UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários
do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* associado à alga marinha
*Bostrychia radicans***

Olívia Maria Campanini Maciel

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários
do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* associado à alga marinha
*Bostrychia radicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aluna: Olívia Maria Campanini Maciel

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hosana Maria Deboni

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 04/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO. POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Maciel, Olívia Maria Campanini

Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* associado à alga marinha *Bostrychia radicans*. Ribeirão Preto, 2016.

88 p.: il 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Hosana Maria Deboni

1. *Annulohypoxylon stygium*
2. Atividade antioxidante
3. Fungo endofítico
4. Potencial fotoprotetor
5. Produtos Naturais

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Olívia Maria Campanini Maciel

Título do trabalho: Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* associado à alga marinha *Bostrychia radicans*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aluna: Olívia Maria Campanini Maciel

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hosana Maria Deboni

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Este trabalho é dedicado especialmente aos meus pais,
José Arnaldo e Maria; e ao meu querido irmão Douglas.
Por todo amor, amparo, incentivo, confiança e paciência.
Vocês são meu orgulho e maiores exemplos de perseverança e honestidade.*

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis e me conceder sabedoria para trilhar o meu caminho e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, José Arnaldo e Maria, e ao meu irmão Douglas e demais familiares pelo amparo, carinho, torcida e orações.

À minha orientadora, a Prof.^a Dra. Hosana Maria Deboni, pelo acolhimento, orientação, amizade e confiança depositada.

Aos meus queridos amigos de laboratório Ezequiane, Lorene e Gabriel, pela amizade, companheirismo, apoio e pelas valiosas reflexões científicas ao longo do trabalho.

Aos professores, técnicos, alunos e demais funcionários do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) pelo auxílio, ensinamentos e companheirismo.

Aos técnicos José Carlos Tomaz, Daniela Ricardo Engracia Caluz, Isabel Cristina Turatti, MS. Jacqueline Nakau Mendonça, Maria Angélica Gelly, Vinícius Pararetti, Dr. Nivaldo Boralle e Clóvis Reis da Silva Júnior.

À professora Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, pela colaboração nos ensaios de fotoproteção.

Às colegas de laboratório de Tecnologia de Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela colaboração científica e troca de aprendizagem.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para a minha formação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela oportunidade de realização deste mestrado.

A CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Martin Luther King

RESUMO

MACIEL, O. M. C. **Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* associado à alga marinha *Bostrychia radicans*.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

Os organismos marinhos constituem uma fonte potencial de metabólitos secundários biologicamente ativos. Neste contexto, os micro-organismos isolados de algas marinhas, dentre eles fungos endofíticos, representam alvos para a pesquisa de novas substâncias com potencial farmacológico pronunciado. Substâncias naturais provenientes de espécies de fungos associados às algas marinhas vêm sendo bastante utilizadas em formulações fotoprotetoras devido à ação antioxidante e ao potencial contra a radiação solar. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo a investigação biológica e química dos fungos endofíticos marinhos pertencentes à família Xylariaceae, o *Annulohypoxylon stygium*, o *Cladosporium* sp. e o *Acremonium implicatum* (Hypocreaceae). A princípio, foi realizado um *screening* para avaliar a absorção de luz ultravioleta na faixa do UVA e UVB pelos extratos obtidos em escala piloto destes fungos endofíticos associados às algas marinhas. O extrato do fungo *A. stygium* apresentou intensa absorção na região do UV, mostrando-se promissor para a produção de metabólitos secundários com ação fotoprotetora. Além do ensaio proposto, foi realizada a avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico da espécie *A. stygium*. O estudo químico em escala ampliada deste fungo proporcionou o isolamento e identificação de uma substância inédita da classe derivada da 2,5-dicetopiperazina, 3-benzilideno-2-metil-hexahidro-pirroló [1,2- α] pirazina-1,4-diona (**Sf3**), e além desta, foram isolados mais quatro metabólitos como, os diastereoisômeros 1-fenil-1,2-propanediol (**Sd2**) e 1-fenil-1,2-propanediol (**Sd3**), 1,3-benzodioxole-5-metanol (**Sc1**), 1,2-propanediol-1-(1,3-benzodioxol-5-il) (**Se1**). Ainda foi possível a desreplicação de substâncias via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), entre elas o ácido palmítico, palmitato de metila, ácido metil linoléico, ácido oléico, álcool benzílico e o piperonal. Quanto ao estudo da atividade biológica, não foi observado potencial antibacteriano e antifúngico para os extratos e frações do fungo. Entretanto, notou-se um potencial como fotoprotetor *in vitro* para as frações n-Hexano/AcOEt (2:3) e n-Hexano/AcOEt (1:4) obtidas a partir do extrato do cultivo de 28 dias do fungo *A. stygium*, extraído com solventes diclorometano/metanol (CH₂Cl₂/MeOH 2:1) e para a substância (**Sf3**) isolada do mesmo. Desta forma, o estudo químico e biológico do fungo *Annulohypoxylon stygium* demonstrou potencial para a produção de metabólitos secundários com atividade fotoprotetora, visto que uma estrutura inédita com esta atividade foi isolada e identificada como produto natural.

Palavras chave: *Annulohypoxylon stygium*, Atividade antioxidante, Fungo endofítico, Potencial fotoprotetor, Produtos naturais.

ABSTRACT

MACIEL, O. M. C. **Evaluation of sunscreen potential and identification of secondary metabolites from *Annulohypoxylon stygium* endophytic fungus associated to marine algae *Bostrychia radicans*.** Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

Marine organisms consist of a potential source of biologically active secondary metabolites. In this context, the microorganisms isolated from marine algae, including fungal endophytes represent targets for the search of new substances with pronounced pharmacological potential. Natural substances from fungal species associated with marine algae, have been widely used in sunscreens formulations due to the antioxidant action and the potential against solar radiation. Thus, this study aimed to research biological and chemical profile of marine endophytic fungi belonging to the Xylariaceae family, the *Annulohypoxylon stygium*, the *Cladosporium* sp. and *Acremonium implicatum* (Hypocreaceae). First of all, a screening was performed to evaluate the absorption of ultraviolet light in the range of UVA and UVB by extracts obtained in pilot scale of these endophytic fungi associated with seaweed. The fungus extract *A. stygium* showed intense absorption in the UV region, being promising for the production of secondary metabolites with sunscreen action. In addition to the proposed test was performed to evaluate the antibacterial and antifungal potential of the species *A. stygium*. The chemical studies on increased scale of this fungus provided the isolation and identification of a novel compound of the class derived from 2,5-diketopiperazine, 3-benzylidene-2-methylhexahydropyrrolo [1,2- α] pyrazine-1,4-dione (**Sf3**), and beyond, four metabolites were isolated like of the diastereoisomers 1-phenyl-1,2-propanediol (**Sd2**) and 1-phenyl-1,2-propanediol (**Sd3**), 1,3-benzodioxole-5-methanol (**Sc1**), 1,2-propanediol-1-(1,3-benzodioxol-5-il) (**Se1**). Furthermore was possible to dereplicate substances by means of gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS) analyses: palmitic acid, methyl palmitate, methyl linoleic acid, oleic acid, benzyl alcohol and piperonal. Regarding to biological activity evaluation, it was not observed antibacterial and antifungal potential for extracts and fractions of the fungus. However, it was observed as a potential sunscreen *in vitro* for fractions n-Hexane/AcOEt (2:3) and n-Hexane/AcOEt (1:4) obtained from extract after 28 days growth culture of the fungus *A. stygium*. The mycelia were extracted with solvents dichloromethane/methanol (CH₂Cl₂/MeOH 2:1) and the compound **Sf3** was isolated from the same extract. Thus, the chemical and biological study of the fungus *Annulohypoxylon stygium* demonstrated the potential for production of secondary metabolites with sunscreen activity, since a novel structure displaying this potential was isolated and identified as a natural product.

Keywords: *Annulohypoxylon stygium*, Antioxidant activity, Endophytic fungi, Potential sunscreen, Natural products.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação das camadas da pele humana. 10
 Fonte: Adaptado de <<<https://www.goconqr.com/en/p/148644-a-pele-notes>>>.
- Figura 2.** Fluxograma geral de obtenção dos extratos pilotos dos fungos endofíticos M59, M60 e T73. 19
- Figura 3.** Fluxograma de obtenção dos extratos da linhagem M59 em escala ampliada. 19
- Figura 4.** Fluxograma do isolamento e purificação das substâncias Se1 a Se4, Sf1 a Sf4, Sd1 e Sd2 a partir do extrato bruto do fungo *Annulohyphoxylon stygium*, cultivado em arroz por 28 dias. 23
- Figura 5.** Placas cromatográficas dos extratos obtidos em 14, 21 e 28 dias do fungo *Annulohyphoxylon stygium* e reveladas sob luz ultravioleta (240 nm) e com iodo ressublimado, respectivamente. 29
- Figura 6.** Cromatogramas obtidos via análise CLAE-DAD analítico dos extratos da linhagem M59 cultivada em arroz por 28 dias em escala ampliada. Extrato CH₂Cl₂/MeOH (2:1) em azul e extrato 100% AcOEt em vermelho. Fase móvel gradiente exploratório: 5-100% de acetonitrila em água. Detecção na faixa espectral de 190 – 400 nm. Vazão 1 mL/min. Coluna analítica Supelco LC-18 (5 µm, 4,6 mm x 25 cm). 30
- Figura 7.** Cromatogramas obtidos via análise CLAE-DAD do meio de cultivo arroz (28 dias) extraído com CH₂Cl₂/MeOH. Fase móvel gradiente exploratório: 5-100% de acetonitrila em água. Detecção em 320 nm em roxo (a) e 280 nm em verde (b). Vazão 1 mL/min. Coluna analítica Supelco LC-18 (5 µm, 4,6 mm x 25 cm). 30
- Figura 8.** Cromatograma da fração C da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm). Fase móvel com gradiente exploratório: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção no UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 µL. Concentração da amostra: 1mg/mL. 34
- Figura 9.** Cromatograma da fração D da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção no UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 µL. Concentração da amostra: 1mg/mL. 35
- Figura 10.** Cromatograma da fração E da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção no UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 µL. Concentração da amostra: 1 mg/mL. 35
- Figura 11.** Cromatograma da fração F da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo 36

de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 µL. Concentração da amostra: 1 mg/mL.

- Figura 12.** Cromatograma da Fração D - M59 em escala semi-preparativa. Coluna Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 10 mm). Fase Móvel: 5 – 100% de Acetonitrila em Água. Tempo de análise: 60 minutos. Vazão 6 mL/minuto. Concentração da amostra: 30 mg/mL. Detecção no UV em 221 nm. 37
- Figura 13.** Cromatograma da Fração E - M59 em escala semi-preparativa. Coluna Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 10 mm). Fase Móvel: 5 – 100% de Acetonitrila em Água. Tempo de análise: 60 minutos. Vazão 6 mL/minuto. Concentração da amostra: 30 mg/mL. Detecção no UV em 320 nm. 38
- Figura 14.** Cromatograma da Fração M59 - F em escala semi-preparativa. Coluna Supelcosil LC-18 (5 µm, 25 cm x 10 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de Acetonitrila em Água. Tempo de análise: 60 minutos. Vazão 6 mL/minuto. Concentração da amostra: 30 mg/mL. Detecção no UV em 320 nm. 39
- Figura 15.** Proposta estrutural para substância Sc1 (álcool piperonílico/ 5-metanol - 1,3 - benzodioxolano). 40
- Figura 16.** Correlações observadas no mapa de contorno HMBC. 42
- Figura 17.** Espectro de RMN de ^1H da substância Sc1, DMSO- d_6 , 600 MHz. 43
- Figura 18.** Espectro de RMN de ^{13}C da substância Sc1, DMSO- d_6 , 100 MHz. 43
- Figura 19.** Mapa de contorno HMQC da substância Sc1, DMSO- d_6 , 600 MHz. 44
- Figura 20.** Mapa de contorno HMBC da substância Sc1, DMSO- d_6 , 600 MHz. 44
- Figura 21.** Mapa de contorno COSY da substância Sc1, DMSO- d_6 , 600 MHz. 45
- Figura 22.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância Sc1 (CDCl_3). 45
- Figura 23.** Cromatograma da substância Sc1 identificada como álcool piperonílico, obtido por CG-EM. 46
- Figura 24.** Espectros de massas obtidos da biblioteca NIST (a) e WILEY7.LIB (b), álcool piperonílico. 46
- Figura 25.** Proposta estrutural para a substância Sd2 (1-fenil-1,2-propanediol). 47
- Figura 26.** Espectro de RMN de ^1H da substância Sd2, DMSO- d_6 , 500 MHz. 49
- Figura 27.** Espectro de RMN de ^1H da substância Sd2, Metanol- d_4 , 500 MHz. 49
- Figura 28.** Espectro de RMN de ^{13}C da substância Sd2, Metanol- d_4 , 100 MHz. 50
- Figura 29.** Mapa de contorno HMQC da substância Sd2, Metanol- d_4 , 500 MHz. 50

Figura 30. Mapa de contorno HMBC da substância Sd2, Metanol- <i>d</i> ₄ , 500 MHz.	51
Figura 31. Mapa de contorno COSY da substância Sd2, Metanol- <i>d</i> ₄ , 500 MHz.	51
Figura 32. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), da substância Sd2, obtido em modo positivo.	52
Figura 33. Proposta estrutural para a substância Sd3 (1-fenil-1,2-propanediol).	52
Figura 34. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC para a substância Sd3.	54
Figura 35. Espectro de RMN de ¹ H da substância Sd3, Metanol- <i>d</i> ₄ , 500 MHz.	55
Figura 36. Mapa de contorno HMQC da substância Sd3, Metanol- <i>d</i> ₄ , 500 MHz.	55
Figura 37. Mapa de contorno HMBC da substância Sd3, Metanol- <i>d</i> ₄ , 500 MHz.	56
Figura 38. Mapa de contorno COSY da substância Sd3, Metanol- <i>d</i> ₄ , 500 MHz.	56
Figura 39. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), da substância Sd3, obtido em modo positivo.	57
Figura 40. Proposta estrutural para a substância Se1 1,2-propanodiol-1-(1,3-benzodioxol-5-il).	57
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H da substância Se1, DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz.	59
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H da substância Se1, DMSO- <i>d</i> ₆ / D ₂ O, 500 MHz.	60
Figura 43. Espectro de RMN de ¹³ C da substância Se1, DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz.	60
Figura 44. Mapa de contorno HMQC da substância Se1, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	61
Figura 45. Mapa de contorno HMBC da substância Se1, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	61
Figura 46. Mapa de contorno COSY da substância Se1, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	62
Figura 47. Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância Se1 (CDCl ₃).	62
Figura 48. Proposta estrutural para a substância Sf3.	63
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ H da substância Sf3, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	66
Figura 50. Mapa de contorno HMQC da substância Sf3, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	66
Figura 51. Mapa de contorno HMBC da substância Sf3, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	67

Figura 52. Mapa de contorno COSY da substância Sf3, DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz.	67
Figura 53. Mapa de contorno NOESY da substância Sf3, DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz.	68
Figura 54. Espectro de absorção na região do Infravermelho, em CDCl ₃ , da substância Sf3.	68
Figura 55. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), da substância Sf3, obtido em modo positivo.	69
Figura 56. Resultados dos ensaios de absorbância na região do UV/VIS através do espectrofotômetro operando na faixa espectral de 290 a 800 nm, dos extratos obtidos em escala piloto das linhagens M59, M60 e T73.	70
Figura 57. Absorbância dos extratos CH ₂ Cl ₂ /MeOH (2:1) e 100% AcOEt obtidos em escala ampliada do fungo <i>A. stygium</i> , soluções em isopropanol à 100µg/mL.	70
Figura 58. Absorbância das frações C, E e F obtidas por CLV do extrato fungo <i>A. stygium</i> , soluções em isopropanol à 100 µg/mL.	71
Figura 59. Ensaio de fotodegradação das frações C (preto), E (azul) e F (vermelho) do fungo <i>A. stygium</i> , soluções em isopropanol à 100µg/mL. Pares irradiados em linhas tracejadas (i), pares não irradiados em linhas contínuas (ni).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias de origem marinha aprovadas como fármacos (GERWICK & MOORE, 2012, 2013; CRAGG & NEWMAN, 2013).	2
Tabela 2. Estruturas químicas de micosporinas e aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) (adaptado de COLABELLA et al., 2015).	4
Tabela 3. Estruturas químicas de metabólitos secundários isolados dos fungos endofíticos do gênero <i>Annulohypoxylon</i> e respectivas atividades biológicas (adaptado de SURUP et al., 2013; QUANG et al., 2005, 2006; GHENG, et al. 2011, 2012; WU, et al., 2013; GHENG, et al. 2014, 2015).	8
Tabela 4. Principais substâncias encontradas nas frações apolares dos extratos analisados via CG-EM, com similaridade maior que 90% de acordo com o banco de dados do equipamento.	33
Tabela 5. Rendimento de 79,3% de massa no total de todas as frações obtidas na CLV.	34
Tabela 6. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração D da linhagem M59.	38
Tabela 7. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração E da linhagem M59.	39
Tabela 8. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração F da linhagem M59.	40
Tabela 9. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração F da linhagem M59.	41
Tabela 10. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância Sc1 (600 MHz, DMSO- d_6).	43
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6) e ^{13}C (Metanol- d_4) da substância Sd2 e comparação com dados obtidos da literatura.	48
Tabela 12. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância Sd2 (500 MHz, Metanol- d_4).	49
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e HMBC (sinais de ^{13}C) em Metanol- d_4 , da substância Sd3 e comparação com dados obtidos da literatura.	54
Tabela 14. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância Sd3 (500 MHz, Metanol- d_4).	56
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 da substância Se1 e comparação com dados obtidos da literatura.	60

