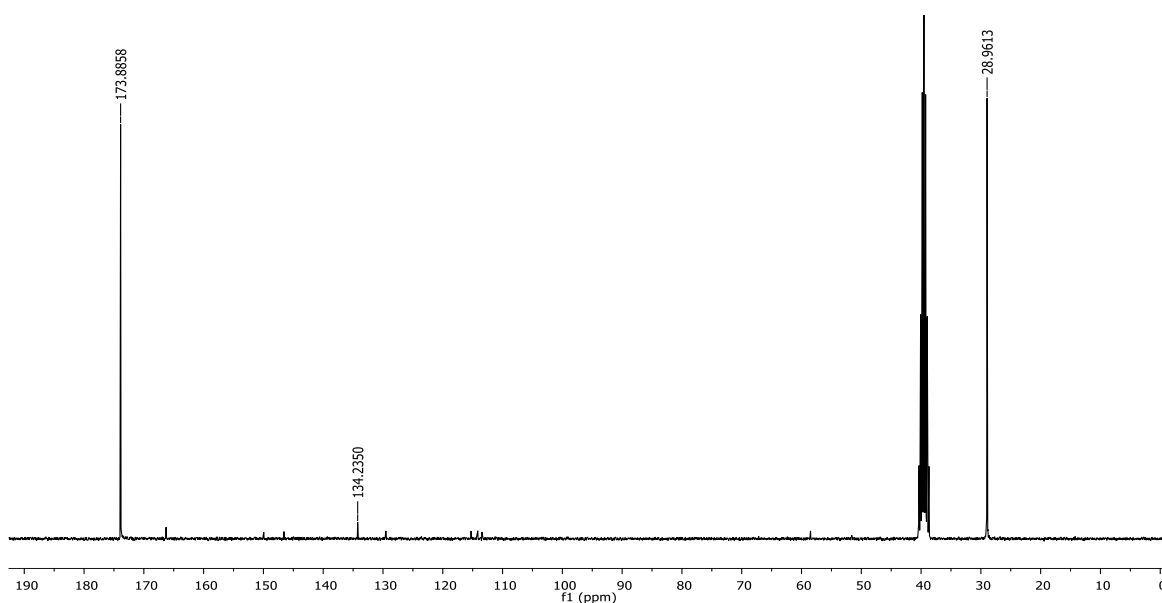


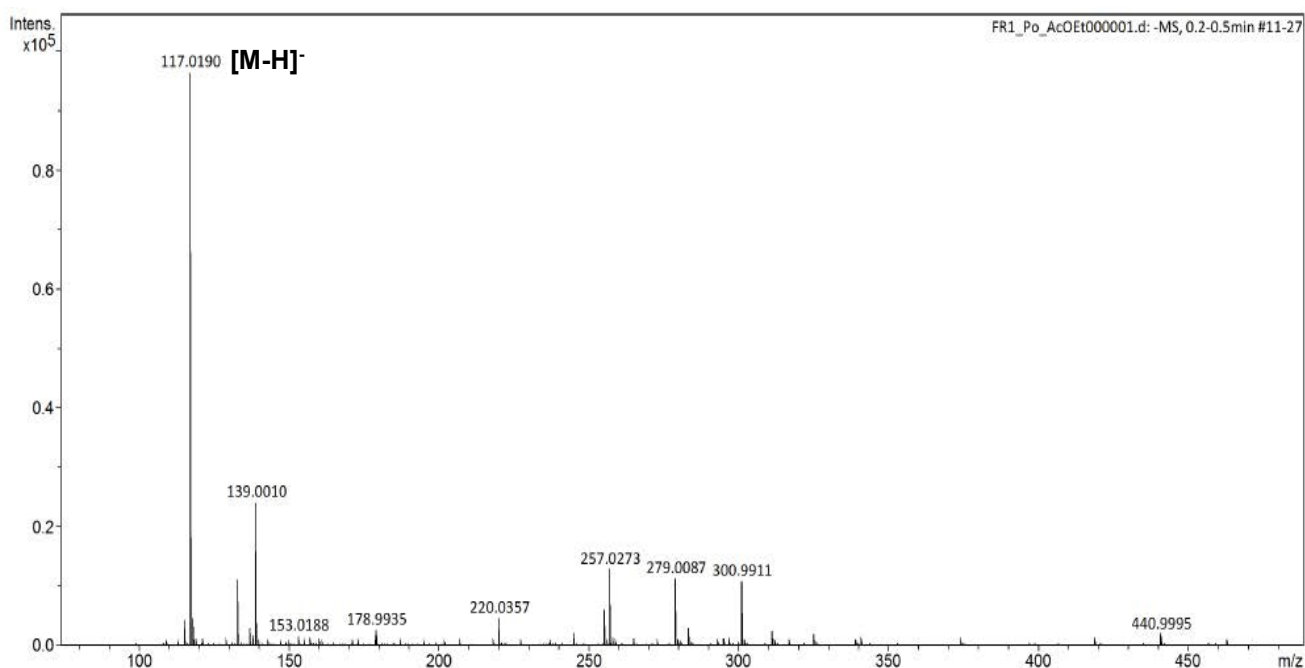
Figura 87: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, DMSO- d_6) da fração Fr1-Ps-AcOEt mostrando a intensidade dos sinais observados.



Quando se analisou os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos extratos oriundos do cultivo em escala reduzida do endófito, observou-se que esses sinais estavam presentes em todos os extratos, o que pode-se comprovar que a produção de tal substância estava sendo realizada pelo micro-organismo.

Para comprovar a produção dessa substância pelo endófito, optou-se por analisar essa fração em um espectrômetro de massas de alta resolução, no modo negativo e, foi possível concluir a presença do ácido succínico na fração Fr1-Ps-AcOEt, através da visualização do sinal de m/z 117,0190 referente a formação de $[M-H]^-$. Com auxílio dos dados de RMN de 1H e ^{13}C permitiu propor a fórmula molecular do ácido succínico $C_4H_6O_4$ (Erro Calculado = 1,452 ppm).

Figura 88: Espectro de massas de alta resolução da fração Fr1-Ps-AcOEt.



Estas informações comparadas aos dados da literatura confirmam a estrutura do ácido succínico para a substância **8**. Esta substância já foi isolada e identificada de extratos de fungos endofíticos como: *Aspergillus terreus*, *Pezicula* sp. e *Penicillium citrinum*. Não tendo relatos de atividade biológica para tal substância^{107, 108, 109}.

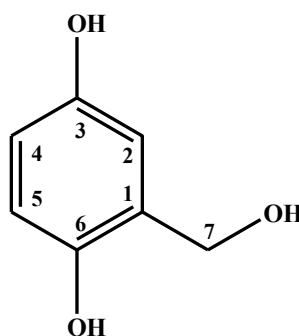
O ácido succínico ou ácido butanodióico é muito utilizado na indústria, entre as suas principais aplicações destacam-se a preparação de solventes, vernizes, perfumes, na fabricação de tintas e corantes, plastificantes, poliésteres, etc. Na indústria alimentícia, o ácido é utilizado na produção de bebidas como refrigerantes, cervejas, etc. Ele serve como aromatizante e neutralizante, e é produzido pela fermentação de carboidratos. Já na indústria de medicamentos, é empregado na

preparação de agentes que combatem a úlcera e de protetores contra a radiação e, é também utilizado como suplemento nutricional.

Atualmente, sua vasta utilização vem sendo na indústria petroquímica com projetos que estão utilizando o ácido succínico na produção de biodiesel. Produzido pela bactéria *Basfia succiniciproducens*, que é capaz de metabolizar uma variedade de rejeitos biológicos, e produzir o ácido, incluindo glicerol, açúcares como pentose e glicose e, CO₂. Isto faz o ácido succínico verde uma alternativa economicamente e ecologicamente atrativa ao petróleo.

7.3.3 Identificação estrutural da substância **9**

Figura 89: Estrutura do Álcool Gentisil



A substância **9** foi identificada em mistura através da análise do espectro de RMN de ¹H da fração Fr1-Ps-AcOEt onde observou-se a produção majoritária de uma substância e, decidiu-se determinar a sua estrutura em mistura, realizando os experimentos de RMN de ¹³C e bidimensionais (HMBC, HSQC e COSY).

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 90**) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,72 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H, H-2), em δ_H 6,53 (*d*, *J* = 8,5 Hz, 1H, H-5) e δ_H 6,41 (*dd*, *J* = 8,5 e 3,0 Hz, 1H, H-4) evidenciando um anel aromático trissubstituído e um sinal em δ_H 4,40 (*s*, 2H, H-7), característico de hidrogênios carbinólicos, com esses dados foi possível sugerir que esta substância é possivelmente pertencente à classe dos hidroxibenzenos.

Os deslocamentos químicos em δ_C 149,9 (C-3) e δ_C 146,5 (C-6) observado no espectro de RMN de ¹³C (**Figura 91**), indicou grupos -OH ligados ao anel aromático, possivelmente posicionados para um em relação ao outro. Foi possível observar também a presença de três carbonos benzênicos em δ_C 115,2 (C-5), δ_C 114,1 (C-2)

e em δ_c 113,4 (C-4), além da presença de um carbono quaternário em δ_c 129,5 (C-1) totalizando assim a presença de sete carbonos na estrutura da substância **9**.

O espectro de HSQC apresentou correlação direta dos hidrogênios aromáticos H-2, H-4 e H-5 com os carbonos em δ_c 114,1; 113,4 e 115,2 respectivamente. E, o hidrogênio H-7 apresentou correlação direta com o carbono em δ_c 58,5 (**Tabela 17**).

No experimento de HMBC foi possível observar a correlação do H-2 $\leftrightarrow$ C-4/C-6/C-7, a correlação do H-5 $\leftrightarrow$ C-1/C-3/C-6/C-7 confirmando a posição dos carbonos C-2, C-4 e, C-5 com deslocamentos característicos de benzenos trissubstituídos.

No experimento de COSY foi possível observar as interações 1H - 1H de H-2 $\leftrightarrow$ H-4 e de H-5 $\leftrightarrow$ H-4 permitindo estabelecer o anel benzênico trissubstituído para a substância **9**.

Estas informações comparadas aos dados da literatura confirmam a estrutura do 1-hidroximetil-3,6-benzenodiol (álcool gentisil) para a substância **9**. Esta substância já foi isolada de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Sendo relatadas atividades antioxidante, inibidor de apoptose e mutagenicidade oxidativa¹¹⁰⁻¹¹³.

Figura 90: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 9.

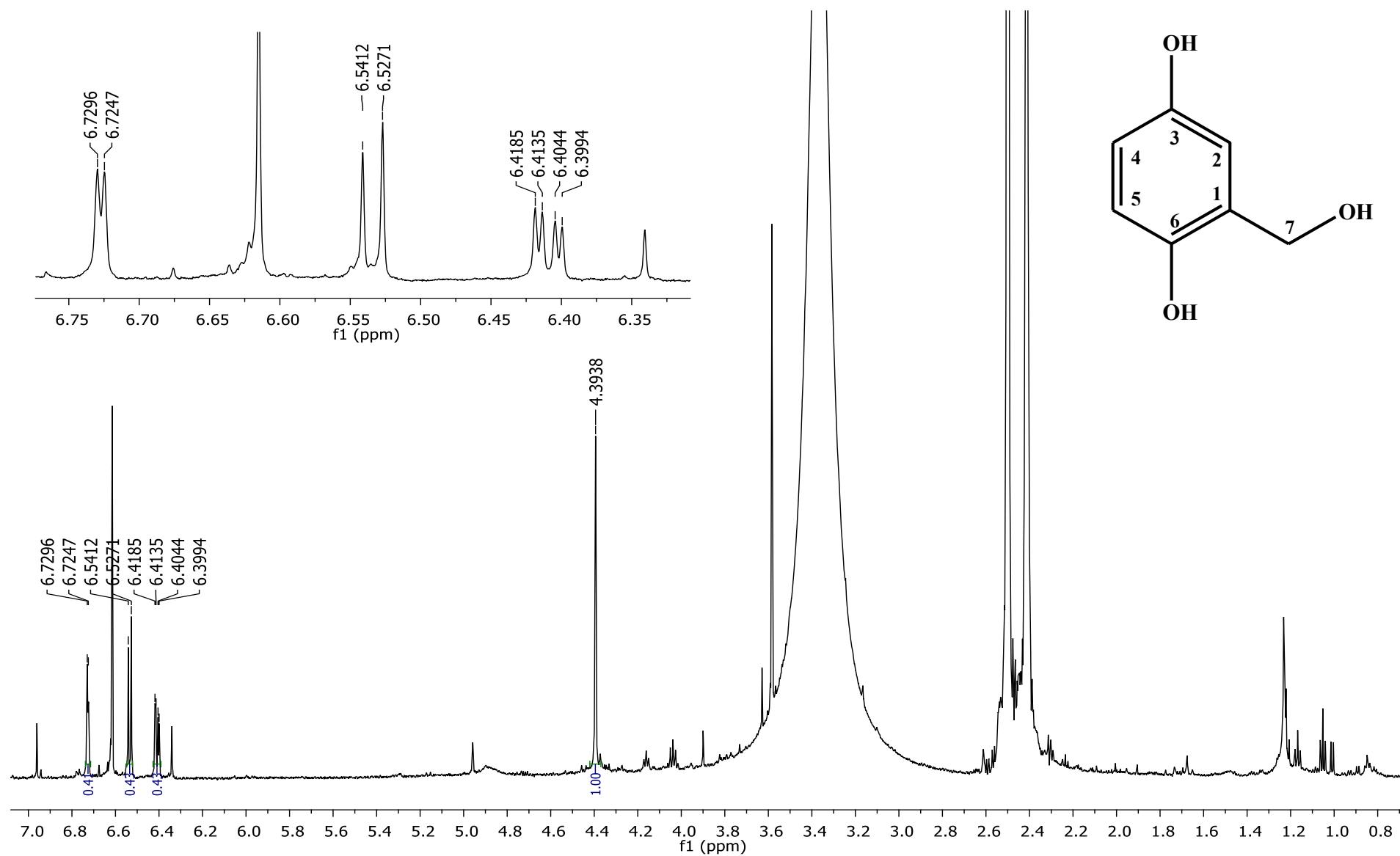


Figura 91: Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

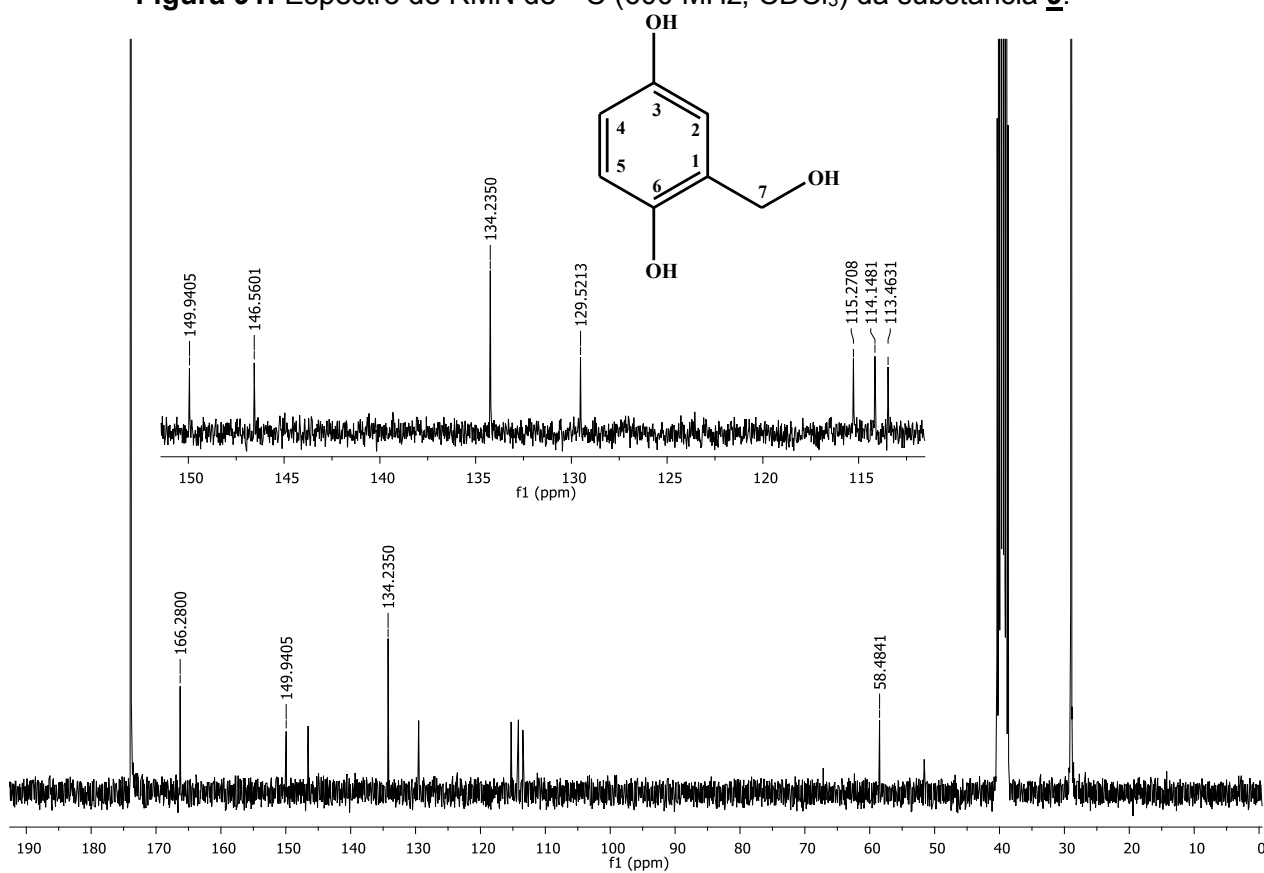


Figura 92: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) e ^1H - ^1H

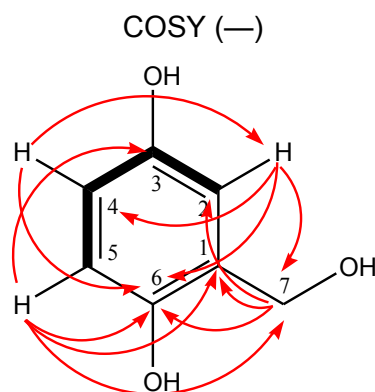


Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **9** (600 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1	-	129,5; C	-
2	6,72 (<i>d</i> ; 3,0)	114,1; CH	C-4; C-6; C-7
3	-	149,9; C	-
4	6,41 (<i>dd</i> , 8,0; 3,0)	113,4; CH	C-2; C-4; C-6
5	6,53 (<i>d</i> ; 8,5)	115,2; CH	C-1; C-3; C-6; C-17
6	-	146,5; C	-
7	4,40 (<i>s</i>)	58,5; CH_2	C-1; C-2; C-6

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

CAPITULO 8

CAPITULO 8

8.0 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Phoma* sp.

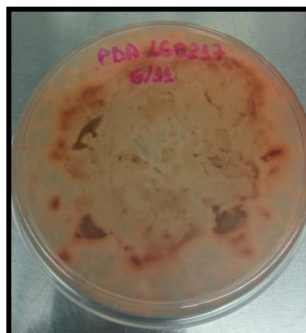
8.1 INTRODUÇÃO

8.1.1 Endófito em Estudo: *Phoma* sp.

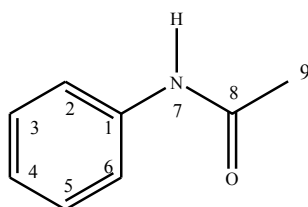
Fungo endofítico pertencente a classe *Dothideomucetes* e, à família *Incertae sedis*. Cerca de 140 táxons de *Phoma* foram definidos e reconhecidos e, compreende cerca de 2000 espécies. Podem ser saprófitas e/ou patógenos específicos de plantas cultivadas causando doenças como: podridão da beterraba (*Phoma beta*) e/ou podridão da batata-doce (*Phoma solani*), doenças na canola (*Phoma lingam*) e, *Phoma glomerata* tem sido reportado por causar doenças em uva, batata, manga, arroz, pera, trigo e muitos outros cultivares. No entanto, algumas espécies apresentaram potencial biológico através da produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica¹¹⁴.

A cultura de *Phoma* sp. forma micélios abundantes na superfície de coloração esverdeada escura e, o reverso das colônias torna-se avermelhada após o envelhecimento (**Figura 93**). Estudos químicos e biológicos com fungos deste gênero revelaram a presença e isolamento de diversos metabólitos secundários tais com: antraquinonas, lactonas, xantonas, alcalóides e terpenos, dentre os quais apresentaram inúmeras atividades biológicas, entre elas, destaca-se a potencialidade antifúngica, antibacteriana, antituberculose e citotóxica¹¹⁵⁻¹¹⁸.

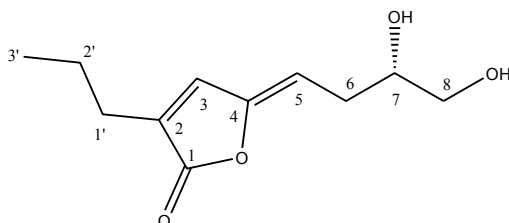
Figura 93: *Phoma* sp. parte inferior do endófito.



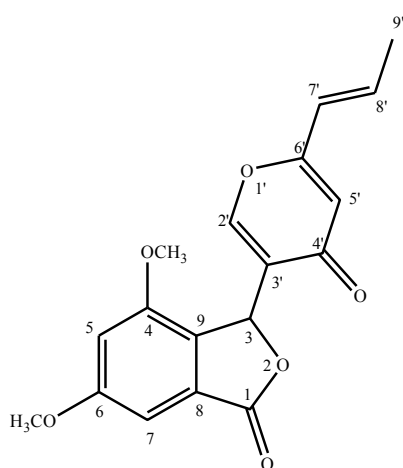
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO ENDÓFITO *Phoma* sp.



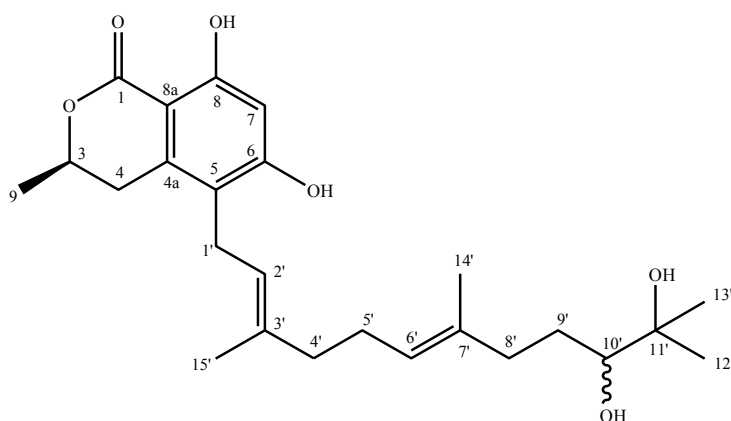
10 - Fenilacetamida



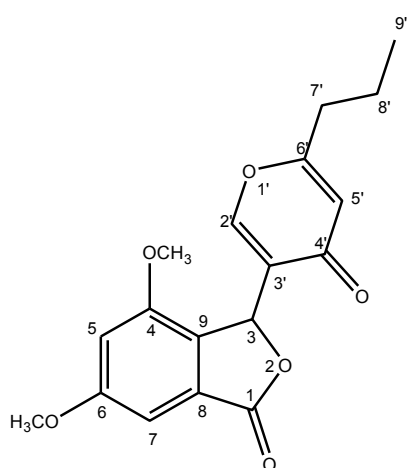
15 - 7,8-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olideo



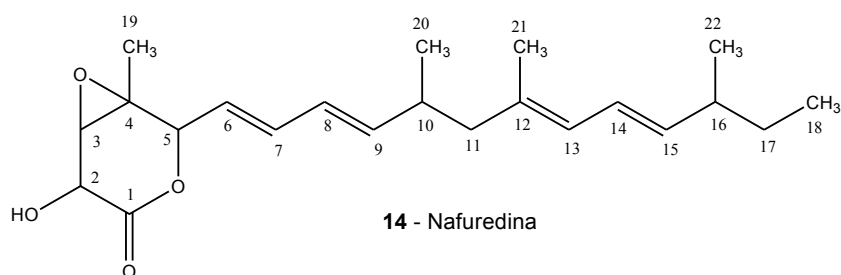
11 - Vermistatina



13 - (*R*)-6,8-dihidroxi-5-((2*E*,6*E*)-10,11-dihidroxi-3,7,11-trimetildodeca-2,6-dienil)-3-metilisocroman-1-ona



12 - Dihidrovermistatina



14 - Nafuredina

8.2 METODOLOGIA

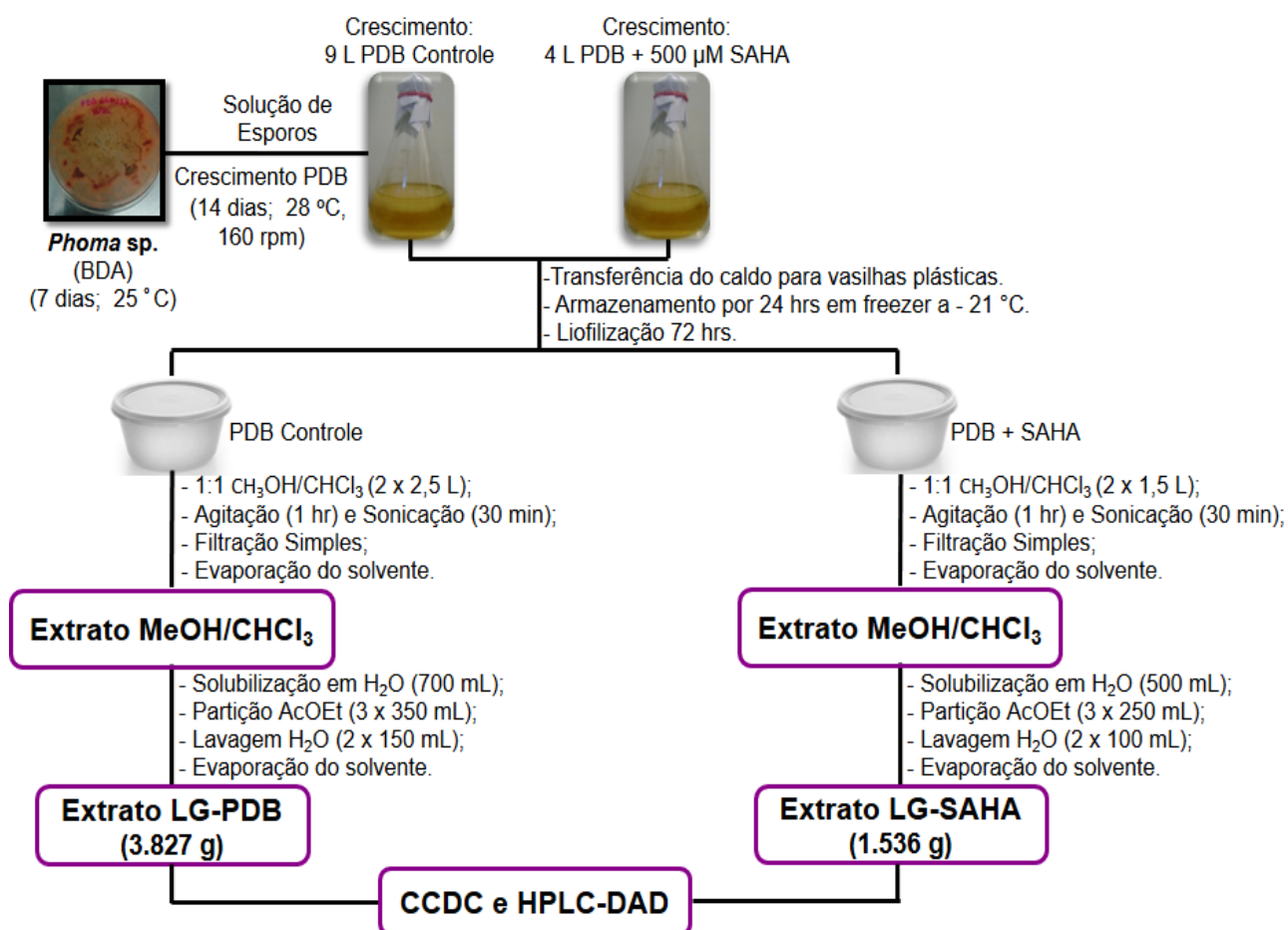
8.2.1 Cultivo de *Phoma* sp. em escala ampliada com e sem utilização de SAHA

Este trabalho foi desenvolvido na The University of Arizona, Tucson-EUA sob supervisão do Prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka, no estágio de doutoramento realizado durante o período de um ano (março de 2014 a fevereiro de 2015).

