UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Prospecção química e biológica em fungos endofíticos
associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**

DENISE OLIVEIRA GUIMARÃES

Ribeirão Preto
2006

DENISE OLIVEIRA GUIMARÃES

**Prospecção química e biológica em fungos endofíticos
associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –
USP para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas, área de concentração:
Produtos Naturais e Sintéticos.**

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Apoio: FAPESP

Ribeirão Preto

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto – USP

Guimarães, Denise Oliveira

Prospecção química e biológica em fungos endofíticos
associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae).

Ribeirão Preto, 2006.

208 p. : il. ; 30 cm

Bibliografia p.: 181-197

Dissertação de Mestrado, apresentada à
FCFRP/USP/DEPTº de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico

1. Fungos endofíticos
2. Metabólitos secundários
3. Atividade Biológica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Denise Oliveira Guimarães

Título: Prospecção química e biológica em fungos endofíticos isolados de *Viguiera arenaria* (Asteraceae)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:___/___/2006.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe, uma mulher forte por natureza, dotada de um espírito familiar que preza sempre a união, o amor e o respeito ao próximo. Seu constante apoio tem sido fundamental para meu desenvolvimento como ser humano.

Ao meu querido Alessandro, um ser humano que possui uma das mais nobres virtudes: a humildade. O seu amor, respeito e companheirismo têm me mostrado o quanto você é e será especial em minha vida.

À pequenina Sofia, que veio ao mundo me ensinando o quanto é preciso lutar e valorizar a vida.

À querida Profa. Mônica, uma pessoa meiga, paciente e muito competente em tudo que faz. Sua oportunidade me fez crescer como profissional e como pessoa e por isso serei eternamente grata ao seu apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de amor e sabedoria, que nos dá a cada nascer do sol uma oportunidade nova de crescermos e amadurecermos como cristãos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo financiamento deste projeto.

À Profa. Dra. Suraia Said pela disponibilidade e carinho em ensinar a trabalhar com os fungos.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (Betão) pela amizade, carinho e disponibilidade em discutir resultados e realizar experimentos de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo pela paciência e contribuição na realização dos ensaios antitumorais.

Ao Prof. Dr. Carlos H. T. P. Silva pela amizade, paciência e pela imensa ajuda nos cálculos de modelagem molecular.

Aos Prof. Dr. Glaucius Oliva e Prof. Dr. Otávio Thiemann do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos – USP, pela imensa colaboração na realização dos ensaios de inibição enzimática.

Ao Prof. Dr. Jairo Kennup Bastos e Prof. Dra. Maria José Vieira Fonseca por estarem sempre dispostos a ajudar e disponibilizar tanto os laboratórios quanto os equipamentos necessários para o desenvolvimento de algumas partes deste trabalho.

À Profa. Dra. Ivone Carvalho pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela amizade, sugestões e discussões de espectros.

À amiga Cláudia (Laboratório de Química Farmacêutica), que sempre com muita disponibilidade, carinho, paciência e amizade esteve presente nas rotinas de laboratório.

À amiga Áurea (Laboratório de Síntese de Fármacos), uma pessoa calma e amiga, que me ensinou e ajudou na manipulação do HPLC.

Aos amigos Edmárcio e Angélica (Laboratório de Enzimologia Industrial), por não medirem esforços em me ajudar, especialmente na parte biológica deste trabalho.

Ao amigo Valter (Laboratório de Farmacognosia), uma pessoa cheia de bom humor e disponibilidade.

Ao amigo Tomás (Laboratório de Química Orgânica) que sempre com muita atenção, disponibilidade e carinho contribuiu para a obtenção dos espectros de massas.

Ao amigo Warley, que me ajudou neste trabalho deste a coleta da planta até discussão de estruturas químicas. Você foi um companheiro muito especial durante esta jornada. Nossa rotina no laboratório ficará sempre guardada no meu coração.

À amiga Cristina (Cris) pela identificação dos fungos endofíticos. Além disso, é uma pessoa muito especial, pois admiro muito seu esforço e sua amizade.

À amiga Niede (Nini), uma pessoa doce e meiga. Obrigada pelo carinho e paciência em me ensinar os ensaios antimicrobianos.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica que permitiram que a rotina de trabalho fosse mais divertida: Anderson, Daniela (Dani), Gláucia, Henrique Moreira, Henrique Ramos, Laiani, Luciano, Netto, Adriane, Bárbara, Lílian, Peterson (Petão), Vanessa, Milena.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia pela amizade: Ana Sílvia, Marley (Bob), Nilton (Niltinho), João Paulo, Sérgio, Gustavo (Pedrega).

Ao meu irmão Gilberto (Gil) que esteve presente em tantos momentos da minha vida sempre me apoiando e me mostrando o lado bom da vida. Obrigada também à minha cunhada Euda pelo apoio e interesse em me ajudar.

A três pessoas da minha família, com um carinho muito especial: Tia Zenair, Mércia (prima) e Carolina (Carol), vocês são pessoas que sempre demonstraram presença e carinho em minha vida.

Ao Armando e à Regina que compreendem minha ausência e apóiam meu crescimento profissional.

Às queridas amigas que tornaram parte da minha família em Ribeirão Preto: Clarissa (Clara) e Gislaine (Gis). O carinho e a amizade de vocês foram fundamentais para que eu pudesse ter a alegria de uma família feliz “fora de casa”.

Às amigas Lívia (coleguinha), Jeane, Lauriane, Juliana Viturino, que apesar da distância ainda posso contar com a amizade de vocês!!!

À uma pessoa muito querida e que estará sempre guardada com muito carinho e respeito em meu coração: minha avó Andreina (*in memoriam*). Foi através de seus ensinamentos que aprendi a dar sempre uma chance ao próximo, a fazer as coisas com capricho e responsabilidade. Espero que eu possa repassar e por em prática o que você me ensinou. Obrigada vizinha!

“Sem luta não pode haver vitória. Se não existissem as dificuldades, os esforços seriam inúteis; se não houvesse o sofrimento e provações, não existiriam a paciência e a resignação”

Alberto Montalvão

“Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento”

Dalai Lama

SUMÁRIO

Lista de ilustrações	i
Lista de tabelas	v
Lista de anexos	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Resumo	x
Abstract	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Produtos Naturais e Biodiversidade	1
1.2 Produtos naturais de origem microbiana	6
1.3 Interações fungo-planta	8
1.4 Fungos endofíticos	9
1.5 A família Asteraceae	17
1.6 Fungos endofíticos de Asteraceae	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Materiais	25
3.1.1 Solventes	25
3.1.2 Reagentes e fases estacionárias usados nos meios de cultura, ensaios antimicrobianos e colunas cromatográficas	25
3.1.3 Equipamentos	27

3.1.4 Vidrarias e outros equipamentos	27
3.1.5 Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos	28
3.1.6 Linhagens tumorais utilizadas	29
3.2 Métodos	29
3.2.1 Obtenção do material vegetal	29
3.2.2 Preparo do meio de cultura ágar batata dextrose (BDA)	30
3.2.3 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos	30
3.2.4 Manutenção do estoque de microrganismos	31
3.2.5 Identificação dos microrganismos	32
3.2.5.1 Taxonomia convencional	32
3.2.5.2 Identificação molecular dos fungos endofíticos	32
3.2.6 Condições de cultura	34
3.2.6.1 Preparo e inoculação dos fungos em meio pré-fermentativo (Jackson) e produção de metabólitos em meio fermentativo (Czapek)	35
3.2.7 Preparação dos extratos	36
3.2.8 Triagem química através de espectros RMN ^1H e perfis cromatográficos (CLAE) dos extratos acetato de etila	39
3.2.9 Cultivos em Escala Ampliada	39
3.2.10 Fracionamentos dos extratos orgânicos do fungo VA1	40
3.2.10.1 Fracionamento do extrato bruto AcOEt (VA1A)	40
3.2.10.2 Fracionamento do extrato micelial MeOH (VA1M)	44
3.2.10.2.1 Fracionamento em coluna da fração VA1MA	45
3.2.10.2.2 Fracionamento da fração VA1MNB	46
3.2.11 Fracionamentos dos extratos orgânicos do fungo VA17	49

3.2.11.1	Fracionamento do extrato bruto AcOEt (VA17A)	49
3.2.11.2	Fracionamento do extrato micelial metanólico VA17M	51
3.2.11.2.1	Partição líquido-líquido do extrato VA17M	51
3.2.11.2.2	Fracionamento em coluna da fração VA17MMA	52
3.2.12	Isolamento da substância IV do fungo VA 5	54
3.2.13	Elucidação estrutural das substâncias isoladas	55
3.2.14	Ensaio de atividade antimicrobiana (Difusão em ágar)	55
3.2.14.1	Preparação da camada de Base	55
3.2.14.2	Preparação do inóculo	56
3.2.14.3	Difusão em ágar	56
3.2.14.4	Revelação	57
3.2.15	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca utilizando cloreto de trifeniltetrazólio	58
3.2.15.1	Microrganismo utilizado	58
3.2.15.2	Preparo do inóculo	58
3.2.15.3	Determinação da atividade antimicrobiana das substâncias I, II, III e VI	59
3.2.16	Ensaio de atividade antitumoral	59
3.2.16.1	Linhagens tumorais humanas	60
3.2.16.2	Meios de Cultura Celular	60
3.2.16.3	Preparação dos extratos para teste de atividade antitumoral	60

3.2.16.4 Ensaio de atividade citotóxica em linhagens tumorais dos extratos	61
3.2.17 Ensaios de inibição de atividades enzimáticas	62
3.2.17.1 Ensaio enzimático com GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
3.2.17.2 Ensaio enzimático com APRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	63
3.2.18 Cálculos de modelagem molecular	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
4.1 Isolamento de endofíticos provenientes de <i>V. arenaria</i>	66
4.1.1 Verificação de esporos	68
4.2 Obtenção e análise dos extratos orgânicos	70
4.3 Resultados biológicos obtidos com os extratos AcOEt no cultivo em pequena escala	73
4.4 Cultivo dos fungos VA1 e VA17 em escala ampliada	78
4.5 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	79
4.5.1 Substância I – Nectriapirona	80
4.5.2 Substância II– Tirosol	90
4.5.3 Substância III – Ergosterol	96
4.5.4 Substância IV – Manitol	101
4.5.5 Substância V	103
4.5.6 Substância VI – Fusaperazina B	117
4.5.7 Substância VII	134
4.6 Ensaios biológicos com as substâncias isoladas	156
4.6.1 Ensaios enzimáticos	156
4.6.2 Ensaios antitumorais	156

4.6.3 Ensaio antimicrobiano	159
4.7 Identificação dos fungos endofíticos	160
4.7.1 Identificação por taxonomia	160
4.7.2 Identificação por biologia molecular	161
5 CONCLUSÕES	179
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
7 ANEXO	198

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Novas entidades químicas entre 1981 e 2002.....	3
Figura 2. Compostos oriundos de produtos naturais.....	5
Figura 3. Substâncias antimicrobianas oriundas de microrganismos em testes clínicos fase I.....	7
Figura 4. Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.....	11
Figura 5. Metabólitos secundários de fungos endofíticos idênticos aos da planta hospedeira.....	12
Figura 6. Metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.....	15
Figura 7. A – <i>V. arenaria</i> B - Estruturas de LST e diterpenos isolados de <i>V. arenaria</i>.....	19
Figura 8. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de espécies de Asteraceae.....	21
Figura 9. Obtenção dos extratos orgânicos AcOEt, BuOH e MeOH.....	37
Figura 10. Fracionamento da fração VA1A.....	43
Figura 11. Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato VA1M.....	44
Figura 12. Fracionamento do extrato micelial metanólico do fungo codificado VA1.....	46
Figura 13. Fracionamentos realizados com a fração VA1MNB.....	48
Figura 14. Partição do extrato bruto AcOEt do fungo VA17.....	51
Figura 15. Fracionamentos realizadas com a fração VA17MMA.....	54
Figura 16. Rendimento dos extratos orgânicos (g) obtidos de fungos endofíticos isolados de <i>V. arenaria</i>	72
Figura 17. Estruturas químicas das substâncias isoladas dos fungos VA1 (I, II, III), VA5 (IV) e VA17 (V, VI e VII).....	79
Figura 18. Espectro RMN ¹ H da substância I.....	84
Figura 19. Espectro RMN ¹³ C da substância I.....	85

Figura 20. Mapa de contornos HMQC da substância I.....	86
Figura 21. Mapa de contornos HMBC da substância I.....	87
Figura 22. Espectros de NOE-diff da substância I.....	88
Figura 23. Espectro de massas da substância I.....	89
Figura 24. Espectro de RMN ^1H da substância II.....	93
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C da substância II.....	94
Figura 26. Espectro de massas da substância II.....	95
Figura 27. Espectro de RMN ^1H da substância III.....	99
Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C da substância III.....	100
Figura 29. Espectro de RMN ^1H da substância IV.....	102
Figura 30. Cromatograma da fração de obtenção da substância V e curva de UV do pico no t_R 10,60 min.....	103
Figura 31. Espectro de RMN ^1H da substância V.....	108
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C da substância V.....	109
Figura 33. Mapa de contornos HMQC da substância V.....	110
Figura 34. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância V.....	111
Figura 35. Mapa de contornos HMBC da substância V.....	113
Figura 36. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância V.....	114
Figura 37. Espectro de massas da substância V.....	116
Figura 38. Conformações dobrada e estendida para a substância VI.....	122
Figura 39. Espectro de RMN ^1H da substância VI.....	123
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C da substância VI.....	124
Figura 41. Mapa de contornos HMQC da substância VI.....	125
Figura 42. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância VI.....	126
Figura 43. Mapa de contornos HMBC da substância VI.....	128

Figura 44. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância VI	129
Figura 45. Espectros de NOE-diff da substância VI	131
Figura 46. Espectro de massas da substância VI	133
Figura 47. Cromatograma da fração de obtenção da substância VII e curva de UV do pico no t_R 21,50 min.....	134
Figura 48. Espectro de RMN 1H da substância VII	139
Figura 49. Mapa de contornos HMQC da substância VII	140
Figura 50. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância VII	141
Figura 51. Mapa de contornos HMBC da substância VII	144
Figura 52. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância VII	145
Figura 53. Espectro de massas da substância VII	147
Figura 54. Atividade antitumoral da Nectriapirona contra células de Leucemia T humana – JURKAT e melanoma (B16F10).....	157
Figura 55. Ensaio citotóxico do Tirosol e Fusaperazina B frente células de leucemia T humana (JURKAT).....	159
Figura 56. A – Colônia de <i>Humicola</i> sp em meio BDA após 48 horas de crescimento. B - Aleuroconídios de <i>Humicola</i> sp.....	160
Figura 57. Metabólitos isolados de <i>Humicola fuscoatra</i> e <i>Humicola grisea</i>	161
Figura 58. Cromatograma (225nm) curva de UV e estrutura da nectriapirona...	167
Figura 59. Cromatograma (225nm) curva de UV e estrutura do tirosol.....	167
Figura 60. Cromatograma do extrato VA1A.....	168
Figura 61. Espectro RMN 1H do extrato VA1A.....	168
Figura 62. Espectro RMN 1H do extrato VA3A.....	169
Figura 63. Cromatograma (225nm) do extrato VA3A.....	169
Figura 64. Espectro RMN 1H do extrato VA5A.....	170
Figura 65. Cromatograma (225nm) do extrato VA5A.....	170
Figura 66. Espectro RMN 1H do extrato VA10A.....	170

Figura 67. Cromatograma (225nm) do extrato VA10A.....	171
Figura 68. Espectro de RMN ^1H do extrato VA7A.....	171
Figura 69. Cromatograma (225nm) do extrato VA7A.....	172
Figura 70. Espectro de RMN ^1H do extrato VA8A.....	172
Figura 71. Cromatograma (225nm) do extrato VA8A.....	172
Figura 72. Espectro de RMN ^1H do extrato VA36A.....	173
Figura 73. Cromatograma (225nm) do extrato VA36A.....	173
Figura 74. Espectro de RMN ^1H do extrato VA6A.....	174
Figura 75. Cromatograma (225nm) do extrato VA6A.....	174
Figura 76. Espectro RMN ^1H do extrato VA25A.....	174
Figura 77. Cromatograma (225nm) do extrato VA25A.....	175
Figura 78. Espectro de RMN ^1H do extrato VA18A.....	175
Figura 79. Cromatograma (225nm) do extrato VA18A.....	175
Figura 80. Espectro de RMN ^1H do extrato VA2A.....	176
Figura 81. Cromatograma (225nm) do extrato VA2A.....	176

LISTA DA TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultura pré-fermentativo e fermentativo Czapek.....	36
Tabela 2 - Código e quantidade dos extratos orgânicos obtidos.....	37
Tabela 3 - Rendimentos dos extratos orgânicos cultivados em escala ampliada.....	40
Tabela 4 - Frações obtidas no fracionamento do extrato AcOEt do fungo VA1..	42
Tabela 5 - Frações obtidas no fracionamento do extrato AcOEt do fungo VA17	49
Tabela 6 - Frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato VA17M.....	52
Tabela 7 - Porcentagem das espécies de fungos endofíticos isolados de <i>V. arenaria</i>	66
Tabela 8 - Tempo de esporulação de fungos endofíticos isolados de <i>V. arenaria</i>	69
Tabela 9 - Atividade biológica dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos cultivados em pequena escala.....	76
Tabela 10 - Dados RMN ^1H e ^{13}C para a substância I.....	82
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para substância II.....	91
Tabela 12 - Valores de RMN ^{13}C para a substância III.....	97
Tabela 13 - Dados de RMN ^1H para a substância IV.....	101
Tabela 14 - Dados RMN ^1H e ^{13}C para a substância V.....	107
Tabela 15 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância VI.....	119
Tabela 16 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância VII.....	137
Tabela 17 - Alcalóides dicetopiperazínicos com atividade biológica.....	148
Tabela 18 - Alcalóides dicetopiperazínicos.....	153
Tabela 19 - Fungos endofíticos identificados por biologia molecular.....	162
Tabela 20 - Metabólitos secundários isolados de <i>Fusarium</i> sp.....	164

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Endofíticos isolados de <i>Viguiera arenaria</i>	198
Anexo 2. Espectro RMN ^1H do extrato VA1A.....	200
Anexo 3. Espectro RMN ^1H do extrato VA11A.....	201
Anexo 4. Espectro de RMN ^1H do extrato VA12A.....	202
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H do extrato VA15A.....	203
Anexo 6. Espectro de RMN ^1H do extrato VA17A.....	204
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H do extrato VA20A.....	205
Anexo 8. Espectro RMN ^1H do extrato VA27A.....	206
Anexo 9. Espectro RMN ^1H do extrato VA28A.....	207
Anexo 10. Espectro de RMN ^1H do extrato VA19A.....	208

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
AcOEt	Acetato de Etila
APRT	Adenina-fosforribosil-transferase
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Dextrose Ágar
BuOH	Álcool n-butilico
CC	Cromatografia em coluna
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
ESI-EM	Espectrometria de massas (ionização por electrospray)
FE	Fase estacionária
FM	Fase Móvel
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
J	Constante de acoplament (em Hz)

MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
min	Minutos
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5difenil Brometo de tetrazolium
MTX	Metotrexato
<i>m/z</i>	Relação massa carga
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
NOE-diff	<i>Nuclear Overhouser Effect – differential</i>
<i>q</i>	Quadrupeto
<i>ql</i>	Quadrupeto largo
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono.
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleto
<i>tl</i>	Tripleto largo
t_R	Tempo de retenção
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UV-VIS	Ultravioleta – Visível

RESUMO

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)** 2006. 208 f . Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Foram isolados 37 fungos endofíticos de *Viguiera arenaria* (VA1 a VA37), sendo 32 oriundos de folhas e 5 de raízes. Os fungos foram classificados por métodos de biologia molecular, sendo *Glomerella cingulata* a espécie predominante. Os fungos foram cultivados em culturas fermentativas em duas etapas, em pequena escala, para obtenção dos extratos em AcOEt, BuOH e MeOH. Os extratos em AcOEt foram avaliados em ensaios antimicrobianos, citotóxicos frente a células leucemia T humana (JURKAT) e frente às enzimas GAPDH de *Trypanosoma cruzi* e APRT de *Leishmania tarentolae*. Diversos extratos apresentaram atividades biológicas significativas. Os perfis químicos dos extratos em AcOEt foram avaliados através de CLAE-UV e RMN ¹H. Os fungos VA1 (*Glomerella cingulata*) e VA17 (*Fusarium* sp.), selecionados após as triagens química e biológica, foram cultivados em escala ampliada. A partir do extrato AcOEt do fungo VA1 foram isoladas duas substâncias, nectriapirona (I) e tirosol (II). A nectriapirona apresentou atividade citotóxica significativa contra células de leucemia T humana (linhagens JURKAT) e melanoma (linhagens B16F10). Ergosterol (III) foi isolado do extrato micelial metanólico do fungo VA1. A partir do extrato micelial metanólico do fungo VA5 (*G. cingulata*), cultivado em pequena escala, foi isolado o manitol (IV). Após do cultivo em escala ampliada do fungo VA17 (*Fusarium* sp.) foram isolados três derivados dicetopiperazínicos, um oriundo do extrato AcOEt, substância V, ainda não relatada na literatura, e dois do extrato micelial MeOH, fusaperazina B (VI) e substância VII, também inédita na literatura. O isolamento das substâncias foi realizado através de técnicas cromatográficas, como CC, CCDP e CLAE. As estruturas químicas foram elucidadas com auxílio de técnicas espectroscópicas (RMN ¹H e ¹³C, HMQC, HMBC, NOE-diff) e espectrométricas (ESI-MS). Experimentos de modelagem molecular foram realizados com a fusaperazina B (VI), que corroboraram com os dados de NOE-diff, indicando que a conformação dobrada do anel dicetopiperazínico é a mais predominante. Foi ainda realizada avaliação do perfil químico dos extratos obtidos em pequena escala dos fungos classificados como *G. cingulata*, via CLAE e RMN ¹H, verificando-se diferenças químicas significativas, o que pode sugerir variabilidade genética entre as linhagens. O tirosol (II) foi detectado na maioria dos extratos de *G. cingulata*.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, metabólitos secundários, atividade biológica.

ABSTRACT

GUIMARÃES, D. O. **Chemical and biological prospection in endophytic fungi found in association with *Viguiera arenaria* (Asteraceae).** 2006. 208 p. Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A total of 37 endophytic fungi were isolated from *Viguiera arenaria* (VA1 to VA37), 32 from the leaves and 5 from the roots. Endophytes were classified by means of molecular biology methods, and *Glomerella cingulata* was the predominant species. The endophytes were cultured in a two step fermentative process in small scale to give the EtOAc, BuOH and MeOH extracts. The EtOAc extracts were submitted to antimicrobial assays, citotoxic assays against human leukemia T cells (JURKAT) and assays against two enzymes, GAPDH from *Trypanosoma cruzi* and APRT from *Leishmania tarentolae*. Several extracts showed promising activities in the bioassays. The chemical profiles of the EtOAc extracts were obtained through HPLC and ¹H NMR. Endophytes VA1 (*Glomerella cingulata*) e VA17 (*Fusarium* sp.) were cultured in large scale after chemical and biological screenings. Nectriapyrone (I) and tirosol (II) were isolated from the EtOAc extract from VA1. Nectriapyrone showed high citotoxicity against leukemia T human cells (JURKAT) and melanoma cells (B16F10). Ergosterol (III) was isolated from the micelial MeOH extract of VA1. Mannitol (IV) was isolated from the micelial MeOH extract from the fungus VA5 (*G. cingulata*). Extracts from VA17 (*Fusarium* sp.), obtained in large scale, yielded three diketopiperazine derivatives. A novel derivative was isolated from the EtOAc extract (compound V). Two derivatives were obtained from the micelial MeOH extract, fusaperazine B (VI) and a new diketopiperazine (VII). The isolation of the compounds was carried out using chromatography techniques (column, prep. TLC, and HPLC) and the identification was achieved by spectroscopic (1D and 2D NMR) and spectrometric methods (ESI-MS). Molecular modeling experiments were carried out with fusaperazine B (VI), showing that the diketopiperazine ring is predominantly in the folded conformation, in agreement with NOE-diff experiments. Significant differences were observed in the HPLC profiles and ¹H NMR spectra of the extracts from the *G. cingulata* strains, which might be related to genetic variability among the strains. Tirosol (II) was detected in the majority of *G. cingulata* extracts.

Keywords: Endophytic fungi, secondary metabolites, biological activity.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais e Biodiversidade

A humanidade sempre esteve ligada a natureza para suprir necessidades como a busca por alimentos, abrigo, meios de transporte, fertilizantes, aromatizantes e também produtos com atividade medicinal. Os primeiros relatos sobre o uso de plantas com finalidade terapêutica são oriundos da Mesopotâmia e datam aproximadamente 2600 a.C. Dentre as substâncias utilizadas nessa época destacam-se os óleos de *Cedrus* sp., *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* sp., e *Papaver somniferum*, sendo estas espécies vegetais ainda utilizadas na medicina atual para o tratamento de enfermidades que variam desde tosse e gripes até infecções e processos inflamatórios (CRAGG; NEWMAN, 2005).

A busca por novos produtos para as indústrias farmacêutica e agroquímica é um processo que requer otimização contínua. A química combinatória e os ensaios em larga escala (“high-throughput screening”/HTS) têm revolucionado os processos de descoberta de fármacos nas indústrias farmacêuticas, onde os programas envolvendo produtos naturais perderam ênfase. Entretanto, o impacto esperado destas novas tecnologias na produtividade não tem sido materializado (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003) e os produtos naturais permanecem como a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos (HARVEY, 2000) e como importantes ferramentas para o entendimento da lógica de rotas biossintéticas. (CLARDY; WALSH, 2004).

Os produtos naturais possuem várias vantagens que justificam sua importância para a descoberta de novos fármacos, entre elas:

- enorme diversidade química com complexidade estrutural e potência biológica

(VERDINE, 1996);

- são a principal fonte de farmacóforos (¹BRAM et al., 1993 apud KNIGHT et al., 2003);
- diversas fontes de produtos naturais são ainda pouco exploradas, onde novas estratégias de descoberta podem levar a novos compostos bioativos (HENKEL et al., 1999);
- pesquisas com produtos naturais tem levado a descoberta de novos mecanismos de ação de fármacos (URIZAR et al., 2002);
- são poderosas ferramentas bioquímicas, servindo como guia para a biologia molecular e química e a investigação das funções celulares;
- podem guiar o desenho de novos compostos sintéticos (² BREINBAUER et al., 2002 apud KNIGHT et al., 2003).

A diversidade de grupos funcionais e a arquitetura das moléculas obtidas nos produtos naturais durante os processos de biossíntese contribuem com a síntese e a química medicinal nas estratégias para a busca de compostos bioativos e também para a busca de ligantes seletivos de alvos celulares (CLARDY; WALSH, 2004).

Comparando-se as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e coleções virtuais de compostos), a mais ampla diversidade química está associada às substâncias de origem natural (HARVEY, 2000). A importância da quimiodiversidade dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de fármacos é discutida amplamente na literatura (STROHL, 2000; NEWMANN; CRAGG; SNADER, 2000; CORDELL, 2000; HENKEL et al., 1999; VERPOORTE, 1998; CLARDY; WALSH, 2004; BUTLER, 2004).

¹ Bram, R.J. et al. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. **Mol. Cell. Biol.**, v.13, p.4760-4769, 1993.

