

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ- REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo químico dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp.,  
*Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., associados à espécie vegetal *Hancornia*  
*speciosa* (Apocinaceae)

MARIO FERREIRA CONCEIÇÃO SANTOS

São Cristóvão

2011

**MARIO FERREIRA CONCEIÇÃO SANTOS**

**Estudo químico dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp.,  
*Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., associados à espécie vegetal *Hancornia  
speciosa* (Apocinaceae)**

**Dissertação apresentada ao Núcleo de pós-graduação em  
Química, da Universidade Federal de Sergipe, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva**

**São Cristóvão**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237e Santos, Mario Ferreira Conceição  
Estudo químico dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp.,  
*Guignardia* sp. *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., associados  
à espécie vegetal *Hancornia speciosa* (Apocinaceae) / Mario  
Ferreira Conceição Santos – São Cristóvão, 2011.  
177 f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-  
Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe,  
2011.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva

1. Química. 2. Fungos endofíticos. 3. *Hancornia  
speciosa*. 4. Metabolitos secundários bioativos. I. Título

CDU: 54:582.28

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ- REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**BANCA EXAMINADORA**

**Membros da comissão julgadora da defesa da dissertação de Mario Ferreira Conceição Santos apresentada ao Núcleo de pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe em 16/02/2011.**

---

**Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva (DQI - UFS)**

---

**Profa. Dra. Angela Regina Araújo (IQ - UNESP)**

---

**Prof. Dr. Damião Pergentino de Souza (DFS - UFS)**

*Dedico esta dissertação...*

*À minha mãe Maria Regina e a Irmã Roseana que sempre estiveram comigo nos momentos de alegria e tristezas me apoiando a continuar lutando.*

*Ao meu orientador prof. Dr. Geraldo Humberto Silva, pela orientação e amizade que me ajudaram a concluir este trabalho. Seus conselhos e orientações foram muitos valiosos para meu aprendizado.*

*E a toda a minha família, tios, tias primos, primas...etc...*

## *Agradeço.....*

A Deus.

A minha mãe e toda minha família.

Ao Núcleo de química da Universidade Federal de Sergipe, campus de Itabaiana pela disponibilidade do espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário de vários acontecimentos importantes para minha vida.

Ao Prof. Dr. Geraldo Humberto silva pela orientação e paciência.

Aos professores da banca examinadora que aceitaram o convite para avaliar a dissertação.

A todos os docentes e técnicos do núcleo de química da Universidade Federal de Sergipe, campus Itabaiana.

Ao aluno de iniciação científica Edvaldo colaboração no laboratório.

As amigas Roberta, Jeisivânia e Gilenilde pela convivência edificante e colaboração no laboratório.

Ao Núcleo de pós-graduação em química da UFS.

A Nailson e a todos os colegas e amigos do mestrado em química da universidade Federal de Sergipe pela convivência edificante.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e ao instituto de química da UNESP, campus Araraquara, pela realização dos espectros de RMN e espectros de massas.

A Nazaré pelos diversos conselhos e apoio.

Em especial a Ana Alice Lima e a Cristiana Santos pela convivência edificante, paciência, apoio e amizade.

A FAPITEC pela bolsa concedida e à CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Depende de você, lutar, trabalhar, acreditar que você pode e ir até o final.”*

*(Airton Senna)*

*"O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência".*

*(Henry Ford)*

## **SUMÁRIO**

Lista de tabelas	i
Lista de figuras	iii
Lista de abreviaturas e símbolos	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fungos endofíticos e efeitos em seu hospedeiro	2
1.1.1 Fungos endofíticos como agente promotor do crescimento do seu hospedeiro	3
1.1.2 Fungos endofíticos antagônicos a insetos	4
1.1.3 Fungos endofíticos antagônicos a fitopatogênicos	5
1.1.4 Fungos endofíticos como patógenos de espécies vegetais	6
1.2 Diversidade metabólica dos fungos endofíticos	8
1.2.1 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana	8
1.2.2 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade citotóxica	11
1.2.3 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade antiparasitária	13
1.2.4 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase	13
1.2.5 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade antioxidante	14
1.2.6 Metabólitos isolados de fungos endofíticos que também são produzidos por espécies vegetais	16
1.3 Espécie vegetal hospedeira	18
1.3.1 Estudo químico de <i>Hancornia speciosa</i>	18
1.4 Os fungos <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Phomopsis</i> sp., e <i>Guignardia</i> sp., submetidos ao estudo químico.	19
1.4.1 Os fungos <i>Aspergillus</i> sp e <i>Aspergillus niger</i> isolados de <i>Hancornia speciosa</i>	19
1.4.1.1 O gênero <i>Aspergillus</i>	19
1.4.1.2 Diversidade Química do Gênero <i>Aspergillus</i>	20

1.4.2	Fungos do gênero <i>Phomopsis</i>	22
1.4.2.1	Diversidade química do gênero <i>Phomopsis</i>	22
1.4.3	Fungos do gênero <i>Guignardia</i>	24
1.4.3.1	Diversidade química do gênero <i>Guignardia</i>	25
2.	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Materiais, instrumentos e reagentes utilizados	31
3.1.1	Meios de culturas	31
3.1.2	Meio de cultura líquido	31
3.1.3	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	31
3.1.4	Teste qualitativo para detecção de atividade antioxidante com DPPH	31
3.1.5	Cromatografia em coluna (CC)	31
3.1.6	Sílica C-18	31
3.1.7	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	32
3.1.8	Padrão de ácido kójico usado	32
3.1.9	As concentração do solvente AcOEt	32
3.1.10	Solventes utilizados	32
3.1.10.1	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C)	33
3.1.10.2	Espectrômetro de massas	33
3.1.10.3	Outros equipamentos	33
3.2	Métodos	34
3.2.1	Seleção e coleta do material vegetal	34
3.2.2	Isolamento dos fungos endofíticos	34
3.2.3	Conservação dos endofíticos	35
3.2.4	Classificação dos fungos	35
3.2.5	Cultivo em pequena escala do isolados fúngicos em meio líquido PDB para seleção dos endofíticos	35
3.2.6	Obtenção dos extratos AcOEt das culturas puras dos endofíticos	36

3.2.7	Avaliação qualitativa com DPPH da atividade antioxidante dos extratos AcOEt	36
3.2.8	Seleção dos endofíticos para o estudo químico	36
3.2.9	Fungos endofíticos selecionados	36
3.2.10	Obtenção dos Extratos Brutos em larga escala	37
3.2.11	Obtenção e fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em meio líquido PDB de <i>Phomopsis</i> sp.	37
3.2.11.1	Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB	37
3.2.11.2	Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido PDB	37
3.2.12	Obtenção e fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em meio líquido ME de <i>Phomopsis</i> sp.	42
3.2.12.1	Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME	42
3.2.12.2	Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido ME	42
3.2.13	Obtenção e fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em meio líquido ME de <i>Guignardia</i> sp.	42
3.2.13.1	Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME	42
3.2.13.2	Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido ME	42
3.2.14	Obtenção e fracionamento do extrato bruto de <i>Aspergillus niger</i> cultivado em meio líquido PDB	46
3.2.14.1	Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido	46
3.2.14.2	Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido PDB	46
3.2.15	Obtenção e fracionamento do extrato bruto de <i>Aspergillus niger</i> cultivado em meio líquido ME	46
3.2.15.1	Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido	46
3.2.15.2	Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido ME	47
3.2.16	Obtenção e análise por CLAE do extrato bruto de <i>Aspergillus</i> sp.	50
3.2.16.1	Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB	50
3.2.16.2	Análise por CLAE-DAD e UV do extrato bruto AcOEt-PDB de <i>Aspergillus</i> sp.	50
3.2.16.3	Solução padrão de ácido kójico usada	50
3.2.16.4	Quantificação do ácido kojico no extrato bruto	50

3.2.17	Avaliação da atividade antioxidante	51
3.2.17.1	Análise do seqüestro do óxido nítrico (NO) <i>in vitro</i>	51
3.2.17.2	Seqüestro do radical DPPH (1,1–difênil-2-picrilhidrazil)	51
3.2.17.3	Espécies reativas com o ac. tiobarbitúrico (tbars) <i>in vitro</i> com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	Isolamento dos endofíticos	54
4.2	Seleção do endofíticos	55
4.2.1	Extratos brutos obtidos em 400 mL de meio PDB	55
4.2.2	Avaliação qualitativa da atividade antioxidante com DPPH	57
4.2.3	Fungos selecionados	58
4.3.1	Identificação das substâncias isoladas dos extratos PDB - AcOEt (I, II e III, IV e V) e ME - AcOEt (VI e VII) de <i>Phomopsis</i> sp.	59
4.3.2	Identificação da substância I	59
4.3.3	Identificação da substância II	69
4.3.4	Identificação da substância III	77
4.3.5	Identificação da substância IV	88
4.3.6	Identificação da substância V	93
4.3.7	Identificação da substância VI	97
4.3.8	Identificação da substância VII	105
4.4	Identificação da substância VIII presente no extrato bruto ME de <i>Guignardia</i> sp.	111
4.4.1	Identificação da substância VIII	111
4.4.2	Ácido salicílico como mecanismo de defesa da planta	113
4.4.3	Ácido salicílico como metabolito de fungo	115
4.5	Identificação das substâncias isoladas dos extratos PDB - AcOEt (IX e X) e ME - AcOEt (XI) de <i>Aspergillus niger</i>	121
4.5.1	Identificação da substância IX	121
4.5.2	Identificação da substância X	127
4.5.3	Identificação da substância XI	138

4.6 Identificação e quantificação da substância IX presente no extrato PDB de <i>Aspergillus</i> sp.	142
4.6.1 Obtenção e análise do extrato bruto	142
4.6.2 Identificação da substância XII	143
4.6.3 Quantificação da substância majoritária presente no extrato bruto PDB	147
4.7 Avaliação da atividade antioxidante do extrato PDB do fungo <i>Aspegillus</i> sp	151
5. CONCLUSÃO	154
6. REFERÊNCIAS	157

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fungos isolados da espécie vegetal <i>Hancornia speciosa</i> .....	35
<b>Tabela 2.</b> Massas dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Hancornia speciosa</i> .....	56
<b>Tabela 3.</b> Atividade antioxidante dos extratos brutos PDB dos fungos endofíticos isolados de <i>Hancornia speciosa</i> .....	57
<b>Tabela 4.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) correlacionados via gHSQC ( $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ) da substância <b>I</b> em $\text{CDCl}_3$ do isolado e dados da literatura em $\text{CDCl}_3$ . ....	62
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>II</b> em $\text{CDCl}_3$ do isolado e dados da literatura em $\text{CDCl}_3$ .....	71
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>III</b> em $\text{CDCl}_3$ do isolado e dados da literatura em $\text{DMSO-d}_6$ .....	79
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>IV</b> em $\text{CDCl}_3$ e da 5-hidroxi metilmeleína presente na literatura em $\text{CDCl}_3$ .....	89
<b>Tabela 8.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>V</b> em $\text{DMSO-d}_6$ do isolado e dados da literatura em $\text{D}_2\text{O}$ com 2% de ácido fórmico.....	93
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) das substâncias <b>VI</b> em $\text{DMSO-d}_6$ do isolado e dados da literatura em $\text{CDCl}_3$ .....	99
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>VII</b> em $\text{CDCl}_3$ do isolado e dados da literatura em $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	106
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e $^{13}\text{C}$ (obtidos via gHMBC, 126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância <b>VIII</b> e do ácido salicílico na literatura em $\text{DMSO-d}_6$ .....	112
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>IX</b> em $\text{CDCl}_3$ do isolado e dados da literatura em $\text{CDCl}_3$ .....	122
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>X</b> em $\text{CDCl}_3$ do isolado e dados da literatura em $\text{CDCl}_3$ .....	129
<b>Tabela 14.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) da substância <b>XI</b> em $\text{D}_2\text{O}$ e do isolado na literatura (300 MHz, $\text{DCI}_3$ ).....	138
<b>Tabela 15.</b> Dados de RMN ( $\delta$ ) $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (126 MHz) da substância <b>XII</b> em $\text{DMSO-d}_6$ do isolado e dados da literatura em $\text{DMSO-d}_6$ .....	145
<b>Tabela 16.</b> Expressão do potencial antioxidante dos extratos brutos PDB do fungo <i>Aspergillus</i> sp., frente ao seqüestro do radical DPPH.....	151

<b>Tabela 17.</b> Percentual de inibição da formação de nitrito pelo extrato PDB do fungo <i>Aspergillus</i> sp., e do Ácido Kójico.....	152
--	-----

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos que ajudam a promover o crescimento do hospedeiro vegetal.....	4
<b>Figura 2:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade inseticida....	5
<b>Figura 3:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade contra fitopatógenos.....	6
<b>Figura 4:</b> substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade fitotóxica.....	7
<b>Figura 5:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana.....	10
<b>Figura 6:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade citotóxica.....	12
<b>Figura 7:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antiparasitária.....	13
<b>Figura 8:</b> Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.....	14
<b>Figura 9:</b> substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade Antioxidante.....	15
<b>Figura 10:</b> Substâncias isoladas e/ou identificadas de fungos endofíticos e espécies vegetais. ....	17
<b>Figura 11:</b> Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Aspergillus</i> .....	21
<b>Figura 12:</b> Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao fungo <i>Phomopsis</i> sp.....	23
<b>Figura 13:</b> Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Guignardia</i> .....	26
<b>Figura 14:</b> Fluxograma do fracionamento do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB do fungo <i>Phomopsis</i> sp.....	39
<b>Figura 15:</b> Fluxograma do fracionamento das frações juntas F8-F12.....	40
<b>Figura 16:</b> Fluxograma do fracionamento das frações juntas F13 e F14.....	41
<b>Figura 17:</b> Fluxograma da separação das substâncias <b>VI</b> e <b>VII</b> a partir do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME do <i>Phomopsis</i> sp.....	44
<b>Figura 17:</b> Fluxograma da separação da substância <b>VIII</b> a partir do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME do <i>Guignardia</i> sp.....	45

<b>Figura 18:</b> Fluxograma da separação das substâncias <b>IX</b> e <b>X</b> a partir do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB do <i>Aspergillus niger</i> .....	48
<b>Figura 19:</b> Fluxograma da separação da substância <b>XII</b> do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME do <i>Aspergillus niger</i> .....	49
<b>Figura 20:</b> Estrutura da substância <b>I</b> .....	59
<b>Figura 21:</b> Correlações observadas no gHMBC.....	60
<b>Figura 22:</b> Correlações observadas no gCOSY.....	61
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>I</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	63
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>I</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	64
<b>Figura 24:</b> Mapa de contorno gCOSY da substância <b>I</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	65
<b>Figura 25:</b> Mapa de contorno gHSQC da substância <b>I</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	66
<b>Figura 26:</b> Mapa de contorno gHMBC da substância <b>I</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	67
<b>Figura 27:</b> Espectro de massa da substância <b>I</b> .....	68
<b>Figura 28:</b> Estrutura da substância <b>II</b> .....	69
<b>Figura 29:</b> Correlação observada no gCOSY.....	70
<b>Figura 30:</b> Correlações observadas no gHMBC.....	70
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>II</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	72
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>II</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) .....	73
<b>Figura 33:</b> Mapa de contorno gCOSY da substância <b>II</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	74
<b>Figura 34:</b> Mapa de contorno gHMBC da substância <b>II</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	75
<b>Figura 35:</b> Espectro de massa da substância <b>II</b> .....	76
<b>Figura 36:</b> Estrutura da substância <b>III</b> .....	77
<b>Figura 37:</b> Correlações observadas no gHMBC.....	78
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>III</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	80
<b>Figura 39:</b> Ampliação 1, do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>III</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	81
<b>Figura 40:</b> Ampliação 2, do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>III</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	82
<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>III</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	83
<b>Figura 42:</b> Mapa de contorno gHMBC da substância <b>III</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	84

<b>Figura 43:</b> Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância <b>III</b> (CDCl <sub>3</sub> , 126 MHz).....	85
<b>Figura 44:</b> Ampliação 1, do mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância <b>III</b> (CDCl <sub>3</sub> , 126 MHz).....	86
<b>Figura 45:</b> Ampliação 2, do mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância <b>III</b> (CDCl <sub>3</sub> , 126 MHz).....	87
<b>Figura 46:</b> Estrutura da substância <b>IV</b> .....	92
<b>Figura 47:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>IV</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).....	90
<b>Figura 48:</b> Ampliação 1, do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>IV</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).....	91
<b>Figura 49:</b> Ampliação 2, do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>IV</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).....	92
<b>Figura 50:</b> Estrutura da substância <b>V</b> .....	93
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>V</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 500 MHz).....	94
<b>Figura 52:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>V</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 126 MHz).....	95
<b>Figura 53:</b> Espectro de massa da substância <b>V</b> .....	96
<b>Figura 54:</b> Estrutura da substância <b>VI</b> .....	97
<b>Figura 55:</b> Estrutura parcial A da substância <b>VI</b> .....	97
<b>Figura 56:</b> Estrutura parcial B da substância <b>VI</b> .....	98
<b>Figura 57:</b> Correlações observadas no <i>g</i> HMBC.....	98
<b>Figura 58:</b> Rota biossintética do tirosol.....	100
<b>Figura 59:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>VI</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 500 MHz).....	101
<b>Figura 60:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>VI</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 126 MHz).....	102
<b>Figura 61:</b> Mapa de contorno <i>g</i> HMBC da substância <b>VI</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 126 MHz).....	103
<b>Figura 62:</b> Espectro de massa da substância <b>VI</b> .....	104
<b>Figura 63:</b> Estrutura da substância <b>VII</b> .....	105
<b>Figura 64:</b> Rota biossintética do triptofano.....	107
<b>Figura 65:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>VII</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).....	108
<b>Figura 66:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>VII</b> (CDCl <sub>3</sub> , 126 MHz).....	109
<b>Figura 67:</b> Espectro de massa da substância <b>VII</b> .....	110
<b>Figura 68:</b> Estrutura da substância <b>VIII</b> .....	111
<b>Figura 69:</b> Correlação observada no <i>g</i> HMBC.....	111

<b>Figura 70:</b> Rota biosintética do ácido salicílico a partir do ácido corismico.....	114
<b>Figura 71:</b> Rota biosintética do ácido salicílico a partir do ácido cinâmico.....	114
<b>Figura 72:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VIII</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).....	116
<b>Figura 73:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VIII</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).....	117
<b>Figura 74:</b> Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da substância <b>VIII</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 126 MHz).....	118
<b>Figura 75:</b> Ampliação do mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da substância <b>VIII</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 126 MHz).....	119
<b>Figura 76:</b> Espectro de massa da substância <b>VIII</b> .....	120
<b>Figura 77:</b> Estrutura da substância <b>IX</b> .....	121
<b>Figura 78:</b> Possível rota biosintética do pirofen.....	123
<b>Figura 79:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a substância <b>IX</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	124
<b>Figura 80:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>IX</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	125
<b>Figura 81:</b> Espectro de massa da substância <b>IX</b> .....	126
<b>Figura 82:</b> Estrutura da substância <b>X</b> .....	127
<b>Figura 83:</b> Correlação observada no $g\text{COSY}$ .....	128
<b>Figura 84:</b> Correlação observada no $g\text{HMBC}$ .....	128
<b>Figura 85:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	130
<b>Figura 86:</b> Ampliação 1, do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	131
<b>Figura 87:</b> Ampliação 2, do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	132
<b>Figura 88:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	133
<b>Figura 89:</b> Mapa de contorno $g\text{COSY}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).....	134
<b>Figura 90:</b> Mapa de contorno $g\text{HMQC}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	135
<b>Figura 91:</b> Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da substância <b>X</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).....	136
<b>Figura 92:</b> Espectro de massa da substância <b>X</b> .....	137
<b>Figura 93:</b> Estrutura da substância <b>XI</b> .....	138
<b>Figura 94:</b> Biossíntese do ácido itacônico.....	140
<b>Figura 95:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XI</b> ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz).....	141

<b>Figura 96:</b> Cromatograma CLAE- DAD analítico do extrato bruto PDB do <i>Aspergillus</i> sp.....	142
<b>Figura 97:</b> Cromatograma CLAE-UV analítico do extrato bruto PDB do <i>Aspergillus</i> sp.....	142
<b>Figura 98:</b> Estrutura da substância <b>XII</b> .....	143
<b>Figura 99:</b> Rota biossintética do ácido kójico a partir da glucose.....	145
<b>Figura 100:</b> Rota biossintética do ácido kójico a partir da gluconolactona.....	145
<b>Figura 101:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>XII</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)....	148
<b>Figura 102:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>XII</b> (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)....	149
<b>Figura 103:</b> Espectro de massa da substância <b>XII</b> .....	150

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

ppm	Parte por milhão
TMS	Tetrametilsilano
$\delta$	Deslocamento químico
$^1J$	Acoplamento a uma ligação
$^2J$	Acoplamento a duas ligações
$^3J$	Acoplamento a três ligações
$^4J$	Acoplamento a quatro ligações
H	Hidrogênio
C	Carbono
BDA	Meio de Batata Dextrose e Ágar
PBD	Meio de Batata e Dextrose
ME	Meio extrato de Malte
$\mu$	Micra
C-18	Sílica gel de fase reversa tipo C18
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector em Arranjo de Diodos
PDA	Photodiodo-array
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
min	minutos

nm	namonetro
UV	Ultra violenta
Vis	visível
OSD	Octadesilsilano
d	dubleto
dl	dubleto largo
dd	duplo dubleto
m	multipleto
s	singleto
t	tripleto
tl	tripleto largo
sl	sinleto largo
td	tripleto de dubleto
dt	dubleto de tripleto
AcOEt	Acetato de Etila
HEX	Hexano
MeOH	Metanol
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
DCM	Diclorometano
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DCCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
D <sub>2</sub> O	Água deuterada

RMN	Ressonância Magnética Nuclear r
$\delta_H$	Deslocamento químico de hidrogênio
$\delta_C$	Deslocamento químico de carbono
RMN de $^1H$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de $^{13}C$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
gCOSY	Gradient Correlated Spectroscopy
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
gHMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
ES	Eletron-Spray
m/z	Relação massa carga

## Resumo

Este trabalho descreve o isolamento de fungos endofíticos da espécie vegetal *Hancornia speciosa*, o qual conduziu a 14 linhagens puras, dos quais quatro foram selecionados para o estudo químico. O estudo químico possibilitou identificar 12 substâncias, isoladas dos fungos *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., cultivados em diferentes meios de culturas. O extrato bruto do fungo *Phomopsis* sp cultivado no meio líquido PBD levou ao isolamento de cinco compostos, 5- metilmeleína, nectapirona, ácido succínico, 5-hidroximetilmeleína e uma dicetopiperazina. Já o mesmo fungo quando cultivado no meio líquido-ME, levou ao isolamento de dois compostos, tirosol e triptofol. O estudo do extrato bruto de *Guignardia* sp., cultivado no meio líquido ME conduziu ao isolamento do composto ácido salicílico, o qual tem um importância ecológica para planta. O extrato bruto do fungo *Aspergillus niger* cultivado no meio líquido PBD levou ao isolamento dos compostos pirofen e nigragillin. Já o mesmo fungo quando cultivado em extrato de malte, levou ao isolamento do ácido itacônico. E do extrato bruto do fungo *Aspergillus* sp., cultivado no meio líquido PBD foi identificada a substância majoritária ácido kójico, a qual foi quantificada por CLAE no extrato bruto (0,7g/ g de extrato bruto). O extrato desse fungo foi testado quanto a sua atividade antioxidante com DPPH, NO<sup>•</sup>, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e mostrou uma forte atividade de inibição da produção de NO<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> de 150 µg/mL), indicando que este fungo possui grande potencial biotecnológico. As estruturas das substâncias foram determinadas por métodos espectrométricos, incluindo RMN bi-dimensional, espectros de massas e comparação com a literatura.

Palavras chaves: Fungos endofíticos, *Hancornia speciosa*, metabolitos secundários bioativos

## Abstract

This work describes the isolation of endophytic fungi from plant species *Hancornia speciosa* and led to the isolation of 14 pure strains. Of which 4 were selected for the chemical study. The chemical study allowed identified 12 substances isolated from fungi *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., grown in different culture medium. The crude extracts of fungus *Phomopsis* sp., grown in PDB medium led to isolation of five compounds, 5- methylmelein, nectriapyrone, succinic acid, 5-hydroxymethylmelein and a diketopiperazine. Already when the same fungus was grown in ME medium, led to isolation of two compounds, tyrosol and tryptofol. The crude extract of *Guignardia* sp grown in ME medium led to isolation of compound salicylic acid, which has a plant for ecological importance. The crude extract of *Aspergillus niger*, grown in PDB medium led to isolation of compounds pyrophen and nigragillin. Already when the same fungus was grown in ME medium, led to isolation of compound itaconic acid. And of crude extract of *Aspergillus* sp., grown in ME medium was identification of their major compound kojic acid, which was quantified by HPLC in the crude extract (0.7 mg/g of crude extract). O crude extract was tested for its antioxidant activity with DPPH, NO<sup>•</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and exhibited significantly potent inhibition of NO<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> de 150 µg/mL) production, showed taht this fungi it owns big biotchenology potential. The structures of these substances were established by spectroscopic methods, including the application of bidimensional NMR techniques, mass spectrum and comparison with published data.

Key words: Endophytic fungi, *Hancornia speciosa*, secondary metabolites.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos são fontes valiosas de substâncias bioativas usadas na medicina e na agricultura. Por essa razão, nos últimos anos esforços têm sido feitos na busca desses metabólitos secundários (STROBEL *et al.*, 2004; GUNATILAKA, 2006). Esses micro-organismos são cultiváveis, e o cultivo deles por processos fermentativos podem ser otimizado levando ao aumento na produção de substâncias bioativas potencialmente úteis como fármacos (DEMAIN, 2000).

Dentre os micro-organismos, os endofíticos, que são aqueles que vivem no interior do seu hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2000) e são representados principalmente por fungos e bactérias, se mostram uma importante fonte de metabólitos bioativos para o desenvolvimento de medicamentos e pesticidas (WEBER *et al.*, 2006), pois tais micro-organismos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas (MASUREKARE, 1992; ISAKA *et al.*, 2001; SILVA, 2006).

De modo geral esses micro-organismos habitam seu hospedeiro sem causar dano se diferenciando assim daqueles que são patogênicos, mas a depender das condições de “estresse” do hospedeiro um micro-organismo endofítico pode ser considerado um patógeno latente (AZEVEDO, 1998 e AZEVEDO *et al.*, 2000).

Esses micro-organismos começaram a despertar a atenção de muitos pesquisadores no início do século XIX, mas uma distinção entre eles e os patógenos de plantas foi feita por Bary, 1866 (AZEVEDO *et al.*, 2000) definindo-os como assintomáticos não produzindo efeito algum no seu hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Atualmente é crescente o interesse por esses micro-organismos, pois hoje sabe-se que em associação com o seu hospedeiro eles são capazes de produzir uma gama de compostos com as mais diversas atividades biológicas desde toxinas a antibióticos naturais (BRADY *et al.*, 2000; CAFÊU *et al.*, 2005; ISAKA *et al.*, 2007). E dentre os micro-organismos endofíticos, os fungos oferecem um enorme potencial para novos produtos, uma vez que várias modificações fisiológicas em plantas foram relacionadas com a presença de micro-organismos que habitam seu interior. Alguns fungos endofíticos produzem para as plantas hormônios de crescimento,

antibacterianos, antifúngicos, inseticidas etc., substâncias que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (CARROLL, 1988).

### **1.1 Fungos endofíticos e efeitos em seu hospedeiro**

Fungos endofíticos, são micro-organismos que vivem sistematicamente nos tecidos internos e subcuticulares das plantas por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (ANDREWS *et al.*, 1991). Os endófitos não apresentam haustórios, estrutura comum em fungos fitopatogênicos e em geral, as infecções causadas por fungos endofíticos não produzem sintomas externos, podendo estar latentes ou serem assintomáticas (PETRINI e CARROLL, 1981; PETRINI, 1986).

As infecções ocorrem através das raízes, estômatos ou lesões e podem também ser passadas para as plantas filhas através da infecção das sementes (CARROL, 1988). A maior diversidade de fungos endofíticos é encontrada na estação de chuvas, sendo que alguns fungos sofrem menor influência do clima (PETRINI, 1991). De acordo com Dreyfuss e Chapela, 1994, uma planta vascular pode hospedar entre 10 e 100 diferentes espécies de endofíticos, sendo que de duas a cinco são específicas ao hospedeiro. Esta especificidade sugere que a taxa de extinção das espécies de fungos endofíticos é muitas vezes maior que a taxa de extinção das espécies de plantas.

Esses fungos podem ser benéficos ao hospedeiro por uma interação simbiótica (SELOSSE *et al.*, 2004), sendo responsáveis pela proteção contra diversas doenças e predadores que possam atacar o hospedeiro (PERREIRA *et al.*, 1993), ou maléficos por uma interação trófica, que ocorre quando o fungo começa a produzir fitotoxinas levando o hospedeiro à morte (FAIL *et al.*, 1990). Deve-se ressaltar ainda que mudanças no hospedeiro, causadas por fatores de estresse pode induzir um fungo a passar de um estado simbiótico para trófico (PETRINI, 1991).

Nestas relações estão envolvidos vários metabólitos secundários e segundo Dreyfuss e Capela, 1994, a produção de metabólitos secundários deste grupo de fungos é 73% superior a de outros fungos. A literatura tem mostrado que interações antagônicas envolvendo fungos que competem com outros organismo por espaço e nutrientes (competição de interferência), são fatores importantes na determinação da

---

organização, composição e padrão de sucessão dentro do ecossistema (WEBSTER, 1970; WICKLOW, 1981).

O mecanismo de antagonismo, em muitos casos, envolve a produção de agentes químicos por uma espécie, inibindo o crescimento da outra. Isto é um indicativo de que os metabólitos responsáveis por esses efeitos são essencialmente antibióticos naturais, que podem inclusive ser usados para o desenvolvimento de fármacos e /ou no controle biológico de pragas como insetos, fungos, bactérias etc., que causam uma grande perda na produtividade agrícola mundial, (GARDENER e MCCOY, 1992), sendo uma excelente alternativa de controle.

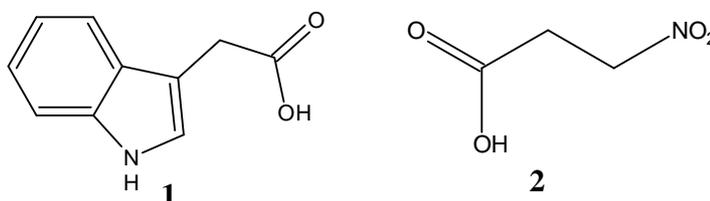
### **1.1.1 Fungos endofíticos como agente promotor do crescimento do seu hospedeiro**

Os fungos endofíticos colonizam o interior do seu hospedeiro conseguindo deles nutrição e proteção, em compensação os fungos endofíticos beneficiam o seu hospedeiro produzindo diversos metabolitos funcionais. Plantas infectadas com endofíticos crescem mais rápido do que aquelas que não são (TAN e ZOU, 2001). Este efeito deve-se a produção de fitohormônios semelhante ao ácido 3-aceto-indolico **(1)**, citocinas e outros agentes promotores do crescimento da planta (TAN e ZOU, 2001).

Outra fato que reforça a tese de que os fungos endofíticos ajudam a promover o crescimento do seu hospedeiro, é o fato de que esses fungos ajudam a planta a absorver elementos nutricionais importante como nitrogênio e fósforo (TAN e ZOU, 2001). O ácido 3-nitropropiónico **(2)** é um bom exemplo de metabólito de fungo endofítico que tem uma importância biológica e ecológica, pois esse metabólito está envolvido nos processos de nitrificação em plantas leguminosas (CHOMCHEON *et al.*, 2009a). Esse metabólito também exibe uma potente atividade nematicida o qual beneficia a planta hospedeira de nematóides parasitas (CHOMCHEON *et al.*, 2009a).

Além disso, certos endofíticos melhoram a adaptabilidade do hospedeiro dentro do ecossistema, aumentando a tolerância à ambiente de estresses e dando resistência contra os mais diversos fitopatógenos (HANADA *et al.*, 2010), como exemplo temos o fato de que gramíneas infectados por endofíticos geralmente

possuem maior resistência a seca (TAN e ZOU, 2001). Provendo também proteção contra insetos herbívoros, bactérias e fungos fitopatogênicos (HANADA *et al.*, 2010).



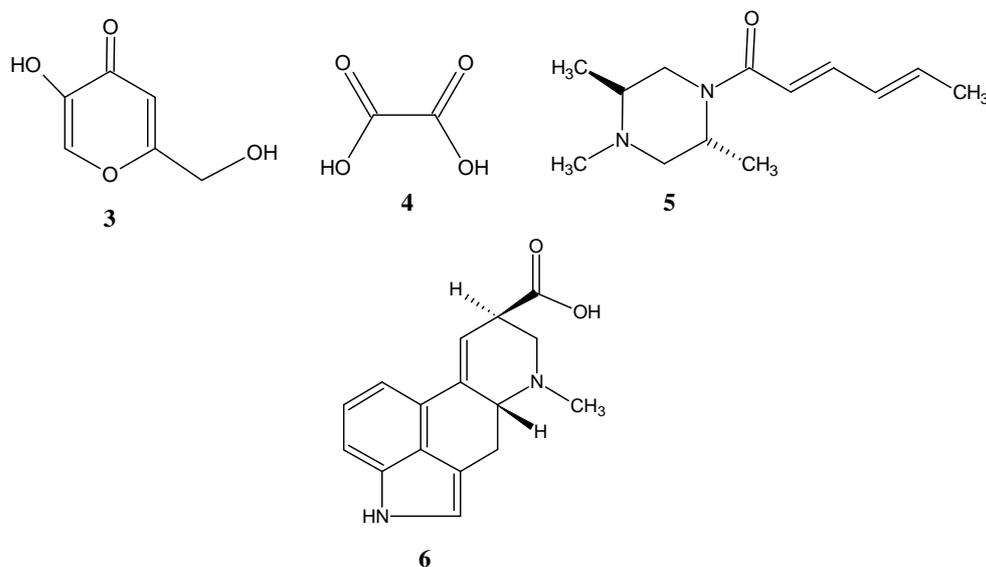
**Figura 1:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos que ajudam a promover o crescimento do hospedeiro vegetal.

### 1.1.2 Fungos endofíticos antagonísticos a insetos

Existem vários relatos na literatura da ação de fungos endofíticos contra insetos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2000; TAN e ZOU, 2001; ALVERSON *et al.*, 2002), o primeiro relato de controle biológico de inseto por fungos endofíticos foi relatado por Web 1981, sendo um exemplo de proteção de um hospedeiro vegetal por um fungo endofítico, mostrando que o fungo *Phomopsis oblonga* protegia a planta olmeiro contra o inseto *Physocnemum brevilineium*, (AZEVEDO, 1998 e AZEVEDO *et al.*, 2000).

Estudo feito por Alveverson, 2003, mostrou que alguns fungos do gênero *Aspergillus* como o fungo *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. são fungos antagonísticos aos insetos *Oncopeltus fasciatus*, *Aedes atropalpus*, pois esses fungos produzem uma variedade de micotoxinas como ácido kójico (**3**), ácido oxálico (**4**), nigragillin (**5**) e os pentapeptídeos malforminas (ISOGAI *et al.*, 1975; ALVERSON, 2003).

Podemos citar ainda o caso dos fungos do gênero *Claviceps*, endofíticos de gramíneas, que produzem os alcalóides de ergot como o ácido lisérgico (**6**), substâncias que ingeridas junto com as plantas provocam doenças em insetos e mamíferos herbívoros, protegendo o fungo e a planta dos predadores. Esse antagonismo deve-se a produção de metabólitos tóxicos ao inseto proporcionado assim uma proteção a planta hospedeira.



**Figura 2:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade inseticida.

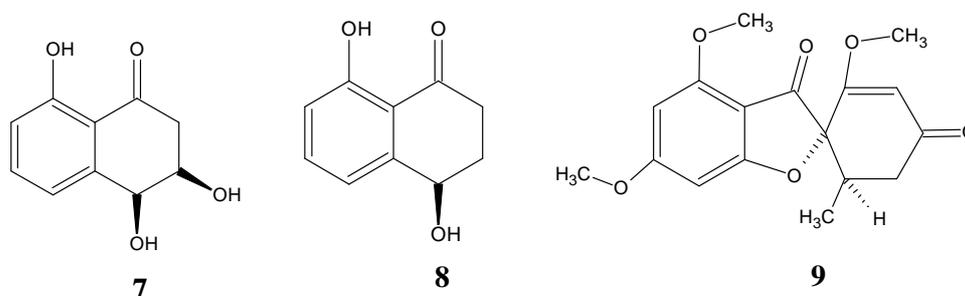
### 1.1.3 Fungos endofíticos antagônicos a fitopatogênicos

Os fungos endofíticos são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias bioativas (GUNATILAKA, 2006), sugerindo que esses micro-organismos podem controlar doenças em plantas (AZEVEDO, 1998 e AZEVEDO *et al.*, 2000). Na literatura existem diversos relatos de fungos produzindo substâncias com atividade antifúngica como os compostos cis-4-hidroxi-6-deoxiscistalona (**7**) e (4R)-4,8-hidroxi- $\alpha$ -tetralona (**8**) com atividade contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium cladosporioides* (INÁCIO *et al.*, 2006) e a griseofulvina (**9**), utilizada na medicina, em animais domésticos, na agricultura (MANN, 1994) e empregada comercialmente nos medicamentos Fulcin® (Zeneca) e Sporostatin® (Shering Plough) (LACAZ, 1975). Vários fungos (MACMILLAN, 1953) produzem a griseofulvina, inclusive o fungo endofítico, *Xylaria* sp., isolado de *Palicourea marcgravii* (CAFÊU *et al.*, 2005).

Diversos outros exemplos mostram o importante papel dos fungos endofíticos no controle biológico de fitopatógenos em geral, como parte do manejo integrado de pragas. Sugerido assim como a solução mais sustentável a longo prazo (MEJIA *et al.*, 2008). Além disso, as evidências recentes mostram que, em alguns casos fungos endofíticos podem restringir o crescimento de patógeno no cacau *in vitro* e *in*

vivo (MEJIA *et al.*, 2008), destacando os fungos endofíticos como uma nova fonte de controle biológico de combate de patógenos de varias espécies vegetais (MEJIA *et al.*, 2008).

A proteção antipatógeno por fungos endofitos tem sido observado também em hospedeiros não-gramíneos. Por exemplo, fungos endofíticos foram usados para proteger culturas de tomates, banana contra nematóides e outros patógenos (MEJIA *et al.*, 2008). No entanto, mesmo com as evidências de que fungos endofíticos podem reduzir os danos do patógeno em gramíneas e outras plantas hospedeiras, pouco se sabe sobre a extensão dessa proteção.



**Figura 3:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade contra fitopatógenos.

#### 1.1.4 Fungos endofíticos como patógenos de espécies vegetais

Segundo Azevedo é muito difícil estabelecer um limite entre micro-organismos endofíticos e patogênicos (AZEVEDO, 1998 e AZEVEDO *et al.*, 2000), pois mudanças dentro do hospedeiro, causadas por fatores de estresse, podem induzir o endofítico a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

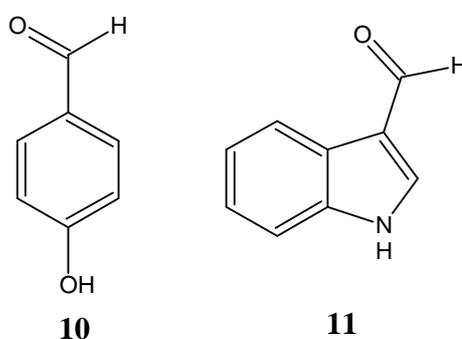
Mesmo sendo patogênicos esses micro-organismos beneficiam o hospedeiro, pois fungos fitopatogênicos produzem fitotoxinas que causam necrose e/ou morte do tecido vegetal, por sua vez as plantas produzem as fitoalexinas (substâncias de defesa da planta), que visa conter a infecção fúngica (HARBONE, 1993 e GLOER, 1995), ou seja, esses microorganismos patogênicos induzem a planta a se

defenderem adquirindo resistências não só aos fungos endofíticos, mas a outros patógenos.

Entre fungos endofíticos que podem ser patogênicos a plantas temos o fungo *Discula quercina* isolados de sobreiros, que é um fungo responsável pela doença conhecida como antracnose (MORICCA e RAGAZZI, 2008). Manchas marrom-escuras com margens arroxeadas formam-se na folhagem, que, tendem a se fundir, formando grandes lesões necróticas (MADDAU *et al.*, 2009).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado a habilidade deste patógeno de persistir em estado latente como um endófito dentro tecidos do hospedeiro, sem demonstrar sinais específicos de sua presença (MADDAU *et al.*, 2009). Confirmando o fato de que estresses sofrido pelo hospedeiro pode fazer com que o fungo passe de um estado simbiótico para trófico (PRETINI, 1991).

A natureza e o surgimento dos sintomas causado por este patógeno mostram que metabólitos fitotóxicos estão envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, esses metabólitos são os compostos para-hidroxibenzaldeído (**10**) e indol-3-aldeído (**11**) (MADDAU *et al.*, 2009).



**Figura 4:** substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade fitotóxica.

Conforme o exposto acima, os fungos endofíticos estão submetidos a intensas e freqüentes interações com outros organismos. Este fato, de acordo com a teoria ecológica, promove uma grande diversidade metabólica (DREYFUSS e CHAPELA, 1994). Tornando os fungos uma importante fonte para a obtenção de metabólitos bioativos com enorme potencial para virarem fármacos.

## 1.2 Diversidade metabólica dos fungos endofíticos

Alguns anos atrás não se conheciam o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos, entretanto a partir de estudos realizados por Stierle *et al.*, 1993, o interesse biotecnológico para estudar os fungos endofíticos foi iniciado, pois evidenciado-se que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* é capaz de produzir o Taxol, um agente antitumoral de alto valor no mercado internacional, visualizando assim um novo processo para a produção deste fármaco (STIERLE *et al.*, 1993; STROBEL *et al.*, 1996).

A partir desse estudo diversos trabalhos começaram a ser feitos mostrando o grande potencial desse grupo de fungos na obtenção de metabólitos com as mais diversas bioatividades. Levantamento bibliográfico sobre a ocorrência de metabólitos secundários isolados de diversas espécies de fungos endofíticos evidenciou um grande número de substâncias com diferentes bioatividades como atividade antimicrobiana, citotóxica, antiparasita, inibidora da acetilcolinesterase, antioxidante e sendo crescente o número de novos metabólitos bioativos, potencialmente úteis para o tratamento de várias doenças (GUNATILAKA, 2006; ALY *et al.*, 2010).

### 1.2.1 Metabolitos isolados de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana

Estudo químico do extrato do fungo *Nodulisporium* sp., (Xylariaceae) isolado da planta *Erica arborea* (Ericaceae) possibilitou isolar os compostos nodulisporinas D (12), E (13) e F (14). Essas substâncias foram testadas como antifúngicos, antibacterianos e algicida, através do teste de difusão em ágar e comparação com antibióticos padrões. Todas essas substâncias mostraram atividade algicida e antibacteriana (DAI *et al.*, 2009).

Do fungo endofítico *Ampelomyces* sp., (Leptosphaeriaceae) isolado da planta medicinal *Urospermum pirocroides* (Asteraceae) foram isolados os compostos 6-*o*-metilalaternina (15) e altersolanol A (16), ambas mostraram atividade antimicrobiana contra patógenos Gram positivos como a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e

*Enterococcus faecalis* com concentração mínima inibitória (CMI) de 41,7; 37,2 e 74,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente (ALY *et al.*, 2010).

Do extrato do fungo *Alternaria* sp., (Pleosporaceae), isolado das folhas de *Sonneratia alba* (Sonneratiaceae), foram obtidos os compostos ácidos xanalterico I (**17**) e II (**18**). Que apresentaram fraca atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* com CMI de 343,40 e 686,81 $\mu\text{M}$  (KJER *et al.*, 2009).

Estudo químico do endofítico *Pestalotiopsis* (Amphisphaeriaceae), isolado dos galhos de uma árvore não identificada na China, resultou no isolamento dos metabólitos pestaloteols A-D. Entre esses, o composto, pestaloteol C (**19**) exibiu efeito inibitório contra a replicação do HIV-1LAI em células C8166 com um valor de  $\text{CE}_{50}$  de 16,1 $\mu\text{M}$  (controle positivo sulfato de indinavir que apresentou um  $\text{CE}_{50}$  de 8,18  $\mu\text{M}$ ) (LI *et al.*, 2008).

Além disso, diversos outros compostos isolados de fungos endofítico possuem atividade antimicrobiana, como a dotideopirona D (**20**) isolada do extrato do fungo *Pestalotiopsis fici* (CHOMCHEON *et al.*, 2009a); a pestalofona A (**21**) também isolada do extrato do fungo *Pestalotiopsis fici*, substância ativa contra o HIV1 (LIU *et al.*, 2009) e a diidroisocoumarina (**22**) isolada do extrato do fungo endofítico *Cytospora eucalypticola* substância antifúngica contra *Cladosporium herbarium* e antibacteriana frente *Bacillus subtilis* (KOKUBUN *et al.*, 2003).

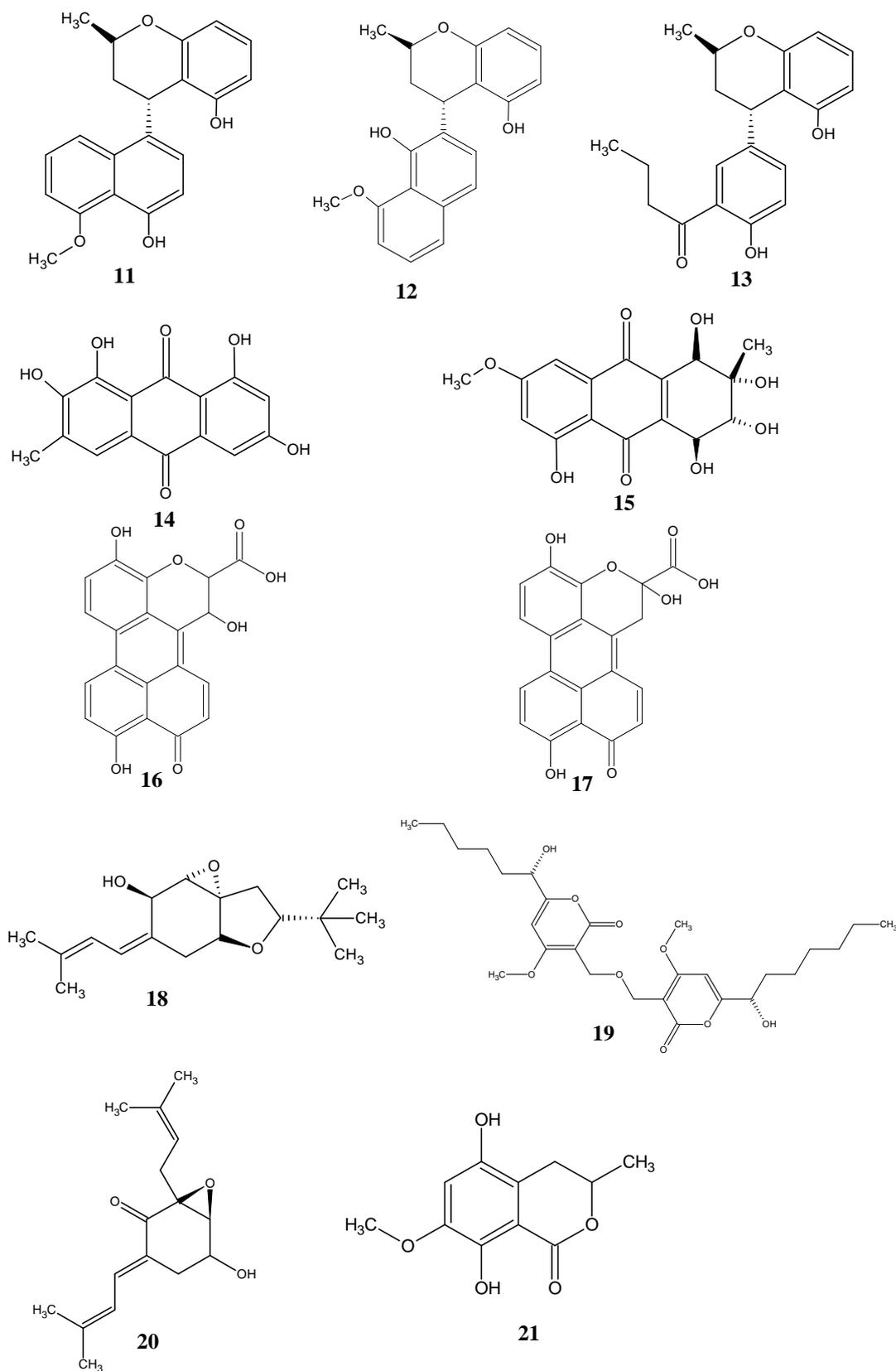


Figura 5: Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana.

### 1.2.2 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade citotóxica

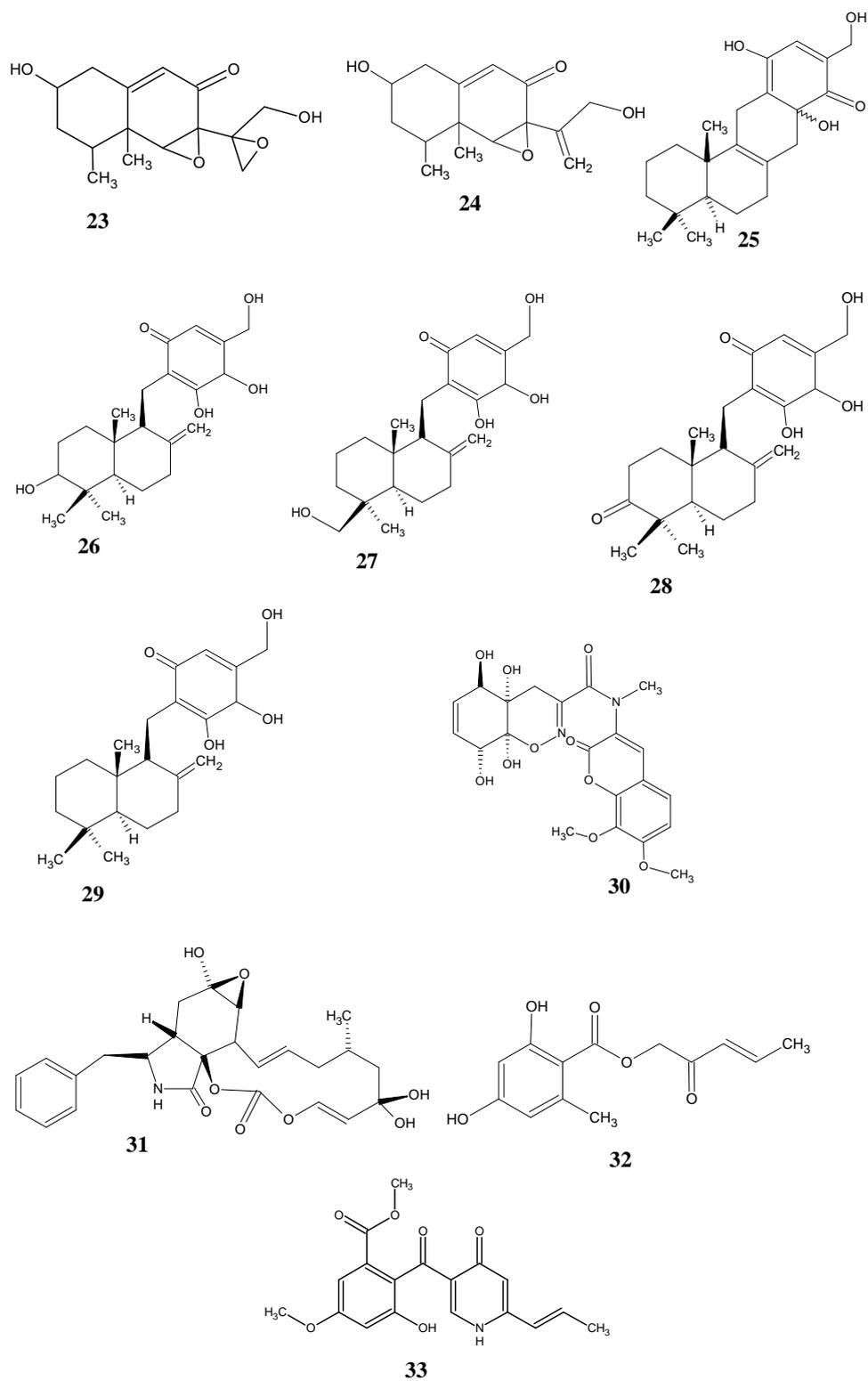
Do extrato do fungo endofítico *Xylaria* sp., associado a espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae), foram isolados dois novos sesquiterpenos derivado do persilfiperfolano e os metabólitos faseolinona (**23**) e fomenona (**24**), ambas com moderada atividade citotóxica quando teste *in vitro* usando orvário de hamster chinses (OHC). O composto faseolinona apresentou 20 e 50%, de citotoxicidade em linhagens de células de OHC, com 20  $\mu$ M e 200  $\mu$ M, respectivamente, quando comparados as células tratadas com DMSO (SILVA *et al.*, 2010).

Do extrato bruto do fungo endofítico *Phyllosticta spinarum* (Botryosphaeriaceae), isolado de *Platyclusus orientalis* (Cupressaceae), foi obtido os compostos, filospinarona (**25**), 3-  $\alpha$ -hidroxitauranina (**26**), 1,2-hidroxitauranina (**27**), 3-cetotauranina (**28**) e tauranina (**29**), todos apresentaram atividade contra a proliferação de cinco linhagens de células cancerosas diferentes com valores de  $CE_{50}$  de 4,3; 1,5; 1,8; 3,5 e 2,8  $\mu$ M contra NCI-H460 (células de câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de mama), SF-268 (câncer do SNC (glioma)) PC-3 M (metastático do câncer de próstata) e MIA Pa Ca-2 (Carcinoma do pâncreas), respectivamente. Doxorrubicina foi usado como controle positivo com valores de  $CE_{50}$  0,01; 0,07; 0,04 e 1,11  $\mu$ M, respectivamente (WIJERATNE *et al.*, 2008; ALY *et al.*, 2010).

O estudo químico do fungo endofítico *Eupenicillium* sp. (Trichocomaceae), isoladas da espécie vegetal *Glochidion ferdinandi* (Euphorbiaceae), possibilitou isolar o trichodermamida C (**30**), o qual mostrou atividade citotóxica contra células HCT116 (câncer intestino) e carcinoma de pulmão A549 com valores de  $IC_{50}$  de 1,5 e 9,3  $\mu$ M, respectivamente (DAVIS *et al.*, 2008).