O meio de cultivo líquido PDB foi selecionado para o crescimento do fungo endofítico *Phoma* sp. em escala ampliada, pois o extrato AcOEt (escala reduzida) em PDB apresentou ótimos resultados com a utilização do modificador epigenético SAHA, diferentemente do extrato obtido em YM do mesmo endófito que não apresentou variação significativa com a adição do modificador epigenético.

A metodologia de crescimentos do micro-organismo esta descrita no **Fluxograma 15**. Após obtenção dos extratos, estes foram submetidos à análise em CCDC e HPLC-DAD (Item 3.5.2.2, pag. 66).

Fluxograma 15: Obtenção dos extratos brutos AcOEt produzido pelo endófito *Phoma* sp.



8.2.2 Fracionamento do extrato AcOEt obtido em escala ampliada com utilização de SAHA de *Phoma* sp.

O extrato AcOEt (1.346,3 mg) foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão, onde foram obtidas dez frações como visualizado na **Fluxograma 16**, de 270 mL cada (Fr1-LG a Fr10-LG). O perfil químico destas frações foi avaliado por HPLC-DAD em gradiente exploratório e, por CCDC (**Figura 94**).

Fluxograma 16: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt em PDB de *Phoma* sp.

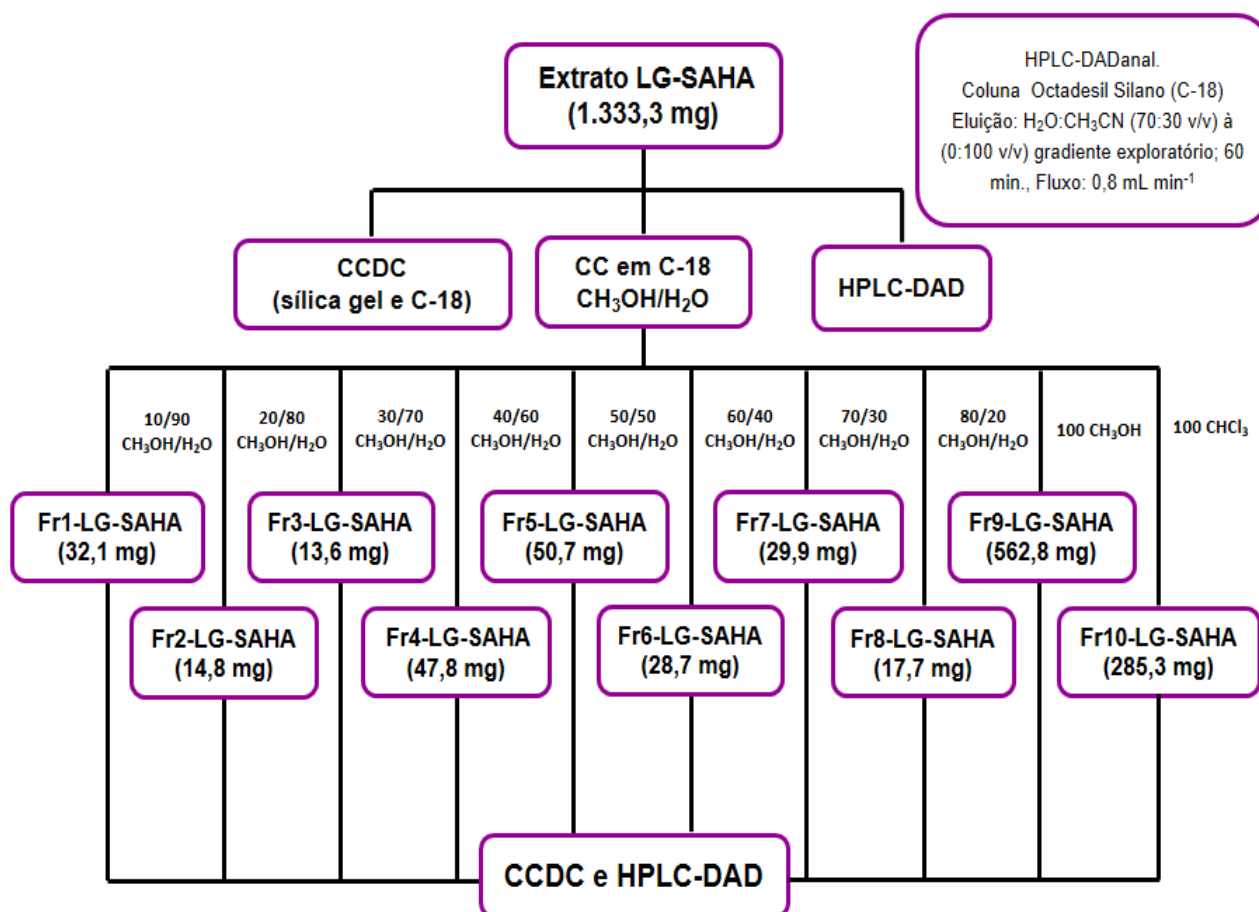
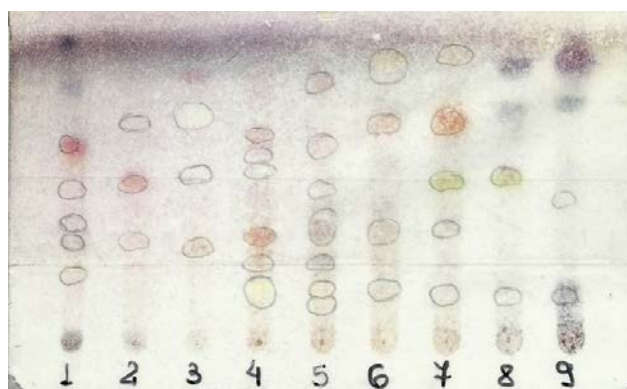


Figura 94: CCDC em fase normal das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto.



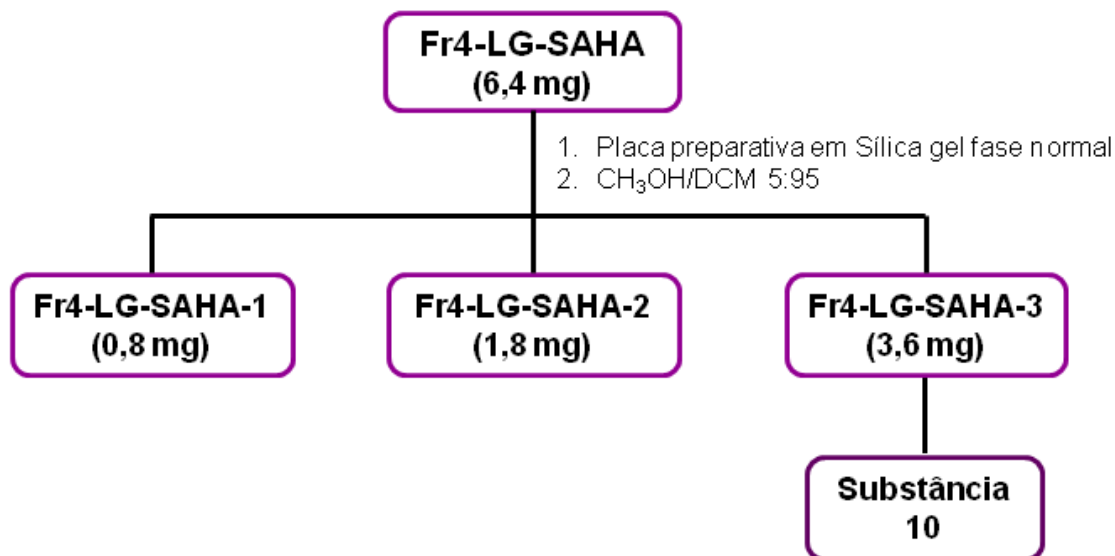
Legenda

- 1 - Fr1-LG-SAHA
- 2 - Fr2-LG-SAHA
- 3 - Fr3-LG-SAHA
- 4 - Fr4-LG-SAHA
- 5 - Fr5-LG-SAHA
- 6 - Fr6-LG-SAHA
- 7 - Fr7-LG-SAHA
- 8 - Fr8-LG-SAHA
- 9 - Fr9-LG-SAHA

8.2.3 Purificação da Fração Fr4-LG-SAHA

A fração Fr4-LG-SAHA (6,4 mg) por apresentar um perfil promissor por CCDC, foi purificada por placa preparativa como visualizado no **Fluxograma 17**. A subfração Fr4-LG-SAHA-3 mostrou-se pura e foi submetida a análise por RMN de ^1H e ^{13}C onde, forneceu a substância **10**.

Fluxograma 17: Fluxograma de purificação da fração Fr4-LG-SAHA.

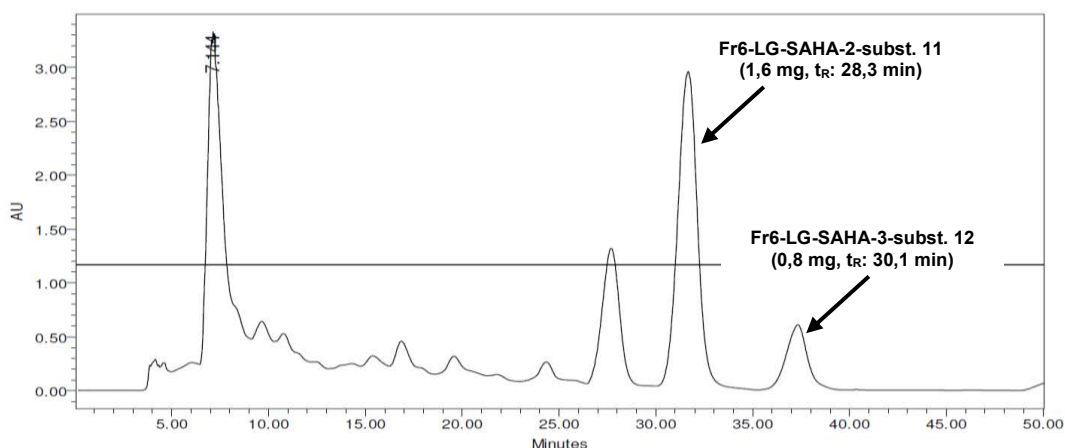


8.2.4 Purificação da Fração Fr6-LG-SAHA

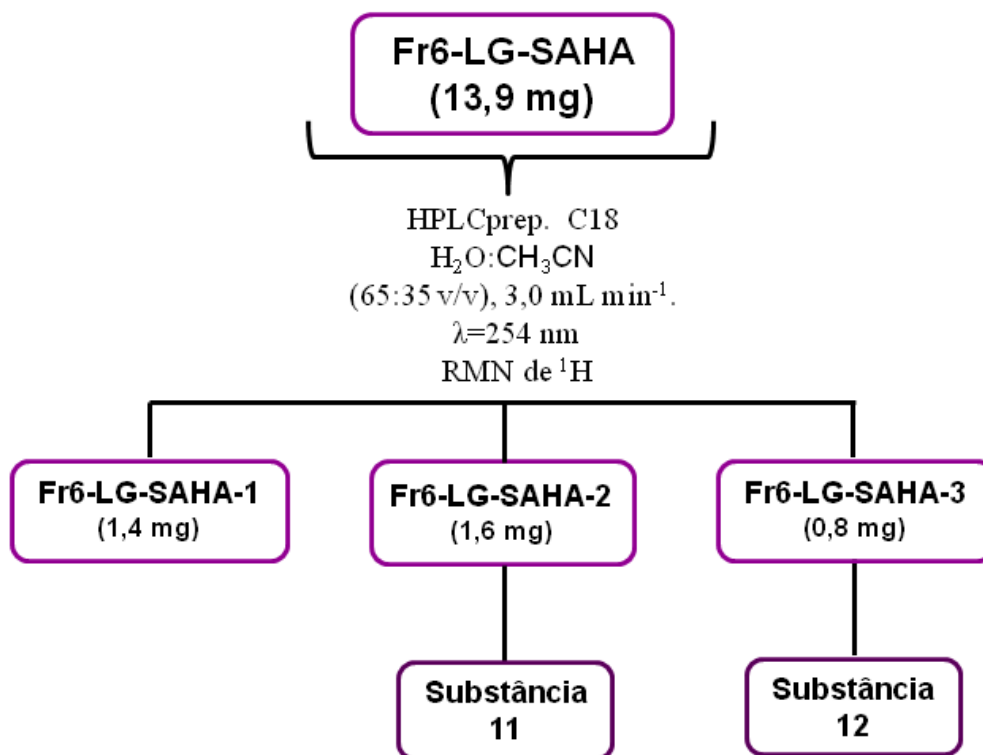
A fração Fr6-LG-SAHA foi selecionada para fracionamento em HPLC preparativo (**Figura 95**) devido ao seu perfil químico obtido das análises dos dados de CCDC e HPLC-DAD analítico.

A amostra (fase orgânica) foi solubilizada em acetona, filtrada em cartucho C18 e, injetada cinco vezes (13,9 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL. Deste fracionamento, isolou-se as substâncias **11** e **12** (**Fluxograma 18**).

Figura 95: Cromatograma HPLC_{prep} de Fr6-LG-SAHA registrado em 254 nm



Fluxograma 18: Fluxograma de purificação da fração Fr6-LG-SAHA.

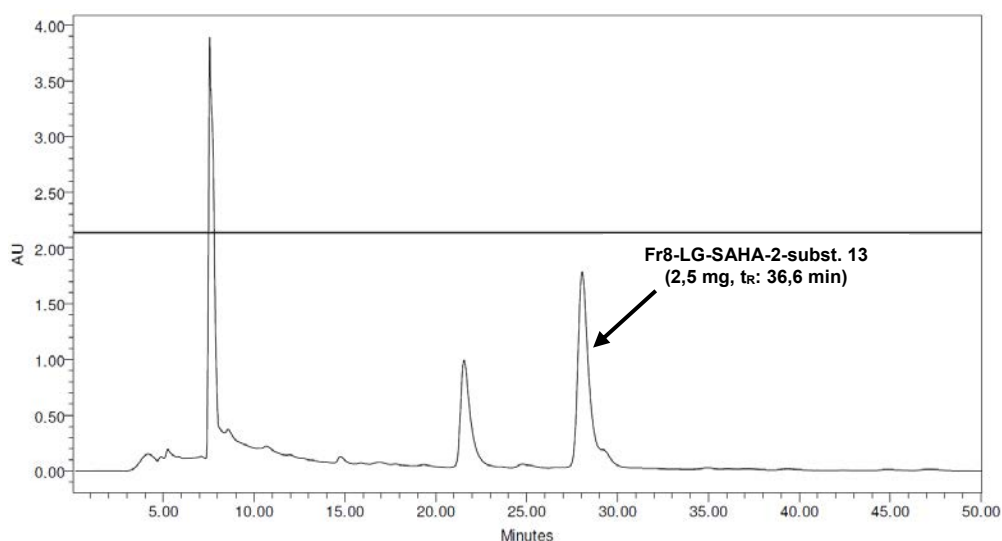


8.2.5 Purificação da Fração Fr8-LG-SAHA

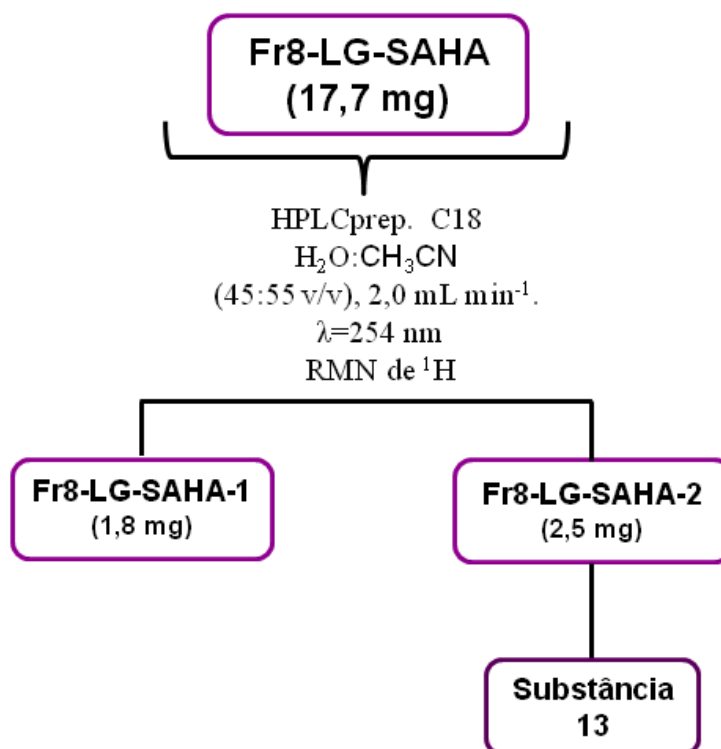
A fração Fr6-LG-SAHA foi selecionada para fracionamento em HPLC preparativo (**Figura 96**) devido ao seu perfil químico obtido das análises dos dados de CCDC e HPLC-DAD analítico.

A amostra (fase orgânica) foi solubilizada em acetona, filtrada em cartucho C18 e, injetada cinco vezes (17,7 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL. Deste fracionamento, isolou-se a substância **13** (**Fluxograma 19**).

Figura 96: Cromatograma HPLC_{prep} de Fr8-LG-SAHA, registrado em 254 nm



Fluxograma 19: Fluxograma de purificação da fração Fr8-LG-SAHA.

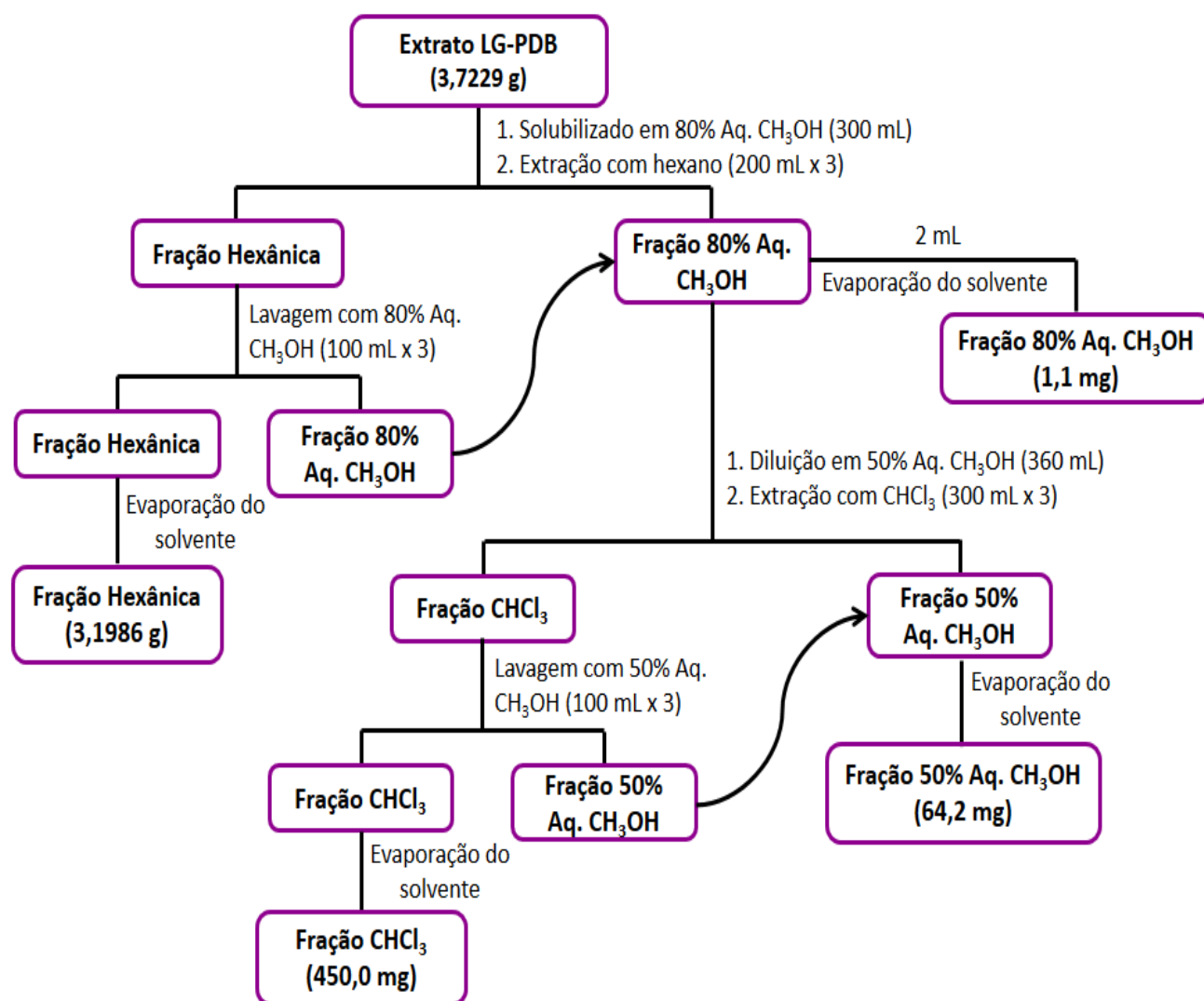


8.2.6 Fracionamento do extrato AcOEt obtido em escala ampliada sem a utilização de SAHA de *Phoma* sp.

O extrato AcOEt obtido em escala ampliada do endófito *Phoma* sp. sem a adição do modificador epigenético SAHA foi cultivado usando a metodologia descrita no item 3.5.2.2 e mostrada no **Fluxograma 3**.

Após obtenção do extrato bruto, esse apresentou um aspecto oleoso e, passou por um processo de remoção do óleo através de uma partição líquido-líquido (**Fluxograma 20**).

Fluxograma 20: Fluxograma da partição líquido/líquido do extrato bruto AcOEt cultivado sem a adição de SAHA.



Uma porção da fração CHCl₃ (400,0 mg) foi fracionada utilizando coluna de vidro (21 x 3 cm), como fase estacionária sílica gel flash (40 μ m, 13,6 g) e eluente um sistema de hexano:acetato de etila até metanol (**Fluxograma 21**), obtendo-se 95 frações, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 13 frações. Algumas das frações foram selecionadas de acordo com o seu perfil obtido das análises por CCDC (**Figura 97**) em fase normal e, submetidas à análise por RMN de ¹H.

Fluxograma 21: Fluxograma de fracionamento da fração CHCl_3 obtida do cultivo do endófito na ausência do modificador epigenético.

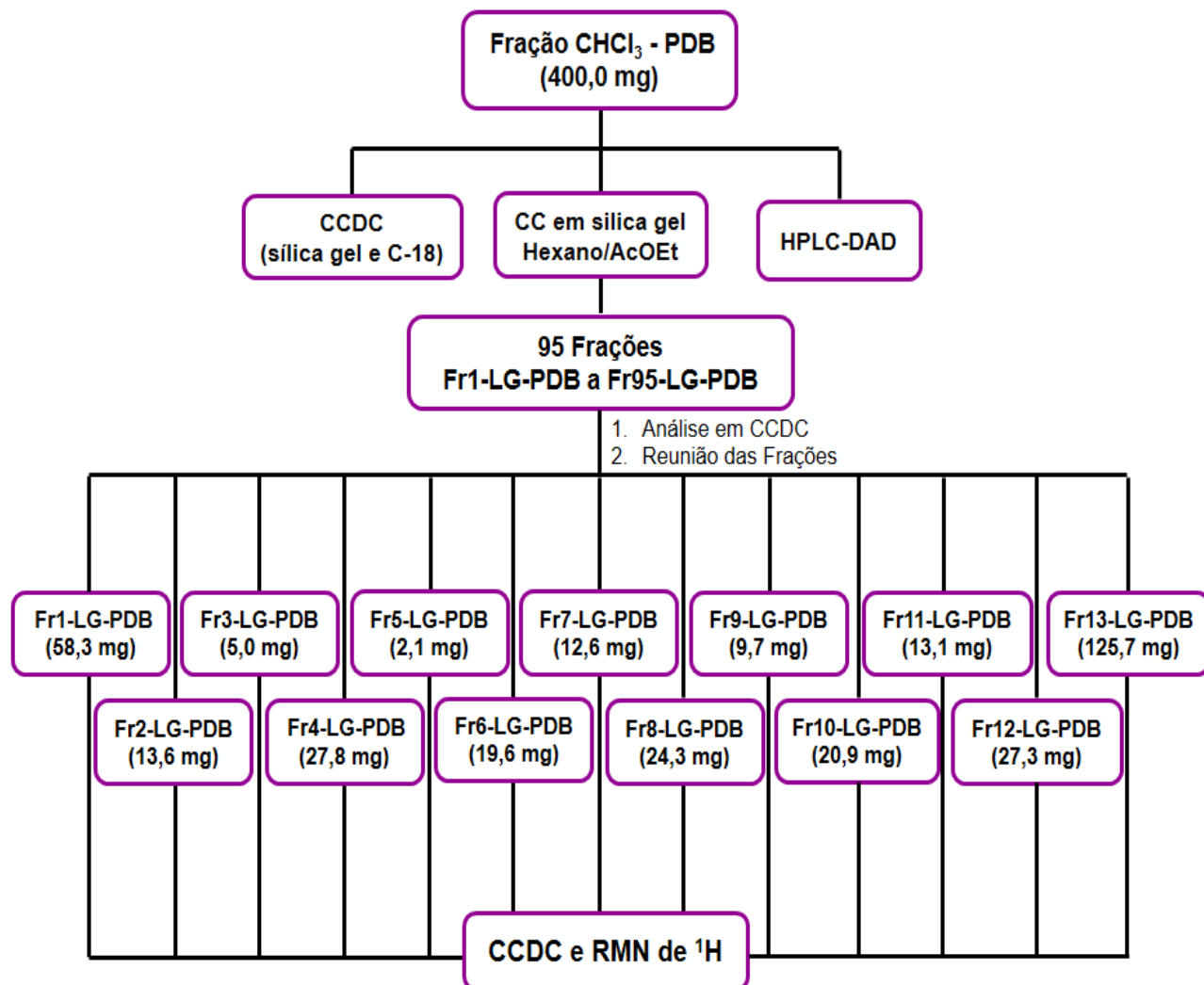
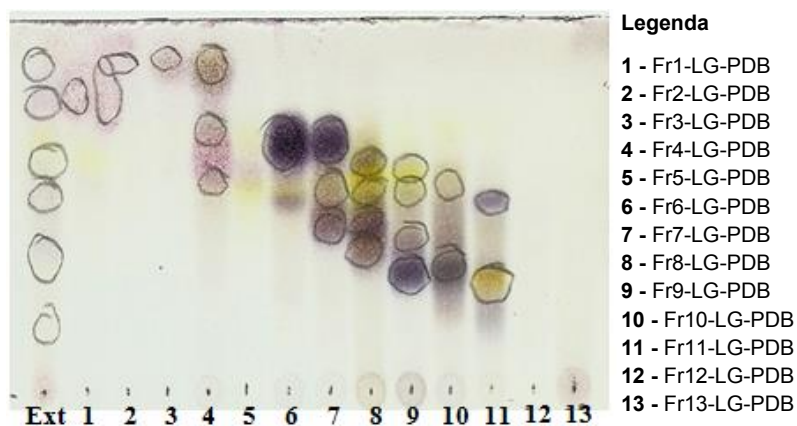


Figura 97: CCDC em fase normal das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto.