² Breinbauer, R. From protein domains to drug candidates – natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v.41, p.2879-2890, 2002.

Devido ao significativo número de fármacos derivados de produtos naturais estarem entre os 35 mais vendidos entre os anos de 2000/2002 grandes companhias farmacêuticas têm novamente voltado atenção para a pesquisa com produtos naturais (BUTLER, 2004). Paralelamente, nesse período houve um aumento do número de patentes de produtos naturais (KHOEN; CARTER, 2005). Adicionalmente, entre os anos de 1981 a 2002 nota-se que dos novos fármacos aprovados, cerca de 50% estão correlacionados com produtos naturais. (figura 1, p.3)

Figura 1. Novas entidades químicas entre 1981 e 2002 (Newman et al., 2003).

Com a contínua necessidade de novos protótipos para ensaios contra um número crescente de alvos moleculares, a diversidade química dos produtos naturais permanece altamente relevante para a descoberta de fármacos (HARVEY, 2000), uma vez que a natureza está continuamente desenvolvendo a sua versão de química combinatória, fornecendo estruturas ricas em estereoquímica, anéis concatenados e grupos funcionais reativos (VERDINE, 1996). Contudo, a complexidade de muitos produtos naturais pode limitar as características para as modificações químicas que venham otimizar o seu(s) uso(s) terapêutico e a obtenção de novos compostos bioativos pode ser problemática (CLARDY; WALSH, 2004).

As plantas têm sido a base para tratamentos na medicina popular, sendo utilizadas por milhares de anos em vários países. Várias substâncias já consagradas na terapêutica atual foram isoladas de plantas. O isolamento da quinina a partir de *Cinchona* sp. serviu de base para a síntese de outros compostos com atividade antimalária. O potente analgésico morfina obtido do *Papaver somniferum* e também agentes antitumorais, como os alcalóides da vinca vinblastina e vincristina isoladas de *Catharanthus roseus*, representam importantes compostos para a terapia do câncer. Outro exemplo de fármaco obtido a partir do uso de plantas é o anti-hipertensivo reserpina, isolado de *Rauwolfia serpentina* (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Houve um interesse maior na busca de substâncias para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) e de doenças oportunistas a partir dos anos 1980, sendo que, apenas três substâncias apresentaram progresso em ensaios clínicos e pré-clínicos: calanolídeos A e B (1-2), isolados de *Calophyllum* sp., e a prostatina (3), isolada de *Homalanthus nutans* (GUSTAFSON, et al., 1992; COX, 2001).

Outras fontes da natureza também representam importância na descoberta de novos agentes terapêuticos. O teprotídeo (4), isolado do veneno de *Bothrops jararaca*, guiou o desenvolvimento de agentes inibidores da enzima conversora de angiotensina, para o tratamento de doenças cardiovasculares (³BUSS; WAIGH, 1995 apud CRAGG; NEWMAN, 2005), enquanto que epibatidina (5), isolada do veneno da pele do sapo *Epipedobates tricolor*, contribuiu para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes contra dor (KAMAL et al, 2003; BELIAKOFF et al., 2003).

³ BUSS, A. D.; WAIGH, R. D. In *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th ed. Vol.1, WOLFF, M. E. (Ed.), pp. 983-1033, John Wiley, New York (1995).

Figura 2. Compostos oriundos de produtos naturais.

É indiscutível que os produtos naturais desempenham papel fundamental nos processos de busca de novos protótipos, e como exemplo, podemos citar as estatinas, medicamentos mais vendidos atualmente, os anti-hipertensivos antagonistas da angiotensina e inibidores da enzima conversora de angiotensina, a ampla variedade de imunossuppressores e também a grande variedade de agentes antineoplásicos e antimicrobianos disponíveis no mercado farmacêutico que fazem parte da história de substâncias desenvolvidas a partir de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Atualmente, pesquisadores de produtos naturais têm voltado atenção para fontes ainda pouco investigadas, como microrganismos marinhos, extremófilos e endofíticos (CRAGG; NEWMAN, 2005). Associadas aos processos de identificação e cultivo destes microrganismos encontram-se novas técnicas de isolamento e identificação, bem como a manipulação das condições de cultivo para obtenção de compostos bioativos.

1.2 Produtos naturais de origem microbiana

A exploração de microrganismos como fontes de substâncias terapêuticamente úteis tem uma história muito mais curta em relação ao uso de plantas na medicina.

Desde a descoberta da penicilina por Fleming em 1928, surgiram vários fármacos importantes baseados em metabólitos de fungos, incluindo os antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos e estreptograminas), antibióticos antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácidos aureólicos), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A, rapamicina), e antiinflamatório (ascomicina) (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; DEMAINE, 1999; MANN, 2002; PEARCE, 1997; KOEHN; CARTER, 2005). A substância derivada de indolocarboxazóis representada pelo UCN-01 (**6**) (DANCEY; SAUSVILLE, 2003) e o composto **7** (KAMAL et al., 2003; BELIAKOFF et al., 2003) derivado de geldamicina representam fármacos em estágio de testes clínicos fase I com notável atividade antimicrobiana ilustrando a contínua contribuição dos microrganismos para a busca de novos fármacos.

Figura 3. Substâncias antimicrobianas oriundas de microrganismos em testes clínicos fase I.

É estimado que existam ao menos 250.000 espécies de plantas, mais de 30 milhões de espécies de insetos, 1,5 milhão de espécies de fungos e um número semelhante de algas e procariotos (PIMM et al., 1995). Estas espécies coexistem em ecossistemas e interagem entre si de diversas maneiras, onde a química exerce

função principal (VERPOORTE, 1998). Assim, é esperada uma ampla variedade de atividades biológicas para os metabólitos secundários. Acredita-se que centenas de milhares de compostos naturais estejam presentes em plantas e microrganismos, sendo que a maioria deles ainda não foram caracterizados (FIRN; JONES, 2003).

Muitas moléculas da natureza são metabólitos secundários obtidos em contextos ou situações específicas. Isso inclui metabólitos microbianos originados durante o período de ausência de nutrientes (antibióticos carbapenêmicos produzidos por *Pseudomonas*), durante o período de desenvolvimento (antibióticos oriundos quando espécies de *Streptomyces* entram em processos de diferenciação celular) e períodos de sinalização (como as moléculas “quorum-sensing”, moléculas sinalizadoras, que são sintetizadas em particulares densidades de culturas de microrganismos) (CLARDY; WALSH, 2004).

Cerca de 100.000 metabólitos secundários com peso molecular inferior a 2.500 têm sido caracterizados. Aproximadamente a metade é proveniente de microrganismos (DEMAIN, 1999). Estima-se que apenas 5% das espécies de fungos estejam descritas, sendo que a maioria destas não foi avaliada em bioensaios para descoberta de fármacos (PEARCE, 1997). Entre as espécies descritas (69.000), somente 16% (11.500) têm sido cultivadas (DEMAIN, 1999). Vale ressaltar que os organismos que ainda não foram cultivados constituem uma das fontes mais promissoras de substâncias bioativas (CLARDY; WALSH, 2004).

Cada vez mais, químicos de produtos naturais estão procurando por novas fontes de ampla diversidade biológica. Fungos endofíticos são microrganismos praticamente inexplorados e que constituem uma enorme diversidade de espécies que habitam as diversas plantas existentes e se inserem no contexto para a busca de novos compostos com variabilidade química e biológica (CLARDY; WALSH, 2004).

Assim o grande potencial químico e biológico a ser explorado com estudos de metabólitos secundários produzidos por fungos.

1.3 Interações fungo-planta

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies incapazes de conseguir por si mesmas meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predadoras e parasitárias. Entre os microrganismos, os fungos são os que se encontram mais freqüentemente associados às plantas (ZOBERI, 1972).

Os fungos não produzem clorofila (são heterotróficos) e sua parede celular é constituída principalmente de quitina. Assim, sua sobrevivência depende do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas, ou de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente.

Estas associações podem ser parasitárias ou mutualísticas (simbióticas) (RICHARDSON, 1999). Nas associações parasitárias o fungo vive dentro da planta, de onde obtém o alimento necessário para seu desenvolvimento. Neste caso, geralmente o metabolismo secundário do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas às plantas. O parasitismo está relacionado a patogenicidade e pode, eventualmente, levar a planta à morte (AGRIOS, 1988). Muitos metabólitos secundários acumulados pelas plantas são induzidos por microrganismos fitopatogênicos e são denominados fitoalexinas (BAILEY; MANSFIELD, 1984; PAXTON, 1981; DESJARDINS; SPENCER, 1989).

No caso das associações simbióticas, a convivência entre fungos e plantas é

pacífica, uma vez que os dois organismos sobrevivem assintomaticamente à associação.

1.4 Fungos endofíticos

Desde a descoberta de endofíticos, em Darnel (Alemanha), em 1904 vários pesquisadores têm definido endofíticos em diferentes aspectos dependendo da perspectiva da qual os endofíticos foram isolados e subseqüentemente investigados (TAN; ZOU, 2001). O conceito utilizado neste trabalho é o que define fungos endofíticos como aqueles fungos que podem ser detectados em um momento particular associado à tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável (SCHULZ; BOYLE, 2005), sendo esta definição aplicada ao status momentâneo da associação. Há um gradiente entre as distinções dos termos endofíticos, epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças nas plantas), portanto às vezes torna-se difícil descrever limites para distinguir cada categoria (AZEVEDO et al., 2000).

Fungos endofíticos podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta hospedeira (PETRINI et al., 1992) e a colonização pelo fungo endofítico pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica. Já que muitas destas associações têm se mostrado benéficas para ambos os organismos, o termo endofítico tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo (FAETH; HAMONN, 1997).

Nas associações simbióticas o tamanho, o formato, expectativa de vida e estágio de maturidade sexual da planta hospedeira obrigam fortemente o crescimento do fungo de acordo com o modelo do hospedeiro (SAIKKONEN et al., 2004).

Aparentemente, o crescimento de endofíticos é regulado pela atividade hormonal e produção de quitinase pelo hospedeiro. As variações sazonais nas plantas também podem regular o crescimento dos fungos (WARDLAW, 1990). A simbiose entre planta e endofítico pode ser observada pela proteção e alimentação do fungo que, em contrapartida, produz substâncias bioativas (hormônios reguladores de crescimento, antibióticos, inseticidas, etc.) que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (LU et al., 2000).

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

O modo de reprodução dos fungos endofíticos para outros hospedeiros é de fundamental importância para a virulência e agressividade que esses microrganismos podem causar à planta hospedeira (SAIKKONEN et al., 1998). A maioria dos endofíticos são, provavelmente, transmitidos horizontalmente por esporos de planta para planta. Também podem ser transmitidos verticalmente através das sementes, e neste caso, a interação mutualística é acentuada através do aumento da adaptação da planta hospedeira com o estágio de germinação e também na fase adulta (figura 4, p.11). Porém, a transmissão vertical pode reduzir a habilidade do fungo endofítico em infectar uma planta não infectada, tanto assexuadamente ou sexuadamente, via

esporos. (SAIKKONEN et al., 1998; SAIKKONEN et al., 2004).

Figura 4. Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.

Alguns dados da literatura têm reportado a habilidade dos fungos endofíticos em produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (STROBEL et al., 1996). O primeiro exemplo e o mais marcante deles foi o isolamento de taxol (**8**) do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* a partir de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). O taxol, ou paclitaxel, é um potente agente terapêutico antineoplásico e foi identificado inicialmente em *Taxus brevifolia* (WANI, 1971). Recentemente a vincristina (**9**), substância anticâncer, foi isolada a partir do fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004). Outros exemplos de microrganismos endofíticos produtores dos mesmos metabólitos que a planta hospedeira podem ser ilustrados pelo fungo *Gibberella fugikuroi*, associado à planta *Curcubita maxima* (Curcubitaceae) que produz derivados do ácido giberélico (**10**) (STOWE; YAMAKI, 1957), e pelos fungos *Fusarium* e *Myrothecium* (TRAPP et al., 1998), produtores de tricotecenos macrocíclicos (**11**) os quais foram isolados das plantas *Baccharis megapotamica* (JARVIS et al., 1988) e *B. coridifolia* (JARVIS et al., 1988; RIZZO et al., 1997).

Figura 5. Metabólitos secundários de fungos endofíticos idênticos aos da planta hospedeira.

Como resultado direto da função que os metabólitos secundários bioativos de endofíticos exercem na natureza, eles podem apresentar aplicações na medicina, agricultura e indústria (STROBEL, 2002). Programas de bioprospecção têm evidenciado o potencial de fungos endofíticos. A proporção de extratos de microrganismos endofíticos de planta e algas ativos foi de 80%, enquanto 64% dos extratos provenientes de microrganismos de solo foram ativos. Adicionalmente, 51% das substâncias isoladas de endofíticos apresentaram atividade biológica. Esta proporção foi superior aos 38% de substâncias bioativas produzidas por microrganismos de solo. (SCHULZ et al., 2002).

Os metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos têm representado diversas classes químicas, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, peptídeos, esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, terpenóides, citocalasinas, compostos alifáticos e clorados (TAN; ZOU,

2001; SCHULZ; BOYLE, 2005). Vários destes compostos têm apresentado diversas atividades biológicas. Como substância antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* resistentes pode ser citado o guanacastepeno A (**12**) (BRADY; BONDI; CLARDY, 2001) e frente a *Helicobacter pylori* o ácido rizoctônico, isolado de *Rizoctonia* sp. associado a *Cynodon dactylon* (**13**) (MA et al., 2004). Globosumonas A, B e C (**14-16**) isolados do endofítico *Chaetomium globosum* apresentaram citotoxicidade contra células tumorais (BASHYAL et al., 2005). Brefeldina A (**17**), isolada do endofítico *Aspergillus clavatus*, apresentou atividade antifúngica, antiviral e maior citotoxicidade frente a várias linhagens tumorais quando comparada ao taxol (WANG et al., 2002). Atividade enzimática inibidora de protease (Citomegalovírus humana) pode ser exemplificada pelos ácidos citônicos A e B (**18-19**) (GUO et al., 2000), isolados de *Cytospora* sp., e pela botralina (**20**), isolada de *Microsphaeropsis olivacea*, com moderada atividade frente acetil colinesterase (AChE) (HORMAZABAL et al., 2005). O composto **21**, obtido a partir do endofítico *Cephalosporium* sp. associado a *Trachelospermum jasminoides*, e subglutinóis A e B (**22-23**), obtido do fungo *Fusarium subglutinans* associado a *Taxus wilfordii* apresentaram atividade antioxidante e imunossupressora, respectivamente (SONG et al., 2005; LEE et al., 1995). Compostos antiparasitários (**24-25**), com atividade antimalária, (ISAKA et al., 2001) e o ácido 3-hidroxipropiônico (**26**), com atividade nematicida, podem ser ilustrados como metabólitos secundários dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp. e *Phomopsis phaseoli*, respectivamente.

Um novo pentacetídeo (**27**) isolado de *Fusarium* sp. apresentou potente atividade antifúngica contra *Candida albicans* (BRADY; CLARDY, 2000). Novos diterpenos primaranos (**28-29**), com atividade inseticida, foram isolados de um fungo endofítico ainda não identificado associado a *Abies balsamea* (TAN; ZOU, 2001).

Novos derivados meroterpenos (**30-32**) foram isolados de *Penicillium* sp., associado a *Melia azedarach* (SANTOS; Fo-RODRIGUES; 2002; SANTOS; Fo-RODRIGUES, 2003). A partir do fungo endofítico *Curvularia* sp., associado a planta brasileira *Ocotea corymbosa*, foram isolados de quatro benzopiranos, sendo um dos novos derivados (**33**) indutor da proliferação celular de células HeLa (TELES et al.; 2005).

Figura 6. Metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

A identificação de novas substâncias e as atividades biológicas já estabelecidas com o cultivo de fungos endofíticos indicam que esses microrganismos constituem uma fonte potencial de substâncias bioativas e novas entidades químicas que ainda é pouco explorada.

A maioria das pesquisas com endofíticos têm sido realizada em países do hemisfério norte e Nova Zelândia. Os resultados de regiões tropicais são menos numerosos, mas têm mostrado que as plantas tropicais apresentam grande diversidade de microrganismos endofíticos quando comparadas com plantas de ambientes temperados (SCHULZ; BOYLE, 2005). Muitos destes microrganismos ainda não classificados podem constituir novos gêneros e espécies (AZAVEDO et al., 2000; STROBEL, 2002). Adicionalmente, uma grande diversidade de metabólitos pode ser encontrada com o estudo dos fungos obtidos em uma única espécie vegetal,

pois se estima que cerca de $1,3 \times 10^6$ endofíticos habitem as 270.000 plantas vasculares conhecidas (BRADY; CLARDY, 2000).

Uma das vantagens em se trabalhar com microrganismos é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rapidamente e em menor espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração, agitação) podem ser modificadas a fim de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos de interesse (PEARCE, 1997).

Geralmente as substâncias produzidas pelo processo fermentativo são excretadas para fora das células (GADEN, 2000; ELIAS, 2003), o que facilita a extração através da partição com solventes orgânicos.

1.5 A família Asteraceae

Asteraceae (ou Compositae) é uma das maiores famílias entre as angiospermas e está bem representada no Brasil. É composta por 1.535 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, agrupadas em 3 subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994). É predominante em regiões de cerrado, área de elevada biodiversidade vegetal (GOTTlieb; KAPLAN; BORIN, 1996), ocorrendo ainda em menor proporção em outros ecossistemas.

Inúmeras espécies possuem importância econômica e biológica, sendo empregadas na terapêutica (fitoterápicos), na medicina popular e na alimentação, muitas delas mundialmente consagradas. Como exemplos de espécies economicamente importantes podem ser citadas a arnica (*Arnica montana*), a alface

(*Lactuca sativa*), a chicórea (*Cichorium intybus*), a camomila (*Matricaria chamomilla*), a alcachofra (*Cynara scolymus*), a calêndula (*Calendula officinale*), o crisântemo (*Chrysanthemum* spp), a carqueja (*Baccharis trimera*), o guaco (*Mikania glomerata*), a marcela (*Achyrocline satureoides*) e o falso boldo (*Vernonia condensata*).

Há também um grande número de substâncias biologicamente ativas isoladas de espécies de Asteraceae, incluindo diferentes classes de terpenóides, flavonóides, cumarinas e poliacetilenos, todas micromoléculas características dessa família (BOHLMANN; ZDERO, 1990; HEYWOOD; HARBORNE; TURNER, 1977; PICMAN, 1986; RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976). As substâncias mais investigadas da família Asteraceae sob diversos aspectos são as lactonas sesquiterpênicas (LST). Além de apresentarem diversas atividades biológicas (PICMAN, 1986; RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976; SCHIMDT, 1999), são importantes marcadores taxonômicos (SEAMAN, 1982). Essa classe de substâncias é predominante em toda família, ocorrendo esporadicamente em outras angiospermas.

A tribo Heliantheae é a segunda maior da família Asteraceae, com mais de 2.500 espécies. Dentre as espécies economicamente importantes que pertencem a esta tribo, pode-se citar o yacón (*Polymnia sonchifolia*), que possui atividade hipoglicemiante, o girassol (*Helianthus annuus*), que além de possuir terpenóides com atividades biológicas ainda é empregado na produção de óleo comestível, o picão (*Bidens pilosa* e *Bidens* spp), com emprego na medicina popular contra hepatite, o margaridão (*Tithonia diversifolia*), planta invasora introduzida no Brasil cujas substâncias possuem atividade antiinflamatória e alelopática, além da equinácea (*Echinacea angustifolia*), cujo fitoterápico é um dos mais vendidos imunostimulantes no mundo.

A tribo Heliantheae engloba, além de outros, o gênero *Viguiera* H.B.K, o maior e mais diverso grupo. Das cerca de 180 espécies do gênero *Viguiera*, na maior parte ervas e arbustos distribuídas por toda a América, 65 foram investigadas fitoquimicamente (TAMAYO-CASTILHO et al., 1990). Outras 5 espécies foram investigadas no laboratório de Farmacognosia da FCFRP, algumas com substâncias bioativas (AMBROSIO; SCHORR; Da COSTA, 2004; AMBROSIO et al., 2002;

AMBROSIO, 2001; Da COSTA; VICHNEWSKI; HERZ, 1996a; Da COSTA; ALBUQUERQUE; VICHNEWSKI, 1996b; Da COSTA et al., 1998, Da COSTA et al., 2001; SPRING et al., 2001; SCHORR et al., 2002).

Da espécie *V. arenaria*, foi identificada a LST budleína A (**34**), nas glândulas das inflorescências (figura 7, p.19). A LST **34** (furanoeliangolido) apresentou atividade citotóxica significativa sobre linhagens SK-BR3 (adenocarcinoma de mama). Foram isolados ainda diterpenos pimarânicos (**35-40**) das partes subterrâneas, sendo que alguns deles apresentaram ação inibitória da contração de músculo liso da artéria carótida de rato, relacionada a um possível efeito sobre a pressão arterial sanguínea, atividade antimicrobiana e tripanocida (AMBROSIO et al., 2002; AMBROSIO, 2001).

A figura 7 (p.19) apresenta estruturas de alguns metabólitos isolados de *Viguiera arenaria*.

A

34 - Budleína A (LST)

diterpenos pimaranos

- 35** R₁: COOH; R₂ = R₃ = R₄: H
- 36** R₁: COOH; R₂ = R₄: H; R₃: =O
- 37** R₁: CH₂OH; R₂ = α-OH; R₃ = R₄: H
- 38** R₁: COOH; R₂ = R₄: H; R₃: α-OH
- 39** R₁: CH₃; R₂ = α-OH; R₃: H; R₄: α-OH
- 40** R₁: COOH; R₂: α-OH; R₃: β-OH; R₄: H

B

Figura 7. A – *V. arenaria* B - Estruturas de LST (34**) e diterpenos (**35-40**) isolados de *V. arenaria*.**

1.6 Fungos endofíticos de Asteraceae

Os trabalhos publicados envolvendo fungos endofíticos de Asteraceae limitam-se ao gênero *Artemisia*, e às espécies *Crassocephalum crepidioides* e *Cirsium arvense*. A atividade contra fungos fitopatogênicos dos extratos das culturas de 39 fungos endofíticos associados a *Artemisia annua* foi avaliada, indicando 21 extratos produtores de substâncias ativas (LIU et al., 2001).

Das culturas de *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo endofítico de *Artemisia mongolica*, foi isolado o ácido coletótrico **(41)**, com significativa ação antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* (CIM 25 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM 50 µg/mL), *Sarcina lutea* (CIM 50 µg/mL) e *Helminthosporium sativum* (CIM 50 µg/mL) (ZOU et al., 2000).

Das culturas de *Colletotrichum* sp, fungo endofítico isolado de *A. annua*, espécie reconhecida pela produção do potente antimalárico artemisinina, foram isolados 7 esteróides derivados do ergosterol, dois com ação antimicrobiana, e o hormônio vegetal ácido indol-3-acético **(42)**. Além destes metabólitos foram isolados outros três novos metabólitos com atividade antimicrobiana: ácido 6-isoprenilindol-3-carboxílico **(43)** e dois derivados do ergosterol **(44-45)** (LU et al., 2000). *Colletotrichum* sp também demonstrou contribuir para o aumento da produção de artemisinina pelas raízes de *A. annua* quando usado como eliciador (WANG; ZHANG, TAN, 2001). Também associado a *A. annua*, o fungo endofítico *Leptosphaeria* sp. forneceu a leptosfaerona **(46)** (LIU et al, 2002), e o ácido leptosfaérico **(47)**, ambos metabólitos dotados de novos esqueletos carbocíclicos (LIU et al, 2003).

De *Geotrichum* sp, fungo endofítico associado a *Crassocephalum crepidioides*, foram isoladas três novas diidroisocumarinas **(48-50)** com atividades antimalárica,

tuberculostática e antifúngica (KONGSAREE et al., 2003).

Uma substância conhecida **(51)** e outros cinco novos metabólitos policetídes **(52-56)** foram isolados a partir da cultura do fungo endofítico *Mycelia sterila*, associado a *Cirsium arvense*. As substâncias **51-53** são pertencentes à classe das isocumarinas, enquanto que o metabólito **55** é um diidrobenzofurano. Ensaio antifúngicos com estas substâncias demonstraram que apenas a isocumarina **52** possuiu atividade antifúngica contra os três microrganismos testados: *Mycotypha microspora*, *Eurotium repens* e *Ustilago violaceae*. O benzofurano **(55)** apresentou moderada atividade antifúngica frente *Eurotium repens* (KROHN et al., 2001).

Outras 3 substâncias, pertencentes à classe das chaetoglobosinas, foram isoladas e identificadas no Laboratório de Química Farmacêutica - FCFRP/USP: chaetoglobosina B **(57)**, chaetoglobosina D **(58)** e chaetoglobosina E **(59)** (MOMESSO, 2004), relatadas como citotóxicas frente células HeLa (COLE; COX, 1981) e isoladas do fungo endofítico *Chaetomium globosum*, associado a *Viguiera robusta* (Asteraceae). A substância **57** apresentou elevada ação frente a células leucêmicas e de melanoma (MOMESSO, 2005).

Figura 8. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de espécies de Asteraceae (continua)

Figura 8. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de espécies de Asteraceae (conclusão).

Há uma busca constante por novos antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicos que sejam mais eficazes, com reduzida toxicidade e que causem menor impacto ambiental. Essa busca tem sido realizada devido ao contínuo desenvolvimento da resistência humana a microrganismos patogênicos como *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus*. Novos fármacos também são necessários para o tratamento de infecções por protozoários, como malária, leishmaniose, tripanossomíases e filariose, pois o arsenal terapêutico para o tratamento destas doenças é reduzido (STROBEL; DAISY, 2003). Os produtos naturais são considerados as fontes majoritárias para a busca de agentes terapêuticos para infecções causadas tanto por fungos quanto bactérias, câncer, distúrbios lipídicos e imunomodulação (CLARDY; WALSH, 2004). Neste contexto, os fungos endofíticos são fontes naturais de crescente interesse industrial e acadêmico para a busca de substâncias bioativas (CLARDY; WALSH, 2004), por serem organismos ainda pouco explorados e que podem oferecer oportunidades de inovação na descoberta de novos agentes terapêuticos e agroquímicos (STROBEL; DAISY, 2003). Desta forma, os microrganismos endofíticos devem ser enfatizados em programas de bioprospecção na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Devido ao potencial promissor dos endofíticos para a produção de substâncias bioativas e novas entidades químicas, este trabalho teve como objetivo geral a prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae).

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento e identificação de fungos endofíticos das folhas e raízes de *V. arenaria*.
- Cultivo em meio fermentativo (2 etapas) das principais espécies de fungos endofíticos isoladas.
- Obtenção de extratos dos fluidos das culturas dos fungos e das massas miceliais.
- Avaliação das atividades antimicrobiana, antitumoral e inibição enzimática (GAPDH – *T. cruzi* e APRT - *L. tarentolae*) dos extratos acetato de etila obtidos.
- Fracionamento dos extratos selecionados.
- Isolamento e identificação do maior número possível de metabólitos secundários.
- Avaliação das atividades antimicrobiana, antitumoral e enzimática (GAPDH – *T. cruzi* e APRT *L. tarentolae*) das substâncias isoladas.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Solventes

- Solventes PA da marca Synth;
- Solventes grau cromatográfico das marcas: Merck, J.T. Baker e Mallinckrodt;
- Solventes deuterados da marca Acros.

