

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

**Estudo de sorbicilinoídes e outros metabólitos de *Penicillium chrysogenum*  
isolado de *Gustavia* sp.**



**AIRI DOS SANTOS SOUSA**

**MANAUS**

**2018**

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

**Estudo de sorbicilinoídes e outros metabólitos de *Penicillium chrysogenum*  
isolado de *Gustavia* sp.**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Química  
da Universidade Federal do Amazonas  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Química, com área  
de concentração em Química Orgânica.

**Airi dos Santos Sousa**

**Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza**

**Co-orientadora: Dra. Maria de Fátima Oliveira Almeida**

**MANAUS**  
**2018**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725e Sousa, Airi dos Santos  
Estudo de sorbicilinoídes e outros metabólitos de *Penicillium chrysogenum* isolado de *Gustavia* sp. / Airi dos Santos Sousa .  
2018  
94 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza  
Coorientadora: Maria de Fátima Oliveira Almeida  
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Penicillium chrysogenum*. 2. Sorbicilinoídes. 3. Atividade antiglicação. 4. Éter tetrahidrotricotidimero. I. Souza, Afonso Duarte Leão de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

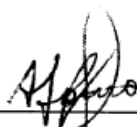
**“Estudos de sorbicilinoídes e outros  
metabólitos de *Penicillium chrysogenum*  
isolado de *Gustavia sp.*”**

**Airi dos Santos Sousa**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 11 de maio de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



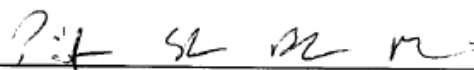
---

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientador



---

Prof.ª Dr.ª Camila Martins de Oliveira  
Membro Externo/ICET-UFAM



---

Prof.ª Dr.ª Patrícia Santana Barbosa Marinho  
Membro Externo/UFPA

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 11 de maio de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e por todas as oportunidades e pessoas, que foram verdadeiros anjos, colocados em meu caminho.

A minha família, em especial minha mãe, Cleuci Santos, pela força, compreensão, carinho, incentivo, por ser um exemplo de mulher guerreira, por me dar a vida e acreditar em mim.

Aos meus amigos, pelas risadas, desabafos e companheirismo, em especial a Bruna Lima e Elzalina Soares que me ensinaram, ajudaram e acompanharam em diversas situações ao longo desses anos, a Paula Suellen que me deu força, incentivou a seguir a área da pesquisa e esteve comigo do início ao fim dessa jornada, a Karem Maciel, Karem Castelo, Yara Lins, Weider Henrique, Rodolfo Oliveira e Berna Souza, pelos momentos de estudos e tensão passados.

A todos do LABCEM, LABMICRA, LAEQ, NMR-LAB e Central Analítica aos que passaram e aos que permaneceram nessa caminhada, e aos colaboradores por compartilharem dúvidas, problemas, conselhos, soluções e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Emerson Lima e ao Msc. Leornad Acho pela colaboração e aprendizado nos ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza e a Dra. Maria de Fátima Oliveira Almeida pela orientação, paciência, compreensão, amizade e oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Agradeço também a Profa. Dra. Antonia Queiroz de Souza Lima pela sua contribuição e carinho.

A Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro e a Profa. Dra. Cecilia Nunez pelas contribuições feitas na defesa do plano de conhecimento.

A Prof. Dra. Patrícia Marinho e a Profa. Dra. Camila Oliveira pelas suas contribuições na defesa final da minha dissertação.

Ao Fabricio Fogassa pelo companheirismo, incentivo, força, carinho, risadas, desabafos, por acreditar em mim e não me deixar desistir.

A CAPES pela bolsa de estudo e a todos os que contribuíram de maneira direta ou indireta para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

*Penicillium chrysogenum* é um fungo filamentosos encontrado em diversos habitats inclusive em interior de células vegetais, como fungo endofítico. Essa espécie é bastante conhecida pela produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina e seus derivados, que são de grande importância para as indústrias farmacêuticas, além de serem produtores de crisogina, roquerfortina e sorbicilinoídes. Os sorbicilinoídes são relatados em sua maioria como dímeros, denominados bisorbicilinoídes, e são considerados como uma classe de substâncias com propriedades bioativas bastante acentuadas, tais como: citotóxicas, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, entre outras. Com o objetivo de aprofundar os estudos dos extratos do meio líquido da linhagem 401 de *P. chrysogenum*, isolada *Gustavia* sp., a qual produziu bisorbicilinoídes (trichodimentol, dihidrotrichodimerol e tetrahydrotrichodimerol), neste trabalho foram isolados por técnicas cromatográficas, além dos metabólitos citados anteriormente, outros metabólitos pertencentes a essa classe como o monômero 2',3'-dihidrosorbicilina e o dímero éter tetrahydrotrichodímero, relatado pela primeira vez no gênero *Penicillium*, o alcalóide crisogina e o ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico, todos identificados através das técnicas espectrométricas e espectroscópicas e confirmados por comparação com dados da literatura. Todas as substâncias isoladas foram submetidas pela primeira vez a ensaio de antiglicação. Destacam-se os bisorbicilinoídes éter tetrahydrotrichodímero, tricodimerol, tetrahydrotricodimerol, e o monômero 2',3'-dihidrosorbicilina que apresentaram excelente a moderada atividade antiglicante, inibindo a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) pelos dois sistemas ensaiados glioxal/BSA e frutose/BSA.

Palavras chaves: *Penicillium chrysogenum*, sorbicilinoídes, atividade antiglicação, éter tetrahydrotricodímero.

## ABSTRACT

*Penicillium chrysogenum* is a filamentous fungus, found in several habitats, including inside to plant cells, as endophytic fungus. This species is well known for the production of  $\beta$ -lactam antibiotics, such as penicillin and its derivatives, which are of great importance for the pharmaceutical industries, as well as producing crisogin, roquerfortina and sorbicillinoids. Sorbicillinoids are mostly reported as dimers, called bisorbicillinoids, and are considered as a class of substances with very accentuated bioactive properties, such as: cytotoxic, antiviral, antimicrobial, antioxidant, among others. In order to further study the extracts from the liquid medium of *P. chrysogenum* strain 401, isolated *Gustavia* sp., which produced bisorbicillinoids (trichodimerol, dihydrotrichodimerol and tetrahydrotrichodimerol), in this work were isolated by chromatographic techniques in addition to the aforementioned metabolites, other metabolites belonging to this class such as 2',3'-dihydrosorbicillin monomer and the tetrahydrotrichodimer ether dimer, this late reported for the first time in the genus *Penicillium*, the alkaloid chrysogine and N-(2-hydroxypropanoyl)-2-aminobenzoic acide amide, all identified by spectrometric and spectroscopic techniques and confirmed by comparison with literature data. All the isolated substances were submitted for the first time to the anti-glycation assay. Among the isolated main compounds are the bisorbicillinoids tetrahydrotrichodimer ether, trichodimerol, tetrahydrotrichodimerol, and the 2',3'-dihydrosorbicillin monomer, which exhibited excellent to moderate anti-glycation, inhibiting the formation of advanced glycation end products (AGEs) by the two systems tested glyoxal / BSA and fructose / BSA.

Key words: *Penicillium chrysogenum*, sorbicillinoids, anti-glycations activity, tetrahydrotrichodimer ether.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias bioativas isoladas de <i>P. chrysogenum</i> , descrito na literatura. ....	13
Figura 2. Micélio fúngico – imagem de microscopia eletrônica de <i>Penicillium</i> sp. ....	16
Figura 3. Crescimento de uma hifa a partir de um esporo.....	16
Figura 4. Estrutura do polímero de N-acetilglucosamina (complexo de quitina). ....	16
Figura 5. Produtos naturais anticancerígenos obtidos de plantas e de seus fungos endofíticos. ....	19
Figura 6. <i>P. chrysogenum</i> em seus diversos meios de crescimento. ....	21
Figura 7. Cultura de <i>P. chrysogenum</i> , conidióforos teverticillate (A) e quaterverticillate (B). ....	22
Figura 8. Ativação da sorbicilina a sorbicilinol (GRAVEL e POUPON, 2008). ....	22
Figura 9. Vias biossintética de dimerização do bisorbicilinol (10) e tricodimerol (11). ....	23
Figura 10. Substâncias bioativas pertencentes a classe dos sorbicilinoídes. ....	30
Figura 11. Vias de glicação avançada. I. hemoglobina glicada, II. via oxidativa. No fim todas levam a formação de produtos finais de glicação avançada: glioxal, metilglioxal e dimetilglioxal, entre outros. ....	32
Figura 12. Sistema de extração em fase sólida.....	35
Figura 13. Esquema do cultivo do fungo e obtenção dos extratos. ....	36
Figura 14. Esquema do fracionamento do extrato 1 – EMMML.....	37
Figura 15. Esquema do fracionamento da F1.....	38
Figura 16. Esquema do fracionamento da F1G.....	38
Figura 17. Esquema do fracionamento da fração F2.....	39
Figura 18. Esquema do fracionamento por CCD da fração F2A. ....	39
Figura 19. Esquema do fracionamento da fração F2J. ....	40
Figura 20. Espectro de íons totais (full scan) do EMMML de <i>P. chrysogenum</i> .....	42
Figura 21. Espectro de íons totais (full scan) da fração F1 do EMMML de <i>P. chrysogenum</i> .....	43
Figura 22. Espectro de íons totais (full scan) da fração F1G. ....	43
Figura 23. Cromatograma da amostra F1G em escala semipreparativa. ....	44
Figura 24. Espectro de massas de íons totais (full scan) da amostra F1G8/F2A1. ....	44
Figura 25. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da amostra F1G8/F2A1(500 MHz, MeOD). ....	45
Figura 26. Mapa de correlação HSQC da amostra F1G8/F2A1 (J <sup>1</sup> , <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H, 500 MHz, MeOD). ....	46
Figura 27. Mapa de correlação COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) (500 MHz, MeOD) da amostra F1G8/F2A1.....	47
Figura 28. Mapa de correlação HMBC (J <sup>2</sup> -J <sup>4</sup> , <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C, 500 MHz, MeOD) da amostra F1G8/F2A1.....	47
Figura 29. Estrutura de 2',3'-dihidrosorbicilina e as correlações observadas para a amostra F1G8/F2A1. ....	49
Figura 30. Espectro de massa de íons totais (full scan) da amostra F1G10. ....	49
Figura 31. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da amostra F1G10 (500 MHz, MeOD).....	50
Figura 32. Mapa de correlação HSQC da amostra F1G10 (J <sup>1</sup> , <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H, 500 MHz, MeOD). ....	51



Figura 33. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra F1G10.....	51
Figura 34. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F1G10. ....	52
Figura 35. Resíduo sorbil e as correlações observadas pelos mapas de correlações COSY e HMBC da amostra F1G10.....	52
Figura 36. Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC no resíduo cicloexano pentassubstituído da amostra F1G10, todas são correlações fortes.....	53
Figura 37. Estrutura do tricodimerol identificado na amostra F1G10.....	54
Figura 38. Espectro de massa de íons totais (full scan) da amostra F1G12. ....	55
Figura 39. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra F1G12 (500 MHz, MeOD). ....	56
Figura 40. Mapa de correlação HSQC da amostra F1G12 ( $J^1$ , $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD). ....	56
Figura 41. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra F1G12.....	57
Figura 42. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F1G12. ....	57
Figura 43. Correlações pelos mapas de correlações COSY e HMBC observadas para os resíduos sorbil e 2',3'-dihidrosorbil da amostra F1G12.....	58
Figura 44. Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC no resíduo cicloexano pentassubstituído da amostra F1G12, todas são correlações fortes.....	59
Figura 45. Estrutura de diidrotricodimerol identificada na amostra F1G12. ....	59
Figura 46. Espectro de massa de íons totais (full scan) da amostra F1G14. ....	61
Figura 47. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra F1G14 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	62
Figura 48. Mapa de correlação HSQC da amostra F1G14 ( $J^1$ , $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	62
Figura 49. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da amostra F1G14. ....	63
Figura 50. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da amostra F1G14.....	63
Figura 51. Correlações observadas pelos mapas de correlações COSY e HMBC para o resíduo 2',3'-dihidrosorbil da amostra F1G14.....	64
Figura 52. Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC no resíduo cicloexano pentassubstituído da amostra F1G14, todas são correlações fortes.....	64
Figura 53. Estrutura de tetraidrotricodimerol identificada na amostra F1G14. ....	66
Figura 54. Espectro de massa de íons totais (full scan) da amostra F1G5.....	66
Figura 55. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra F1G5 (500 MHz, MeOD). ....	67
Figura 56. Mapa de correlação HSQC da amostra F1G5 ( $J^1$ , $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD). ....	68
Figura 57. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra F1G5.....	68
Figura 58. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F1G5. ....	69
Figura 59. Correlações observadas pelos mapas de correlações COSY e HMBC para o 2',3'-dihidrosorbil e a outra estrutura lateral da amostra F1G5. ....	70
Figura 60. Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC no resíduo cicloexano pentassubstituído da amostra F1G5, todas as correlações são fortes. ....	70

Figura 61. Estrutura de éter tetraidrotricotidimero identificada na amostra F1G5.....	72
Figura 62. Espectro de íons totais (full scan) modo negativo da fração F2 do EMMML de <i>P. chrysogenum</i> . .....	72
Figura 63. Espectro de íons totais (full scan) modo positivo da fração F2 do EMMML de <i>P. chrysogenum</i> . .....	73
Figura 64. Cromatograma da fração F2 e o espectro de íons totais (full scan) no modo positivo da região selecionada. ....	73
Figura 65. Espectro de íons totais (full scan) da fração F2J1.....	74
Figura 66. Cromatograma analítico da fração F2J1. ....	74
Figura 67. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra F2J1 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ).....	75
Figura 68. Mapa de correlação HSQC da amostra F2J1 ( $J^1$ , $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, DMSO- $d_6$ ).....	76
Figura 69. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, DMSO- $d_6$ ) da amostra F2J1.....	77
Figura 70. A - Estrutura de crisogina e B – as principais correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC para a amostra F2J1.....	78
Figura 71. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra F2J1/2 (500 MHz, MeOD).....	79
Figura 72. Mapa de correlação HSQC da amostra F2J1/2 ( $J^1$ , $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD).....	80
Figura 73. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F2J1/2. ....	80
Figura 74. A - Estrutura de ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico e B – Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC para a amostra F2J1/2.....	81

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Informações taxonômicas de <i>P. chrysogenum</i> . .....	21
Tabela 2. Substâncias bioativas pertencentes à classe dos sorbicilinoídes. ....	24
Tabela 3. Comparação dos dados de RMN da amostra F1G8/F2A1 e da substância 2',3'- diidrosorbicilina. ....	48
Tabela 4. Comparação dos dados de RMN da amostra F1G10 com os dados da substância tricodimerol.....	54
Tabela 5. Comparação dos dados de RMN da amostra F1G12 com os dados da substância diidrotricodimerol. ....	60
Tabela 6. Comparação dos dados de RMN da amostra F1G14 com os dados da substância tetraidrotricodimerol.....	65
Tabela 7. Comparação dos dados de RMN da amostra F1G5 com os dados da substância éter tetraidrotricodimerol.....	71
Tabela 8. Comparação dos dados de RMN da amostra F2J1 e da substância crisogina. ....	78
Tabela 9. Comparação dos dados de RMN da amostra F2J1/2 com os dados da substância ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico.....	81
Tabela 10. Atividade antiglicante (Glioxal) das substâncias identificadas de <i>Penicillium chrysogenum</i> . .....	82
Tabela 11. Atividade antiglicante (Frutose) das substâncias identificadas de <i>Penicillium chrysogenum</i> . .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional.
2D	Bidimensional.
AGEs	Advanced Glycation End Products.
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization.
BDA	Batata Dextrose Ágar.
BDL	Batata Dextrose Levedura.
BSA	Albumina sérica bovina.
COSY	Correlated Spectroscopy.
CC	Cromatografia em Coluna.
CCD	Cromatografia em Camada Delgada.
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
$\delta$	Deslocamento químico.
<i>d</i>	Dupleto.
<i>dd</i>	Duplo duplo.
<i>ddd</i>	Duplo duplo duplo.
<i>dq</i>	Duplo quarteto.
<i>dt</i>	Duplo tripleto.
DMSO	Dimetilsufóxido.
DAD	Diode Array Detector.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence.
Hz	Hertz.
IT	Ion Trap.
<i>J</i>	Constante de acoplamento.
LC	Liquid Chromatography.
<i>m</i>	Multiplete.
<i>m/z</i>	Relação massa/carga.
MeOD	Metanol deuterado.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.
<i>s</i>	Simpleto.
<i>t</i>	Triplete.
UV	Ultravioleta.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
2.1. <i>Gustavia</i> sp.....	14
2.2. Fungos .....	14
2.3. Fungos Endofíticos .....	17
2.4. O Gênero <i>Penicillium</i> .....	19
2.5. Característica e estudo químico de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	20
<b>2.5.1.Sorbicilinoídes .....</b>	<b>22</b>
2.6. Atividade Antiglicante .....	30
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos.....	33
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>34</b>
4.1. Reativação da linhagem de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	34
<b>4.1.1.Meio BDA – Batata Dextrose Ágar .....</b>	<b>34</b>
4.2. Cultivo de <i>P. chrysogenum</i> .....	34
<b>4.2.1.Meio BDL.....</b>	<b>35</b>
4.3. Obtenção dos extratos do líquido cultivado e do micélio .....	35
4.4. Fracionamento do extrato metanólico do meio líquido cultivado de <i>P. chrysogenum</i> .....	36
4.5. Fracionamento da fração um – F1.....	37
4.6. Fracionamento da fração dois - F2.....	38
4.7. Avaliação da atividade antiglicante .....	41
<b>4.7.1.Antiglicação (Gloxal) .....</b>	<b>41</b>
<b>4.7.2.Antiglicação (Frutose).....</b>	<b>41</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>42</b>
5.1 Análise por APCI-IT-MS do EMMML de <i>P. chrysogenum</i> .....	42
5.2. Análise por APCI-IT-MS da fração F1 .....	42
5.3. Análise por APCI-IT-MS e CLAE semipreparativa da fração F1G .....	43
<b>5.3.1.Identificação da amostra F1G8 / F2A1 .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.2.Identificação da amostra F1G10.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3.3.Identificação da amostra F1G12.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.4.Identificação da amostra F1G14.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.5.Identificação da amostra F1G5.....</b>	<b>66</b>

5.4. Análise por APCI-IT-MS da fração F2.....	72
<b>5.4.1. Identificação da amostra F2J1 .....</b>	<b>73</b>
<b>5.4.2. Identificação da amostra F2J1/2.....</b>	<b>79</b>
5.5. Avaliação da atividade antiglicante .....	82
<b>5.5.1. Glicação (Glioxal).....</b>	<b>82</b>
<b>5.5.2 Glicação (Frutose).....</b>	<b>82</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

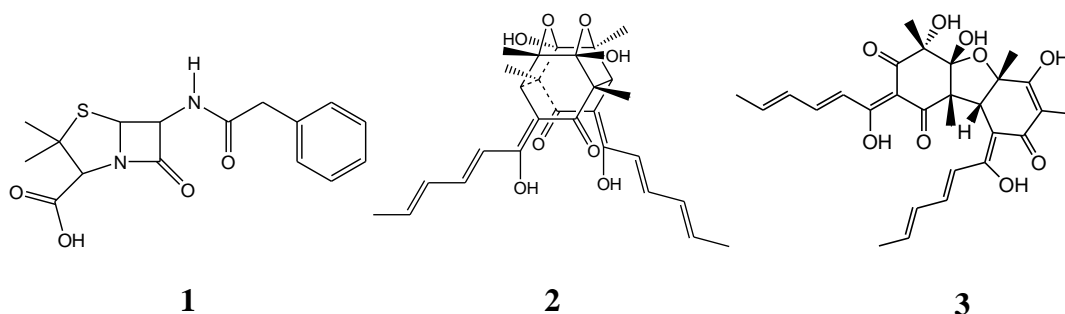
A natureza tem uma química notável, nos fornecendo estruturas cada vez mais complexas e inimagináveis (LIU et al., 2016), principalmente relacionadas aos metabólitos secundários sintetizados por microrganismos endofíticos. Estudos recentes têm demonstrado a grande variedade e potencial dos microrganismos endofíticos de espécies vegetais de regiões tropicais, como da Amazônia, registrados em diversos trabalhos (por exemplo: de SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2008; KOOLEN et al., 2012; BANHOS et al., 2014). Os endófitos são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos aparentes ao hospedeiro. Estes são um grupo diversificado, definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais (CHAPLA, et al., 2013).

Um relato importante de substância isolada tanto de plantas quanto de fungos endofíticos ocorreu em 1993 com o isolamento do Taxol<sup>®</sup>, antes isolado de diversas espécies vegetais da família Taxaceae, foi então obtido da linhagem *Taxomyces andreanae*, oriundos das mesmas plantas (LIU et al., 2016). Além do Taxol, várias outras substâncias de importância biológica, também oriundas de fungos endofíticos foram identificadas, tais como: cefalosporinas, ácido micofenólico, estatinas e outros compostos (TAKAHASHI et al., 2013; DEMAINE e SANCHEZ, 2009). A partir destas descobertas, os microrganismos endofíticos têm sido intensivamente explorados como fontes produtoras de novas substâncias bioativas (RADIC e STRUKELJ, 2012).

Dentre os microrganismos pode-se citar espécies do gênero *Penicillium* que são grandes produtores de estruturas policetídicas complexas com atividades biológicas bastante promissoras, como o *Penicillium chrysogenum* que desde a descoberta da penicilina (1) (Figura 1, p.15), vem sendo visado como fonte importante de metabólitos antibacteriano, antifúngico, citotóxico e outros (MENG et al., 2011; LOPES et al., 2012; GUO et al., 2015).

No acervo de substâncias bioativas oriundas de *P. chrysogenum* destacam-se os sorbicilinoídes que são metabólitos policetídicos também isolado de *Trichoderma* sp., *Phialocephala* sp., entre outros (ALMEIDA, 2014; NEUMANN et al., 2007; LI et al., 2007). Essas substâncias representam uma nova classe de compostos bioativos contra células cancerígenas, fungos, vírus e bactérias (BALDE et al., 2010; EL-ELIMAT et al.,

2015; PENG et al., 2014; CABRERA et al., 2006). Alguns representantes desta classe são o tricodimerol (2) e o bisvertinolona (3) (Figura 1, p.15).



**Figura 1.** Substâncias bioativas isoladas de *P. chrysogenum*, descrito na literatura.

Visando continuar os estudos dos extratos do meio líquido da linhagem de *P. chrysogenum*, isolado de *Gustavia* sp. em um estudo anterior (ALMEIDA, 2014), o qual revelou a produção dos bisorbicilinoídeos (tricodimentol, dihidrotricodimerol e tetrahidrotricodimerol), o presente trabalho tem como objetivo, o estudo das estruturas dos metabólitos secundários de *P. chrysogenum*, especialmente os pertencentes à classe dos sorbicilinoídeos, bem como a avaliação do seu potencial antiglicante.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Gustavia* sp.

O gênero *Gustavia* pertence a mesma família pantropical da castanheira do Brasil, *Lecythidaceae*, possui cerca de 45 espécies encontradas principalmente na América do Sul (MORI, 2004; PETTIT et al., 2004).

Através de um estudo microbiológico desse gênero foi possível isolar 93 espécies de fungos endofíticos (ALMEIDA, 2014) e nos extratos de *Pestalotiopsis virgulata* um fungo endofítico de *Gustavia elliptica* foi identificado atividade larvicida contra larvas de *Aedes* e *Anopheles* (BÜCKER et al., 2013), em uma investigação bioguiada de substâncias com potencial anticâncer foi isolada gustastatina de *Gustavia hexapétala* (PETTIT et al., 2004), nos extratos de *G. elliptica* foi observado uma promissora atividade leishmanicida (ALMEIDA et al., 2011), atividade antidiabética através da inibição da enzima glucose-6-fosfatase foi observada nos extratos de *Gustavia pulchra* (RODRIGUEZ et al., 2007), em um estudo fitoquímico de *Gustavia augusta* foram identificados os seguintes constituintes químicos: espinasterona, taraxerona, epitaraxerol, epilupeol, estigmasterol e espinasterol, taraxerol, lupeol,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina e ácido betulínico (SOUZA et al., 2001). Apesar de ser um gênero abrangente, poucos são os estudos realizados em suas espécies.

### 2.2. Fungos

O Reino Fungi é um dos grupos com maior diversidade de organismos na Terra, estes são agentes de proteção integral do ecossistema, que regem o ciclo do carbono em solos florestais, mediam a nutrição mineral de plantas e as limitações de carbono de outros organismos do solo (TEDERSOO et al., 2014). Estão amplamente distribuídos em todos os ecossistemas terrestres e aquáticos, dos trópicos às regiões árticas e antárticas (MAIA e CARVALHO JR., 2010). Ocupando um lugar importante no mundo natural, como organismos não fotossintéticos, dependem da obtenção de nutrientes tais como açúcares ou aminoácidos, para este fim, eles obtêm seus nutrientes a partir da degradação de matéria orgânica morta ou da interação com organismos vivos para obter alimento a partir de outras espécies (SPITELLER, et al., 2015).

Os fungos usam muitos de seus metabólitos secundários para garantir um lugar em um ambiente natural competitivo e se proteger contra predadores (HANSON,

2008;). Os metabólitos secundários de fungos servem para fins de comunicação, defesa química, interação simbiótica, ataque a outras espécies pela produção de composto tóxico ou para derrubar os mecanismos de defesa do hospedeiro (SPITELLER et al., 2015).

Os produtos naturais de fungos possuem atividades biológicas de muita importância para a medicina, agricultura e manufatura, embora mostrem uma variedade impressionante em estruturas químicas e atividades biológicas, suas vias biosintéticas compartilham de uma série de características chave ainda pouco conhecidas (VAN der LEE et al., 2016; FUGA LI et al., 2016).

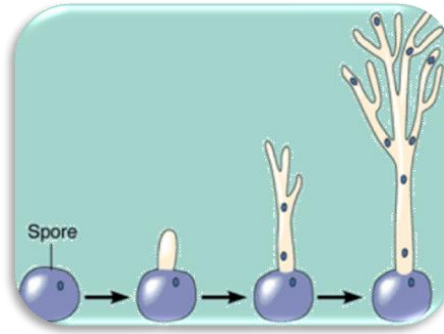
Três tipos de fungos são determinados, dependendo do seu estilo de vida, são eles: saprófitas, parasitas e simbióticos. Os fungos sapróbios decompõem a matéria orgânica dos organismos mortos, enquanto que os fungos parasitas retiram sua nutrição de organismos vivos, hospedeiros, que são prejudicados pelo parasita e os fungos simbióticos também obtêm sua nutrição de outros organismos vivos, porém eles também oferecem as vantagens de acolhimento ao seu hospedeiro, não causando danos aparente (SPITELLER, et al., 2015).

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduras) ou pluricelulares, este último caracterizado pela formação de estruturas tubulares filamentosas, as hifas, que constituem o micélio (Figura 2). Os filamentosos constituem a maioria dos fungos microscópicos, que na fase reprodutiva, seu micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos, principais responsáveis pela propagação das espécies (Figura 3) (MAIA e CARVALHO JR., 2010).

Muitos fungos são tão pequenos que só podem ser observados ao microscópio, enquanto que outros são capazes de formar estruturas visíveis a olho nu e facilmente reconhecíveis como os cogumelos, podendo ser classificados em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota e Ascomycota, neste último estão a maioria dos fungos endofíticos (CANUTO et al., 2012).



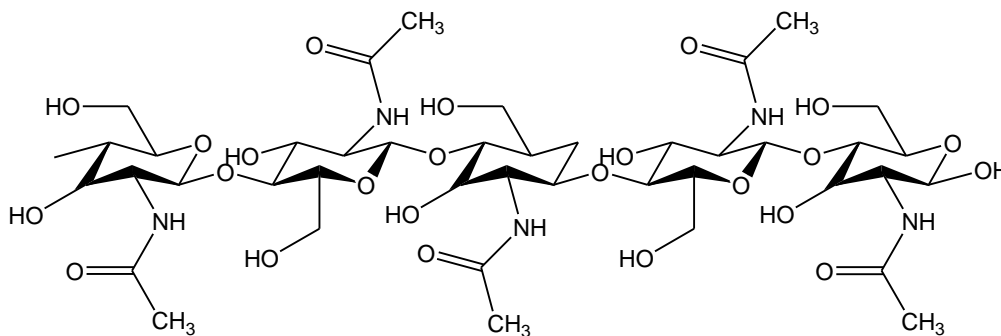
**Figura 2.** Micélio fúngico – imagem de microscopia eletrônica de *Penicillium* sp.  
Fonte: <http://www.greghi.com.br/fungos.php>



**Figura 3.** Crescimento de uma hifa a partir de um esporo.  
Fonte: <http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2014/08/Morfologia-e-Citologia-dos-Fungos.pdf>

Fungos são caracterizados pela sua falta de pigmento fotossintético e a sua parede celular difere nos seus constituintes estruturais, tanto a partir da parede celular vegetal, quanto da parede celular bacteriana e membranas celulares de mamíferos. A parede celular fúngica é um complexo de quitina (um polímero de *N*-acetilglucosamina) (Figura 4), (BARREIRO et al., 2012; HANSON, 2008;).

O número de espécies de fungos descritos compreende entre 72.000 a 120.000, o que supõe menos de 10% dos teoricamente estimado, de 0,8 a 5,1 milhões de espécies globalmente existentes (TEDERSOO et al., 2014).



**Figura 4.** Estrutura do polímero de *N*-acetilglucosamina (complexo de quitina).

O metabolismo dos fungos é relativamente semelhante ao encontrado em plantas, pois, muitas substâncias fitoquímicas já foram identificadas em fungos, como Taxol<sup>®</sup>. Entretanto, a maioria dos fungos possui rotas bioquímicas únicas, resultando em metabólitos característicos ou específicos de uma determinada espécie, os produtos dessas rotas metabólicas incluem importantes fármacos, tais como penicilina e estatinas, ou substâncias tóxicas como as aflatoxinas (CANUTO et al., 2012).

Uma das vantagens de se trabalhar com fungos é que eles podem ser cultivados em laboratórios e em fermentadores industriais, com meios de cultura de baixo custo ou com resíduos industriais alimentícios, não havendo assim, prejuízo ao ecossistema (TAKAHASHI e LUCAS, 2008; LOPES et al., 2012). Outra vantagem, é que à adição de vários precursores biosintéticos, bem como a troca de componentes nutricionais no meio de cultivo podem modificar as vias biosintéticas, conduzindo assim, a produção de novos metabólitos, além disso, as condições clássicas de cultivo (pH, temperatura, luminosidade) podem ser manipuladas para modificar perfis dos metabólitos fúngicos (TAKAHASHI et al., 2013).

### **2.3. Fungos Endofíticos**

Os fungos têm evoluído com uma variedade de relações simbióticas com plantas, tais como: endosimbióticos ou endofíticos, fungos que crescem dentro de plantas (folhas, caules, raízes, etc.), micorrízicos, fungos que interagem simbioticamente com as raízes das plantas e nos líquens, os fungos interagem com as algas. Além disso, já são conhecidas as relações simbióticas entre fungos e insetos, e também entre fungos e bactérias, essas relações simbióticas dos fungos com seus hospedeiros favorecem o surgimento de novas rotas metabólicas, resultando em uma rica produção de metabólitos bioativos, por isso, os fungos endofíticos vêm impulsionando investigações de novos metabólitos secundários de interesse para medicina e agricultura (SPITELLER et al., 2015).

Os fungos endofíticos vivem em uma relação de mutualismo dentro de tecidos vegetais sem exercer efeitos negativos aparente na planta, pelo contrário, eles ajudam as plantas na adaptação em condições ambientais adversas (seca, frio, salinidade, presença de metais pesados, etc.), e na resistência a ataque de insetos herbívoros ou fitopatogênicos (CANUTO, et al., 2012).

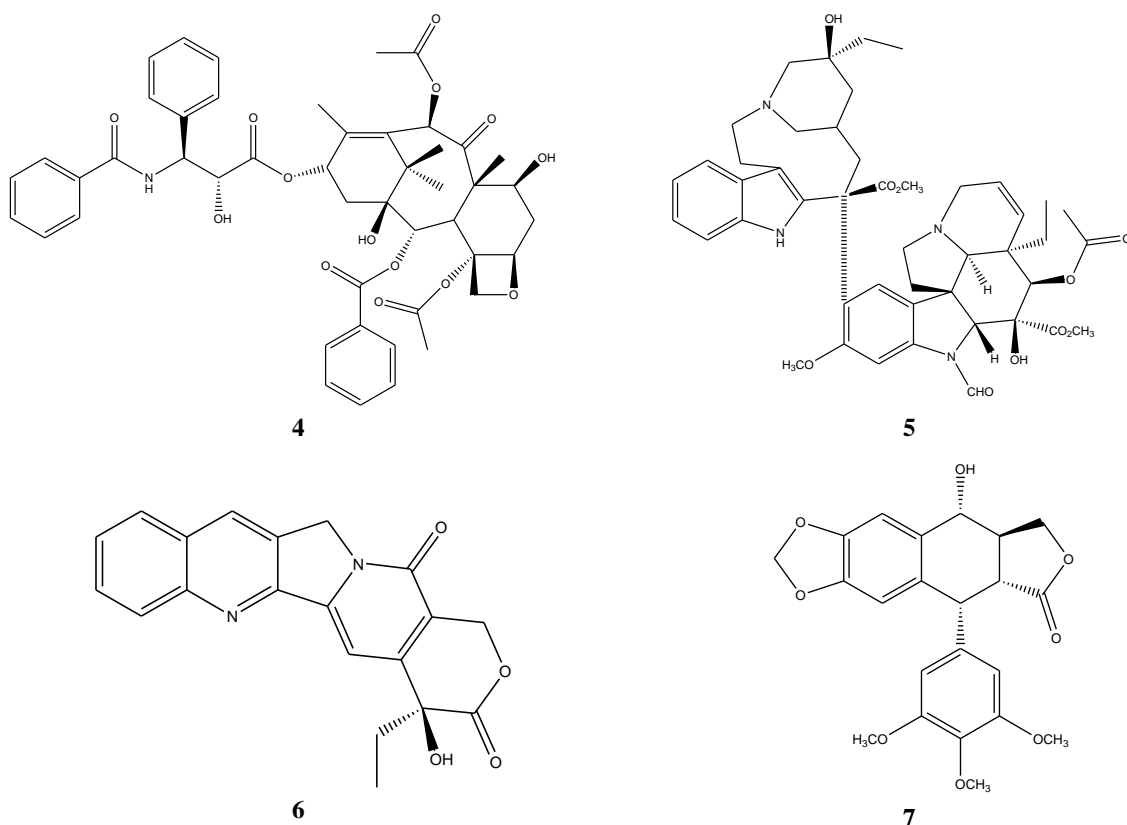
Centenas de metabólitos secundários de fungos endófitos são conhecidos, incluindo as classes: alcaloides, terpenos, policetídeos, isocumarinas, quinonas, fenil propanoides, lignanas, fenóis, ácidos fenólicos, metabolitos alifáticos, lactonas, etc. (ZHANG, SONG e TAN, 2006; CHAPLA et al., 2013). Acredita-se que essas substâncias possam estar diretamente associadas com a planta hospedeira através da recombinação gênica entre as espécies (planta e fungo) durante a fase evolutiva (CONTI et al., 2012). Esses microrganismos são compostos de um repertório enzimático que

auxiliam na biosíntese de moléculas de estruturas diversas e complexas que são muitas das vezes difíceis de sintetizar (KUSARI e SPITELLER, 2011).

Essa associação dentro das comunidades microbianas endofíticas, com o hospedeiro, teria um impacto sobre os processos fisiológicos da planta, e essa peculiaridade favorece ao fungo a capacidade de biosintetizar metabólitos originalmente produzidos pela planta hospedeira (ZHOU et al., 2010; DEEPIKA et al., 2016). É o caso do paclitaxel (4) (Taxol®) (Figura 5, p. 20), uma substância isolada de plantas do gênero *Taxus*, é utilizada, com sucesso, na terapia de diversos cânceres e outras doenças, esta já foi identificada em vários gêneros de fungos que colonizam espécies vegetais desse gênero, como os fungos *Taxomyces andreanae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Metarhizium anisopliae*, *Phoma betae*, entre outros, fazendo com que os processos de fermentação desses microrganismos, pudessem ser uma forma alternativa promissora para a produção de Taxol (LIU et al., 2016).

Outras substâncias anticancerígenas inicialmente naturais de plantas também foram isoladas de seus respectivos fungos endofíticos como vincristina (5) (*Camptotheca acuminata* e *Nothapodytes foetida*); camptotecina (6) (*Fusarium oxysporum* e *Mycelia sterilia*) e podofilotoxina (7) (*Phialocephala fortinii* e *Podophyllum peltatum*) (Figura 5) (BORGES et al., 2009).

Assim, os fungos endofíticos poderiam substituir plantas como fontes de fármacos, considerando-se as vantagens da produção por via biotecnológica que é um processo não sujeito a variações externas, de fácil escalonamento, com possibilidade de maiores rendimentos, além de ser sustentável, permitindo a preservação da espécie botânica produtora, uma vez que, tanto a planta quanto os endófitos sintetizam uma extensa coleção de metabólitos semelhantes com precursores comuns (CANUTO et al., 2012; CHAPLA et al., 2013).



**Figura 5.** Produtos naturais anticancerígenos obtidos de plantas e de seus fungos endofíticos.

#### 2.4. O Gênero *Penicillium*

Os fungos do gênero *Penicillium*, assim como o *Aspergillus*, são conhecidos por sua capacidade de adaptação em diversos *habitats* e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos (Figura 2, p.17) (TAKAHASHI e LUCAS, 2008). São amplamente estudados pela produção de metabólitos secundários com atividades: citotóxica, antimicrobiana, antiviral e entre outras (BALDE et al., 2010; LOPES, et al., 2012; PENG et al., 2014; GUO et al., 2015).

