

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS PLANTAS *Strychnos* cf.
toxifera (LOGANIACEAE) E *Mauritia flexuosa*
(ARECACEAE).**

HÉCTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN

MANAUS-AM
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HÉCTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN*

**METABOLISMO SECUNDÁRIO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS ÀS PLANTAS *Strychnos* cf. *toxifera*
(LOGANIACEAE) E *Mauritia flexuosa* (ARECACEAE).**

Dissertação de mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Química. Área de
atuação: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Co-Orientadora: Prof. Dr^a Antonia Queiroz Lima de Souza

* bolsista CNPq

MANAUS-AM
2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Koolen, Héctor Henrique Ferreira

K82m Metabolismo secundário de fungos endofíticos associados às plantas *Strychnos cf. toxifera* (Loganiaceae) e *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) / Hector Henrique Ferreira Koolen.- Manaus: UFAM, 2011.

246 f.: il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza

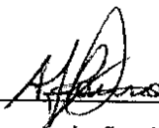
1. Fungos endofíticos 2. *Strychnos* 3. *Mauritia flexuosa* I. Souza, Afonso Duarte Leão de (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997): 582.28(043.3)

Universidade Federal do Amazonas
Programa de Pós-graduação em Química

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e em cuja Biblioteca Central encontra-se depositada. A banca examinadora em 08 de Abril de 2011 avaliou e aprovou o candidato Hector Koolen.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza (Orientador – UFAM-DQ)



Prof. Dr. Marcos Batista Machado (Membro – UFAM-DQ)



Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho (Membro – UFPA)

Dedico este trabalho a minha mãe Isabel e ao meu pai Henk por todo apoio e incentivo, sem vocês nenhuma das minhas conquistas seriam possíveis.

“Quando mais envelhecemos, mais precisamos ter o que fazer. Mais vale morrer, do que nos arrastar na ociosidade de uma velhice insípida: trabalhar é viver.”

Voltaire

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Afonso Duarte Leão de Souza e Antonia Queiroz Lima de Souza pela orientação, paciência e acima de tudo amizade durante os últimos anos.

Ao Professor Edson Rodrigues Filho que gentilmente me recebeu em seu laboratório na UFSCar, sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

Aos Professores Maria Lúcia Belém, Marcos Batista Machado, Ana Lúcia Galotta e Rita Saraiva Nunomura pelos ensinamentos e pelos conselhos.

A Aimê Almeida de Oliveira pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos Felipe Moura e Richardson Alves que me acompanharam durante os anos de mestrado.

Aos colegas de laboratório da UFAM: Dominique, Júnior, Eliana, Renyer, Edson, Klenicy, Lidian, Priscila Oliver, André, Adriana Silva, Danielle e Laís.

Aos colegas de laboratório da UFSCar: Diego, Enzo, Florim, Lú, Marília, Taícia, Helô1, Helô2, Monize, Lilian, Carol, Gabriel e Nat.

Aos grandes amigos que fiz em São Carlos: Zé, Thaísa e em especial a Lívia Soman que não só foi uma grande amiga como me ajudou muito.

A minha aluna de I.C. Elzalina Ribeiro Soares que participou em muitos dos trabalhos desta dissertação.

Ao aluno de apoio técnico Ismael Ribeiro no auxílio do isolamento dos fungos endofíticos.

A professora Cláudia do Ó da UFC Pessoa pelos ensaios anticâncer, a professora Carmem Lúcia da USP pelos ensaios antiacetilcolinesterase e antioxidante qualitativo.

A técnica Lú do Lab. de RMN da UFSCar pela paciência comigo nos experimentos realizados.

Ao Professor Valdir Veiga da UFAM pelas análises de GC-MS na UFRJ.

As alunas de mestrado Klenicy e Priscila Oliver da UFAM pelo auxílio nos testes com *Artemia salina* e o teste antioxidante quantitativo.

Ao professor Raimundo do Depto. de Estatística da UFAM no auxílio do tratamento estatístico dos dados de perfil químico.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Fungos endofíticos são uma fonte promissora de moléculas bioativas que possam vir a ser utilizadas no tratamento de doenças, estima-se que apenas 16% das espécies de fungos conhecidas, e que são conhecidas apenas 5% de todas as espécies do mundo. Neste trabalho foram isolados 58 linhagens de fungos endofíticos das hospedeiras *Strychnos* cf. *toxifera* e *Mauritia flexuosa*, destas sendo 35 linhagens do gênero *Penicillium*, todas foram cultivadas em pequena escala e seus respectivos extratos testados quanto suas atividades anticâncer frente as linhagens HCT-8 (côlon-humano), HL-60 (leucemia humano), MB-435 (mama humano) e SF-295 (glioblastoma humano), além de serem testados quanto suas atividades antiacetilcolinesterase e antioxidante. Foram selecionadas três linhagens (duas de *Penicillium* e uma de *Gliocladium*) de seus extratos ativos foram isoladas 15 substâncias, destas os alcalóides glandicolina B, *ciclo-(Glicil-L-tirosil)* 4,4-dimetilalil éter e o composto fenólico β -naftol apresentaram atividade antimicrobiana frente diversas linhagens de bactérias patógenas, este último sendo relatado pela primeira vez como um produto natural. Foi realizado o estudo fitoquímico das raízes de *Mauritia flexuosa* aonde foram isoladas 10 substâncias, sendo o triterpeno 3-*epi*-20,21-diidroxiturberogenina de estrutura provisória inédito na literatura. Flavonóides isolados foram atribuídos como sendo os responsáveis pela atividade antioxidante do extrato metanólico de *M. flexuosa*. Das linhagens de *Penicillium* cultivadas foram selecionadas 23 diferentes extratos do meio em AcOEt que tiveram seus perfis químicos comparados por inserção direta em espectrômetro de massas, alguns íons selecionados foram submetidos a experimentos de MS/MS de modo que se propôs a presença da antraquinona questinol e do macrociclo brefeldina A, os dados foram comparados com os obtidos da hospedeira *Strychnos* cf. *toxifera*, sendo a linhagem Stsp C2.3/1-2c a que apresentou um perfil muito semelhante ao de sua hospedeira, os dados foram tratados estatisticamente por cinco métodos de análise multivariada (Média das Ligações, Ligação Completa, Ligação Simples, Centróide e Ward), todos eles discutidos.

ABSTRACT

Endophytic fungi are a promising source of bioactive molecules that may be used in the treatment of diseases, it is estimated that only 16% of species known, and which are known only 5% of all species in the world. In this work we isolated 58 strains of endophytic fungi from the hosts *Strychnos* cf. *toxifera* and *Mauritia flexuosa*, of which 35 strains are from the genus *Penicillium*, all were grown on a small scale and their extracts tested for their anticancer activity front the lines HCT-8, HL-60, MB-435 and SF-295, besides being tested for their antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. We selected three strains (two from *Penicillium* and one of *Gliocladium*) of its active extracts were isolated 15 substances, the alkaloids glandicolin B, cyclo-(glycyl-L-tyrosyl) 4,4-dimethylallyl ether and the phenolic compound α -naphthol showed antimicrobial activity against several strains of pathogenic bacteria, the latter being first reported as a natural product. The phytochemical study of the roots from *Mauritia flexuosa* gave 10, including the provisory new compound 3-*epi*-20,21-diidroxithurberogenin. Flavonoids were isolated and attributed as being responsible for the antioxidant activity of the methanol extract of *M. flexuosa*. Cultivated strains of *Penicillium* were selected from 23 different EtOAc extracts had their chemical profiles compared by direct insertion into the mass spectrometer, a few selected ions were subjected to MS / MS experiments , was proposed the presence of the anthraquinone questinol and the macrocycle brefeldin A, the data were compared with those obtained from the host *Strychnos* cf. *toxifera*, and the strain STSP C2.3/1-2c that showed a profile very similar to that of their host, the data were statistically treated by five different methods of multivariate analysis (Average of the Links, Link Complete, Simple Connection, and Centroid Ward), they all discussed.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Introdução | 23 |
| 1.1. Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas..... | 23 |
| 1.2. Fungos..... | 26 |
| 1.3. As interações entre fungos e plantas..... | 29 |
| 1.4. Fungos endofíticos..... | 30 |
| 1.5. O gênero <i>Penicillium</i> | 36 |
| 1.6. O gênero <i>Gliocladium</i> | 40 |
| 1.7. A hospedeira <i>Mauritia flexuosa</i> | 44 |
| 1.8. A hospedeira <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> | 46 |
| 1.9. Perfil químico por inserção direta em espectrômetro de massas..... | 49 |
| Objetivos | 53 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 53 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 53 |
| Procedimentos experimentais | 55 |
| 3.1. Materiais e equipamentos..... | 55 |
| 3.1.1. Material vegetal utilizado para o isolamento de fungos endofíticos..... | 55 |
| 3.1.2. Materiais utilizados para o isolamento e cultivo de fungos endofíticos..... | 55 |
| 3.1.3. Equipamentos utilizados para o isolamento e cultivo de fungos endofíticos..... | 55 |
| 3.1.4. Materiais e equipamentos utilizados nos estudos químicos..... | 56 |
| 3.1.5. Suportes cromatográficos..... | 56 |
| 3.1.6. Cromatógrafos..... | 56 |
| 3.1.7. Espectrômetros..... | 57 |
| 3.1.8. Solventes empregados..... | 57 |
| 3.1.9. Materiais e equipamentos utilizados nos ensaios biológicos..... | 57 |
| 3.2. Procedimento experimental do isolamento e preservação dos fungos endofíticos..... | 57 |
| 3.2.1. Preparo dos meios de cultura..... | 57 |
| 3.2.2. Preparo dos antibióticos e antifúngicos..... | 59 |
| 3.2.3. Coleta do material botânico..... | 59 |
| 3.2.4. Esterilização do material botânico..... | 61 |
| 3.2.5. Técnica de Tween e cultura monospórica..... | 61 |
| 3.2.6. Conservação dos fungos isolados..... | 61 |
| 3.2.7. Identificação dos fungos isolados..... | 62 |
| 3.3. Cultivo em pequena escala dos microrganismos isolados..... | 63 |
| 3.3.1. Cultivo dos microrganismos..... | 63 |
| 3.3.2. Obtenção dos extratos dos fungos cultivados..... | 63 |
| 3.4. Obtenção dos extratos das raízes de <i>Mauritia flexuosa</i> | 67 |
| 3.5. Testes biológicos..... | 69 |
| 3.5.1. Teste anticâncer..... | 69 |
| 3.5.1.1. Teste colimétrico..... | 69 |
| 3.5.1.2. Cálculo da CI_{50} | 69 |
| 3.5.2. Teste antiacetilcolinesterase..... | 70 |
| 3.5.2.1. Ensaio de Ellman..... | 70 |
| 3.5.2.2. Ensaio de Marston..... | 71 |
| 3.5.2.3. Teste antiacetilcolinesterase por IMER..... | 73 |
| 3.5.3. Teste de atividade antioxidante..... | 74 |
| 3.5.3.1. Teste antioxidante (DPPH) qualitativo..... | 74 |
| 3.5.3.2. Teste antioxidante (DPPH) quantitativo..... | 75 |
| 3.5.4. Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 76 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.5. Teste de atividade antimicrobiana frente à <i>Bacillus cereus</i> | 77 |
| 3.5.6. Teste de atividade antifúngica frente à <i>Candida albicans</i> | 78 |
| 3.5.7. Teste de atividade antimicrobiana das substâncias puras..... | 79 |
| 3.6. Estudo do perfil químico das linhagens de <i>Penicillium</i> spp. e da hospedeira <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> por APCI-MS..... | 81 |
| 3.7. Cultivo em larga escala dos fungos selecionados..... | 82 |
| 3.8. Isolamento dos metabólitos secundários dos fungos selecionados..... | 83 |
| 3.8.1. Fungo PBR 2.2.2..... | 83 |
| 3.8.2. Fungo PBR 1.2.1.a..... | 85 |
| 3.8.3. Fungo Stsp CC1-2/1-1 b 02..... | 87 |
| 3.8.4. Fungo Stsp CR 2.3.1..... | 88 |
| 3.9. Isolamento dos metabólitos secundários de <i>Mauritia flexuosa</i> | 90 |
| 3.9.1. Extratos hexânicos..... | 90 |
| 3.9.2. Extrato hidroalcolólico das raízes..... | 92 |
| Resultados | 94 |
| 4.1. Isolamento de endófitos de <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> e <i>Mauritia flexuosa</i> | 94 |
| 4.2. Testes de atividade anticâncer..... | 97 |
| 4.3. Testes antiacetilcolinesterase..... | 98 |
| 4.3.1. Testes qualitativos em CCD..... | 98 |
| 4.3.2. Testes quantitativos por IMER..... | 99 |
| 4.4. Testes antioxidantes..... | 100 |
| 4.4.1. Teste qualitativo em CCD..... | 100 |
| 4.4.2. Teste quantitativo..... | 102 |
| 4.5. Teste de citotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 102 |
| 4.6. Teste de atividade antimicrobiana frente à <i>Bacillus cereus</i> | 103 |
| 4.7. Teste de atividade antifúngica frente à <i>Candida albicans</i> | 104 |
| 4.8. Testes antimicrobianos das substâncias puras..... | 106 |
| 4.9. Determinação estrutural das substâncias isoladas..... | 108 |
| 4.9.1. Fungo PBR 2.2.2. (<i>Penicillium</i> sp.)..... | 108 |
| 4.9.2. Fungo PBR 1.2.1.a. (<i>Penicillium</i> sp.)..... | 130 |
| 4.9.3. Fungo Stsp CC1-2/1-1 b 02. (<i>Penicillium</i> sp.)..... | 140 |
| 4.9.4. Fungo Stsp CR 2.3-1 (<i>Gliocladium</i> sp.)..... | 145 |
| 4.9.5. Substâncias da hospedeira <i>M. flexuosa</i> | 161 |
| 4.10. Estudo do perfil químico de fungos por APCI-MS..... | 201 |
| 4.10.1. Comparação de diferentes concentrações do analito para o estudo de perfis químicos em APCI-MS..... | 201 |
| 4.10.2. Influência da temperatura de dessolvatação na sonda APCI para o estudo de perfis químicos..... | 202 |
| 4.10.3. Perfis químicos das linhagens classificadas como <i>Penicillium</i> sp. das hospedeiras estudadas..... | 204 |
| 4.10.4. Comparativo do perfil químico de <i>Strychnos</i> cf. <i>toxifera</i> com seus endófitos..... | 211 |
| Conclusões | 223 |
| Biogênese das moléculas isoladas | 225 |
| 6.1. Esteróides..... | 225 |
| 6.2. Triterpenos..... | 226 |
| 6.3. Flavonóides..... | 227 |
| 6.4. Outras substâncias fenólicas..... | 228 |
| 6.5. Alcalóide dicetopiperazínico..... | 229 |
| 6.6. Açúcares e micotoxina ácido kójico..... | 230 |
| 6.7. Alcalóide indólico..... | 231 |
| Referências bibliográficas | 233 |

LISTA DE ABREVIações

% - porcentagem

δ - deslocamento químico

Φ - largura da coluna cromatográfica

AChE- Enzima acetilcolinesterase

APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization

BDA - Batata Dextrose e Ágar

BOD – Biochemical Oxygen Demand

M.- Mauritia

CCD - Cromatografia em camada delgada

cf. - confront

CI₅₀ - Concentração inibitória de 50% do crescimento da população (células ou microrganismos)

CS₅₀- Capacidade de seqüestro de 50% do total de radicais livres

CIM - Concentração Inibitória Mínima

COSY - Correlation spectroscopy

DAD - Diode Array Detection

DCM- Diclorometano

DMP- Desvio Médio Padrão

d - dubleto

dd - duplo dubleto

ddd - duplo duplo dubleto

dt - duplo tripleto

DMSO – Dimetilsulfóxido

ESI-MS – Modo de ionização por elétron-spray de Espectromtria de massas.

EtOH- Etanol

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz- Hertz
IMER- Immobilized enzyme reactors
IE- Impacto Eletrônico
J - constante de acoplamento
L – Litro
LC- Liquid Chromatography
m - multipletto
m/z - razão massa carga
 M^+ - íon molecular
MID- Minimal Inhibitory Dilution
MS - Mass Spectrometry
MS-MS- Tandem Mass Spectrometry
NOE- Nuclear Overhauser Effect
NOESY- Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NIST- National Institute of Standards and Technology
pH - potencial de hidrogênio
q - quarteto
RMN ^{13}C - Ressonância magnética nuclear do núcleo de carbono 13
RMN ^1H - Ressonância magnética nuclear do núcleo de hidrogênio 1
rpm - rotações por minuto
s- singleto
sl- singleto largo
sp.- espécie
spp. - Algumas espécies
 t_r - tempo de retenção

t - tripleto

UV - Ultra Violeta

v/v – volume por volume

® - Marca Registrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1. Produtos naturais utilizados como fármacos.

Figura 1.1.2. Produtos naturais empregados no tratamento de câncer.

Figura 1.1.3. Estrutura geral das penicilinas.

Figura 1.1.4. Substâncias de origem microbiana utilizadas como fármacos.

Figura 1.1.5. Substâncias de origem microbiana utilizadas no tratamentos de câncer.

Figura 1.2.1. Composição química da parede celular de um fungo endofítico.

Figura 1.4.1. Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.

Figura 1.4.2. Esquematização do mecanismo de ataque de um microorganismo invasor a uma planta hospedeira.

Figura 1.4.3. Endófito *Neotyphodium coenophialum* associado a *Festuca arundinaceae*, único responsável pela produção de alcalóides que são ingeridos pelo gado.

Figura 1.4.4. Estruturas químicas do ácido giberélico e da podofilotoxina.

Figura 1.4.5. O fungo *Taxomyces andreanae* que por transmissão gênica horizontal com sua hospedeira *Taxus brevifolia* produz o diterpeno taxol.

Figura 1.5.1. Cultura de *Penicillium notatum* e imagem ampliada de suas estruturas reprodutivas.

Figura 1.6.1. Cultura de *Gliocladium roseum* e imagem ampliada de suas estruturas reprodutivas.

Figura 1.7.1. Distribuição geográfica da espécie *Mauritia flexuosa* pela América do Sul e Central. As áreas verdes do mapa assinalam a localização da espécie.

Figura 1.7.2. (A) Frutos de *M. flexuosa*, (B) Árvore com frutos, (C) Buritizal.

Figura 1.7.3. Flavonóides e leucoantocianidina das folhas de *M. flexuosa*.

Figura 1.8.1. (A) *Strychnos toxifera*, (B) *Chondrodendron tomentosum*, (C) Dardos envenenados com Curare, (D) Índios caçando com zarabatanas.

Figura 1.8.2. Exsicata de *Strychnos toxifera*.

Figura 1.8.3. Alcalóides isolados de *Strychnos toxifera*.

Figura 3.2.1. Local da coleta na mata do campus da UFAM.

Figura 3.2.2. *Strychnos* cf. *toxifera*.

Figura 3.2.3. Local da coleta no Km 106 da rodovia AM-010.

Figura 3.3.1. (A) Cultivo dos fungos em incubadora shaker, (B) Linhagem Stsp C1-2/1-2 após cultivo, (C) Extratos obtidos da linhagem Stsp C1-2/1-2, (D) Cromatoplaça dos mesmos extratos eluída em CH₂Cl₂/AcOEt 7:3 e revelada em luz U.V. 365 nm.

Figura 3.2.4. Técnica para obtenção de cultura monospórica.

Figura 3.4.1. (A) Raízes respiratórias, (B) raízes submersas de *M. flexuosa*.

Figura 3.4.2. Fluxograma representando os procedimentos adotados para a obtenção dos extratos das raízes de *Mauritia flexuosa*.

Figura 3.5.1. Esquema da catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Figura 3.5.2. Esquema da catálise do acetato de α -naftila e reação com Fast Blue.

Figura 3.5.3. Cromatograma representando a diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença do inibidor padrão tacrina.

Figura 3.5.4. Estabilização do radical livre DPPH.

Figura 3.5.5. Placa de Petri contendo cultura de *Bacillus cereus*.

Figura 3.5.6. Placa de Petri contendo cultura de *Candida albicans*

Figura 3.5.7. Bactérias patogênicas usadas no teste: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* respectivamente.

Figura 3.8.1. Cromatograma obtido para a análise da fração D2 no modo isocrático MeOH 50% em 60 minutos, $\lambda = 270$ nm, injeção de 20 μ L e fluxo de 0,7 mL/min e espectro de U.V. da substância de interesse.

Figura 3.8.2. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **P1M**.

Figura 3.8.3. Fluxograma representando o estudo químico do extrato **P2**.

Figura 3.8.4. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **P2M**.

Figura 3.8.5. Cristais presentes no extrato **ST1**.

Figura 3.8.6. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **ST1**.

Figura 3.8.7. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **G1 + G1***.

Figura 3.8.8. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **G1M**.

Figura 3.9.1. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **RFH+RGH**.

Figura 3.9.2. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **hidroalcolico** das raízes de *M. flexuosa*.

Figura 4.1.1. Relação entre a diversidade de gêneros dos isolados de *Strychnos* cf. *toxifera* e o meio de cultura do isolamento.

Figura 4.1.2. Relação entre a diversidade de gêneros dos isolados de *Mauritia flexuosa* e o meio de cultura do isolamento.

Figura 4.1.3. Relação das quantidades de linhagens por parte da hospedeira *Strychnos* cf. *toxifera*.

Figura 4.1.4. Algumas das linhagens obtidas.

Figura 4.4.1. Placa de CCD indicando a atividade de alguns dos extratos testados.

Figura 4.6.1. Halos de inibição indicando a atividade antimicrobiana.

Figura 4.7.1. Poços com coloração esverdeada após adição do corante indicando a presença de atividade antifúngica.

Figura 4.7.2. Placas confirmando as atividades antifúngicas dos extratos.

Figura 4.8.1. Esquema de redução catalítica da resazurina.

Figura 4.8.2. Placas de Elisa aonde foi realizado o teste antimicrobiano, os poços com coloração violeta indicam a atividade positiva da substância testada.

Figura 4.9.1. (A) Cultivado em meio Czapek, (B) Linhagem PBR 2.2.2. sob estresse excretando um pigmenta amarelo, (C) Cultivo em larga escala no meio ISP2 e (D) Imagem de microscopia óptica da mesma linhagem.

Figura 4.9.2. Substâncias isoladas da linhagem PBR 2.2.2.

Figura 4.9.3. Cromatograma da fração D2 em coluna Synergi preparativa 250 mm x 21,20 mm, método 50% MeOH com fluxo de 21,3 mL/min.

Figura 4.9.4. Espectro de RMN de ^1H da amostra 1 em acetona- d_6 .

Figura 4.9.5. Ampliação da região de aromáticos do espectro de RMN de ^1H da amostra 1 em acetona- d_6 .

Figura 4.9.6. Espectro de RMN de ^{13}C da fração D2 que originou a amostra 1 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.7. Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da amostra 1 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.8. Espectro de massas *fullscan* no modo ESI $^+$ da amostra 1 e estrutura da meleagrina.

Figura 4.9.9. Ampliação do mapa de HMBC para a região de aromáticos da amostra 1 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.10. Ampliação da região mais blindada do mapa de HMBC da amostra 1 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.11. Correlações de HMBC dos hidrogênios aromáticos, olefínico e do grupo isoprenila confirmando a estrutura parcial derivada da meleagrina.

Figura 4.9.12. Ampliação dos singletos na região mais blindada e correlações assinaladas para o anel histidina presente na amostra 1, HMBC gerado em metanol- d_4 .

Figura 4.9.13. Espectro de NOE em metanol- d_4 da amostra 1.

Figura 4.9.14. Correlações de NOE observadas para a amostra 1.

Figura 4.9.15. Estrutura da glandicolina B.

Figura 4.9.16. Espectro de RMN de ^1H da amostra 2 em clorofórmio- d .

Figura 4.9.18. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 2 em clorofórmio- d .

Figura 4.9.17. Estrutura do ergosterol.

Figura 4.9.19. Espectro de RMN de ^1H da amostra 3 em clorofórmio- d .

Figura 4.9.20. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 3 em clorofórmio- d .

Figura 4.9.21. Estrutura do peróxido de ergosterol.

Figura 4.9.22. Espectro de RMN de ^1H da amostra 4 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.23. Estrutura da 1-*O*-metil- α -D-glicopirranose.

Figura 4.9.24. Espectro de massas *fullscan* no modo ESI da amostra 4.

Figura 4.9.25. Espectro de RMN de ^1H e ampliação da região de hidrogênios carbinólicos da amostra 5 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.26. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 5 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.27. Espectro de massas por ESI-MS no modo negativo da amostra 5.

Figura 4.9.28. Espectro de massas por ESI-MS de íons produtos do íon precursor em m/z 181 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

Figura 4.9.29. Estrutura do manitol.

Figura 4.9.30. (A) Linhagem PBR 1.2.1. a. em meio Czapek, (B) crescendo em meio líquido ISP2, (C) estruturas reprodutivas em microscopia óptica.

Figura 4.9.31. Substâncias isoladas da linhagem PBR 1.2.1.a.

Figura 4.9.32. Espectro de ^1H da amostra 6 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.33. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da região de hidrogênios aromáticos e correlações da amostra 6 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.35. Estruturas do *p*-hidroxibenzaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico.

Figura 4.9.34. Espectro de massas por ESI-MS no modo negativo da amostra 6.

Figura 4.9.36. Espectro de RMN de ^1H da amostra 7 em metanol- d_4 e ampliação da região de aromáticos.

Figura 4.9.37. Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para os hidrogênios vicinais da amostra 7 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.38. Algumas correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ por HMBC observadas no experimento de HMBC da substância 7 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.39. Espectro de massas ESI-MS no modo negativo da amostra 7.

Figura 4.9.40. Metabólitos com esqueleto naftalênico isolados de fungos e plantas.

Figura 4.9.41. (A) Linhagem Stsp CC1-2/1-1 b 02 em meio Czapek, (B) Mesma linhagem crescendo em meio líquido BDL e (C) Imagem das estruturas reprodutivas por microscopia óptica.

Figura 4.9.42. Espectro de RMN de ^1H da amostra 10 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.43. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 10 em DMSO - d_6 .

Figura 4.9.44. Estrutura do ácido kójico.

Figura 4.9.45. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no experimento de HMBC para a amostra 10 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.46. Correlações para o ácido kójico, em vermelho as correlações ^1H - ^{13}C (HMBC), em verde as correlações ^1H - ^{13}C (HMBC) para os sinais satélites e em azul os acoplamentos a distância observados no espectro de RMN de ^1H .

Figura 4.9.47. Espectro de massas da amostra 10 no modo ESI⁺ *full*.

Figura 4.9.48. (A) Linhagem Stsp CR 2.3-1 em meio Czapek, (B) mesma linhagem em meio líquido ISP2 e (C) estruturas reprodutivas em imagem por microscopia óptica.

Figura 4.9.49. Substâncias isoladas da linhagem Stsp CR 2.3-1.

Figura 4.9.50. Espectro de RMN de ^1H da amostra 11 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.51. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra 11 em metanol- d_4

Figura 4.9.52. Projeção do espectro de RMN de ^{13}C baseado no experimento de HMBC da amostra 11 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.53. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no experimento de HMBC para o grupo preniloxi da substancia 11 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.54. Correlações homonucleares ^1H - ^1H observadas no experimento de COSY para o grupo preniloxi da amostra 11 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.55. Correlações homonucleares ^1H - ^1H observadas no experimento de COSY para os grupos aromáticos e dicetopiperazínicos da substancia 11 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.56. Demais correlações de COSY da amostra 11.

Figura 4.9.57. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas no experimento de HMBC para os grupos aromáticos e dicetopiperazínicos da substancia 11 em metanol- d_4 .

Figura 4.9.58. Demais correlações de HMBC da amostra 11.

Figura 4.9.59. Espectro de gNOE da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

Figura 4.9.60. Espectro de gNOESY da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

Figura 4.9.61. Estrutura espacial observada pelos experimentos de gNOE e gNOESY.

Figura 4.9.62. Espectro de massas *fullscan* no modo ESI⁺ da amostra 11.

Figura 4.9.63. Espectro de massas de íon produtos indo até MS⁵ do íon precursor m/z 289 referente ao íon *quase*-molecular da amostra 11.

Figura 4.9.64. Proposta de fragmentação baseada em alguns íons produtos observados no experimentos de MS-MS.

Figura 4.9.65. Estrutura da *ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-dimetilalil éter*.

Figura 4.9.66. Espectro de RMN de ^1H da amostra 14 em clorofórmio- d .

Figura 4.9.67. Estrutura do cerevisterol.

Figura 4.9.69. Estrutura do ácido cítrico

Figura 4.9.70. (A) Detalhe da plameira na beira da água e suas raízes submersas espalhadas pela terreno alagado, (B) Detalhe das raízes respiratórias e (C) detalhe da parte alta da palmeira com frutos.

Figura 4.9.71. Substâncias identificadas e isoladas de *M. flexuosa*.

Figura 4.9.72 TIC da amostra Fração 2.

Figura 4.9.73. Estrutura do ácido palmítico.

Figura 4.9.74. Espectro de massas por IE a 70 eV referente a banda em RT 20,23 minutos.

Figura 4.9.75. Estrutura do éster metílico do ácido (9Z,12Z) – octadecadienóico.

Figura 4.9.76. Espectro de massas por IE a 70 eV referente a banda em RT 22,18 minutos.

Figura 4.9.77. Estrutura do ácido linoléico.

Figura 4.9.78. Espectro de massas por IE a 70 eV referente a banda em RT 23,38 minutos.

Figura 4.9.79. Espectro de RMN de ^1H da amostra 16 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.80. Espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 16.

Figura 4.9.81. Estrutura da friedelina.

Figura 4.9.83. Cromatograma de íons totais e espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 17.

Figura 4.9.82. Espectro de RMN de ^1H da amostra 17 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.84. Estrutura da taraxerona.

Figura 4.9.85. Espectro de RMN de ^1H da amostra 18 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.86. Espectro de massas do campesterol por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST para o íon em m/z 400.

Figura 4.9.87. Espectro de massas do estigmasterol por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST para o íon em m/z 412.

Figura 4.9.88. Espectro de massas do sitosterol por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST para o íon em m/z 414.

Figura 4.9.89. Estruturas dos esteróides campesterol, estigmasterol e sitosterol respectivamente

Figura 4.9.90. Espectro de RMN de ^1H da amostra 19 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.91. Espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 19.

Figura 4.9.92. Estrutura do acetato de lupeol.

Figura 4.9.93. Espectro de RMN de ^1H da amostra 20 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.95. Estruturas da lupenona.

Figura 4.9.96. Espectro de RMN de ^1H da amostra 21 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.98. Estrutura da betulina.

Figura 4.9.97. Espectro de massas da betulina por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST para o íon em m/z 442.

Figura 4.9.98. Estrutura da betulina

Figura 4.9.99. Espectro de RMN de ^1H da substância 22 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.100. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 22 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.101. Espectro de DEPT 135° da substância 22 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.102. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HSQC da substância 22 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.103. Estruturas do anel A e principais mudanças nos deslocamentos devido a posição do grupo hidroxila (equatorial em β e axial em α).

Figura 4.9.104. Ampliação do mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HMBC da substância 22 em clorofórmio-*d*.

Figura 4.9.105. Correlações observadas para as metilas 23,24,25,26 e 27 no mapa de HMBC.

Figura 4.9.106. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HMBC da substância 22 em clorofórmio-*d* e principais correlações assinaladas para o anel E do esqueleto lupânico

Figura 4.9.107. Estrutura inicialmente proposta para a amostra 22.

Figura 4.9.108. Cromatograma de íon totais e espectro de massas das bandas nos tempos de retenção em RT 9,3 e RT 15,8 minutos, corrida em modo gradiente (30 – 100% de MeOH em 20 minutos, fluxo de 0,7 mL/min, coluna Luna C18).

Figura 4.9.109. Espectros de massas em APCI⁻, APCI⁺, ESI⁻ e ESI⁺ respectivamente da amostra 22.

Figura 4.9.110. Espectros de massas em APCI⁺ e íons produtos de m/z 473.

Figura 4.9.111. Estruturas que estariam coerentes com os dados observados por massas.

Figura 4.9.112. Espectro de RMN de ¹H da substância 23 em metanol-*d*₄.

Figura 4.9.113. Ampliações dos sinais do espectro de RMN de ¹H da substância 23.

Figura 4.9.115. Correlações homonucleares ¹H - ¹H observadas no experimento de COSY para a substância 23 em metanol-*d*₄.

Figura 4.9.116. Correlações de COSY observadas para a substância 23.

Figura 4.9.114. Estrutura da rutina.

Figura 4.9.117. Correlações heteronucleares ¹H - ¹³C observadas no experimento de HMBC para os hidrogênios aromáticos e da ramnose da substância 23 em metanol-*d*₄.

Figura 4.9.118. Correlações observadas no mapa de HMBC para a substância 23.

Figura 4.9.119. Espectro de massas no modo *fullscan* e espectro de íons produtos do íon precursor m/z 609 no modo ESI⁻.

Figura 4.9.120. Fragmentação da rutina baseada nos íons produtos observados.

Figura 4.9.121. Espectro de RMN de ¹H da substância 24 em metanol-*d*₄.

Figura 4.9.122. Ampliações de todos os sinais do espectro de RMN de ¹H da substância 24.

Figura 4.9.123. Estrutura da quercetrina.

Figura 4.9.124. Espectro de massas no modo *fullscan* e espectro de íons produtos do íon precursor m/z 447 no modo ESI⁻.

Figura 4.9.125. Fragmentação da quercetrina baseada nos íons produtos observados.

Figura 4.9.126. Espectro de RMN de ¹H da substância 25 em metanol-*d*₄.

Figura 4.9.127. Estrutura da quercetina.

Figura 4.9.128. Espectro de massas no modo *fullscan* e espectro de íons produtos do íon precursor m/z 301 no modo ESI⁻.

Figura 4.9.129. Fragmentação da quercetina baseada nos íons produtos observados.

Figura 4.10.1. Comparativo da inserção direta do extrato do fungo "Stsp C2-1 a" em diferentes concentrações

Figura 4.10.2. Espectros de massas no modo APCI⁺ dos extratos brutos do fungo Stsp C1-2/1-2 nas temperaturas de dessolvatação 150, 300 e 450 °C respectivamente.

Figura 4.10.3. Comparação dos perfis químicos das linhagens F2.3.2c, Stsp CC1-2/1-1 b 02, Stsp C2-1a e Stsp C2.2/2.2a cultivadas em BDA.

Figura 4.10.4. Espectro de íons produtos do íon precursor em m/z 301 no modo APCI⁺.

Figura 4.10.5. Proposta de fragmentação para o questinol.

Figura 4.10.6. Comparação dos perfis químicos das linhagens Stsp R1/ 1-2, Stsp C1-2/1-3, Stsp C2-1c e Stsp C2-1d cultivadas em ISP2.

Figura 4.10.7. Comparação dos perfis químicos das linhagens Stsp C2.3/1-2 a, Stsp C2.2/1-1 a, Stsp C2.3/1-2c, Stsp C1-2/1-1c e Stsp CR1.1.2 b cultivadas em BDA.

Figura 4.10.8. Comparação dos perfis químicos das linhagens Stsp C1.2/1-1 f, Stsp C1-2/1-1 a, Stsp C1-2/1.3, Stsp CR1-1.3 e Stsp C1.2/2.1 cultivadas em diferentes meios de cultura.

Figura 4.10.9. Comparação dos perfis químicos das linhagens Pbr 3.3.1., Pbr 3.3.2., Pbr 1.1.1., Pbr 2.1.1. e Pbr 3.2.1. cultivadas em BDA.

Figura 4.10.10. Espectro de íons produtos do íon precursor em m/z 281 no modo APCI⁺.

Figura 4.10.11. Proposta de fragmentação para a brefeldina A.

- Figura 4.10.12.** Perfis químicos do caule (A) e folhas (B) de *Strychnos cf. toxifera*.
- Figura 4.10.13.** Falso TIC e espectro de massas da linhagem Stsp C2.3/1-2c.
- Figura 4.10.14.** Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método da ligação simples.
- Figura 4.10.15.** Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método da média das ligações.
- Figura 4.10.16.** Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método do centróide.
- Figura 4.10.17.** Espectros de fullscan no modo APCI⁺ dos fungos f26 e f37 respectivamente, picos separados por 44 daltons podem ser oriundos de contaminação por detergente.
- Figura 4.10.18.** Espectros de fullscan no modo APCI⁺ dos fungos f50 e f3 respectivamente, picos separados por 44 daltons podem ser oriundos de contaminação por detergente.
- Figura 4.10.19.** Espectros de fullscan no modo APCI⁺ dos fungos f50 e f51 respectivamente, picos separados por 44 daltons podem ser oriundos de contaminação por detergente.
- Figura 4.10.20.** As altas diferenças observadas nas intensidades de alguns íons na matriz gerada (quadro assinalado de vermelho) para o processamento, a linha 19 se refere a linhagem 50 e a linha 20 a linhagem 51.
- Figura 4.10.21.** Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método da ligação completa.
- Figura 4.10.22.** Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método de Ward.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.5.1.** Informações taxonômicas sobre o gênero *Penicillium*.
- Tabela 1.5.2.** Alguns metabólitos isolados de *Penicillium* spp. e suas atividades biológicas.
- Tabela 1.6.1.** Informações taxonômicas sobre o gênero *Penicillium*.
- Tabela 1.6.2.** Substâncias isoladas de *Gliocladium* spp.
- Tabela 3.3.1.** Linhagens cultivadas em pequena escala fermentativa.
- Tabela 3.4.1.** Relação dos extratos de *M. flexuosa* obtidos e suas massas.
- Tabela 3.5.1.** Extratos testados no teste antioxidante quantitativo.
- Tabela 3.5.2.** Relação dos extratos de endofíticos ensaiados nos testes biológicos.
- Tabela 3.6.1.** Condições otimizadas do espectrômetro de massas para os compostos presentes nos extratos testados.
- Tabela 3.7.1.** Extratos obtidos a partir do cultivo das linhagens fúngicas selecionadas.
- Tabela 4.1.1.** Número de microrganismos endofíticos isolados de *Strychnos* sp. e *Mauritia flexuosa* por gênero e meio de cultura.
- Tabela 4.2.1.** Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais para os melhores resultados obtidos. Valores são média ± DPM.
- Tabela 4.2.2.** Valores de CI₅₀ e intervalo de 95% de confiança (IC95%) em µg/mL das substâncias selecionadas em diferentes linhagens celulares no teste do MTT.
- Tabela 4.3.1.** Resultados positivos dos testes antiacetilcolinesterase em CCD.
- Tabela 4.3.2.** Resultados dos testes antiacetilcolinesterase quantitativo por IMER.
- Tabela 4.4.1.** Relação das amostras que apresentaram atividade no teste antioxidante.
- Tabela 4.4.2.** Resultados do teste antioxidante quantitativo.

Tabela 4.5.1. Resultados do teste de toxicidade frente a *Artemia salina*.

Tabela 4.6.1. Resultados positivos dos testes antimicrobianos frente à *Bacillus cereus*.

Tabela 4.7.1. Resultados positivos do teste antifúngico frente à *Candida albicans*.

Tabela 4.9.1. Dados da amostra 1 em comparação com os dados da meleagrina C descritos na literatura (DU et al., 2009).

Tabela 3.9.2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 2 em comparação com os dados do ergosterol descritos na literatura (SHIRANE et al., 1996).

Tabela 3.9.3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 3 em comparação com os dados do peróxido de ergosterol descritos na literatura (YUE et al., 2001).

Tabela 4.9.4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 4 em comparação com os dados do manitol descritos na literatura (GALOTTA, 2005).

Tabela 4.9.5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 5 em comparação com os dados do manitol descritos na literatura (POUCHERT & BEHNKE, 1993).

Tabela 4.9.6. Dados de RMN de ^1H da amostra 6 em comparação com os dados do *p*-hidroxibenzaldeído descritos na literatura (AYER et al., 1985; DEY & HARBORNE, 1993).

Tabela 4.9.7. Dados de RMN da amostra 7.

Tabela 4.9.8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 10 em comparação com os dados do ácido kójico descritos na literatura (LI et al., 2003).

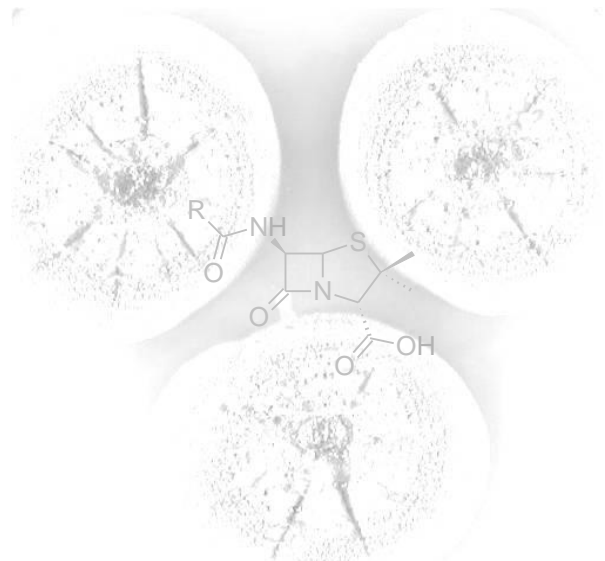
Tabela 3.9.9. Dados de RMN de ^1H da amostra 11 em comparação com os dados do ciclo-(glicil- L – tirosil) 4,4- dimetilalil éter descritos na literatura (KIRBY et al., 1988).

Tabela 4.9.11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (125 MHz) e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ por HMBC da substância 22.

Tabela 4.9.12. Dados de RMN de ^1H da substância 23 em comparação com os dados da rutina descritos na literatura (GALOTTA et al., 2008).

Tabela 4.9.13. Dados de RMN de ^1H da substância 25 em comparação com os dados da rutina descritos na literatura (GALOTTA et al., 2008).

1. INTRODUÇÃO



1.1. Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas.

Produtos naturais são explorados há muitos anos e as plantas sempre representaram a principal fonte natural de compostos usados na medicina popular (STROBEL et al., 2004). Entre os exemplos de fármacos obtidos a partir de fontes vegetais destacam-se alguns usados até o presente e de uso disperso pelos continentes como, por exemplo: aspirina, codeína, digitoxina e eugenol (Figura 1.1.1). Além destes, pode-se ainda destacar o psolarel[®], uma cumarina isolada de *Psorelea corylifolia* (empregada no tratamento de vitiligo), e um derivado semi-sintético de um produto natural: o teniposídeo (que tem emprego no tratamento de leucemia). Uma descoberta de fármaco de fonte vegetal muito significativa foi a do alcalóide da Vinca (*Catharanthus roseus*), vincristina, utilizada em diversos tratamentos de câncer (Figura 1.1.2; DAVID et al., 2004).

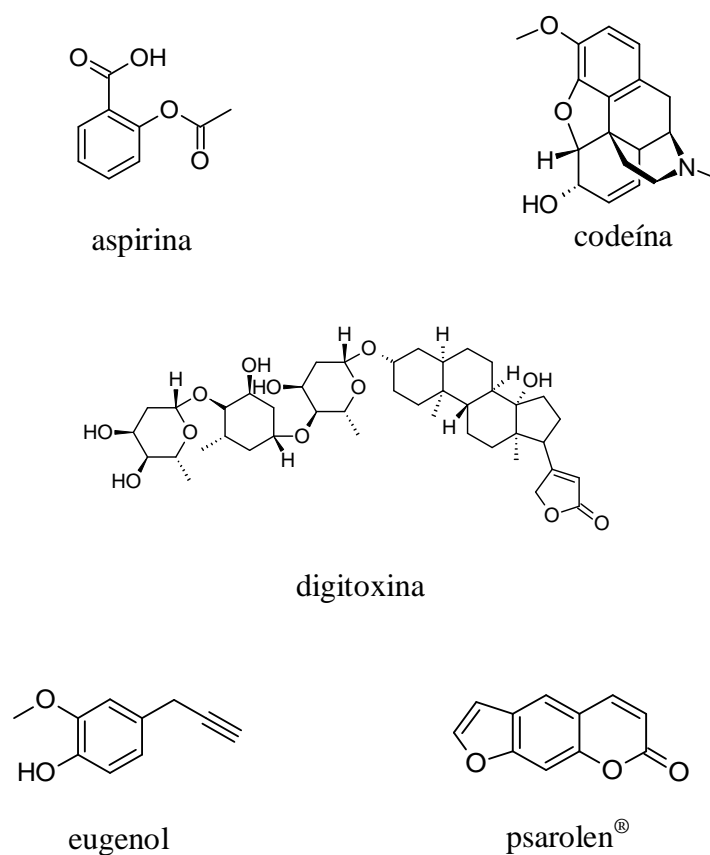


Figura 1.1.1. Produtos naturais utilizados como fármacos.

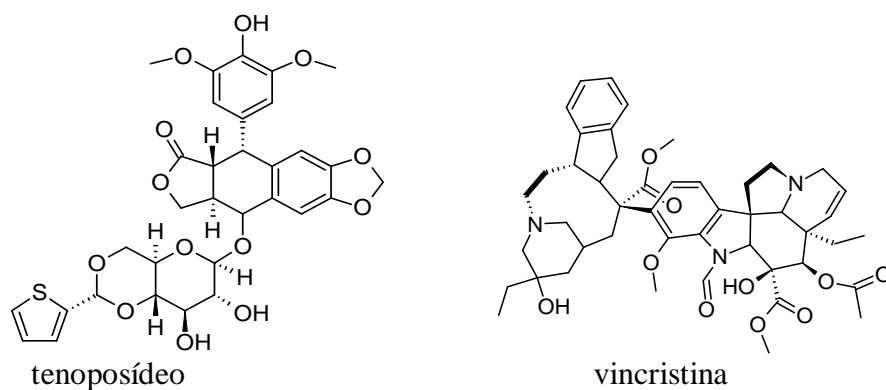


Figura 1.1.2. Produtos naturais empregados no tratamento de câncer.

A busca por compostos bioativos produzidos por microrganismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. A descoberta da penicilina (Figura 1.1.3) por Fleming, em 1929, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas e tornou-se o marco para o início das pesquisas de metabólitos bioativos derivados de microrganismos, e essas pesquisas resultaram em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (PUPO et al., 2007).

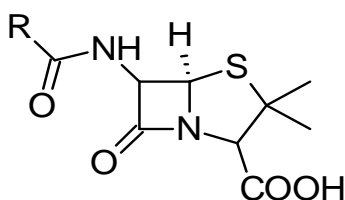


Figura 1.1.3. Estrutura geral das penicilinas.

A importância da quimiodiversidade dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de fármacos é amplamente discutida na literatura (NEWMAN & CRAGG, 2007; GALM & SHEN, 2007; LAM, 2007; CHIN et al., 2006; GULLO et al., 2006). Entre todos os organismos conhecidos como produtores de pequenas moléculas de produtos naturais, os fungos representam uma fonte rica de metabólitos bioativos que apresentam larga escala de aplicações como agroquímicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários e agentes anticâncer. (GUNATILAKA, 2006).

Desde a descoberta de Fleming, a investigação de microrganismos como fonte de metabólitos bioativos estruturalmente diversos, têm fornecido alguns dos mais importantes produtos da indústria farmacêutica. Estes incluem: agentes antibacterianos como a cefalosporina de *Cephalosporium cryptosporium* e tetraciclina de espécies de *Streptomyces*; agentes

imunossupressores, como a rapamicina de *Streptomyces* sp. e ciclosporina de *Beauveria nivea*; agentes redutores do colesterol sanguíneo, tais como a mevastatina de *Penicillium citrinum* e lovastatina de *Aspergillus terreus*; anti-helmínticos e antiparasitários, tais como a ivermectina de *Streptomyces* sp. (Figura 1.1.4; NEWMAN & CRAGG, 2007; PUPO et al., 2007).

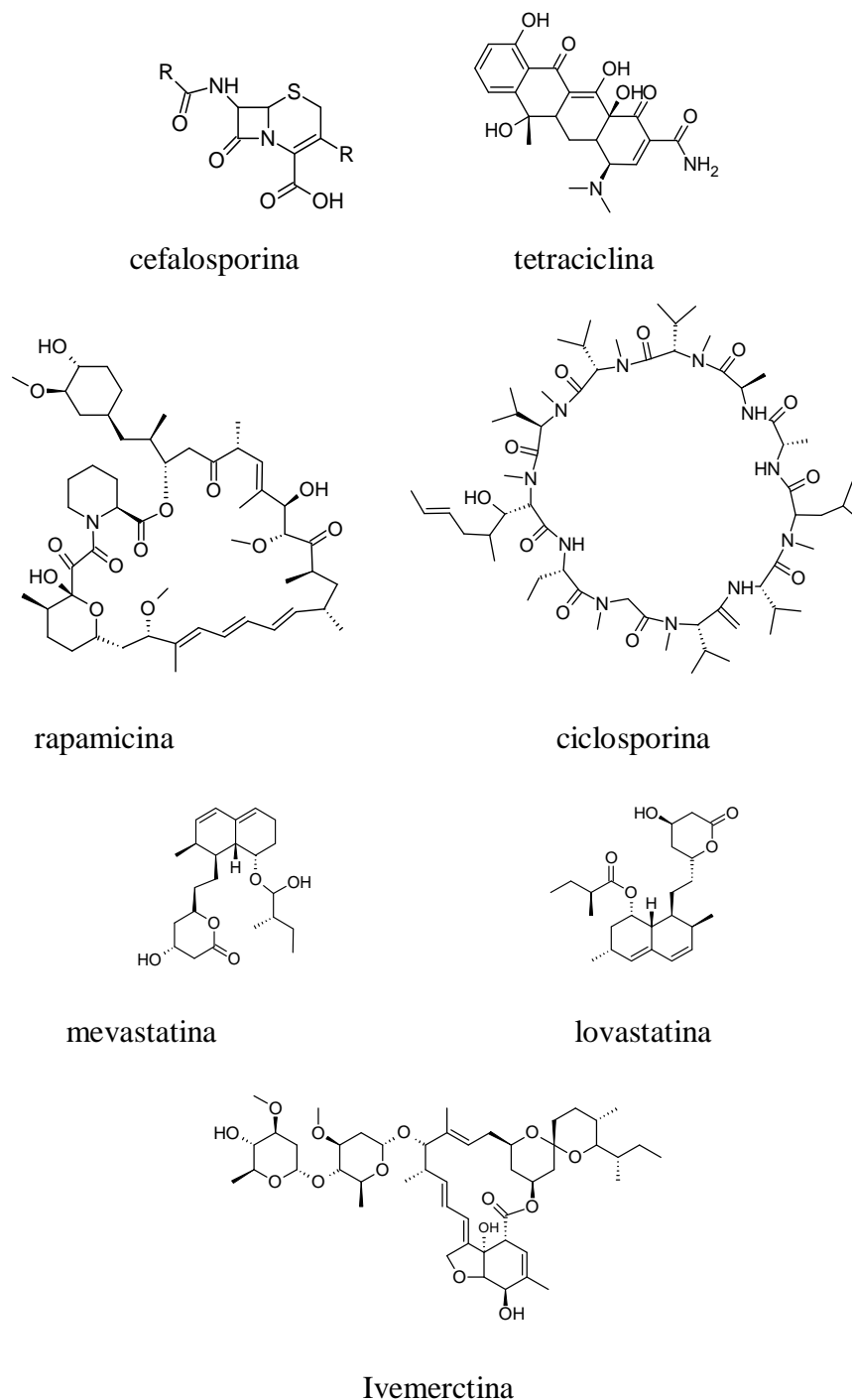
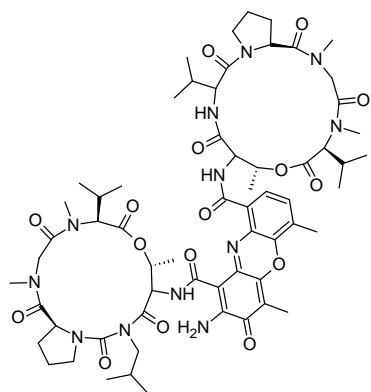


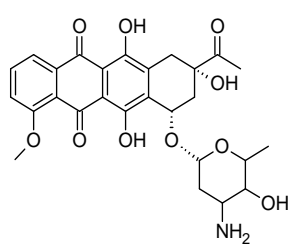
Figura 1.1.4. Substâncias de origem microbiana utilizadas como fármacos.

Metabólitos microbianos estão entre os mais importantes agentes quimioterápicos do câncer (DEMAIN, & SANCHEZ, 2009), eles começaram a aparecer por volta de 1940 com a descoberta da actinomicina D, e desde então diversos compostos com propriedades anticancerígenas foram isolados de fontes naturais. Mais de 60% dos compostos atuais com atividade antineoplásica foram originalmente isolados como produtos naturais ou seus derivados, os produtos aprovados mais vendidos são: actinomicina D, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, valrubicina, mitomicina C, streptozotocina, pentostatina, epotilona, taxol e calicheamicina (Figura 1.1.5; SOUZA, 2004; DEMAIN, & SANCHEZ, 2009). Uma bem sucedida molécula não advinda de actinomicetos é o taxol (paclitaxel[®]) que foi isolado pela primeira vez da planta *Taxus brevifolia*, mas que também é produzida pelos fungos *Taxomyces andreanae*, *Nodulisporium sylviforme* e *Pestalotiopsis microspora* (ZHAO et al., 2004). Este composto inibe a divisão rápida de células cancerosas de mamíferos através da promoção da polimerização de tubulina e interferindo na distribuição dos microtúbulos durante a divisão celular. A droga também inibe o crescimento de vários fungos (*Pythium* sp., *Phytophthora* sp. e *Aphanomyces* sp.) pelo mesmo mecanismo (DEMAIN, & SANCHEZ, 2009). Em 1992, o taxol foi aprovado para câncer de ovário e hoje em dia também é utilizado em câncer de mama e formas avançadas de sarcomas de Kaposi (NEWMAN & CRAGG, 2007).

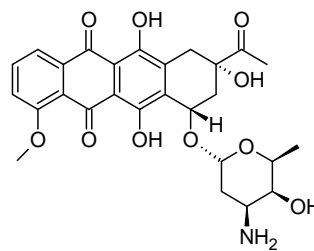
As epotilonas (nome derivado de suas características moleculares: epóxido, tiazol e cetona) são macrolídeos isolados do caldo fermentado de *Sorangium cellulosum* (GERTH et al., 1996), estas moléculas apresentaram atividade estabilizadora de microtúbulos, agindo de maneira semelhante ao taxol (BOLLAG et al., 1995), entretanto as epotilonas são de 5 a 25 vezes mais potentes que o taxol contra o crescimento de células cancerosas (KOWALSKI et al., 1997).



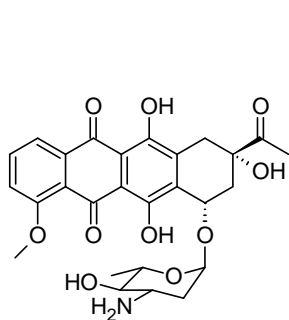
actinomicina D



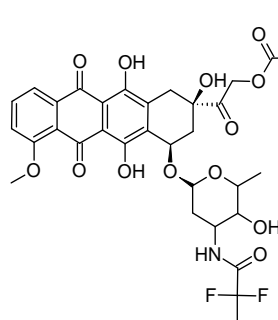
daunorubicina



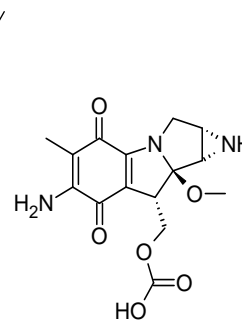
doxorubicina



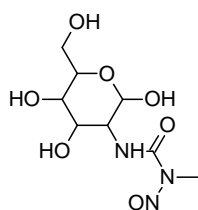
epirubicina



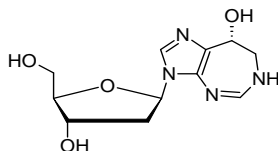
valrubicina



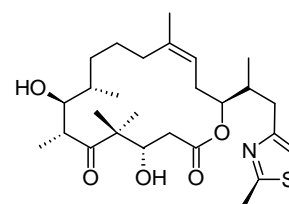
mitomicina C



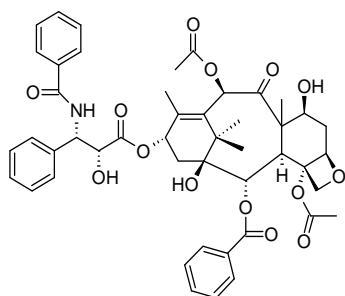
streptozotocina



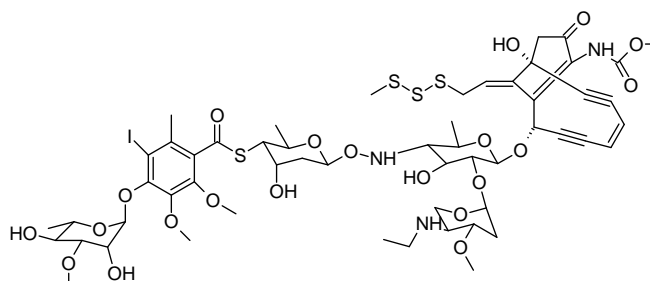
pentostatina



epotilona



taxol



calicheamicina

Figura 1.1.5. Substâncias de origem microbiana utilizadas no tratamentos de câncer.

1.2. Fungos.

Fungos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos, que possuem como forma mais comum de nutrição a absorção por osmose ou difusão. A maioria dos fungos é filamentosa tendo de 5 a 10 μm de dimensão transversal. Cada filamento é denominado hifa, e um conjunto de hifas compõe o corpo do fungo, denominado micélio que forma uma rede frouxa ou um corpo compacto como no caso dos cogumelos, nem todo fungo possui micélio, as leveduras que também são fungos não possuem micélio por serem unicelulares (ALEXOPOULOS, 1996).

Os fungos se reproduzem por meio de esporos. Cada fragmento de um fungo é potencialmente capaz de formar um novo indivíduo. As estruturas reprodutivas são diferentes das estruturas de crescimento (somáticas), a maioria dos fungos somente podem ser identificados por meio de análise de seus estágios reprodutivos. Os fungos possuem uma ampla faixa de temperatura para seu desenvolvimento, esta faixa varia de 22 a 30 $^{\circ}\text{C}$ para a maior parte das espécies. A maior parte dos fungos se reproduz por meio de esporos, os quais podem apresentar diferentes formas e podem ser formados de duas maneiras: sexuada e assexuada (ALEXOPOULOS, 1996).

Outra característica dos fungos é que estes são seres imóveis, porém podem apresentar células reprodutivas móveis. Os fungos apresentam parede celular formada por quitina (Figura 1.2.1), exceto os fungos pertencentes ao reino Protozoa que possuem como constituinte de sua parede celular a celulose assim como nas plantas (PELCZAR, 1981).

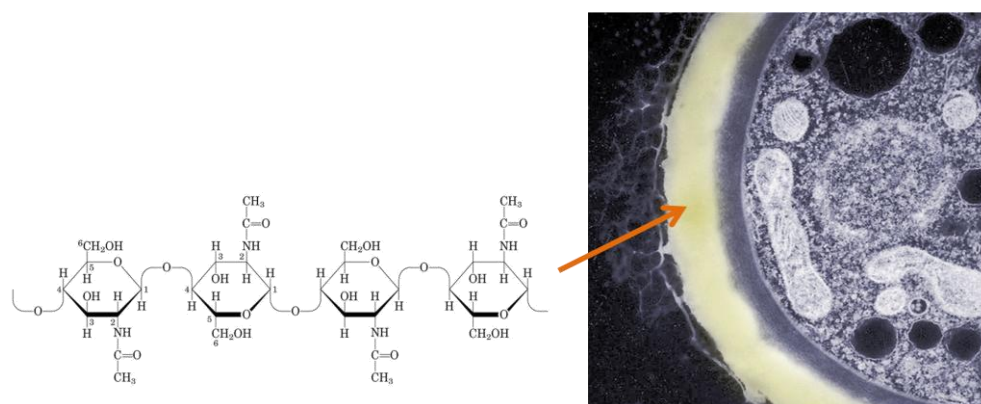


Figura 1.2.1. Composição química da parede celular de um fungo endofítico.
Fonte: CASADEVALL et al., (2009).

A nutrição e crescimento dos fungos, como mencionado anteriormente, é baseada em heterotrofismo, para todos eles sem exceção, ou seja, não produzem seu próprio alimento. Os fungos obtêm seu alimento infectando organismos vivos, como parasitas ou simbióticos mutualistas, ou decompondo matéria orgânica morta como os saprófitos. Outra característica importante é que eles são capazes de se desenvolverem e reproduzirem em meios de cultura artificiais (ALEXOPOULOS, 1996).

Os fungos são capazes de decompor e utilizar uma grande variedade de substratos, tendo uma alta eficiência na conversão de nutrientes em material celular. Se, contudo, houver um excesso de nutrientes, diversos produtos de degradação podem ser excretados no meio ambiente, enquanto nutrientes de reserva são acumulados no micélio. Fungos preferem ambientes ácidos para seu crescimento ao contrário de bactérias, sendo que seu pH ótimo para crescimento é por volta de 5,6 (ALEXOPOULOS, 1996).

1.3. As interações entre Fungos e Plantas.

As associações entre seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies que não consigam ou tenham dificuldades de obter por si próprias os seus meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predadoras (MELO & AZEVEDO, 1998). Entre todos os microrganismos (Fungos, Virus, Bactérias) os fungos são aqueles que se encontram mais freqüentemente associados a plantas (ZOBBERI, 1972). Em geral as associações entre fungos e plantas podem ser parasitárias ou simbióticas (MAYER, 1989). No caso das associações parasitárias, o fungo parasita vive sobre ou dentro da planta, obtendo desta o alimento necessário para seu crescimento e desenvolvimento, sendo que quase sempre o metabolismo do fungo é prejudicial à planta devido ao consumo de seus elementos vitais (minerais, hormônios, proteínas e carboidratos, etc.) ou pela biossíntese de metabólitos tóxicos à planta (MELO & AZEVEDO, 1998). Nas associações simbióticas a convivência entre fungos e plantas ao nível molecular é pacífica (ZOBBERI, 1972). O mecanismo do estabelecimento das associações entre fungos e plantas vem sendo extensivamente estudado em diversos casos, estes estudos vem despertando interesse uma vez que estas associações mutualísticas têm envolvido

metabólitos secundários que possuem diversas atividades biológicas que podem vir a ser úteis na medicina (CLAY et al., 1993).

Diversas evidências indicam que as associações mutualísticas podem ter sido responsáveis pela colonização do planeta por plantas, conduzindo, portanto, a hipótese de que as plantas são produtos de associações entre algas verdes e fungos (HAWKSWORTH, 1991). Esta hipótese tem um reforço em seu embasamento uma vez que o ambiente terrestre pobre em nutrientes e com a exposição a rigorosas mudanças climáticas seria uma grande dificuldade, de modo que as relações simbióticas mutualistas teriam sido uma estratégia de sobrevivência bem sucedida (BLACKWELL, 2000). Em estudos conduzidos por Redecker e colaboradores foram encontrados esporos e hifas de fungos fossilizados de mais de 460 milhões de anos o que comprova a coexistência de fungos com briófitas. Os fungos tiveram um papel importante no aparecimento de novas espécies de plantas por meio do mutualismo, especialmente as plantas vasculares, a troca de materiais genéticos entre plantas e fungos durante a simbiose levou a adaptação das plantas ao ambiente terrestre (LEVEAU, 2009; BLACKWELL, 2000). A associação de plantas com fungos endofíticos levou estas a terem vantagens, contra outros microrganismos invasores, herbívoros e pragas de insetos (HAWKSWORTH, 1991).

1.4. Fungos Endofíticos.

Fungos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas, ocupando todas suas partes sem lhes causar danos aparentes (MELO & AZEVEDO, 1998). Fungos endofíticos foram descritos pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas, mas apenas por volta da década de 70 passaram a ser estudados por uma série de motivos, porém evidências baseadas em morfologia, química e relação com o hospedeiro apontam que os fungos endofíticos evoluíram de um ancestral similar aos dos fungos patogênicos nas plantas (CLAY, 1988). Diversos estudos vêm sendo conduzidos para que se possam distinguir infecções de plantas por endofíticos mutualistas de patógenos latentes (SCHULTZ et al., 2005). Os endofíticos não apresentam haustórios, estrutura comum em fungos fitopatogênicos e em geral, as infecções causadas por fungos endofíticos não produzem sintomas externos, podendo estar latentes ou serem

assintomáticas (PETRINI, 1981; CARROL, 1988, PETRINI, 1986). Mudanças no hospedeiro causadas por fatores de *stress* (biótico ou abiótico) podem induzir a transição de um estado simbiótico (mutualismo ou comensalismo) a trófico (parasitismo), passando o endofítico a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

A quantidade de fungos endofíticos em um tecido vegetal depende de diversos fatores como: a distribuição geográfica, idade do hospedeiro e espécies coexistindo no mesmo tecido. Os fungos endofíticos dão preferência a tecidos mais antigos do vegetal devido à inatividade metabólica no local além de certa forma evitar ataques de herbívoros que preferem tecidos mais novos (CARROL, 1988). Os fungos endofíticos podem estar presentes em todos os órgãos da planta hospedeira (PETRINI et al., 1992).

A colonização por um fungo endofítico pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica. Já que muitas destas associações têm se mostrado benéficas para ambos os organismos, o termo endofítico tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo (FAETH & HAMNON, 1997).

Nas associações simbióticas o tamanho, o formato, a expectativa de vida e o estágio de maturidade sexual da planta hospedeira obrigam fortemente o crescimento do fungo de acordo com o modelo do hospedeiro (SAIKKONEN et al., 2004). Aparentemente, o crescimento de fungos endofíticos é regulado pela atividade hormonal e a produção de quitinase pelo hospedeiro. As variações sazonais nas plantas também podem regular o crescimento dos fungos (WARDLAW, 1990). A simbiose entre planta e endofítico pode ser observada pela proteção e alimentação do fungo que, em contrapartida, produz substâncias bioativas (hormônios reguladores do crescimento, antimicrobianos, inseticidas e entre outras) que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (LU et al., 2000).

Há a hipótese de que a interação fungo endofítico e planta hospedeira seja caracterizada por um equilíbrio entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta. Se o balanço é perturbado por ambos, uma diminuição da defesa da planta ou aumento do poder de virulência do microrganismo pode desenvolver (SHULZ et al., 2002; SHULZ & BOYLE, 2005). Apesar do antagonismo balanceado, não se exclui a possibilidade que os endofíticos talvez possam promover benefícios ao hospedeiro, como por exemplo, através da indução de metabólitos secundários contra patógenos, secreção de fitohormônios e aumento da atividade metabólica da planta hospedeira (SHULZ & BOYLE, 2005).

O modo de reprodução dos fungos endofíticos para outros hospedeiros é de fundamental importância para a virulência e agressividade que esses microrganismos podem causar a planta hospedeira (SAIKKONEN et al., 1998). A maioria dos endofíticos são, provavelmente, transmitidos horizontalmente por esporos de planta para planta. Também podem ser transmitidos verticalmente através das sementes, e neste caso, a interação mutualística é acentuada através do aumento da adaptação da planta hospedeira com o estágio de germinação e também na fase adulta (Figura 1.4.1). Porém, a transmissão vertical pode reduzir a habilidade do fungo endofítico em infectar uma planta ainda não infectada, tanto assexuadamente ou sexuadamente, via esporos (SAIKKONEN et al., 2004).

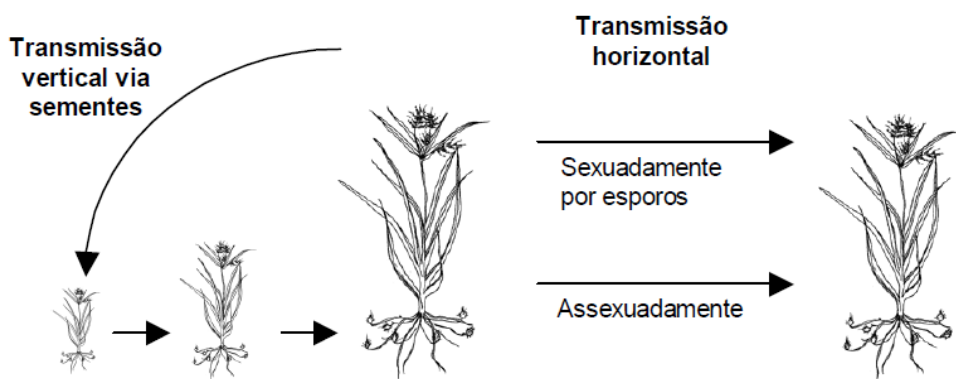


Figura 1.4.1. Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.
Fonte: SAIKKONEN et al., (1998).

Aparentemente um fungo endofítico utiliza o mesmo mecanismo de um fungo fitopatogênico para invadir o tecido da planta hospedeira (PASCHOLATI et al., 1998). Em geral os fungos endofíticos adentram as plantas por aberturas e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas são as raízes que ao penetrar mais profundamente no solo geram abrasões que facilitam a entrada de invasores. (DOBEREINER et al., 1993). Outras portas de entrada são aberturas naturais como estômatos e hidatóditos além de aberturas causadas por ataques de insetos (MELO & AZEVEDO, 1998). Ao adentrar estas aberturas o esporo eclode e libera a hifa do fungo que vai penetrando os tecidos do vegetal (MELO & AZEVEDO, 1998).

Ao atacar uma planta o fungo endofítico invasor ativa o sistema de defesa do hospedeiro que responde de distintas maneiras como o enrijecimento da parede celular com o acúmulo de lignanas ou desvio na biossíntese de seus metabólitos secundários de modo a produzir fitoalexinas (KEEN et al., 1982). Por outro lado o fungo invasor como forma de contra-ataque degrada enzimaticamente as fitoalexinas (Figura 1.4.2) (WELTRING et al., 1998).

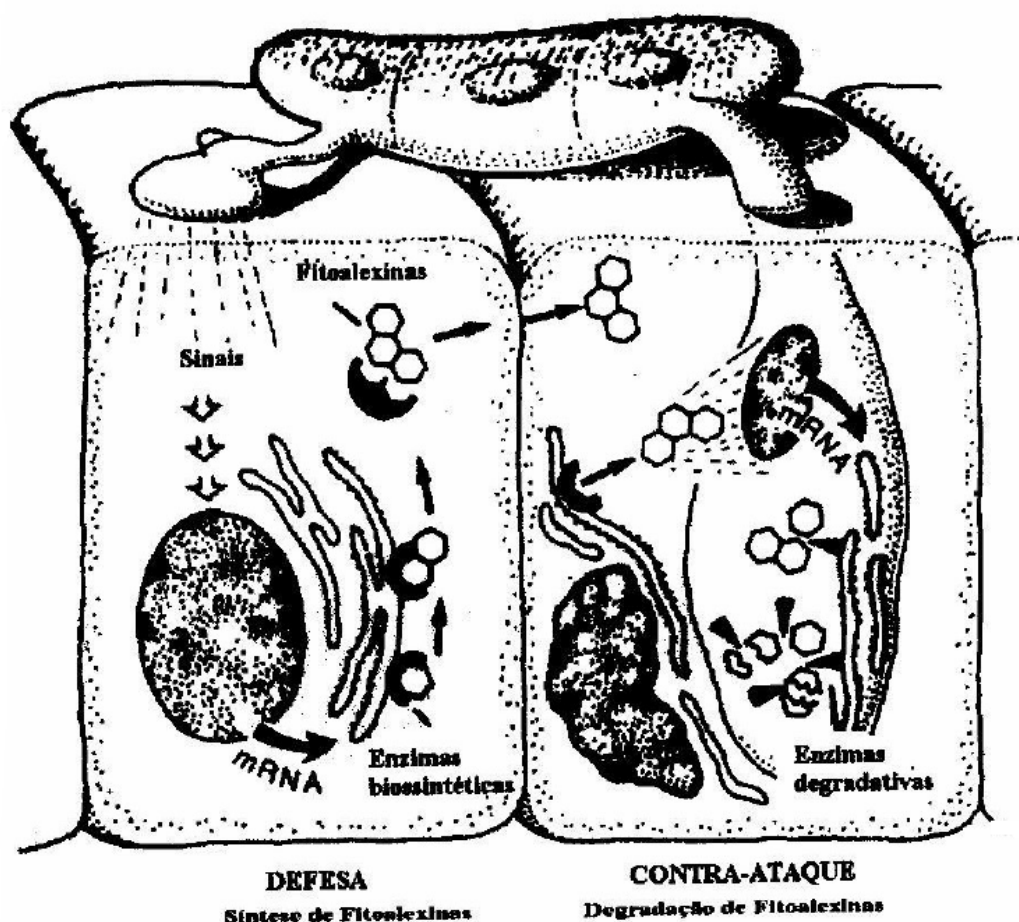


Figura 1.4.2. Esquemática do mecanismo de ataque de um microorganismo invasor a uma planta hospedeira.

Fonte: PASCHOLATI et al., (1998)

Os fungos endofíticos além de conferir diversas vantagens à sua planta hospedeira, também são fontes de novos metabólitos úteis à planta com diversas atividades biológicas benéficas (SURYANARAYANAN et al., 2009). Um dos casos mais comuns desta interação benéfica entre fungos endofíticos e plantas hospedeira é a toxicosis que atinge rebanhos de gado em países da Europa e dos Estados Unidos devido à ingestão de uma gramínea *Festuca arundinaceae* comum nos campos destas

regiões (QIN YUE et al., 2001). Os efeitos gerados pela ingestão de *F. arundinaceae* ao rebanho não são causados pela planta e sim pelo fungo *Neotyphodium coenophialum* um endófito que produz alcalóides do ergot nocivos ao gado (Figura 1.4.3) (MALINOWSKI et al., 1998).



Figura 1.4.3. Endófito *Neotyphodium coenophialum* associado a *Festuca arundinaceae*, único responsável pela produção de alcalóides que são ingeridos pelo gado.

Fonte: Modificado de www.wnwu.edu.

Um fenômeno tem chamado a atenção de pesquisadores do mundo todo nos últimos anos, aonde é descrito que diversos fungos endofíticos passaram a produzir metabólitos antes apenas produzidos por plantas ou vice e versa (HOEKSTRA, 2004). Este fenômeno é conhecido como “transmissão gênica horizontal” aonde um fragmento do material genético da planta é incorporado ao material genético do fungo endofítico de modo que este muda suas rotas biossintéticas e passa a produzir metabólitos exclusivos da hospedeira (HOEKSTRA, 2004).

Como exemplo deste fato pode-se citar o fungo *Gibberela fugikuroi*, um endofítico de *Curcubita máxima*, o qual se mostrou capaz de produzir derivados do ácido giberélico, um diterpeno com atividade hormonal de crescimento antes somente encontrado em plantas (HEDDEN et al., 2001). Outro exemplo deste fenômeno é o do fungo endofítico *Phialocephala fortinii*, isolado de *Podophyllum peltatum*, e também com o fungo *Trametes hirsuta* isolado de *Podophyllum hexandrum*. Ambos produzem uma substância antitumoral presente nas duas hospedeiras, a podofilotoxina (Figura 1.4.4) uma tetraarillignana com potente atividade citotóxica, mas que está em uma concentração muito baixa na planta, porém é obtida com bom rendimento na produção por fungos (EYBERGER et al., 2006; PURI et al., 2006).

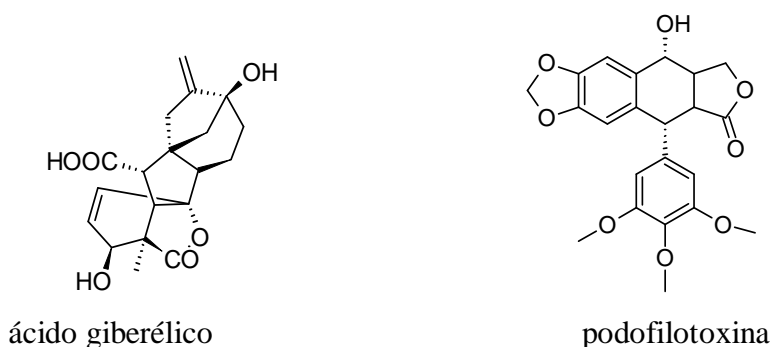


Figura 1.4.4. Estruturas químicas do ácido giberélico e da podofilotoxina.

Talvez o caso mais conhecido de transferência gênica horizontal de plantas para fungos endofíticos seja o da produção do diterpeno antitumoral taxol por *Taxomyces andreanae* isolado do caule da hospedeira *Taxus brevifolia* planta produtora do mesmo anticancerígeno (Figura 1.4.5) (STROBEL et al., 1996). O rendimento de taxol na planta *Taxus brevifolia* é muito baixo, (menor que 0,02 % da planta seca) (WANI et al., 1971) e devido a grande demanda dessa substância, certamente e principalmente por motivos ecológicos, a planta não pode ser uma fonte sustentável de taxol (STROBEL et al., 1996).

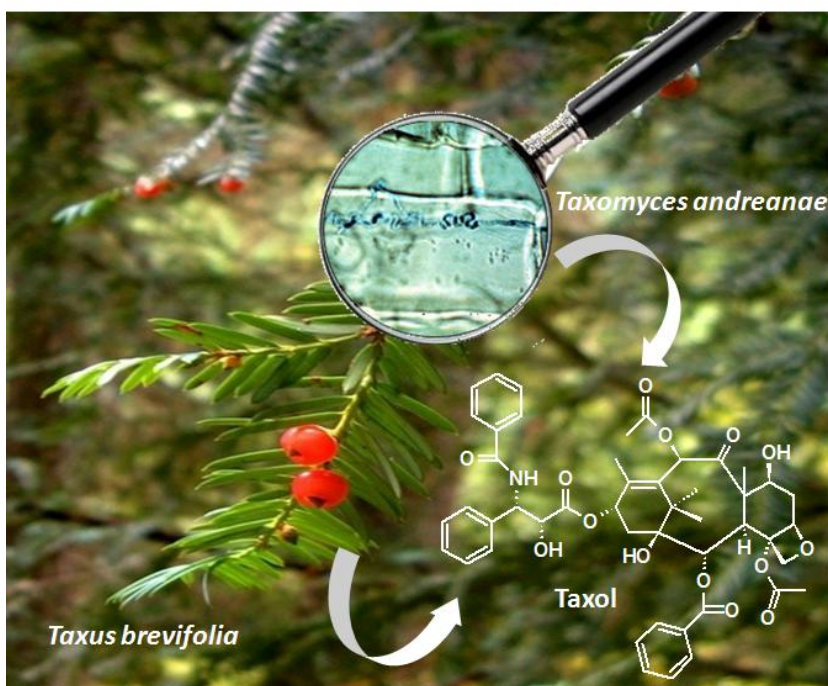


Figura 1.4.5. O fungo *Taxomyces andreanae* que por transmissão gênica horizontal com sua hospedeira *Taxus brevifolia* produz o diterpeno taxol.

Fonte: Modificado de www.worldbotanical.com.

O fato da hospedeira *Taxus brevifolia* não produzir quantidades significantes de Taxol aliada à descoberta de que um de seus endófitos produz taxol com melhores rendimentos, e a possibilidade de se manipular o microrganismo de modo a aumentar a produção da molécula de interesse impulsionou o estudo dos fungos endofíticos na busca de taxol. Em estudo conduzido por Li e colaboradores (1998) foi relatada a produção de taxol em *Periconia* sp. em associação com *Terreya grandifolia*, planta da mesma família do gênero *Taxus* mas que não é produtora de taxanos.

As conseqüências para essa troca de material genético podem ser observadas na biossíntese de moléculas idênticas às produzidas pela hospedeira ou na codificação de enzimas pelo novo material genético do fungo de modo a alterar as rotas biossintéticas nos fungos endofíticos dando origem a novas classes de metabólitos (STROBEL et al., 1996).

A química de fungos endofíticos vem ganhando destaque nos últimos com o isolamento de diversas moléculas com distintas atividades biológicas que podem vir a serem candidatos a fármacos, porém se considerado que existam por volta de 1,5 milhões de espécies e que apenas sejam descritas 5 % destas espécies, e que das espécies descritas apenas 16 % foram estudadas quanto sua capacidade de gerar fármacos (STROBEL, 2003).

1.5. O gênero *Penicillium*.

O gênero *Penicillium* possui mais de 150 espécies descritas (REDONDO et al., 2009), os membros deste gênero são no geral fungos filamentosos (exceto *P. marneffeii*), espécies deste gênero são encontradas em praticamente todos os ambientes. *Penicillium* spp. são saprófitas e popularmente são chamados de bolores por estarem entre as principais causas de deterioração de alimentos, a Tabela 1.5.1 apresenta a divisão taxonômica do gênero *Penicillium* (PITT, 1979)

Tabela 1.5.1. Informações taxonômicas sobre o gênero *Penicillium*.

| Categoria | Táxon |
|------------------|----------------|
| Reino | Fungi |
| Filo | Ascomycota |
| Classe | Eurotiomycetes |

| | |
|---------|--------------------|
| Ordem | Eurotiales |
| Família | Trichocomaceae |
| Gênero | <i>Penicillium</i> |

Espécies de *Penicillium* têm ramificações em seus conídios, os quais são redondos e unicelulares. Glucanos são comuns nas paredes celulares de espécies de *Penicillium*. Espécies de *Penicillium* tendem a ter pequenas hifas o que faz com que o movimento protoplasmático seja difícil de detectar. As hifas pequenas também levam a um menor crescimento das zonas periféricas. Os esporos de *Penicillium* spp. possuem uma superfície hidrofóbica, no entanto, são capazes de serem molhados, o que é necessário para a germinação. *Penicillium* spp. são osmoticamente tolerantes, o que significa que, embora eles crescem melhor com níveis de água elevados, são capazes de tolerar o baixo potencial hídrico (PITT, 1979) (Figura 1.5.1).

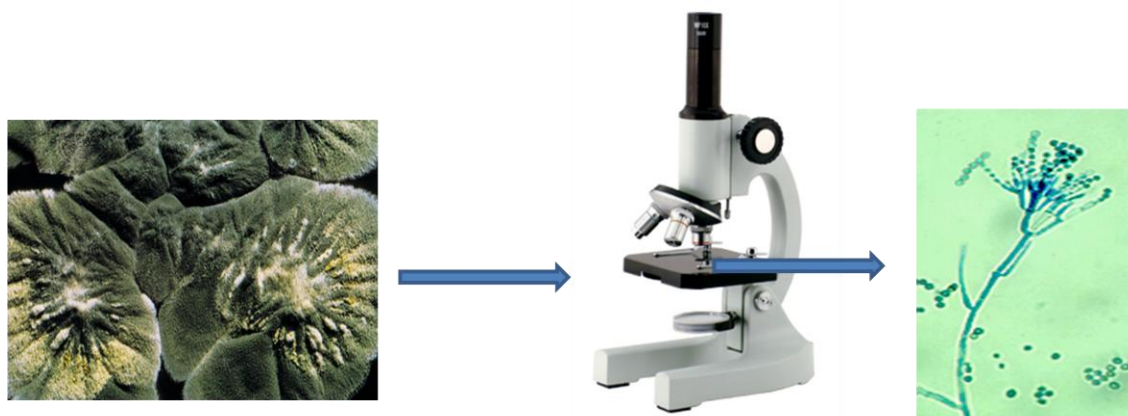


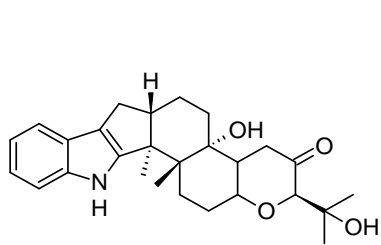
Figura 1.5.1. Cultura de *Penicillium notatum* e imagem ampliada de suas estruturas reprodutivas.

O gênero *Penicillium* é o mais estudado dentre todos os microrganismos, seus representantes produzem metabólitos de praticamente todas as classes, muitos deles sendo tóxicos (micotoxinas), diversas substâncias isoladas de *Penicillium* spp. possuem diversas atividades biológicas. A Tabela 1.5.2 apresenta alguns exemplos de substâncias encontradas nos extratos de *Penicillium* ao longo dos anos.

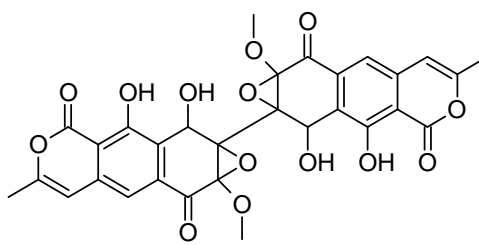
Tabela 1.5.2. Alguns metabólitos isolados de *Penicillium* spp. e suas atividades biológicas.

| Espécie | Metabólito | Atividade Biológica | Referência |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|--|
| <i>Penicillium paxilli</i> | paxilina | n.t. ^a | Penn et al., 1993 |
| <i>P. simplicissimum</i> | xantoe pocina | antibiótico | Igarashi et al., 2000 |
| <i>P. brocae</i> | brocaenol A | n.t. | Bubni et al., 2003 |
| <i>P. hesseltnei</i> | hesseltina | n.t. | Phipps et al., 2004 |
| <i>P. fellutanum</i> | fellutanina A | n.t. | Kozlovsky et al., 2000 |
| <i>P. decumbens</i> | versiol | Inibidor da melanina | Fujii et al., 2002 |
| <i>P. verruculosum</i> | roquefortina C verrucologenina | micotoxinas | Ihara & Fukomoto, 1995 |
| <i>P. expansum</i> | viridicatumtoxina | micotoxina | Horak et al., 1988 |
| <i>P. brasilianum</i> | preaustinóide A preaustinóide B | n.t. | Geris dos Santos & Rodrigues Filho, 2002 |
| <i>P. herquei</i> | neociclocitrinol | n.t. | Marinho et al., 2009 |
| <i>Penicillium</i> sp. | isocumarina | antifúngico | Lai et al., 1991 |
| <i>Penicillium</i> sp. | 7, 8-dimetil-iso-alloxazina | citotóxico | Wang et al., 2008 |
| <i>Penicillium</i> sp. | penicidona B | citotóxico | Ge et al., 2008 |
| <i>Penicillium</i> sp. | penicellenona | Antitumoral | Xu et al., 2007 |
| <i>P. verrucosum</i> | ácido arabeinóico | n.t. | Larsen et al., 1998 |
| <i>P. chrysogenum</i> | sorbicillactona A | antileucêmico | Brignman et al., 2005 |

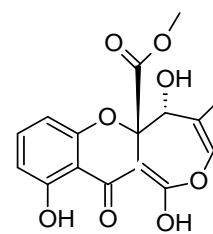
^a – não tem atividade biológica e/ou não foi testada.



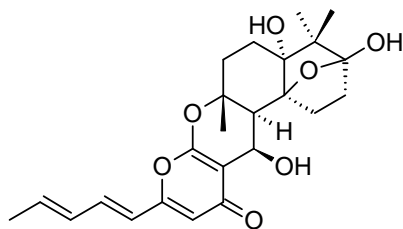
paxilina



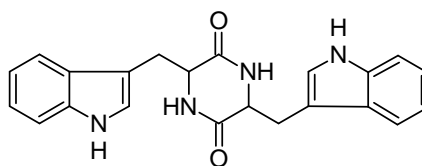
xantoeopocina



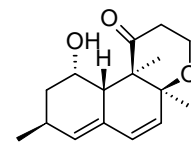
brocaenol A



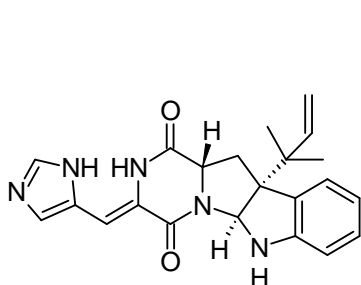
Hesseltina



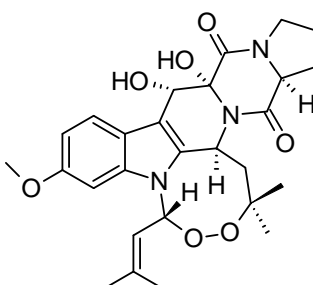
fellutanina A



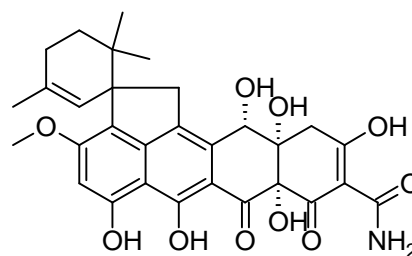
versiol



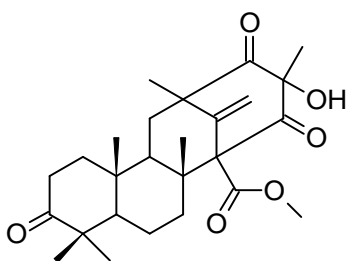
Roquefortina C



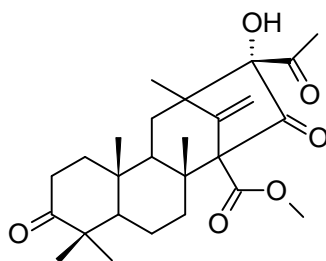
verrucalogenina



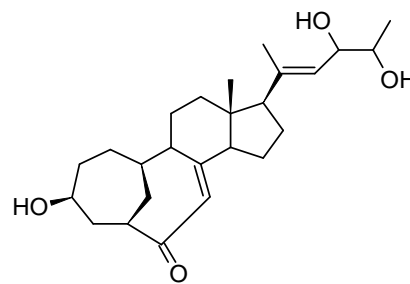
Viridicatumtoxina



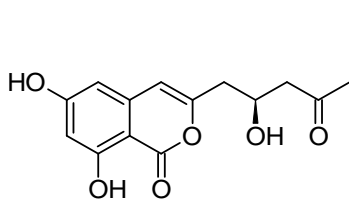
preaustinoide A



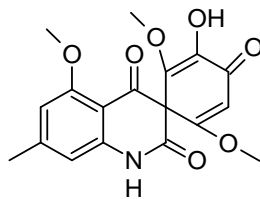
preaustinoide B



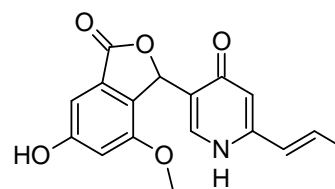
neociclocitrinol



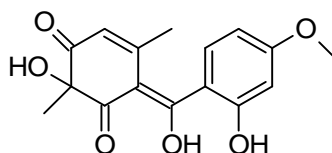
Isocumarina 1



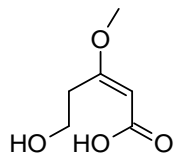
7, 8-dimetil-iso-alloxazina



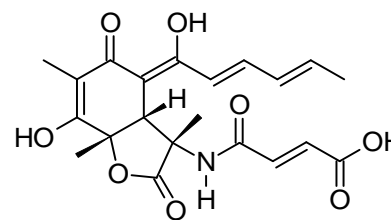
Penicidona B



Penicillenona



ácido arabenóico



sorbicillactona A

1.6. O gênero *Gliocladium*.

O gênero *Gliocladium* possui por volta de 15 espécies todas elas filamentosas e mitospóricas (REHNER & SAMUELS, 1994), fungos deste gênero são amplamente distribuídos no solo e na vegetação. As sinônimas para este gênero são *Acrostalagmus*, *Isaria* e *Verticillium*. O gênero *Gliocladium* possui como telemorfos fungos dos gêneros *Nectria*, *Hypocrea* e *Nectriopsis*. Fungos do gênero *Gliocladium* são saprófitas e por pertencerem a família Hypocreaceae são comumente confundidos com os gêneros *Trichoderma* e *Verticillium*. A Tabela 1.6.1 apresenta a divisão taxonômica do gênero *Gliocladium*.