3.1.2 Reagentes e fases estacionárias usados nos meios de cultura, ensaios antimicrobianos e colunas cromatográficas:

- Ácido clorídrico (J.T. Baker)
- Ágar (Oxoid)
- Ágar dextrose batata (Acumedia)
- Ágar e caldo triptona soja (Oxoid)
- Ágar triptona soja (Oxoid)
- *Antibiotic Medium* nº 1 (Oxoid)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt GenAR[®])
- Cloreto de Trifeniltetrazólio (Sigma)
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt GenAR[®])
- Dimetil sulfóxido (Synth)
- Estreptomicina 777U/mg (Sigma)
- Farinha de Aveia (Nestlé)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

- Gemzar – Cloridrato de Gencitabina (Eli-Lilly do Brasil).
- Glicose (Synth)
- H_3BO_3 (Nuclear)
- Iodo (Synth)
- KCl (Synth)
- K_2HPO_4 (Synth)
- Metotrexato - Laboratório Wyeth-Whitehall Ltda.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Miconazol (Sigma)
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- NaCl (Synth)
- NaNO_3 (Synth)
- $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Papel de Filtro (A Z Labor)
- Pasta de Tomate (Arisco)
- Penicilina G 1215U/mg (Sigma)
- Pó de milho (Yoki)
- Sacarose (Synth)
- Sephadex LH – 20 (Sigma-Aldrich)
- Sílica Gel 60 (Merck) 0,063-0,200nm
- Sílica Gel 60 PF₂₅₄(Merck)
- Sílica Gel 60 Silanizada (Merck) 0,063-0,200nm
- Sílica Flash (Acros Organics) 400-200 mesh

3.1.3 Equipamentos

- Autoclave Vertical (Phoenix® AV 75)
- Balança Analítica BP 121 S (Sartorius)
- Bomba a vácuo MOD LD-2 (Lamarc)
- Capela de fluxo laminar (Pachane® PA 320)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE (Shimadzu® Shim-Pak). Acoplado a bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10A_{VP} Shimadzu, detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-M10A_{VP} Shimadzu, coletor de fração FRC-10A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e *software* Class VP.
- Espectrômetro de RMN: (Bruker® DPX-300MHz, Bruker® DRX-400MHz, Bruker® DRX-500MHz).
- Espectrômetro no UV-VIS (Shimadzu® PC 1520 – Diode Array)
- Espectrômetro de Massas: ESI-EM: Micromass Quattro LC (ionização por electrospray) e UltrO-TOF (Bruker-daltonics, Billarica, USA)
- Mesa agitadora com controle de temperatura (Innova™ 4300 – New Brunswick Scientific)

3.1.4 Vidrarias e outros equipamentos

- Alça de Platina
- Alça de Trigauski
- Auxiliar de pipetador (Brand)
- Balão de fundo redondo e volumétrico (Kontes e Vidrolabor)
- Béqueres (Quimividros)

- Bisturi
- Colunas para cromatografia (Quimividros)
- Fracos tipo *ependorf*
- Erlenmeyers (Quimividros)
- Funil de Buckner (Chiarotti Mauá)
- Funil de placa porosa acoplado a vácuo
- Funis de separação (Quimividros)
- Grau e pistilo (Chiarotti Mauá)
- Micropipetadores ajustáveis de 1,0 a 1000,0 µL (Finnpipette)
- Microseringas graduadas 100, 50 µL (Microliter[®]) e 0,5 mL (Perfektum[®])
- Moldes de aço inoxidável (*template*)
- Pinça
- Pipetas graduadas (Pyrex) e Pasteur
- Placas de Petri
- Placas de vidro para cromatografia
- Ponteiras para micropipetadores
- Provetas (vidrolabor)
- Tubos de ensaio
- Tubo de RMN (Kontes)

3.1.5 Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos

Cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC):

- <i>Candida albicans</i>	ATCC 1023
- <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.1.6 Linhagens tumorais utilizadas

A linhagens tumorais foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA)

- JURKAT (leucemia T humana)
- B16F10 (melanoma)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do material vegetal

A coleta do material vegetal - folhas e raízes – de *Viguiera arenaria* Baker, foi realizada no dia 01/03/04, no período da manhã, na rodovia SP 330 – W. Luis, Km 240-245. O material recém coletado foi envolvido em jornal e armazenado em caixa de isopor para o seu transporte até que recebesse o tratamento adequado para o isolamento dos fungos endofíticos. Exsicata foi coletada e depositada no herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Alguns indivíduos dessa população foram anteriormente identificadas pelo Prof Edward E. Schiling, Departamento de Botânica, Universidade de Tenesse, EUA, cujas testemunhas estão no mesmo herbário, sob os códigos SPFR 4001 e 4006. (AMBRÓSIO, 2001).

3.2.2 Preparo do meio de cultura ágar batata dextrose (BDA)

Utilizando a proporção de 39 g de meio BDA (batata, dextrose e ágar) 1000mL de água destilada, preparou-se tubos de ensaio “*slant*” (tubo de ensaio contendo BDA inclinado) e placas de Petri, para a realização do isolamento. Estes tubos foram previamente autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

3.2.3 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos

Todos os materiais utilizados no isolamento (Placas de Petri - 20 x 100 mm - contendo BDA, pinça, bisturi, béqueres, água destilada) foram previamente esterilizados em autoclave.

Para esterilização e garantia da eliminação de microrganismos epifíticos das partes vegetais a serem utilizadas (raízes e folhas) foram realizadas submersões consecutivas em solventes na seguinte seqüência: i) álcool etílico 70% durante 2,5 minutos, ii) solução de hipoclorito de sódio a 5% por 60, 90 segundos e 5 minutos, iii) novamente em álcool etílico 70% por 1 minuto e iv) água destilada estéril. O material vegetal foi cortado com o auxílio de bisturi e pinça em fragmentos pequenos (8 x 8 mm para folhas e 1,5 cm para raízes) em placa de vidro, dentro de capela de fluxo laminar. Fragmentos das folhas e raízes foram inoculados, separadamente, em placas de Petri previamente preparada contendo o meio BDA para possibilitar o crescimento dos fungos endofíticos (adaptado de BACON, 1990). Foi preparado um controle, para cada tempo de esterilização, através da inoculação da água estéril utilizada para a última lavagem do material vegetal em placa de Petri, a fim de certificar a inexistência de qualquer outro microrganismo que não fosse endofítico.

Após 24 horas de inoculação do material vegetal nas placas de Petri foi possível iniciar o isolamento. Cada nova colônia que surgia era isolada com auxílio da alça de platina e inoculada em tubos de ensaio “*slant*”. Os fungos isolados foram mantidos em temperatura ambiente e periodicamente foram avaliados visualmente quanto ao desenvolvimento do micélio vegetativo aéreo. Essa observação foi acompanhada pela Profa Dra Suraia Said, Laboratório de Enzimologia Industrial FCFRP-USP, auxiliando na separação das colônias que eram comuns macroscopicamente entre si. O tempo total utilizado para o isolamento foi de, aproximadamente, 96 horas. Após esse período o isolamento tornou-se inviável devido ao rápido crescimento de algumas colônias que encobriram a placa de Petri. Os fungos endofíticos isolados foram mantidos à temperatura ambiente por 7 dias e após esse período, foram armazenados sob refrigeração.

3.2.4 Manutenção do estoque de microrganismos

Os fungos isolados estão sendo mantidos em tubo “*slant*” contendo meio BDA, sob refrigeração. Estão sendo repicados a cada seis meses, para o mesmo meio, em capela de fluxo laminar, com auxílio de alça de platina, para a garantia de meio para sua sobrevivência. Os fungos isolados foram analisados quanto à presença de esporos, para conservação em sílica gel daqueles que sejam capazes de esporularem, já que essa técnica necessita de fungos com essa característica.

Para que fosse avaliada a presença de esporos nos fungos, estes (VA1 a VA37, com exceção dos VA21, VA22 e VA23 isolados como leveduras) foram repicados em tubos “*slant*” contendo meio BDA e analisados com auxílio de microscópio óptico após sete dias de crescimento. Os fungos que não apresentaram

esporos nesse período foram avaliados após quatorze dias de crescimento.

Esse experimento foi feito vertendo-se água estéril no tubo contendo o fungo e, posteriormente, a superfície do tubo onde o fungo apresentava crescimento foi raspada com auxílio de alça de platina, previamente flambada e resfriada. Pequena quantidade da suspensão formada, após a raspagem, foi colocada em lâmina e observada sob microscópio para avaliação quanto à presença de esporos.

3.2.5 Identificação dos microrganismos

3.2.5.1 Taxonomia convencional

Os fungos codificados como VA1, VA15 e VA17 foram enviados à Fundação André Tosello, em Campinas - SP para serem identificados por taxonomia convencional. O repique dos fungos enviados para identificação foi realizado em capela de fluxo laminar, com auxílio de alça de platina. Foram enviados em tubos “*slant*”, contendo meio BDA, previamente autoclavados.

3.2.5.2 Identificação molecular dos fungos endofíticos

A maioria dos fungos endofíticos foi identificada por biologia molecular através da colaboração estabelecida pela Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo, Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman e Dra. Cristina Kawano.

Preparação das cepas para a extração do DNA: os isolados são crescidos em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) sob agitação constante (120 rpm) a 30 °C, até a obtenção de uma massa micelial (cerca de 450

mg). Em seguida as culturas são filtradas através de papel de filtro depositado em um funil de Büchner acoplado a uma bomba a vácuo, para a recuperação da massa micelial. A maceração do micélio é realizada em nitrogênio líquido com o auxílio de grau e cadinho de porcelana gelados. O DNA genômico é extraído de acordo com o protocolo Fenol/clorofórmio – RiT11 e TiT 13, que consiste das seguintes etapas: após o micélio ser macerado com nitrogênio líquido, este é transferido para um tubo de *ependorf* (1,5 mL) e, cerca de 500 µL de tampão para extração (TE, Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0.5%) são adicionados ao *ependorf*. Um volume igual da mistura fenol/clorofórmio (1:1) é adicionado e a mistura é agitada com auxílio de vortex por 10 minutos. Em seguida, o *ependorf* é levado à centrífuga a 12.000 rpm por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante é coletado e transferido para um tubo de *ependorf* novo, e o volume da mistura é completado com clorofórmio para 1.5 mL. Após agitação, é centrifugado novamente por 5 min a 12.000 rpm. O sobrenadante é coletado novamente e transferido para outro *ependorf* e são adicionados cerca de 540 µL de isopropanol (0,54 volumes). A mistura é centrifugada por 2 min a 12.000 rpm, para remover o sobrenadante e levar o *pellet* com 100 µL de etanol (70%). A mistura é centrifugada novamente por 1 min a 12.000 rpm, para retirar o sobrenadante para a secagem do *pellet*. Após a secagem, o *pellet* é eluído em água esterilizada (50 µL) e adiciona-se cerca de 5 µL de RNase. A mistura é levada para um banho a 37 °C por 1 hora. A checagem do DNA genômico é realizada em gel de agarose 1%. A quantificação do DNA genômico é feita em espectrofotômetro, com os comprimentos de onda a 260 e 280 nm.

Amplificação por PCR e seqüenciamento do DNA genômico: a amplificação pela técnica da PCR da região ITS2 é realizada através do uso de *primers* universais específicos ITS3 (5'GCATCGATGAAGAACGCAG3') e ITS4

(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Os *primers* usados foram descritos por White e colaboradores (1990). A reação de amplificação é realizada num volume total de 50 μ L, contendo: 5 μ L de Buffer 10x, 2,5 μ L de dNTP 4 mM, 2 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ L de cada primer na concentração de 21 pMol, 500 ng de DNA genômico, 1 unidade de Taq polymerase platinun (Promega corporation) e 37 μ L de água esterilizada. A reação ocorre em um termocilador (Perkin-Elmer-Cetus). O processo de desnaturação a 94 °C é conduzido por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, anelamento e extensão. A temperatura e os tempos para estes passos são 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min. Após 35 ciclos completados as amostras são incubadas por 10 min a 72 °C e mantidas no freezer a -20 °C. Cerca de 5 μ L dos produtos da PCR são checados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotografado sob luz UV. Os produtos da PCR são purificados através de colunas da Qiagen (PCR purification Kit, Qiagen Corp., Chatsworth, CA) e levados para o seqüenciamento. O seqüenciamento é executado em ambas direções usando os mesmos *primers* do processo de amplificação e é realizado no Laboratório da Profa. Dra. Maria Helena Goldman, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

3.2.6 Condições de cultura (adaptado de LU et al., 2000 e de BRADY; CLARDY, 2000).

Dos 37 fungos isolados, 34 foram cultivados em pequena escala. Apenas os fungos codificados como VA22, VA23 e VA24 não foram cultivados devido a dificuldades experimentais. Os fungos VA1 e VA17 foram cultivados em escala ampliada, a fim de obter maior quantidade de extrato para prosseguimento de técnicas de isolamento e identificação de substâncias. A escolha deste dois fungos para o cultivo em escala ampliada (VA1 e VA17) foi realizada com base na avaliação dos perfis químico-biológico de oito (VA1, VA11, VA12, VA15, VA17, VA20, VA27 e VA28) fungos cultivados em um screening inicial.

O branco da cultura foi obtido através da exposição do meio fermentativo Czapek sob as mesmas condições que para o cultivo dos fungos endofíticos, porém, sem a inoculação de microrganismo. Foi feita extração desse meio fermentativo, sem inóculo, com acetato de etila após 144 horas de incubação sob agitação constante de 120 rpm a 30 °C.

3.2.6.1 Preparo e inoculação dos fungos em meio pré-fermentativo (Jackson) e produção de metabólitos em meio fermentativo (Czapek).

Placas de Petri foram previamente autoclavadas e preparadas com meio BDA para o repique dos fungos a serem cultivados. Após o repique, os fungos foram mantidos em temperatura ambiente por 7 dias.

Os conídios ou micélios dos fungos foram inoculados em 200mL de meio pré-fermentativo (JACKSON et al., 1993), descrito na tabela 1(p.36)

Tabela 1 – Meios de cultura pré-fermentativo (JACKSON et al., 1993) e fermentativo Czapek (ALVIANO et al., 1992).

Meio Pré-Fermentativo		*Solução de Traços		Meio fermentativo	
Componentes	Quantidade	Componentes	Quantidade	Componentes	Quantidade
	e		e		e
Pó de Milho	0,25%	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1%	Sacarose	3,0%
Glicose	1,0%	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1%	NaNO ₃	0,2%
Farinha de Aveia	1,0%	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0025%	K ₂ HPO ₄	0,1%
Pasta de Tomate	4,0%	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01%	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05%
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0%	H ₃ BO ₃	0,056%	KCl	0,05%
*Solução de Traços	10ml/L	(NH ₄) ₆ .MoO ₂ .4H ₂ O	0,0019%	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001%
H ₂ O destilada q.s.p.	200mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,02%	H ₂ O destilada q.s.p.	400mL
		H ₂ O destilada q.s.p.	100mL	Sacarose	3,0%

As culturas foram incubadas inicialmente por 48 horas, sob agitação constante (120rpm), a 30 °C. Em seguida as massas miceliais foram assepticamente coletadas por filtração a vácuo e reinoculadas em 400 mL do meio fermentativo Czapek (ALVIANO et al., 1992).

Após 6 dias de incubação sob agitação constante (120 rpm) a 30 °C os fluidos das culturas foram separados das massas miceliais por filtração a vácuo, sem a necessidade de ambiente asséptico para esse procedimento.

3.2.7 Preparação dos extratos

Após o crescimento, em meio fermentativo, o fluido de cada cultura foi separado da massa micelial por filtração a vácuo. O fluido foi submetido à partição com AcOEt e BuOH resultando em 3 extratos (aquoso, AcOEt e BuOH) (figura 9, p. 37). Os extratos AcOEt e BuOH foram concentrados em rotaevaporador. A massa micelial foi imersa em MeOH por 7 dias (para morte do fungo e extração de metabólitos).

Figura 9. Obtenção dos extratos orgânicos AcOEt, BuOH e MeOH.

Tabela 2 – Código e quantidade dos extratos orgânicos obtidos (continua)

Código	Código do	Quantidade	Código do	Quantidade	Código do	Quantidade
--------	-----------	------------	-----------	------------	-----------	------------

do	Extrato	dos extratos	Extrato	dos extratos	Extrato	dos extratos
Fungo	AcOEt	AcOEt (g)	BuOH	BuOH (g)	MeOH	MeOH (g)
VA1*	VA1A	0,0093	VA1NB	0,0221	VA1M	1,0773
VA2	VA2A	0,0040	VA2NB	0,0800	VA2M	0,8240
VA3	VA3A	0,0040	VA3NB	0,1290	VA3M	1,0930
VA4	VA4A	0,0050	VA4NB	0,0790	VA4M	1,5790
VA5	VA5A	0,0080	VA5NB	0,0500	VA5M	1,8930
VA6	VA6A	0,0040	VA6NB	0,0500	VA6M	1,4340
VA7	VA7A	0,0040	VA7NB	0,0470	VA7M	1,1100
VA8	VA8A	0,0060	VA8NB	0,0690	VA8M	1,3220
VA9	VA9A	0,0040	VA9NB	0,1060	VA9M	1,0760
VA10	VA10A	0,0170	VA10NB	0,0670	VA10M	1,0610
VA11*	VA11A	0,0159	VA11NB	0,1138	VA11M	0,1902
VA12*	VA12A	0,0071	VA12NB	0,0660	VA12M	1,0313
VA13	VA13A	0,0090	VA13NB	0,0270	VA13M	0,7570

Tabela 2 – Código e quantidade dos extratos orgânicos obtidos (conclusão)

Código	Código do	Quantidade	Código do	Quantidade	Código do	Quantidade
do	Extrato	dos extratos	Extrato	dos extratos	Extrato	dos extratos
Fungo	AcOEt	AcOEt (g)	BuOH	BuOH (g)	MeOH	MeOH (g)
VA14	VA14A	0,0080	VA14NB	0,0530	VA14M	0,3710
VA15*	VA15A	0,0656	VA15NB	0,2423	VA15M	2,6306
VA16	VA16A	0,0280	VA16NB	0,5230	VA16M	0,3270
VA17*	VA17A	0,0140	VA17NB	0,0405	VA17M	1,0470
VA18	VA18A	0,0560	VA18NB	0,1800	VA18M	1,2150
VA19	VA19A	0,1000	VA19NB	0,0029	VA19M	2,0370
VA20*	VA20A	0,0128	VA20NB	0,1268	VA20M	0,8884
VA21	VA21A	0,0089	VA21NB	1,7778	VA21M	0,1004
VA25	VA25A	0,0430	VA25NB	0,2399	VA25M	1,0100
VA26	VA26A	0,0640	VA26NB	0,4003	VA26M	0,5730

VA27*	VA27A	0,0156	VA27NB	0,3037	VA27M	1,4894
VA28*	VA28A	0,0114	VA28NB	0,0790	VA28M	1,2264
VA29	VA29A	0,0170	VA29NB	0,0714	VA29M	1,0370
VA30	VA30A	0,0360	VA30NB	0,1681	VA30M	0,7690
VA31	VA31A	0,0800	VA31NB	0,0685	VA31M	0,7870
VA32	VA32A	0,0780	VA32NB	0,0994	VA32M	0,5170
VA33	VA33A	0,0140	VA33NB	0,0436	VA33M	1,0380
VA34	VA34A	0,0091	VA34NB	0,0982	VA34M	0,8142
VA35	VA35A	0,0260	VA35NB	0,0801	VA35M	1,4560
VA36	VA36A	0,0031	VA36NB	0,0150	VA36M	0,9200
VA37	VA37A	0,0118	VA37NB	0,1593	VA37M	1,0389

*Fungos cultivados no screening inicial

3.2.8 Triagem química através de espectros RMN ^1H e perfis cromatográficos (CLAE) dos extratos acetato de etila.

Todos os extratos AcOEt, previamente solubilizados em CDCl_3 , obtidos no cultivo em pequena foram submetidos à análise preliminar de RMN ^1H (400 MHz).

A análise em CLAE dos extratos AcOEt deu-se sob as seguintes condições: coluna CLC-ODS (M) 250 mm x 4,5 mm, fase móvel: água/MeOH (gradiente iniciando MeOH/ H_2O 1:1 e terminando com 100% MeOH, por 20 minutos), os extratos foram solubilizados em MeOH obtendo uma concentração de 1mg/mL, sendo as injeções de 20 μl , vazão de 1 ml/min, e utilização de diferentes comprimentos de onda.

3.2.9 Cultivos em Escala Ampliada

Os fungos VA1 e VA17, após avaliação e seleção pelos perfis químico e biológico foram submetidos ao cultivo em escala ampliada. O cultivo foi realizado sob as mesmas condições descritas no item anterior (3.2.6.1). Porém, para o cultivo de cada fungo em escala ampliada foram utilizados 12 frascos (Erlenmeyers), ao invés de 1 frasco como no cultivo em pequena escala. Após o cultivo e obtenção dos extratos orgânicos verificou-se que a produção em escala ampliada manteve os mesmos perfis químicos para os extratos AcOEt analisados de ambos os cultivos em pequena escala. As quantidades obtidas dos extratos AcOEt após as partições dos fluidos das culturas (VA1 e VA17) podem ser observadas na tabela 3 (p.40).

Tabela 3 – Rendimentos dos extratos orgânicos cultivados em escala ampliada

Fungo	Extrato AcOEt (g)	Extrato BuOH (g)	Extrato MeOH (g)
VA 1	0,0880	0,3271	18,1751
VA 17	0,2480	1,1967	9,4810

3.2.10 Fracionamentos dos extratos orgânicos do fungo VA1

3.2.10.1 Fracionamento do extrato bruto AcOEt (VA1A)

Para o fracionamento do extrato bruto acetato de etila - VA1A (85 mg) (figura 10, p.43) foi utilizado coluna de 1cm de diâmetro, preenchida com 40 cm de sílica gel 60 (0,063-0,200 nm). A coluna foi eluída nas fases móveis: Hex/AcOEt (9:1 –100 mL),

Hex/AcOEt (1:1 – 180 mL), AcOEt (100% - 40 mL) e Metanol (100% - 60 mL). O fracionamento foi acompanhado por CCDA, usando a mesma fase móvel da coluna, e revelação sob a luz ultravioleta, 254 nm, e posteriormente exposição aos vapores de iodo. Com isso, foi possível agrupar as 223 frações resultantes em 30 frações, de acordo com a tabela 4 (p.41). O rendimento final da coluna foi de 91,7%, correspondendo a uma massa final de todas as frações de 77,94 mg.

A partir da fração VA1A19, obtida no fracionamento VA1A, fez-se cromatografia de camada delgada preparativa utilizando sílica gel 60 PF₂₅₄, como fase estacionária, e sistema de fase móvel constituído por Hex/AcOEt 7:3 (100 mL) (figura 10, p.43). A amostra foi solubilizada em CHCl₃ e aplicada numa faixa de 8cm de comprimento, na parte inferior à placa. A eluição foi feita, por duas vezes consecutivas. A mancha de interesse foi extraída com acetona/MeOH (9:1) e após filtração à vácuo fez-se concentração do material purificado (substância I). O mesmo procedimento de CCDP foi utilizado para a purificação da fração VA1A25, porém com sistema de fase móvel constituído por: CH₂Cl₂/MeOH (9:1). A partir deste procedimento com a fração VA1A25 foi possível a obtenção da substância II (figura 10, p.43).

Tabela 4 – Frações obtidas no fracionamento do extrato AcOEt do fungo VA1 (continua)

Frações resultantes	Frações reunidas		Quantidade (mg)
VA1A1	5-6		0,5
VA1A2	7-8		0,7
VA1A3	9-13		1,9
VA1A4	14-20		1,5
VA1A5	21-23		1,4

VA1A6	24-34	9,3
VA1A7	35-36	2,5
VA1A8	37-45	5,9
VA1A9	46-48	0,2
VA1A10	49-51	-
VA1A11	52-66	0,6
VA1A12	67-84	0,5
VA1A13	85-97	1,4
VA1A14	98-100	1,4
VA1A15	101-108	3,0
VA1A16	109-114	1,6
VA1A17	115-116	1,1
VA1A18	117-118	1,9
VA1A19*	119-140	7,6
VA1A20	141-145	1,5

Tabela 4 – Frações obtidas no fracionamento do extrato AcOEt do fungo VA1 (conclusão)

Frações resultantes		Quantidade (mg)
	Frações reunidas	
VA1A21	146-150	1,5
VA1A22	151-155	0,7
VA1A23	156-158	1,3
VA1A24	159-160	0,4
VA1A25**	161-185	6,4
VA1A26	186-195	1,0
VA1A27	196-205	0,7
VA1A28	206-223	1,0
VA1A29	AcOEt	2,9
VA1A30	MeOH	17,2

* Fração que originou a substância I

** Fração que originou a substância II

Figura 10. Fracionamento da fração VA1A.

3.2.10.2 Fracionamento do extrato micelial MeOH (VA1M)

O extrato VA1M (18,1751 g) foi particionado de acordo com o procedimento ilustrado na figura 11 (p.44) (PUPO, 1997).

Figura 11. Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato VA1M.

As frações VA1MM e VA1MA foram eluídas em placas cromatográficas de sílica gel 60 nas seguintes fases móveis: Hex/AcOEt (9:1; 8:2 e 1:1), observadas sob luz ultravioleta a 254 nm e, posteriormente, reveladas no vapor de iodo. Essa análise permitiu a observação das semelhanças entre estas frações. Fez-se, portanto, a junção destas duas frações, que foram codificadas como VA1MA (1,1169 g).

3.2.10.2.1 Fracionamento em coluna da fração VA1MA

Para a realização do fracionamento da fração codificada como VA1MA (1,1169g), foi utilizada coluna de 2 cm de diâmetro, preenchida com 45 cm de sílica gel 60 (0,063-0,200 nm). A coluna foi eluída com as fases móveis: Hex/AcOEt 8:2 (400 mL), Hex/AcOEt 1:1 (300 mL), AcOEt 100% (100 mL) e MeOH 100% (300 mL). Foram obtidas 13 subfrações e o rendimento final deste fracionamento foi de 44% (figura 12, p.46). A partir da subfração VA1MA9 foi possível observar formação de precipitado, o qual foi separado do sobrenadante e codificado como substância III (27,0 mg).

O fracionamento da subfração VA1MA8 foi realizado em coluna de 1 cm de diâmetro, contendo 40 cm de sílica gel 60 (0,063-0,200 nm). A seguir, foi eluída com CHCl₃/Acetona 10:0,5 (100 mL) e MeOH 100% (80 mL). O rendimento final obtido foi de 93% (figura 12, p.46)

As subfrações obtidas, em ambos fracionamentos, foram eluídas em placas cromatográficas de sílica gel 60, em sistemas de fases móveis apropriados, observadas sob luz ultravioleta a 254 nm e, posteriormente, reveladas no vapor de iodo. Essa análise permitiu a reunião adequada das subfrações semelhantes.

3.2.10.2.2 Fracionamento da fração VA1MNB

A fração VA1MNB, obtida pela partição com BuOH do extrato micelial metanólico do fungo VA1, foi solubilizada em MeOH e eluída nesse mesmo solvente numa coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 2,5 cm), originando 120 subfrações que foram reunidas em 9 subfrações finais através do monitoramento por placas de camada delgada de sílica gel 60, eluídas em CHCl₃/MeOH/H₂O (80:18:2), sendo reveladas, posteriormente à luz ultravioleta 254 nm e vapores de iodo (figura 13, p.48).