*Penicillium* é um gênero diversificado existente em todo o mundo, suas espécies desempenham papéis importantes como decompositores de materiais orgânicos produzindo uma vasta gama de micotoxinas. Em 2014, o gênero continha pouco mais de 350 espécies identificadas. Este tem grande impacto econômico sobre a vida humana, tais como: patógenos causadores de podridão devastadora, pré e pós colheita de culturas alimentares e como na produção de queijos especiais (*P. roqueforti* e *P. camemberti*), embutidos fermentados (*P. nalgiovense*) e fonte de novos fármacos (*P. chrysogenum*, *P. rubrum*) (VISAGIE et al., 2014).

Devido ao seu poder degradativo resultou no rastreamento de novas enzimas, mas seu maior impacto foi à descoberta da penicilina há mais de 80 anos, isolada de *P. notatum*, e atualmente de *P. chrysogenum*, que revolucionou abordagens médicas para o tratamento de doenças bacterianas (VISAGIE et al., 2014).

No arsenal biossintético de *Penicillium* estão inclusos azafilones, alcaloides, policetídeos, peptídeos cíclicos, entre outros (KOZLOVSKII et al., 2013; MIZUTANI et al., 2008; PASTRE et al., 2007; SON et al., 2016).

## 2.5. Característica e estudo químico de *Penicillium chrysogenum*

*P. chrysogenum* é um fungo filamentosos empregado na produção industrial de  $\beta$ -lactamas, mas precisamente penicilina e seus derivados (SALO, et al., 2015; GAO, et al., 2011), também é produtor de uma variedade de outras substâncias como andrastrina, crisogina, roquefortina, meleagrina, ácido secalônico e sorbicilina, que apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas, amebicida, antiviral e citotóxica (HOUBRAKEN, et al., 2012; LOPES et al., 2012; GAO, et al., 2011; PENG, et al., 2014). Além de produzir a penicilina *P. chrysogenum* exibiu habilidades em outras áreas, incluindo biolixiviação, remediação biológica, e promovendo o crescimento de plantas, (DENG et al., 2012; KUMAR et al., 2012; MURALI et al., 2013).

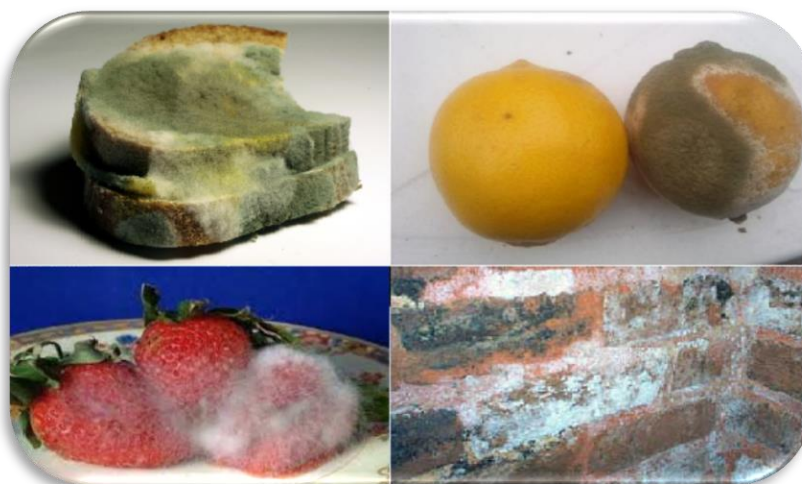
Os avanços em microbiologia, bioquímica, engenharia genética e biologia molecular têm contribuído muito para o conhecimento do fungo, seus genes e enzimas biossintéticas estruturais, auxiliares, e de regulação, e na caracterização dos compartimentos subcelulares envolvidos na biossíntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e outros metabólitos como sorbicilina e seus derivados (BARREIRO, et al., 2012; SALO, et al., 2016), auxiliando na produção e obtenção de quantidades de substâncias de interesse farmacológico, medicinal e industrial.

*P. chrysogenum* é encontrado em diversos *habitats* tais como: terrestre, marinho, ártico, no interior de células vegetais como endofíticos e como contaminantes de ambientes interiores, incluindo materiais de construção úmidos, ar, poeira e também como agente de deterioração de alimentos, sendo por isso tão associado a doenças humanas como as alergias (Figura 6) (SONJAK, et al., 2006; HOUBRAKEN, et al., 2011). Possuem uma aparência de algodão/ lã que começa na cor branca, e vão mudando a diferentes tons de verde, amarelo, cinza ou azul, durante o seu crescimento. Suas características fenotípicas são: conidióforos ramificados ter- ou quarterverticilato,

filíades relativamente curta e suave para conídios finamente rugosos (Figura 7, p. 23) (HOUBRAKEN, et al., 2011, 2012), na tabela 1 estão apresentadas as informações taxonômicas da espécie *P. chrysogenum*.

**Tabela 1.** Informações taxonômicas de *P. chrysogenum*.

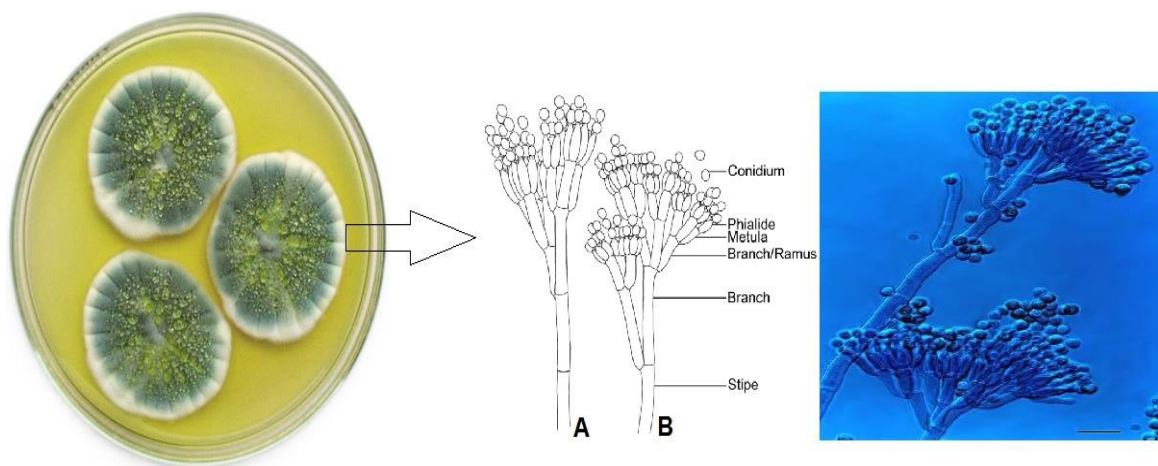
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordem	Eurotiales
Família	Trichocomaceae
Gênero	<i>Penicillium</i>
Espécie	<i>P. chrysogenum</i>



**Figura 6.** *P. chrysogenum* em seus diversos meios de crescimento.

Fontes: <http://upload.wikimedia.org>; <http://golly-gee.org>; <http://2bp.blogspot.com>;  
<http://3.bp.blogspot.com>.





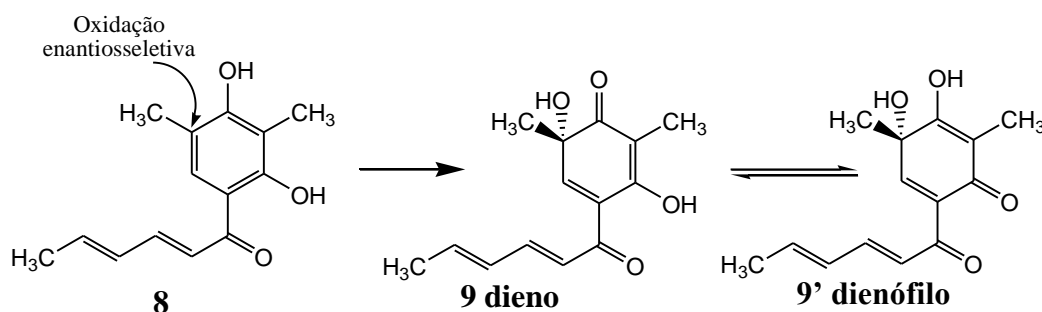
**Figura 7.** Cultura de *P. chrysogenum*, conidióforos teverticillate (A) e quaterverticillate (B).

Fonte: <http://www.sciencepresse.qc.ca>; VISAGIE et al., 2014; <http://www.beeeworld.de>.

### 2.5.1. Sorbicilinoídes

Os sorbicilinoídes são uma família de metabólitos secundários policetídeos de cor amarela que tem sido isolado de uma variedade de fungos marinhos, terrestres e endofíticos (HARNED e VOLP, 2011; MENG et al., 2016). Os primeiros relatos destes compostos datam de mais de setenta anos atrás, com o isolamento e elucidação estrutural do composto sorbicilina (8) (Figura 8) obtido do fungo *Penicillium notatum* (CRAM, 1948).

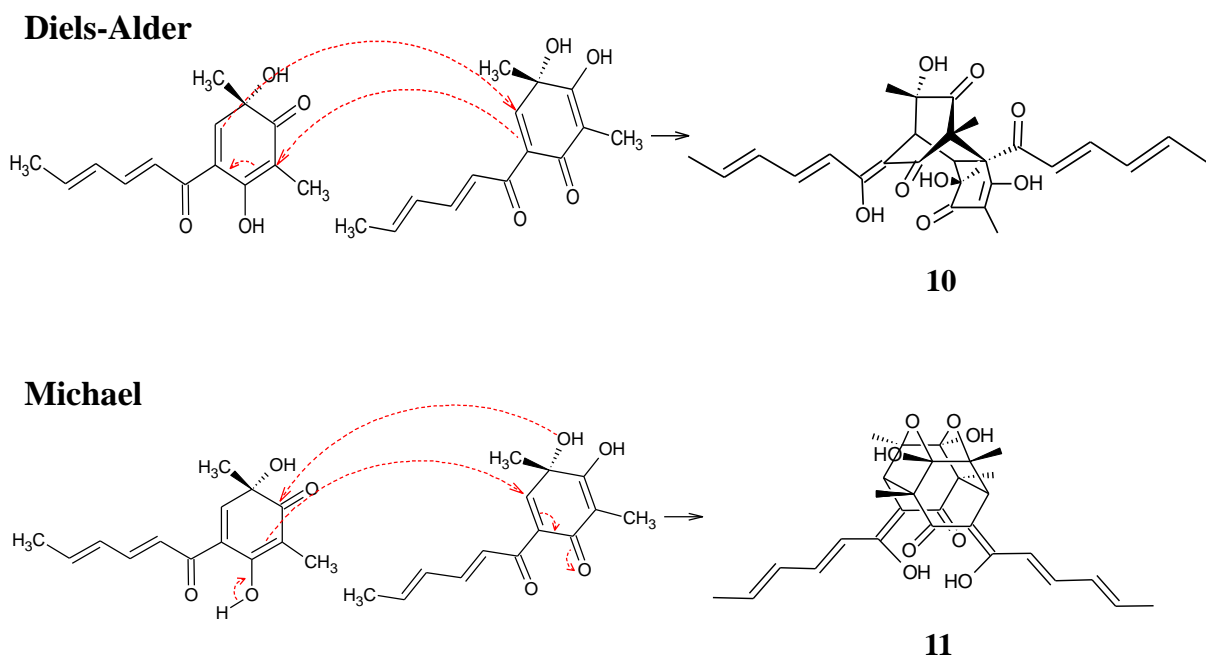
As estruturas dessa família geralmente são complexas e altamente oxigenadas, contendo sistemas de anéis bicíclicos e tricíclicos, que num sentido geral, parecem resultar da desaromatização de 8 e dimerização oxidativa subsequente do sorbicilinol (9) e seu tautômero (9') sendo essas as formas ativadas da sorbicilina (Figura 8). O termo sorbicilinoídes refere-se a qualquer composto que pelo menos, a uma primeira aproximação, contém o esqueleto de carbono de sorbicilina (HARNED e VOLP, 2011; MENG et al., 2016).



**Figura 8.** Ativação da sorbicilina a sorbicilinol (GRAVEL e POUPON, 2008).

Essas substâncias vêm representando uma nova classe de compostos bioativos, podendo superar a resistência natural de cânceres associados com prognóstico maligno como gliomas, melanomas, cânceres pancreáticos, estomacais e sobre todos os cânceres metastáticos (BALDE et al., 2010).

Os sorbicilínóides geralmente são encontrados como dímeros de sorbicilina formados por duas vias biossintéticas de dimerização, resultando em produtos de reações de Diels-Alder tal como o bisorbicilinol (10) e Michael como tricodimerol (11) (Figura 9) (MASKEY et al., 2005; GRAVEL e POUPON, 2008).



**Figura 9.** Vias biossintética de dimerização do bisorbicilinol (10) e tricodimerol (11).

Através de um perfil metabólico comparativo, o grupo de genes que codificam a enzima poliketídeo-síntetase (*pks13*) foi identificado como responsável pela biossíntese dos sorbicilínóides em estirpes de *P. chrysogenum* (SALO, et al., 2015; 2016).

Sobre as atividades biológicas dos sorbicilinoídes, Du e colaboradores (2009) observaram que a bioatividade diminui à medida que as insaturações na cadeia lateral são reduzidas e que os produtos da reação de Diels-Alder são mais efetivos que os de Michael.

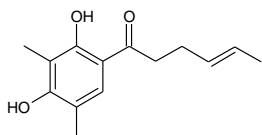
Estudos anteriores relatam que diversos metabólitos da família dos sorbicilínóides apresentam efeitos citotóxicos e antioxidantes (Li et al., 2007a, 2007b, 2011a, 2011b; WASHIDA et al., 2007, 2009). Na tabela 2 (p. 24) estão listadas algumas substâncias

bioativas pertencentes a essa classe e na figura 10 (p. 26-28) estão suas respectivas estruturas.

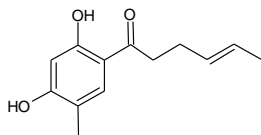
**Tabela 2.** Substâncias bioativas pertencentes à classe dos sorbicilinoídes.

Espécie	Substância	Atividade Biológica	Referência
<i>P. notatum</i> / <i>P. chrysogenum</i>	2'-3'-dihidrosorbicilina (1), Sohirmonas A (2) e B (3), Oxosorbicilinol (4), Bisorbicilinol (5), Bisvertinoquinol (6), Rezichanona A-D (7-10); Sorbicilactona A (11); Sorbicatecol A (12) e B (13); 13-hidroxi- dihidrotricodermolide (14); 10, 11, 27, 28-tetrahidrotrisorbicilinona C (15);	Bactericida; Citotóxica; Antiviral; Afinidade p/ direcionar proteínas GLP-1R (diabetes) e eEF2K (câncer);	MASKEY, et al., 2005; BRINGMANN et al., 2010; PENG et al., 2014; CAO et al., 2019
<i>Trichoderma</i> sp.	Bisvertinolona (16) e Tricodimerol (17); (2S)-2,3-dihidro-7-hidroxi-6-metil- 2-[(E)-prop-1-enil]-croman-4-ona (18); (2S)-2,3-dihidro-7-hidroxi-6,8- dimetil-2-[(E)-prop-1-enil]-croman- 4-ona (19); 2',3'-dihidrosorbicilina; Bisorbicilinol;	Citotóxica; Antialérgico;	DU et al., 2009; LAN et al., 2012; SUGAYA et al., 2019
<i>Scytalidium album</i>	5'-formil-2'-hidroxil-4'-metoxi- (E,E)-sorbofenona (20); Escalbaculina B (21); 5'-formil-2'- hidroxil-4'-metoxi-(E)-4- hexenofenona (22)	Citotóxica e antifúngica;	EL-ELIMAT et al., 2015
<i>Penicillium</i> sp.	Tricodimerol Dihidrotricodimerol (23) e Tetrahidrotricodimerol (24); 2-(2',3'-dihidrosorbil)-3,6-dimetil- 5-hidroxi-1,4-benzoquinona (25) Dihidrobisvertinolona (26), Tetrahidrobisvertinolona (27); Cloctanspirona A (28) e B (29); Sorbiterrina A (30); 2-dioxi- sorhinona C (31);	Citotóxica; Inibidor de Acetilcolinesterase; Bactericida;	LIU et al., 2005a, 2005b; LI et al., 2011b; CHEN et al., 2012; JIANG et al., 2018
<i>Trichoderma</i> <i>citrinoviride</i>	Dihidrotricodimerol, Bislongiquinolide (32); Tricodermanona C (33);	Inseticida; Citostático; Antiinflamatório;	EVIDENTE et al., 2009; BALDE et al., 2010; MARRA et al., 2018;
Fungo não identificado	Tricodimerol; Dihidrotricodimerol; Demetilbisorbibutenolide (34); Espirosorbicilinol A-C (35, 36, 37);	Antiinflamatório; Antioxidante;	LEE et al., 2005; WASHIDA et al., 2007, 2009;

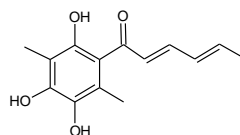
<i>Phialocephala</i> sp	Oxosorbiquinol ( <b>38</b> ), dihidrooxosorbiquinol ( <b>39</b> ), dihidrotricodermolide ( <b>40</b> ), dihidrodemetilsorbicilina ( <b>41</b> ), trisorbicilinona A ( <b>42</b> ), trisorbicilinas B-D ( <b>43, 44, 45</b> );	Citotóxico;	LI et al., 2007a, 2007b,2010, 2011a;
<i>Phaeoacremonium</i> sp.	5'-formil-2'-hidroxil-4'-metoxi- ( <i>E,E</i> )-sorbofenona, e 1-(2'-hidroxil- 4'-metoxi-5'-hidroximetilfenil)- <i>E</i> -4- hexen-1-one ( <b>46</b> );	Antifúngico;	REATEGUI, et al., 2006
<i>P. citrinum</i>	JBIR-124 ( <b>47</b> ); Bisorbibutenolide/bislongiquinolide; Bisvertinolona; Tricodimerol; JBIR- 59 ( <b>48</b> );	Antioxidante;	UEDA et al., 2010; KAWAHARA et al., 2012
<i>Trichothecium</i> sp.	Tricodimerol; Sorbicilina ( <b>49</b> );	Citotóxico;	YAO et al., 2015, 2017;
<i>Clonostachys rosea</i>	Eter dihidrotricodimero A ( <b>50</b> ) e B ( <b>51</b> ); Tricodimerol; Dihidrotricodimerol;	Bactericida;	ZHAI et al., 2016
<i>T. saturnisporum</i>	Saturnispol F ( <b>52</b> );	Bactericida;	MENG et al., 2018
<i>Aspergillus protuberus</i>	Bisvertinolona;	Bactericida;	CORRAL et al., 2018



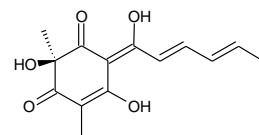
1



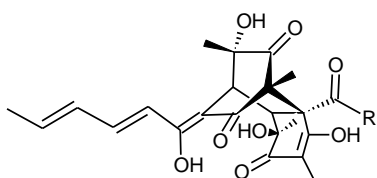
2

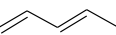


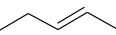
3

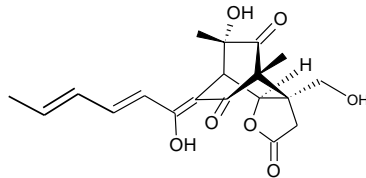


4

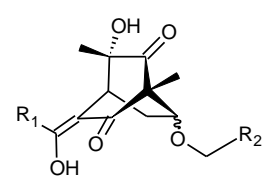


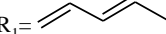
5 R= 

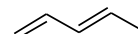
6 R= 

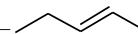


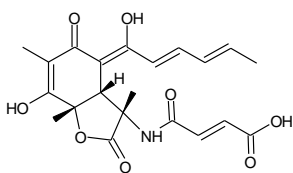
7



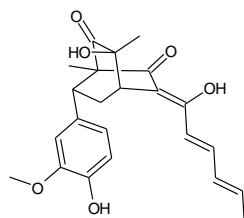
8 R<sub>2</sub> = n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = 

9 R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = 

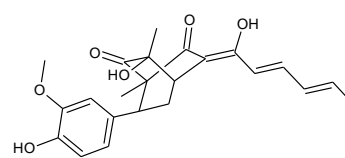
10 R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = 



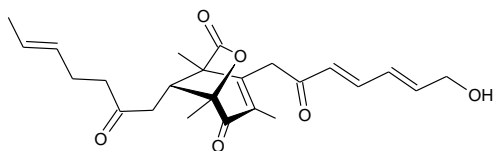
11



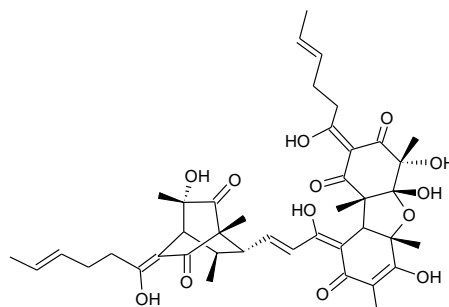
12



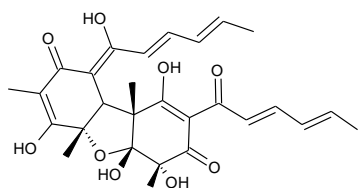
13



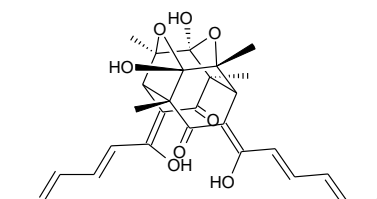
14



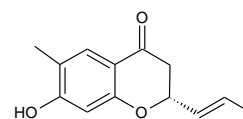
15



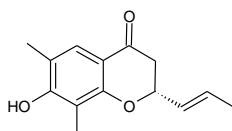
16



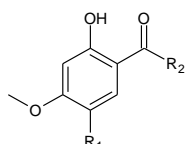
17



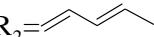
18

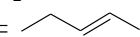


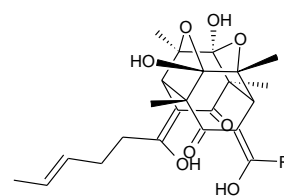
19

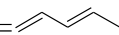


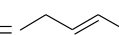
20 R<sub>1</sub> = COH, R<sub>2</sub> = 

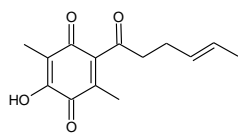
21 R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OH, R<sub>2</sub> = 

22 R<sub>1</sub> = COH, R<sub>2</sub> = 

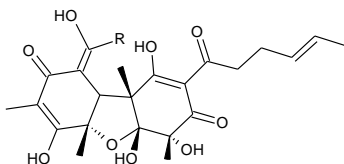


23 R= 

24 R= 

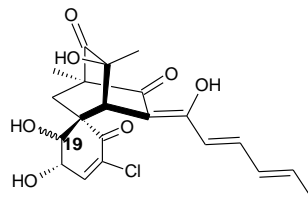


25



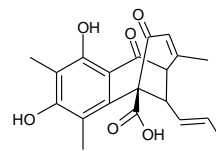
26 R=

27 R=

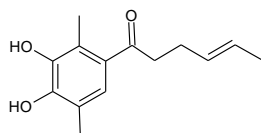


28 (19 R)

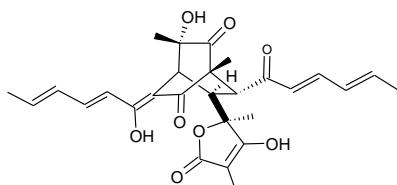
29 (19 S)



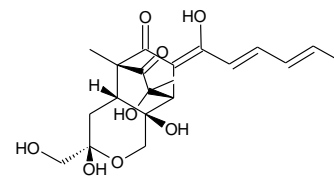
30



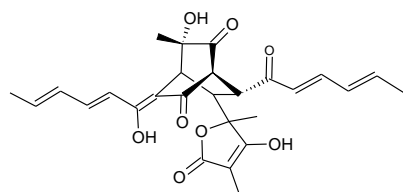
31



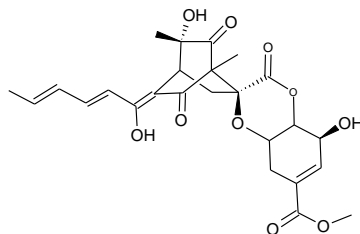
32



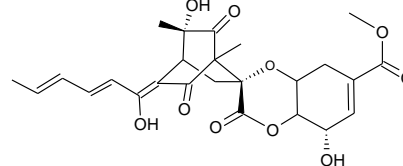
33



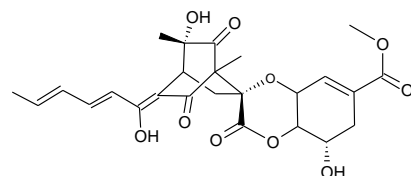
34



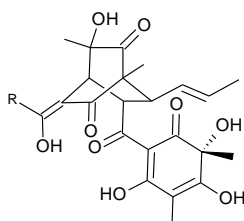
35



36

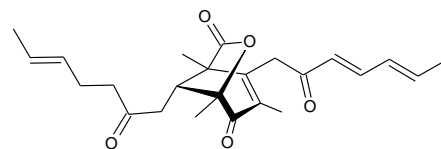


37

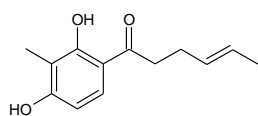


38 R=

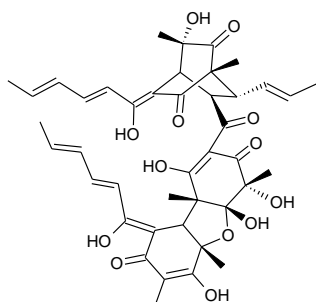
39 R=



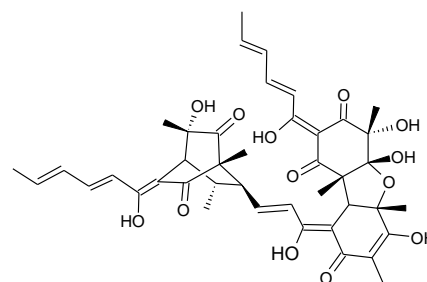
40



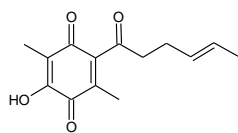
41



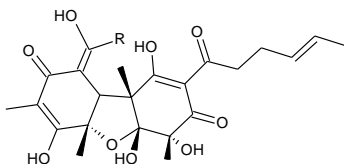
42



43

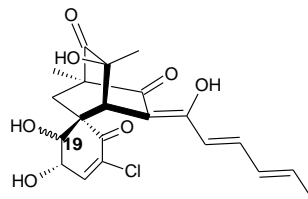


25



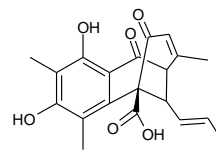
26 R=

27 R=

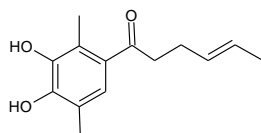


28 (19 R)

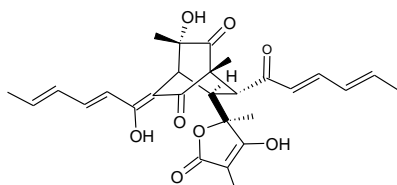
29 (19 S)



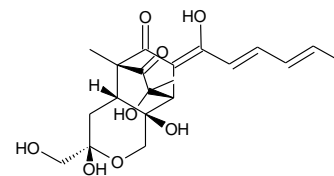
30



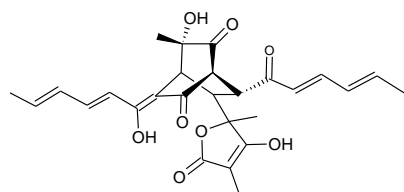
31



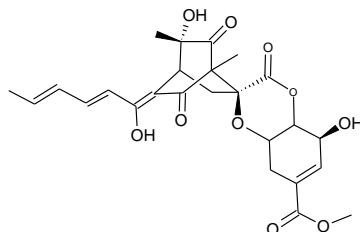
32



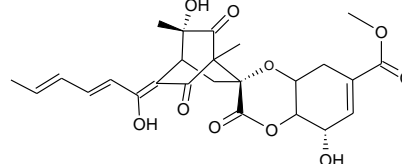
33



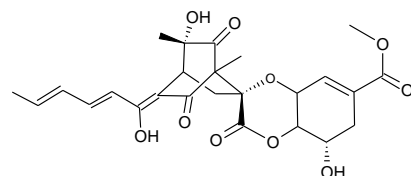
34



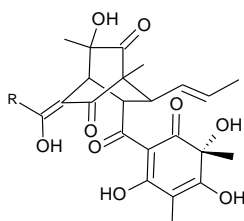
35



36

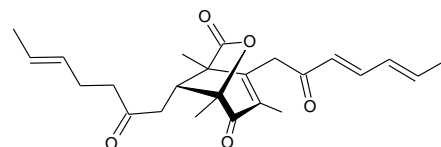


37

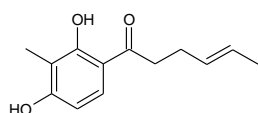


38 R=

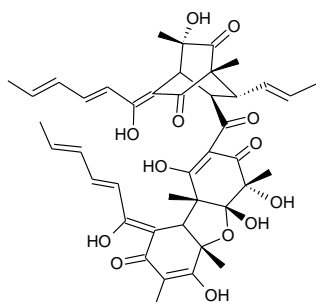
39 R=



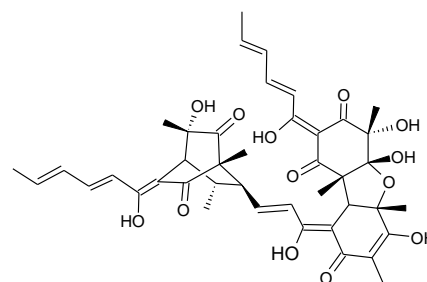
40



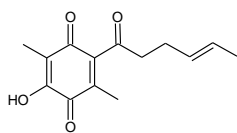
41



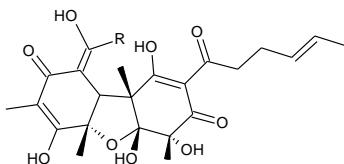
42



43

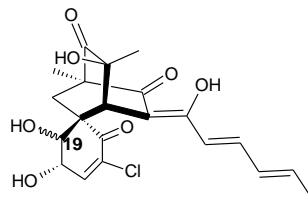


25



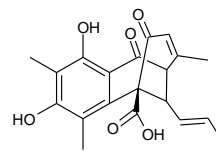
26 R=

27 R=

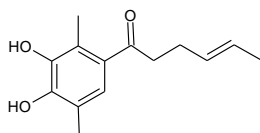


28 (19 R)

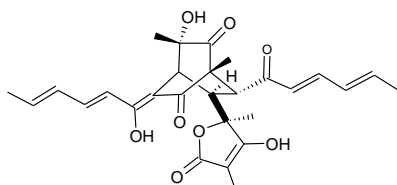
29 (19 S)



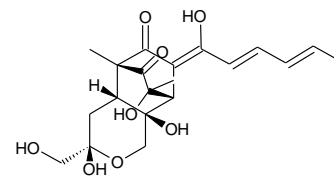
30



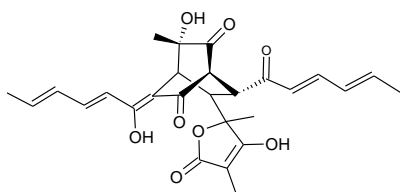
31



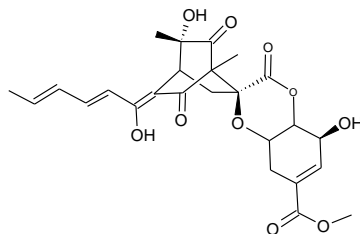
32



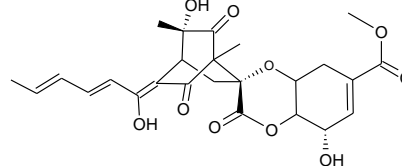
33



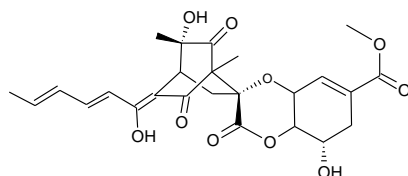
34



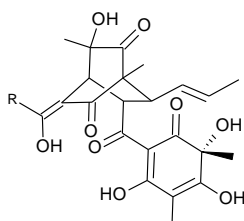
35



36

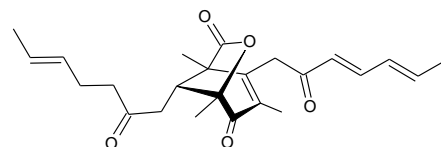


37

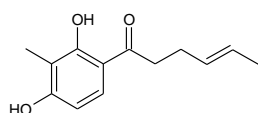


38 R=

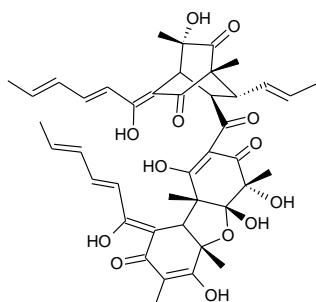
39 R=



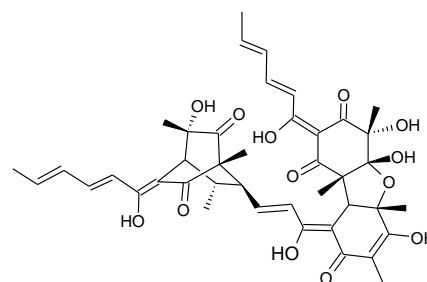
40



41

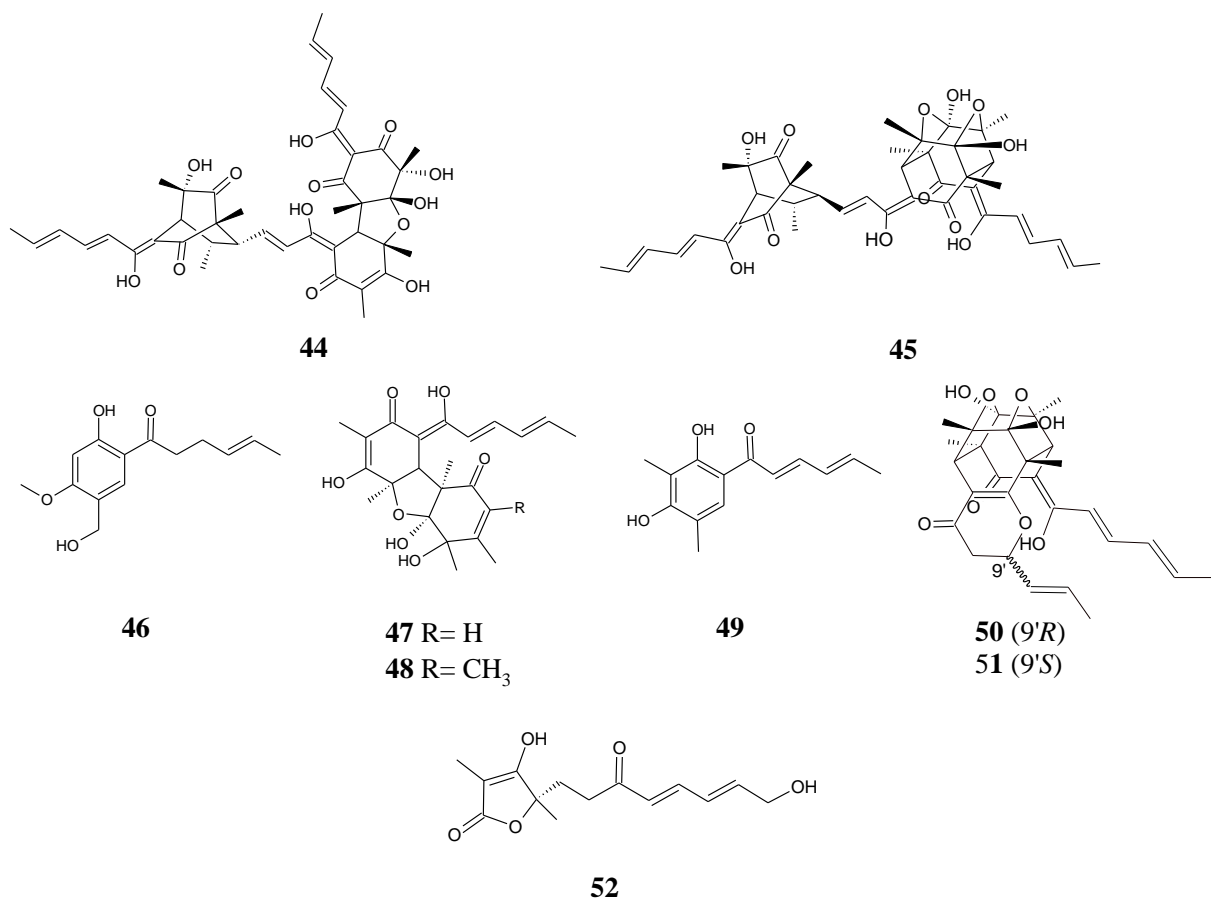


42



43





**Figura 10.** Substâncias bioativas pertencentes a classe dos sorbicilinoídeos.

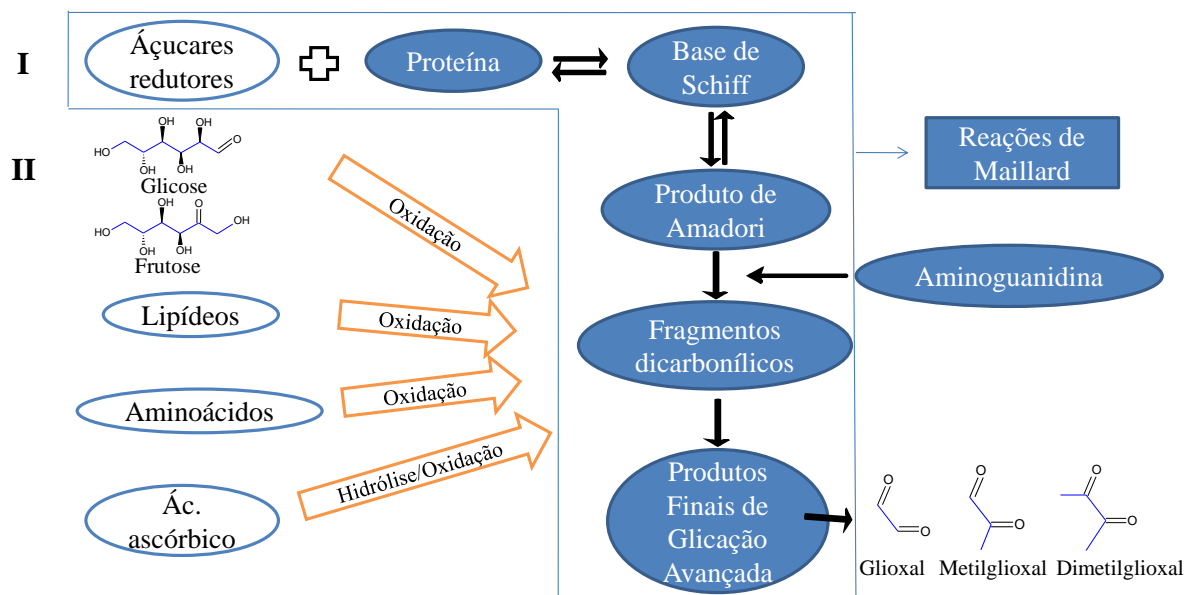
## 2.6. Atividade Antiglicante

Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizadas por hiperglicemia, resultantes de defeitos na secreção e/ou ação de insulina, a hiperglicemia crônica está associada a dano, disfunção e falência de vários órgãos, como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos principalmente em paciente com DM (GROSS et al., 2002). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016), existe cerca de 387 milhões de pessoas no mundo com diabetes e que até 2035 esse número aumentará para 471 milhões, sendo a maioria de países desenvolvidos e subdesenvolvidos, considerando as complicações decorrentes da hiperglicemia, diabetes é considerada a quinta principal causa de morte no mundo.