Além disso, tem-se diversos outros compostos isolados de fungos endofíticos que possuem atividade citotóxica como a citocalasina E (**31**), obtida do extrato do fungo *Rhinochadiella* sp., isolado da espécie vegetal *Tripterygium wilfordii*. Substância citotóxica frente às linhagens de células A2780S (câncer de ovário) e SW-620 e HTC-116 (câncer de cólon) (WAGENAR *et al.*, 2000), a globosumona A (**32**) isolada do fungo endofítico *Chaetomium globosum* endofítico de *Ephedra fasciculata* (Mormom tea), substância com atividade citotóxica (BASYAL *et al.*, 2005) e penicidona C (**33**) obtida do extrato do fungo *Penicillium* sp., isolado de *Quercus*

*variabilis*, substância ativa no teste com linhagens de células humanas cancerosas. (MING *et al.*, 2007).

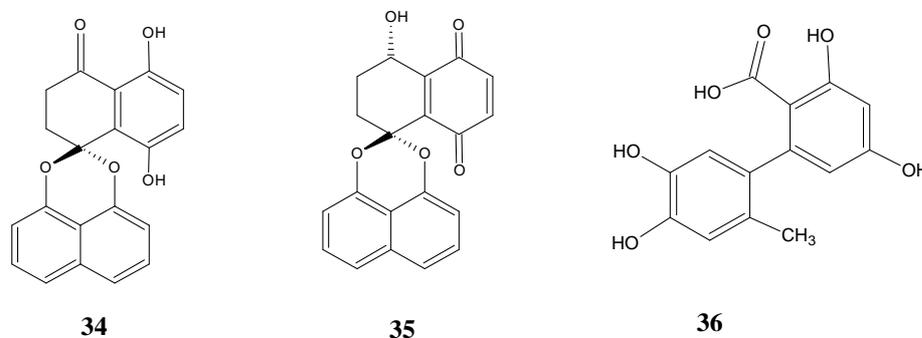


**Figura 6:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade citotóxica.

### 1.2.3 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade antiparasitária

Dois metabólitos, palmarumicina CP17 (**34**) e palmarumicina CP18 (**35**), formam isolados de *Edenia* sp., (Pleosporaceae), obtidas das folhas da espécie vegetal *Petrea volubilis* (Verbenaceae), e mostraram uma inibição significativa do crescimento da *Leishmania donovani* com valor  $IC_{50}$  de 1,34 e 0,62 $\mu$ M respectivamente (usando anfotericina como controle positivo com valor de  $IC_{50}$  de 0,09 $\mu$ M). Entretanto esses compostos foram inativos quando testado contra *Plasmodium falciparum* ou *Trypanasoma*, o que mostra que esses compostos possuem uma atividade seletiva contra os parasitas da *Leishmania* (MARTÌNEZ-LUIS *et al.*, 2008).

O estudo químico do extrato bruto do fungo *Alternaria* sp., (Pleosporaceae) endófito em *Trixis vauthieri* (Asteraceae) possibilitou isolar o comoposto altenusina (**36**), o qual mostrou atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase (TR) com um valor de  $IC_{50}$  de  $4,3 \pm 0,3\mu$ M. Este composto é o primeiro em sua classe que possui atividade inibitória da TR (ALY *et al.*, 2010).



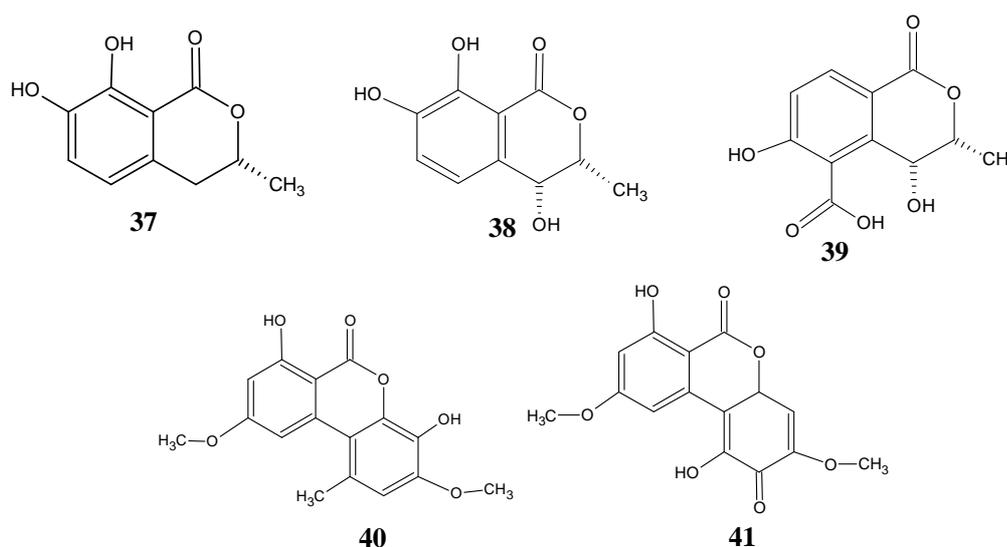
**Figura 7:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antiparasitária.

### 1.2.4 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

Poucos estudos têm sido dedicados à atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. Entre esses poucos estudos há o estudo químico do extrato do fungo *Penicillium* sp., associado a *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae), que resultou no isolamento da (R)-7-hidroximeleína (**37**) e (3R, 4R)-4,7-dihidroximeleína (**38**) e

que apresentaram um limite de detecção de 10 mg em ensaio de inibição da acetilcolinesterase realizado em cromatografia em camada delgada comparativa, sendo considerada uma fraca atividade de inibição. Já o fracionamento do extrato bruto do fungo endofítico *Xylaria* sp., associado a *Piper aduncum* (Piperaceae), resultou no isolamento do composto (3R, 4R)-3,4-diidro-4,6-ácido-diidroxi-3-metil-1-oxo-1H-isocomena-5-carboxílico (**39**), uma diidroisocumarina, que exibiu moderada atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, apresentando um limite de detecção de 3,0 mg (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Outros compostos como a grafislactona A (**40**) e botalina (**41**) ambos isolados do extrato do fungo endofítico *Microsphaeropsis olivacea*, isolado da planta *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae) também apresentam atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (GUNATILAKA, 2006).



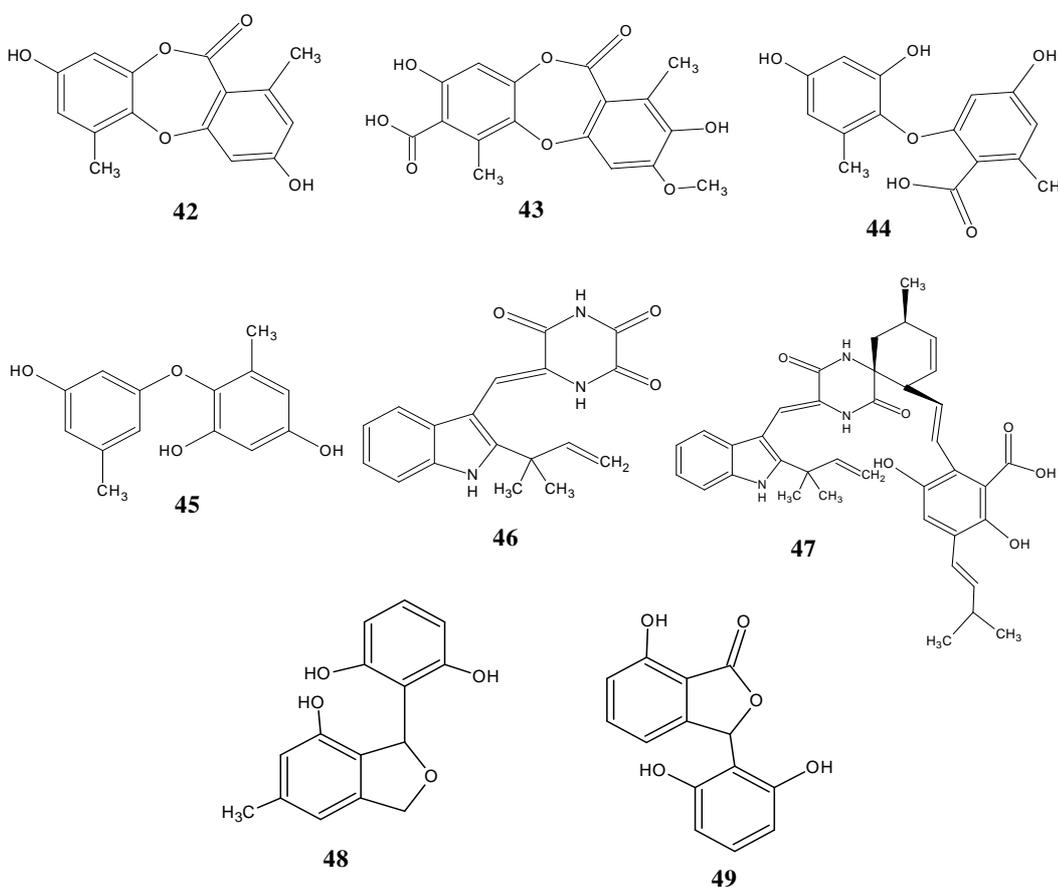
**Figura 8:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase.

### 1.2.5 Metabólitos isolados de fungos endofíticos com atividade antioxidante

O fracionamento do extrato do fungo endofítico *Corynespora cassiicola* isolado da planta medicinal, *Lindenbergia philippensis* (Scrophulariaceae), resultou no isolamento de quatro compostos, corinesidona A (**42**) e B (**43**), corineter A (**44**) e éter diaril (**45**), com forte atividade antioxidante com base no teste da capacidade de

absorção de radicais de oxigênio. Entre os compostos testados, corinesidona B mostrou a melhor atividade para a eliminação de radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) com um valor de  $IC_{50}$  de 22,4  $\mu$ M, comparável ao ácido ascórbico ( $IC_{50}$  21,2  $\mu$ M), (CHOMCHEON *et al.*, 2009b).

O cultivo do fungo *Eurotium rubrum*, endofítico isolado do caule da planta de manga *Hibiscus tiliaceus*, resultou no isolamento de dois derivados da dioxopiperazina, com intensa atividade antioxidante, neoechinulina E (**46**), e criptoechinulina D (**47**). Esses compostos foram avaliados frente à atividade seqüestradora de radicais livres, usando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Neste estudo, os compostos neoechinulina E, e criptoechinulina D mostraram valores de  $IC_{50}$  de 46,0  $\mu$ M e 23,6  $\mu$ M, respectivamente, e o controle positivo, butil-hidroxitolueno (BHT), exibiu um valor de  $IC_{50}$  de 82,6  $\mu$ M (LI *et al.*, 2008). Outros compostos isolados que possuem atividade antioxidante são: os compostos, pestacina (**48**) e isopestacina (**49**) obtidos do extrato bruto do fungo *Pestalotiopsis microspora* isolado da planta *Terminalia morobensis* (GUNATILAKA, 2006).



**Figura 9:** Substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antioxidante.

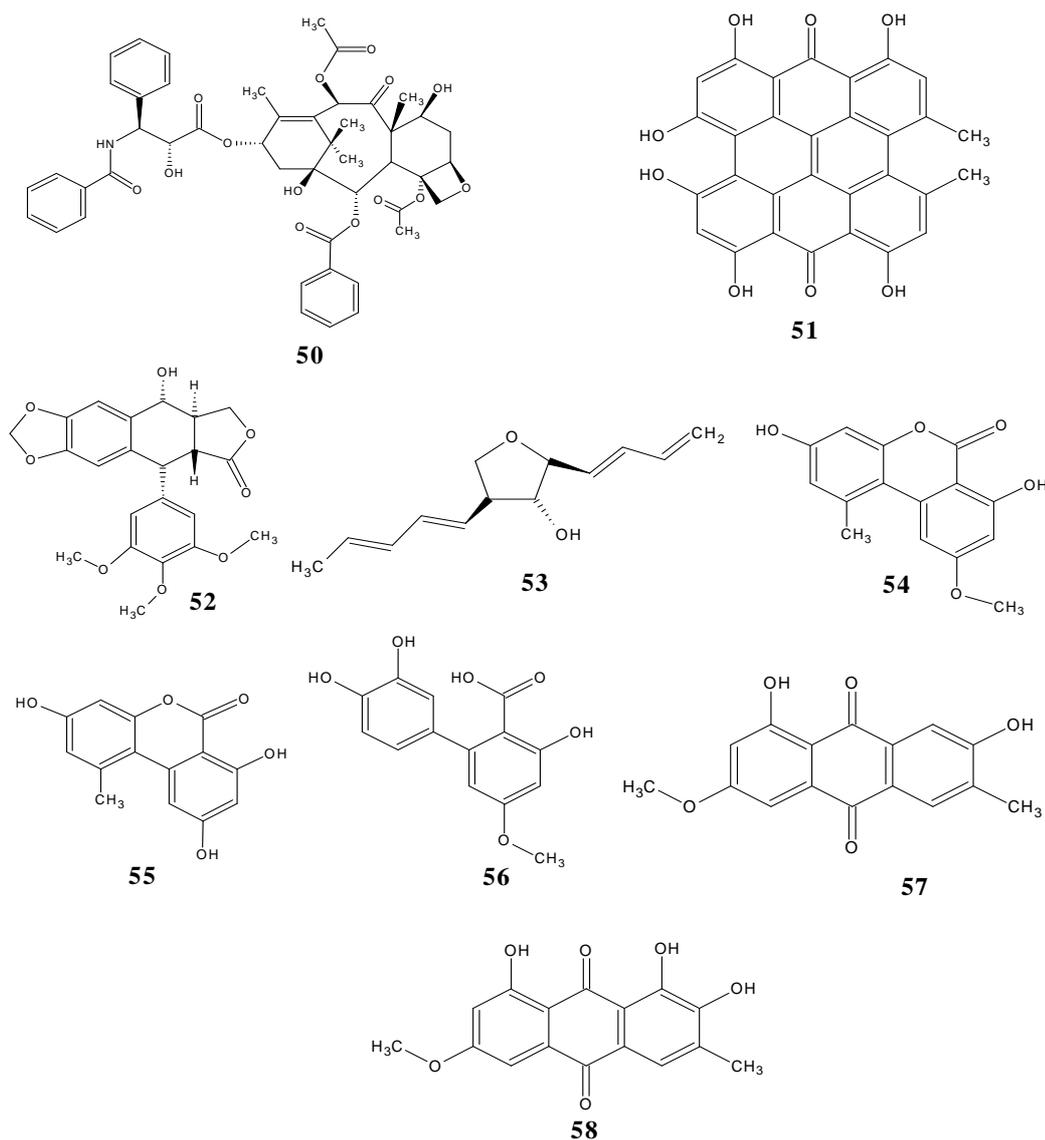
### 1.2.6 Metabólitos isolados de fungos endofíticos que também são produzidos por espécies vegetais

Muitos estudos na atualidade têm mostrado que muitos metabólitos secundários importantes isolados de plantas podem ser produzidos por fungos endofíticos, o que tornam esses microorganismos uma alternativa na busca desses metabólitos (STIERLE *et al.*, 1993 e 1995), além do taxol (**50**), importante medicamento que tem atividade anticâncer e que é produzido planta *Taxus brevifolia* e por diversos fungos com destaque para o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (ALY *et al.*, 2010). Outro metabólito produzido por uma planta e um fungo associado é a lignana podofilotoxina (**51**) que é um precursor de uma droga anticâncer, e foi isolada do fungo *Fusarium oxysporum*, endófito de *Juniperus recurva* planta medicinal que acumula podofilotoxina (KOUR *et al.*, 2008).

Outro metabólito inicialmente isolado de planta e que hoje é relatada a sua produção por um endofítico, é a hipericina (**52**). A hipericina é um metabólito com atividades antiinflamatória, antimicrobiana e com atividade antioxidante, foi originalmente obtido do extrato da erva medicinal *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) sendo também identificado nas culturas do fungo endófito não identificado e codificado como INFU/Hp/KF/34B , isolado de *H. perforatum*. (KUSARI *et al.*, 2008).

Atualmente a ocorrência de metabólitos secundários de fungos endofíticos identificado em extratos e/ou frações de plantas também é grande, como exemplo, tem-se o alternariol isolado e identificado de diversas espécies do fungo *Alternaria*, e que também foi identificado como um metabólito da planta *Anthocleista djalonensis*, e o aureonitol (**53**) um metabólito do fungo *Chaetomium*, e que foi isolado do extrato da planta *Helichrysum aureo-nitens* (ALY *et al.* 2010). Metabólitos fúngicos, como alternariol (**54**), alternariol monometil éter (**55**), altenusina (**56**), macrosporina (**57**) e metilalaternina (**58**) isolados das linhagens endofíticas de *Alternaria* e *Ampelomyces*, foram também identificados em frações da sua correspondente plantas hospedeiras *Polygonum senegalense* e *Urospermum picroides* por meio da LC / MS (ALY *et al.*, 2008a, b).

Como mostrado muito fungos endofíticos são capazes de biossintetizar os mesmos produtos naturais que ocorrem em plantas e vice-versa. No entanto permanece uma questão em aberto, saber se uma transferência horizontal de genes ocorreu em algum momento durante a coevolução de plantas e microrganismos endofíticos. Essa transferência permitiria que o receptor conseguisse executar as mesmas reações biossintéticas que estão presentes no doador (ALY *et al.*, 2010).



**Figura 10:** Substâncias isoladas e/ou identificadas de fungos endofíticos e espécies vegetais.

### 1.3 Espécie vegetal hospedeira

Algumas estratégias na seleção da planta podem ser utilizadas para uma melhor seleção da espécie vegetal hospedeira, garantindo assim melhores oportunidades no isolamento de fungos endofíticos quimicamente promissores (STROBEL *et al.*, 2004), entre essas estratégias estão: selecionar plantas de ambiente úmido, possuindo diferentes estratégias de sobrevivência e com biologia incomum; planta com histórico etnobotânico que relate seu uso e a aplicação específica de partes do vegetal; plantas endêmicas que ocupam solos antigos e plantas nativas de áreas com grande biodiversidade.

A planta selecionada para o isolamento dos fungos endofíticos foi *Hancornia speciosa* (apocinaceae), popularmente conhecida como mangabeira. Nativa do Brasil, e é encontrada vegetando em solos profundos, pobres e arenosos em várias regiões do país, desde os Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até as áreas sob Cerrado da Região Centro-Oeste; verifica-se ainda sua ocorrência nas Regiões Norte e Sudeste (LORENZI, 2002).

*Hancornia speciosa* é uma planta arbórea de porte médio, que atinge de 5 a 10 metros de altura. A mangabeira (*Hancornia speciosa*) possui um fruto extremamente apreciado que é consumido in natura, além de ser utilizado na fabricação de refrescos, sorvetes, doces secos, compotas, no preparo de vinho e vinagre (PARENTE *et al.*, 1985) e na medicina popular (FERREIRA, 1980). Além do aproveitamento da fruta, a mangaba pode ser explorada na produção de borracha (PAULA, 1992), que é utilizada na região dos cerrados para impermeabilizar tecidos, confeccionar bolas e para tratar luxações e hipertensão (HIRSCHMAN e ARIAS, 1990).

### 1.3 Estudo químico de *Hancornia speciosa*

Sampaio *et al.*, 2005, estudando o látex dos frutos de *Hancornia speciosa* isolou os triterpenos lupeol,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina e uma mistura contendo 07 ésteres 3- $\beta$ -O-acil-lupeol. A composição química dos componentes voláteis dos frutos foi investigada por Sampaio *et al.*, 2006, onde foram identificados 37 compostos, sendo 9 os componentes principais (77,69% do total do óleo). Sendo eles: propanoato de

etila, acetato de *n*-propila, furfural, 1-hexanol, 3-metil-2-butenal, acetato de 2-metilpropila, acetato de 3-metil-3-butenol, (Z)-3-hexenol, acetato de (Z)-3-Hexenol, acetato de hexila, *cis*-óxido de linalol, *trans*-óxido de linalol, linalol, nonanal, benzenoetanol e  $\alpha$ -terpineol.

#### **1.4 Os fungos *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Phomopsis* sp., e *Guignardia* sp., submetidos ao estudo químico.**

##### **1.4.1 Os fungo *Aspergillus* sp e *Aspergillus niger* isolados de *Hancornia speciosa***

###### **1.4.1.1 O gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus*, possui um grande número de espécies, e são pertencentes à classe dos Mitospóricos, sendo largamente encontrado na natureza, pois como não necessitam de uma boa nutrição, podem ser isolados de diversos locais, como: plantas, solo, ar, material em decomposição e no ar (SLIVINSKI, 2007). Quanto à diferenciação pode-se definir como sendo “simples”, já que possuem diferentes cores e texturas a depender da espécie de *Aspergillus*.

Várias espécies têm sido descritas como produtoras de metabólitos tóxicos (BLUMENTAL, 2004), entre as diversas espécies do gênero, os fungos do grupo *Aspergillus niger* (conhecido como o *Aspergilli* preto, subgênero *Aspergillus* da seção circundante *Nigri*). Esse grupo tem cerca de 18 espécie da qual as mais comuns são *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. acidus*, *A. carbonarius* e *A. ibericus* (NILSEN *et al.*, 2009), e entre essas espécies o *A. niger* se destaca por ser utilizado em vários processos biotecnológicos como na produção de alimentos e na produção comercial de ácido cítrico e glucônico dentre outros (NILSEN *et al.*, 2009).

#### 1.4.1.2 Diversidade Química do Gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam-se como uma importante fonte de produtos naturais úteis para a exploração na medicina, agricultura e na indústria, pois os micro-organismos desse gênero são responsáveis por uma grande variedade de produtos naturais bioativos. Do fungo *A. niger*, foram isolados o compostos os rubrofusarem B **(59)**, com atividade citotóxicas, aurasperona A **(60)** com atividade antioxidante (SONG *et al.*, 2005), e o ácido tensiúico A **(61)** com atividade antimicrobial ativa contra *Bacillus subtilis* (HASEGAWA *et al.*, 2007), dentre outros metabólitos (NILSEN *et al.*, 2009).

Wang *et al.*, em 2002 isolou o composto brefeldina A **(62)**, produzido por *A. clavatus* que apresentou atividade antifúngica, antiviral e citotóxica contra várias linhagens tumorais quando e com atividade comparada ao taxol. Diversos alcalóides da classe das dicetopeperazinas com atividade antimicrobiana foram isolados do *A. fumigatus* (FURTADO *et al.*, 2004). As substâncias aspinoclorina **(63)** (SAKATA *et al.*, 1987), fenilistidina **(64)** (KANO *et al.*, 1997) com atividade antibiótica e citotóxica respectivamente e aspernolido A **(65)** (PARTAVATKAS *et al.*, 2009) com atividade citotóxica foram isoladas dos fungos *A. flavus* e *A. ustus* respectivamente. Os compostos nigeraspirona A **(66)** e naftoquinoimina isolados também de *A. flavus* e *A. ustus* apresentaram atividade antifúngica contra a *Candida albicans* (ZHANG *et al.*, 2007) e orizina C **(67)**, isolada de *Aspergillus oryzae* apresentou atividade contra *Escherichia coli* (QIAO *et al.*, 2010).

Em 2004 Li *et al.*, isolaram do fungo *Aspergillus* sp., a golmoenona **(68)** e neoechinulina A **(69)**, as duas com atividade antioxidante.

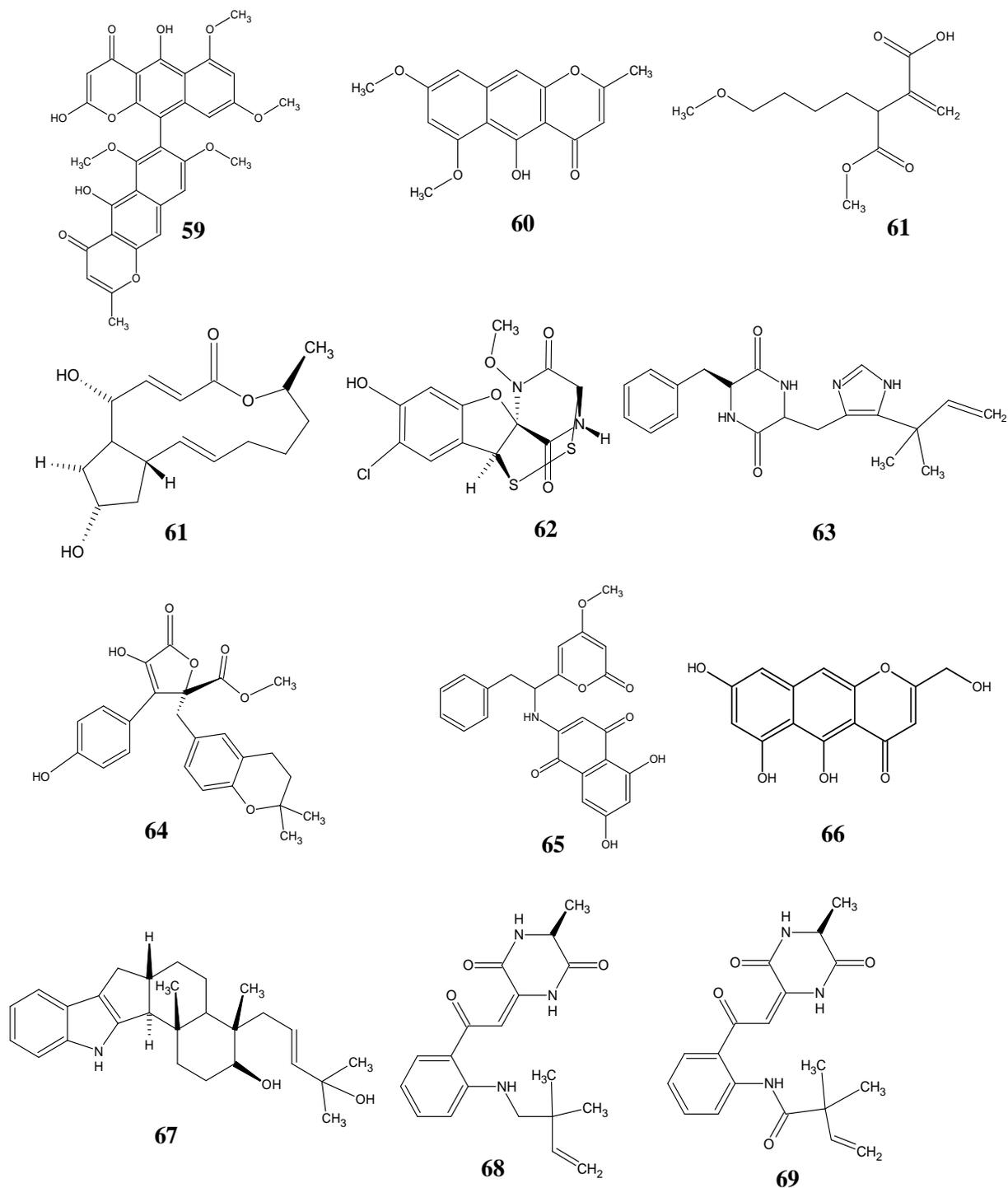


Figura 11: Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

### 1.4.2 Fungos do gênero *Phomopsis*

O gênero *Phomopsis* corresponde à forma Mitospórica (assexuada) do ascomiceto *Diaporthe* (ordem Diaporthales). Como estes não apresentam fase sexuada, ou só a apresentam em condições especiais, são classificados como ascomicetos mitospóricos, e são classificados na classe dos Coelomycetes, por produzirem conídios (esporos assexuais) (SILVA, 2005).

#### 1.4.2.1 Diversidade química do gênero *Phomopsis*

O gênero *Phomopsis* é conhecido por ser uma rica fonte de metabólitos secundários bioativos (ISAKA *et al.*, 2001, YANG *et al.*, 2010). Dentre as diversas estruturas produzidas por este gênero, podemos destacar: 2,4-diidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila (**70**) e fomopsilactona (**71**) com forte atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, bem como atividade citotóxica contra a linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa), em experimentos in vitro (SILVA *et al.*, 2006). As substâncias citosporona B (**72**) e C (**73**) isolados do fungo *Phomopsis* sp., foram ativas contra *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*, (HUANG *et al.*, 2008), já phoenamida (**74**) e phomonitroester (**75**), também isolado do *Phomopsis* sp., apresentaram atividade antibacteriana contra o *Mycobacterium tuberculosis* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2007). Outro composto isolado de *Phomopsis* sp. foi cicloepoxilactona (**76**) uma substância com atividade antibacteriana, antifúngica e algicida contra *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum* e *Chlorella fusca*, respectivamente (HUSSAIM *et al.*, 2009).

Outras substâncias isoladas de *Phomopsis* que merecem destaque são as phomopsina A (**77**) e a citocalasina H (**78**) ambas com atividade antitumoral (TAO *et al.*, 2008), os oblogolideos Y (**79**) e Z (**80**), isoladas do fungo *Phomopsis* sp., ambas com atividade citotóxica (BUNYAPAIBOONSRI *et al.*, 2010) e a phomoindena A (**81**), também isolada do fungo *Phomopsis* sp., esta substância mostrou pequena atividade citotóxica (CHEN *et al.*, 2010).

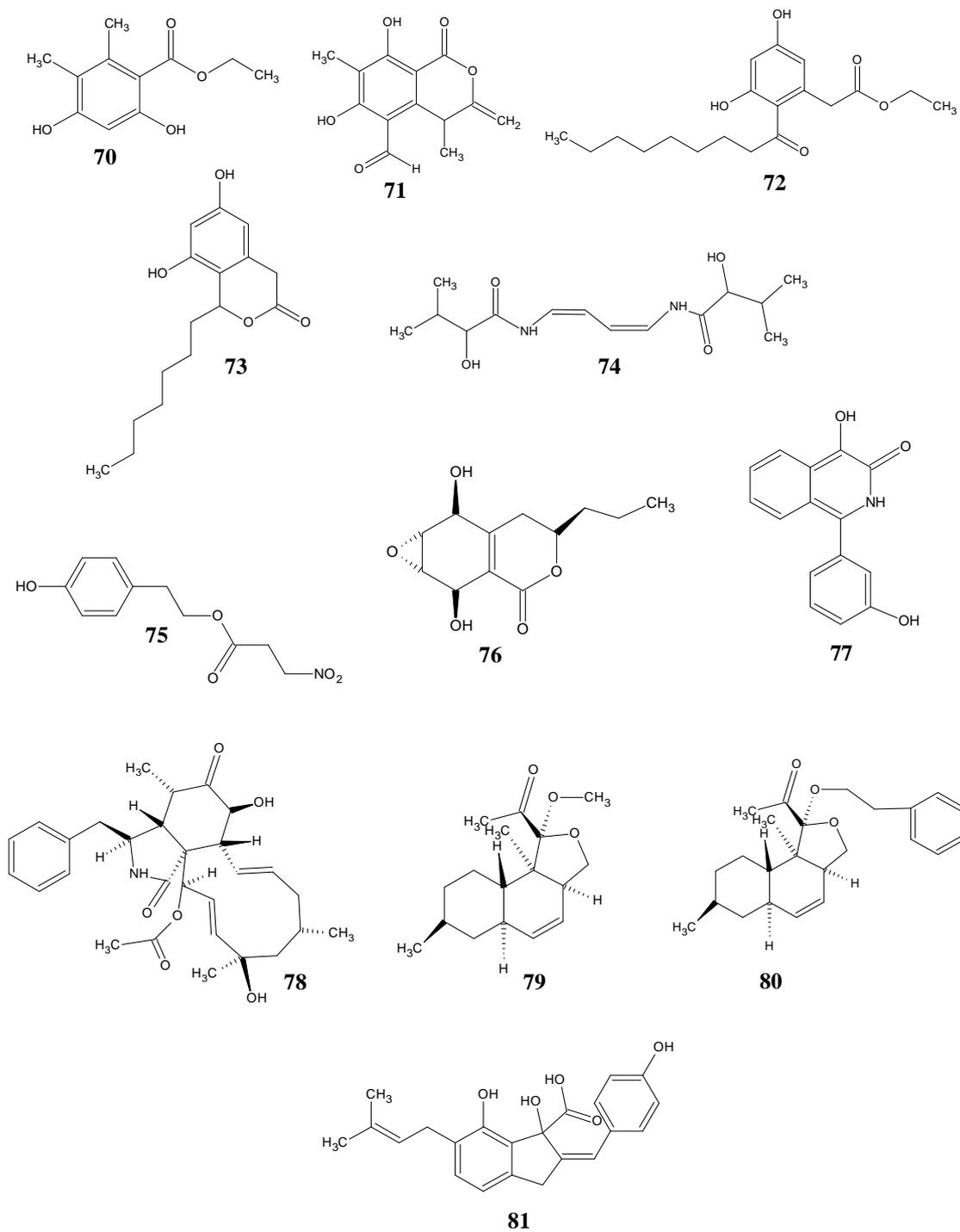


Figura 12: Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao fungo *Phomopsis* sp.

### 1.4.3 Fungos do gênero *Guignardia*

O gênero *Guignardia* foi descrito pela primeira vez por Viala e Ravaz, em 1892 compreendendo as formas anamorfica de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados (SIVANESAN, 1984). Tanto a forma anamórfica como a telemórfica tem sido isolados como fungos endofíticos (POSSIEDE, 2004). O gênero *Guignardia* é um fungo da Classe Ascomycetes, Subclasse Loculoascomycetidae, Ordem Dothideales, Família Dothideaceae (SIVANESAN, 1984).

Na fase imperfeita, os conídios encontram-se no interior dos picnídios, estruturas globosas, macroscopicamente pequenas, seu estroma é pseudoparenquimatoso, composto por entrelaçamento de hifas multinucleadas, com mistura de células esféricas, irregulares com coloração marrom escura (VAN DER AA, 1973; JOHNSTON e FULLERTON, 1988). Seus conídios são unicelulares, ovóides, elípticos ou subglobosos, levemente clavados quando jovens característicos de espécies de *Phyllosticta* (PUNITHALINGAM, 1974). O crescimento das colônias, em diferentes meios de cultura é lento. A superfície da colônia forma uma crosta negra, exceto em algumas regiões sendo amarelada e de forma irregular (JOHNSTON, FULLERTON, 1988; BAAYEN *et al.*, 2002).

Diversas espécies do gênero *Guignardia* são descritas na literatura como um fungo patogênico dos hospedeiros (KUPPER *et al.*, 2006) ocasionando pequenas lesões nas folhas em alguns casos nos frutos chamadas de citros como a ocasionada pela espécie *G. citricarpa* (POSSIEDE, 2004). Muitos trabalhos, porém mostram que muitos fungos do gênero *Guignardia* foram isolados de plantas assintomáticas, sugerindo assim a existência de espécie patogênica e endofíticos assintomáticos do gênero *Guignardia* com suas morfologias muito semelhantes (KIELY, 1948) essas espécies podem em muitos casos co-habitar o mesmo hospedeiro (McONIE, 1964). Diversas pesquisas apontam também para a existência de duas variedades do fungo, uma patogênica e outra não, coabitando o mesmo hospedeiro (KÓTZE, 1981; BLANCO, 1999; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002).

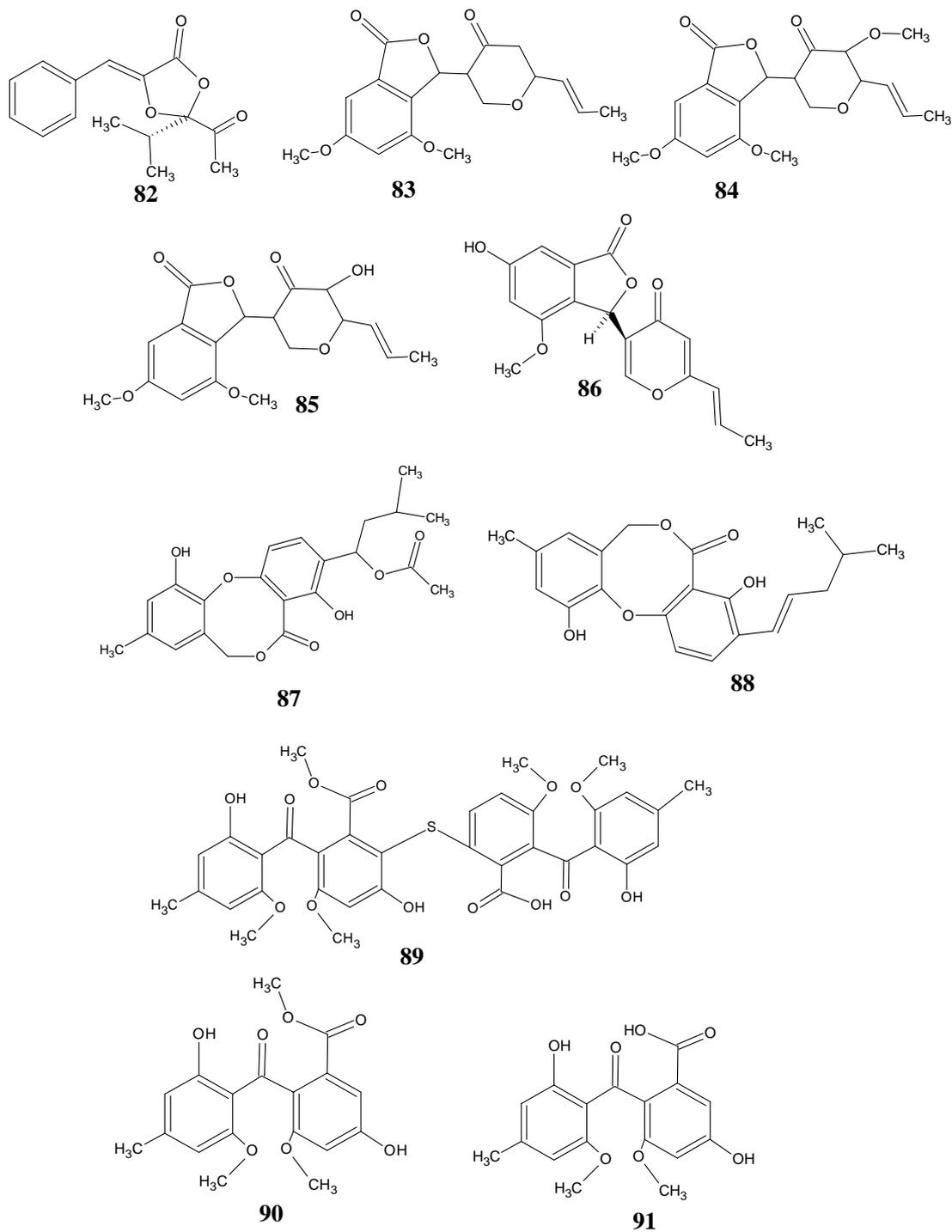
#### 1.4.3.1 Diversidade química do gênero *Guignardia*

Os fungos do gênero *Guignardia* apresentam-se como uma importante fonte em potencial de produtos naturais a ser explorada na medicina, agricultura e na indústria, pois existem relatos de que o extrato bruto do fungo *Guignardia* sp., possui potente atividade antimicrobiana especificamente atividade antifúngica e antibacteriana sendo usado em composições farmacêuticas. O principal metabólito desse extrato é o ácido guignardico **(82)** (RODRIGUES-HEERKLOTZ *et al.*, 2002 e 2001). Além disso, os microorganismos desse gênero ainda são poucos explorados quanto a sua diversidade metabólica.

Alguns estudos das substâncias produzidas por esse fungo e de suas formas teleomorfas como a *Phyllosticta* mostram que esses micro-organismos produzem uma grande variedade de produtos naturais bioativos como fitotoxinas e antibacterianos (RODRIGUES-HEERKLOTZ *et al.*, 2001). Sesquiterpenos, lactonas, ácido heptelídico e compostos análogos, isolados do extrato bruto de fungos do gênero *Guignardia* têm sido descritos como compostos antimicrobianos ou possuindo outras bioatividades (CALLHOUN *et al.*, 1992). Em 2007 Xia *et al.*, isolou vermistatina **(83)** com atividade antifúngica, Metoxivermistatina **(84)** com atividade citotóxica e Hidroxivermistatina **(85)**. Em 2008 isolou o 6-demetil-vermistatina **(86)** e dois derivados do Penicillido **(87)** e **(88)** (XIA *et al.*, 2008).

Recentemente Wang *et al.*, (2010) isolaram o primeiro produto natural com enxofre contendo um dímero da benzofenona, chamado guignasulfido **(89)** com atividade citotóxica e antibacteriana, além de dois derivados da benzofenona conhecidos, o monometilsulocina **(90)** e o ácido rizotônico **(91)** ambas com atividade antibacteriana (WANG *et al.*, 2010).

Essa grande variedade de substâncias isoladas dos diversos gêneros e espécies de fungos endofíticos, mostra que esse grupo de microorganismos são bastantes promissores na busca de substâncias bioativas. Tais resultados aliados a coevolução do endófito e de seu hospedeiro ratificaram a importância da escolha do hospedeiro, pois durante o processo de coevolução pode ocorrer a transferência de genes (AZEVEDO *et al.*, 2000).



**Figura 13:** Substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Guignardia*.

# *Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico de fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Hancornia speciosa*, visando o isolamento e identificação estrutural dos metabólitos secundários, avaliando a atividade antioxidante dos extratos e/ou desses metabolitos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar, purificar e preservar fungos endofíticos de espécie vegetal *Hancornia speciosa*;
- Iniciar uma micoteca, facilitando posteriores estudos químico/biológico;
- Selecionar isolados fúngicos para estudo químico e biológico;
- Cultivar os fungos selecionados para obtenção dos extratos brutos;
- Fracionar os extratos obtidos dos fungos selecionados por métodos cromatográficos;
- Caracterizar os metabólitos presentes nos extratos por métodos espectroscópicos como RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- Testar o extrato do fungo *Aspergillus* sp., nos bioensaios de atividade antioxidante (**Etaapa realizada pelo Professor Dr. Humbero dos Matos Reis**);
- Contribuir para o conhecimento da química dos fungos e da interação planta/fungo endofítico;

- Contribuir para futuros estudos biotecnológicos, que visem o aumento na produção de metabólitos bioativos.

# *Materiais e métodos*

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais, instrumentos e reagentes utilizados**

#### **3.1.1 Meios de culturas**

BDA - Batata dextrose ágar da Acumedia

39g/L de água destilada e esterilização (15 min à 121°C)

#### **3.1.2 Meio de cultura líquido**

PDB - batata dextrose da Acumedia

ME - Extrato de Malte da Himedia

24g/L de água destilada e esterilização (15 min à 121°C)

#### **3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)**

As análises foram feitas em placas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV<sub>254</sub> da Merck. As revelações foram efetuadas com irradiações UV de 254nm e 360nm, e exposição a iodo sublimado.

#### **3.1.4 Teste qualitativo para detecção de atividade antioxidante com DPPH**

Nos experimentos para detecção de atividade antioxidante utilizou-se: uma solução de 0,2% de DPPH em metanol, nebulizada sobre placas de CCDC de sílica gel.

#### **3.1.5 Cromatografia em coluna (CC)**

A cromatografia em coluna foi feita usando sílica gel 60 (0,063- 0,200 mm; 70-230 Mesh) da Proquímica, modo normal.

#### **3.1.6 Sílica C-18**

O preparo das amostras para serem injetada no CLAE foram feitas em sílica C-18 ODS (Accu Bond<sup>II</sup> SPE; n° part 189-1302) da Agilent technologies.

### **3.1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho semipreparativo da Shimadzu LC-6 acoplado ao detetor SPD –M2DA 330 PhotoDiodo-Array Ultra-violeta (PDA-UV), usando coluna analítica Shimpack (ODS C-18, 5  $\mu$ , 150 x 4,6 mm) e coluna semi-preparativa da Phenomenex (ODS C-18, 10  $\mu$ , 250 x 10 mm ). E em um aparelho analítico da Varian. Módulos: 1-Bomba: “Polaris<sup>®</sup>” 230 Solvente Delivery Module; 2-Detector: “Polaris<sup>®</sup> UV/Vis Detector. Foi usado coluna analítica Shimpack (ODS C-18, 5  $\mu$ , 150 x 4,6 mm).

### **3.1.8 Padrão de ácido kójico usado**

O padrão comercial ácido kójico usado neste trabalho foi adquirido da Sigma Aldrich.

### **3.1.9 A concentração do solvente AcOEt**

Foram feitas sob pressão reduzida, usando evaporadores Fisatom 550.

### **3.1.10 Solventes utilizados**

Não deuterados da Qhemis p.a.:

-Clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e hexano.

Não deuterados da Synth p.a.:

-Metanol, ácido clorídico.

Deuterados da Tedia Brazil:

-Clorofórmio, metanol, acetonitrila, água.

Grau HPLC da Jt Baker:

-Metanol.

Reagentes usados da Synth p.a.:

- Carbonato de sódio, hidróxido de sódio.

### **3.1.10.1 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )**

Experimentos uni e bidimensionais foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e na UNESP campus Araraquara em espectrômetro Varian INOVA-500 operando a 500 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$  e em 126 MHz para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ . Foi utilizado TMS como referência interna.

### **3.1.10.2 Espectrômetro de massas**

O Experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em espectrômetro de massas de alta resolução da Micromass; técnicas, ionização por electrospray TOF-MS-ES (+) e também TOF-MS-MS-ES (+). As substâncias foram preparadas em solução de MeOH com 0,1% de ácido fórmico.

### **3.1.10.3 Outros equipamentos**

Balança analítica – Shimadzu AW220

Autoclave vertical – Primatec CS

Câmara de fluxo laminar – Fulterflux FLV- 1266/4

Papel indicador de pH 0-14 da Merck

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Seleção e coleta do material vegetal

Foram selecionadas e coletadas folhas de *Hancornia speciosa* no povoado Parque Santa Rita em São Cristovão-SE. Exicata da espécie vegetal encontra-se depositada no herbário da UFS.

### 3.2.2 Isolamento dos fungos endofíticos

A superfície do material vegetal (folhas) foram esterilizadas de acordo com a literatura (MAIER *et al.*, 1997) por imersão das folhas em NaClO (2%) por 5 minutos e em etanol 70% por 1 minuto, lavagem duas vezes em água estéril por 10 minutos e a seguir colocada para secar.

Pedaços de folhas cortados assepticamente (3 a 4) foram colocados para crescer em placas de Petri contendo os meios de culturas batata dextrose ágar (BDA), todos contendo antibiótico (Sulfato de Gentamicina) para evitar o crescimento bacteriano.

O crescimento dos fungos foi monitorado diariamente, após cada fungo atingir 1-2 cm em diâmetro. A seguir foram repicadas sucessivamente até obtenção das linhagens puras. A pureza dos isolados foi determinada pela aparência uniforme nas placas com os meios próprios. Esse processo resultou em 14 isolados fúngicos conforme observado na tabela abaixo (**Tabela 1**, p. 34).

**Tabela 1.** Fungos isolados da espécie vegetal *Hancornia speciosa*.

Código do Fungo	Classificação
P3P6F2	<i>Aspergillus niger</i>
P2P7P2	<i>Guignardia</i> sp
P2P1F4	Não identificado
P2P1F3	Não identificado
P2P2F2	<i>Phomopsis</i> sp
P2P1F2	Não identificado
P3P6F1	Não identificado
P1F1	Não identificado
P3F1	<i>Phytophthora</i> sp
P3F2	<i>Aspergillus</i> sp
P3F3	<i>Curvularia</i> sp
YF1	Não identificado
YF2	<i>Fusarium</i> sp
ZF1	Não identificado

### 3.2.3 Conservação dos endofíticos

Depois de considerados puros, os isolados foram repicados para frascos de 10 mL contendo água estéril, os quais foram em seguida lacrados e mantidos a temperatura ambiente para a preservação conforme a metodologia de Castellani (1939).

### 3.2.4 Classificação dos fungos

As linhagens puras foram classificadas pelo Prof. João Basílio de Mesquita do Departamento de Agronomia da UFS.

### 3.2.5 Cultivo em pequena escala do isolados fúngicos em meio líquido PDB para seleção dos endofíticos

Os 14 isolados fúngicos foram primeiramente repicados para placas de Petri contendo BDA e incubados por sete dias. Após este período estes foram inoculados em 400 mL de meio líquido PDB, e mantidos a temperatura ambiente por 28 dias.

### 3.2.6 Obtenção dos extratos AcOEt das culturas puras dos endofíticos

Após o período de fermentação líquida, os caldos foram separados dos micélios por filtração, extraídos três vezes com 200 mL de acetato de etila e secos em evaporador rotatório, fornecendo os respectivos extratos AcOEt, os quais tiveram sua massa obtida em balança analítica.

### 3.2.7 Avaliação qualitativa com DPPH da atividade antioxidante dos extratos AcOEt

Os extratos foram submetidos à CCDC sílica gel no modo normal, e eluidas com DCM/MeOH 90/10, (esta mistura foi a que apresentou melhor resultado, uma vez que o objetivo é a detecção de zonas de inibição do extrato bruto, não o isolamento e/ou detecção de substâncias puras) seguida de nebulização com solução 0,2% de DPPH em metanol.

Após exposição à luz natural ou após descoramento do fundo da placa (resultante da oxidação do DPPH), apareceram em alguns extratos manchas amarelas, que evidenciaram os extratos com possíveis propriedades antioxidantes, conforme metodologia descrita por Cuendet, 1997.

### 3.2.8 Seleção dos endofíticos para o estudo químico

Para seleção dos endofíticos foi avaliado a produção de massa do extrato bruto produzida em 400 mL de meio líquido PDB, se o fungo foi identificado, se apresenta atividade antioxidante quando avaliada pelo teste qualitativo com DPPH e pelo seu histórico pesquisado na literatura (periódicos) quanto à produção de metabólitos bioativos ou não.

### 3.2.9 Fungos endofíticos selecionados

Seguindo critérios expostos acima os fungos selecionados para o estudo químico foram: *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp.

### 3.2.10 Obtenção dos Extratos Brutos em larga escala

Os fungos selecionados foram primeiramente repicados para placas de Petri contendo BDA e incubados por sete dias. Em seguida cada fungo foi crescido em 5000 mL de meio líquido PDB e/ou ME, exceto o *Aspergillus niger* que foi cultivado em 3000 mL de meio PDB. Após o período de fermentação, os caldos foram separados dos micélios por filtração, extraídos com AcOEt e secos em evaporador rotativo, fornecendo os extratos.

### 3.2.11 Obtenção e fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em meio líquido PDB de *Phomopsis* sp.

#### 3.2.11.1 Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB

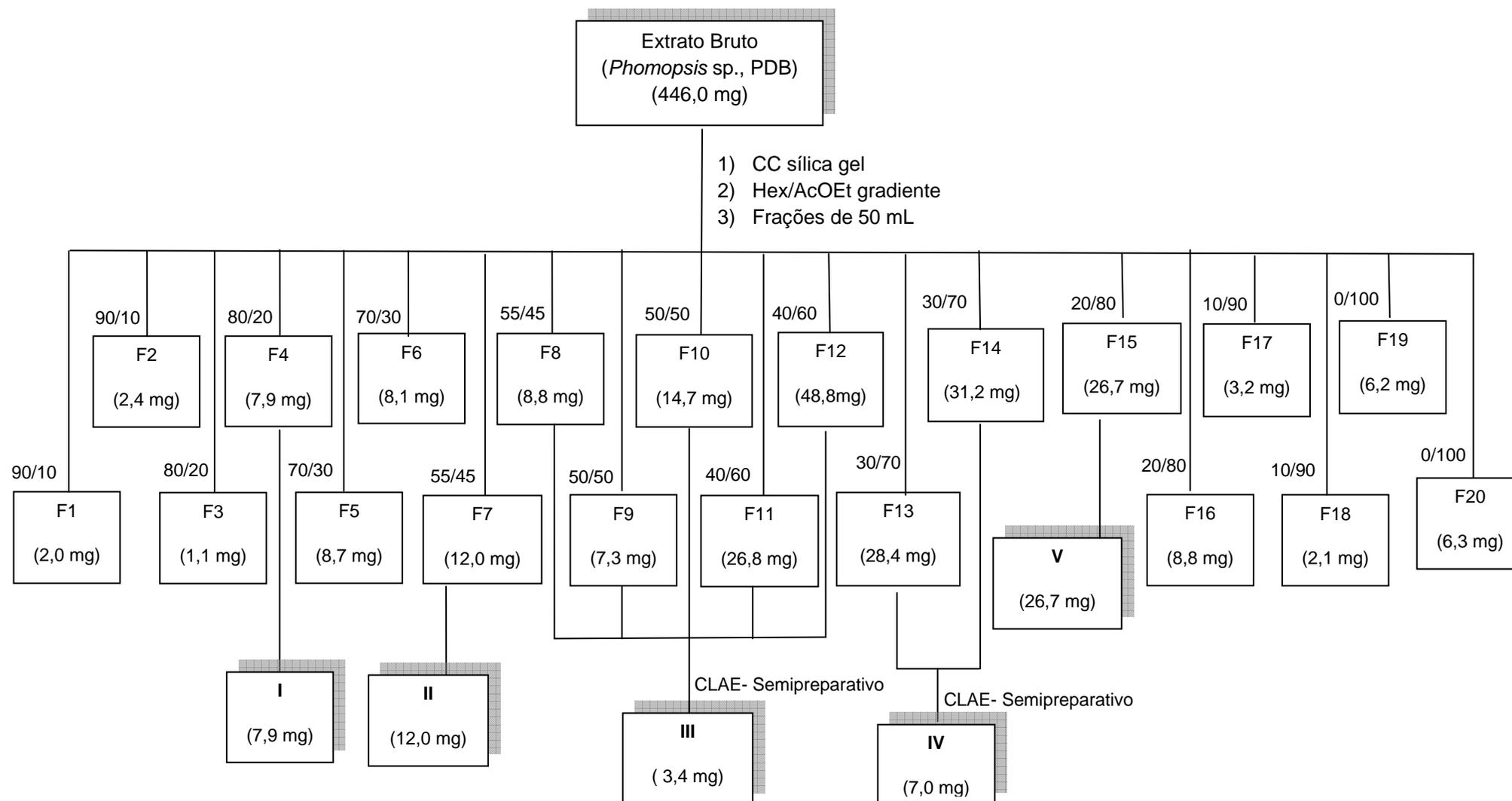
O fungo *Phomopsis* sp., foi cultivado em cinco litros de meio líquido PDB. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído três vezes com metade do volume do cultivo usando AcOEt e seco em evaporador rotatório, fornecendo o respectivo extrato bruto AcOEt-PDB (446,0 mg).