As subfrações VA1MNB1 e VA1MNB2 resultantes, foram novamente fracionadas em coluna (43 cm de comprimento de sílica gel 60 x 2 cm de diâmetro),

sendo eluídas com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Ac. Acético}$ (80:18/ 50 gotas). A fração VA1MNB1 originou 150 subfrações que foram agrupadas em 7 subfrações. A fração VA1MNB2 originou 203 subfrações que foram agrupadas em 4 novas subfrações (figura 13, p.48)

A subfração VA1MNB3 foi solubilizada em MeOH e eluída, a seguir em Sephadex LH-20. A subfração VA1MNB3.2 foi submetida a CCDP em sílica gel 60 PF₂₅₄, sendo a fase móvel constituída por $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2). As duas manchas separadas foram codificadas como VA1MNB3.2.1 (27,0 mg) e VA1MNB3.2.2 (2 mg) (figura 13, p.48)

A subfração VA1MNB6 foi submetida a fracionamento em coluna (15 cm x 7mm) de sílica gel 60 silanizada eluída com $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1, originando 90 subfrações que foram agrupadas em 4 subfrações (figura 13, p.48).

Figura 13. Fracionamentos realizados com a fração VA1MNB

3.2.11 Fracionamentos dos extratos orgânicos do fungo VA17

3.2.11.1 Fracionamento do extrato bruto AcOEt (VA17A)

Para o fracionamento do extrato bruto acetato de etila - VA17A (228 mg) - foi utilizado coluna de 2 cm de diâmetro, preenchida com 45 cm de sílica flash (400-200 mesh). A coluna foi eluída nas fases móveis: Hex/AcOEt (1:1 – 625 mL), Hex/AcOEt (2:8 – 150 mL), AcOEt (100% - 100 mL) e Metanol (100% - 400 mL). O fracionamento foi acompanhado por CCDA. As placas foram eluídas em sistema apropriado de fase móvel, observadas sob a luz ultravioleta (254 nm) e posteriormente expostas ao vapor de iodo para revelação. Foi possível agrupar as 246 frações resultantes em 10 frações, de acordo com a tabela 5 (p.49). O rendimento final da coluna foi de 72%, correspondendo a uma massa final de todas as frações de 164 mg.

Tabela 5 - Frações obtidas no fracionamento do extrato AcOEt do fungo VA17.

Frações resultantes	Frações reunidas	Massa (mg)
VA17A1	1-26	14
VA17A2	27-56	13
VA17A3	57-88	4
VA17A4	89-127	6
VA17A5	128-160	10
VA17A6	161-184	5
VA17A7	185-208	5
VA17A8	209-244	16
VA17A9	AcOEt (100%)	1
VA17A10	MeOH (100%)	90

As frações VA17A5, VA17A6, VA17A7 e VA17A8 foram submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa na fase móvel constituída por Hex/AcOEt 1:1 (100 mL), sendo cada placa eluída apenas uma vez (figura 14, p.51). A fração VA17A10 foi solubilizada em MeOH e submetida a fracionamento em sephadex LH-20 no mesmo solvente em que foi solubilizada. Foram coletadas 78 subfrações reunidas em quatro subfrações finais (figura 14, p.51). O rendimento final obtido foi de 47,54%.

Após a realização de cromatografia em camada delgada preparativa da fração VA17A8 (10,0 mg), fez-se purificação desta fração através de cromatografia líquida de alta eficiência, usando: coluna semi-preparativa VP 250/10 Nucleosil 100-7 (Macherey-Nagel), fase móvel: CH₃CN/H₂O (35:65), por 40 minutos. A amostra foi solubilizada na mesma fase móvel obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg/mL, sendo as injeções de 200 µL, vazão de 4 mL/min, e utilização de diferentes comprimentos de onda para detecção. Desta separação foi possível a obtenção da substância **V** (figura 14, p.51).

As frações VA17A5, VA17A6 e VA17A7, após cromatografia de camada delgada preparativa, foram submetidas à análise em CLAE sob as seguintes condições: coluna semi-preparativa VA 250/10 Nucleosil 120-5, fase móvel: CH₃CN/H₂O (35:65), por 30 minutos, as frações foram solubilizadas na mesma fase móvel obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg/mL, as injeções foram de 200 µL, vazão de 4 mL/min, e diferentes comprimentos de onda foram usados para detecção.

Figura 14. Partição do extrato bruto AcOEt do fungo VA17.

3.2.11.2 Fracionamento do extrato micelial metanólico VA17M

3.2.11.2.1 Partição líquido-líquido do extrato VA17M (PUPO, 1997)

O extrato micelial metanólico VA17M (9,4810 g) foi submetido a partição de acordo com os mesmos procedimentos ilustrados na figura 11 (p.44) para o extrato micelial metanólico VA1M. As frações resultantes da partição líquido-líquido VA17M podem ser visualizadas conforme a tabela 6 (p.52).

Tabela 6 – Frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato VA17M (9,4810 g)

Frações resultantes	Solvente correspondente	Quantidade (g)
VA17MH	Hexano	0,9616
VA17MM	Metanol	0,5069
VA17MA	AcOEt	0,4680
VA17MH ₂ O	H ₂ O	7,3504

As frações VA17MM e VA17MA foram eluídas em placas cromatográficas de sílica gel 60 nas seguintes fases móveis: Hex/AcOEt (9:1; 8:2 e 1:1), observadas sob luz ultravioleta a 254 nm e, posteriormente, reveladas no vapor de iodo. Essa análise permitiu a observação das semelhanças entre estas frações. Fez-se, portanto, a junção destas (VA17MM e VA17MA), que foram reunidas e codificadas apenas como VA17MMA (0,9749 g).

3.2.11.2.2 Fracionamento em coluna da fração VA17MMA

O fracionamento realizado com a fração VA17MMA (0,9749 g) foi realizado em coluna de 2 cm de diâmetro, preenchida com 45 cm de sílica gel 60 (0,063-0,200 nm). Em seguida, foi eluída nos seguintes sistemas de fases móveis: Hex/AcOEt 8:2 (300mL), Hex/AcOEt 1:1 (680 mL), AcOEt 100% (100 mL) e MeOH 100% (200 mL). Foram obtidas 9 subfrações e o rendimento final foi de 76,9%. (figura 15, p.54).

A partir da subfração VA17MMA7 foi possível a visualização de cristais, estes foram lavados várias vezes com metanol resfriado até a obtenção de precipitado puro, que foi denominado substância **VI**.

A subfração VA17MMA5, foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa na fase móvel constituída por CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (9:1/5 gotas). Três manchas foram obtidas e codificadas de acordo com a figura 15 (p.54).

As subfrações VA17MMA8 e VA17MMA9 foram reunidas após análise por cromatografia de camada delgada em sílica gel 60 na fase móvel CH₂Cl₂/MeOH (9:1), seguidas de revelação à luz ultravioleta (254 nm) e vapor de iodo. Após a junção, a subfração foi codificada apenas como VA17MMA8, obtendo-se uma massa final de 164,1 mg. A partir da subfração VA17MMA8 (164,1 mg) foi realizado fracionamento em coluna com 1,5 cm de diâmetro, preenchida com 60 cm de sílica gel 60 (0,063-0,200 nm). A eluição foi realizada com CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (600 mL), seguida de CH₂Cl₂/MeOH 1:1 (200 mL) e MeOH 100% (100 mL). Foram originadas 147 subfrações que foram agrupadas em 8 novas subfrações, após análise por cromatografia de camada delgada analítica. As placas foram eluídas em CH₂Cl₂/MeOH (9:1 e 1:1) e reveladas em luz ultravioleta (254 nm) e vapor de iodo. O rendimento final obtido nesse fracionamento foi de 74,71%.

A subfração VA17MMA8.5 foi submetida a CCDP em sistema de fase móvel constituída por CH₂Cl₂/MeOH 9:1, sendo eluída uma vez. Foi possível separar apenas uma mancha correspondente à fração VA17MMA8.5.1 (0,8 mg) (figura 15, p.54).

A subfração VA17MMA6 foi purificada em CLAE usando: coluna semi-preparativa VA 250/10 Nucleosil 120-5 e fase móvel CH₃CN/H₂O (35:65), por 40 minutos. A amostra foi solubilizada na mesma fase móvel, obtendo-se uma

concentração final de 2,5 mg/mL, sendo as injeções de 200 μ L, vazão de 5 mL/min, e utilização de diferentes comprimentos de onda para detecção. A partir deste fracionamento foi possível o isolamento da substância **VII**.

3.2.12 Isolamento da substância IV do fungo VA 5

Durante o processo de obtenção dos extratos metanólicos dos fungos que foram cultivados em pequena escala, houve formação de cristais brancos durante o processo de secagem do extrato micelial metanólico do fungo VA5. Esse precipitado foi lavado, por várias vezes, com MeOH resfriado, para obtenção da substância **IV**.

3.2.13 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As elucidações estruturais das sete substâncias isoladas foram baseadas nos experimentos de RMN: RMN ^1H (400 MHz); RMN ^{13}C (100 MHz); HMQC, ^1H - ^{13}C (500 MHz/ ^1H , 125 MHz/ ^{13}C); HMBC, ^1H - ^{13}C (500 MHz/ ^1H , 125 MHz/ ^{13}C); Noe-diff ^1H (300 MHz); além de espectrometria de massas (ionização por electrospray – ESI-EM, MS-MS). As substâncias **I**, **II**, **III**, **V** e **VII** foram solubilizadas em CDCl_3 , a substância **IV** foi solubilizada em D_2O , e a substância **VI** foi solubilizada em DMSO-d_6 .

3.2.14 Ensaios de atividade antimicrobiana (Difusão em ágar) (FURTADO, 2004).

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 1023

Esses microrganismos foram mantidos em meio ágar triptona soja, com exceção da *Candida albicans*, mantida em meio Sabouraud, ambos contendo glicerol.

3.2.14.1 Preparação da camada de Base

Foram transferidos 15 mL do meio *antibiotic* nº1 – ANTI 1, previamente esterilizado, para placas de Petri (20 x 100 mm), que permaneceram em repouso

sobre superfície plana horizontal até solidificação do meio.

3.2.14.2 Preparação do inóculo

O meio ANTI 1 foi preparado na proporção de 30,5 g/L e esterilizado. Para sua manutenção no estado líquido, foi conservado em banho-maria à aproximadamente 50 °C até o momento de uso.

Com o auxílio de alça de platina esterilizada e capela de fluxo laminar, culturas de 24 horas dos microrganismos, desenvolvidas no meio ANTI 1, foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina (0,9% NaCl) esterilizada. Padronizou-se esta suspensão comparando-a com a escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0%). Obteve-se, portanto, um inóculo com aproximadamente 10^7 células/mL, denominada “suspensão concentrada”, utilizada para a elaboração do meio de superfície, quando adicionada ao meio de cultura, na proporção de 0,5%.

Adicionou-se 5mL deste inóculo (meio de superfície: 0,5% de suspensão bacteriana + meio de cultura) a 50° C sobre a camada de base já preparada.

3.2.14.3 Difusão em ágar

Após completa solidificação do meio de superfície, colocou-se um molde de aço inoxidável (*template*) em cada placa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

Com o auxílio de micropipeta e ponteiros esterilizados, foram adicionados, em cada cavidade do *template*, 50 µL de cada extrato a ser testado, previamente dissolvidos em DMSO/H₂O na proporção de 1:1. A concentração das amostras para

a realização do ensaio foi de 1 mg/mL.

Controles negativos foram preparados pela inoculação de 50 µL do diluente DMSO/H₂O (1:1) em um dos orifícios do *template*, para cada placa de Petri.

Os controles positivos foram feitos utilizando os seguintes padrões:

- Penicilina G 1215 U/mg. Após sucessivas diluições, aplicou-se 50 µL de uma suspensão na concentração de 1,215 U (1 µg) para *Staphylococcus aureus*.

- Estreptomicina 777 U/mg. Após diluição, foram aplicados 50 µL de uma suspensão de 77,7 U (100 µg) para *Escherichia coli*.

- Miconazol. Foi aplicado 50 µL de uma suspensão de 4 mg/mL (200 µg) para *Candida albicans*.

Foi colocado papel de filtro esterilizado na tampa de cada placa para reter a água de condensação. As placas foram incubadas a 37 °C, por cerca de 24 horas.

3.2.14.4 Revelação

O gel de ágar bacteriológico foi preparado a 1% (p/v) em água destilada e esterilizado em autoclave, a 121 °C, por 15 minutos. Após resfriamento até cerca de 50 °C utilizaram-se 2 mg de TTC por mL do meio ágar. O TTC foi dissolvido em 5 mL de água esterilizada para depois ser adicionado ao ágar (LUND; LYON, 1975).

Foi adicionada a solução reveladora (TTC) em cada placa, sendo as mesmas reincubadas a 37 °C por cerca de 30 minutos. Quando ocorria presença de atividade por alguma substância, o halo de inibição formado era mensurado.

3.2.15 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca utilizando cloreto de trifeniltetrazólio (ANDREWS, 2001; FURTADO, 2004)

Foram preparadas soluções de quatro substâncias previamente isoladas: substâncias **I** (nectriapirona), **II** (tirosol), **III** (ergosterol) e **VI** (fusaperazina B), contendo 2 mg/mL em DMSO. Fez-se a diluição destas soluções em caldo triptona soja, obtendo-se soluções de concentrações de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL para a realização dos ensaios.

3.2.15.1 Microrganismo utilizado

Utilizou-se a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.15.2 Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas do microrganismo indicador, desenvolvidas no ágar triptona soja, foram transferidas para tubo contendo 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Padronizou-se estas suspensões comparando-se com a escala de McFarland 1 (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0%). Em seguida, foi feita diluição no caldo triptona soja de modo a fornecer o inóculo de 10^3 UFC/mL.

3.2.15.3 Determinação da atividade antimicrobiana das substâncias I, II, III e VI

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram depositados um total de 50 µL da mistura final: caldo triptona soja, soluções das substâncias e suspensão bacteriana. Inicialmente foram utilizados quantidades de 400 µg; 300 µg; 200 µg; 100 µg; 50 µg; 25 µg; 12,5 µg; 6,25 µg e 3,125 µg de substância por mL da mistura final. A partir dos resultados obtidos com essa primeira diluição foram feitas novas diluições das substâncias a fim de diminuir o intervalo das concentrações utilizadas até a obtenção da CIM.

Em um dos orifícios de cada placa foi feito o controle da cultura, a qual deve apresentar crescimento bacteriano devido a ausência do agente antimicrobiano. Em outro orifício foi feito o controle de esterilidade do caldo triptona soja e em outro o controle do sistema solvente utilizado na solubilização das substâncias isoladas.

As microplacas foram seladas com plástico PVC e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 20 µL de cloreto de trifeniltetazólio preparado em solução aquosa (0,7%). As microplacas foram reincubadas por 30 minutos, sendo então observado o aparecimento de cor. A ausência de cor nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento microbiano (microrganismo sensível à substância avaliada).

3.2.16 Ensaios de atividade antitumoral

Os ensaios antitumorais foram realizados pelo Prof. Dr. Auro Nomizo, do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.2.16.1 Linhagens tumorais humanas

Foram utilizadas as linhagens tumorais humana JURKAT (leucemia T humana) e melanoma (B16F10), obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). Estas linhagens foram mantidas em criopreservação em nitrogênio líquido a -190 °C em solução de congelamento que consiste em de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal. Para fazer os ensaios de atividade citotóxica dos produtos naturais, essas células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, à temperatura de 37 °C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

3.2.16.2 Meios de cultura celular

Para a manutenção das linhagens de tumores humanos, dissolução dos extratos obtidos das culturas dos endofíticos e realização dos ensaios de atividade antitumoral, foi utilizado o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20 mM de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio e 10 µg/mL de gentamicina (meio RPMI completo). Este meio foi preparado na hora do uso e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm.

3.2.16.3 Preparação dos extratos para teste de atividade antitumoral

Os extratos AcOEt e substâncias isoladas na forma cristalina solúveis em meio aquoso foram pesados e dissolvidos na concentração apropriada em meio de

cultura celular RPMI completo. Posteriormente, foram submetidos ao misturador (VORTEX) para dissolução completa. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rotações por dez segundos para a sedimentação de qualquer produto insolúvel ou precipitado. Por fim, estes extratos e substâncias foram esterilizados por filtração em membranas de 0,22 µm para a utilização experimental. Os extratos ou substâncias dissolvidas em DMSO foram posteriormente diluídos em meio RPMI completo e esterilizadas por filtração. Como controle positivo, foi utilizado metotrexato - Laboratório Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, Brasil e Gemzar – Cloridrato de Gencitabina (Eli-Lilly do Brasil). Como controle negativo, foi utilizado o diluente DMSO/meio RPMI (1:100) usado para diluição das amostras.

3.2.16.4 Ensaio de atividade citotóxica em linhagens tumorais dos extratos

Para avaliação da atividade citotóxica dos extratos AcOEt e substâncias isoladas foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium -MTT (MOSMANN, 1983). As células tumorais foram incubadas em placas de cultivo celular de 96 poços com os diferentes extratos ou droga controle por 24 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C. Ao final do período de incubação, 10 µL de MTT na concentração de 5mg/mL foram adicionados aos poços de cultivo celular que foram mantidas por mais 3 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37 °C. Após este período, foram acrescentados 50 µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio/HCl 0,01N. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite a temperatura ambiente. A avaliação da atividade citotóxica dos diferentes extratos foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de interferência de 570

nm.

3.2.17 Ensaios de inibição de atividades enzimáticas

As enzimas utilizadas para a realização destes ensaios são obtidas a partir dos plasmídeos inseridos em bactérias *Escherichia coli*. A preparação e purificação das enzimas são feitas rotineiramente de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

As enzimas foram armazenadas a 4 °C e utilizadas nos experimentos nas concentrações de 0,3 e 0,9 mg/mL para GAPDH e APRT, respectivamente.

3.2.17.1 Ensaio enzimático com GAPDH de *Trypanosoma cruzi*

Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP de acordo com procedimentos previamente descritos (VIEIRA et al., 2001), através da medida espectrofotométrica de NADH formado em 340 nm durante 30 segundos. A mistura reacional possui ao final 1mL, sendo 50 mM tampão Tris-HCl pH 8,6; 1 mM EDTA; 1 mM β -mercaptoetanol; 30 mM arseniato de sódio; 2,5 mM NAD; 0,3 mM gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e 1,5 μ g de enzima. A reação tem início com a adição do substrato.

Para a avaliação da atividade, os extratos foram preparados em solução de DMSO na concentração de 1 mg/mL e adicionados à mistura reacional na concentração de 100 μ g/mL. Substâncias puras são inicialmente testadas em 100 μ g/mL e esta concentração é diminuída até a obtenção de aproximadamente 50% de

inibição (IC_{50}). A concentração final de DMSO usada foi 10% e este volume foi subtraído do volume do tampão. Ensaios controles foram feitos na ausência de extratos, onde um volume equivalente de DMSO foi adicionado. As medidas foram feitas em triplicata e considerou-se o valor da média.

3.2.17.2 Ensaio enzimático com APRT de *Leishmania tarentolae*

Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. Foi utilizada a enzima APRT de *L. tarentolae* clonada e caracterizada por Thiemann e colaboradores em 1998. Esses ensaios foram feitos de acordo com a modificação de um procedimento descrito (TUTTLE; KRENISTSKY, 1980) pela medida espectrofotométrica da formação de AMP. Os ensaios foram acompanhados por 60 segundos, no comprimento de onda de 259 nm. A mistura reacional de volume final 1 mL possui: tampão Tris-HCl 100 mM pH7,4; $MgCl_2$ 5 mM; adenina 100 mM, PRPP 560 mM e APRT 7,5 μ g.

Para a avaliação da atividade, os extratos foram preparados em solução de DMSO na concentração de 1 mg/mL e 50 μ l foram adicionados à mistura reacional. A concentração final de DMSO usada foi 10% e este volume foi subtraído do volume do tampão. Ensaios controles foram feitos na ausência de extratos, onde um volume equivalente de DMSO foi adicionado. As medidas foram feitas em triplicata e considerou-se o valor da média.

A avaliação dos resultados obtidos para GAPDH e APRT foi seguida conforme descrito (VIEIRA et al., 2001). As médias obtidas nos resultados em triplicata são feitas da seguinte maneira:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t \text{ (min)}} \right) \times \text{x volume da cubeta}}{\epsilon_{\text{NADH,AMP}} \times \text{vol. enzima na cubeta} \times [\text{enzima}]}$$

onde: Δt = min.

$$\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{AMP}} = 1,24 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

volumes expressos em mililitros (mL)

Através das medidas espectrofotométricas da formação do produto (NADH) pela diferença de absorbância entre os tempos específicos de reação para cada enzima é possível calcular a atividade específica das enzimas (unidade/mg). Obtendo-se o valor da atividade específica torna-se possível o cálculo da porcentagem de inibição da enzima GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae* frente aos extratos testados, através da fórmula:

$$\% = 100 \times \frac{\text{U/mg (controle)} - \text{U/mg (amostra)}}{\text{U/mg (controle)}}$$

3.2.18 Cálculos de modelagem molecular

Realizou-se uma busca conformacional na molécula fuzaperazina B

(substância **VI**), obtendo-se 4 confôrmeros de baixa energia. Para essa análise utilizou-se o programa SPARTAN 4.0.3, com o método MONTE CARLO e o modelo de mecânica molecular MMFF. As estruturas dos 4 confôrmeros foram completamente otimizadas com o híbrido da teoria do funcional de densidade HF-DFT, a nível B3LYP/6-31G** de cálculo (SPARTAN'04, 2005).

Resultados e Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Isolamento de endofíticos provenientes de *V. arenaria*

Após as primeiras 24 horas de inoculação do material vegetal em meio BDA, em placas de Petri, foi possível iniciar o isolamento das primeiras colônias de fungos. Ao final de 96 horas de isolamento foi possível obter um total de 123 tubos contendo isolados de endofíticos. Estes foram agrupados, após 7 dias de crescimento, em 37 colônias (32 isoladas de folhas e 5 de raízes), de acordo com as características morfológicas, e codificados VA1 a VA37. Abaixo, segue a tabela 7 (p.66) com porcentagem de tubos isolados correspondentes a cada espécie, destacando o fungo VA1 que representou o maior número de tubos, constituindo-se o fungo predominante da espécie *V. arenaria* na época em que foi coletada:

Tabela 7 – Porcentagem das espécies de fungos endofíticos isolados de *V. arenaria* (continua)

Código do fungo	Nº de tubos isolados	% correspondente	Tempos de esterilização em que foram isolados
VA1	38	30,90	60", 90" e 5'
VA2	2	1,63	60" e 5'
VA3	4	3,25	60" e 90"
VA4	2	1,63	90" e 5'
VA5	4	3,25	90" e 5'
VA6	3	2,44	60" e 5'
VA7	5	4,06	60", 90" e 5'
VA8	3	2,44	90"
VA9	2	1,63	60"

Tabela 7 – Porcentagem das espécies de fungos endofíticos isolados de *V. arenaria* (continuação)

Código do fungo	Nº de tubos isolados	% correspondente	Tempos de esterilização em que foram isolados
VA10	2	1,63	60''
VA11	5	4,06	90'' e 5'
VA12	10	8,13	60'' e 90''
VA13	2	1,63	60'' e 90''
VA14	2	1,63	90'' e 5'
VA15	12	9,76	90'' e 5'
VA16	2	1,63	60'' e 90''
VA17	4	3,25	60'' e 90''
VA18	1	0,81	60''
VA19	1	0,81	5'
VA20*	1	0,81	5'
VA21*	1	0,81	90''
VA22*	1	0,81	90''
VA23	1	0,81	90''
VA24	1	0,81	90''
VA25	1	0,81	60''
VA26	1	0,81	90''
VA27*	1	0,81	5'
VA28*	1	0,81	5'
VA29	2	1,63	60''
VA30	1	0,81	90''
VA31	1	0,81	90''
VA32	1	0,81	90''
VA33	1	0,81	60''
VA34	1	0,81	90''

Tabela 7 – Porcentagem das espécies de fungos endofíticos isolados de *V. arenaria* (conclusão)

Código do fungo	Nº de tubos isolados	% correspondente	Tempos de esterilização em que foram isolados
VA35	1	0,81	60"
VA36	1	0,81	60"
VA37	1	0,81	60"

* fungos isolados da raiz de *V. arenaria*.

Os dados mostram que cada fungo foi isolado em tempos específicos de esterilização, sendo que os fungos não isolados no tempo de 5 minutos foram, possivelmente, eliminados durante o processo de esterilização das folhas.

Durante o processo de isolamento, as placas de Petri que continham inóculo da água de lavagem, após a esterilização das amostras de folhas e raízes, não apresentaram crescimento de nenhum tipo de microrganismo, portanto o processo de esterilização foi eficiente e apenas fungos endofíticos foram isolados. A documentação destes fungos foi feita através de fotografia após 48 horas de crescimento, em meio BDA, e pode ser observada no anexo 1.

4.1.1 Verificação de esporos

Após realizado o processo de isolamento dos fungos endofíticos, foi feita análise, através de auxílio de microscópio óptico, da presença ou ausência de esporos. Todos os fungos foram submetidos a essa análise, com exceção dos microrganismos VA21, VA22, VA23, isoladas como leveduras, e dos fungos VA6, VA7, VA11, VA14 e VA20, por dificuldades experimentais. A tabela 8 (p.69) ilustra

todos os fungos que esporularam no período de 7 e 14 dias.

A importância da produção de esporos para este trabalho se restringe apenas à técnica de conservação dos fungos em sílica gel, pois esse processo de conservação é mais duradouro e eficaz, assegurando uma maior preservação das características iniciais das culturas isoladas, garantindo assim, manutenção de suas capacidades biossintéticas originais de metabólitos secundários. Há relatos de alguns endofíticos que, após sucessivos repiques, perderam a capacidade de biossíntese dos metabólitos que eram produzidos logo que foram isolados das plantas⁴ (informação verbal).

Tabela 8 – Tempo de esporulação de fungos endofíticos isolados de *V. arenaria* (continua)

Fungos que esporularam com 7 dias de crescimento	Fungos que esporularam com 14 dias de crescimento	Fungos que não esporularam com 14 dias de crescimento
VA1	VA3	VA9
VA2	VA8	VA12
VA4	VA19	VA16
VA5	VA25	-
VA10	VA28	-
VA13	VA29	-
VA15	VA31	-
VA17	VA32	-
VA18	VA35	-
VA24	VA37	-
VA26	-	-

⁴ Informação fornecida pelo Dr. Strobel, G. A. durante a XXV Escola de Verão em Química Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira, realizada em São Carlos/SP, 2005.

Tabela 8 – Tempo de esporulação de fungos endofíticos isolados de *V. arenaria* (conclusão)

Fungos que esporularam com 7 dias de crescimento	Fungos que esporularam com 14 dias de crescimento	Fungos que não esporularam com 14 dias de crescimento
VA27	-	-
VA30	-	-
VA33	-	-
VA34	-	-
VA36	-	-

4.2 Obtenção e análise dos extratos orgânicos

Inicialmente foram selecionados 8 endofíticos (VA1, VA11, VA12, VA15, VA17, VA20, VA27 e VA28) para cultivo em pequena escala e seleção das cepas que seriam cultivadas em escala ampliada para prosseguimento das etapas químicas do trabalho. Posteriormente, todas as 29 linhagens restantes foram cultivadas em pequena escala para avaliação químico-biológica.