Tabela 1.6.1. Informações taxonômicas sobre o gênero *Gliocladium*.

| Categoria | Táxon |
|------------------|--------------------|
| Reino | Fungi |
| Filo | Ascomycota |
| Classe | Sordariomycetes |
| Ordem | Hypocreales |
| Família | Hypocreaceae |
| Gênero | <i>Gliocladium</i> |

Fungos do gênero *Gliocladium* são comumente usados como agentes de biocontrole em associação com *Trichoderma* spp. para o combate de fungos fitopatogênicos como *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*. *Gliocladium* spp. são de rápido crescimento, e suas colônias possuem aspecto felpudo. O crescimento abrange toda a superfície da placa em cerca de uma semana. Pela frente, as colônias são brancas a creme, inicialmente, podendo tornar-se rosa ou verde-escuro quando esporulam (Figura 1.6.1) (REHNER & SAMUELS, 1994)

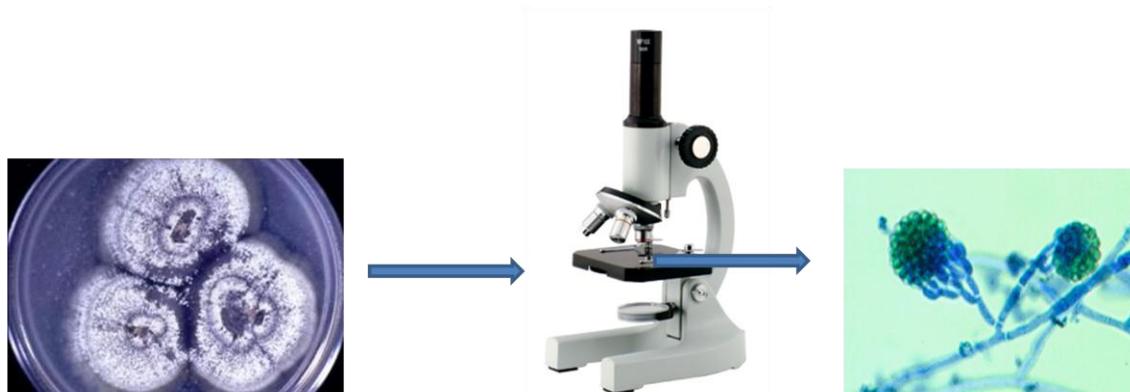


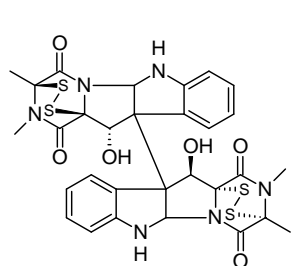
Figura 1.6.1. Cultura de *Gliocladium roseum* e imagem ampliada de suas estruturas reprodutivas.

Algumas espécies de *Gliocladium* possuem relatos de estudos químicos na literatura, entre as classes de substâncias isoladas de *Gliocladium* spp. encontram-se alcalóides piperazínicos, tetracíclicas, peptídeos, sesquiterpenos e poliprenóis. A Tabela 1.6.2 apresenta alguns exemplos de substâncias isoladas de *Gliocladium* spp.

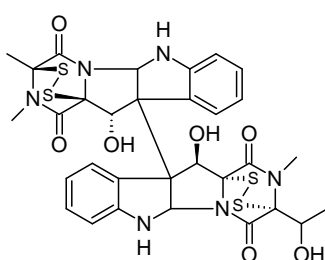
Tabela 1.6.2. Substâncias isoladas de *Gliocladium* spp.

| Espécie | Metabólito | Atividade Biológica | Referência |
|--------------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>Gliocladium roseum</i> | verticilina A | Nematocida | DONG et al., 2006 |
| | verticilina B | | |
| | verticilina C | | |
| | verticilina D | | |
| <i>Gliocladium</i> sp. | gliocladinina A | Antimicrobiano | GUO et al., 2007 |
| | gliocladinina B | | |
| <i>Gliocladium catenulatum</i> | glisoprenina A | Antimicrobiano | BIREN et al., 1999 |
| | glisoprenina B | | |

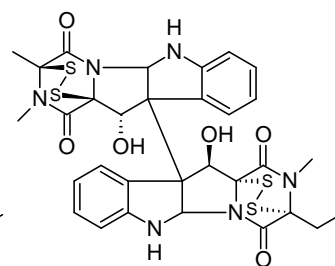
| | | | |
|---|---|-------------|-----------------------|
| | glisoprenina C | | |
| | glisoprenina D | | |
| | glisoprenina E | | |
| <i>Gliocladium</i> sp. | ácido secalônico | Citotóxico | REN et al., 2006 |
| | emodina | | |
| | citreorseína | | |
| | isorhodoptilometrina | | |
| <i>Gliocladium</i> sp. | ceto-clonostachydiol | Citotóxico | LANG et al., 2006 |
| | clonostachydiol | | |
| | gliotídeo | | |
| <i>Gliocladium</i> <i>virens</i> | viridina I | Micotoxina | GROVE et al., 1965 |
| <i>Gliocladium</i> <i>deliquescens</i> | bisditiobis(methyltio)gliotoxina | n.t. | KIRBY et al., 1980 |
| <i>Gliocladium</i> <i>virens</i> | ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-Dimetilalil-eter | n.t. | KIRBY et al., 1988 |
| <i>Gliocladium</i> <i>catenulatum</i> | TMC 151-A TMC 151-B | Antibiótico | KOHNO et al., 1999 |



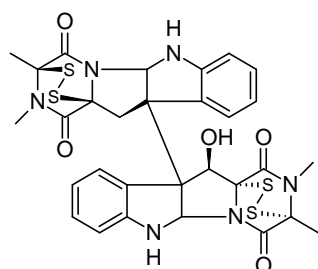
verticilina A



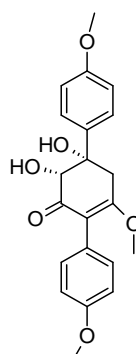
verticilina B



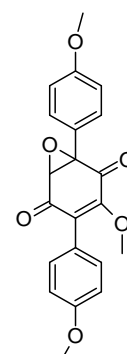
verticilina C



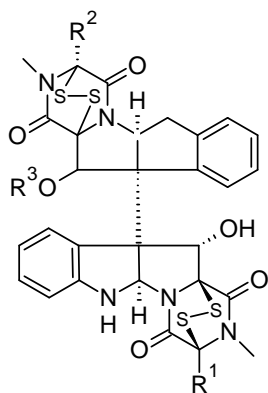
verticilina D



gliocladinina A



gliocladinina B



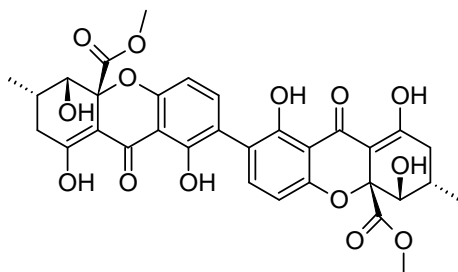
$R^1 = R^2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3, R^3 = \text{H}$

$R^1 = R^2 = \text{COCH}_3, R^3 = \text{H}$

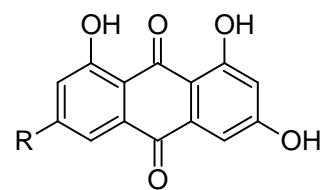
$R^1 = \text{COCH}_3, R^2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3, R^3 = \text{H}$

$R^1 = R^2 = \text{CH}_3, R^3 = \text{H}$

$R^1 = R^2 = \text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_3, R^3 = \text{H}$



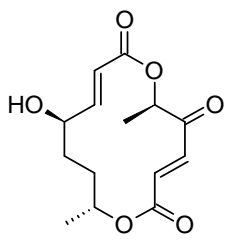
ácido secalônico



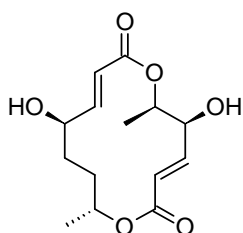
$R = \text{CH}_3$

$R = \text{CH}_2\text{OH}$

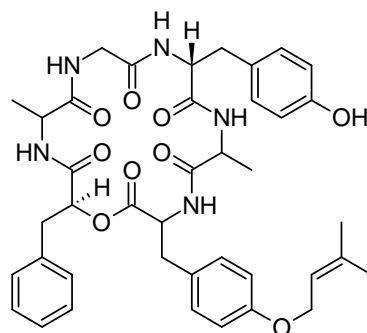
$R = \text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$



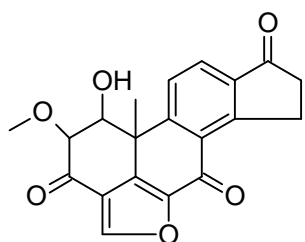
ceto-clonostachydiol



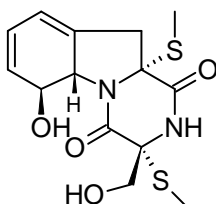
clonostachydiol



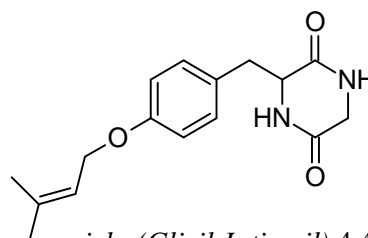
gliotideo



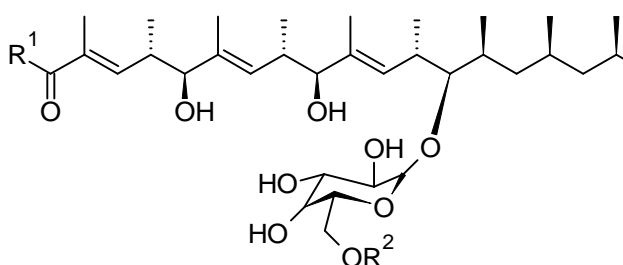
viridina I

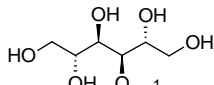


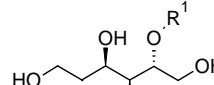
bisditiobis(methylthio)gliotoxina



ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-Dimetilalil-eter



$R^1 =$  $, R^2 = \text{H}$ TMC 151-A

$R^1 =$  $, R^2 = \text{H}$ TMC 151-A

1.7. A hospedeira *Mauritia flexuosa*.

A espécie *Mauritia flexuosa* popularmente conhecida como buriti pertencente a família Arecaceae, é uma palmeira de grande porte podendo chegar a até 25 metros de altura. *M. flexuosa* distribuiu-se por parte da América do Sul e parte da América Central (Figura 1.7.1) (RULL, 1998).



Figura 1.7.1. Distribuição geográfica da espécie *Mauritia flexuosa* pela América do Sul e Central. As áreas verdes do mapa assinalam a localização da espécie.

É encontrada no seu estado silvestre em várias formações vegetais, principalmente em áreas de inundação permanente ou periódica, em agrupamentos mais ou menos homogêneos, sobre solos hidromórficos, formando populações quase mono-específicas, às quais se dá o nome de buritizais Figura 1.7.2 (LORENZI et al., 2004). As folhas de *M. flexuosa* são utilizadas para cobertura de habitações e suas fibras na confecção de artesanatos bem diversificados (PASSOS & MENDONÇA, 2006), seu fruto de origem nativa é uma fonte de alimento para as populações de baixa renda, pois possui adequados valores nutricionais, destacando-se os carotenóides e o ácido ascórbico. O uso medicinal está associado ao óleo extraído da polpa dos frutos, com

propriedades energéticas e vermífugas, o óleo é usado contra queimaduras na pele, provocando alívio imediato e auxiliando na cicatrização (SILVA et al., 2001). O óleo dos frutos de *M. flexuosa* absorve radiações no espectro ultravioleta, sendo um eficiente filtro solar, tendo sido empregado recentemente pela indústria cosmética como um dos principais constituintes de sabonetes, cremes e xampus.



Figura 1.7.2. (A) Frutos de *M. flexuosa*, (B) Árvore com frutos, (C) Buritizal.

Estudos fitoquímicos com *M. flexuosa* são escassos na literatura, sendo encontrado apenas um estudo conduzido por Williams e Harborne (1973) aonde foram apenas detectados flavonóides e leucoantocianidinas (Figura 1.7.3) nas folhas por meio de comparação com padrões, porém nenhum metabólito foi isolado.

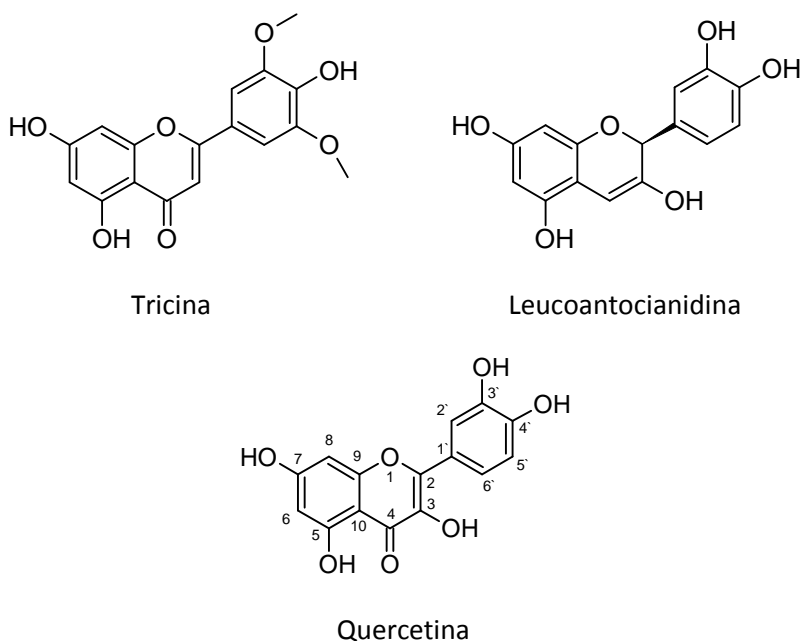


Figura 1.7.3. Flavonóides e leucoantocianidina das folhas de *M. flexuosa*.

1.8. A hospedeira *Strychnos cf. toxifera*.

O gênero pantropical *Strychnos* pertencente a família Loganiaceae compreende cerca de 200 espécies sendo pelo menos 73 destas encontradas na América do Sul (PHILIPPE et al., 2004). Plantas do gênero *Strychnos* L. (Loganiaceae) são conhecidas desde há muito tempo devido às propriedades farmacológicas das substâncias presentes em algumas de suas espécies. Esses princípios em geral curarizantes nas espécies americanas (Silva et al, 2005). O curare é um veneno de origem vegetal preparado por algumas tribos de índios que vivem nas regiões montanhosas e cobertas de matas da América Equatorial. O curare tem aspecto de alcatrão, possui sabor muito amargo e é produzido por dois grupos de plantas: das do gênero *Chondrodendron* (Menispermaceae) e *Strychnos* (Loganiaceae) (Figura 1.8.1) (PHILIPPE et al., 2004).

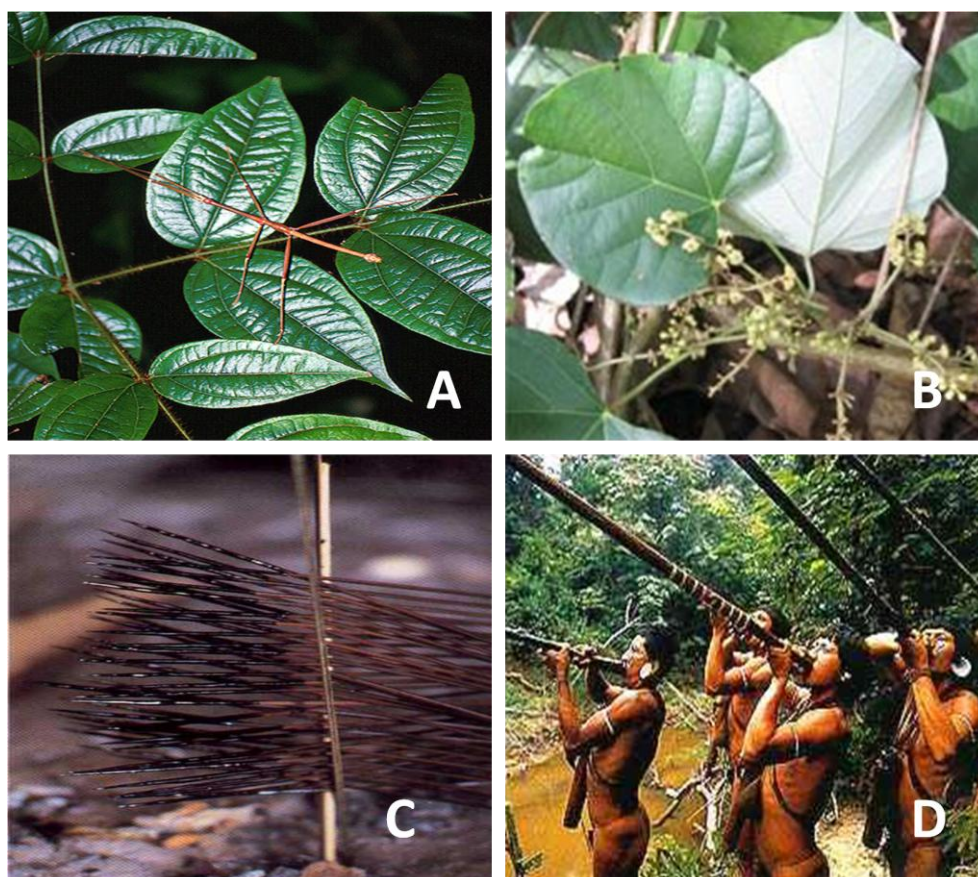


Figura 1.8.1. (A) *Strychnos toxifera*, (B) *Chondrodendron tomentosum*, (C) Dardos envenenados com Curare, (D) Índios caçando com zarabatanas.

Embora várias espécies sejam tóxicas, muitas vêm sendo utilizadas popularmente para diversas afecções. A maioria das espécies usadas popularmente é empregada na forma de chá das folhas ou cascas, com as subseqüentes ações farmacológicas: estimulante e tônica (*S. acuta*, *S. brasiliensis*, *S. guianensis*, *S. pseudoquina*, *S. rubiginosa* e *S. trinervis*), antipirética e antimalárica (*S. brasiliensis*, *S. fendleri* e *S. pseudoquina*), analgésica e antireumática (*S. javariensis*, *S. panamensis* e *S. tansentosa*), espasmolítica (*S. toxifera*), no tratamento de doenças venéreas (*S. erichsonii*), como abortiva (*S. erichsonii*), como afrodisíaca (*S. erichsonii*, *S. melinoniana*, *S. mitscherlichii* var. *mitscherlichii*, *S. nigricans* e *S. oiapocensis*) e no tratamento da anemia (*S. guianensis*) (ANGENOT et al., 1990; FREDERICH et al., 2000).

A espécie *Strychnos toxifera* (Figura 1.8.2) é a que apresenta maior toxicidade dentre todas as espécies do gênero que são utilizadas na confecção do curare. Como principais constituintes desta espécie destacam-se os alcalóides indólicos (ANGENOT et al., 1992). Seus constituintes são no geral tóxicos, entretanto a normasquina possui atividade sedativa, a bisnordiidrotoxiferina possui atividade antimicrobiana e antidiarréica e a curacurina II é um poderoso relaxante muscular (Figura 1.8.3) (ANGENOT et al., 1990).



Figura 1.8.2. Exsicata de *Strychnos toxifera*.

Fonte: www.drugs.infohealth.info.

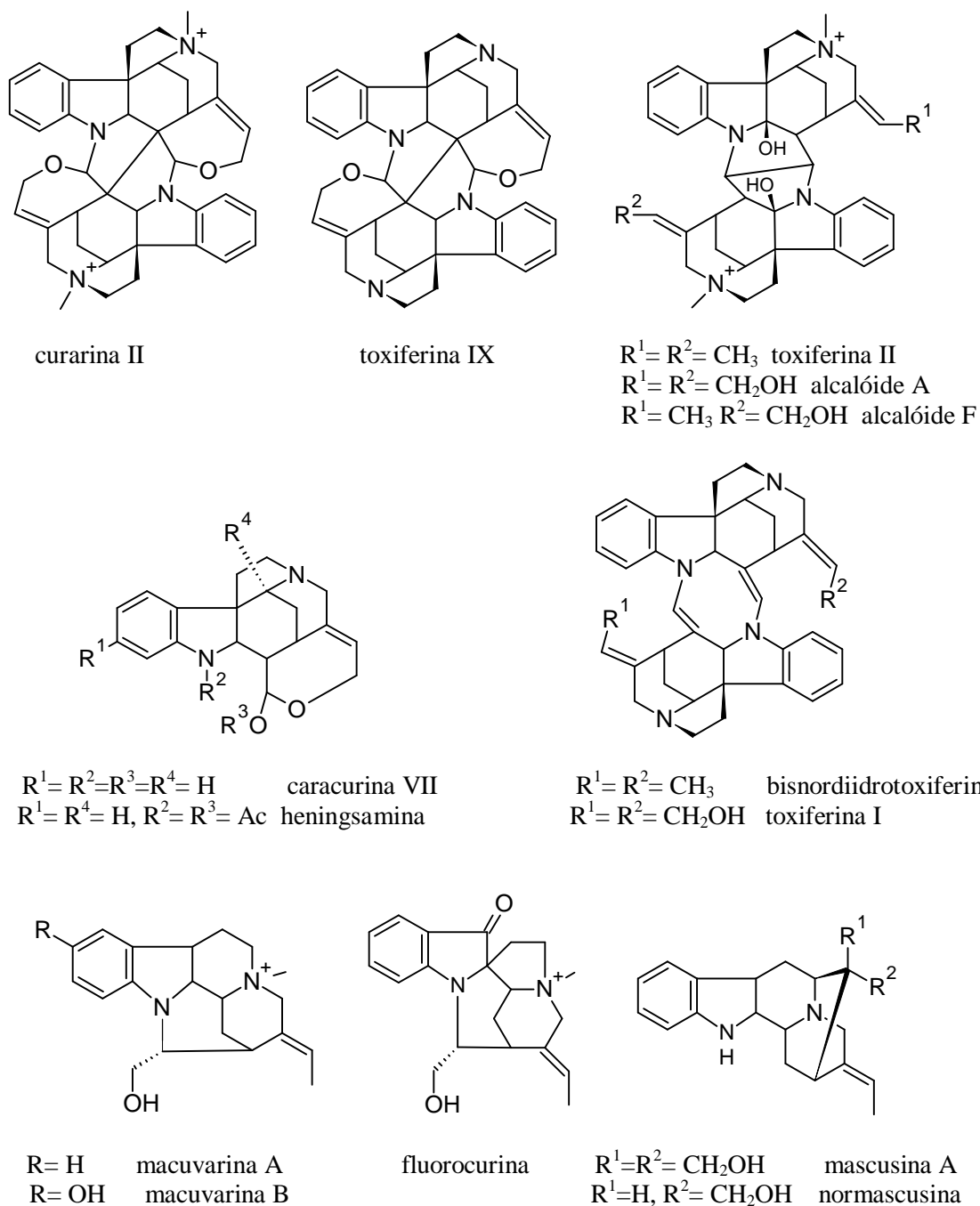


Figura 1.8.3. Alcalóides isolados de *Strychnos toxifera*.

1.9. Perfil químico por inserção direta em espectrômetro de massas.

O estudo dos metabólitos de microrganismos compreende uma matriz complexa, o que requer uma técnica uma boa sensibilidade de detecção, bem como os obstáculos da classificação taxonômica dos fungos, de modo que diversas pesquisas quimiotaxonômicas têm sido desenvolvidas (SOUZA, 2005). O perfil dos metabólitos secundários produzidos por cada espécie de fungo tem sido uma importante ferramenta na taxonomia. Um método simples por CCD foi desenvolvido por Filtenborg e colaboradores (1983) como uma das primeiras ferramentas quimiotaxonômicas. Uma análise mais seletiva de metabólitos fúngicos baseado em HPLC/DAD realizada por Frisvad e colaboradores (1987) incluiu mais de 350 metabólitos. Um número crescente de estudos e aplicações tem utilizado espectrometria de massas com ionização por eletronspray (ESI-MS) como uma ferramenta sensível para a análise de uma ampla gama de compostos polares de baixo peso molecular como metabólitos de drogas e metabólitos secundários de origem vegetal ou de microrganismos (POON et al., 1993).

A utilização da espectrometria de massas tem sido fundamental para a taxonomia dos fungos, em trabalho desenvolvido por Overy e Frisvad (2003) duas novas espécies de *Penicillium* (*P. tulipae* e *P. radícícola*) foram descobertas com o auxílio de perfis químicos por espectrometria de massas com comparação com outras espécies já conhecidas. Outro aspecto importante relativo a espécies desconhecidas é a questão da segurança em alimentos e fungos neles presentes que produzem micotoxinas. Deste modo a descrição de novas espécies bem próximas a aquelas já conhecidas podem indicar literaturas com informações inconsistentes sobre a produção de micotoxinas (BOYSEN et al., 1996). Isto pode ser claramente verificado no caso do fungo *Penicillium roqueforti* de onde surgiram duas novas espécies: *P. carneum* e *P. paneum* descritos recentemente com base em dados morfológicos, mas principalmente em perfil dos metabólitos secundários produzidos em análises por LC/MS, aonde ambas produziam a micotoxina patulina enquanto *P. roqueforti* não a produz (Figura 1.9.1) (NIELSEN et al., 2005).

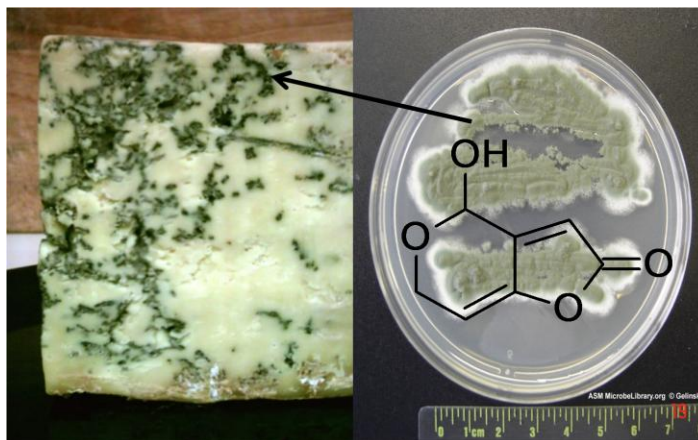


Figura 1.9.1. *Penicillium roqueforti* crescendo em Queijo Roquefort em associação com a nova espécie *P. paneum* produtora da micotoxina patulina.

Com a chegada da espectrometria de massas com ionização (ESI-MS) e as técnicas associadas a cerca de 15 anos obteve-se uma ferramenta maravilhosa para os estudos de produtos naturais e outras biomoléculas. ESI-MS tem a vantagem de ser uma técnica de ionização suave e sensível, que pode ser otimizado para produzir principalmente íons protonados ou adutos de sódio (SMEDSGAARD E FRISVAD, 1996). Estes mesmos autores tomaram vantagem da fragmentação limitada no modo ESI/MS de modo a desenvolver uma técnica rápida de impressões digitais onde perfis de massas são determinados por inserção direta de extratos fúngicos brutos. As vantagens da obtenção de impressões digitais por infusão direta por espectrometria de massas são: impressões digitais podem ser obtidas em minutos, estruturas químicas podem ser preditas e os dados podem ser facilmente armazenados em bancos de dados (SMEDSGAARD, 1997). O número de informações obtidas pela técnica de inserção direta em espectrômetro de massas é muito grande, tornando-se necessária a utilização de computadores para o tratamento dos dados, por meio de quimiometria, isto se deve a grande variedade de compostos existentes nos extratos brutos, por meio da quimiometria o agrupamento das linhagens e posterior interpretação dos resultados se tornam simples.

Em trabalho conduzido por Smedsgaard e colaboradores (2004) a inserção direta de extratos brutos de 8 espécies de *Penicillium* majoritárias encontradas em esterco (das séries *Claviformia* e *Urticicolae*) e duas linhagens não pertencentes derivadas de outras fontes não pertencentes a estas séries (*Penicillium atramentosum* e *P. formosanum*) por meio de análises de ``cluster`` permitiu o agrupamento destas com base nos perfis de seus metabólitos secundários (Figura 1.9.2).

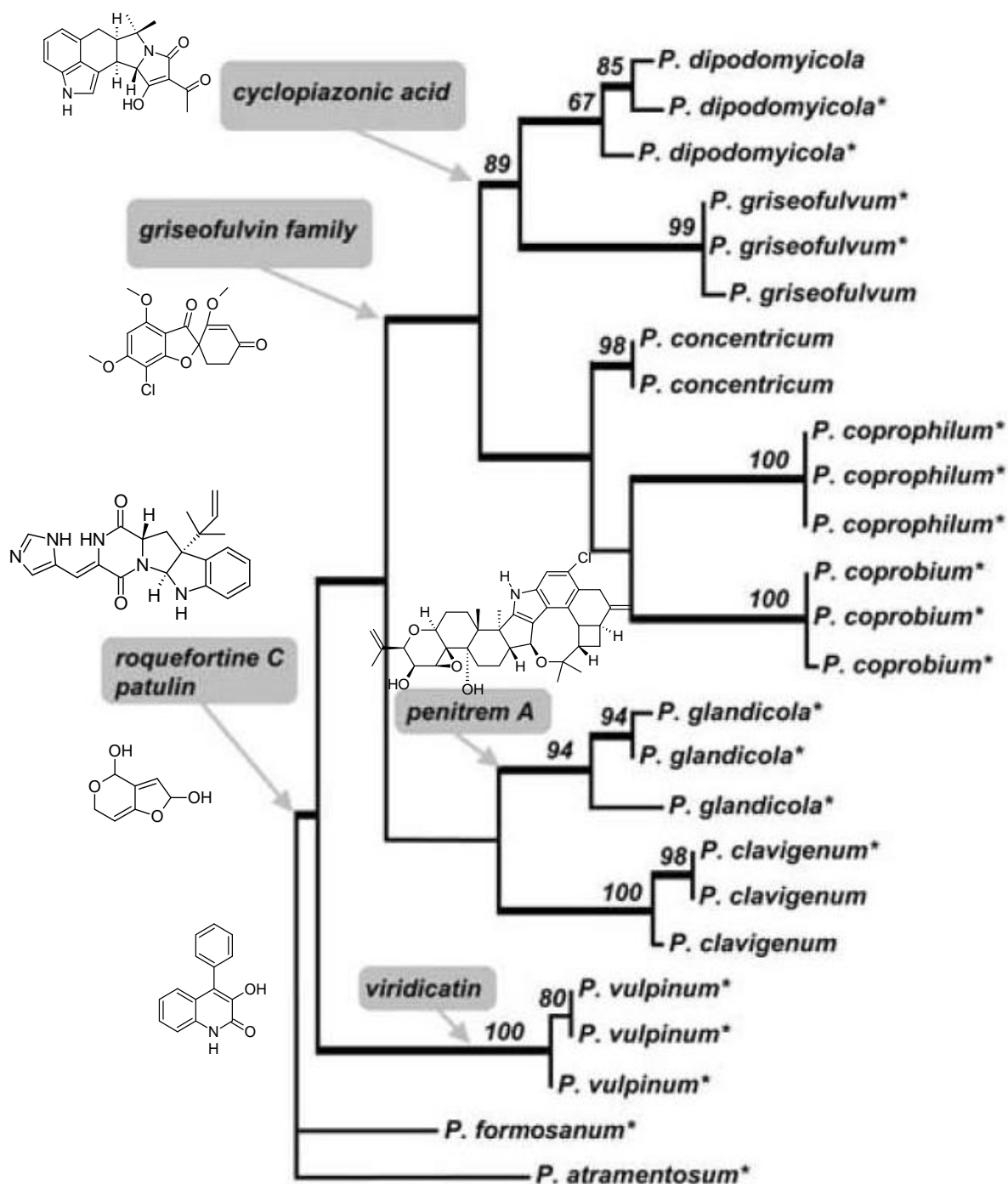
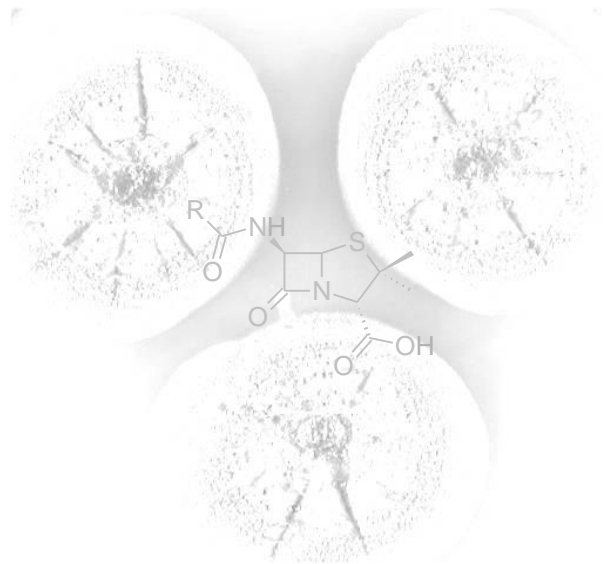


Figura 1.9.2. Classificação das oito espécies de *Penicillium* e comparação com as linhagens externas baseados nos metabólitos presentes em seus extratos brutos.

2.OBJETIVOS



2.1. Geral

Realizar o estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados às plantas *Mauritia flexuosa* e *Strychnos cf. toxifera*.

2.2. Específicos

Isolar e identificar por características morfológicas fungos isolados das plantas *Mauritia flexuosa* e *Strychnos cf. toxifera*.

Cultivar em pequena escala os fungos isolados das espécies *M. flexuosa* e *Strychnos cf. toxifera* de modo a ensaiar seus respectivos extratos quanto sua atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais.

Testar os mesmos extratos quanto as atividades antioxidante, antiacetilcolinesterase, antimicrobianos e antifúngicos.

Cultivar em larga escala os fungos que apresentarem melhores resultados nos testes de atividade biológica.

Isolar e identificar os constituintes químicos dos fungos cultivados em larga escala.

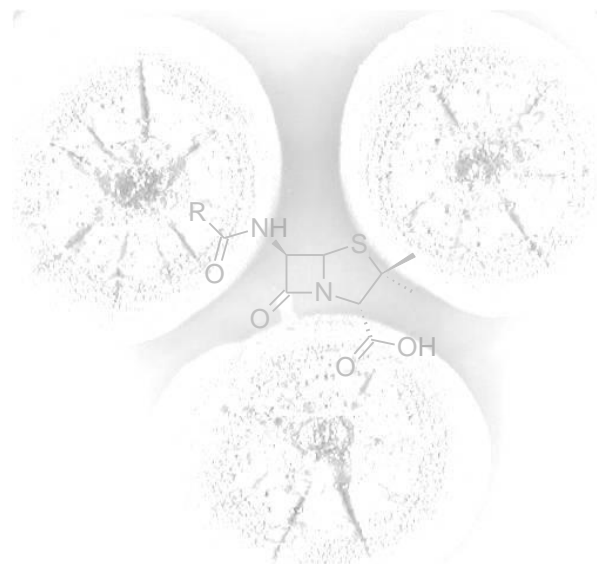
Realizar o estudo fitoquímico da hospedeira *Mauritia flexuosa*.

Ensaia os extratos de *M. flexuosa* contra *Artemia salina* e avaliar a atividade antioxidante em testes quantitativos.

Realizar o estudo de perfis químicos por APCI-MS de todas as linhagens de *Penicillium* spp. obtidas das plantas hospedeiras.

Agrupar os dados de perfis químicos utilizando métodos quimiométricos de análise.

3.PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS



3.1. Materiais e equipamentos

3.1.1. Material vegetal utilizado para o isolamento de fungos endofíticos

- Raízes, casca das raízes, caule, casca do caule e folhas de *Strychnos cf. toxifera*.
- Raízes de *Mauritia flexuosa*.

3.1.2. Materiais utilizados para o isolamento e cultivo de fungos endofíticos.

- Água destilada
- Álcool 70%
- Alça de cole e agulha de platina, cabo de bisturi nº 21
- Lâminas de bisturi
- Pinça
- Placas de Petri
- Erlenmeyeres de 50, 250, 500 e 1000 mL
- Espátulas diversas
- Batata portuguesa
- Ágar bacteriológico – Biosystems®
- Hipoclorito de Sódio 3% - Nuclear®
- Glicerol P.A. - Nuclear®
- Dextrose – Nuclear®
- Extrato de levedura – Biosystems®
- Extrato de malte – Biosystems®
- Amido de milho - YOKI®
- Aveia - QUAKER®
- Cetoconazol – Neo Química®
- Tetraciclina – Neo Química®
- Amoxicilina - Medley®
- Acetato de Etila P.A. - Tedia®
- *Iso*-Propanol grau HPLC – Tedia®
- Metanol P.A. - Tedia®
- Papel de filtro
- Ponteiras de 100 e 1000 µL
- Laminas de vidro
- Lamínulas 18 x 18 mm
- Funil de vidro
- Tubos criogênicos
- Tubos de ensaio de 15 x 180 mm
- Óleo mineral

3.1.3. Equipamentos utilizados para o isolamento e cultivo de fungos endofíticos.

- Capela de Fluxo Laminar – Tecnal®
- Estufa Incubadora de laboratório com demanda bioquímica de oxigênio – Tecnal®
- Autoclave Vertical – Stermax®

- Microscópio Óptico Comum – Nikon[®]
- Balança analítica - Shimadzu[®]
- Estufa Incubadora rotatória de laboratório com demanda bioquímica de oxigênio - Tecnal[®]

3.1.4. Materiais e equipamentos utilizados nos estudos químicos.

- Rotoevaporador - Marconi[®]
- Balança analítica - Shimadzu[®]
- Sonicador – Tecnal[®]
- Pipetadores automáticos - Eppendorff[®]
- Moinho de facas
- Vanilina - Merck[®]
- Ácido sulfúrico P.A. – Tedia[®]
- Bomba a vácuo – v-500, Buchi[®]
- Chapa aquecedora – C-MAG H57, IKA[®]
- Lâmpada de U.V. 254 e 396 nm
- Estufa – TE-393/2, Tecnal[®]

3.1.5. Suportes cromatográficos.

- Cromatografia em camada delgada analítica: Sílica gel em folhas sobre alumínio – Merck[®] e Macherey-Nagel[®]
- Colunas cromatográficas para cromatografia líquida de baixa pressão: sílica gel 230-400 mesh (flash), sílica gel 70-230 mesh (comum) - Silicycle[®], sephadex LH-20 - Aldrich[®].
- Colunas cromatográficas para cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico:
 - Synergi Fusion _RP 80, 4 μ (part number 00G-4424-E0) tamanho 250 x 4,60 mm - Phenomenex[®].
 - Luna Phenyl-hexyl (fase reversa), 5 μ (part number 00G-4257-E0) tamanho 250 x 4,60 mm - Phenomenex[®].

- Colunas cromatográficas para cromatografia líquida de alta eficiência em modo preparativo:

- Synergi Fusion_RP 80, 4 μ , tamanho 250 x 21,20 mm.
- Luna Phenyl-hexyl, 5 μ , tamanho 250 x 21,20 mm.

3.1.6. Cromatógrafos.

- Cromatógrafo líquido modo analítico - Shimadzu[®], bomba LC10AD gradient pumps, Detector de UV (PDA) SPD-10A, módulo de comunicação detector/computador CBM-10A, autoinjeter SIL-10ADVp.
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massas - Shimadzu[®] GCMS-QP2010 plus, coluna capilar DB-5, gás de arraste hélio, temperatura do forno 250 °C, aquecimento a 1°C/min até 290 °C.

3.1.7. Espectrômetros.

- Espectrômetro de RMN BRUKER[®] DRX-400.
- Espectrômetro de RMN BRUKER[®] ARX-200.
- Espectrômetro de RMN VARIAN[®] INOVA-500.
- Espectrômetro de Massas QuattroLC-MICROMASS[®], triplo-quadrupolo, *ESI*.
- Espectrômetro de Massas LCQ *fleet* - THERMO[®], íon-trap, *APCI*.
- Espectrômetro de Massas TSQ *quantum* - THERMO[®], triplo-quadrupolo, *APCI*.

3.1.8. Solventes empregados.

- Solventes grau HPLC para cromatografia de alta eficiência: acetonitrila e *iso* – propanol MALLINCKRODT[®] e TEDIA[®], metanol J. T. BAKER[®] e TEDIA[®], água purificada em sistema MILLI-Q[®].
- Solventes deuterados para análise em RMN: clorofórmio e metanol: Cambrigde Isotope Laboratories[®], Inc.

3.1.9. Materiais e equipamentos utilizados nos ensaios biológicos

- Caldo sabouraud - Biosystems[®]
- Ágar bacteriológico – Biosystems[®]
- Dimetilsulfóxido - TEDIA[®]
- Cetoconazol - Medley[®]
- Agitador de tubos – Eppendorff[®]
- Placas de Eliza com 96 poços
- Corante Azul de lactofenol
- Corante resazurina
- Caldo Mueller Hinton - Criterion[®]
- Placas de Eliza com 96 poços
- Solução de H₂SO₄ a 1%
- Solução de BaCl₂ a 1%
- Norfloxacin - Medley[®]
- Tetraciclina - Medley[®]

3.2. Procedimento experimental do isolamento e preservação dos fungos endofíticos.

3.2.1. Preparo dos meios de cultura.

a) BDA – Batata, dextrose e agar:

| | |
|-----------------------------|-------|
| Batata portuguesa sem casca | 200 g |
| Dextrose | 20 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1 L |
| Extrato de levedura | 2g |

As batatas foram cortadas em cubos com aproximadamente 15 x 15 mm e levadas ao microondas em copo de béquer com água destilada suficiente para cobrir os cubos, e cozida por 20 minutos em potência alta. O caldo foi filtrado com coador de pano e o volume completado com água destilada. Foram acrescentadas dextrose, ágar e extrato de levedura após isto o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min.

b) ISP2 (*International Streptomyces Project*)

| | |
|---------------------|------|
| Amido de milho | 10 g |
| Extrato de levedura | 4 g |
| Extrato de Malte | 10 g |
| Dextrose | 4 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1 L |

O amido de milho, os extratos de levedura e malte, a dextrose e o ágar foram pesados e colocados em um erlenmeyer. Foi adicionada água destilada e o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos para esterilização.

c) AVEIA

| | |
|---------------------|------|
| Aveia em flocos | 10 g |
| Extrato de levedura | 4 g |
| Extrato de Malte | 10 g |
| Dextrose | 4 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1 L |

A aveia, os extratos de levedura e malte, a dextrose e o ágar foram pesados e colocados em um erlenmeyer. Foi adicionada água destilada e o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos para esterilização.

d) BHI (*Brain Heart Infusion*)

| | |
|----------------|------|
| Extrato BHI | 10 g |
| Dextrose | 4 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1 L |

O extrato pronto de BHI, a dextrose e o ágar foram pesados e colocados em um erlenmeyer. Foi adicionada água destilada e o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos para esterilização.

e) Sabouraud – Ágar

| | |
|-------------------|------|
| Extrato Sabouraud | 10 g |
| Dextrose | 4 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1 L |

O extrato pronto de Sabouraud, a dextrose e o ágar foram pesados e colocados em um erlenmeyer. Foi adicionada água destilada e o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos para esterilização.

3.2.2. Preparo dos antibióticos e antigúngicos.

Em uma câmara asséptica 500 mg de tetraciclina dissolvidas em 5 mL de água autoclavada e 5 mL de solução de EtOH 70%, para a amplicilina e o cetoconazol estes foram apenas diluídos em água destilada autoclavada nas concentrações de 50 mg/mL.

3.2.3. Coleta do Material Botânico

As plantas hospedeiras *Mauritia flexuosa* e *Strychnos cf. toxifera* foram coletadas em 2008 na mata do setor norte do campus da Universidade Federal do Amazonas (localização geográfica S 03° 05` 33`` e W 59° 57` 47``) (Figura 3.2.1). No local da coleta o material foi lavado com água destilada autoclavada e armazenado em sacos plásticos.



Figura 3.2.1. Local da coleta na mata do campus da UFAM.

Fonte: Arquivo pessoal

Foram coletados da espécie *M. flexuosa* apenas fragmentos das raízes aéreas que estavam submersas, enquanto que de *Strychnos cf. toxifera* (Figura 3.2.2) que se apresentou na forma de um cipó que estava enrolado no tronco de *M. flexuosa* foram coletados fragmentos das folhas, casca do caule, caule, e raízes. Uma nova coleta foi realizada em 2010 no Km 106 da rodovia AM-010 (Figura 3.2.3) aonde foram coletadas as raízes de sustentação e raízes aéreas de *M. flexuosa* para estudos fitoquímicos.



Figura 3.2.2. *Strychnos cf. toxifera*.
 Fonte: Arquivo pessoal



Figura 3.2.3. Local da coleta no Km 106 da rodovia AM-010.
 Fonte: Arquivo pessoal

3.2.4. Esterilização do Material Botânico

O material botânico coletado foi lavado com detergente neutro e água corrente em abundância para assepsia externa. Em câmara asséptica os fragmentos foram imersos em EtOH 70% por 1 mim, seguido de hipoclorito de sódio 3% por 4 mim, EtOH 70% por 30 segundos exceto para as raízes de *Strychnos* que ficaram imersas em EtOH 70% por mais de 2 minutos devido a fragilidade do tecido, em seguida lavado com água destilada autoclavada até o momento da inoculação. Com um bisturi os fragmentos foram cortados em pequenos pedaços de 4 mm x 4 mm e inoculados em placas de petri contendo meios de cultura apropriados para o crescimento de fungos ou bactérias. Alíquotas de 50 µL dessa água foram espalhadas em placas controleno mesmo meio de cultura para o controle da assepsia de acordo com a metodologia de Souza e colaboradores, (2004).

3.2.5. Técnica de Tween e Cultura Monospórica.

Os fungos que apresentaram conídios foram purificados pela técnica de tween (AZEVEDO E COSTA, 1973). Uma porção de conídios do fungo foi imersa em um tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de tween 0,05% autoclavada. Desta suspensão de células foram retirados 1 mL para outro tubo contendo 9 mL de água destilada autoclavada. Esse processo denominado diluição seriada prosseguiu até o total de cinco tubos contendo 9 mL de água cada. De cada uma das diluições a 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram retirados 50 µL e plaqueados em triplicata no meio de cultura de origem do fungo. Após 48 horas retirou-se uma cultura originada de uma única célula, transferiu-se para outra placa de petri com meio selecionado e incubou-se em estufa BOD a 26 °C para o desenvolvimento do microrganismo e posterior preservação (Figura 3.2.4).

Os fungos que não apresentaram conídios foram purificados por repiques sucessivos, diluições e/ou com uso de antibióticos, nos casos aos fungos contaminados por bactérias.

3.2.6. Conservação dos fungos isolados.

Os fungos isolados foram conservados por três métodos: Castellani, glicerol 10% e óleo mineral a fim de compor a coleção de endófitos do GEMMA (Grupo de Estudos de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia) e para uso futuro dos mesmos em

estudos químicos e biológicos. A metodologia de Castellani (1939) consiste em armazenar, em triplicata, cinco pequenos blocos de meio de cultura contendo hifas e conídios em ampolas de vidro estéreis de 13 mL contendo 8 mL de água destilada autoclavada. A metodologia que utiliza glicerol 20% consiste em preparar soluções de esporo em cinco microtubos de 2 mL com 1,5 mL solução de água com glicerol (SOUZA, 2005). Para a terceira metodologia cada fungo foi inoculado em dois tubos de ensaio com meio de cultura inclinado, onde permaneceram até a sua esporulação. Após este período foi acrescentado óleo mineral autoclavado até encobrir a colônia.

3.2.7. Identificação dos fungos isolados

As identificações dos microrganismos foram realizadas baseando-se nas características macro e micromorfológicas. Para observar os aspectos micromorfológicos foi feito o microcultivo do fungo em placa de petri, em três pontos bem separados e cobrindo dois destes com uma lamínula de vidro esteril. Após incubação em BOD a 26 °C até o crescimento das hifas e dos conídios, foi retirada uma das lamínulas para observação em microscópio óptico e análise de suas formas vegetativas e reprodutivas, caso a lamínula não estivesse ainda com as estruturas reprodutivas, a segunda lamínula era retirada depois de um período em que as estruturas desejadas pudessem ser observadas. O tempo decorrido para a retirada das lamínulas foi de acordo com os aspectos fisiológicos de cada indivíduo. Os resultados das observações macro e micromorfológicas foram comparados com chaves morfológicas de identificação de fungos.

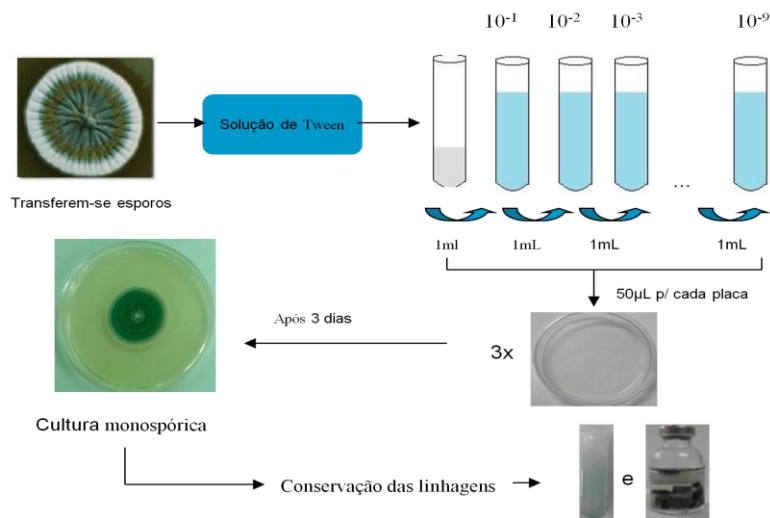


Figura 3.2.4. Técnica para obtenção de cultura monospórica.

3.3. Cultivo em pequena escala dos microrganismos isolados.

3.3.1. Cultivo dos microrganismos

Os meios de cultura utilizados para cada microrganismo são os mesmos do processo de isolamento, apenas sem o acréscimo de ágar de modo que o meio fique líquido para que seja submetido a cultivo sob agitação. Os microrganismos isolados foram inoculados em erlenmeyeres de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura no qual foi isolado. A fermentação foi realizada em incubadoras shaker a uma temperatura de 26 °C e 120 rpm (Figura 3.3.1) em tempo adequado a cada linhagem.

3.3.2. Obtenção dos extratos dos fungos cultivados.

Após a fermentação do fungo, o meio líquido fermentado foi filtrado à vácuo em câmara asséptica e separado do micélio. O meio fermentado de cada fungo foi extraído por 3 vezes com 50 mL de acetato de etila e 2 vezes com 50 mL de uma mistura de acetato de etila e isopropanol 7:3 e posteriormente utilizando volumes de 50 mL. O micélio foi macerado por 2 vezes com metanol e concentrado. Portanto, foram obtidos dois extratos originados do meio fermentado e um do micélio para cada fungo cultivado. Os extratos foram registrados e etiquetados com o código dos fungos, a origem do extrato, meio de fermentação ou micélio, o solvente da extração e a massa obtida.

Foram selecionadas as 47 linhagens de fungos endofíticos isolados de *Strychnos* sp. e cinco de *M. flexuosa*. O tempo de incubação variou de linhagem para linhagem e após cada cultivo foi realizada medição do pH para controle. Na Tabela 3.3.1 estão relacionados os dados das linhagens cultivadas e seus respectivos rendimentos.

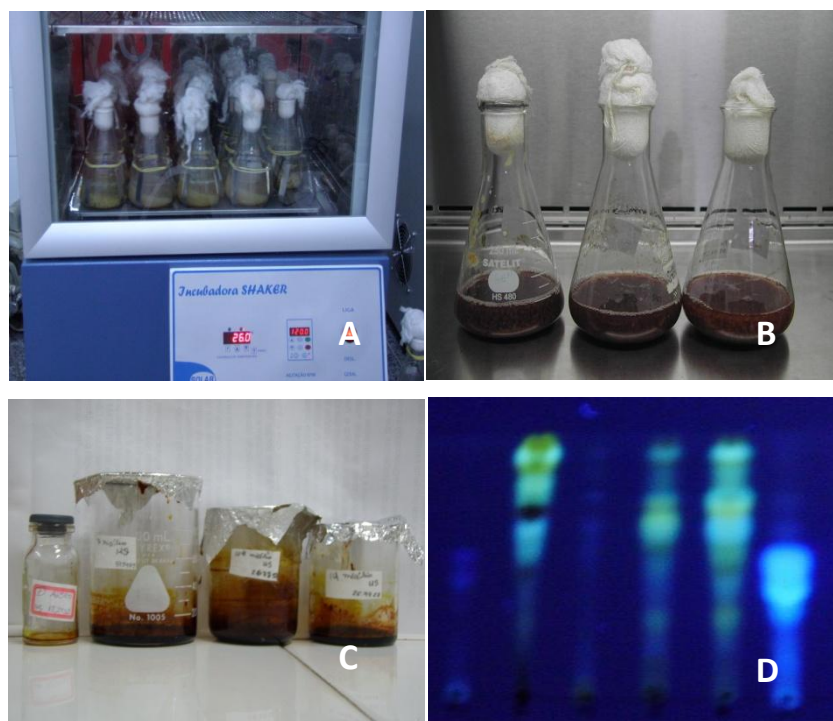


Figura 3.3.1. (A) Cultivo dos fungos em incubadora shaker, (B) Linhagem Stsp C1-2/1-2 após cultivo, (C) Extratos obtidos da linhagem Stsp C1-2/1-2, (D) Cromatoplaça dos mesmos extratos eluída em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 7:3 e revelada em luz U.V. 365 nm.

Tabela 3.3.1. Linhagens cultivadas em pequena escala fermentativa.

| Linhagem | Meio | Tempo de cultivo | pH final* | Extrato em AcOEt (mg) | Extrato em AcOEt 7:3 I-PrOH (mg) | Extrato do Micélio em MeOH (mg) |
|------------------|-------|------------------|-----------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Stsp R2/ 1-2.2 c | BDA | 21 dias | 4 | 22,1 | 39,2 | 101,3 |
| Stsp C2-2/1-1 a | BDA | 14 dias | 4,5 | 21,8 | 25,7 | 77,2 |
| Stsp R1/ 1-2 | BDA | 9 dias | 4 | 43,7 | 47,8 | 54,9 |
| Stsp C2.2/ 1-1 b | ISP2 | 21 dias | 4,5 | 13,5 | 18,0 | 39,7 |
| Stsp C2-1/1-2 | AVEIA | 9 dias | 3 | 32,7 | 31,9 | 64,6 |
| Stsp C1.1/1.1 | AVEIA | 9 dias | 5 | 43,2 | 37,4 | 72,2 |
| Stsp C1-2/1-3 | ISP2 | 9 dias | 3,5 | 47,1 | 33,3 | 88,9 |
| Stsp F2.3.2 c | AVEIA | 9 dias | 4 | 22,8 | 26,2 | 59,5 |

| | | | | | | |
|------------------------|-------|---------|-----|------|------|-------|
| Stsp CC1-2/1-1 b 01 | BDA | 11 dias | 4,5 | 70,2 | 49,9 | 74,8 |
| Stsp C2-1/1-2 a | BDA | 9 dias | 4 | 42,1 | 38,1 | 51,3 |
| Stsp CC1-2/1-1 b 02 | BDA | 14 dias | 4 | 380 | 210 | 202,7 |
| Stsp C2-1 a | BDA | 14 dias | 5 | 52,6 | 38,3 | 118,3 |
| Stsp C1-2/1-2 | ISP2 | 14 dias | 5,5 | 62,3 | 44,4 | 1,3 g |
| Stsp C2-1 c | ISP2 | 14 dias | 3,5 | 33,6 | 37,0 | 76,9 |
| Stsp C2-1 d | ISP2 | 14 dias | 4,4 | 31,9 | 28,4 | 1,1 g |
| Stsp C2.3/1-2 a | BDA | 14 dias | 3,5 | 28,9 | 19,4 | 62,5 |
| Stsp C2.2/1-1 a | BDA | 14 dias | 4 | 41,6 | 48,7 | 90,2 |
| Stsp C2.3/1-2c | BDA | 9 dias | 4 | 38,5 | 33,4 | 39,7 |
| Stsp C1-2/1-1 c | BDA | 9 dias | 3,5 | 24,7 | 23,9 | 48,6 |
| Stsp C1.2/1-1 f | BDA | 9 dias | 6 | 23,8 | 26,8 | 55,7 |
| Stsp C1-2/1-1 a | BDA | 9 dias | 3,5 | 68,2 | 74,5 | 136,9 |
| Stsp CR1.1.3 | AVEIA | 11 dias | 7 | 31,5 | 48,9 | 68,8 |
| Stsp C2-1/2.3 | AVEIA | 11 dias | 4,5 | 52,8 | 41,3 | 102,8 |
| Stsp F1.2.1 | BDA | 14 dias | 5,5 | 16,9 | 18,7 | 59,6 |
| Stsp C1-2/1.3 | ISP2 | 9 dias | 5 | 90,3 | 80,0 | 127,8 |
| Stsp CR1-1.3 | ISP2 | 9 dias | 4,5 | 28,6 | 27,7 | 42,1 |
| Stsp CC2.1/1-2 | ISP2 | 9 dias | 3 | 50,3 | 44,3 | 71,2 |
| Stsp C2-1/2-2 | AVEIA | 9 dias | 4,5 | 56,7 | 39,4 | 68,4 |
| Stsp F3.2.1 a | BDA | 18 dias | 3,5 | 35,6 | 32,1 | 53,9 |
| Stsp C2.2/2.2 a | BDA | 14 dias | 5,5 | 42,0 | 37,4 | 64,3 |

| | | | | | | |
|-----------------|-------|---------|-----|------|------|------|
| Stsp CR b | AVEIA | 9 dias | 6,5 | 28,9 | 31,5 | 79,6 |
| Stsp R2.1.1 a | BDA | 9 dias | 4,5 | 23,6 | 28,8 | 49,6 |
| Stsp R2.3.3 | ISP2 | 9 dias | 4 | 25,7 | 19,7 | 43,6 |
| Stsp CR1 b | AVEIA | 16 dias | 3,5 | 36,3 | 28,7 | 86,0 |
| Stsp R2.1.1 | BDA | 14 dias | 4,5 | 47,1 | 40,7 | 44,7 |
| Stsp C1.2/2.1 | BDA | 14 dias | 6 | 38,4 | 34,8 | 63,0 |
| Stsp CR1.1.2 b | BDA | 14 dias | 4,5 | 91,3 | 55,0 | 89,8 |
| Stsp C2.1.2 c | AVEIA | 9 dias | 5 | 32,7 | 28,5 | 48,6 |
| Stsp C1 1.3.1 | AVEIA | 9 dias | 4,5 | 86,4 | 77,6 | 76,4 |
| Stsp C1-2/1-1 | ISP2 | 9 dias | 4 | 33,1 | 38,3 | 54,8 |
| Stsp C1.3.1.1 | ISP2 | 9 dias | 4,5 | 76,2 | 50,0 | 61,1 |
| Stsp C1.3/2.1 b | BDA | 14 dias | 3 | 64,2 | 47,8 | 81,3 |
| Stsp CR2.3-1 | ISP2 | 14 dias | 5 | 23,9 | 25,4 | 57,6 |
| Stsp CR2/3.2.1 | ISP2 | 14 dias | 5,5 | 27,0 | 31,9 | 64,8 |
| Stsp R2/2.3.1 | ISP2 | 14 dias | 4,5 | 19,5 | 23,2 | 69,7 |
| Stsp F2.1.2 b | BDA | 14 dias | 5 | 37,5 | 48,4 | 82,0 |
| Stsp CR2.3.1 | ISP2 | 14 dias | 4,5 | 78,8 | 45,7 | 88,3 |
| PBR 2.2.2 | ISP2 | 9 dias | 5 | 51,6 | 17,8 | 90,2 |
| PBR 1.2.1 | ISP2 | 9 dias | 5 | 43,8 | 22,5 | 65,4 |
| PBR 3.2.1 | ISP2 | 9 dias | 5,5 | 39,9 | 41,9 | 78,4 |
| PBR 2.1.1 | ISP2 | 9 dias | 6 | 21,9 | 27,0 | 41,8 |
| PBR 1.1.1 | ISP2 | 9 dias | 4,5 | 16,9 | 33,7 | 32,7 |

* Os valores de pH medidos para os controles não se alteraram durante o tempo de cultivo: pH = 6 para os meios AVEIA e BDA e pH = 5,5 para o meio ISP2.

3.4. Obtenção dos extratos das raízes de *Mauritia flexuosa*.

As raízes finas (submersas) e grossas (subterrâneas) (Figura 3.4.1) foram secas em estufa de ar circulante por 48 horas a 40 °C, em seguida foram trituradas em moinho de facas. Em seguida o material botânico foi submetido a maceração sequencial hexano, acetato de etila e metanol, ao final foi realizado um tratamento com o extrato metanólico (Figura 3.4.2). A Tabela 3.4.1 apresenta os extratos obtidos e seus rendimentos.



Figura 3.4.1. (A) Raízes respiratórias, (B) raízes submersas de *M. flexuosa*.

Tabela 3.4.1. Relação dos extratos de *M. flexuosa* obtidos e suas massas.

| | Solvente | Código | Massa |
|------------------------------------|-----------------|---------------|--------------|
| Raízes submersas (500g) | Hexano | RFH | 1,04 g |
| | AcOEt | RFA | 28,40 g |
| | Metanol | RFM | 49,67 g |
| Raízes respiratórias (700g) | Hexano | RGH | 3,82 g |
| | AcOEt | RGA | 39,47 g |
| | Metanol | RGM | 65,89 g |

Após a obtenção dos extratos, estes foram submetidos a análise por CCD. Verificou-se que os extratos hexânicos das raízes submersas e das raízes respiratórias eram praticamente iguais o que levou a reunião de RFH com RGH. Os extratos em acetato de etila não foram fracionados neste trabalho. Ao extrato metanólico das raízes respiratórias foi adicionada uma mistura de água e metanol 3:1 e procedeu-se a partição com diclorometano e acetato de etila para remoção das substâncias menos polares. Para os extratos metanólicos foi realizada a partição líquido-líquido apenas para o extrato das raízes respiratórias, uma vez que as raízes submersas quando submetidas a partição proporcionaram um extrato hidroalcolico com uma massa inferior

a 1 grama o que dificultaria no processo de isolamento de seus constituintes, por isso optou-se por se trabalhar apenas a junção dos extratos hexânicos e o extrato hidroalcoólico das raízes respiratórias de *M. flexuosa*.

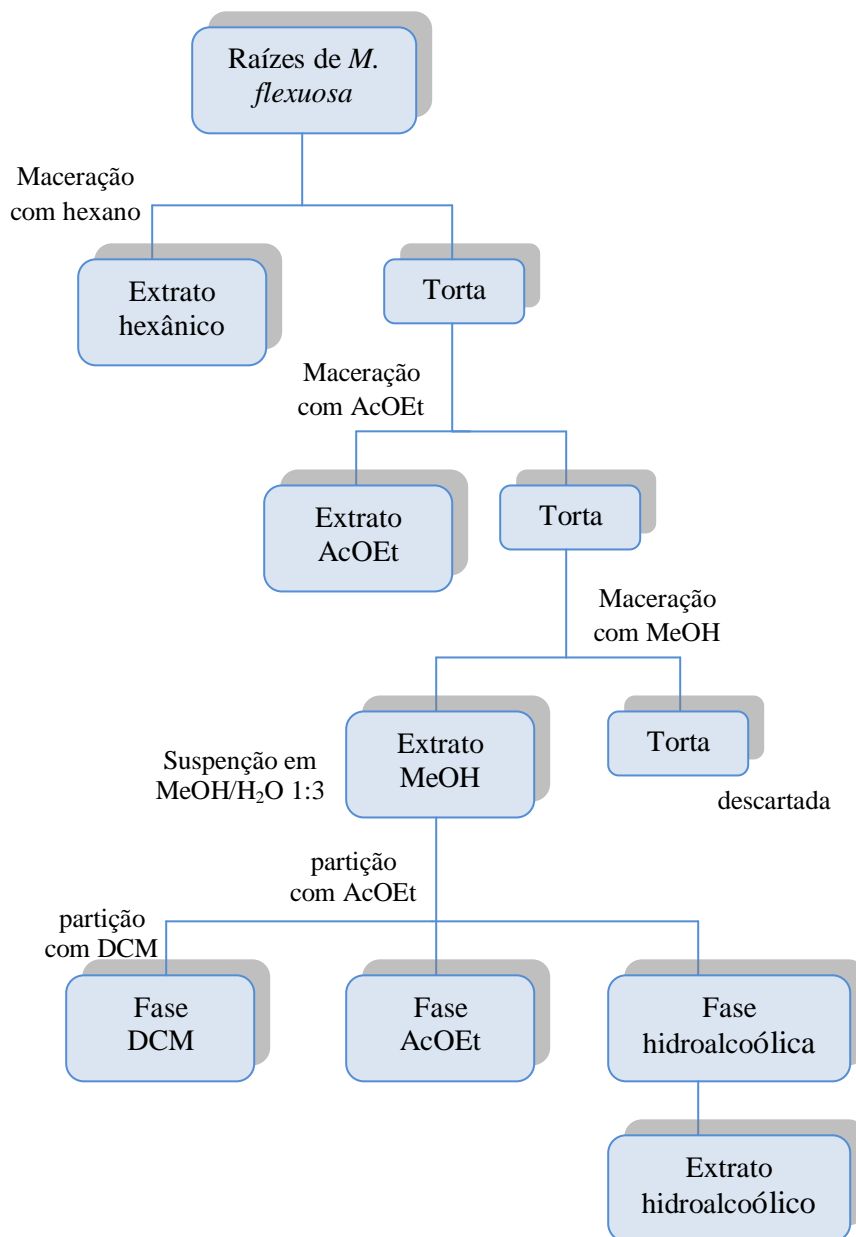


Figura 3.4.2. Fluxograma representando os procedimentos adotados para a obtenção dos extratos das raízes de *Mauritia flexuosa*.

3.5. Testes biológicos.

3.5.1. Teste anticâncer.

3.5.1.1. Teste colorimétrico

Os testes de atividade citotóxica foram realizados pelo método do MTT contra linhagens de células tumorais de mama-humano (MDA-MB435), cólon-humano (HCT-8), glioblastoma-humano (SF-295) e leucemia-humano (HL-60). Para as análises os extratos foram dissolvidos em DMSO puro até a concentração de 50 µg/mL. A metodologia aplicada é descrita por Mosman (1983), e se baseia em 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.

As células foram plaqueadas em placas de Eliza na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas de cultura de células com 96 poços 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 dos extratos dissolvidos em DMSO e o mesmo volume 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. Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

3.5.1.2. Cálculo da IC₅₀

As amostras que apresentaram elevado potencial citotóxico tiveram suas respectivas IC₅₀ medidas através da elaboração de curvas de concentração. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações (células/mL):

- MDA-MB435, SF-295: $0,1 \times 10^6$;
- HCT-8: $0,7 \times 10^5$;
- HL-60: $0,3 \times 10^6$;

Os extratos, previamente dissolvidos em DMSO, foram diluídos em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,09-50 µg/mL) numa placa de 96 poços (100 µL/ poço).

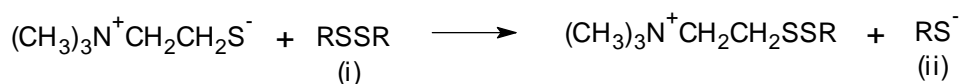
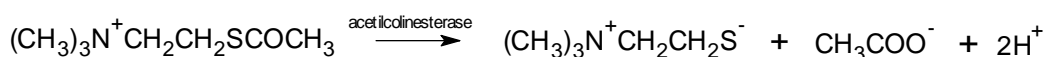
Após um período de incubação de 72 horas, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 150 µL de solução de MTT, a 10%, em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO₂ por 3 h. As placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/ 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e o precipitado ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por 30 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 595nm.

Apenas os extratos que apresentaram valores de CI₅₀ ≤ 20 µg/mL em pelo menos três linhagens tumorais foram escolhidos para avaliações subsequentes de purificação, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral. Todas as análises foram realizadas em comparação com o padrão de doxorubicina.

3.5.2. Teste antiacetilcolinesterase

3.5.2.1. Ensaio de Ellman

A atividade enzimática da acetilcolinesterase é avaliada por métodos colorimétricos segundo metodologia descrita por Ellman (1961). Baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetilcolina (Figura 3.5.1). A tiocolina reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis [2-nitrobenzóico]) (DTNB), formando uma mistura de dissulfetos (I) e um ânion amarelo (II) com intensa absorção em 412 nm.



(i) Reagente de Ellman (5,5 - ditiobis[2 - nitrobenzóico])

(ii) Ânion amarelo

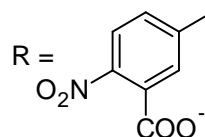


Figura 3.5.1. Esquema da catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Relatos na literatura indicam que compostos como aldeídos e aminas podem provocar resultados falso-positivo no ensaio de Ellman (RHEE et al., 2003). Estes compostos impedem a reação entre a tiocolina (produto da reação enzimática) e o reagente de Ellman, o que impediria a

formação do ânion amarelo e resultaria na formação do halo branco. No entanto, nesse caso não há inibição da atividade enzimática e sim da reação química entre o produto da reação e o corante. Assim, a fim de distinguir entre os compostos que atuam realmente na inibição da atividade enzimática e aqueles que atuam na reação química entre a tiocolina e o reagente de Ellman, as amostras foram submetidas ao teste de falso positivo.

O ensaio de Ellman foi realizado com as amostras numa concentração 10mg/mL. As amostras foram solubilizadas em DMSO, metanol (MeOH), clorofórmio (CHCl₃), etanol e acetato de etila dependendo de cada amostra. A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex. Volumes de 2,5 µL de cada amostra foram aplicados nas placas cromatográficas de sílica gel 60 com a realização de eluição em uma fase CHCl₃:MeOH 85:15 (v/v). Após a eluição e secagem das placas, as soluções dos reagentes de Ellman DTNB (ácido 5,5 – ditiobis – 2-nitrobenzóico) e ACTI (iodeto de acetilcolina) em tampão foram borrifadas sobre as placas de sílica. Após três minutos borrifou-se a solução da enzima AChE (3 U/mL). O padrão utilizado foi a Galantamina aplicada no final de cada placa. A inibição da enzima, nesse ensaio é observada pelo aparecimento de halos brancos na placa de sílica. Para confirmar os halos de inibição, foi realizado o teste de falso positivo, colocando-se a mistura enzima AChE e acetiltiocolina a 37 °C, por 20 min, antes de aplicá-la na placa.

3.5.2.2. Ensaio de Marston

A atividade enzimática é detectada pela conversão do acetato de α -naftila a α -naftol que reage com o sal de Fast Blue B formando um corante diazo de cor púrpura segundo a metodologia de Marston et al. (2002). Resultado positivo é observado com a formação de halos brancos na placa cromatográfica que significa que o composto presente na amostra inibiu a enzima não ocorrendo, portanto a formação do α -naftol e a consequente formação do corante (Figura 3.5.2).

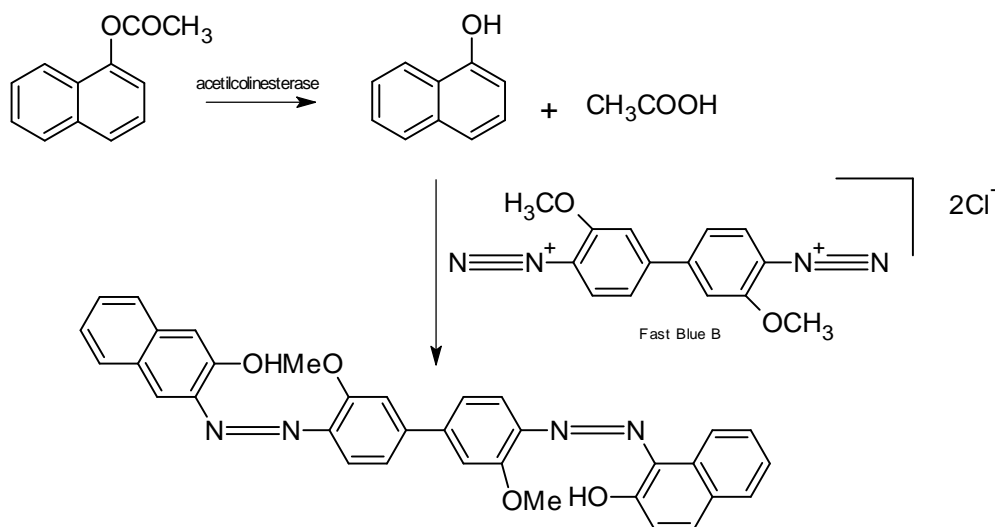


Figura 3.5.2. Esquema da catálise do acetato de α -naftila e reação com Fast Blue.

As amostras foram solubilizadas em DMSO, metanol (MeOH), clorofórmio (CHCl_3), etanol (EtOH) e acetato de etila ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_3$). A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex. Volumes de 2,5 μL de cada amostra foram aplicados nas placas cromatográficas e eluídas em CHCl_3 :MeOH 85:15 (v/v). O padrão utilizado foi a Galantamina aplicado no final de cada placa.

As seguintes soluções foram preparadas e utilizadas no ensaio:

- A) 60 mL de água deionizada + 0,546 g de tris/HCl \rightarrow Tampão A (T.A.), pH= 7,8 (ajustado com NaOH 3N e HCl)
- B) 50 mL T.A. + 0,05 g albumina bovina (para estabilizar) + 168 μL (2000 U/mL) \rightarrow agitou-se por 5min
- C) 0,06 g de fast blue + 24 mL de água deionizada
- D) 0,015 g de α -naftol + 6 mL de etanol

Após a eluição e secagem das placas as soluções A e B foram borrifadas sobre as placas e estas foram mantidas em uma “cuba úmida” a 37 $^\circ\text{C}$ por 20 minutos. Após esse período as soluções C e D foram misturadas e borrifadas sobre as placas. Resultado positivo é o aparecimento do halo branco na placa de sílica.

3.5.2.3. Teste antiacetilcolinesterase por IMER.

A utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, tendo como fase estacionária biorreatores ou IMER (*Immobilized enzyme reactors*) pode ser chamado de cromatografia de afinidade analítica ou cromatografia de afinidade quantitativa ou biocromatografia. Esse processo cromatográfico fornece seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima, além da reprodutibilidade obtida através da combinação da especificidade e da sensibilidade de uma reação enzimática. Assim, com a sensibilidade de detecção sensivelmente aumentada o IMER pode ser usado para isolar e/ou identificar compostos biologicamente ativos em misturas complexas (CARDOSO et al., 2009).

A constante de Michaelis Menten (KM) é uma constante de equilíbrio similar à constante de inibição (Ki), usada para descrever o efeito de inibidores reversíveis sobre a atividade da enzima. Tais constantes (KM e Ki) são similares às constantes de afinidade, Kd (constante de dissociação) e Ka (constante de associação), usadas para descrever o processo ligante-receptor, a ligação com a enzima e o equilíbrio. Uma vez que técnicas cromatográficas podem ser usadas para determinar Kd e Ka , valores de KM e Ki podem ser obtidas utilizando os princípios da cromatografia seletiva de afinidade. Para as condições da corrida em IMER e seus procedimentos foram utilizados:

- coluna IMER-AChE – 30 cm x 0,01 mm – coluna capilar de sílica fundida com a enzima acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*) imobilizada, utilizada como coluna acoplada ao HPLC;
- Monitoramento do produto da reação enzimática: Metodologia de Ellman;
- Fase móvel: Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e DTNB (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico] 0,1 mM;
- Amostra injetada: 10 μ L da solução contendo: 1 mM de Acetilcolina (substrato análogo da tiocolina em concentração de saturação) e 200 μ g/mL do extrato a ser testado ou 200 μ M de inibidor padrão tacrina (Figura 3.5.3).

- Vazão: 0,05 mL/min;

- Detector DAD-UV: 412 nm;

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a equação:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - [V_i - V_0] \times 100$$

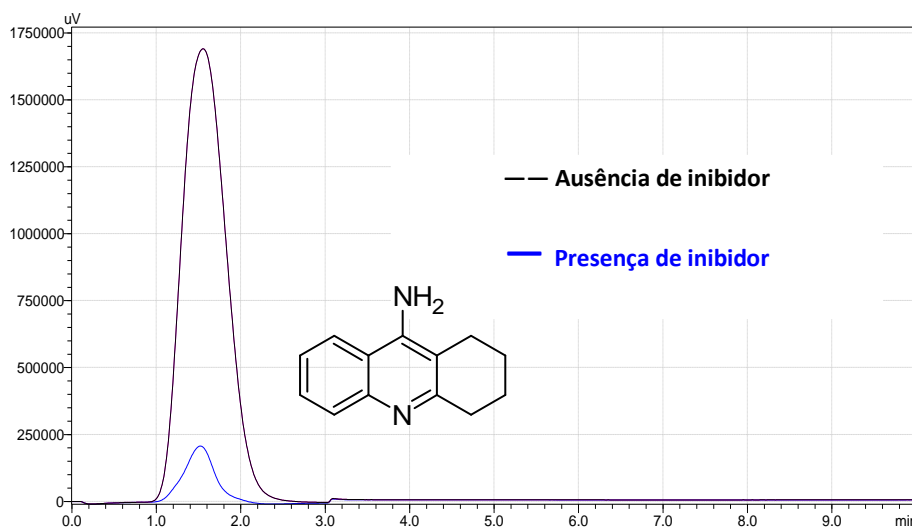


Figura 3.5.3. Cromatograma representando a diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença do inibidor padrão tacrina.

3.5.3. Teste de atividade antioxidante

3.5.3.1. Teste antioxidante qualitativo por DPPH

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, e está baseado no descolorimento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Figura 3.5.4).

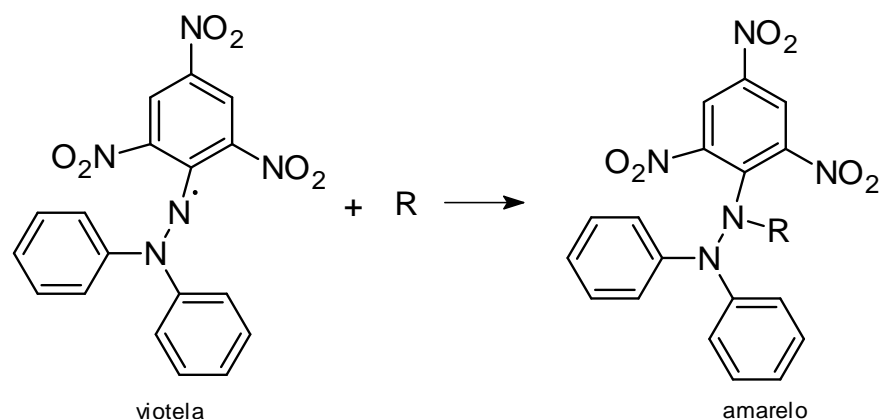


Figura 3.5.4. Estabilização do radical livre DPPH.

O ensaio foi realizado com as amostras numa concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As amostras foram solubilizadas em DMSO, metanol, clorofórmio, etanol e acetato de etila. A homogeneização das amostras foi efetuada em um vórtex. Volumes de 2,5 μL de cada amostra foram aplicados nas placas cromatográficas e eluídas em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 85:15 (v/v). Os padrões utilizados foram a rutina e a quercetina, estes aplicados no final de cada placa na ordem citada.

Após a eluição e secagem das placas a solução de DPPH em metanol (2 mg/mL) foi borrifada sobre as placas. Resultado positivo é o aparecimento do halo amarelo.

3.5.3.2. Teste antioxidante quantitativo por DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por MENSOR, et al. (2001), monitorando o consumo do radical DPPH pelas amostras através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. As medidas de absorvância foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis Spectronic BioMate 3, tendo como controle positivo quercetina comercial. Um volume de 2,5 mL de cada amostra em diferentes concentrações foi adicionado a 1,0 mL de solução de DPPH na concentração de 0,3 mM/L e misturados vigorosamente. A leitura da absorvância da mistura reacional (quercetina + DPPH) foi realizada a 517 nm após 30 minutos. A partir dos valores obtidos foi construída a curva de calibração. As medidas foram feitas em cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 cm. O mesmo procedimento foi realizado para os extratos de *M. flexuosa*. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores das absorvâncias foram convertidos em porcentagem da capacidade de seqüestro (%CS), determinada pela seguinte Equação:

$$\%CS = 100 - \frac{(Abs amostra - Abs branco) \times 100}{Abs controle}$$

A CS₅₀ foi determinada por interpolação da curva de calibração: capacidade de seqüestro contra a absorbância da amostra. As amostras testadas quanto sua atividade antioxidante estão na Tabela 3.5.1.

Tabela 3.5.1. Extratos testados no teste antioxidante quantitativo.

| Amostra | Descrição |
|----------------|--|
| RFH | Extrato em hexano das raízes submersas |
| RFA | Extrato em AcOEt das raízes submersas |
| RFM | Extrato em MeOH das raízes submersas |
| RGH | Extrato em hexano das raízes respiratórias |
| RGA | Extrato em AcOEt das raízes respiratórias |
| RGM | Extrato em MeOH das raízes respiratórias |

3.5.4. Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Este ensaio determina a atividade citotóxica de uma substância através da medida da resposta biológica, expressa pela morte dos metanúplios de *Artemia salina*. Com este teste, selecionam-se produtos naturais com habilidade de destruir ou inibir o crescimento de culturas de células tumorais, destruir ou inibir o desenvolvimento de insetos e ainda exercer uma larga faixa de efeitos farmacológicos (MEYER et.al., 1982).

Em um aquário de vidro, contendo aproximadamente 100 mL de solução salina (38 g de sal marinho sintético dissolvidos em 1 L de água destilada), foram adicionados cerca de 10 mg de ovos de *Artemia salina* e deixados sob iluminação artificial a 28 °C. Após 24 horas foram transferidos os náuplios do microcrustáceo (primeiros estágios larval) para outro aquário contendo 100 mL de solução salina limpa. Este segundo aquário, à semelhança do primeiro, também foi mantido em incubação por mais 24 horas, sob iluminação artificial a 28 °C, para obtenção de uma cultura pura do estágio larval de metanúplios.

Em seguida, foram preparadas, em triplicata, soluções de lapachol, cuja CL₅₀ sobre *A. salina* é de 70 µg/mL (61 < DL₅₀ < 81) e das amostras-teste (extratos) em cinco concentrações

diferentes, expressas em $\mu\text{g/mL}$, utilizando-se o dimetilsulfóxido (DMSO), além de uma solução controle, utilizando-se apenas a solução salina com DMSO a 1%. Essas soluções foram adicionadas em tubos contendo 5 mL de solução salina com aproximadamente 10 a 15 larvas de *A. salina* em estágio de metanúplios. Após 24 horas de incubação em local fresco, foi realizada a contagem do número de microcrustáceos mortos (indivíduos imóveis e/ou depositados no fundo do tubo) e vivos. Com os valores dos números de microcrustáceos vivos e mortos em cada concentração testada, determinou-se a CL50 (com intervalo de confiança de 95%) através do método probitos de análise (FINNEY, 1974). As amostras testadas neste teste foram as mesmas listadas na Tabela 3.5.1.

3.5.5. Teste de atividade antimicrobiana frente a *Bacillus cereus*

Para este ensaio foi utilizado o método por difusão em ágar utilizando placas de Petri (SOUZA et al., 2004). Os extratos foram classificados quanto à sua atividade antimicrobiana, comparando os diâmetros dos halos de inibição com a padronização pré-estabelecida. Como controle, discos foram embebidos com uma mistura de água e DMSO 9:1. O meio utilizado foi o BHI aonde foram adicionados 100 μL da solução bacteriana de *B. cereus* (Figura 3.5.5) para sua inoculação por toda placa e 100 μL dos extratos na concentração de 2 mg/mL em cada poço de 5 mm de diâmetro em triplicata (16 poços por placas). Após 24, 48 e 72 horas de incubação em BOD a 37 °C foram realizadas leituras dos resultados do ensaio e medidos os halos de inibição formados.



Figura 3.5.5. Placa de Petri contendo cultura de *Bacillus cereus*.

Fonte: www.microbelibrary.org

3.5.6. Teste de atividade antifúngica frente a *Candida albicans*

Os testes de atividade antifúngica foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, utilizando-se placas de Eliza com 96 poços (SOUZA et al., 2006). Para o teste inicialmente a cultura de *Candida albicans* (Figura 3.5.6) foi reativada em placa de Petri contendo meio ágar Sabouraud e encubada por 24 horas a 37 °C. Após este período de tempo uma porção da colônia fúngica foi transferida dessa placa para um tubo de ensaio contendo meio sabouraud líquido, este foi novamente incubado por mais 24 a 37 °C. Para o teste foram apenas testados alguns extratos fúngicos, que foram dissolvidos em DMSO na concentração de 1 mg/mL tiveram um volume de 2 µL adicionados em cada poço juntamente com 93 µL de meio Sabouraud líquido e 5 µL da solução de *Candida albicans* (Figura 3.5.6). Após 24 horas todos os poços tem seu conteúdo inoculado em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud, de modo a se verificar o tipo de atividade; fungicida ou fungistático, feito isso é adicionado o corante azul de lactofenol aonde a presença de colaração verde indica a presença de células mortas o que sinaliza um resultado positivo de atividade antifúngica. Na Tabela 3.5.2 estão listadas as amostras de extratos fúngicos e seus respectivos códigos enviados para os testes biológicos.



Figura 3.5.6. Placa de Petri contendo cultura de *Candida albicans*.

Fonte: www.microbelibrary.org

Tabela 3.5.2. Relação dos extratos de fungos endofíticos ensaiados nos testes biológicos.

| Fungo | Teste Anticâncer | Teste Antiacetilcolinesterase | Teste Antioxidante** | Teste Antifúngico e Antimicrobiano |
|---------------|------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| Stsp CR2.3-1 | a, c* | a, b, c | a, b, c | a, c |
| Stsp C1-2/1-3 | a, c | a, c | a, c | a, c |
| Stsp CR b | a | a | a | a |

| | | | | |
|------------------------|---------|---------|---------|------|
| Stsp C1-2/1-2 | a | a | a | a |
| Stsp R2.1.1 | a, b, c | a, b, c | a, b, c | c |
| Stsp C2.2/1-1 a | a, b, c | a, b, c | a, b, c | b |
| Stsp CR1.1.2 b | b, c | a, b, c | a, b, c | a |
| Stsp F2.3.2 c | a, c | a, b, c | a, b, c | a, c |
| Stsp R1/ 1-2 | a, c | c | c | c |
| Stsp C2-1/1-2 | c | a | a | - |
| Stsp C2-1 c | a | a | a | a |
| Pbr 1.2.1 | a | a | a | a |
| Pbr 2.2.2 | a | a | a | - |
| Stsp CC1-2/1-1 b 01 | - | a | a | - |
| Stsp CC2.1/1-2 | - | a | a | - |
| Stsp C2-1 d | - | c | c | c |
| Stsp C1.2/1-1 f | - | a | a | - |
| Stsp C1-2/1-1 a | - | a | a | a, c |
| Stsp C2-1/2-2 | - | a | a | a |
| Stsp C1-2/2-1 | - | - | - | a, c |
| Stsp C2-2/2-2 | - | - | - | a, c |
| Stsp C1-2/1-2 | - | - | - | a, c |
| Stsp C2-1/2-3 | - | - | - | a, c |
| Stsp F1.2.1 | - | - | - | a, c |

* a – extrato em AcOEt do meio fermentado, b – extrato em AcOEt 8:2 *i* – PrOH, c – extrato em MeOH do micélio.

** - teste apenas qualitativo para os extratos fúngicos. Apenas os extratos de *M. flexuosa* foram testados no teste quantitativo.

3.5.7. Teste de atividade antimicrobiana das substâncias puras.

Inicialmente as culturas de células bacterianas foram ativadas em placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton, sendo incubadas a 37 °C durante 24 horas, após este período de tempo, as colônias bacterianas foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura líquido, após a homogeneização

estes tubos foram novamente incubados nas mesmas condições anteriormente citadas por mais 24 horas.

As bactérias utilizadas para o ensaio foram padronizadas a uma concentração de 1×10^8 cel/mL, através de comparação com o padrão McFarland de turbidez. Este padrão consistia da mistura de 9,95 mL de uma solução de H_2SO_4 a 1% e 0,05 mL de uma solução de $BaCl_2$ 1% (DE MEDEIROS, 2010).

Inicialmente para o teste preparou-se uma solução mãe das substâncias de interesse em DMSO, que foram diluídas sucessivamente de modo a se obter as concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Os testes foram realizados placas de Eliza, contendo 96 poços, através de diluições seriadas em triplicata das substâncias puras e dos antibióticos de referência em caldo Mueller Hinton.

As placas de Elisa foram então encubadas por 24 horas, após este período de tempo foi adicionado o corante resazurina e após 30 minutos tem-se o resultado do teste aonde a presença de coloração rosa nos poços indica atividade celular, o que aponta para resultados negativos de atividade antimicrobiana, apenas os poços com coloração violeta atestam para atividade. Ao fim dos testes de MIC, as concentrações que apresentaram atividade foram novamente repetidas a fim de se replaquear o conteúdo dos poços de modo a se verificar o tipo de atividade, se é bactericida ou bacteriostática. Para este teste foram utilizadas cinco linhagens de bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Figura 3.5.7) (DE MEDEIROS, 2010).

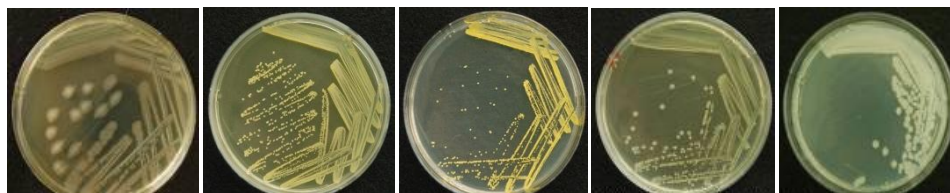


Figura 3.5.7. Bactérias patogênicas usadas no teste: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* respectivamente.