#### 3.2.11.2 Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido PDB

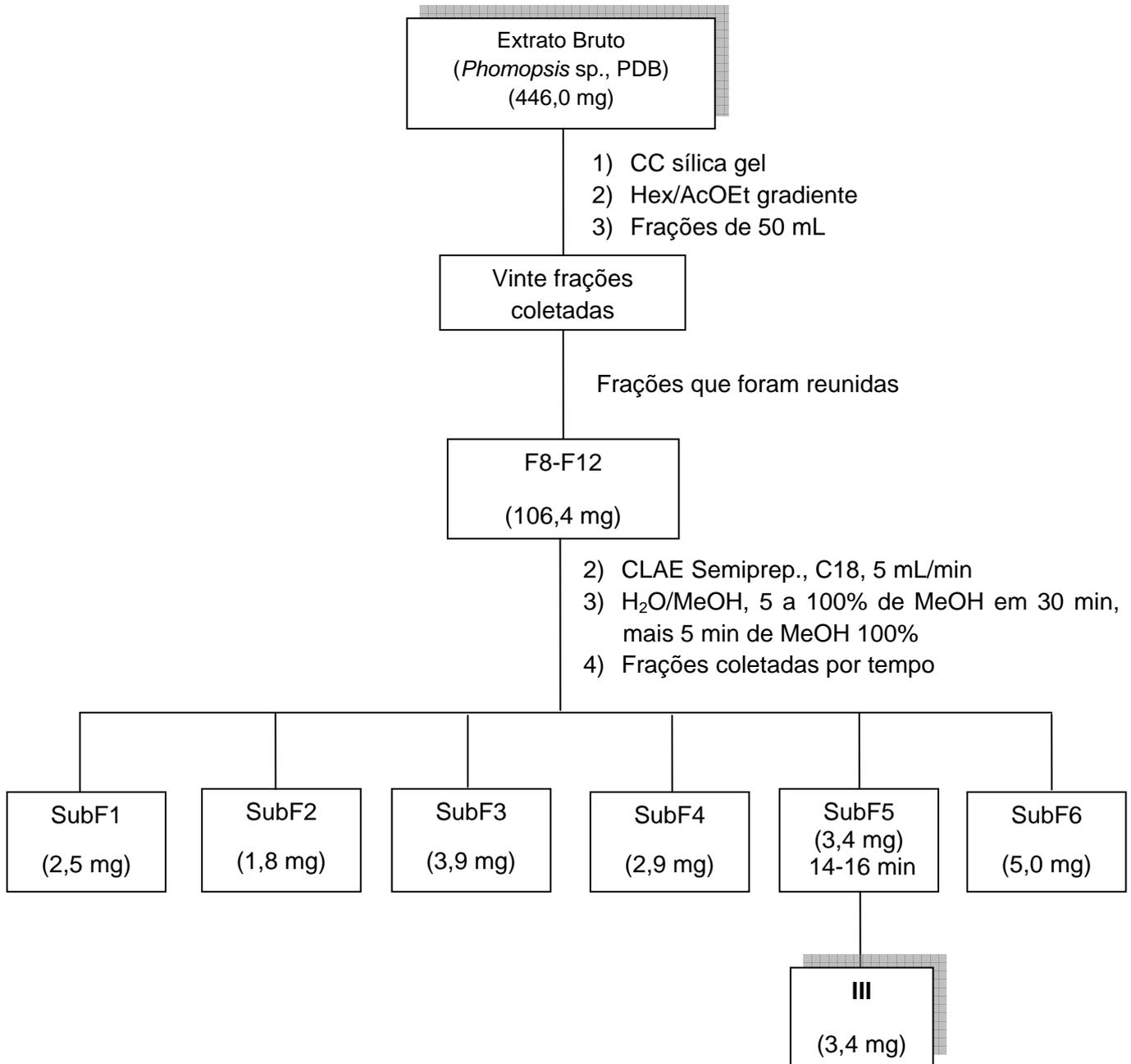
O extrato bruto foi fracionado (**Figura 14**, p. 39) em CC (coluna 15 x 2,5cm, sílica gel) usando um gradiente Hex/AcOEt nas seguintes proporções: 90/10, 80/20, 70/30, 55/45, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90 e 0/100, usando 100 mL de cada sistema de solvente. Foram coletadas duas frações de 50 mL para cada proporção.

Após evaporação do solvente as frações foram avaliadas por CCDC, resultando na substância **I** (fração 4; 80/20 Hex/AcOEt), substância **II** (fração 7; 55/45 Hex/AcOEt) e na substância **V** (fração 15; 20/80 Hex/AcOEt). As frações de F8 a F12; 55/45, 50/50, 50/50, 40/60, 40/60 Hex/AcOEt respectivamente, foram reunidas e fracionadas por CLAE-semipreparativa resultando na substância **III**. As

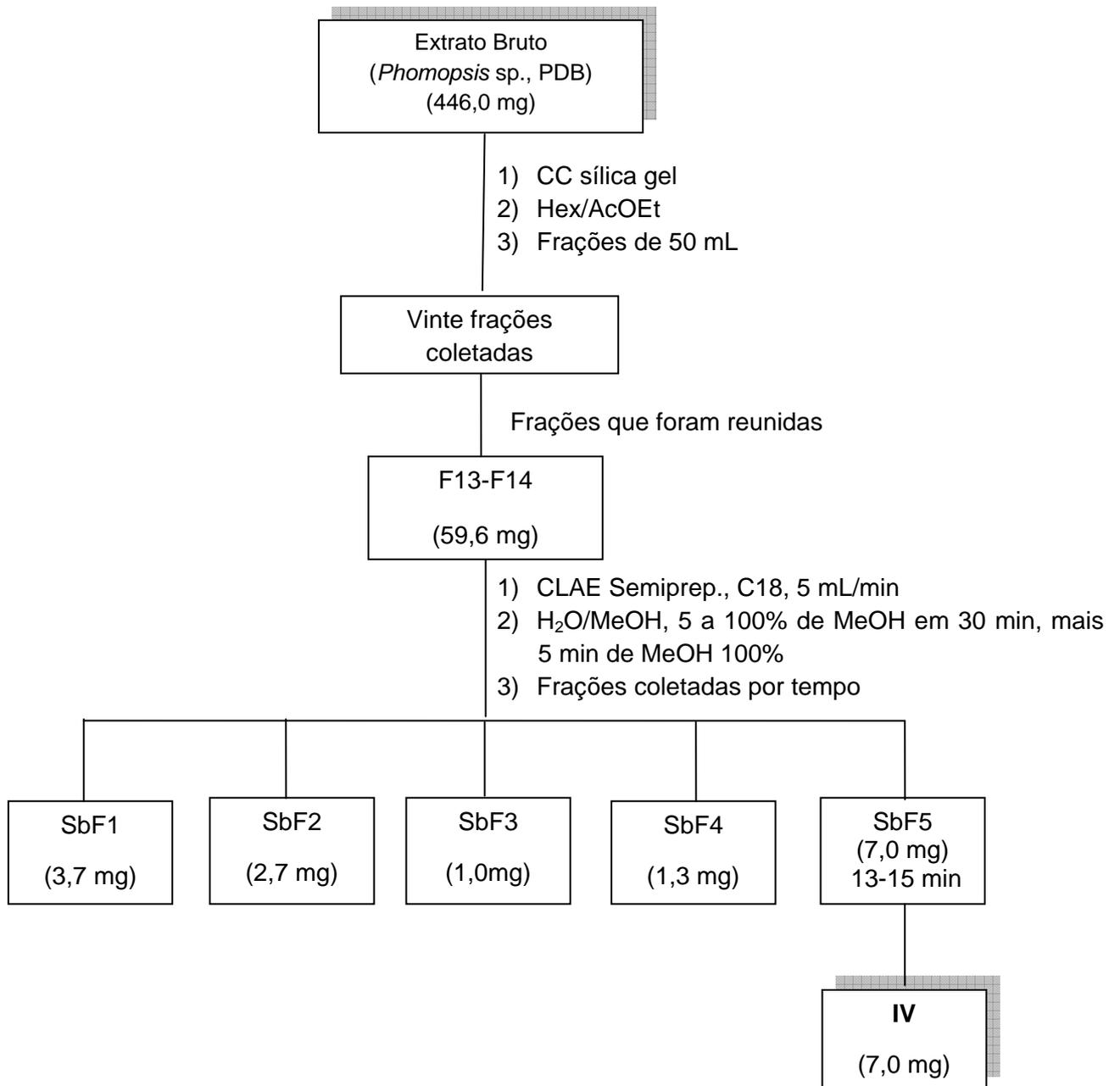
F13 e F14; 30/70 Hex/AcOEt também foram reunidas e fracionadas por CLAE-semipreparativa resultando na substância **IV**.



**Figura 14:** Fluxograma do fracionamento do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB do fungo *Phomopsis* sp.



**Figura 15:** Fluxograma do fracionamento das frações juntas F8-F12.



**Figura 16:** Fluxograma do fracionamento das frações juntas F13 e F14.

### **3.2.12 Obtenção e fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em meio líquido ME de *Phomopsis* sp.**

#### **3.2.12.1 Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME**

O fungo *Phomopsis* sp., foi cultivado em cinco litros de meio líquido ME. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído três vezes com metade do volume do cultivo com AcOEt e seco em evaporador rotatório, fornecendo o extrato bruto AcOEt-ME (400,0 mg).

#### **3.2.12.2 Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido ME**

O extrato bruto foi fracionado (**Figura 17**, p. 44) em CC (coluna 15 x 2,5cm, sílica gel) usando um gradiente DCM/AcOEt nas seguintes proporções: 100/0, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25 e 70/30, usando 100 mL de cada sistema de solvente. Coletando duas frações de 50 mL para cada proporção. As frações obtidas foram avaliadas por CCDC, resultando na substância **VI** (fração 5; 90/10 DCM/AcOEt) e na substância **VII** (fração 10; 80/20 DCM/AcOEt).

### **3.2.13 Obtenção e fracionamento do extrato bruto AcOEt cultivado em meio líquido ME de *Guignardia* sp.**

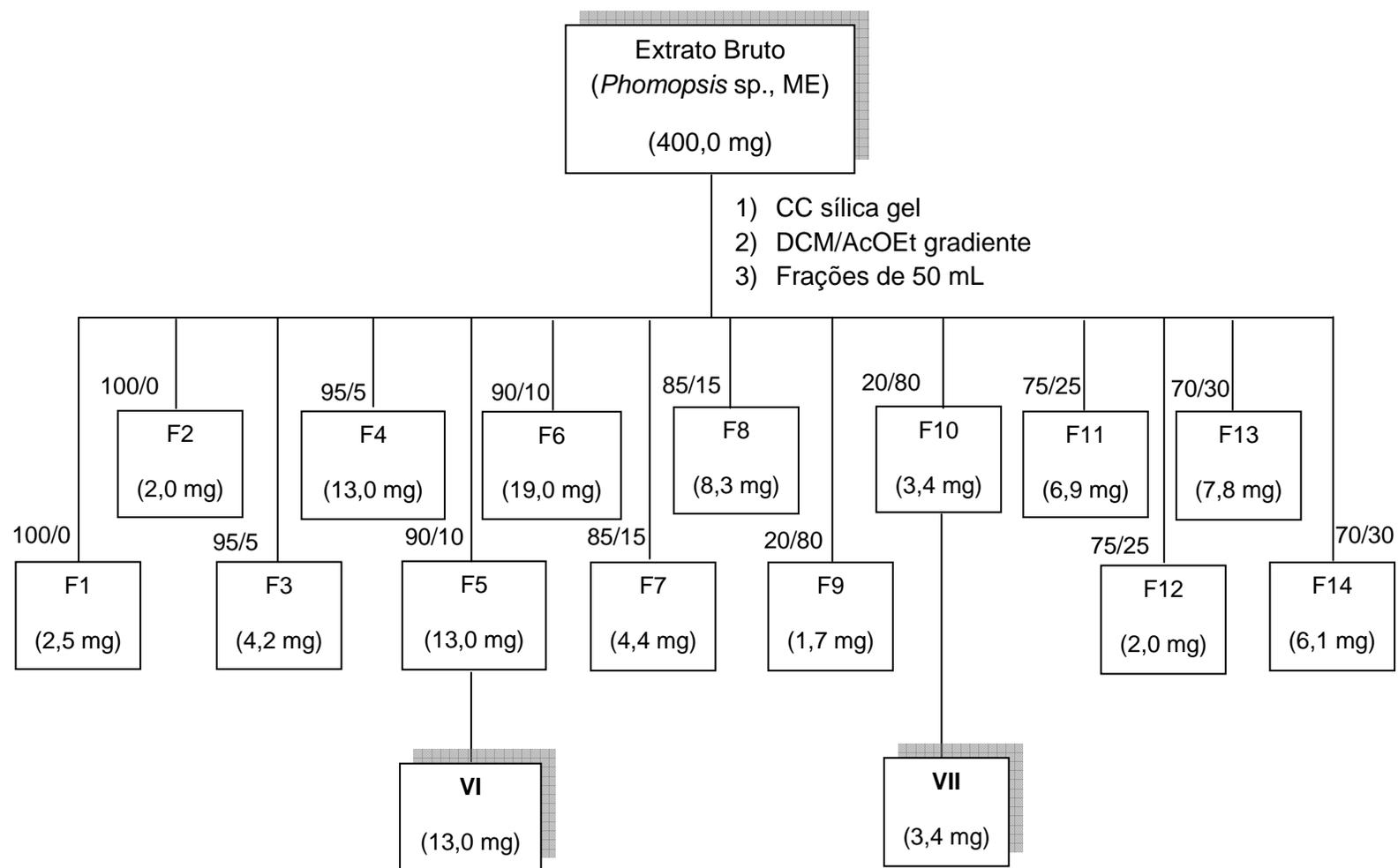
#### **3.2.13.1 Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME**

O fungo *Guignardia* sp., foi cultivado em cinco litros de meio líquido ME. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído três vezes com metade do volume do cultivo com AcOEt e seco em evaporador rotatório, fornecendo o extrato bruto AcOEt-ME (300,2 mg).

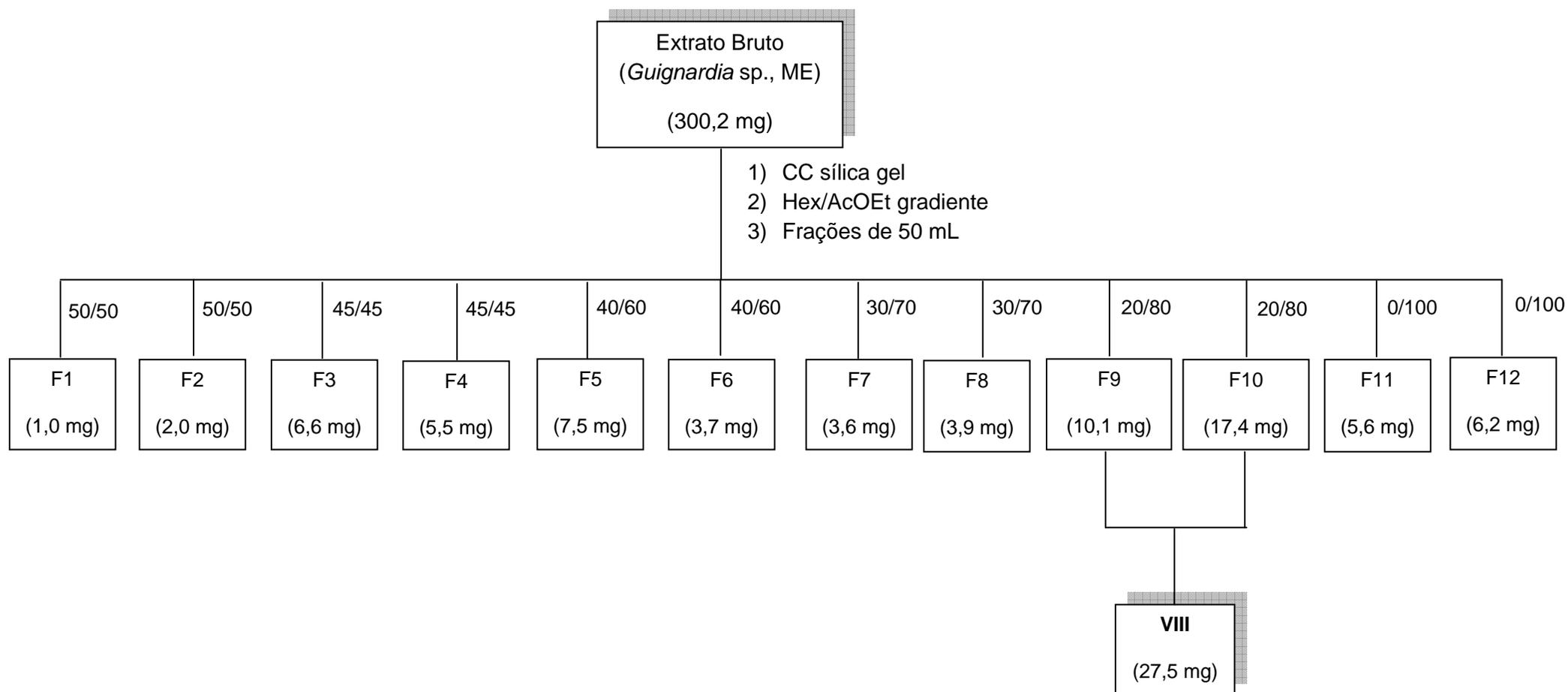
#### **3.2.13.2 Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido ME**

O extrato bruto foi fracionado (**Figura 18**, p. 45) em CC (coluna 15 x 2, 5cm, sílica gel) usando um gradiente Hex/AcOEt nas seguintes proporções: 50/50, 45/55,

40/60, 30/70, 80/20 e 100/0, usando 100 mL de cada sistema de solvente. Coletando duas frações de 50 mL para cada proporção. As frações obtidas foram avaliadas por CCDC, resultando na substância **VIII** (fração 9 e 10; 30/70 DCM/AcOEt).



**Figura 17:** Fluxograma da separação das substâncias **VI** e **VII** a partir do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME do *Phomopsis* sp



**Figura 17:** Fluxograma da separação da substância **VIII** a partir do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME do *Guignardia* sp.

### **3.2.14 Obtenção e fracionamento do extrato bruto de *Aspergillus niger* cultivado em meio líquido PDB**

#### **3.2.14.1 Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido**

O fungo *Aspergillus niger* foi cultivado em três litros de meio líquido PDB. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído três vezes com metade do volume do cultivo com AcOEt e seco em evaporador rotatório, fornecendo o extrato bruto AcOEt-PDB (371,2 mg).

#### **3.2.14.2 Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido PDB**

O extrato bruto foi fracionado (**Figura 18**, p. 48) em coluna cromatográfica (coluna 15 x 3 cm sílica gel) usando um gradiente AcOEt/MeOH nas seguintes proporções: 95/5, 90/10, 80/20, 50/50 e 0/100, usando 200 mL de cada sistema de solvente, coletando 82 frações de 11 mL cada.

As frações foram analisadas em CCDC e as frações com uma única mancha e mesmo R<sub>f</sub> foram reunidas, resultando na substância **IX** (frações 11 – 17; 90/10 AcOEt/MeOH) e na substância **X** (frações 59 – 69; 50/50).

### **3.2.15 Obtenção e fracionamento do extrato bruto de *Aspergillus niger* cultivado em meio líquido ME**

#### **3.2.15.1 Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido**

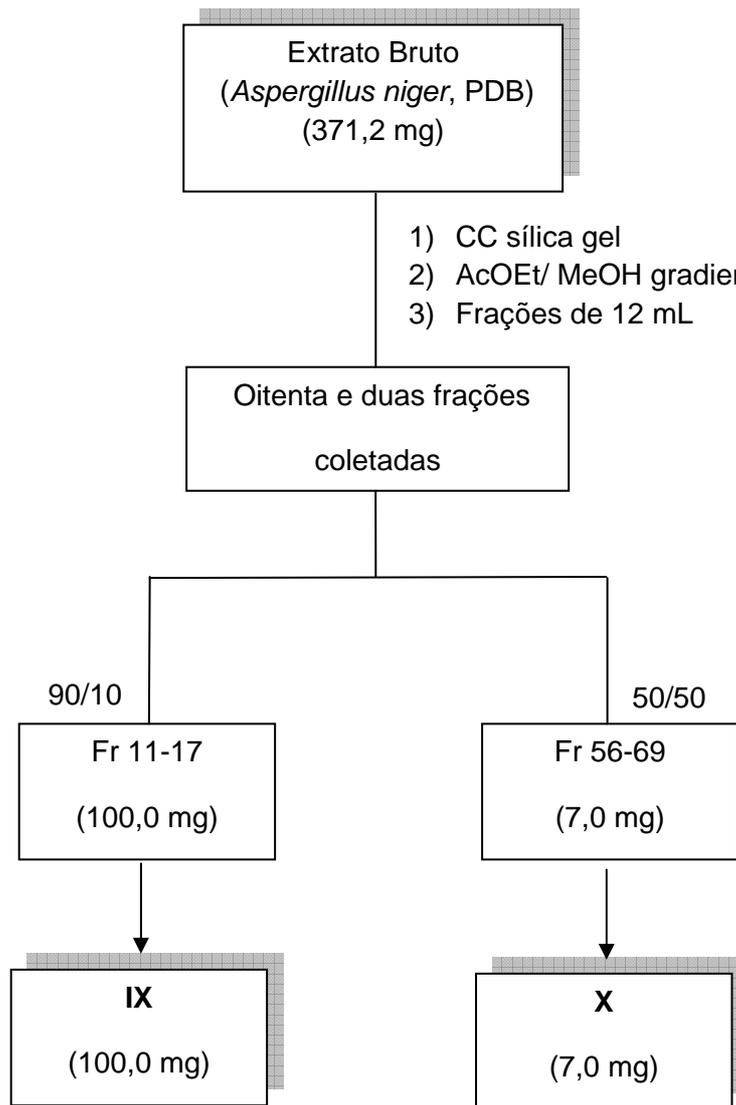
O fungo *Aspergillus niger* foi cultivado em cinco litros de meio líquido ME. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído três vezes com metade do volume do cultivo com AcOEt e seco em evaporador rotatório, fornecendo o extrato bruto AcOEt-ME (600,0 mg).

### 3.2.15.2 Fracionamento do extrato bruto AcOEt obtido do meio líquido ME

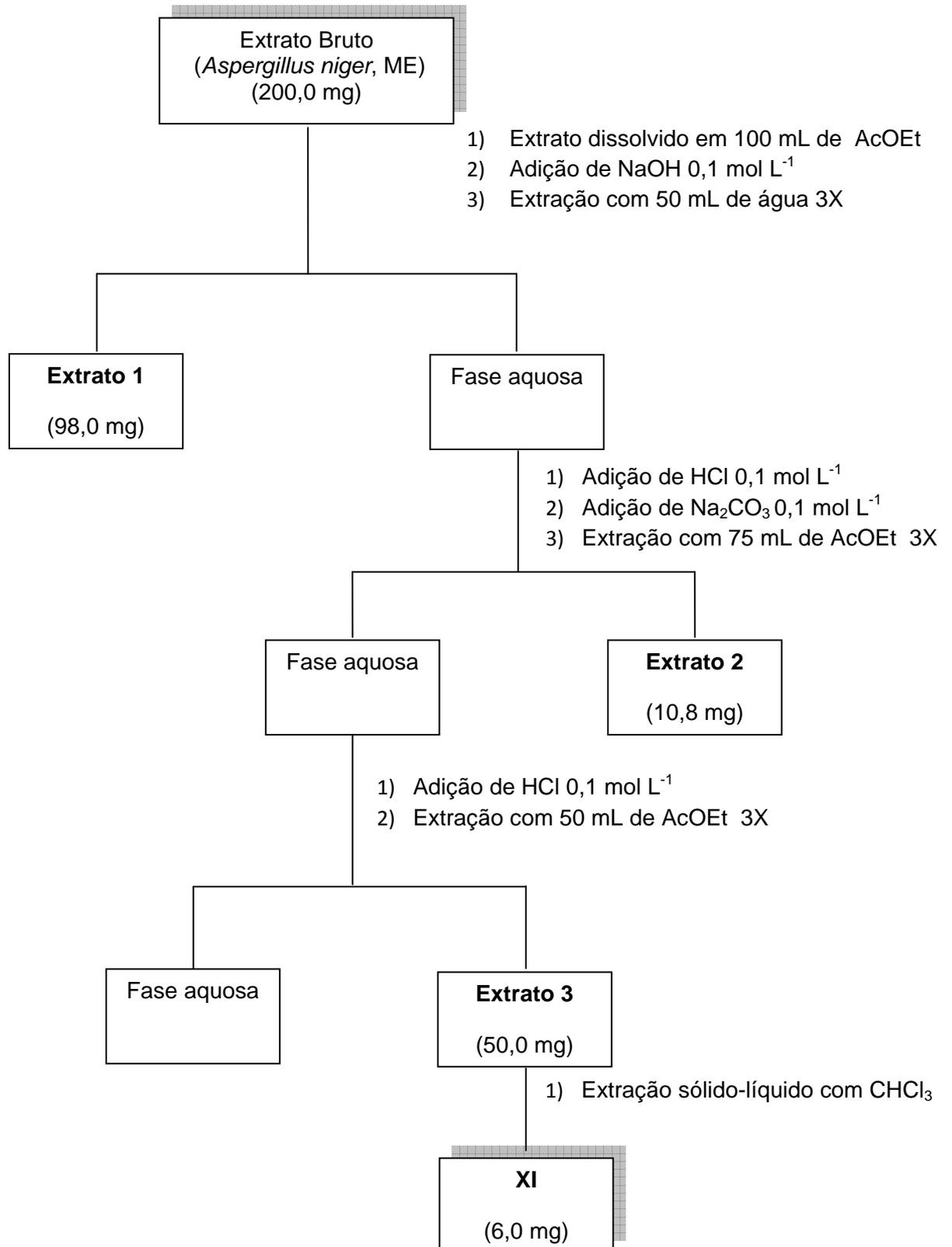
Parte do extrato bruto (200 mg) foi dissolvido em 100 mL de acetato de etila e submetido (**Figura 19**, p. 49) a extração com 50 mL de solução de hidróxido de sódio  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  por três vezes, sendo obtida após a extração uma fase orgânica e a uma fase aquosa básica (150 mL).

A fase orgânica obtida foi lavada três vezes com água destilada e em seguida seca em evaporador rotatório obtendo-se o **extrato bruto 1** (98,0 mg). A fase aquosa básica foi acidificada com ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  até pH 6, o qual foi verificado com papel indicador. Em seguida foi adicionado carbonato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  até o pH ficar em torno de 9, e extraído com 75 mL de acetato de etila por três vezes, o qual foi seco gerando o **extrato bruto 2** (10,8 mg).

A fase aquosa foi novamente acidificada com ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e extraída com acetato de etila gerando o **extrato bruto 3** (50,0 mg), o qual foi seco e particionado com clorofórmio obtendo-se a substância **XI**.



**Figura 18:** Fluxograma da separação das substâncias IX e X a partir do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB do *Aspergillus niger*.



**Figura 19:** Fluxograma da separação da substância **XI** do extrato bruto AcOEt do meio líquido ME do *Aspergillus niger*.

### 3.2.16 Obtenção e análise por CLAE do extrato bruto de *Aspergillus* sp.

#### 3.2.16.1 Obtenção do extrato bruto AcOEt do meio líquido PDB

O fungo *Aspergillus* sp., foi cultivado em cinco litros de meio líquido PDB. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído três vezes com metade do volume do cultivo com acetato de etila e seco em evaporador rotatório, fornecendo o extrato bruto AcOEt-PDB (1000 mg).

#### 3.2.16.2 Análise por CLAE-DAD e UV do extrato bruto AcOEt-PDB de *Aspergillus* sp.

O extrato bruto foi inicialmente submetido a “Clean up” em C-18, depois deste processo o extrato bruto foi submetido à análise via CLAE analítico, em CLAE-DAD, utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>O/MeOH 5% durante 10 min., e de 5 a 100% de MeOH em 20 min, mais 5 min de MeOH 100%, fluxo de 1 mL/min. E em CLAE-UV, 5 a 100% de MeOH em 30 min, mais 5 min de MeOH 100%, fluxo de 1 mL/min.

Os cromatogramas obtidos desse extrato apresentou somente um pico, posteriormente identificada como ácido kójico (substância **XII**), a qual foi quantificada no extrato utilizando um padrão comercial.

#### 3.2.16.3 Solução padrão de ácido kójico usada

O ácido kójico, padrão comercial adquirido da Sigma Aldrich, foi usado para preparar a solução padrão em diferentes concentrações. Os padrões foram preparados dissolvendo 1 mg de ácido kojico em 1 mL de metanol puro grau HPLC obtendo a solução estoque com uma concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

#### 3.2.16.4 Quantificação do ácido kojico no extrato bruto

A curva de calibração (R=0,99) foi construída utilizando padrão externo nas concentrações 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg mL<sup>-1</sup>, e injetando 20 µL em CLAE-

UV, nas mesmas condições cromatográficas do extrato. Obtendo a seguinte equação de reta  $Y = 18,9875 + 669,24516X$  (com  $R^2 = 0,999$ ).

### **3.2.17 Avaliação da atividade antioxidante (Etapa realizada pelo Professor Dr. Humbero dos Matos Reis)**

A atividade antioxidante do extrato AcOEt do fungo *Aspergillus* sp., foi avaliada pela sua capacidade em reduzir o radical DPPH• (1,1- diphenyl- 2- picryl- hydrazyl), segundo o método original de BLOIS (BLOIS, 1958), pela análise dos dados do seqüestro do óxido nítrico (NO) *in vitro* e pelas espécies reativas com o ac. tiobarbitúrico (tbars) *in vitro* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O extrato foi testado nas concentrações de 1; 2,5; 7,5 e 10 mg/mL e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 515 nm em triplicata.

#### **3.2.17.1 Análise do seqüestro do óxido nítrico (NO) in vitro**

Para avaliação do sequestro do NO *in vitro* foi utilizada solução de nitroprussiato de sódio (NPS), seguindo método descrito por GREEN (GREEN *et al.*, 1981 e 1982) Solução de NPS 5 mM foi diluído em tampão fosfato (0,1 molL<sup>-1</sup>, pH 7) e misturado com diferentes concentrações do extrato AcOEt do fungo *Aspergillus* sp., (1; 2,5; 7,5; 10 mg/mL) dissolvido em etanol e incubados a 24 °C por 150 min.

Foi conduzido um experimento controle em paralelo utilizando tampão fosfato pH 7 e 0,1 molL<sup>-1</sup>, com etanol em lugar das amostras. Em intervalos de 30 min, 1 mL das amostras incubadas foram retiradas e misturadas com 1 mL reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% e cloridrato de naftiletilenodiamino 0,1%).

A absorbância do cromóforo formado durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletilenodiamino foi medido por espectrofotometria a 546 nm.

#### **3.2.17.2 Sequestro do radical DPPH (1,1 –difeníl-2-picrilhidrazil)**

O sequestro do Radical DPPH foi determinado pelo método descrito por BLOIS (BLOIS, 1958) com algumas modificações. Cinquenta micro litros da amostra foi

adicionado a 2 mL de solução metanólica de DPPH 90 mM. A absorbância da mistura foi lida em espectrofotômetro contra um branco de metanol em 515 nm. A inibição do radical DPPH foi calculada pela formula  $IP \% = (ADPPH - Aamostra)/ADPPH \times 100$ .

### **3.2.17.3 Espécies reativas com o ac. tiobarbitúrico (tbars) in vitro com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Foi feita segundo método POLYDORO (POLYDORO et al., 2004) utilizando como fonte lipídica gema de ovos e solução salina a 5%. A reação se processou em meio ácido (ácido acético 20%) em presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%, Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 1% e Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mM, incubados por 40 minutos a 90°C em banho-maria.

O produto dessa reação foi extraído com álcool butílico e lido em espectrofotômetro a 532 nm. Utilizou-se como padrão Butilhidroxitoueno (BHT) 1000 ppm.

# *Resultados e discussão*

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento dos fungos endofíticos

A etapa de isolamento e seleção dos fungos endofíticos foi realizada com a espécie vegetal *Hancornia speciosa* (Apocynaceae), resultando no isolamento de 14 fungos diferentes. As linhagens que apresentaram esporulação foram enviadas ao prof. Dr. João Basílio de Mesquita do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Sergipe-UFS, onde foram classificados os seguintes fungos: *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Phytophthora* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp.

O fato de somente serem isolados uma pequena variedade de fungos endofítico pode ser devida a exposição à radiação solar a qual a planta hospedeira selecionada estava sujeita, pois a *Hancornia speciosa* é uma espécie vegetal nativa do nordeste brasileiro que cresce em campo limpo, e a intensidade e o período de exposição à radiação solar podem repercutir diretamente na população de fungo endofíticos, uma vez que esses organismos são sensíveis a radiação solar (PIMENTEL *et al.*, 2006).

Outro fator que pode ter influenciado no isolamento dos endofíticos é a umidade do meio, plantas nativas de mata fechada são propensas a serem colonizadas por uma maior número de fungos endofíticos por estarem em um ambiente mais úmido do que plantas que crescem em campo limpo, pois um ambiente mais úmido é mais propício a sobrevivência dos endofítico enquanto que em pleno sol, a umidade tende a ser menor, ocorrendo o ressecamento das folhas (PIMENTEL *et al.*, 2006).

Além desses fatores as técnicas usadas no isolamento dos endofíticos também podem ter influenciado na quantidade de isolados fúngicos, uma vez que neste trabalho não foi usada nenhuma variação de meios, e sendo somente usadas as folhas para o isolamento dos endofíticos.

De todos os fungos endofíticos isolados, o fungo o *Guignardia* sp., foi o encontrado com maior frequência após o procedimento de isolamento dos endofíticos.

## **4.2 Seleção dos fungos endofíticos**

### **4.2.1 Extratos brutos obtidos em 400 mL de meio PDB**

Os isolados fúngicos foram inicialmente cultivados em 400 mL de meio de cultura PDB para verificar quais fungos teriam maior rendimento em massa de extrato bruto após extração com acetato de etila. Os fungos que tiveram maior massa de extrato AcOEt em 400 mL de meio líquido PDB foram *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp.

Uma maior massa de extrato bruto significa que o fungo possui um grande potencial para o isolamento dos metabólitos secundários, pois a massa é um fator crucial na hora do desenvolvimento das técnicas cromatográficas.

Durante o fracionamento do extrato existe perda de massa, levando ao isolamento de substâncias muitas vezes com pouca massa, o que pode prejudicar na aplicação do extrato bruto, substâncias puras e/ou frações em diversos testes biológicos, a **Tabela 2**, p. 56, mostra a massa dos extratos dos fungos isolados de *Hancornia speciosa*.

**Tabela 2.** Massas dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Hancornia speciosa*.

Código do Fungo	Classificação	Massa de extrato em 400 mL de meio PDB
P3P6F2	<i>Aspergillus niger</i>	54,4 mg
P2P7P2	<i>Guignardia</i> sp.	11,7 mg
P2P1F4	Não identificado	26,2 mg
P2P1F3	Não identificado	32,4 mg
P2P2F2	<i>Phomopsis</i> sp.	22,3 mg
P2P1F2	Não identificado	39,6 mg
P3P6F1	Não identificado	17,8 mg
P1F1	Não identificado	2,7 mg
P3F1	<i>Phytophthora</i> sp.	61,3 mg
P3F2	<i>Aspergillus</i> sp.	138,6 mg
P3F3	<i>Curvularia</i> sp.	36,0 mg
YF1	Não identificado	10,6 mg
YF2	<i>Fusarium</i> sp.	65,3 mg
ZF1	Não identificado	8,0 mg

#### 4.2.2 Avaliação qualitativa da atividade antioxidante com DPPH

Os extratos brutos PDB foram submetidos à bioensaio qualitativo para verificação da atividade antioxidante com DPPH. Dos 14 extratos fúngicos avaliados quase todos tiveram resultado positivo exceto os fungos P3P6F1, P1F1 e P3F1 (**Tabela 3**) que apresentaram resultados negativos. Esses resultados evidenciam que os fungos endofíticos são importantes produtores de metabólitos com potencial atividade antioxidante, o que torna esses fungos promissores para o isolamento de substâncias bioativas.

**Tabela 3.** Atividade antioxidante dos extratos brutos PDB dos fungos endofíticos isolados de *Hancornia speciosa*.

Código do Fungo	Classificação	Atividade antioxidante
P3P6F2	<i>Aspergillus niger</i>	+
P2P7P2	<i>Guignardia</i> sp.	+
P2P1F4	Não identificado	+
P2P1F3	Não identificado	+
P2P2F2	<i>Phomopsis</i> sp.	+
P2P1F2	Não identificado	+
P3P6F1	Não identificado	-
P1F1	Não identificado	-
P3F1	<i>Phytophthora</i> sp.	-
P3F2	<i>Aspergillus</i> sp.	+
P3F3	<i>Curvularia</i> sp.	+
YF1	Não identificado	+
YF2	<i>Fusarium</i> sp.	+
ZF1	Não identificado	+

### 4.2.3 Fungos selecionados

Diante dos resultados mostrados acima os fungos selecionado foram:

*Phomopsis* sp., o fungo foi selecionado por apresentar massa do extrato bruto de 24 mg/ 400 mL e atividade antioxidante quando avaliado no teste qualitativo com DPPH, outros fatores que contribuíram para a sua escolha foram as diversas citações presentes na literatura relatando esse fungo como um prolífico produtor de metabolitos com atividade biológica (HUSSAIN *et al.*, 2009), além do fato desse fungo esporular facilmente o que possibilitou sua identificação.

*Guignardia* sp., apesar de ter uma baixa produção de massa de extrato bruto 11 mg/ 400 mL, o fungo foi selecionado por ser o endofítico encontrado com maior frequência na planta hospedeira (*Hancornia speciosa*), esse fato pode ter implicações ecológica, pois o fungo deve estar atuando no aumento da resistência do hospedeiro a ação de predadores e de algumas doenças, em uma relação mutualística.

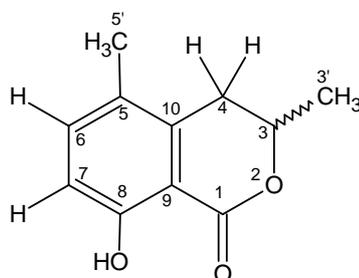
*Aspergillus niger*, o fungo foi selecionado por ser um micro-organismo importante para indústria, sendo usado na produção de diversas substâncias (BLUMENTHAL, 2003). Além disso, o seu extrato bruto apresentou uma massa de 54,4 mg/ 400 mL, se mostrando promissor para o crescimento em escala ampliada, e o extrato PDB apresentou atividade antioxidante.

*Aspergillus* sp., por apresentar uma massa de 138,6 mg/ 400 mL do extrato bruto, se mostrando assim bastante promissor para o crescimento em escala ampliada, o fungo foi selecionado. Além disso, o fungo foi identificado facilmente e teve atividade antioxidante quando avaliado no teste qualitativo com DPPH.

Os fungos selecionados foram cultivados em larga escala possibilitando separar e identificar diversas substâncias presentes nos seus extratos brutos. Do *Phomopsis* sp., foi identificado as substâncias (I, II e III, IV e V) do extrato PDB e (VI e VII) do extrato ME. Do fungo *Guignardia* sp., foi identificado a substância VIII, do *Aspergillus niger* foi identificado as substâncias (IX, X) do extrato PDB e (XI) do extrato ME e do fungo *Aspergillus* sp., foi identificada o substância XII.

### 4.3 Identificação das substâncias isoladas dos extratos PDB - AcOEt (I, II e III, IV e V) e ME - AcOEt (VI e VII) de *Phomopsis* sp.

#### 4.3.1 Identificação da substância I



**Figura 20:** Estrutura da substância I.

A substância I (**Figura 20**) foi isolada como um cristal branco. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 23**, p. 63; **tabela 4**, p. 62) registrou dois sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,21 (d, 1H; 8,5 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,75 (d, 1H; 8,5 Hz) indicando ser de aromático tetrasubstituído sendo a relação entre esses dois hidrogênios *orto* como observado pelo valor da constante de acoplamento.

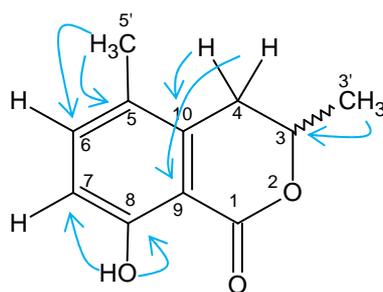
Além destes sinais, foi possível observar um sinal com valor de deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  10,92 (s, OH), indicando ser de hidroxila. Foram observados também sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (m, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  2,80 (dd, 1H; 16,5 e 3,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2,60 (dd, 1H; 16,5 e 12,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2,12 (s, 3H), e 1,48 (d, 3H; 6,5 Hz), indicando assim haver na molécula cinco hidrogênios metínicos e duas metilas ( $\delta_{\text{H}}$  2,12 s e 1,49 d,  $J = 6,5$  Hz), e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,12 sugerindo uma metila ligada a anel aromático.

Através das correlações  $^1\text{J}$  observadas no experimento *g*HSQC (**Figura 25**, p. 66) os hidrogênios foram atribuídos a seus respectivos carbonos confirmando haver na molécula três hidrogênios metínicos, duas metilas e um hidrogênio metilênico correspondendo aos hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  2,80 (dd, 1H; 16,5 e 3,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2,60 (dd, 1H; 16,5 e 12,0 Hz) com constante geminal, ligados ao átomo de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  32,1.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 24** p. 64; **Tabela 4**, p. 62) da substância **I** registrou seis carbonos aromáticos  $\delta_{\text{C}}$  (160,7; 138,1; 137,2; 125,1; 115,9; 108,3), um carbono metínico em  $\delta_{\text{C}}$  75,5; um carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  32,1; duas metilas  $\delta_{\text{C}}$  (21,1; 18,3) e uma carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  170,5.

Os substituintes no anel aromático foram posicionados pelas correlações heteronucleares  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  e/ou  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  observado no mapa de contorno gHMBC (**Figura 21** e **Figura 26**, p. 67), entre  $\delta_{\text{H}}$  10,92 (OH) com  $\delta_{\text{C}}$  160,7 (C-8) e  $\delta_{\text{C}}$  125,1 (C-7), de  $\delta_{\text{H}}$  2,12 (H-5') com  $\delta_{\text{C}}$  138,1 (C-6) e  $\delta_{\text{C}}$  115,9 (C-5).

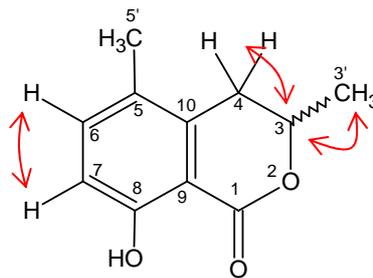
A conexão da lactona ao anel aromático é suportada pelas correlações em gHMBC, entre  $\delta_{\text{H}}$  2,80 (H-4) e  $\delta_{\text{H}}$  2,60 (H-4) com  $\delta_{\text{C}}$  137,2 (C-10) e  $\delta_{\text{C}}$  108,3 (C-9). O substituinte na lactona foi proposta pela correlação em gHMBC, entre  $\delta_{\text{H}}$  1,48 (H-3') com  $\delta_{\text{C}}$  75,5 (C-3).



**Figura 21:** Correlações observadas no gHMBC.

As correlações observadas em gCOSY (**Figura 22** p. 61 e **Figura 24**, p. 65) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,21 (H-6) /  $\delta_{\text{H}}$  6,75 (H-7);  $\delta_{\text{H}}$  1,48 /  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (H-3);  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (H-3) /  $\delta_{\text{H}}$  2,80 (H-4) e  $\delta_{\text{H}}$  2,60 (H-4), e as informações obtidas do espectro de massas foram de grande importância para a confirmação da estrutura.

No espectro de massas TOF-MS (**Figura 27**, p. 68) no modo positivo foi possível observar a presença dos íons em  $m/z$  193,0879 ( $[\text{M}+\text{H}]$ ) e  $m/z$  175,0805 ( $[(\text{M}+\text{H})-\text{H}_2\text{O}]$ ), o que está de acordo com a fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ , proposta pelas análises dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono.



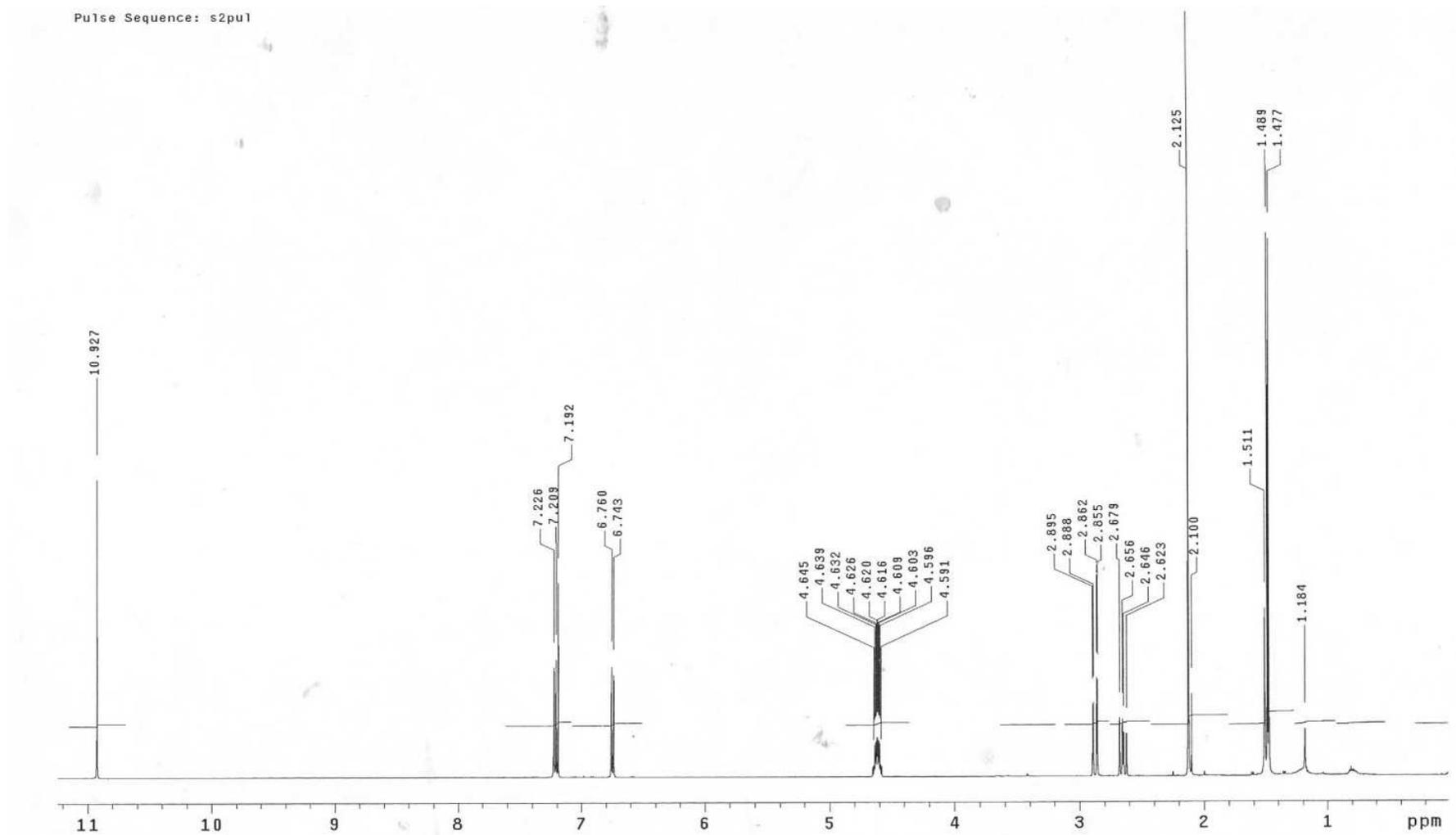
**Figura 22:** Correlações observadas no gCOSY.

Comparação com dados presente na literatura (YUN-MEI *et al.*, 2007) auxiliaram na identificação da substância I como sendo a di-hidro-5-dimetil-8-hidroxi-isocoumarina ou 5- metilmeleína.

A substancia 5- metilmeleína tem sido descrita como metabolito de diversos fungos como *Fusicoccum amygdale* e *Phomopsis* sp., entre outros. Existem relatos de atividade fitotóxica a brotos de maçã com uma concentração de 1000 ppm e a mudas de alface com um a concentração de 500 ppm (OKUNO *et al.*, 1986). De acordo com Sumarah *et al.*, 2008, um desequilíbrio ecológico pode levar um fungo isolado assintomático a se tornar um patógeno para a planta. Neste caso um desequilíbrio pode tornar o fungo endofítico *Phomopsis* sp., em um patógeno para a cultura da mangaba, pois o mesmo possui capacidade de produzir substâncias fitotóxica.