Através do cultivo em pequena escala, para avaliação do perfil químico-biológico dos fungos endofíticos isolados de *V. arenaria*, foi possível perceber a especificidade de cada fungo em produzir e liberar seus metabólitos para o meio, pois houve uma considerável variação de um fungo para outro dentro das mesmas condições de cultivo. A figura 16 (p.72) mostra que os extratos AcOEt foram obtidos em menores rendimentos, sendo a ordem crescente de rendimento para os extratos butanólicos, vindo a seguir os extratos miceliais metanólicos com os maiores valores. Uma exceção ocorreu com o fungo VA19, que apresentou baixo rendimento

para o extrato butanólico, enquanto o extrato AcOEt foi o que apresentou maior quantidade dentre os demais fungos. O espectro de RMN ^1H (anexo 10) do extrato VA19A indica que há a produção de um composto majoritário por este fungo. Isso sugere que ocorre a produção de metabólitos mais apolares, fáceis de serem extraídos com AcOEt.

A obtenção dos extratos AcOEt em escala ampliada para os fungos VA1 e VA17 (anexos 2 e 6) demonstrou, através dos espectros de RMN ^1H , que o perfil obtido no cultivo em pequena escala foi mantido, mostrando que a ampliação da escala de cultivo não interferiu na produção dos metabólitos por estes dois endofíticos.

Os espectros de RMN ^1H dos extratos AcOEt dos fungos cultivados no “screening” inicial percebe-se que os extratos VA11A, VA20A e VA28A (anexos 3, 7 e 9) possuem como constituintes majoritários os ácidos graxos e triglicerídeos, devido a presença de sinal intenso em δ 1,2 (s), característico de hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica longa. Para os extratos VA12A, VA17A e VA27A (anexos 4, 6 e 8) já não se observa a predominância desses tipos de metabólitos, havendo, portanto, a produção de outros constituintes químicos interessantes. O espectro do extrato VA15A (anexo 5) foi o mais notável por apresentar reduzida quantidade de ácidos graxos e triglicerídeos e diversos sinais de hidrogênios aromáticos, vinílicos, carbinólicos e metílicos.

Figura 16. Rendimento dos extratos orgânicos (g) obtidos de fungos endofíticos isolados de *V. arenaria*.

4.3 Resultados biológicos obtidos com os extratos AcOEt no cultivo em pequena escala

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através do antibiograma qualitativo, método de difusão em ágar. Os resultados foram considerados através da medida do halo de inibição formado pelos extratos e seus respectivos padrões, sendo importante ressaltar a utilização de controle negativo feito com diluente DMSO/H₂O (1:1). Porém, todos os halos apresentados pelo diluente, para todos os microrganismos testados, se restringiram ao valor de 10 mm, o que corresponde ao valor do diâmetro da cavidade do *template*.

Os resultados antimicrobianos da tabela 9 (p.76) mostram que a maioria dos extratos foi ativa para pelo menos um dos microrganismos testados. Em destaque encontram-se os extratos dos fungos VA11, VA12, VA19, VA26 e VA27 que apresentaram inibição de dois dos três microrganismos utilizados nos ensaios. Estes testes foram realizados em triplicata e a atividade considerada foi para halo de inibição superior a 12 mm.

Nos ensaios enzimáticos realizados (GAPDH e APRT), foram calculadas as porcentagens de inibição das atividades enzimáticas. Os resultados podem ser observados na tabela 9 (p.76), onde o extrato mais promissor frente a GAPDH foi o VA14A que apresentou 95,0% de inibição, sendo um resultado muito satisfatório, já que este ensaio é de certa forma específico por verificar a interação entre o ligante e a enzima. Este mesmo extrato demonstrou também uma inibição de 60,7% frente à enzima APRT. Esses valores ilustram o potencial desse extrato para a busca de substâncias com potencial antiparasitário. O extrato VA35A também apresentou considerável atividade de inibição quando comparado com os demais extratos

testados, com valores de 32,2% de inibição para GAPDH e 61,4% para APRT. O extrato VA16A com 57,5% de inibição frente APRT também demonstrou ser um extrato promissor na busca de substâncias inibidoras da via de síntese de purinas de *L. tarentolae*.

Os resultados apresentados pelos extratos AcOEt dos fungos cultivados em pequena escala ilustram que os fungos endofíticos podem também contribuir como fonte de novos protótipos para agentes antiparasitários com inibição frente das enzimas GAPDH (*T. cruzi*) e APRT (*L. tarentolae*). Há uma grande necessidade de novos e mais eficientes fármacos para o tratamento de infecções por protozoários, como a malária, leishmaniose, tripanossomíases e filariose. (STROBEL, 2003).

Os resultados de atividade antitumoral foram realizados com células de leucemia T humana (JURKAT) e expressos em IC₅₀ (mg/mL), sendo o resultado final a média da triplicata que é feita para cada ensaio. O controle negativo foi realizado com o diluente usado para solubilizar as amostras (DMSO/ meio RPMI 1:100), para confirmar que estes reagentes não têm atividade sobre as células JURKAT.

Os dados da tabela 9 (p.76) mostram que há uma notável atividade citotóxica para os extratos testados, quando comparados com o controle positivo metotrexato. Cerca de 76% dos 34 extratos apresentaram IC₅₀ com valores inferiores a 3,99 mg/mL, correspondente ao valor para o fármaco padrão. O extrato mais promissor para busca de substâncias com atividade antitumoral frente às células leucêmicas foi o VA26A com IC₅₀ = 0,16 mg/mL.

Os resultados obtidos com o branco da cultura (extração do meio fermentativo sem inoculação de microrganismo) foram negativos para os ensaios antimicrobianos. Nos ensaios enzimáticos e antitumorais, o extrato do meio de cultura apresentou pequena atividade indicando que os resultados positivos obtidos são provenientes

de metabólitos secundários excretados pelos fungos endofíticos para o meio de cultura.

Vários extratos brutos de fungos endofíticos obtidos a partir de diferentes meios de cultura têm sido relatados como fontes promissoras de substâncias bioativas frente a fungos patogênicos, bactérias, leveduras, atividade citotóxica contra linhagens tumorais humanas (carcinoma oral da epiderme – KB, linhagem de células de câncer de mama – BC1), atividade antiviral (Herpes vírus tipo 1), e também atividade antimalária frente ao protozoário *Plasmodium falciparum* K1 (CORRADO; RODRIGUES, 2004; HUANG et al., 2001; LIU et al., 2001; RODRIGUES; HESSE; WERNER, 2000; WIYAKRUTTA et al., 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para evidenciar o potencial de endofíticos em produzir substâncias bioativas.

Tabela 9 – Atividade biológica dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos cultivados em pequena escala (continua)

Extratos AcOEt	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA						ATIVIDADE ENZIMÁTICA		ATIVIDADE ANTITOMORAL
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		GAPDH <i>T. cruzi</i> (%)	APRT <i>L. tarentolae</i> (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
	Res	H.I. (mm)	Res	H.I. (mm)	Res	H.I. (mm)	(100 µg/mL)	(50 µg/mL)	
VA1A	-	10	+	14	-	10	18,0	0,0	247 ± 4,65
VA2A	-	8	+	12	-	10	17,3	27,9	0,22 ± 0,07
VA3A	-	9	-	11	-	10	12,9	32,2	0,3 ± 0,01
VA4A	-	8	+	12	-	10	19,7	0,0	0,18 ± 0,08
VA5A	-	10	+	13	-	10	7,7	1,5	0,32 ± 0,06
VA6A	-	8	+	13	-	10	21,1	0,0	0,27 ± 0,07
VA7A	-	8	+	12	-	11	5,5	11,3	0,29 ± 0,02
VA8A	-	8	+	12	-	11	10,9	7,5	0,35 ± 0,05
VA9A	-	8	+	12	-	11	26,0	30,5	0,23 ± 0,08
VA10A	-	8	+	12	-	11	20,4	4,0	0,35 ± 0,06
VA11A	+	13	+	13	-	11	10,0	0,0	122,4 ± 2,14
VA12A	-	10	+	13	+	12	10,0	18,2	202,7 ± 3,89
VA13A	-	8	-	10	+	14	7,9	35,4	0,25 ± 0,08
VA14A	-	9	-	10	+	15	94,9	60,7	0,38 ± 0,1
VA15A	-	10	-	10	-	10	12,0	9,1	151,8 ± 2,8
VA16A	-	9	-	10	-	10	6,3	57,4	0,3 ± 0,1
VA17A	-	10	-	10	-	10	40,0	27,3	53,3 ± 1,4
VA18A	-	11	-	10	-	10	0,0	4,2	0,18 ± 0,08
VA19A	+	12	-	10	+	15	0,0	4,5	0,24 ± 0,07
VA20A	-	10	-	9	+	14	0,0	9,1	155,8 ± 3,34
VA21A	-	11	-	10	+	14	4,4	7,2	0,55 ± 0,01
VA25A	-	11	-	9	+	13	9,2	30,7	0,18 ± 0,08
VA26A	+	12	-	9	+	13	0,0	20,1	0,16 ± 0,08
VA27A	+	13	-	9	+	13	0,0	36,4	112,9 ± 3,0
VA28A	-	10	-	11	+	12	0,0	18,2	129,9 ± 2,9
VA29A	-	11	-	9	+	13	0,0	23,5	0,5 ± 0,01
VA30A	-	11	-	10	+	13	0,0	26,3	0,82 ± 0,01
VA31A	-	9	-	11	+	13	6,0	2,1	0,41 ± 0,08
VA32A	-	9	-	10	+	14	5,5	10,1	0,36 ± 0,07

Tabela 9 – Atividade biológica dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos cultivados em pequena escala

(conclusão)

ExtratoAs AcOEt	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA						ATIVIDADE ENZIMÁTICA		ATIVIDADE ANTITOMORAL
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		GAPDH <i>T. cruzi</i> (%) (100µg/mL)	APRT <i>L. tarentolae</i> (%) (50 µg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)
	Res	H.I. (mm)	Res	H.I. (mm)	Res	H.I. (mm)			
VA33A	-	9	-	11	+	13	4,0	22,2	0,35 ± 0,06
VA34A	-	10	-	10	+	12	5,7	5,3	0,41 ± 0,01
VA35A	-	9	-	9	+	14	32,2	61,4	0,64 ± 0,02
VA36A	-	10	-	9	+	15	0,5	0,0	0,89 ± 0,02
VA37A	-	11	-	10	+	15	1,2	0,0	0,49 ± 0,01
Branco	-	9	-	10	-	10	6,0	11,8	5,95
Diluyente	-	9	-	9	-	10	*	*	0,00
Penic. G (1,215µg)	+	25	*	*	*	*	*	*	*
Strepto. (100µg)	*	*	+	21	*	*	*	*	*
Micon. (200µg)	*	*	*	*	+	19	*	*	*
Metotrexato	*	*	*	*	*	*	*	*	3,99

Resultado: + ativo, - inativo

H.I. – Halo de Inibição

* Padrões não utilizados nos ensaios

4.4 Cultivo dos fungos VA1 e VA17 em escala ampliada

O fungo VA1 foi o predominante dentre as demais isoladas de *V. arenaria*, correspondendo a 30,9% do número total de tubos de ensaio contendo isolados de fungos endofíticos.

O extrato AcOEt do fungo VA1 apresentou atividade contra *E. coli* e inibição da enzima GAPDH de *T. cruzi* em 18% (tabela 9, p.76).

Além disso, o espectro RMN ^1H do extrato AcOEt do fungo VA1 (anexo 2), apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos, vinílicos, metoxílicos e metílicos. Através de cromatografia em camada delgada analítica notou-se facilidade de separação dos constituintes desta fração. Portanto, os resultados das atividades biológica, espectro RMN ^1H interessante e facilidade em separação dos constituintes do extrato AcOEt levou ao cultivo do fungo VA1 em escala ampliada.

O espectro RMN ^1H de extrato VA17A (anexo 6) apresentou sinais quimicamente interessantes, indicativos de poucos constituintes como ácidos graxos e triglicerídeos, devido o sinal em δ 1,2 (s) não ser muito intenso. Os resultados dos ensaios de inibição enzimática deste extrato foram satisfatórios para as enzimas GAPDH de *T. cruzi* (40,0%) e APRT de *L. tarentolae* (27,3%). Estes resultados direcionaram o cultivo deste fungo em escala ampliada foi o antitumoral para células de leucemia T humana (JURKAT), que apresentou o menor valor de IC_{50} (53,3 mg/mL) quando comparado com os outros sete extratos (VA1A, VA11A, VA12A, VA15A, VA20A, VA27A e VA28A) cultivados para o “screening” inicial.

O fracionamento do extrato VA1A levou ao isolamento das substâncias **I**, **II** e **III**. O fracionamento do extrato VA17A conduziu ao isolamento das substâncias **V**, **VI** e **VII**. A substância **IV** foi separada por precipitação do extrato micelial metanólico do

fungo VA5.

4.5 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

Figura 17. Estruturas químicas das substâncias isoladas dos fungos VA1 (I, II, III), VA5 (IV) e VA17 (V, VI e VII).

4.5.1 Substância I – Nectriapirona

A substância I foi isolada da fração AcOEt do fungo VA1, cultivado em escala ampliada.

O espectro de RMN ^1H (figura 18, p.84) apresentou sinais referentes a 14 hidrogênios, caracterizados pela presença de sinais de hidrogênios vinílicos, metoxílicos e metílicos.

O espectro de RMN ^{13}C (figura 19, p.85) apresentou 11 sinais, dentre eles um sinal apresenta valor típico para deslocamento químico característico de carbonos carbonílicos de éster (δ 165,1).

O sinal em δ 3,90 (3H), caracteriza a presença de um grupo metoxila. O duplete em δ 1,84, com valor de $J=7,1$ Hz (3H), sugere hidrogênios metílicos com acoplamento com o hidrogênio vinílico em δ 6,69 ($J=1,0$ Hz; $J=7,1$ Hz; 1H), o qual é caracterizado por um quadruplete largo. O alargamento do quadruplete acoplamento deste hidrogênio a longa distância com os hidrogênios metílicos em δ 1,89, de acordo com o valor de $J=1,0$ Hz (3H).

O experimento de HMQC permitiu a atribuição dos carbonos ligados aos hidrogênios. (figura 20, p.86).

No mapa de contornos de HMBC (figura 21, p.87) observou-se correlações dos hidrogênios em δ 1,93 (3H) com o carbono carbonílico de éster em δ 165,1 e o carbono em δ 101,8. O hidrogênio em δ 6,10 (s,1H) apresentou correlações com os

carbonos nos deslocamentos δ 166,0, δ 160,1 e δ 126,8.

Com estes dados foi proposta a seguinte estrutura para a substância I:

Correlações observadas no mapa de HMBC (H → C)

Foram realizados experimentos de NOE-diff. A irradiação do hidrogênio em δ 6,10 (H-5), levou ao aumento da intensidade dos sinais dos hidrogênios em δ 3,90 (H-11) e 1,89 (H-12). A irradiação do hidrogênio em δ 3,90 (H-11) produziu aumento de intensidade no hidrogênio em δ 6,10 (H-5) (figura 22, p.88), confirmando o posicionamento dos substituintes no anel lactônico.

NOEs observados

Os dados de RMN obtidos estão de acordo com os dados publicados para nectriapirona (NAIR; CAREY, 1975; AVENT; HANSON; TRUNEH, 1991).

Para a confirmação da estrutura da substância **I**, esta foi analisada por ESI-EM, no modo positivo, onde a presença do íon em m/z 195 ($[M+H]^+$) (figura 23, p.89) está coerente com a estrutura proposta.

Tabela 10 – Dados RMN 1H e ^{13}C para a substância **I** ($CDCl_3$).

	δ_C Nectriapirona (AVENT et al, 1991)	δ_C Substância I (125MHz)	δ_H Nectriapirona (NAIR; CAREY, 1975)	δ_H Substância I (400MHz) (J(Hz))
1	-	-	-	-
2	165,2	165,1	-	-
3	101,9	101,8	-	-
4	166,1	166,0	-	-
5	91,5	91,4	6,10 s	6,10 s (1H)
6	160,2	160,1	-	-
7	127,0	126,8	-	-
8	129,8	129,7	6,67 q	6,69 dq (J=1,3; 7,1; 1H)
9	14,2	14,2	1,75 d	1,84 d (J=7,1; 3H)
10	8,6	8,6	1,90 s	1,93 s (1H)
11	56,1	56,0	3,88 s	3,90 s (3H)
12	12,1	12,1	1,87 m	1,89 t (J=1,0; 3H)

* O dados obtidos no artigo de NAIR; CAREY (1975) foram realizados a 60 e 220 MHz, e os obtidos no artigo AVENT et al. (1991) a 90.55 MHz usando $CDCl_3$ como solvente. As atribuições dos δ de H e C da estrutura foi obtida através dos dados de HMQC e HMBC.

A nectriapirona pertence à classe das α -pironas e já foi isolada de outros fungos, como *Gyrostroma missouriense* Seeler (NAIR; CAREY, 1975), *Phomopsis oblonga* (CLAYDON; GROVE; POPLE, 1985), *Gliocladium vermoesenii* (AVENT; HANSON; TRUNEH, 1991) e um fungo de espécie ainda não identificada oriundo da esponja *Stylotella* sp (ABRELL; CHENG; CREWS, 1994). Essa substância possui sua síntese total descrita (REFFSTRUP; BOLL, 1976; ABRAMSON; WORMSER,

1981) e teve apenas atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* relatada (NAIR; CAREY, 1975).

A estrutura da nectriapirona pode ser dividida em duas unidades de isopreno, e quando foi isolada pela primeira vez foi descrita como incorporado ao ácido mevalônico (NAIR; CAREY, 1975). Logo, a nectriapirona foi assumida como sendo um monoterpênóide. Porém, um metabólito similar, denominado fusalanipirona (**60**) (ABRAHAM; KNOCH; WITTE, 1990) obtido do *Fusarium solani* (ABRAHAM; ARFMANN, 1988) mostrou, por espectrometria de massas, incorporar duas unidades trideuteriometil da [Me-²H₃] metionina, consistente com a sua biossíntese a partir de uma tetracetídeo com duas metilações. A nectriapirona é, portanto, derivada da metionina (AVENT; HANSON; TRUNEH, 1992).

Figura 18. Espectro RMN ^1H da substância I (400MHz, CDCl_3)

Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C da substância I (125MHz, CDCl_3)

Figura 20. Mapa de contornos HMBC da substância I (125MHz, CDCl_3)

Figura 21. Mapa de contornos HMBC da substância I (125MHz, CDCl₃)

Figura 22. Espectros de NOE-Diff da substância I (300MHz, CDCl₃)

A – Irradiação em δ 6,10

B – Irradiação em δ 3,90

Figura 23. Espectro de massas da substância I.

4.5.2 Substância II– Tirosol

A substância **II** foi isolada do extrato AcOEt do fungo codificado como VA1 cultivado em escala ampliada, e para sua elucidação, foram utilizadas técnicas de RMN ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas, a qual foi fundamental para a conclusão da sua estrutural final.

O espectro de RMN ^1H (figura 24, p.93) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos e metilênicos. A presença de dois dubletos num sistema de spins AA'XX' em δ 6,78 ($J=8,6$ Hz, 2H) e δ 7,10 ($J=8,6$ Hz, 2H), sugere um anel aromático *para* dissubstituído.

O espectro de RMN ^{13}C (figura 25, p.94) mostra apenas seis sinais que estão atribuídos de acordo com a tabela 11 (p. 91), onde observa-se um sinal para o par de carbonos C-4/C-8 e outro sinal para o par C-5/C-7. Essa similaridade é devido a simetria desses núcleos no sistema *para* dissubstituído.

As constantes de acoplamento dos dois tripletos presentes no espectro de RMN ^1H para os sinais em δ 3,83 ($J=6,6$ Hz; 2H) e δ 2,81 ($J=6,6$ Hz; 2H) indicam que há o acoplamento entre os hidrogênios representados por esses sinais.

O uso da espectrometria de massas foi de fundamental importância para a confirmação da estrutura da substância **II**, pois com os dados de RMN havia a possibilidade da estrutura ser correspondente a molécula de tiramina, a qual possui uma substituinte NH_2 ao invés da hidroxila ligada ao carbono 1.

No espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, observa-se a presença dos íons em m/z 161 ($[M+Na]^+$) e m/z 177 ($[M+K]^+$) (figura 26, p.95), que conferem com a massa da estrutura proposta para o tirosoil.

Os valores de RMN 1H e ^{13}C foram comparados com os obtidos na literatura (tabela11, p.91) (CHEN, et al., 2004).

Tabela 11 – Dados de RMN 1H e ^{13}C para substância II ($CDCl_3$)

	δ_C , Tirosoil (CHEN et al., 2004)	δ_C Substância II (100MHz)	δ_H Tirosoil (J(Hz)) (CHEN et al., 2004)	δ_H Substância II (400 MHz) (J(Hz))
1	62,6	63,8	3,51 <i>t</i> (6,5)	3,83 <i>t</i> (6,6)
2	38,3	38,2	2,59 <i>t</i> (6,5)	2,81 <i>t</i> (6,6)
3	129,6	130,2	-	-
4,8	129,7	130,4	6,98 <i>d</i> (8,5)	7,10 <i>d</i> (8,6)
5,7	114,9	115,4	6,65 <i>d</i> (8,5)	6,78 <i>d</i> (8,6)
6	155,5	154,2	-	-
OH	-	-	9,14	-

* Solvente usado na literatura DMSO, 500 MHz e 125MHz.

O tirosoil foi identificado como uma molécula “quorum-sensing” – molécula sinalizadora, com importantes implicações na dinâmica do crescimento e morfogênese de *Candida albicans* (CHEN et al., 2004). É também um promissor agente antifúngico contra *Lagenidium callinectes*, um fungo que contagia embriões de *Homarus americanus*, dificultando ou até mesmo impedindo seu crescimento

(SOFIA; TURNES; FENICAL, 1992).

Além da produção de tirosol pela bactéria gram-negativa, codificada como SGT-76, que vive associada com embriões de *Homarus americanus*, o tirosol foi produzido também por duas espécies de fungos em associação simbiótica com plantas: *Phomopsis oblonga* (CLAYDON; GROVE; POPL, 1985) e *Ceratocystis fimbriata* (STOESSL, 1969).

Figura 24. Espectro de RMN ^1H da substância II (400MHz, CDCl_3)

Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C da substância II (100MHz, CDCl_3)

Figura 26. Espectro de massas da substância II

4.5.3 Substância III – Ergosterol

A substância **III** foi isolada do extrato micelial metanólico do fungo VA1A, após cultivo em escala ampliada.

O espectro de RMN ^1H (figura 27, p.99) apresenta sinais de hidrogênios alifáticos metílicos, carbinólico e vinílicos. No espectro de RMN ^{13}C (figura 28, p.100), foi possível observar a presença de 28 átomos de carbono. A análise dos espectros RMN ^1H e ^{13}C , comparados com dados da literatura (SANTOS, 2001) sugeriu ser a estrutura do ergosterol, um esteróide comum nos fungos.

O multipeto em δ 3,64 refere-se a presença de um hidrogênio carbinólico (H-3). A presença de duplo dubleto em δ 5,57 ($J=2,5$ Hz e $J=5,6$ Hz; 1H) é referente ao hidrogênio H-7, e o sinal multipeto em δ 5,39 refere-se ao hidrogênio H-6. O multipeto em δ 5,20 é referente aos hidrogênios do sistema olefínico H-22 e H-23.

Na região de δ 1,1-0,5 pode-se observar a presença de dois singletos e quatros dubletos. Os singletos foram atribuídos como sendo os sinais das metilas H-18 e H-19 (δ 0,63 e δ 0,95, respectivamente). Os dubletos em δ 1,04 ($J=6,8$ Hz), δ 0,91 ($J=6,8$ Hz), δ 0,84 ($J=3,0$ Hz) e δ 0,82 ($J=3,0$ Hz), são referentes as metilas H-21, H-26, H-27 e H-28.

Dos 28 átomos de carbonos observados no espectro de RMN ^{13}C , seis

carbonos são olefínicos em δ 141,3; δ 139,7; δ 135,5; δ 131,9; δ 119,5; δ 116,2 e um é carbinólico em δ 70,4, referente ao carbono C-3.

Os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono da substância **III** encontram-se na tabela 12 (p.97) e estão de acordo com os dados publicados para o ergosterol (SHIRANE et al., 1996).

Tabela 12 – Valores de RMN ^{13}C para a substância **III** (continua)

Carbono	δ_{C} Substância III (CDCl_3) (100MHz)	δ_{C} ergosterol (CDCl_3) (SHIRANE et al., 1996).
1	38,3	38,3
2	31,9	32,0
3	70,4	70,4
4	40,7	40,8
5	139,7	139,8
6	119,5	119,6
7	116,2	116,3
8	141,3	141,3
9	46,2	46,2
10	37,0	37,0
11	21,1	21,1
12	39,0	39,1
13	42,8	42,8
14	54,5	54,5
15	22,9	23,0
16	28,3	28,2
17	55,7	55,7
18	12,0	12,0

Tabela 12 – Valores de RMN ^{13}C para a substância **III** (conclusão)

Carbono	δ_c Substância III (CDCl ₃) (100MHz)	δ_c ergosterol (CDCl ₃) (SHIRANE et al., 1996).
19	16,2	16,2
20	40,4	40,4
21	21,1	21,1
22	135,5	135,5
23	131,9	132,0
24	42,8	42,8
25	33,0	33,1
26	19,9	19,9
27	19,6	19,6
28	17,6	17,6

O ergosterol já foi isolado de outros fungos, dentre eles, *Agaricus blazei* (micélio do fungo e do cogumelo) e *Ganoderma lucidum* (micélio), ambos fungos comestíveis (SANTOS, 2001). Além disso, o ergosterol foi produzido por fungos endofíticos como *Rhizoctonia* sp (MA et al., 2004), e *Pestalotiopsis microspora* (LI et al., 1998).

Apenas a atividade contra *Helicobacter pylori* foi encontrada na literatura para o ergosterol, que apresentou uma concentração inibitória mínima de 30,0 µg/mL (MA et al., 2004).

Figura 27. Espectro de RMN ^1H da substância **III** (400MHz, CDCl_3)

Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C da substância III (100MHz, CDCl_3)

4.5.4 Substância IV – Manitol

O manitol foi isolado através de sua precipitação do extrato micelial metanólico do fungo codificado como VA5, cultivado em pequena escala.

O espectro RMN ^1H (figura 29, p.102) apresentou quatro sinais referentes a 8 hidrogênios carbinólicos: dois dubletos em δ 3,58 ($J=11,6$ Hz e $J=5,8$ Hz) e δ 3,78 ($J=11,6$ Hz e $J=2,5$ Hz), um duplo duplo dubleto em δ 3,68 ($J=8,5$ Hz; $J=5,8$ Hz e $J=2,5$ Hz) e um dubleto em δ 3,71 ($J=8,5$ Hz). Essa substância foi facilmente elucidada, através da comparação com padrão previamente isolado no Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP (ELIAS, 2003; NETTO, 2004).

