UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas:
química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados**

Ana Lígia Leandrini de Oliveira

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas:
química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientada: Ana Lígia Leandrini de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria

Debonisi

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 21/05/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto
2013**

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.

Oliveira, Ana Lúcia Leandrini de

Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas: química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados. Ribeirão Preto, 2013.

182 p. : il ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Debonisi, Hosana Maria

1. *Bostrychia radicans*. 2. Algas marinhas 3. Fungos endofíticos. 4. *Xylaria* sp. 5. *Phomopsis longicolla*. 6. *Penicillium brevicompactum*. 7. Produtos naturais marinhos.

Ana Lúgia Leandrini de Oliveira

Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas: química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado aos meus pais José Alexandre e Maria de Lourdes; e à
minha irmã Marina.

Vocês são meus melhores amigos, meus exemplos de vida,
meus grandes incentivadores e o meu maior orgulho...

Muito obrigada por tanto amor, dedicação, apoio e
confiança.

Muito obrigada por tudo que vocês me ensinaram.

Às minhas avós e meus amores Zilda e Virgínia.

Aos meus anjos José, Mazinha e Geraldo.

Eu amo vocês.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ao CNPq pela bolsa concedida. A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

À minha querida orientadora Profa. Hosana M. Deboni, que cuida de todos os seus orientados com tanto carinho. Muito obrigada, não apenas pela oportunidade, acolhida, orientação e por todo aprendizado... muito obrigada pela amizade e confiança.

Aos professores do NPPNS pela atenção, pelos conselhos e conhecimentos compartilhados. A todos os funcionários do laboratório de Química Orgânica, sempre dispostos a ajudar.

À Izabel Cristina C. Turatti, à Jacqueline N. Mendonça e ao José Carlos Tomaz (FCFRP-USP), pela obtenção dos espectros de massas, por toda ajuda e sugestões.

Ao Vinícius Palaretti (FFCLRP), pela obtenção dos espectros de RMN, pela atenção e disponibilidade em ajudar, sempre.

Aos queridos Prof. Isidro, Profa. Rosario e Profa. Rosa, pela oportunidade e acolhida, que tornou minha adaptação a outro país uma tarefa tão fácil e prazerosa... Muito obrigada por terem contribuído tanto para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Cádiz, pela ótima convivência e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos atenciosos funcionários da pós-graduação da FCFRP-USP.

À Dra. Nair Sumie Yokoya, pela colaboração, identificação botânica das algas e pelas prazerosas coletas.

A todos os demais pesquisadores colaboradores deste trabalho.

À minha querida amiga gêmea Denise... por ser essa pessoinha essencial na minha vida. Muito obrigada pela amizade e por tantos ensinamentos.

Ao amigo Rafael, meu parceirinho querido neste caminho. Muito obrigada pela amizade e presença constante... por tantas conversas *urgentes* e *essenciais*; por me entender e me apoiar sempre.

À querida Fernandinha, pela amizade e convivência especiais, que sempre tornaram a rotina do laboratório muito melhor.

A todos os amigos do NPPNS, que contribuíram muito neste trabalho e se tornaram pessoas importantes na minha vida.

À querida Michelli, um verdadeiro anjinho; e às amigas Lia e Helena, que fizeram de Cádiz um lugar especial.

Ao querido Antonio Juano, *mi hermano* e *mi maestro*, por sua disposição em ensinar sobre seu idioma, sua cultura, seu país e sobre a vida. Muito obrigada por seu empenho em converter-me em uma andaluza (você conseguiu).

A todos os amigos e colegas do laboratório *Botrytis* pela acolhida, amizade e apoio. *No sabeis como os echo de menos!*

Aos meus amigos-irmãos Fábio e Camila, pessoas importantes demais na minha vida. Obrigada por não desistirem da minha amizade ausente.

“O mais importante e bonito, do mundo, é isto:
que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas —
mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam.

Verdade maior.”

João Guimarães Rosa

(*Grande Sertão: Veredas*)

RESUMO

Oliveira, Ana Lígia Leandrini de. **Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas: química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados.** 2013. 182 f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A diversidade de organismos oriundos do ambiente marinho constitui uma fonte significativa de substâncias estruturalmente inéditas e biologicamente ativas, dentre as quais, diversas inspiraram o desenvolvimento de novas classes de agentes terapêuticos. Neste contexto, macroalgas vermelhas do gênero *Bostrychia* (Rhodomelaceae) foram coletadas em praias do litoral norte do estado de São Paulo e têm sido objeto de estudos químicos e biológicos, no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (LQOAM - NPPNS) da FCFRP-USP, sob a supervisão da Profa. Dra. Hosana M. Debonisi. As algas da espécie *Bostrychia radicans* demonstraram potencial quando avaliadas as atividade citotóxica, tripanocida, leishmanicida e antimicrobiana; além de um perfil químico interessante, evidenciado pelo isolamento de substâncias inéditas na literatura. Neste contexto, o presente trabalho descreve a continuidade do estudo químico da espécie *B. radicans*, coletada no Manguezal do Rio Escuro, em Ubatuba-SP; bem como o potencial biológico desta espécie, além da avaliação da atividade de enzimas fenolsulfatases na espécie. Ainda, no sentido de explorar novas fontes promissoras para o isolamento de substâncias bioativas, este trabalho descreve o isolamento de micro-organismos endofíticos associados à espécie *B. radicans*. Foram isoladas 45 linhagens de micro-organismos; dentre as quais foram selecionadas nove linhagens para obtenção de extratos e realização de triagens química e biológica. A partir desta triagem inicial, foi realizado o estudo químico dos fungos *Xylaria* sp., *Penicillium brevicompactum* e *Phomopsis longicolla*. A partir da *Xylaria* sp. foram isoladas as seguintes substâncias: ácido 2,5-diidroxibenzóico, 8-diidroxinaftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo, 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona e ácido pilifórmico. O estudo químico de *Penicillium brevicompactum* resultou no isolamento das substâncias: ácido micofenólico, asperfenamato, brevianamida A, brevianamida C e brevianamida oxindol, substância inédita como produto natural. A partir de *Phomopsis longicolla* foi isolado o dicerandrol C. Este trabalho descreve ainda o potencial biológico de algumas destas substâncias isoladas. O estudo químico e biológico de micro-organismos realizado no LQOAM estimulou a consolidação de uma colaboração com o Prof. Dr. Isidro C. Gonzalez, através da realização de um estágio de 12 meses no Laboratório *Botrytis* (Departamento de Química Orgânica, Universidade de Cádiz). Durante este período foi realizado o estudo químico do fitopatógeno *Botrytis cinerea*, visando o isolamento de novos metabólitos ou toxinas; além do estudo da biogênese destas substâncias, através de ensaios utilizando precursores isotopicamente marcados.

Palavras-chave: 1. Algas marinhas. 2. *Bostrychia radicans*. 3. Fungos endofíticos. 4. *Xylaria* sp. 5. *Phomopsis longicolla*. 6. *Penicillium brevicompactum*. 7. Produtos naturais marinhos.

ABSTRACT

Oliveira, Ana Lgia Leandrini de. **Marine algae and microorganisms as source of bioactive compounds: chemistry and biology of *Bostrychia radicans* and endophytic fungi**. 2013. 182 f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The diversity of organisms from the marine environment is a significant source of structurally novel and biologically active substances, several of which have inspired the development of new classes of therapeutic agents. In this context, red macroalgae belonging to *Bostrychia* genus (Rhodomelaceae) were collected on beaches of the north coast of São Paulo State and have been studied chemically and biologically in the Laboratory of Organic Chemistry of the Marine Environment - (LQOAM - NPPNS) at FCFRP-USP, under Prof. Hosana M. Deboni supervision. Algae *Bostrychia radicans* species showed cytotoxic, trypanocidal, antileishmanial and antimicrobial potential, besides a interesting chemical profile, evidenced by the isolation of new compounds in the literature. In this context, this work describes the sequential chemical study of *B. radicans* species, collected at the Rio Escuro Mangrove, Ubatuba-SP, as well as the biological potential of this species. Also, the phenolsulphatases enzyme activity was evaluated in this species. Still, in order to explore new promising sources for the isolation of bioactive substances, this study describes the isolation of endophytic microorganisms associated to *B. radicans*. In this way, 45 strains of microorganisms were isolated and nine strains were selected for extracts preparation; and subsequently chemical and biological screenings. Based on the biological screening and chemical profile analyses, the large-scale fermentation of the endophytic fungi *Xylaria* sp., *Penicillium brevicompactum* and *Phomopsis longicolla* was carried out. The chromatographic purification of the bioactive acethyl acetate extract from *Xylaria* sp. allowed the isolation of 2,5-dihydroxybenzoic acid, 8-dihydroxynaphtol 1-*O*- α -glucopyranoside, 8-methoxy-3-methyl-1-isochromanone and piliformic acid. Chemical studies of *Penicillium brevicompactum* resulted in the isolation of: mycophenolic acid, asperphenamate, brevianamide A, brevianamide C and brevianamide oxindole, isolated for the first time as a natural product. From *Phomopsis longicolla* was isolated dicerandrol C. This thesis also describes the potential biological of some of these isolated compounds. The chemical and biological studies of microorganisms achieved in LQOAM encouraged the consolidation of a collaboration work with Prof. Dr. Isidro C. Gonzalez, through the completion of a 12-month internship at the Laboratory *Botrytis* (Department of Organic Chemistry, University of Cádiz). During this period, was conducted the chemical study of plant pathogen *Botrytis cinerea*, aiming the isolation of new metabolites or toxins, in addition to studying the biogenesis of these substances, through experiments using isotopically labeled precursors.

Key-words: 1. Marine algae. 2. *Bostrychia radicans*. 3. Endphytic fungi. 4. *Xylaria* sp. 5. *Phomopsis longicolla*. 6. *Penicillium brevicompactum*. 7. Marine natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos naturais (incluindo sua origem) que revolucionaram a história da medicina.	2
Figura 2. Exemplos de produtos naturais marinhos bioativos.	4
Figura 3. Metabólitos secundários bioativos oriundos de algas marinhas.	12
Figura 4. Exemplares de <i>Bostrychia radicans</i> crescendo sobre árvores do manguezal do Rio Escuro em Ubatuba, São Paulo.	14
Figura 5. Substâncias inéditas isoladas de espécies do gênero <i>Bostrychia</i> .	15
Figura 6. Esquema da extração líquido-líquido do extrato metanólico de <i>B. radicans</i> .	19
Figura 7. Constituintes majoritários da fração BRM C (análise CG-EM).	27
Figura 8. Constituintes majoritários da fração BRM D (análise CG-EM).	28
Figura 9. Constituintes majoritários da fração BRM E (análise CG-EM).	29
Figura 10. Constituintes majoritários da fração BRM G (análise CG-EM).	31
Figura 11. Cromatograma obtido via CLAE expandido (1 a 20 minutos) da fração hidro-alcoólica de <i>B. radicans</i> , a 310 nm.	32
Figura 12. Espectro de absorção na região do UV (A) e espectro de massas (B), obtidos via CLAE-DAD-EM da substância BRMHA-02, identificada como palitínol.	33
Figura 13. Espectro de absorção UV (A) e espectro de massas (B), obtidos via CLAE-DAD-EM da substância BRMHA-03 (identificada como palitina).	34
Figura 14. Estrutura química do palitínol.	36
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da substância BRMHA-02, 500 MHz, CD_3OD .	37
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H da substância BRMHA-02 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .	37
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H da substância BRMHA-02 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .	38
Figura 18. Mapa de contorno HMQC da substância BRMHA-02 (expandido), 500-125 MHz, CD_3OD .	38
Figura 19. Mapa de contorno HMBC da substância BRMHA-02 (expandido), 500-125 MHz, CD_3OD .	39
Figura 20. Cromatogramas dos padrões: A) 4-metilumbeliferil sulfato ($t_r = 13,92$ min) e B) 4-metilumbeliferona ($t_r = 20,77$); CLAE-DAD (320 nm).	40
Figura 21. Cromatograma do ensaio enzimático com o precursor 4-metilumbeliferil sulfato ($t_r = 20,71$); CLAE-DAD (320 nm).	40
Figura 22. Cromatogramas dos padrões: A) 4-nitrofenil sulfato ($t_r = 5,90$ min) e B) 4-nitrofenil ($t_r = 20,56$ min); CLAE-DAD (320 nm).	41
Figura 23. Cromatograma do ensaio enzimático com o precursor 4-nitrofenil sulfato ($t_r = 20,10$ min); CLAE-DAD (320 nm).	41
Figura 24. Linhagens de micro-organismos endofíticos da espécie <i>B. radicans</i> selecionados de acordo com os aspectos morfológicos.	60
Figura 25. Cromatograma obtido via CLAE-DAD do extrato AcOEt de <i>Xylaria</i> sp., a 205 nm.	66
Figura 26. Estrutura química do ácido 2,5-diidroxibenzóico	68
Figura 27. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-01, obtido em modo negativo.	68
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-01, 500 MHz, CD_3OD .	69
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-01 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .	69
Figura 30. Mapa de contorno HMQC da substância XS-01, 125-500 MHz, CD_3OD .	70
Figura 31. Mapa de contorno HMBC da substância XS-01 (expandido), 125-500	70

MHz, CD₃OD.

Figura 32. Estrutura química do 1,8-diidroxinaftol 1- <i>O</i> - α -glucopiranosídeo	72
Figura 33. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-02, obtido em modo negativo.	72
Figura 34. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-02, 500 MHz, CD ₃ OD.	73
Figura 35. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-02 (expansão I), 500 MHz, CD ₃ OD.	73
Figura 36. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-02 (expansão II), 500 MHz, CD ₃ OD.	74
Figura 37. Mapa de contorno HMQC da substância XS-02 (expandido), 125-500 MHz, CD ₃ OD.	74
Figura 38. Mapa de contorno HMBC da substância XS-02, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	75
Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ¹ H - ¹ H COSY da substância XS-02, 500 MHz, CD ₃ OD.	75
Figura 40. Estrutura química da 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona	77
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-03, obtido em modo negativo.	77
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-03, 400 MHz, CD ₃ OD.	78
Figura 43. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-03 (expansão I), 400 MHz, CD ₃ OD.	78
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-03 (expansão II), 400 MHz, CD ₃ OD.	79
Figura 45. Espectro de RMN de ¹³ C da substância XS-03, 100 MHz, CD ₃ OD.	79
Figura 46. Mapa de contorno HMQC da substância XS-03, 100-400 MHz, CD ₃ OD.	80
Figura 47. Mapa de contorno HMBC da substância XS-03, 100-400 MHz, CD ₃ OD.	80
Figura 48. Estrutura química do ácido pilifórmico	82
Figura 49. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-04, obtido em modo negativo.	82
Figura 50. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-04, 500 MHz, CD ₃ OD.	83
Figura 51. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-04 (expansão I), 500 MHz, CD ₃ OD.	83
Figura 52. Espectro de RMN de ¹ H da substância XS-04 (expansão II), 500 MHz, CD ₃ OD.	84
Figura 53. Espectro de RMN de ¹³ C da substância XS-04, 125 MHz, CD ₃ OD.	84
Figura 54. Mapa de contorno HMQC da substância XS-04, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	85
Figura 55. Mapa de contorno HMBC da substância XS-04, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	85
Figura 56. Estrutura química do asperfenamato	88
Figura 57. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-D01, 500 MHz, CDCl ₃ .	89
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-D01 (expansão I), 500 MHz, CDCl ₃ .	89
Figura 59. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-D01 (expansão II), 500 MHz, CDCl ₃ .	90
Figura 60. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-D01 (expansão III), 500 MHz, CDCl ₃ .	90
Figura 61. Espectro de RMN de ¹³ C da substância PB-D01, 125 MHz, CDCl ₃ .	91
Figura 62. Espectro de RMN de ¹³ C da substância PB-D01 (expansão I), 125 MHz, CDCl ₃ .	91
Figura 63. Mapa de contorno HMQC da substância PB-D01, 125-500 MHz, CDCl ₃ .	92
Figura 64. Mapa de contorno HMBC da substância PB-D01, 125-500 MHz, CDCl ₃ .	92
Figura 65. Mapa de contorno HMBC da substância PB-D01 (expansão I), 125-500	93

MHz, CDCl₃.

Figura 66. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-D01, obtido em modo positivo.	93
Figura 67. Estrutura química da substância brevianamida A	95
Figura 68. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H03, 500 MHz, CD ₃ OD.	96
Figura 69. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H03 (expansão I), 500 MHz, CD ₃ OD.	96
Figura 70. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H03 (expansão II), 500 MHz, CD ₃ OD.	97
Figura 71. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H03 (expansão III), 500 MHz, CD ₃ OD.	97
Figura 72. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H03, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	98
Figura 73. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H03 (expansão I), 125-500 MHz, CD ₃ OD.	98
Figura 74. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H03, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	99
Figura 75. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-H03, obtido em modo positivo.	99
Figura 76. Estrutura química da substância brevianamida C	101
Figura 77. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H04, 500 MHz, CD ₃ OD.	102
Figura 78. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H04 (expansão I), 500 MHz, CD ₃ OD.	102
Figura 79. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H04 (expansão II), 500 MHz, CD ₃ OD.	103
Figura 80. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H04 (expansão III), 500 MHz, CD ₃ OD.	103
Figura 81. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H04 (expansão IV), 500 MHz, CD ₃ OD.	104
Figura 82. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H04, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	104
Figura 83. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H04 (expansão I), 125-500 MHz, CD ₃ OD.	105
Figura 84. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H04 (expansão II), 125-500 MHz, CD ₃ OD.	105
Figura 85. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H04, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	106
Figura 86. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H04, 125-500 MHz (expansão I), CD ₃ OD.	106
Figura 87. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H04, 125-500 MHz (expansão II), CD ₃ OD.	107
Figura 88. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-H04, obtido em modo positivo.	107
Figura 89. Estrutura química da substância brevianamida oxindol.	109
Figura 90. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H02, 500 MHz, CD ₃ OD.	110
Figura 91. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H02 (expansão I), 500 MHz, CD ₃ OD.	110
Figura 92. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H02 (expansão II), 500 MHz, CD ₃ OD.	111
Figura 93. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H02 (expansão III), 500 MHz, CD ₃ OD.	111
Figura 94. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H02, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	112
Figura 95. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H02 (expansão I), 125-500 MHz, CD ₃ OD.	112

Figura 96. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H02 (expansão II), 125-500 MHz, CD ₃ OD.	113
Figura 97. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H02, 125-500 MHz, CD ₃ OD.	113
Figura 98. Estrutura química da substância ácido micofenólico.	115
Figura 99. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H05, 500 MHz, CD ₃ OD.	116
Figura 100. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H05 (expansão I), 500 MHz, CD ₃ OD.	116
Figura 101. Espectro de RMN de ¹ H da substância PB-H05 (expansão II), 500 MHz, CD ₃ OD.	117
Figura 102. Espectro de RMN de ¹³ C da substância PB-H05, 125 MHz, CD ₃ OD.	117
Figura 103. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-H05, obtido em modo negativo.	118
Figura 104. Estrutura química da substância dicerandrol C	120
Figura 105. Espectro de RMN de ¹ H da substância PL-01, 500 MHz, CDCl ₃ .	121
Figura 106. Espectro de RMN de ¹ H da substância PL-01 (expansão I), 500 MHz, CDCl ₃ .	121
Figura 107. Espectro de RMN de ¹ H da substância PL-01 (expansão II), 500 MHz, CDCl ₃ .	122
Figura 108. Espectro de RMN de ¹³ C da substância PL-01, 125 MHz, CDCl ₃ .	122
Figura 109. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PL-01, obtido em modo negativo.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produtos naturais de origem marinha aprovados para o uso terapêutico e em fase de avaliação clínica	5
Tabela 2. Frações provenientes do fracionamento por CLV da fração acetato de etila do extrato metanólico de <i>B. radicans</i>	20
Tabela 3. Avaliação da atividade enzimática de fenolsulfatases em <i>B. radicans</i> Tampão: 0,4 M MES-Tris PH 6,2	24
Tabela 4. Atividade microbiana frente ao micro-organismo <i>Streptococcus mutans</i> (concentração inibitória mínima)	25
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BRMHA-02 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados de RMN de ^{13}C obtidos da literatura (67,9 MHz, D_2O).	36
Tabela 6. Metabólitos estruturalmente inéditos isolados a partir de fungos endofíticos associados a algas marinhas do filo Rhodophyta.	47
Tabela 7. Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico de 8 g do extrato diclorometano/ metanol (2:1) do fungo <i>Penicillium brevicompactum</i> por CLV.	57
Tabela 8. Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico de 10 g do extrato diclorometano/ metanol (2:1) do fungo <i>Penicillium brevicompactum</i> por CLV.	57
Tabela 9. Rendimento das frações hexânicas (cultivo em meio sólido arroz)	61
Tabela 10. Rendimento das frações AcOEt (cultivo em meio sólido arroz)	61
Tabela 11. Rendimento dos extratos AcOEt (cultivo em meio líquido BDC)	61
Tabela 12. Potencial antifúngico de extratos e/ou frações dos micro-organismos endofíticos isolados de <i>B. radicans</i>	63
Tabela 13. Atividade antitumoral de extratos e/ou frações dos micro-organismos endofíticos isolados de <i>B. radicans</i>	64
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-01 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (200 MHz, CD_3OD).	68
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-02 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (400 e 100 MHz, DMSO-d_6).	72
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-03 (400 e 100 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).	77
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-04 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (400 e 100 MHz, CDCl_3).	82
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-D01 (500 e 125 MHz, CDCl_3), comparados com dados obtidos da literatura (500 e 67,5 MHz, CDCl_3).	88
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância PB-H03 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).	95
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-H04 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (60 MHz, CDCl_3).	101
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-H02 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).	109
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-H05 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).	115
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PL-01 (500 e 125 MHz, CDCl_3), comparados com dados obtidos da literatura (500 e 125 MHz, CD_3CN).	120

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BRM	Espécie <i>Bostrychia radicans</i> coletada no Manguezal do Rio Escuro, Ubatuba - SP
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
δ	Deslocamento Químico
Dcm	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EI	Ionização por Impacto de Elétrons
ESI	Ionização por eletrospray
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de Acoplamento (Hz)
m.	Massa
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min	Minutos
ppm	Partes por Milhão
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
TFA	Ácido Trifluoroacético
τ	Tesla
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	
1.1. Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas.....	1
1.1.2. Produtos naturais marinhos.....	2
1.1.3. Micro-organismos marinhos.....	6
1.2. Química e biologia da macroalga marinha <i>Bostrychia radicans</i> e fungos endofíticos associados a esta espécie.....	7
2. CAPÍTULO I	
Estudo químico e biológico da macroalga marinha <i>Bostrychia radicans</i> (Rhodomelaceae)	
2.1. INTRODUÇÃO	
2.1.1. Algas marinhas.....	9
2.1.2. O gênero <i>Bostrychia</i> e a espécie <i>B. radicans</i>	13
2.2. OBJETIVOS	16
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	
2.3.1. Especificação do material e equipamentos utilizados.....	17
2.3.2. Coleta das algas.....	18
2.3.3. Métodos.....	19
2.3.3.1. Obtenção, fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias.....	19
2.3.3.1.1. Métodos cromatográficos (CLAE).....	20
2.3.3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	21
2.3.3.3. Avaliação da atividade tripanocida.....	22
2.3.3.4. Atividade enzimática de fenolsulfatases em <i>Bostrychia radicans</i>	22
2.3.3.4.1. Obtenção do extrato enzimático de <i>Bostrychia radicans</i>	22
2.3.3.4.2. Avaliação da atividade de fenolsulfatases no extrato enzimático de <i>Bostrychia radicans</i>	23
2.3.3.4.3. Análises cromatográficas das reações enzimáticas.....	24
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
2.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana e tripanocida de frações obtidas a partir do extrato metanólico de <i>B. radicans</i>	25
2.4.2. Estudo químico da fração acetato de etila de <i>B. radicans</i>	26
2.4.3. Estudo químico da fração hidro-alcoólica de <i>B. radicans</i>	31
2.4.3.1. Determinação estrutural da substância BRMHA-02.....	35
2.4.4. Atividade enzimática de fenolsulfatases.....	39
2.5. CONCLUSÕES	42
3. CAPÍTULO II	

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Fungos como fonte de produtos naturais bioativos.....	44
3.1.2. Fungos endofíticos.....	45
3.1.3. Fungos endofíticos obtidos a partir de algas marinhas.....	46

3.2. OBJETIVOS	50
----------------	----

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Coleta das algas.....	51
3.3.2. Metodologia.....	51
3.3.2.1. Isolamento dos micro-organismos.....	51
3.3.2.2. Preservação das linhagens de micro-organismos isoladas.....	52
3.3.2.3. Estabelecimento dos cultivos e obtenção de extratos.....	52
3.3.2.3.1. Cultivo em meio sólido.....	52
3.3.2.3.2. Cultivo em meio líquido.....	53
3.3.2.4. Triagem química dos extratos.....	53
3.3.2.5. Avaliação da atividade biológica dos extratos e frações.....	53
3.3.2.5.1. Avaliação da atividade antitumoral.....	53
3.3.2.5.2. Avaliação da atividade antifúngica.....	54
3.3.2.6. Identificação dos micro-organismos.....	55
3.3.2.7. Estudo químico de <i>Xylaria</i> sp.....	55
3.3.2.7.1. Cultivo em escala ampliada e obtenção do extrato orgânico.....	55
3.3.2.7.2. Fracionamento cromatográfico do extrato e isolamento das substâncias.....	55
3.3.2.8. Estudo químico de <i>Penicillium brevicompactum</i> e <i>Phomopsis longicolla</i>	56
3.3.2.8.1. Cultivo em escala ampliada e obtenção do extrato orgânico.....	56
3.3.2.8.2. Fracionamento cromatográfico do extrato e isolamento das substâncias.....	56
3.3.2.8.2.1. Métodos cromatográficos.....	57

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Isolamento dos micro-organismos endofíticos da espécie <i>Bostrychia radicans</i> ...	59
3.4.2. Linhagens selecionadas de acordo com os aspectos morfológicos.....	59
3.4.3. Rendimento dos extratos.....	61
3.4.4. Avaliação das atividades biológicas.....	62
3.4.4.1. Atividade antifúngica.....	62
3.4.4.2. Atividade antitumoral.....	62
3.4.5. Identificação das espécies de micro-organismos.....	62
3.4.5.1. Seleção das linhagens de acordo com o potencial de atividade biológica.....	62
3.4.5.2. Linhagens identificadas.....	65
3.4.6. Estudo químico de <i>Xylaria</i> sp.....	65
3.4.6.1. Determinação estrutural da substância XS-01 (ácido 2,5-diidroxibenzóico; ácido gentisínico, ácido 5-hidroxisalicílico).....	67
3.4.6.2. Determinação estrutural da substância XS-02 (8-diidroxinaftol 1- <i>O</i> - α -glucopiranosídeo).....	71
3.4.6.3. Determinação estrutural da substância XS-03 (8-metóxi-3-metil-1-isocromanona).....	76
3.4.6.4. Substância XS-04 (identificada como ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico ou ácido pilifórmico).....	81

3.4.7. Estudo químico de <i>Penicillium brevicompactum</i>	86
3.4.7.1. Determinação estrutural da substância PB-D01 (asperfenamato).....	87
3.4.7.2. Determinação estrutural das substâncias PB-H02, PB-H03 e PB-H04.....	94
3.4.7.3. Determinação estrutural da substância PB-H05 (ácido micofenólico).....	114
3.4.8. Estudo químico de <i>Phomopsis longicolla</i>	119
3.4.8.2. Determinação estrutural da substância PL-01.....	119
3.5. CONCLUSÕES	124
4. CAPÍTULO III	125
Avaliação do potencial de atividade biológica das substâncias: ácido micofenólico e dicerandrol C	
5. CAPÍTULO IV	132
Novos metabólitos/toxinas do fungo <i>Botrytis cinerea</i> e o estudo de suas rotas biossintéticas (Trabalho desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche)	
6. CONCLUSÕES GERAIS	161
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

1. Introdução geral

1.1. Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas

Os primeiros registros do uso de produtos naturais pelo homem, na busca pelo alívio e cura de doenças, remetem às escrituras sagradas e a papiros egípcios. No documento conhecido como papiro de Ebers estão enumeradas, além de dezenas de doenças, um grande número de drogas de origem vegetal e animal. Este papiro, publicado por Georg Ebers, foi encontrado próximo à casa mortuária de Ramsés II e considera-se que seja pertencente à época da XVIII dinastia (PINTO et al., 2002).

Diversos autores consideram que o surgimento da fitoquímica ocorreu no ano de 1769, quando houve o isolamento do ácido tartárico a partir de uvas, realizado pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele (CORDELL, 2011). A obtenção da morfina, constituinte majoritário do ópio extraído dos bulbos da papoula (*Papaver somniferum*), por Friedrich Sertürner em 1805; também marcou o início da utilização de substâncias de origem natural na sua forma isolada e purificada (VIEGAS JR et al., 2006; LI & VEDERAS, 2009).

No início do século passado, cerca de 80% de todos os medicamentos eram obtidos a partir de produtos naturais ou derivados. Dentre as classes terapêuticas atuais, aproximadamente 90% foram desenvolvidas a partir de um protótipo de origem natural (McCHESNEY et al., 2007). Como exemplos destas classes, podem ser mencionados: antibióticos (penicilina e tetraciclina), antiparasitas (avermectina), antimaláricos (quinina e artemisina), hipolipidêmicos (lovastatina), imunossupressores (ciclosporina) e antitumorais (taxol, vincristina e vinblastina). Estas substâncias, representadas na Figura 1, foram responsáveis por uma verdadeira revolução na história da medicina (LI & VEDERAS, 2009).

A importância da natureza como fonte de novos fármacos nas últimas décadas foi evidenciada recentemente no artigo de revisão dos pesquisadores Newman e Cragg (2012). Esta publicação apresenta uma análise da origem e desenvolvimento de todas as novas substâncias químicas aprovadas para o uso terapêutico, no período compreendido entre 1981 e 2010. Entre estes fármacos 66% tiveram sua origem relacionada direta ou indiretamente a metabólitos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Sendo assim, o desenvolvimento de agentes terapêuticos modernos constituídos por medicamentos com ações específicas sobre receptores, canais iônicos e enzimas; certamente não teria sido possível sem o aporte dos produtos naturais.

Figura 1. Produtos naturais (incluindo sua origem) que revolucionaram a história da medicina.

1.1.2. Produtos naturais marinhos

A diversidade de organismos oriundos do ambiente marinho constitui uma fonte significativa de substâncias estruturalmente inéditas e biologicamente ativas, dentre as quais, diversas inspiraram o desenvolvimento de novas classes de agentes terapêuticos (Figura 02).

Os produtos naturais marinhos, muitas vezes diferem fundamentalmente daqueles encontrados no ambiente terrestre, por apresentarem estruturas químicas incomuns, exibirem atividade biológica através de mecanismos de ação ainda não elucidados, ou apresentarem vias biossintéticas únicas, não descritas na literatura. Entretanto, a despeito deste potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, os estudos químicos envolvendo organismos marinhos foram intensificados de forma sistemática a partir dos últimos 40 anos (COSTA-LOTUFO et al, 2009; GERWICK & MOORE, 2012; de OLIVEIRA et al., 2012).

A primeira descoberta de um produto natural de origem marinha foi no início da década de 50, quando foram isolados os nucleosídeos espongouridina e espongotimidina a partir da esponja *Cryptotethya crypta* (BERGMANN & BURKE, 1955). O estudo de análogos sintéticos destas substâncias levou ao desenvolvimento dos fármacos ARA-A ou Vidarabina® (antiviral) e ARA-C ou Citarabina® (anticâncer) (NEWMAN et al., 2000). No entanto, somente no final dos anos 70, após a identificação de grandes quantidades de prostaglandinas no octocoral *Plexaura homomalla*, o interesse por estes metabólitos converteu-se em investimento de indústrias farmacêuticas em laboratórios de pesquisa de produtos naturais marinhos (COSTA-LOTUFO et al, 2009).

Em 2004, foi aprovado pelo FDA, o primeiro medicamento produzido diretamente a partir de um produto natural marinho, o peptídeo ziconotídeo, comercializado sob o nome de Prialt® e utilizado no tratamento de dores crônicas (MOLINSKI, 2009). Em 2007, foi aprovado o antitumoral Ecteinascidina 743, um alcalóide tetrahydroquinolínico isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, comercializado sob o nome de Yondelis® (MOLINSKI, 2009).

Além dos exemplos citados no parágrafo anterior, nos quais o fármaco mantém a estrutura original do metabólito isolado, atualmente existem cinco fármacos disponíveis no mercado que são produtos de síntese inspirados no esqueleto químico de produtos naturais marinhos. São estes: os antitumorais ARA-C, Mesilato de Eribulina e Brentuximab vedotina; o antiviral ARA-A; além de ésteres do ácido Omega-3, utilizados para o controle de triglicérides. Ainda, outras treze substâncias, derivadas direta ou indiretamente destes metabólitos secundários, encontram-se em fase clínica de avaliação, conforme descrito na Tabela 1 (GERWICK & MOORE, 2012).

Figura 2. Exemplos de produtos naturais marinhos bioativos

Tabela 1. Produtos naturais de origem marinha aprovados para o uso terapêutico e em fase de avaliação clínica (GERWICK & MOORE, 2012).

