UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

Willian Jonis Andrioli

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 16/03/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Willian Jonis Andiroli

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Andrioli, Willian Jonis

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral. Ribeirão Preto, 2012.

230 p.; 30cm.

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

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. Fungos. 2.*Beauveria bassiana*. 3. *Mycoleptodiscus indicus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Willian Jonis Andrioli
Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho à Jaime Andrioli e Lea T. Tedesco Andrioli, meus queridos pais que transmitiram a mim os mais importantes valores da vida, aos meus amados irmãos Gabriela e Ronald e a Deus pelo dom da vida.

Agradecimento especial

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

"Se eu não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro."
Dom Pedro II

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida;

Aos meus queridos pais, Jaime e Lea Andrioli;

Aos meus amados irmãos, Gabriela e Ronald;

À toda minha família, repleta de pessoas de bom coração;

Aos meus amigos André Damásio, Maller, Tony, Fernando, André Miotello, Lucas, Camilo, Marcelo, Fausto, Nilmar, Anderson, Antônio, Roberto, pelas tantas histórias, quinta dos amigos, República Cueca Virada e futebol;

Aos meus colegas de laboratório João Paulo, Bruno Mineiro, Eliane, Daniella, Ricardo, Mauro, Cris, Rejane, Bruno, Thiago, Cristiane, Niltinho, Renata, Juliana, Mariza, Flávia, Carol, Camila, João Luiz, obrigado pela boa convivência e pelo aprendizado ao lado de vocês;

À Profa. Dra. Niege, pela gentileza e disponibilidade em ajudar e ensinar com carinho;

Ao Prof. Dr. Fernando, pelos ensinamentos e oportunidade de compartilhar a cultura que possuí;

À Profa. Dra. Mônica T. Pupo, por todo apoio e disponibilidade em auxiliar meu cresimento;

Aos técnicos de Laboratório da Farmacognosia Waltinho, Mário e João Gabriel, pelo companheirismo.

To Dr. Dhammika Nanayakkara and his wife Kumudine, thank you for receiving me in the United States and for all the teaching;

To Tibba, Ranjitt, Mallika and Vladmyr for the acceptance and good relationship;

À Cássia, pelo ótimo convivio durante o estágio nos EUA e pela amizade que construímos;

Aos técnicos de Laboratório Thomaz, Cláudia, Áurea, Cris e Giba pela disponibilidade e apoio;

Ao pessoal do Laboratório de Química Farmacêutica Denise, Warley, Adriana, Fernanda, Marília, Raphael, Larissa, Noemi, Gisele, Eduardo, Rita, Luciano e Pedro;

Aos Professpores, Norberto P. Lopes, Nivaldo, Carlos Curti, Andréia Leopoldino,

Ao Professor Dr. Carlo Bertucci, pela aquisição dos dados de dicroísmo circular e ao Professor Dr. José Ricardo Sabino (UFG) pelos dados de cristalografia;

Às secretárias Soninha, Nilva, Lilian, Ruth, Rosana, Rossana, Eleni, Ana;

À Dona Evanira do cafezinho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP;

A todos os funcionários e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Agradeço a ampla disponibilidade de infra-estrutura, bem como a credibilidade demonstrada em nosso trabalho através da concessão de suporte financeiro de bolsas e projetos:

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Mestrado: 05/57116-4; Doutorado: 07/58650-0; Projeto Temático: 04/07935-6.

The University of Mississippi

National Center for Natural Products Research

Epígrafe

“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos”

(Albert Einstein)

RESUMO

ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral.** 2012. 230f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Sabe-se que micro-organismos são vistos como promissoras fontes de moléculas bioativas, incluindo-se nesse grupo fungos endofíticos e também entomopatogênicos. Desse modo, foram selecionados o fungo entompatogênico *Beauveria bassiana* e o fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus*. Numa primeira etapa foram prospectadas condições de cultivo favoráveis à obtenção de metabólitos secundários com atividade biológica. Este trabalho foi guiado por ensaios biológicos e análises cromatográficas. As frações obtidas nos cultivos de escala ampliada foram submetidas a ensaios biológicos (leishmanicida, antimalárico, antimcrobiano e citotóxico). As frações diclorometânicas e em acetato de etila de ambos os fungos apresentaram resultados promissores em ensaios antitumorais e leishmanicidas. Em seguida, estas frações foram submetidas a processos cromatográficos que permitiram o isolamento de substâncias, cujas estruturas químicas foram elucidadas por meio do uso de técnicas de RMN, espectrometria de massas, UV, IV, rotação óptica (α_D) e difração de raio-X. A partir de cultivos de *B. bassiana* foram obtidos compostos da classe das piridonas: piridovericina, piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) e 15-desóxi-piridovericina, sendo os dois últimos inéditos; e das aloxazinas: 7,8-dimetilaloxazina (lumicromo) e 1-metil-11-hidróxilumicromo, sendo este inédito. A partir dos cultivos de *M. indicus* foram obtidas substâncias de duas classes: cromenos e azafilonas. Neste trabalho foram isolados derivados cromenos: eugenitina, 6-metóxieugenina e 9-hidróxieugenina, os quais têm sido isolados de uma ampla variedade de plantas e fungos. As azafilonas são uma classe estruturalmente diversa de metabólitos fúngicos, conhecidos pigmentos com estrutura pirano-quinona que contêm um núcleo bicíclico altamente oxigenado e um centro quiral quaternário. Foram obtidas duas azafilonas conhecidas: austidiol e austidiol diacetato (produto de acetilação); e três azafilonas inéditas: dímero de austidiol, austidiol diidroisocumarina e austidiol cromeno. As três azafilonas inéditas de *M. indicus* apresentam um padrão não usual de conexão entre dois policetídeos aromáticos, uma ponte metilênica. O isolamento de tais moléculas reforça a hipótese de que a biossíntese ocorra com a participação de uma molécula de formaldeído. As substâncias purificadas foram submetidas aos ensaios biológicos para confirmar o potencial de suas frações geradoras. No ensaio citotóxico as azafilonas austidiol e austdiol diacetato e a piridona piridovericina mostraram-se ativas contra as linhagens tumorais avaliadas, embora em concentrações superiores aos padrões utilizados. Além disso, apresentaram algum grau de seletividade (não tóxicas para linfócitos humanos). Também nos ensaios leishmanicidas, austidiol, austidiol diacetato e piridovericina mostraram-se ativos, embora em níveis inferiores aos leishmanicidas padrões. De modo que, pode-se considerar que as azafilonas e piridonas são bons compostos líderes para a busca de agentes citotóxicos e leishmanicidas, uma vez que estas classes de compostos possuem dinamicidade biológica. Por fim, o isolamento e elucidação de novos metabólitos das classes azafilonas e piridonas contribuem para o enriquecimento destas importantes classes de metabólitos fúngicos, ao mesmo tempo, que evidenciam a importância dos fungos endofíticos e entomopatogênicos na química de produtos naturais.

Palavras-chave: Aloxazinas, azafilonas, *Beauveria bassiana*, cromenos, *Mycoleptodiscus indicus* e piridonas.

ABSTRACT

ANDRIOLI, W. J. **Optimization of culture conditions of *Beauveria bassiana* and *Mycoleptodiscus indicus* aiming the production of metabolites with antimicrobial, antitumor and antiparasitic activity.** 2012. 230l. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012

It is known that microorganisms are considered as promising source of bioactive molecules and endophytic and entomopathogenic fungi are included in this group. Therefore, we selected the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the endophytic fungus *Mycoleptodiscus indicus* to initiate the prospection aiming to determine the favorable growing conditions to obtain secondary metabolites with biological activity. This work was guided by biological assays and chromatographic analysis. The fractions obtained in the cultivation in a large scale were subjected to biological tests (leishmanicidal, antimalarial, antimicrobial and cytotoxic). The dichloromethane and ethyl acetate fractions of both fungi showed promising results in antitumor and leishmanicidal assays. Then, these fractions were subjected to chromatographic processes that allowed the isolation of compounds whose chemical structures were elucidated through the use of NMR techniques, mass spectrometry, UV, IR, αD, and X-ray diffraction. From cultures of *B. bassiana* were obtained compounds from the pyridone class: pyridovericin, pyridovericin-N-*O*-(4-*O*-methyl-*β*-D-glucopyranoside) and pyridovericin-15-deoxy, being the latter two novel compounds; and alloxazine class: 7,8-dimethylalloxazine (lumichrome) and 1-methyl-11-hydroxylumichrome, being this last one unprecedented. From *M. indicus* cultures were obtained compounds from two classes: azaphilone and chromene. In this thesis we report the derivatives eugenitin, 6-methoxyeugenin and 9-hydroxyeugenin, which have been isolated from a wide variety of plants and fungi. Azaphilones are a class of structurally diverse fungal metabolites, known pigments with pyran-quinone structure and contains a highly oxygenated bicyclic core and a chiral quaternary center. Then, we obtained two known azaphilones: austdiol and austdiol diacetate (product of acetylation), and three unprecedent azaphilones: austdiol dimer, austdiol dihydroisocoumarin and austdiol chromen. The three new azaphilones from *M. indicus* have an unusual pattern of connection between two aromatic polyketides, a methylene bridge. The isolation of these molecules reinforces the hypothesis that the biosynthesis occurs with the participation of one formaldehyde molecule. The purified compounds were submitted to biological assays. In the cytotoxic assay the azaphilones austdiol and austdiol diacetate, and the pyridone pyridovericin displayed activity against tumor cell lines, although at higher concentrations than the standard compounds used. Moreover, there was some degree of selectivity, since the assayed compounds were not toxic to human lymphocytes. Also in leishmanicidal assays, austdiol, austdiol diacetate and pyridovericin displayed activity, although at levels lower than leishmanicidal standards. Thereby, it can be considered that azaphilone and pyridone compounds are good leader compounds to search for cytotoxic and leishmanicidal agents, since these classes of compounds have biological dynamicity. Finally, the isolation and elucidation of new metabolites belonging to azaphilone and pyridone classes contribute to the enrichment of these important fungal metabolites and, likewise, this study demonstrates the importance of endophytic and entomopathogenic fungi in natural products chemistry.

Keywords: Alloxazines, azaphilones, *Beauveria bassiana*, chromenes, *Mycoleptodiscus indicus* and pyridones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais. 2

Figura 2. Metabólitos microbianos utilizados na clínica e seus respectivos micro-organismos produtores. 4

Figura 3. Metabólitos isolados de culturas de *Beauveria bassiana*. 6

Figura 4. Metabólitos isolados de culturas de *Beauveria bassiana*. 7

Figura 5. a) Colônia de cresicmento de *M. indicus* **b)** Esporodóquio de *M. indicus*. 8

Figura 6. Esquema de fracionamento da fração BbA60DCM. 25

Figura 7. (A) Cromatogramas da Fr6.2.1 e **(B)** da substância Fr6.2.1 (251 mm). 29

Figura 8. Esquema de fracionamento da fração BbA60EtOAc. 30

Figura 9. Cromatograma em CLAE de 1-metil-11-hidróxilumicromo **(A)** e 7,8-dimetilloxazina **(B)** (251 mm). 33

Figura 10. Esquema de fracionamento da fração BbLEtOAc. 34

Figura 11. (A) Cromatograma em CLAE das frações agrupadas; **(B)** piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) (em 251 mm). 36

Figura 12. Esquema de fracionamento da fração MiHex (9835 mg). 38

Figura 13. Solubilização em MeOH e centrifugação amostra MiDCM. 39

Figura 14. Esquema de fracionamento da fração MiDCM precipitado. 40

Figura 15. Esquema de fracionamento da fração MiDCM solúvel. 42

Figura 16. Solubilização em MeOH e centrifugação amostra MiEtOAc. 45

Figura 17. Esquema de fracionamento da fração MiEtOAc precipitado. 46

Figura 18. Esquema de fracionamento da fração MiEtOAc MeOH solúvel. 48

Figura 19. Aloxazinas e piridonas isoladas de cultivos de *B. bassiana* 52

Figura 20. Exemplos de piridonas produzidos planta (ricinina) e por fungos. 53

Figura 21. Exemplos de piridonas com atividades biológicas. 54

Figura 22. Estrutura de piridovericina isolada de *B. bassiana*. 55

Figura 23. Experimentos de ^{1}H — ^{1}H COSY e HMBC de piridovericina. 56

Figura 24. Piridonas inéditas de *B. bassiana*. 60

Figura 25. Derivados aloxazina isolados de cultivos de *B. bassiana*. 63

Figura 26. Correlações de HMBC 1-metil-11-hidróxilumicromo. 64

Figura 27. Azafilonas e cromenos isolados de cultivos de *M. indicus*. 64

Figura 28. Estrutura dos cromenos isolados a partir de *M. indicus*. 65

Figura 29. Correlações do mapa de contornos HMBC de eugenitina 66

Figura 30. Correlações do mapa de contornos HMBC de 6-metóxieugenina. 67

Figura 31. Correlações do mapa de contornos HMBC de 9-hidróxieugenina. 68

Figura 32. Biogênese de cromenos. 70
Figura 33. Estrutura das azafilonas: austidiol e austidiol diacetato. 75
Figura 34. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol. 76
Figura 35. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol diacetato. 77
Figura 36. Biogênese de austidiol. 80
Figura 37. Estrutura da azafilona dímero de austidiol. 82
Figura 38. Representação ORTEP da estrutura do cristal de dímero de austidiol. 85
Figura 39. Estrutura da azafilona austidiol diidroisocumarina. 86
Figura 40. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol diidroisocumarina. 89
Figura 41. Estrutura da azafilona austidiol cromeno. 90
Figura 42. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol cromeno. 93
Figura 43. Aspergilonas A e B isoladas de *Aspergillus* sp. 94
Figura 44. Estruturas de xilocetal B e F isolados de *Xylaria* sp. 95
Figura 45. Espectro de RMN ^{1}H - eugenitina (DMSO-d_6., 400 MHz). 125
Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C - eugenitina (DMSO-d_6, 100 MHz). 126
Figura 47. Mapa de contornos HMQC – eugenitina (DMSO-d_6). 127
Figura 48. Mapa de contornos HMBC– eugenitina (DMSO-d_6). 128
Figura 49. Espectro de massas eugenitina 129
Figura 50. Espectro de RMN ^{1}H – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6, 400 MHz). 130
Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6, 100 MHz). 131
Figura 52. Mapa de contornos HMQC – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6) 132
Figura 53. Mapa de contornos HMBC – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6). 133
Figura 54. Espectro de massas 6-metóxieugenina 134
Figura 55. Espectro de RMN ^{1}H – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6, 400 MHz). 135
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6, 100 MHz). 136
Figura 57. Mapa de contornos HMQC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6). 137
Figura 58. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6) 138
Figura 59. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6). 139
Figura 60. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6). 140
Figura 61. Espectro de massas 9-hidróxieugenina 141
Figura 62. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol (DMSO-d_6, 400 MHz). 142
Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol (DMSO-d_6, 100 MHz). 143
Figura 64. Mapa de contornos HMQC – austidiol (DMSO-d_6). 144
Figura 65. Mapa de contornos HMBC – austidiol (DMSO-d_6). 145
Figura 66. Espectro de massas austidiol. 146

Figura 67. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diacetato ($CDCl_3$ - 400 MHz). 147
Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol diacetato ($CDCl_3$ - 400 MHz). 148
Figura 69. Mapa de contornos HMQC – austidiol diacetato ($CDCl_3$). 149
Figura 70. Mapa de contornos HMBC – austidiol diacetato ($CDCl_3$).....150
Figura 71. Espectro de masas austidiol diacetato. 151
Figura 72. Espectro de RMN ^{1}H – dímero de austidiol (DMSO-d_6, 400 MHz).....152
Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C – dímero de austidiol (DMSO-d_6, 100 MHz). 153
Figura 74. Espectro de RMN DEPT – dímero de austidiol (DMSO-d_6, 100 MHz).....154
Figura 75. Mapa de contornos HMQC – dímero de austidiol (DMSO-d_6). 155
Figura 76. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol (DMSO-d_6). 156
Figura 77. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol (DMSO-d_6). 157
Figura 78. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol (DMSO-d_6). 158
Figura 79. Espectro de massas dímero de austidiol.....159
Figura 80. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).....160
Figura 81. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).....161
Figura 82. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).....162
Figura 83. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).....163
Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 100 MHz).....164
Figura 85. Mapa de contornos COSY – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD, 400 MHz)..165
Figura 86. Mapa de contornos COSY – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD, 400 MHz)..166
Figura 87. Mapa de contornos HMQC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).....167
Figura 88. Mapa de contornos HMQC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).....168
Figura 89. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).....169
Figura 90. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).....170
Figura 91. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).....171
Figura 92. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).....172
Figura 93. Espectro de massas austidiol diidroisocumarina.....173
Figura 94. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 400 MHz) 174
Figura 95. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 400 MHz). 175
Figura 96. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 400 MHz) 176
Figura 97. Espectro de RMN DEPT austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 125 MHz).....177
Figura 98. Mapa de contornos HMQC – austidiol cromeno (DMSO-d_6). 178
Figura 99. Mapa de contornos HMBC – austidiol cromeno (DMSO-d_6).....179
Figura 100. Espectro de massas austidiol cromeno.....180
Figura 101. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina (DMSO-d_6 - 400 MHz).....181

Figura 102. Espectro de RMN ^{13}C – piridovericina (DMSO-d_6 - 100 MHz).....182
Figura 103. Mapa de contornos HMQC – piridovericina (DMSO-d_6).....183
Figura 104. Mapa de contornos HMBC – piridovericina (DMSO-d_6).....184
Figura 105. Mapa de contornos COSY – piridovericina (DMSO-d_6, 400 MHz).....185
Figura 106. Espectro de massas de piridovericina. 186
Figura 107. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).....187
Figura 108. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).....188
Figura 109. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).....189
Figura 110. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).....190
Figura 111. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).....191
Figura 112. RMN NOESY 1D – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz). 192
Figura 113. RMN TOCSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz). 193
Figura 114. RMN de ^{13}C – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 100 MHz). 194
Figura 115. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6, 400 MHz).....195
Figura 116. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6, 400 MHz).....196
Figura 117. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6, 400 MHz).....197
Figura 118. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....198
Figura 119. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....199
Figura 120. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....200
Figura 121. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....201
Figura 122. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....202
Figura 123. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....203
Figura 124. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).....204
Figura 125. Espectro de massas de piridovericina-Glc. 205
Figura 126. Espectro de RMN ^{1}H – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4 - 400 MHz). 206
Figura 127. Espectro de RMN ^{1}H – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4 - 400 MHz). 207
Figura 128. Espectro de RMN ^{1}H – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4 - 400 MHz). 208
Figura 129. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4). 209
Figura 130. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4). 210
Figura 131. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4). 211
Figura 132. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).....212
Figura 133. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).....213
Figura 134. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d).....214
Figura 135. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).....215
Figura 136. Espectro de massas de 15-desóxi-piridovericina 216

Figura 137. Espectro de RMN ^{1}H – 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 400 MHz).217

Figura 138. Espectro de RMN ^{13}C – 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 100 MHz).....218

Figura 139. Espectro de RMN DEPT 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 125 MHz).....219

Figura 140. Mapa de contornos COSY - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 400 MHz).....220

Figura 141. Mapa de contornos HMQC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 400 MHz).....221

Figure 142. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6).....222

Figura 143. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6).....223

Figura 144. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6).....224

Figura 145. Espectro de massas de 1-metil-11-hidróxilumicromo. 225

Figura 146. Espectro de RMN ^{1}H – 7,8-dimetilaloxazina (DMSO-d_6 - 400 MHz). 226

Figura 147. Espectro de RMN ^{13}C –7,8-dimetilaloxazina (DMSO-d_6 - 100 MHz). 227

Figura 148. Mapa de contornos HMQC – 7,8-Dimetilaloxazina (DMSO-d_6). 228

Figura 149. Espectro de massas de 7,8-dimetilaloxazina.....229

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento das frações dos cultivos em escala ampliada. 17
Tabela 2. Cromatografia em coluna (CC) - BbA60DCM5 (182 mg)..... 26
Tabela 3. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM5 (182 mg)..... 26
Tabela 4. Cromatografia em coluna (CC) - BbADCM6 (182 mg)..... 27
Tabela 5. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM6 (562 mg)..... 28
Tabela 6. Cromatografia em coluna (CC) – BbAEtOAc5 (462 mg)..... 31
Tabela 7. Agrupamento das frações obtidas por CC – BbAEtOAc5 (462 mg)..... 31
Tabela 8. Cromatografia em coluna (CC) - BbAEtOAc6 (239 mg)..... 32
Tabela 9. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM6 (239 mg)..... 32
Tabela 10. Cromatografia em coluna (CC)- BbL21EtOAc5 (293 mg). 35
Tabela 11. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbL21EtOAc5 (293 mg)..... 35
Tabela 12. Cromatografia em coluna (CC) - BbL21EtOAc7 (200 mg). 36
Tabela 13. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbL21EtOAc7 (200 mg)..... 37
Tabela 14. Cromatografia em coluna (CC) - MiDCM ppt (3870 mg)..... 40
Tabela 15. Cromatografia em coluna (CC) - fração MiDCM5 (461 mg)..... 43
Tabela 16. Agrupamento das frações obtidas por CC – MiDCM5 (461 mg)..... 43
Tabela 17. Cromatografia em coluna (CC) - MiDCM6 (220 mg)..... 44
Tabela 18. Agrupamento das frações obtidas por CC - MiDCM6 (220 mg). 44
Tabela 19. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc ppt (2420 mg)..... 46
Tabela 20. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc6-7 (830 mg). 49
Tabela 21. Agrupamento das frações obtidas por CC –MiEtOAc6-7 (461 mg). 49
Tabela 22. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc8 (300 mg)..... 50
Tabela 23. Agrupamento das frações obtidas por CC – MiEtOAc8 (300 mg)..... 50
Tabela 24. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de piridovericina..... 57
Tabela 25. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de piridovericina-Glc e 15-desóxi-piridovericina..... 61
Tabela 26. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC 7,8-dimetilaloxazina e 1-metil-11-hidróxilumicromo. 63
Tabela 27. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC dos cromenos isolados..... 69
Tabela 28. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de austidiol e austidiol diacetato..... 79
Tabela 29. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de dímero de austidiol. 83
Tabela 30. Distâncias de ligação (Å) e ângulos (deg) para o austidiol e dímero de austidiol. 84

Tabela 31. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de austidiol diidroisocumarina. 88
Tabela 32. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de austidiol cromeno. 92
Tabela 33. Ensaio de atividade citotóxica *in vitro*. 95
Tabela 34. Ensaio de atividade citotóxica *in vitro*. 97
Tabela 35. Ensaio cinético de inibição de GAPDH – *T. cruzi*. 99
Tabela 36. Ensaio cinético de inibição de LtAPRT – *L. tarentolae*. 100
Tabela 37. Ensaio leishmanicida para determinação de DL_{50} – *L. major*. 100
Tabela 38. Ensaio cinético de inibição de (*p*LDH) – *P. falciparum*. 101
Tabela 39. Ensaio antileishmania - *Leishmania donovani*. 102
Tabela 40. Ensaio antileishmania secundário CI_{50} e CI_{90} – *L. donovani*. 103
Tabela 41. Ensaio antileishmania secundário CI_{50} e CI_{90} - *Leishmania donovani*. 103
Tabela 42. Ensaio de atividade antimicrobiana – antibacteriana e antifúngica. 105
Tabela 43. Ensaio secundário de atividade antimicrobiana – antibacteriana e antifúngica... 107
Tabela 44. Ensaios antimicrobianos com substâncias controle. 107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APRT	Adenina fosforribosil transferase
ATCC	American Type Culture Collection
BuOH	Butanol
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
CBM	Concentrações bactericidas mínimas
CFM	Concentrações fungicidas mínimas
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI-TOF	Electron Spray Ionization – Time of Flight
EtOAc	Acetato de etila
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Hex	Hexano
IV	Infra-vermelho
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
LDH	Lactato desidrogenase parasítica
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazo-2-il)-2,5 difeniltetrazólio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
s	Singleto
d	Dubleto

dd	Duplo dupleto
t	Tripleto
q	Quadrupleto
J	Constante de acoplamento (Hz)
UV	Ultra-violeta
$[\alpha_D]$	Rotação óptica
δ_C	Deslocamento químico de carbono (ppm)
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio (ppm)

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
LISTA DE FIGURAS ..... **iii**
LISTA DE TABELAS ..... **viii**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **x**

1. INTRODUÇÃO **1**
1.1 Produtos Naturais 1
1.2 Micro-organismos 3
1.3 *Beauveria bassiana* 5
1.4 *Mycoleptodiscus indicus* 7

2. OBJETIVOS **10**

3. EXPERIMENTAL **11**
3.1 Micro-organismos: identificação e manutenção de estoque 11
3.2 Produção dos metabólitos em meio fermentativo líquido 11
3.3 Produção de metabólitos em meio fermantativo sólido 12
3.4 Obtenção dos extratos e frações 12
3.5 Ampliação de escala 13
3.6 Análise cromatográfica 15
3.7 Extratos e frações – escala ampliada 17
3.8 Ensaios Biológicos – NCNPR – University of Mississippi 17
3.9 Ensaios Biológicos – Grupos de pesquisa do Brasil 19
3.10 Procedimentos gerais de isolamento 22
3.11 Fracionamento das frações obtidas em escala ampliada – *Beauveria bassiana* 24
3.12 Fracionamento das frações obtidas em escala ampliada – *Mycoleptodiscus indicus.* 37
3.13 Análise Orgânica. 50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **52**
4.1 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas – *Beauveria bassiana.* 52
4.2 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas – *Mycoleptodiscus indicus* 64
4.3 Ensaios Biológicos de Frações e Substâncias Purificadas. 95

5. CONCLUSÃO **109**

6. REFERÊNCIAS **110**

ANEXO **124**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

O uso de produtos naturais como agentes terapêuticos na medicina moderna tem declinado bruscamente nas últimas décadas, principalmente do século passado. No entanto, pesquisas por moléculas naturais bioativas (animais, micro-organismos e plantas) ainda desempenham um papel imprescindível na prospecção de novos agentes terapêuticos. Com o emprego de técnicas modernas, instrumentação e automação no isolamento e elucidação estrutural, a humanidade tem em mãos um enorme e diversificado banco de produtos naturais. Em paralelo, a biologia tem contribuído com enorme progresso para a expansão das fronteiras do conhecimento. Uma interface destas duas áreas do conhecimento constitui uma valiosa mola propulsora na pesquisa dos compostos elaborados pela natureza (Dev, 2010).

A importância dos produtos naturais tem sido amplamente discutida em diversas revisões. O valor dos produtos naturais pode ser mensurado usando três critérios: (1) o nível de introdução de novas entidades químicas de ampla diversidade estrutural, incluindo aquelas que servem como protótipo para compostos semissintéticos e sintéticos, (2) o número de doenças tratadas ou prevenidas por estas substâncias, e (3) sua frequência de uso para o tratamento de doenças (Chin *et al*., 2006)

Uma análise da origem de medicamentos desenvolvida entre 1981 e 2002 mostrou que os produtos naturais ou medicamentos derivados de produtos naturais abrangeram 28% de todas as novas entidades químicas (NEQ) lançadas no mercado. Em adição, 24% destas novas entidades químicas eram compostos sintéticos ou imitações de produtos naturais, baseados no estudo de grupos farmacofóricos relacionados aos produtos naturais. Esta porcentagem combinada (52% de todos os NEQs) sugere que os produtos naturais são importantes fontes para novos fármacos e também são excelentes compostos protótipos, apropriados para processos de modelagem molecular durante o desenvolvimento de medicamentos. A vasta proporção de produtos naturais na descoberta de fármacos tem surgido de diversas estruturas e intrincados esqueletos carbônicos. Metabólitos secundários de fontes naturais são elaborados dentro de sistemas vivos e frequentemente concebidos como sendo mais "fármaco-semelhante" e tendo maior efeito biológico quando comparado a moléculas totalmente sintéticas, o que faz deles bons candidatos para o desenvolvimento de outros fármacos (Chin *et al*., 2006).

Uma avaliação minuciosa das indicações médicas observando as origens dos compostos utilizados tem demonstrado que os produtos naturais e fármacos relacionados são usados para tratar 87% de todas as categorias de doenças humanas (48/55), incluindo antimicrobianos,

anticancerígenos, anticoagulantes, antiparasitários, agentes imunossupressores, entre outros. Não havia relatos sobre produtos naturais e fármacos relacionados para outras sete categorias (anestésicos, antiangina, anti-histamínicos, ansiolíticos, queladores e antídotos, diuréticos e hipnóticos) de 1981 a 2002. No caso de agentes antimicrobianos, produtos naturais têm dado grande contribuição no direcionamento de tratamentos ou como base para processos de modificação via síntese. Dos 90 fármacos deste tipo que se tornaram comercialmente disponíveis nos Estados Unidos ou foram aprovadas no mundo entre 1981 e 2002, cerca de 80% têm origem a partir de produtos naturais (Chin *et al*., 2006).

Newman e Cragg (2007) analisaram a origem de fármacos desenvolvidos e aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 e 2006 e concluíram que 63% das pequenas moléculas consideradas como novas entidades químicas apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Destes fármacos, 6% são totalmente originários de produtos naturais, 28% são derivados semissintéticos e 29% são derivados miméticos ou de síntese total, porém foram baseados nos grupos farmacofóricos de produtos naturais (Newman e Cragg, 2007).

Recentemente, Ganesan (2008) reavaliou os dados publicados por Newman e Cragg em 2007, aplicando filtros para analisar de fato as contribuições inovadoras dos produtos naturais na terapêutica após 1970. Desta análise resultaram 24 fármacos (produtos naturais ou derivados semissintéticos), dos quais 54% (n= 13) foram obtidos de actinobactérias de solo, 21% de plantas, 17% de fungos e 8% de bactérias. Estes dados demonstram o grande potencial dos micro-organismos como fonte de obtenção de novos produtos naturais com aplicação farmacêutica (**Figura 1**).

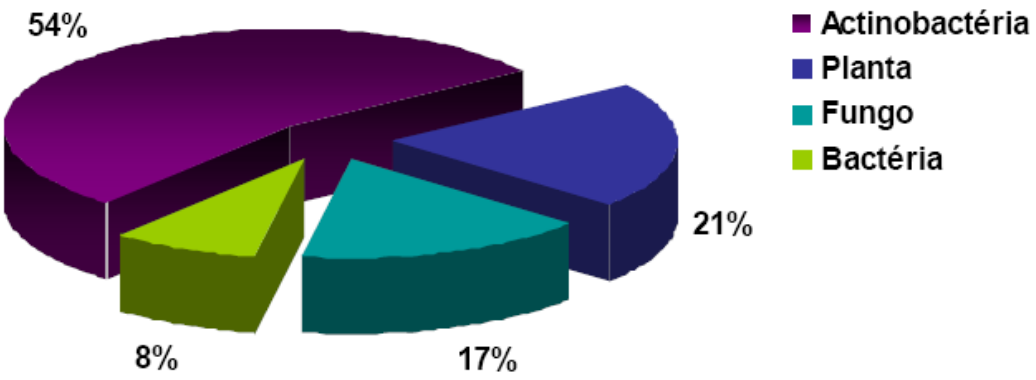


Figura 1. Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais.

A frequência do uso de produtos naturais no tratamento e/ou prevenção de doenças pode ser mensurado pelo número e/ou valor econômico das prescrições, a partir das quais a amplitude de preferência e/ou efetividade dos fármacos pode ser estimada indiretamente. De acordo com um estudo de Grifo e colaboradores (1997), 84 de um representativo grupo de 150 fármacos prescritos nos Estados Unidos caíram dentro da categoria de produtos naturais ou a esses relacionados. Elas foram prescritas predominantemente como: antialérgicos, agentes pulmonares/respiratórios, analgésicos, fármacos cardiovasculares e para doenças infecciosas. As vendas de duas categorias de agentes quimioterápicos derivados de plantas foram responsáveis por aproximadamente um terço do total das vendas mundiais de fármacos anticancer. Algo em torno de U$ 3 bilhões em 2002; isto é, os taxanos, paclitaxel e docetaxel, bem como os derivados de camptotecina, irinotecan e topotecan (Chin *et al*., 2006).

1.2 Micro-organismos

Até o desenvolvimento da penicilina no início dos anos 40, muitos dos fármacos derivados de produtos naturais foram obtidos de plantas. O sucesso da penicilina no tratamento de infecções levou a uma expansão na área de descoberta de fármacos a partir de micro-organismos. Micro-organismos terrestres são abundantes fontes de substâncias bioativas com diversidade estrutural, e têm provido ampla contribuição para a descoberta de agentes antimicrobianos incluindo penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas e policetídeos. Aplicação terapêutica de metabólitos de micro-organismos tem expandido para agentes imunossupressores (ciclosporinas e ripamicina), agentes redutores de colesterol (lovastatina e mevastatina), agentes antihelmínticos (ivermectina), um agente antidiabético (acarbose) e agentes anticancer (pentostatina, peplomicina e epirrubicina) (Chin *et al*., 2006).

Micro-organismos produzem alguns dos mais importantes medicamentos já desenvolvidos. Eles são fonte de tratamento para infecções fúngicas e bacterianas (ex., penicilina, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina, anfotericina), câncer (ex., daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina e bleomicina), imunossupressores (ex., ciclosporina, FK-506, ripamicina) e redutores de colesterol (ex., estatinas como lovastatina e mevastatina) (**Figura 2**). Os produtos naturais microbianos são notáveis não somente por seu potencial terapêutico, mas também pelo fato deles frequentemente possuírem propriedades farmacocinéticas desejáveis, as quais são requeridas para o desenvolvimento clínico (Farnet, 2005).

Fermentação microbiana é um método para produção comercial de certos produtos que são gerados em quantidades substanciais (Weiss e Edwards, 1980; Strhol, 1997; Leeper, 2000;

Liese *et al*., 2000; Schereiber, 2000). O mercado mundial de estatinas gira em torno de 15 bilhões de dólares. O total do mercado farmacêutico excede os 400 bilhões de dólares e continua a crescer mais rápido do que a média da economia mundial. Neste âmbito a biotecnologia está diretamente envolvida nos processos de produção de muitos destes fármacos (Gavrilescu e Chisti, 2005).

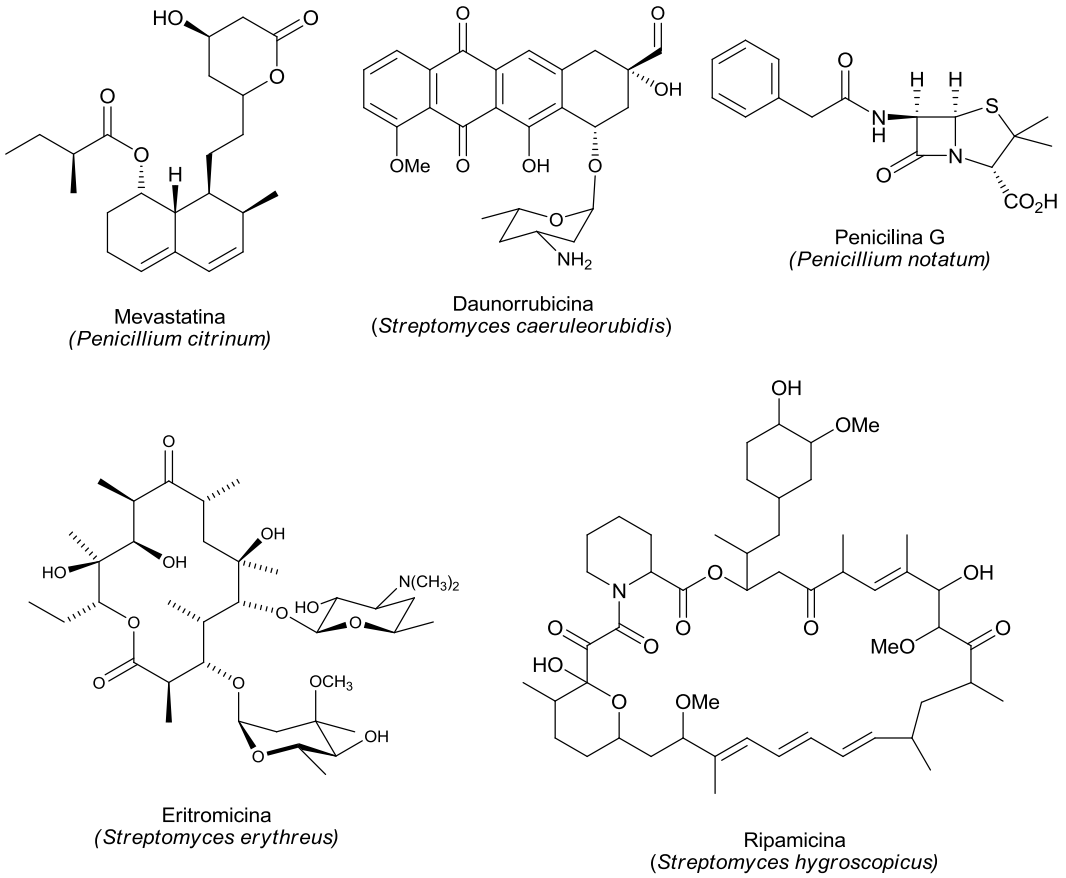


Figura 2. Metabólitos microbianos utilizados na clínica e seus respectivos micro-organismos produtores.

A introdução de antibióticos sulfonamidas nos anos 30 e da penicilina nos anos 40 revolucionou a prática médica pelo decréscimo dramático das taxas de mortalidade associadas a infecções bacterianas. Estas descobertas conduziram as pesquisas para novas classes de fármacos antimicrobianos conhecidos atualmente, sendo que muitos foram derivados de produtos naturais. Dado este sucesso, é surpreendente notar que apenas três novas classes de antimicrobianos, o antibiótico tópico mupirocina em 1985, a oxazolidinona linezolida em 2000 e o lipoptetídeo daptomicina em 2003, tenham entrado no mercado desde 1970. Entre 1986 e 2006 houve um declínio de 56% no número de antibióticos aprovados anualmente pelo Food na Drug Adminstration (FDA) e ao longo da década compreendida entre 1996 e 2006,

apenas 22 novos fármacos antimicrobianos foram lançados. Destes 12 foram derivados de produtos naturais pertencentes a cinco diferentes classes (*β*-lactama, estreptogramina, macrolídeos, tetraciclinas e daptomicinas), enquanto os 10 fármacos sintéticos lançados pertencem a apenas duas classes de antimicrobianos, sendo que nove pertencem a classes das quinolonas (Butler, 2006).

Os micro-organismos endofíticos são relativamente pouco estudados e considerados como fonte alternativa de grande potencial de produtos naturais, contribuindo na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas das mais variadas classes químicas com ação antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (Wiyarutta *et al*., 2004; Firáková *et al*., 2007; Gallo *et al*., 2008; Gallo *et al*., 2009).

A palavra endofítico é originária do grego (*éndon* + *phytón*), significando "dentro da planta". O termo abrange principalmente bactérias e fungos que convivem de forma simbiôntica com a planta hospedeira (Tan e Zou, 2001; Owen e Hundley, 2004; Schultz e Boyle, 2005; Firáková *et al*., 2007). A comunidade endofítica, ao contrário dos micro-organismos patogênicos, não causa fitopatogenias aparentes a seus hopedeiros, podendo ser patógenos latentes, mutualísticos, comensalistas e/ou saprofíticos (Bacon e White, 2000; Schultz e Boyle, 2005; Kogel *et al*., 2006). Os endófitos, com exceção dos transmitidos pelas sementes (transmissão vertical) penetram primariamente através da zona radicular, embora micro-organismos do ar possam utilizar aberturas naturais como estômatos e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (transmissão horizontal). Os micro-organismos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminarem pelo sistema vascular, alojando-se intra e/ou intercelularmente (Bacon e White, 2000; Zinniel *et al*., 2002; Saikkonen *et al*., 2004; Marinho *et al*., 2005).

1.3 *Beauveria bassiana*

Fungos patogênicos a insetos são um grupo de micro-organismos ecologicamente especializados e parecem ser uma interessante fonte de compostos biologicamente ativos como inseticidas (Roberts, 1981) e imunossupressores (Fujita *et al*., 1994; Iijima *et al*., 1992), pois todas as ordens de insetos são suscetíveis a infecções por fungos (Takahashi *et al*., 1998).

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é uma conhecida estratégia comercial para o controle biológico de importantes pragas da agricultura e de insetos vetores de doenças animais e humanas (Fan *et al*., 2011). Além do interesse como agente biológico para o controle de pragas, é conhecido que algumas linhagens de *B. bassiana* podem catalisar reações de hidroxilação, redução e oxidação (Olivo *et al*., 2003; Osorio-Lozada *et al*., 2008;

Zhan e Gunatilaka, 2008). Além de ser usado como agente microbiano para controle de pragas (insetos) por todo o mundo, *B. bassiana* tem provido praticamente o único controle microbiano contra gafanhotos, os quais são acometidos por poucas doenças bacterianas ou virais conhecidas (Mason e Erlandson, 1994; Lomer *et al*., 2001; Quesada-Moraga, 2002, *apud* Quesada-Moraga e Vey, 2004).

Fungos entomopatogênicos secretam ampla gama de metabólitos tóxicos em meios de cultura artificiais e, em poucos casos, *in vivo* (Mazet *et al*., 1994; Vey, 1998; Vey *et al*., 2001). Muitas das toxinas de fungos descritas são metabólitos secundários de baixo peso molecular (**Figura 3**), sobretudo peptídeos cíclicos, apresentando propriedades antibióticas ou inseticidas (Strasser *et al*., 2000; Vey *et al*., 2001, *apud* Quesada-Moraga e Vey, 2004).

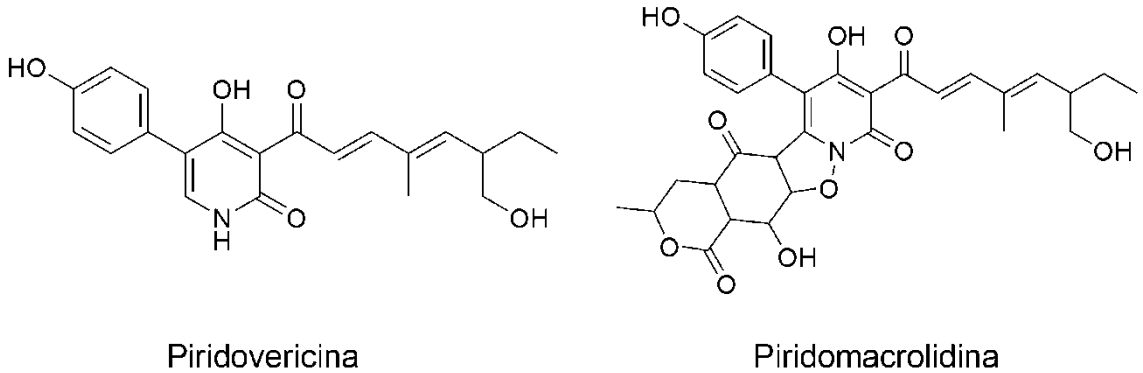
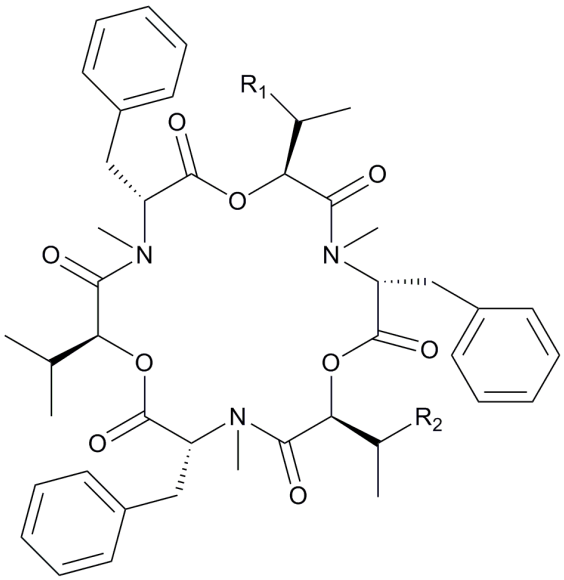
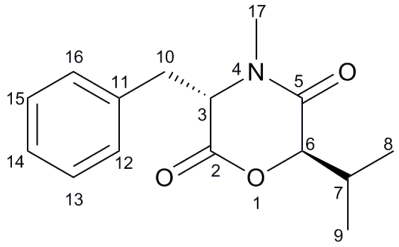


Figura 3. Metabólitos isolados de culturas de *Beauveria bassiana.*

Beauvericina e dois ciclodepsipeptídeos análogos, beauvericina A e beauvericina B, contendo ácido 2-hidróxi-3-metilfenilpentanóico como um de seus resíduos constituintes foram isolados como os principais componentes tóxicos para insetos a partir de extratos do fungo *Beauveria bassiana* (**Figura 4**). A toxina ciclodepsipeptídeo (beauvericina) é conhecida por ser produzida por diversos fungos, incluindo *Beauveria bassiana* (hifomiceto), a qual apresenta atividade frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Gupta *et al*., 1995).

Um inibidor de agregação plaquetária, bassiatina, foi obtido de caldos de cultivo de *Beauveria bassiana,* o qual foi isolado de amostra de solo coletada na província de Yunna, China. A estrutura da bassiatina foi determinada como (3*S*,6*R*)-4-metil-6-(1-metiletil)-3-fenilmetil-1,4-peridroxazina-2,5-diona (**Figura 4**). A substância inibiu a agregação de plaquetas de coelhos ADP-induzida com CI_{50} de 1.9 x 10^{-4} M (Kagazimono *et al*., 1995).





Beauvericina $R_1=R_2= CH_3$
Beauvericina A $R_1= CH_2CH_3$, $R_2= CH_3$
Beauvericina B $R_1=R_2= CH_2CH_3$

Figura 4. Metabólitos isolados de culturas de *Beauveria bassiana*.

1.4 *Mycoleptodiscus indicus*

Mycoleptodiscus indicus é um fungo tropical ou subtropical de difícil cultivo e identificação, trata-se de um agente etiológico de feohifomicose associado com plantas que em condições ideais causa infecção subcutânea em pacientes imunocomprometidos. *M. indicus* é uma espécie que ocorre em folhas de plantas hospedeiras, principalmente, mas não exclusivamente em monocotiledôneas (Sutton, 1973). O fungo produz esporodóquios e não escleródios em meio de cultura ou em substrato natural, assim como fazem outras espécies de *Mycoleptodiscus*, *M. terrestris* e *M. sphericus* (Ellis, 1976; Ostazeski, 1967; Sutton, 1973). Esporodóquios de *M. indicus* estão associados com amplas lesões em folhas de *Zamia* spp (Cycadófita americana) e em outras plantas monocotiledôneas. *Zamia* é um gênero de cerca de 40 espécies de pequenas plantas classificadas na família *Zamiaceae* da classe *Cycadophyta* das gimnospermas. Estas pequenas plantas são encontradas ao longo da costa da Carolina do Sul, Flórida, México, e ao norte e noroeste da América do Sul. Também está presente na Índia, Sudeste da Ásia e partes da África. *M. indicus* tem sido isolado em culturas a partir de lesões em folhas de *Zamia* ssp. As culturas em extrato malte desenvolveram esporodóquios e conídios após diversas semanas de tratamento com UV, mas a produção de esporodóquios e conídios não foram consistentes (Padhye *et al*., 1995)

No Canadá foi reportado um caso de artrite séptica causada pelo fungo. A infecção fúngica foi contraída durante as férias na Costa Rica, provavelmente através da inoculação direta na pele lesionada. O fungo foi isolado do fluído sinovial e a identificação confirmada pela sequência de DNA. Houve apenas um caso prévio de artrite séptica de joelho (homem de 72 anos na Carolina do Norte) e uma infecção de pele reportada para este fungo. Os casos envolveram pacientes imunossuprimidos. Ambos os pacientes com artrite séptica precisaram de cirurgia na articulação e lavagem para remoção do fungo. No futuro, é muito provável que o número de pacientes infectados com *M. indicus* aumente devido ao maior contato com este patógeno. Presume-se que estas infecções sejam adquiridas pela implantação traumática do fungo (Dewar e Sigler, 2010).

A identificação de *M. indicus* é difícil, sendo que a característica fenotípica mais importante inclui a presença de apressórios (**Figura 5**), fiálides escuras, células conidiogências com proeminências e agregadas dentro da massa esporodoquial, hialina e conídios curvados.

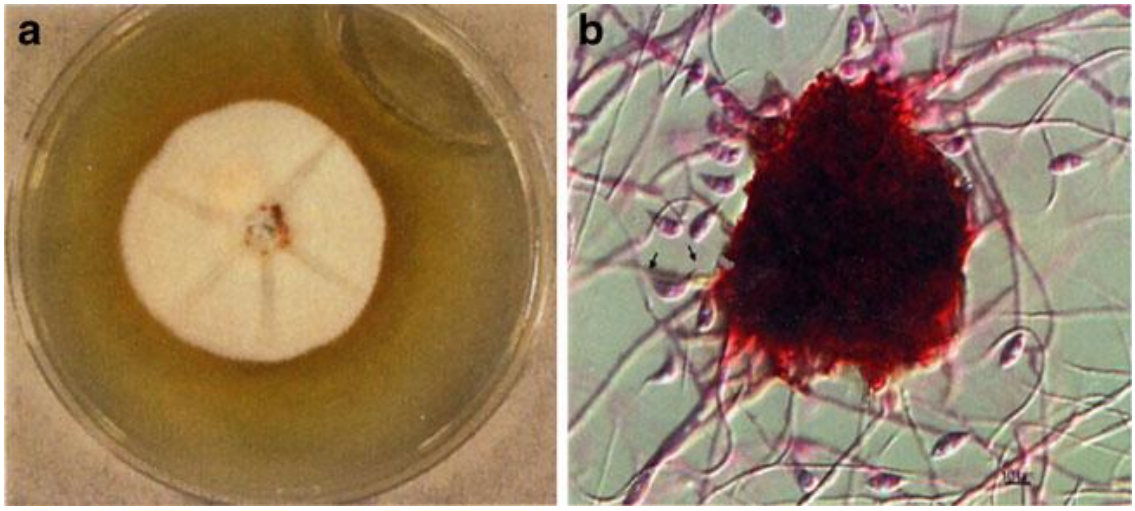


Figura 5. a) Colônia de cresicmento de *M. indicus* **b)** Esporodóquio de *M. indicus*.

A cepa de *M. indicus* utilizada nesta tese foi isolada como um fungo endofítico de folhas de *Borreria verticillata*, uma erva anual ou perene, subarbusto ramoso com hastes subangulosas, com 15-60 cm de altura, flores pequenas branco-esverdeadas e dispostas em densas inflorescências capituliformes, folhas simples, lineares ou lanceoladas de quase 1 a 3 cm de comprimento dispostas em verticilos e frutos aquênios oblongos de cor marromesverdeada (Corrêa, 1978; Braga, 2001; Porto *et al.*, 2004). Esta planta ocorre em todo território brasileiro, principalmente na orla marítima, conhecida popularmente como vassourinha-de-botão nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e, em outras regiões, por outros

nomes populares como falsa-poaia, poaia-preta, erva-botão, perpétua-do-mato, cordãozinho-de-frade e erva-de-largato (Lorenzi, 1991; Vieira *et al.*, 1999; Braga, 2001). *B. verticillata* apresenta ação diurética, abortiva e vomitiva e é utilizada no tratamento de diversas enfermidades e infecções como: leucorréias; blenorréias; diarréias; esquistossomose e doenças de pele (Baldé *et al*., 1991; Burkill, 2000; Lorenzi e Matos, 2002; Sá Peixoto Neto *et al*., 2002; Gazzaneo *et al*., 2005).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho de doutorado estão listados abaixo e foram ajustados de acordo com a evolução dos experimentos:

- Otimização das condições de cultivo de *Beauveria basssiana* e *Mycoleptodiscus indicus* (escala analítica) para a produção de moléculas com atividades biológicas: antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral;
- Avaliação preliminar *in vitro* das atividades biológicas dos extratos e das frações;
- Ampliação de escala dos cultivos selecionados;
- Avaliação preliminar *in vitro* das atividades biológicas dos extratos e das frações obtidas dos cultivos em escala ampliada;
- Isolamento de metabólitos secundários, uilizando-se diferentes modalidades cromatográficas, dos extratos e frações obtidas a partir dos cultivos em escala ampliada, como parte do Estágio Sanduíche no National Center for Natural Products Research – University of Mississippi – United States of America;
- Elucidação estrutural das substâncias isoladas utilizando-se técnicas de RMN de ^{1}H e ^{13}C, DEPT, HMBC, HMQC, COSY, TOCSY e NOESY, bem como de dados de espectrometria de massas, difração de Raio-X, infravermelho, ultravioleta, ponto de fusão e rotação óptica;
- Realização de ensaios biológicos (antitumoral, antiparasitário e antimicrobiano) com frações e/ou substâncias isoladas.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Micro-organismos: identificação e manutenção de estoque

O fungo *Beauveria bassiana* foi gentilmente cedido pela Profª. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As culturas do fungo são mantidas em ágar–Khanna em tubos de ensaio armazenados sob 4ºC. O fungo foi isolado de amostra de solo no município de Crato, Ceará, Brasil (7° 14′ 2″ S, 39° 24′ 32″ W) em Janeiro de 2006 e identificado como *Beauveria bassiana* com base na morfologia e análise da sequência da região ITS do rDNA (número de acesso no GenBank HQ665468).

O fungo *Mycoleptodiscus indicus* por sua vez, foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Janete Magali de Araújo do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. As culturas do fungo são mantidas em ágar-batata dextrose em tubos de ensaio armazenados à 4ºC e também em imersão em óleo mineral. O fungo foi isolado como um endófito da planta medicinal *Borreria verticillata* (L.) G. F. W. Meyer, que pertence à família *Rubiaceae,* nativa da América do Sul. Cinco espécimes de *B. verticillata* foram coletadas no período de floração no Estado do Pernambuco, Brasil (34º 56’ 57” W; 8º 2’ 53” S) em Janeiro de 2006. O isolado foi identificado como *M. indicus* baseado na análise da sequência da região ITS do rDNA (número de acesso no GenBank GU220382.1).

3.2 Produção dos metabólitos em meio fermentativo líquido

As culturas foram mantidas em sílica gel foram repicadas para placas de Petri contendo meio ágar-Khanna e mantidas em estufa durante sete dias à temperatura específica de 30°C. Para o processo de inoculação em meio fermentativo foram coletados a partir da cultura da placa de Petri com auxílio de dispositivo específico e estéril (transfertube), 10 segmentos de micélio–ágar (0.5 cm de diâmetro) contendo o fungo para cada 200 mL de meio fermentativo.

Os meios fermentativos avaliados foram: I - Extrato de Malte 1% (pH 6.2); II - Caldo Batata Dextrose (PDB – Potato Dextrose Broth), preparado conforme as instruções do fabricante e III - Czapek (Atlas, 1995). Estas culturas foram incubadas sob duas condições: em agitação e estacionária. As culturas em agitação foram incubadas sob 120 RPM e temperatura de 30ºC. Já as culturas em fase estacionária foram incubadas sob temperatura de 30ºC e permaneceram estáticas. As culturas em agitação foram submetidas à quatro tempos diferentes de cultivo: 7, 10, 15 e 20 dias. Por sua vez, os cultivos estáticos foram desenvolvidos por 21 dias.

Cabe ressaltar que as fermentações foram desenvolvidas em duplicata, bem como foram processados cultivos controle para efeito comparativo.

3.3 Produção de metabólitos em meio fermantativo sólido

As culturas mantidas em sílica gel foram repicadas para garrafas contendo meio ágar-Khanna e incubadas em estufa durante sete dias à temperatura específica de 30°C. Para o processo de inoculação em meio fermentativo foram coletados, a partir das garrafas com auxílio de solução Tween 2%, 10 mL de solução de esporos, que foram inoculados em 60 g do meio fermentativo sólido, o qual é descrito a seguir.

O meio sólido tem a seguinte composição: 2,5 g de peptona e 1,25 mL de solução de $MnCl_2$ (20 mg de $MnCl_2$/mL) em 280 mL de água deionizada estéril. Esta solução é utilizada para umedecer a mistura de 200 g de aveia e 200 g de arroz. Foram avaliados três diferentes períodos de cultivo: 30, 60 e 90 dias sob temperatura de 30ºC. Os cultivos foram processados em duplicata e, da mesma forma, cultivos controles também foram desenvolvidos.

3.4 Obtenção dos extratos e frações

3.4.1 Fermentação em meio líquido

Para o processo de obtenção dos extratos da fermentação em meio líquido foi promovido tratamento prévio à extração. Cinco dias antes do encerramento do cultivo foram adicionadas de forma asséptica aos frascos das culturas 10 g da resina Diaion HP–20 (Supelco) estéril, empacotadas em bolsas de papel de filtro. As culturas foram mantidas em agitação até o tempo final de cultivo para subseqüente extração, no caso das culturas sob agitação. Por sua vez, as culturas em fase estacionária foram mantidas estáticas até o tempo final de cultivo. A resina tem por finalidade adsorver metabólitos gerados no processo fermentativo.

Com relação ao processo extrativo, as bolsas de papel de filtro contendo a resina HP–20 foram lavadas com água deionizada. Os compostos adsorvidos à resina foram extraídos com etanol 95% por meio de sonicação durante 30 minutos e filtrados na sequência (processo extrativo desenvolvido em duplicata). Por fim, os extratos etanólicos foram concentrados sob vácuo.

Para extração dos metabólitos remanescentes no meio líquido e daqueles contidos na massa micelial foram adicionados 200 mL de etanol 95% aos 200 mL de cada meio fermentativo e, em seguida, estas soluções foram homogeneizadas em mixer, sonicadas por 15 minutos e filtradas sob vácuo. Posteriormente, foi adicionada água deionizada aos filtrados etanólicos até o volume final de 1 L. Em seguida, foram desenvolvidas partições com acetato

de etila (cultivos líquidos agitados) e com diclorometano e acetato de etila (cultivos líquidos estáticos), respectivamente, em duplicata, utilizando-se 300 mL de cada solvente. Por fim, as fases orgânicas foram concentradas a vácuo.

3.4.2 Fermentação em meio sólido

No processo de obtenção dos extratos dos cultivos em fase sólida foram adicionados 200 mL de etanol às massas fermentadas em cada frasco Erlenmeyer, até submersão das mesmas e os frascos foram mantidos em processo de maceração por 24 horas. Posteriormente a solução etanólica extratora foi filtrada e, em seguida, concentrada sob vácuo.

Os extratos foram suspendidos em solução água:metanol (9:1) e submetidos a partições com *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila, respectivamente, utilizando uma parte de solvente orgânico para quatro partes de fase aquosa. Por fim, as frações obtidas foram concentradas sob vácuo.

3.5 Ampliação de escala

3.5.1 *Beauveria bassiana*

Fermentação em meio líquido

Optou-se por desenvolver ampliação do cultivo em meio fermentativo líquido estático, utilizando o meio caldo batata dextrose (PDB). Para tal adotou-se a estratégia de aumento do número de frascos cultivados sem alteração das condições utilizadas na fase analítica. Foram cultivados 100 frascos tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de meio fermentativo caldo batata dextrose, sob temperatura de 30°C, durante 21 dias.

Para a obtencão do extrato do cultivo em fase estacionária, adiconou-se ao caldo de cultivo 200 mL de etanol, a solução foi homogeneizada em mixer e posteriormente filtrada sob vácuo. Em seguida, a porção etanólica foi evaporada sob vácuo e a fração aquosa remancescente foi submetida à partição com diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente, na proporção de uma parte de solvente orgânico para quatro partes de solução aquosa, em triplicata. As frações orgânicas foram concentradas a vácuo.

Fermentação em meio sólido

Como relatado na seção Resultados e Discussão, também optou-se por realizar ampliação de escala de uma condição da fermentação em meio sólido. De maneira semelhante à ampliação descrita acima foi desenvolvido cultivo sob as mesmas condições quando do processo analítico, mas utilizando-se de maior número de frascos cultivados. Para tanto foram

cultivados 100 frascos tipo Erlenmeyer contendo 60 g de meio fermentativo sólido cada, sob temperatura de 30°C, durante 60 dias.

A obtenção do extrato do cultivo em fase sólida se deu pela adição de 200 mL de etanol em cada frasco, até submersão das culturas e, em seguida, os frascos foram mantidos em processo de maceração por 24 horas. Posteriormente, a solução etanólica extratora foi filtrada e concentrada sob vácuo. O extrato foi suspenso em solução água:metanol (9:1) e particionado com os seguintes solventes orgânicos: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente, utilizando-se as proporções anteriormente mencionadas. O processo foi desenvolvido em triplicata e as frações orgânicas foram concentradas sob vácuo.

3.5.2 *Mycoleptodiscus indicus*

Pré-fermentação em meio líquido

O fungo endofítico *M. indicus* foi inoculado em placas de petri contendo PDA, incubado por sete dias a 30°C. Posteriormente, com auxílio do dispositivo transfertube estéril, foram transferidos dez segmentos de micélio-ágar (0,5 cm de diâmetro) contendo esporos do fungo para frascos tipo Erlenmeyer com 100 mL de PDB. Os frascos foram incubados em mesa agitadora INNOVA (120 RPM) sob 30°C, durante 48 horas. Com finalidade de obtenção de biomassa para o processo fermentativo.

Fermentação em meio líquido

Após a obtenção da biomassa em meio pré-fermentativo, com auxílio de pipeta estéril foram transferidos 10 mL da massa micelial para 90 mL do meio fermentativo (PDB). Foram cultivados 80 frascos, os quais foram incubados por cinco dias, sob agitação de 120 RPM a 30°C.

A obtenção do extrato se deu pela adição de 100 mL de etanol ao caldo de cultivo e, em seguida, a solução foi homegeneizada em mixer e filtrada sob vácuo. Posteriormente, a fração etanólica foi evaporada sob vácuo e a fração aquosa remanescente particionada com acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente, na proporção de uma parte de solvente orgânico para quatro partes de solução aquosa, processo este desenvolvido em triplicata. As frações orgânicas foram concentradas sob vácuo.

Fermentação em Meio Sólido

Para o processo de fermentação em meio sólido foi obtida previamente biomassa do fungo através do processo de pré-fermentação, seguindo o protocolo utilizado na pré-fermentação para o cultivo em meio líquido.

Após pré-fermentação, com o auxílio de pipeta estéril foram transferidos 10 mL da massa micelial para cada frasco tipo Erlenmeyer contendo 60 g do meio fermentativo sólido (meio arroz-aveia). Foram inoculados 100 frascos, os quais foram incubados por 28 dias a 30°C.

Para a obtenção do extrato das culturas em meio sólido foi usado o mesmo processo descrito para as culturas sólidas de *B. bassiana.*

3.6 Análise cromatográfica

3.6.1 Perfil cromatográfico dos extratos por cromatografia em camada delgada

Para desenvolver uma análise preliminar da complexidade dos extratos foram realizadas cromatografias em camada delgada. O objetivo foi avaliar a complexidade dos extratos considerando-se os seguintes parâmetros: meios fermentativos, cultivos estáticos, cultivos em agitação, cultivos submersos, cultivos em substrato sólido, bem como os tempos de cultivo. Os extratos controles também foram analisados por cromatografia.

Os extratos foram solubilizados em solventes adequados de acordo com o solvente usado no processo extrativo dos mesmos, conforme os extratos em acetato de etila, *n*-butanol, diclorometano, etanol e *n*-hexano. A quantidade de solvente adicionada a cada extrato obtido foi calculada de forma a se obter concentração 30 mg/mL. Nas placas de sílica gel GF_{254} com espessura de camada de 0.25 mm foram aplicados 10 μL dos extratos avaliados com o auxílio de microseringa graduada de 50 μL (Hamilton^{R}), resultando na aplicação de 300 μg de cada extrato. Para cada tipo de extrato, foram testadas diferentes fases móveis, até que se encontrassem as melhores fases móveis para eluição das placas. Para os extratos em acetato de etila, diclorometano e *n*-hexano estabeleceu-se a fase móvel acetato de etila:tolueno:hexano:metanol:água:ácido acético glacial na proporção 53:20:15:10:1:1. Já para os extratos butanólicos e etanólicos utilizou-se a fase móvel clorofórmio:dioxana:tolueno:metanol:butanol:água:ácido acético glacial na proporção 47:20:10:14:6:2:1. As amostras foram aplicadas nas placas de CCD à distância de 2 cm da base e o intervalo de eluição padronizado foi de 15 cm. Foram utilizadas placas de vidro sílica gel GF_{254} (Art. 7730 – Merck) de 20 cm x 20 cm. Em seguida, as placas foram eluídas em cuba de vidro contendo 200 mL da fase móvel correspondente. Em seguida, as mesmas foram retiradas e secas ao ar livre. As substâncias foram observadas previamente sob luz ultravioleta

a 254 nm e 366 nm e, posteriormente, as placas cromatográficas foram expostas a vapores de iodo e finalmente reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico (Cannel, 1998).

3.6.2 Perfil cromatográfico em CLAE dos extratos e frações

Inicialmente, apenas as amostras mais promissoras e que apresentaram melhor potencial químico-biológico (no que se referem à complexidade química e à atividade biológica) foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a realização das análises utilizou-se o cromatógrafo da marca Shimadzu. O equipamento é composto por três bombas Shimadzu LC-10AD, detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M10A_{VP} (Diode Array), sistema controlador SCL-10 A_{VP}, conectado a um computador com *software* Shimadzu Class-VP versão 5.02, injetor automático (SIL-10AD_{vp}) e coletor de frações FRC-10A. Foi empregada a coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C – 18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 μm. Para proteção da coluna analítica foi empregada uma pré-coluna Pelliguard^{TM} LC-18 (4,6 mm x 20 mm cartridge, SUPELCO PARK).

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: sistema de eluição por gradiente, iniciando com 5% de metanol-água e finalizando com 100% de metanol-água, tempo de 42 minutos, vazão de 1,0 mL/min e detecção em intervalo de 215 a 280 nm. Os extratos foram solubilizados na fase móvel inicial de modo a obter-se a concentração de 5 mg/mL. Foram injetados 20 μL de cada extrato, pela utilização de sistema de injeção manual.

Em suma, a metade inicial do projeto permitiu amplo estudo do potencial dos metabólitos secundários do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* por meio da promoção de variações nas condições de cultivo, seguido de análise cromatográfica e de potencial de ação antimicrobiana, com o propósito de selecionar os extratos e frações mais promissoras para ampliação de escala. Ao estudo foi adicionado o fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus.*

Após a seleção das condições mais promissoras, foram desenvolvidos os cultivos em escala ampliada para as duas espécies de fungo utilizadas, em meio sólido (arroz-aveia) e em meio líquido (PDB). Os extratos e frações obtidos destes cultivos em escala ampliada foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência e em ensaios de atividade antimicrobiana, antitumoral e antiparasitária.

Por sua vez, a metade final do trabalho envolveu: a avaliação da atividade antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária dos extratos e frações obtidos a partir da escala ampliada; processo de fracionamento e isolamento de substâncias por meio da utilização de diferentes

modalidades cromatográficas; elucidação estrutural das substâncias isoladas e realização de ensaios biológicos com as substâncias puras.

3.7 Extratos e frações – escala ampliada

A seguir é apresentada a **Tabela 1** com o rendimento das frações obtidas dos cultivos em escala ampliada.

Tabela 1. Rendimento das frações dos cultivos em escala ampliada.

Fungo/Meio	Hex (g)	EtOAc (g)	DCM (g)	BuOH (g)
M. indicus/Arroz-Aveia 30 dias	9,835	12,326	7,1459	6,850
M. indicus/PDB 96 horas	-	2,170	-	1,680
*B. bassiana/*Arroz-Aveia 60 dias	18,2032	4,322	5,2847	9,3678
*B. bassiana/*PDB 21 dias	-	1,100	0,900	2,0382

As frações acima foram submetidas aos seguintes ensaios biológicos disponíveis no National Center for Natural Products Reseach (NCNPR) – University of Mississippi – USA: antimalárico, leishimanicida e antimicrobiano.

3.8 Ensaios Biológicos – NCNPR – University of Mississippi

3.8.1 Ensaio LDH antimalárico:

A atividade antimalárica *in vitro* foi medida por ensaio colorimétrico que determina a atividade da lactato desidrogenase parasítica (*p*LDH) (Muhammad *et al.*, 2004; Makler *et al.*, 1993a; 1993b). O ensaio foi desenvolvido em microplacas de 96 poços e incluiu dois tipos de *Plasmodium falciparum* [Sierra Leone D6 (sensível a cloroquina) e Indochina W2 (resistente a cloroquina)]. Para o ensaio, uma suspensão de células vermelhas do sangue foi infectada com linhagens de *P. falciparum* (D6 ou W2) (200 μL, com 2% parasitemia e 2% hematócrito em meio RPMI - 1640 suplementado com 10% de soro humano e 60 μg/mL de amicacina) e adicionada aos 96 poços das placas contendo 10 μL das amostras em teste em várias concentrações. As placas foram limpas com uma mistura de gás de 90% N_2, 5% O_2, e 5% CO_2, em uma câmara modular de incubação (Billups-Rothenberg, 4464 M) e incubadas a 37°C por 72 horas. A atividade da LDH plasmodial foi determinada pelo uso do reagente Malstat™ (Flow Inc., Portland, OR). Os valores de CI_{50} foram computados a partir da curva dose resposta, gerada pelo percentual de crescimento plotado contra as concentrações testadas. Dimetilsulfóxido (DMSO), artemisinina e cloroquina foram incluídas em cada ensaio como veículo e fármacos controle, respectivamente. O índice de seletividade de

atividade antimalárica foi determinado pela medição da citoxicidade das amostras sobre células de mamíferos (VERO; fibroblastos de rim de macaco).

3.8.2 Ensaio leishmanicida

A ação leishmanicida das substâncias foi testada *in vitro* em uma cultura de formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Em uma microplaca de ensaios de 96 poços com apropriada diluição foram adicionadas as culturas promastigotas de Leishmania (2 x 10^6 células/mL). As placas foram incubadas a 26°C por 72 horas e o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* foi determinado pelo ensaio de Alamar Blue (Mikus e Steverding, 2000). O padrão de fluorescência foi medido em uma placa de leitura Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies) pela excitação no comprimento de onda de 544 nm e emissão no comprimento de onda de 590 nm. Pentamidina e anfotericina B foram usadas como agentes antileishmania padrões. Os valores de CI_{50} para cada composto foram computados a partir da curva de inibição de crescimento.

3.8.3 Ensaio antimicrobiano

Todos os micro-organismos foram obtidos da American Type Culture Collection (Manassas, VA) e incluíu os fungos *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 90906 e a bactéria resistente à meticilina *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRS), *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068. O teste de suscetibilidade foi desenvolvido usando uma versão modificada dos métodos CLSI (NCCLS 1998; 2000). O teste de suscetibilidade de *M. intracellulare* foi feito usando o procedimento de Alamar Blue™ modificado de Franzblau *et al* (1998). Amostras (dissolvidas em DMSO) foram diluídas seriadamente em 20% DMSO/salina e transferidas (10 μL) em duplicata para microplacas de 96 poços de fundo chato. Os inóculos microbianos foram preparados em meio de cultura para fornecer a UFC/mL desejada depois da adição das amostras. Cultivo, solvente e meios controles foram incluídos em cada placa teste. As placas de ensaio foram lidas em 630 nm (*A. fumigatus* e *M. intracellulare*) antes e após a incubação usando o leitor de placas Biotek Powerwave XS (Bio-Tek Instruments, Vermont) ou o leitor de placas Polarstar Galaxy (BMG Lab Technologies), respectivamente. A porcentagem de crescimento foi plotada *versus* a concentração fornecida pelo CI_{50} ou a concentração que forneceu 50% de crescimento relativo aos controles. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração teste que permite não detectar crescimento. As concentrações bactericidas ou fungicidas mínimas (CBM/CFMs) foram determinadas pela

remoção de 5 μL de cada poço limpo (ausência de crescimento), transferidas para ágar e incubadas até crescimento ser observado. A CBM/CFMs é definida como a menor concentração que permite não haver crescimento em ágar. Fármacos controles [ciprofloxacino (ICN Biomedicals, Ohio) para bactéria e anfotericina B (ICN Biomedicals, Ohio) para fungo] foram incluídos em cada ensaio.

3.9 Ensaios Biológicos – Grupos de pesquisa do Brasil

Além dos ensaios realizados no NCNPR – University of Mississippi, as frações obtidas do processo de cultivo em escala ampliada também foram avaliadas em ensaios de atividade citotóxica e antiparasitárias em grupos de pesquisa do Brasil. Como é relatado a seguir.

3.9.1 Ensaio de Atividade Antitumoral *in vitro* - Estudos sobre a proliferação celular.

Os ensaios de atividade antitumoral foram desenvolvidos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

A citotoxidade dos extratos e frações foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT (Mosman, 1983) utilizando-se linhagens celulares tumorais humanas. Este ensaio quantifica indiretamente as células viáveis baseada na conversão do sal de MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazo-2-il)-2,5 difeniltetrazólio - um composto de cor amarela) a formazan, de coloração púrpura. As frações e substâncias foram testadas em um painel de linhagens de células tumorais: HCT-8 (adenocarcinoma de cólon), HL-60 (leucemia – humana), MDA-MB-435 (adenocarcinoma de mama), PC3 (próstata) e SF-295 (gliobastoma, origem – Sistema Nervoso Central), bem como contra linfócitos humanos para determinação da eficácia e seletividade em células de diferentes origens. As linhagens de células foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 e plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes densidades: 0,1 x 10^6 (MDA-MB-435), 0,7 x 10^5 (HCT-8), 0,7 x 10^5 (PC3), 0,6 x 10^5 (SF-95) e 0,3 x 10^6 (HL-60). Os extratos e frações foram testados em uma única concentração (50 µg/mL). Já as substâncias purificadas foram avaliadas em concentrações que variaram de 0,04 a 25 µg/mL. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectofotômetro de placa a 550 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

3.9.2 Ensaio enzimático sobre a inibição de GAPDH de *Trypanosoma cruzi*

O ensaio sobre a inibição de GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foi realizado pelo grupo do Prof. Dr. Glaucius Oliva do IFSC-USP, conforme procedimento previamente descrito (Vieira *et al*., 2001), pela medida espectrofotométrica de NADH formado em 340 nm durante 30 segundos. A mistura reacional contém (volume final 1 mL): 50 mM tampão Tris-HCl pH 8,6 e 1 mM EDTA e 1mM β-mercaptoetanol, 30 mM arseniato de sódio, 2,5 mM NAD, 1,5 μg de enzima e 0,3 mM gliceraldeído-3-fosfato (G3P). A reação é iniciada pela adição do substrato (G3P). Para o teste de inibição, as soluções dos extratos, frações e/ou substâncias puras foram preparadas em DMSO (1 mg/mL) e adicionadas à mistura reacional (100 μL). Ensaios controle foram feitos na ausência de extratos, frações e/ou substâncias puras, onde um volume equivalente de DMSO foi adicionado. As medidas foram feitas em triplicata e considerou-se o valor da média.

3.9.3 Ensaio enzimático de inibição de APRT de *Leishmania tarentolae*

O ensaio sobre a inibição de APRT (adenina fosforribosil transferase) foi desenvolvido também pelo grupo do Prof. Dr. Glaucius Oliva do IFSC-USP.

Os ensaios de atividade com a enzima APRT de *L. tarentolae* foram desenvolvidos de acordo com a modificação de um procedimento previamente descrito (Tuttle e Krenitsky, 1990) pela medida espectrofotométrica da formação de AMP. Os ensaios de atividade foram acompanhados por 60 segundos e o comprimento de onda utilizado foi de 259 nm. A mistura reacional contém (volume final de 0,5 mL); tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,4; $MgCl_2$ 5 mM; Adenina 100 mM; PRPP 560 mM e APRT 7,5 μg.

Para o teste de inibição, as soluções dos extratos, frações e/ou substâncias puras (1 mg/mL) foram preparadas em DMSO e adicionadas à mistura reacional. A concentração final de DMSO usada foi de 10% e este volume foi subtraído do volume do tampão. Extratos brutos e frações foram testados em aproximadamente 50 μg/mL. Ensaios controle foram feitos na ausência de extratos, frações e/ou substâncias puras no qual volume equivalente de DMSO foi adicionado. As medidas foram desenvolvidas em triplicata e foi considerado o valor da média.

A atividade específica das enzimas é calculada através de medidas espectrofotométricas da formação do produto pela diferença de absorbância entre os tempos específicos de reação para cada enzima.

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

Todas as medidas foram feitas em triplicata, onde se calcula a média e, em seguida, aplica-se a fórmula:

Δt = min ; ε_{NADH}= 6,22 $mM^{-1}\ cm^{-1}$; ε_{AMP}= 1,24 $mM^{-1}\ cm^{-1}$;

Volumes expressos em mililitros (mL).

Através da atividade específica é possível calcular a porcentagem de inibição da enzima GAPDH de *T. cruzi* e enzima APRT de *L. tarentolae* frente aos extratos brutos, frações e/ou substâncias puras testadas, pela fórmula:

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

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

3.9.4 Ensaio de atividade leishmanicida

Os ensaios foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Ângela K. Cruz (FMRP-USP) como parte dos objetivos do INCT-INBEQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas).

Inicialmente foi realizado o descongelamento das linhagens (*Leishmania major*), a partir de uma linhagem previamente congelada. Em seguida, todo conteúdo foi inserido em um tubo Falcon contendo a quantidade de meio de cultura (M199) desejado. O tubo falcon foi centrifugado durante 10 minutos a 2000 RPM sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o líquido restante foi transferido para uma garrafa com a quantidade desejada de M199, e aguardaram-se três dias para a troca e separação de células mortas e vivas. Toda cultura foi transferida para um tubo Falcon, centrifugada a 1000 RPM durante 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon e foi centrifugado novamente a 2000 RPM durante 10 minutos sob temperatura de 4°C. O

sobrenadante foi desprezado e o líquido restante foi inserido numa garrafa de cultura contendo meio de cultura. Aguardaram-se, novamente, três dias para que a cultura atingisse o ponto ideal de uso. Então, iniciou-se o procedimento do ensaio do Kill Curve (curva de mortalidade).

Preparação do inoculo: foi contado o número de parasitas presentes na cultura, e a partir de determinado volume de meio de cultura usado para o ensaio, o sheneider completo (soro fetal necessário para manter o crescimento do parasita), calculou-se a quantidade correta de volume a ser coletado da cultura, de forma que a concentração atingisse 200.000 parasitas/mL de inóculo.

Em seguida, foi calculada a quantidade de amostra a ser utilizada, a partir das suas concentrações de estoque e do volume inicial da diluição seriada. Para isto foram adicionados 800 μL de inóculo em dez eppendorfs para as diluições seriadas. No primeiro foi colocada a quantidade de amostra calculada, e a partir dele foram feitas as diluições seriadas. Foi preparado um controle contendo somente o meio de cultura e um controle negativo contendo apenas o parasita, sem o fármaco. Em seguida, foi colocada em triplicata em placa de 96 poços, 200 μL da solução contida no eppendorf. As placas foram vedadas com parafilme, para impedir possíveis evaporações. Os cultivos da linhagem *Leishmania major* foram incubados em BOD por três dias. Em seguida, foram adicionados 10 μL de MTT na concentração de 10 μg/μL em cada poço. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C, protegido da luz. Na sequência, as culturas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 RPM sob temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi solubilizado com 100 μL de DMSO em cada poço, com o devido cuidado para a completa solubilização. A leitura foi feita no leitor Eliza, no comprimento de onda em 495 nanômetros. A partir das leituras foram feitas as análises, que geraram gráficos dos quais foram obtidos os valores de Dose Letal (DL) (Dutta *et al*., 2005).

3.10 Procedimentos gerais de isolamento

O processo de fracionamento das frações obtidas envolveu basicamente passos cromatográficos que incluíram: coluna de gel filtração (Sephadex LH-20-Sigma), colunas de sílica gel e cromatografia preparativa em placa, eventualmente foi utilizada também cromatografia líquida de alta eficiência. O processo de isolamento foi monitorado por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), observação em ultravioleta (254 e 366 nm) e revelação com anisaldeído.

As frações iniciais foram submetidas à cromatografia em coluna Sephadex LH-20. O sistema cromatográfico consistiu em coluna de vidro (120 cm x 5 cm) preenchida com 400 g de Sephadex LH-20 até altura de 100 cm. As amostras foram solubilizadas em 15 mL de metanol, filtradas e em seguida aplicadas ao topo da coluna empacotada. As colunas foram eluídas com metanol, e frações de 10 mL foram obtidas usando coletor automático (Spectra/Chrom ®CF-1 Fraction Collector).

Obtiveram-se de 150 a 200 frações (10 mL) de cada uma das amostras filtradas em Sephadex. As quais foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (UNIPLATE™ - ANALTECH Silica gel GF 250 microns) utilizando a fase móvel CH_2Cl_2:MeOH (95:5). As substâncias foram observadas previamente sob luz UV (254 e 366 nm) e, posteriormente, reveladas com solução de anisaldeído. As análises das frações obtidas permitiram reuni-las em um menor número de frações, variando de 8 a 10.

As frações reunidas foram submetidas à cromatografia comparativa em camada delgada, com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica.

As frações selecionadas foram submetidas à cromatografia em sílica gel [(MERK grade 10180, 70-230 MESH, 40 Å, Surface área 750 m^2/g. Aldrich). Sistema cromatográfico: colunas de vidro (25 cm x 1 cm, 25 cm x 2 cm ou 30 cm x 3.5 cm) preenchidas com sílica gel (20 g, 50 g ou 150 g), as amostras foram homogeneizadas e incorporadas em quantidade suficiente de sílica gel 60 (0.063 – 0.200 Mesh ASTM), aplicadas ao topo da colunas empacotadas e protegidas com algodão]. As colunas foram eluídas segundo os esquemas apresentados nas tabelas e ilustrações de isolamentos descritos para cada fração. As frações coletadas foram analisadas em CCD, observadas previamente sob luz UV e posteriormente reveladas com solução de anisaldeído. De acordo com o perfil cromatográfico as frações semelhantes foram agrupadas em subfrações, para prosseguimento dos isolamentos.

Os processos de isolamento incluíram também o uso de cromatografia preparativa em placa. Assim, utilizaram-se placas UNIPLATE™ - ANALTECH Silica gel GF 250 microns 20 cm x 20 cm, nas quais foram aplicados 8 mg de cada subfração isolada por placa. As fases móveis utilizadas para as subfrações foram específicas para cada qual e estão indicadas na descrição dos isolamentos a seguir. Em seguida, as placas foram observadas sob luz UV e as bandas recortadas. As substâncias foram removidas da sílica através de adição de CH_2Cl_2:MeOH (9:1) seguida de filtração e secagem.

3.11 Fracionamento das frações obtidas em escala ampliada – *Beauveria bassiana*

3.11.1 Fração diclorometânica meio arroz-aveia (BbA60DCM)

O processo de fracionamento da fração diclorometânica do cultivo de *B. bassiana* em meio arroz-aveia foi desenvolvido de acordo com o esquema descrito na **Figura 6**.

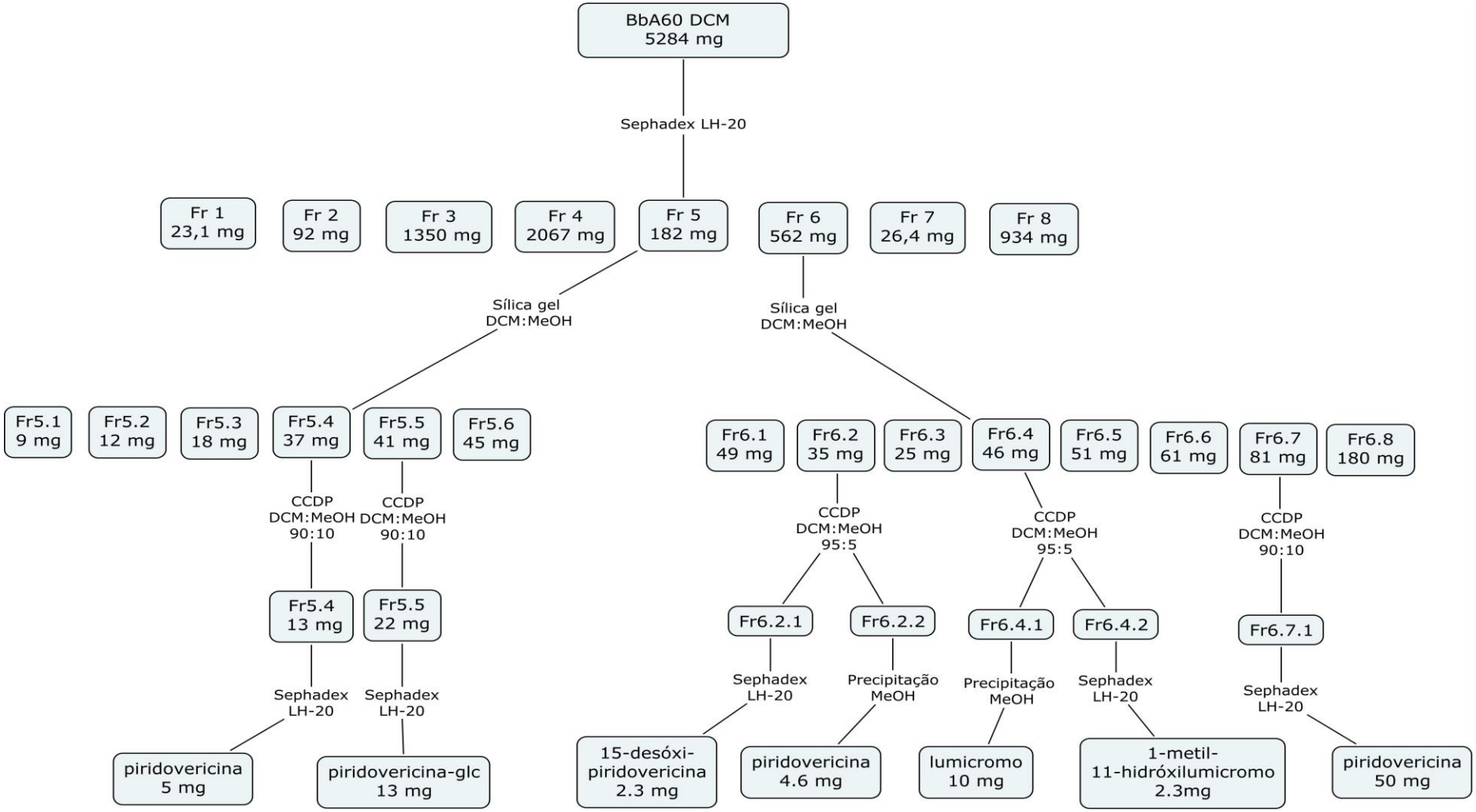


Figura 6. Esquema de fracionamento da fração BbA60DCM.

A fração diclorometânica (5284 mg) foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20 Obtiveram-se 200 frações (10 mL), as quais foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e reunidas em oito frações.

As frações reunidas foram submetidas à cromatografia comparativa em camada delgada com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica. Assim, as frações 5 (182 mg) e 6 (562 mg) foram selecionadas para a continuidade dos processos de isolamento.

A fração 5 (182 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida à fracionamento em sílica gel [25 cm x 1 cm, 20 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 2**, fornecendo 18 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram analisadas em CCD (fase móvel: CH_2Cl_2:MeOH 95:5) e agrupadas em seis subfrações, descritas na **Tabela 3**.

Tabela 2. Cromatografia em coluna (CC) - BbA60DCM5 (182 mg).

Frações	DCM/MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	4
2	100:0	100	3
3	100:0	100	2
4	99:1	100	3
5	99:1	100	4
6	99:1	100	5
7	98:2	100	8
8	98:2	100	4
9	98:2	100	6
10	96:4	100	7
11	96:4	100	6
12	96:4	100	9
13	95:5	100	4
14	95:5	100	8
15	90:10	100	13
16	90:10	100	19
17	90:10	100	9
18	0:100	100	45

Tabela 3. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM5 (182 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 3	9
2	4 – 6	12
3	7 – 9	18
4	10 – 14	37
5	15 – 17	41
6	18	45

As subfrações 4 (37 mg) e 5 (41 mg) apresentaram perfil cromatográfico interessante para o prosseguimento do isolamento (atividade no UV). Portanto, ambas foram submetidas à cromatografia preparativa em camada delgada. A fase móvel utilizada para ambas subfrações foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1), sendo as placas eluídas por três vezes consecutivas na mesma fase móvel. Assim, foram obtidas as substâncias piridovericina (13 mg) e piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) (22 mg), que foram submetidas adicionalmente a um último passo cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 (25 cm x 1 cm – 20 g), eluídas com MeOH, com vistas a purificar melhor as amostras, gerando rendimento final de 5 e 13 mg, respectivamente.

A fração 6 (562 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida à fracionamento em sílica gel [25 cm x 2 cm, 50 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 4**, fornecendo 20 frações de 200 mL cada. As frações coletadas foram analisadas em CCD utilizando a fase móvel CH_2Cl_2:MeOH (95:5) e agrupadas em oito subfrações, descritas na **Tabela 5**.

Tabela 4. Cromatografia em coluna (CC) - BbADCM6 (562 mg).

Frações	DCM/MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	200	20
2	100:0	200	29
3	100:0	200	10
4	99:1	200	12
5	99:1	200	13
6	99:1	200	25
7	98:2	200	20
8	98:2	200	13
9	98:2	200	13
10	96:4	200	21
11	96:4	200	17
12	96:4	200	14
13	95:5	200	24
14	95:5	200	37
15	95:5	200	29
16	90:10	200	11
17	90:10	200	21
18	90:10	200	20
19	0:100	200	127
20	0:100	200	53

Tabela 5. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM6 (562 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 2	49
2	3 – 5	35
3	6	25
4	7 – 9	46
5	10 – 12	51
6	13 – 14	61
7	15 -18	81
8	19 – 20	180

As subfrações 2 (35 mg), 4 (46 mg) e 7 (81 mg) apresentaram perfis cromatográficos interessantes para o prosseguimento do isolamento (atividade no UV). Logo foram submetidas à cromatografia preparativa em camada delgada. A fase móvel utilizada para as subfrações 2 e 4 foi CH_2Cl_2:MeOH (95:5), já para a subfração 7 foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1), sendo as placas eluídas por três vezes consecutivas com a mesma fase móvel.

Assim foram obtidas as substâncias 15-desóxi-piridovericina (4 mg) e piridovericina (7 mg). A primeira foi submetida a um último passo cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 (25 cm x 1 cm – 5 g) eluída com MeOH, com vistas a purificar melhor a amostra e, por fim, foram obtidos 2,3 mg desta substância; a segunda foi melhor purificada através do processo de precipitação quando da adição de metanol resfriado a 4˚C, sendo obtidos 4,6 mg de amostra.

A fração Fr6.2.1 (15-desóxi-piridovericina) foi submetida a CLAE, para verificar o grau de pureza da mesma e a necessidade de mais um passo de purificação, para posterior desenvolvimento de técnicas espectroscópicas.

Condições cromatográficas: fase estacionária - coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C–18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 μm. Fase móvel: - eluição por gradiente multilinear iniciando com CH_3CN:H_2O - 10:90, aumentando até 100% de CH_3CN em 17 minutos e retornando para CH_3CN:H_2O - 10:90 em 23 minutos, vazão de 1,0 mL/min, 251 mm.

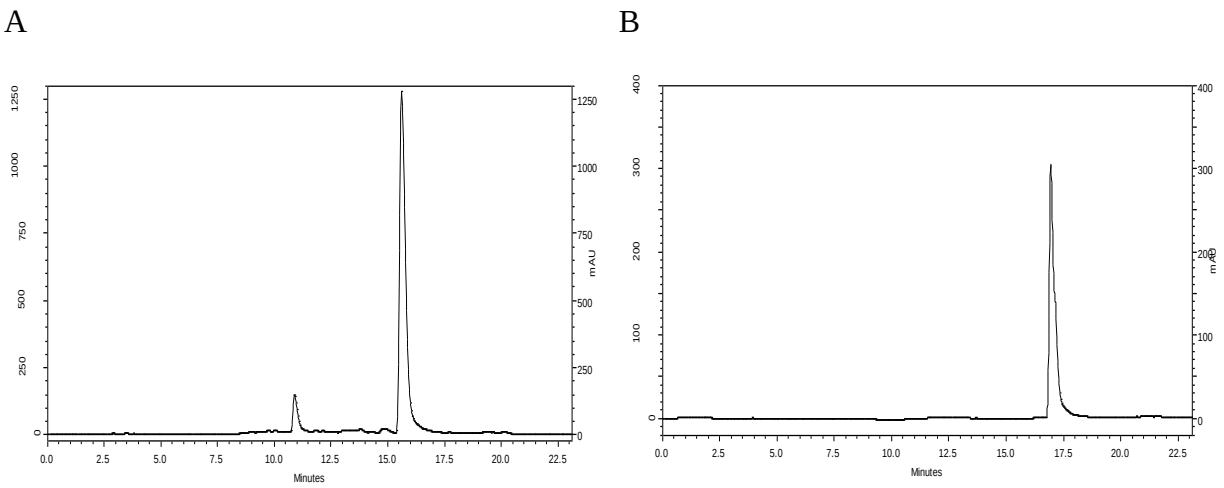


Figura 7. (A) Cromatogramas da Fr6.2.1 e **(B)** da substancia Fr6.2.1 (251 mm).