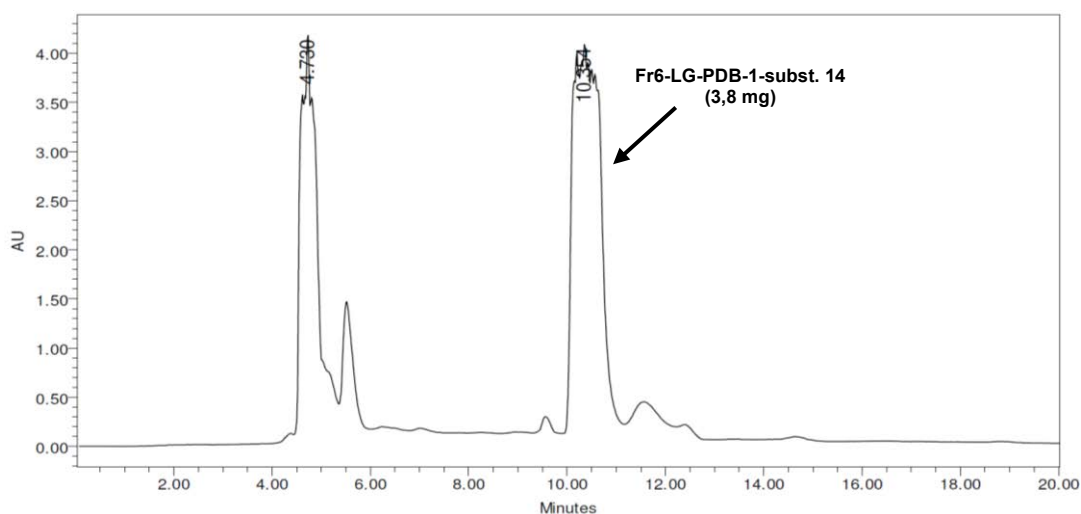
Após a análise por RMN de ^1H , foram selecionadas as frações Fr6-LG-PDB e Fr11-LG-PDB para posterior purificação e isolamento das substâncias.

8.2.7 Purificação da Fração Fr6-LG-PDB

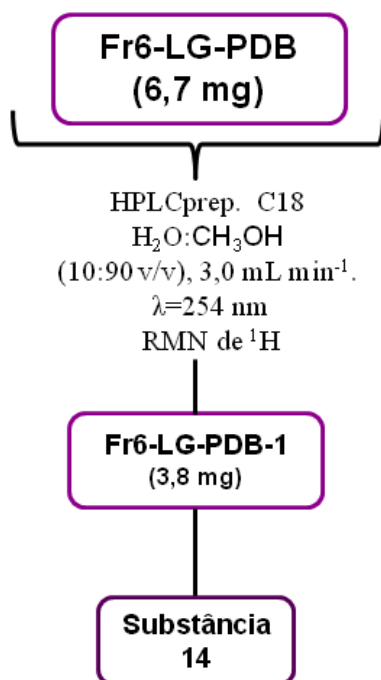
Após análise dos resultados químicos das frações oriundas do extrato em PDB sem a adição do modificador epigenético obtido do endófito *Phoma* sp., a fração Fr6-LG-PDB apresentou uma boa resolução por CCDC, além de um ótimo perfil químico após análise do cromatograma analítico obtido em HPLC-DAD.

O fracionamento em HPLC-DAD preparativo (**Figura 98**) foi realizado de acordo com o visualizado no **Fluxograma 22**. A amostra (fase orgânica) foi solubilizada em acetona, filtrada em cartucho C18 e, injetada três vezes (6,0 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL. Deste fracionamento, isolou-se a substância **14**.

Figura 98: Cromatograma HPLC_{prep} de Fr6-LG-PDB registrado em 254 nm



Fluxograma 22: Fluxograma de purificação da fração Fr6-LG-PDB.

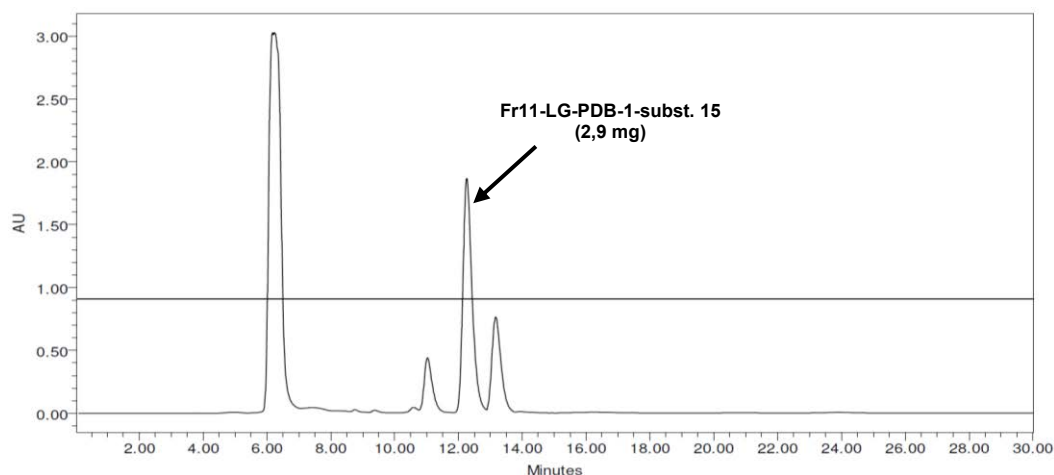


8.2.8 Purificação da Fração Fr11-LG-PDB

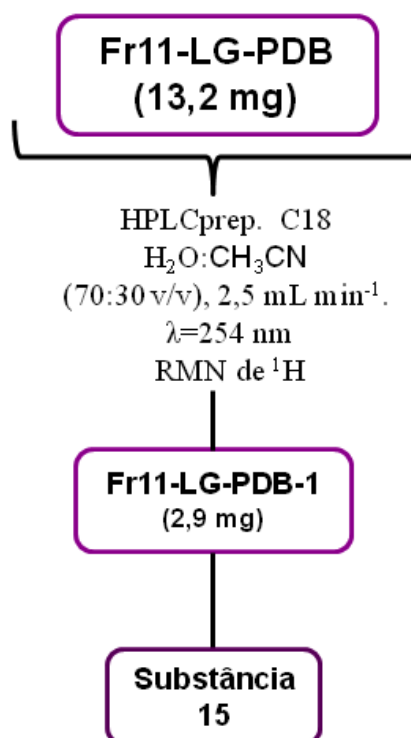
A fração Fr11-LG-SAHA apresentou uma boa resolução por CCDC, além de um ótimo perfil químico, com bandas bem definidas no cromatograma analítico obtido em HPLC-DAD, sendo selecionada para fracionamento cromatográfico.

O fracionamento em HPLC-DAD preparativo (**Figura 99**) foi realizado de acordo com o visualizado no **Fluxograma 23**. A amostra (fase orgânica) foi solubilizada em diclorometano, filtrada em cartucho C18 e, injetada três vezes (13,2 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL. Deste fracionamento, isolou-se a substância **15**.

Figura 99: Cromatograma HPLC_{prep} de Fr11-LG-PDB registrado em 254 nm



Fluxograma 23: Fluxograma de purificação da fração Fr11-LG-PDB.



8.2.9 Esterificação de Mosher

A substância **15** foi submetida a reação com reagentes de Mosher para determinação da configuração absoluta de C-7.

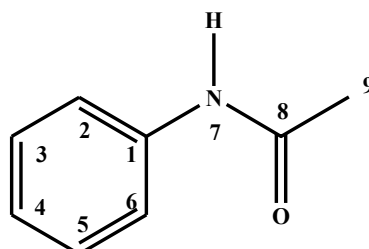
A substância **15** (0,5 mg) foi transferida para um tubo de RMN limpo e completamente seco, adicionou-se ao tubo piridina deuterada (0,5 mL) e o reagente (*R*)-MTPA-Cl (10 μ L), em seguida borrifou N₂ no tubo de RMN. A reação foi monitorada por RMN de ¹H, deixou-se a 25 °C durante 5 horas. O produto final resultou no composto **15a** (éster (*S*)-MTPA).

Da mesma maneira descrita acima, o composto **15** (0,5 mg) foi submetido a reação com (*S*)-MTPA-Cl em um segundo tubo de RMN a 25 °C durante 5 horas usando piridina deuterada (0,5 mL) como solvente. O produto final resultou no composto **15b** (éster (*R*)-MTPA).

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.3.1 Identificação estrutural da substância **10**

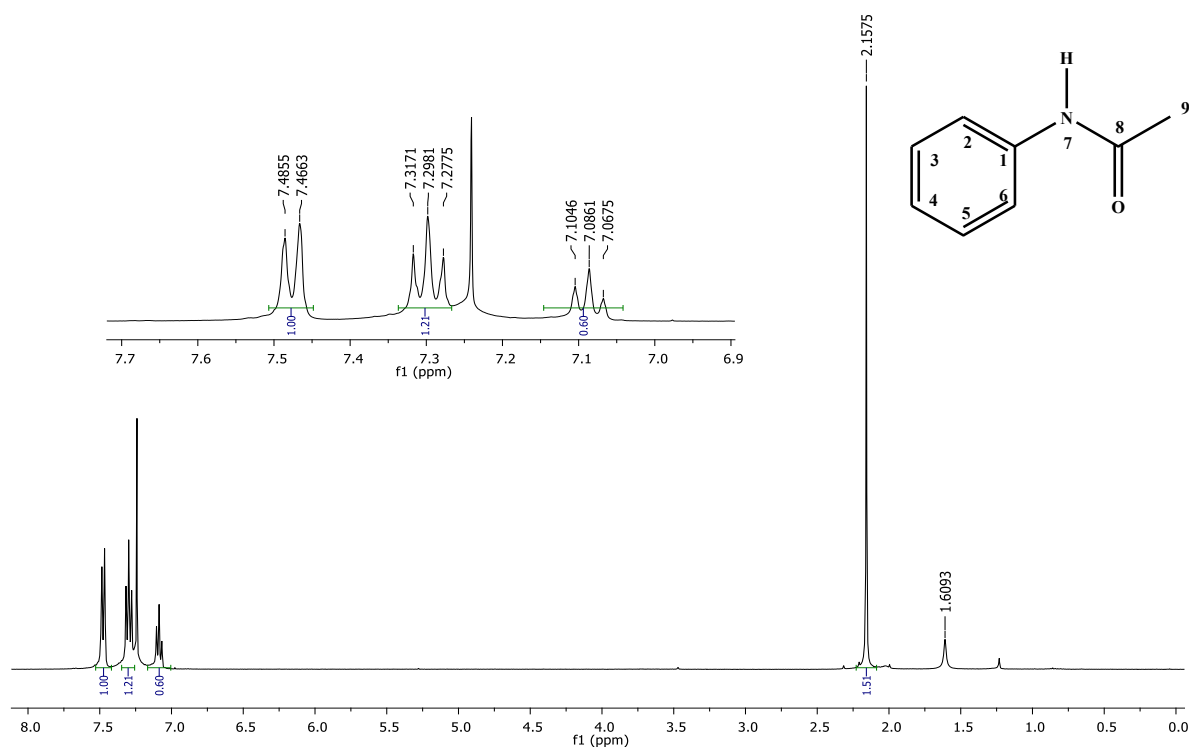
Figura 100: Estrutura da Fenilacetamida



A substância **10** foi isolada como um sólido de cor branca (3,6 mg) e, sua fórmula molecular C_8H_9ON foi determinada utilizando os dados obtidos através das análises dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C e EM.

O espectro de RMN de 1H (**Figura 101**) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,45 (*d*, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-4), em δ_H 7,30 (*t*, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-3 e H-5) e, δ_H 7,08 (*t*, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-2 e H-6) evidenciando um anel aromático monossustituído e, um sinal em δ_H 2,15 (*s*, 3H, H-9), característico de hidrogênios de metila ligada a uma carbonila.

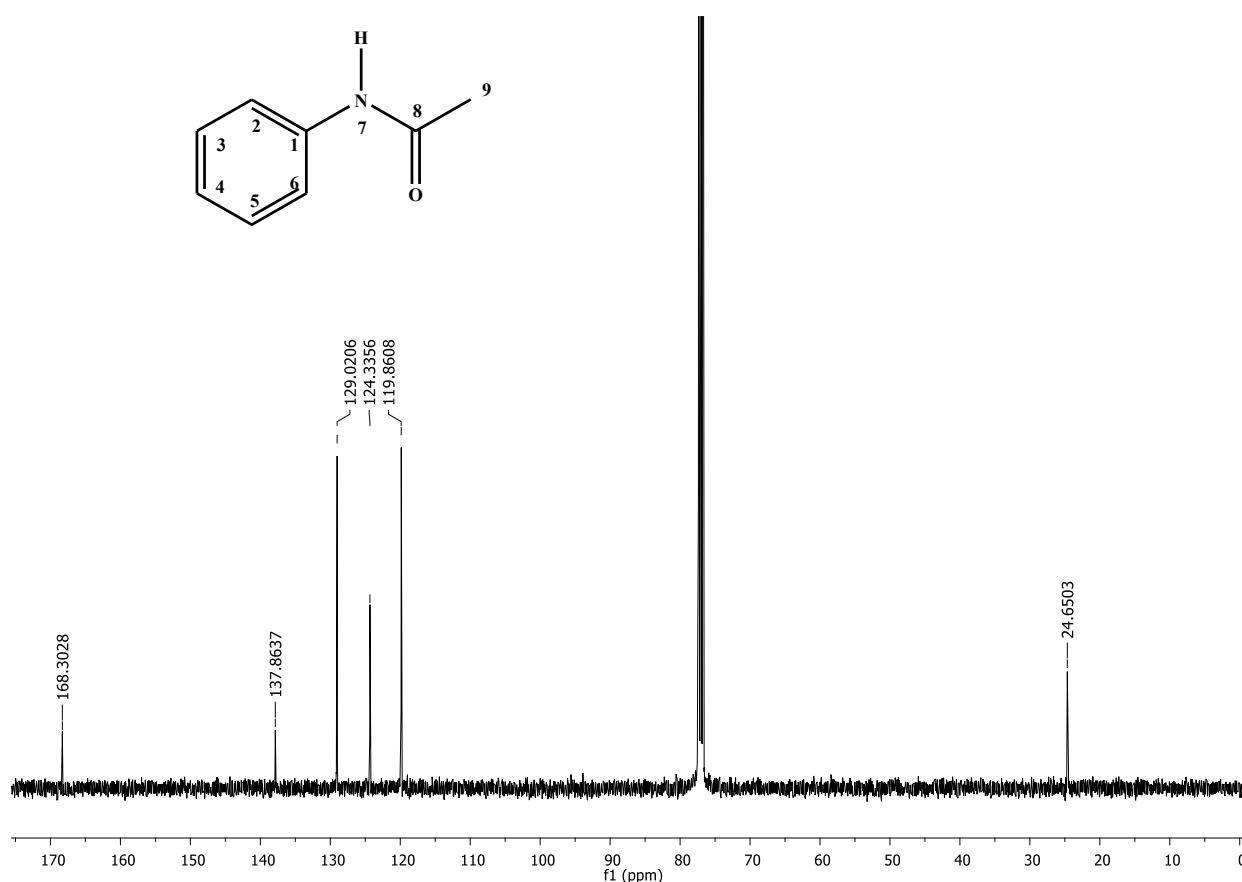
Figura 101: Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) da substância **10**.



O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 102**) registrou a presença de três carbonos benzênicos em δ_{C} 129,0 (C-3 e C-5), δ_{C} 124,3 (C-4) e, em δ_{C} 119,8 (C-2 e C-6), um carbono quaternário em δ_{C} 137,8 (C-1), uma metila em δ_{C} 24,6 (C-9) e, uma carbonila em δ_{C} 168,3 (C-8). Considerando tratar-se de um anel aromático monosubstituído, consideramos uma substância constituída de oito átomos de carbono.

Com esses dados foi possível sugerir tratar-se de uma amida aromática.

Figura 102: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância **10**.



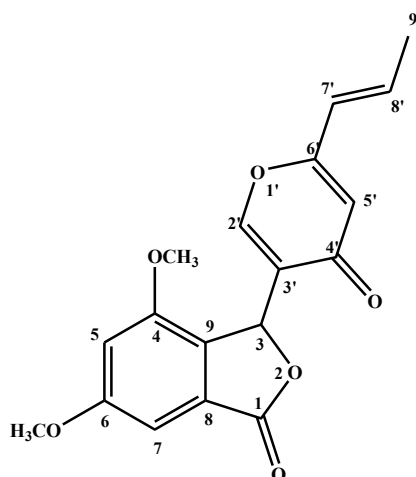
Os dados obtidos por RMN de ^1H , ^{13}C e EM e, comparação com os dados da literatura nos permitiu atribuir para a substância em questão, a estrutura da fenilacetamida (acetanilida). Esta substância já foi isolada do fungo *Pseudomonas aeruginosa*. Não sendo relatada atividade biológica para essa substância¹¹⁹.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **10** (400 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	-	137,8; C
2	7,08 (t, 8,0)	119,8; CH
3	7,29 (t, 8,0)	129,0; CH
4	7,45 (d, 8,0)	124,3; CH
5	7,29 (t, 8,0)	129,0; CH
6	7,08 (t, 8,0)	119,8; CH
8	-	168,3; C
9	2,15 (s)	24,6; CH_3

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

8.3.2 Identificação estrutural da substância **11**

Figura 103: Estrutura da Vermistatina

A substância **11** foi isolada como um sólido cristalino branco (1,6 mg), a fórmula foi estabelecida como $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$ com auxílio dos dados obtidos por análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 104**) foi possível observar a presença de um grupo (1*E*)-propenila, duas metoxilas em δ_{H} 3,76 e 3,85 e, cinco hidrogênios na região de δ_{H} 6,13 a 7,40 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 105**) associado ao experimento de HSQC (**Figura 106**) e valor dos deslocamentos químicos nos evidenciaram a presença de uma metila em δ_{C} 18,5, duas metoxilas em δ_{C} 55,8 e 56,0, sete carbonos metínicos e oito quaternários.

Figura 104: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **11**.

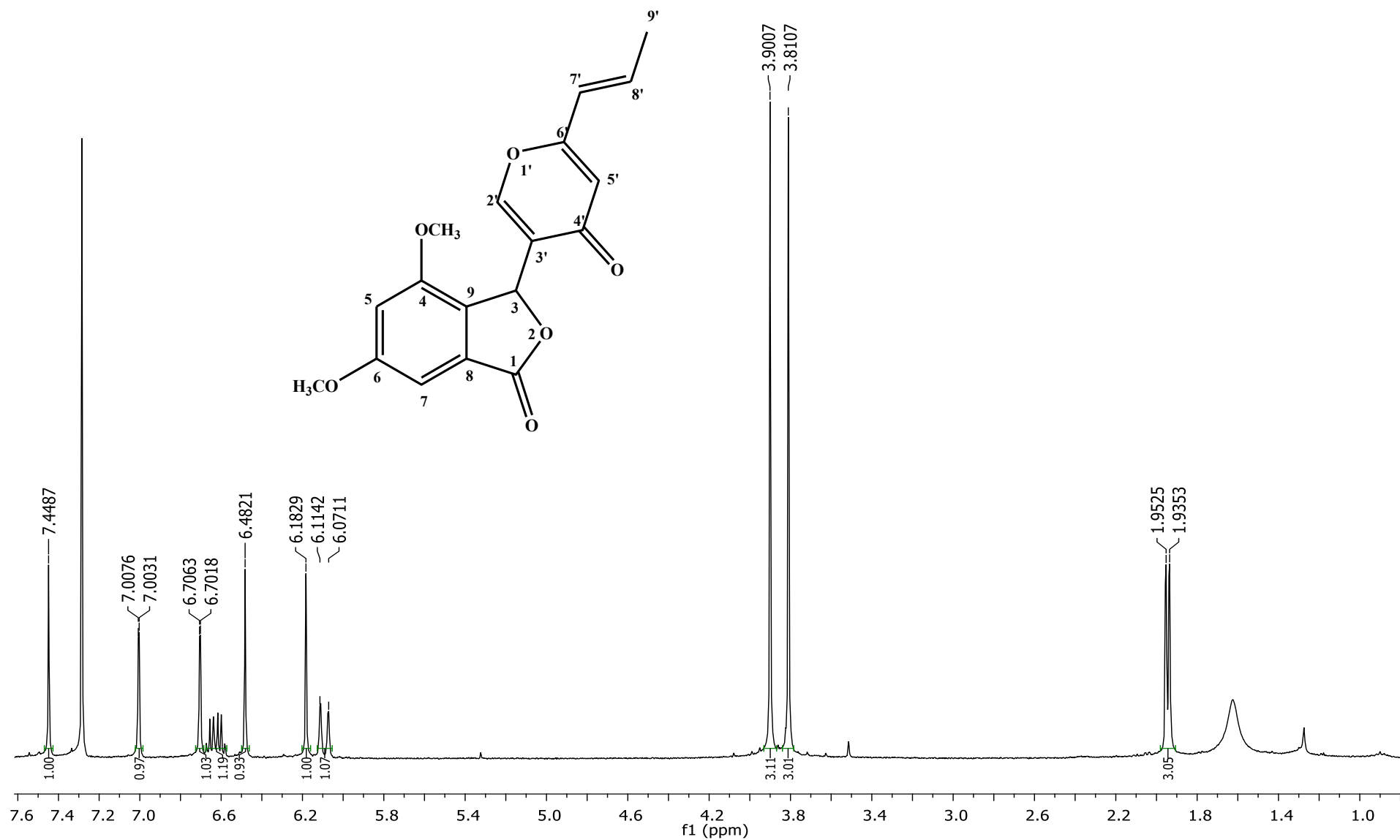


Figura 105: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância **11**.