Situação	Substância	Natural (PN) ou Derivado (D)	Origem (organismo coletado)	Origem biossintética (hipótese)	Atividade farmacológica
Aprovado pelo FDA	Citarabina (ARA-C)	D	Esponja	Bactéria	Antitumoral
Aprovado pelo FDA	Vidarabina (ARA-A)	D	Esponja	Bactéria	Antiviral
Aprovado pelo FDA	Ziconotídeo	PN	Caracol	Molusco	Analgésico
Aprovado pelo FDA	Mesilato de Eribulina	D	Esponja	Bactéria	Antitumoral
Aprovado pelo FDA	Ésteres do ácido Omega-3	D	Peixe	Microalga	Triglicérides
Aprovado pelo FDA	Trabectedina	PN	Tunicado	Bactéria	Antitumoral
Aprovado pelo FDA	Brentuximab vedotina	D	Molusco	Cianobactéria	Antitumoral
Fase III	Aplidina	PN	Tunicado	Bactéria	Antitumoral
Fase II	DMXBA	D	Verme	Verme?	Cognição/ Esquizofrenia
Fase II	Plinabulina	D	Fungo	Fungo	Antitumoral
Fase II	Elisidepsina	D	Molusco	Bactéria	Antitumoral
Fase II	Zalypsis	D	Nudibrânquio	Bactéria	Antitumoral
Fase II	Glembatumumab vedotina	D	Molusco	Cianobactéria	Antitumoral
Fase I	Salinosporamida	PN	Bactéria	Bactéria	Antitumoral
Fase I	Análogo da Trabectedina	D	Tunicado	Bactéria	Antitumoral
Fase I	SGN-75	D	Molusco	Cianobactéria	Antitumoral
Fase I	ASG-5ME	D	Molusco	Cianobactéria	Antitumoral
Fase I	Hemiasterlina	D	Esponja	Bactéria	Antitumoral
Fase I	Briostatina 1	PN	Briozoário	Bactéria	Antitumoral
Fase I	Pseudopterosinas	PN	Soft coral	Bactéria?	Antitumoral

A pesquisa de produtos naturais marinhos no Brasil teve início na década de 60. A primeira publicação relatando o isolamento de uma substância química a partir de um organismo marinho proveniente da costa brasileira foi em 1963, pelo Professor Bernard

Tursch da Universidade Livre de Bruxelas (Bélgica). O Prof. Tursch foi responsável pelo isolamento do colesterol, a partir da espécie *Echinometra lucunter*, e realizou este trabalho como pesquisador visitante no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BERLINCK et al., 2004).

Em contrapartida, o primeiro estudo químico de micro-organismos marinhos realizado no país é mais recente e data do ano 2000. Este trabalho foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Roberto G. S. Berlinck e descreve o isolamento da lactona *N*-acetil- γ -hidroxivalina a partir do actinomiceto *Streptomyces cebimarensis*; sendo que esta espécie ainda não havia sido descrita na literatura (BERLINCK et al., 2004).

Atualmente existem 23 grupos de pesquisa no país (registrados no diretório de grupos de pesquisa do CNPq, em 2013) que se dedicam a estudos químicos e biológicos de organismos provenientes do ambiente marinho. Entretanto, em se tratando do potencial químico e biológico dos organismos coletados ao longo do extenso litoral brasileiro, ainda existe uma escassez relativa de informações documentadas em artigos científicos. Por conseguinte, este intrigante potencial tem sido alvo de estudos por muitos pesquisadores, o que tem impulsionado o crescimento desta linha de pesquisa no país (PINTO et al., 2002, BERLINCK et al., 2004).

1.1.3. Micro-organismos marinhos

No decorrer das últimas décadas, centenas de metabólitos foram descritos e os produtos naturais marinhos tornaram-se uma subdisciplina bem estabelecida no contexto mais amplo da química de produtos naturais. Desta forma, alguns grupos de organismos marinhos tiveram seus constituintes majoritários caracterizados, o que culminou também na facilidade e assiduidade quanto ao reisolamento de substâncias já descritas (FAULKNER, 2002; GERWICK & MOORE, 2012).

Sendo assim, a atenção de diversos pesquisadores foi voltada para organismos cada vez menores e de acesso dificultado, que anteriormente haviam sido excluídos das coletas e dos trabalhos de investigação (KUSARI & SPITELLER, 2011). Dentre estes estão as cianobactérias marinhas, fungos marinhos e diversos outros grupos de eubactérias marinhas (GERWICK & MOORE, 2012).

A ênfase dada pelos pesquisadores aos micro-organismos pertencentes a este ambiente resultou no conhecimento de uma nova química de produtos naturais. Estes estudos também permitiram a formulação da hipótese de que a produção de muitas substâncias (anteriormente atribuída aos macro-organismos coletados) ocorria de fato a partir do

metabolismo secundário de micro-organismos simbiontes (PIEL, 2009). De acordo com esta hipótese, e conforme descrito na Tabela 1; existe a suspeita de que dentre os fármacos obtidos de produtos naturais marinhos aprovados para o uso terapêutico ou em fase clínica de avaliação para entrarem no mercado farmacêutico, 90% tenham a sua origem relacionada a micro-organismos simbiontes (GERWICK & MOORE, 2012).

O termo simbiose é utilizado usualmente para descrever dois conceitos biológicos distintitos. A definição original de Anton de Bary (1879) estabelece que a simbiose seja uma associação física próxima entre dois organismos pertencentes a espécies diferentes. Entretanto, outros autores estabeleceram posteriormente que este termo se aplica exclusivamente quando há benefício mútuo entre as espécies (PIEL, 2009).

Grande parte dos químicos de produtos naturais adota a definição de Bary e utiliza o termo “mutualismo” para tratar das relações simbióticas benéficas (PIEL, 2009). De forma geral, nestas associações mutualísticas o macro-organismo oferece proteção e nutrientes ao micro-organismo, que por sua vez produz metabólitos bioativos capazes de aumentar a competitividade do macro-organismo em ambientes com intenso estresse biótico e abiótico, como é o caso do ambiente marinho (GUNATILAKA, 2006).

A diversidade química dos metabólitos secundários produzidos por micro-organismos marinhos é muito ampla e deve ser reconhecida como uma fonte expressiva de substâncias bioativas (NEWMAN & CRAGG, 2012). Somente no ano de 2010, foram descritas na literatura mais de 300 substâncias isoladas a partir de micro-organismos que se encontram neste ambiente. Dentre estas publicações estão diversas descrições de novas estruturas químicas, atividade biológica relevante e importantes estudos biossintéticos (BLUNT et al., 2012; HILL, 2012).

Ainda, aliada à exploração da microbiota marinha como fonte de substâncias bioativas ocorreram avanços em diversas abordagens e estratégias na interface entre a química de produtos naturais e a biologia molecular moderna. Atualmente, a ciência é capaz de responder questões acerca da capacidade biossintética dos organismos marinhos, do papel sintético da microbiota na química de produtos naturais de invertebrados marinhos e da bioengenharia de fármacos marinhos (LANE & MOORE, 2011; GERWICK & MOORE, 2012).

1.2. Química e biologia da macroalga marinha *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados a esta espécie

Diante do contexto exposto anteriormente e tendo em vista o potencial de macro e micro-organismos marinhos para isolamento de substâncias bioativas; o presente trabalho apresenta o estudo químico e biológico da macroalga vermelha *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae) e de fungos endofíticos associados a esta espécie.

Além disso, o presente trabalho aborda o estudo biossintético do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, realizado na Universidade de Cádiz (Espanha) com o intuito de evidenciar a importância da interação entre estudos químicos, biossintéticos e a biologia molecular moderna, no contexto da química de produtos naturais.

2. Capítulo I

**Estudo químico e biológico da macroalga marinha *Bostrychia radicans*
(Rhodomelaceae)**

2.1. Introdução

2.1.1. Algas marinhas

As algas marinhas têm sido usadas para fins terapêuticos a mais de 2000 anos, com registros de seu emprego na medicina tradicional chinesa que datam de 200 a.C.. Além disso, as algas marinhas foram amplamente utilizadas no Antigo Egito e na medicina Ayurvedica (FOLMER et al., 2010). Sendo assim, as algas, além de espécies denominadas de forma genérica como “gramas marinhas”, estão entre os primeiros organismos marinhos a serem investigados por químicos de produtos naturais, na procura por substâncias bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (FENICAL & PAUL, 1984; FOLMER et al., 2010).

De forma geral, as algas marinhas possuem hábitos bentônicos, embora existam espécies capazes de sobreviver flutuando na água; como alguns exemplares do gênero *Sargassum* (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002). As algas bentônicas são especialmente influenciadas por diversos fatores biológicos e ambientais, tais como: herbivoria, competição, luz, temperatura, salinidade, períodos de imersão e submersão e disponibilidade de nutrientes. Variações destes parâmetros podem influenciar no crescimento e distribuição espacial das macroalgas, podendo afetar também a susceptibilidade a herbívoros pela alteração de nutrientes ou concentração de metabólitos bioativos (McCLINTOCK & BAKER, 2001).

A evolução de algas marinhas neste ambiente de intenso estresse biótico e abiótico resultou na biossíntese de substâncias que apresentam uma alta diversidade química estrutural, além de importantes funções ecológicas. Diversos metabólitos são conhecidos pela capacidade de inibir a herbivoria, outros possuem função reprodutiva ou mesmo de proteção contra a radiação ultravioleta. Ainda, muitas destas substâncias possuem aplicação na saúde e nutrição humana (McCLINTOCK & BAKER, 2001; CARDOZO et al., 2007).

Dentre os metabólitos secundários bioativos isolados a partir de algas marinhas destacam-se: sesquiterpenos, policetídeos, esteróis, terpenóides, ácidos graxos, carotenóides, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (BHAKUNI & RAWAT, 2005; CARDOZO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

As macroalgas estão taxonomicamente organizadas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes, 13% marinhas), Phaeophyta (algas pardas, 99% marinhas) e Rhodophyta (algas vermelhas, 98% marinhas) (McCLINTOCK & BAKER, 2001).

Uma vez que apenas uma pequena porcentagem das algas verdes pertence ao ambiente marinho, quando comparada às demais divisões, o filo Chlorophyta torna-se o menos representativo na química de produtos naturais deste ambiente. Os isoprenóides constituem a principal classe de metabólitos secundários produzidos por estas algas. Dentre outros metabólitos isolados incluem: carboidratos, acetogeninas e derivados do ácido chiquímico (McCLINTOCK & BAKER, 2001; OLIVEIRA et al., 2012).

Considera-se que o depsipeptídeo kahalalido F seja o metabólito secundário mais notável já isolado de uma alga verde. Inicialmente, esta substância foi obtida a partir do molusco herbívoro *Elysia rufescens*. No entanto, hoje, a verdadeira origem do metabólito é atribuída à clorofícea *Bryopsis* sp., que representa o principal alimento da dieta deste herbívoro (FOLMER et al., 2010). Desenvolvida pela indústria farmacêutica PharmaMar, esta substância alcançou a fase clínica II de desenvolvimento, após haver apresentado atividade antitumoral significativa e um bom índice terapêutico (JANMAAT et al., 2005).

Outras substâncias isoladas a partir de algas verdes apresentam atividade antitumoral promissora, tais como o diterpeno halimedatrial obtido de *Udotea flabellum* e *Halimeda* sp., além do bromofenol isorawsonol de *Avrainvillea rawsonii* (FOLMER et al., 2010).

As algas pardas são quase exclusivamente marinhas e os principais produtos de seu metabolismo secundário são derivados do isopreno. Além de diterpenos de estrutura complexa produzidos pelas feofíceas, estão relatados na literatura: compostos voláteis, fucoïdanos, florotaninos e fucoxantinas. Estas substâncias estão relacionadas às atividades antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticâncer (FOLMER et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Os principais compostos voláteis de algas pardas consistem em hidrocarbonetos de cadeia curta (C8 ou C11), cíclicos ou acíclicos. Estas substâncias (como por exemplo, o dictioteno) desempenham função de feromônios na reprodução sexuada, enquanto seus produtos de decomposição são usados como defesa química pelas algas (McCLINTOCK & BAKER, 2001; RUI & BOLAND, 2010).

Os fucoïdanos são polissacarídeos sulfatados que exibem atividade antiviral frente a diferentes vírus, tais como HIV, herpes simplex (HSV-1 e HSV-2) e citomegalovírus. Há poucos anos, foi isolada uma substância da classe dos fucoïdanos, a partir da alga parda *Cladosiphon okamuranus*; que demonstrou forte atividade frente ao vírus da dengue tipo II (WIJESEKARA et al., 2011).

Além disso, alguns metabólitos secundários de feofíceas são amplamente conhecidos por suas aplicações no desenvolvimento de produtos cosmeceúticos. Dentre estes estão alginatos, florotaninos e fucoxantinas (WIJESINGHE & JEON, 2011).

As algas vermelhas são assim chamadas pela presença do pigmento ficoeritrina, a principal característica do filo Rhodophyta. Estas algas são produtoras prolíficas de substâncias halogenadas com diferentes esqueletos químicos, tais como terpenos, policetídeos, fenóis e hidrocarbonetos voláteis (CABRITA et al., 2010). As algas vermelhas ainda produzem grande quantidade de polissacarídeos sulfatados e derivados do ácido chiquímico e ácidos nucleicos (WIJESEKARA et al., 2011; GÜVEN et al., 2010).

Diversas atividades biológicas estão relacionadas aos produtos do metabolismo secundário de algas vermelhas. O extrato aquoso de *Digenea simplex* foi usado como vermífugo durante séculos na medicina tradicional de países asiáticos. Estudos químicos posteriores resultaram no isolamento do ácido caínico, considerado o principal metabólito ativo deste extrato. Este aminoácido tem recebido grande atenção uma vez que lhe foram atribuídas propriedades neuroativas, culminando em sua utilização como reagente padrão em estudos de distúrbios neurofisiológicos, como Alzheimer, Parkinson e epilepsia (SAKAI et al., 2005; SMIT, 2004).

Em contrapartida, a despeito do uso medicinal, os primeiros estudos químicos de algas foram focados no isolamento de substâncias halogenadas. Neste contexto, o monoterpene halogenado halomona foi isolado a partir da alga vermelha *Portieria hornemanni* (FULLER et al., 1992). Esta substância exibiu atividade frente a diferentes células tumorais e foi considerada como um dos metabólitos mais promissores já isolados de uma alga marinha. Entretanto, seu desenvolvimento como fármaco anticâncer foi interrompido devido a sua baixa solubilidade e difícil obtenção (ADRIANASOLO et al., 2006).

Outra substância halogenada bioativa isolada de algas vermelhas é o diterpeno laurenditerpenol. Esta substância foi obtida a partir do extrato lipídico de *Laurencia intricata* e representa o primeiro produto natural marinho capaz de inibir o fator de transcrição induzível por hipóxia; que despontou há alguns anos como um importante alvo molecular específico de tumores (CHITTIBOYINA ET AL., 2007; JUNG & IM, 2008; NAGLE & ZHOU, 2009). O gênero *Laurencia* é o mais estudado da família Rhodomelaceae. Deste gênero foram descritas várias substâncias com atividade biológica significativa, como o diterpeno citotóxico brasilenol e a acetogenina antibacteriana e citotóxica laurencina, por exemplo.

A Figura 3 ilustra os metabólitos secundários bioativos oriundos de algas marinhas, mencionados anteriormente.

Figura 3. Metabólitos secundários bioativos oriundos de algas marinhas

2.1.2. O gênero *Bostrychia* e a espécie *B. radicans*

Dentre as algas pertencentes ao filo Rhodophyta, a família Rhodomelaceae consiste em uma das mais importantes. Desta família destacam-se os seguintes gêneros: *Polysiphonia*, *Bostrychia*, *Acantophora*, *Laurencia*, *Bryothamnion*, *Herposiphonia*, *Odonthalia*, *Digenea*, *Chondria*, *Dasyclonium*, *Lenormandia*, *Osmundaria*, *Bryocladia*, *Halopytis*, *Vidalia*, *Rhodomela*, *Amansia* e *Alsidium* (DUARTE et al., 2002). Várias espécies da família Rhodomelaceae já foram objeto de investigação química, resultando em uma infinidade de estruturas inéditas isoladas, muitas biologicamente ativas, documentadas em artigos científicos (FUJII et al., 2011; BLUNT, 2011).

O gênero *Bostrychia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) é amplamente distribuído nos ambientes de clima tropical e temperado ao redor do mundo todo. As macroalgas vermelhas deste gênero são frequentemente encontradas em sistemas estuários associadas a manguezais ou vegetações pantanosas salinas (ZUCARELLO & WEST, 2003). Este gênero tem sido estudado extensivamente em termos de sua fisiologia, especialmente no que se refere a sua tolerância à variação de salinidade e à sua biogeografia (ZUCARELLO & WEST, 2003).

No entanto, os estudos químicos publicados relativos ao gênero são bastante restritos e até o ano de 2007 limitavam-se, em sua maioria, a trabalhos relacionados ao metabolismo primário. Estes estudos limitavam-se ao isolamento de carboidratos de baixo peso molecular e polissacarídeos sulfatados; além da investigação visando à busca por determinados aminoácidos (tipo micosporinas) dentre as espécies do gênero (DUARTE et al., 2001; DUARTE et al., 2002; KARSTEN et al., 2007; NOSEDA et al., 1999). Neste aspecto, o grupo de pesquisas da Profa. Dra. Hosana Maria Debonisi, do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho - NPPNS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (LQOAM-NPPNS, FCFRP-USP), têm contribuído com o avanço de informações científicas relativas ao metabolismo secundário de espécies do gênero *Bostrychia* (de FELÍCIO et al., 2008; de FELÍCIO et al., 2010; OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

A investigação química da espécie *Bostrychia tenella*, resultou no isolamento de duas substâncias aromáticas: a substância inédita 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio (representada na Figura 5), bem como do álcool 1- metoxifeniletílico, descrito previamente como um produto de síntese (FELÍCIO et al., 2008). Ainda, foram estabelecidos os constituintes químicos de frações apolares, da mesma espécie, através de análises por CG-EM. Estas frações

demonstraram potencial biológico frente aos parasitas *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* e frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (de FELICIO et al., 2008; de FELICIO et al., 2010).

O estabelecimento do perfil químico dos constituintes voláteis, obtidos por microextração em fase sólida, realizado via CG-EM permitiu a identificação de aproximadamente setenta substâncias em espécies do gênero *Bostrychia*, dentre estas *B. tenella*, *B. calliptera*, incluindo ainda espécimes de *B. radicans* coletados em ambientes bastante distintos, como manguezal e costões rochosos. Este estudo, empregando exemplares de *B. radicans* oriundos de variados habitat, demonstrou que a produção de metabólitos pode ser influenciada por variações ambientais (OLIVEIRA et al., 2009). Em contrapartida, as análises comparativas dos constituintes apolares (CG-EM) e polares (CLAE) dos extratos obtidos de espécimes provenientes de costões rochosos e manguezal, não revelaram diferenças significativas quanto à composição química destes constituintes na espécie em estudo (OLIVEIRA, 2009).

A espécie *Bostrychia radicans* (Figura 4) é uma das espécies mais difundidas do gênero (ZUCARELLO & WEST, 2006). As algas vermelhas desta espécie integram a flora litorânea do Estado de São Paulo e como mencionado anteriormente, habitam diferentes regiões com características peculiares, tais como costões rochosos e manguezais.

Figura 4. Exemplares de *Bostrychia radicans* crescendo sobre árvores do manguezal do Rio Escuro em Ubatuba, São Paulo (foto tirada por Júlio Avanzo, IBOT-SP, durante coleta do grupo do LQOAM em 2008).

O estudo químico da espécie *B. radicans*, realizado no LQOAM, conduziu ao isolamento das substâncias *N*,4-diidroxi-*N*-(2'-hidroxietil)-benzamida e *N*,4-diidroxi-*N*-(2'-hidroxietil)-benzenoacetamida (Figura 5), que até o presente momento são consideradas inéditas na literatura. Neste trabalho, também foram isoladas e/ou identificadas 18 substâncias já descritas na literatura, dentre elas o colesterol, esqualeno, neofitadieno, 4-hidroxibenzaldeído, hidroquinona, 4-metoximetilfenol e ácido 4-hidroxibenzenoacético (OLIVEIRA, 2012).

Figura 5. Substâncias inéditas isoladas de espécies do gênero *Bostrychia*

Ainda, por meio da avaliação das atividades biológicas de extratos e frações da alga marinha *B. radicans* foi possível observar que esta espécie produz substâncias com potencial antitumoral, tripanocida e antifúngico. A fração hexânica do extrato diclorometano: metanol (2:1) de *B. radicans* apresentou potencial de inibição de células tumorais da linhagem HL-60 (leucemia, 104,5 + 0,15 %) semelhante ao do controle positivo, a doxorubicina (104,5 + 0,22 %). Frações apolares provenientes das algas desta espécie apresentaram forte atividade de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Os extratos obtidos destas algas também exibiram uma potente atividade tripanocida e leishmanicida, com valores superiores aqueles demonstrados pelos próprios controles positivos (*Trypanosoma cruzi*: violeta de genciana IC₅₀ = 31,0 µg/mL, Fração diclorometânica IC₅₀ = 5,7 µg/mL e *Leishmania amazonensis*: anfotericina B (IC₅₀ = 304,0 µg/mL), Fração diclorometânica IC₅₀ = 0,6 µg/mL e Fração hexânica IC₅₀ = 7,9 µg/mL) (de OLIVEIRA, 2009).

Diante desta excelente versatilidade quanto ao potencial biológico exibido por este gênero, optou-se por continuar o estudo químico da espécie *Bostrychia radicans*, no intuito de atribuir e estabelecer esta potencialidade às substâncias produzidas por este organismo.

2.2. Objetivos

- Estabelecimento do perfil químico de substâncias de média a alta polaridade de *B. radicans*;
- Avaliação do potencial antimicrobiano, e tripanocida de frações e substâncias isoladas.

2.3. Material e métodos

2.3.1. Especificação do material e equipamentos utilizados

Os solventes orgânicos empregados nos processos de fracionamento e purificação dos extratos e frações foram de grau técnico (purificados por destilação fracionada antes de serem utilizados) e de grau analítico da marca JT Baker. Para a preparação de amostras analisadas por ressonância magnética nuclear foram utilizados solventes deuterados da marca Aldrich, contendo TMS como padrão interno.

As placas cromatográficas comparativas (CCDC) e preparativas (CCDP) foram preparadas aplicando-se uma suspensão de gel de sílica 60 (GF₂₅₄ – Merck) em água destilada na proporção de 1:2 (p/v), sobre placas de vidro de 5x20, 10x20 ou 20x20 cm, obtendo-se camadas de 0,25 mm de espessura de adsorvente para as placas comparativas e 1 mm de espessura para as placas preparativas.

Para a cromatografia líquida a vácuo (CLV) foi utilizada uma coluna com placa sinterizada na parte inferior. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60H e como eluentes foram utilizados n-hexano, acetato de etila, acetona e metanol. Na extremidade inferior da coluna promoveu-se a redução da pressão com o uso de bomba de vácuo.

Os reveladores utilizados nas análises por cromatografia em camada delgada foram: irradiação UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, nebulização com sulfato cérico, anisaldeído sulfúrico ou iodicloroplatinato, seguida de aquecimento da cromatoplaça a 100°C por cinco minutos; além de câmara saturada com iodo ressublimado.

As colunas cromatográficas clássicas (CCC) foram preparadas utilizando como fase estacionária sílica gel Merck (70-230 µm). Para o procedimento de cromatografia em coluna clássica em fase reversa foi utilizada coluna comercial da marca Waters Sep-Pak®, modelo Vac 35cc, contendo 10g de adsorvente C18.

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo SCL-10AVP, equipado com detector de arranjo de diodos UV-Vis DAD Shimadzu, modelo SPD-M10AVP, injetores manual e automático e sistema de integração computadorizada com software CLASS-VP. Foram utilizadas: coluna analítica C18 (4,6 x 250 mm; 5µm) e coluna semipreparativa C18 (20 x 250 mm; 15µm) modelo SHIMPACK ODS(H) KIT, Shimadzu.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos através dos espectrofotômetros Bruker DPX 300 e Bruker DRX 500, na FFCLRP-USP. O técnico responsável pelas análises foi Vinícius Palaretti.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos, na FCFRP-USP, em um espectrômetro de massas UltrO-TOFq (Bruker Daltonics) ESI-q TOF. As análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) foram realizadas em cromatógrafo Proeminence UFLC Shimadzu, equipado com bombas LC-20AD, injetor automático modelo Sil-20A HT, detector de DAD SPD-M20A, acoplado ao espectrômetro de massas com ionização por electrospray microTOF II da marca Bruker. O técnico responsável por estas análises foi José Carlos Tomaz (FCFRP-USP).

As análises em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas, na FCFRP-USP, em aparelho da marca Shimadzu, modelo QP 2010, em um sistema operando via impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250 °C), na FCFRP-USP. Foi utilizada uma coluna DB-5 MS, empregando hélio como gás carreador, o fluxo na coluna de 1,41 mL/min e pressão de 87,1 kPa. A técnica responsável por estas análises foi Izabel Cristina C. Turatti (FCFRP-USP).

As medidas de atividade ótica foram realizadas em polarímetro digital da marca JASCO. As leituras foram realizadas em 589 nm. A técnica responsável por estas análises foi Daniela Engracia (FCFRP-USP).

Para a obtenção do extrato enzimático foram utilizados: pH-metro digital PG 2000, agitador magnético TE-084, banho Dubnoff TE-053, centrífuga refrigerada da marca SORVALL® RC PLUS e microcentrífuga Denver Instrument Force 7.

2.3.2. Coleta das algas

Algas vermelhas da espécie *Bostrychia radicans* foram coletadas no Manguezal do Rio Escuro (23°29'30,0''/ 45°09'46,2''W), em Ubatuba – São Paulo. A coleta foi realizada em novembro de 2009; sendo que a data foi determinada de acordo com a tábua de marés. As algas coletadas foram lavadas em água do mar para remoção de detritos e contaminantes, e posteriormente triadas minuciosamente para separação de epífitas e outras espécies de algas associadas. O material coletado foi congelado e transportado em caixas com isolamento térmico contendo bolsas de gelo ao LQOAM (FCFRP/USP).

O processo de identificação, limpeza e triagem das algas coletadas foi supervisionado pela bióloga Dra. Nair Sumie Yokoya, pesquisadora especialista em taxonomia de algas, vinculada à Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo e colaboradora dos projetos do grupo. Em cada coleta, exemplares da espécie foram devidamente limpos e mantidos em solução de formol (4%), para a confecção de exsicata depositada no herbário SP, Instituto de Botânica de São Paulo sob o número SP371443.

2.3.3. Método

2.3.3.1. Obtenção, fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias

O material algal fresco foi submetido à extração por maceração até o esgotamento, utilizando metanol (volume três vezes superior ao peso do mesmo) como solvente extrator. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura máxima de 40°C. O extrato metanólico foi solubilizado em uma solução de metanol/água (4:1) e filtrado em funil de Büchner, utilizando papel de filtro. Este filtrado foi submetido à partição com os solventes n-hexano e acetato de etila (extração líquido-líquido, Figura 6).

Figura 6. Esquema da extração líquido-líquido do extrato metanólico de *B. radicans*.

A fração hexânica foi analisada por CCDC, CG-EM e RMN de ^1H e uma vez que foram identificadas apenas substâncias já descritas na espécie (de OLIVEIRA, 2009) este material foi reservado para ensaio da atividade antimicrobiana, entretanto não foi procedido seu estudo químico.

A fração acetato de etila foi submetida a fracionamento cromatográfico por CLV, originando 13 subfrações. Todas as amostras obtidas a partir deste fracionamento foram analisadas por CCDC, CG-EM e RMN de ^1H .

Tabela 2. Frações provenientes do fracionamento por CLV da fração acetato de etila do extrato metanólico de *B. radicans*

Frações	Eluente	Peso (mg)
BRM A	Hex 100%	3,4
BRM B	Hex: AcOEt (9:1)	6,9
BRM C	Hex: AcOEt (4:1)	28,2
BRM D	Hex: AcOEt (7:3)	214,7
BRM E	Hex: AcOEt (3:2)	257,7
BRM F	Hex: AcOEt (1:1)	229,4
BRM G	Hex: AcOEt (2:3)	171,4
BRM H	Hex: AcOEt (3:7)	120,1
BRM I	Hex: AcOEt (1:4)	72,5
BRM J	Hex: AcOEt (9:1)	45,0
BRM L	AcOEt 100%	58,0
BRM M	Acetona 100%	385,8
BRM N	MeOH 100%	2155,7

A fração hidro-alcoólica remanescente foi submetida à purificação prévia em resina Amberlite XAD-2. A resina foi inicialmente eluída com água destilada, até a completa eluição dos constituintes de maior polaridade do extrato; para em seguida, ser eluída com metanol exaustivamente. A fração orgânica obtida a partir deste procedimento foi analisada por CLAE-DAD e fracionada por CLAE preparativa.

2.3.3.1.1. Métodos cromatográficos (CLAE)

- Método analítico inicial:

Fase móvel: acetonitrila (ACN) e água (0,5% de ácido fórmico). Gradiente: 0 a 40 minutos (min.); 5 a 100% de ACN. Fluxo: 1 mL/min.

A partir da análise do cromatograma obtido utilizando-se o método analítico inicial, foi feita a otimização do método de acordo com o perfil químico da amostra. Posteriormente, foi realizada a transposição do método analítico para o preparativo.

- Método preparativo:

Fase móvel: ACN e H₂O (0,5% de ácido fórmico). Gradiente: 0 a 60 min: 5 a 60% de ACN; 60 a 70 min: 60 a 100% de ACN; 70 a 80 min: 100% ACN; 80 a 85 min: 100 a 5% de ACN e 85 a 95 min: 5% ACN. Fluxo: 9 mL/min. Comprimento de onda selecionado: 310 nm.

2.3.3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Nígea A. J. Cardoso Furtado, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. As bactérias utilizadas neste estudo são provenientes da American Type Culture Collection (ATCC). A linhagem utilizada no ensaio descrito neste capítulo foi: *Streptococcus mutans* 25175. Foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações.

Foram utilizadas para a preparação dos inóculos e posterior realização dos ensaios, bactérias de crescimento de 24 h nos meios de cultura apropriados. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Em microplacas foram depositados o caldo Mueller Hinton com os extratos ou substâncias a serem testadas nas concentrações de 50 a 400 µg/mL e os inóculos tendo um volume final em todos os poços de 100 µL. A clorexidina foi utilizada como controle positivo.

Foram realizados os controles de esterilidade do caldo, extratos, substâncias testadas e padrões, bem como os controles de crescimento das culturas. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 h. Após o tempo de incubação foi adicionado em cada poço 30 µL de sal de tetrazólio na concentração de 0,02 % preparado em solução aquosa. Para a realização da leitura foi observada a mudança de coloração da mesma através de uma reação de oxi-redução.

2.3.3.3. Avaliação da atividade tripanocida

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP). As formas epimastigotas do parasita *Trypanosoma cruzi* foram obtidas do cultivo axênico do parasito em meio LIT, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, a 28 °C. Após 7 dias cultivo (durante a fase exponencial de crescimento) o sobrenadante contendo as formas epimastigotas foi removido.

Em uma microplaca de 96 poços, o sobrenadante contendo as formas epimastigotas do parasita foi aliquoteado (1×10^7 parasitas/mL), e adicionaram-se as misturas das amostras em análise, nas concentrações de 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500,0 µg/ mL (para extratos e frações) e 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µM (para substâncias isoladas). Após 72 horas de incubação, foi realizada a verificação da atividade biológica utilizando a técnica colorimétrica pelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Foram adicionados 10µL de MTT na concentração de 2,5 µg/mL/poço, com incubação a 28 °C, por 75 minutos, no escuro. Após esse período, adicionou-se uma solução de 10% de dodecil sulfato de sódio e esperou-se 30 minutos. A leitura da microplaca foi realizada em leitor de Elisa (Bio Rad) a 595 nm. Os valores de IC₅₀ foram determinados através de análises de regressão linear.

2.3.3.4. Atividade enzimática de fenolsulfatases em *Bostrychia radicans*

O estudo da atividade enzimática de fenolsulfatases na espécie *Bostrychia radicans*, foi idealizado mediante a observação da presença de metabólitos sulfatados em espécies do gênero *Bostrychia* (FELÍCIO et al., 2008), bem como em demais espécies da família Rhodomelaceae (CARVALHO et al., 2000). Estes experimentos foram realizados em colaboração com a aluna de iniciação científica Débora Munhoz Rodrigues (LQOAM – FCFRP), que realizou estudos biossintéticos com a espécie *Bostrychia tenella*, também sob a orientação da Profa. Dra. Hosana Maria Deboni.

2.3.3.4.1. Obtenção do extrato enzimático de *Bostrychia radicans*

Aproximadamente 20 g da espécie *Bostrychia radicans* (mantida a -20°C), foram triturados com o auxílio de Mixer doméstico e homogeneizados em 120 ml de tampão Tris-HCl

0,1M pH 9,0 contendo 1mM de cisteína (Esquema 1). Este homogeneizado foi transferido para um béquer e submetido à extração por cerca de 4 horas, sob agitação constante. Durante todo o processo a alga foi mantida em banho de gelo (a 4°C) para evitar a desnaturação enzimática. O conteúdo do béquer foi filtrado em gaze e submetido à centrifugação por 20 min. a 5000 g (em centrífuga refrigerada). O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado por 60 min. a 28.000 g, para obtenção do extrato enzimático.