O grau de pureza da amostra é relativamente satisfatório (**Figura 7A**), mas por se tratar de uma massa de 4 mg, optou-se por desenvolver a purificação por CLAE através de múltiplas injeções, que resultou em 2,3 mg de substância pura, de acordo com o cromatograma a seguir (**Figura 7B**). Embora haja uma alteração no tempo de retenção em relação ao cromatograma anterior, o importante é que o grau de pureza foi satisfatório.

A subfração 4 (46 mg) gerou as substâncias lumicromo (7,8-dimetialoxazina) (14 mg) e 1-metil-7-hidróximetilumicromo (8 mg), sendo que a primeira foi submetida a coluna Sephadex LH-20, como descrito acima, e a segunda foi purificada por precipitação em metanol, como observado acima. De forma que, foram obtidos 10 e 2,3 mg, respectivamente.

Por sua vez a subfração 7 (81 mg) forneceu a substância piridovericina (42 mg), que foi submetida a um passo cromatográfico final em coluna de Sephadex LH-20, rendendo 35 mg do composto puro.

3.11.2 Fração em acetato de etila meio arroz-aveia (BbA60EtOAc)

O processo de fracionamento da fração em acetato de etila do cultivo de *B. bassiana* em meio arroz-aveia foi desenvolvido de acordo com o esquema descrito na **Figura 8**.

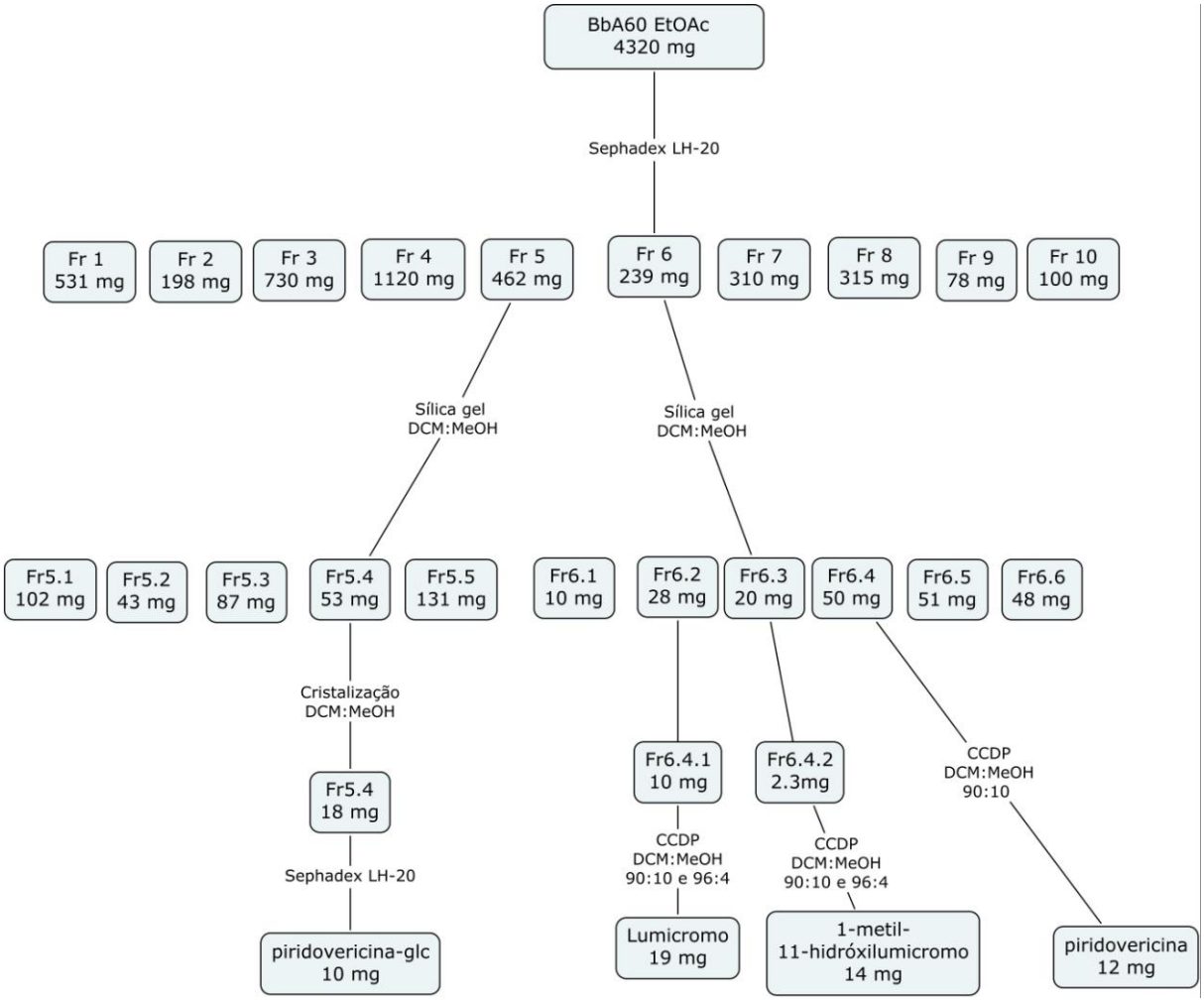


Figura 8. Esquema de fracionamento da fração BbA60EtOAc.

A fração em acetato de etila (4320 mg) foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20. Obtiveram-se 150 frações (10 mL), as quais foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e reunidas em dez frações.

As frações reunidas foram submetidas à análise em CCD com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica. Assim, foi observado que as frações 5 (462 mg) e 6 (239 mg) mostraram perfil promissor e foram portanto selecionadas para continuidade dos processos de isolamento.

A fração 5 (462 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida à fracionamento em sílica gel [25 cm x 2 cm, 50 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 6**, fornecendo 16 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram analisadas em CCD (fase móvel CH_2Cl_2:MeOH (9:1)) e agrupadas em cinco subfrações, descritas na **Tabela 7**.

Tabela 6. Cromatografia em coluna (CC) – BbAEtOAc5 (462 mg).

Frações	DCM/MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	39
2	100:0	100	42
3	100:0	100	21
4	99:1	100	21
5	99:1	100	10
6	98:2	100	12
7	98:2	100	32
8	96:4	100	24
9	96:4	100	31
10	96:4	100	23
11	95:5	100	18
12	95:5	100	12
13	90:10	100	24
14	90:10	100	33
15	90:10	100	25
16	0:100	100	49

Tabela 7. Agrupamento das frações obtidas por CC – BbAEtOAc5 (462 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 3	102
2	4 – 6	43
3	7 – 9	87
4	10 – 12	53
5	13 – 16	131

As subfração 4 (53 mg) apresentou perfil cromatográfico interessante para o prosseguimento do isolamento (atividade no UV). Portanto, foi submetida à cromatografia preparativa em camada delgada. A fase móvel utilizada foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1), sendo as placas eluídas apenas uma vez.

Assim foi obtida a substância piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) (18 mg), que foi submetida a um último passo cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 (25 cm x 1 cm – 20 g), eluída com MeOH, com vistas a uma melhor purificação da amostra (rendimento final de 10 mg). Esta substância foi agrupada com a mesma obtida a partir da fração diclorometânica.

A fração 6 (239 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida à fracionamento em sílica gel [25 cm x 2 cm, 50 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 8**, fornecendo 16 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram analisadas em CCD utilizando a fase móvel CH_2Cl_2:MeOH (9:1) e agrupadas em seis subfrações, descritas na **Tabela 9**.

Tabela 8. Cromatografia em coluna (CC) - BbAEtOAc6 (239 mg).

Frações	DCM/MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	5
2	100:0	100	5
4	99:1	100	7
5	99:1	100	7
6	98:2	100	8
7	98:2	100	18
8	96:4	100	19
9	96:4	100	13
10	95:5	100	11
11	95:5	100	10
12	95:5	100	20
13	90:10	100	10
14	90:10	100	10
15	0:100	100	29
16	0:100	100	35

Tabela 9. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM6 (239 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 2	10
2	3 – 5	28
3	6	20
4	7 – 9	50
5	10 – 13	51
6	14 – 16	48

As subfrações 2, 3 e 4 apresentaram perfil interessante para o prosseguimento dos processos de purificação.

A subfração Fr6.2 (25 mg) foi reunida com a fração Fr6.4.1 (10 mg) proveniente da fração diclorometânica do cultivo em meio sólido, com base no perfil em CCD, resultando em 35 mg de fração. Tal fração apresentou solubilidade bastante difícil em diversos solventes testados, sendo que a solubilização parcial se deu em mistura MeOH:CH_2Cl_2. Mesmo assim houve a formação de precipitado amarelo. A solubilidade total se deu somente em DMSO. Devido à baixíssima solubilidade em solventes usuais, optou-se por promover a purificação em placas preparativas à separação em CLAE. A fase móvel utilizada foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1) na primeira eluição e CH_2Cl_2:MeOH (96:4) na segunda e terceira eluições. O processo de separação em placas permitiu a obtenção da substância 7,8-dimetilloxazina (lumicromo) (19 mg) que resulta em intensa coloração amarela quando solubilizada em DMSO.

A subfração Fr6.3 (25 mg) foi reunida com a fração Fr6.4.2 (2,3 mg) proveniente da fração diclorometânica do cultivo em meio sólido, com base no perfil em CCD, resultando em 27,3 mg de fração. Como mencionado para a fração anterior, esta fração também mostrou ser

de difícil solubilização, pois apenas DMSO sob aquecimento foi capaz de solubilizá-la completamente. Utilizando a mesma estratégia usada para a amostra anterior, foi promovida a separação por cromatografia em placa sob as mesmas condições, que resultou na substância 1-metil-7-hidróximetilumicromo (14 mg), a qual precipita com facilidade em solventes como MeOH e DMSO sob temperatura ambiente.

As substâncias 7,8-dimetilloxazina e 1-metil-11-hidróxilumicromo foram analisadas em CLAE para verificar o grau de pureza das mesmas (**Figura 9**).

Condições cromatográficas: fase estacionária - coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C–18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 μm. Fase móvel: eluição por gradiente multilinear iniciando com CH_3CN:H_2O - 5:95, aumentando até 100% de CH_3CN em 20 minutos e retornando para CH_3CN:H_2O - 5:95 até 25 minutos, vazão de 1,0 mL/min, 251 mm.

A B

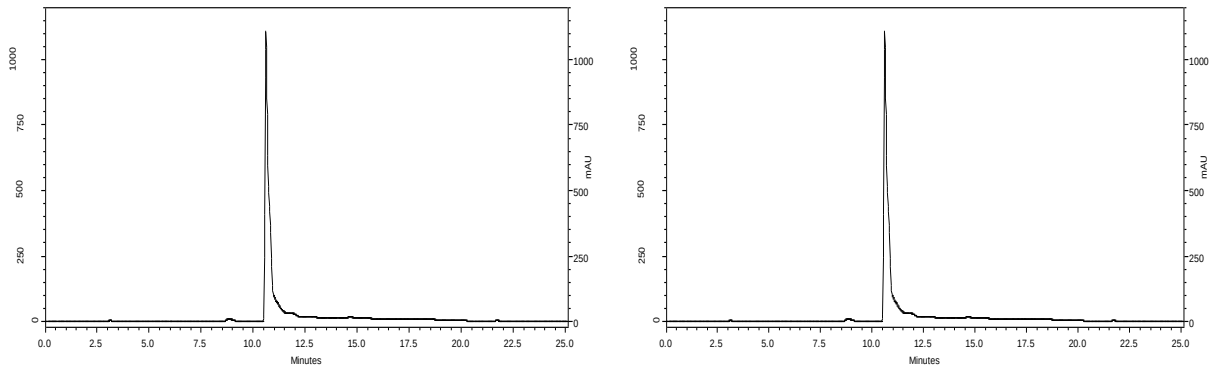


Figura 9. Cromatograma em CLAE de 1-metil-11-hidróxilumicromo **(A)** e 7,8-dimetilloxazina **(B)** (251 mm).

Observando os cromatogramas é possível constatar a dificuldade na separação das substâncias, uma vez que estas apresentam tempos de retenção bastante semelhantes, mesmo utilizando gradiente de eluição multilinear com maior quantidade de H_2O para promover uma melhor separação (1-metil-11-hidróxilumicromo: 10.6 min e 7,8-dimetilloxazina: 11.5 min). As substâncias mostraram grau de pureza satisfatório para a realização dos experimentos de RMN.

Por sua vez a subfração Fr6.4 (50 mg) foi submetida a purificação em placas preparativas A fase móvel utilizada foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1) e o processo de separação em placas cromatográficas em camada delgada permitiu a obtenção da substância piridovericina (12 mg).

3.11.3 Fração em acetato de etila meio líquido PDB (BbL21EtOAc)

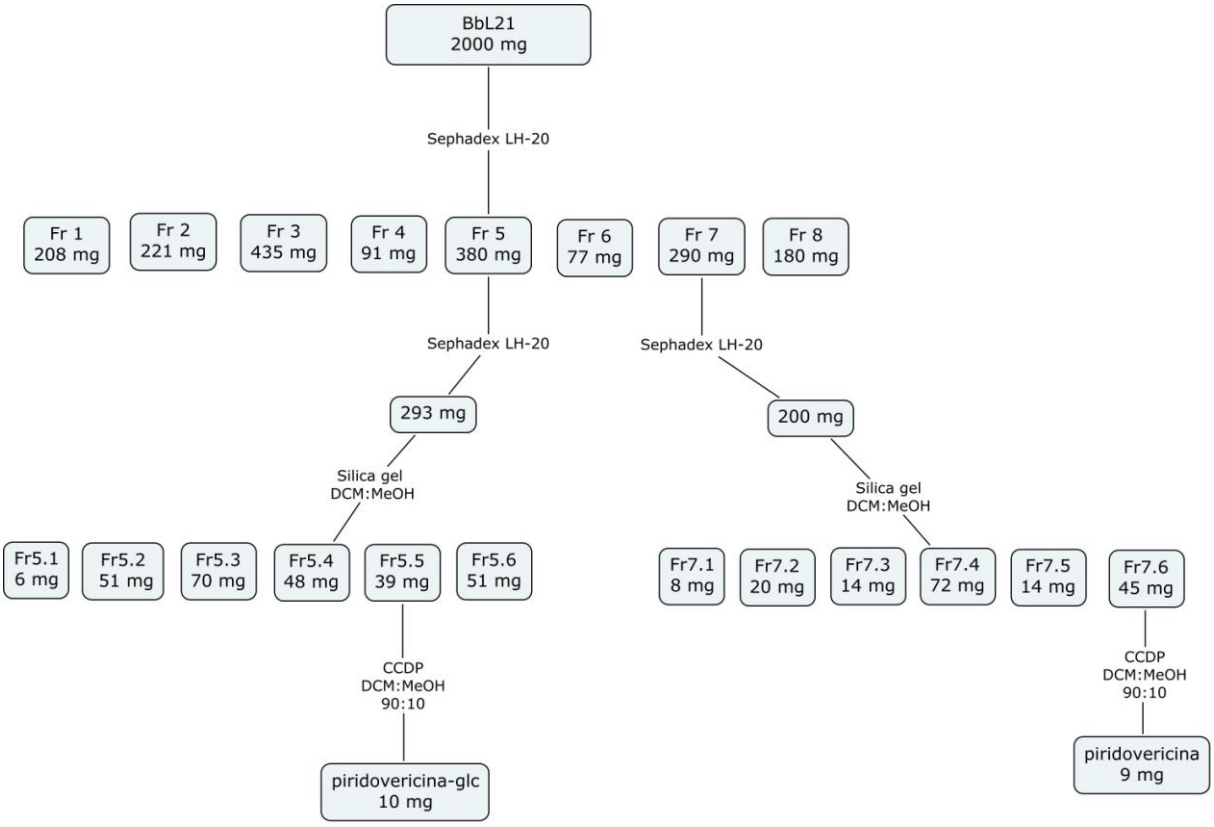


Figura 10. Esquema de fracionamento da fração BbLEtOAc.

A fração em acetato de etila obtida do cultivo líquido em PDB (2000 mg) foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20. Obtiveram-se 150 frações (10 mL), as quais foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e reunidas em oito frações (**Figura 10**).

As frações reunidas foram submetidas à CCD com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica. Assim, foi observado que as frações 5 (380 mg) e 7 (290 mg) provenientes da coluna Sephadex LH-20, apresentavam perfil interessante quanto a detecção no UV e também quando reveladas com solução de anisaldeído. Logo, foram selecionadas para continuidade dos processos de isolamento.

A fração 5 (380 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida à um novo fracionamento em coluna de gel filtração, que permitiu a obtenção de uma fração de 293 mg. Esta foi submetida a fracionamento em sílica gel [25 cm x 1 cm, 20 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 10**, fornecendo 15 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à CCD e as semelhantes foram agrupadas em seis subfrações (**Tabela 11**).

Tabela 10. Cromatografia em coluna (CC)- BbL21EtOAc5 (293 mg).

Frações	DCM/MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	3
2	100:0	100	3
3	100:0	100	18
4	99:1	100	10
5	99:1	100	30
6	98:2	100	20
7	98:2	100	12
8	96:4	100	10
9	96:4	100	28
10	96:4	100	17
11	95:5	100	31
12	95:5	100	10
13	90:10	100	18
14	90:10	100	11
15	90:10	100	51

Tabela 11. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbL21EtOAc5 (293 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 2	6
2	3 – 5	51
3	6 – 9	70
4	10 – 11	48
5	12 – 14	39
6	15	51

A subfração 5 (39 mg) apresentou perfil cromatográfico interessante para o prosseguimento do isolamento (atividade no UV) e, portanto, foi submetida a cromatografia preparativa em camada delgada. A fase móvel utilizada foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1), sendo as placas eluídas apenas uma vez. Assim, foi obtida a substância Fr5.4 (10 mg). Essa fração foi agrupada nas frações Fr5.4 (EtOAc) e Fr5.5 (CH_2Cl_2) provenientes dos cultivos em meio sólido, valendo-se do perfil químico obtido por CCD. Essas frações agrupadas foram submetidas a isolamento em CLAE gerando a substância denominada piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) (**Figura 11**).

Condições cromatográficas: fase estacionária - coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C–18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 μm. Fase móvel: eluição por gradiente multilinear iniciando com CH_3CN:H_2O - 10:90, aumentando até 100% de CH_3CN em 16 minutos e retornando para CH_3CN:H_2O - 10:90 até 23 minutos, vazão de 1,0 mL/min, 251 mm.

A B

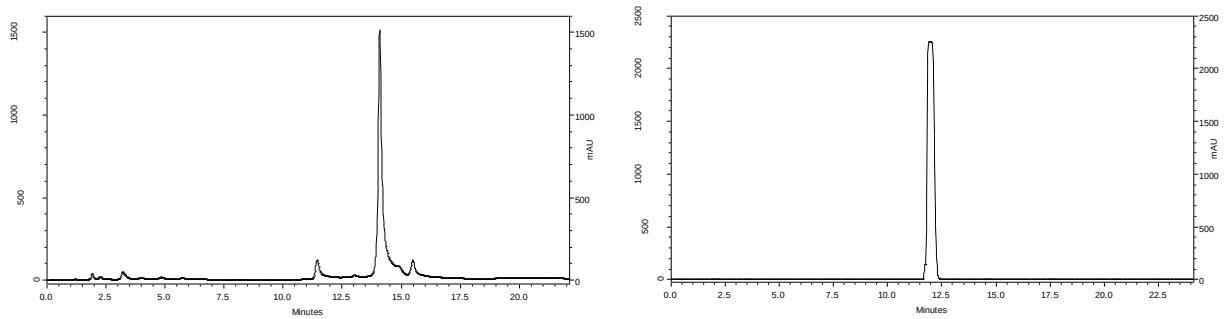


Figura 11. (A) Cromatograma em CLAE das frações agrupadas; **(B)** piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) (em 251 mm).

É possível notar que o grau de pureza da amostra é satisfatório (tempo de retenção: 14,5 min). Entretanto, para obter uma amostra com maior grau de pureza para a realização dos experimentos espectroscópicos, a substância foi purificada através de múltiplas injeções em CLAE. O cromatograma a seguir atesta a pureza da amostra, embora o tempo de retenção seja diferente, provavelmente devido a alguma alteração das condições da coluna. O rendimento foi de 14 mg (tempo de retenção: 12,3 min) (**Figura 14**).

Por sua vez a fração 7 (290 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida à um novo fracionamento em coluna de gel filtração, que permitiu a obtenção de uma fração de 200 mg. Essa foi submetida a fracionamento em sílica gel utilizando as mesmas condições a qual foi submetida à fração 5. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 12**, fornecendo 12 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à CCD, utilizando a fase móvel CH_2Cl_2:MeOH (9:1) e as semelhantes foram agrupadas em seis subfrações (**Tabela 13**).

Tabela 12. Cromatografia em coluna (CC) - BbL21EtOAc7 (200 mg).

Frações	DCM/MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	4
2	100:0	100	4
3	100:0	100	20
4	99:1	100	14
5	99:1	100	23
6	98:2	100	27
7	98:2	100	22
8	96:4	100	10
9	96:4	100	4
10	96:4	100	12
11	95:5	100	18
12	95:5	100	15

Tabela 13. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbL21EtOAc7 (200 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 2	8
2	3	20
3	4	14
4	5 – 7	72
5	8 – 9	14
6	10 – 12	45

A subfração 6 (45 mg) apresentou perfil cromatográfico interessante para o prosseguimento do isolamento (atividade no UV) e, portanto, foi submetida a cromatografia preparativa em camada delgada. A fase móvel utilizada foi CH_2Cl_2:MeOH (9:1), sendo as placas eluídas apenas uma vez. Assim, foi obtida a substância Fr7.6.1 (15 mg), que foi submetida a um último passo cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 (25 cm x 1 cm – 20 g), eluída com MeOH, com vistas a purificar melhor a amostra, gerando rendimento final de 9 mg da substância piridovericina, a qual também foi obtida nas frações em CH_2Cl_2 e EtOAc dos cultivos em meio sólido.

3.12 Fracionamento das frações obtidas em escala ampliada – *Mycoleptodiscus indicus*.

3.12.1 Fração Hexânica meio arroz-aveia (MiHex)

O processo de fracionamento da fração hexânica do cultivo de *M. indicus* em meio arroz-aveia foi desenvolvido de acordo com o esquema descrito na **Figura 12**. A fração hexânica (9835 mg) foi solubilizada em metanol e submetida a centrifugação de 3000 RPM durante 3 minutos. Assim foi obtido um precipitado (insolúvel em MeOH) com massa de 1500 mg e uma fração solúvel em MeOH de 8335 mg.

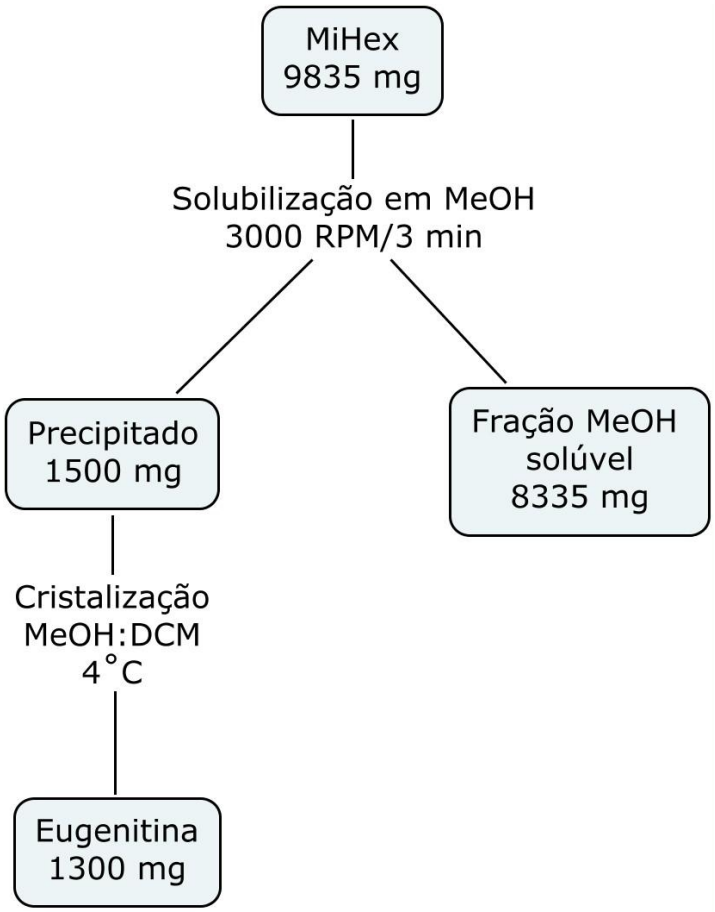


Figura 12. Esquema de fracionamento da fração MiHex (9835 mg).

O precipitado foi submetido a processo de cristalização, através da solubilização em 300 mL de CH_2Cl_2:MeOH (1:1) em balão de 1 L, seguido de aquecimento e posterior período de repouso (overnight) à 4˚C em geladeira. Posteriormente, os cristais foram recolhidos e pesados, resultando na obtenção de 1300 mg da substância denominada eugenitina, pertencente a classe dos cromenos que será discutida posteriormente.

3.12.2 Fração diclorometânica meio arroz-aveia (MiDCM)

O processo de fracionamento da fração diclorometânica do cultivo do fungo *M. indicus* em meio arroz-aveia foi desenvolvido de acordo com o esquema descrito nas **Figuras 13**, **14** e **15**. Previamente aos processos cromatográficos a fração diclorometânica (6900 mg) foi solubilizada em metanol e submetida a centrifugação à 3000 RPM por 3 minutos. Assim foi obtido um precipitado (insolúvel em MeOH) com massa de 3870 mg e uma fração solúvel em MeOH de 3030 mg (**Figura 13**). Tanto o precipitado quanto a fração solúvel foram submetidas a processos cromatográficos que envolveram: colunas de Sephadex LH-20, colunas de sílica gel e cromatografia preparativa em camada delgada, além de técnicas de

cristalização. O processo de isolamento foi monitorado através CCD, observação em UV e revelação com anisaldeído.

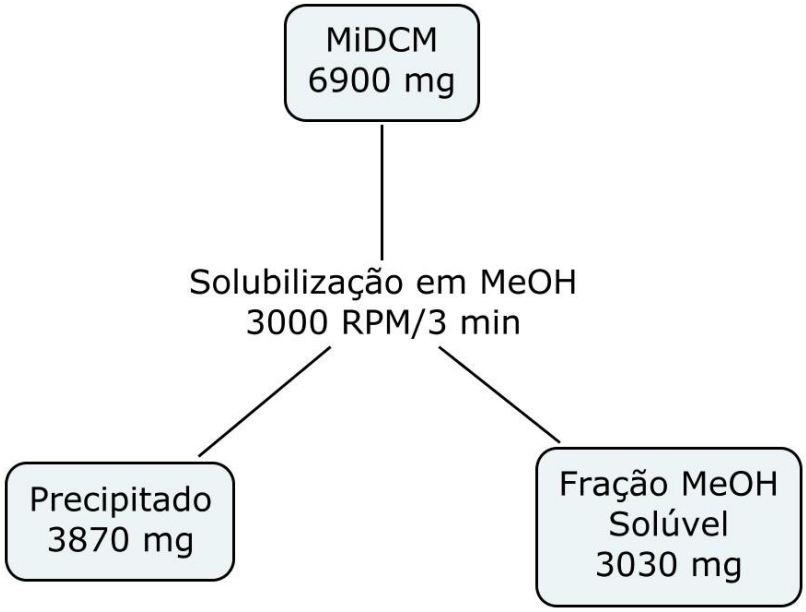


Figura 13. Solubilização em MeOH e centrifugação amostra MiDCM.

A seguir são abordados de forma separada os processos cromatográficos do precipitado e da fração solúvel.

3.12.2.1 Fração diclorometânica - precipitado (MiDCM)

O processo de isolamento da fração insolúvel em metanol proveniente da fração diclorometânica do cultivo de *M. indicus* em meio arroz-aveia foi desenvolvido por cromatografia clássica, seguida de passos de cristalização e técnica de precipitação (**Figura 14**).

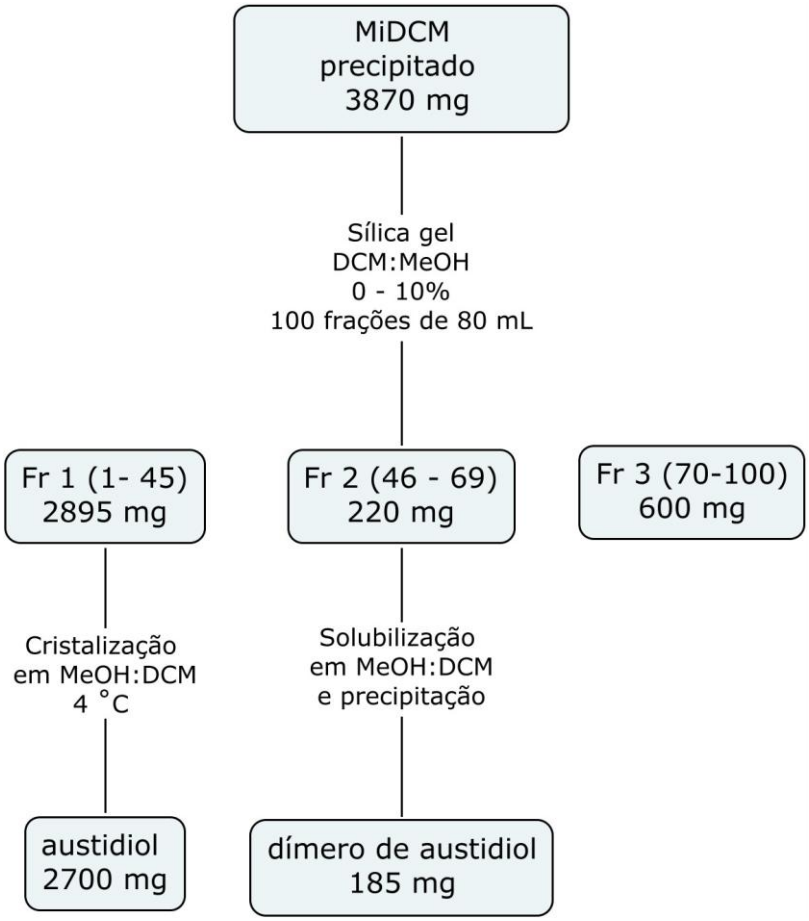


Figura 14. Esquema de fracionamento da fração MiDCM precipitado.

O primeiro passo foi o fracionamento em sílica gel [30 cm x 3,5 cm, 150 g de sílica gel, altura de 10 cm]. A coluna foi eluída utilizando um sistema gradiente de CH_2Cl_2:MeOH, iniciando com diclorometano 100% e elevando a concentração de metanol em 1% a cada 10 frações coletadas. Assim foram coletadas 100 frações de 80 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à análise por CCD. De acordo com o perfil cromatográfico as frações semelhantes foram agrupadas em três subfrações (**Tabela 14**).

Tabela 14. Cromatografia em coluna (CC) - MiDCM ppt (3870 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 45	2980
2	46 – 69	237
3	170 – 100	600

A subfração 1 (3000 mg) foi submetida ao processo de cristalização, através da solubilização em 500 mL de CH_2Cl_2:MeOH (1:1) em balão de 1 L, seguido de aquecimento e posterior período de repouso (overnight) sob 4˚C em geladeira. Posteriormente, os cristais

foram recolhidos e pesados, resultando na obtenção de 2700 mg da substância denominada austidiol, pertencente a classe das azafilonas que será discutida posteriormente.

A subfração 2 (250 mg) foi solubilizada em 100 mL de CH_2Cl_2:MeOH (1:1), aquecida e na sequência mantida em repouso sobre a bancada sendo, em seguida, recolhido o precipitado (Fr 2 - 185 mg), cujo processo de elucidação estrutural permitiu a proposição do metabólito inédito dímero de austidiol, pertencente a classe das azafilonas.

3.12.2.2 Fração diclorometânica - solúvel em MeOH (MiDCM)

O fracionamento da porção solúvel em MeOH se deu de forma semelhante às etapas desenvolvidas para o fracionamento das frações obtidas a partir dos cultivos em *B. bassiana*, com o uso de colunas Sephadex LH-20, colunas de sílica gel, cromatografia preparativa em camada delgada e lavagem com combinações de solventes orgânicos (**Figura 15**).

A fração diclorometânica (3030 mg) foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20. Obtiveram-se 200 frações (10 mL), as quais foram submetidas à análise por CCD utilizando a fase móvel Hex:EtOAc (1:1). A análise cromatográfica em camada delgada das frações obtidas permitiu reuni-las em dez frações.

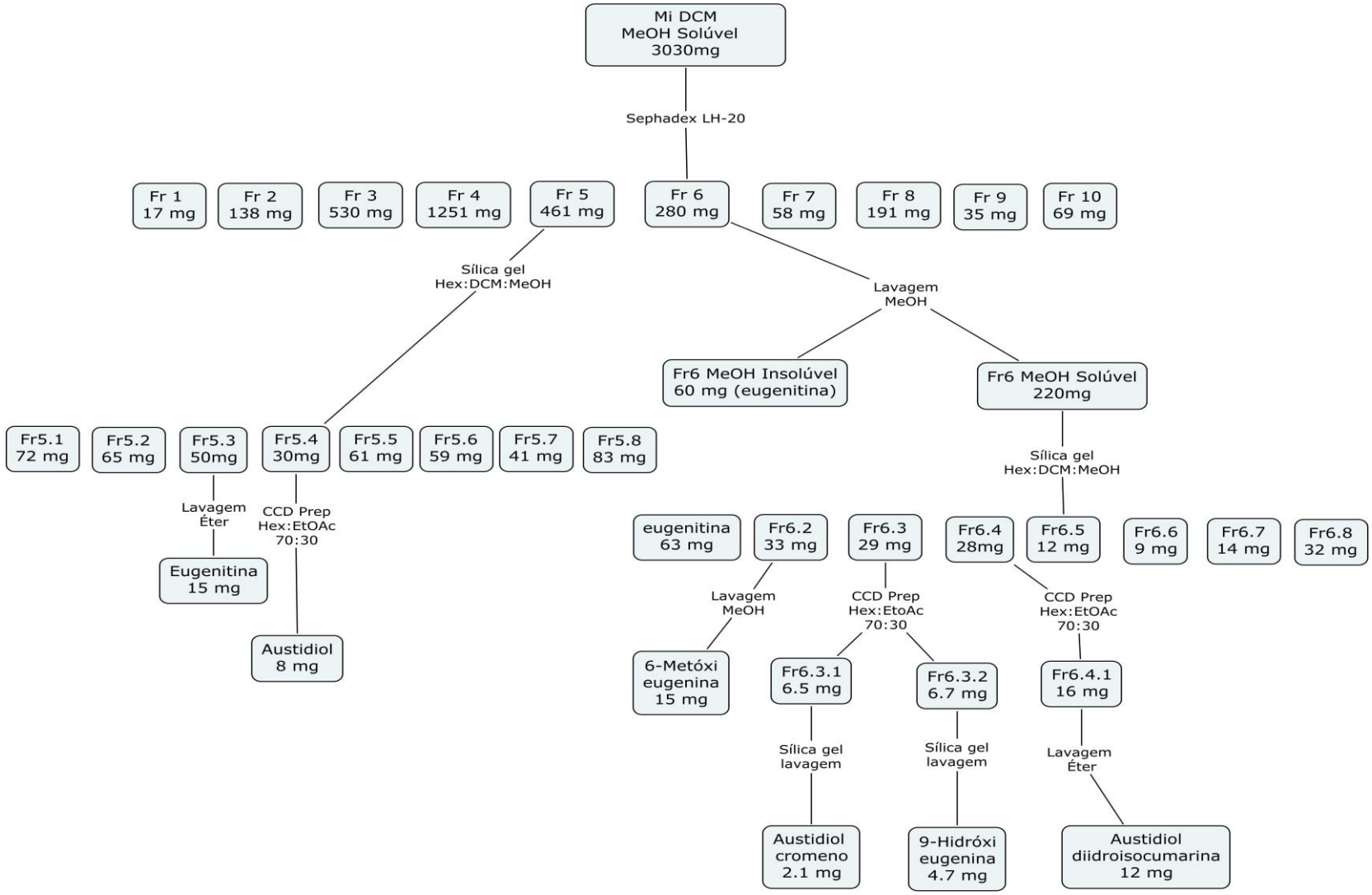


Figura 15. Esquema de fracionamento da fração MiDCM solúvel.

As frações reunidas foram submetidas à análise por CCD. Assim, foi observado que as frações 5 (461 mg) e 6 (280 mg) provenientes da coluna Sephadex LH-20, apresentavam perfil promissor e foram selecionadas para continuidade dos processos de isolamento.

A fração 5 (461 mg) foi submetida à fracionamento em sílica gel [25 cm x 2 cm, 50 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 15**, fornecendo 18 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à CCD, utilizando a fase móvel Hex:EtOAc (1:1) e as semelhantes foram agrupadas em oito subfrações (**Tabela 16**).

Tabela 15. Cromatografia em coluna (CC) - fração MiDCM5 (461 mg).

Frações	Hex: CH_2Cl_2:MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0:0	100	24
2	100:0:0	100	18
3	50:50:0	100	12
4	50:50:0	100	25
5	0:100:0	100	24
6	0:100:0	100	12
7	99:1	100	17
8	99:1	100	21
9	99:1	100	18
10	92:8	100	12
11	92:8	100	23
12	96:4	100	12
13	96:4	100	16
14	95:5	100	16
15	95:5	100	23
16	90:10	100	20
17	90:10	100	15
18	0:100	100	70

Tabela 16. Agrupamento das frações obtidas por CC – MiDCM5 (461 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 3	54
2	4 – 5	49
3	6 – 8	50
4	9 – 10	30
5	11 – 13	51
6	14 – 15	39
7	16 – 17	35
8	18	70

A subfração 3 (50 mg) foi submetida ao processo de lavagem com éter etílico, obtendo-se 15 mg da substância eugenitina, pertencente à classe dos cromenos. Por sua vez a subfração 4 (30 mg) foi submetida a cromatografia preparativa em camada delgada. Utilizou-se a fase

móvel Hex:EtOAc (3:7), sendo as placas eluídas por duas vezes consecutivas na mesma fase móvel. Assim foi obtido o composto austidiol (8 mg), pertencente a classe das azafilonas.

A fração 6 (280 mg) proveniente da coluna Sephadex LH-20 foi submetida a lavagem com metanol, resultando em uma porção insolúvel, correspondente a substância eugenitina (60 mg) e uma porção solúvel (220 mg) que foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel [25 cm x 1 cm, 20 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 17**, fornecendo 16 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à CCD, utilizando a fase móvel Hex:EtOAc (1:1) e as semelhantes foram agrupadas em oito subfrações (**Tabela 18**).

Tabela 17. Cromatografia em coluna (CC) - MiDCM6 (220 mg).

Frações	Hex: CH_2Cl_2:MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0:0	100	19
2	100:0:0	100	20
3	50:50:0	100	12
4	50:50:0	100	20
5	0:100:0	100	13
6	0:100:0	100	8
7	99:1	100	10
8	99:1	100	10
9	92:8	100	10
10	92:8	100	18
11	96:4	100	10
12	96:4	100	9
13	95:5	100	7
14	95:5	100	3
15	90:10	100	10
16	0:100	100	14

Tabela 18. Agrupamento das frações obtidas por CC - MiDCM6 (220 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 3	41
2	4 – 5	33
3	6 – 8	29
4	9 – 10	28
5	11	10
6	12	9
7	13 – 14	10
8	15 – 16	24

A subfração 1 rendeu 63 mg da substância eugenitina, por sua vez a subfração 2 (33 mg) foi lavada com MeOH fornecendo 15 mg da substância denominada 6-metóxieugenina. Já a subfração 3 (29 mg) foi submetida a cromatografia preparativa em camada delgada. Utilizou-

se a fase móvel Hex:EtOAc (7:3), as placas foram eluídas por duas vezes consecutivas na mesma fase móvel e, em seguida, observadas sob luz UV. Obtiveram-se duas substâncias: austidiol isocromeno (6,5 mg) e 9-hidróxieugenina (6,7 mg). Ambas foram submetidas a um último passo cromatográfico em silica gel em pipeta Pasteur (fase móvel Hex:EtOAc (1:1)) fornecendo 2,1 e 4,7 mg das substâncias, respectivamente.

A subfração 4 (28 mg) foi submetida a cromatografia preparativa em placa, sob as mesmas condições da subfração 3, fornecendo a substância austidiol diidroisocumarina (16 mg), a qual foi lavada com éter etílico, resultando na obtenção de 12 mg da substância.

3.12.3 Fração em acetato de etila meio arroz-aveia (MiEtOAc)

O processo de fracionamento da fração em acetato de etila do cultivo do fungo *M. indicus* em meio arroz-aveia foi desenvolvido de acordo com o esquema descrito nas **Figuras 16** e **17**. Previamente aos processos cromatográficos, a fração em acetato de etila (11878 mg) foi solubilizada em metanol e submetida a centrifugação à 3000 RPM por 3 minutos. Assim foi obtido um precipitado (insolúvel em MeOH) com massa de 2420 mg e uma fração solúvel em MeOH de 9458 mg (**Figura 16**). Tanto o precipitado quanto a fração solúvel foram submetidas a processos cromatográficos que envolveram: colunas de Sephadex LH-20, colunas de sílica gel e cromatografia preparativa em camada delgada, bem como técnicas de cristalização. O processo de isolamento foi monitorado através de cromatografia em camada delgada (CCD), observação em UV e revelação com anisaldeído.

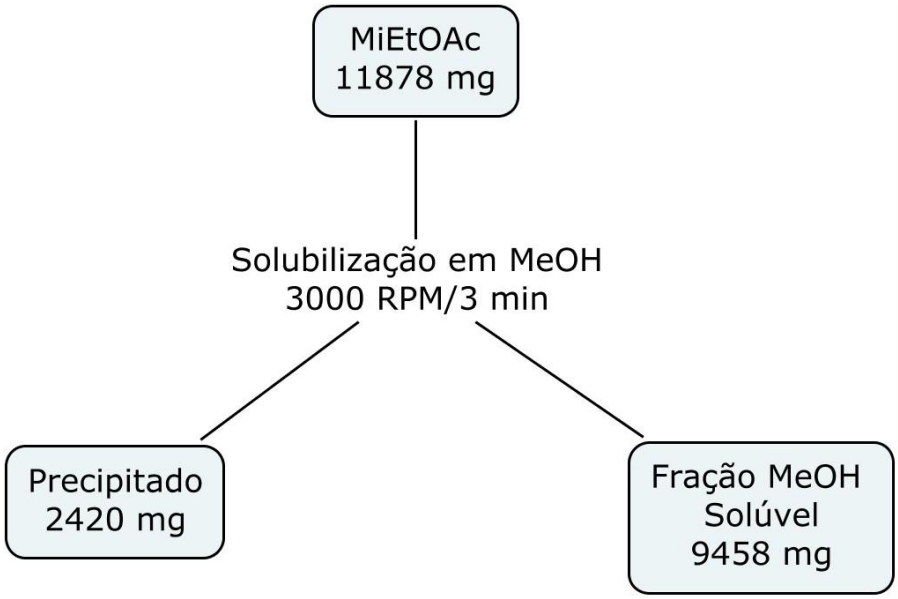


Figura 16. Solubilização em MeOH e centrifugação amostra MiEtOAc.

3.12.3.1 Fração em acetato de etila - precipitado (MiEtOAc)

O processo de isolamento da fração insolúvel em metanol proveniente da fração em acetato de etila do cultivo de *M. indicus* em meio arroz-aveia foi desenvolvido por cromatografia clássica, seguida de passos de cristalização e técnica de precipitação, ilustrado na **Figura 17**. O primeiro passo foi o fracionamento em sílica gel [30 cm x 3,5 cm, 150 g de sílica gel, altura de 10 cm]. A coluna foi eluída utilizando um sistema gradiente de CH_2Cl_2:MeOH, iniciando com diclorometano 100% e elevando a concentração de metanol em 1% a cada 10 frações coletadas, sendo coletadas 100 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à CCD, utilizando a fase móvel Hex:EtOAc (3:7) e as semelhantes foram agrupadas em três subfrações (**Tabela 19**).

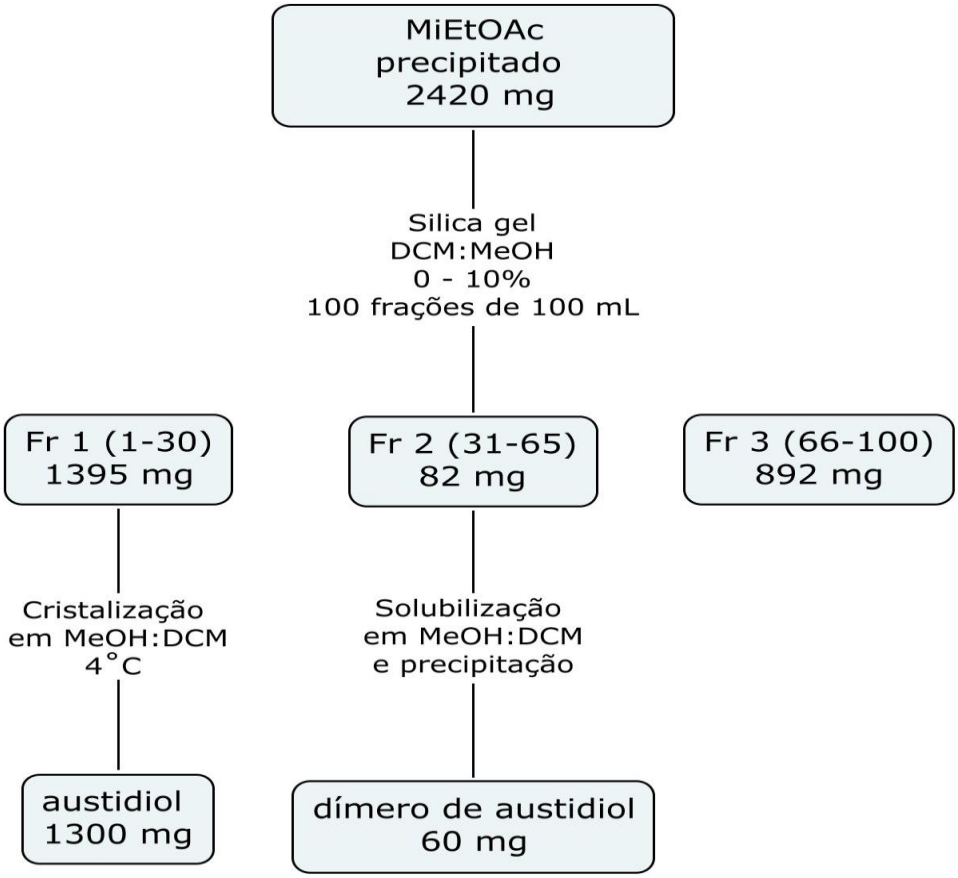


Figura 17. Esquema de fracionamento da fração MiEtOAc precipitado.

Tabela 19. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc ppt (2420 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 30	1395
2	31 – 65	82
3	66 – 100	892

A subfração 1 (1400 mg) foi submetida a processo de cristalização, através da solubilização em 500 mL de CH_2Cl_2:MeOH (1:1) em balão de 1L, seguido de aquecimento e posterior período de repouso (overnight) a 4˚C em geladeira. Posteriormente, os cristais foram recolhidos e pesados, resultando na obtenção de 1300 mg da substância denominada austidiol, obtida anteriormente a partir da fração diclorometânica.

A subfração 2 (85 mg) foi solubilizada em 200 mL de CH_2Cl_2:MeOH (1:1), aquecida e mantida em repouso sobre a bancada e, em seguida, foi recolhido o precipitado (60 mg) que corresponde à substância denominada dímero de austidiol, pertencente a classe das azafilonas.

3.12.3.2 Fração em acetato de etila - solúvel em MeOH (*M. indicus* - EtOAc)

O fracionamento da porção solúvel em MeOH se deu de forma semelhante às etapas desenvolvidas para o fracionamento da fração diclorometânica, sendo utilizadas colunas Sephadex LH-20, colunas de sílica gel, cromatografia preparativa em camada delgada e lavagem com combinações de solventes orgânicos (**Figura 18**).

A fração em acetato de etila (9458 mg) foi submetida a gel filtração Sephadex LH-20, que permitiu a obtenção de 200 frações (10 mL), as quais foram submetidas à análise por CCD utilizando a fase móvel Hex:EtOAc (1:1). A análise cromatográfica das frações obtidas permitiu reuni-las em dez frações.

As frações reunidas foram submetidas à análise em CCD. Assim, foi observado que as frações 6 (592 mg), 7 (488 mg) e 8 (420 mg) provenientes da coluna Sephadex LH-20, apresentavam perfil promissor e foram selecionadas para continuidade dos processos de isolamento.

As três frações foram separadamente solubilizadas em MeOH e centrifugadas. A porção insolúvel que precipitou correspondeu à substância eugenitina (300 mg). Por sua vez a parte solúvel em MeOH de cada fração foi submetida aos processos cromatográficos esquematizados a seguir (**Figura 18**). As frações 6 (500 mg) e 7 (330 mg) foram analisadas por CCD e reunidas em uma mesma fração (Fr6-7). Esta fração foi submetida à coluna de sílica gel [25 cm x 2 cm, 50 g de sílica gel,altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 20**, fornecendo 18 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram submetidas à análise por CCD, utilizando a fase móvel CH_2Cl_2:MeOH (95:5). De acordo com o perfil cromatográfico as frações semelhantes foram agrupadas, resultando em cinco subfrações, descritas na **Tabela 21**.

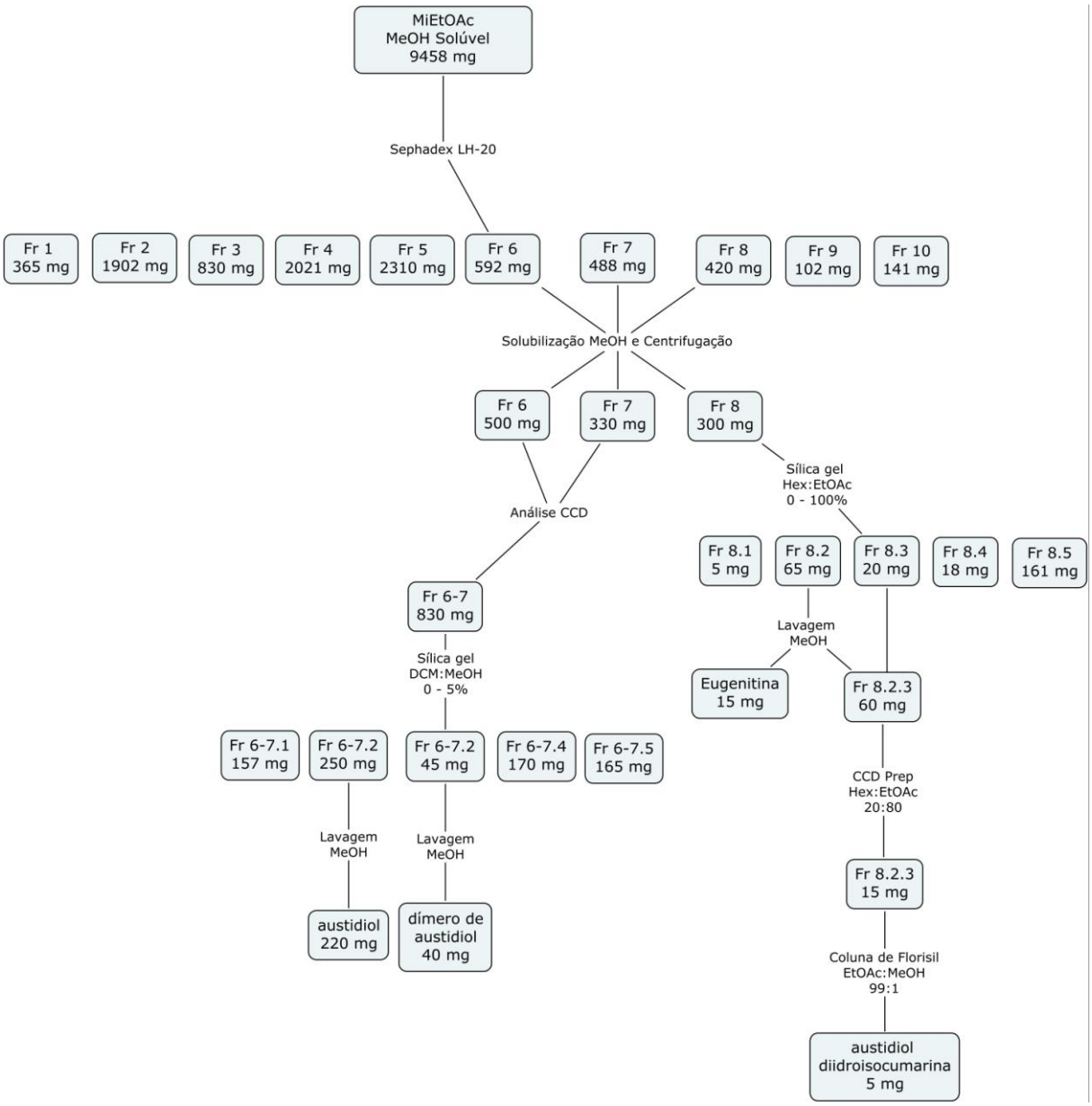


Figura 18. Esquema de fracionamento da fração MiEtOAc MeOH solúvel.

Tabela 20. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc6-7 (830 mg).

Frações	CH_2Cl_2:MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	45
2	100:0	100	57
3	100:0	100	55
4	99:1	100	51
5	99:1	100	79
6	98:2	100	65
7	98:2	100	55
8	97:3	100	23
9	97:3	100	22
10	96:4	100	28
11	96:4	100	26
12	95:5	100	42
13	95:5	100	35
14	95:5	100	41
15	90:10	100	25
16	90:10	100	33
17	90:10	100	41
18	0:100	100	66

Tabela 21. Agrupamento das frações obtidas por CC –MiEtOAc6-7 (461 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 3	157
2	4 – 7	250
3	8 – 9	45
4	10 – 14	170
5	15 – 18	165

A subfração 2 (250 mg) e a subfração 3 (45 mg) foram submetidas a lavagem com MeOH resfriado, gerando precipitados de intensa coloração amarela e fornecendo as substâncias austidiol (220 mg) e dímero de austidiol (40 mg) (**Figura 18**). Tais substâncias foram obtidas a partir da fração em acetato de etila insolúvel em MeOH e também a partir da fração diclorometânica do cultivo de *M. indicus* em meio sólido.

Por sua vez a fração 8 proveniente da coluna Sephadex foi submetida à fracionamento em sílica gel [25 cm x 2 cm, 30 g de sílica gel, altura de 15 cm]. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na **Tabela 22**, fornecendo 12 frações de 100 mL cada. As frações coletadas foram analisadas por CCD, utilizando a fase móvel Hex:EtOAc (3:7) e agrupadas em cinco subfrações (**Tabela 23**).

Tabela 22. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc8 (300 mg).

Frações	Hex:EtOAc	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	100	2
2	100:0	100	3
3	80:20	100	25
4	80:20	100	40
5	60:40	100	8
6	60:40	100	12
7	50:50	100	9
8	40:60	100	11
9	30:70	100	15
10	20:80	100	39
11	0:100	100	47
12	0:100	100	60

Tabela 23. Agrupamento das frações obtidas por CC – MiEtOAc8 (300 mg).

Subfrações	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 2	5
2	3 – 4	65
3	6 – 5	20
4	7 – 8	18
5	9 – 12	161

A subfração 2 (65 mg) e 3 (20 mg) apresentaram perfis cromatográficos interessantes para o prosseguimento do isolamento (atividade no UV). A subfração 2 foi submetida ao processo de lavagem com MeOH, obtendo-se 15 mg da substância eugenitina (insolúvel em MeOH), pertencente à classe dos cromenos. A parte solúvel em MeOH (40 mg) foi reunida com a subfração 3 (20 mg), resultando na subfração Fr8.2-3 (60 mg). Esta foi submetida à cromatografia preparativa em camada delgada, a fase móvel utilizada foi Hex:EtOAc (2:8), sendo as placas eluídas apenas uma vez. Assim, foi obtida a substância Fr8.2-3 (15 mg), que foi submetida a um último passo cromatográfico em pipeta Pasteur contendo sílica Florisil®, eluída com fase móvel isocrática de EtOAc:MeOH (99:1), com vistas a uma melhor purificação da amostra, gerando rendimento final de 5 mg da substância austidiol diidroisocumarina, a qual também foi obtida a partir da fração diclorometânica do cultivo em meio sólido.

3.13 Elucidação Estrutural.

A análise orgânica das substâncias isoladas foi realizada pelo uso de técnicas de ressonância magnética nuclear (^{1}H e ^{13}C, DEPT, HMBC, HMQC, COSY, NOESY e TOCSY), bem como de dados de espectrometria de massas, infravermelho, ultravioleta, difração de Raio-X, ponto de fusão e rotação específica.

3.13.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{1}H e ^{13}C, COSY, HMBC, HMQC, NOESY e TOCSY).

Parte dos espectros de RMN foi adquirida em um instrumento BRUKER Avance DRX-500 e outra parte em um instrumento VARIAN 400, utilizando $CDCl_3$, CD_3OD ou DMSO (deuterado) com o solvente residual como padrão interno; as determinações de multiplicidade e espectros de RMN 2D (COSY, HMQ e HMBC) foram obtidos usando programas pulso padrões Bruker.

3.13.2 Espectrometria de Massas (EM).

Os espetros de massas de alta resolução foram obtidos pela injeção direta no equipamento LC/MSD – TOF Agilent Technologies (Model # F1969A).

3.13.3 Ultravioleta (UV)

Os dados de ultravioleta foram obtidos no equipamento UV VARIAN – 50 BIO UV-Visible Spectrophotometer.

3.13.4 Rotação óptica [α_D]

Os dados de rotação específica foram mensurados em $CHCl_3$, DMSO ou MeOH utilizando o instrumento AUTOPOL IV® sob temperatura ambiente de 20°C.

3.13.5 Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos através do uso do instrumento Bruker Tensor 27 FTIR.

3.13.6 Ponto de fusão (°C)

Os valores de ponto de fusão das substâncias isoladas foram obtidos por meio do uso do equipamento OptiMelt (Automated Melting Point System) Digital Image ProcessingTechnology SRS Stanford Research Systems.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas – *Beauveria bassiana.*

A partir das frações diclorometânica e em acetato de etila dos cultivos em meio sólido do fungo *B. bassiana* foram obtidos produtos naturais pertencentes à classe das piridonas e das aloxazinas (**Figura 19**).

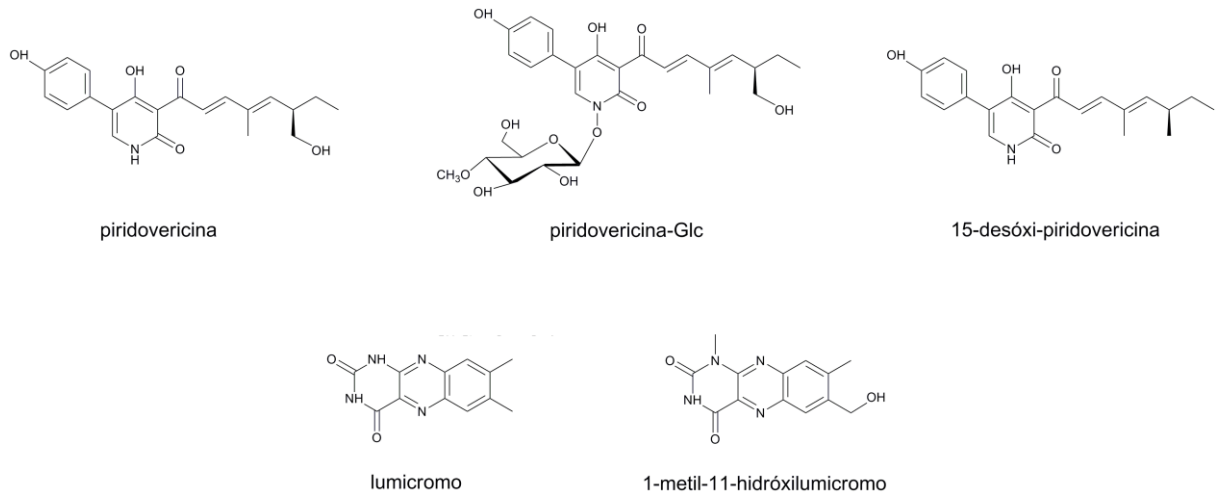


Figura 19. Aloxazinas e piridonas isoladas de cultivos de *B. bassiana*

Piridonas

Referente aos derivados piridônicos foram isolados três metabólitos. O metabólito fúngico conhecido como **piridovericina** 4-hidróxi-3-[(6*R*,2*E*,4*E*)-6-(hidróximetil)-4-metilocta-2,4-dienoil)-5-(4-hidróxifenil)]piridina-2(1*H*)-ona e dois metabólitos inéditos relacionados: **piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo)** 1-[(2”,3”-diidróxi-5”-(hidróximetil)-4”-metoxitetraidro-1”*H*-pirano-1”-iloxi)]-4-hidróxi-3-[(6*R*,2*E*,4*E*)-6-(hidróximetil)-4-metilocta-2,4-dienoil]-5-(4-hidróxifenil)-piridina-2(1*H*)-ona) e **15-desóxi-piridovericina** 3-[(6*R*,2*E*,4*E*)-4,6-dimetilocta-2,4-dienoil)-4-hidróxi-5-(4-hidróxifenil)]piridina-2(1*H*)-ona).

Alcalóides 4-hidróxi-2-piridona exercem diversos efeitos biológicos, incluindo atividades antifúngica, antimicrobiana, inseticida e citotóxica. Por esta razão, esta classe de compostos tem atraído muita atenção da comunidade científica, resultando na elucidação da biossíntese de alguns membros que são formados por policetídeo síntases fúngicas via ácido tetrâmico, bem como por diferentes vias de síntese total. Esta classe de compostos é extremamente rica em diversidade e em atividades biológicas. Nas últimas décadas, novos compostos com intrincadas estruturas foram revelados e diferentes abordagens sintéticas têm sido desenvolvidas. Apesar do conhecimento sobre a classe dos alcalóides 2-piridona ser cada vez

maior, muitas perguntas permanecem sem resposta no que se refere à biossíntese, congêneres desconhecidos, alvos biológicos e configuração absoluta (Jessen e Gademann, 2010).

A história dos alcalóides piridonas remonta ao século 19, quando Tuson isolou da mamona uma substância venenosa cristalina que ele chamou de ricinina (Tuson, 1864). A elucidação estrutural foi realizada em 1904 por Maquenne e Philippe, que propuseram a estrutura do núcleo 2-piridona. Algumas décadas mais tarde pigmentos amarelos foram isolados de culturas do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em 1968, sendo que as características estruturais dos biocromos tenellina e bassianina foram desvendadas em 1974 por McInnes *et al*. Entretanto, mais alcalóides piridonas foram isolados, entre eles, flavipucina (Casinovi *et al.*, 1968), funiculosina (Ando *et al.*, 1969), ilicicolina H (Hayakawa *et al*., 1971) e o antibiótico kirromicina (Wolf e Zahner, 1972) (**Figura 20**). Estes resultados enriqueceram a classe dos alcalóides piridonas no âmbito da química de produtos naturais, que foi aberto em 1864 e continua ainda hoje, com estruturas fascinantes que estão sendo descobertas (Jessen e Gademann, 2010).

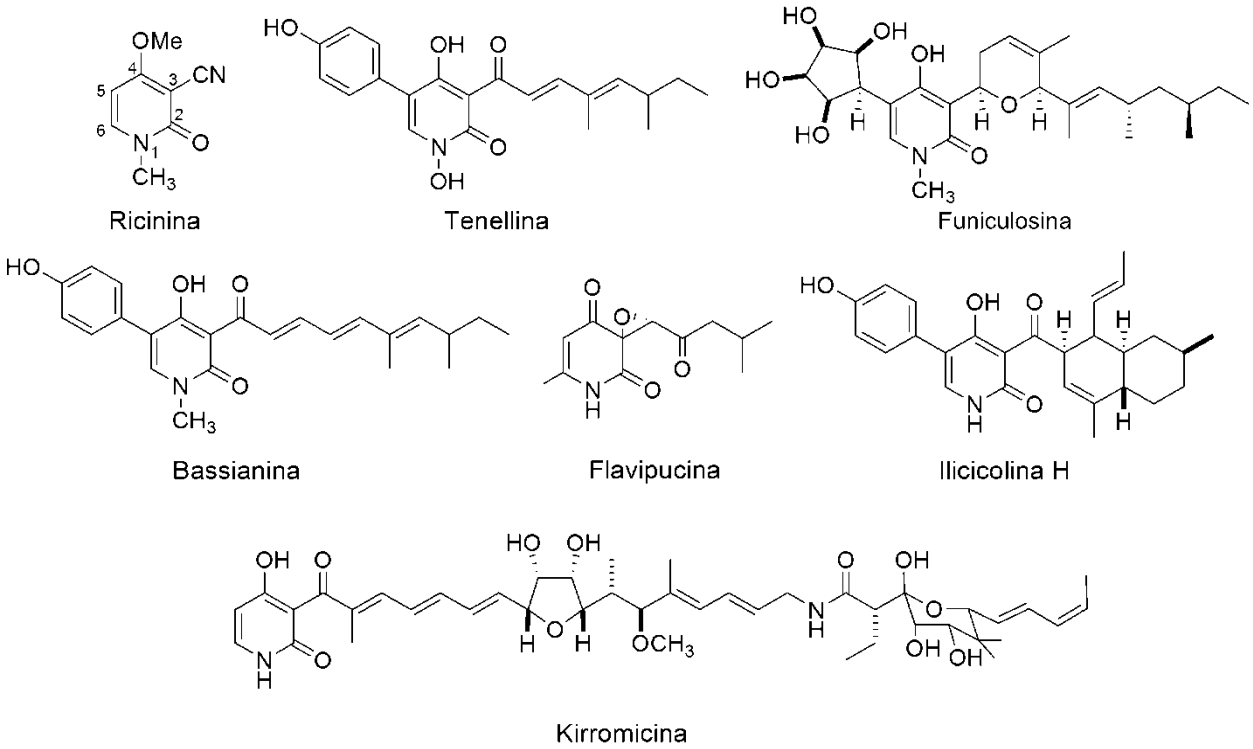


Figura 20. Exemplos de piridonas produzinas por planta (ricinina) e fungos.

Culturas do fungo entomopatogênico *B. bassiana* geralmente desenvolvem uma coloração amarela, devido à formação de uma mistura de pigmentos relacionados, entre estes pigmentos

tem sido reportados a tenellina, bassianina (Wat *et al.*, 1977), piridovericina e piridomacrolidina (Takahashi *et al*., 1998).

Piridonas são compostos que possuem um sistema anel 2-piridona-5-substituído, com uma metade acila ligada ao C-3 (complexo 2-piridona + ácido aciltetrâmico) (Moore *et al.*, 1999). Piridovericina e piridomacrolidina são metabólitos isolados por Takahashi e colaboradores (1998) e que contém em comum uma unidade *p*-hidróxifenil piridona. A atividade biológica de piridovericina e piridomacrolidina inclui a inibição da proteína tirosina quinase (PTK) em concentrações de 100 μg/mL. Inibidores de PTK têm potencial para desempenhar ações como agentes terapêuticos contra uma variedade de doenças proliferativas e inflamatórias (Irlapati *et al*., 2003).

Muitos compostos pertencentes à classe das piridonas possuem interessantes atividades biológicas, por exemplo: fischerina de *Neosartorya fischeri*, tóxica para mamíferos; leporina B (*Aspergillus leporis*), tóxica para insetos e; sambutoxina e compostos relacionados que são micotoxinas hemorrágicas de *Fusarium oxysporum* (Halo *et al*., 2008) (**Figura 21**).

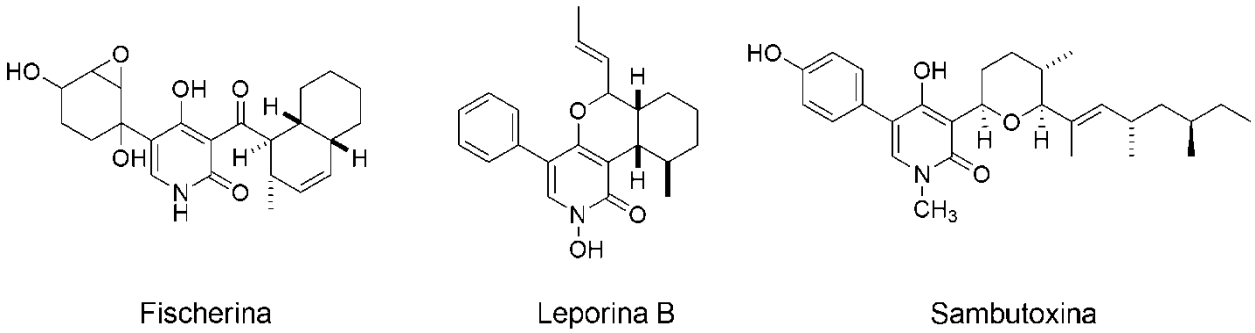


Figura 21. Exemplos de piridonas com atividades biológicas.

Quimicamente esta classe de compostos tem estimulado muito interesse, visto os trabalhos de estudo sobre biossíntese e síntese química destas substâncias. Nesse contexto, o isolamento de novas estruturas contribui para o enriquecimento da classe.

A fórmula molecular do metabólito piridovericina (**Figura 22**) foi determinada como $C_{21}H_{23}NO_5$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 370,1646 (calc para $C_{21}H_{23}NO_5$, 370,1649) (**Figura 106**). O espectro de IV sugeriu a presença de um grupo hidroxílico (3350 cm^{-1}), carbonila de amida (1648 cm^{-1}) e hidrogênio ligado a carbonila (1611 cm^{-1}), respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C confirma a presença de 21 sinais de carbono (**Figura 102)**. As análises dos espectros de RMN ^{1}H e DEPT indicam a presença de duas metilas (δ_C 11,6 e

12,8), um metileno (δ_C 24,0), um metileno oxigenado (δ_C 64,0), um metino (δ_C 43,6), oito metinos oleofínicos (δ_C 115,0 (2); 123,0; 130,1 (2); 140,6; 147,5 e 149,4) e oito carbonos quaternários incluindo seis carbonos oleofínicos (δ_C 105,9; 112,7; 123,4; 134,5; 156,7; e 176,9) e dois carbonos carbonílicos (δ_C 161,7 e 193,8).

O espectro de RMN ^{1}H (**Figura 101**) mostrou 23 sinais de hidrogênios incluindo dois metílicos (δ_H 0,80, *t* (7,7 Hz) e δ_H 1,83, *s*), um metilênico (δ_H 1,20, *m* e δ_H 1,59, *m*), um metilênico oxigenado (δ_H 3,35, 2H, *m*) cujo perfil de multiplicidade não parece bem claro, um metínico (δ_H 2,48, *m*), três hidrogênios oleofínicos (δ_H 5,93, *d* (9,4 Hz), δ_H 7,50, *d* (15,0 Hz) e δ_H 7,98, *d* (15,0 Hz)), um hidrogênio aromático (δ_H 7,53, *s*) e hidrogênios do anel benzênico *p*-dissubstituído (δ_H 6,76, 2H, *d* (8,4 Hz) e δ_H 7,25, 2H, *d* (8,4 Hz). Além destes sinais, existe um hidróxi-hidrogênio alifático (δ_H 4,57, *s*), um hidróxi-hidrogênio fenólico (δ_H 9,46, *s*) e um NH (δ_H 11,60, *sl*). Os dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (DMSO-d_6) são apresentados na **Tabela 24**.

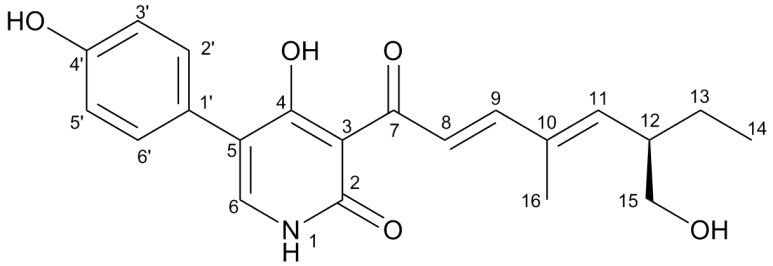


Figura 22. Estrutura de piridovericina isolada de *B. bassiana*.

Os espectros ^{1}H—^{1}H COSY e HMBC (**Figuras 105** e **104**) de piridovericina revelaram a presença de duas estruturas parciais, A e B: uma metade 4-hidróxi-5-(*p*-hidróxifenil) piridona e uma metade 4-metil-6-hidróximetil-octa-2,4-dienoil, respectivamente, como mostrado na **Figura 23**. A presença da metade *p*-hidróxifenil é deduzida pelos sinais de hidrogênios de multiplicidade típica AA'XX' e dos dois sinais de carbono correspondentes a um par de carbonos quimicamente equivalentes (C-2' e C-6' - δ_C 130,1 e C-3'e C-5' - δ_C 115,0). Corroboram para essa proposta as correlações de 4'-OH (δ_H 9,46) com C-4' (δ_C 156,7) e C-3' (C-5') (δ_C 115,0); de H-3' ou 5' (δ_H 6,76) com C-4' (δ_C 156,7), C-3' (5') (δ_C 115,0) e C-1' (δ_C 123,4); de H-2' ou 6' (δ_H 7,25) com C-4' (δ_C 156,7), C-2' (C-6') (δ_C 130,1) e C-5 (δ_C 112,7). Apesar do sinal 4-OH não estar presente no espectro, sua localização é deduzida pelo deslocamento químico dos carbonos C-4 (δ_C 176,9), C-3 (δ_C 105,9) e C-5 (δ_C 112,7) e pelos dados obtidos em literatura. A ligação do grupo *p*-

hidroxifenílico ao C-5 do anel piridona é estabelecida pela correlação de H-2'(6') (δ_H 7,25) com C-5 (δ_C 112,7), como mostrado na **Figura 23**.

O espectro de ^{1}H - ^{1}H COSY de piridovericina revelou duas sequências de hidrogênios [**—^{8}CH=^{9}CH—** e **=^{11}CH—^{12}CH(^{15}CH$_2$OH)—^{13}CH$_2$—^{14}CH$_3$]**, que compõe parcialmente a estrutura B. No espectro de HMBC, o hidrogênio metílico δ_H 1,83 apresentou correlações com três carbonos oleofínicos C-9 (δ_C 149,4), C-10 (δ_C 134,5) e C-11 (δ_C 147,5). Ambos os hidrogênios oleofínicos δ_H 7,98 e 7,50 (H-8 e H-9) se correlacionam com o carbono de carbonila (δ_C 193,8) e com o C-10 (δ_C 134,5). Além disso, o hidrogênio oleofínico δ_H 7,50 se correlaciona com os carbonos δ_C 123,0 e 12,8 (C-7 e C-16). Por fim, o hidrogênio metínico em δ_H 5,93 (H-11) se correlaciona com os carbonos oleofínicos C-9 e C-10 (δ_C 149,4 e 134,5), e com os carbonos δ_C 64,0; 43,6; 24,0 e 12,8.

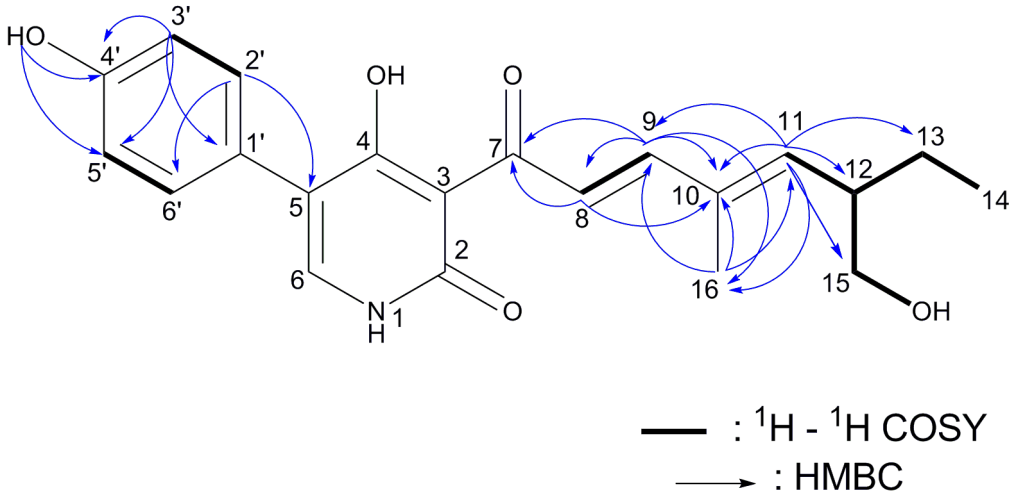


Figura 23. Experimentos de ^{1}H — ^{1}H COSY e HMBC de piridovericina.

A configuração das duas ligações duplas (C-8 – C-9 e C-10 – C-11) foi elucidada como *E* pela constante de acoplamento ($J_{8\text{-}9}$ = 15 Hz) e pela comparação de dados de RMN ^{1}H e ^{13}C com dados previamente reportados (Takahashi *et al*., 1998) para mesmo composto. Estas informações convergiram para a proposição da metade (2*E*,4*E*)-4-metil-6-hidróximetil-octa-2,4-dienoil como estrutura parcial B.

Piridovericina apresenta um centro quiral na cadeia alifática na posição C-12 (**Figura 22**). A determinação da configuração absoluta deste centro quiral foi descrita no trabalho publicado por Zhang *et al*., (2002), utilizando a estratégia de síntese quasiracêmica.

Como em síntese racêmica, a síntese quasiracêmica fornece ambos enantiômeros em uma simples sequência sintética. Entretanto, a separação marcada é usada para assegurar que a mistura quasiracêmica possa ser analisada, separada e identificada. Marcadores com flúor de diferentes tamanhos de cadeias são usados para marcar dois materiais enantioméricos de partida. Os quasienantiômeros são misturados para resultar no quasiracemato, que é então tratado como um racemato em sucessivas etapas de síntese. A flúor-cromatografia é então utilizada para separar o produto final quasiracemato em apenas dois componentes, que são então desmarcados para resultar nos produtos enantioméricos.

Após o processo de síntese e separação dos produtos quasiracêmicos em enantiômmeros, estes foram analisados por RMN e espectrometria de massas. Os dados espectroscópicos de cada enantiômero foram idênticos aos dados da piridovericina natural. A rotação óptica do enantiômero (*S*) foi +3,0 (*c* 0,1, MeOH), enquanto do enantiômero (*R*) foi -3,3 (*c* 0,06, MeOH). Estas rotações são consideravelmente menores do que o valor de -20,3 (*c* 0,1 MeOH) reportado para o produto natural isolado pela primeira vez pelo Dr. Nakagawa da Universidade de Teikyo. A piridovericina isolada no trabalho aqui descrito apresentou valor de -15,0 (*c* 0,3, MeOH). Dessa forma, pode-se considerar a configuração absoluta do produto natural piridovericina como *R* (**Figura 22)**

Tabela 24. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de piridovericina.

Posição	**piridovericina**[a]		
	δ_C mult.	δ_H (*J* in Hz)	HMBC[b]
1	N-H	11,60, s	-
2	161,7, C	-	-
3	105,9, C	-	-
4	176,9, C	-	-
5	112,7, C	-	-
6	140,6, C	7,53, *s*	4
7	193,8, C	-	-
8	123,0, CH	7,98, *d* (15,0)	
9	149,4, CH	7,50, *d* (15,0)	7
10	134,5, C	-	
11	147,5, CH	5,93, *d* (9,4)	9, 12, 16
12	43,6, CH	2,48, *m*	-
13	24,0, CH_2	1,20, *m*; 1,59, *m*	11, 12, 14, 15
14	11,6, CH_3	0,80, *t* (7,7)	12, 13
15	64,0, CH_2	3,35, *m*;4,57, *d* (5,4) (OH)	11, 12, 13,15
16	12,8, CH_3	1,83, *s*	9, 10, 11
1'	123,4, C	-	-
2',6'	130,1, C	7,25, *d* (8,4)	5, 2', 3', 4'
3',5'	115,0, C	6,76, *d* (8,4)	1', 2', 3', 4'
4'-OH	156,7, C	9,46, *s*	3', 5'

[a]Em DMSO-d_6. [b]Correlações HMBC, a partir do(s) hidrogênio(s) assinalados para os carbonos indicados.

O composto piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) (piridovericina-Glc) (**Figura 24**), com a fórmula molecular $C_{28}H_{35}NO_{11}$ determinada a partir do espetro de massas de alta resolução, foi obtido como um óleo amarelo com $[\alpha]_D^{20}$ - 59,5 (*c* 0,02, MeOH). Os dados espectrais de RMN de ^{13}C e de ^{1}H foram bastante similares aos obtidos para a piridovericina, os sinais adicionais nos espectros são atribuídos à metade sacarídea ligada ao grupamento N–OH. O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 114**) indicou a presença de 28 carbonos, dos quais 21 foram atribuídos para a porção aglicônica, e sete à metade sacarídea. Na metade aglicônica os carbonos foram categorizados como: uma cetona conjugada em δ_C 193,7, sete carbonos quaternários sp^2 em δ_C 175,4; 157,3; 157,1; 134,6; 122,8; 111,8 e 106,5; oito metinos sp^2 em δ_C 150,4; 148,5; 142,9; 130,5 (2); 122,5; 115,1 (2), um metileno oxigenado em δ_C 64,0, um metino sp^3 em δ_C 43,7, um metileno em δ_C 24,0 e dois grupos metílicos em δ_C 12,9 e 11,7 (**Tabela 25**).

Os dados de COSY (**Figura 115**) revelaram a presença de um dieno conjugado (CH-8 e CH-11). A geometria *E,E* (*trans*) foi atribuída pela comparação de dados de RMN ^{1}H e ^{13}C com dados previamente reportados (Takahashi *et al*., 1998). As correlações no espectro de HMBC de H-8 e H-9 com δ_C 193,7 indicaram que o dieno está ligado à cetona (C-7). Os dados de COSY revelaram que o outro lado do dieno (C-11) conecta-se a um metino (δ_H 2,52, *m*; δ_C 43,7; CH-12), que está ligado a um grupo hidroximetilênico e a um grupo etílico. A partir dessa informação, a metade 4-metil-6-hidróximetil-octa-2,4-dienoil (C-7–C-15) foi estabelecida. A presença do grupo *p*-hidroxifenílico foi deduzida pelo típico padrão de multipletos AA'XX' no espectro de RMN ^{1}H e pelos sinais de carbonos decorrentes dos pares quimicamente equivalentes (C-2’, C-6’ e C-3, C-5’), que foram evidenciados pelas correlações de 4'-OH (δ_H 9,55) com C-4' (δ_C 157,1) e C-3' (ou 5') (δ_C 115,1), de H-3' (ou 5') (δ_H 6,78) com C-4', e H-2' (ou 6') (δ_H 7,28) com C-4' e C-5 (δ_H 111,8). Uma correlação no espectro de HMBC (**Figura 121**) do metino sp^2 em δ_H 8,03 (*s*, H-6) com C-4 (δ_C 175,4) indicou a localização do metino sp^2 (CH-6), mas não revelou correlações deste com C-2 e C-5 (δ_C 157,3 e 111,8).

As ressonâncias restantes de piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) foram atribuídas a unidade glicopiranosídeo com base nos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (**Tabela 25**), associado ao uso dos dados de TOCSY e NOESY 1D (**Figura 112** e **113**) para decifrar a estrutura e ligação do monossacarídeo. A alta constante de acoplamento observada entre H-2’’ e H-3’’ (δ_H 3,21 e 3,38), H-3’’ e H-4’’ (δ_H 3,38 e 3,02), e H-4’’ e H-5’’(δ_H 3,02 e 3,28) indicaram que estes pares de hidrogênios estão todos em orientação *trans*-diaxial em relação

ao resíduo piranosil, levando a atribuição de uma metade do tipo glicopiranose. Ligado à posição C-4” foi atribuído um grupo metílico (δ_H 3,41; δ_C 59,7) baseado na correlação revelada pelo HMBC de δ_H 3,41 com C-4” (δ_C 78,7). Além disso, o espectro de NOESY 1D revelou uma correlação entre o hidrogênio anomérico (H-1’’; δ_H 4,97) e o metino sp^2 em δ_H 8,03 (*s*, H-6) do anel piridona e este dado confirmou a ligação da unidade glicopiranosil à metade piridovericina na posição 1. A unidade glicopiranose em piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) está conectada via uma ligação *β* com base no deslocamento químico do carbono anomérico (C-1’’; δ_C 106,0), bem como pela constante de acoplamento $^1H—^1H$ (8,0 Hz) observada para o hidrogênio anomérico (H-1’). A fórmula molecular de piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) requereu a presença de um átomo de nitrogênio e, devido aos deslocamentos químicos dos carbonos heteroaromáticos sp^2 (C-2, C-6), uma estrutura 2-piridona–N-*O*-glicopiranosil foi proposta.

Por fim, o padrão de fragmentação observado no espectro EM/EM confirmou a presença da metade 4-*O*-metil-*β*-D-glicopiranosídeo [HREIMS (ESI – TOF): *m/z* 562,2253, *m/z* 386,1560], devido a perda de uma molécula de glicose metilada na posição 4” (**Figura 125**). A estrutura de piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) é relacionada à piridovericina (Takahashi et al., 1998) e os dados espectroscópicos de NMR ^1H e ^{13}C são bastante similares aqueles reportados previamente.

A 15-desóxi-piridovecina (**Figura 24**) foi a terceira piridona isolada no trabalho, sua fórmula molecular foi determinada por espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* 354,1702 $[M+H]^+$ (calcd $C_{21}H_{24}NO_4$, 354,1700) (**Figura 136**) como $C_{21}H_{23}NO_4$ e apresentou valor de $[\alpha]_D^{20}$ - 48,0 (*c* 0,02, MeOH). Os dados espectroscópicos de RMN ^1H (**Figura 126**), COSY, HMQC e HMBC foram similares àqueles apresentados pela piridovericina, exceto por pequenas diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos do sistema piridona, H-6 e pela substituição do grupo hidroximetílico por um metílico na posição 12 (**Tabela 25**). Os carbonos foram atribuídos pela análise dos dados de HMQC e HMBC (**Figuras 129** e **132**). Como no caso de piridovericina, correlações importantes foram observadas no espectro de HMBC do H-6 com os carbonos C-2 e C-1’. Além disso, importantes correlações foram observadas do H-15 (δ_H 1,03) com C-11 (δ_H 5,85), C-12 (δ_H 2,56) e C-13 (δ_H 1,35 e 1,46), então caracterizando a presença do grupo metílico. Desse modo, o composto 15-desóxi-piridovericina foi atribuído como um N-desóxi análogo de tenellina, o qual possui dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C similares.

Com relação à estereoquímica do C-12, presente tanto na piridovericina-Glc quanto em 15-desóxi-piridovericina, inferimos que estes possuem a mesma configuração atribuída à piridovericina, ou seja, configuração *R*, uma vez que os três metabólitos certamente possuem a mesma via biossintética. Esta conclusão é reforçada pelos valores de $[\alpha]_D^{20}$ obtidos para os dois metabólitos inéditos (-59,5 e -48,0, respectivamente), os quais se assemelham ao valor obtido para piridovericina (-15.0), cuja configuração foi determinada experimentalmente. Muito embora a piridovercina-Glc apresente outros centros quiriais na porção sacarídea.

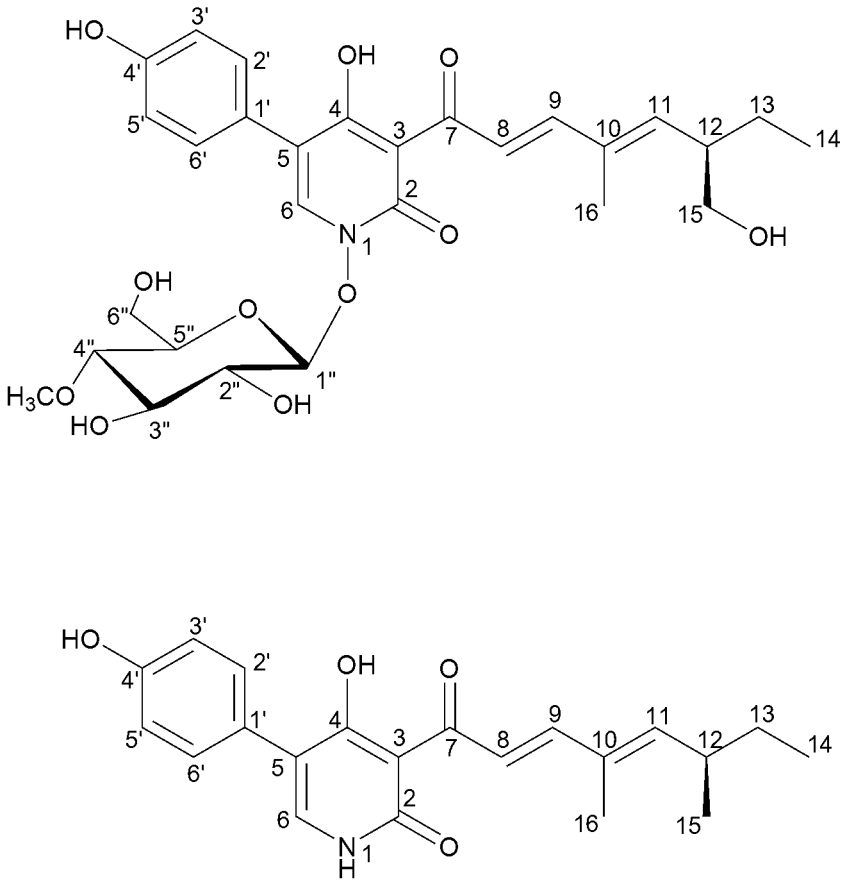


Figura 24. Piridonas inéditas de *B. bassiana.*

Tabela 25. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de piridovericina-Glc e 15-desóxi-piridovericina.

	piridovericina-Glc[a]			**15-desóxi-piridovecina**[b]		
Posição	δ_C mult.	δ_H (*J* in Hz)	HMBC[c]	δ_C mult.	δ_H (*J* in Hz)	HMBC[c]
1	N-O	-	-	N-H	-	-
2	157,3, C	-	-	164,1, C	-	-
3	106,5, C	-	-	105,9, C	-	-
4	175,4, C	-	-	177,7, C	-	-
5	111,8, C	-	-	112,8, C	-	-
6	142,9, CH	8,03, *s*	4	140,1, C	7,47, *s*	2, 4, 1’
7	193,7, C	-	-	195,8, C	-	-
8	122,5, CH	7,88, *d* (15,0)		123,6, CH	7,97, *d* (15,0)	7, 10
9	150,4, CH	7,55, *d* (15,0)	7	150,8, CH	7,58, *d* (15,0)	7, 9, 10
10	134,6, C	-		134,3, C	-	
11	148,5, CH	5,98, *d* (9,4)	9, 12, 16	151,1, CH	5,85, *d* (9,0)	9, 16
12	43,7, CH	2,52, *m*	-	36,1, C	2,56, *m*	
13	24,0, CH_2	1,21, *m*; 1,57, *m*	11, 12, 14, 15	30,8, CH_2	1,35, *m*; 1,46, *m*	
14	11,7, CH_3	0,80, *t* (7,4)	12, 13	11,9, CH_3	0,88, *t* (7,4)	12, 13
15	64,0, CH_2	3,35, *m*	11, 12, 13	20,2, CH_3	1,03, *d* (6,7)	11, 12, 13
		4,59, *t* (5,4) (OH)	15			
16	12,9, CH_3	1,85, *s*	9, 10, 11	12,5, C	1,91, *s*	10, 11
1’	122,8, C	-	-	124,1, C	-	-
2’,6’	130,5, C	7,28, *d* (8,4)	5, 2’, 3’, 4’	131,0, CH	7,28, *d* (8,6)	2’, 3’, 4’
3’,5’	115,1, C	6,78, *d* (8,4)	1’, 2’, 3’, 4’	115,7, CH	6,81, *d* (8,6)	1’, 3’, 4’
4’- OH	157,1, C	9,55, *s*	3’, 5’	156,7, C	-	-
1 –*NO*						
1”	106,0,CH	4,97, *d* (8,0)	3”	-	-	-
2”	72,4,CH	3,21, *ddd* (4,4; 8,0; 9,1)	1”	-	-	-
		5,48, *s* (OH)				
3”	75,8,CH	3,38, *m*	2”, 4”	-	-	-
		5,33, *d* (5,6) (OH)	4”			
4”	78,7,CH	3,02, *t* (9,1)	5”, 6”,	-	-	-
4-OCH_3	59,7,CH_3	3,41, *s*	4”	-	-	-
5”	75,7,CH	3,28, *m*	6”	-	-	-
6”	60,4,CH_2	3,48, *m*; 3,57 *m*	-	-	-	-
		4,70, *t* (5,6) (OH)	5”, 6”			

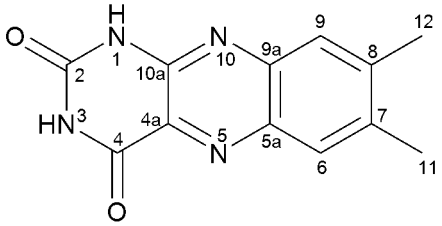
[a]Em DMSO-d_6. [b]Em CD_3OD. [c] Correlações HMBC, a partir do(s) hidrogênio(s) assinalados para os carbonos indicados.