Fonte: www.microbelibrary.org

3.6. Estudo do perfil químico das linhagens de *Penicillium* spp. e da hospedeira *Strychnos* cf. *toxifera* por APCI-MS.

Foram utilizados os extratos obtidos das linhagens de endofíticos durante o cultivo em pequena escala. Foram selecionadas apenas as linhagens de ambas hospedeiras que morfologicamente aparentavam serem do gênero *Penicillium*, foram apenas utilizados extratos em AcOEt do meio metabolizado. Estes extratos foram solubilizados em metanol, em seguida particionados em pequena escala com uma mistura de hexano e éter de petróleo 1:1 de modo a retirar os compostos menos polares. A fração metanólica foi ressolubilizada em metanol e então diluídos até a concentração de 2 ppm. Em 20 µL dos extratos foram injetados com ajuda de uma mistura de metanol, água e ácido fórmico 90:9:1 presentes na bomba do aparelho LCQfleet da Thermo[®], para as análises de perfil químico foi utilizada a sonda de APCI operando no modo positivo.

Inicialmente foram realizadas diversas injeções de modo a se obter as melhores condições de ionização para os extratos brutos (Tabela 3.6.1) sendo utilizado sempre o modo positivo de ionização. Após o refino das condições de ionização partiu-se para a otimização da concentração injetada no aparelho de modo a se conciliar a preservação do aparelho juntamente com bons resultados na sensibilidade de detecção.

Tabela 3.6.1. Condições otimizadas do espectrômetro de massas para os compostos presentes nos extratos testados.

| Parâmetros | Valor utilizado |
|---|------------------------|
| Taxa de fluxo do gás principal | 20 psi |
| Taxa de fluxo do gás auxiliar | 10 psi |
| Taxa de fluxo do gás da cortina protetora | 5 psi |
| Temperatura de dessolvatação | 450 °C |
| Voltagem da corona | 4 kV |
| Voltagem do cone | 21 V |
| Lente RF | 0,8 V |

3.7. Cultivo em larga escala dos fungos selecionados

De acordo com os resultados dos testes biológicos foram selecionadas três linhagens de fungos para os estudos químicos: da hospedeira *Mauritia flexuosa* foram selecionadas as linhagens PBR 2.2.2 e PBR 1.2.1.a, e de *Strychnos cf. toxifera*, a linhagem Stsp CR 2.3.1. Também tiveram seus extratos estudados devido a altos rendimentos de extração as linhagens Stsp CC1-2/1-1 b 02, Stsp C1-2/1-2, Stsp C1-2/1-3, Stsp C2-1c e Stsp C1.2/1-1f.

Cada uma das três linhagens selecionadas foi cultivada utilizando o meio de cultura ISP2 por ser o meio de origem das linhagens. Foram utilizados 60 frascos de Erlenmeyer de 1 L com 300 mL do meio de cultura em cada frasco, previamente autoclavados por 30 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Foram inoculados 50 µL da suspensão de esporos em 58 erlenmeyers os dois restantes ficaram como controles para comparação do pH. Após 21 dias de crescimento a 26 °C, o meio fermentado foi separado da biomassa fúngica (micélio) por filtração a vácuo. O meio fermentado (~18 L) após ter seu pH medido foi então extraído com solventes orgânicos por meio de partição líquido-líquido: 3 x com 500 mL de acetato de etila e em seguida 2 x com 500 mL de acetato de etila 7:3 iso-propanol. Os solventes foram evaporados em rotoevaporador sob pressão reduzida e os extratos secos reunidos pesados e codificados. O micélio depois de separado do meio metabolizado foi macerado com metanol por 48 horas por três vezes. O solvente foi evaporado e os extratos reunidos. Desta forma para cada fungo cultivado em larga escala obtiveram-se três extratos, dois com os metabólitos extracelulares e um com os metabólitos intracelulares, (Tabela 3.7.1).

Tabela 3.7.1. Extratos obtidos a partir do cultivo das linhagens fúngicas selecionadas.

| Fungo | Código | Extrato | Quantidade (g) |
|---------------------|------------|--|----------------|
| PBR 2.2.2 | P1 | Extrato em AcOEt do meio fermentado | 1,4 |
| | P1* | Extrato em AcOEt/ <i>i</i> -PrOH 7:3 do mesmo meio | 0,6 |
| | P1M | Extrato em MeOH do micélio | 12,3 |
| PBR 1.2.1. a | P2 | Extrato em AcOEt do meio fermentado | 1,8 |
| | P2* | Extrato em AcOEt/ <i>i</i> -PrOH 7:3 do mesmo meio | 0,4 |
| | P2M | Extrato em MeOH do micélio | 14,0 |
| Stsp CC1-2/1-1 b 02 | ST1 | Extrato em AcOEt do meio fermentado | 0,380 |
| Stsp CR 2.3.1 | G1 | Extrato em AcOEt do meio fermentado | 2,6 |
| | G1* | Extrato em AcOEt/ <i>i</i> -PrOH 7:3 do mesmo meio | 0,82 |
| | G1M | Extrato em MeOH do micélio | 7,83 |

3.8. Isolamento dos metabólitos secundários dos fungos selecionados.

3.8.1. Fungo PBR 2.2.2

O fungo PBR 2.2.2. teve inicialmente seus extratos **P1** e **P1*** reunidos e fracionados em coluna filtrante sob pressão reduzida em gel de sílica em gradiente crescente de polaridade (Hexano, Acetato de Etila e Metanol) fornecendo quatro frações. A fração 3 foi submetida a um novo fracionamento em coluna aberta de gel de sílica flash com gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) fornecendo 56 frações, analisadas e comparadas por CCD. As subfrações de 15 a 21 eluídas com Hex/AcOEt/MeOH 5,5:4:0,5 foram reunidas (72,0 mg) e codificadas como D2.

A análise de D2 por RMN de ^1H evidenciou uma mistura que foi tratada em HPLC utilizando-se uma coluna analítica Synergi 4 μ Fusion (C18) 250 x 4,6 mm, sendo obtido melhor separação com MeOH e água 1:1 (Figura 3.8.1). Uma vez otimizadas as condições, partiu-se para o isolamento das substâncias de interesse em D2 via HPLC preparativo. Para o isolamento utilizou-se uma coluna preparativa Synergi 4 μ Fusion (C18) 250 x 21,20 mm, trabalhando em sobrecarga para maior produtividade em um fluxo de 20 mL/min calculado por meio do fator de escalonamento de modo a ser isolada a amostra 1.

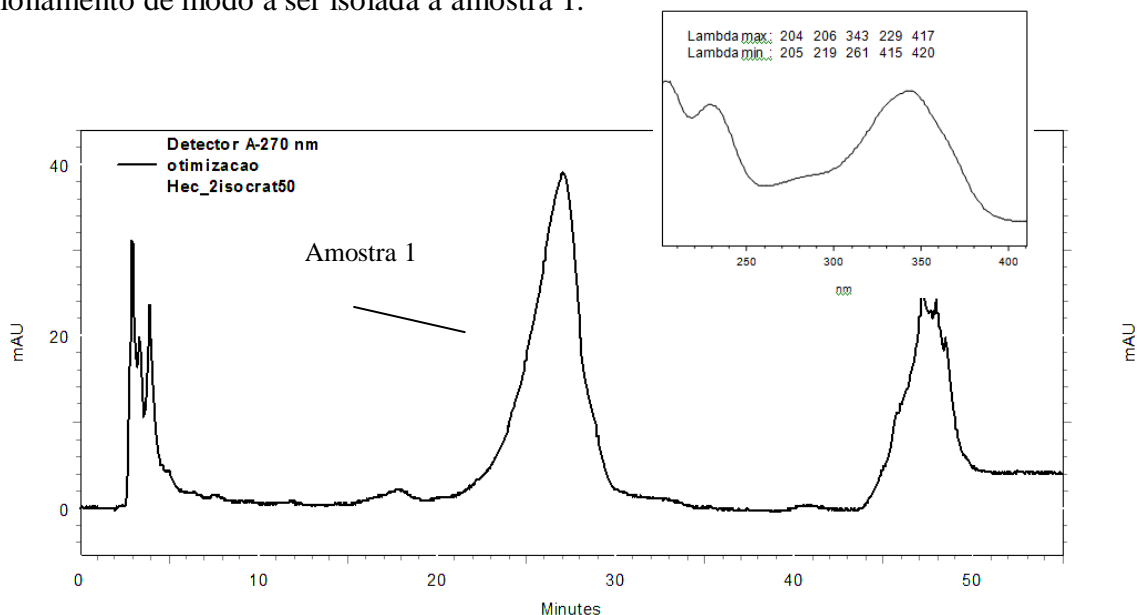


Figura 3.8.1. Cromatograma obtido para a análise da fração D2 no modo isocrático MeOH 50% em 60 minutos, $\lambda = 270$ nm, injeção de 20 μL e fluxo de 0,7 mL/min e espectro de U.V. da substância de interesse.

O extrato bruto do micélio **P1M** também foi submetido inicialmente a um fracionamento em coluna filtrante com gel de sílica em gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) fornecendo quatro frações. A fração 1 (330 mg) foi lavada com acetato de etila e a porção solúvel (120 mg) reunida com a fração 2 (320 mg) e submetidas a um fracionamento em coluna de gel de sílica flash, eluídas em gradientes crescentes de polaridade (hexano e acetato de etila) fornecendo 31 frações. A subfração 5 (8,0 mg), eluída com Hex/AcOEt 8:2, apresentou cristais em forma de agulha que foram purificados por recristalização com com uma mistura de Hex/AcOEt 4:6 resultando na amostra 2. A subfração 6 (4,9 mg) eluída com o mesmo sistema de solventes apresentou-se como um sólido amorfo cuja análise em comparação com a amostra 2 revelou tratar-se de substâncias distintas e aparentemente pura, fornecendo assim a amostra 3.

A fração 3 (1,09 g) foi submetida a fracionamento em gel de sílica flash por eluição em modo crescente de gradiente (hexano, acetato de etila, *iso*-propanol e metanol) de eluição forneceu 25 frações. As subfrações de 11 a 13, eluídas com AcOEt/*i*-PrOH 9:1, foram reunidas após análise por CCD e denominadas Grupo I (140 mg), as subfrações de 16 a 20 eluídas em AcOEt/*i*-PrOH 1:1 também reunidas, e constituíram o Grupo II (263 mg).. O Grupo II foi fracionado em gel de sílica flash com gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) fornecendo 21 frações. As frações 13 e 14 apresentaram-se como estruturas monocristalinas que se apresentaram puras por análises em CCD e foram denominadas como amostra 4 (31,1 mg). A fração 4 após seca apresentou a formação de cristais na parede do frasco esta fração foi submetida a fracionamento em gel de sílica fase reversa (ODS) utilizando água e metanol em gradiente crescente do modificador orgânico. A subfração 17 eluída com MeOH/H₂O 7:3, após análise por CCD foi codificada como amostra 5 (3,1 mg) (Figura 3.8.2).

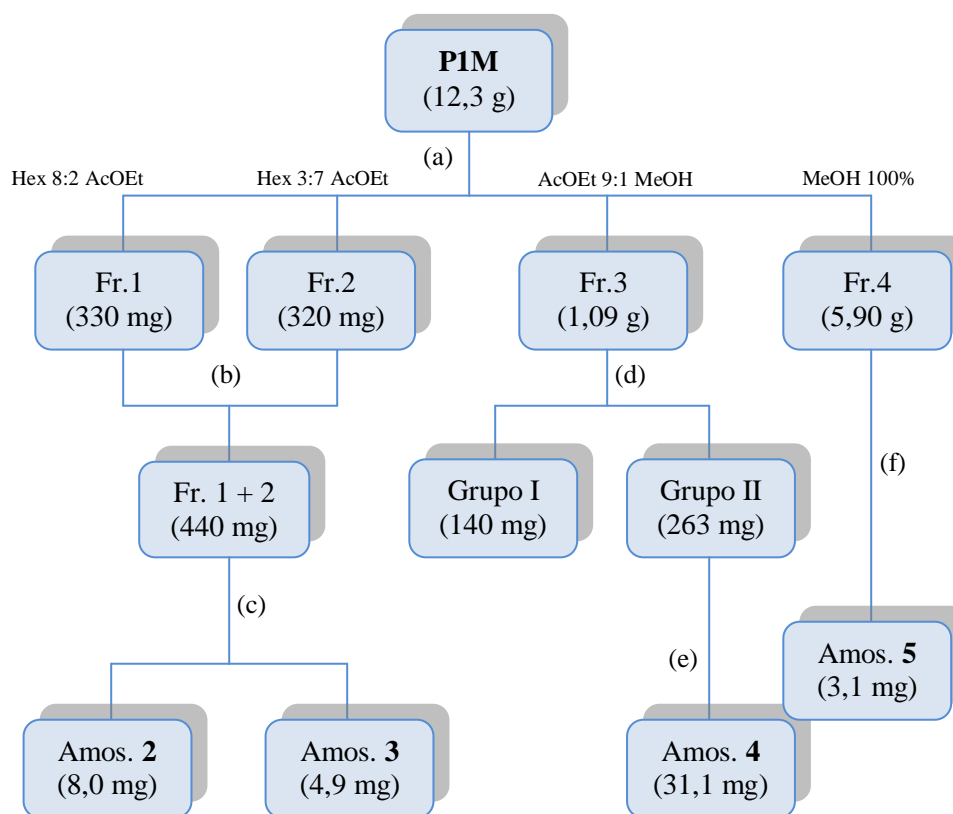


Figura 3.8.2. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **P1M**.

(a): coluna em funil de separação de 500 mL, sílica 70-230 mesh;(b): reunião de Fr.1 e Fr.2; (c): h =15 cm e φ = 2,5 cm, sílica 230-400 mesh; (d): h =30 cm e φ = 3,0 cm, sílica 230-400 mesh; (e): h = 15 cm e φ = 2,5 cm, sílica 230-400 mesh; (f) h =40 cm e φ = 3,0 cm, sílica fase reversa ODS (C8).

3.8.2. Fungo PBR 1.2.1.a

O extrato do meio líquido fermentado **P2** do fungo PBR 1.2.1.a foi fracionado em quatro frações em coluna filtrante sob pressão reduzida utilizando gel de sílica 70-230 mesh. A fração 3 (487 mg) foi fracionada em sílica flash sob eluição em gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) fornecendo 38 frações. A subfração 14 eluída em AcOEt/Hex 9:1 apresentou a formação de um sólido amorfo que após análise por CCD foi codificada como amostra 6 (8,9 mg). A subfração 21, eluída em AcOEt/MeOH 8:2 apresentou também a formação de um sólido amorfo branco juntamente com uma goma de cor amarela. Este sólido foi lavado com uma mistura de hexano e acetato de etila 1:1 e após análise em CCD foi denominado amostra 7 (12,4 mg). A Figura 3.8.3 apresenta os procedimentos adotados para o extrato **P2** de forma resumida.

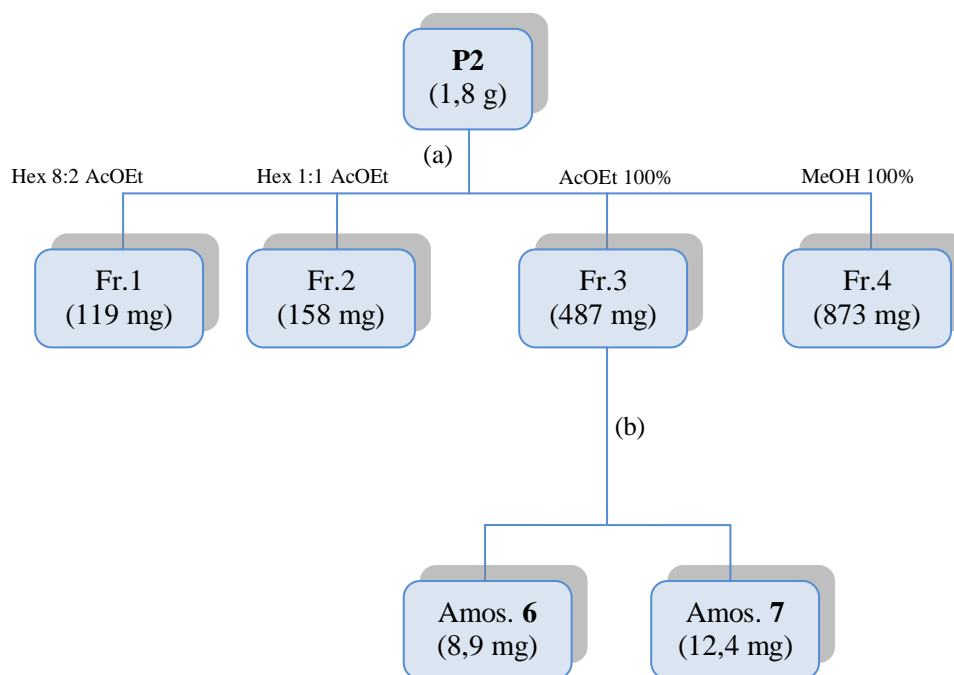


Figura 3.8.3. Fluxograma representando o estudo químico do extrato **P2**.

(a): coluna em funil de separação de 500 mL, sílica 70-230 mesh;
 (b): h = 30 cm e ϕ = 3,0 cm, sílica 230-400 mesh.

O extrato do micélio **P2M** (14 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica 70-230 mesh em gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol), fornecendo quatro frações. A fração 2 (392 mg) foi fracionada em coluna de gel de sílica flash por eluição com gradientes crescentes de polaridade (hexano e acetato de etila), fornecendo 17 frações. A subfração 6 eluída com Hex/AcOEt 85:15 apresentou a formação de cristais que foram purificados por recristalização em Hex/AcOEt 4:6 produzindo assim a amostra 8 (6,3 mg). A subfração 10 eluída em Hex/AcOEt 7:3 também apresentou a formação de cristais em forma de agulha, os quais foram apenas lavados com hexano e denominados amostra 9 (11,7 mg) (Figura 3.8.4).

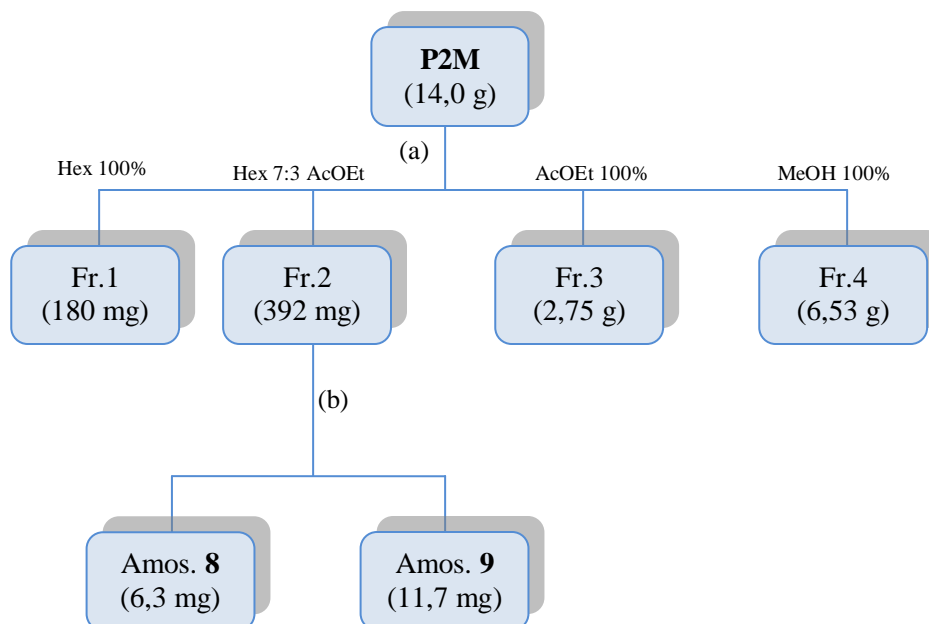


Figura 3.8.4. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **P2M**.

(a): coluna em funil de separação de 500 mL, sílica 70-230 mesh;
(b): h = 30 cm e φ = 3,0 cm, sílica 230-400 mesh.

3.8.3. Fungo Stsp CC1-2/1-1 b 02.

O fungo Stsp CC1-2/1-1 b 02 foi cultivado apenas em pequena escala, porém o líquido deu alto rendimento na extração com acetato de etila. O extrato **ST1** (381 mg) obtido ainda apresentou a formação de cristais na parede do frasco (Figura 3.8.5).

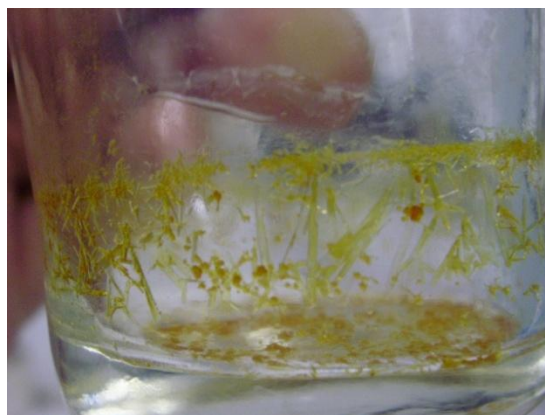


Figura 3.8.5. Cristais presentes no extrato **ST1**.

Este extrato foi sucessivamente lavado com hexano e submetido a um fracionamento em coluna de gel de sílica eluída em gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) e forneceu quatro frações. A fração 3 apresentou a formação de cristais, estes foram purificados por recristalização em AcOEt a quente e denominada amostra 10 (21,7 mg) (Figura 3.8.6).

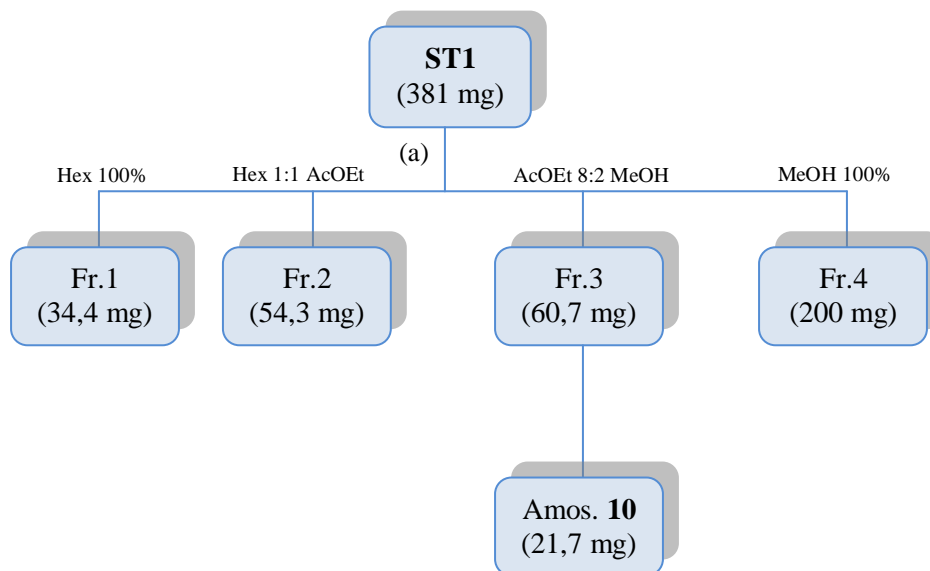


Figura 3.8.6. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **ST1**.

(a): h = 10 cm e ϕ = 1,5 cm, sílica 230-400 mesh.

3.8.4. Fungo Stsp CR 2.3.1

Os extratos brutos do líquido fermentado do fungo Stsp CR 2.3.1 **G1** e **G1*** foram reunidos após análise por CCD (3,42 g) e fracionados em coluna filtrante sob pressão reduzida em gradiente crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) utilizando gel de sílica mesh 70-230 originando quatro frações. A fração 4 (1,46 g) foi submetida a um fracionamento por permeação em gel de Sephadex LH-20 no modo isocrático com metanol fornecendo 8 frações. A quinta fração apresentou a formação de cristais em forma de agulha, estes foram lavados com acetato de etila e recristalizados em metanol a quente e após análise por CCD codificou-se estes cristais como amostra 11 (114,6 mg) (Figura 3.8.7).

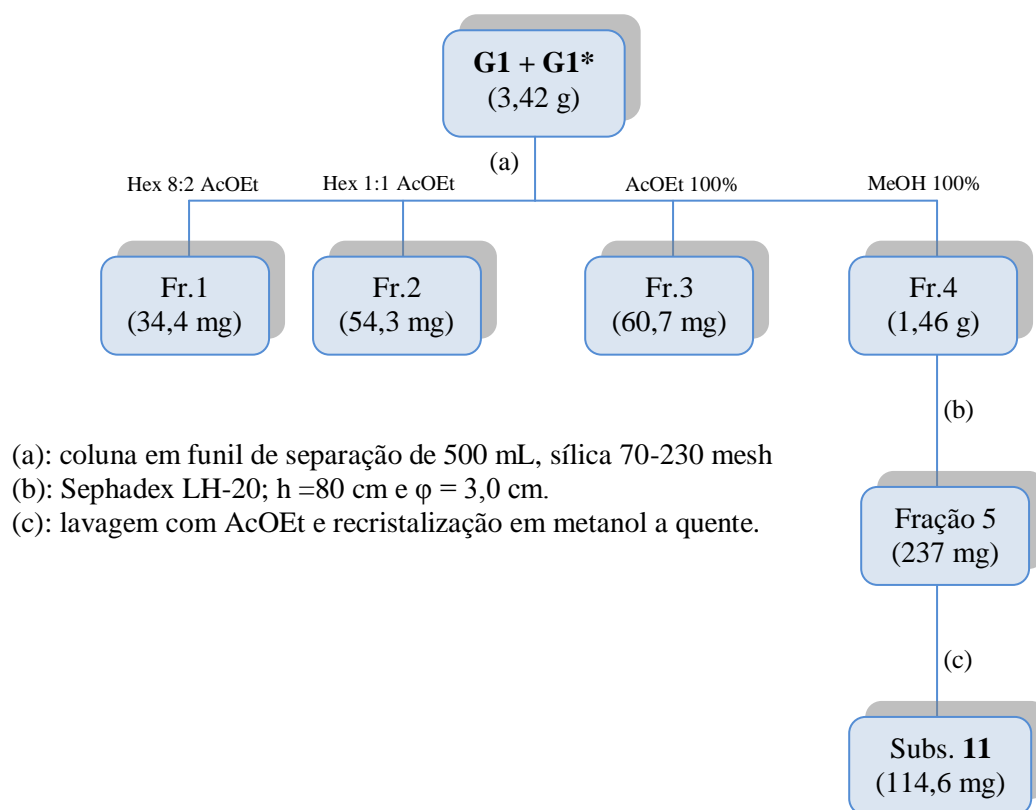


Figura 3.8.7. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **G1 + G1***.

O extrato do micélio G1M foi fracionado em coluna filtrante sob pressão reduzida utilizando gradiente crescente de polaridade (cicloexano, diclorometano, acetona e metanol) originando cinco frações. A fração 2 eluída em DCM 100% foi submetida a fracionamento em gel de sílica mesh 230-400 em gradiente crescente de polaridade (cicloexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) fornecendo 27 frações. A subfração eluída em cicloexano/DCM 1:9 apresentou a formação de cristais denominados amostra 12 (4,8 mg). A fração 3 eluída com DCM/acetona 1:1 foi fracionada da mesma forma que a fração 2, sendo encontrados cristais nas subfrações 10, eluída em cicloexano/DCM 1:1 e na subfração 17 eluída em DCM/AcOEt 9:1, denominadas amostras 13 (8,6 mg) e 14 (10,5 mg) respectivamente. A fração 5 eluída em metanol 100% foi submetida a fracionamento em gel de sílica modificada (C18) utilizando gradiente crescente (metanol e água) fornecendo 13 subfrações. Um sólido amorfo branco formado na subfração 3 foi lavado com acetato de etila e após análise por CCD foi denominado amostra 15 (7,3 mg) (Figura 3.8.8).

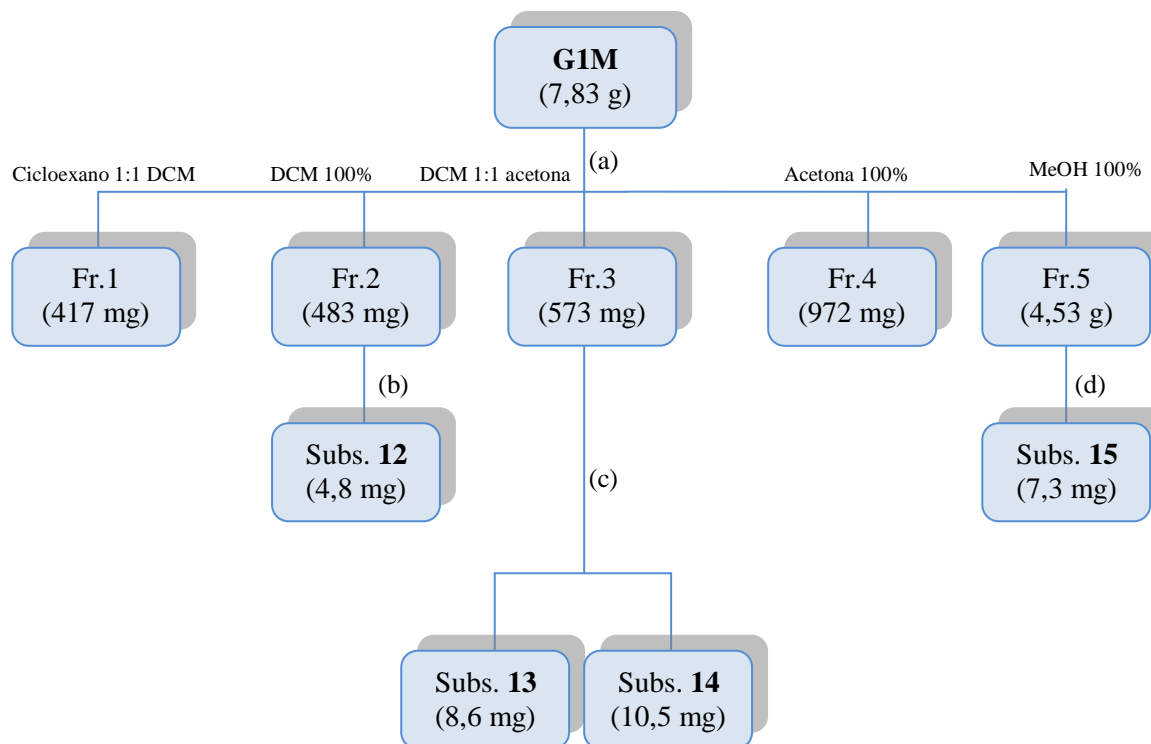


Figura 3.8.8. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **G1M**.

(a): coluna em funil de separação de 500 mL, sílica 70-230 mesh.

(b): $h = 30$ cm e $\varphi = 2,0$ cm, sílica mesh 230-400.

(c): $h = 50$ cm e $\varphi = 2,0$ cm, sílica mesh 230-400.

(d): Sílica fase reversa (ODS): $h = 40$ cm e $\varphi = 2,0$ cm.

3.9. Isolamento dos metabólitos secundários de *Mauritia flexuosa*.

3.9.1. Extratos hexânicos.

Os extratos hexânicos das raízes submersas (RFH) e das raízes respiratórias (RGH) apresentaram perfis semelhantes em análise por CCD e foram reunidos de modo a se obter mais massa. Este extrato foi fracionado em coluna aberta de gel de sílica utilizando um gradiente crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) originando 68 frações, algumas quase puras. A fração 2 apresentou-se como uma goma de coloração laranja que foi analisada por GC-MS. A fração 10 apresentou a formação de cristais em forma de agulha que foram recristalizados em hexano fornecendo a amostra 16.

A fração 17 apresentou poucas bandas cromatográficas quando analisadas por CCD, então foi submetida a um novo fracionamento em gel de sílica utilizando gradientes crescentes de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila), fornecendo 37 subfrações. As subfrações 14, 18 e 21 apresentaram-se como sólidos amorfos brancos com aparente pureza quando analisadas por CCD, fornecendo assim as amostras 17, 18 e 19 respectivamente.

As frações 21 e 23 provenientes do extrato bruto se apresentaram na forma de sólidos amorfos que por CCD aparentavam estar puras, ambas foram recristalizadas em acetato de etila a quente e os cristais foram codificados como amostras 20 e 21 respectivamente. A fração 34 eluída em Hex/DCM 1:1 foi fracionada em gel de sílica fase normal em gradiente crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila) a subfração 20 eluída em DCM/AcOEt 9:1 apresentou a formação de cristais em forma de agulhas, os quais foram purificados por recristalização em diclorometano a frio fornecendo a amostra 22. O esquema da Figura 3.9.1 resume o fracionamento do extrato hexânico de *M. flexuosa*.

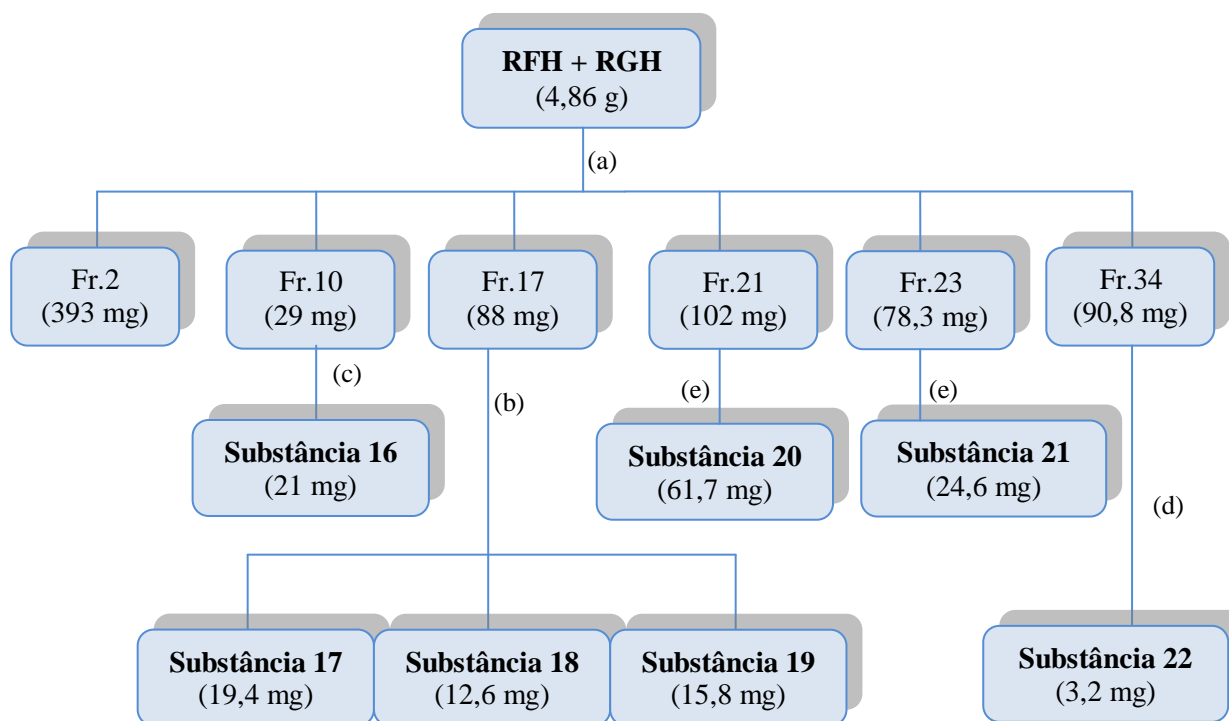


Figura 3.9.1. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **RFH+RGH**.

- (b): $h = 50$ cm e $\phi = 2,0$ cm, sílica 70-230 mesh.
 (a): $h = 10$ cm e $\phi = 1,5$ cm, sílica 230-400 mesh.
 (c): Recristalização em hexano a frio.

- (d): $h=10$ cm e $\varphi = 1,5$ cm, sílica 230-400 mesh e posterior recristalização em diclorometano a frio.
 (e): Recristalização em acetato de etila a quente.

3.9.2. Extrato hidroalcólico das raízes respiratórias.

O extrato hidroalcólico proveniente das raízes respiratórias foi fracionado por permeação em gel de Sephadex LH-20 no modo isocrático utilizando como fase móvel a mistura de água e metanol na proporção de 1:1, fornecendo 49 frações, a fração 22 (112,3 mg) após análise por CCD de fase reversa revelou apenas duas bandas cromatográficas, de modo que esta fração foi novamente submetida a um novo fracionamento em Sephadex LH-20 sendo usado metanol como fase móvel, fornecendo duas subfrações codificadas como amostra 23 (10,7 mg) na forma de um sólido amorfo amarelo e a amostra 24 (4,6 mg) na forma de uma goma amarelada.

A fração 32 (58,5 mg) do fracionamento do extrato hidroalcólico apresentou a formação de um sólido amorfo amarelo. Este foi suspenso em metanol e precipitado com a adição de acetona, analisado por CCD e codificado como amostra 25 (21,9 mg). A Figura 3.9.2 apresenta o fluxograma que resume os procedimentos adotados nos fracionamentos do extrato hidroalcólico.

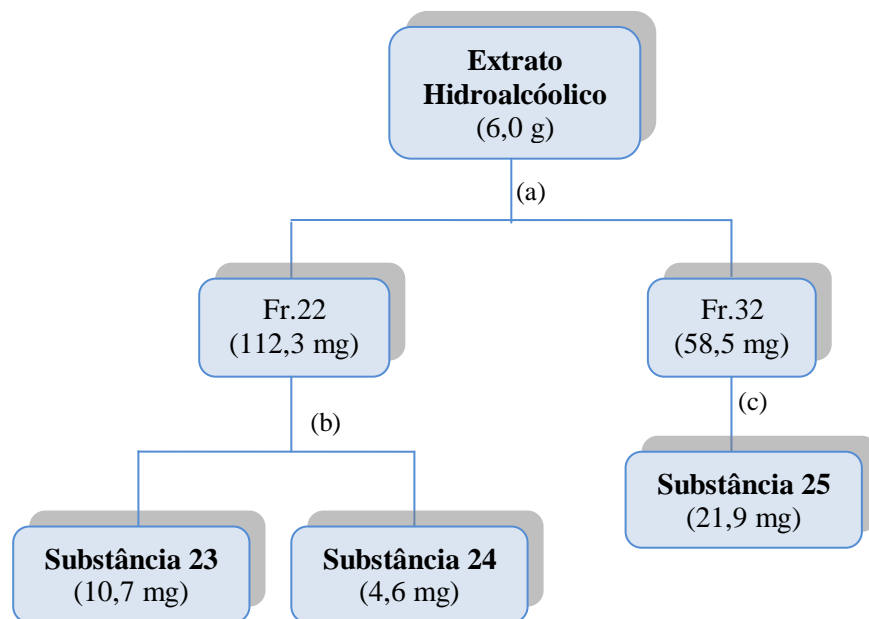
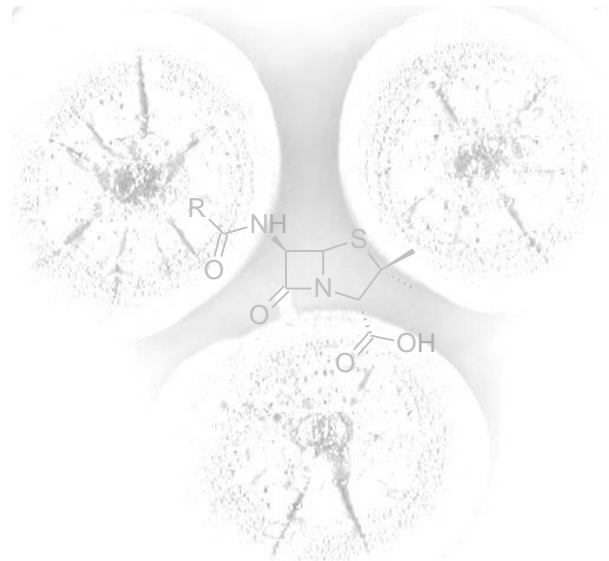


Figura 3.9.2. Fluxograma representado o estudo químico do extrato **hidroalcólico** das raízes de *M. flexuosa*.

- (a): Sephadex LH-20; $h=80$ cm e $\varphi = 3,0$ cm.
 (b): Sephadex LH-20; $h=30$ cm e $\varphi = 2,0$ cm.
 (c) Suspensão em MeOH e precipitação com acetona.

4.RESULTADOS



4.1. Fungos endofíticos de *Strychnos cf. toxifera*. e *Mauritia flexuosa*.

Foram isolados 47 fungos endofíticos a partir dos diversos fragmentos de *Strychnos* sp. e 11 fungos endofíticos isolados das raízes de *Mauritia flexuosa*. Quatro grupos que ainda não foram identificados foram classificados como: Preto feltroso, Amarelo, Branco feltroso e branco cotonoso. Os demais grupos são constituídos por fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Guignardia* e *Pestalotiopsis*. O meio de cultura de onde foi isolada uma quantidade maior de endófitos foi o meio ISP2 seguido do meio BDA e por último o meio AVEIA. Isto se explica devido a utilização de antifúngicos no meio AVEIA enquanto que foi utilizado antibiótico nos meios ISP2 e BDA (Figuras 43 e 44). De *Strychnos cf. toxifera* foram isoladas 29 linhagens de *Penicillium*, duas de *Trichoderma*, uma de *Gliocladium*, uma de Amarelo, uma de Branco feltroso, duas de Branco cotonoso, três de *Xylaria*, três de *Colletotrichum*, duas de *Guignardia* e duas de *Pestalotiopsis* (Tabela 4.1.1 e Figura 4.4.1).

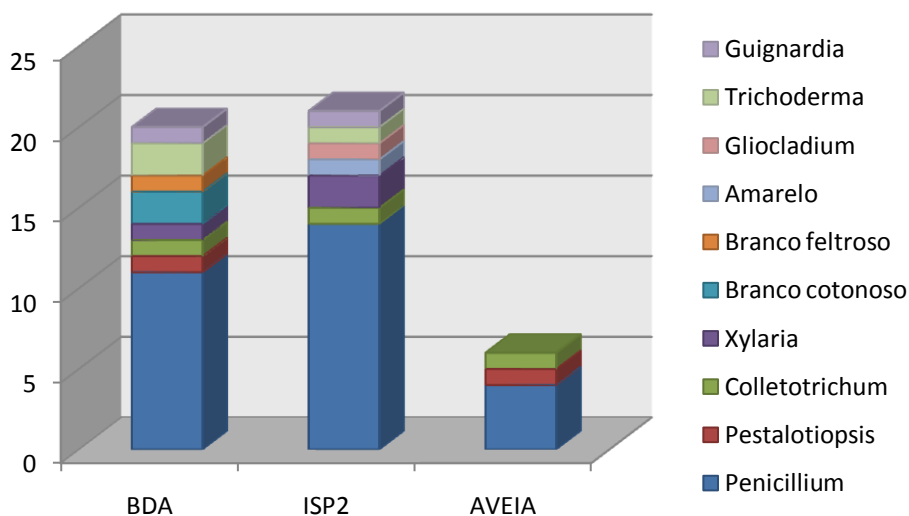


Figura 4.1.1. Relação entre a diversidade de gêneros dos isolados de *Strychnos cf. toxifera* e o meio de cultura do isolamento.

Das raízes de *Mauritia flexuosa* foram isoladas 6 linhagens de *Penicillium*, 2 de *Trichoderma*, 1 de *Xylaria*, 1 de *Guignardia* e 1 de Branco feltroso (Figura 4.1.2).

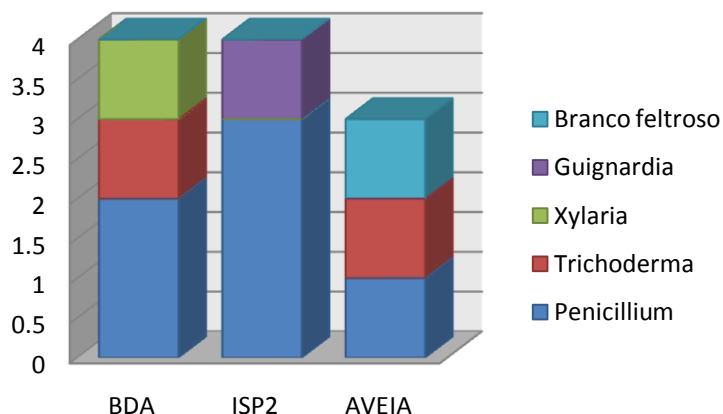


Figura 4.1.2. Relação entre a diversidade de gêneros dos isolados de *Mauritia flexuosa* e o meio de cultura do isolamento.

Tabela 4.1.1. Número de fungos endofíticos isolados de *Strychnos cf. toxifera* e *Mauritia flexuosa* por gênero e meio de cultura.

| Gênero | BDA | | ISP2 | | AVEIA | | Total |
|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------|
| | <i>Strychnos</i> | <i>Mauritia</i> | <i>Strychnos</i> | <i>Mauritia</i> | <i>Strychnos</i> | <i>Mauritia</i> | |
| <i>Pestalotipsis</i> | 1 | - | - | - | 1 | - | 2 |
| <i>Trichoderma</i> | 2 | 1 | 1 | - | - | 1 | 6 |
| <i>Xylaria</i> | 1 | 1 | 2 | - | - | - | 4 |
| <i>Penicillium</i> | 11 | 2 | 14 | 3 | 4 | 1 | 35 |
| <i>Guignardia</i> | 1 | - | 1 | 1 | - | - | 3 |
| Branco feltroso | 1 | - | - | - | - | 1 | 2 |
| Branco cotonoso | 2 | - | - | - | - | - | 2 |
| <i>Gliocladium</i> | - | - | 1 | - | - | - | 1 |
| Amarelo | - | - | 1 | - | - | - | 1 |
| <i>Colletotrichum</i> | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 3 |
| | 20 | 4 | 21 | 4 | 7 | 3 | 58 |

Os valores observados nos isolamentos dos endófitos revelam uma alta predominância de indivíduos do gênero *Penicillium* em relação aos demais gêneros, podendo indicar a adaptação destes indivíduos aos hospedeiros ou simplesmente ser consequência da facilidade que fungos

desse gênero têm em adaptar-se a diversos ambientes ou ainda da sua facilidade de crescer nos meios e condições utilizados. De cada tecido da hospedeira foi encontrada mais de uma espécie endofítica o que corrobora com a alta diversidade encontrada de organismos endofíticos em simbiose com diversas plantas com estudos similares. Os resultados obtidos apontam que os grupos de endofíticos estão distribuídos de forma específica em cada tecido ou órgão como apresenta a Figura 4.1.3. Estas diferenças poderiam ser refletidas na adaptabilidade dos fungos por certos tecidos do hospedeiro, o que vai de encontro com Petrini et al (1992) que conclui em seu trabalho que diferentes tecidos de plantas e órgãos podem exibir microhabitats distintos.

Distribuição das linhagens Isoladas de *Strychnos cf. toxifera*

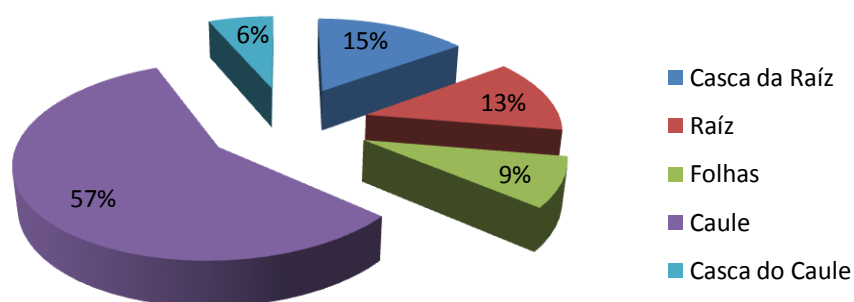


Figura 4.1.3. Relação das quantidades de linhagens por parte da hospedeira *Strychnos cf. toxifera*.

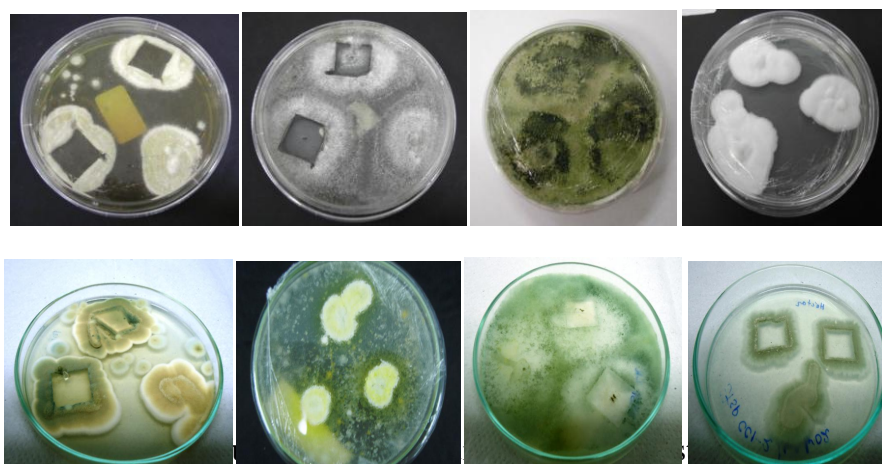


Figura 4.1.4. Algumas das linhagens obtidas.

O cultivo em pequena escala fermentativa (Item 3.3) forneceu um total de 156 extratos, com destaque para o extrato do meio fermentativo em AcOEt do fungo Stsp CC1-2/ 1-1 b 02 que apresentou um rendimento bastante alto além da formação de cristais, os extratos do micélio em MeOH dos fungos Stsp C1-2/1-2 e Stsp C2-1d apresentam massa maiores que um grama representado os maiores rendimentos de extração da fase do cultivo em pequena escala.

4.2. Testes de atividade anticâncer.

Para os testes de atividade citotóxica foram inicialmente selecionados 28 extratos que foram enviados ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará sob a responsabilidade da Dr^a Cláudia do Ó Pessoa. Destes extratos cinco apresentaram atividade anticâncer frente às células tumorais utilizadas. Apenas os extratos que apresentarem valores de inibição $\geq 90\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) são escolhidos para avaliações subseqüentes, valor este considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral (Tabela 4.2.1).

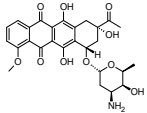
Tabela 4.2.1. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais para os melhores resultados obtidos. Valores são média \pm DPM.

| Amostra | SF295 ^a | | HCT-8 ^b | | MDA-MB435 ^c | |
|---------------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------|------------------------|--------|
| | Média | DMP ^d | Média | DMP | Média | DMP |
| Stsp CR b | 57,55% | 1,13% | 68,56% | 1,55% | 32,17% | 6,96% |
| Stsp C1-2/1-2 | 41,76% | 5,71% | 51,93% | 0,67% | 67,18% | 3,48% |
| Stsp F2.3.2c | 83,10% | 5,41% | 87,86% | 0,59% | 76,96% | 0,48% |
| Stsp C2.2/1-1a | 61,21% | 42,68% | 36,24% | 31,44% | 62,32% | 30,46% |
| Stsp R1/ 1-2 | 89,64% | 12,25% | 14,32% | 3,70% | 95,42% | 8,22% |
| Stsp R1/ 1-2 (micélio) | 11,74% | 1,13% | -17,07% | 3,70% | 19,18% | 4,45% |
| Stsp C2-1 c | 42,35% | 0,23% | 34,72% | 3,40% | 14,94% | 1,16% |
| Stsp CR2.3-1 | 102,02% | 1,05% | 100,84% | 0,44% | 102,74% | 0,58% |
| PBR 1.2.1 | 102,34% | 0,60% | 100,99% | 0,67% | 102,39% | 0,48% |
| PBR 2.2.2 | 101,43% | 1,13% | 98,33% | 0,89% | 100,07% | 1,06% |

^aCélulas Cancerígenas de Glioblastoma – Humano, ^bCélulas Cancerígenas de Cólon – Humano, ^cCélulas Cancerígenas de Mama – Humano, ^dDesvio Médio Padrão

As três amostras que obtiveram os melhores resultados de inibição do crescimento celular tiveram suas CI_{50} elucidadas por elaboração de curvas de concentração demonstradas na Tabela 4.2.2. Baseados nos resultados foram selecionadas para cultivo em larga escala as linhagens PBR 2.2.2, PBR 1.2.1 e Stsp C R2.3.1. devido aos altos valores de inibição obtidos nas análises contra todas as linhagens de células tumorais testadas. As linhagens Stsp F2.3.2.c e Stsp R1/1-2 apresentaram bons resultados com porcentagens de inibição do crescimento celular superiores a 85% em mais de uma linhagem de células tumorais.

Tabela 4.2.2. Valores de CI_{50} e intervalo de 95% de confiança (IC95%) em $\mu\text{g/mL}$ das substâncias selecionadas em diferentes linhagens celulares no teste do MTT.

| Linhagem celular | HCT-8 | HL-60 ^a | MDA/MB-435 | SF-295 |
|--|-------------|--------------------|-------------|------------|
|  Doxorrubicina | 0.01 – 0.02 | 0.01 – 0.02 | 0.01 – 0.02 | |
| CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$] | | | | |
| Stsp CR2.3-1 | > 20 | > 20 | > 20 | > 20 |
| (IC95%) | | | | |
| PBR 1.2.1 | 7,9 | 4,7 | 10,5 | 6,3 |
| (IC95%) | 6.6 - 9.3 | 3.7 - 6.0 | 8.7 - 12.7 | 4.6 - 8.5 |
| PBR 2.2.2 | > 20 | 9,8 | > 20 | 15,4 |
| (IC95%) | | 7.5 - 12.8 | | 11.3- 21.0 |

^aCélulas Cancerígenas de Leucemia – Humano

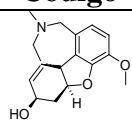
4.3. Testes antiacetilcolinesterase

4.3.1. Testes qualitativos em CCD

Para uma triagem inicial da atividade antiacetilcolinesterase optou-se pelas análises em CCD combinando três metodologias diferentes. Os resultados dos testes de Ellman, Marston e Falso-positivo em CCD para os extratos brutos dos fungos endofíticos de *M. flexuosa* e

Strychnos cf. toxifera bem como os resultados do padrão galantamina estão listados na tabela 4.3.1.

Tabela 4.3.1. Resultados positivos dos testes antiacetilcolinesterase em CCD.

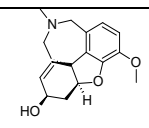
| Código | Teste de Ellman | Teste Falso-Positivo | Teste de Marston |
|--|-----------------|----------------------|------------------|
|  Galantamina | ++ | - | ++ |
| Stsp CR1.1.2 b (micélio) | + | - | + |
| Stsp CC2.1/1-2 (AcOEt) | + | - | + |
| Stsp C2.2/1-1 a (AcOEt) | ++ | - | - |
| Stsp CR1.1.2 b (8:2) | ++ | - | ++ |
| Stsp C2-1 c (AcOEt) | - | - | + |
| Stsp C1.2/1-1 f (AcOEt) | + | - | - |
| Stsp C1-2/1-1 a (micélio) | + | - | - |
| PBR 1.2.1 (AcOEt) | ++ | + | - |
| Stsp C2-1/2-2 (AcOEt) | - | - | + |
| Stsp C2.2/1-1 a (AcOEt) | - | - | + |
| Stsp C1-2/1-2 (AcOEt) | + | - | + |

4.3.2. Testes quantitativos por IMER

De acordo com os resultados dos testes antiacetilcolinesterase em CCD foram selecionadas as linhagens que apresentaram melhores resultados nas triagens iniciais para serem testadas na metodologia por IMER. Os testes de atividade antiacetilcolinesterase tanto qualitativos como quantitativos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP sob a responsabilidade da

Dr^a Carmem Lúcia Cardoso. As linhagens selecionadas e seus resultados do teste em IMER em comparação com o padrão galantamina estão listados na Tabela 4.3.2.

Tabela 4.3.2. Resultados dos testes antiacetilcolinesterase quantitativo por IMER.

| Amostras | <i>Imer-AChE</i> (% de inibição) | Contraprova em CCD |
|---|----------------------------------|--------------------|
|  Galantamina ^a | + 85,2 | + |
| Stsp CC2.1/1-2 | + 39,6 | + |
| Stsp C2.2/1-1 a | + 41,8 | + |
| Stsp CR1.1.2 b | + 38,9 | + |
| Stsp C1.2/1-1 f | + 19,4 | + |
| Stsp C1-2/1-1 a | + 42,5 | + |

^ainibidor padrão da AChE; (+) Inibição da atividade AChE; (-) não inibição; Valor em % de inibição calculado pela redução área da banda cromatográfica.

4.4. Testes antioxidantes.

4.4.1. Teste qualitativo em CCD.

Os extratos brutos dos fungos endofíticos testados estão listados na Tabela 8 e seus resultados positivos frente ao teste antioxidante pelo método de captura do radical DPPH em CCD em comparação com os padrões rutina e quercetina (Figura 4.4.1) estão listados na tabela 4.4.1.

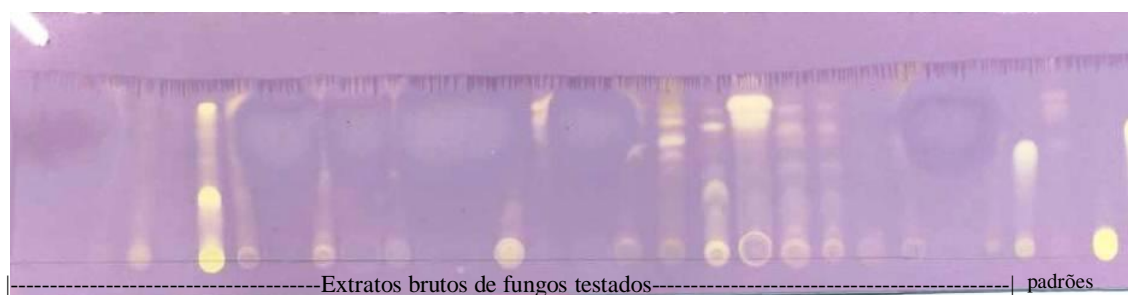
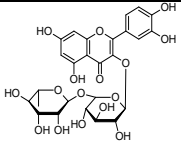
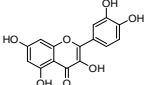


Figura 4.4.1. Placa de CCD indicando a atividade de alguns dos extratos testados.

Da mesma forma que as amostras testadas no teste antiacetilcolinesterase, o teste antioxidante qualitativo foi realizado na USP sob a responsabilidade da Dr^a Carmem Lúcia Cardoso, sendo utilizadas as mesmas amostras dos testes anteriores.

Tabela 4.4.1. Relação das amostras que apresentaram atividade no teste antioxidante.

| Código | Teste Antioxidante |
|---|---------------------------|
|  Rutina | ++ |
|  Quercetina | ++ |
| Stsp R2.1.1 ^a | + |
| Stsp F2.3.2 c | + |
| Stsp CR1.1.2 b | ++ |
| Stsp C2-1/1-2 | + |
| Stsp CR2.3.1 | + |
| Stsp C2-1 c | + |
| Stsp C1.2/1-1 f | + |
| Stsp C1-2/1-1 a | + |
| PBR 1.2.1 | ++ |
| Stsp C2-1/2-2 | + |
| Stsp C2.2/1-1 a | + |
| Stsp C1-2/1-3 | + |
| Stsp C1-2/1-2 | + |
| Stsp CR b | ++ |
| PBR 2.2.2 | + |

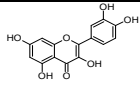
^aCoincidentemente todos os resultados positivos foram para os extratos do meio extraído com AcOEt

A grande quantidade de resultados positivos no teste de atividade antioxidante aponta para a presença de substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes serem enzimáticos ou não enzimáticos. O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas. A atividade dos extratos aponta para a presença de substâncias fenólicas comuns em fungos que podem ser responsáveis pela atividade do extrato.

4.4.2. Teste quantitativo.

O teste antioxidante quantitativo foi realizado no laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas sob a responsabilidade da Msc. Priscila Oliveira, aonde foram testados apenas os extratos brutos das raízes de *M. flexuosa*. Os resultados estão listados na tabela 4.4.2.

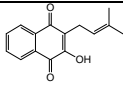
Tabela 4.4.2. Resultados do teste antioxidante quantitativo.

| Amostra | CS ₅₀ ± DP (µg/mL) |
|---|-------------------------------|
|  Quercetina | 3,27 ± 0,19 |
| RFH | ND |
| RFA | 23,393 ± 1,295 |
| RFM | 78,015 ± 2,779 |
| RGH | ND |
| RGA | 30,239 ± 0,918 |
| RGM | 11,385 ± 0,618 |

4.5. Teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina*.

Para o teste de toxicidade contra *A. salina* foram apenas testados os extratos das raízes de *M. flexuosa*. Os resultados do ensaio citotóxico foram expressos em CL₅₀ com intervalo de confiança de 95% sendo utilizado como controle positivo o lapachol. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.5.1. Dentre os extratos testados o que mostrou ser o mais promissor foi o extrato hexânico das raízes submersas com o menor valor de CL₅₀. Os extratos que apresentaram valor de CL₅₀ abaixo de 1000 µg/mL são considerados como detentores de atividade biológica (Ferrigni et al. 1984). Os testes de Citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas sob a responsabilidade de Klenicy de Lima Yamaguchi.

Tabela 4.5.1. Resultados do teste de toxicidade frente a *Artemia salina*.

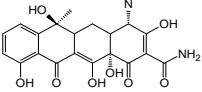
| Amostras | CL ₅₀ (µg/mL) |
|---|--------------------------|
|  Lapachol | 70 |
| RFH | 74,4692 |
| RFA | 258,8588 |
| RFM | 286,7141 |
| RGH | 58,78199 |
| RGA | 150, 0120 |
| RGM | 273,9623 |

4.6. Teste de atividade antimicrobiana frente à *Bacillus cereus*.

Os testes antimicrobianos por difusão em placa contra *Bacillus cereus* (Figura 48) apontaram para apenas duas linhagens ativas e com halos de inibição inferiores aos da tetraciclina que foi utilizada como controle, estes testes foram realizados no laboratório do Grupo de Estudos em Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia (GEMMA) sob a responsabilidade da Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza. Os resultados das linhagens ativas bem como do controle tetraciclina utilizados no teste estão listados na Tabela 4.6.1.

**Figura 4.6.1.** Halos de inibição indicando a atividade antimicrobiana.

Tabela 4.6.1. Resultados positivos dos testes antimicrobianos frente à *Bacillus cereus*.

| Amostra | Halo de inibição |
|---|------------------|
|  Tetraciclina | 25 mm |
| Stsp CR2.3-1 (AcOEt) | 14 mm |
| Stsp CR b (AcOEt) | 17 mm |

4.7. Teste de atividade antifúngica frente à *Candida albicans*.

Os testes de atividade antifúngica realizados pelo método de microdiluição em caldo usando placas de Eliza (Figura 4.7.1) de modo a se verificar a atividade fungicida ou fungistática dos extratos brutos de endofíticos usando como controle positivo cetoconazol. Este ensaio foi realizado no mesmo laboratório do grupo GEMMA também sob a supervisão da Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza. A Tabela 4.7.1 lista as linhagens que apresentaram atividade antifúngica. Dentre as amostras que apresentaram atividade destaca-se o extrato do meio em AcOEt da linhagem Stsp CR 2.3.1. que apresentou atividade em diversos testes, sendo uma das linhagens selecionadas para o cultivo em larga escala. Na figura 4.7.2 estão as placas evidenciando as atividades fungicida e fungistática das amostras listadas.

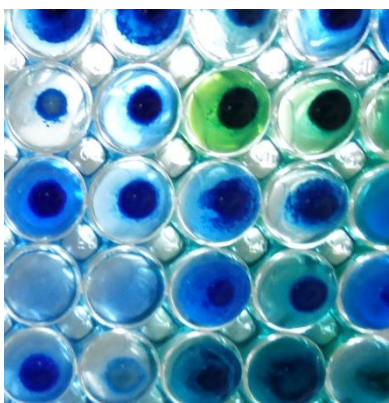
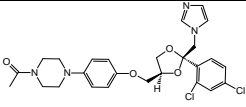
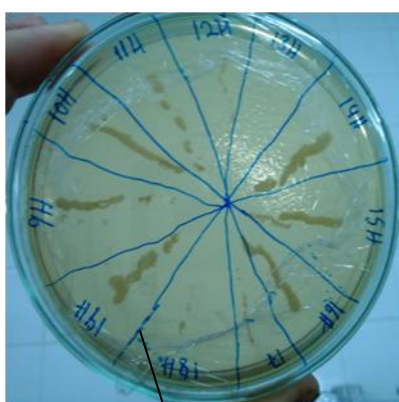


Figura 4.7.1. Poços com coloração esverdeada após adição do corante indicando a presença de atividade antifúngica.

Tabela 4.7.1. Resultados positivos do teste antifúngico frente à *Candida albicans*.

| Amostra | Fungicida | Fungistática |
|--|-----------|--------------|
|  Cetoconazol | ++ | - |
| Stsp CR 2.3.1 (meio em AcOEt) | ++ | - |
| Stsp C2-2/2-2 (meio em AcOEt) | ++ | - |
| Stsp C1-2/1-1f (meio em AcOEt) | - | ++ |
| Stsp CR 2.3.1 (micélio em MeOH) | - | ++ |
| Stsp C2-1c (micélio em MeOH) | ++ | - |
| Stsp C1-2/1-2 (meio em AcOEt) | - | ++ |
| Stsp C1-2/1.3 (micélio em MeOH) | - | ++ |



Fungistática



Fungicida

Figura 4.7.2. Placas confirmando as atividades antifúngicas dos extratos.

4.8. Testes antimicrobianos das substâncias puras.

As substâncias puras que apresentaram uma maior complexidade estrutural, além de uma boa massa obtida foram submetidas a testes de atividade antimicrobiana, o método utilizado foi o de diluição em caldo onde é observada a atividade antimicrobiana pela mudança na coloração da resazurina, devido a sua redução a resorufina (Figura 4.8.1).

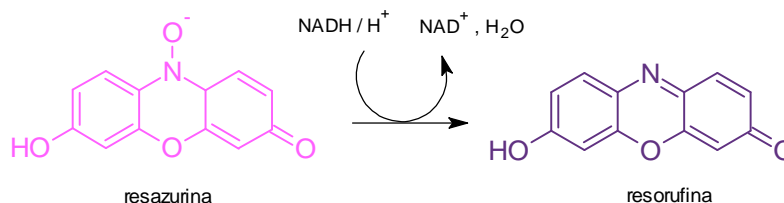
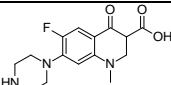
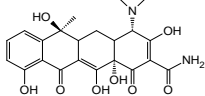


Figura 4.8.1. Esquema de redução catalítica da resazurina.

Para os ensaios antimicrobianos foram testadas as substâncias 1, 8 e 11 em diferentes concentrações de modo a se observar sua diluição inibitória mínima (MID), todas contra cinco linhagens de bactérias patogênicas. Os resultados dos testes antimicrobianos estão listados na Tabela 4.8.1.

Tabela 4.8.1. Resultados para o MID dos testes antimicrobianos.

| Amostra | Concentração | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Micrococcus luteus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
|---|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
|  norfloxacina | 10 µg/mL | + | + | + | + | + |
|  tetraciclina | 10 µg/mL | + | + | + | + | - |
| Amostra 1 | 100 µg/mL | + | - | + | + | - |
| | 50 µg/mL | - | - | - | - | - |
| Amostra 11 | 100 µg/mL | - | - | + | - | - |
| | 50 µg/mL | - | - | + | - | - |
| | 25 µg/mL | - | - | + | - | - |

| | | | | | | |
|-----------|------------|---|---|---|---|---|
| | 12,5 µg/mL | - | - | + | - | - |
| Amostra 8 | 100 µg/mL | - | - | + | - | - |
| | 50 µg/mL | - | - | + | - | - |
| | 25 µg/mL | - | - | - | - | - |
| | 12,5 µg/mL | - | - | - | - | - |

Após isto as concentrações que apresentaram atividade foram submetidas a novos testes de modo que ao final sejam plaqueados os conteúdos dos poços para que se tenha noção da atividade bactericida ou bacteriostática. Os resultados (Figura 4.8.2) obtidos para as concentrações testadas estão listados na Tabela 4.8.2.

Tabela 4.8.2. Resultados das contraprovas com os intervalos de MID.

| Bactéria | Substância testada | | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| | Substância 1 | Substância 11 | Substância 8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | MIC ≤ 100 µg/mL Bactericida | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - |
| <i>Micrococcus luteus</i> | MIC ≤ 100 µg/mL Bactericida | 12,5 < MIC ≤ 100 µg/mL Bactericida | 50 < MIC ≤ 100 µg/mL Bactericida |
| <i>Escherichia coli</i> | MIC ≤ 100 µg/mL Bacteriostática | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | - | - | - |

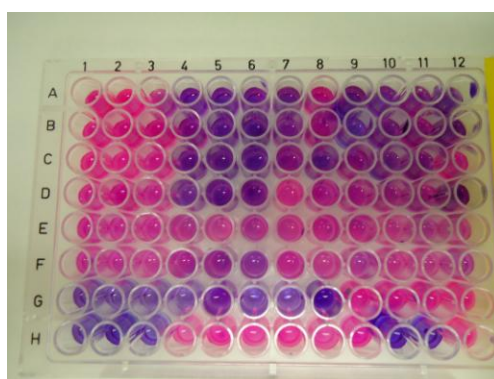


Figura 4.8.2. Placas de Elisa aonde foi realizado o teste antimicrobiano, os poços com coloração violeta indicam a atividade positiva da amostra 11.

4.9. Determinação estrutural das substâncias isoladas.

4.9.1. Fungo PBR 2.2.2. (*Penicillium* sp.)

Da linhagem de *Penicillium* sp. PBR 2.2.2. (Figura 4.9.1) isolada das raízes de *Mauritia flexuosa* e cultivada em larga escala no meio ISP2, cujos extratos foram ativos contra quatro linhagens de células cancerígenas (mama, cólon, glioblastoma e leucemia), além de ter apresentado atividade antioxidante foram isoladas as substâncias 1-5 (Figura 4.9.2; Item 3.8.1)

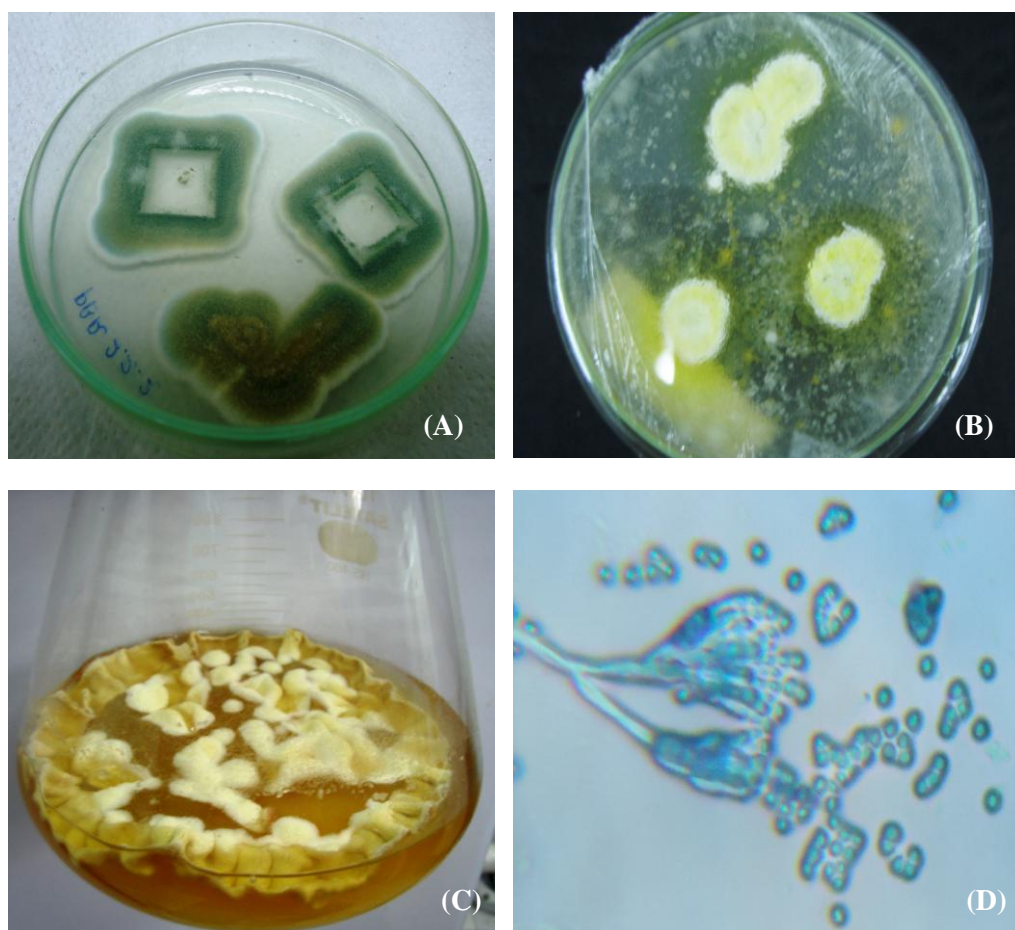
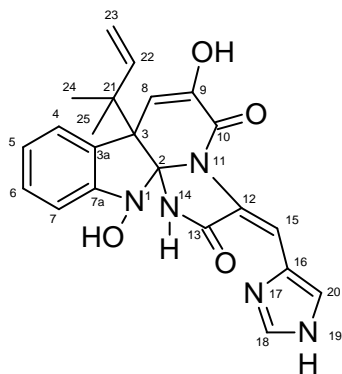
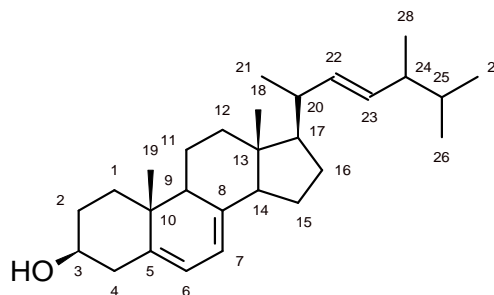


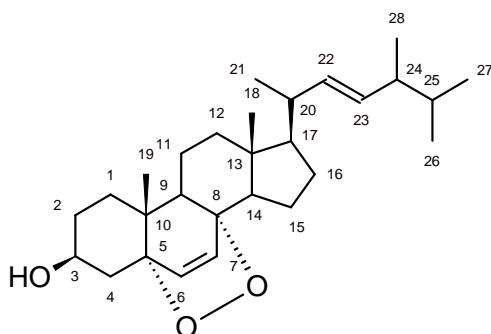
Figura 4.9.1. (A) Cultivado em meio Czapek, (B) Linhagem PBR 2.2.2. sob estresse excretando um pigmenta amarelo, (C) Cultivo em larga escala no meio ISP2 e (D) Imagem de microscopia óptica da mesma linhagem.



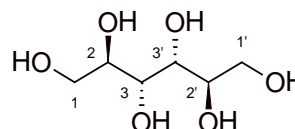
glandicolina B – **Amostra 1**
 $C_{22}H_{21}N_5O_4$; 419,4



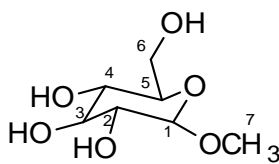
ergosterol – **Amostra 2**
 $C_{28}H_{44}O$; 396,6



peróxido de ergosterol – **Amostra 3**
 $C_{28}H_{44}O_3$; 428,7



manitol – **Amostra 5**
 $C_6H_{14}O_6$; 182,2



1-*O*-metil- α -D-glicopiranosose – **Amostra 4**
 $C_7H_{14}O_6$; 194,2

Figura 4.9.2. Substâncias isoladas da linhagem PBR 2.2.2.

Amostra 1.

A amostra 1 foi isolada por CLAE preparativo (Figura 4.9.3) de uma fração proveniente do extrato **P1** com aparência de uma goma amarela, a esta substância é a provável pigmentação apresentada pelo fungo PBR 2.2.2. (Figura 4.9.1). No espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.9.4 e 4.9.5) indicou a presença de sinais metílicos, olefínicos e aromáticos. Os hidrogênios em δ 7,63 (d, $J= 8$ Hz), δ 7,28 (t, $J= 8$ Hz), δ 7,04 (t, $J= 8$ Hz) e δ 6,96 (d, $J= 8$ Hz) evidenciam a presença de um anel aromático dissubstituído em orientação *orto*, isto comprovado pelo experimento de COSY (Figura 4.9.7).

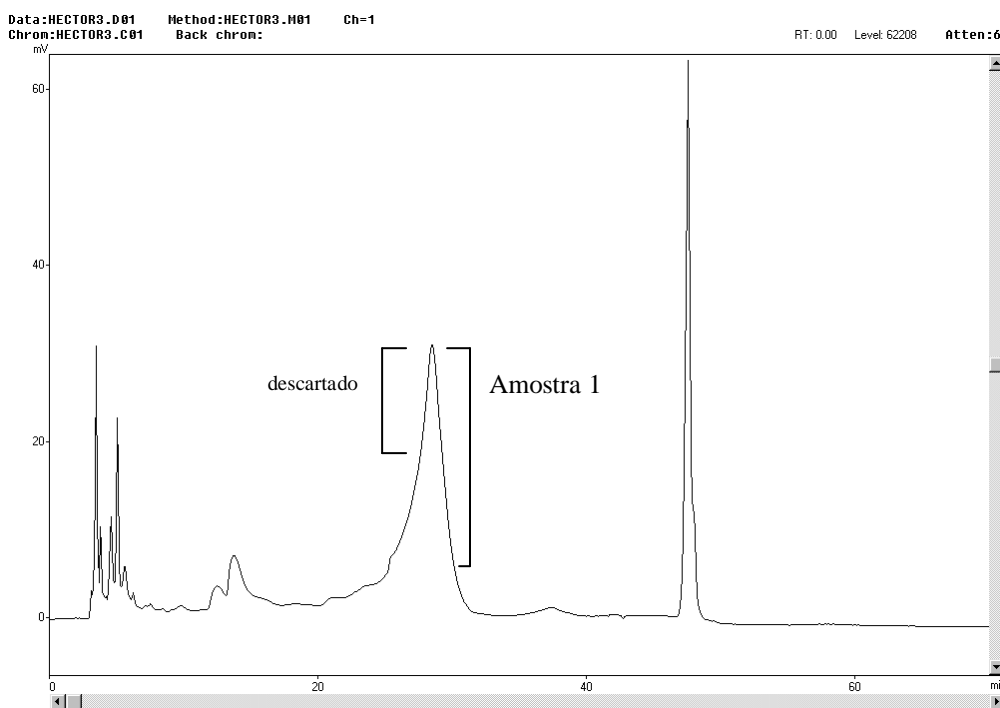


Figura 4.9.3. Cromatograma da fração D2 em coluna Synergi preparativa 250 mm x 21,20 mm, método 50% MeOH com fluxo de 21,3 mL/min.

Anteriormente a amostra 1 quando ainda estava na fração D2 submetida a purificação por CLAE preparativo teve seu espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.9.6) e os espectros bidimensionais tirados por possuir grande quantidade de massa, após a purificação foi obtida uma massa bem inferior o que comprometeu os experimentos de RMN ficando apenas com razoável qualidade o espectro de RMN de ^1H , de modo que serão apresentados os mapas de contorno e o espectro de RMN de ^{13}C ainda da fração impura em metanol-*d* e o espectros de RMN de ^1H e NOE da substancia já purificada em acetona-*d6*.

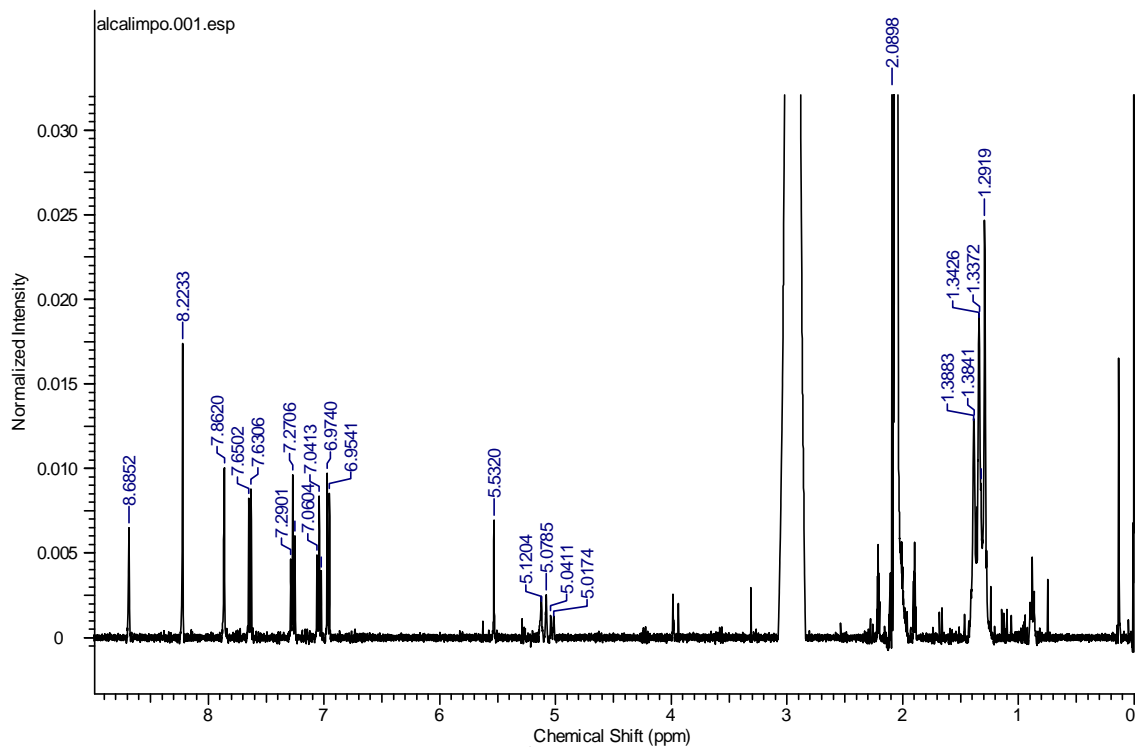


Figura 4.9.4. Espectro de RMN de ^1H da amostra 1 em acetona- d_6 (400 MHz).

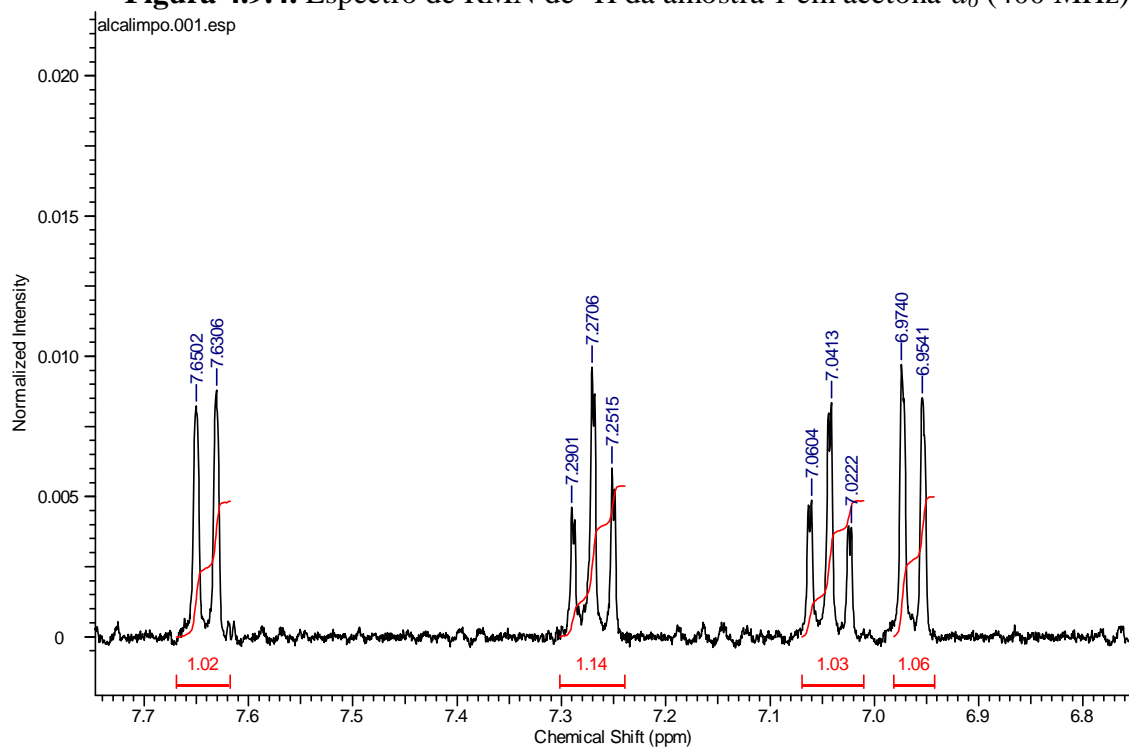


Figura 4.9.5. Ampliação da região de aromáticos do espectro de RMN de ^1H da amostra 1 em acetona- d_6 (400 MHz).

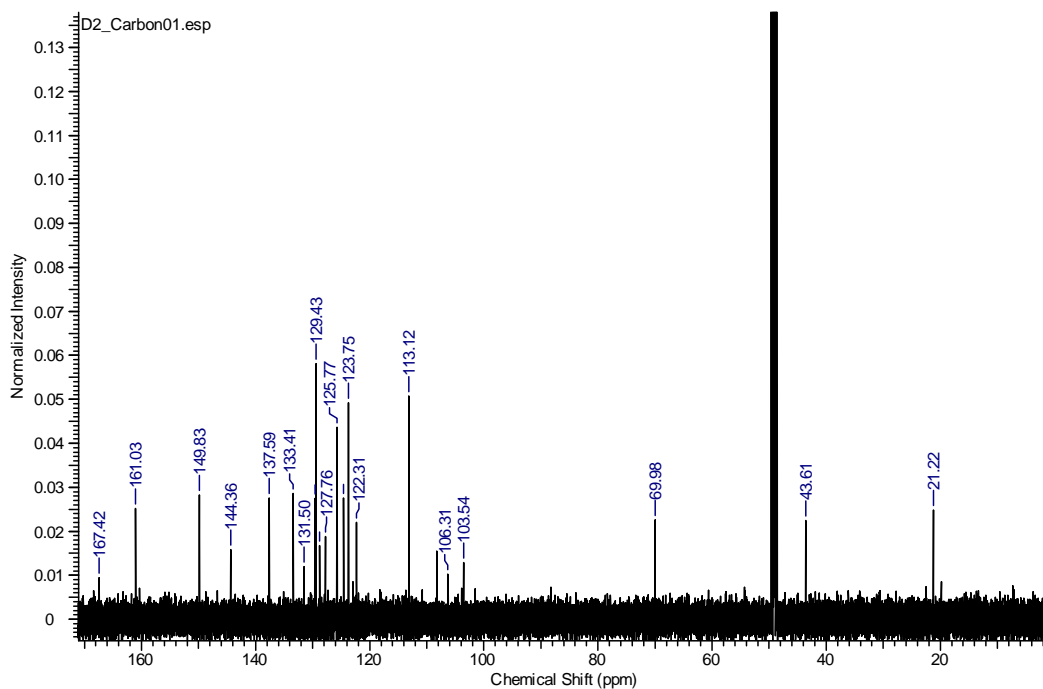


Figura 4.9.6. Espectro de RMN de ^{13}C da fração D2 que originou a amostra 1 em metanol- d_4 (500 MHz).

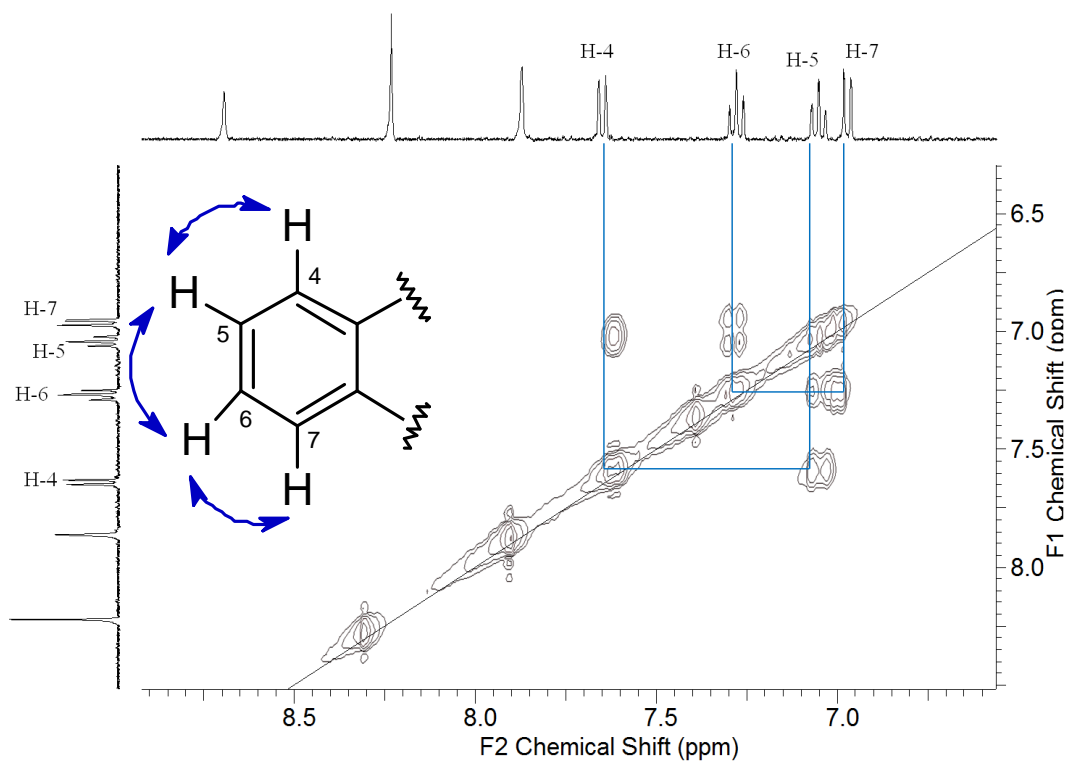


Figura 4.9.7. Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da amostra 1 em metanol- d_4 (500 MHz)

Uma rápida análise de espectro de massas (Figura 4.9.8) da amostra 1 aponta para consecutivas perdas neutras de 17 daltons referentes a perdas de amônia (NH_3) o que sugeriu que a molécula fosse nitrogenada. Uma busca detalhada na literatura a cerca de alguma semelhança nos dados espectroscópicos da amostra 1 com alguma substância já conhecida, o que levou a acreditar-se que se tratava de um alcalóide derivado da meleagrina (KAWAI et al., 1984).