Tabela 16. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância Se1 (600 MHz, DMSO- d_6).	61
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e HMQC/HMBC (sinais de ^{13}C) em DMSO- d_6 da substância Sf3 e comparação com dados estimados pelo programa ChemDraw Professional 15.0.	67
Tabela 18. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância Sf3 (600 MHz, DMSO- d_6).	68
Tabela 19. Dados do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU PT das subfrações do fungo <i>A. stygium</i> .	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ACN	Acetonitrila
BDA	Batata dextrose ágar
BDC	Batata dextrose caldo
CBM	Concentração bacteriana mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
COSY	<i>Homonuclear correlation spectroscopy</i>
δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por Electrospray
EROs	Espécies reativas do oxigênio
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>

CLAE	Cromatografica líquida de alta eficiência
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
MAAs	Aminoácidos tipo micosporinas
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MPE	Mean photo effect
MIC	Concentração inibitória mínima
mL	Mililitros
min	Minutos
<i>m</i>	Multipeto
nm	Nanômetro
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser
OECD	Organization for Economic Co-Operation and Development
ppm	Partes por milhão
PIF	Photo irradiation factor
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
<i>s</i>	Simpleto
TMS	Tetrametilsilano
<i>t</i>	Tripleto
<i>tt</i>	Triplo tripleto
TSA	Ágar Triptona de Soja
UV	Ultravioleta

UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Produtos Naturais e o Ambiente Marinho	1
1.2. Fungos Endofíticos	6
1.3. Fungo <i>Annulohyphoxylon stygium</i>	7
1.4. Pele e a radiação solar	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material e equipamentos utilizados	15
3.2. Métodos	17
3.2.1. Coleta das algas	17
3.2.2. Isolamento e cultivo dos fungos endofíticos	17
3.2.3. Extração, fracionamento e triagem química	18
3.2.3.1. Obtenção dos extratos	18
3.2.3.2. Análise das frações apolares dos extratos M59 via CG-EM	20
3.2.3.3. Fracionamento do extrato obtido do cultivo em escala ampliada do fungo M59	20
3.2.3.4. Triagem química dos extratos e frações provenientes do fungo endofítico marinho	21
3.2.3.5. Isolamento e caracterização estrutural das substâncias isoladas do fungo 59	22
3.3 Ensaio para avaliação da atividade biológica	23
3.3.1. Avaliação da atividade fotoprotetora	23
3.3.1.1. Determinação do espectro de absorção na região do ultravioleta	24
3.3.1.2. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria de absorção na região do UV	24
3.3.1.3. Avaliação da fototoxicidade	25

3.3.2. Avaliação da atividade antibacteriana	26
3.3.3. Avaliação da atividade antifúngica	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Triagem química preliminar e obtenção dos extratos em escala ampliada	29
4.2. Análise via CG-EM dos extratos obtidos em escala ampliada da linhagem 59	31
4.3. Fracionamento do extrato bruto da linhagem M59 em escala ampliada	33
4.4. Triagem química preliminar das frações do fungo <i>A. stygium</i>	33
4.5. Isolamento de metabólitos via CLAE-DAD semi-preparativa	36
4.6. Dados das análises químicas das subfrações	39
4.6.1. Determinação estrutural da substância Sc1 da fração C	39
4.6.2. Determinação estrutural da substância Sd2 da fração D	46
4.6.3. Determinação estrutural da substância Sd3 da fração D	52
4.6.4. Determinação estrutural da substância Se1 da fração E	57
4.6.5. Elucidação estrutural da substância Sf3 da fração F	63
4.7. Atividade Biológica	70
4.7.1. Triagem espectral dos extratos em escala piloto das linhagens M59, M60 e T73 e em escala ampliada da linhagem M59	70
4.7.2. Avaliação da atividade fotoprotetora das frações C, E e F obtidas a partir do extrato do fungo <i>A. stygium</i>	71
4.7.3. Ensaios antibacterianos e antifúngicos dos extratos bruto do fungo M59	74
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Produtos Naturais e o Ambiente Marinho

Os produtos naturais têm sido investigados e utilizados no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano desde os primórdios da história da humanidade (NEWMAN & CRAGG, 2012). A notável diversidade química dos produtos naturais faz com que permaneçam como uma fonte potencial de compostos com atividade biológica e terapêutica, com significativa importância para a descoberta e desenvolvimento de novas substâncias candidatas a fármacos, seja como derivados destes produtos ou como protótipos moleculares para a síntese de análogos (BLUNT et al., 2014; XIONG et al., 2013; KHAZIR et al. 2013).

A pesquisa na área de produtos naturais do ambiente marinho é uma vertente da pesquisa de produtos naturais relativamente recente, quando comparado ao ambiente terrestre (LEAL et al., 2012; CRAGG & NEWMAN, 2013).

No que diz respeito aos organismos marinhos e, devido ao fato dos oceanos integrarem 70% da superfície da Terra, este nicho ecológico é bastante valioso, visto que é constituído por uma inestimável biodiversidade a qual pode levar a produção de substâncias únicas estruturalmente e além de biologicamente ativas (BLUNT et al., 2010; BHATNAGAR & KIM, 2012; JULIANTI et al., 2013; HENRÍQUEZ et al., 2013). As condições adversas, como o pH, pressão, clima, radiação UV, nutrientes, concentração de oxigênio e salinidade dos oceanos e mares, são essenciais para a produção destes compostos químicos complexos (FELCZYKOWSKA et al., 2012; CRAGG & NEWMAN, 2013). Adicionalmente, a necessidade de estes organismos manterem relações ecológicas tais como competitividade, defesa contra predadores, resistência aos micro-organismos patogênicos, e ainda pressionados pelo meio, faz com que produzam uma variedade de metabólitos secundários diferenciados e diversificados (RADJASA et al., 2011; GERWICK & MOORE, 2012; CRAGG & NEWMAN, 2013; HOU et al., 2015).

Além dos diversos macro-organismos que habitam os oceanos, o ecossistema marinho também é constituído por uma densa microbiota marinha. Dentre esta microbiota, cianobactérias, bactérias e fungos livres ou que vivem em associação com algas, esponjas, corais, ascídias e outros invertebrados, podem ser considerados como os reais produtores de metabólitos marinhos já isolados, atuando assim como uma promissora fonte produtiva de substâncias biologicamente ativas (BLUNT et al., 2015; HOU et al., 2015).

A pesquisa por metabólitos secundários oriundos de organismos marinhos, já resultou no isolamento de substâncias que atualmente estão no mercado e apresentam diversas finalidades terapêuticas, tais como: o analgésico Ziconotide (Prialt[®]), antiviral Vidarabina (Ara-A[®]), o regulador da hipertrigliceridemia, Ésteres do Ômega-3 (Lovarza[®]) e os destinados no tratamento do câncer, Citarabina (Ara-C[®]), Trabectedina (Yondelis[®]) e o Mesilato de Eribulina (Halaven[®]), conforme apresentadas na Tabela 1 (BHATNAGAR et al., 2010; BHATNAGAR & KIM, 2012; CRAGG & NEWMAN, 2012; 2013).

Tabela 1. Substâncias de origem marinha aprovadas como fármacos (GERWICK & MOORE, 2012, 2013; CRAGG & NEWMAN, 2013).

Organismo	Fármaco	Estrutura	Alvo terapêutico
Caracol	Ziconotide (Prialt [®])		Analgésico
Esponja	Vidarabina (Ara-A [®])		Antiviral
Peixe	Éster do Ômega-3 (Lovarza [®])		Hiper trigliceridemia
Esponja	Citarabina (Ara-C [®])		Leucemia mielóide aguda

Organismo	Fármaco	Estrutura	Alvo terapêutico
Tunicado	Trabectedina (Yondelis®)		Câncer de sarcoma de tecido mole e câncer de ovário recorrente
Esponja	Mesilato de Eribulina (Halaven®)		Câncer de mama

Além da farmacologia, outras substâncias de origem marinha, vêm sendo aplicadas em setores como a cosmetologia e produtos químicos finos (intermediários de reações) (DEBBAB et al., 2010).

Considerando o aumento da incidência da radiação solar sobre a Terra, especialmente a radiação ultravioleta na qual consta uma faixa espectral entre 100 - 400 nm, esta ao atingir os organismos que habitam a Terra pode provocar muitos danos, inclusive àqueles pertencentes ao ambiente marinho (FLOR et al., 2007; BALOGH et. al., 2011). De modo que, micro-organismos, algas, plantas e animais têm desenvolvido estratégias para enfrentar os efeitos nocivos da radiação ultravioleta. Como exemplo, temos as produções de diversos metabólitos secundários com potencial fotoprotetor classificados como: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs, do inglês *mycosporine-like amino acids*) e micosporinas (SINGH et al., 2008; MIYAMOTO et al., 2014). Estas moléculas apresentam como características físico-químicas, baixo peso molecular, solubilidade em água, são incolores e apresentam absorção na região do UV. As micosporinas possuem um anel cicloexenona e os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) apresentam anel cicloeximina, ambos com substituintes como o aminoácido ou imino álcool. As micosporinas absorvem na região do UV na faixa de 310 a 320 nm, enquanto os MAAs apresentam absorção no UV na faixa de 310 a 360 nm. (MIYAMOTO et al., 2014; SUH et al., 2014; WADA et. al., 2015).

Em 1960 o pesquisador Dehorter foi pioneiro ao isolar a partir do fungo *Nectria galligena*, a micosporina conhecida a princípio como P310. Entretanto, em 1976 esta mesma substância foi isolada de outro fungo, o *Stereum hirsutum*, pelo pesquisador Favre-Bonvin e colaboradores. A partir deste isolamento, a estrutura foi elucidada por este grupo como sendo a micosporina serinol (Tabela 2) (BONVIN & ARPIN, 1976; OREN & CIMERMA, 2007). A rota biossintética das micosporinas ainda é desconhecida, porém sabe-se que são produzidas apenas por fungos, e está relacionada à indução de esporulação (BONVIN & ARPIN, 1976; COLABELLA, et al., 2014). Contudo, os aminoácidos tipo micosporinas são encontrados em cianobactérias, fitoplânctons, macroalgas, corais e líquens terrestres. Sua rota biossintética pode ocorrer por duas vias, a do chiquimato ou fosfato pentose (SUH et al., 2014; WADA et al., 2015).

Atualmente são conhecidas mais de 30 substâncias pertencentes às classes micosporinas e MAAs isolados de organismos marinhos. Como exemplos podemos destacar: a micosporina-glutamicol-glucosídeo, micosporina serinol, micosporina glicina, asterina-330, porphyra-334, shinorina, paltina, palitinol, micosporina-aurina, que podem ser vistas na Tabela 2 (OREN & CIMERMA, 2007; COLABELLA et al., 2014; KULKARNI et al., 2015).

Tabela 2. Estruturas químicas de micosporinas e aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) (adaptado de COLABELLA et al., 2014).

Organismo	Espécie	Substância	λ máximo	Estrutura	Tipo de molécula
Fungo	<i>Rhodotorula minuta</i> / <i>Dioszegia spp.</i> / <i>Phaffia rhodozyma</i>	Micosporina-glutamicol-glucosídeo	310 nm		micosporina
Fungo	<i>Stereum hirsutum</i>	Micosporina serinol (P310)	310 nm		micosporina

Organismo	Espécie	Substância	λ máximo	Estrutura	Tipo de molécula
Alga/Coral	<i>Gymnogongrus devoniensis</i> / <i>Platygyra ryukyensis</i>	Micosporina glicina	310 nm		micosporina
Cianobactéria	<i>Nostoc commune</i>	Asterina-330	330 nm		MAA
Alga/Dinoflagelado	<i>Porphyra yezoensis</i> / <i>Gymnodinium catenatum</i>	Porphyra-334	334 nm		MAA
Alga	<i>Chlamydomonas hedleyi</i>	Shinorina	334 nm		MAA
Cianobactéria	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Palitina	320 nm		MAA
Cianobactéria	<i>Plectonema boryanum</i>	Palitinol	332 nm		MAA
Alga	<i>Porphyra umbilicalis</i>	Miscosporina taurina	296 nm		micosporina

Diversos estudos com relação à atividade biológica das micosporinas e MAAs já isolados vêm demonstrando inúmeras características vantajosas frente a radiação solar UV. Estas características compreendem: fotoestabilidade química, absorção na região do UVA ou UVB, ação antioxidante, ausência de citotoxicidade; o que os conduz a atuarem como excelentes agentes fotoprotetores (COLABELLA et al., 2014). Atualmente há disponíveis no mercado filtros solares altamente eficientes que apresentam algum tipo de MAAs em sua formulação. Como exemplos, temos o Helioguard[®], que contém a prophyra-334 e shinorina e o Helionori[®], o qual possui ambas as substâncias e ainda o MAAs palitina em sua composição (SCHMID et al., 2006; COLABELLA et al., 2014). Em virtude destas propriedades, tem-se intensificado a pesquisa com algas, organismos invertebrados e micro-organismos marinhos, em busca de novas substâncias com potencial biologicamente ativas, como aquelas destinadas à proteção frente à radiação solar (RASTOGI et al., 2010; KULKARNI et al., 2015).

1.2. Fungos Endofíticos

Micro-organismos endofíticos, em especial aqueles pertencentes ao ambiente marinho, têm sido alvo de interesse de muitos pesquisadores uma vez que são reconhecidos como uma fonte auspiciosa para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos (XIONG et al., 2013; BAI et al., 2014).

Em 1866 o termo endofítico foi adotado por De Bary, no qual foi empregado a qualquer micro-organismo que colonizasse internamente os tecidos saudáveis de seus hospedeiros (plantas) causando infecções assintomáticas, ou seja, sem trazer prejuízos (NISA et al., 2015). Atualmente, a definição de fungo endofítico se destinam aqueles que apresentam hifas no tecido vivo de seu hospedeiro e vivem sob a forma de micélio numa relação simbiótica com plantas ou outros organismos vivos durante todo ou parte de seu ciclo de vida sem causar malefícios imediatos, numa relação de mutualismo (KAUL et al., 2012; CHENG et al., 2012; SULTAN et al., 2014; MASAND et al., 2015).

A relação de sinergismo endófito-hospedeiro pode proporcionar diversos benefícios a ambos. Ao hospedeiro é fornecida uma resistência à adversidade ambiental, através da produção de metabólitos secundários bioativos pelo endófito, favorecendo o crescimento e a competitividade do hospedeiro na natureza; inclui-se ainda o estímulo à produção de hormônios e amensalismo (SULTAN et al., 2014; NISA et al., 2015; FLÓREZ et al., 2015). Enquanto que o micro-organismo endofítico se beneficia com o fornecimento de nutrientes,

proteção contra o ambiente externo e contra a competição microbiana pelo seu hospedeiro (KAUL et al., 2012; FLÓREZ et al., 2015).

Produtos naturais produzidos por estes micro-organismos endofíticos possuem amplo alvo terapêutico/atividade biológica e diversificada classe de substâncias, tais como: terpenóides, alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, quinonas, glicosídeos, etc (KAUL et al., 2012; CHENG et al., 2014; BLUNT et al., 2015). A exemplo, temos vários estudos com fungos endofíticos associados a algas marinhas (BLUNT et al., 2015).

Sendo assim, foi proposto o estudo com o fungo *Annulohypoxylon stygium* (linhagem M59) associado à alga marinha *Bostrychia radicans*, com a finalidade de avaliar a diversidade de produtos naturais deste micro-organismo, buscando o isolamento de novos metabólitos secundários e/ou bioativos, especialmente aqueles com potencial fotoprotetor.

1.3. Fungo *Annulohypoxylon stygium*

O gênero *Annulohypoxylon* pertencente à família Xylariaceae (Ascomycota), foi considerado como uma parte (*Annulata*) do gênero *Hypoxylon* até o ano 2005. Entretanto, devido às diferenças nas características morfológicas, taxonômicas e quimiotaxonômicas, notou-se que se tratava de um novo gênero (*Annulohypoxylon*) (FOURNIER et al., 2010; CHENG et al., 2012; SUWANNASAI et al., 2013).