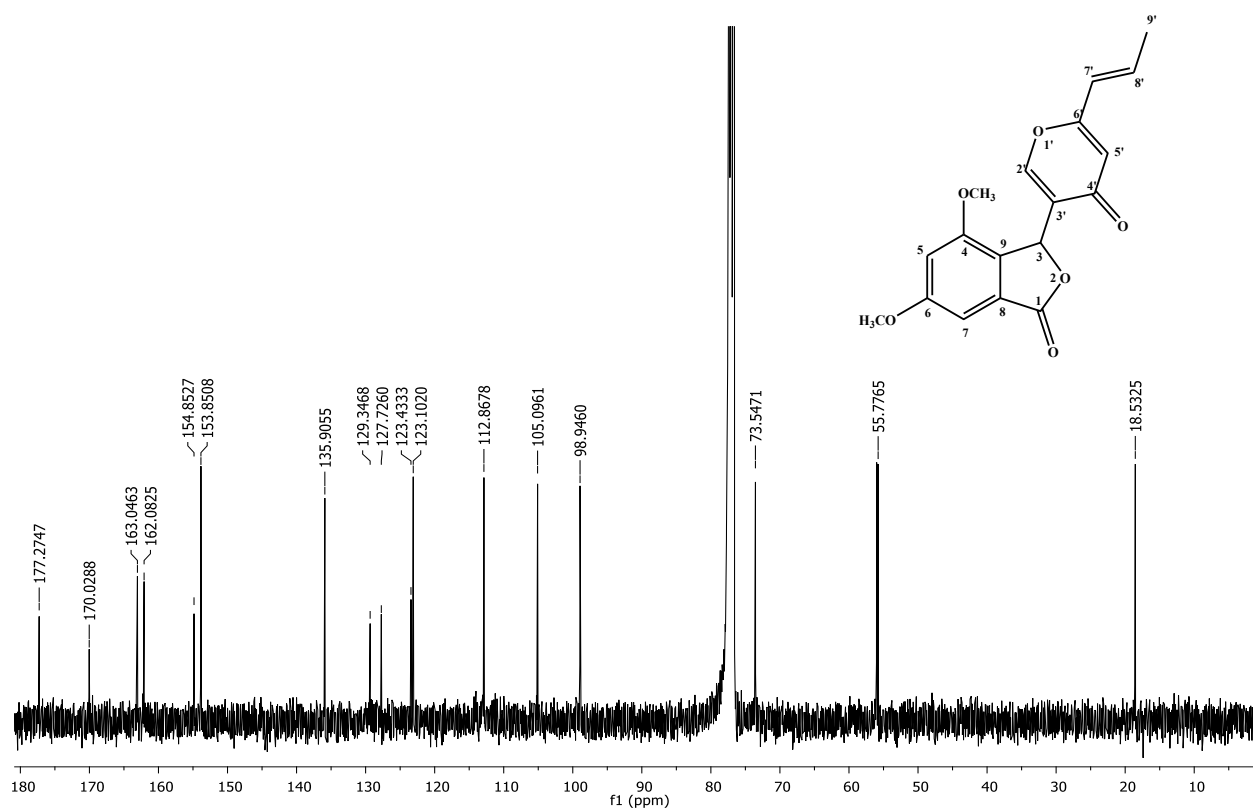
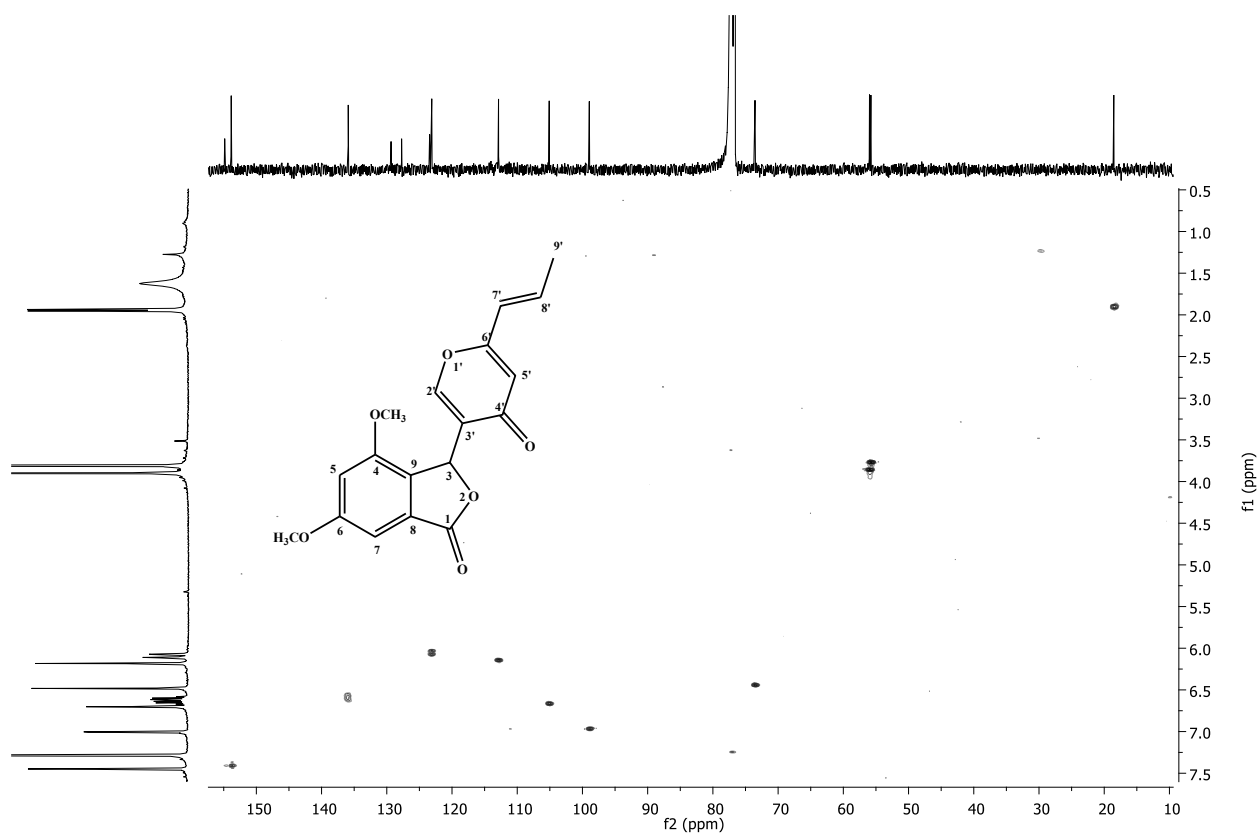


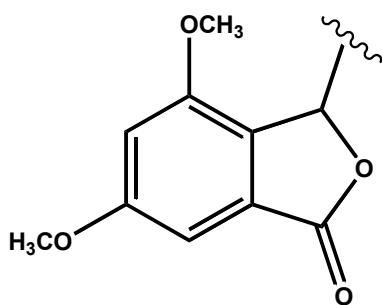
Figura 106: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) da substância **11**.



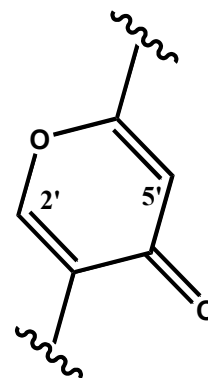
Os acoplamentos spin-spin $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (**Figura 107**) em conjunto com os dados de ^1H e ^{13}C sugeriram valores dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, nos permitiram sugerir tratar-se de uma substância formada por uma unidade dimetoxifalida e outra 2-(1-propenil)-4*H*-piran-4-ona.

Os sinais observados em δ_{H} 6,65 (*d*, 2,0 Hz, δ_{C} 105,1, H-5) e δ_{H} 6,96 (*d*, 2,0 Hz, 4 δ_{C} 98,9, H-7) evidenciaram um anel aromático 1,2,3,5-tetrasubstituído. Os deslocamentos em δ_{C} 73,5 (C-3) e 170,0 (C-1) associados às correlações observadas em HMBC (**Figura 108**) entre $\text{H-3} \leftrightarrow \text{C-1/C-8/C-9}$, $\text{H-5} \leftrightarrow \text{C-4/C-6/C-7/C-9}$, $\text{H-7} \leftrightarrow \text{C-1/C-5/C-6/C-9}$ e, das metoxilas $\text{C(4)-OCH}_3 \leftrightarrow \text{C-4}$ e $\text{C(6)-OCH}_3 \leftrightarrow \text{C-6}$ evidenciaram a presença de uma dimetoxifalida identificada como **estrutural parcial A**.

A segunda unidade da substância foi definida como 2-(1-propenil)-4*H*-piran-4-ona (**estrutura parcial B**) com base nos valores dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados nos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C e, HSQC. Os singletos observados em δ_{H} 7,40 (*d*, 0,6 Hz, δ_{C} 153,8, H-2') e δ_{H} 6,13 (*dd*, 0,5; 0,4 δ_{C} 112,8, H-5'), indubitavelmente nos permitiram visualizar uma unidade 2-(1-propenil)-4*H*-piran-4-ona.



Estrutura Parcial A



Estrutura Parcial B

A junção entre as estruturas parciais A e B foi realizada pela observação da correlação observada em HMBC entre $\text{H-2}' \leftrightarrow \text{C-3}$ e $\text{H-3} \leftrightarrow \text{C-4}'$. O posicionamento do radical propenil também foi realizado com auxílio do experimento de HMBC onde foi visualizada a correlação entre $\text{H-8}' \leftrightarrow \text{C-6}'$.

Figura 107: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância **11**

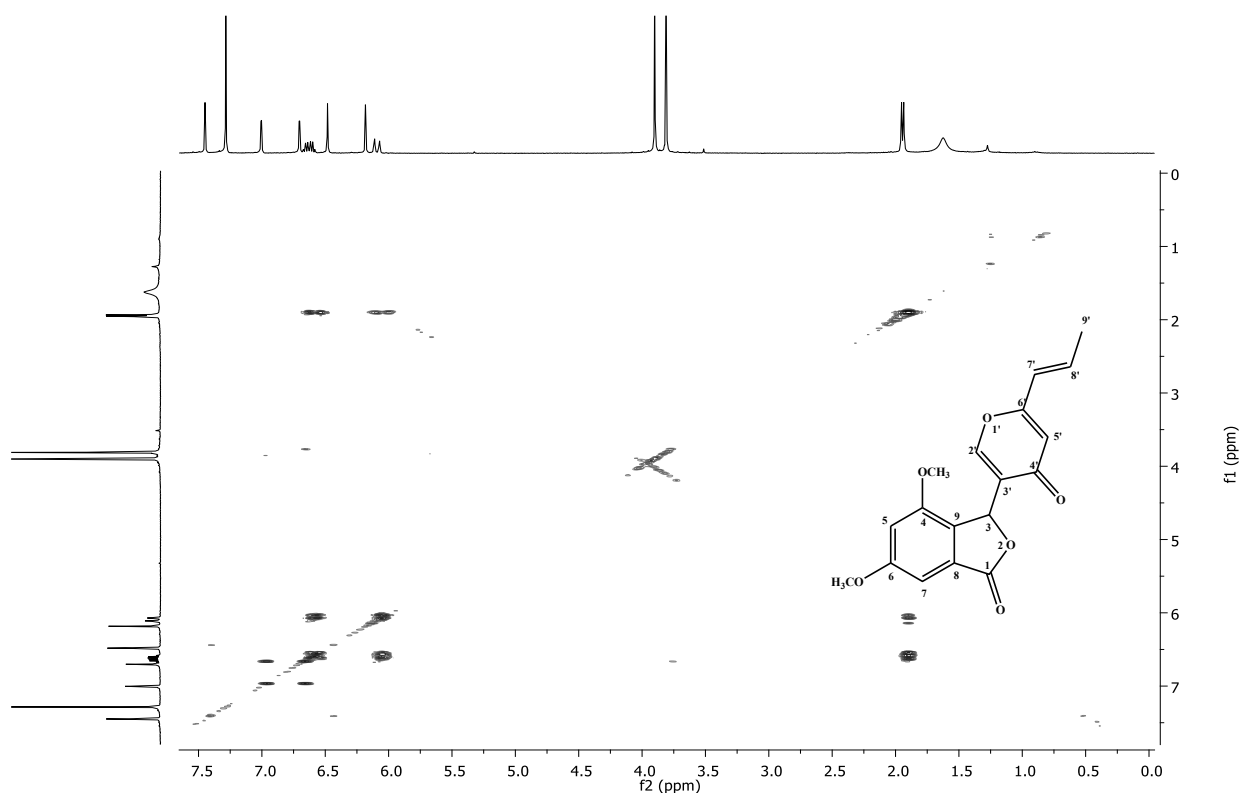
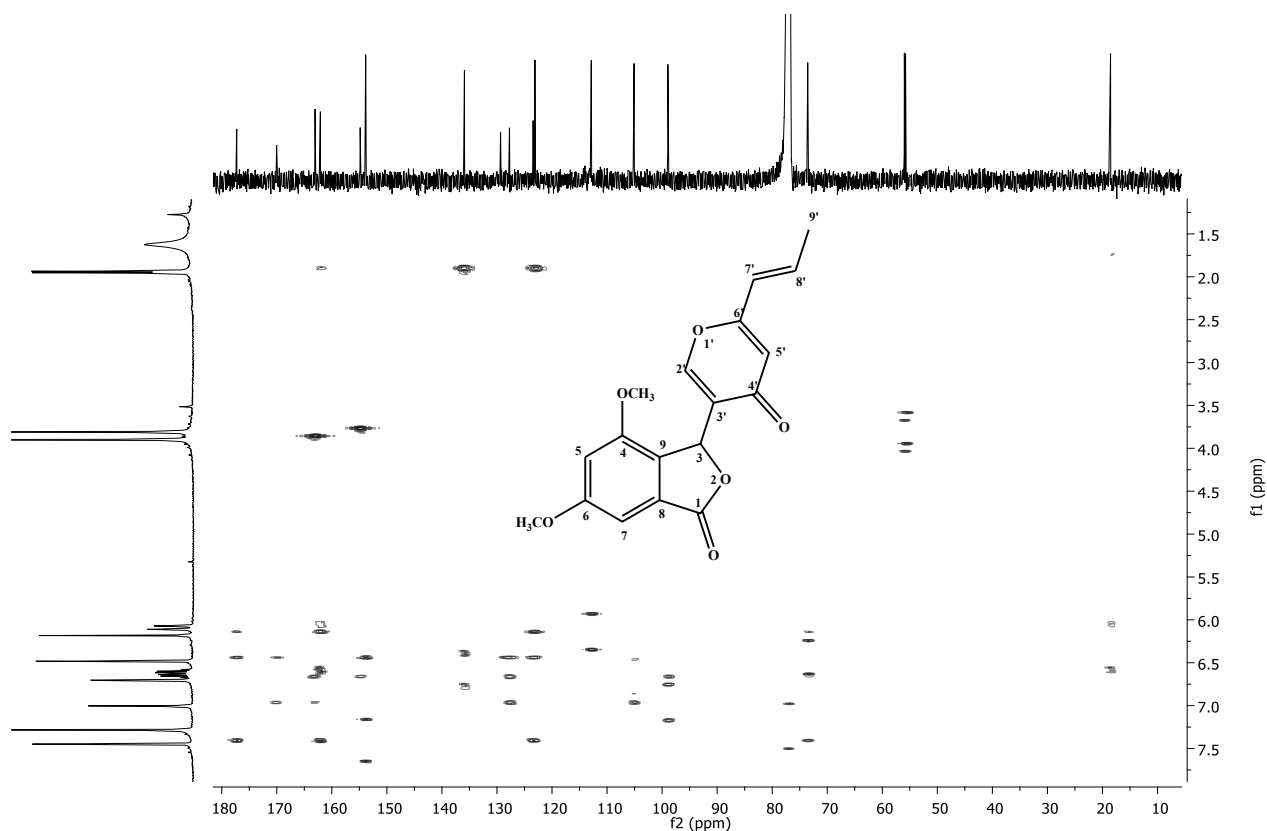


Figura 108: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da substância **11**



Estes dados, comparados com os dados da literatura nos permitiram propor para a substância em questão a estrutura da vermistatina (**11**). Esta substância já foi isolada de fungos endofíticos tais como: *Penicillium vermiculatum*, *Penicillium rubrum*, *Guinardia* sp. e *Talaromyces thailandiasis*. Sendo relatadas atividades citotóxica, antibiótica, antifúngica, inibidor de elastase e fitotóxica¹²⁰⁻¹²².

Figura 109: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹H-¹H COSY (—)

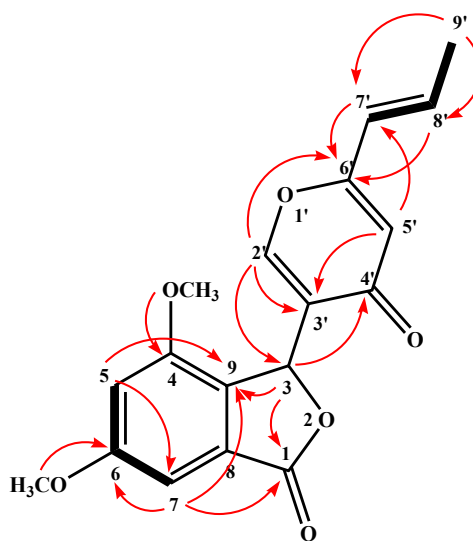


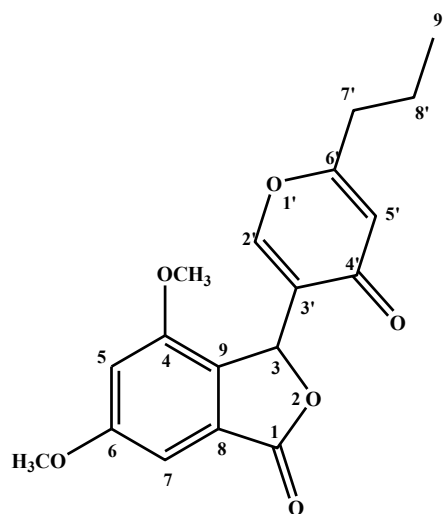
Tabela 19: Dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância **11** (400 MHz, CDCl₃^a)

Posição	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	HMBC
1	-	170,0; C	-
3	6,43 (s)	73,5; CH	C-1; C-8; C-9; C-2'; C-3'; C-4'
4	-	154,8; C	-
5	6,66 (d, 2,0)	105,1; CH	C-4; C-6, C-7; C-9
6	-	163,0; C	-
7	6,96 (d, 2,0)	98,9; CH	C-1; C-5; C-6; C-9
8	-	129,3; C	-
9	-	127,7; C	-
10	3,76 (s)	55,8; CH ₃	C-4
11	3,85 (s)	56,0; CH ₃	C-6
2'	7,40 (d, 0,6)	153,8; CH	C-3; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	-	123,4; C	-
4'	-	177,2; C	-
5'	6,13 (dd, 0,5; 0,4)	112,8; CH	C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
6'	-	162,1; C	-
7'	6,04 (dq, 16,0; 1,5)	123,1; CH	C-6'; C-9'
8'	6,58 (ddq, 16,0; 6,9; 0,4)	135,9; CH	C-6'; C-9'
9'	1,90 (ddd, 7,0; 1,5; 0,5)	18,5; CH ₃	C-6'; C-7'; C-8'
C(4)-OCH ₃	3,81 (s)	55,7	C-4
C(6)-OCH ₃	3,90 (s)	55,9	C-6

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

8.3.3 Identificação estrutural da substância 12

Figura 110: Estrutura da Dihidrovermistatina

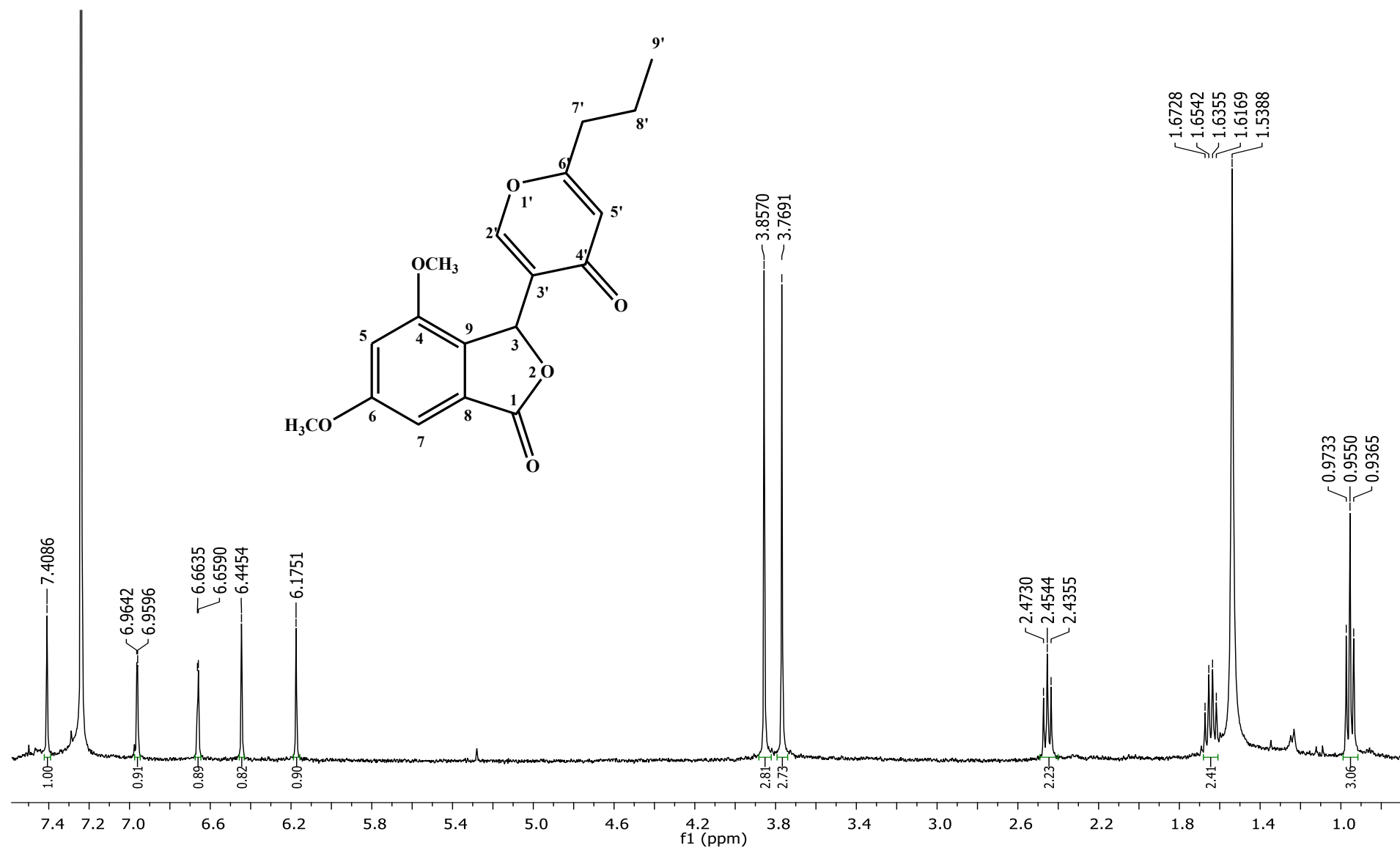


A substância 12 foi isolada como um óleo amarelo (0,8 mg), a fórmula foi estabelecida como $C_{18}H_{18}O_6$ com auxílio dos dados obtidos por análises dos espectros de RMN de 1H e EM.

Os dados de RMN de 1H (**Figura 111**) da substância 12 apresentaram similaridade estrutural com os dados da vermistatina (11), sendo que a única diferença observada foi a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios olefinicos da unidade propenila e a presença de dois metilenos em δ_H 2,45 (*t*, 7,5 Hz, 2H, H-7'), δ_H 1,64 (*m*, 2H, H-8') e um sinal em δ_H 0,95 (*t*, 7,5 Hz, 2H, H-9') evidenciando um radical propil, permitindo assim, atribuir para a substância em questão a 7',8'-dihidrovermistatina (12).

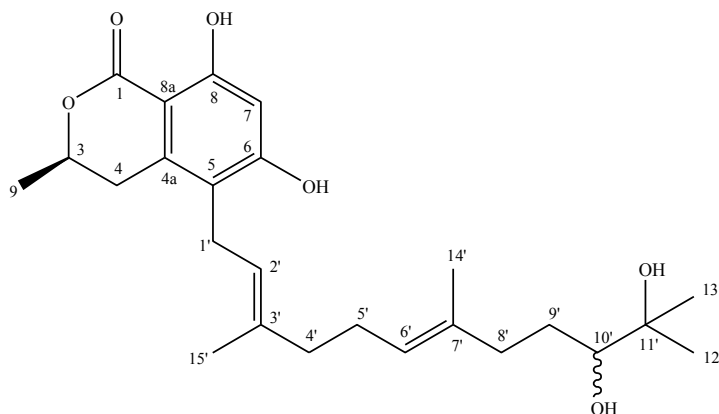
Estas informações comparadas aos dados da literatura sugerem a estrutura da dihidrovermistatina para a substância 12. Esta substância já foi isolada dos fungos *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium rubrum* sendo relatada atividade citotóxica da mesma^{123, 124}.

Figura 111: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **12**.



8.3.4 Determinação estrutural da substância **13**

Figura 112: Estrutura da (*R*)-6,8-dihidroxi-5-((2'*E*, 6'*E*)-10',11'-dihidroxi-3',7',11'-trimetildodeca-2',6'-dienil)-3-metilisocroman-1-ona



A substância **13** foi obtida como um sólido amorfo amarelo ($[\alpha]_D^{25} = 1,96$, c 0,28, CHCl_3). A fórmula molecular de $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_6$ foi determinada com base nas análises obtidos pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

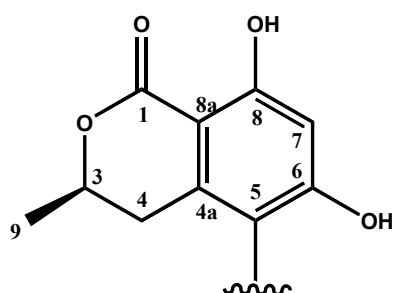
O espectro de ultra violeta apresentou λ_{max} em 311, 272 e 207 nm sugerindo a presença de uma hidroxila, um anel aromático e uma lactona saturada.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 113**) de **13** exibiu sinais em δ_{H} 6,29 (s, δ_{C} 101,9, 1H), δ_{H} 2,95 (dd, 16,0 e 3,0 Hz, 1H, δ_{C} 32,0) e 2,68 (dd, 16,0 e 11,0 Hz, 1H, δ_{C} 32,0) evidenciando dois hidrogênios geminais vizinhos a um centro estereogênico e um sinal em δ_{H} 1,50 (d, 3H, δ_{C} 20,9). A quelação do grupo hidroxila fenólico foi confirmada por sinais em campo baixo nos espectros de RMN de ^1H em δ_{H} 11,3 e por sinais em δ_{C} 170,4 nos espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 114**).

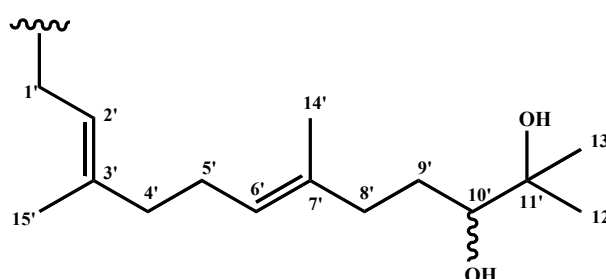
Estes valores associados aos deslocamentos químicos e, as constantes de acoplamento observados em RMN de ^1H e ^{13}C , evidenciaram claramente a presença da isocumarina 6-hidroxi meleina, estrutura parcial A. No entanto, a ausência do sinal de H-5, fortemente sugeriu que este carbono estivesse substituído, no caso por uma cadeia lateral.

Em continuidade a determinação estrutural e elucidação da cadeia posicionada em C-5, foram observados em RMN de ^1H (**Figura 113**, **Tabela 20**) e ^{13}C (**Figura 114**, **Tabela 20**) quatro sinais em δ_{H} 1,69 (s, δ_{C} 15,9, 3H, H-15'), δ_{H} 1,55 (s, δ_{C} 16,2, 3H, H-14'), δ_{H} 1,21 (s, δ_{C} 26,5, 3H, H-13') e δ_{H} 1,18 (s, δ_{C} 23,5, 3H, H-12'), atribuídos a duas metilas sobre carbono sp^2 e duas outras sobre carbono

carbinólico sp^3 , respectivamente. Adicionalmente, foram observados dois tripletos em δ_{H} 4,95 (*t*, 6,0 Hz, δ_{C} 122,8, 1H, H-2') e δ_{H} 5,08 (*t*, 6,0 Hz, δ_{C} 124,4, 1H, H-6') atribuídos a dois hidrogênios olefinícos e um hidrogênio carbinólico em δ_{H} 3,37 (*d*, 10,0 Hz, δ_{C} 78,1, 1H, H-10'). Estes dados associados às correlações observadas em COSY (**Figura 115**) e HMBC (**Figura 116**) nos permitiram propor a estrutura parcial B.