A hiperglicemia é diagnosticada por meio de dois testes laboratoriais: glicemia e hemoglobina glicada (HbA1c), ambos complementares pois um avalia a taxa de glicemia momentânea, ocasionando a falta de reprodutibilidade, e o outro a média glicêmica de dois a três meses anteriores, que equivale a vida útil dos eritrócitos, com

resultados mais precisos e clinicamente mais significativos, tornando-se um biomarcador confiável para o diagnóstico e prognóstico do DM (SACKS, 2011; MAKRIS e SPANOU, 2011; SHERWANI et al., 2016). Hemoglobina glicada (A1C) refere-se a um grupo de substâncias resultantes de reações não enzimáticas entre a hemoglobina A (HbA) ou outras proteínas do organismo e açúcares redutores como a glicose ou outros compostos carbonílicos, conhecidas como reações de Maillard, formando os produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End products – AGEs*), o qual estão diretamente envolvidos no aumento do risco das complicações avançadas do DM (NETTO et al., 2009; SINGH et al., 2014) (Figura 11).

As reações de Maillard são complexas e ocorrem inicialmente entre um grupo carbonílico, presente em açúcares redutores ou em produtos da oxidação de lipídeos, aminoácidos ou do ácido ascórbico, e um grupo amino livre, proveniente de aminoácidos, peptídeos, aminofosfolipídeos ou proteínas, formando uma base de Schiff instável que se rearranja para um produto mais estável conhecido como produto de Amadori, degradado por desidratação, oxidação e outras reações químicas em uma variedade de compostos intermediários reativos, conhecido como  $\alpha$ -dicarbonilos ou oxoaldeídos (Figura 11), por fim, os *AGEs* são fluorescentes e adutos insolúveis que se acumulam em proteínas de meia vida longa, modificando suas funções específicas, além das vias endógenas, os produtos de glicação avançada também podem ser obtidos por vias exógenas, ingeridos através de uma dieta rica em alimentos preparados sob alta temperatura (SINGH et al., 2014; BARBOSA et al., 2016).



**Figura 11.** Vias de glicação avançada. I. hemoglobina glicada, II. via oxidativa. No fim todas levam a formação de produtos finais de glicação avançada: glioxal, metilglioxal e dimetilglioxal, entre outros.

Com isso a atividade antiglicante é justamente a capacidade de inibir a formação desses AGEs endógenos e um dos métodos utilizados para a avaliação dessa atividade *in vitro* é baseado em fluorescência específica, em placas de 96 poços, considerado uma forma rápida e confiável de rastreamento de produtos naturais antiglicantes (KIHO et al., 2004; BTISSAM et al., 2017). A aminoguanidina foi o primeiro agente antiglicante testado clinicamente descrito na literatura, porém apresentou efeitos colaterais associados ao seu uso crônico, entretanto é utilizado até hoje como suplemento alimentar e em alguns cosméticos (TORRES et al., 2018). A busca por novos agentes antiglicantes se faz necessário para prevenção e tratamento das inúmeras disfunções fisiopatológicas que preocupa não somente pacientes enfermos como também indivíduos com predisposição a essas doenças.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar química e biologicamente sorbicilinoídes e outros metabólitos produzidos pelo fungo endofítico *Penicillium chrysogenum* isolada de *Gustavia* sp.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- I. Isolar metabólitos do fungo *Penicillium chrysogenum* obtido de *Gustavia* sp., principalmente substâncias da classe dos sorbicilinoídes detectadas na forma de monômeros e dímeros em estudo anterior (ALMEIDA, 2014);
- II. Caracterizar e identificar esses metabolitos;
- III. Avaliar o potencial antiglicante das substâncias isoladas e identificadas;

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

As etapas a seguir de 4.1 a 4.3 foram realizadas em um estudo anterior, servindo apenas como orientação de como os extratos foram obtidos, para dar sequência ao estudo atual.

### **4.1. Reativação da linhagem de *Penicillium chrysogenum***

A linhagem 401 de *P. chrysogenum*, mantida na coleção de estudos do Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismo da Amazônia – GEMMA foi reativada em uma cabine de segurança biológica (FILTERFLUX), utilizando placa de Petri contendo o meio de cultura BDA, descrito abaixo. A linhagem foi inoculada em três pontos da placa, com 10 µL da suspensão de esporos por ponto, cultivada a 29 °C até crescimento e repicada para duas outras placas contendo o mesmo meio de cultura. A partir destas placas foram preparadas novas suspensões de esporos em tubos criogênicos de 1,8 mL, para as próximas etapas.

#### **4.1.1. Meio BDA – Batata Dextrose Ágar**

Pesou-se 200 g de batatas limpas, descascadas e cortadas, cozinhou-se em 0,5 L de água destilada até ficar bem macia, filtrou-se o líquido e adicionou 20 g de dextrose e 15 g de Ágar bacteriológico, completou-se o volume para 1 L de água destilada e misturou-se manualmente em banho-maria até dissolver bem todos os ingredientes em seguida foi esterilizado em autoclave (PHOENIX) a 120°C por 20 minutos.

### **4.2. Cultivo de *P. chrysogenum***

O fungo foi cultivado em 100 frascos erlenmeyes de 1 L contendo 300 mL do meio de cultura BDL, descrito abaixo. Em cada frasco foram inoculados 50 µL da suspensão de esporos da linhagem de *P. chrysogenum* e o cultivo prosseguiu no modo estático, em câmara de BOD (SOLAB), a temperatura de 26 °C, por 20 dias. Após o período de cultivo, o líquido cultivado foi separado da massa micelial por peneiração e filtrado em papel de filtro sob vácuo. O líquido filtrado foi acrescido de 3% de metanol e armazenado em garrações de vidro âmbar de 4 L até nova filtração em membrana de 0.45 micra.

#### 4.2.1. Meio BDL – Batata Dextrose e Levedura

Para 1 L de meio de cultura: pesou-se 200 g de batatas limpas, descascadas e cortadas, cozinhou-se em 0,5 L de água destilada até ficar bem macia, filtrou-se o líquido e adicionou 20 g de dextrose e 2 g de levedura, completou-se o volume para 1 L de água destilada e misturou-se manualmente em banho-maria até dissolver bem todos os ingredientes em seguida foi esterilizado em autoclave (PHOENIX) a 120°C por 20 minutos.

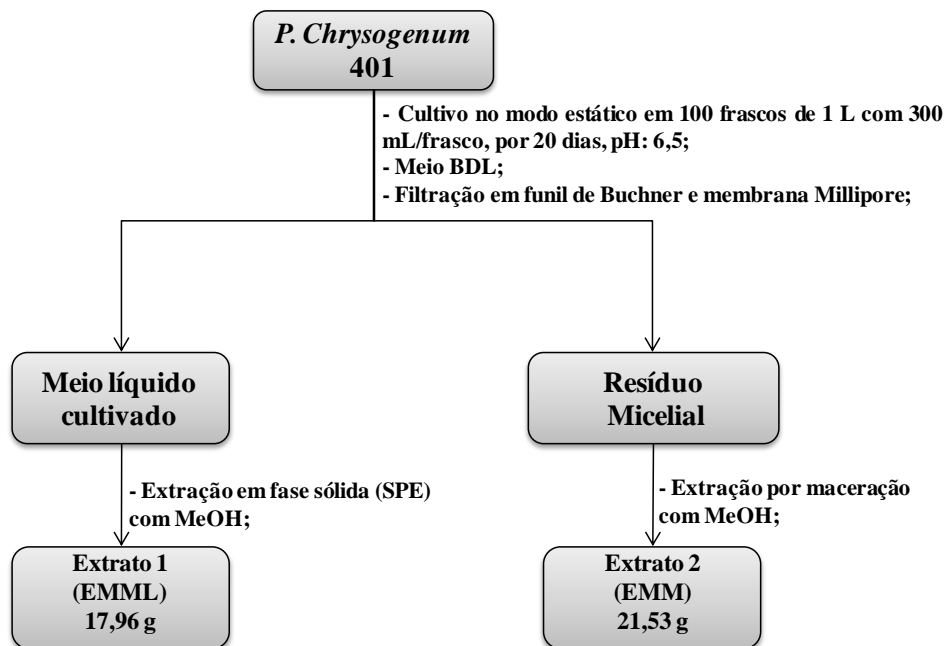
#### 4.3. Obtenção dos extratos do líquido cultivado e do micélio

O líquido filtrado foi extraído em fase sólida – SPE, composta por 10 g de sílica C18 (Figura 12). Antes de iniciar foi feito o condicionamento do cartucho de SPE com MeOH, sem vácuo, seguido da mistura H<sub>2</sub>O:MeOH 3% sob vácuo. Após o condicionamento, cada litro do líquido cultivado foi gradativamente filtrado no cartucho com a bomba em baixa pressão e extraído por duas vezes consecutivas com 30 mL de MeOH. Os extratos foram reunidos, concentrados, identificados e armazenados em dessecador para as próximas análises.

A massa micelial foi seca em estufa para remover os resíduos de água do cultivo e submetido à extração por maceração com metanol. O extrato metanólico foi concentrado e armazenado para estudos posteriores (Figura 13).



**Figura 12.** Sistema de extração em fase sólida.

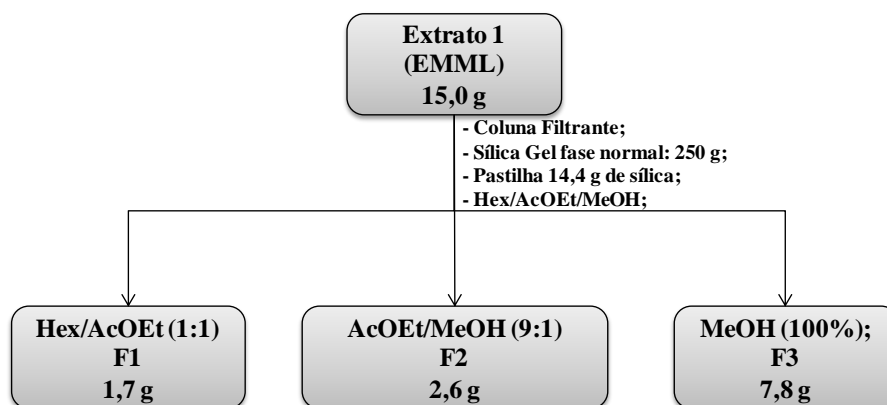


**Figura 13.** Esquema do cultivo do fungo e obtenção dos extratos.

#### **4.4. Fracionamento do extrato metanólico do meio líquido cultivado de *P. chrysogenum***

O extrato metanólico do meio líquido cultivado (EMML) foi inicialmente analisado por Cromatografia em Camada Delgada - CCD (cromatoplasas pré-fabricadas de sílica gel TLC de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência F<sub>254</sub> da Sorbent Technologies), reveladas por irradiação com lâmpada ultravioleta - UV (264 e 365 nm) e reagente vanilina acidificada. As placas foram eluídas em diferentes combinações de hexano/acetato de etila/metanol (Hex/AcOEt/MeOH).

Após as análises por CCD, o extrato bruto seco foi submetido, duas vezes, à cromatografia em coluna com sílica gel (SiliCycle SiliaFlash F60) e eluída com a mistura dos solventes: Hex/AcOEt/MeOH (Figura 14).



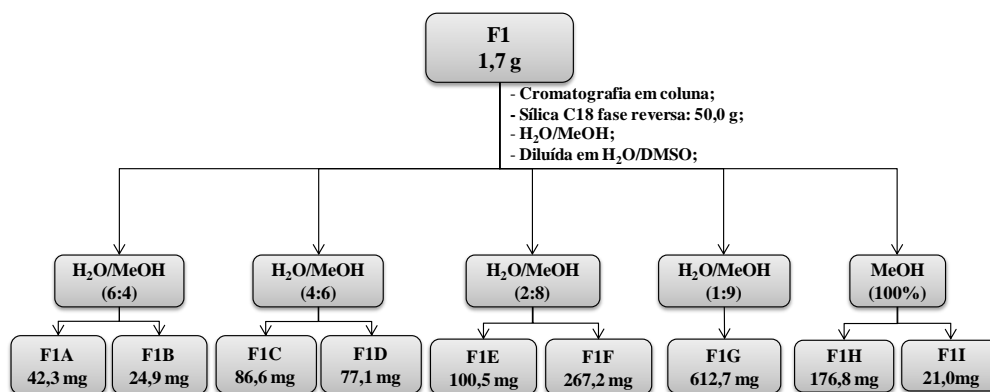
**Figura 14.** Esquema do fracionamento do extrato 1 – EMML.

#### 4.5. Fracionamento da fração um – F1

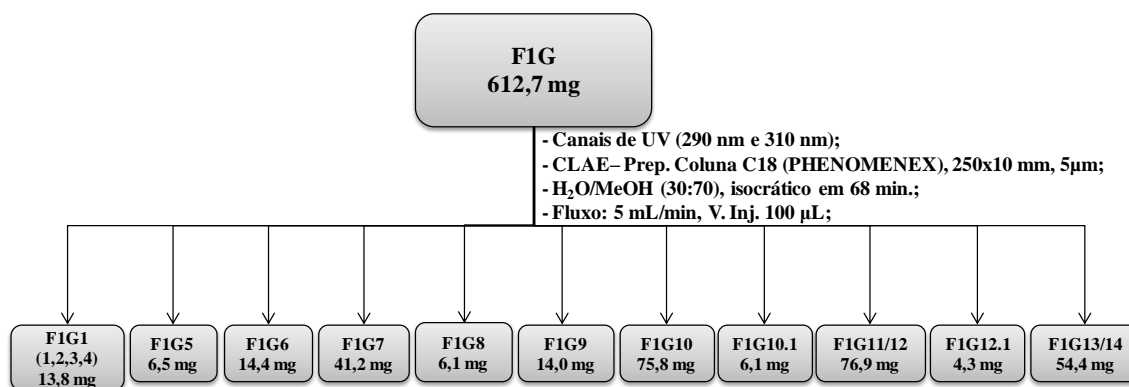
A fração F1 (1,7 g), após análise por cromatografia de camada delgada – CCD em fase reversa foi submetida a um novo fracionamento em coluna cromatográfica de sílica-C18 retirada de cartuchos de SPE e eluída com as misturas de solventes: H<sub>2</sub>O (Milli-Q) e MeOH (grau HPLC) (Figura 15).

Após análises espectrométricas das frações obtidas, observou-se que as substâncias de interesse estavam presente na fração F1G, que foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, analítica com detector de arranjo de diodos (DAD) ajustado para monitoramento entre 200 e 400 nm (Acella<sup>®</sup> da Thermo Scientific), em coluna Luna C18, 5 µm, 150 mm x 4,60 mm – Phenomenex, para determinação do método de separação. Após o ajuste do método e o escalonamento (Fator de escalonamento: 7,876, Fluxo: 5 mL/min, Concentração: 500 mg/mL, carga: 50 mg/mL, Vol. de injeção: 100 µL), a separação foi realizada por CLAE semipreparativa em cromatógrafo modelo Shimadzu<sup>®</sup> (CBM-20A), equipado com detector de UV (SPD-20A), degaseificador (DGPU-20A) e sistemas binários de solvente (LC-6AD), e operando nos comprimentos de onda de 290 nm e 310 nm, com eluição isocrática com metanol 70% (Figura 16).





**Figura 15.** Esquema do fracionamento da F1.

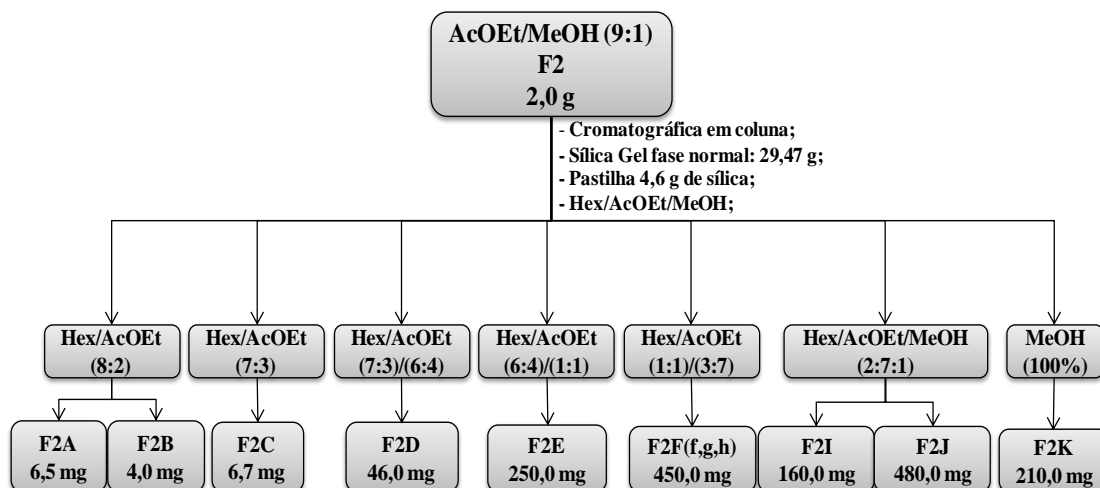


**Figura 16.** Esquema do fracionamento da F1G.

As amostras F1G5, F1G8, F1G10, F1G12 (11 e 12) e F1G14 (13 e 14) após análises espectrométricas foram encaminhadas para análise de RMN.

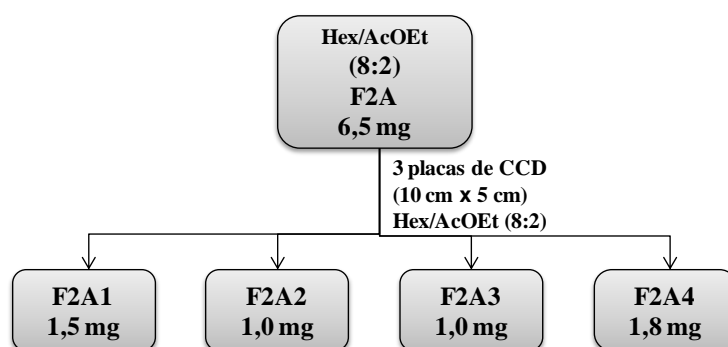
#### 4.6. Fracionamento da fração dois - F2

A fração F2 (2 g), após análise por cromatografia de camada delgada - CCD, foi submetida a um novo fracionamento em coluna cromatográfica, empacotada com sílica gel (SiliCycle SiliaFlash F60), eluída em gradiente crescente de polaridade até 100% MeOH (Figura 17). A fração F3, originada do fracionamento do extrato 1 foi armazenada para estudos posteriores.



**Figura 17.** Esquema do fracionamento da fração F2.

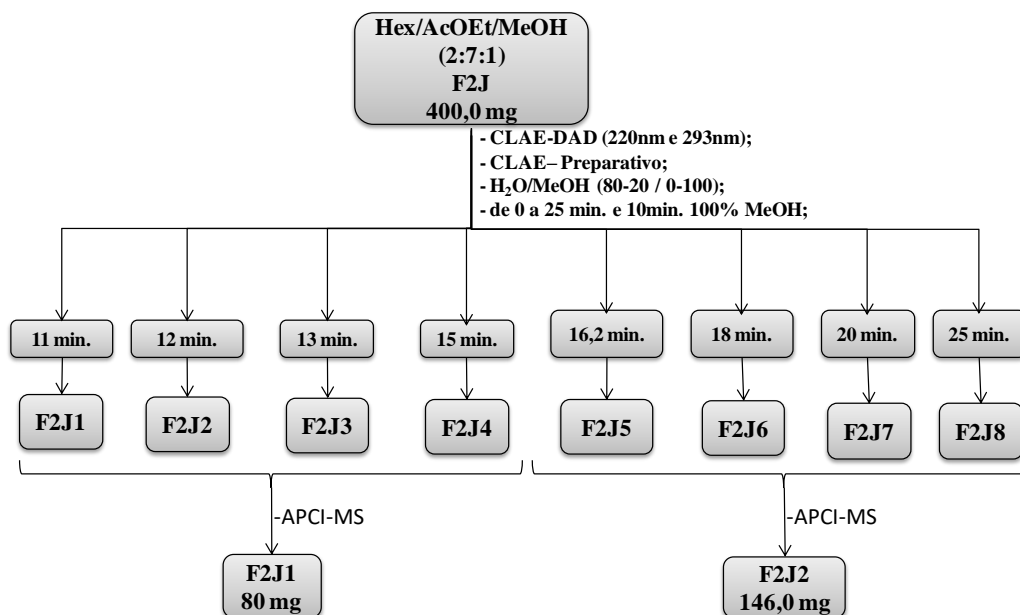
A fração F2A (6,5 mg) foi fracionada em três placas de CCD (5x10 cm), eluída com a mistura dos solventes Hex/AcOEt (8:2), revelada com lâmpada ultravioleta (UV-264nm), da qual foram obtidas quatro novas frações (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema do fracionamento por CCD da fração F2A.

As frações F2D, F2E, F2F, F2J e F2K, foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE analítica, eluída com água Milli-Q (A) e MeOH grau HPLC (B), com o gradiente (80:20) a 100% B em 25 min. seguido por mais 10 min. com 100% de B e intervalo de 16 min. para condicionamento da coluna, em um fluxo 1mL.min<sup>-1</sup>.

Após a análise dos cromatogramas, a fração F2J foi solubilizada em 500 µL de metanol e fracionada em CLAE-semipreparativa, utilizando uma coluna Luna C18 (5µm, 250 x 15,00 mm) Phenomenex, com fluxo de 6 mL.min<sup>-1</sup>, em modo gradiente de eluição como descrito no modo analítico. Foram obtidas oito frações que foram reunidas após análise por espectrometria de massas, resultando em duas frações (Figura 19).



**Figura 19.** Esquema do fracionamento da fração F2J.

A fração F2J1 após ser analisada por espectrometria de massas foi encaminhada para análise de RMN para sua determinação estrutural.

Em geral, o extrato e as frações foram diluídas a 10 ppm em metanol grau HPLC e analisadas, na faixa de  $m/z$  100-1000, por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (modelo LCQ Fleet da Thermo scientific), equipado com fonte de ionização a pressão atmosférica – APCI e ionização por *electrospray* - ESI, operando em modo positivo e/ou negativo de aquisição. As análises de RMN 1D e 2D foram feitas em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III HD, operando a 11,75 tesla, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe™), com gradiente de campo na direção z, observando-se os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 500,13 e 125,76 MHz, respectivamente. Para amostras com pouca quantidade foram utilizado clorofórmio e metanol deuterados ( $\text{CDCl}_3$  e MeOD), e para amostra com muita quantidade foram utilizado DMSO-*d*, como solventes para diluição. Ambos os equipamentos pertencem aos laboratórios LABCEM e NMR-LAB da Central Analítica, Setor Norte do Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

## **4.7. Avaliação da atividade antiglicante**

### **4.7.1. Antiglicação (Glioxal)**

Esta atividade foi feita em parceria com a farmácia pelo grupo BIOPHAR de acordo com a metodologia de Kiho et al. (2004), com algumas modificações. A análise foi efetuada em triplicata com: Albumina (BSA) a 10 mg/mL (SIGMA), Glioxal a 30 mM (SIGMA) e 1 mg/mL de cada amostra em DMSO. As soluções de glioxal e BSA foram preparadas em tampão fosfato (0,2 M, pH 7.4), contendo azida de sódio 3 mM (NUCLEAR) como agente antimicrobiano. Em resumo, os 200 µL da mistura total da reação foram compostos por: BSA (135 µL), glioxal (135 µL) ou tampão fosfato (135 µL, para controle negativo/branco) e amostra (30 µL) ou DMSO (30 µL, para controle negativo/branco) colocados em placa de Eliza de 96 poços preta, vedados com PARAFILM, tampado e incubado a 37 °C por 24 horas com uma rotação de 150 rpm, em condições estéreis e no escuro. Após a incubação, cada amostra foi analisada no leitor de microplaca pela intensidade da fluorescência nos comprimentos de onda de 330 nm (excitação) e 420 nm (emissão). Para controle positivo foi utilizado Aminoguanidina (SIGMA). Os resultados foram expressos em percentual de inibição e a CI<sub>50</sub> (quantidade de inibidor necessário para reduzir a 50% concentração inicial de Albumina glicada) foi calculada por meio da equação da reta.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Fluor.}_{(\text{amostra} - \text{branco})} / \text{Fluor.}_{(\text{controle} - \text{branco})}] \times 100$$

$$\text{Fluor.}_{(\text{amostra} - \text{branco})} = \text{fluorescência da amostra} - \text{a fluorescência do branco.}$$

$$\text{Fluor.}_{(\text{controle} - \text{branco})} = \text{fluorescência do controle} - \text{a fluorescência do branco.}$$

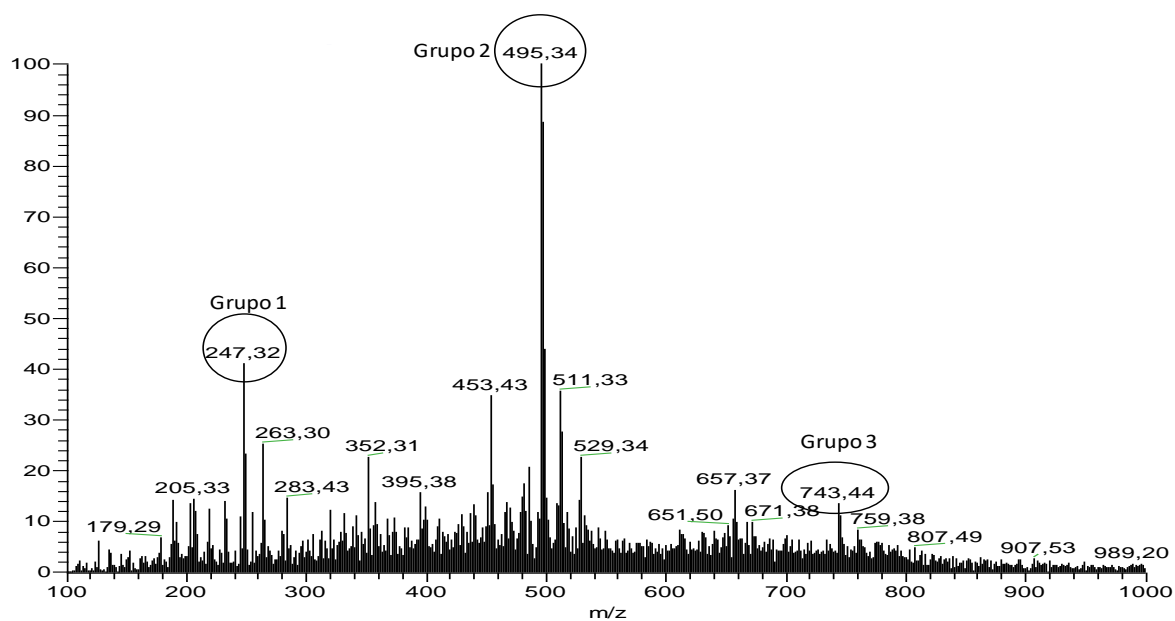
### **4.7.2. Antiglicação (Frutose)**

Segue a mesma metodologia da via oxidativa, com exceção do glioxal que foi trocado pela frutose (0,1 mM) e do tempo de incubação que foi de cinco dias.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise por APCI-IT-MS do EMML de *P. chrysogenum*

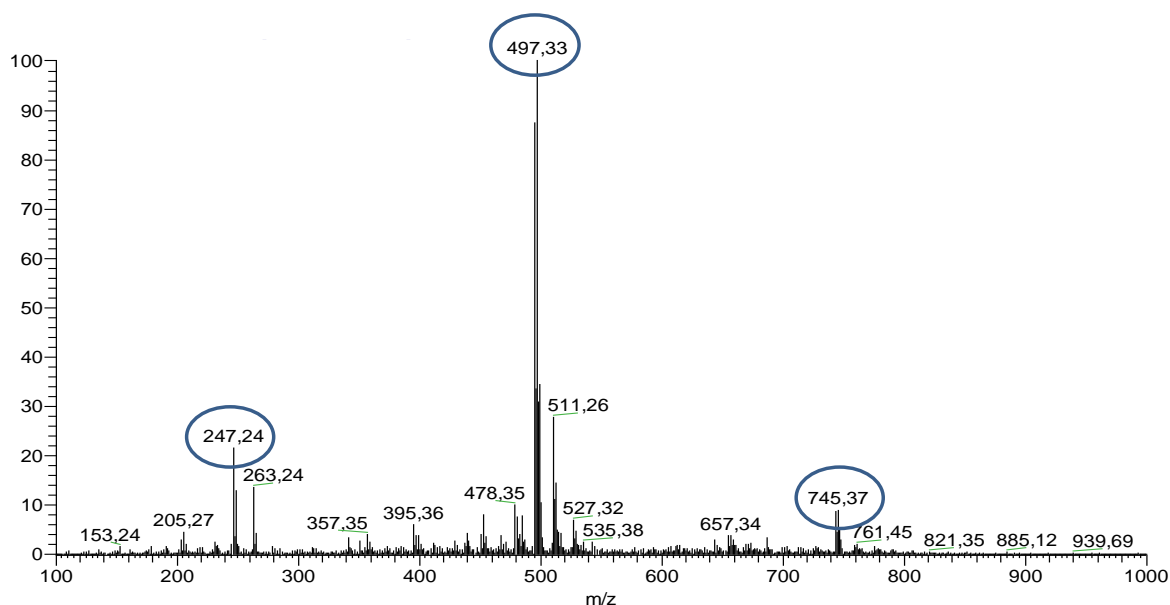
No espectro de íons totais do extrato bruto do meio líquido cultivado (EMML) de *P. chrysogenum*, na faixa de  $m/z$  100-1000 ( $[M-H]^-$ ), foram detectados três grupos distintos de íons compatíveis com os sorbicilinoídes, grupo 1: os monômeros, grupo 2: os dímeros e grupo 3: os trímeros (Figura 20).



**Figura 20.** Espectro de íons totais (*full scan*) do EMML de *P. chrysogenum*.

### 5.2. Análise por APCI-IT-MS da fração F1

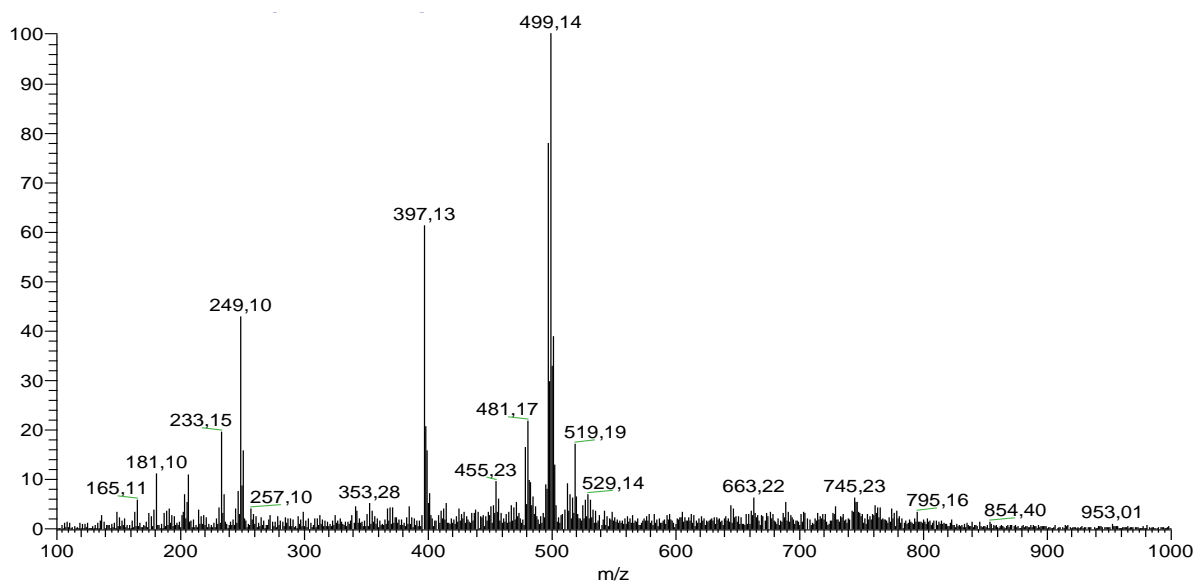
A análise espectrométrica no modo negativo da fração F1 do EMML apresentou um espectro de massas com menos ruídos e com os mesmos sinais referentes aos grupos anteriormente observados no perfil de massas desse extrato (Figura 21).



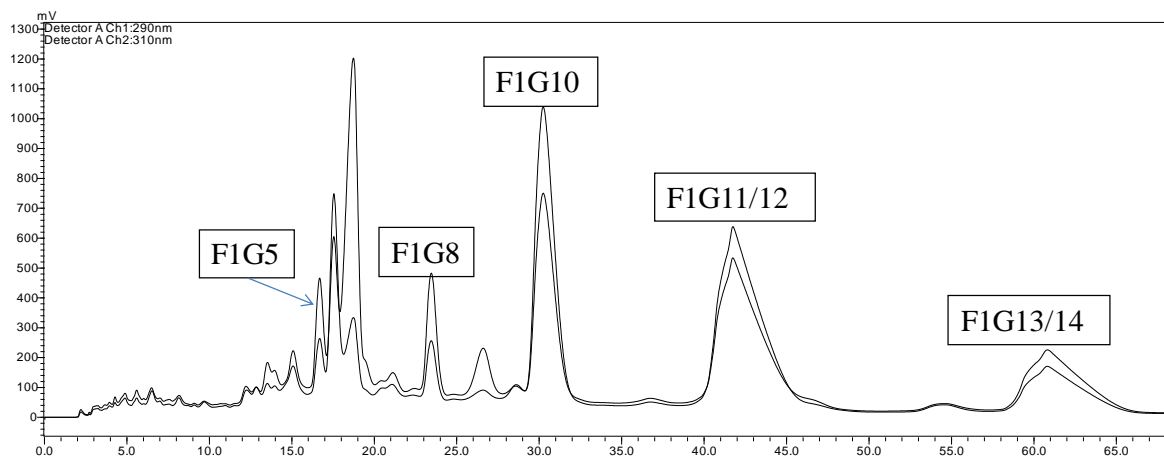
**Figura 21.** Espectro de íons totais (*full scan*) da fração F1 do EML de *P. chrysogenum*.

### 5.3. Análise por APCI-IT-MS e CLAE semipreparativa da fração F1G

A fração F1G apresentou um perfil espectrométrico em modo positivo com sinais coerentes com os mesmos grupos 1 e 2 do EML (Figura 22). Seu perfil cromatográfico apresentou uma boa resolução e separação entre cada pico principal, o que possibilitou a obtenção e identificação de cinco substâncias da classe dos sorbicilinoídes (Figura 23).



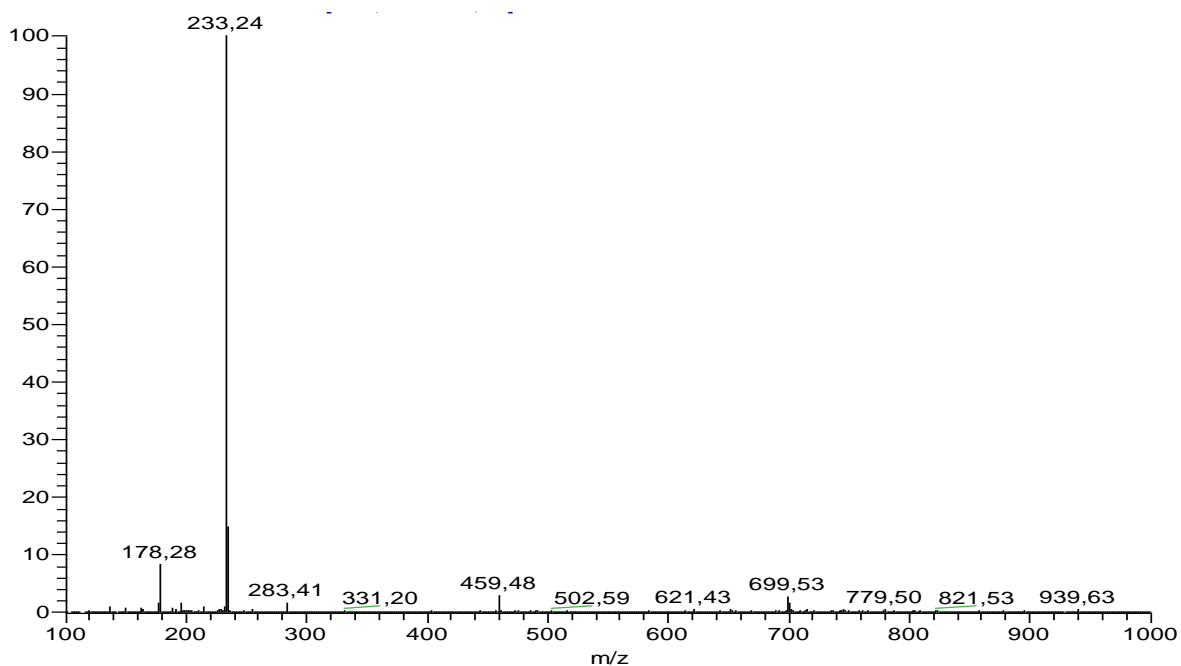
**Figura 22.** Espectro de íons totais (*full scan*) da fração F1G.