Esquema 1. Obtenção do extrato enzimático de *B. radicans*

2.3.3.4.2. Avaliação da atividade de fenolsulfatases no extrato enzimático de *Bostrychia radicans*

O extrato enzimático foi incubado com dois diferentes precursores sulfatados: 4-metilumbeliferil sulfato e 4-nitrofenil sulfato. Cada extrato foi submetido a quatro condições distintas para cada tipo de precursor (Tabela 3). A primeira condição avalia a atividade enzimática da amostra a partir da adição desta em uma solução contendo o tampão de 0,4 M MES-Tris pH 6,2 e o precursor. As demais situações foram mantidas como controle do experimento. As amostras foram incubadas durante um período de 24 horas (a 27°C), submetidas à ligeira agitação. As reações foram interrompidas através da adição de 1,5 ml de acetato de etila. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Avaliação da atividade enzimática de fenolsulfatases em *B. radicans* Tampão: 0,4 M MES-Tris PH 6,2

Precusores: 4-metilumbeliferil sulfato e 4-nitrofenil sulfato (solução 0,2 M)

Amostra	Enzima (µL)	Precursor (µL)	Tampão (µL)
Ensaio enzimático	800	500	700
Controle 1	800*	500	700
Controle 2	800	-	1300
Controle 3	-	500	1500

*enzima desnaturada (por aquecimento)

2.3.3.4.3. Análises cromatográficas das reações enzimáticas

Os perfis cromatográficos dos ensaios realizados foram obtidos por CLAE-DAD. As amostras foram analisadas em coluna de fase reversa (C-18) e o método utilizado para estas análises foi:

- Fase móvel: MeOH:H₂O. Gradiente: 0,1 a 3 min: 3% de MeOH; 3 a 20 min: 3 a 100% de MeOH; 20 a 23 min: 100% de MeOH; 23 a 25 min: 100 a 3% de MeOH; 25 a 30 min: 3% de MeOH. Fluxo: 1 ml/min.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana e tripanocida de frações obtidas a partir do extrato metanólico de *B. radicans*

As amostras obtidas a partir do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila por CLV (Item 3.3.1) foram avaliadas quanto ao potencial de inibição de micro-organismos responsáveis por infecções bucais (Item 3.3.2, Tabela 4).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo *Streptococcus mutans* (concentração inibitória mínima)

Frações	CIM µg/mL
BRM C	200
BRM D	200
BRM E	200
BRM F	400
BRM G	200
BRM H	400
BRM I	400
BRM J	> 400
BRM L	> 400
BRM M	> 400
BRM N	> 400
BRM AcOEt	> 400
BRM HAlc	> 400
BRM Hex	> 400

*Controle positivo Clorexidina: 1,475 µg/mL.

Os resultados apresentados na Tabela 4 evidenciam que, embora tenham exibido um potencial fraco de atividade antimicrobiana, algumas frações podem conter substâncias ativas (BRM C, D, E e G). A partir deste estudo, as frações que exibiram potencial biológico foram

submetidas a processos de fracionamento visando o isolamento e purificação das substâncias bioativas.

As frações provenientes do extrato metanólico de *B. radicans* e subfrações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila por CLV, também foram avaliadas frente ao parasita *Trypanosoma cruzi* (Item 3.3.3). Neste experimento, apenas a fração BRM G apresentou potencial (brando) de atividade tripanocida ($IC_{50} = 500 \mu\text{g/ mL}$).

2.4.2. Estudo químico da fração acetato de etila de *B. radicans*

As subfrações BRM C, D, E e G; que apresentaram maior potencial de atividade biológica foram caracterizadas quimicamente. Através da análise destas amostras por CCDC, CG-EM e RMN de ^1H , algumas considerações foram solidificadas:

- BRM C: através da análise por CG-EM, observou-se que apesar de possuir como constituinte majoritário um éster de ácido graxo (palmitato de metila), que representa aproximadamente 26 % da fração), a fração BRM C apresenta como demais constituintes principalmente hidrocarbonetos de cadeia saturada (Figura 7). Entretanto, deve ser considerado o fato de que o emprego da técnica hifenada CG-EM apresenta como limitação a análise apenas daquelas substâncias passíveis de serem volatilizadas no gradiente de temperatura empregado (BONATO, 2006). Contudo, através da análise do espectro de RMN de ^1H da amostra, foram observados principalmente sinais nas regiões de δ 0,90 e 1,26 ppm; que correspondem, respectivamente, ao deslocamento químico previsto para hidrogênios metílicos e metilênicos, abundantes em hidrocarbonetos de cadeia saturada e ácidos graxos (cadeia longa). O sinal observado em 3,60 ppm provavelmente corresponde à metila do éster metílico do ácido palmítico (constituente majoritário). Sendo assim, considerou-se a fração devidamente caracterizada e devido à natureza química comum das substâncias identificadas, não se procedeu ao fracionamento cromatográfico visando o isolamento destas substâncias conhecidas.

Figura 7. Constituintes majoritários da fração BRM C (análise CG-EM).

- BRM D: quando analisada por CG-EM, observou-se que esta fração é constituída principalmente por ácidos graxos (Figura 8), sendo o ácido palmítico a substância majoritária (57 %). Nesta fração também foram identificadas as substâncias: 5,6,7,7a-tetraidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona e o éster metílico do ácido 2,4-diidrox-3,6-dimetil-benzóico. Assim como na fração anterior, no espectro de RMN de ^1H de BRM D, foram observados principalmente sinais nas regiões de δ 0,90 e 1,26 ppm. Ainda, observou-se um sinal na região de δ 2,31 ppm, que corresponde ao deslocamento químico esperado para hidrogênios metilênicos vizinhos a ácidos carboxílicos; confirmando assim a presença majoritária de ácidos graxos nesta fração. Ainda, nesta fração, diversamente da fração anterior (BRM C), puderam ser observados indícios de que havia ácidos graxos insaturados, demonstrados por meio de deslocamentos químicos em torno de 5 ppm no espectro de RMN de ^1H . Desta forma, esta fração também não foi submetida a posteriores fracionamentos cromatográficos.

Figura 8. Constituintes majoritários da fração BRM D (análise CG-EM).

Diversas publicações evidenciam a presença de ácidos graxos livres, assim como de ácidos graxos metilados, em algas marinhas (BARNATHAN, 2009). O ácido palmítico e/ou o palmitato de metila já haviam sido identificados nas espécies de macroalgas *Acantophora nayadiformis*, *Polysiphonia denudata*, *Corallina mediterranea*, *Corallina granifera*, *Dictyopteris membranacea* e *Botryococcus braunii* (DE ROSA et al., 2001; DE ROSA et al., 2003; NECHEV et al., 2004; DAYNANDA et al., 2007; EL HATTAB et al., 2007); além de diferentes espécies do gênero *Laurencia* (CARVALHO et al., 2006; KAMENARSKA et al., 2006; LI et al., 2002). O interesse de químicos e bioquímicos nos lipídeos e ácidos graxos de origem marinha é estimulado principalmente pela produção de ácidos graxos poli-insaturados, conhecidos popularmente como as PUFA's (Polyunsaturated fatty acids), que possuem pronunciado potencial biológico, além do valor nutricional (LE GAL e ULBER, 2005). Entretanto, não foram encontrados na literatura

estudos que relacionem diretamente estas substâncias a atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana.

- BRM-E: os principais constituintes da fração BRM E (CG-EM) são substâncias aromáticas com diferentes padrões de substituição (Figura 9). As substâncias encontradas em maior quantidade são o 4-hidroxibenzaldeído (27 %) e o éster metílico do ácido 4-hidroxibenzenoacético (10 %).

Figura 9. Constituintes majoritários da fração BRM E (análise CG-EM).

No espectro de RMN de ^1H desta fração observou-se a presença, na região de hidrogênios aromáticos, de dois dupletos em δ 7,64 e 6,84 ($J = 8,7$ Hz) e dois dupletos em δ 6,97 e 6,68 ($J = 8,3$); ambos com J característico de acoplamento de hidrogênios em posição *orto*; indicando a presença de anéis aromáticos *para* substituídos. Ainda, pode-se observar um simpleto bastante desblindado em δ 9,65; que indica a presença de um hidrogênio característico de grupamento aldeído, uma vez que não houve alterações no espectro de RMN de ^1H quando foram adicionadas gotas de água deuterada, por meio de possíveis trocas isotópicas. Desta forma, e ainda por meio de comparação com dados da literatura (SCHMITT e SCHNEIDER,

1999), conclui-se que os sinais observados no espectro de RMN de ^1H estão de acordo com os deslocamentos químicos esperados para as substâncias majoritárias identificadas por CG-EM.

As substâncias 4-metoximetilfenol e 4-hidroxibenzaldeído haviam sido isoladas previamente dos rizomas de *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae), uma planta medicinal usada para dores de cabeça, epilepsia, reumatismo e outras desordens nervosas (HAYASHI et al., 2002; PYO et al., 2004). Enquanto a substância 4-hidroxibenzaldeído também foi encontrada em outras fontes marinhas tais como a esponja *Anchinoe paupertas* (BOUAICHA et al., 1994) e nas algas vermelhas *Nitophyllum marginata* (SRIDEV et al., 2003), *Laurencia tristicha* (SUN et al., 2006) e *Bostrychia tenella* (de FELICIO et al., 2010); a substância 4-metoximetilfenol apresenta ocorrência mais restrita, não tendo sido relatada em nenhuma espécie de alga marinha. Ainda, é importante ressaltar que, na espécie *B. tenella*, o 4-hidroxibenzaldeído foi identificado em uma fração que demonstrou atividade antifúngica e leishmanicida (de FELICIO et al., 2010).

O éster 4-hidroxibenzoato de metila, também conhecido como metilparabeno, é amplamente utilizado como conservante nas indústrias cosméticas e farmacêuticas devido às suas propriedades microbiostáticas (ANDERSEN, 2008). Esta substância foi isolada como produto natural das folhas de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) (SILVA et al., 2008) e identificado na fração volátil de *Securidaca longepedunculata* (Polygalaceae) (JAYASEKARA et al., 2002).

Este metabólito também foi encontrado no fungo *Cladosporium* sp., associado à alga *Phorphyra yezoensis* (DING et al., 2008); e em uma espécie do gênero *Penicillium* obtida a partir de sedimentos marinhos (LIU et al., 2010). O ácido 4-hidroxibenzenoacético, bem como o éster 4-hidroxibenzenoacetato de metila, já haviam sido isolados anteriormente de *Burkholderia* sp.. Neste estudo, Mao e colaboradores (2006) ainda demonstraram a atividade antifúngica destas substâncias frente a diferentes linhagens de fungos, como exemplo *Colletotrichum gloeosporioides* e *Chaetomium globosum*.

- BRM-G: através da análise por CG-EM, inferiu-se que esta fração é constituída por substâncias aromáticas com padrão de substituição *para*, além de ácidos graxos e esteróis (Figura 10). Ainda, nesta fração destacam-se as substâncias loliolídeo (8 %) e oleamida (menos de 1%). O espectro de RMN de ^1H da fração BRM G reflete a diversidade estrutural identificada na análise anteriormente descrita, uma vez que pode ser observada uma grande quantidade de sinais

abrangendo toda a região espectral. Destacam-se sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e aromáticos.

Figura 10. Constituintes majoritários da fração BRM G (análise CG-EM).

Apesar de terem sido identificadas substâncias já descritas na literatura, o presente estudo contribuiu para o conhecimento químico do gênero *Bostrychia*, bem como da espécie *B. radicans*; além de sugerir um potencial biológico para estas substâncias.

2.4.3. Estudo químico da fração hidro-alcoólica de *B. radicans*

Após a purificação prévia em resina Amberlite, a fração hidro-alcoólica de *B. radicans* foi analisada por CLAE-DAD (Figura 11). Através da análise dos espectros de absorção na região do ultravioleta de cada pico observado inferiu-se que a maior parte destas substâncias provavelmente pertencia à classe dos aminoácidos do tipo micosporinas (SINGH et al., 2008).

As substâncias conhecidas como micosporinas ou MAAs (mycosporyne-like amino acids) são moléculas de baixo peso molecular (geralmente inferior a 400 Da), estruturalmente formadas

por uma unidade dos cromóforos cicloexenona ou cicloexenimina, conjugada a um aminoácido ou aminoálcool. Sendo assim, estas substâncias possuem como principal característica, uma forte absorção de luz ultravioleta nos comprimentos de onda entre 300 e 360 nm (WHITEHEAD e HEDGES, 2003; ROULLIER et al., 2011; CARDOZO et al., 2006).

Durante muitos anos as micosporinas foram caracterizadas e quantificadas em diversos organismos marinhos (fungos, algas e cianobactérias) por CLAE-DAD, através da análise do espectro de absorção na região do UV e co-injeção de padrões (ROULLIER et al., 2011; CARDOZO et al., 2006). Recentemente, a caracterização destas substâncias vem sendo amplamente realizada através de análises por espectrometria de massas (ROULLIER et al., 2011). Na última década, estudos envolvendo o mecanismo de fragmentação de alguns aminoácidos do tipo micosporinas foram descritos na literatura. Estes estudos constituem mais uma importante ferramenta na identificação das micosporinas (WHITEHEAD e HEDGES, 2003; ROULLIER et al., 2011; CARDOZO et al., 2006).

Diante das considerações expostas anteriormente, a fração hidro-alcoólica de *B. radicans* foi analisada por CLAE-DAD-EM. A partir desta análise, inferiu-se a presença dos aminoácidos do tipo micosporinas palitinol (λ_{max} : 331 nm e m/z $[M+H]^+$ 303) e palitina (λ_{max} : 319 nm e m/z $[M+H]^+$ 245), na fração analisada. O espectro de massas e o espectro de absorção de luz ultravioleta destas substâncias estão representados nas figuras 12 e 13.

Figura 11. Cromatograma obtido via CLAE expandido (1 a 20 minutos) da fração hidro-alcoólica de *B. radicans*, a 310 nm.

Figura 12. Espectro de absorção na região do UV (A) e espectro de massas (B), obtidos via CLAE-DAD-EM da substância BRMHA-02, identificada como palitinol.

Figura 13. Espectro de absorção UV (A) e espectro de massas (B), obtidos via CLAE-DAD-EM da substância BRMHA-03 (identificada como palitina).

Uma vez que as análises mencionadas anteriormente permitiram a identificação de apenas duas substâncias presentes na fração, esta amostra foi submetida ao fracionamento por CLAE preparativa. Foram isoladas as substâncias eluídas nos seguintes tempos de retenção: 6,33 min

(BRMHA-00; 0,6 mg); 6,84 min (BRMHA-01; 0,5 mg); 7,37 min (BRMHA-02; 2,7 mg) e 8,55 (BRMHA-03; 0,7 mg).

No entanto, estas substâncias foram isoladas em pequena quantidade e a qualidade dos espectros de RMN permitiu a elucidação estrutural apenas do constituinte majoritário (palititol).

2.4.3.1. Determinação estrutural da substância BRMHA-02

A substância BRMHA-02 apresentou absorção máxima na região UV no comprimento de onda 331 nm (λ max), além de um perfil de absorção característico de aminoácidos pertencentes à classe das micosporinas (MAA, mycosporyne-like amino acids). As MAAs são usualmente produzidas por diversos organismos marinhos, incluindo espécies de algas marinhas do gênero *Bostrychia*. Sendo assim, dados como o tempo de retenção nas análises por CLAE em fase reversa (que reflete a alta polaridade desta substância) e o espectro de absorção no UV, foram essenciais para direcionar a determinação estrutural deste metabólito.

Através da análise do espectro de massas de alta resolução (Figura 20), aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_{13}H_{22}N_2O_6$ (ionização por electrospray no modo positivo, valor observado: m/z $[M+H]^+$ 303,1530; valor teórico: m/z $[M+H]^+$ 303,1556; erro: 8,6 ppm).

No espectro de RMN de 1H (Figuras 15 a 17) foram observados sinais de hidrogênios ligados a carbonos oximetílicos em δ 3,62 e oximetilênicos δ 3,46; δ 3,36 e δ 3,34; além de outros sinais referentes a hidrogênios de grupos metínicos e metilênicos desprotegidos, em δ 3,92 e δ 3,90, que foram atribuídos aos hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio. Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram atribuídos indiretamente através da análise dos mapas de contorno HMQC e HMBC (Figuras 18 e 19). Nos espectros bidimensionais foram observados sinais de carbono referentes a um grupo carbonílico (δ 172,3); duas iminas (δ 159,8 e δ 160,0); além de dois carbonos quaternários (δ 125,5 e δ 70,8); dois carbonos ligados a N (δ 51,1 e δ 47,5); dois grupos oximetilênicos (δ 68,9 e δ 67,4); um grupo oximetílico (δ 59,4); dois grupos metilênicos (δ 34,5) e um grupo metílico (δ 20,8). Estes valores foram comparados com dados obtidos da literatura e resultaram na identificação do palititol (Figura 14).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BRMHA-02 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados de RMN de ^{13}C obtidos da literatura (67,9 MHz, D_2O).

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	^{13}C (δ)	
	BRMHA-02	BRMHA-02*	Literatura**
1		159,8	160,9
2		125,5	126,1
3		160,0	160,4
4a	2,73; d; 17,2	34,5	33,6
4b	2,65; d; 17,2		
5		70,8	71,9
6a	2,90; d; 11,2	34,5	33,9
6b	2,87; d; 11,2		
7	3,46; sl	68,9	68,2
8	3,62; s	59,4	59,9
9	3,92; s	47,5	47,4
10		172,3	175,9
11a	3,36	51,1	50,7
11b	3,34		
12	3,90	67,4	67,4
13	1,19; d; 6,1	20,8	20,2

*dados observados nos mapas de contorno HMQC e HMBC

**Hirata et al., 1979

Figura 14. Estrutura química do palitinol

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da substância BRMHA-02, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 16. Espectro de RMN de ^1H da substância BRMHA-02 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H da substância BRMHA-02 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 18. Mapa de contorno HMQC da substância BRMHA-02 (expandido), 500-125 MHz, CD_3OD .

Figura 19. Mapa de contorno HMBC da substância BRMHA-02 (expandido), 500-125 MHz, CD₃OD.

2.4.4. Atividade enzimática de fenolsulfatases

As reações enzimáticas foram cessadas e as substâncias resultantes da atividade enzimática foram extraídas pela adição de 1,5 ml de acetato de etila, havendo a formação de duas fases. A fração acetato de etila foi concentrada e analisada por CLAE-DAD (2.3.3.3). A análise dos cromatogramas obtidos a partir destas reações indicou a presença de enzimas fenolsulfatases ativas nos extratos enzimáticos de *B. radicans* (Figuras 20 a 23); através da conversão dos precursores sulfatados (4-metilumbeliferil sulfato e 4-nitrofenil sulfato) nos respectivos produtos dessulfatados (4-metilumbeliferona e 4-nitrofenil). Ainda, é importante mencionar que esta conversão não foi observada em nenhum dos controles realizados.

Figura 20. Cromatogramas dos padrões: **A)** 4-metilumbeliferil sulfato ($t_r = 13,92$ min) e **B)** 4-metilumbeliferona ($t_r = 20,77$); CLAE-DAD (320 nm).

Figura 21. Cromatograma do ensaio enzimático com o precursor 4-metilumbeliferil sulfato ($t_r = 20,71$); CLAE-DAD (320 nm).

Figura 22. Cromatogramas dos padrões: **A)** 4-nitrofenil sulfato ($t_r = 5,90$ min) e **B)** 4-nitrofenil ($t_r = 20,56$ min); CLAE-DAD (320 nm).

Figura 23. Cromatograma do ensaio enzimático com o precursor 4-nitrofenil sulfato ($t_r = 20,10$ min); CLAE-DAD (320 nm).

Os compostos sulfatados são metabólitos comuns no ambiente marinho, especificamente encontrados na família Rhodomelaceae. No entanto, até o presente momento, poucos metabólitos secundários sulfatados de algas são conhecidos, sendo as seguintes classes químicas reportadas: glicerídeos, ribosídeos, lipídeos e esteróides, além de um expressivo grupo de fenóis (CARVALHO et al., 2000; CARVALHO et al., 2006; de FELÍCIO et al. 2008; ZHANG et al., 2004). Além disso, uma grande variedade destes compostos sulfatados exibem atividades

biológicas promissoras, tais como, propriedades antivirais, antitumorais, anticoagulantes, e anti-inflamatórias (ZHANG et al., 2004).

As substâncias sulfatadas, principalmente quando ligadas a anéis aromáticos, estão presentes em grande quantidade nos organismos vegetais, sendo responsáveis pela metabolização dos compostos tóxicos a estes organismos. A sulfatação é um modo efetivo de tornar determinadas substâncias solúveis em água, favorecendo, assim, sua excreção (JENSEN & RAGAN, 1978). Esta classe de substâncias é produzida por vias sintéticas derivadas do metabolismo primário, e estão envolvidas em processos de adaptação das espécies ao meio ambiente, sendo de fundamental importância adaptativa (CARVALHO et al., 2000; CARVALHO et al., 2006; KNÖSS & GLOMBITZA, 2007).

Acredita-se que a conjugação com sulfato e posteriormente a degradação desta mesma ligação, para a secreção da substância, possa ser um importante mecanismo adquirido pela alga, contra agentes epífitos e fungos. Assume-se que a formação de ésteres sulfatados ocorra em organismos vegetais a partir da catálise da enzima fenolsulfatase que possui capacidade de originar moléculas orgânicas (fenólicas) sulfatadas nestes organismos. Entretanto, ainda não se tem certeza se estas substâncias são excretadas para o meio ambiente na forma sulfatada ou não, as quais poderiam ser eliminadas sem os grupamentos sulfatados, por meio da ação da mesma enzima fenolsulfatases (KNÖSS & GLOMBITZA, 2007).

2.5. Conclusões

A partir da observação de um potencial de atividade antimicrobiana de frações de média polaridade da espécie *Bostrychia radicans*, foi realizado o estudo químico destas frações, que resultou na identificação de diferentes substâncias tais como: hidrocarbonetos, ácidos graxos e substâncias aromáticas; algumas das quais de grande relevância para a química de produtos naturais, pois ainda não haviam sido identificadas na espécie em estudo. O estudo químico das frações mais polares resultou no isolamento de diversas substâncias, dentre estas um aminoácido do tipo micosporina, além de possíveis análogos; que se encontram em fase de elucidação e/ou determinação estrutural. Ainda, a realização dos estudos biossintéticos preliminares indicaram a presença de enzimas sulfatases ativas na espécie *B. radicans*. A constatação deste sistema enzimático ativo nesta espécie é de grande interesse uma vez que mecanismos de defesas de

organismos marinhos podem estar associados a processos de sulfatação de metabólitos quando estes se encontram em perigo devido à presença de predadores herbívoros. Os compostos sulfatados são metabólitos comuns no ambiente marinho; entretanto, até o presente momento, poucos metabólitos secundários sulfatados de algas são conhecidos. A inclusão do substituinte SO_3^- em uma molécula orgânica ocorre com a finalidade de proporcionar uma mudança das características estruturais para facilitar a excreção desta ao meio externo. Além disso, diversas substâncias sulfatadas exibem interessantes atividades biológicas, conforme mencionado anteriormente.

3. Capítulo II

**Estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos associados à
macroalga marinha *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)**

3.1. Introdução

3.1.1. Fungos como fonte de produtos naturais bioativos

Os fungos são responsáveis pela produção de uma grande variedade de metabólitos bioativos; tendo sido utilizados com aplicação terapêutica, na Ásia e na África, desde tempos remotos (MOLITORIS, 2002). Muitos destes metabólitos desempenharam um importante papel na medicina moderna, revolucionando o tratamento de sérias enfermidades; como por exemplo, o antibiótico penicilina que representou um grande marco no tratamento das infecções bacterianas (BOHILIN et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2010).

Atualmente, estes organismos ainda representam uma fonte significativa de novos fármacos (OSMANOVA et al., 2010). Dentre os medicamentos utilizados no tratamento de doenças infectocontagiosas, destacam-se os antibióticos β -lactâmicos também da classe da penicilina e cefalosporina. Outros exemplos incluem a mevinolina (Mevacor®, ou lovastatina), medicamento utilizado para a redução do colesterol, bleomicinas, daunorubicinas e alcalóides de ergot. Estes micro-organismos ainda destacam-se como produtores de agroquímicos naturais, entre estes as destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas) (PINTO et al., 2002; PUPO et al., 2007).

Não obstante, esta classe de micro-organismos é também responsável pela produção de substâncias altamente tóxicas para mamíferos, conhecidas como micotoxinas, algumas consideradas como potenciais carcinogênicos. Entre as micotoxinas incluem-se aflatoxinas, ocratoxinas, citreoviridinas, tricotecenos e fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos (PINTO et al., 2002).

Os estudos mais recentes nesta área abordam aspectos da biossíntese destes metabólitos, visando compreender os complexos mecanismos regulatórios que controlam a expressão de genes biossintéticos (BONHERT et al., 2010). Ainda, estes trabalhos buscam aplicar de forma mais efetiva o impacto da proteômica e transcriptômica no conhecimento do metabolismo secundário dos fungos (BONHERT et al., 2010). Outra abordagem, amplamente difundida é a aplicação industrial das enzimas destes micro-organismos em processos biotecnológicos, bem como catalisadores na biotransformação de moléculas de baixo peso molecular (BORGES et al., 2009).

3.1.2. Fungos endofíticos

O termo endófito define micro-organismos (fungos ou bactérias) que colonizam o interior de tecidos vegetais saudáveis (ao menos em parte de seu ciclo de vida) sem causar qualquer sintoma, numa relação que pode variar de fitopatogênese latente a simbiose mutualística (TAN; ZOU, 2001; GUNATILAKA, 2006). O primeiro relato da ocorrência de endófitos data de 1904, entretanto apenas recentemente foi descoberta a importância ecológica destes micro-organismos através da produção metabólitos secundários estruturalmente diversos e biologicamente ativos (GUNATILAKA, 2006).

Alguns autores sugerem que a interação entre o fungo endofítico e a planta seja resultante de processos evolutivos planta-patógeno. Existe ainda, a hipótese de que haja um equilíbrio entre o potencial de virulência do fungo e a defesa da planta. Neste caso, se o equilíbrio é perturbado, pode ocorrer uma diminuição da defesa da planta ou o aumento da virulência do micro-organismo, resultando no desenvolvimento de uma enfermidade na planta (SCHULZ et al., 2002; SCHULZ e BOYLE, 2005; BORGES et al., 2009). Neste tipo de associação mutualística, a planta oferece proteção e nutrientes ao endófito, que por sua vez produz metabólitos bioativos capazes de aumentar a competitividade da planta em ambientes com intenso estresse biótico e abiótico (GUNATILAKA, 2006).

A função que estes metabólitos secundários exercem na natureza pode representar aplicações na agricultura, medicina e indústria (STROBEL, 2002). Um estudo realizado com micro-organismos endofíticos e de solo resultou no isolamento de, respectivamente, 51% e 38% de substâncias estruturalmente inéditas. Ainda, 80% dos extratos provenientes de micro-organismos endofíticos demonstraram-se biologicamente ativos, enquanto 64% daqueles oriundos de micro-organismos de solo exibiram atividade; evidenciando assim o potencial dos endófitos (SCHULZ et al., 2002).

A diversidade química dos metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos é muito ampla e inclui policetídeos, derivados do ácido chiquímico, terpenos, esteróis e peptídeos (BORGES et al., 2009). O interesse crescente de químicos de produtos naturais por estas substâncias reflete-se no aumento do número de publicações relacionadas ao tema nos últimos anos. Entre os anos de 2008-2009 foram publicados 113 artigos acerca do metabolismo secundários de fungos endofíticos; entre 2006-2007: 69 artigos; em 2004-2005: 36; em 2003-2002: 14 e em 2000-2001: 18 artigos (ALY et al., 2010). Tan e Zou (2001) relataram em um artigo de revisão, a existência de 138 substâncias isoladas de endófitos, caracterizadas até o ano 2000. Entre os anos de 2001 e 2006, Gunatilaka relatou o isolamento de outras 184 substâncias, das quais 96 eram inéditas (GUNATILAKA, 2006).

Na literatura estão descritos diversos protocolos utilizados para o isolamento de fungos endofíticos (BACON & WHITE, 1996; SCHULZ et al., 1994; BILLS, 1996; ZHANG et al., 2006; KJER et al., 2010). Há informações práticas detalhadas para o isolamento destes micro-organismos a partir de diferentes substratos, incluindo as técnicas usadas, agentes para a desinfecção e meios de cultivo; no entanto não existe uma padronização de métodos. Geralmente, a superfície do material é esterilizada através do tratamento com um forte agente oxidante ou um desinfetante geral por um determinado período de tempo, seguida do enxague em água estéril (ZHANG et al., 2006).

Soluções de hipoclorito de sódio diluído em água (em concentrações que variam de 2 a 10%) consistem no esterilizante de superfície mais frequentemente utilizado. Os agentes oxidantes mais usados incluem 3% H_2O_2 e 2% KMnO_4 . Soluções de etanol (70-95%) também são amplamente usadas (ZHANG et al., 2006). Recentemente foi publicado no periódico Nature Protocols (KJER et al., 2010) um método para o isolamento e cultivo de fungos endofíticos associados a diferentes organismos marinhos (esponjas, algas e plantas de manguezais). Neste protocolo, a etapa de esterilização da superfície é realizada através da submersão do material em etanol 70% por 60-120 segundos e é considerada uma etapa crítica que exige cautela, uma vez que se o tratamento não for feito por tempo suficiente, a esterilização pode ser incompleta. Por outro lado, se o período de submersão for excessivo, pode ocorrer a morte dos micro-organismos (KJER et al., 2010).

3.1.3. Fungos endofíticos obtidos a partir de algas marinhas

Existem na literatura diversos relatos acerca da associação entre algas e fungos (ZUCCARO e MITCHELL, 2005). Entretanto, o estudo químico de fungos endofíticos associados às algas marinhas é relativamente recente, sendo que as primeiras publicações datam de aproximadamente 10 anos (OLIVEIRA et al., 2012).

Dentre os estudos químicos e biológicos de fungos endofíticos associados a algas pardas, destacam-se as atividades antifúngica e antioxidante de derivados do naftaleno e pirona (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2007a, b), macrolídeos que exibem atividade antibiótica promissora (HOLLER et al., 2000; YANG et al., 2006), os derivados benzodiazepínicos com propriedade antioxidante (CUI et al., 2009) e a diversidade estrutural de derivados do benzofurano e lactonas bicíclicas (ABDEL-LATTEF et al., 2003; OSTERHAGE et al., 2002a). Neste contexto, os principais gêneros de feófitas estudados são *Fucus* e *Sargassum*.

Com relação às algas verdes, estão descritos fungos endofíticos isolados a partir de espécies dos gêneros: *Ulva*, *Enteromorpha*, *Codium*, *Blidingia* e *Valonia*. Dentre os metabólitos secundários obtidos destes micro-organismos estão: sesquiterpenos, substâncias aromáticas, além de compostos tricíclicos derivados da citrinina. As substâncias isoladas foram relacionadas às atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica (ELSEBAI et al., 2010; ZHU et al., 2009; EL-BEIH et al., 2007; OSTERHAGE et al., 2000; ALMEIDA et al., 2010; GAMAL-ELDEN et al., 2009).

A partir de fungos endofíticos associados a algas vermelhas destacam-se os macrolídeos do tipo curvularina que exibem propriedades antimicrobianas e algicidas (DAI et al., 2011), diversas classes de terpenos com atividade antimicrobiana (QIAO et al., 2010; GAO et al., 2011a; GAO et al., 2011b), substâncias polioxigenadas antifúngicas, além de esteróis e policetídeos citotóxicos (GAO et al., 2011b; GAO et al., 2011c; WANG et al., 2006). A Tabela 6 lista as substâncias inéditas isoladas a partir de fungos endofíticos associados a algas marinhas do filo Rhodophyta e ilustra esta diversidade química.

Tabela 6. Metabólitos estruturalmente inéditos isolados a partir de fungos endofíticos associados a algas marinhas do filo Rhodophyta.

<i>Alga marinha/ Fungo associado</i>	Substâncias inéditas isoladas
<i>Corallina officinalis/ Aspergillus flavus</i> (Qiao et al., 2011)

Gracilaria folifera/
Curvularia sp.

(Dai et al., 2011)

Liagora viscida/
Drechslera
dematioidea

(Osterhage et al.,
2002)

Kappaphycus
alvarezii/
Mycelium sterilium

(Tarman et al., 2011)

Heterosiphonia
japonica/
Aspergillus oryzae

(Qiao et al., 2010)

 Continuação

Laurencia sp./
Penicillium
chrysogenum

(Gao et al., 2011a,b,c)

Laurencia similis/
Exophiala
oligosperma

(Li et al., 2011)

Plocamium sp./
Acremonium sp.

(Pontius et al., 2008a)

Polyshiponia
urceolata/
Chaetomium
globosum

(Wang et al., 2006)

Diante do que foi exposto, pode-se inferir que o estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos marinhos constitui uma importante ferramenta na busca por novas substâncias bioativas.

3.2. Objetivos

- Isolar e preservar micro-organismos endofíticos associados à espécie *Bostrychia radicans* (proveniente do Manguezal do Rio Escuro, Ubatuba-SP);
- Cultivo em pequena escala de linhagens obtidas a partir de *B. radicans* para avaliação do perfil químico (triagem química) e potencial antitumoral e antifúngico;
- Identificação das espécies de micro-organismos;
- Cultivo em escala ampliada para o estudo químico e biológico das espécies consideradas mais promissoras.