Estrutura Parcial A



Estrutura Parcial B

Especificamente, as correlações HMBC de $\text{H}_2\text{-1}' \leftrightarrow \text{C-2}'/\text{C-3}'$, $\text{H-2}' \leftrightarrow \text{C-1}'/\text{C-4}'/\text{C-15}'$, $\text{H}_2\text{-4}' \leftrightarrow \text{C-2}'/\text{C-3}'/\text{C-15}'$, $\text{H}_2\text{-5}' \leftrightarrow \text{C-6}'/\text{C-7}'$, $\text{H-6}' \leftrightarrow \text{C-5}'/\text{C-8}'/\text{C-14}'$ e $\text{H}_2\text{-8}' \leftrightarrow \text{C-6}'/\text{C-7}'$ sugerindo a presença de duas unidades de isopreno. Correlações entre $\text{H}_3\text{-12}'$ e $\text{H}_3\text{-13}'$ com $\text{C-10}'/\text{C-11}'$ (δ 73,1) e de $\text{H}_3\text{-9} \leftrightarrow \text{C-3}/\text{C-4}$ reforçaram o posicionamento das metilas.

A junção entre as estruturas parciais A e B foi realizada com base nas correlações observadas em HMBC (**Figura 116**) entre $\text{H}_2 \leftrightarrow \text{C-5}$.

A estereoquímica relativa de C-2' e C-6' foi determinada com a ajuda dos dados de NOESY (**Figura 118**) onde as interações espaciais entre H-2' (δ 4,95) com H-1' (δ 3,20), e H-6' (5,08 δ) com H-8' (δ 2,03 e 2,14), indicaram que estes hidrogênios estão em uma configuração *E*.

Com base em toda discussão apresentada acima foi possível estabelecer para a substância em questão a (*R*)-6,8-dihidroxi-5-((2'*E*, 6'*E*)-10',11'-dihidroxi-3',7',11'-trimetildodeca-2',6'-dienil)-3-metilisocroman-1-ona, substância essa inédita na literatura.

Figura 113: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **13**.

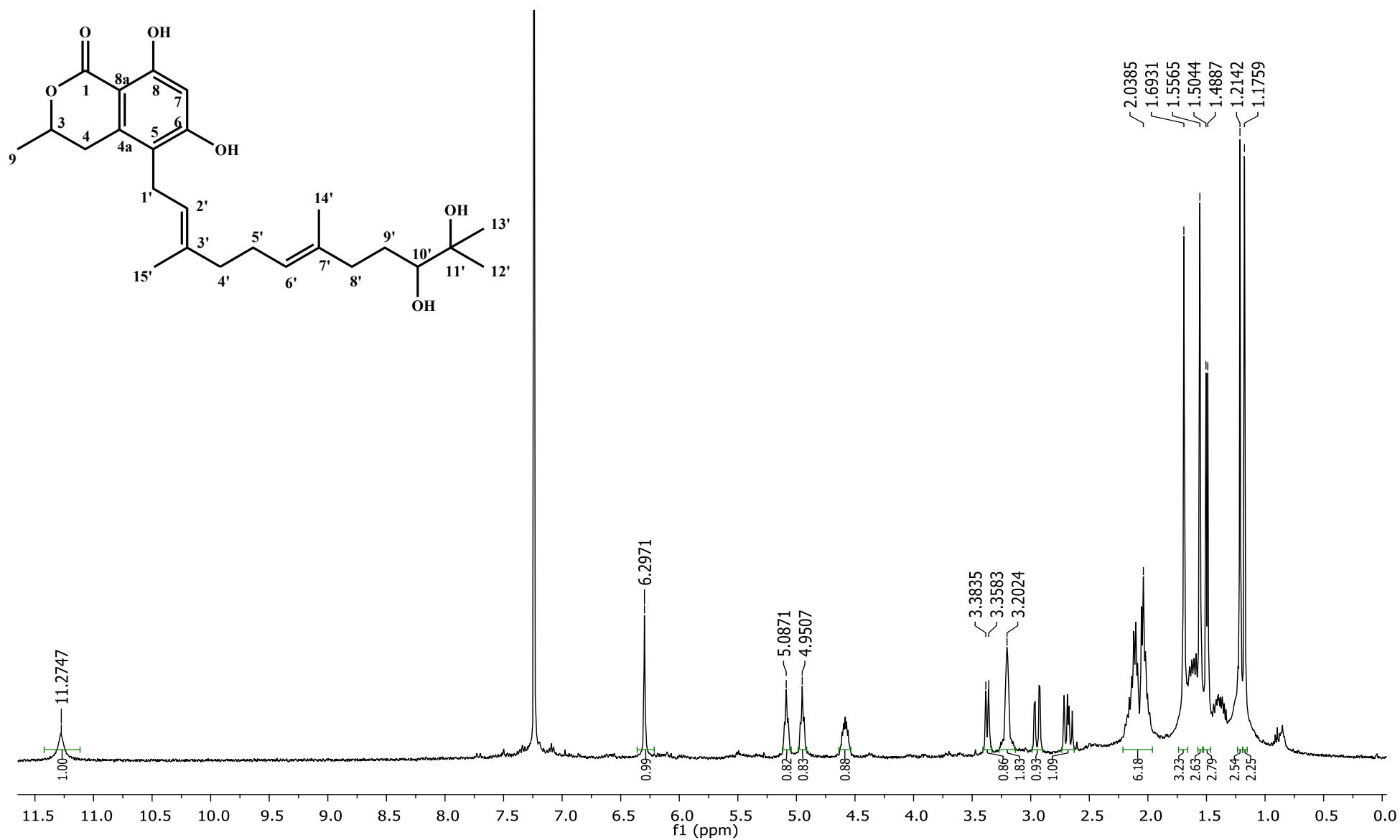


Figura 114: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância **13**

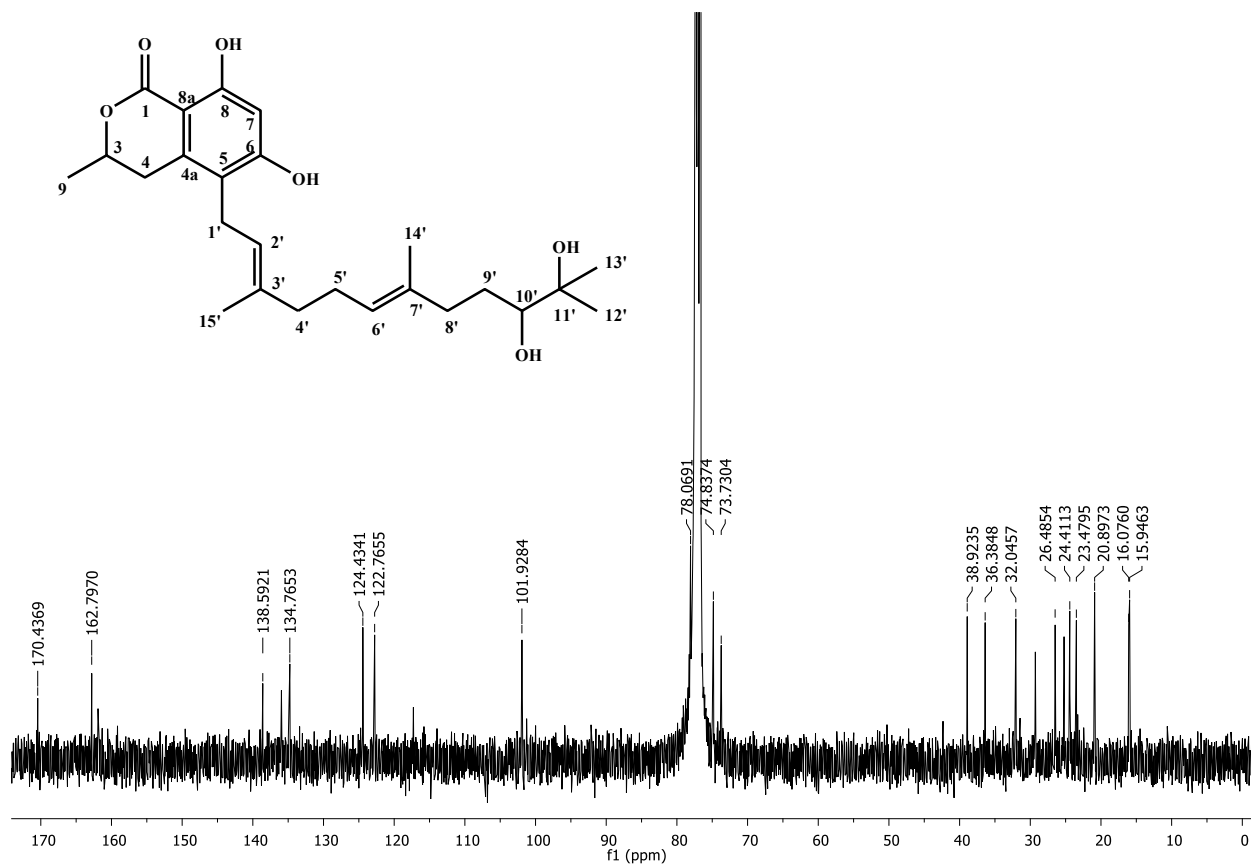


Figura 115: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância **13**

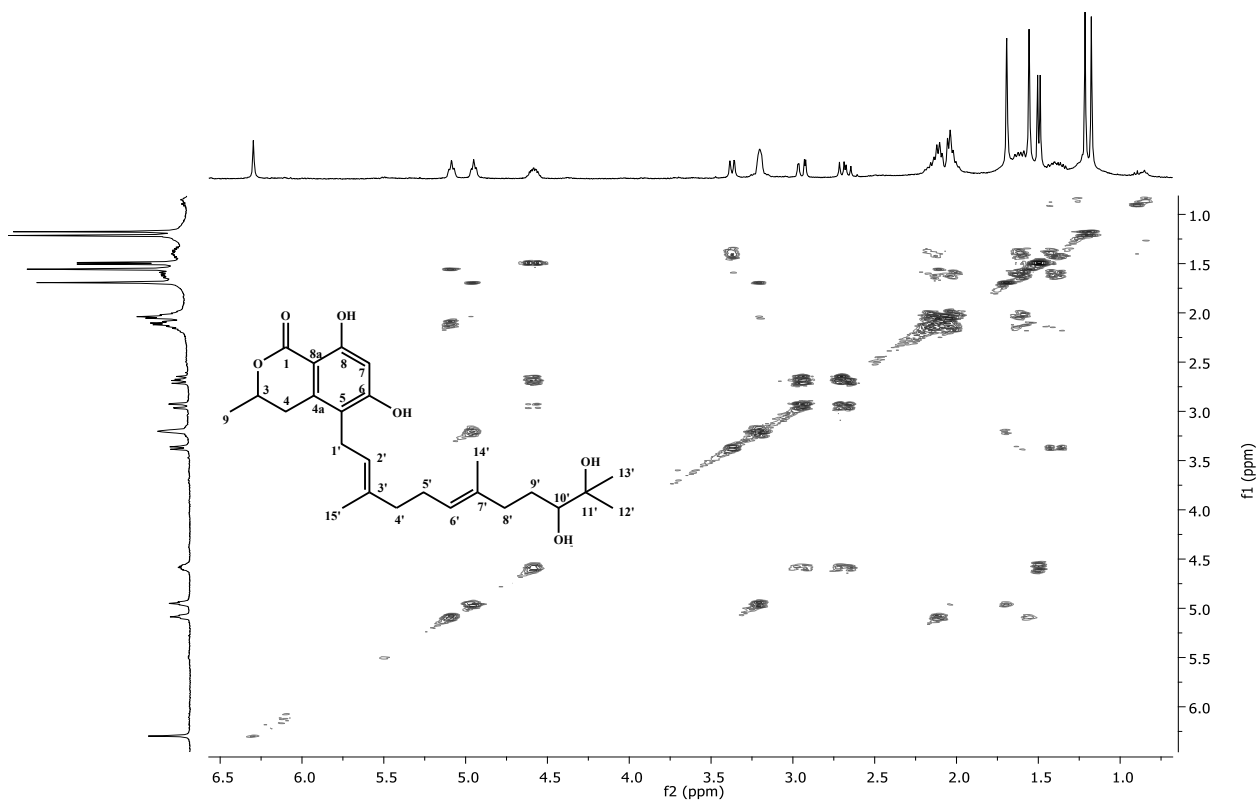


Figura 116: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da substância

13

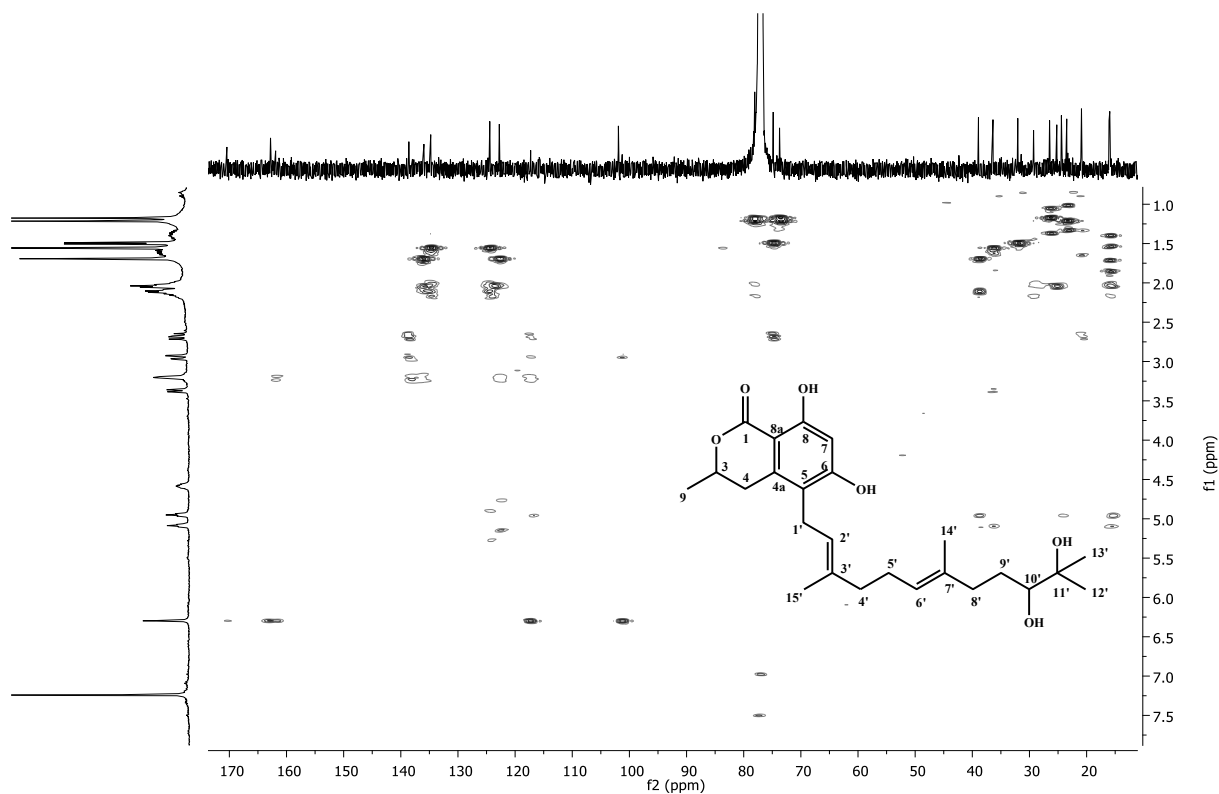


Figura 117: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da substância **13**

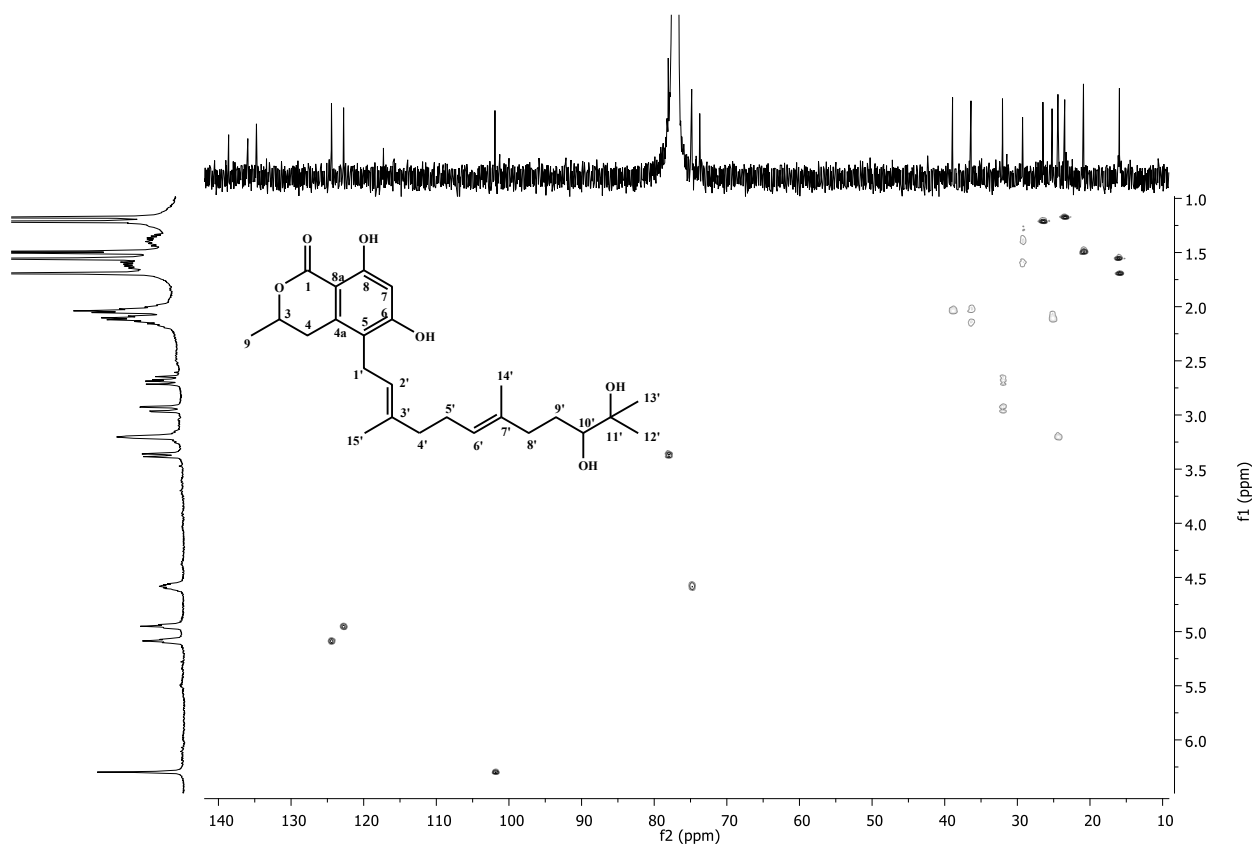


Figura 118: Mapa de correlação ^1H - ^1H através do espaço (NOESY, 400 MHz, CDCl_3) da substância **13**.

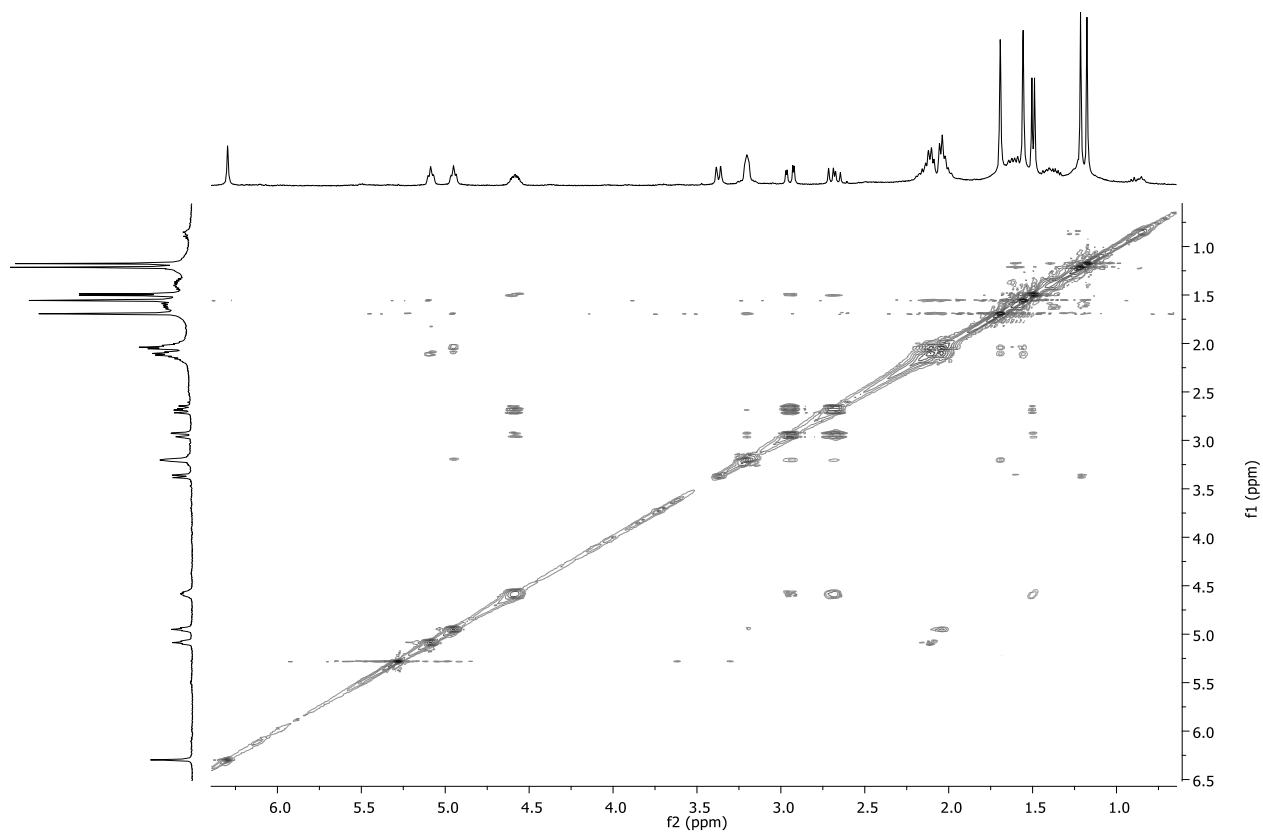


Figura 119: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) e ^1H - ^1H COSY (—)

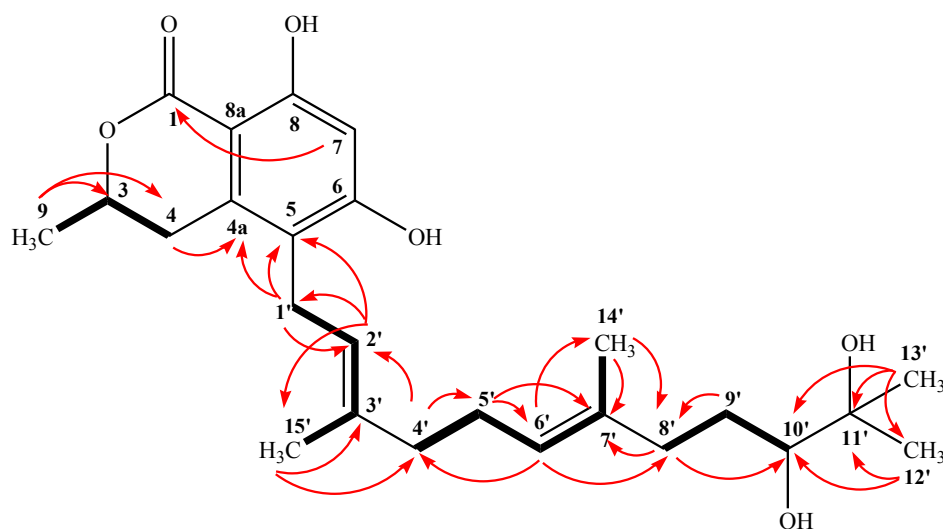


Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **13** (400 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC
1	-	170,4, C	-
3	4,58 (m)	74,8, CH	-
4 _a	2,95 (dd; 16,0, 3,0)	32,0, CH ₂	C-4a; C-5; C-8a
4 _b	2,68 (dd; 16,4; 11,5)		C-3; C-4a; C-5; C-9
4a	-	138,6, C	-
5	-	117,3, C	-
6	-	161,9, C	-
7	6,29 (s)	101,9, CH	C-1; C-5; C-6; C-8
8	-	162,8, C	-
	-	101,3, C	-
9	1,50 (d; 6,0)	20,9, CH ₃	C-3; C-4
1'	3,20 (s)	24,4, CH ₂	C-4a; C-5; C-6; C-2'; C-3'
2'	4,95 (t; 6,0)	122,8, CH	C-5; C-1'; C-4'; C-15'
3'	-	135,9, C	-
4'	2,04 (m)	38,9, CH ₂	C-2'; C-3'; C-5'; C-6'; C-15'
5'	2,11 (m)	25,2, CH ₂	C-4'; C-6'; C-7'
6'	5,08 (t; 6,2)	124,4, CH	C-4'; C-5'; C-8'; C-14'
7'	-	134,7, C	-
8' _a	2,14 (m)	36,4, CH ₂	C-6'; C-7'; C-9'; C-10'
8' _b	2,03 (m)		C-6'; C-7'; C-9'; C-10'
9' _a	1,61 (m)	29,3, CH ₂	C-6'; C-7'; C-8'
9' _b	1,39 (m)		C-7'; C-13'
10'	3,37 (d; 10,0)	78,1, CH	C-8'
11'	-	73,1, C	-
12'	1,18 (s)	23,5, CH ₃	C-10'; C-11'; C-13'
13'	1,21 (s)	26,5, CH ₃	C-10'; C-11'; C-12'
14'	1,55 (s)	16,2, CH ₃	C-6'; C-7'; C-8'
15'	1,69 (s)	15,9, CH ₃	C-2'; C-3'; C-4'

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

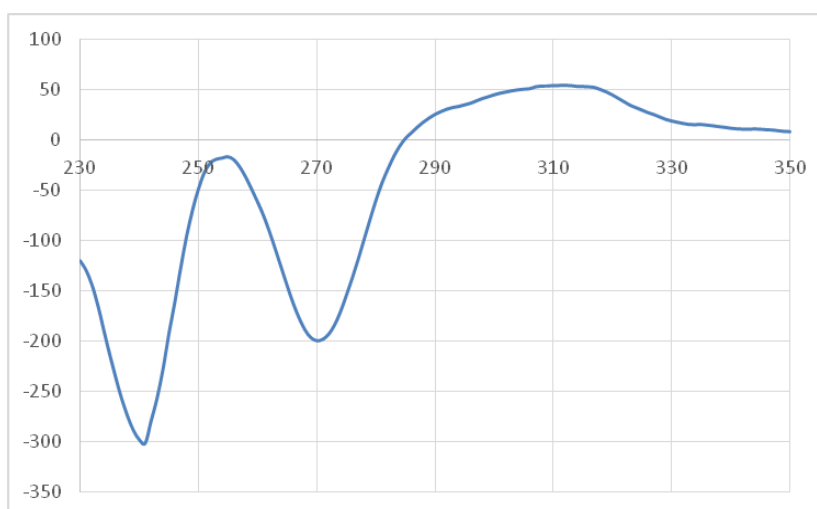
8.3.4.1 Determinação da Configuração Absoluta de C-3 da substância **13**

A estrutura secundária de uma molécula pode ser determinada pela espectroscopia Dicroísmo Circular (DC), que se baseia na diferença de absorção entre a luz circumentemente polarizada à esquerda e luz circumentemente polarizada à direita. Quando a molécula interage com a luz circumentemente polarizada provoca uma alteração nesta luz incidente. A técnica do DC está baseada nesta alteração da luz incidente. O dicroísmo circular está na região do espectro eletromagnético referente ao extremo ultravioleta cujo comprimento de onda se estende de 190 a 250 nm e é de extrema valia para determinar a composição de misturas quirais, mudanças conformacionais de macromoléculas, bem como a interação dessas macromoléculas

com outras moléculas menores, principalmente as aquirais. Basicamente, uma molécula apresenta DC quando ela é quiral e contém um cromóforo¹²⁵.