Os valores encontrados referentes aos dados de RMN ^1H do manitol foram confrontados com modelos da literatura, tabela 13 (p. 101) (www.aist.go.jp e BOCK; PEDERSEN, 1983)

Tabela 13 – Dados de RMN ^1H para a substância IV

H	δ_{H} , Manitol (www.aist.go.jp) (DMSO- d_6) ($J=\text{Hz}$)	δ_{H} substância IV 400MHz; D_2O ($J=\text{Hz}$)
1a	3,38 <i>dd</i> (10,7; 5,6; 2H)	3,58 <i>dd</i> (11,6; 5,8; 2H)
1b	3,61 <i>dd</i> (10,7; 3,3; 2H)	3,78 <i>dd</i> (11,6; 2,5; 2H)
2	3,45 <i>ddd</i> (5,6; 3,3; 2H)	3,68 <i>ddd</i> (8,5; 5,8; 2,5; 2H)
3	3,54 <i>d</i> (2H)	3,71 <i>d</i> (2H)

Figura 29. Espectro de RMN ^1H da substância IV (400 MHz, D_2O)

4.5.5 Substância V

A substância **V** foi isolada da fração AcOEt do fungo VA17, após cultivo em escala ampliada. O isolamento foi feito com auxílio de CLAE e o cromatograma obtido pode ser observado na figura 30 (p.103). O pico em destaque no tempo de retenção de 10,60 min corresponde à substância **V**.

A substância **V** foi isolada da fração AcOEt do fungo VA17, após cultivo em escala ampliada. O isolamento foi feito com auxílio de CLAE de acordo com os procedimentos descritos no item 4.5.

O espectro de RMN ¹H (figura 31, p.108) apresenta 12 sinais, caracterizados por hidrogênios metílicos, metilênicos, vinílico e aromáticos. As integrais relativas a esses sinais indicam a presença de 21 hidrogênios.

A presença de dois dubletos num sistema de spins AA'XX' em δ 6,86 (J=8,7

Hz; 2H) e 7,08 (J=8,7 Hz; 2H), sugere sistema típico aromático *para* dissustituído. O hidrogênio em δ 2,75 (d, 1H) apresenta acoplamento com o hidrogênio em δ 3,50 (d, 1H), num sistema de spins do tipo AX, de acordo com o valor de J=17,6 Hz. O hidrogênio em δ 3,00 (d, 1H) acopla com o hidrogênio em δ 3,20 (d, 1H), formando outro sistema de spins AX, de acordo com o valor de J=13,6 Hz. Os singletos em δ 1,74; δ 1,80 e δ 2,84, integrando para 3 hidrogênios cada, sugerem a presença de 3 metilas na estrutura.

Os hidrogênios em δ 4,50 (d, 2H) acoplam apenas com o hidrogênio vinílico em δ 5,40 (t, 1H) com o valor de J=6,8 Hz. O tripleto largo em δ 5,40 (1H) sugere também que o hidrogênio vinílico apresenta acoplamento a longa distância com os hidrogênios metílicos. Estes dados, juntamente com os hidrogênios da metila em δ 1,80, indicam a presença de um grupo prenilóxi na estrutura:

Ainda pode-se observar um singlete em δ 6,30 e outro em δ 3,95, ambos integrando para 1 hidrogênio. Estes singletos sugerem a presença de OH ou NH na estrutura.

No espectro de RMN ^{13}C (figura 32, p.109) podem ser observados apenas 4 sinais, devido a pequena quantidade de amostra (0,6 mg). Dois sinais são referentes aos carbonos do anel aromático *para* dissustituído: em δ 131,7 para o par C-9/C-9' e outro sinal em δ 115,2 para o par C-10/C-10'. A similaridade dos sinais ocorre devido à simetria dos núcleos do sistema *para* dissustituído. Os outros dois sinais são possivelmente carbonos metílico e vinílico devido aos seus respectivos deslocamentos (δ 26,2 e δ 138,9). Os demais carbonos foram observados com

auxílio dos experimentos bidimensionais de HMQC e HMBC (figuras 33-36, p.110-115).

Os hidrogênios em δ 2,84 (H-3) indicam que esta metila deve estar ligada a heteroátomo, possivelmente nitrogênio. No HMBC observou-se correlação destes hidrogênios com os carbonos em δ 52,1 e δ 167,3. O sinal em δ 167,3 é compatível com a presença de carbonila de amida e o sinal em δ 52,1 pode ser atribuído a carbono alfa de aminoácidos. Estes dados indicam a possível presença de um anel dicetopiperazínico na estrutura, formado pela ciclização de 2 ou 3 aminoácidos, comum em metabólitos de fungos e anteriormente isolado nos laboratórios de Química Farmacêutica e Farmacognosia (FCFRP/USP) (ELIAS, 2003; FURTADO, 2005):

Não foram observados sinais característicos para outros hidrogênios alfa de aminoácidos, portanto o outro carbono alfa da dicetopiperazina deveria ser quaternário. O sinal em δ 82,6 (s) apresentou correlação com o hidrogênio em δ 3,00 (d, H-7a), o qual ainda correlaciona-se com o carbono aromático em δ 131,7 e com o carbono carbonílico em δ 167,3. O hidrogênio em δ 3,20 (d, H-7b) também se correlaciona com o carbono em δ 131,7. Assim, os hidrogênios metilênicos (H-7a e H-7b) devem estar próximos ao anel aromático, ao carbono quaternário em δ 82,6 e ao carbono da amida, o que é possível na estrutura proposta abaixo:

Correlações observadas no mapa de contornos HMBC (H → C)

Espectro de massas foi obtido para confirmação da estrutura proposta, esta foi analisada por ESI-MS, no modo positivo, onde a presença dos íons em m/z 341 ($[M+Na]^+$) e 357 ($[M+K]^+$) (figura 37, p.116) estão coerentes com a estrutura proposta.

Tabela 14 – Dados RMN 1H e ^{13}C para a substância **V**.

	δ_H Substância V (400Mhz; $CDCl_3$) (J=Hz)	δ_C Substância V (125MHz; $CDCl_3$)
1	6,30 s	-
2	-	*
3	3a 2,75 d (J=17,6; 1H) e 3b 3,50 d (J= 17,6; 1H)	52,1
4	-	-
5	-	167,3
6	-	82,6
7	7a 3,00 d (J=13,6; 1H) e 7b 3,20 d (J=13,6; 1H)	48,4
8	-	125,1
9 e 9'	7,08 d (J=8,7Hz; 2H)	131,7
10 e 10'	6,86 d (J=8,7Hz; 2H)	115,2

11	-	159,0
12	4,50 <i>d</i> (J= 6,8; 2H)	65,4
13	5,40 <i>t</i> (J= 6,8; 1H)	119,7
14	-	138,9
15	1,80 <i>s</i> / (3H)	26,2
16	1,74 <i>s</i> / (3H)	18,5
17	2,84 <i>s</i> (3H)	33,8

* Sinal não observado

Após busca no Scifinder não foi possível encontrar dados na literatura sobre a descrição da estrutura proposta, portanto a estrutura parece ser inédita.

Figura 31. Espectro de RMN ^1H da substância **V** (400MHz, CDCl_3)

Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C da substância **V** (125MHz, CDCl_3)

Figura 33. Mapa de contornos HMQC da substância **V** (125MHz, CDCl_3)

Figura 34. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância **V** (125MHz, CDCl₃) (continua)

Figura 34. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância **V** (125MHz, CDCl_3) (conclusão)

Figura 35. Mapa de contornos HMBC da substância **V** (125MHz, CDCl₃)

Figura 36. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **V** (125MHz, CDCl₃) (continua)

Figura 36. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **V** (125MHz, CDCl_3) (conclusão)

Figura 37. Espectro de massas da substância V

4.5.6 Substância VI – Fusaperazina B

A substância **VI** foi isolada do extrato micelial metanólico do fungo VA17, após cultivo em escala ampliada. Seu isolamento ocorreu através da formação de cristais durante o fracionamento cromatográfico deste extrato.

A análise do espectro de RMN ^1H (figura 39, p.123) mostra sinais de 24 hidrogênios correspondentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, vinílicos e aromáticos.

O espectro de RMN ^{13}C (figura 40, p.124) apresentou 16 sinais, dentre eles dois sinais típicos de carbonos de amida em δ 164,7 e δ 164,2 sugerindo a presença de uma dicetopiperazina na estrutura.

O dois dubletos num sistema de spins AA'XX' em δ 7,16 ($J=8,6$ Hz; 2H) e δ 6,80 ($J=8,6$ Hz; 2H) sugerem um anel aromático *para* dissustituído. Os outros dois dubletos referentes a um sistema de spins AX em δ 2,82 ($J=13,1$ Hz; 1H) e δ 3,41 ($J=13,1$ Hz; 1H) indicam que estes acoplam entre si.

O dubleto em δ 4,45 ($J=6,6$ Hz; 2H) sugere acoplamento destes dois hidrogênios com o hidrogênio representado pelo tripleto em δ 5,37 ($J=6,6$ Hz; 1H). O desdobramento deste tripleto ($J=1,3$ Hz) indica o acoplamento a longa distância com os hidrogênios metílicos. Estes dados mostram a presença de um grupo prenilóxi como observado para a estrutura **V**.

O dubleto em δ 5,05 ($J=1,6$ Hz; 1H) sugere acoplamento a longa distância com o NH. Os hidrogênios das metilas do grupo prenilóxi encontram-se em δ 1,68 e δ 1,72. São observados ainda dois sinais referentes a hidrogênios metílicos em δ 2,14 (s, 3H) e δ 1,14 (s, 3H). Os outros singletos em δ 8,57 (1H) e δ 9,05 (1H) referem-se a hidrogênios ligados aos nitrogênios do anel dicetopiperazínico,

sugerido anteriormente com os deslocamentos dos carbonos de amida.

O espectro de carbono mostra os sinais característicos para o par de carbonos do anel aromático *para* substituído, onde pode ser atribuído o sinal em δ 132,2 para o par C-9/C-9' e o sinal em δ 114,5 para o par C-10/C-10'. Os carbonos metílicos tiveram deslocamentos em δ 25,7; δ 18,3; δ 12,2 e δ 9,4.

Com o mapa de contornos HMQC (figuras 41-42, p.125-127) foi possível estabelecer a relação direta a uma ligação entre carbonos e hidrogênios e com o mapa de contornos HMBC (figuras 43-44, p.128-130) foi possível a visualização de seis carbonos quaternários em δ 137,2; δ 157,9; δ 127,3; δ 68,0; δ 164,7 e δ 164,2, sendo esses dois últimos pertencentes ao anel dicetopiperazínico da estrutura proposta. A partir das correlações obtidas no experimento HMBC foi proposta a seguinte estrutura para a substância **VI**:

Correlações observadas no mapa de contornos HMBC (H $\rightarrow$ C)

Para a confirmação da estrutura **VI**, esta foi analisada por ESI-MS, no modo positivo, onde a presença dos íons em m/z 381 ($[M+H]^+$), 403 ($[M+Na]^+$) e 419 ($[M+K]^+$) (figura 46, p.133) estão coerentes com a estrutura proposta.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C estão de acordo com os dados reportados para a fusaperazina B, com exceção para os dados das metilas C-17 e C-18 (CHU et al, 1993). No artigo, as atribuições das metilas, ligadas aos átomos de enxofre estão invertidas, e não foram realizados experimentos de HMQC e HMBC. Além disso, os autores atribuem como conformação mais estável a estendida, com o anel aromático distante da metila C-17, o que não está de acordo com os dados obtidos experimentalmente e através de modelagem molecular para a substância **VI**.

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância **VI** (continua)

	δ_{C} Fusaperazina B (CHU et al., 1993) (CDCl_3 e CD_3OD)	δ_{C} substância VI (DMSO-d_6 ; 100MHz)	δ_{H} Fusaperazina B (CHU et al., 1993) (CDCl_3 e CD_3OD)	δ_{H} substância VI (DMSO-d_6 ; 400MHz; J=Hz)
1	-	-	-	9,05 s
2	165,5	164,2	-	-
3	57,8	57,7	4,93 s	5,05 d (J=1,6)
4	-	-	-	8,57 s
5	165,9	164,7	-	-
6	68,0	68,0	-	-
7	42,2	41,6	3,60; 2,95 d (J=13,7Hz)	3,41; 2,82 d (J=13,1)
8	126,1	127,3	-	-
9	132,0	132,2	7,19 d (J=8,7Hz)	7,16 d (J=8,6)
9'	132,0	132,2	7,19 d (J=8,7Hz)	7,16 d (J=8,6)
10	114,6	114,5	6,83 d (J=8,7Hz)	6,80 d (J=8,6)
10'	114,6	114,5	6,83 d (J=8,7Hz)	6,80 d (J=8,6)

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância **VI** (conclusão)

	δ_{C} Fusaperazina B (CHU et al., 1993) (CDCl_3 e CD_3OD)	δ_{C} substância VI (DMSO-d_6 ; 100MHz)	δ_{H} Fusaperazina B (CHU et al., 1993) (CDCl_3 e CD_3OD)	δ_{H} substância VI (DMSO-d_6 ; 400MHz; J=Hz)
11	158,5	157,9	-	-
12	64,54	64,5	4,47 d (J=6,7Hz)	4,45 d (J=6,5)
13	119,4	120,4	5,46 t (J=6,7Hz)	5,37 t (J=6,57)
14	138,3	137,2	-	-
15	25,1	25,7	1,74 s	1,68 s
16	17,4	18,3	1,79 s	1,72 s
17	9,7	9,4	2,22 s	1,14 s
18	12,2	13,0	1,48 s	2,14 s

Foram realizados experimentos de NOE-diff para se analisar a estereoquímica da substância **VI**. A irradiação do hidrogênio em δ 5,10 (H-3) levou ao aumento da intensidade dos sinais dos hidrogênios em δ 1,14 e δ 2,14 (figura 45, p.131). Isto só é possível com o H-3 em relação cis com a metila C-18. A irradiação do hidrogênio em δ 2,82 (H-7b) produziu aumento da intensidade dos sinais em δ 3,41 (H-7a) e 7,16 (H-9) (figura 45, p.131). A irradiação dos hidrogênios metílicos em δ 2,14 (H-18) produziu aumento da intensidade nos sinais dos hidrogênios em δ 3,41 (H-7a) e δ 5,05 (H-3) (figura 45, p.132), confirmando a relação cis entre H-18 e H-3. A irradiação dos hidrogênios em δ 1,14 (H-17) produziu aumento da intensidade nos sinais dos hidrogênios em δ 5,05 (H-3) δ 6,8 (H-10) e δ 7,16 (H-9) (figura 45, p.132).

O NOE observado entre H-17 e os hidrogênios aromáticos confirma a relação *cis* entre estes grupos.

Os experimentos de NOE-diff realizados com essa substância permitiram a visualização de um fator conformacional interessante do ponto de vista da estabilização da conformação estrutural. O NOE observado entre os hidrogênios metílicos em δ 1,14 (H-17) e os hidrogênios aromáticos em δ 3,80 e δ 7,16 (H-10/10' e H-9/9') evidenciou a proximidade espacial destes grupamentos. Isto só é possível em uma conformação dobrada para a estrutura, que é estabilizada pela interação CH/ π entre os elétrons do anel aromático e os hidrogênios polarizados do grupo SCH₃ (UMEZAWA et al., 1999). Essa interação ocasionaria um dobramento do anel dicetopiperazínico.

Essa conformação dobrada também explicaria os fatos dos hidrogênios metílicos H-17 possuírem um valor de deslocamento químico blindado em relação aos hidrogênios metílicos H-18, pois os hidrogênios metílicos H-17 estariam sofrendo efeito da blindagem eletrônica do anel aromático. Esse tipo de conformação já é relatado para substâncias dicetopiperazínicas e peptídeos, onde foi observado que a interação CH/ π é responsável pela estabilização de muitas estruturas de proteínas e outros peptídeos, podendo ter implicações até na atividade biológica (UMEZAWA et al., 1999).

Para verificar a estabilidade da conformação proposta foram realizados estudos de modelagem molecular usando o programa SPARTAN 4.0.3 (SPARTAN, 2005). Na distribuição dos 4 confôrmers de baixa energia, a conformação dobrada revela ser de energia equivalente ($\Delta E = 0,6$ KJ/mol) à estrutura de mínimo global, em conformação estendida.

Os principais NOE observados, que evidenciaram a conformação dobrada e

estereoquímica relativa do anel dicetopiperazínico, encontram-se na figura 38 (p.122). A figura 38 também mostra as duas conformações, dobrada e estendida, favoráveis energeticamente. Na conformação dobrada as distâncias interatômicas entre H-17 e os hidrogênios aromáticos estão destacadas, evidenciando a proximidade espacial que permitiu a visualização do NOE.

Figura 38. Conformações dobrada e estendida para a substância VI.

Essa substância já foi isolada dos fungos *Tolypocladium* sp (CHU et al., 1993) e *Fusarium chlamydosporum* (USAMI et al., 2002) sendo reportada como inibidora do PAF com um valor de IC_{50} de 50 μ M (CHU et al., 1993).

Figura 39. Espectro de RMN ^1H da substância **VI** (400MHz, DMSO-d_6)

Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C da substância **VI** (100MHz, DMSO- d_6)

Figura 41. Mapa de contornos HMBC da substância **VI** (125MHz, DMSO-d₆)

Figura 42. Ampliação do mapa de contornos HMPC da substância **VI** (125MHz, DMSO-d₆) (continua)

Figura 42. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância **VI** (125MHz, DMSO- d_6) (conclusão)

Figura 43. Mapa de contornos HMBC da substância **VI** (125MHz, DMSO-d₆)

Figura 44. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **VI** (125MHz, DMSO- d_6) (continua)

Figura 44. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **VI** (125MHz, DMSO-d₆) (conclusão)

Figura 45. Espectros de NOE-diff da substância VI (DMSO-d₆) (300MHz) (continua)

A – Irradiação em δ 5,10 (H-3)

B – Irradiação em δ 2,82 (H-7b)

Figura 45. Espectros de NOE-diff da substância VI (DMSO-d₆) (300MHz) (conclusão)

A. Irradiação em δ 2,14 (H-18)

B. Irradiação em δ 1,14 (H-17)

Figura 46. Espectro de massas da substância VI

4.5.7 Substância VII

A substância **VII** foi isolada do extrato micelial metanólico do fungo VA17, após cultivo em escala ampliada. O isolamento foi feito com auxílio de CLAE e o cromatograma obtido pode ser observado na figura 47 (p.134). O pico em destaque no t_R 21,50 min corresponde à substância **VII**.

comprimento de onda de 220 nm, coluna preparativa (V1-250) 10 μ m, fase móvel: CH_3CN/H_2O (55:45), vazão de 3 mL/min, injeções de 200 μ L (a amostra foi solubilizada na mesma fase móvel obtendo uma concentração final de 2,5 mg/mL).

A análise do espectro de RMN 1H (figura 48, p.139) mostra sinais semelhantes aos das duas dicetopiperazinas (substâncias **V** e **VI**) isoladas anteriormente do fungo VA17, com sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos, vinílicos e aromáticos.

A obtenção do espectro de RMN ^{13}C não foi possível devido a pequena quantidade de amostra isolada (1,0 mg), porém os deslocamentos químicos para os carbonos presentes na estrutura foram adquiridos através dos mapas de contornos HMQC e HMBC apresentou dois dubletos em um sistema de spins AA'XX' em δ 7,14 ($J=8,6$ Hz; 2H) e δ 6,86 ($J=8,6$ Hz; 2H) sugerindo um anel aromático *para* dissustituído. O dubleto referente ao hidrogênio em δ 4,05 ($J=16,5$ Hz, 1H) sugere acoplamento num sistema de spins tipo AX com o hidrogênio em δ 3,52 ($J=16,5$ Hz; $J=13,6$ Hz, 2H) e este ainda indica acoplamento, num sistema de spins AX, com o hidrogênio representado pelo dubleto em δ 2,99 ($J=13,6$ Hz, 1H).

Os hidrogênios representados pelo dubleto em δ 4,47 ($J=7,4$ Hz; 2H) sugerem acoplamento com o hidrogênio representado pelo triplete em δ 5,47 ($J=7,4$ Hz; 1H). O desdobramento deste triplete ($J=1,3$ Hz) indica o acoplamento a longa distância com os hidrogênios metílicos. Estes dados mostram a presença de um grupo prenilóxi como observado nas estruturas **V** e **VI**.

Os hidrogênios metílicos do grupo prenilóxi encontram-se em δ 1,74 (s, 3H) e δ 1,79 (s, 3H). Ainda foi observado sinal referente a hidrogênios metílicos em δ 2,22 (s, 3H). O sinal em δ 3,73 (s, 3H) sugeriu a presença de um grupo metoxila, que encontra-se em um valor mais desblindado que metoxilas ligadas a carbonos por estar, provavelmente, ligada a um dos nitrogênios do anel dicetopiperazínico proposto na estrutura. Metoxilas ligadas a nitrogênios já têm sido reportadas na literatura (SAKATA et al., 1987) e encontram-se com deslocamentos químicos mais desblindados em relação às metoxilas ligadas a átomos de carbono.

Com o mapa de contornos HMQC (figuras 49-50, p.140-143) foi possível estabelecer a relação direta a uma ligação entre carbonos e hidrogênios. O mapa de contornos HMBC (figuras 51-52, p.144-146) permitiu a visualização das correlações

entre carbonos e hidrogênios a até três ligações de distância, além da observação de seis carbonos quaternários em δ 138,6; δ 158,7; δ 124,9; δ 67,7; δ 162,4 e δ 164,3 sendo esses três últimos pertencentes ao anel dicetopiperazínico da estrutura proposta. O carbono em δ 61,7 mostrou correlação apenas com os hidrogênios em δ 3,66, indicando realmente a existência de uma metoxila ligada a um dos nitrogênios do anel dicetopiperazínico. Valores semelhantes de deslocamento químico para N-OMe podem ser observados para a substância O,O-dimetilaspiroclorina (SAKATA et al, 1987) que apresenta δ 3,96 (s, 3H) e 66,5 (q, NOME) para deslocamentos de hidrogênio e carbono do grupo N-OCH₃, respectivamente.

O,O-dimetilaspiroclorina

A partir de outras correlações possíveis de serem obtidas com o mapa HMBC foi proposta a seguinte estrutura para a substância **VII**:

Correlações observadas no mapa HMBC (H→ C)

A substância **VII** foi analisada por ESI-MS, no modo positivo, para a confirmação da estrutura, a presença dos íons em m/z , 387 ($[M+Na]^+$) e 403 ($[M+K]^+$) (figura 53, p.147) estão coerentes com a estrutura proposta.

Após busca no Scifinder não foi possível encontrar dados sobre a estrutura proposta, seja como grupamento OCH_3 em N_1 ou N_4 , sendo provável que a substância **VII** seja inédita na literatura.

Tabela 16 – Dados de RMN 1H e ^{13}C para a substância **VII** ($CDCl_3$) (continua)

	δ_C substância VII (125MHz)	δ_H substância VII (400MHz; J=Hz)
2	164,3	-
3	*	3,52 <i>d</i> (J=16,5); 4,05 <i>d</i> (J=16,5)
5	162,4	-
6	67,8	-
7	*	2,99 <i>d</i> (J=12,4); 3,52 <i>d</i> (J=12,4)
8	124,9	-
9	132,2	7,14 <i>d</i> (J=8,5)
9'	132,2	7,14 <i>d</i> (J=8,5)
10	115,1	6,86 <i>d</i> (J=8,5)

Tabela 16 – Dados de RMN 1H e ^{13}C para a substância **VII** ($CDCl_3$) (conclusão)

	δ_C substância VII	δ_H substância VII
--	----------------------------------	----------------------------------

	(125MHz)	(400MHz; J=Hz)
10'	115,1	6,86 <i>d</i> (J=8,5)
11	158,8	-
12	65,1	4,47 <i>d</i> (J=7,4)
13	119,4	5,47 <i>t</i> (J=7,4)
14	138,6	-
15	25,9	1,79 <i>s</i>
16	18,4	1,74 <i>s</i>
17	13,2	2,22 <i>s</i>
18	61,7	3,73 <i>s</i>

* Valores não observados.

A metoxila foi posicionada no N-4, porém este grupamento também poderia estar localizado no N-1. Os experimento de NOE-diff não permitiram concluir o posicionamento correto do grupamento OCH₃.

Figura 48. Espectro de RMN ^1H da substância VII (400MHz, CDCl_3)

Figura 49. Mapa de contornos HMBC da substância **VII** (125MHz, CDCl₃)

Figura 50. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância **VII** (125MHz, CDCl₃) (continua)

Figura 50. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância **VII** (125MHz, CDCl₃) (continuação)

Figura 50. Ampliação do mapa de contornos HMQC da substância **VII** (125MHz, CDCl_3) (conclusão)

Figura 51. Mapa de contornos HMBC da substância **VII** (125MHz, CDCl₃)

Figura 52. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **VII** (125MHz, CDCl_3) (continua)

Figura 52. Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **VII** (125MHz, CDCl₃) (conclusão)

Figura 53. Espectro de massas da substância VII

Os alcalóides dicetopiperazínicos constituem uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuída em fungos (LAWS; MANTLE, 1985), com diversas e interessantes atividades biológicas incluindo atividades antibiótica, imunossupressora e antitumoral (AMEUR et al., 2004). Mais de 40 substâncias dicetopiperazínicas estão listadas como metabólitos de fungos e a mais freqüente biossíntese envolve a condensação de dois ou três aminoácidos como precursores (LAWS; MANTLE, 1985; KOZLOVSKY; VINOKUROVA; ADANIN, 2000).

A tabela 17 (p.148) ilustra alguns metabólitos dicetopiperazínicos isolados de microrganismos que possuem atividade biológica.

Tabela 17 - Alcalóides dicetopiperazínicos com atividade biológica (continua)

Microrganismos	Substâncias	Atividade Biológica	Referências
<i>Penicillium</i> sp		anti-enzima α -glicosidase	KWON et al., 2000
<i>Penicillium verrucosum</i>	roquefortine C	anti-enzima do citocromo P450	MUSUKU et al., 1994, ANINAT et al., 2001
<i>P. verrucosum</i>		citotóxica	ELIAS, 2003

Tabela 17 - Alcalóides dicetopiperazínicos com atividade biológica (continuação)

Microrganismos	Substâncias	Atividade Biológica	Referências
<i>Aspergillus fumigatus</i>		Antimicrobiana	FURTADO, 2005
<i>P. verrucosum</i>		citotóxica	ELIAS, 2003
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	<p>R = H R = isoprenil</p>	citotóxica	USAMI et al., 2002.
<i>Gliocladium virens</i>		inibidor do fator de ativação plaquetária (PAF)	KIRBY; RAO; ROBINS, 1988
<i>Rhodotorula pilimanae</i>	<p>ácido rodotorulico</p>	ativação do fator de crescimento	ATKIN; NEILANDS, 1968

Tabela 17 - Alcalóides dicetopiperazínicos com atividade biológica (continuação)

Microrganismos	Substâncias	Atividade Biológica	Referências
<i>Phoma lingam</i>	<p>R = Ac, N=1 R = Ac, N=2 R = Ac, N=3 R = Ac, N=4</p>	fitotóxico	PEDRAS; SWARTZ; ABRAMS, 1990.
<i>Streptomyces</i> sp		Fraca atividade antibiótica	GURNEY; MANTLE, 1993
<i>Penicillium janczewskii</i>	<p>R = H gliovictina R = Ac acetato de gliovictina</p>	citotóxica	HIRSCHMA NN et al., 2005
<i>Verticillium hemipterigenum</i>	<p>R = CH₃ vertihemiptelideo A R = H vertihemiptelideo B</p>	Antibiótica e citotóxica	ISAKA et al., 2005
<i>Aspergillus ustus</i>	<p>(-)-fenilhistidina</p>	cititóxica	KANOH et al., 1997

Tabela 17 - Alcalóides dicetopiperazínicos com atividade biológica (continuação)

Microrganismos	Substâncias	Atividade Biológica	Referências
<i>Aspergillus</i> sp.	<p>golmaenona neoechinulina A</p>	antioxidante	LI et al., 2004
<i>Exserohilum rostratum</i>	<p>rostratina A rostratina B rostratina C rostratina D</p>	citotóxica	TAN et al., 2004
<i>Exserohilum holmii</i>	<p>exserohilona</p>	fitotóxica	TAN et al., 2004
<i>Papularia</i> sp.	<p>micodictopiperazina</p>	citotóxica	FANG et al., 2005
<i>Penicillium rugulosum</i> <i>Penicillium piscarium</i>	<p>R = H rugulosuvina A R = — COCH₃ rugulosuvina B</p>	citotóxica	KOZLOVSKY et al., 2001

Tabela 17 - Alcalóides dicetopiperazínicos com atividade biológica (conclusão)

Microrganismos	Substâncias	Atividade Biológica	Referências
<i>Tyridiomyces formicarum</i>		antifúngica	WANG; MUELLER; CLARDY, 1999
<i>Penicillium griseofulvum</i>	micelianamida	antibiótico	BIRCH; WESTRO- PP-M; RICKARDS, 1956
<i>Thielavia minor</i>		Inibidor da geração de ânion superóxido	KITA et al., 1991
<i>Aspergillus flavus</i>	aspiroclorina	antibiótica	SAKATA et al., 1987

Alguns alcalóides dicetopiperazínicos isolados ainda não tiveram sua atividade biológica avaliada. A tabela 18 (p.153) demonstra alguns deste metabólitos.