Aloxazinas

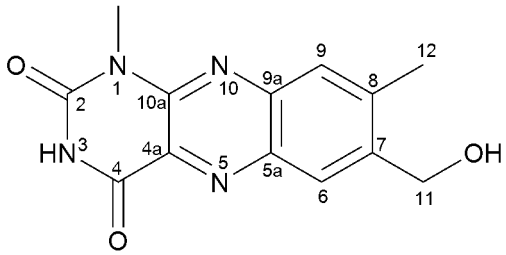
Referente aos derivados aloxazínicos foram isolados dois metabólitos. O metabólito fúngico conhecido como **lumicromo** (7,8-dimetilbenzo[*g*]pteridina-2,4-(1*H*,3*H*)-diona ou 7,8-dimetilaloxazina) e um metabólito inédito relacionado, **1-metil-11-hidróxilumicromo** (11-(hidróxi)-1,8-dimetilbenzo[*g*]pteridina-2,4-(1*H*,3*H*)-diona). Estes metabólitos são derivados resultantes da biotransformação da riboflavina.

O composto 7,8-dimetilaloxazina (**Figura 25**), lumicromo, foi identificado através da comparação dos dados de RMN ^{1}H, ^{13}C e espectrometria de massas de alta resolução com dados da literatura. Os dados espectroscópicos são apresentados na **Tabela 26**. O espectro de RMN de ^{1}H em DMSO-d_6 (**Figura 146**) revelou dois singletos metílicos (δ_H 2,47 e 2,50), dois singletos aromáticos (δ_H 7,69 e 7,90) e dois hidrogênios NH (δ_H 11,51 e 11,67). Os dados de RMN de ^{13}C (**Figura 147**) indicaram a presença de 12 carbonos, duas carbonilas em δ_C 160,6 e 150,0, seis carbonos quaternários sp^2 em δ_C 146,5; 144,7; 141,7; 138,9; 138,4; 130,1; dois metinos sp^2 (δ_C 128,7 e 125,8) e dois grupos metílicos (δ_C 20,2 e 19,5). Análise do espectro de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* 243,0865 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{12}H_{11}N_4O_2$, 243,0882) (**Figura 149**) confirmou a identificação proposta.

A substância 1-metil-11-hidróxilumicromo (**Figura 25**) foi obtida como um pó amarelo, e a fórmula molecular foi estabelecida como $C_{13}H_{12}N_4O_3$ por espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* 273,0962 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{13}H_{13}N_4O_3$, 273,0982) (**Figura 145**). Apresenta estrutura similar a 7,8-dimetilaloxaxina, diferenciando-se por uma metilação na posição 1 (N-CH_3) e pela oxidação da metila (CH_3, C-11) ao álcool primário CH_2OH na posição 7. Os dados espectroscópicos são apresentados na **Tabela 26**. O espectro de RMN ^{1}H em DMSO-d_6 (**Figura 137**) revelou dois singletos metílicos (δ_H 2,48 e 3,52), dois singletos aromáticos (δ_H 7,77 e 8,07), um hidrogênio metilênico oxigenado (δ_H 4,70), e dois hidrogênios trocáveis (δ_H 5,51 e 11,98). Os dados de RMN ^{13}C, DEPT135 e HMQC (**Figuras 138, 139** e **141**) indicaram a presença de 13 carbonos, duas carbonilas em δ_C 159,6 e 150,2, seis carbonos quaternários sp^2 em δ_C 146,7; 143,0; 142,9; 141,2; 137,4 e 130,7, dois metinos sp^2 (δ_C 126,6 e 125,7), um metileno oxigenado (δ_C 60,6), e dois grupos metílicos (δ_C 28,2 e 18,7). O espectro de HMBC (**Figura 26**) indicou importantes correlações que estabeleceram o esqueleto aloxazínico com um grupo metílico na posição 1 (δ_H 3,52 para δ_C 150,2 e 146,7) e um grupo hidroximetílico na posição 7 (δ_H 4,70 para δ_C 143,0 e 125,7), revelando as principais diferenças em relação ao lumicromo. A elucidação foi confirmada pelo espectro de massas de alta resolução obtido.



7,8-dimetilaloxazina



1-metil-11-hidróxilumicromo

Figura 25. Derivados aloxazina isolados de cultivos de *B. bassiana.*

Tabela 26. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC 7,8-dimetilaloxazina e 1-metil-11-hidróxilumicromo.

Posição	7,8-dimetilaloxazina[a]		1-metil-11-hidróxilumicromo[a]		
	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[c]
1	NH	11,67, *s*	28,2, N-CH_3	3,52, *s*	146,7; 150,2
2	150,0, C	-	150,2, C	-	-
3	NH	11,51, *s*	NH	11,98, *s*	-
4	160,6, C	-	159,6, C	-	-
4[a]	130,1, C	-	130,7, C	-	-
5	N		N		
5[a]	138,9, C	-	142,9, C	-	-
6	125,8, CH	7,90, *s*	125,7, CH	8,07, *s*	60,5; 141,9; 143,0
7	144,7, C	-	141,2, C	-	
8	138,4, C	-	143,0, C	-	
9	128,7, CH	7,69, *s*	126,6, CH	7,77, *s*	18,7; 137,4; 143,0
9[a]	144,7, C	-	137,4, C	-	-
10	N		N		
10[a]	141,7, C	-	146,7, C	-	
11	20,2, CH_3	2,50, *s*	60,6, CH_2	4,70, *s*	125,7; 143,0
11–OH	-	-		5,51, *s*	
12	19,5, CH_3	2,47, *s*	18,7, CH_3	2,48, *s*	126,6; 143,0

[a]Em DMSO-d_6. Correlações HMBC a partir do(s) hidrogênio(s) assinalados para os carbonos indicados.

Lumicromo é um produto comum de quebra de riboflavina, formado na presença de luz através de uma clivagem fotoquímica do grupo ribitil sob condições neutras e ácidas (Ball, 2006). Estudos têm mostrado a produção de lumicromo a partir do catabolismo de riboflavina (McCormick, 2003), mas outros estudos sugerem que lumicromo pode ser produzido via um mecanismo ativo e exercer atividades bioquímicas. Bactérias, plantas e algas comumente secretam riboflavina ou lumicromo. Lumicromo é uma substância potencialmente importante que pode aumentar a taxa fotossintética e o crescimento de plantas (Tuberoso *et al.*, 2011).

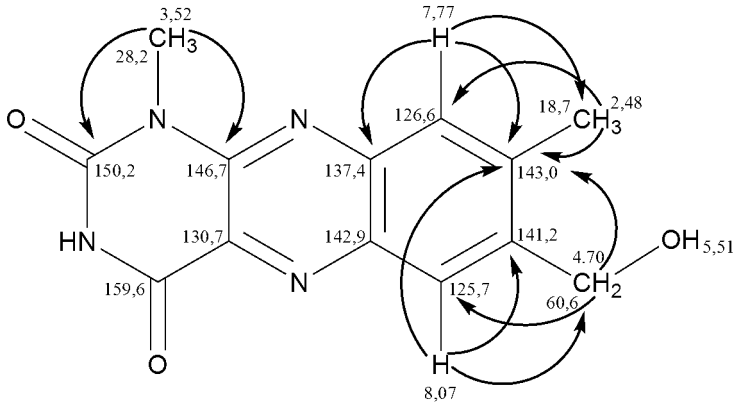


Figura 26. Correlações de HMBC 1-metil-11-hidróxilumicromo.

4.2 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas – *Mycoleptodiscus indicus*

A partir das frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila dos cultivos em meio sólido do fungo *M. indicus* foram obtidos produtos naturais pertencentes à classe dos cromenos e dos azafilonas (**Figura 27**).

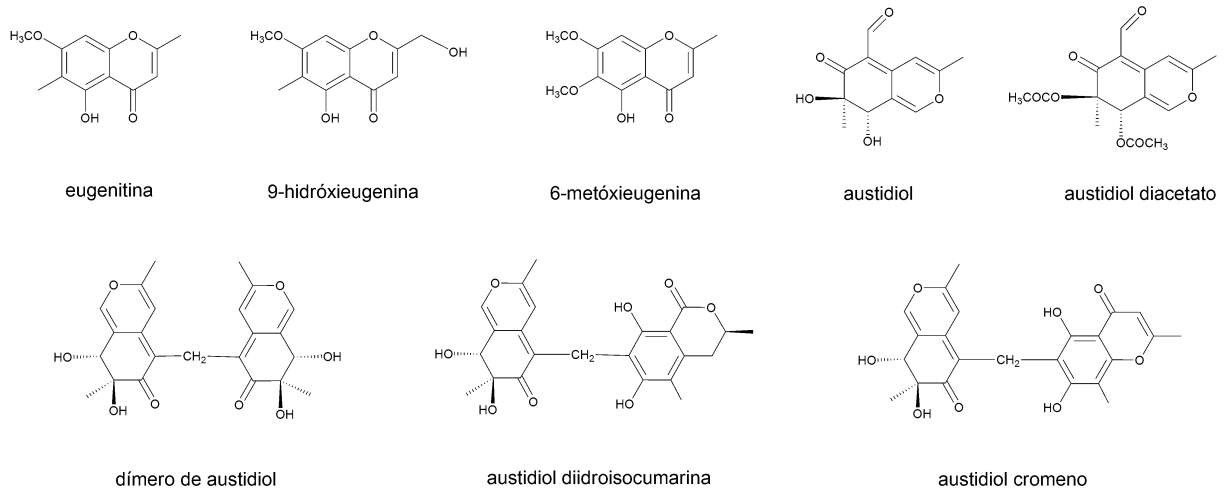


Figura 27. Azafilonas e cromenos isolados de cultivos de *M. indicus.*

Cromenos

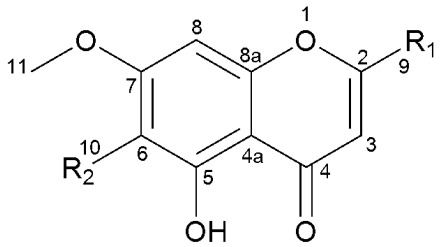
Referente aos derivados cromenos foram isoladas as seguintes substâncias: 5-hidróxi-7-metóxi-2,6-dimetil-cromen-4-ona (5-hidróxi-7-metóxi-2,6-dimetil-1-benzopiran-4-ona), conhecida como **eugenitina**, 5-hidróxi-6,7-dimetóxi-2-metil-1-benzopiran-4-ona, conhecida como **6-metóxieugenina** e 5,9-diidróxi-7-metóxi-6-metil-1-benzopiran-4-ona, conhecida como **9-hidróxieugenina.**

Derivados cromenos têm sido isolados de uma ampla variedade de plantas e fungos (Tsui e Brown, 1996). Estudos prévios sugerem que eles possuem um espectro de atividades

incluindo anticancer (Aono *et al*., 1990; Eda *et al*., 1990) e inibição de cabelos grisalhos pela promoção da formação de melanina (Okamoto *et al*., 1997). Fungos produtores de derivados cromenos incluem *Tolypocladium extinguens*, *Paraphaeosphaeria quadriseptata*, *Chaetomium chiversii* e *Chaetomium brasiliense*.

A fórmula molecular do metabólito majoritário eugenitina (**Figura 28**), um sólido branco, foi deduzida como $C_{12}H_{12}O_4$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) em combinação com dados de RMN ^{1}H e ^{13}C, HMQC e HMBC. A substância tem um simples espectro de RMN ^{1}H (seis singletos) (**Figura 45**) que sugere seis hidrogênios não acoplados. O singleto δ_H 12,92 foi interpretado como um hidrogênio de hidroxila fenólica. Os hidrogênios metínicos δ_H 6,59 e 6,19 pertencem ao anel benzênico e ao anel benzopiranona, respectivamente. O singleto em δ_H 3,84 corresponde aos hidrogênios metílicos do grupamento metoxílico (C-7). Por fim, têm-se os sinais de hidrogênios δ_H 2,34 e 1,93, correspondentes aos grupamentos metílicos pertencentes ao sistema benzopiranona e ao anel benzênico, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 46**) confirmou 12 sinais de carbono que incluem três carbonos metílicos (δ_C 56,2; 19,8 e 7,2), dois metínicos (δ_C 108,2 e 89,9) e sete sinais de carbonos quaternários (δ_C 181,8; 167,6; 162,8; 157,4; 155,8; 107,3 e 103,9). A presença de sistema aromático oxigênio substituído foi deduzido com base nos deslocamentos químicos dos carbonos e confirmado pelo espectro de UV correspondente (231, 236, 255 e 284 nm). O sinal de carbono quaternário δ_C 181,8 foi atribuido à carbonila de cetona e confirmado pela absorção em 1652 cm^{-1} no espectro de IV.



Eugenitina: R_1 e R_2= -CH_3
6-metóxieugenina: R_1= -CH_3; R_2= -OCH_3
9-hidróxieugenina: R_1= -CH_2OH; R_2= -CH_3

Figura 28. Estrutura dos cromenos isolados a partir de *M. indicus*.

Em adição aos dados citados, a substância eugenitina foi elucidada pela combinação com dados de RMN bidimensional (RMN 2D). Análise detalhada dos espectros de HMQC e HMBC (**Figuras 47** e **48**) permitiu definir duas subunidades: um anel aromático substituído e uma cetona *β*-metil-*α*,*β*-insaturada (**Figura 29**). No mapa de contornos HMBC foi possível observar correlação do hidrogênio δ_H 6,19 com os carbonos δ_C 181,8; 167,6 da cetona *β*-metil-*α*,*β*-insaturada, além das correlações com o carbono metílico δ_C 19,8 e o carbono quaternário δ_C 103,9. O hidrogênio δ_H 6,59 pertencente ao anel aromático apresenta correlações com os carbonos aromáticos δ_C 162,8; 155,8; 107,3 e 103,9. Por sua vez, o hidrogênio δ_H 12,92 pertencente à hidroxila fenólica, se correlaciona com os carbonos aromáticos δ_C 157,4; 107,3 e 103,9. Os hidrogênios metílicos δ_H 3,84 apresentam correlação com o carbono aromático δ_C 162,8 e os hidrogênios metílicos δ_H 1,93 com os carbonos aromáticos δ_C 162,8; 157,4 e 107,3. Por fim, os hidrogênios metílicos δ_H 2,34 se correlacionam com os carbonos δ_C 167,6 e 108,4, pertencentes ao sistema cetona *β*-metil-*α*,*β*-insaturada (**Tabela 27**).

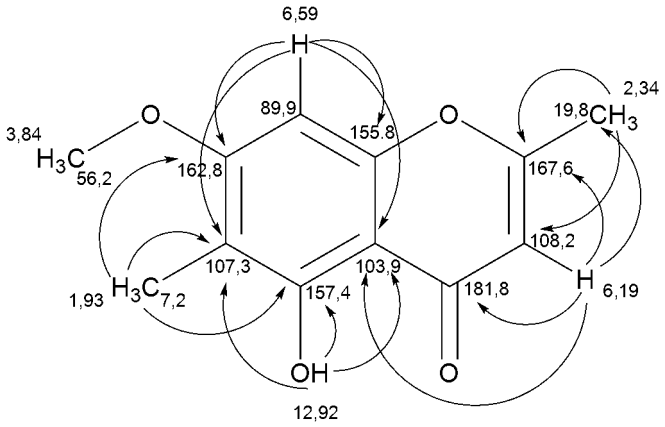


Figura 29. Correlações do mapa de contornos HMBC de eugenitina

A confirmação da existência do anel benzopiranona se deu pelas correlações trazidas pelos dados de RMN HMBC, pela formula molecular e pelos deslocamentos químicos para os carbonos C-2 e C-8a (δ_C 167,6 e 155,8) que se encontram mais desblindados. O metabólito eugenitina teve a fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_4$ determinada por espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 221,0810 (calc para $C_{12}H_{12}O_4$, 221,0808) (**Figura 49**) e os dados espectroscópicos foram semelhantes àqueles reportados na literatura (Fox e Huneck, 1969).

O composto 6-metóxieugenina (**Figura 28**) é um sólido cristalino e apresentou dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (**Figuras 50** e **51**) bastante similares àqueles apresentados por eugenitina. A estrutura da 6-metóxieugenina difere apenas pela substituição de um $–CH_3$ (metila) por um $–OCH_3$ (metoxila) na posição C-6, onde um singleto metílico (δ_H 1,93) foi substituído por um singleto metoxílico (δ_H 4,41). O espectro de RMN ^{13}C (δ_C 7,2 foi substituído por δ_C 50,4) foi consistente com a alteração proposta (**Tabela 27**). Além disso, os dados dos experimentos de HMBC (**Figura 30**) e HMQC (**Figuras 52** e **53**) e a fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_5$ deduzida pelo espectro de massas de alta resolução corroboraram com a estrutura proposta. O espectro de massas de alta resolução (ESI – TOF) gerou *m/z* $[M+Na]^+$ 259,0577 (calc para $C_{12}H_{12}O_5$, 259,0577) (**Figura 54**).

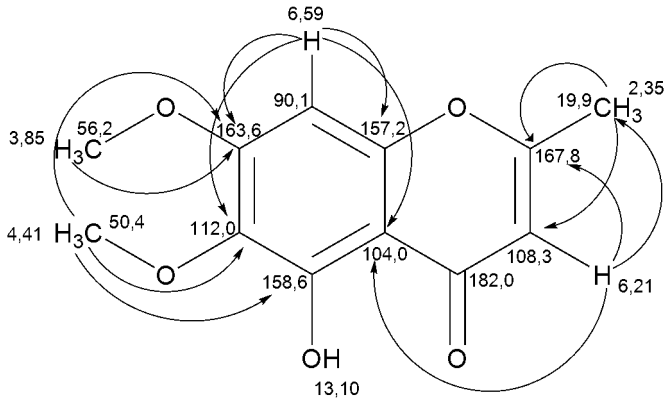


Figura 30. Correlações do mapa de contornos HMBC de 6-metóxieugenina.

O composto 9-hidróxieugenina (**Figura 28**) é também um sólido cristalino e possuí dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (**Figuras 55** e **56**) bastante similares aos dados do composto majoritário eugenitina relacionado anteriormente. A estrutura da substância 9-hidróxieugenina difere da eugenitina apenas pela oxidação do grupamento metílico ($–CH_3$) ao álcool primário CH_2OH na posição C-9, onde um singleto metílico (δ_H 2,34) foi substituído por um singleto metilênico (δ_H 4,43). No espectro de RMN ^{13}C (δ_C 19,8 (CH_3) foi substituido por δ_C 60,6 (CH_2OH)) foi consistente com a alteração proposta (**Tabela 27**). A fórmula molecular foi deduzida como $C_{12}H_{12}O_5$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 237,0829 (calc para $C_{12}H_{12}O_5$, 237,0757 (**Figura 61**). Além disso, os dados de HMQC e HMBC (**Figuras 57** e **58**) corroboram com a estrutura proposta (**Figura 31**).

A via biossintética dos cromenos é a via dos policetídeos, os quais são formados pela fusão de unidades acetato (**Figura 32**).

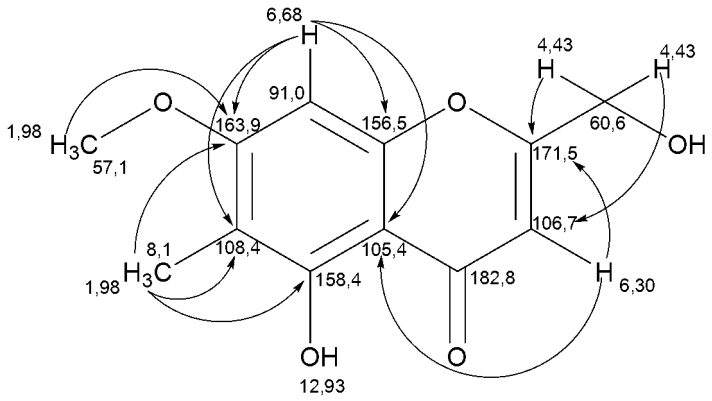


Figura 31. Correlações do mapa de contornos HMBC de 9-hidróxieugenina.

Tabela 27. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC dos cromenos isolados.

Posição	**eugenitina**[a]			**6-metóxieugenina**[a]			**9-hidróxieugenina**[a]		
	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[b]	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[b]	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[b]
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	167,6, C	-	-	167,8, C	-	-	171,5, C	-	-
3	108,2, CH	6,19,*s*	2, 4, 9, 4a	108,3, CH	6,21, *s*	2, 9, 4a	106,7, CH	6,30, *s*	2, 4a
4	181,8, C	-	-	182,0, C	-	-	182,8, C	-	-
4a	103,9, C			104,0, C			105,4, C		-
5	157,4, C	12,92, *s* (OH)	5, 6, 4a	158,6, C	13,10, *s* (OH)	-	158,5, C	12,93, *s* (OH)	-
6	107,3, C	-	-	112,0, C	-	-	108,5, C	-	-
7	162,8, C	-	-	163,6, C	-	-	164,0, C	-	-
8	89,9, CH	6,59, *s*	6, 7, 4a, 8a	90,1, CH	6,59, *s*	6, 7, 4a, 8a	91,0, CH	6,68, *s*	6, 7, 4a , 8a
8a	155,8, C	-		157,2, C	-	-	156,5, C	-	-
9	19,8, CH	2,34, *s*	2, 3	19,9, CH	2.35, *s*	2, 3	60,6, CH_2	4,43, *s*	2, 3
10	7,2, CH_3	1,93, *s*	5, 6, 7	50,4, CH_3	4,41, *s*	5, 6, 7	8,1, CH_3	1,98, *s*	5, 6, 7
11	56,2, CH_3	3,84, *s*	9, 12, 16	56,2, CH_3	3.85, *s*	7	57.2, CH_3	3,89, *s*	7

[a]Em DMSO-d_6. [b]Correlações de HMBC do(s) hidrogênio(s) para os carbonos indicados.

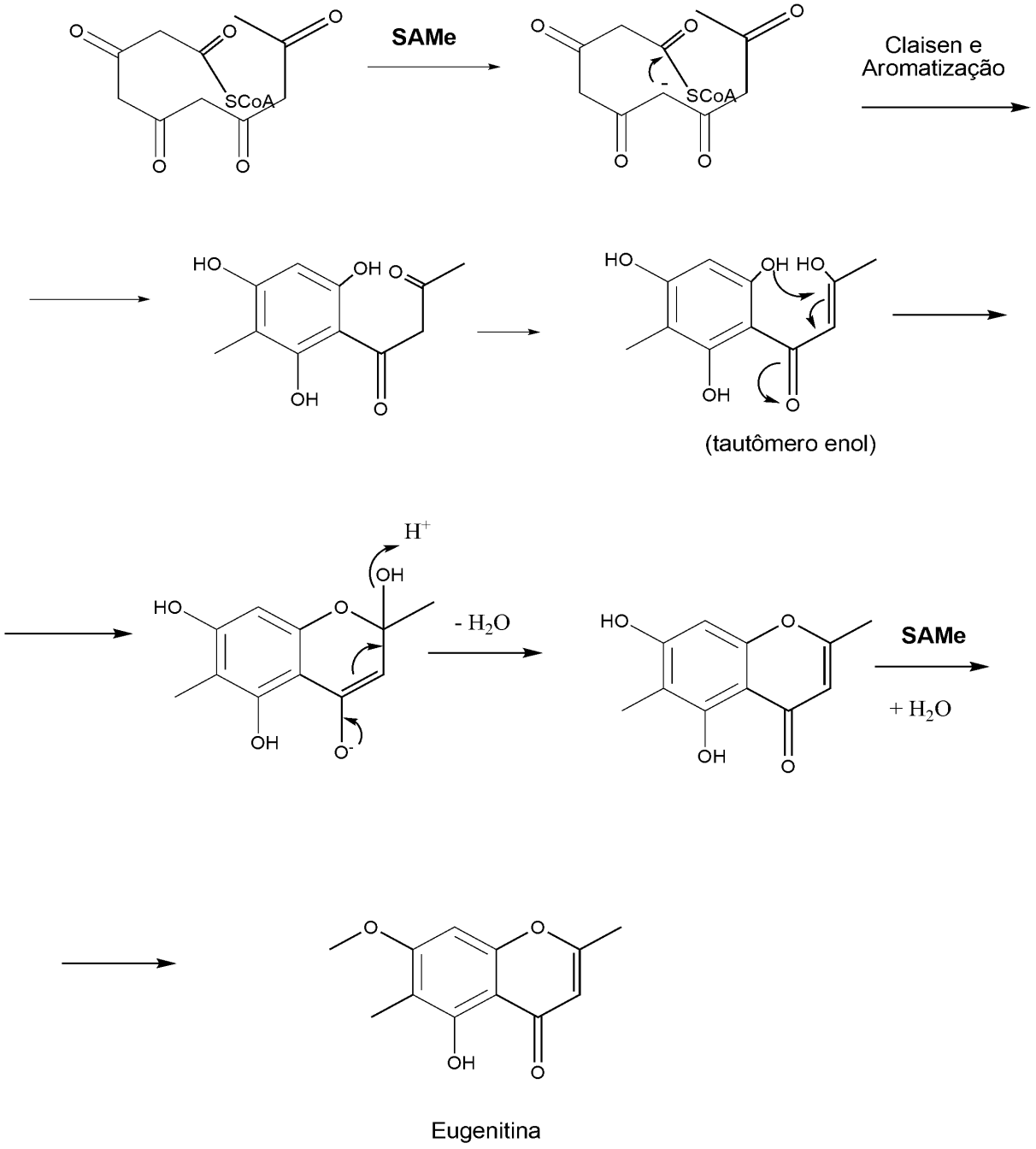


Figura 32. Biogênese de cromenos.

Azafilonas

Referente à classe das azafilonas foram obtidos quatro produtos naturais: (*7R,8S*)-7,8-diidro-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-6-oxo-6*H*-2-benzopiran-5-carboxaldeído conhecido como **austidiol**; (7*R*,8*S*)-5-[(7'*R*,8'*S*)-7',8'-diidróxi-3',7'-dimetil-6'-oxo-7',8'-diidro-5'-metilisocromenil]-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-7,8-diidro-6*H*-isocromen-6-ona, denominado **dímero de austidiol,** 6',8'-diidróxi-3',5'-dimetilisocromen-1'-ona-5-metil-(7*R*,8*S*)-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-7,8-diidro-6*H*-isocromen-6-ona, denominada **austidiol diidroisocumarina** e 5',7'-diidróxi-2',8'-dimetilcromen-4'-ona-5-metil-(7*R*,8*S*)-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-7,8-diidro-6*H*-isocromen-6-ona, denominado **austidiol cromeno**. As substâncias austidiol dímero, austidiol diidroisocumarina e austidiol cromeno são inéditas na literatura e receberam provisoriamente estas denominações e serão referenciados no trabalho desta forma para facilitar a análise orgânica e discussão. Por fim, foram obtidos produtos de acetilação dos produtos naturais austidiol e austidiol dímero.

Mais de 170 diferentes azafilonas ocorrem em fungos pertencentes a 23 gêneros de 13 diferentes famílias. Estas azafilonas podem ser classificadas em dez diferentes grupos estruturais. Numerosas estruturas de azafilonas foram descritas, especialmente dos membros das famílias *Trichocomacea* e *Xylariaceae.* Azafilonas exibem ampla gama de interessantes atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, citotóxica, nematicida e atividade anti-inflamatória. Muitas dessas ações podem ser explicadas pelas reações das azafilonas com grupos amino, tais como aqueles encontrados em aminoácidos, proteínas e ácidos núcleicos, resultando na formação de γ-piridonas (Osmanova *et al*., 2010; Park *et al*., 2005).

Azafilonas é um conjunto interessante de metabólitos secundários de fungos. Classificado como um conjunto, o grupo é na realidade considerado como um subconjunto relativamente pequeno da classe dos policetídeos e alguns autores incluem as azafilonas dentro do grupo dos policetídeos sem dar outra definição (Turner, 1971, Gill e Steiglich, 1987; Gill, 1996; 1999). No entanto, uma definição mais precisa desse termo é necessária, pois policetídeos representam uma série de produtos naturais estruturalmente complexos produzidos por diversos organismos e incluem classes como antraquinonas, flavonóides, antibióticos macrolídeos, naftalenos e naftoquinonas, antibióticos polienos, tetraciclinas e tropolonas (Turner, 1971; Gill e Steglich, 1987). Policetídeos geralmente são classificados por suas estruturas químicas (Hutchinson, 1999). Nesse sentido, azafilonas podem ser definidas como uma classe estruturalmente diversa de metabólitos secundários de fungos (derivados de policetídeos), ou seja, conhecidos pigmentos com estrutura pirano-quinona que contêm um núcleo bicíclico altamente oxigenado e um centro quiral quaternário (Sturdikova *et al*., 2000; Zhu *et al*., 2005; Dong *et al*., 2006). Nota-se que tanto

uma estrutura pirano-quinona quanto um centro quiral quaternário são essenciais para que a estrutura seja classificada como azafilona.

O nome azafilona surgiu como resultado de sua afinidade com amônia: os pigmentos reagem com aminas, tais como proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos para resultar em γ-piridonas vinílicas vermelhas ou roxas devido à troca do oxigênio pirano por nitrogênio (Stadler *et al*., 1995; Sturdikova *et al*., 2000; Wei e Yao, 2005).

É necessário, no entanto, notar que azafilona não é a única classe estrutural a reagir com aminas primárias. Assim, fluoronas isoladas de *Echinodontum tinctoriumm* e *Pyroformes albomarginatus* também mudam de cor quando expostos à amônia (Gill, 1996). No entanto, elas não são azafilonas e não devem ser erroneamente incluídas nesta classe.

Biossinteticamente a maioria dos pigmentos produzidos por fungos são baseados em policetídeos (algumas podem envolver biossíntese mista policetídeo-aminoácido) e envolvem vias complexas catalisadas por policetídeos sintase do tipo I. A biossíntese de azafilonas usa tanto a via dos policetídeos (**Figura 36**) quanto a via de síntese de ácidos graxos. A via dos policetídeos estrutura a principal cadeia de policetídeo dos pigmentos azafilonas a partir do ácido acético (unidade inicial) e de cinco moléculas de ácido malônico (a unidade extensora da cadeia) de uma forma convencional para gerar a estrutura do cromóforo. A via de síntese de ácidos graxos produz um ácido graxo de cadeia média (octanóico ou hexanóico), que é então ligado ao cromóforo por uma reação de transesterificação (Hajjaj *et al*., 1999; Velisek *et al*., 2008).

Vias biossintéticas são sugeridas para as seguintes azafilonas: monascorubrina e monascoflavina (Kurono *et al*., 1963); mitorubrina e rubropunctatina (Turner, 1971); ascochitina (Turner e Aldridge, 1983); ochrefilona (Turner e Aldridge, 1983); citrinina (Turner e Aldridge, 1983; Hajjaj *et al*., 1999); monascusonas A e B, monascina (Jongrungruangchok *et al*., 2004) e sassafina D (Quang *et al*., 2005). No entanto, alguns pesquisadores são da opinião de que um compreensivo conhecimento sobre a via de biossíntese dos pigmentos policetídeos (incluindo os extensivamente pesquisados pigmentos de *Monascus*) ainda não está disponível (Mapari *et al*., 2009).

Algumas estruturas de azafilonas já foram apresentadas em revisões de metabólitos secundários, como pigmentos de fungos. No entanto, uma vez que estas revisões de metabólitos fúngicos são muito gerais e lidam com numerosas classes de substâncias (Turner, 1971; Turner e Aldridge, 1983; Gill e Steglich, 1987; Quang *et al*., 2006a), isto necessariamente significa que as azafilonas são apresentadas apenas como um grupo marginal (Osmanova *et al*., 2010).

Azafilonas também são mencionadas em revisões sistemáticas de certas famílias ou gêneros de fungos (Frisvad *et al*., 1990; Stadler *et al*., 2005; Stadler e Fournier, 2006; Pelaez

et al., 2008). No entanto, estes autores cobrem apenas uma fração de todas as azafilonas conhecidas, uma vez que naturalmente seus artigos omitem as azafilonas produzidas por fungos não incluídos em suas revisões (Osmanova *et al*., 2010).

Neste sentido o isolamento de derivados de azafilonas a partir de culturas de *Mycoleptodiscus indicus* contribui para o enriquecimento e reforça a importância desta classe de metabólitos policetídeos.

O austidiol é estruturalmente relacionado às azafilonas e o tratamento de austidiol com amônia, leva a uma extensiva decomposição deste (Vleggaar *et al*., 1974). As azafilonas são pigmentos amarelo ou laranja produzidos por fungos e seus oxigênios piranil são facilmente trocáveis por nitrogênio de amônia (Arai *et al.*, 1995).

A estrutura assinalada para o austidiol (**Figura 33**) é biogeneticamente possível, cuja molécula pode ser considerada uma cadeia plana de pentacetídeo alquilada em duas posições para render o grupo aldeídico no C-5 e o grupo metílico no C-7 (Vleggaar *et al*., 1974) e é composta de unidades acetato cabeça-cauda, a qual possui duas unidades CH_3 introduzidas por *S*-adenosil-metionina (Colombo *et al.*, 1981).

O composto intitulado (*7R,8S*)-7,8-diidro-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-6-oxo-6*H*-2-benzopiran-5-carboxaldeído (austidiol), $C_{12}H_{12}O_5$, é um diol *trans*-vicinal de dois anéis fundidos. O anel pirano é quase perfeitamente planar, enquanto o anel ciclohexenona adota uma conformação meia-cadeira levemente torcida. A formação de cristais é ditada pela forte interação intermolecular O — H --- O, uma envolvendo grupos hidroxílicos e grupos cetônicos, e a outra envolvendo os dois grupos hidroxílicos (Lo Presti *et al.*, 2003).

Têm sido reportadas atividades inibitórias contra monoamino oxidase, fosfolipase A_2 e promoção de tumores para esta classe de compostos (Arai *et al*., 1995). Além disso, Arai e colaboradores isolaram duas isocromofilonas de *Penicillium multicolor* FO-3216, denominadas isocromofilonas III e VI, com capacidade de inibir a enzima ACAT (colesterol aciltransferase). Esta enzima é um promissor sítio de inibição para tratamento de aterosclerose e hipercolesterolemia (Arai *et al*., 1995).

Outra importante ação relacionada aos derivados azafilônicos é a capacidade de ligação a receptores de endotelina (ET_A e ET_B). As endotelinas (que existem em três isoformas: ET-1, ET-2 e ET-3) são uma família de potentes peptídeos vasoconstritores com ampla variedade de atividades biológicas incluindo broncoconstrição, efeitos inotrópicos ou cronotrópicos positivos, mitogênese e potente efeito renal. Estes peptídeos estão implicados em diversas doenças humanas, incluindo hipertensão, falha cardíaca congestiva, disfunção renal, hipertensão pulmonar, isquemia e vasoespasmo cerebral. O uso de antagonistas do receptor

endotelina é importante para o entendimento do papel pato-fisológico destes peptídeos. Neste sentido, Pairet e colaboradores (1995), isolaram uma série de azafilonas derivadas de esclerotiorina a partir de culivos de *Penicillium sclerotium.* Estas azafilonas apresentaram atividade antagonista aos receptores de endotelina, bloqueando os processos desencadeados pelas mesmas, como por exemplo, processos inflamatórios.

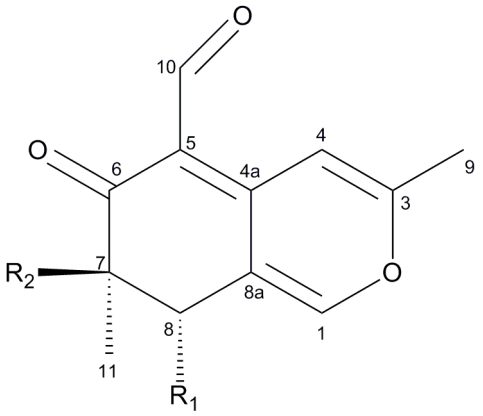
O composto majoritário austidiol foi obtido em boa quantidade, cerca de quatro gramas. A análise orgânica do mesmo foi desenvolvida com base nos dados de RMN ^{1}H, ^{13}C, HMBC, HMQC, espectrometria de massas de alta resolução, além de dados de infravermelho, ultravioleta, rotação específica $[\alpha]_D$ e ponto de fusão (˚C). Além disso, dados da literatura também foram utilizados.

Austidiol foi obtido como um pó ou cristal amarelo, a fórmula molecular foi deduzida como $C_{12}H_{12}O_5$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF). O espectro de UV [λ_{max} (MeOH) 254 e 379 nm] indicou a presença de um sistema conjugado estendido. O espectro de IV mostrou $\nu_{max.}$ 3470 (OH), 3373 (OH), 3100 (C=C), 1679 (CHO) e 1604 cm^{-1} (C=C). O ponto de fusão indicou decomposição à temperatura de 259˚C. Dados elementares bastante próximos àqueles citados na literatura (Vleggaar, 1974).

O composto austidiol tem um espectro de RMN ^{1}H (**Figura 62**) relativamente simples, com sete singletos. O singleto δ_H 10,00 foi atribuído como hidrogênio pertencente a grupamento aldeídico, o qual está ligado ao anel ciclohexenona. O singleto δ_H 8,20 corresponde a dois hidrogênios, um ligado ao C-1 (δ_C 151,8) e o outro ao C-4 (δ_C 106,3) do anel pirânico. Tal atribuição é confirmada pela integral do espectro de RMN ^{1}H que corresponde a dois hidrogênios e pelos dados de RMN 2D (HMBC e HMQC), que trazem as correlações que sustentam tal proposta. Os singletos δ_H 5,92 e 4,39 correspondem aos hidrogênios que se encontram ligados ao C-8 (δ_C 70,6) do anel ciclohexenona, onde δ_H 5,92 corresponde ao hidrogênio de grupamento hidroxílico. Por se tratar de um diol *trans*-vicinal tem-se o singleto δ_H 5,26, que corresponde ao hidrogênio do grupamento OH. Ao mesmo carbono (δ_C 74,2) ao qual se liga o hidrogênio em δ_H 5,26, está ligada uma metila que corresponde ao singleto metílico δ_H 1,08.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 63**) confirmou 12 sinais de carbonos que incluem dois carbonos metílicos (δ_C 19,8 e 18,7), quatro metínicos (δ_C 189,3; 151,8; 106,3 e 70,6) e seis sinais de carbonos quaternários (δ_C 198,2; 166,1; 148,6; 122,1; 108,2 e 74,3). O sinal de carbono quaternário δ_C 198,2 foi atribuido à carbonila de cetona e a presença dos dióis do

sistema diol *trans*-vicinal, com carbonos δ_C 74,3 e 70,6, se confirma pelos dados de IV citados acima. Tais carbonos formam juntamente com δ_C 166,1; 122,1 e 108,2 o anel ciclohexenona. Da mesma forma, o sinal δ_C 189,3 que correspondente ao carbono de grupamento aldeídico (CHO), é sustentado pelo dado de IV (1679 cm^{-1}). Por fim, a presença do heteroátomo de oxigênio formando o anel pirânico, explica os sinais δ_C 151,8 e 148,6.



Austidiol: R_1 e R_2= -OH
Austidiol diacetato: R_1 e R_2= $-OCOCH_3$

Figura 33. Estrutura das azafilonas: austidiol e austidiol diacetato.

O composto austidiol também foi identificado pela combinação das informações anteriores com dados de RMN 2D. Uma análise detalhada dos espectros de HMQC e HMBC (**Figuras 64** e **65**) permitiu definir o anel pirânico e o sistema ciclohexenona diol (**Figura 34**). O mapa de contornos HMBC traz as correlações dos hidrogênios δ_H 8,20 com os carbonos do anel pirânico (δ_C 166,1; 151,8; 148,6; 122,1) e com o carbono metílico (δ_C 19,8) ligado ao anel pirânico. Os hidrogênios dos grupamentos hidroxílicos (δ_H 5,26 e 5,92) que se encontram ligados aos carbonos C-7 e C-8 (δ_C 74,3 e 70,6) do anel ciclohexenona apresentam uma intrincada rede de correlações com os carbonos deste anel. O hidrogênio hidroxílico δ_H 5,26 se correlaciona com os carbonos quaternários δ_C 198,2; 74,3 e 70,6 e com o carbono metílico 18,7; o hidrogênio hidroxílico δ_H 5,92 apresenta correlações com os carbonos quaternários δ_C 122,1; 74,3 e 70,6. Por sua vez, o hidrogênio metínico δ_H 4,39 se correlaciona com os carbonos quaternários δ_C 198,2; 151,8; 122,1 e 74,3 e com o carbono metílico δ_C 18,7. Por fim, os hidrogênios metílicos δ_H 1,08 se correlacionam com os carbonos quaternários do anel ciclohexenona δ_C 198,2; 74,3 e 70,6. Os dados trazidos pelo mapa de correlações de RMN

HMBC (**Figura 34**) somados aos dados de RMN 1D (^{1}H e ^{13}C), infravermelho e ultravioleta corroboraram a estrutura proposta.

Com relação à conformação diol *trans*-vicinal nas posições C-7 e C-8 (7*R*,8S) do anel ciclohexanona, a atribuição foi dada através da comparação com dados da literatura para o mesmo composto, dados de rotação específica e de ponto de fusão. O metabólito isolado (austidiol) apresentou $[\alpha]_D^{20}$ +248 (*c* 0,3, DMSO) enquanto a literatura traz valor de $[\alpha]_D^{20}$ +250 (*c* 0,64, $CHCl_3$). O parâmetro de ponto de fusão também foi semelhante, para o metabólito isolado o valor foi de 259˚C, enquanto que o valor encontrado na literatura foi de 255˚C (Vleggaar, 1974).

O metabólito austidiol teve a fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_5$ confirmada por espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 237,0759 (calcd para $C_{12}H_{12}O_5$, 237,0757) (**Figura 66**), corroborando com a estrutura identificada.

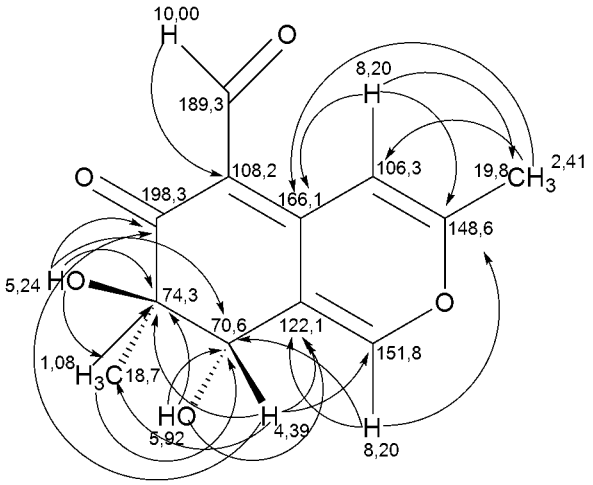


Figura 34. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol.

O derivado austidiol diacetato (**Figura 35**), foi obtido pelo processo de acetilação do produto natural isolado previamente (austidiol), com finalidade de confirmar a estrutura do austidiol. Para tal, este foi submetido à reação de acetilação com piridina e anidrido acético em agitação por 24 horas. O composto acetilado, um sólido cristalino amarelo, possui dados de RMN ^{1}H e ^{13}C (**Figuras 67** e **68**) relativamente similares aos dados obtidos para o composto austidiol. O composto acetilado apresenta espectro de RMN ^{1}H com oito singletos. Difere estruturalmente do produto natural apenas pela substituição dos hidrogênios hidroxílicos nas posições C-7 e C-8 por grupamentos acetílicos (–$OCOCH_3$), o que confere dois singletos metílicos (δ_H 2,16 e 1,99) ao espectro. Outra alteração importante é a presença

de dois singletos δ_H 7,62 e 8,29 correspondentes aos hidrogênios metínicos das posições C-1 e C-4 que substituem o singleto δ_H 8,20 que corresponde aos dois hidrogênios (posições C-1 e C-4) no composto austidiol. Além disso, no derivado acetilado o hidrogênio metínico δ_H 6,64 ligado ao C-8 do anel ciclohexenona encontra-se mais desblindado em relação ao seu equivalente no austidiol (δ_H 4,39), devido ao efeito anisotrópico promovido pela acetilação.

Análise do espectro de RMN ^{13}C confirmou a presença de 16 sinais de carbonos que incluem quatro carbonos metílicos (δ_C 21,2; 20,7; 20,3 e 17,6), quatro metínicos (δ_C 191,1; 150,0; 107,2 e 68,6) e oito carbonos quaternários (δ_C 191,5; 169,9; 169,6; 165,5; 148,1; 117,9; 109,8 e 80,6). A diferença para o espectro de RMN ^{13}C do composto majoritário austidiol é a presença de sinais adicionais de carbonos, que correspondem aos dois grupamentos acetílicos, sendo que os demais carbonos apresentam valores de deslocamento relativamente próximos àqueles apresentados pelo austidiol.

Uma análise detalhada dos espectros HMBC e HMQC (**Figuras 69** e **70**) permitiu observar as correlações ilustradas na figura a seguir (**Figura 35**).

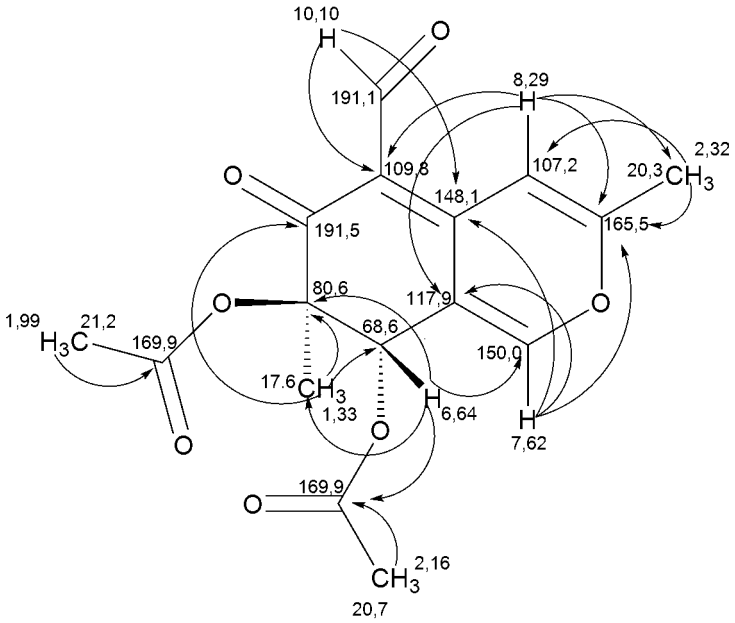


Figura 35. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol diacetato.

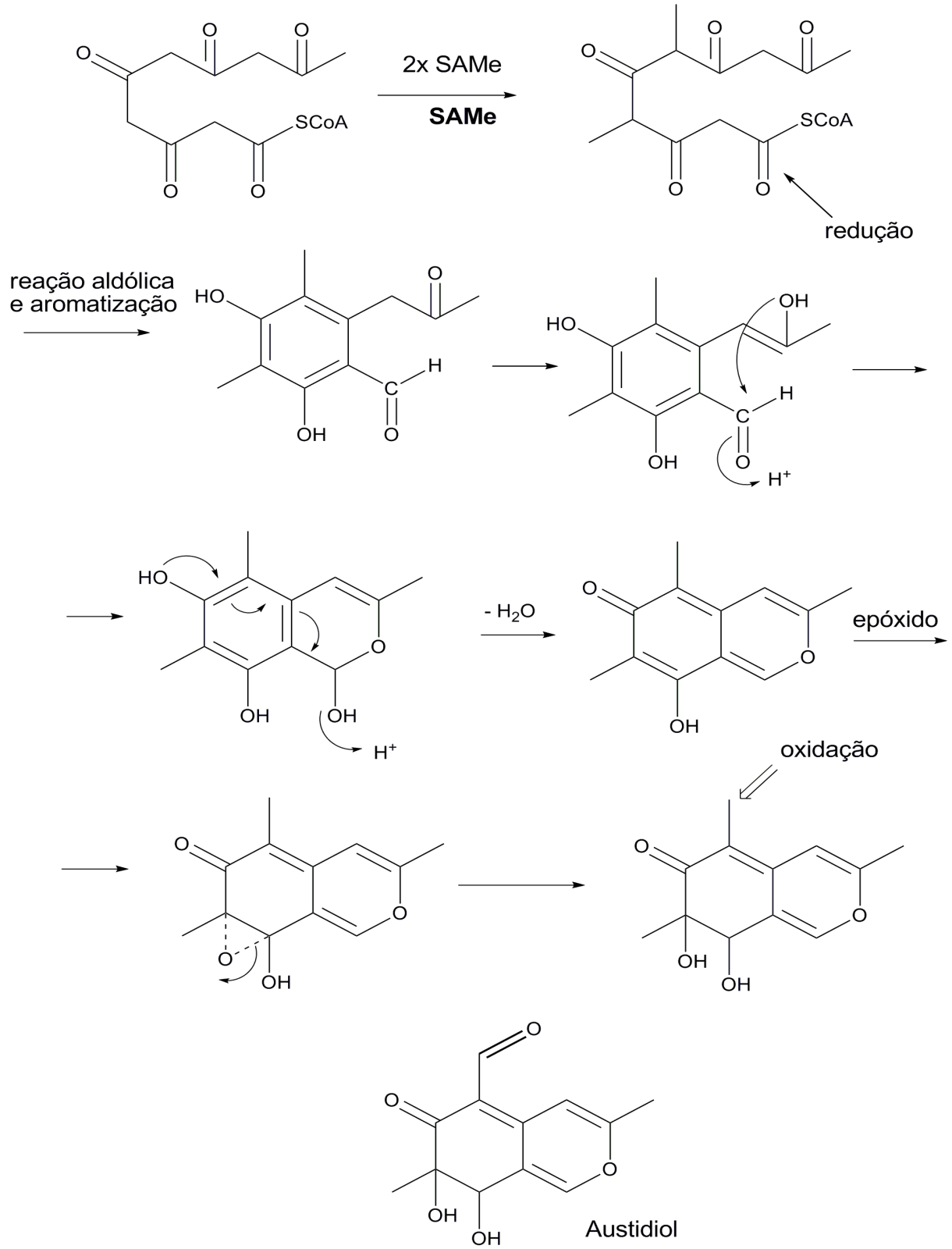
Como o austidiol diacetato é um derivado do produto natural austidiol, também foi proposta para a forma acetilada a conformação *trans*-vicinal nas posições C-7 e C-8 (7*R*,8S) do anel ciclohexenona. O derivado acetilado apresentou $[\alpha]_D^{20}$ +32 (*c* 0,3, CH_3Cl_3), ponto de fusão 255˚C e teve a fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_7$ determinada por espectrometria de massas

de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 321,0970 (calc para $C_{16}H_{16}O_7$, 321,0969) (**Figura 71**).

Tabela 28. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de austidiol e austidiol diacetato.

	austidiol[a]			**austidiol diacetato**[b]		
Posição	δ_C mult.	δ_H (*J* em Hz)	HMBC[c]	δ_C mult.	δ_H (*J* em Hz)	HMBC[c]
1	151,8, CH	8,20, *s*	3, 8[a]	150,0, CH	7,62, *s*	3, 4a, 8[a]
2	-	-	-	-	-	-
3	148,6, C	-	-	165,5, C	-	-
4	106,3, CH	8,20, *s*	3, 9, 4[a]	107,2, CH	8,29, *s*	3, 5, 9, 8[a]
4a	166,1, C	-	-	148,1, C	-	-
5	108,2, C	-	-	109,8, C	-	-
6	198,2, C	-	-	191,5, C	-	-
7	74,3, C	-	-	80,6, C	-	-
7-OH	74,3, CH	5,26, *s* (OH)	-	-	-	-
8	70,6, CH	4,39, *s*	6, 7, 8, 11	68,6, CH	6,64, *s*	1, 7, 11, 13
8-OH	70,6, CH	5,92, *s* (OH)	-	-	-	-
8a	122,1, C	-	-	117,9, C	-	-
9	19,8, CH_3	2,21, *s*	4, 4a	20,3, CH_3	2,32, *s*	3, 4
10	189,3, C	10,00, *s*	5	191,1, CH_2	10,10, *s*	5, 4a
11	18,7,CH_3	1,08, *s*	7, 8	17,6, CH_3	1,33, *s*	6, 7, 8
12	-	-	-	169,9, C	-	-
13	-	-	-	169.6, C	-	-
14	-	-	-	21,1, CH_3	1,99, *s*	12
15	-	-	-	20,7, CH_3	2,16, *s*	13

[a]Em DMSO-d_6. [b]Em $CDCl_3$. [c] Correlações de HMBC do(s) hidrogênio(s) para os carbonos indicados.



S-Adenosilmetionina (SAMe)

Figura 36. Biogênese de austidiol.

Azafilonas inéditas

Dímero de austidiol

O composto (7*R*,8*S*)-5-[(7'*R*,8'*S*)-7',8'-diidróxi-3',7'-dimetil-6'-oxo-7',8'-diidro-5'-metilisocromenil]-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-7,8-diidro-6*H*-isocromen-6-ona, é um dímero do composto austidiol, no qual o grupamento aldeídico (–CHO) ligado a posição C-5 é substituído por um grupamento metilênico (–CH_2), este faz a ligação entre as duas metades austidiol, resultando no dímero em questão.

O dímero de austidiol (**Figura 37**) possui espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C bastante semelhantes ao austidiol, com pequenas diferenças de deslocamento químico e alguns sinais no espectro de hidrogênio apresentam-se diferentes, mas de um modo em geral os espectros possuem perfil semelhante.

Uma vez que os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C apresentaram apenas a metade dos sinais esperados para 24 hidrogênios e 23 carbonos, a estrutura foi proposta como um dímero. A atribuição estrutural completa foi realizada por análise espectral e por estudo de difração de raio-X do monocristal (**Figura 38**). Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C são similares aos espectros do austidiol, exceto pela ausência dos sinais do grupamento aldeídico (δ_H 10,00 e δ_C 189,3). Em vez destes sinais, os espectros mostraram um grupo metilênico δ_H 3,26 e δ_C 18,6, sugerindo uma estrutura similar ao austidiol. Além disso, o espectro de massas do dímero de austidiol (obsd $[M+H]^+$ *m/z* 429,1543, calcd 429,1544) apresentou íon molecular com valor de quase o dobro daquele apresentado por austidiol (obsd $[M+H]^+$ em *m/z* 237,0759, calcd 237,0757). Este dado, somado a uma compreensiva análise dos dados de RMN 1D e 2D, permitiram a completa elucidação da estrutura planar do composto com uma forma dimérica de austidiol, caracterizada pela presença de uma ponte metilênica, gerando um composto com a fórmula molecular $C_{23}H_{24}O_8$. Esta proposta explica a simplicidade dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C, onde os sinais estão duplicados, exceto os sinais referentes ao grupo metilênico.

O espectro de RMN ^{1}H (**Figuras 72**) exibiu os hidrogênios aromáticos δ_H 7,30 e 6,25, dois hidrogênios hidroxílicos [δ_H 5,66 (OH, d, J = 4,66 Hz) e δ_H 4,93 (OH, s)], um hidrogênio metínico em δ_H 4,22 (d, J = 4,66 Hz), um sinal metilênico em δ_H 3,26 e dois hidrogênios metílicos, δ_H 2,07 e 0,91.

Análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 73**) permitiu estabelecer a presença de uma carbonila de cetona (δ_C 197,9) do anel ciclohexenona, cinco carbonos aromáticos pertencentes ao anel pirânico, dos quais dois carbonos são ligados a oxigênio (δ_C 157,9 e 143,6), um carbono quaternário insaturado (δ_C 112,8), dois carbonos oxigenados (δ_C 75,7 e 71,1) do anel ciclohexenona, um carbono metilênico (δ_C 18,6) e dois carbonos metílicos (δ_C 19,3 e 18,9).

No espectro de HMBC (**Figura 76**), as correlações entre CH_2-10 e C-5, C-4a C-6; C-5', C-4a' e C-6' sugerem a união de duas metades austidiol na posição C-5 por uma ponte metilênica (–CH_2). Por fim, a presença dos quarto grupos hidroxílicos foi confirmada pela acetilação com piridina/anidrido acético que resultou no derivado com quatro acetilações. Com base nas evidências anteriores, a estrutura do dímero de austidiol foi elucidada.

Para reforçar a proposta do dímero, os dados de espectrometria de massas de alta resolução obtidos foram fundamentais e conclusivos, corroborando com a estrutura proposta. A fórmula molecular do dímero foi deduzida como $C_{23}H_{24}O_8$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 429,1543 (calc para $C_{23}H_{24}O_8$, 429,1544) (**Figura 79**). O espectro de UV [λ_{max} (MeOH) 254 e 361 nm] indicou a presença de um sistema conjugado estendido. O ponto de fusão indicou decomposição à temperatura de 308˚C e apresentou $[\alpha]_D^{20}$ +354 (*c* 0,3, DMSO).

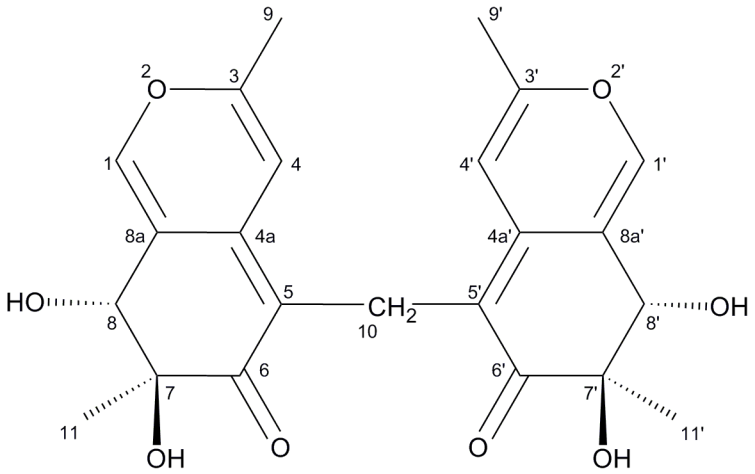


Figura 37. Estrutura da azafilona dímero de austidiol.

Tabela 29. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC do dímero de austidiol.

	dímero de austidiol[a]		
Posição	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[b]
1	143,5, CH	7,30, *s*	7, 8
2			
3	157,9, C		
4	104,7, CH	6,25, *s*	3, 8a, 5, 9
4ª	141,1, C		
5	112,8, C		
6	197,9, C		
7	75,7, C	4,94, *s* (OH)	6, 7, 8, 11
8	71,1, CH	4,22, *d* (4,66)	1, 7, 8a
8-OH	71,1, CH	5,66, *d* (4,66) (OH)	8, 8ª
8ª	120,8, C		
9	19,3, CH_3	2,07, *s*	3, 4
10	18,6, CH_2	3,26, *s*	5, 4a, 6
11	18,9, CH_3	0,91, *s*	6, 7, 8
1'	143,6, CH	7,30, *s*	7', 8'
2'			
3'	157,9, C		
4'	104,7, CH	6,25, *s*	3', 8a', 5', 9'
4a'	141,1, C		
5'	112,8, C		
6'	197,9, C		
7'	75,7, C	4,93, *s* (OH)	6', 7', 8', 11'
8'	71,1, CH	4,22, *d* (4,66)	1', 7', 8a'
8'-OH	71,1, CH	5,66, *d* (4,66) (OH)	8', 8a'
8a'	120,8, C		
9'	19,3, CH_3	2,07, *s*	3', 4'
10'	18,6, CH_2	3,26, *s*	5', 4a', 6'
11'	18,9, CH_3	0,91, *s*	6', 7', 8'

[a]Em DMSO-d_6. [b]Correlações de HMBC, do(s) hidrogênio(s) para os carbonos indicados.

Estrutura cristalográfica

Cristais disponíveis para análise de raios-X foram obtidos por recristalização em solução de metanol. Um cristal prisma incolor de dimensões aproximadas 0,3 x 0,2 x 0,2 mm^3 foi usado para o experimento. Dados de raios-X foram medidos em um difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 empregando radiação grafite-monocromado Cu-Kα (λ = 1.5418 Å) a 298 K e operando no modo scan φ-ω. Dados do cristal: $C_{23}H_{24}O_8$, M = 428.42, triclínico, grupo espacial P1, a = 10.473(6) Å, b = 11.223(3) Å, c = 11.429(2) Å, α = 60.65(2)o, β = 89.83(3)o, γ = 67.75(4)o, V = 1055.5(9) Å3, Z = 2, Dc = 1.348g/cm3, F(000) = 452, e μ(Cu Kα) = 0.86 mm-1. Todas as amostras de cristais testadas apresentaram geminação e a amostra utilizada para a coleta de dados foi visualmente homogênea, mas ela apresentou uma geminação pseudo-merohedral, o que causou a superposição parcial dos fatores de estrutura levando a

presença de resíduos durante o refinamento da estrutura. Um total de 8384 reflexões na faixa θ de 4.56° to 73.92° e faixa de índice h de 15 a – 15, k de – 24 a 25 e I de – 15 a 15. O refinamento da célula e redução dos dados foram realizados com o suíte software XCAD4. A estrutura foi resolvida e refinada usando o WingX CHELX97 suíte (Farrugia, 1999; Sheldrick, 2008). O refinamento da estrutura foi realizado no F2 por cálculos de mínimos quadrados em matriz completa. Átomos não-hidrogênios foram refinados anisotropicamente, e todos os átomos de hidrogênio foram colocados em coordenadas idealizadas e refinados como átomos montados com os parâmetros isotrópicos de seus átomos parentes. O refino final dos resíduos foram R1 = 0.091 (wR2 = 0.32) para 6964 reflexões observadas [com I > 2σ(I)] e 575 parâmetros e três restrições, e R1 = 0.11 (wR2 = 0.32) para todas as reflexões únicas com GoF = 1.41. A estrutura absoluta parâmetro Flack é 0.1 (3), indica que o sentido quiral foi corretamente escolhido, embora este número não seja confiável, dado o grande desvio padrão na ausência de dispersor anômalo forte. Além disso, a estrutura do dímero de austidiol apresenta os mesmos centros quirais da molécula precursora, austidiol (Lo Presti *et al.*, 2003) e a biossíntese não modificou esta configuração. Por isso foi mantida a descrição estereoquímica dos centros quirais como C7*R* e C8*S*.

O composto cristaliza em duas moléculas independentes em uma unidade assimétrica, uma molécula representativa é mostrada na **Figura 38**. O composto austidiol dímero selecionou parâmetros geométricos que estão listados na **Tabela 30**, em comparação a molécula precursora austidiol. A distância C5 – C10 foi alongada em caso de alteração da hibridização do átomo C-10 para sp^3 no dímero de austidiol e a distância C5-C4a foi reduzida, aumentando o caráter da ligação dupla. O anel pirânico é quase planar com RMSD (Root Mean Square Deviation) de plano médio de 0,03 Å, o anel ciclohexenona adota uma conformação de envelope torcido.

Tabela 30. Distâncias de ligação (Å) e ângulos (deg) para o austidiol e dímero de austidiol.

Parâmetro	dímero de austidiol	austidiol*
C1A—C8AA	1.337 (8)	1.338(3)
C3A—C4A	1.341 (8)	1.345(3)
C5A—C4AA	1.373 (7)	1.399(2)
C5A—C6A	1.433 (8)	1.432(3)
C5A—C10A	1.533 (7)	1.455(2)
C4AA—C5A—C6A /	118.6 (5)	124.3(2)

*Lo Presti *et al.*, 2003

Cálculo de Estrutura Eletrônica

A fim de comparar a rotação óptica da estrutura do dímero e correlacionar esta com a correta configuração absoluta, foram conduzidos cálculos eletrônicos *ab initio* na molécula do dímero e em sua estrutura invertida, usando a Teoria da Densidade Funcional com o B3LYP funcional, implementado no pacote Gaussian 03 (Frisch, 2003). Após a otimização das coordenadas, cálculos de dicroísmo circular foram feitos a fim de obter a rotação óptica em comprimento de onda de 589 nm e em campo estático. O cálculo indicou rotação óptica de -73,8^o para o comprimento de onda de 589 nm e estático de -19,4^o. Para a molécula invetida foi obtida a rotação estática de 19,4^o. Estes resultados corroboram com a medida experimental de $[\alpha]_D$ de -6° para o dímero de austidiol.

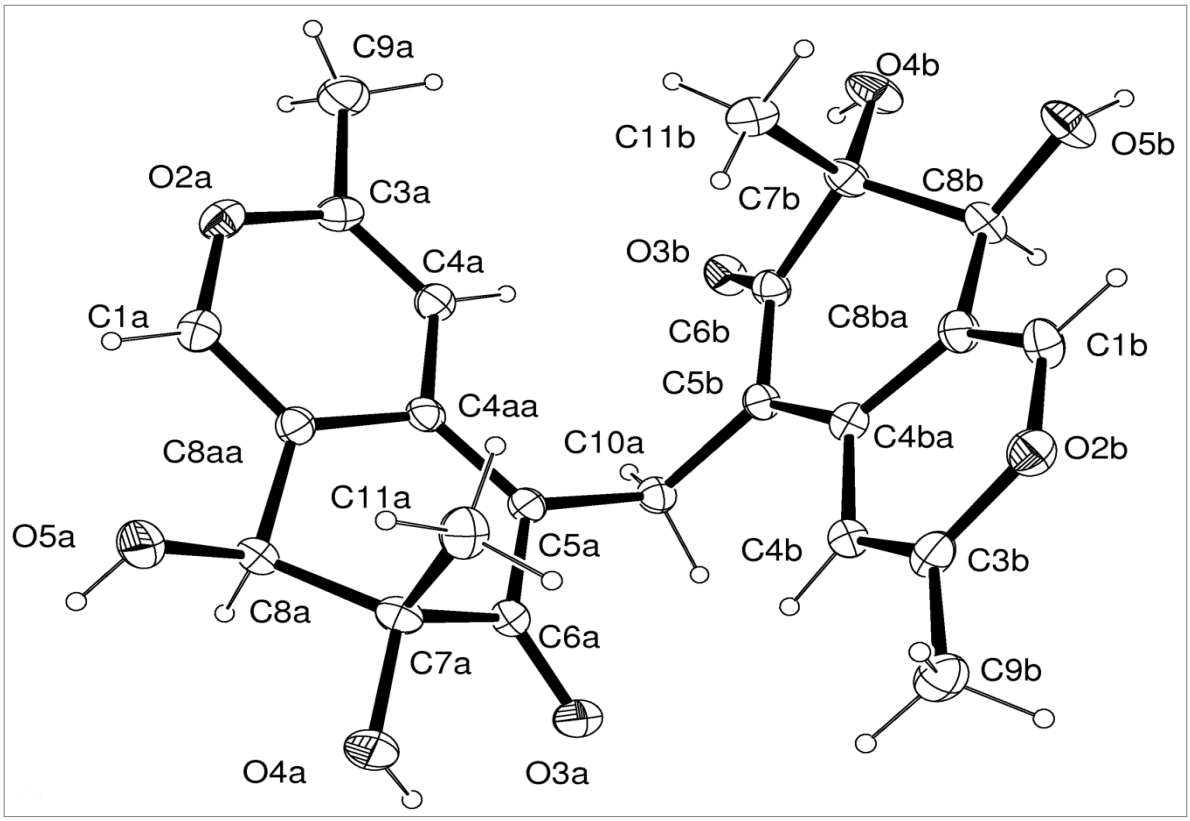


Figura 38. Representação ORTEP da estrutura do cristal do dímero de austidiol.

Austidiol diidroisocumarina

O composto 6’,8’-diidróxi-3’,5’-dimetilisocromen-1’-ona-5-metil-(7*R*,8*S*)-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-7,8-diidro-6*H*-isocromen-6-ona, denominado **austidiol diidroisocumarina** (**Figura 39**), trata-se de um composto minoritário, um derivado diidroisocumarínico do metabólito majoritário austidiol, o qual além de possuir a estrutura base da classe das

azafilonas (anel ciclohexenona e anel pirânico), apresenta ligado ao C-5 através de uma ponte metilênica um esqueleto diidroisocumarínico (anel benzênico e anel lactônico fundidos).

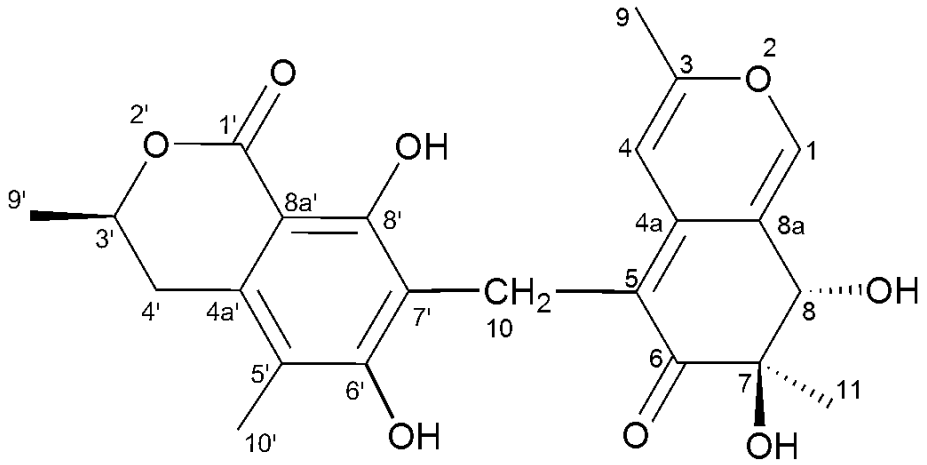


Figura 39. Estrutura da azafilona austidiol diidroisocumarina.

A fórmula molecular foi deduzida como $C_{23}H_{24}O_8$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+Na]^+$ 451,1363 (calc para $C_{23}H_{24}O_8$, 451,1363) (**Figura 93**). O espectro de UV [λ_{max} (MeOH) 212 e 361 nm] indicou a presença de um sistema conjugado estendido. O ponto de fusão indicou decomposição à temperatura de 255˚C e apresentou $[\alpha]_D^{20}$ +71 (*c* 0,2, MeOH).

Naturalmente o derivado diidroisocumarínico apresenta espectro de RMN ^{1}H (**Figura 80**) mais complexo em relação ao seu precursor austidiol, uma vez que a estrutura tem praticamente o dobro de tamanho, assemelhando-se ao dímero de austidiol. O espectro de RMN ^{1}H revelou cinco dubletos, quatro singletos, dois duplo dubletos e um multipleto. O espectro mostrou algumas similaridades com o espectro do dímero de austidiol: dois hidrogênios aromáticos [δ_H 7,43 (1H, *d*, *J* = 1,70 Hz) e δ_H 6,63 (1H, *s*)], um metino sp^3 oxigenado δ_H 4,41 [(1H, *d*, *J* = 1,70 Hz)], um grupo metilênico na posição C-10 [δ_H 3,60 (1H, *d*, J_{gem} = 15,0 Hz) e δ_H 3,53 (1H, *d*, J_{gem} = 15,0 Hz)] como uma ponte metilênica conectando a metade austidiol à metade diidroisocumarínica, e dois hidrogênios metílicos δ_H 2,22 e 1,09.

No esqueleto diidroisocumarina tem-se o hidrogênio metínico δ_H 4,55 ligado ao C-3' (δ_C 75,0), que acopla com os hidrogênios metílicos em δ_H 1,44 (C-9' - δ_C 19,6), formando um quadrupleto (*q*) com constante de acoplamento 6,2 Hz. O hidrogênio metínico em δ_H 4,55 acopla também com os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,60 e 3,17 (C-4' – δ_C 32,2), formando dois dubletos, cujas constantes de acoplamento são 11,0 e 3,0 Hz, respectivamente. Com base

nestes valores é proposto que o hidrogênio δ_H 2,60 encontra-se em posição axial (orientação α) e o hidrogênio δ_H 3,17 em posição equatorial (orientação β) em relação ao anel diidroisocumarínico. Como mencionado anteriormente os hidrogênios metilênicos δ_H 2,60 (α) e 3,17 (β) acoplam com o hidrogênio metínico δ_H 4,55 (*d*, $J_{4'ax-3'}$ 11,0 Hz e *d*, $J_{4'eq-3'}$ 3,0 Hz), além destes acoplamentos, apresentam também acoplamento geminal (J_{gem} 16,0 Hz), formando cada qual um duplo dubleto (*dd*). Por fim, têm-se hidrogênios metílicos em δ_H 1,44 (C-9' - δ_C 19,6) que acoplam com o hidrogênio δ_H 4,55 (*d*, $J_{9'-3'}$ 6,2 Hz) e um singleto metílico em δ_H 2,06 (C-10' - δ_C 6,9) (**Tabela 31**).

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 84**) confirmou 23 sinais de carbonos, 11 sinais correspondem aos carbonos pertencentes à metade austidiol e que já foram discutidos previamente no processo de elucidação deste, inclusive os valores de deslocamento químico obtidos para os carbonos da metade austidiol do derivado diidroisocumarínico em pouco diferem dos valores obtidos para o composto majoritário austidiol. A diferença primordial é a presença do carbono metilênico δ_C 20,7, que une os esqueletos austidiol e diidroisocumarina. O espectro de RMN ^{13}C para o esqueleto diidroisocumarínico apresenta 11 sinais que incluem dois carbonos metílicos (δ_C 19,6 e 6,9), um carbono metilênico (δ_C 32,2), um carbono metínico (δ_C 75,0) e sete carbonos quaternários (δ_C 171,2; 160,9; 160,2; 136,8; 116,5; 110,1 e 100,1). O sinal de carbono quaternário δ_C 171,2 foi atribuido à carbonila do anel lactônico, dado o valor de deslocamento químico. Completam o anel um carbono metínico (δ_C 75,0) em posição α em relação ao – O –, um carbono metilênico (δ_C 32,2), e os carbonos quaternários δ_C 110,1 e 100,1, que permitem a fusão ao anel benzênico. Neste anel a presença das hidroxilas nas posições C-6'e C-8' justificam os carbonos quaternários δ_C 160,2 e 160,9. Além destes tem-se mais dois carbonos quaternários, δ_C 116,5 e 136,8, sendo que o primeiro liga-se diretamente ao carbono metilênico δ_C 20,7 (ponte metilênica) e ao segundo liga-se a um carbono metílico (δ_C 6,9).

Tabela 31. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de austidiol diidroisocumarina.

	austidiol diidroisocumarina[a]		
Posição	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[b]
1	144,8, CH	7,43, *d* (1,79)	3, 8, 4a, 8[a]
2	-	-	-
3	160,1, C	-	-
4	104,4, CH	6,63, *s*	3, 8a, 9’
4[a]	143,7, C	-	-
5	112,8, C	-	-
6	199,3, C	-	-
7	76,1, C	-	-
8	71,5, CH	4,41, *d* (1,79)	1, 7, 8[a]
8[a]	121,1, C	-	-
9	18,3, CH_3	2,22, *s*	3, 4
10	20,7, CH_2	3,53; 3,60 *d* (15,0)	4a, 5, 6, 5’, 7’, 8’
11	17,5, CH_3	1,09, *s*	6, 7
1’	171,2, C	-	-
2’		-	-
3’	75,0, CH	4,55, *m*	-
4’	32,2, CH_2	3,17, *dd* (16,0; 3,0)	5’, 8a’
		2,60, *dd* (16,0; 11,0)	3’, 8a’, 5’
4a’	110,1, C	-	-
5’	136,8, C	-	-
6’	160,2, C	-	-
7’	116,5, C	-	-
8’	160,9, C	-	-
8a’	100,1, C	-	-
9’	19,6, CH_3	1,44, *d* (6,2)	3’, 4’
10’	20,7, CH_2	3,53; 3,60, *d* (15,0)	4a, 5, 6, 7, 5’, 6’
11’	6,9, CH_3	2,06, *s*	4a’, 6’

[a]Em CD_3OD. [b]Correlações HMBC a partir do(s) hidrogênio(s) assinalados para os carbonos indicados.

O composto também foi elucidado pela combinação das informações anteriores com dados de RMN 2D. Através da análise dos mapas de contornos de HMQC e HMBC (**Figuras 87** e **89**) foi possível definir além das correlações que confirmam a metade austidiol, também as correlações que corroboram com a proposta da metade diidroisocumarínica (**Figura 40**).

As correlações apresentadas pela metade austidiol no derivado diidroisocumarínico são bastante semelhantes àquelas observadas e anteriormente descritas para o composto majoritário austidiol, salvo algumas diferenças. Entre elas, citam-se as hidroxilas do sistema diol *trans*-vicinal nas posições C-7 e C-8 (7*R*,8*S*) do anel ciclohexenona, as quais não apresentaram sinais de deslocamento químico no espectro de RMN ^{1}H. Logo, não mostraram correlações no mapa de contornos HMBC e HMQC. Além disso, o grupamento aldeídico ligado ao C-5 é substituído por um grupamento metilênico (δ_H 3,56; δ_C 20,7) que une a

metade austidiol à metade diidroisocumarínica. Dessa forma, estes hidrogênios metilênicos (δ_H 3,60 e 3,53) apresentam correlações com carbonos das duas metades: δ_C 199,3; 112,8 e 143,7 (austidiol) e δ_C 160,2; 136,8 e 116,5 (diidroisocumarina).

Para melhor compreensão das correlações do mapa de contornos HMBC, as mesmas estão ilustradas na figura a seguir.

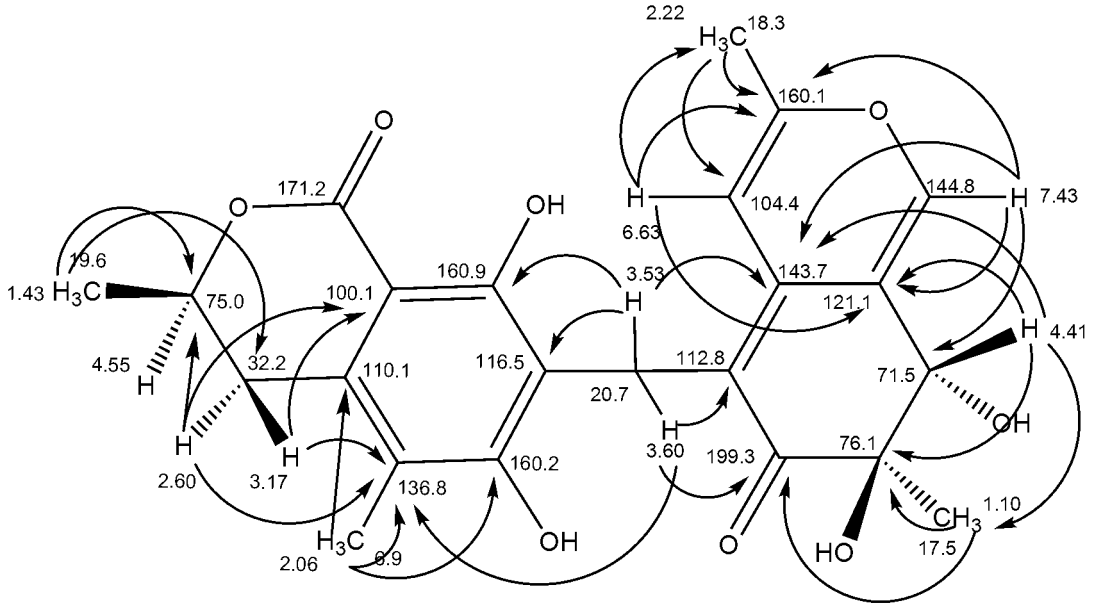


Figura 40. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol diidroisocumarina.

O mapa de contornos HMBC traz correlações importantes para reforçar a proposta da metade diidroisocumarínica. Os hidrogênios metilênicos (δ_H 3,17 e 2,60; δ_C 32,2) são quimicamente diferentes apesar de estarem ligados ao mesmo carbono, como observado anteriormente. O hidrogênio δ_H 3,17 se correlaciona com os carbonos δ_C 136,8 e 100,1 enquanto o δ_H 2,60 se correlaciona com os carbonos δ_C 136,8; 100,1 e 75,0. Os hidrogênios metílicos δ_H 1,43 se correlacionam com os carbonos δ_C 75,0 e 32,2, enquanto os hidrogênios metílicos δ_H 2,06 se correlacionam com os carbonos δ_C 160,2; 136,8 e 110,1. Por fim, é importante ressaltar que os hidrogênios metilênicos δ_H 3,60 e 3,53 além de se correlacionarem com carbonos do núcleo austidiol, também o fazem com carbonos do núcleo diidroisocumarina (160.9; 136,8 e 116,5).

Austidiol cromeno.

O composto: 5',7'-diidróxi-2',8'-dimetilcromen-4'-ona-5-metil-(7*R*,8*S*)-7,8-diidróxi-3,7-dimetil-7,8-diidro-6*H*-isocromen-6-ona, denominado **austidiol cromeno** (**Figura 41**), trata-se de um composto minoritário, um derivado cromênico do metabólito majoritário austidiol, o qual além de possuir a estrutura base da classe das azafilonas (anel ciclohexenona e anel pirânico), apresenta ligado ao C-5, através de uma ponte metilênica, um esqueleto cromênico, com estrutura semelhante aos cromenos relatados anteriormente (eugenitina). A estrutura assemelha-se ao dímero de austidiol e resulta da fusão de dois metabólitos majoritários produzidos pelo fungo: austidiol e eugenitina.

A fórmula molecular de austidiol cromeno foi deduzida como $C_{23}H_{22}O_8$ por análise de espectrometria de massas de alta resolução (ESI – TOF) *m/z* $[M+H]^+$ 427,1387 (calc para $C_{23}H_{22}O_8$, 427,1387) (**Figura 100**).

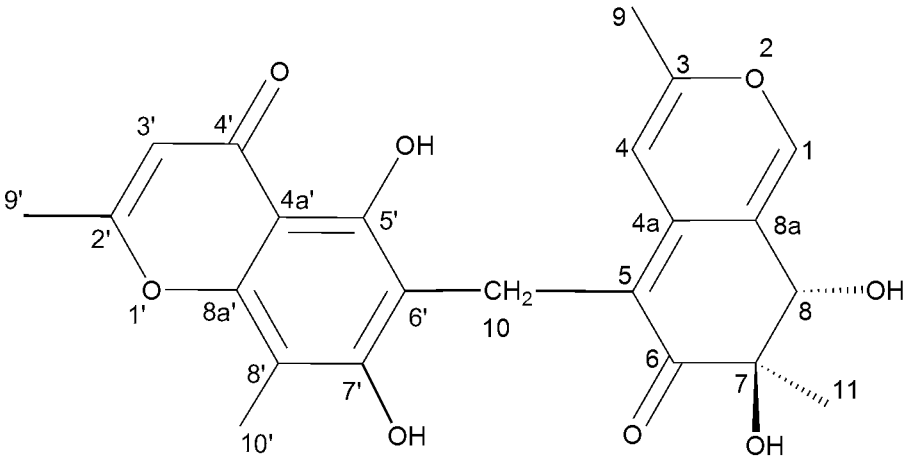


Figura 41. Estrutura da azafilona austidiol cromeno.

O espectro de RMN ^{1}H (**Figura 94**) é relativamente simples, apresentando nove singletos e dois dubletos. Para melhor entendimento o composto foi dividido em duas metades: austidiol e cromeno. O espectro de RMN ^{1}H da metade austidiol apresenta cinco singletos (três metínicos e dois metílicos) e dois dubletos. Os singletos correspondem aos hidrogênios metínicos: δ_H 7,52 (C-1 - δ_C 145,7), δ_H 7,02 (C-4 - δ_C 105,5) e δ_H 4,24 (C-8 - δ_C 70,7) pertencentes ao sistema *trans*-diol vicinal; e aos hidrogênios metílicos: δ_H 2,24 (δ_C 19,5) ligado ao C-3 (δ_C 160,5) e δ_H 0,99 (δ_C 19,0) ligado ao C-7 (δ_C 75,4) do sistema *trans*-diol vicinal. Além disso, em substituição ao grupamento aldeídico do composto majoritário austidiol, há um grupo metilênico com hidrogênios não equivalentes (δ_H 3,73 e 3,45, J_{gem} 15,0

Hz), formando uma ponte metilênica que une as metades austidiol e cromeno, caracterizando o composto austidiol cromeno.

O espectro de RMN ^{1}H da metade cromeno apresenta quatro singletos (um metínico, dois metílicos e um hidroxílico). O singleto metínico (ou vinílico) δ_H 6,12 liga-se ao C-3' (δ_C 107,9) e por sua vez os singletos metílicos δ_H 2,36 e 1,99 pertencem aos grupamentos metílicos que se ligam aos carbonos C-2' e C-3' (δ_C 167,2 e 105,0), respectivamente. Por fim, o singleto δ_H 13,05 foi atribuído ao grupamento hidroxílico ligado ao C-5' que se apresenta conjugado com o grupamento cetona na posição C-4'.

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT (**Figuras 96** e **97**) confirmaram 23 sinais de carbonos, sendo 12 sinais correspondentes aos carbonos da metade austidiol e que já foram discutidos previamente no processo de elucidação do mesmo. Inclusive, os valores de deslocamento químico obtidos para os carbonos da metade austidiol do derivado cromeno em pouco diferem daqueles obtidos para o composto majoritário austidiol. A diferença primordial é a presença do carbono metilênico δ_C 18,6, que une os núcleos austidiol e cromeno.

A metade cromênica apresenta 11 sinais de carbonos que incluem dois carbonos metílicos (δ_C 20,2 e 8,5), um carbono metínico (δ_C 107,9) e oito carbonos quaternários (δ_C 181,8; 167,2; 161,1; 156,6; 153,5; 107,8; 105,0 e 103,1). O sinal de carbono quaternário δ_C 181,8 foi atribuído à carbonila de cetona, dado seu valor de deslocamento químico, completam o anel cromeno: dois carbonos vinílicos (δ_C 167,8 e 107,9), o primeiro em posição α em relação ao heteroátomo – O – e o segundo em posição β, e os carbonos quaternários δ_C 153,5 e 103,1 que permitem a fusão dos anéis que compõe o esqueleto cromênico. Além disso, o anel benzênico do esqueleto cromênico possui duas substituições com grupamentos hidroxílicos, uma substituição com grupamento metílico e ligação ao carbono metilênico δ_C 18,6.

Tabela 32. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H, ^{13}C e HMBC de austidiol cromeno.

Posição	austidiol cromeno[a]		
	δ_C mult.	δ_H (J em Hz)	HMBC[b]
1	145,7, CH	7,52, *s*	3, 4a, 8, 8[a]
2			
3	160,5, C		
4	105,5, CH	7,02, *s*	3, 8[a]
4a	144,3, C		
5	112,1, C		
6	200,5, C		
7	75,4, C		
8	70,7, CH	4,24, *s*	1, 6, 7, 8[a]
8a	121,3, C		
9	19,5, CH_3	2,24, *s*	3, 4
10	18,6, CH_2	3,73; 3,45, *d* (15,0)	4a, 5, 6, 5’, 6’,7’
11	19,0, CH_3	0,99, *s*	6, 7, 8
1’			
2’	167,8, C		
3’	107,9, CH	6,12, *s*	2’, 4a’, 9’
4’	181,8, C		
4a’	103,1, C		
5’	156,6, C	13,05, *s* (OH)	4a’, 5’, 6’
6’	107,8, C		
7’	161,1, C		
8’	105,0, C		
8a’	153,5, C		
9’	20,2, CH_3	2,36, *s*	2’, 3’
10’	18,6, CH_2	3,74; 3,45, *d* (15,0)	4a, 5, 6, 5’, 6’,7’
11’	8,5, CH_3	1,99, *s*	7’,8’, 8a’

[a]Em DMSO-d_6. Correlações HMBC, a partir do(s) hidrogênio(s) assinalados para os carbonos indicados.

O composto austidiol cromeno também foi elucidado pela combinação das informações anteriores com dados de RMN 2D. Através da análise dos mapas de contornos de HMQC e HMBC (**Figuras 98** e **99**) foi possível definir além das correlações que confirmam a metade austidiol, também as correlações que corroboram com a proposta da metade cromeno (**Figura 42**).

As correlações apresentadas pela metade austidiol no derivado cromênico são bastante semelhantes às correlações observadas e anteriormente descritas para o composto majoritário austidiol, salvo algumas diferenças. Entre elas, citam-se as hidroxilas do sistema diol *trans*-vicinal nas posições C-7 e C-8 (7*R*,8*S*) do anel ciclohexenona, as quais não apresentaram sinais de deslocamento químico no espectro de RMN ^{1}H. Logo não apresentaram correlações no mapa de contornos HMBC e HMQC. Além disso, o grupamento aldeídico ligado ao C-5 é

substituído por um grupamento metilênico (δ_H 3,73 e 3,45; δ_C 18,6), sendo esta a ponte metilênica que une as metades austidiol e cromeno. Dessa forma, estes hidrogênios metilênicos (δ_H 3,73 e 3,45) apresentam correlações com carbonos das duas metades: δ_C 200,5; 144,3 e 112,1 (austidiol) e δ_C 161,1; 156,6 e 107,8 (cromeno).

Para melhor compreensão das correlações do mapa de contornos HMBC, as mesmas estão ilustradas na figura a seguir.

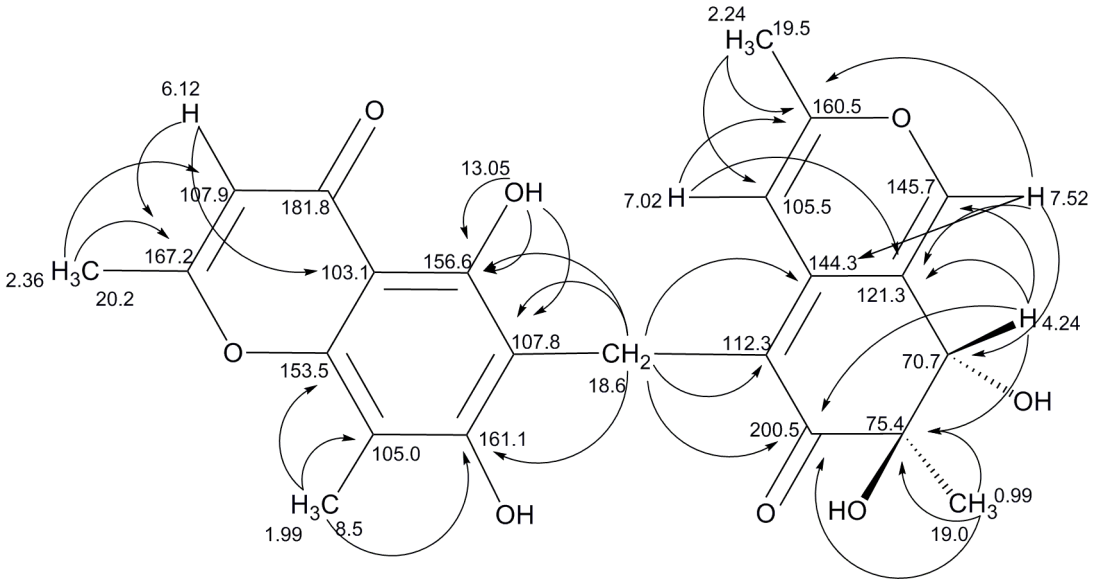


Figura 42. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol cromeno.