Em 2009 no Brasil, o pesquisador Pereira e colaboradores realizaram estudos taxonômicos das espécies de *Annulohypoxylon* encontradas em duas áreas da Floresta Atlântica no estado da Bahia, tais como: *A. austrobahiense*, *A. hemicarpum*, *A. macrodiscum* e *A. purpureopigmentum*. No entanto, ainda não há estudos quanto aos metabólitos secundários produzidos por estas espécies (PEREIRA, et al., 2010).

São escassos os relatos na literatura sobre substâncias isoladas deste gênero e sobre as atividades biológicas que podem apresentar. Os metabólitos secundários isolados (destacados entre parênteses) são de espécies encontradas no ecossistema terrestre como: *A. multiforme* (multiformina A), *A. squamulosum* (annulosquamulina), *A. elevatidiscus* (elevafuranona), *A. stygium* (annulostygilactona), *A. boveri* (annulohypoxylina), *A. ilanense* (ilanepirrolal) e *A. cohaerens* (cohaerina A). Algumas das substâncias citadas acima foram analisadas quanto às suas atividades biológicas como: atividade citotóxica (anticâncer), antibacteriana, anti-inflamatória, como ilustrado na tabela 3 (QUANG et al., 2005, 2006; CHENG, et al. 2011, 2012; SURUP et al., 2013; WU, et al., 2013; CHENG, et al. 2014, 2015; ROBL et al., 2015).

Portanto, estes dados nos motivam a prosseguir com os estudos quanto ao metabolismo secundário deste fungo *Annulohypoxylon stygium* ainda tão pouco explorado, principalmente, por se tratar de um endófito marinho, ambiente foco do nosso grupo de pesquisa na FCFRP-USP.

Tabela 3. Estruturas químicas de metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos do gênero *Annulohypoxylon* e respectivas atividades biológicas (adaptado de QUANG et al., 2005, 2006; CHENG, et al. 2011, 2012; SURUP et al., 2013; WU, et al., 2013; CHENG, et al. 2014,2015).

Metabólito	Estrutura	Atividade biológica
Multiformina A		Antimicrobiana
Annulosquamulina		Câncer de mama
Elevafuranona		-----
Annulostygilactona		Anti-inflamatória

Metabólito	Estrutura	Atividade biológica
Annulohypoxylina		-----
Ilanepirrolal		Antibacteriana
Cohaerina A		Antibacteriana

1.4. Pele e a radiação solar

O maior órgão do corpo humano é a pele, que corresponde a uma área de superfície total de 2 m² no indivíduo adulto (DANGELO & FANTTINI, 2007). Ela estabelece a interface entre o corpo e o meio ambiente, funcionando como uma barreira contra agentes exógenos como: a radiação solar, micro-organismos e agentes tóxicos. Além disso, a pele dificulta a perda de proteínas e a desidratação em excesso (GUARATINI, et al., 2009; INFANTOZZI COSTA, 2014). A pele também tem papel importante na excreção de eletrólitos e outras substâncias, na síntese da vitamina D, no sistema imunológico, na regulação da temperatura corporal e é um órgão sensorial, por possuir diversos receptores

associados à dor, à pressão, à temperatura e ao tato (HALLER, 1989; INFANTOZZI COSTA, 2014).

A pele é composta por três camadas estruturais: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1). A epiderme é estruturada por um tecido epitelial pavimentoso estratificado e queratinizado, onde há outros tipos celulares intercalados, são eles: os melanócitos, as células de Merkel e as células de Langerhans. Ela consiste em cinco camadas que se renovam continuamente, e são elas: o córneo, lúcido, granular, espinhal e basal. Sendo a camada basal a mais profunda e com atividade mitótica, em que os queratinócitos resultantes da divisão celular sofrem diferenciação conforme atingem as camadas mais superficiais (estrato córneo) (EDWARDS & MARKS, 1995; DANGELO & FANTTINI, 2007).

A derme está situada logo abaixo do estrato basal da epiderme, é constituída por fibras de colágeno, fibras elásticas, mastócitos, macrófagos e uma espessa camada de fibroblastos de tecido conectivo, que atuam como um apoio às extensas redes vasculares, nervosas e anexos cutâneos. É uma área altamente vascularizada o que permite ter sensibilidade aos 4 sentidos. A hipoderme é a camada mais profunda da pele e está organizada em lóbulos de gordura (tecido adiposo), sua função é contribuir para impedir a perda de calor, unir a derme aos órgãos adjacentes e constitui como reserva de material nutritivo (DANGELO & FANTTINI, 2007).

Figura 1. Representação das camadas da pele humana.

Fonte: Adaptado de <<<https://www.goconqr.com/en/p/148644-a-pele-notes>>>. Acessado em: 02/12/2015.

A luz solar é constituída por espectro contínuo de radiação eletromagnética, que são classificadas de acordo com os intervalos de comprimentos de ondas que apresentam, como: infravermelho (> 780 nm), luz visível (400 - 780 nm) e ultravioleta (UV) (100 - 400 nm) (BALOGH et al., 2011). A radiação UV emitida é subdividida em: UVC (100 - 280 nm), UVB (280 - 320 nm) e UVA (320 - 400 nm). A radiação UVC é absorvida na camada de ozônio, enquanto que as radiações UVA e UVB tem sua importância do ponto de vista biológico e dos processos associados às reações químicas e morfológicas provocadas na pele (GUARATINI et al., 2009).

A radiação UVB é parcialmente absorvida na epiderme, ela induz o bronzeamento, edemas, eritemas e com a exposição frequente e intensa pode causar lesões no DNA, além de suprimir a resposta imunológica da pele (SAEWAN & AMPA, 2015). A radiação UVA, por sua vez, é dividida em UVA I ou UVA longo (340 - 400 nm) e UVA II ou UVA curto (320 - 340 nm). Frequentemente a radiação UVA não causa eritema, porém penetra mais profundamente na derme desencadeando processos inflamatórios, pois promove ativação de diversos receptores de membrana para mediadores pró-inflamatórios, danificando as fibras de colágeno e elastina (SCHMID et al., 2006). Além disso, a formação de espécies reativas oxigênio (ERO) promovem alterações da expressão dos genes, contribuindo para o fotoenvelhecimento da pele, e no caso mais grave o câncer de pele (RINNERTHALER et al., 2015).

Para prevenir estes efeitos que os raios solares podem causar, é recomendada pela academia Americana de dermatologia adotar algumas indicações como: o uso de chapéus/bonés, camisetas, luvas, óculos de sol, barracas, aplicação uniforme de protetores solares e evitar a exposição ao sol por longos períodos, principalmente entre 10h-16h (BALOGH et al., 2011).

Deve ainda ser mencionado que na última década houve um aumento considerável de casos de câncer de pele, representando assim problema de saúde pública. A proteção contra a radiação solar, incluindo a busca por substâncias com esta propriedade é essencial, pois está envolvida como uma medida preventiva frente ao câncer de pele. (OLIVEIRA et al., 2015).

2 Objetivos

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral realizar a investigação química e avaliar a atividade biológica de metabólitos secundários de fungos endofíticos associados às algas marinhas.

2.1. Objetivos Específicos

- ⊙ Cultivar em escala piloto as linhagens M59 (*Annulohypoxylon stygium*) e M60 (*Cladosporium* sp.), isoladas da alga marinha *Bostrychia radicans*; e a linhagem T73 (*Acremonium implicatum*) isolada da alga marinha *Bostrychia tenella* e avaliar o potencial biológico de cada linhagem.
- ⊙ Otimização do cultivo em escala ampliada do fungo endófito *Annulohypoxylon stygium*;
- ⊙ Promover fracionamentos cromatográficos do extrato e frações obtidas, almejando o isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos;
- ⊙ Estudo do potencial fotoprotetor através da avaliação da absorção na região do ultravioleta (UV), avaliação da fotoestabilidade e fototoxicidade;
- ⊙ Adicionalmente, foi proposta também a avaliação das atividades antimicrobianas *in vitro* e antifúngica.

3 Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material e equipamentos utilizados

Solventes

- ⊙ Solventes para extração, fracionamento e isolamento: solventes orgânicos grau técnico (purificados por destilação fracionada) e de grau analítico;
- ⊙ Solventes deuterados: metanol-d4 (D 99,8%), DMSO-d6 ambos sem TMS, CDCl_3 com TMS e D_2O , da marca Sigma-Aldrich[®].
- ⊙ Solventes grau cromatográfico: Metanol e Acetonitrila da marca Merck[®] e J. T. Baker[®].

Meios de cultura

- ⊙ Meios sólidos: BDA (Batata Dextrose Agar) marca Himedia, arroz parboilizado Uncle Ben's Agroparr alimentos Ltda - RS e BDC (Batata Dextrose Caldo);
- ⊙ Água do mar, coletada na praia de Ubatuba – SP.

Cromatografia em camada delgada

- ⊙ Placas cromatográficas de alumínio para CCD impregnadas com sílica gel F (254 nm), com 0,25 mm de espessura da marca Fluka Analytical[®];
- ⊙ Reveladores: solução comercial de iodo-cloro-platinado da marca Sigma-Aldrich[®], solução de anisaldeído sulfúrico, iodo ressublimado, iodocloroplatinado e luz UV (254 nm).

Cromatografia líquida a vácuo

- ⊙ Coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada, 8 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento;
- ⊙ Sílica gel-60 (40-70 mesh);
- ⊙ Bomba de vácuo, modelo TE-058, marca Tecnal[®].

Equipamentos

⊙ Cromatógrafo Shimadzu, modelo SCL-10AVP, equipado com detector de arranjo de diodos UV-Vis DAD Shimadzu, modelos SPD-M10AVP, bombas LC-6AD e sistema de integração computadorizado com software CLASS-VP, coluna C-18 Supelco (5µm, 4,4mm x 25cm), purificador Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm (Laboratório de Química Orgânica - NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP - USP);

⊙ Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier equipamento FTIR Shimadzu IR-Prestige 21 (Laboratório de Química Analítica e Inorgânica - FCFRP);

⊙ Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, equipamento de RMN Bruker DRX 400 (400MHz) e BRUKER AVANCE III 600 HD (600MHz), Instituto de Química - UNESP - Araraquara; e equipamento de RMN da marca Bruker, modelo DRX 500 (500 MHz), Departamento de Química - FFCLRP - USP;

⊙ Espectrômetro de massas acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM/EM) Íon-Trap Bruker-daltonics, com equipamentos da Shimadzu, como bombas, modelo LC-20AD, amostrador SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos DAD, modelo SPM-20A, comunicador CBM-20A e forno CTO-20A (Laboratório de Química Orgânica - NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP - USP, Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes);

⊙ Espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo microTOF II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI), com analisador do tipo tempo de voo (TOF), Calibrante: NaTFA (Laboratório de Química Orgânica - NPPNS do Departamento de Física e Química da FCFRP -USP, Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes);

⊙ Cromatógrafo a gás, Shimadzu, modelo QP 2010, em um sistema operado com detector de massas com impacto eletrônico (70 eV), e injeção split (250 °C) (Laboratório de Tecnologia de Cosméticos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP - USP, Profª. Drª. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro);

⊙ Espectrofotômetro operando na região do Ultravioleta Gehaka, modelo UV-380G e software UVSPECTRUM® (Laboratório de Tecnologia de Cosméticos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP - USP, Profª. Drª. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro);

⊙ Radiômetro UV - meter µC Honle Basic;

⊙ Lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands);

⊙ Rotaevaporador Buchi, modelo R-210;

- ⊙ Autoclave vertical (PHOENIX - Araraquara - SP/BR);
- ⊙ Fluxo laminar (PACHANE - Piracicaba - SP/BR).
- ⊙ Ponto de Fusão Fisatom, modelo 431;
- ⊙ Polarímetro Jasco P- 300;
- ⊙ Balança analítica Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta das algas

O material algal, contendo as espécies *Bostrychia radicans* e *Bostrychia tenella*, foi coletado no litoral norte do São Paulo, sob a supervisão da Dra. Nair S. Yokoya (IBot - Instituto de Botânica - SP) em dezembro de 2007. Este material foi lavado em água do mar para remover contaminantes (areia, crustáceos) e em seguida, as algas foram estocadas em frascos de vidro com água do mar filtrada. É importante ressaltar que no processo de limpeza das algas, foi realizada uma minuciosa triagem para separar estas espécies de algas de outras que estavam presentes, com o auxílio de espátulas e pinças. Em seguida, a alga foi estocada em frascos de vidro com água do mar filtrada. Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho - NPPNS - FCFRP/USP.

3.2.2. Isolamento e cultivo dos fungos endofíticos

Para o estudo piloto foram selecionadas as linhagens de fungo M59 e M60, ambas isoladas da alga marinha *Bostrychia radicans* e a linhagem T73 isolada da alga *Bostrychia tenella*.

O processo de isolamento dos fungos foi realizado em condições assépticas na capela de fluxo laminar. A princípio as algas coletadas foram conservadas em água do mar com cloranfenicol (antibiótico), a fim de eliminar a contaminação por bactérias. O isolamento procedeu-se utilizando três métodos distintos de lavagens, como segue abaixo:

⊙ I - Foram utilizados 4 frascos onde, no primeiro foi preparada uma solução na concentração de 70% (v/v) metanol/água purificada e nos outros três apenas com água purifica. O tempo de permanência dos fragmentos de alga na solução foi de 15 segundo e na sequência, fez-se uma breve ‘lavagem’ em água esterilizada. Em seguida, foi preparada uma

placa com meio BDA apenas fazendo um toque no meio com fragmentos, e duas placas de BDC (Batata Dextrose Caldo) e duas de CZAPEK foram utilizadas, para aplicar 10 fragmentos de alga em cada uma e ao final foi realizado o espalhamento da água da última lavagem em uma segunda placa de BDA (Batata Dextrose Agar). (Figura 2).

☉ II e III – Nestas etapas utilizou-se 5 frascos, o primeiro com solução na concentração 70% (v/v) de metanol/água purificada, no segundo frasco uma solução de hipocloreto de sódio (NaClO) e nos três últimos água purificada. O tempo de permanência dos fragmentos de alga nos dois primeiros recipientes foi de 5 segundos, e depois fez-se a lavagem em água esterelizada. A distribuição dos fragmentos nas placas de meio de cultura procedeu-se conforme realizada primeira etapa. As linhagens em questão foram preservadas e mantidas em vaselina no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho - NPPNS da FCFRP-USP.

A fim de reativar as três linhagens microbianas, foram transferidas amostras de cada linhagem, para placas de Petri com meio sólido BDA. As placas foram mantidas a 25° C ao abrigo da luz, acompanhando-se o crescimento dos micro-organismos, até o seu crescimento atingir toda a placa de Petri. Após esse período, foram transferidos 10 plugs de cada linhagem para três frascos tipo Erlenmeyer com o meio de cultivo, constituído por 90 g de arroz em 90 ml de água do mar, por 28 dias a 25° C ao abrigo da luz. A produção qualitativa de metabólitos foi avaliada, ainda, em escala ampliada, em três períodos distintos (14, 21 e 28 dias) do fungo *Annulohypoxylon stygium*. Vale ressaltar que todos os procedimentos envolvendo a manipulação do micro-organismo foram realizados em capela de fluxo laminar e com material esterilizado.

3.2.3. Extração, fracionamento e triagem química

3.2.3.1. Obtenção dos extratos

Foram obtidos extratos pilotos das três linhagens de fungos endofíticos utilizando a mistura de solventes diclorometano/metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1)), seguida de trituração do micélio em ambiente asséptico e após o período de extração por maceração, cada frasco tipo Erlenmeyer foi colocado no ultrassom por 5 minutos e filtrado à vácuo. Este procedimento foi realizado três vezes (Figura 2).

Em seguida, o micélio e o meio de cultivo foram removidos por filtração a pressão reduzida e descartado após esterilização em autoclave. O filtrado foi coletado e concentrado

por evaporação a pressão reduzida, obtendo-se os extratos brutos de M59, M60 e T73. Estes extratos foram analisados quanto ao potencial biológico, seguindo a metodologia descrita no item 3.3, sendo selecionado o fungo mais promissor para cultivo em escala ampliada e posteriormente para os estudos químicos.

A partir do cultivo em escala ampliada do fungo M59 (*Annulohypoxylon stygium*), foram obtidos dois extratos, um proveniente de duas extrações com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) e outro da última extração foi com solvente 100% Acetato de etila (AcOEt), a massa obtida para cada extrato está descrita na Figura 3.

Figura 2. Fluxograma geral de obtenção dos extratos pilotos dos fungos endofíticos M59, M60 e T73.

Figura 3. Fluxograma de obtenção dos extratos da linhagem M59 em escala ampliada.

3.2.3.2. Análise das frações apolares dos extratos M59 via CG-EM

Os extratos CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e AcOEt 100% do fungo M59 (*Annulohypoxylon stygium*) foram lavados com solvente n-hexano grau HPLC para extração dos constituintes apolares. As frações n-hexânicas obtidas foram concentradas e analisadas por CG-EM no laboratório de Química Orgânica - NPPNS do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Na análise via cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), foi utilizada a coluna DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25mm), o gás hélio como gás carreador, com fluxo de 1,41 mL/min, a uma pressão de 87,1 KPa e aquecimento com programação de temperatura de 60 - 240° C/min.