Tabela 18 - Alcalóides dicetopiperazínicos (continua)

Microrganismos	Substâncias	Referências
<i>Emericella striata</i>	<p data-bbox="587 786 823 842">R = S aureantioemestrina R = O detiosecoemestrina</p>	KAWAHARA et al., 1986
<i>Aspergillus silvaticus</i>	<p data-bbox="592 1357 999 1413">R' = SCH₃, R'' = H cis-bis-(metilitio)silvationa R' = H; R'' = SCH₃ trans-bis-(metilitio)silvationa</p>	KAWAHARA et al., 1987
<i>Phoma lingam</i>		FEREZOU et al., 1980

Aspergillus flavus

BARROW;

SEDLOCK, 1994

Tabela 18 - Alcalóides dicetopiperazínicos (continuação)

Microrganismos	Substâncias	Referências
<i>Penicillium brevi-compactum</i>	<p>R = H R = OH</p> <p>R = OH R = H</p>	<p>AYER; ALTENA; BROWNE, 1990.</p>
<i>Penicillium terlikowskii</i>	<p>R = H R = OH</p> <p>dehidrogliotoxina</p>	<p>KAWAHARA et al., 1986.</p>
<i>Phoma lingam</i>	<p>R' = R'' = H R' = Ac; R'' = H</p>	<p>PEDRAS; SWARTZ; ABRAMS, 1990</p>

Gliocladium virens

ciclo-(Glicil-L-tirosil)Dimetilalil Eter

KIRBY; RAO;

ROBINS, 1998

bis-N-norgliovictina

Streptomyces sp maremicina C₁maremicina C₂ R = OH maremicina D₁
R = OH maremicina D₂

TANG et al., 2001

Tabela 18 - Alcalóides dicetopiperazínicos (conclusão)

Microrganismos	Substâncias	Referências
<i>Macrophomina</i>		TRIGOS; REYNA;
<i>phaseolina</i>		MATAMOROS,
		1995

Conforme ilustrado nas tabelas 17 (p.148) e 18 (p.153) nota-se uma grande quantidade de alcalóides dicetopiperazínicos com grupamento SCH₃ ou ponte dissulfeto. Dentre as três dicetopiperazinas isoladas neste trabalho, duas substâncias (**VI** e **VII**) apresentaram SCH₃ à estrutura proposta. Relatos da literatura indicam que o mecanismo de biossíntese acerca da introdução de átomos de enxofre nesse tipo de estrutura ainda é pouco conhecido. Experimentos práticos têm demonstrado que a metionina, cisteína e o sulfato de sódio podem agir como fontes de enxofre, embora acredita-se que a cisteína seja o doador direto. Entretanto, o

mecanismo pelo qual o enxofre é introduzido é desconhecido (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005).

Rotas biossintéticas para substâncias como sirodesmina, pertencente à classe dos epipolítiodioxopiperazinas, têm sido propostas e, nestes casos, a introdução do enxofre ocorre com a reação de sulforização após a combinação de aminoácidos como fenilalanina/ serina (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005).

É conhecido apenas em qual estágio a N-metilação e ciclização oxidativa ocorrem para a formação do anel dioxopiperazínico, mas o intermediário aceptor de enxofre ainda é desconhecido (PEDRAS; SWARTZ; ABRAMS, 1990). Ayer, Altena e Browne (1990) sugeriram que metabólitos desta natureza são originados a partir de bioprecusores comuns, onde a conversão para um derivado ditiol talvez possa proceder a formação de compostos tiometilados ou epidissulfetos, com N-metilação ocorrendo posteriormente.

4.6 Ensaios biológicos com as substâncias isoladas

4.6.1 Ensaios enzimáticos

A substância nectriapirona (substância I) isolada da fração AcOEt do fungo VA1 foi testada frente à enzima GAPDH – *T. cruzi* e APRT – *L. tarentolae*.

A substância I não apresentou inibição enzimática significativa: 13% de

inibição em relação à enzima GAPDH e 5,3% à enzima APRT.

4.6.2 Ensaaios antitumorais

Em relação ao ensaio antitumoral para células de leucemia T humana (JURKAT), os resultados foram satisfatórios para a nectriapirona (substância I), pois na concentração de 1 mg/mL foi mais citotóxica que os fármacos padrões testados – metotrexado (MTX) e gemzar – sob as mesmas condições e concentrações (figura 54, p.157). A substância I também apresentou maior citotoxicidade que o metotrexato na concentração de 100 µg/mL e pouco menos que o gemzar também na concentração de 100 µg/mL. A figura 54 (p.157) mostra atividade superior da nectriapirona contra células de melanoma (B16F10), em relação ao metotrexato, nas duas concentrações testadas (1 mg/mL e 0,1 mg/mL). Porém, a nectriapirona não apresentou maior citotoxicidade comparada ao gemzar. Entretanto a citotoxicidade de 33,7% (1 mg/mL) frente as células de melanoma pode ser considerada relevante, já que esta linhagem celular é mais resistente a quimioterapia quando comparada com a linhagem JURKAT (leucemia T humana).

Figura 54. Atividade antitumoral da Nectriapirona contra células de leucemia T humana – JURKAT e melanoma (B16F10).

O metotrexato é um antimetabólito do ácido fólico que compete com o substrato natural pelo sítio ativo da enzima diidrofolato redutase. Pela inibição desta enzima o MTX bloqueia a síntese do DNA e causa morte celular. A gencitabina é um antimetabólito pirimidínico, que apresenta excelente atividade *in vivo* contra ampla variedade de tumores sólidos em ratos. Para que a gencitabina exerça sua atividade é necessário que seja fosforilada para o análogo ativo trifosfato, o qual pode ser incorporado erroneamente ao DNA, que está sendo formado, levando a morte

celular (CALLERY; GANNETT, 2002).

O tirosol (substância II) e a fusaperazina B (substância VI) foram testados frente às células de leucemia T humana (JURKAT). O tirosol não teve nenhuma atividade citotóxica e a fusaperazina B apresentou valores negativos para as concentrações de 1 e 0,1 mg/mL e um pequeno valor positivo de 1,67% de citotoxicidade na concentração de 0,01 mg/mL (figura 55, p.159). Os altos valores negativos observados tanto para a concentração de 1 e 0,1 mg/mL podem estar relacionados com a regulação do crescimento celular, onde esta substância favoreceria o crescimento celular, podendo assim exercer uma atividade imunorreguladora ao invés de citotóxica. O fármaco padrão usado foi o gemzar, nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/ml, produzindo 77,1 e 43,8% de citotoxicidade, respectivamente.

Figura 55. Ensaio citotóxico do Tirosol e Fusaperazina B frente células de leucemia T humana (JURKAT).

4.6.3 Ensaios antimicrobianos

Quatro substâncias isoladas tiveram suas atividades antimicrobianas frente ao microrganismo *Escherichia coli* avaliadas. Apenas a substância **III** (ergosterol) não apresentou nenhuma atividade frente à *E. coli* na maior concentração testada de 400 µg/mL, sendo portanto, inativa contra este microrganismo.

As substâncias **I** (nectriapirona), **II** (tirosol) e **VI** (fusaperazina B) tiveram como concentrações inibitórias mínimas os valores de 191 µg/mL, 187 µg/mL e 186 µg/mL, respectivamente. Esses resultados podem ser confrontados com o padrão positivo do agente antimicrobiano estreptomicina que apresentou inibição frente à *E. coli* de 99 µg/mL.

4.7 Identificação dos fungos endofíticos

4.7.1 Identificação por taxonomia

As colônias puras (VA1, VA15 e VA17) isoladas e enviadas em tubo “*slant*” contendo meio BDA foram investigadas, para identificação da espécie, nos laboratórios da Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello (Campinas – SP), através de taxonomia convencional. A descrição do fungo VA17 foi observada por micélio hialino a pigmentado, presença de conídios grandes, escuros, mais ou menos globosos, do tipo aleurosporo (figura 56, p.160) formando-se diretamente da hifa ou sobre conidióforos curtos, poucos distintos e presença de fialoconídios. O fungo VA17 foi identificado como *Humicola* sp, mas não possível a identificação da espécie.

Figura 56. **A** – Colônia de *Humicola* sp em meio BDA após 48 horas de crescimento. **B** - Aleuroconídios de *Humicola* sp.

O gênero *Humicola* sp é descrito na literatura como produtor de enzimas de interesse industrial e farmacêutico (KOTWAL,1999; MONTI, 2003; HATZAKIS; DAPHNOMILI; SMONOU, 2003), mas também tem sido descrito como produtor de alguns metabólitos com atividade biológica: fuscoatosideo (**61**), ativo contra *Aspergillus flavus*, fuscoatramida (**62**), 7-desoxiesterigmatocistina (**63**), esterigmatocistina (**64**) isolados da espécie *Humicola fuscoatra* (JOSHI; GLOER; WICKLOW, 2002). Um outro composto fenólico denominado humicolona (**65**) foi isolado da espécie *Humicola grisea*, possuindo atividade citotóxica (LAURENT et al., 2002).

Figura 57. Metabólitos isolados de *Humicola fuscoatra* e *Humicola grisea*. (JOSHI;

GLOER; WICKLOW, 2002; LAURENT et al., 2002).

O fungo VA1 também foi enviado sob as mesmas condições, mas a Fundação André Tosello não conseguiu realizar a sua identificação, apenas pode ser classificado como um ascomiceto. O fungo VA15 não teve nenhuma informação acerca de sua espécie, pois foi uma colônia que não produziu esporos, o que dificultou o prosseguimento dos testes realizados pela Fundação André Tosello pelos métodos convencionais de taxonomia.

4.7.2 Identificação por biologia molecular

Os fungos endofíticos isolados de *V. arenaria* foram também identificados através de técnicas de biologia molecular onde os dados encontrados foram comparados com dados do GenBank pelo programa BLASTn. Os dados dos gêneros e/ou espécies obtidos podem ser visualizados na tabela 19, p.162, sendo importante ressaltar que apenas a homologia do seqüenciamento acima de 96% deve ser considerada para uma real afirmação da espécie em análise.

Tabela 19 – Fungos endofíticos identificados por biologia molecular (continua)

Código do fungo	Espécie identificada	Homologia (%)
VA1	<i>Glomerella cingulata</i>	100
VA2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100
VA3	<i>Glomerella cingulata</i>	100
VA4	<i>Colletotrichum</i> sp.	97
VA5	<i>Glomerella cingulata</i>	99
VA6	<i>Glomerella cingulata</i> / <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99/ 97

VA7	<i>Glomerella cingulata</i>	99
VA8	<i>Glomerella cingulata</i>	99
VA9	<i>Diaporthe helianthi/ Phomopsis</i> sp.	99/ 93
VA10	<i>Glomerella cingulata</i>	99
VA12	<i>Diaporthe helianthi</i>	99
VA13	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	96
VA14	<i>Diaporthe phaseolorum/ Phomopsis amygdali</i>	97/ 96
VA15	<i>Guignardia mangiferae</i>	100
VA17	<i>Fusarium</i> sp.	97
VA18	<i>Glomerella cingulata/ Colletotrichum</i> sp.	100/ 98
VA19	<i>Phomopsis longicolla</i>	97
VA24	<i>Glomerella cingulata</i>	100
VA25	<i>Glomerella cingulata</i>	100

Tabela 19 – Fungos endofíticos identificados por biologia molecular (conclusão)

Código do fungo	Espécie identificada	Homologia (%)
VA27	<i>Epacris microphylla</i>	94
VA28	<i>Chaetomium</i> sp./ <i>Thielavia hyrcaniae</i>	96/ 95
VA31	<i>Exserohilum mcginnisii</i>	93
VA32	<i>Phomopsis</i> sp.	99
VA36	<i>Glomerella cingulata</i>	100
VA37	<i>Phoma sorghina</i>	97

A cepa VA17 foi classificada pela Fundação André Tosello como *Humicola* sp., através de taxonomia clássica. Porém, através de técnicas de biologia molecular detectou-se que a cepa em questão pertence ao gênero *Fusarium* sp.

Membros do gênero *Fusarium* são amplamente distribuídos como habitantes do solo, patógenos de plantas e contaminantes de alimentos e rações. Muitas espécies têm sido investigadas pela sua capacidade de produção de metabólitos

secundários bioativos (ALTOMARE et al., 2000). A infecção de muitas plantações por *Fusarium* sp. tem causado extensas consequências econômicas, sendo reconhecido como um dos maiores problemas da agricultura (ApSIMON, et al., 1990). Várias espécies do gênero *Fusarium* são capazes de produzir micotoxinas, comumente conhecidas como micotoxinas tricotecenas, que resultam em sintomas como vômitos, inflamação da pele, perda de peso e morte tanto em humanos como animais (CORLEY; ROTTINGHAUS; TEMPESTA, 1987). A principal micotoxina encontrada como contaminante de cereais em várias regiões do mundo é denominada desoxinivalenol (tabela 20, p.164) e representa risco tanto a saúde humana como animal (ApSIMON et al., 1990).

Vários metabólitos secundários têm sido isolados de *Fusarium* sp., representando moléculas com grande variabilidade química e diversas atividades biológicas. A tabela 20 (p.164) ilustra alguns destes metabólitos e os respectivos fungos dos quais foram isolados.

Tabela 20 - Metabólitos secundários isolados de *Fusarium* sp. (continua)

<i>Fungo</i>	Metabólitos secundários	Referências
<i>Fusarium</i> sp.	desoxinivalenol	ApSIMON et al., 1990
<i>F. culmorum</i> e		ApSIMON et al.,

F. Graminearum

1990

F. semitectum

ALTOMARE et al.,
2000

Tabela 20 - Metabólitos secundários isolados de *Fusarium* sp. (continuação)

<i>Fungo</i>	Metabólitos secundários	Referências
<i>F. sporotrichioides</i>	<p>R' = OH; R'' = H 8β-hidroxisambucaína R' = H; R'' = OH 8α-hidroxisambucaína</p>	CORLEY; ROTTINGHAUS; TEMPESTA, 1987

F. lateritium

TSANTRIZOS et al., 1993

F. chlamydosporum e

SOLFRIZZO et al., 1994

F. tricinctum

F. sambucinum

NIEDERER;
TAMM;
ZÜRCHER, 1992

Tabela 20 - Metabólitos secundários isolados de *Fusarium* sp. (conclusão)

<i>Fungo</i>	Metabólitos secundários	Referências
<i>F.culmorum</i>	<p>13-hidroxi-apotricotec-9-ene</p> <p>13-hidroxi-tricho-2(12), 9(10)-dien-3-ona</p>	ZAMIR et al., 1992

F. sambucinum

ZAMIR et al., 1992

Outro ponto importante de ressaltar é a produção do metabólito fusaperazina B pelo fungo *Fusarium chlamydosporum* (USAMI et al., 2002), sendo este mesmo metabólito produzido pelo fungo endofítico VA17 de *V. arenaria*, classificado como *Fusarium* sp. através de técnicas de biologia molecular.

A quimiotaxonomia não é tão difundida na classificação de fungos quando comparada à classificação de vegetais. Porém, um exemplo sobre divergências na classificação pode ser citado pela identificação taxonômica de um fungo endofítico como *Guignardia bidwelli*, associado a *Viguiera robusta*, e que teve sua classificação por biologia molecular como *Chaetomium globosum*. As substâncias produzidas por esta cepa, chaetoglobosinas, corroboram com a identificação deste fungo como *C. globosum* (MOMESSO, 2004).

A cepa VA1 foi identificada, por técnicas de biologia molecular, como *Glomerella cingulata* e vários outros fungos endofíticos associados *V. arenaria* também pertencem a essa mesma classificação (tabela 19, p.162). Porém, durante o isolamento dos endofíticos, estes fungos foram mantidos separadamente por apresentarem características morfológicas diferentes. Essas diferenças podem ser observadas pelo anexo 1 onde se encontram as fotos das linhagens dos endofíticos isolados de *V.arenaria*.

Além da morfologia diferente, as linhagens caracterizadas como *G. cingulata*, quando cultivadas sob as mesmas condições, produziram extratos extracelulares em AcOEt com espectros de RMN ^1H e cromatogramas obtidos via CLAE com algumas diferenças.

A partir do extrato AcOEt, obtido do fluído da cultura do fungo VA1, foi possível o isolamento de duas substâncias: a nectriapirona com t_R 6,05 (figura 58, p.167) e o tirosol com t_R 4,13 min (figura 59, p.167).

Figura 58. Cromatograma (225nm) curva de UV e estrutura da nectriapirona

Figura 59. Cromatograma (225nm) curva de UV e estrutura do tirosol

O cromatograma do extrato bruto AcOEt do fungo VA1 - *G. cingulata* - (figura 60, p. 168) apresenta estes dois compostos e também um terceiro com t_R 14,37 min. Este pico com t_R 14,37 min. é comum a vários outros extratos brutos AcOEt dos fungos identificados como *G. cingulata* (VA3, VA5, VA7, VA8, VA10 e VA25). Porém, comparando-se os espectros de RMN 1H (figura 61, p.168) dos extratos AcOEt destas cepas nota-se algumas diferenças. O espectro do extrato VA1A apresenta sinais predominantes referentes às substâncias nectriapirona e tirosol, com sinal característico de substâncias graxas em δ 1,2.

Figura 60. Cromatograma do extrato VA1A

Figura 61. Espectro RMN ^1H do extrato VA1A (400MHz, CDCl_3)

O espectro de RMN ^1H do extrato VA3A (figura 62, p.169) não apresenta sinais comuns ao do extrato VA1A e possui pico em δ 1,2 mais intenso, caracterizando um extrato com maior quantidade de substâncias de natureza graxa. O cromatograma deste extrato (VA3A) (figura 63, p.169) apresenta o mesmo pico com t_R 14,39 min. observado para o extrato VA1A.

Figura 62. Espectro RMN ^1H do extrato VA3A (400MHz, CDCl_3) **Figura 63.** Cromatograma (225nm) do extrato VA3A.

O espectro de RMN ^1H do extrato VA5A (figura 64, p.170) apresenta sinais característicos do tirosol, e sinais em δ 1,2 e δ 4,2, típicos de triglicerídeos. No cromatograma deste extrato (figura 65, p.170) observa-se o pico referente ao tirosol no t_R 4,11 min., além do pico com t_R 14,41 min. comum a alguns extratos de fungos denominados *G.cingulata*.

Figura 64. Espectro RMN ^1H do extrato VA5A (400MHz, CDCl_3)

Figura 65. Cromatograma (225nm) do extrato VA5A.

O cromatograma do extrato VA10A (figura 66, p.170) é muito semelhante ao do extrato VA5A (figura 67, p.171) com pico no t_R 4,11min., relacionado ao tirosol, e pico no t_R 14,13 min. A análise do espectro de RMN 1H do extrato VA10A confirma sinais típicos do tirosol além de apresentar sinal característico de substâncias graxas em δ 1,2.

Figura 66. Espectro RMN 1H do extrato VA10A (400MHz, $CDCl_3$)

Figura 67. Cromatograma (225nm) do extrato VA10A.

Os espectros de RMN 1H dos extratos VA7A, VA8A e VA36A (figuras 68, 70,

72, p.171-173), apresentam sinais semelhantes, característicos de triglicerídeos (δ 1,2 e 4,2). Porém, somente os cromatogramas dos extratos VA7A e VA8 (figuras 69 e 71, p.172) são parecidos com predomínio do composto no t_R 14,43 min. O cromatograma do extrato VA36A (figura 73, p.173) não apresenta o pico no t_R 14,43 min.

Figura 68. Espectro de RMN ¹H do extrato VA7A (400MHz, CDCl₃)

Figura 69. Cromatograma (225nm) do extrato VA7A.

Figura 70. Espectro de RMN ^1H do extrato VA8A (400MHz, CDCl_3)

Figura 71. Cromatograma (225nm) do extrato VA8A.

Figura 72. Espectro de RMN ^1H do extrato VA36A (400MHz, CDCl_3)

Figura 73. Cromatograma (225nm) do extrato VA36A

Os extratos oriundos dos fungos VA6, VA25 e VA18, também classificados como *G. cingulata* são os que apresentaram espectro de RMN ^1H e cromatogramas mais diferentes dos demais. O espectro de RMN ^1H referente ao extrato VA6A (figura 74, p.174) não apresenta sinais típicos do tirosol. No cromatograma deste extrato (figura 75, p.174) também não se observa o pico do tirosol em t_R 4,13.

Figura 74. Espectro de RMN ^1H do extrato VA6A (400MHz, CDCl_3)

Figura 75. Cromatograma (225nm) do extrato VA6A

O espectro de RMN ^1H do extrato VA25A (figura 76, p.174) é diferente dos demais extratos dos fungos classificados como *G. cingulata*. Nota-se a presença de menor quantidade de tirosol neste extrato, tanto pelo espectro de RMN ^1H como pelo cromatograma (figura 77, p.175).

Figura 76. Espectro RMN ^1H do extrato VA25A (400MHz, CDCl_3)

Figura 77. Cromatograma (225nm) do extrato VA25A.

O espectro do extrato VA18A (figura 78, p.175), oriundo do fungo VA18,

também identificado como *G. cingulata*, apresenta sinais que podem indicar a presença de um composto majoritário e não apresenta sinais característicos do tirosol. O cromatograma deste extrato (figura 79, p.175) também não apresenta o pico em t_R 4,11 min, referente ao tirosol, porém há a presença de um pico em t_R 23,2 min. também observado no extrato VA25A.

Figura 78. Espectro de RMN ^1H do extrato VA18A (400MHz, CDCl_3)

Figura 79. Cromatograma (225nm) do extrato VA18A

A tabela 19 (p.162) mostra que a classificação do fungo VA2 foi como *Colletotrichum gloesporioides*, sendo esta espécie descrita na literatura como o estágio assexual do fungo *Glomerella cingulata* (AL-SAMARRAI et al., 2002). O espectro de RMN ^1H do extrato VA2A (figura 80, p.176) apresenta sinais típicos do tirosol, indicando que este composto está presente em quantidade majoritária. O cromatograma deste extrato (figura 81, p.176), também apresenta um pico bastante intenso no t_R 4,11 min referente ao pico do tirosol.

Figura 80. Espectro de RMN ^1H do extrato VA2A (400MHz, CDCl_3)

Figura 81. Cromatograma (225nm) do extrato VA2A.

Várias cepas identificadas como *G. cingulata* apresentaram, sob as mesmas condições de cultivo, significativas diferenças tanto para os espectros de RMN ^1H como para os cromatogramas. Isto sugere, aliado às diferenças morfológicas observadas macroscopicamente entre as linhagens, que pode existir alguma variabilidade entre as cepas de *G. cingulata*. Estes resultados sugerem que entre os endofíticos da mesma espécie, isolados de uma mesma planta, pode haver variação genética que leva a produção de diferentes metabólitos, ou de quantidades diferentes de metabólitos iguais, nas mesmas condições de cultivo.

Apenas estudos sobre o sistema de reprodução a nível genético são descritos

em fungos filamentosos ascomicetos. Edgerton⁵ (1914 apud CISAR; TeBEEST, 1999) caracterizou dois tipos de cepas férteis de *G. cingulata*: cepas formadas por aglomerado de massas de peritécio fértil em cultura e cepas produtoras de peritécio menos fértil. Poucos estudos têm sido realizados sobre a reprodução em *G. cingulata*, porém há propostas de que certos tipos de genes, passíveis de mutações, possam estar correlacionados com o tipo de reprodução sexual ou assexual desta espécie de fungo. Uma vez que mutações a nível genético podem influenciar a reprodução de *G. cingulata*, pode ser possível também que variações e/ou mutações estejam correlacionadas com funções do metabolismo secundário.

O tirosol foi relatado como molécula “quorum-sensing” em *Candida albicans* (CHEN et al., 2004). Em bactérias estes compostos auto-estimulatórios são geralmente pequenas moléculas, e suas concentrações aumentam em função do aumento populacional. Após atingir um limiar de concentração, estas moléculas sinalizadoras (ou “quorum-sensing”) induzem respostas como bioluminescência, produção de antibióticos, virulência, formação de biofilme, competência, esporulação, etc (CHEN et al., 2004). Como o tirosol foi detectado em diversos extratos de fungos endofíticos pode ser possível que este composto tenha alguma função sinalizadora para a produção de outros metabólitos secundários, ou para alguma outra função biológica em *G. cingulata*.

⁵ Edgerton, C. W. Plus and minus strains in the genus *Glomerella*. **Am. J. Bot.**, v.1, p.244-254, 1914.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

O resultado do isolamento de 37 fungos endofíticos oriundos da *V. arenaria*, indica que esta espécie vegetal estava colonizada por maior número de fungos endofíticos comparada às outras espécies de Asteraceae avaliadas no Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP, *Viguiera robusta*, de onde foram isolados 12 fungos endofíticos e *Tithonia diversifolia*, que forneceu 5 endofíticos.

Os extratos VA11, VA12, VA19, VA26 e VA27 foram os mais promissores nos ensaios antimicrobianos, sendo ativos para dois dos três microrganismos testados (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*). Os extratos que apresentaram melhores resultados tanto para GAPDH (*T. cruzi*) e APRT (*L. tarentolae*) foram os extratos VA14A e VA35A, merecendo destaque também frente a APRT o extrato VA16A.

A atividade citotóxica mais relevante foi a do extrato VA26A, que apresentou a menor IC₅₀ (0,16 mg/mL) contra células de leucemia T humana (JURKAT), sendo inclusive mais ativa que o fármaco padrão metotrexato nas mesmas condições e concentrações.

Do extrato AcOEt, obtido do cultivo em escala ampliada do fungo VA1 (*Glomerella cingulata*), foi possível o isolamento de duas substâncias: nectriapirona (I), com 79,5% de citotoxicidade frente células de leucemia T humana e moderada atividade frente *E. coli* com CIM 191 µg/mL; tirosol (II), também com moderada atividade antimicrobiana com CIM 187 µg/mL frente *E. coli*. Do extrato micelial metanólico foi possível o isolamento do ergosterol (III).

Do extrato micelial metanólico do fungo VA5 (*G. cingulata*) isolou-se o manitol (IV).