O mapa de contornos HMBC traz correlações importantes para reforçar a proposta da metade cromeno. O hidrogênio hidroxílico δ_H 13,05 se correlaciona com os carbonos quaternários δ_C 156,6; 107,8 e 103,1. Por sua vez, o hidrogênio metínico δ_H 6,12 se correlaciona com os carbonos quaternários δ_C 167,8 e 103,1 e com o carbono metílico δ_C 20,2. Os hidrogênios metilênicos δ_H 3,73 e 3,46 se correlacionam com os carbonos quaternários δ_C 161,1; 156,6 e 107,8. Por fim, os hidrogênios metílicos δ_H 2,36 e 1,99 se correlacionam com os carbonos δ_C 167,8 e 107,9; δ_C 161,1; 153,5 e 105,0, respectivamente. O conjunto de correlações é mais facilmente visualizado na **Figura 42**.

A forma dimérica do austidiol é similar ao dímero de azafilona conhecido como aspergilona B (Shao *et al*., 2011). Este metabólito é um dímero simétrico de duas benzilazafilonas com uma única ponte metilênica e foi isolado do fungo marinho *Aspergillus* sp sendo o primeiro dímero de azafilona com tal característica a ser reportado (**Figura 43**). Apesar de inúmeros dímeros naturais, incluindo flavonóides (Ariyasena *et al*., 2004),

macrolídeos (Rao e Faulkner, 2002), alcalóides (Kanokmedhakul *et al*., 2003), antraquinonas (Agusta *et al*., 2006), xantonas (Isaka *et al*., 2005) e naftopiranonas (Santos *et al*., 2001), terem sido reportados, a ocorrência de ponte metilênica entre produtos naturais é bastante incomum (Shao *et al*., 2011).

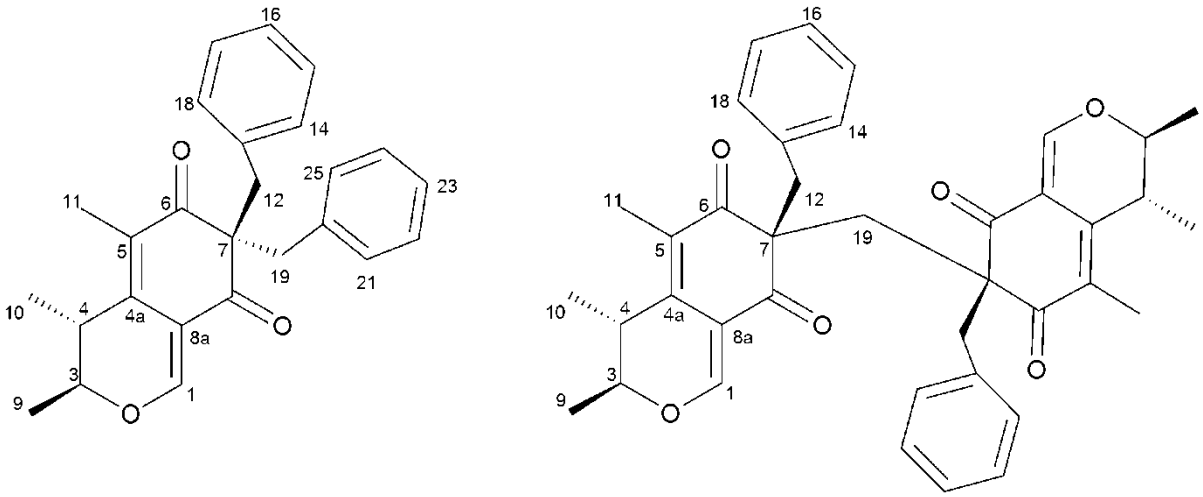
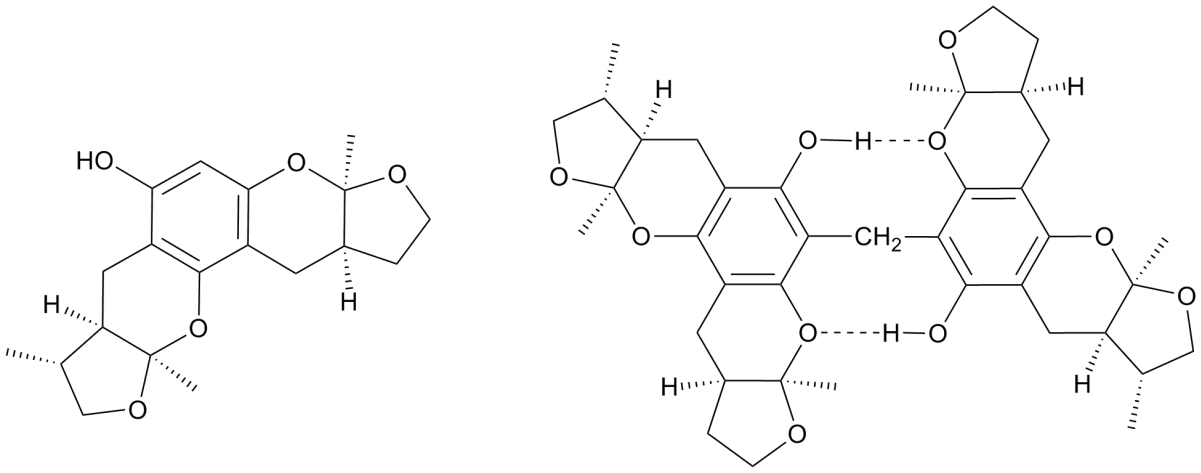


Figura 43. Aspergilonas A e B isoladas de *Aspergillus* sp.

Como hipotetizado por Shao *et al.* (2011) previamente, no presente trabalho o co-isolamento de austidiol e de seu dímero sugere que o este pode ser sintetizado por duas moléculas de austidiol e uma molécula de formaldeído no fungo. O isolamento de austidiol dímero também fornece evidência adicional de que pode haver um sistema de biossíntese na natureza que use formaldeído (Wu *et al*., 2005; Yao *et al*., 2005; Ito *et al*., 2004). A mesma hipótese pode ser aplicada aos compostos austidiol diidroisocumarina e austidiol cromeno, pois eles apresentam o mesmo padrão de conexão entre dois policetídeos aromáticos, a ponte metilênica. Neste contexto, o isolamento do dímero xilocetal F do fungo de mangue *Xylaria* sp por Wu e colaboradores (2005) também sugere fortemente que a biossíntese no fungo ocorre pela reação de duas moléculas de xilocetal B e uma molécula de formaldeído (**Figura 44**). Sabe-se que existe um nível endógeno de formaldeído em humanos e também em diversas plantas (Tzrel *et al*., 1998), mas não foi relatada nenhuma evidência de que fungos tenham capacidade de realizar esse tipo de reação (Wu *et al*., 2005). Dessa forma, o isolamento destes três novos policetídeos aromáticos de *Mycoleptodicus indicus* reforça a hipótese de que a biossíntese ocorra com a participação de uma molécula de formaldeído.



Xilocetal B Xilocetal F

Figura 44. Estruturas de xilocetal B e F isolados de *Xylaria* sp.

4.3 Ensaios Biológicos de Frações e Substâncias Purificadas.

4.3.1 Ensaio de Atividade Citotóxica *in vitro*

As frações obtidas em cultivos de escala ampliada foram submetidas ao ensaio de atividadade antitumoral *in vitro* no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. As frações foram testadas em um painel de três linhagens de células tumorais: HCT-8 (adenocarcinoma de cólon), MDA-MB-435 (adenocarcinoma de mama) e SF-295 (gliobastoma, origem – Sistema Nervoso Central) para determinação da eficácia e seletividade em células de diferentes origens. Esses ensaios foram realizados na estação automatizada (High Throughput Screening - HTS) Biomek 3000.

Na tabela a seguir estão apresentados os percentuais de inibição do crescimento celular (CI%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose de 50 μg/mL.

Tabela 33. Ensaio de atividade citotóxica *in vitro.*

Amostras	Linhagens Celulares		
	MDA-MB435 (mama)	**HCT-8 (cólon)**	**SF-295 (glioblastoma)**
BbADCM	PA (21,03%)	MA (85,12%)	MO (73,09%)
BbAEtOAc	MA (93,90%)	MA (100,00%)	MA (88,78%)
BbLEtOAc	PA (47,85%)	MA (89,83%)	MA (83,19%)
BbAHex	SA	PA (5,05%)	PA (35,40%)
MiHex	SA	AS	PA (5,72%)
MiDCM	SA	MA (95,45%)	MA (92,91%)
MiEtOAc	PA (47,57%)	MA (82,16%)	MA (86,16%)
MiLEtOAc	SA	PA	PA (5,72%)

Referente aos códigos das amostras, para melhor entendimento leia-se que a letra A corresponde ao cultivo em meio arroz-aveia e a letra L ao cultivo líquido em PDB. Por sua vez as siglas DCM, EtOAc e Hex se referem aos solventes utilizados nos fracionamentos dos extratos, no caso, diclorometano, acetato de etila e hexano, respectivamente.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (Mo, inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Observando-se a **Tabela 32** é possível concluir que as frações diclorometânicas e em acetato de etila dos cultivos em arroz-aveia tanto de *B. bassiana* quanto de *M. indicus* apresentaram promissores valores de inibição de crescimento celular (CI%), com porcentagens variando de 79,06 % a 100,00%. Sendo que as maiores taxas de inibição se deram contra as linhagens HCT-8 (adenocarcinoma de cólon) e SF-295 (gliobastoma, origem – Sistema Nervoso Central). O mesmo perfil pode ser atribuído às frações em acetato de etila e em diclorometano do cultivo de *B. bassiana* em meio líquido. Convém destacar que a fração em acetato de etila do cultivo em arroz de *B. bassiana* e a fração diclorometânica de *M. indicus* apresentaram elevado percentual de inibição de crescimento contra as três linhagens avaliadas. Resultados que indicaram interessante potencial destas frações para o processo de isolamento cromatográfico e elucidação estrutural.

Por sua vez as frações obtidas em hexano dos cultivos em meio arroz e a fração em acetato de etila do cultivo em meio líquido de *M. indicus* não geraram percentuais de inibição promissores contra as linhagens celulares testadas.

Foi determinada a citoxidade (CI_{50} µg/mL) das substâncias isoladas, pelo uso da metodologia do MTT (Mosman, 1983). As linhagens tumorais utilizadas foram: HCT-8 (colon- humano), HL-60 (leucemia - humana), MDA-MB435 (melanoma - humano), PC-3 (próstata-humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), bem como foi utilizada uma linhagem celular de linfócitos humanos. Tais linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

Tabela 34. Ensaio de atividade citotóxica *in vitro*.

	Citoxidade (CI_{50}, µM)* ± E.P.M.[a] – Linhagens celulares[b]					
Substâncias	**HCT-8**	**HL-60**	**MDA-MB435**	**PC3**	**SF-95**	**Linf. humanos**
Austidiol	12,90 ±3,51	38,80 ±9,32	34,30 ±4,36	ND[c]	28,00 ±7,16	>113
Austidiol diacetato	13,90 ±2,56	22,10 ±2,56	26,90 ±0,31	ND	26,30 ±1,18	>78
Dímero de austidiol	>58	>58	>58	10,00±6,54	>58	>58
A.dimero acetilado	>42	>42	>42	33,30±29,00	>42	>42
Austidiol diidroisocumarina	>58	>58	>58	7,05±3,78	>58	>58
Austidiol cromeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eugenitina	>113	>113	>113	>113	>113	>113
6-Metóxieugenina	>105	>105	>105	20,50±11,9	>105	>105
9-Hidróxieugenina	>105	>105	>105	>105	>105	>105
Piridovericina	25,90 ±0,32	34,66 ±3,63	34,80 ±3,82	ND	31,08 ±0,65	>68
Piridovericina-Glc	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15-Desóxi-piridovericina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lumicromo	>102	>102	>102	>102	>102	>102
1-Metil-11-hidróxilumicromo	>92	>92	>92	>92	>92	>92
Doxorrubicina[d]	0,10 ±0,01	0,05 ±0,01	1,51 ±0,20	0,41 ±0,05	0,70 ±0,20	0,70 ±0,20

[a]Erro Padrão de Média; [b]Linhagens celulares: HCT-8: cancer de cólo; HL-60: leucemia; MDA-MB435: melanoma; PC3: câncer de próstata; SF-95: glioblastoma.; [c]ND = não determinado; [d]Doxorubicina foi usada como droga padrão.*Todas as amostras foram testadas em concentrações ≤ 40 µg/µL.

Os resultados dos ensaios de citoxidade *in vitro* para as substâncias purificadas revelam que os compostos da classe das azafilonas (austidiol e austidiol diacetato) e da classe das piridonas (piridovericina) apresentaram promissora atividade citotóxica (CI_{50} μM), embora em níveis inferiores à substância citotóxica de referência (doxorrubicina). As azafilonas apresentaram níveis de citoxidade semelhantes, com destaque para a ação sobre a linhagem HCT-8 (cólon humano), com valores de 12,90 e 13,90 μM. Da mesma forma o metabólito piridovericina foi mais citotóxico para tal linhagem tumoral (25,90 μM).

Levando-se em conta as aloxazinas e piridonas isoladas dos cultivos de *B. Bassiana*, apenas piridovericina apresentou atividade no ensaio de citoxidade. Além disso, algum grau de seletividade foi observado, pois piridovericina foi ativa contra quatro linhagens cancerígenas utilizadas, mas foi inativa contra linfócitos humanos. Cheng e colaboradores (2006) reportaram a atividade citotóxica contra neurônios humanos (células IMR-32) do derivado piridona *N*-desóximilitarinona A, que foi isolado do fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus* e testada nas concentrações de 1, 10 e 100 μM. A viabilidade celular não foi afetada nas concentrações de 1 e 10 μM, mas foi reduzida em 22% na maior concentração (100 μM). Além disso, o composto YM-215343, um congênero oxidado da piridona apiosporamida isolado do fungo *Phoma* sp., mostrou toxicidade contra células HeLa-S3 (CI_{50} 7,96 µM) (Shibazaki *et al*., 2004). Dessa forma, piridonas apresentam potencial como protótipos para prospecção de moléculas com ação citotóxica.

Como mencionado anteriormente, as azafilonas tem um amplo espectro de atividades biológicas, entre elas a ação citotóxica. Nesse contexto, na literatura já foi reportada uma ampla gama de azafilonas com atividade citotóxica, o que ajuda a explicar a atividade encontrada para algumas das azafilonas isoladas neste trabalho. Uma série de chaetomugilinas (I – O) isoladas de cultivos do fungo *Chaetomium globosum* (isolado do peixe marinho *Mugil cephalusi*), apresentaram citoxidade contra as linhagens tumorais de leucemia HL-60, L1210 e P388 e carcinoma epidermóide KB, com valores de CI_{50} variando de 1,1 a 20 mM (Muroga *et al*., 2009). Além disso, *seco*-chaetomugilina D isolada deste mesmo fungo mostrou-se ativa contra as linhagens tumorais acima citadas, com valores de CI_{50} mais significantes (P388: 38,6; HL-60: 47,2; L1210: 53,6 e KB: 47,2 µM) (Yamada *et al*., 2009). Além disso, azafilonas do tipo chaetoviridinas E e F isoladas de cultivos de *Chaetomium cochlioides* mostraram atividade citotóxica contra as linhagens tumorais KB (carcinoma epidermóide), BC1 (câncer de mama) e NCl-H187 (câncer de pulmão), com os respectivos valores de CI_{50}: 25,7; 13,4 e 8,43 µM para chaetoviridina E e 29,4; 32,1 e 10,7 µM para chaetoviridina F (Phonkerd *et al*., 2008). Qian-Cutrone e colaboradores (1996) reportaram a atividade citotóxica da azafilona isolada de *Trichoderma harzianum*, denominada harzifilona. Este

derivado azafilônico apresentou citoxidade contra células tumorais M109 (câncer de pulmão) na concentração de 38 µM. Esse conjunto de trabalhos reforça o potencial dessa classe de compostos quanto à atividade citotóxica, da mesma forma que o isolamento de novas azafilonas contribuem para o enriquecimento químico e biológico dessa importante e representativa classe de metabólitos fúngicos.

Observando os resultados dos ensaios preliminares desenvolvidos com as frações e os ensaios com as substâncias puras, é possível concluir que as atividades dos metabólitos purificados corroboram com as ações apresentadas pelas frações e que algumas das substâncias obtidas têm promissora ação citotóxica.

4.3.2 Ensaio enzimático sobre a inibição de GAPDH de *Trypanosoma cruzi.*

As frações obtidas em cultivos de escala ampliada foram submetidas ao ensaio sobre a inibição de GAPDH. Na tabela a seguir estão apresentados os percentuais de inibição.

Tabela 35. Ensaio cinético de inibição de GAPDH – *T. cruzi*.

Amostra	% de inibição
BbAEtoAc	0,0
BbADCM	45,1
BbAHex	84,4
BbLEtOAc	90,5
BbLDCM	91,0
MiAEtOAc	19,8
MiADCM	89,1
MiAHex	0,0
MiLEtOAc	99,7

Referente às codificações, estas seguem o mesmo padrão adotado para o ensaio antitumoral mencionando anteriormente.

As frações mais promissoras foram: diclorometânica e em acetato de etila do cultivo líquido de *B. bassiana* (91,0 e 90,5%); em acetato de etila do cultivo líquido de *M. indicus* (99,7%); diclorometânica do cultivo em arroz de *M. indicus* (89,1%) e fração hexânica do cultivo em arroz de *B. bassiana.*

4.3.3 Ensaio enzimático de inibição de APRT de *Leishmania tarentolae.*

As frações obtidas em cultivos de escala ampliada foram submetidas ao ensaio de inibição de APRT. Na tabela a seguir estão apresentados os percentuais de inibição da atividade de LtAPRT – *Leishmania tarentolae.*

Tabela 36. Ensaio cinético de inibição de LtAPRT – *L. tarentolae.*

Amostra	% de inibição
BbAEtoAc	37,8
BbADCM	16,1
BbAHex	39,2
BbLEtOAc	64,6
BbLDCM	52,6
MiAEtOAc	23,8
MiADCM	44,2
MiAHex	22,2
MiLEtOAc	41,2

Observando os resultados listados na **Tabela 36**, é possível concluir que as frações avaliadas não apresentaram níveis elevados de inibição da enzima LtAPRT, uma vez que boa parte das frações não mostraram atividade de inibição superior a 50%, somente as frações em acetato de etila e em diclorometano provenientes do cultivo líquido do fungo *B. bassiana*, ainda que em níveis discretos.

4.3.4 Ensaio Leishmanicida - INCT-INBEQMeDI.

Algumas substâncias isoladas (austidiol, ausidiol dímero, austidiol diidroisocumarina, austidiol diacetato, eugenitina, 6-metóxieugenina e piridovericina) foram submetidas ao ensaio leishmanicida contra *Leishmania major*, de acordo com a metodologia citada na Seção Experimental. O ensaio foi utilizado para determinar a dose letal (DL_{50}). Os resultados estão relatados na **Tabela 37**.

Tabela 37. Ensaio leishmanicida para determinação de DL_{50} – *L. major*.

Substâncias	***Leishmania major***	
	DL_{50} (µM) (a partir de 5 µM)	DL_{50} (µM) (a partir de 40 µM)
Austidiol	NA	20,5
Austidiol diidroisocumarina	NA	21,7
Dímero de austidiol	NA	28,5
Austidiol diacetato	NA	19,8
Eugenitina	NA	39,9
6-Metóxieugenina	NA	34,5
Piridovericina	NA	35,3
Geneticina (G418)*	3,43	3,43

*Antibiótico controle

Observando os valores de DL_{50} apresentados pelas substâncias isoladas e pelo controle (geneticina), é notório que a partir da diluição de 5 µM as substâncias avaliadas não apresentaram atividade inibitória. A atividade se deu a partir das diluições de 40 µM com valores variando de 19,8 a 39,9 µM, com destaque para o derivado acetilado de austidiol (19,8 µM). Embora as substâncias avaliadas tenham apresentado algum nível de atividade leishmanicida, elas são menos potentes quando comparadas ao antibiótico controle geneticina (G418). Entretanto, a atividade biológica é de certa forma satisfatória, considerando que o derivado acetilado de austidiol foi apenas seis vezes menos potente que geneticina. De forma que, pode-se hipotetizar que esta classe de compostos (azafilonas) pode atuar como uma classe líder para o desenvolvimento de substâncias com potente atividade leishmanicida.

4.3.5 Ensaio Antiparasitário: LDH antimalária.

O ensaio antiparasitário para malária foi desenvolvido no National Center for Natural Products Research – University of Mississippi, onde a atividade antimalárica *in vitro* foi medida por ensaio colorimétrico que determina a atividade da lactato desidrogenase parasítica (*p*LDH) de acordo com o descrito na seção Experimental.

Tabela 38. Ensaio cinético de inibição de (*p*LDH) – *P. falciparum.*

Amostra	***P. falciparum* (D6 Clone) % de inibição**	***P. falciparum* (W2 Clone) % de inibição**
BbLEtOAc	5	NT
BbAEtoAc	0	NT
BbADCM	0	NT
BbAHex	0	NT
MiLEtOAc	0	NT
MiAEtOAc	0	NT
MiADCM	0	NT
MiAHex	0	NT

D6 clone = sensível a cloroquina; W2 = resistente a cloroquina; NT = não testado.

As frações obtidas dos cultivos dos fungos estudados foram testadas apenas contra a variedade de *P. falciparum* D6 clone, sensível a cloroquina. Para a variedade W2 clone (resistente a cloroquina) as amostras não foram testadas. De acordo com a **Tabela 38** nota-se que apenas a fração em acetato de etila do cultivo em meio PDB do fungo *B. bassiana* apresentou atividade, entretanto, bastante discreta (apenas 5% de inibição). As demais frações foram inativas. Sendo assim, as frações não foram submetidas a ensaios antimaláricos secundários para determinação de CI_{50}.

4.3.6 Ensaio Antiparasitário: *Leishmania donovani.*

O ensaio antiparasitário para leishmania foi desenvolvido no National Center for Natural Products Research – University of Mississippi. A ação antileishmania foi testada *in vitro* em uma cultura de formas promastigotas de *Leishmania donovani* de acordo com a metodologia descrita na seção Experimental.

Tabela 39. Ensaio antileishmania - *Leishmania donovani.*

Amostra	% de inibição
BbLEtOAc	93,03
BbAEtoAc	71,06
BbADCM	87,14
BbAHex	NA
MiLEtOAc	NA
MiAEtOAc	21,77
MiADCM	95,31
MiAHex	NA

NA = não ativo.

As frações obtidas dos cultivos dos fungos estudados foram testadas contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* de acordo com a metodologia descrita na seção Experimental. As amostras foram avaliadas na concentração de 80 μg/mL, sendo utilizado como controle a substância anfotericina B, que promoveu 100% de inibição. As amostras que apresentaram porcentagem de inibição inferior a 50% foram consideradas inativas e aquelas que apresentaram valores de inibição superiores foram consideradas ativas. Portanto, foram submetidas à avaliação secundária para determinação de valores de CI_{50} e $CI_{90.}$ De acordo com os resultados descritos na tabela acima, tem-se quatro frações ativas, sendo três delas com níveis de inibição superiores a 85%. Três das quatro frações ativas são provenientes dos cultivos do fungo *B. bassiana:* fração em acetato de etila de cultivo em PDB (BbLEtOAc, 93,03%), e frações diclorometânica e em acetato de etila de cultivo em meio sólido (BbADCM, 87,14%; BbAEtOAc, 71,06%). A partir do fungo *M. indicus* a fração ativa corresponde à diclorometânica do cultivo em meio sólido (MiADCM, 95,31%). Fazendo um paralelo com o ensaio antimalárico, pode-se afirmar que as frações obtidas são mais promissoras para atividade leishmanicida.

As frações ativas no ensaio primário antileishmania foram submetidas ao ensaio secundário para determinação de valores de CI_{50} e $CI_{90.}$

Tabela 40. Ensaio antileishmania secundário CI_{50} e CI_{90} – *L. donovani.*

Amostras	CI_{50} (µg/mL)	CI_{90} (µg/mL)
BbLEtOAc	20,5	>40
BbAEtoAc	>40	>40
BbADCM	>40	>40
MiADCM	>40	>40
Pentamidina*	1	4
Anfotericina B*	0,2	0,4

*Agentes leishmanicidas padrões.

Os fármacos pentamidina e anfotericina B foram usados como agentes leishmanicidas padrões. Das quatro amostras ativas no ensaio preliminar apenas a fração BbLEtOAc apresentou valor de CI_{50} inferior a 40 µg/mL (20,5 µg/mL) no ensaio secundário. As demais amostras apresentaram valores superiores à concentração máxima testada de 40 µg/mL. Concentrações bastante superiores aos fármacos padrões utilizados. De qualquer forma as frações apresentaram atividade leishmanicida ainda que de forma preliminar, destaque para a fração em acetato de etila do cultivo de *B. bassiana* em PDB.

Substâncias isoladas também foram submetidas a ensaios leishmanicidas para determinação dos valores de CI_{50} e CI_{90}. As concentrações são dadas em µM, sendo que a concentração máxima de cada substância em µM equivale a 40 µg/mL. A tabela a seguir, apresenta os resultados.

Tabela 41. Ensaio antileishmania secundário CI_{50} e CI_{90} - *Leishmania donovani.*

Substâncias	CI_{50} (µM)	CI_{90} (µM)
Austidiol	80,5	>169
Dímero de austidiol	>93,4	>93,4
Austidiol diacetato	59,3	>125
Eugenitina	>181	>181
6-Metóxieugenina	>169	>169
Piridovericina	18,1	81,3
Pentamidina*	0,0041	0,176
Anfotericina B*	0,140	0,324

*Agentes leishmanicidas padrões.

Os resultados da **Tabela 41** mostram que o composto austidiol e austidiol diacetato apresentaram algum grau de atividade leishmanicida (CI_{50}). Embora sejam ativas, apresentaram níveis de inibição muito acima dos padrões leishmanicidas utilizados.

O composto piridovericina apresentou perfil inibitório mais promissor quando comparado às azafilonas testadas: CI_{50} 18,1 µM e CI_{90} 81,3 µM, mas da mesma forma, são resultados distantes daqueles apresentados pelos padrões leishmanicidas utilizados. De qualquer forma

são resultados significativos, mostrando que as substâncias isoladas apresentam algum potencial lehismanicida. Embora as azafilonas, em geral, apresentem diversificadas atividades, destacando-se: citotóxica, antimicrobiana e antifúngica, entre outras, não há relatos na literatura sobre o potencial das mesmas quanto à atividade leihsmanicida. De modo que o isolamento e caracterização de novas azafilonas contribuem para o enriquecimento desta classe de compostos.

A literatura oferece poucas informações sobre ação leishmanicida de piridonas. Fan e colaboradores (2010) recentemente reportaram a síntese de pirano[3,2-c]piridona, pirano[4,3-b]piridona e seus hibrídos com ação leishmanicida sobre *L. donovani*. A reação de 5-formil-20-desóxiuridina com 4- hidróxi-1,6-dimetilpiridin-2(1*H*)-ona e malononitrila rendeu híbridos do tipo pirano[3,2-c]piridona e pirano[4,3-b]piridona com promissora ação leishmanicida contra *L. donovani*, com valores de CI_{50} variando de 10,6 a 139,9 µM.

4.3.7 Ensaio Antimicrobiano: antifúngico e antibacteriano.

O ensaio antimicrobiano para bactérias e fungos foi desenvolvido no National Center for Natural Products Research – University of Mississippi de acordo com a metodologia descrita na seção Experimental.

Tabela 42. Ensaio de atividade antimicrobiana – antibacteriana e antifúngica.

Amostra	Inibição de Crescimento (%)									
	Antifúngico					Antibacteriano				
	C. albicans	*C. galbrata*	*C. Krusei*	*C. neoformans*	*A. fumigatus*	*S. aureus*	*MRS*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*M. intracellulare*
BbLEtOAc	21	93	3	0	0	0	0	16	36	0
BbAEtOAc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BbADCM	0	0	0	0	0	0	0	13	4	0
BbAHex	0	0	0	2	0	0	12	0	0	0
MiAEtOAc	9	0	0	0	0	0	6	25	0	0
MiADCM	9	0	11	7	0	0	0	21	0	0
MiAHex	0	0	0	4	0	0	6	11	0	0
MiLEtOAc	6	0	0	0	0	0	14	19	0	0

Amostras apresentando % de inibição de crescimento < 50% são consideradas inativas.
Amostras apresentando % de inibição de crescimento > ou = 50% são destinadas a ensaios secundários (IC_{50}).
Concentração teste: 50 µg/mL.

De acordo com a **Tabela 42** os resultados de inibição de crescimento microbiano (em %) indicam que de uma maneira em geral as frações avaliadas tem um potencial discreto para atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana). Pode-se citar, por exemplo, que a cepa fúngica *Aspergillus fumigatus* e as cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium intracellulare* não apresentaram sensibilidade às frações avaliadas. Por sua vez, as cepas fúngicas *Candia albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* mostraram alguma sensibilidade às frações avaliadas, ainda que em níveis discretos que variaram de 2 a 21% de inibição; as cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina também apresentaram baixa sensibilidade frente às frações avaliadas, com valores entre 4 e 36%. Somente a fração em acetato de etila do cultivo em PDB (BbLEtOAc) mostrou atividade satisfatória. Entretanto apenas frente à cepa fúngica *C. galbrata*, com valor de inibição de crescimento de 93%. Considerando que apenas as amostras que apresentaram valores de inibição iguais ou superiores a 50% são classificadas como ativas, somente a amostra BbLEtOAc foi submetida a ensaio secundário para determinação de CI_{50}.

De acordo com a **Tabela 43**, referente ao ensaio antimicrobiano secundário da amostra BbLEtOAc, observa-se que a fração apresentou-se ativa contra as cepas *C. galbrata* e *C. neoformans* (22,92 e 20,75 μg/mL). Já contra as demais cepas os valores de CI_{50} foram superiores a maior concentração avaliada (50 μg/mL), portanto inativas. Para efeito de comparação, na **Tabela 43** apresentam-se os dados de $CI_{50,}$ CIM e CMF/CMB dos fármacos controle utilizados para as cepas avaliadas.

Tabela 43. Ensaio secundário de atividade antimicrobiana – antibacteriana e antifúngica.

Amostra	*CI_{50}									
	Antifúngico					Antibacteriano				
	C. albicans	*C. galbrata*	*C. Krusei*	*C. neoformans*	*A. fumigatus*	*S. aureus*	*MRS*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*M. intracellulare*
BbLEtOAc	>50	22,92	>50	20,75	-	-	-	-	>50	-

*Consideram-se amostras ativas aquelas que apresentarem $IC_{50} <= 20$ µg/mL

Tabela 44. Ensaios antimicrobianos com substâncias controle.

Micro-organismos	Droga Controle	CI_{50} (µg/mL)*	CIM (µg/mL)**	CMF/CMB (µg/mL)***
C. albicans ATCC 90028	Anfotericina B	0,57	1,25	1,25
C. galbrata ATCC 90030	Anfotericina B	0,58	1,25	1,25
C. Krusei ATCC 6258	Anfotericina B	0,74	1,25	2,50
A. fumigatus ATCC 90906	Anfotericina B	1,07	1,25	5,00
C. neoformans ATCC 90113	Anfotericina B	0,27	1,25	1,25
S. aureus ATCC 29213	Ciprofloxacino	0,09	0,50	1,00
S. aureus meticilina resistente ATCC 33591	Ciprofloxacino	0,09	0,25	0,50
E. coli ATCC 35218	Ciprofloxacino	0,005	0,031	0,063
P. aeruginosa ATCC 27853	Ciprofloxacino	0,058	0,250	0,50
M. intracellulare ATCC 23068	Ciprofloxacino	0,33	0,50	-

*Concentração (µg/mL) que resulta em inibição do crescimento em 50%.
**CIM (Concentração Inibitória Mínima) é a menor concentração testada (µg/mL) que permite não detectar nenhum crescimento.
***Concentração Fungicida/Bactericida Mínima é a menor concentração testada (µg/mL) que mata o micro-organismo.

As azafilonas se caracterizam por possuir amplo espectro de atividades biológicas, o que inclui ação antimicrobiana e antifúngica. Nesse sentido, é possível elencar algumas azafilonas fúngicas com amplo espectro de ação antimicrobiana (*B. brevis, B. subtilis, E. faecium, S. aureus, M. luteus, Y. lipolytica,* MRSA e outras bactérias) e antifúngica (*C. albicans, C. trifolii* e *S. aureus*). Alguns exemplos de azafilonas com este espectro de ação são: ácido lunatóico (Marumo *et al*., 1982), patulodina (Sakuda *et al*., 1995), sassafrina D (Quang *et al*., 2005), sclerotiorina (Natsume *et al*., 1988), cohaerina E e F (Quang *et al*., 2006b), ácido mitorubrínico (Locci *et al*., 1967), mitorubrinol (Buechi *et al*., 1965), chaetomugilinas A e B (Park *et al*., 2005), chaetoviridinas A e B (Takahashi *et al*., 1990), deflectinas A e B (Anke *et al*., 1981) e multiforminas A, B e C (Quang *et al*., 2005).

Da mesma forma que as azafilonas, as piridonas também apresentam diversidade de atividades biológicas que vão desde antimicrobianas a antitumorais. Dessa forma é possível enumerar algumas piridonas com ação antimicrobiana: apiosporamida (Alfatafta *et al*., 1994) fusapiridona A (Tsuchinari *et al*., 2007), kirromicina (Wolf e Zahner, 1971), harzianopiridona (Dickinson *et al*., 1989), atepenin B, B4 e A5 (Omura *et al*., 1988), flavipucina (Casinovi *et al*., 1968) e leporina A (TePaske *et al*., 1991); e com ação antifúngica: funiculosina (Ando *et al*., 1969) e ilicicolina H (Hayakawa *et al*., 1971).

5. CONCLUSÃO

O estudo de metabólitos secundários do fungo entomopatogênico *B. bassiana* permitiu o isolamento e elucidação de produtos naturais de representativas classes de metabólitos fúngicos: **aloxazinas** e **piridonas.** Foram obtidos os derivados aloxazínicos 7,8-dimetilaloxazina e 1-metil-7-hidróximetilumicromo, sendo este inédito. Além dos derivados aloxazínicos, foram obtidos três metabólitos piridônicos: piridovericina, piridovericina-N-*O*-(4-*O*-metil-*β*-D-glucopiranosídeo) e 15-desóxi-piridovericina, os dois últimos inéditos. Cabe destacar que o metabólito piridovercina-Glc apresenta um padrão incomum de glicosilação para produtos piridônicos, a glicosilação do grupo N-OH.

Por sua vez o estudo de metabólitos secundários do fungo endofítico *M. indicus* permitiu o isolamento e elucidação de produtos naturais de relevantes classes de metabólitos fúngicos: **azafilonas** e **cromenos**. Cabe destacar a obtenção de três azafilonas inéditas: dímero de austidiol, austidiol diidroisocumarina e austidiol cromeno. Estas azafilonas apresentam o mesmo padrão de conexão entre duas cadeias policetídeos aromáticas, uma ponte metilênica. A ocorrência de ponte metilênica entre produtos naturais é bastante incomum e é hipotetizado que a conexão entre as duas cadeias policetídicas ocorra através de um sistema de biossíntese na natureza que use formaldeído. Foram obtidos também o austidiol e seu derivado acetilado. Além dos produtos inéditos e das azafilonas conhecidas foram isolados os derivados cromênicos: eugenitina, 6-metóxieugenina e 9-hidróxieugenina, os quais possuem ampla distribuição na natureza

Do ponto de vista biológico as azafilonas: austidiol e austidiol diacetato, bem como a piridona piridovericina, mostraram-se ativas nos ensaios citotóxicos (HCT-8, HL-60, MDA-MB435, PC3 e SF-95) e leishmanicidas (*L. donovani e L.major*), embora em níveis inferiores aos padrões utilizados. Cabe destacar que nos ensaios citotóxicos as substâncias foram ativas contra as linhagens tumorais e inativas contra linfócitos humanos, considerando as maiores concentrações avaliadas. Este dado é relevante, pois há um grau de seletividade por células tumorais, o que é bastante desejável.

Por fim, o isolamento e elucidação de novos metabólitos azafilônicos e piridônicos contribuem para o enriquecimento destas importantes classes de metabólitos fúngicos, ao mesmo tempo, evidenciam a importância dos fungos endofíticos e entomopatogênicos na química de produtos naturais.

6. REFERÊNCIAS

Alfatafta, A.A., Gloer, J.B., Scott, J.A., Malloch, D. Apiosporamida: a new antifungal agent from the coprophilous fungus *Apzospora montagnez*. **Journal of Natural Products.** v.57, p.1696–1702. 1994.

Anke, H., Kemmer, T., Hofle, G. Deflectins, new antimicrobial azaphilones from *Aspergillus deflectus*. **Journal of Antibiotics.** v.34, p.923–928. 1981.

Aono, T.; Mizuno, K. European Patent, 283761, 1998.

Agusta, A.; Ohashi, K.; Shibuya, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.54, p.579-582. 2006.

Arai, N., Shiomi, K., Tomoda, H., Tabata, N., Yang, D.J., Masuma, R., Kawakubo, T., Omura, S. Isochromophilones III-VI, inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium multicolor* FO-3216. **Journal of Antibiotics.** v.48, p.696–702. 2005.

Ariyasena, J.; Baek, S.-H.; Perry, N. B.; Weavers, R. T. Ether-linked biflavonoids from *Quintinia acutifolia*. **Journal of Natural Products**. v.67, p.693-696. 2004.

Ando, K., Suzuki, S., Saehi, T., Tamura, T., Arima, K. Antiviral and antitumor antibiotics. XIII. Funiculosin, a new antibiotic. 1. Isolation, biological and chemical properties. **Journal of Antibiotics** v.22, p.189–194. 1969.

Arai, N.; Shiomi, K.; Tomoda, H.; Tabata, N.; Yang, J.; Masuma, R.; Kawakubo, T.; Omura, S. Isochromophilones III ~VI, inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium multicolor* FO-3216. **Journal of Antibiotics.** v.48, p.696-702, 1995.

Atlas, R. M. Handbook of microbiological media. Boca Raton: **CRC Press**, p.280. 1995.

Bacon, C.W.; White Jr., J.F. **Microbial endophytes.** New York: Marcel Dekker, v. 1 p. 487, 2000.

Baldé, A.M., Pieters, L.A., Gergely, A., Wray, V., Clayes, M., Vlietinck, A. J. Spermacoceine, a bis-indole alkaloid from *Borreria verticillata*. **Phytochemistry**. v.30, p.997-1000, 1991.

Ball, G. F. M., 2006. Vitamins in Foods: Analyzis, Bioavailability, and Stability. In: Press, C. (Ed.), Boca Raton, FL, pp. 167-168.

Braga, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará - 5ª Ed. - Fund. Guimarães Duque/Fund. Vingt-Un Rosado - Mossoró (RN) - Brasil – 496 p, 2001.

Burkill, H.M. The useful plants of West Tropical Africa. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. v 5, 686 p, 2000.

Buechi, G., White, J.D., Wogan, G.N. The structures of mitorubrin and mitorubrinol. **Journal of American Chemical Society.** v.87, p.3484–3489. 1965.

Butler, M.S.; Buss, A.D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**. v.7, p.919-929, 2006.

Cannell, R. J. P. (ed.). Scale-up of natural products isolation. In: **Natural Products Isolation**. New Jersey, Humana Press. cap. 14, p.409–424. 1998.

Casinovi, C.G., Grandolini, G., Mercantini, R., Oddo, N., Olivieri, R., Tonolo, A. A new antibiotic produced by a strain of *Aspergillus flaviceps*. **Tetrahedron Letters.** v.9, 3175–3178. 1968.

Cheng, Y., Schneider, B., Riese, U., Schubert, B., Li, Z., Hamburger, M. (+)-*N*-Deoxymilitarinone A, a Neuritogenic Pyridone Alkaloid from the Insect Pathogenic Fungus *Paecilomyces farinosus* **Journal of Natural Products**. v.69, p. 436–438. 2006.

Chin, Y.W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghom, D. A. Drug Discovery From Natural Sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal.** v. 8, p. 239-253. 2006.

Colombo, L., Gennari, C., Ricca, G.S., SCOLASTICO, C. Detection of one symmetrical precursor during the biosynthesis of the fungal metabolite austidiol using [1,2- C_2]acetate and [Me-]methionine. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications.** 575 – 576. 1981.

Corrêa, P.M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. v 6, 777 p, 1978.

Dev, S. Impact of natural products on modern drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, p. 191-198. 2010.

Dewar, C. L., Sigler, L. Fungal arthritis of the knee caused by *Mycoleptodiscus indicus.* **Clinical Rheumatology.** v.29, p.1061–1065, 2010.

Dickinson, C., Hanson, J. R, Hitchcock, P.B., Claydon, N. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of Trichoderma harzianum. **Journal of Chemical Society** Perkin Trans. 1, p.1885–1887. 1989.

Dong, J., Zhou, Y., Li, R., Zhou, W., Li, L., Zhu, Y., Huang, R., Zhang, K. New nematicidal azaphilones from the aquatic fungus *Pseudohalonectria adversaria* YMF1.01019. **FEMS Microbiology Letters**. v.264, p.65–69. 2006.

Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., Chatterjee, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International.** v.54, p.119-122. 2005.

Eda, S., Nishioka, K., Ogawa, Y., Hosaka, K. Japanese Patent, 02169586, 1990.

Ellis, M.B. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, England.v.1, p.447–448. 1976.

Fan, Y., Zhang, S., Kruer, N., Keyhani, N.O. High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology.** v.106, 274-279. 2011.

Farnet, C. M., Zazapoulos, E. Improving drug discovery from Microorganisms. In: Zhang L, Demain AL (eds.). **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. Humana Press, Totowa, p. 95-106. 2005.

Farrugia, L.J. *WinGX* suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystalography**. v.32, p.837-838. 1999.

Firáková, S., Šturdíková, M., Múčková, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**. v. 62, p.251-257. 2007.

Fox, C.H., Huneck, S. The formation of roccellic acid, eugenitol, eugenetin, and rupicolon by the mycobiont *Lecanora rupicola.* **Phytochemistry.** v.8, p.1301-1304. 1969.

Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., Gilman, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, p.362-366. 1998.

Frisch, J *et al.*, *Gaussian 03* (Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2003).

Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Samson, R.A., Stolk, A.C. Chemotaxonomy of the genus Talaromyces. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.57, p.179–218. 1990.

Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., Chiba, K., Hoshino, Y., Okumoto, T. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. **Journal of Antibiotics**. v.47, p.208-215. 1994.

Gallo, M.B.C., Chagas, F.O., Almeida, M.O., Macedo, C.C., Cavalcanti, B.C., Barros, F.W.A., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., Bastos, J.K., Pupo, M.T. Bioprospecting studies of extracts and compounds from endophytic fungi isolated in *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) for cytotoxic activity. **Journal of Basic Microbiology**. v.49, p.142-151, 2009.

Gallo, M.B.C., Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T. Natural Products from Endophytic Fungi. *In*: Ratul Saikai, Rajib L. Bezbaruah and Tarun Ch. Bora (Eds) **Microbial Biotechnology**. New Delhi, India, New India Publishing Agency. v.1, p.139-168, 2008.

Ganesan, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.12, p. 306-31. 2008.

Gavrilescu, M., Chisti, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances.** v.23, p.471–499. 2005.

Gazzaneo, L.R.S., Lucena, R.F.P., Albuquerque, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v1, p.1-9. 2005.

Gill M, Steglich W. Pigments of fungi (Macromycetes). **Prog Chem. Org Nat Prod** v.51, p.1–317. 1987.

Gill, M. Pigments of fungi (Macromycetes). **Natural Products Reports.** v.13, p.513–528. 1996.

Gill, M. Pigments of fungi (Macromycetes). **Natural Products Reports.** v.16, p.301–317. 1999.

Grifo, F., Newman, D., Farifiel, A., Bhattacharya, B., Grupenhoff, J. The origins of prescription drugs. In: Grifo, F., Rosenthal, J., eds. **Biodiversity and Human Health**. Washington, DC: Island Press. 131–163. 1997.

Gupta, S., Montillor, C., Wang, Y. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana.* **Journal of Natural Products.** v.58, p.733-738. 1995.

Hajjaj, H., Klaebe, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J., Francois, J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance. **Applied Environment Microbiology.** v.65, p.311–314. 1999.

Halo, L.M., Heneghan, M.N., Yakasai, A.A., Song, Z., Williams, K., Bailey, A.M., Cox, R.J., Lazarus, C.M., Simpson, T.J. Late stage oxidations during the biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana.* **Journal of American Chemical Society.** v.130, p.17988-17996. 2008.

Hayakawa, S., Minato, H., Katagiri, K. The ilicicolins, antibiotics from *Cylindrocladium ilicicola*. **Journal of Antibiotics.** v.24, p.653-654. 1971.

Hutchinson, C.R. Microbial polyketide synthases: more and more prolific. **Proceedings of the National Academy of Science** USA 96, p.3336–3338. 1999.

Iijima, M., Masuda, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Kurasawa, S., Okami, Y., Ishizuka, M., Takeuchi, T., Iitake, Y. Metacytofilin, a novel immunomodulator produced by *Metarhizium* sp. TA2759. **Journal of Antibiotics.** v.45, p.1553-1556. 1992.

Irlapati, N.P., Baldwin, J.E., Adlington, R.M., Pritchard, G.J. An unusual oxidative cyclization: studies towards the biomimetic synthesisof pyridomacrolidin. **Organic Letters.** v.5, p.2351-2354. 2003.

Isaka, M., Palasarn, S., Kocharin, K., Saenboonrueng, J. A Cytotoxic xanthone dimer from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. BCC 8401 **Journal of Natural Products.** v.68, p.945-946, 2005.

Ito, H., Kasajima, N., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T. Dimeric flavonol glycoside and galloylated C-glucosylchromones from Kunzeaambigua. **Journal of Natural Products.** v.67, p.411-415, 2004.

Jessen, H.J., Gademann, K.. 4-Hydroxy-2-pyridone alkaloids: structures and synthetic approaches. **Natural Products Reports**. v.27, p.1168-1185. 2010.

Jongrungruangchok S, Kittakoop P, Yongsmith B, Bavovada R, Tanasupawat S, Lartpornmatulee N, Thebtaranonth Y. Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. **Phytochemistry**. v.65, p.2569–2575. 2004.

Kagazimono, T., Nishino, E., Matsumoto, K., Kawashima, A., Kishimoto, M., Sakai, N., He, B., Chenf, Z., Adachi, T., Morimoto, S., Hanada, K. Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.1407-1412, 1995.

Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Yodbuddee, D., Phonkerd, N. New Antimalarial bis-dehydroaporphine alkaloids from *Polyalthia debilis.* **Journal of Natural Products** v.66, p.616-619. 2003.

Kogel, K.H., Franken, P., Hückelhoven, R. Endophytes or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**. v.9, p.358-363, 2006.

Kurono, M., Nakanishi, K., Shindo, K., Tada, M. Biosyntheses of monascorubrin and monascoflavin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin.** v.11, p.359–362. 1963.

Leeper, F. J. Biosynthesis: aromatic polyketides and vitamins. Berlin. 7 Springer; 2000.

Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. Industrial biotransformations. A collection of processes. Weinheim 7 Wiley-VCH; 2000.

Locci, R., Merlini, L., Nasini, G., Locci, J.R. Mitorubrinic acid and related compounds from a strain of *Penicillium funiculosum.* **Gioron Microbiology**. v.15, p.92–102. 1967.

Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., Thomas, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology.** v.46, p.667-702. 2001.

Lo Presti, R.S., Destro, R. The fungal metabolite austdiol. **Acta Crystallographica**. v.59, p.199-201. 2003.

Lorenzi, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. 440p, 1991.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 512p, 2002.

Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L., Hinriches, D.J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.48, p.739-741. 1993a.

Makler, M.T., Hinriches, D.J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.48. p.205-210, 1993b.

Mapari, S., Meyer. A.S., Thrane, U., Frisvad, J.C. Identificationof potentially safe promising fungal cell factoriesfor the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**. v.8, p.24. 2009.

Marinho, A.M.R., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M.L.R., Santos, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.16, p.280-283, 2005.

Mason, P.G., Erlandson, M.A. The potential of biological control for management of grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) in Canada**. Canadian Entomologist.** v.126, p.1459-1491. 1994.

Maquenne, L., Philippe, L. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences**. v.139, p. 840–843. 1904.

Marumo, S., Nukina, M., Kondo, S., Tomiyama, K.. Lunatoic acid A, a morphogenic substance inducing chlamydospore-like cells in some fungi. **Agricultural and Biological Chemistry.** v.46,p.2399–2401. 1982.

Mazet, I., Hung, S.Y., Boucias, D.G.. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. **Experientia**. v.40, p.385-391. 1994.

McCormick, D. B. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. In: Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. (Eds.), New York. 2003.

McInnes, A. G., Smith, D. G., Wat, C.K., Vining, L.C., Wright, J.L.C. Tenellin and bassianin, metabolites of *Beauveria* species. Structure elucidation with ^{15}N- and doubly ^{13}C-enriched compounds using ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chemical Society. Chemical Communications.** p.281–282. 1974

Mikus, J., Steverding, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* by using the dye Alamar Blue. **Parasitology International**. v.48, p.265-269. 2000.

Moore, M.C., Cox, R.J., Duffin, G.R., O'Hagan, D. Synthesis and evaluation of a putative acyl tetramic acid intermediate in tenellin biosynthesis in *Beauveria bassiana.* a new role for tyrosine. **Tetrahedron.** v.54, p.9195-9206. 1998.

Mosman, 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.

Muhammad, I., Bedir, E., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., Pelletier, J., Walker, L.A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **Journal of Natural Products**. v.67, p.772-777. 2004.

Muroga, Y., Yamada, T., Numata, A., Tanaka, R. Chaetomugilins I–O, new potent cytotoxic metabolites from a marine-fish-derived. *Chaetomium* species. Stereochemistry and biological activities. **Tetrahedron.** v.65, p.7580–7586. 2009.

Natsume, M., Takahashi, Y., Marumo, S. Chlamydosporelikecell-inducing substances of fungi: close correlation between chemical reactivity with methylamine and biological activity. **Agricultural Biological Chemistry**. v.52, p.307–331. 1988.

NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Proposed Standard, M38-P. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 18 (13). 1998.

NCCLS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically M7-A5. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 20(2). 2000.

NCCLS Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Tentative Standard, Second Edition, M24-T2. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 20 (26). 2000.

Newman D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v.70, p.461-477. 2007.

Okamoto, Y, Kobayashi, T., Imokawa, G., Hori, T., Nishizawa, Y. Japanese Patent, 09188608, 1997.

Olivo, H. F., Peeples, T. L., Ríos, M. Y., Velásquez, F., Kim, J. W., Narang, S. Microbial C-hydroxylation and β-4-*O*-methylglucosidation of methyl-benzamide 7-azanorbornane ethers with *Beauveria bassiana.* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic** v.21, p.97-105. 2003.

Omura, S., Tomoda, H., Kimura, K., Zhen, D., Kumagai, H., Igarashi, K., Imamura, N. Takahashi, Y., Tanaka, Y., Iwai, Y. Atpenins, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. production, isolation, physico-chemical and biological properties. **Journal of Antibiotics**. v.41, p.1769–1773. 1988.

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

Ostazeski, S.A. An undescribed fungus associated with a root and crown rot of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). **Mycologia**. v.59, p.970–975. 1967.

Osorio-Lozada, A., Tovar-Miranda, R., Olivo, H.F. Biotransformation of *N*-piperidinylacetophenone with *Beauveria bassiana* ATCC-7159. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic.** v.55, p.30-36. 2008.

Owen, N.L., Hundley, N. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**. v.87, p.79-99. 2004.

Padhye, A. A., Davis, M.S., Reddick, A., Bell, M.F., Gearhart, E.D., Von Moll, L. *Mycoleptodiscus indicus*: a new etiologic agent of *Phaeohyphomycosis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, p.2796–2797. 1995.

Pairet, L., Wrigley, S.K., Chetland, I., Reynolds, E.E., Hayes, M.A., Holloway, J., Ainsworth, A.M., Katzer, W., Cheng, X.M., Hupe, D.J., Charlton, P., Doherty, A.M. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.913-923. 1995.

Park, J.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Kim, H.T., Cho, K.Y., Kim, J.C. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum.* **FEMS Microbial Letters.** v.252, p.309–313. 2005.

Pelaez, F., Gonzalez, V., Platas, G., Sanchez-Ballesteros, J., Rubio, V. Molecular phylogenetic studies within the *Xylariaceae* based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversty.** v.31, p.111–134. 2008.

Phonkerd, N., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Soytong, K., Prabpai, S., Kongsearee, P. Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes*VTh01 and *C. cochliodes* CTh05. **Tetrahedron**. v.64, p.9636–9645. 2008.

Porto, K.C., Cabral, J.P., Tabareli, M. Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: História Natural, Ecologia e Conservação. 1ª ed. Brasília, 324p, 2004.

Qian-Cutrone, J., Huang, S., Chang, L.P., Pirnik, D.M., Klohr, S.E., Dalterio, R.A., Hugill, R., Lowe, S., Alam, M., Kadow, K.F. Harziphilone and fleephilone, two new HIV REV/RRE binding inhibitors produced by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Antibiots**. v.49, p.990–997. 1996.

Quang, D.N., Hashimoto, T., Fournier, J., Stadler, M., Radulovic, N., Asakawa, Y. Sassafrins A-D, new antimicrobial azaphilones from the fungus *Creosphaeria sassafras*. **Tetrahedron** 61:1743–1748. 2005.

Quang, D.N., Hashimoto, T., Asakawa, Y. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. **Chemical Record**. v.6, p.79–99. 2006a.

Quang, D.N., Harinantenaina, L., Nishizawa, T., Hashimoto, T., Kohchi, C., Soma, G.I., Asakawa, Y. Inhibition ofnitric oxide production in RAW 264.7 cells by azaphilones from xylariaceous fungi. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.29, p.34–37. 2006b.

Quesada-Moraga, E. Los hongos entomopatógenos en el control de plagas de insectos. **Phytoma.** v.144, p. 41-47. 2002.

Quesada-Moraga, E.; Vey, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **Mycological Research**. v.108, p.441–452. 2004.

Rao, M. R.; Faulkner, D. J. Clavosolides A and B, dimeric macrolides from the philippines sponge *Myriastra clavosa*. **Journal of Natural Products**. v.65, p.386-388. 2002.

Roberts, D. W. Toxins of entomopathogenic fungi. In Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, New York. 1981.

Sá Peixoto-Neto, P.A., Silva, M.V., Campos, N.V.C., Porfírio, Z., Caetano, L.C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia**. v.73, p.529-531. 2002.

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**. v.9, p.275-280. 2004.

Sakuda, S., Otsubo, Y., Yamada, Y. Structure of patulodin,a new azaphilone epoxide, produced by *Penicillium urticae.* **Journal of Antibiotics**. v.48, p.85–86.1995.

Santos, L. C., Piacente, S., Pizza, C., Albert, K., Dachtler, M., Vilegas, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius* **Journal of Natural Products**. v.64, p.122-124. 2001.

Schereiber, S. L. Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids. Berlin 7 Springer; 2000.

Schulz, B., Boyle, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**. v.109, p.661-686. 2005.

Shao, C. L.; Wang, C. Y.; Wei, M. Y.; Gu, Y. C.; She, Z. G.; Qian, P. Y; Lin, Y. C. Aspergilones A and B, two benzylazaphilones with an unprecedented carbon skeleton from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v.21, p.690-693. 2011.

Sheldrick, G.M. A short history of *SHELX*. **Acta Crystallographica**. v.64, p.112-122. 2008.

Shibazaki, M., Tanaka, K., Nagai, K., Watanabe, M., Fujita, S., Suzuki, K., Okada, G., Yamamoto, T. YM-92447 (spinosulfate A), a neuraminidase inhibitor produced by an unidentified pycnidial fungus. **Journal of Antibiotics** v.57, p.812-815. 2004.

Stadler, M., Akne, H., Dekermendjian, K., Reiss, R., Sterner, O., Witt, R. Novel bioactive azaphilones from fruit bodies and mycelial cultures of the Ascomycete Bulgaria inquinans (FR). **Natural Products Letters.** v.7, p.7–14. 1995.

Stadler, M., Laessoe, T., Vasilyeva, L. The genus Pyrenomyxa and its affinities to other cleistocarpous Hypoxyloideae as inferred from morphological and chemical traits. **Mycologia**.v.97, p.1129–1139. 2005.

Stadler, M., Fournier, J. Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the Hypoxyloideae (Xylariaceae). **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.23, p.160–170. 2006

Strasser, H., Vey, A., Butt, T. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to bioactive metabolites of *Metarhizium, Tolypocladium* and *Beauveria* species. **Biocontrol Science and Technology**. v.10, p.717-735. 2000.

Strhol, W. R. Biotechnology of antibiotics. New York 7 Dekker; 1997.

Sturdikova, M., Slugen, D., Lesova, K., Rosenberg, M. Mikrobialna produkcia farbnych azaphilonovych metabolitov. **Chem Listy**. v.94, p.105–110. 2010.

Sutton, B. C. *Pucciniopsis*, *Mycoleptodiscus* and *Amerodiscosiella*. **Transactions of the British Mycological Society.** v.60, p.525–536. 1973.

Takahashi, M., Koyama, K., Natori, S. Four new azaphilones from *Chaetomium globosum* var. flavo-viridae. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.38, p.625–628. 1990.

Takahashi, S., Kakinuma, N., Uchida, K., Hashimoto, R., Yanagisawa, T., Nakagawa, A. Pyridovericin and pyridoacrolidin: novel metabolites from entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*. **Journal of Antibiotics.** v.51, p.596-598. 1998.

Tan, R.X., Zou, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**. v.18, p.448-459. 2001.

TePaske, M.R., Gloer, J. B., Wicklow, D.T., Dowd, P. F. Leporin A: an antiinsectant N-alkoxypyridone from the sclerotia of *Aspergillus leporis*. **Tetrahedron Letters**. v.32, p.5687–5690. 1991.

Tsuchinari, M., Shimanuki, M., Hiramatsu, K., Murayama, F., Koseki, F., Shiono, T. Fusapyridons A and B, novel pyridone alkaloids from an endophytic fungus, *Fusarium* sp. YG-45. **Zeitschrift fur. Naturforsch B Chemical Sciences**. v.62, p.1203–1207. 2007.

Tsui, W.; Brown, G. D. Chromones and chromanones from *Baeckea frutescens*. **Phytochemistry**. v.43, p.871-876. 1996.

Tuberoso, C. I., Bifulco, E., Caboni, P., Sarais, G., Cottiglia, F., Floris, I. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (Galactites tomentosa Moench) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, p.364-369. 2011

Turner, W.B. Fungal metabolites. Academic press, London. 1971.

Turner, W.B., Aldridge, D.C. Fungal metabolites II. Academic press, London. 1983.

Tuson, J. An alkaloid contained in the seeds of the *Ricinus communis*, or castor-oil plant **Journal of Chemical Society**. v.17, p.195–197. 1864.

Tuttle, J.V.; Krenistsky, T. A. Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani***.** **Journal of Biological Chemistry**. v.255, p,909-915.1990.

Tzrel, L.; Hullan, L.; Szarvas, T.; Csiba, A.; Szende, B.; Novak, E. K.; Spazan, O, **Kosmat**. v. 47, p.153-161. 1998.

Velisek, J., Davidek, J., Cejpek, K. Biosynthesis of food constituents: natural pigments. Part 2: a review. **Czech Journal Food Science.** v.26, p.73–98. 2008.

Vey, A. Researches on insecticidal mycotoxins as a contribution to the development of biological control and sustainable agriculture. **OILB. WPRS. Bulletin**. v.21, p.71–76. 1998.

Vey, A., Hoagland, R., Butt, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In Fungi as Biocontrol Agents Progress: problems and potential (T. M. Butt, C. W. Jackson & N. Magan, eds): 311–346. CABI Publishing, Wallingford. 2001.

Vieira, I.J.C., Mathias, L., Braz-Filho, R., Schripsema, J. Iridoids from *Borreria verticillata*. **Organic Letters**. v.1, p.1169-1171. 1999.

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 Applied Chemistry**. v.73, p.617-622. 2001.

Vleggaar, R., Steyn, P.S., Nagel, D.W. Constitution and absolute configuration of austdiol, the main toxic metabolite from *Aspergillus ustus*. **Journal of Chemical Society.** v.1, p.45–49. 1974.

Wat, C. K., McInnes, A. G., Smith, D. G., Wright, J. L. C., Vining, L. C. The yellow pigments of *Beauveria* species. Structures of tenellin and bassianin. **Canadian Journal of Chemistry.** v.55, p.4090 - 4098. 1977.

Wei, W.G., Yao, Z.J. Synthesis studies toward chloroazaphilone and vinylogous c-pyridones: two common natural product core structures. **Journal of Organic Chemistry**. v.70, p.4585–4590. 2005.

Weiss, U., Edwards, J. M. Biosynthesis of aromatic compounds. New York 7 Wiley; 1980.

Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrungsi, N., Meevootisom, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.20, p.65-272. 2004.

Wolf, H., Zahner, H. **Archives in Microbiology**. v.83, p.147–154. 1972.

Wu, X.Y., Liu, X.H., Lin, Y.C., Luo, J.H., She, Z.G., Li, H.J., Chan, W.L., Antus, S., Kurtan, T., Elsasser, B., Krohn, K. Xyloketal F: A Strong L-Calcium Channel Blocker from the Mangrove Fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea Coast. **European Journal of Organic Chemistry**. v.19, p.4061-4064. 2005

Yamada, T., Muroga, Y., Tanaka, R. New Azaphilones, *seco*-Chaetomugilins A and D, produced by a marinefish- derived *Chaetomium globosum*. **Marine Drugs**. v.7, p.249–257. 2009.

Yao, G. M., Ding, Y., Zuo, J. P., Wang, H. B., Wang, Y. B., Ding, B. Y., Chiu, P., Qin, G. W. Dihydrochalcones from the Leaves of *Pieris japonica*. **Journal of Natural Products.** v.68, p.392-396. 2005.

Zhang, Q., Rivikin, A., Curran, D.P. Quasiracemic synthesis: concepts and implementation with a fluorous tagging strategy to make both enantiomers of pyridovericin and mappicine. **Journal of American Chemical Society**. v.124, p.5774-5781. 2002.

Zhang, J., Gunatilaka, A. A. Microbial metabolism of 1-aminoanthracene by *Beauveria bassiana*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.16, p.5085-5089. 2008.

Zhu, J., Grigoriadis, N.P., Lee, J.P., Porco, J. Synthesis of the azaphilones using copper-mediated enantioselective oxidative dearomatization. **Journal of American Chemical Society**. v.127, p.342–343. 2005.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, B. N., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p.2198-2208. 2002.

ANEXO

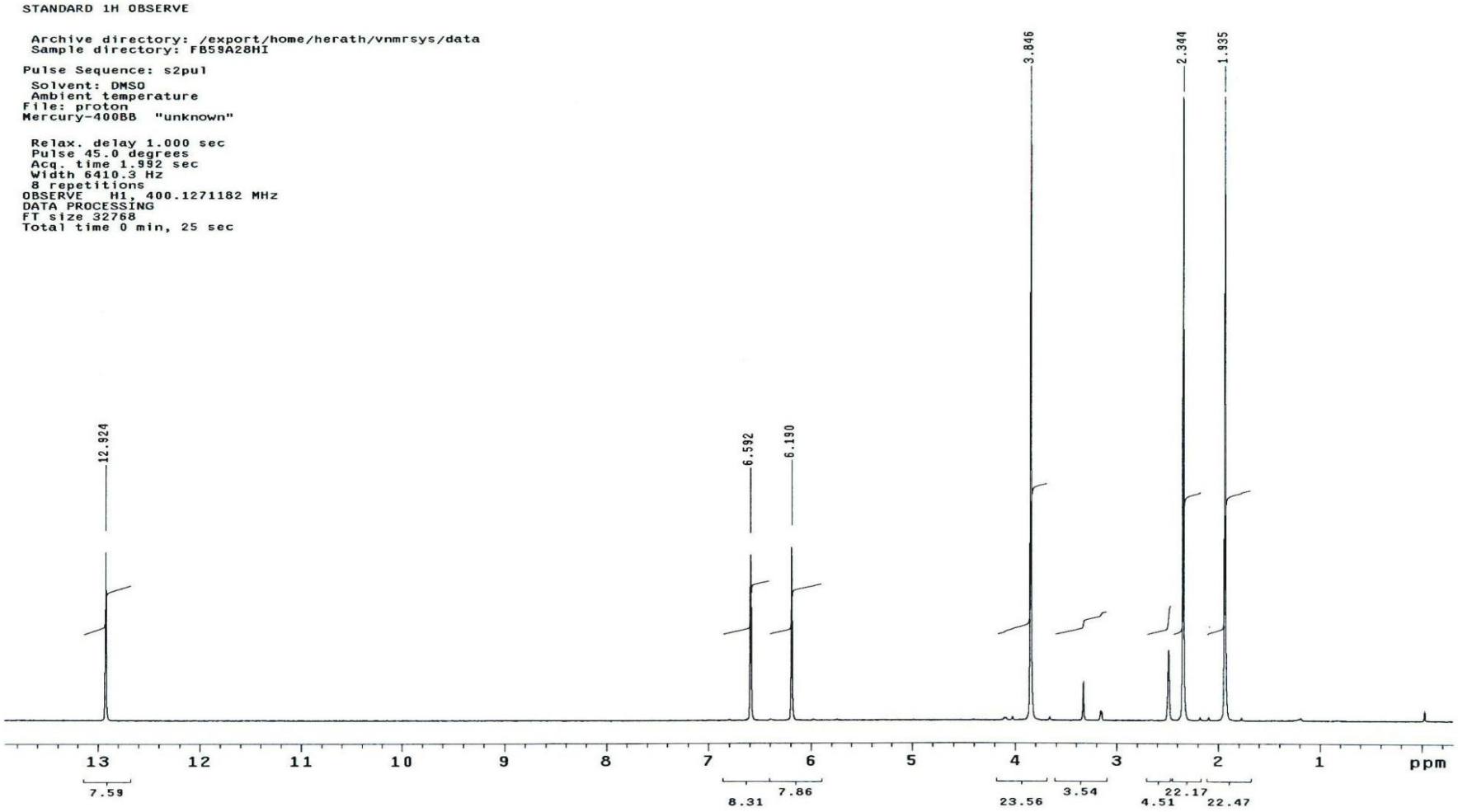


Figura 45. Espectro de RMN ^{1}H - eugenitina (DMSO-d_6., 400 MHz).

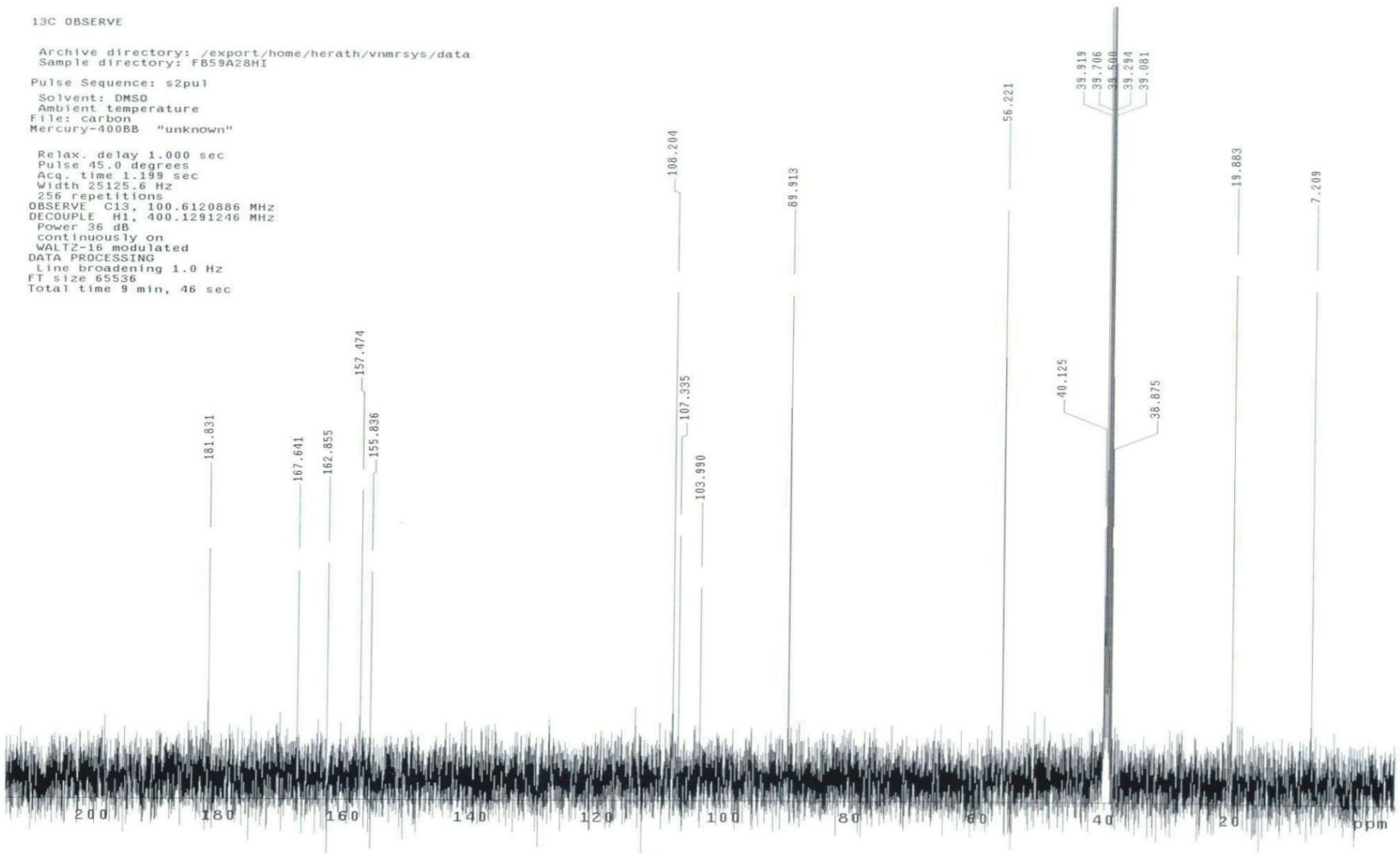


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C - eugenitina (DMSO-d_6, 100 MHz).

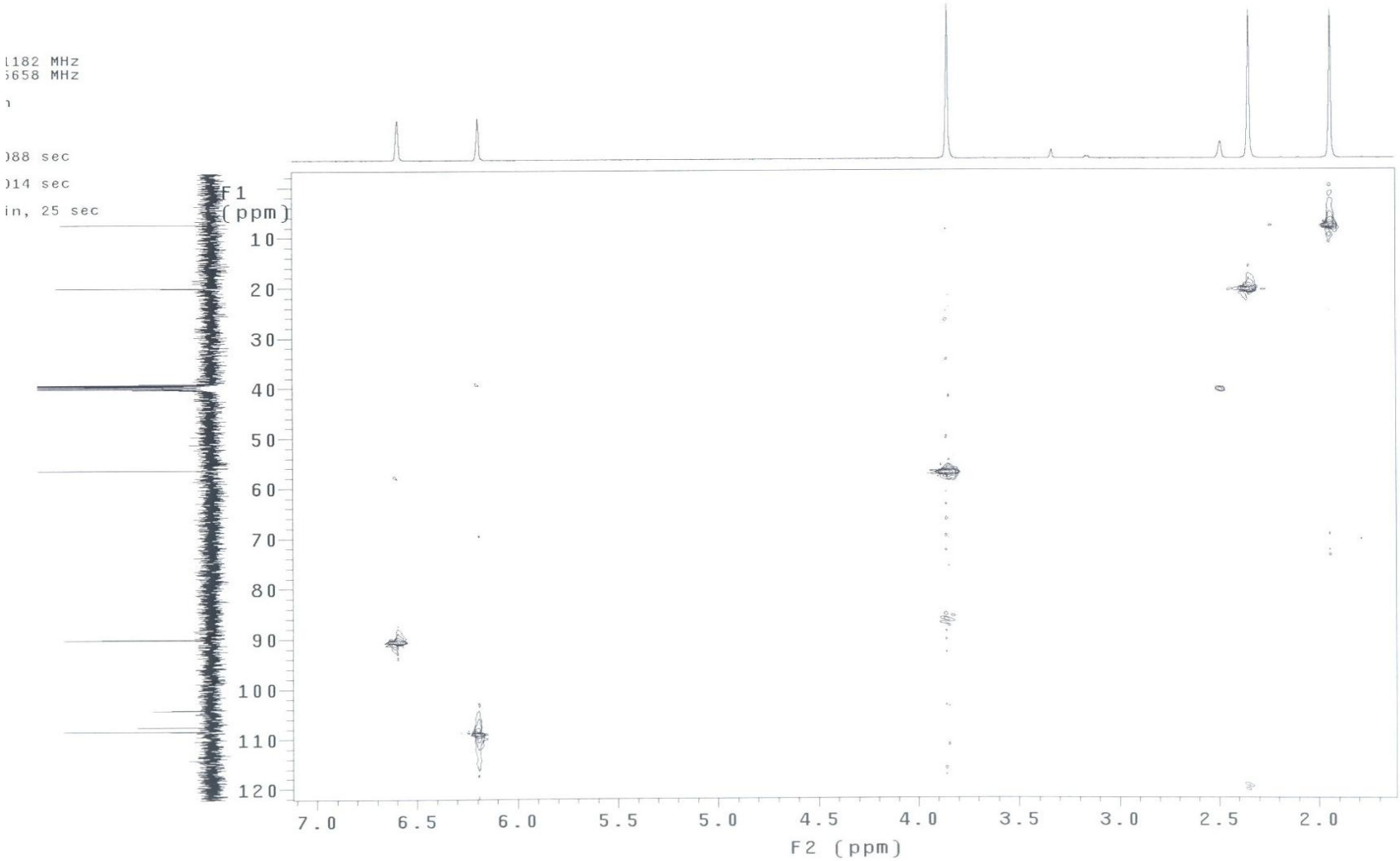


Figura 47. Mapa de contornos HMQC – eugenitina (DMSO-d_6).

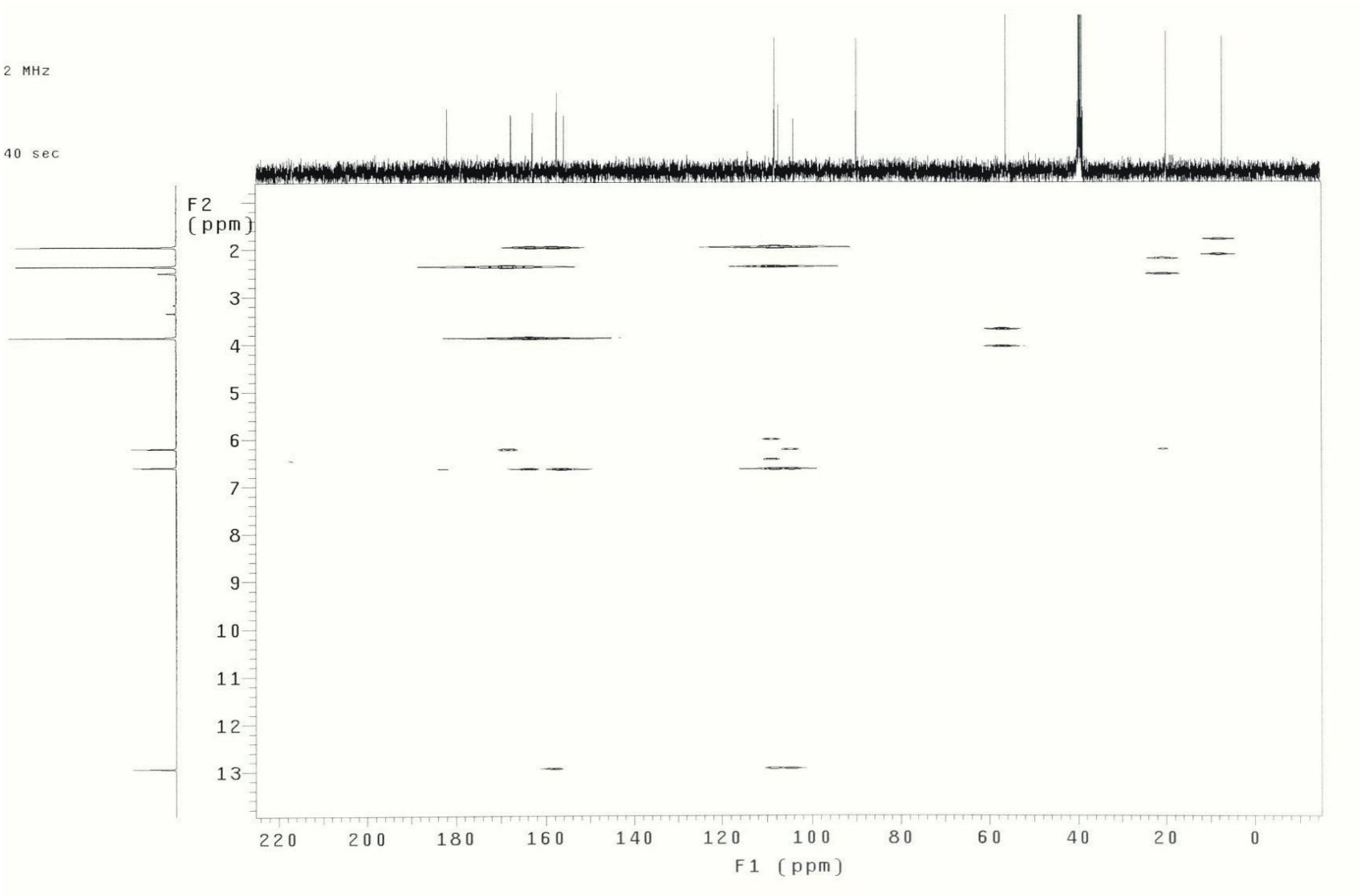


Figura 48. Mapa de contornos HMBC– eugenitina (DMSO-d_6).

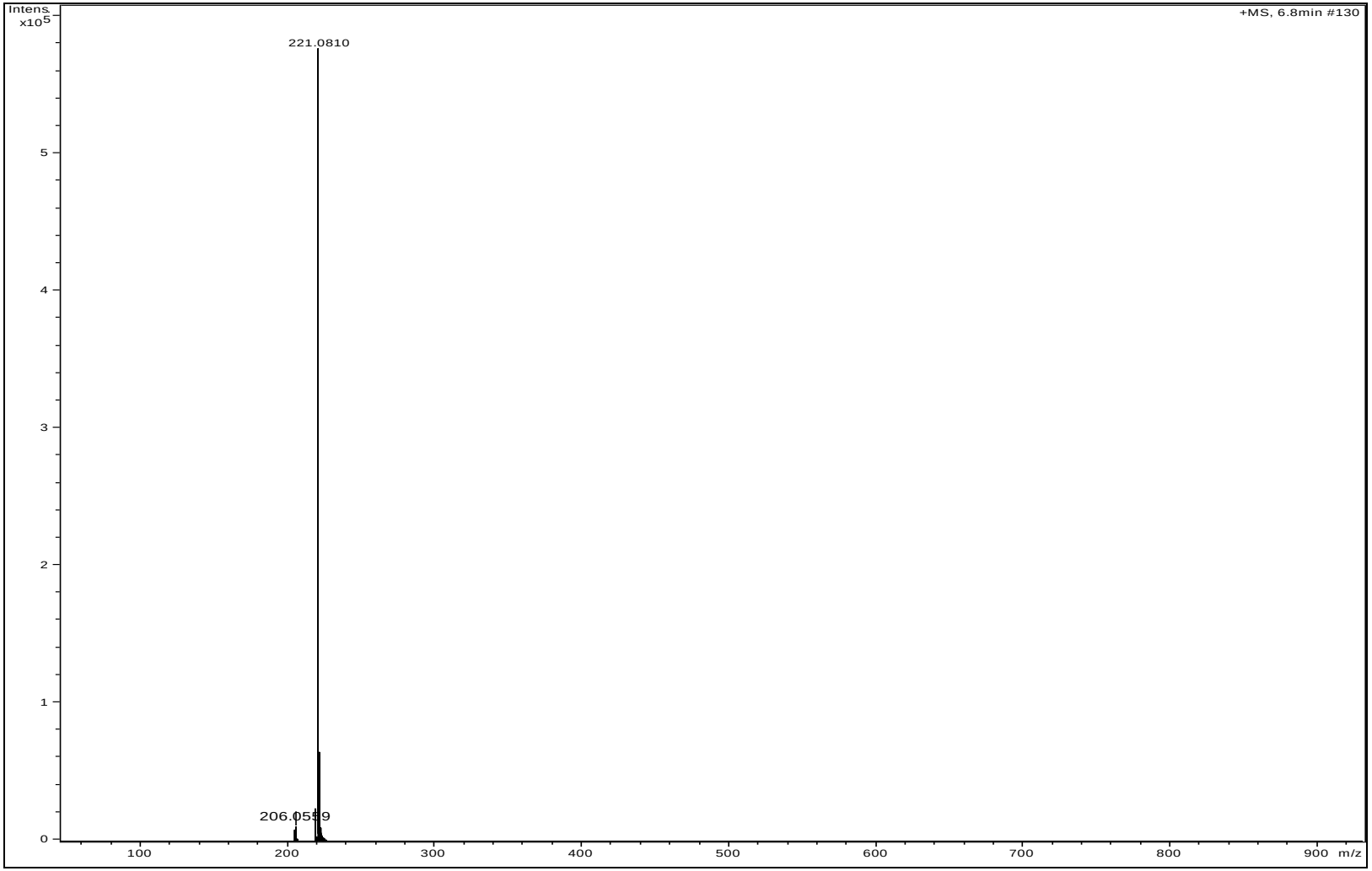

Intens.
x10^5
+MS, 6.8min #130
221.0810
206.0559
0
1
2
3
4
5
100
200
300
400
500
600
700
800
900
m/z

Figura 49. Espectro de massas eugenitina

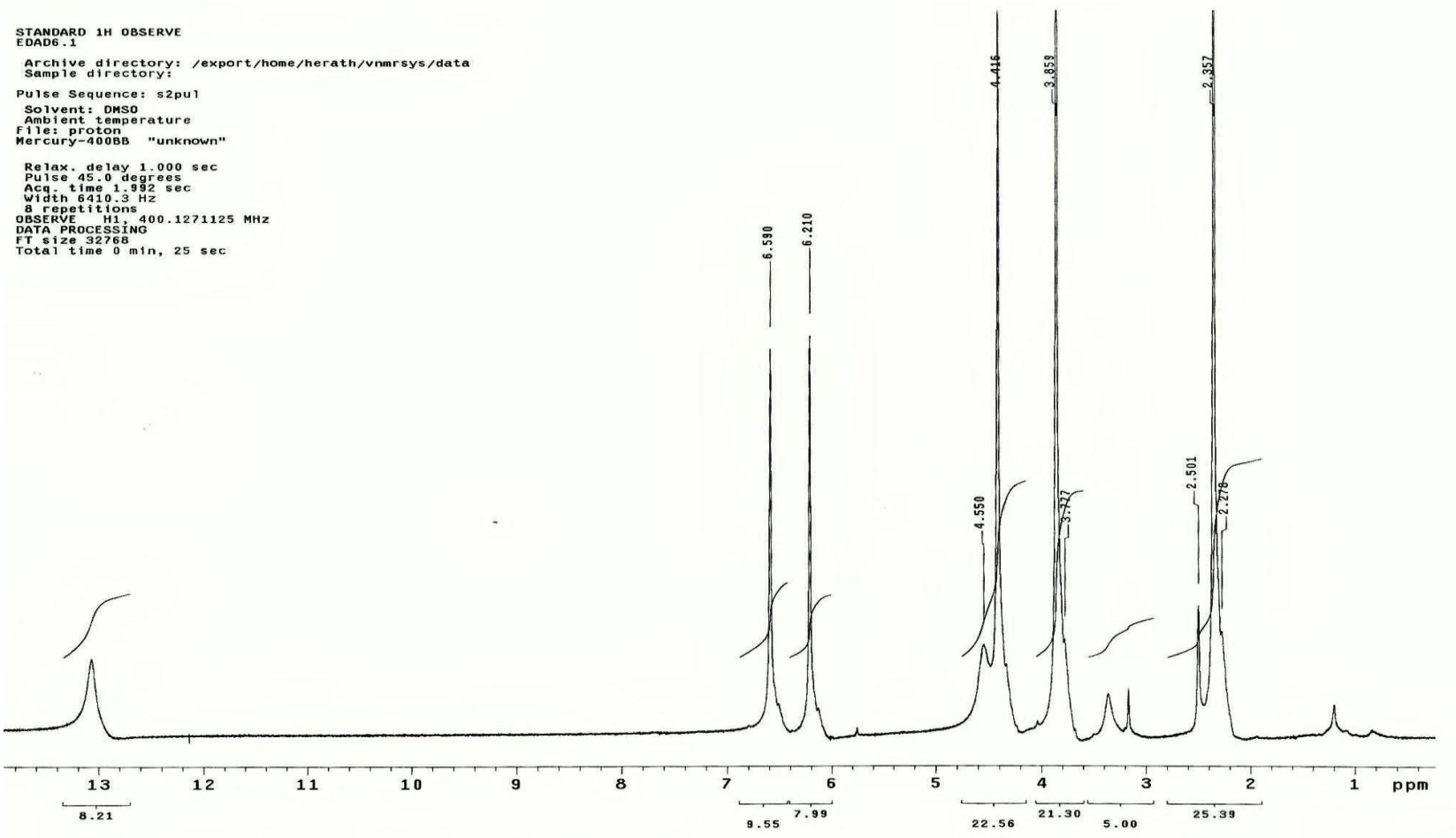


Figura 50. Espectro de RMN ^{1}H – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6, 400 MHz).

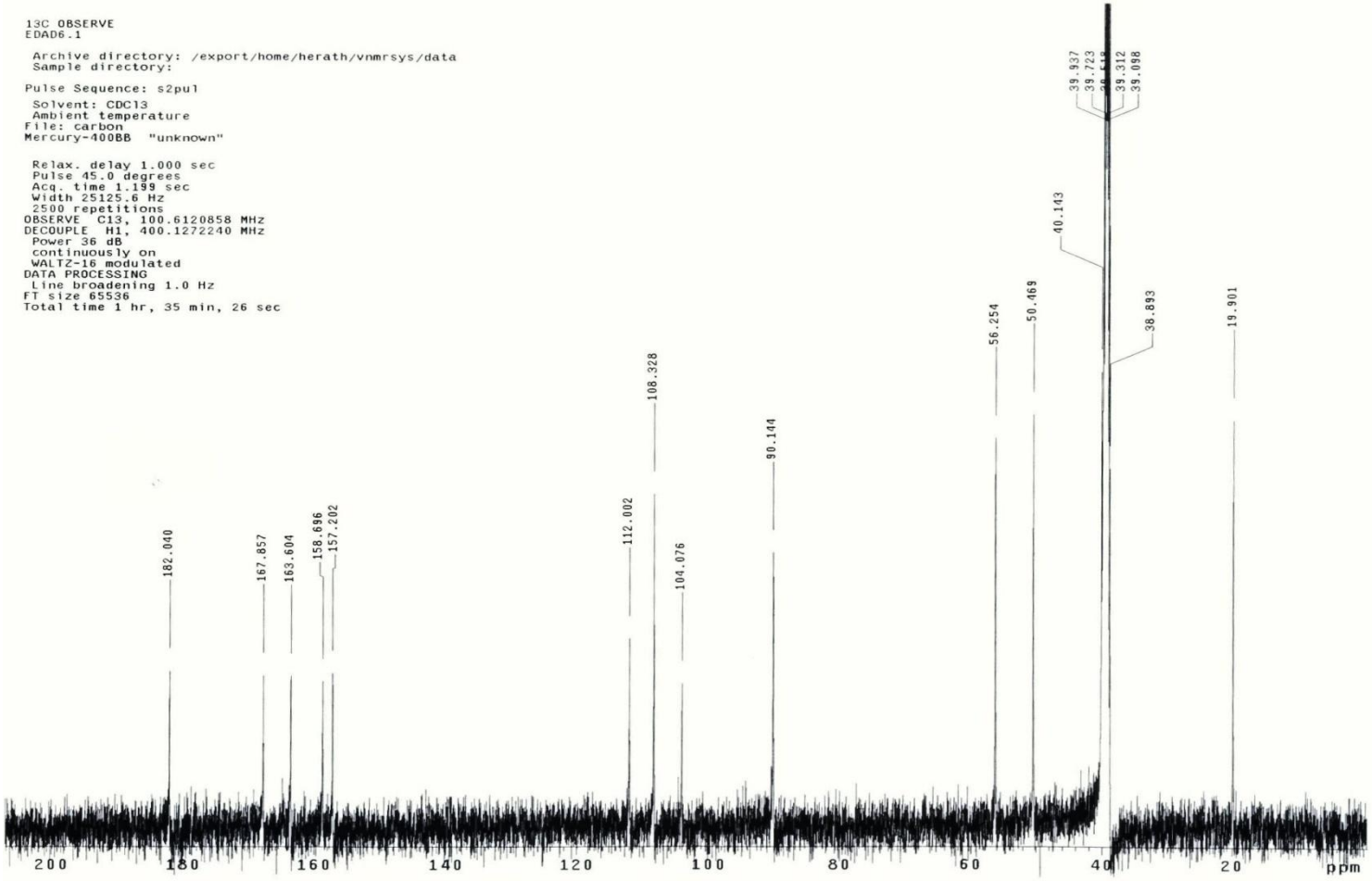


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6, 100 MHz).