**Figura 23.** Cromatograma da amostra F1G em escala semipreparativa.

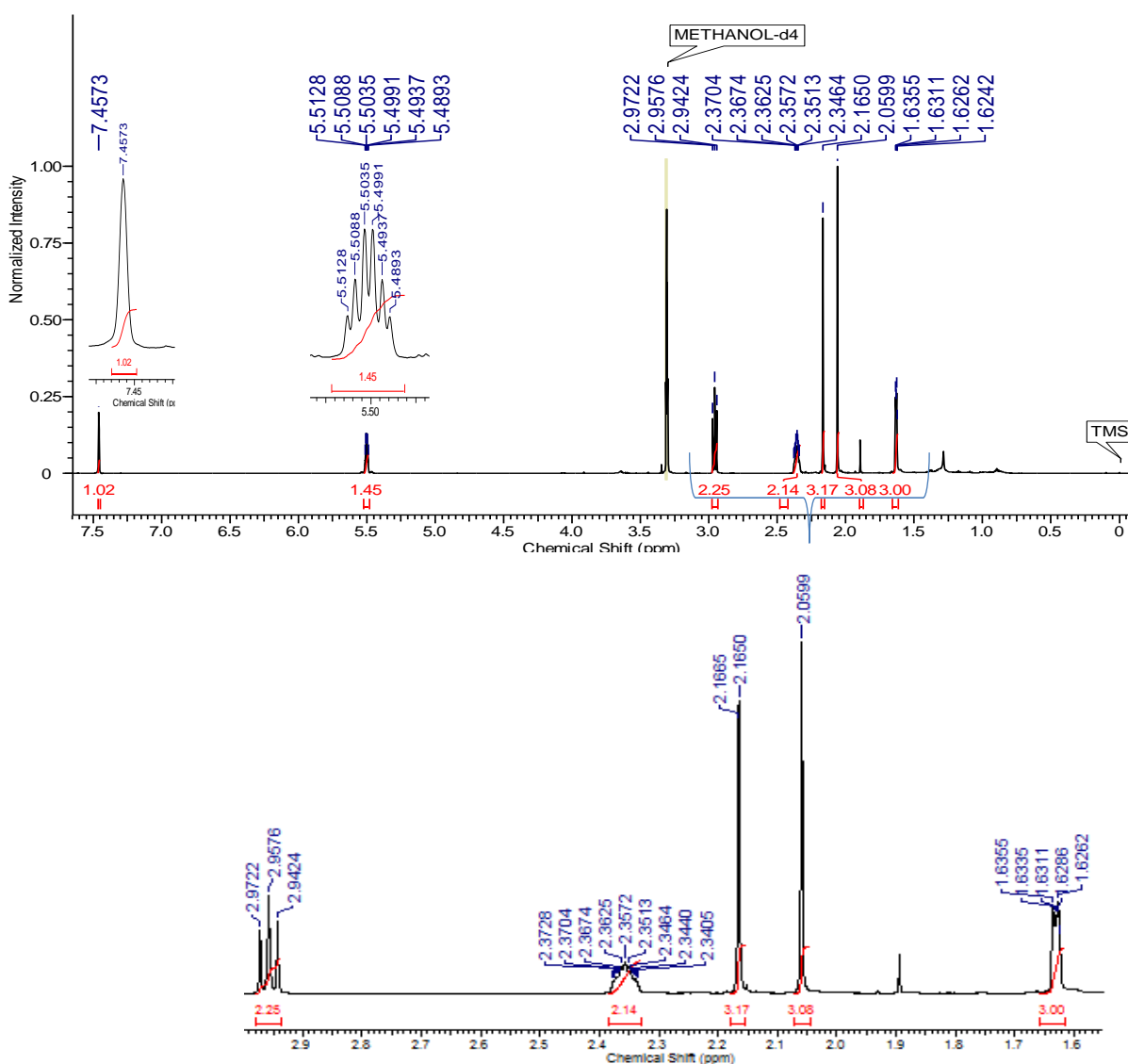
### 5.3.1. Identificação da amostra F1G8 / F2A1

As amostras F1G8 e F2A1 (7,6 mg) obtidas por fracionamento por CLAE e CCD (Item 4.5 e 4.6) respectivamente, apresentaram características de um sólido amarelo pálido, totalmente solúvel em MeOH. A análise de massas de ambas, no modo negativo evidenciou a presença de um pico base em  $m/z$  233 ( $[M-H]^-$ ), coerente com uma molécula desprotonada de massa 234 (Figura 24). Após a análise por massas e elucidação estrutural por RMN, constatou-se que as amostras F1G8 e F2A1 correspondiam a mesma substância, sendo então reunidas.



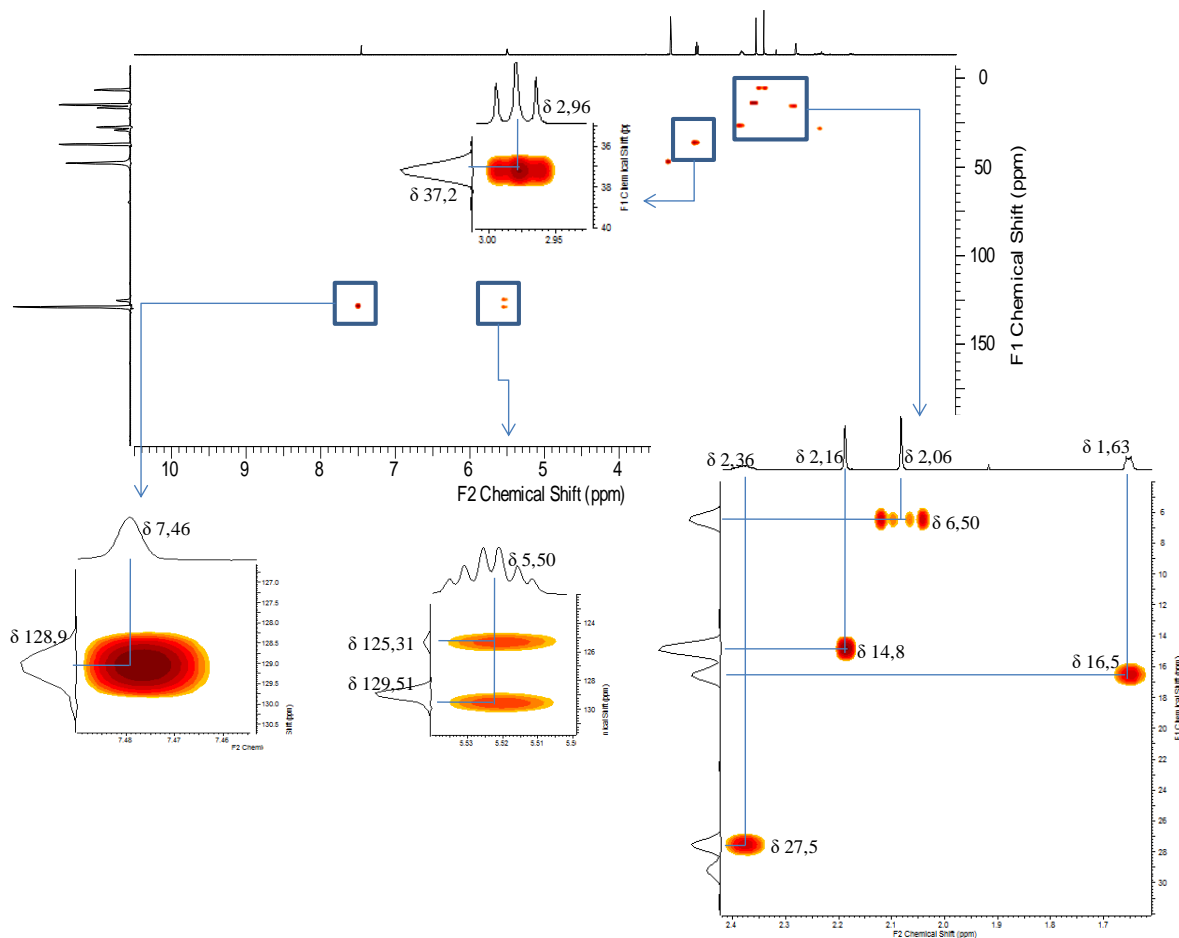
**Figura 24.** Espectro de massas de íons totais (*full scan*) da amostra F1G8/F2A1.

Na região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F1G8/F2A1 (Figura 25) foi possível observar um único sinal de hidrogênio em  $\delta$  7,46 (1H, *s*), o qual correlaciona com um carbono em  $\delta$  128,9 (HSQC, Figura 26), coerente com a presença de um anel aromático pentassubstituído. Na região alifática do espectro observou-se: um sinal de hidrogênios vinílicos sobrepostos em  $\delta$  5,50 (2H, *m*) correlacionados, em experimento de HSQC, a dois carbonos em  $\delta$  125,3 e 129,6; dois sinais metilênicos em  $\delta$  2,96 (2H, *t*, 7,45 Hz), correlacionado a um carbono em  $\delta$  37,2 (HSQC) e em  $\delta$  2,36 (2H, *m*), correlacionado a um carbono em  $\delta$  27,5; três sinais de metilas em  $\delta$  2,17 (3H, *d*, 0,7 Hz), em  $\delta$  2,06 (3H, *s*) e em  $\delta$  1,63 (3H, *m*), correlacionados respectivamente a carbonos em  $\delta$  14,8, 6,5 e 16,6 (HSQC).



**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra F1G8/F2A1(500 MHz, MeOD).





**Figura 26.** Mapa de correlação HSQC da amostra F1G8/F2A1 ( $J'$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD).

O hidrogênio aromático em  $\delta$  7,46 apresenta correlações com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  2,17 (COSY, Figura 27) e com carbonos em  $\delta$  14,8 ( $\text{CH}_3$ ), 160,6 ( $=\text{C}-\text{OH}$ ), 161,2 ( $=\text{C}-\text{OH}$ ) e 204,4 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 110,4 ( $=\text{C}$ , fraca), 111,8 ( $=\text{C}$ , fraca) e 115,7 ( $=\text{C}$ , fraca) (HMBC, Figura 28). Os hidrogênios em  $\delta$  2,17 estão correlacionados a longa distância com os carbonos em  $\delta$  115,7, 128,9 e 160,6. Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  2,06 estão correlacionados com os carbonos em  $\delta$  110,4, 160,6 e 161,2. Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,63 estão correlacionados aos hidrogênios em  $\delta$  5,50 (COSY) e aos respectivos carbonos em  $\delta$  129,5 e 125,3 (HMBC). Os hidrogênios em  $\delta$  2,36 estão correlacionados aos hidrogênios em  $\delta$  5,50 e  $\delta$  2,96 (COSY) e apresentam correlações com os carbonos em  $\delta$  37,2, 125,3 e 129,5, e 204,4. Finalmente, os hidrogênios em  $\delta$  2,96 correlacionam-se com os carbonos em  $\delta$  27,5, 129,5 e 204,4 (HMBC).

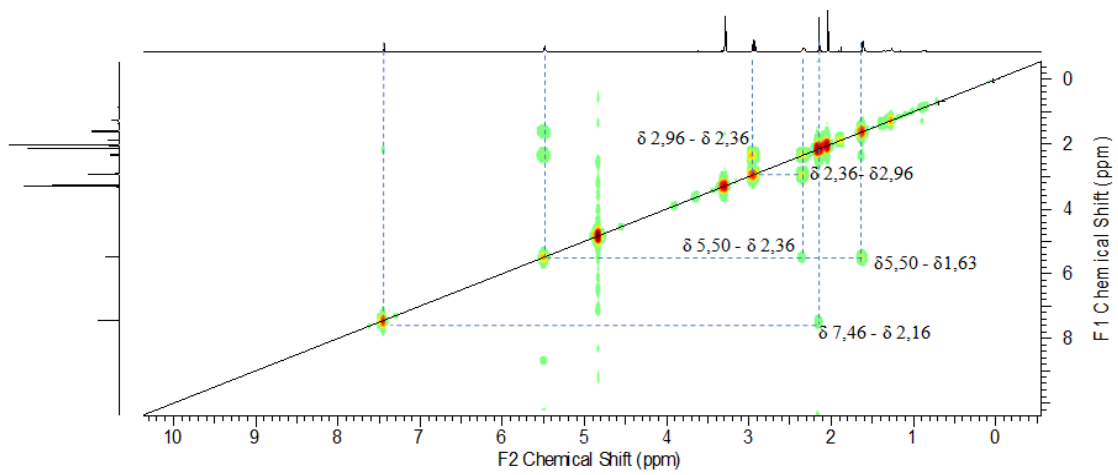


Figura 27. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra F1G8/F2A1.

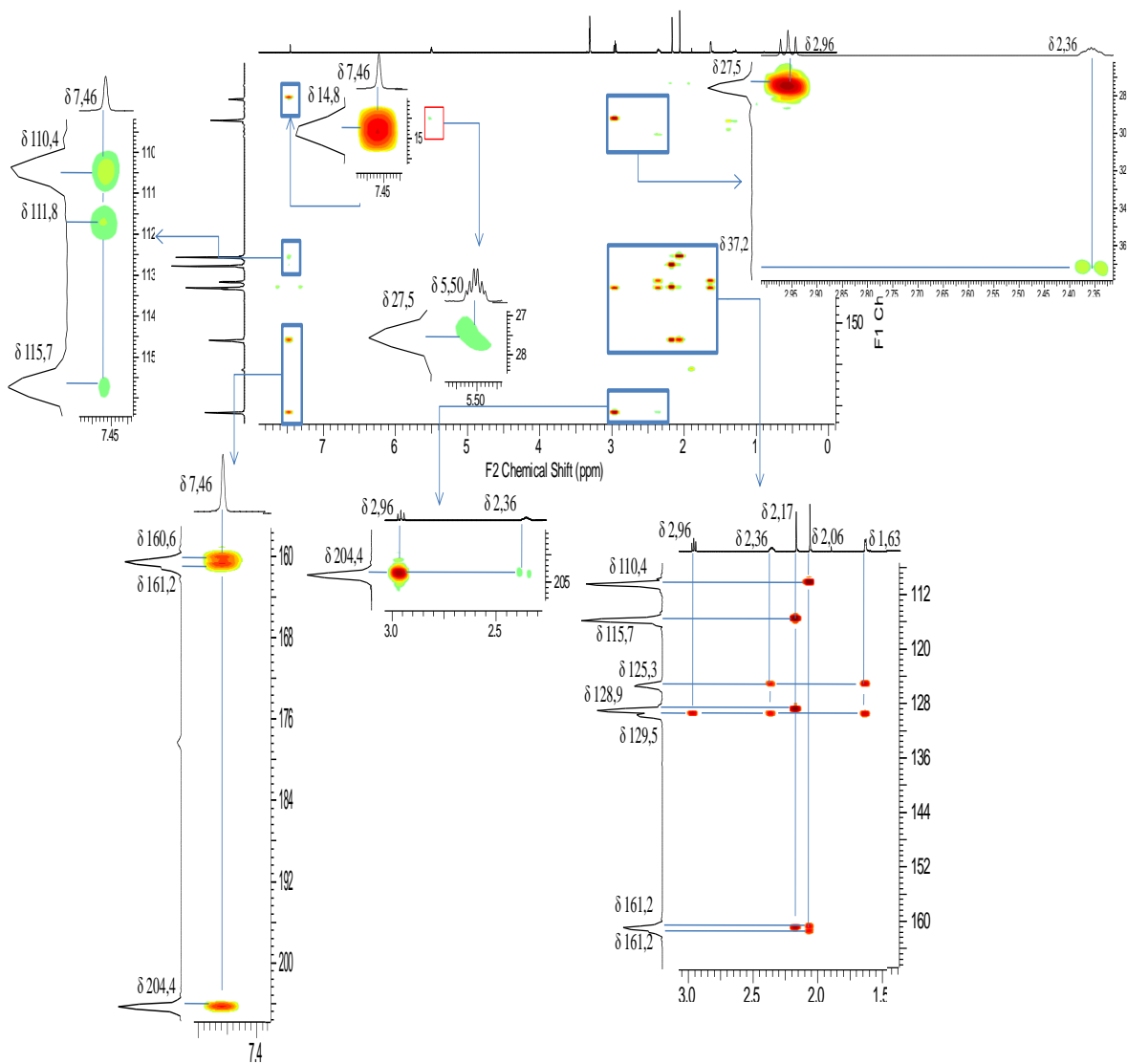


Figura 28. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F1G8/F2A1.

Pela interpretação dos sinais descritos e a comparação com dados da literatura (Tabela 3, TRIFONOV et al., 1983; MASKEY et al., 2005) foi possível identificar a amostra F1G8/F2A1 com o sorbicilinoide 2',3'-dihidrosorbicilina (Figura 29) cuja fórmula molecular é C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>. Esta substância foi isolada anteriormente de espécies dos gêneros *Verticillium*, *Trichoderma* e *Penicillium* e apresentou atividade citotóxica moderada contra várias linhagens de células cancerígenas e atividade antibiótica fraca contra bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (TRIFONOV et al., 1983; MASKEY et al., 2005; LAN et al., 2012; MENG et al., 2016).

**Tabela 3.** Comparação dos dados de RMN da amostra F1G8/F2A1 e da substância 2',3'-diidrosorbicilina.

N°	Amostra F2A1 <sup>1</sup>				2',3'-Dihidrosorbicilina <sup>2</sup>		2',3'-Dihidrosorbicilina <sup>3</sup>	
	$\delta_H$ (J em Hz)	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	$\delta_C$ <sup>4</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>5</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1'			204,4			207,3		204,3
2'	2,96 (2H; t; 7,5)	2,36	37,2	<b>27,5; 129,5;</b> <b>204,4</b>	3,02 (2H; t; 7,2)	39,2	2,97 (2H; t; 7,5)	37,5
3'	2,36 (2H; m)	2,96; 5,50	27,5	<b>125,3; 129,5;</b> <b>37,2; 204,4</b>	2,37 (2H; m)	28,5	2,5-2,3 (2H; m)	27,2
4', 5'	5,5 (2H; m)	2,26; 1,63	129,5; 125,3	27,5	5,49 (2H; m)	130,8; 127,0	5,7-5,4 (2H; m)	129,2; 125,9
6'	1,63 (3H; m)	5,5	16,5	<b>125,3; 129,5</b>	1,63 (3H; m)	18	1,66 (3H; d; 4,0)	17,7
1			111,8			117,3		110,1
2-OH			161,2			161,4	12,97 (1H; s)	161,5
3			110,4			122,8		112,5
3-CH <sub>3</sub>	2,06 (3H; s)		6,5	<b>110,4; 160,6;</b> <b>161,2</b>	2,24 (3H; s)	10,3	2,14 (3H; s)	7,2
4-OH			160,6			156,6	5,24 (1H; s)	158,6
5			115,7			124,6		114,5
5-CH <sub>3</sub>	2,17 (3H; d; 0,7)	7,46	14,8	<b>115,7; 128,9;</b> <b>160,6</b>	2,35 (3H; d; 0,8)	17,2	2,21 (3H; s)	15,5
6	7,46 (1H; s)	2,17	128,9	<b>14,8; 160,6;</b> <b>161,2; 204,4;</b> <b>110,4; 111,8;</b> <b>115,7</b>	7,56 (1H; s)	130	7,40 (1H; s)	128,8

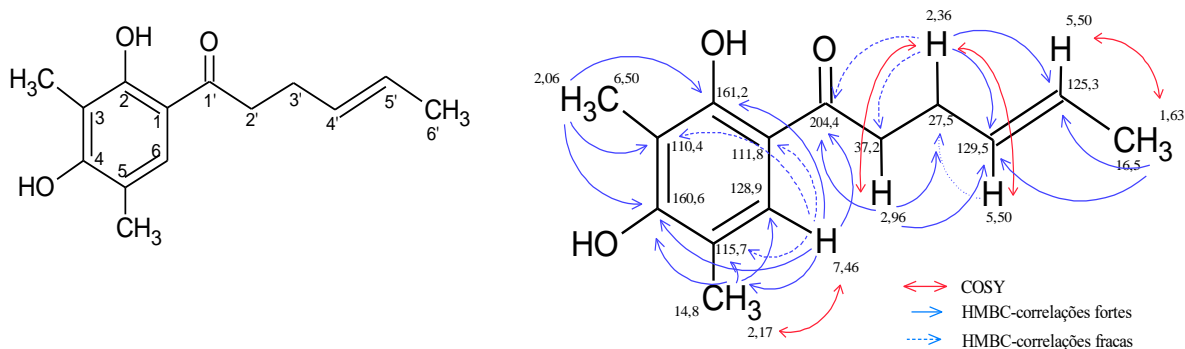
<sup>1</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III HD (500 MHz em MeOD);

<sup>2</sup> Espectrômetro AMX 300 (300.135 MHz em MeOD), (MASKEY et al., 2005);

<sup>3</sup> Espectrômetro VARIAN FT-80 (200 MHz em CDCl<sub>3</sub>), (TRIFONOV et al., 1983);

<sup>4</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

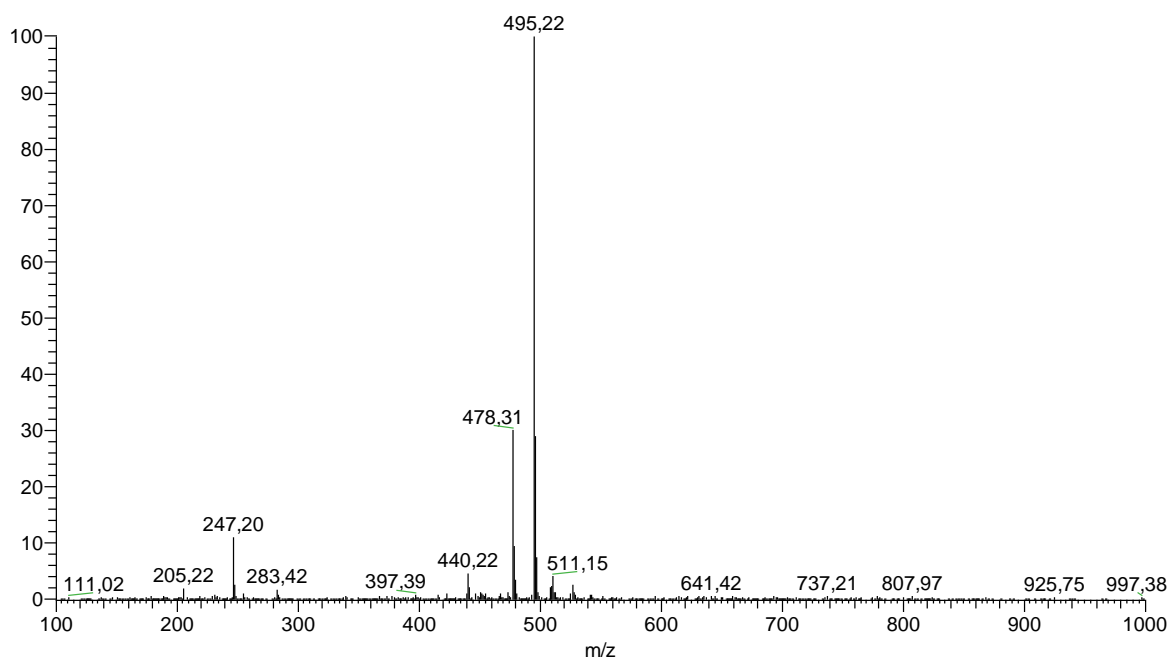
<sup>5</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;



**Figura 29.** Estrutura de 2',3'-dihydrosorbicilina e as correlações observadas para a amostra FIG8/F2A1.

### 5.3.2. Identificação da amostra F1G10

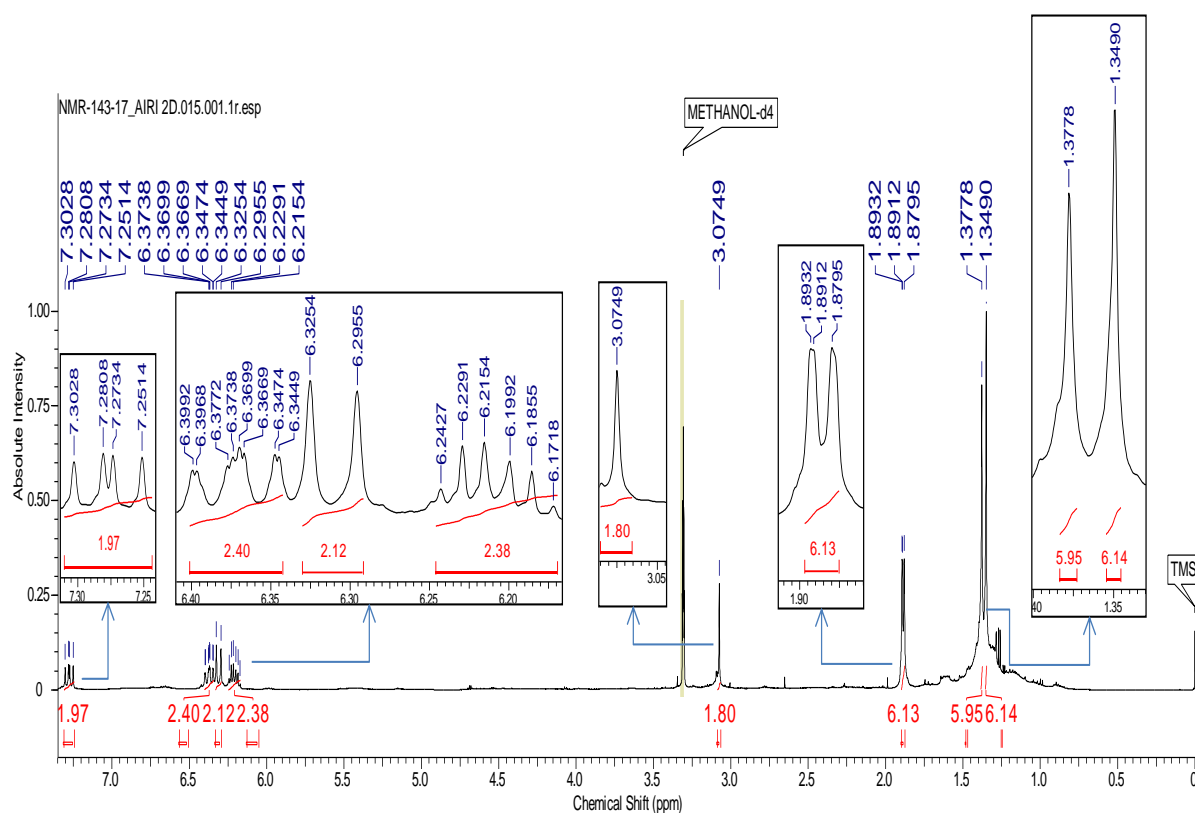
A amostra F1G10 (20,0 mg) apresentou característica de um pó amarelo, solúvel em MeOH. Na análise por espectrometria de massas no modo negativo foi observado o pico base em  $m/z$  495 ( $[M-H]^-$ ), correspondente a uma molécula desprotonada de um possível bisorbicilinoide com massa 496 u (Figura 30).



**Figura 30.** Espectro de massa de íons totais (*full scan*) da amostra F1G10.

No espectro de RMN de  $^1H$  de F1G10 (Figura 31) foi possível observar oito sinais, cinco característicos de um resíduo sorbil, composto por quatro hidrogênios vinílicos em  $\delta$  7,28 (2H, *dd*, 14,7, 11,0 Hz), 6,38 (2H, *m*), 6,31 (2H, *d*, 14,7 Hz) e 6,21 (2H, *dq*, 14,9, 6,8 Hz), e um hidrogênio metílico em  $\delta$  1,89 (6H, *dd*, 6,8, 1,0 Hz). Esses

hidrogênios foram revelados estarem diretamente correlacionados por experimento de HSQC (Figura 32) com os carbonos em  $\delta$  144,2, 132,3, 120,2, 140,8, 18,8, respectivamente. Observa-se pelos valores das constantes de deslocamento que as duplas ligações relacionadas a esses sinais têm configurações *trans*. Este resíduo sorbil foi confirmado pelos experimentos de COSY que correlaciona  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  a partir de duas ligações de distância (Figura 33) e HMBC que correlaciona  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a partir de duas ligações de distância (Figura 34); o sinal em  $\delta$  7,28 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  6,38 e 6,31 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  120,2, 132,3, 140,8 e um carbono em  $\delta$  175,9; o sinal em  $\delta$  6,38 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  7,28, 6,21, e 1,89 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  18,8, 140,8 e 120,2; o sinal em  $\delta$  6,31 está correlacionado por COSY ao hidrogênio em  $\delta$  7,28 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  132,3, 144,2, 175,9 e um em  $\delta$  104,7; o sinal em  $\delta$  6,21 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  6,38 e 1,89 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  18,8, 132,3 e 144,2; e o sinal em  $\delta$  1,89 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  6,38 e 6,21 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  120,2, 132,3, 140,8 e 144,2 (Figura 35).



**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra F1G10 (500 MHz, MeOD).

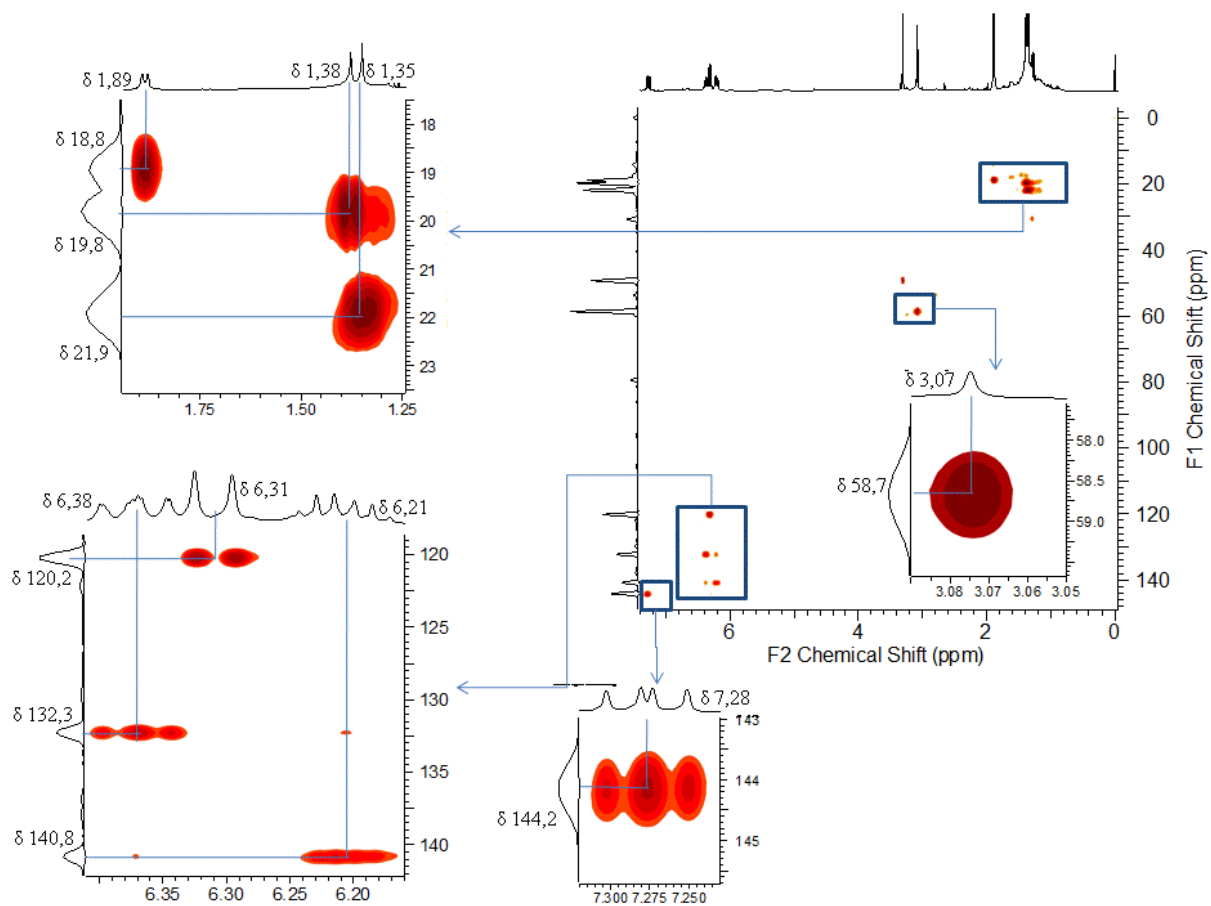


Figura 32. Mapa de correlação HSQC da amostra FIG10 ( $J'$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD).

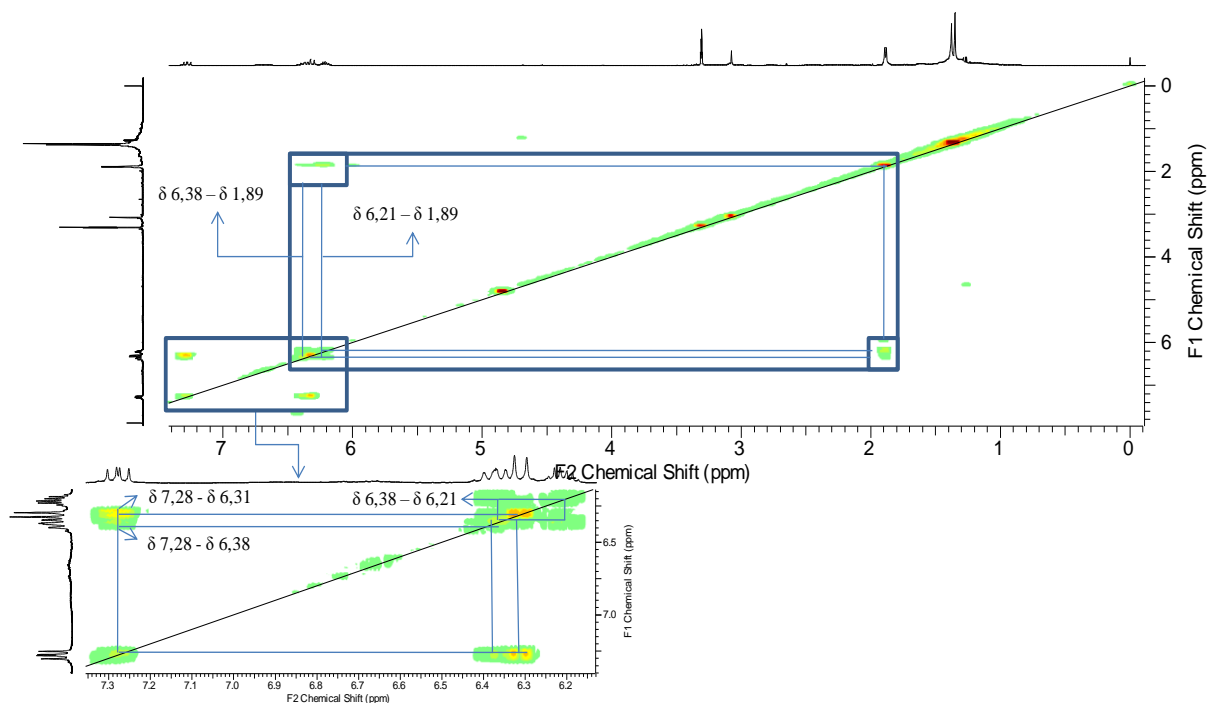


Figura 33. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra FIG10.

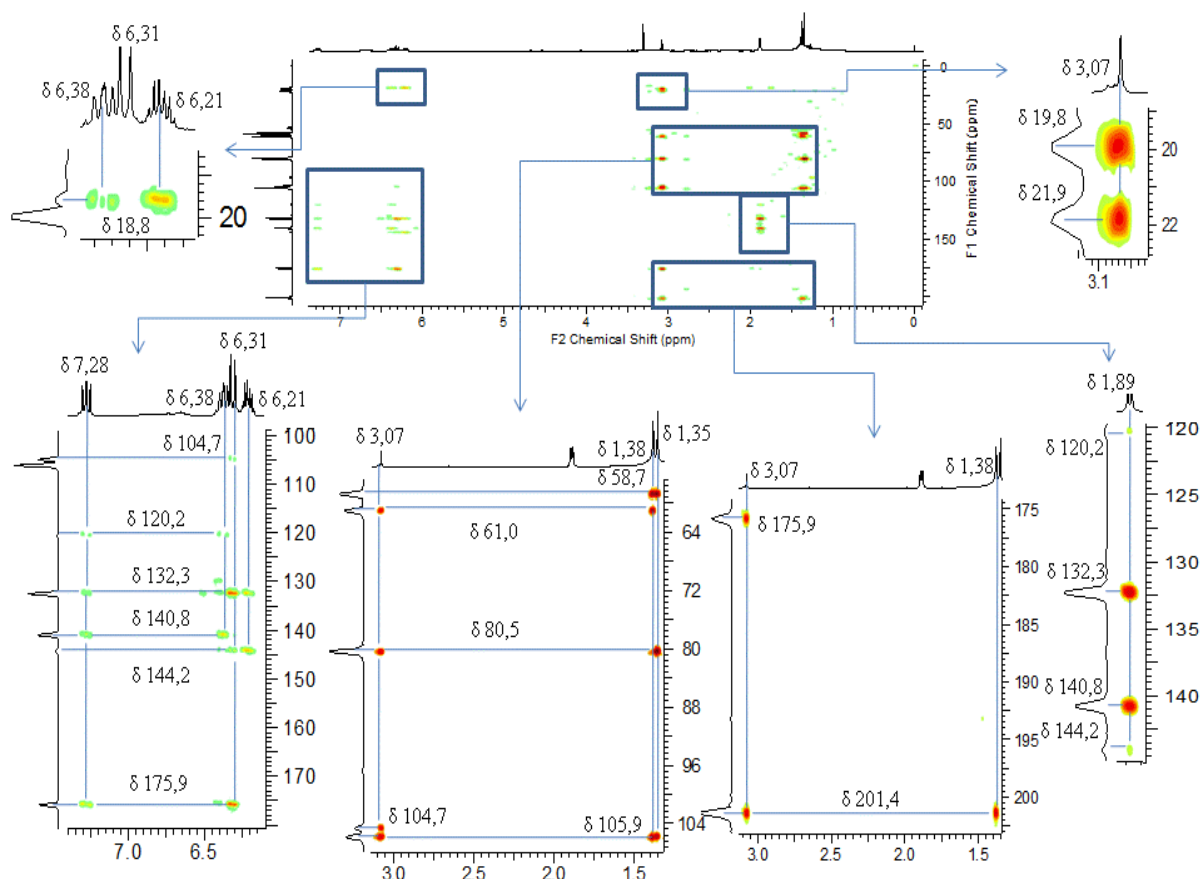


Figura 34. Mapa de correlação HMBC ( $J^2-J^4$ ,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra FIG10.