3.3. Material e métodos

O material e os instrumentos utilizados no desenvolvimento deste capítulo estão descritos no item 2.3.1, do Capítulo 2.

3.3.1. Coleta das algas

Algas vermelhas da espécie *Bostrychia radicans* foram coletadas no Manguezal do Rio Escuro, em Ubatuba – São Paulo. A coleta foi realizada em setembro de 2008. As algas coletadas foram lavadas em água do mar e posteriormente triadas. O material algal limpo e triado foi conservado em frascos de vidro contendo água do mar filtrada, suplementada com 200 mg/L de cloranfenicol e esterilizada por autoclavagem. Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao LQOAM (FCFRP/USP).

3.3.2. Metodologia

3.3.2.1. Isolamento dos micro-organismos

O isolamento dos micro-organismos endofíticos foi realizado no LQOAM (FCFRP – USP), em colaboração com a Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo e Profa. Dra. Nígea A. J. C. Furtado, docentes da FCFRP-USP.

Inicialmente, as algas conservadas nos frascos contendo água do mar esterilizada foram submetidas a um processo de desinfecção superficial, realizado através de três metodologias distintas:

I) submersão em etanol 70% por 15 segundos, seguida de três enxagues em água do mar esterilizada.

II) submersão em etanol 70% por 10 segundos; incubação em hipoclorito de sódio por 5 segundos e três enxagues em água do mar esterilizada.

III) submersão em etanol 70% por 5 segundos; incubação em hipoclorito de sódio por 15 segundos e três enxagues em água do mar esterilizada.

A eficácia do método de desinfecção foi analisada por meio da separação de uma alíquota de água da última lavagem, semeada pela técnica de espalhamento nos meios de cultura sólidos utilizados no isolamento dos micro-organismos. As amostras desinfetadas superficialmente foram fragmentadas com uso de pinça e bisturi cirúrgico estéreis e os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meios de cultivo sólidos diferentes: ágar-alga (BRA) e batata-dextrose-ágar (BDA). Todos os procedimentos descritos

anteriormente foram realizados em fluxo laminar para manutenção do ambiente estéril durante a manipulação do material.

O meio BRA foi feito pesando-se 20 g de alga (*B. radicans*), os quais foram fragmentados em liquidificador com 200 mL de água do mar filtrada. Foram adicionados 200mg de cloranfenicol e 15g de ágar, e o volume foi completado com água do mar filtrada para 1000 mL. O meio BDA foi preparado segundo instruções do fabricante, ou seja, 39 g por litro de água do mar filtrada. Foram também adicionados 20 mg de cloranfenicol.

As placas de Petri contendo os fragmentos de alga foram mantidas a 30°C, em estufa bacteriológica e observadas diariamente para verificar o desenvolvimento de colônias de micro-organismos ao redor dos fragmentos. Estes micro-organismos, quando observados, foram imediatamente repicados (e de forma sucessiva) para a obtenção de linhagens isoladas.

3.3.2.2. Preservação das linhagens de micro-organismos isoladas

As linhagens isoladas foram preservadas por meio de duas metodologias distintas: preservação em óleo e água, com o intuito de garantir maior viabilidade a estas linhagens. Nestes procedimentos foram utilizados frascos de penicilina de 10 mL, água do mar e meio BDA esterilizados. Discos de meio contendo os micro-organismos foram retirados com auxílio de “tubos transferidores” esterilizados, e colocados nos frascos de penicilina contendo meio BDA inclinado ou água do mar.

A preservação em água foi finalizada imediatamente ao depósito dos discos nos frascos de penicilina, enquanto que, para a preservação em óleo esperou-se o estabelecimento dos micro-organismos no meio inclinado (aproximadamente uma semana). Posteriormente, foi adicionada vaselina líquida esterilizada e o recipiente devidamente selado.

3.3.2.3. Estabelecimento dos cultivos e obtenção de extratos

Foram separadas duas placas de Petri com meio sólido BDA para cada linhagem isolada selecionada para a obtenção de cultivo em pequena escala. Foram selecionadas inicialmente 10 linhagens, de acordo com aspectos morfológicos apresentados pelos micro-organismos. Uma vez que as placas foram inoculadas, estas foram mantidas em B.O.D. a 30°C durante 7 dias.

3.3.2.3.1. Cultivo em meio sólido

Decorridos os 7 dias de crescimento em placas de Petri, foram transferidos cerca de 10 discos de cada linhagem para um frasco do tipo Erlenmeyer com capacidade de 500 ml,

contendo 90g de arroz parboilizado e 90mL de água do mar, esterilizado por autoclavagem. Os Erlenmeyers foram mantidos a 25°C durante 28 dias. Ainda, foi feito um controle contendo somente arroz parboilizado (acrescido de água do mar) esterilizado.

Após 28 dias, foram então acrescentados 250 mL de metanol para a extração. O material foi submetido à maceração durante 24 horas e filtrado a vácuo utilizando-se filtros de papel. Uma nova alíquota de 250 mL de solvente foi acrescentada para uma segunda extração (24 horas). O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo para obtenção do extrato metanólico. Este extrato foi suspenso em uma solução de metanol/água (8:2) e submetido à partição com os solventes hexano e acetato de etila (extração líquido-líquido).

3.3.2.3.2. Cultivo em meio líquido

Foram transferidos cerca de 10 discos de cada linhagem para um Erlenmeyer com capacidade de 500 ml, contendo 200 ml de caldo de batata-dextrose (BDC), preparado segundo instruções do fabricante, ou seja, 24 g por litro de água do mar filtrada. Os Erlenmeyers foram mantidos a 25°C durante 28 dias. Após 28 dias, foram então acrescentados 200 mL de metanol. Após 24 horas, este material foi filtrado, para separação do micélio, utilizando-se filtros de papel.

A extração dos metabólitos obtidos neste meio líquido foi realizada através de partição com AcOEt do caldo da cultura filtrado, acrescido de metanol. A fase hidro-alcoolica foi devidamente descartada, enquanto a porção AcOEt foi concentrada em evaporador rotativo para obtenção do extrato orgânico.

3.3.2.4. Triagem química dos extratos

Todos os extratos obtidos foram analisados por CCDC em fase normal. As frações hidro-alcoolicas foram solubilizadas em metanol/água 7:3 e eluídas em AcOEt/MeOH/BuOH (6:3:1). Os extratos (BDC) e frações (arroz) acetato de etila foram solubilizados neste mesmo solvente e eluídos em Hex/AcOEt/MeOH (6:3:1), enquanto as frações hexânicas foram eluídas em Hex/AcOEt/MeOH (7:2:1).

3.3.2.5. Avaliação da atividade biológica dos extratos e frações

3.3.2.5.1. Avaliação da atividade antitumoral

Os ensaios para a detecção de atividade antitumoral foram realizados sob a responsabilidade da Profa. Letícia Veras Costa-Lotufo em colaboração com o Prof. Manoel

Odorico de Moraes e Profa. Cláudia do Ó Pessoa no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os pesquisadores vêm atuando no desenvolvimento de novas drogas anticâncer e vacinas, bem como em ensaios de imunomodulação e hipertermia. Inicialmente foi realizado um teste através do método do MTT, utilizando células tumorais das linhagens HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon) e SF-295 (SNC) em concentração única 100 µg/mL, para seleção dos extratos mais ativos. Os extratos selecionados serão testados em diferentes linhagens celulares para quantificação da citotoxicidade e verificação da seletividade em células de diversas origens (leucemia, mama, pulmão, cérebro, próstata, cólon) novamente através do teste do MTT.

Todas as linhagens celulares utilizadas foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI-EUA). Todas as células foram cultivadas em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do National Cancer Institute (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano. É um método rápido, sensível e barato. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

3.3.2.5.2. Avaliação da atividade antifúngica

Os experimentos para avaliação da atividade antifúngica foram realizados sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young do Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Botânica, São Paulo. Os ensaios são realizados por meio de bioautografia utilizando os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (HOMANS & FUCKS, 1970, HOWARD 1983).

Para a atividade antifúngica, os extratos e frações foram aplicados em placa de sílica gel, em diferentes concentrações a fim de estabelecer os limites de detecção de cada amostra. Após a eluição, a fase móvel foi completamente evaporada e a cromatoplaça aspergida com uma solução salina de esporos de *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* em glicose e incubada durante 72 horas em uma câmara úmida e escura a 25 °C. Para a avaliação desta atividade foi realizado um ensaio para visualização do efeito inibitório das substâncias sobre o crescimento dos fungos, usando como padrão a nistatina, na concentração de 1 µg/mL.

3.3.2.6. Identificação dos micro-organismos

A identificação das linhagens de micro-organismos 09, 61 e 63 descritas neste capítulo foi realizada sob a responsabilidade da Dra. Lara Durães Sette, pesquisadora do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), vinculado à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A identificação foi realizada por meio da metodologia de taxonomia molecular.

A identificação das 10, 14, 59 e 60 descritas neste capítulo foi realizada pela empresa Genotyping Biotecnologia LTDA (<http://www.genotyping.com.br>). O laudo foi realizado após extração do DNAr do micro-organismo, amplificação da região 16S do DNAr por PCR, purificação da reação e sequenciamento dos fragmentos purificados.

Placas de Petri contendo meio sólido BDA foram inoculadas com micro-organismos, mantidas a temperatura ambiente durante 7-14 dias e posteriormente enviadas aos laboratórios mencionados.

3.3.2.7. Estudo químico de *Xylaria* sp.

3.3.2.7.1. Cultivo em escala ampliada e obtenção do extrato orgânico

O micro-organismo *Xylaria* sp. foi reativado à partir dos frascos preservados em óleo (Item 3.3.2.2) através da transferência de parte do micélio do micro-organismo preservado para um frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio líquido BDC, com o auxílio de uma alça de platina. O frasco foi mantido à temperatura ambiente até a observação do crescimento do micro-organismo. Em seguida, placas de Petri previamente autoclavadas e preparadas com meio BDA foram inoculadas e mantidas a temperatura ambiente durante 7 dias.

Posteriormente, este micro-organismo foi cultivado em meio líquido (conforme descrito no Item 3.3.2.3.2), em escala ampliada (30 frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL cada, contendo 200 mL de meio líquido BDC).

A extração dos metabólitos expelidos para o meio líquido foi realizada através de partição líquido-líquido entre AcOEt e o caldo da cultura filtrado. A fase orgânica obtida foi concentrada em evaporador rotativo para obtenção do extrato.

3.3.2.7.2. Fracionamento cromatográfico do extrato e isolamento das substâncias

O extrato obtido (1,128 g) foi analisado por CCDC, RMN de ^1H e CLAE-DAD. Através das análises cromatográficas foi observado que o extrato constituía-se quase que totalmente por substâncias de média a alta polaridade. Desta forma optou-se por fracionar o

extrato por CLAE preparativa em fase reversa (Item 2.3.2.1, Capítulo 2). A limpeza do extrato bruto foi realizada por meio da eluição do extrato (MeOH: Água, 9:1) em uma coluna comercial Sep-Pak[®], contendo 10g de adsorvente C18.

O método cromatográfico utilizado na separação por CLAE foi:

- Fase móvel: ACN e água (0,5% de ácido fórmico). Gradiente: 0 a 60 min: 5 a 50% de ACN; 60 a 70 min: 50 a 100% de ACN; 70 a 80 min: 100% ACN; 80 a 85 min: 100 a 5% de ACN e 85 a 95 min: 5% ACN. Fluxo: 9 mL/min.

3.3.2.8. Estudo químico de *Penicillium brevicompactum* e *Phomopsis longicolla*

3.3.2.8.1. Cultivo em escala ampliada e obtenção do extrato orgânico

Para o estudo químico de ambas as espécies de micro-organismos *Penicillium brevicompactum* e *Phomopsis longicolla*, foi utilizada a mesma metodologia de cultivo em escala ampliada e obtenção dos extratos orgânicos. Os micro-organismos foram reativados conforme descrito no item 3.3.2.7.1.

Posteriormente, estes micro-organismos foram cultivados em meio sólido (Item 3.2.3.1), em escala ampliada (10 frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 ml cada, contendo 90 g de arroz). A obtenção do extrato também foi realizada de acordo com o item 3.2.3.1, utilizando para extração uma mistura dos solventes diclorometano e metanol na proporção 2:1.

3.3.2.8.2. Fracionamento cromatográfico do extrato e isolamento das substâncias

Os extratos de *P. brevicompactum* e *P. longicolla* foram analisados por CCDC e RMN de ¹H. Após estas análises, optou-se por fracionar ambos os extratos por CLV (Item 2.3.2.1, Capítulo 2). As subfrações obtidas, bem como os solventes utilizados para eluição estão descritos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico de 8 g do extrato diclorometano/ metanol (2:1) do fungo *Penicillium brevicompactum* por CLV.

Código da amostra	Solvente de eluição	Massa (mg)
PB - A	Hex 100%	24,5
PB - B	Hex: AcOEt (9:1)	1741,1
PB - C	Hex: AcOEt (4:1)	1087,4
PB - D	Hex: AcOEt (7:3)	544,1
PB - E	Hex: AcOEt (3:2)	1282,6
PB - F	Hex: AcOEt (1:1)	1514,3
PB - G	Hex: AcOEt (2:3)	147,4
PB - H	Hex: AcOEt (3:7)	315,4
PB - I	Hex: AcOEt (1:4)	66,6
PB - J	Hex: AcOEt (1:9)	23,9
PB - L	AcOEt 100%	63,3
PB - M	Acetona 100%	390,5
PB - N	MeOH 100%	1035,1

Tabela 8. Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico de 10 g do extrato diclorometano/ metanol (2:1) do fungo *Penicillium brevicompactum* por CLV.

Código da amostra	Solvente de eluição	Massa (mg)
PL - A	Hex 100%	26,8
PL - B	Hex: AcOEt (9:1)	981,4
PL - C	Hex: AcOEt (4:1)	619,1
PL - D	Hex: AcOEt (7:3)	854,1
PL - E	Hex: AcOEt (3:2)	1125,2
PL - F	Hex: AcOEt (1:1)	1180,1
PL - G	Hex: AcOEt (2:3)	596,7
PL - H	Hex: AcOEt (3:7)	255,1
PL - I	Hex: AcOEt (1:4)	125,3
PL - J	Hex: AcOEt (1:9)	92,1
PL - L	AcOEt 100%	121,7
PL - M	Acetona 100%	953,3
PL - N	MeOH 100%	842,3

Todas as frações obtidas a partir da CLV foram analisadas por CCDC, RMN de ^1H e CLAE-DAD. A partir destas análises algumas subfrações foram fracionadas por CLAE preparativa em fase reversa (Item 3.2.1, Capítulo 1).

3.3.2.8.2.1. Métodos cromatográficos

- Método A (utilizado para fracionar a amostra PB - D por CLAE preparativa)

Fase móvel: ACN e água (0,5% de ácido fórmico). Gradiente: 0 a 15 min: 5 a 50% de ACN; 15 a 65 min: 50 a 100% de ACN; 65 a 70 min: 100% ACN; 70 a 75 min: 100 a 5% de ACN e 75 a 80 min: 5% ACN. Fluxo: 9 mL/min.

- Método B (utilizado para fracionar a amostra PB – H por CLAE preparativa)

Fase móvel: ACN e água (0,5% de ácido fórmico). Gradiente: 0 a 15 min: 5 a 65% de ACN; 15 a 65 min: 65 a 100% de ACN; 65 a 70 min: 100% ACN; 70 a 75 min: 100 a 5% de ACN e 75 a 80 min: 5% ACN. Fluxo: 9 mL/min.

- Método C (utilizado para fracionar a amostra PL – I por CLAE preparativa)

Fase móvel: ACN e água (0,5% de ácido fórmico). Gradiente: 0 a 15 min: 5 a 50% de ACN; 15 a 50 min: 50 a 100% de ACN; 50 a 55 min: 100% ACN; 55 a 60 min: 100 a 5% de ACN e 60 a 65 min: 5% ACN. Fluxo: 9 mL/min.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Isolamento dos micro-organismos endofíticos da espécie *Bostrychia radicans*

Através da metodologia descrita no item 3.2.1 foram isoladas 45 linhagens de micro-organismos endofíticos da espécie *B. radicans*. Os três métodos de desinfecção superficial utilizados neste procedimento foram eficientes, uma vez que não foi observado o desenvolvimento de colônias de micro-organismos nas placas semeadas com a água da última lavagem das algas (semeadas pela técnica de “spread plate”) e incubadas. Ainda, todos os métodos permitiram o desenvolvimento de micro-organismos a partir dos fragmentos de alga incubados, não interferindo na viabilidade destes organismos.

O método de desinfecção superficial I (ver item 3.2.1), considerado mais brando, permitiu o isolamento de um maior número de linhagens (67%) de micro-organismos a partir dos fragmentos algais. Por outro lado, apenas 17,5% e 15,5% das linhagens foram isoladas utilizando-se os métodos de desinfecção II e III, respectivamente.

Estes resultados podem ser atribuídos à fragilidade do talo de *B. radicans*; uma vez que, considerando os métodos de desinfecção superficial de forma geral, sabe-se que métodos muito agressivos podem ocasionar a morte dos micro-organismos no interior do tecido vegetal. Por outro lado, a utilização de um método de desinfecção muito brando, pode resultar na desinfecção apenas parcial da parte externa do tecido vegetal. Desta forma a escolha do método de desinfecção superficial para obtenção de endófitos deve ser realizada de acordo com as características morfológicas da espécie do macro-organismo em estudo (KJER et al., 2010).

Com relação aos meios sólidos usados (BDA e Ágar-alga), o meio BDA mostrou-se mais adequado; sendo que neste meio foram isoladas 62% das linhagens. O resultado observado pode ser atribuído à maior riqueza nutricional do meio BDA, em relação ao meio Ágar-alga.

3.4.2. Linhagens selecionadas de acordo com os aspectos morfológicos

A partir das 45 linhagens de micro-organismos endofíticos isolados da espécie *B. radicans*, foram selecionadas inicialmente 09 linhagens de acordo com os aspectos morfológicos observados (Figura 1). Foram excluídas desta seleção inicial as linhagens aparentemente iguais. As linhagens selecionadas foram cultivadas em meio sólido arroz e em meio líquido BDC para análise do perfil químico (Item 3.2.4) e avaliação do potencial de atividade biológica (3.2.5).

Figura 24. Linhagens de micro-organismos endofíticos da espécie *B. radicans* selecionados de acordo com os aspectos morfológicos.

3.4.3. Rendimento dos extratos

O cultivo das linhagens selecionadas em meio sólido e meio líquido resultou na obtenção de 36 extratos e/ou frações. Nas Tabelas 9, 10 e 11 estão descritos os rendimentos dos extratos orgânicos.

Tabela 9. Rendimento das frações hexânicas (cultivo em meio sólido arroz)

Frações	Massa (mg)
AR09HEX	467,1
AR10HEX	173,5
AR14HEX	60,6
AR36HEX	275,5
AR59HEX	96,3
AR60HEX	396,4
AR61HEX	59,3
AR62HEX	227,7
AR63HEX	58,8

Tabela 10. Rendimento das frações AcOEt (cultivo em meio sólido arroz)

Frações	Massa (mg)
AR09AC	4360,0
AR10AC	781,9
AR14AC	318,3
AR36AC	202,5
AR59AC	289,3
AR60AC	159,0
AR61AC	83,7
AR62AC	154,8
AR63AC	72,2

Tabela 11. Rendimento dos extratos AcOEt (cultivo em meio líquido BDC)

Extratos	Massa (mg)
BDC09AC	143,8
BDC10AC	41,4
BDC14AC	38,7
BDC36AC	36,7
BDC59AC	52,9
BDC60AC	46,3
BDC61AC	62,8
BDC62AC	74,0
BDC63AC	65,2

3.4.4. Avaliação das atividades biológicas

3.4.4.1. Atividade antifúngica

O potencial antifúngico dos extratos e frações de micro-organismos endofíticos associados à espécie *B. radicans* foi avaliado através do método da bioautografia, frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Tabela 7). As frações acetato de etila (meio sólido) de diferentes linhagens (09, 10, 14, 36, 59 e 61) apresentaram potencial antifúngico. Com relação às frações hidro-alcoólicas, foi observado potencial apenas na fração AR10HA, sendo que o controle positivo para estas frações (ARBRHA) apresentou o mesmo potencial. As frações que apresentaram maior atividade (potencial forte) foram AR14HEX e BDC09AC.

3.4.4.2. Atividade antitumoral

A atividade antitumoral de extratos e frações de micro-organismos endofíticos associados espécie *B. radicans* foi três linhagens tumorais distintas. Dentre as amostras avaliadas, várias apresentaram atividade antitumoral promissora (porcentagem de inibição acima de 50 % frente à ao menos uma linhagem celular tumoral). As frações que apresentaram maior atividade estão destacadas na Tabela 8 (AR14AC, AR59AC, PDB60AC, AR36HA, PDB59AC).

3.4.5. Identificação das espécies de micro-organismos

3.4.5.1. Seleção das linhagens de acordo com o potencial de atividade biológica

Através dos resultados de avaliação da atividade biológica apresentados anteriormente pode-se inferir que a microbiota endofítica da espécie *Bostrychia radicans* representa uma fonte expressiva de substâncias bioativas. Dentre as nove linhagens avaliadas, oito apresentaram algum potencial de atividade biológica, antifúngica ou antitumoral, (09, 10, 14, 36, 59, 60, 61 e 63).

Entretanto, na etapa de reativação das linhagens a partir dos frascos preservados em óleo e em água (Item 3.2.2), para o posterior envio dos micro-organismos para a identificação; não foi possível estabelecer o cultivo da linhagem 36.

Tabela 12. Potencial antifúngico de extratos e/ou frações dos micro-organismos endofíticos isolados de *B. radicans*

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	RF	<i>C. sphaerospermum</i>	RF
AR09AC	**	0,46	-	-
AR10AC	**/**/*	0,82/0,48/origem	**/**/*	0,42/0,17/0,07
AR14AC	**/**/*	0,72/0,39/0,20	-	-
AR36AC	**	0,09	*	0,70
AR59AC	**/**/*	0,36/0,25	*	0,43
AR60AC	-	-	-	-
AR61AC	**	0,14	*	0,18
AR62AC	-	-	-	-
AR63AC	-	-	-	-
ARBRAC	-	-	-	-
AR09HEX	**/**/*	0,75/0,63	**/**/*	0,61
AR14HEX	**/**/*/**/*/**/*	0,81/0,33/0,28/0,20	*	0,20
AR36HEX	-	-	*	0,20
AR59HEX	-	-	*	0,20
AR60HEX	-	-	*	0,21
AR62HEX	-	-	-	-
AR63HEX	*	0,22	-	-
AR09HA	-	-	-	-
AR10HA	*	origem	-	-
AR14HA	-	-	-	-
AR36HA	-	-	-	-
AR59HA	-	-	-	-
AR601HA	-	-	-	-
AR61HA	-	-	-	-
AR62HA	-	-	-	-
AR63HA	-	-	-	-
ARBRHA	*	0,95	-	-
PDB09AC	**/**/*/**/*	0,95/0,52/0,32	**/**/*	0,23
PDB10AC	-	-	-	-
PDB14AC	-	-	-	-
PDB36AC	-	-	-	-
PDB59AC	-	-	-	-
PDB60AC	-	-	-	-
PDB61AC	**/**/*	0,24/0,12	-	-
PDB62AC	-	-	-	-
PDB63AC	-	-	-	-
PDBBRAC	-	-	-	-

Legenda

* = Atividade fraca

** = Atividade média

*** = Atividade forte

Tabela 13. Atividade antitumoral de extratos e/ou frações dos micro-organismos endofíticos isolados de *B. radicans*

Amostra	MDA-MB-435 GI% (média)	SD	HCT-8 GI% (média)	SD	SF-295 GI% (média)	SD
AR61HEX	-2,11%	9,99%	9,70%	0,55%	15,16%	1,16%
R62HEX	-0,51%	0,64%	24,79%	2,90%	8,63%	1,84%
PDB63AC	17,03%	4,19%	30,90%	1,33%	26,28%	0,73%
AR60AC	11,24%	4,51%	23,30%	0,16%	8,45%	12,48%
AR10HA	5,59%	1,16%	26,85%	1,88%	-0,11%	5,51%
AR61AC	7,60%	5,03%	5,98%	1,88%	11,61%	0,67%
ARBRAC	0,63%	0,84%	16,97%	4,87%	83,78%	17,68%
AR14AC	95,44%	11,60%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
AR09AC	14,39%	3,93%	37,50%	9,42%	6,33%	12,30%
AR36HEX	13,16%	12,24%	30,62%	5,81%	20,53%	0,67%
PDB14AC	51,07%	18,17%	12,47%	15,93%	-7,51%	0,67%
AR62HA	-8,71%	7,09%	2,37%	14,99%	-13,13%	5,57%
AR63HA	82,46%	5,73%	26,29%	4,71%	1,40%	5,32%
AR60HA	1,99%	12,18%	71,69%	0,63%	20,78%	7,40%
AR36AC	30,11%	2,96%	-3,73%	1,02%	-17,24%	0,86%
AR59HEX	4,64%	2,26%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
AR14HEX	15,12%	3,29%	27,18%	3,45%	1,32%	2,63%
AR09HEX	-8,94%	0,06%	32,34%	0,08%	1,10%	11,99%
ARBRHA	22,09%	5,41%	-3,85%	14,84%	-4,13%	8,38%
AR62AC	19,03%	10,63%	-0,35%	10,36%	-8,89%	22,33%
PDB60AC	-26,53%	0,84%	101,55%	6,59%	95,41%	11,75%
AR63AC	106,83%	0,13%	24,29%	5,65%	-1,97%	2,75%
AR61HA	4,64%	3,54%	10,70%	6,67%	-11,66%	5,81%
AR36HA	11,47%	8,83%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
AR59HA	13,98%	5,41%	25,07%	3,92%	20,40%	8,57%
AR14HA	26,19%	4,38%	31,01%	0,71%	-1,06%	14,93%
AR09HA	52,52%	50,90%	17,41%	8,01%	-3,53%	15,11%
AR60HEX	-0,88%	9,54%	19,63%	3,45%	-14,60%	13,03%
PDB61AC	-7,80%	6,83%	42,17%	11,62%	-0,11%	14,44%
PDB62AC	26,51%	21,84%	77,74%	0,55%	58,21%	13,83%
AR63HEX	93,89%	0,39%	3,43%	0,78%	-1,19%	5,45%
PDB59AC	10,42%	5,28%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
PDB36AC	22,68%	1,74%	45,33%	4,63%	17,54%	7,59%
AR59AC	29,47%	2,45%	92,06%	2,28%	72,61%	0,67%
PDB10AC	89,61%	1,16%	35,23%	2,75%	-27,28%	34,14%
AR10HEX	23,36%	22,81%	36,89%	11,07%	-16,81%	15,17%
PDB09AC	30,24%	3,67%	48,60%	2,83%	-9,24%	21,72%
PDBBRAC	42,00%	8,83%	46,44%	0,71%	7,24%	23,37%
AR10AC	40,54%	12,44%	3,37%	6,20%	-8,03%	6,42%

GI = Inibição do crescimento

SD = Desvio padrão

3.4.5.2. Linhagens identificadas

As linhagens de micro-organismos 09, 61 e 63 foram identificadas por taxonomia molecular, sob a responsabilidade da Dra. Lara Durães Sette (CPQBA-UNICAMP). De acordo com o laudo fornecido, foram identificados os seguintes gêneros:

- ✓ Linhagem 09: *Botryosphaeria* sp.
- ✓ Linhagem 61: *Xylaria* sp.
- ✓ Linhagem 63: espécie não identificada da família Nectriaceae. Esta espécie foi considerada possivelmente inédita, no laudo emitido pela pesquisadora responsável pela identificação.

A identificação das linhagens 10, 14, 59 e 60 descritas neste capítulo foi realizada pela empresa Genotyping Biotecnologia LTDA (<http://www.genotyping.com.br>). Foram identificadas as seguintes espécies:

- ✓ Linhagem 10: *Rosellinia subiculata*
- ✓ Linhagem 14: *Glomerella cingulata*
- ✓ Linhagem 59: *Annulohypoxylon stygium*
- ✓ Linhagem 60: *Cladosporium* sp.

Estes resultados evidenciam a ampla biodiversidade da microbiota endofítica da espécie *Bostrychia radicans*, coletada no manguezal do Rio Escuro, em Ubatuba-SP.

Todas as espécies identificadas estão sendo descritas pela primeira vez como fungos endofíticos associados a algas marinhas do gênero *Bostrychia*. Os fungos pertencentes aos gêneros *Botryosphaeria* e *Xylaria* ainda não haviam sido isolados de algas marinhas. Além disso, esta é a primeira descrição das espécies *Rosellinia subiculata*, *Glomerella cingulata* e *Annulohypoxylon stygium* no ambiente marinho.

Os gêneros *Botryosphaeria*, *Rosellinia*, *Glomerella* e *Cladosporium* são conhecidos como fitopatógenos, em uma ampla variedade de plantas hospedeiras. Existem relatos destes fungos também como endófitos de algumas espécies vegetais. Estes dados reforçam o argumento de que os micro-organismos endofíticos estabelecem com o organismo hospedeiro uma relação que pode variar da fitopatogênese latente a simbiose mutualística. Acredita-se então, que exista um equilíbrio entre o potencial de virulência do fungo e a defesa da planta. Quando o equilíbrio é perturbado, pode ocorrer uma diminuição da defesa da planta ou o aumento da virulência do micro-organismo, resultando no desenvolvimento de uma enfermidade na planta.

3.4.6. Estudo químico de *Xylaria* sp.

Os resultados de avaliação da atividade biológica, bem como a triagem química inicial dos extratos e frações obtidos a partir dos micro-organismos endofíticos associados à espécie *B. radicans*, nortearam a escolha da linhagem a ser cultivada em escala ampliada para realização do estudo químico.

Os primeiros resultados obtidos da triagem biológica foram aqueles relacionados à avaliação da atividade antifúngica. Sendo assim a linhagem 61 (*Xylaria* sp.) foi selecionada para o cultivo em escala ampliada, uma vez que apresentou potencial de atividade antifúngica e um perfil químico interessante. Além disso, foi realizada uma revisão da literatura científica relacionada ao gênero *Xylaria* que apresenta um potencial expressivo para a produção de substâncias bioativas.

De acordo com a classificação taxonômica, o gênero *Xylaria* pertence à classe Pyrenomycetes, ordem Xylariales e família Xylariaceae; que consiste de uma grande família de ascomicetos amplamente distribuídos ao redor do mundo, mas que apresentam uma maior representação em ambientes tropicais (QUANG e BACH, 2008). Estes micro-organismos são frequentemente encontrados na natureza crescendo sobre pedaços de madeira, vivendo dentro de plantas ou líquens (como endófitos) ou ainda, habitando ninhos de cupins como fungo associado (YAN et al., 2011).

A família Xylariaceae compreende cerca de quarenta gêneros e o número acurado de espécies não foi determinado, devido à dificuldade de classificação; entretanto mais de 500 linhagens estão descritas na literatura (SILVA et al., 2010). Os fungos pertencentes ao gênero *Xylaria* têm sido fonte de diversas substâncias biologicamente ativas, entre estas: citocalasinas e xyloalenolideos citotóxicos (PONGCHAROEN et al., 2008; YAN et al., 2011), xylocetais inibidores da enzima acetil colinesterase (XU et al., 2008), sesquiterpenos de esqueleto eremofilano com atividade antiviral (SINGH et al., 1999), isocumarinas antioxidantes (QUANG e BACH, 2008) e multiplolideos antifúngicos (WU et al., 2011).

Diante destas considerações, micro-organismo *Xylaria* sp. foi reativado à partir dos frascos preservados em óleo e cultivado em escala ampliada (Item 3.3.2.7.1) para obtenção de seu extrato orgânico.

A partir do fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de *Xylaria* sp., por CLAE preparativa (Figura 25), foram isoladas as substâncias nos seguintes tempos de retenção: 27,0 min (XS-01); 43,8 min (XS-02); 48,6 min (XS-03) e 64,1 min (XS-04). Todas as amostras foram analisadas por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e técnicas bidimensionais.

Figura 25. Cromatograma obtido via CLAE-DAD do extrato AcOEt de *Xylaria* sp., a 205 nm.

3.4.5.1. Determinação estrutural da substância XS-01 (ácido 2,5-diidroxibenzóico; ácido gentisínico, ácido 5-hidroxisalicílico)

Através da análise do espectro de massas de alta resolução (ionização por eletrospray, ESI), aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_7H_6O_4$ (modo negativo, valor observado: m/z [M-H]⁻ 153,0194; valor teórico: m/z [M-H]⁻ 153,0188; erro: -3,9 ppm).

No espectro de RMN de 1H deste metabólito observou-se a presença, na região de hidrogênios aromáticos, de dois dupletos (H-3, δ 6,73 e H-6, δ 7,25) com constante de acoplamento característico de hidrogênios em posição *meta* (2,9 Hz) em posição *orto* (9,0 Hz), respectivamente. Nesta região do espectro, ainda foi observado um duplo duplete (H-4, δ 6,90; $J = 2,9; 9,0$ Hz); integrando para um hidrogênio, com constantes de acoplamento características de acoplamento em posição *meta* (2,9 Hz) em posição *orto* (9,0 Hz). Através da análise do mapa de contornos HMQC, foram atribuídos os valores de deslocamento químico dos carbonos C-3 (δ 118,0), C-4 (δ 123,5) e C-6 (δ 115,9).