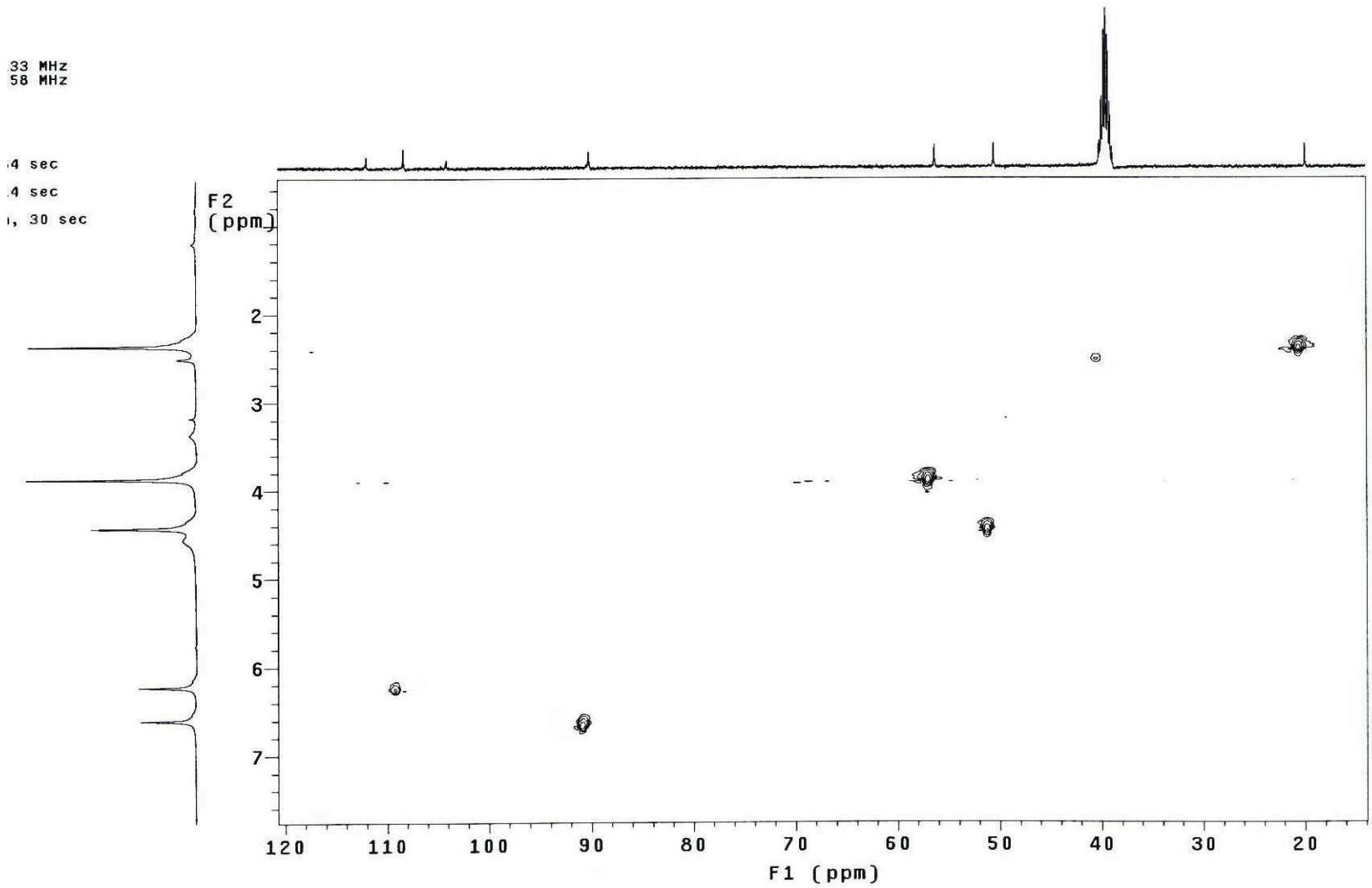

33 MHz
58 MHz
4 sec
4 sec
, 30 sec
F2
(ppm)
2
3
4
5
6
7
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
F1 (ppm)

Figura 52. Mapa de contornos HMQC – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6)

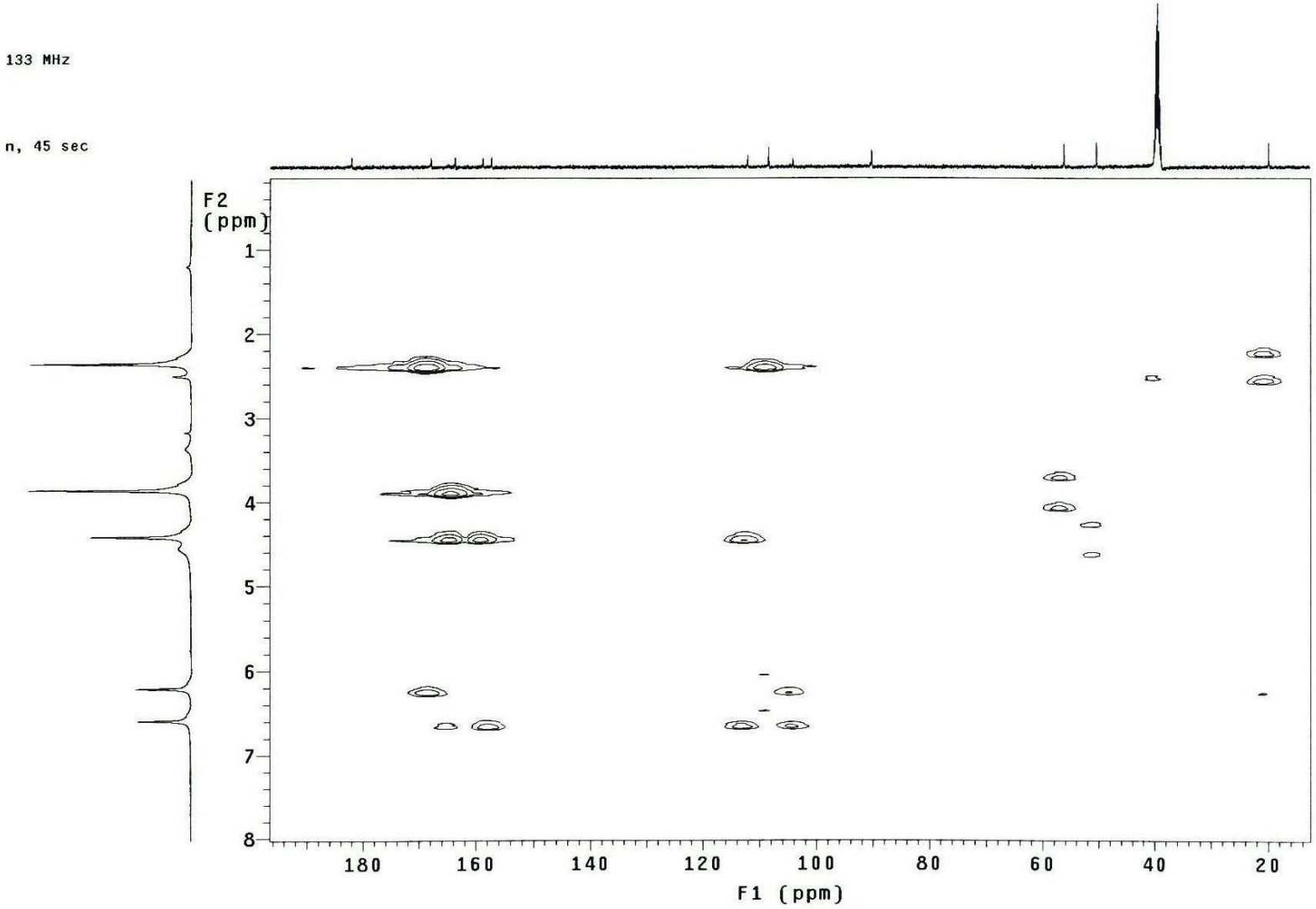


Figura 53. Mapa de contornos HMBC – 6-metóxieugenina (DMSO-d_6).

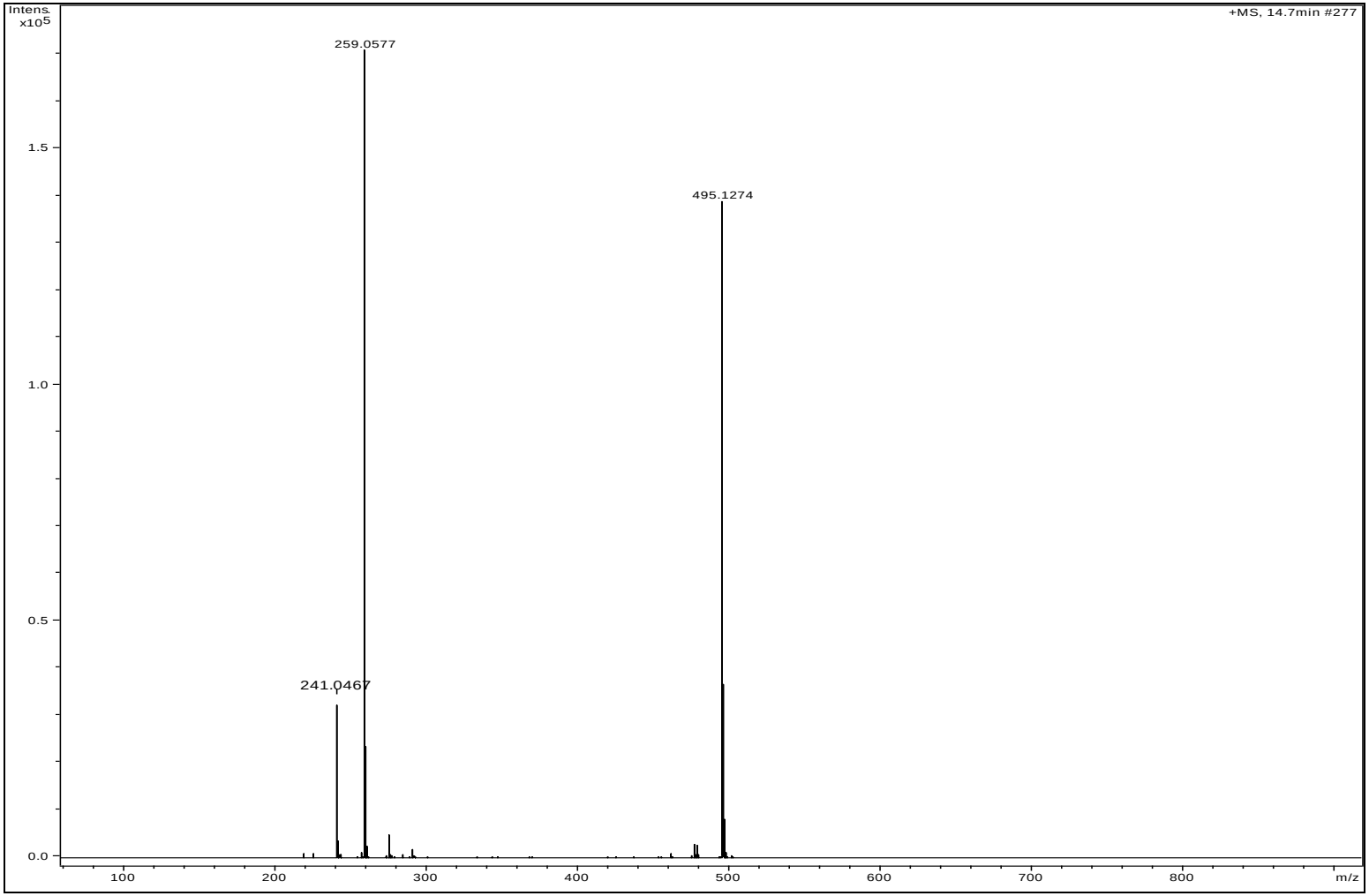


Figura 54. Espectro de massas 6-metóxieugenina

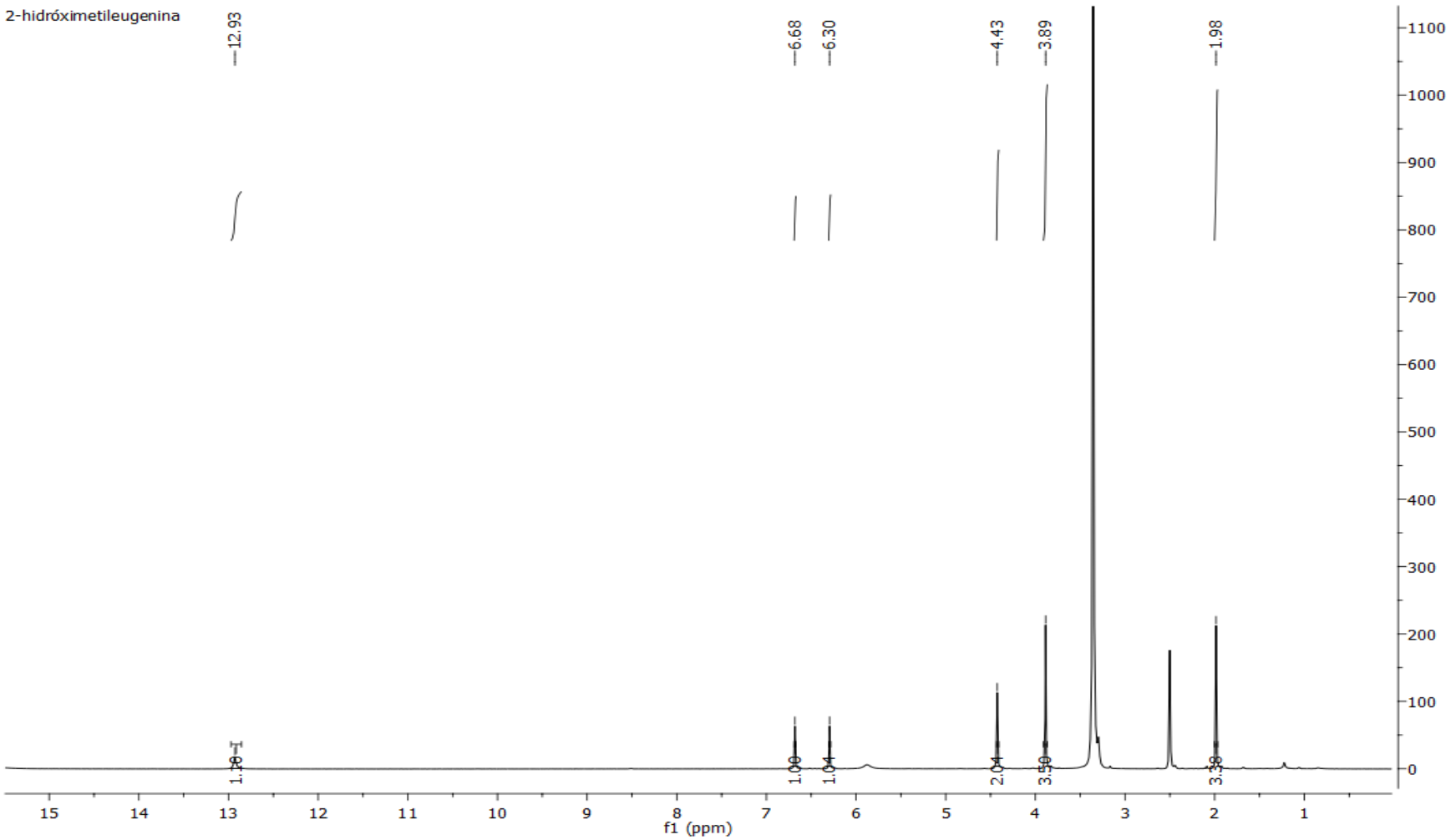


Figura 55. Espectro de RMN ^{1}H – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6, 400 MHz).

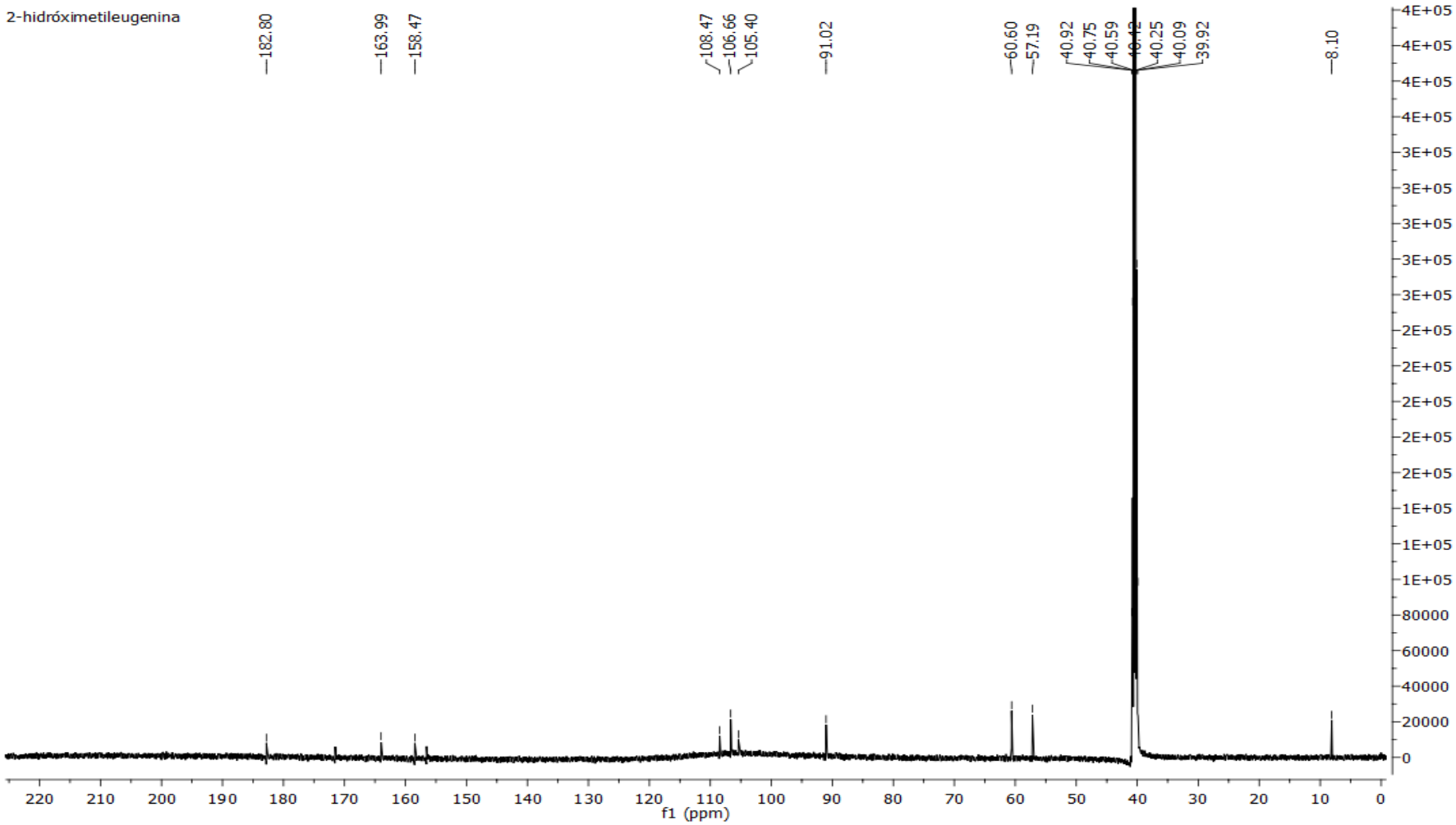

2-hidróximetileugenina
182.80
163.99
158.47
108.47
106.66
105.40
91.02
60.60
57.19
40.92
40.75
40.59
40.42
40.25
40.09
39.92
8.10
f1 (ppm)

Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6, 100 MHz).

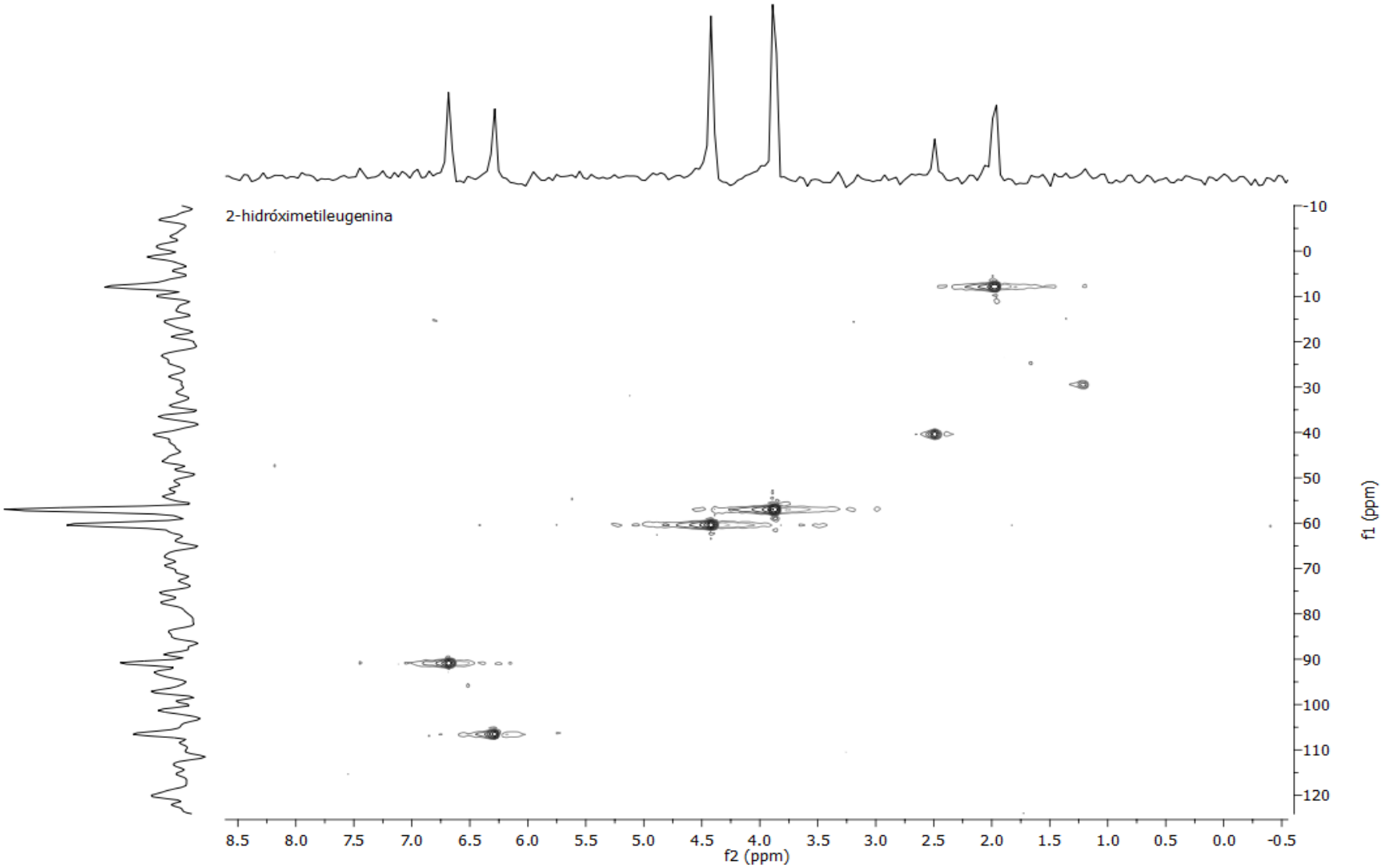


Figura 57. Mapa de contornos HMQC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6).

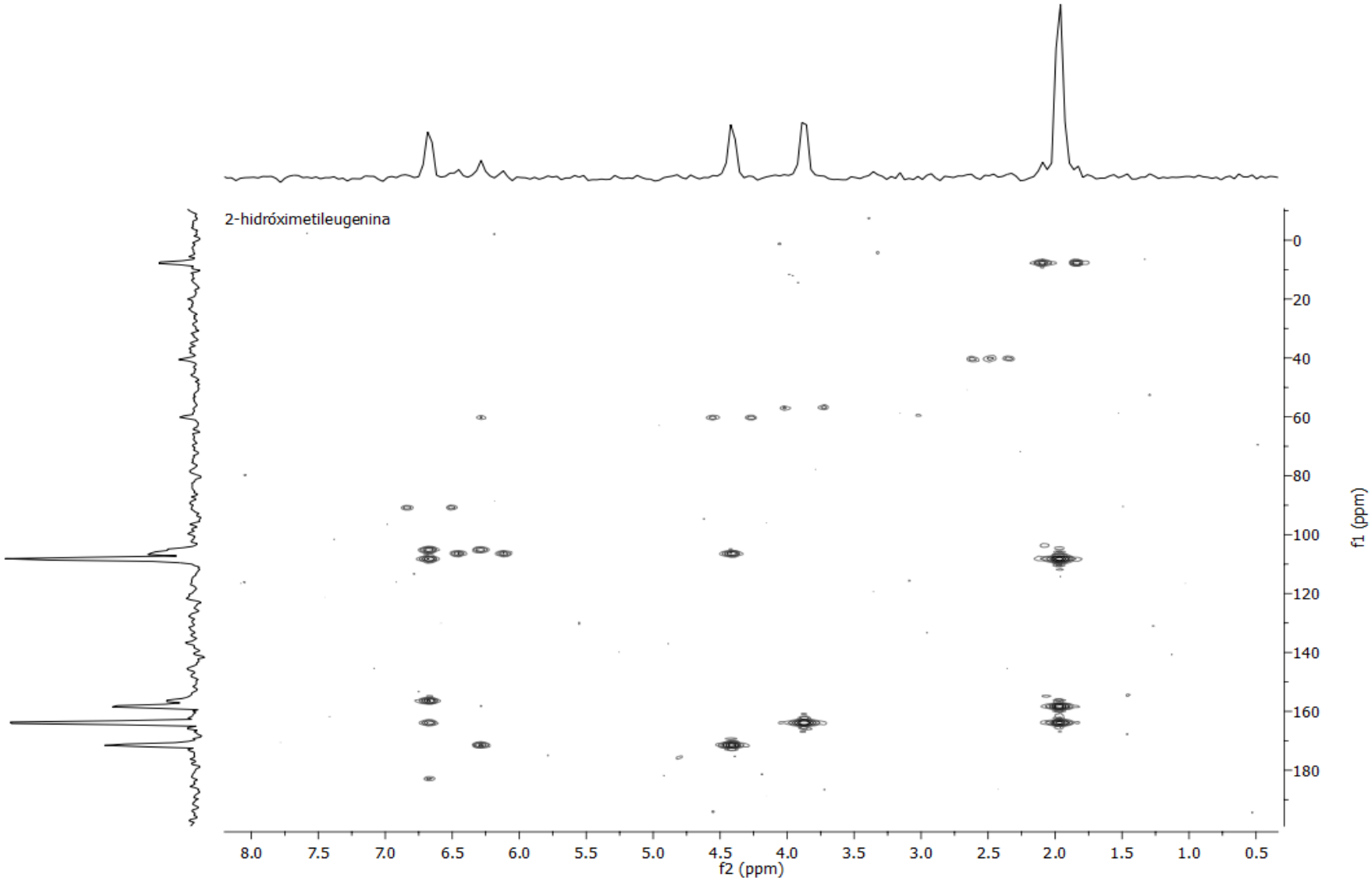


Figura 58. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6)

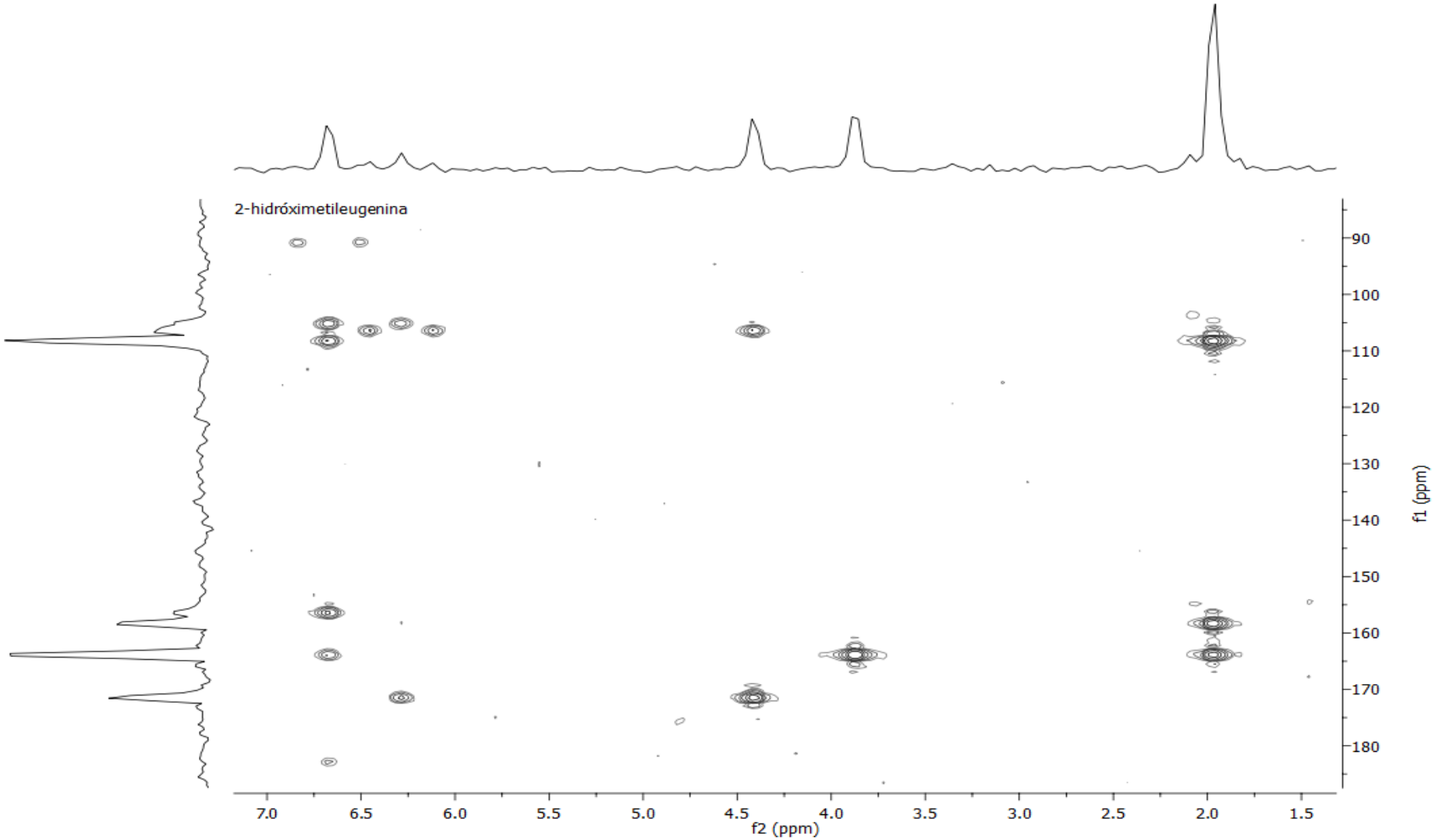


Figura 59. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6).

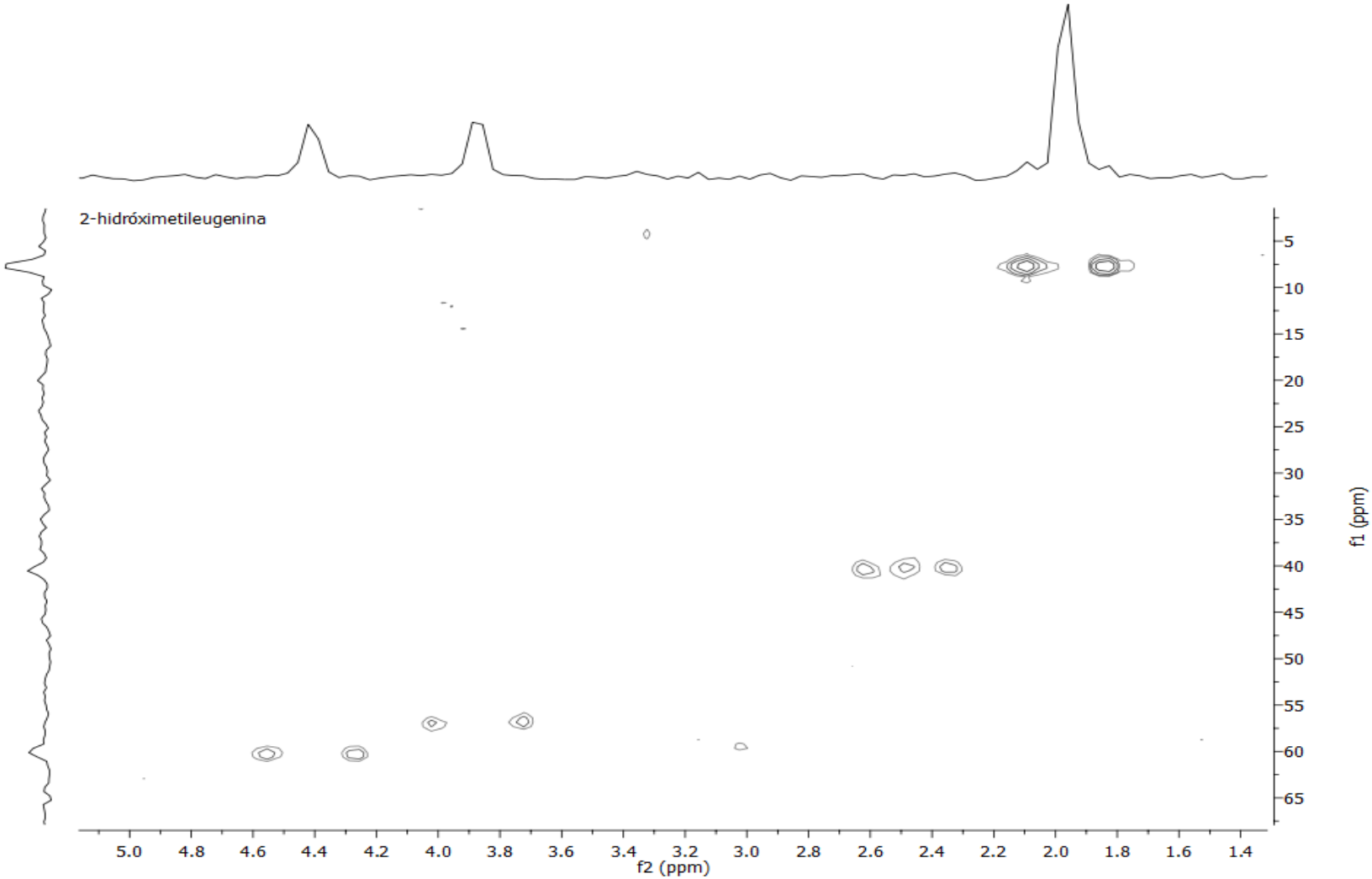


Figura 60. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO-d_6).

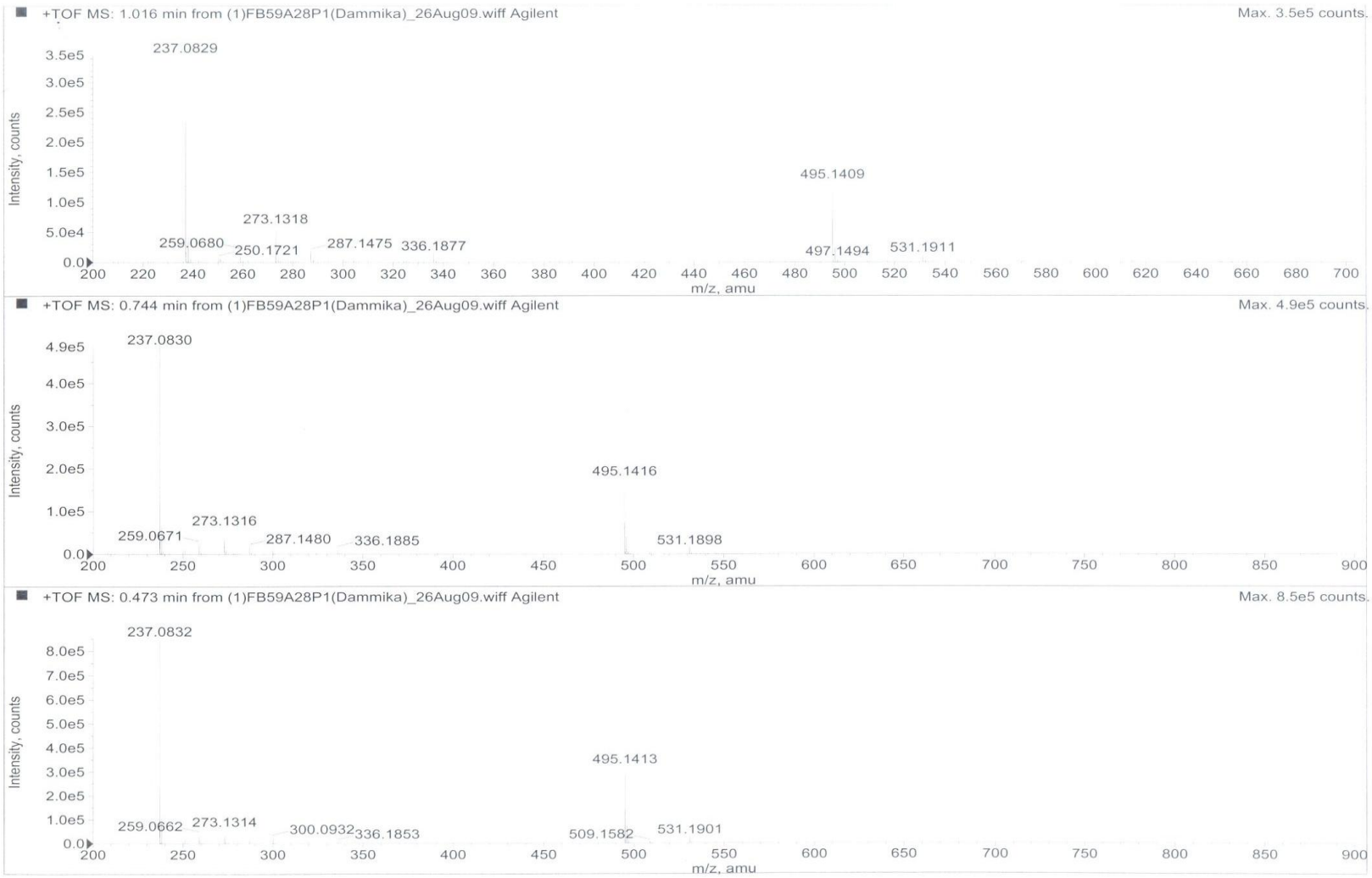


Figura 61. Espectro de massas 9-hidróxieugenina

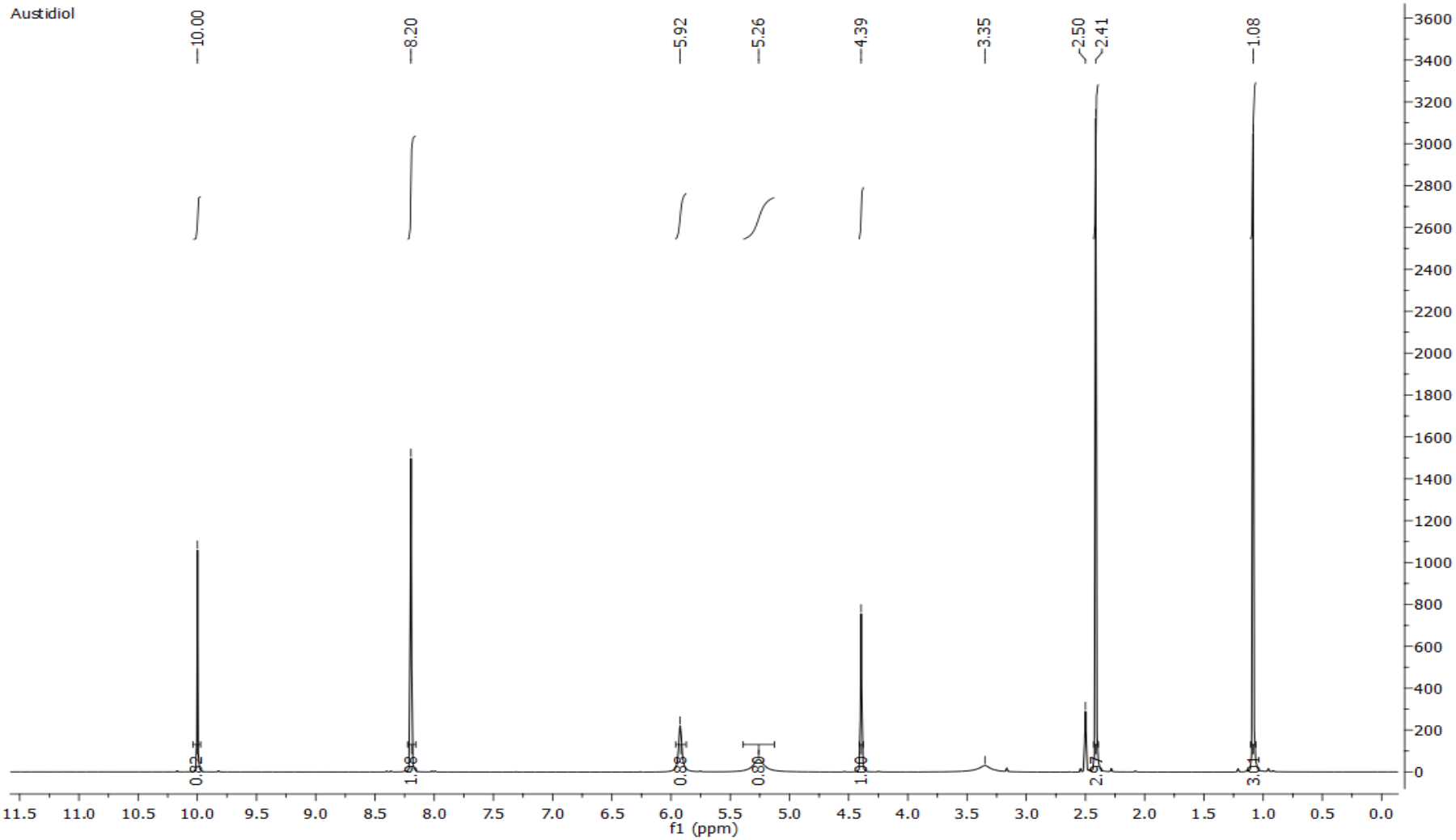


Figura 62. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol (DMSO-d_6, 400 MHz).

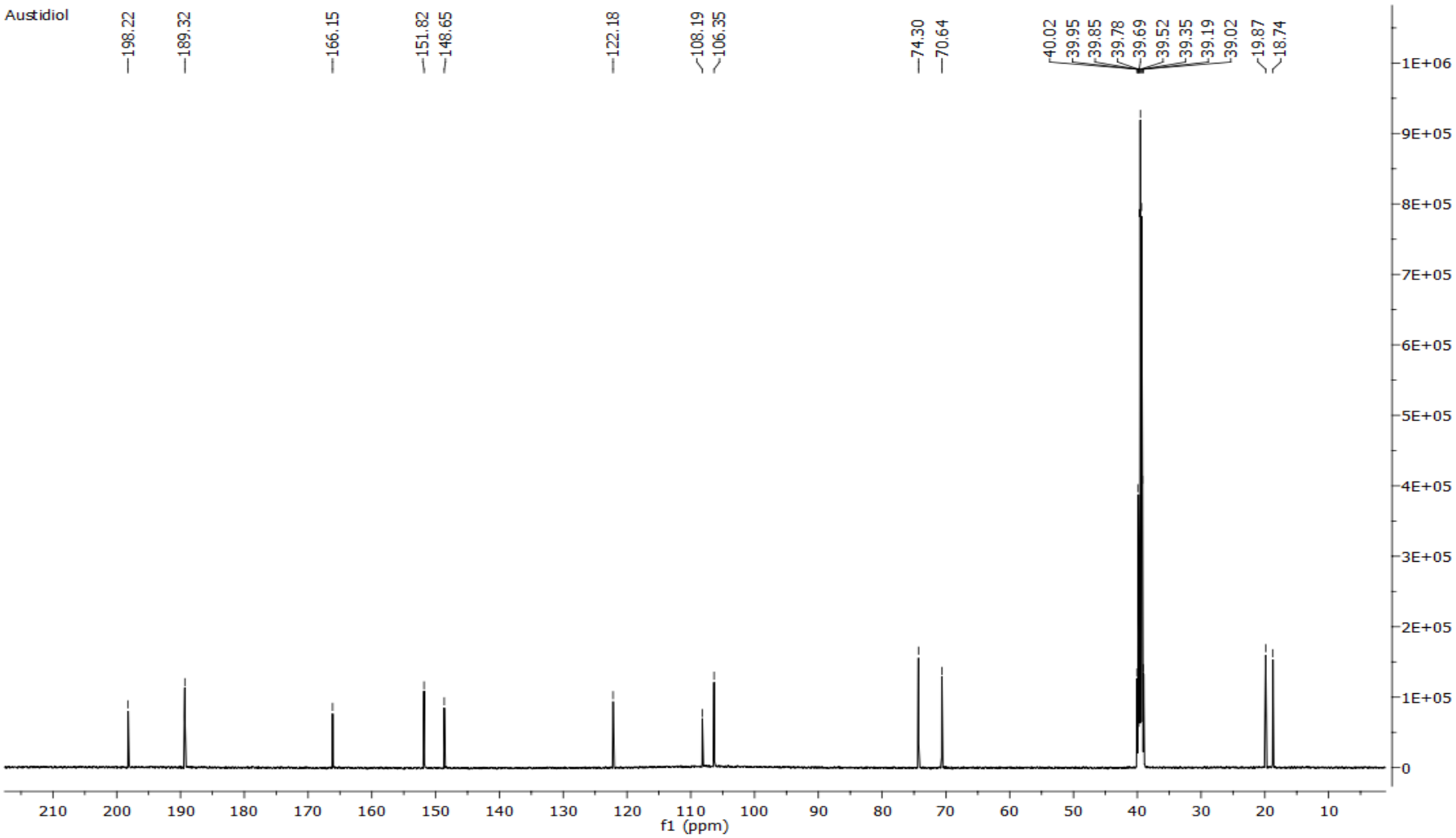


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol (DMSO-d_6, 100 MHz).

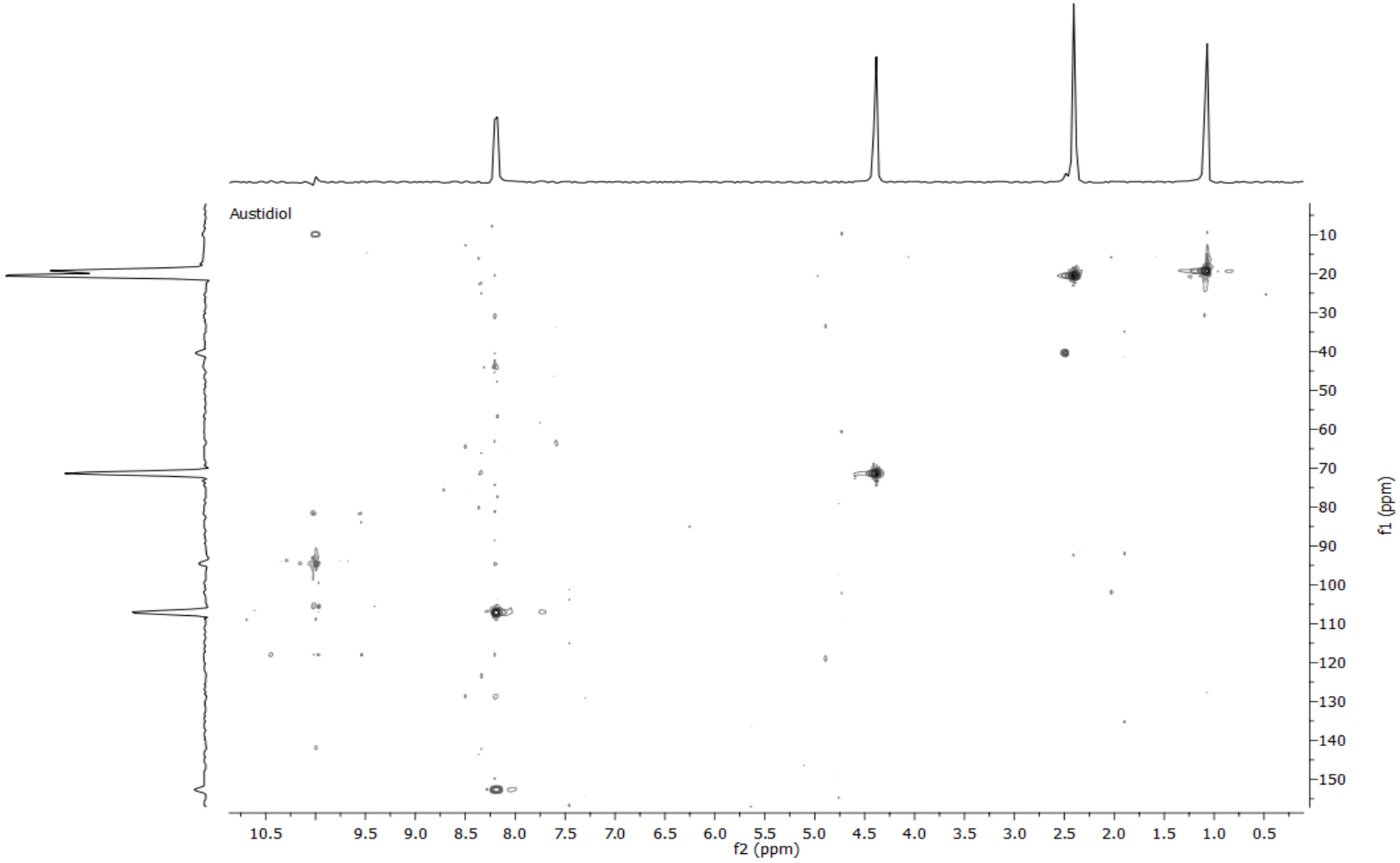


Figura 64. Mapa de contornos HMQC – austidiol (DMSO-d_6).

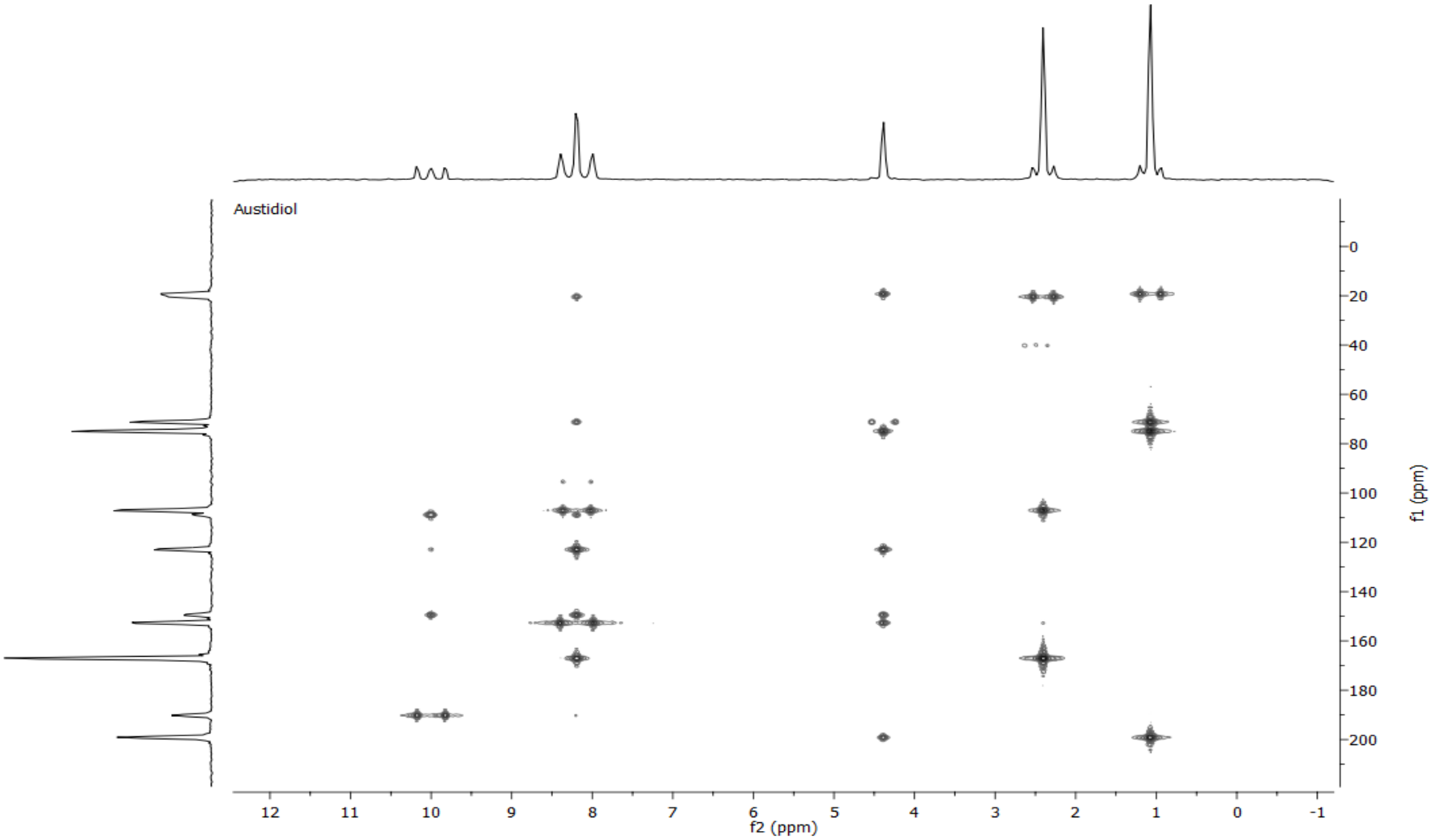


Figura 65. Mapa de contornos HMBC – austidiol (DMSO-d_6).

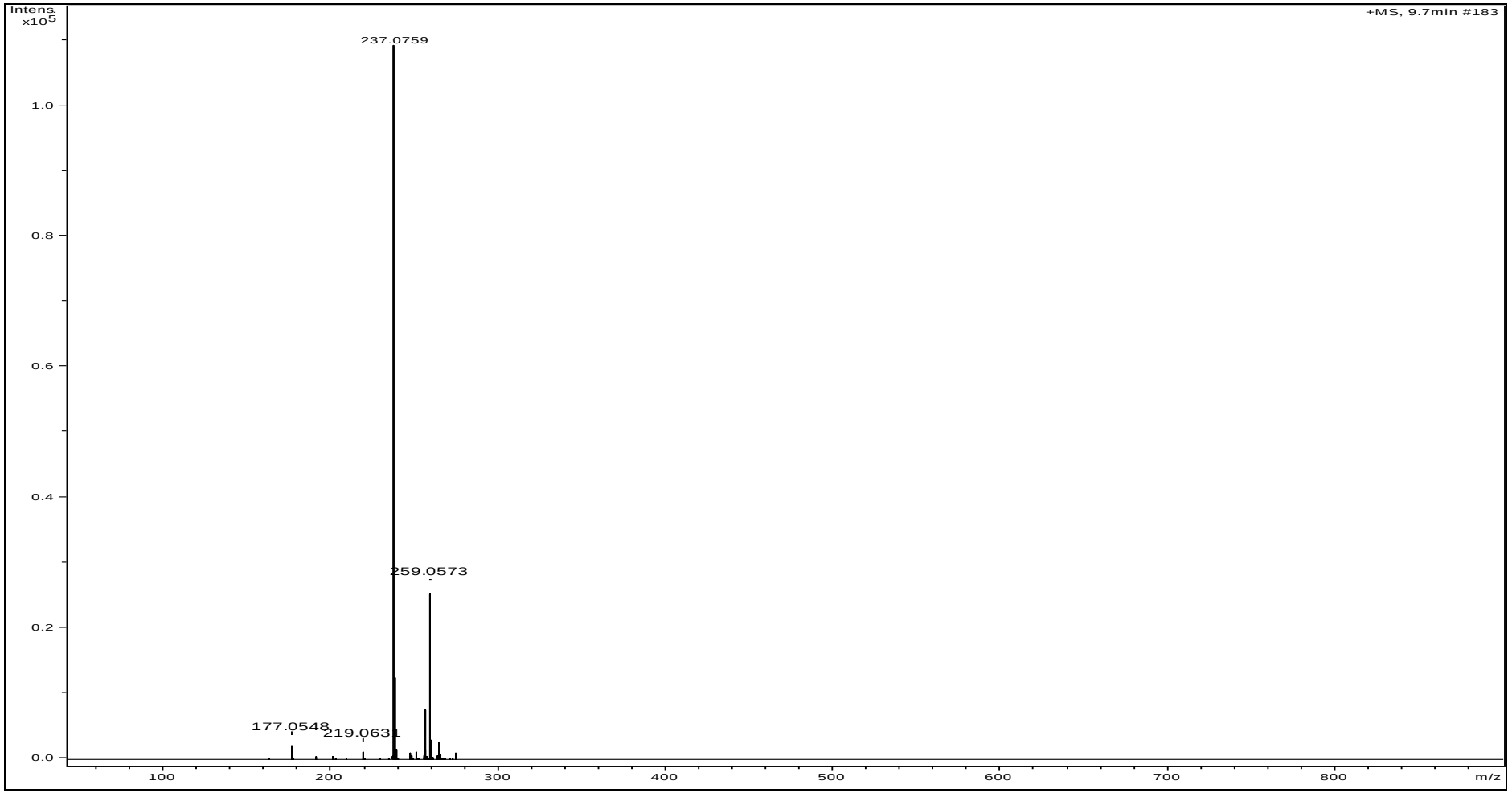


Figura 66. Espectro de massas austidiol.

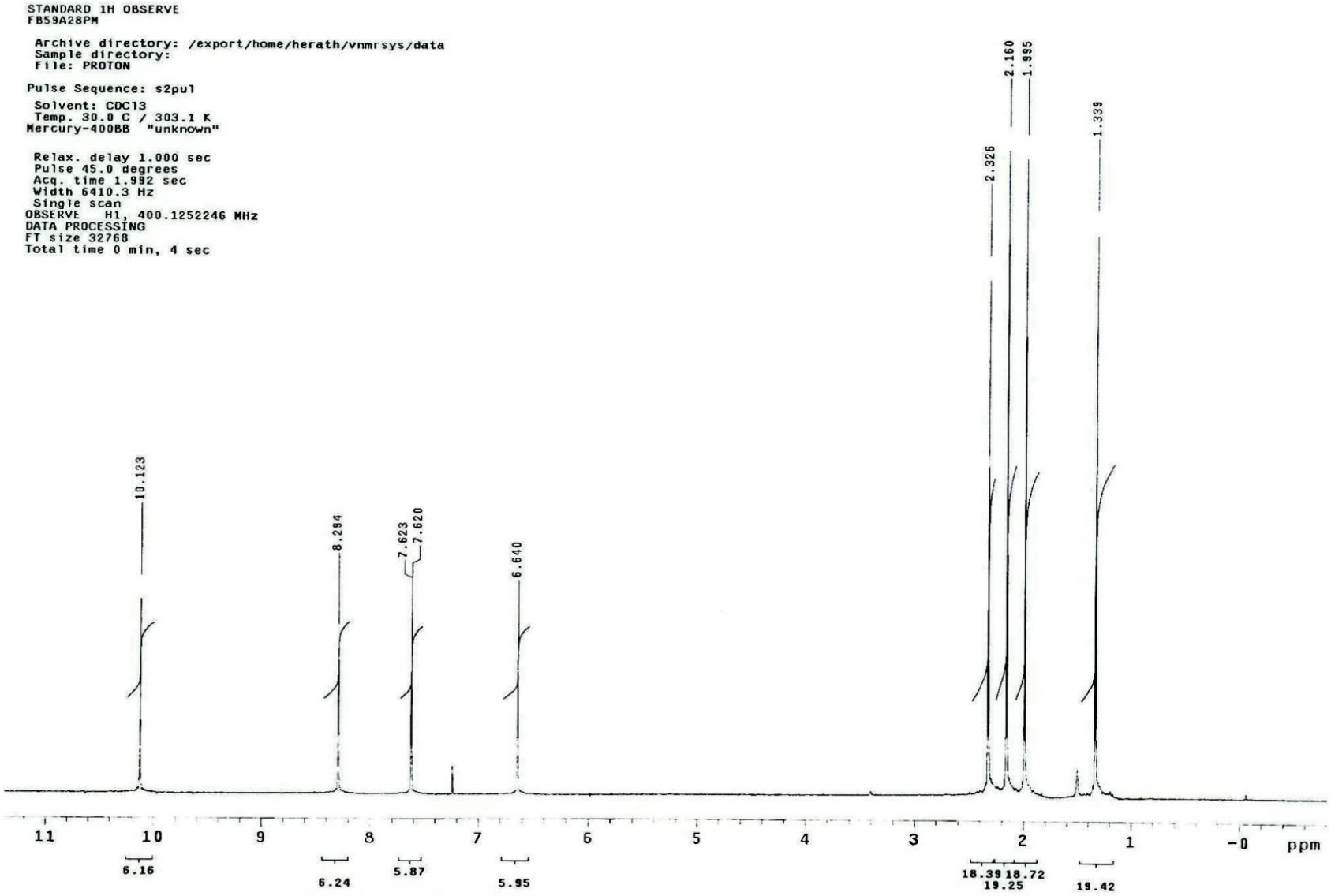


Figura 67. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diacetato ($CDCl_3$ - 400 MHz).

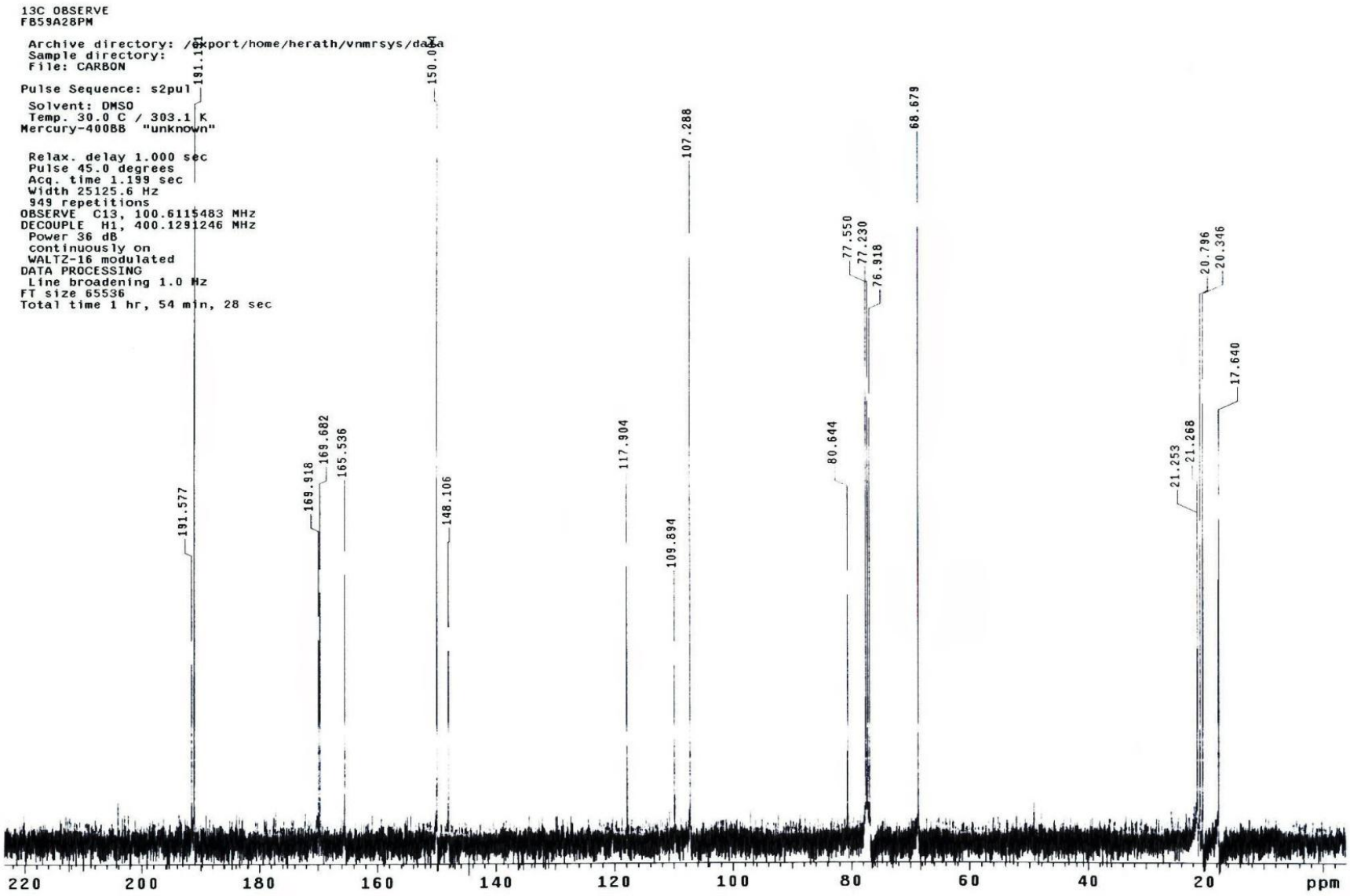


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol diacetato ($CDCl_3$ - 400 MHz).

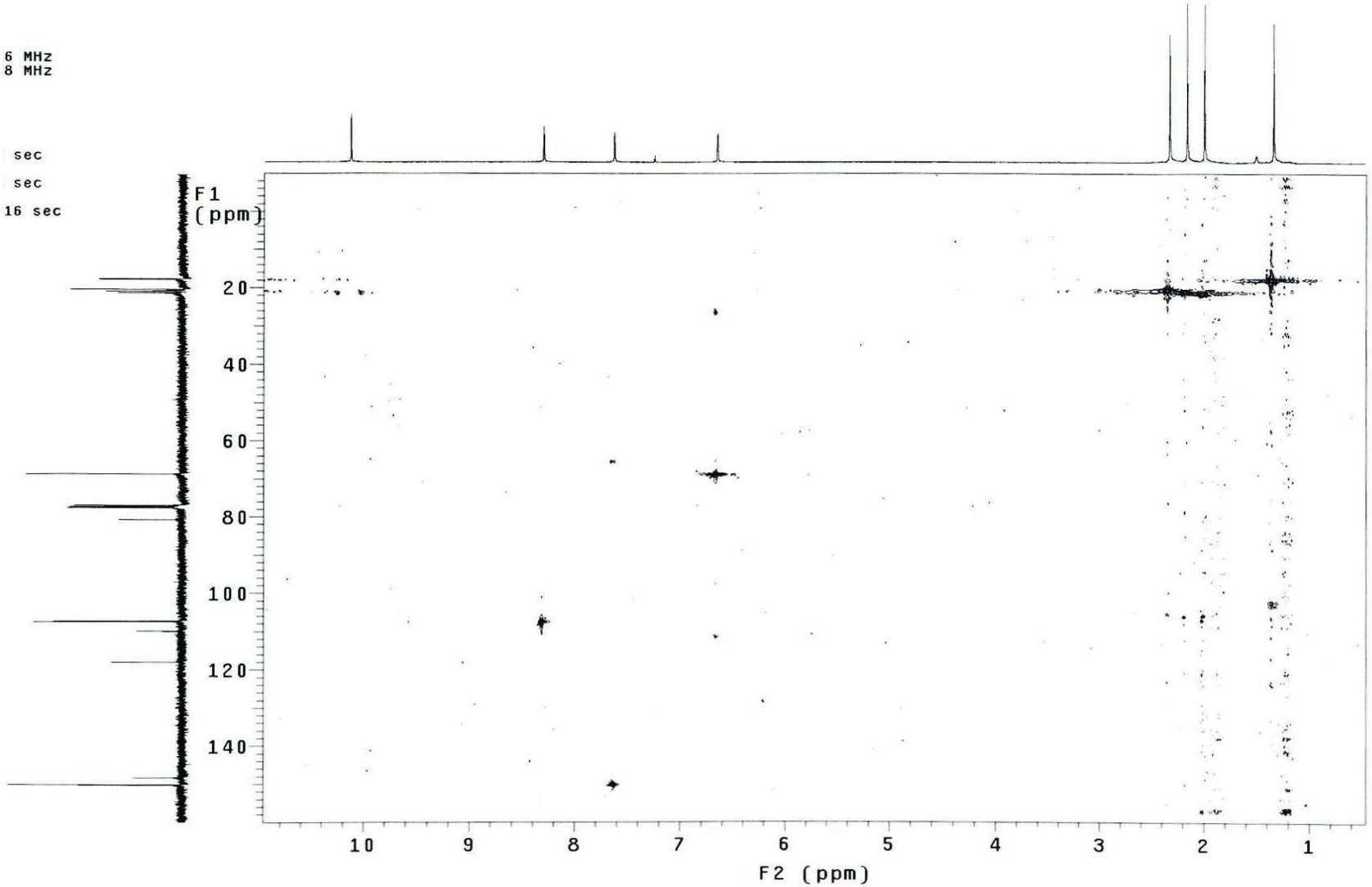


Figura 69. Mapa de contornos HMQC – austidiol diacetato ($CDCl_3$).

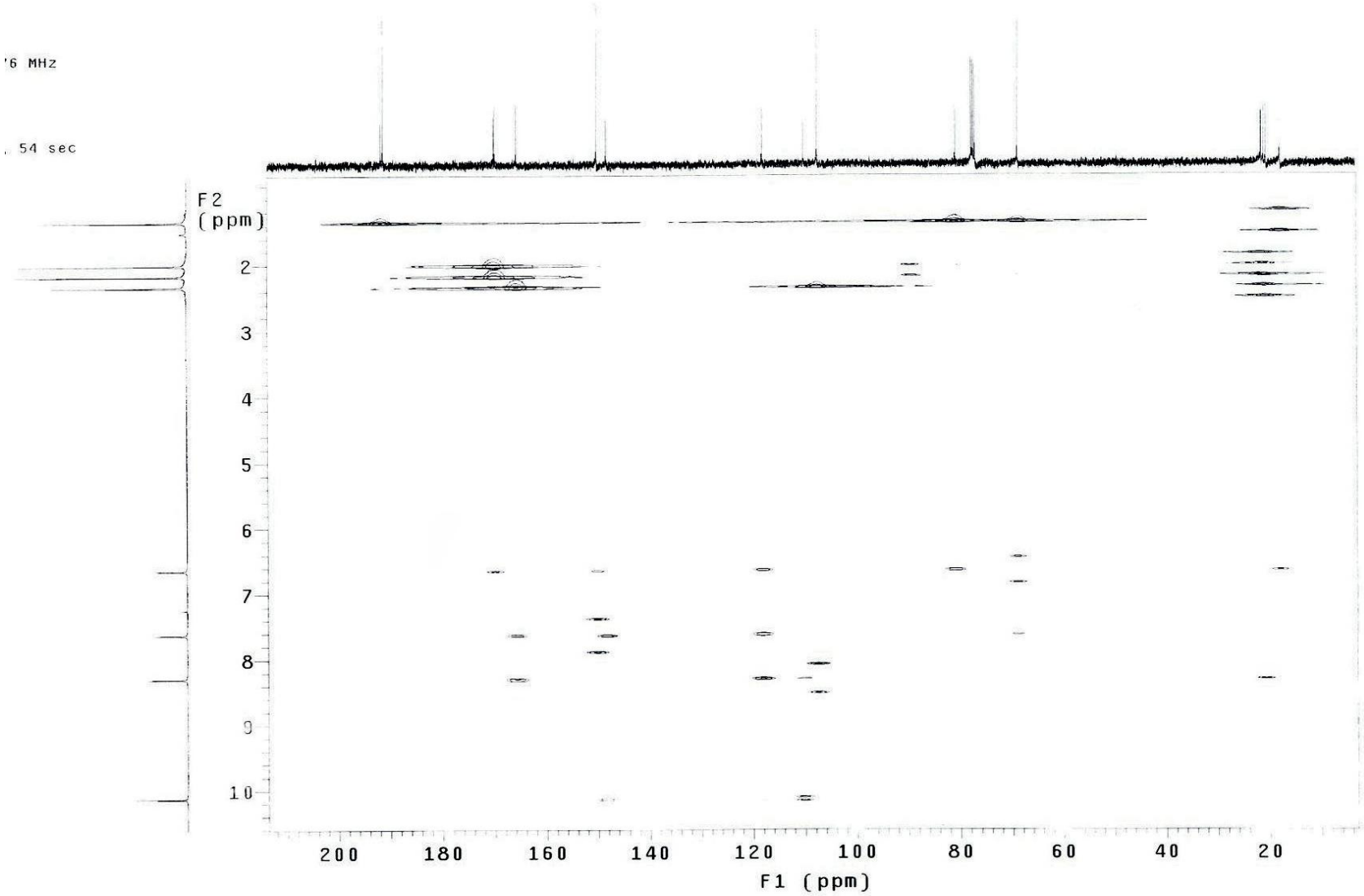


Figura 70. Mapa de contornos HMBC – austidiol diacetato (CD_3Cl_3).

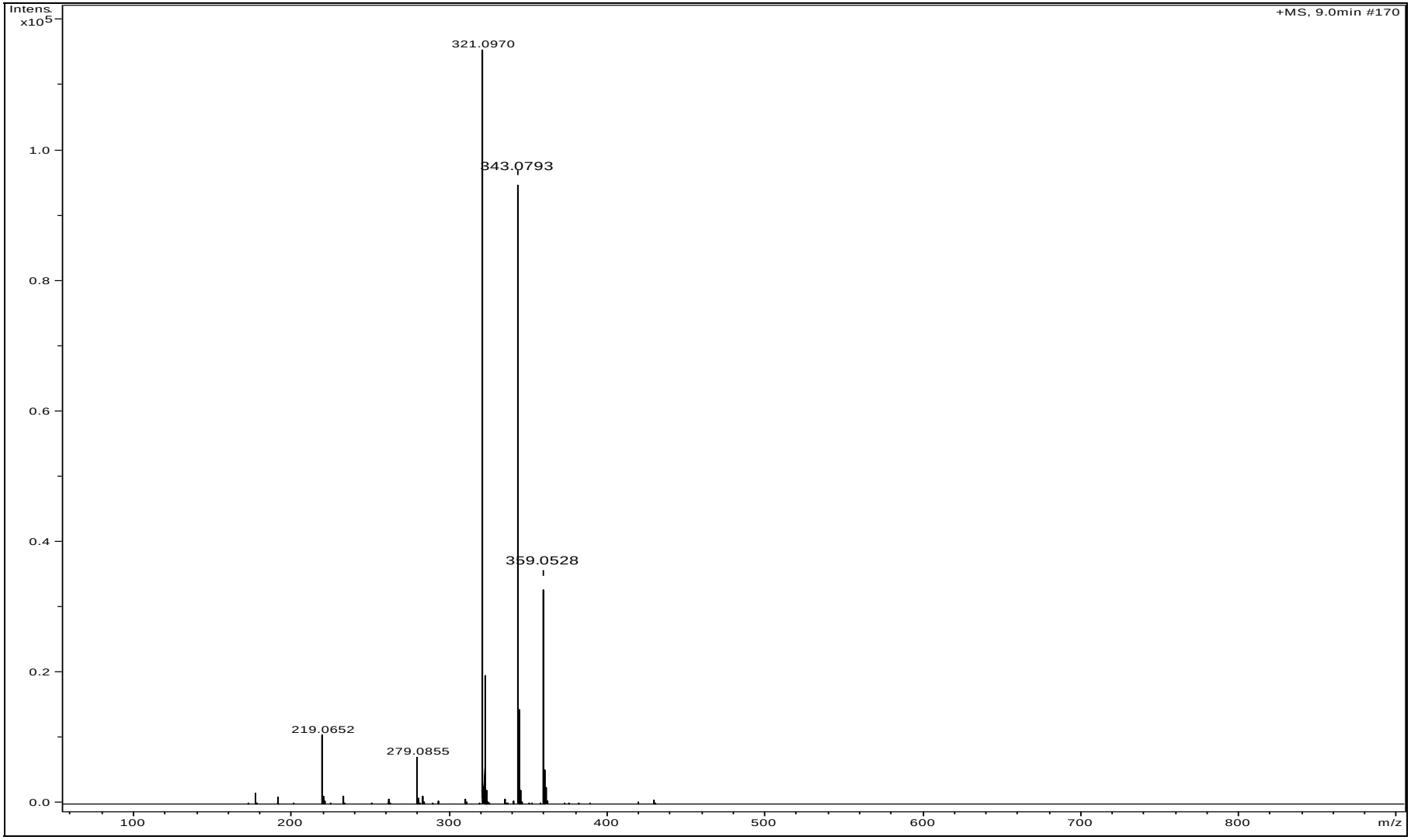


Figura 71. Espectro de masas austidiol diacetato.

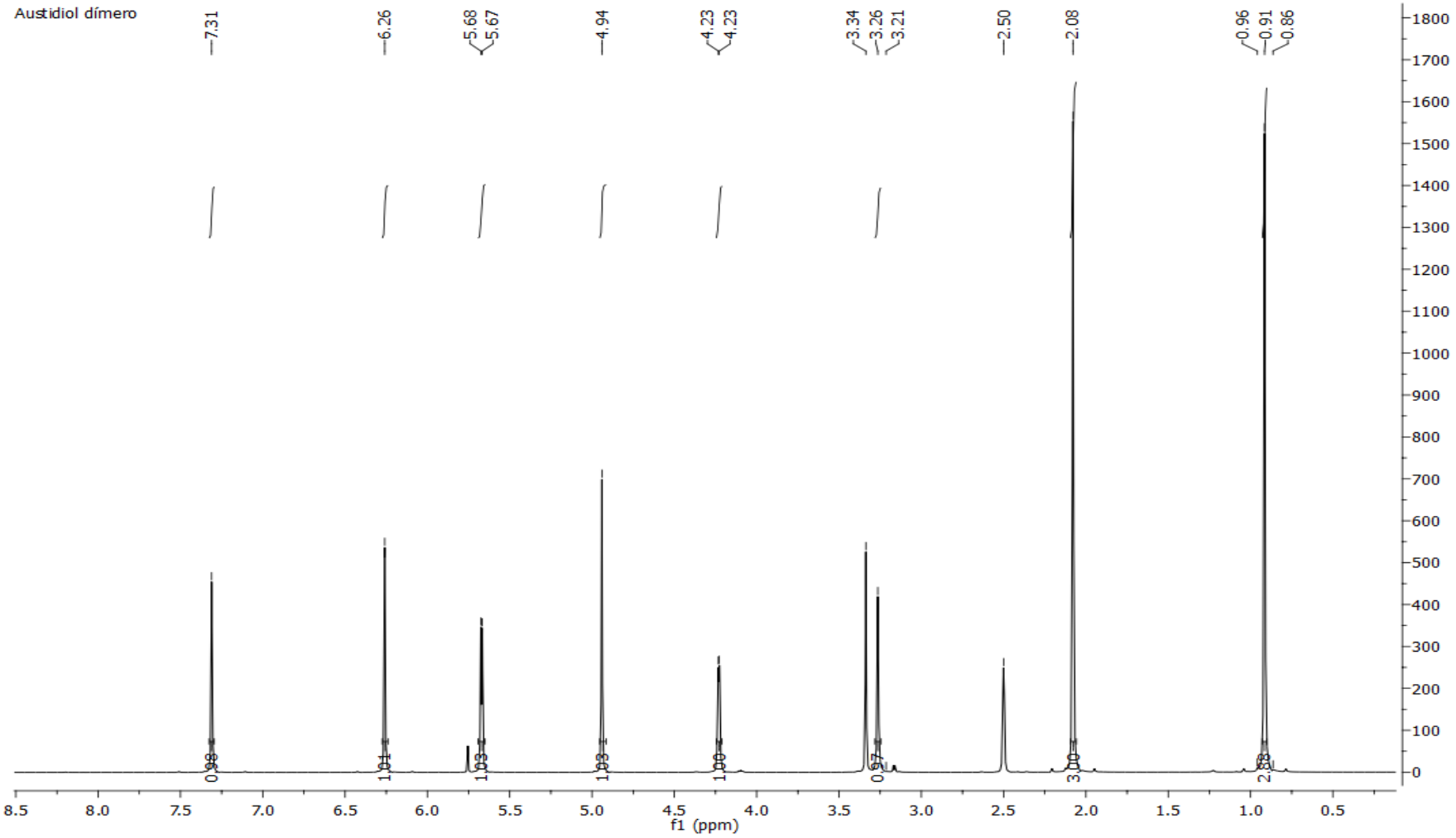


Figura 72. Espectro de RMN ^{1}H – dímero de austidiol (DMSO-d_6, 400 MHz).

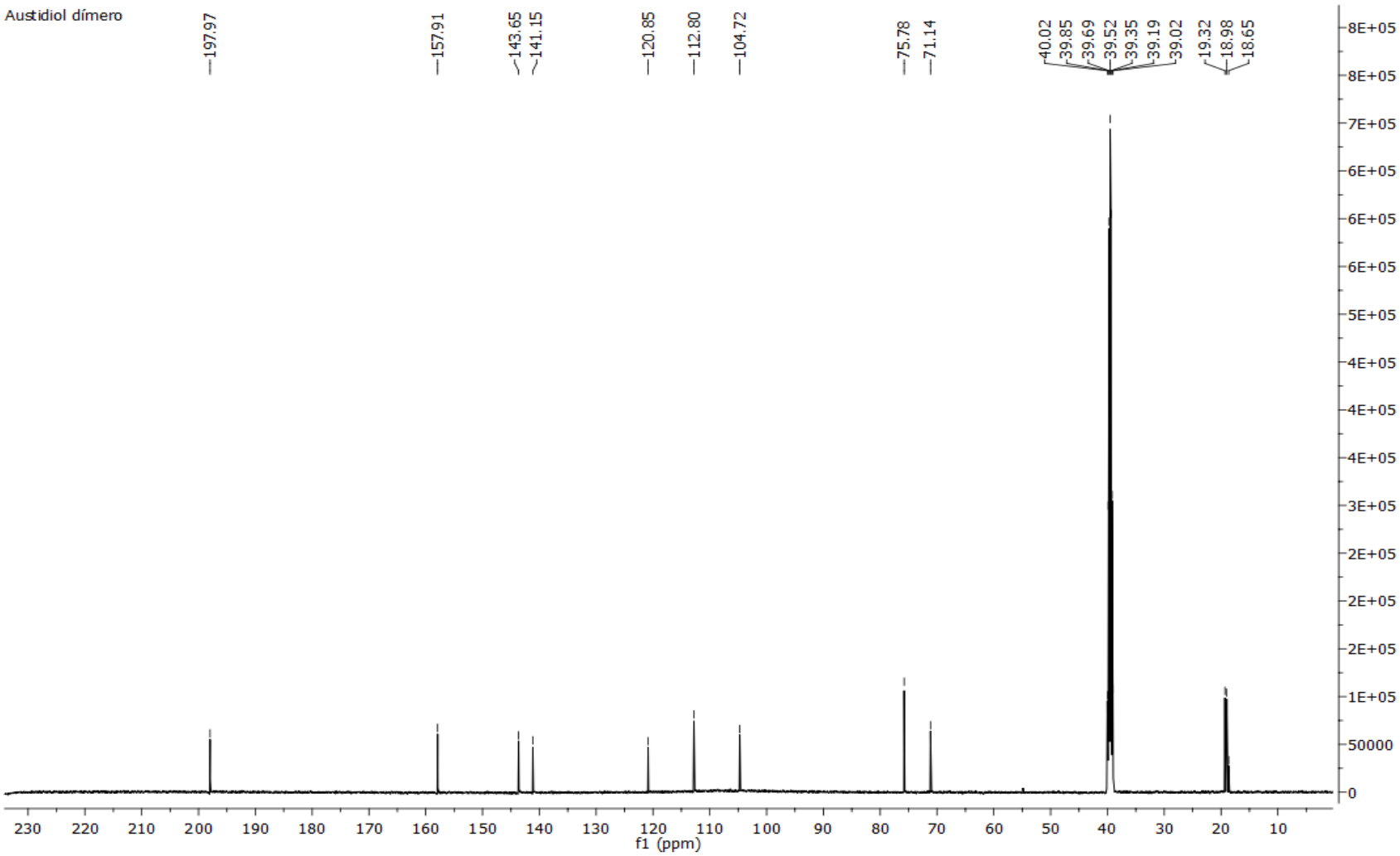


Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C – dímero de austidiol (DMSO-d_6, 100 MHz).

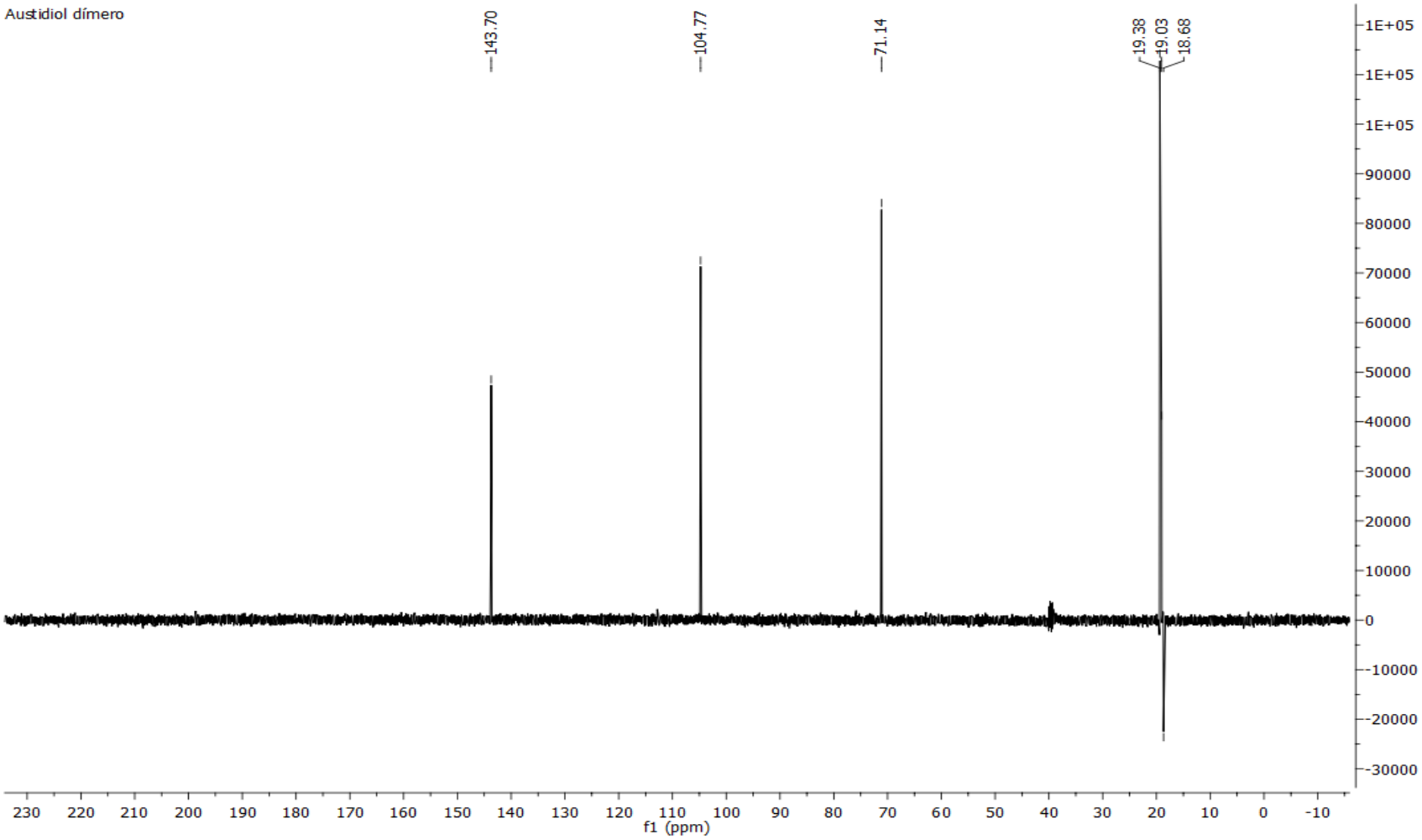


Figura 74. Espectro de RMN DEPT – dímero de austidiol (DMSO-d_6, 100 MHz).

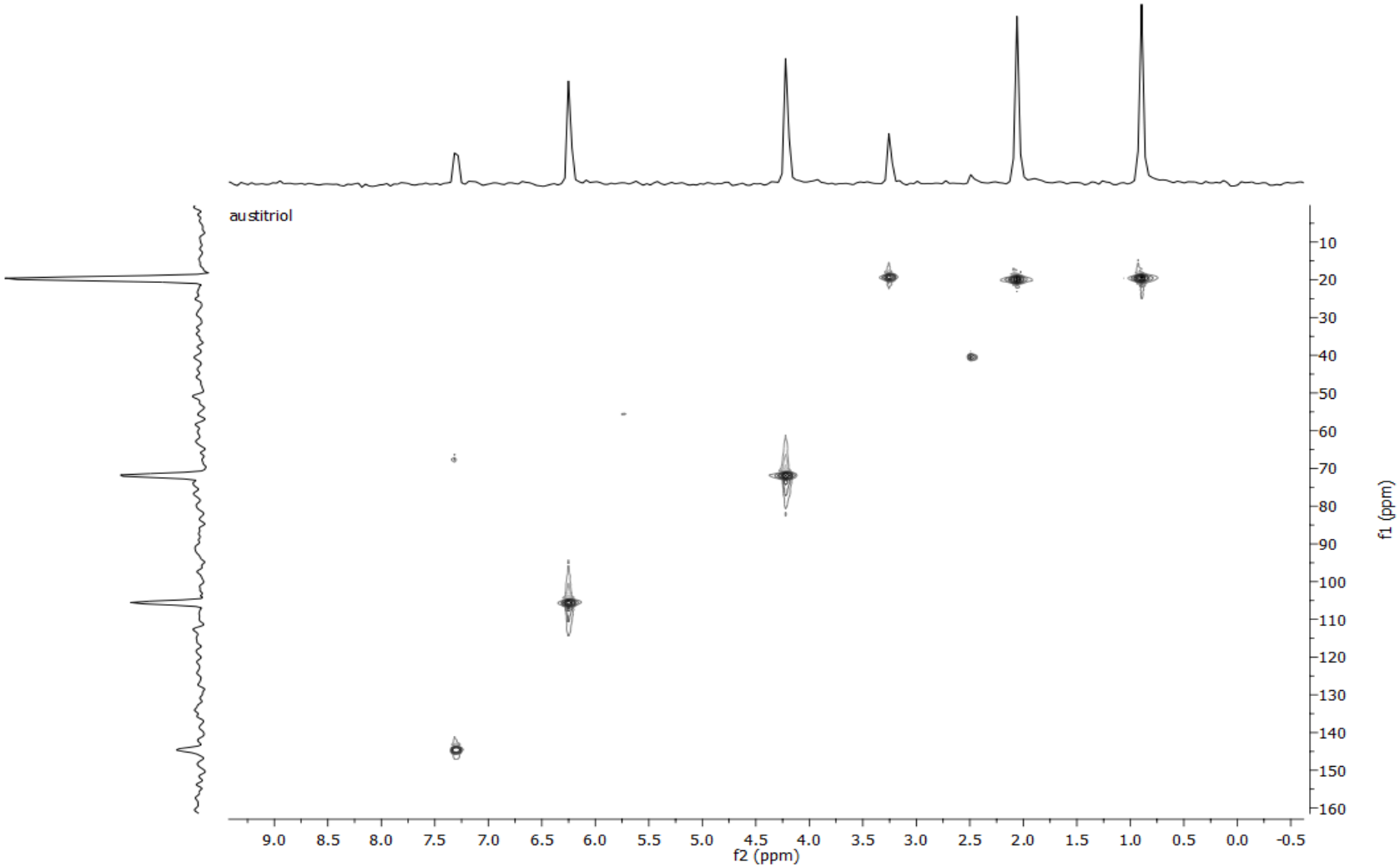


Figura 75. Mapa de contornos HMQC – dímero de austidiol (DMSO-d_6).

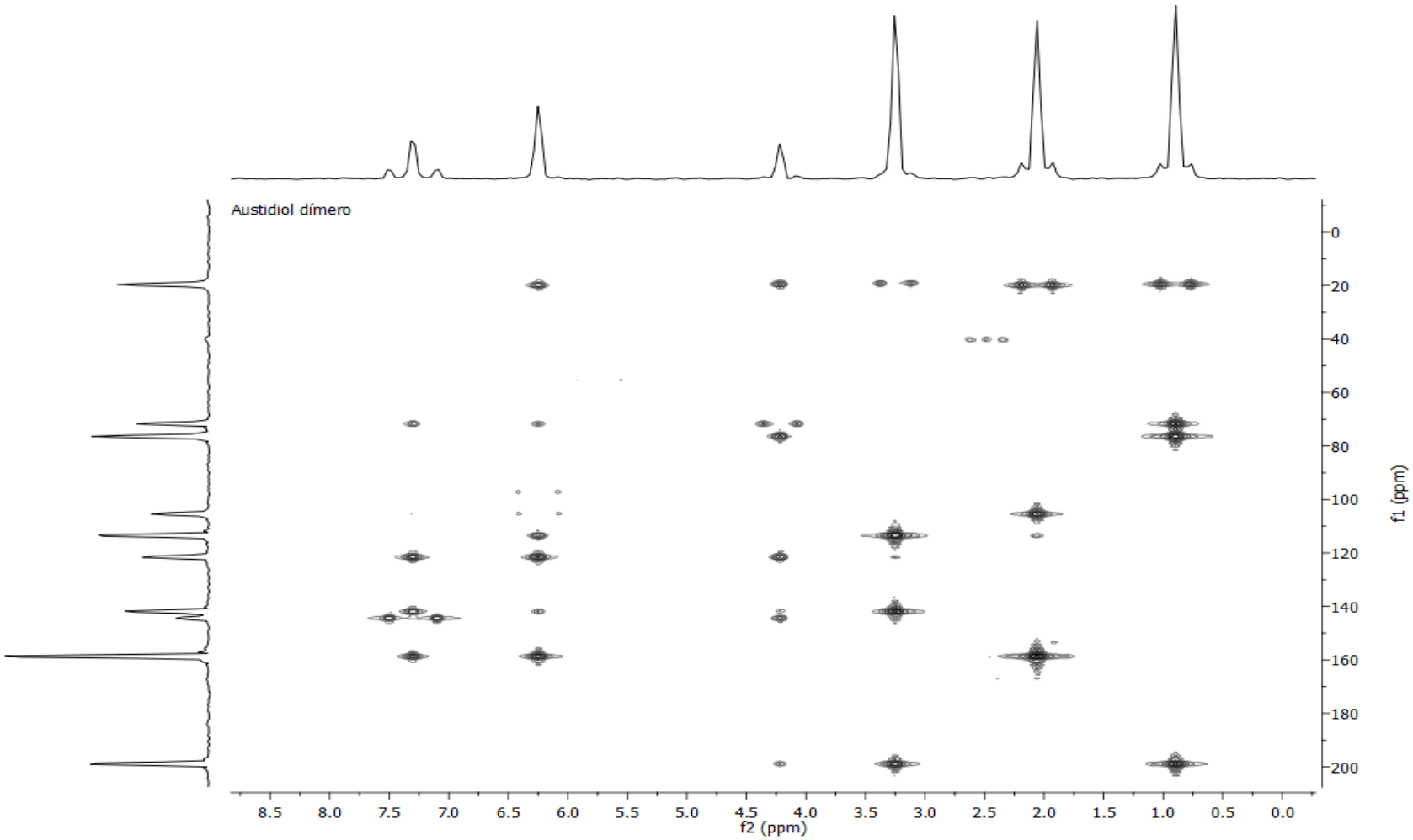


Figura 76. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol (DMSO-d_6).