**Tabela 4.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) correlacionados via gHSQC ( $^1J_{\text{CH}}$ ) da substância **I** em  $\text{CDCl}_3$  e do isolado na literatura em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta_{\text{C}}$ de <b>I</b> (Isolado)	$\delta_{\text{C}}$ de <b>I</b> (Literatura)	$\delta_{\text{H}}$ de <b>I</b> (Isolado)	$\delta_{\text{H}}$ 5-metilmeleína (Literatura)
1	170,5	169,2	-	-
2	-	-	-	-
3	75,5	77,8	4,60 m	4,68 m
3'	18,3	19,7	1,48 d (6,5 Hz)	1,56 d (6,5 Hz)
4	32,1	29,6	2,80 dd (16,5 e 3,0 Hz)	2,95 dd (16,5 e 3,7 Hz)
4	32,1	29,6	2,60 dd (16,5 e 12,0 Hz)	2,80 dd (16,5 e 10,7 Hz)
5	115,9	112,8	-	-
5'	21,1	20,8	2,12 s	2,18 s
6	138,1	134,6	6,75 d (8,5 Hz)	6,7 d (8,6 Hz)
7	125,1	126,2	7,21 d (8,5 Hz)	7,21 d (8,6 Hz)
8	160,7	154,4	-	-
9	108,3	106,4	-	-
10	137,2	140,6	-	-
OH	-	-	10,92 s	10,97 s



**Figura 23:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância I ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

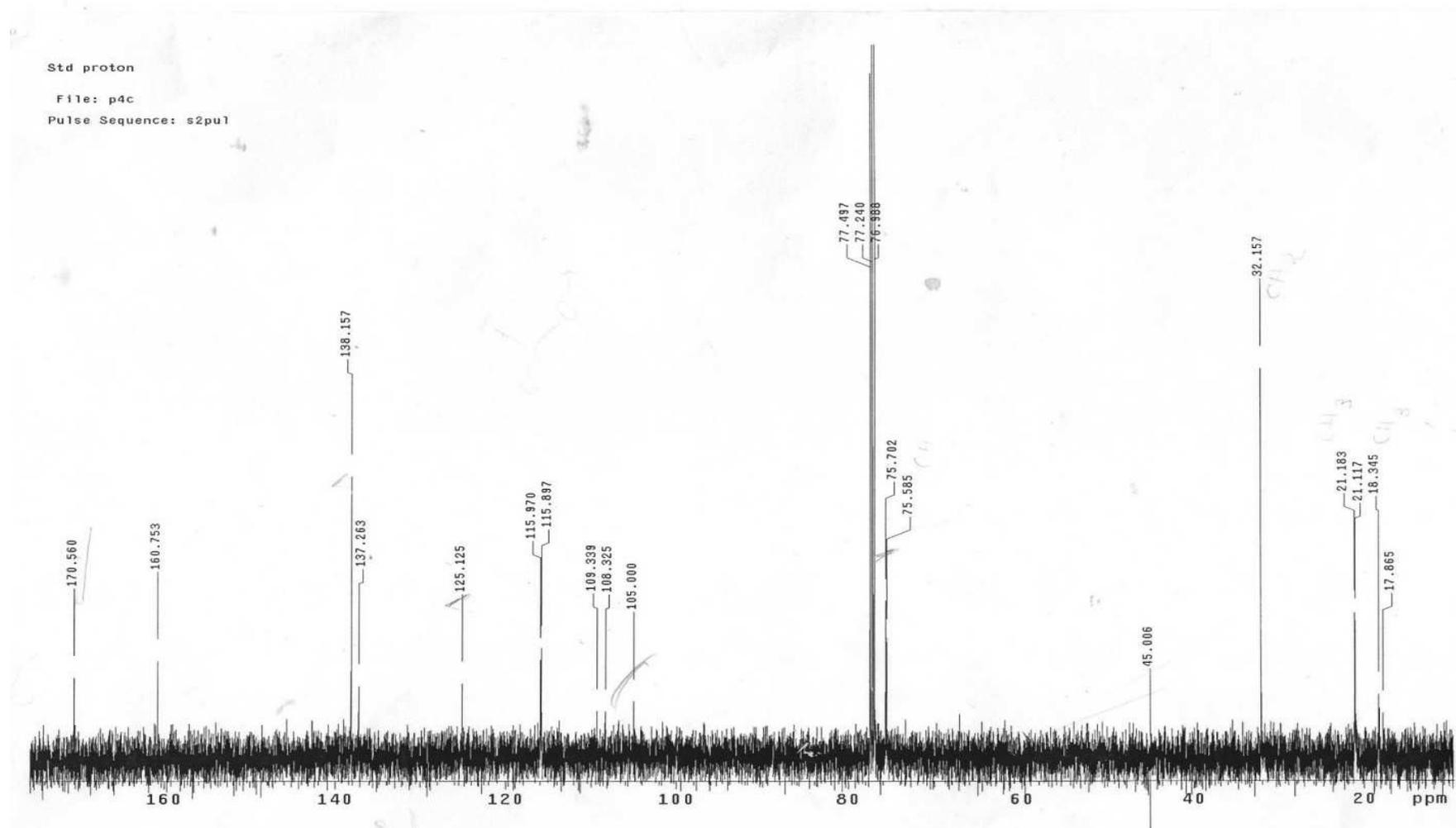
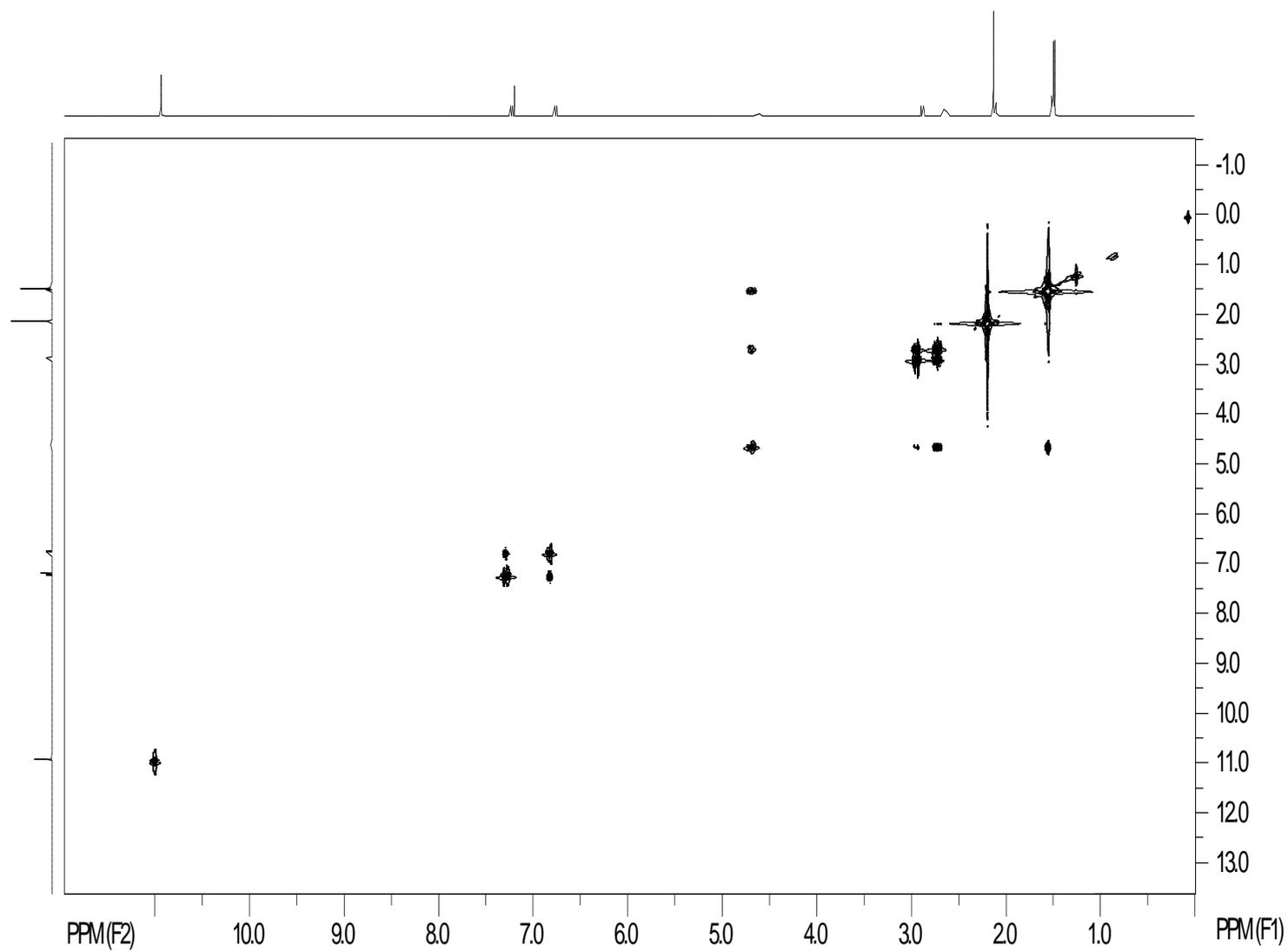
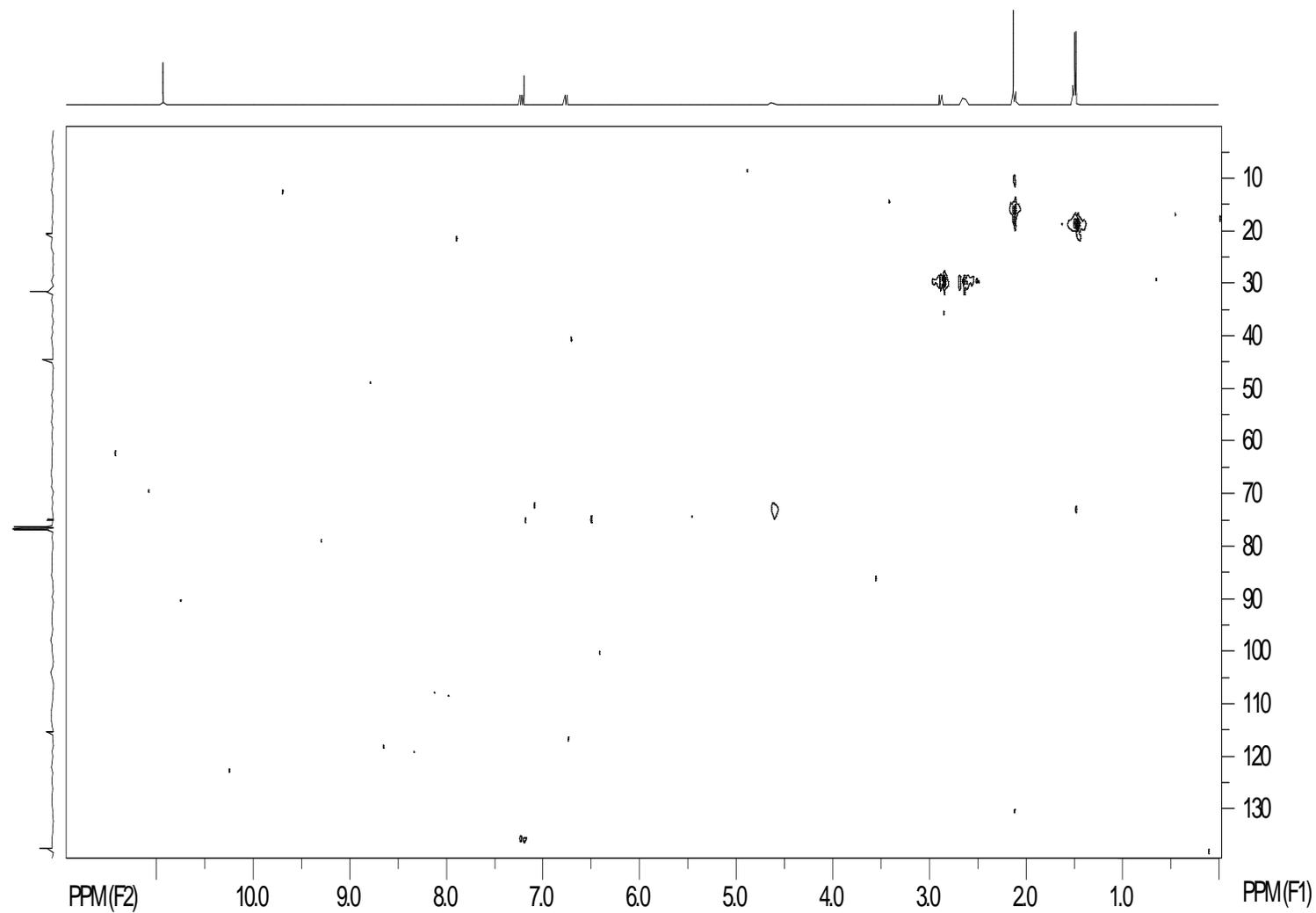


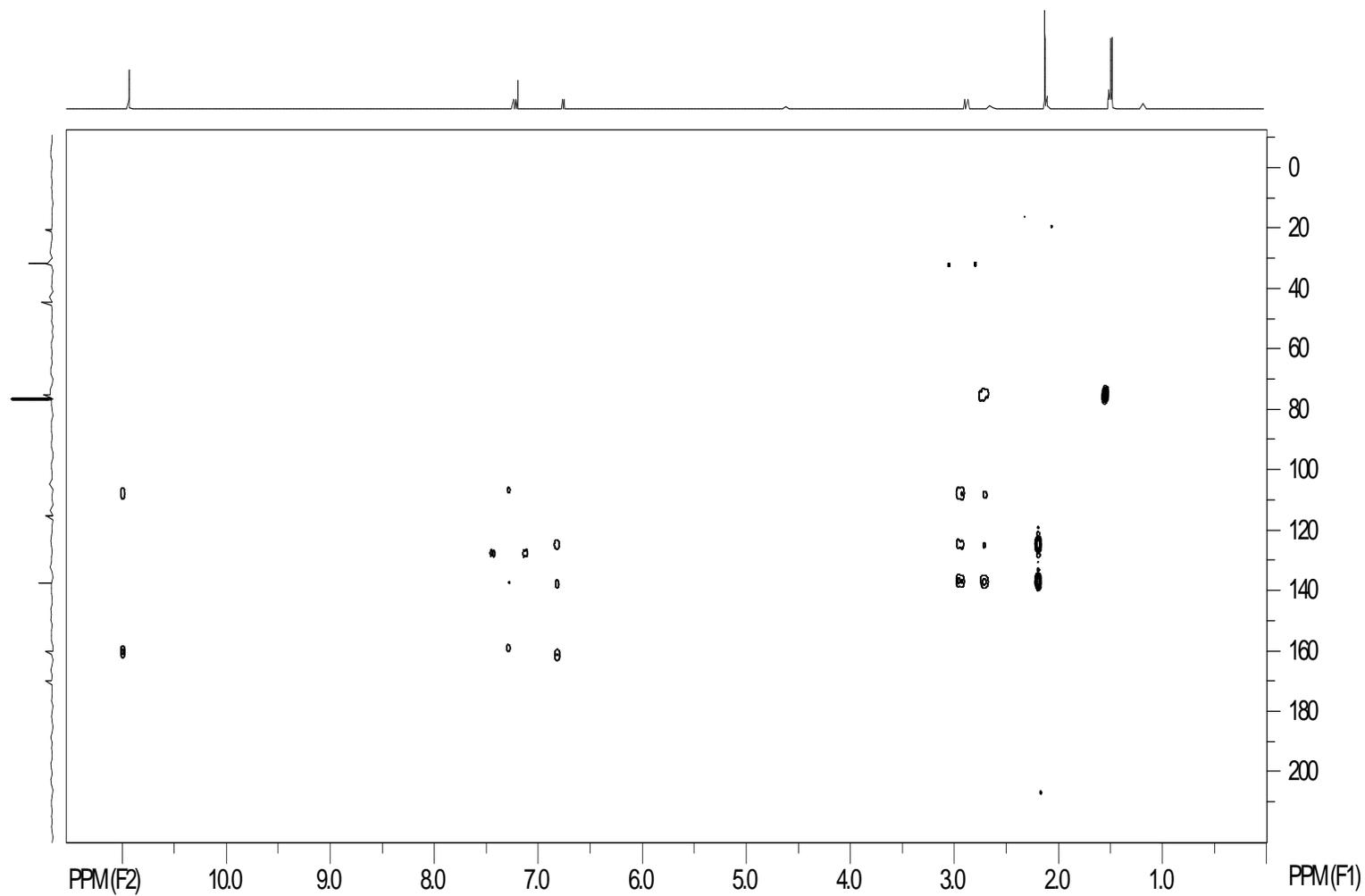
Figura 24: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância I ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).



**Figura 24:** Mapa de contorno gCOSY da substância I ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Figura 25:** Mapa de contorno gHSQC da substância I ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).



**Figura 26:** Mapa de contorno gHMBC da substância I ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).

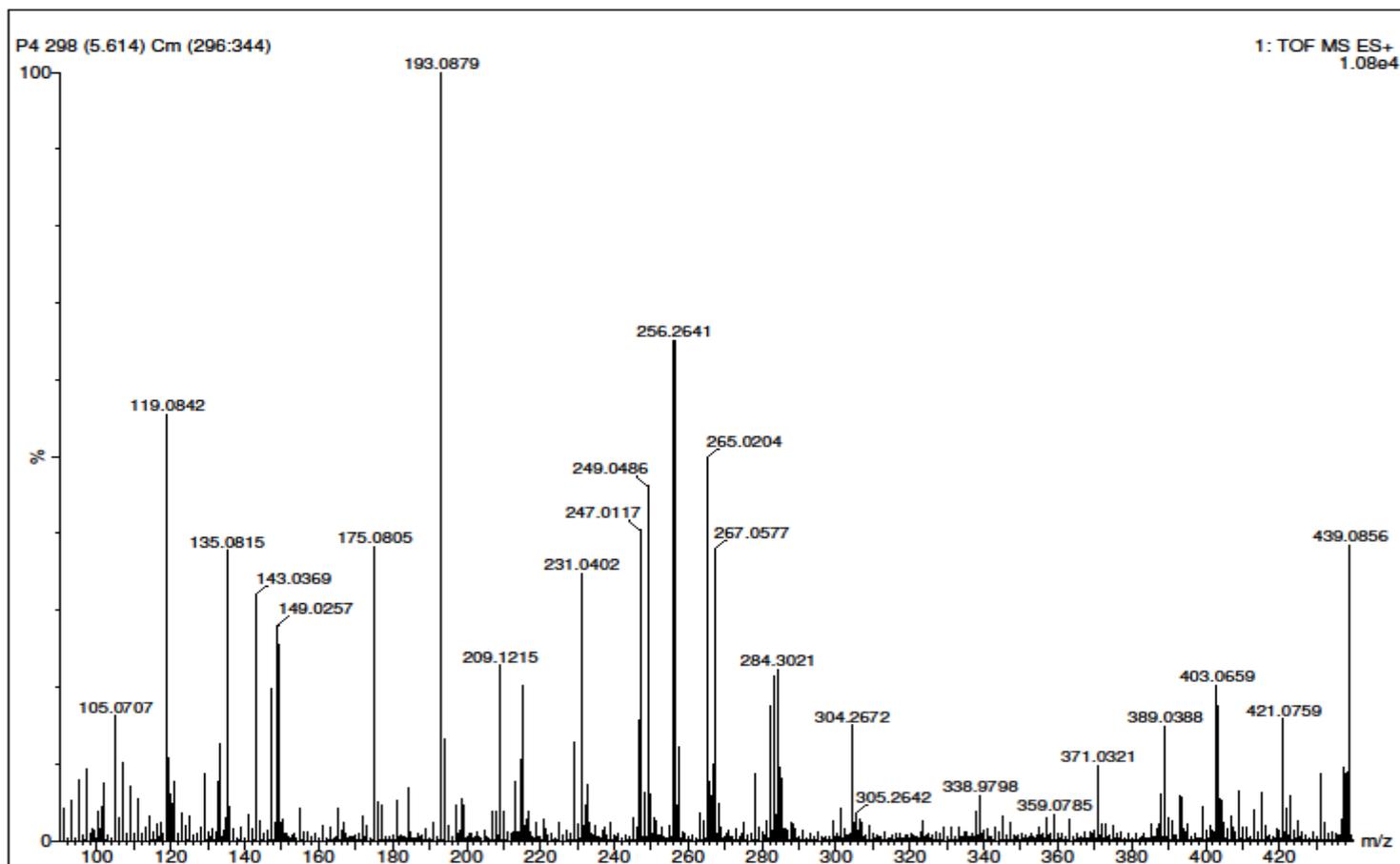
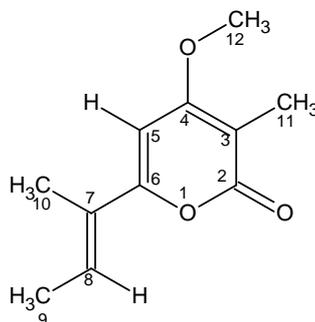


Figura 27: Espectro de massa da substância I.

### 4.3.2 Identificação da substância II

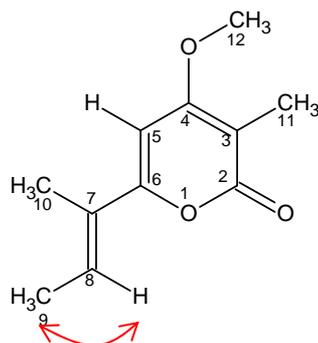


**Figura 28:** Estrutura da substância II.

A substância II (**Figura 28**) foi isolada como sólido amorfo e o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**Figura 31**, p. 72; **Tabela 5**, p. 71) revelou a presença de uma metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,83 (s, 3H), três metilas ligadas à ligação dupla em  $\delta_{\text{H}}$  1,86 (s, 3H); 1,82 (s, 3H) e  $\delta_{\text{H}}$  1,76 (d, 3H; 7,3 Hz), esta última com um acoplamento com o hidrogênio vinílico em  $\delta_{\text{H}}$  6,61 (q, 1H; 7,3 Hz), um hidrogênio olefínico em  $\delta_{\text{H}}$  6,03 (s) também foi observado.

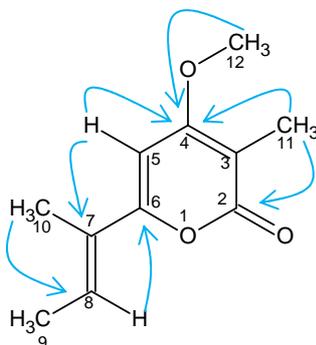
O espectro de carbono (**Figura 32**, p. 73; **Tabela 5**, p. 71) apresentou 11 sinais, entre estes, seis olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  (129,9; 127,1; 160,4; 91,7 e 102,1), três metilas  $\delta_{\text{C}}$  (14,4; 12,3; 8,8). E um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  56,3 correspondendo a uma metoxila, confirmando o espectro de hidrogênio.

Foi também observado um sinal característico de carbono de carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  165,4. Com o mapa de correlação gCOSY (**Figura 29**, p. 70 e **Figura 33**, p. 74) foi possível confirmar o acoplamento entre o hidrogênio vinílico em  $\delta_{\text{H}}$  6,61 (H-8) e a metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,76 (H-9).



**Figura 29:** Correlação observada no gCOSY.

As correlações observadas em gHMBC (**Figura 30** e **Figura 34**, p. 75) entre o hidrogênio  $\delta_{\text{H}}$  6,61 (H-8) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  160,4 (C-6). E da metoxila  $\delta_{\text{H}}$  3,83 (H-12) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  166,3 (C-4); metila  $\delta_{\text{H}}$  1,82 (H-10) com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  129,9 (C-8) e dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1,86 (H-11) com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  165,4 (C-2) e 166,3 (C-4).



**Figura 30:** Correlações observadas no gHMBC.

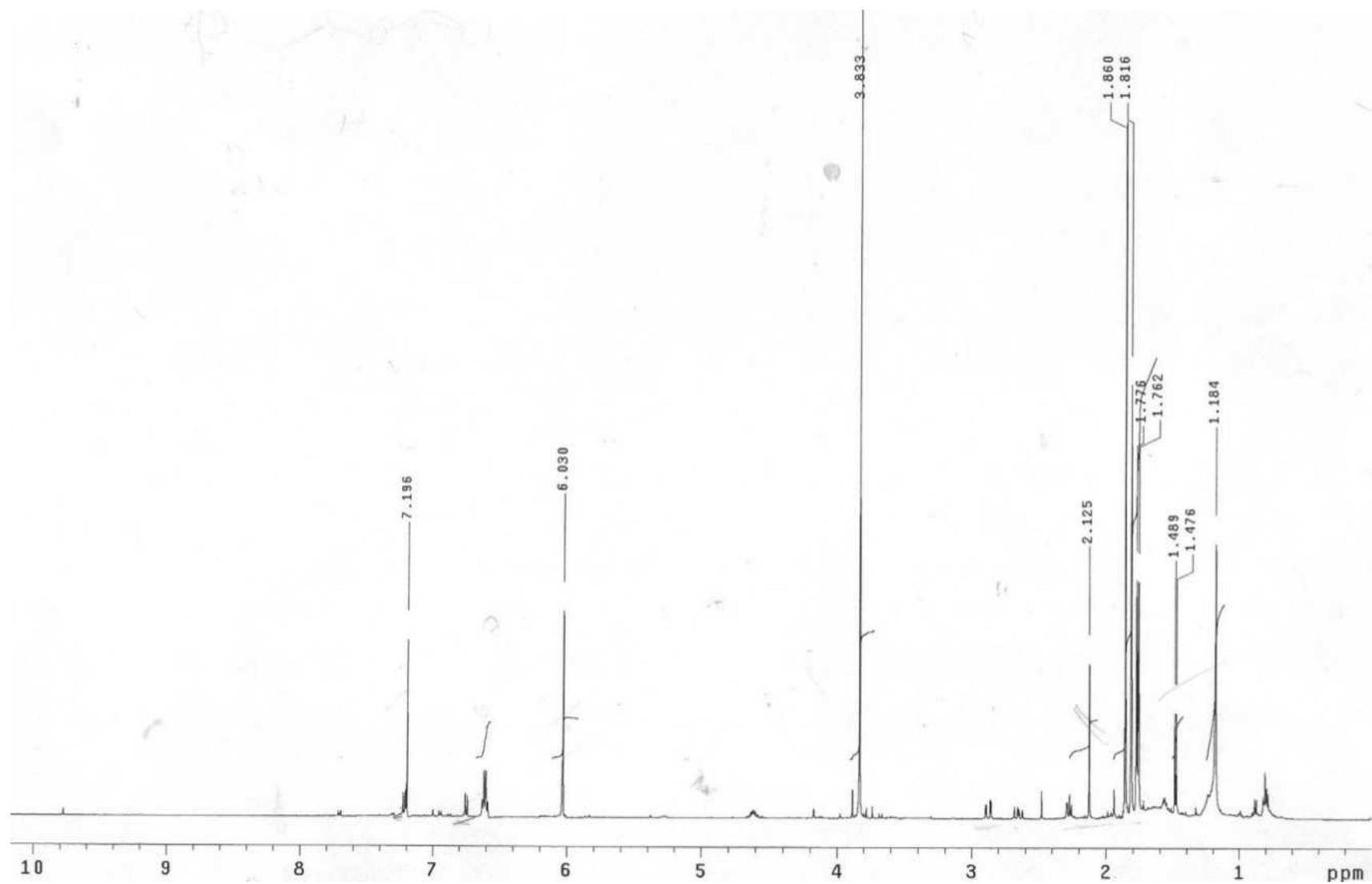
Pelas análise do espectro de massas TOF-MS (**Figura 32**, p. 76) no modo positivo foi possível observar a presença dos íons  $m/z$  195,1054 ( $[(M+H)]$ ),  $m/z$  217,0820 ( $[(M+Na)]$ ) e  $m/z$  233,0778 ( $[(M+K)]$ ) o que esta de acordo com fórmula molecular  $C_{11}H_{14}O_3$ , da estrutura proposta.

Análise desses dados e comparação com os da literatura (GUIMARÃES, 2006) permitiram identificar a substância **II** como sendo a nectriapirona.

**Tabela 5.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) da substância II em  $\text{CDCl}_3$  do isolado e dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta_{\text{C}}$ de II (Isolado)	$\delta_{\text{C}}$ Nectriapirona (Literatura)	$\delta_{\text{H}}$ de II (Isolado)	$\delta_{\text{H}}$ de II (Literatura)
1	-	-	-	-
2	165,4	165,1	-	-
3	102,1	101,8	-	-
4	166,3	166,0	-	-
5	91,7	91,4	6,03 s	6,10 s
6	160,4	160,1	-	-
7	127,1	126,8	-	-
8	129,9	129,7	6,61 q (7,3 Hz)	6,69 dq (1,3 e 7,1 Hz)
9	14,4	14,2	1,76 d (7,3 Hz)	1,84 d (7,1 Hz)
10	8,8	8,6	1,82 s	1,89 s
11	12,3	12,1	1,86 s	1,93 s
12	56,3	56,0	3,83 s	3,90 s

A nectriapirona é um metabolito isolado de diversos fungos, entre esses o *Phomopsis oblonga* (GUIMARÃES, 2006), e apresenta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (GUIMARÃES, 2006; NAIR, 1975) e citotóxica para células de leucemia (GUIMARÃES, 2006).



**Figura 31:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância II ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

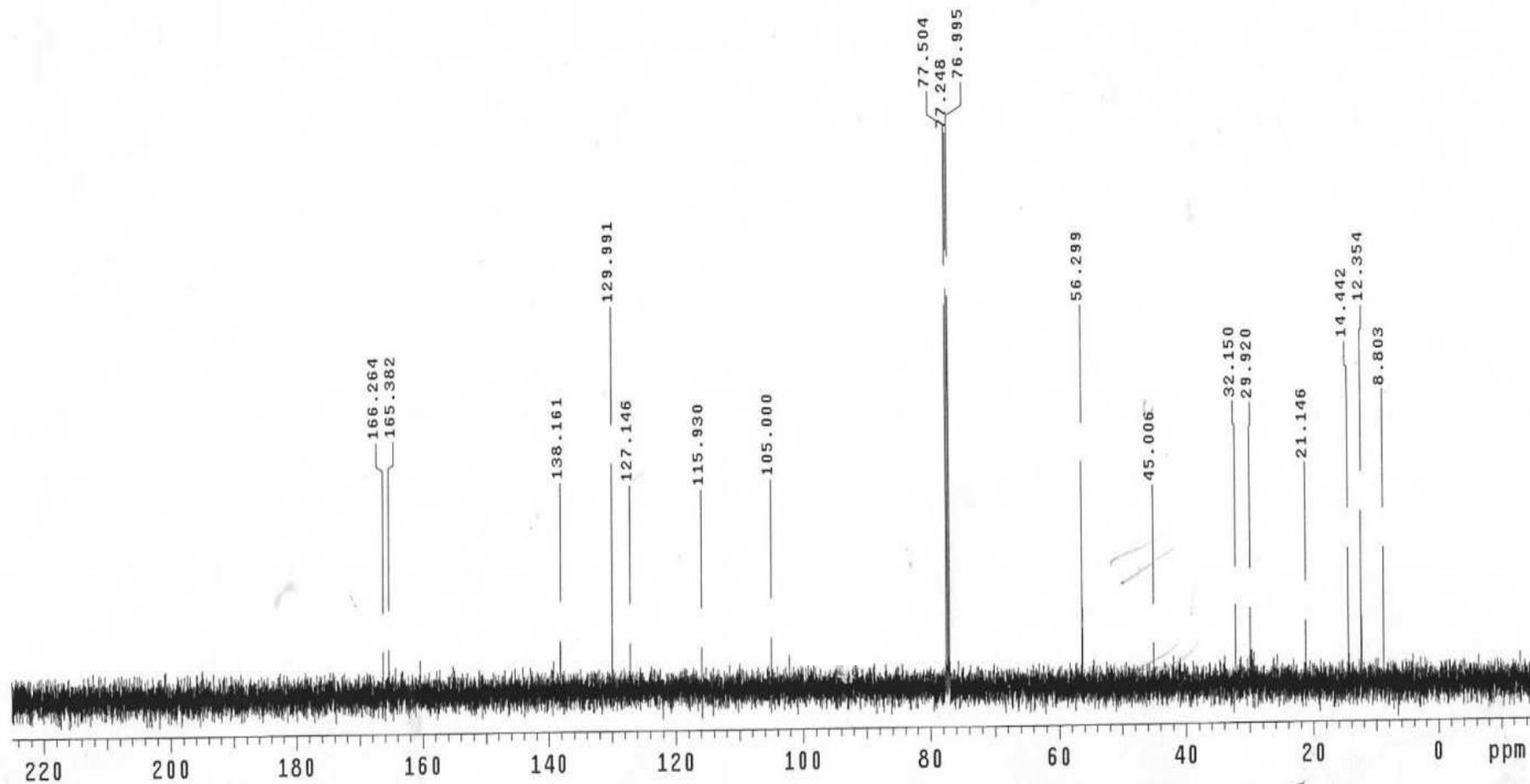
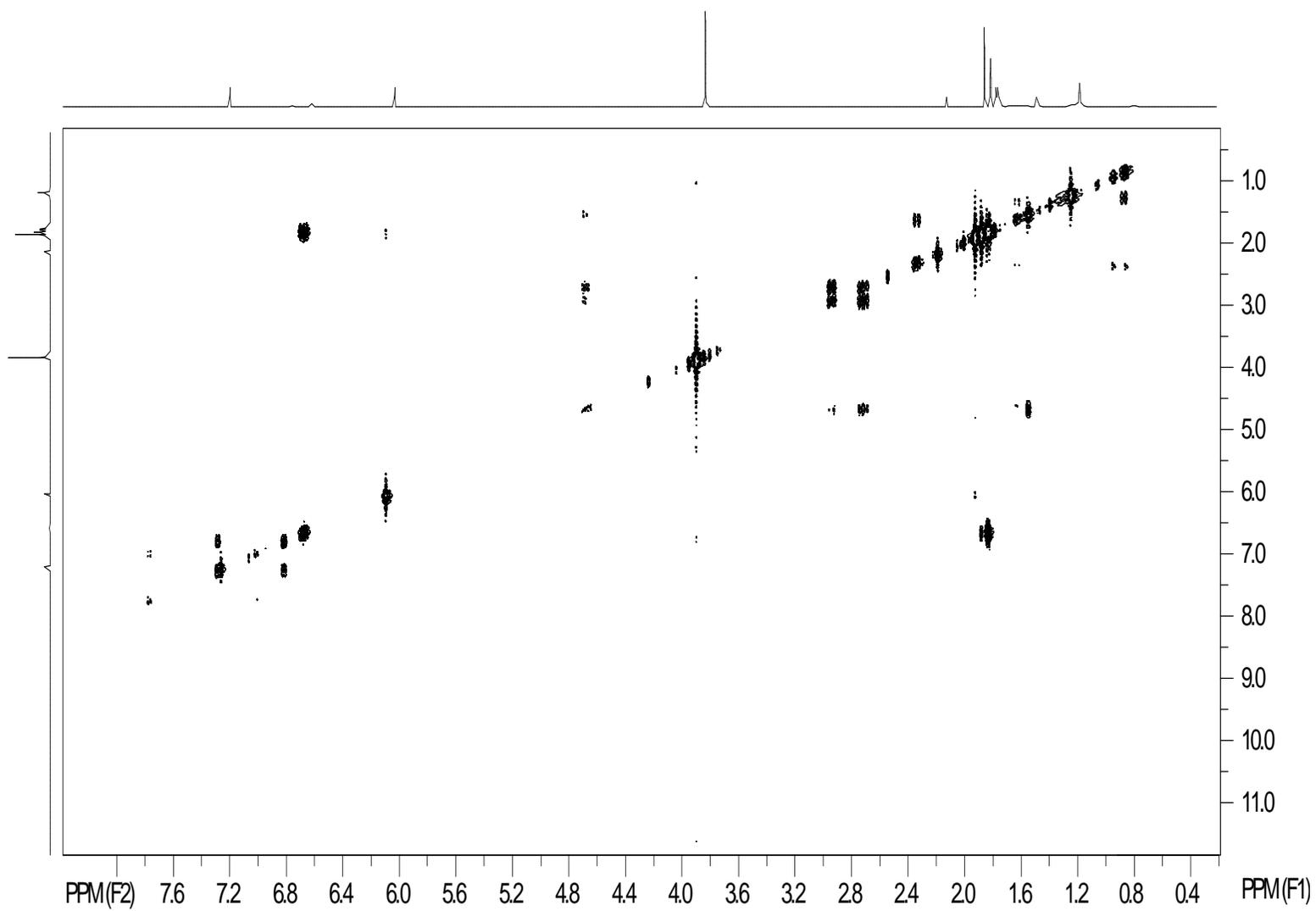
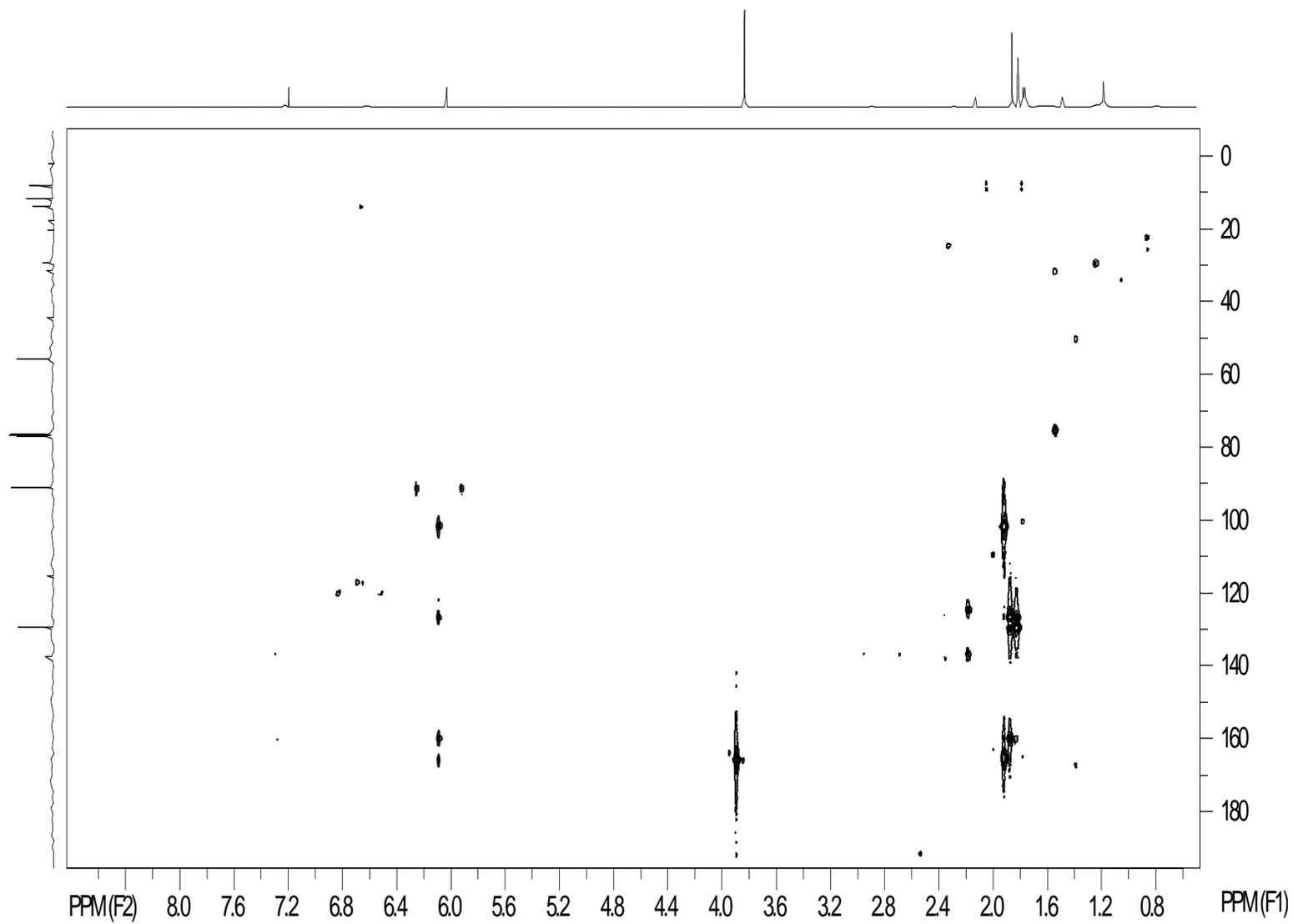


Figura 32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância II ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Figura 33:** Mapa de contorno gCOSY da substância II ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Figura 34:** Mapa de contorno gHMBC da substância II (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz).

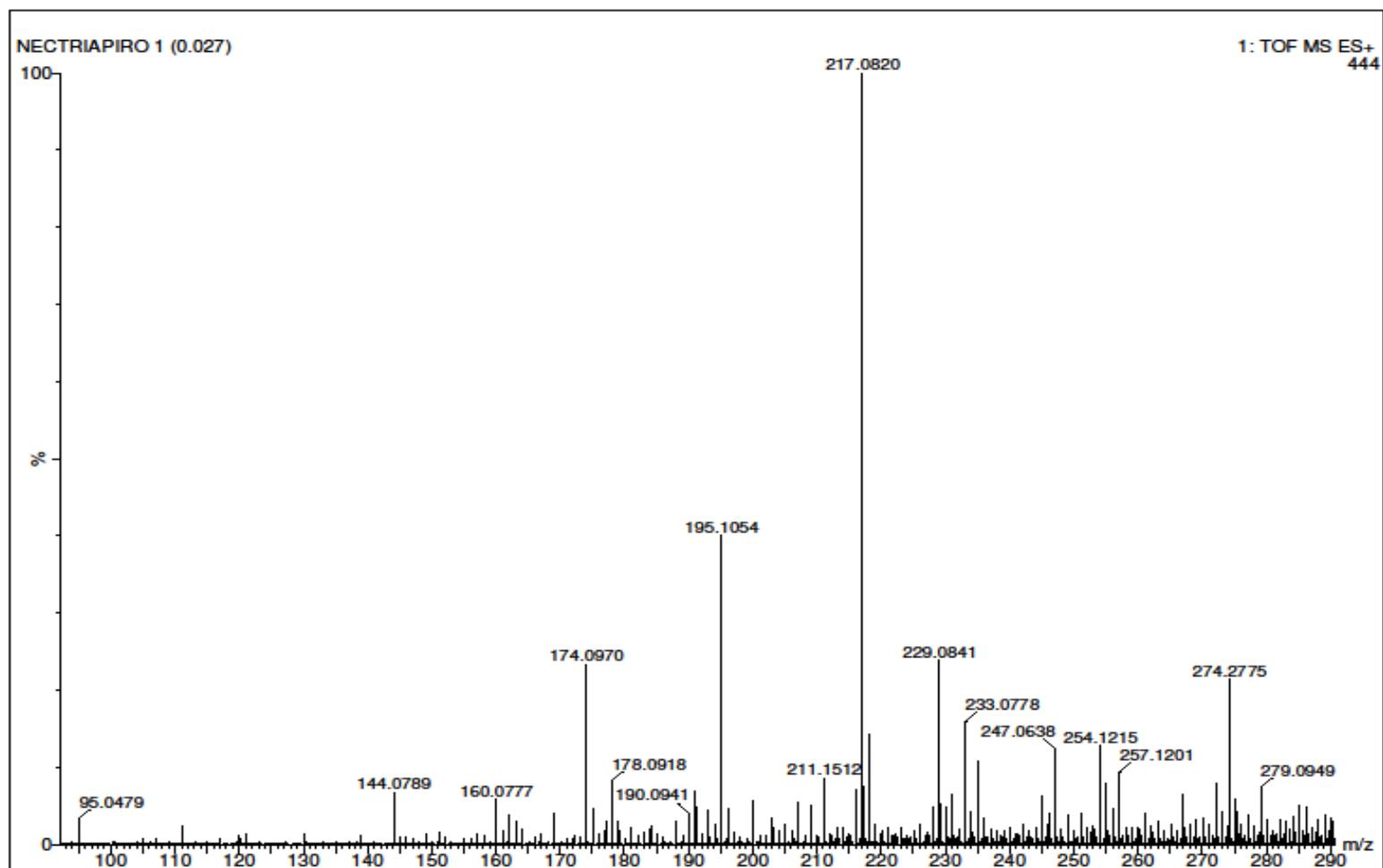
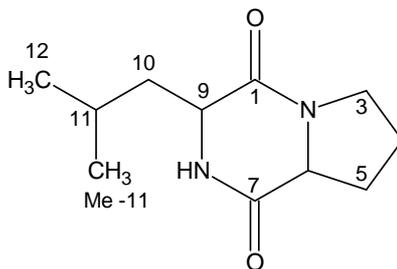


Figura 35: Espectro de massa da substância II.

### 4.3.3 Identificação da substância III

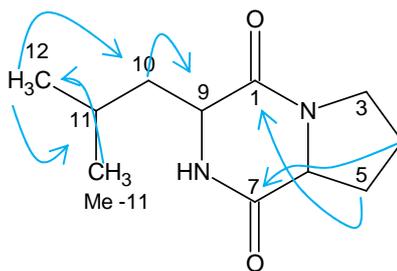


**Figura 36:** Estrutura da substância III.

A substância III (**Figura 36**) foi isolada do extrato bruto PBD de *Phomopsis* sp. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 38, 39 e 40**, p.80-82; **Tabela 6**, p. 79) revelou a presença de duas metilas em  $\delta_{\text{H}}$  1,01 (d, 3H; 6,5 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  0,96 (d, 3H; 6,5 Hz), sendo observados também a presença de quatro sinais multipletos, posteriormente identificados como sendo de hidrogênios metilênicos, em  $\delta_{\text{H}}$  (3,58 e 3,65 m),  $\delta_{\text{H}}$  (1,74 e 1,92 m),  $\delta_{\text{H}}$  (2,16 e 1,60 m) e  $\delta_{\text{H}}$  (1,53 e 1,68 m), e dois sinais de hidrogênios metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,13 (t, 1H; 8,5 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  3,57 (dt, 1H; 3,5 e 9,0 Hz). O sinal observado em 5,75 s foi atribuído ao grupo NH, presente na molécula.

O espectro de carbono (**Figura 41**, p. 83; **Tabela 6**, p. 79) apresentou 8 sinais  $\delta_{\text{C}}$  (59,2; 44,9; 38,9; 28,3; 24,9; 22,9; 21,4 e 23,5), sendo que os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  164,8 e  $\delta_{\text{C}}$  166,4 foram determinados pelas correlações observadas no mapa de correlação *g*HMBC. Com o *g*HMQC (**Figura 42**, p. 81) foi possível atribuir os hidrogênios das metilas e o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,13 t, a seus respectivos carbonos.

Pelas análises dos mapas de contorno em *g*HMBC (**Figura 37**, p. 78 e **Figuras 43, 44 e 45**, p. 85-87) foi possível observar as seguintes correlações:  $\delta_{\text{H}}$  (1,74 e 1,92 m)(H-4) com  $\delta_{\text{C}}$  164,8 (C-7);  $\delta_{\text{H}}$  (2,16 e 1,60 m)(H-5) com  $\delta_{\text{C}}$  166,4(C-1);  $\delta_{\text{H}}$  (1,53 e 1,68 m)(H-10) com  $\delta_{\text{C}}$  53,6 (C-10);  $\delta_{\text{H}}$  0,96 d (H-11) com  $\delta_{\text{C}}$  23,5 (C-12) e dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1,01 d (H-11) com  $\delta_{\text{C}}$  38,9 (C-10).



**Figura 37:** Correlações observadas no *g*HMBC.

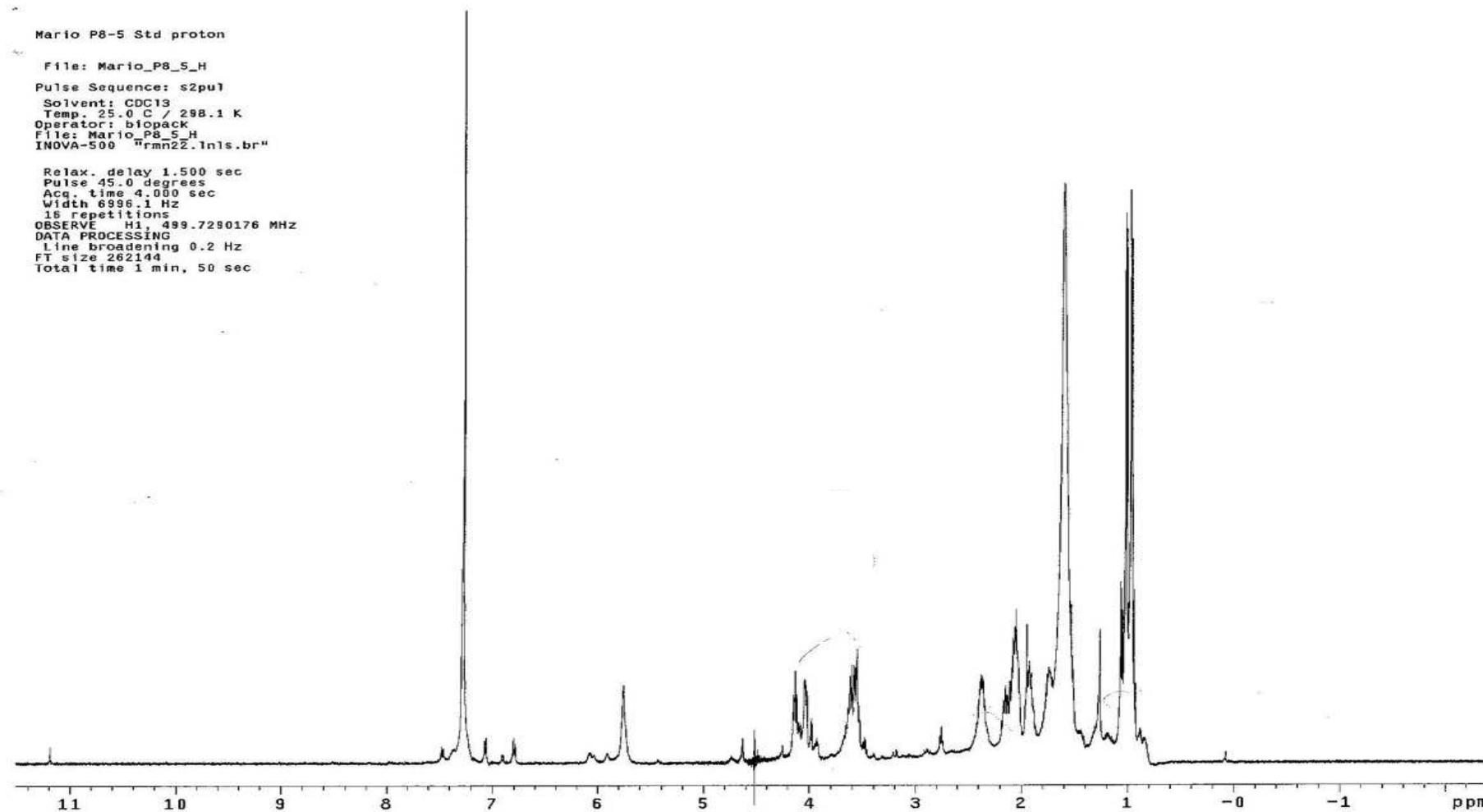
Análises desses dados com os presentes na literatura sugere que tal substância seja uma dicetopiperazina que contém resíduos de uma unidade do aminoácido Leucina (Leu) e do aminoácido Prolina (Pro) na estrutura (CAFÊU, 2007). Os dados espectrais estão de acordo com os observados na literatura (CAFÊU, 2007), indicando que a substância **III**, se trata da dicetopiperazina ciclo (D-Pro-D-Leu).

Os compostos da classe das dicetopiperazinas são atualmente isolados de diversos fungos e outros micro-organismos, possuindo diversas atividades biológicas como atividade antibiótica, imunossupressora e antitumoral (GUIMARÃES, 2006), especificamente a dicetopiperazina ciclo (D-Pro- D-Leu) é um metabólito produzido por outros micro-organismos como as bactérias e organismos marinhos como as esponjas marinha.

Essa dicetopiperazina apresenta potente atividade antibiótica frente à *Vibrio anguillarum*, evidenciando assim o potencial biológico dessa classe de substâncias (FDHILA *et al.*, 2003).

**Tabela 6.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) da substância **III** em  $\text{CDCl}_3$  do isolado e dados da literatura em  $\text{DMSO-d}_6$ .

N <sup>o</sup>	$\delta_{\text{C}}$ de <b>III</b> (Isolado)	$\delta_{\text{C}}$ (Literatura)	$\delta_{\text{H}}$ de <b>III</b> (Isolado)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatura)
1	166,4	168,7	-	-
2	-	-	-	-
3	44,9	44,9	3,58 m	3,30 m
3	44,9	44,9	3,65 m	3,43 m
4	22,9	21,7	1,74 m	1,80 m
4	22,9	21,7	1,92 m	1,85 m
5	28,3	28,4	2,16 m	2,14 m
5	28,3	28,4	1,60 m	1,79 m
6	59,2	57,3	4,13 t (8,5 Hz)	4,16 t (8,0 Hz)
7	164,8	166,0	-	-
NH	-	-	5,75 s	8,30 s
9	53,6	55,2	3,57 dt (3,5 e 9,0 Hz)	3,61 dt (5,0 e 9,0 Hz)
10	38,9	42,1	1,53 m	1,45 ddd (6,0; 9,0 e 14,0 Hz)
10	38,9	42,1	1,68m	1,57 ddd (6,0; 9,0 e 14,0 Hz)
11	24,9	23,8	1,74 m	1,71 m
Me-11	21,4	21,5	0,96 d (6,5 Hz)	0,88 d (6,5 Hz)
12	23,5	22,7	1,01 d (6,5 Hz)	0,91 d (6,5 Hz)



**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância III ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

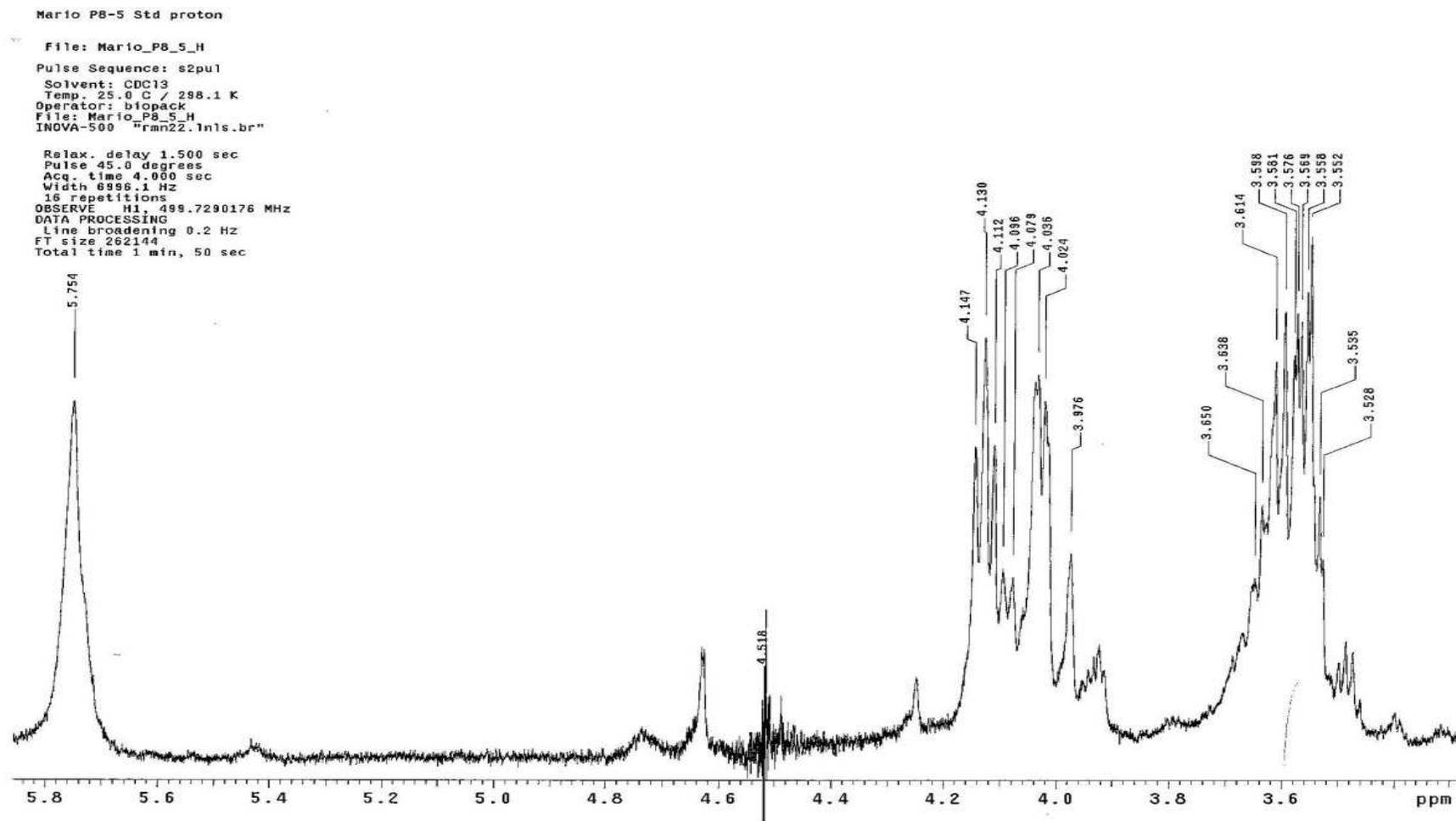


Figura 39: Ampliação 1, do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância III (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

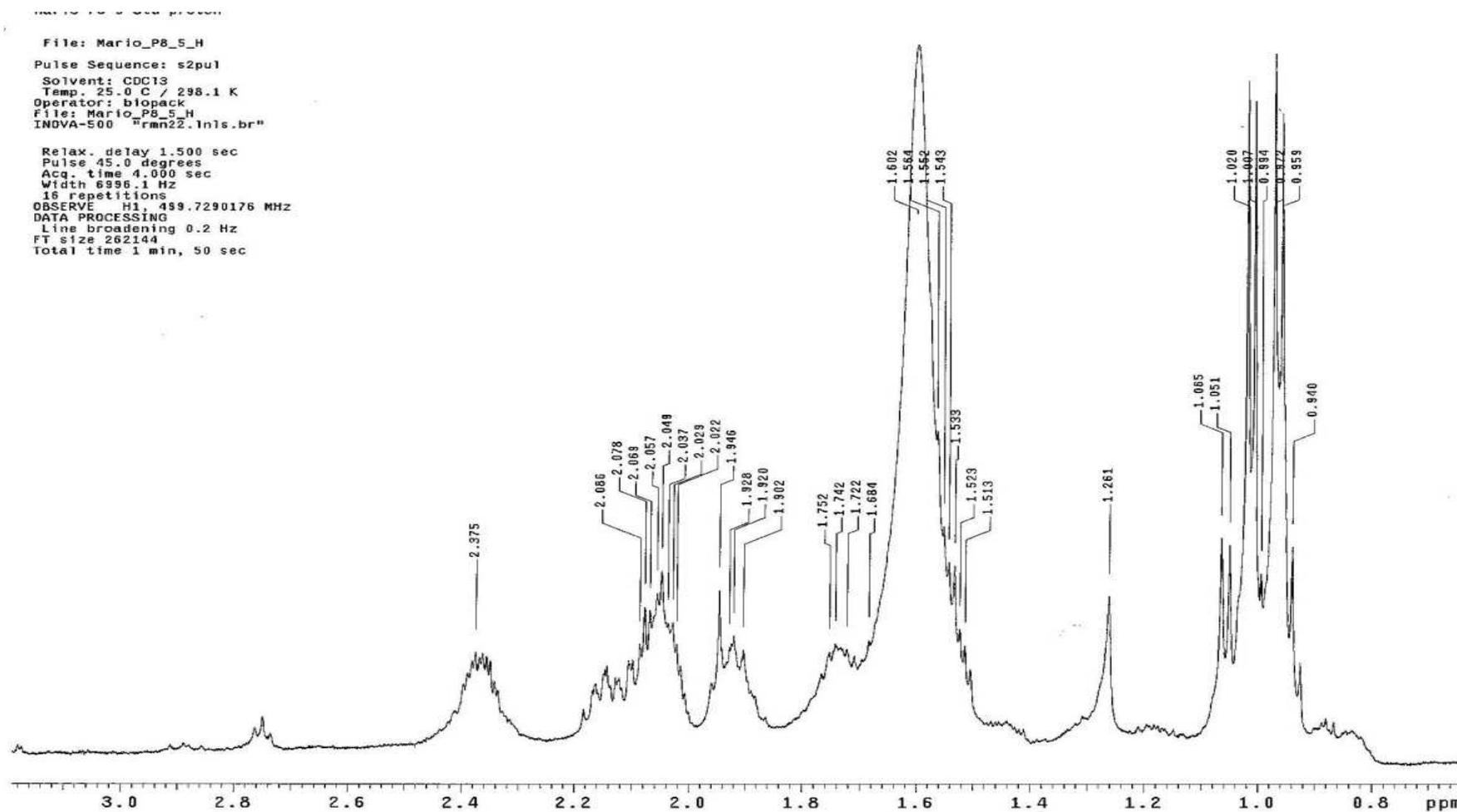


Figura 40: Ampliação 2, do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância III ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

Mario P8-5 Carbono  
File: Mario\_P8\_5\_C  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDCl3  
Temp: 25.0 C / 298.1 K  
Operator: biopack  
File: Mario\_P8\_5\_C  
INOVA-500 "rmn22.1nls.br"  
  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 1.300 sec  
Width 30154.5 Hz  
16896 repetitions  
OBSERVE C13, 125.6569314 MHz  
DECOUPLE H1, 499.7315164 MHz  
Power 39 dB  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 3.0 Hz  
FT size 131072  
Total time 32 hr, 5 min, 42 sec