Os sinais observados sugerem que a substância é constituída por um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-3 e H-4, ainda sugerem a presença de substituintes doadores de elétrons neste anel.

Os carbonos quaternários observados no mapa de contornos HMBC (δ 115,0; δ 155,0; δ 155,8 e δ 173,6) indicam a presença de dois carbonos aromáticos oxigenados e uma carbonila. Os valores de deslocamento químico destes carbonos e as correlações a longa distância entre estes carbonos e os hidrogênios aromáticos, permitiram a determinação dos substituintes (-OH; -OH; -COOH), bem como seu posicionamento no anel aromático.

A comparação destes dados com a literatura confirma a proposta estrutural da substância ácido 2,5-diidroxibenzóico (TARZI et al., 2008).

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-01 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (200 MHz, CD_3OD).

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)		^{13}C (δ)
	XS-01	Literatura*	XS-01**
1			115,0
2			155,8
3	6,73; d; 9,0	6,80; d; 9,0	118,0
4	6,90; dd; 2,9/9,0	7,00; dd; 3,0/9,0	123,5
5			150,0
6	7,25; d; 2,9	7,30; d; 3,0	115,9
7			173,6

*Tarzi et al., 2008

**Dados obtidos indiretamente através dos mapas de contorno HMQC e HMBC

Figura 26. Estrutura química do ácido 2,5-diidroxibenzóico

Figura 27. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-01, obtido em modo negativo.

Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-01, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-01 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 30. Mapa de contorno HMQC da substância XS-01, 125-500 MHz, CD₃OD.

Figura 31. Mapa de contorno HMBC da substância XS-01 (expandido), 125-500 MHz, CD₃OD.

3.4.6.2 Determinação estrutural da substância XS-02 (8-diidroxinaftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo)

Através da análise do espectro de massas de alta resolução (ionização por eletrospray, ESI), aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_{16}H_{18}O_7$ (ionização por eletrospray no modo negativo, sendo o valor observado m/z $[M-H]^-$ 321,0992 e o valor teórico: m/z $[M-H]^-$ 321,0974; erro: - 5,6 ppm).

No espectro de RMN de 1H desta substância foram observados três sinais na região de hidrogênios aromáticos integrando para seis hidrogênios (δ 6,79; δ 7,28-7,31 e δ 7,47), além de sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos, característicos de açúcares (δ 3,46-5,58). Dentre estes sinais, destaca-se o hidrogênio observado em δ 5,58 (d, J = 3,8 Hz), que devido à sua desblindagem em relação aos demais hidrogênios oximetínicos, sugere a presença de um hidrogênio anomérico, indicando esta unidade de açúcar como um substituinte do anel aromático.

No mapa de contornos HMQC este possível hidrogênio anomérico apresentou correlação com o carbono δ 102,5; sugerindo este açúcar como sendo um *O*-heterosídeo, uma vez que *C*-heterosídeos possuem carbonos anoméricos menos desblindados por estarem ligados a apenas um átomo de oxigênio. Ainda, no mapa de contorno HMQC foram observados os sinais de carbono oximetínicos δ 62,4; δ 70,9; δ 72,8; δ 74,9 e δ 75,4. A comparação do deslocamento químico destes carbonos com dados da literatura permitiu inferir que a unidade de açúcar desta substância é uma glicose (PITTAYAKHAJONWUT et al., 2005). A configuração α da molécula de glicose foi determinada através do valor da constante de acoplamento do sinal de hidrogênio anomérico (J = 3,8 Hz).

No mapa de contornos HMQC e HMBC foram observados dez carbonos com valores de deslocamento químico característicos de carbonos aromáticos δ 111,6; δ 111,8; δ 117,0; δ 120,1; δ 124,2; δ 127,0; δ 128,3; δ 138,3; δ 155,0 e δ 155,9. A análise destes espectros permitiu inferir a presença de um naftaleno 1,8-dissubstituído. O hidrogênio anomérico mostrou correlação com o carbono δ 155,9; enquanto o outro substituinte foi proposto com base no deslocamento químico do carbono aromático oxigenado δ 155,0.

A comparação destes dados com a literatura confirma a proposta estrutural da substância 8-diidroxinaftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-02 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Posição	^1H (δ , mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	XS-02	Literatura *	XS-02 **	Literatura *
1			155,9	154,4
2	6,79; dd; 3,0/5,7	6,78; dd; 3,39/5,38	111,8	110,7
3	7,47; t; 8,0	7,33-7,36; m	111,6	127,4
4	7,28-7,31; m	7,33-7,36; m	127,0	118,7
5	7,28-7,31; m	7,53; dd; 8,28/0,85	128,3	122,8
6	7,47; t; 8,0	7,33-7,36; m	124,2	126,3
7	7,28-7,31; m	7,44; dd; 7,65/0,85	120,1	110,9
8			155,0	153,6
9			117,0	115,5
10			138,3	136,3
1'	5,58; d; 3,8	5,50; d; 3,46	102,5	101,2
2'	3,70; dd; 3,8/9,2	3,52-3,60; m	72,8	74,2
3'	3,46; t; 9,2	3,52-3,60; m	70,9	71,0
4'	3,82; t; 9,2	3,20-3,25; s	75,4	69,5
5'	3,76	3,52-3,60; m	74,9	73,6
6'a	3,88	3,52-3,60; m	62,4	60,8
6'b	3,78	3,72-3,75; m		

*Pittayakhajonwut et al., 2005

**Dados obtidos indiretamente através dos mapas de contorno HMQC e HMBC

Figura 32. Estrutura química do 1,8-di-hidroxinaftol 1- O - α -glucopiranosídeo

Figura 33. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-02, obtido em modo negativo.

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-02, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-02 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-02 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 37. Mapa de contorno HMQC da substância XS-02 (expandido), 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 38. Mapa de contorno HMBC da substância XS-02, 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ^1H - ^1H COSY da substância XS-02, 500 MHz, CD_3OD .

3.4.6.3. Determinação estrutural da substância XS-03 (8-metóxi-3-metil-1-isocromanona)

Através da análise do espectro de massas de alta resolução (ionização por electrospray, ESI), aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_{11}H_{12}O_3$ (ionização por electrospray no modo positivo; valor observado: m/z $[M+H]^+$ 193,0832; valor teórico: m/z $[M+H]^+$ 193,0865; erro: 17 ppm).

No espectro de RMN de 1H deste metabólito observou-se a presença, na região de hidrogênios aromáticos, de dois dupletos (δ 6,89, H-5 e δ 7,05, H-7) e um tripleto (δ 7,53, H-6) com constante de acoplamento característica de hidrogênios em posição *orto* (8,0 Hz). Cada sinal foi integrado para um hidrogênio, indicando a presença de um anel aromático trissubstituído. Através da análise do mapa de contornos HMQC, foram atribuídos os valores de deslocamento químico dos carbonos C-5 (δ 120,5), C-6 (δ 136,3) e C-7 (δ 112,1).

No espectro de RMN de 1H ainda foram observados sinais em δ 2,87 ($J = 11,4$; 16,2 Hz) e δ 2,95 ($J = 3,0$; 16,2 Hz) que correspondem a hidrogênios que acoplam entre si com constante de acoplamento de 16 Hz, característica de hidrogênios geminais (H-4a e H-4b). No mapa de contornos HMQC foi observado que ambos os hidrogênios estão ligados ao mesmo carbono metilênico em δ 36,5. Os demais valores das constantes de acoplamento observados para estes hidrogênios geminais ($J = 3,0$; 11,4 Hz), e as correlações observadas nos espectros bidimensionais corroboram a presença de um sistema cíclico.

No mapa de contorno HMBC foi observada a correlação entre o hidrogênio aromático H-5 (δ 6,89) e o carbono metilênico C-4 (δ 36,5). O hidrogênio aromático H-7 (δ 7,05) apresentou correlação com o carbono quaternário C-9 (δ 114,0) e a carbonila em δ 164,5. O hidrogênio aromático H-6 (δ 7,53) e o hidrogênio oximetílico (δ 3,88) apresentaram correlação com o carbono aromático oxigenado C-8 (δ 162,5). As demais correlações observadas nos espectros bidimensionais, bem como a comparação com dados da literatura permitiram a proposição da estrutura 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-03 (400 e 100 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ , mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	XS-03	Literatura*	XS-03	Literatura*
1			164,5	162,6
2				
3	4,56; m	4,56; qt; 6,3/4,2	76,1	74,1
4a	2,87; dd; 11,4/16,2	2,87; d; 4,7	36,5	36,1
4b	2,95; dd; 3,0/16,2			
5	6,89; dl; 7,2	6,79; d; 7,2	120,5	119,2
6	7,53; dd; 8,0	7,45; dd; 8,7/7,2	136,3	134,4
7	7,05; d; 8,0	6,92; d; 8,7	112,1	110,9
8			162,5	161,3
9			114,0	113,9
10			143,8	142,0
11	3,88; s	3,95; s	56,3	56,2
12	1,44; d; 6,3	1,48; d; 6,3	20,7	20,7

*Klaiklay et al., 2012

Figura 40. Estrutura química da 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona

Figura 41. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-03, obtido em modo positivo.

Figura 42. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-03, 400 MHz, CD_3OD .

Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-03 (expansão I), 400 MHz, CD_3OD .

Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-03 (expansão II), 400 MHz, CD_3OD .

Figura 46. Mapa de contorno HMQC da substância XS-03, 100-400 MHz, CD₃OD.

Figura 47. Mapa de contorno HMBC da substância XS-03, 100-400 MHz, CD₃OD.

3.4.6.4. Substância XS-04 (identificada como ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico ou ácido pilifórmico)

Através da análise do espectro de massas de alta resolução (ionização por electrospray, ESI), aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_{11}H_{18}O_4$ (ionização por electrospray no modo negativo; valor observado: m/z $[M-H]^-$ 213,1148; valor teórico: m/z $[M-H]^-$ 213,1127; erro: -9,8 ppm).

No espectro de RMN de 1H obtido para esta substância foram observados sinais referentes a hidrogênios metilênicos, por meio de um noneto e dois multipletos, referentes aos hidrogênios H-5 (2H, δ 2,22); H-6 (2H, δ 1,48) e H-7/ H-8 (4H, δ 1,34), respectivamente. Neste espectro ainda foram observados dois sinais de hidrogênios metílicos em δ 0,91 e δ 1,29; além de dois hidrogênios metínicos, um ligado a um carbono sp_3 (δ 3,61) e o outro ligado a um carbono sp_2 (δ 6,83).

No espectro de RMN de ^{13}C , foram observados os sinais dos carbonos metilênicos C-5 (δ 29,4), C-6 (δ 29,4); C-7 (δ 32,6); C-8 (δ 23,5) e do carbono metílico C-9 em δ 14,3. Através da análise dos espectros bidimensionais os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos da cadeia $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$ foram determinados.

No mapa de contorno HMBC, observou-se a correlação dos hidrogênios H-2 e H-4 com o carbono carbonílico δ 169,9 (C-10) e dos hidrogênios H-2 e H-11 com a carbonila em δ 177,8 (C-1). O deslocamento químico observado para ambas as carbonilas é característico dos grupamentos: ácido carboxílico, éster ou amida. A ausência de nitrogênio nesta molécula foi confirmada através da análise por CCDC utilizando os agentes reveladores iodocloroplatinato e ninidrina. Além disso, a presença de grupamentos ésteres foi excluída pela ausência de sinais de deslocamento químico de carbonos sp_3 oxigenados. Sendo assim, foi possível inferir a presença dos dois grupamentos ácidos carboxílicos, sendo que o carbono carbonílico menos desblindado, foi atribuído ao ácido carboxílico conjugado com uma ligação dupla.

Ainda no mapa de contorno HMBC foram observadas as correlações dos hidrogênios H-5, ligados ao carbono alílico, com os carbonos da ligação dupla C-3 (δ 134,1) e C-4 (δ 145,1).

As demais correlações observadas nos espectros bidimensionais, bem como a comparação com dados da literatura permitiram a proposição da estrutura do ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico ou ácido pilifórmico.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância XS-04 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (400 e 100 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	XS-04	Literatura*	XS-04**	Literatura*
1			177,8	180,7
2	3,61; q; 7,1	3,63; q; 7,1	38,6	38,0
3			134,1	131,5
4	6,83; t; 7,5	7,02; t; 7,0	145,1	147,9
5	2,22; n; 7,5	2,24; m	29,4	29,3
6	1,48; m	1,34; m	29,4	28,6
7	1,34; m	1,28; m	32,6	32,0
8	1,34; m	1,28; m	23,5	22,9
9	0,91; t; 6,9	0,90; t; 6,9	14,3	14,4
10			169,9	172,5
11	1,29; d; 7,1	1,28; m	16,3	15,1

* Chesters & O'Hagan, 1997

** Dados obtidos indiretamente através dos mapas de contorno HMQC e HMBC

Figura 48. Estrutura química do ácido pilifórmico

Figura 49. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância XS-04, obtido em modo negativo.

Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-04 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da substância XS-04 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C da substância XS-04, 125 MHz, CD_3OD .

Figura 54. Mapa de contorno HMQC da substância XS-04, 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 55. Mapa de contorno HMBC da substância XS-04, 125-500 MHz, CD_3OD .

Com relação à ocorrência dos metabolitos de *Xylaria* sp., que foram isolados e identificados neste trabalho, o ácido 2,5-diidroxibenzóico, também conhecido como ácido gentísico, já havia sido identificado previamente em uma ampla diversidade de fungos e espécies vegetais.

Existem apenas dois relatos na literatura científica acerca do isolamento da substância 8-diidroxinaftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo, a partir de fontes naturais. Dentre estes, está a descrição desta substância como metabólito secundário da espécie *Xylaria mellisii*. Entretanto, os dados espectrais disponíveis na literatura, para esta substância, não coincidem. A divergência entre os dados sugere tratar-se de duas substâncias distintas, provavelmente devido a diferença na estereoquímica da ligação entre a unidade de glicose e a aglicona (Pittayakhajonwut et al., 2005). A análise dos dados espectroscópicos da substância XS-02, bem como a estrutura química proposta, estão de acordo com os dados publicados por Pittayakhajonwut e colaboradores.

As substâncias conhecidas como meleínas foram isoladas inicialmente a partir da espécie *Aspergillus melleus*. Posteriormente, as meleínas foram descritas em diversas espécies do gênero *Xylaria*, têm sido apontada como marcadores da família Xylareaceae. A substância 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona, também conhecida como meleína metil éter, já havia sido identificada anteriormente no gênero *Xylaria* species (Klaiklay et al., 2012). O ácido pilifórmico, identificado por Anderson e colaboradores em 1985, é também conhecido como um importante metabólito presente em diferentes gêneros da família Xylareaceae (Chesters & O'Hagan, 1997).

3.4.7. Estudo químico de *Penicillium brevicompactum*

O isolamento dos micro-organismos endofíticos foi realizado no LQOAM (FCFRP – USP), envolveu além do presente trabalho, o estudo de linhagens isoladas também da espécie *Bostrychia radicans* coletada nos costões rochosos da Praia Dura, em Ubatuba-SP e o estudo de linhagens isoladas da espécie *Bostrychia tenella*.

O estudo químico inicial das espécies *Penicillium brevicompactum* e *Phomopsis longicolla* isoladas da espécie *B. radicans* coletada nos costões rochosos foi desenvolvido pela aluna de doutorado Cíntia Ebert (tese depositada no ano de 2011), sob a supervisão da Profa. Dra. Hosana M. Deboni. Em vista do potencial químico e biológico destas espécies, optou-se por dar continuidade à investigação química das mesmas.

Sendo assim a espécie *Penicillium brevicompactum* foi reativada e cultivada em escala ampliada para obtenção do extrato orgânico. A partir do fracionamento cromatográfico da fração PB-D de *Penicillium brevicompactum*, por CLAE preparativa foi isolada a substância PB-D01 em 45,1 minutos (tempo de retenção). O fracionamento cromatográfico da fração PB-H resultou no isolamento das substâncias nos seguintes tempos de retenção: 21,4 min (PB-H02); 24,2 (PB-H03); 28,8 (PB-H04) e 31,4 (PB-H05).

3.4.7.1. Determinação estrutural da substância PB-D01 (asperfenamato)

Através da análise do espectro de massas de alta resolução (ionização por eletronspray, ESI), aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_{32}H_{30}N_2O_4$ (ionização por eletronspray no modo positivo; valor observado: $m/z [M+H]^+$ 507,2334; valor teórico: $m/z [M+H]^+$ 507,2284; erro: 9,8 ppm).

O espectro de RMN de 1H deste metabólito apresentou sinais na região de aromáticos, integrando, no total, para aproximadamente vinte hidrogênios. Estes dados, aliados à multiplicidade destes sinais, permitiu inferir a presença de quatro anéis aromáticos monossustituídos. Nesta região do espectro de RMN de 1H , foram observados dois dupletos relativamente desblindados em δ 7,70 e δ 7,65, integrando para dois hidrogênios cada; que correspondem aos hidrogênios aromáticos em posição *orto* ao substituinte sacador de elétrons (H-2 e H-6; H-2' e H-6'). Os sinais observados entre δ 7,30 e δ 7,50 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos em posição *meta* e *para* em relação a este mesmo substituinte (H-3 e H-5; H-3' e H-5'; H-4; H-4'). Os demais sinais entre δ 7,21 e δ 7,33, integrando para dez hidrogênios, foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel $CH_2-C_6H_5$. Além disso, neste espectro foram observados sinais de hidrogênio ligado a carbono oximetilênico (δ 4,54 e δ 4,03) e a carbono metínico ligado a um átomo de nitrogênio (δ 2,89 a δ 3,39). A presença de nitrogênio nesta molécula foi confirmada através da análise por CCDC utilizando os agentes reveladores iodocloroplatinato e ninidrina.

A análise das correlações a curta ($^1J_{CH}$) e longa ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) distância observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC, principalmente as correlações apresentadas pelos hidrogênios α , β e γ ; além da comparação com dados da literatura, permitiram propor a estrutura do asperfenamato.

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-D01 (500 e 125 MHz, CDCl_3), comparados com dados obtidos da literatura (500 e 67,5 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	PB-D01	Literatura*	PB-D01	Literatura*
1			133,2	133,3
1'			134,3	134,2
1''			137,2	137,7
1'''			135,8	135,1
2 e 6	7,70; dl; 7,5	7,68; dd; 8,0/1,5	127,1	127,1
2' e 6'	7,65; dl; 7,5	7,64; dd; 8,0/1,5	128,9	127,0
2'' e 6''	7,21 a 7,33	7,20 a 7,27	129,3	129,3
2''' e 6'''	7,21 a 7,33	7,20 a 7,27	128,7	129,1
3 e 5	7,39; t; 7,5	7,30; dd; 8,0/1,5	129,2	128,6
3' e 5'	7,30***	7,37; dd; 8,0/1,5	126,9	128,6
3'' e 5''	7,21 a 7,33	7,20 a 7,27	129,3	128,7
3''' e 5'''	7,21 a 7,33	7,20 a 7,27	128,7	128,7
4	7,43; tl; 7,5	7,41; tt; 8,0/1,5	131,4	132,0
4'	7,50; tl; 7,5	7,48; tt; 8,0/1,5	132,1	131,3
4''	7,21 a 7,33	7,20 a 7,27	128,7	127,1
4'''	7,21 a 7,33	7,20 a 7,27	128,7	127,1
α	4,91; q; 6,5	4,90; q; 7,0	54,5	54,4
α'	4,61; m	4,60; dddd; 8,0/6,5/4,0/3,5	50,3	50,2
βa	3,29; dd; 6,5/ 13,5	3,27; dd; 6,5/14,0	37,5	37,5
βb	3,21; dd; 6,5/13,5	3,19; dd; 7,0/14,0		
$\beta'\text{a}$	3,00; dd; 6,5/13,5	2,98; dd; 6,5/14,0	37,3	37,2
$\beta'\text{b}$	2,89; dd; 6,5/13,5	2,87; dd; 8,0/14,0		
γa	4,54; dd; 11,0/3,0	4,52; dd; 11,0/3,5	65,5	65,4
γb	4,03; dd; 11,0/3,9	4,02; dd; 11,0/4,0		
C=O			167,2**	167,2
benzamidas				
C=O éster			171,9**	171,9

* Catalán et al., 2003

** dado observado no mapa de contornos HMBC

*** sinal encoberto

Figura 56. Estrutura química do asperfenamato

Figura 57. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-D01, 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-D01 (expansão I), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 59. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-D01 (expansão II), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 60. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-D01 (expansão III), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C da substância PB-D01, 125 MHz, CDCl_3 .

Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C da substância PB-D01 (expansão I), 125 MHz, CDCl_3 .

Figura 63. Mapa de contorno HMQC da substância PB-D01, 125-500 MHz, CDCl_3 .

Figura 64. Mapa de contorno HMBC da substância PB-D01, 125-500 MHz, CDCl_3 .

Figura 65. Mapa de contorno HMBC da substância PB-D01(expansão I), 125-500 MHz, CDCl_3 .

Figura 66. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-D01, obtido em modo positivo.

3.4.7.2. Determinação estrutural das substâncias PB-H02, PB-H03 e PB-H04

A análise do espectro de massas de alta resolução permitiu estabelecer a fórmula molecular destas três substâncias como sendo $C_{21}H_{23}N_3O_3$ (ionização por electrospray no modo positivo). Os valores observados de m/z foram: $[M+H]^+$ 366,1810 (PB-H02); $[M+H]^+$ 366,1808 (PB-H03) e $[M+H]^+$ 366,1809 (PB-H04); sendo que o valor teórico é m/z $[M+H]^+$ 366,1818).

A partir da fórmula molecular estabelecida, o índice de insaturação destas três substâncias foi calculado através da determinação da fórmula molecular do hidrocarboneto acíclico saturado contendo 21 átomos de carbono (corrigida pela presença de três átomos de nitrogênio na fórmula molecular das substâncias desconhecidas). A diferença entre o número de átomos de hidrogênio das fórmulas moleculares, dividida por dois, resultou em um índice de insaturação igual a doze.

A determinação estrutural da substância PB-H03 será discutida antes das demais, com o intuito de facilitar a compreensão. No espectro de RMN de 1H da substância PB-H03 observou-se a presença, na região de hidrogênios aromáticos, de um duplete integrando para dois hidrogênios (δ 7,45, H-4 e δ 7,43, H-6) e dois tripletos integrando para um hidrogênio cada (δ 6,70, H-5 e δ 6,83, H-7), indicando a presença de um anel aromático dissustituído. Os deslocamentos químicos destes hidrogênios aromáticos indicam a presença de um substituinte doador de elétrons na posição C-24 e um substituinte sacador de elétrons na posição C-23.

A análise detalhada deste espectro e dos espectros bidimensionais sugeriu a ausência de outras ligações duplas C=C. Em contrapartida, no mapa de contorno HMBC, foram observados três sinais de carbonos carbonílicos (C=O). O deslocamento químico destes carbonos, bem como os átomos de nitrogênio observados na fórmula molecular, indicou a presença de um grupamento cetona em δ 201,5 (C-3) e duas amidas em δ 170,5 (C-11) e δ 173,8 (C-17).

O índice de insaturação calculado, associado a estas observações iniciais, norteou para a possibilidade da presença de outros cinco anéis na molécula em estudo. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos corroboram a presença dos anéis. Sendo assim, através do conhecimento prévio relativo às classes de metabólitos encontradas no gênero *Penicillium*, foi sugerida a presença de um anel indólico oxigenado na posição C-3 e um anel dicetopiperazínico.

A proposta da estrutura brevianamida A foi possível através da comparação dos dados espectrais desta substância com dados descritos na literatura.

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância PB-H03 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ , mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	PB-H03	Literatura *	PB-H03 **	Literatura *
1				
2			79,0	76,5
3			201,5	206,1
4	7,45; d; 7,8	7,50; d; 7,5	123,5	124,5
5	6,70; t; 7,8	6,33; dd; 8,0/7,5	117,4	117,9
6	7,43; d ***	7,37; ddd; 8,0/7,5/1,0	137,6	137,6
7	6,83; d; 8,2	6,75; d; 8,0	111,1	111,2
8a	2,43; d; 15,5	2,08; d; 14,5	35,7	34,8
8b	2,68; d; 15,5	2,76; d; 14,5		
9			67,3	65,2
10				
11			170,5	169,9
12			69,3	68,8
13a	1,90; m	2,00; m	28,5	30,4
13b	2,63; m	2,67; ddd; 12,5/7,0/5,2		
14a	1,99-2,06; m	1,85-2,00; m	24,4	24,5
14b	1,99-2,06; m	1,85-2,00; m		
15a	3,42; t; 6,7	3,30-3,50; m	43,8	43,8
15b	3,42; t; 6,7	3,30-3,50; m		
16				
17			173,8	173,9
18			48,6	45,2
19	2,56; dd; 10,4/10,0	3,09; dd; 10,0/8,0	54,5	55,8
20a	1,79; dd; 13,0/11,0	1,54; dd; 13,0/8,0	27,6	29,5
20b	2,02	1,77; dd; 13,0/8,0		
21	1,07; s	0,81; s	17,4	19,1
22	0,80; s	0,73; s	21,2	23,2
23			119,7	118,5
24			161,1	161,2

*Williams et al., 1998

**Dados obtidos indiretamente através dos mapas de contorno HMQC e HMBC

***Sinais sobrepostos

Figura 67. Estrutura química da substância brevianamida A

Figura 68. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H03, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 69. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H03 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 70. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H03 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 71. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H03 (expansão III), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 72. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H03, 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 73. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H03 (expansão I), 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 74. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H03, 125-500 MHz, CD₃OD.

Figura 75. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-H03, obtido em modo positivo.

No espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04, notou-se a presença de um sinal característico de hidrogênio ligado a carbono sp_2 (ligação dupla $\text{C}=\text{C}$) em δ 5,89; que não foi observado no espectro de RMN de ^1H da substância PB-H03. No mapa de contorno HMQC foi observada a correlação deste hidrogênio com o carbono em δ 104,1 (C-8). Em contrapartida, os sinais correspondentes aos hidrogênios geminais ligados ao carbono C-8 da substância PB-H03 (com constante de acoplamento de 15,5 Hz), não foram observados no espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04.

Neste espectro, a presença dos dois dupletos em δ 0,84 (H-21) e δ 0,91 (H-22), bem como as correlações observadas entre estes hidrogênios e os carbonos C-18 e C-20 no mapa de contorno HMBC, indicam a presença de um grupamento isopropila, que não está presente na estrutura química de PB-03.

Ainda no mapa de contorno HMBC, foram observados três sinais de carbonos carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$). O deslocamento químico destes carbonos, bem como os átomos de nitrogênio observados na fórmula molecular, indicou a presença de duas amidas em δ 174,0 (C-11) e em δ 169,8 (C-17); sendo que o carbono carbonílico mais desblindado (em δ 187,8), foi atribuído à cetona α,β -insaturada C-3. Sendo assim, o deslocamento químico do carbono C-3 representa outra diferença significativa entre os dados espectrais das substâncias PB-H03 e PB-H04.

A análise das demais correlações a curta ($^1J_{\text{CH}}$) e longa ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) distância observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC, permitiram propor a estrutura da brevianamida C.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-H04 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (60 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ , mult; J -Hz) PB-H04	^1H (δ , mult; J -Hz) Literatura****	^{13}C (δ)* PB-H04	^{13}C (δ) – HMBC PB-H04
1				
2			***	
3			187,8	
4	7,59; dl; 8,0	6,8-7,7	125,2	137,8; 155,8
5	6,88; dt; 8,0/1,0	6,8-7,7	120,4	112,6; 120,7
6	7,47; dt; 8,0/1,0	6,8-7,7	137,8	125,2; 155,8
7	6,97; dl; 8,0	6,8-7,7	112,6	120,4
8	5,89; s	5,93	104,1	46,0; 187,8
9			67,0	
10				
11			174,0	
12			67,7	
13a	1,93; dd	2,8; m	29,6	24,9; 45,0; 67,7; 174,0
13b	2,67**	2,8; m		
14a	1,99; m	1,7-2,5; m	24,9	67,7
14b	2,08; m**	1,7-2,5; m		
15a	3,43-3,51; m	3,48; m	45,0	24,9; 29,6; 169,8
15b	3,43-3,51; m	3,48; m		
16				
17			169,8	
18	2,66**		46,0	28,6; 31,4; 168,9
19a	1,99; m	1,7-2,5; m	31,4	28,6; 46,0; 67,0
19b	1,77; m	1,7-2,5; m		
20	2,08; m**	1,7-2,5; m	28,6	67,0
21	0,84; d; 6,7	0,84; d	15,8	21,9; 28,7; 46,0
22	0,91; d; 6,7	0,84; d	21,9	15,8; 28,7; 46,0
23			120,7	
24			155,8	

* Dados obtidos indiretamente através dos mapas de contorno HMQC e HMBC

** Sinais sobrepostos

*** Sinal não observado

**** Birch & Russel, 1972

Figura 76. Estrutura química da substância brevianamida C

Figura 77. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 78. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 79. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 80. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04 (expansão III), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 81. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H04 (expansão IV), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 82. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H04, 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 83. Mapa de contorno HMJC da substância PB-H04 (expansão I), 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 84. Mapa de contorno HMJC da substância PB-H04 (expansão II), 125-500 MHz, CD_3OD .

Figura 85. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H04, 125-500 MHz, CD₃OD.

Figura 86. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H04, 125-500 MHz (expansão I), CD₃OD.

Figura 87. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H04, 125-500 MHz (expansão II), CD_3OD .

Figura 88. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-H04, obtido em modo positivo.

No espectro de RMN de ^1H , bem como nos espectros bidimensionais, da substância PB-H02, foram observados sinais correspondentes àqueles observados nos espectros da substância brevianamida A (observação de deslocamentos químicos semelhantes). Notou-se que a diferença significativa entre os dados espectrais restringia-se aos deslocamentos químicos da carbonila cetônica C-2/C-3 e do carbono quaternário C-23/C-24.

Através de uma revisão da literatura científica publicada acerca das brevianamidas e outros metabólitos secundários estruturalmente relacionados, observou-se que enquanto as brevianamidas eram resultado da oxidação na posição 3 do anel indólico, diversos outros metabólitos relacionados produzidos por diferentes gêneros de fungos eram consequência da oxidação na posição 3 do anel indólico.

Sendo assim, as correlações a curta ($^1J_{\text{CH}}$) e longa ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) distância observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC, bem como a comparação com dados da literatura, permitiram a *proposta* da estrutura brevianamida oxindol.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-H02 (500 e 125 MHz, CD_3OD), comparados com dados obtidos da literatura (300 e 75 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ , mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	PB-H02	Brevianamida A [*]	PB-H02 ^{**}	Brevianamida A [*]
1				
2			182,7	76,5
3			67,8	206,1
4	6,87; dl; 7,7	7,50; d; 7,5	109,1	124,5
5	7,22; dl; 7,7	6,33; dd; 8,0/7,5	128,2	117,9
6	7,02; dl; 7,7	7,37; ddd; 8,0/7,5/1,0	121,1	137,6
7	7,37; dl; 7,7	6,75; d; 8,0	126,0	111,2
8a	2,07; d; 15,0	2,08; d; 14,5	33,7	34,8
8b	3,03; d; 15,0	2,76; d; 14,5		
9			62,8	65,2
10				
11			170,5	169,9
12			69,3	68,8
13a	1,91; m	2,00; m	28,5	30,4
13b	2,64; m	2,67; ddd; 12,5/7,0/5,2		
14a	2,04-2,07; m	1,85-2,00; m	24,3	24,5
14b	2,04-2,07; m	1,85-2,00; m		
15a	3,40-3,45; m	3,30-3,50; m	43,4	43,8
15b	3,40-3,45; m	3,30-3,50; m		
16				
17			174,1	173,9
18			46,9	45,2
19	3,39	3,09; dd; 10,0/8,0	50,8	55,8
20a	1,77	1,54; dd; 13,0/8,0	28,0	29,5
20b	1,99	1,77; dd; 13,0/8,0		
21	1,08; s	0,81; s	19,7	19,1
22	0,80; s	0,73; s	22,1	23,2
23			142,3	118,5
24			129,4	161,2

^{*}Williams et al., 1998

^{**}Dados obtidos indiretamente através dos mapas de contorno HMQC e HMBC

Figura 89. Estrutura química da substância brevianamida oxindol

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H02, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 91. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H02 (expansão I), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 92. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H02 (expansão II), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 93. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H02 (expansão III), 500 MHz, CD_3OD .

Figura 94. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H02, 125-500 MHz, CD₃OD.

Figura 95. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H02 (expansão I), 125-500 MHz, CD₃OD.

Figura 96. Mapa de contorno HMQC da substância PB-H02 (expansão II), 125-500 MHz, CD₃OD.

Figura 97. Mapa de contorno HMBC da substância PB-H02, 125-500 MHz, CD₃OD.

3.4.7.3. Determinação estrutural da substância PB-H05 (ácido micofenólico)

Através da análise do espectro de massas de alta resolução, aliada à análise prévia dos espectros de RMN, a fórmula molecular desta substância foi proposta como sendo: $C_{17}H_{20}O_6$ (ionização por electrospray no modo negativo; valor observado: m/z $[M-H]^-$ 319,1200; valor teórico: m/z $[M-H]^-$ 319,1182; erro: -5,6 ppm).