Para análises realizadas com a intenção de se obter a identificação de compostos apolares, como substâncias de cadeias carbônicas longas (ácidos graxos, hidrocarbonetos e derivados); foi aplicado para cada substância o calculado do índice de retenção de Kovats (I), de acordo com a fórmula a seguir:

$$I = 100a + 100 \times \left\{ \frac{t_R(b) - t_R(a)}{t_R(z) - t_R(b)} \right\}$$

t_R = tempo de retenção; **a** = número de carbonos do alcano igual ao da substância (**b**) que se deseja obter o índice; **z** = número de carbonos do alcano equivalente à **a** + 1.

3.2.3.3. Fracionamento do extrato obtido do cultivo em escala ampliada do fungo M59

O extrato bruto do cultivo em escala ampliada (CH₂Cl₂/MeOH (2:1)) foi submetido à análise por cromatografia líquida à vácuo (CLV) em fase móvel com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 9 frações, de A a I, conforme a metodologia utilizada no *Scripps Institution of Oceanography* - Universidade da Califórnia - San Diego - USA (EDWARDS et al., 2004).

É importante ressaltar que embora foi obtida uma massa total de 45 g do extrato bruto CH₂Cl₂/MeOH (2:1), para a CLV foram utilizadas apenas 20g deste extrato.

- Fração A: 100% n-Hexano
- Fração B: 90% n-Hexano e 10% Acetato de Etila
- Fração C: 80% n-Hexano e 20% Acetato de Etila
- Fração D: 60% n-Hexano e 40% Acetato de Etila
- Fração E: 40% n-Hexano e 60% Acetato de Etila
- Fração F: 20% n-Hexano e 80% Acetato de Etila
- Fração G: 100% Acetato de Etila
- Fração H: 25% Acetato de Etila e 75% Metanol
- Fração I: 100% Metanol

3.2.3.4. Triagem química dos extratos e frações provenientes do fungo endofítico marinho *Annulohypoxylon stygium*

Os extratos brutos obtidos em escala ampliada e frações foram submetidos à análise por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) em fase normal e revelação em UV (254 nm), em câmara saturada de iodo ressublimado, com solução de anisaldeído sulfúrico e iodocloroplatinado. Foram utilizadas placas de alumínio impregnadas com sílica gel F (254 nm), com 0,25 mm de espessura. Além disto, os extratos brutos CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e 100% AcOEt do fungo M59, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, equipada com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em fase reversa. Foi utilizada a coluna analítica C-18 Supelco (5µm, 4,4mm x 25cm), monitoramento na região do ultravioleta na faixa de 190 - 400 nm, fase móvel de acetonitrila e água, utilizando o gradiente exploratório: 0-40 min (5% ACN e 95% H₂O); 40-50 min (100% ACN); 50-55 min (5% ACN e 95% H₂O). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL, com amostras preparadas na concentração de 1 mg/mL. As frações obtidas a partir da CLV foram analisadas a princípio, nas mesmas condições e metodologia utilizadas para os extratos, com diferença na preparação da fase móvel, pois foi adicionado o ácido fórmico 0,1%.

As análises das frações por CLAE-DAD em fase reversa foram alteradas conforme a necessidade em melhorar a resolução dos picos. Sendo assim, a fração D foi otimizada para um gradiente de eluição acetonitrila e água (contendo ácido fórmico 0,1%): 0-25 min (5% ACN); 25-30 min (30% ACN); 30-40 min (60% ACN); 40-45 min (70% ACN); 45-50 min (100% ACN) e 50-55 min (100% ACN) e 55 -60 min (5% ACN). A análise da fração E foi otimizada para um gradiente de eluição acetonitrila e H₂O (contendo ácido fórmico 0,1%): 0-40 min (5% ACN); 40-50 min (30% ACN); 50-55 min (70% ACN); 55-60 min (100% ACN)

e 60-65 min (5% ACN). E a fração F foi otimizada para um gradiente de eluição acetonitrila e água (contendo ácido fórmico 0,1%): 0-40 min (5% ACN); 40-45 min (50% ACN); 45-50 min (100% ACN); 50-55 min (100% ACN) e 55-60 min (5% ACN). Todas com fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL, com amostras na concentração de 1 mg/mL. A fração C foi a única que apresentou ótimo perfil cromatográfico nas condições de gradiente exploratório descrita acima. Sendo analisada na sequência por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, conforme descrito no item 3.2.3.5.

3.2.3.5. Isolamento e caracterização estrutural das substâncias produzidas pelo fungo M59

Após o desenvolvimento do melhor método de separação por CLAE-DAD em escala analítica das frações obtidas a partir da CLV do extrato bruto CH₂Cl₂/MeOH (2:1), as frações com melhores resoluções e/ou interessante potencial biológico foram submetidas à CLAE-DAD semi-preparativa. Foi aplicada a metodologia otimizada descrita no item 3.2.3.4, porém utilizando coluna LC-18 Supelco (5µm, 25cm x 10mm), com fluxo de 6 mL/min, vol. de injeção de 1mL/min e sem a adição do ácido fórmico. Visando o isolamento das substâncias presentes nas frações D, E e F, como pode ser observado no fluxograma da Figura 4.

A fração C e as sub-frações (**Sd1**, **Sd2**, **Se1**, **Se3**, **Sf3**) obtidas em escala semi-preparativa do fungo M59, foram submetidas aos experimentos de RMN uni e bidimensionais nos equipamentos do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP e no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara, UNESP. As análises espectrométricas utilizadas foram a ionização por electrospray (ESI-ES) com analisador do tipo tempo de voo (TOF) e calibrante: NaTFA e a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), realizados no laboratório de Química Orgânica - NPPNS do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes do Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Figura 4. Fluxograma do isolamento e purificação das substâncias **Se1** a **Se4**, **Sf1** a **Sf4**, **Sd1**, **Sd2** e **Sc1** (fração C) a partir do extrato bruto do fungo *Annulohypoxylon stygium*, cultivado em arroz por 28 dias.

3.3. Ensaio para avaliação da atividade biológica

3.3.1. Avaliação da atividade fotoprotetora

Os experimentos referentes à avaliação da atividade fotoprotetora, foram realizados de acordo com os protocolos abaixo, no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, no laboratório Tecnologia de Cosméticos, sob supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro.

3.3.1.1. Determinação do espectro de absorção na região do ultravioleta

Para a análise do espectro de absorção dos extratos e frações, foram realizados ensaios de absorbância na região do UV/VIS através do espectrofotômetro operando na faixa espectral de 290 a 800 nm, em equipamento Gehaka modelo UV-380G (São Paulo, Brasil). As amostras foram preparadas a uma concentração de 100 µg/mL em Isopropanol Synth® (WHITEHEAD & HEDGES, 2005; GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006). As amostras que apresentaram uma absorção na região de interesse UVA/UVB (290 - 400 nm) foram selecionadas para os ensaios químicos e biológicos subsequentes.

3.3.1.2. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria de absorção na região do UV

Para a realização desse estudo, foram preparadas soluções de 100 µg/mL dos extratos e frações em isopropanol, e a seguir 0,7 mL de cada solução foram adicionados em béqueres de vidro e submetidos à evaporação do solvente para a formação de um filme seco. As amostras foram submetidas à radiação UVA de 9,5 mW/cm² emitida por uma lâmpada Philips UVA por 48 minutos (KOCKLER et al., 2012). A dose de radiação foi medida pelo radiômetro equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA (365 nm) e da radiação UVB (312 nm). Para cada béquer submetido à irradiação houve o seu controle negativo, ou seja, um béquer deixado ao abrigo da luz (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

Após a irradiação, o filme seco foi ressuscitado em 0,7 mL de solvente e, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro na faixa de 200 a 400 nm. Isto permitiu a determinação do espectro de absorção e a área sob a curva (integral do espectro de absorção) das amostras na faixa do UVB (280-320 nm) e UVA (320 - 400 nm), utilizando-se a função integração do Software Microcal Origin. A seguir foram obtidas as razões entre a integral do espectro de absorção na faixa UVA e integral do espectro de absorção na faixa do UVB e, por meio da avaliação da queda na razão é possível determinar a fotoestabilidade da amostra (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006; 2007).

Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste paramétrico Análise de Variância.

3.3.1.3. Avaliação da fototoxicidade

As substâncias que se apresentaram fotoestáveis, ou com uma absorção significativa na região UVA/UVB foram selecionadas para o teste de fototoxicidade. O ensaio de fototoxicidade é definido como uma resposta tóxica clara depois da primeira exposição de fibroblastos a agentes químicos, e posterior exposição à irradiação, segundo o POP (Procedimento Operacional Padrão) presente no guia 432 da OECD (SPIELMANN et al., 1994).

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV. Células Balb/c 3T3 foram mantidas em cultura durante 24 horas para a formação de monocamadas. Em seguida duas placas de 96 poços com a amostra, foram pré-incubadas com oito concentrações químicas diferentes durante 1 h. Uma placa foi exposta a uma dose de 5 J/cm² UVA (+ UV), ao passo que a outra placa foi mantida no escuro (-UV). O meio de tratamento foi, em seguida, substituído pelo meio de cultura e após 24 h a viabilidade das células foi determinada por meio da incubação do meio de cultura com o corante Vermelho Neutro, durante 3 h. Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi realizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas e não submetidas à radiação UVA, a 540 nm em leitor de microplacas Biotek Synergy 2, e os dados analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 (obtido pelo ZEBET, Alemanha) para o cálculo do PIF (“photo irritation factor”- fator de fotoirritação) – e do MPE (“mean photo effect”- foto efeito médio), para posterior previsão do potencial fototóxico (SPIELMANN et al., 1998; OECD, 2004; GASPAR et al., 2013). De acordo com o guia de determinação de fototoxicidade número 432 da OECD (2004), uma substância que apresenta:

- PIF < 2 ou MPE > 0.1 prediz: “nenhuma fototoxicidade”,
- PIF > 2 e < 5 ou MPE > 0.1 e < 0.15 prediz: “provavelmente fototóxico”;
- PIF > 5 ou MPE > 0.15 prediz: “fototóxico”.

As características dos fibroblastos nas diversas etapas do estudo, a sua viabilidade frente à radiação UV e a captação do corante vermelho neutro foram monitorados por Microscópio biológico binocular invertido.

3.3.2. Avaliação da atividade antibacteriana

Os experimentos para a avaliação de atividade antibacteriana foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, no laboratório de Farmacognosia, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Niede A.J.C. Furtado. As bactérias utilizadas no experimento foram: as gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC15305 e as gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003; Alves et al., 2008), com adaptações.

As padronizações dos inóculos foram realizadas em espectrofotômetro por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Nas microplacas de 96 poços foram adicionados o caldo de Muller Hinton com os extratos ou frações nas concentrações de 50 a 400 µg/mL a um volume total em cada poço de 100 µL. Os antibióticos como a Penicilina e estreptomicina foram utilizados como controles positivos, bem como também, foram realizados os controles do caldo, das substâncias testadas e dos meios de cultura. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C em estufa bacteriológica. Ao final do período de incubação foi realizada a revelação das placas, adicionando em cada poço 30 µL de sal de tetrazólio na concentração de 0,02% em solução aquosa. Após 15 a 130 minutos faz-se leitura visual, visto que, a mudança de coloração implica numa reação de oxi-redução. Após a incubação por 24 h em estufa a 37° C, faz-se a leitura visual se houve ou não crescimento de bactérias. A cor passa de azul para rosa. Se a bactéria cresceu, fica rosa.

Para a análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM), é retirada uma amostra de todos os poços com haste autoclavada antes de revelar a placa de MIC, e transferido para uma placa de Petri com meio TSA (Agar Tripton de Soja).

3.3.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os experimentos para a avaliação de atividade antibacteriana foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, no laboratório de Farmacognosia, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Niede A.J.C. Furtado.

Foram utilizados os seguintes fungos: *Cândida krusei* ATCC 34135, *Cândida parapsilosis* ATCC 22019, *Cândida glabrata* ATCC 90030 e *Cândida tropicalis* ATCC 750. Para o experimento foi utilizado o método preconizado pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003; Alves et al., 2008), com adaptações. Os inóculos foram preparados com 5,0 mL de solução salina 0,85%, colocando-se colônias de leveduras nos tubos falcon. A padronização foi em espectrofotômetro a 530 nm por comparação do nível de turvação da solução com a escala de McFarland (0,5). Foram adicionadas a placas de 96 poços com meio de cultura RPMI - 1640 (glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato) e tampão MOPS (ácido 3-[*N*-morfolino]propanosulfônico), 20µL do inóculo. Como controle positivo foi utilizado o fluconazol (Sigma). Após incubação na estufa a 37° C por 24 h, as placas foram reveladas com solução de Resazurina na concentração de 0,02% preparada em solução aquosa. A leitura é feita após 15 a 30 minutos, observando se houve alteração da coloração. A cor passa de azul para rosa, e se a bactéria cresceu, fica rosa.

4 Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Triagem química preliminar e obtenção dos extratos em escala ampliada

Com os extratos obtidos em escala piloto podemos observar que as linhagens M60 e M73 não apresentaram absorção na região do ultravioleta correspondente aos comprimentos de onda nas faixas de UVA e UVB. Entretanto a linhagem M59 (*Annulohypoxylon stygium*) apresentou resultado promissor, com absorção na região UV em 290 nm, conforme descrito no item 4.7.1. Neste sentido, ele foi selecionado para o cultivo em escala ampliada por três períodos distintos, com o objetivo de avaliar também a produção qualitativa de metabólitos secundários nestes períodos. Portanto, a linhagem do fungo foi cultivada em 40 frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL, em modo estático, no meio arroz parboilizado com água do mar, como descrito no item 3.2.2. Foram obtidos dois extratos deste fungo, conforme descrito no item 3.2.3.1 e na Figura 3.

Notamos através de análises cromatográficas (CCD e CLAE-DAD), que o período de 28 dias de cultivo foi o ideal na produção qualitativa de metabólitos, visto que, produziu uma variedade maior de substâncias. Foi verificado também que a combinação dos solventes CH_2Cl_2 e MeOH é a mais eficiente na extração das mesmas, quando comparado ao perfil cromatográfico do extrato de AcOEt, Figuras 5 e 6. Foi analisado também em CLAE-DAD o meio de cultivo extraído com a mistura de solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, como pode ser visto na Figura 7.

Figura 5. Placas cromatográficas dos extratos obtidos em 14, 21 e 28 dias do fungo *Annulohypoxylon stygium* e reveladas sob luz ultravioleta (240 nm) e com iodo ressublimado, respectivamente.

Figura 6. Cromatogramas obtidos via análise CLAE-DAD analítico dos extratos da linhagem M59 cultivada em arroz por 28 dias em escala ampliada. Extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) em azul e extrato 100% AcOEt em vermelho. Fase móvel gradiente exploratório: 5-100% de acetonitrila em água. Detecção na faixa espectral de 190 – 400 nm. Vazão 1 mL/min. Coluna analítica Supelco LC-18 (5 μm , 4,6 mm x 25 cm).

a)

b)

Figura 7. Cromatogramas obtidos via análise CLAE-DAD do meio de cultivo arroz (28 dias) extraído com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Fase móvel gradiente exploratório: 5-100% de acetonitrila em água. Detecção em 320 nm em roxo (a) e 280 nm em verde (b). Vazão 1 mL/min. Coluna analítica Supelco LC-18 (5 μm , 4,6 mm x 25 cm).

Os meios de cultivos sólidos favorecem o crescimento de fungos filamentosos, pois a matriz sólida funciona como suporte para o crescimento das hifas e permitindo uma maior área de crescimento dos micro-organismos, além de fornecer os nutrientes (ROBINSON;

SINGH; NIGAM, 2001; PANDEY, 2003). Em se tratando de micro-organismos do ambiente marinho, há estudos que relatam que eles apresentam melhor crescimento em matrizes sólidas, visto que, mais de 98% deles já isolados deste ambiente são obtidos a partir de superfícies de substratos sólidos (SINGHANIA et al., 2009). Com base nestes dados o meio arroz foi selecionado para o cultivo do fungo.

4.2. Análise via CG-EM dos extratos obtidos em escala ampliada da linhagem M59

As frações n-hexânicas obtidas a partir dos extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) e AcOEt (100%) em escala ampliada da linhagem M59, foram analisadas via CG-EM, o perfil de fragmentação foi obtido e comparado com o banco de dados do equipamento CG-EM. Para confirmar a identidade das substâncias, foi aplicado o cálculo do índice de retenção de Kovats, conforme descrito no item 3.2.3.2.