Assim, utilizando a técnica de DC, foi possível determinar a configuração absoluta de C-3 (**Figura 120**), como *R* com base no fato de que o espectro da substância **13** mostrou quatro efeitos Cotton (dois positivos e dois negativos) sendo um dos efeitos negativos atribuída à banda K-absorção em 270 nm a qual atribui a configuração *R* a C-3^{126, 127}.

Figura 120: Curva de dicroísmo circular da substância **13**.



8.3.4.2 Isocumarinas derivadas de poliacetatos

O mecanismo que leva a formação de poliacetatos aromáticos dá origem quase exclusivamente a metabólitos secundários, e encontra-se especialmente em fungos e em menor escala, em bactérias e plantas superiores. Mesmo em fungos, a possibilidade de formação de poliacetatos não se encontra uniformemente distribuída, sendo características principalmente de fungos imperfeitos e Ascomycetos⁹⁶.

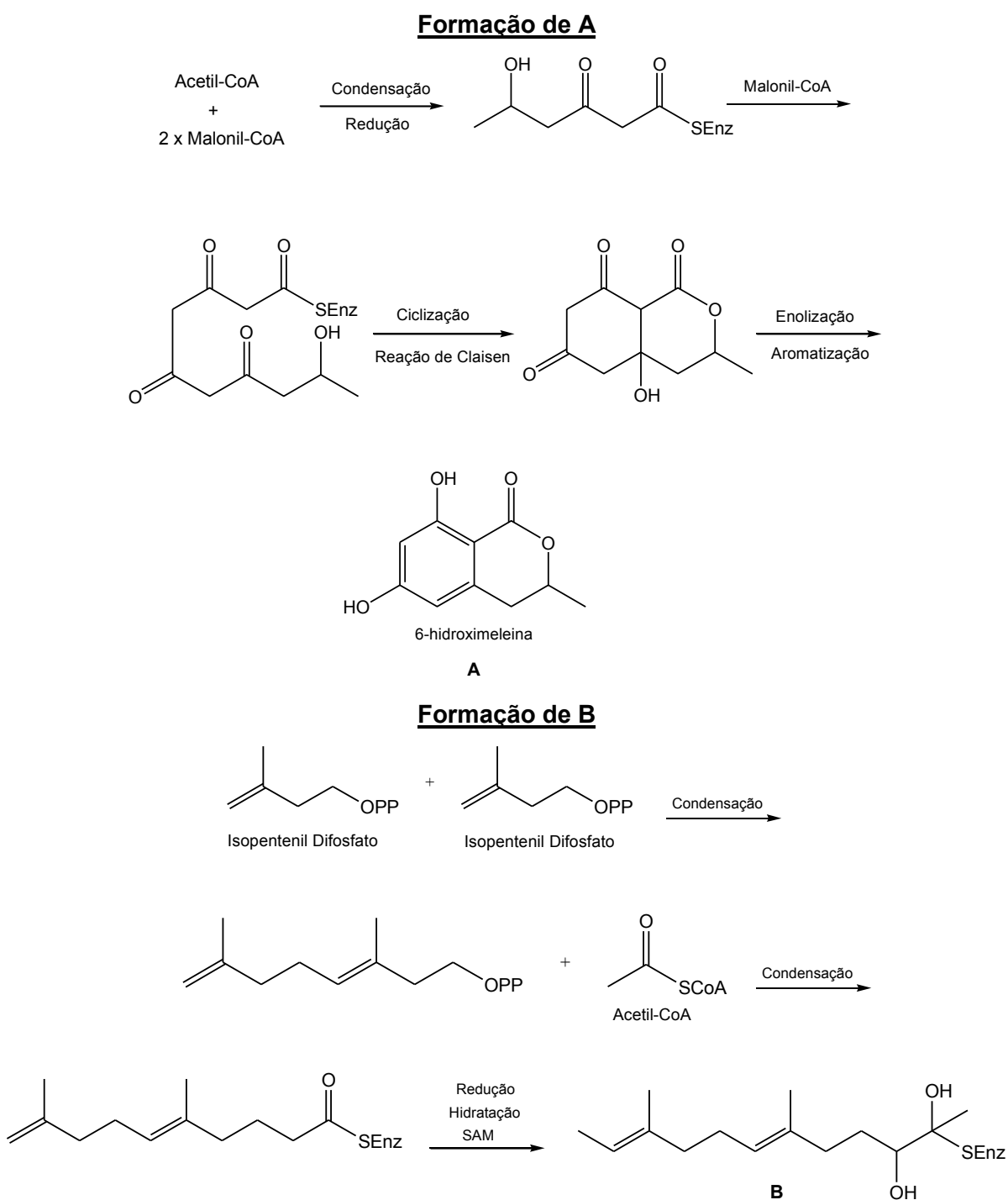
Os poliacetatos aromáticos são metabólitos de fungos amplamente conhecidos e seu processo de síntese é análogo ao dos ácidos graxos.

8.3.4.2.1 Proposta biossintética para a formação da isocumarina **13**

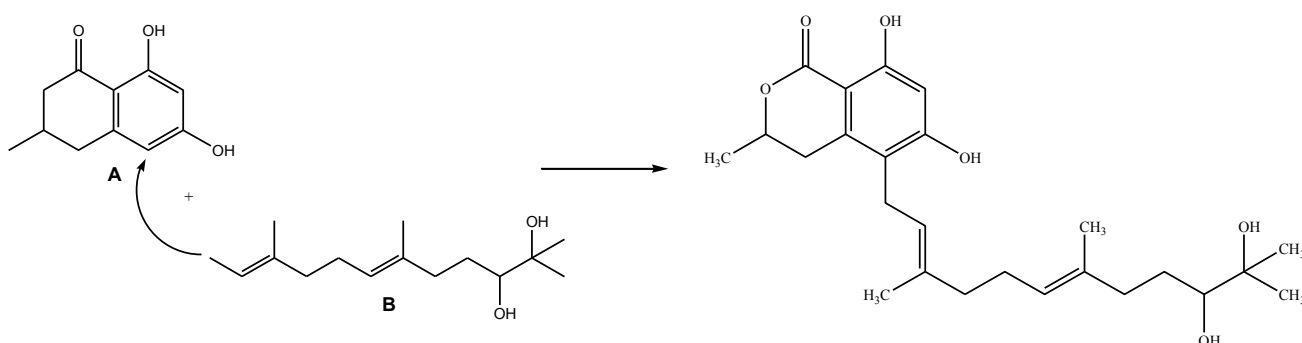
A proposta biossintética para a formação da nova isocumarina 6,8-dihidroxi-5-((2'*E*,6'*E*)-10',11'-dihidroxi-3',7',11'-trimetildodeca-2',6'-dienil)-3-metilisocroman-1-ona (**13**) se baseia na condensação de uma molécula de acetil-ScoA com duas de

malonil-ScoA, seguida de descarboxilação para formação de A⁹⁶. A cadeia isoprenica da isocumarina **13**, é formada pela condensação de duas unidades de isopentenil difosfato com uma molécula de acetil-CoA, seguida de diversas reações enzimáticas até a formação de B. A formação da isocumarina prenilada se dá a partir da reação de condensação de A mais B. Na **Figura 121** encontra-se uma possível rota biossintética para esta substância.

Figura 121: Proposta biossintética para formação da isocumarina **13**

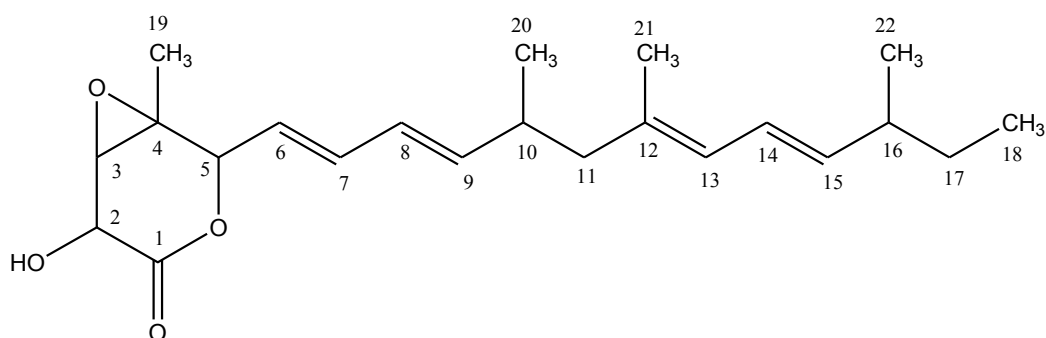


Formação da Isocumarina Prenilada



8.3.5 Identificação estrutural da substância 14

Figura 122: Estrutura da Nafuredina



Análise de dados de RMN, massas, ponto de ebulição e rotação óptica obtidos da substância 14 e, comparação com dados relatados na literatura, levou a identificação desta como sendo a nafuredina^{128, 129}.

A fórmula molecular para a substância 14 foi estabelecida como $C_{22}H_{32}O_4$ através da análise dos dados obtidos pelos espectros de RMN de 1H (Figura 123) e ^{13}C (Figura 124) e EM.

Figura 123: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **14**.

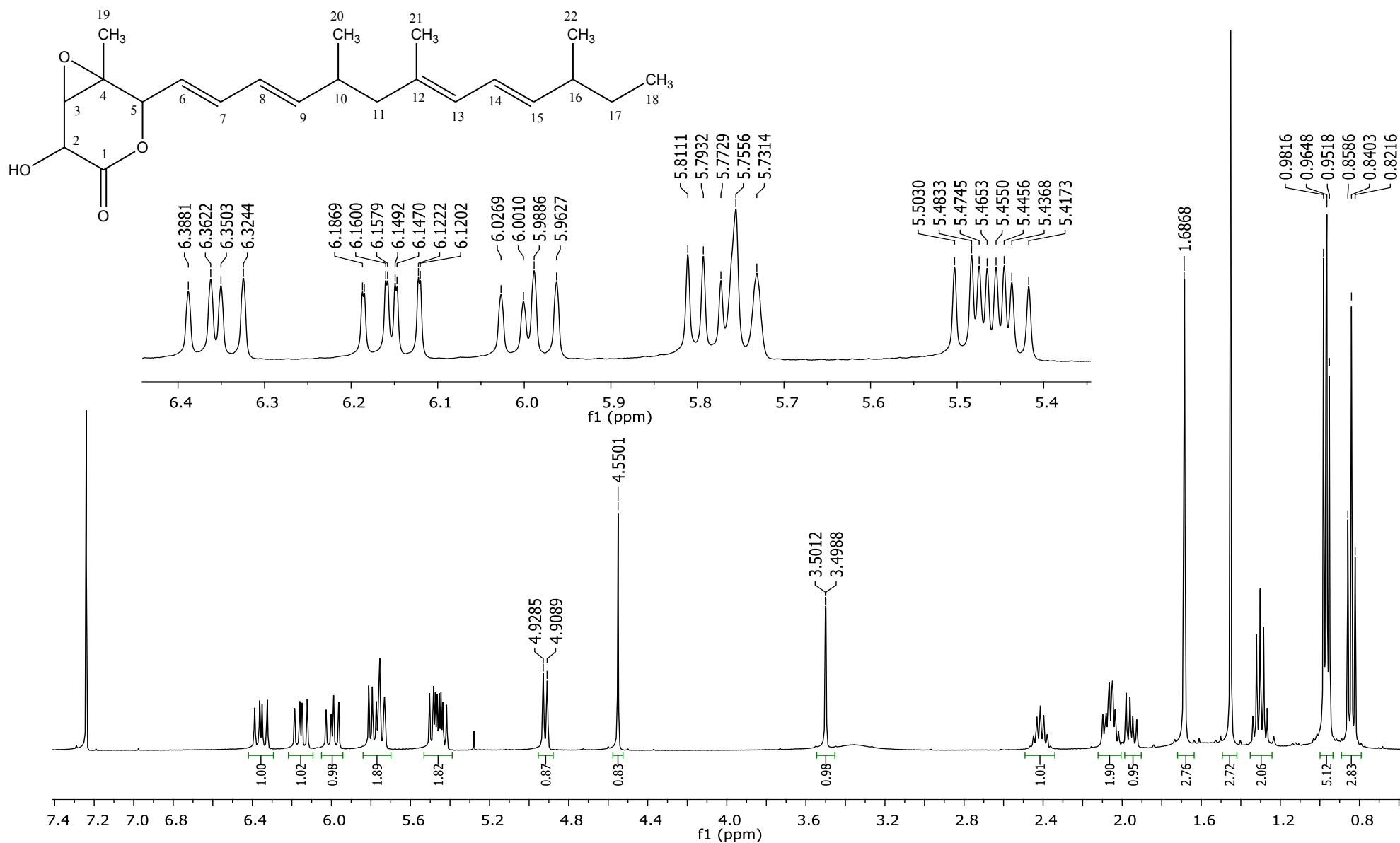
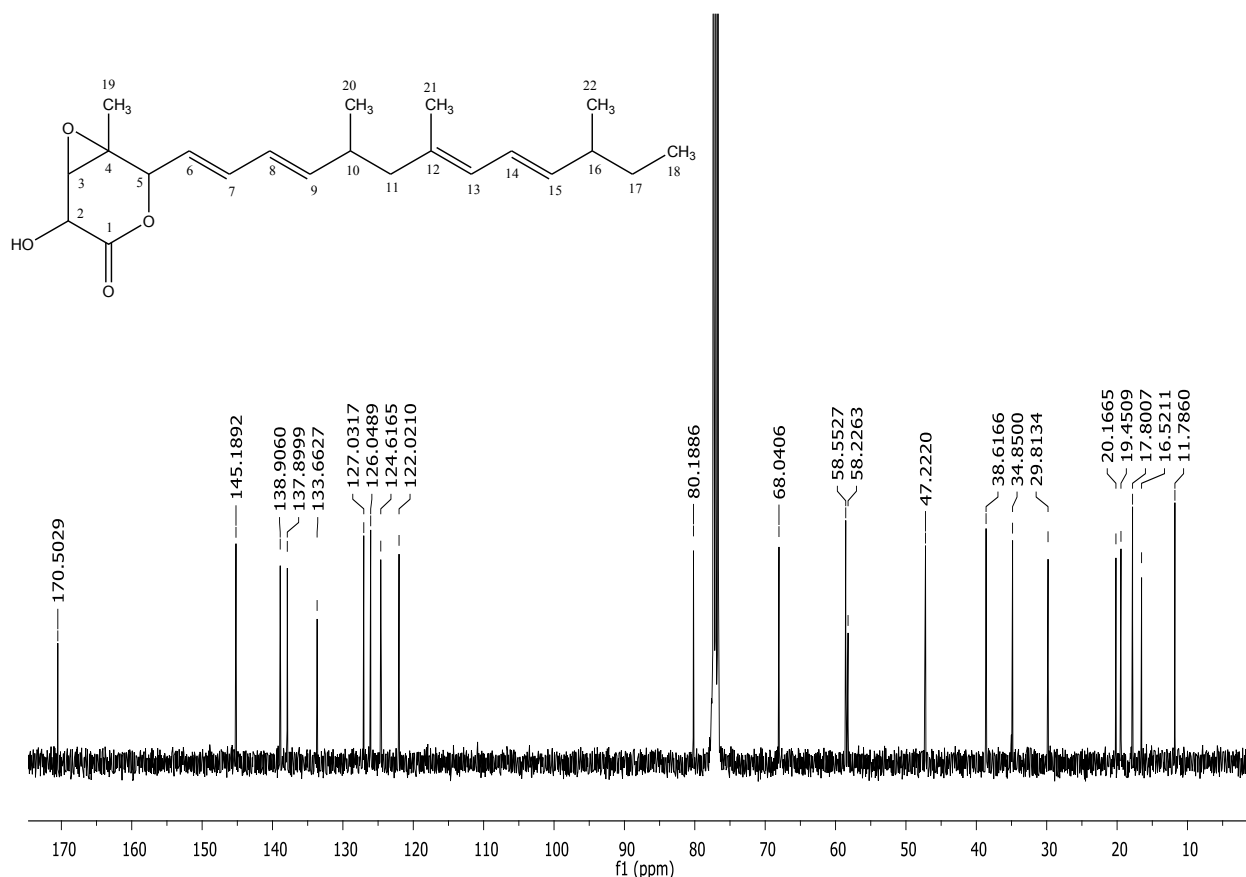
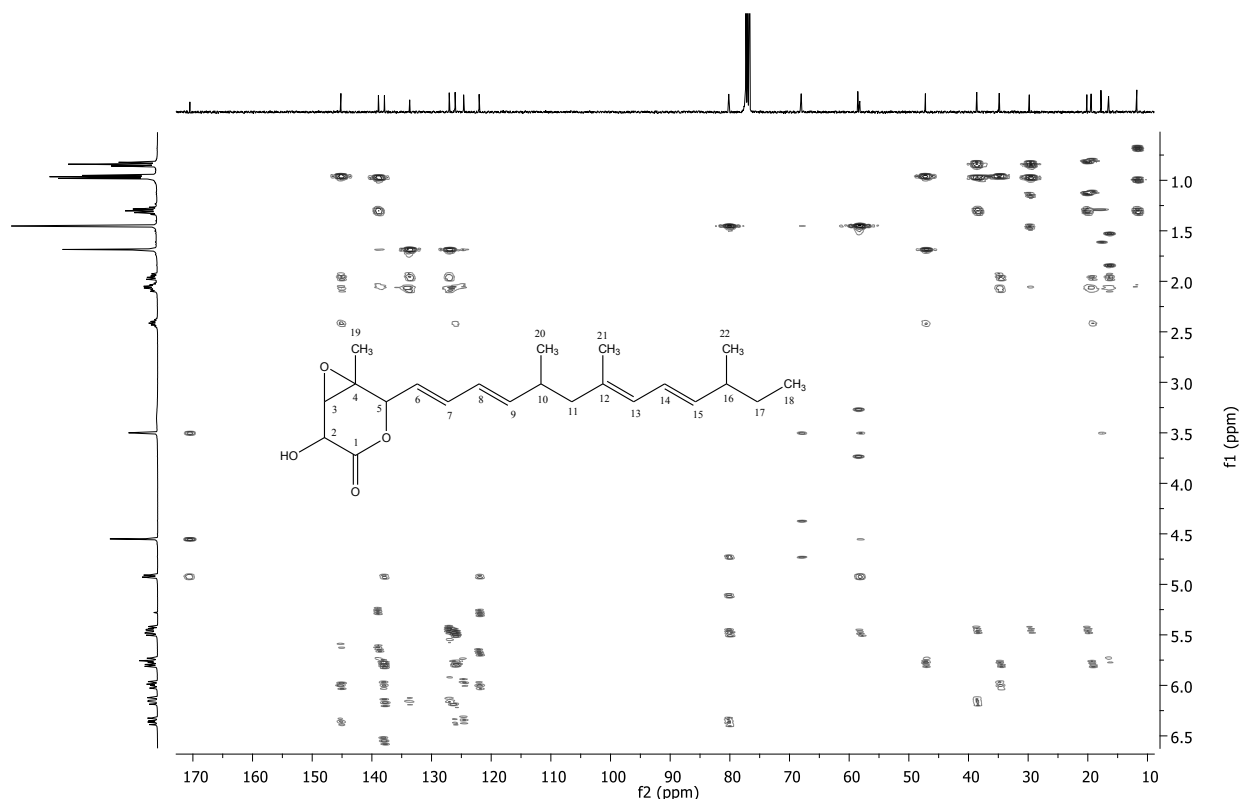


Figura 124: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância **14**

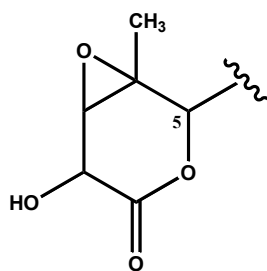
A porção δ -lactona foi elucidada, principalmente, pelas correlações obtidas a longa distância nos experimentos de HBMN (Figura 125). Correlações dos hidrogênios δ_H 1,45 (H-19) com os carbonos oxigenados C-3, C-4 e C-5 alongaram a cadeia hidrocarbônica em C-4 contendo um grupamento metila em δ_c 17,9 (C-19) como ramificação. No entanto, interações entre H-2 com C-4 e entre H-3 com C-1 demonstraram alinhamento de C-1 para C-3. Finalmente, o anel δ -lactona foi determinado baseado nas interações observadas entre H-5 com C-1 e seus respectivos deslocamentos químicos.

Dois carbonos adjacentes (δ_c 58,5, C-3 e, δ_c 58,2, C-4) foram indicativos de um anel epóxido, conclusão essa obtida através do índice de deficiência de hidrogênio e dos valores de acoplamento de C-2 e C-3. A isomeria geométrica dos dois dienos foi elucidada como sendo *E* através das constantes de acoplamento vicinal dos hidrogênios e deslocamentos químicos de C-21 (δ_c 16,5).

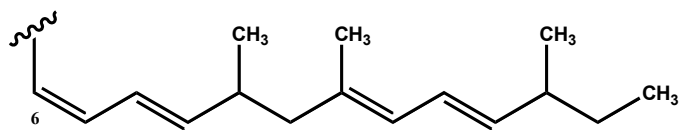
Figura 125: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da substância**14**

Análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC (**Figura 126**) revelaram a presença de três carbonos quaternários, sendo um deles atribuído a uma carbonila de éster (δ_{C} 170,5; C-1), um carbono sp^2 (δ_{C} 133,6; C-12) e, um carbono carbinólico (δ_{C} 58,2; C-4), 12 carbonos metínicos sendo sete sp^2 (δ_{C} 122,0, C-6; δ_{C} 137,9, C-7; δ_{C} 126,0, C-8; δ_{C} 145,2, C-9; δ_{C} 127,1, C-13; δ_{C} 124,6, C-14 e δ_{C} 138,9, C-15), três carbinólicos (δ_{C} 68,0, C-2; δ_{C} 58,5, C-3 e, δ_{C} 80,2, C-5), e dois metínicos sp^3 (δ_{C} 34,8, C-10 e, δ_{C} 80,2, C-16) e dois metilênicos (δ_{C} 47,2, C-11 e, δ_{C} 29,8, C-17). Adicionalmente foram observados cinco metilas sendo uma sobre Csp^2 (δ_{C} 16,5, C-21), duas se desdobrando como dubletos (δ_{C} 19,4, C-20; e, δ_{C} 20,2, C-22) uma como singlete sobre carbono carbinólico (δ_{C} 17,8, C-19) e a última se apresentando como um tripleto (δ_{C} 11,8, C-18).

Estas informações adicionadas às multiplicidades, constantes de acoplamento, valor do deslocamento químico nos permitiram visualizar para a substância em questão duas estruturas **parcias A e B**.



Estrutura Parcial A



Estrutura Parcial B

A junção entre as estruturas parciais A e B foi realizada com base nas interações observadas em ^1H - ^1H COSY (Figura 127) e HBMC.