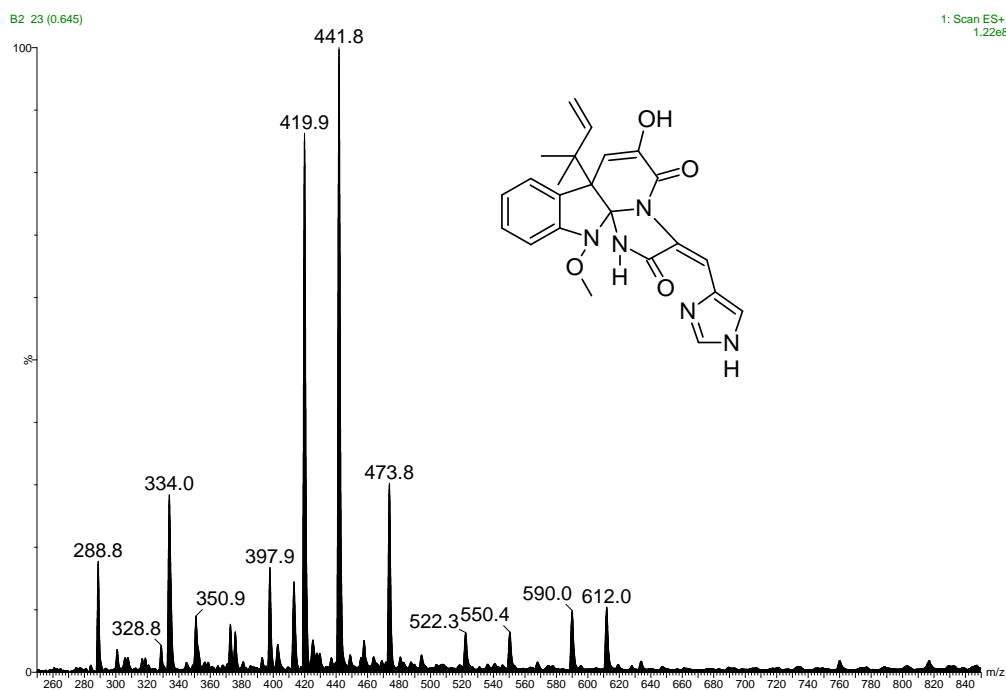


Figura 4.9.8. Espectro de massas *fullscan* no modo ESI⁺ da amostra 1 e estrutura da meleagrina.

Nos mapas de correlação de HMBC (Figuras 4.9.9 e 4.9.10) são observados acoplamentos bem distintos para os hidrogênios do anel aromáticos e os outros três singletos em δ 8,68, δ 8,22 e δ 7,86, sugerindo que estes sinais estariam em outra parte da molécula distante deste anel. Ainda na Figura 4.9.9 são observadas as correlações de HMBC para os hidrogênios do anel aromático, aonde são observadas correlações chave para a confirmação do anel aromático dissubstituído, estas correlações juntamente com as observadas na Figura 4.9.10 para o singlete em δ 5,53 aonde é confirmada a estrutura parcial para o anel C uma vez que este singlete apresentou correlação com carbonos característicos tais como C9 (enol) e C10 (carbonila α,β insaturada), os sinais metílicos sobrepostos em δ 1,30 levam a confirmação das estruturas parciais de um alcalóide indólico derivado da meleagrina. (Figura 4.9.11).

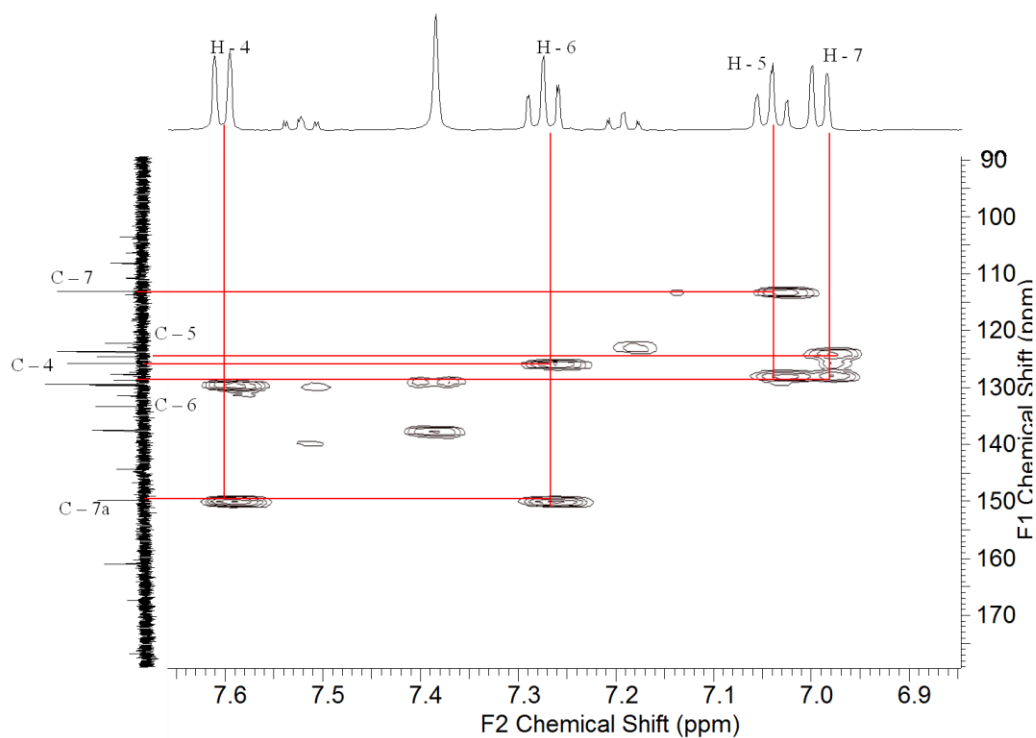


Figura 4.9.9. Ampliação do mapa de HMBC para a região de aromáticos da amostra 1 em metanol-*d*₄.

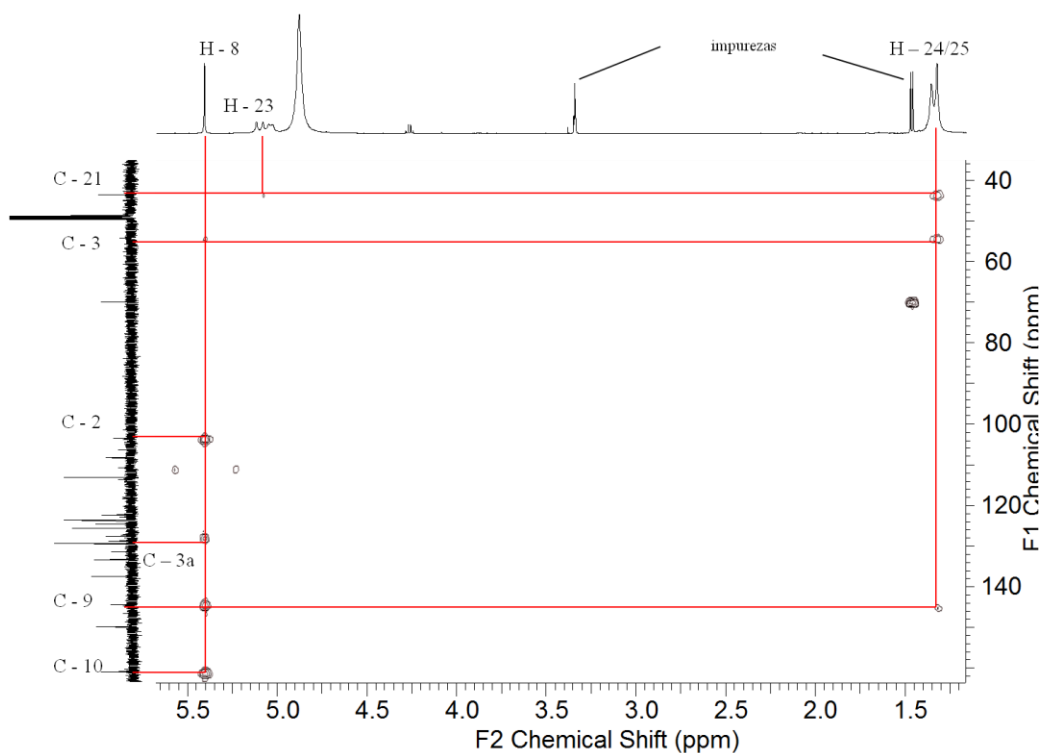


Figura 4.9.10. Ampliação da região mais blindada do mapa de HMBC da amostra 1 em metanol-*d*₄.

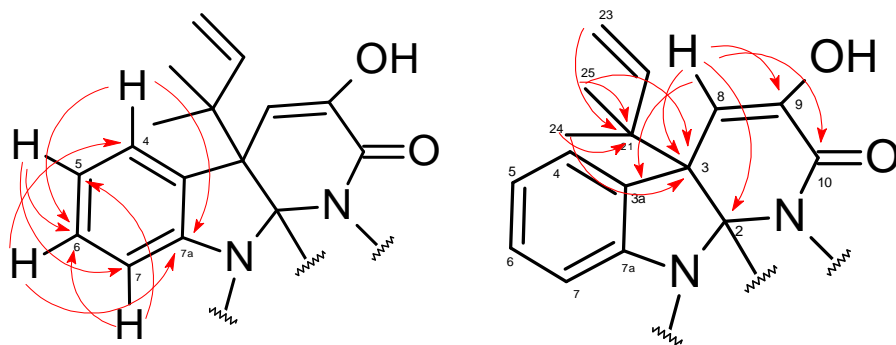


Figura 4.9.11. Correlações de HMBC dos hidrogênios aromáticos, olefínico e do grupo isoprenila confirmando a estrutura parcial derivada da meleagrina.

Os singletos observados na região mais desblindada do espectro de hidrogênio apresentaram alguns acoplamentos, tais como o H-15 que acopla com o carbono carbonílico em C13 com deslocamento químico característico de lactamas e os hidrogênios H-18 e H-20 que acoplam com os carbonos C20 e C18 bem como outros acoplamentos respectivamente confirmando a presença de um anel de histidina na molécula (Figura 4.9.12).

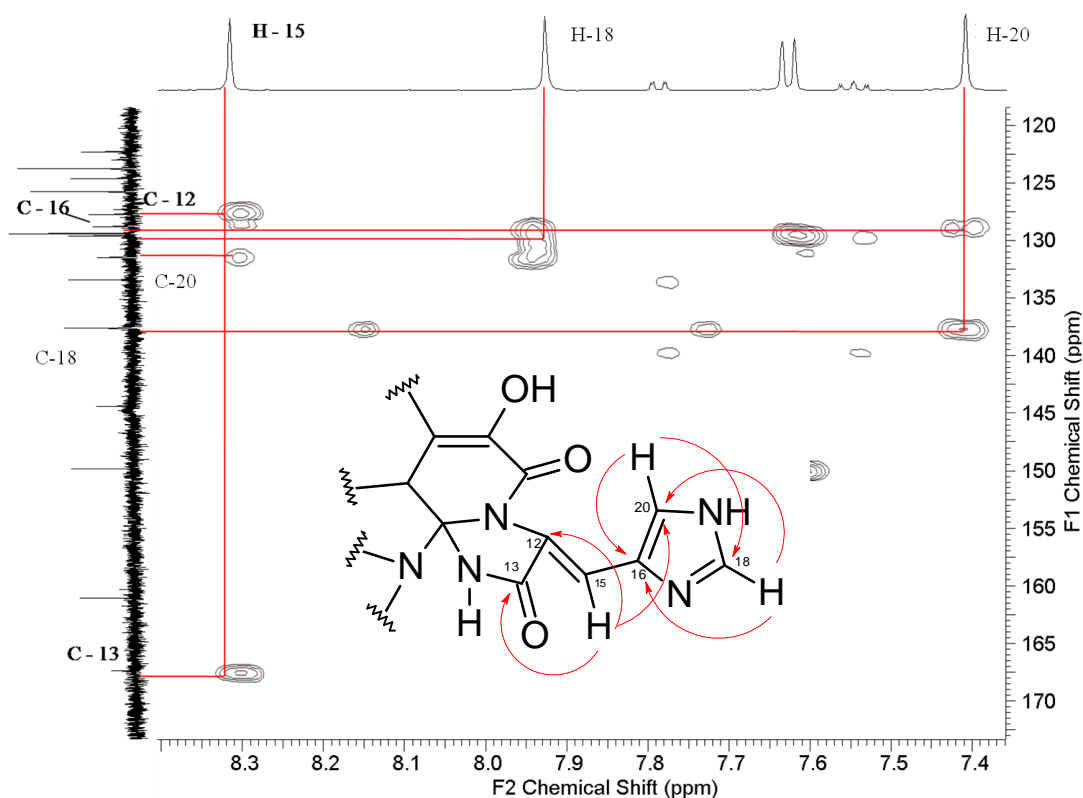


Figura 4.9.12. Ampliação dos singletos na região mais blindada e correlações assinaladas para o anel histidina presente na amostra 1, HMBC gerado em metanol- d_4 .

As diferenças de aparelho utilizado e solvente para cada um dos experimentos de RMN realizados para a amostra 1 bem como algumas diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais de carbono levaram a necessidade da realização de um experimento de NOE que confirmou alguns pontos em aberto na molécula tais como as metilas do grupo isoprenila que apresentou correlação a longa distancia com H-8 e H-4, além da confirmação da presença do anel de histidina uma vez que juntamente com os dados já apresentados o hidrogênio na posição 15 apresentou acoplamento com H-20 (Figuras 4.9.13 e 4.9.14).

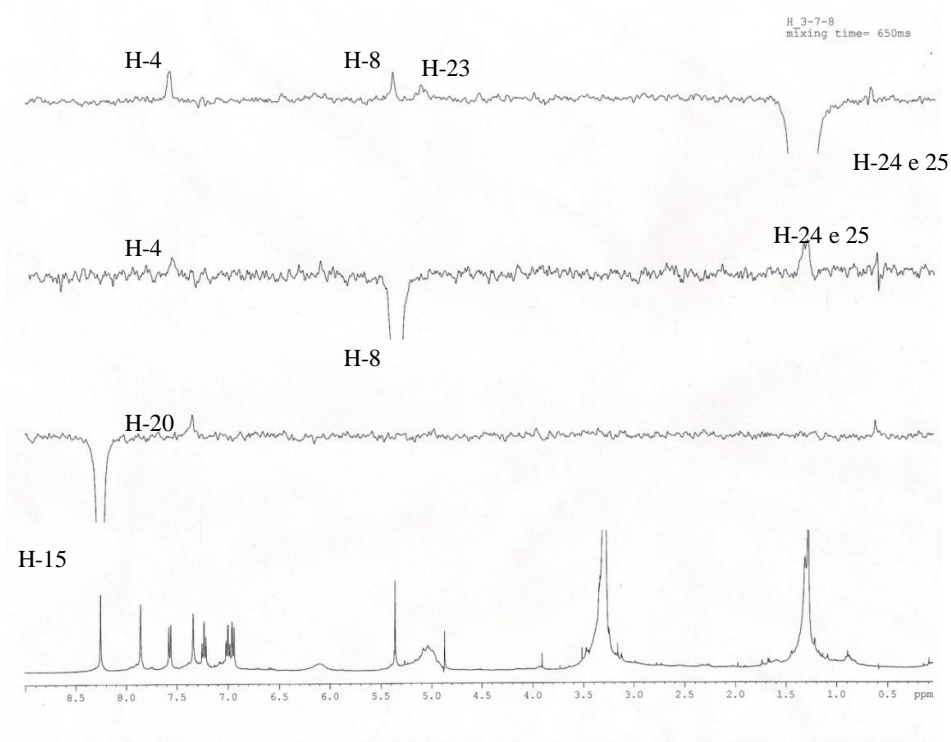


Figura 4.9.13. Espectro de NOE em metanol-*d*₄ da amostra 1 (400 MHz).

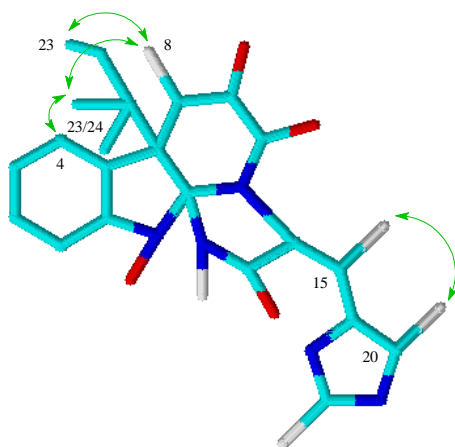


Figura 4.9.14. Correlacoes de NOE observadas para a amostra 1.

Os dados de RMN observados bem como os dados de massas levaram a confirmação de que a substância 1 se tratava de um derivado da melegrina, porém com uma diferença de 13 Daltons na massa observada bem como a ausência de um sinal de metoxila no espectro de RMN de ^1H , estes dados juntamente com os anteriores e a comparação com dados da literatura (DU et al., 2009) levaram a identificação da amostra 1 como sendo o alcalóide indólico glandicolina B (Figura 4.9.15) (Tabela 4.9.1).

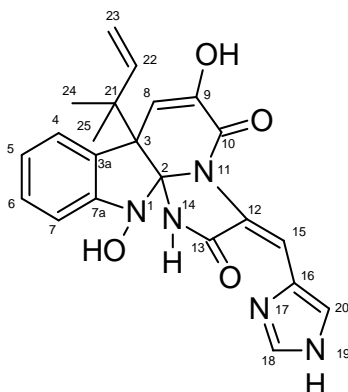


Figura 4.9.15. Estrutura da glandicolina B.

Tabela 4.9.1. Dados da amostra 1 em comparação com os dados da melegrina C descritos na literatura (DU et al., 2009).

| Posição | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}/\text{HSQC}^c$ | HMBC ^c | Cosy | ^1H melegrina C ^b |
|----------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|----------|---------------------------------------|
| 1 | - | - | - | - | 3,70 (s) |
| 2 | - | 103,5 | - | - | - |
| 3 | - | 54,32 | - | - | - |
| 3 ^a | - | 127,7 | - | - | - |
| 4 | 7,63 (d, $J=8$ Hz) | 125,7 | C6, C7a | H-4 | 7,54 (d, $J=7,8$ Hz) |
| 5 | 7,04 (t, $J=8$ Hz) | 123,7 | C3a, C7 | H-4, H-6 | 7,04 (t, $J=7,8$ Hz) |
| 6 | 7,28 (t, $J=8$ Hz) | 129,4 | C4, C7a | H-5, H-7 | 7,25 (t, $J=7,8$ Hz) |
| 7 | 6,96 (d, $J=8$ Hz) | 113,1 | C3a, C5 | H-6 | 6,95 (d, $J=7,8$ Hz) |
| 7 ^a | - | 149,8 | - | - | - |
| 8 | 5,53 (s) | 110,8 | C2, C3a, C9, | - | 5,44 (s) |

| C10 | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|--------|------------------|---|-----------|
| 9 | - | 144,3 | - | - | - |
| 10 | - | 161,0 | - | - | - |
| 12 | - | 127,2 | - | - | - |
| 13 | - | 167,41 | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - |
| 15 | 8,69 (s) | 108,2 | C12, C13, C20 | - | 8,57 (s) |
| 16 | - | 129,6 | - | - | - |
| 18 | 8,22 (s) | 137,6 | C16, C20 | - | 8,48 (s) |
| 20 | 7,89 (s) | 131,5 | C16, C18 | - | 7,63 (s) |
| 21 | - | 43,60 | - | - | - |
| 22 | 6,20 (sl) | 146,7 | - | - | 6,23 (sl) |
| 23^a | 5,10 (d, $J =$ 16 Hz) | 113,7 | C21 | - | 5,13 (dl) |
| 23^b | 5,03 (d, $J = 8$ Hz) | 113,7 | C21 | - | 5,09 (s) |
| 24 | 1,29 (s) | 21,2 | C21, C3 | - | 1,22 (s) |
| 25 | 1,38 (s) | n.d. | C21, C3 | - | 1,34 (s) |

^aDados obtidos em aparelho de 400 MHz e em acetona-*d*₆.

^bDados obtidos em aparelho de 600 MHz e em clorofórmio-*d*.

^cDados obtidos em aparelho de 500 MHz ainda com a fração impura e em metanol-*d*₄.

A glandicolina B, foi isolada anteriormente apenas de *Penicillium glandicola* (KOZLOVSKY et al., 1994). Overy e colaboradores (2005) este alcalóide indólico e outros alcalóides foram identificados por LC/MS em espécies de *Penicillium* da série *Corymbifera* (seção *Viridicata*, subgênero *Penicillium*), sendo considerados como marcadores da mesma, a qual não inclui *P. glandicola* (subgênero *Penicillium*, seção *Penicillium*, série *Claviformia*). Em 2008 Zhelifonova e colaboradores aplicaram metabólitos secundários como ferramenta no estudo taxonômico de *Penicillium* spp., deste modo os subgêneros *Aspegilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* e *Penicillium* tiveram diversas de suas espécies estudadas e verificou-se que havia pelo menos um representante em casa grupo que produzia esta classe de alcalóides, observando-se uma predominância nos subgêneros *Furcatum* e *Penicillium*.

Amostra 2.

O espectro de RMN de ^1H (4.9.16) da amostra 2 cristalizada na forma de agulhas (Item 3.8.1) apresenta sinais de hidrogênios alifáticos metílicos, carbinólicos e vinílicos. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 28 sinais o que indicou tratar-se de um esteróide (Figura 4.9.18). A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C bem como a comparação com a literatura (SHIRANE et al., 1996), (Tabela 3.9.2) levaram a identificação da amostra 2 como sendo o ergosterol um esteróide amplamente encontrado em fungos. (Figura 4.9.17).

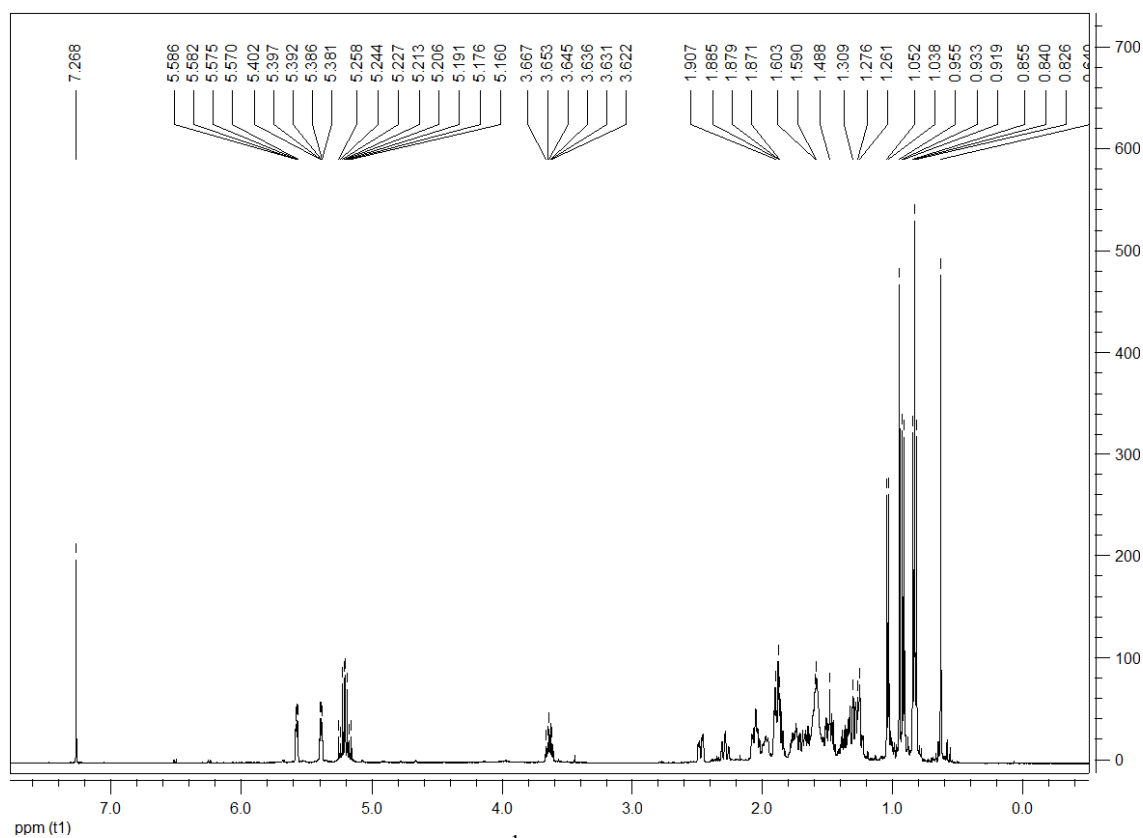


Figura 4.9.16. Espectro de RMN de ^1H da amostra 2 em clorofórmio-*d* (500 MHz).

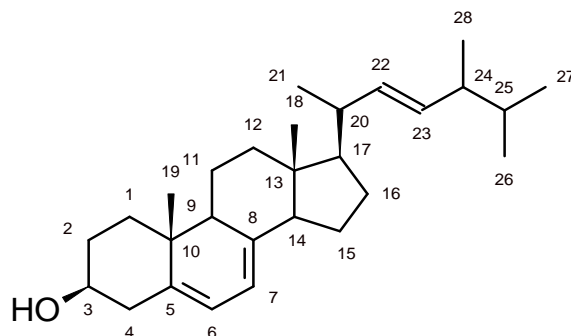


Figura 4.9.17. Estrutura do ergosterol.

Tabela 3.9.2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 2 em comparação com os dados do ergosterol descritos na literatura (SHIRANE et al., 1996).

| | Amostra 2 ^a | | Ergosterol ^b | |
|----|------------------------|--|-------------------------|--|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ |
| 1 | 38,7 | | 38,6 | |
| 2 | 32,3 | | 32,2 | |
| 3 | 70,8 | 3,64 (m) | 70,7 | 3,64 (m) |
| 4 | 41,1 | 2,47 (ddd, $J = 14,2$; 4,5; 2,2 Hz) 2,28 (t, $J = 11,9$) | 41,0 | 2,47 (ddd, $J = 14,2$; 4,5; 2,2 Hz) 2,28 (t, $J = 11,9$) |
| 5 | 140,1 | | 140,0 | |
| 6 | 119,9 | 5,57 (dd, $J = 5,7$; 2,5 Hz) | 119,8 | 5,57 (dd, $J = 5,7$; 2,5 Hz) |
| 7 | 116,6 | 5,37 (m) | 116,5 | 5,38 (ddd, $J = 5,7$; 2,7; 2,6 Hz) |
| 8 | 141,7 | | 141,5 | |
| 9 | 46,6 | | 46,5 | |
| 10 | 37,4 | | 37,3 | |
| 11 | 21,4 | | 21,3 | |
| 12 | 39,4 | | 39,1 | |
| 13 | 43,2 | | 43,0 | |
| 14 | 54,9 | | 54,8 | |
| 15 | 23,3 | | 23,2 | |
| 16 | 28,6 | | 28,5 | |
| 17 | 56,1 | | 56,0 | |
| 18 | 12,4 | 0,63 (s) | 12,3 | 0,63 (s) |
| 19 | 16,6 | 0,94(s) | 16,5 | 0,95 (s) |
| 20 | 40,7 | | 40,6 | |
| 21 | 21,4 | 1,04 (d, $J = 6,6$ Hz) | 21,3 | 1,04 (d, $J = 6,6$ Hz) |
| 22 | 135,9 | 5,15 – 5,25 (m) | 135,8 | 5,15 – 5,25 (m) |
| 23 | 132,3 | 5,15 – 5,25 (m) | 132,2 | 5,15 – 5,25 (m) |
| 24 | 43,1 | | 43,0 | |
| 25 | 33,4 | | 33,3 | |
| 26 | 20,3 | 0,83 (d, $J = 6,6$ Hz) | 20,2 | 0,83 (d, $J = 6,6$ Hz) |
| 27 | 20,0 | 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz) | 19,9 | 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz) |
| 28 | 17,9 | 0,92 (d, $J = 6,8$ Hz) | 17,8 | 0,92 (d, $J = 6,8$ Hz) |

Deslocamentos químicos em δ . ^aDados obtidos em um aparelho de 500 MHz, em clorofórmio-*d*. ^b Dados obtidos em um aparelho 400 MHz, em clorofórmio-*d*.

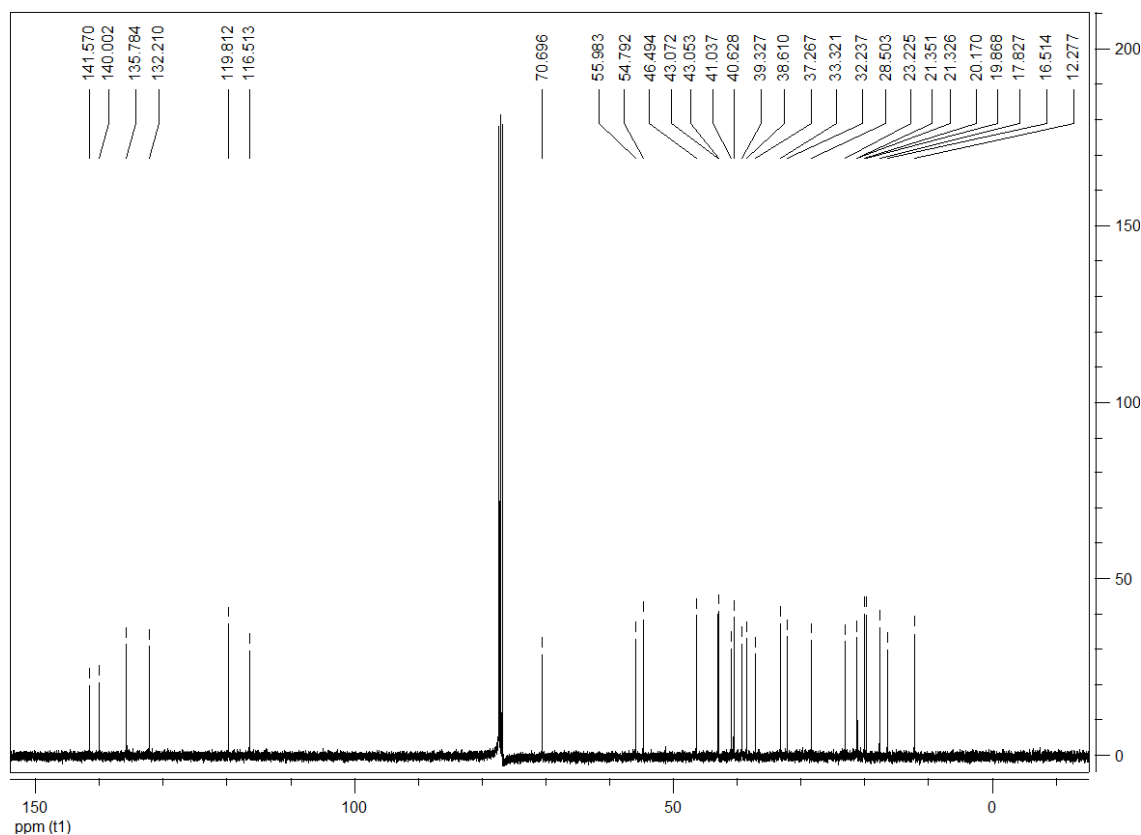


Figura 4.9.18. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 2 em clorofórmio-*d* (500 MHz).

O ergosterol é um esteróide comumente encontrado em fungos, pois é um dos principais componentes da sua membrana celular. A ausência de ergosterol na membrana celular de animais tem sido explorada para o desenvolvimento de diversas drogas antifúngicas tendo este esteróide como alvo. (ROBERTS et al., 2003). Diversos trabalhos na literatura relatam o isolamento de ergosterol de basidiomycetes, tais como *Agaricus blazei* (TAKAKU et al., 2001) e *Pleurotus sajor* (NIETO & CHEGWIN, 2008), e de Deuteromycetes endofíticos, tais como *Penicillium herquei* (MARINHO et al., 2009) e *Pestalotiopsis microspora* (LI et al, 1998).

Algumas atividades biológicas para o ergosterol são relatadas na literatura como antitumoral (TAKAKU et al, 2001) e antimicrobiana possuindo uma concentração inibitória de mínima de 30 $\mu\text{g/mL}$ contra *Helicobacter pylori* (MA et al., 2004). Outra importante função do ergosterol é que ele é o precursor biológico da vitamina D uma vez que em presença de luz Ultravioleta forma o viosterol que por sua vez se rearranja e forma o ergocalciferol que é a vitamina D_2 (RAJAKUMAR et al., 2007).

Amostra 3.

O espectro de RMN de ^1H da amostra 3 cristalizada na forma de agulhas apresenta sinais de hidrogênios alifáticos metílicos, carbinólicos e vinílicos (Figura 4.9.19). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou muitos sinais porém apenas 28 eram da molécula majoritária, os demais são impurezas. (Figura 4.9.20). A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C bem como a comparação com a literatura (YUE et al., 2001) (Tabela 4.9.3) levaram a identificação da amostra 3 como sendo o peróxido de ergosterol um esteróide também comum em fungos (Figura 4.9.21).

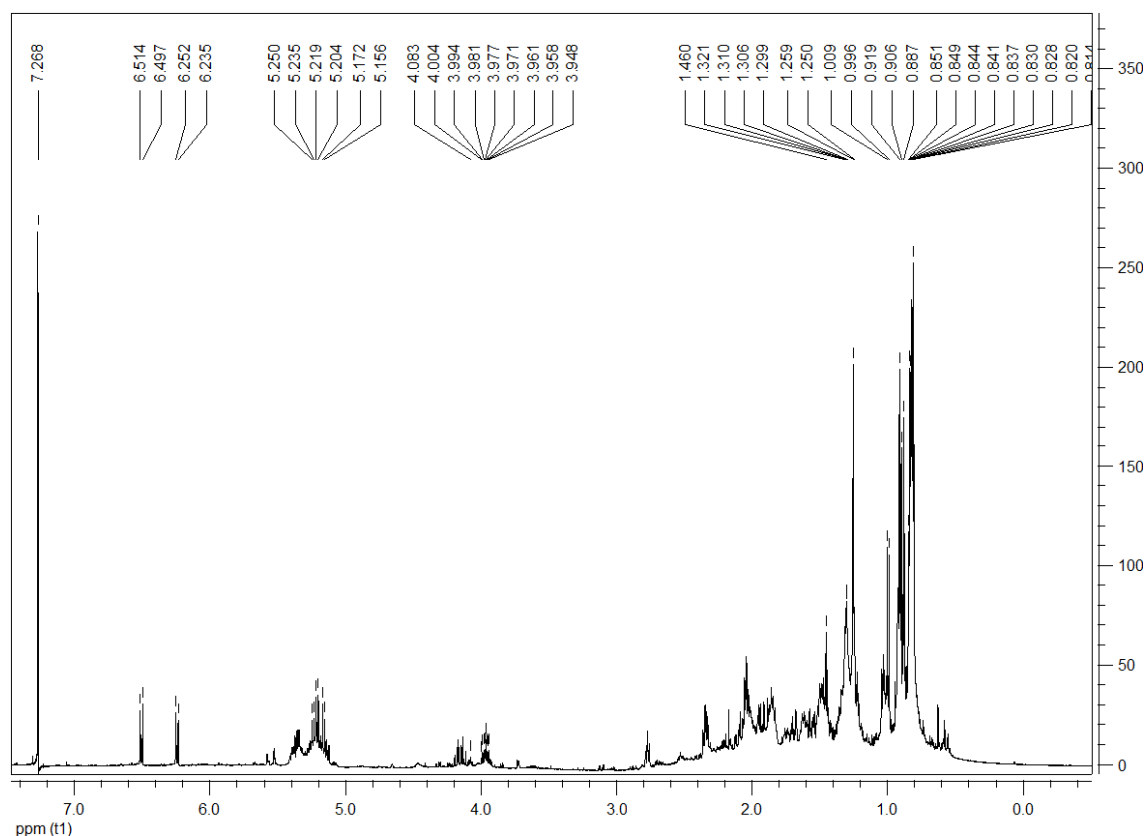


Figura 4.9.19. Espectro de RMN de ^1H da amostra 3 em clorofórmio-*d* (500 MHz).

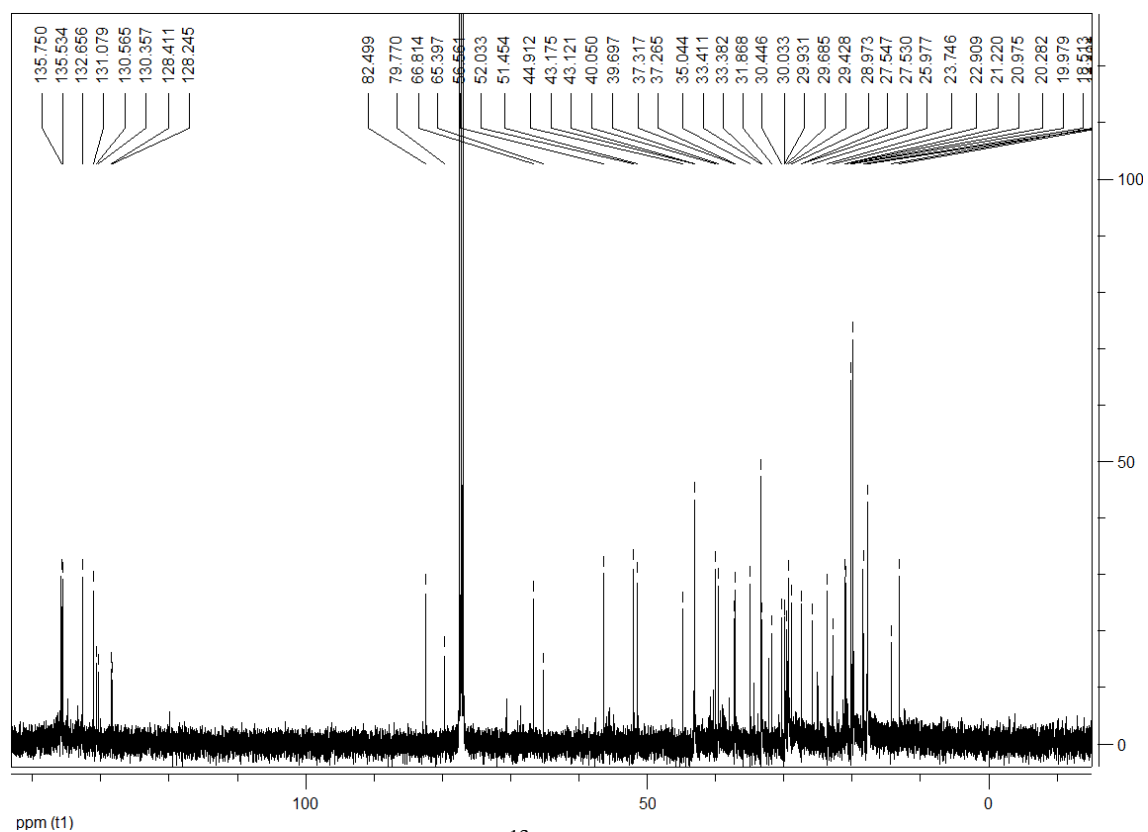


Figura 4.9.20. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 3 em clorofórmio-*d* (500 MHz).

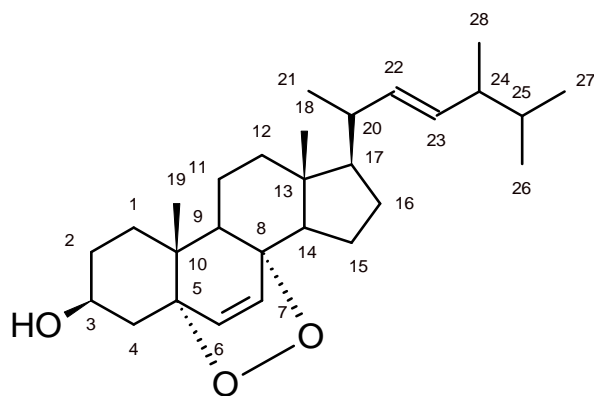


Figura 4.9.21. Estrutura do peróxido de ergosterol.

Tabela 3.9.3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 3 em comparação com os dados do peróxido de ergosterol descritas na literatura (YUE et al., 2001).

| | Amostra 3 ^a | | Peróxido de Ergosterol ^b | |
|----|------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ |
| 1 | 30,0 | | 30,2 | |
| 2 | 34,7 | | 34,7 | |
| 3 | 66,4 | 3,96 (m) | 66,4 | 3,97 (m) |
| 4 | 39,3 | | 39,4 | |
| 5 | 82,1 | | 82,1 | |
| 6 | 135,2 | 6,23 (d, $J = 8,5$ Hz) | 135,2 | 6,24 (d, $J = 8,5$ Hz) |
| 7 | 130,7 | 6,48 (d, $J = 8,5$ Hz) | 130,7 | 6,49 (d, $J = 8,5$ Hz) |
| 8 | 79,4 | | 79,4 | |
| 9 | 51,1 | | 51,2 | |
| 10 | 36,9 | | 37,0 | |
| 11 | 20,6 | | 20,6 | |
| 12 | 37,0 | | 37,0 | |
| 13 | 44,5 | | 44,6 | |
| 14 | 51,6 | | 51,6 | |
| 15 | 23,4 | | 23,4 | |
| 16 | 28,6 | | 28,5 | |
| 17 | 56,2 | | 56,3 | |
| 18 | 12,8 | 0,81 (s) | 12,9 | 0,82 (s) |
| 19 | 18,2 | 0,87 (s) | 18,2 | 0,88 (s) |
| 20 | 39,7 | | 39,6 | |
| 21 | 20,8 | 0,90 (d, $J = 6,9$ Hz) | 20,9 | 0,90 (d, $J = 6,6$ Hz) |
| 22 | 135,4 | | 135,4 | |
| 23 | 132,3 | | 132,4 | |
| 24 | 42,8 | | 42,8 | |
| 25 | 33,0 | | 33,1 | |
| 26 | 19,5 | 0,80 (m) | 19,6 | 0,82 (d, $J = 12,6$ Hz) |
| 27 | 19,6 | 0,82 (m) | 19,9 | 0,83 (d, $J = 17,1$ Hz) |
| 28 | 17,5 | 1,00 (d, $J = 6,6$ Hz) | 17,5 | 1,00 (d, $J = 6,6$ Hz) |

Deslocamentos químicos em δ . ^aDados obtidos em um aparelho 500 MHz, em CDCl_3 . ^bDados obtidos em um aparelho 400 MHz, em clorofórmio-*d*.

O peróxido de ergosterol é um esteróide amplamente distribuído nos fungos, sendo resultado da oxidação do ergosterol. Há diversos dados na literatura a cerca das atividades biológicas do peróxido de ergosterol tais como: imunossupressora (FUJIMOTO et al., 1994), antiinflamatória (YASUKAWA et al., 1996), antiviral (LINDEQUIST et al., 1989) e antitumoral (BOK et al., 1999).

Amostra 4.

A amostra 4 foi isolada do extrato metanólico do micélio do fungo PBR 1.2.1 a. na forma de cristais cilíndricos. O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.22) da amostra 4 apresentou apenas sinais característicos de açúcares, estes sinais juntamente com a presença de um singlete intenso em δ 3,44 (3H) tornaram simples a conclusão de que 4 era um derivado metilado de uma hexose. Os dados da amostra 4 ao serem comparados com dados da literatura (GALOTTA, 2005) (Tabela 4.9.4) levaram a identificação de 4 como sendo 1-*O*-metil- α -D-glicopirranose (Figura 2.9.23).

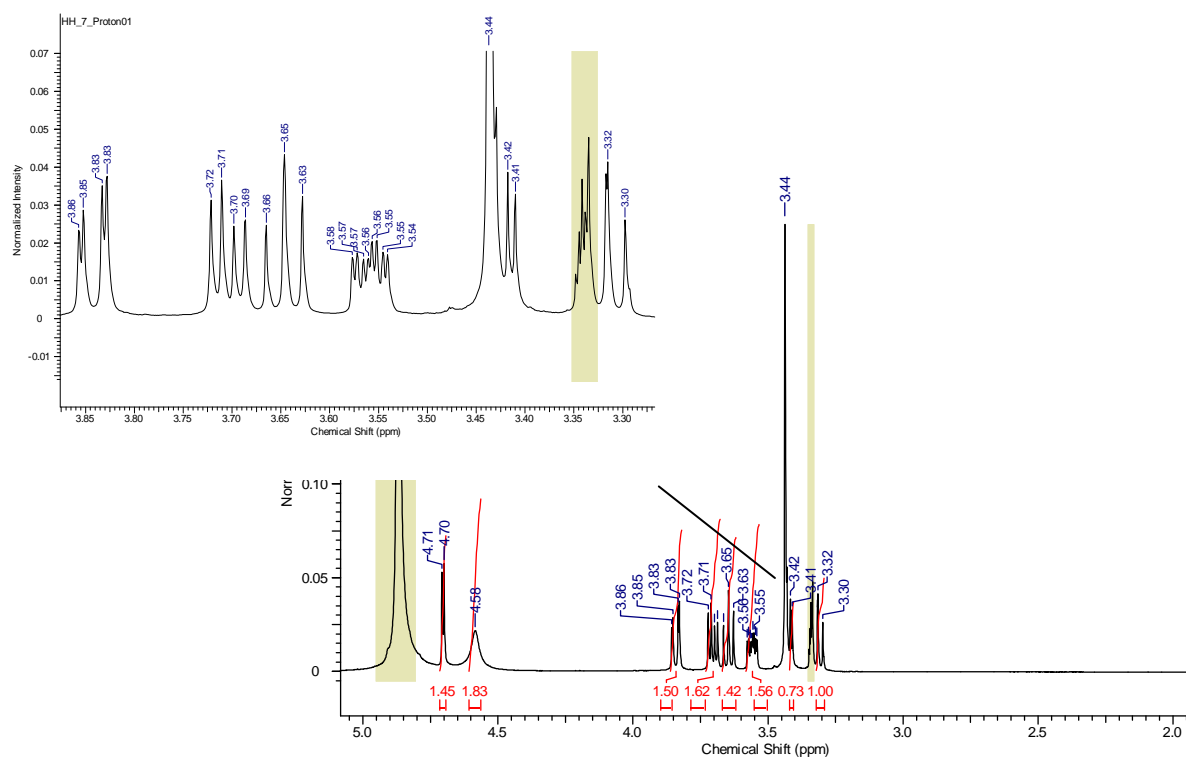


Figura 4.9.22. Espectro de RMN de ^1H da amostra 4 em metanol- d_4 (400 MHz).

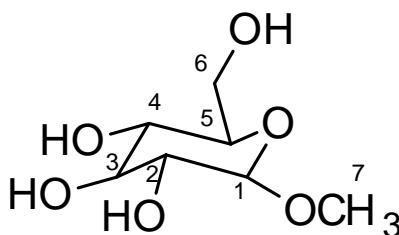


Figura 4.9.23. Estrutura da 1-*O*-metil- α -D-glicopirranose.

Tabela 4.9.4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra 4 em comparação com os dados do manitol descritos na literatura (GALOTTA, 2005).

| | Amostra 4 ^a | 1- <i>O</i> -metil- α -D-glicopirranose. ^b |
|-----------------|------------------------------|--|
| | δ ^1H | δ ^1H |
| H ₁ | 4,71 (d, $J = 3,5$ Hz) | 4,67 (d, $J = 3,7$ Hz) |
| H ₂ | 3,37 (m) | 3,38 (m) |
| H ₃ | 3,65 (t, $J = 9,3$ Hz) | 3,61 (t, $J = 9,3$ Hz) |
| H ₄ | 3,32 (t, $J = 9,3$ Hz) | 3,28 (t, $J = 9,3$ Hz) |
| H ₅ | 3,56 (m) | 3,51 (m) |
| H _{6a} | 3,84 (dd, $J = 11$ Hz; 2 Hz) | 3,80 (dd, $J = 11,8$ Hz; 2,2 Hz) |
| H _{6b} | 3,71 (dd, $J = 11$ Hz; 2 Hz) | 3,67 (dd; $J = 11,8$ Hz; 5,7 Hz) |
| H ₇ | 3,44 (s) | 3,40 (s) |

^aDados obtidos em metanol-*d*.

^bDados obtidos em água-*d*₂.

No espectro de massas da amostra 4 foi possível ter-se a confirmação de sua estrutura que foi analisada no modo ESI (Figura 4.9.24) aonde foi observado o íon *quasi*-molecular em m/z 193.

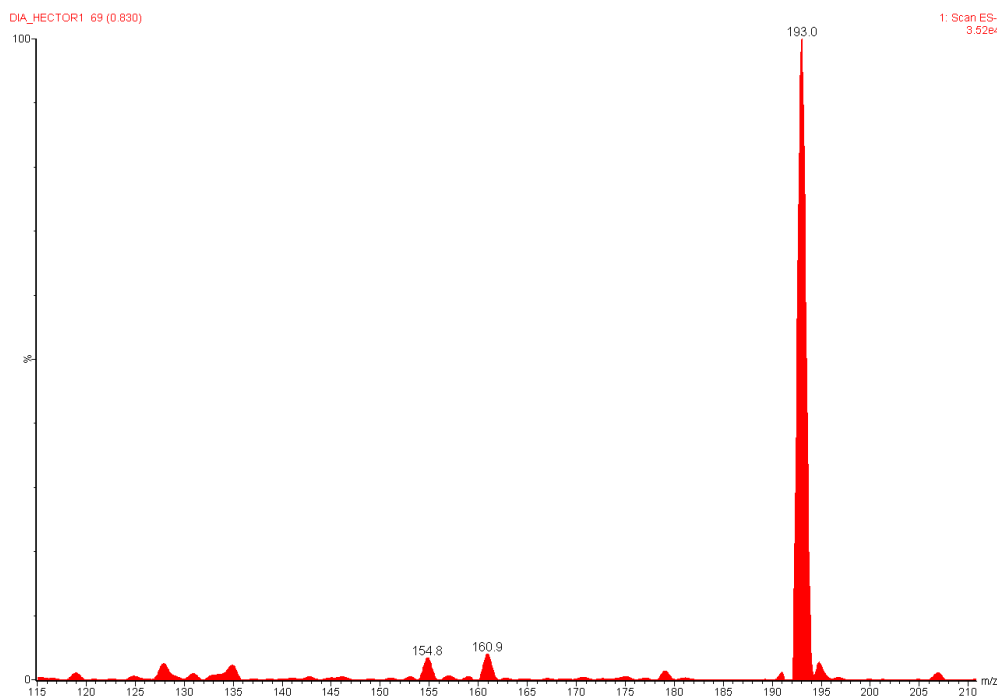


Figura 4.9.24. Espectro de massas *fullscan* no modo ESI da amostra 4.

Amostra 5.

O espectro de RMN de ^1H da amostra 5 cristalizada na forma de cristais (Item 3.8.1) apresentou quatro sinais referentes a hidrogênios carbinólicos em δ 3,76, 3,72, 3,64 e 3,57 (Figura 4.9.25).

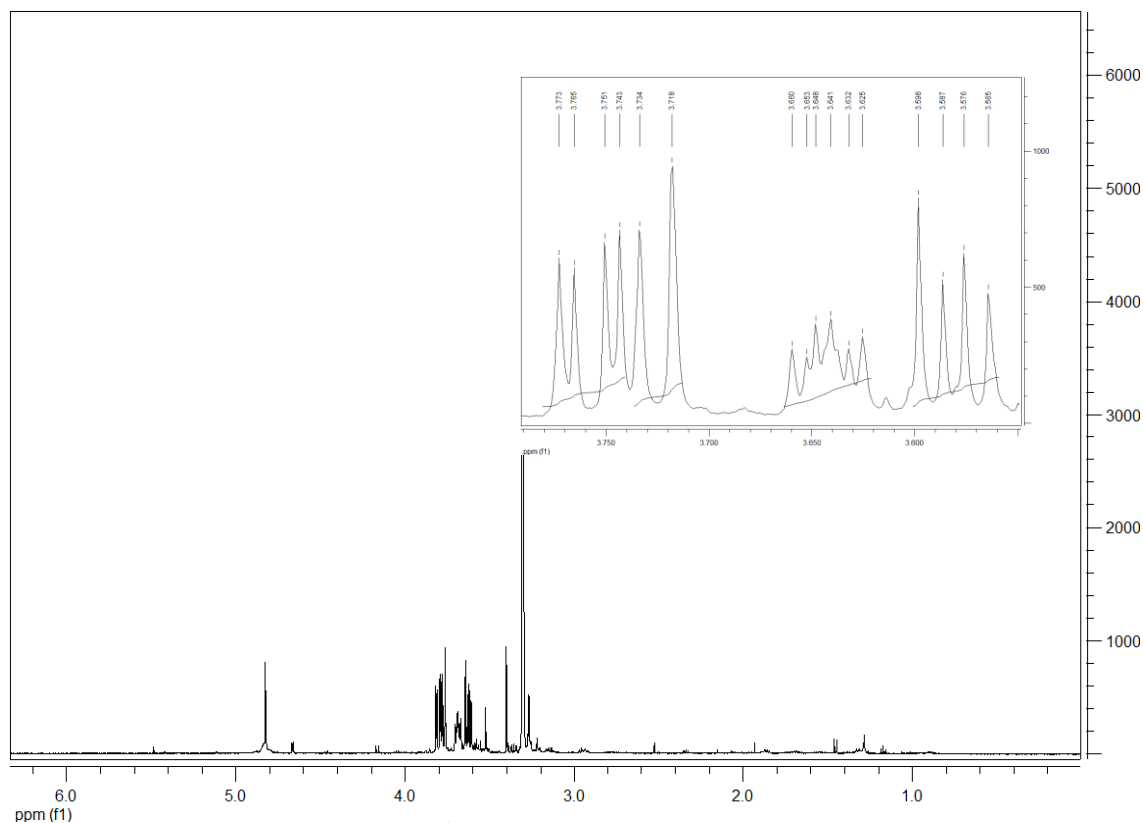


Figura 4.9.25. Espectro de RMN de ^1H e ampliação da região de hidrogênios carbinólicos da amostra 5 em metanol- d_4 (500 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C são observados apenas três sinais de carbonos carbinólicos em δ 71,1, 69,5 e 63,2 (Figura 4.9.26). Nos espectros de massas por ESI-MS no modo negativo (Figura 4.9.27) bem como o espectro de íons filhos do íon *quasi*-molecular em m/z 181 $[\text{M-H}]^-$ (Figura 4.9.28) é possível determinar massa da molécula como sendo 182 daltons. A comparação dos dados obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C juntamente com os dados dos espectros de massas em comparação com a literatura (Tabela 4.9.5) levaram a determinação da amostra 5 como sendo a do manitol (Figura 4.9.29) (POUCHERT & BEHNKE, 1993; SILVA, 2007).

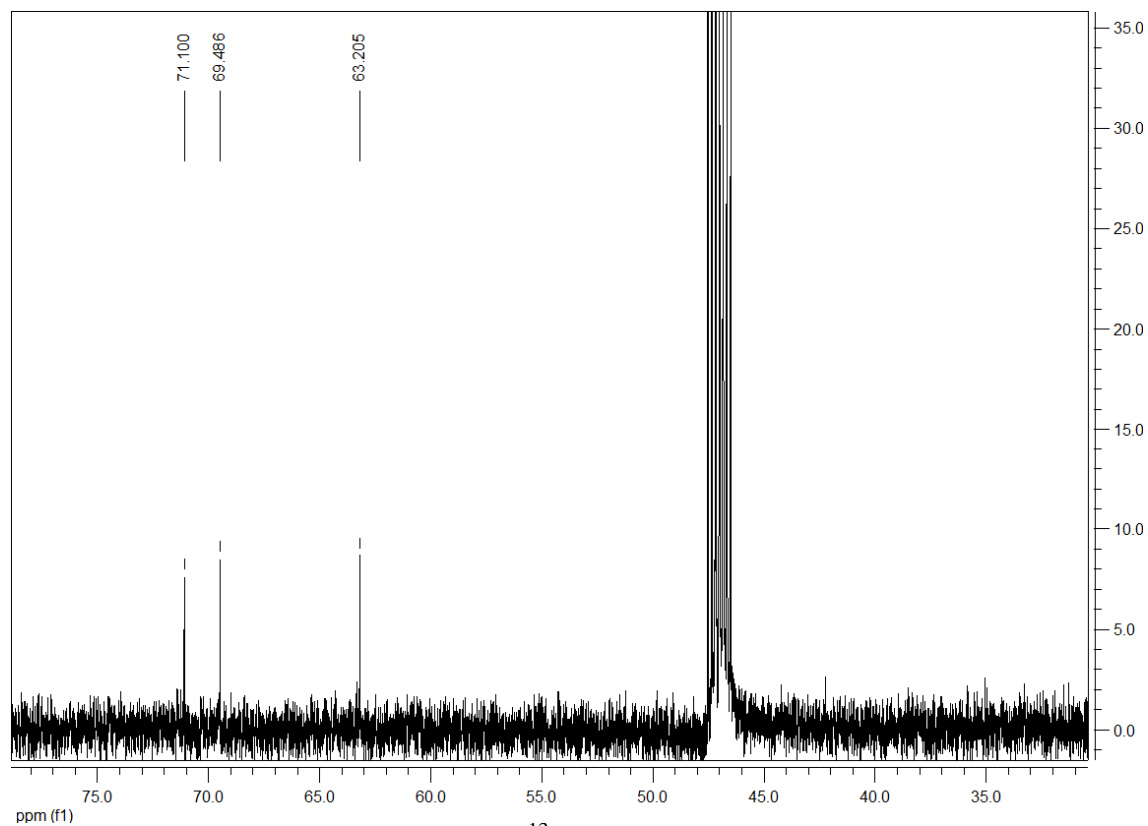


Figura 4.9.26. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 5 em metanol- d_4 (500 MHz).

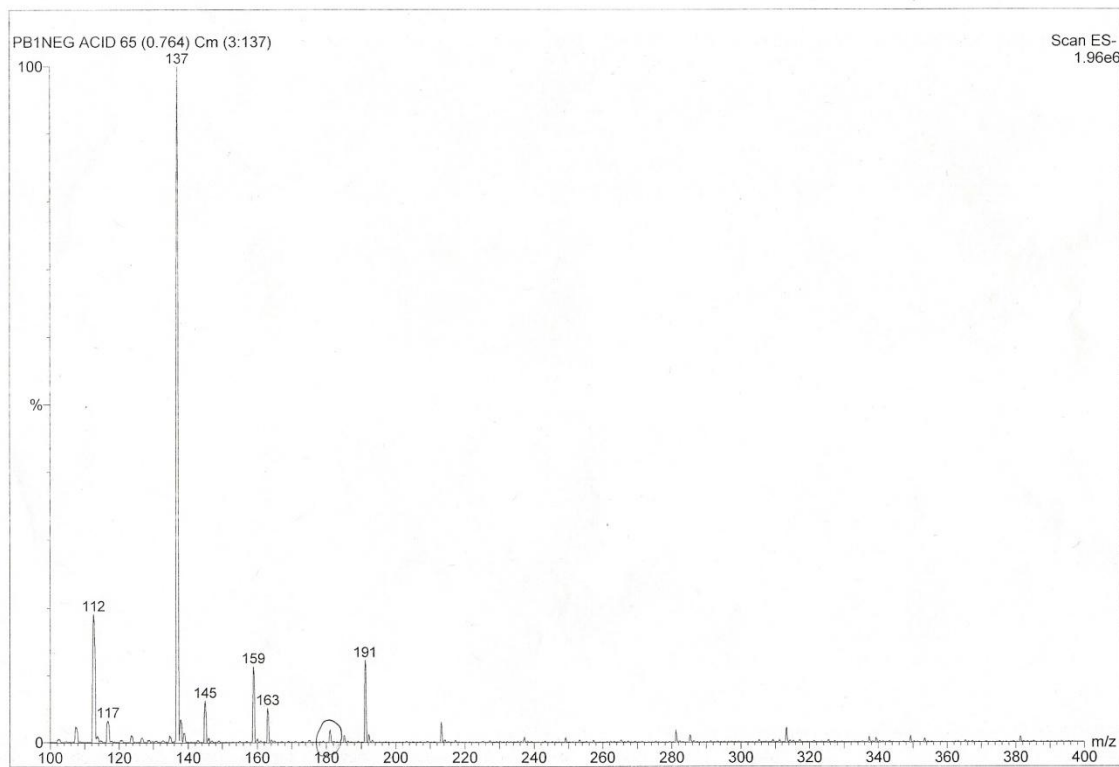


Figura 4.9.27. Espectro de massas por ESI-MS no modo negativo da amostra 5.

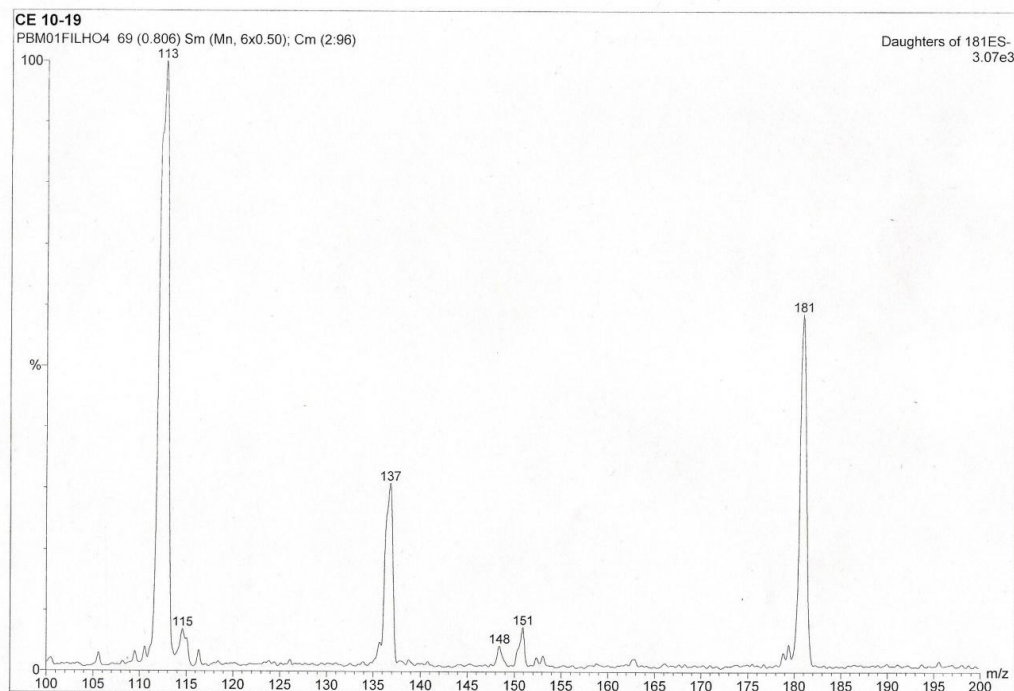


Figura 4.9.28. Espectro de massas por ESI-MS de íons produtos do íon precursor em m/z 181 ($[M-H]^-$).

Tabela 4.9.5. Dados de RMN de 1H e ^{13}C da amostra 5 em comparação com os dados do manitol descritos na literatura (POUCHERT & BEHNKE, 1993).

| | Amostra 5 | | <i>D</i> -manitol |
|----|----------------|-----------------------------------|-------------------|
| | $\delta^{13}C$ | δ^1H | $\delta^{13}C$ |
| 1 | 63,2 | 3,57 (dd, $J = 5,5;$ 11 Hz) | 63,2 |
| 2 | 69,4 | 3,64 (ddd, $J = 3,5;$ 6; 7 Hz) | 69,4 |
| 3 | 71,1 | 3,72 (d, $J = 8$ Hz) | 70,2 |
| 3' | 71,1 | - | 70,2 |
| 2' | 69,4 | - | 69,4 |
| 1' | 63,2 | 3,76 (dd, $J = 3,5;$ 11 Hz) | 63,2 |

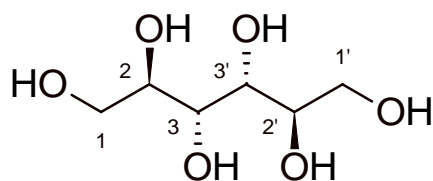


Figura 4.9.29. Estrutura do manitol.

4.10.2. Fungo PBR 1.2.1.a. (*Penicillium* sp.).

Os extratos da linhagem de *Penicillium* sp. PBR 1.2.1.a. (Figura 4.9.30) isolada das raízes de *Mauritia flexuosa* e cultivada em larga escala no meio ISP2, apresentaram atividades contra quatro linhagens de células cancerígenas (mama, cólon, glioblastoma e leucemia), antioxidante e antiacetilcolinesterase.

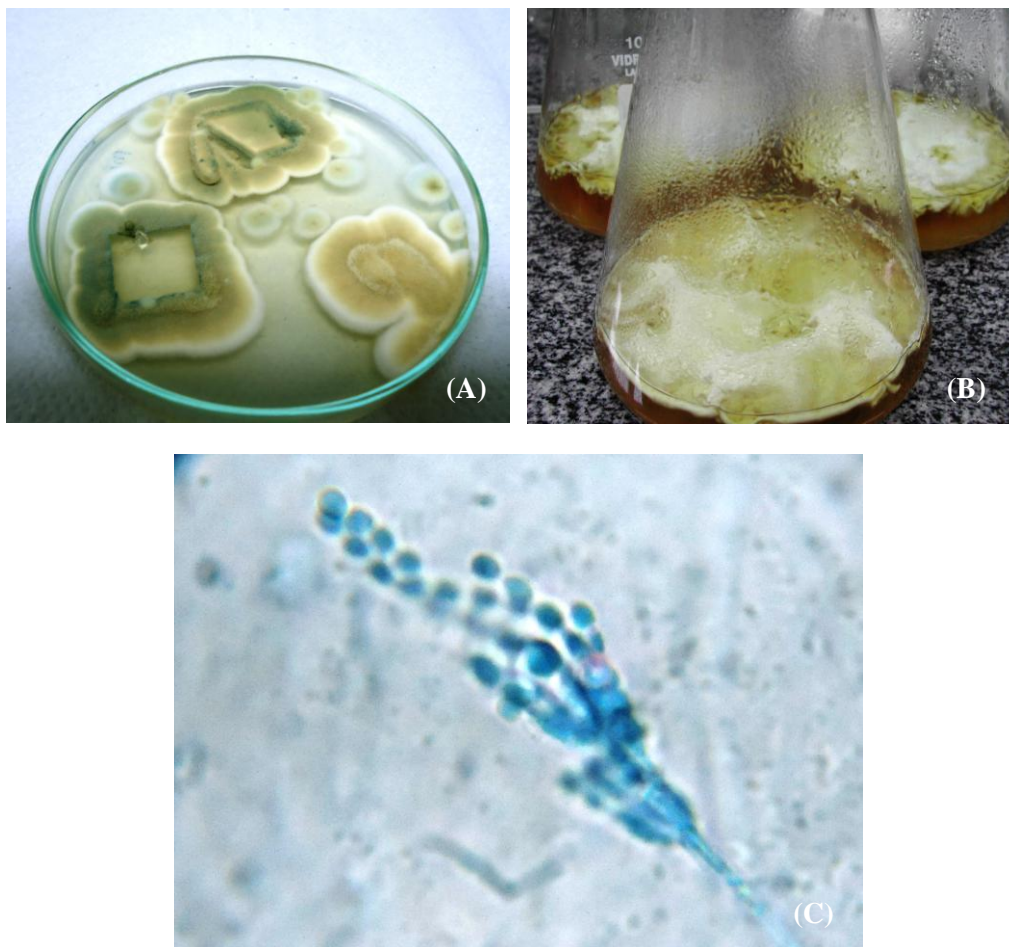
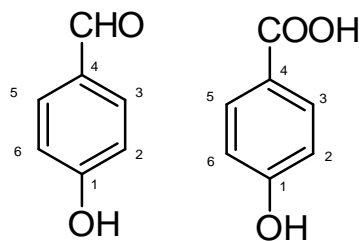
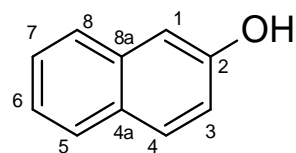


Figura 4.9.30. (A) Linhagem PBR 1.2.1. a. em meio Czapek, (B) crescendo em meio líquido ISP2, (C) estruturas reprodutivas em microscopia óptica.

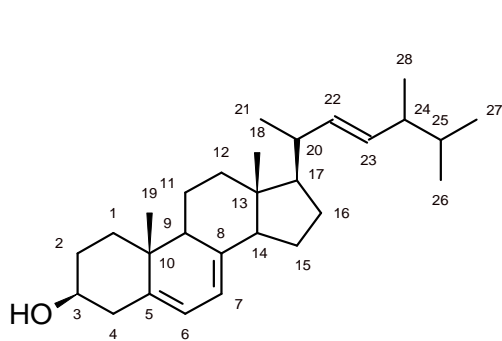
De aspecto similar a linhagem PBR 2.2.2. devido a detecção da amostra 1 em seu extrato do meio fermentado, além de outras substâncias que não foram encontradas na linhagem estudada anteriormente (amostras 6 e 7) juntamente com as amostras 8 e 9 previamente isoladas (Figura 4.10.31; Item 3.8.2).



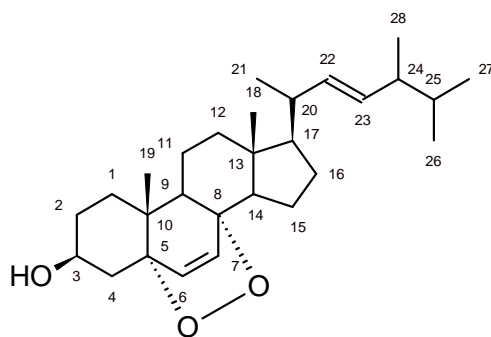
p-hidroxibenzaldeído $C_7H_6O_2$; 122,1
 ácido *p*-hidroxibenzóico $C_7H_6O_3$; 138,1
Amostra 6



β -naftol – **Amostra 7**
 $C_{10}H_8O$; 144,1



ergosterol – **Amostra 8**
 $C_{28}H_{44}O$; 396,6



peróxido de ergosterol – **Amostra 9**
 $C_{28}H_{44}O_3$; 428,7

Figura 4.9.31. Substâncias isoladas da linhagem PBR 1.2.1.a.

Amostra 6.

O espectro de RMN de ^1H da amostra 6 precipitada como um sólido amorfo branco apresentou sinais de hidrogênios aromáticos e de aldeído (Figura 4.9.32). Na ampliação do espectro de RMN de ^1H de são observadas as multiplicidades para os sinais da região de hidrogênios aromáticos aonde os dubletos mais intensos em δ 7,73 e em δ 6,88 com constante de acoplamento $J = 8,5$ Hz, bem e dubletos em δ 7,23 e δ 6,77 com mesma constante de acoplamento, indicando se tratar de hidrogênios em posição *orto* uns em relação aos outros (Figura 4.10.33). O espectro também apresenta um singlete em δ 9,73 referente a um hidrogênio de aldeído. A intensidade comparativa deste sinal indica que o aldeído é o composto principal da mistura.

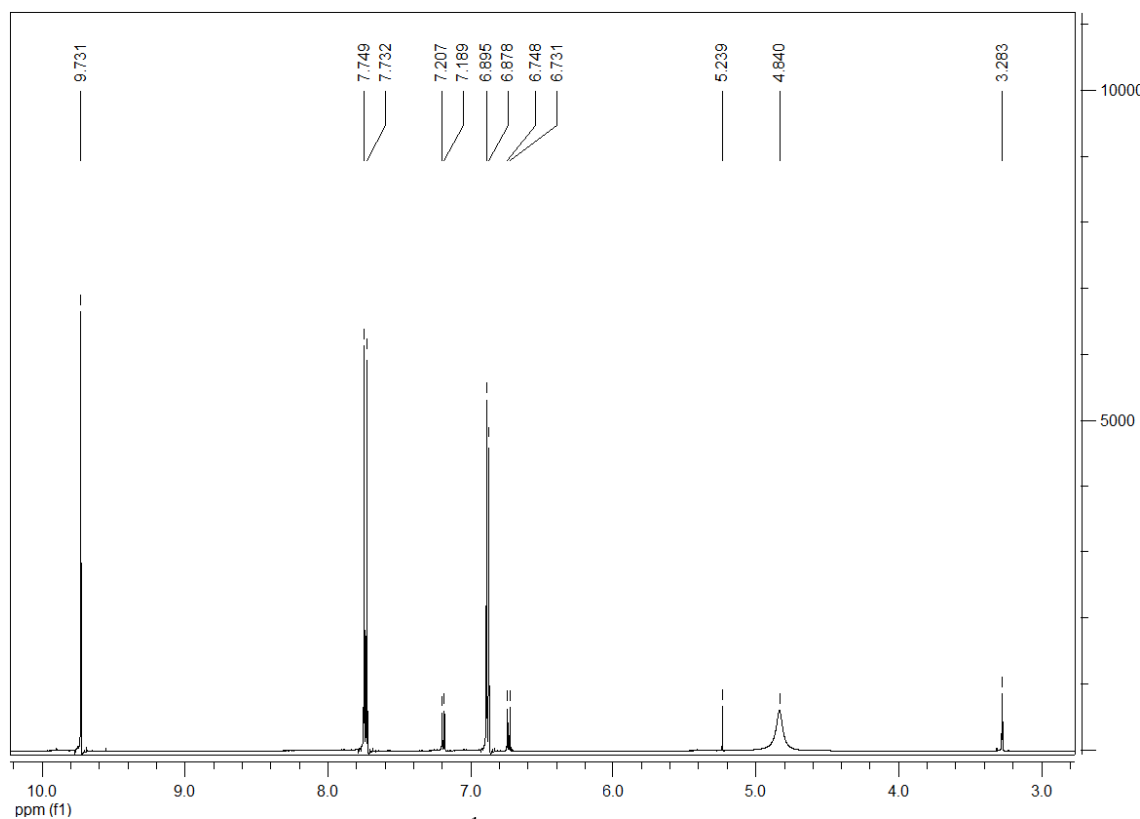


Figura 4.9.32. Espectro de ^1H da amostra 6 em metanol- d_4 (400 MHz).

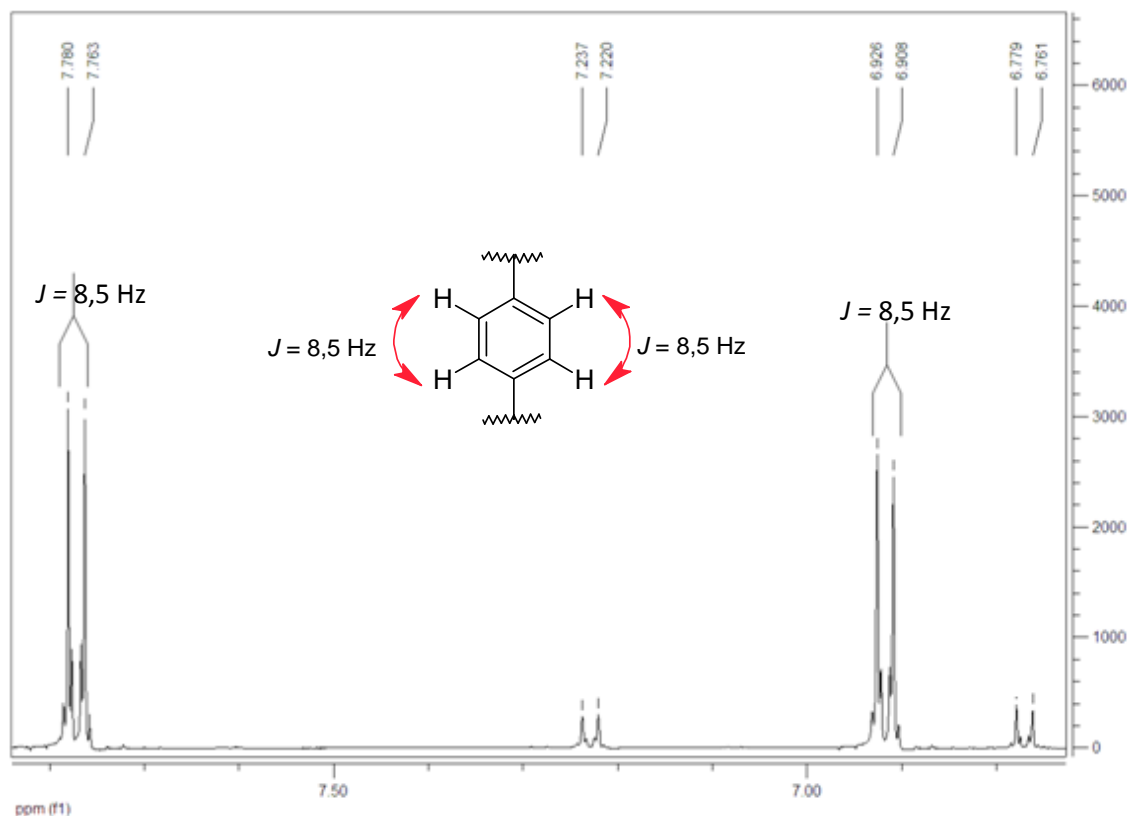


Figura 4.9.33. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da região de hidrogênios aromáticos e correlações da amostra 6 em metanol- d_4 (400 MHz).

O espectro de massas da amostra 6 por ESI-MS no modo negativo (Figura 4.10.34) apresentou íon *quasi*-molecular em m/z 121 daltons. A comparação dos dados obtidos de RMN de ^1H do espectro de massas com dados da literatura permitiu a identificação da amostra 6 como uma mistura de *p*-hidroxibenzaldeído e o ácido *p*-hidroxibenzóico (AYER et al., 1985; DEY & HARBORNE, 1993), (Figura 4.10.35; Tabela 4.9.6).

#30136 IT: 100.000 ST: 0.77 uS: 3 NL: 2.75
 F: ITMS + p ESI Full ms2 121.00@cid19.00 [50.00-150.00]

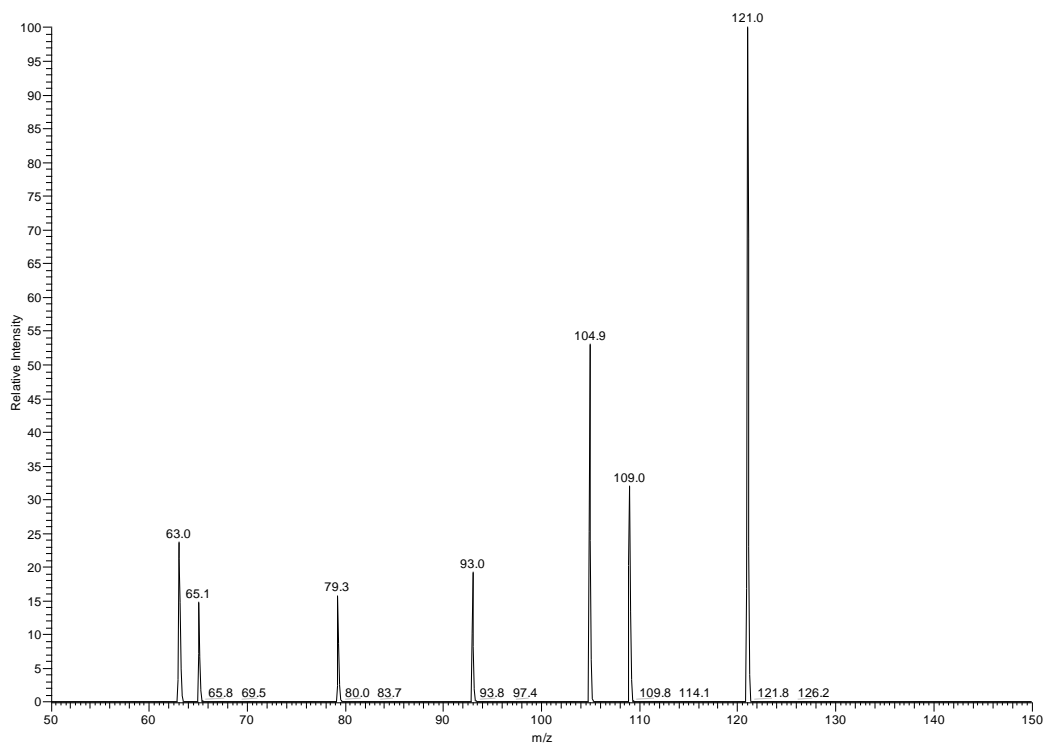


Figura 4.9.34. Espectro de massas por ESI-MS no modo negativo da amostra 6.

Tabela 4.9.6. Dados de RMN de ^1H da amostra 6 em comparação com os dados do *p*-hidroxibenzaldeído descritos na literatura (AYER et al., 1985; DEY & HARBORNE, 1993).

| | Amostra 6 | ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico (DEY & HARBORNE, 1993) | <i>p</i>-hidroxibenzaldeído (AYER et al., 1985) |
|-------|-------------------------------------|---|---|
| | $\delta \text{ } ^1\text{H}$ | $\delta \text{ } ^1\text{H}$ | $\delta \text{ } ^1\text{H}^{\text{d}}$ |
| 2 | 7,73 (d, $J = 8,5$ Hz) | | 7,82 (d, $J = 8,6$ Hz) |
| 2' | 7,23 (d, $J = 8,5$ Hz) | 7,29 (d, $J = 8,5$ Hz) | |
| 3/5 | 6,88 (d, $J = 8,5$ Hz) ^a | | 6,98 (d, $J = 8,6$ Hz) |
| 3'/5' | 6,77 (d, $J = 8,5$ Hz) ^b | 6,82 (d, $J = 8,5$ Hz) | |
| 6 | 7,73 (d, $J = 8,5$ Hz) | | 7,82 (d, $J = 8,6$ Hz) |
| 6' | 7,23 (d, $J = 8,5$ Hz) | 7,29 (d, $J = 8,5$ Hz) | |
| CHO | 9,73 (s) | | 9,86 (s) |
| COOH | n.d. ^c | - | - |
| OH | 5,26 (s) | n.d. | n.d. |

^a – Sinais referentes ao *p*-hidroxibenzaldeído, obtidos em metanol- d_4 .

^b – Sinais referentes ao ácido *p*-hidroxibenzóico, obtidos em metanol- d_4 .

^c – Não determinado.

^d – Dados obtidos em água- d_2 .

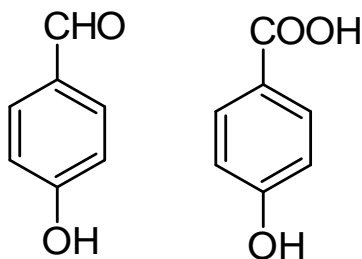


Figura 4.9.35. Estruturas do *p*-hidroxibenzaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico.

O isolamento de ácido *p*-hidroxibenzóico e seu análogo *p*-hidroxibenzaldeído não são comuns em fungos havendo poucos relatos na literatura. Para o primeiro é atribuída atividade antimicrobiana contra uma diversidade bactérias gram-positivas e gram-negativas (CHO et al., 1998). O *p*-hidroxibenzaldeído mais comumente isolado de fungos como *Phaeoacremonium chlamydosporum* apresentou atividade antimicrobiana (TABACCHI et al., 2000).

Amostra 7.

Esta amostra, um sólido amorfo acinzentado isolado do extrato do líquido fermentado do fungo PBR 1.2.1a. (Item 3.8.2), apresentou no espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.36) apenas sinais de hidrogênios aromáticos.

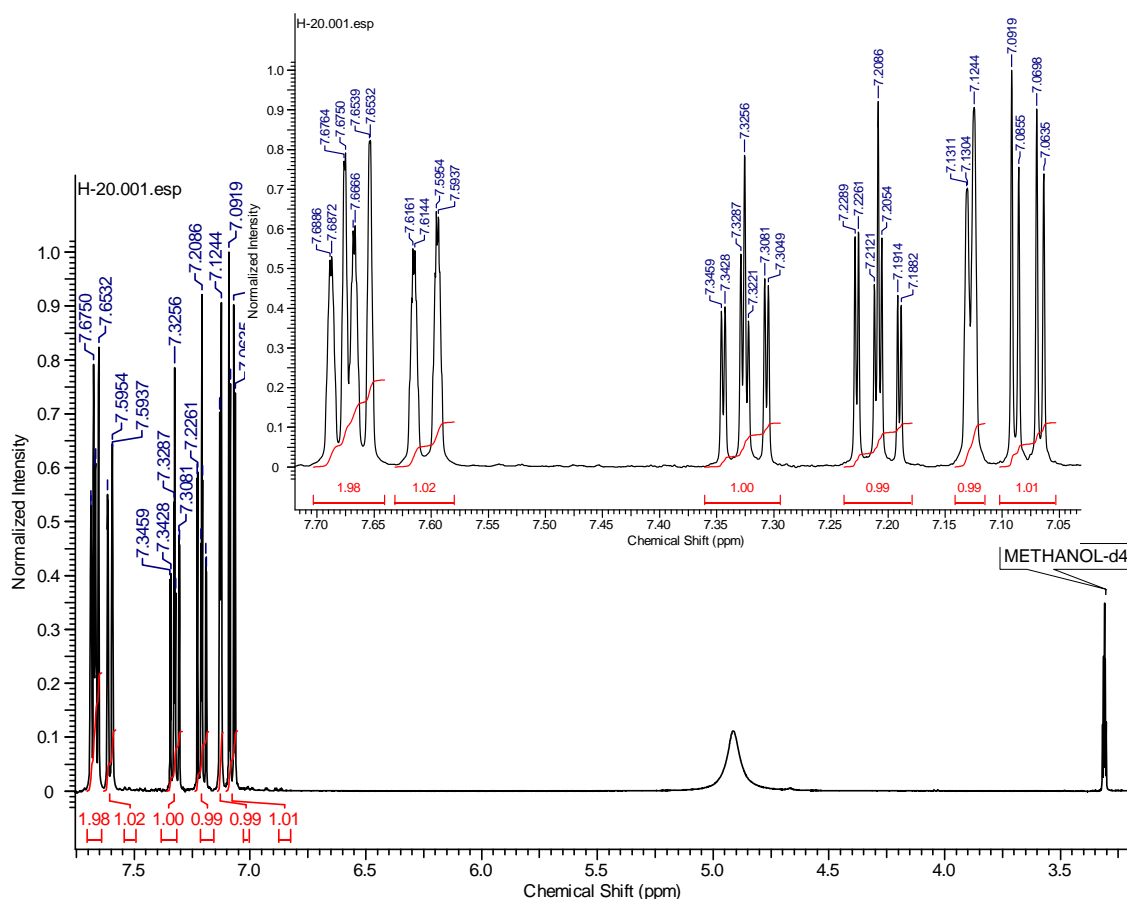


Figura 4.9.36. Espectro de RMN de ^1H da amostra 7 em metanol- d_4 e ampliação da região de aromáticos (400 MHz).

As correlações observadas no mapa de COSY (Figura 3.9.37) da amostra 7, o número de sinais e as constantes de acoplamento do experimento de RMN de ^1H são coerentes com um núcleo naftalênico monosubstituído. As correlações observadas no experimento de HMBC (Figura 3.9.38) e os deslocamentos corretos dos carbonos obtidos no mesmo experimento sugerem a natureza da amostra 7 como sendo o β -naftol. A reconsideração das constantes de acoplamentos e as respectivas multiplicidades dos sinais do experimento de RMN de ^1H ratificam a amostra 7 como o β -naftol. Destaca-se o desdobramento e respectivas constantes dos

sinais em 7,13 (H-1) (dd, $J_1 = 0,6$ Hz e $J_2 = 2,7$ Hz) e 7,08 (H-3) (dd, $J_1 = 2,7$ Hz e $J_2 = 8,8$ Hz). A natureza da amostra 7 foi ainda confirmada por espectrometria de massas no modo ESI⁻ (Figura 3.9.39), aonde é observado o íon *quasi*-molecular em m/z 143 [M - H]⁻.

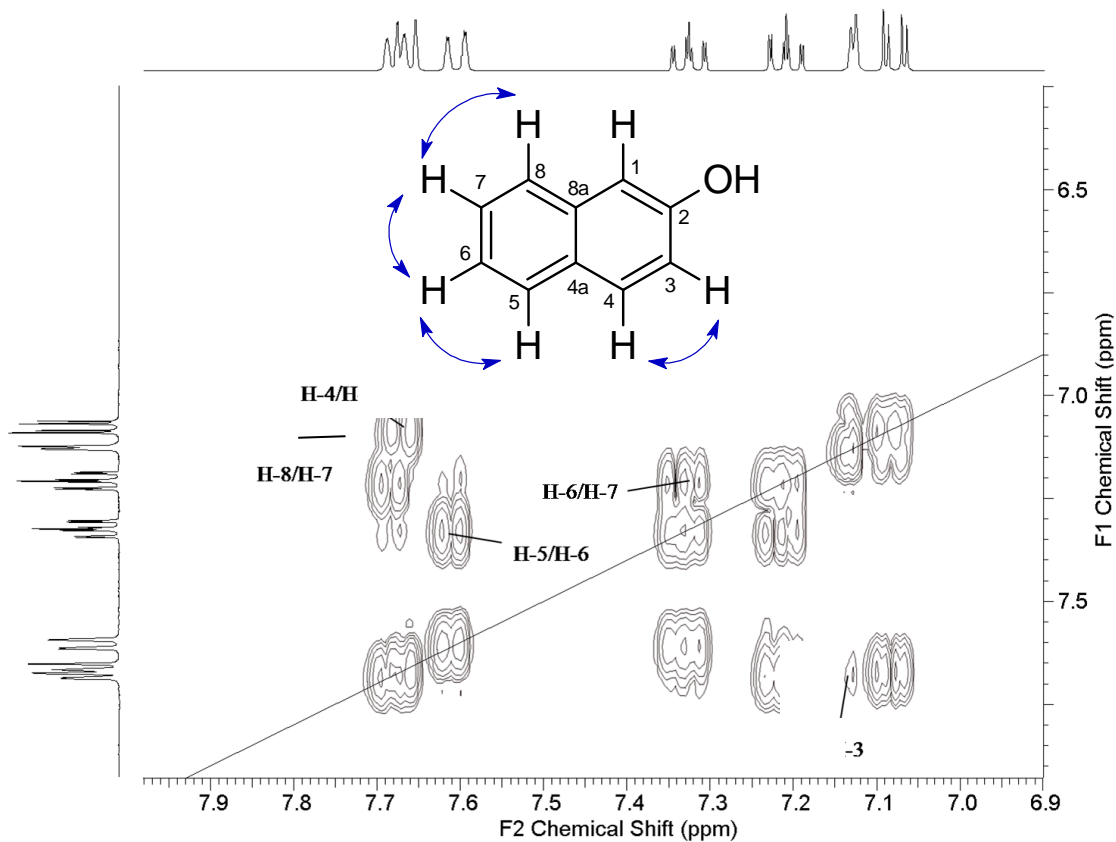


Figura 4.9.37 Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para os hidrogênios vizinhos da amostra 7 em metanol- d_4 (400 MHz).