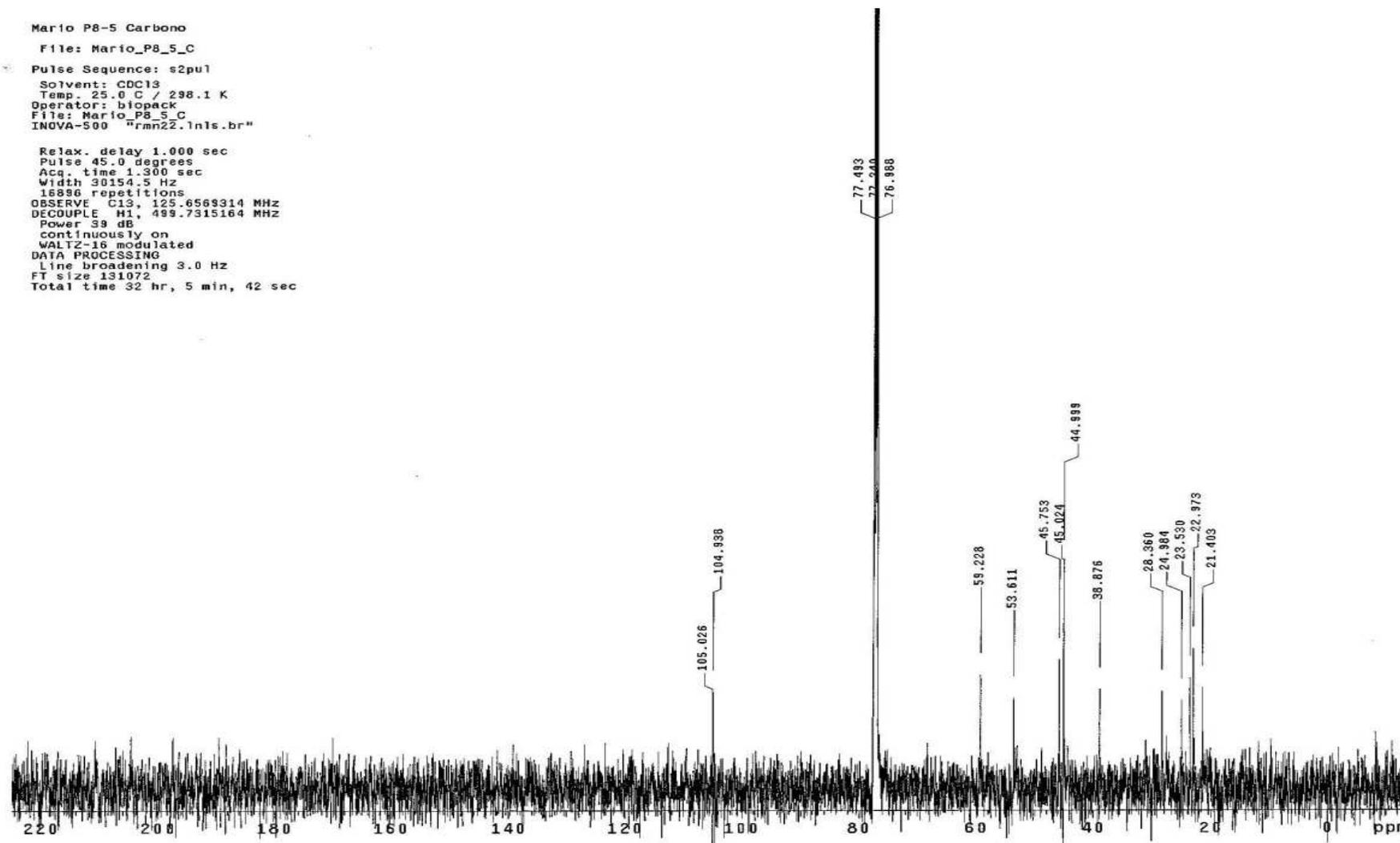
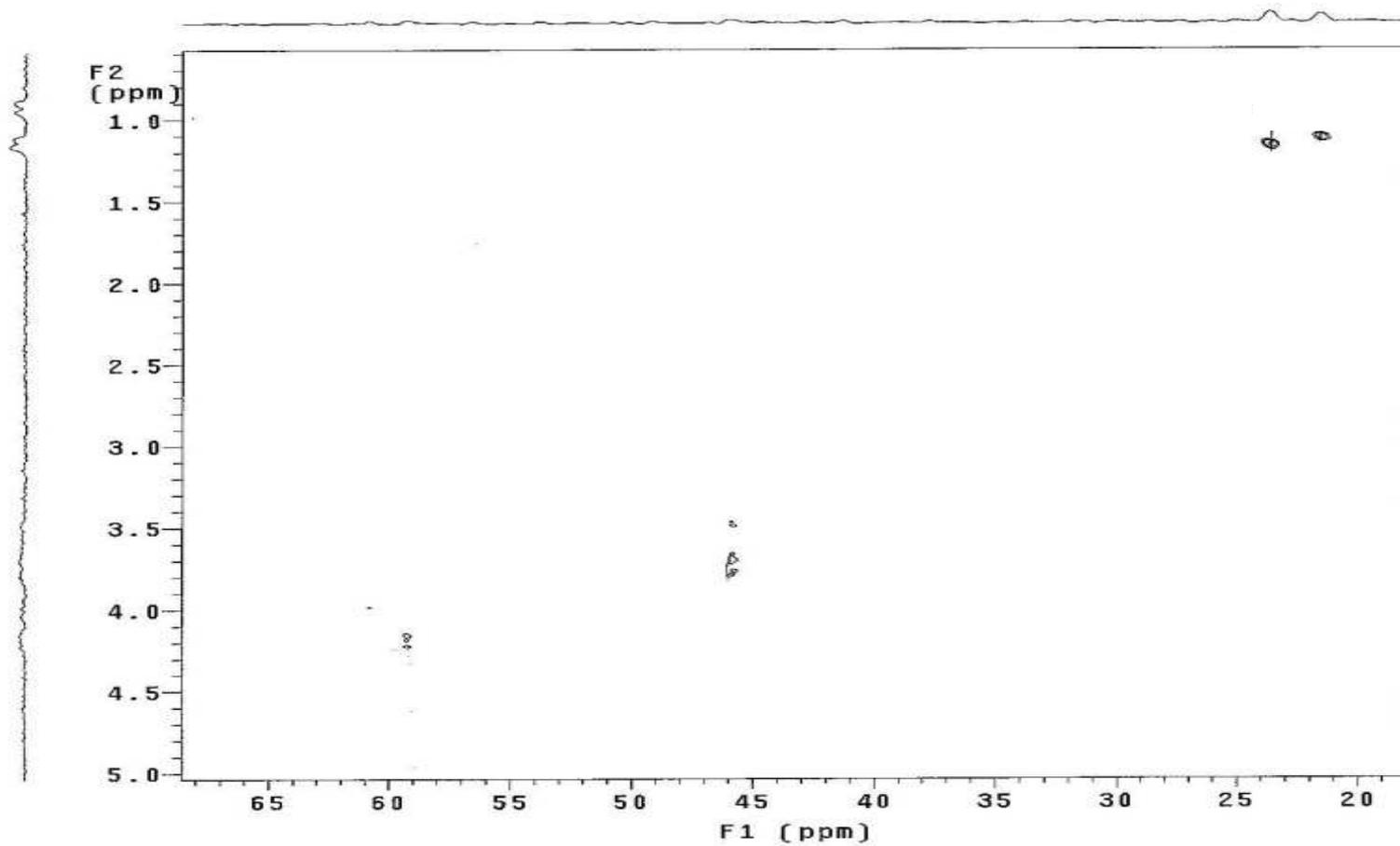
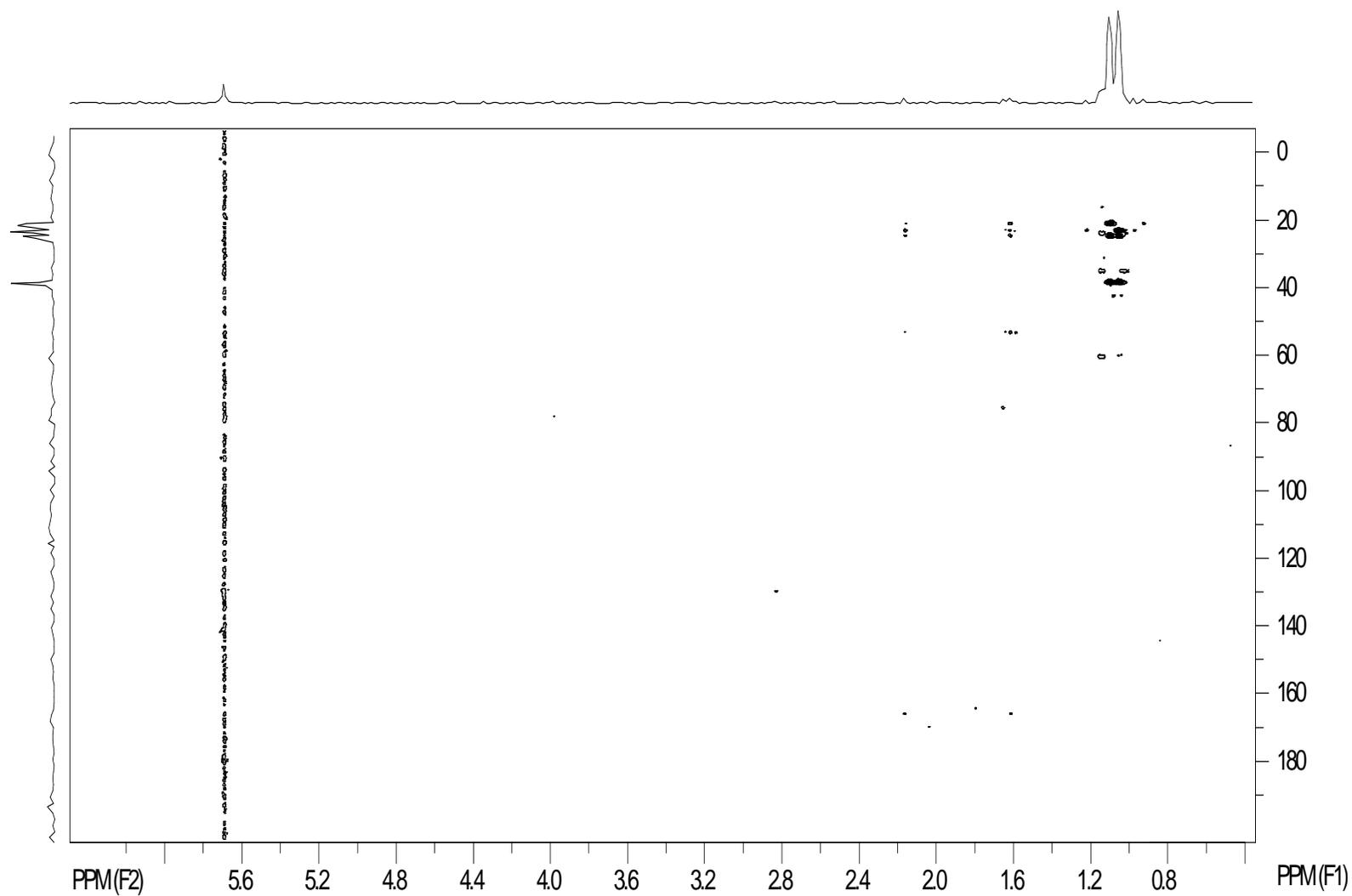


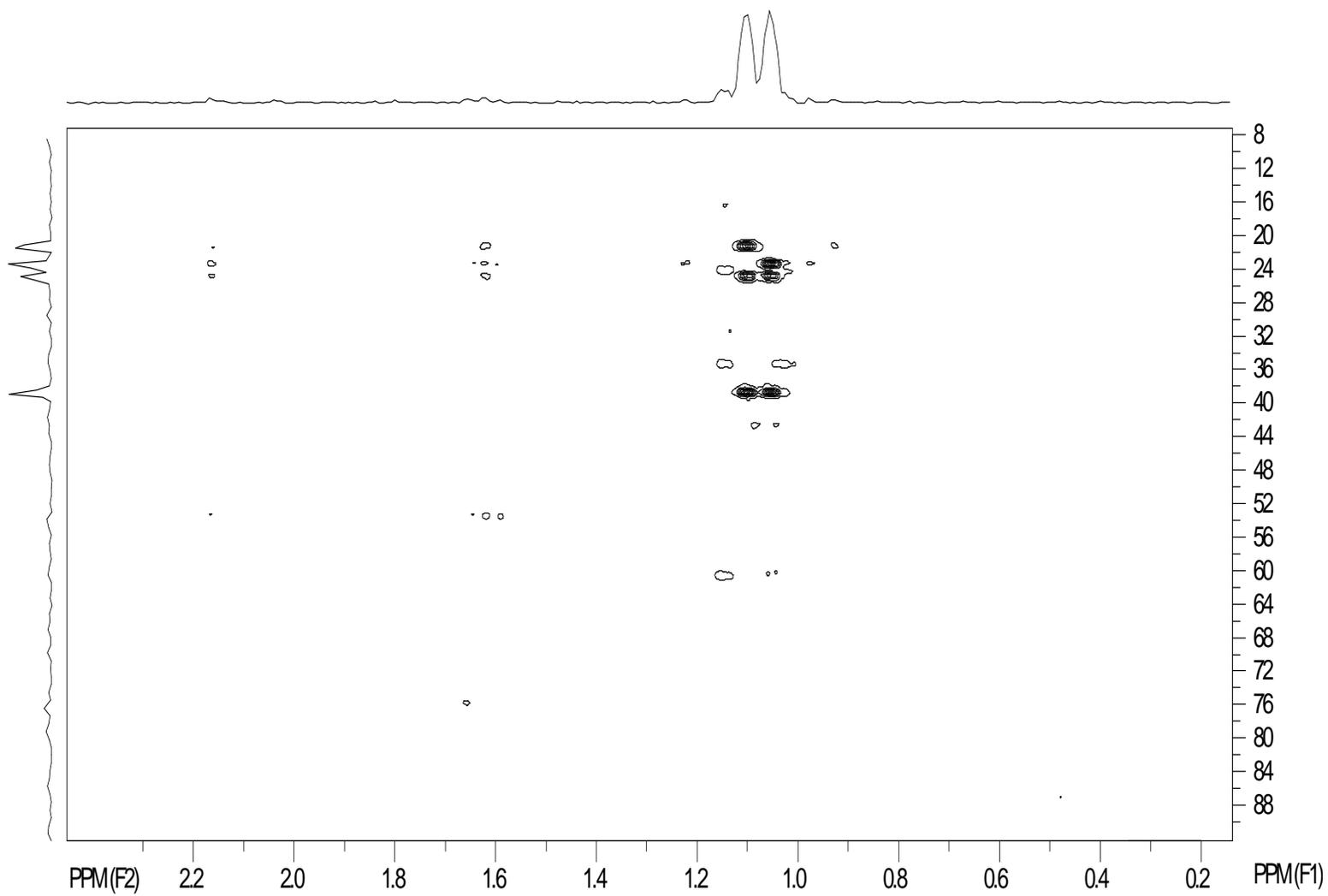
Figura 41: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância III ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



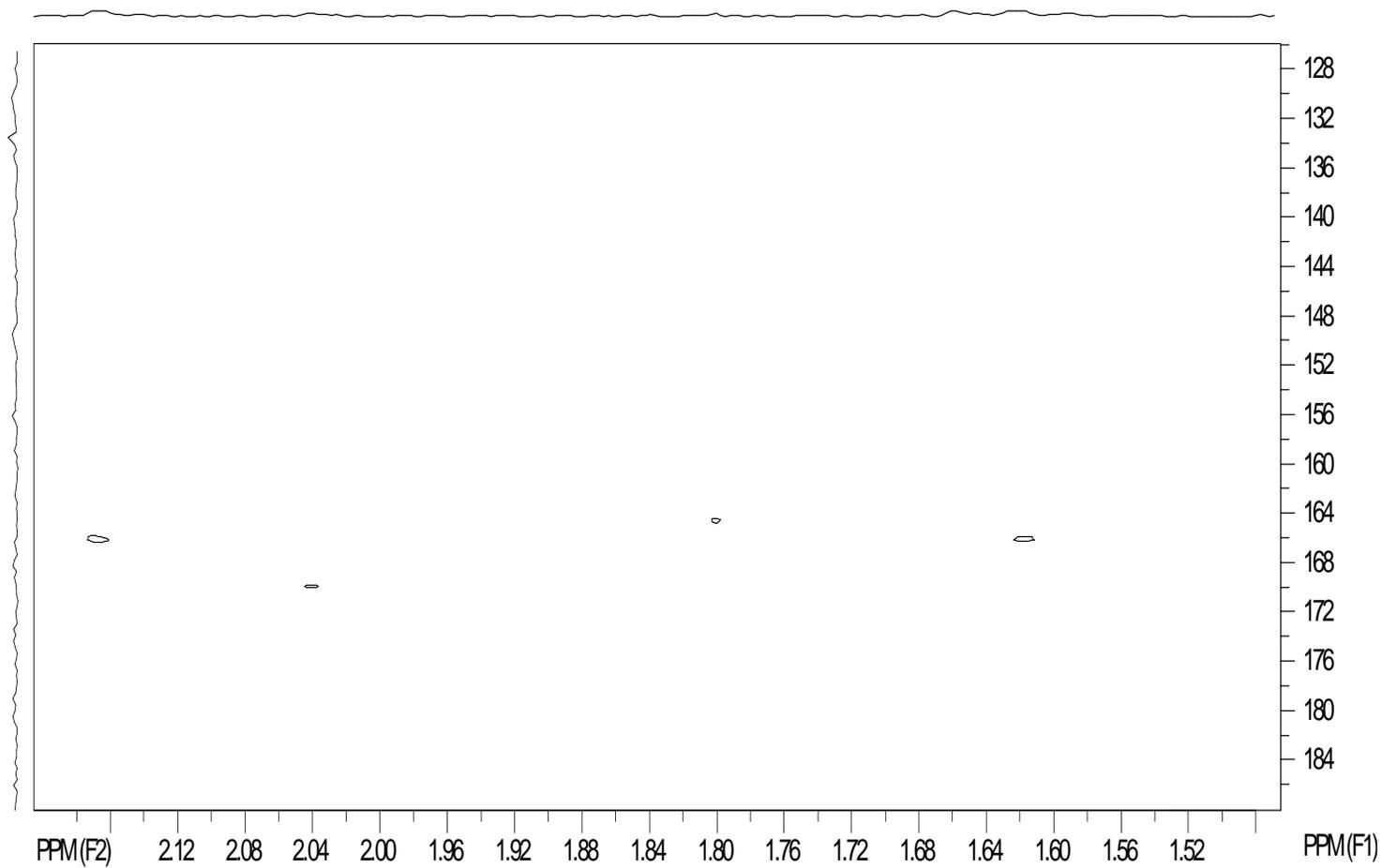
**Figura 42:** Mapa de contorno gHMQC da substância III ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).



**Figura 43:** Mapa de contorno gHMBC da substância III ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).

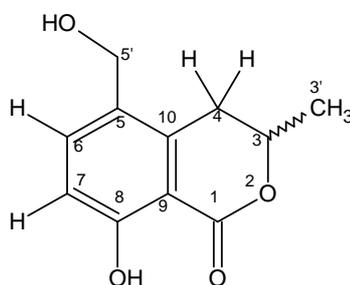


**Figura 44:** Ampliação 1, do mapa de contorno gHMBC da substância III (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz).



**Figura 45:** Ampliação 2, do mapa de contorno gHMBC da substância III ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).

#### 4.3.5 Identificação da substância IV



**Figura 46:** Estrutura da substância IV.

A substância **IV** (**Figura 46**) foi isolada como um sólido amorfo. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 51, 52 e 53**, p. 90-92; **Tabela 8**, p. 89) registrou dois sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,46 (d, 1H; 8,5 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (d, 1H; 8,5 Hz) indicando um aromático tetra-substituído sendo a relação entre esses dois hidrogênios *orto* como observado pelo valor da constante de acoplamento.

Além destes, foi possível observar um sinal com  $\delta_{\text{H}}$  11,19 (s, OH), indicando ser de hidroxila. Foram observados também sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,71 (m, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  3,19 (dd, 1H; 16,5 e 3,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2,88 (dd, 1H; 16,5 e 11,5 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4,63 (s, 2H), e 1,54 (sl, 3H).

Analisando esses dados percebe-se que se trata de uma molécula derivada da 5-metilmeleína, sendo que a única diferença é a presença do sinal  $\delta_{\text{H}}$  4,63 (s, 2H), e a ausência da metila ligada ao anel aromático em  $\delta_{\text{H}}$  2,12 (s, 3H). Estas observações Sugerem que a metila na posição 5 se encontra oxidada a álcool benzílico na substância **IV**. Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com os presentes na literatura (OKUNO *et al.*, 1986) possibilitou identificar a substância como 5-hidroxilmetilmeleína.

**Tabela 7.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) da substância **IV** em  $\text{CDCl}_3$  e da 5-hidroxi metilmeleína presente na literatura em  $\text{CDCl}_3$  (60 MHz).

Nº	$\delta_{\text{H}}$ de <b>IV</b> (isolado)	$\delta_{\text{H}}$ 5-hidroxi metilmeleína (Literatura)
1	-	-
2	-	-
3	4,71 m	4,69 m
3'	1,54 sl	1,52 d (6,0 Hz)
4	3,19 dd (16,5 e 3,0 Hz)	2,76 dd (16,5 e 3,5 Hz)
4	2,88 dd (16,5 e 11,5 Hz)	2,76 dd (16,5 e 10,5 Hz)
5	-	-
5'	4,63 s	4,57 s
6	6,90 d (8,5 Hz)	6,81 d (8,5 Hz)
7	7,46 d (8,5 Hz)	7,43 d (8,5 Hz)
8	-	-
9	-	-
10	-	-
OH	11,19 s	11,09 s
OH	-	2,40 s

Existem relatos na literatura da fitotoxicidade da 5-hidroxi metilmeleína, frente a brotos de maçã, o qual causou queima em uma concentração de 1000 ppm, e frente a muda de alface inibindo o seu crescimento com um concentração de 500 ppm (OKUNO *et al.*, 1986). Este fato significa que a depender da situação de estresse a qual o hospederiro seja submetido esse fungo assintomático pode passar a exercer uma atividade parasitária, sendo prejudicial à cultura de mangaba.

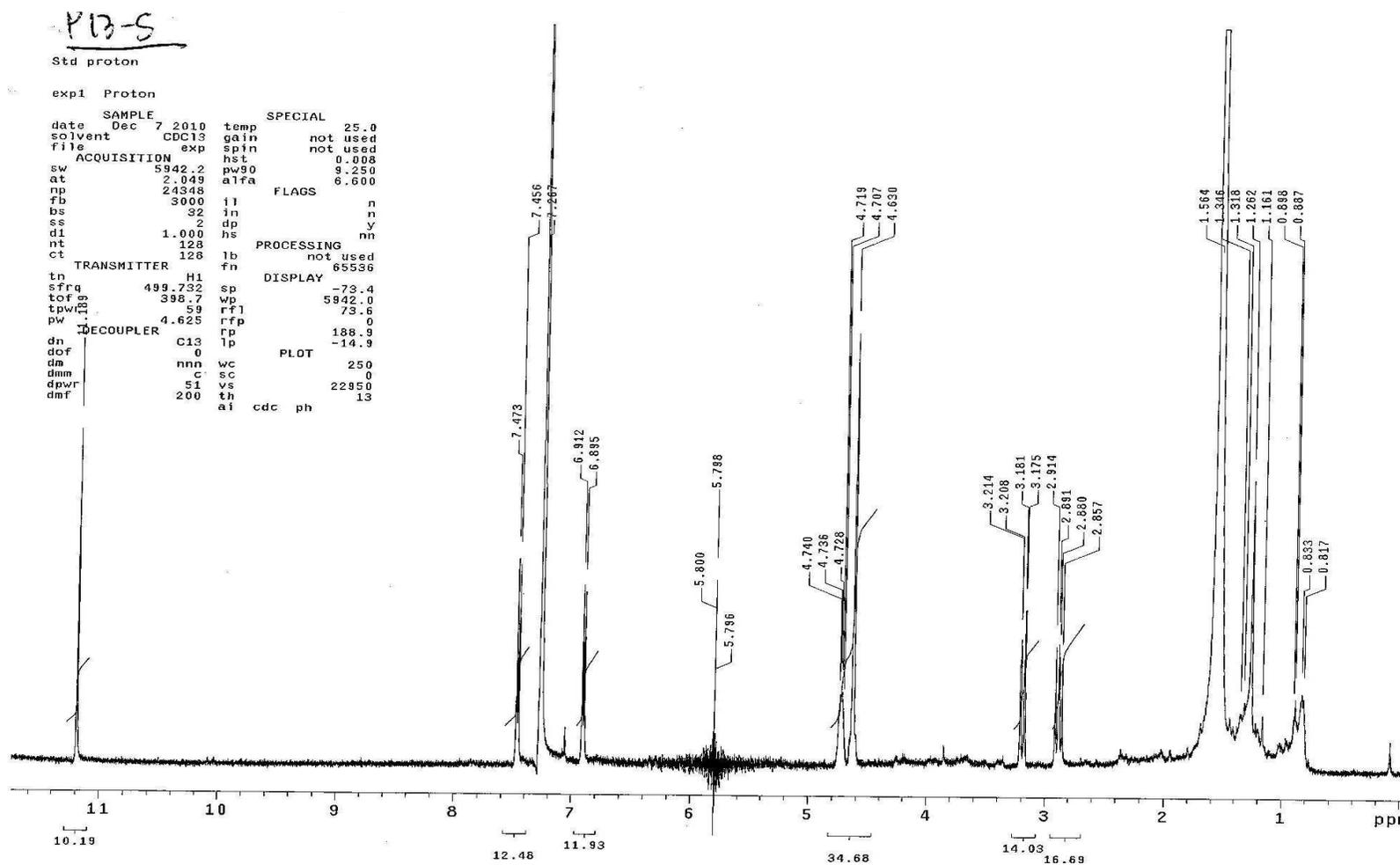


Figura 47: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IV ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

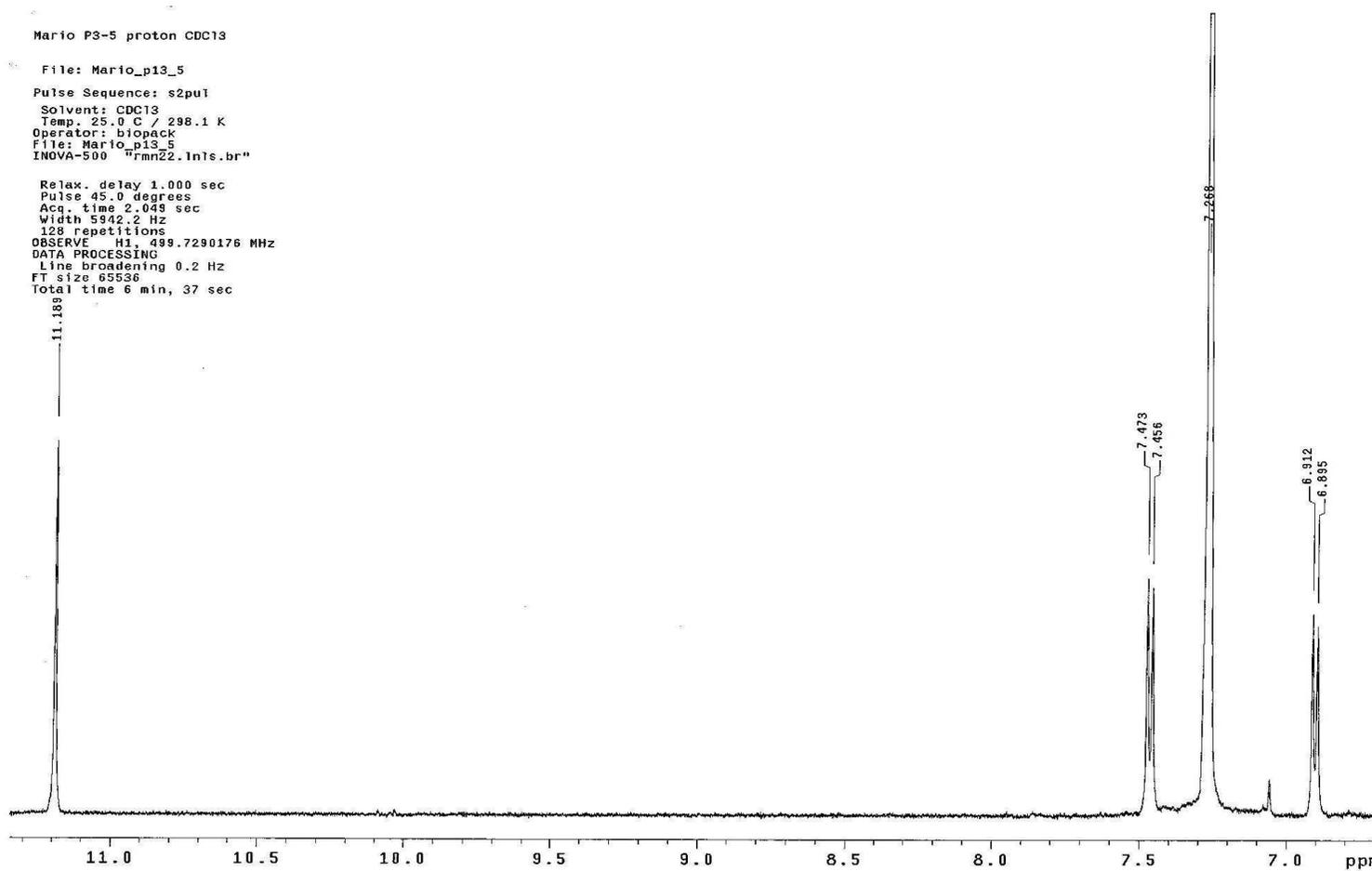


Figura 48: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IV ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

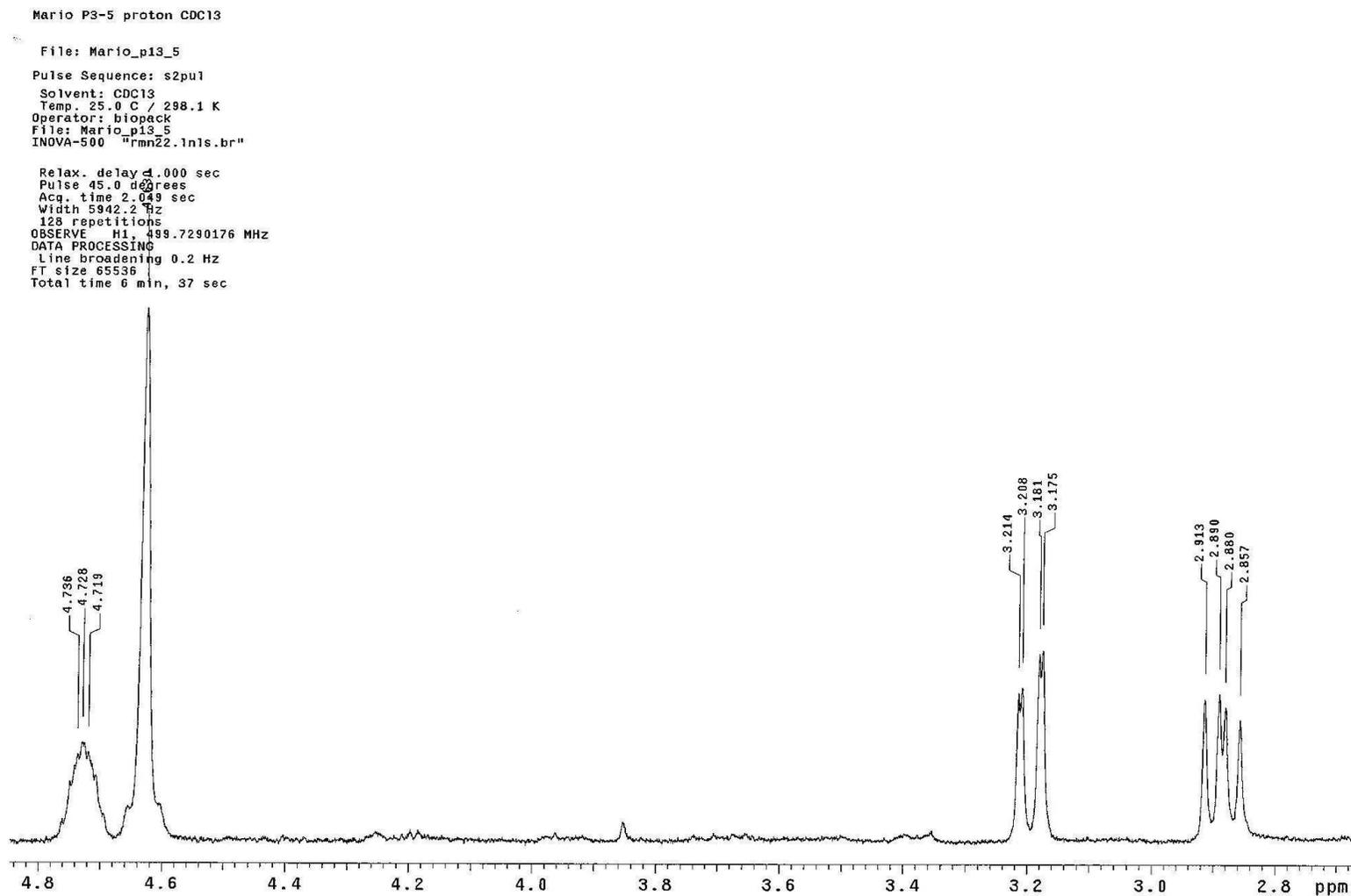
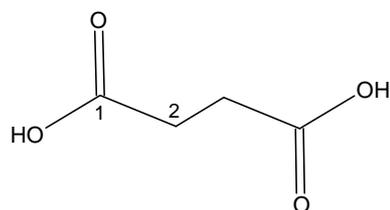


Figura 49: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IV ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

#### 4.3.4 Identificação da substância V



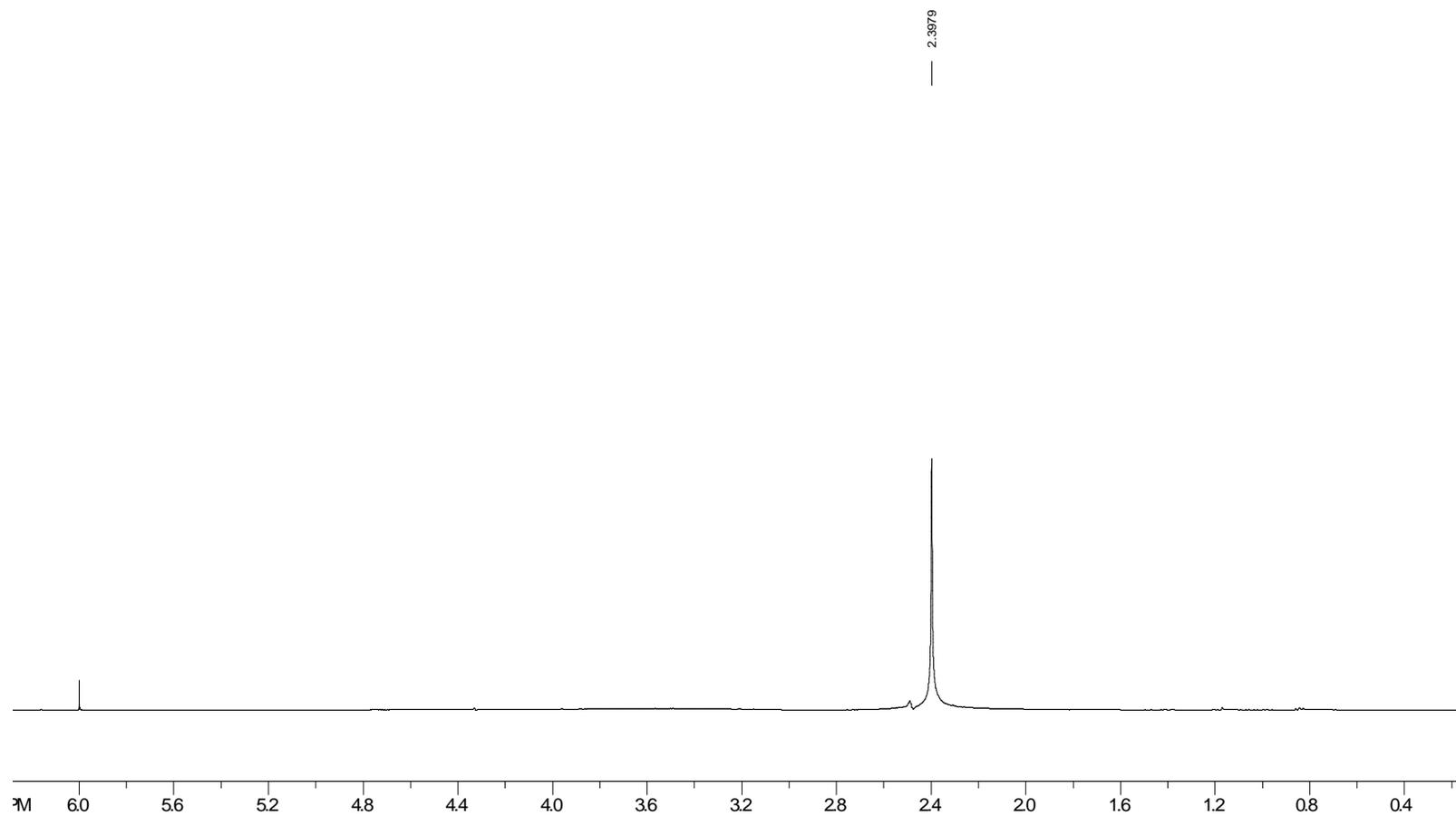
**Figura 50:** Estrutura da substância V.

A substância **IV** (**Figura 50**) foi isolada como um cristal incolor. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 47**, p. 94 e **tabela 7**) mostrou apenas um único sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,39 (s) de hidrogênio metilênico. Já o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 48**, p. 95) mostrou a presença de dois sinais um em  $\delta_{\text{C}}$  174,3 de carboxila ácida e outro em  $\delta_{\text{C}}$  29,5 de carbono metilênico.

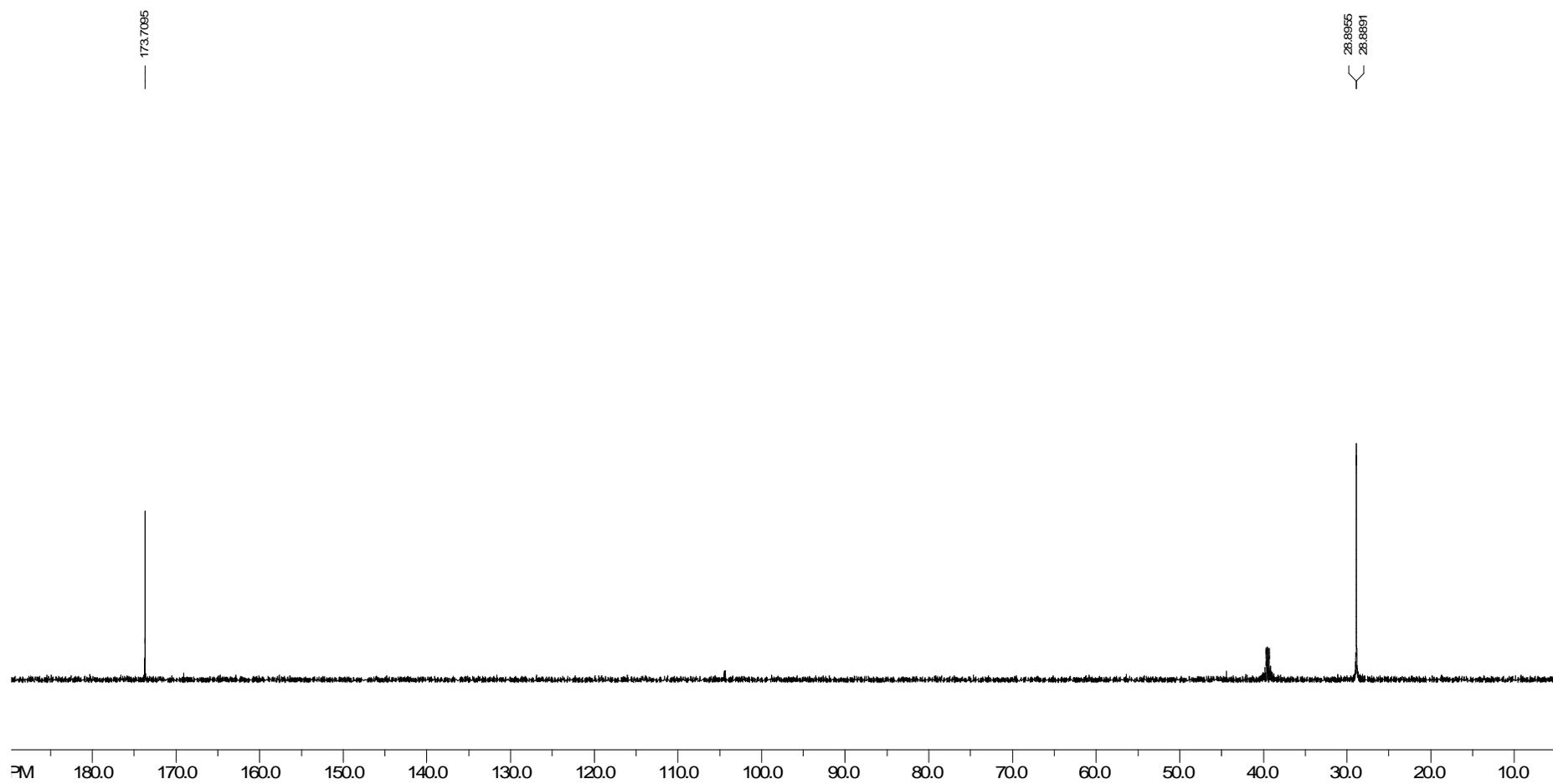
Confirmação da estrutura proposta foi feita através da análise do espectro de massas TOF-MS (**Figura 49**, p. 96) no modo positivo, onde foi possível observar a presença do íon em  $m/z$  119,0882 ( $[\text{M}+\text{H}]$ ) o que está de acordo com a massa da fórmula molecular proposta  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ . Análise desses dados e comparação com os da literatura (MAZZEI *et al.*, 2010) possibilitou identificar a substância **V**, como ácido succínico.

**Tabela 8.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) da substância **V** em  $\text{DMSO-d}_6$  do isolado e dados da literatura em  $\text{D}_2\text{O}$  com 2% de ácido fórmico.

Nº	$\delta_{\text{C}}$ de <b>V</b> (Isolado do Extrato)	$\delta_{\text{H}}$ de <b>V</b> (Isolado do Extrato)	$\delta_{\text{H}}$ ácido succínico (Literatura)
1	174,3	-	-
2	29,5	2,39 (s)	2,66 (s)



**Figura 51:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **V** (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz).



**Figura 52:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **V** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz).

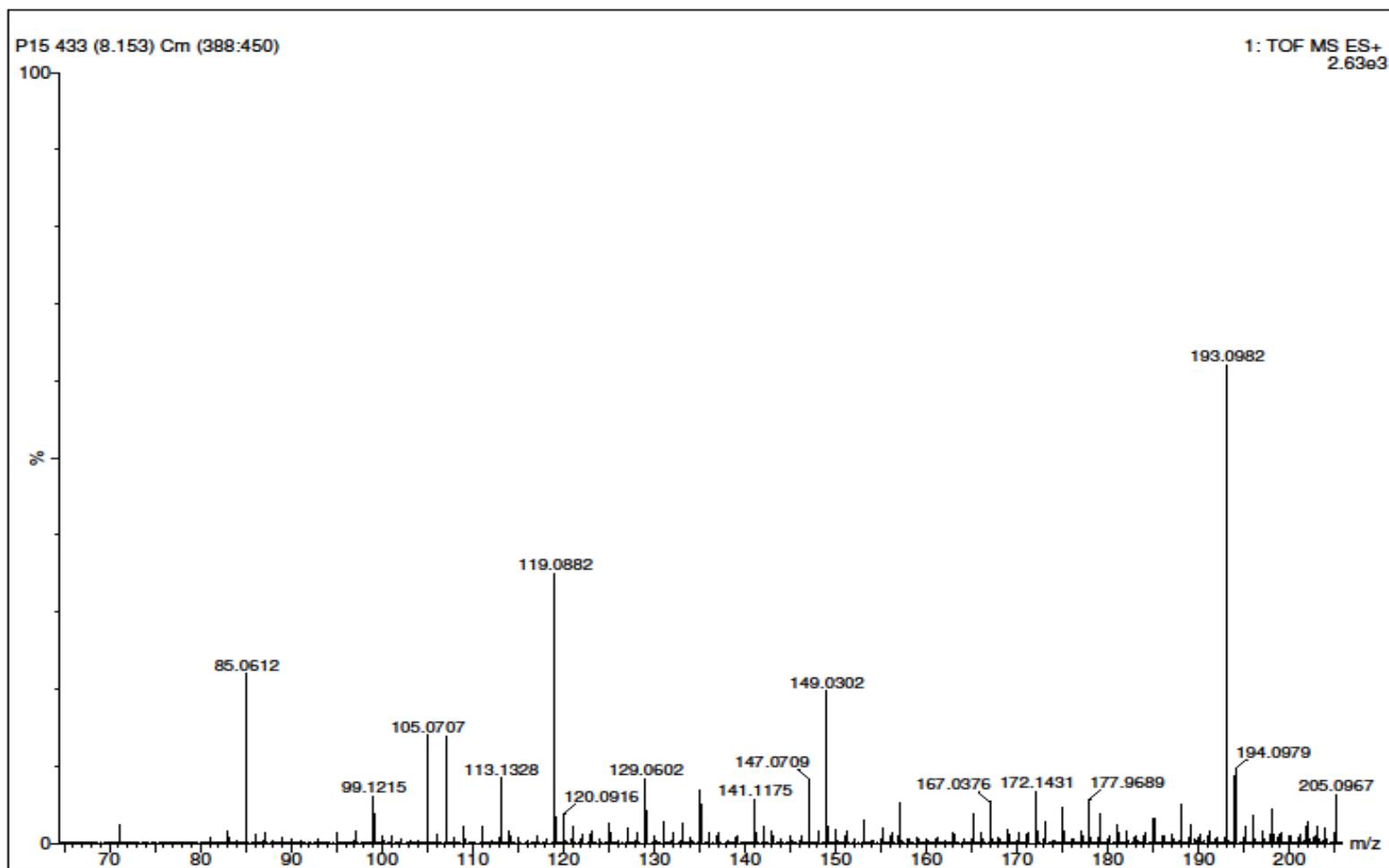
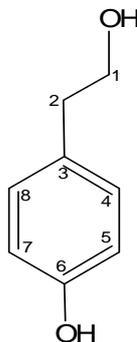


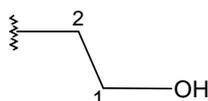
Figura 53: Espectro de massa da substância V.

#### 4.3.6 Identificação da substância VI



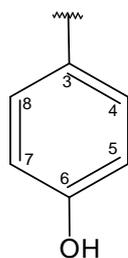
**Figura 54:** Estrutura da substância VI.

A substância VI (**Figura 54**) foi isolada como um sólido amorfo. Análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 59**, p. 101; **Tabela 9**, p. 99) evidenciou dois hidrogênios característicos de anel aromático *para* substituído em  $\delta_{\text{H}}$  6,94 (d, 2H; 8,5 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,58 (d, 2H; 8,5 Hz), além de dois tripletos ambos integrando para dois hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,44 (t, 2H; 7,2 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,52 (t, 2H; 7,2 Hz) de hidrogênios metilênico. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,44 é característico de metileno ligado a hidroxila. Sugerindo a seguinte sub-estrutura A (**Figura 55**):



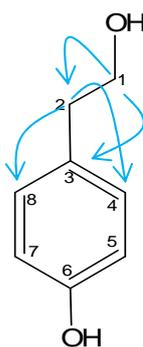
**Figura 55:** Estrutura parcial A da substância VI.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 60**, p. 102; **Tabela 9**, p. 99) mostrou seis sinais, sendo dois de carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  63,2 e  $\delta_{\text{C}}$  38,9. O primeiro sinal é de carbono metilênico carbinólico. O espectro de carbono também registrou a presença de quatro sinais de carbonos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  (156,1; 115,6; 130,3; 130,1), sendo isto uma característica dos sistemas aromático *para* substituído, devido à simetria dos núcleos nesse sistema. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  156,1 indica a presença de uma hidroxila ligada a carbono aromático. Sugerindo a seguinte subestrutura B (**Figura 56**, p. 98):



**Figura 56:** Estrutura parcial B da substância VI.

As subestruturas foram unidas pelas correlações heteronucleares observadas no mapa de contorno *g*HMBC (**Figura 57** e **Figura 61**, p. 103), observando correlações  $^3J_{CH}$  ou  $^2J_{CH}$  entre hidrogênio e carbono, onde foi possível visualizar os correlações entre  $\delta_H$  3,44 (H-1) com  $\delta_C$  130,1 (C-3) e  $\delta_C$  38,9 (C-2); do hidrogênio em  $\delta_H$  2,52 (H-2) com os carbonos  $\delta_C$  130,3 (C-8),  $\delta_C$  130,3 (C-4) e  $\delta_C$  63,2 (C-1).



**Figura 57:** Correlações observadas no *g*HMBC.

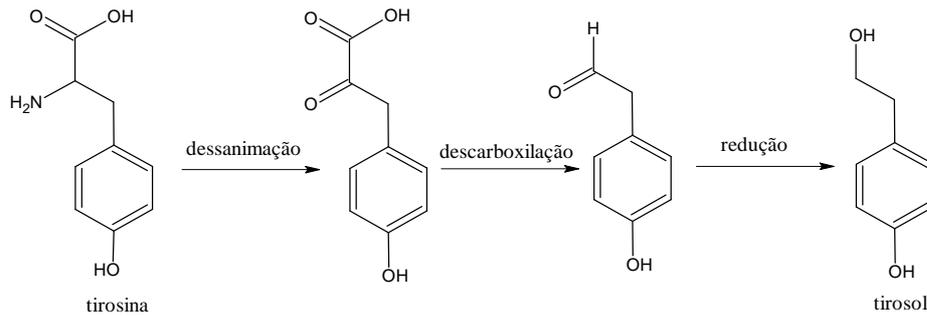
Pela análise do espectro de massas TOF-MS (**Figura 62**, p. 104), no modo positivo foi possível observar a presença dos íons em  $m/z$  121,0668 ( $[M+H-(H_2O)]$ ) e  $m/z$  177,1146 ( $[M+K]$ ), o que está de acordo com a massa da fórmula molecular da estrutura proposta  $C_8H_{10}O_2$ . Comparação desses dados com os presentes na literatura (GUIMARÃES, 2006) possibilitou identificar a substância VI com sendo o tirosol.

**Tabela 9.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) das substâncias **VI** em DMSO- $d_6$  do isolado e dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta_{\text{C}}$ de <b>VI</b> (Isolado)	$\delta_{\text{C}}$ Tirosol (Literatura)	$\delta_{\text{H}}$ de <b>VI</b> (Isolado)	$\delta_{\text{H}}$ Tirosol (Literatura)
1	63,2	63,8	3,44 t (7,2 Hz)	3,83 t (6,6 Hz)
2	38,9	39,2	2,52 t (7,2 Hz)	2,91 t (6,6 Hz)
3	130,1	130,2	-	-
4 e 8	130,3	130,4	6,94 d (8,5 Hz)	7,10 d (8,6 Hz)
5 e 7	115,6	115,4	6,58 d (8,5 H z)	6,78 d (8,6 Hz)
6	156,1	154,2	-	-

O tirosol é um composto fenólico bastante conhecido e isolado de diversos fungos entre os quais estão: *Ceratocystis adiposa*, *Ceratocystis fimbriata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Picea glauca*, *Nigrospora* sp., *Hypoxyton serpens* entre outros (GUIMARÃES, 2006 e 2009; SUMARAH *et al.*, 2008; TRISUWAN *et al.*, 2009).

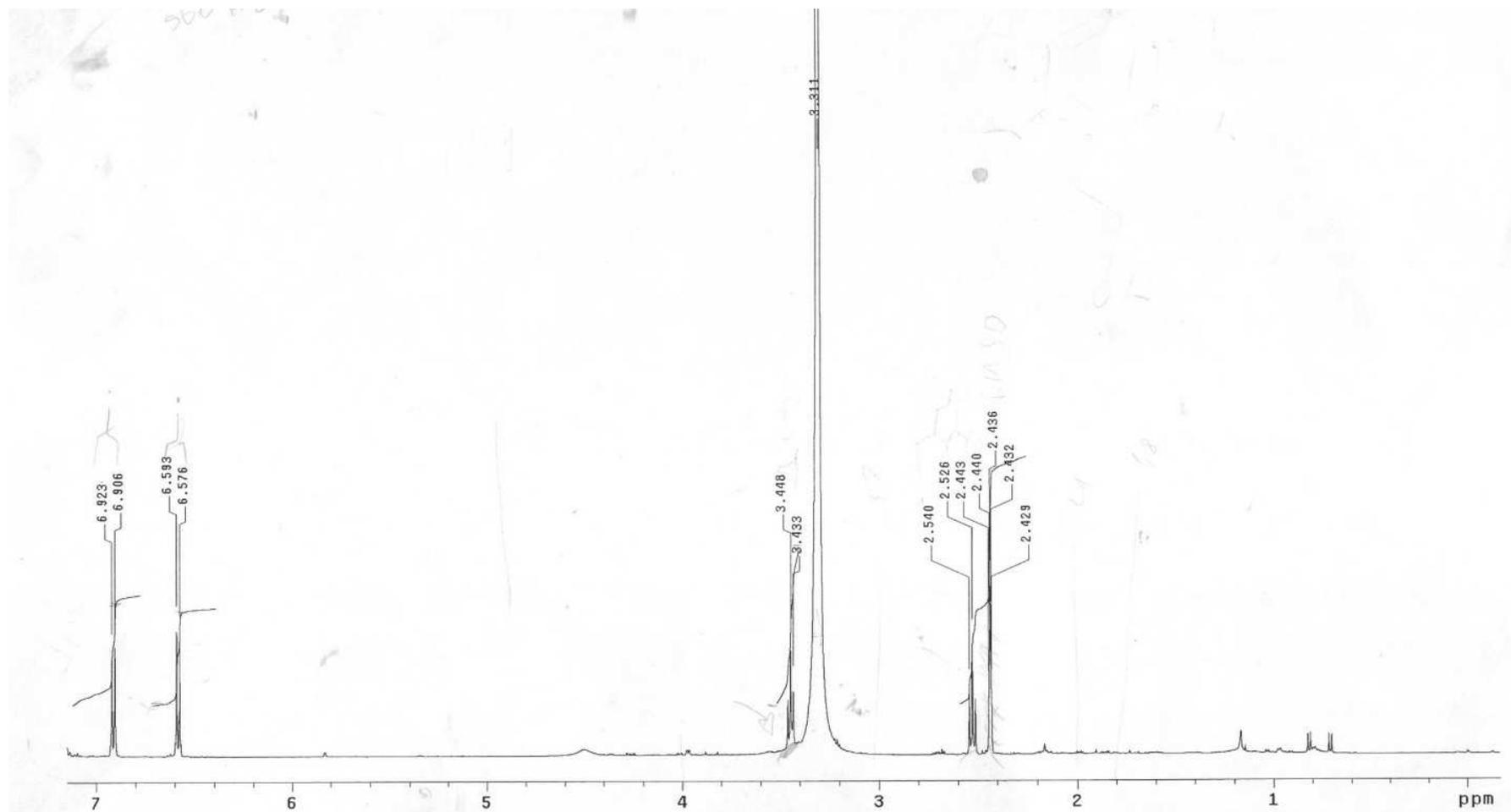
Segundo informações da literatura, o tirosol é produzido a partir da tirosina. A via biossintética mostra que há uma reação de desaminação oxidativa inicial, seguido por um descarboxilação e redução do aldeído resultante (**Figura 58**, p. 100) (GUZMÁN-LÓPEZ *et al.*, 2007).