Figura 126: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da substância **14**

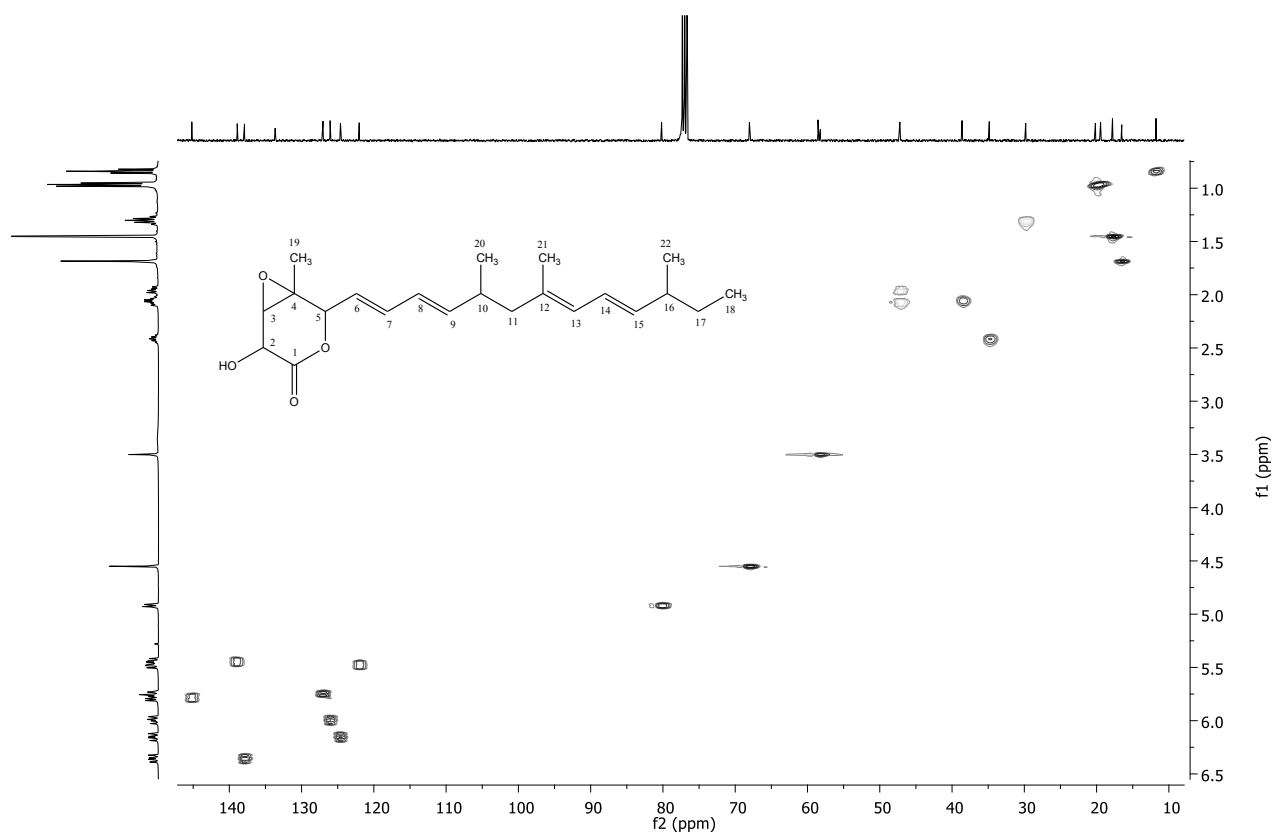
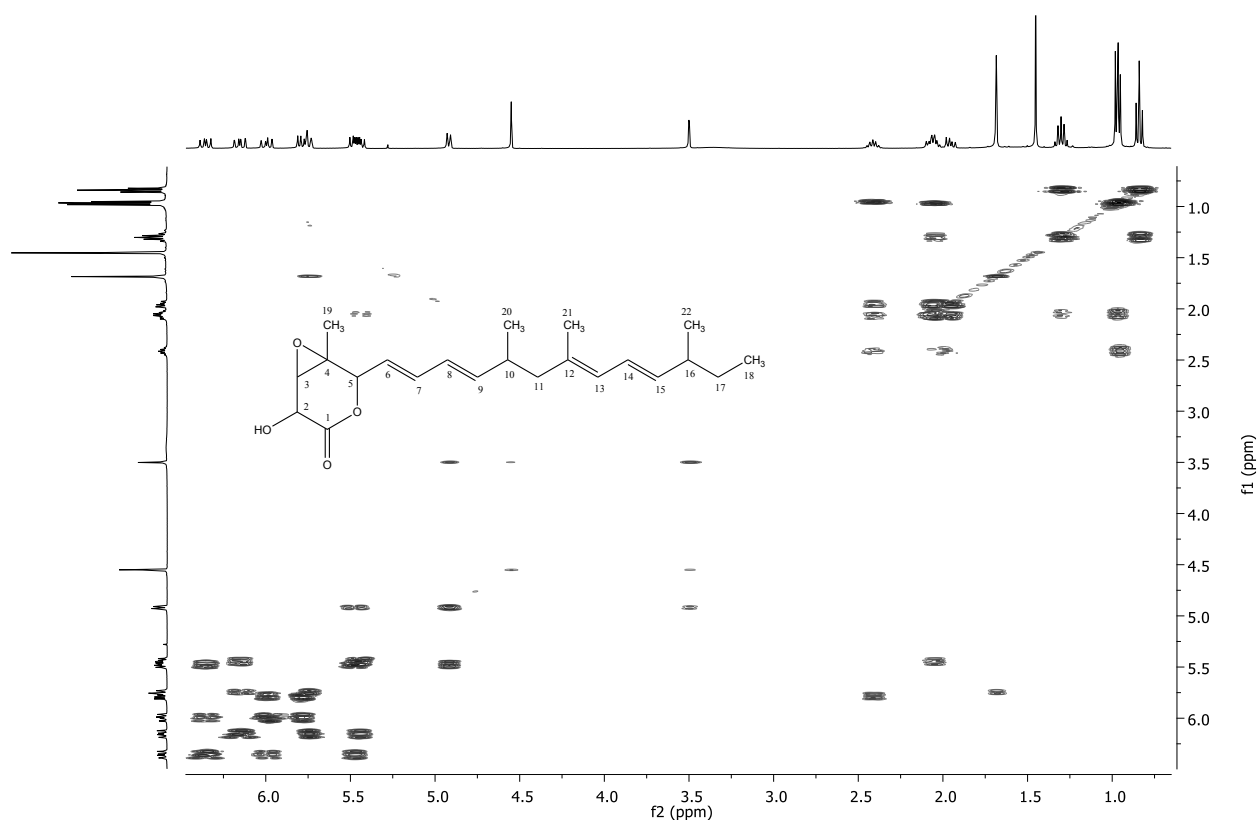


Figura 127: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) da substância **14**



Nafuredina já foi descrita como um inibidor específico de transporte de elétrons anaeróbico (NADH-fumarato-redutase) produzida pelo endófito *Aspergillus niger* FT-0554 isolado de uma esponja marinha¹²⁸⁻¹³⁰.

Figura 128: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ¹H-¹H COSY (—)

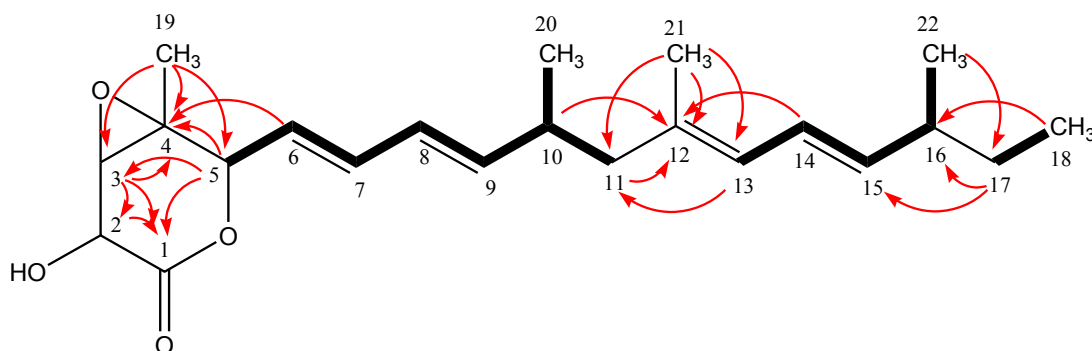
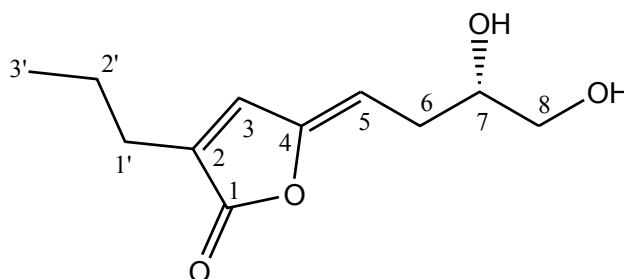


Tabela 21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **14** (400 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC
1	-	170,5, C	-
2	4,55 (s)	68,0, CH	C-1; C-4
3	3,50 (d; 0,8)	58,5, CH	C-1; C-2; C-4
4	-	58,2, C	-
5	4,92 (d, 7,6)	80,2, CH	C-1; C-3; C-4; C-6; C-7
6	5,48 (dd, 8,0; 11,2)	122,0, CH	C-4; C-5; C-8
7	6,35 (dd, 10,2; 15,2)	137,9, CH	C-5; C-8; C-9
8	6,00 (dd, 10,4; 15,2)	126,0, CH	C-6; C-7; C-9; C-10
9	5,80 (dd, 6,9; 15,2)	145,2, CH	C-7; C-8; C-10; C-11; C-20
10	2,41 (st, 7,0)	34,8, CH	C-8; C-9; C-11; C-12; C-20
11	2,06 (m) 1,97 (m)	47,2, CH_2	C-8; C-9; C-10; C-12; C-13; C-20; C-21 C-9; C-10; C-12; C-13; C-20; C-21
12	-	133,6, C	-
13	5,75 (d, 10,9)	127,1, CH	C-10; C-11; C-14; C-15; C-21
14	6,15 (dd, 10,8; 15,2)	124,6, CH	C-12; C-13; C-16
15	5,44 (dd, 8,0; 11,2)	138,9, CH	C-13; C-16; C-17; C-22
16	2,04 (m)	38,6, CH	C-13; C-14; C-15; C-17; C-18
17	1,30 (qt, 7,3)	29,8, CH_2	C-15; C-16; C-18; C-22
18	0,84 (t, 7,4)	11,8, CH_3	C-16; C-17
19	1,45 (s)	17,8, CH_3	C-3; C-4; C-5
20	0,96 (d, 5,2)	19,4, CH_3	C-9; C-10; C-11
21	1,68 (s)	16,5, CH_3	C-11; C-12; C-13
22	0,97 (d, 5,2)	20,2, CH_3	C-15; C-16

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

8.3.6 Determinação estrutural da substância **15**

Figura 129: Estrutura do 7,8-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olideo

A substância **15** foi isolada como um óleo amarelo ($[\alpha]^{25}_{\text{D}} = +10,95$, $c = 0,28$, CHCl_3) e, a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4$ foi proposta para **15** com base nas análises feitas dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de correlação dos experimentos HSQC (**Figura 130**).

Figura 130: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da substância **15**



O espectro de RMN de ^1H (**Figura 131**) de **15** exibiu, claramente, uma unidade propila com sinais em δ_{H} 0,94 (*t*, 7,0 Hz, δ_{C} 13,7, H-3', 3H), δ_{H} 1,58 (*tg*, 7,5 Hz, δ_{C} 20,8, H-2', 2H) e, δ_{H} 2,31 (*t*, 7,0 Hz, δ_{C} 27,1, H-1', 2H), o que foi confirmado pelas correlações observadas em COSY (**Figura 132**).

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figura 133**) foram observados sinais em δ_{C} 170,5, 134,2, e 149,8 e um singlete em δ_{H} 6,97 (δ_{C} 136,7) o que, inequivocamente, nos evidenciaram uma unidade δ -lactona 2,3,4-insaturada.

Ainda nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e COSY, foram observados sinais em δ_{H} 5,25 (*t*, 8,0 Hz, 1H, δ_{C} 109,2, C-5), δ_{H} 2,53 (*m*, 2H, δ_{C} 30,1, C-6), δ_{H} 3,85 (*m*, 1H, δ_{C} 71,3, C-7) e δ_{H} 3,68 (*dd*, 11,0 e 3,0 Hz, 1H, δ_{C} 66,3, C-8) e δ_{H} 3,49 (*dd*, 11,0 e 7,0 Hz, 1H, 66,3, C-8), evidenciando uma unidade de 1,2-dihidroxibutano na substância **15**.

Figura 131: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **15**.

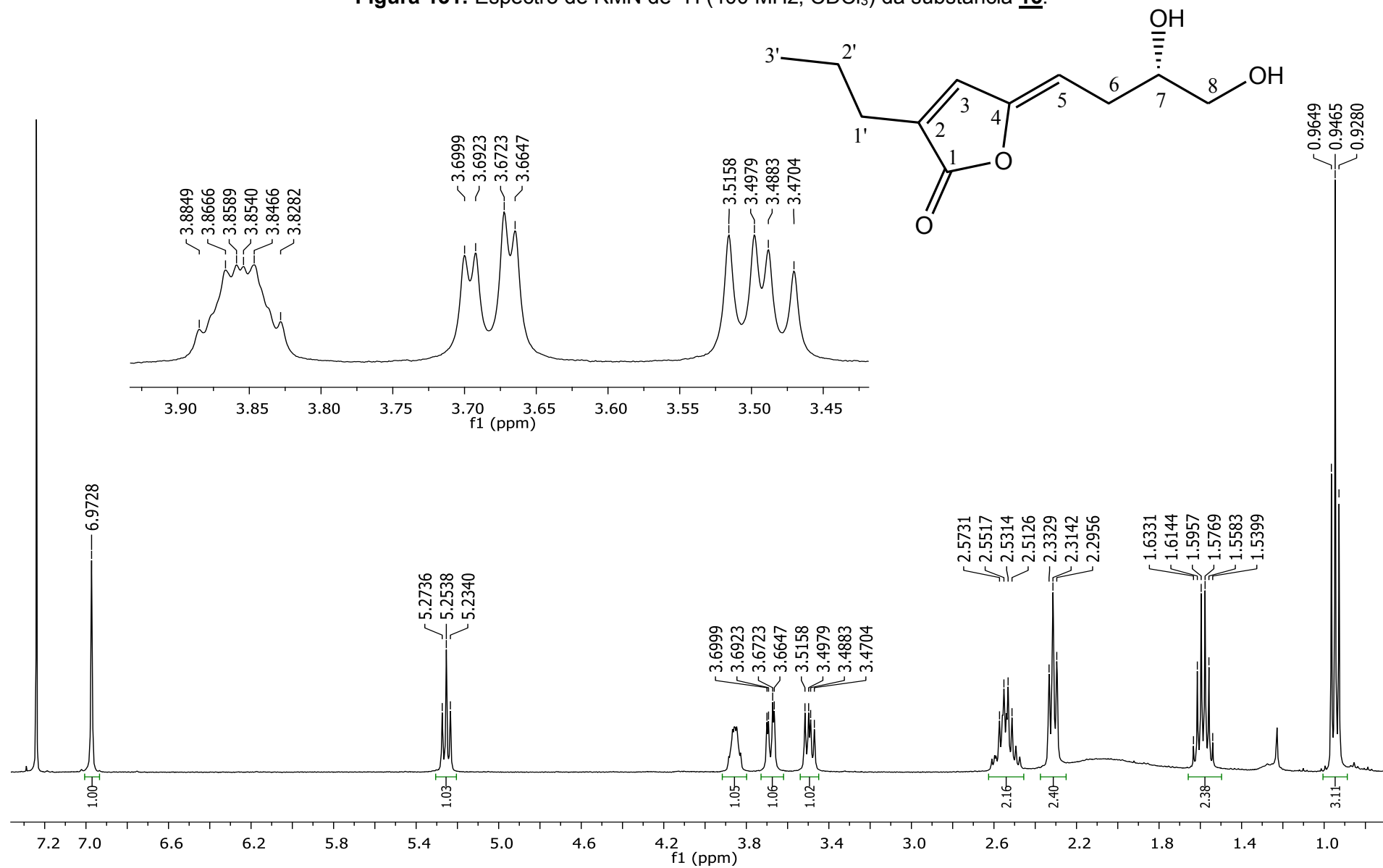


Figura 132: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) da substância **15**

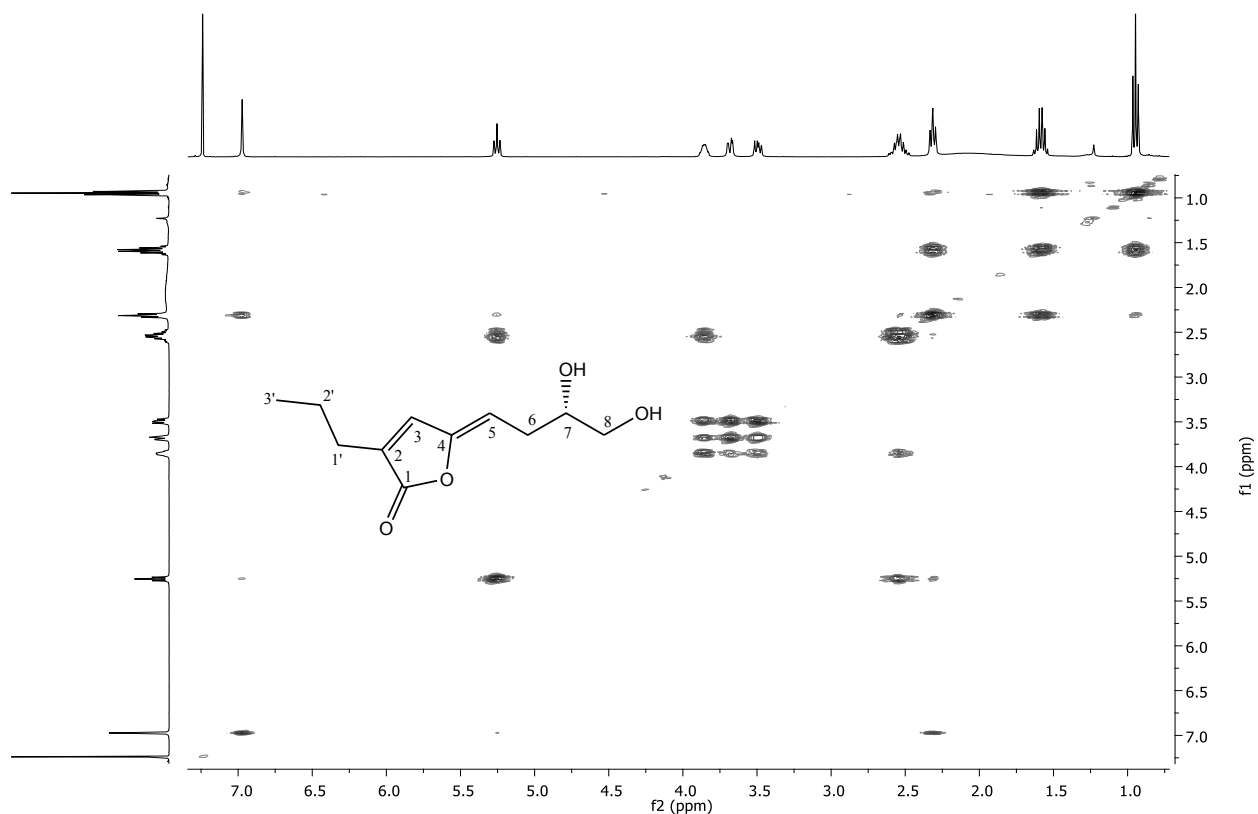
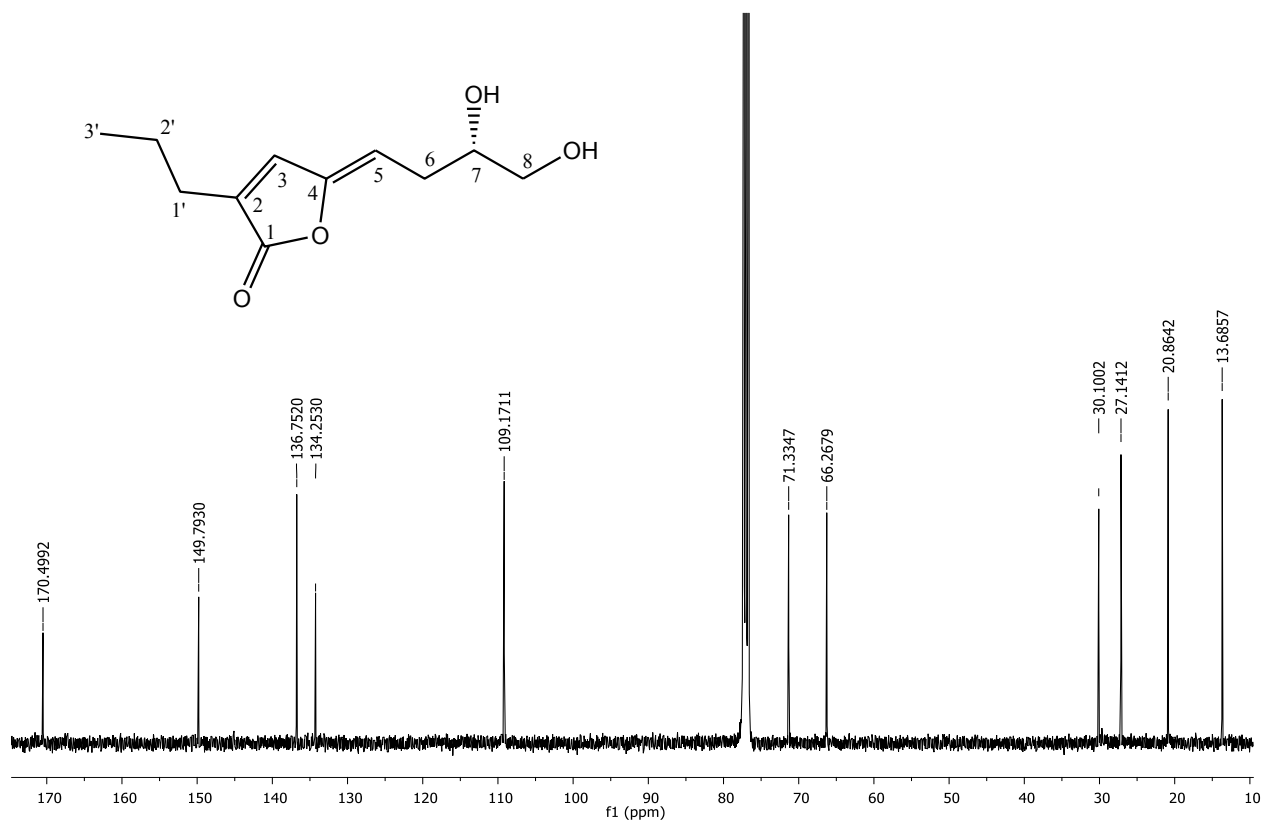


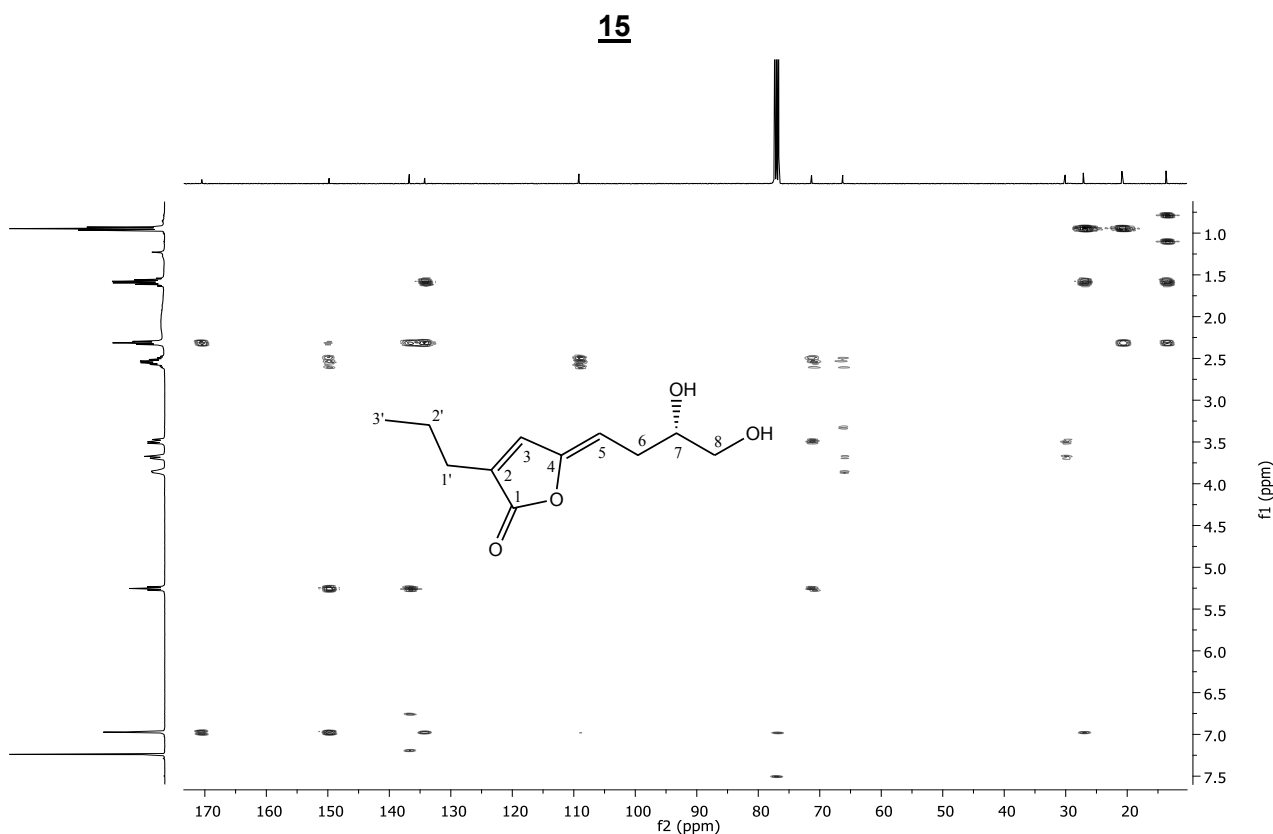
Figura 133: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) da substância **15**



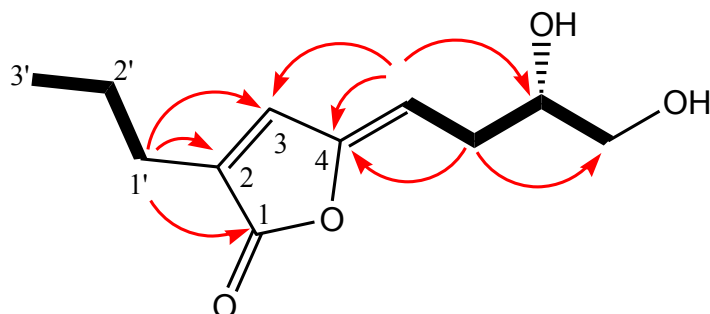
No espectro de COSY ^1H - ^1H de **15** foi confirmado a presença de um grupamento *n*-propil e a sequência $\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{CH}$ atribuídas às cadeias laterais H-3', H-2', H-1' e, H-8, H-7, H-6, H-5, respectivamente.

Análise do mapa de contorno do experimento HMBC (**Figura 134**) foi decisivo na determinação estrutural desta substância, fornecendo subsídio para posicionar os substituintes no anel lactônico. A subunidade $\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{CH}$ foi conectada em C-4, devido às correlações a longa distância observada entre $\text{H-5} \leftrightarrow \text{C-3/C-4}$, assim como de $\text{H-6} \leftrightarrow \text{C-4}$. E, a subunidade *n*-propil foi posicionada em C-2 devido às correlações a longa distância observada no experimento HMBC entre $\text{H-1}' \leftrightarrow \text{C-1/C-2/C-3}$ e $\text{H-2}' \leftrightarrow \text{C-2}$. As demais correlações observadas no experimento podem ser visualizadas na **Figura 135**.

Figura 134: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da substância



Assim, a substância **15** foi identificada como um novo composto, pertencente à classe dos olideos, 7,8-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olideo. Um composto similar foi isolado a partir de culturas de um fungo endofítico, não tendo relatados de atividade biológica para esta classe de substância¹³¹.