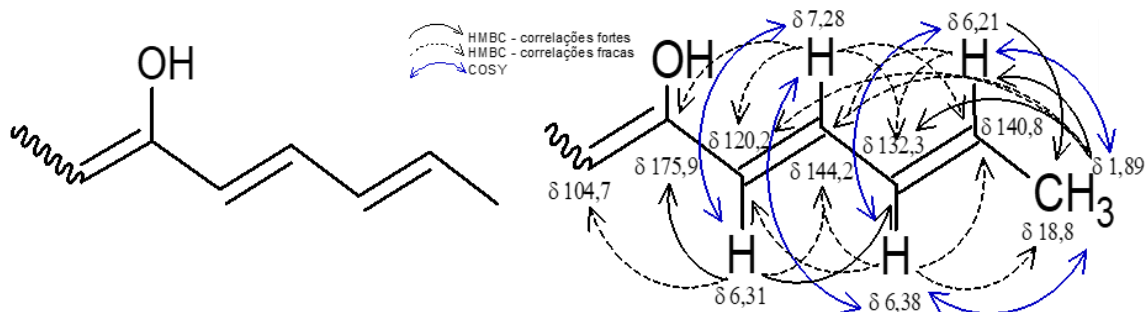


Figura 35. Resíduo sorbil e as correlações observadas pelos mapas de correlações COSY e HMBC da amostra FIG10.

Dos três sinais de hidrogênios restantes foi possível observar um sinal metínico em  $\delta$  3,07 (2H, *s*), característico de próton ligado a carbono  $sp^3$  próximo a carbonos carbonílico, vínflico ou aromático, e dois sinais metílicos em  $\delta$  1,38 (6H, *s*) e 1,35 (6H, *s*), todos diretamente correlacionados por HSQC aos carbonos em  $\delta$  58,7, 19,8 e 21,9 respectivamente, e tipicamente sem qualquer correlação por COSY. O sinal em  $\delta$  3,07 apresentou correlações à longa distância por HMBC com os carbonos em  $\delta$  19,8, 21,9, 61,0, 80,5, 104,7, 105,9, 175,9 e 201,4 (característico de carbonila de cetona); o sinal





**Tabela 4.** Comparação dos dados de RMN da amostra F1G10 com os dados da substância tricodimerol.

Nº	Amostra F1G10 <sup>1</sup>				Tricodimerol <sup>2</sup>		Tricodimerol <sup>3</sup>	
	$\delta_H$ (J em Hz)	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	$\delta_C$ <sup>4</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>5</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1/1'	3,07 (1H, s)		58,7	<b>19,8; 21,9; 61,0; 80,5;</b> <b>104,7; 105,9; 175,9; 201,4</b>	3,14 (1H, s)	58,1	2,99 s	57,5
2/2'			80,5			79,6		78,9
3/3'			105,9			105,2		104,1
4/4'			61,0			60,4		58,8
5/5'			201,4			201,0		198,0
6/6'			104,7			104,5		102,7
7/7'			175,9			176,1		175,9
8/8'	6,31 (1H, d, 14,7)	7,28	120,2	104,7; <b>132,3</b> ; 144,2; <b>175,9</b> ;	6,45 (1H, d, 14,7)	120,3	6,13 d (15,0)	118,5
9/9'	7,28 (1H, dd, 14,7, 11,0)	6,38, 6,31	144,2	120,2; 132,3; 140,8; 175,9	7,26 (1H, dd, 14,7, 11,4)	143,3	7,31 dd (10,2, 14,7)	143,6
10/10'	6,38 (1H, m)	7,28, 1,89	132,3	18,8; 140,8; 120,2, 144,2	6,40 (1H, m)	131,9	6,28 m	130,9
11/11'	6,21 (1H, dq, 14,9, 6,8)	6,38, 1,89	140,8	<b>18,8</b> ; 132,3; 144,2	6,24 (1H, dq, 15,0, 6,6)	140,2	6,22 m	140,4
12/12'	1,89 (3H, dd, 6,8, 1,0)	6,38, 6,21	18,8	120,2; <b>132,3</b> ; <b>140,8</b> ; 144,2	1,86 (3H, d, 6,6)	18,8	1,88 d (5,7)	18,7
13/13'	1,35 (3H, s)		21,9	<b>58,7</b> ; <b>80,5</b> ; <b>105,9</b>	1,34 (3H, s)	19,7	1,42 s	21,3
14/14'	1,38 (3H, s)		19,8	<b>58,7</b> ; <b>61,0</b> ; <b>105,9</b> ; <b>201,4</b>	1,41 (3H, s)	21,8	1,45 s	18,9
OH	-				16,60 (1H, s)		16,34 s	
OH	-				5,66 (1H, s)			

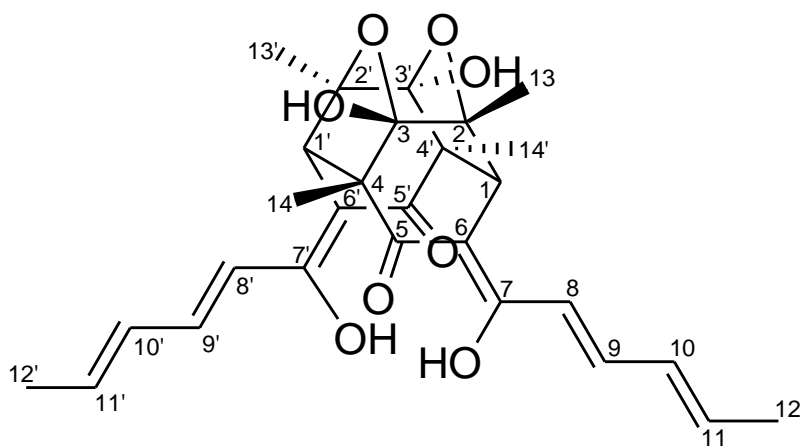
<sup>1</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III HD 500 MHz em MeOD;

<sup>2</sup> Espectrômetro JEOL ECLIPS-600 MHz em acetona-*d*<sub>6</sub> (LIU et al., 2005);

<sup>3</sup> Espectrômetro VARIAN UNITY 400 ou BRUKER DMX 600 MHz em CDCl<sub>3</sub> (LEE et al., 2005);

<sup>4</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

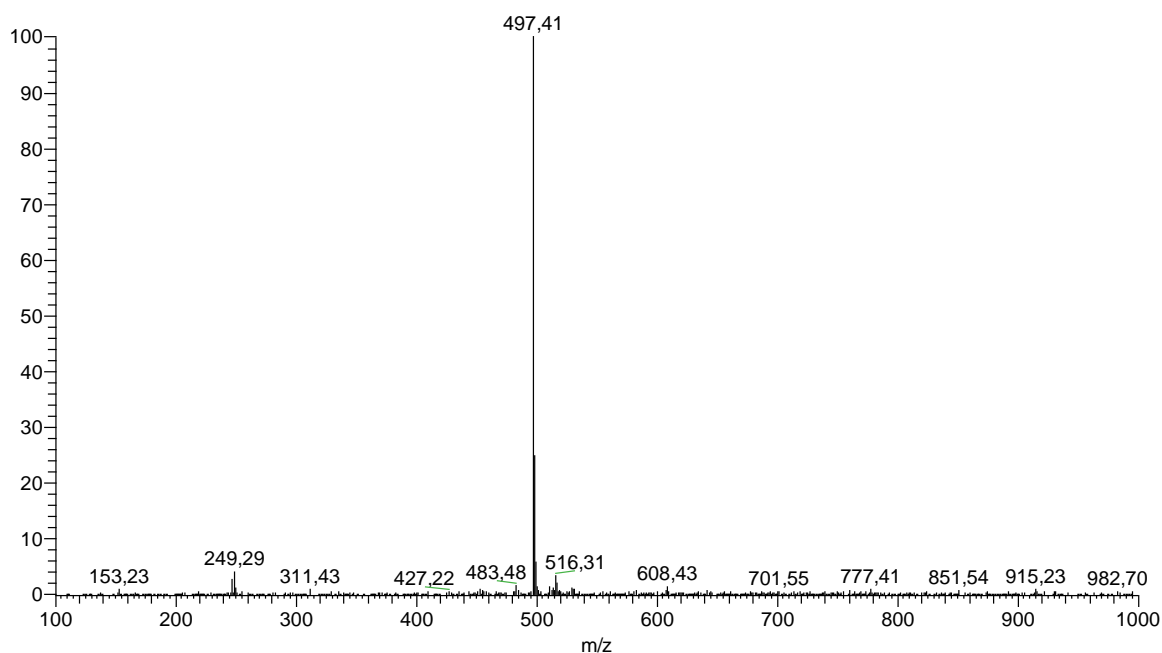
<sup>5</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;



**Figura 37.** Estrutura do tricodimerol identificado na amostra F1G10.

### 5.3.3. Identificação da amostra F1G12

A amostra F1G12 (12,0 mg) apresentou característica de um pó amarelo, solúvel em MeOH. A análise por espectrometria de massas no modo negativo revelou um pico base em  $m/z$  497 ( $[M-H]^-$ ), correspondendo a um possível bisorbicilinoide de massa 498 u (Figura 38).



**Figura 38.** Espectro de massa de íons totais (*full scan*) da amostra F1G12.

O espectro de RMN de  $^1H$  de F1G12 (Figura 39) apresentou algumas semelhanças com o espectro de  $^1H$  das amostras F1G10 e F1G8/F2A1, sugerindo-se outro dímero de sorbicilinoide com o mesmo esqueleto, porém com um resíduo sorbil e outro 2',3'-dihidrosorbil. Nos sinais característicos do resíduo sorbil, foram observados os hidrogênios em  $\delta$  7,29 (1H, *dd*, 14,9, 11,0 Hz), 6,37 (1H, *0020m*), 6,32 (1H, *d*, 14,9 Hz), 6,21 (1H, *dq*, 14,9, 6,8) e 1,89 (3H, *dd*, 6,8, 1,0 Hz) diretamente correlacionados por HSQC (Figura 40) aos carbonos em  $\delta$  144,2 132,3 120,1 140,9 e 18,9 respectivamente. O sinal em  $\delta$  7,29 está correlacionado por COSY (Figura 41) ao hidrogênio em  $\delta$  6,32 e por HMBC (Figura 42) aos carbonos em  $\delta$  132,3, 140,8, 175,7, 120,1; o sinal em  $\delta$  6,37 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  6,21 e 1,89 e por HMBC com os carbonos em  $\delta$  18,9, 120,1 e 140,8; o hidrogênio em  $\delta$  6,32 está correlacionado por COSY ao hidrogênio em  $\delta$  7,29 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  104,6, 132,3, 144,2 e 175,7; o hidrogênio em  $\delta$  6,21 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  6,37

e 1,89 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  18,9, 132,3 e 144,2; o hidrogênio em  $\delta$  1,89 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  6,37 e 6,21 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  132,3, 140,8 e 144,2 (Figura 43).

NMR-348-17\_AIRI-Bidimensionais.016.001.1r.esp

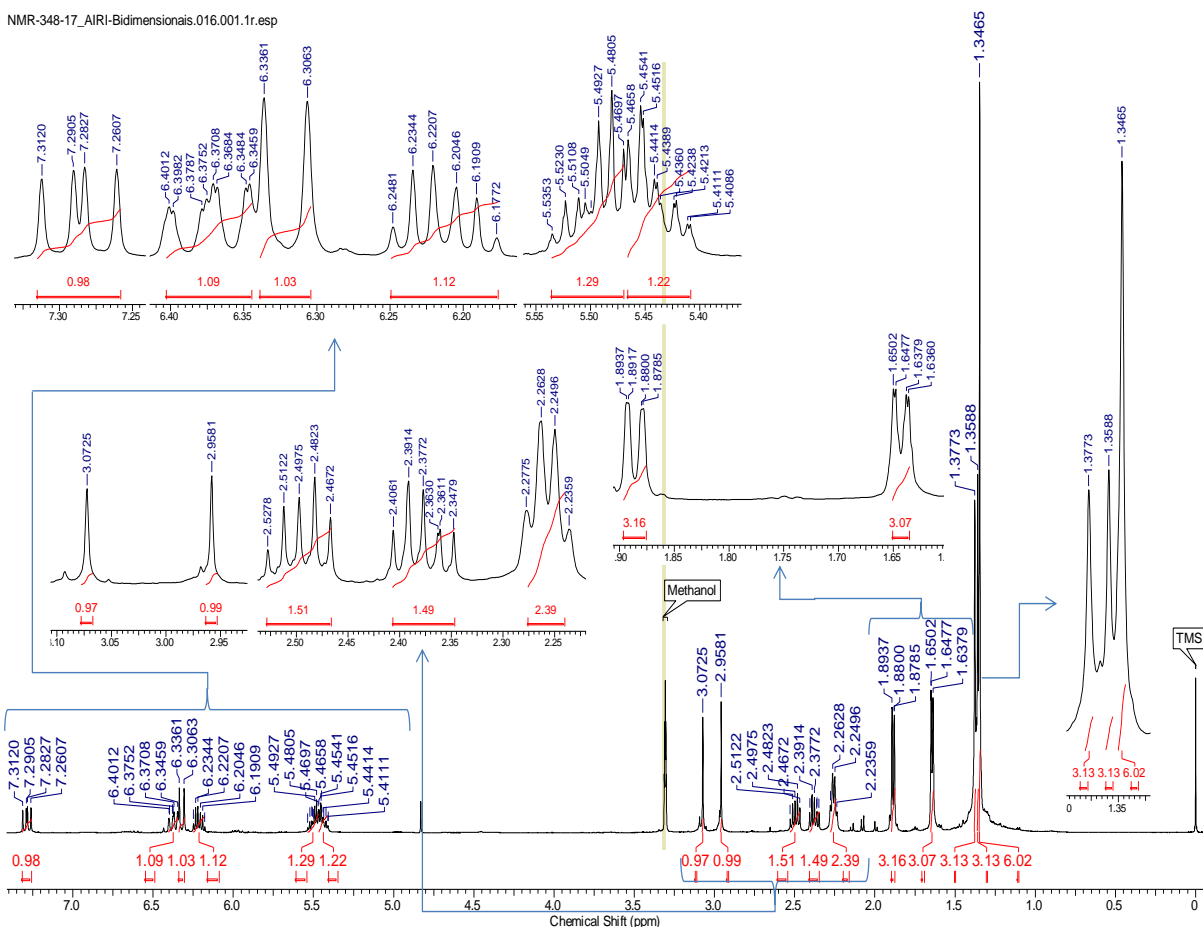


Figura 39. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra FIG12 (500 MHz, MeOD).

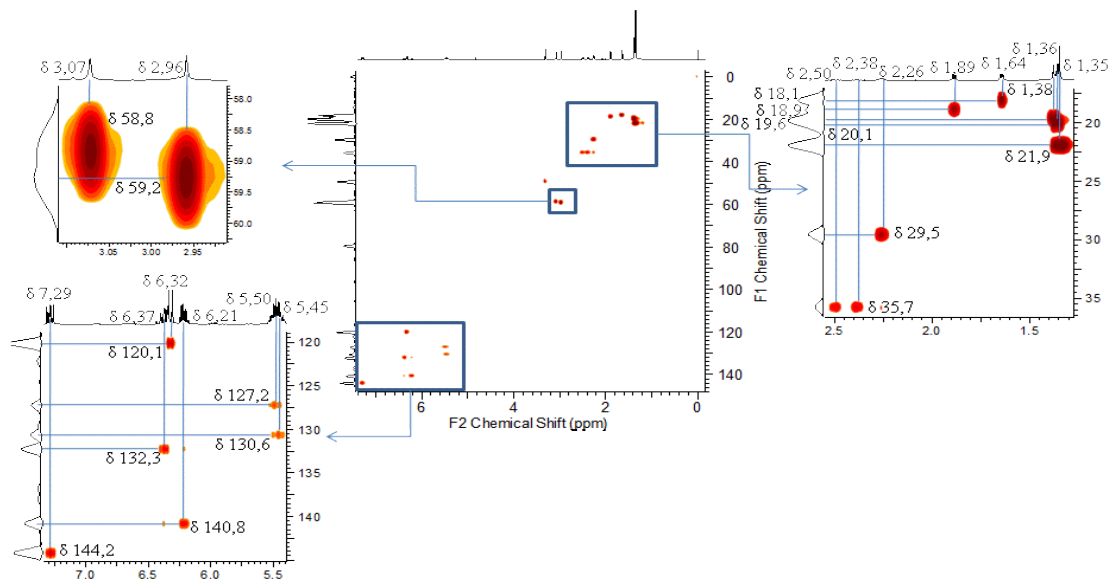


Figura 40. Mapa de correlação HSQC da amostra FIG12 ( $J'$ ,  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD).

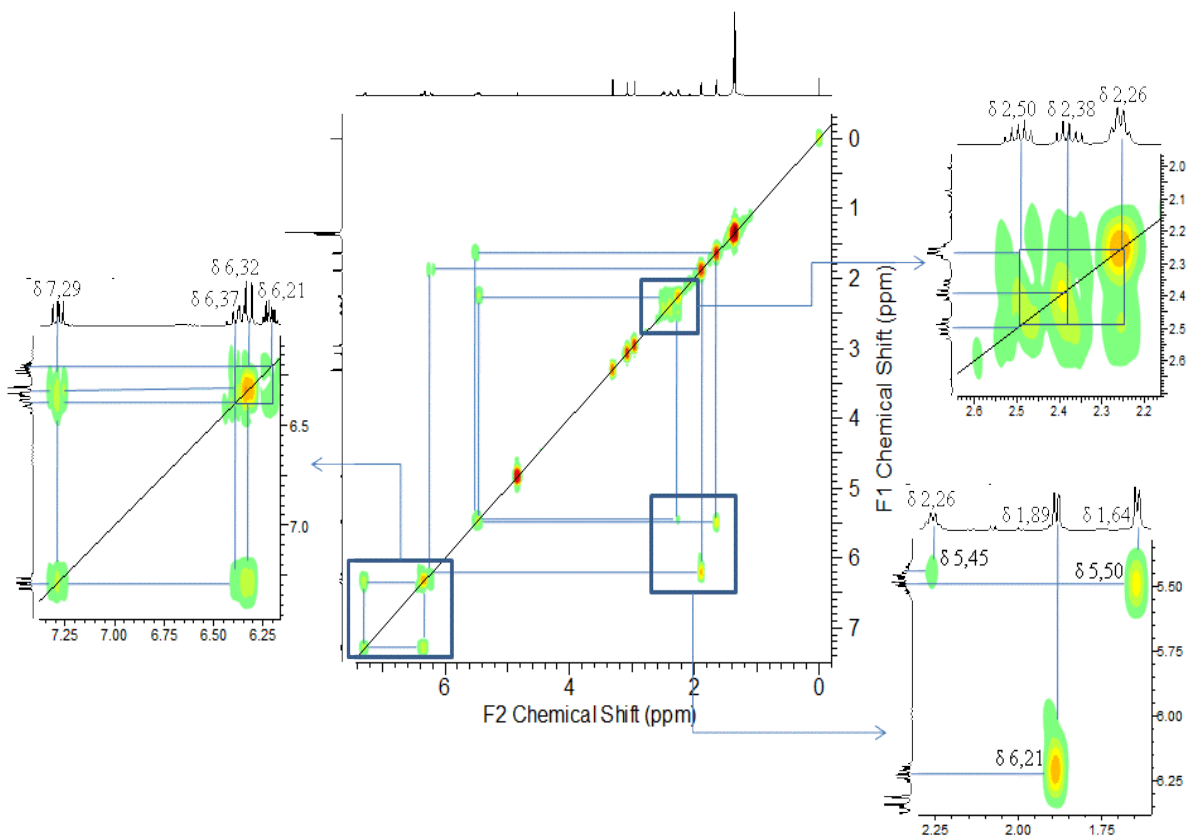


Figura 41. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra FIG12.

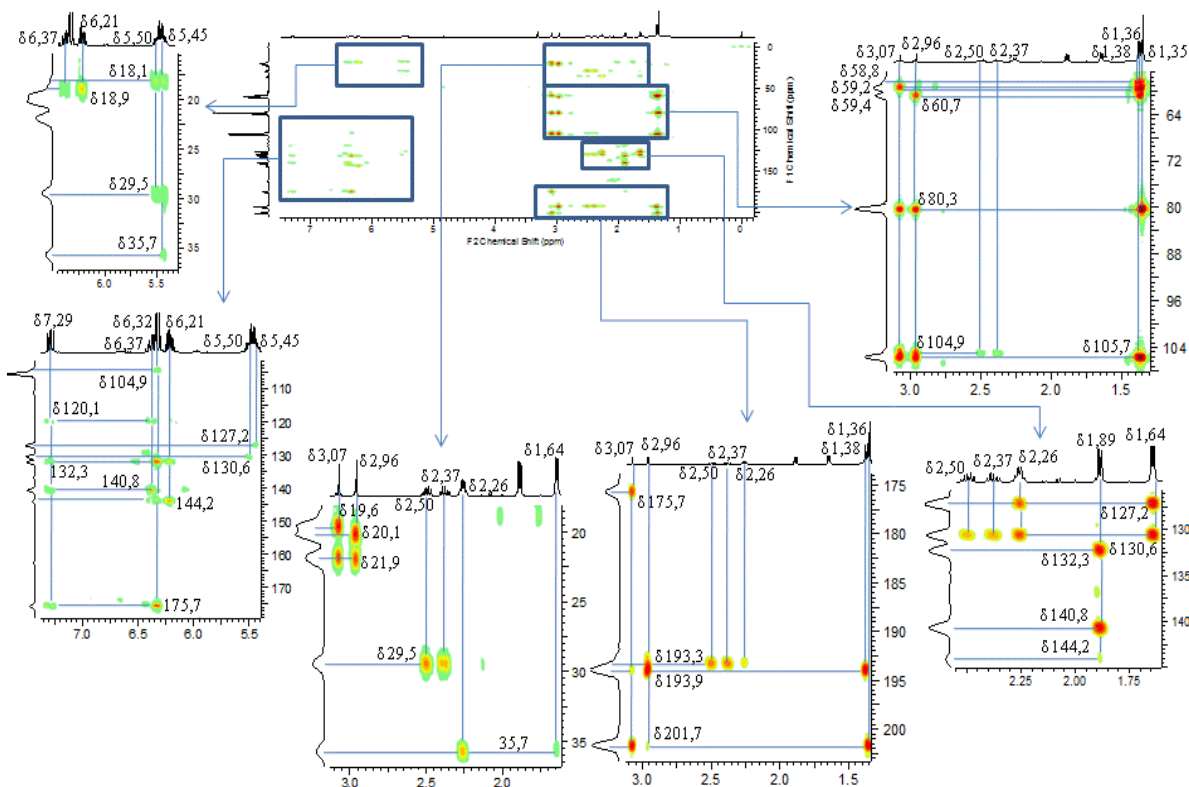
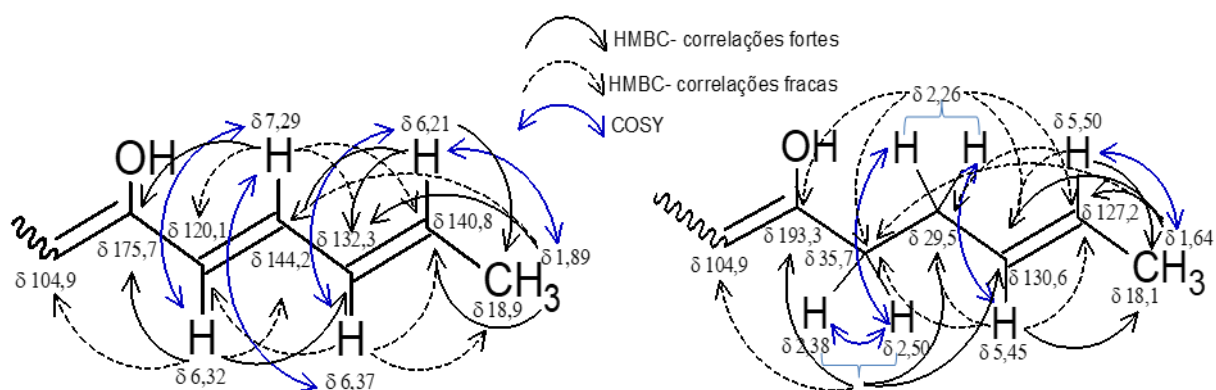


Figura 42. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra FIG12.

Nos sinais característicos do resíduo 2',3'-dihidrosorbil foram observados hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,50 (1H, *dq*, 14,9, 6,1 Hz) e  $\delta$  5,45 (1H, *m*), hidrogênios metilênicos não equivalentes quimicamente em  $\delta$  2,50 (1H, *dt*, 14,9, 7,6 Hz) e  $\delta$  2,38 (1H, *dt*, 14,9, 7,6 Hz), hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,26 (2H, *m*) e hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,64 (3H, *dd*, 6,1, 1,0 Hz), todos diretamente correlacionados por HSQC aos carbonos em  $\delta$  127,2, 130,6, 35,7, 29,5, 18,1 respectivamente. O hidrogênio em  $\delta$  5,50 está correlacionado por COSY ao hidrogênio em  $\delta$  1,64, e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  18,1, 29,5 e 130,6; o hidrogênio em  $\delta$  5,45 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  2,26 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  18,1, 29,5, 35,7 e 127,2; o hidrogênio em  $\delta$  2,50 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  2,26 e 2,38 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  29,5, 104,9, 130,6 e 193,3, carbonos com os quais o hidrogênio em  $\delta$  2,38 também está correlacionado; o hidrogênio em  $\delta$  2,26 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  5,45 e 2,50, e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  35,7, 127,2, 130,6, e 193,3; os hidrogênios em  $\delta$  1,64 estão correlacionados por COSY ao hidrogênio em  $\delta$  5,50 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  35,7, 127,2 e 130,6 (Figura 43).



**Figura 43.** Correlações pelos mapas de correlações COSY e HMBC observadas para os resíduos sorbil e 2',3'-dihidrosorbil da amostra FIG12.

Nos sinais característicos da parte cíclica da molécula, observam-se hidrogênios metínicos em  $\delta$  3,07 (1H, *s*) e 2,96 (1H, *s*), e hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,38 (3H, *s*), 1,36 (3H, *s*) e 1,35 (6H, *s*) diretamente correlacionados por HSQC aos carbonos em  $\delta$  58,8, 59,2, 19,6, 20,1 e 21,9 respectivamente. O hidrogênio em  $\delta$  3,07 está correlacionado por HMBC aos carbonos em  $\delta$  19,6, 21,9, 59,2, 80,3, 104,9, 105,7, 175,7, 193,9 e 201,7; o hidrogênio em  $\delta$  2,96 está correlacionado por HMBC aos carbonos em  $\delta$  20,1, 21,9, 60,7, 80,3, 104,9, 105,7, 193,3, 193,9 e 201,7; os hidrogênios



**Tabela 5.** Comparação dos dados de RMN da amostra F1G12 com os dados da substância dihidrotricodimerol.

Nº	Amostra F1G12 <sup>1</sup>			Dihidrotricodimerol <sup>2</sup>		Dihidrotricodimerol <sup>3</sup>		
	$\delta_H$ (J em Hz)	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	$\delta_C$ <sup>4</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>5</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1	2,96 (1H, s)		59,2	<b>20,1; 21,9; 60,7; 80,3;</b> <b>104,9; 105,7; 193,3; 201,7;</b> <b>193,9</b>	3,03 (1H, s)	58,6	2,92 s	57,8
2	-		80,3		-	79,6		79,0
3	-		105,7		-	105,1		104,1
4	-		59,4		-	58,9		57,4
5	-		193,9		-	193,1		191,4
6	-		104,9		-	104,7		103,3
7	-		193,3		-	192,7		192,8
8	2,38 (1H, dt, 14,9, 7,6)	2,50	35,7	<b>29,5; 104,9; 130,6; 193,3</b>	2,40 (1H, dt, 15,1, 6,9)	35,2	2,38 m	34,7
	2,50 (1H, dt, 14,9, 7,6)	2,26, 2,38		<b>29,5; 104,9; 130,6; 193,3</b>	2,56 (1H, dt, 15,1, 6,9)		2,45 m	
9	2,26 (2H, m)	2,50, 5,45	29,5	35,7; 127,2; 130,6; 193,3	2,25 (1H, m)	29,0	2,27 m	28,2
10	5,45 (1H, m)	2,26	130,6	<b>18,1; 29,5; 35,7; 127,2</b>	5,46 (1H, m)	130,5	5,42 m	129,0
11	5,50(1H, dq, 14,9, 6,1)	1,64	127,2	<b>18,1; 29,5; 130,6</b>	5,49 (1H, m)	126,5	5,49 m	126,4
12	1,64 (3H, dd, 6,1, 1,0)	5,50	18,1	<b>35,7; 127,2; 130,6</b>	1,61 (3H, br d, 4,4)	18,0	1,64 d (6,0)	17,8
13	1,35 (3H, s)		21,9	<b>58,8; 59,2; 80,3; 105,7</b>	1,36 (3H, s)	21,9	1,42 s	21,2
14	1,38 (3H, s)		19,6	<b>58,8; 59,4; 105,7; 193,9</b>	1,41 (3H, s)	20,1	1,45 s	18,6
OH					16,60 (s)		16,54 s	
1'	3,07 (1H, s)		58,8	<b>19,6; 21,9; 59,4; 80,3;</b> <b>104,9; 105,7; 175,7; 193,9;</b> <b>201,7</b>	3,14 (1H, s)	58,3	2,98 s	57,6
2'	-		80,3		-	79,5		78,9
3'	-		105,7		-	105,0		104,2
4'	-		60,7		-	60,4		58,7
5'	-		201,7		-	201,9		198,3
6'	-		104,9		-	104,5		102,8
7'	-		175,7		-	174,5		176,0
8'	6,32 (1H, d, 14,9)	7,29	120,1	104,9; <b>132,3;</b> 144,2; <b>175,7</b>	6,46 (1H, d, 14,7)	120,1	6,14 d (14,4)	118,4
9'	7,29 (1H, dd, 14,7, 11,0)	6,32, 6,37	144,2	120,1; 132,3; 140,8; <b>175,7</b>	7,26 (1H, dd, 15,1, 11,0)	143,2	7,32 dd (10,8, 15,0)	143,6
10'	6,37 (1H, m)	6,21, 7,29	132,3	18,9; 120,1; <b>140,8</b>	6,40 (1H, m)	131,9	6,29 m	130,8
11'	6,21 (1H, dq, 14,9, 6,8)	1,89, 6,37	140,8	<b>18,9; 132,3; 144,2</b>	6,23 (1H, dq, 15,1, 6,9)	140,1	6,20 m	140,4
12'	1,89 (3H, dd, 6,8, 1,0)	6,21	18,9	<b>132,3; 140,8;</b> 144,2	1,85 (3H, dd, 6,9, 1,4)	18,8	1,88 d (6,6)	18,8
13'	1,35 (3H, s)		21,9	<b>58,8; 59,2; 80,3; 105,7</b>	1,34 (3H, s)	21,9	1,42 s	21,3
14'	1,36 (3H, s)		20,1	<b>59,2; 60,7; 105,7; 201,7</b>	1,39 (3H, s)	19,6	1,43 s	19,1
OH					16,80 (s)		16,39 s	

<sup>1</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III HD 500 MHz em MeOD;

<sup>2</sup> Espectrômetro JEOL ECLIPS-600 MHz em acetona-*d*<sub>6</sub> (LIU et al., 2005);

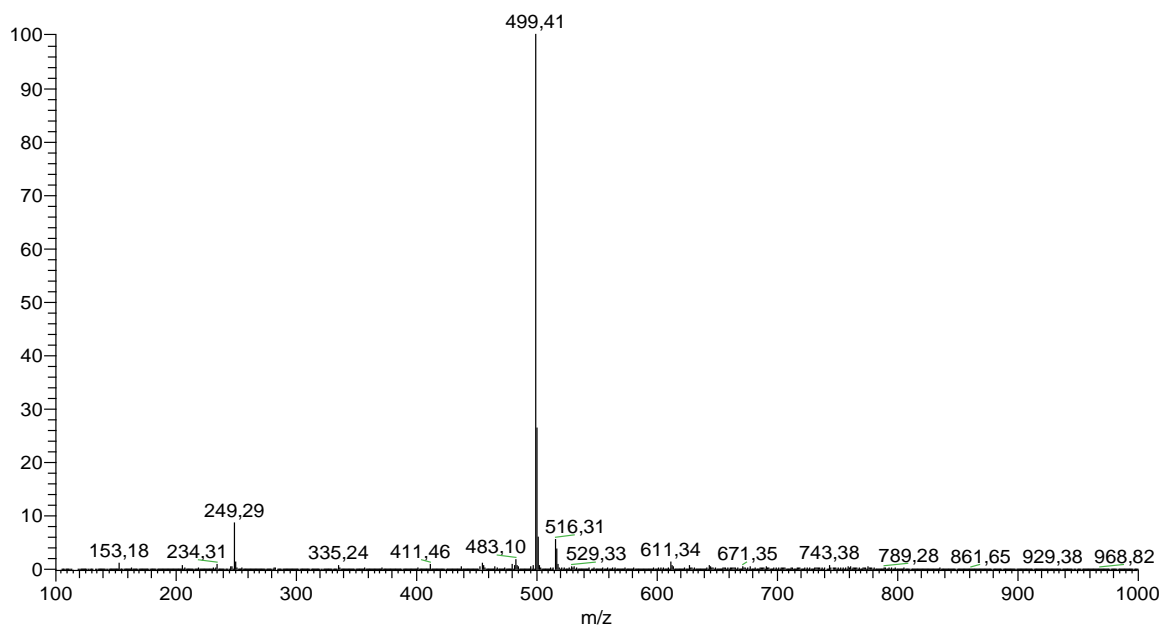
<sup>3</sup> Espectrômetro VARIAN UNITY 400 ou BRUKER DMX 600 MHz em CDCl<sub>3</sub> (LEE et al., 2005);

<sup>4</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

<sup>5</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;

### 5.3.4. Identificação da amostra F1G14

A amostra F1G14 (10,5 mg) apresentou característica de um pó amarelo, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ . A análise de massas, no modo negativo, revelou o pico base em  $m/z$  499 ([M-H]<sup>-</sup>), correspondendo a uma molécula desprotonada de massa 500 u (Figura 46), outro possível bisorbicilinoide.