No espectro de RMN de 1H deste metabólito observou-se a presença de sinais correspondentes a hidrogênios metílicos em δ 1,79 (H-15); hidrogênios de carbono metílico ligado a anel aromático em δ 2,14 (H-16); hidrogênios oximetílicos em δ 3,75 (H-17); hidrogênios oximetilênicos em δ 5,19 (H-13); um hidrogênio ligado a carbono sp_2 em δ 5,24 (H-5); hidrogênios ligados ao carbono olefínico em δ 3,38 (H-6); além dos hidrogênios metilênicos em δ 2,43 (H-2) e δ 2,30 (H-3).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou seis sinais de carbonos aromáticos não hidrogenados C-7 (δ 122,1); C-8 (δ 153,7); C-9 (δ 106,4); C-10 (δ 116,7); C-11 (δ 144,1) e C-12 (δ 163,7); e dois sinais de carbono carbonílicos C-1 (δ 179,0) e C-14 (δ 172,9).

A comparação com dados espectrais da literatura permitiram a identificação desta substância como ácido micofenólico, um metabólito secundário produzido por várias espécies do gênero *Penicillium*, especialmente pela espécie *P. brevicompactum*.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PB-H05 (500 e 125 MHz, CDCl_3), comparados com dados obtidos da literatura (500 e 67,5 MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	PB-H05	Literatura*	PB-H05	Literatura*
1			179,0	177,3
2	2,43; t; 8,0	2,43; t; 8,5	32,7	31,8
3	2,30; t; 8,0	2,30; t; 8,5	34,3	33,5
4			133,9	133,1
5	5,24; t; 6,8	5,25; t; 6,9	123,0	122,1
6	3,38; t; 6,8	3,38; t; 6,9	22,6	21,8
7			122,1	121,3
8			153,7	152,9
9			106,4	105,6
10			116,7	115,9
11			144,1	143,2
12			163,7	162,9
13	5,19; s	5,19; s	70,0	69,2
14			172,9	172,1
15	1,79; s	1,80; s	16,1	15,3
16	2,14; s	2,14; s	11,5	10,7
17	3,75; s	3,75; s	61,0	60,2

*Rovirosa et al., 2006

Figura 98. Estrutura química da substância ácido micofenólico

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H05, 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 100. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H05 (expansão I), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 101. Espectro de RMN de ^1H da substância PB-H05 (expansão II), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 102. Espectro de RMN de ^{13}C da substância PB-H05, 125 MHz, CDCl_3 .

Figura 103. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PB-H05, obtido em modo negativo.

3.4.8. Estudo químico de *Phomopsis longicolla*

A espécie *Phomopsis longicolla* foi reativada e cultivada em escala ampliada para obtenção do extrato orgânico. A partir do fracionamento cromatográfico da fração PL-I de *Phomopsis longicolla*, por CLAE preparativa foi isolada a substância PL-01 em 51,0 minutos (tempo de retenção). O fracionamento cromatográfico da fração PL-I resultou no isolamento de análogos estruturais à substância PL-01.

3.4.8.2. Determinação estrutural da substância PL-01

A análise do espectro de massas de alta resolução permitiu estabelecer a fórmula molecular desta substância como $C_{38}H_{38}O_{16}$ (ionização por electrospray no modo negativo; valor observado: m/z $[M-H]^-$ 749,2120; valor teórico: m/z $[M-H]^-$ 749,2082; erro: -5,0 ppm).

No espectro de RMN de 1H da substância PL-01 observou-se a presença, na região de hidrogênios aromáticos, de dois dupletos integrando para um hidrogênio (δ 7,38, H-3 e δ 6,57, H-4), com constante de acoplamento de hidrogênios em posição *orto* (8,8 Hz); indicando a presença de um anel aromático tetrassubstituído. Os deslocamentos químicos destes hidrogênios aromáticos indicam a presença de um substituinte doador de elétrons na posição C-4a. Neste espectro ainda foi observada a presença de dois grupamentos metilênicos, com constante de acoplamento de hidrogênios geminais, grupamentos metílicos e grupamentos metínicos, sendo que o sinal de hidrogênio oximetínico δ 5,40 foi atribuído ao H-5.

Os sinais de carbono observados indiretamente nos mapas de contorno HMBC e HMQC (apenas 17 carbonos), sugeriram que a substância poderia ser um dímero simétrico.

A análise das demais correlações a curta ($^1J_{CH}$) e longa ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) distância observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC, bem como a comparação com dados da literatura, aliado ao conhecimento prévio das classes de metabólitos secundários produzidas pelos fungos do gênero *Phomopsis* (conhecido pela produção de xantonas) permitiram propor a estrutura do dicerandrol C.

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PL-01 (500 e 125 MHz, CDCl_3), comparados com dados obtidos da literatura (500 e 125 MHz, CD_3CN).

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)		^{13}C (δ)	
	PL-01	Literatura*	PL-01	Literatura*
1, 1'			161,5	160,3
2, 2'			115,3	118,8
3, 3'	7,38; d; 8,8	7,39; d; 8,0	141,1	141,2
4, 4'	6,57; d; 8,8	6,37; d; 8,0	109,5	108,8
4a, 4a'			153,8	158,6
5, 5'	5, 40; sl	5,54; d; 1,5	70,3	71,6
6, 6'	2,35	2,45; m	27,5	28,5
7 α , 7 α'	2,45; dd; 6,5/ 18,0	2,53; dd; 6,5/ 18,0	33,2	34,1
7 β , 7 β'	2,31; dd; 11,0/ 18,0	2,35; dd; 11,0/ 18,0		
8, 8'			177,6	180,4
8a, 8a'			100,1	101,5
9, 9'			187,8**	189,0
9a, 9a'			106,2	107,3
10, 10'				
10a, 10a'			80,3	82,0
11, 11'	1,00; d; 6,2	1,01; d; 7,0	17,5	17,7
12 α , 12 α'	4,28; d; 12,8	4,49; d; 13,0	64,7	66,1
12 β , 12 β'	4,17; d; 12,8	4,20; d; 13,0		
13, 13'			169,5	171,3
14, 14'	2,06; s	2,00; s ou 2,03; s	20,6	21,0
15, 15'			170,0	171,1
16, 16'	1,88; s	2,00; s ou 2,03; s	20,4	20,9

*Wagenaar & Clardy, 2001

** dado observado no mapa de contornos HMBC

Figura 104. Estrutura química da substância dicerandrol C

Figura 105. Espectro de RMN de ^1H da substância PL-01, 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 106. Espectro de RMN de ^1H da substância PL-01 (expansão I), 500 MHz, CDCl_3 .

Figura 107. Espectro de RMN de ¹H da substância PL-01 (expansão II), 500 MHz, CDCl₃.

Figura 108. Espectro de RMN de ¹³C da substância PL-01, 125 MHz, CDCl₃.

Figura 109. Espectro de massas de alta resolução (EM-ESI) da substância PL-01, obtido em modo negativo.

3.5. CONCLUSÕES

Através deste estudo foi estabelecida uma metodologia eficiente para o isolamento de microrganismos endofíticos da espécie *Bostrychia radicans*. Foram isoladas 45 linhagens de microrganismos; sendo que, dentre estas foram selecionadas nove linhagens para obtenção de extratos e realização de triagens química e biológica.

Os resultados de avaliação da atividade biológica indicam que a microbiota endofítica da espécie *Bostrychia radicans* representa uma fonte expressiva de substâncias bioativas. Dentre as nove linhagens avaliadas, oito apresentaram algum potencial de atividade biológica, antifúngica ou antitumoral, (09, 10, 14, 36, 59, 60, 61 e 63). Além disso, a identificação destas linhagens evidenciou a ampla biodiversidade da microbiota endofítica da espécie *Bostrychia radicans*, coletada no manguezal do Rio Escuro, em Ubatuba-SP.

Ainda, foi realizado o estudo químico dos fungos *Xylaria* sp., *Penicillium brevicompactum* e *Phomopsis longicolla*. A partir da *Xylaria* sp. foram isoladas as seguintes substâncias: ácido 2,5-diidroxibenzóico, 8-diidroxinaftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo, 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona e ácido pilifórmico. O estudo químico de *Penicillium brevicompactum* resultou no isolamento das substâncias: ácido micofenólico, asperfenamato, brevianamida A, brevianamida C e brevianamida oxindol, substância inédita como produto natural. A partir de *Phomopsis longicolla* foi isolado o dicerandrol C.

O alto rendimento no isolamento das substâncias ácido micofenólico e dicerandrol C, metabólitos secundários majoritários nas espécies *Penicillium brevicompactum* e *Phomopsis longicolla* (respectivamente), estimulou a realização de estudos subsequentes para a avaliação do potencial biológico destas substâncias. Foram isolados 3 g de ácido micofenólico e 1 g dicerandrol C, o que permitiu a realização dos experimentos descritos no Capítulo III.

4. Capítulo III

**Avaliação do potencial de atividade biológica das substâncias: ácido
micofenólico e dicerandrol C**

4.1. Avaliação da fotoestabilidade e fototoxicidade de extratos e substâncias isoladas de algas vermelhas do gênero *Bostrychia* e fungos endofíticos associados

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro (FCFRP-USP)

Alunos responsáveis pela execução do trabalho: Bianca Bueno Fontanezi e Lara Cristina Dias

A obtenção de uma proteção efetiva, ampla e segura contra os danos provocados pela radiação ultravioleta (UV) tem sido bastante almejada pela população sendo, ainda, alvo de grande número de pesquisas realizadas mundialmente. Um fator muito importante a ser considerado ao se elaborar um fotoprotetor efetivo é a fotoestabilidade, ou seja, os fotoprotetores devem conter uma associação de filtros solares fotoestável que proteja a pele contra as radiações UVA e UVB durante todo o período de exposição.

Apesar dos formuladores contarem com um grande número de filtros solares UVB, há poucos filtros solares UVA disponíveis no mercado. Sendo assim, há um grande esforço, tanto da comunidade científica acadêmica quanto de centros de Pesquisa & Desenvolvimento de grandes empresas, no sentido de buscar novos filtros solares que possuam um amplo espectro de ação, tanto no UVA quanto no UVB, bem como de novas matérias-primas que aumentem a fotoestabilidade dos filtros solares.

Neste contexto, substâncias naturais de origem marinha vêm sendo bastante utilizadas em formulações fotoprotetoras por apresentarem ação antioxidante e de filtro biológico. Entretanto alguns metabólitos apresentam estabilidade limitada e há pouca informação sobre a segurança do uso dessas substâncias, uma vez que ao mesmo tempo em que elas podem se comportar como antioxidantes, elas podem também apresentar atividade pró-oxidante e risco à saúde do consumidor.

Diante do exposto, extratos e frações obtidos a partir da alga marinha vermelha *Bostrychia radicans*, e dos fungos endofíticos *Phomopsis longicolla* e *Penicillium brevicompactum*, foram submetidos à avaliação do espectro de absorção ultravioleta. Após a análise do espectro de varredura, foram selecionados os extratos, frações e substâncias isoladas que melhor apresentaram uma ampla absorção no UVA/UVB, e posteriormente, estas foram submetidas ao teste de fotoestabilidade por espectroscopia no UV.

As amostras fotoestáveis foram submetidas a ensaios de fototoxicidade. Estes experimentos foram realizados em cultura de fibroblastos através da avaliação da viabilidade celular, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro.

PROTOCOLO

Determinação do espectro de absorção no ultravioleta

A análise do espectro de absorção das soluções dos extratos e substâncias em estudo (100µg/mL) foi realizada em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200 a 400nm (WHITEHEAD; HEDGES, 2005; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). As amostras que apresentaram maior absorção na faixa do UVA e UVB foram submetidas à análise da fotoestabilidade.

Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV

Para a realização desse estudo, foram preparadas soluções de 100µg/mL das substâncias e extratos em estudo, a seguir 2 mL de cada solução foram adicionados em béqueres de vidro, submetidas à evaporação do solvente para a formação de um filme seco. As amostras foram submetidas à radiação UVA de 4 mW/cm² emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) por 115 minutos, o que forneceu uma dose total de 27,6 kJ/cm² (KOCKLER; OELGEMÖLLER; ROBERTSON; GLASS, 2012). A dose de radiação foi medida pelo radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA (365 nm) e da radiação UVB (312 nm). Para cada béquer submetido à irradiação havia 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 ressuspensionado em 2 mL de solvente, o que levou a uma solução de 100µg/mL. As soluções foram analisadas em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200 a 400 nm. Isto permitiu determinar o 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 foi obtida a razão entre a integral do espectro de absorção na faixa UVA e a integral do espectro de absorção na faixa do UVB, cuja equação está representada a seguir (DIFFEY, 1994; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007):

$$\frac{\int_{320}^{400} A(\lambda) d\lambda / \int_{320}^{400} d\lambda}{\int_{280}^{320} A(\lambda) d\lambda / \int_{280}^{320} d\lambda}$$

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste paramétrico Análise de Variância, uma vez que as amostras apresentavam distribuição normal.

Avaliação da Fototoxicidade

O potencial fototóxico foi determinado por meio do teste em cultura de fibroblastos 3T3 NRU PT (linhagem Balb 3T3, clone 31, *American Type Culture Collection* - ATCC). As substâncias foram diluídas em DMSO e em seguida foram realizadas 8 diluições geométricas sucessivas em dPBS, com um fator de diluição constante, sendo que a concentração final de DMSO não excedeu 1%. As 8 concentrações estudadas para as substâncias isoladas foram de 6,8; 10,0; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100,0 µg/mL. Os estudos foram realizados em duplicata.

Fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme protocolo INVITTOX nº 78 (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998). 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.

Previamente ao início dos estudos, foi avaliada a sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA. Para este estudo, foram avaliadas quatro diferentes doses de radiação UVA: 0, 3, 5, 9J o que equivale a 0, 17, 28 e 50 minutos de exposição à radiação UVA de 3 mW/cm², emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) e detectada por um radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetector para a medida da radiação UVA (365 nm).

Após a avaliação da sensibilidade das células à radiação, foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada substância. Para tal, foi preparada uma suspensão dos fibroblastos no meio de cultura (1×10^5 células/mL) e, a seguir, foram inoculados 100µL dessa suspensão (1×10^4 células) em 60 poços centrais de cada microplaca. Os 36 poços laterais das microplacas foram utilizados como branco. Uma microplaca foi utilizada para a determinação da citotoxicidade (na ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO₂, para a formação de uma monocamada semiconfluente. A seguir as células foram decantadas, separadas do meio de cultura e cada poço foi lavado com dPBS (tampão fosfato modificado por Dubelcco contendo cálcio).

Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100µL de 8 diferentes concentrações de cada composto em estudo diluídos em DMSO / dPBS. Cada experimento foi realizado em duplicata.

As 2 microplacas foram incubadas por 1h e, a seguir, uma delas foi submetida à radiação UVA de 3 mW/ cm² por 28 minutos, emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 o que equivale a uma dose total de 5 J/cm² de radiação UVA, para a determinação da fototoxicidade; a outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e serviu como um controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, os poços foram lavados com dPBS, o meio de cultura foi repostado e as microplacas incubadas a 37°C por 20h. A seguir, 100µL de meio DMEM contendo uma solução de 50 µg/mL do corante vital vermelho neutro foi adicionado em cada poço e as células incubadas por 3 h a 37°C. Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por água / etanol / ácido acético foi acrescentada em cada poço.

Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para este ensaio, 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. Os dados foram 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.

O cálculo do PIF está relacionado com a EC₅₀ (effective cytotoxic chemical concentrations), ou seja, à concentração de cada substância que inibe 50% da viabilidade celular da placa não irradiada e da placa irradiada, como apresentado na equação a seguir:

$$PIF = \frac{EC_{50}(-Irr)}{EC_{50}(+Irr)} \quad (1)$$

O cálculo do MPE é baseado na comparação das curvas dose-resposta completas, como apresentado na equação a seguir:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (2)$$

Em que, o foto efeito (PE_{Ci}) em qualquer concentração (C) é definido como o produto do efeito resposta (RE_C) e do efeito dose (DE_C), ou seja, PE_{Ci} = RE_C x DE_C. O efeito resposta (RE_C) é a diferença entre as respostas observadas na ausência e na presença de radiação, ou seja, RE_C = R_C(-Irr) – R_C(+Irr).

Modelo de Predição:

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” e

PIF > 5 ou MPE > 0.15 prediz: “fototóxico”.

RESULTADOS PRELIMINARES

As substâncias puras, dicerandrol C e ácido micofenólico, ambas isoladas dos fungos *Phomopsis longicolla* e *Penicilium brevicompactum*, apresentaram uma alta absorção na faixa do UVA e do UVB, respectivamente. Deve ser mencionado que ainda apresentam perfil de absorção no espectro na região do ultravioleta semelhante a alguns aminoácidos do tipo micosporina, os quais vêm sendo estudados como candidatos a filtros solares.

Estas substâncias foram consideradas fotoestáveis, uma vez que a radiação UVA não provocou uma redução estatisticamente significativa nos valores da razão UVA/UVB (Figura 1). Os valores da razão UVA/UVB encontrados para as soluções de dicerandrol C irradiadas e não irradiadas foram de 2,30 e 2,39, respectivamente e os valores encontrados para as soluções de ácido micofenólico irradiadas e não irradiadas foram de 0,21 e 0,10, respectivamente.

Com relação aos ensaios de fototoxicidade, o dicerandrol C apresentou toxicidade tanto em células expostas a radiação como as que não foram expostas, o classificando como uma substância com potencial citotóxico (EC 50 das células não expostas: 3,2 e 5,8 µg/mL), entretanto não apresentou potencial fototóxico, uma vez que apresentou MPE: 0,077 e 0,042. O ácido micofenólico não apresentou fototoxicidade/citotoxicidade sendo considerado um bom candidato a filtro solar (EC50 das células não expostas: não determinado e MPE: 0,014 e -0,015).

Figura 104. Espectro de absorção das substâncias isoladas dicerandrol C (Dic) (32,8 μ g/ml) e ácido micofenólico (Am) (100 μ g/ml) submetidas ou não à irradiação por UVA de 27,6 kJ/cm².

4.2. Ensaios de Indução de Apoptose

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro (FCFRP-USP)

Equipe responsável pela execução do trabalho: Dra. Raquel Tognon Ribeiro, Sandra Mara Burin e Luciana Ambrósio

Esses experimentos foram realizados com o intuito de avaliar se a substância Dicerandrol C seria capaz de induzir a apoptose nas linhagens celulares K562 (linhagem BCR-ABL positiva de Leucemia Mieloide Crônica e SET-2 (linhagem megacariocítica contendo a mutação JAK 2). A presença do oncogene BCR-ABL e da mutação JAK 2 tornam estas linhagens resistentes à apoptose.

As células K562 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 /mL em placa de 24 poços, enquanto as células SET-2 foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 /mL em placa de 24 poços na ausência e na presença do Dicerandrol C para padronização da técnica e das doses a serem utilizadas nos experimentos subsequentes.

Foram utilizadas durante a padronização dos ensaios as seguintes concentrações de Dicerandrol C: 0,5 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 2,0 μ g/mL, 4,0 μ g/mL, 5,0 μ g/mL, 10 μ g/mL e 15 μ g/mLg/mL.

As células foram plaqueadas e incubadas por 18 horas. Após a incubação, foram recuperadas dos poços, centrifugadas e submetidas à avaliação da apoptose celular pelo método de *Hypotonic-Fluorescent-Solution* (HFS) (iodeto de propídeo 50 μ g/mL em citrato

de sódio 0,1% e Triton X-100 0,1%) por 15 minutos e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto, BD) pelo software DiVa (Brumatti et al, 2003).

RESULTADOS PRELIMINARES

Os resultados obtidos até o momento indicam que o Dicerandrol C foi capaz de induzir apoptose de maneira dose-dependente em células K562 à partir da concentração de 10 µg/mL. Já nas células SET-2, esta indução da apoptose parece acontecer de maneira dose-dependente a partir da concentração de 0,5 µg/mL . Sendo assim, os ensaios preliminares indicam que o Dicerandrol C apresenta uma ação promissora em linhagens resistentes à morte celular.

5. Capítulo IV

**Novos metabólitos/toxinas do fungo *Botrytis cinerea* e o estudo de suas rotas
biossintéticas**

1. Introdução

O controle racional das enfermidades ocasionadas por fungos sobre cultivos comerciais é um dos maiores problemas enfrentados pela indústria alimentícia. A diversidade de espécies destes micro-organismos, sua grande capacidade para adaptar-se a condições ambientais extremas, bem como desenvolver resistência aos fungicidas, tornam estas enfermidades amplamente temidas por parte dos agricultores (WILLIAMSON et al., 2007).

O gênero *Botrytis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Leotimiceto, ordem Heotiales e família Sclerotiniaceae (WILLIAMSON et al., 2007). Este gênero inclui um importante número de espécies de fitopatógenos, das quais algumas são consideradas as mais destrutivas em cultivos comerciais e com grande incidência em regiões produtoras de vinhos (COLEY-SMITH et al., 1980). Dentre as espécies pertencentes a este gênero destaca-se a *Botrytis cinerea*, uma vez que afeta mais de 235 espécies de plantas cultivadas ou silvestres (JARVIS, 1977), sendo este patógeno um dos principais responsáveis pelo aumento dos gastos dos agricultores relacionados a tratamentos fitossanitários.

A enfermidade causada pela espécie *B. cinerea*, também conhecida como podridão ou mofo cinzento, pode afetar a planta em diferentes órgãos, incluindo flores, frutos, folhas e órgãos de reserva subterrâneos; sendo as partes aéreas mais comumente atingidas (DROBY e LICHTER, 2004). Esta enfermidade pode desenvolver-se em todos os estágios de crescimento, desde a germinação das sementes, até as plantas adultas; causando graves danos em cultivos, provocando a podridão do talo e do fruto. Além disso, por ser também um fitopatógeno de pós-colheita, causa perdas econômicas significativas durante o armazenamento de produtos agrícolas (ELAD et al., 2004).

Existem importantes plantações que sofrem danos severos devido ao mofo cinzento. Os vegetais: alface, brócolis e feijão, e frutas pequenas como a uva e o morango estão entre os mais afetados; além de outras plantas, como os girassóis, importante fonte para a produção de óleo vegetal (DROBY e LICHTER, 2004). Países produtores de vinho como o Chile, França, Itália, Alemanha e Espanha sofrem sérios prejuízos em função da ocorrência deste fungo (ROSSLENBOICH, 2000). Ainda neste contexto, destacam-se as perdas significativas de grão-de-bico e outros legumes ricos em proteínas que sustentam milhões de famílias rurais na Índia, Bangladesh e Nepal (PANDE et al., 2002).

O custo anual dos tratamentos contra este fitopatógeno já chegou a 540 milhões de euros, o que representa 10% do mercado mundial de fungicidas (UIPP, 2002). Na Espanha,

como média anual, o consumo de fungicidas contra *Botrytis* é de aproximadamente 3 milhões de euros em tomate, 2 milhões em morango e 3 milhões em uva (BASF).

A aplicação de produtos químicos sintéticos é o método mais usado para o controle das podridões fungicas. No entanto, a grande capacidade de adaptação dos patógenos a estes fungicidas usuais, a persistência destas substâncias no solo durante longos períodos de tempo e a incorporação dos mesmos na cadeia alimentar, diminuem a confiança na utilização destes produtos e motivam a busca de novas técnicas e métodos de controles compatíveis ao meio ambiente (JACOMETTI et al., 2010).

Além disso, são cada vez maiores as objeções de ordem higiênico-sanitárias que estes produtos implicam, uma vez que os fungicidas são potenciais agentes oncogênicos quando aplicados em frutas e verduras. A preocupação com relação aos possíveis efeitos nocivos na fruta adquire especial importância se considerarmos que geralmente as frutas são consumidas frescas e existe um espaço de tempo curto entre a aplicação do tratamento e o consumo. Devido ao grande problema que representam os resíduos de produtos químicos para a saúde humana, diferentes países têm estabelecido uma série de limites máximos de resíduos (LMR) bastante restritivos, em muitos casos abaixo dos recomendados pelo Codex Alimentarius (FAO/OMS). A diferença existente entre os países Iberoamericanos, no que se refere ao conteúdo máximo permitido destes resíduos, representa em alguns casos uma barreira para o comércio, em especial para as exportações de frutas.

Atualmente, estão sendo desenvolvidos estudos voltados para a obtenção de fungicidas racionais que não se incorporem na cadeia alimentar e que sejam facilmente degradáveis. Para abordar estes aspectos, torna-se necessário um maior conhecimento do mecanismo de infecção do fitopagano; principalmente no que se refere aos aspectos relacionados com seu metabolismo secundário, ou seja, à produção de toxinas.

Neste contexto, o seqüenciamento do genoma dos primeiros Lectinomicetos, como *B. cinerea* e *Sclerotinia sclerotinium* realizados pelo Broad Institut (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea) e Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>) representou um grande avanço na descoberta dos genes implicados na biogênese das toxinas excretadas por este fungo durante o processo de infecção e novos alvos biológicos que permitirão abordar novas estratégias de controle destes fitopatógenos.

O grupo do Prof. Isidro G. Collado, pertencente ao Departamento de Química Orgânica da Universidad de Cádiz (Espanha), estabeleceu dentro do “IV Programa Marco de Investigación Europeo” (FAIR PL97- 3351 AOSPLANT), o papel que exercem as principais

toxinas excretadas pelo fungo (Figura 1) durante o processo de infecção (DURAN-PATRON et al., 1997; 1999; 2001; COLLADO et al., 1994-1999; COLMENARES et al., 2002a; 2002b).

Figura 1. Principais toxinas excretadas pelo fitopatógeno *B. cinerea*.

Os resultados obtidos no desenvolvimento do projeto anteriormente mencionado permitiram propor que o fungo expressa sua patogenicidade mediante a produção das toxinas (1-3), metabólitos fitotóxicos que produzem lesões no tecido vegetal, para posteriormente excretar enzimas responsáveis pela degradação destes tecidos (COLMENARES et al., 2002 a).

Desta forma, a inibição das rotas biossintéticas que conduzem a estas toxinas, mediante o uso de análogos biossintéticos, permitiu o controle do fungo e de sua patogenicidade. Este estudo resultou no registro de cinco patentes, entre as quais, duas já foram licenciadas (COLLADO et al. 2001a e b, 2004a e b; 2005 a e b). Ainda, a utilização de produtos estruturalmente próximos a produtos naturais implica em uma biodegradação rápida e fácil.

O sequenciamento do genoma de *Botrytis cinerea* foi realizado em duas diferentes linhagens T4 e B 05.10 e como resultado deste estudo conheceu-se os genes que codificam as principais enzimas envolvidas na biossíntese das toxinas conhecidas até o presente momento, revelando um grande arsenal de enzimas ainda desconhecidas. Na Figura 2 pode observar-se um resumo do número de enzimas em comparação com outros micro-organismos.

A investigação dos genes envolvidos no metabolismo secundário de *Botrytis cinerea* resultou na descrição de um elevado número de genes que codificam um importante número de enzimas; tais como seis enzimas pertencentes à classe das sesquiterpeno ciclases (STC) e vinte e duas enzimas do tipo policetídeo sintases (PKs), entre outras.

Até o presente momento somente um cluster de genes foi caracterizado, e dentro deste foram determinadas e caracterizadas apenas duas enzimas, que estão envolvidas na

biossíntese do botridial: a probotriano sesquiterpeno ciclase (*bcbot2*) e a monooxigenase responsável pela oxidação na posição 15 do esqueleto probotriano (*bcbot1*), (SIEWERS et al., 2005; PINEDO et al., 2008). Sendo assim, a função das demais enzimas no metabolismo secundário de *B. cinerea* permanece desconhecida.

**"Key enzymes" of the secondary metabolism in *B. cinerea*
comparing to other fungi**

	Non-Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)	Polyketides synthases (PKS) & (PKS - NRPS)	Dimethylallyl tryptophan synthetase (DMATS)	Sesqui- / Di-terpene cyclases (STC/DTC)
<i>Botrytis cinerea</i>	8	22 (5)	1	6 / 3
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5	19 (2)	1	1 / 1
<i>Magnaporthe grisea</i>	8	22 (9)	3	1 / 2
<i>Aspergillus nidulans</i>	10	26 (2)	2	2 / 3
<i>Neurospora crassa</i>	3	6 (1)	1	0 / 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	0	0 / 0

Figura 2. Enzimas importantes ao metabolismo secundário de *B. cinerea* em comparação com outras espécies de fungos.

Foi observado que a inativação destes genes caracterizados teve efeito sobre a virulência e patogenicidade de *Botrytis*; além disso, foram obtidos dados a respeito da versatilidade do mecanismo deste fungo para super-expressar outros genes envolvidos na produção de uma segunda toxina, a botcinina.

Desta forma, torna-se importante a continuação do estudo funcional dos genes do metabolismo secundário, além da caracterização das enzimas ou complexos enzimáticos envolvidos nas rotas biossintéticas. Estes estudos permitirão determinar novos alvos moleculares que proporcionem um controle eficiente do patógeno, a produção de novos fatores de virulência e toxinas implicadas no metabolismo secundário e o conhecimento dos possíveis mecanismos de adaptação no hospedeiro, que parecem estar relacionados com os resultados obtidos até o momento (PINEDO et al., 2008). Todos estes dados permitirão abordar novas estratégias de controle do patógeno e desenvolver fungicidas seletivos e eficientes contra os mesmos.

Diante do exposto anteriormente o objetivo deste capítulo da tese (desenvolvido na Universidade de Cádiz, de 24 de agosto de 2010 a 8 de setembro de 2011, sob a orientação do Prof. Dr. Isidro Collado Gonzalez) foi o isolamento e a caracterização de novos metabólitos de *Botrytis cinerea*. Para tanto, foi realizado o estudo químico de linhagens mutantes que apresentam silenciados os genes responsáveis pela codificação de enzimas ou fatores de transcrição implicados na biossíntese das principais toxinas excretadas pelo fungo.

2. Parte experimental

2.1. Material e métodos

2.1.1. Técnicas instrumentais

- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): foram obtidos nos equipamentos Varian Inova 400 e Varian Inova 600 do Serviço Central de Ciência e Tecnologia da Universidade de Cádiz, utilizando como solventes clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD). Os deslocamentos químicos estão descritos em escala δ (ppm) e as constantes de acoplamento em hertz (Hz). Para os espectros de ^1H -RMN foi utilizada como referencia interna o sinal do solvente residual não deuterado a $\delta=7,25$ ppm para o clorofórmio e $\delta=3,30$ ppm para metanol.
- Espectros de Massas (EM): os espectros foram obtidos em espectrômetro Finnigan Voyager GC 8000^{top} (Serviço Central de Ciência e Tecnologia da Universidade de Cádiz). A fonte de ionização utilizada foi impacto de elétrons, utilizando uma energia de 70 eV.

2.1.2. Técnicas cromatográficas

- Cromatografia em Camada Delgada (CCDC): foram realizadas em laminas de alumínio pré-fabricadas (Merck) recobertas com gel de sílica Kiesegel 60, 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência UV_{254} (20 x 20 cm) As placas cromatográficas foram analisadas por exposição à luz UV (254 e 360 nm) e reveladas com vanilina sulfúrica e ácido fosfomobilídico.
- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP): foram realizadas em placas de gel de sílica Kiesegel 60 F_{254} (20 x 20 cm, 1 mm de espessura), com indicador de fluorescência. As placas foram eluídas com diferentes misturas de solventes e foram analisadas por UV (254 nm).
- Cromatografia em coluna (CC): foi realizada utilizando gel de sílica Merck (60-200 μm). Os eluentes utilizados foram: hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) e mistura dos mesmos em diferentes graus de polaridade.
- Cromatografia em coluna (fase reversa): foi realizada utilizando coluna comercial Waters Sep-Pak[®], Vac 35cc, contendo 10g de adsorvente C18. Os eluentes utilizados foram MeOH e água destilada.
- Cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC): foi utilizado cromatógrafo Merck-Hitachi equipado com detector de índice de refração IR-71, bomba L-6200 e integrador D-

2500; ou Merck-Hitachi LaChrom, equipado com índice de refração L-7490, bomba L-7100 e um processador Pentium 90 usando o programa Borwin, versão 1.21. As separações foram feitas em coluna de gel de sílica Lichrospher Si-60, 10 µm e dimensões de 1x25 cm (semipreparativa) ou 5 µm e dimensões de 0,4 x 25 cm (analítica).

2.2. Isolamento e caracterização dos metabólitos secundários de *Botrytis cinerea*

2.2.1. Estudo químico da linhagem ΔΔD1

Para a realização desta etapa do trabalho, foi proposto o cultivo de linhagens mutantes que apresentam silenciados os genes responsáveis pela codificação de enzimas ou fatores de transcrição implicados na biossíntese das principais toxinas excretadas pelo fungo. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com pesquisadores da Universidade de Münster e do INRA em Versailles, que tem colaborado assiduamente com o grupo de pesquisa do Prof. Isidro C. Gonzalez em temas relacionados. Estes pesquisadores foram os responsáveis pelo preparo das linhagens mutantes ΔΔD1 e Cnd15, para as análises posteriores.

Foram transferidos 100 µL de uma solução estoque de esporos da linhagem ΔΔD1 (preservados em solução 80% glicerol em água, mantidos a – 80°C) para placas de Petri contendo meio sólido Agar Malte (2% glicose, 2% malte, 1% peptona e 2% Agar, ajustado a pH 6,5 a 7,0). Depois de 5 dias de crescimento, foram transferidos discos circulares de ágar contendo micélio a 45 garrafas Roux (6 discos em cada garrafa) que continham 150mL de meio Czapeck Dox modificado (5% de glicose, 0,1% extrato de levedura, 0,5% K₂HPO₄, 0,2% NaNO₃, 0,05% MgSO₄.7H₂O e 0,001% FeSO₄.7H₂O ajustado a pH 6,5 a 7,0). As garrafas foram mantidas a 25°C em presença de luz artificial (lâmpadas fluorescentes) durante 15 dias.