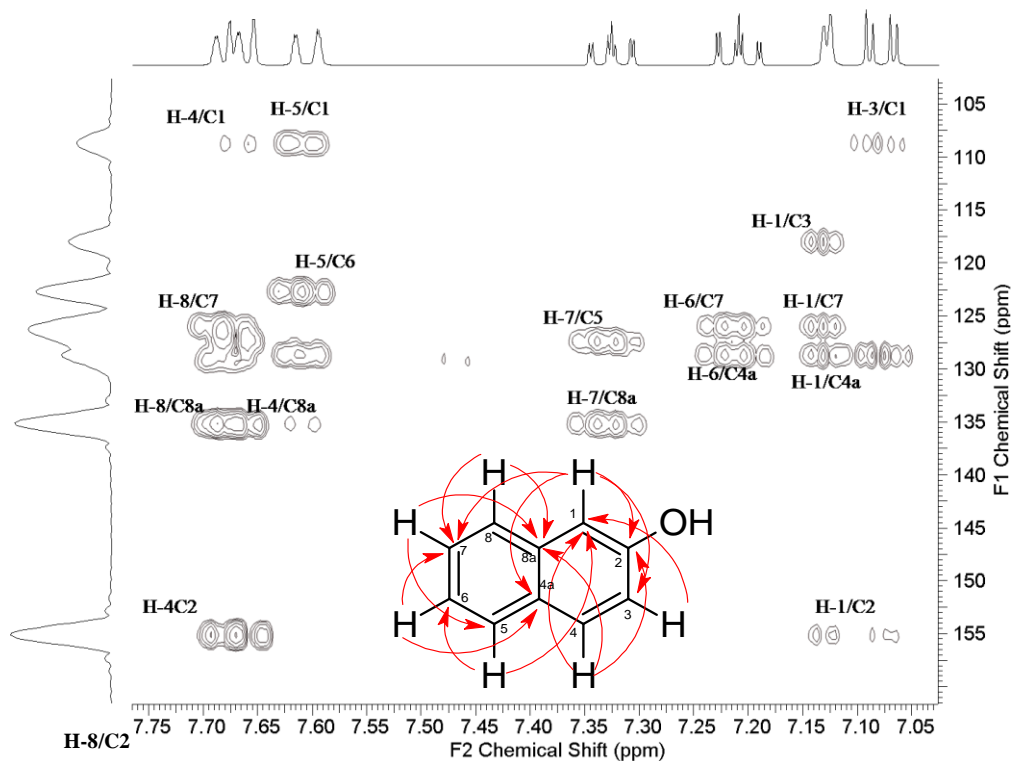


Figura 4.9.38. Algumas correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ por HMBC observadas no experimento de HMBC da substância 7 em metanol- d_4 (400 MHz).

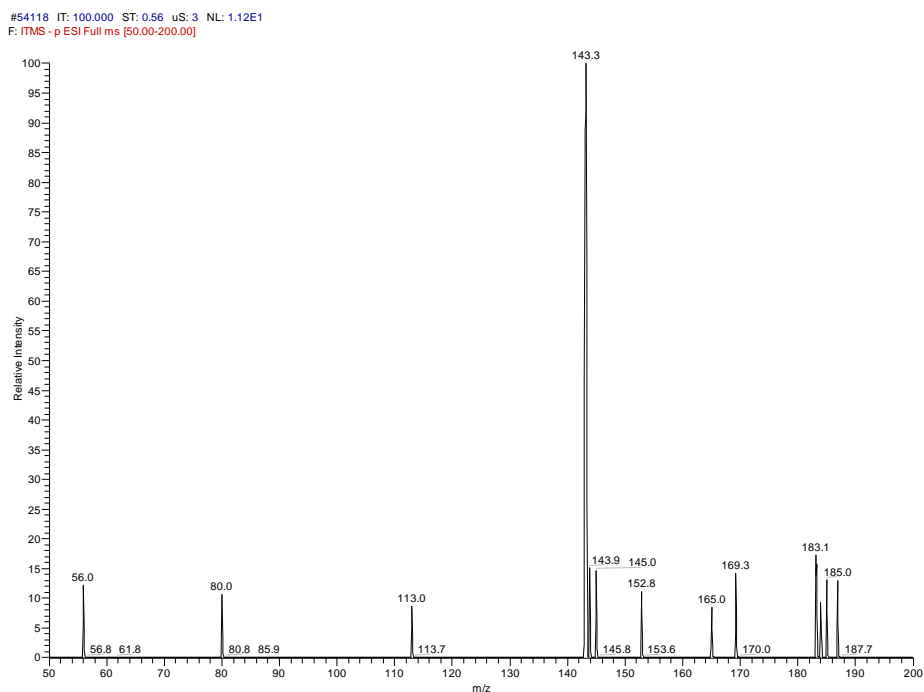


Figura 4.9.39. Espectro de massas ESI-MS no modo negativo da amostra 7.

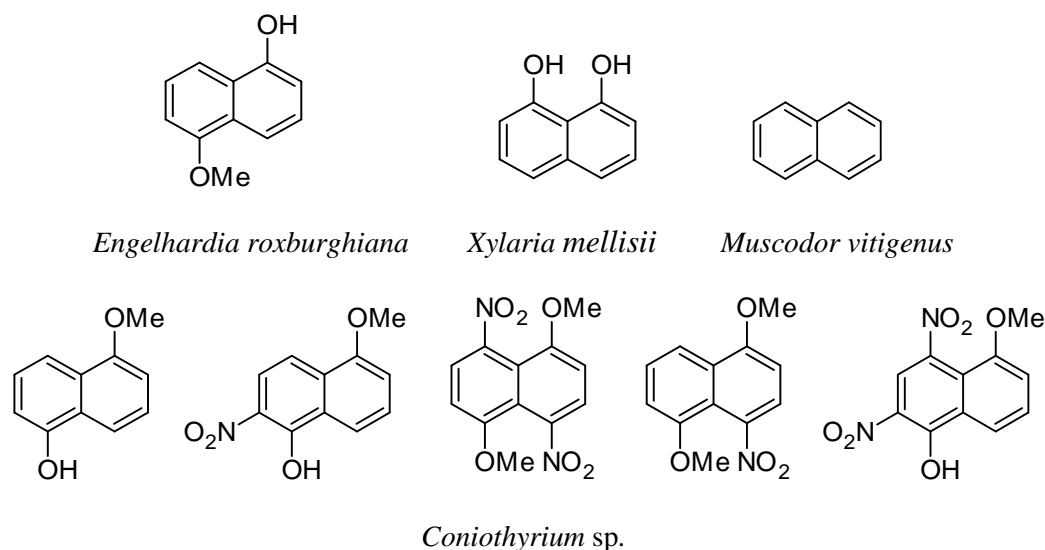
Tabela 4.9.7. Dados de RMN da amostra 7.

| Posição | ¹ H | ¹³ C ^a | C | HMBC |
|----------------|--|------------------------------|----------|-----------------|
| 1 | 7,13 (dd, $J_1 = 0,6$ Hz e $J_2 = 2,7$ Hz) | 109,6 | H-3 | C2, C3, C4a, C7 |
| 2 - OH | - | 154,8 | - | - |
| 3 | 7,08 (dd, $J_1 = 2,7$ Hz e $J_2 = 8,8$ Hz) | 118,3 | H-2, H-4 | C1, C4a |
| 4 | 7,66 (dd, ($J_1 = 0,6$ e $J_2 = 8,8$ Hz) | 130,2 | H-3 | C1, C2, C4a |
| 4a | - | 129,6 | - | - |
| 5 ^b | 7,60 (dd, $J_1 = 0,6$ e $J_2 = 8,2$ Hz) | 128,9 | H-6 | C1, C6, C8a |
| 6 | 7,20 (ddd, $J_1 = 1,2$, $J_2 = 6,8$ e $J_3 = 8,2$ Hz) | 124,6 | H-5, H-7 | C4a, C7 |
| 7 | 7,32 (ddd, $J_1 = 1,2$, $J_2 = 6,8$ e $J_3 = 8,2$ Hz) | 126,5 | H-6, H-8 | C5, C8a |
| 8 ^b | 7,68 (dd, $J_1 = 0,6$ e $J_2 = 8,2$ Hz) | 126,5 | H-7 | C2, C7, C8a |
| 8a | - | 135,1 | - | - |

^a Obtido através da projeção do experimento de HMBC e por simulação no software HNMR da ACDlabs®.

^b Não foi possível determinar as constantes para os acoplamentos previstos em *meta*.

Uma busca nas bases de dados disponíveis (SciFinder, PubMed, etc.) mostrou que este é o primeiro relato do isolamento de β -naftol como um produto natural, fato surpreendente, pois as rotas biossintéticas para compostos que tenham como esqueleto base anéis naftalênicos ainda são desconhecidas, porém, uma busca mais detalhada da literatura é possível encontrar uma série de moléculas com o mesmo esqueleto porém com substituintes diferentes já foram isolados tanto de fungos como de plantas (DAISY et al., 2002; PITTAYAKHAJONWUT et al., 2005; WU et al., 2007 e KROHN et al., 2008) (Figura 4.9.40).

**Figura 4.9.40.** Metabólitos com esqueleto naftalênico isolados de fungos e plantas.

4.10.3. Fungo Stsp CC1-2/1-1 b 02. (*Penicillium* sp.).

O extrato em AcOEt da linhagem CC1-2/1-1 b 02 (Figura 4.9.41) cultivada em pequena escala (Item 3.8.3), apresentou alto rendimento e a formação espontânea de uma grande quantidade de cristais, contudo nenhum resultado nos testes biológicos foi obtido para este material bruto, estes cristais foram purificados dando origem a amostra 10.

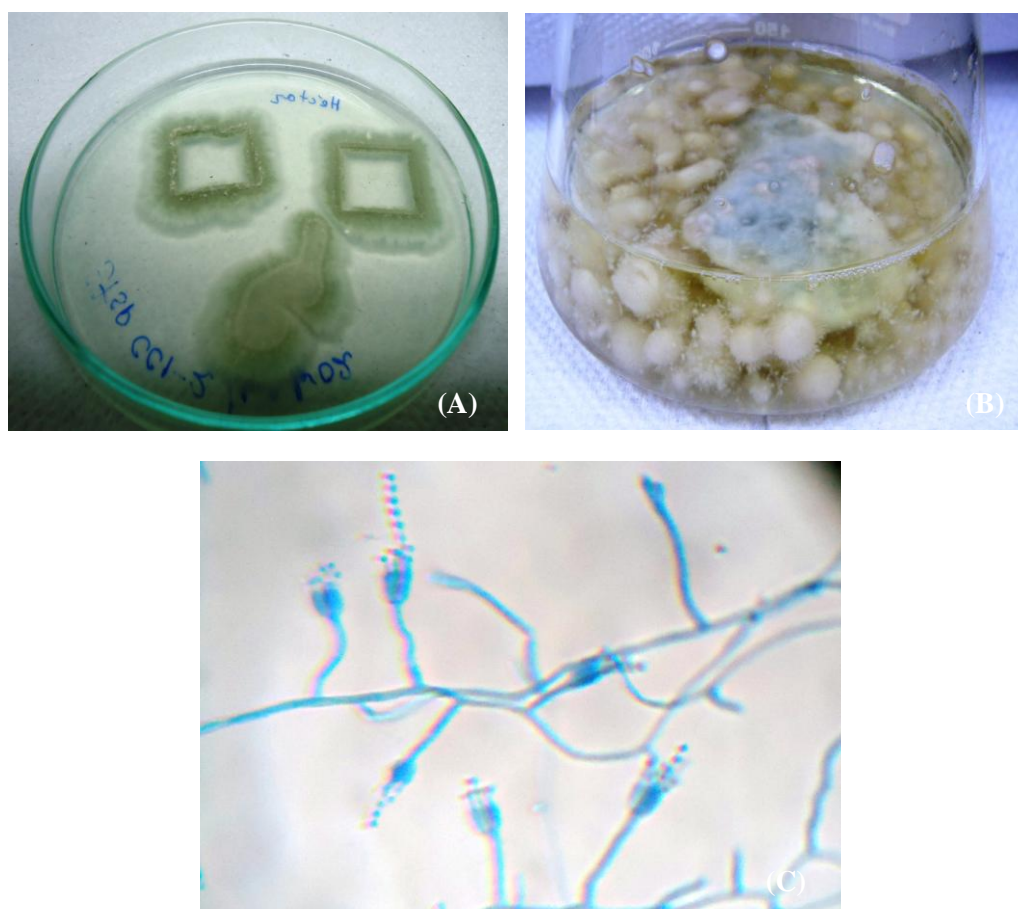


Figura 4.9.41. (A) Linhagem Stsp CC1-2/1-1 b 02 em meio Czapek, (B) Mesma linhagem crescendo em meio líquido BDL e (C) Imagem das estruturas reprodutivas por microscopia óptica.

Amostra 10.

A amostra 10 foi isolada da fração em AcOEt do meio metabolizado do fungo Stsp CC1-2/1-2 b 02 (Item 3.8.3) e se apresentou-se como cristais na forma de agulhas. Em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.42) são observados dois sinais na região de aromáticos em δ 7,95 (s, 1H) e δ 6,49 (t, $J = 0,8$ Hz, 1H) e um metilênico hidroxilado em δ 4,40 (d, $J = 0,8$ Hz, 2H).

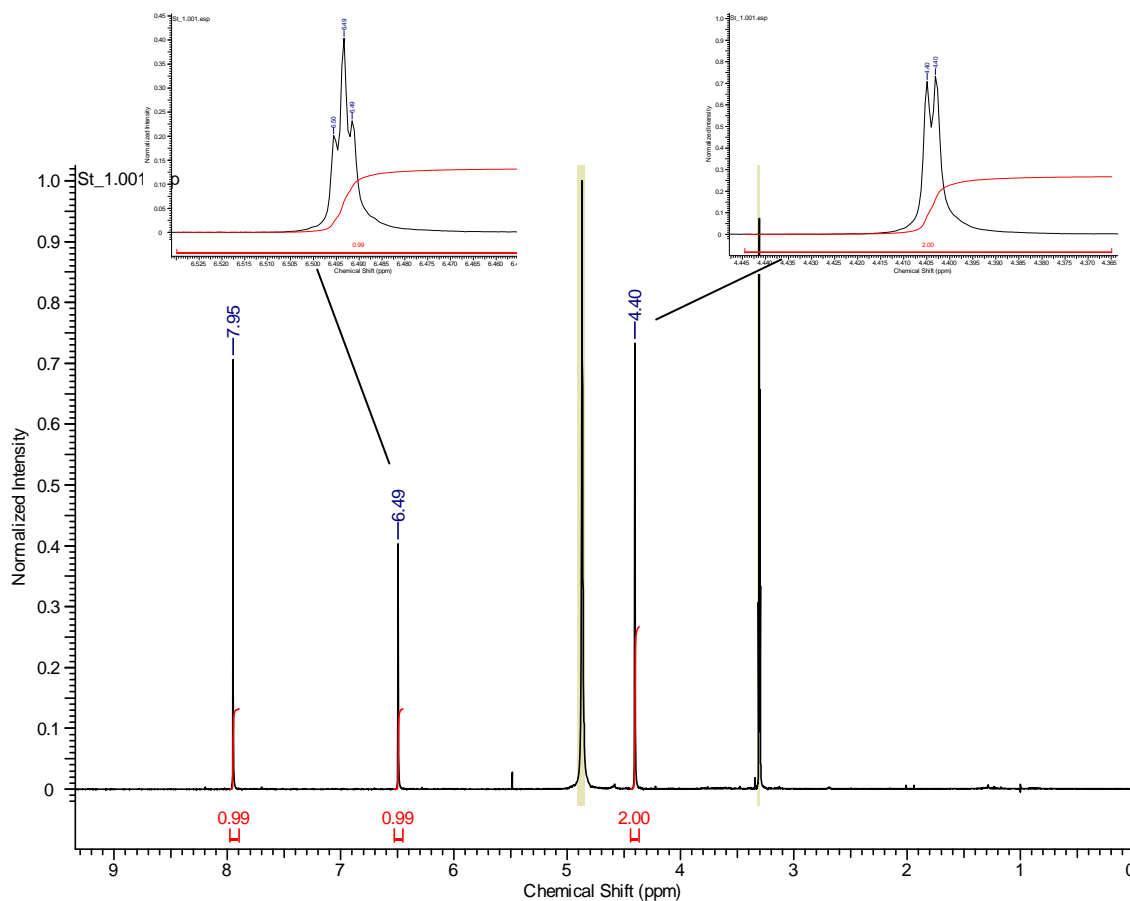


Figura 4.9.42. Espectro de RMN de ^1H da amostra 10 em metanol- d_4 (400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.9.43) são observados apenas cinco sinais de carbonos sp^2 e um de carbono sp^3 ligado a oxigênio.

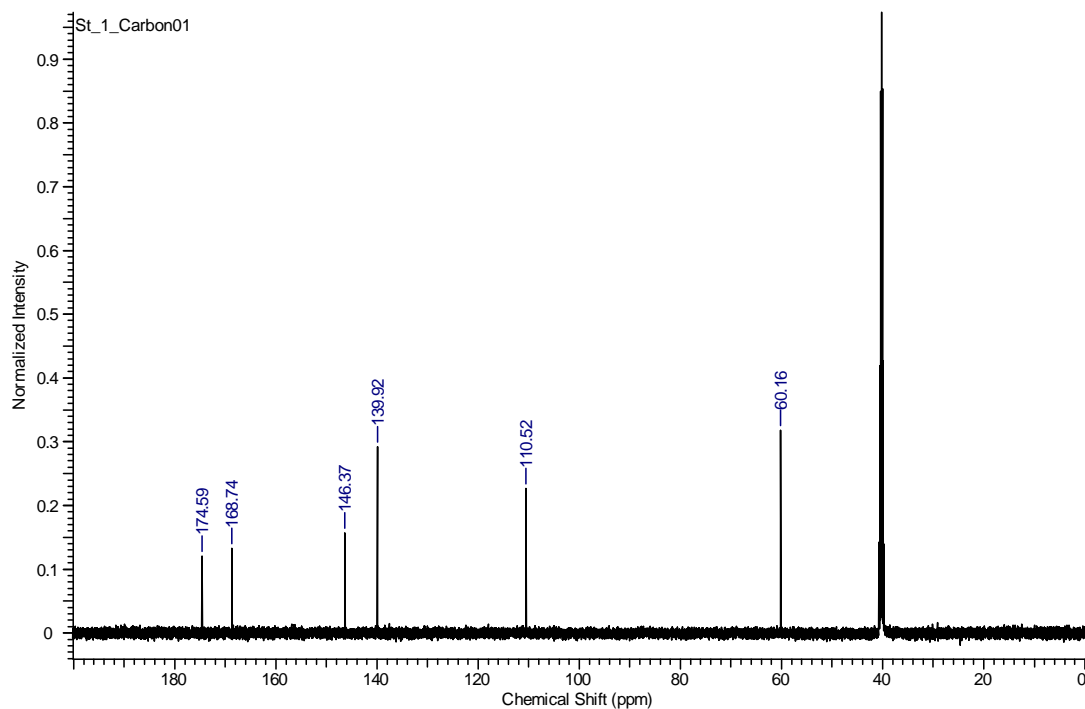


Figura 4.9.43. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 10 em $\text{DMSO} - d_6$ (400 MHz).

No mapa de contornos do experimento de HMBC (Figura 4.9.45) são observadas as correlações múltiplas, mas também os contornos típicos a ^1J entre os sinais de hidrogênio e seus respectivos carbonos δ 7,95 x δ 139,9; δ 6,49 x δ 110,5 e δ 4,40 x δ 60,2. Esses dados de RMN e a comparação com a literatura são coerentes com a identidade da amostra como o ácido kójico (Figura 4.9.44), as multiplicidades observadas são atribuídas a acoplamentos a longa distância entre δ 6,49 (t) e δ 4,40 (d), a Figura 4.9.46 apresenta todas as correlações observadas nos experimentos para o ácido kójico. O espectro de massa no modo ESI^+ (Figura 4.9.47) apresentou os íons em m/z 143 referente ao íon *quasi* – molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ e o seu aduto de sódio em m/z 175.

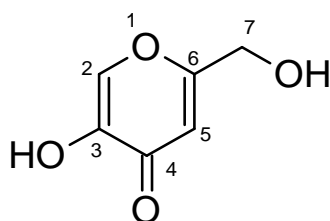


Figura 4.9.44. Estrutura do ácido kójico.

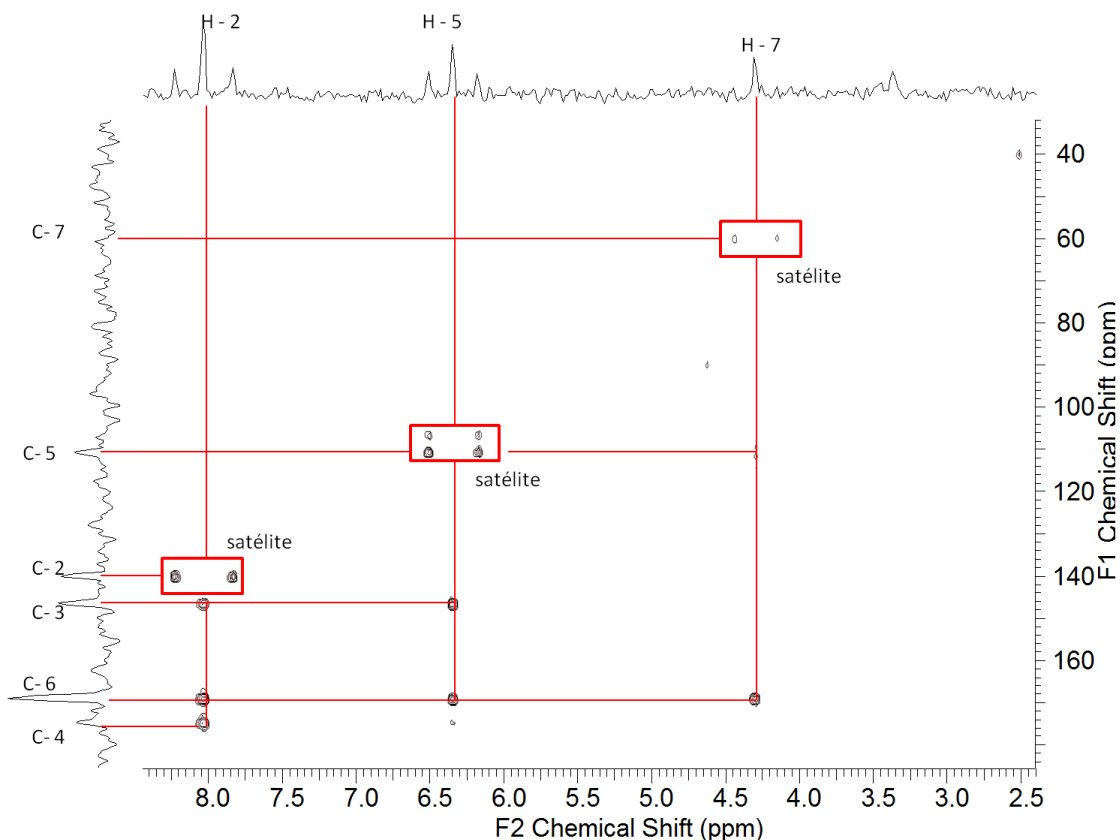


Figura 4.9.45. Correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBC para a amostra 10 em metanol- d_4 (400 MHz).

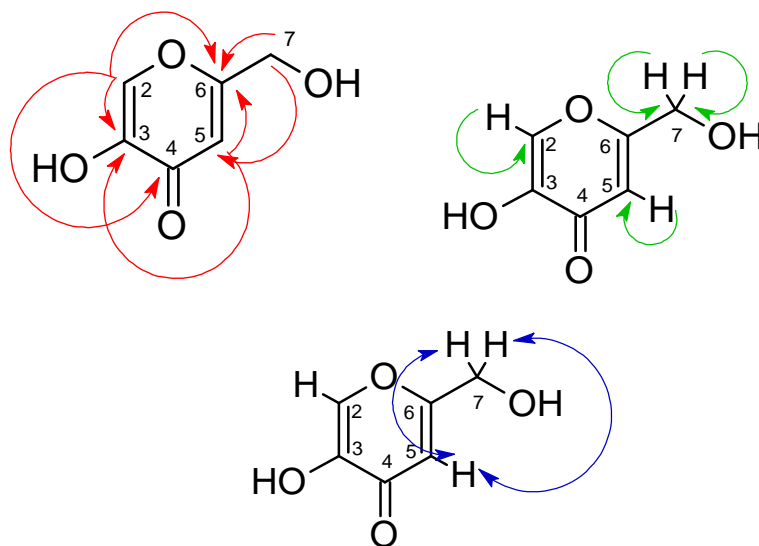
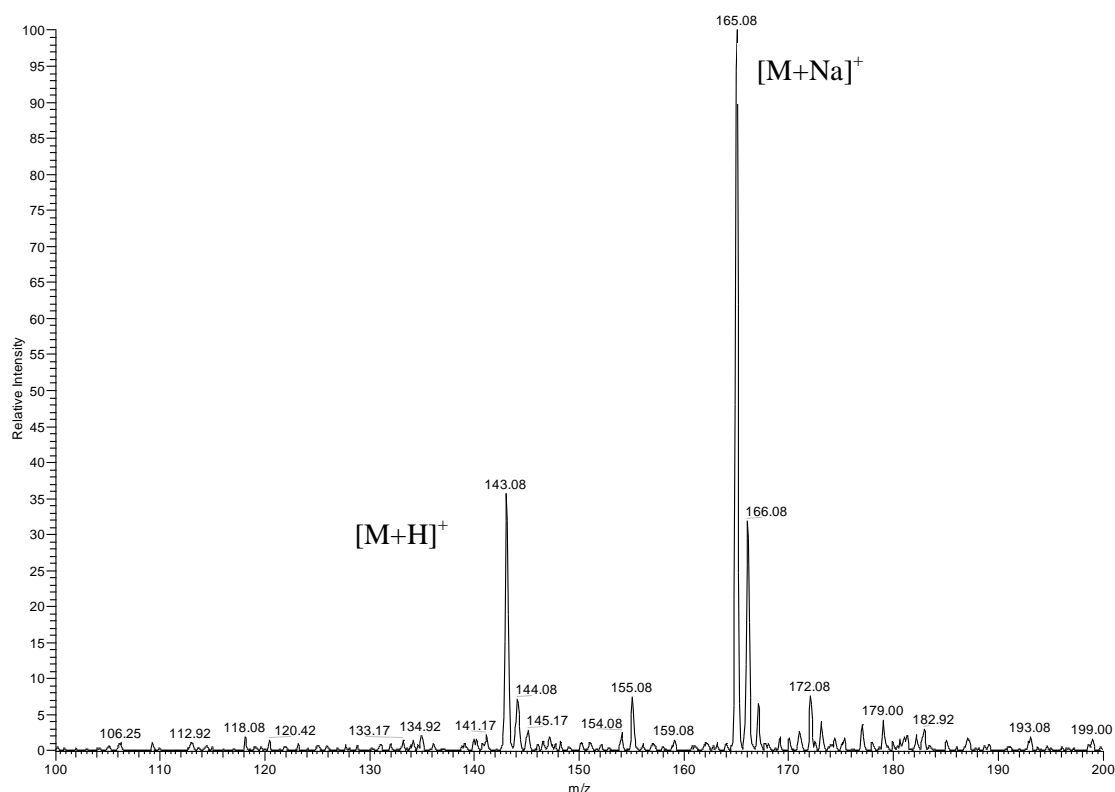


Figura 4.9.46. Correlações para o ácido kójico, em vermelho as correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC), em verde as correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) para os sinais satélites e em azul os acoplamentos a distância observados no espectro de RMN de ^1H .

#1405 IT: 100.000 ST: 0.91 uS: 5 NL: 2.07E2
F: ITMS + p ESI Full ms [100.00-200.00]



Figura

4.9.47. Espectro de massas da amostra 10 no modo ESI⁺ full.Tabela 4.9.8. Dados de RMN de ¹H e ¹³C da amostra 10 em comparação com os dados do ácido kójico descritos na literatura (LI et al., 2003).

| | Amostra 10 ^a | ácido kójico ^b |
|----------------|-------------------------|---------------------------|
| | δ ¹ H | δ ¹ H |
| H ₂ | 7,95 (s) | 8,02 (s) |
| H ₅ | 6,46 (t, J = 0,8 Hz) | 6,33 (s) |
| H ₇ | 4,28 (d, J = 0,8 Hz) | 4,28 (s) |

^aDados obtidos em metanol-*d*₄.

^bDados obtidos em DMSO-*d*₆

O ácido kójico é uma toxina geralmente isolada de fungos do gênero *Aspergillus* e rara em *Penicillium*. Este metabólito é derivado da degradação oxidativa de pentoses e hexoses (BAJPAI et al., 1981). O ácido kójico atualmente tem como finalidade terapêutica o tratamento de vitiligo, pois em associação com ácido glicólico auxilia na repigmentação da pele (GARCIA & FULTON, 1996).

4.10.4. Fungo Stsp CR 2.3-1 (*Gliocladium* sp.).

Os extratos da linhagem Stsp CR 2.3-1 (Figura 4.9.48), obtida da casca da raiz de *Strychnos* cf. *toxifera* e única linhagem do gênero *Gliocladium* isolada neste trabalho, apresentaram atividades: anticancerígena contra as quatro linhagens de células tumorais já mencionadas, antioxidante, antiacetilcolinesterase, atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e antifúngica contra *Candida albicans*. Além de uma de suas substâncias isoladas apresentar atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus*. A Figura 4.9.49 lista as substâncias isoladas da linhagem Stsp CR 2.3-1 que teve tanto o meio metabolizado como seu micélio estudados.

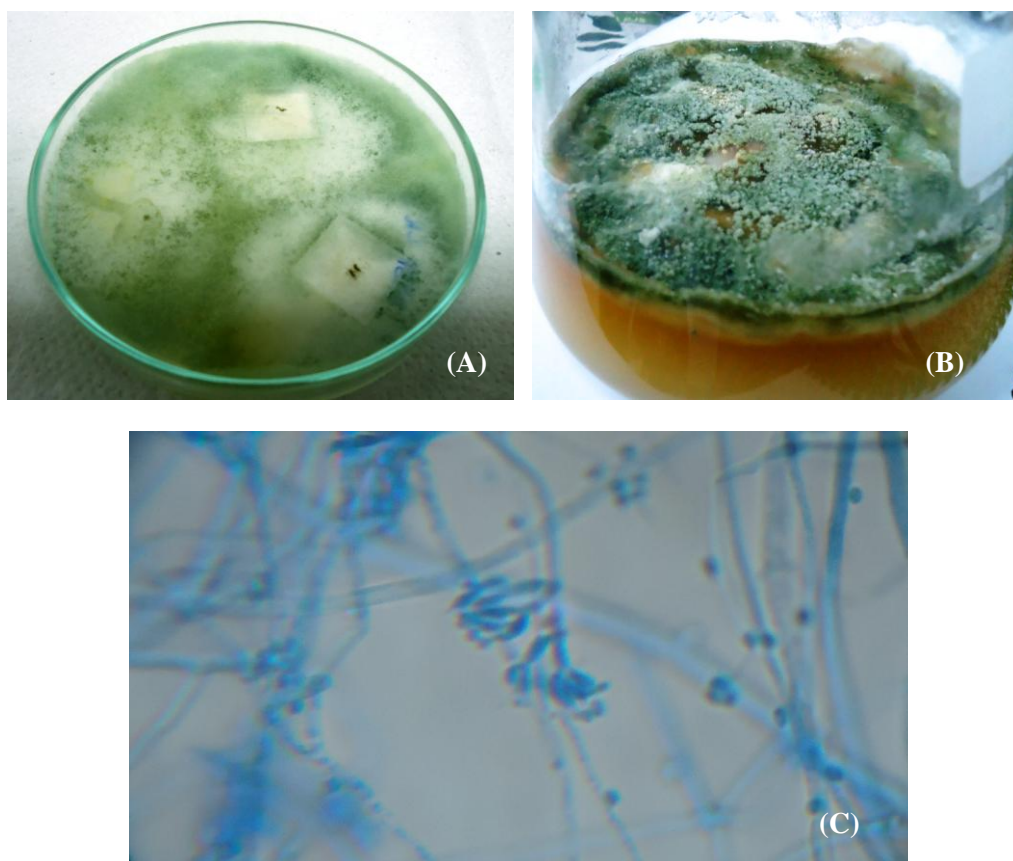
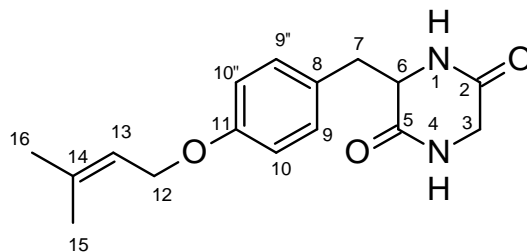
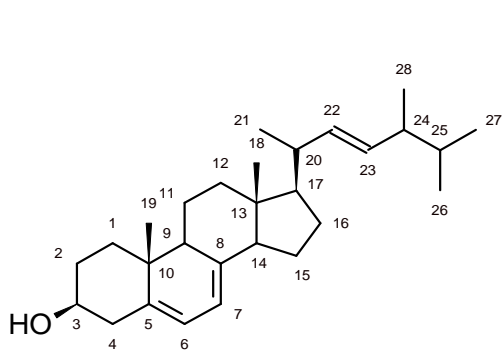


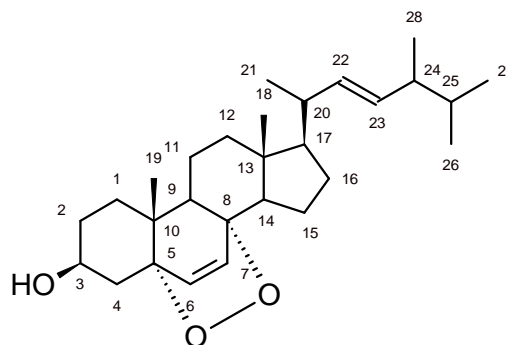
Figura 4.9.48. (A) Linhagem Stsp CR 2.3-1 em meio Czapek, (B) mesma linhagem em meio líquido ISP2 e (C) estruturas reprodutivas em imagem por microscopia óptica.



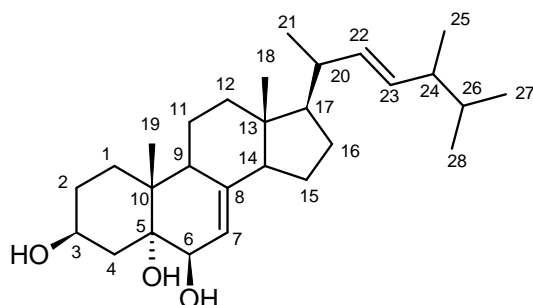
ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-dimetilalil éter – **Amostra 11**
 $C_{16}H_{20}N_2O_3$; 288,3



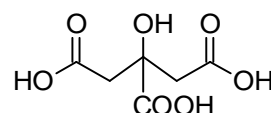
ergosterol – **Amostra 12**
 $C_{28}H_{44}O$; 396,6



peróxido de ergosterol – **Amostra 13**
 $C_{28}H_{44}O_3$; 428,7



cerevisterol – **Amostra 14**
 $C_{28}H_{46}O_3$; 430,7



ácido cítrico – **Amostra 15**
 $C_6H_8O_7$; 192,1

Figura 4.9.49. Substâncias isoladas da linhagem Stsp CR 2.3-1.

Amostra 11.

A amostra 11, isolada da fração AcOEt do meio líquido do fungo Stsp CR 2.3.1 na forma de cristais (Item 3.8.4), apresentou no espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.50) 11 sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos, vinílicos e aromáticos.

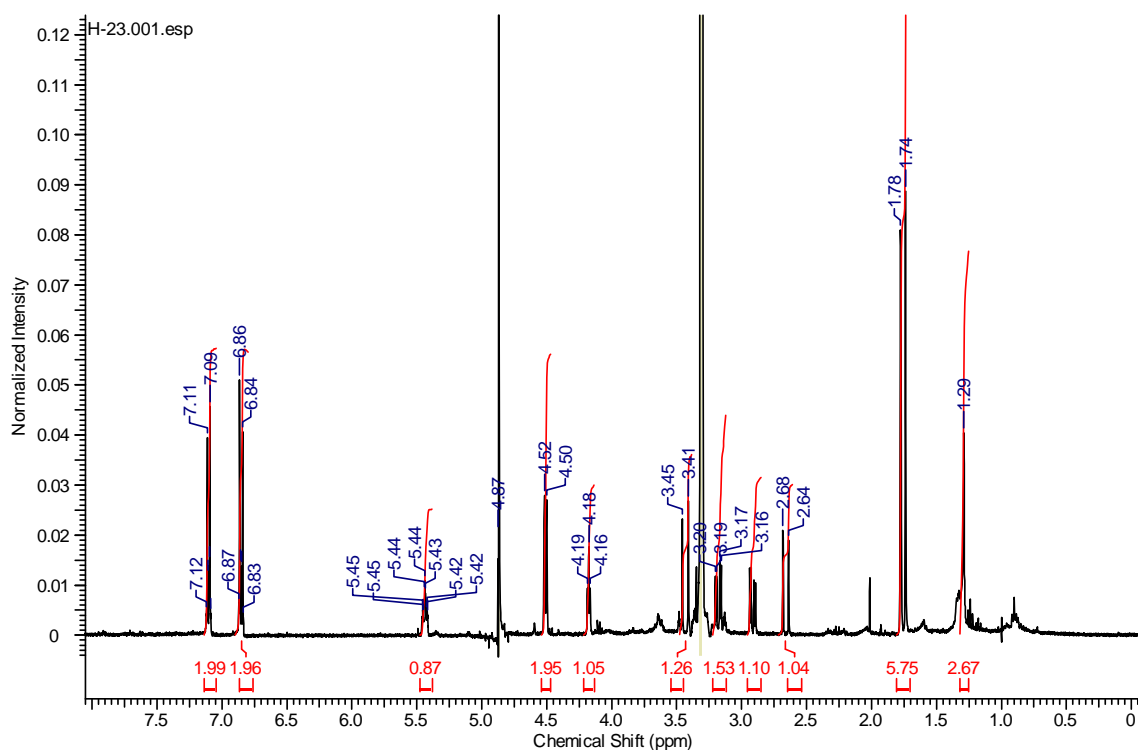


Figura 4.9.50. Espectro de RMN de ^1H da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

O aspecto e a presença de dois dupletos em δ 6,85 ($J = 8,8$ Hz) e δ 7,10 ($J = 8,8$ Hz), cada um integrando para dois hidrogênios, sugerem para a estrutura da amostra 11 um sistema aromático *para*-dissubstituído. O hidrogênio em δ 2,65 (dd, 1H) apresenta acoplamento com o hidrogênio em δ 3,43 (d, 1H) em um sistema de spins AX, de acordo com o valor da constante de acoplamento ($J = 17,8$ Hz). Um sistema geminado AMX é formado pelos sinais em δ 3,18 (dd, $J = 3,8$ e $13,8$ Hz, 1H), 2,91 (dd, $J = 4,8$ e $13,8$ Hz, 1H) e δ 4,18 (m). Os hidrogênios em δ 4,50 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H) acoplam com os hidrogênios vinílicos em δ 5,43 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H) e este correlaciona à distância com os hidrogênios metílicos em δ 1,74(s) e 1,78(s). A Figura 4.9.51 apresenta as ampliações dos sinais do espectro de RMN de ^1H .

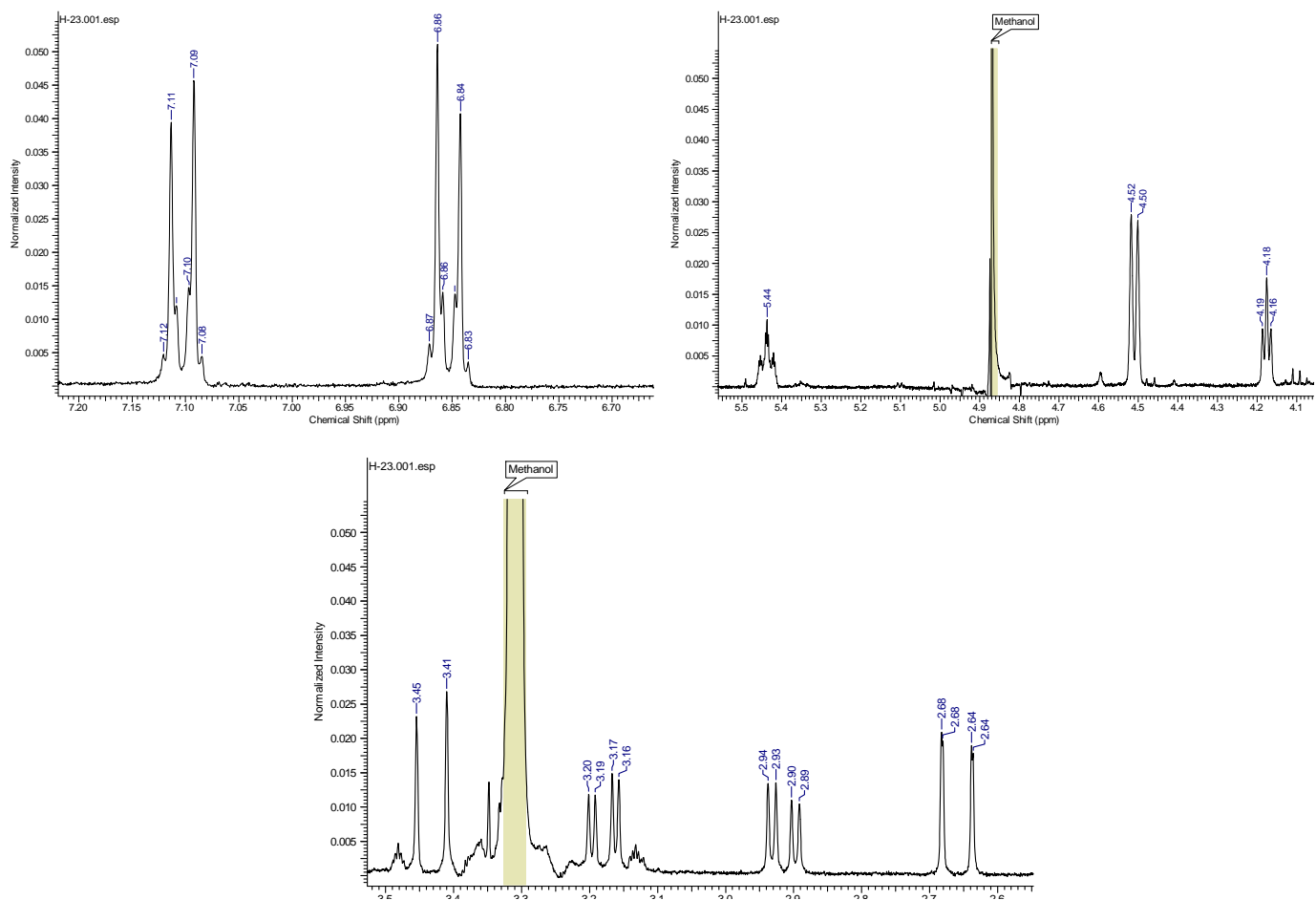


Figura 4.9.51. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

A projeção do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.9.52) do experimento de HMBC apresentou 14 sinais sendo de carbonos, carbonílicos, aromáticos, metilênicos, metílicos e vinílicos. Nas ampliações dos mapas HMBC e COSY (Figuras 4.9.53 e 4.9.54) é possível observar-se as correlações dos sinais para os hidrogênios em δ 5,43; δ 4,50 e δ 1,74 referentes ao grupo preniloxi da amostra 11.

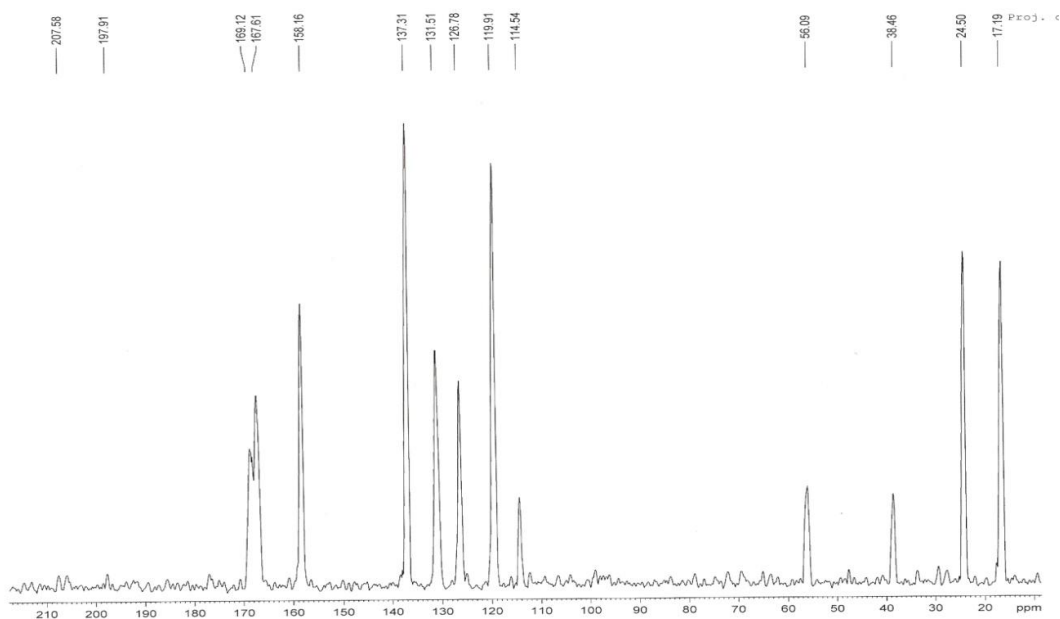


Figura 4.9.52. Projeção do espectro de RMN de ^{13}C baseado no experimento de HMBC da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

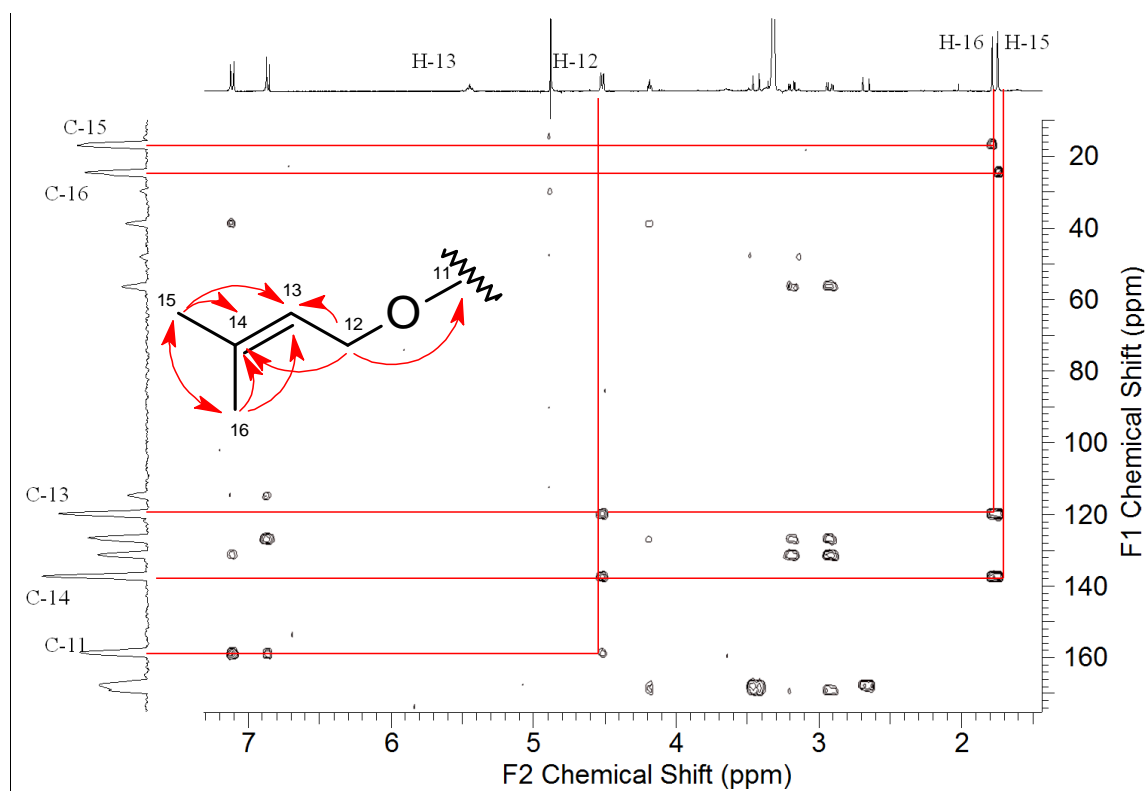


Figura 4.9.53. Correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBC para o grupo preniloxi da substância 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

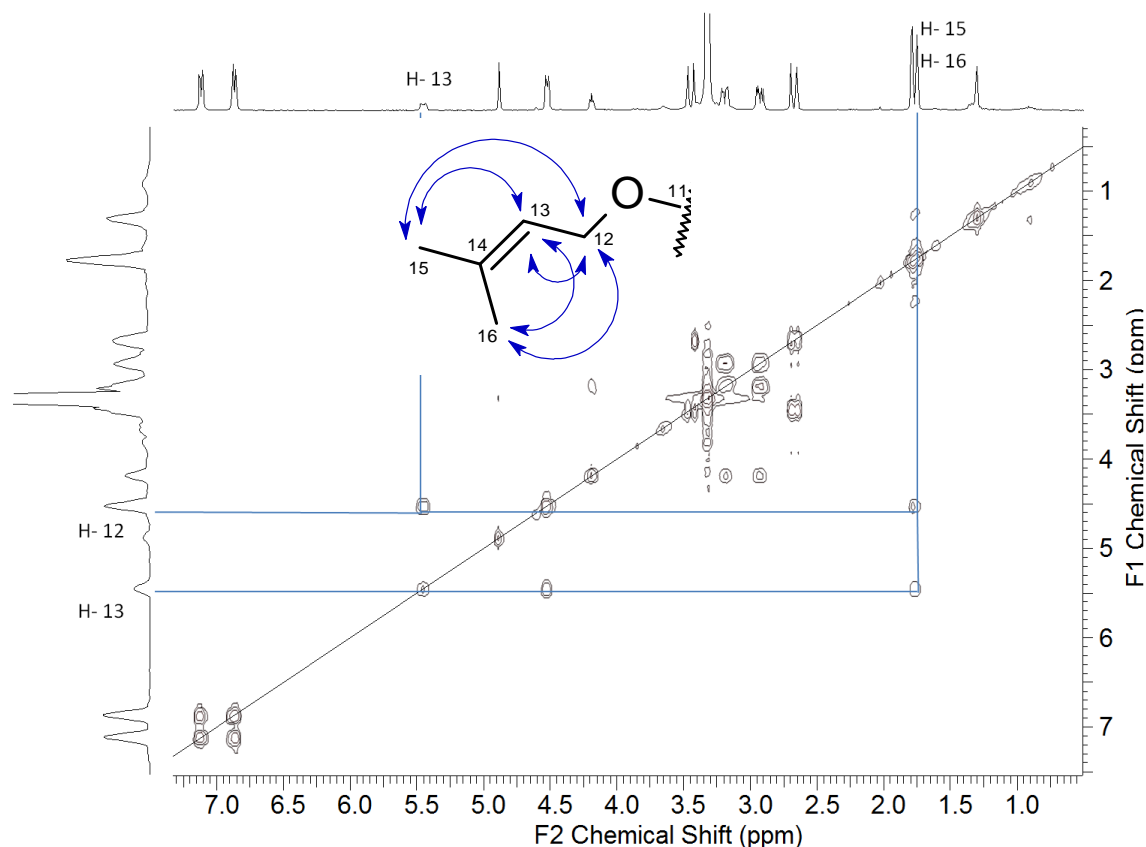


Figura 4.9.54. Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para o grupo preniloxi da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

Para os hidrogênios aromáticos em δ 6,85 e δ 7,10 são observadas correlações com o carbono em δ 158,2 indicando uma função oxigenada no anel aromático. Este mesmo carbono tem correlação com o sinal em δ 4,50, o que confirma que o grupo preniloxi está ligado ao anel aromático. Os sinais de hidrogênios em δ 3,18 e 2,91, correlacionados entre si e com o sinal em 4,18 (m) no mapa de COSY apresentam uma ligeira diferença em suas correlações no mapa de HMBC, dada a diversidade das respectivas orientações espaciais, porém em conjunto são essenciais para marcar o ponto de ligação do anel aromático com o anel dicetopiperazínico (Figuras 4.9.55 a 4.9.58). Estes dados de RMN levaram a identificação da amostra 22 como sendo o alcalóide dicetopiperazínico *ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-dimetilalil éter* (Figura 4.9.65).

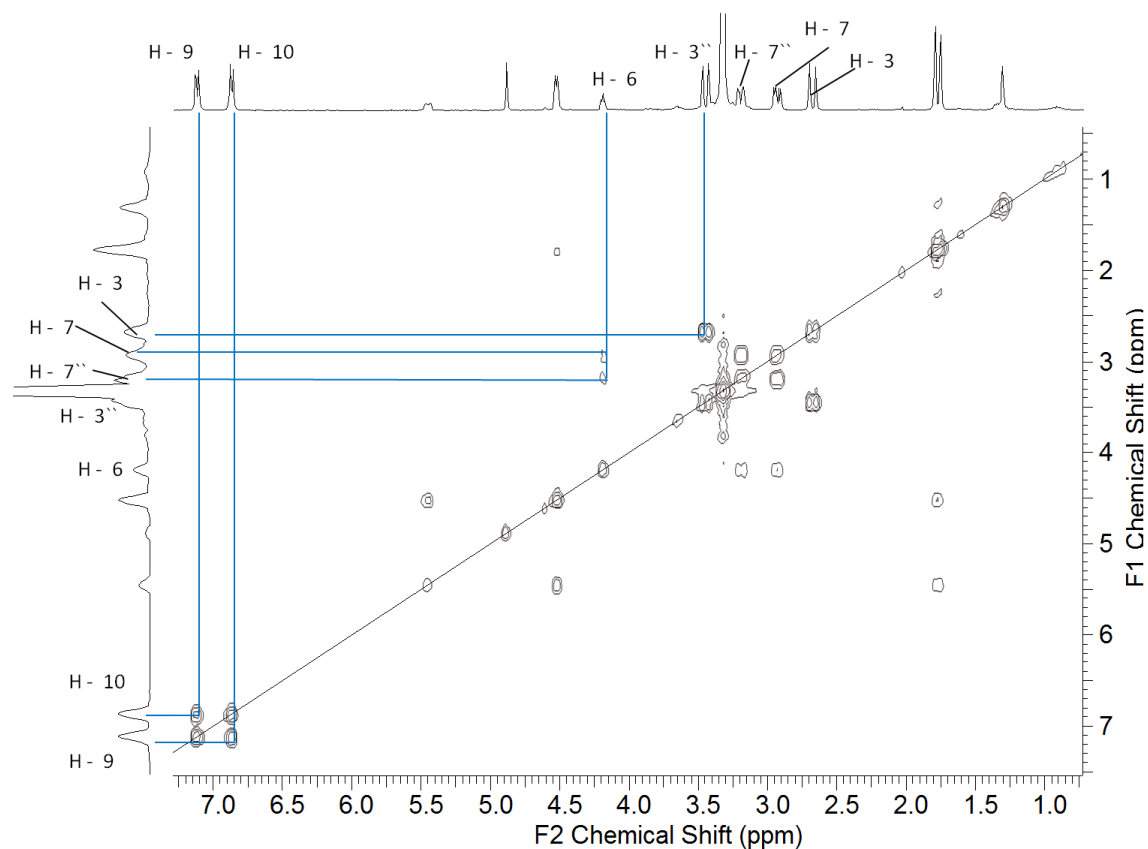


Figura 4.9.55. Correlações homonucleares ^1H - ^1H observadas no experimento de COSY para os grupos aromáticos e dicetopiperazínicos da substância 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

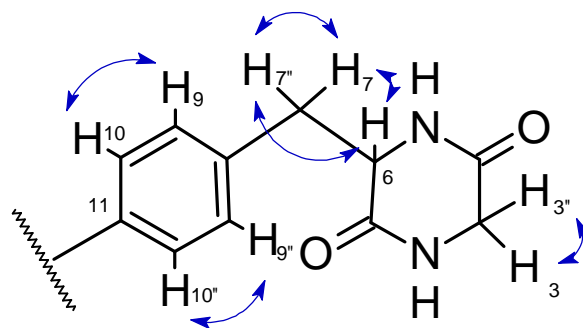


Figura 4.9.56. Demais correlações de COSY da amostra 11.

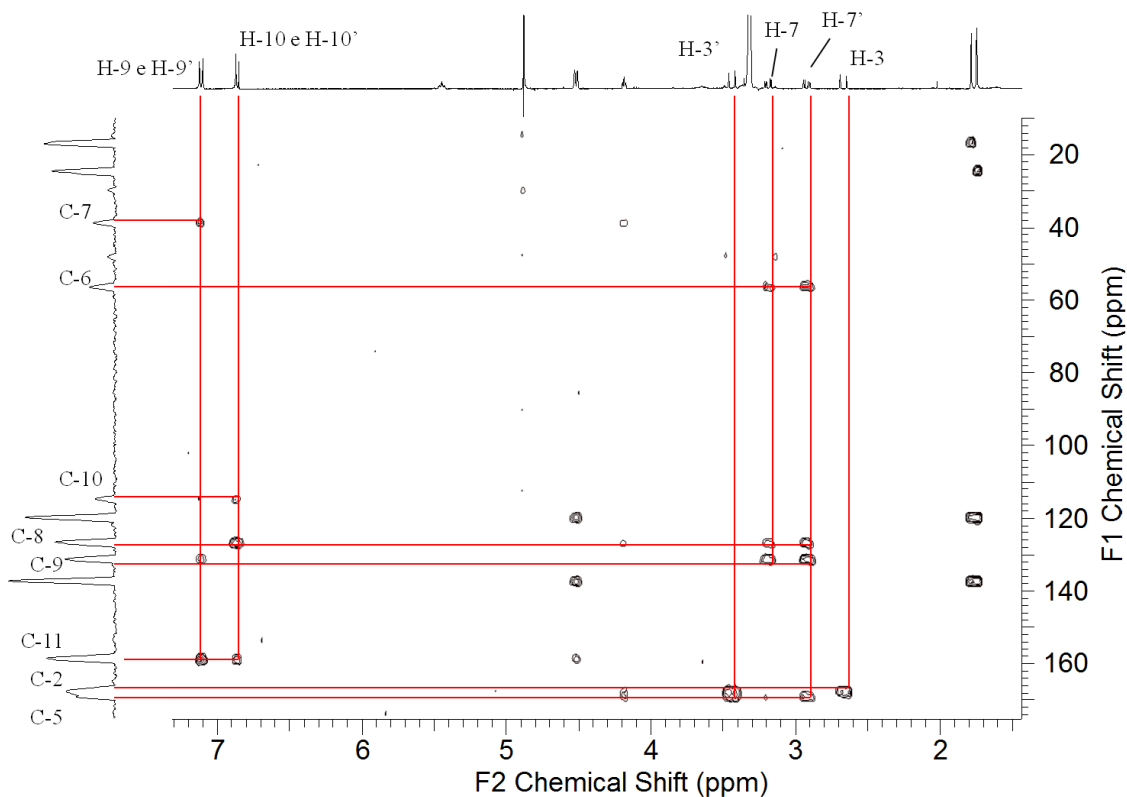


Figura 4.9.57. Correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBC para os grupos aromáticos e dicetopiperazínicos da substância 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

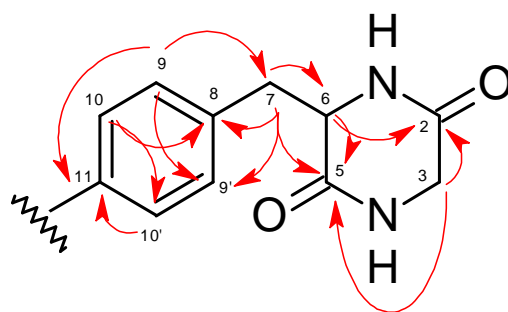


Figura 4.9.58. Demais correlações de HMBC da amostra 11.

No espectro de massas por ESI-MS *fullscan* no modo positivo (Figura 4.9.62) é observado como pico base o íon em m/z 311 referente ao aduto de sódio $[\text{M}-\text{Na}^+]^+$ da amostra 11, e a confirmação da estrutura do alcalóide também se deu pelo monitoramento até MS^3 dos íons produtos do íon precursor em m/z 289 (Figuras 4.9.63 e 4.9.64) dicetopiperazínico *ciclo*-(glicil-L – tirosil) 4,4- dimetilalil éter (Figura 4.9.65) (Tabela 4.9.9) (KIRBY et al., 1988).

Experimentos de gNOE (Figuras 4.9.59 e 4.9.60) foram conduzidos de modo a se as orientações espaciais dos hidrogênios da molécula e também confirmar as propostas estruturais baseadas em experimentos 2D. Na irradiação dos hidrogênios em δ 2,65 e 3,43 referentes a posição 3 do anel dicetopiperazínico, foi apenas observado a interação esperada entre seus respectivos hidrogênios. Não pode ser observada a interação de nenhum desses hidrogênios com o H-6, uma possível consequência da presença de dois nitrogênios no anel dicetopiperazínico.

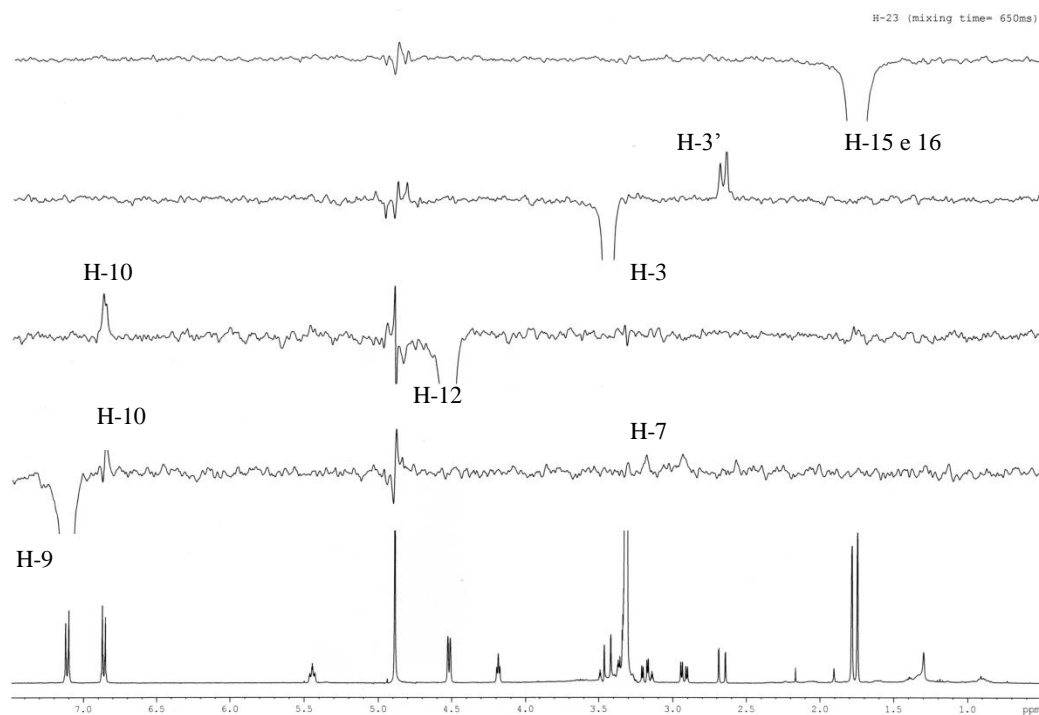


Figura 4.9.59. Espectro de gNOE da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

Outras correlações importantes são observadas pela irradiação dos sinais do H-9 em δ 7,10 e do H-12 em δ 4,50. Para o H-9 foram observadas fracas correlações com o H-7 e H-7' e para o H-12, a correlação com o H-10. Em ambos os casos são confirmadas as posições dos substituintes do anel aromático (Figura 4.9.61).

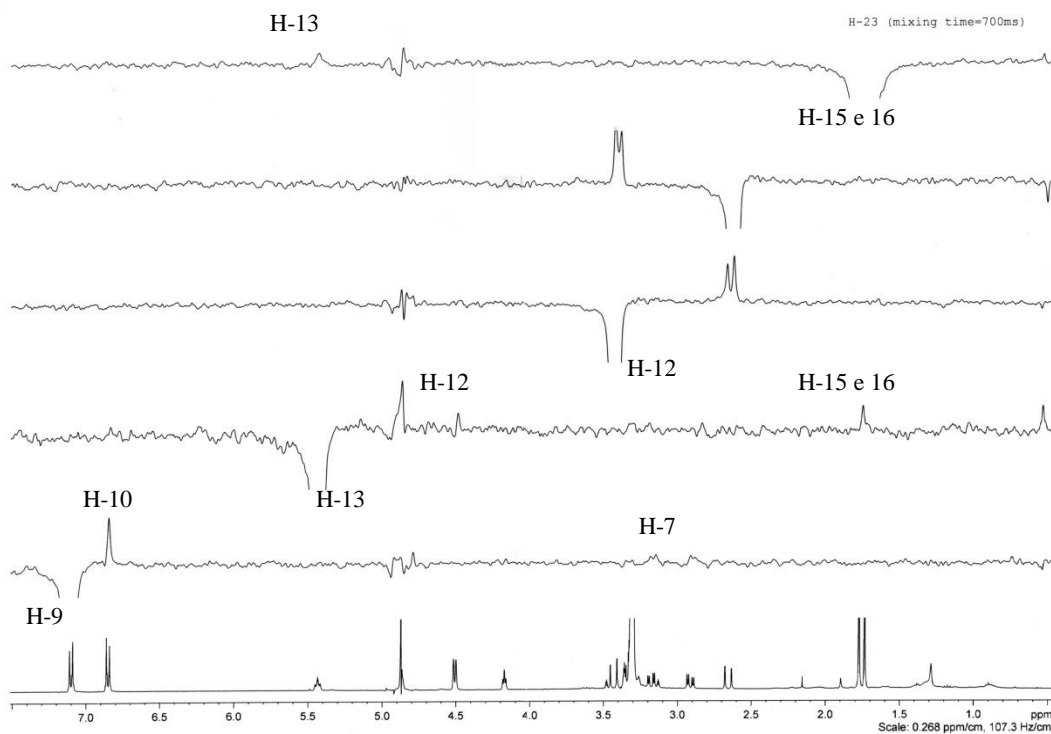


Figura 4.9.60. Segundo espectro de gNOE da amostra 11 em metanol- d_4 (400 MHz).

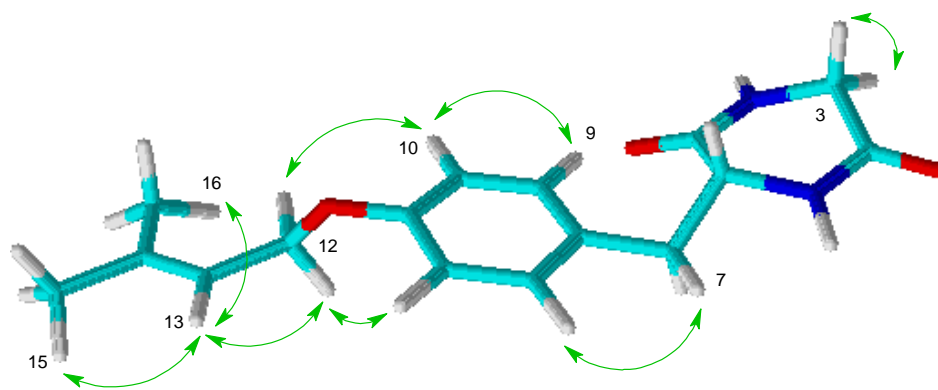


Figura 4.9.61. Estrutura espacial observada pelos experimentos de gNOE.

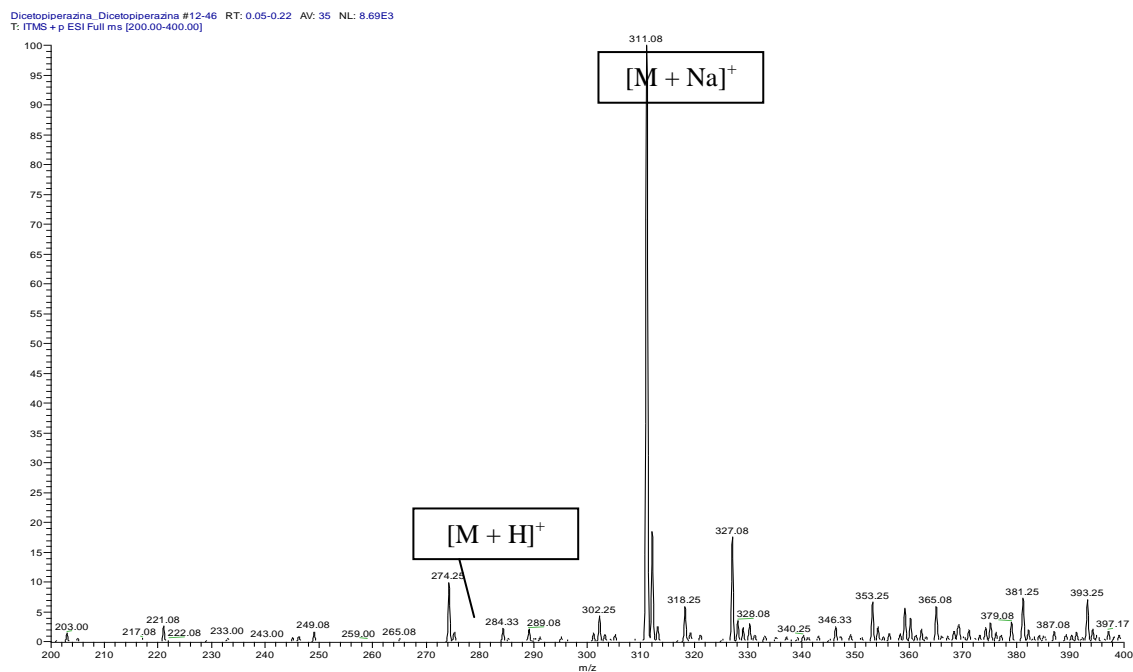


Figura 4.9.62. Espectro de massas *fullscan* no modo ESI⁺ da amostra 11.

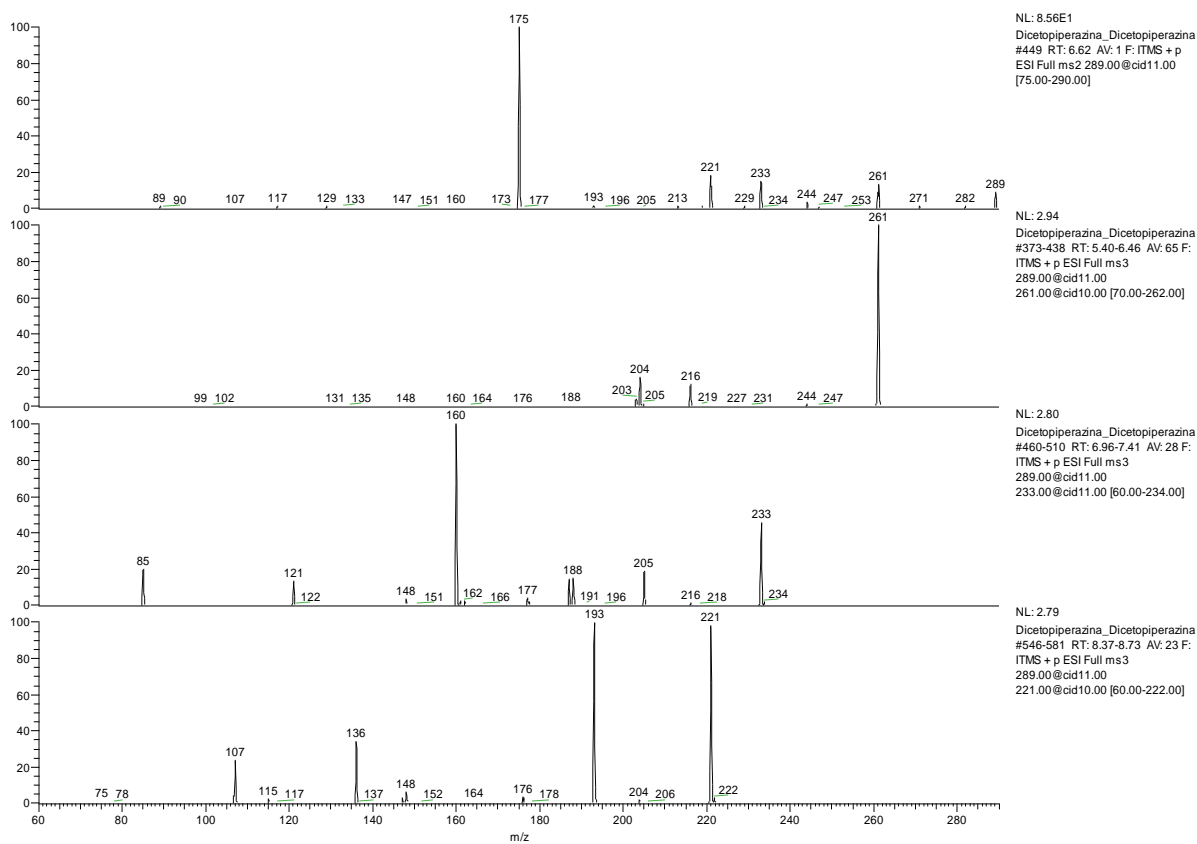


Figura 4.9.63. Espectro de massas de íon produtos indo até MS³ do íon precursor m/z 289 referente ao íon *quase*-molecular da amostra 11.

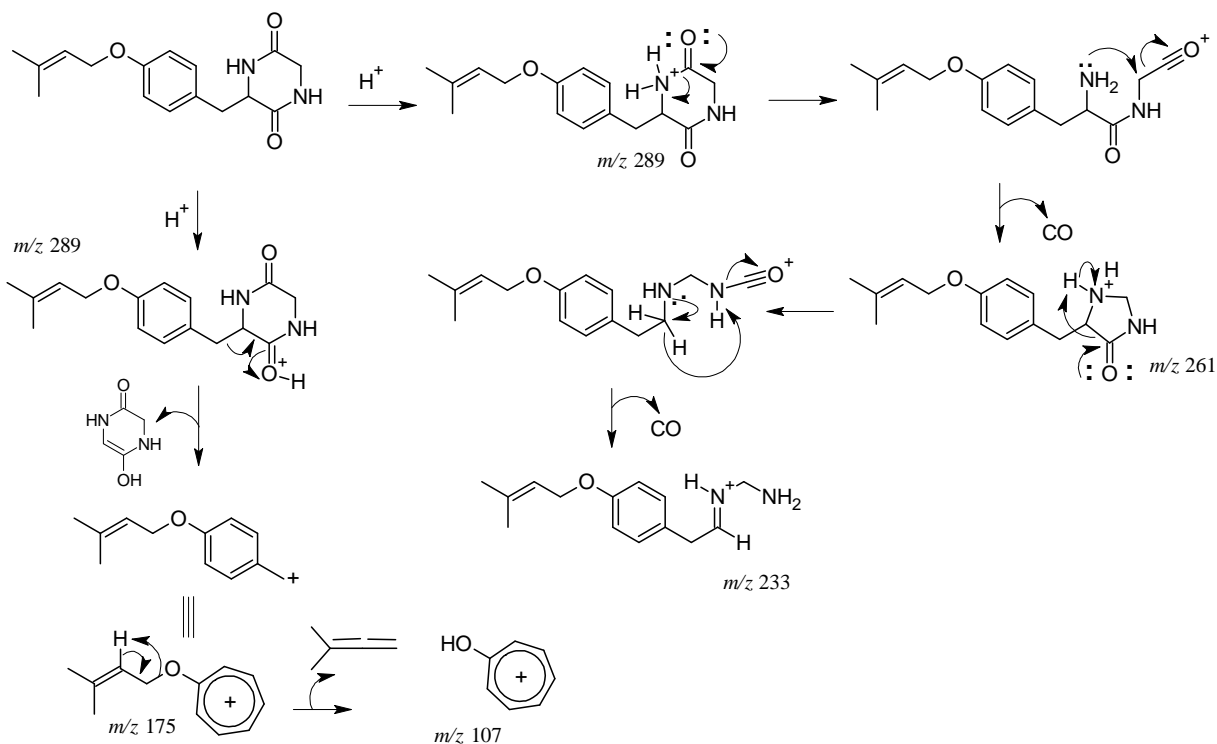


Figura 4.9.64. Proposta de fragmentação baseada em alguns íons produtos observados no experimentos de MS-MS.

Tabela 3.9.9. Dados de RMN de 1H da amostra 11 em comparação com os dados do ciclo-(glicil- L – tirosil) 4,4- dimetilalil éter descritos na literatura (KIRBY et al., 1988).

| Posição | 1H | $^{13}C^*$ | HMBC |
|---------|---|------------|-------------------|
| 2 | - | 167,6 | - |
| 3 | 2,65 (dd, $J = 1,0$ e $17,8$ Hz), H-3 3,43(d, $J = 17,8$ Hz) , H-3' | n.d. | C2, C5 |
| 5 | - | 169,1 | - |
| 6 | 4,18 (m) | 58,1 | C5, C7 |
| 7 | 3,18 (dd, $J = 3,8$ e $13,8$ Hz), H-7 2,91 (dd, $J = 4,8$ e $13,8$ Hz), H-7' | 38,5 | C5, C6, C8, C9 |
| 8 | - | 126,8 | - |
| 9 | 7,10 (d $J = 8,8$ Hz) | 131,5 | C7, C9, C11 |
| 10 | 6,85 (d, $J = 8,8$ Hz) | 114,5 | C8, C10, C11 |
| 11 | - | 158,2 | - |
| 12 | 4,50 (d, $J = 6,6$ Hz) | n.d. | C11, C13, C14 |
| 13 | 5,43 (t, $J = 6,6$ Hz) | 119,9 | - |
| 14 | - | 137,3 | - |

| | | | |
|----|----------|------|------------------|
| 15 | 1,74 (s) | 17,2 | C13, C14, C16 |
| 16 | 1,78(s) | 24,5 | C13, C14, C15 |

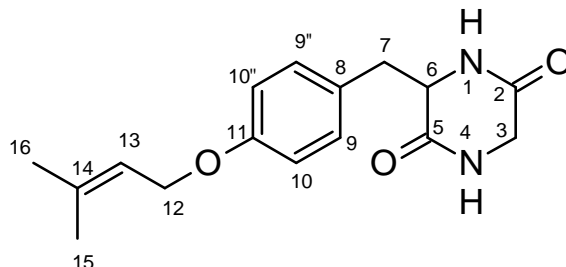


Figura 4.9.65. Estrutura da *ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-dimetilalil éter*.

A substância *ciclo-(Glicil-L-tirosil) 4,4-dimetilalil éter* é um alcalóide dicetopiperazínico que foi apenas reportado uma vez na literatura, em 1988 por Kirby e colaboradores, tendo sido isolada de uma linhagem de *Gliocladium virens* de solo. Este alcalóide é tido como um intermediário na biossíntese das gliotoxinas, importantes alcalóides pelas potentes atividades antimicrobianas, porém os dados relatados na literatura para a amostra 11 são apenas dados de RMN de ^1H , massas por IE e ponto de fusão. Desta maneira os dados obtidos são inéditos.

Amostra 14.

A amostra 14 isolada da fração 3:7 Hex/AcOEt do extrato **G1M** apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.66; Item 3.8.4) apresentou sinais de hidrogênios alifáticos, metílicos e carbinólicos. A comparação dos dados da literatura (KAWAGISHI et al., 1988) com os dados de RMN da amostra 14 sugeriu-se tratar do esteróide cerevisterol (Figura 4.9.67). A Tabela 4.9.10 lista a comparação dos dados de RMN de ^1H da amostra 14 e do cerevisterol descritos na literatura.

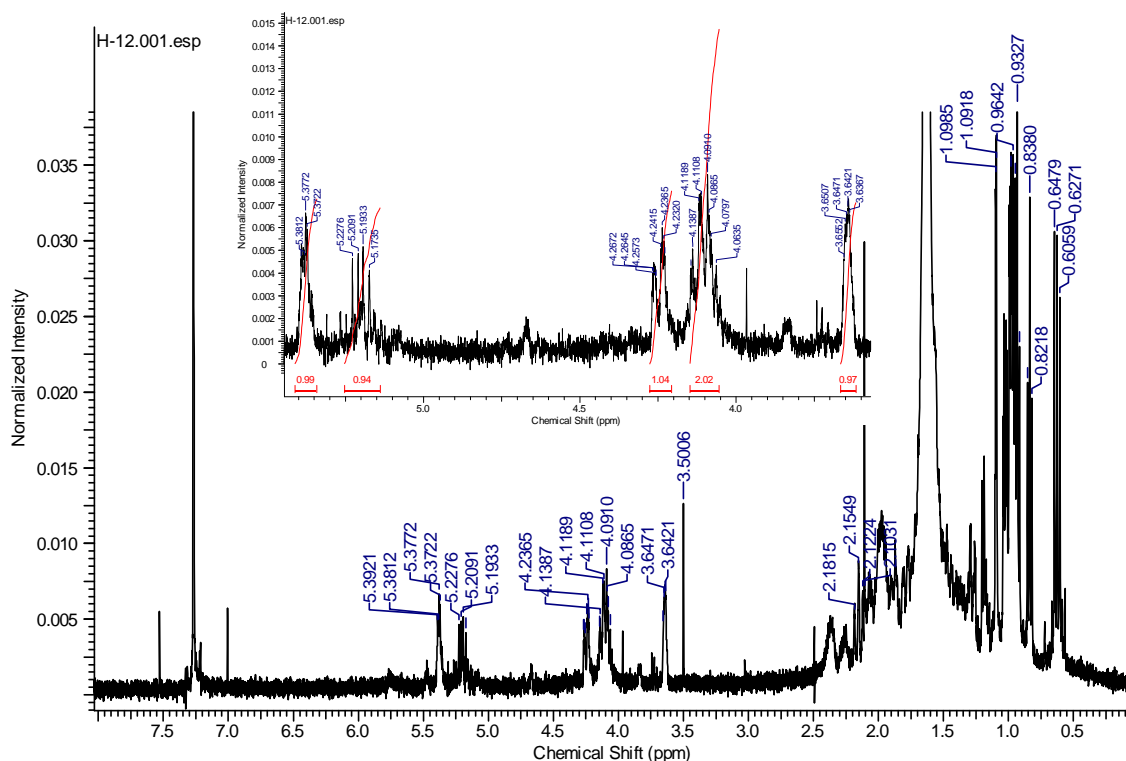


Figura 4.9.66. Espectro de RMN de ^1H da amostra 14 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

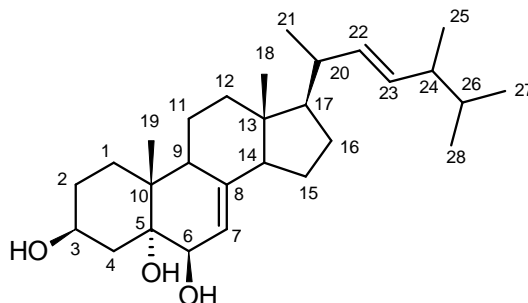


Figura 4.9.67. Estrutura do cerevisterol.

Tabela 4.9.10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 14 em comparação com os dados do peróxido de ergosterol descritos na literatura (KAWAGISHI et al., 1988).

| | Amostra 14 | Cerevisterol |
|----|-------------------------------|-------------------------------|
| | $\delta ^1\text{H}$ | $\delta ^1\text{H}$ |
| 1 | - | - |
| 2 | - | - |
| 3 | 4,08 (m) | 4,07 (m) |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | 3,64 (d, $J = 4,5$ Hz) | 3,62 (d, $J = 4,8$ Hz) |
| 7 | 5,35 (dd, $J = 4,5; 2,5$ Hz) | 5,32 (dd, $J = 4,8; 2,4$ Hz) |
| 8 | - | - |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| 11 | - | - |
| 12 | - | - |
| 13 | - | - |
| 14 | - | - |
| 15 | - | - |
| 16 | - | - |
| 17 | - | - |
| 18 | 0,60 (s) | 0,59 (s) |
| 19 | 1,10 (s) | 1,09 (s) |
| 20 | - | - |
| 21 | 1,05 (s) | 1,03 (s) |
| 22 | 5,18 (dd, $J = 8,0; 15,5$ Hz) | 5,16 (dd, $J = 8,1; 15,4$ Hz) |
| 23 | 5,25 (dd, $J = 7,3; 15,5$ Hz) | 5,23 (dd, $J = 7,0; 15,4$ Hz) |
| 24 | - | - |
| 25 | - | - |
| 26 | 0,83 (d, $J = 6,5$ Hz) | 0,82 (d, $J = 6,3$ Hz) |
| 27 | 0,85 (d, $J = 6,6$ Hz) | 0,84 (d, $J = 6,9$ Hz) |
| 28 | 0,94 (d, $J = 6,5$ Hz) | 0,92 (d, $J = 6,6$ Hz) |

O cerevisterol é um esteróide já bem relatado na literatura sendo isolado previamente de *Agaricus blazei*, este esteróide apresentou atividade anticancerígena (KAWAGISHI et al., 1988). Em trabalho desenvolvido por Koyama e colaboradores (2002) este esteróide foi isolado do basidiomiceto *Auricularia polytricha* e em seguida testado em uma série de testes, dentre eles apresentou potente atividade antinociceptiva (KOYAMA et al., 2002).

Amostra 15.

Esta substância foi isolada do micélio do fungo *Stp CR 2.3.1* a na forma de sólido amorfo branco (Item 3.8.4). Através da simples análise de seu espectro RMN de ^1H (Figura 4.9.68) a amostra 15 foi identificada como sendo o ácido cítrico, um dos componentes do ciclo de Krebs (Figura 4.9.69). Os dados de RMN de ^1H foram comparados com a literatura (SOUZA, 2005).

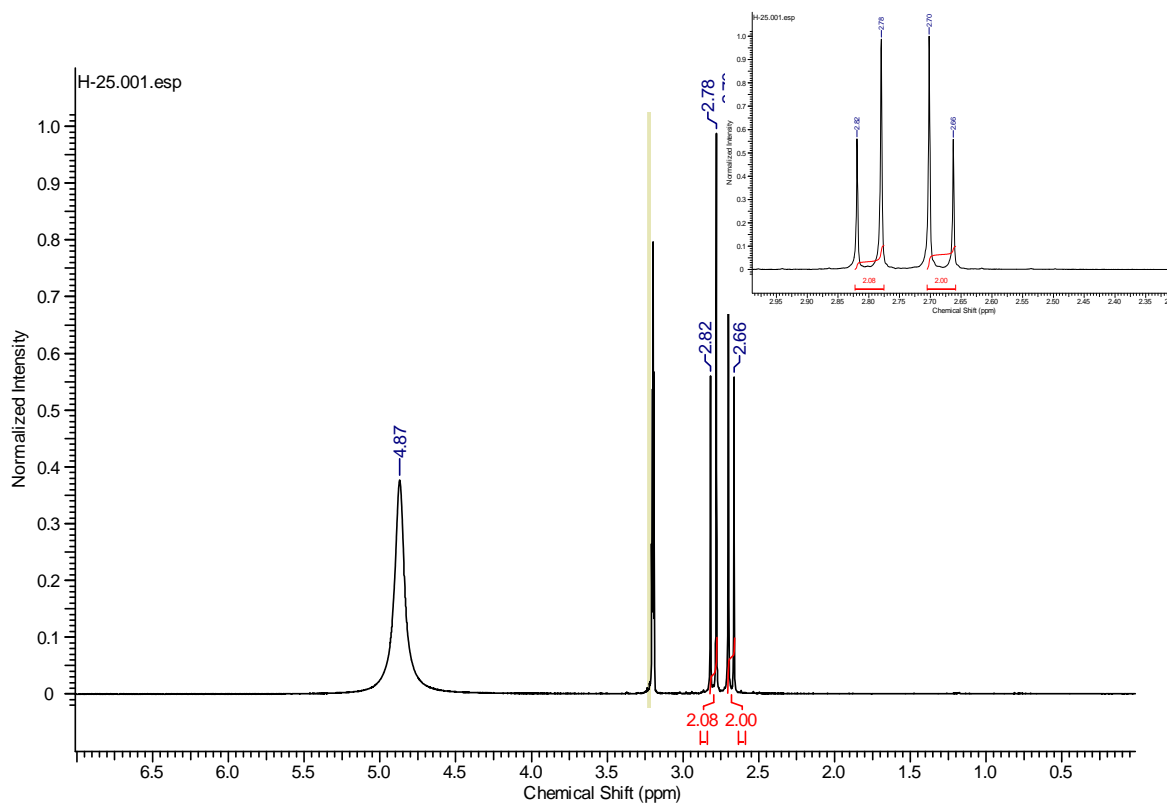


Figura 4.9.68. Espectro de RMN de ^1H da amostra 15 em metanol- d_4 (400 MHz).

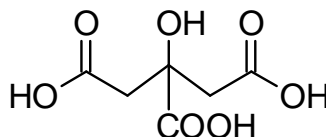


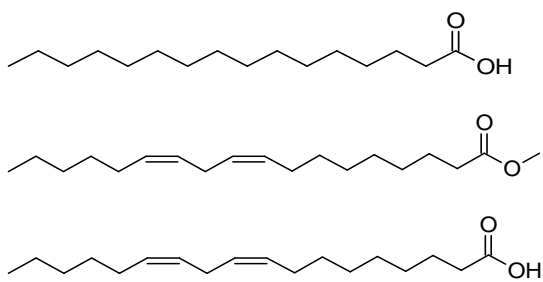
Figura 4.9.69. Estrutura do ácido cítrico.

4.9.5. Substâncias da hospedeira *Mauritia flexuosa*.

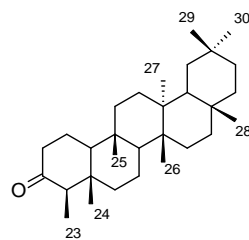
A hospedeira *Mauritia flexuosa* (Figura 4.9.70) teve seu estudo fitoquímico realizado por não apresentar estudos químicos prévios bem como por ser uma espécie vegetal mais comum na Amazônia e de grande importância econômica (PASSOS & MENDONÇA, 2006). Entre os extratos de *M. flexuosa* o hidroalcolólico das raízes respiratórias apresentou atividade antioxidante, enquanto que o hexânico das raízes submersas apresentou baixa citotoxicidade frente à *Artemia salina* (Item 4.5). A Figura 4.9.71 lista as substâncias das raízes de *M. flexuosa*.



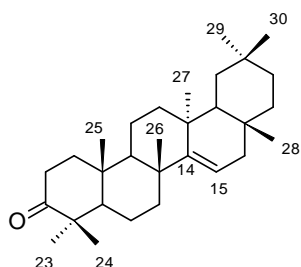
Figura 4.9.70. (A) Detalhe da plameira na beira da água e suas raízes submersas espalhadas pelo terreno alagado, (B) Detalhe das raízes respiratórias e (C) detalhe da parte alta da palmeira com frutos.



