

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**“METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS *Penicillium* sp  
E *Fusarium moniliforme* ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE  
*Melia azedarach* (MELIACEAE)”**

**REGINA MARIA GERIS DOS SANTOS\***

**\* BOLSISTA FAPESP**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS *Penicillium* sp  
E *Fusarium moniliforme* ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE  
*Melia azedarach* (MELIACEAE)”**

**REGINA MARIA GERIS DOS SANTOS\***

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS**, área de concentração: **QUÍMICA ORGÂNICA**.

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\* Bolsista FAPESP**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2003**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

S237ms

Santos, Regina Maria Geris dos.

Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae) / Regina Maria Geris dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

432 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Fungo. 2. Fungos endofíticos. 3. *Melia azedarach*. 4. Meliaceae. 5. Interação planta - microrganismos. 6. Metabólitos secundários de fungos. I. Título.

CDD: 589.2 (20<sup>a</sup>)

*Primeiramente eu agradeço a Deus pela mais inacreditável aventura que é a vida.*

*“Àquele que pela virtude que opera em nós, pode fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou entendemos, a Ele seja dada a glória” (Efésios 3, 20).*

*Aos meus pais, Ademir e Yvone, por serem atenciosos oferecendo sua completa compreensão, amor e suporte.*

*A toda a minha família, especialmente aos meus sobrinhos, Gabriela, Isabela, João Marcos e Bianca, pelo carinho.*

*Eu dedico este trabalho*

*Ao Malta, por sempre estar ao meu lado e sua dedicação de todos os dias*

*“O amor se manifesta através de gestos realizados no dia a dia...”*

## ***Menção Especial***

*Ao professor **Dr. Edson Rodrigues Filho** não apenas pela orientação prestada durante a realização deste trabalho, mas pelo suporte, amizade, respeito e por estar constantemente presente em todos esses anos de convivência. O meu eterno reconhecimento.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Aos professores do Depto de Química pelo convívio, amizade e ensinamentos.*

*Aos meus colegas do laboratório de Produtos Naturais, pela convivência alegre durante todo o período de trabalho.*

*Ao pessoal do LaBioMi (Lucília, Murgu, Grace, Péricles, Cebolinha, Rodrigo, Ana Paula, Francinete, Ângela, Michele, Denise, Tharcila, Andrei, Afonso, Antônia, Gezimar, Fernando, Bianca e Paschoalino). Obrigada do fundo do meu coração pelo companheirismo, amizade, disposição e valiosas sugestões.*

*Ao corpo Técnico do Departamento de Química da UFSCar pelo apoio e serviços preciosos prestados durante a execução do trabalho.*

*Ao pessoal do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, em especial a Cris e a Luciana, pela execução dos espectros e amizade.*

*Ao pessoal de Maringá (Lucília, Prof. Dr. Benedito Prado e Marinete Martinez), pela valiosa colaboração cedendo as cepas para ensaios antimicrobianos.*

*A Professora Doutora Francisca Simas Teixeira pela valiosa colaboração na identificação dos fungos isolados.*

*Ao Professor Gulab por ceder os padrões de limonóides.*

*Ao Professor **Thomas James Simpson** pelo convite e pela oportunidade concedida de realizar o estágio em seu laboratório na Universidade de Bristol.*

*Ao Doutor Russel Cox e aos colegas Frank, Wanpen e Song pelo companheirismo e atenção durante a minha estada em Bristol.*

*Aos professores Ionizete e Heloísa e a técnica Carmeci, da Universidade Federal de Goiânia, pela execução dos ensaios larvicidas e também pela amizade conquistada durante o curto período de convivência.*

*Ao grupo do professor Odair Bueno, da UNESP – Rio Claro, pela execução dos ensaios inseticidas contra formigas.*

*As minhas amigas*

***Ana Paula, Francinete e Lisandra,***

*Quero ser um amigo que está sempre em seu caminho...  
...E quem tem amigos nunca está sozinho...*

*A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.*

*À Fapesp pela Bolsa concedida.*



## SUMÁRIO

|  | Páginas |
|--|---------|
| <b>Principais Abreviaturas</b>   | xiv     |
| <b>Principais Símbolos</b>   | xv      |
| <b>Resumo</b>  | xvi     |
| <b>Abstract</b>  | xviii   |
| <b>Apresentação</b>  | xx      |
| <b>Objetivos Gerais</b>  | xxi     |
| <br>   |         |
| <b>Capítulo 1: Estudo da Interação Planta-Fungo Envolvendo Metabólitos Secundários</b>           |         |
| 1. Generalidades   | 1       |
| 2. Biologia das Interações entre Fungos e Plantas  | 2       |
| 3. Interações de Plantas com Microrganismos Endofíticos  | 7       |
| 4. O envolvimento de Metabólitos Secundários na Interação Fungo-Planta                           | 11      |
| <br>   |         |
| <b>Capítulo 2: Isolamento de Microrganismos Endofíticos de <i>Melia azedarach</i></b>            |         |
| 1. Introdução  | 44      |
| 2. Objetivos   | 49      |
| 3. Parte Experimental  | 49      |
| 3.1. Materiais e Equipamentos  | 49      |
| 3.2. Fungos Endofíticos de <i>Melia azedarach</i>  | 50      |
| 3.3. Micoteca  | 52      |
| 4. Resultados e Discussão  | 53      |
| 4.1. Micoteca  | 53      |
| 4.2. Fungos Endofíticos Isolados de <i>Melia azedarach</i>                                       | 60      |
| 5. Conclusões  | 65      |
| <br>   |         |
| <b>Capítulo 3: Estudo Químico dos Fungos <i>Penicillium</i> sp e <i>Fusarium moniliforme</i></b> |         |
| 1. Introdução  | 67      |
| 2. Objetivos   | 72      |
| 3. Parte Experimental  | 73      |
| 3.1. Materiais   | 73      |
| 3.2. Elucidação Estrutural   | 73      |
| 3.3. Cultivo dos Fungos <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium</i> sp                      | 75      |
| 3.4. Estudo Químico de <i>Fusarium moniliforme</i>   | 78      |
| 3.5. Estudo Químico de <i>Penicillium</i> sp   | 80      |