Após 15 dias de fermentação, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a pressão reduzida, usando filtro “Nytal” de 200 µm de poro. O meio foi extraído três vezes com acetato de etila (1:1) e a fase orgânica obtida foi lavada três vezes com água destilada (2:1), seguida da adição de NaSO₄ anidro. Após filtração, utilizando papel de filtro, a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

O extrato obtido foi submetido à separação cromatográfica em coluna de gel de sílica, usando como eluente mistura de Hex e AcOEt, em gradientes de polaridade crescente, seguida de acetona e metanol (Item 2.1.2). As frações obtidas foram submetidas à análise por

CCDC e RMN de ^1H . As frações eluídas com acetona 100% e MeOH 100% foram reunidas e submetidas a outro fracionamento por cromatografia em coluna de fase reversa (Item 2.1.2).

Tabela 1. Frações cromatográficas do extrato AcOEt da linhagem $\Delta\Delta\text{D1}$.

Frações	Eluente	Peso (mg)
$\Delta\Delta\text{D15d45B01}$	Hex 100%	4,68
$\Delta\Delta\text{D115d45B02}$	Hex: AcOEt (9:1)	9,52
$\Delta\Delta\text{D115d45B03}$	Hex: AcOEt (8:2)	6,00
$\Delta\Delta\text{D115d45B04}$	Hex: AcOEt (7:3)	14,29
$\Delta\Delta\text{D115d45B05}$	Hex: AcOEt (6:4)	32,45
$\Delta\Delta\text{D115d45B06}$	Hex: AcOEt (1:1)	24,78
$\Delta\Delta\text{D115d45B07}$	Hex: AcOEt (6:4)	30,16
$\Delta\Delta\text{D115d45B08}$	Hex: AcOEt (7:3)	29,51
$\Delta\Delta\text{D115d45B09}$	Hex: AcOEt (8:2)	28,30
$\Delta\Delta\text{D115d45B10}$	Hex: AcOEt (9:1)	16,33
$\Delta\Delta\text{D115d45B11}$	AcOEt 100%	21,70
$\Delta\Delta\text{D115d45B12}$	Acetona 100%	226,82
$\Delta\Delta\text{D115d45B13}$	MeOH 100%	246,02

Após as análises por CCDC e RMN de ^1H as frações consideradas de interesse foram submetidas a colunas cromatográficas, quando necessário, e purificadas por HPLC em coluna semipreparativa, de acordo com o descrito a seguir (Item 2.1.2).

- **Fração $\Delta\Delta\text{D115d45B04}$:** purificada por HPLC, fluxo 2,5 mL/min, fase móvel Hex: AcOEt (3:1).
- **Fração $\Delta\Delta\text{D115d45B05}$:** fluxo 2,5 mL/min, fase móvel Hex: AcOEt (1:1).
- **Fração $\Delta\Delta\text{D115d45B07}$:** fluxo 2,5 mL/min, fase móvel Hex: AcOEt (3:2).
- **Fração $\Delta\Delta\text{D115d45B08}$:** fluxo 2,5 mL/min, fase móvel Hex: AcOEt (3:2).

As frações $\Delta\Delta$ D115d45B12 e $\Delta\Delta$ D115d45B13, reunidas e submetidas à separação cromatográfica em coluna de fase reversa, resultaram em 5 subfrações eluídas com: 05% MeOH, 25% MeOH, 50% MeOH, 75% MeOH e 100% MeOH. As subfrações 05%, 25% e 50% foram posteriormente purificadas por HPLC, resultando no isolamento de três substâncias que podem representar uma nova família de substâncias no gênero *Botrytis*.

2.2.2. Reações químicas

2.2.2.1. Acidificação (dimerização)

Foi realizada com ácido clorídrico (3 gotas de solução 1N) em clorofórmio (aproximadamente 2 mL); mantendo-se sob agitação magnética durante 120 horas, a temperatura ambiente. O produto foi obtido por eliminação do solvente.

2.2.2.2. Acetilação

Foi realizada através da adição de 20 mg de produto (monômero) em 120 mg de anidrido acético, acrescentando-se 2 gotas de piridina. A reação foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação magnética, durante uma noite 12 horas. O produto foi obtido por eliminação do solvente.

2.2.2.3. Metilação

O produto foi dissolvido em uma mistura de DCM:MeOH (1:1) e tratado com uma solução 2M de trimetilsilildiazometano ($\text{Me}_3\text{SiCHN}_2$) em éter etílico. Deixou-se a mistura reagir durante 24 horas. O produto foi obtido por eliminação do solvente.

2.2.2.4. Reações com alcoóis de alto peso molecular

Para realizar estas reações o produto foi dissolvido no álcool correspondente (ou em clorofórmio, caso este fosse sólido) e adicionaram-se gotas de ácido clorídrico (4 gotas, 1N). Os alcoóis utilizados foram:

- 4-Nitrofeniletanol
- R-(+)-1-Feniletanol
- 4-Fluorobenzilalcool
- 2-Iodoetanol

2.3. Estudos preliminares da via biossintética do monômero e de seus derivados

2.3.1. Condições gerais de fermentação da linhagem $\Delta\Delta D1$

Placas de Petri contendo meio sólido Agar Malte foram inoculadas com 100 μL de uma solução de esporos da linhagem $\Delta\Delta D1$ ($2,85 \cdot 10^6$ esporos/ml de solução glicerizada). Depois de 5 dias de crescimento, foram transferidos discos circulares de ágar contendo micélio a frascos (garrafas Roux ou Erlenmeyers) que continham meio Czapeck Dox modificado (composição do meio, ver Item 2.2.1).

Após a fermentação, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a pressão reduzida, usando filtro “Nytal” de 200 μm de poro. O meio foi extraído três vezes com acetato de etila (1:1) e a fase orgânica obtida foi lavada três vezes com água destilada (2:1), seguida da adição de Na_2SO_4 anidro. Após filtração, utilizando papel de filtro, foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

2.3.2. Cinética de produção do metabólito em estudo (monômero)

O estudo da cinética de produção foi realizado em meio líquido em modo estático e em agitação, de acordo com o descrito no procedimento geral de fermentação (Item 2.3.1).

- Modo estático: foram inoculadas 15 garrafas Roux contendo 150 mL de meio Czapeck Dox modificado com 6 discos de Agar da linhagem $\Delta\Delta D1$; extraíndo uma garrafa a cada dia, desde o primeiro até o décimo quinto dia de fermentação.
- Agitação: foram inoculados 15 Erlenmeyers contendo 200 mL de meio Czapeck Dox modificado com 6 discos de ágar da linhagem $\Delta\Delta D1$; extraíndo um Erlenmeyer a cada dia, desde o primeiro até o décimo quinto dia de fermentação.

A análise dos extratos brutos (AcOEt) foi realizada por RMN de ^1H e CCDC (Item 2.1.2) usando como eluente AcOEt : Met (95:5) e vanilina como revelador.

2.3.3. Fermentação de $\Delta\Delta D1$ com acetato de sódio (D_3 , 99%)

De acordo com o procedimento geral, foram inoculadas 20 garrafas com discos de ágar da linhagem $\Delta\Delta D1$. No terceiro dia de crescimento, o meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 100mg de acetato sódico deuterado (D_3 , 99%) dissolvidos em 200 μL de água estéril. A extração do filtrado foi realizada no sétimo dia desde a inoculação e resultou na obtenção de 147 mg de extrato.

Depois de analisado por CCDC e RMN de ^1H o extrato foi fracionado por CC. A fração eluída com metanol foi posteriormente purificada por CCDP, usando como eluente AcOEt:MeOH (95:5%). A separação resultou no isolamento de 8 mg de substância.

2.3.4. Fermentação de $\Delta\Delta\text{D1}$ com acetato de sódio (D_3 , 99%) - 2 suplementações

De acordo com o procedimento geral, foram inoculadas 10 garrafas com discos de ágar da linhagem $\Delta\Delta\text{D1}$. O meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 100 mg de acetato sódico deuterado (D_3 , 99%) dissolvidos em 200 μl de água estéril, nos dias 3 e 5 de fermentação (duas suplementações, de 100 mg cada). A extração do filtrado foi realizada no sétimo dia desde a inoculação e resultou na obtenção de 39 mg de extrato. Depois de analisado por CCDC e RMN de ^1H o extrato foi fracionado de acordo com o descrito no item anterior, o que resultou no isolamento de 2 mg de substância.

2.3.5. Fermentação de $\Delta\Delta\text{D1}$ com glicose totalmente marcada (Parte I: otimização)

Segundo o procedimento geral, foram inoculadas 10 garrafas com discos de ágar da linhagem $\Delta\Delta\text{D1}$. Depois de três dias a partir da inoculação, o micélio (crescido ao redor dos discos de Agar inoculados) foi separado do meio de cultivo por filtração a pressão ambiente, usando um filtro “Nytal” de 200 μm de poro. O micélio foi transferido para garrafas contendo o meio Czapeck Dox sem glicose (0,1% extrato de levedura, 0,5% K_2HPO_4 , 0,2% NaNO_3 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajustado a pH 6,5 a 7,0). O meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 100mg de glicose comum dissolvidos em 200 μl de água estéril, nos dias 3, 5 e 7 de fermentação, a partir da inoculação. A extração do filtrado foi realizada no dia 9 e resultou no extrato analisado por RMN de ^1H e CCDC em laminais pré-fabricadas de gel de sílica usando como eluente AcOEt: MeOH (95:5) e vanilina como revelador.

2.3.6. Fermentação de $\Delta\Delta\text{D1}$ com glicose totalmente marcada (Parte II: otimização)

Segundo o procedimento geral, foram inoculadas 20 garrafas com discos de agar da linhagem $\Delta\Delta\text{D1}$. Depois de três dias a partir da inoculação, o micélio de 5 garrafas foi separado do meio de cultivo e transferido para garrafas contendo o meio Czapeck Dox sem glicose, preparado de acordo com o descrito no item anterior. Esse procedimento foi realizado com outras 5 garrafas no dia 4, 5 garrafas no dia 5 e finalmente, 5 garrafas no dia 6. O meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 100mg de glicose comum dissolvidos em

200µl de água estéril, no dia da transferência do micélio e duas vezes mais com intervalo de dois dias. A extração do filtrado foi realizada dois dias depois da última suplementação do meio.

- Meio sem glicose: dia 3, suplementação: dias 3, 5 e 7; extração: dia 9.
- Meio sem glicose: dia 4, suplementação: dias 4, 6 e 8; extração: dia 10.
- Meio sem glicose: dia 5, suplementação: dias 5, 7 e 9; extração: dia 11.
- Meio sem glicose: dia 6, suplementação: dias 6, 8 e 10; extração: dia 12.

Os extratos foram analisados por CCDC e RMN ^1H em laminas pré-fabricadas de gel de sílica usando como eluente AcOEt:MeOH (95:5) e vanilina como revelador.

2.3.7. Condições gerais de fermentação da linhagem Cnd15

Placas de Petri contendo meio sólido Agar Malte foram inoculadas com 100 µL de uma solução de esporos de *Botrytis cinerea* B0510 Cnd15 1^op 17/02/2010 ($2,85 \cdot 10^6$ esporos/ml de solução glicerizada) e mantidas a 25°C em presença de luz artificial (lâmpadas fluorescentes). Depois de 5 dias de crescimento, foram transferidos discos circulares de Agar contendo micélio a frascos (garrafas Roux ou Erlenmeyers) que continham meio Czapeck Dox modificado (composição do meio, ver Item 2.2.1).

Após a fermentação, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a pressão reduzida, usando filtro “Nytal” de 200 µm de poro. O meio foi extraído três vezes com acetato de etila (1:1) e a fase orgânica obtida foi lavada três vezes com água destilada (2:1), seguida da adição de NaSO₄ anidro. Após filtração, utilizando papel de filtro, foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

O extrato obtido foi dissolvido em clorofórmio, foram adicionadas 4 gotas de ácido clorídrico 1N e deixou-se agitar por 7 dias. A “dimerização” do produto foi acompanhada por CCDC (placas de gel de sílica pré-fabricadas e como eluente Hex:AcOEt 1:1). Depois de observada a dimerização do produto, o extrato foi fracionado em coluna de gel de sílica (Item 2.1.2). Através da análise por CCDC as frações eluídas com Hex: AcOEt (7:3), nas quais foi observada a presença do dímero, foram reunidas e purificadas por HPLC. Neste procedimento foi utilizada coluna de gel de sílica semipreparativa e Hex:AcOEt (75:25) como eluente (ver Item 2.1.2).

2.3.8. Fermentação de Cnd15 com [1- ^{13}C] acetato sódico

Segundo o descrito no Item 2.3.7, foram inoculadas 05 garrafas contendo 150 mL de meio Czapeck Dox com 6 discos de Agar da linhagem Cnd15. O meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 100mg de $[1-^{13}\text{C}]$ acetato sódico dissolvidos em 200 μL de água estéril, no mesmo dia da inoculação e no dia 3. A extração do filtrado foi realizada no dia 7 a partir da inoculação e resultou em 39 mg de extrato, que foi processado de acordo com o descrito no Item anterior.

2.3.9. Fermentação de Cnd15 com glicose totalmente marcada (Parte I: otimização)

De acordo com o procedimento geral de fermentação, foram inoculadas 10 garrafas com discos de Agar da linhagem Cnd15. Depois de três dias a partir da inoculação, o micélio (crescido ao redor dos discos de agar inoculados) foi separado do meio de cultivo por filtração a pressão ambiente, usando um filtro “Nytal” de 200 μm de poro. O micélio foi transferido para garrafas contendo o meio Czapeck Dox sem glicose (0,1% extrato de levedura, 0,5% K_2HPO_4 , 0,2% NaNO_3 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajustado a pH 6,5 a 7,0). O meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 100mg de glicose comum dissolvidos em 200 μL de água estéril, nos dias 3, 5 e 7 de fermentação, a partir da inoculação. O mesmo procedimento foi realizado transferindo o micélio para o meio de cultivo sem glicose no quarto dia de fermentação. Neste caso, o meio foi suplementado com 100mg de glicose comum nos dias 4, 6 e 8. A extração foi realizada nos dias 9 e 10, contados a partir da inoculação. Os extratos foram analisados por CCDC e RMN ^1H em laminas pré-fabricadas de gel de sílica usando como eluente AcOEt: Met (95:5) e vanilina como revelador.

2.3.10. Fermentação de Cnd15 com glicose totalmente marcada (Parte II: otimização)

De acordo com as condições gerais de fermentação, foram inoculadas 5 garrafas contendo 150 mL de meio Czapeck Dox modificado (**0,7% de glicose**, 0,1% extrato de levedura, 0,5% K_2HPO_4 , 0,2% NaNO_3 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajustado a pH 6,5 a 7,0) com discos de Agar da linhagem Cnd15. Depois de 7 dias de fermentação o meio foi extraído como descrito no Item 2.3.7. O extrato foi analisado segundo o descrito no item anterior.

2.3.11. Fermentação de Cnd15 com glicose (U- ^{13}C 6, 99%)

Segundo o Item 2.3.7, foram inoculadas 07 garrafas contendo 150 mL de meio Czapeck Dox sem glicose (0,1% extrato de levedura, 0,5% K_2HPO_4 , 0,2% NaNO_3 , 0,05%

MgSO₄.7H₂O e 0,001% FeSO₄.7H₂O ajustado a pH 6,5 a 7,0) com 6 discos de Agar da linhagem Cnd15. O caldo de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 1g de glicose (U-13C6, 99%) dissolvidos em 200 µl de água estéril, no momento da inoculação. Depois de 7 dias de fermentação o meio foi extraído como descrito nos procedimentos gerais e analisado como descrito anteriormente.

2.3.12. Fermentação de Cnd15 com *L*-metilmetionina (metil-13C, 99%)

De acordo com o Item 2.3.7, foram inoculadas 05 garrafas com discos de agar da linhagem Cnd15. O meio de cultivo de cada garrafa foi suplementado com 60 mg de *L*-metilmetionina (metil-13C, 99%) dissolvidos em 2000 µl de água estéril, no mesmo dia da inoculação e no dia 02. A extração do filtrado no dia 07 conduziu a 55,95 mg de extrato, que foi processado de acordo com o descrito em 2.3.7.

3. Resultados e discussão

3.1. Isolamento e caracterização de metabólitos secundários do fungo *Botrytis cinerea*

3.1.1. Estudo químico da linhagem $\Delta\Delta D1$

A partir do fracionamento cromatográfico por CCC da linhagem $\Delta\Delta D1$, foram obtidas frações contendo metabólitos que não haviam sido identificados nas linhagens selvagem (que não sofreram mutação) da espécie *B. cinerea*. As frações consideradas de interesse foram submetidas à purificação e resultaram no isolamento das seguintes substâncias:

- **Fração $\Delta\Delta D115d45B04$** (eluída a 30% de AcOEt): purificada por HPLC, fase móvel Hex: AcOEt (3:1). Esta separação resultou no isolamento de três produtos que podem representar duas novas substâncias da classe dos aristoloquenos (tempo de retenção (TR) = 21 minutos (min) e 26 min (Figuras 4 e 5) e um possível metabólito aromático ainda não identificado (TR = 38 min), (Figura 6).
- **Fração $\Delta\Delta D115d45B05$** (eluída a 40% de AcOEt): fase móvel Hex: AcOEt (1:1). Esta separação nos conduziu ao isolamento de 6,13 mg de um produto da classe dos aristoloquenos, ainda não descrito em *B. cinerea* (azul rosa, TR = 27 min), (Figura 7).
- **Fração $\Delta\Delta D115d45B07$** (eluída a 60% de AcOEt): fluxo 2.5 mL/min, fase móvel Hex: AcOEt (3:2). Esta separação nos conduziu ao isolamento de 6.51 mg de outro produto da classe dos aristoloquenos, ainda não descrito na espécie *B. cinerea* (azul 27, TR = 40 min), (Figura 8).
- **Fração $\Delta\Delta D115d45B08$** (eluída a 70% de AcOEt): fluxo 2.5 mL/min, fase móvel Hex: AcOEt (3:2). Esta separação resultou no isolamento de 2,13 mg de uma substância (da classe dos aristoloquenos), ainda não descrita em *B. cinerea* (tr = 45 min), (Figura 9).

Figura 4. Espectro de RMN de ^1H de uma substância da classe dos aristoloquenos, 400 MHz, CDCl_3 .

Figura 5. Espectro de RMN ^1H de uma substância da classe dos aristoloquenos, 400 MHz, CDCl_3 .

Figura 6. Espectro de RMN ^1H de um possível derivado da melanina, 400 MHz, CDCl_3 .

Figura 7. Espectro de RMN ^1H de uma substância da classe dos aristoloquenos, 400 MHz, CDCl_3 .

Figura 8. Espectro de RMN ¹H de uma substância da classe dos aristoloquenos, 400 MHz, CDCl₃.

Figura 9. Espectro de RMN ¹H de uma substância da classe dos aristoloquenos, 400 MHz, CDCl₃.

Embora esta classe de substâncias ainda não tenha sido publicada na espécie, os três últimos metabólitos apresentados já haviam sido isolados dentro do grupo de pesquisa e foram identificados por comparação dos dados espectroscópicos. As demais substâncias estão em fase de elucidação estrutural.

As frações $\Delta\Delta$ D115d45B12 e $\Delta\Delta$ D115d45B13, reunidas e submetidas à separação cromatográfica em coluna de fase reversa, resultaram em 5 subfrações eluídas com: 05% MeOH, 25% MeOH, 50% MeOH, 75% MeOH e 100% MeOH. As subfrações 05%, 25% e 50% foram posteriormente purificadas por HPLC, resultando no isolamento de três substâncias que podem representar uma nova família de substâncias no gênero *Botrytis*. Foi observado que o produto majoritário da nova classe de substâncias de *B. cinerea* se dimerizava (ou perdia sua simetria) quando em meio ácido. Esta observação foi feita com base nos dados de RMN de ^1H , uma vez que os sinais presentes no espectro da substância que aqui está sendo tratada como monômero, apareciam duplicados quando a substância era mantida em meio ácido. Baseando-se nestas observações, foi proposto o estudo químico desta substância que aqui denominamos dímero. A obtenção desta segunda substância foi realizada através de reações químicas, utilizando como produto de partida o monômero. Outras reações também foram realizadas, com o intuito de auxiliar na elucidação estrutural deste metabólito.

No espectro de RMN de ^1H da substância tratada como monômero (Figura 10) foi possível observar sinais na região de hidrogênios aromáticos, condizentes com a presença de um anel aromático monossustituído (Tabela 2). Além disso, observou-se a presença de dois doubletos em δ 0,91 e 1,11 ($J = 6,9$ Hz); multipletos em 2,04 e 3,03 ppm e um duplo doubleto em δ 4,15. No espectro de RMN ^1H da substância tratada como dímero (Figura 11) observa-se a presença dos sinais descritos anteriormente de forma duplicada.

Figura 10. Espectro de RMN ^1H da substância descrita como monômero, 400 MHz, CD_3OD .

Figura 11. Espectro de RMN ^1H da substância descrita como dímero, 400 MHz, CDCl_3 .

Tabela 2. Dados de RMN ^1H da substância tratada como monômero.

^1H (δ); mult; J (Hz)
0,91; <i>d</i> ; 6,9
1,11; <i>d</i> ; 6,9
2,04; <i>m</i> ; 6,9
3,03; <i>m</i> ; 9,5
4,15; <i>dd</i> ; 9,5
7,23; <i>m</i>

Dentre os análogos desta nova família de substâncias, um metabólito foi identificado até o presente momento como 4,5,6-triidroxi-2-metil-7-fenil-3-heptanona. No espectro de RMN ^1H desta substância (Figura 12) foi possível observar a presença de um multipeto na região de hidrogênios aromáticos (δ 7,30), condizente com a presença de um anel aromático monossustituído (Tabela 3). Os sinais observados em δ 3,54 (1H, *d*, $J = 5,0$ Hz), 4,01 (1H) e 4,43 (1H, *t*, $J = 5,0$) foram atribuídos aos hidrogênios que sofrem efeito de desblindagem, ligados aos carbonos carbinólicos. Além disso, observou-se a presença de dois dubletos em δ 1,05 e 1,14 ($J = 7,0$ Hz), integrando para três hidrogênios cada, atribuídos às duas metilas ligadas ao mesmo carbono; e o multipeto em 2,90 ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado a este carbono.

No espectro de RMN ^{13}C desta substância (Figura 13) observou-se a presença de quatro sinais na região de carbonos aromáticos: δ 226,8, 128,7, 129,5 e 137,1; além de três sinais próximos a 70 ppm, relativos aos carbonos carbinólicos. O sinal em δ 214,9 sugere a presença de uma carbonila.

Figura 12. Espectro de RMN ^1H da 4,5,6-triidroxi-2-metil-7-fenil-3-heptanona, 600 MHz, CD_3OD .

Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C da 4,5,6-triidroxi-2-metil-7-fenil-3-heptanona, 600 MHz, CD_3OD .

Figura 14. Mapa de contornos HMBC (8 Hz) da 4,5,6-trihidroxi-2-dimetil-7-fenil-3-heptanona, 600 MHz, CD₃OD.

Tabela 03. Correlações entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC (8Hz) da substância 4,5,6-triidroxi-2-dimetil-7-fenil-3-heptanona (600 MHz, CD₃OD).

¹ H (δ); mult; <i>J</i> (Hz)	¹³ C (δ) HMQC	¹³ C (δ) HMBC
1,05; <i>d</i> ; 7,0	17,0	19,4; 37,8; 214,9
1,14; <i>d</i> ; 7,0	19,4	17,0; 37,8; 214,9
2,05; <i>d</i> ; 6,5		73,9; 77,5
2,76; <i>m</i>	39,0	128,7
2,90; <i>m</i> ; 6,5	37,8	
3,54; <i>d</i> ; 5,0		77,5; 214,9
4,01; <i>m</i>	73,9	
4,43; <i>t</i> ; 5,0	77,5	39,0; 77,5; 214,9
7,30; <i>m</i>		126,8; 128,7; 129,5; 137,1

No mapa de contornos HMBC foi possível observar correlações entre os carbonos e hidrogênios da cadeia lateral, bem como a correlação entre os hidrogênios metilênicos e um carbono aromático (Tabela 3, Figura 14). Ainda, a substância foi submetida à análise por espectrometria de massas e foi solicitado um experimento de HMBC a 5Hz. Embora a estrutura proposta ainda não tenha sido confirmada, foi realizada uma busca por estruturas químicas similares na literatura e até o presente momento consideramos esta uma substância inédita tanto como produto de origem natural, como intermediário sintético.

3.2. Estudos preliminares da via biossintética do monômero e de seus derivados

Através da análise dos espectros e placas cromatográficas provenientes do estudo de cinética de produção do monômero, foi possível inferir que este metabólito era produzido (ou detectado através dos métodos de análise utilizados) a partir do quarto dia de fermentação do micro-organismo. A partir destes resultados, foram realizados os primeiros experimentos com o intuito de propor a biogênese do monômero, que consistiram na fermentação da linhagem $\Delta\Delta D1$ suplementando o meio de cultivo com acetato de sódio deuterado (D_3 , 99%) no terceiro dia de crescimento e em segundo momento, procedendo duas suplementações (no terceiro e quinto dias). O precursor foi escolhido com base nas características estruturais dos demais metabólitos isolados previamente de *B. cinerea*, uma vez que a estrutura do monômero não está elucidada. Ainda, o uso de deutério em experimentos de marcação isotópica apresenta algumas vantagens, tais como o valor comercial (mais barato, quando comparado ao C_{13}) e sua baixa abundância natural, o que permite maiores diluições.

Através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de deutério não foi possível observar a presença de nenhuma marcação isotópica (Figura 15). Esses resultados motivaram a escolha de outro precursor, a glicose totalmente marcada com C_{13} , por ser uma molécula presente em todas as vias de biogênese. No entanto, para realizar este experimento de marcação seria necessário transferir o micro-organismo para um meio de cultivo sem glicose, para assegurar a incorporação das moléculas de glicose isotopicamente marcadas. Neste sentido, foram realizados experimentos de otimização com o intuito de observar se o micro-organismo era capaz de continuar produzindo o metabólito de interesse mesmo na ausência (ou em concentrações muito baixas) de glicose. Todavia, o monômero não foi observado nestes experimentos.

Figura 16. Espectro de RMN de deutério do monômero, 600 MHz, solvente: CH₃OH.

Diante de várias fermentações da linhagem $\Delta\Delta D1$, questionou-se a reprodutibilidade destes experimentos, uma vez que este fungo duplamente mutado parecia ser mais susceptível a algum tipo de variação ambiental, quando comparado às demais linhagens mutantes estudadas no laboratório. Sendo assim, foi proposto o estudo da biossíntese desta substância em outro mutante (linhagem Cnd15). Para tanto, a cinética de produção do monômero nesta linhagem também foi estudada. Nesta etapa do trabalho também se optou por submeter os extratos a uma reação em meio ácido, visando dimerizar o monômero; uma vez que, devido às condições do laboratório, a purificação do dímero (realizada por cromatografia em fase normal) era mais eficiente que a purificação do monômero (envolvia etapas de cromatografia em fase reversa).

A primeira fermentação foi realizada suplementando-se o meio de cultivo com acetato de sódio marcado isotopicamente no carbono 1 ([1-¹³C]-acetato de sódio) no mesmo dia da inoculação e no terceiro dia de fermentação. Através da análise do espectro de RMN de ¹³C, foi observada a incorporação do precursor marcado em uma posição, pelo aumento dos sinais próximos a 170 ppm (Figura 16) em comparação com o espectro da substância sem marcação (Figura 17).

Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C do dímero (experimento de marcação com $[1-^{13}\text{C}]$ -acetato de sódio), 600 MHz, CDCl_3 .

Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C do dímero, 600 MHz, CDCl_3 .

Durante a purificação do dímero foi isolado desta linhagem a toxina boticinina, cuja biogênese já é conhecida. Uma vez que este metabolito provém da via do acetato, foi obtido

um espectro de RMN de ^{13}C da substância isolada (Figura 18), como uma forma de validar o experimento de marcação.

Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C da boticinina (experimento de marcação com $[1-^{13}\text{C}]$ -acetato de sódio), 600 MHz, CDCl_3 .

Baseando-se nestes resultados inferiu-se que o monômero provavelmente origina-se de uma via biossintética mista. Sendo assim, novamente pensou-se em realizar um ensaio com glicose universalmente marcada. Entretanto, essa linhagem também se demonstrou como incapaz de produzir o monômero na ausência de glicose. Considerando a disponibilidade de precursor isotopicamente marcado no laboratório (7g de glicose $\text{U-}^{13}\text{CC}_6$, 99%) foi proposta a fermentação da linhagem em meio Czapeck Dox modificado (contendo 0,7% de glicose ao invés de 5%); no qual o micro-organismo seria cultivado tendo como fonte de glicose somente as moléculas marcadas. Novamente foi realizado um experimento usando meio de cultivo contendo 0,7% de glicose comum, com o objetivo de observar se nestas condições haveria a produção do monômero. Através da análise dos resultados obtidos a partir deste estudo, foi observado que o fungo era capaz de produzir o metabólito de interesse em quantidade significativa na presença de 0,7% de glicose no meio de cultivo. Sendo assim, o microrganismo foi fermentado nas condições descritas no item 2.3.11.

O estudo descrito anteriormente, bem como a fermentação realizada suplementando o meio de cultivo com *N*-metil metionina, foram feitos nas últimas semanas do estágio de

pesquisa realizado na Universidade de Cádiz. Sabendo-se que não haveria tempo para proceder com a purificação do extrato, foi obtido um espectro de RMN de ^{13}C , com o intuito de verificar se havia ocorrido a incorporação do precursor marcado (Figura 18).

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C do extrato da linhagem Cnd15 (experimento de marcação com glicose (U- $^{13}\text{C}6$, 99%), 600 MHz, CD_3OD).

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C inferiu-se que houve a incorporação do precursor marcado na substância boticinina (δ 150 ppm a 185 ppm), que consiste no metabólito majoritário observado neste extrato. Ainda, foram observados sinais na região de δ 130 ppm, que provavelmente correspondem ao monômero (outro metabólito majoritário neste extrato, conforme observado através da análise por CCDC e RMN ^1H).

O fracionamento do extrato e o isolamento das substâncias permitirão confirmar se houve a incorporação do precursor marcado e através da análise da posições onde ocorreram as marcações, será possível propor a biogênese desta classe de substâncias, que seria confirmada por meio de experimentos mais específicos.

4. Conclusões

Através do estudo químico de linhagens geneticamente modificadas de *B. cinerea*, o objetivo deste projeto de pesquisa foi alcançado, uma vez que foram isolados e caracterizados novos metabólitos, mediante a ativação de genes “silenciosos/ latentes” presentes no genoma da linhagem B 05.10 de *Botrytis cinerea*. Estes metabolitos não haviam sido isolados nas linhagens selvagens de *B. cinerea*, tendo sido conhecidos a partir do estudo químico de linhagens mutantes. Foram isoladas duas classes de substâncias, uma delas pertencentes à família dos aristoloquenos e a segunda, pode representar uma nova família de substâncias na espécie *B. cinerea*.

6. CONCLUSÕES GERAIS

As considerações finais acerca deste estudo estão discriminadas a seguir:

Estudo químico da macroalga marinha *Bostrychia radicans*:

- ✓ Foram identificados metabólitos ainda não descritos no gênero *Bostrychia*
- ✓ A substância 4-hidroxibenzaldeído já havia sido identificada em uma fração obtida a partir do extrato de *Bostrychia tenella*, que apresentou potencial antifúngico e leishmanicida;
- ✓ O ácido 4-hidroxibenzenoacético e o éster 4-hidroxibenzenoacetato de metila apresentam atividade antifúngica já descrita na literatura;
- ✓ A substância 4-metoximetilfenol apresenta ocorrência restrita, sendo inédito em algas marinhas;
- ✓ O éster 4-hidroxibenzoato de metila é inédito na família Rhodomelaceae;
- ✓ Os ácidos 4-hidroxifenilacético e hidroxi-4-hidroxifenilacético, bem como o éster 4-hidroxifenilacetato de metila, são inéditos no gênero *Bostrychia*.

Estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos associados à macroalga marinha *Bostrychia radicans*:

- ✓ Foi estabelecido um protocolo que permitiu o isolamento de 45 linhagens de fungos endofíticos da espécie *B. radicans*;
- ✓ A partir da *Xylaria* sp. foram isoladas as seguintes substâncias: ácido 2,5-diidroxibenzóico, 8-diidroxinaftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo, 8-metóxi-3-metil-1-isocromanona e ácido pilifórmico;
- ✓ O estudo químico de *Penicillium brevicompactum* resultou no isolamento das substâncias: ácido micofenólico, asperfenamato, brevianamida A, brevianamida C e brevianamida oxindol (inédita como produto natural);
- ✓ A partir de *Phomopsis longicolla* foi isolado o dicerandrol C;
- ✓ Foram avaliadas as atividades: antimicrobiana, antifúngica, antitumoral e o potencial para fotoproteção, sendo que as duas últimas apresentaram resultados promissores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Medica**, v. 69, p. 831-834, 2003.