Em ambas as frações foram encontradas substâncias com alta porcentagem de similaridade com relação às substâncias encontradas no banco de dados. Entretanto para as substâncias como, o 1-fenil-1,2-propanediol e álcool piperonílico (1,3-benzodioxol-5-metanol), não foram encontrados valores de índice de retenção de Kovats na literatura para fins comparativos. Mas em ambas as frações n-hexânica dos extratos observou-se que os componentes majoritários foram, o ácido n-Hexadecanóico (ácido palmítico), com similaridade de 96% nos dois extratos e o Hexadecanoato de metila (palmitato de metila), com similaridade de 96% e 97% nos extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ e AcOEt, respectivamente. Além disto, apenas o extrato AcOEt apresentou os componentes (Z,Z) 9,12-Octadecanoato de metila (metil linoléico) e o ácido (E)-9-Octadecanóico (ácido oléico). Já os componentes álcool benzílico e piperonal (1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído) foram observados exclusivamente no extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Porém, não foi possível comparar o índice de retenção de Kovats do álcool benzílico com o valor encontrado na literatura, pois as condições de análises não foram compatíveis. Entretanto, sete destas substâncias puderam ser confirmadas através do índice de retenção de Kovats, no qual foi semelhante aos observados na literatura (DE FELÍCIO et. al., 2010; BABUSHOK et al., 2011; YUSUF & BEWAJI, 2011). Os resultados do CG-EM, encontram-se na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Principais substâncias encontradas nas frações apolares dos extratos analisados via CG-EM, com similaridade maior que 90% de acordo com o banco de dados do equipamento.

Substância	Tempo de retenção (min)	Similaridade (%)	Área (%)	Índice de retenção obtido	Índice de retenção *literatura
Fração n-hexânica do extrato bruto (CH₂Cl₂/MeOH)					
Álcool benzílico	3,633	96	2,75	1521,1	-
1-fenil-1,2-propanediol	7,900	94	3,53	958,6	-
1-fenil-1,2-propanediol	8,022	95	8,01	957,6	-
Piperonal	8,250	95	2,67	1328,0	1329,0
1,3-benzodioxol-5-metanol	8,921	91	9,10	1263,5	-
Hexadecanoato de metila	15,041	96	1,64	1905,1	1924,2
Ácido n-Hexadecanóico	15,510	96	22,04	1923,1	195,0
Fração n-hexânica do extrato bruto (AcOEt)					
1-fenil-1,2-propanediol	7,883	96	4,00	958,8	-
1-fenil-1,2-propanediol	8,002	95	10,96	957,8	-
1,3-benzodioxol-5-metanol	8,920	92	3,20	1263,6	-
Ácido n-hexadecanóico	15,505	96	31,39	1944,9	1950,0
Hexadecanoato de metila	15,029	97	5,05	1916,7	1924,2
(Z,Z) 9,12-Octadecanoato de metila	17,040	96	4,92	2112,2	2091,1
Ácido (E)-9-Octadecanóico	17,128	94	3,60	2124,7	2138,8

4.3. Fracionamento do extrato bruto da linhagem M59 em escala ampliada

O fracionamento inicial do extrato bruto $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) da linhagem M59 foi obtido através da cromatografia líquida à vácuo (CLV) em fase normal com fase móvel de gradiente crescente de polaridade, conforme relatado no item 3.2.3.3. Foram utilizados 20,00g do extrato bruto e obteve-se ao final 9 frações, conforme descritas na tabela 5. Observou-se que as frações com maiores rendimentos, consistem nas frações B, G, H e I, sendo que a fração B correspondente à baixa polaridade enquanto que G, H e I são frações de maior polaridade.

Tabela 5. Rendimento de 79,3% de massa no total de todas as frações obtidas na CLV.

Fração	Fase Móvel	Massa Obtida
M59-A	100% Hex	0,11 g
M59-B	90% Hex : 10%AcOEt	2,89 g
M59-C	80% Hex : 20%AcOEt	0,78 g
M59-D	60% Hex : 40%AcOEt	0,80 g
M59-E	40% Hex : 60%AcOEt	0,65 g
M59-F	20% Hex : 80%AcOEt	0,29 g
M59-G	100% AcOEt	2,40 g
M59-H	25% AcOEt : 75% MeOH	2,12 g
M59-I	100% MeOH	5,82 g

Hex = n-hexano; AcOEt = acetato de etila; MeOH = metanol

4.4. Triagem química preliminar das frações do fungo *Annulohypoxylon stygium*

No estudo inicial das frações, foram realizadas análises em CCD e CLAE-DAD conforme descrito no item 3.2.3.4, onde foi observado que as amostras constituíam-se de misturas complexas, com exceções das frações de média polaridade (C, D, E e F), que apresentaram menor número de picos. Portanto, apesar da maior massa apresentada pelas frações mais polares e fração B, devido as suas altas complexidades, estas não foram consideradas viáveis para o desenvolvimento de purificação.

As frações de média polaridade C, D, E e F analisadas por CLAE-DAD em coluna analítica de fase reversa (RP-18) utilizando como fase móvel um gradiente exploratório de 5 - 100% acetonitrila em água, apresentaram as melhores resoluções dos picos e pelos perfis nos cromatogramas observou-se que estavam mais purificadas (Figuras 8-11). Considerando que as frações D, E e F possuíam uma quantidade de massa satisfatória e absorviam na região do UV na faixa espectral de interesse (190 - 400 nm), conforme descrito no item 4.7.2, estas

foram selecionadas para a realização das etapas de purificação de substâncias por CLAE-DAD semi-preparativa, conforme descrito no item 3.2.3.5. A fração C apresentou duas manchas na placa de CCD, uma delas revelada com lâmpada de UV e a outra observada frente ao revelador iodo ressublimado (indícios de ligações insaturadas). Esta fração apresentou-se como uma mistura de substâncias, porém observou-se por RMN de ^1H e CLAE-DAD que uma das substâncias era majoritária, com tempo de retenção de 8,07 minutos e UV máximos de 248, 270 e 272 nm (Figura 8 do item 4.4.1.). Diante deste fato, a fração C passou a ser denominada como substância **Sc1** e foi submetida aos experimentos de RMN uni e bidimensionais e CG-EM, descritos no item 4.6.1, visando a identificação da substância majoritária.

Figura 8. Cromatograma da fração C da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 μm , 25 cm x 4,6 mm). Fase móvel com gradiente exploratório: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção no UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 μL . Concentração da amostra: 1mg/mL.

Figura 9. Cromatograma da fração D da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção no UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 μ L. Concentração da amostra: 1 mg/mL.

Figura 10. Cromatograma da fração E da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção no UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 μ L. Concentração da amostra: 1 mg/mL.

Figura 11. Cromatograma da fração F da linhagem M59. Coluna analítica Supelcosil LC-18 (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de acetonitrila em água (ácido fórmico 0,1%). Vazão 1 mL/minuto. Detecção UV na faixa espectral 190-400 nm. Tempo de Análise: 60 min. Volume de Injeção: 20 μ L. Concentração da amostra: 1 mg/mL.

4.5. Isolamento de metabólitos via CLAE-DAD semi-preparativa

Fração D

Ao desenvolvermos o melhor método de separação em escala analítica da fração D da linhagem M59, o mesmo foi adaptado para escala semi-preparativa para purificação das substâncias, conforme descrito no item 3.2.3.5. Foram coletadas amostras correspondentes aos picos numerados de 1-6 (Figura 12), dos quais foram analisados por CCD. Observamos que as amostras 1, 4, 5 e 6 coletadas, estavam em mistura e como não foram obtidas quantidades significativas, não prosseguimos com os estudos destas amostras. As amostras referentes aos picos 2 e 3 foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e via espectrometria de massas ESI-MS micro-TOF, como pode ser visto no item 4.6.

Figura 12. Cromatograma da Fração D - M59 em escala semi-preparativa. Coluna Supelcosil LC-18 (5 μ m, 25 cm x 10 mm). Fase Móvel: 5 – 100% de Acetonitrila em Água. Tempo de análise: 60 minutos. Vazão 6 mL/minuto. Concentração da amostra: 30 mg/mL. Detecção no UV em 221 nm.

Tabela 6. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração D da linhagem M59.

Amostra	Tempo de retenção	Massa	Absorção Máxima UV
Sd1	7,50 - 10,00 min	3,70 mg	196, 208 nm
Sd2	10,05 - 12,75 min	12,10 mg	192 nm
Sd3	15,00 - 16,50 min	16,00 mg	202, 261, 331 nm
Sd4	18,70 - 20,00 min	2,40 mg	202 nm
Sd5	35,60 - 36,73 min	7,60 mg	201, 232, 275, 316 nm
Sd6	36,50 - 37,00 min	5,50 mg	232 nm

Fração E

Após o desenvolvimento do melhor método de separação em escala analítica, a fração E da linhagem M59 foi submetida à CLAE semi-preparativa, Figura 13. Foram coletados vários picos, entretanto, apenas quatro deles tiveram massas significativas para prosseguir com os estudos, Tabela 7. As amostras foram analisadas por CCD e por experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , onde observou-se que as amostras **Se2** e **Se4** estão em mistura e devido a baixa quantidade de massa obtida não foi possível o isolamento e identificação das substâncias. Mas as substâncias **Se3** e **Se1** foram analisadas utilizando as técnicas de RMN uni e bidimensional e a espectrometria de massas, ESI-MS micro-TOF, descrito no item 4.6.

Figura 13. Cromatograma da Fração E - M59 em escala semi-preparativa. Coluna Supelcosil LC-18 (5 μ m, 25 cm x 10 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de Acetonitrila em Água. Tempo de análise: 60 minutos. Vazão 6 mL/minuto. Concentração da amostra: 30 mg/mL. Detecção no UV em 320 nm.

Tabela 7. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração E da linhagem M59.

Amostra	Tempo de retenção	Massa	Absorção Máxima UV
Se1	21,40 - 25,60 min	20,00 mg	202, 243 e 284 nm
Se2	40,50 - 42,80 min	4,60 mg	230, 244 e 199 nm
Se3	48,00 - 51,50 min	11,00 mg	290, 224 e 198 nm
Se4	54,50 - 56,80 min	2,50 mg	312, 200 e 333 nm

Fração F

Estabelecido o melhor método de separação em escala analítica, a fração F do fungo M59 foi submetida à CLAE semi-preparativa, Figura 14. Vários picos foram coletados, mas apenas quatro deles apresentaram massas significativas, Tabela 8. Todos foram analisados por CCDC e experimentos de RMN uni e bidimensionais. Observou-se que as amostras **Sf1**, **Sf2** e **Sf4** estão em mistura, e devido à pequena quantidade de massa adquirida não seguimos com as etapas de purificação. Entretanto, foi obtido a partir desta fração a substância **Sf3**, e sua elucidação estrutural foi realizada utilizando os experimentos de RNM de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e a espectrometria de massas, ESI-MS micro-TOF, conforme descrito no item 4.6.

Figura 14. Cromatograma da Fração M59 - F em escala semi-preparativa. Coluna Supelcosil LC-18 (5 μ m, 25 cm x 10 mm). Fase Móvel: 5 - 100% de Acetonitrila em Água. Tempo de análise: 60 minutos. Vazão 6 mL/minuto. Concentração da amostra: 30 mg/mL. Detecção no UV em 320 nm.

Tabela 8. Resultado do isolamento em CLAE-DAD semi-preparativa da fração F da linhagem M59.

Amostra	Tempo de retenção	Massa	Absorção máxima no UV
Sf1	38,20 - 40,10 min	5,30 mg	194, 224 e 245 nm
Sf2	40,30 - 42,05 min	8,50 mg	196, 296 e 224 nm
Sf3	46,80 - 51,80 min	6,00 mg	289, 296 e 224 nm
Sf4	60,00 - 61,40 min	26,00 mg	195, 297 e 333 nm

4.6. Dados das análises químicas das subfrações

4.6.1. Determinação estrutural da substância Sc1 da fração C

A substância majoritária da fração C (**Sc1**, 780 mg), foi identificada como sendo o álcool piperonílico (Figura 15). A amostra possui uma aparência líquida marrom junto a cristais incolores, são solúveis em diclorometano, metanol, n-hexano, acetato de etila e clorofórmio. Sua determinação estrutural foi baseada nos espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz), ^1H , HSQC, HMBC na frequência de 600MHz e solvente deuterado $\text{DMSO}-d_6$, por espectroscopia de absorção na região do infravermelho e CG-EM (Tabelas 9 - 10 e Figuras 15-24).

Figura 15. Proposta estrutural para substância **Sc1** (álcool piperonílico/5-metanol-1,3-benzodioxolano).

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ da substância **Sc1** e comparação com dados obtidos da literatura da estrutura parcial.

Posição	^1H δ (ppm); mult; J (Hz) (600MHz) (DMSO)	^{13}C δ (ppm) (100MHz) (DMSO)	*Literatura ^1H δ (ppm) (400MHz) (DMSO)	*Literatura ^{13}C δ (ppm) (100MHz) (DMSO)
1	-	147,1	-	147,8
2	-	145,9	-	-
3	6,83 (<i>d</i> ; $J = 7,9$; 1H)	107,2	6,81	108,8
4	6,76 (<i>dd</i> ; $J = 7,9$; 1H)	119,6	6,81	121,8
5	-	136,6	-	-
6	6,85 (<i>s</i> ; 1H)	107,8	-	-
7	4,37 (<i>d</i> ; $J = 5,2$; 2H)	62,7	-	-
O - CH_2 - O	5,97 (<i>s</i> ; 2H)	100,6	5,90	100,7
OH	5,12 (<i>t</i> ; $J = 5,2$; 1H)	-	-	-

*PRETSCH, et al. 2000.

No espectro de RMN de ^1H , observou-se a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos, bem como, um simpleto largo e um duplete com deslocamento químico em δ 6,85 e δ 6,83, respectivamente, correspondendo a 2H. Ainda observou-se a constante de acoplamento deste duplete, equivalente a 7,9, característico de acoplamento *orto*. Notou-se nesta região, um duplo-duplete com deslocamento químico δ 6,76, integrando para 1H e constante de acoplamento 7,9, condizente com o acoplamento em *orto* com o hidrogênio H-3. Ainda pode-se observar um simpleto com deslocamento químico δ 5,97, integrando para 2H, este valor de deslocamento químico caracteriza os dois hidrogênios metilênicos ligados ao carbono sp^3 do anel dioxolano. Além disto, observou-se a presença de um triplete com deslocamento químico δ 5,12, integrando para 1H, referente ao hidrogênio ligado ao oxigênio, com constante de acoplamento 5,2. Foi notado ainda um duplete com deslocamento químico δ 4,37, integrado para 2H, referente aos hidrogênios CH_2 de constante de acoplamento equivalente a 5,2, condizente com a constante do hidrogênio do grupo hidroxílico (Figura 17 e Tabela 9).

No espectro de ^{13}C de **Sc1** (Figura 18 e Tabela 9) observou-se a presença de cinco sinais de carbonos com deslocamento químico em δ 147,1 (C-1), δ 145,9 (C-2), δ 107,2 (C-3), δ 107,8 (C-6), δ 119,6 (C-4) e δ 100,6 (O - CH₂ - O), característico de éter cíclico ligados a um anel aromático (1,3-benzodioxolano). Ainda há o sinal de deslocamentos químicos em δ 136,6 (C-5) na região de carbono aromático, que indica a presença de substituinte neste carbono. Observou-se também o sinal de deslocamento químico em δ 62,5 (C-7), possivelmente referente ao carbono metilênico. Os valores de deslocamentos químicos referentes a uma parte da estrutura (1,3-benzodioxolano) são condizentes com os dados encontrados na literatura.

A confirmação da estrutura se deu pelos espectros de RMN bidimensionais HMQC, HMBC e COSY. No mapa de contorno HMQC (Figura 19, Tabela 10) foi possível observar a correlação dos hidrogênios presentes no anel aromático H-6 (δ 6,85) e H-4 (δ 6,76) com os carbonos C-6 (δ 107,8) e C-4 (δ 119,6), respectivamente. Foram observadas as correlações entre o hidrogênio de CH₂ do éter cíclico de δ 5,97 com o carbono sp^2 (δ 100,6), e o sinal do hidrogênio H-7 (δ 4,37) com o carbono C-7 (δ 62,7). Com relação ao mapa de contorno HMBC (Figura 16 - 20, Tabela 10) observou-se a correlação entre o hidrogênio da hidroxila (δ 5,12) com o C-7 (δ 62,7) e C-5 (δ 136,6); o H-7 (δ 4,37) se correlacionando com C-5 (δ 136,6), C-4 (δ 119,6) e C-3 (δ 107,2); o hidrogênio de O - CH₂ - O (δ 5,97) se correlacionando com C-1 (δ 147,1) e C-2 (δ 145,9); H-3 (δ 6,83) se correlacionando com C-4 (δ 119,6) e C-2 (δ 145,9); a correlação entre H-4 (δ 6,76) com C-7 (δ 62,7), C-3 (δ 107,2) e C-2 (δ 145,9) e o H-6 se correlacionando com C-7 (δ 62,7), C-5 (δ 136,6) e C-1 (δ 147,1), também esquematizado na Figura 15. No mapa de contorno COSY (Figura 21), foi observada correlação entre os hidrogênios H-7 (δ 4,37) e o hidrogênio da hidroxila (δ 5,12).