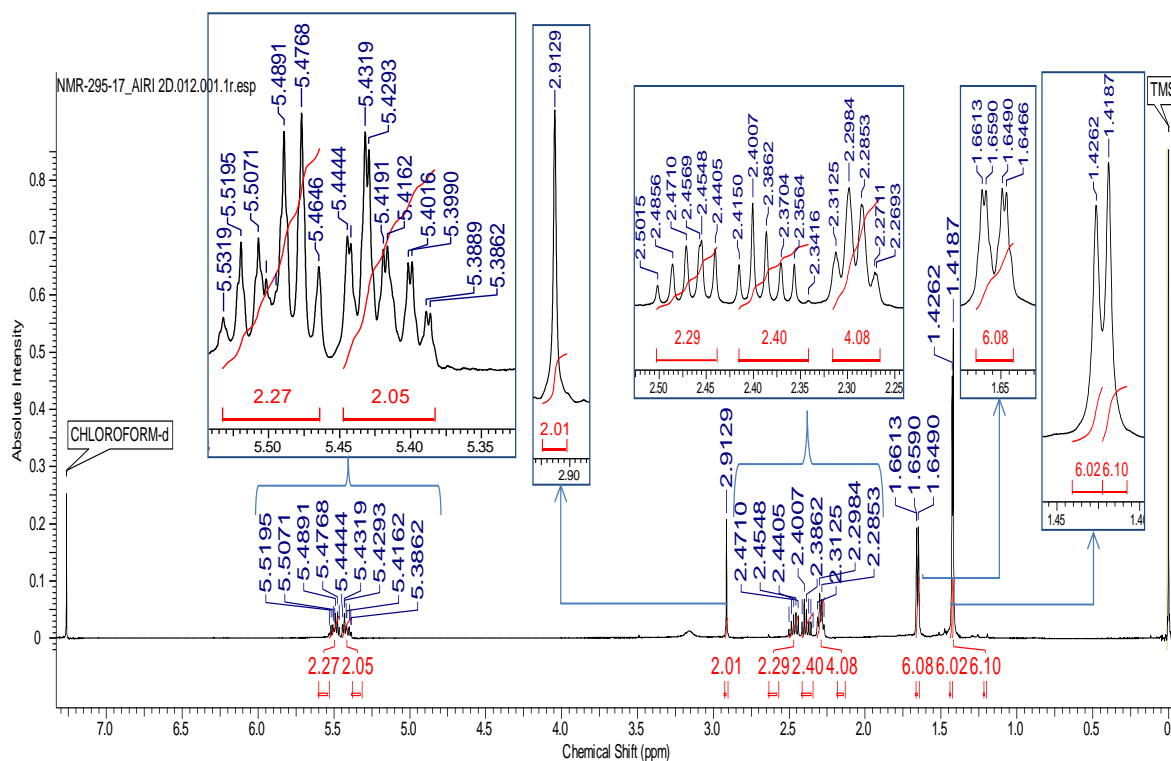


**Figura 46.** Espectro de massa de íons totais (*full scan*) da amostra F1G14.

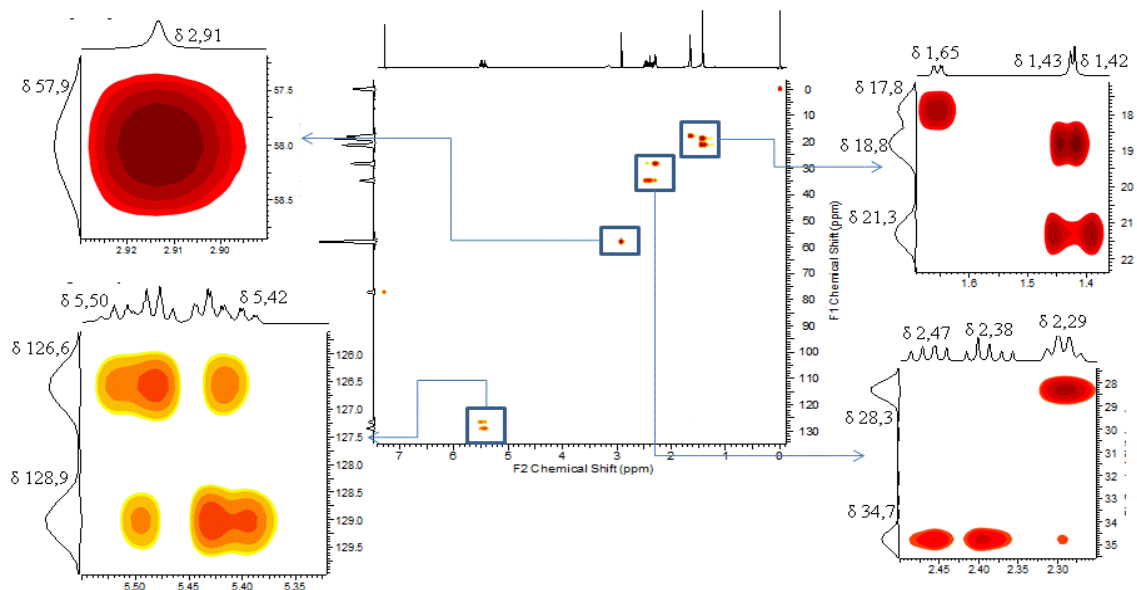
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F1G14 (Figura 47) apresentou sinais semelhantes ao resíduo 2',3'-dihidrosorbil do espectro da amostra F1G12, sugerindo-se outro dímero de sorbicilinoide, com as duas unidades equivalentes, visto que os deslocamentos de um monômero são iguais aos do outro. Nos sinais característicos do resíduo 2',3'-dihidrosorbil foram observados hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,50 (2H, *dq*, 15,2, 6,2 Hz) e  $\delta$  5,42 (2H, *m*), hidrogênios metilênicos não equivalentes quimicamente em  $\delta$  2,47 (2H, *dt*, 15,2, 7,2 Hz) e  $\delta$  2,38 (2H, *dt*, 15,2, 7,2 Hz), hidrogênios equivalentes quimicamente em  $\delta$  2,29 (4H, *m*) e hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,65 (6H, *dd*, 6,2, 1,2 Hz), todos diretamente correlacionados por HSQC (Figura 48) aos carbonos em  $\delta$  126,6, 128,9, 34,7, 28,3 e 17,8 respectivamente. Os hidrogênios em  $\delta$  5,50 estão correlacionados por COSY (Figura 49) aos hidrogênios em  $\delta$  5,42 e 1,65, e por HMBC (Figura 50) aos carbonos em  $\delta$  17,8, 28,3, 128,9, o hidrogênio em  $\delta$  5,42 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  5,50, 2,29 e 1,65 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  17,8, 28,3, 34,7, 126,6, o hidrogênio em  $\delta$  2,47 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  2,38



e 2,29, assim como o hidrogênio em  $\delta$  2,38 está correlacionado com o hidrogênio em  $\delta$  2,47 e ambos estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  28,3, 103,4, 128,9 e 192,7, o hidrogênio em  $\delta$  2,29 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  2,46 e 5,42, e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  34,7, 126,6, 128,9 e 192,7, os hidrogênios em  $\delta$  1,65 estão correlacionados por COSY ao hidrogênio em  $\delta$  5,50 e 5,42 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  28,3, 34,7, 126,6 e 128,9 (Figura 51).



**Figura 47.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra F1G14 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 48.** Mapa de correlação HSQC da amostra F1G14 ( $J'$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

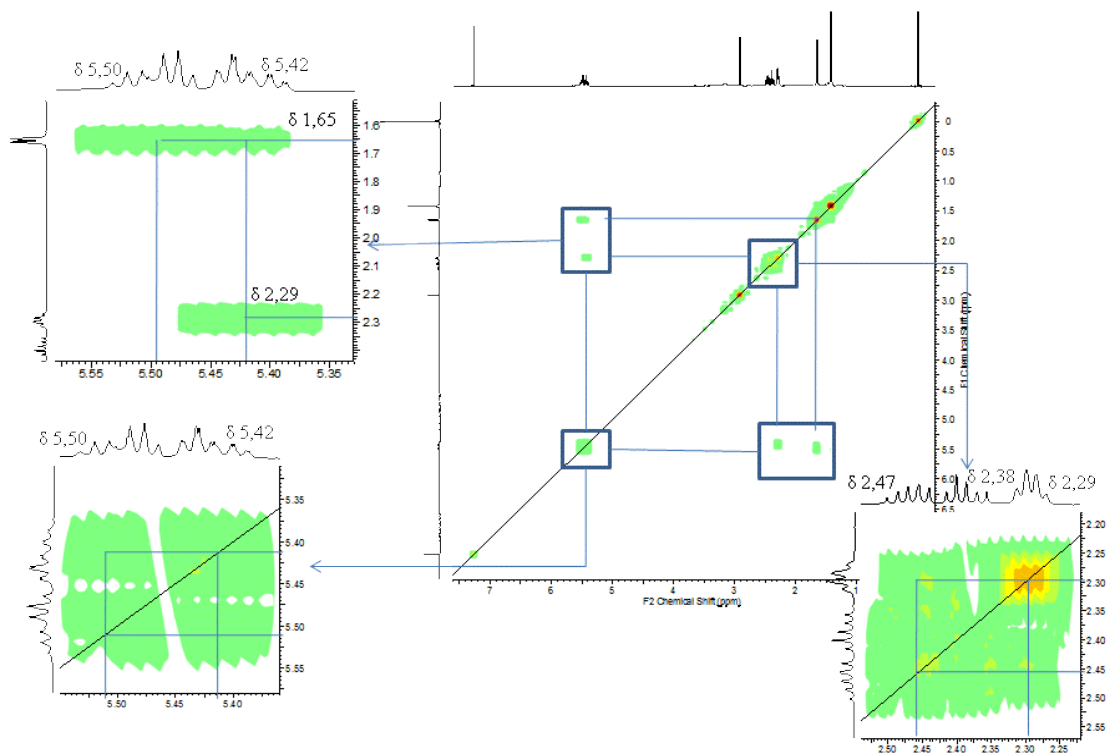


Figura 49. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra FIG14.

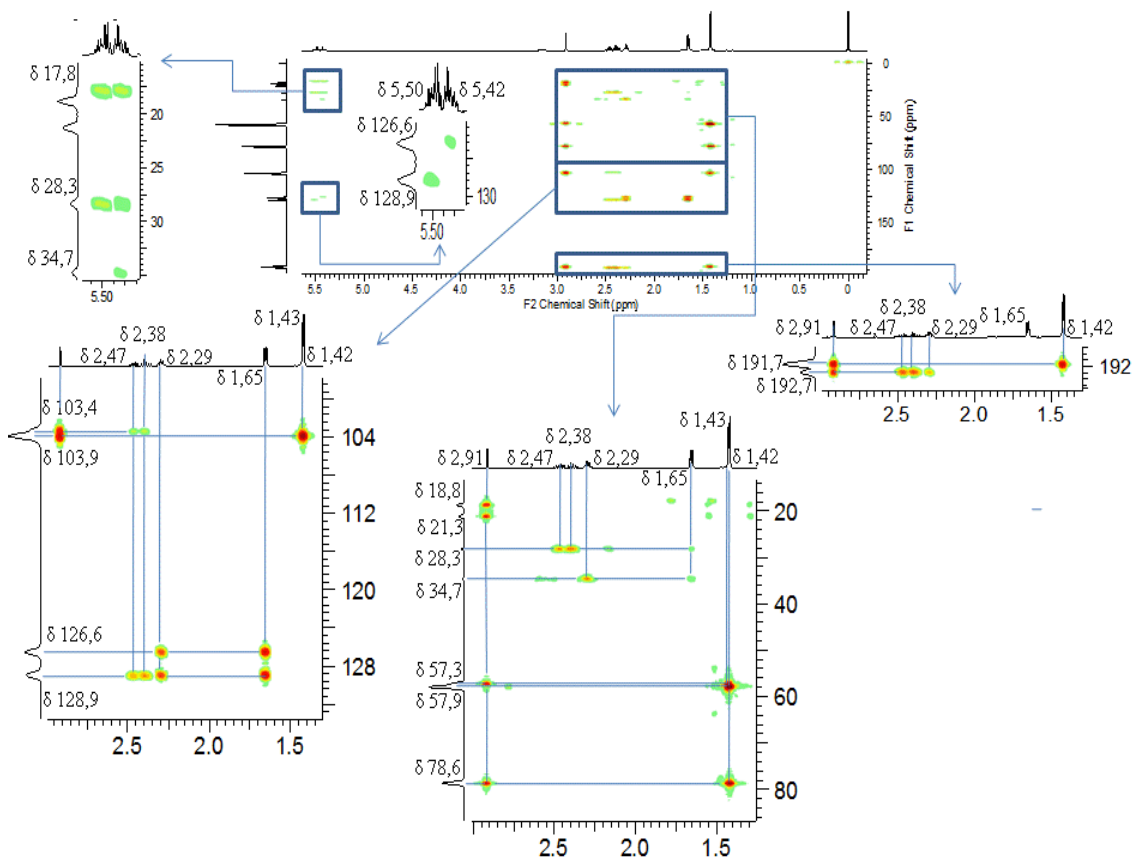
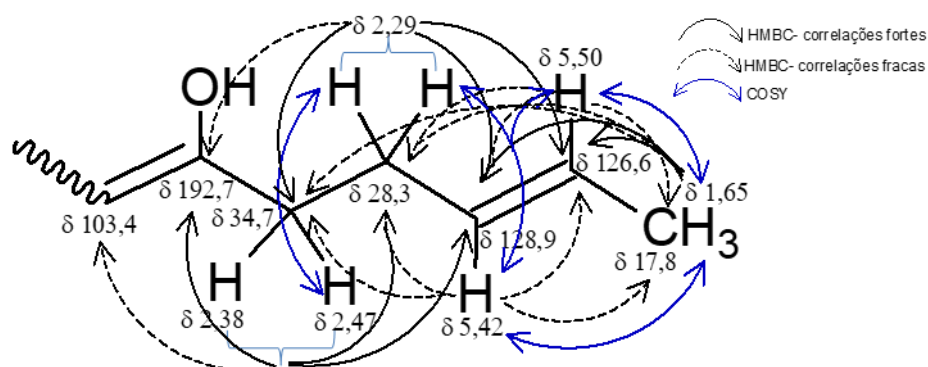
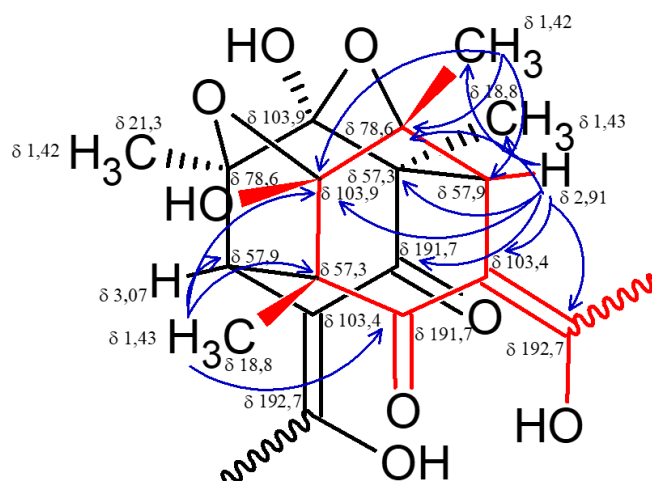


Figura 50. Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra FIG14.



**Figura 51.** Correlações observadas pelos mapas de correlações COSY e HMBC para o resíduo 2',3'-dihidrosorbil da amostra FIG14.

Nos sinais característicos da parte cíclica da molécula, observam-se os hidrogênios metínicos em  $\delta$  2,91 (2H, *s*), os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,43 (6H, *s*) e 1,42 (6H, *s*) diretamente correlacionados por HSQC aos carbonos em  $\delta$  57,9, 18,8 e 21,3 respectivamente. Os hidrogênios em  $\delta$  2,91 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  18,8, 21,3, 57,3, 78,6, 103,4, 103,9, 191,7 e 192,7, os hidrogênios em  $\delta$  1,43 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  57,3, 57,9, 103,9 e 191,7, os hidrogênios em  $\delta$  1,42 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  57,9, 78,6 e 103,9 (Figura 52).



**Figura 52.** Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC no resíduo cicloexano pentassubstituído da amostra FIG14, todas são correlações fortes.

Através da comparação dos dados acima descritos com os dados da literatura (Tabela 6, LIU et al, 2005), pode-se identificar a fração F1G14 como um dímero de sorbicilinoide de fórmula molecular de C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub> denominado de tetrahidrotricodimerol (Figura 53). Esta substância foi isolada anteriormente de espécies dos gêneros *Clonostachys* e *Penicillium*, apresentando atividades citotóxicas contra linhagens de células P388, A549, com CI<sub>50</sub> de 8,8 e 4,3 µM respectivamente, e atividade antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, com um CIM de 12,5 µg/mL (MENG et al, 2016).

**Tabela 6.** Comparação dos dados de RMN da amostra F1G14 com os dados da substância tetrahidrotricodimerol.

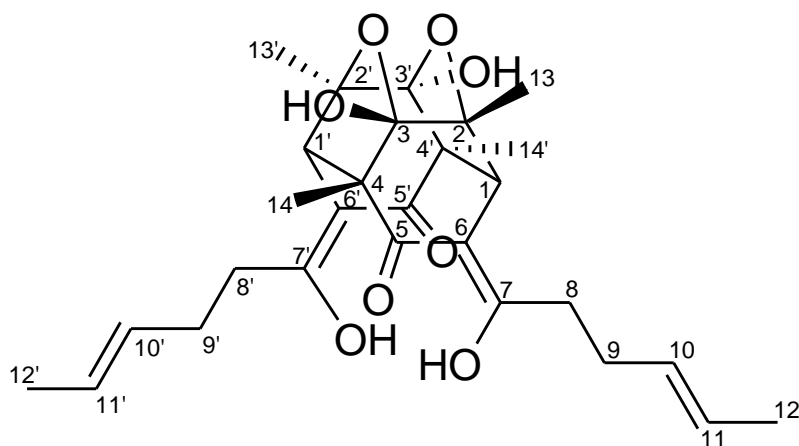
Nº	Amostra F1G14 <sup>1</sup>				Tetrahidrotricodimerol <sup>2</sup>	
	$\delta_H$ (J em Hz)	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	$\delta_C^3$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>4</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1/1'	2,91 (1H, s)		57,9	<b>18,8; 21,3; 57,3; 78,6;</b> <b>103,4; 103,9; 191,7; 192,7;</b>	3.02 (1H, s)	58.7
2/2'			78,6			79.5
3/3'			103,9			105.0
4/4'			57,3			58.7
5/5'			191,7			192.3
6/6'			103,4			104.8
7/7'			192,7			193.8
8/8'	2,38 (1H, dt, 15,2, 7,2)		34,7	<b>28,3; 103,4; 128,9; 192,7;</b>	2.41 (1H, dt, 14,9, 7,4)	35.1
	2,47 (1H, dt, 15,2, 7,2)	2,29		<b>28,3; 103,4; 128,9; 192,7;</b>	2.57 (1H, dt, 15,4, 7,7)	
9/9'	2,29 (2H, m)	2,47, 5,42	28,3	<b>34,7; 126,6; 128,9; 192,7</b>	2.25 (2H, m)	29.0
10/10'	5,42 (1H, m)	1,65, 2,29, 5,50	128,9	17,8; 28,3; 34,7; 126,6	5.45 (1H, m)	130.4
11/11'	5,50 (1H, dq, 15,2, 6,2)	1,65, 5,42	126,6	17,8; 28,3; 128,9	5.49 (1H, m)	126.5
12/12'	1,65 (3H, dd, 6,2, 1,2)	5,50, 5,42	17,8	28,3; 34,7; <b>126,6; 128,9;</b>	1.61 (3H, brd, 5.0)	18.0
13/13'	1,42 (3H, s)		21,3	<b>57,9; 78,6; 103,9</b>	1.35 (3H, s)	21.9
14/14'	1,43 (3H, s)		18,8	<b>57,3; 57,9; 103,9; 191,7</b>	1.38 (3H, s)	19.9
OH					16,61 (1H, s)	

<sup>1</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III HD 500 MHz em CDCl<sub>3</sub>;

<sup>2</sup> Espectrômetro JEOL ECLIPS-600 MHz em acetona-*d*<sub>6</sub> (LIU et al., 2005);

<sup>3</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

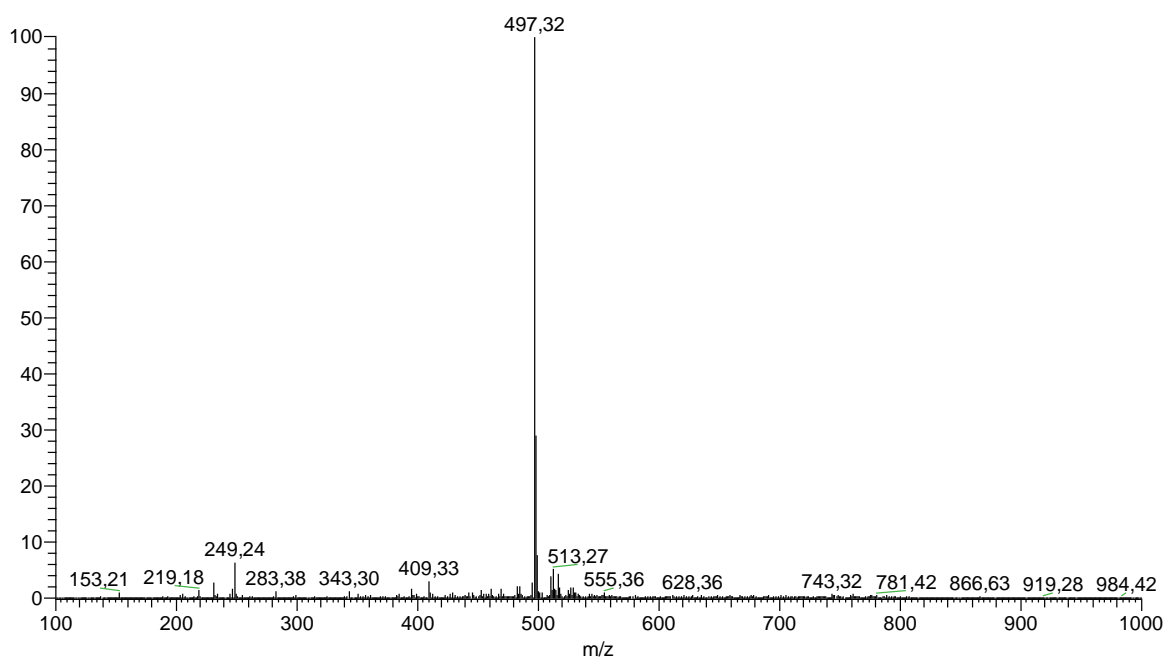
<sup>4</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;



**Figura 53.** Estrutura de tetraidroticodimerol identificada na amostra FIG14.

### 5.3.5. Identificação da amostra FIG5

A amostra FIG5 (6,5 mg) apresentou característica de um cristal amarelo, solúvel em MeOH. A análise de massas, no modo negativo evidenciou ser um isômero da amostra FIG12 pela presença de um pico base em  $m/z$  497, correspondente a uma molécula desprotonada de massa 498 u (Figura 54).



**Figura 54.** Espectro de massa de íons totais (*full scan*) da amostra FIG5.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de FIG5 (Figura 55), assim como no espectro de massas, observou-se semelhança com o espectro de  $^1\text{H}$  da amostra FIG12. Nos sinais



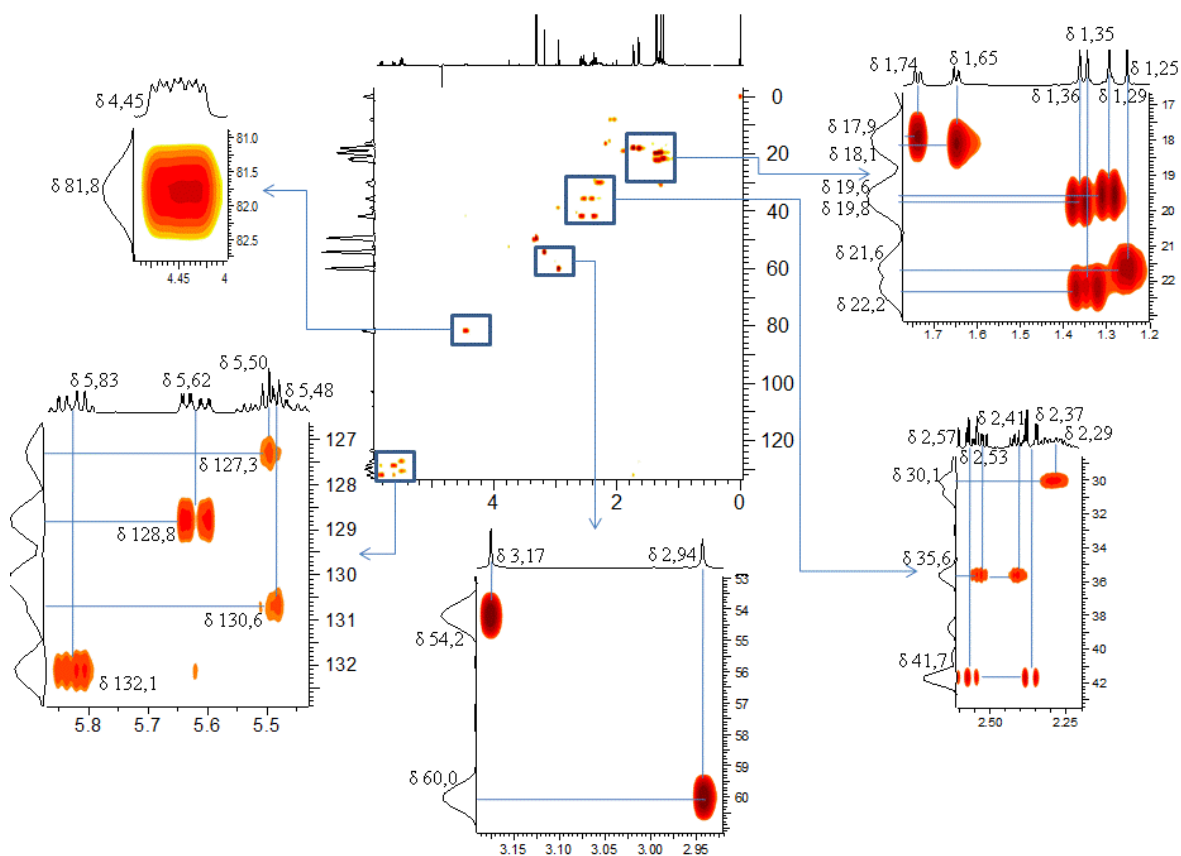


Figura 56. Mapa de correlação HSQC da amostra FIG5 ( $J^I$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD).

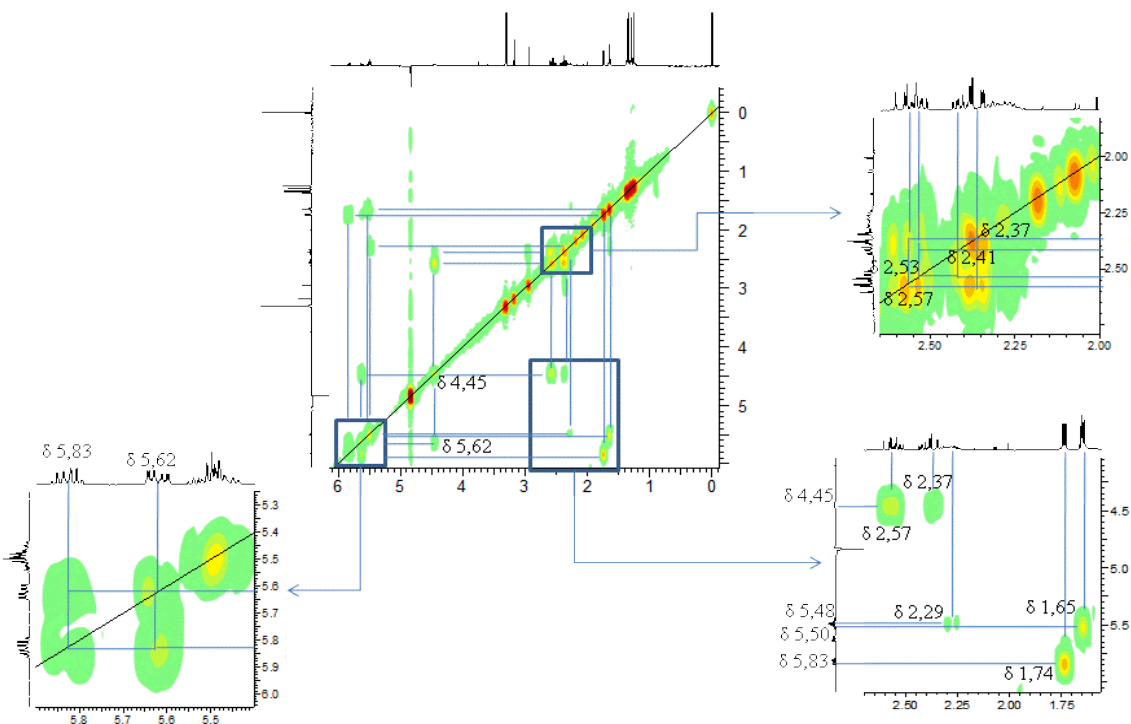
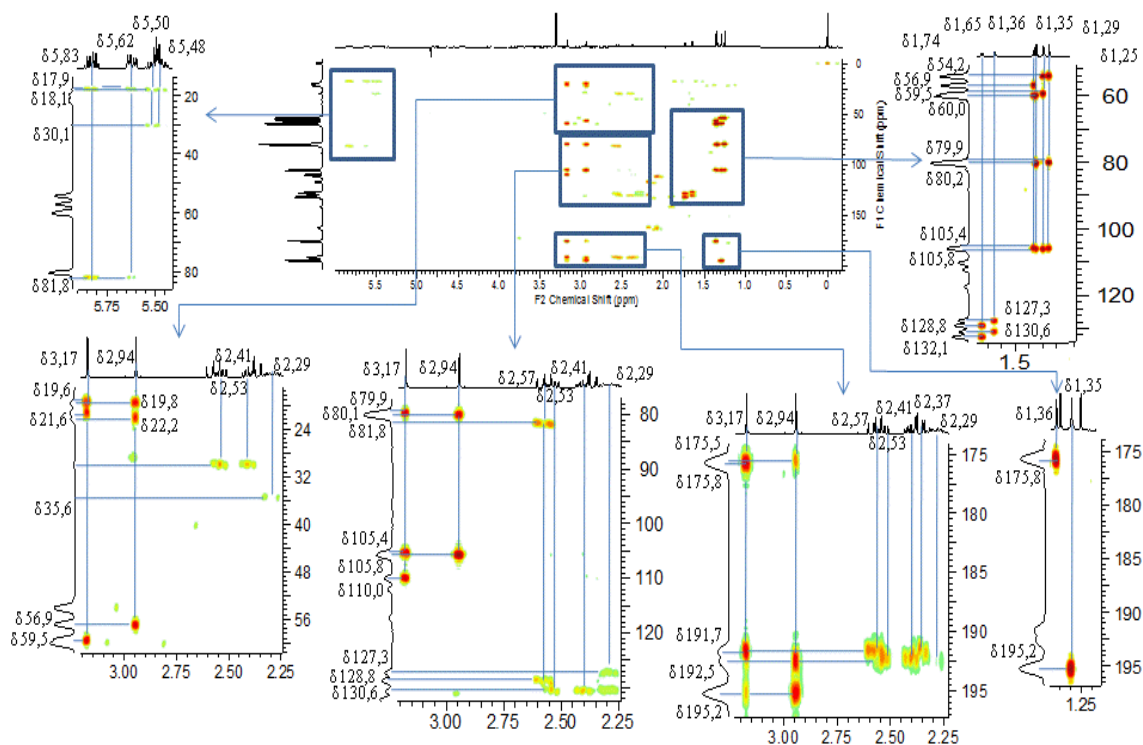


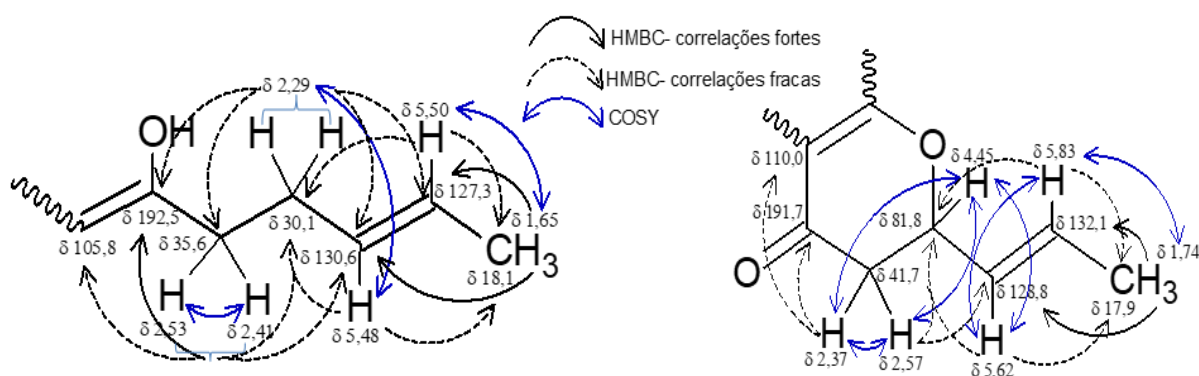
Figura 57. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (500 MHz, MeOD) da amostra FIG5.



**Figura 58.** Mapa de correlação HMBC ( $J^2-J^4$ ,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F1G5.

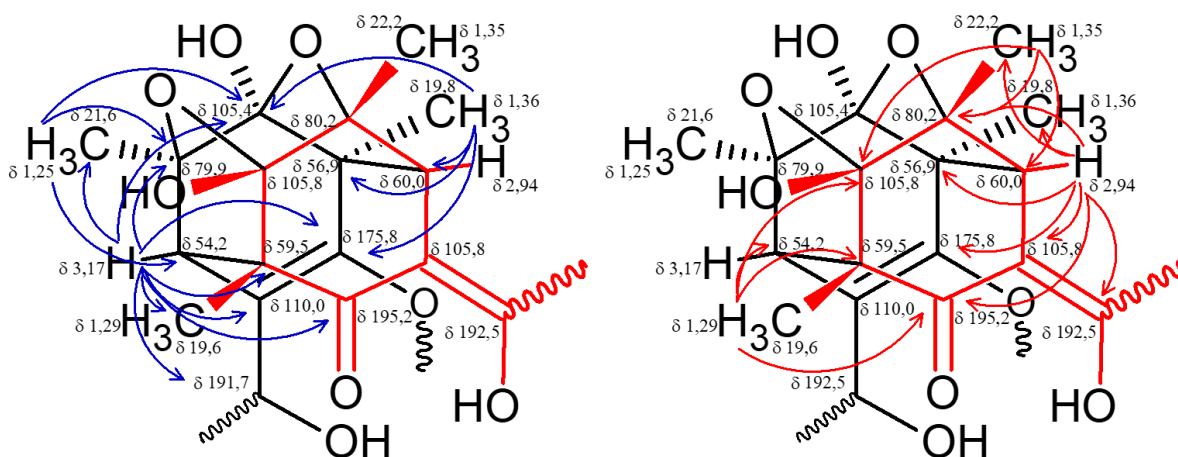
Na outra parte lateral da molécula observou-se característica de um resíduo 2',3'-dihidrosorbil com modificação. Foram observados hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,83 (1H, *ddq*, 15,4, 6,6, 1,0 Hz) e 5,62 (1H, *ddq*, 15,4, 6,6, 1,6 Hz), um sinal não observado nas estruturas anteriores característico de hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,45 (1H, *ddd*, 13,2, 6,6, 3,7 Hz), hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,57 (1H, *dd*, 16,9, 13,2 Hz) e  $\delta$  2,37 (1H, *dd*, 16,9, 3,4 Hz) e hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,74 (3H, *dd*, 6,6, 1,0 Hz), todos diretamente correlacionados por HSQC a carbonos em  $\delta$  132,1, 128,8, 81,8, 41,7 e 17,9, respectivamente. O hidrogênio em  $\delta$  5,83 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  1,74 e 5,62, o qual também está correlacionado ao hidrogênio em  $\delta$  4,45. Ambos os hidrogênios em  $\delta$  5,83 e 5,62 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  17,9 e 81,8. O hidrogênio em  $\delta$  4,45 está correlacionado por COSY aos hidrogênios em  $\delta$  5,62, 2,57 e 2,37 e não possui correlações por HMBC; os hidrogênios em  $\delta$  2,57 e 2,37 também estão correlacionando entre si (COSY), enquanto no HMBC o hidrogênio em  $\delta$  2,57 está correlacionado aos carbonos em  $\delta$  81,8 e 128,8 e o hidrogênio em  $\delta$  2,37 está correlacionado aos carbonos em  $\delta$  110,0 e 191,7. Os hidrogênios em  $\delta$  1,74 estão correlacionados por COSY ao hidrogênio em  $\delta$  5,83 e por HMBC aos carbonos em  $\delta$  128,8 e 132,1 (Figura 59).





**Figura 59.** Correlações observadas pelos mapas de correlações COSY e HMBC para o 2',3'-dihidrosorbil e a outra estrutura lateral da amostra FIG5.

Nos sinais característicos da parte cíclica da molécula, observam-se hidrogênios metínicos em  $\delta$  3,17 (1H, *s*) e 2,94 (1H, *s*), e hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,36 (3H, *s*), 1,35 (3H, *s*), 1,29 (3H, *s*) e 1,25 (3H, *s*), diretamente correlacionados por HSQC aos carbonos em  $\delta$  54,2, 60,0, 19,8, 22,2, 19,6 e 21,6 respectivamente. O hidrogênio em  $\delta$  3,17 está correlacionado por HMBC aos carbonos em  $\delta$  19,6, 21,6, 59,5, 79,9, 105,4, 110,0, 175,8, 191,7 e 195,2; o hidrogênio em  $\delta$  2,94 está correlacionado por HMBC aos carbonos em  $\delta$  19,8, 22,2, 56,9, 80,2, 105,8, 175,5, 192,5 e 195,2; os hidrogênios em  $\delta$  1,36 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  56,9, 60,0, 105,4, 175,8; os hidrogênios em  $\delta$  1,35 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  60,0, 80,2, 105,8; os hidrogênios em  $\delta$  1,29 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  59,5, 54,2, 105,8, 195,2; e os hidrogênios em  $\delta$  1,25 estão correlacionados por HMBC aos carbonos em  $\delta$  54,2, 79,9, 105,4 (Figura 60).



**Figura 60.** Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC no resíduo cicloexano pentassubstituído da amostra FIG5, todas as correlações são fortes.

Através da comparação dos dados acima descritos com os dados da literatura (ZHAI et al., 2016, Tabela 7), pode-se identificar a fração FIG5 como um isômero funcional da substância dihidrotricodimerol de fórmula molecular  $C_{28}H_{34}O_8$  denominado de éter tetrahidrotricodímero (Figura 61) que possui em sua estrutura um anel  $\gamma$ -piranona. Esta substância foi isolada anteriormente da espécie *Clonostachys rosea*, não apresentando atividade antimicrobiana significativa (MENG et al, 2016). Este sorbicilinoide é considerado raro e está sendo reportado pela primeira vez no gênero *Penicillium*.