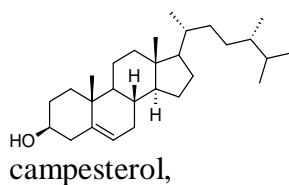
ácidos graxos e derivados - **Fração 2.**



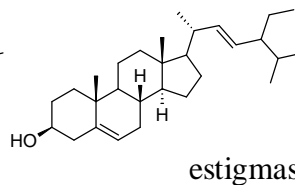
friedelina – **Amostra 16**
C₃₀H₅₀O; 426,7



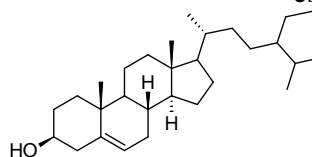
taraxerona – **Amostra 17**
C₃₀H₄₈O; 424,7



campesterol,

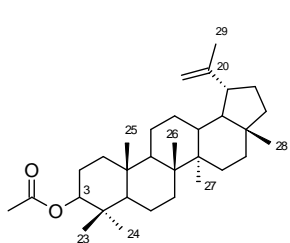


estigmasterol

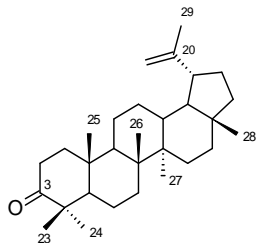


sitosterol

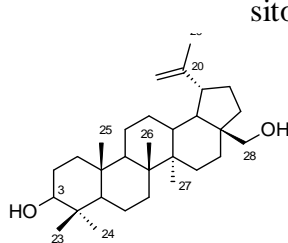
Amostra 18



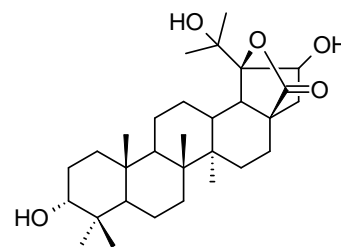
acetato de lupeol
C₃₂H₅₂O₂; 468,7
Amostra 19



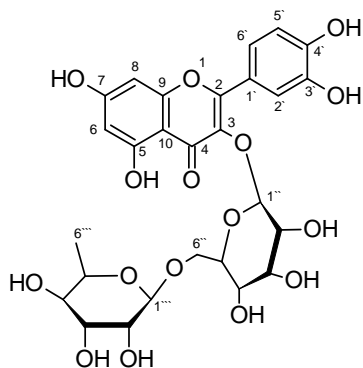
lupenona
C₃₀H₄₈O; 424,7
Amostra 20



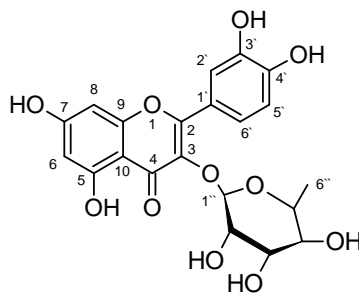
betulina
C₃₀H₅₀O₂; 442,7
Amostra 21



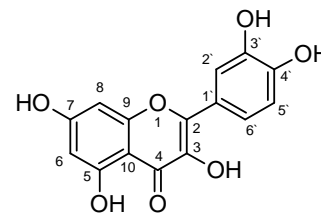
3-epi-20,21-dihdroxithurberogenina
C₃₀H₄₈O₅
Amostra 22



rutina – **Amostra 23**
C₂₇H₃₀O₁₆; 610,5



quercetrina – **Amostra 24**
C₂₁H₂₀O₁₁; 448,3



quercetina – **Amostra 25**
C₁₅H₁₀O₇; 302,2

Figura 4.9.71. Substâncias identificadas e isoladas de *M. flexuosa*.

Fração 2.

A fração 2 do extrato hexânico apresentou-se com um óleo de coloração alaranjada que aparentava um certo grau de pureza em análise por CCD. O cromatograma de íons totais (Figura 4.9.72) mostrou que esta fração é complexa, porém tem três substâncias majoritárias. Como toda amostra é mistura complexa de ésteres metílicos e seus ácidos graxos. Apenas os majoritários serão abordados.

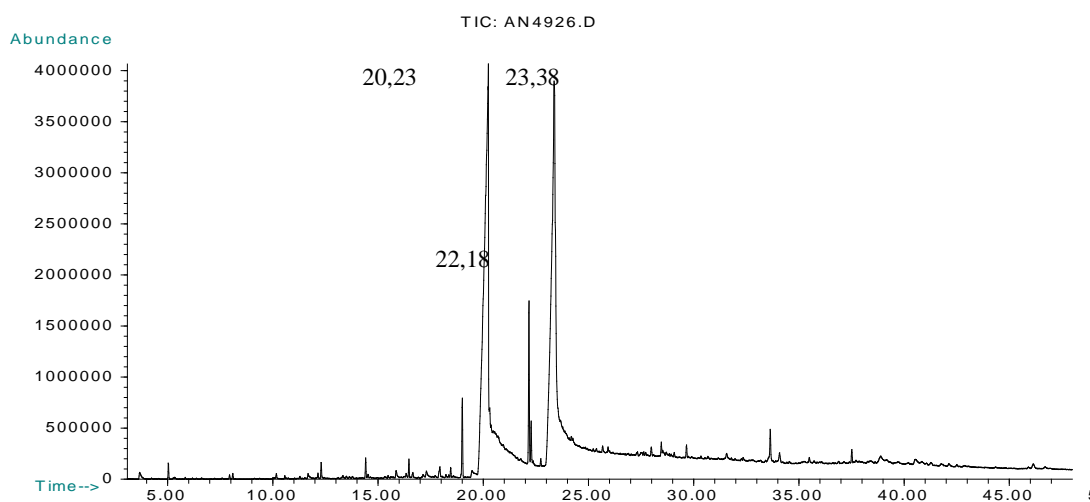


Figura 4.9.72 TIC da amostra Fração 2.

Para a banda com TR 20,23 minutos a sugestão da biblioteca Nist275 com 99% de similaridade baseada na fragmentação (Figura 4.9.74) é de que esta banda se trata do ácido palmítico (Figura 4.9.73), sendo este o constituinte majoritário na amostra.

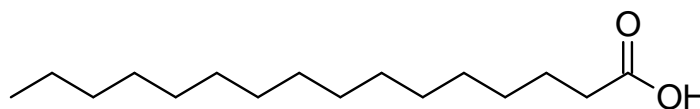


Figura 4.9.73. Estrutura do ácido palmítico.

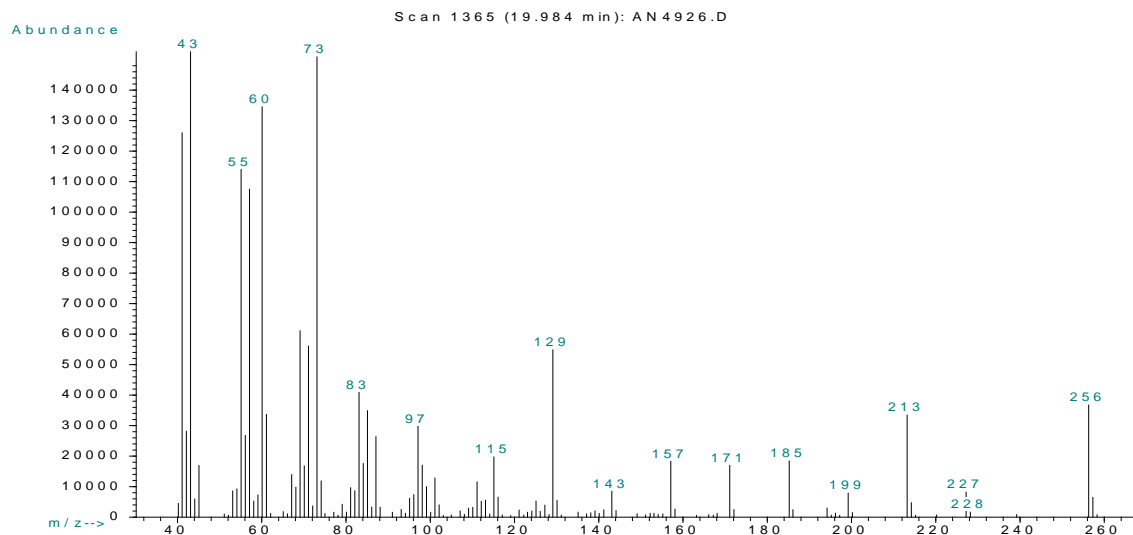


Figura 4.9.74. Espectro de massas por IE a 70 eV referente a banda em RT 20,23 minutos.

Para a banda com TR de 22,18 minutos a sugestão da biblioteca Nist275 resultou em 99% de similaridade (Figura 4.9.76) com o ácido (9Z,12Z) - octadecadienóico (Figura 4.9.75).

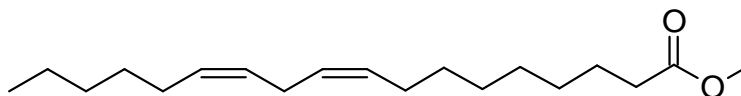


Figura 4.9.75. Estrutura do éster metílico do ácido (9Z,12Z) – octadecadienóico.

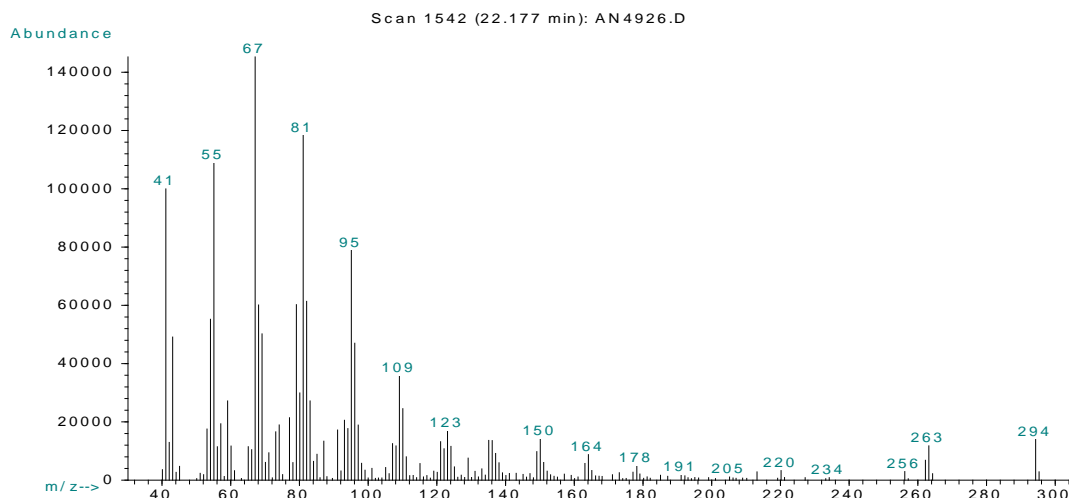


Figura 4.9.76. Espectro de massas por IE a 70 eV referente a banda em RT 22,18 minutos.

Para a banda com TR em 23,38 minutos a sugestão da biblioteca Nist275 com 99% de similaridade baseada na fragmentação (Figura 4.9.78) é de que esta banda se trata do ácido linoléico (Figura 4.9.77).

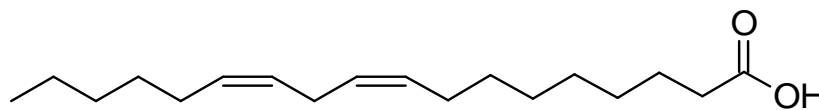


Figura 4.9.77. Estrutura do ácido linoléico.

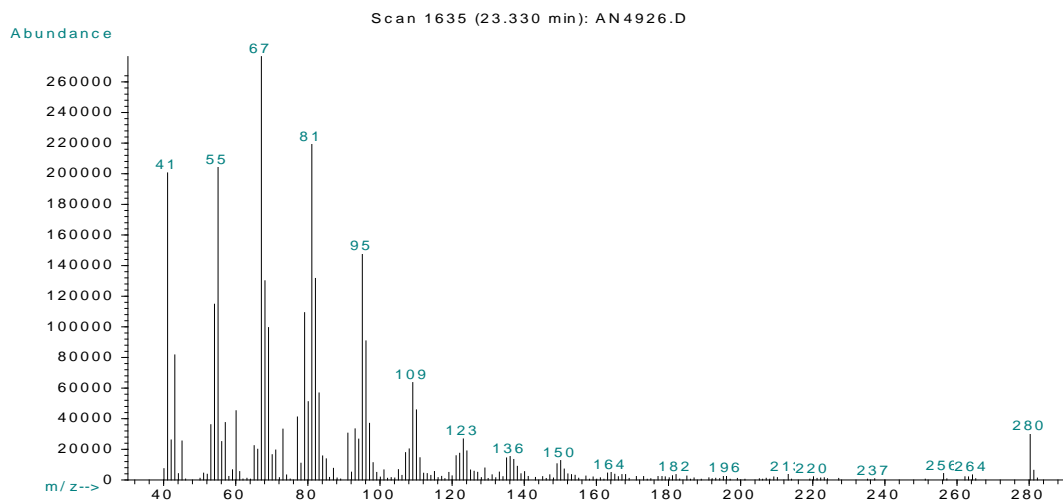


Figura 4.9.78. Espectro de massas por IE a 70 eV referente a banda em RT 23,38 minutos.

Amostra 16.

A amostra 16, do extrato hexânico das raízes de *M. flexuosa* (Item 3.8.5), formou cristais em forma de agulha e apresentou em seu espectro de RMN de ^1H um perfil típico de triterpenos pentacíclicos (Figura 4.9.79), com oito sinais de hidrogênios metílicos; sete singletos entre δ 0,7 – 1,2 e um duplete em δ 0,90 ($J = 2,7$ Hz). Os outros sinais do espectro estão na região de hidrogênios metilênicos e metínicos. No espectro de massas da amostra 16 por IE a 70 eV (Figura 4.9.80) é observado o íon molecular em m/z 412. Estes dados comparados com os da literatura (KLASS & TINTO, 1992) levaram a identificação da amostra 16 como o triterpeno pentacíclico friedelina (Figura 4.9.81).

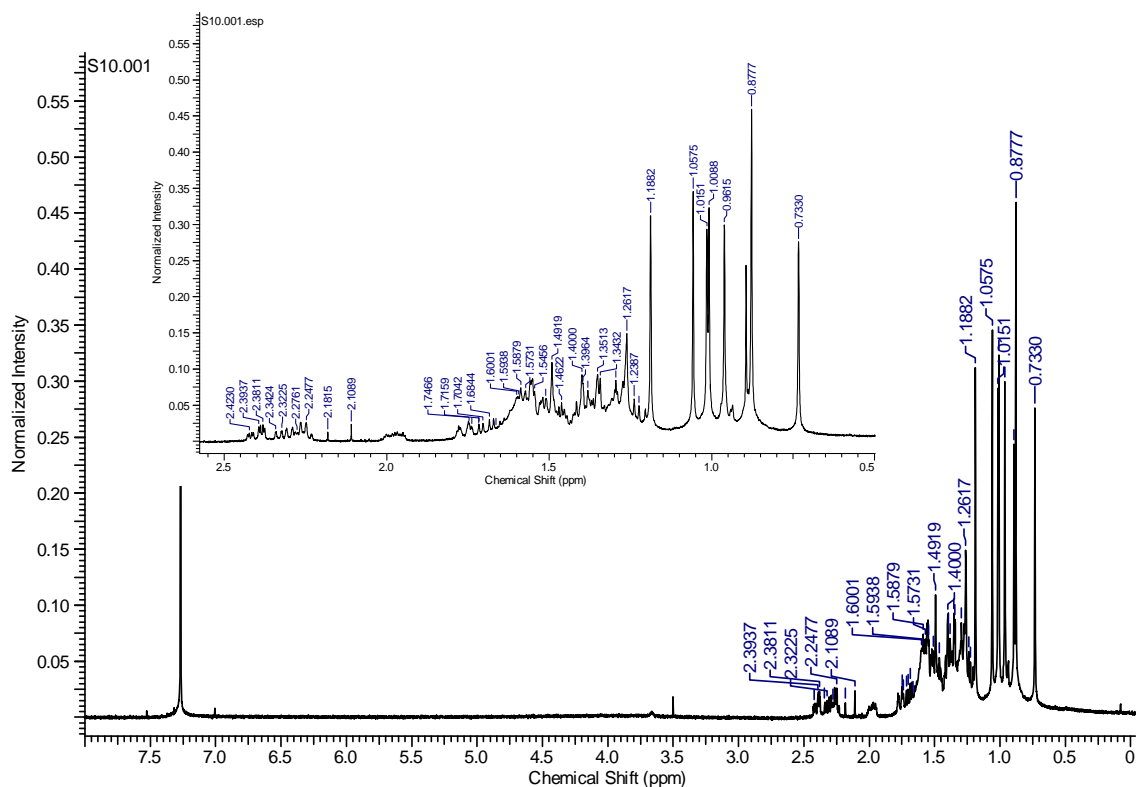


Figura 4.9.79. Espectro de RMN de ^1H da amostra 16 em clorofórmio- d (400 MHz).

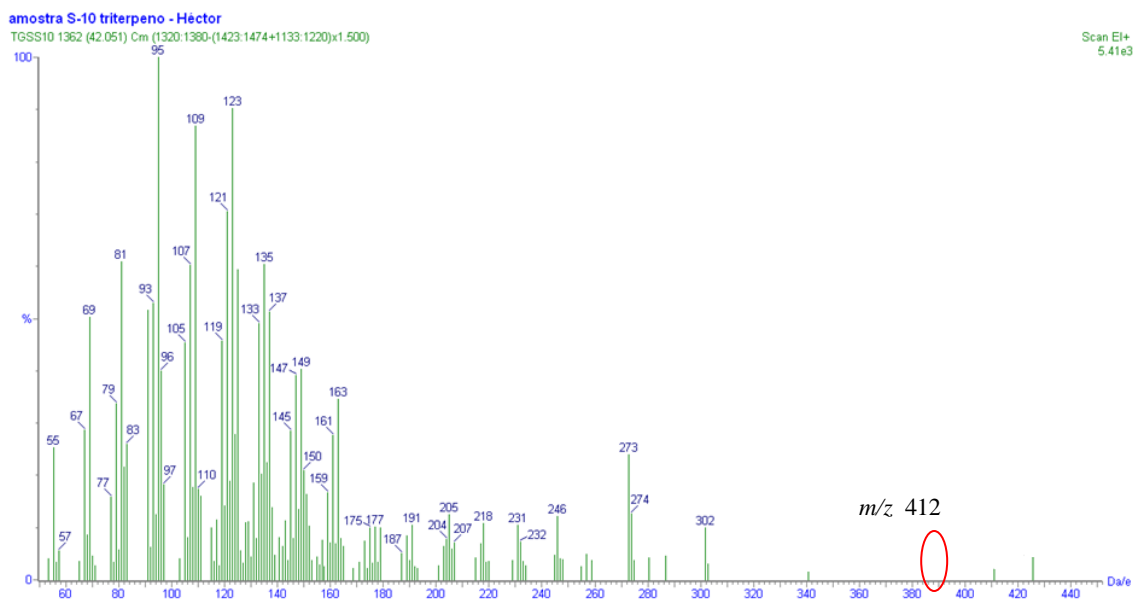


Figura 4.9.80. Espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 16.

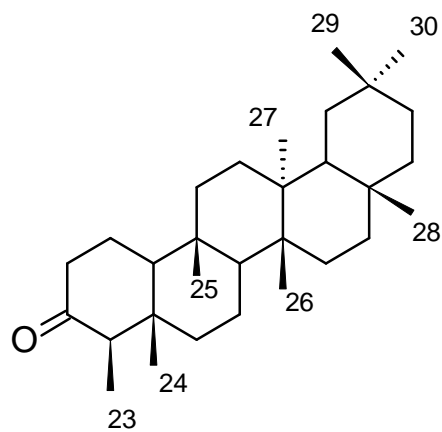


Figura 4.9.81. Estrutura da friedelina.

Amostra 17.

A amostra 17 foi isolada do extrato hexânico das raízes submersas de *M. flexuosa* na forma de cristais em forma de agulha (Item: 3.8.5), em seu espectro de RMN de ^1H são observados (Figura 4.9.82) com oito singletos referentes a metilas na região de δ 0,7 - 1,1, e multipletos na região de δ 1,3 a 2,5, ainda apresentou sinal em δ 5,56 (dd, $J = 3,1$ e $8,1$ Hz, 1H) olefínico e também dois sinais em δ 2,58 (ddd, $J = 7,1; 12,0; \text{ e } 15,8$ Hz) e δ 2,33 (ddd, $J = 3,4; 6,1; \text{ e } 15,8$ Hz). No espectro de massas por IE a 70 eV (Figura 4.9.83) é observado o íon molecular em m/z 424. A comparação dos dados obtidos por RMN de ^1H junta mente com dados de massas com dados da literatura (SARAIVA et al., 2006) levaram a identificação da amostra 17 como sendo o triterpeno pentacíclico taraxerona (Figura 4.9.84).

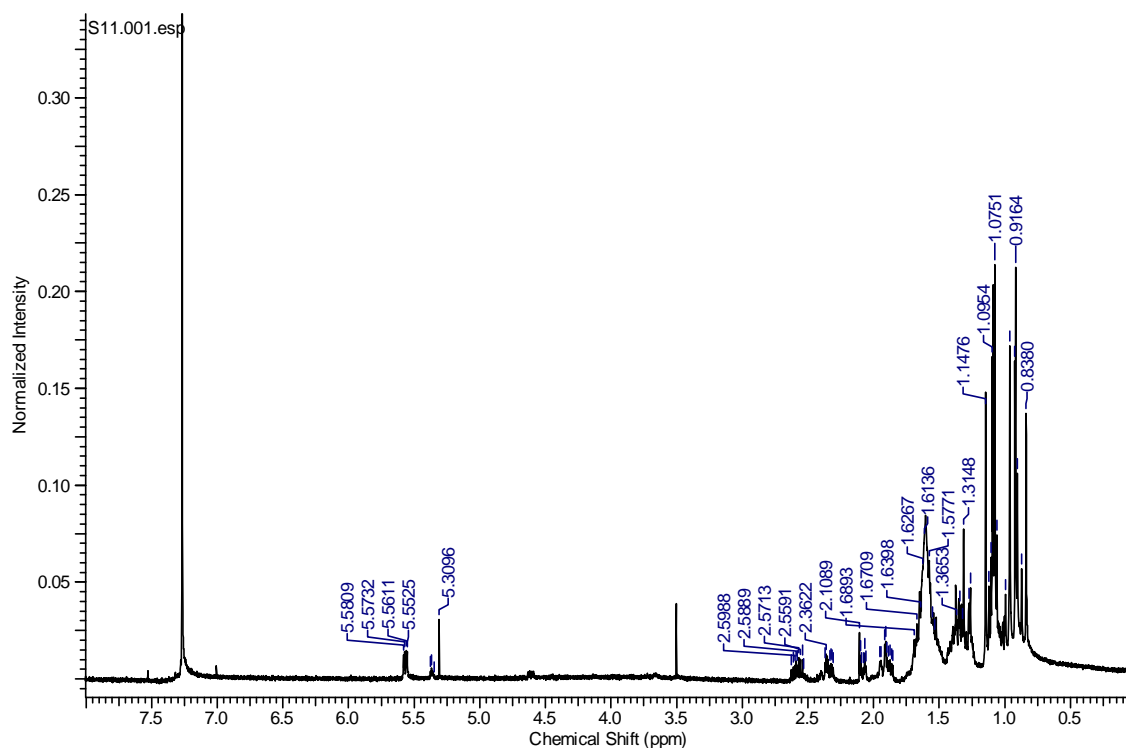


Figura 4.9.82. Espectro de RMN de ^1H da amostra 17 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

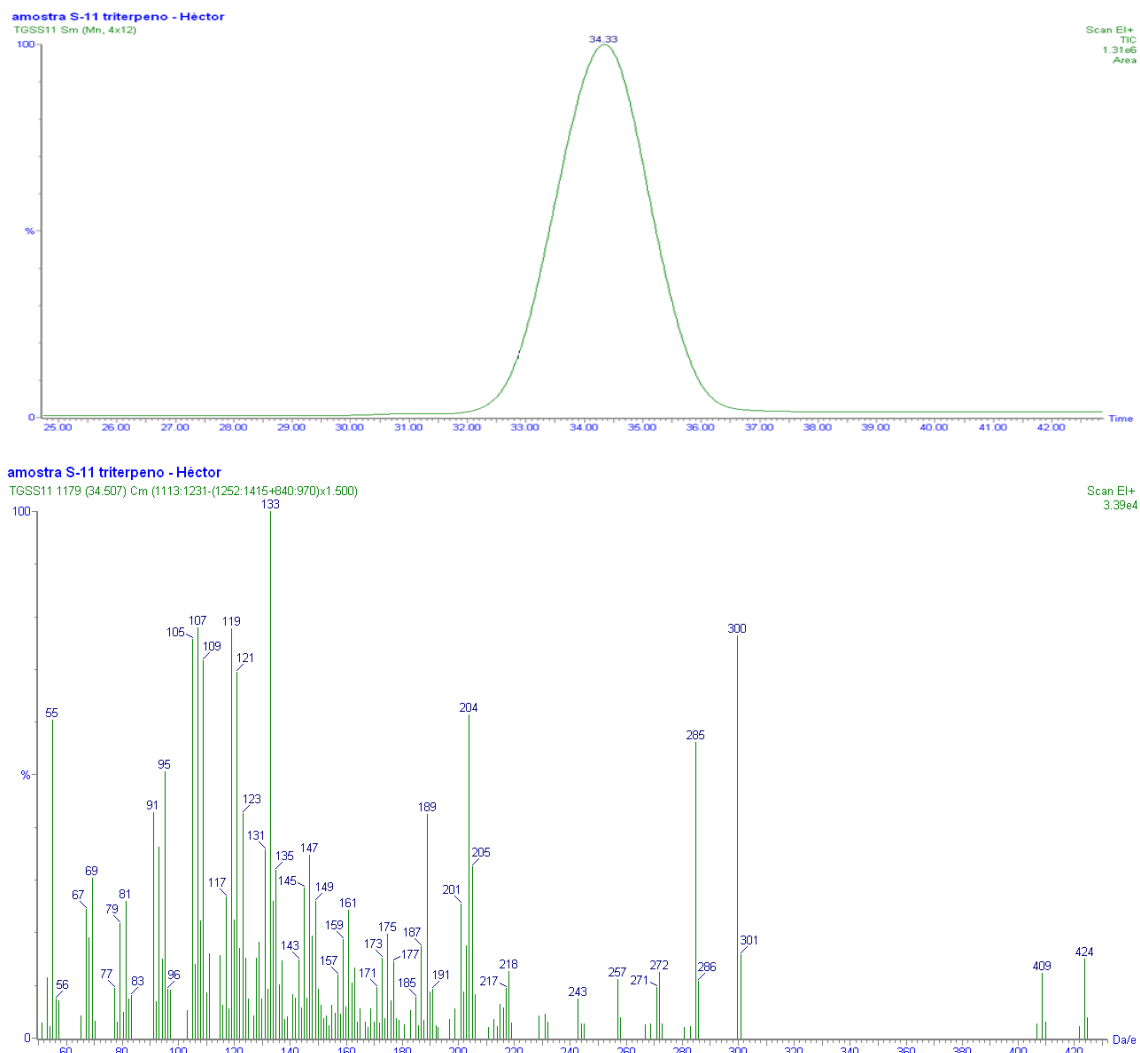


Figura 4.9.83. Cromatograma de íons totais e espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 17.

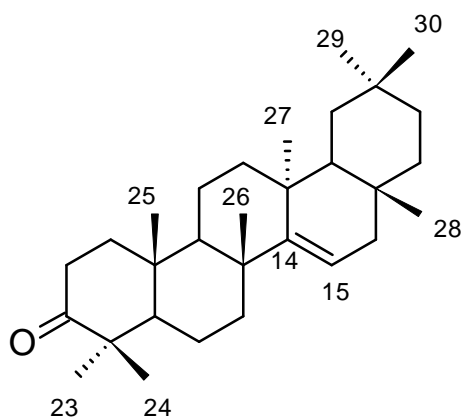


Figura 4.9.84. Estrutura da taraxerona.

Amostra 18.

A amostra 18 foi isolada do extrato hexânico das raízes submersas de *M. flexuosa* na forma de um sólido amorfo (Item: 3.8.5), em seu espectro de RMN de ^1H da (Figura 4.9.85) são observados hidrogênios metílicos metilênicos e metínicos na região de δ 0,68 a 2,28. Os sinais em δ 3,50 (m) e δ 5,35 (dl) foram atribuídos a hidrogênios carbinólicos e olefínicos respectivamente. A presença de diversos sinais sobrepostos na região mais blindada do espectro sugere a presença de uma mistura de dois ou mais substâncias. Nos espectros de massas por IE a 70 eV (Figuras 4.9.86 a 4.9.86) são observados três íons moleculares em m/z 400, 412 e 414. A comparação dos dados obtidos por RMN de ^1H junta mente com dados de massas com dados da literatura (SAKAKIBARA et al., 1983; SUGA & KONDO, 1974) levaram a identificação da amostra 18 como sendo uma mistura dos esteróides estigmasterol, campesterol e sitosterol (Figura 4.9.89).

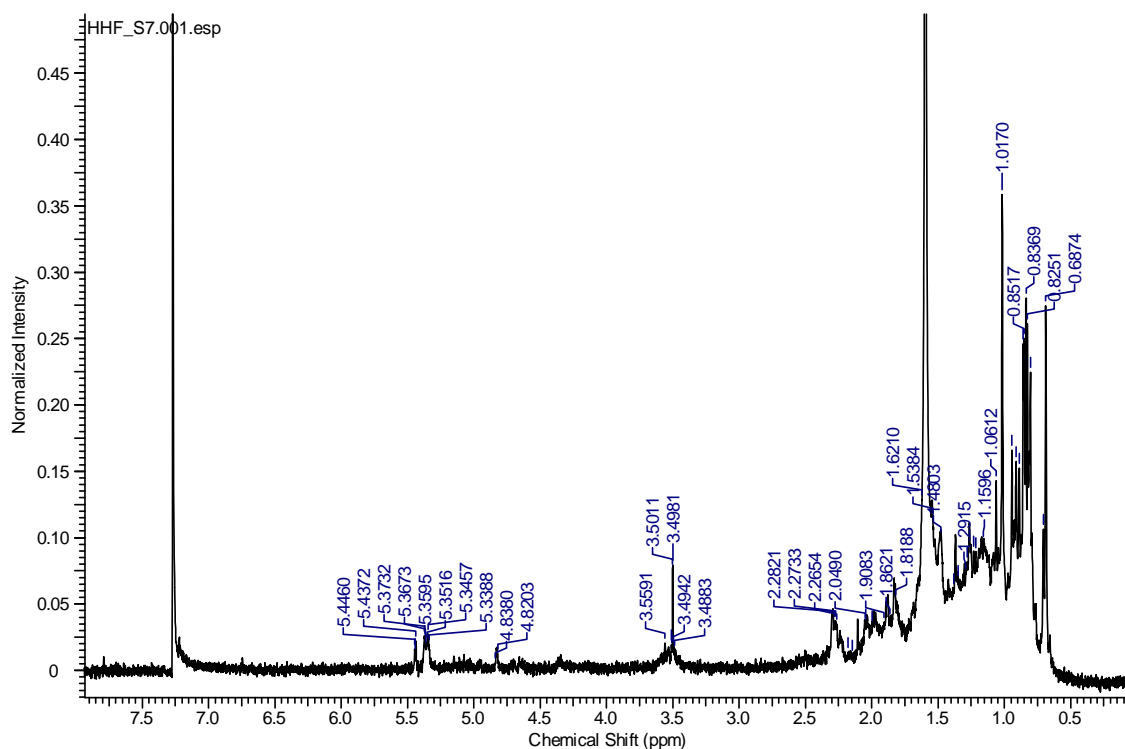


Figura 4.9.85. Espectro de RMN de ^1H da amostra 18 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

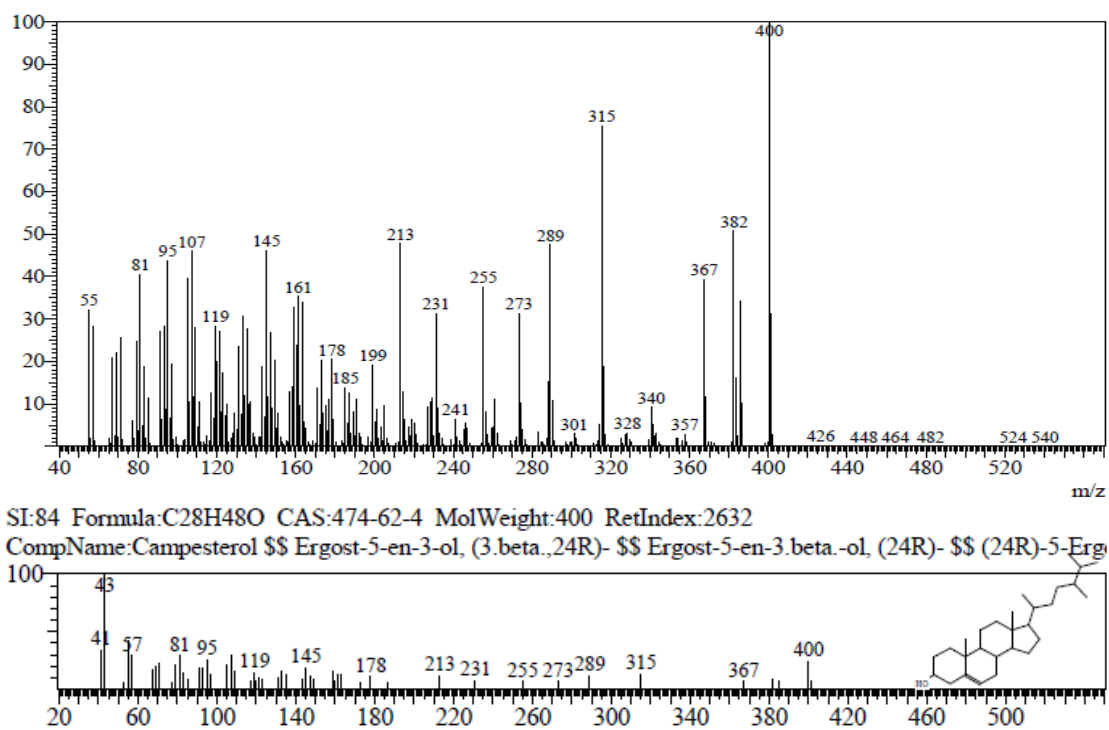


Figura 4.9.86. Espectro de massas do campesterol por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST275 para o íon em m/z 400.

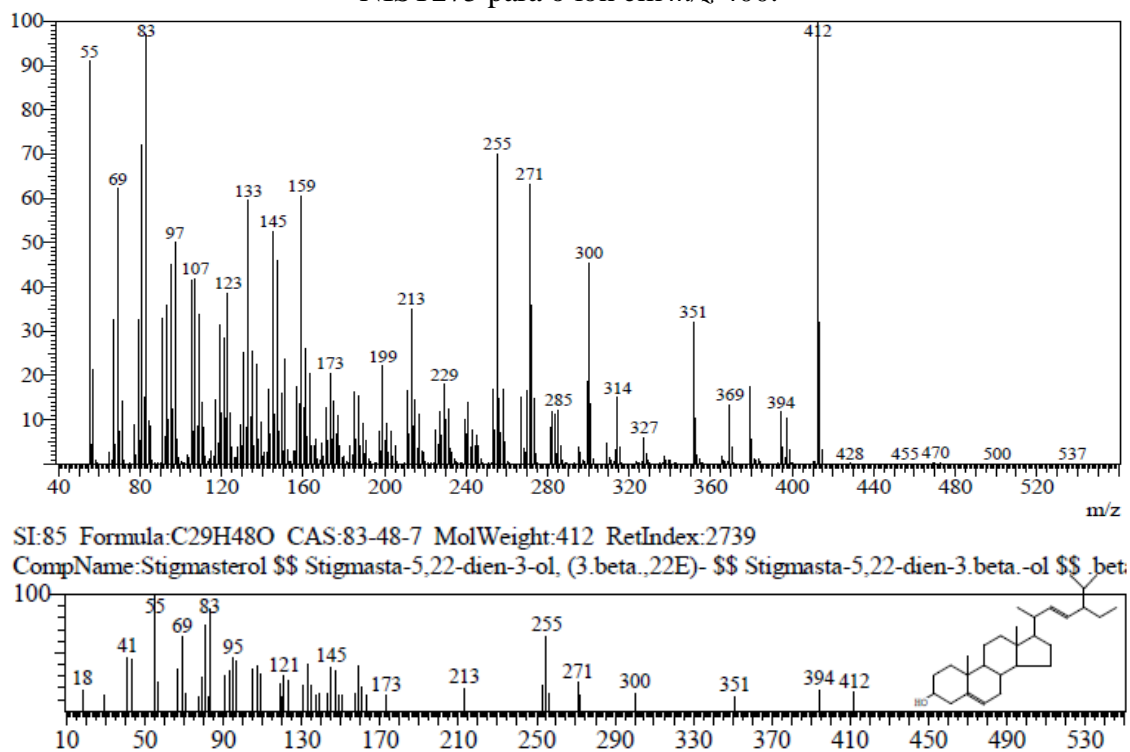


Figura 4.9.87. Espectro de massas do estigmasterol por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST275 para o íon em m/z 412.

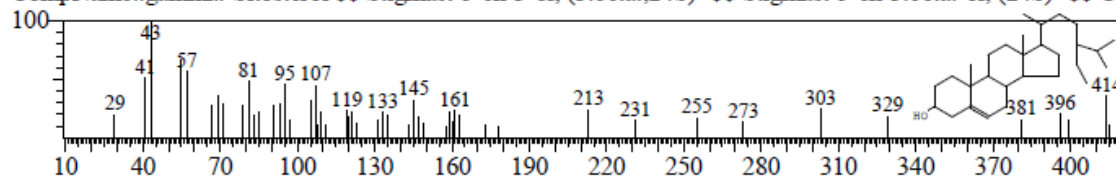
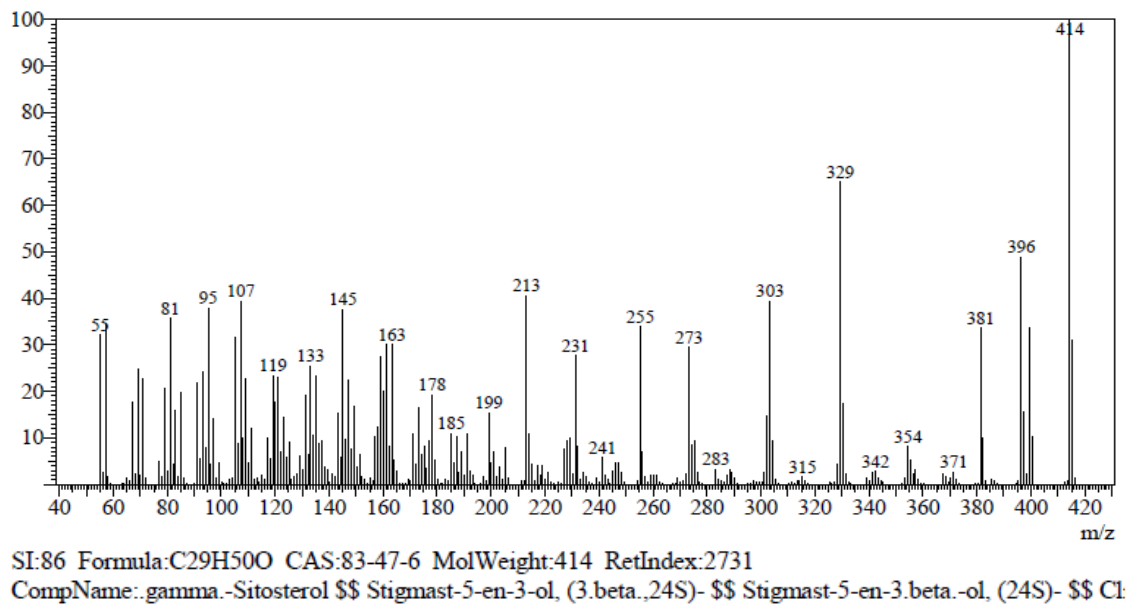


Figura 4.9.88. Espectro de massas do sitosterol por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST275 para o íon em m/z 414.

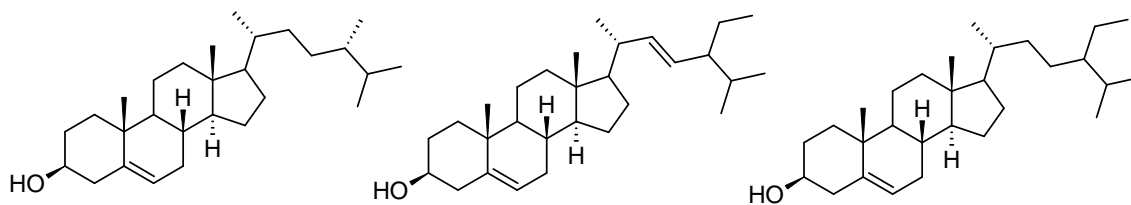


Figura 4.9.89. Estruturas dos esteróides campesterol, estigmasterol e sitosterol respectivamente.

Amostra 19.

A amostra 19 foi isolada do extrato hexânico das raízes submersas de *M. flexuosa* na forma de um sólido amorfo (Item: 3.8.5), em seu espectro de RMN de ^1H da (Figura 4.9.90) sinais metílicos na região de δ 0,7 - 1,1, alguns destes sinais estão sobrepostos o que sugere que a amostra não esteja com bom grau de pureza. É observado um singlete alto em δ 2,05 integrando para três hidrogênios, isto associado ao fato de que se trata de um esqueleto triterpênico, sugeriu que este singlete seria de um grupo acetil, isto apoiado na ausência de sinal carbinólico típico de triterpenos. A presença dos multipletos em δ 4,69 e δ 4,57 indica a presença de hidrogênios pertencentes a uma dupla exocíclica. No espectro de massas por IE a 70 eV (Figura 4.9.91) é observado íon molecular em m/z 468. A comparação dos dados obtidos por RMN de ^1H e massas com dados da literatura (SILVA et al., 1998) levou a identificação da amostra 19 como sendo o triterpeno pentacíclico acetato de lupeol (Figura 4.9.92).

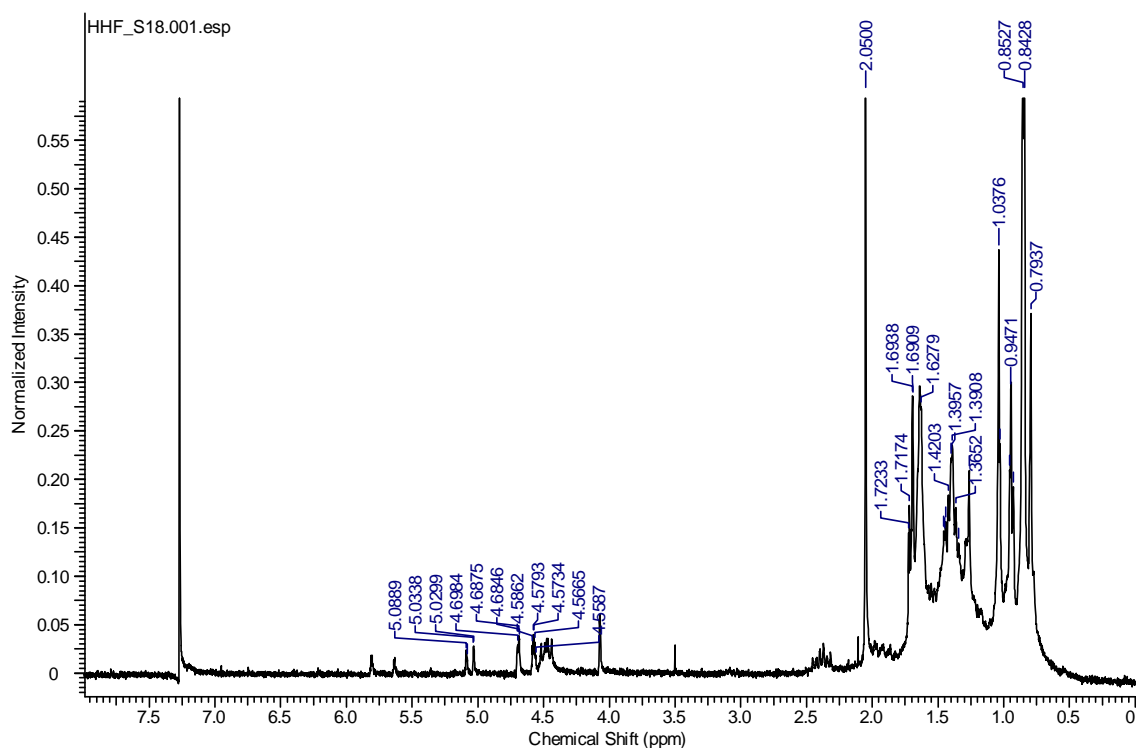


Figura 4.9.90. Espectro de RMN de ^1H da amostra 19 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

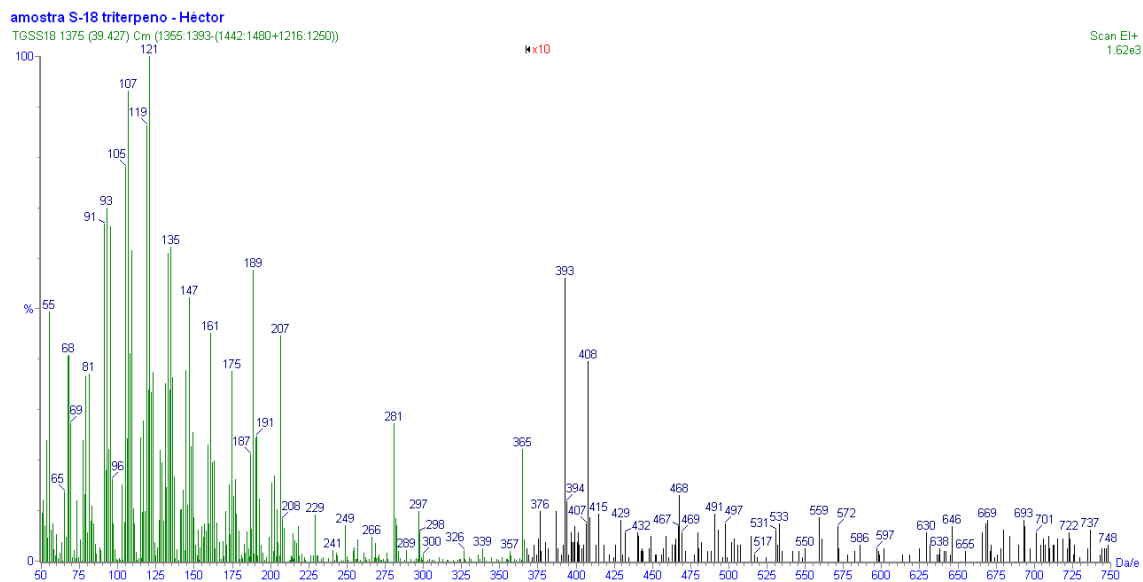


Figura 4.9.91. Espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 19.

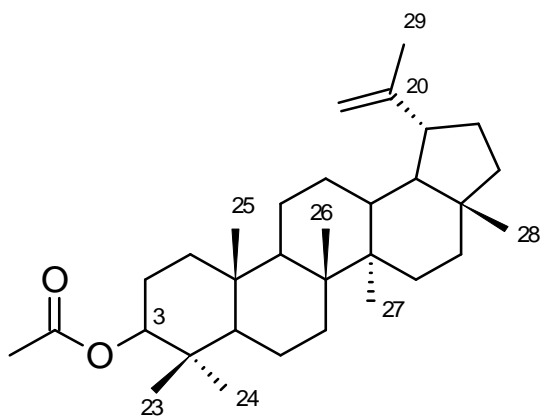


Figura 4.9.92. Estrutura do acetato de lupeol.

Amostra 20.

A amostra 20 foi isolada do extrato hexânico das raízes submersas de *M. flexuosa* na forma de um sólido amorfo (Item: 3.8.5), em seu espectro de RMN de ^1H da (Figura 4.9.93) são observados diversos sinais sobrepostos e indícios que sugerem que a amostra 20 não se encontra totalmente pura, alguns de seus sinais são bem característicos e já observados na amostra 19. No espectro de massas por IE a 70 eV (Figura 4.9.94) apresentou o íon molecular em m/z 424. A comparação destes dados com a literatura (SILVA et al., 2000) conduziu a identificação da amostra 20 como sendo contida principalmente do triterpeno pentacíclico lupenona e em menor proporção o lupeol.

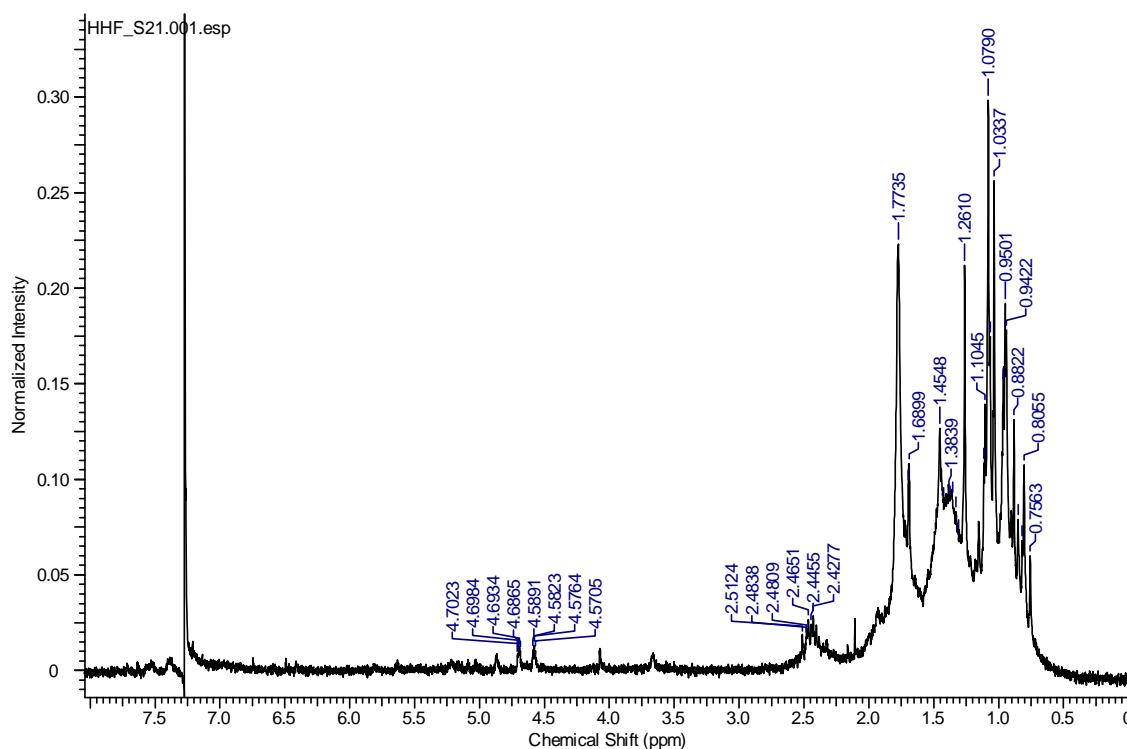


Figura 4.9.93. Espectro de RMN de ^1H da amostra 20 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

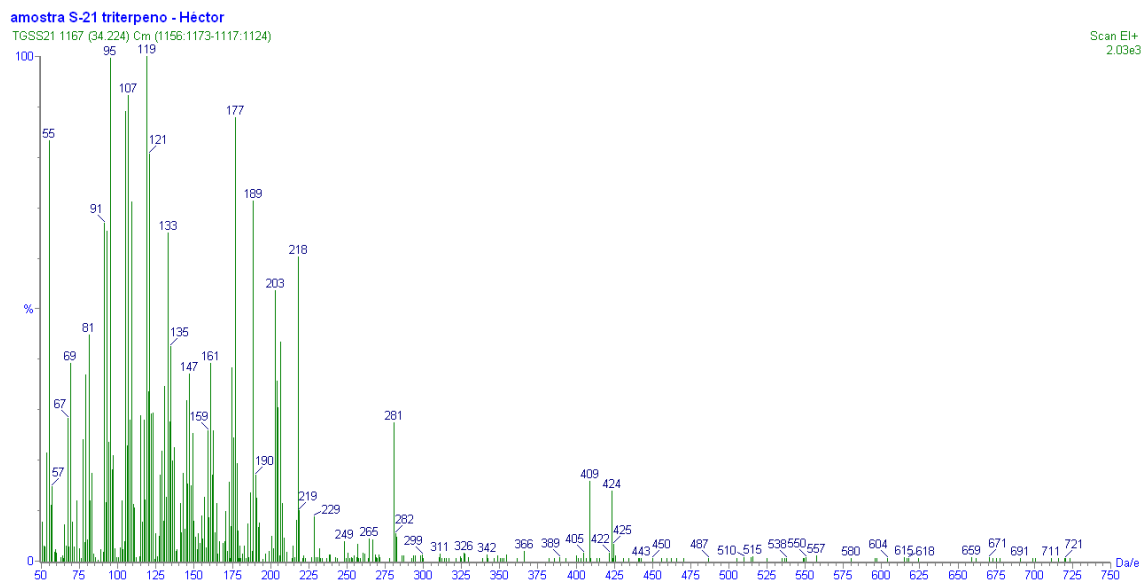


Figura 4.9.94. Espectro de massas por IE a 70 eV da amostra 20.

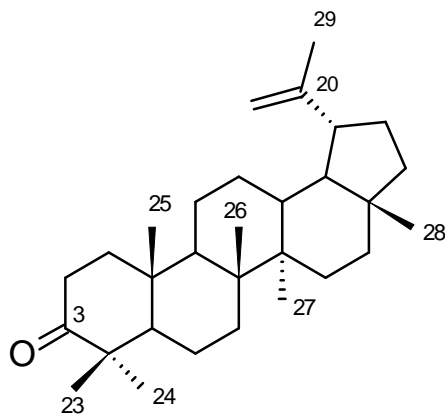


Figura 4.9.95. Estruturas da lupenona.

Amostra 21.

A amostra 21 foi isolada do extrato hexânico das raízes submersas de *M. flexuosa* na forma de cristais em forma de agulha (Item: 3.8.5), em seu espectro de RMN de ^1H são observados (Figura 4.9.96) os sinais em δ 4,68 e δ 4,57 característicos de dupla exocíclica bem como os sinais em δ 3,23 e δ 3,89 característicos de hidrogênios carbinólicos, bem como um padrão no restante dos sinais bem semelhante aos observados para as amostras 19 e 20. A análise por GC-MS (Figura 4.9.97) da amostra 21 aponta no espectro de massas o íon molecular em m/z 442. A comparação dos dados obtidos por RMN de ^1H e de massas com dados da literatura (FULGENTIUS et al., 1990) levaram a identificação da amostra 21 como sendo majoritário o triterpeno pentacíclico betulina e em menor quantidade o lupeol (Figura 4.9.97).

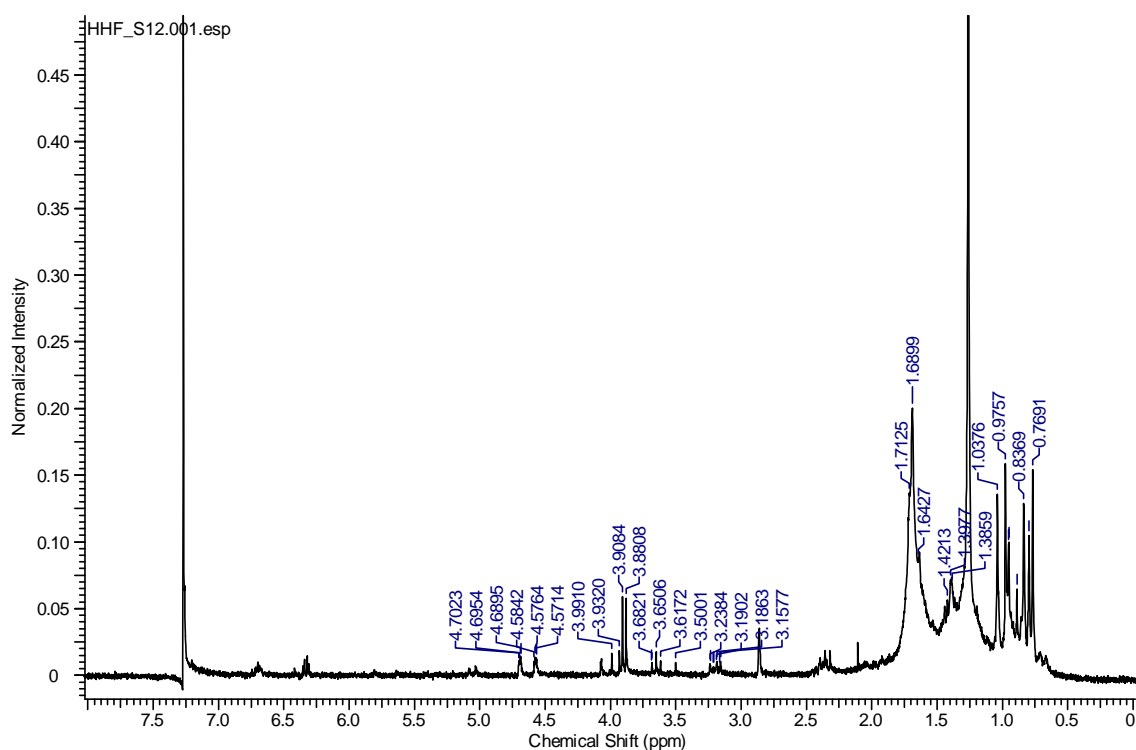
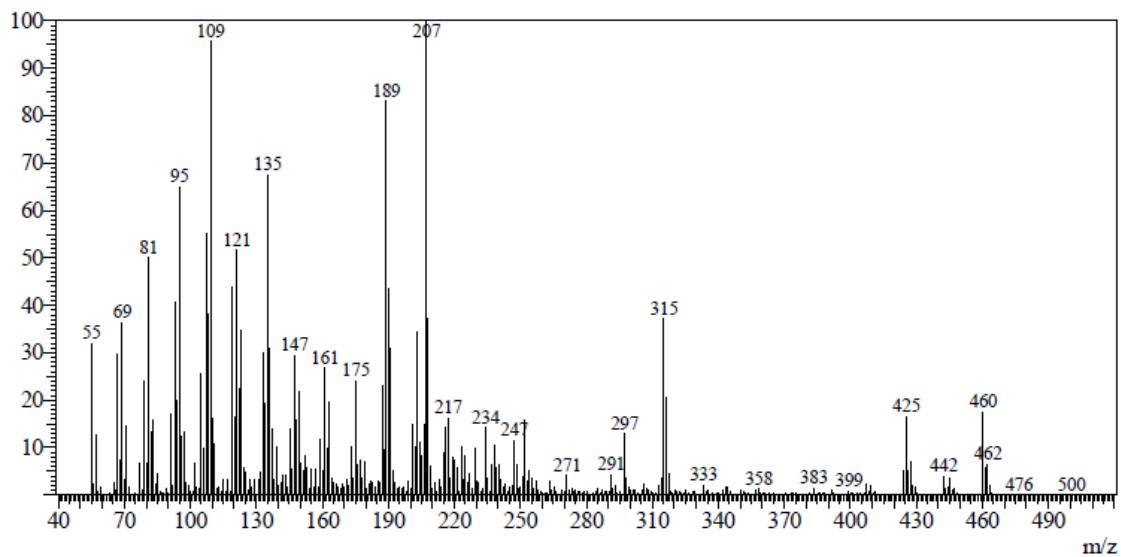


Figura 4.9.96. Espectro de RMN de ^1H da amostra 21 em clorofórmio-*d* (400 MHz).



SI:80 Formula:C30H50O2 CAS:473-98-3 MolWeight:442 RetIndex:3090
 CompName:Betulin \$\$ Lup-20(29)-ene-3,28-diol, (3.beta.)- \$\$ Lup-20(29)-ene-3.beta.,28-diol \$\$ Betuline \$\$

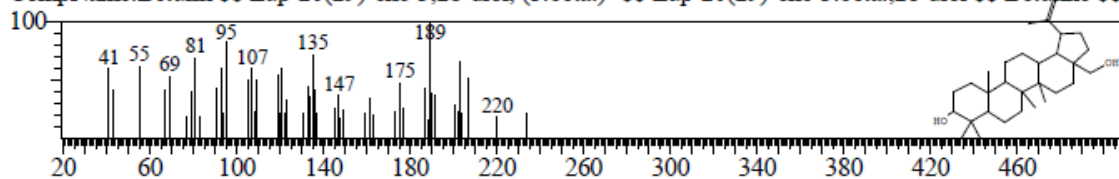


Figura 4.9.97. Espectro de massas da betulina por IE a 70 eV e sugestão da biblioteca NIST275 para o íon em m/z 442.

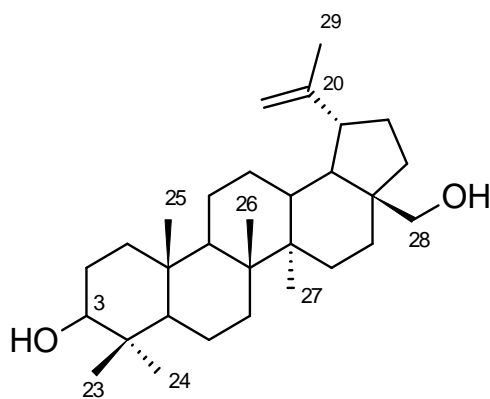


Figura 4.9.98. Estrutura da betulina.

Amostra 22.

A amostra 22 foi isolada do extrato hexânico das raízes de *M. flexuosa* na forma de cristais em forma de agulhas de cor branca, em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.99) são observados sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e carbinólicos. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.9.100) apresenta 30 sinais de carbonos, as características de ambos espectros indicam tratar-se de um triterpeno.

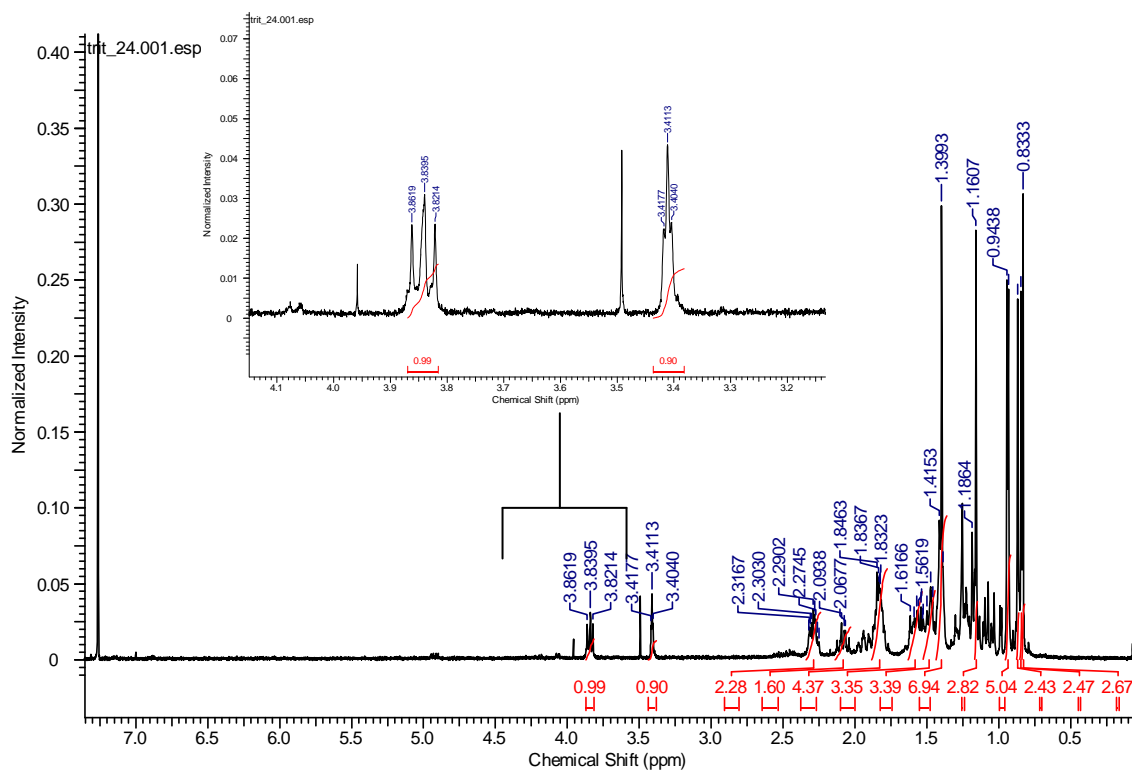


Figura 4.9.99. Espectro de RMN de ^1H da substância 22 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C são observados sinais de carbonos carbonílicos, carbinólicos, metínicos, metilênicos e metílicos. No espectro de DEPT 135° (Figura 4.9.101) é observado um sinal sobreposto em δ 76,6 referente a um carbono carbinólico que estava sobreposto pelo sinal do solvente. Uma análise mais profunda do espectro de RMN de ^{13}C aponta que os sinais em δ 50,4 e δ 28,4 apresentam sobreposição de sinais devida a suas alturas relativas serem bem superiores aos demais sinais além de análise no experimento de DEPT 135° que indicou que o sinal em δ 50,4 é de um carbono CH e de outro quaternário e que o sinal em δ 28,4 era de dois carbonos metílicos. Na Figura 4.9.102 é apresentado o mapa de correlação de HSQC que mostra em quais carbonos estão ligados os sinais observados no espectro de RMN de ^1H .

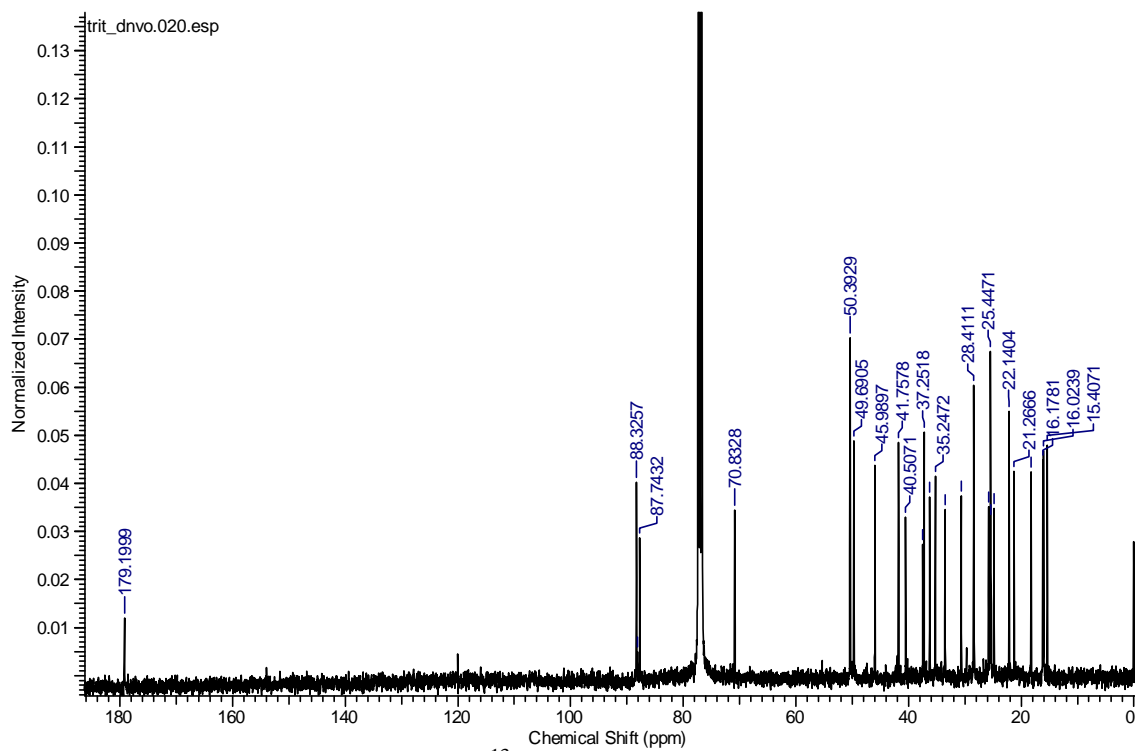


Figura 4.9.100. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 22 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

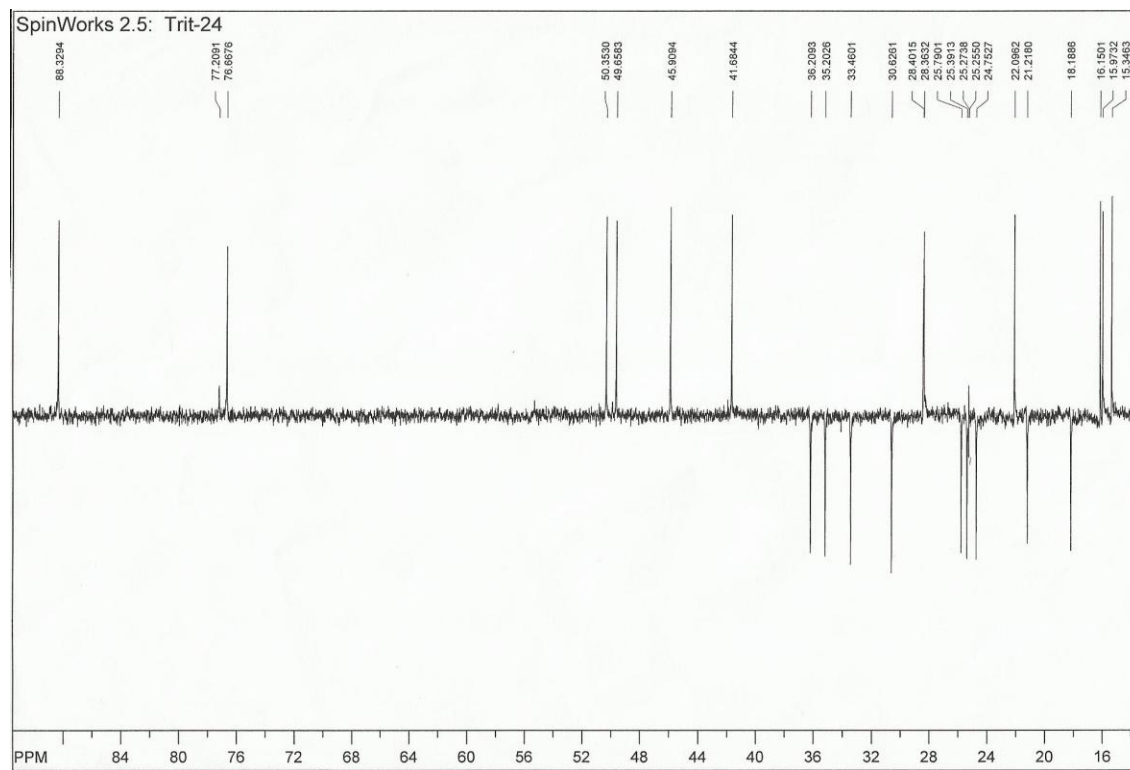


Figura 4.9.101. Espectro de DEPT 135° da substância 22 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

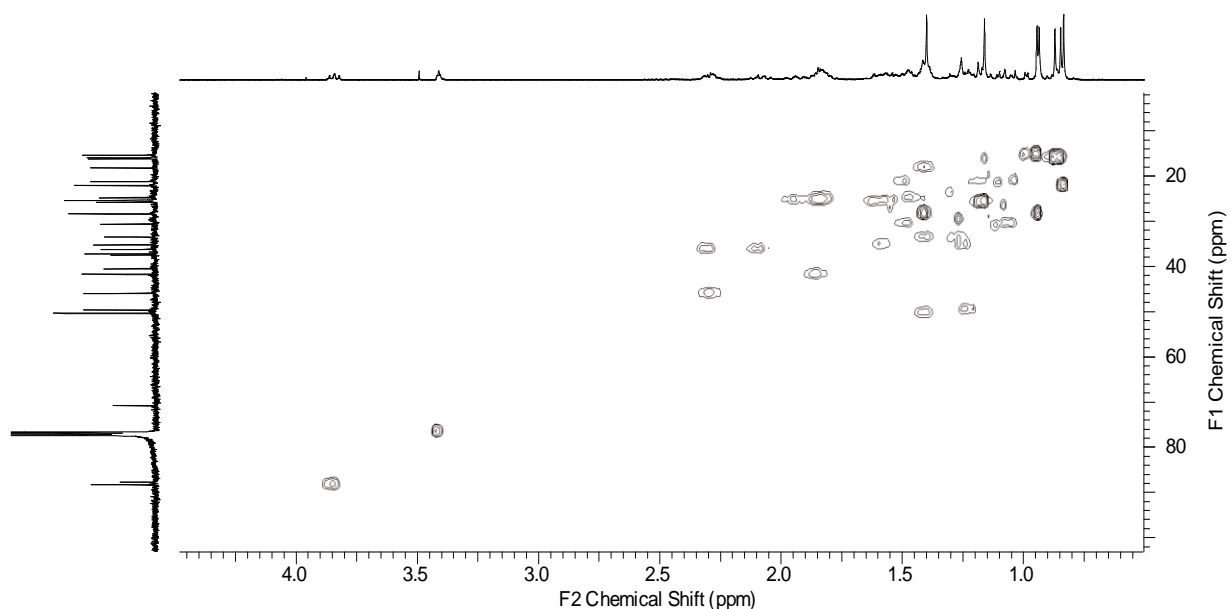


Figura 4.9.102. Mapa de correlação de HSQC da substância 22 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

O sinal de hidrogênio carbinólico em δ 3,40 (t, $J = 2,8$ Hz) inicialmente chamou a atenção por sua constante de acoplamento, que sugeriu que o grupo OH ligado ao C-3 estaria em posição α , diferente do habitual observado na biossíntese de triterpenos, comparando-se os dados de deslocamentos químicos do carbono C-3 e carbonos adjacentes C-1 e C-5 da substância 24 com dados da literatura (SOUZA, 1998) do lupeol e *epi*-lupeol, levou a confirmação de que a hidroxila em C-3 estaria em posição α (Figura 4.9.103).

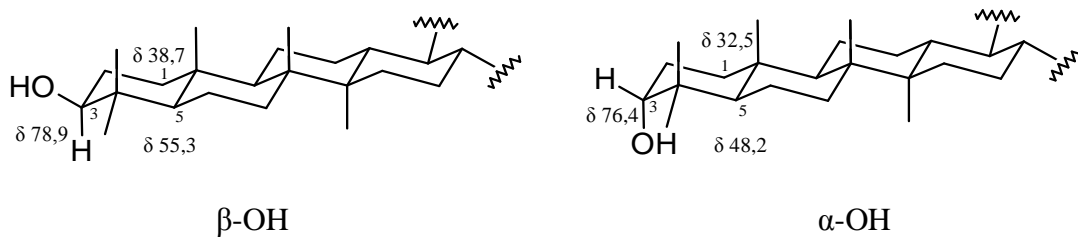


Figura 4.9.103. Estruturas do anel A e principais mudanças nos deslocamentos devido a posição do grupo hidroxila (equatorial em β e axial em α).

Ainda no experimento de HMBC são observadas algumas correlações das metilas nas posições C-23, C-24 com o carbono em δ 76,6 (C-3) por meio desta correlação e pelos valores de deslocamentos químicos é confirmada a orientação em β para a metila em C-23 e em α para a metila em C-24, bem como as metilas nas posições C-25, C-26 e C-27 e seus carbonos vizinhos

que confirmam a natureza de esqueleto triterpênico do tipo lupânico para os anéis A, B e C da substância 22 (Figuras 4.9.104 e 4.9.105).

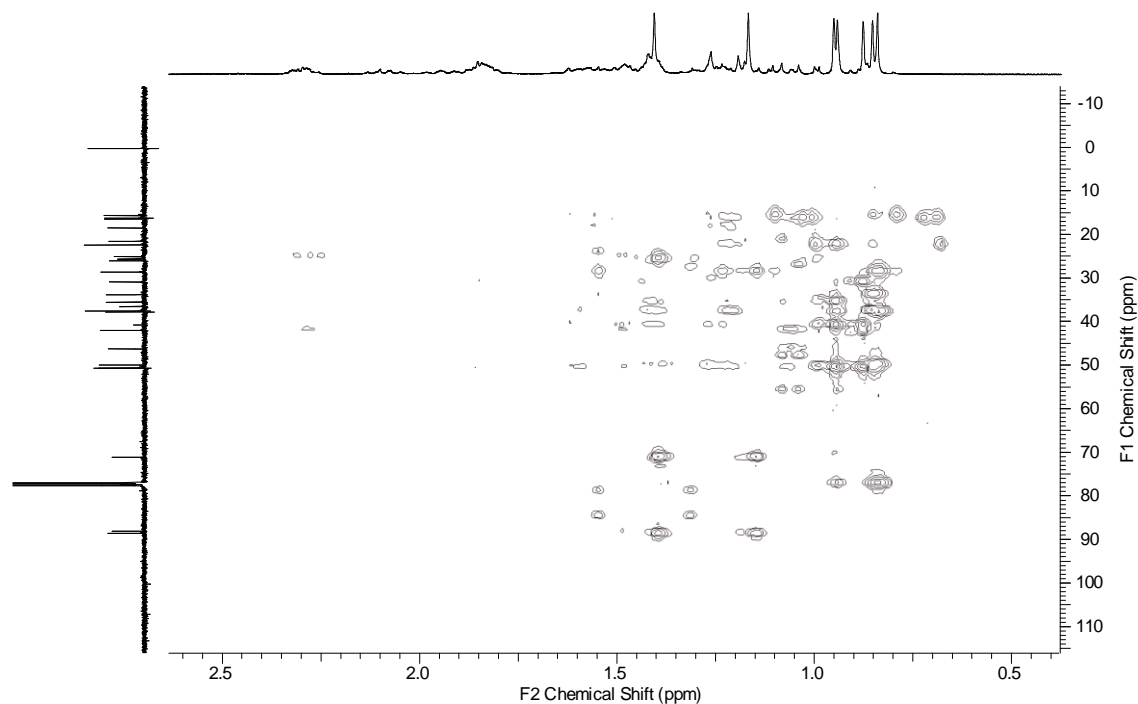


Figura 4.9.104. Ampliação do mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HMBC da substância 22 em clorofórmio-*d* (400 MHz).

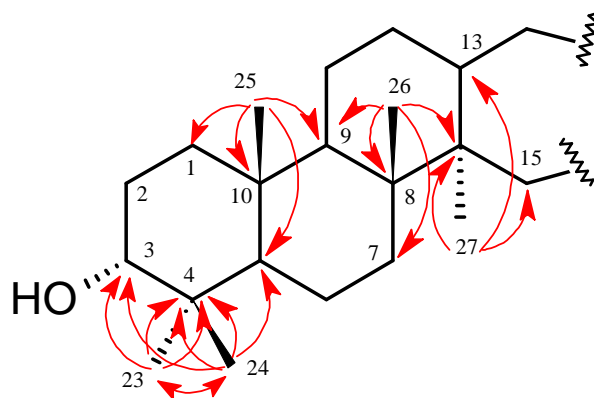


Figura 4.9.105. Correlações observadas para as metilas 23,24,25,26 e 27 no mapa de HMBC.

A presença de um sistema hexacíclico na substância 22 é observada pela presença do carbono oxigenado em δ 87,7 o qual não aparece no experimento de DEPT 135° por ser

quaternário e o sinal em δ 179,1 referente a um carbono carbonílico, estes dados juntamente com o sinal em δ 70,8 de um carbono carbinólico, o qual também não é observado no espectro de DEPT 135° indicaram que a substância 22 é baseada em um sistema hexacíclico do tipo lup-20-ol (CHATURVEDULA et al., 2003; DJERASSI & HODGES, 1956). Estes dados são confirmados pelos acoplamentos observados no experimento de HMBC (Figura 4.9.106), aonde os sinais de hidrogênios metílicos em δ 1,40 (C-29) e δ 1,16 (C-30) correlacionaram com o carbono em δ 70,8 (C-20) juntamente com as correlações destas mesmas metilas com o carbono carbinólico em δ 88,2 (C-21) confirma a estrutura parcial. As mudanças nos deslocamentos químicos dos carbonos das posições C-20 ($\Delta\delta = -80,4$), C-29 ($\Delta\delta = -81,2$), C-30 ($\Delta\delta = +6$) e C-19 ($\Delta\delta = +39,5$) em comparação com dados de RMN de ^{13}C do ácido betulínico (MAHATO & KUNDU, 1994), reforçam os dados observados no HMBC.

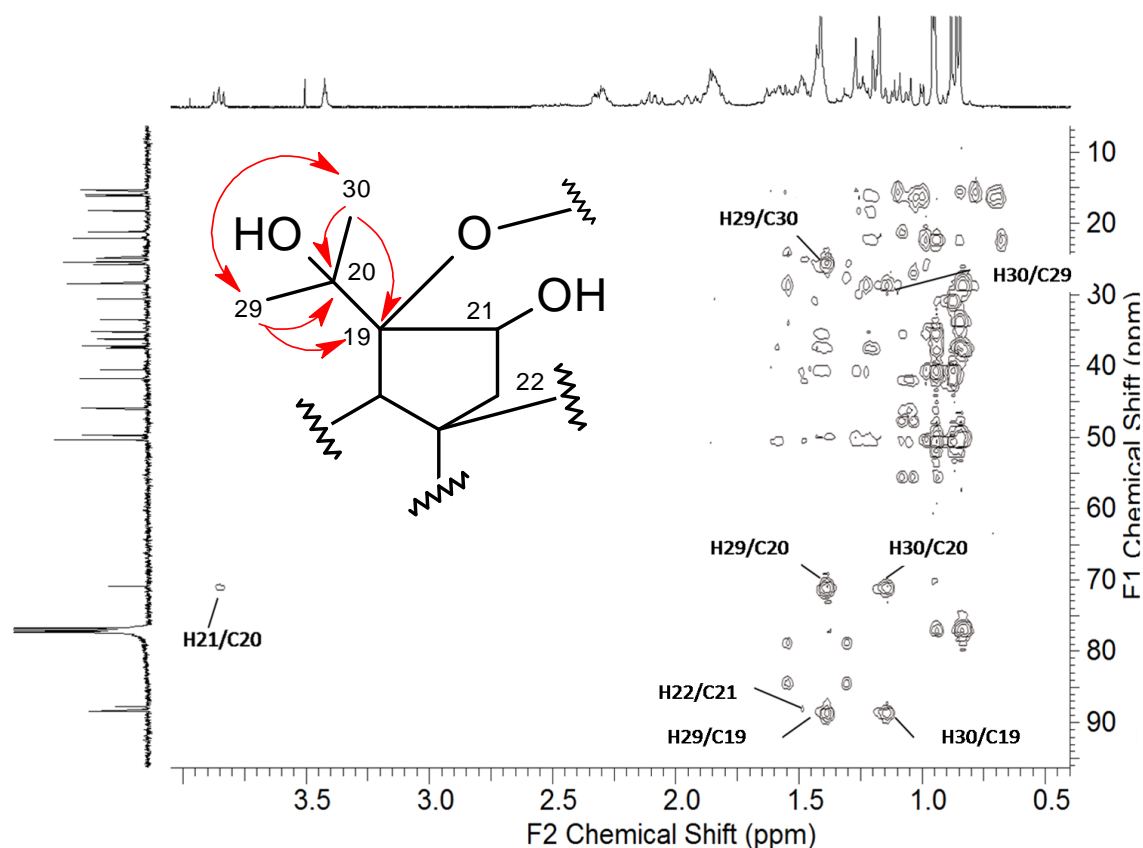


Figura 4.9.106. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HMBC da substância 22 em clorofórmio-*d* e principais correlações assinaladas para o anel E do esqueleto lupânico (400 MHz).

Após todas essas assinalações dos dados de RMN ainda ficam pendentes as correlações para o carbono carbonílico em δ 179,1, que não foram possíveis de serem visualizadas nos mapas

de HMBC, o que fez com que a molécula não pudesse ser totalmente determinada, pelo valor de descolamento deste carbono em questão e por não serem observados sinais de ácidos carboxílicos, aldeídos e nem de metilas características de ésteres foi inicialmente atribuída ao esqueleto lupânico um sexto anel lactona entre o oxigênio em C-19 e a carbonila em C-28 (DJERASSI et al., 1955; Figura 4.9.107).

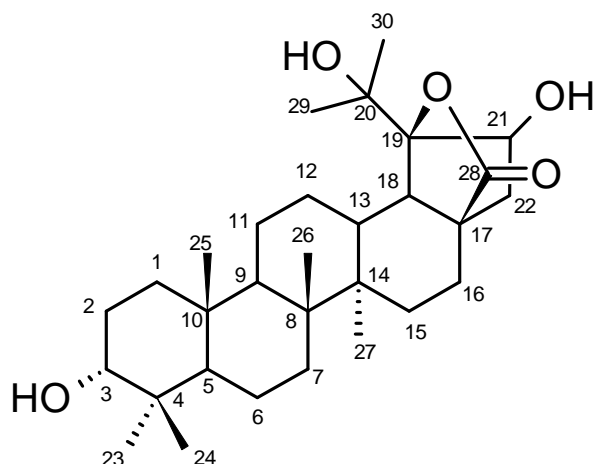
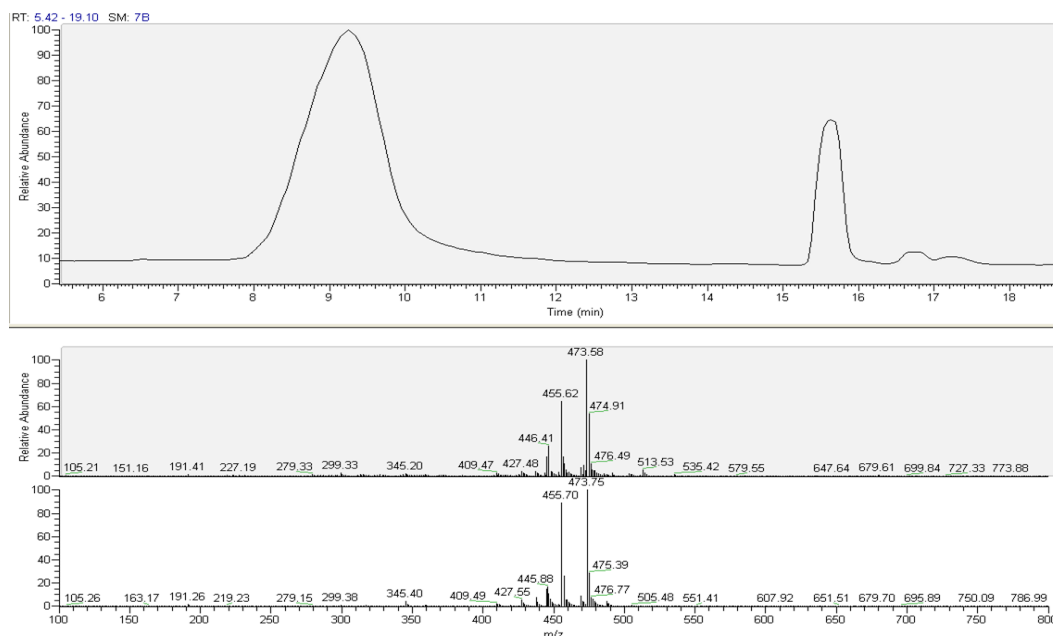


Figura 4.9.107. Estrutura inicialmente proposta para a amostra 22.

Os dados de RMN para esta proposta estrutural são coerentes, porém os dados de massas obtidos para a amostra 22 não correspondem à molécula proposta. No experimento de LC/APCI-MS (Figura 4.9.108) é observado que a amostra apenas em seu espectro de RMN aparentava estar pura, e que os dois constituintes da amostra 22 são na verdade isômeros. O íon em m/z 473 não era a massa *quasi*-molecular da molécula proposta de modo que se sugeriu estar ocorrendo uma desidratação na fonte.



Figura

4.9.108. Cromatograma de íon totais e espectro de massas das bandas nos tempos de retenção em RT 9,3 e RT 15,8 minutos, corrida em modo gradiente (30 – 100% de MeOH em 20 minutos, fluxo de 0,7 mL/min, coluna Luna C18).

Novos experimentos de massas foram conduzidos tanto por ESI como por APCI nos modos positivo e negativo a fim de se observar os verdadeiros íons *quasi*-moleculares (Figura 4.9.109 e 4.9.110).

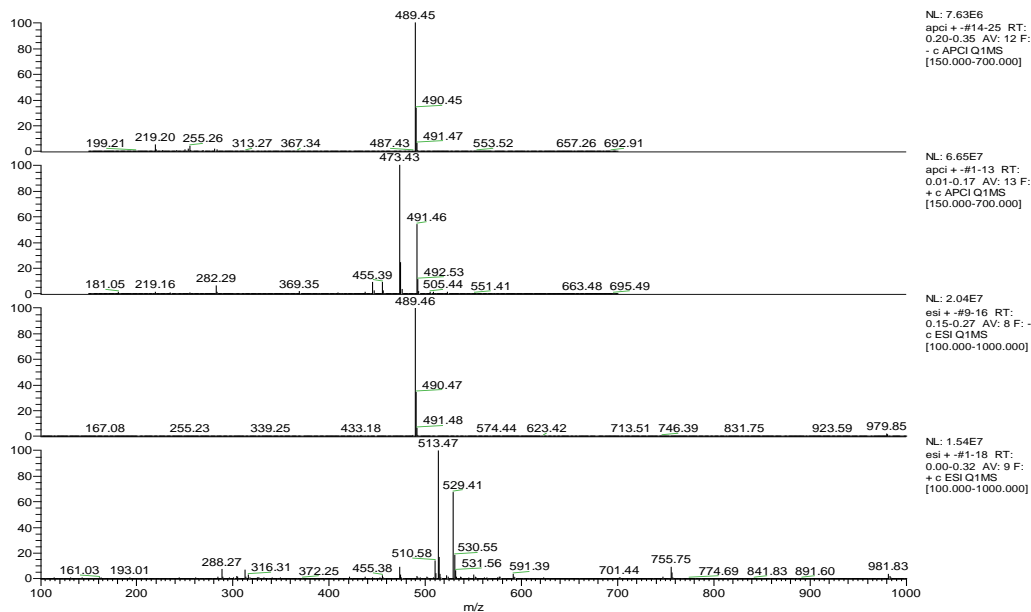


Figura 4.9.109. Espectros de massas em APCI⁻, APCI⁺, ESI⁻ e ESI⁺ respectivamente da amostra 22.