Na análise por espectroscopia na região do infravermelho observamos a presença de algumas bandas de absorção na estrutura **Sc1**. Notamos uma banda larga com absorção máxima em 3400 cm^{-1} , indicando possivelmente a presença de hidroxila, três bandas de intensidade baixa característica de anel aromático trissubstituído (1, 2, 4) na faixa de absorção de $800 - 900\text{ cm}^{-1}$ (Figura 22) (PAVIA et al., 2010; PRETSCH et al., 2000; CONSTANTINO et al., 2008).

O espectro de massas obtido a partir da análise via CG-EM da substância **Sc1** apresentou uma alta similaridade (92%) com o espectro de massa do padrão de 1,3-benzodioxole-5-metanol da biblioteca do equipamento (NIST e WILEY7.LIB); sendo possível observar o pico do íon molecular (M^+ 152), Figuras 23 e 24.

Tabela 10. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância **Sc1** (600 MHz, DMSO- d_6).

^1H (δ)	^{13}C (δ) HMQC	^{13}C (δ) HMBC
H-6 (6,85)	107,8	C-7 (62,7); C-5 (136,6); C-1 (147,1)
H-4 (6,76)	119,6	C-7 (62,7); C-3 (107,2); C-2 (145,9)
H-3 (6,83)	-	C-4 (119,5) ; C-2 (145,9)
O - CH ₂ - O (5,97)	100,6	C-1 (147,1) ; C-2 (145,9)
H-7 (4,37)	62,7	C-4 (119,6); C-5 (136,6); C-3 (107,2)
H (OH) (5,12)	-	C-7 (62,7); C-5 (136,6)

Figura 16. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC.

Figura 17. Espectro de RMN de ¹H da substância Sc1, DMSO-*d*₆, 600 MHz.

Figura 18. Espectro de RMN de ¹³C da substância Sc1, DMSO-*d*₆, 100 MHz.

Figura 19. Mapa de contorno HMQC da substância **Sc1**, DMSO- d_6 , 600 MHz.

Figura 20. Mapa de contorno HMBC da substância **Sc1**, DMSO- d_6 , 600 MHz.

Figura 21. Mapa de contorno COSY da substância **Sc1**, DMSO- d_6 , 600 MHz.

Figura 22. Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância **Sc1** (CDCl_3).

Figura 23. Cromatograma da substância **Sc1** identificada como álcool piperonílico, obtido por CG-EM.

a)

b)

Figura 24. Espectros de massas obtidos da biblioteca NIST (a) e WILEY7.LIB (b), álcool piperonílico.

4.6.2. Determinação estrutural da substância **Sd2** da fração **D**

A substância **Sd2** (12,1 mg), isolada da fração **D**, apresentou-se como um cristal branco, com ponto de fusão a 68° C e $[\alpha]_D = + 3,614$ em metanol, na concentração 1%; sendo

identificada como 1-fenil-1,2-propanediol (Figura 25). A determinação estrutural da **Sd2** foi baseada nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HMQC; e via espectrometria de massas (EM-ESI-TOF), conforme apresentado nas Tabelas 11 - 12 e Figuras 26 - 33.

Figura 25. Proposta estrutural para a substância **Sd2** (1-fenil-1,2-propanediol).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6) e ^{13}C (Metanol- d_4) da substância **Sd2** e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H δ (ppm); mult; J (Hz) (500MHz)	^{13}C δ (ppm) (100MHz)	*Literatura ^1H δ (ppm) (400MHz) (CDCl ₃)
1	4,34 (<i>dd</i> ; $J = 5,6$; $J = 4,7$; 1H)	79,0	4,36 (<i>d</i> ; $J = 7,3$; 1H)
2	3,65 (<i>dq</i> ; $J = 6,2$; 5,6; 1H)	72,4	3,84 (<i>dq</i> ; $J = 6,4$; 1H)
3	0,99 (<i>d</i> ; $J = 6,2$; 3H)	18,1	1,05 (<i>d</i> ; $J = 6,4$; 3H)
4	-	143,4	-
5-9 (Ar)	7,27 - 7,32 (<i>m</i> ; 5H)	128,0 - 129,1	7,30- 7,38 (<i>m</i> ; 5H)
OH	5,13 (<i>d</i> ; $J = 4,7$; 1H)	-	2,62 (<i>m</i> , 1H)
OH (C-1)	4,46 (<i>d</i> ; $J = 5,6$; 1H)	-	2,78 (<i>m</i> , 1H)

* TAKESHITA & TAKUMI, 1989.

No espectro de RMN de ^1H em solvente DMSO- d_6 (Figura 26) podemos verificar a presença de um sinal multipeto, na região de hidrogênios aromáticos de deslocamento químico entre δ 7,27 - δ 7,32. Além disto, observou-se um duplo dupeto em δ 4,34, integrado para um hidrogênio, correspondente ao H-1 de $J = 4,7$. Notou-se um dupeto de δ 5,13 com constante de acoplamento $J = 4,7$, indicando correlação com o hidrogênio H-1. Ainda notamos um sinal sextupeto com δ 3,65 relativo ao H-2, integrado para um hidrogênio e com valores de $J = 6,2$ e $J = 5,6$. O que nos sugere uma correlação com os hidrogênios metilênicos (δ 0,99) de constante de acoplamento equivalente a $J = 6,2$ e correlação com o hidrogênio da hidroxila de δ 4,46 de $J = 5,6$, conforme apresentado na Tabela 11. Ainda, foi possível confirmar a presença dos hidrogênios referentes aos grupos hidroxílicos através do espectro de RMN ^1H em solvente DMSO- d_6 . Este foi comparado com o espectro de RMN de ^1H em solvente metanol- d_4 , onde estes sinais ficaram suprimidos (Figura 27).

No espectro de ^{13}C (Figura 28) observaram-se seis sinais na região de carbonos aromáticos, em que o C-4 apresenta deslocamento químico em δ 143,4, devido à presença do substituinte 1,2-propanediol. O sinal em δ 18,1 é característico de carbono de grupo metílico e os sinais δ 79,0 e δ 72,4 são referentes aos carbonos C-1 e C-2, respectivamente. De acordo com o mapa de contorno HMQC (Figura 29 e Tabela 12), estes dois últimos carbonos estão correlacionados com hidrogênios de deslocamento químico em H-1 (δ 4,34) e H-2 (δ 3,65), respectivamente. Ainda nota-se neste mesmo espectro (HMQC) as correlações entre os H-3 (δ 0,99) com o C-3 (δ 18,1).

Com relação ao mapa de contorno HMBC (Figura 30 e Tabela 12) foi possível observar as correlações entre o H-1 (δ 4,34) com os carbonos C-2 (δ 72,4), C-4 (δ 143,4) e C-9 (δ 128,05); bem como entre H-3 com os carbonos C-2 (δ 72,4) e C-1 (79,0).

No mapa de contorno COSY (Figura 31) observou-se a correlação entre os hidrogênios H-1 (δ 4,34) e H-2 (δ 3,65); e H-2 (δ 3,65) e H-3 (δ 0,99).

O espectro de massas (ionização por EM-ESI) (Figura 32), obtido em modo positivo, apresentou um pico de m/z 175,0743 referente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Através do cálculo de erro em ppm, obteve-se o valor equivalente a 5,7225 ppm, dentro da margem de erro, portanto este sinal está condizente com a estrutura proposta. A partir das análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos propôs-se a que a substância **Sd2** é o 1-fenil-1,2-propanediol.

Tabela 12. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância **Sd2** (500 MHz, Metanol- d_4).

^1H (δ)	^{13}C (δ) HMQC	^{13}C (δ) HMBC
H-1 (4,34)	79,0	C-2 (72,4); C-4 (143,4); C-9 (128,0)
H-2 (3,65)	72,4	C-3 (18,1); C-1 (79,0); C-4 (143,4)
H-3 (0,99)	18,1	C-2 (72,4); C-1 (71,0)

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da substância **Sd2**, $\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz.

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da substância **Sd2**, $\text{Metanol-}d_4$, 500 MHz.

Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Sd2**, Metanol- d_4 , 100 MHz.

Figura 29. Mapa de contorno HMQC da substância **Sd2**, Metanol- d_4 , 500 MHz.

Figura 30. Mapa de contorno HMBC da substância **Sd2**, Metanol-*d*₄, 500 MHz.

Figura 31. Mapa de contorno COSY da substância **Sd2**, Metanol-*d*₄, 500 MHz.

Figura 32. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), da substância **Sd2**, obtido em modo positivo.

4.6.3. Determinação estrutural da substância **Sd3** da fração D

A substância **Sd3** (16,00 mg), foi identificada como 1-fenil-1,2-propanediol, um diastereoisômero da substância **Sd2** (Figura 33). Esta substância apresenta uma aparência líquida de coloração roxa e possui $[\alpha]_D = -4,55$ em metanol, na concentração de 1%. A determinação estrutural desta substância foi baseada nos espectros de RMN de ^1H , HMQC, HMBC, COSY e espectrometria de massas (Tabelas 13 -14 e Figuras 35 - 39).

Figura 33. Proposta estrutural para a substância **Sd3** (1-fenil-1,2-propanediol).

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e HMBC (sinais de ^{13}C) em Metanol- d_4 , da substância **Sd3** em comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H δ (ppm); mult; J (Hz) (500MHz)	^{13}C δ (ppm) (100MHz)	*Literatura ^1H δ (ppm); mult; J (Hz) (400MHz) (CDCl_3)
1	4,35 (<i>d</i> ; $J = 7,1$; 1H)	80,3	4,69 (<i>d</i> ; $J = 3,9$; 1H)
2	3,80 (<i>q</i> ; $J = 6,5$; 1H)	72,9	4,20 (<i>dq</i> ; $J = 6,4$; 1H)
3	0,96 (<i>d</i> ; $J = 6,5$; 3H)	19,1	1,10 (<i>d</i> ; $J = 6,4$; 3H)
4	-	143,4	-
5 - 9 (Ar)	7,26 - 7,30 (<i>m</i> ; 5H)	-	7,28 - 7,38 (<i>m</i> ; 5H)
OH	-	-	1,82
OH	-	-	2,29

*TAKESHITA & TAKUMI, 1989.

Analisando-se o espectro de RMN ^1H (Figura 35) da substância **Sd3**, nota-se um duplete com deslocamento químico δ 0,96, referente aos hidrogênios H-3 ligados ao carbono sp^3 . Os hidrogênios H-1 e H-2 apresentam deslocamento químico em δ 4,35 e δ 3,80, respectivamente, correspondendo a hidrogênios próximos aos grupos hidroxílicos; e ainda observam-se os sinais de hidrogênios na região de aromáticos com deslocamento químico entre δ 7,26 - 7,30, dados apresentados na Tabela 13.

Os sinais de carbonos foram observados através dos espectros bidimensionais de HMQC e HMBC. No mapa de contorno HMQC (Figura 36 e Tabela 14) observou-se os acoplamentos de C-1 e C-2 (δ 80,3 e δ 72,9, respectivamente) com os hidrogênios H-1 (δ 4,32) e H-2 (δ 3,81), respectivamente. Ainda observou-se o acoplamento entre o carbono C-3 (δ 19,1) com os hidrogênios H-3 (δ 0,92). Com relação ao mapa de contorno HMBC (Figura 37) foi possível observar as correlações entre os carbonos e hidrogênios próximos, conforme representados na Figura 34 e Tabela 14. No mapa de contorno COSY (Figura 38) observou-se as correlações entre os hidrogênios H-1 (δ 4,35) e H-2 (δ 3,80); e H-2 (δ 3,80) e H-3 (δ 0,96).

A fórmula molecular de 1-fenil-1,2-propanediol é $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$ e no espectro de massas (ionização por ESI), obtido em modo positivo, apresentou-se um pico em m/z 175,0739 referente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Figura 39). Através do cálculo de erro em ppm, obteve-se o valor equivalente a 3,0923 ppm, dentro da margem de erro, portanto esta massa sinal está condizente com a estrutura proposta. Diante das análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos propôs-se a que a substância **Sd3** é o 1-fenil-1,2-propanediol.

Uma vez que as substâncias **Sd2** e **Sd3** apresentaram picos com tempo de retenção distintos nos cromatogramas obtidos e diferentes valores de deslocamentos químicos nas análises de RMN, sugere que se tratam de diastereoisômeros. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados exatamente nas mesmas condições analíticas (solventes, fase

móvel, equipamentos, operador, etc) e em sequencia cronológica. Ainda, através da análise no $[\alpha]_D$, podemos observar que a substância **Sd2** apresenta rotação óptica dextrógera (+) enquanto que a substância **Sd3** apresenta rotação levógira (-). Os resultados obtidos de α_D e RMN de ^1H e ^{13}C foram comparados com os dados da literatura do 1-fenil-1,2-propanediol (TAKESHITA & TAKUMI, 1989; JANUSZ et al., 2003).

Diante do exposto, notamos que há duas possibilidades para este par de diastereoisômeros. Experimentos adicionais são necessários para estabelecer a configuração absoluta, uma vez que a primeira pode ser diastereoisômeros R/R (-) e S/R (+); e a segunda é de que são R/S (-) e S/S (+).

Figura 34. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC para a substância **Sd3**.

Tabela 14. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância **Sd3** (500 MHz, Metanol- d_4).

^1H (δ)	^{13}C (δ) HMQC	^{13}C (δ) HMBC
H-1 (4,32)	80,3	C-2 (72,9); C-3 (19,1); C-4 (143,4)
H-2 (3,81)	72,9	C-1 (80,3); C-3 (19,1); C-4 (143,4)
H-3 (0,92)	19,1	C-1 (80,3); C-2 (72,9)

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da substância **Sd3**, Metanol- d_4 , 500 MHz.

Figura 36. Mapa de contorno HMQC da substância **Sd3**, Metanol- d_4 , 500 MHz.

Figura 37. Mapa de contorno HMBC da substância **Sd3**, Metanol- d_4 , 500 MHz.

Figura 38. Mapa de contorno COSY da substância **Sd3**, Metanol- d_4 , 500 MHz.

Figura 39. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), da substância **Sd3**, obtido em modo positivo.

4.6.4. Determinação estrutural da substância **Se1** da fração E

A substância **Se1** (20,00 mg) isolada da fração E, apresentou-se como um sólido amarelado e $[\alpha]_D = -1,30$ (metanol, na concentração de 1%), esta foi identificada como 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-1,2-propanodiol, (Figura 40). A determinação estrutural da substância **Se1** foi baseada nos espectros de RMN uni e bidimensionais, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Figuras 41 - 47 e Tabelas 15 e 16).

Figura 40. Proposta estrutural para a substância **Se1** 1,2-propanodiol-1-(1,3-benzodioxol-5-il).

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ da substância **Se1** e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H δ (ppm); mult; J (Hz) (500MHz)	^{13}C δ (ppm) (100MHz)	*Literatura ^1H δ (ppm) (500MHz) (CDCl_3)	*Literatura ^{13}C δ (ppm) (100MHz) (CDCl_3)
1	-	145,7	-	145,8
2	-	146,7	-	147,4
3	6,86 (<i>sl</i> ; 1H)	107,3	6,86	107,1
4	-	137,7	-	135,0
5	6,82 (<i>dd</i> ; $J = 8,0$; $J = 1,4$; 1H)	120,0	6,81	120,4
6	6,76 (<i>d</i> ; $J = 8,0$; 1H)	107,3	6,77	108,2
7	4,24 (<i>t</i> ; $J = 4,2$; 1H)	76,9	4,29	79,4
8	3,59 (<i>m</i> ; 1H)	70,5	3,82	72,3
9	0,98 (<i>d</i> ; $J = 6,1$; 3H)	18,9	1,06	18,8
OH (C-8)	4,48 (<i>d</i> ; $J = 4,8$)	-	-	-
OH (C-7)	5,15 (<i>d</i> ; $J = 4,2$)	-	-	-
O-CH₂-O	5,95 (<i>s</i> ; 2H)	100,6	5,96	101,1

*SY, et al., 1997.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 41 e Tabela 15) foi possível observar sinais característicos do anel dioxolano, referentes aos hidrogênios de deslocamentos químico δ 5,95 (O-CH₂-O); δ 6,86 (H-3); δ 6,82 (H-5) e δ 6,76 (H-6). Observou-se também o sinal de hidrogênio metílico δ 0,98 (H-9) e os sinais de hidrogênios H-7 (δ 4,24) e H-8 (δ 3,59) presentes na cadeia carbônica. Ainda pode-se observar no espectro de RMN de ^1H , dois dupletos distintos e bastante desprotegidos em δ 5,15 e δ 4,48, referentes aos hidrogênios dos grupos hidroxílicos do C-7 e C-8, respectivamente. Estes sinais foram confirmados através da análise de RMN de ^1H com a adição de D_2O , em que estes sinais de hidrogênios ficaram suprimidos no espectro (Figura 42).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 43) apresentou os sinais característicos referente ao benzodioxolano, com deslocamentos químicos δ 100,6 (O-CH₂-O); δ 145,7 (C-1); δ 146,7 (C-2); δ 107,3 (C-3); 137,7 (C-4); δ 120,0 (C-5) e δ 107,3 (C-6), como também foram observados os sinais de C-7 (δ 76,9), C-8 (δ 70,5) e C-9 (δ 18,9). Comparando os dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C com os dados apresentados por Lai-King Sy e colaboradores, 1997 (Tabela 15), pode-se concluir que a substância isolada **Se1** consiste no 1-(1,3-Benzodioxol-5-il)-1,2-propanodiol. Além disto, podem-se observar as correlações entre carbonos e hidrogênios nos mapas de contorno de HMQC (Figura 44) e HMBC (Figura 45) conforme apresentadas na Tabela 16. No mapa de contorno COSY (Figura 46) foi possível observar as correlações entre os seguintes hidrogênios:

- H-8 (δ 3,59) com H-9 (δ 0,98) e H (δ 5,15) da OH ligada ao C-7;

- H-7 (δ 4,24) com H (δ 4,48) da OH ligada ao C-8.