**Tabela 7.** Comparação dos dados de RMN da amostra FIG5 com os dados da substância éter tetrahidrotricodímero.

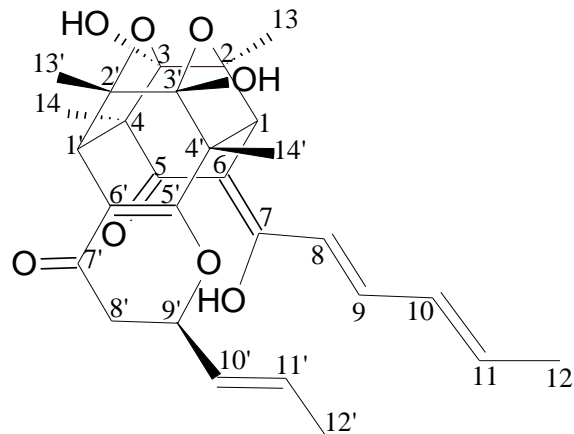
Amostra FIG5 <sup>1</sup>				Éter Tetrahidrotricodímero <sup>2</sup>		
Nº	$\delta_H$ (J em Hz)	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	$\delta_C$ <sup>3</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>4</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1	2,94 (1H, s)		60,0	<b>19,8; 22,2; 56,9; 80,2; 105,8; 175,5; 192,5; 195,2</b>	2,98 (1H, s)	59,4
2	-		80,2		-	79,6
3	-		105,8		-	105,3
4	-		59,5		-	59,1
5	-		195,2		-	195,5
6	-		105,8		-	105,6
7	-		192,5		-	192,6
8	2,53 (1H, ddd, 6,1, 8,6, 14,7)	2,41	35,6	30,1; 105,8; 130,6; <b>192,5</b>	2,60 (1H, dd, 14,8, 8,0)	35,2
	2,41 (1H, ddd, 6,0; 8,6; 14,7)	2,53		30,1; 105,8; 130,6; <b>192,5</b>	2,46 (1H, dd, 14,8, 6,4)	
9	2,29 (2H, m)	5,48	30,1	35,6; 127,3; 130,6; 192,5	2,26 (2H, m)	29,6
10	5,48 (1H, m)	2,29	130,6	18,1; 30,1	5,50 (1H, m)	130,6
11	5,50 (1H, m)	1,65	127,3	18,1; 30,1	5,51 (1H, m)	126,7
12	1,65 (3H, dd, 1,0, 5,9)	5,50	18,1	<b>127,3; 130,6</b>	1,63 (3H, d, 4,0)	18,1
13	1,35 (3H, s)		22,2	<b>60,0; 80,2; 105,8</b>	1,35 (3H, s)	22,2
14	1,29 (3H, s)		19,6	<b>59,5; 54,2; 105,8; 195,2</b>	1,31 (3H, s)	19,6
<b>OH</b>					5,57 (1H, s)	
1'	3,17 (1H, s)		54,2	<b>19,6; 21,6; 59,5; 79,9; 105,4; 110,0; 175,8; 191,7; 195,2</b>	3,17 (1H, s)	54,0
2'	-		79,9		-	79,3
3'	-		105,4		-	105,1
4'	-		56,9		-	56,3
5'	-		175,8		-	173,4
6'	-		110,0		-	109,8
7'	-		191,7		-	189,0
8'	2,37 (1H, dd, 3,4, 16,9)	2,57, 4,45	41,7	191,7; 110,0	2,33 (1H, dd, 16,8, 3,2)	41,6
	2,57 (1H, dd, 13,2, 16,9)	2,37, 4,45		81,8; 128,8	2,54 (1H, dd, 16,8, 13,2)	
9'	4,45 (1H, ddd, 3,7, 6,6, 13,2)	2,37, 2,57, 5,62	81,8		4,46 (1H, m)	81,2
10'	5,62 (1H, ddq, 1,6, 6,6, 15,4)	4,45, 5,83	128,8	17,9; 81,8	5,66 (1H, ddd, 15,6, 6,4, 1,2)	129,0
11'	5,83 (1H, ddq, 1,0, 6,6, 15,4)	1,74, 5,62	132,1	17,9; 81,8	5,85 (1H, dq, 15,6, 6,8)	131,0
12'	1,74 (3H, dd, 1,0, 6,6)	5,83	17,9	<b>128,8; 132,1</b>	1,73 (3H, d, 6,4)	18,0
13'	1,25 (3H, s)		21,6	<b>54,2; 79,9; 105,4</b>	1,24 (3H, s)	21,8
14'	1,36 (3H, s)		19,8	<b>56,9; 60,0; 105,4; 175,8</b>	1,39 (3H, s)	19,9
<b>OH</b>					5,63 (1H, s)	

<sup>1</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III HD 500 MHz em MeOD;

<sup>2</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III-400 MHz e VARIAN INOVA-600 em acetona-*d*<sub>6</sub> (ZHAI et al., 2016);

<sup>3</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

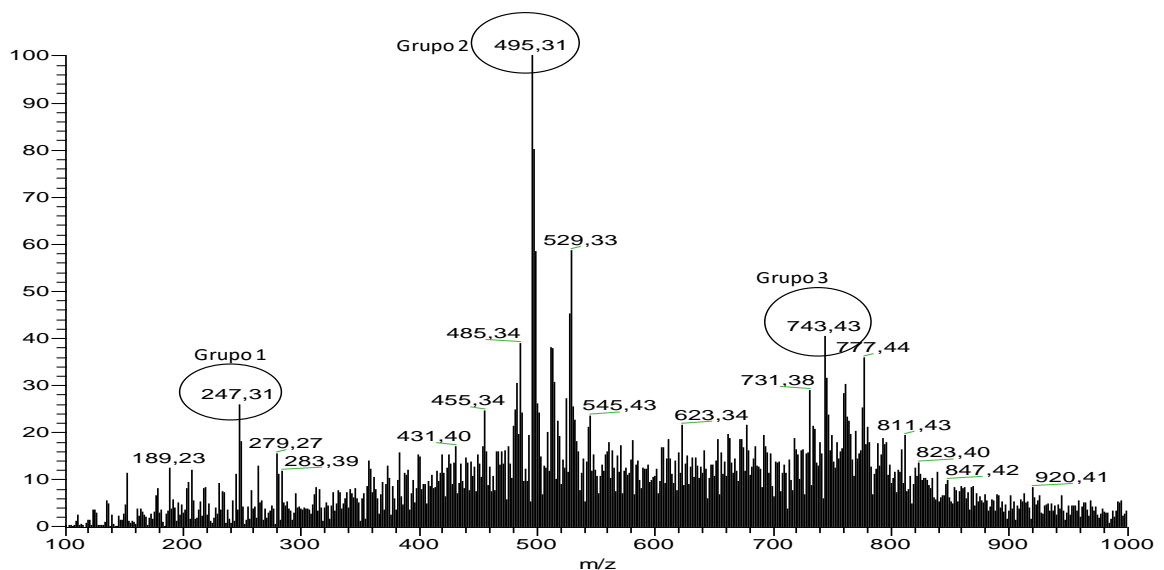
<sup>4</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;



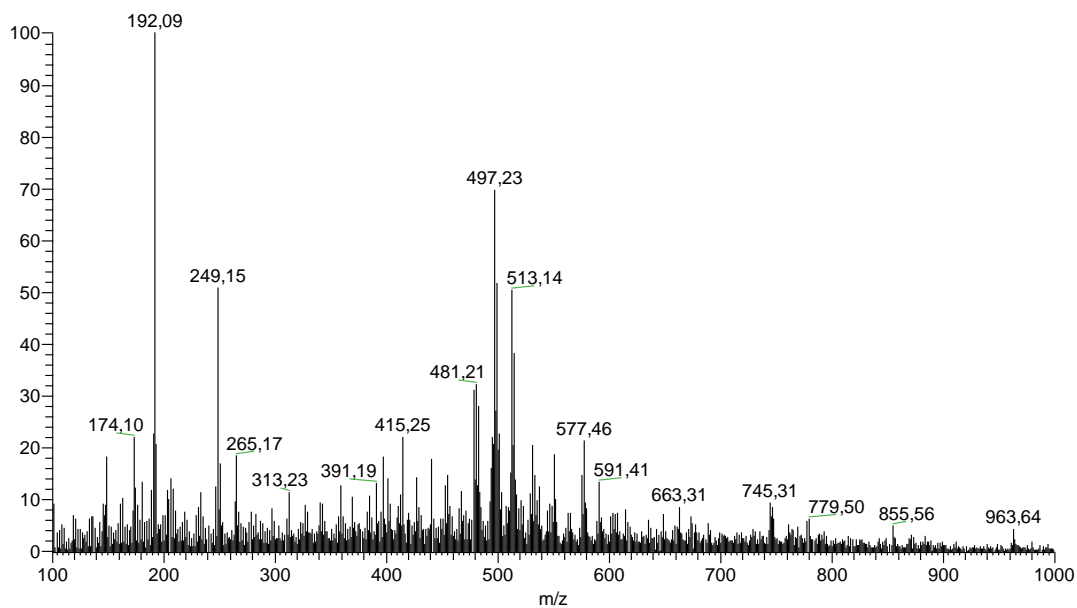
**Figura 61.** Estrutura de éter tetraidrotrícodimero identificada na amostra FIG5.

#### 5.4. Análise por APCI-IT-MS da fração F2

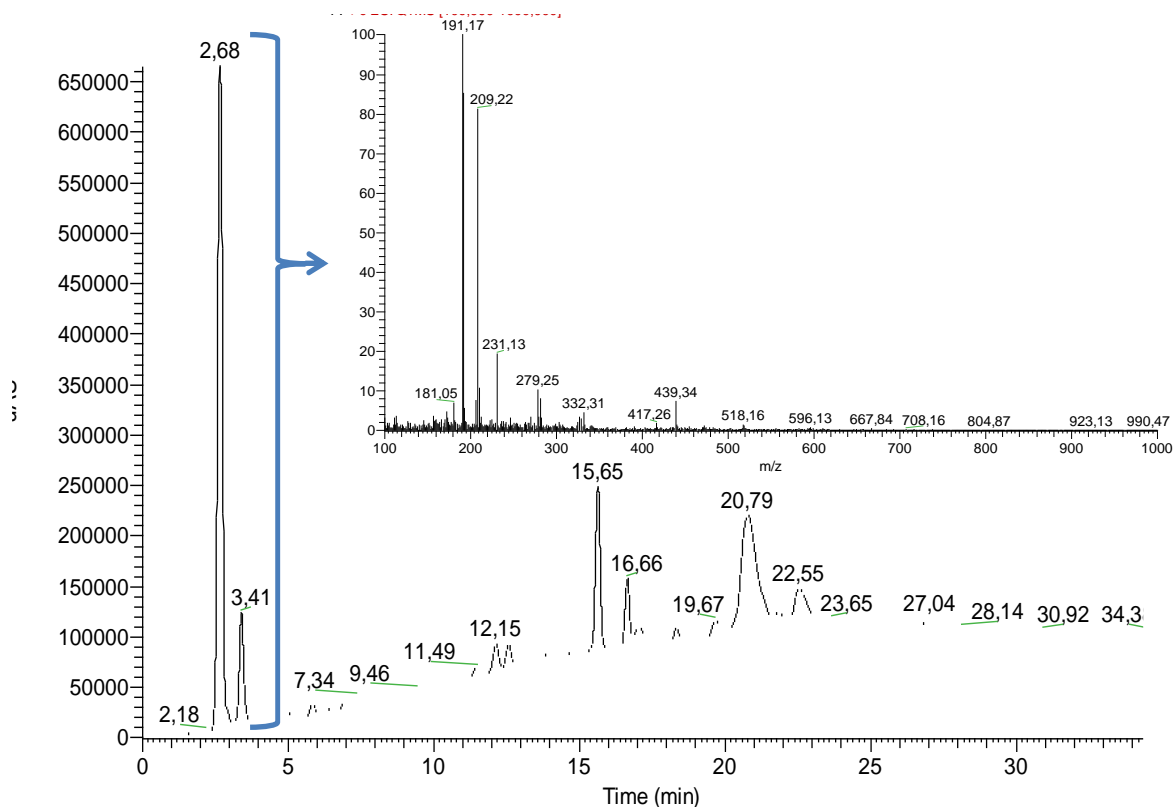
O espectro de massas no modo negativo da fração F2 do EMMML apresentou muito ruído e, dentre outros sinais, os mesmos três grupos anteriormente observados no perfil de massas do extrato bruto (Figura 62). Isso evidencia a possível presença dos sorbicilinoídes nessa fração, principalmente os dímeros (Grupo 2), porém como foi descrito no item 5.3.1 só foi possível identificar o monômero 2',3'-dihidrosorbicilin. Embora a intensidade dos íons observada seja alta, a quantidade deles não é, devido ao favorecimento do modo de ionização, o que é confirmado observando o espectro obtido no modo de ionização positivo (Figura 63) e o cromatograma (Figura 64).



**Figura 62.** Espectro de íons totais (*full scan*) modo negativo da fração F2 do EMMML de *P. chrysogenum*.



**Figura 63.** Espectro de íons totais (*full scan*) modo positivo da fração F2 do EMMI de *P. chrysogenum*.

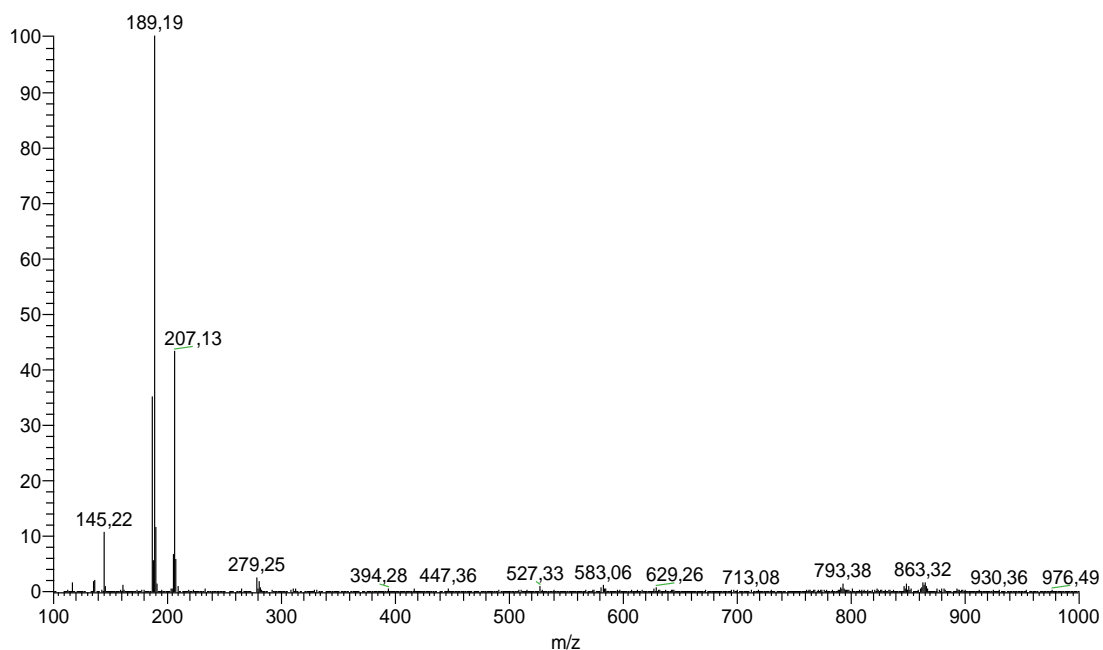


**Figura 64.** Cromatograma da fração F2 e o espectro de íons totais (*full scan*) no modo positivo da região selecionada.

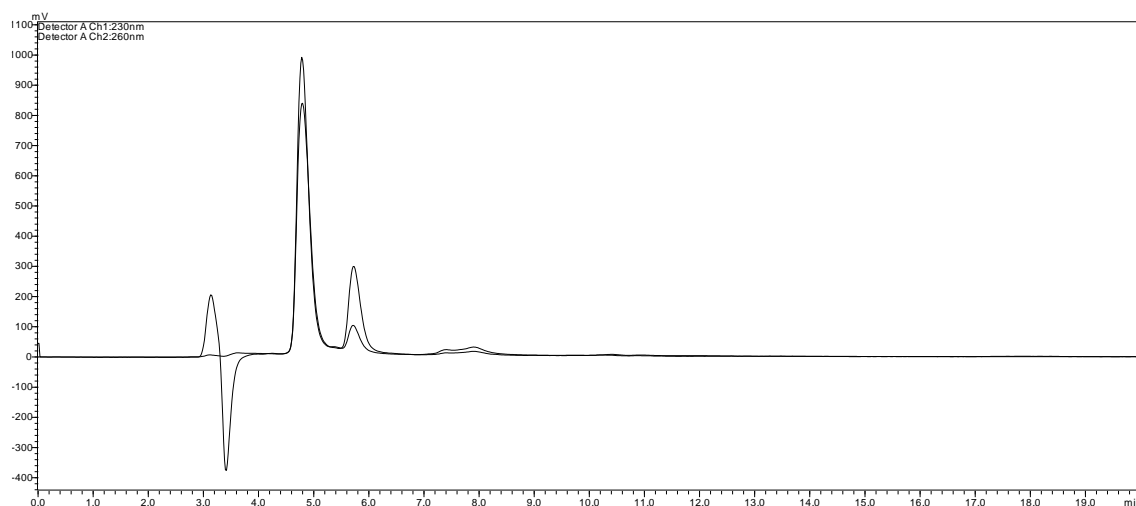
#### 5.4.1. Identificação da amostra F2J1

A amostra F2J1 (80,0 mg) apresentou característica de um sólido amarelo escuro, totalmente solúvel em MeOH. A análise de massas, no modo negativo evidenciou a presença do pico base em  $m/z$  189 e de um pico menor em  $m/z$  207, correspondendo a

duas moléculas desprotonada de massa 190 u e 208 u (Figura 65). Isso é confirmado pelo cromatograma analítico (Figura 66) e pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  onde se observou uma mistura de duas substâncias correspondente à região selecionada no cromatograma da figura 64, onde a majoritária foi previamente identificada em DMSO-*d*.



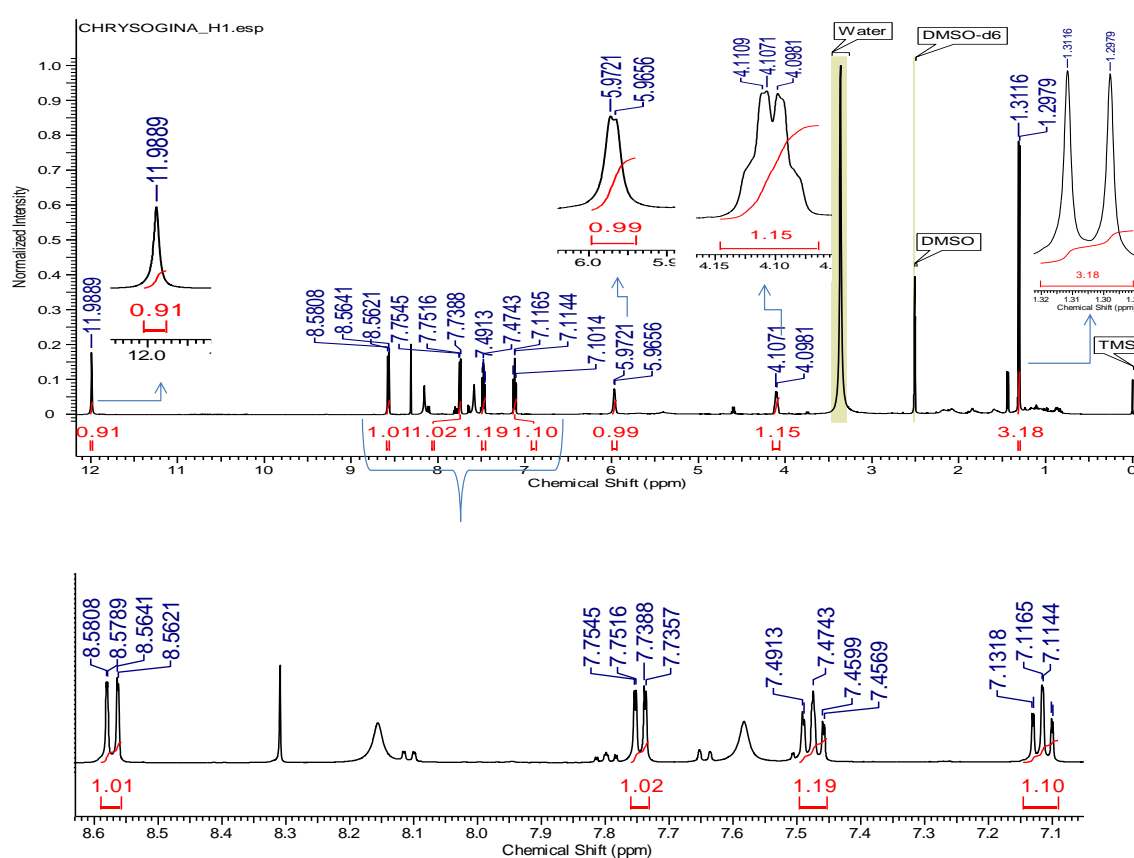
**Figura 65.** Espectro de íons totais (*full scan*) da fração F2J1.



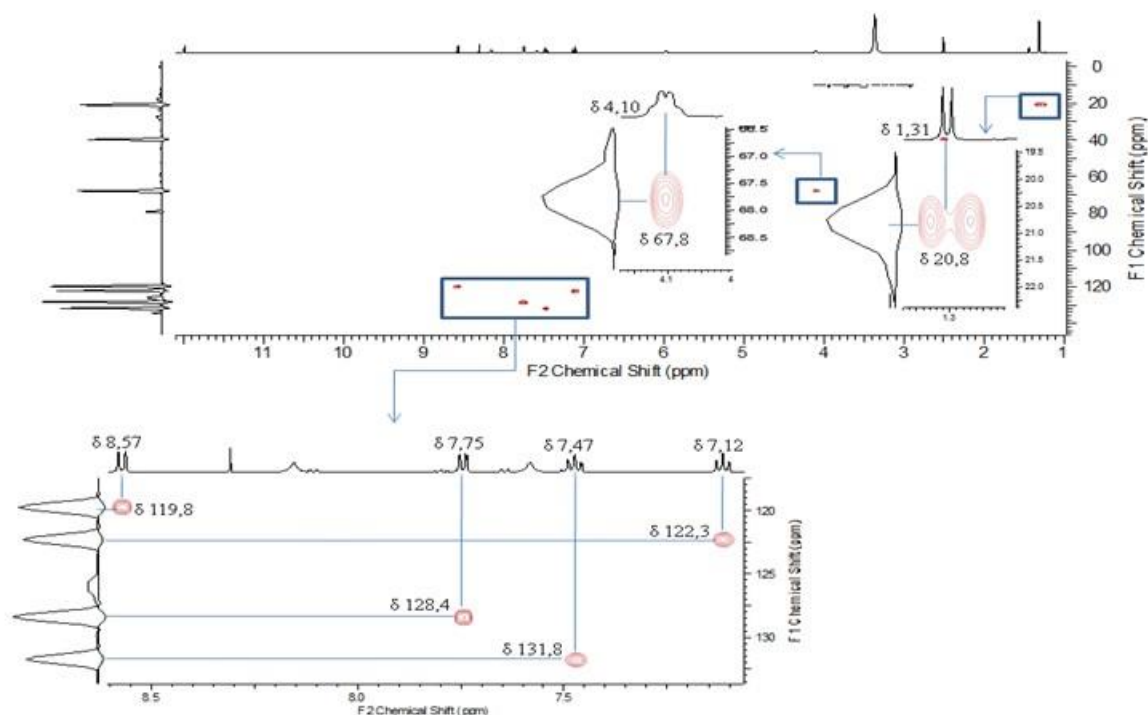
**Figura 66.** Cromatograma analítico da fração F2J1.

No RMN de  $^1\text{H}$  da F2J1 (Figura 67) foi observado um sinal de hidrogênio altamente desblindado em  $\delta$  11,99 (1H; *s*), característico de hidrogênios ácidos ligados a átomos eletronegativos, o que é confirmado, pois o sinal não possui correlação com

nenhum carbono por experimento de HSQC. Na região aromática do espectro foi possível observar quatro sinais de hidrogênio em  $\delta$  8,57 (1H; *dd*; 8,5; 1,2 Hz),  $\delta$  7,75 (1H; *dd*; 7,6; 1,5 Hz),  $\delta$  7,47 (1H; *ddd*; 8,5; 7,3; 1,5),  $\delta$  7,12 (1H; *ddd*; 7,6; 7,6; 1,2), coerente com a presença de um anel aromático dissubstituído. Na região alifática do espectro observou-se: um sinal característico de hidrogênio de hidroxila em  $\delta$  5,97 (1H; *d*; 3,4), um sinal de hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,10 (1H; *m*), confirmando a presença da hidroxila, e um sinal de metila em  $\delta$  1,31 (3H, *d*, 6,7 Hz). Excluído o hidrogênio em  $\delta$  11,99, esses hidrogênios aromáticos e alifáticos estão diretamente correlacionados com os carbonos em  $\delta$  119,8, 128,4, 131,7, 122,3, 67,8, 20,8 respectivamente (HSQC, Figura 68).

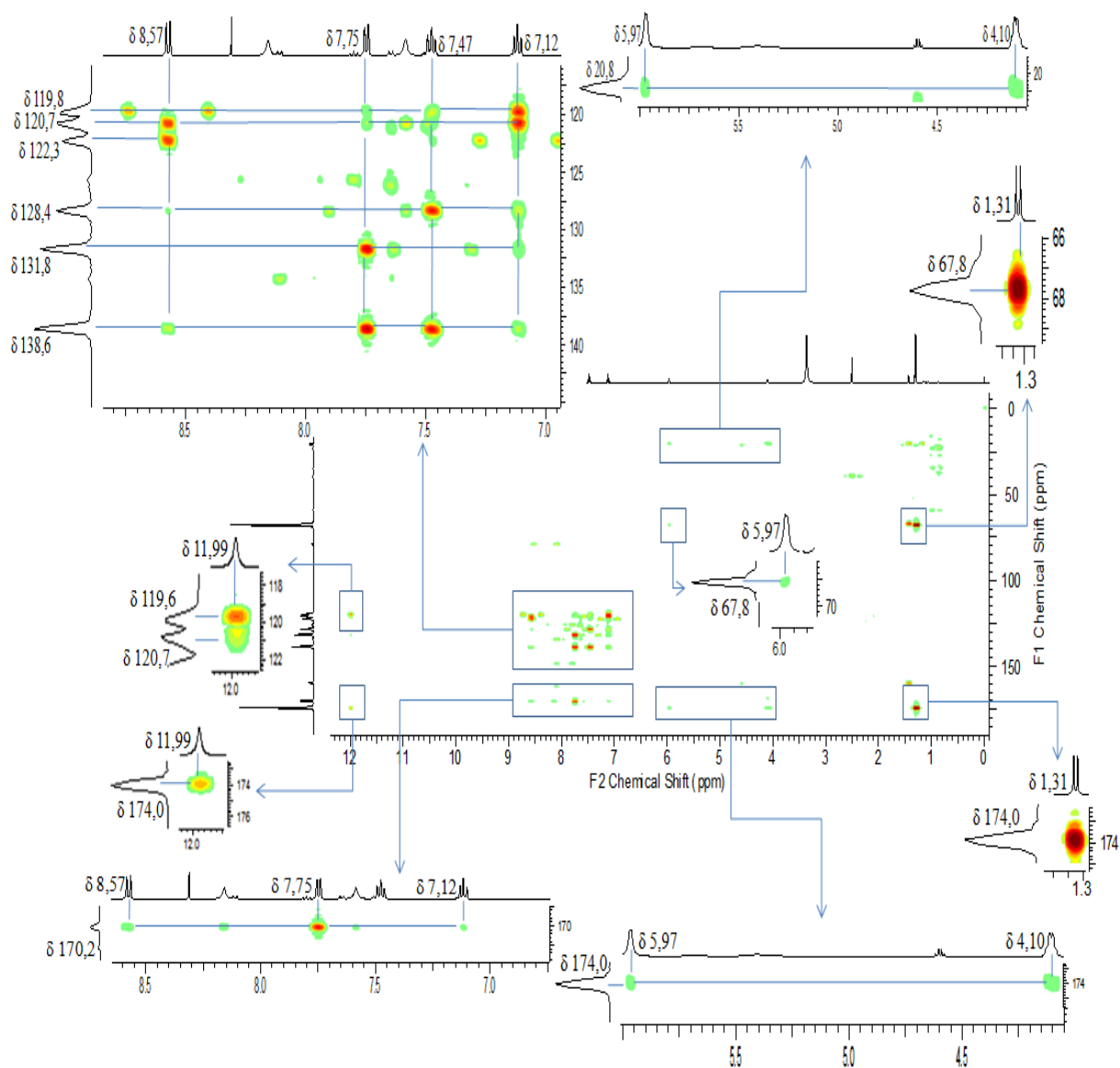


**Figura 67.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra F2J1 (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figura 68.** Mapa de correlação HSQC da amostra F2J1 ( $J^I$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

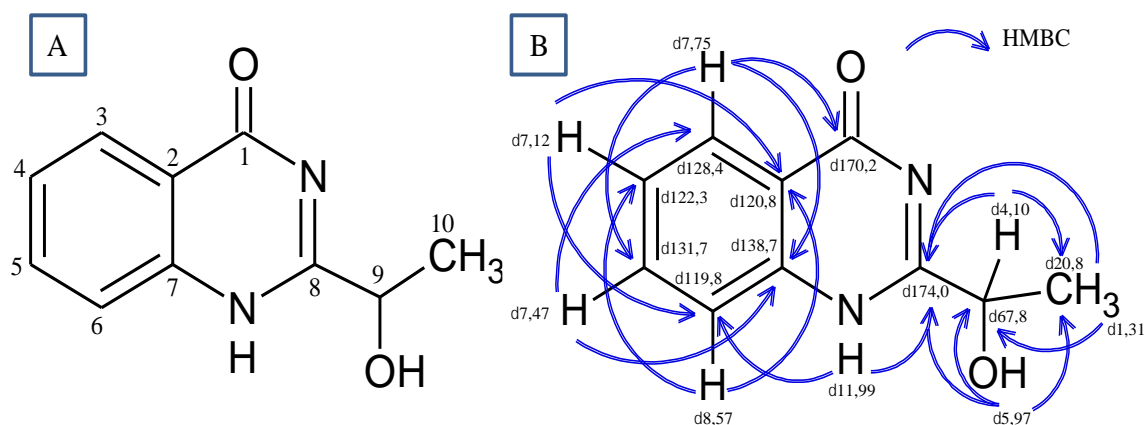
O hidrogênio em  $\delta$  11,99 apresenta correlações com os carbonos em  $\delta$  119,8, 174,0 e 138,7 (HMBC, Figura 69). O hidrogênio em  $\delta$  8,57 está correlacionado com os carbonos em  $\delta$  120,8 e 122,3, 128,4, 138,7 e 170,2. O hidrogênio em  $\delta$  7,75 está correlacionado com os carbonos em  $\delta$  131,7, 138,7, 170,2, 119,8 e 120,8. O hidrogênio em  $\delta$  7,47 está aos carbonos em  $\delta$  128,4 e 138,7 e 119,8. O hidrogênio em  $\delta$  7,12 está fortemente correlacionado com os carbonos em  $\delta$  119,8, 120,8, 128,4, 131,7 e 138,7, fechando assim as correlações em torno do anel aromático. O hidrogênio em  $\delta$  5,97 apresenta correlações com os carbonos em  $\delta$  20,8, 67,8, 174,0. O hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,10 apresenta correlações com os carbonos em  $\delta$  20,8 e 174,0. Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,31 apresentam correlações com os carbonos 67,8 e 174,0.



**Figura 69.** Mapa de correlação HMBC ( $J^2-J^4$ ,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , 500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da amostra F2J1.

Pela interpretação dos dados acima descritos e a comparação com dados da literatura (KETTERING et al., 2004; YUNianto et al., 2014; Tabela 8) foi possível identificar a amostra F2J1 com o alcalóide crisogina (Figura 70). Esta substância foi isolada anteriormente de espécies do gênero *Penicillium* e não apresentou atividade citotóxica e antimicrobiana (KETTERING et al., 2004; YUNianto et al., 2014).





**Figura 70.** A - Estrutura de crisogina e B – as principais correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC para a amostra F2J1.

**Tabela 8.** Comparação dos dados de RMN da amostra F2J1 e da substância crisogina.

Nº	Amostra F2J1 <sup>1</sup>			Crisogina <sup>2</sup>			Crisogina <sup>3</sup>		
	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$ <sup>4</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>5</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	
1		170,2		-	172,1		-	170,2	
2		120,8		-	124,6		-	120,9	
3	7,75 (1H, <i>dd</i> , 7,6, 1,5)	128,4	131,7; 138,7; 170,2; 119,8; 120,8	7,74 (1H, <i>dd</i> , 7,95x(2))	132,5	C7, C5	7,74 (1H, <i>dd</i> , 1,4, 7,8)	128,4	
4	7,12 (1H, <i>ddd</i> , 7,6, 7,6, 1,2)	122,3	119,8; 120,8; 128,4; 131,7; 138,7; 170,2	7,16 (1H, <i>dt</i> , 7,35, 7,95)	129,6	C6	7,11 (1H, <i>dt</i> , 1,1, 7,8)	122,3	
5	7,47 (1H, <i>ddd</i> , 8,5, 7,3, 1,5)	131,7	128,4; 138,7; 119,8	7,51 (1H, <i>ddd</i> , 1,2, 7,35, 8,55)	133,4	C7, C4	7,45 (1H, <i>ddd</i> , 1,4, 7,8, 8,4)	131,8	
6	8,57 (1H, <i>dd</i> , 8,5, 1,2)	119,8	120,8; 122,3; 128,4; 138,7; 170,2	8,54 (1H, <i>dd</i> , 7,35, 8,55)	122,3	C2	8,57 (1H, <i>dd</i> , 1,1, 8,4)	119,8	
7		138,7		-	138,1		-	138,7	
8		174		-	176,2		-	174,1	
9	4,10 (1H, <i>m</i> )	67,8	20,8; 174,0	4,21 (1H, <i>dq</i> , 6,7, 7,35)	69,9		4,10 (1H, <i>dq</i> , 3,8, 6,8)	67,9	
10	1,31 (3H, <i>d</i> , 6,7)	20,8	67,8; 174,0	1,42 (3H, <i>d</i> , 6,75)	21,3	C9, C8	1,30 (1H, <i>d</i> , 6,8)	20,8	
NH	11,99 (1H, <i>s</i> )		119,8; 120,8; 174,0				11,98 (1H, <i>s</i> )		
OH	5,97 (1H, <i>d</i> , 3,4)		20,8; 67,8; 174,0				5,95 (1H, <i>d</i> , 3,8)		

<sup>1</sup> Espectrometro BRUKER AVANCE III HD 500 MHz em DMSO-*d*<sub>6</sub>;

<sup>2</sup> Espectrometro JEOL 500 MHz em MeOD (YUNIAN O et al., 2014);

<sup>3</sup> Espectrometro BRUKER DRX 500 MHz em CDCl<sub>3</sub> (KETTERING et al., 2004);

<sup>4</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

<sup>5</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;

### 5.4.2. Identificação da amostra F2J1/2

A substância minoritária de F2J1, após separação da crisogina, foi nomeada como F2J1/2 (10 mg). Como foi relatada na discussão anterior, essa substância possui massa de 208 u, 18 u a mais que a crisogina, podendo ser uma forma hidratada da crisogina.

Como os espectros de RMN foram feitos em MeOD, um solvente polar prótico, os hidrogênios sobre heteroátomos e passíveis de troca com o solvente não foram observados. Na região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 71) foi possível observar quatro sinais de hidrogênio em  $\delta$  8,20 (1H; dd; 8,0; 1,2 Hz), 7,81 (1H; ddd; 8,3; 7,1; 1,5 Hz), 7,69 (1H; dd; 8,3; 0,5) e 7,51 (1H; ddd; 8,0; 7,1; 1,2), coerentes com a presença de um anel aromático dissubstituído. Na região alifática do espectro observou-se: um sinal de hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,73 (1H; q; 6,7) e um sinal de metila em  $\delta$  1,55 (3H, d, 6,7 Hz). Esses hidrogênios, aromáticos e alifáticos, estão diretamente correlacionados com os carbonos em  $\delta$  125,7, 134,5, 126,3, 126,4, 67,2, 21,0 respectivamente (HSQC, Figura 72).