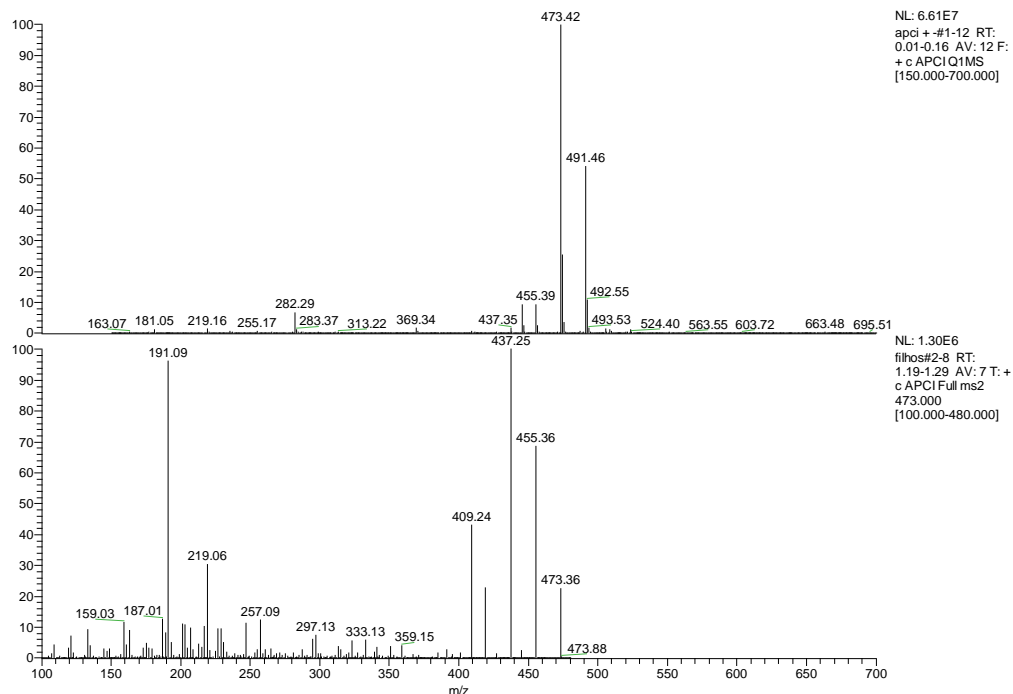


Figura 4.9.110. Espectros de massas em APCI⁺ e íons produtos de m/z 473.

Por meio destes novos experimentos observou-se que em modo APCI⁺ havia uma desidratação na fonte, diminuído-se os parâmetros de temperatura do capilar e temperatura de dessolvatação do spray, foi possível observar o íon m/z 491 referente ao íon *quasi*-molecular, este confirmado pela presença de m/z 289 em APCI⁻ e ESI⁻ e pelos adutos de sódio e potássio m/z 513 e m/z 529 respectivamente. Estes dados vão contra a estrutura proposta inicialmente, a massa deduzida pelos espectros seria de 490 daltons o que por parte dos dados de RMN seria plausível com as estruturas das substâncias da Figura 4.9.111.

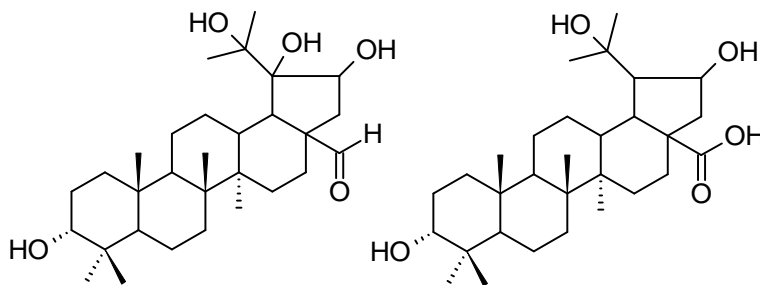


Figura 4.9.111. Estruturas que estariam coerentes com os dados observados por massas.

Estas estruturas pelos dados observados de RMN não são possíveis uma vez que os espectros foram obtidos em clorofórmio deuterado e que não foram observados sinais de ácidos e aldeídos. A necessidade de novos experimentos de degradação química (hidrólises) bem como de difração de raios-X e cálculos teóricos de ORTEP que já estão em análise. A interpretação dos espectros de RMN (Tabela 4.9.11) juntamente com a comparação de dados da literatura (CHEN et al., 2008) levou a se propor uma estrutura provisória para o componente majoritário da amostra 22, o 3-*epi* – 20,21 – diidroxithurberogenina (Figura 4.9.107), uma lactona triterpênica inédita, devido a presença das hidroxilas em C-20 e C-21. Este tipo de triterpeno lupânico não é comum tendo sido isolado anteriormente apenas de espécies de Celastraceae e Cactaceae (KOYAMA et al., 1993; DJERASSI et al., 1955).

Tabela 4.9.11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (125 MHz) e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ por HMBC da substância 22.

| Posição | ^1H | $^{13}\text{C}/\text{HSQC}$ | HMBC |
|---------|------------------------|-----------------------------|------|
| 1 | 1,41 (m) | 33,46 | - |
| 2 | 1,82 (m) e 1,93 (m) | 25,39 | - |
| 3 | 3,40 (t, $J = 2,8$ Hz) | 76,8 | - |
| 4 | - | 37,5 | - |
| 5 | 1,39 (m) | 45,9 | - |
| 6 | 1,41 (m) | 18,18 | - |
| 7 | 1,58 (m) | 35,2 | - |
| 8 | - | 40,5 | - |
| 9 | 2,29 (m) | 50,4 | - |
| 10 | - | 37,3 | - |
| 11 | 1,03 (m) e 1,49 (m) | 21,21 | - |
| 12 | 1,17 (m) e 1,58 (m) | 25,79 | - |
| 13 | 1,85 (m) | 41,68 | - |
| 14 | - | n.d. | - |
| 15 | 1,07 (m) e 1,48 (m) | 30,62 | - |
| 16 | 1,47 (m) | 24,75 | - |
| 17 | - | 50,4 | - |

| | | | |
|----|------------------------|-------|--------------------|
| 18 | 1,22 (m) | 49,65 | - |
| 19 | - | 87,7 | - |
| 20 | - | 70,8 | - |
| 21 | 3,83 (t, $J = 8,9$ Hz) | 88,2 | C20 |
| 22 | 2,08 (m) e 2,30 (m) | 36,2 | C18, C21, C28, C29 |
| 23 | 0,93 (s) | 28,4 | C3, C4, C24 |
| 24 | 0,83 (s) | 22,09 | C3, C4, C23, C10 |
| 25 | 0,84 (s) | 15,8 | C1, C10, C5, C9 |
| 26 | 0,94 (s) | 15,3 | C9, C8, C14, C7 |
| 27 | 0,87 (s) | 16,1 | C15, C13, C14 |
| 28 | - | 179,1 | - |
| 29 | 1,40 (s) | 28,36 | C20, C19, C30 |
| 30 | 1,16 (s) | 25,25 | C20, C19, C29 |

Substância 23.

A substância 23 foi isolada da fração hidroalcoólica do extrato metanólico das raízes de *M. flexuosa* na forma de um sólido amorfo amarelo. O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.112) da substância 23 aparentemente apresentou características de um esqueleto flavonoídico, um dubleto na região de aromáticos em δ 7,67 ($J = 2,1$ Hz) que juntamente com outros dois sinais, um duplo dubleto em δ 7,64 ($J_1 = 2,1$ Hz e $J_2 = 8,5$ Hz) e um dubleto em δ 6,85 ($J = 8,5$ Hz) constituindo um sistema de spins ABC, um outro sistema de spins AB é observado para os demais sinais da região de aromáticos em δ 6,38 (d, $J = 2,1$ Hz) e δ 6,19 (d, $J = 2,1$ Hz) referentes a outro anel aromático. Os sinais múltiplos na região entre δ 3,20-3,81 são compatíveis com a presença de hidrogênios de açúcares. Os dois dubletos em δ 5,09 ($J = 7,6$ Hz) e em δ 1,12 ($J = 6,2$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios anomérico de glicose (H-1'') e metílicos (H-6''') de ramnose, respectivamente, por fim o sinal em δ 4,52 (d, $J = 1,36$ Hz) referente a hidrogênio anomérico de ramnose (H-1''') (Figura 4.9.113).

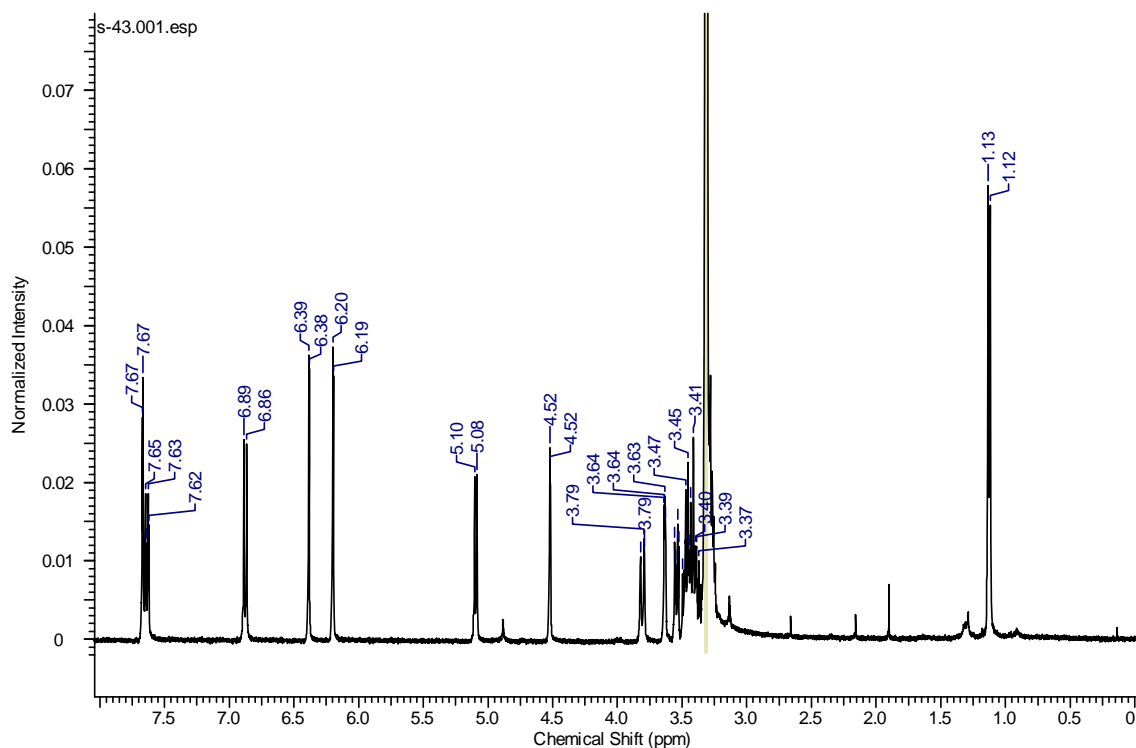


Figura 4.9.112. Espectro de RMN de ^1H da substância 23 em metanol- d_4 (400 MHz).

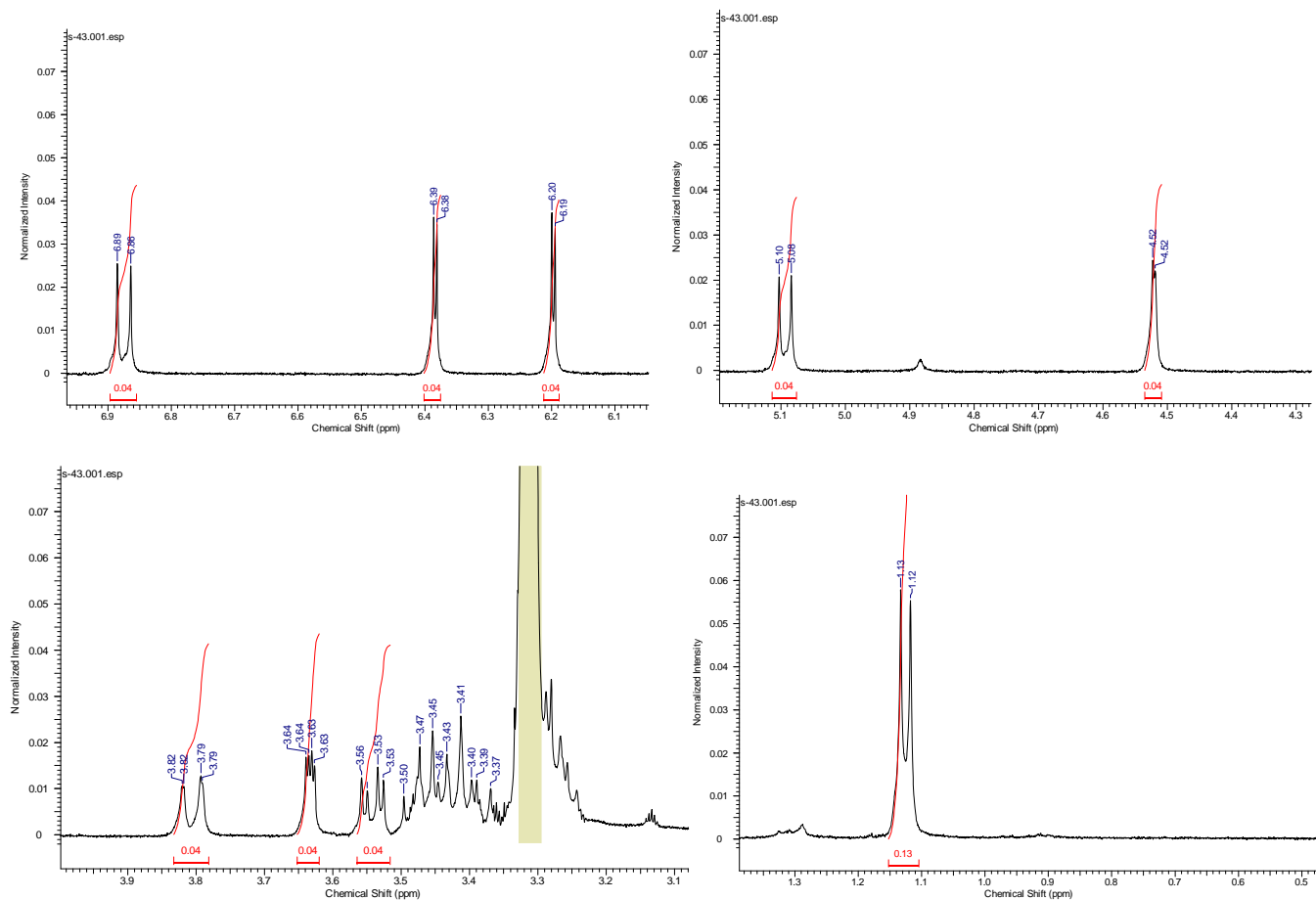


Figura 4.9.113. Ampliações dos sinais do espectro de RMN de ¹H da substância 23.

A comparação destes dados com aqueles registrados na literatura (GALOTTA et al., 2008) confirmou a estrutura da substância 23 como sendo a do flavonóide glicosilado rutina (3-O-Rutinosídeo de 3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavonol (Figura 4.9.114) [Tabela 33]).

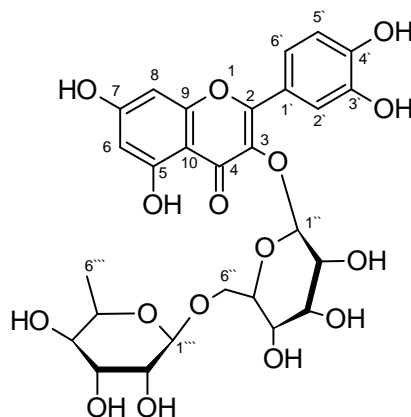


Figura 4.9.114. Estrutura da rutina.

Os acoplamentos observados no espectro de RMN de ^1H para os hidrogênios H-8 e H-6 acoplado em *meta* no anel A, dos hidrogênios H-6' e H-5' vicinais no anel B e os hidrogênios H-1'' e H-2'' da ramnose foram confirmados no mapa do experimento de COSY (Figuras 4.9.115 e 4.9.116).

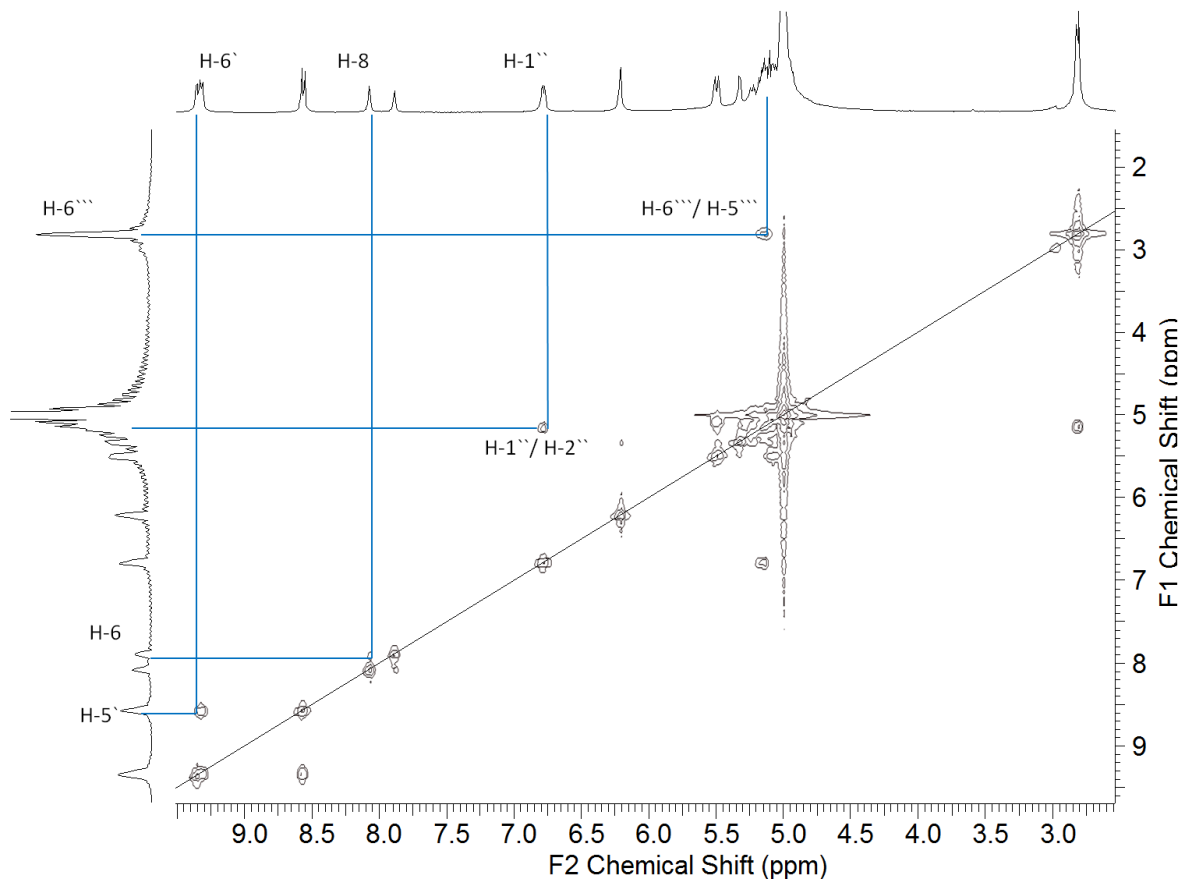


Figura 4.9.115. Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para a substância 23 em metanol- d_4 (400 MHz).

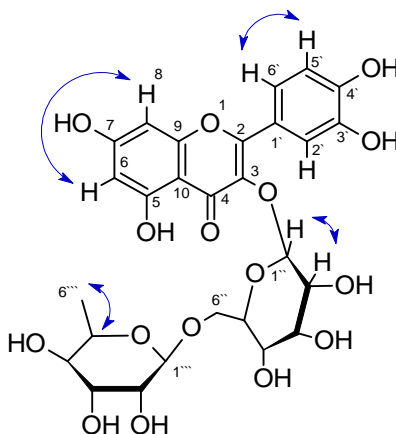


Figura 4.9.116. Correlações de COSY observadas para a substância 23.

No mapa de HMBC (Figura 4.9.117) são observadas algumas correlações que corroboram para as propostas de localização dos hidrogênios tanto aromáticos H-2', H-5', H-6' como para hidrogê metílicos e metínicos da ramnose H-1''' e H-6''' (Figura 4.9.118).

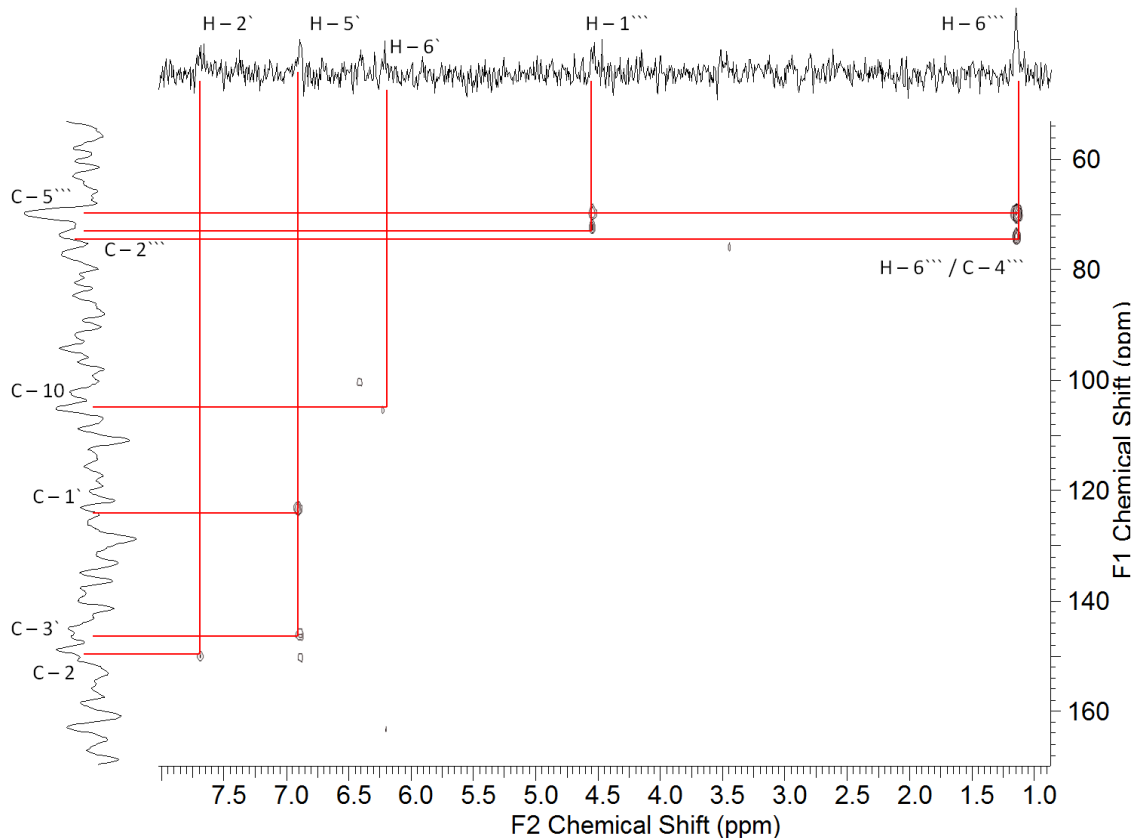


Figura 4.9.117. Correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBC para os hidrogênios aromáticos e da ramnose da substância 23 em metanol- d_4 (400 MHz).

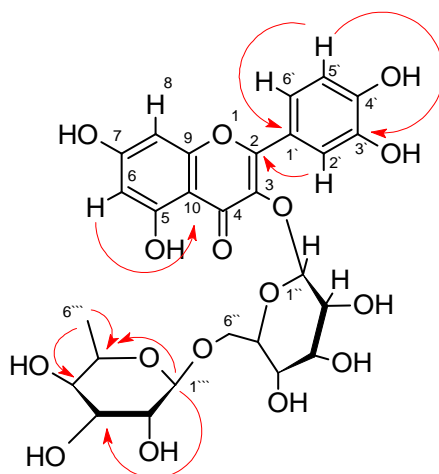


Figura 4.9.118. Correlações observadas no mapa de HMBC para a substância 23.

Tabela 4.9.12. Dados de RMN de ^1H da substância 23 em comparação com os dados da rotina descritos na literatura (GALOTTA et al., 2008).

| Posição | Substância 23 | rotina |
|---------|--|------------------------|
| | δ ^1H | δ ^1H |
| 1 | - | - |
| 2 | - | - |
| 3 | - | - |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | 6,19 (d, $J = 2,1$ Hz) | 6,18 (d, $J = 1,8$ Hz) |
| 7 | - | - |
| 8 | 6,38 (d, $J = 2,1$ Hz) | 6,38 (d, $J = 1,8$ Hz) |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| 1` | - | - |
| 2` | 7,67 (d, $J = 2,1$ Hz) | 7,53 (sl) |
| 3` | - | - |
| 4` | - | - |
| 5` | 6,86 (d, $J = 8,5$ Hz) | 6,84 (d, $J = 8,4$ Hz) |
| 6` | 7,64 (dd, $J_1 = 2,1$ e $J_2 = 8,5$ Hz) | 7,56 (sl) |
| 1`` | 5,09 (d) | 5,34 (d) |
| 2`` | 3,40-3,81 (m) | 3,22-3,38 (m) |
| 3`` | 3,40-3,81 (m) | 3,22-3,38 (m) |
| 4`` | 3,20-3,40 (m) | 3,04-3,11 (m) |
| 5`` | 3,30-3,81 (m) | 3,22-3,38 (m) |
| 6`` | 3,30-3,81 (m) | 3,22-3,38 (m) |
| 1''' | 4,52 (d) | 4,40 (sl) |
| 2''' | 3,30-3,81 (m) | 3,22-3,38 (m) |
| 3''' | 3,30-3,81 (m) | 3,22-3,78 (m) |
| 4''' | 3,20-3,40 (m) | 3,04-3,11 (m) |
| 5''' | 3,30-3,81 (m) | 3,22-3,38 (m) |
| 6''' | 1,12 (d, $J = 6,2$ Hz) | 1,00 (d, $J = 6,2$ Hz) |

O espectro de massas *fullscan* da substância 23 (Figura 4.9.119) no modo ESI⁻ apontou para a presença do íon *quasi*-molecular em m/z 609 e de seu aduto de TFA em m/z 713, o

espectro de íons produtos do precursor m/z 609 levou a fragmentos característicos de flavonóides. A fragmentação da rutina baseada nos íons produtos observados encontra-se na Figura 4.9.120 (FABRE et al., 2001).

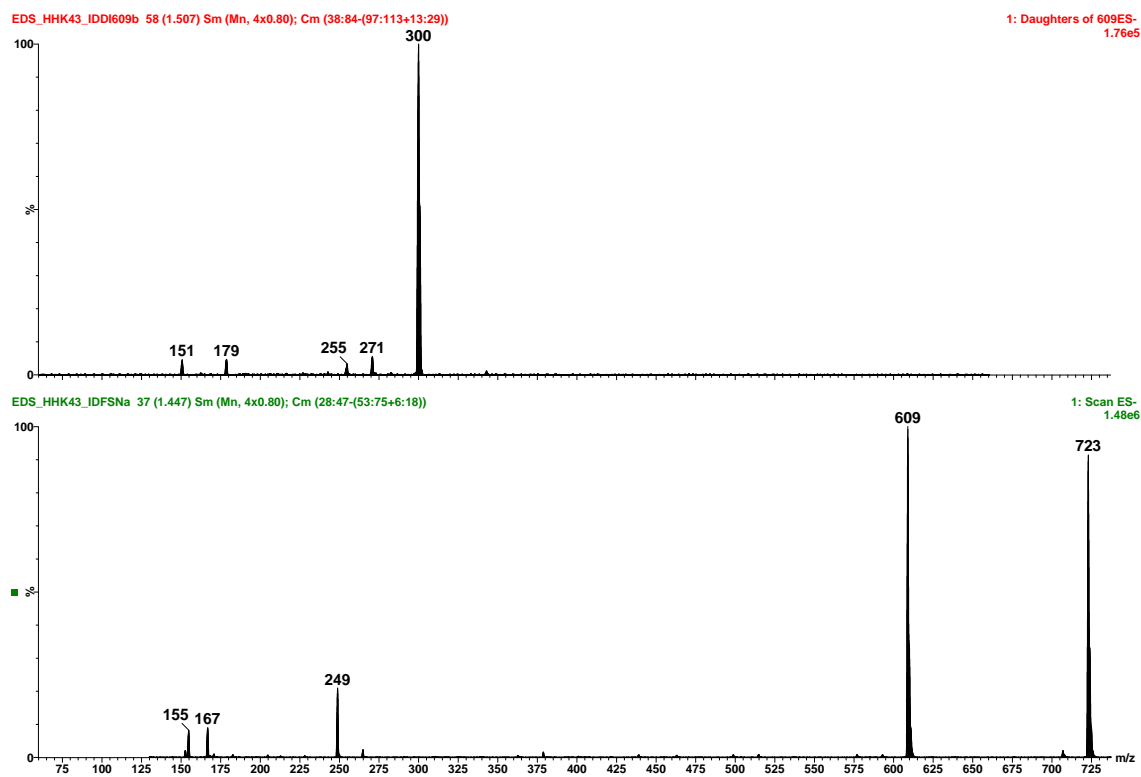


Figura 4.9.119. Espectro de massas no modo *fullscan* e espectro de íons produtos do íon precursor m/z 609 no modo ESI.

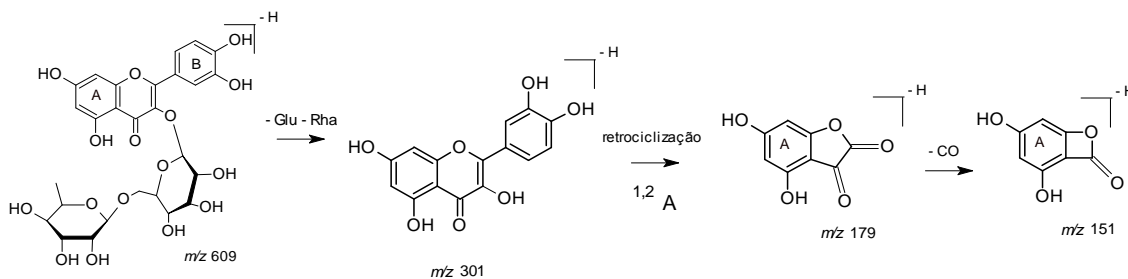


Figura 4.9.120. Fragmentação da rutina baseada nos íons produtos observados.

Substância 24.

A substância 24 foi isolada da fração hidroalcolólica do extrato metanólico das raízes respiratórias de *M. flexuosa* na forma de uma goma de cor amarela. O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.121) da substância 24 assim como o da substância 24 mostra sinais que caracterizam um sistema de substituição nas posições 3' e 4' no anel B devido aos sinais δ 7,33 (d, $J = 2,1$ Hz), δ 7,30 (dd, $J = 2,1$ e 8,3 Hz) e δ 6,91 (d, $J = 8,3$ Hz) (Figura 4.9.122). Foram observados também sinais em δ 6,35 (d, $J = 1,9$ Hz) e δ 6,18 (d, $J = 1,9$ Hz) que são característicos de acoplamentos em *meta* no anel A. Sinais na região entre δ 3,0 e δ 4,5 revelaram que a amostra se tratava de um flavonóide glicosilado, esta afirmação confirmada pelo sinal do hidrogênio ligado ao carbono anomérico em δ 5,34 (s) o que confirma que a ligação entre a aglicona e o açúcar tem configuração α , o sinal em δ 0,93 (d, $J = 5,5$ Hz) referente a presença de uma metila na posição 6'' revelou que este açúcar se tratava da ramnose. A comparação dos dados obtidos com os dados da literatura (HANSEN et al., 1999) revelou que a substância 24 é o flavonóide glicosilado quercetrina (3-O- β -ramnosil quercetina) (Figura 4.9.123).

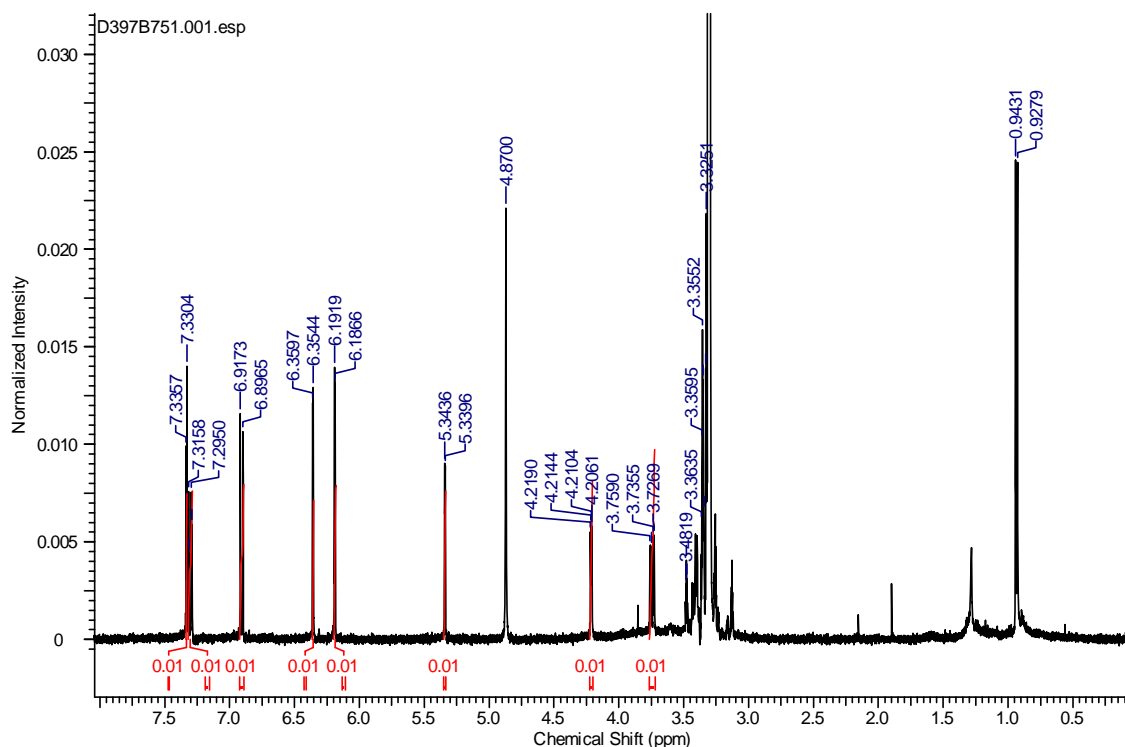


Figura 4.9.121. Espectro de RMN de ^1H da substância 24 em metanol- d_4 (400 MHz).

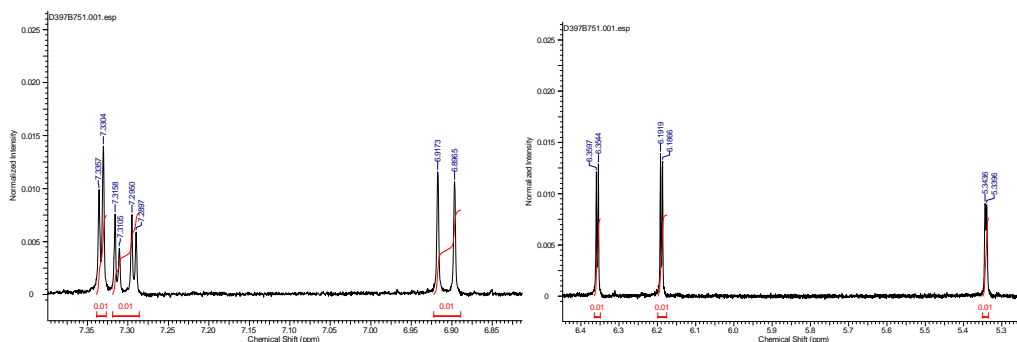


Figura 4.9.122. Ampliações de todos os sinais do espectro de RMN de ^1H da substância 24.

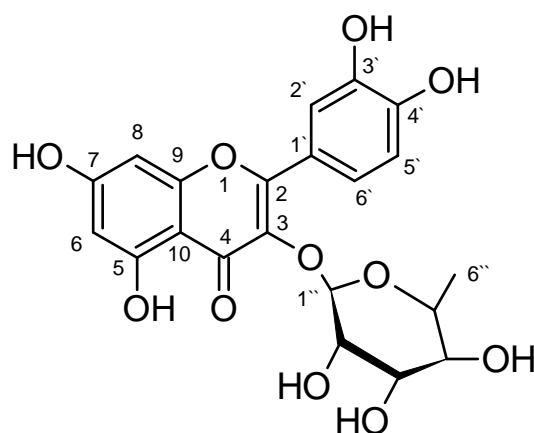


Figura 4.9.123. Estrutura da quercetrina.

No espectro de massas no modo ESI fullscan (Figura 4.9.124) foi observado o íon *quasi* – molecular em m/z 447 bem como seu aduto de TFA em m/z 561, a fragmentação do íon precursor m/z 447 levou a identificação de alguns íons produtos característicos da fragmentação de flavonóides (FABRE et al., 2001), a fragmentação da quercetrina encontra-se na Figura 4.9.124.

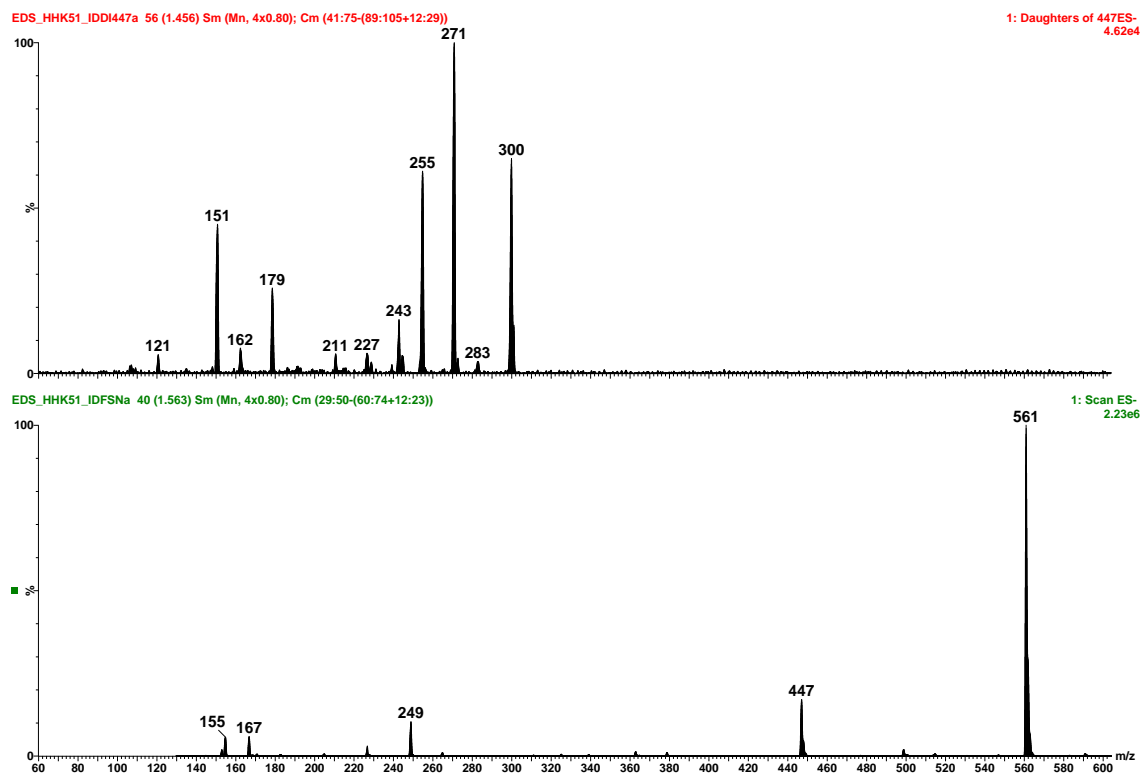


Figura 4.9.124. Espectro de massas no modo *fullscan* e espectro de íons produtos do íon precursor m/z 447 no modo ESI.

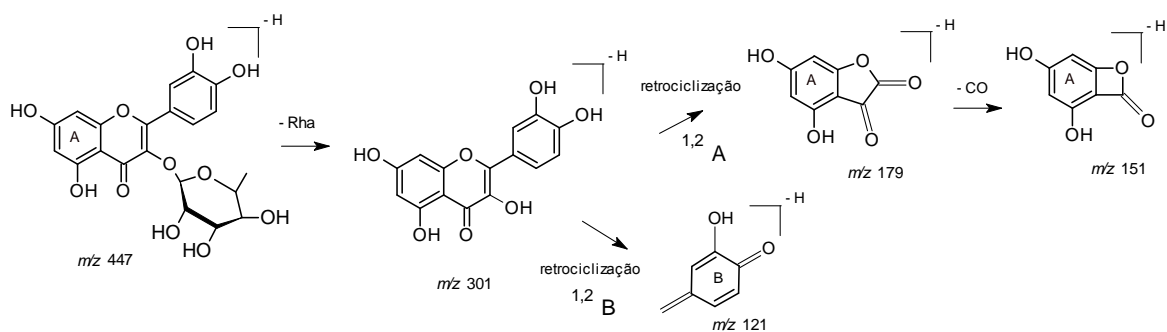


Figura 4.9.125. Fragmentação da quercetrina baseada nos íons produtos observados.

Substância 25.

A substância 25 foi isolada da fração hidroalcolica do extrato metanólico das raízes respiratórias de *M. flexuosa* na forma de um sólido amorfo de cor amarela. O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.126) da substância 25 indica sinais que caracterizam um sistema de substituição nas posições 3` e 4` no anel B devido aos sinais δ 7,73 (d, $J = 2,1$ Hz), δ 7,64 (dd, $J = 2,1$ e 8,3 Hz) e δ 6,88 (d, $J = 8,3$ Hz). Foram observados também sinais em δ 6,38 (d, $J = 1,9$ Hz) e δ 6,18 (d, $J = 1,9$ Hz) que são característicos de acoplamentos em *meta* no anel A.

Os dados obtidos por RMN de ^1H e por espectrometria de massas quando comparadas com a literatura (GALOTTA et al., 2008) levaram a identificação da substância 25 como sendo o flavonóide quercetina (Figura 4.9.127) (Tabela 4.9.13).

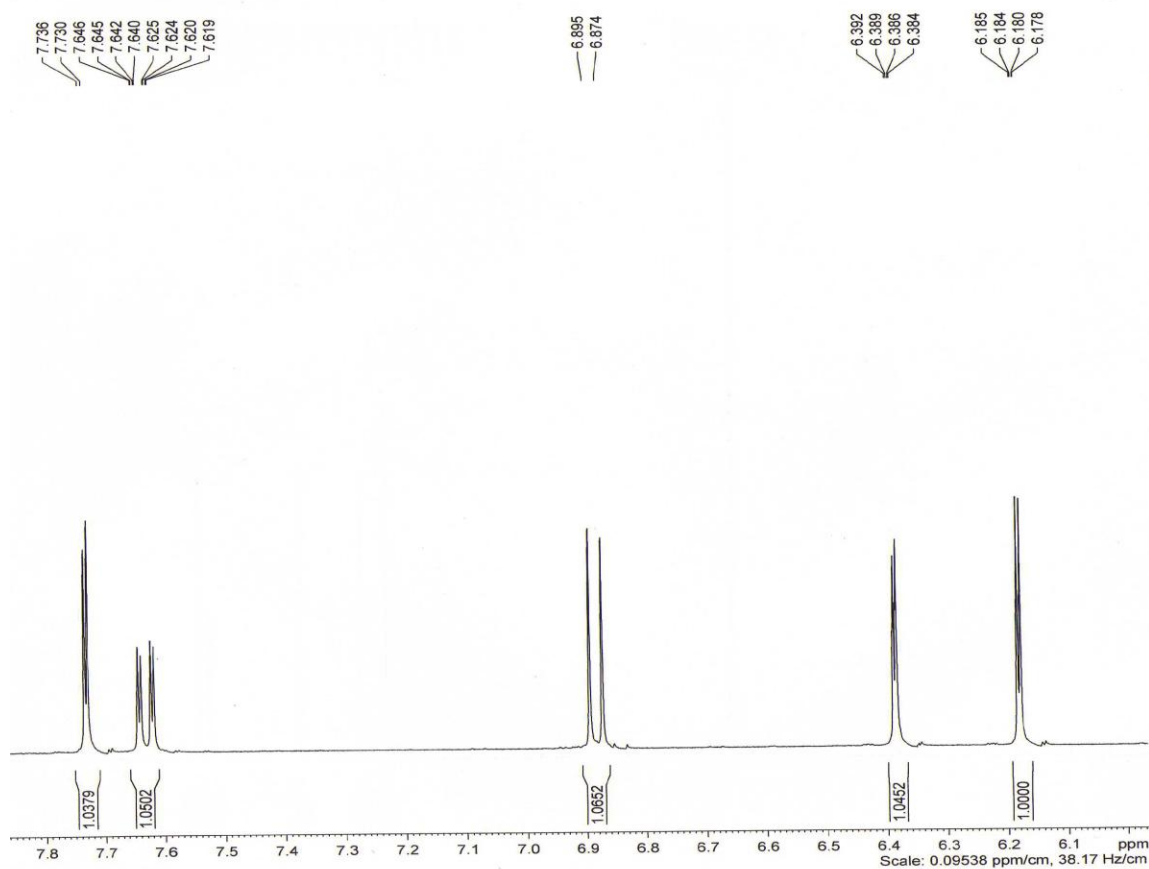


Figura 4.9.126. Espectro de RMN de ^1H da substância 25 em metanol- d_4 .

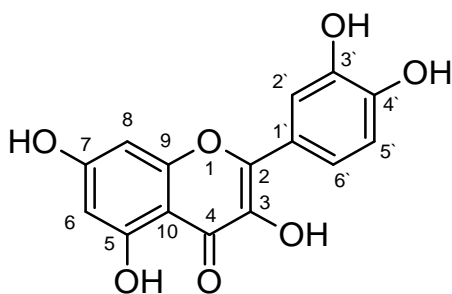


Figura 4.9.127. Estrutura da quercetina.

Tabela 4.9.13. Dados de RMN de ^1H da substância 25 em comparação com os dados da quercetina descritos na literatura (GALOTTA et al., 2008).

| Posição | Substância 25 | quercetina |
|---------|---|---|
| | δ ^1H | δ ^1H |
| 1 | - | - |
| 2 | - | - |
| 3 | - | - |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | 6,18 (d, $J = 1,9$ Hz) | 6,20 (d, $J = 1,8$ Hz) |
| 7 | - | - |
| 8 | 6,38 (d, $J = 1,9$ Hz) | 6,42 (d, $J = 1,8$ Hz) |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| 1' | - | - |
| 2' | 7,73 (d, $J = 2,1$ Hz) | 7,68 (d, $J = 2,1$ Hz) |
| 3' | - | - |
| 4' | - | - |
| 5' | 6,88 (d, $J = 8,3$ Hz) | 6,84 (d, $J = 8,5$ Hz) |
| 6' | 7,64 (dd, $J_1 = 2,1$ e $J_2 = 8,3$ Hz) | 7,55 (dd, $J_1 = 2,1$ e $J_2 = 8,5$ Hz) |

O espectro de massas *fullscan* no modo ESI $^-$ (Figura 4.9.128), apresentou o íon *quasi*-molecular em m/z 301 e seu aduto de TFA em m/z 415. O espectro de íons produtos do íon precursor em m/z 301 apenas confirma a estrutura da substância 25 como realmente sendo a da

quercetina, a fragmentação para os íons observados encontra-se na Figura 4.9.129 (FABRE et al., 2001).

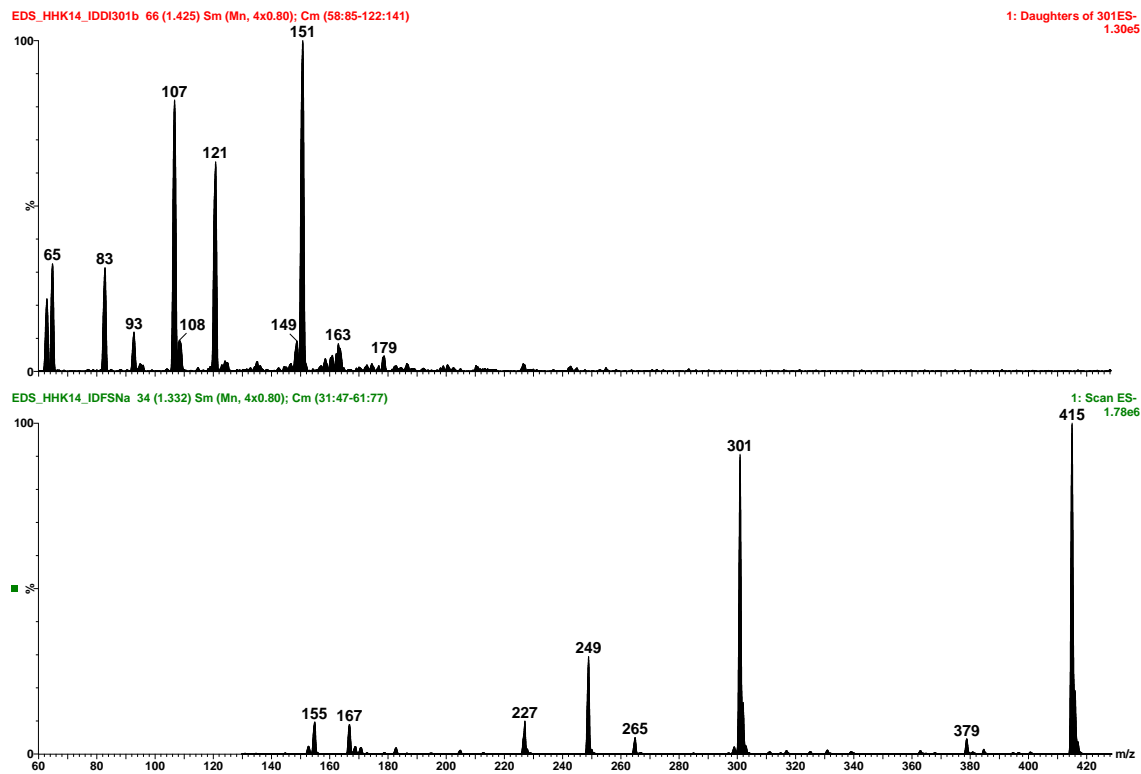


Figura 4.9.128. Espectro de massas no modo *fullscan* e espectro de íons produtos do íon precursor m/z 301 no modo ESI.

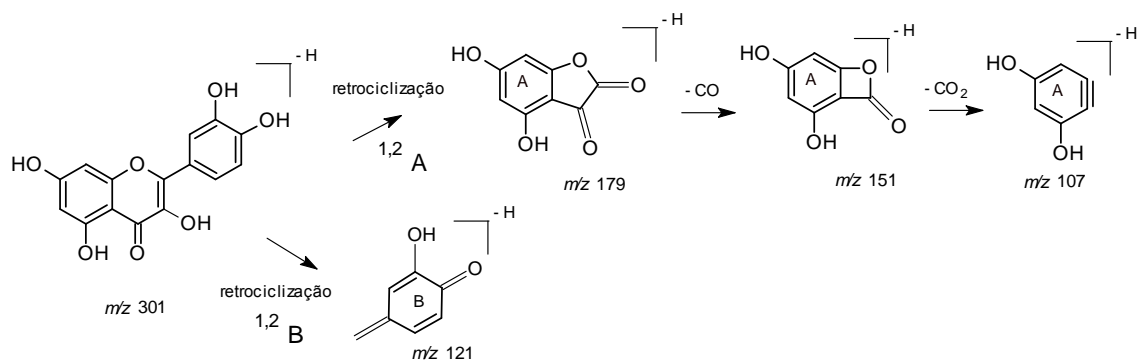


Figura 4.9.129. Fragmentação da quercetina baseada nos íons produtos observados.

4.10. Estudo do perfil químico de fungos por APCI-MS.

4.10.1. Comparação de diferentes concentrações do analito para o estudo de perfis químicos em APCI-MS.

A Figura 4.10.1 demonstra que nas diferentes concentrações do extrato o perfil dos metabólitos do fungo não se alterou consideravelmente. Isto norteou as injeções seguintes uma vez que poderiam ser feitas as análises, nas menores concentrações 1 e 3 ppm sem prejuízo para obtenção dos dados e mantendo o equipamento limpo.

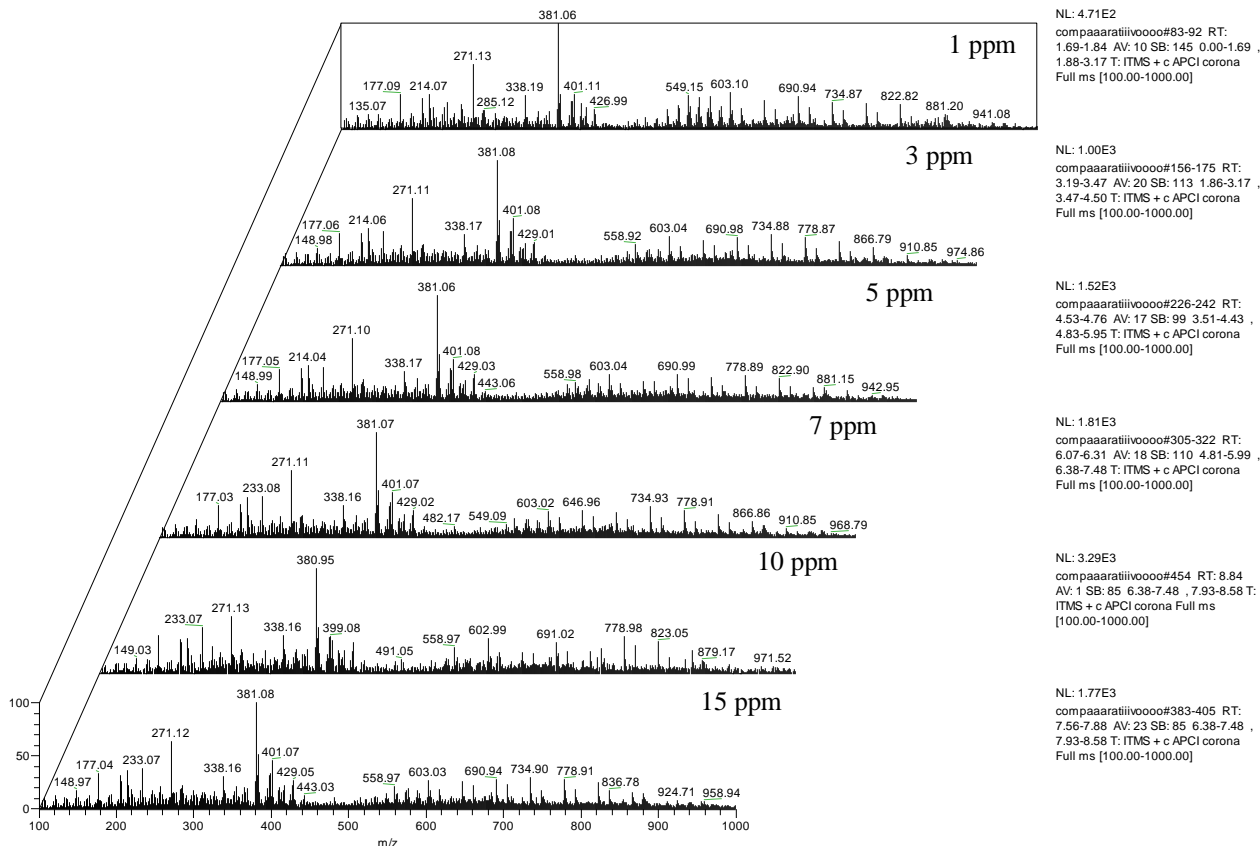


Figura 4.10.1. Comparativo da inserção direta do extrato do fungo ``Stsp C2-1 a`` em diferentes concentrações

O estudo da concentração do extrato é suma importância para as análises de perfil químico uma vez que existe a necessidade de se fragmentar o maior número de metabólitos

presentes nos extratos de modo que o espectro gerado seja uma impressão digital do metabolismo secundário do fungo. Tomando em conta que na sonda do espectrômetro tem-se a possibilidade de habilitar uma fina cortina de gás nitrogênio (*sweep gas*) que ``filtra`` a amostra que está entrando no capilar de transferência. Com estes dados decidiu-se então trabalhar com concentrações do extrato bruto de 3 ppm juntamente com uma pressão de 5 psi do sweep gas, aonde é possível ter-se um ótimo grau de fragmentação e ao mesmo tempo mantém o aparelho limpo.

4.10.2. Influência da Temperatura de Dessolvatação na sonda APCI para o estudo de Perfis Químicos.

Os estudos de Perfis Químicos por espectrometria de massas ao longo dos anos têm sido aplicados apenas com sondas de ionização por elétronspray (ESI-MS). Neste modo tem-se como um dos principais parâmetros a pressão do gás de dessolvatação (*sheet gas*), já para a sonda APCI o principal na dessolvatação do solvente é a temperatura de dessolvatação (*desolvation temperature*) que juntamente com o gás de nebulização são determinantes para o estudo de perfis químicos por APCI-MS.

O experimento testando três diferentes temperaturas de dessolvatação na fonte (Figura 185), apesar de ser um dos principais parâmetros para a fragmentação, resultou em perfis dos metabólitos muito semelhantes, isto é uma vantagem, pois a sonda APCI permite a abordagem de empregar uma temperatura de dessolvatação alta de modo a ionizar o maior número de metabólitos do extrato e conseqüentemente gerar um perfil químico mais representativo.

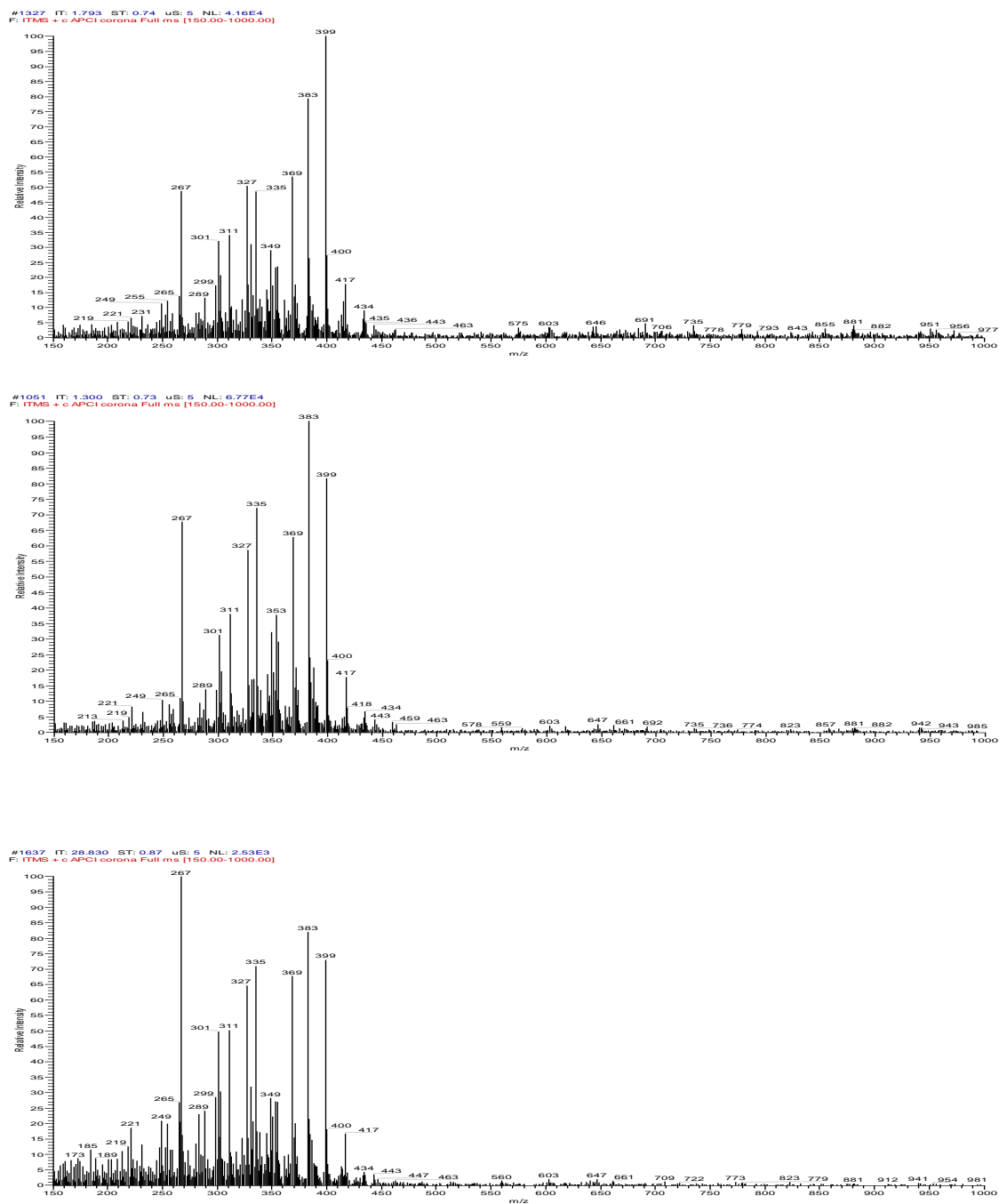


Figura 4.10.2. Espectros de massas no modo APCI⁺ dos extratos brutos do fungo Stsp C1-2/1-2 nas temperaturas de dessolvatação 150, 300 e 450 °C respectivamente.

4.10.3. Perfis químicos das linhagens classificadas como *Penicillium* sp. das hospedeiras *Strychnos* cf. *toxifera* e *Mauritia flexuosa*.

Os perfis químicos das linhagens de *Penicillium* obtidos por inserção direta representados nas Figuras 4.10.3 a 4.10.9 mostraram a repetição de alguns íons *quasi*-moleculares característicos de metabólitos tipicamente isolados de fungos do gênero *Penicillium*. Os espectros no modo APCI⁺ mostraram os íons moleculares protonados (M + H⁺) ou então adutos com íons metálicos [M + Na]⁺ que estão presentes como impurezas no solvente, porém poucos íons podem ser usados para identificação direta de quais metabólitos estão presentes no extrato bruto. A utilização de ácido fórmico no preparo da amostra para inserção direta foi de vital importância uma vez que o pH tem grande influência no padrão de fragmentação, bem como nas reações redox que ocorrem durante a formação do spray. A adição do ácido fórmico reduziu o número de picos vistos nos espectros (background) e aumentou a sensibilidade para as moléculas polares que não contém nitrogênio.

A fragmentação limitada observada nos espectros foi obtida por meio de otimização dos parâmetros, isto foi utilizado como vantagem na análise dos extratos obtendo-se o menor número de íons para cada composto. Os espectros de massas resultantes representam os perfis químicos dos componentes da amostra. Só é possível identificar um composto pelo perfil com o prévio conhecimento amostra aliado a experimentos em MS/MS.

Na Figura 4.10.3 estão os perfis químicos das linhagens Stsp F2.3.2c, Stsp CC1-2/1-1 b 02, Stsp C2-1a e Stsp C2.2/2.2a, apesar destes fungos serem de partes diferentes da hospedeira, estes apresentam perfil semelhante destacando-se os picos dos íons *m/z* 338, 603, 646, 690 e 778 presentes nas 4 linhagens. Na Figura 4.10.7 estão os perfis químicos das linhagens Stsp R1/ 1-2, Stsp C1-2/1-3, Stsp C2-1c e Stsp C2-1d, em destaque no espectro da linhagem Stsp C1-2/1-3 foi realizado o experimento em MS/MS do pico em *m/z* 301 (Figura 4.10.4) com aspecto coerente do policetídeo questinol (NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003), a Figura 4.10.5 apresenta a proposta de fragmentação do questinol.

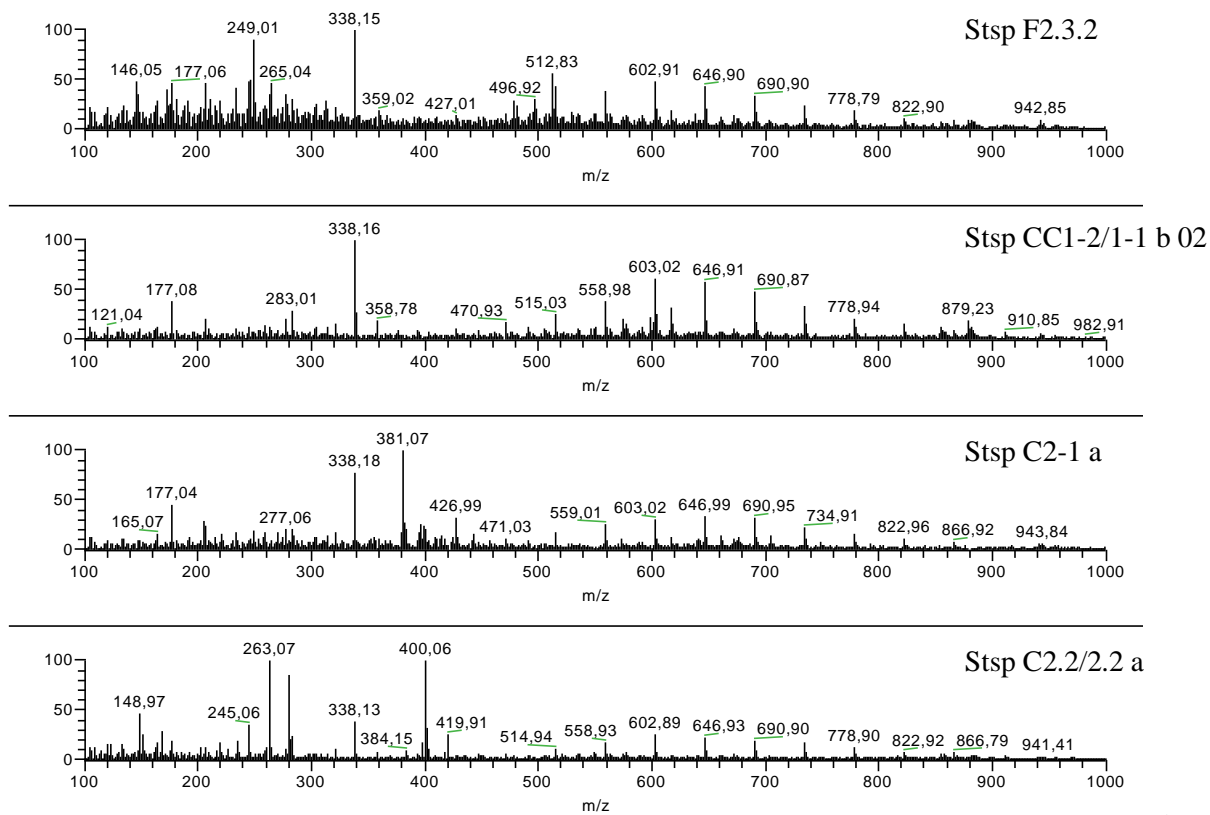


Figura 4.10.3. Comparação dos perfis químicos das linhagens F2.3.2c, Stsp CC1-2/1-1 b 02, Stsp C2-1a e Stsp C2.2/2.2a cultivadas em BDA.

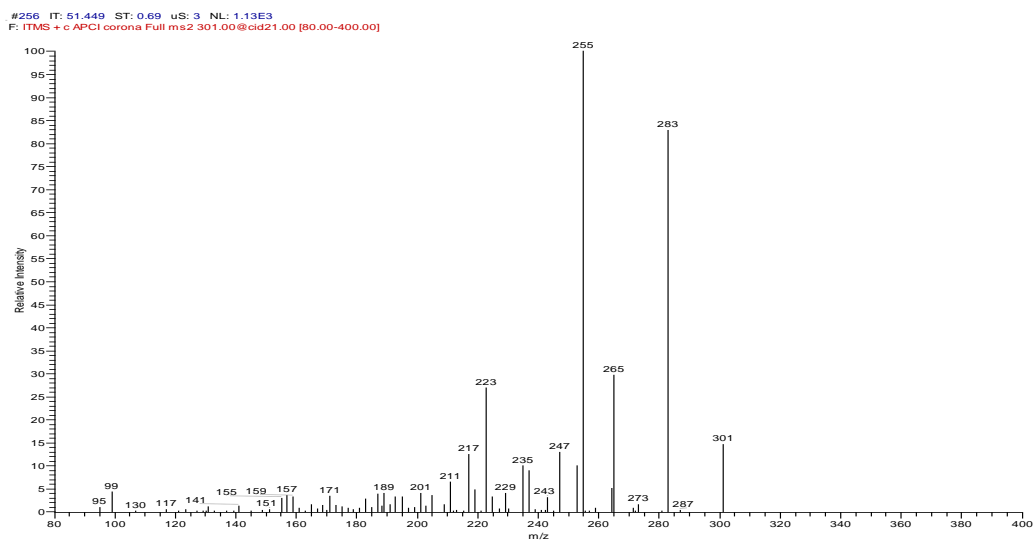


Figura 4.10.4. Espectro de íons produtos do íon precursor em m/z 301 no modo APCI⁺.

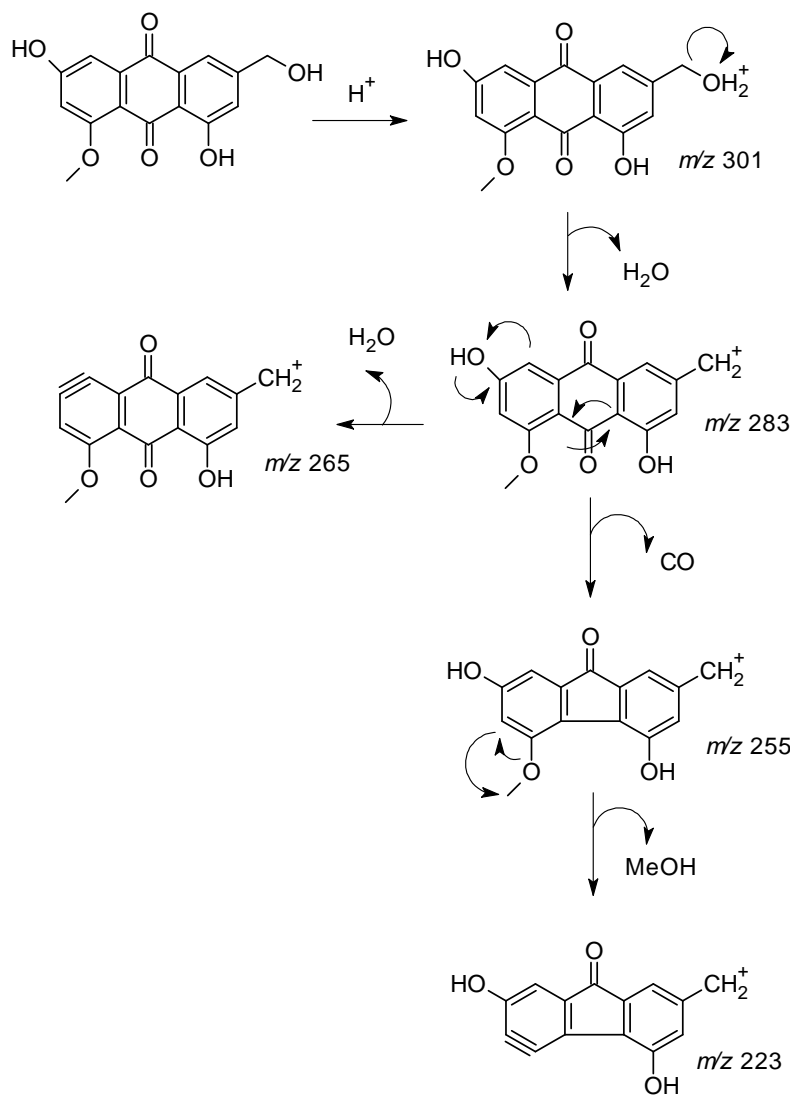


Figura 4.10.5. Proposta de fragmentação para o questinol.

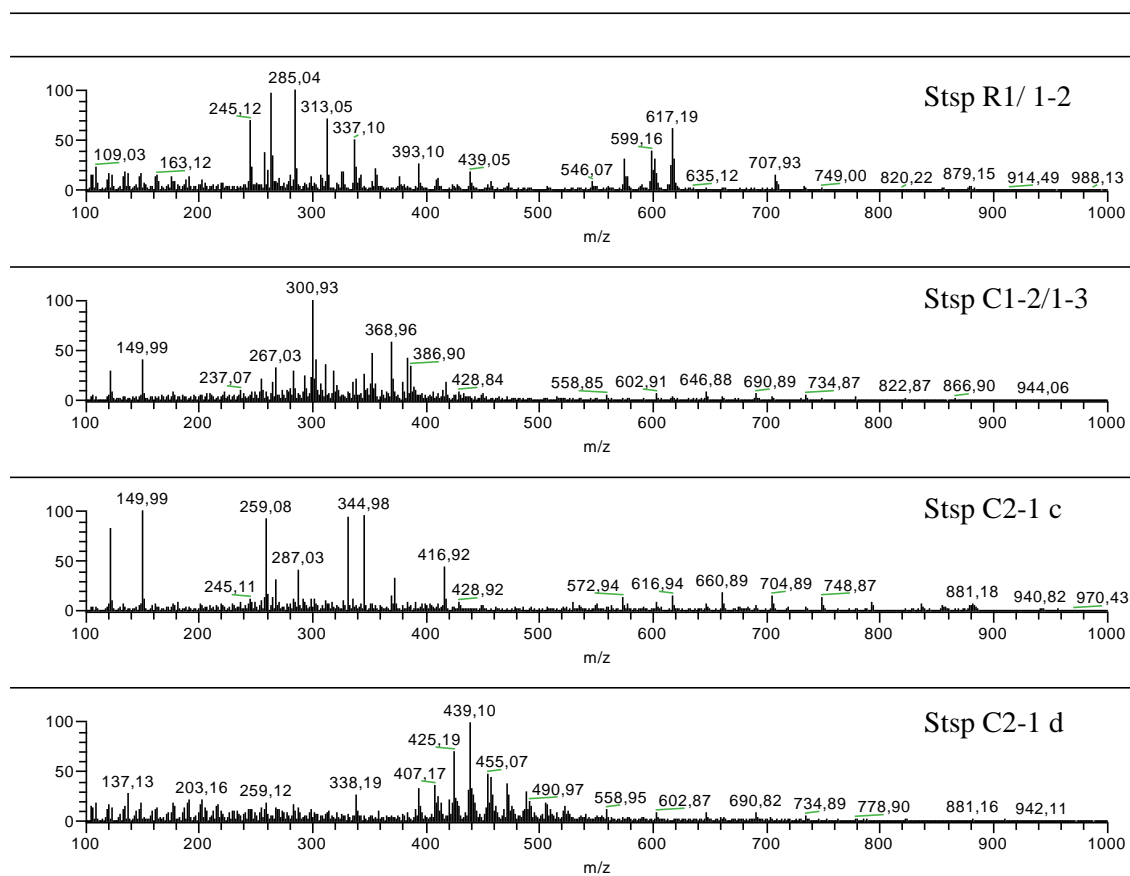


Figura 4.10.6. Comparação dos perfis químicos das linhagens Stsp R1/ 1-2, Stsp C1-2/1-3, Stsp C2-1c e Stsp C2-1d cultivadas em ISP2.

Na Figura 4.10.8 está a comparação dos perfis químicos das linhagens de *Penicillium* sp. onde os metabolismos secundários das linhagens são completamente diferentes, qualquer conclusão é precipitada, mesmo que estas linhagens cultivadas em BDA apresento perfis totalmente diferentes, podem ser de fungos da mesma espécie.

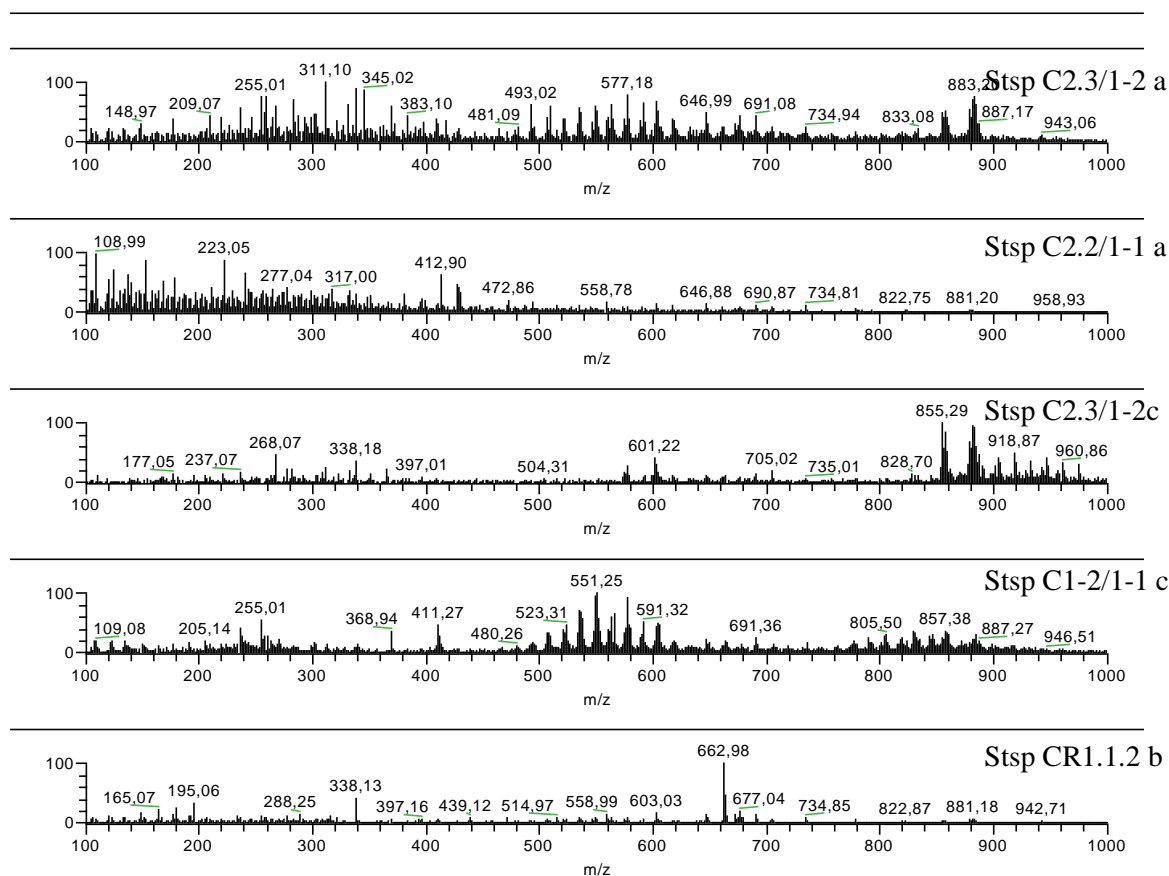


Figura 4.10.7. Comparação dos perfis químicos das linhagens Stsp C2.3/1-2 a, Stsp C2.2/1-1 a, Stsp C2.3/1-2c, Stsp C1-2/1-1c e Stsp CR1.1.2 b cultivadas em BDA.

Nos perfis químicos das linhagens Stsp C1.2/1-1 f, Stsp C1-2/1-1 a, Stsp C1-2/1.3, Stsp CR1-1.3 e Stsp C1.2/2.1 (Figura 4.10.8) são observadas poucas semelhanças entre as impressões digitais o pico em m/z 311 esta presente nas linhagens Stsp C1.2/1-1 f e Stsp CR1-1.3 bem como o pico em m/z 348 nas mesmas linhagens indicando que há a possibilidade de serem da mesma espécie apesar de terem sido cultivadas em diferentes meios de cultura, as duas primeiras em BDA e as três seguintes em meio ISP2.

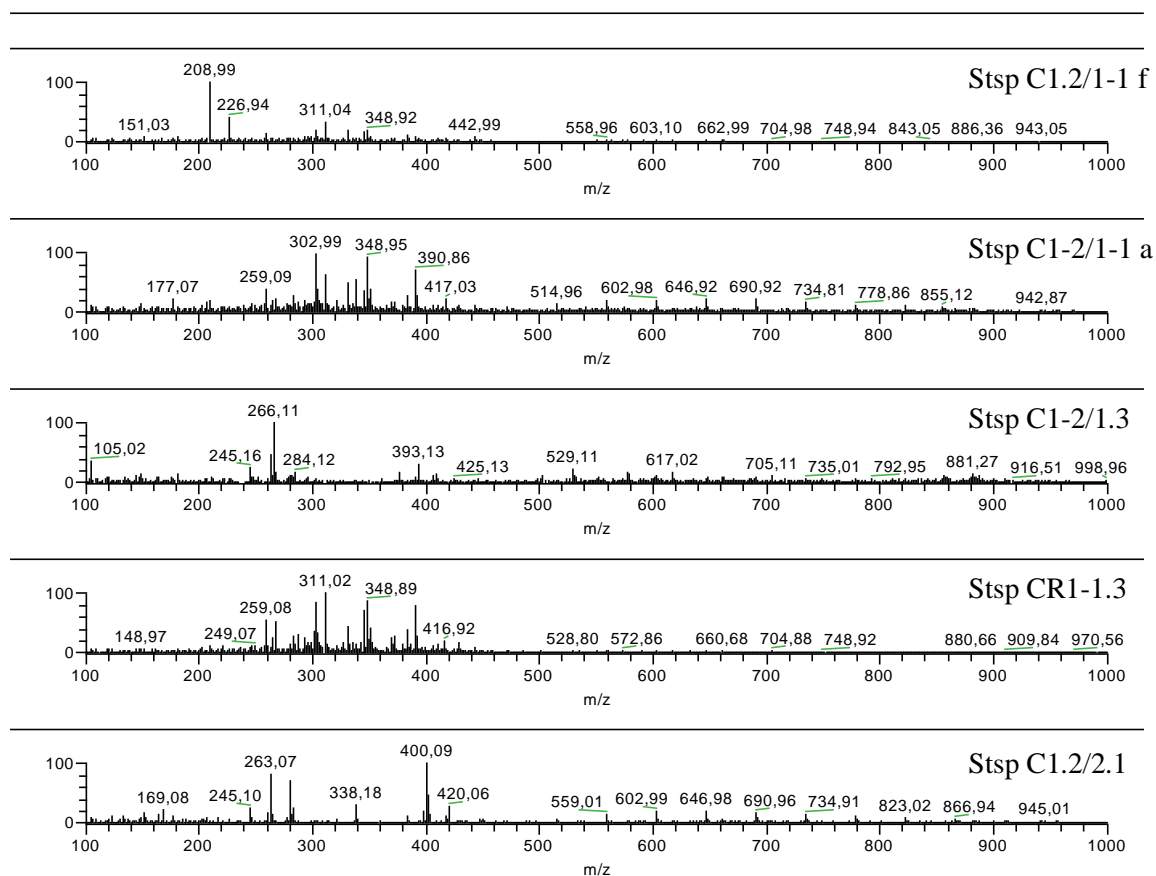


Figura 4.10.8. Comparação dos perfis químicos das linhagens Stsp C1.2/1-1 f, Stsp C1-2/1-1 a, Stsp C1-2/1.3, Stsp CR1-1.3 e Stsp C1.2/2.1 cultivadas em diferentes meios de cultura.

Na Figura 4.10.9 estão os perfis químicos das linhagens de *Penicillium* isoladas da hospedeira *Mauritia flexuosa*, todas as cinco linhagens apresentaram perfis muito semelhantes com diversos picos coincidentes, todas as linhagens apresentaram o pico em m/z 663. Dentre as linhagens isoladas de *M. flexuosa* as linhagens Pbr 3.3.1. e Pbr 3.3.2. apresentaram não só características macro e micromorfológicas idênticas bem como perfis químicos muito próximo de serem iguais. Uma análise mais aprofundada do perfil químico da linhagem PBR 2.1.1. levou a proposta de identificação do íon em m/z 281 como sendo o macrolídeo brefeldina A por experimentos em MS/MS (Figura 4.10.10) (NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003) a proposta de fragmentação da brefeldina A encontra-se na Figura 4.10.11.

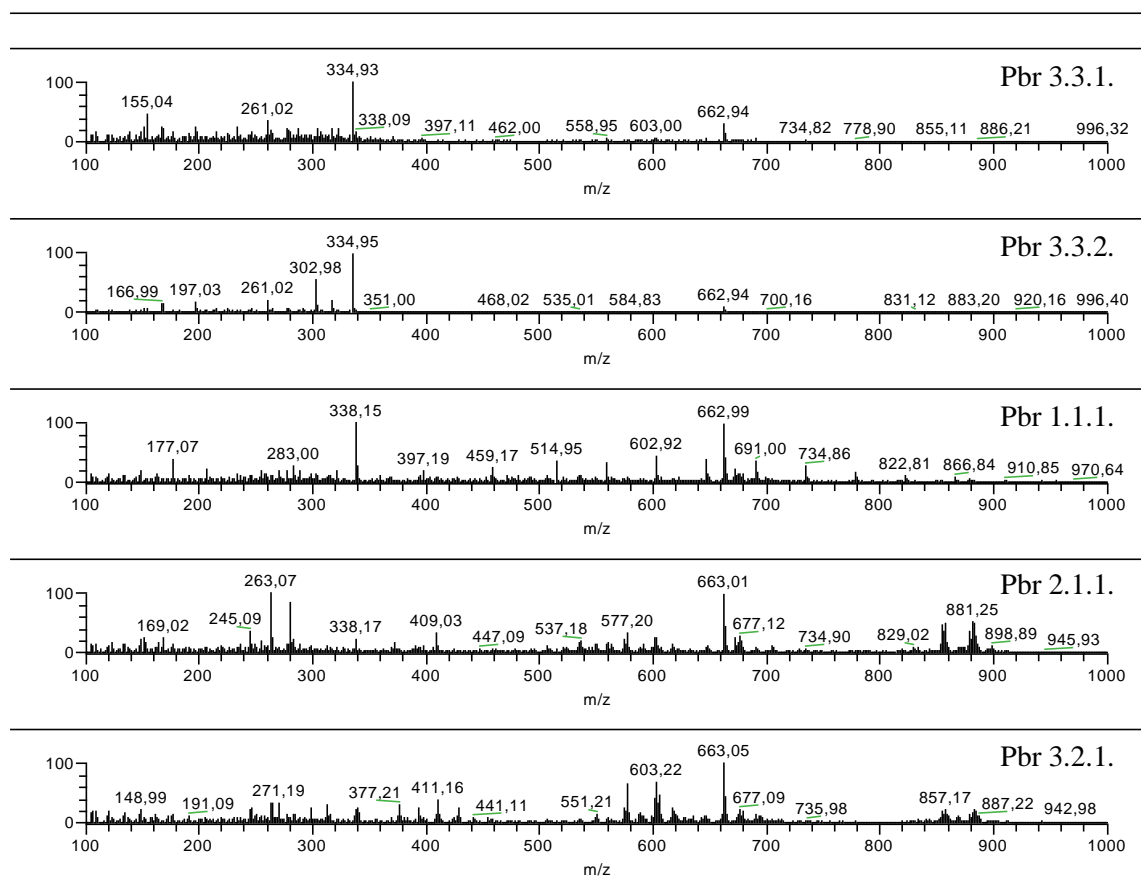


Figura 4.10.9. Comparação dos perfis químicos das linhagens Pbr 3.3.1., Pbr 3.3.2., Pbr 1.1.1., Pbr 2.1.1. e Pbr 3.2.1. cultivadas em BDA.

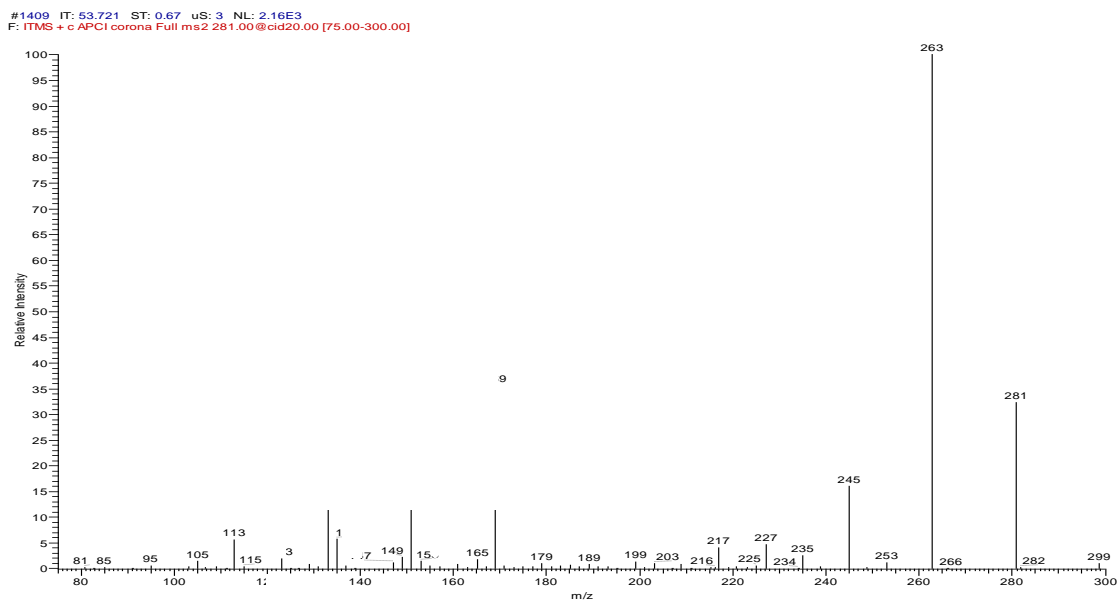


Figura 4.10.10. Espectro de íons produtos do íon precursor em m/z 281 no modo APCI⁺.

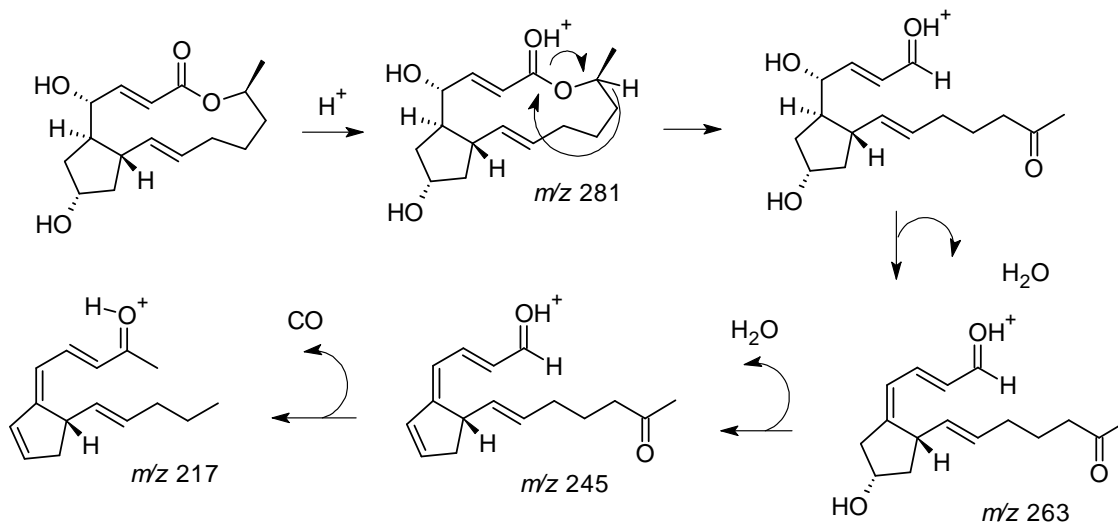


Figura 4.10.11. Proposta de fragmentação para a brefeldina A.