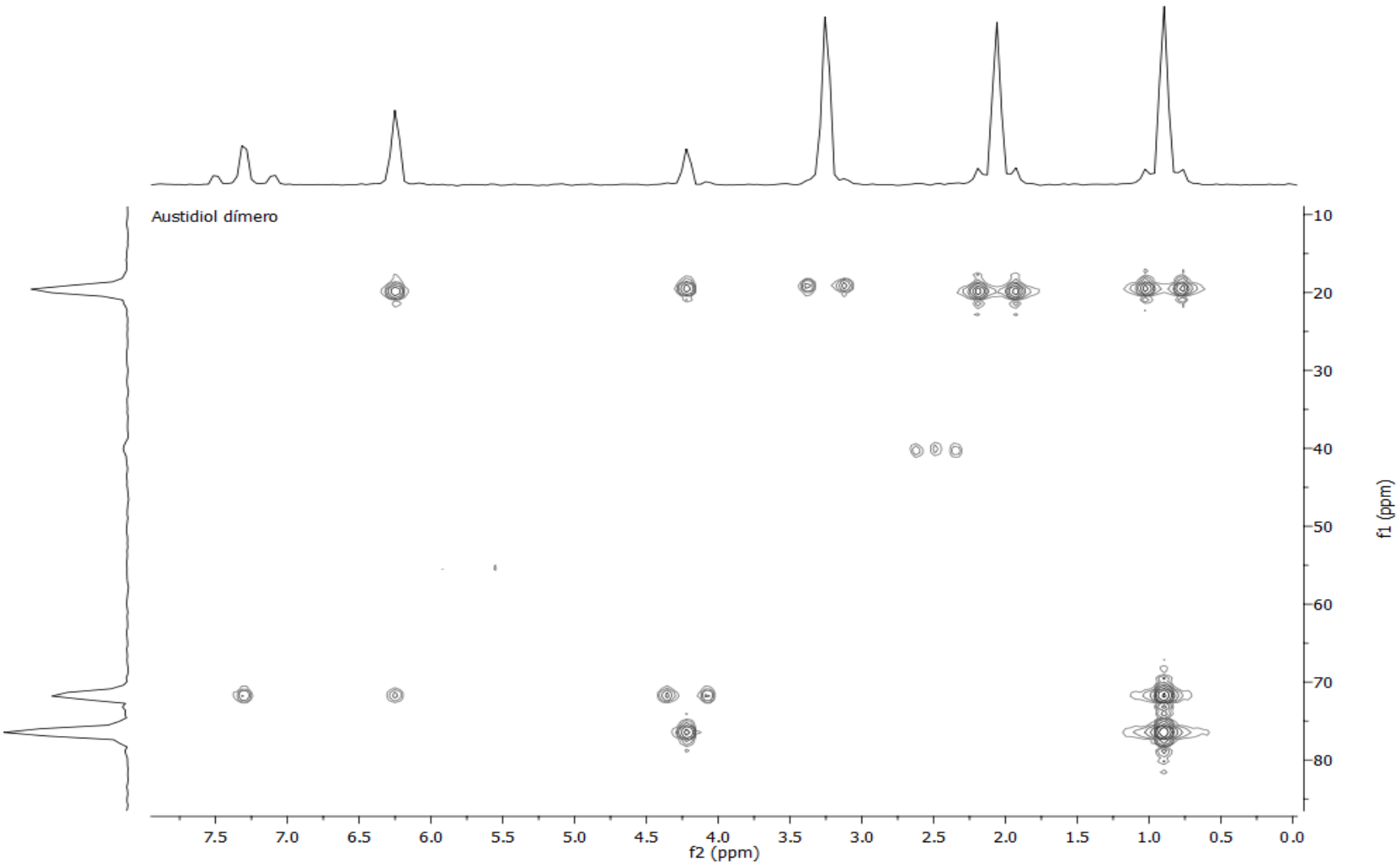


Figura 77. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol (DMSO-d_6).

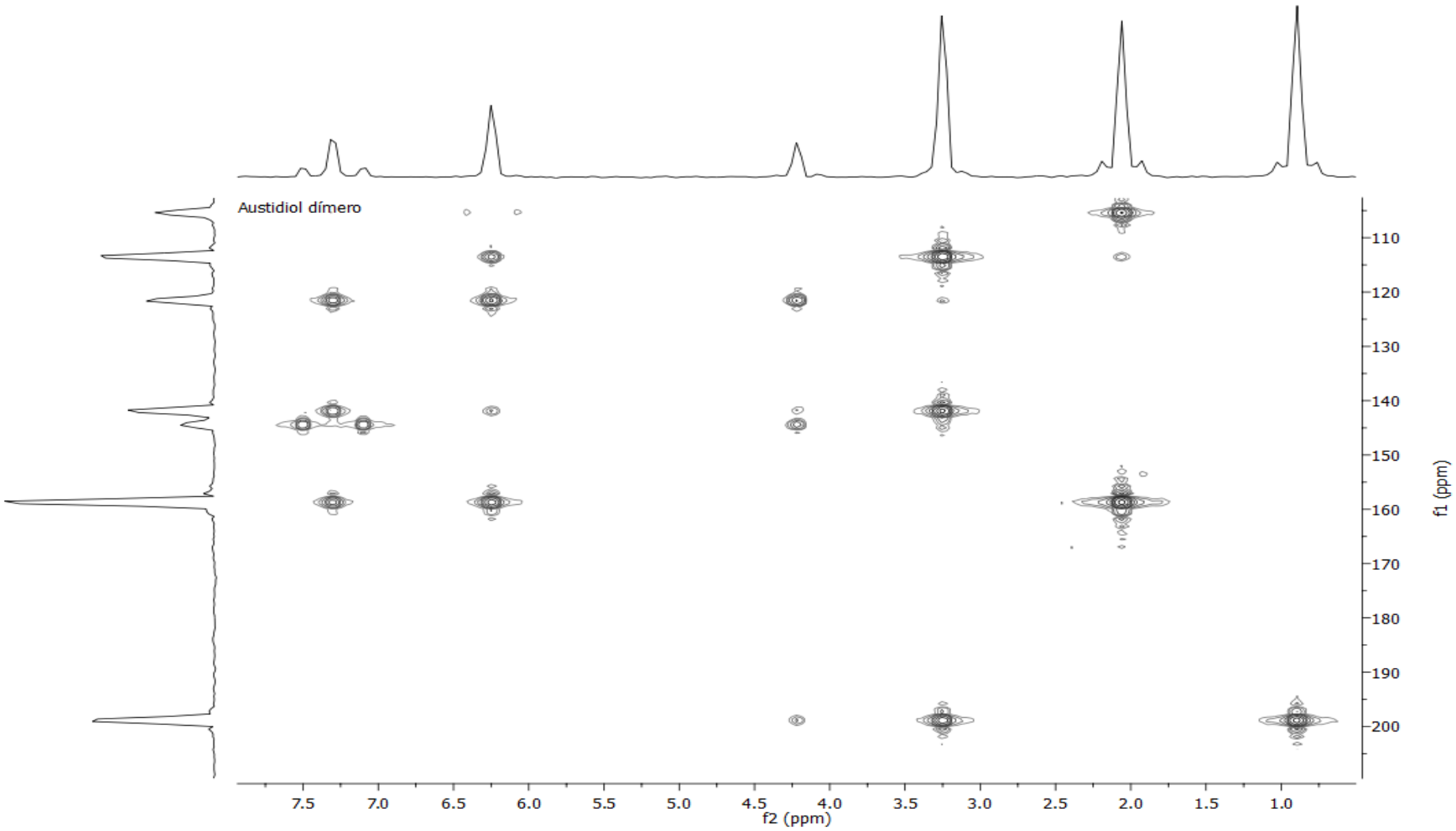


Figura 78. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol (DMSO-d_6).

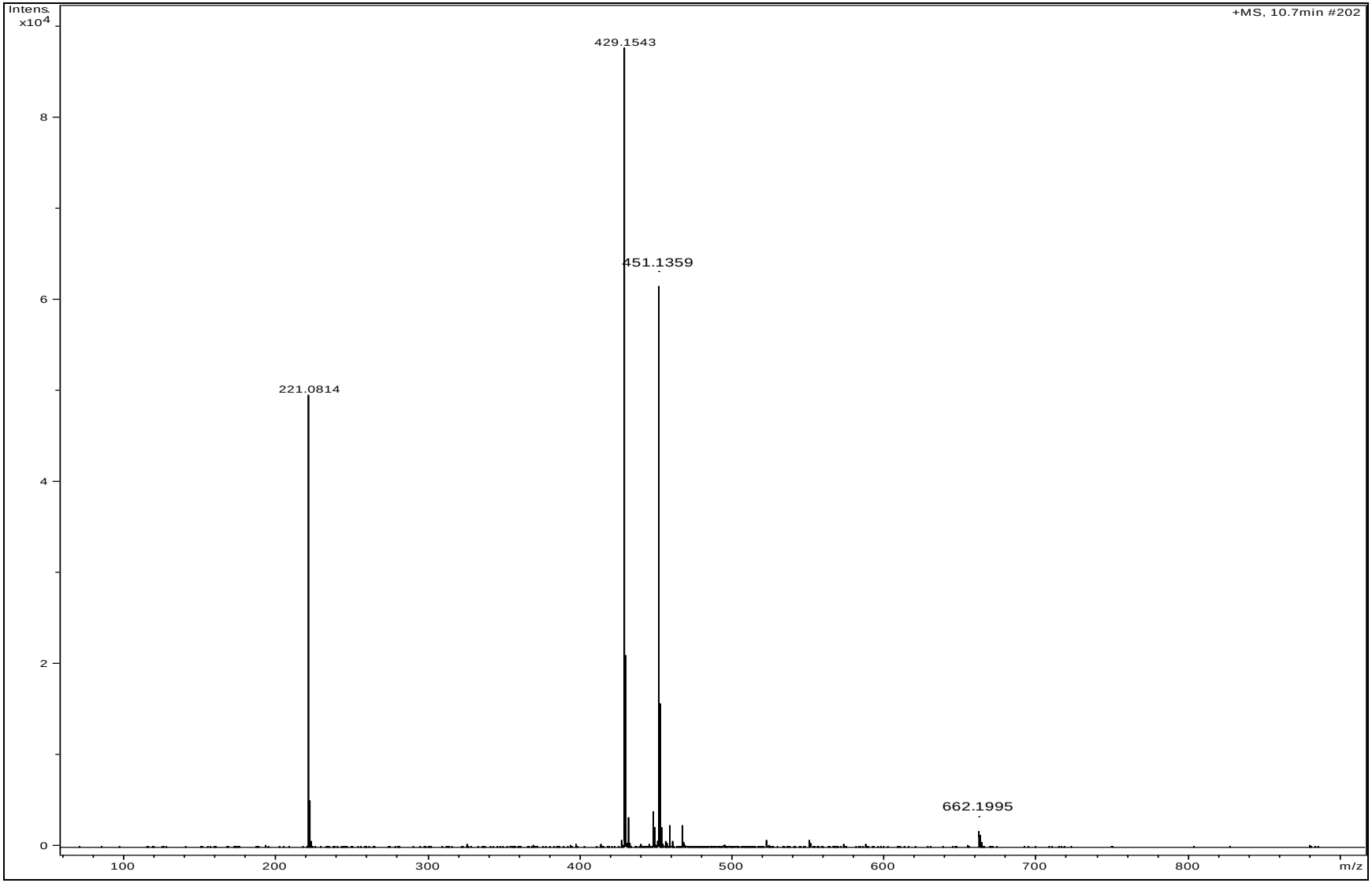


Figura 79. Espectro de massas dímero de austidiol.

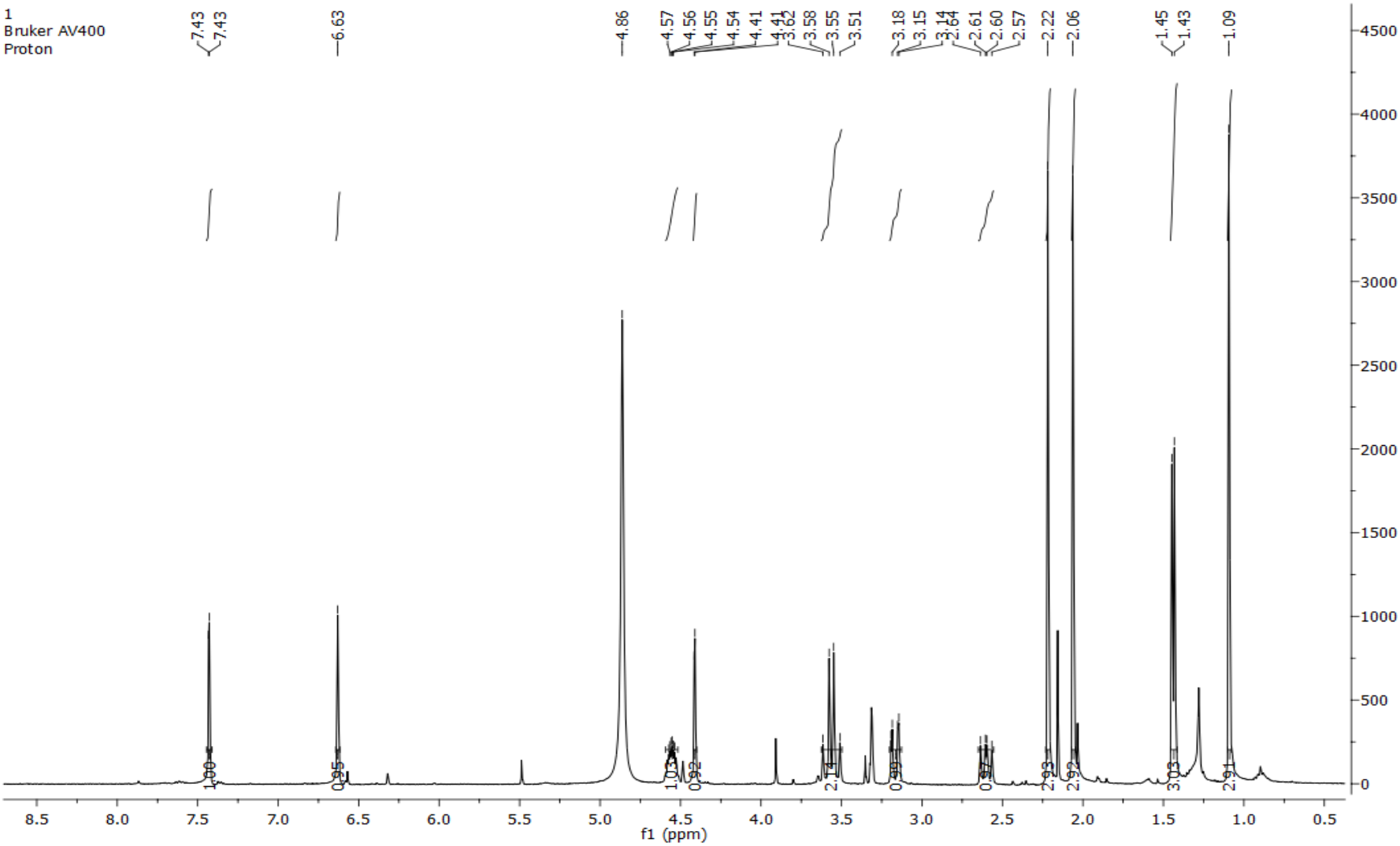


Figura 80. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).

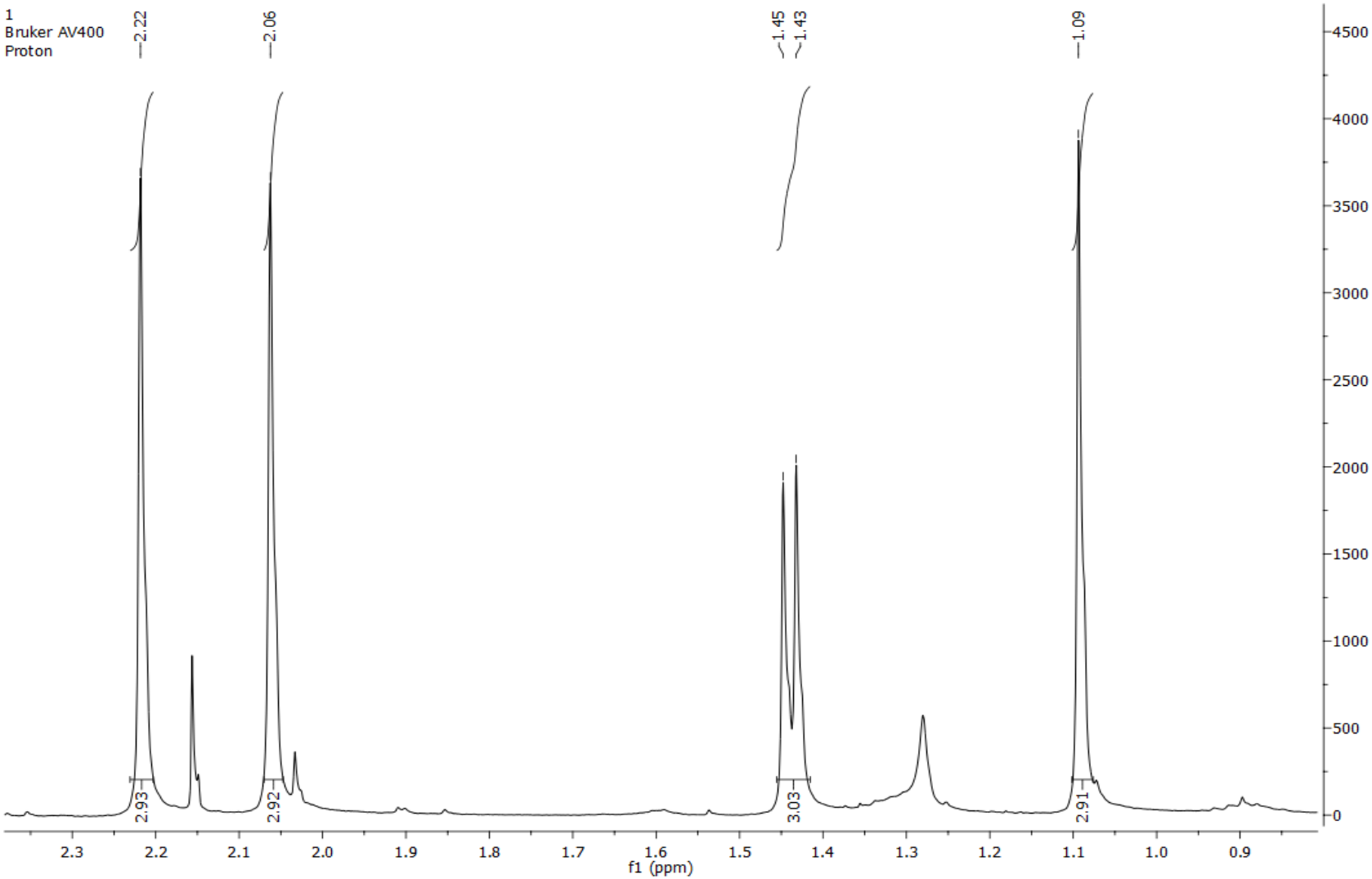


Figura 81. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).

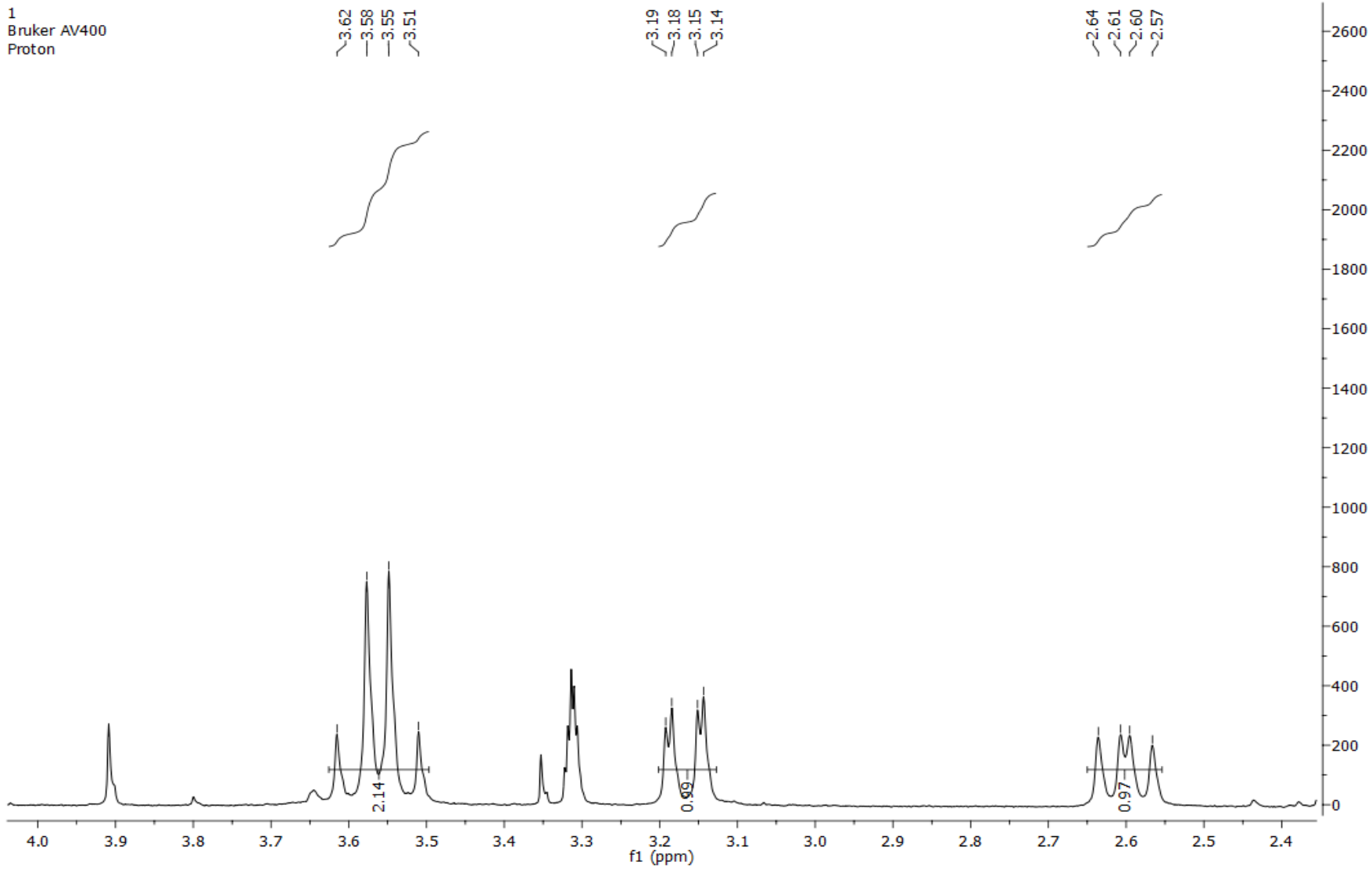


Figura 82. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).

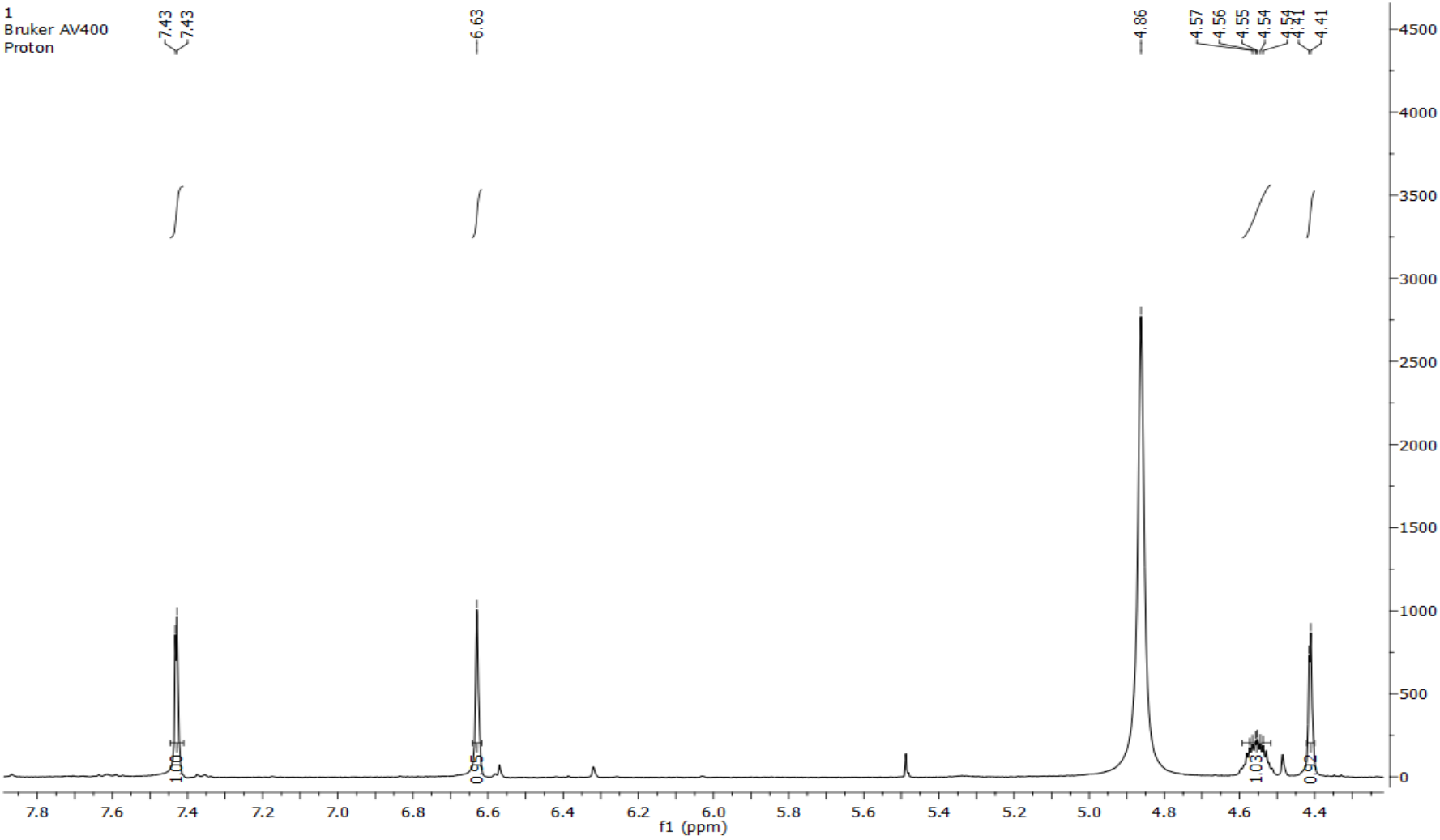


Figura 83. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).

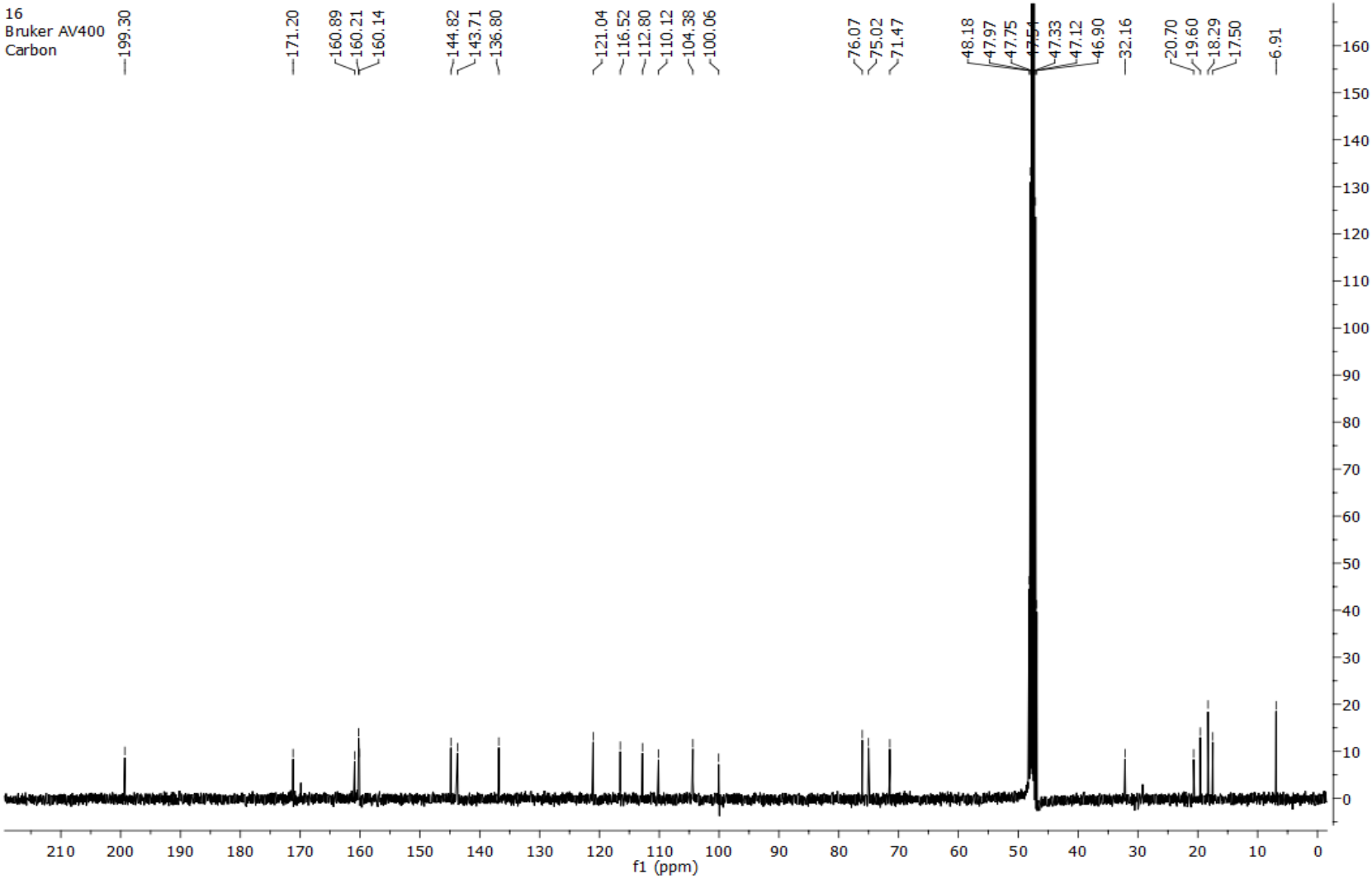


Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 100 MHz).

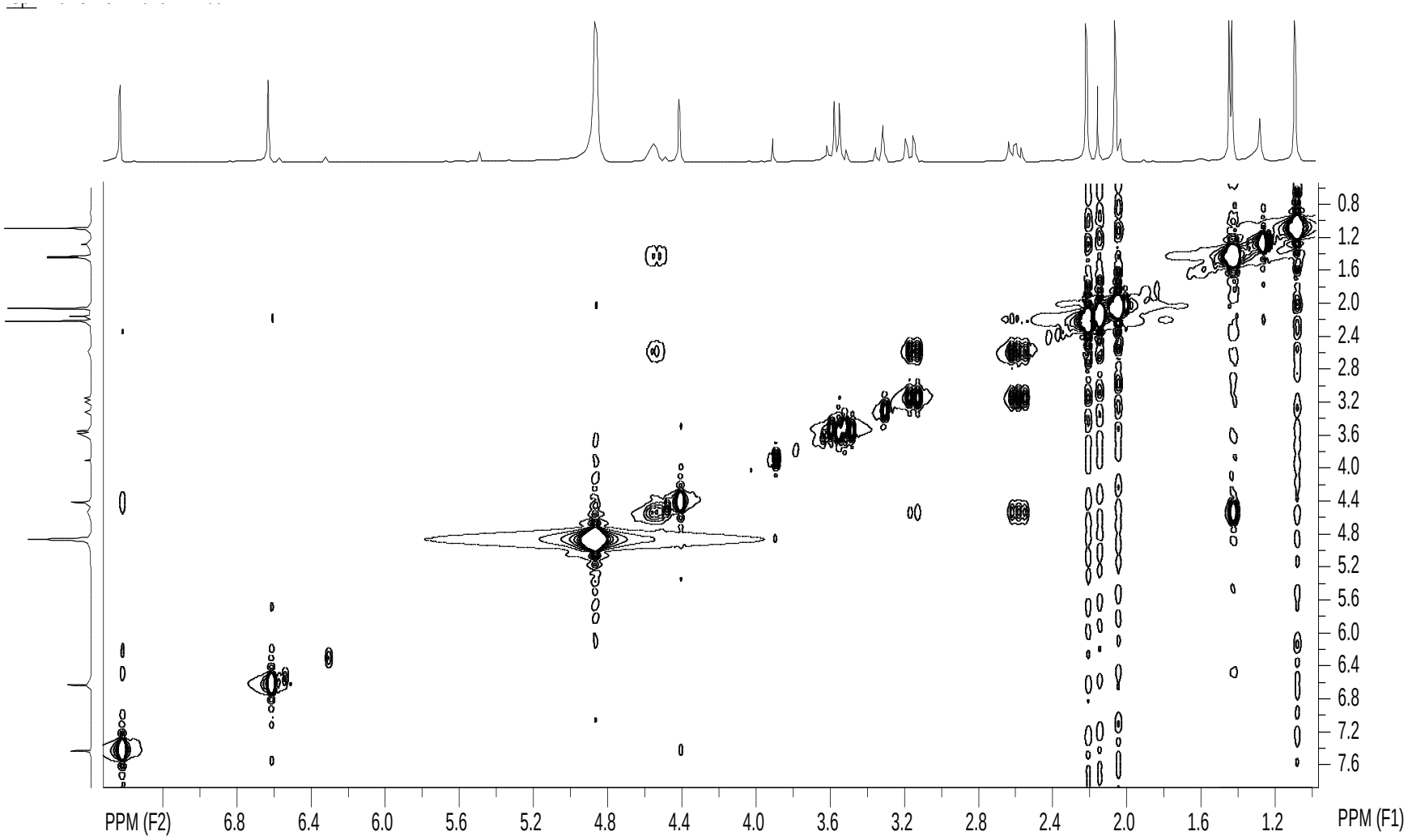


Figura 85. Mapa de contornos COSY – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD, 400 MHz).

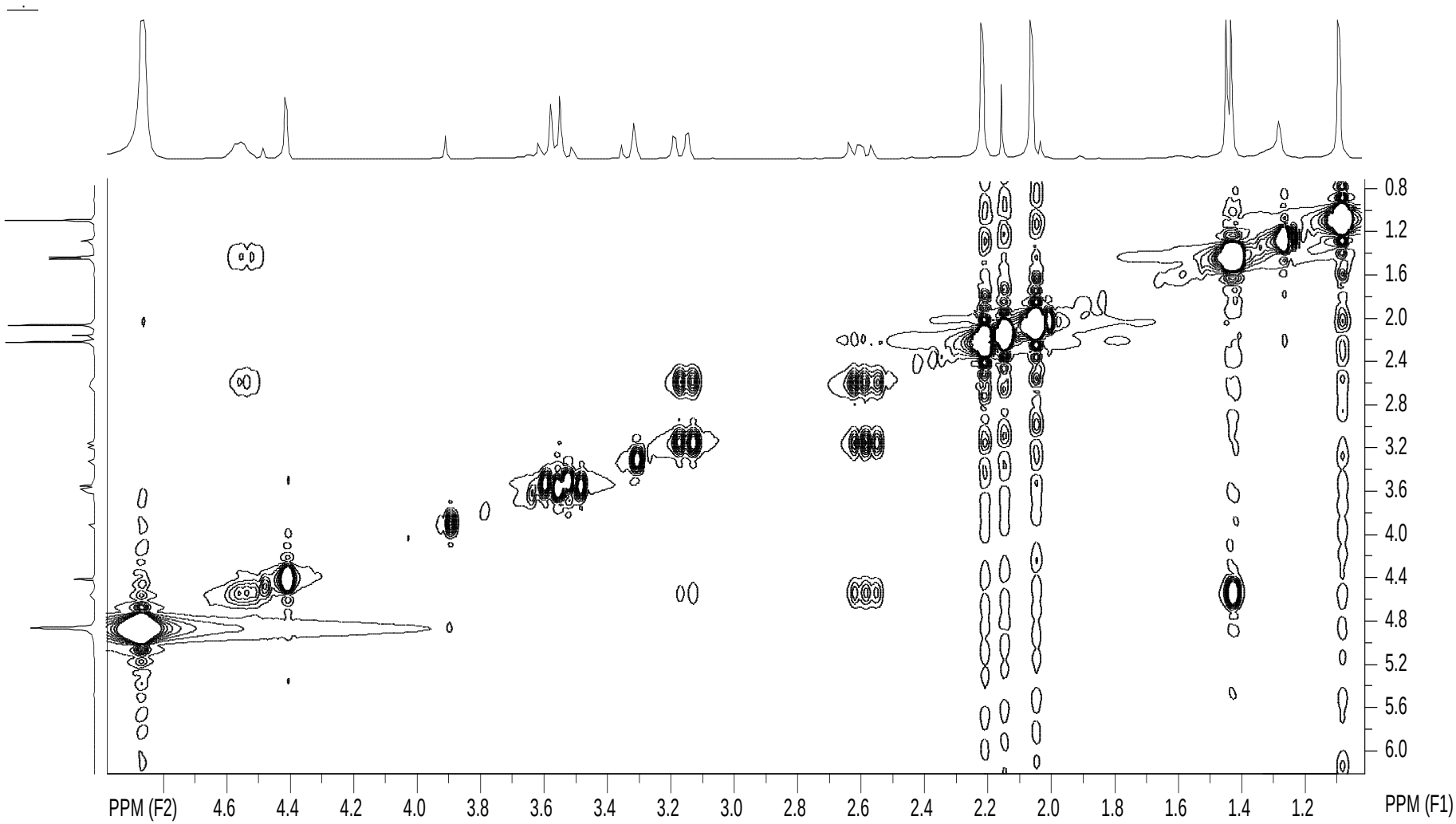


Figura 86. Mapa de contornos COSY – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD, 400 MHz).

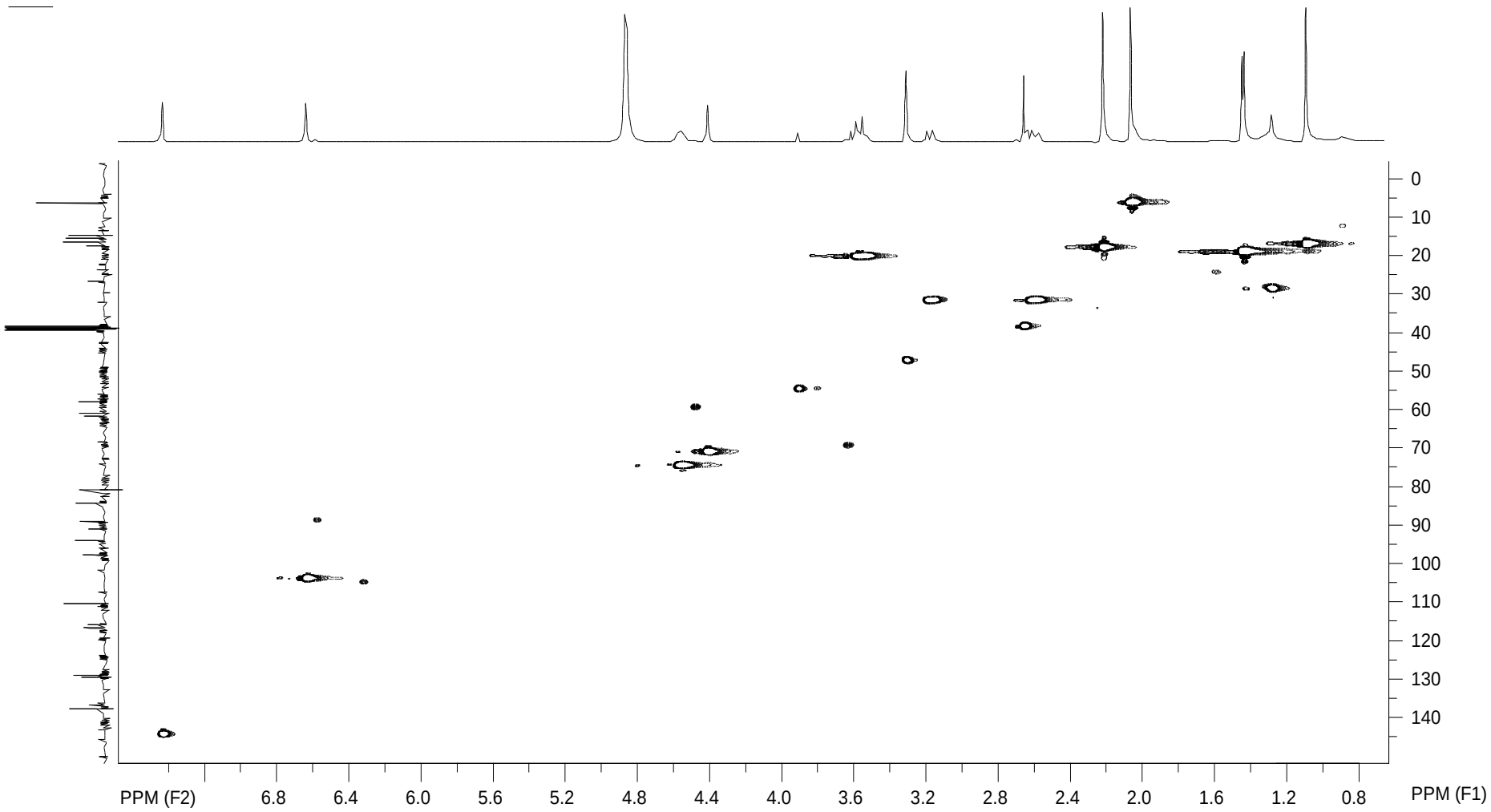


Figura 87. Mapa de contornos HMQC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).

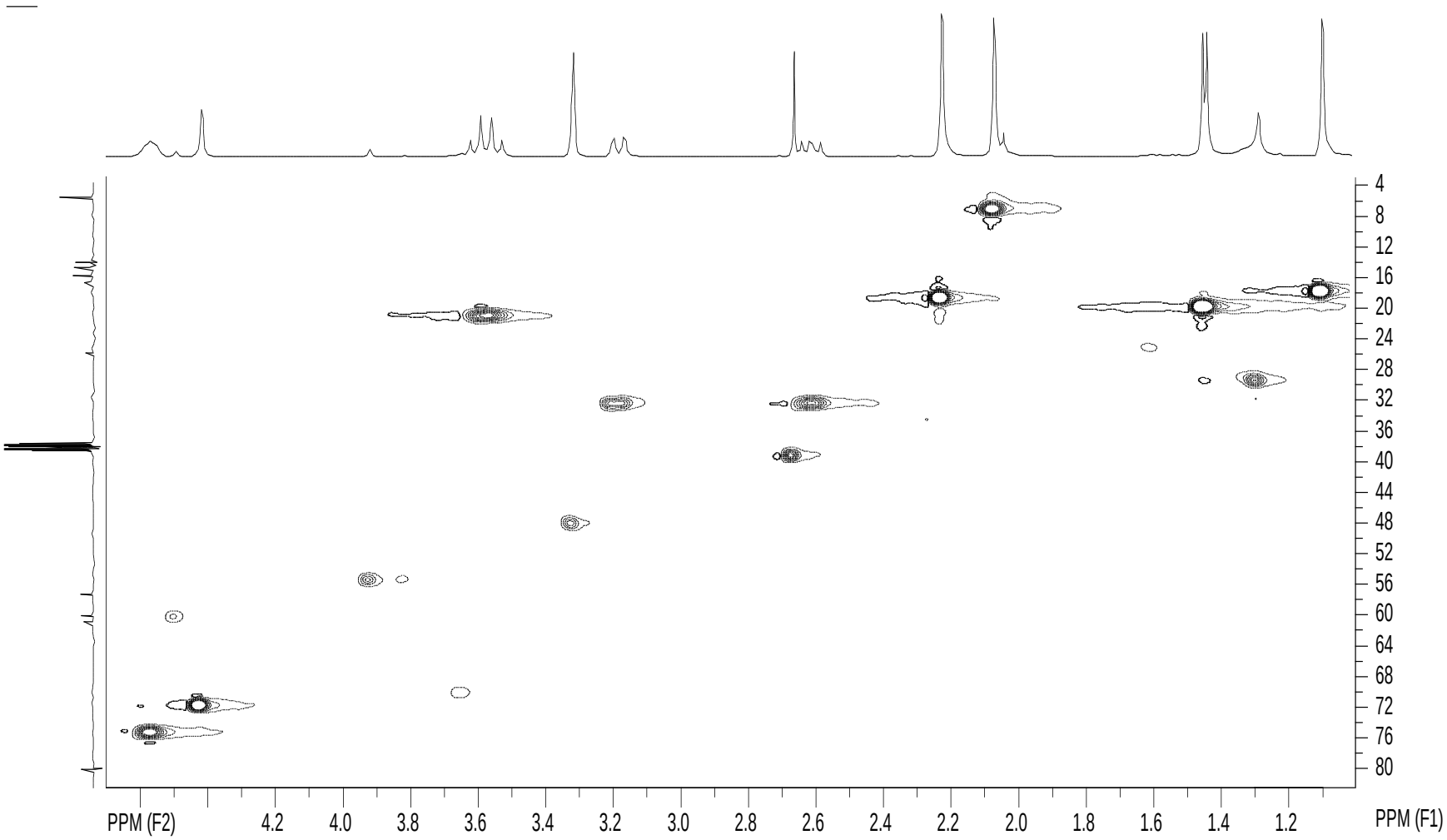


Figura 88. Mapa de contornos HMQC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).

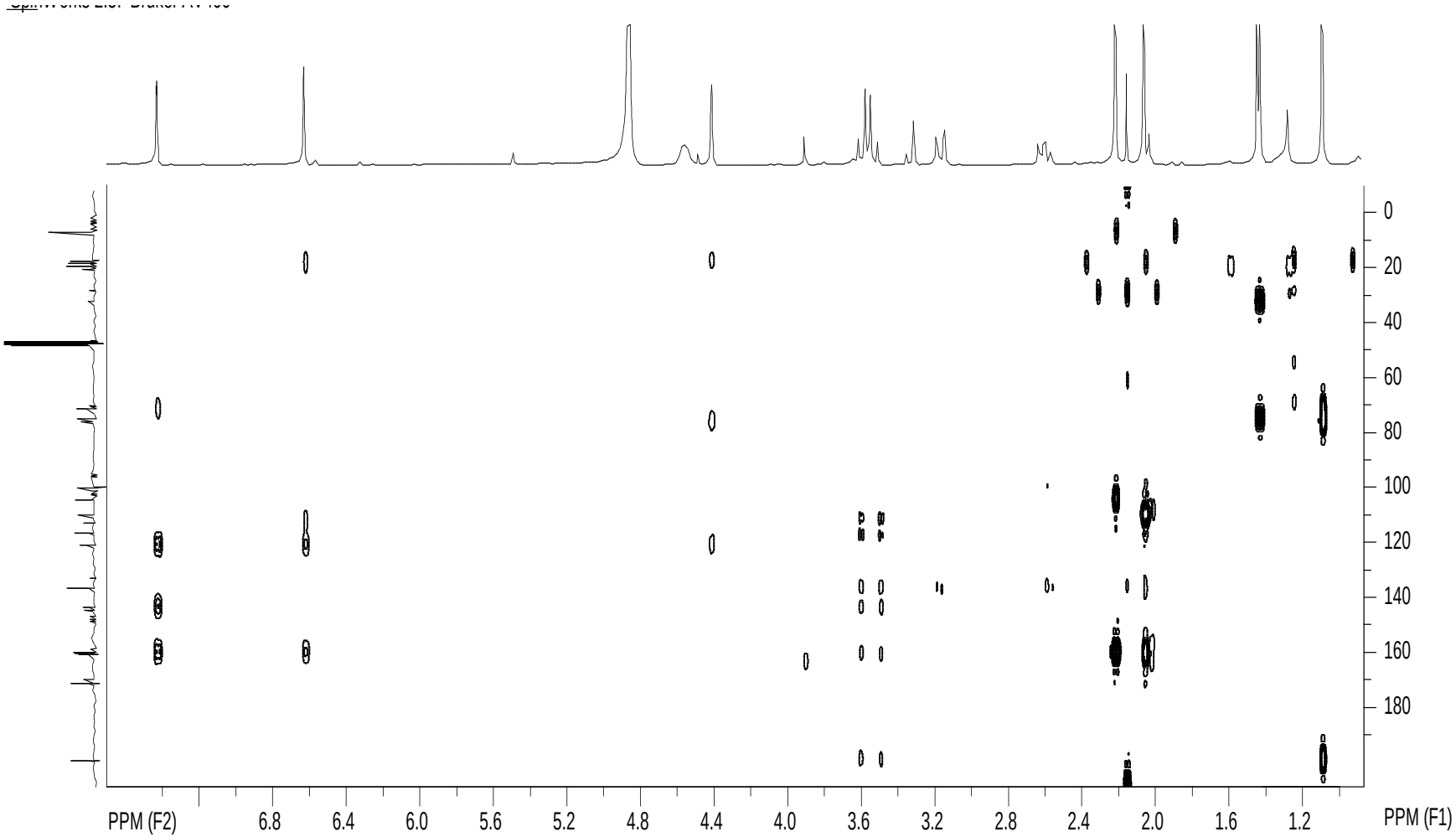


Figura 89. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).

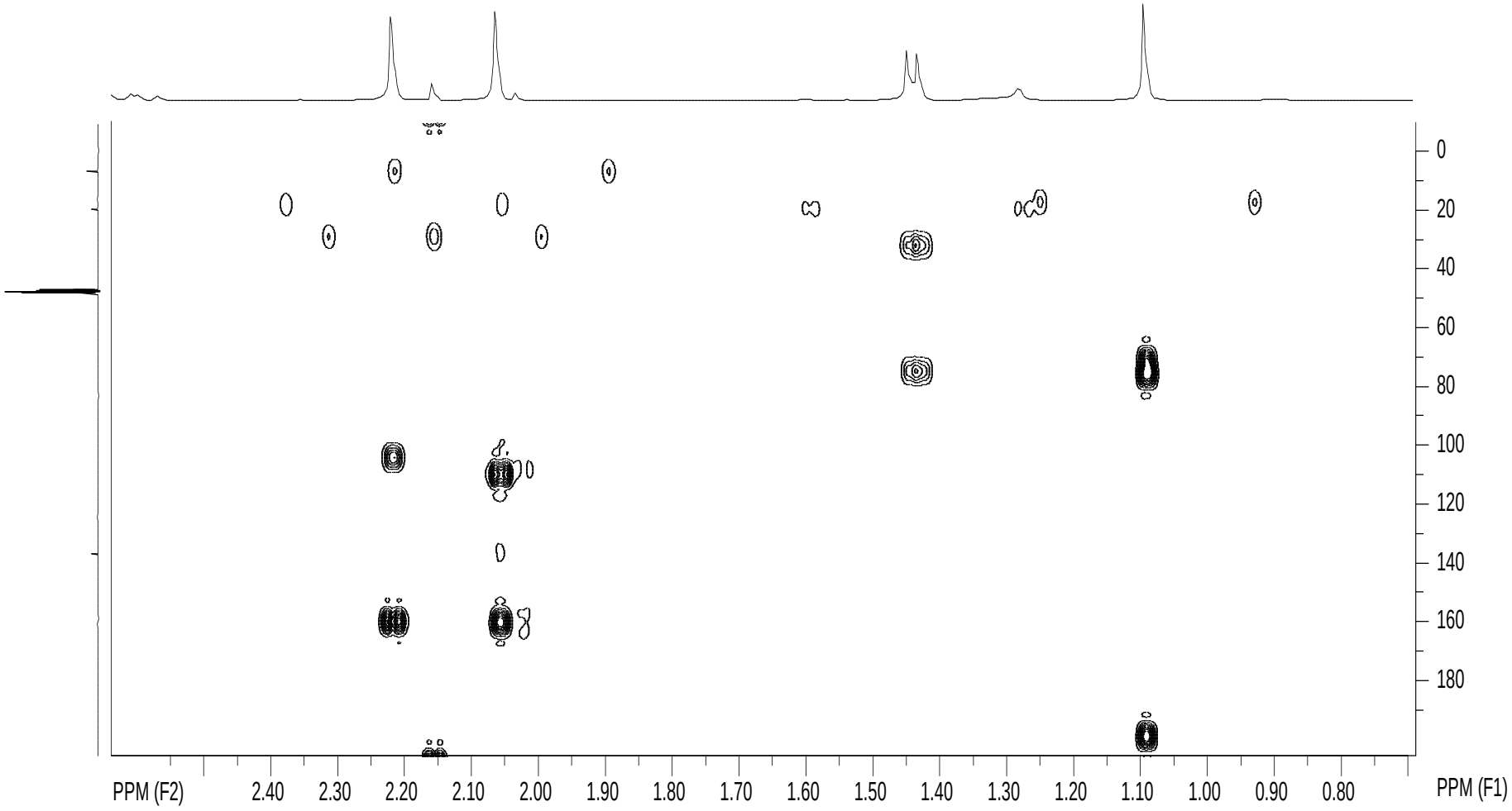


Figura 90. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).

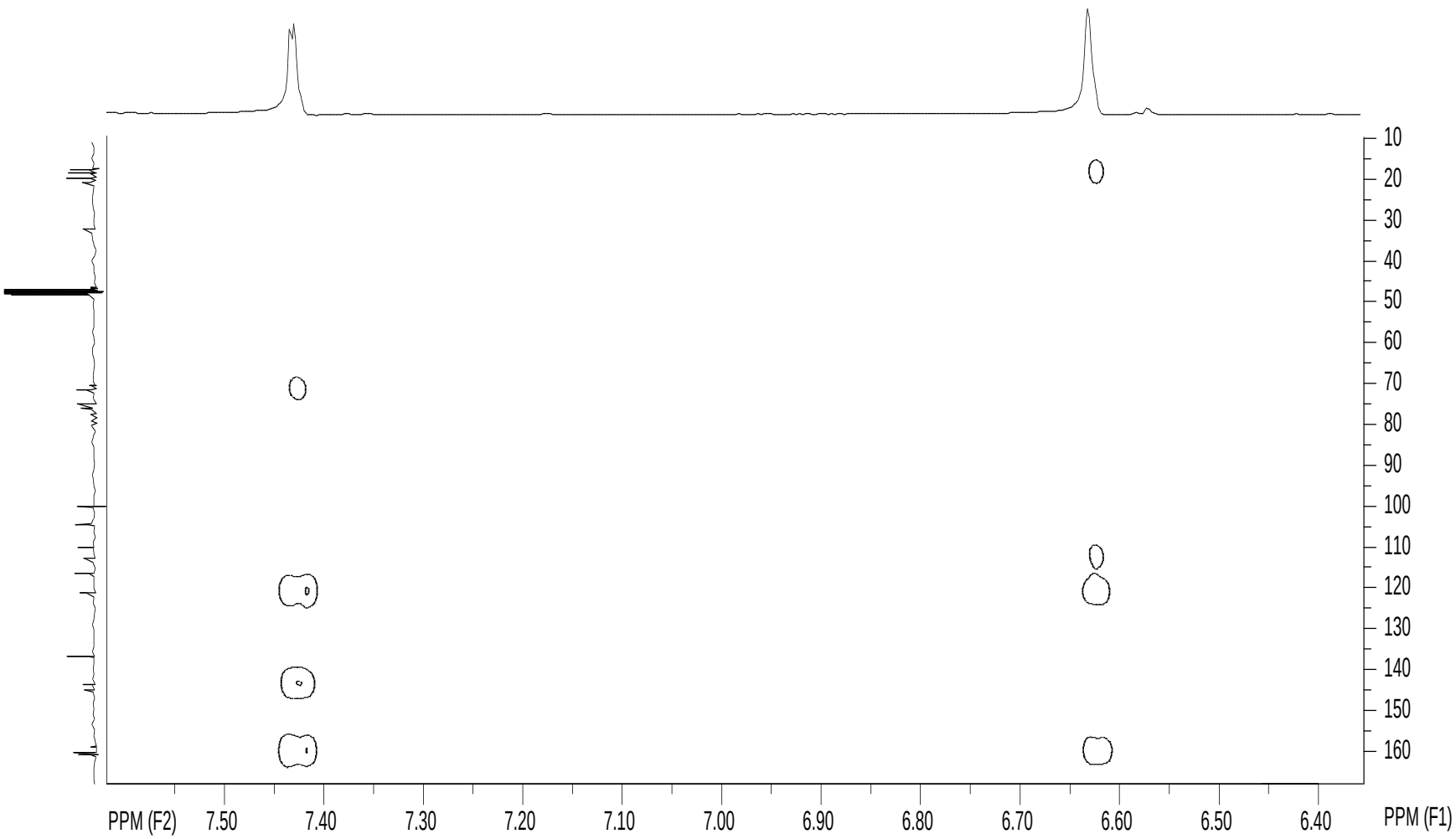


Figura 91. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).

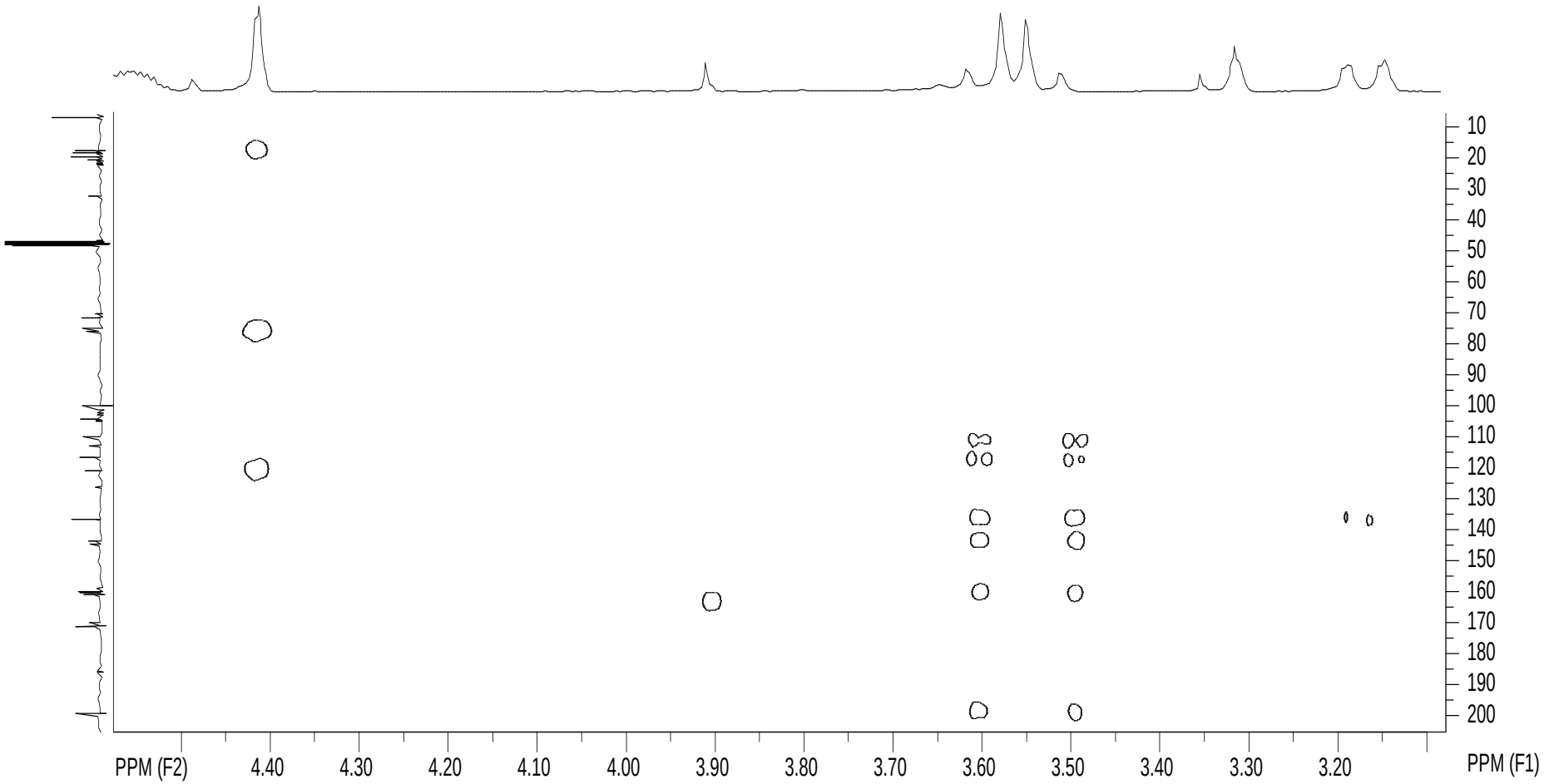


Figura 92. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).

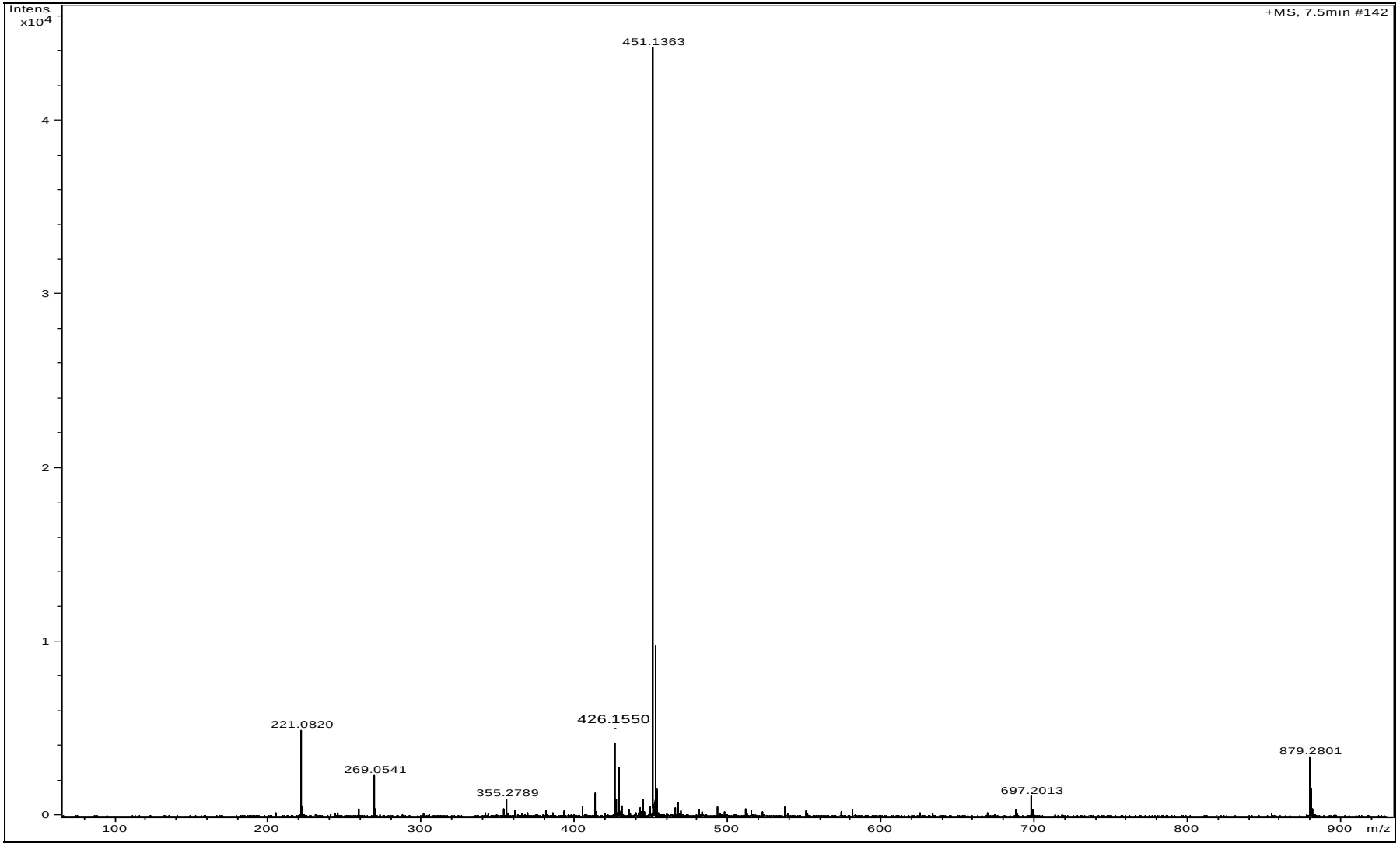


Figura 93. Espectro de massas austidiol diidroisocumarina.

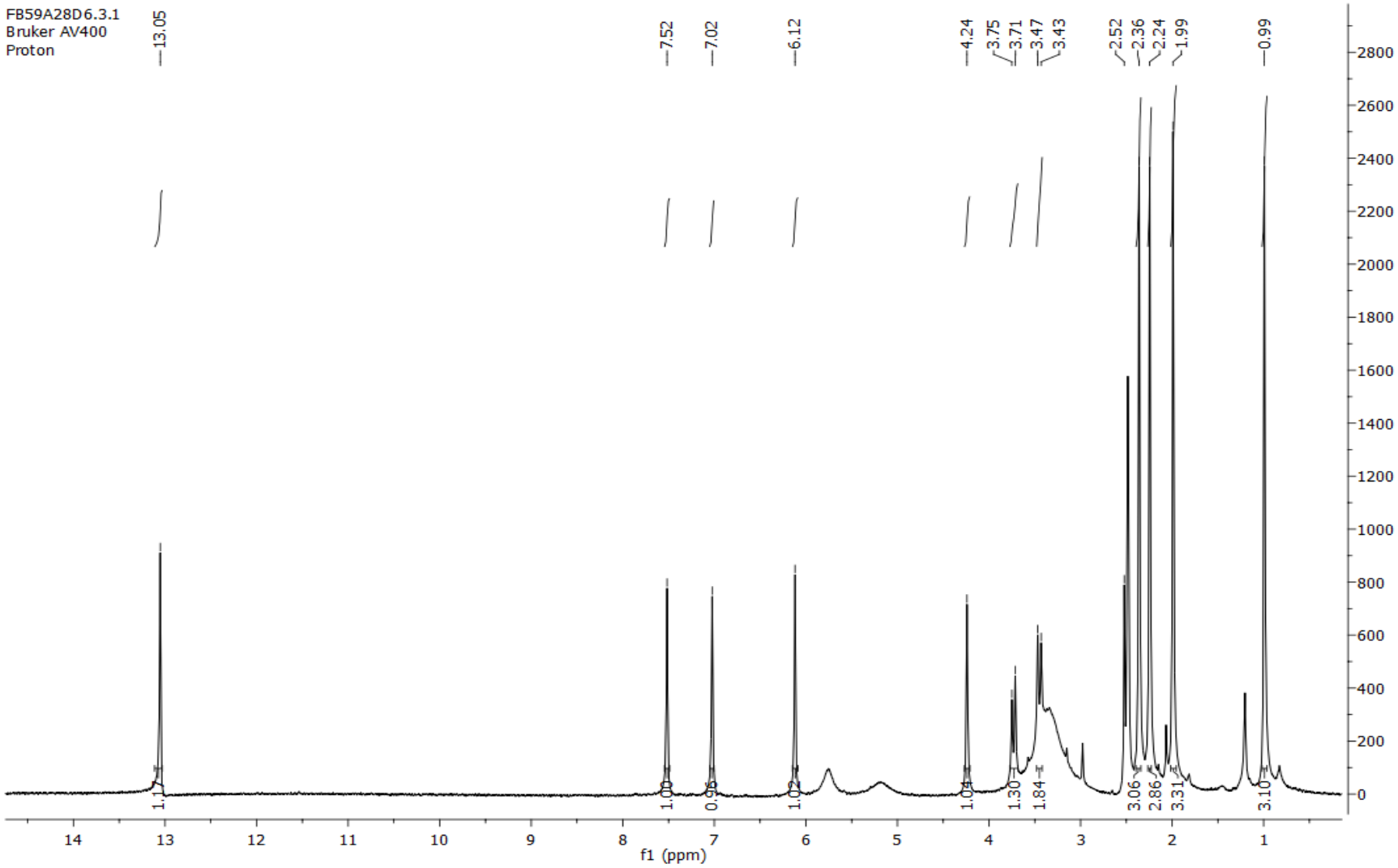


Figura 94. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 400 MHz)

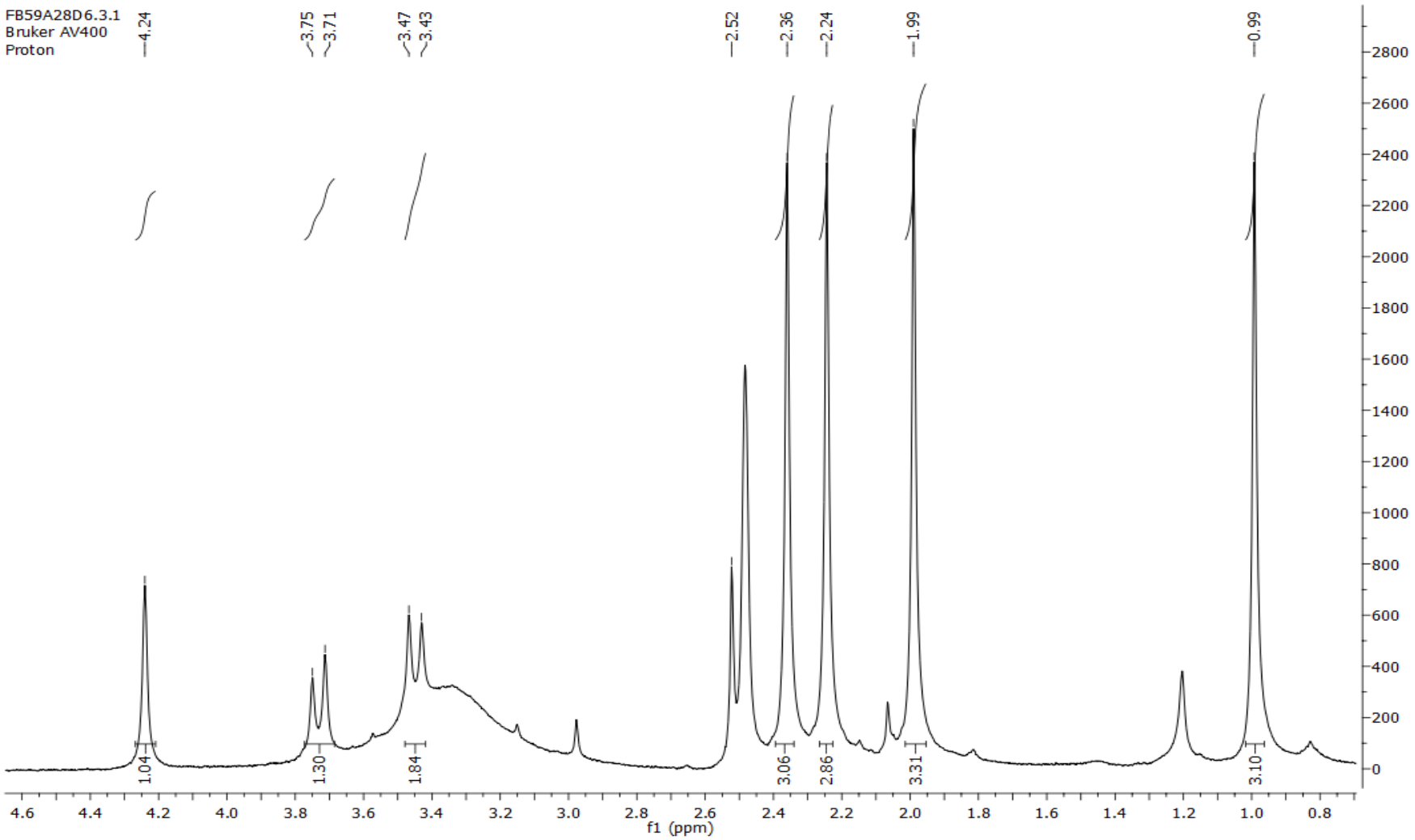


Figura 95. Espectro de RMN ^{1}H – austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 400 MHz).

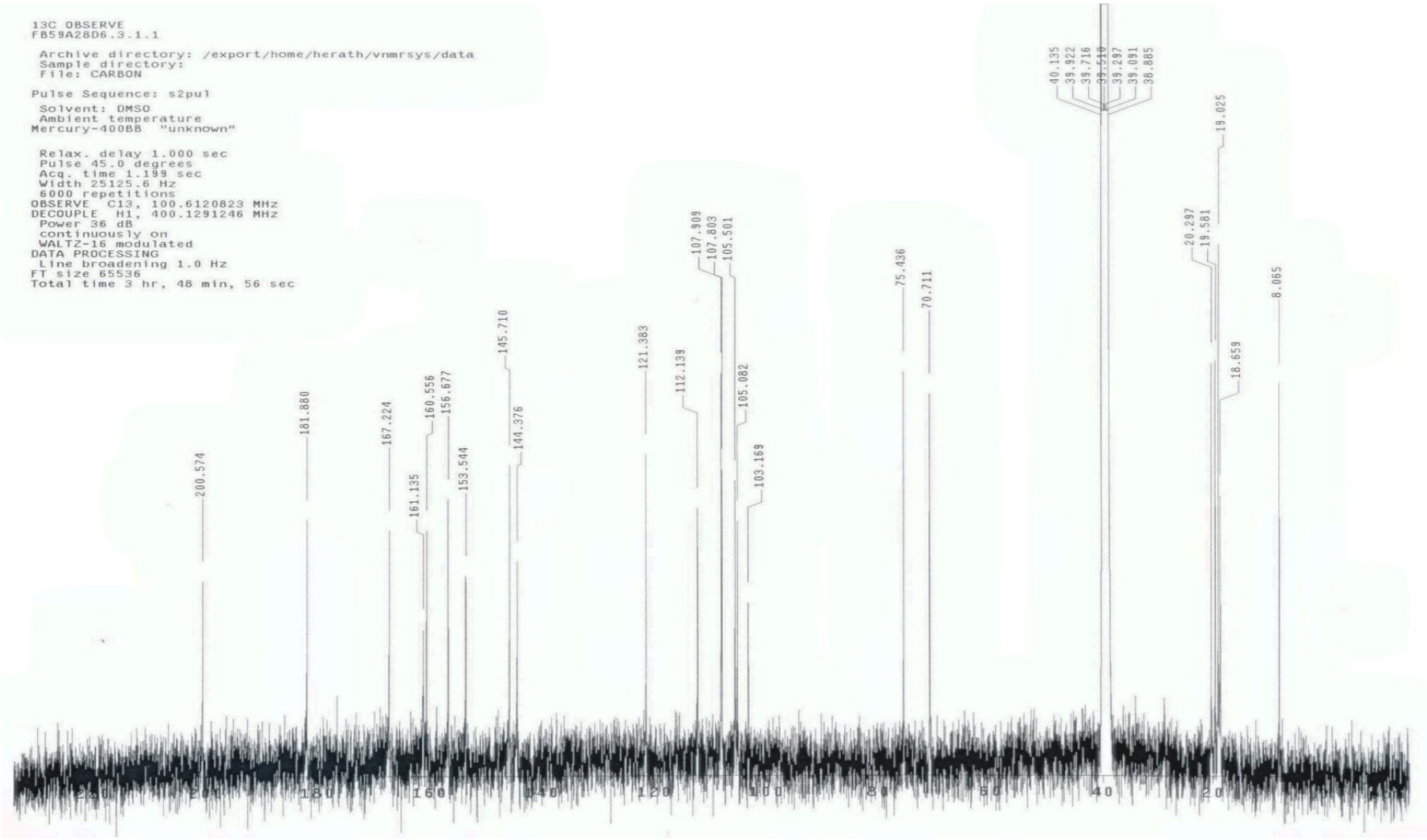


Figura 96. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 400 MHz)

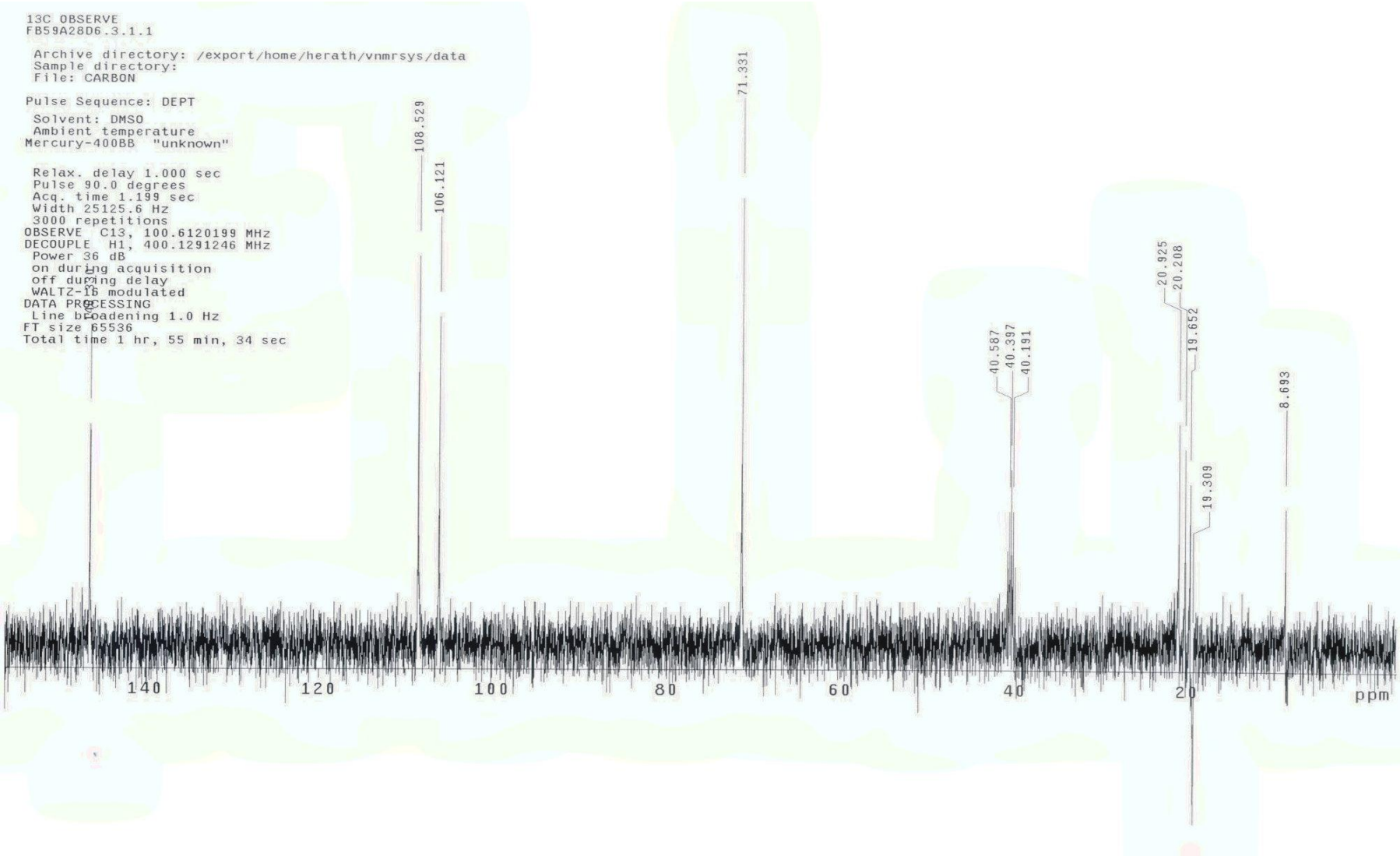


Figura 97. Espectro de RMN DEPT austidiol cromeno (DMSO-d_6 - 125 MHz).

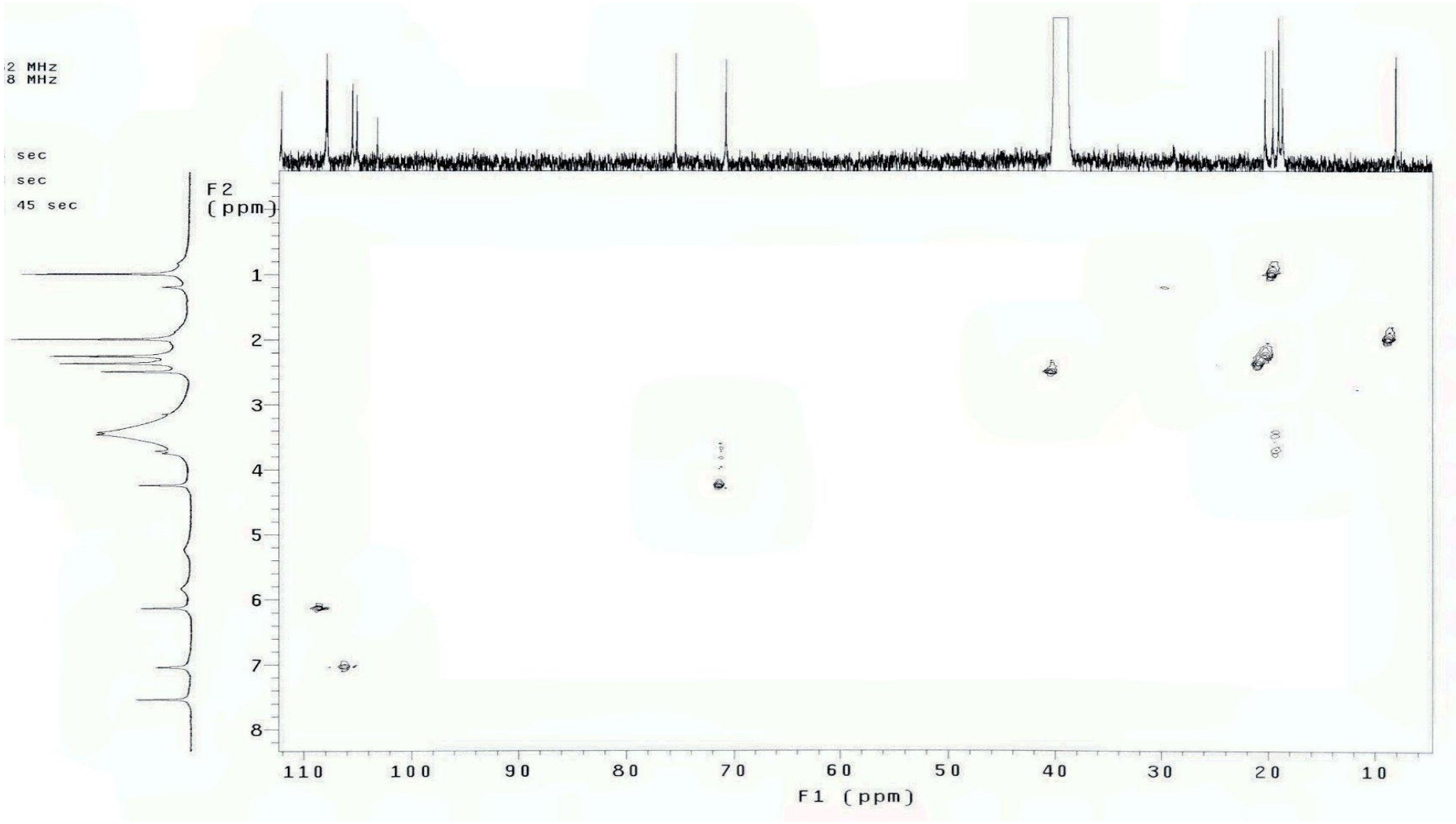


Figura 98. Mapa de contornos HMQC – austidiol cromeno (DMSO-d_6).

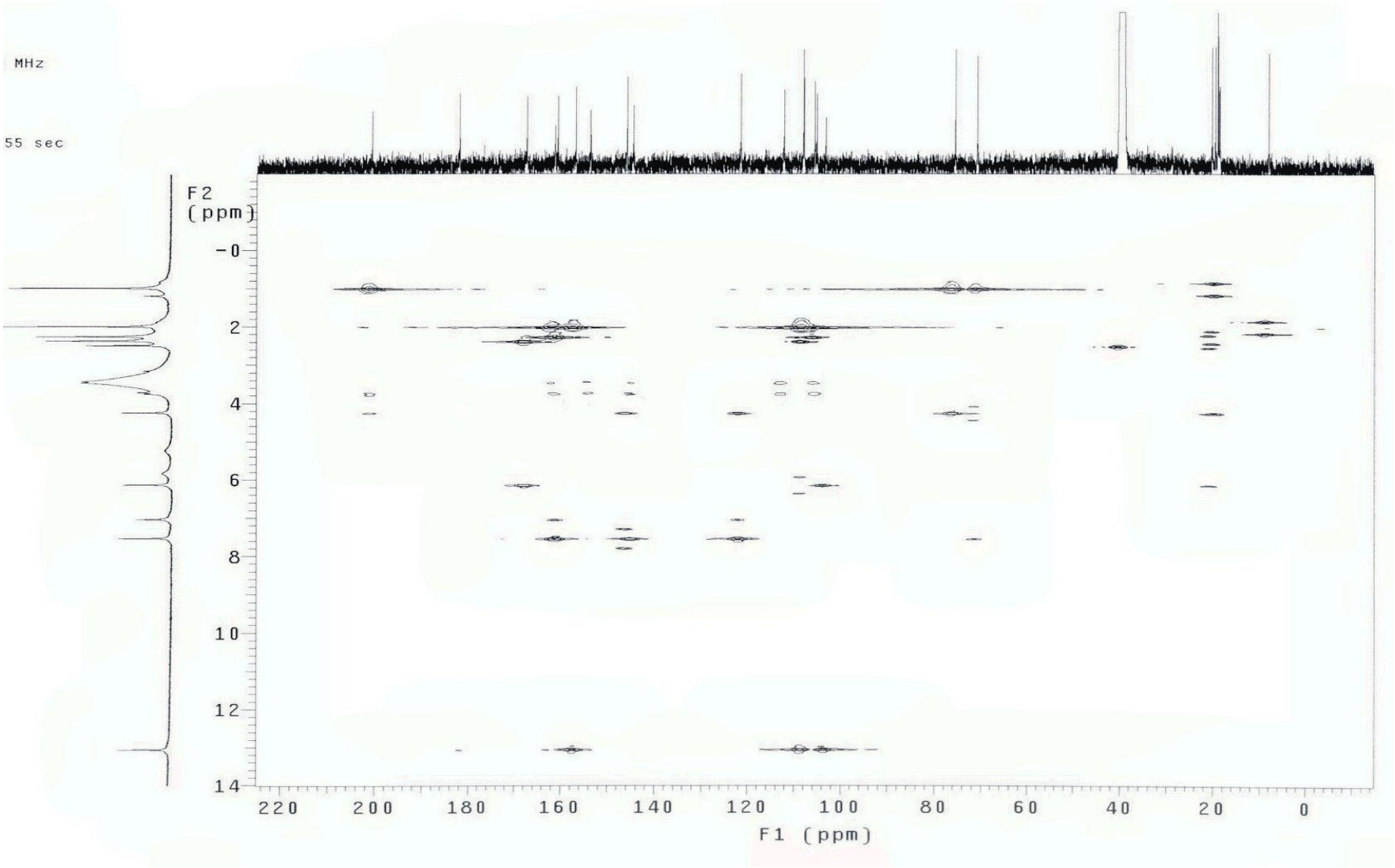


Figura 99. Mapa de contornos HMBC – austidiol cromeno (DMSO-d_6).

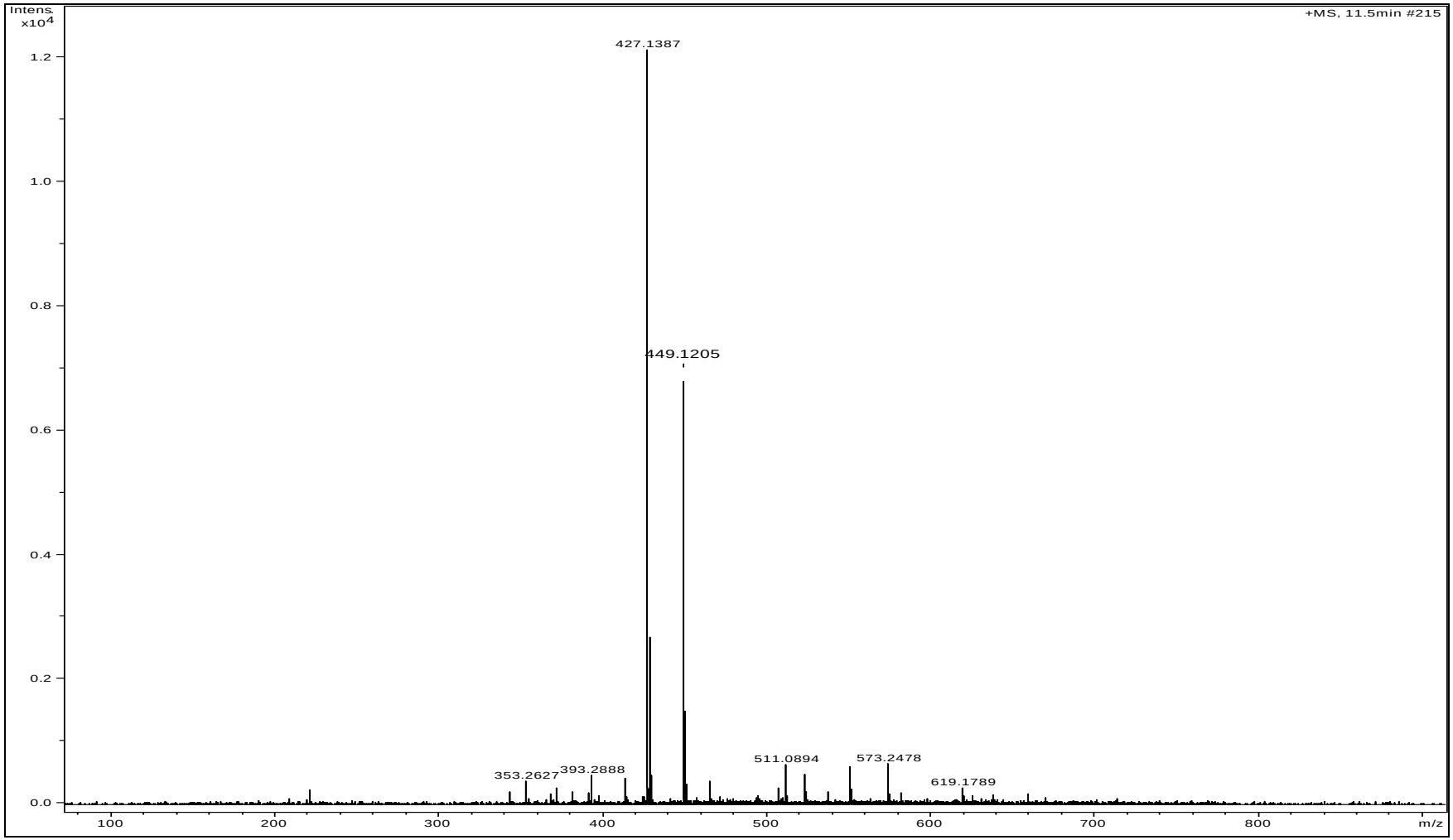


Figura 100. Espectro de massas austidiol cromeno.