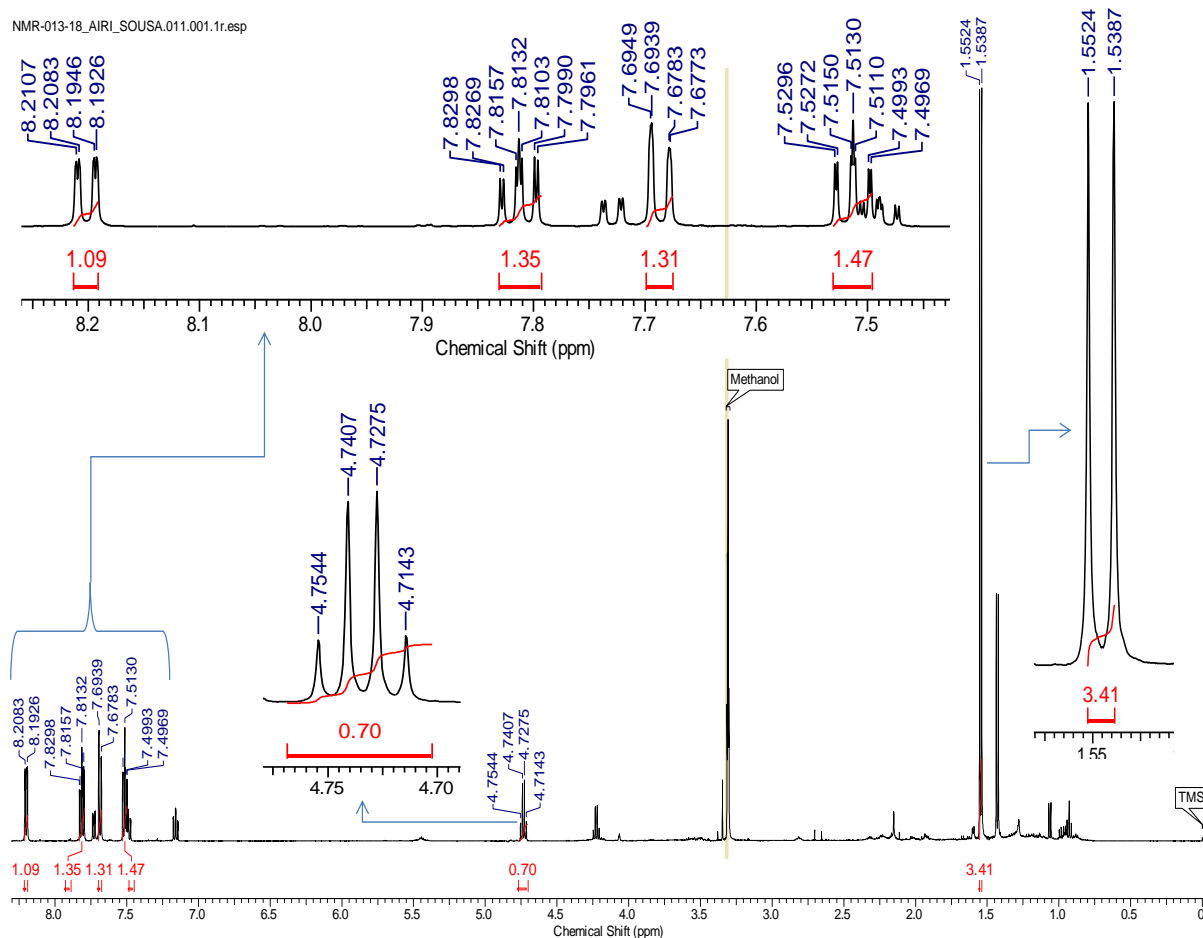
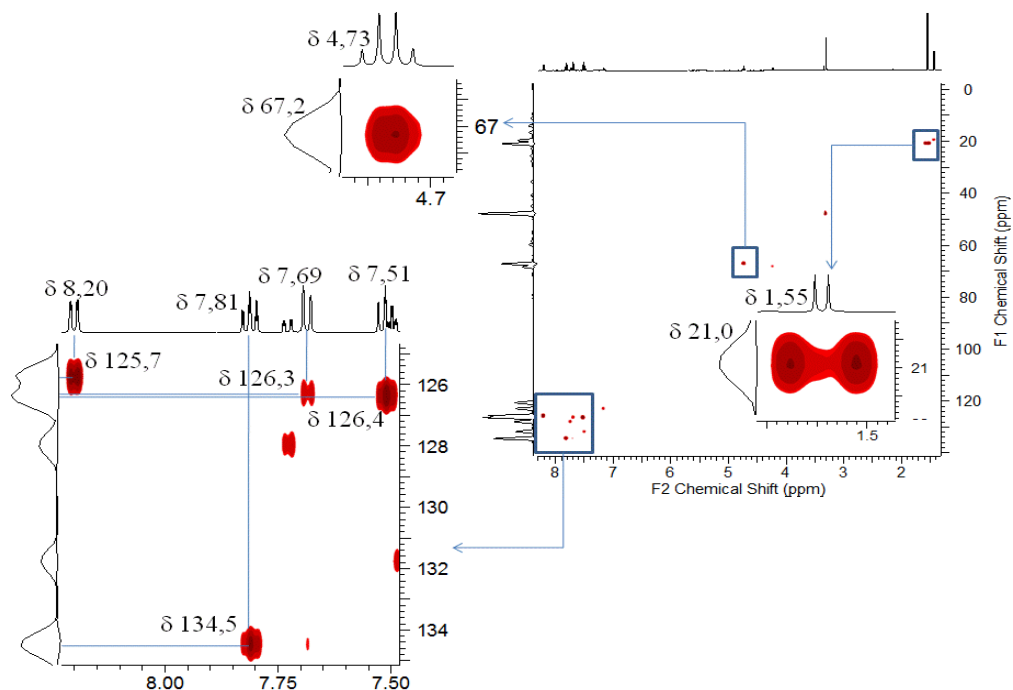
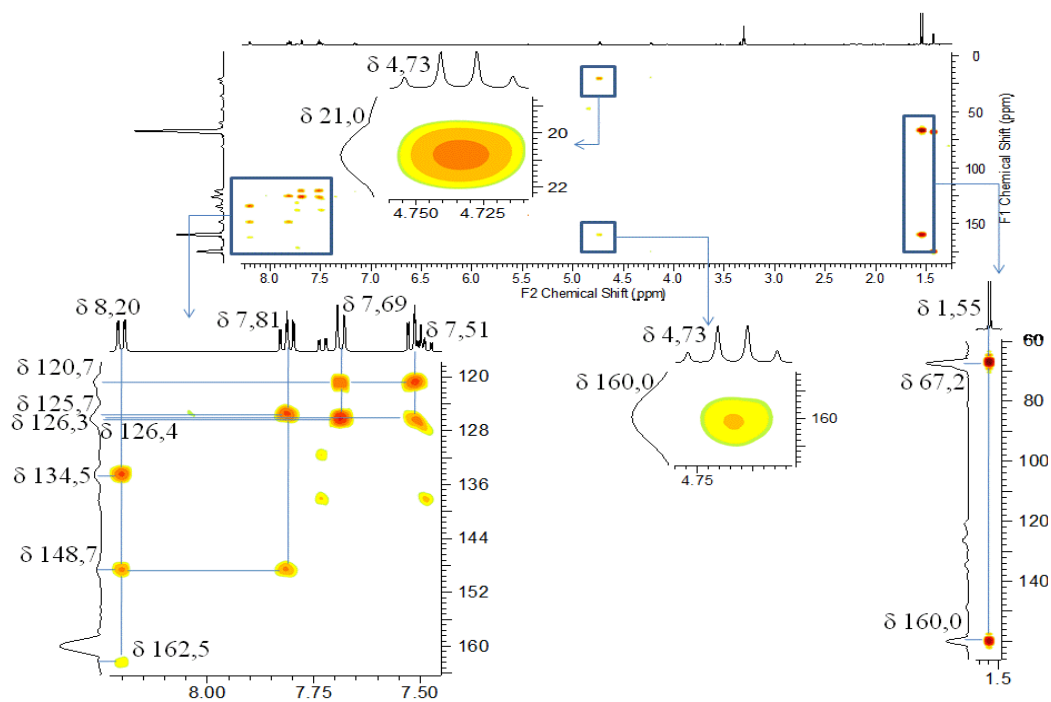


Figura 71. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra F2J1/2 (500 MHz, MeOD).



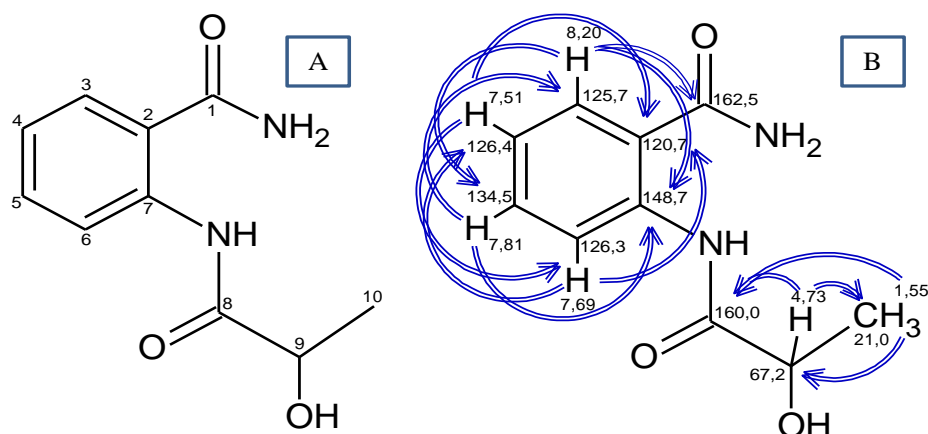
**Figura 72.** Mapa de correlação HSQC da amostra F2J1/2 ( $J^1$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD).

No experimento de HMBC (Figura 73) foram observadas as correlações dos seguintes átomos: o hidrogênio em  $\delta$  8,20 com os carbonos em  $\delta$  134,5, 148,7 e 162,5; o hidrogênio em  $\delta$  7,81 com os carbonos em  $\delta$  125,7 e 148,7; o hidrogênio em  $\delta$  7,69 com os carbonos em  $\delta$  120,7 e 126,4; o hidrogênio em  $\delta$  7,51 com os carbonos em  $\delta$  120,7 e 126,3; o hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,73 com os carbonos em  $\delta$  21,0 e 160,0; e o hidrogênio metílico em  $\delta$  1,55 em correlações fortes com os carbonos  $\delta$  67,2 e 160,0.



**Figura 73.** Mapa de correlação HMBC ( $J^2$ - $J^4$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , 500 MHz, MeOD) da amostra F2J1/2.

Pela interpretação dos dados acima descritos e a comparação com os dados literatura (KETTERING et al., 2004; Tabela 9) foi possível identificar a amostra F2J1/2 com a substância ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico (Figura 74). Esta substância, assim como crisogina, foi isolada anteriormente de espécies do gênero *Penicillium* e não apresentou atividade citotóxica e antimicrobiana (KETTERING et al., 2004).



**Figura 74.** A - Estrutura de ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico e B – Correlações observadas pelo mapa de correlações HMBC para a amostra F2J1/2.

**Tabela 9.** Comparação dos dados de RMN da amostra F2J1/2 com os dados da substância ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico.

Nº	Amostra F2J1/2 <sup>1</sup>			Ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico <sup>2</sup>	
	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C^3$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>4</sup>	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1		162,5			162,3
2		120,7			121,0
3	8,20 (1H, dd, 8,0, 1,2)	125,7	<b>134,5; 148,7; 162,5</b>	8,21; d; 8,0	126,4
4	7,51 (1H, ddd, 8,0, 7,1, 1,5)	126,4	<b>120,7; 126,3</b>	7,44; t; 8,0	126,7
5	7,81 (1H, ddd, 8,3, 7,1, 1,5)	134,5	<b>125,7; 148,7</b>	7,73; t; 8,0	134,8
6	7,69 (1H, dd, 8,3, 0,5)	126,3	<b>120,7; 126,4</b>	7,63; d; 8,0	126,7
7		148,7			148,5
8		160,0			159,0
9	4,73 (1H, q, 6,7)	67,2	21,0; 160,0	4,72; q; 6,7	67,0
10	1,55 (3H, d, 6,7)	21,0	<b>67,2; 160,0</b>	1,55; d; 6,8	22,2
7-NH				2,85; brs	
9-OH				2,77; brs	

<sup>1</sup> Espectrômetro BRUKER AVANCE III HD 500 MHz em MeOD;

<sup>2</sup> Espectrômetro BRUKER DRX 500 MHz em DMSO-*d*<sub>6</sub> (KETTERING et al., 2004);

<sup>3</sup> Valores obtidos através do HSQC para carbonos protonados e HMBC para carbonos quaternários;

<sup>4</sup> Valores em negrito indicam correlações fortes;

## 5.5. Avaliação da atividade antiglicante

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antiglicante foram expressos pela porcentagem de inibição total e pelo parâmetro de  $CI_{50}$ , que se refere à quantidade de amostra necessária para inibir a glicação em 50%.

### 5.5.1. Glicação (Glioxal)

De seis amostras, cinco apresentaram atividade antiglicante pela via oxidativa. Apenas a amostra F2J1 (ainda em mistura) não apresentou atividade, como está representado na tabela 10. Destacam-se as amostras F1G10, F1G12, F1G14 e F1G5, com exceção da F1G10, as quais apresentaram inibição total muito superior a 100% e todas com um  $CI_{50}$  superior ao padrão (Aminoguanidina), utilizado como referência, principalmente a amostra F1G5.

**Tabela 10.** Atividade antiglicante (Glioxal) das substâncias identificadas de *Penicillium chrysogenum*.

Amostras	% Inibição total	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
F2J1	41,50 $\pm$ 3,76	-
F1G10	82,65 $\pm$ 1,88	24,17 $\pm$ 1,81
F1G12	126,74 $\pm$ 1,86	6,50 $\pm$ 0,75
F1G14	197,46 $\pm$ 13,03	17,50 $\pm$ 1,13
F1G8	65,26 $\pm$ 3,17	44,47 $\pm$ 0,65
F1G5	369,35 $\pm$ 21,28	1,63 $\pm$ 0,12
Padrão	84,95 $\pm$ 0,26	35,57 $\pm$ 0,85

### 5.5.2 Glicação (Frutose)

Assim com no Item 5.5.1, cinco amostras apresentaram atividade antiglicante pela via não oxidativa, mas nesse ensaio a amostra F1G12 não apresentou atividade (Tabela 11). Destaca-se a amostra F1G5 que apresentou inibição total de 100% e um  $CI_{50}$  de 4,40  $\pm$  0,35  $\mu\text{g/mL}$  e se manteve com um potencial antiglicante superior ao padrão como observado também no Item 5.5.1. Em comparação a outras substâncias como catequina (64,5  $\pm$  0,7  $\mu\text{g/mL}$ ), ácido protocatequínico (61,9  $\pm$  0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), vanilina (>1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e rutina (70,5  $\pm$  0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (YAGI et al., 2012) o potencial antiglicante da amostra F1G5 ainda é superior. Vale ressaltar a importância dessa atividade no tratamento preventivo das complicações diabéticas, uma vez que a glicação está diretamente relacionada com a hiperglicemia. Esse resultado aponta a amostra F1G5 como um excelente candidato a fármaco.

**Tabela 11.** Atividade antiglicante (Frutose) das substâncias identificadas de *Penicillium chrysogenum*.

<b>Amostras</b>	<b>% Inibição total</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>F2J1</b>	73,73 ± 3,42	94,90 ± 1,39
<b>F1G10</b>	83,19 ± 1,96	34,87 ± 1,62
<b>F1G12</b>	28,75 ± 1,32	-
<b>F1G14</b>	62,83 ± 2,84	88,10 ± 1,06
<b>F1G8</b>	85,39 ± 2,71	29,20 ± 0,70
<b>F1G5</b>	100,02 ± 2,76	4,40 ± 0,35
<b>Padrão</b>	52,77 ± 2,94	28,60 ± 1,35

## 6. CONCLUSÃO

A análise do perfil espectrométrico do extrato metanólico do meio de líquido da linhagem 401 de *Penicillium chrysogenum* isolado de *Gustavia* sp. evidenciou que este é rico produtor de sorbicilinoídes. O fracionamento desse extrato por técnicas cromatográficas levou ao isolamento dos sorbicilinoídes 2',3'-dihidrosorbicilina, tricodimerol, dihidrotricodimerol, tetrahidrotricodimerol e éter tetrahidrotricodímero, sendo este último relatado pela primeira vez no gênero *Penicillium*, além do alcalóide crisogina e ácido amida N-(2-hidroxiopropanoil)-2-aminobenzoico. Estes resultados permitem sugerir que a espécie *Penicillium chrysogenum* é uma fonte promissora de monômeros, dímeros e trimeros de sorbicilinoídes.

Várias substâncias isoladas da linhagem 401 de *Penicillium chrysogenum* apresentaram atividade antiglicante de excelente a moderado potencial antiglicante, com destaque para as substâncias éter tetrahidrotricodímero, tricodimerol, tetrahidrotricodimerol e 2',3'-dihidrosorbicilina, as quais inibiram a reação de glicação nos dois sistemas ensaiados Glioxal/Albumina e Frutose/Albumina. O éter tetrahidrotricodímero apresentou um resultado superior ao próprio padrão utilizado como referência, indicando assim essa substância como um promissor candidato a fármaco na prevenção de complicações em pacientes diabéticos. Como as vias de glicação de proteínas são complexas mais estudos são necessários para entender o mecanismo molecular da atividade antiglicante dos sorbicilinoídes.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; SOUZA, A. D. L. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). *Química Nova*, v. 34, p. 1182–1187, 2011.

ALMEIDA, M. F. O. Estudo Químico e Biológico dos Metabólitos Secundários de Fungos Endofíticos de *Gustavia* sp. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, 2014.

BALDE, E. S.; ANDOLFI, A.; BRUYERE, C.; CIMMINO, A.; THEYS, D. L.; VURRO, M.; DAMME, M. V.; ALTOMARE, C.; MATHIEU, V.; KISS, R.; Evidente, a. Investigations of Fungal Secondary Metabolites with Potential Anticancer Activity. *Journal Natural Products*, v. 73, p. 969–971, 2010.

BANHOS, E. F.; SOUZA, A. Q. L.; ANDRADE, J. C.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi isolated from *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 153-161, 2014.

BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 39, p. 608-620, 2016.

BARREIRO, C.; MART, J. F.; ESTRADA, C. G. Proteomics Shows New Faces for the Old Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. doi:10.1155/2012/105109.

BTISSAM, R.; RAJAE, R.; HASSANE, G.; NAIMA, B.; MOHAMED, N. Protocol implementation for the detection of advanced glycation end products and screening of natural extracts involved in the prevention of diabetic complications. *Journal of Medicinal Plants Studies*, v5, p. 04-15, 2017.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. *Current Organic Chemistry*, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BRINGMANN, G.; MUHLBACHER, J.; WIESE, J.; LANG, G.; MAKSIMENKA, K.; IMHOFF, J. F.; GULDER, T. A. M.; STEFFENS, S.; TSURUTA, H.; SCHAUMANN, K.; OTTSTADT, S. P.; MULLER, W. E. G.; STOHR, R.; BOREIKO, O. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. *Tetrahedron*, v.61, p. 7252–7265, 2005.

BRINGMANN, G.; LANG, G.; BRUHN, T.; SCHANFLER, K.; Schmaljohann, r.; Wiese, j.; IMHOFF, J. F.; STEFFENS, S. Sorbifuranones A e C, sorbicillinoid metabolites from



*Penicillium* strains isolated from Mediterranean sponges. *Tetrahedron*, v.66, p. 9894-9901, 2010.

BUCKER, A.; BUCKER, N. C. F.; SOUZA, A. Q. L.; GAMA, A. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; COSTA, F. M.; NUNEZ, C. V.; SILVA, A. C.; TADEI, W. P. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae) v.46, n.4, p. 411-419, 2013.

CABRERA, G. M.; BUTLER, M.; RODRIGUEZ, M. A.; GODEAS, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. A Sorbicillinoid Urea from an Intertidal *Paecilomyces marquandii*. *Journal of Natural Products*, v.69, p. 1806-1808, 2006.

CANUTO, K. M.; RODRIGUES, T. H. S.; OLIVEIRA, F. S. A.; GONÇALVES, F. J. T. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. Embrapa Agroindústria Tropical, 1ª ed., Fortaleza, 2012.

CAO, M.; ZHU, T.; LIU, J.; OUYANG, L.; YANG, F.; LIN, H. New sorbicillinoid derivatives with GLP-1R and eEF2K affinities from a sponge-derived fungus *Penicillium chrysogenum* 581F1. *Natural Product Research*, p. 1478-6467, 2019.

CORRAL, P.; ESPOSITO, E. P.; TEDESCO, P.; FALCO, A.; TORTORELLA, L. T.; FESTA, C.; D'AUREA, M. V.; GNAVI, G.; VARESE, G. C.; PASCALE, D. Identification of a Sorbicillinoid-Producing *Aspergillus* Strain with Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus*: a New Polyextremophilic Marine Fungus from Barents Sea. *Marine Biotechnology*, v. 20, p. 502-511, 2018.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R.; Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Revista Virtual de Química*, v. 5, p. 421-437, 2013.

CHEN, L.; ZHU, T.; DING, Y.; KHAN, I. A.; GU, Q.; LI, D. Sorbiterrin A, a novel sorbicillin derivative with cholinesterase inhibition activity from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *Tetrahedron Letters*, v. 53, p. 325-328, 2012.

CONTI, R.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Cienc. Cult.* [online]. 2012, vol.64, n.3, p. 43-47. ISSN 0009-6725.

CRAM, D. J. Mold Metabolites. II. The Structure of Sorbicillin, a Pigment Produced by the Mold *Penicillium notatum*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 70, p. 4240-4243.

DEEPIKA, V. B.; MURALI, T. S.; SATYAMOORTHY, K. Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. *Microbiological Research*, v. 182, p. 125-140, 2016.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, v. 62, p. 5-16, 2009.

DENG, X. H.; CHAI, L. Y.; YANG, Z. H.; TANG, C. J.; TONG, H. X.; YUAN, P. F. Bioleaching of heavy metals from a contaminated soil using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1. *J. Hazard Mater.*, v. 233, p. 25-32, 2012.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech...[et. al.]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

DU, L.; ZHU, T.; LI, L. Y.; CAI, S.; ZHAO, B.; GU, Q. Cytotoxic Sorbicillinoids and Bisorbicillinoids from a Marine-Derived Fungus *Trichoderma* sp. *Chem. Pharm. Bull.*, v.57, p.220-223, 2009.

EL-ELIMAT, T.; RAJA, H. A.; FIGUEROA, M.; SWANSON, S. M.; JOSEPH O.; FALKINHAM III; LUCAS, D. M.; GREVER, M. R.; WANI, M. C.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Sorbicillinoid Analogues with Cytotoxic and Selective Anti *Aspergillus* Activities from *Scytalidium album*. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, v. 68, p. 191–196, 2015.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; GANASSI, S.; ALTOMARE, C.; FAVILLA, M.; CRISTOFARO, A. D. F.; VITAGLIANO, S.; SABATINI, M. A. Bisorbicillinoids Produced by the Fungus *Trichoderma citrinoviride* Affect Feeding Preference of the Aphid *Schizaphis graminum*. *J. Chem. Ecol.*, v35, p. 533–541, 2009.

FUGA LI, Y.; TSAI, K. J. S.; HARVEY, C. J. B.; LI, J. J.; ARY, B. E.; BERLEW, E. E.; BOEHMAN, B. L.; FINDLEY, D. M.; FRIANT, A. G.; GARDNER, C. A.; GOULD, M. P.; HA, J. H.; LILLEY, B. K.; MEKINSTRY, E. L.; NAWAL, S.; PARRY, R. C.; ROTHCHILD, K. W.; SILBERT, S. D.; TENTILUCCI, M. D.; THURSTON, A. M.; WAI, R. B.; YOON, Y.; AIYAR, R. S.; MEDEMA, M. H.; HILLENMEYER, M. E.; CHARKOUDIAN, L. K. Comprehensive curation and analysis of fungal biosynthetic gene clusters of published natural products. *Fungal Genetics and Biology*, v. 89, p. 18-28, 2016.

GAO, S.; LI, X.; DU, F.; LI, C.; PROKSCH, P.; WANG, B. Secondary Metabolites from a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Mar. Drugs*, v.9, p. 59-70, 2011.

GRAVEL, E.; POUPON, E. Biogenesis and Biomimetic Chemistry: Can Complex Natural Products Be Assembled Spontaneously?. *Eur. J. Org. Chem.* p.27-42, 2008. DOI: 10.1002/ejoc.200700331.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHELT, A. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, p. 16-26, 2002.

GUO, W.; PENG, J.; ZHU, T.; GU, Q.; KEYZERS, R. A.; LI, D. Sorbicillamines A-E, Nitrogen-Containing Sorbicillinoids from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23-2. *J. Nat. Prod.*, v. 76, p. 2106-2112, 2013.

GUO, W.; LI, D.; PENG, J.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Penicitols A-C and Penixanacid A from the Mangrove-Derived *Penicillium chrysogenum* HDN11-24. *Journal Natural Products*, v. 78, p. 306-310, 2015.

HARNED, A. M.; VOLP, K. A. The sorbicillinoid family of natural products: Isolation, biosynthesis, and synthetic studies. *Natural Products Report*, v.28, p. 1790–1810, 2011.

HANSON, J. R. *The chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry, 221 p, 2008.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*, v.2, p.87-95, 2011.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SEIFERT, K. A.; OVERY, D. P.; TUTHILL, D. M.; VALDEZ, J. G.; SAMSON, R. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*, v.29, p.78-100, 2012.

JIANG, C.; ZHOU, Z.; YANG, X.; LAN, L.; GU, Y.; YE, P.; GUO, Y. Antibacterial sorbicillin and diketopiperazines from the endogenous fungus *Penicillium* sp. GD6 associated Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v.16, n. 5, p. 0358-0365, 2018.

KAWAHARA, T.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K.; JBIR-124: a novel antioxidative agent from a marine sponge-derived fungus *Penicillium citrinum* SpI080624G1f01. *The Journal of Antibiotics*, v.65, p. 45-47, 2012.

KETTERING, M.; STERNER, O.; ANKE, T. Antibiotics in the Chemical Communication of Fungi. *Z. Naturforsch*, v.59, p. 816-823, 2004.

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v. 68, n. 1, p. 200-205, 2004.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; MEDEIROS, L. S.; RODRIGUES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. An endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. *Química Nova*, v. 35, N. 4, 771-774, 2012.

KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (review). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, v. 49, p. 5–16, 2013.

KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S. K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresour. Technol.*, v. 120, p.300-304, 2012.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?. *Nat. Prod. Rep.*, v. 28, p. 1203–1207, 2011.

- LAN, W. J.; ZHAO, Y.; XIE, Z. L.; LIANG, L. Z.; SHAO, W. Y.; ZHU, L. P.; YANG, D. P.; ZHU, X. F.; LI, H. J. Novel sorbicillin analogues from the marine fungus *Trichoderma* sp. associated with the seastar *Acanthaster planci*. Nat. Prod. Commun., v. 7, 2012.
- LEE, D.; LEE, J. H.; CAI, X. F.; SHIN, J. C.; LEE, K.; HONG, Y.; LEE, J. J. Fungal Metabolites, Sorbicillinoid Polyketides and Their Effects on the Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$ . J. Antibiot. v.58, p.615–620, 2005.
- LI, D.; WANG, F.; CAI, S.; ZENG, X.; XIAO, X.; GU, Q.; ZHU, W. Two New Bisorbicillinoids Isolated from a Deep-sea Fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. The Journal of Antibiotics, v. 60, p. 317-320, 2007a.
- LI, D.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q.; FANG, Y.; ZHU, W. Trisorbicillinone A, a novel sorbicillin trimer, from a deep sea fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. Tetrahedron Letters, v. 48, p. 5235–5238, 2007b.
- LI, D.; CAI, S.; ZHU, T.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q.; Three new sorbicillin trimers, trisorbicillinones B, C, and D, from a deep ocean sediment derived fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. Tetrahedron, v. 66, p. 5101-5106, 2010.
- LI, D.; CAI, S.; ZHU, T.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q. New Cytotoxic Metabolites from a Deep-Sea-Derived Fungus, *Phialocephala* sp., Strain FL30r. CHEMISTRY & BIODIVERSITY, Vol. 8, p. 895-901, 2011a.
- LI, D.; CHEN, L.; ZHU, T.; KURTAN, T.; MANDI, A.; ZHAO, Z.; GU, Q. Chloctanspirones A and B, novel chlorinated polyketides with an unprecedented skeleton, from marine sediment derived fungus *Penicillium terrestris*. Tetrahedron, v. 67, p. 7913-7918, 2011b.
- LIU, W.; GU, Q.; ZHU, W.; CUI, C.; FAN, G. Two New Benzoquinone Derivatives and Two New Bisorbicillinoids were Isolated from a Marine-derived Fungus *Penicillium terrestris*. J. Antibiot., v.58, p. 441-446, 2005a.
- LIU, W.; GU, Q.; ZHU, W.; CUI, C.; FAN, G. Dihydrotrichodimerol and tetrahydrotrichodimerol, two new bisorbicillinoids, from a marine-derived *Penicillium terrestris*. J. Antibiot., v.58, p. 621-624, 2005b.
- LIU, W. C.; GONG, T.; ZHU, P. Advances in exploring alternative Taxol sources. The Royal Society of Chemistry, v. 6, p. 48800–48809, 2016.
- LOPES, F. C.; TICHOTA, D. M.; SAUTER, I. P.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; ROTT, M. B.; RIOS, A. O.; BRANDELLI, A. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. Ann Microbiol. DOI 10.1007/s13213-012-0532-6, 2012.
- MARRA, R.; NICOLETTI, R.; PAGANO, E.; DELLAGRECA, M.; SALVATORE, M. M.; BORRELI, F.; LOMBARDI, N.; VINALE, F.; WOO, S. L.; ANDOLFI, A. Inhibitory effect of trichodermanone C, a sorbicillinoid produced by *Trichoderma citrinoviride* associated to

the green alga *Cladophora* sp., on nitrite production in LPS-stimulated macrophages. *Natural Products Research*, p. 1478-6427, 2018.

MAKRIS, K.; SPANOU, L. Is There a Relationship between Mean Blood Glucose and Glycated Hemoglobin?. *Journal of Diabetes Science and Technology*, v. 5, p. 1572-1583, 2011.

MAIA, L. C.; CARVALHO JR., A. A.. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, RC., org., *et al.* INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books <HTTP://books.scielo.org>.

MASKEY, R. P.; WOLLNY, I. G.; LAATSCH, H. Sorbicillin Analogues and Related Dimeric Compounds from *Penicillium notatum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p.865-870, 2005.

MENG, L.; SUN, P.; TANG, H.; LING LI, L.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; ZHANG, W.; YI, Y. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 39, p. 163–165, 2011.

MENG, J.; WANG, X.; XU, D.; FU, X.; ZHANG, X.; LAI, D.; ZHOU, L.; ZHANG, G. Sorbicillinoids from Fungi and Their Bioactivities. *Molecules*, v.21, 2016. DOI: 10.3390/molecules21060715.

MENG, J.; CHENG, W.; HEYDARI, H.; WANG, B.; ZHU, K.; KONUKLUGIL, B.; LIN, W. Sorbicillinoid-Based Metabolites from a Sponge-Derived Fungus *Trichoderma saturnisporum*. *Marine Drugs*, v. 16, p. 226, 2018.

MIZUTANI, K.; HIRASAWA, Y.; SUGITA-KONISHI, Y.; MOCHIZUKI, N.; MORITA, H. Structural and Conformational Analysis of Hydroxycyclochlorotine and Cyclochlorotine, Chlorinated Cyclic Peptides from *Penicillium islandicum*. *J. Nat. Prod.*, v. 71, p. 1297-1300, 2008.

MORI, S. Diversificação e conservação das LECYTHIDACEAE neotropicas. *Acta bot. bras.* v.4, n. 1, 1990.

MURALI, M.; SUDISHA, J.; AMRUTHESH, K. N.; ITO, S. I.; SHETTY, H. S. Rhizosphere fungus *Penicillium chrysogenum* promotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in pearl millet. *Plant Biol.*, v.15, p.111-118, 2013.

NETTO, A. P.; ANDRIOLO, A.; FILHO, F. F.; TAMBASCIA, M.; GOMES, M. B.; MELO, M.; SUMITA, N. M.; LYRA, R.; CAVALCANTI, S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 45, p. 31-48, 2009.

- NEUMANN, K.; ABDEL-LATEFF, A.; KRICK, A.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. Novel Sorbicillin Derivatives with an Unprecedented Carbon Skeleton from the Sponge-Derived Fungus *Trichoderma* Species. *Eur. J. Org. Chem.*, p. 2268–2275, 2007. DOI: 10.1002/ejoc.200601092
- PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES FILHO, E. ; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *murraya paniculata*. *Química Nova*, v.30, p. 2007.
- PENG, J.; ZHANG, X.; DU, L.; WANG, W.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Sorbicatechols A and B, Antiviral Sorbicillinoids from the Marine Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* PJX-17. *Journal of Natural Products*, v. 77, p. 424-428, 2014.
- RADIC, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi – The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*. v. 19, p. 1270-1284, 2012.
- REATEGUI, R. F.; WICKLOW, D. T.; GLOER, J. B. Phaeofurans and Sorbicillin Analogues from a Fungicolous *Phaeoacremonium* Species (NRRL 32148). *J. Nat. Prod.* v.69, p.113-117, 2006.
- PETTIT, G. R.; ZHANG, Q.; PINILLA, V.; HERALD, D. L.; DOUBEK, D. L.; DUKE, J. A. Isolation and Structure of Gustastatin from the Brazilian Nut Tree *Gustavia hexapetala*. *J. Nat. Prod.* v. 67, p. 983-985, 2004.
- RODRIGUES, M.; HASEGAWA, M.; GONZÁLES-MÚJICA, F.; MOTTA, N.; CASTILLO, A.; CASTILLO, J.; ZEA, E.; MORA, K.; SOUSA, L.; GONZÁLES A.; CAMEJO, D. Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 331-338, 2008.
- SACKS, D. B. A1c Versus Glucose Testing: A comparinon. *Diabetes Care*, v. 34, 2011. DOI: 10.2337/dc10-1546
- SAIKKONEN, K.; GUNDEL, P. E.; HELANDER, M. Chemical Ecology Mediated by Fungal Endophytes in Grasses. *Journal Chemical Ecology*, v. 39, p. 962-968, 2013.
- SALO, O. V.; RIES, M.; MEDEMA, M. H.; LANKHORST, P. P.; VREEKEN, R. J.; ROEL A. L. BOVENBERG, R. A. L.; DRIESSEN, A. J. M. Genomic mutational analysis of the impact of the classical strain improvement program on  $\beta$ -lactam producing *Penicillium chrysogenum*. *Bio. Med. Central Genomics*, 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-2154-4
- SALO, O.; GUZMÁN-CHÁVEZ, F.; RIES, M. I.; LANKHORST, P. P.; BOVENBERG, R. A. L.; VREEKEN, R. J.; DRIESSEN, A. J. M. Identification of a polyketide synthase involved in sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. doi:10.1128/AEM.00350-16.

SHERWANI, S. I.; KHAN, H. A.; EKHAIFY, A.; MASOOD, A.; SAKHARKAR, M. K. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomarker Insights*, v. 11, 2016.

SINGH, V. P.; BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Advanced Glycation End Products and Diabetic complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, v. 18: p. 1-14, 2014. <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>

SON, S.; KO, S.; KIM, J. W.; LEE, J. K.; JANG, M.; RYOO, I.; HWANG, G. J.; KWON, M. C.; SHIN, K.; FUTAMURA, Y.; HONG, Y.; OH, H.; KIM, B. Y.; UEKI, M.; TAKAHASHI, S.; OSADA, H.; JANG, J.; AHN, J. S. Structures and biological activities of azaphilones produced by *Penicillium* sp. KCB11A109 from a ginseng field. *Phytochemistry*, v. 122, p. 154-164, 2016.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; CIMERMAN, N. G. *Penicillium* Mycobiota in Arctic Subglacial Ice. *Microbial Ecology*, V. 52, p. 207–216, 2006.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PIMHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. S. Constituintes químicos de *Gustavia Augusta* L. (LECYTHIDACEAE). *Química Nova*, V. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA, A. D. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q.L.; PEREIRA, J. O.; CALGAROTTO, A. K.; V. MASO, MARANGONI, S. AND SILVA, S. L. Koninginins, phospholipase A2 inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma koningii*. *Toxicon*, V. 51, p. 240, 2008.

SOUZA, A. Q. L. DE; SOUZA, A. D. L. DE; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; MARIA SARQUIS, I. DE M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogensbentham*. *Acta Amazônia*, v. 34, n. 2, p. 185 - 195. 2004.

SPITELLER, P. Chemical ecology of fungi. *Natural Products Report*, v. 32, p. 971-993, 2015.

SUGAYA, K.; TERAJIMA, T.; TAKAHASHI, A.; ONOSE, J.; ABE, N. Bisorbicillinol inhibits Lyn tyrosine kinase for allergic response on RBL-2H3 cells. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters*, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.01.019>, 20019.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v. 31, No. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. A. P.; CORRE. D.; GOMES, D. C. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, p. 773-789, 2013.

TEDERSOO, L.; YOROU, N. S.; THU, P. Q.; SAITTA, A.; PÖLDMAA, K.; PARTS, NILSSON, R. H.; MAJUAKIM, L.; HOSAKA, K.; GUO, L.; DUNSTAN, W.; DANG, T.; ANSLAN, S.; BAHRAM, M.; WIJESUNDERA, R.; SUIJA, A.; PÖLME, S.; RUIZ, L. V.;

SMITH, M. E.; ROSAS, M.; PIEPENBRING, M.; PÄRTEL, K.; RIIT, T.; KÕLJALG, U.; VASCO-PALACIOS, A. M.; SHARP, C.; RATKOWSKY, D.; PHOSRI, C.; OTSING, E.; MORGADO, L. N.; LODGE, D. J.; HIIESALU, I.; GRESLEBIN, A.; CHEN, X.; DUNK, C.; NOUHRA, E.; MAYOR, J.; LEE, S. S.; SALUVEER, E.; PRITSCH, K.; PETERSON, M.; NJOUONKOU, A. L.; MAY, T. W.; LARSSON, K. H.; HENKEL, T. W.; GRELET, G.; DRENKHAN, R.; BUEGGER, F.; ABELL, S.; HAREND, H.; GEML, J.; DEARNALEY, J.; BREARLEY, F. Q.; ABARENKOV, K.; KOHOUT, P.; GATES, G.; KESEL, A. D.; BONITO, G.. Global diversity and geography of soil fungi. *SCIENCE*, v. 346, p. 1052–1053, 2014.

TORRES, N. M. P. O.; XAVIER, J. A.; GOULART, M. O. F.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. A. Química dos Produtos Finais de Glicação Avançada, *Rev. Virtual Quim.*, v. 10, n. 2, 2018, no prelo.

TRIFONOV, L. S.; BEN, J. H.; PIEWO, R.; DREIDING, A. S. Isolation and structure elucidation of three metabolites from *Verticillium intertextum*: sorbicillin, dihydrosorbicillin and bisvertinoquinol. *Tetrahedron*, v. 39, p. 4243-4256, 1983.

UEDA, J.; HASHIMOTO, J.; INABA, S.; TAKAGI, M.; SHIN-YANG, K. JBIR-59, a new *sorbicillinoid*, from a marine-derived fungus *Penicillium citrinum* SpI080624G1f0. *The Journal of Antibioyocs*, v. 63, p. 203-205, 2010.

VAN DER LEE, T. A. J.; MEDEMA, M. H. Computational strategies for genome-based natural product discovery and engineering in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 89, p. 29-36, 2016.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; SAMSON, R. An Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, v. 78, p. 343–371, 2014.

WASHIDA, K.; ABE, N.; SUGIYAMA, Y.; HIROTA, A. Novel DPPH Radical Scavengers, Demethylbisorbibutenolide and Trichopyrone, from a fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V.71, p.1052-1057, 2007.

WASHIDA, K.; ABE, N.; SUGIYAMA, Y.; HIROTA, A. Novel Secondary Metabolites, Spirosorbicillinols A, B and C, from a fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V.73, p.1355-1361, 2009.

YAGI, S.; DROUART, N.; BOURGAUD, F.; HENRY, M.; CHAPLEUR, Y.; LAURAIN-MATTAR, D. Antioxidant and antiglycation properties of *Hydnora johannis* roots. *South African Journal of Botany*, v. 84, p. 124–127, 2013.

YAO, Y.; LI, J.; JIANG, C.; ZHAO, X.; MIAO, Z.; LIU, H.; ZHENG, P.; YAO, W.; LI, W. Trichodimerol and sorbicillin induced apoptosis of HL-60 cells is mediated by reactive oxygen species. *Pharmazie*, v. 70, p. 394-398, 2015.



YAO, Y.; NIU, Y.; HAN, H.; LI, W.; HUANG, Y, SUN, T.; ZHANG, X.; HONG, Z.; LI, J. Tamaractam, a natural lactam, induces apoptosis and inhibits inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Biochemical Pharmacology*, v. 139, p. 105-141, 2017.

YUNianto, P.; RUSMAN, Y.; SAEPUDIN, E.; SUWARSO, W. P.; SUMARYONO, W. Alkaloid (Meleagrine and Chrysogine) from Endophytic Fungi (*Penicillium* sp.) of *Annona squamosa* L. *Pak. J. Biol. Sci.*, v. 17, p. 667-674, 2014.

ZHAI, M.; QI, F.; LI, J.; JIANG, C.; HOU, Y.; SHI, Y.; DI, D.; ZHANG, J.; WU, Q. Isolation of Secondary Metabolites from the Soil-Derived Fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a Biological Control Agent, and Evaluation of Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00556, 2016.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Report*, v.23, p.753–771, 2006.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 86, p.1707–1717, 2010.