Após o cultivo em escala ampliada do fungo VA17 (*Fusarium* sp.), três

derivados dicetopiperazínicos foram isolados sendo um proveniente do extrato AcOEt: dicetopiperazina **V**, inédita na literatura, e os outros do extrato micelial metanólico: fusaperazina B (substância **VI**) e dicetopiperazina **VII**, também inédita na literatura. Os dados obtidos nos experimentos de NOE-diff da substância **VI** permitiram o estabelecimento das estereoquímicas relativas e sugeriram que a molécula deveria estar em conformação dobrada. Os estudos de modelagem molecular confirmaram que a conformação dobrada da substância **VI** (Fusaperazina B) foi a mais estável quando comparada com a conformação estendida, indicando que a interação CH/ π contribui para a estabilidade da conformação dobrada desta estrutura.

Os espectros de RMN ^1H dos extratos AcOEt e cromatogramas provenientes de fungos classificados como *G. cingulata*, por métodos de biologia molecular, demonstraram significativa diversidade química. Esta diversidade química pode estar aliada às variações genéticas entre as cepas isoladas.

A substância **II** (tirosol) foi detectada, por RMN ^1H e CLAE, em vários extratos de fungos endofíticos, e, como já foi relatada como molécula sinalizadora, pode estar relacionada a alguma função sobre a produção de metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados.

Os resultados obtidos indicam que os endofíticos associados a *V. arenaria* são promissores principalmente para a busca de substâncias com atividade antitumoral. Além disso, estes endofíticos demonstraram a capacidade de biossintetizar metabólitos com significativa diversidade estrutural. Assim, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com as indicações de fungos endofíticos como uma fonte promissora de substâncias bioativas e novas entidades químicas.

*Referências
Bibliográficas*

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W. R.; KNOCH, I.; WITTE, L. Biosynthesis of the terpenoidic polyketide fusalanipyrone. **Phytochemistry**, v.29, p.2877-2878, 1990.

ABRAHAM, W. R. & ARFMANN H. A. Fusalanipyrone, a monoterpenoid from *Fusarium solani*. **Phytochemistry**, v.27, p.3310-3311, 1988.

ABRAMSON, H. N.; WORMSER, H. C. Synthesis of Nectriapyrone. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v.18, p.363-366, 1981.

ABRELL, L. M.; CHENG, X. C.; CREWS, P. New nectriapyrones by salt water cultures of a fungus separated from an Indo-Pacific sponge. **Tetrahedron Letters**, v.35, p.9159-9160, 1994.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 3 ed. New York: Academic Press, 1988. p.40.

ALTOMARE, C.; PERRONE, G.; ZONNO, M. C.; EVIDENTE, A.; PENGUE, R.; FANTI, F.; POLONELLI, L. Biological Characterization of Fusapyrone and Deoxyfusapyrone, two Bioactive Secondary Metabolites of *Fusarium semitectum*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1131-1135, 2000.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.

AMBROSIO, S. R.; SCHORR, K.; DA COSTA, F. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.221-224, 2004.

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; BONAVENTURA, D.; DE OLIVEIRA, A. M.; DA COSTA, F. B. Pimarane diterpene from *Viguiera arenaria* (Asteraceae) inhibit rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v.73, p.484-489, 2002.

AMBROSIO, S. R. Investigação fitoquímica das raízes de *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae) e ensaios farmacológicos em útero de ratas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 150 pp. , 2001.

AMEUR, R. M. B.; MELLOULI, L.; CHABCHOUB, F.; FOTSO, S.; BEJAR, S. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolated *Streptomyces* sp. US 24 strain. **Chemistry of Natural Compounds**, v.40, n.5, p.510-513, 2004.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, suppl. S1, p.5-16, 2001.

ANINAT, C.; HAYASHI, Y.; ANDRÉ, F.; DELAFORGE, M. Molecular requirements for inhibition of cytochrome P450 activities by roquefortine. **Chemical Research in Toxicology**, v.14, p.1259-1265, 2001.

ApSIMON, J. W.; BLACKWELL, B. A.; BLAIS, L.; FIELDER, D. A.; GREENHALGH, R.; KASITU, G.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. Mycotoxins from *Fusarium* species: detection, determination and variety. **Pure and Applied Chemistry**, v.62, n.7, p.1339-1346, 1990.

ATKIN, C. L.; NEILANDS, J. B. Rhodotorulic Acid, a Diketopiperazine Dihydroxamic Acid with Growth-Factor Activity. I. Isolation and Characterization. **Biochemistry**, v.7, n.10, p.3734-3739, 1968.

AVENT, A. G.; HANSON J. R.; TRUNEH, A. The bioynthesis of nectriapyrone and vermopyrone. **Phytochemistry**, v.31, p.3447-3449, 1992.

AVENT, A. G.; HANSON J. R.; TRUNEH, A. Two pyrones from *Gliocladium vermoesonii*. **Phytochemistry**, v.31, p.1065-1066, 1991.

AYER, W. A.; ALTENA, I. V.; BROWNE, L. M. Three piperazinediones and a drimane diterpenoid from *Penicillium brevi-compactum*. **Phytochemistry**, v.29, n.5, p.1661-1665, 1990.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr, W.; PEREIRO, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65, 2000.

BACON, C. W. In: **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw-Hill, 1990, p. 259-282.

BAILEY, J. A.; MANSFIELD, J. W. **Phytoalexins**. 1 ed. New York: John Wiley &

Sons, 1984. p.1.

BARROW, C. J.; SEDLOCK, D. M. 1'-(2-phenyl-ethyl)-ditryptophenaline, a new dimeric diketopiperazine from *Aspergillus flavus*. **Journal of Natural Products**, v.57, n.9, p.1239-1244, 1994.

BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert

Endophytic Fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.724-728, 2005.

BELIAKOFF, J.; BAGATELL, R.; PAINE-MURRIETA, G.; TAYLOR, C. W.; LYKKESFELDT, A. E.; WHITESELL, L. Hormone-refractory breast cancer remains sensitive to the antitumor activity of heat shock protein 90 inhibitors. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.4961-4971, 2003.

BOCK, B.; PEDERSEN, C.; Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, v.41, p.27-65, 1983.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Systematics and evolution within the Compositae seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**, v.171, p.1-14, 1990.

BRADY, S. F.; BONDI, S. M.; CLARDY, J. The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p.9900-9901, 2001.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, A new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1447-1448, 2000.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 1994.

BUTLER, M. R. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p.2141-2153, 2004.

CALLERY, P. S.; GANNETT, P. M. Cancer and Cancer Chemotherapy. In **Foye's Principles of Medicinal Chemistry** Williams, D. A.; Lemke, T. L. 5th Ed., 2002. Lippincott Williams & Wilkins. p.936-939.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-

sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.14, p.5048-5052, 2004.

CISAR, C. R.; TeBEEST, D. O. Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. **Current Genetics**, v.35, p.127-133, 1999.

CHU, M.; MIERZWA, R.; TRUUMES, I.; GENTILE, F.; PATEL.; GULLO, V.; CHAN, T-M.; PUAR, M. S. Two Novel Diketopiperazines Isolated from the fungus *Tolypocladium* sp. **Tetrahedron Letters**, v.34, n.47, p.7537-7540, 1993.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829-837, 2004.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v.24, p.937-943, 1985.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press, 1981.

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p.463-480, 2000.

CORLEY, D. G.; ROTTINGHAUS, G. E.; TEMPESTA, M. S. Secondary Metabolites from *Fusarium* sp. Two new modified trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides* MC-72083. **Journal of Natural Products**, v.50, n.5, p.897-902, 1987.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, n.2, p.157-160, 2004.

COX, P. A. Ensuring equitable benefits: The Falealupo covenant and the isolation of anti-viral drug prostatin from a Samoan medicinal plant. **Pharmaceutical Biology**, v.39, n.1, p.33-40, 2001.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v.77, n.1, p.7-24, 2005.

DA COSTA, F. B.; SCHORR, K.; ARAKAWA, N. S.; SCHILLING, E. E.; SPRING, O.

Intraspecific variation in the chemistry of glandular thichomer of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, p.403-407, 2001.

DA COSTA, F. B.; ITO, Y. I.; ANDRÉ, R. F. G.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Constituents of *Viguiera* species with antibacterial activity. **Fitoterapia**, v.LXIX, p.86-87, 1998.

DA COSTA, F. B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.24, p.585-587, 1996a.

DA COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspillioides* with tripanomicidal activity. **Planta Medica**, v.62, p.557-559, 1996b.

DANCEY, J.; SAUSVILLE, E. A. Issues and Progress with protein Kinase Inhibitors for cancer treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.4, p.296-313, 2003.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.455-463, 1999.

DESJARDINS, A. E.; SPENCER, G. F. Furanocoumarin phytoalexins, trichothecene toxins and infection of *Pastinaca sativa* by *Fusarium sporotrichioides*. **Phytopathology**, v.79, n.2, p.170-175, 1989.

ELIAS, B. C. Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos das culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 186 pp., 2003.

FAETH, S.; HAMONN, K. Fungal endophytes in Oak Trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. **Ecology**, v.78, p.820-827, 1997.

FANG, M.; FANG, H.; HUANG, Y.; ZHAO, Y. Mycoediketopiperazine, a novel fungal metabolite from a *Papularia* sp. **Tetrahedron Letters**, v.46, p.2147-2148, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Métodos Biológicos. 4ed. São Paulo. 1988.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Natural Products Reports**, v.20, p.382-391, 2003.

FEREZOU, J. P.; THIERRY-Q, A.; BARBIER, M.; KOLLMANN, A.; BOUSQUET, J. F. Structure and Synthesis of Phomamide, a New Piperazine-2,5-dione related to the Sirodesmins, isolated from the Culture Medium of *Phoma lingam* Tode. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I**, p.113-115, 1980.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, no prelo, 2005.

FURTADO, N. A. J. C. Estudos sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus*. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 293pp., 2004.

GADEN, E. L. Fermentation process kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, n.6, p.629-635, 2000.

GARDINER, D. M.; WARING, P.; HOWLETT, B. J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. **Microbiology**, v.151, p.1021-1032, 2005.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996.

GUO, B.; DAI, J. R.; NG, S.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTÉ, B. K. Cytonic Acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **Journal of Natural Products**, v.63, p.602-604, 2000.

GURNEY, K. A.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of 1-N-methylalbonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. Isolated from perennial ryegrass. **Journal of Natural Products**, v.56, n.7, p.1194-1198, 1993.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; McMAHON, J. B.; GULAKOWSKI, R. J.; ISHITOYA, J.; SZALLASI, Z.; LEWIN, N. E.; BLUMBERG, P. M.; WEISLOW, O. S.; BEUTLER, J. A.; BUCKHEIT Jr, R. W.; CRAGG, G. M.; COX, P. A.; BADER, J. P.; BOYD, M. R. A nonpromoting phorbol from the Samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.35, n.11, p.1978-1986, 1992

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, n.7, p.294-300, 2000.

HATZAKIS, N. S.; DAPHNOMILI, D.; SMONOU, I. Ferulic acid esterase from *Humicola Insolens* catalyses enantioselective transesterification of secondary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B**, v.21, p.309-311, 2003.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie-International Edition**, v.38, p.643-647, 1999.

HEYWOOD, V. A.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. (eds.) **The biology and chemistry of the Compositae**. London: Acad. Press, vol. 1 e 2, 1977.

HIRSCHMANN, G. S.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.27-32, 2005.

HORMAZABAL, E.; HIRSCHMANN, G. S.; ASTUDILLO, L.; RODRÍGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.60, p.11-21, 2005.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei*, *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, p.163-167, 2001.

ISAKA, M.; PALASARN, S.; RACHTAWEE, P.; VIMUTTIPONG, S.; KONGSAEREE, P. Unique Diketopiperazine Dimers from the Insect Pathogenic Fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. **Organic Letters**, v.7, n.11, p.2257-2260, 2005.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHARON, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthenes A and B, Novel Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* Species. **Journal of Natural Products**, v.64, p.1015-1018, 2001.

JACKSON, M.; KARWOSWSKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W. L.; BARLOW, G. J.; TANAKA, S. K. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum* **Journal of Antibiotics**, v.46, p.34-38, 1993.

JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O.; BEAN, G. A.; ABOULNASR, M. B.; BARROS, C. S. The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v.51, p.736-744, 1988.

JOSHI, B. K.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Bioactive Natural Products from a Sclerotium-Colonizing Isolate of *Humicola fuscoatra* **Journal of Natural Products**, v.65, p.1734-1737, 2002.

KAMAL, A.; THAO, L.; SENSINTAFFAR, J.; ZHANG, L.; BOEHM, M. F.; FRITZ, L. C.; BURROWS, F. J. A high-affinity conformation of HSP90 confers tumor selectivity of Hsp90 inhibitors. **Nature**, n.425, p.407-410, 2003.

KANOH, K.; KOHNO, S.; ASARI, T.; HARADA, T.; KATADA, J.; MURAMATSU, M.; KAWASHIMA, H.; SEKIYA, H.; UNO, I. (-)-Phenylahistin: A New Mammalian Cell Cycle Inhibitor Produced By *Aspergillus ustus*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.7, n.22, p.2847-2852, 1997.

KAWHARA, N.; NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K-i. Studies on Fungal Products. Part 13. Isolation and Structures of Dithiosilvatin and Silvathione, Novel Dioxopiperazine Derivatives from *Aspergillus silvaticus*. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I**, p.2099-2101, 1987.

KAWHARA, N.; NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K-i. Aurantioemestrin from *Emericella striata* and Silvathione from *Aspergillus silvaticus*, possible key intermediates from Epidithiodioxopiperazines to Trioxopiperazines. **Journal of the Chemical Society-Communications**, n.19, p.1495-1496, 1986.

KIRBY, G. W.; RAO, G. V.; ROBINS, D. J. New Co-metabolites of Gliotoxin in *Gliocladium virens*. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I**, p.301-303, 1988.

KITA, Y.; AKAI, S.; FUJIOKA, H.; TAMURA, Y. Total synthesis of a new inhibitor of superoxide anion generation, OPC-15161. **Tetrahedron Letters**, v.32, n.42, p.6019-6020, 1991.

KNIGHT, V.; SANGIER, J.-J.; DiTULIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.62, p.446-458, 2003.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.206-220, 2005.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.709-711, 2003.

KOTWAL, S. M.; GOTE, M. M.; KHAN, M. I.; KHIRE, J. M. Production, purification and characterization of a constitutive intracellular α -galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola* sp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.661-667, 1999.

KOZLOVSKY, A. G.; ADANIN, V. M.; DAHSE, H. M.; GRAFE, U. Rugulosuvines A and B, Diketopiperazine Alkaloids of *Penicillium rugulosum* and *Penicillium piscarium* Fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.37, n. 3, p. 253-256, 2001.

KOZLOVSKY, A. G.; VINOKUROVA, N. G.; ADANIN, V. M. Diketopiperazine alkaloids from the fungus *Penicillium piscarium* Westling. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.36, n.3, p.271-275, 2000.

KWON, O. S.; PARK, S. H.; YUN, B. S.; PYUN, Y. R.; KIM C. J.; Cyclo (dehydroala-l-Leu) an α -glucosidase inhibitor from *Penicillium* sp. F70614. **Journal of Antibiotics**, v.53, n.9, p.954-985, 2000.

KROHN, K.; FLÖRKE, U.; RAO, M. S.; STEINGRÖVER, K.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Metabolites from fungi 15. New isocoumarins from an endophytic fungus isolated from the Canadian thistle *Cirsium arvense*. **Natural Products Letters**, v.15, n. 5, p.353-361, 2001.

LAURENT, D.; GUELLA, G.; MANCINI, I.; ROQUEBERT, M. F.; FARINOLE, F.; PIETRA, F. A new cytotoxic tetralone derivative from *Humicola grisea*, a filamentous fungus from wood in the southestern lagoon of New Caledonia. **Tetrahedron**, v.58, p.9163-9167, 2002.

LAWS, I.; MANTLE, P. G. Nigrifortine, a diketopiperazine metabolite of *Penicillium nigricans*. **Phytochemistry**, v.4, v.6, p.1395-1397, 1985.

LEE, J. C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N. B.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Subglutinols A and B: Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. **Journal of Organic Chemistry**, v.60, p.7076-7077, 1995.

LI, Y.; LI, X.; KIM, S. K.; KANG, J. S.; CHOL, H. D.; RHO, J. R.; SON, B. W.

Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.52, n.3, p.375-376, 2004.

LI, J. Y.; SIDHU, R. S.; BOLLON, A.; STROBEL, G. A.; Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. **Mycological Research**, v.102, p.461-464, 1998.

LIU, J. Y.; LIU, C. H.; ZOU, W. X.; TAN, R. X. Leptosphaeric Acid, a metabolite with a Novel Carbon Skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV 403, an Endophytic Fungus in *Artemisia annua*. **Helvetica Chimica Acta**, v.86, p.657-660, 2003.

LIU, J. Y.; LIU, C. H.; ZOU, W. X.; TIAN, X.; TAN, R. X. Leptosphaerone, a metabolite with a novel skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Helvetica Chimica Acta**, v.85, p.2664-2667, 2002.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p.277-282, 2001.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J., TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p.67-73, 2000.

LUND, B. M.; LYON, G. D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *Erwinia herbicola* on thin-layer chromatograms. **Journal of Chromatography A**, v.110, p.193-196, 1975.

MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, v.75, p.451-456, 2004.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p.143-148, 2002.

MOMESSO, L. S. Antitumoral activity of chaetoglobosin B from the endophytic fungus *Chaetomiun globosum*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.311. 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto/SP. PN-22, 2005.

MOMESSO, L. S. Bioprospecção em fungos endofíticos associados a *Viguiera*

robusta (Asteraceae) e citocalasanas produzidas por *Guignardia bidwelli*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto/ SP, 176 pp, 2004.

MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M. F.; GOULART, A. J.; SAYAMA, A. H.; CONTIERO, J. Production and purification of an endo -1,4- β -xylanase from *Humicola grisea* Var. *thermoidea* by electroelution. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.124-128, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUSUKU, A.; SELALA, M. I.; BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; SCHEPENS, P. J. C. Isolation and structure determination of a new roquefortine-related mycotoxin from *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium* isolated from Cassava. **Journal of Natural Products**, v.57, p.983-987, 1994.

NAIR, M. S. R.; CAREY, S. T. Metabolites of pyrenomycetes II: nectriapyrone, na antibiotic monoterpenoid. **Tetrahedron Letters**, v.19, p.1655-1658, 1975.

NETTO, C. E. Estudo químico e atividade biológica de extratos obtidos das culturas de *Penicillium waksmanii* Zaleski. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto/ SP, 138 pp., 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003.

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

NIEDERER, D.; TAMM, C.; ZÜRCHER, W. Nitrogen containing metabolites of *Fusarium sambucinum*. **Tetrahedron Letters**, v.33, n.28, p.3997-4000, 1992.

PAXTON, J. D. Phytoalexins: a working redefinition. **Phytopathology Z**, v.101, p.106-109, 1981.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied**

Microbiology, v.44, p.1-68, 1997.

PEDRAS, M. S. C.; SWARTZ, G. S.; ABRAMS, S. R. Minor phytotoxins from the blackleg fungus *Phoma lingam*. **Phytochemistry**, v.29, n.3, p.777-782, 1990.

PETRINI, O., SIEBER, T. N., TOTI, L., VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v.1, p.185-196, 1992.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.14, p.255-281, 1986.

PIMM, S. L., RUSSELL, G. J., GITTLEMAN, J. L., BROOKS, T. M. The future of biodiversity. **Science**, v.269, p.347-350, 1995.

PUPO, M. T. Constituintes Químicos de *Trichilia Claussenii* (Meliaceae). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP, 315 pp., 1997.

REFFSTRUP, T.; BOLL, P. M. Synthesis of the antibiotic monoterpenoid nectriapyrone. **Tetrahedron Letters**, v.22, p.1903-1904, 1976.

RICHARDSON, D. H. S. War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. **Mycological Research**, v.103, p.641-650, 1999.

RIZZO, I.; VARSAVKY, E.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides*. **Toxicon**, v.35, n.5, p.753-757, 1997.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.4, p.261-267, 2000.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v.15, p.1573-1580, 1976.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, n.6, p.275-280, 2004.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v.29, p.319-343, 1998.

SAKATA, K.; MARUYAMA, M.; UZAWA, J.; SAKURAI, A.; LU, H. S. M.; CLARDY, J. Structural revision of aspirochlorine (=antibiotic A30641), a novel epidithiopiperazine-2,5-dione produced by *Aspergillus* spp. **Tetrahedron Letters**, v.28, n.46, p.5607-5610, 1987.

SANTOS, D. A. P. Isolamento e Identificação de metabólitos secundários dos fungos comestíveis *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/ SP , 170 pp., 2001.

SANTOS, R. M. G.; FO-RODRIGUES, E. Structures of Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp, an Endophytic Fungus Found Associated with *Melia azedarach*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.14, n.5, p.722-727, 2003.

SANTOS, R. M. G.; FO-RODRIGUES, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v.61, p.907-912, 2002.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v.3, p.577-608, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, n.6, p.661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.

SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I. DA COSTA, F. B. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF- κ B. **Phytochemistry**, v.60, p.733-740, 2002.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **Botanical Review**, v.48, p.123-551, 1982.

SHIRANE, N.; TAKENAKA, H.; UEDA, K.; HASHIMOTO, Y.; KATOH, H.; ISHII, H. Sterol analysis of dmi-resitant and sensitive strains of *Venturia inaequalis*. **Phytochemistry**, v.41, n.5, p.1301-1308, 1996.

SOFIA, M.; TURNES, G.; FENICAL W. Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. **Biological Bulletin**, v.182, p.105-108, 1992.

SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A.; SAVARD, M. E.; BLACKWELL, B. A.; NELSON, P. E. Isolation and characterization of new chlamydosporol related metabolites of *Fusarium chlamydosporum* and *Fusarium tricinctum*. **Mycopathologia**, v.127, p.95-101, 1994.

SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F. W.; TAN, R. X. Characterization of Graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, and endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.3, p.506-509, 2005.

SPARTAN'04, v.1.0.3, **Warefunction**, Inc., Irvine, CA, 2005.

SPRING, O.; ZIPPER, R.; REEB, S.; VOGLER, B.; DA COSTA, F. B. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from the glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v.57, p.267-272, 2001.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.

STOESSL, A.; 8- hidroxy-6-methoxy-3-methylisocoumarin and other metabolites of *Ceratocystis fimbriata*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.35, n.2, p.186-191, 1969.

STOWE, B. B.; YAMAKI, T. The history and physiological action of the gibberellins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.8, p.181-216, 1957.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.491-502, 2003.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.4, p.315-333, 2002.

STROBEL G. A.; HESS W. M.; FORD E.; SIDHU R. S.; YANG X. Taxol from fungal

endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.17, p.417-423, 1996.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v.5, p.39-41, 2000.

TAN, R. X.; JENSEN, P. R.; WILLIAMS, P. G.; FENICAL, W. Isolation and Structure Assignments of Rostratins A-D, Cytotoxic Disulfides Produced by the Marine-Derived Fungus *Exserohilum rostratum*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1374-1382, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v.18, p.448-459, 2001.

TANG, Y. Q.; SATTler, I.; THIERICKE, R.; GRABLEY S.; FENG, X. Z. Maremycins C and D, New Diketopiperazines, and Maremycins E and F, Novel Polycyclic *spiro*-Indole Metabolites Isolated from *Streptomyces* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, v.2001, n.2, p.261-267, 2001.

TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; KING, R. M.; BOLDT, P.E. Germacranolides and diterpenos from *Viguiera* species. **Revista Latinoamericana de Química**, v.21, p.67-69, 1990.

TELES, H. L.; SILVA, G. H.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, J. O.; NETO, C. M. C.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R. Benzopyrans from *Curvularia* sp., na endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v.66, n.19, p.2363-2367, 2005.

TRAPP, S. C.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S.; JARVIS, B. B. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. **Molecular and General Genetics**, v.257, n.4, p.421-432, 1998.

TRIGOS, A.; REYNA, S.; MATAMOROS, B. Macrophominol, a Diketopiperazine from Cultures of *Macrophomina phaseolina*. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1697-1698, 1995.

TSANTRIZOS, Y. S.; XU, X. J.; SAURIOL, F.; HYNES, R. C. Novel quinazolines and enniatins from *Fusarium lateritium* Nees. **Canadian Journal of Chemistry**, v.71, p.1362-1367, 1993.

TUTTLE, J. V.; KRENISTSKY, T. A. Purine Phosphoribosyltransferases from

Leishmania donovani. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, n.3, p.909 – 916, 1980.

UMEZAWA, Y.; TSUBOYAMA, S.; TAKAHASHI, H.; UZAWA, J.; NISHIO, M. CH/ π Interaction in the Conformation of Peptides. A Database Study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7, p.2021-2026, 1999.

URIZAR, N. L.; LIVERMAN, A. B.; DODDS, D. T.; SILVA, F.V.; ORDENTLICH, P.; YAN, Y.; GONZALEZ, F. J.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; MOORE, D. D; A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligant for FXR. **Science**, v.296, p.1703-1706, 2002.

USAMI, Y.; AOKI, S.; HARA, T.; NUMATA, A. New dioxopiperazine Metabolite from a *Fusarium* Species Separated from a Marine Alga. **Journal of Antibiotics**, v.55, n.7, p.655-659, 2002.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v.3, p.232-238, 1998.

VERDINE, G. L. The combinatorial chemistry of nature. **Nature**, v.384, p.11-13 (supplement), 1996.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p. 617-622, 2001.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspegillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, p.51-57, 2002.

WANG, J. W.; ZHANG, Z.; TAN, R. X. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. **Biotechnology Letters**, v.23, p.857-860, 2001.

WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal Diketopiperazines from Symbiotic Fungus of Fungus-Growing Ant *Cyphomyrmex minutus*. **Journal of Chemical Ecology**, v.25, n.4, p.935-941, 1999.

WANI, M. W. Plant tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, p.2325, 1971.

WARDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. **New Phytologist**, v.116, p.341-381, 1990.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR protocols; A guide to methods and applications**. INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. Academic Press, San Diego, California, 1990, p.315-322.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; KANJANA, K. D.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.265-272, 2004.

www.aist.go.jp (acesso em maio/ 2003)

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S.; Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v.35, n.1, p.79-81, 2004.

ZAMIR, L. O.; DEVOR, K. A.; NIKOLAKAKIS, A.; NADEAU, Y.; SAURIOL, F. Structures of New Metabolites from *Fusarium* Species: an Apotrichothecene and Oxygenated Trichodienes. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n.36, p.5181-5184, 1992.

ZOBERI, M. H. **Tropical microfungi**. 1 ed. London: The MacMillan Press, p. 1, 1972.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y. & TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1529-1530, 2000.

Anexo

Anexo 1 – Endofíticos isolados de *Viguiera arenaria*

VA20

VA21

VA22

VA23

VA24

VA25

VA26

VA27

VA28

VA29

VA30

VA31

VA32

VA33

VA34

VA35

VA36

VA37

Anexo 2. Espectro de RMN ^1H do extrato VA1A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 3. Espectro de RMN ^1H do extrato VA11A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 4. Espectro de RMN ^1H do extrato VA12A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 5. Espectro de RMN ^1H do extrato VA15A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 6. Espectro de RMN ^1H do extrato VA17A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 7. Espectro de RMN ^1H do extrato VA20A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 8. Espectro de RMN ^1H do extrato VA27A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 9. Espectro de RMN ^1H do extrato VA28A (400MHz, CDCl_3)

Anexo 10. Espectro de RMN ^1H do extrato VA19A (400MHz, CDCl_3)