**Figura 58:** Rota biossintética do tirosol.

O tirosol é uma substância sinalizadora na regulação da dinâmica de crescimento e morfogênese em *Candida albicans* e foi identificada por Chen em 2004 (GUIMARÃES, 2009 e 2010). Esta substância atua estimulando a formação do tubo germinativo, contribuindo na aceleração da conversão da fase leveduriforme para a fase filamentosa, contribuindo para proteção de *Candida albicans* contra morte por fagocitose (GUIMARÃES, 2009 e 2010).

Esse composto possui diversas atividades biológicas entre elas: atividade antioxidante, antifúngica contra os fungos *Lagenidium callinectes* e *Gibberella pulicaris* e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (GUIMARÃES, 2006). Adicionalmente, o tirosol apresenta interesse farmacológico como antioxidante e tem sido utilizado em tratamento da aterosclerose, protegendo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da oxidação, a qual desempenha um papel importante na iniciação e na progressão de doenças cardiovasculares. A literatura também relata a ação fitotóxica desse metabólito em folhas de alface e sua toxicidade a certos camundongos (GUZMÁN-LÓPEZ *et al.*, 2007).



**Figura 59:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VI** ( $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz).

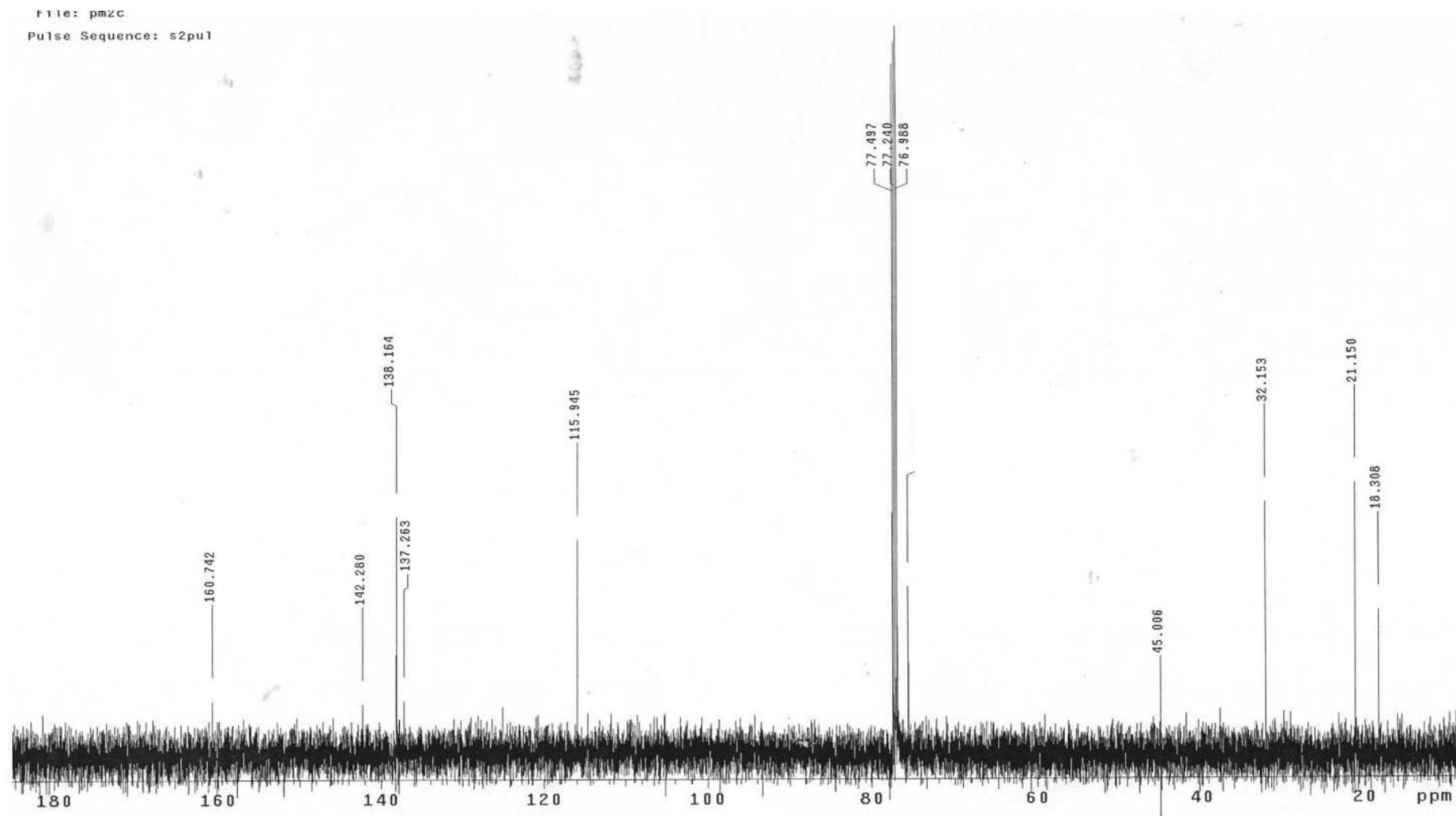
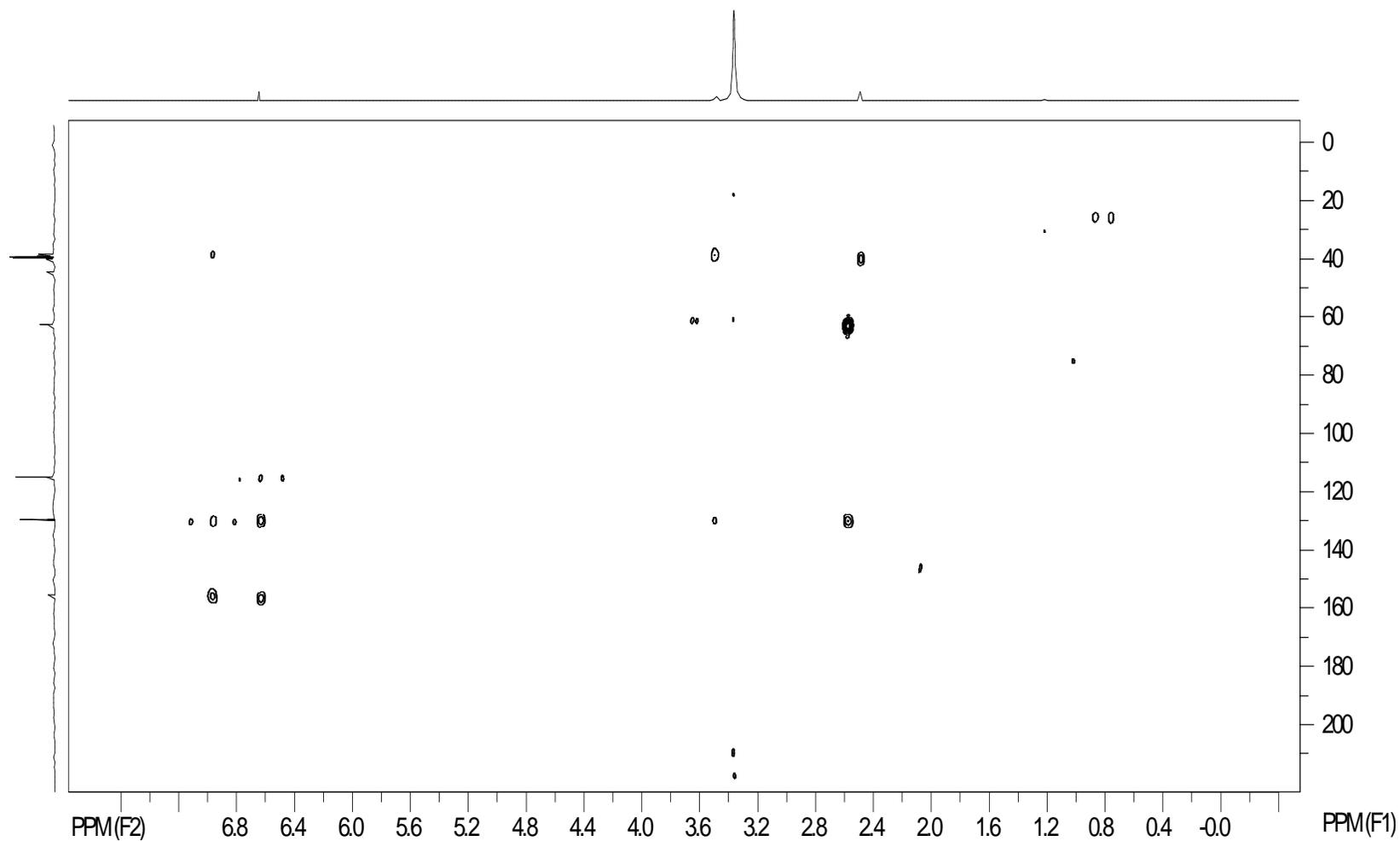


Figura 60: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância VI (DMSO- $\text{d}_6$ , 126 MHz).



**Figura 61:** Mapa de contorno gHMBC da substância VI (DMSO-d<sub>6</sub>, 126 MHz).

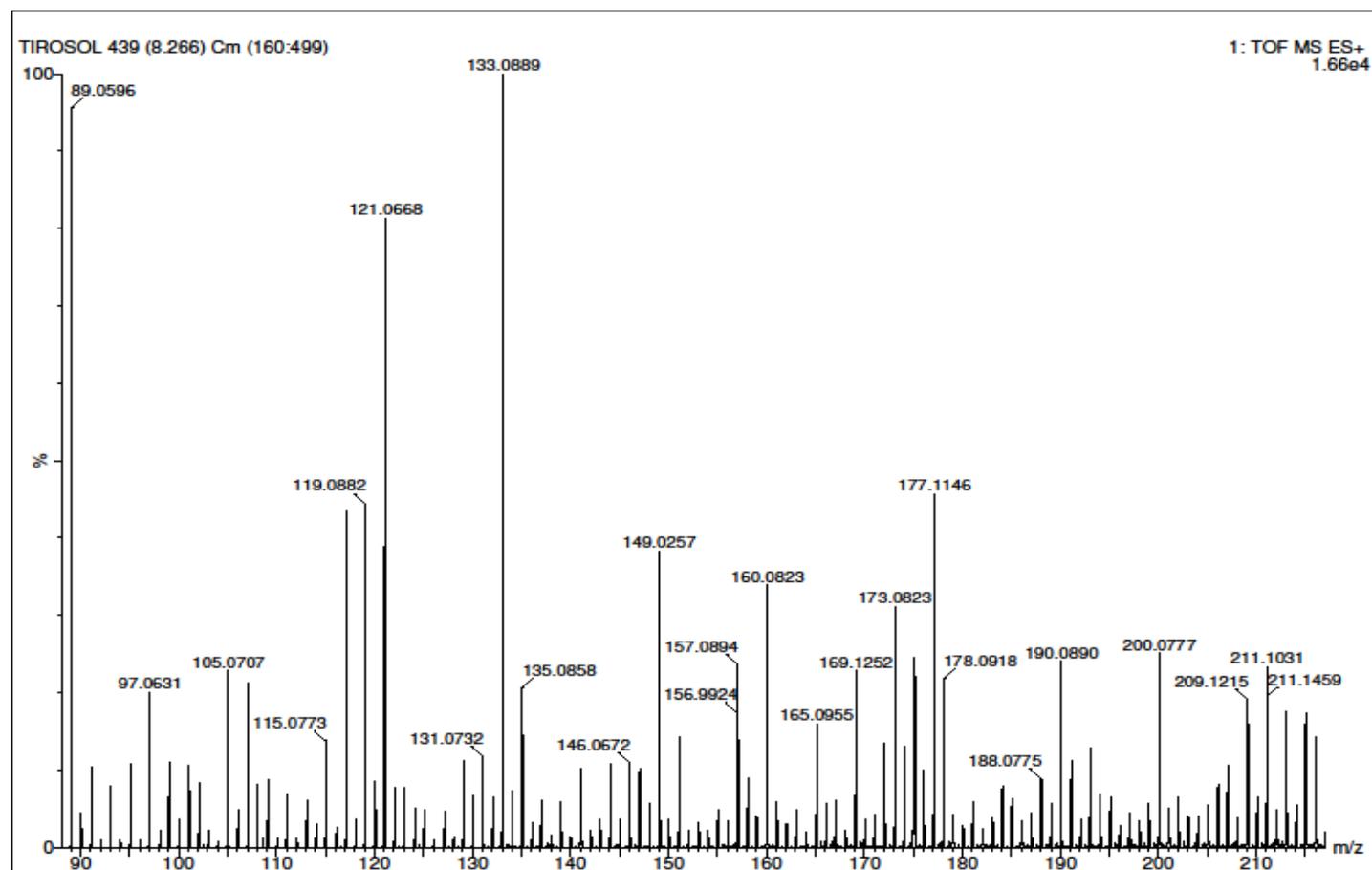
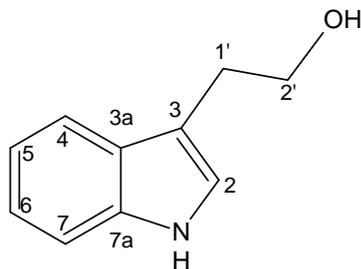


Figura 62: Espectro de massa da substância VI.

#### 4.3.7 Identificação da substância VII



**Figura 63:** Estrutura da substância VII.

A substância VII (**Figura 63**) foi isolada como sólido amorfo. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 65**, p. 108 **Tabela 10**, p. 106) mostrou cinco sinais na região do aromático  $\delta_{\text{H}}$  7,54 (d, 1H; 8,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,29 (d, 1H; 8,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,14 (t, 1H; 7,5 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,06 (t, 1H; 7,5 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,00 (s, 1H) e um singleto em  $\delta_{\text{H}}$  8,10, sugerindo um grupo NH na molécula.

Dois tripletos ambos integrando para dois em  $\delta_{\text{H}}$  3,84 (t, 2H; 6,2 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,97 (t, 2H; 6,2 Hz) de hidrogênios metilênico também foram observados no espectro. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,84 é característico de hidrogênio metilênico ligado a hidroxila.

O espectro de carbono (**Figura 66**, p. 109; **Tabela 10**, p. 106) confirmou a presença do anel aromático  $\delta_{\text{C}}$  (128,0; 119,4; 118,4; 122,1; 110,8; 136,6), e de dois carbonos  $\text{sp}^2$   $\delta_{\text{C}}$  (121,7; 111,4), além de dois carbonos metilênicos  $\delta_{\text{C}}$  (62,8; 29,9).

Esse sistema de dois tripletos, dois dupletos e um singleto na região do aromático observado no espectro de hidrogênio, mais o sinal de hidrogênio NH são devidos provavelmente a um sistema indólico monosubstituído na molécula.

Essa substância foi confirmada através da análise do espectro de massas TOF-MS (**Figura 67**, p. 110) no modo positivo onde foi possível observar a presença dos íons em  $m/z$  144,0833 ( $[\text{M}+\text{H}-(\text{H}_2\text{O})]$ ) e  $m/z$  200,0777 ( $[\text{M}+\text{K}]$ ) o que esta de acordo com a massa da fórmula molecular proposta  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$ . Comparação desses dados com os presentes na literatura (LIU *et al.*, 2006) possibilitou identificar a substância VII com sendo o triptofol.

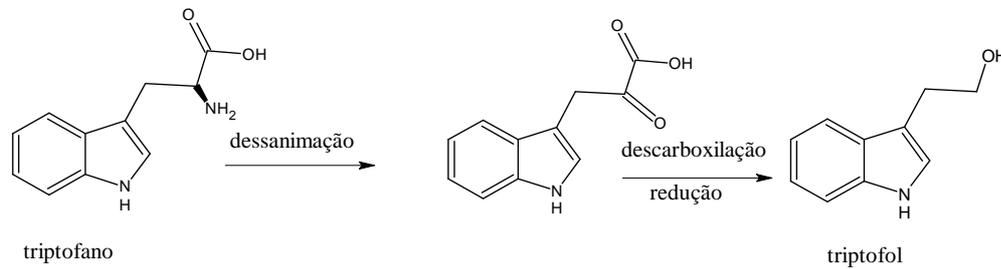
**Tabela 10.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MH) da substância **VII** em  $\text{CDCl}_3$  do isolado e dados da literatura em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

N <sup>o</sup>	$\delta_{\text{C}}$ de <b>VII</b> (Isolado)	$\delta_{\text{C}}$ Triptofol (Literatura)	$\delta_{\text{H}}$ de <b>VII</b> (Isolado)	$\delta_{\text{H}}$ Triptofol (Literatura)
1'	29,9	29,8	2,97 t (6,2 Hz)	2,96 t (7,5 Hz)
2'	62,8	62,5	3,84 t (6,2 Hz)	3,80 t (7,5 Hz)
1	-	-	8,10 s	-
2	121,7	122,3	7,00 s	7,06 s
3	111,4	111,0	-	-
3 <sup>a</sup>	128,0	128,0	-	-
4	119,0	118,4	7,54 d (7,5 Hz)	7,52 d (8,0 Hz)
5	118,4	118,4	7,06 t (7,5 Hz)	6,98 td (7,0 e 1,0 Hz)
6	122,1	121,0	7,14 t (8,0 Hz)	7,06 td (7,0 e 1,0 Hz)
7	110,8	110,8	7,29 d (8,0 Hz)	7,31 d (8,5 Hz)
7 <sup>a</sup>	136,6	137,5	-	-

O triptofol ocorre como um produto natural nas plantas, organismos marinho e em micro-organismos, sendo freqüentemente relatada como um metabólito dos fungos *Aspergillus niger*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizóbio* sp., *Drechslera nodulosum* e *Acremonium lolii* além das esponjas marinhas *Luffariella geometrica* e *Ircinia spinulosa* (LIU *et al.*, 2006; GUZMÁN-LÓPEZ *et al.*, 2007).

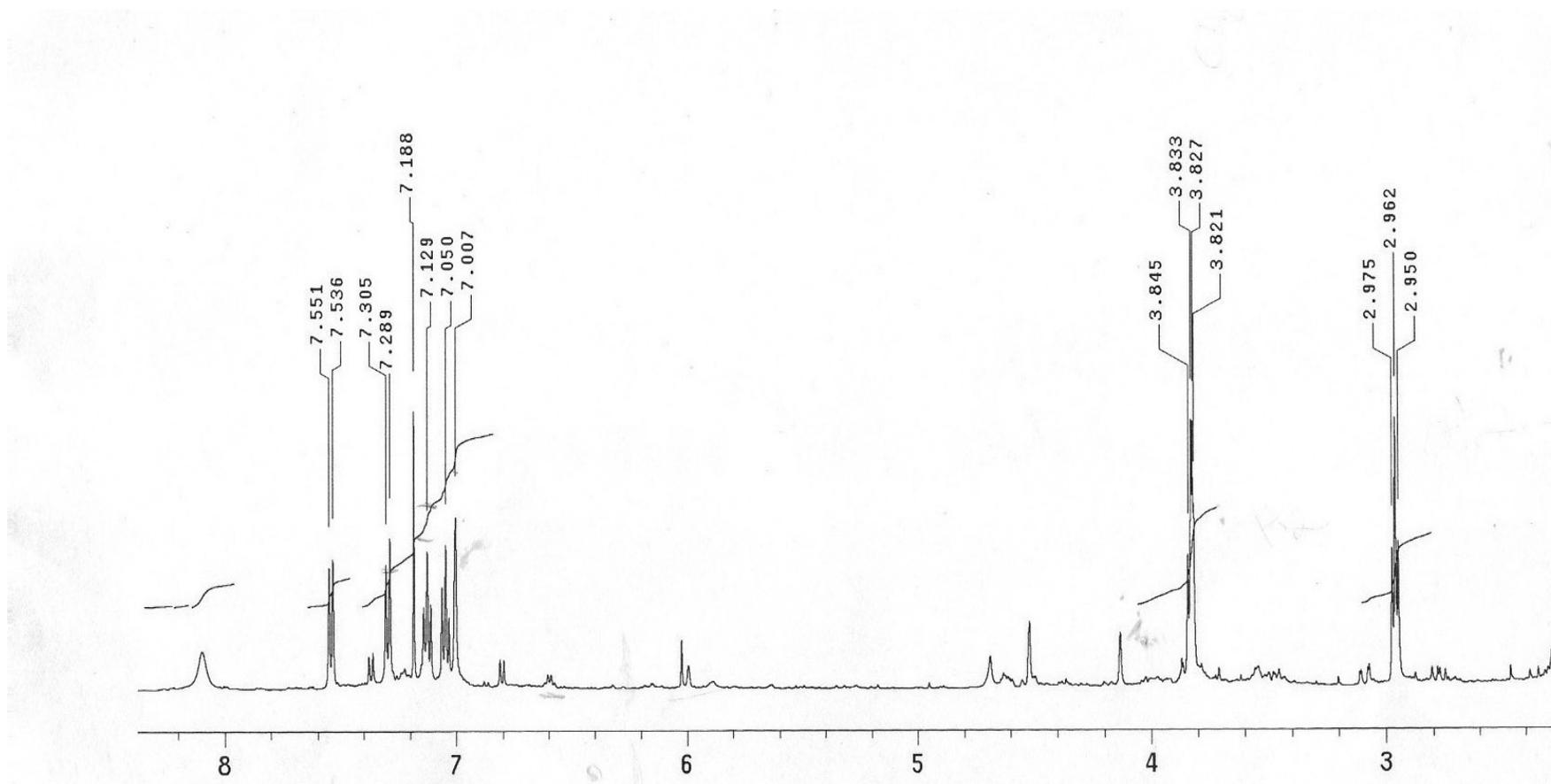
É um metabólito derivado do triptofano e triptamina e se acumulando como subproduto da síntese do ácido indolacético (FENN *et al.*, 1977; LIU *et al.*, 2006). A biossíntese de triptofol acontece a partir do triptofano, seguida das reações de

desaminação, descarboxilação e redução (**Figura 64**) (GUZMÁN-LÓPEZ *et al.*, 2007).



**Figura 64:** Rota biosintética do triptofol.

O triptofol pode ter algum papel no desenvolvimento de doenças em seu hospederio, pois existem relatos na literatura de possuir atividade fitotóxica, podendo induzir sintomas na planta hospedeira dependendo da situação de estresses pelo qual passa o hospedeiro (PRETINI, 1991). Estes sintomas podem ser lesões acinzentadas, que evoluem para manchas necróticas marrons (GUZMÁN-LÓPEZ *et al.*, 2007). Triptofol também é relatado por ter atividades antibiótica, antibacteriana contra bactérias gram-positivas e antifúngicas contra o fungo patógeno *Candida albicans* (LIU *et al.*, 2006).



**Figura 65:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VII ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

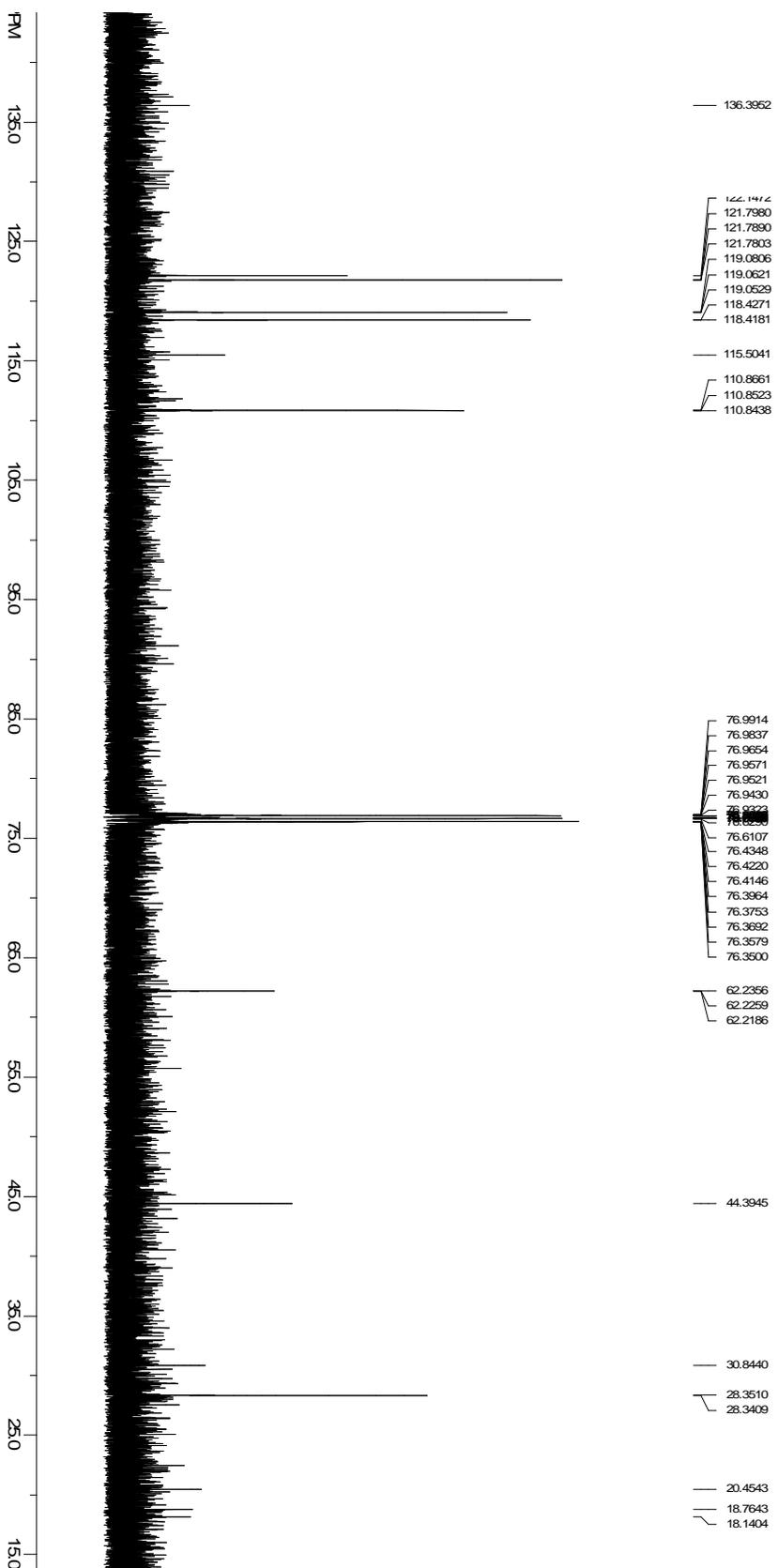


Figura 66: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância VII ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).

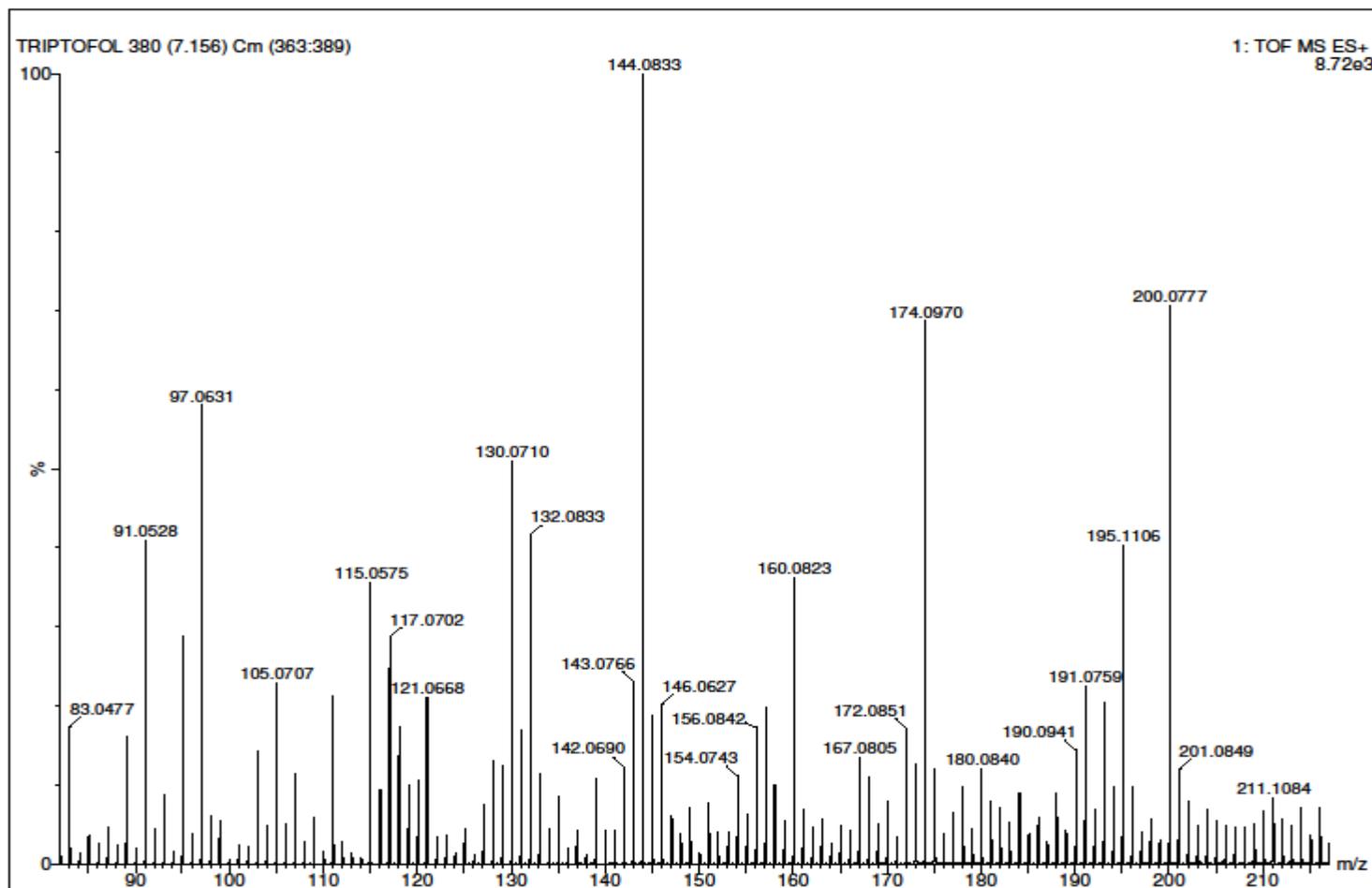
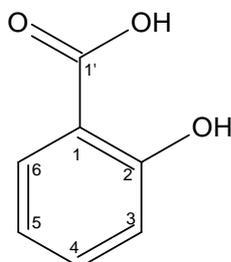


Figura 67: Espectro de massa da substância VII.

#### 4.4 Identificação da substância isolada do extrato bruto ME de *Guignardia* sp.

##### 4.4.1 Identificação da substância VIII

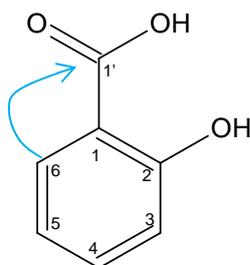


**Figura 68:** Estrutura da substância VIII.

A substância VIII (**Figura 68**) foi isolada como um cristal incolor. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 72 e 73** p.116-117; **Tabela 11** p. 112) da substância VIII registrou quatro sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 (1H, tl,  $J = 7,0$  Hz), 6,87 (1H, dl,  $J = 9,0$  Hz); 7,40 (1H, td,  $J = 2,0$  e  $8,5$  Hz); 7,85 (1H, dd,  $J = 2,5$  e  $8,5$  Hz), sugerindo tratar-se de um anel *orto* dissubstituído.

Os dados de  $^{13}\text{C}$  (**Tabela 11**, p. 112) foram obtidos das correlações observadas no experimento *g*HMBC, onde foi possível observar os seguintes deslocamento de carbono:  $\delta_{\text{C}}$  (162,0; 135,0; 130,0; 119,0; 117,0; 113,0) e uma carbonila de ácido em  $\delta_{\text{C}}$  172,0. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  162,0 sugeriu ser de um carbono ligado à hidroxila.

A correlação heteronuclear  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  observada no experimento *g*HMBC (**Figuras 74 e 75**, p. 118-119) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,85 (H-6) com  $\delta_{\text{C}}$  172,0 (C-1'), indicou a posição da carbonila ácida na molécula.



**Figura 69:** Correlação observada no *g*HMBC.

No espectro de massas TOF-MS (**Figura 76**, p. 120) no modo positivo foi possível observar a presença do íon em  $m/z$  121,0708 ( $[M+H-(H_2O)]$ ), o que esta de acordo com fórmula molecular proposta  $C_7H_6O_2$ , através da análise dos espectros de RMN hidrogênio e mapa de contorno gHMBC.

Análises desses dados com os dados disponíveis na literatura (TAKAC *et al.*, 2004; KWON, 2000) possibilitou identificar a substância **VIII** como ácido salicílico.

**Tabela 11.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) e  $^{13}C$  (obtidos via gHMBC, 126 MHz,  $CD_3OD$ ) da substância **VIII** e do ácido salicílico na literatura em  $DMSO-d_6$ .

Nº	$\delta_C$ de <b>VIII</b> (isolado)	$\delta_C$ do ácido salicílico (Literatura)	$\delta$ $^1H$ de <b>VIII</b> (isolado)	$\delta$ $^1H$ do ácido salicílico (Literatuta)
1'	172,0	172,0	-	-
1	113,0	113,0	-	-
2	162,0	161,2	-	-
3	117,0	117,2	6,87 dl (9,0 Hz)	6,96 d (7,5 Hz)
4	135,0	135,7	7,40 td, (2,0 e 8,5 Hz)	7,52 t (7,7 Hz)
5	119,0	119,2	6,84 tl, (7,0 Hz)	6,92 t (7,4 Hz)
6	130,0	130,4	7,85 dd, (2,5 e 7,5 Hz)	7,82 d (7,7 Hz)

O ácido salicílico possui propriedades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias, mas infelizmente uma série de efeitos colaterais associados com o seu uso podem ocorrer. Os mais notáveis são: distúrbios gastrintestinais, sangramento, ulcerações gástricas e gastrite (TAKAC *et al.*, 2004) por esse motivo tal substância passa pelo processo de acetilação formando um potente fármaco antiinflamatório vendido comercialmente como Asprina<sup>®</sup>, AAS<sup>®</sup> e outros, diminuindo seus efeitos colaterais.

Além disso, ácido salicílico tem um papel importante na defesa da planta. Quando uma planta é atacada por um fungo ou um vírus, ela ativa suas defesas, e sua defesa pode envolver uma variedade de proteínas que irão proteger a planta, essas proteínas são ativadas pelo ácido salicílico, que é sintetizado pela planta em resposta ao stress (PAVIANE, 2010).

#### **4.4.2 Ácido salicílico como mecanismo de defesa da planta**

As plantas estão sujeitas a diversos tipos de estresses ambientais, os quais podem ser abióticos como a radiação UV, variação de temperatura, metais pesados e produtos tóxicos, como podem ser bióticos como os fungos, insetos, vírus e nematóides (PAVIANI, 2010), mas apesar de está sujeita ao ataque dos mais diversos fitopatógenos, as plantas apresentam seus mecanismos de defesa. Nesses mecanismos podem estar envolvidas interações com microorganismos, como os fungos endofíticos que podem produzir substâncias úteis a planta ou fazer com que a planta produza determinado metabólito (AZEVEDO, 1998 e AZEVEDO *et al.*, 2000), que seja de grande importância para a saúde da mesma.

Desse modo ressalta-se a importância da interação fungo endofítico- planta como mecanismo de defesa da planta hospedeira, em uma interação simbiótica e/ou até mesmo trófica, pois esse tipo de interação em muitos casos faz com que a planta produza as fitoalexinas visando conter a infecção fúngica e fortalecendo a plantas aos futuros ataques do fitopatógenos (HARBONE, 1993 e GLOER, 1995).

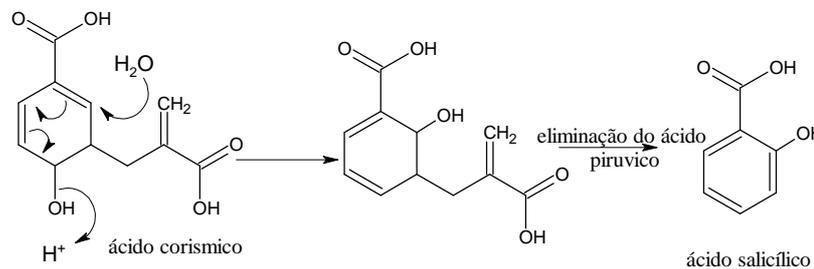
Outra forma de defesa da planta é o ácido salicílico produzido pelas mesmas, pois para sobreviver as mais diversas agressões causadas por diferentes patógenos, às plantas desenvolveram mecanismos de defesa que permitem que as mesmas sobrevivam apesar dos ataques sofridos pelos. Muitos fitopatógenos entram na planta através de ferimentos, produzindo em seguida substâncias tóxicas conhecidas como elicitores, desencadeando a ativação do mecanismo de defesa na planta atacada (PAVIANI, 2010).

O ácido salicílico, um composto natural que exerce grande importância nos processos fisiológicos e na defesa da planta (PAVIANI, 2010), funciona na espécies vegetais como uma molécula sinalizadora, induzindo enzimas a produzir outras

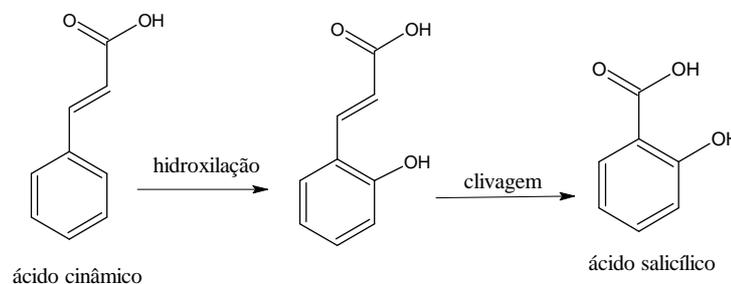
substâncias importantes para desencadear o mecanismo de defesa das mesmas (DHONDT *et al.*, 2002).

O primeiro a observar o papel sinalizador que o ácido salicílico tem nas plantas foi White onde observou que folhas de tabaco incubadas com ácido salicílico causava estimulação de genes ligado a resposta de defesa das plantas, sendo esse efeito observado por outros pesquisadores (PAVIANI, 2010).

Biossinteticamente nas plantas, o ácido salicílico é derivado do ácido corísmico (**Figura 70**) que se isomeriza via uma reação  $S_N2$  tendo a água como nucleófilo atacando o sistema dieno eliminando uma hidroxila protonada, formando o ácido isocorísmico. A partir daí o ácido isocorísmico sofre eliminação liberando o ácido pirúvico (DEWICK, 2001). Outra via Biossintética do ácido salicílico se dá a partir do ácido cinâmico (**Figura 71**) que sofre hidroxilação na posição 2 e depois uma clivagem na dupla ligação formando a ácido salicílico (DEWICK, 2001) .



**Figura 70:** Rota biossintética do ácido salicílico a partir do ácido corísmico.



**Figura71:** Rota biossintética do ácido salicílico a partir do ácido cinâmico.

Levando em consideração a importância do ácido salicílico para a defesa da planta e a produção dessa substância pelo fungo endofítico *Guignardia* sp., estudado neste trabalho, sugerimos que o fungo *Guignardia* sp tenha um importante papel ecológico na planta hospedeira, explicando assim a grande frequência deste fungo na mesma.

Esse resultado mostra que os fungos endofíticos associados à espécies vegetais interagem com o hospedeiro produzindo diversas substâncias as quais podem conferir diversas vantagens à planta, tais como: resistência à estresses abióticos e bióticos e o controle de outros microrganismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES, DIAS FILHO, 1996).

#### 4.4.3 Ácido salicílico como metabólito de fungo

O fato do fungo endofítico *Guignardia* sp., isolado de *Hancornia speciosa* e produzir ácido salicílico pode ser explicado pela “transferência genética horizontal” ou recombinação de genes entre micro-organismos endofíticos e planta hospedeira durante a coevolução, fazendo com que muitos micro-organismos endofíticos desenvolvam habilidades bioquímica para a produção de compostos semelhantes ou idênticos aos produzidos por suas plantas hospedeiras, (MARINHO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2008 ).

Tal proposta é corroborada por diversos exemplos na literatura em que os fungos produzem substâncias iguais as das plantas hospedeiras e vice-versa. Como exemplos podemos citar o fato de várias espécies de fungos endofíticos em *Taxus brevifolia* (*Taxosmyces andenea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, etc) produzirem taxol, um diterpeno com potente atividade anticâncer. Uma possível prova dessa recombinação genética tem sido demonstrada com a transferência de tricodieno sintetase de fungos de gênero *Fusarium* para a planta *Nicotina tabacum*. Essa transferência leva a planta a produzir tricodieno (MARINHO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2008).

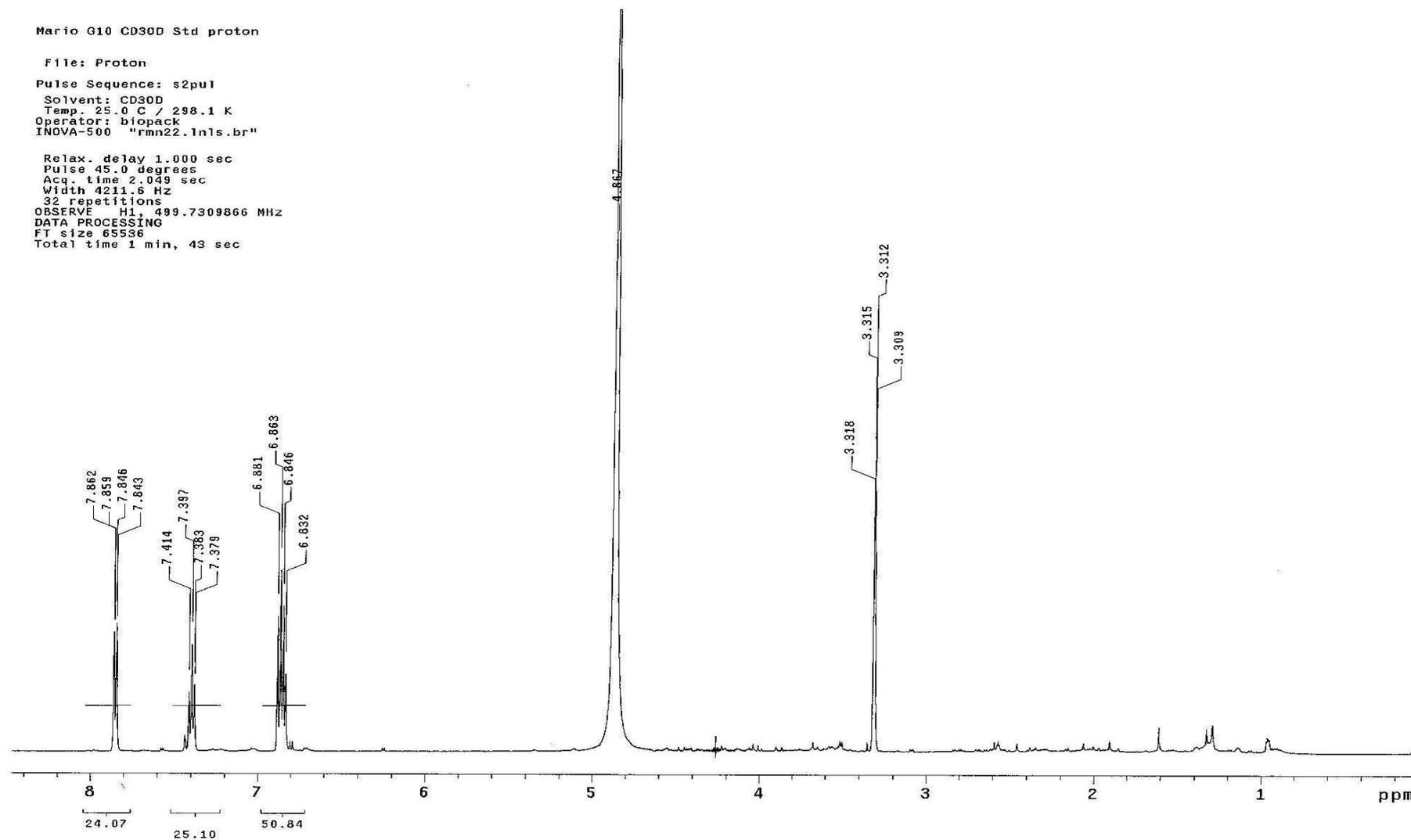


Figura 72: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).



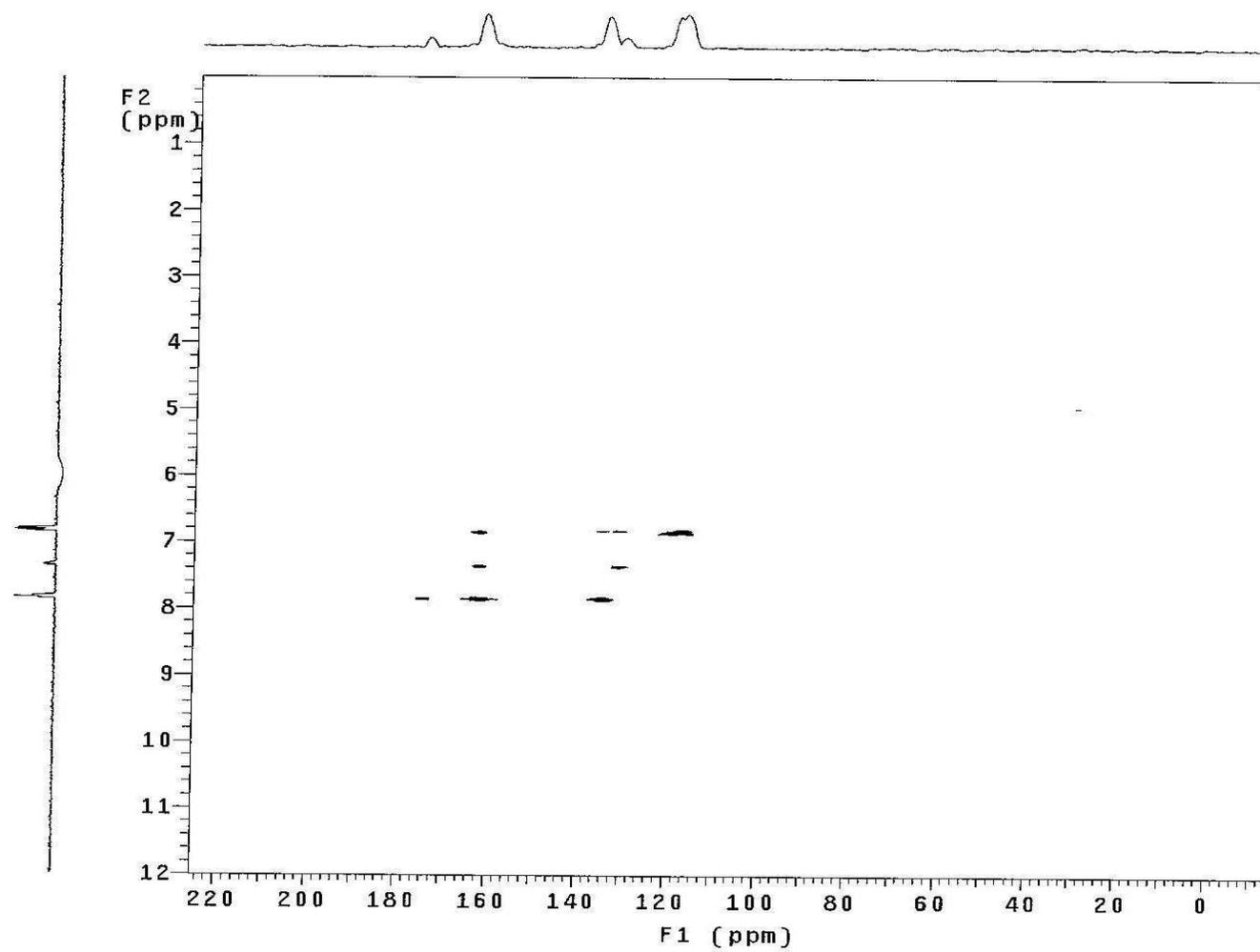
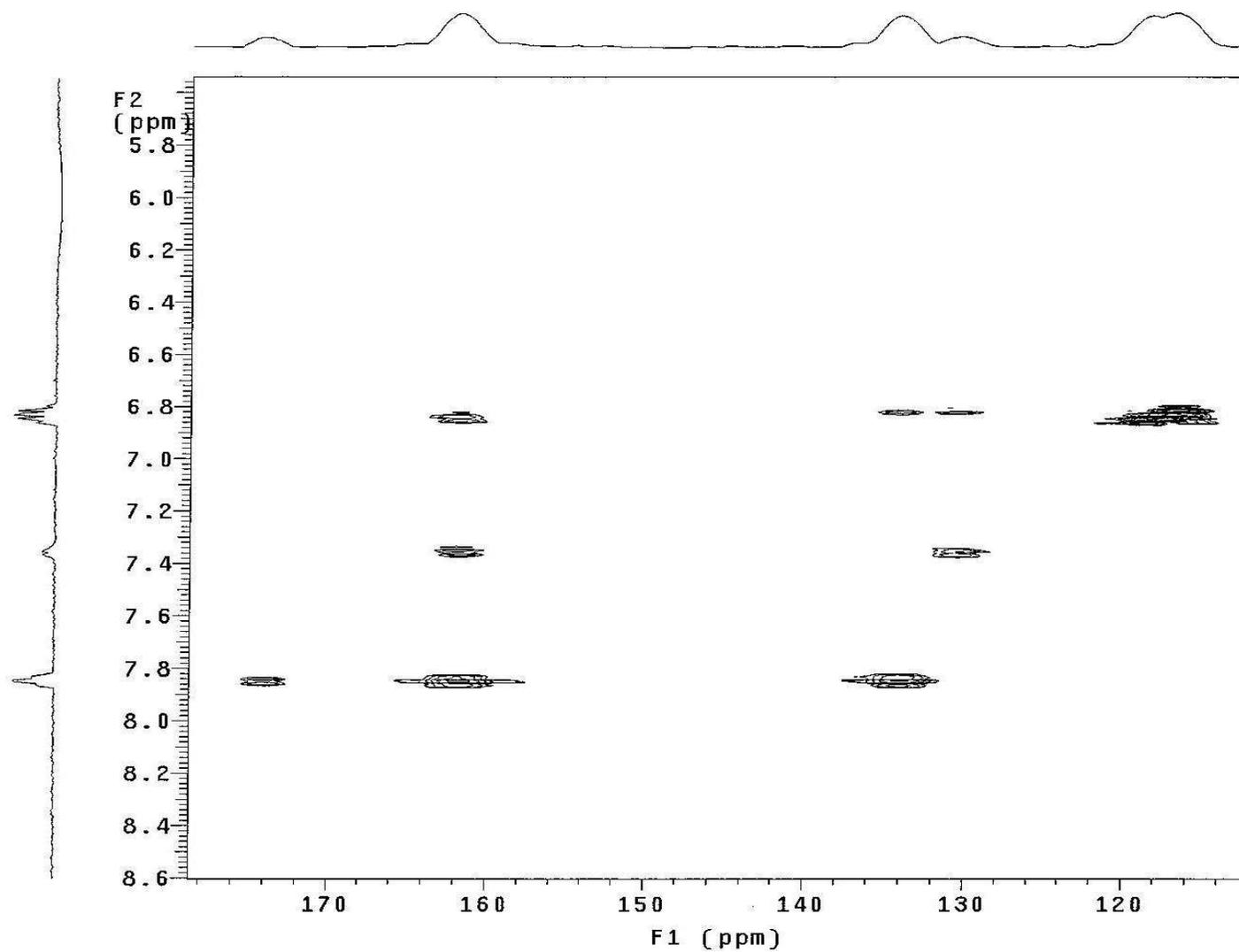


Figura 74: Mapa de contorno gHMBC da substância VI ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 126 MHz).



**Figura 75:** Ampliação do mapa de contorno gHMBC da substância VIII (CD<sub>3</sub>OD, 126 MHz).

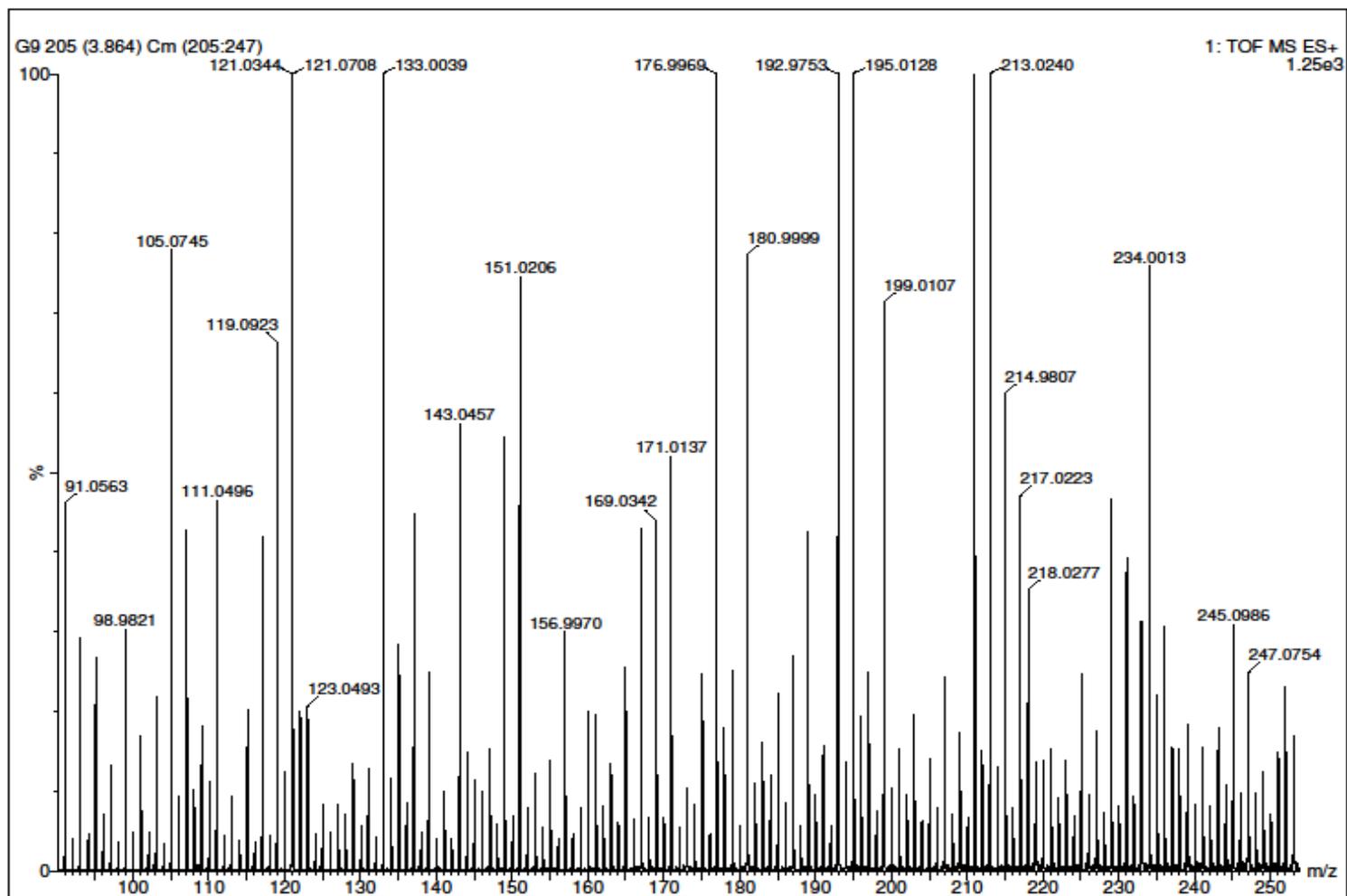
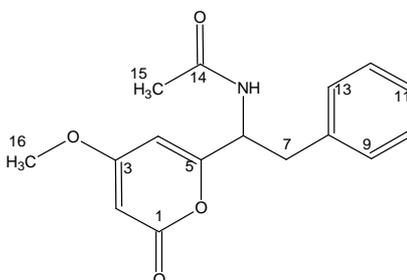


Figura 76: Espectro de massa da substância VIII.