Na análise por espectroscopia na região do infravermelho, observou-se uma banda larga e forte em 3400 cm^{-1} característico de grupo hidroxila, banda em $2750 - 3000\text{ cm}^{-1}$ de absorção de estiramento da ligação entre carbono e hidrogênio aromático. Há uma banda em $1100 - 1250\text{ cm}^{-1}$, possivelmente referente à absorção de estiramento entre uma ligação simples entre carbono e oxigênio (Figura 47).

Tabela 16. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância **Se1** (600 MHz, DMSO- d_6).

^1H (δ)	^{13}C (δ) HMQC	^{13}C (δ) HMBC
H-3 (6,86)	107,3	C-2 (146,7); C-4 (137,7); C-5 (120,0); C-6 (107,3) e C-7 (76,9)
H-5 (6,82)	120,0	C-1 (145,7); C-6 (107,3) e C-7 (76,9)
H-6 (6,76)	107,3	C-1 (145,7)
O-CH₂-O (5,95)	100,6	C-1 (145,7) e C-2 (146,7)
H-7 (4,24)	76,9	C-4 (137,7); C-5 (120,0); C-9 (18,9)
H-8 (3,59)	70,5	C-4 (137,7); C-7 (76,9) e C-9 (18,9)
H-9 (0,98)	18,9	C-7 (76,9) e C-8 (70,5)

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da substância **Se1**, $\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz.

Figura 42. Espectro de RMN de ^1H da substância **Se1**, $\text{DMSO-}d_6$, D_2O , 500 MHz.

Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **Se1**, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

Figura 44. Mapa de contorno HMQC da substância **Se1**, $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

Figura 45. Mapa de contorno HMBC da substância **Se1**, $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

Figura 46. Mapa de contorno COSY da substância **Se1**, $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz.

Figura 47. Espectro de absorção na região do Infravermelho da substância **Se1** (CDCl_3).

4.6.5. Elucidação estrutural da substância **Sf3** da fração F

As substâncias **Sf3** e **Se3** apresentaram espectros RMN iguais, e por esta razão suas massas foram reunidas. A substância foi identificada como 2,5-dicetopiperazina, 3-benzilideno-2-metil-hexahidro-pirrólo [1,2- α] pirazina-1,4-diona (Figura 48), e apresentou-se como um sólido branco. Para caracterizar estruturalmente esta substância, foram realizados os experimentos de RMN ^1H , HMQC, HMBC, COSY, NOESY, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectrometria de massas (Tabelas 17 - 18 e Figuras 49 - 55.)

Figura 48. Proposta estrutural para a substância **Sf3**.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 49) observou-se na região de hidrogênios aromáticos o sinal de multipeto de deslocamento químico entre δ 7,26 - δ 7,42, integrado para 5H. Pode-se observar um simpleto bastante desblindado em δ 6,93 e integrado para 1H, característico de hidrogênio vinílico. Observou-se um sinal duplo dupeto, integrado para 1H

de deslocamento químico δ 4,43 e constante de acoplamento 7,1 e 9,1; referente ao hidrogênio H-9 ligado ao carbono quiral. Foram observados ainda os sinais de multipeto de deslocamentos químicos entre δ 3,43 - δ 3,49 (integrado para 1H), referentes aos hidrogênios H-6; o multipeto de deslocamento químico entre δ 1,86 - δ 2,02 (integrado para 4H), referentes aos hidrogênios em H-8 e H-7. Observou-se um simpleto bastante desblindado de deslocamento químico δ 2,72 (integrado para 3H), referente aos hidrogênios metílicos próximos ao átomo de nitrogênio (Tabela 17).

Os dados de deslocamento químico dos átomos de carbono da substância **Sf3** foram atribuídos de forma indireta, pelos mapas de contorno HMQC e HMBC (Figuras 50 e 51, respectivamente), e podem ser observados na Tabela 18 em comparação com os dados do programa ChemDraw Professional 15.0.

Através de HMQC observou-se as correlações dos sinais entre os carbonos e hidrogênios do anel ciclo pentano, tais como: C-6 (δ 44,7) e H-6 (δ 3,41 e δ 3,49); C-7 (δ 22,0) e H-7 (δ 1,86 e δ 1,94); C-8 (δ 28,3) e H-8 (δ 1,99 e δ 2,02); C-9 (δ 57,9) e H-9 (δ 4,43). Notou-se a correlação do carbono metílico (C-10; δ 34,0) com o H-10 (δ 2,72) e a correlação do carbono vinílico (C-11; δ 121,0) com o H-11 (δ 6,93). Na região de aromáticos observaram-se as correlações entre o C-2'/C-6' (128,2), C-3'/C-5' (δ 129,4) e C-4' (δ 7,30) com os H-2'/H-6' (δ 7,42), H-3'/H-5' (δ 7,39) e H-4' (δ 7,30); respectivamente.

No mapa de contorno HMBC observou-se as correlações de hidrogênios H-11 (δ 6,93) e H-4' (δ 7,30) com o carbono C-1' (δ 134,2). Ainda observou-se a correlação de H-11 (δ 6,93) com o carbono da carbonila C-4 de deslocamento químico (δ 160,1) e os hidrogênios H-10 (δ 2,72); H-9 (δ 4,43) e H-8 (δ 2,22 e δ 1,96) com o outro carbono carbonílico C-1 (δ 167,9). Observou-se a presença do carbono C-3 (δ 129,6) através da correlação deste com os hidrogênios H-10 (δ 2,72) e H-11 (δ 6,93). Na Tabela 17, estão demonstradas as correlações observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC.

No mapa de contorno COSY (Figura 52), foram observadas as seguintes correlações entre hidrogênios:

- H-9 (δ 4,43) com H-8 (δ 2,22 e δ 1,99) e H-7 (δ 1,94);
- H-6 (δ 3,49) com H-7 (δ 1,94 e δ 1,86);
- H-8 (δ 2,22) com H-7 (δ 1,94 e δ 1,86).

No mapa de contorno NOESY (Figura 53) observou-se a correlação espacial entre os hidrogênios H-10 (δ 2,72) e H-5' (δ 7,39), o que nos sugere que esta molécula apresenta a configuração Z (isômero *Cis*) para a ligação dupla entre os carbonos C-3 (δ 129,6) e C-11 (δ 121,0). Pelo espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 54), foi possível

confirmar a presença das carbonilas de amidas através de duas bandas em 1670 e 1675 cm^{-1} , e observou-se as bandas características de grupos metilênicos e benzeno em 2934 cm^{-1} e 1497 cm^{-1} , respectivamente.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e HMQC/HMBC (sinais de ^{13}C) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância **Sf3** e comparação com dados estimados pelo programa ChemDraw Professional 15.0.

Posição	Sf3 ^1H δ (ppm); mult; J (Hz) (600MHz)	Sf3 ^{13}C δ (ppm) (600MHz)	*ChemDraw ^1H δ (ppm) (300MHz) DMSO	*ChemDraw ^{13}C δ (ppm) (100MHz) DMSO
1	-	167,9	-	165,5
2	-	-	-	-
3	-	129,6	-	128,0
4	-	160,1	-	164,1
5	-	-	-	-
6	a 3,43; b 3,49 (<i>m</i> ; 2H)	44,7	a 3,40; b 3,50	49,7
7 e 8	1,86 - 2,02 (<i>m</i> ; 4H)	22,0 e 28,3	1,74 - 2,15	28,6 e 29,5
9	4,43 (<i>dd</i> ; $J = 7,5$ e $J = 1,7$;1H)	57,9	4,39	67,9
10	2,72 (<i>s</i> ; 3H)	34,0	3,12	35,8
11	6,93 (<i>s</i> ; 1H)	121,0	6,02	122,4
1'	-	134,2	-	134,2
2'- 6'(Ar)	7,26 - 7,42 (<i>m</i> ; 5H)	127,4 - 129,4	7,33 - 7,60	127,9 - 128,6

*ChemDraw Professional 15.0, 2016.

Tabela 18. Correlação entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância **Sf3** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

^1H (δ)	^{13}C (δ) HMQC	^{13}C (δ) HMBC
H-6 (3,41; 3,49)	44, 7	C-8 (δ 28,3) e C-9 (57,9)
H-7 (1,86; 1,94)	22,0	C-6 (δ 44,7); C-8 (δ 28,3) e C-9 (57,9)
H-8 (2,22; 1,99)	28,3	C-1 (δ 167,9); C-6 (δ 44,7); C-7 (δ 22,0) e C-9 (δ 57,9)
H-9 (4,43)	57,9	C-1 (δ 167,9) e C-8 (δ 28,3)
H-10 (2,72)	34,0	C-1 (δ 167,9) e C-3 (δ 129,6)
H-11 (6,93)	121,0	C-3 (δ 129,6); C-4 (δ 160,1) e C-1' (δ 134,2)
H-2' - H-6' (Ar)	127,4-128,2	-

No espectro de massas (ionização por ESI) (Figura 55), obtido em modo positivo, apresentou um pico em m/z 279,1141, referente ao íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$ e um pico em m/z 256, uma massa par, que sugere a presença de dois

nitrogênios na estrutura de **Sf3**. Portanto, a partir da análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos pode-se confirmar a estrutura.

A substância **Sf3** isolada do fungo endofítico marinho *Annulohyphoxylon stygium*, pertence à classe de substância conhecida como: 2,5 - dicetopiperazina; que são ciclopeptídeos formados pela ciclização de dois aminoácidos. Desde o início do século 20 vem crescendo a pesquisa de substâncias desta classe, devido ao importante fato de apresentarem uma ampla atividade biológica, como citotoxicidade em células cancerígenas, anti-microbiana e anti-inflamatória (GHEN et al., 2009; HUANG et al., 2014). Há relatos na literatura sobre diversas substâncias desta classe já isoladas a partir de uma diversificada fonte de organismos, inclusive aqueles pertencentes ao ambiente marinho (RATEB & EBEL, 2011). Até no ano 2014, mais de 200 substâncias da classe 2,5 - dicetopiperazina foram isoladas apenas de organismos marinhos, e em particular esta taxa é mais elevada quando se refere aos fungos marinhos, tanto daqueles que vivem em associação ou vivem de forma independente (HUANG et al., 2014). De qualquer forma, as 2,5 - dicetopiperazinas pertencem a uma categoria de peptídeos cíclicos bioativos relativamente inexplorados e correspondem a uma promissora alternativa como futuro medicamento e/ou produto cosmético (HUANG et al., 2014).

Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância **Sf3**, $\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz.

Figura 50. Mapa de contorno HMQC da substância **Sf3**, DMSO- d_6 , 600 MHz.

Figura 51. Mapa de contorno HMBC da substância **Sf3**, DMSO- d_6 , 600 MHz.

Figura 52. Mapa de contorno COSY da substância **Sf3**, DMSO-*d*₆, 600 MHz.

Figura 53. Mapa de contorno NOESY da substância **Sf3**, DMSO-*d*₆, 500 MHz.

Figura 54. Espectro de absorção na região do Infravermelho, em CDCl_3 , da substância **Sf3**.

Figura 55. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), da substância **Sf3**, obtido em modo positivo.

4.7. Atividade biológica

Avaliação da atividade fotoprotetora

4.7.1. Triagem espectral dos extratos em escala piloto das linhagens M59, M60 e T73 e em escala da linhagem M59

Inicialmente, foi realizado um *screening* para avaliar o potencial biológico dos extratos obtidos em escala piloto das três linhagens de fungos, o M59 (*Annulohypoxylon stygium*), M60 (*Cladosporium* sp.) e T73 (*Acremonium implicatum*). A princípio analisou-se o perfil de absorbância na região do ultravioleta/visível (290 - 800 nm) destes extratos, dos quais foram preparados na concentração de 100 µg/mL em Isopropanol, conforme descrito no item 3.3.1.1 e Figura 56. Este estudo foi utilizado como pré requisito para selecionar a(s) linhagem(s) mais promissora(s), onde observou-se que apenas o extrato da linhagem M59 apresentou absorção na região de interesse (UVB, 290 nm) e, portanto este foi selecionado para o cultivo em escala ampliada.

Figura 56. Resultados dos ensaios de absorbância na região do UV/VIS através do espectrofotômetro operando na faixa espectral de 290 a 800 nm, dos extratos obtidos em escala piloto das linhagens M59, M60 e T73.

Após o cultivo em escala ampliada do fungo *A. stygium* conforme descrito no item 3.2.2, foram obtidos dois extratos, o primeiro foi extraído duas vezes com solvente CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e a última extração ocorreu com 100% de acetato de etila (AcOEt). Através da análise por espectrofotometria obtivemos os espectros de absorbância conforme demonstrado na Figura 57, os estudos subsequentes foram realizados com o primeiro extrato, uma vez que este demonstrou maior absortividade molar.

Figura 57. Absorbância dos extratos CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e 100% AcOEt obtidos em escala ampliada do fungo *A. stygium*, soluções em isopropanol à 100µg/mL.

4.7.2. Avaliação da atividade fotoprotetora das frações C, E e F obtidas a partir extrato do fungo *A. stygium*

O extrato bruto (CH₂Cl₂/MeOH 2:1) do fungo *A. stygium* foi submetido ao fracionamento por CLV (item 3.2.3.3), e dentre as nove frações obtidas, as frações C, E e F foram selecionadas através do perfil cromatográfico com absorção na região de interesse (280 a 400 nm) e quantidade de massa satisfatória. Através das varreduras por espectrofotometria na concentração de 100 µg/mL em isopropanol, as três frações demonstraram picos máximos de absorção na região do UVB (C e E: 287 nm; F: 293 nm), Figuras 58.

Assim, estas frações foram avaliadas quanto à fotodegradação por meio da avaliação da fotoestabilidade frente à radiação UV e na ausência da mesma, Figura 59. Segundo o cálculo de razão da integral dos espectros UVA/UVB, dos pares irradiados e não irradiados, a fração C (4:1Hex/AcOEt), obteve um resultado de redução de 95% da área sob a curva, o que determina fotoinstabilidade. As frações E (2:3 Hex/ AcOEt) e F (1:4 Hex/AcOEt) obtiveram baixa queda na razão, de 21% e 19%, respectivamente, apresentando o resultado de fotoestabilidade frente a radiação UVA.

Figura 58. Absorvância das frações C, E e F obtidas por CLV do extrato fungo *A. stygium*, soluções em isopropanol à 100 µg/mL.

Figura 59. Ensaio de fotodegradação das frações C (preto), E (azul) e F (vermelho) do fungo *A. stygium*, soluções em isopropanol à 100µg/mL. Pares irradiados em linhas tracejadas (i), pares não irradiados em linhas contínuas (ni).

As três frações também foram testadas quanto à fototoxicidade, sendo a fração F considerada provavelmente fototóxica, pois obteve o MPE abaixo de 0,15 e o PIF inferior a 2. As frações C e E apresentaram potencial fototóxico, com valores de MPE: 0,542 e 0,468 respectivamente; estes resultados foram inclusive superior ao do controle positivo de Norfloxacin, sabidamente fototóxico. Todas as frações estudadas, assim como o controle, não obtiveram valores de EC₅₀ - UV, o que traduz que nenhuma das substâncias apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração.

Ao analisarmos os perfis cromatográficos das frações E e F notamos que são semelhantes quanto aos seus componentes majoritários. Então, estas frações foram fracionadas via CLAE-DAD semi-preparativa em quatro subfrações, conforme descrito no item 4.5.

O segundo pico de maior intensidade que estava presente na fração E foi obtido e classificado como **Se4** (item 4.5), este foi considerado fototóxico (MPE: 0,255). Enquanto que as subfrações **Se1** e **Se3** foram consideradas não fototóxicas, o que sugere que a subfração **Se4** era a responsável pelo potencial fototóxico da fração E. Já as subfrações **Sf3** e **Sf4** foram consideradas não fototóxica e fototóxica, pois obtiveram o MPE: 0,037 e 0,202, respectivamente, Tabela 19. As subfrações **Se2**, **Sf1** e **Sf2** não foram testadas, pois não possuíam uma quantidade de massa suficiente para a realização dos ensaios concomitantemente aos estudos químicos.