ALMEIDA, C.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS, S.; SIERING, C.; KÖNIG, G. M. Hidroxylated sclerosporin derivatives from the marine-derived fungus *Cladophora malorum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 476-478, 2010.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal diversity**, v.41, p.1-16, 2010.

ANDERSEN, F.A., A final amended report on safety assesment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. **International Journal of Toxicology**, v.27, p. 1-82, 2008.

ANDRIANASOLO, E. H.; FRANCE, D.; CORNELL-KENNON, S.; GERWICK, W. H. DNA methyl transferase inhibiting halogenated monoterpenes from the Madagascar red marine alga *Portieria hornemannii*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 576-579, 2006.

BARREIRO, J. E. & BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BARNATHAN, G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: ocurrence, characterization and biological properties. **Biochemie**, v. 91, p. 671-678, 2009.

BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothyidine and spongouridine. **Journal of Organic Chemistry**, v.20, p.1501-1507, 1955.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, O. M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L. ; MINARINI, P. R. R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v.67, p.510-522, 2004.

BHAKUNI, D. S. & RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Nova Delhi: Anamaya, 2005, 328 p.

BIRCH, A. J.; RUSSELL, R. A. Studies in relation to biosynthesis-XLVI. Structural elucidations of Brevianamides B, C, D e F. **Tetrahedron**, v. 28, p. 2999-3008, 1972.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 29, p. 144-222, 2012.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 31-86, 2007.
Bohlin, L.; Goransson, U.; Alsmark, C.; Weden, C.; Backlund, A. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews** v. 9, p. 279-301, 2010.

BOHLIN, L.; GORANSSON, U.; ALSMARK, C.; WEDEN, C.; BACKLUND, A. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews** v. 9, p. 279-301, 2010.

BOHNERT, M.; WACKLER, B.; HOFFMEISTER, D. Spotlights on advances in mycotoxin research. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 87, p. 1-7, 2010.

BOUAICHA, N. ; AMADE, P. ; PUEL, D. Zarzissine, a new citotoxic guanidine alkaloid from the mediterranean sponge *Anchinoe paupertas*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n.10, p. 1455-1457, 1994.

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

CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2301-2317, 2010.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, p. 253-258, 2008.

CARVALHO, L. R., ROQUE, N. F. Fenóis Halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 757-64, 2000.

CARVALHO, L. R., FUJII, M. T.; ROQUE, N. F.; LAGO, J. H. G. Aldingenin derivatives from the red alga *Laurencia aldingensis*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 757-764, 2006.

CASSANO, V.; DE-PAULA, J.C.; FUJII, M. T.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenes from the introduced red seaweed *Laurencia caduciramulosa* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biochemical, Systematics and Ecology**, v.36, p. 223-226, 2008.

CATALÁN, C. A. N.; HELUANI, C. S.; KOTOWICZ, C.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 625-629, 2003.

CHEN, Z.; HUANG, H.; CHEN, Y, WANG, Z.; MA, J.; WANG, B.; ZHANG, W.; ZHANG, C.; JU, J. New Cytochalasins from the Marine-Derived Fungus *Xylaria* sp. SCSIO 156. **Helvética Chemica Acta**, v. 94, p. 1671-1676, 2011.

CHESTERS, N. C. J. E.; O'HAGAN, D. Biosynthesis of the fungal metabolite, piliformic acid (2-hexylidene-3-methylsuccinic acid). **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p. 827-834, 1997.

CHITTIBOYINA, A. G.; GUNDLURU, M. K.; CARVALHO, P. Total synthesis and absolute configuration of laurenditerpenol: a HIF-1 activation inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 6299-6302, 2007.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, T. C. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1541-1550, 2006.

COLLADO-VIDES, L.; GÓMEZ-ALCARAZ, G.; RIVAS-LECHUGA, G.; GÓMEZ-GUTIERREZ, V. Simulation of the clonal growth of *Bostrychia radicans* (Ceramiales-Rhodophyta) using Lindenmayer systems. **BioSystems**, v.42, p.19-27, 1997.

COLLADO I.G., ALEU, J., HERNÁNDEZ-GALÁN, R., DURÁN-PATRÓN R. *Botrytis* Species: An Intriguing Source of Metabolites with a Wide Range of Biological Activities. Structure, Chemistry and Bioactivity of Metabolites Isolated from *Botrytis* species. **Current**

Organic Chemistry v. 4, p. 1261-1286, 2000.

COLLADO, I.G., HANSON, J.R, MACIAS-SÁNCHEZ, A.J. **2001 a**, Clovane derivatives for treating phytopathogenic fungi infections as fungistatics of low ecological impact".ES 2154185 A1, CO7 CO35-37, N° solicitud 9802241.

COLLADO, I.G., HANSON, J.R, MACIAS-SÁNCHEZ, A.J. **2001b**, "Botryane analoges derivatives as inhibitors of the biosynthesis of botrydial and their use treating infections of phytopathogenic fungi, as fungistatics of low ecological impact". ES 2154199 A1, CO7 CO35-37, N° solicitud 9802639.

COLLADO ISIDRO G., ALEU CASATEJADA JOSEFINA, BUSTILLO ANTONIO JOSÉ Y HERNÁNDEZ GALÁN ROSARIO. **2004a**, "Derivatives comprising a phenylethanol backbone and preparation method thereof". N. de solicitud: PCT ES2004/000232, N° de Publicación WO2004/112479 A1.

COLLADO ISIDRO G., MACÍAS SÁNCHEZ ANTONIO J. Y DÍAZ AMIGO CARLOS. **2004b**, "Derivados clovánicos 2-N,9 sustituidos y su preparación, para el tratamiento de infecciones producidas por hongos fitopatógenos, como agentes fungiestáticos de bajo impacto ecológico". N. de solicitud: P200400620.

COLLADO ISIDRO G., ALEU CASATEJADA JOSEFINA, HERNÁNDEZ GALÁN ROSARIO. **2005a**, "Derivados con esqueleto de botcinolida como herbicidas de contacto, naturales y biodegradables". N. de solicitud: P200301467, N° de Publicación: 2 224 857.

COLLADO ISIDRO G., FEMENÍA RÍOS MARIA ENCARNACIÓN, MACIAS SÁNCHEZ ANTONIO J. Y GARCÍA PAJÓN CARLOS M., **2005b**. "Nuevos antioxidantes obtenidos de fuente natural y sintética, y procedimiento de extracción". N. de solicitud: P 2005 01121.

COLLADO I. G.; MACIAS-SÁNCHEZ, A. J. AND HANSON, J. R.. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Product Reports** v. 24, p. 674–686, 2007.

COLMENARES, A. J.; ALEU , J.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea* . **Journal of Chemical Ecology** v. 28, p. 997-1005, 2002a.

COLMENARES, A.J.; DURÁN-PATRÓN, R. M.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. AND COLLADO, I.G. Four New Lactones from *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products** v. 65, p.1724-1726, 2002b.

CORDELL, G. A. Phytochemistry and traditional medicine - A revolution in process. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 391-398, 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

CUI, C. M.; LI, X. M.; LI, H. F.; GAO, S. S.; WANG, B. G. Benzodiazepine alkaloids from marine-derived endophytic fungus *Aspergillus ochraceus*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 1366-1370, 2009.

DAI, J.; KROHN, K.; FLÖRKE, U.; PESCIPELLI, G.; KERTI, G.; PAPP, T.; KÖVÉRKEBÉNYEI, A.C.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KURTÁN, T. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry** p. 6928-6937, 2011.

DAVYT, D.; FERNANDEZ, F.; SUESCUN, S.; MOMBRÚ, A. V.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, L.; FUJII, M. T.; MANTA, E. Bisabolanos from the Red Alga *Laurencia scorparia*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p.1113-1116, 2006.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; KUMAR, V.; RAVISHANKAR, G. A. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. **Electronic Journal of Biotechnology**, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile, v. 10, p. 78-91, 2007.

DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B.; O'DONNELL, K.; WICKLOW, D. T. Kolokosides A-D: Triterpenoid Glycosides from a Hawaiian Isolate of *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.378-382, 2007.

DING, L.; QIN, S.; LI, F.; CHI, X.; LAATSCH, H. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red algae *Porphyra yezoensis*. **Current microbiology**, v.56, p. 229-235, 2008.

DORTA, E.; DIAZ-MARRERO, A. R.; CUETO, M.; D'CROZ, L.; MATE, J. L.; DARIAS, J. Chamigrenelactone, a polyoxygenated sesquiterpene with a novel structural type and devoid of halogen from *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.7065-7068, 2004.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, p. 53-58, 2001.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1137-44, 2002.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, PAUL; DELEN, NAFIZ; Editors. **2004**, Botrytis: Biology , Pathology and Control. *Kluwer Academic Publishers*, 428 pp.

EL-BEIH, A. A.; KATO, H.; OHTA, T.; TSUKAMOTO, S. (3R, 4aR,5S,6R)-6-Hydroxy-5-methylramulosin: a new ramulosin derivative from a marine-derived sterile mycelium. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 953-954, 2007.

ELSEBAI, M. F.; KEHRAUS, S.; LINDEQUIST, U.; SASSE, F.; SHAABAN, S.; GÜTSCHOW, M.; JOSTEN, M.; SAHL, H. G.; KÖNIG, G. M. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereal*. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 802-808, 2010.

EL GAMAL, A. A.; WANG, W. W.; DUH, C. H. Sulfur-containing polybromindoles from the formosan red alga *Laurencia brongniartii*. **Journal of Natural Products**. v.68, p. 815-817, 2004.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.19, p.1-48, 2002.

FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M.; YOKOYA, N. S. 4-(Hidroximetil)-benzenossulfato de potássio: metabólito inédito isolado da alga marinha *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Química Nova**, v.31, p.837-839, 2008.

FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE S.; YOUNG, M.C.M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red algae *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.

FENICAL, W.; PAUL, V. J. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. **Hydrobiologia**, v. 11, p. 135-140, 1984.

FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; GIL, L. V.; E NORTE, M. Isolation of naturally occurring dactylomelane metabolites as *Laurencia* constituents. **Tetrahedron**, v.61, p.8910-8915, 2005.

FOLMER, F.; JASPARS, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemical Reviews**, v. 9, p. 557-579, 2010.

FUJII M.T.; CASSANO M.; STEIN E.M.; CARVALHO, L.R. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 268-282, 2011.

FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H.; KATO, Y.; BRINEN, L. S.; CLARDY, J.; SNADER, K. M.; BOYD, M. R. A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 3007-3011, 1992.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F. ; RÉZIG, S.H. **Algas – uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 1ª Ed. Porto Alegre: ARTMED. 332p. 2010.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; ABDEL-LATEFF, A.; OKINO, T. Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algicolous marine fungus *Penicillium* sp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 317-322, 2009.

GAO, S.S.; LI, X.M.; ZHANG, Y.; LI, C.S.; WANG, B.G. Conidiogenones H and I, two new diterpenes of cyclopiane class from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Chemical Biodiversity**, v. 8, p. 1748-1753, 2011.

GAO, S.S.; LI, X.M.; DU, F.Y.; LI, C.S.; PROKSCH, P.; WANG, B.G. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, p. 59-70, 2011.

GAO, S.S.; LI, X.M.; LI, C.S.; PROKSCH, P.; WANG, B.G. Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2894-2897, 2011.

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.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v.76, p.73-82, 2005.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-669, 2010.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v.45, p.160-168, 2006.

GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 269-284, 2010.

HAYASHI, J.; SEKINE, T.; DEGUCHI, S.; LIN, Q.; HORIE, S.; TSUCHIYA, S.; YANO, S.; WATANABE, K.; IKEGAMI, F. Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. **Phytochemistry**, v.59, p.513-519, 2002.

HILL, R. A. Marine natural products. **Annul Reports on the Progress of Chemistry, Section B**, v. 102, p. 123-37, 2006.

HILL, R. A. Marine natural products. **Annul Reports on the Progress of Chemistry, Section B**, v.103, p.125-139, 2007.

HILL, R. A. Marine natural products. **Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section B**, v.108, p.131-146, 2012.

HIRATA, Y.; UEMURA, D.; UEDA, K.; TAKANO, S. Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (Coelenterata). **Pure and Applied Chemistry**, v. 51, p. 1875-1883, 1979.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. A new tyrosine inhibitor from a marine isolate of *Ulocladium botrytis* and new metabolites from the marine fungi *Asteromyces cruciatus* and *Varicosporina ramulosa*. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 2949-2955, 1999.

HOMANS, A. L.; FUCKS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v.51, p. 327-9, 1970.

HOWARD, D.H. **Fungi pathogenic for humans and animals**. New York: Marcel Dekker, USA, 1983.

ISAKA, M.; CHINTHANOM, P.; BOONRUANGPRAPA, T.; RUNGJINDAMAI, N.; PINRUAN, U. Eremophilane-Type Sesquiterpenes from the Fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 683-687, 2010.

ISAKA, M.; YANGCHUM, A.; AUNCHAROEN, P.; SRICHOMTHONG, K.; SRIKITIKULCHAI, P. Ring B Aromatic Norpimarane Glucoside from a *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 300-302, 2011.

JAYASEKARA, T. K. ; STEVENSON, P. C.; BELMAIN, S. R.; FARMAN, D. I.; HALL, D.R. Identification of methyl salicylate as the principal volatile component in the methanol extract of root bark of *Securidaca longepedunculata* Fers. **Journal of Mass Spectroscopy**, v.37, p.577-580, 2002.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; DING, L-P.; WANG, B-G. Aristolane sesquiterpenes and highly brominated indoles from the marine red alga *Laurencia similes* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**. v. 90, p. 385-91, 2007.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; DING, L-P.; WANG, B-G. Laurendecumallenes A–B and Laurendecumenynes A–B, Halogenated Nonterpenoid C15-Acetogenins from the Marine Red Alga *Laurencia decumbens*. **Journal of Natural Products**. v.70, p. 1499-1502, 2007.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; LI, K.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Halogenated sesquiterpenes and non-halogenated linear C15-acetogenins from the marine red alga *Laurencia composita* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.938-941, 2008a.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; LI, K.; WANG, B-G. Halogenated terpenes and a C15-acetogenin from the marine red alga *Laurencia saitoi*. **Molecules**, v.13, p.2894-2899, 2008b.

Jl, N-Y.; LI, X-.; XIE, H.; DING, J.; LI, K.; DING, L-P.; WANG, B-G. Highly oxygenated triterpenoids from the marine red alga *Laurencia mariannensis* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v.91, p.1940-1946, 2008c.

JIMENEZ-ROMERO, C.; ORTEGA-BARRIA, E.; ARNOLD, A.E.; CUBILLA-RIOS, L. Activity against *Plasmodium falciparum* of Lactones Isolated from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 700–703, 2008.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 11ª Edição, 1993, 777p.

JONES, E. B. G.; STANLEY, S. J.; PINRUAN, U. Marine endophyte sources of new Chemicals natural products: a review. **Botanica Marina**, v.51, p.163-170, 2008.

KAMENARSKA, Z.; IVANOVA, A.; STANCHEVA, R.; STOYNEVA, M.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application. **Botanica Marina**, v. 49, p. 47-56, 2006.

KARSTEN, U.; BOCK, C.; WEST, J. A. Low molecular weight carbohydrate patterns in geographically different isolates of the eulittoral red alga *Bostrychia tenuissima* from Australia. **Botanica Acta**, v. 108, p. 321-6, 1995.

KARSTEN, U.; GORS, S.; EGGERT, A.; WEST, J. A. Trehalose, digeneaside, and floridoside in the Florideophyceae (Rhodophyta) – a reevaluation of its chemotaxonomic value. **Phycologia**, v.46, p.143-50, 2007.

KHARWAR, R.N.; MISHRA, A.; GOND, S.K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.

KHOTIMCHENKO, S. V. & GUSAROVA, I. S. Red Algae of Peter the Great Bay as a Source of Arachidonic and Eicosapentaenoic Acids. **Russian Journal of Marine Biology**, v.30, p.183-187, 2004.

KIJJOA, A. & SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the sea. **Marine Drugs**, v.2, p.73-82, 2004.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A.H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v.5, p. 479-490, 2010.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; FURNARI, G.; MOREAU, D.; ROUSSAKIS, C. ; ROUSSIS, V. Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron Letters**, v.46, p.5723-5726, 2005.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; FURNARI, G.; SERIO, D. ; ROUSSIS, V. New sesquiterpenes from the red algae *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron Letters**, v.63, p.7606-7611, 2007.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; SIMONI, B.; ANDREA, T. ; ROUSSIS, V. Tetrahydrofuran acetogenins from *Laurencia glandulifera*. **Journal of Natural Products**, v.X, 2009.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; FURNARI, G.; SERIO, D. ; ROUSSIS, V. KREMER, B. P. Distribution of Alditols in the Genus *Bostrychia*. **Biochemical, Systematics and Ecology**, v.4, p.139-141, 1976.

KLAIKLAY, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPODMA, Y.; PHONGPAICHT, S.; BUATONG, J.; BUSSABAN, B. Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, p. 1127-1131, 2012.

KOHLMEYER, J. Revisions and descriptions of algicolous marine fungi. **Journal of Phytopathology**, v.63, p. 342-363, 1968.

KOHLMEYER, J.; VOLKMANN- KOHLMEYER, B. Marine ascomycetes from algae and animal hosts. **Botanica Marina**, v. 46, p. 285-306, 2003.

KUBOTA, T.; TAKAHASHI, A.; TSUDA, M. E KOBAYASHI, J. Luteophanol D, New Polyhydroxyl Metabolite from Marine Dinoflagellate *Amphidinium* sp. **Marine Drugs**, v.3,113-118, 2005.

KUNIYOSHI, M.; WAHOME, T. M.; HASHIMOTO, T.; YOKOYAMA, M.; SHRESTHA, K. L.; HIGA, T. Terpenoids from *Laurencia luzonensis*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.1314-1317, 2005.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Products Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.

LANE, A.L. & MOORE, B.S. A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 411-428, 2011.

LI, K.; LI, X-M.; JI, N-Y.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Urceolatin, a structurally unique bromophenol from *Polysiphonia urceolata*. **Organic Letters**, v.10, p.1429-1432, 2008.

LI, K.; LI, X-M.; JI, N-Y.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. **Journal of Natural Products**, v.71, p.28-30, 2008.

LI, K.; LI, X-M.; JI, N-Y.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Isolation, Characterization, and Antioxidant Activity of Bromophenols of the Marine Red Alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 9916-9921, 2011.

LI, Y.; LU, C. ; HUANG, Y.; LI, Y.; SHEN, Y. Cytochalasin H2, a New Cytochalasin, Isolated from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. A23. **Records of Natural Products**, v.6, p.121-126, 2012.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; ZHOU, J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 78, p. 241–247, 2008.

LIU, S.; YAN, X.; YU, M.; CHEN, J.; ZHANG, L. A novel compound from *Penicillium* sp. **Chemistry of natural compounds**, v. 46, p. 116-118, 2010.

LI, J. W. –H. & VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LYAKHOVA, E. G.; KALINOVSKY, A. I.; KOLESNIKOVA, S. A.; BASKOVSKY, V. E.; STONIK, V. A. Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2527-32, 2004.

MA, M.; ZHAO, J.; WANG, S.; LI, S.; YANG, S.; SHI, J.; FAN, X.; HE, L. Bromophenols coupled with nucleoside bases and brominated tetrahydroisoquinolines from the red alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.337-341, 2007.

MAKHANU, D. S.; YOKOYAMA, M.; MIONO, T.; MAESATO, T.; MAEDOMARI, M.; WISESPONGPAND, P.; KUNIYOSHI, N. New sesquiterpenes from the Okinawan red alga *Laurencia luzonensis*. **Bulletin of the College of Science, University of the Ryukyus**. No.81 2006.

MAO, S-C.; GUO, Y-W. A laurane sesquiterpene and rearranged derivatives from the Chinese red alga *Laurencia okamurai* Yamada. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1209-11, 2006.

MAO, S.; LEE, S.; HWANGBO, H.; KIM, Y.; PARK, K.; CHA, G.; PARK, R.; KIM, K. Isolation and Characterization of Antifungal Substances from *Burkholderia* sp. Culture Broth. **Current Microbiology**, v.53, p.358-364, 2006.

MAYER, A.M.S; GLASER, K.B.; CUEVAS,C.; JACOBS, R.S.; KEM, W.; LITTLE, R.D., McINTOSH, J.M.; NEWMAN, D.J.; POTTS, B.C.; SHUSTER, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.31, p.255-265, 2010.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v.68, p.2015-2022, 2007.

MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology**. CRC Press, USA, 2001.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOHAMMED, K. A.; HOSSAIN, C. F.; ZHANG, L.; BRUICK, R. K.; ZHOU, Y. D.; NAGLE, D. G. Laurenditerpenol, a New Diterpene from the Tropical Marine Alga *Laurencia intricata* that Potently Inhibits HIF-1 Mediated Hypoxic Signaling in Breast Tumor Cells. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2002-2007, 2004.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 69-85, 2009.

MOLITORIS, H.P. Mushrooms in medicine, folklore and religion. **Feddes Repertorium** v. 113, p. 165-182, 2002.

NAGLE, D. G.; ZHOU, Y. Marine natural products as inhibitors of hypoxic signaling in tumors. **Phytochemical Reviews**, v. 8, p.415-429, 2009.

NECHEV., J.; CHRISTIE, W.W.; ROBAINA, R.; DIEGO, F.; POPOV, S.; STEFANOV, K. Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canarian Islands. **Comparative Biochemical Physiology**, v.137, p.365-374, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine Natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1216-1238, 2004.

NEWMAN, D. J. E CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products Reviews**. Published on Web, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, v.17, p.215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 25, p. 311-335, 2012.

NOSEDA, M.D.;TÚLIO, S.; DUARTE, M.E.R. Polysaccharides from the red seaweed *Bostrychia montagnei*: chemical characterization. **Journal of Applied Phycology**, v.11, p.35-40, 1999.

de OLIVEIRA, A. L. L. **Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – FCFRP, USP, Ribeirão Preto, 2009.

de OLIVEIRA, A.L.L.; SILVA, D.B.; TURATTI, I.C.C.; YOKOYA, N.S.; DEBONSI, H.M. Volatiles constituents of Brazilian *Bostrychia* species (Rhodomelaceae) from mangrove and rocky shore. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 761-765, 2009.

de OLIVEIRA, A.L.L.; de FELÍCIO, R.; DEBONSI, H.M. Marine Natural Products: Chemical and biological potential of Seaweeds and their Endophytic Fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22. p.906-920, 2012.

OLIVEIRA, C.M.; REGASINI, L.O.; SILVA, G.H.; PFENNING, L.H.; YOUNG, M.C.M.; BERLINCK, R.G.S.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A.R. Dihydroisocoumarins produced by

Xylaria sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry letters**, v.4, p.93-96, 2011.

OSMANOVA, N., SCHULTZE, W., AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews** v. 9, p. 315–342, 2010.

OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G.M.; HÖLLER, U.; WRIGHT, A.D. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p.306-313, 2002.

OSTERHAGE, C.; KAMINSKY, R.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 6412-6417, 2000.

PALERMO, J.A. Produtos naturales de origem marinha. In: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org) Editoras UFRGS/ UFSC, 2003, 821.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**, Thomson Learning, USA, 2001.

PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2002, 382p.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Products Reports**, v.26, p.338-362, 2009.

PINEDO, CRISTINA; WANG, CHIEH-MEI; PRADIER, JEAN-MARC; DALMAIS, BERENGERE; CHOQUER, MATHIAS; LE PECHEUR, PASCAL; MORGANT, GUILLAUME; COLLADO, ISIDRO G.; CANE, DAVID E.; VIAUD, MURIEL. Sesquiterpene Synthase from the Botrydial Biosynthetic Gene Cluster of the Phytopathogen *Botrytis cinerea*. **ACS Chemical Biology** v.12, p. 791-801, 2008.

PINTO, C. A.; SILVA D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TANTICHAROEN, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 1341-1344, 2005.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; KUHN, T.; PELZING, M.; SAKAYAROJ, J.; TAYLOR, W.C. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. **Phytochemistry**, v. 69, p.1900–1902, 2008.

PONTIUS, A.; MOHAMED, I.; KRIK, A.; KÖNIG, G. Aromatic poliketides from marine algicolous fungi. **Journal of Natural Products**, v.71, p.272-274, 2008.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

PYO, M. K.; JIN, J. L.; KOO, Y. K.; YUN-CHOI, H. S. Phenolic and furan type compounds isolated from *Gastrodia elata* and their anti-platelet effects. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 381-385, 2004.

QIAO, M.F.; JI, N.Y.; MIAO, F.P.; YIN, X.L. Steroids and an oxylipin from an algicolous isolate of *Aspergillus flavus*. **Magnetic Resonance Chemistry** v. 49, p. 366-369, 2011.

QIAO, M.F.; JI, N.Y.; LIU, X.H.; LI K.; ZHU, Q.M.; XUE, Q.Z. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 5677-5680.

QUANG, D.N.; BACH, D.D. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from Vietnamese *Xylaria* sp. possessing inhibitory activity of nitric oxide production. **Natural Products Research**, v. 22, p. 901-906.

REBORDINOS L., M. SANTOS, I. VALLEJO, I.G. COLLADO AND J.M. CANTORAL. Molecular characterization of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Recent Research Developments in Phytochemistry** v.1, p. 293-307, 1997.

REBORDINOS L., I. VALLEJO, M. SANTOS, I.G. COLLADO, M. CARBU AND J.M. CANTORAL. Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*. **Revista Iberoamericana de Micología** v.16, p. 9-15, 2000.

REVIERS, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**, ARTMED: Porto Alegre, 2006.

ROMMINGER, S. **Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum***. Dissertação de Mestrado, IQSC, USP, São Carlos, 2008.

ROULLIER, C.; CHOLLET-KRUGLER, M.; PFERSCHY-WENZIG, E.; MAILLARD, A.; RECHBERGER, G.N.; LEGOUIN-GARGADENNEC, B.; BAUER, B.; BOUSTIE, J. Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1348-1357, 2011.

De ROSA, S.; KAMENARSKA, Z.; BANKOVA, V.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; POPOV, S. Chemical composition and biological activities of the Black Sea Algae *Polysiphonia denudata* (Dillw.) Kütz and *Polysiphonia denudata* f. *fragilis* (Sperk) Woronich. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.56, p.1008-1014, 2003.

De ROSA, S.; KAMENARSKA, Z.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; NINOVA, V.; POPOV, S. Chemical composition of *Corallina mediterranea* Areschoug and *Corallina granifera*. Ell. Et. Soland. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58, p.325-323, 2003.

ROSSI, M.; MATTOS, I. F. A. Solos de mangue do estado de São Paulo: caracterização química e física. **Revista do Departamento de Geografia, USP** v.15, p.101-113, 2002.

RUI, F. & BOLAND, W. Algal pheromone biosynthesis: stereochemical analysis and mechanistic implications in gametes of *Ectocarpus siliculosus*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, p. 3958-3964, 2010.

SAKAI, R.; MINATO, S.; KOIKE, K.; JIMBO, M.; KAMIYA, H. Cellular and subcellular localization of kainic acid in the marine red alga *Digenea simplex*. **Cellular Tissue Research**, v. 322, p. 491-502, 2005.

SCHMITT, B.; SCHNEIDER, B. Dihydrocinnamic acids are involved in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. **Phytochemistry**, v.52, p.45-53, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Micological Research**, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Micological Research**, v. 109, p. 661-668, 2005.

SIEWERS VERENA, VIAUD MURIEL, JIMÉNEZ-TEJA DANIEL, G. COLLADO ISIDRO, GRONOVER CHRISTIAN SCHULZE, PRADIER JEAN-MARC, TUDZYNSKI BETTINA, TUDZYNSKI PAUL. Functional análisis of the cytochrome P450

monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. **Microbial Plant Molecular Interaction** v. 18, p. 602-612, 2008.

SILVA, V. C.; CARVALHO, M. G.; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). **Natural Medicine Note**, v. 62, p. 356-357, 2008.

SILVA, G.H.; DE OLIVEIRA, C.M.; TELES, H.L.; PAULETTI, P.M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; COSTA-NETO, C.M.; PFENNING, L.H.; BERLINCK R.G.S.; ARAUJO, A.R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry letters**, v.3, p.164-167, 2010.

SINGH, S.P.; KUMARI, S.; RASTOGI, R.P.; SINGH, K.L.; SINHA, R.P. Mycosporine-like amino acids (MAAs): Chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 7-17, 2008.

SMIT, A. J.; Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, p. 245-262, 2004.

SRIDEVI, K. V.; VENKATESHAM, U.; REDDY, A. V.; VENKATESWARLU, Y. Chemical constituents of the red alga *Nitophyllum marginata*. **Biochemical, Systematics and Ecology**, v. 31, p.335-337, 2003.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22 , p.315-333, 2002.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, p.257-268, 2004.

SUN, J.; SHI D.;MA, M.; LI, S.; WANG, S.; HAN, L.; YANG, Y.; FAN, X.; SHI, J.; HE, L. Sesquiterpenes from the red algae *Laurencia tristicha*. **Journal of Natural Products**, v.68, 915-919, 2005.

SUZUKI, M.; TAKAHASHI, Y.; MITOME, Y.; ITOH, T.; ABE, T.; MASUDA, M. Brominated metabolites from an Okinawan *Laurencia intricata*. **Phytochemistry**, v.60, p.861-7, 2002.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TANSUWAN, S.; CHANAPRAT, P.; TEERAWATANANOND, T.; MUANGSIN, N.; PORNPAKAKUL, S. (4S,5S,6S)-4-Hydroxy-3-methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one. **Acta Crystallographica**, v. 66, p. 2263, 2010.

TARMAN, K.; LINDEQUIST, U.; WENDE, K.; PORZEL, A.; ARNOLD, N.; WESSJOHAN, L.A. Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. **Marine Drugs**, v.9, p. 294-306, 2011.

TÜNEY, I.; ÇADIRCI, B. H.; ÜNAL, D.; SUKATAR, A. Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). **Turk Journal of Biology**, v.30, 171-175, 2006.

VAIRAPPAN, C. S.; KAWAMOTO, T.; MIWA, H. SUZUKI, M.; Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. **Planta Medica**, v.70, p.1087-1090, 2004.

VALLEJO I., M. SANTOS, J.M. CANTORAL, I.G. COLLADO AND L. REBORDINOS. Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea*. **Hereditas** v. 124, p. 31-38, 1996.

VIDOTTI, E. C. & ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química nova**, v.27, p.139-145, 2004.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WAGENAAR, M. M.; CLARDY, J. Dicerandrols, New Antibiotic and Cytotoxic Dimers Produced by the Fungus *Phomopsis longicolla* Isolated from an Endangered Mint. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1006-1009, 2001.

WANG, S., LI, X.L., TEUSCHER, F., LI, D.L., DIESEL, A., EBEL, R., PROKSCH, P., WANG, B.G. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1622-1625, 2006.

WHITEHEAD, K. & HEDGES, J.I. Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.7, p. 2133-2138, 2003.

WILLIAMS, R. M.; SANZ-CERVERA, J. F.; SANCENO, F.; MARCO, J. A.; HALLIGAN, K. Biomimetic Diels-Alder cyclizations for the construction of the Brevianamide, Paraherquamide Sclerotamide, and VM55599 ring systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 1090-1091, 1998.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymer**, v. 84, p. 14-21, 2011.

WIJESINGHE, W. A. J. P. & JEON, Y-J. Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. **Phytochemical Reviews**, v. 10, p. 431-443, 2011.

WU, W.; DAI, H.; BAO, L.; REN, B.; LU, J.; LUO, Y.; GUO, L.; ZHANG, L.; LIU, H. Isolation and Structural Elucidation of Proline-Containing Cyclopentapeptides from an Endolichenic *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1303-1305, 2011.

YAN, S.; LI, S.; WU, W.; ZHAO, F.; BAO, L.; DING, R.; GAO, H.; WEN, H-A.; SONG, F.S.; LIU, H-W. Terpenoid and Phenolic Metabolites from the Fungus *Xylaria* sp. Associated with Termite Nests. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 1689-1700, 2011.

YIN, W.; LIN, Y.; SHE, Z.; VRIJMOED, L.L.P; JONES E.B.G. A new compound: Xyloketal H from mangrove fungus *Xylaria* sp. From the south china sea coast. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, p. 3-5, 2008

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

ZHANG, Y.; LI, X. M.; WANG, B. G. Nigerasperones A-C, new monomeric and dimeric naphtho- γ -pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *J Antibiot* 60: 204-210, 2007a.

ZHANG, Y.; LI, X. M.; WANG, C. Y.; WANG, B. G. A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Chinese Chem Lett* 18: 951-953, 2007b.

ZHANG, Y.; LI, X. M.; FENG, Y.; WANG, B. G. Phenethyl- α -pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Nat Prod Res* 24: 1036-1043, 2010.

ZHAO J.; FAN, X.; WANG, S.; LI, S.; SHANG, S.; YANG, Y.; XU, N.; LÜ, Y.; SHI, J. Bromophenol derivates from the red alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1032-35, 2004.

ZHU, T. J.; DU, L.; HAO, P. F.; LIN, Z.J.; GU, Q. Q. Citrinal A, a novel tricyclic derivative of citrinin, from an algicolous fungus *Penicillium* sp. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 917-920, 2009.

ZUCCARO, A. & MITCHELL, J. I. Em: DIGHTON, J.; WHITE, J. F.; OUDEMANS, P. **The fungal community** 3rd edition; CRC Press: New York, 2005.

ZUCARELLO, G. C.; WEST, J. A. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on north american isolates. **Journal of Phycology**, v.39, p.948-959, 2003.