## 4.5 Identificação das substâncias IX e X isoladas dos extratos PDB - AcOEt e XI do extrato ME - AcOEt de *Aspergillus niger*

### 4.5.1 Identificação substância IX



**Figura 77:** Estrutura da substância IX.

A substância IX (**Figura 77**) foi isolada como um cristal amarelado. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 79**, p. 124; **Tabela 12**, p. 122) mostrou sinais característicos de um anel aromático *mono* substituído com  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (m, 3H);  $\delta_{\text{H}}$  7,13 (m, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,18 (m, 1H), dois singleto largo indicativo de pirona em  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (sl, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  5,70 (sl, 1H) um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,87 (s, 3H) indicando a presença de uma metila ligada a carbonila e outro em  $\delta_{\text{H}}$  3,65 (s, 3H) de metoxila.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 80**, p. 125; **Tabela 12**, p. 122) confirmou a presença de um anel aromático monosubstituído com deslocamento em  $\delta_{\text{C}}$  135,8;  $\delta_{\text{C}}$  128,5(2C);  $\delta_{\text{C}}$  126,9 e 128,9 (2C), uma metoxila ( $\delta_{\text{C}}$  55,9) e duas carbonilas, uma em  $\delta_{\text{C}}$  169,8 e a outra em  $\delta_{\text{C}}$  164,5.

Pela análise do espectro de massas TOF-MS (**Figura 81**, p. 126) no modo positivo foi possível observar a presença dos íons em  $m/z$  288,1046 ( $[(\text{M}+\text{H})]$ ), 310,0598 ( $[(\text{M}+\text{Na})]$ ) e 326,0797 ( $[(\text{M}+\text{K})]$ ) que esta de acordo com a fórmula molecular proposta  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ . Comparação com dados da literatura (VAROGLU *et al.*, 2000) possibilitou identificar a substância IX como pirofen.

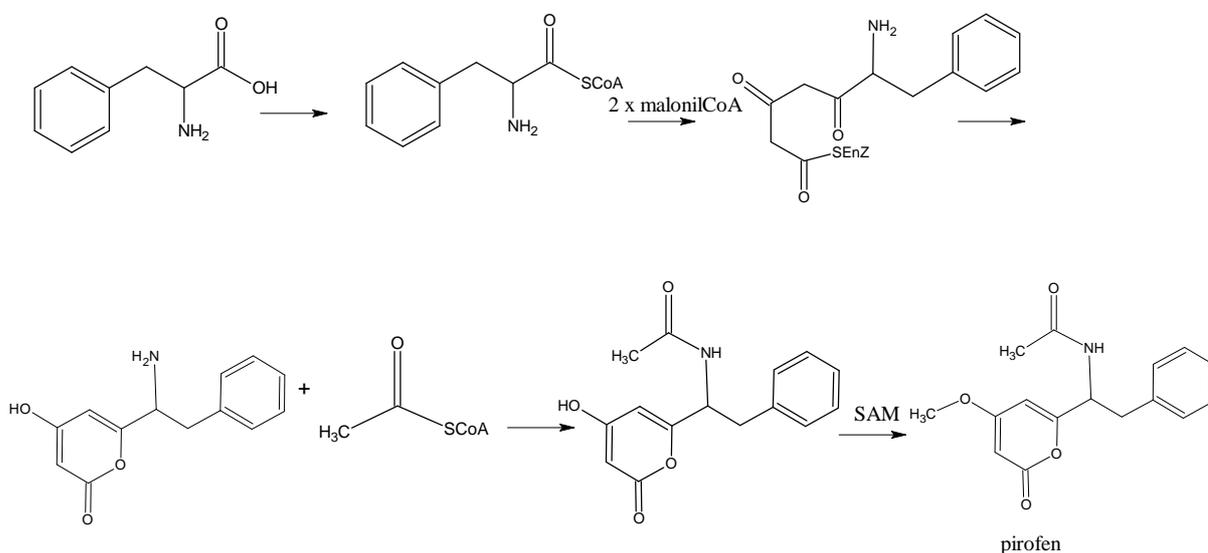
**Tabela 12.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) da substância **IX** em  $\text{CDCl}_3$  do isolado e dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ .

	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de <b>IX</b> (isolado)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ do pirofen (Literatura)	$\delta$ $^1\text{H}$ de <b>IX</b> (isolado)	$\delta$ $^1\text{H}$ do pirofen (Literatura)
1	164,5	164,4	-	-
2	88,4	88,5	5,33 sl	5,42 d (2,2 Hz)
3	170,9	170,5	-	-
4	101,1	101,2	5,7 sl	5,75 d (2,2Hz)
5	161,4	161,3	-	-
6	52,4	52,4	4,9 t (8,0 Hz)	5,0 t (8,0 Hz)
7	38,7	38,9	3,00 d (8,0 Hz)	3,08 d (8,0 Hz)
8	135,8	135,8	-	-
9	128,9	129,1	7,04 m	7,15 m
10	128,5	129,7	7,13m	7,30 m
11	126,9	127,2	7,04 m	7,22 m
12	128,5	129,1	7,18 m	7,30m
13	128,9	127,2	7,04 m	7,06 m
14	169,8	169,6	-	-
15	22,9	23,2	1,87 s	1,96 s
16	55,9	56,0	3,65 s	3,75 s

O pirofen foi isolado pela primeira vez em 1990 por Barnes *et al.* do fungo *Aspergillus niger*, e em seguida por Varoglu *et al.*, em 2000. Dos metabólitos isolados do fungo *Aspergillus niger* o pirofen é um composto do qual ainda não foi identificado nenhuma atividade farmacológica (BARNES *et al.*, 1990; VAROGLU *et al.*, 2000), sendo desconhecida, portanto sua função no meio biológico ou na interação fungo-planta.

Biossinteticamente o pirofen é derivado do aminoácido fenilalanina, pois a literatura mostra que os alcalóides são formados a partir dos aminoácidos (TEM e ZOU, 2001; DEWICK, 2001).

O pirofen é um alcalóide que possivelmente tem uma rota biossintética mista, pois em sua estrutura observa-se uma parte que possivelmente é derivada do aminoácido fenilalanina e uma parte que é derivada de uma pirona aromática típica de um policetídeo, proposta para uma possível rota biossintética do pirofen esta representa abaixo (**Figura 78**).



**Figura 78:** Possível rota biossintética do pirofen.

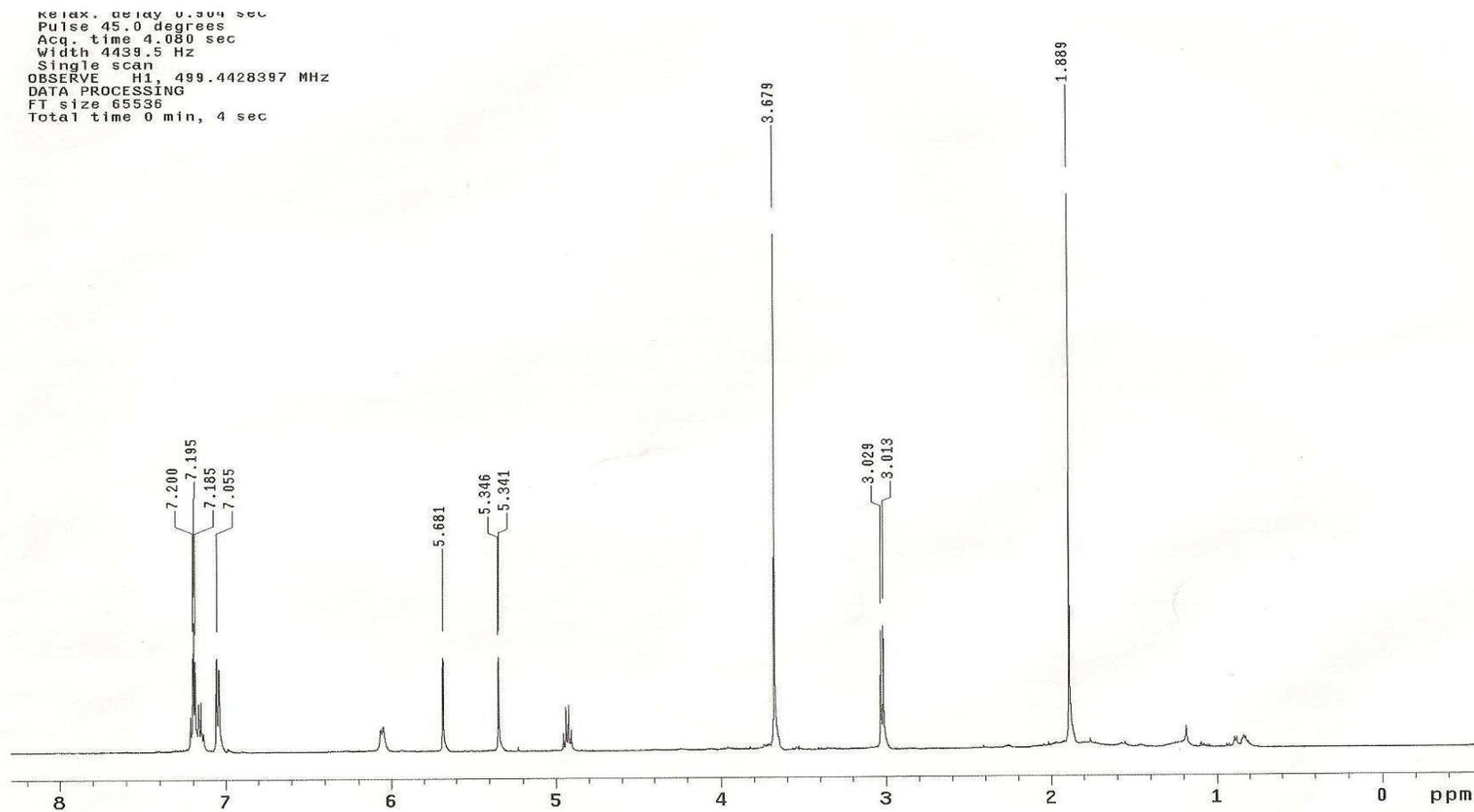


Figura 79: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IX ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

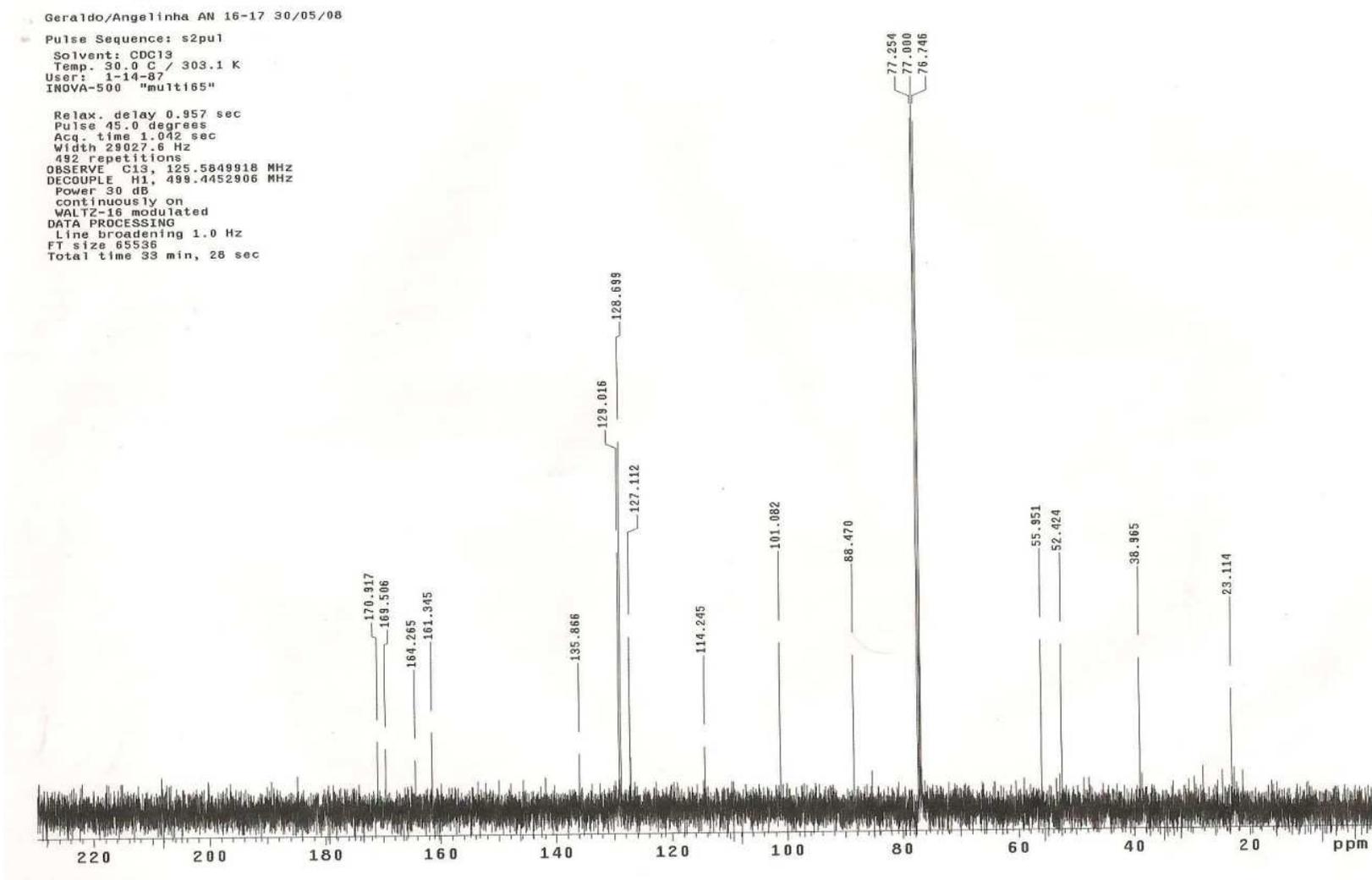
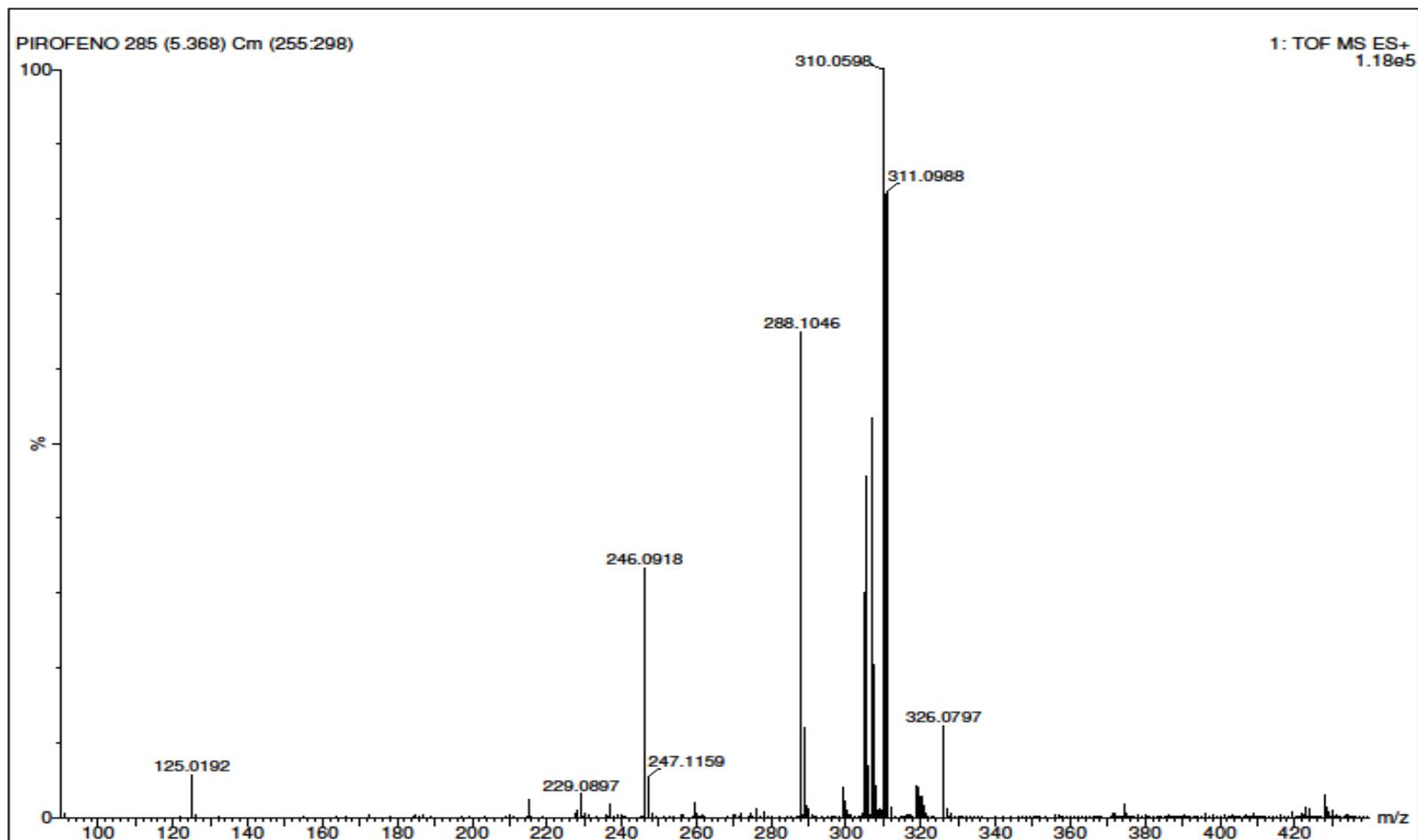
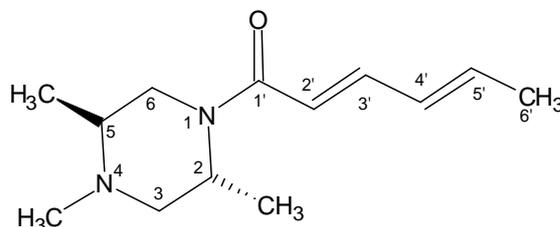


Figura 80: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância IX ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).



**Figura 81:** Espectro de massa da substância IX.

#### 4.5.2 Identificação da substância X



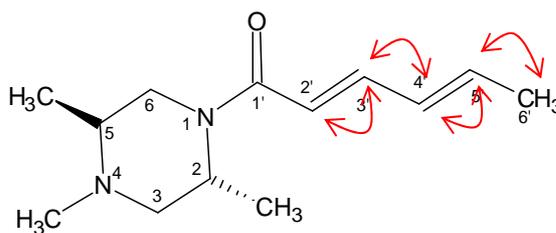
**Figura 82:** Estrutura da substância X.

A substância **X** (**Figura 82**) foi isolada como sólido amorfo. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 85, 86 e 87**, p. 130-132; **Tabela 13**, p. 129) de **X** apresentou sinais de duas duplas trans em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 (dd, 1H; 10,5 e 15,0 Hz);  $\delta_{\text{H}}$  6,01 (d, 1H; 15,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (m, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (m, 1H), um sinal de metila olefinica em  $\delta_{\text{H}}$  1,70 (d, 3H; 6,0 Hz), duas metilas em  $\delta_{\text{H}}$  1,60 (d, 3H; 7,5 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1,20 (d, 3H; 7,0 Hz); e uma metila sugerindo está ligada a nitrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  2,80 (d, 3H; 3 Hz).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 88**, p. 133, **Tabela 13**, p. 129) confirmou a presença de duas duplas ligações em  $\delta_{\text{C}}$  (117,8; 143,0; 130,1; 137,3), uma metila ligada a nitrogênio em  $\delta_{\text{C}}$  42,5 e uma carbonila de amida em  $\delta_{\text{C}}$  166,4.

Através das correlações  $^1\text{J}$  observadas no experimento  $g\text{HMQC}$  (**Figura 90**, p. 135) os hidrogênios foram atribuídos a seus respectivos carbonos.

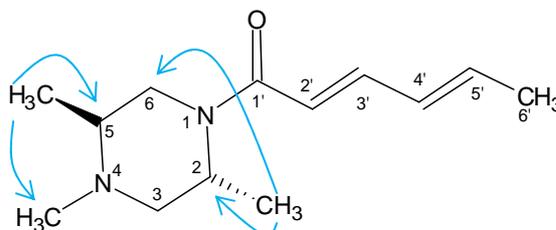
Análise das correlações observadas no mapa de contorno  $g\text{COSY}$  (**Figura 83**, p. 128 e **Figura 89**, p. 134) evidenciou as seguintes correlações:  $\delta_{\text{H}}$  6,01(H-2') /  $\delta_{\text{H}}$  7,34 (H-3');  $\delta_{\text{H}}$  7,34 (H-3')/  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (H-4');  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (H-4')/  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (H-5') e  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (H-5') /  $\delta_{\text{H}}$  1,70 (H-6'), mostrando haver um sistema trans conjugado na molécula.



**Figura 83:** Correlação observada no gCOSY.

Análise das correlações observadas no mapa de contorno gHMBC (**Figura 84** e **Figura 91**, p. 133) evidenciou correlações entre  $\delta_{\text{H}}$  1,20 (CH<sub>3</sub> em C-5) com  $\delta_{\text{C}}$  53,9 (C-5) e  $\delta_{\text{C}}$  7,2 (CH<sub>3</sub> em C-4);  $\delta_{\text{H}}$  16,8 (CH<sub>3</sub> em C-2) com  $\delta_{\text{C}}$  46,7 (C-2) e uma correlação  $^4J$  a longa distância com  $\delta_{\text{C}}$  44,1 (C-6).

Pela análise do espectro de massas TOF-MS (**Figura 92**, p. 137) no modo positivo foi possível observar a presença dos íons em  $m/z$  223,1886 ([M+H]) e 245,0870 ([M+Na]), mostrando que todos os dados obtidos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão de acordo com a massa da fórmula molecular proposta C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O, confirmando-a.



**Figura 84:** Correlação observada no gHMBC.

Comparação com dados da literatura (CAESAR *et al.*, 1969) auxiliaram na identificação da substância **VIII** como nigragillin.

Nigragillin foi isolado pela primeira vez por César *et al.*, 1969, do fungo *Aspergillus niger* e mostrou potencial inseticida frente à espécie de inseto *Bombyx mori*, larva do bicho da seda (ISOGAI *et al.*, 1975), este fato aliado a uma possível coevolução do endófito-hospedeiro sugere que tal substância pode estar envolvida

na associação planta endófito produzindo substâncias de defesa para a planta contra insetos. O composto também é produzido pelo fungo *Aspergillus phoenicis*, que é uma espécie da secção *Nigri* (BLUMENTAL, 2004).

**Tabela 13.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) da substância **X** em  $\text{CDCl}_3$  do isolado e dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ .

N <sup>o</sup>	* $\delta$ $^{13}\text{C}$ de <b>X</b> (isolado)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ do Nigragillin ( literatura)	* $\delta$ $^1\text{H}$ de <b>X</b> (isolado)
1	-	-	-
2	46,7	46,7	3,60 m
CH <sub>3</sub> em C-2	16,8	16,8	1,60 (d, 3H; 7,5 Hz)
3	51,8	51,0	3,10 m
4	-	-	-
CH <sub>3</sub> em N-4	42,5	41,4	2,80 d
5	53,9	55,2	3,60 m
CH <sub>3</sub> em C-5	7,2	8,6	1,20 (d ,3H; 7,0 Hz)
6	44,1	44,0	3,10 m
1'	166,4	166,4	-
2'	117,8	115,8	6,01 d (15,0 Hz)
3'	143,0	145,5	7,34 dd(10,5 e 15,0 Hz)
4'	130,1	129,8	6,19 m
5'	137,3	139,6	6,20.m
6'	18,5	18,6	1,70 (d, 3H; 6,0 Hz)

\* Os sinais não observados nos espectros de hidrogênio e/ou carbono foram determinado através da correlação observada nos mapas de contorno gHMBC e gHMQC.

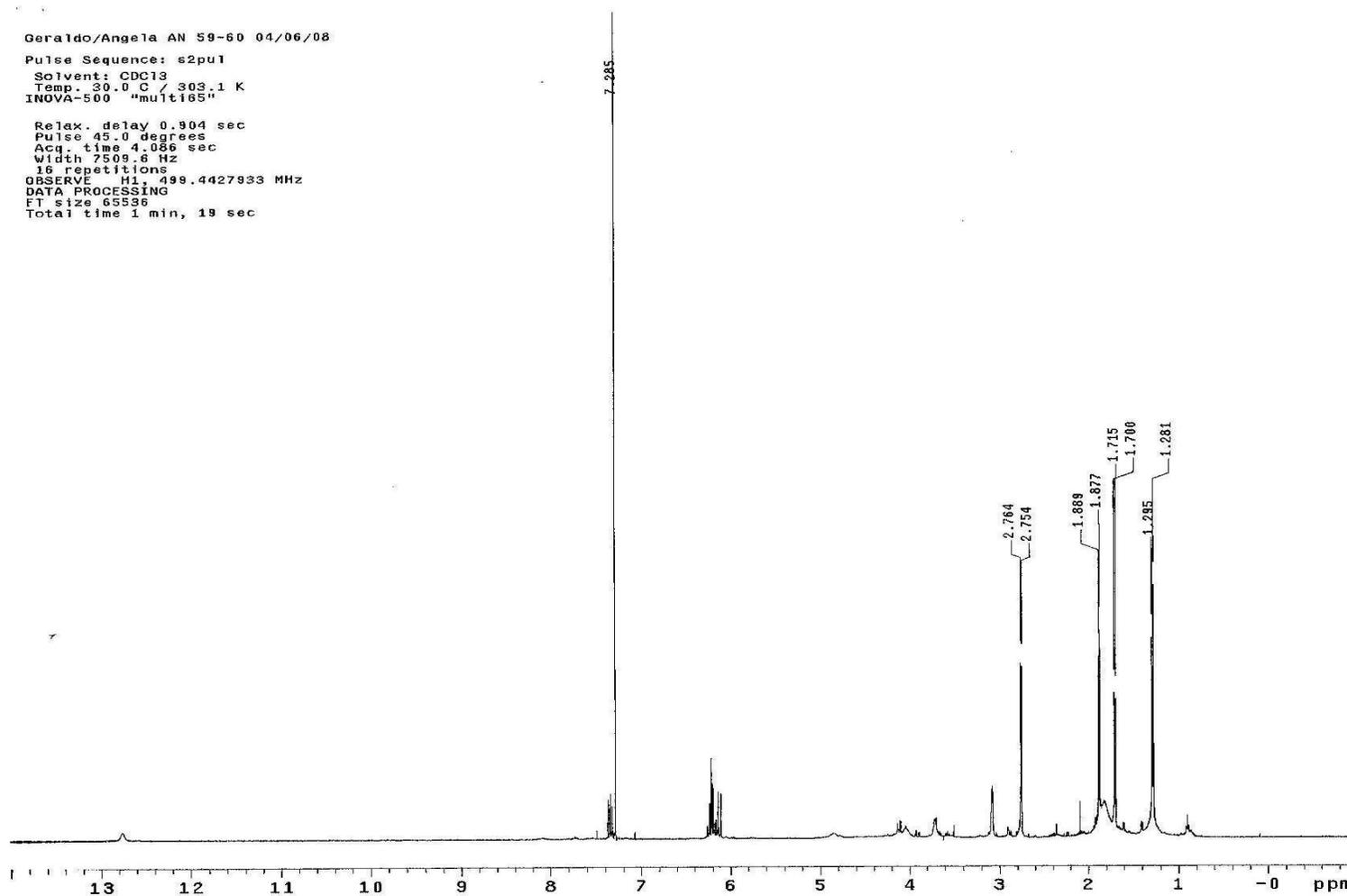


Figura 85: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância X (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

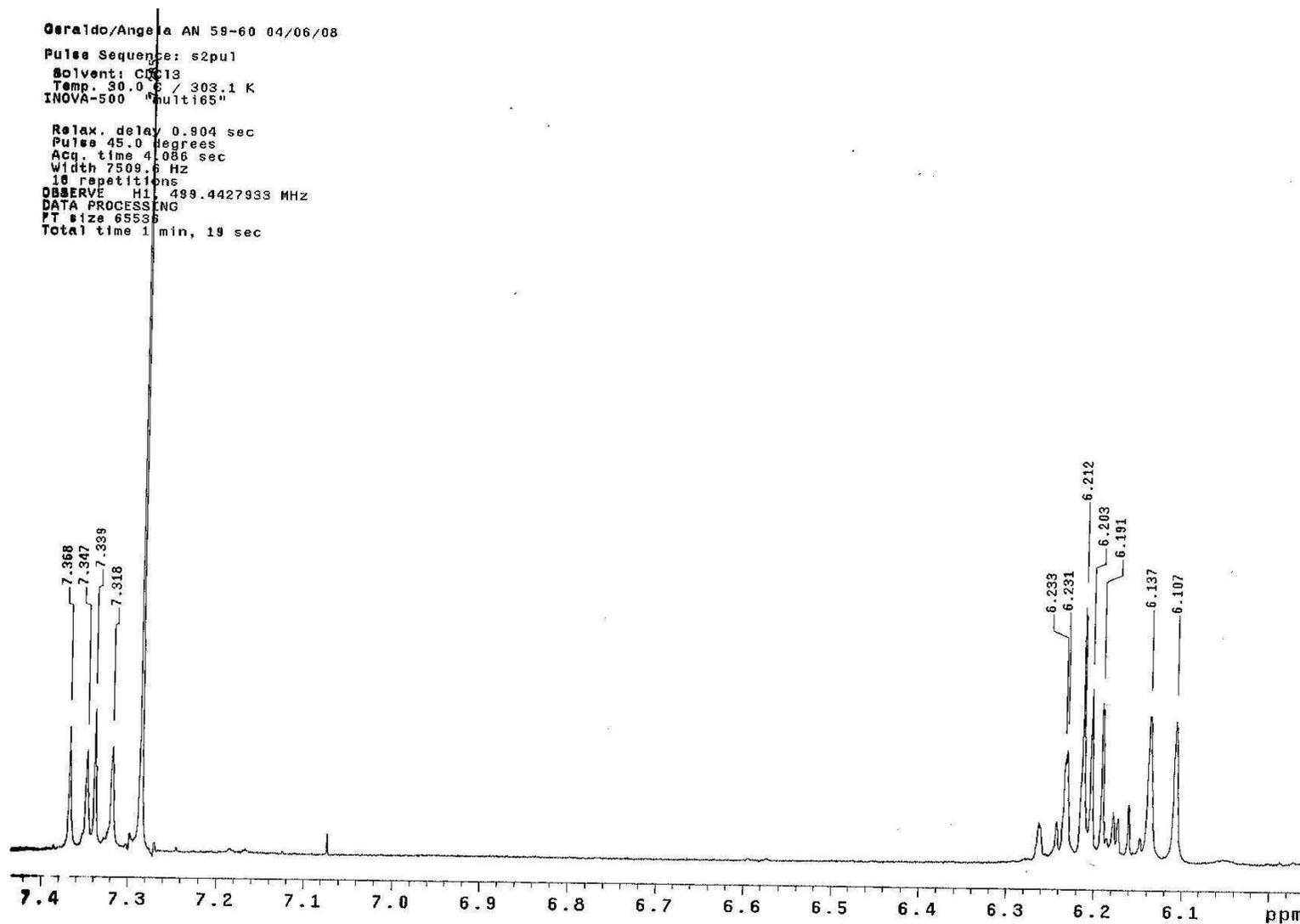


Figura 86: Ampliação 1, do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

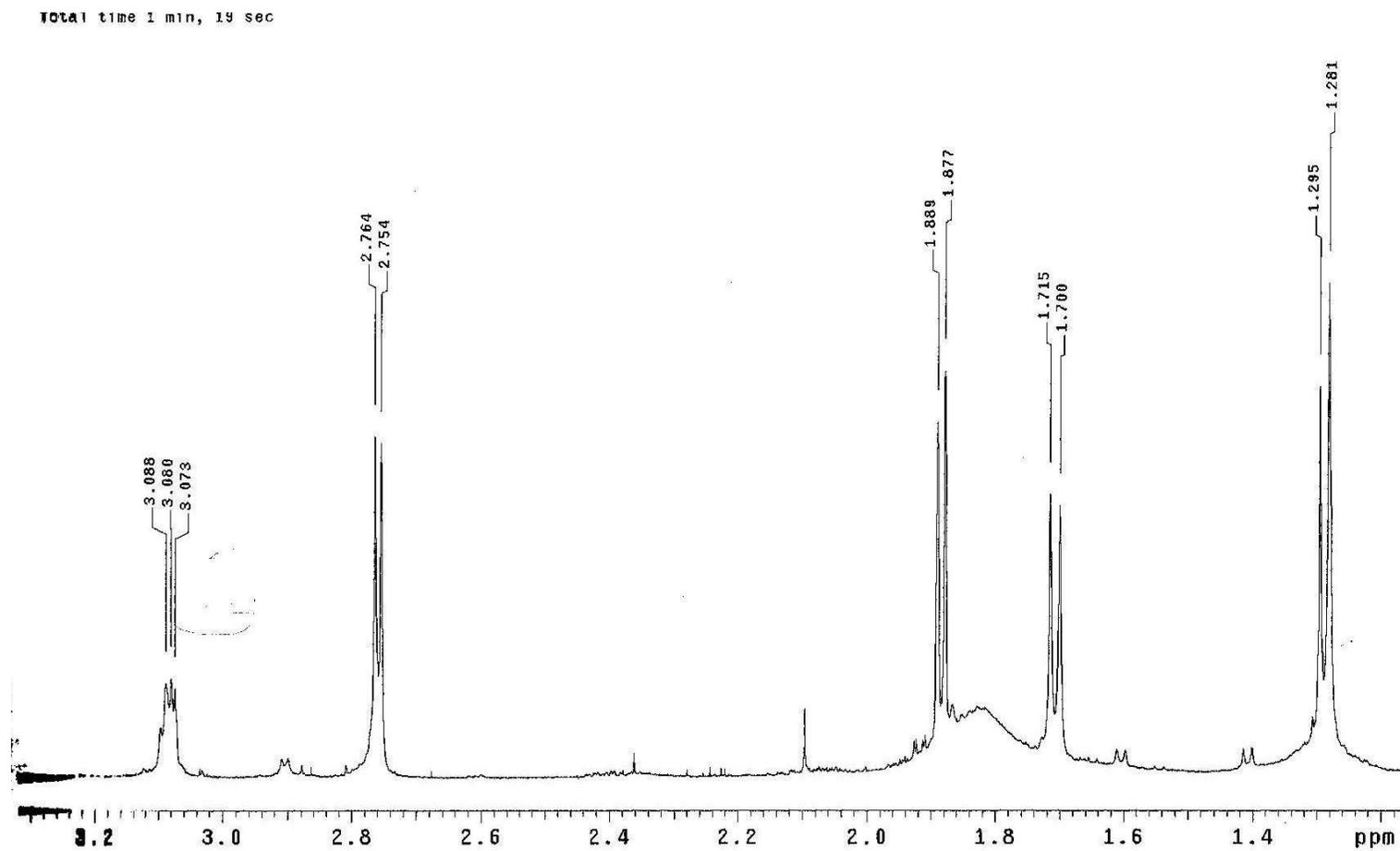


Figura 87: Ampliação 2, do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

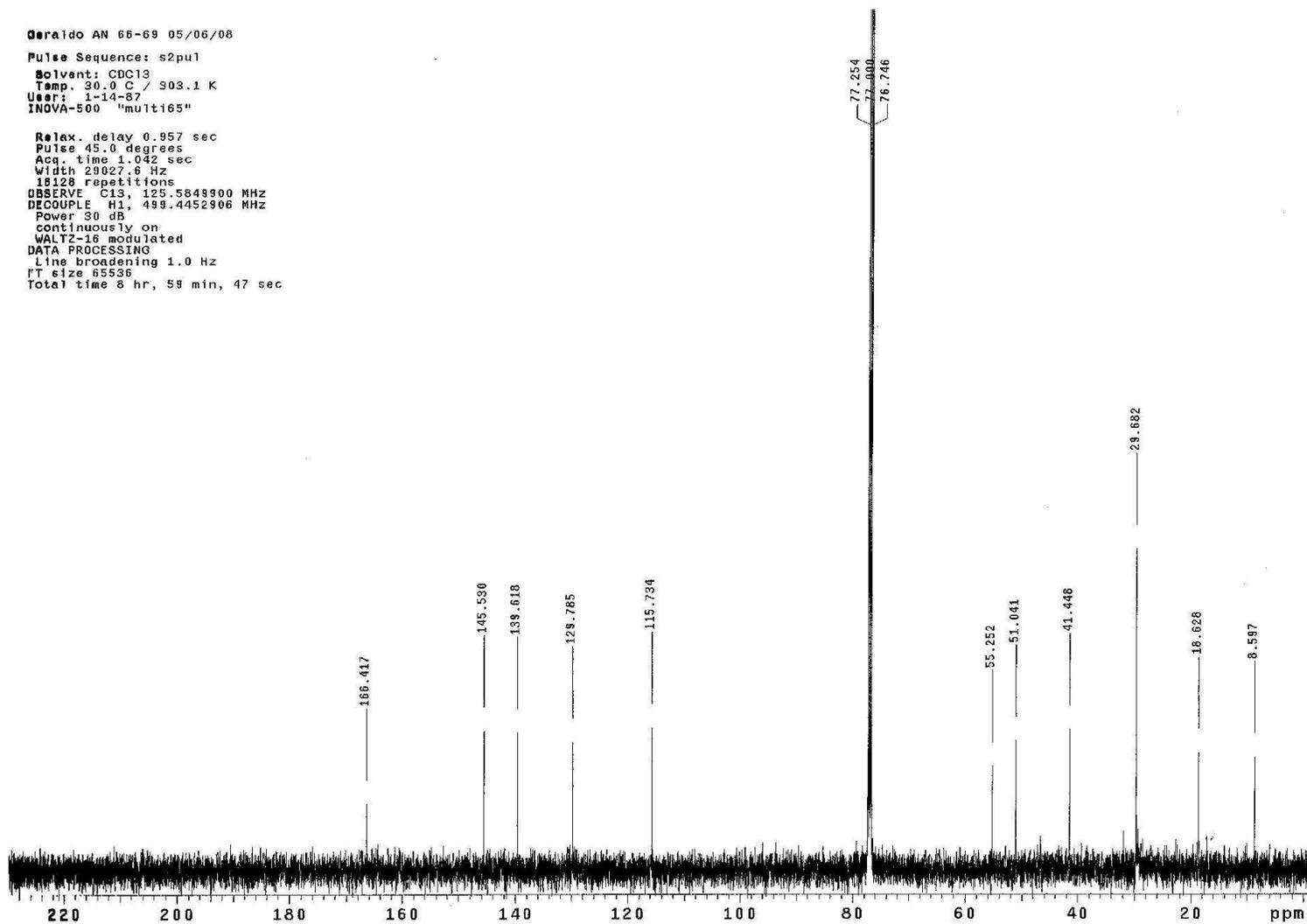
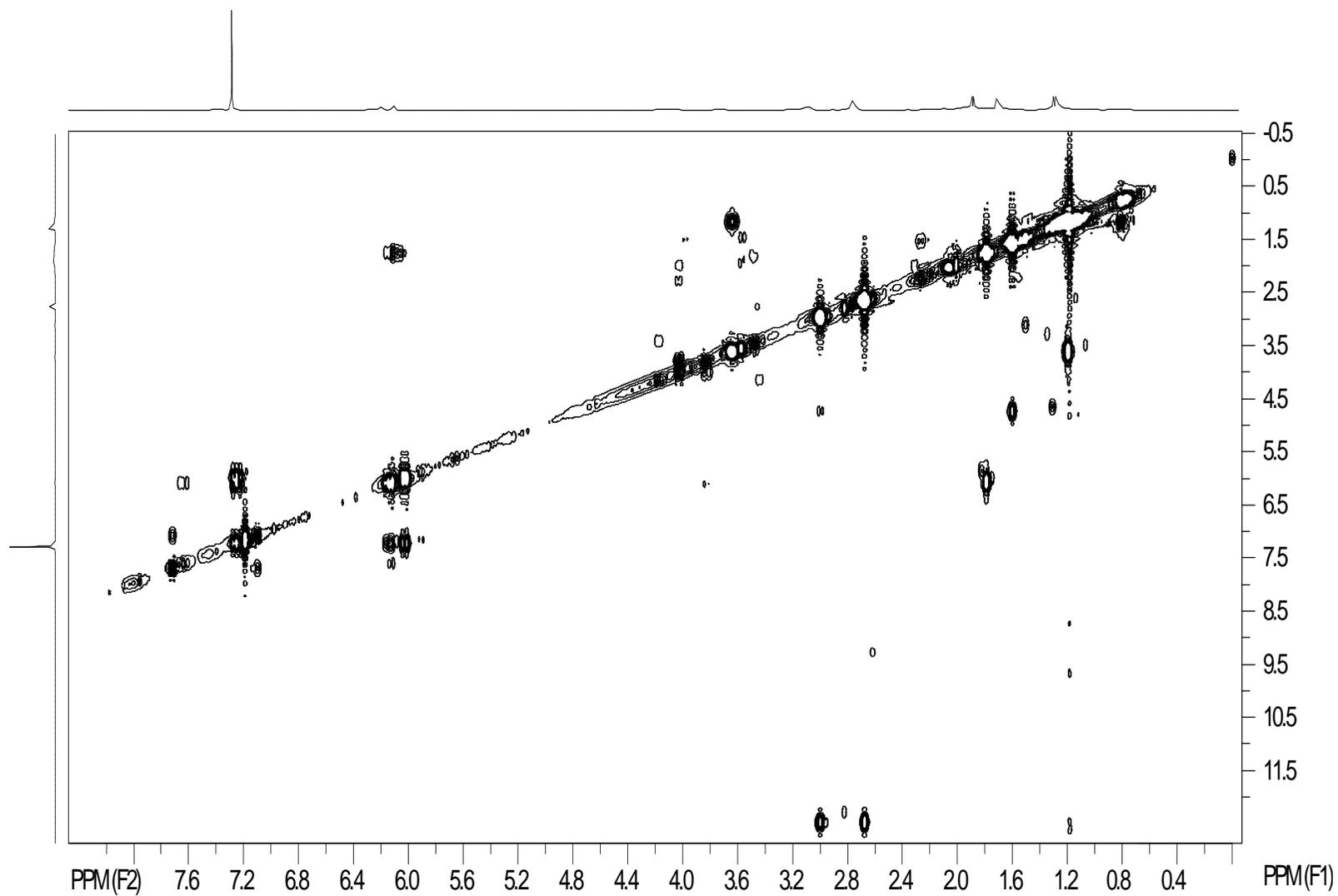
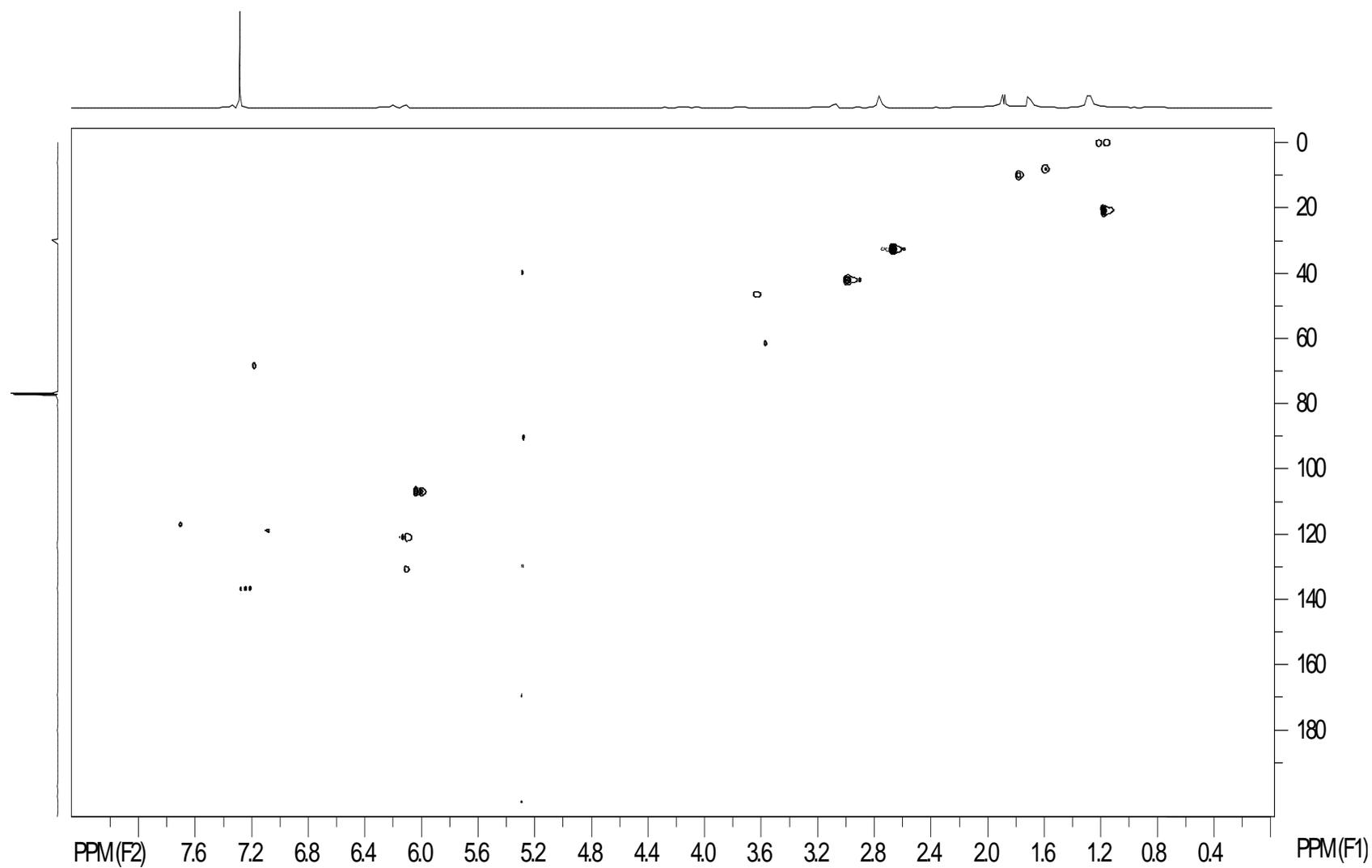


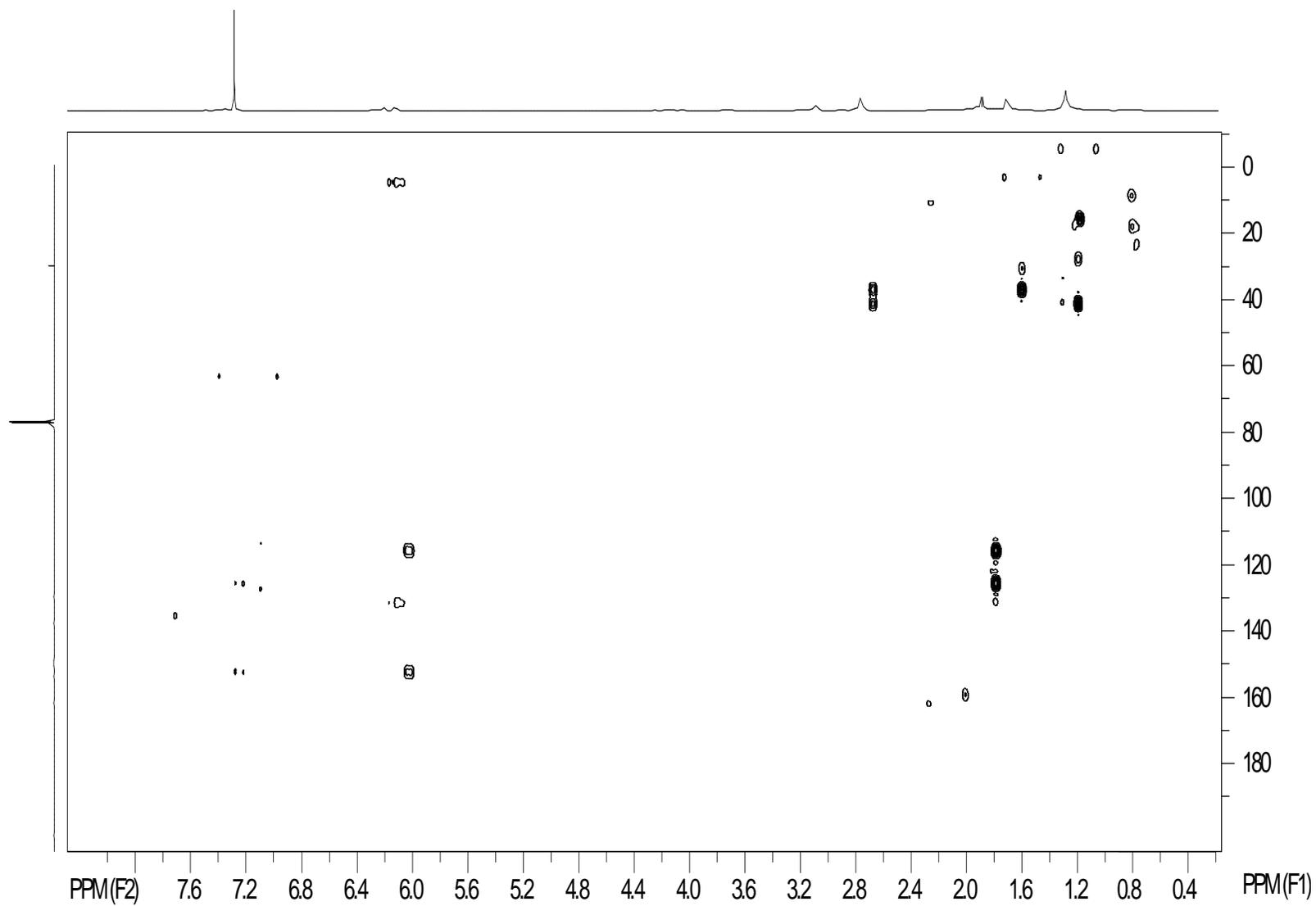
Figura 88: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância X ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).



**Figura 89:** Mapa de contorno gCOSY da substância **X** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Figura 90:** Mapa de contorno gHMBC da substância **X** ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).



**Figura 91:** Mapa de contorno gHMBC da substância X ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).

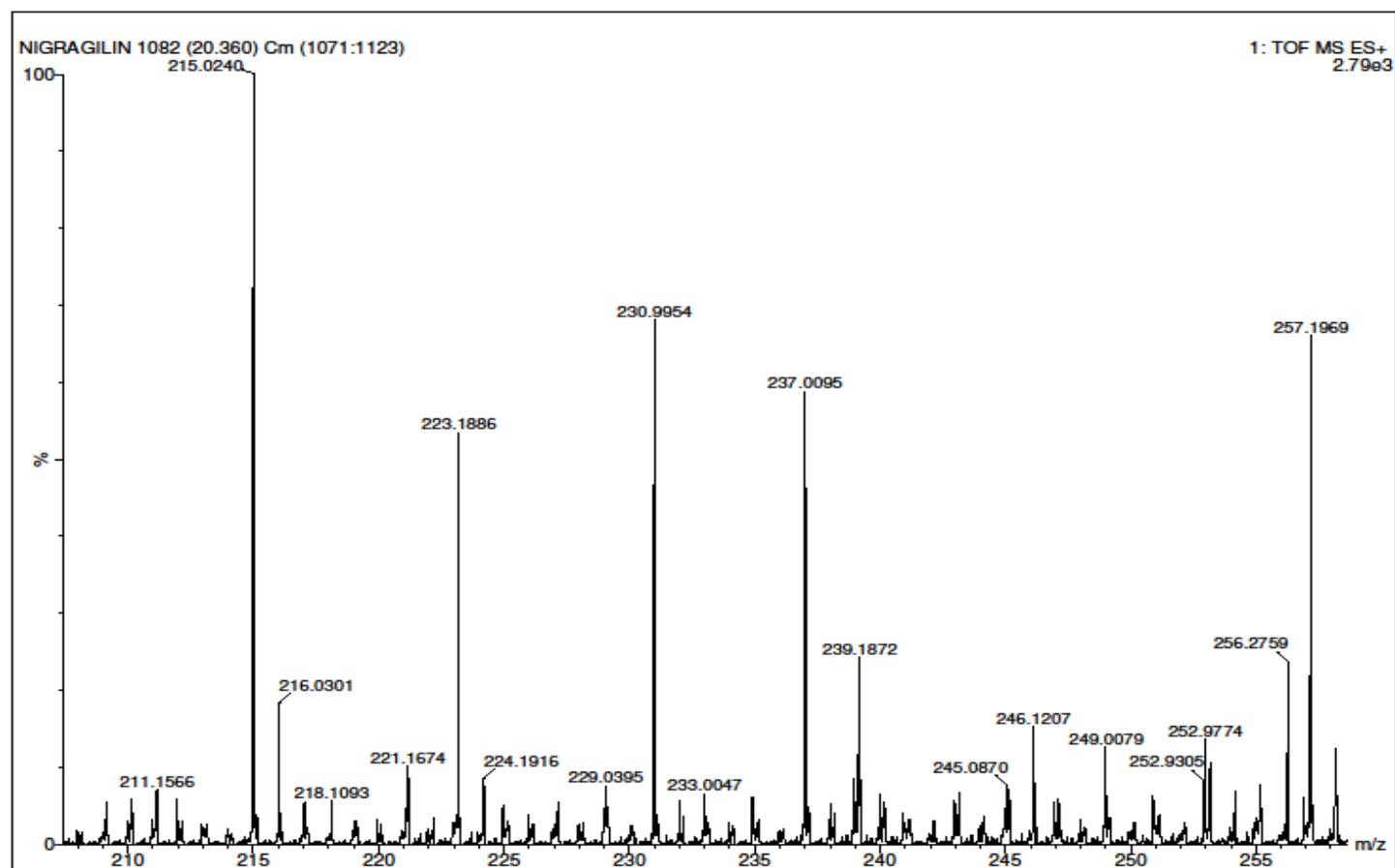
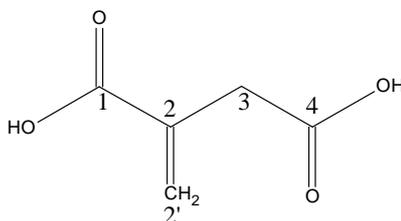


Figura 92: Espectro de massa da substância X.