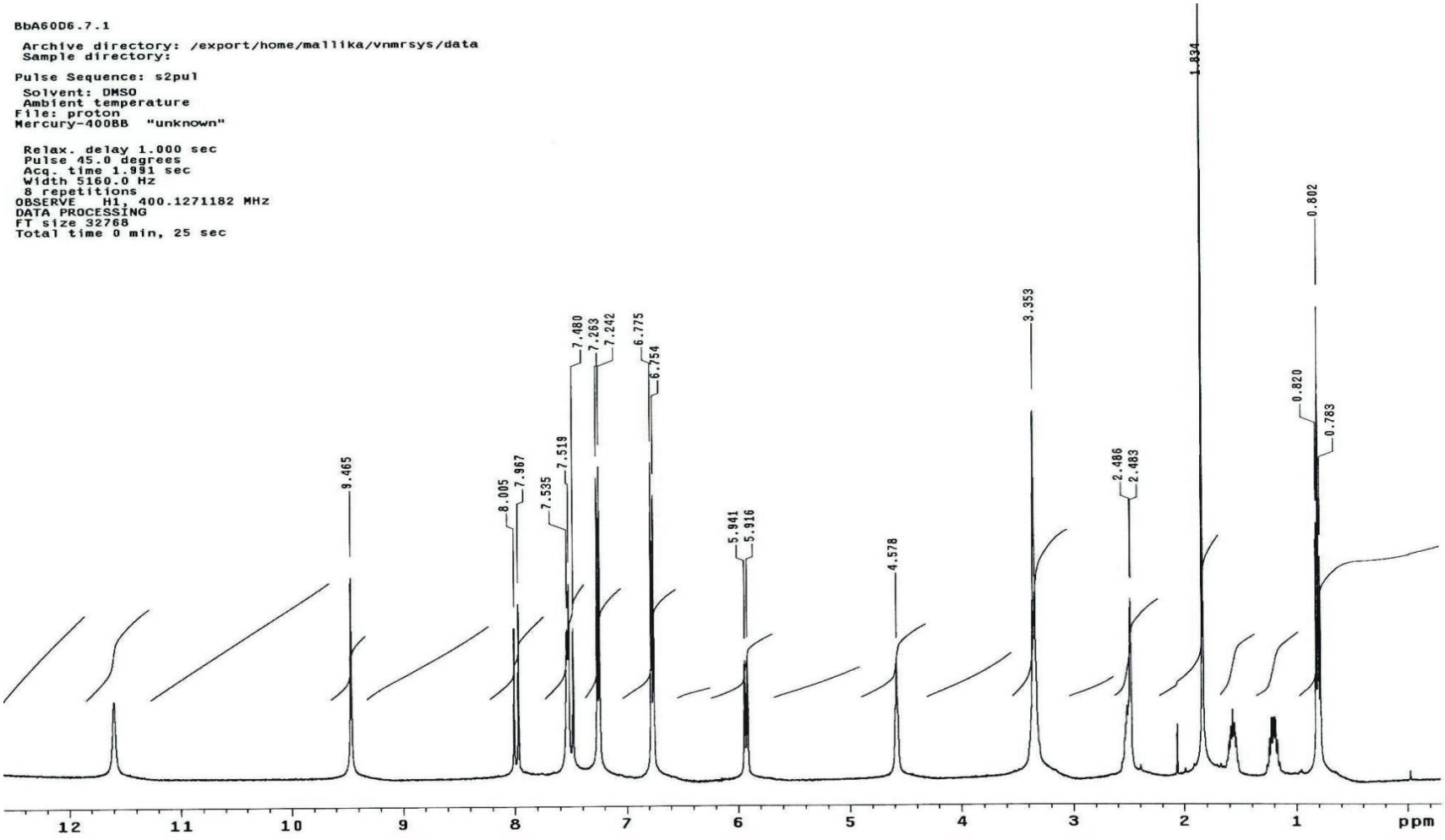


Figura 101. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina (DMSO-d_6 - 400 MHz).

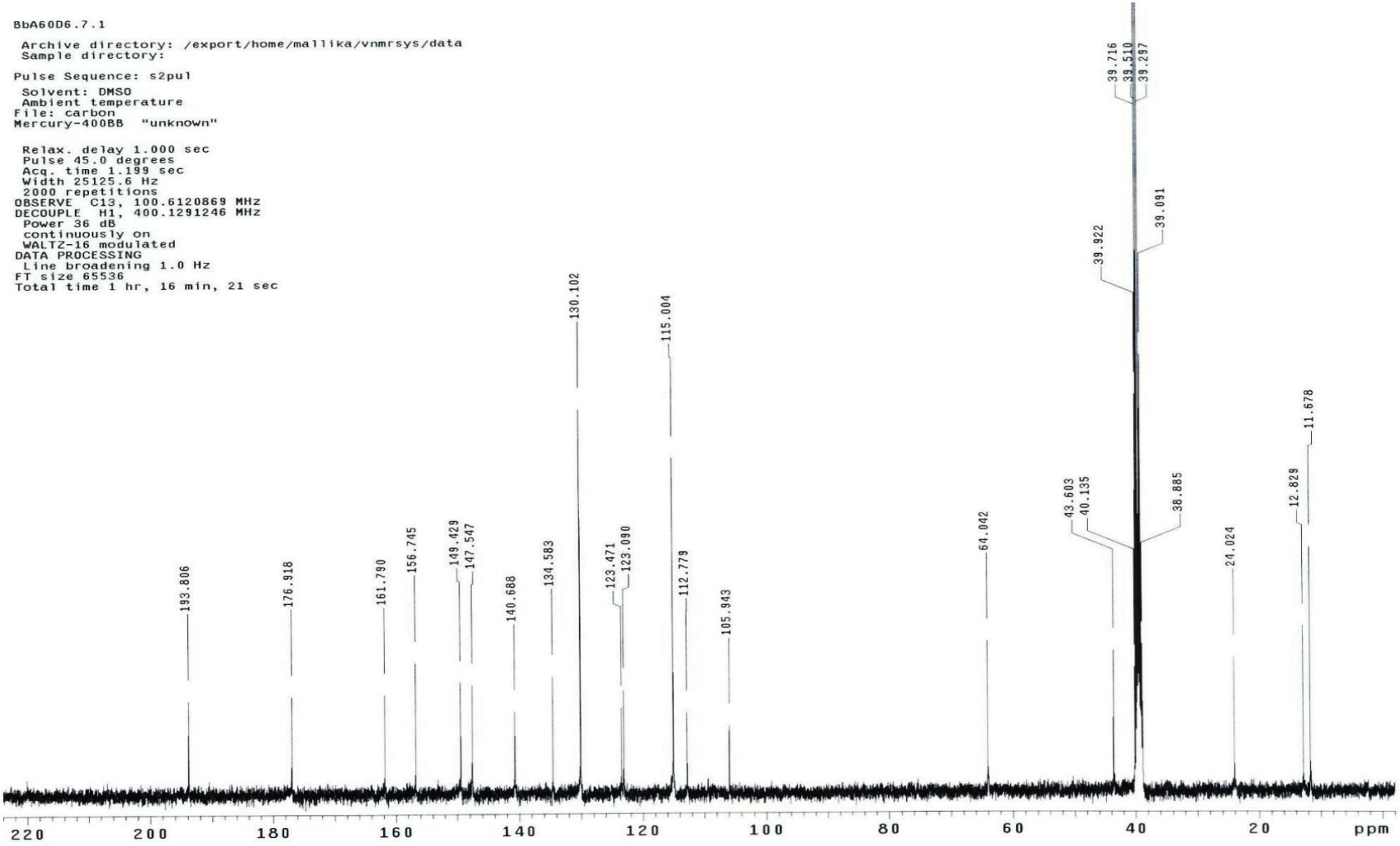


Figura 102. Espectro de RMN ^{13}C – piridovericina (DMSO-d_6 - 100 MHz).

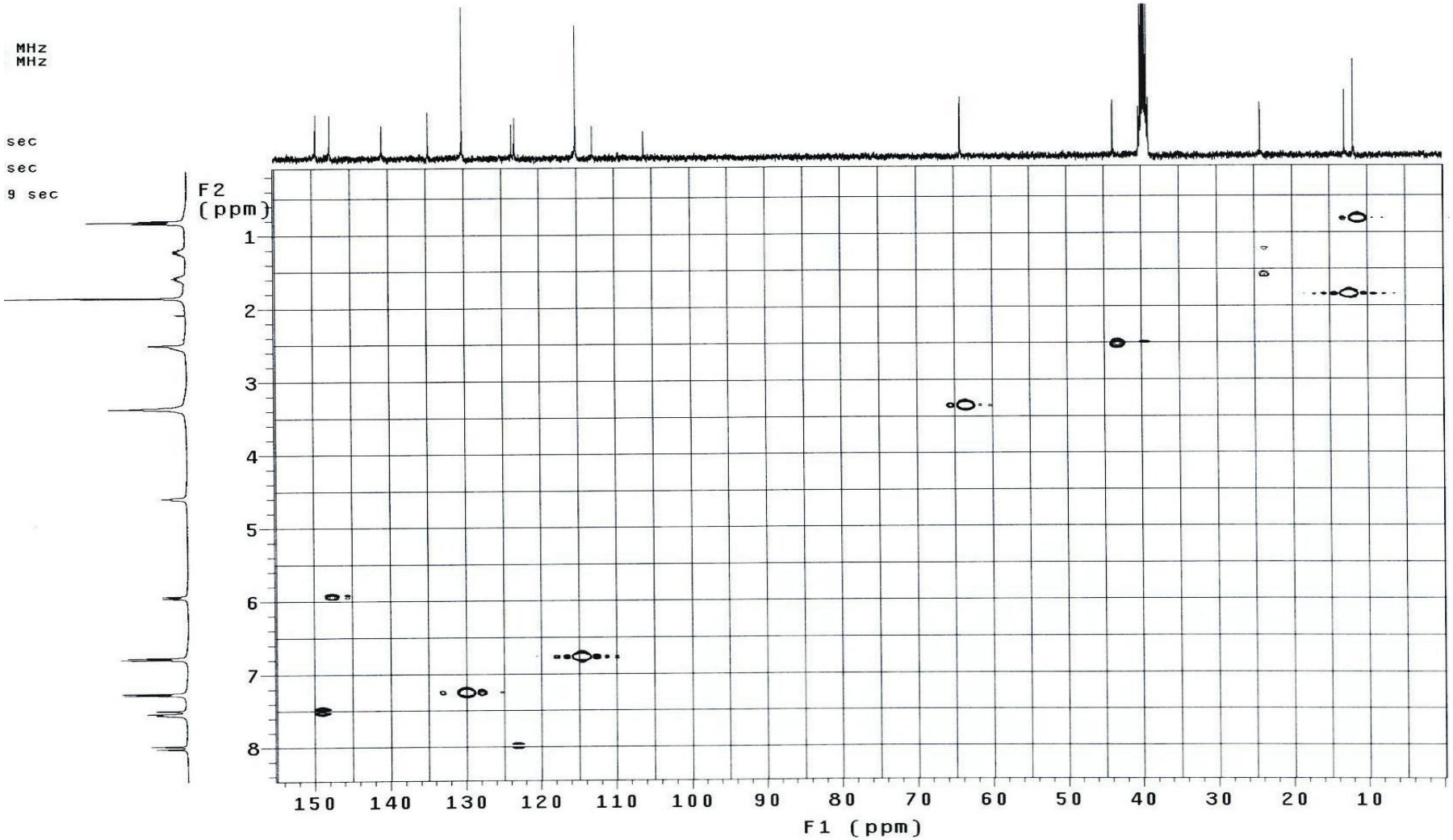


Figura 103. Mapa de contornos HMQC – piridovericina (DMSO-d_6).

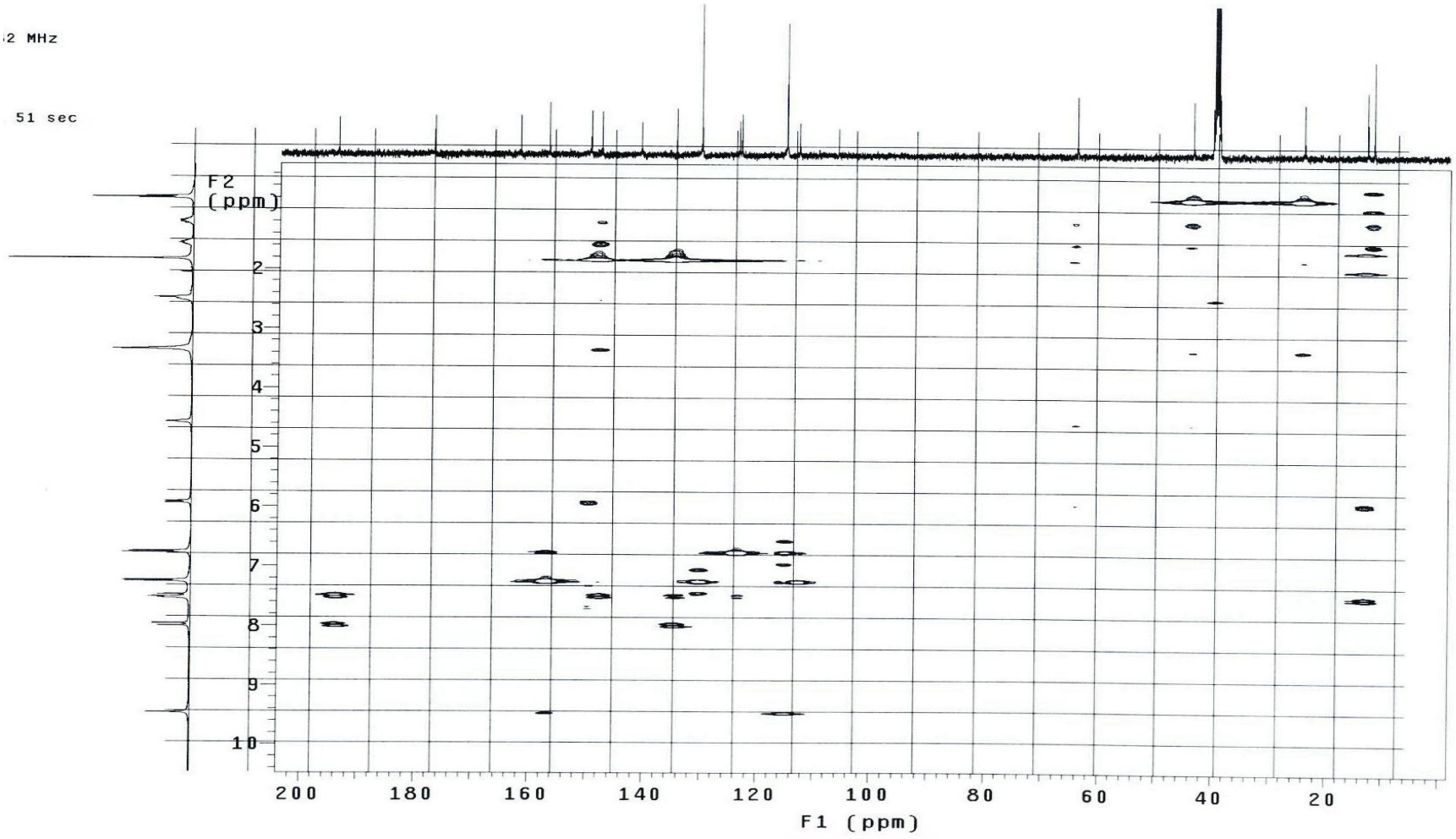


Figura 104. Mapa de contornos HMBC – piridovericina (DMSO-d_6).

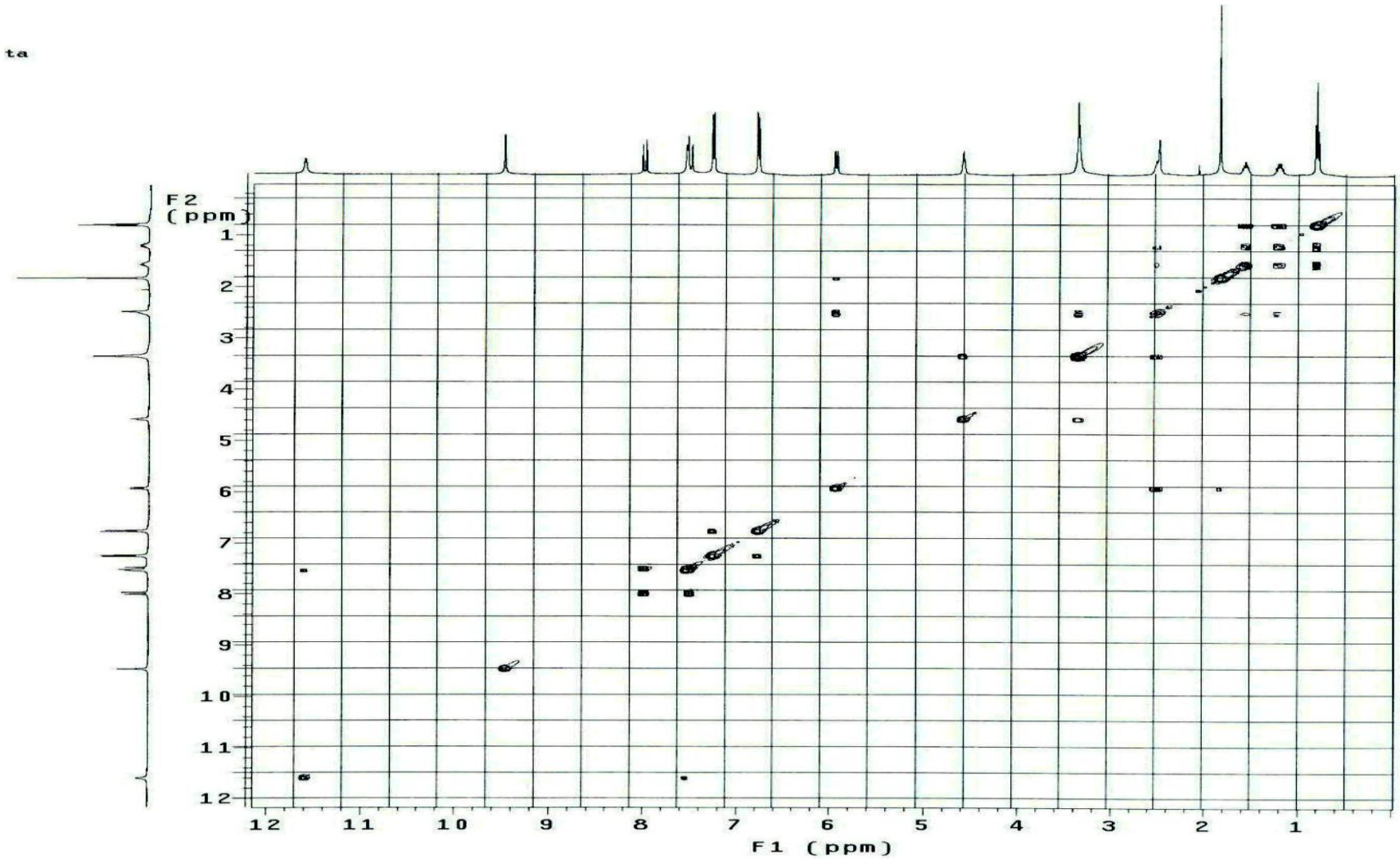


Figura 105. Mapa de contornos COSY – piridovericina (DMSO-d_6, 400 MHz).

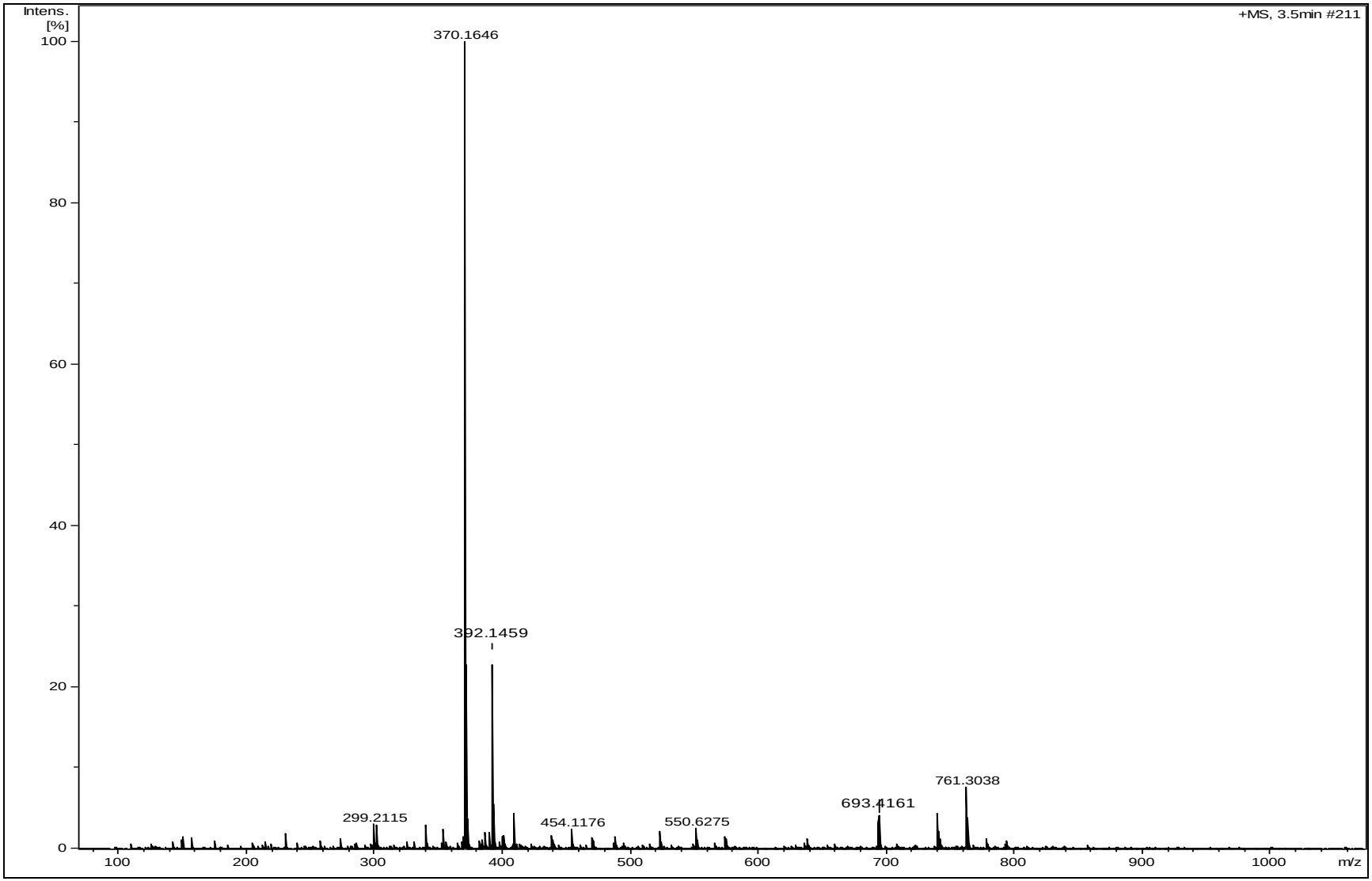


Figura 106. Espectro de massas de piridovericina.

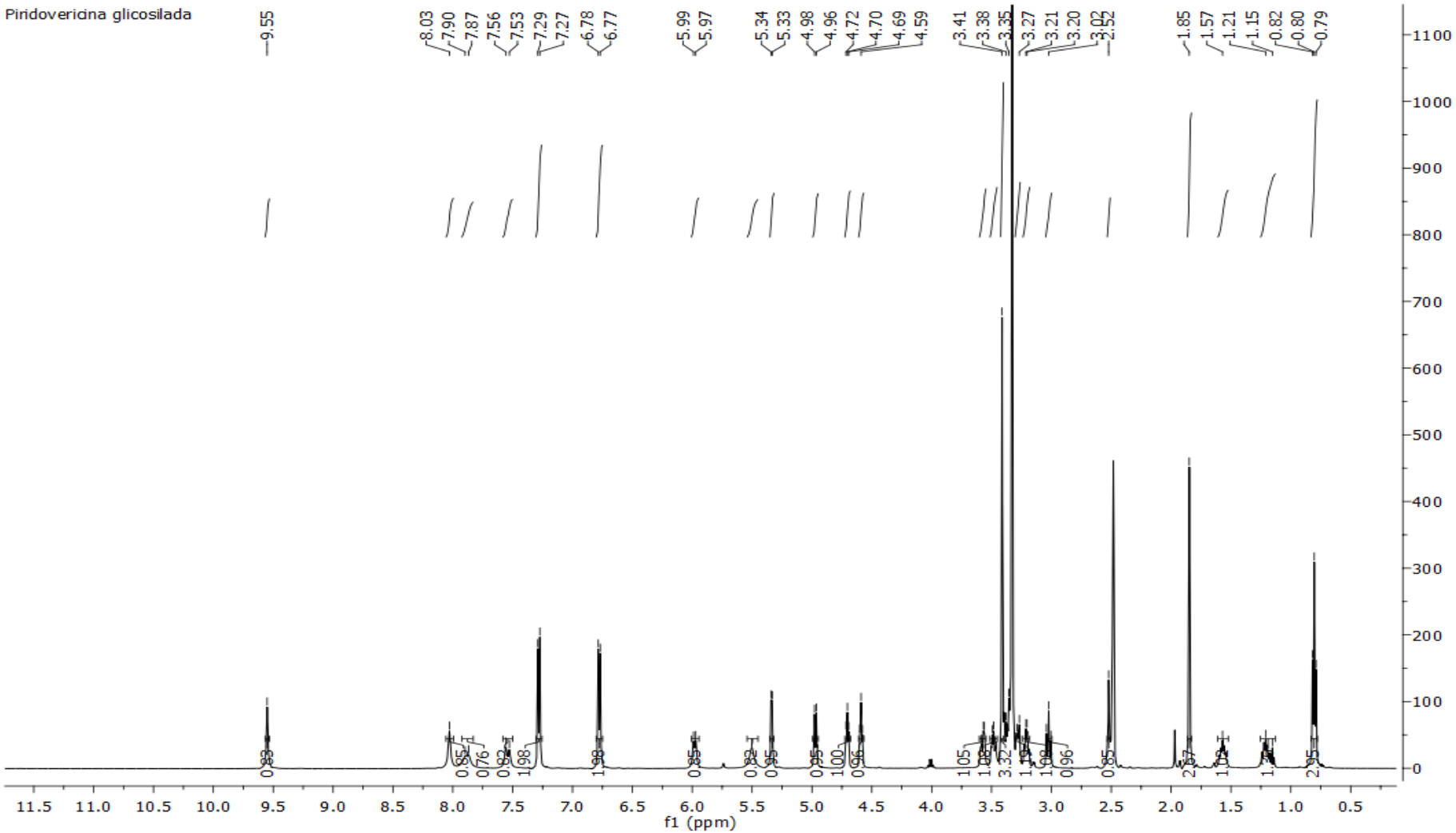


Figura 107. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

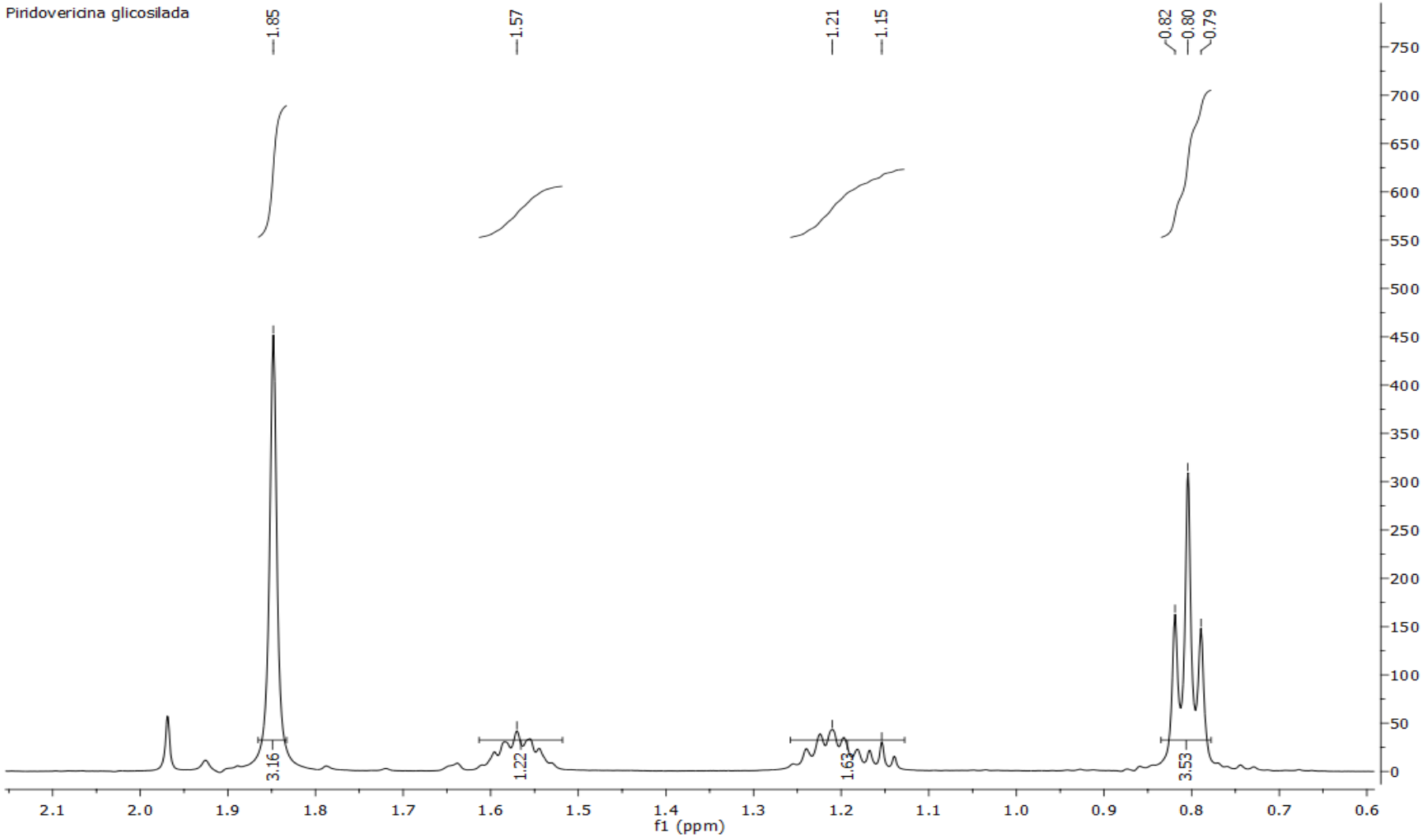


Figura 108. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

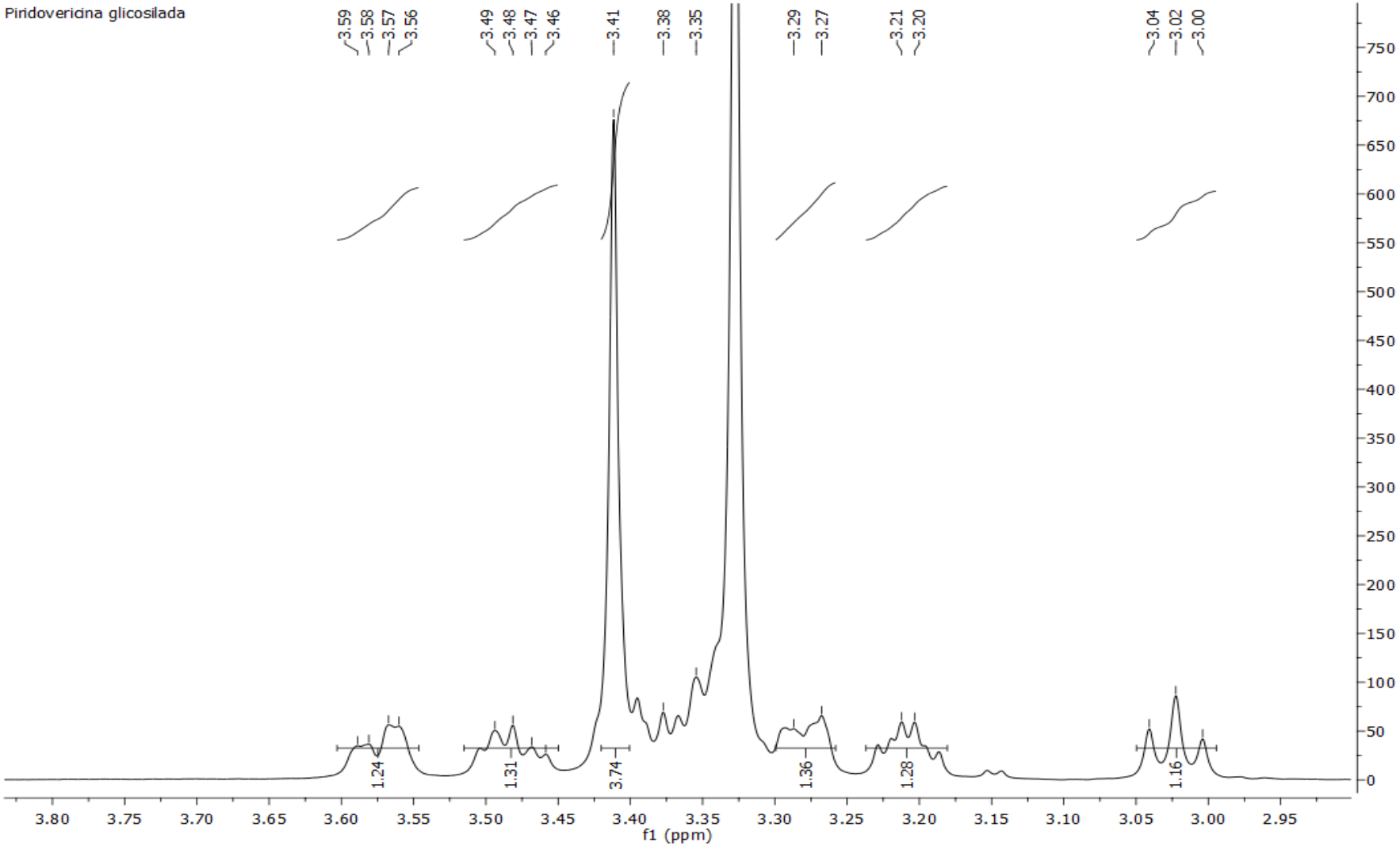


Figura 109. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

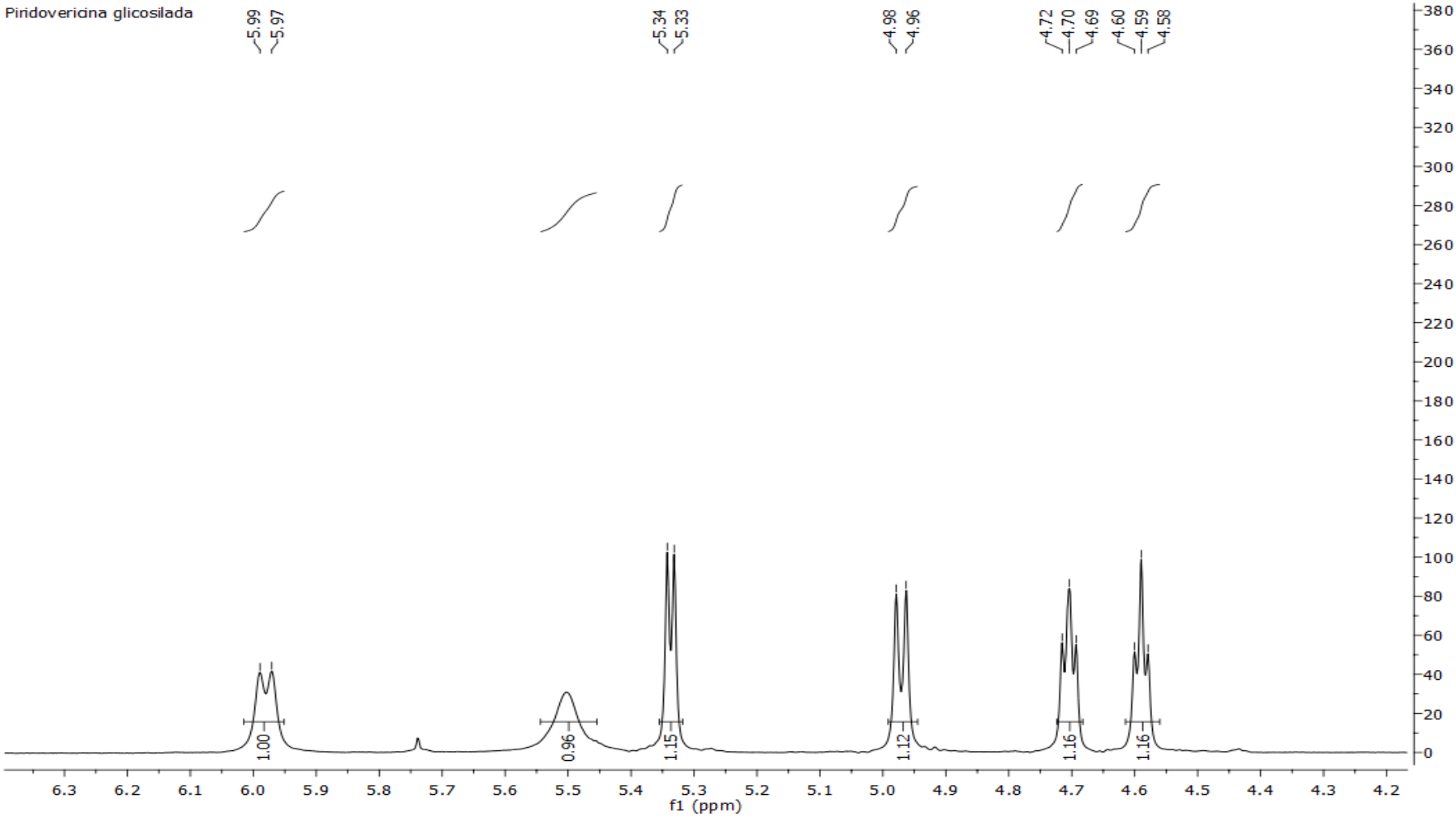


Figura 110. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

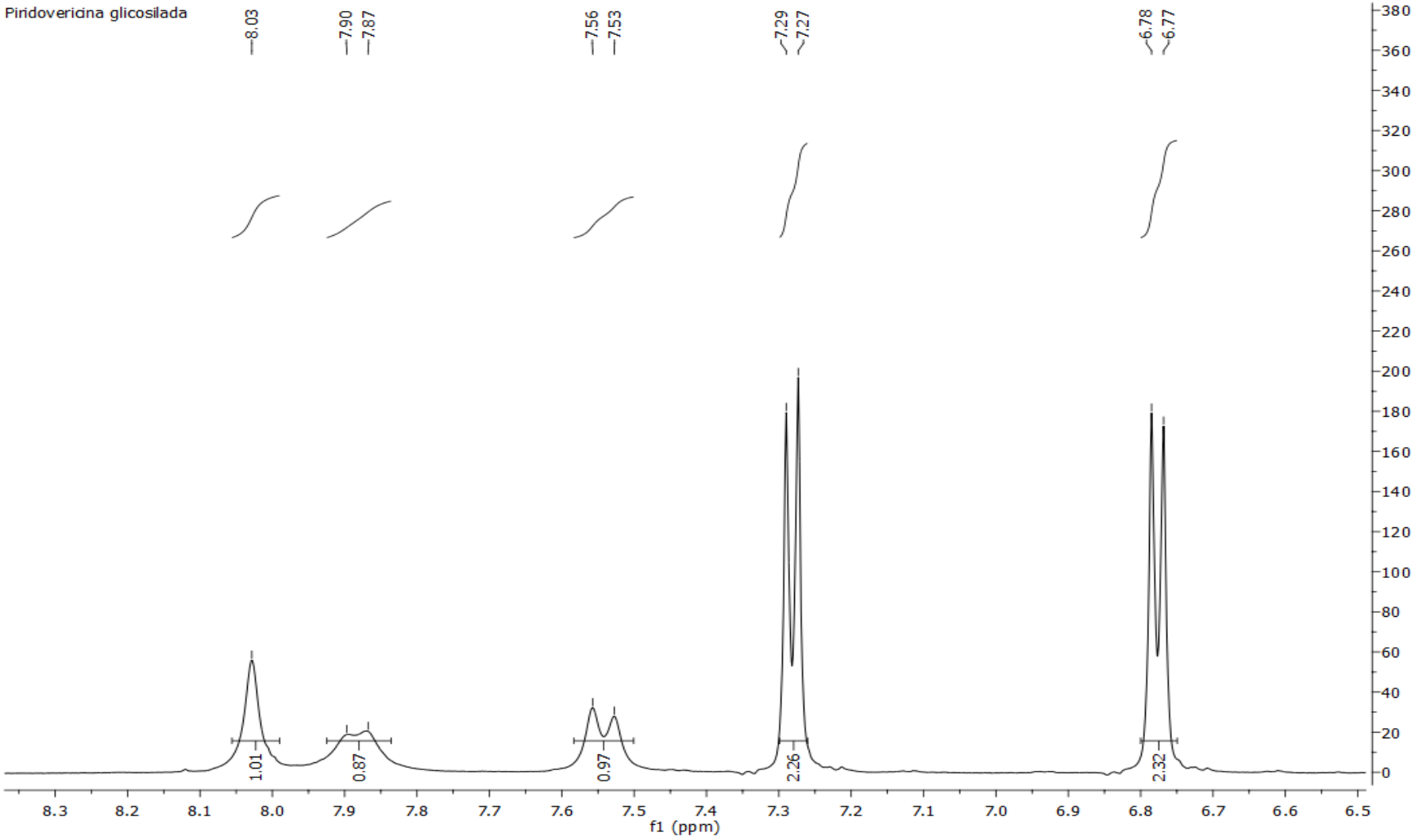


Figura 111. Espectro de RMN ^{1}H – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

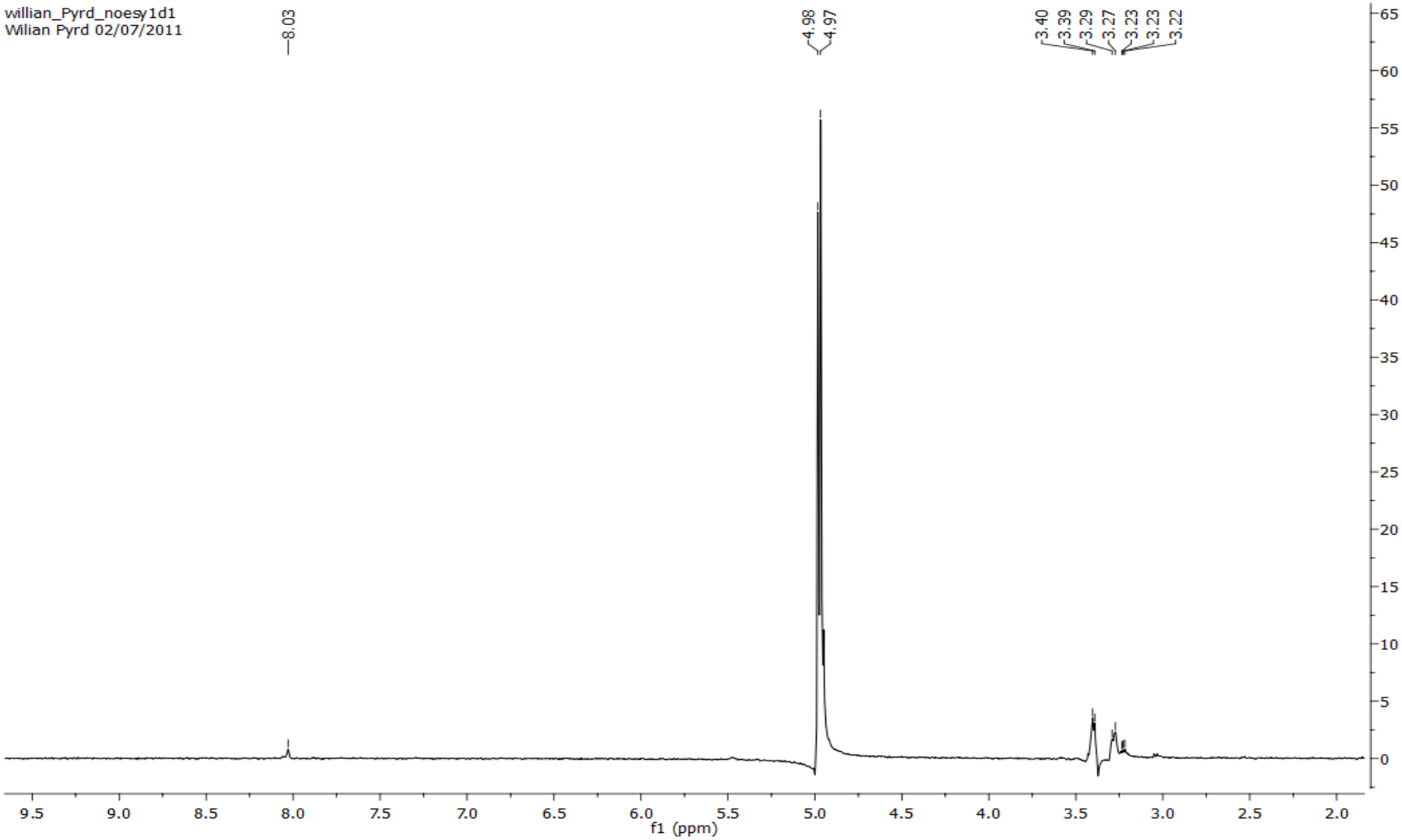


Figura 112. RMN NOESY 1D – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

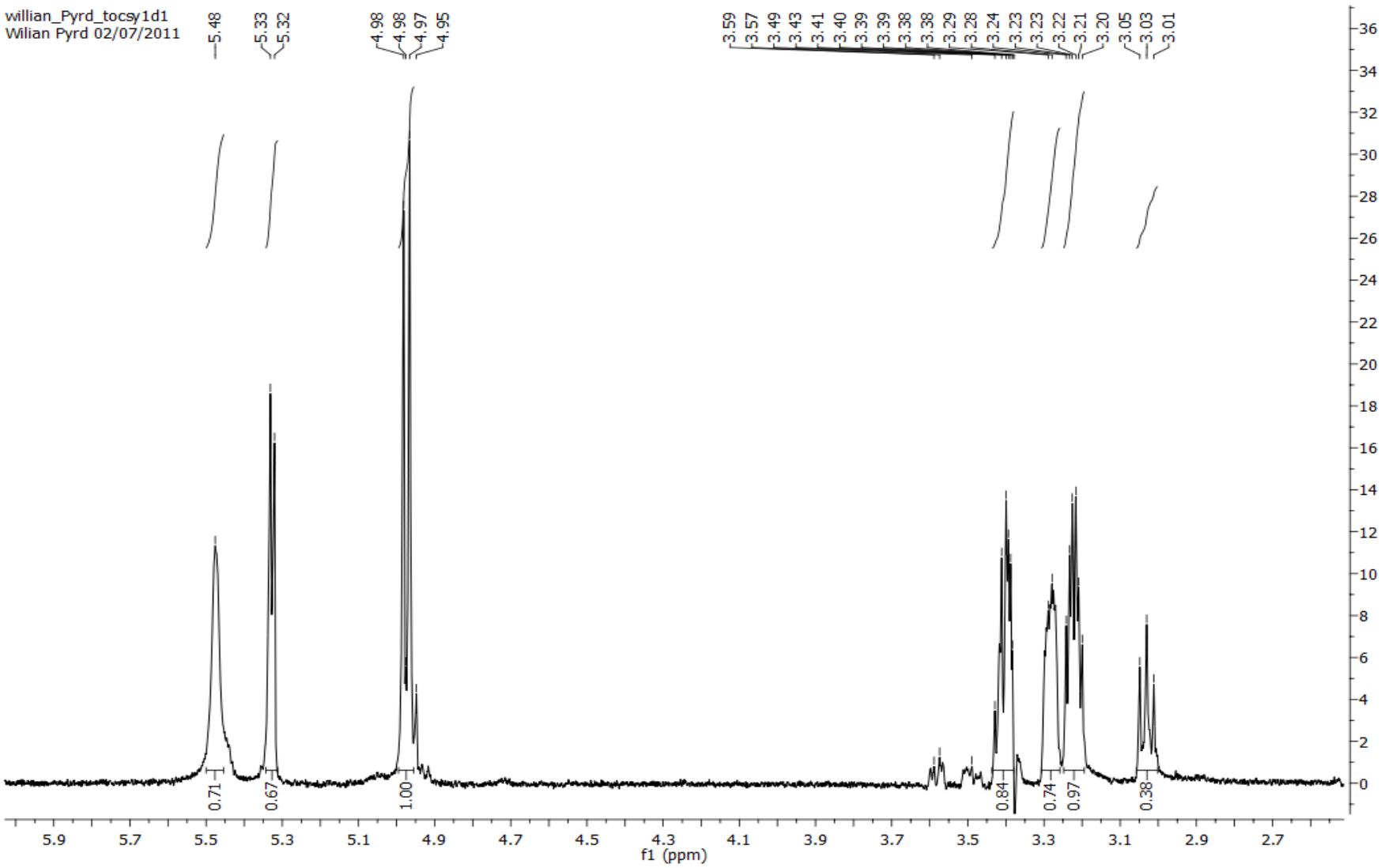


Figura 113. RMN TOCSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 400 MHz).

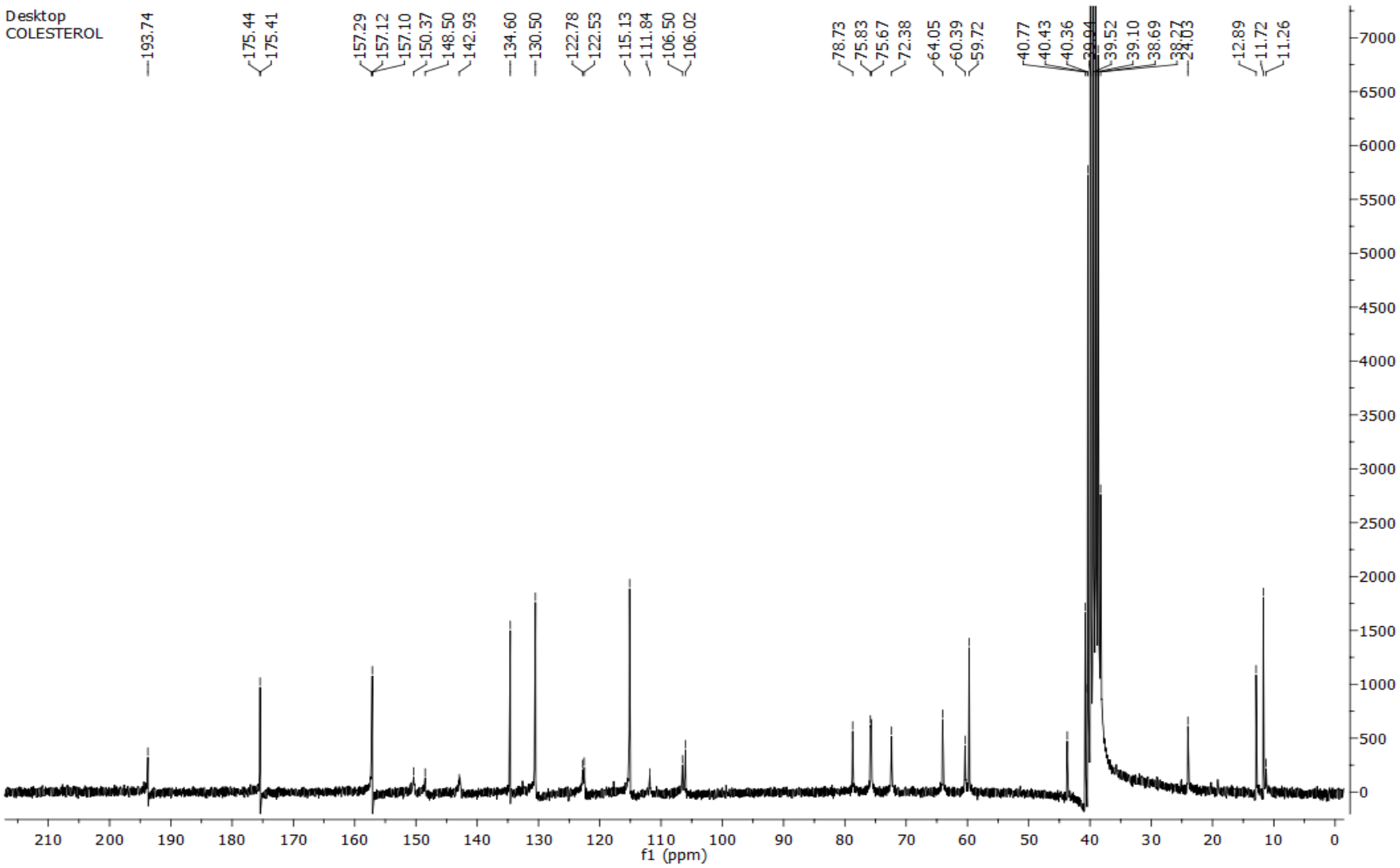


Figura 114. RMN de ^{13}C – piridovericina-Glc (DMSO-d_6 - 100 MHz).

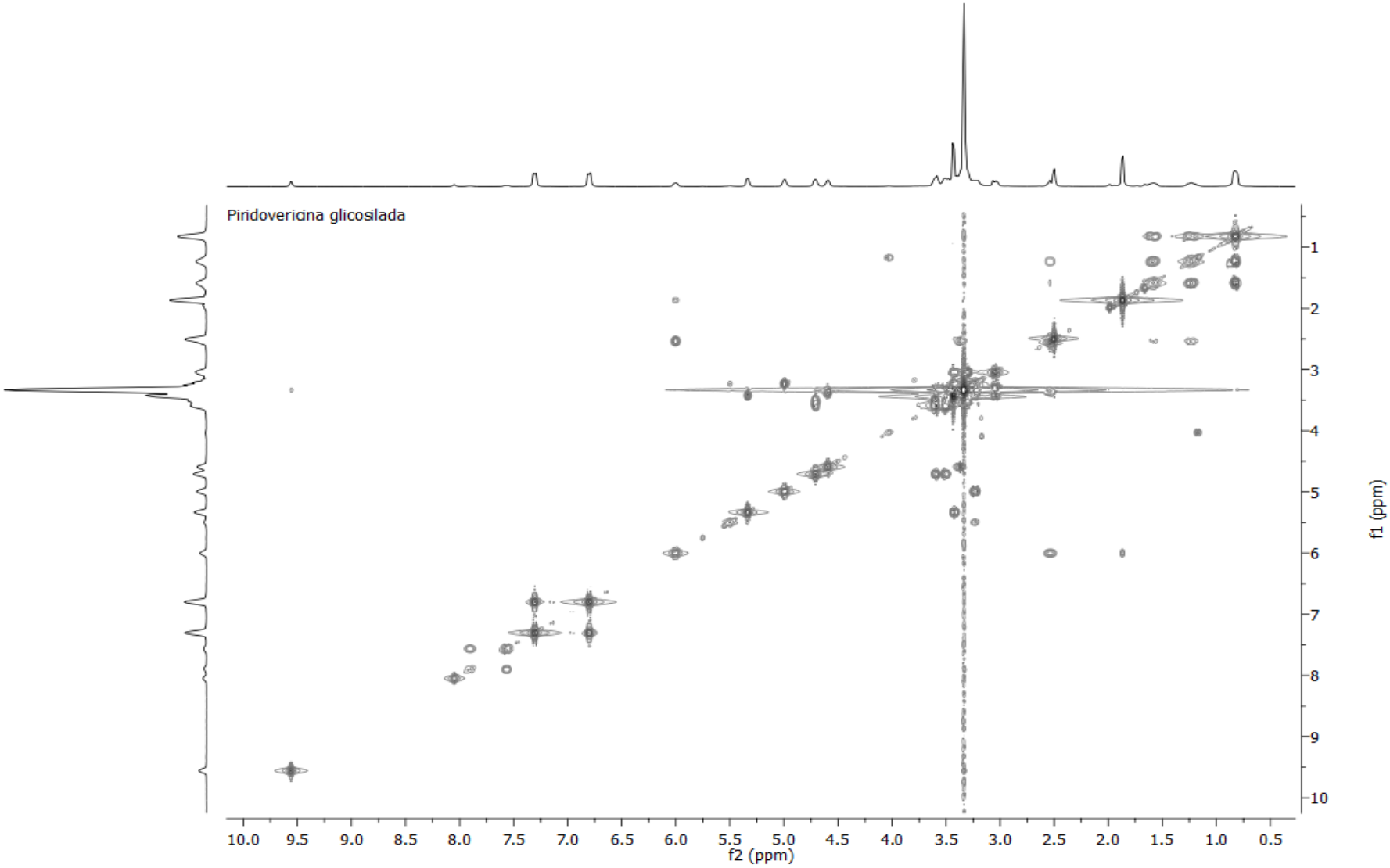


Figura 115. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6, 400 MHz).

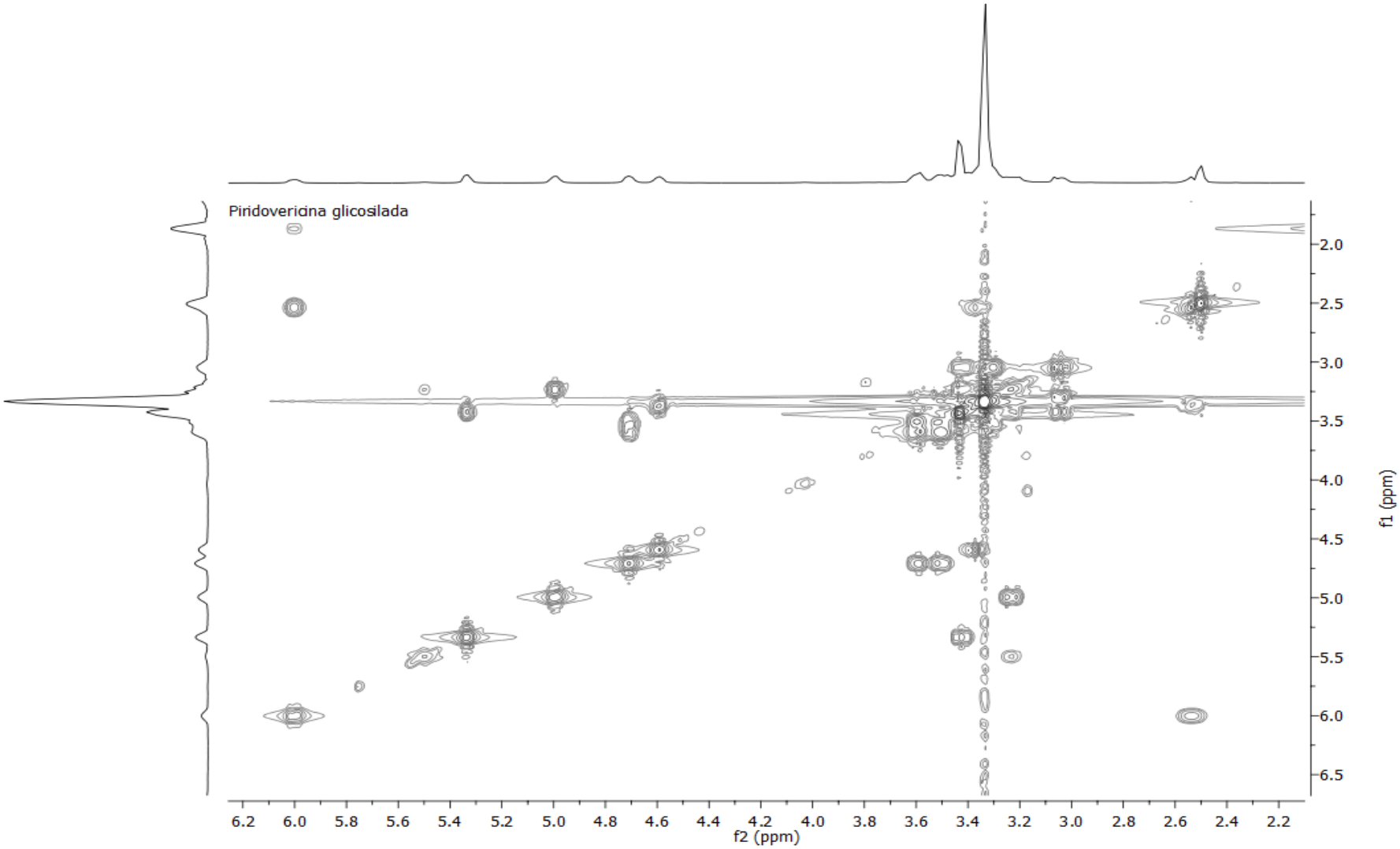


Figura 116. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6, 400 MHz).

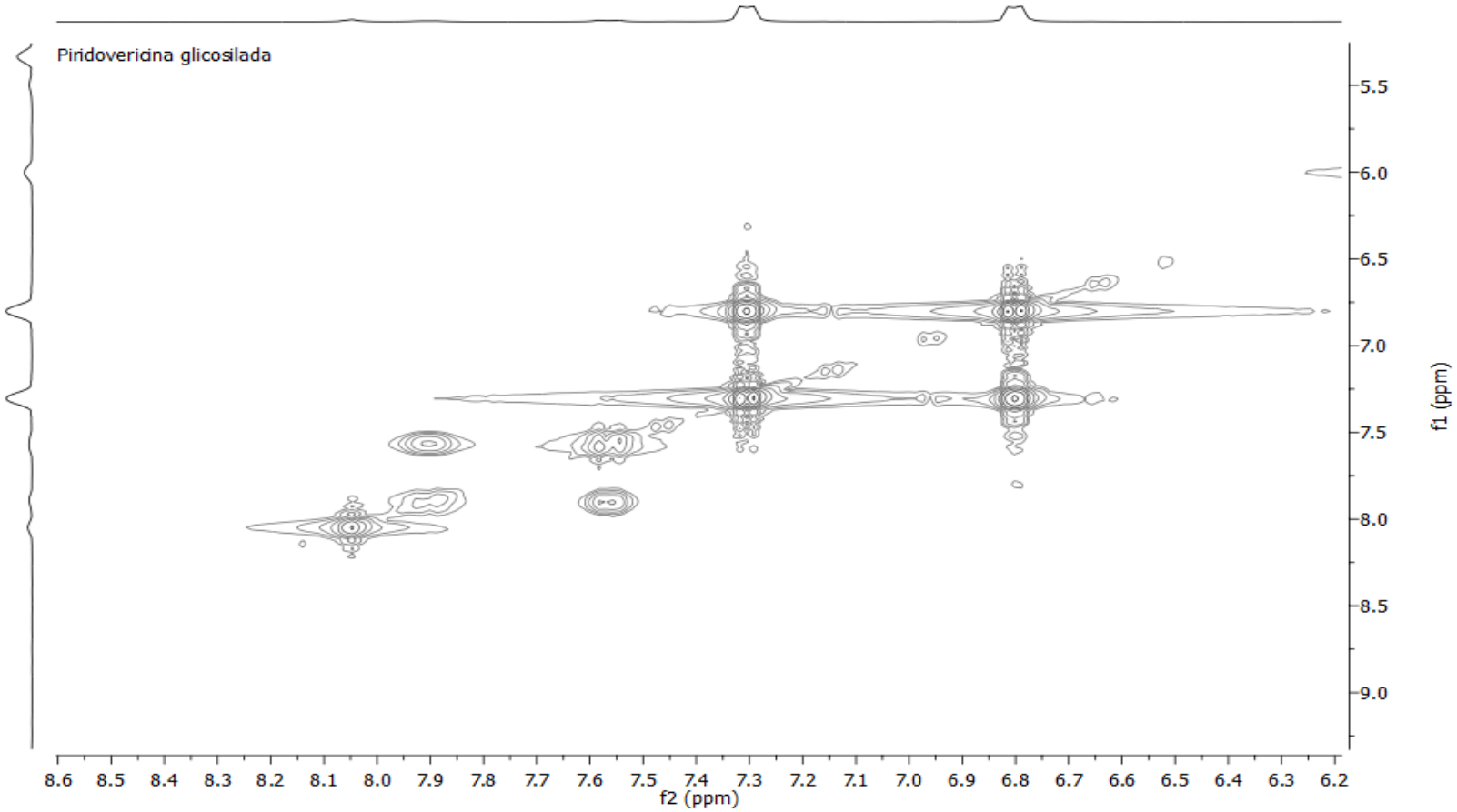


Figura 117. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO-d_6, 400 MHz).

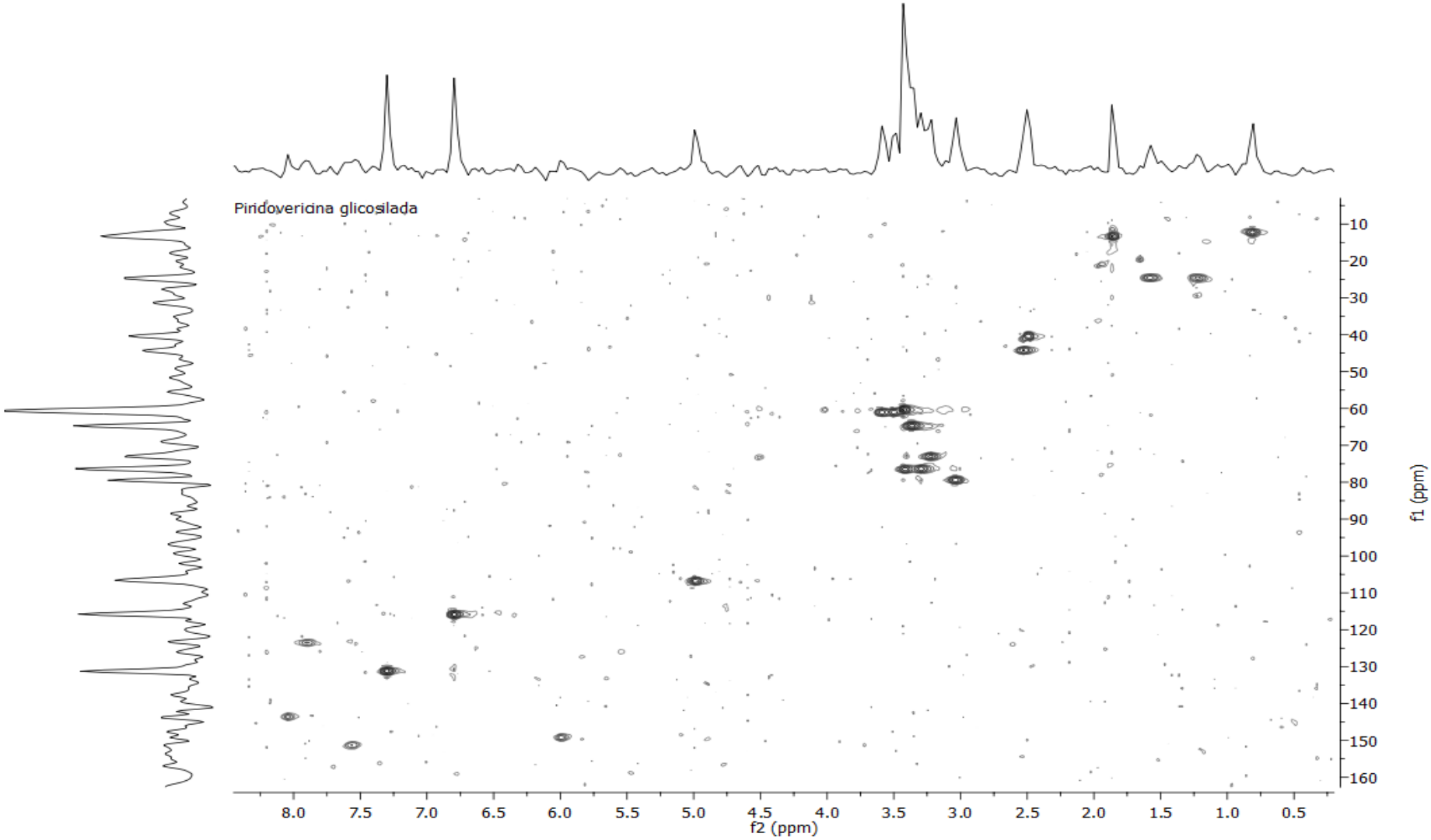


Figura 118. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

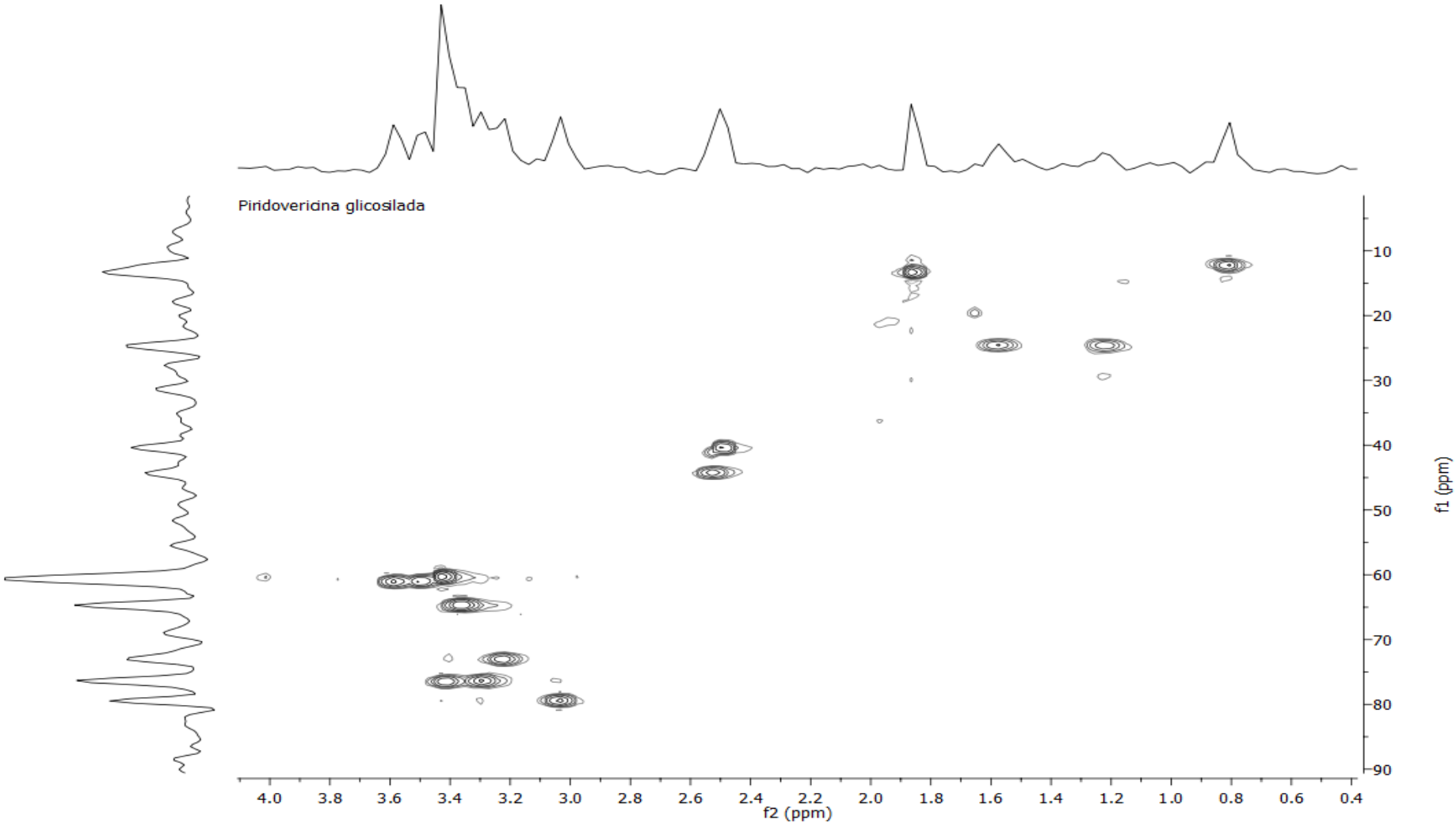


Figura 119. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

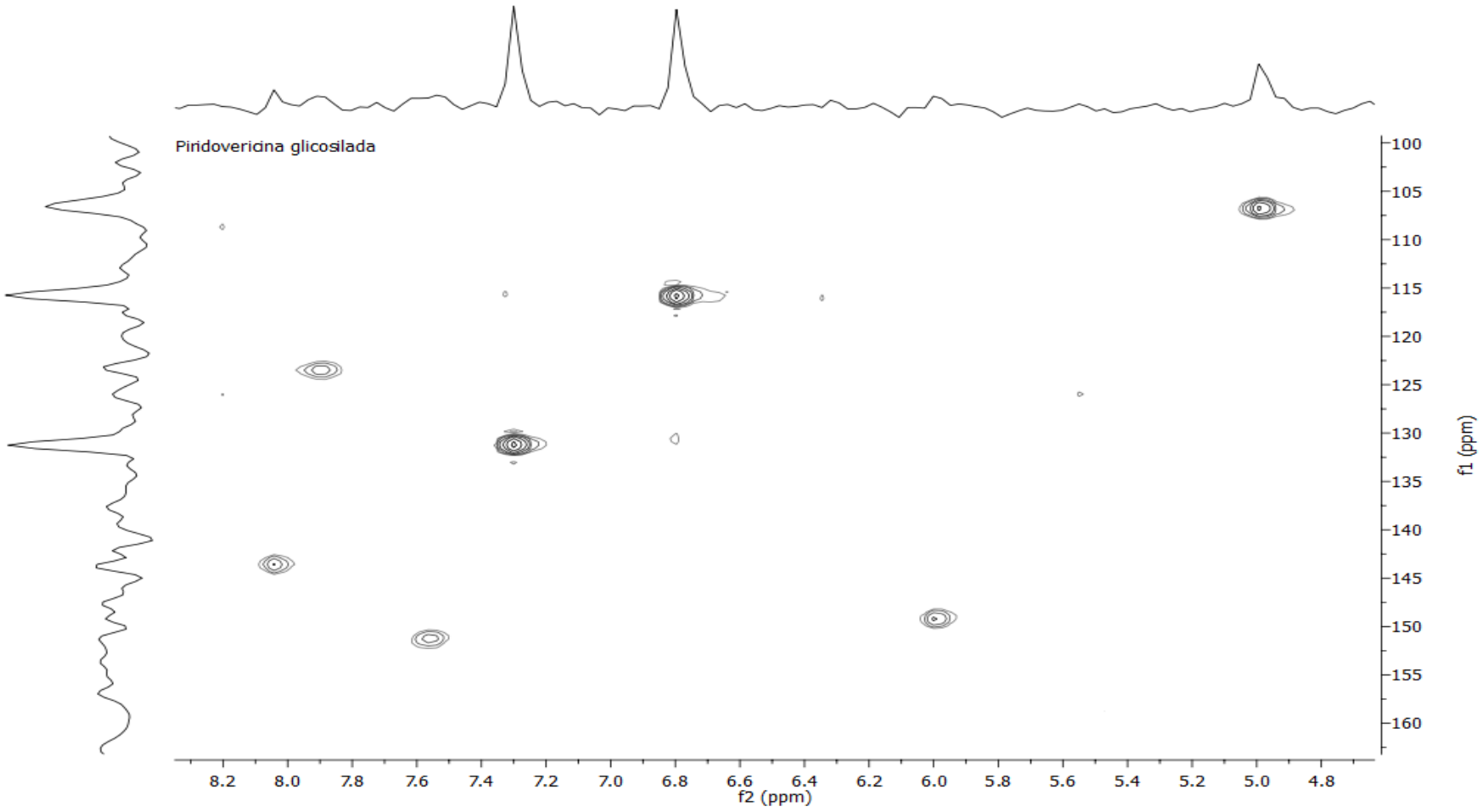


Figura 120. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

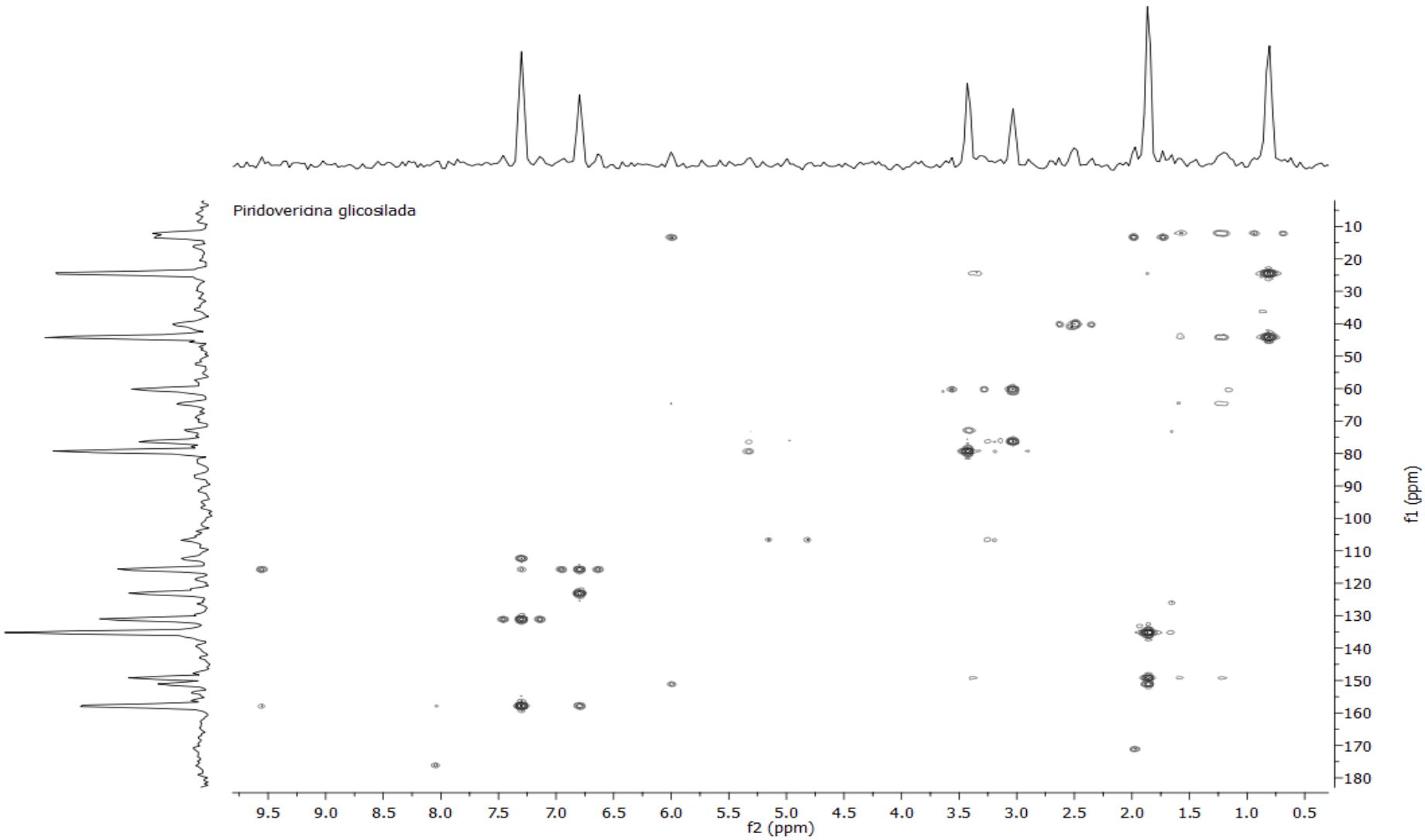


Figura 121. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

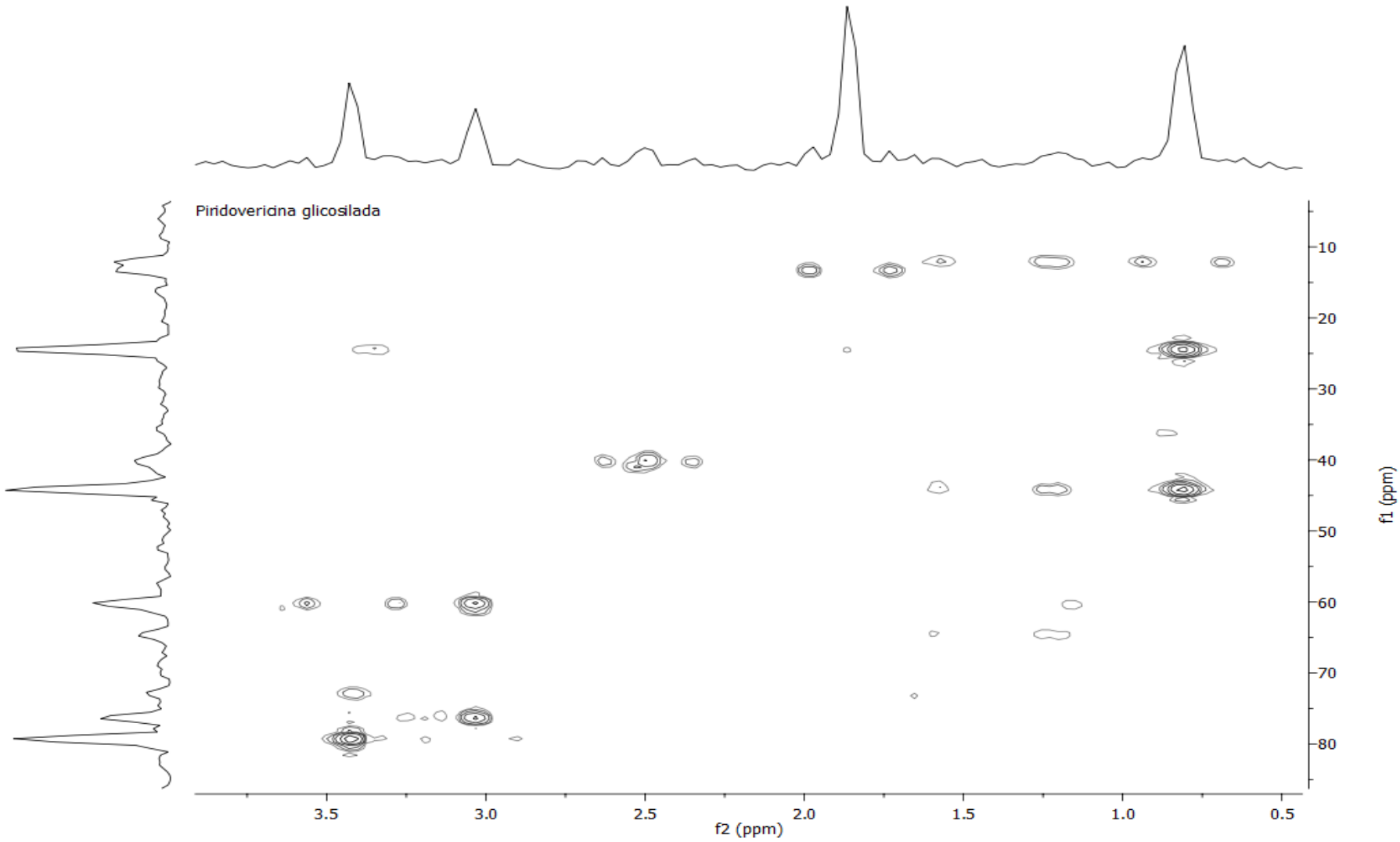


Figura 122. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

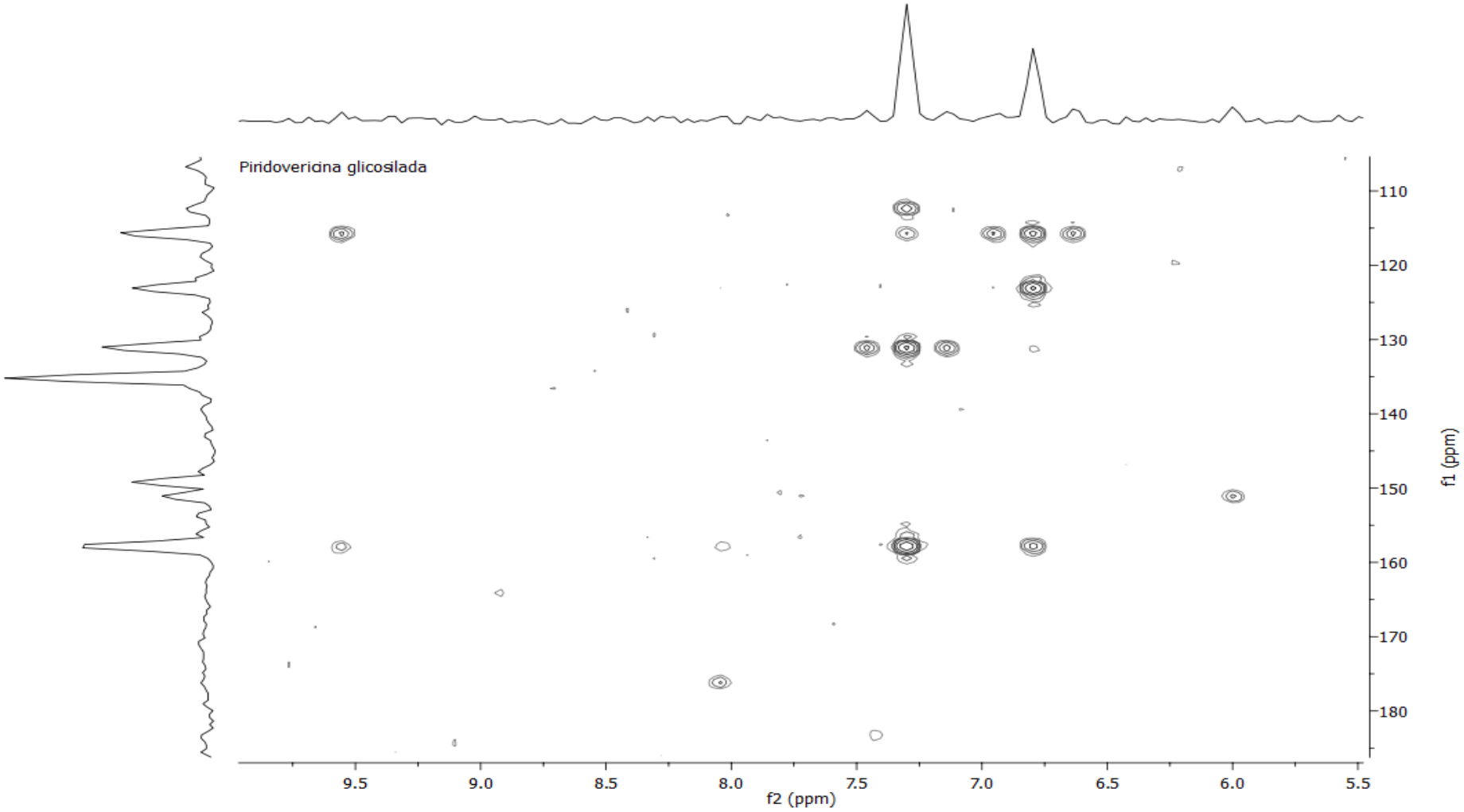


Figura 123. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

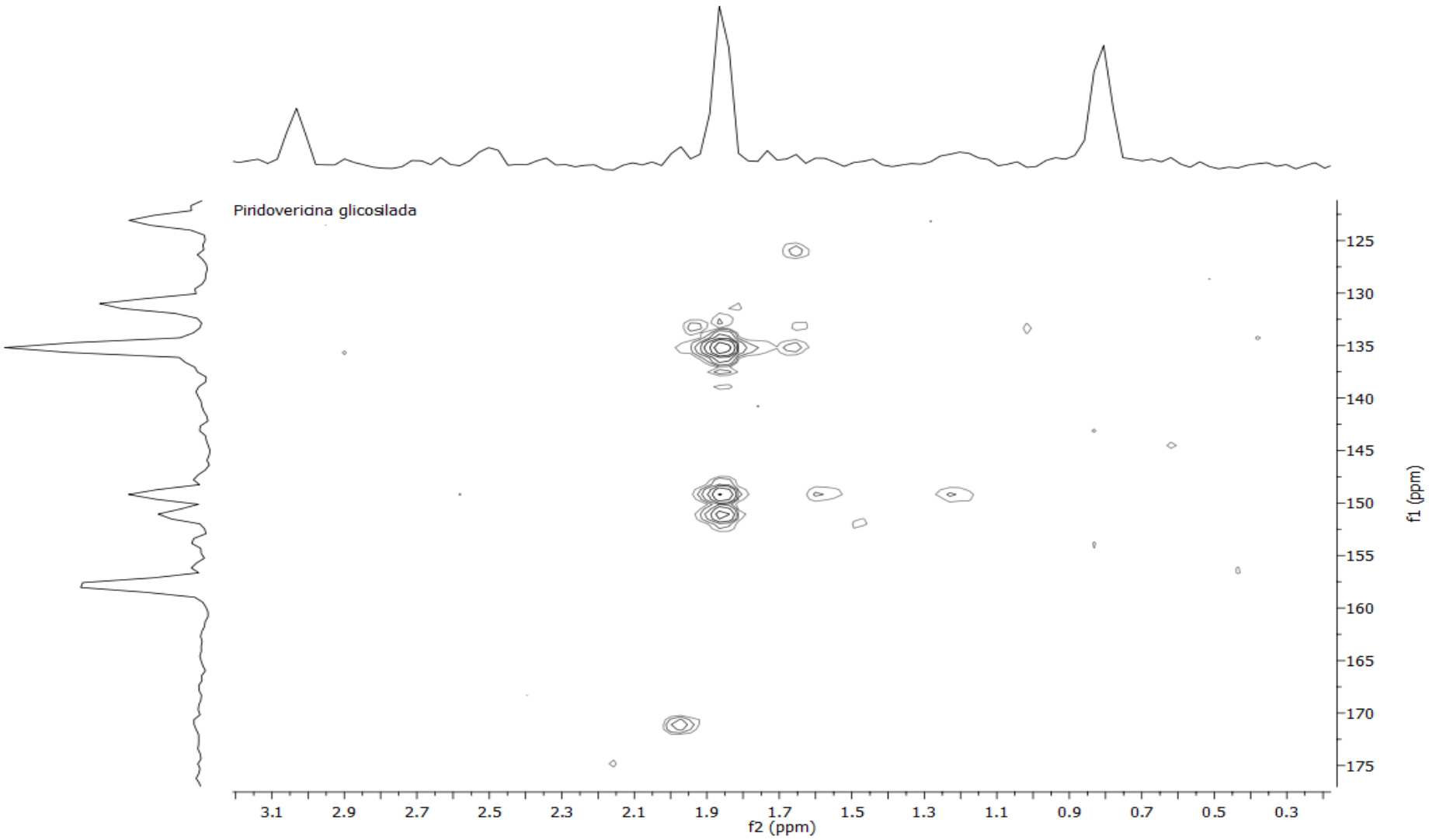


Figura 124. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO-d_6).

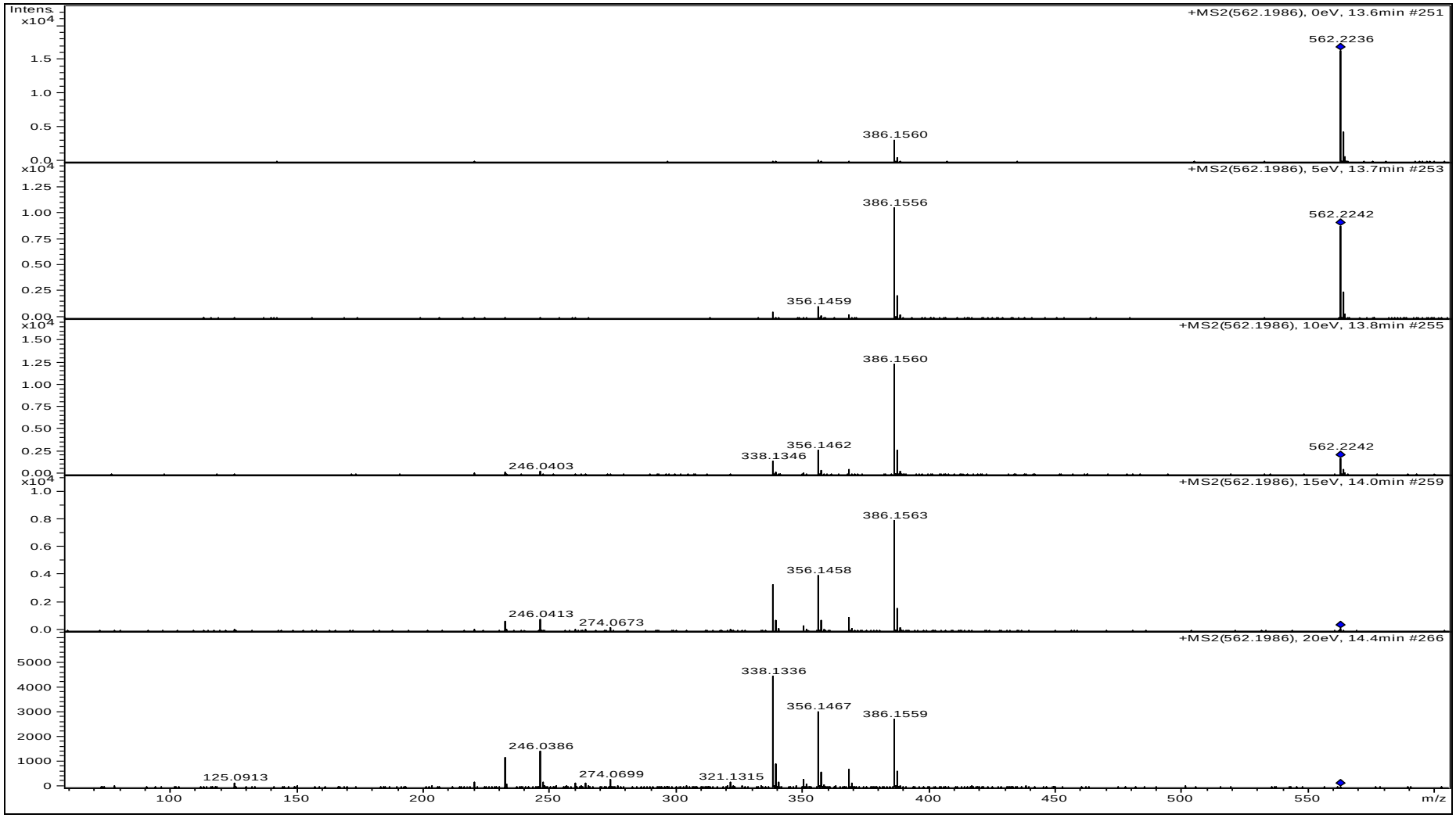


Figura 125. Espectro de massas de piridovericina-Glc.