Diversas vantagens foram observadas durante a análise de perfis químicos entre elas o tempo de análise que é curto podendo-se analisar muitas amostras em um dia de trabalho, além dos resultados poderem ser usados para rejeitar ou reforçar a hipótese de que um determinado metabólito possa estar presente na amostra ou não. O perfil químico por inserção direta a partir de uma amostra fúngica pode ser utilizado como uma forma de desreplicação devido às diversas conclusões que dele podem ser tiradas. Este tipo de identificação de uma amostra bruta é baseada em vários critérios (variáveis), onde os íons representam algumas informações específicas da amostra. Não é necessário saber a identidade dos picos ou padrão de fragmentação da amostra para a utilização de um banco de dados, porém com os dados de fragmentação de certos íons é possível identificar certos compostos presentes na amostra como demonstrado.

4.10.4. Comparativo do perfil químico de *Strychnos cf. toxifera* com seus endofíticos.

A inserção direta dos extratos metanólicos das folhas e caule de *Strychnos cf. toxifera* no espectrômetro forneceu perfis químicos (Figura 4.10.12) muito semelhantes entre as duas partes da hospedeira, a região de m/z acima de 800 Da apresentou um perfil praticamente idêntico, sendo observadas apenas diferenças na região de 500 a 700 Da.

ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]

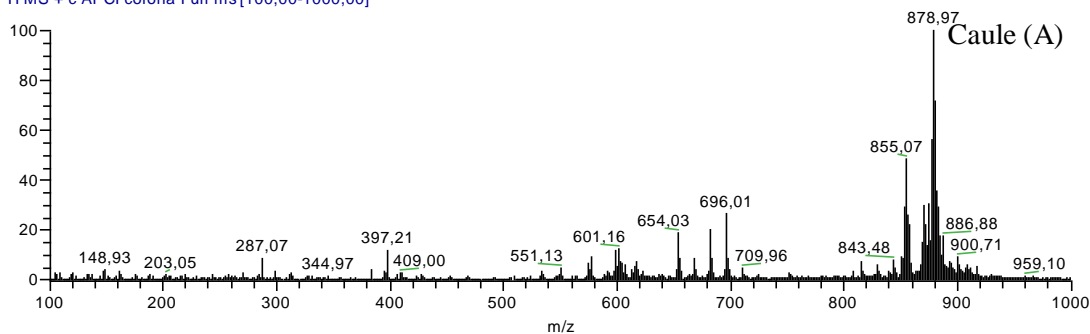
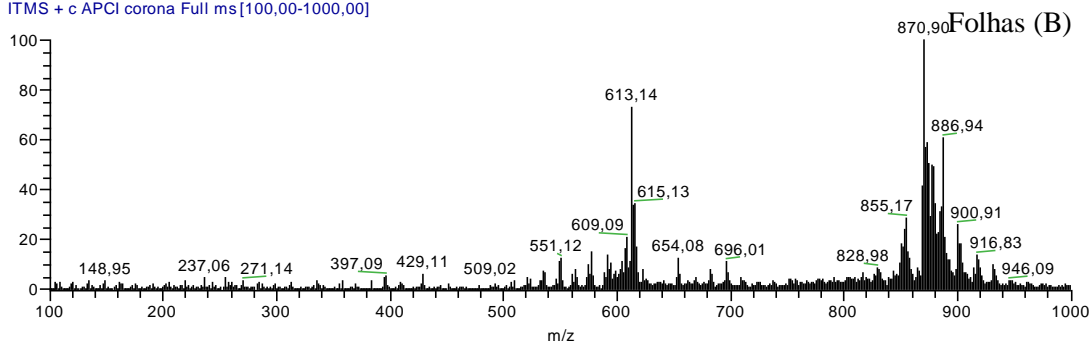
strychnos-toxifera_CAULE #107-121 RT: 2,18-2,49 NL: 1,65E3
T: ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]strychnos-toxifera_folhas_100720132136 #58-70 RT: 1,16-1,34 AV: 13 SB: 30 0,74-1,04 , 1,54-1,84 NL: 1,62E3
T: ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]

Figura 4.10.12. Perfis químicos do caule (A) e folhas (B) de *Strychnos cf. toxifera*.

Quando comparados os perfis químicos da hospedeira e os de seus endofíticos não são observadas semelhanças em praticamente nenhuma linhagem de *Penicillium* spp. com exceção da linhagem Stsp C2.3/1-2c que surpreendentemente exibiu um perfil praticamente igual ao do caule de *Strychnos cf. toxifera* de onde foi isolado (Figura 4.10.13), com destaque para o pico em m/z 855 apresentou-se intenso tanto no espectro do caule como no espectro da linhagem isolada dele. Este fato não é inusitado uma vez já comprovada na literatura diversos relatos de metabólitos co-produzidos tanto pela hospedeira como por seus microrganismos endofíticos, contudo é apenas um indicativo que possa estar acontecendo este tipo de interação, no caso relatado são necessários estudos mais aprofundados a cerca desta relação de modo que se possa se há realmente esta relação e quais são os metabólitos envolvidos.

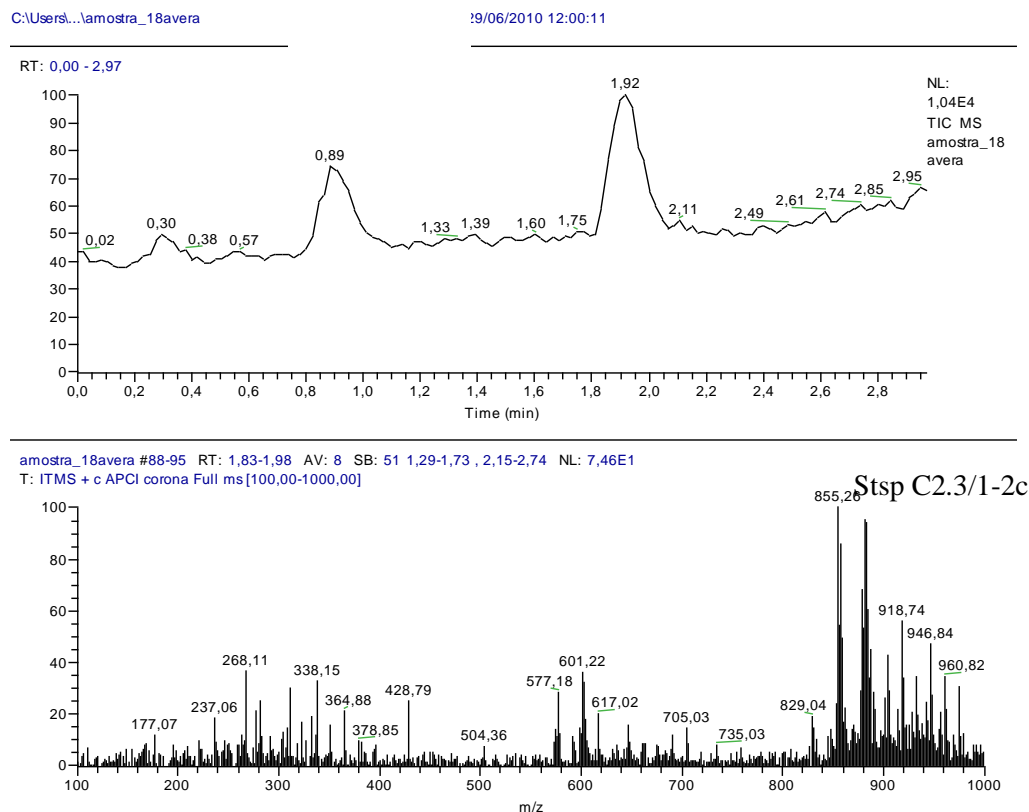


Figura 4.10.13. Falso TIC e espectro de massas da linhagem Stsp C2.3/1-2c.

4.10.5. Análise Quimiométrica dos dados obtidos nos estudos de perfis químicos.

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, baseado em critérios que são mais subjetivos que objetivos. Para a análise dos dados que obtive nas análises por inserção direta no espectrômetro de massas foi decidido que as variáveis a se analisar seriam todos os íons indo de m/z 100 a m/z 1000 e cada intensidade de cada íon, isto baseado em sua abundância. Esta redução de variáveis através de critérios objetivos permitiu a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, isto foi conseguido através de análise de componentes principais. Também foi possível construir agrupamentos

hierárquicos entre as amostras de acordo com suas similaridades, utilizando as variáveis escolhidas, e representá-las de maneira bidimensional através de dendrogramas.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, *segundo as variáveis* escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço. Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço n-dimensional. A maneira mais simples consiste em agrupar pares de pontos que são mais próximos, usando a distância euclidiana, e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles, sendo o método utilizado nas análises.

Na análise de agrupamentos (*cluster analysis*) a similaridade entre duas amostras pode ser expressa como uma função da distância entre os dois pontos representativos destas amostras no espaço n-dimensional. A maneira mais usual de calcular a distância entre dois pontos a e b no espaço é conhecida por distância euclidiana (X_{ab}) e é dada por:

$$X_{ab}^2 = \sum_{j=1}^n (d_{aj} - d_{bj})^2$$

As distâncias euclidianas foram calculadas por meio de programas estatísticos sendo utilizadas cinco metodologias diferentes, havendo apenas pequenas diferenças na forma como os dados são aglomerados. O método da ligação simples foi o primeiro método utilizado, neste método a distância entre dois conjuntos é frequentemente considerado como sendo o mínimo de todas as distâncias entre pares, portanto, este também é chamado de método do vizinho próximo. O primeiro método estatístico forneceu resultados muito semelhantes aos métodos do centróide e ao método da média das ligações, estas metodologias de análise multivariada diferenciam-se, o método da média das ligações é uma variante do método da ligação simples que começa levando em conta as dissemelhanças entre os objetos originais (que não necessariamente são as distâncias euclidianas, mas de qualquer tipo) dentro de grupos já pré-estabelecidos de modo a

formar novos grupos em alguns casos. O método do centróide destina-se a medidas de escala intervalar, ou seja, sem valores que estejam faltando, de modo que a dissimilaridade entre dois grupos é definida como a distância euclidiana entre seus centróides. As Figuras 4.10.14, 4.10.15 e 4.10.16 apresentam os dendrogramas com as distâncias euclidianas calculadas pelos três métodos citados acima.

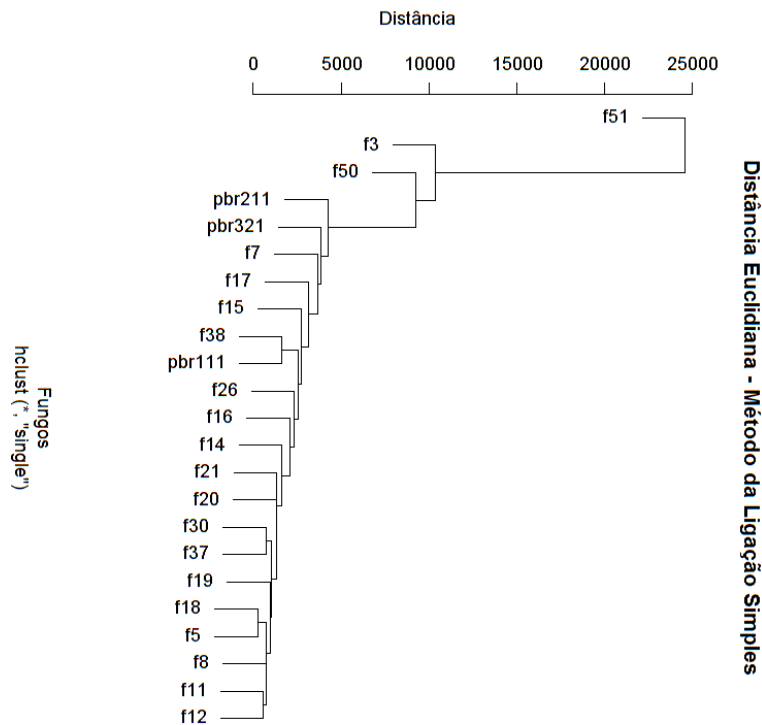


Figura 4.10.14. Dendrograma das distâncias euclidianas calculadas pelo método da ligação simples.

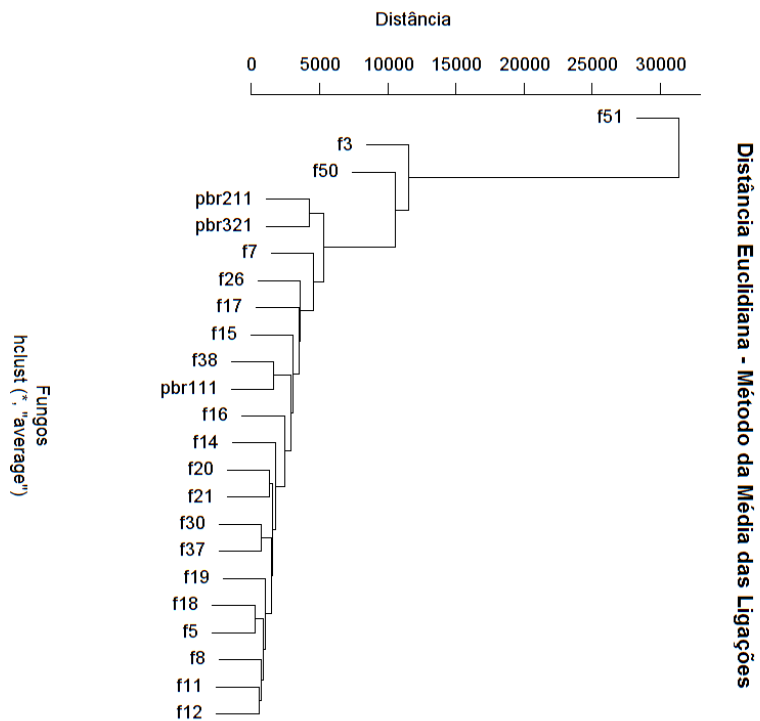


Figura 4.10.15. Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método da média das ligações.

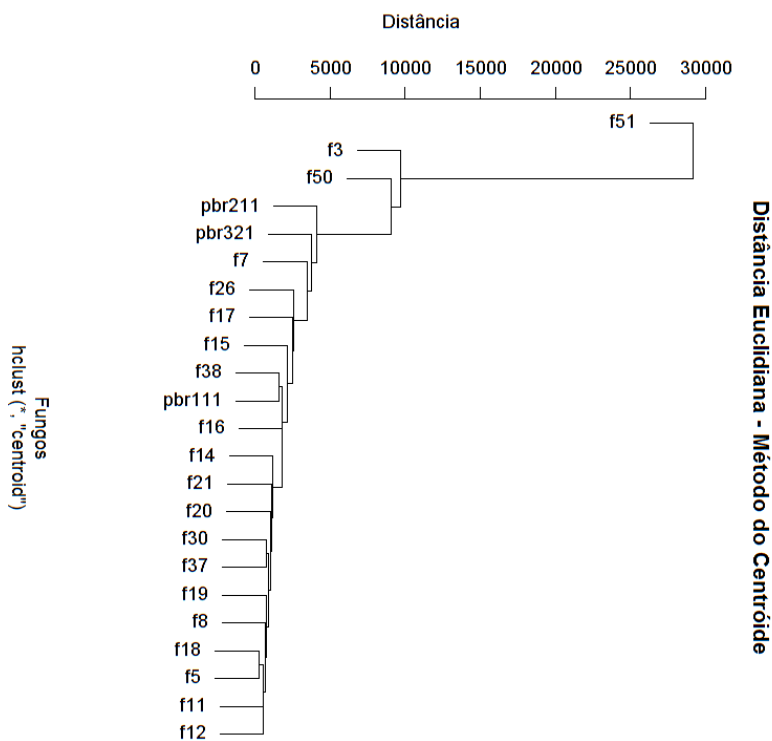


Figura 4.10.16. Dendrograma das distância euclidianas calculadas pelo método do centróide.

A análise dos dendrogramas pelas três primeiras metodologias revela as distâncias euclidianas entre 3 grupos distintos, o primeiro grupo indo desde o fungo PBR 2.1.1. até o fungo 12, os fungos deste grupo não são tão próximos em seus perfis químicos por isso são formados vários subgrupos dentro do grupo 1. Um exemplo disto são os fungos 26 e 37 escolhidos aleatoriamente dentro deste grupo, seus espectros de massas (Figura 4.10.17) apresentam na região de m/z de 200 a 400 seus picos mais intensos bem distintos, e é isso o que os faz estar distantes um do outro dentro do grupo 1, porém são razoavelmente próximos pois seus íons mais intensos estão dentro de uma mesma faixa de m/z bem como seus íons pouco intensos estão com intensidades similares.

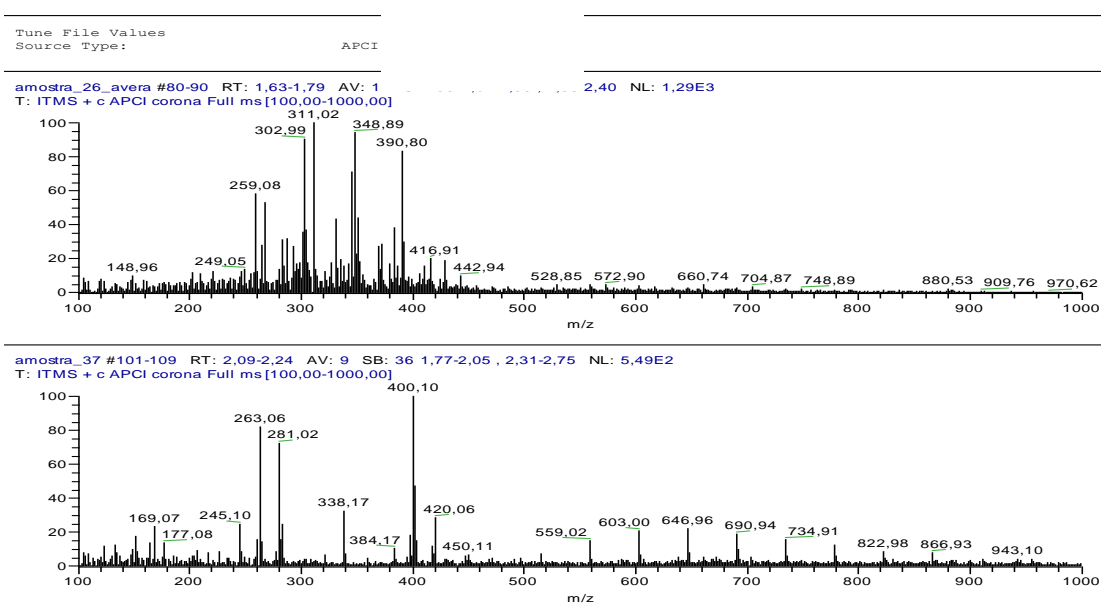


Figura 4.10.17. Espectros de fullscan no modo APCI⁺ dos fungos f26 e f37 respectivamente, picos separados por 44 daltons podem ser oriundos de contaminação por detergente.

No grupo 2 existem dois subgrupos apenas constituídos cada um por apenas um fungo, no caso os fungos f50 e f3, seus espectros na região de m/z de 200 a 400 diferem bastante (Figura 4.10.18) ao passo que íon presente em m/z 663 é bem intenso para uma e para outra bem menor. Já para o grupo três constituído apenas pela linhagem f51 é observada uma inconsistência nos dados causada ou por mau preparo da amostra ou pela escolha das variáveis analisadas, pois visualmente os espectros de f50 e f51 (Figura 4.10.19) são semelhantes, porém suas intensidades relativas diferem bastante na matriz gerada para o processamento dos dados (Figura 4.10.20) e como a intensidade dos íons é uma das principais variáveis, linhagens que produzam as mesma

substâncias, tenham a mesma origem e tenham sido cultivadas no mesmo meio podem estar mais distantes entre si do que linhagens de outra parte da planta ou até mesmo outra hospedeira.

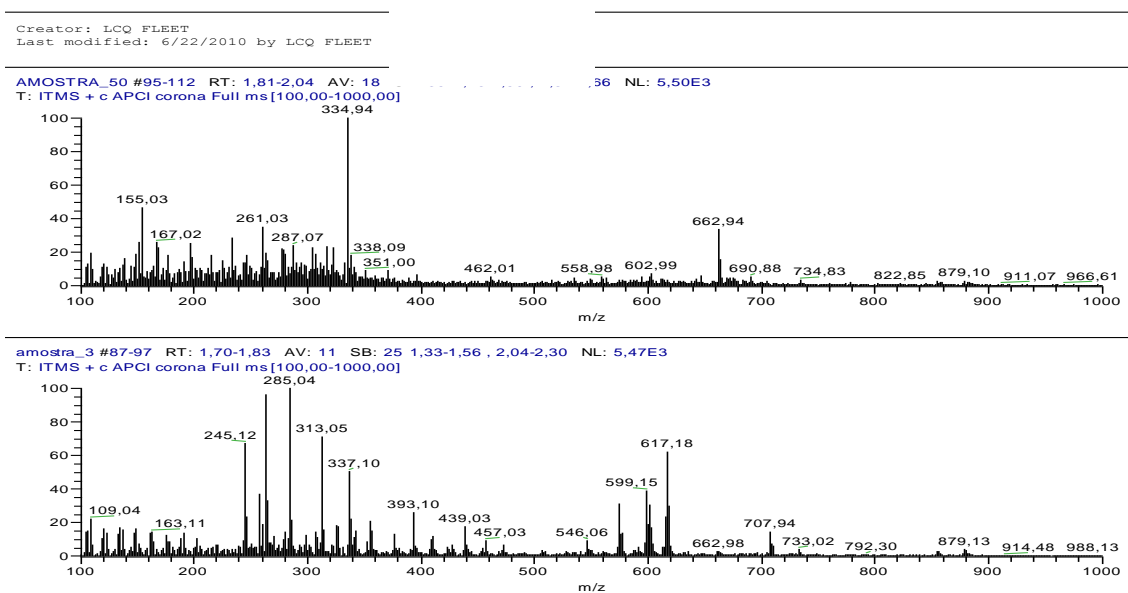


Figura 4.10.18. Espectros de fullscan no modo APCI⁺ dos fungos f50 e f3 respectivamente, picos separados por 44 daltons podem ser oriundos de contaminação por detergente.

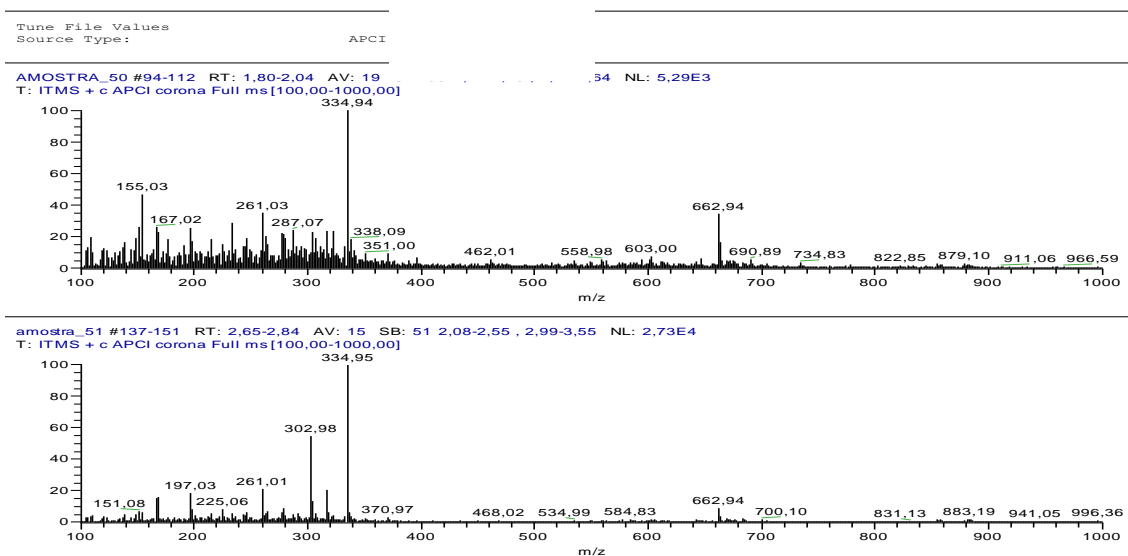
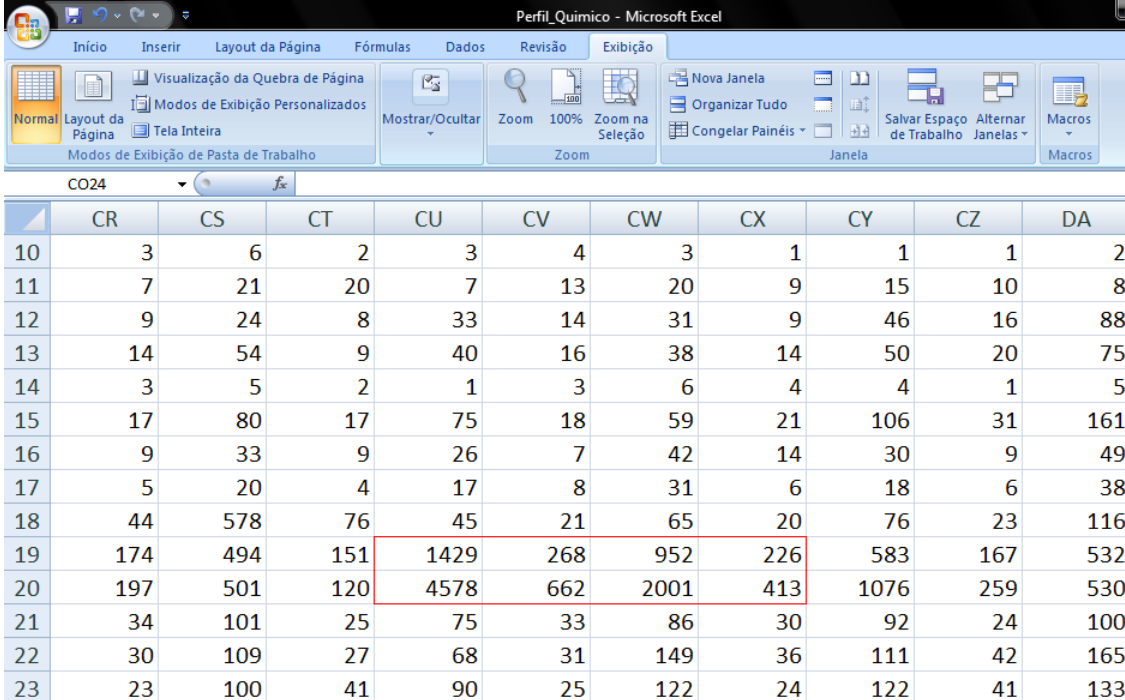


Figura 4.10.19. Espectros de fullscan no modo APCI⁺ dos fungos f50 e f51 respectivamente, picos separados por 44 daltons podem ser oriundos de contaminação por detergente.



The image shows a screenshot of Microsoft Excel with the 'Perfil_Quimico' workbook open. The 'Exibição' (View) ribbon is active, showing options like 'Zoom' and 'Janela'. Below the ribbon, a data matrix is displayed with columns labeled CR, CS, CT, CU, CV, CW, CX, CY, CZ, and DA, and rows numbered 10 to 23. A red rectangular box highlights the cells in rows 19 and 20, columns CU, CV, CW, and CX, indicating high values.

| | CR | CS | CT | CU | CV | CW | CX | CY | CZ | DA |
|----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|
| 10 | 3 | 6 | 2 | 3 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 11 | 7 | 21 | 20 | 7 | 13 | 20 | 9 | 15 | 10 | 8 |
| 12 | 9 | 24 | 8 | 33 | 14 | 31 | 9 | 46 | 16 | 88 |
| 13 | 14 | 54 | 9 | 40 | 16 | 38 | 14 | 50 | 20 | 75 |
| 14 | 3 | 5 | 2 | 1 | 3 | 6 | 4 | 4 | 1 | 5 |
| 15 | 17 | 80 | 17 | 75 | 18 | 59 | 21 | 106 | 31 | 161 |
| 16 | 9 | 33 | 9 | 26 | 7 | 42 | 14 | 30 | 9 | 49 |
| 17 | 5 | 20 | 4 | 17 | 8 | 31 | 6 | 18 | 6 | 38 |
| 18 | 44 | 578 | 76 | 45 | 21 | 65 | 20 | 76 | 23 | 116 |
| 19 | 174 | 494 | 151 | 1429 | 268 | 952 | 226 | 583 | 167 | 532 |
| 20 | 197 | 501 | 120 | 4578 | 662 | 2001 | 413 | 1076 | 259 | 530 |
| 21 | 34 | 101 | 25 | 75 | 33 | 86 | 30 | 92 | 24 | 100 |
| 22 | 30 | 109 | 27 | 68 | 31 | 149 | 36 | 111 | 42 | 165 |
| 23 | 23 | 100 | 41 | 90 | 25 | 122 | 24 | 122 | 41 | 133 |

Figura 4.10.20. As altas diferenças observadas nas intensidades de alguns íons na matriz gerada (quadro assinalado de vermelho) para o processamento, a linha 19 se refere a linhagem 50 e a linha 20 a linhagem 51.

Outros dois métodos avaliados e que apresentaram resultados diferentes foram o método da ligação completa e o método de Ward, o primeiro é totalmente o oposto do método de ligação simples, neste a dissimilaridade entre dois grupos é definida como a maior dissimilaridade entre um objeto de um grupo e o de outro grupo. Apesar dessas diferenças o dendrograma pelo método da ligação completa (Figura 4.10.21) é similar aos anteriores, porém o dito grupo 1 passa a ter seus subgrupos um pouco mais distantes por justamente levar em conta apenas as maiores dissimilaridades.

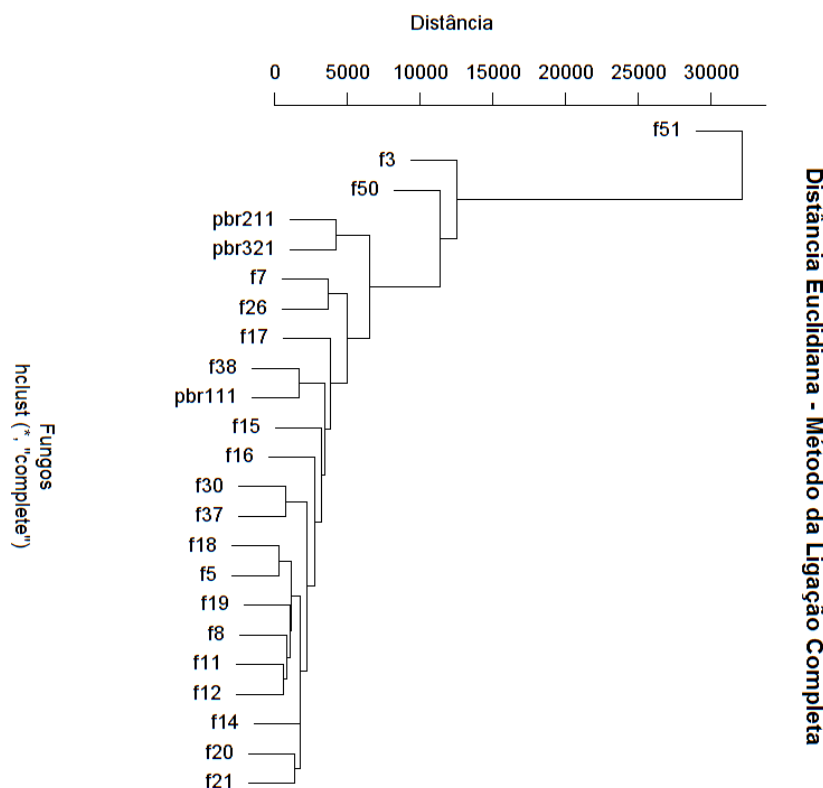


Figura 4.10.21. Dendrograma das distâncias euclidianas calculadas pelo método da ligação completa.

O último método de análise multivariada foi o de Ward, que consiste em um método de medidas dos intervalos dimensionados fazendo uso das distâncias euclidianas, as dissimilaridades entre dois grupos é calculada pela distância de seus centróides porém desta vez multiplicadora por um fator de correção. Este método apresentou o dendrograma com as maiores diferenças observadas agora (Figura 4.10.22), entre as amostras e novamente os fungos 3 e 50 estão em um grupo, porém sem divisão de subgrupos. O fungo 51 mais uma vez fica distante dos demais. A mudança mais significativa é a divisão no antigo grupo 1 dos outros métodos, aqui o novo grupo 1 é constituído desde o fungo f30 até o f21 e o grupo 2 constituído de PBR 2.1.1. até f17, existindo dentro de cada grupos diversos subgrupos razoavelmente separados. Este último método devido ao fator de correção aplicado ao cálculo mostrou-se mais sencível no que diz respeito ao perfil dos fungos em cada grupo e as intensidades relativas de cada pico.

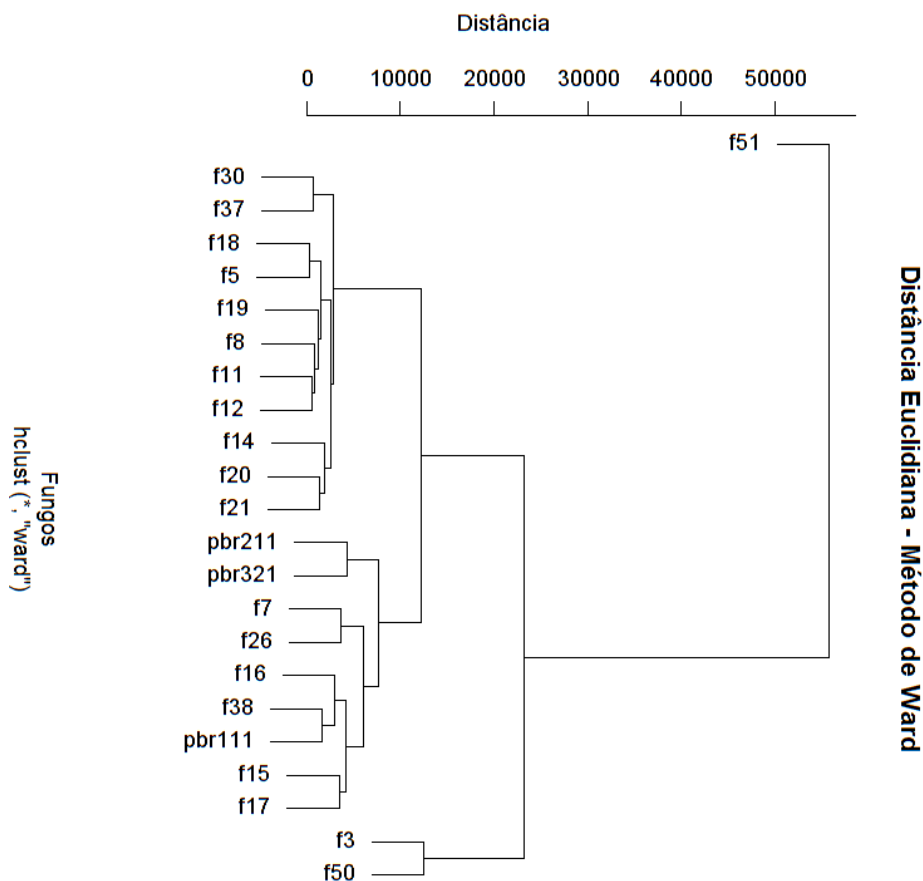
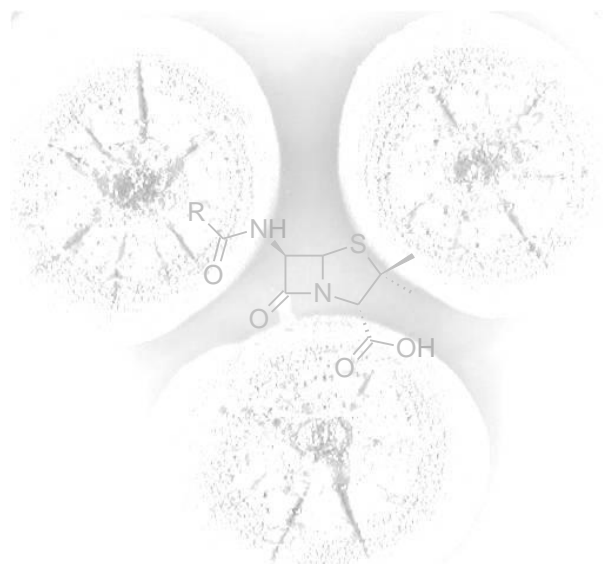


Figura 4.10.22. Dendrograma das distâncias euclidianas calculadas pelo método de Ward.

No geral os métodos quimiométricos utilizados apontaram para mais semelhanças entre as diversas linhagens de *Penicillium* utilizadas, vale ressaltar que as linhagens trabalhadas neste trabalho são de duas plantas distintas porém que estavam bem próximas pois uma estava parasitando a outra, o que torna o ambiente muito semelhante, além de terem sido aproveitados os restantes de extratos das escalas analíticas de cultivo. Visualmente os espectros por si sós apontam para diferenças significantes entre diversas linhagens, o que não ocorreu pelas análises quimiométricas, isto foi detectado pela intensidades relativas de cada íon que o programa Xcalibur designou para a matriz utilizada, um maior refinamento dos dados é necessário para se agrupar de forma mais correta o que se observa nos espectros de modo que mais experimentos se tornam necessários para conclusões mais precisas.

5. CONCLUSÕES



Do trabalho proposto inicialmente foram isolados um total de 58 fungos endofíticos de duas plantas hospedeiras endêmicas da região Amazônica: *Strychnos* cf. *toxifera* e *Mauritia flexuosa*, estes fungos foram divididos em grupos de acordo com seus gêneros (quando possível identificar), deste total de fungos 52 foram cultivado em meio líquido para uma fermentação em pequena escala, totalizando deste modo 156 extratos brutos.

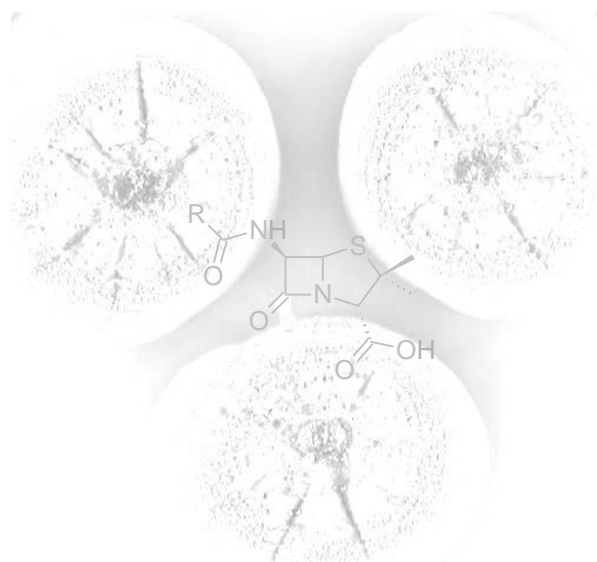
Um total de 28 extratos selecionados foram enviados a testes anticâncer na UFC e antioxidante e antiacetilcolinesterase na USP de Ribeirão Preto sendo empregadas em alguns dos testes mais de uma metodologia. Uma série de extratos apresentaram atividades nestes testes, sendo então selecionados os fungos mais promissores para cultivos em larga escala de modo a realizar-se os estudos químicos.

As linhagens de *Penicillium* sp. PBR 2.2.2 e PBR 2.1.1.a e a linhagem de *Gliocladium* sp. Stsp CR 2.3.1 foram cultivadas em larga escala, e dos estudos químicos de seus extratos foram isoladas um total de 14 substâncias, entre elas alcalóides, esteróides, fenóis e açúcares e o ácido cítrico. Ainda a linhagem Stsp CC1-2/1-1 b 02 cultivada em pequena escala proporcionou o isolamento em grande quantidade da micotoxina ácido kójico. A substância β -naftol isolada de PBR 2.1.1.a é descrita pela primeira vez como um produto natural, ao passo que os dados de RMN 2D (HMBC, COSY, HSQC) além de NOE dos alcalóides glandicolina B e *ciclo-(Glicil-L-tirosil)* 4,4-dimetilalil éter são inéditos pois estas substâncias haviam sido reportadas anteriormente uma vez cada uma na literatura.

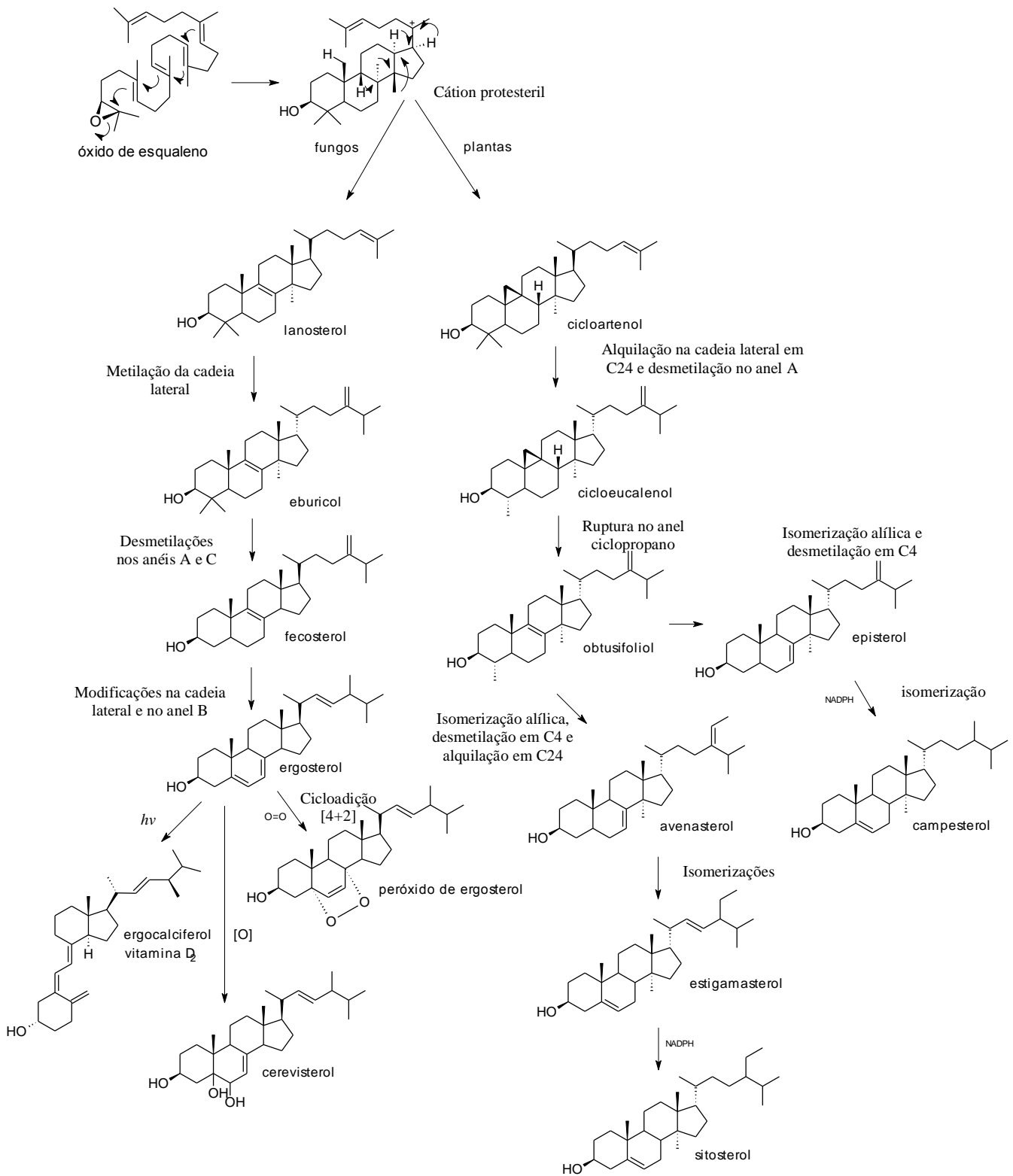
O estudo fitoquímico das raízes de *M. flexuosa* foram realizados tanto para as raízes submersas como para as raízes de sustentação, o que levou ao isolamento de 10 substâncias entre elas esteróides, flavonóides e triterpenos, a amostra 22 indicou se tratar de um triterpeno inédito na literatura, porém diferenças nos dados de massas e RMN sugerem uma determinação estrutural incompleta, o que nos levou a apenas sugerir uma estrutura provisória, mais análises incluindo difração de raios-X e cálculos teóricos estão sendo desenvolvidos em parceria com a UFSCar de modo a se determinar totalmente a amostra 22.

Um estudo estatístico foi realizado com alguns extratos selecionados de fungos endofíticos de modo a se avaliar o perfil químico destes fungos e assim por meio de cinco metodologias diferentes de agrupamentos de dados obteve-se diferentes dendrogramas e estes foram avaliados em comparação com os perfis químicos, duas moléculas em experimentos por MS/MS, foram propostas (questinol e brefeldina A) em comparação com dados da literatura, também foram avaliados os perfis de *Strychnos cf. toxifera* com o de seus fungos sendo encontradas semelhanças em uma linhagem.

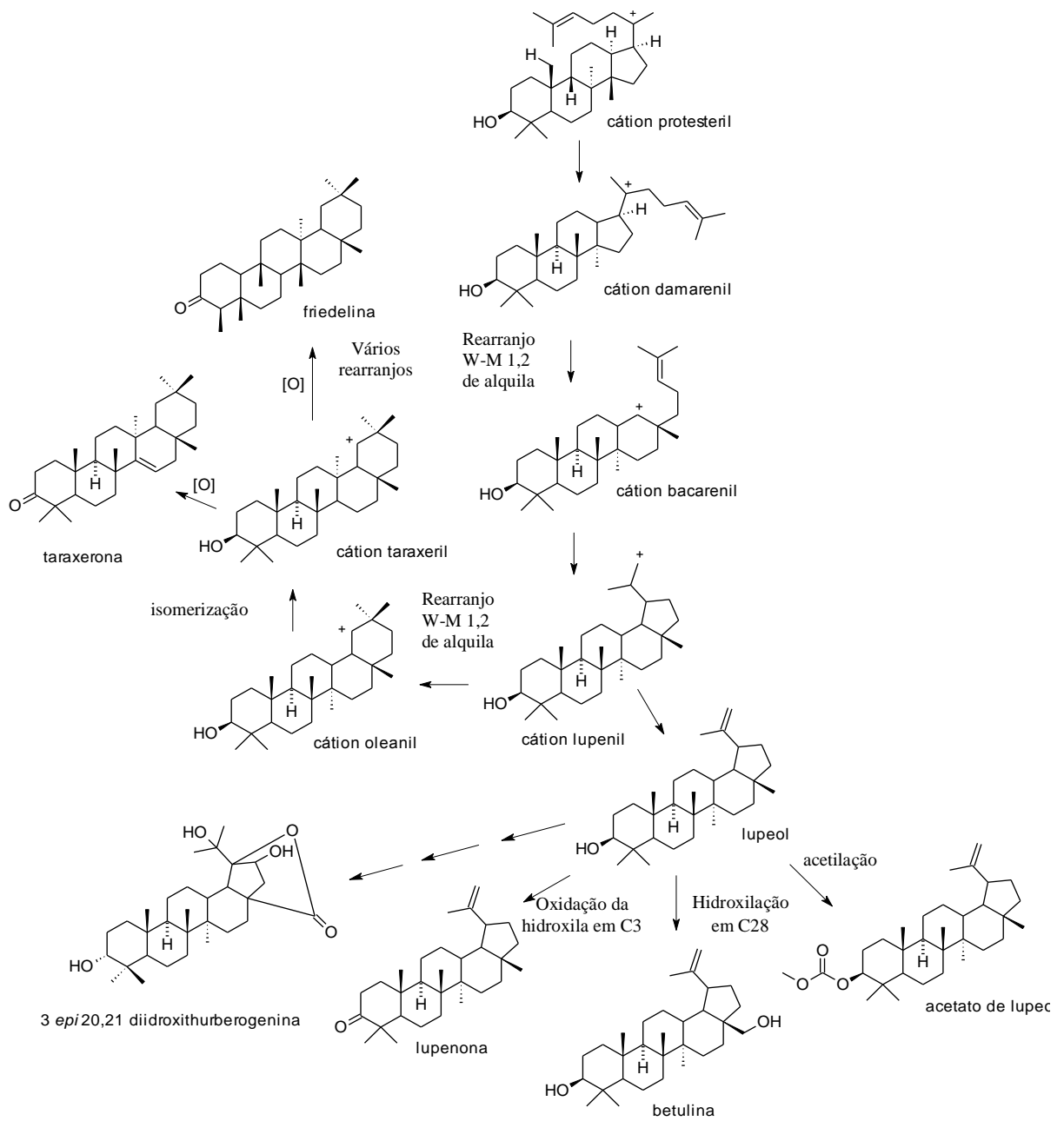
6. BIOGÊNESE DAS MOLÉCULAS ISOLADAS



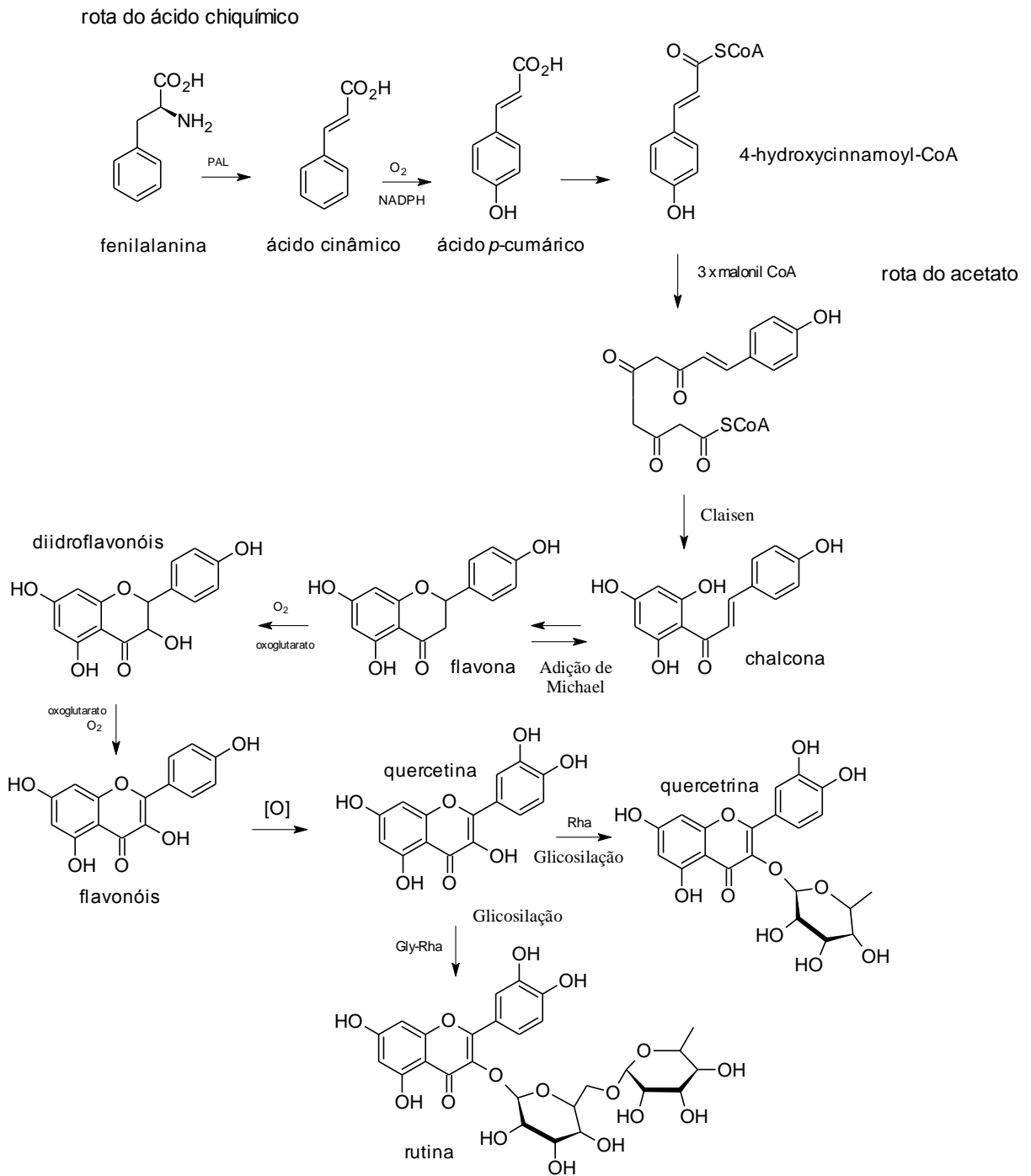
6.1. Esteróides.



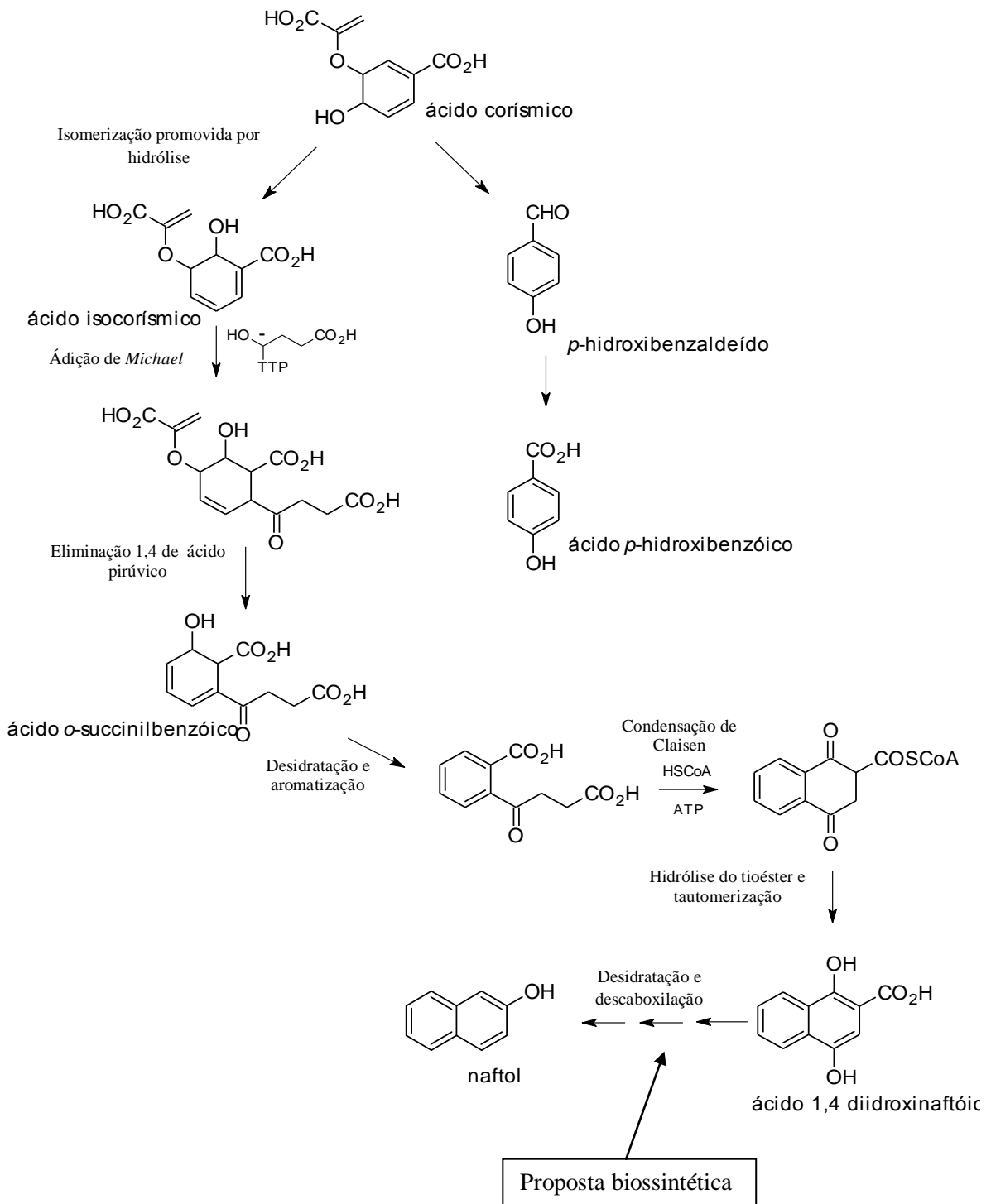
6.2. Triterpenos.



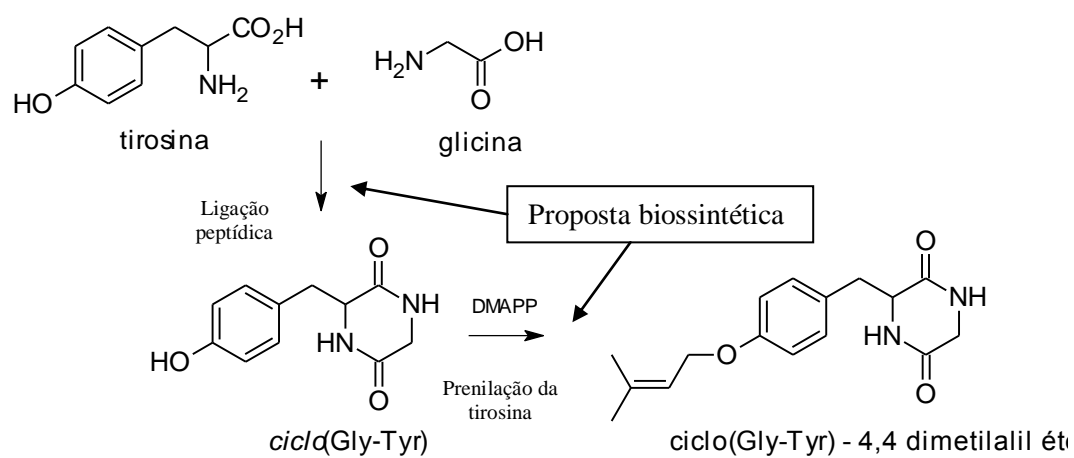
6.3. Flavonóides.



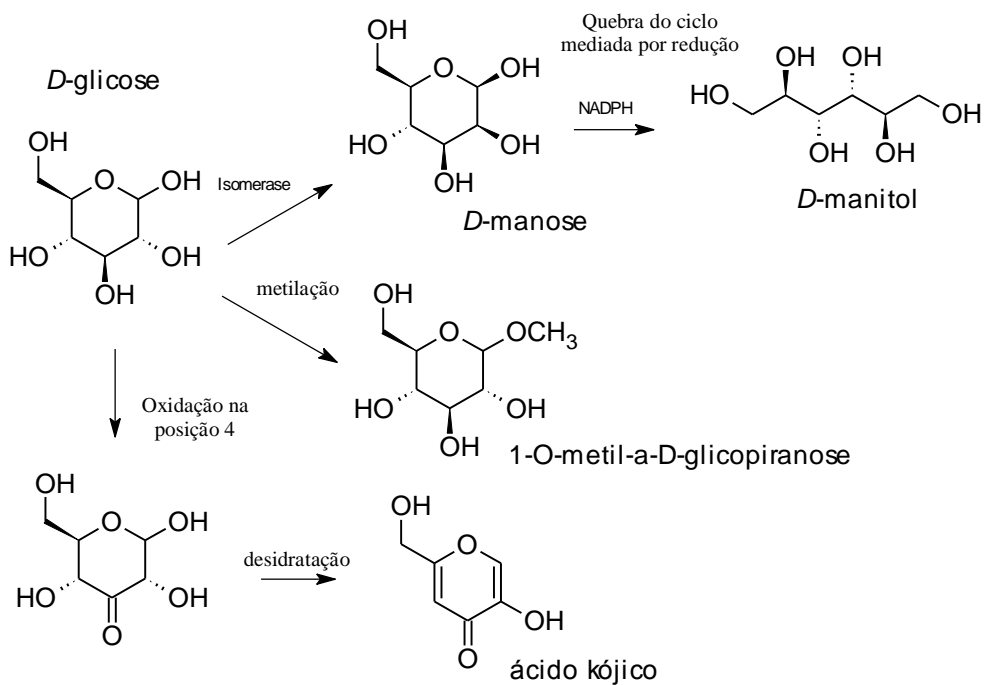
6.4. Outras substâncias fenólicas.



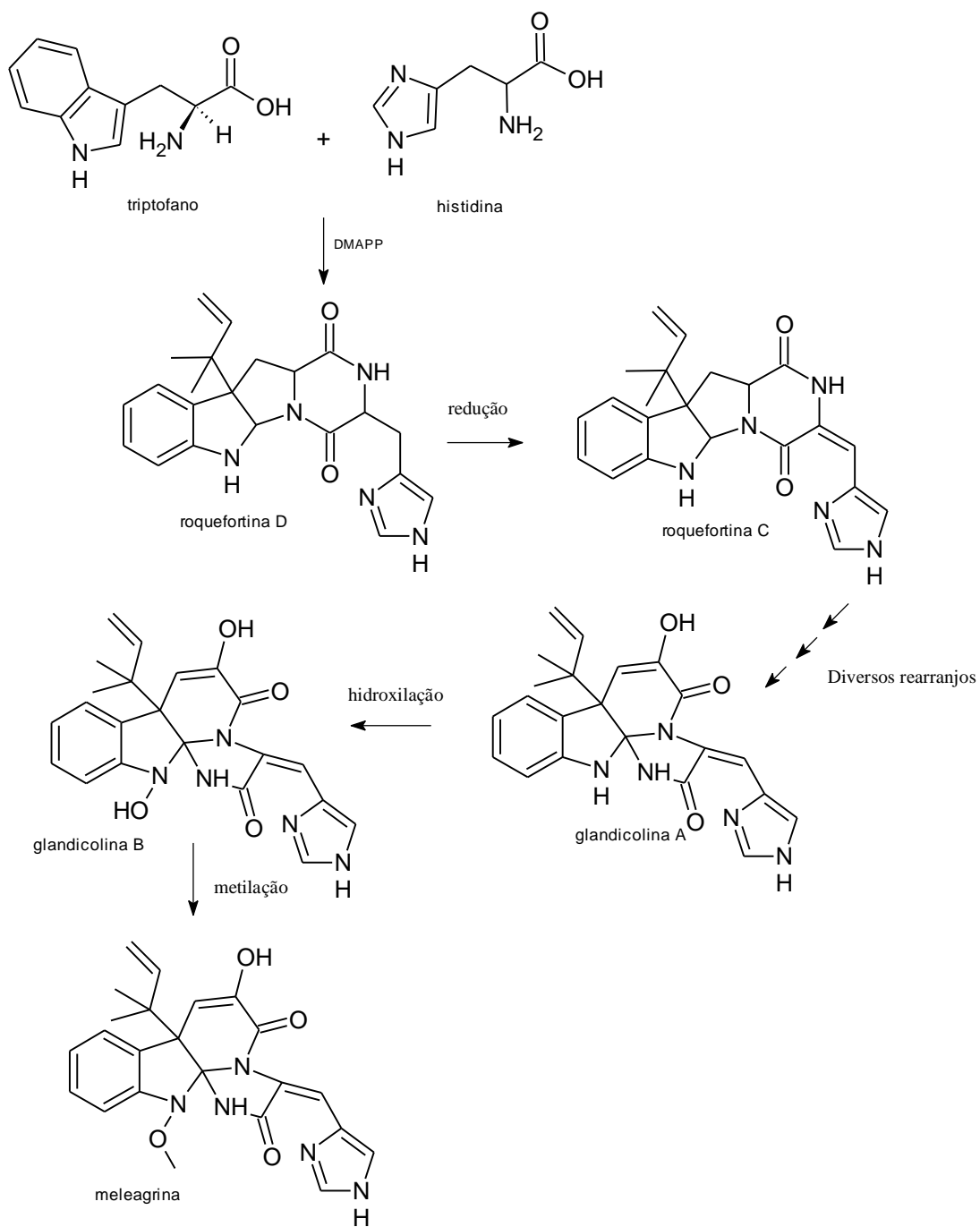
6.5. Alcalóide dicetopiperazínico.



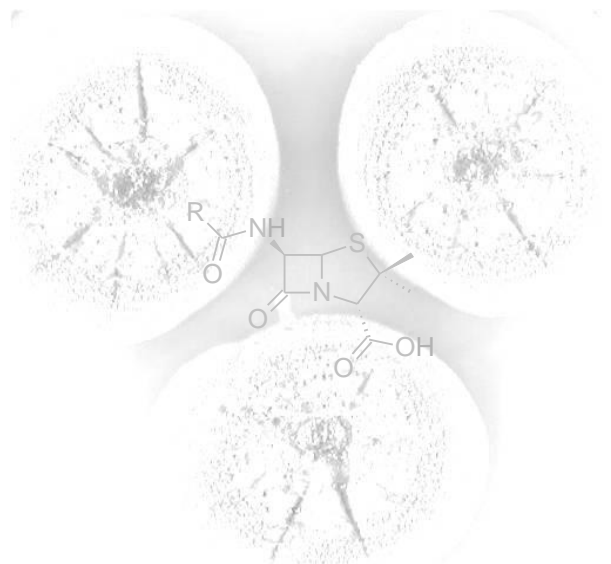
6.6. Açúcares e micotoxina ácido kójico.



6.7. Alcalóide indólico.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ALEXOPOULOS, C. J & MIMS, C.W. *Introductory Mycology*. 4^a ed. Nova York, J. Wiley & Sons, 1996.
- ANGENOT, L.; BELEM, M. L. B.; IMBIRIBA, R. A. F.; LECCLERC, J.; WARIN, J. An indolinic cryptoalkaloid from *Strychnos mattogrossensis*. *Phytochemistry* 29: 2746-2749. 1990.
- AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de genética; São Paulo – SP.; 280p. 1973.
- BAJPAI, P.; AGRAWALA, P.; VISHWANATHAN, L. Enzymes relevant to kojic acid biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Journal of General Microbiology* 127: 131-136. 1981.
- BIREN, K. J.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. New Verticillin and Glisoprenin Analogues from *Gliocladium catenulatum*, a Mycoparasite of *Aspergillus flavus* Sclerotia. *Journal of Natural Products* 62: 730-733. 1999.
- BLACKWELL, M. 2000. Enhanced: Terrestrial Life-Fungal from the start? *Science*, 289: 1884-1885.
- BOLLAG, D. M., McQUENEY, P. A. & ZHU, J. 1995. Epothilones, a new class of microtubule stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Research*, 55: 2325–2333
- BOYSEN, M; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J. C.; ROSSEN, L. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetics and biochemical profiles. *Mycobiology* 142: 541-544. 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technology* 28: 25-30. 1995.
- BRINGMANN, G.; LANG, G.; GULDER, A. M.; TSURUTA, J.; MAKSIMENKA, K.; STEFFENS, S.; SCHAUMANN, K.; STOHR, R.; WIESE, J.; IMHOFF, J.; BOREIKO, O.; MULLER, E. G. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysognum* strain. *Tetrahedron* 61: 7252-7265. 2005.
- BOK, J. W.; LERMER, L.; CHILTON, J.; KLINGEMAN, H. G.; TOWERS, N. G. H. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51: 891–98. 1999.
- BUBNI, T. S.; BERNAN, V. S.; GREENSTEIN, M.; JANSO, J. E.; MAIESE, W. M.; MAYNE, C. L.; IRELAND, C. M. Brocaenols A-C: novel polyketides from a marine derived *Penicillium brocae*. *Journal of Organic Chemistry* 68: 2014-2017. 2003.
- CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.; WILLIAMSON, P.; RODRIGUES, M. L. 2009. Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends in Microbiology* 17: 158-162.

- CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in destiled water. *Journal of Tropical Medicine Hygiene* 42: 225-228. 1939.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos uma ferramenta de busca por substâncias bioativas. *Química Nova* 32: 175-187. 2009.
- CARROLL, G. C. 1988. Fungus endophytes in steams and larvae: from latent pathogens to mutualistic symbiot. *Ecology*, 69: 2-9.
- CHATURVEDULA, V. S.; SCHILLING, J. K.; JOHNSON, R. K.; KINGSTON, D. G. New cytotoxic lupine triterpenoids from the twigs of *Coussarea paniculata*. *Journal of Natural Products* 66: 419-422. 2003.
- CHEN, I. H.; DU, Y. C.; LU, M.; LIN, S.; HSIEH, H. P.; WU, C. C.; CHEN, S.; YEN, H.; CHANG, F.; WU, Y. Lupane-Type triterpenoids from *Microtropis fokienensis* and *Perrottetia arisanensis* and the apoptotic effect of 28-Hydroxy-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al. *Journal of Natural Products* 71: 1352-1357. 2008.
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. 2006. Drugs discovery from natural sources . *AAPS Journal*, 8: 239-253.
- CHO, J.; MOON, J.; SEONG, K.; PARK, K. Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid and *trans* 4-Hydroxycinnamic Acid Isolated and Identified from Rice Hull. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 11: 2273-2276. 1998.
- CLAY, K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology* 69: 10-16.
- DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; EZRA, D., CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor vitigenus*, sp. nov., an endophyte from *Paullinia*. *Mycotaxon* 84: 39-50. 2002.
- DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. 2004. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. *Infarma*, 16: 71-76.
- DE MEDEIROS, L. S. Estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos associados às frutas banana, pêra e goiaba. São Carlos 164p. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.
- DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The journal of antibiotics* 62: 5-16.
- DEY, P.M.; HARBORNE, J. B.; *Methods in Plant Biochemistry*; 3^a ed. Academic Press, Inc., San Diego, 556p. 1993.

DJERASSI, C.; BURSTEIN, B.; ESTRADA, E.; GROSSMAN, J.; HERRÁN, J.; LEMIN, J.; MANJARREZ, A.; PAKRASHI, S. Terpenoids. XXII . Triterpenes from some Mexican and South American plants. *Journal of the American Chemical Society* 77: 5330-5336. 1955.

DJERASSI, C.; HODGES, R. Terpenoids. XXIII. Interconversion of Thurberogenin and Betulinic Acid. *Journal of the American Society* 78: 3534-3538. 1956.

DOBEREINER, J; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F. 1993. Endophytic diazotropic in sugar cane, cereals and tuber plants In: Palacios, R.; Mora, J.; Newton, W.F., ed. *New Horizons in nitrogen fixations*. 1993. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993 p 671-676.

DONG, J.; LI, R. Z.; ZHANG, K. *Four nematocidal metabolites of Gliocladium roseum 1A*. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* 31: 232-236. 2006.

DU, L.; LI, D; ZHU, T.; CAI, S.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q. New alkaloids and diterpenes from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp. *Tetrahedron* 65: 1033-1039. 2009.

ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-93. 1961.

EYBERGER, A.M.; DONPADATI, R.; PORTER, J.R. 2006. Two endophyte fungal Isolates from *Podophyllum peltatum* Produce Podophyllotoxin. *Journal of natural products* 68:1121-1124.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMAN, E.; LEQUERC, J. Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry* 12: 707-715. 2001.

FAETH, S; HAMONN, K. 1997. Fungal endophytes in OAK threes: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology* 78: 820-827.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; AND SVENDSEN, J.A. Simple screening method for pure mould producing intra cellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 581-585. 1983.

FINNEY, D. J. Probits analysis. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 77p. 1974.

FOKKEMA, N. J. J.; VAN DEN HEUVAL, J. (Ed.). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: University Press Cambridge, 1986. p. 175-187.

FREDERICH, M.; DEPAUW, M. C.; LLABRES, G.; TITS, M.; HAYETTE, M. P.; BRANDT, V.; PENELLE, J.; DEMOL, P.; ANGENOT, L. New antimalarial and cytotoxic sungucine derivatives from *Strychnos icaia* roots. *Planta Medica* 66: 262-269. 2000.

- FRISVAD, J.C. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of metabolites of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography A* 392: 333-347. 1987.
- FUJII, Y.; ASAHARA, M.; ICHINOE, M.; NAKAJIMA, H. Fungal melanin inhibitor and related compounds from *Penicillium decumbens*. *Phytochemistry* 60: 703-708. 2002.
- FUJIMOTO, H.; NAKAYAMA, Y.; YAMAZAKI, M. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42: 694-697. 1994.
- FULGENTIUS, N.; LUGEMWA, T.; HUANG, F. H.; BENTLEY, D.; ALFRODX, R. A *Heliothis zea* Antifeedant from the abundant birchbark triterpen betulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 494-496. 1990.
- GALOTTA, A. L. Q. A. Estudo químico e farmacológico da espécie *Euterpe precatoria* (Martiu) Arecaceae. Belo Horizonte 340p. Tese de Doutorado em Química – Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.
- GALOTTA, A. L. Q. A.; LIMA, L. A. R.; BOAVENTURA, M. A. D. Antioxidant and cytotoxic activities of Açaf *Euterpe precatória*. *Química Nova* 31: 1427-1430. 2008.
- GALM, U.; SHEN, B. 2007. Natural product discovery: the times have never been better. *Chemistry & biology*. 14: 1098-1104.
- GARCIA, A.; FULTON, J. The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatologic Surgery* 22: 443-447. 1996.
- GE, H. M.; SHEN, C.; ZHU, H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidan metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. *Phytochemistry* 69: 571-576. 2008.
- GERIS DOS SANTOS, R. M.; RODRIGUES FILHO, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 61: 907-912. 2002.
- GERTH, K., BEDORF, N. & HOFLE, G. 1996. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria): production, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 49: 560-563.
- GROVE, J. F.; MOFFATT, J. S.; VISCHER, E. B. Viridin. I. Isolation and characterization. *Journal of the Chemical Society* 3803-3811. 1965.
- GULLO, V.P.; McALPINE, J.; LAM, K.S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. 2006. Drug discovery from natural products . *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 33: 523-531.

GUO, H.; HU, H.; LIU, S.; ZHOU, Y.; CHE, Y. Bioactive *p*-Terphenyl Derivatives from a *Cordyceps*-Colonizing Isolate of *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products* 70: 1519-1521. 2007.

GUNATILAKA, A.A.L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity bioactivity and implications of their occurrence. *Journal of natural products* , 69: 509-526.

HANSEN, S. H.; JENSEN, A. G.; CORNETT, C.; TAYLOR, S.; WILSON, I. D. High performance liquid chromatography on-line coupled to high-field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum* L. *Analytical Chemistry* 71: 5253-5241. 1999.

HAWKSWORTH, D. L. 1991. The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, Significance and Conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L.; ROJAS, M. C.; CARRERA, E.; TUDZYNSKI, B. 2001. Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution?. *Journal of plant Growth Regulation* 20: 319-331.

HOEKSTRA R. F. 2004. Population genetics of filamentous fungi` *Antonie van Leeuwenhoek* 65: 199-204.

HORAK, R. M.; MAHARAJ, V. J.; MARAIS, S. F.; HEERDEN, F. R.; VLEGGaar, R. Stereochemical studies on the biosynthesis of viridicatumtoxin: Evidence for a 1,3-hydride shift in the formation of the spirobicyclic ring system. *Journal Chemical Society, Chemical Communication* 23: 1562-1564, 1988.

IGARASHI , Y.; KUWAMORI, Y.; TAKAGI, K.; ANDO, T.; FUDOU, R.; FURUMAI, T.; OKI, T. Xanthoepocin, a New Antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IFO5762. *The journal of antibiotics* 53: 928-933. 2000.

IHARA, M.; FUKUMOTO, K. Recente progress in the chemistry of non-monoterpenoid indole alkaloids. *Natural Products Reports* 12: 277-301. 1995.

KAWAGISHI, H.; KATSUMI, R.; SAZAWA, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Citotoxic steroids from the mushroom. *Agaricus blazei*. *Phytochemistry* 27: 2777-2779. 1988.

KAWAI, K.; NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.; IITAKA, Y. Studies of fungal products. VII The structures of meleagrins and 9-O-*p*-bromobenzoylmeleagrins. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 32: 94-98. 1984.

KEEN, N.T.; HOLLIDAY, M.J.; YOSHIKAWA, M. 1982. Effects of Glyphosate on Glyceollin Production and the expression of resistance to *Phytophthora megasperma* Fsp Glycinea in Soybean. *Phytopathology* 72:1467-1470.

KIRBY, G. W.; ROBINS, D.; SEFTON, M.; RATNAKER, R. Biosynthesis of bisdethiobis(methylthio)gliotoxin, a new metabolite of *Gliocladium deliquescens*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 119-121. 1980.

- KIRBY, G. W.; RAO, G. V.; ROBINS, J. R. New Co-metabolites of Gliotoxin in *Gliocladium virens*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 30-31. 1988.
- KLASS, J.; TINTO, W. Friedelane triterpenoids from *Perzassa compta*: Complete ^1H and ^{13}C assignments by 2D NMR spectroscopy. *Journal of Natural Products* 55: 1626-1630. 1992.
- KOHNO, J.; NISHIO, M.; SAKURAI, M.; KAMEDA, N.; KISHI, N.; OKUDA, Y.; KOMATSUBARA, S. Isolation and Structure Determination of TMC-151s: Novel Polyketide Antibiotics from *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abbott TC 1280. *Tetrahedron* 55: 7771-7786. 1999.
- KOZLOVSKY, A. G.; VINOKUROVA, N. G.; ADANIN, V. M.; BURKHARDT, G.; DAHSE, H.; GRAFE, U. New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *Journal of Natural Products* 63: 698-700. 2000.
- KOWALSKI, R. J., GIANNAKAKOU, P. & HAMEL, E. 1997. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol). *Journal of Biological Chemistry*, 272: 2534–2541.
- KOYAMA, K.; AKIBA, M.; IMAIZUMI, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; WATANABE, K. Antinociceptive constituents of *Auricularia plytricha*. *Planta Medica* 68: 284-285. 2002.
- KOYAMA, K.; YAMA, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K. New triterpens from Cactaceous plants. *Journal of Natural Products* 56: 2201-2203. 1993.
- KOZLOVSKY, A. G.; VINOKUROVA, N.; RESHETILOVA, T. A.; SAKHAROVSKY, V. G.; BASKUNOV, B. P.; SELEZNYOV, S. G. New metabolites of *Penicillium glandicola* var. *glandicola* – glandicolin A and B. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia* 30: 410-414. 1994.
- KROHN, K.; KOUAM, S.; BRANDT, S.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Bioactive Nitronaphthalenes from an Endophytic Fungus, *Coniothyrium* sp. and Their Chemical Synthesis. *European Journal of Organic Synthesis* 3615-3618. 2008.
- LAI, S.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K.; FURUKAYA, H. Three new phenolic metabolites from *Penicillium* species. *Heterocycles* 32: 297-305. 1991.
- LAM, K. S. 2007. New aspects of natural products in drugs discovery. *Trends in microbiology*.15: 279-289.
- LANG, G.; MITOYA, M.; ELLIS, G.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J.; CUMMINGS, N. J. Bioactivity Profiling Using HPLC/Microtiter-Plate Analysis: Application to a New Zealand Marine Alga-Derived Fungus, *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products* 69: 621-624. 2006.

- LARSEN, T. O.; FRISVAD, J.; CHRISTOPHERSEN, C. Arabenoic acid (Verrucolone), a major chemical indicator of *Penicillium verrucosum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 463-465. 1998.
- LEVEAU, J. 2009. Microbiology: Life on leaves. *Nature* 461: 741-742.
- LI, J. Y.; SIDHU, R. S.; BOLLON, A.; STROBEL, G. A. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycological Research* 102: 461-464. 1998.
- LI, X.; JEONG, J. H.; LEE, K. T.; RHO, J. R.; CHOI, H. D.; SON, B. W. 7-pyrone derivatives, kojic acid methyl ethers from marine derived fungus *Alternaria* sp. *Archives of Pharmacological Research* 26: 532-534. 2003.
- LI, J. Y.; SIDHU, R. S.; BOLLON, A.; STROBEL, G. A. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycological Research* 102: 461-464. 1998.
- LINDEQUIST, U.; LESNAU, A.; TEUSCHER, E.; PILGRIM, H. Antiviral activity of ergosterol peroxide. *Pharmazie* 44: 579-80. 1989.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MADEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C. & FERREIRA, E. 2004. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. Nova Odessa, Plantarum.
- LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science* 151: 67-73.
- MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia* 75: 451-456. 2004.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37: 1517-1575. 1994.
- MALINOWSKI D. P.; BELESKY N. S.; HILL. A. B.; BALIGAR, V. C.; FEDDERS, J. M. 1998. Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum* infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and soil* 198: 53-61.
- MAYER, A. M. 1989. Plant-Fungal Interactions: A Plant Physiologists Viewpoint. *Phytochemistry*, 28: 311-317.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Esterides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endoítico isolado de dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Química Nova* 32: 1710-1712. 2009.

- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC Bioautographic method for the detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51–54. 2002.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Ecologia Microbiana 1ª Ed. Jaguariúna. Embrapa. 1998.
- MENSOR, L. L.; FABIO, S. M.; GILDOR, G. L.; ALEXANDER, S. R.; TEREZA, C. D.; CINTIA, S. C.; SUZANE, G.L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15: 127-130. 2001.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for activity plant constituents. *Planta Medica* 45: 31-34. 1982.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65: 55-63. 1983.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70: 461-477.
- NIELSEN, K. F.; DALSGAARD, P. W.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, O. Andrastins A– D, *Penicillium roqueforti* Metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2908-2912. 2005.
- NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*. 1002: 111-136. 2003.
- NIETO, I. J.; CHEGWIN, C. A. Triterpenoids and fatty acid acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-cajú*. *Journal of the Chilean Chemical Society* 53: 1515-1517. 2008.
- OVERY, D. P.; FRISVAD, J.C. New *Penicillium* species associated with bulbs and root vegetables. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 631-639. 2003.
- OVERY, D. P.; NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium* ser. *Corymbifera*: In *Planta* production and implications for competitive fitness. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2373-2390. 2005.
- PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; LEITE, B.; SCHAWN-ESTRADA, K.R.F. 1998. Mecanismos de Patogenicidade em fungos. *Revisão anual de Patologia de plantas* 6: 1-47.
- PASSOS, M. A. B.; MENDONÇA, M. S. 2006. Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) em três fases de desenvolvimento. *Acta Amazônica* 36: 431-436.

PEEN, J.; SWIFT, R.; WIGLEY, L. J.; MANTLE, P. G.; BILTON, J. N.; SHEPPARD, R. N. Janthitrem B and C, two principal indole diterpenoids produced by *Penicillium janthinellum*. *Phytochemistry* 32: 1431-1434. 1993.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. Vol 1. São Paulo, Mc Graw-Hill, 1981.

PETRINI, O.; CARROL, G. 1981. Endophytic fungi in foliage of some cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany*, 59: 629-636.

PETRINI, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In:

PETRINI, O. 1991. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. *Microbiol ecology of leaves* springer. New York: Springer-Verlag, 1991. cap. 9, p. 179-197.

PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. 1992. Ecology, Metabolite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi. *Natural Toxins* 1: 185-196.

PHILLIPE, G.; ANGENOT, L.; MONIQUE, T.; MICHEL, F. 2004. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. *Toxicon* 44: 405-416.

PHIPPS, R. K.; PETERSEN, B. O.; CHRISTENSEN, K. B.; DUUS, J. O.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Hesseltin A, a novel antiviral metabolite from *Penicillium hesseltinei*. *Organic Letters* 6: 3441-3443. 2004.

PITT, J.I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, New York, Academic Press.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TANTICHAROEN, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). *Tetrahedron Letters* 46: 1341-1344. 2005.

POON, G.K.; BISSET, G.M.F.; MISTRY, P. Electrospray ionization mass spectrometry for analysis of low-molecular-weight anticancer drugs and their analogues. *Journal of the American Chemical Society for Mass Spectrometry*. 4: 588-595. 1993.

POUCHERT, C.J.; BEHNKE, J. 1993. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra. Aldrich Chemical Company, Milwaukee.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. 2007. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Química Nova*, 30: 1446-1455.

PURI, S.; NAZIR, A.; CHAWLA, R. 2006. The endophytic fungi *Trametes hirsute* as a novel Alternative Source of Podophyllotoxin and related Aryl Tetralin Lignans. *Journal of Biotechnology* 122: 494-510.

QIN, Y.; WANG, C.; GIANFAGNA, T. J.; MEYER, A. W. 2001. Volatile compounds of endophyte-free and infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Phytochemistry* 58: 935-941.

- RAJAKUMAR, K.; GREENSPAN, S. L.; THOMAS, S. B.; HOLICK, M. F. Solar ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *American Journal of Public Health* 97: 1746-1754. 2007.
- REDONDO, C.; CUBERO, J.; MELGAREJO, P. Characterization of *Penicillium* Species by Ribosomal DNA Sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR Analysis. *Mycopathologia* 168: 11-22. 2009.
- REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625-634. 1994.
- REN, H.; TIAN, L.; GU, Q.; ZHU, W. Secalonic acid D; A cytotoxic constituent from marine lichenderived fungus *Gliocladium* sp. T31. *Archives of Pharmacal Research* 29: 59-63. 2006.
- RHEE, K.; VAN RIJN, R. M.; VERPOORTE, R. Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. *Phytochemical Analysis* 14: 127-131. 2003.
- ROBERTS, C. W.; MCLEOD, R.; RICE, D. W.; GINGER, M.; CHANCE, M. L.; GOAD, L. J. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular Biochemical Parasitology* 126: 129-142. 2003.
- RULL, V. Biogeographical and evolutionary considerations of *Mauritia* (Arecaceae), based on palynological evidence. *Review of Paleobotany and Palynology* 100: 109-122. 1998.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interections with host plants. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 29: 319-343.
- SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; STANLEY, H.F. 2004. Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science* 9: 275-280
- SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H.; OHKI, T. 6 β -hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus*. *Phytochemistry* 22: 2553. 1983.
- SARAIVA, R. C.; PINTO, A. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Triterpenos e alcalóide do tipo cantinona dos galhos de *Simaba polyphylla* (Cavalcante) W.W. Thomas (Simaroubaceae). *Química Nova* 29: 264-268. 2006.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109: 661-686.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.K.; KROHN, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.

- SHIRANE, N.; TAKENAKA, H.; UEDA, K.; HASHIMOTO, Y.; KATOH, K.; ISHII, H. Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* 41: 1301-1308. 1996.
- SILVA, M. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; LIMA, C. A. H.; SANNOMIYA, S.; VILEGAS, W. 2005. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. *Revista brasileira de Farmacognosia* 15: 256-267
- SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; ANDRADE, L. R. M.; JUNQUEIRA, N. T. V. Frutas do Cerrado. 2001. Brasília. Embrapa.
- SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. *Química Nova* 21: 702-704. 2000.
- SMEDSGAARD J.; FRISVAD, J. C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *Journal of Microbiological Methods* 25: 5-17. 1996.
- SMEDSGAARD, J.; HANSEN, M. E.; FRISVAD, J. C. Classification of Terverticillate Penicillia by electrospray mass spectrometric profiling. *Studies in Mycology* 49: 243-251. 2004.
- SMEDSGAARD, J. Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts. II. Database and identification. *Biochemical Systematic and Ecology*. 25: 65-71. 1997.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. L.; MOURA, M. I.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* 34: 185-195. 2004.
- SOUZA, A. D. L. Estudo fitoquímico de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). Manaus 106p. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Federal do Amazonas, UFAM.
- SOUZA, A. D. L. Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros *Eutypa*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis* isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Strychnos cogens*, *Pinus taeda* e *Gustavia* cf. *elliptica*. São Carlos 302p. Tese de Doutorado em Ciências – Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.
- SOUZA, M.V.N. 2004. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química nova*, 27: 308-312.
- STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67: 257-268.

STROBEL, G.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. 1996. Taxol from fungal Endophytes and the Issue of Biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17: 417-423.

STROBEL, G. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535-544.

SUGA, T.; KONDO, S. Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*. *Phytochemistry* 13: 522. 1974.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, M. B.; GOVINDARAJULU, F.; SASSE, R. J.; MURALI, T. S. 2009. Fungal endophytes and biospecting. *Fungal Biology Reviews* 30: 1-11.

TABACCHI, R.; FKYERAT, A.; POLIART, C.; DUBIN, G. Phytotoxins from fungi of esca of grapefruit. *Phytopathology Mediterraneum* 39: 156-161. 2000.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition* 131: 1409-1413. 2001.

WANG, F. W.; HOU, E. Z.; WANG, P. L.; SHI, D. H. Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. *World Journal of Microbiology and Biothechnology* 24: 2143-2147. 2008.

WANI, M. C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGOON, P.; McPHAIL, A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93: 2325-2327.

WARDLAY, I. F. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist*. 116: 341-381.

WELTRING, K.M.; WASSELS, J.; PAULI, G.F. 1998. Metabolism of the tomato Saponin α -Tomatine by *Gibberlla pulicaris*. *Phytochemistry* 48: 1321-1328.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. Negatively charged flavones and tricin as chemosystematic markers in the Palmae. *Phytochemistry* 12: 2417-2430. 1973.

WU, C.; FENG, P.; TSAI, L.; EL-RAZEK, M.; HUANG, H.; CHEN, I. Secondary metabolites from the roots of *Engelhardia roxburghiana* and their antitubercular activities. *Phytochemistry* 68: 1338-1343. 2007.

XU, M.; GRESSNER, G.; GROTH, I.; LANGE, C.; CHRISTNER, A.; BRUHN, T.; DENG, Z.; LI, X.; HEINEMANN, S. H.; GRABLEY, S.; SATTLEBER, I. 2007. Shearinines D–K, new indole triterpenoids from an endophytic *Penicillium* sp. (strain HKI0459) with blocking activity on large-conductance calcium-activated potassium channels. *Tetrahedron* 63: 435-444.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KANNO, H.; KAMINAGA, T.; IZUMIDA, M.; SAKOH, T.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **19**: 573–576. 1996.

YUE, J. M.; CHEN, J.; LIN, Z.; SUN, H. D. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry* **56**: 801-806. 2001.

ZHAO, K., ZHOU, D., PING, W. & GE, J. 2004. Study on the preparation and regeneration of protoplast from taxol-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*. *Natural Science*, **2**: 52–59.

ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; KOZLOVSKY, A. G. Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology* **79**: 277-286. 2010.

ZOBERI, M.H. *Tropical macrofungi* 1^a Ed. London, The McMillan Press, 1972.