Tabela 19. Dados do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU PT das subfrações do fungo *A. stygium*.

Amostras	Corrida	EC 50 -UV	EC 50 +UV	MPE	PIF	Resultado
Sf4	1	-	55,44	0,202	1,80	Fototóxico
Sf4	2	-	53,04	0,045	1,88	Não Fototóxico
Sf3	1	-	-	0,037	2,17	Não Fototóxico
Sf3	2	-	-	0,093	1	Não Fototóxico
Se1	1	-	-	-0,006	1	Não Fototóxico
Se1	2	-	-	0,084	1	Não Fototóxico
Se3	1	-	-	0,025	1	Não Fototóxico
Se3	2	-	-	0,029	1	Não Fototóxico
Se4	1	-	78,08	0,255	1,283	Fototóxico

* Análise do programa Phototox.

4.7.3. Ensaios antibacteriano e antifúngico dos extratos bruto do fungo

Avaliação da atividade antibacteriana

Para a atividade antibacteriana foram testados os extratos bruto de CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e 100% AcOEt do fungo *A. stygium* (cultivo em ampla escala), nenhuma destas amostras avaliadas foi ativa frente às bactérias testadas (item 3.3.2). Além disto, após realização do CBM, não foi observado inibição do crescimento bacteriano em nenhuma placa. Segundo a literatura, para um extrato ou fração ser considerada promissora quanto sua atividade antibacteriana, é interessante a inibição do crescimento bacteriano em concentrações menores que 100µg/ml (RIOS; RECIO, 2005).

Avaliação da atividade antifúngica

Para a atividade antifúngica, citada no item 3.3.3, foram avaliados os extratos bruto de CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e 100% AcOEt do fungo *A. stygium* cultivado em escala ampliada, nenhuma destas amostras foi ativa frente às linhagens utilizadas.

5 Conclusão

5. CONCLUSÕES

O estudo químico do fungo endofítico marinho *Annulohypoxylon stygium* mostrou-se promissor na busca de novas estruturas químicas, visto que foi isolada e identificada uma estrutura inédita desta espécie ainda pouco estudada, o 3-benzilideno-2-metil-hexahidro-pirroló [1,2- α] pirazina-1,4-diona (**Sf3**). Esta substância pertencente à classe 2,5-dicetopiperanizira, uma classe que tem despertado muitos interesses em virtude da alta diversidade de atividades biológicas que atinge. Neste estudo, o 3-benzilideno-2-metil-hexahidro-pirroló [1,2- α] pirazina-1,4-diona se mostrou promissor como potencial agente fotoprotetor.

Além deste produto natural inédito, também foram isolados a partir de outras frações o 1,3-benzodioxole-5-metanol (**Sc1**), 1-fenil-1,2-propanediol (**Sd2**), 1-fenil-1,2-propanediol (**Sd3**) e 1,2-propanodiol-1-(1,3-benzodioxol-5-il) (**Se1**). O estabelecimento do perfil químico dos voláteis, presentes nas frações n-hexânicas dos extratos bruto de CH₂Cl₂/MeOH (2:1) e AcOEt (100%) obtidos em escala ampliada da linhagem M59, foi realizado via CG-EM e permitiu a identificação de substâncias tais como: o 1-fenil-1,2-propanediol, álcool piperonílico (1,3-benzodioxol-5-metanol), o ácido n-Hexadecanóico (ácido palmítico), éster Hexadecanoato de metila (palmitato de metila), (Z,Z) 9,12-Octadecanoato de metila (metil linoléico) e o ácido (E)-9-Octadecanóico (Ácido oléico). Este estudo auxilia na compreensão do perfil químico de substâncias voláteis produzidas pelo fungo *A. stygium*, uma espécie ainda pouco pesquisada.

Ainda, por meio da avaliação das atividades biológicas de extratos e frações do fungo *Annulohypoxylon stygium*, foi possível observar que nas condições de cultivo estabelecidas, esta espécie não produziu metabólitos secundários com potencial antibacteriano e antifúngico, considerando-se os micro-organismos que foram utilizados nos testes neste estudo. Entretanto, no ensaio de fotoproteção obtido pela triagem espectral, observou-se o perfil de absorbância na região do ultravioleta/visível do extrato do fungo M59 (*A. stygium*) e este foi considerado promissor. Ao darmos sequência aos estudos, constatamos que as frações da maior relevância foram as frações E e F, de onde foi isolada a substância inédita com potencial fotoprotetor. E também podemos observar qual era a subfração que possivelmente estava gerando resultados de fototoxicidade às frações, no caso **Se4** e **Sf4**, porém as substâncias presentes em ambas não foram identificadas devido ao alto grau de impurezas observadas nos espectros de RMN de ¹H destas subfrações.

Portanto, o fungo *A. stygium* configura-se em uma matriz promissora na busca por novos metabólitos secundários com possível atividade fotoprotetora frente aos raios UVA e UVB.

6 Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. G., et al. Estudo Comparativo de Técnicas de *Screeing* para Avaliação da atividade Anti-bacteriana de Extratos Brutos de Espécies Vegetais e de Substâncias Puras. **Quim. Nova** v. 31, n. 5, p. 124-1229, 2008.

BALOGH T. S., et al. Proteção à radiação ultravioleta: recurso disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 86, n. 4, p. 732 - 742, 2011.

BAI, Z. Q., et al. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. **Fitoterapia** v. 95, p. 194-202, 2014.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. **J. Phys. Chem. Ref. Data** v. 40, n. 4, 2011.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: Amarine microbial perspective. **J. Environmental Toxicology and Pharmacology** v.34, p. 631-643, 2012.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Marine Drugs** v.8, p. 2673-2701, 2010.

BLUNTT, J. W., et al. Marine natural products. **The Royal Society of Chemistry** v.32, p.116-211, 2015.

BLUNT, J. W., et al. Marine natural products. **The Royal Society of Chemistry** v.31, p. 160-258, 2014.

BLUNT, J. W., et al. Marine natural products. **The Royal Society of Chemistry** v.27, p. 165-237, 2010.

BONVIN, J. F.; ARPIN, NOEL Structure de la mycosporine (P310) **Can. J. Chem.** V.54, p.1105-1113, 1976.

CARDOZO, H. M., et al. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 21, p. 202-208, 2011.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica** v. 3, p. 95-228, 2008.

COLABELLA, F.; MOLINÉ M.; LIBKIND D. UV sunscreens of microbial origin: mycosporines and mycosporine-like aminoacids. **Recent Patents on Biotechnology** v.8, n.3, p. 179-193, 2014.

CHENG, M. J., et al. Constituents of the endophytic fungus *Annulohypoxylon boveri* var. *microspora* BCRC 34012 **Helvetica Chimica Acta** v.94, p. 1108 – 1114, 2011.

CHENG, H., et al. Synthesis and Antitumor Activities of Derivatives of the Marine Mangrove Fungal Metabolite Deoxybostrycin. **Mar. Drugs** v. 10, p. 2715-2728, 2012.

CHENG, M. J., et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Annulohypoxylon stygium* BCRC 34024. **Chemistry of Natural Compounds** v.50, n.2, p. 237-241, 2014.

CHENG, M. J., et al. Metabolites isolated from an endophytic fungus of *Annulohypoxylon elevatidiscus*. **Chemistry of Natural Compounds** v. 51, n.1, p. 67 - 70, 2015.

CHEN, Y., et al. Structure elucidation and NMR assignments for two amide alkaloids from a mangrove endophytic fungus (No. ZZF - 22). **Magnetic Resonance in Chemistry** v.47, p. 92 - 95, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **J. Biochimica et Biophysica Acta** p. 3670-3695, 2013.

DANGELLO, J. G.; FANTTINI C. A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. **Editora Atheneu**. 3ª edição, 2007.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; LIN, W. H.; PROKSCH, P. Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. **Microbial Biotechnology** v. 3, p. 544-563, 2010.

DE FELÍCIO, R., et al., Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.52, p.763 - 769, 2010.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clin Dermatol**. v. 13, p. 375 - 380, 1995.

FELCZYKOWSKA, A., et al. Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. **Biochimica Polonica Acta** v. 59, n. 4, p. 501-505, 2012.

FLÓREZ, L. V., et al. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **J. The Royal Society of Chemistry** p. 1-33, 2015.

FLOR, J., DAVOLOS, M. R., CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova** v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FOURNIER, J. et al. The new genus *Rostrohypoxylon* and two new *Annulohypoxylon* species from Northern Thailand. **Fungal Diversity** v.40, p. 23-36, 2010.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability of different UV filters associations in a sunscreen. **Int J Pharm** v.307, n. 2, p. 123-128, 2006.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **Int J Pharm.** v.343, n.12, p.181-189, 2007.

GASPAR, L. R., et al. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro** v. 27, p. 418-425, 2013.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug Discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology** v.19, p.85-98, 2012.

GUARATINI, T., et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de Mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova** v. 32, n.3, p. 717-721, 2009.

HALLER, P. H. Aplicações de lipídeos e fosfolipídeos em cosméticos. **Cosm Toil.**, v. 1, n. 4, p. 33 - 40, 1989.

HENRÍQUEZ, M., et al. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potencial. **J. Microbiol Biotechnol**, 2013.

HOU, X. M., et al. Biological and chemical diversity of coral-derived microorganisms. **Current Medicinal Chemistry** v. 22, p. 3707 - 3762, 2015.

HUANG, R. M., et al. An update on 2,5 - diketopiperazines from marine organisms. **Marine drugs** v.12, p. 6213 - 6235, 2014.

INFANTOZZI COSTA, V. A. **ANATOMIA HUMANA** Ribeirão Preto: 2014. Disponível em <http://neurociencia.tripod.com/labs/lela/textos/APOSTILA_ANATOMIA_HUMANA.pdf> Acessado em: 23/11/2015.

JANUSZ, A. et al. Microbial degradação of illicit drugs, their precursors, and manufacturing by-products: implications for clandestine drug laboratory investigation and environmental assessment. **Forensic Science International** v. 134, p. 62 - 71, 2003.

JULIANTI, E., et al. New polyaromatic metabolites from a marine derived fungus *Penicillium* sp. **Organic Letters** v. 15, n.6, p. 1286 - 1289, 2013.

KAUL, S., et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Rev. Phytochemistry** p. 9260 - 9266, 2012.

KOCKLER J., OELGEMÖLLER M., ROBERTSON S., GLASS B. D. Photostability of sunscreens. **J. Photochem Photobiol C** v.13, p 91 - 110, 2012.

KHAZIR J., MIR B. A., MIR S. A., COWAN D. Natural products as lead compounds in drug discovery. **J. of Asian Natural Products Research** v. 15, n. 7, p.764 - 788, 2013.

KULKARNI, A., et al. Photoinduced conductivity in mycosporine-like amino acids. **Materials Chemistry and Physics** p. 1 - 4, 2015.

LEAL, M. C., et al. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades-Where and What are we bioprospecting? **PLoS ONE** v.7, p.1-15, 2012.

EDWARDS, D. J., et al. Structure and biosynthesis of the Jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Chemistry & Biology**, v. 11 , p. 817 - 833, 2004.

EDWARDS, D. J., et al., Structure and biosynthesis of the Jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Chemistry & Biology** v.11, p. 817-833, 2004.

MASAND, M., et al. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. **J. Microbiol Biotechnol** v.31 p. 1863- 1875, 2015.

MIYAMOTO, K. T.; KOMATSU, M.; HARUO, I. Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from *Actinomycetales* microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology** v.80, n.16, p. 5028-5036, 2014.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard **6a. Ed. NCCLS documents**: Wayne. 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. of Nat. Prod** v. 75, p. 311-335, 2012.

NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis** v.82, p.50-59, 2015.

OREN, A.; CIMERMAN, G. N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?; **Federation of European Microbiological Societies** v. 269, p. 1-10, 2007.

PAVIA, D. L., et al. **Intrdução à Espectroscopia**, 4^a edição norte-americana, p. 15-595, 2010.

PEREIRA, J., et al. New *annulohypoxylon* species from Brazil. **The Mycologia Society of America** p. 248 - 252, 2010.

PRETSH, E., BUHLMANN, P., AFFOLTER C. **Structure Determination of Organic Compounds**, p. 245 - 312, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Bioch. Engineering Journal** v. 13, n. 2 - 3, p. 81 - 84, 2003.

QUANG, D. N., et al. Antimicrobial azaphilones from the fungus *Hypoxylon multifforme*. **Planta Med** v.71, p. 1058 -1062, 2005.

QUANG, D. N., et al. Coharins C-F, four azaphilones from the xylariaceous fungus *Annulohypoxylon cohaerens*. **Tetrahedron** v.62, p. 6349-6354, 2006.

RASTOGI, R. P., et al. Photoprotective compounds from marine organisms. **J. Ind. Microbiol Biotechnol** v. 37, p. 537-558, 2010.

RADJASA, O. K., et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potencial and possible production by microbial associants. **Bioorganic & Medical Chemistry** v. 19, p.6658-6674, 2011.

RATEB, M. E. & RAINER E. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Products Rep.** v.28, p. 290 - 344, 2011.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol** v. 100, n. 1 - 2, p. 80 - 84, 2005.

RINNERTHALER, M., et al. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules** v. 5, p. 545 - 589, 2015.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 55, n. 3, p. 284 - 289, 2001.

ROBL, D., et al. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohyphoxylon stygium* glycohydrolases. **Bioresource Technology** v.177, p. 247-254, 2015.

SPIELMANN, H., et al. In vitro phototoxicity testing. **The report and recommendations of ECVAM workshop 2**. ATLA 22, p. 314 - 348, 1994.

SINGH, S. P., et al. Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of a rice-field cyanobacterium *Anabaena doliolum* as influenced by PAR and UVR. **SPRINGER-VERLAG**. p. 225 - 233, 2008.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M. INVITTOX Protocol No. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. **European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database**, 1998. Last update October 2002. <<<http://ecvamsis.jrc.it/invittox/static/index.html>>>.

SINGHANIA, R. R., et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Bioch. Eng. J.** v. 44, n. 1, p. 13 - 18, 2009.

SULTAN, S., et al. Structure and absolute configuration of 20 β -hydroxyprednisolone, a biotransformed product of prednisolone by the marine endophytic fungus *Penicillium lapidosum*. **J. Molecules** v. 19, p. 13775-13787, 2014.

SUWANNASAI, N., et al. Fungi in Thailand: A case study of the efficacy of an ITS barcode for automatically identifying species within the *Annulohyphoxylon* and *Hyphoxylon* genere. **PLOS ONE** v.8, p. 1 - 8, 2013.

SURUP, F., et al. Cohaerins G-K, azaphilone pigments from *Annulohyphoxylon cohaerens* and absolute stereochemistry of cohaerins C-K. **Phytochemistry** v. 95, p. 252 - 258, 2013.

SUH, S. S., et al. Anti-inflammation activities of mycosporine-like amino acids (MAAs) in response to UV radiation suggest potential anti-skin aging activity. **Marine Drugs** v.12, p. 5174 - 5187, 2014.

SCHMID, D.; SCHURCH, C.; ZULLI F. Mycosporine-like amino acids from red alga protect against premature skin-aging. **Mibelle AG Biochemistry** p. 1 - 4, 2006.

SAEWAN, N.; AMPA, J. Natural products as photoprotection **J. of Cosmetic Dermatology** v. 14, p. 47 - 63, 2015.

SY, L. K., et al. Phytochemistry of *illicium dunnianum* and the systematic position of the Illiciaceae. **Phytochemistry** v.44, n. 6, p. 1099 - 1108, 1997.

TAKESHITA, M. & TAKUMI, S. Synthesis of optically active 1-phenyl-1,2-propanediol by use of Baker's yeast. **Chem. Pharm. Bull** v. 37, n. 4, p. 1085 - 1086, 1989.

WADA, N.; SAKAMOTO, T.; MATSUGO S. Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. **J. Antioxidants** v. 4, p. 603 - 646, 2015.

WHITEHEAD, K.; HEDGES, J. I. Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. **J Photochem Photobiol B** v. 80, n. 2, p. 115 - 121, 2005.

WU, M. D., et al. Phytochemical investigation of *Annulohypoxylon ilanense*, an endophytic fungus derived from *Cinnamomum* species **Chemistry & Biodiversity** v. 10, p. 493 - 505, 2013.

XIONG, Z-Q.; WANG, J-F.; HAO, Y-Y.; WANG, Y. Recent advances in the Discovery and development of marine microbial natural products. **Marine Drugs** v. 11, p. 700 - 717, 2013.

YUSUF, O. K.; BEWAJI, C. O. GC-MS of volatile components of fermented wheat germ extract, **J. Cereals Oilseeds** v. 2, n. 3, p. 38 - 42, 2011.

ZEID, A. H. A., et al. Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities. **Carbohydrate Polymers** v. 113, p. 62 - 66, 2014.

OLIVEIRA C. A., et al. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sunn care products. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 148, p. 154 - 159, 2015.

OECD, 2004. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432**: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (Original Guideline, adopted 13th April 2004) <<http://www.oecd.org/>>.