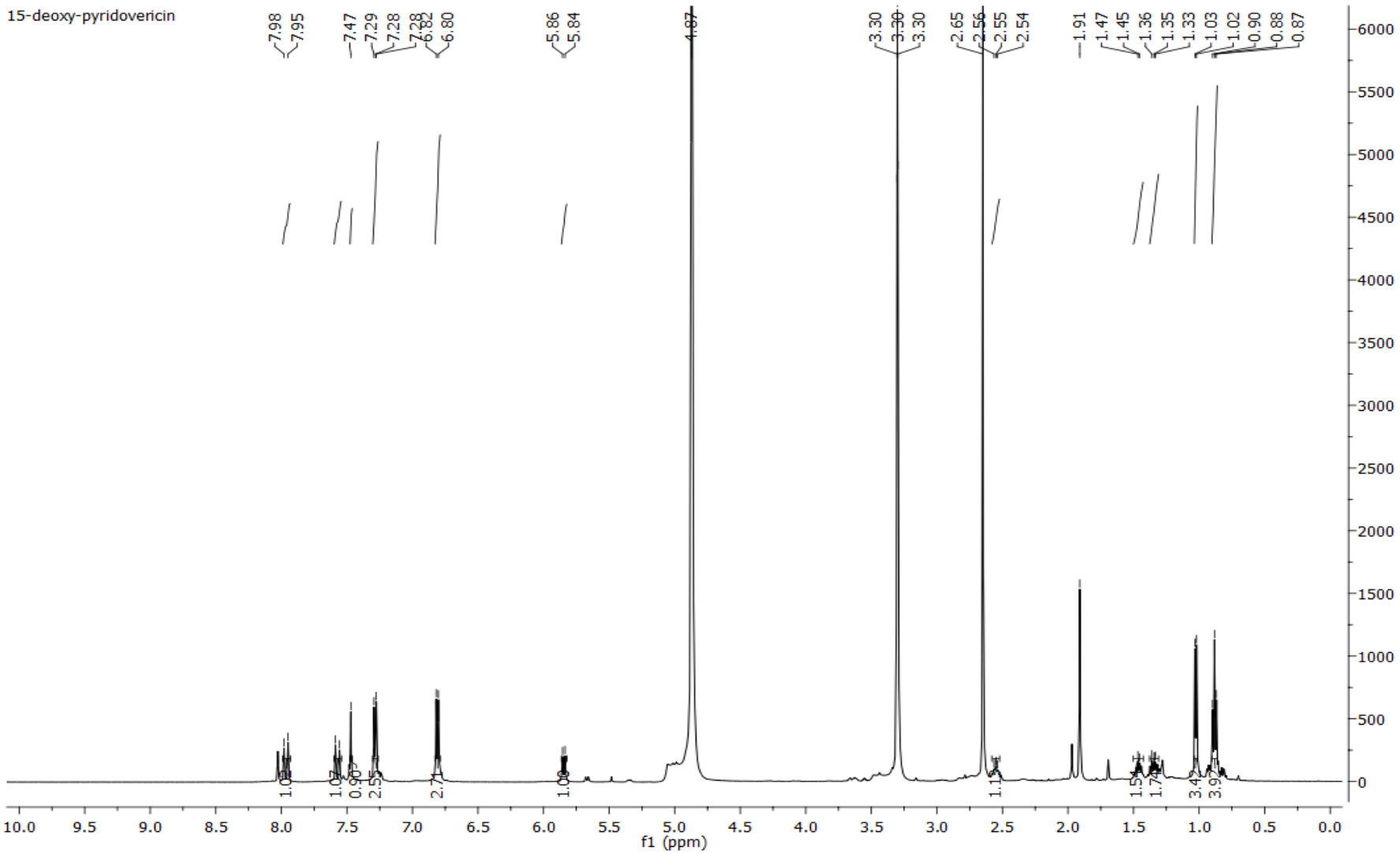


Figura 126. Espectro de RMN ^{1}H – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4 - 400 MHz).

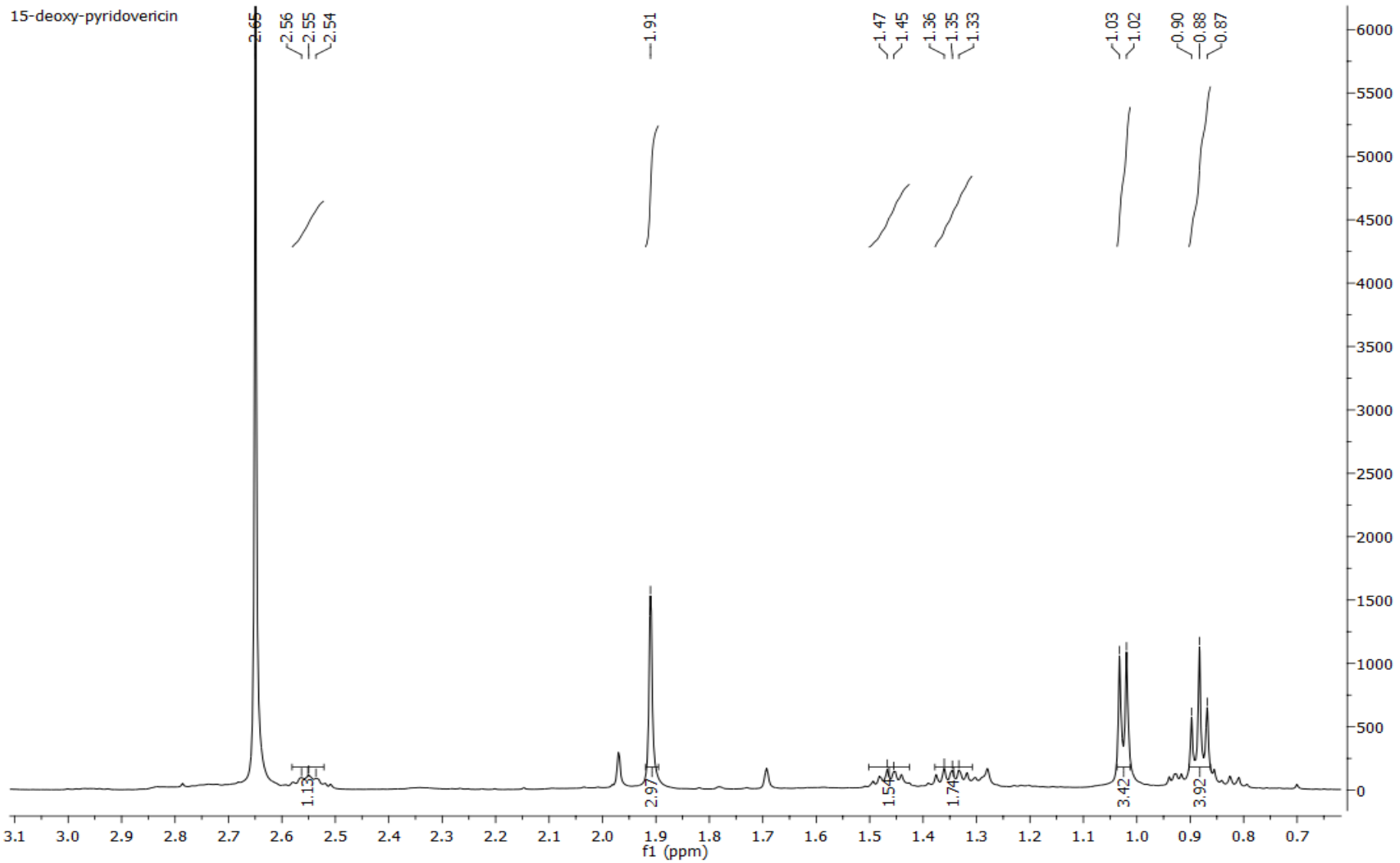


Figura 127. Espectro de RMN ^{1}H – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4 - 400 MHz).

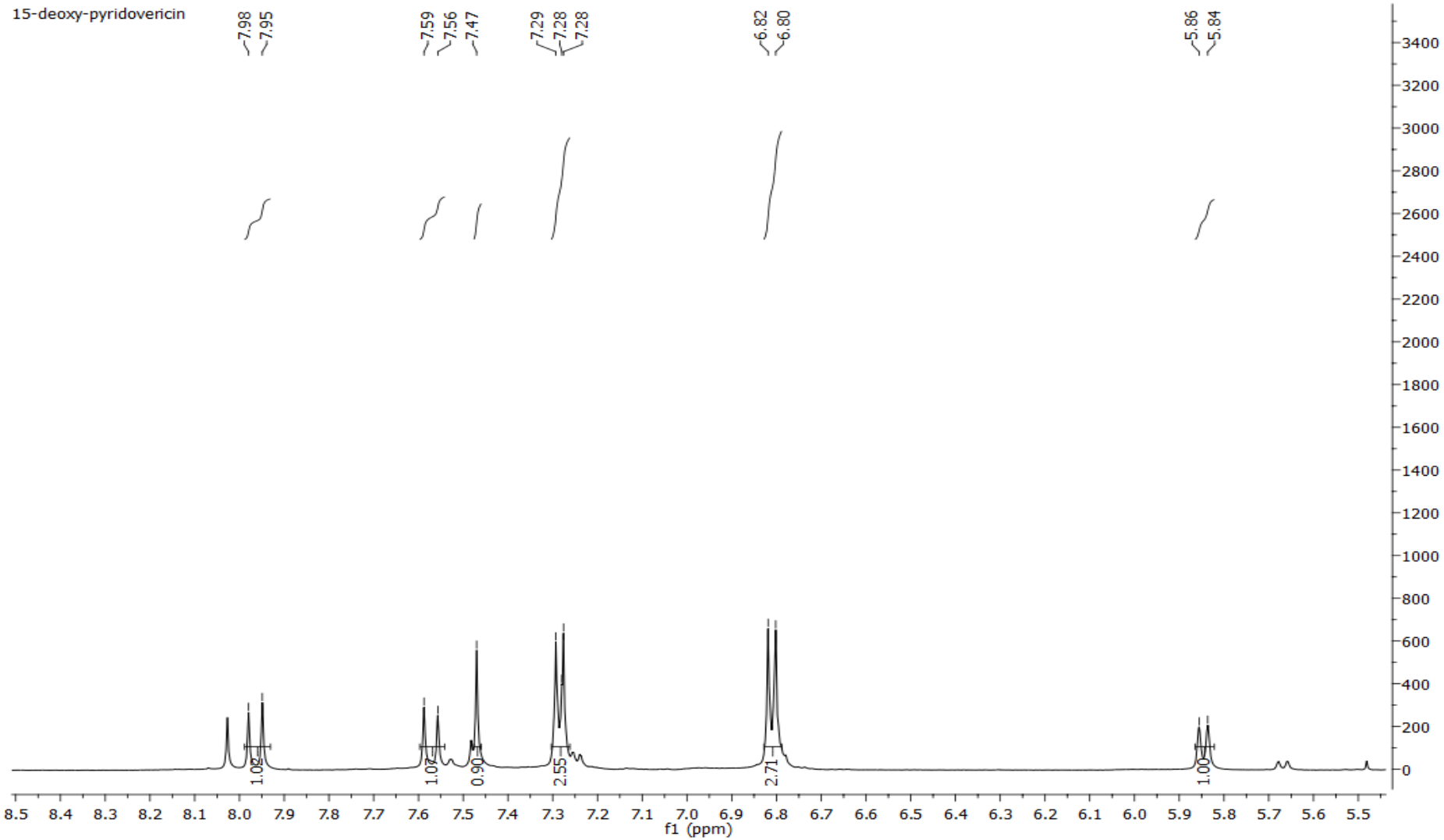


Figura 128. Espectro de RMN ^{1}H – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4 - 400 MHz).

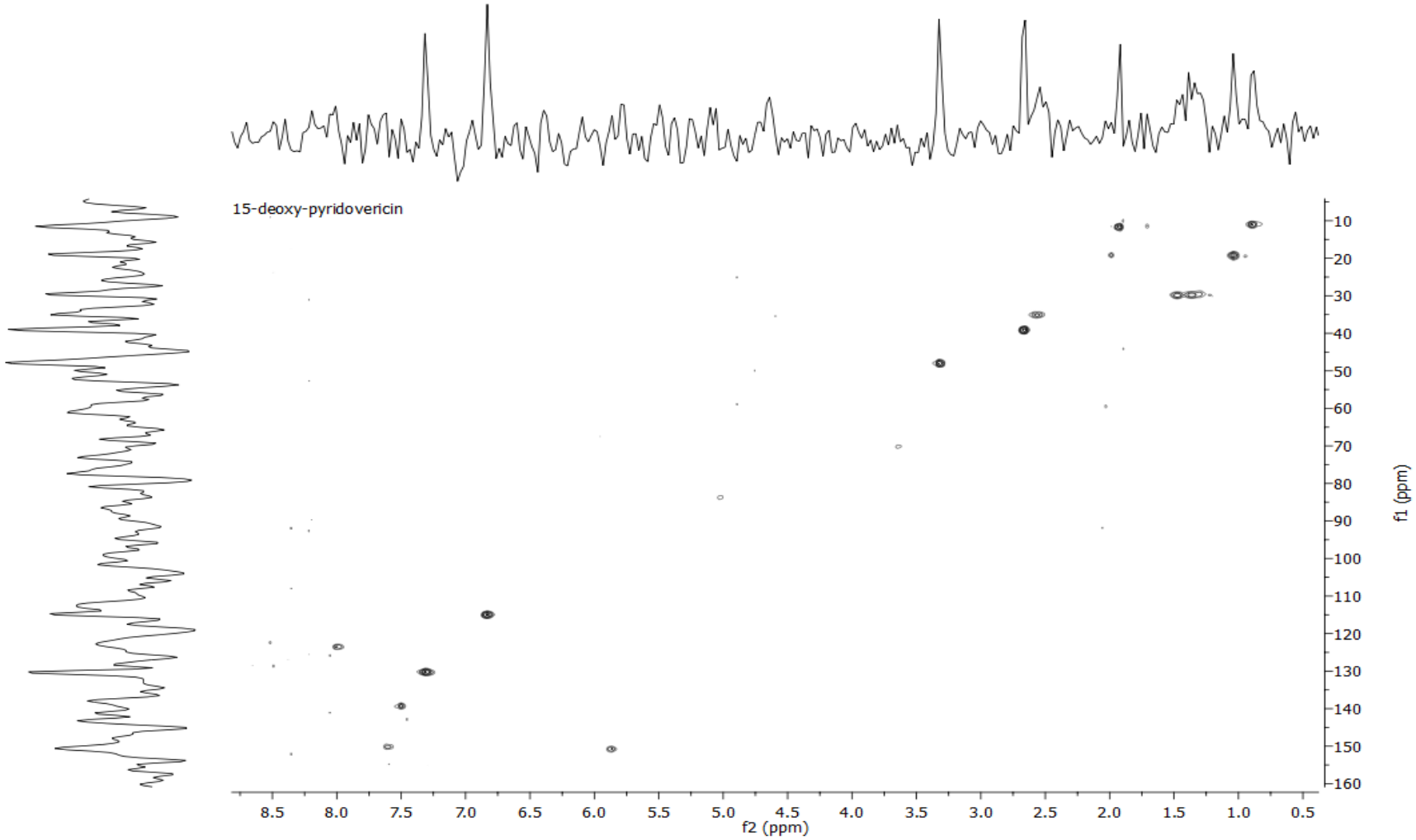


Figura 129. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).

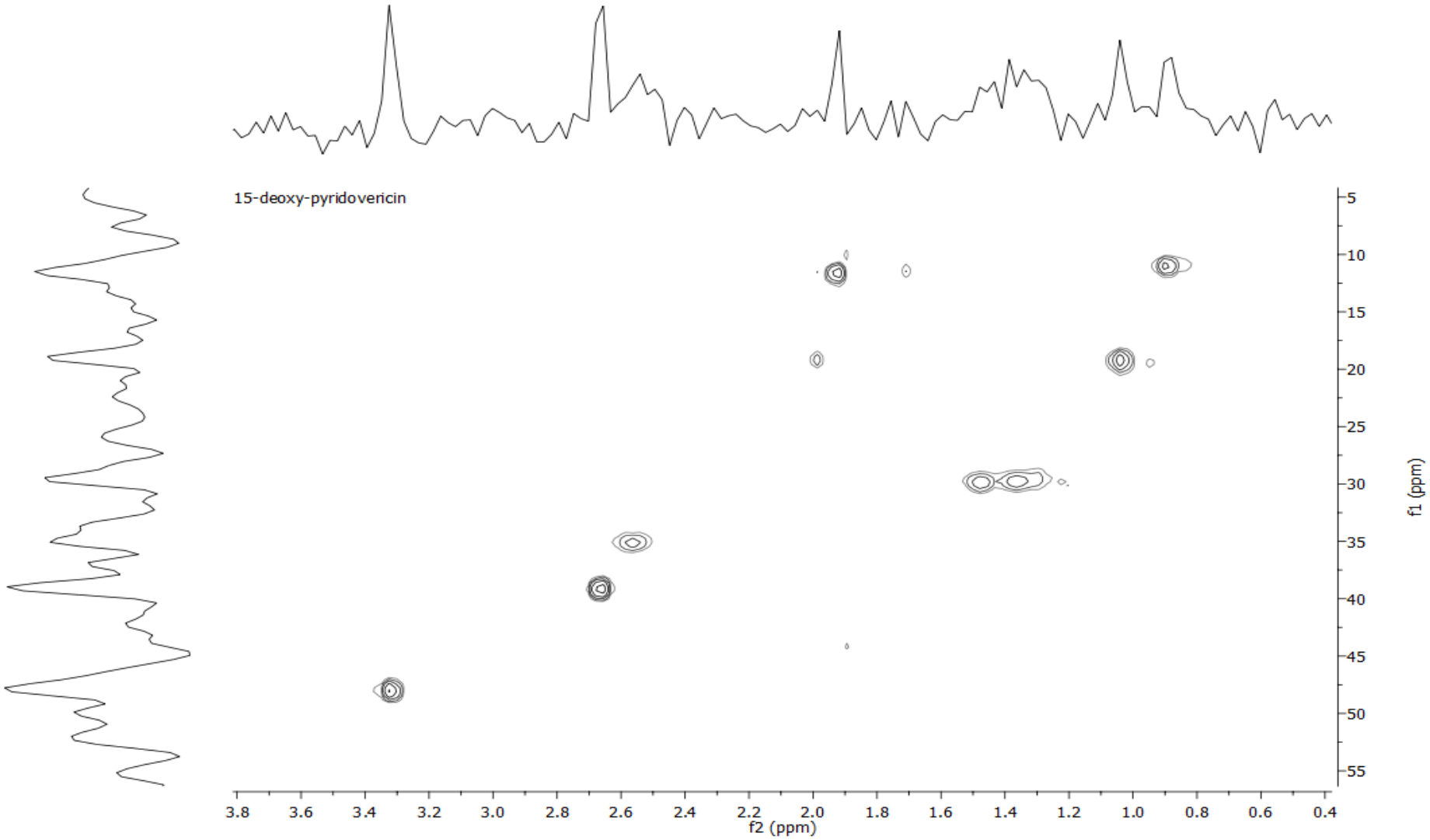


Figura 130. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).

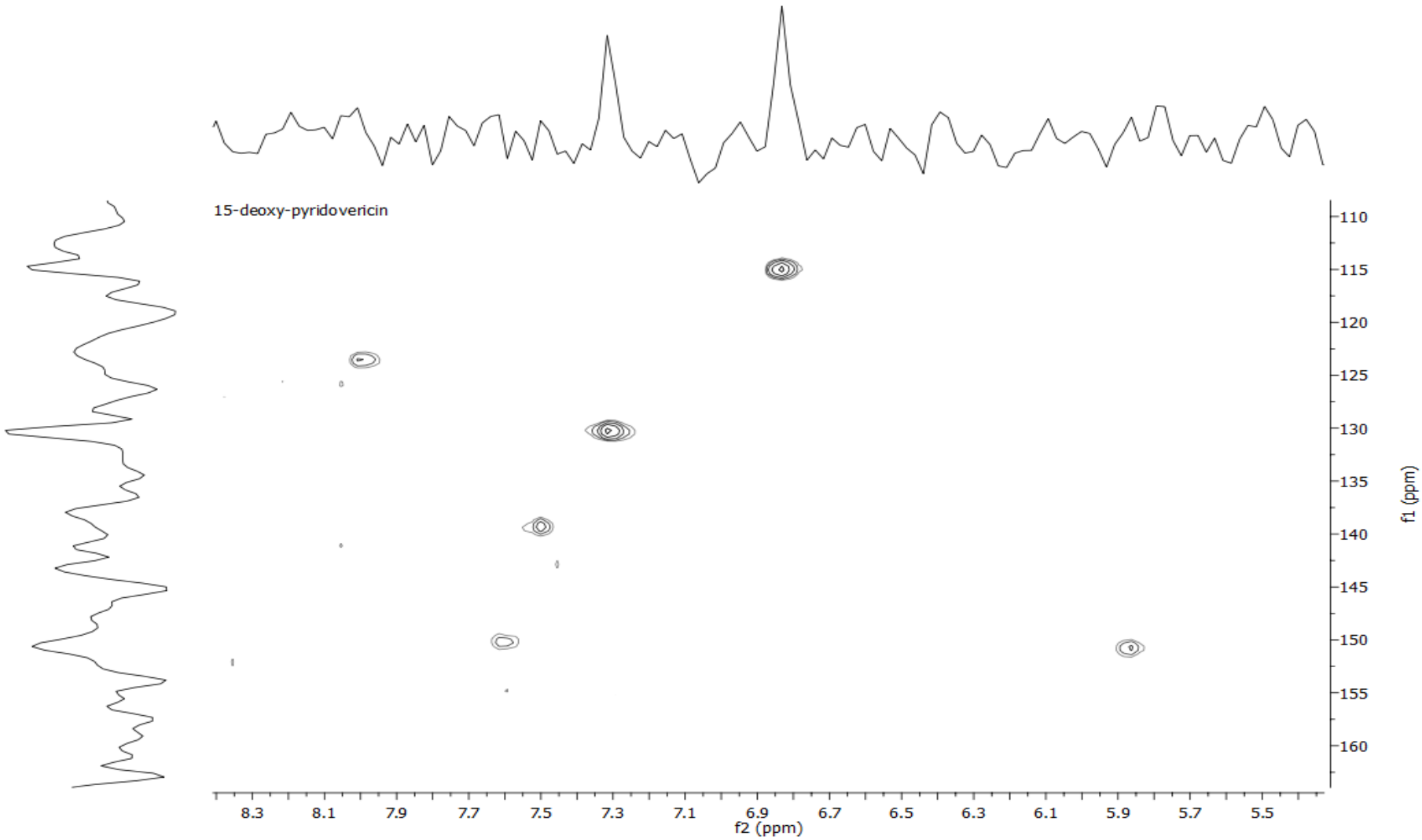


Figura 131. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).

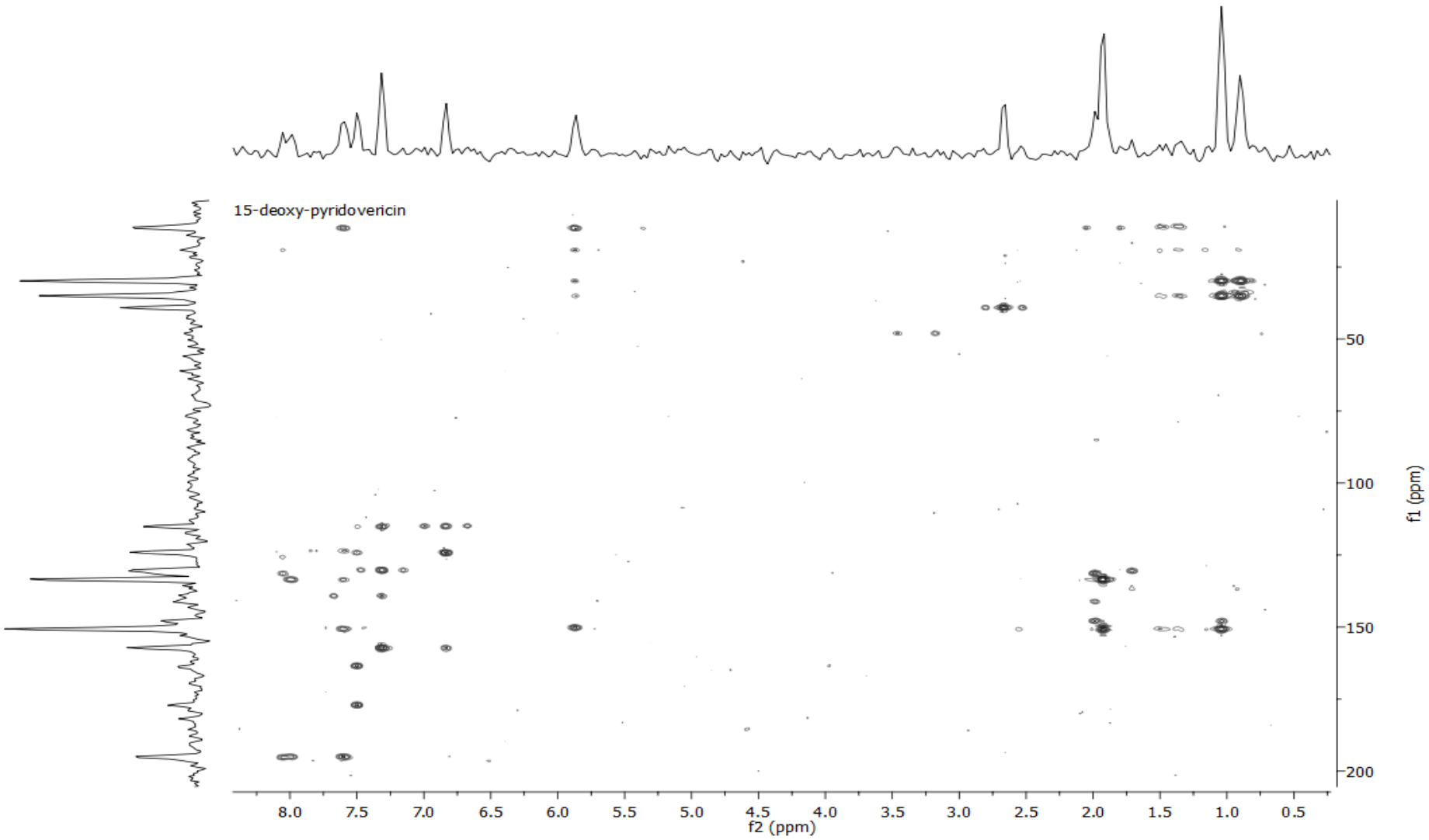


Figura 132. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).

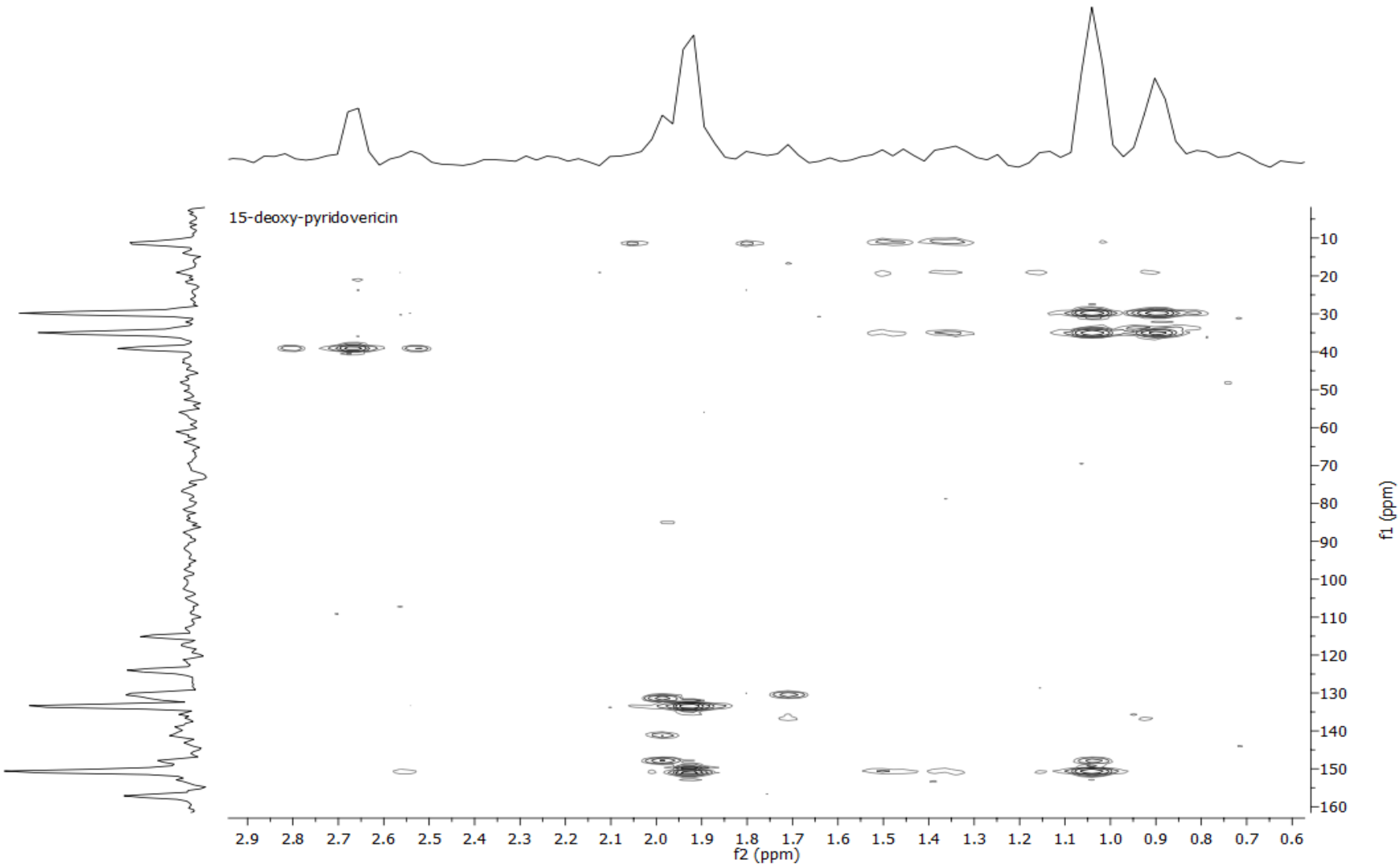


Figura 133. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).

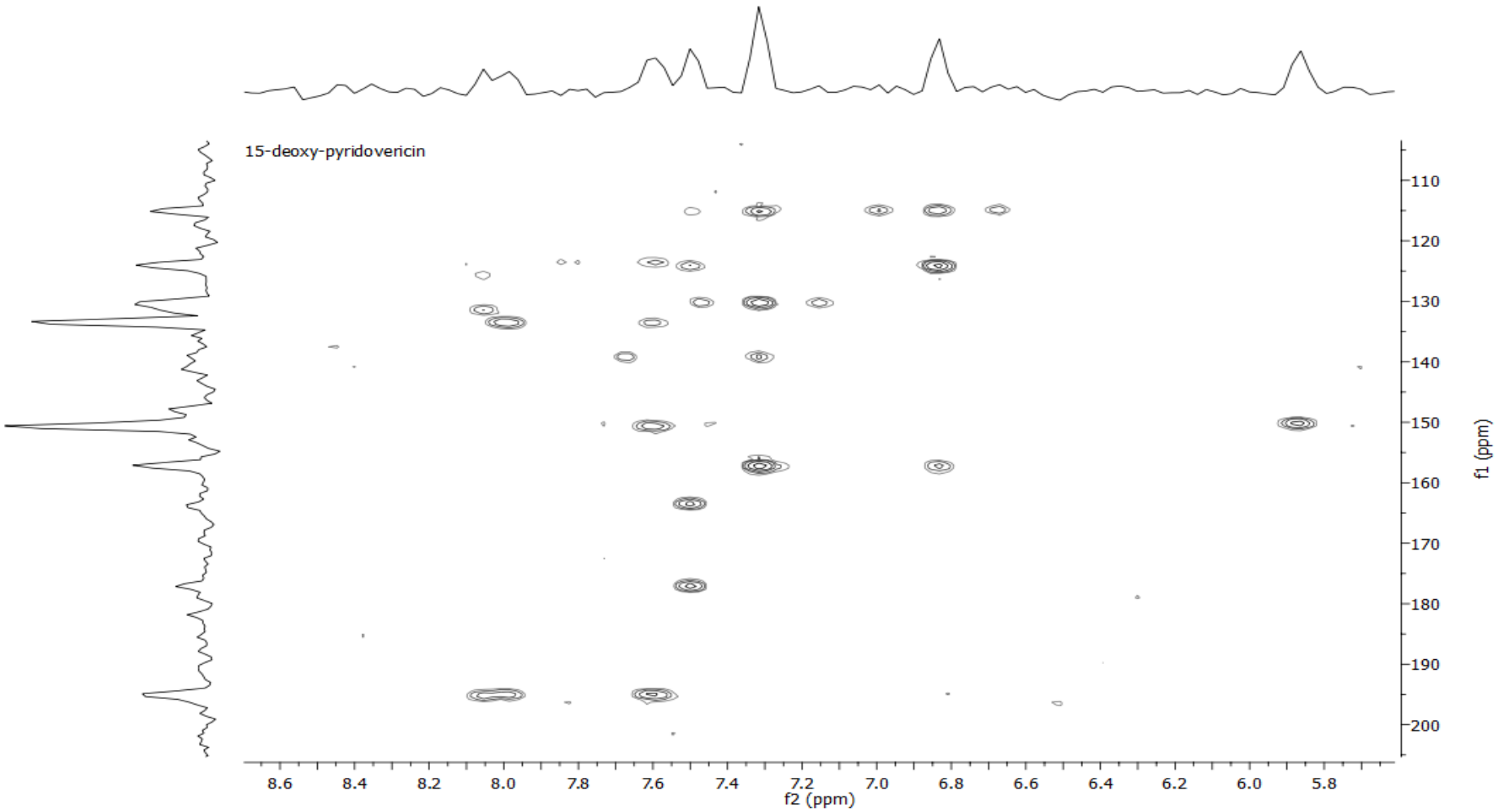


Figura 134. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-*d*)

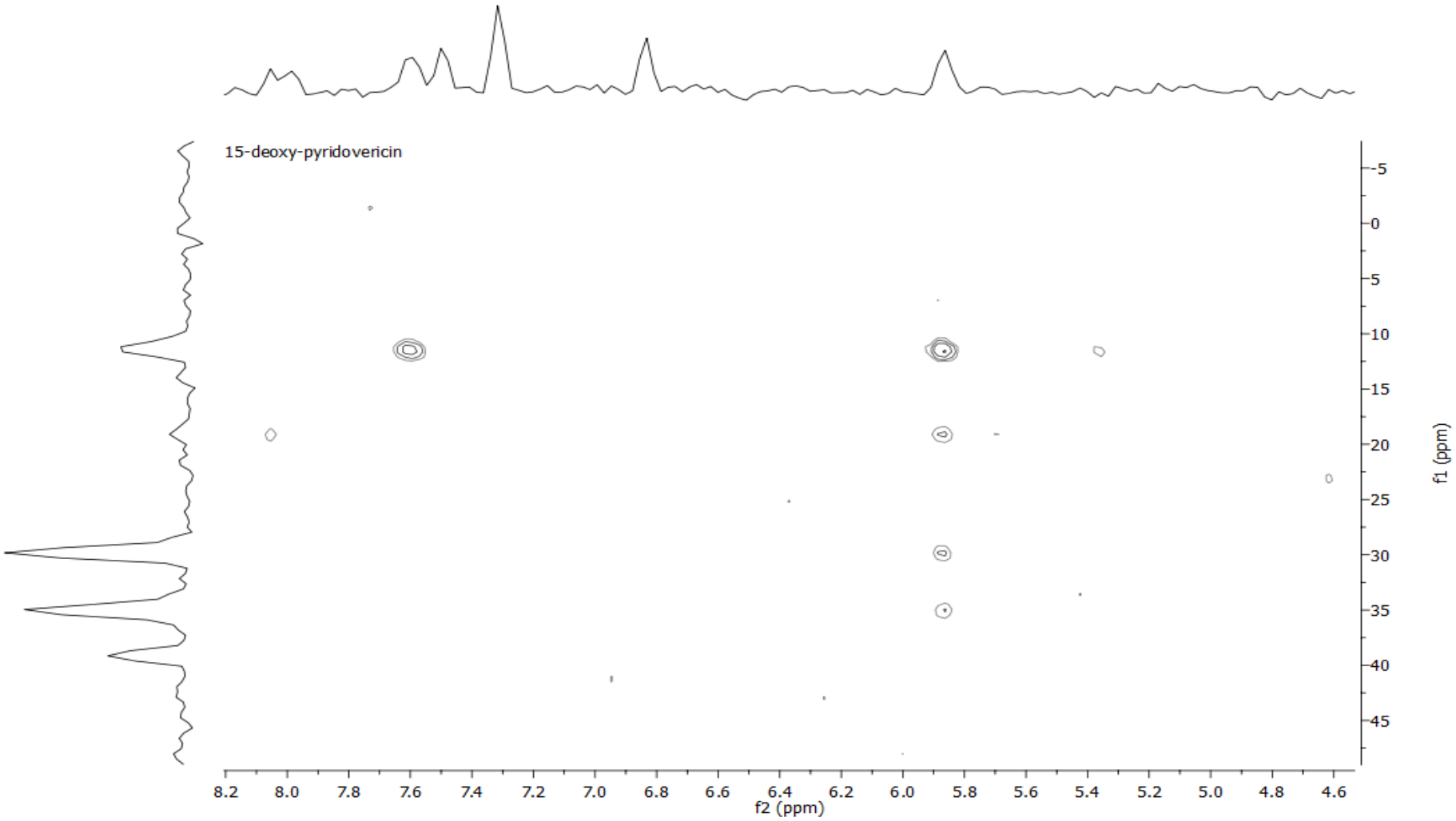


Figura 135. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD_3OD-d_4).

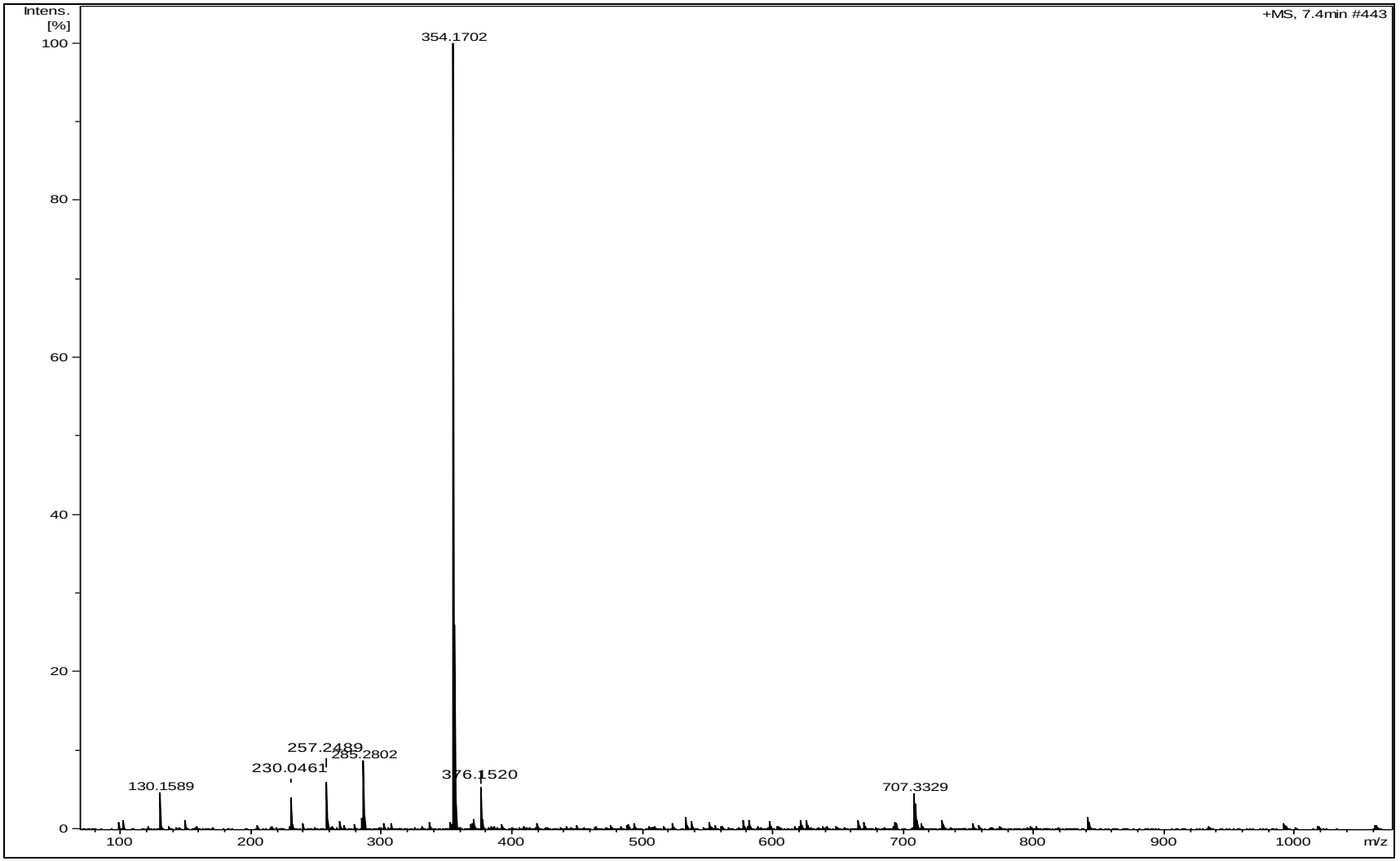


Figura 136. Espectro de massas de 15-desóxi-piridovericina

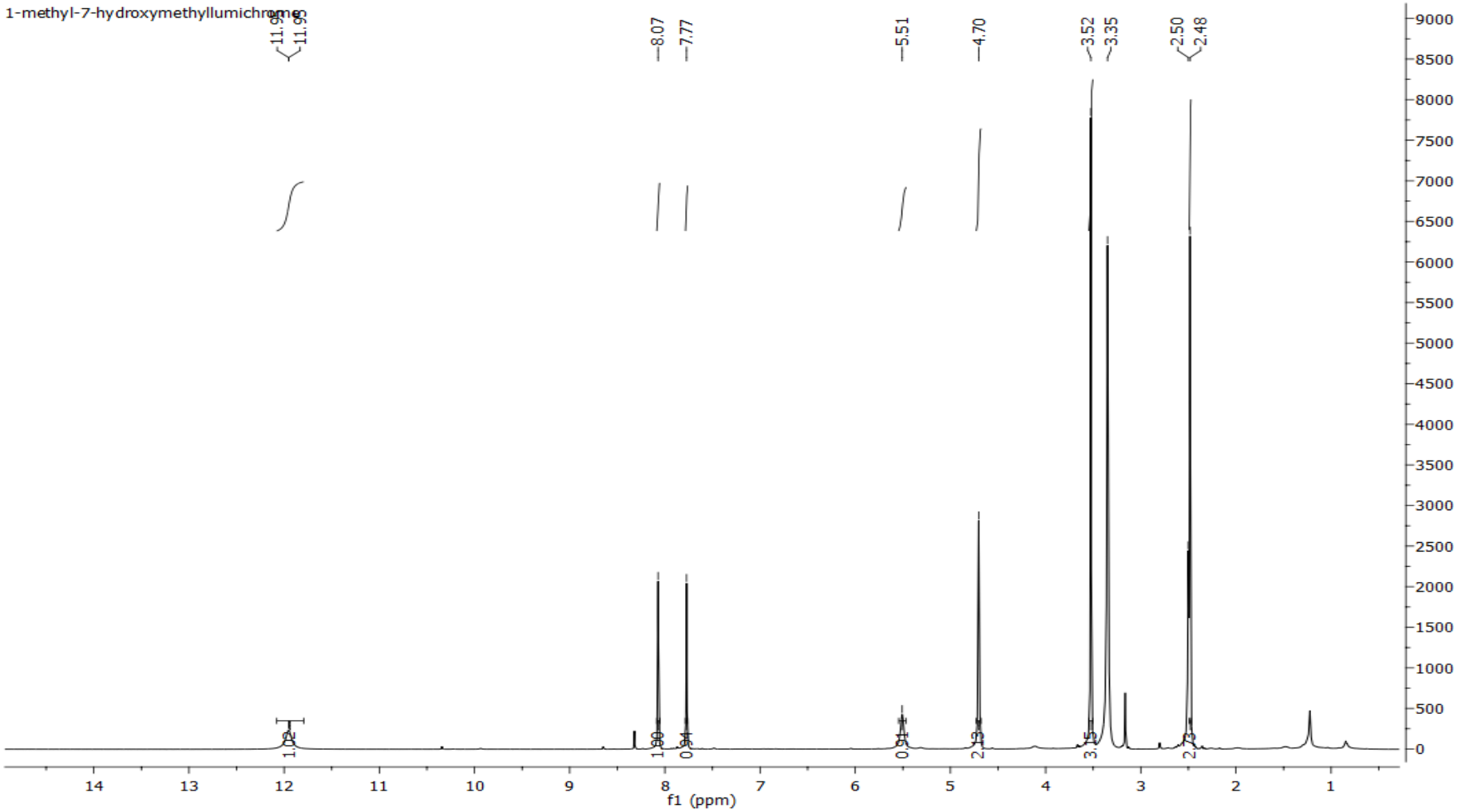


Figura 137. Espectro de RMN ^{1}H – 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 400 MHz).

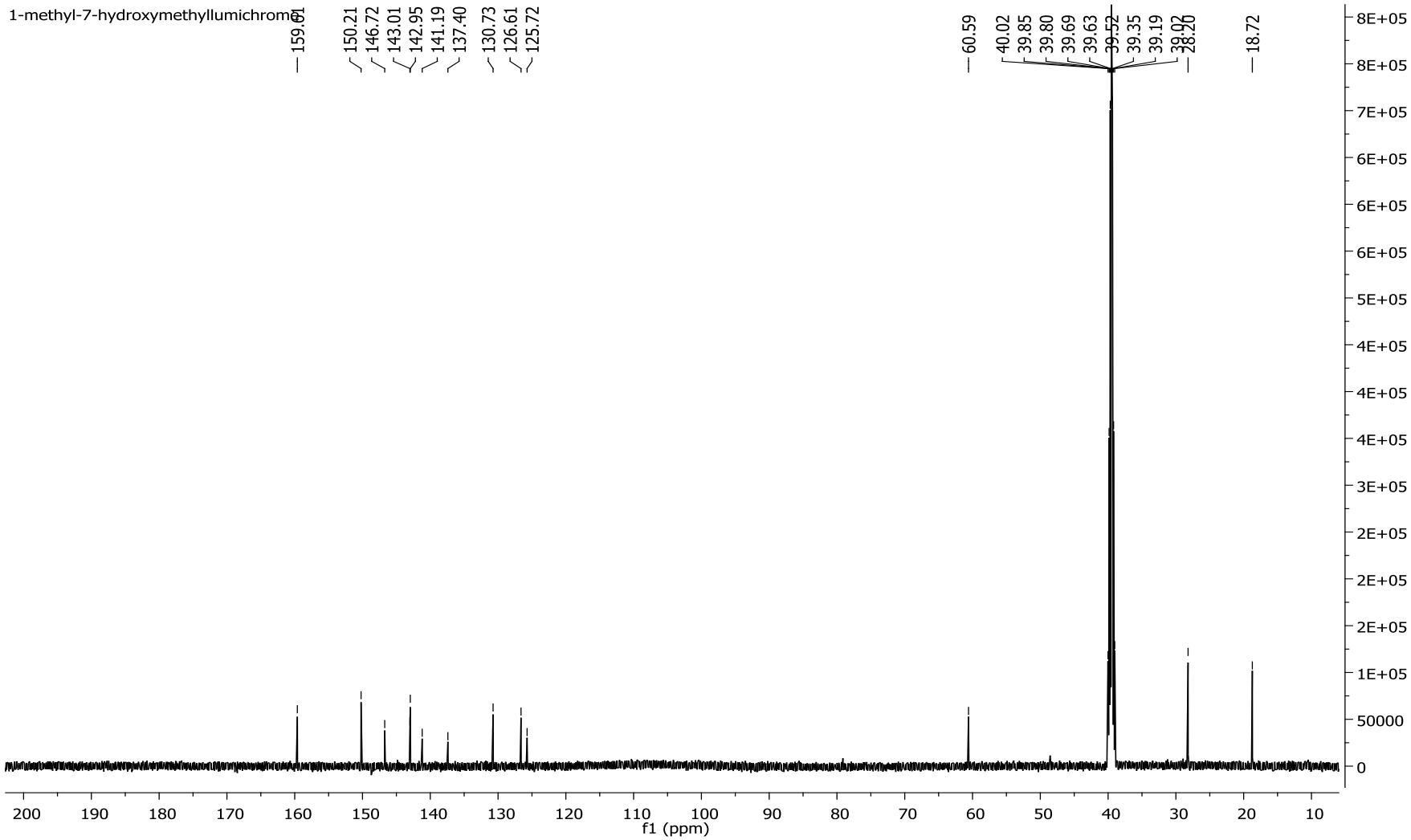


Figura 138. Espectro de RMN ^{13}C – 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 100 MHz).

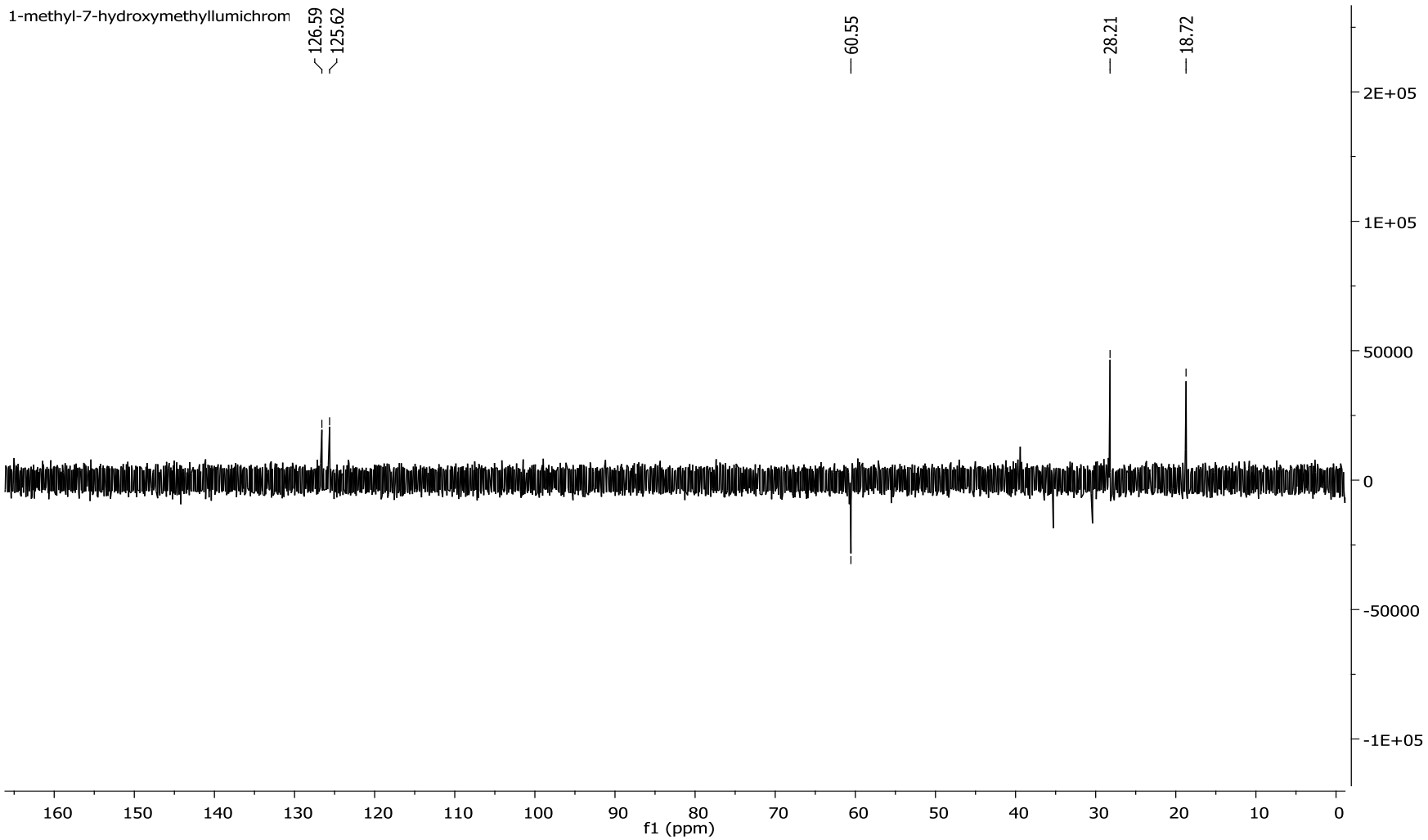


Figura 139. Espectro de RMN DEPT 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 125 MHz).

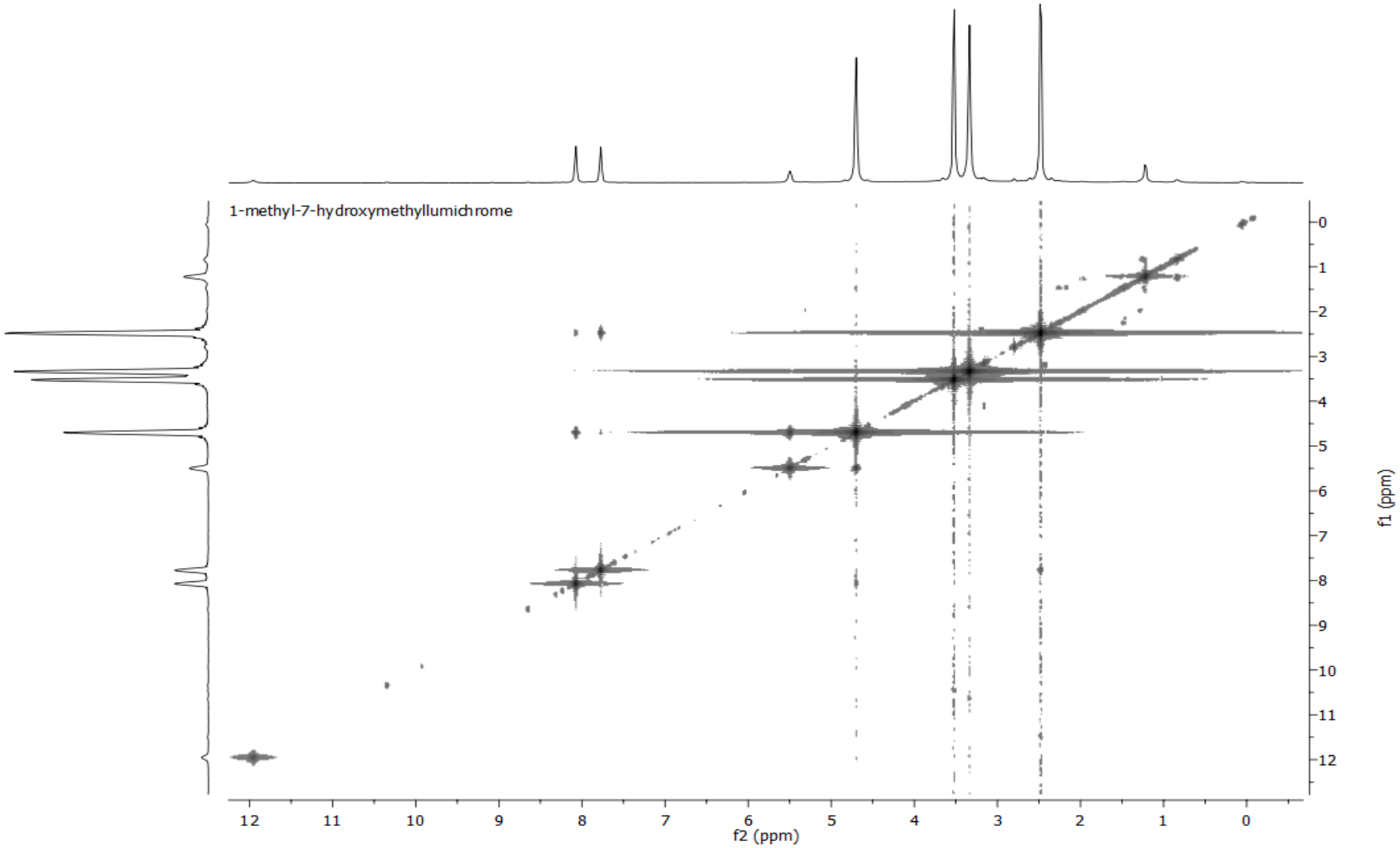


Figura 140. Mapa de contornos COSY - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 400 MHz).

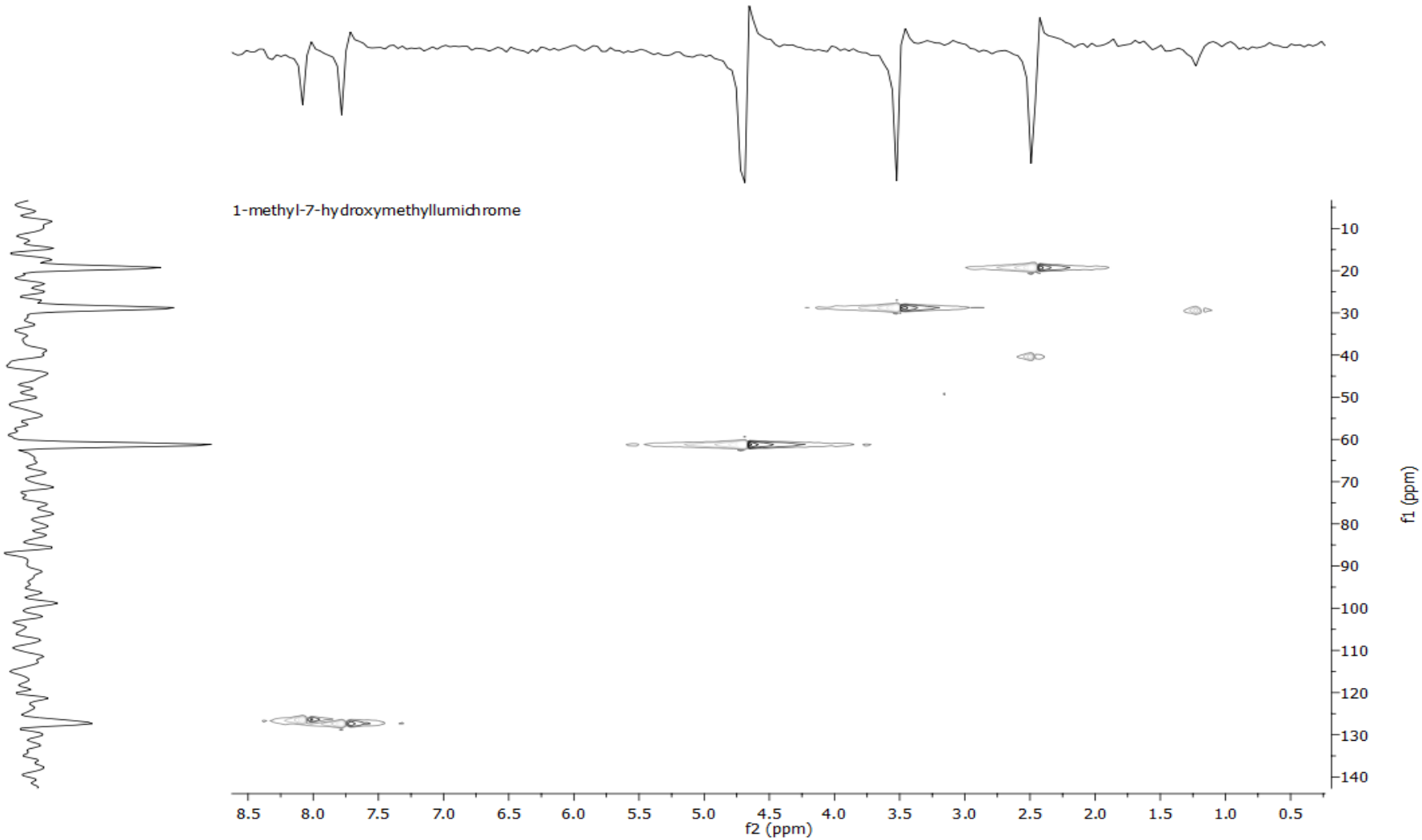


Figura 141. Mapa de contornos HMQC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6 - 400 MHz).

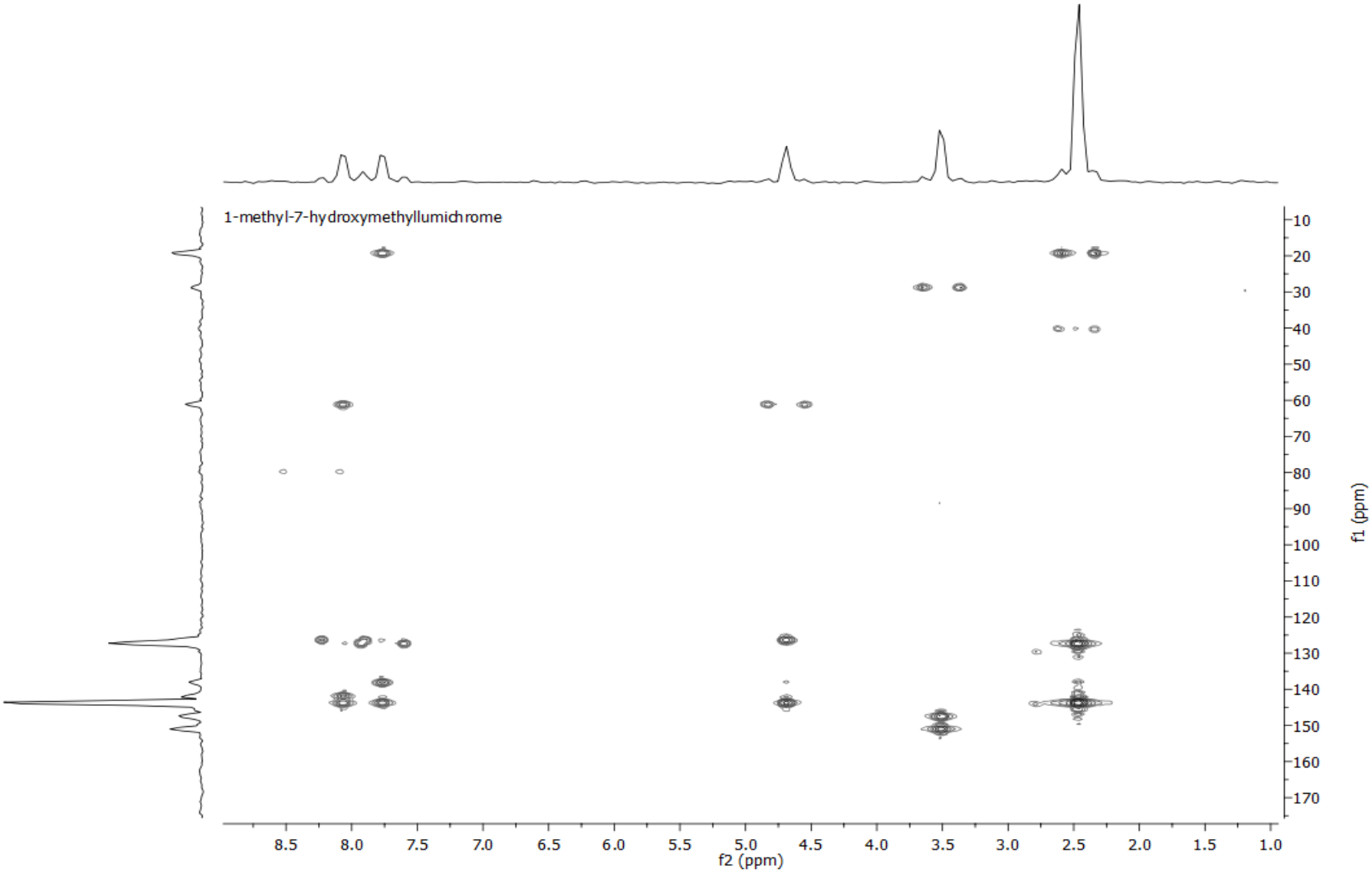


Figure 142. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6)

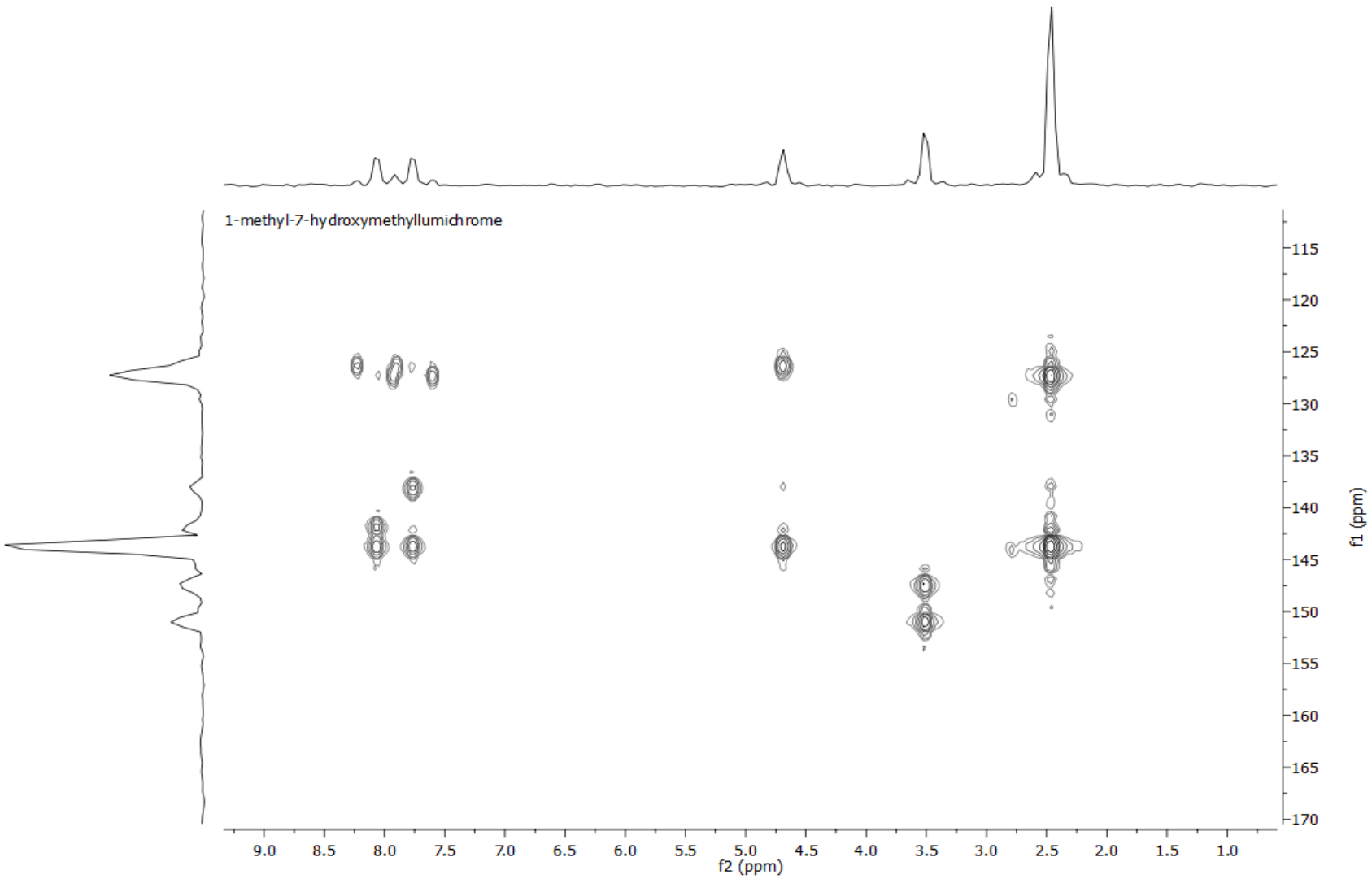


Figura 143. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6)

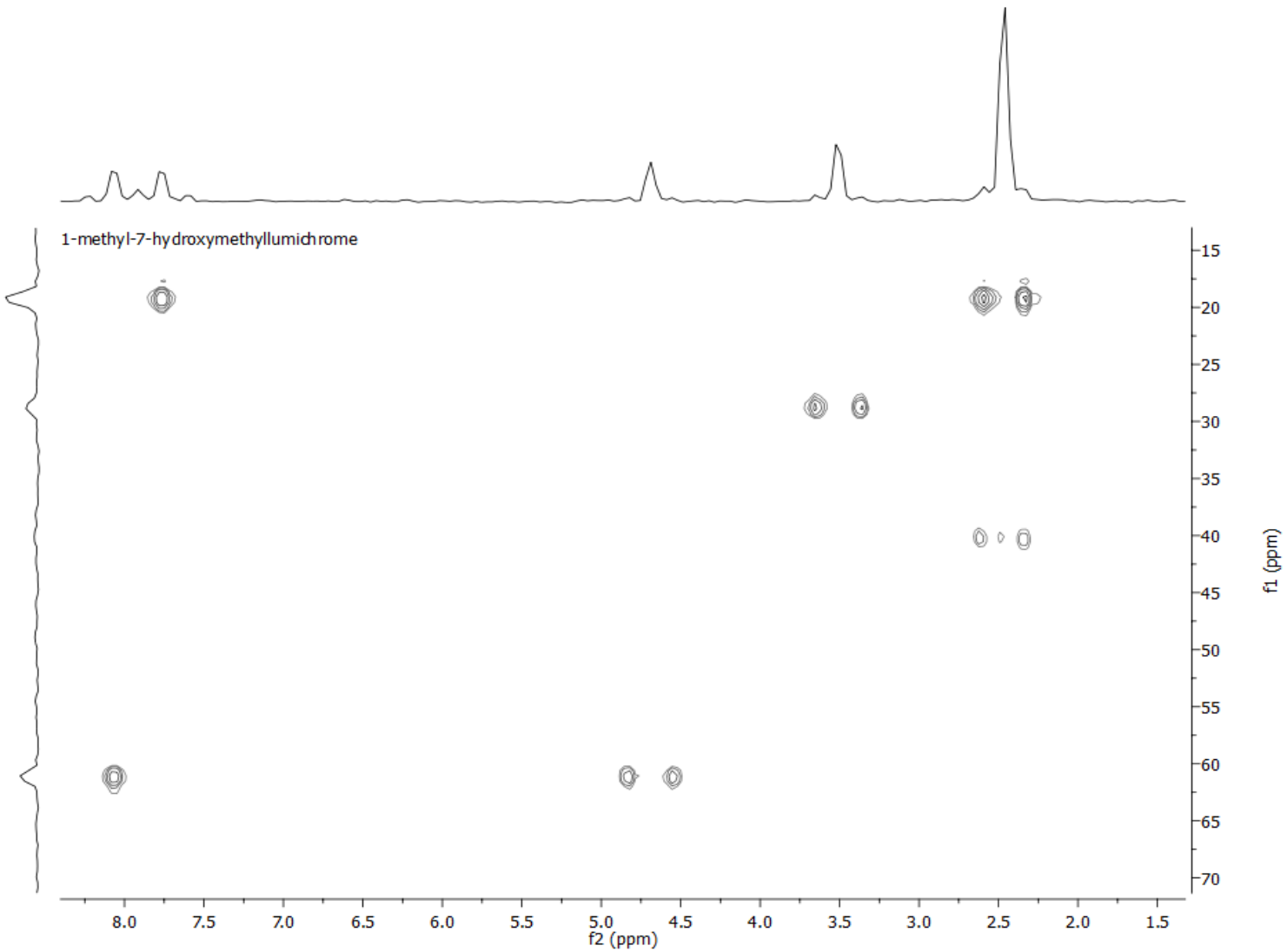


Figura 144. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO-d_6)

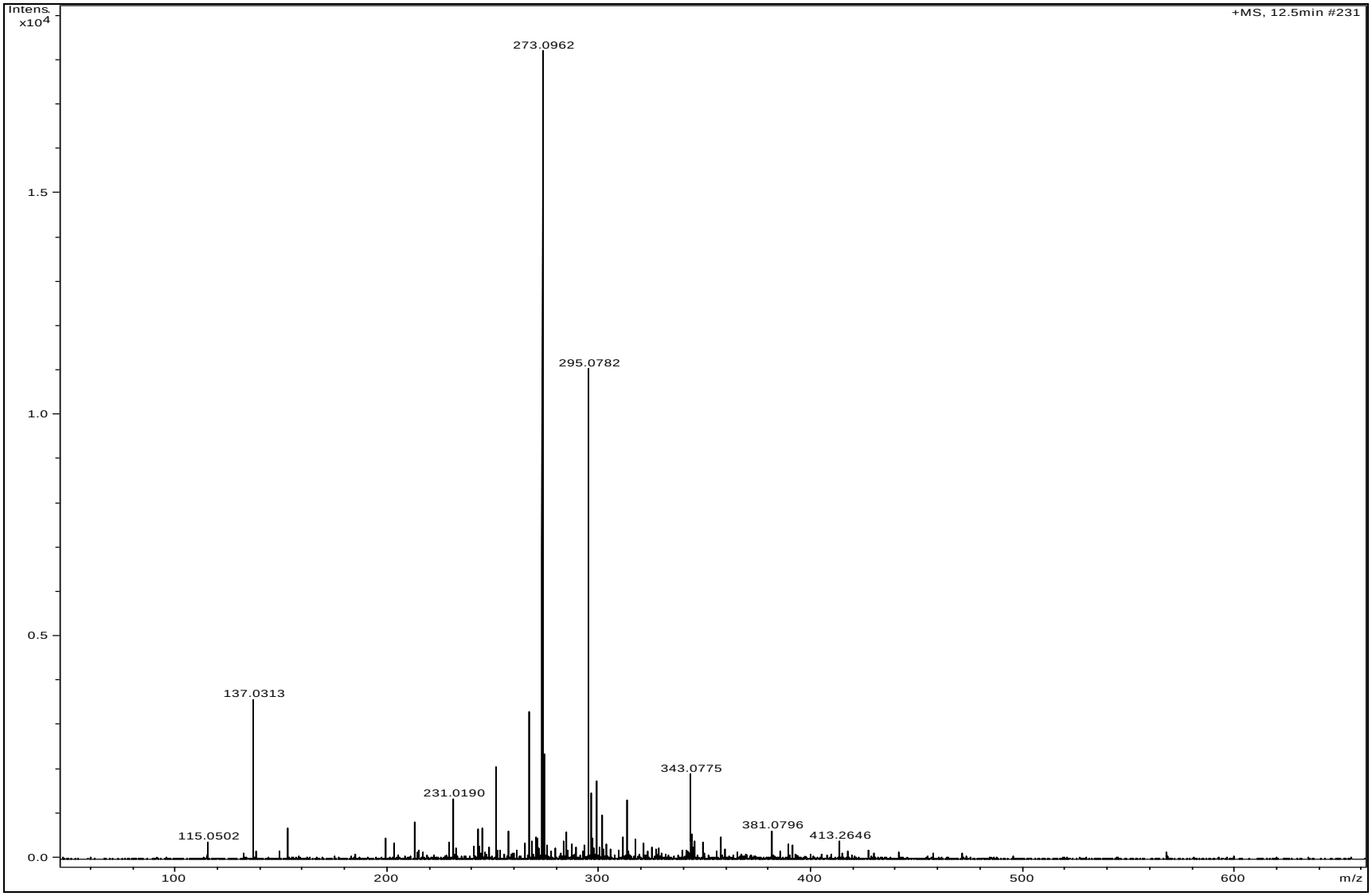


Figura 145. Espectro de massas de 1-metil-11-hidróxilumicromo.

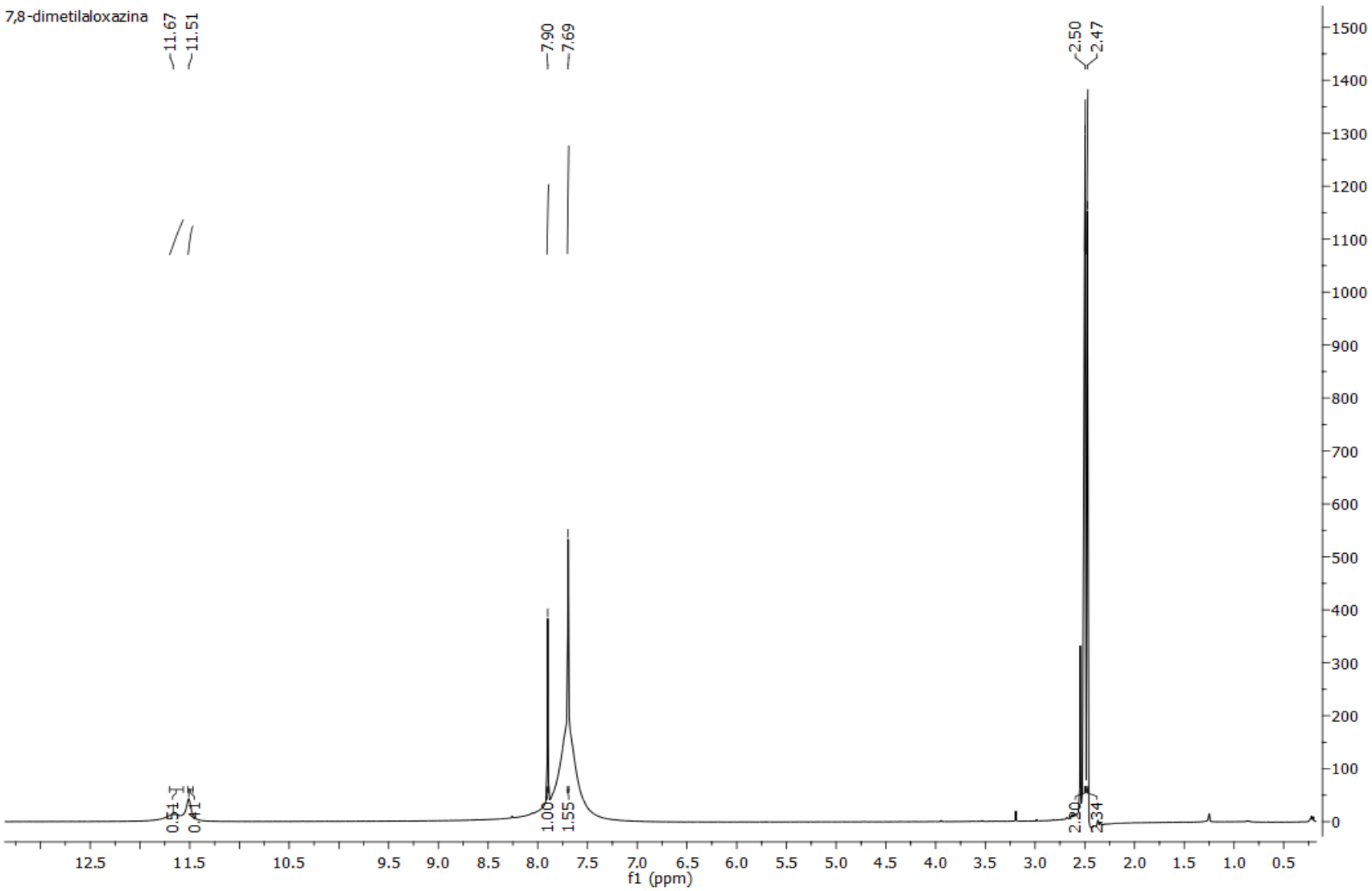


Figura 146. Espectro de RMN ^{1}H – 7,8-dimetilaloxazina (DMSO-d_6 - 400 MHz).

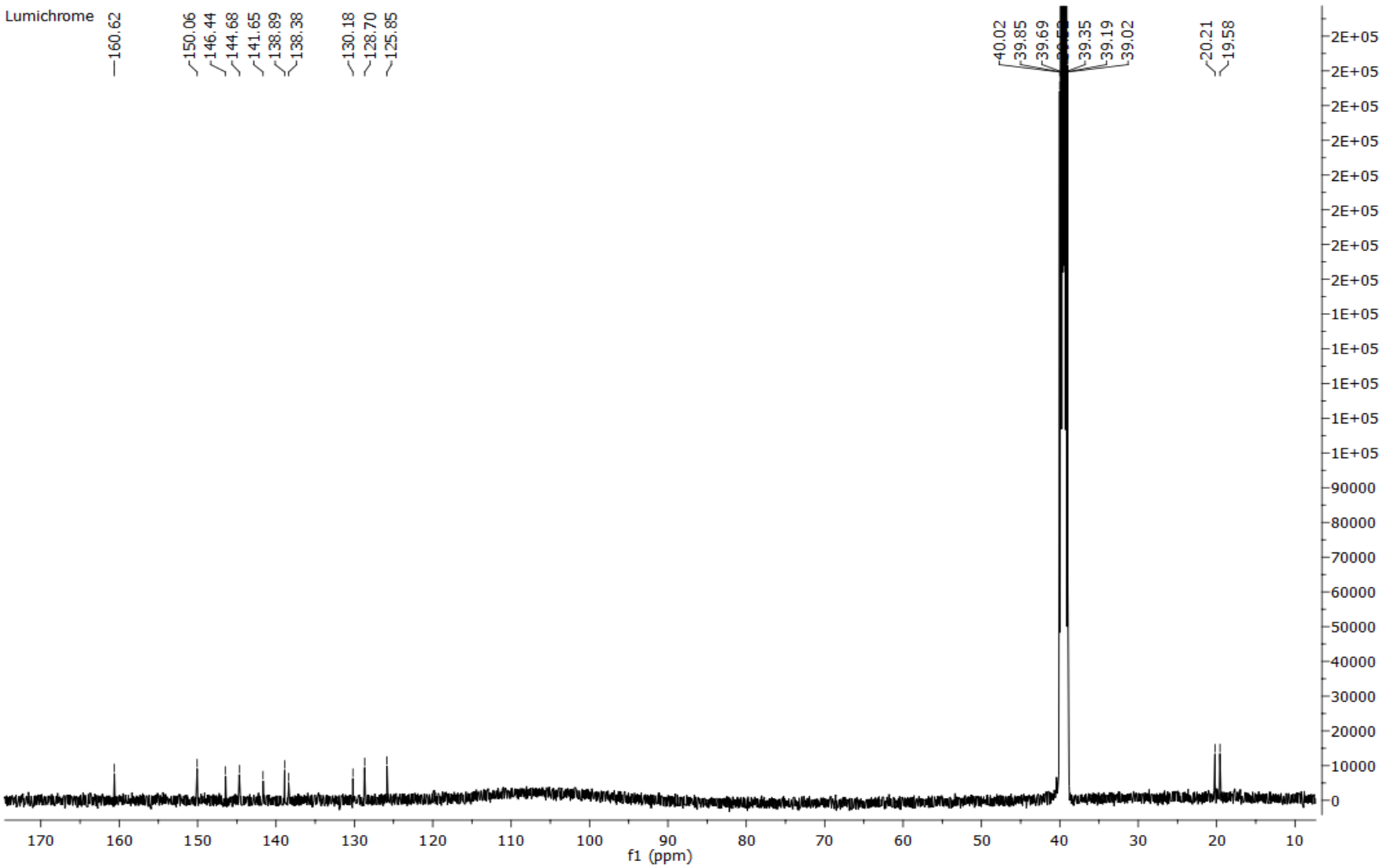


Figura 147. Espectro de RMN ^{13}C –7,8-dimetilaloxazina (DMSO-d_6 - 100 MHz).

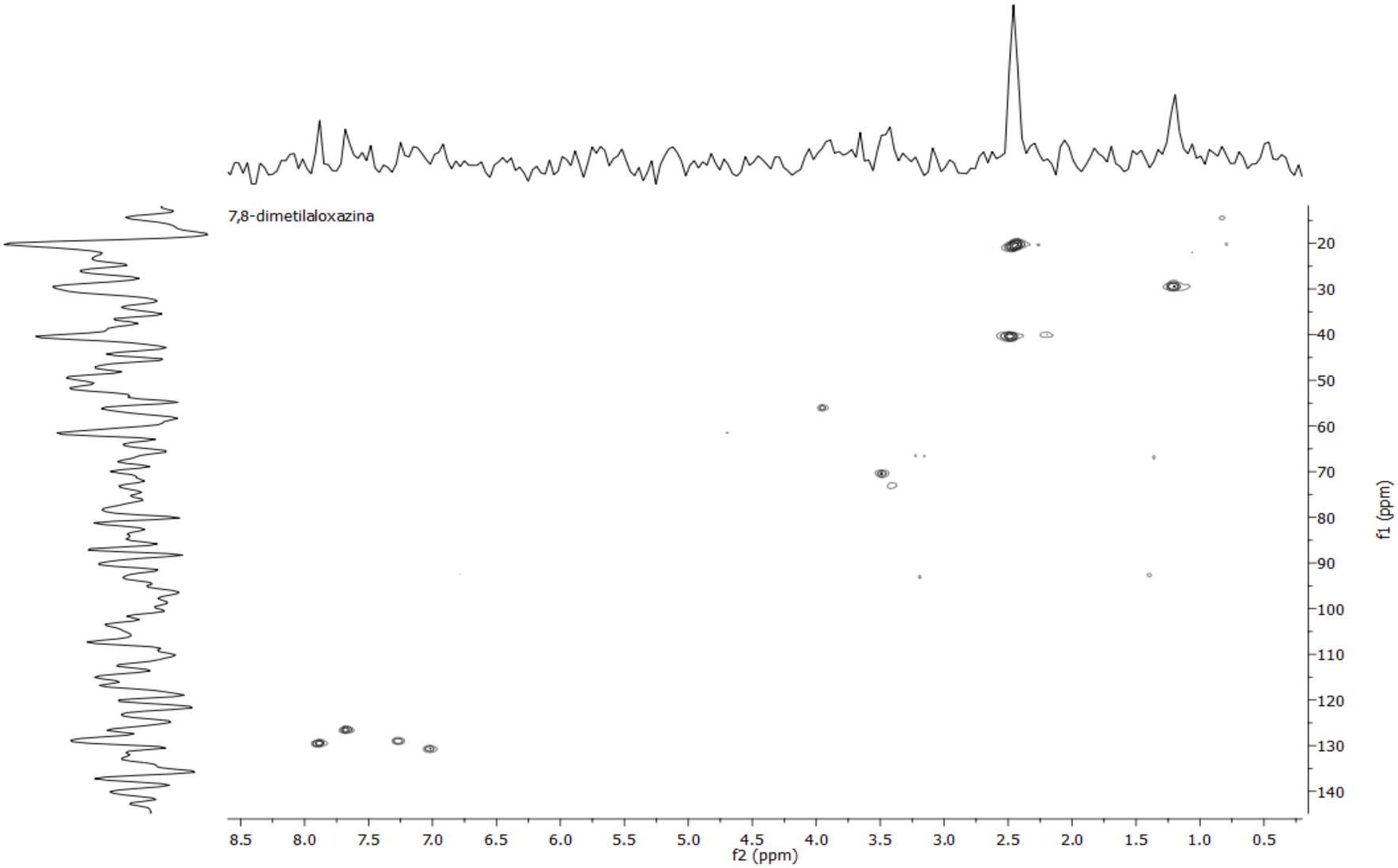


Figura 148. Mapa de contornos HMQC – 7,8-Dimetilaloxazina (DMSO-d_6).

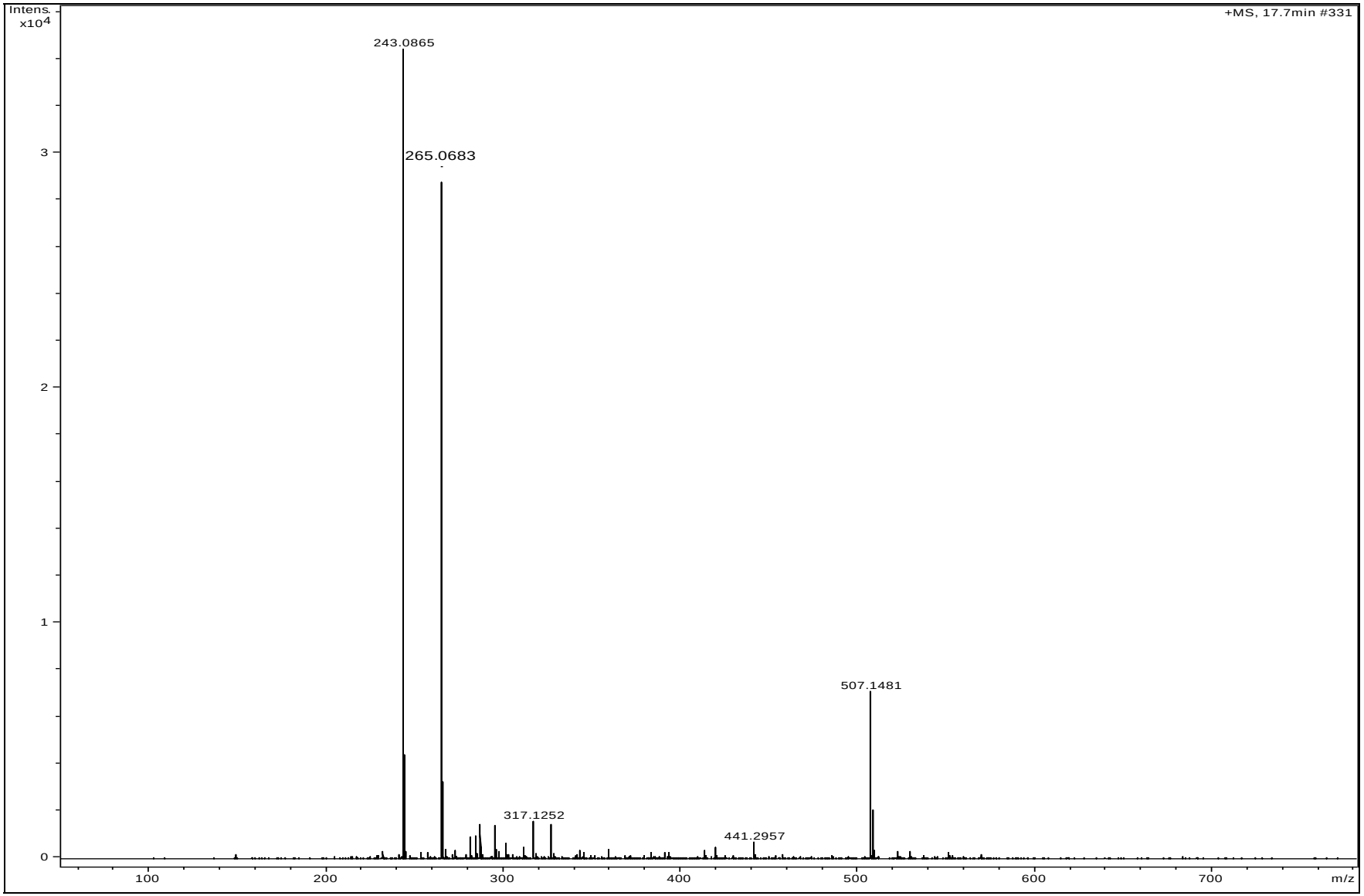


Figura 149. Espectro de massas de 7,8-dimetilaloxazina