### 4.5.3 Identificação da substância XI



**Figura 93:** Estrutura da substância XI.

A substância **XI** (**Figura 39**) foi isolada como um cristal incolor. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 47**, p.141 e **Tabela 14**) mostrou os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (1H, d; 2,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (1H, d; 2,0 Hz), indicando haver um metileno terminal na molécula e um sinal  $\delta_{\text{H}}$  4,50 (2H, d; 2,0 Hz) indicando a presença de hidrogênio metilênico com constante de acoplamento vinílica com o metileno terminal.

Análise desses dados e comparação com os da literatura (BUSI *et al.*, 2009) possibilitou identificar a substância **XI**, como ácido itacônico.

**Tabela 14.** Dados de RMN ( $\delta$ )  $^1\text{H}$  (500 MHz) da substância **XI** em  $\text{D}_2\text{O}$  do isolado e dados da literatura (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Nº	$\delta_{\text{H}}$ de XI (Isolado do Extrato)	$\delta_{\text{H}}$ ácido itacônico (literatura)
1	-	-
2		
2'	6,39 d (2,0Hz)	5,65 s
2'	6,90 d (2,0 Hz)	6,23 s
3	4,50 d (2,0 Hz)	3,21 s
4	-	-

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são muitas vezes utilizados para a produção industrial de ácidos orgânicos como o ácido itacônico, ácido que possui diversas aplicações indústrias.

O ácido itacônico foi isolado pela primeira vez de *Aspergillus itaconicus* por Kinoshita, sendo mais tarde demonstrado ser um produto acumulativo de *Aspergillus terreus* (BONNARME *et al.*, 1995).

Açúcares como a glicose e sacarose são geralmente utilizados na produção industrial utilizando fermentação fúngica. Várias vias biossintética levando ao acúmulo de ácido itacônico têm sido postuladas, algumas delas são apresentadas abaixo (**Figura 94**, p. 140) (BONNARME *et al.*, 1995).



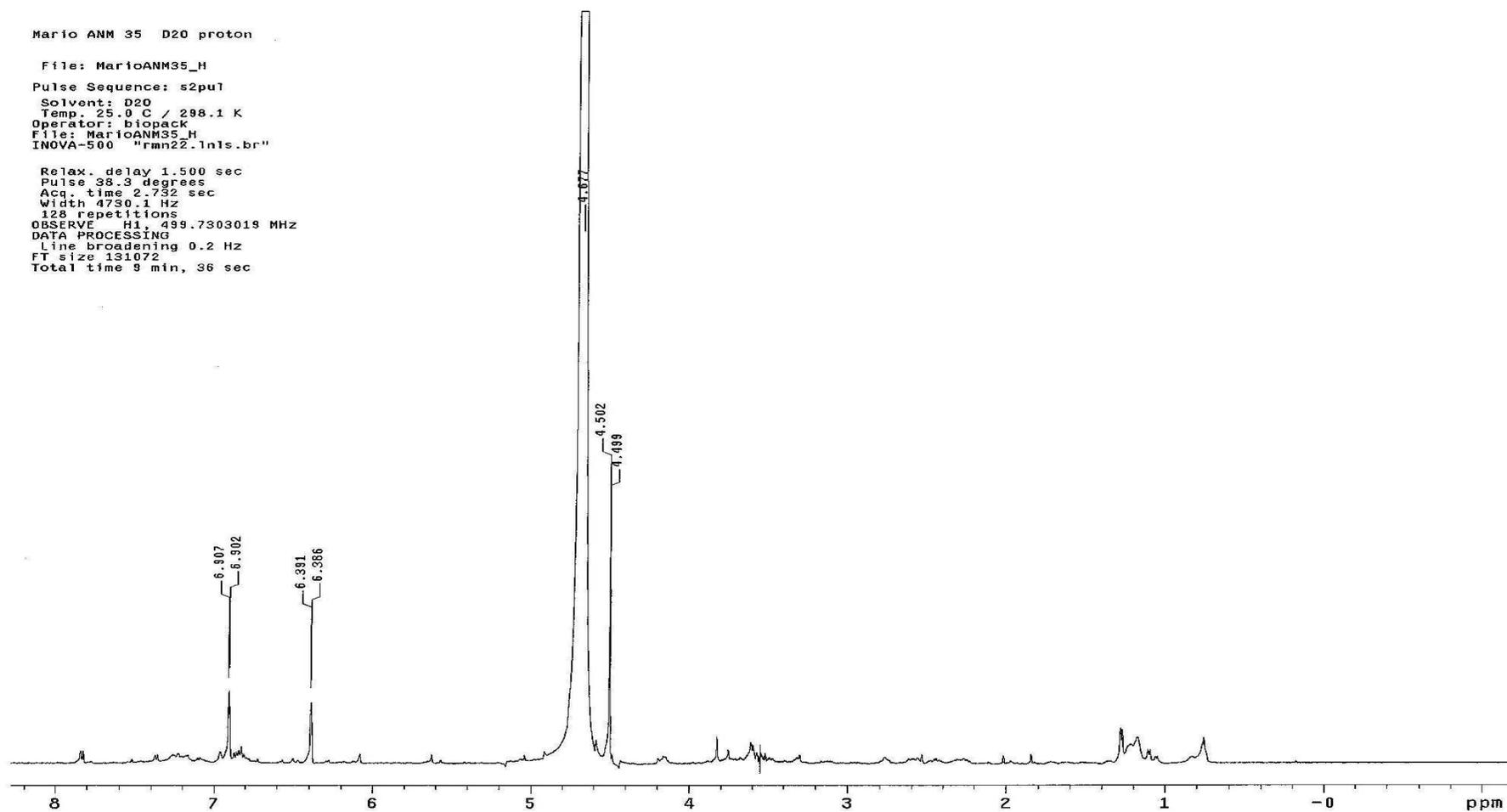
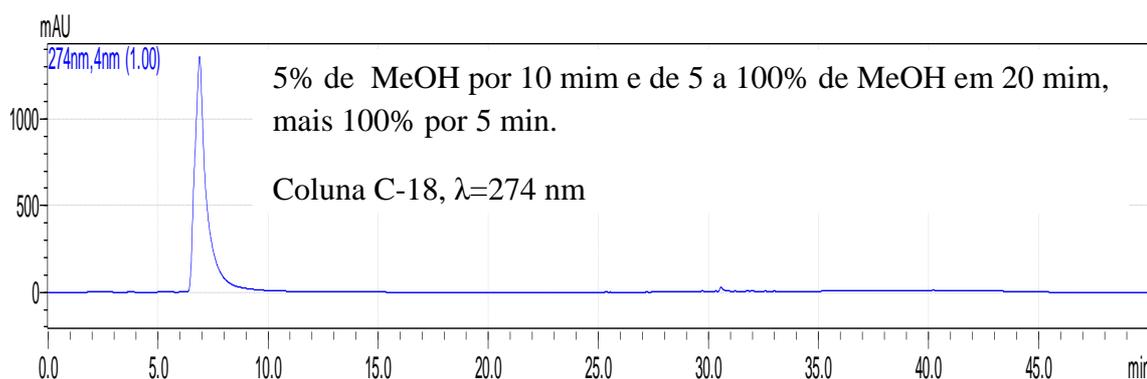


Figura 95: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância XI ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz).

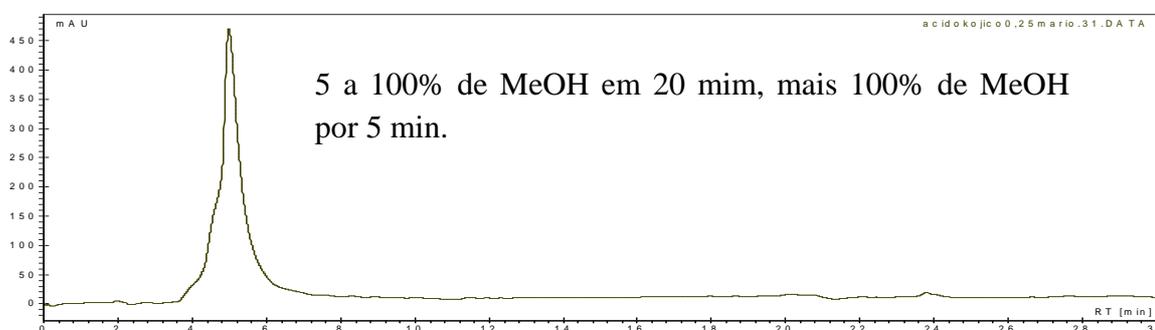
## 4.6 Identificação e quantificação da substância XII presente no extrato PDB de *Aspergillus* sp.

### 4.6.1 Obtenção e análise do extrato bruto

O extrato bruto do *Aspergillus* sp., foi submetido a CLAE-DAD e CLAE-UV, modo analítico com sistema de eluente H<sub>2</sub>O/MeOH em isocrático-gradiente e gradiente exploratório, respectivamente, onde foi verificada a presença de uma substância (**Figura 96 e 97**).



**Figura 96:** Cromatograma CLAE- DAD analítico do extrato bruto do *Aspergillus* sp.

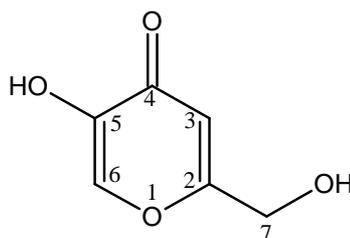


**Figura 97:** Cromatograma CLAE-UV analítico do extrato bruto PDB do *Aspergillus* sp.

Aparentemente o extrato o bruto se mostra puro, mas como o detector usado na CLAE foi o DAD e o UV, a ausência de substâncias sem grupos cromóforos pode ter influenciado no resultado. O extrato foi então submetido à ressonância magnética de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**Figura 101**, p.148; **Tabela 15**, p. 144) mostrou praticamente sinais de uma única substância, esse fato mostra que o número de impurezas presentes no extrato bruto PDB são pequenas e que no

extrato existe praticamente uma única substância confirmando o cromatograma obtido em CLAE-DAD e CLAE-UV.

#### 4.6.2 Identificação da substância XII



**Figura 98:** Estrutura da substância XII.

Do estudo químico do extrato bruto PDB, produzidos pelo fungo *Aspergillus* sp., resultou na identificação da substância ácido kójico (**Figura 98**). A identificação desta substância foi realizada com base na análise de seus dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com valores disponíveis na literatura (ZERINGUE et al., 1999).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 101**, p.148; **Tabela 15**, p. 144) do extrato bruto foi possível observar cinco singletos, sendo dois sinais de hidrogênio ligados a carbono  $\text{sp}^2$ . Para evidenciar a presença de hidrogênios lábeis foi adicionada  $\text{D}_2\text{O}$  a amostra e realizado um novo experimento, constatando a presença de dois hidrogênios lábeis.

Os outros sinais indicavam ser de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta_{\text{H}}$  6,34 (s, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  8,01 (s, 1H) e em  $\delta_{\text{H}}$  4,29 (s, 2H) indicando a presença de um álcool primário alílico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 102**, p. 149; **Tabela 15**, p. 144), confirmou a presença de cinco sinais de carbono  $\text{sp}^2$ , com  $\delta_{\text{C}}$  110,0;  $\delta_{\text{C}}$  139,8;  $\delta_{\text{C}}$  146,2;  $\delta_{\text{C}}$  168,6 e  $\delta_{\text{C}}$  174,5 e um sinal de carbono carbinólico em  $\delta_{\text{C}}$  60,0.

No espectro de massas TOF-MS (**Figura 103**, p. 150) no modo positivo foi possível observar a presença dos íons em  $m/z$  143,0281 ([M+H]), 125,0233 ([M+H]-H<sub>2</sub>O) e 165 ([M+Na]) o que está de acordo com a fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, proposta através da análise dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono.

Comparação com dados da literatura (ZERINGUE *et al.*, 1999), levou a determinação estrutural como sendo 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona, que pertence ao grupo das  $\gamma$ -pironas, sendo conhecido como “ácido kójico”, e tendo aplicações em diversos segmentos industriais.

**Tabela 15.** Dados de RMN ( $\delta$ ) <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (126 MHz) da substância **XII** em DMSO-d<sub>6</sub> do isolado e dados literatura em DMSO-d<sub>6</sub>.

Nº	$\delta$ <sup>13</sup> C de <b>XII</b> (isolado)	$\delta$ <sup>13</sup> C do ácido kójico (Literatura)	$\delta$ <sup>1</sup> H de <b>XII</b> (isolado)	$\delta$ <sup>1</sup> H do ácido kójico (Literatura)
2	168,6	168,8	-	-
3	110,0	110,7	6,34 s	6,33 s
4	174,5	177,1	-	-
5	146,2	144,8	-	-
6	139,8	142,3	8,01 s	8,03 s
7	60,0	60,4	4,29 s	4,28 s
OH	-	-	9,00 s	9,07 s
OH	-	-	5,63 s	5,67 s

O ácido kójico é produzido por cepas de *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium* através da conversão de glucose por meio de reações enzimáticas em várias etapas. Foi isolado pela primeira vez de uma cepa de *Aspergillus* em 1907 por Saito e a estrutura foi definida por Yabuta em 1924, sendo extraído pela primeira vez de *Aspergillus oryzae* em culturas de arroz (PIANTAVINI, 2010).

O ácido kójico pode ser produzido biosinteticamente a partir da conversão de glucose, sem a quebra do anel piranosídico ou da cadeia carbônica (**Figura 99**, p. 145), (TERABAYASHI *et al.*, 2010).



*al.*,1998; ROSFARIZAN *et al.*, 2000; ROSFARIZAN, ARIFF, 2007). Várias fontes de carbono podem ser usadas na biossíntese do ácido kójico por espécies de *Aspergillus*. Entre elas a D-xylose e D-ribose são as que deram os melhores rendimentos, já a L-arabinose é menos efetiva e a D-arabinose, D-lyxose e L-xylose são fontes de carbono muito pobres para a produção do ácido kójico (PIANTAVINI, 2010).

Por ser um composto quelante, o ácido kójico é utilizado na saúde pública no tratamento de doenças. Como as relacionadas à sobrecarga de ferro como a  $\beta$ -talassemia, pois o ácido kójico quela os íons ferro que estão em excesso no organismo. E também é usado no tratamento do diabetes, mimetizando a ação da insulina a partir da formação de complexo com os íons vanádios (PIANTAVINI, 2010).

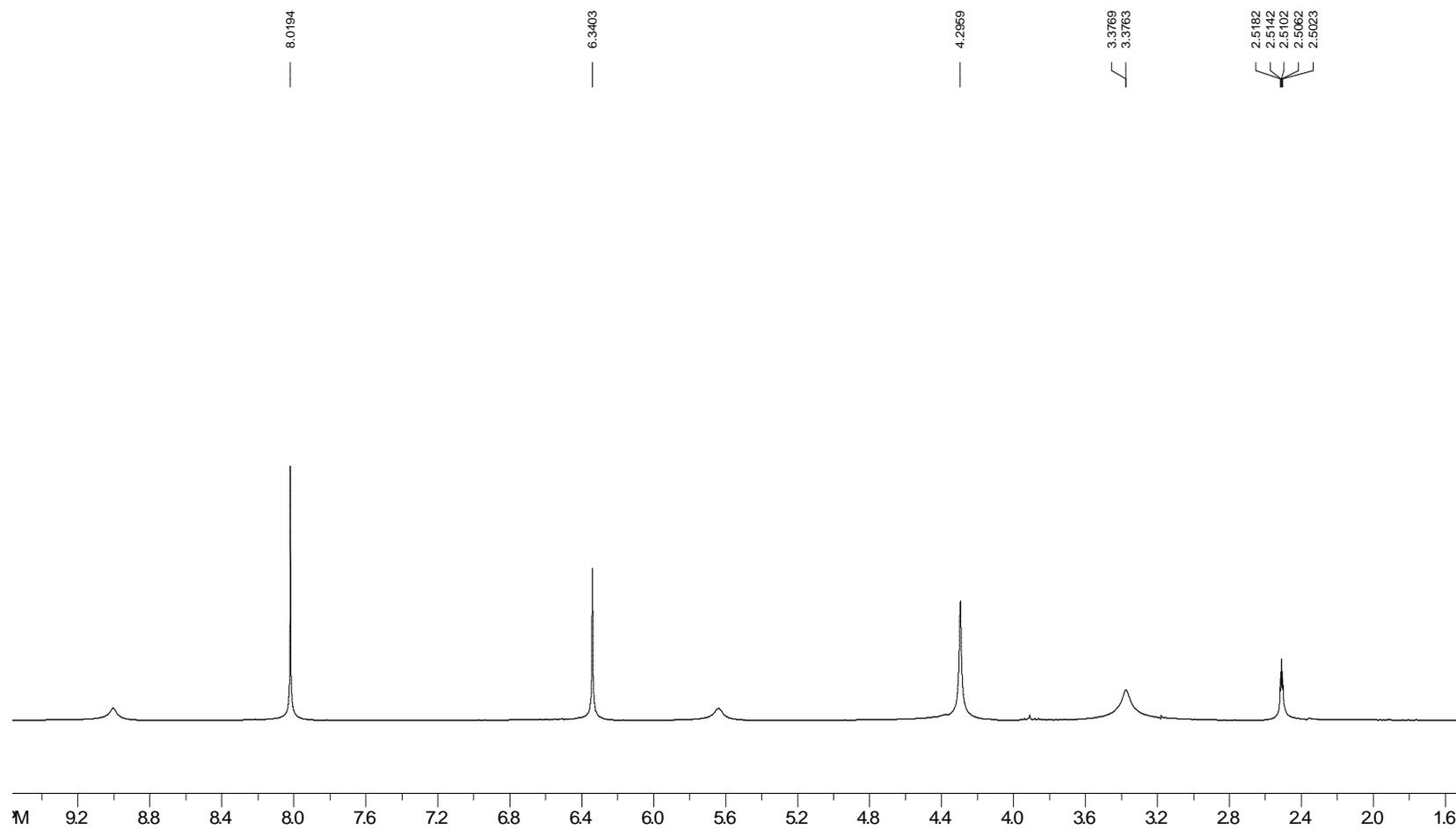
O ácido kójico também é extensamente usado como anti-inflamatório, analgésico e na indústria de alimentos como um precursor para realçar o sabor, preservar ou mudar cores dos alimentos. Sendo permitido como aditivo no Japão, adicionado a alimentos como um antioxidante (LE BLANCH, 1989; KAYAHARA *et al.*, 1990; OHYAMA, 1990; CORRER, 2005; PIANTAVI, 2010).

Na indústria cosmética, é usado como um dos despigmentantes naturais mais eficientes do mercado, pois age inibindo a formação da melanina formando complexos com os íons cobre e bloqueando a ação da tirosinase, acabando com as manchas (LE BLANCH, 1989; KAYAHARA *et al.*, 1990; OHYAMA, 1990; CORRER, 2005). Existem também relatos de atividade inseticida o que pode indicar uma possível função desse metabolito na planta hospedeira do fungo que o produz (ALVERSON, 2003).

#### 4.6.2 Quantificação da substância majoritária presente no extrato bruto PDB

Para a análise e quantificação do extrato bruto por CLAE- UV, este foi diluído em MeOH na concentração  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , injetando  $20 \text{ }\mu\text{L}$  na Coluna analítica, em triplicata nas condições descritas na metodologia. A partir da análise do extrato bruto calculou-se uma concentração de  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  corresponde a  $0,7 \text{ mg}$  de ácido kójico por grama de extrato seco. Como cada litro de caldo fermentado produz  $0,24 \text{ g}$  de extrato, podemos obter  $0,17\text{g}$  de ácido kójico por litro de caldo fermentado.

Estes resultados mostram que o fungo *Aspergillus* sp., isolado de *Hancornia speciosa* é muito promissor para a produção de ácido kójico em escala comercial, pois o mesmo foi crescido em um único meio sem otimização das condições de cultivo. Tais otimizações podem levar a um aumento significativo da produção de ácido kójico.



**Figura 101:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância XII ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

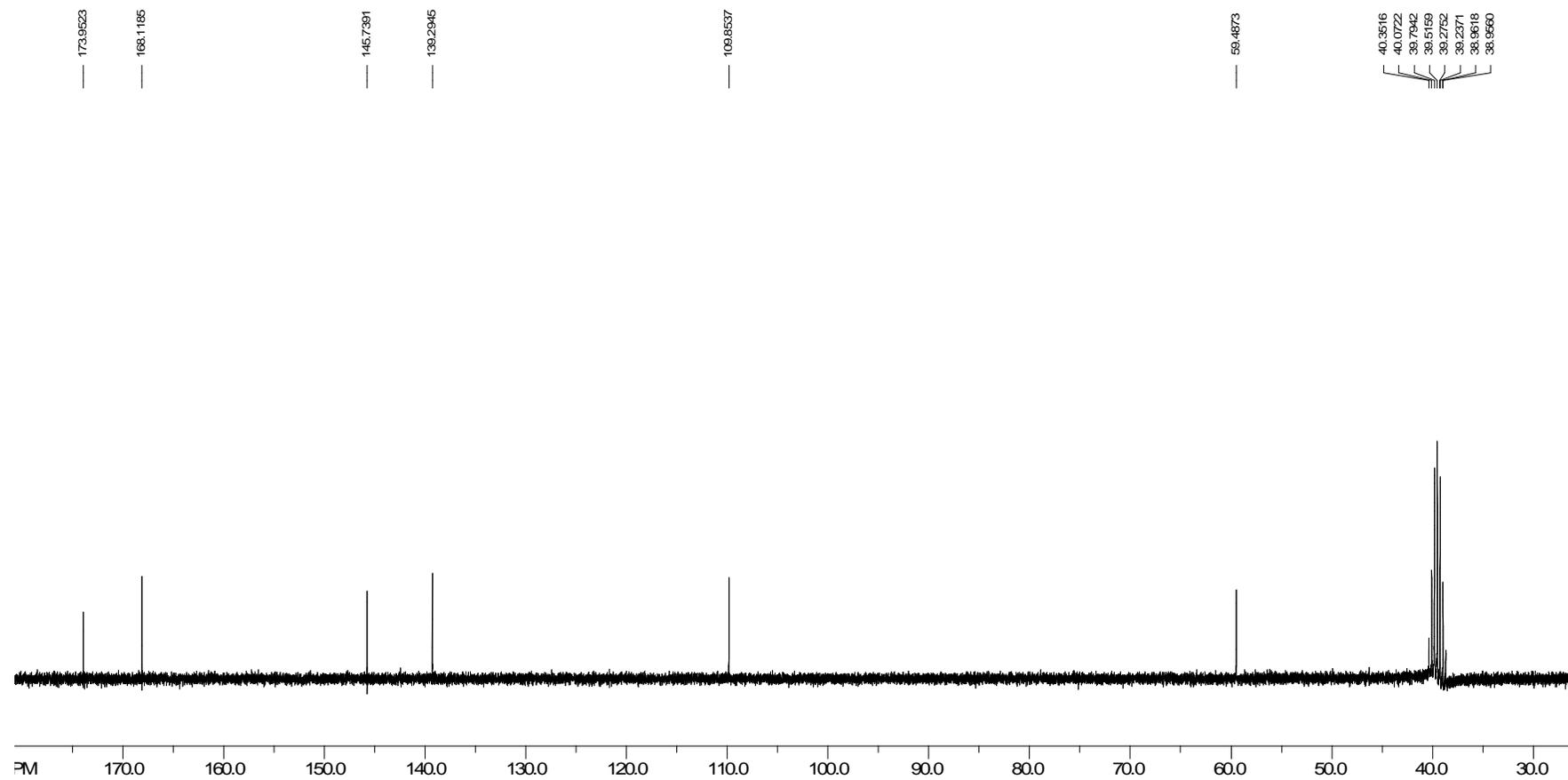


Figura 102: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância XII (DMSO-d6, 126 MHz).

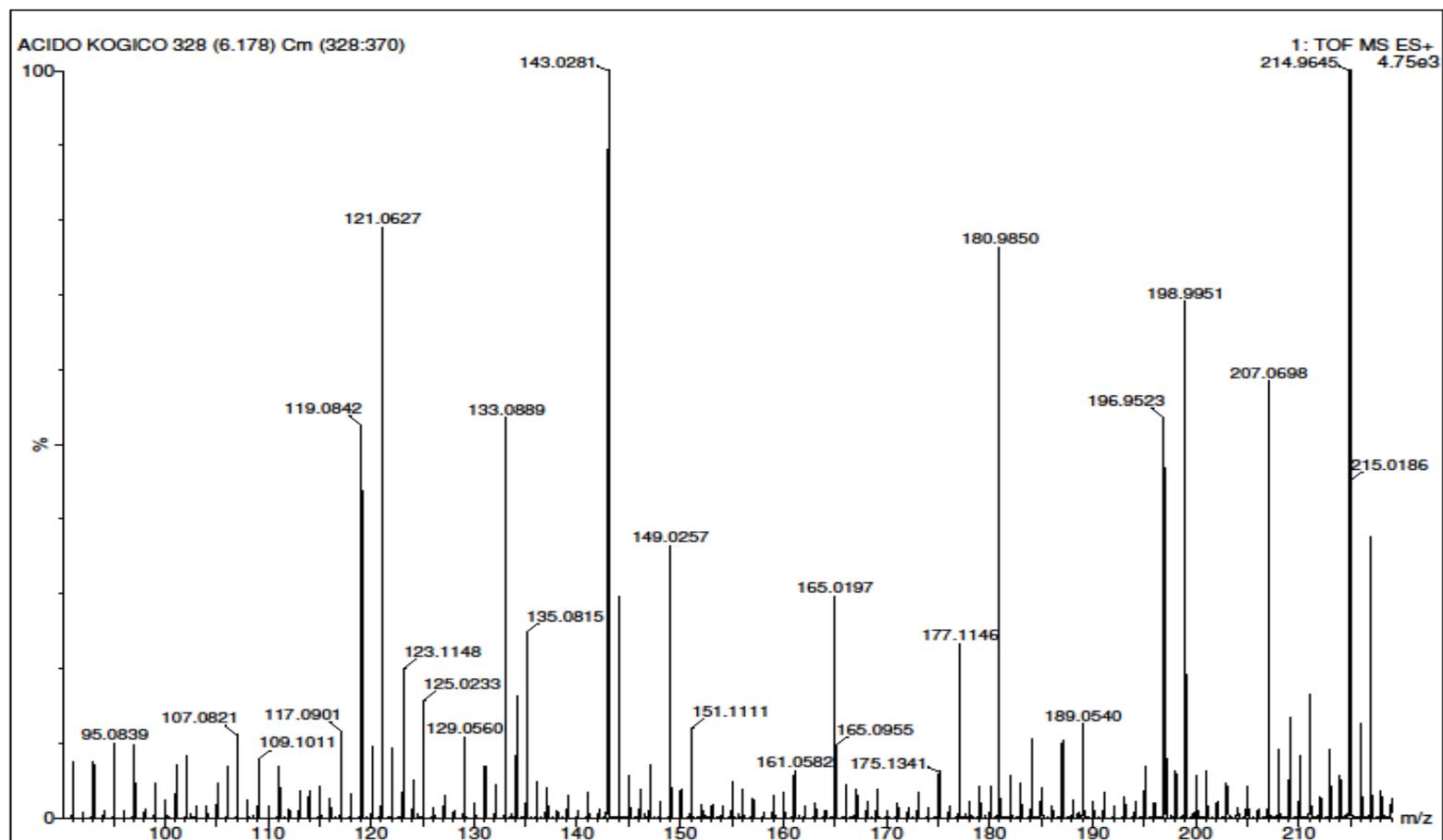


Figura 103: Espectro de massa da substância XII.

#### 4.7 Avaliação da atividade antioxidante do extrato PDB do fungo *Aspergillus sp*

Na avaliação da atividade antioxidante, o extrato bruto PDB do fungo *Aspergillus sp.*, e o ácido kójico (padrão comercial adquirido da SigmaAldrich) foram testados nos bioensaios nas mesmas condições. Os resultados obtidos no bioensaio para atividade antioxidante, utilizando o seqüestro do radical DPPH, são apresentados na abaixo (**Tabela 16**).

**Tabela 16.** Expressão do potencial antioxidante dos extratos brutos PDB do fungo *Aspergillus sp.*, frente ao seqüestro do radical DPPH.

Amostras /Conc. em mg/mL	Extrato PDB (%)	ácido kójico (%)
1	9	10
2,5	18	11
7,5	16	12
10	18	12
(BHT)* 1000 ppm	86,5	
Epigalocatequina	92,3	

\* Butilhidroxitolueno

Podemos observar na **Tabela 16**, que a substância pura ácido kójico quanto o extrato bruto apresentaram uma baixa capacidade de seqüestro de radical livre no teste com DPPH.

Neste trabalho, também foi analisada a ação inibitória da formação do radical óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) pelo extrato PDB e a substância ácido kójico como mostrado na abaixo (**Tabela 17**, p. 152). O radical  $\text{NO}^{\bullet}$  foi gerado quimicamente pelo nitroprussiato de sódio (NaNPS), doador de  $\text{NO}^{\bullet}$ , que serve para liberar a molécula que é quantificada indiretamente pela formação de íons nitrito.

Foi evidenciado que o extrato PDB e a substância ácido kójico apresentaram um  $\text{IC}_{50}$  de 45 e 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente mostrando um forte efeito com o radical  $\text{NO}^{\bullet}$ , sendo importante mencionar que um efeito de 20% de inibição pode ser

importante em determinados momentos metabólicos como no caso da pré-eclâmpsia (WAKATSUKI e OKATANI, 2000). Todas as análises foram feitas em triplicata.

**Tabela 17.** Percentual de inibição da formação de nitrito pelo extrato PDB do fungo *Aspergillus sp.*, e do Ácido Kójico.

	Extrato PDB do Fungo <i>Aspergillus sp.</i>					ácido kójico				
Conc. (mg/mL)	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0
IP <sub>(%)</sub> NO	37	47	55	55	50	36	37	41	41	50
IC <sub>50</sub> NO	45 mg/mL de NPS 50 mM					40 mg/mL de NPS 50 mM				

Para os cálculos de NO foi utilizado o tempo de 150 min. O ácido kójico e o extrato PDB apresentaram uma forte atividade de inibição da produção de NO• indicando que este fungo possui grande potencial biotecnológico, pois o extrato bruto pode ser potencialmente útil no tratamento de doenças como pré-eclâmpsia, hipóxia fetal e/ou isquemia de reperfusão, uma vez que o principal constituinte do extrato bruto do fungo *Aspergillus sp.*, é o ácido kojico.

Foi realizada também análise das Substâncias Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) *in vitro* pelo método do Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ambas as amostras (extrato e Acido Kójico) não apresentaram percentual de inibição (IP %) significativo em relação ao grupo controle (Etanol) pelo teste t-Student para p<0.05 – dados não mostrados.

# *Conclusão*

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho iniciou o estudo químico com fungos endofíticos da espécie vegetal *Hancornia speciosa*, tendo sido criada uma micoteca com 14 isolados fúngicos. Esta será uma fonte de fungos a ser estudado pelo grupo de pesquisa, além disso, os dados obtidos durante todo o estudo evidenciaram esses como uma fonte promissora de vários metabólitos potencialmente bioativos.

O estudo possibilitou o isolamento de 12 substâncias entre elas o ácido kójico, o tirosol e o ácido itacônico substâncias que possuem aplicação industrial.

Outra substância isolada é o ácido salicílico, substância que até o momento foi somente isoladas de plantas, sendo esse o primeiro relato de sua produção por um fungo endofítico.

O presente trabalho possibilitou, ainda, isolar o composto 5-hidroxiilmelmeleína e outros metabólitos como, nectriapirona, pirofen, 5-metilmelína, dicetopiperazina ciclo (D-Pro- D-Leu), triptofol, nigragillin.

Os composto, 5-hidroxiilmelmeleína, 5-metilmelína, tirosol e triptofol, isolado do fungo *Phomopsis* sp., possuem relatos de atividade fitotóxica. Esse fungo a princípio assintomático pode se tornar patógeno a depender do desequilíbrio ecológico a qual a espécie hospedeira for submetida, nesse caso *Hancornia speciosa*.

Os fungos *Guignardia* sp., e *Aspergillus niger* produziram ácido salicílico e nigragillin, respectivamente, mostrando que fungos em associação com o seu hospedeiro podem proteger o mesmo, uma vez que o ácido salicílico é responsável pela inicialização dos mecanismos de defesa da planta, e o nigragillin possui atividade inseticida relatada na literatura.

Estes fatos confirmam o importante papel dos micro-organismos especialmente os fungos endofíticos dentro do ecossistema, contribuindo para um melhor entendimento das relações ecológicas destes com a espécie vegetal estudada e os outros organismos. Sendo uma alternativa para o controle biológico de fitopatógenos em *Hancornia speciosa*, pois o controle biológico utilizando fungos é pouco agressivo ao meio ambiente e uma forma eficaz de controlar doenças em plantas.

Estes resultados são promissores, pois mostram que os fungos associados com espécies vegetais são prolíficos produtores de substâncias potencialmente bioativas e de grande valor comercial, além de ter contribuído para um maior entendimento da interação fungo/planta.

# *Referências*

## 6. REFERÊNCIAS

ALVERSON, J. Effects of mycotoxins, kojic acid and oxalic acid, on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 60-62, 2003.

ALVERSON, J.; COHEN, A.C. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 256-260, 2002.

ALY, A.H.; EDRADA-EBEL, R.; INDRIANI, I.D.; WRAY, V.; MÜLLER, W. E. G.; FRANK, T.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHÄCHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W.H.; PROKSC, H. P.; EBEL, R. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 972-980, 2008a.

ALY A.H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MÜLLER, W. E. G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p.1716-1725, 2008b.

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

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves** New York: Springer-Verlag, 1991.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. 1996. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

ARNSTEIN, H. R. V.; BENTLEY, R. The biosynthesis of kojic acid. 1. Production from [1-14C] and [3:4-14C<sub>2</sub>]glucose and [2-14C]-1:3-dihydroxyacetone. **Biochemical Journal**, v. 54, p.493-508, 1953.

AZEVEDO, J. L. **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHEERONI JR. W.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, 2000.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, M.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, G.C.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI, Jr.; W.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic strains of citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, p.464-477, 2002.

BARNES, C.L.; RIOS, S. J.; TORRES, E. ;PACHECO, R.; MARQUEZ, H. Structure and absolute configuration of pyrophen, a novel pyrone derivative of L-phenylalanine from *Aspergillus niger*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 36, p. 292-296, 1990.

BASHYAL, B. P.; KITHSIRI, W. E. M.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the sonoran desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 724-728, 2005.

BLANCO, C. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 200p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature** , v. 181, p.1199-1200, 1958.

BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 214-228, 2004.

BONNARME, P.; GILLET, B.; SEPULCHRE, A. M.; ROLE, C.; BELOEIL, J. C.; DUCROCQ, C. Itaconate Biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 3573-3578, 1995.

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

BUNYAPAIBOONSRI, T.; YOIPROMMARAT, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; SRICHOMTHONG, K.; LUMYONG, S. Oblongolides from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 55-59, 2010.

BUSI, S.; PEDDIKOTLA, P.; UPADYAYULA, S. M.; YENAMANDRA, V. Isolation and Biological Evaluation of Two Bioactive Metabolites from *Aspergillus gorakhpurensis*. **Records of Natural Products**, v.3, p.161-164, 2009.

CAESAR, F.; JANSSON, K.; MUTSCHLER, E. Nigragillin, a new alkaloid from the *Aspergillus niger* group Isolation and structure clarification of nigragillin and a dioxopiperazine. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 44, p. 676-690, 1969.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae).** 2007, 255p. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CAFEU, M. C., SILVA, G. H., TELES, H. L., ARAUJO, A. R., BOLZANI, V. S., Pfenning, L.H., YOUNG, M. C. M. Substâncias antifúngicas de *xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (RUBIACEAE). **Quimica Nova**, v.28, p. 991- 995, 2005.

CALHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, v. 96, p. 281-286, 1992.

CARROLL, G. C. Fungus endophytes in steams and larvae: from latent pathogens to mutualistic symbiot. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHEN, Y.; PAN, J.; XU, F.; LIU, F.; YANG, J. X.; HUANG, C.; XU, C.; LU, Y.; CAI, X.; SHE, Z.; LIN, Y. a new indene derivative from the marine fungus *Phomopsis* sp. (No. GX7-4A). **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, p. 230-232, 2010.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; GAMROJANAVANICH, N.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Metabolites from the endophytic mitosporic *Dothideomycete* sp. LRUB20. **Phytochemistry**, v. 70, p.121-127, 2009a.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; KENGTONG, S.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. **Phytochemistry**, v. 70, p. 407-413, 2009b.

CORRER, C. J.; CORDEIRO, G.; GASPARETTO, J.; PERALTA-ZAMORA, P. PONTAROLO, R. Determinação de Ácido Kójico em Produtos Farmacêuticos por Espectroscopia UV-Vis E Processo de Calibração Multivariada. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p.416-20, 2005.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, p. 1144-1152, 1997.

DAI, J.; KROHN, K.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. New naphthalene-chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp., from *Erica arborea*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, p.1564-1569, 2009.

DAVIS, R. A.; LONGDEN, J.; AVERY, V. M.; HEALY, P. C. The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2836-2839, 2008.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. England: John Wiley & Sons, LTD, 2001.

DHONDT, S.; GOUZERH, G.; MÜLLER, A.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. **The Plant Journal**, v. 32, p. 749-762, 2002.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. **Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals**. In: GULLO, V. P. The discovery of natural products with therapeutic potential. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. cap. 3, p. 49-80.

FAIL, G. L. E LANGENHEIM, J. H. The infection process by *Pestalotia subcuticularia* on leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytopathology**, v.80, p.1259-1265, 1990.

FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DDDiketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated

with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66,p. 1299-1301 2003.

FENN, P.; DURBIN R. D.; KUNTZ, J. E. Synthesis of tryptophol and O-acetyltryptophol from tryptophan by *Ceratocystis fagacearum*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 899-901, 1977.

FERREIRA, M.B. Plantas de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v.6, p.19-23, 1980.

FURTADO, N. A. J. C. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus***. 2004. 293 f. Tese (Doutoradoem Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMANN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v.4490, p. 56-8, 1981.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A. GLOGOWISKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. .Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-8, 1982.

GARDNER, W. A.; McCOY, C. W. **Inseticides and herbicides**. In: FINKELSTEIN D. B.; BALL, C. Biotechnology of filamentous fungi: technology and products. **Boston: Butterworth- Heinemann**, 1992. p. 335-359.

GLIENKE-BLANCO; C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 251-255, 2002.

GLOER, J. B. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S1265-S1274, 1995.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A Simple Method for the Quantitative Analysis of Tyrosol by HPLC in Liquid Czapek Cultures from Endophytic Fungi. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, p. 188-194, 2009.

GUIMARÃES, D.O. Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "*Caenorhabditis elegans*". 2010. 186p. Tese- Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, 2010.

GUIMARÃES, D.O. **Prospecção química e biológica de fungos endofíticos associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 200 p. Dissertação- Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, 2006.

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

GUZMÁN-LÓPEZ, O.; TRIGOS, Á.; FERNÁNDEZ, F. J.; YANÑEZ-MORALES, M. DE J.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 1473-1477, 2007.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, p. 901-910, 2010.

HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Products Report**, v. 10, p. 327-348, 1993.

HASEGAWA, Y.; FUKUDA, T.; HAGIMORI, K.; TOMODA, H.; OMURA, S. Tensyuic Acids, New Antibiotics Produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1338-1341, 2007.

HIRSCHMANN, G.S.; ARIAS, A.R. de. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p.159-172, 1990.

HOAGLAND, R. E. **Microbes and microbial products as herbicides**: an overview. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). *Microbes and microbial products as herbicides*. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 2-52.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1604-1608, 2008.

HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTÁN, T.; KROHN, K. New bioactive 2, 3 epoxy cyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. From *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009 p. 749-756, 2009.

INÁCIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H.C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAÚJO, A. R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 822-824, 2006.

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

ISOGAI, A.; HORII, T.; SUZUKI, A.; MURAKOSHI, S.; IKEDA, K.; SATO, S.; TAMURA, S. Isolation and identification of nigragillin as an insecticidal metabolite produced by *Aspergillus niger*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 39, p. 739-740, 1975.

JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov.; cause of a citrus leaf spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture, Wellington**, v.16, p.159-163, 1988.

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

KAYAHARA, H.; SHIBATA N.; TADASA, I. C.; MAEDA, H., KOTANI, T.; ICHIMOTO, I. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 2441 2442, 1990.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. And its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, Matraville**, v.73, p. 249-292, 1948.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R. A.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W. H.; PROKSCH, P. Xantheric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 2053-2057, 2009.

KOKUBUN, T; VEITCH, N. C.; BRIDGE, P. D.; SIMMONDS, M. S. J. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 779-782, 2003.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v.65, p.945-950, 1981.

KOUR, A.; SHAWL, A. S.; REHMAN, S.; QAZI, P. H.; SUDAN, P.; KHAJURIA, R. K.; SULTAN, P.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 1115-1121, 2008.

KUPPER, K.C., BETTIOL, W., DE GOES, A., DE SOUZA, P.S., BELLOTTE, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Crop Protection**, v. 25, p. 569-573, 2006.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLE, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71 p. 159-162, 2008.

KWON, Y. Theoretical study on salicylic acid and its analogues: intramolecular hydrogen bonding. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 532, p. 227-237, 2000.

LACAZ, C. S. **Antibióticos**. 3 ed. São Paulo: USP/Edga. Blucher, p. 24, 1975.

LI, Y.; LI, X.; KIM, S-K.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; RHO, J. R.; SON, B. W. Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 375-376, 2004.

LE BLANCH, D. T.; AKERS H. A. Maitol and ethyl maltol: from larch tree to successful food additive. **Food Technology**, v. 26, p. 78-79, 1989.

LI, E.; TIAN, R.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Pestalothols A-D, bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. **Journal of Natural Products**, v.71 p. 664-668, 2008.

LIN, T.; LIN, X. C.; HU, Z.; HUANG, W.Y.H.; SHEN, Y. Secondary Metabolites of *Phomopsis* sp. XZ-26, an endophytic fungus from *Camptotheca acuminata*. **European Journal of Organic Chemistry**, v.2009 p. 2975-2982, 2009.

LIU, L.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Pestalofones A–E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 606-613, 2009.

LIU, Y.; JUNG, J. H.; ZHANG, S. Indole alkaloids from a sponge *Sarcotragus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p.453-456, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002

MACMILLAN, J. Griseofulvin: 7-Dechlorogriseofulvin. **Journal of the Chemical Society**, v. 7, p. 1697-1702, 1953.

MADDAU, L.; PERRONE, C.; ANDOLFI, A.; SPANU, E.; LINALDEDDU, B. T.; EVIDENTE, A. Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. **For. Pathology**, p. 1-7, 2009.

MAIER, W.; HAMMER, U.; DAMMANN, U.; SCHULZ, B.; STRACK, D. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus immembers of the Poaceae. **Planta**, v. 202, p. 36-42, 1997.

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York: Oxford University Press, 1994. 92 p.

MARINHO, A. M. DO R.; MARINHO, P. S. B.; FILHO E. R. Constituintes Químicos de *Penicillium* sp, um Fungo Endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae) Chemical components of *Penicillium* sp, an endophytic fungus from *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.9, p. 190-199, 2007.

MARTÍNEZ-LUIS S, DELLA-TOGNA G, COLEY PD, KURSAR TA, GERWICK WH, CUBILLA-RIOS L. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, p.2011-2014, 2008.

MASUREKAR, P. S. **Therapeutic metabolites**. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. *Biotechnology of filamentous fungi: technology and products*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 241-301.

MAZZEI, P.; FRANCESCA, N.; MOSCHETTI, G.; PICCOLO, A. NMR spectroscopy evaluation of direct relationship between soils and molecular composition of red wines from *Aglianico grapes*. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, p. 167-172, 2010.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia easily* confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopatology**, St. Paul, v.54, p. 40-43, 1964.

MEJÍA L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens, **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.

MING GE, H.; SHEN, Y.; ZHU, C.H.; TAN, S.H.; DING, H.; SONG, Y. C.; TAN, R.X.; Penicidones A–C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**. v. 69, p. 571–576, 2007.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, v. 98, p. 380-386, 2008.

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

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the

*Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225-1242, 2009.

OHYAMA, Y.; MISHIMA, Y. Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. **Fragrance Journal**, v. 6, p. 53-58, 1990.

OKUNO, T.; OIKAWA, S.; GOTO, T.; SAWAI, K.; SHIRAHAMA, H.; MATSUMOTO, T. Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, p. 997-1001, 1986.

OLIVEIRA, C. M.; REGASINI, L. O.; SILVA, G. H.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C.M.; BERLINCK, R. G. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Alibertia macrophylla* and *Piper aduncum*. **Phytochemistry Letters**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2010.

PARENTE, T.V.; BORGIO, L.A.; MACHADO, J.W.B. Características físico-químicas de frutos de mangaba de cerrado da região geoeconômica do Distrito Federal. **Ciência e Cultura**, v.37,p.95-98, 1985.

PARVATKAR, R. R.; D'SOUZA, C.; TRIPATHI, A.; NAIK, C. G. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*, **Phytochemistry**, v. 70, p. 128-132, 2009.

PAULA, J.E. Cerrado: sugestão para a adequação entre produção e preservação. **Informe Agropecuário**, v.16, p.1-2, 47-48, 1992.

PAVIANI, V. **Efeito do extrato de Azadirachta indica (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus***. 2010, 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PETRINI, O. **Fungal endophytic of tree leaves**. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). *Microbiol ecology of leaves* springer. New York: Springer-Verlag, 1991. cap. 9, p. 179-197.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; J. VAN DEN HEUVAL, J. (Ed.). **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge: University Press Cambridge, 1986. p. 175-187.

PETRINI, O.; CARROL, G. Endophytic fungi in foliage of some cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 629-636, 1981.

PIANTAVINI, M. S. **Desenvolvimento e validação de um método espectrofotométrico para a quantificação de ácido kójico por complexação com alumínio e caracterização do complexo**. 2010, 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. st.-hil.). **Floresta**, v. 36, p. 123-128, 2006.

POLYDORO, M.; SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SHAPOVAL, E. E.S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, v. 2815–2826, 2004.

POSSIEDE, Y. M. **Estudos morfológicos e genéticos em *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp**. 2004, 129p. Tese (doutorado em Ciências Biológicas)- Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PUNITHALINGAM, E. **Studies on Sphaeropsidales in culture II.** Mycological Papers, Oxon, v.136, p.1-9, 1974.

QIAO, N-Y.; JI, N-Y.; LIU, X-H.; LI, K.; ZHU, Q-M.; XUE, Q-Z. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 5677-5680, 2010.

RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p. 905-909, 1996.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. Guignardic Acid, a Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic Fungus *Guignardia* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, v. 84, p.3766-3772, 2001.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, HEERKLOTZ, J.; WERNER, C. Extracts from the fungus *Guignardia* sp., their uses in pharmaceutical compositions, new isolate compound from the extract of the fungus *Guignardia* sp. and its use in pharmaceutical compositions. **wipo patent application** wo/017937/2002.

ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A.B. HASSAN, M.A.; KARIM, M.I.A. Kojic Acid Production by *Aspergillus flavus* Using Gelatinized and Hydrolyzed Sago Starch as Carbon Sources. **Folia Microbiol**, v. 43, p. 459-464, 1998.

ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A. B.; HASSAN, M. A.; KARIM, M. I. A. Influence of pH on kojic acid fermentation by *A. flavus*. Pakistan. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 977-982, 2000.

ROSFARIZAN M.; ARIFF, A. B. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell-bound enzyme system of *A. flavus* Link 44-1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p.203–209, 2007.

RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KIRTIKARA, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, v. 69, p. 783-787, 2008.

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

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. e MORAES, V. R. S. Triterpenos do látex dos frutos de *Hancornia speciosa* (apocynaceae). In: **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG. Livro de Resumos**. São Paulo- SP :Sociedade Brasileira de Química, 2005.

SAMPAIO, T. S. E NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 606-610, 2006.

SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, M. N.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, I. C. S.; LOPES-JÚNIOR, M.L.; ARRUDA, M.S.P.; SAILVA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES FILHO, B. E.; OLIVEIRA, M. C. F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, v.26, p. 539-548, 2008.

SELOSSE, M.;BAUDOIN,E.;VANDENKOORNHUYSE,P. symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plantas. **Comptes Rendus Biologies** 327. p. 639-648, 2004.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados com espécies vegetais de Cerrado**. 2005. 0 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2005.

SILVA, G. H., TELES, H. L., ARAUJO, A. R., PFENNING, L.H., HADDAD, R., COSTA-NETO, C. M., EBERLIN, M. N., YOUNG, M. C. M., BOLZANI, V. S. Cadinane Sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H.S.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C.M.; COSTA-NETO, CL. M.; PFENNING, L. H.; BERLINCK, R. G.S.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae), **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 164-167, 2010.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. Germany: J.Cramer, 1984. 701p.

SLIVINSKI, C.T. **Produção, purificação parcial e caracterização glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. 119p. dissertação- (mestrado em ciencia e tecnologia)-Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

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

STIERLE, A.; STOBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1315-1324, 1995.

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

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R. *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology-UK**, v. 142, p. 435-440, 1996.

SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D. Characterization of Polyketide Metabolites from Foliar Endophytes of *Picea glauca*. **Journal Natural Products** v. 71, p. 1393-1398, 2008.

TAKAC, M. J.M.; TOPIC, D. V. FT-IR and NMR spectroscopic studies of salicylic acid derivatives. II. Comparison of 2-hydroxy- and 2,4- and 2,5-dihydroxy derivatives **Acta Pharmaceutica**, v.54, p. 177-191, 2004.

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

TAO, Y.; MOU, C.; ZENG, X.; XU, F.; CAI, J.; SHE, Z.; ZHOU, S.; LIN, Y. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of two new diaryl ethers phomopsides A and B from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 761-764, 2008.

TERABAYASHI, Y.; SANO M.; YAMANE, N.; MARUI, J.; TAMANO, K.; SAGARA, J.; DOHMOTO, M.; ODA, K.; OHSHIMA, E.; TACHIBANA, K.; HIGA, Y.; OHASHI, S.; KOIKE H.; MACHIDA, M. Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 12, p. 953-61, 2010.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPODMA, Y.; PREEDANON, S.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18. **Phytochemistry**, v. 70, p. 554-557, 2009.

- VAN der AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, v.5, p.1-110, 1973.
- VAROGLU, M; CREWS, P. Biosynthetically Diverse Compounds from a Saltwater Culture of Sponge-Derived *Aspergillus niger*, **Journal Natural Products**, v. 63, p. 41-43, 2000.
- WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.
- WAKATSUKI, A.; OKATANI, Y. Melatonin protects against the free radical induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. **Journal Pineal Research**, v. 28, p. 172-178, 2000.
- WANG, F-W.; YE, Y-H.; DING, H.; CHEN, Y-X.; TAN, R-X.; SONG, Y.-C. Benzophenones from *Guignardia* sp. IFB-E028, an Endophyte on *Hopea hainanensis*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, p. 216- 220, 2010.
- WANG, J. F.; HUANG, Y. J.; FANG, M. J.; ZHANG, Y. J.; ZHENG, Z. H.; ZHAO, Y. F.; SU, W. J. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 51-57, 2002.
- WEBER, R. W. S.; KAPPE, R.; PAULULAT, T.; MOSKER, E.; ANKE, H. anti- candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**. V.68, p. 886-892, 2006.
- WEBSTER, J. Coprophilous fungi. **Transactions British Mycological Society**, v. 54, p. 161-180, 1970.
- WICKLOW, D. T. The coprophilous fungal community: a mycological system for examining ecological ideas. In: WICKLOW, D. T.; CARROLL, G. C. (Ed.). **The**

**fungal community:** its organization and role in the ecosystem. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 47-76, 351-385.

WIJERATNE EMK, PARANAGAMA PA, MARRON MT, GUNATILAKA MK, ARNOLD AE, GUNATILAKA AAL. Sesquiterpene quinines and related metabolites from *Phyllosticta spinarum*, a fungal strain endophytic in *Platyclusus orientalis* of the Sonoran desert. **Journal of Natural Products**, v. 71, p.218-222, 2008.

XIA, X-K, LIU, F.; SHE, Z-G.; YANG, L-G.; LI, M-F., VRIJMOED, L. L. P.; LINA, Y-C. 1H and 13C NMR assignments for 6-demethylvermistatin and two penicillide derivatives from the mangrove fungus *Guignardia* sp. (No. 4382) from the South China Sea. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 693-696, 2008.

XIA, X-K.; HUANGA, H-R.; SHE, Z-G.; CAIB, J-W.; LANA, L.; ZHANGC, J-Y.; FUC, L-W.; VRIJMOEDD, L. L. P.; LIN, Y-C. Structural and Biological Properties of Vermistatin and Two New Vermistatin Derivatives Isolated from the Marine-Mangrove Endophytic Fungus *Guignardia* sp. No. 4382. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, p.1925-1931, 2007.

YANG, J.; XU, F.; HUANG, C.; Li, J.; SHE, Z.; PEI, Z.; LIN, Y. Metabolites from the Mangrove Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. (#zs u-H76). **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, p. 3692-3695, 2010.

YU, B-Z.; ZHANG, G-H.; DU, Z-Z.; ZHENG, Y-T.; XU, J-C.; LUO, X-D. A Phomoeuphorbins A–D, azaphilones from the fungus *Phomopsis euphorbiae*. **Phytochemistry**, v.69, p. 2523-2526, 2008.

YUN-MEI BI, XU-BIN BI, FANG A.; ZHAO, Q.-R. Metabolites from the Fungus *Cephalosporium* sp. AL031. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p.,267-269, 2007.

ZERINGUE JR, H. J.; SHIH, B. Y. .; MASKOS, K.; GRIMM, D. Identification of the bright-greenish-yellow-fluorescence (BGYF) compound on cotton lint associated with aflatoxin contamination in cottonseed. **Phytochemistry**, v. 52 p. 1391-1397, 1999.

ZHANG, Y.; MING LI, X.; WANG, C. Y.; WANG, B. G. A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 951-953, 2007.