Figura 135: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H→C) e ^1H - ^1H COSY (—)**Tabela 22:** Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **15** (400 MHz, CDCl_3^a)

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1	-	170,5; C	-
2	-	134,2; C	-
3	6,97 (s)	136,7; CH	C-1; C-2; C-4; C-1'
4	-	149,8; C	-
5	5,25 (t; 8,0)	109,2; CH	C-3; C-4; C-7
6	2,53 (m)	30,1; CH_2	C-4; C-5; C-7; C-8
7	3,85 (m)	71,3; CH	C-5; C-8
8	3,68 (dd, 11,0; 3,0)	66,3; CH_2	C-6; C-7
	3,49 (dd, 11,0; 7,0)		C-6; C-7
1'	2,31 (t; 7,0)	27,1; CH_2	C-1; C-2; C-3; C-2'; C-3'
2'	1,58 (tq; 7,5)	20,8; CH_2	C-2; C-1'; C-3'
3'	0,94 (t; 7,0)	13,7; CH_3	C-1'; C-2'

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

8.3.6.1 Determinação da configuração absoluta de C-7 da substância **15**

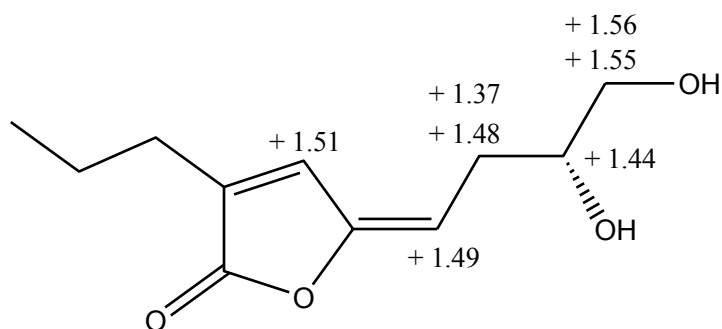
O reagente de Mosher MTPA (ácido α -metoxi- α -triclorometil fenil acético) foi introduzido por Mosher em 1969. Este é encontrado comercialmente como ácido ou cloreto de ácido em ambas as formas enantiomericamente puras. É um dos reagentes auxiliares mais populares para reconhecimento da estereoquímica absoluta de álcoois secundários e aminas primárias, ambos α -substituídos⁸⁷.

Seguindo o mesmo modelo proposto por Seco e colabs. (2004)⁸⁷ para determinação da configuração de dióis descrito nas páginas 105 e 106, a configuração absoluta da posição C-7 foi determinada através da reação da substância **15** com (*R*)- e (*S*)-MTPA-Cl fornecendo (*S*)- (*R*)-MTPA ésteres **15a** e **15b**,

respectivamente (**Figura 136**), a atribuição dos sinais do espectro foi feita com o auxílio dos experimentos de RMN de ^1H e ^1H - ^1H COSY.

Análise dos valores de $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$), confirmam a absoluta estereoquímica S para o C-7, confirmando a absoluta estereoquímica para a substância **15**.

Figura 136: Valores de $\Delta\delta$ [$(\Delta\delta \text{ em ppm}) = \delta_S - \delta_R$] para a substância **15**.



Esses dados associados aos dados da literatura permitiram propor a estrutura da substância **15** como sendo um novo olídeo.

CAPITULO 9

CAPÍTULO 9

9.0 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Por apresentarem maior quantidade de massa, apenas as substâncias **1** (56,1 mg), **4** (54,6 mg) e **5** (31,0 mg) foram submetidas à avaliação da potencialidade biológica frente aos ensaios antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico. As demais substâncias por apresentarem pouca massa não foram avaliadas nos ensaios biológicos. Os resultados obtidos estão descritos abaixo.

9.1 Ensaio Citotóxico

A atividade citotóxica das substâncias **1**, **4** e **5** foram testadas frente a três linhagens tumorais OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) e, os resultados estão apresentados na **Tabela 23** com seus respectivos percentuais de inibição.

Somente as substâncias que apresentaram valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Portanto, conclui-se que nenhuma das substâncias avaliadas apresentou ação citotóxica frente às linhagens tumorais testadas.

Tabela 23: Percentual de inibição do crescimento celular ($IC_{50}\%$) das frações em três linhagens tumorais testadas na dose única de 5 $\mu\text{g/mL}$

Amostra		HCT-116	SD	OVCAR-8	SD	SF-295	SD
Substância	Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
1	Fr2-Ca-2-2	12,39%	2,18%	9,11%	1,80%	39,13%	4,92%
4	Fr3-Ca-7	21,13%	4,70%	5,64%	25,56%	15,82%	2,53%
5	Fr4-Ca-6	61,12%	13,33%	18,00%	5,67%	20,67%	16,87%

*Valores são média $\pm$ DPM (Desvio Padrão da Média)

9.2 Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica das substâncias **1**, **4** e **5** foram testadas frente a dois fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, os resultados estão apresentados na **Figura 137** e na **Tabela 24** abaixo. A substância **1** foi testada apenas frente ao patógeno *C. sphaerospermum* pelo fato da cepa do patógeno *C. cladosporioides* estar contaminada.

Pode-se observar que nenhuma das substâncias testadas apresentou atividade antifúngica quando comparados com o padrão nistatina.

Figura 137: Atividade antifúngica (A) *C. cladosporioides* e, (B) *C. sphaerospermum* das substâncias puras isoladas.

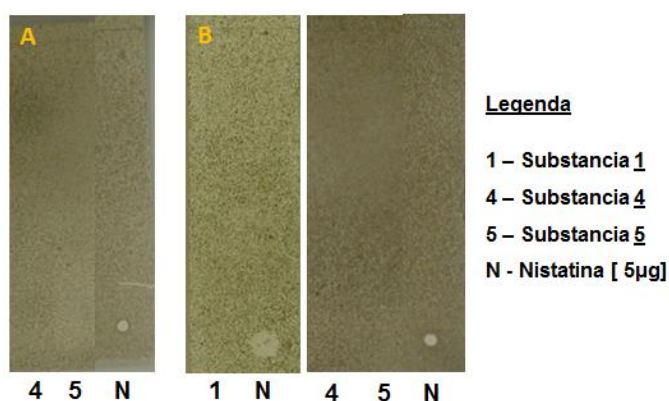


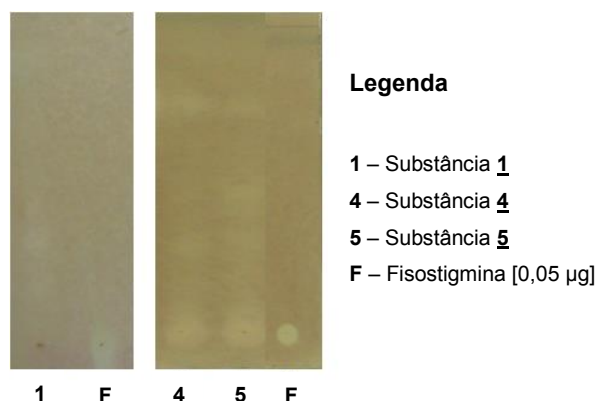
Tabela 24: Atividade antifúngica das substâncias isoladas.

Substância	Identificação	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	Rf
1	Fr2-Ca-2-2	-	-	-
4	Fr3-Ca-7	-	-	-
5	Fr4-Ca-6	-	-	-

9.3 Atividade Anticolinesterásica

As substâncias **1**, **4** e **5** foram avaliadas diante da inibição da enzima acetilcolinesterase e, observou-se (**Figura 138**) que apenas as substâncias **4** e **5** apresentaram atividade positiva neste ensaio, sendo consideradas com uma atividade inibitória fraca da enzima acetilcolinesterase (**Tabela 25**).

Manchas brancas na cromatoplaça são evidências de atividade anticolinesterásica em potencial.

Figura 138: Atividade anticolinesterásica das substâncias puras isoladas.**Tabela 25:** Atividade anticolinesterásica das substâncias isoladas.

Substância	Identificação	Atividade	Rf
<u>1</u>	Fr2-Ca-2-2	-	-
<u>4</u>	Fr3-Ca-7	Fraca	Rastro
<u>5</u>	Fr4-Ca-6	Fraca	Rastro

Esse resultado de atividade anticolinesterásica para as substâncias 4 e 5 foram surpreendentes, como descrito anteriormente, elas estão relacionadas na formação dos sesquiterpenos eremofilanos isolados em trabalhos anteriores realizados com o endófito *Camarops* sp.^{67, 79} Esses sesquiterpenos eremofilanos isolados (xylarenona C e D) apresentaram atividade anticolinesterásica forte, podendo-se concluir que a cadeia lateral destes metabólitos está relacionada com a atividade anticolinesterásica deles.

CAPITULO 10

CAPITULO 10

10.0 CONCLUSÃO

O trabalho realizado com os endófitos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* isolados das espécies vegetais *Alibertia macrophylla*, *Xylopia aromatica* e *Eugenia jambolana*, permitiu uma avaliação da potencialidade dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada, na produção de metabólitos secundários. Os cinco meios de cultivo líquidos comerciais (Extrato de Malte, PDB, YM, Czapek® e Nutrient®) e os dois meios sólidos (Milho e Arroz) apresentaram uma produção metabólica muito promissora, avaliado em HPLC-DAD e RMN de ^1H , evidenciando que o perfil metabólico é dependente do meio de cultivo, no entanto com massa muito pequena para os meios de cultivo líquido.

A potencialidade biológica dos extratos obtidos em escala reduzida frente aos ensaios anticolinesterásico, antifúngico contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e citotóxico foram surpreendentes, considerando que todos os extratos apresentaram uma ou mais substâncias com potencial atividade.

A triagem química e biológica realizada dos três endófitos isolados de espécies vegetais do Cerrado, nos permitiu selecionar os meios de cultivo Czapek®, Extrato de Malte e Milho para o estudo em escala ampliada dos fungos *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Periconia atropurpurea* e *Camarops* sp., respectivamente.

Do cultivo em escala ampliada de *Camarops* sp. no meio sólido de Milho e do fracionamento do extrato CH_3CN nos conduziu ao isolamento de cinco substâncias pertencentes a diferentes classes: 3-((1S,2S)-1,2-dihidroxibut-3-enil)-4-((E)-pent-1-enil)furan-2(5H)-ona (**1**), 3,5,9-trihidroxipresilfiperfolano (**2**), deacetilbotridial (**3**), ácido (E)-2,4-dimetilocta-2-enóico (**4**) e ácido (E)-2,4-dimetilnon-2-enóico (**5**). O isolamento das substâncias inéditas **1**, **2**, **3** e **5** fortalece a necessidade de estudos com fungos endofíticos, pois essa classe de micro-organismos é uma fonte promissora de novas substâncias.

A capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, das substâncias **4** e **5**, indica que os estudos de *Camarops* sp. devem ser continuados, considerando que este fungo é produtor de terpenos eremofilanos. Este trabalho permitiu sugerir

que a cadeia lateral dos eremofilanos é responsável pela atividade anticolinesterásica.

O cultivo em escala ampliada do endófito *Periconia atropurpurea* no meio de cultivo líquido de Extrato de Malte produziu o extrato AcOEt que após fracionamento cromatográfico pode-se isolar um novo ftalato, o 4,5-dietil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona (**6**) e, a periconicina B (**7**). Inúmeros ftalatos já foram isolados e identificados de micro-organismos endofíticos, sendo o mais comum deles o dibutilftalato. A periconicina B (**7**) já foi isolada deste mesmo endófito e descrita por apresentar forte potencial citotóxico.

Do extrato bruto, obtido do cultivo Czapek®, *Pseudofusicoccum stromaticum* forneceu o ácido succínico (**8**) e o álcool gentílico (**9**). O ácido succínico foi identificado tanto nos extratos obtidos em escala reduzida quanto nas frações oriundas do fracionamento do extrato AcOEt obtido em escala ampliada do endófito *P. stromaticum*, resultado este muito importante para a indústria, pois comprova que fungos endofíticos também são prolíficos produtores deste metabólito que esta sendo largamente utilizado na produção de biodiesel.

O uso de modificador epigenético no cultivo do endófito *Phoma* sp. isolado de *Parkinsonia microphylla* espécie vegetal esta encontrada no Deserto de Sonora, para promover a expressão gênica das vias biossintéticas alterou a produção metabólica do fungo, com a produção de novos compostos.

Do crescimento no meio de cultivo líquido de PDB de *Phoma* sp. utilizando modificador epigenético SAHA, conduziu ao isolamento da: fenilacetamida (**10**), vermístatina (**11**), dihidrovermístatina (**12**) e, uma nova isocumarina prenilada, (*R*)-6,8-dihidroxi-5-((*2E,6E*)-10,11-dihidroxi-3,7,11-trimetildodeca-2,6-dienil)-3-metilisocroman-1-ona (**13**), comparando-se com o cultivo sem o modificador do qual foram isoladas duas substâncias a nafuregina (**14**) e um novo olideo, 7,8-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olideo (**15**). Demonstrando, dessa maneira, que o uso da epigenética pode ser um meio útil para a produção de novas substâncias.

Os resultados obtidos deste trabalho são encorajadores, pois conduzem ao conhecimento da diversidade química e potencialidade biológica dos metabólitos produzidos por micro-organismos associados a espécies vegetais tanto do Cerrado quanto do Deserto.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 IOCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 646-675, 2014.
- 2 CHOWDHARY, K. et al. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 467-485, 2012.
- 3 KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.
- 4 STROBEL, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 259-272, 2014.
- 5 ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- 6 KAUL, S. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 487-505, 2012.
- 7 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.
- 8 CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 95, p. 47-59, 2012.
- 9 GOODLAND, R.; FERRI, M. G. **Ecologia do Cerrado**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1979. p. 61-79.
- 10 TREVISAN, L. V. M. **A química micromolecular e a classificação de Rubiaceae**. 1993. 52 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.
- 11 JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- 12 AGRIOS, G. N. **Patology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1988. 40 p.
- 13 CAMACHO, F. J.; GERNANDT, D. S.; LISTON, A. Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 983-987, 1997.
- 14 ZHANG, W.; WENDEL, J. F.; CLARK, L. G. Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bomboos (Poaceae: Bambusoideae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 8, p. 205-217, 1997.

- 15 MAYER, A. M. Plant-fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 311-317, 1989.
- 16 MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.
- 17 RÖNSBERG, D. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 3256-3259, 2013.
- 18 GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Review**, v. 9, n. 4, p. 537-545, 2010.
- 19 KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 507-522, 2012.
- 20 ZHENG, C. J. et al. Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7617-7625, 2013.
- 21 TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- 22 KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.
- 23 ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.
- 24 GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; RAMIREZ, A. M. Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2992-3030, 2012.
- 25 DEMAINE, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 185-201, 2014.
- 26 BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- 27 LI, H. Q. et al. Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 876-879, 2011.
- 28 FU, J. et al. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 1231-1236, 2011.

- 29 WANG, L. W. et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231-1239, 2012.
- 30 LIU, D. et al. Nigerasterols A and B, antiproliferative sterols from the mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, p. 1055-1061, 2013.
- 31 HUANG, X. S. et al. Asperterpenoid A, a new sesterterpenoid as an inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B from the culture of *Aspergillus* sp. **Organic Letters**, v. 15, p. 721-723, 2013.
- 32 SHANG, Z. et al. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1338-1348, 2012.
- 33 GUBIANI, J. R. et al. Biologically active eremophilane-type sesquiterpenes from *Camarops* sp., an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 668-672, 2014.
- 34 NASCIMENTO, A. M. et al. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1276-1281, 2012.
- 35 SILVA, G. H. et al. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 164-167, 2010.
- 36 MONTENEGRO, T. G. C. et al. Cytotoxic activity of fungal strains isolated from the ascidian *Eudistoma vannamei*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, p. 2203-2209, 2012.
- 37 MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES FILHO, E. Dicitrinol, a citrinin dimer, produced by *Penicillium janthinellum*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 835-841, 2011.
- 38 DEVARI, S. et al. Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC-ESI-MS/MS analysis. **Phytochemistry**, v. 98, p. 183-189, 2014.
- 39 YE, Y. et al. Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7131-7139, 2013.
- 40 SEBASTIANES, F. L. et al. Pizzirani-Kleiner and D. Cortes, 3-hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 622-632, 2012.
- 41 ZHAO, J. T. et al. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.] produce antioxidant cajaninstilbene acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4314-4319, 2012.

- 42 ZHAO, J. et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 11, p. 2100-2104, 2012.
- 43 INÁCIO, M. L. et al. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 822-824, 2006.
- 44 GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- 45 STROBEL, G. A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- 46 MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: um novo campo da genética. **Revista RUBS**, v. 1, n. 3, p. 61-69, 2008.
- 47 CHERBLANC, F. L. et al. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Report**, v. 30, p. 605-624, 2013.
- 48 ASAI, T. et al. Tenuipyrone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers. **Organic Letters**, v. 15, n. 8, p. 2058-2061, 2013.
- 49 SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.
- 50 WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895-1897, 2008.
- 51 CHEN, G. et al. Xanthoquinodins from the endolichenic fungal strain *Chaetomium elatum*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 702-709, 2013.
- 52 PARANAGAMA, P. A.; WIJERANTE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1939-1945, 2007.
- 53 CHUNG, Y.-M. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1260-1266, 2013.
- 54 CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Report**, v. 27, n. 1, p. 11-22, 2010.
- 55 STRAUSS, J.; REYES-DOMINGUEZ, Y. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 62-69, 2011.

- 56 GUERRERO-BOSAGNA, C.; SKINNER, M. K. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 354, p. 3-8, 2011.
- 57 FISH, K. M. et al. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1199-1213, 2009.
- 58 SUZUKI, T.; MIYATA, N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 935-958, 2006.
- 59 RAPP, R. A.; WENDEL, J. F. Epigenetics and plant evolution. **New Phytologist**, v. 168, p. 81-91, 2005.
- 60 KURDISTANI, S. K.; GRUNSTEIN, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. **Nature Reviews**, v. 4, p. 276-284, 2003.
- 61 RICHON, V. M. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. S2-S6, 2006.
- 62 RICHON, V. M.; GARCIA-VARGAS, J.; HARDWICK, J. S. Development of vorinostat: current applications and future perspectives for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 280, p. 201-210, 2009.
- 63 LIU, D.-Z. et al. Induced production of new diterpenoids in the fungus *Penicillium funiculosum*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 607-608, 2014.
- 64 WANG, X. et al. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an Atlantic-Forest-Soil-Derived *Penicillium citreonigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 942-948, 2010.
- 65 CHEN, H.-J. et al. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, p. 20-23, 2013.
- 66 YANG, X.-L. et al. Induced biosynthesis of a novel butyrophenone and two aromatic polyketides in the plant pathogen *Stagonospora nodorum*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, p. 141-144, 2013.
- 67 OLIVEIRA, C. M. et al. Xylarenones C-E from an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1353-1357, 2011.
- 68 INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Quimioterapia**. Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101>. Acesso em: 24 ago. 2012.
- 69 TELES, H. L. et al. Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 2363-2367, 2005.

- 70 MAIER, W. et al. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the *Poaceae*. **Planta**, v. 202, p. 36-42, 1997.
- 71 MOORE-LANDECKER, E. **Fundamental of the fungi**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996. 574 p.
- 72 OLMO-RUIZ, M. del. **Diversity, distributions, and host affiliations of fungal endophytes associated with seedless vascular plants**. 2012. 429 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Graduate College, University of Arizona, Tucson, 2012.
- 73 PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1-68, 1997.
- 74 MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 75 BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- 76 RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-201, 1991.
- 77 MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Pytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- 78 PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524 p.
- 79 GUBIANI, J. R. **Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2011. 175 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- 80 FREIRE, F. et al. Challenging the absence of observable hydrogens in the assignment of absolute configurations by NMR: application to chiral primary alcohols. **Chemical Communications**, n. 14, p. 1456-1458, 2007.
- 81 ZHANG, H. et al. Pestalafuranones F-J, five new furanone analogues from the endophytic fungus *Nigrospora* sp. BM-2. **Molecules**, v. 19, p. 819-825, 2014.
- 82 LIU, H. et al. New furanones from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis besseyi*. **Molecules**, v. 17, p. 14015-14021, 2012.
- 83 WANG, Y. et al. Appenolides A-C: three new antifungal furanones from the coprophilous fungus *Podospira appendiculata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 3, p. 341-344, 1993.

- 84 ALMASSI, F. et al. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 396-402, 1991.
- 85 SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. Assignment of the absolute configuration of polyfunctional compounds by NMR using chiral derivatizing agents. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 4603-4641, 2012.
- 86 BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M. Utilização de RMN de ^1H na determinação da configuração absoluta de álcoois. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1061-1065, 2005.
- 87 SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 17-117, 2004.
- 88 STAUNTON, J.; SUTKOWSKI, A. C. Biosynthesis of aspyrone, a metabolite of *Aspergillus melleus*: advanced precursor studies to identify the product of the polyketide synthase. **Journal of the Chemical Society: Chemical Communications**, v. 16, p. 1108-1110, 1991.
- 89 AVENT, A. G.; HANSON, J. R.; TRUNEH, A. The biosynthesis of harzianolide by *Trichoderma harzianum*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 791-793, 1992.
- 90 PATRÓN-DURÁN, R. et al. Some key metabolic intermediates in the biosynthesis of botrydial and related compounds. **Tetrahedron**, v. 57, p. 1929-1933, 2001.
- 91 REINO, J. L. et al. Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 563-566, 2004.
- 92 LIN, Y. et al. Chemical constituents from endophytic *Phomopsis* sp. Lz42 of *Maytenus hookeri*. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 30, n. 1, p. 78-81, 2009.
- 93 HANSON, J. R. The biosynthesis of some sesquiterpenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 53, p. 1155-1162, 1981.
- 94 COLLADO, I. G. et al. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 647-650, 1995.
- 95 RUKACHAISIRIKUL, V. et al. An [11]cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 12, p. 1409-1411, 2009.
- 96 ALCARAZ, L. et al. Synthetic approaches to the manumycin A, B and C antibiotics: the first total synthesis of (+)-Manumycin A. **Tetrahedron**, v. 55, n. 12, p. 3707-3716, 1999.
- 97 MUGAMBI, G. K.; HUHNDORF, S. M. Molecular phylogenetics of Pleosporales: *Melanommataceae* and *Lophiostomataceae* re-circumscribed (*Pleosporomycetidae*, *Dothideomycetes*, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 64, p. 103-121, 2009.

- 98 TELES, H. L. **Estudo químico de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e micoparasitas**. 2005. 251 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 99 HENG-CHAO, E. et al. Secondary metabolites from the fungus *Engyodontium album* associated with starfish *Anthena pentagonula* in the South China Sea. **Chinese Journal of Marine Drugs**, v. 32, n. 6, p. 8-12, 2013.
- 100 LI, Z.; YANG, X. Cytotoxic secondary metabolites from liquid culture of plant endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula*. **Mycosystema**, v. 33, n. 1, p. 97-102, 2014.
- 101 SHEN, K. et al. Separation, identification and bioactivity of anti-tumor components from fermented broth and mycelia of fungus *Penicillium stoloniferum* derived from *Salicornia herbacea*. **Food Science**, v. 33, n. 23, p. 278-282, 2012.
- 102 ZHENG, Z.; LIU, Y.; FAN, L. Antioxidant activity and structure identification of metabolites of an endophytic fungus *Alternaria* sp. N.SBA10 isolated from *Scutellaria baicalensis*. **Mycosystema**, v. 31, n. 6, p. 917-923, 2012.
- 103 LUCAS, E. M. F. et. al. Phthalates production from *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram, a fungal species associated to crops of commercial value. **Microbiological Research**, v. 163, p. 495-502, 2008.
- 104 KIM, S. et al. Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 448-450, 2004.
- 105 TELES, H. L. et al. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopiia aromatica*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2686-2690, 2006.
- 106 CASTRO-MEDINA, F.; CASTILLO, S. M. Botryosphaeriaceae en Venezuela (una revisión). **Fitopatología Venezolana**, v. 22, n. 2, p. 44-58, 2009.
- 107 WANG, J. et al. Isolation and identification of an endophytic fungus *Pezicula* sp. in *Forsythia viridissima* and its secondary metabolites. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2639-2644, 2014.
- 108 CHEN, G. et al. The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomi*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, n. 2, p. 159-164, 2007.
- 109 WAQAS, M. et al. Endophytic infection alleviates biotic stress in suflower through regulation of defence hormones, antioxidants and functional amino acids. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 803-824, 2015.
- 110 CHEN, L. et al. Gentisyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 66-70, 2008.

- 111 JINHEE, K. et al. Gentisyl alcohol inhibits apoptosis by suppressing caspase activity induced by etoposide. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 532-536, 2005.
- 112 ISHIKAWA, Y.; MORIMOTO, K.; HAMASAKI, T. Gentisyl alcohol produced by *Penicillium commune* a potent antioxidant and synergist for tocopherol. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v. 35, n. 11, p. 903-906, 1986.
- 113 SMETANINA, O. F. et al. Metabolites of the marine fungus *Asperigillus varians* KMM 4630. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 2, p. 243-244, 2005.
- 114 DAI, J. et al. Metabolites from the fungus *Phoma* sp. 7210, associated with *Aizoon canariense*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 8, p. 1175-1180, 2010.
- 115 PAN, J. et al. New lactone and xanthone derivatives produced by a mangrove endophytic fungus *Phoma* sp. SK3RW1M from the South China Sea. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 1369-1375, 2010.
- 116 BORGES, W. S.; PUPO, M. T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 929-934, 2006.
- 117 KROHN, K. et al. Secondary metabolites isolated from an endophytic *Phoma* sp. – absolute configuration of tetrahydropyrenophorol using the solid-state TDDFT CD methodology. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 3206-3211, 2007.
- 118 QIN, S. et al. Two new metabolites, epoxydine A and B, from *Phoma* sp. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 169-174, 2010.
- 119 GREGORIOU, M.; BROWN, P. R. Adaptation to phenylacetamide as a growth substrate by an acetanilide-utilizing mutante of *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Microbiology**, v. 125, p. 277-283, 1980.
- 120 PROKSA, B. et al. Production of (-)-Mitorubrinic acid by *Penicillium vermiculatum*. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 2, p. 133-135, 1997.
- 121 DETHOUP, T. et al. Merodrimanes and other constituents from *Talaromyces thailandiasis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1200-1202, 2007.
- 122 FUSKA, J. et al. The structure of vermistatin, a new metabolite from *Penicillium vermiculatum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 39, n. 11, p. 1605-1608, 1986.
- 123 KOMAI, S. et al. New vermistatina derivatives isolated from *Penicillium simplicissimum*. **Heterocycles**, v. 65, n. 11, p. 2771-2776, 2005.
- 124 STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B.; GIRTSMAN, T. Caspase-1 inhibitors from an extremophilic fungus that target specific leukemia cell lines. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 344-350, 2012.

125 ANTUS, S.; SNATZKE, G.; STEINKE, I. Synthese und circular dichroismus von steroiden mit isochromanon-chromophor. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 81, p. 2247-2261, 1983.

126 KROHN, K. et al. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 313-320, 1997.

127 SHIBANO, M. et al. Two isocoumarins from *Pleurosporum angelicoides*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 5, p. 717-718, 2006.

128 UI, H. et al. Nafuredin, a novel inhibitor of NADH-fumarate reductase, produced by *Aspergillus niger* FT-0554. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 3, p. 234-238, Mar. 2001.

129 TAKANO, D. et al. Absolute configuration of nafuredin, a new specific NADH-fumarate reductase inhibitor. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 3017-3020, 2001.

130 OMURA, S. et al. An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v. 98, n. 1, p. 60-62, Jan. 2001.

131 FINDLAY, J. A. et al. Insect toxins from spruce endophytes. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 81, p. 284-292, 2003.