|  |     |
|--|-----|
| 4. Resultados e Discussão  | 95  |
| 4.1. Substâncias Isoladas de <i>Fusarium moniliforme</i>                           | 95  |
| 4.1.1. Identificação dos Ciclopeptídeos <b>FM-1</b> e <b>FM-2</b>                  | 95  |
| 4.1.2. Identificação do Esteróide Peróxido de Ergosterol <b>FM-3</b>               | 105 |
| 4.2. Substâncias Isoladas de <i>Penicillium</i> sp                                 | 107 |
| 4.2.1. Identificação dos Polióis <b>PSP-15</b> e <b>PSP-8</b>                      | 108 |
| 4.2.2. Identificação do Alcalóide <b>PSP-5</b>                                     | 109 |
| 4.2.3. Identificação da Substância <b>PSP-7</b>                                    | 115 |
| 4.2.4. Identificação da Lignana <b>PSP-20</b>                                      | 118 |
| 4.2.5. Identificação do Nucleosídeo <b>PSP-14</b>                                  | 126 |
| 4.2.6. Identificação dos Meroterpenos  | 128 |
| 4.2.6.1. Identificação dos Meroterpenos <b>PSP-1</b> e <b>PSP-2</b>                | 128 |
| 4.2.6.2. Identificação dos Meroterpenos <b>PSP-11</b> e <b>PSP-17</b>              | 133 |
| 4.2.6.3. Identificação dos Meroterpenos <b>PSP-9</b> e <b>PSP-4</b>                | 138 |
| 4.2.6.4. Identificação dos Meroterpenos <b>PSP-19</b> e <b>PSP-13</b>              | 142 |
| 4.2.6.5. Identificação dos Meroterpenos <b>PSP-10</b> e <b>PSP-12</b>              | 148 |
| 4.2.6.6. Identificação dos Meroterpenos <b>PSP-3</b> , <b>PSP-6</b> e <b>PSP-8</b> | 154 |
| 5. Conclusões  | 162 |

## Capítulo 4: Estudos Biogénéticos dos Meroterpenos

|   |     |
|---|-----|
| 1. Introdução   | 164 |
| 1.1. Meroterpenos   | 164 |
| 1.1.1. Aspectos Gerais  | 164 |
| 1.1.2. Biossíntese dos Meroterpenos Derivados do Farnesil Pirofosfato e 3,5-Dimetilorselinato | 168 |
| 1.2. Meroterpenos e sua Relação com Policetídeos  | 181 |
| 1.3. Policetídeos   | 183 |
| 2. Objetivos  | 187 |
| 3. Parte Experimental   | 188 |
| 3.1. Reagentes  | 188 |
| 3.2. Materiais e Equipamentos   | 188 |
| 3.3. Microrganismos e Meios de Cultivo  | 189 |
| 3.4. Extração do gDNA Fúngico   | 189 |
| 3.5. Fragmentos de gDNA de <i>Penicillium</i> sp  | 191 |
| 4. Resultados   | 195 |
| 4.1. DNA Genômico Fúngico   | 195 |
| 4.2. Produtos de PCR  | 195 |
| 4.3. Alinhamento e Análise Filogenética   | 207 |
| 5. Discussão  | 212 |
| 5.1. Genes PKS  | 212 |
| 5.2. Genes CMeT   | 213 |
| 6. Propostas Biossintéticas   | 213 |
| 7. Conclusões   | 218 |

## **Capítulo 5: Metabolismo Secundário do Fungo *Penicillium* sp na Presença de Substratos Exógenos**

|   |     |
|---|-----|
| 1. Introdução   | 220 |
| 2. Objetivos  | 221 |
| 3. Parte Experimental                                   | 222 |
| 3.1. Reagentes e Equipamentos                           | 222 |
| 3.2. Cultivo e Obtenção dos Extratos                    | 222 |
| 3.3. Análises dos Extratos do Experimento I             | 226 |
| 3.4. Análises dos Extratos do Experimento III           | 228 |
| 4. Resultados e Discussão                               | 234 |
| 4.1. Experimentos com o Ácido Cinâmico e Ácido Ferúlico | 234 |
| 4.2. Experimentos com a Flavona                         | 235 |
| 4.3. Experimentos com os Limonóides e Triterpenos       | 235 |
| 4.3.1. Identificação do Metabólito <b>B-1</b>           | 236 |
| 4.3.1. Identificação do Metabólito <b>B-3</b>           | 238 |
| 4.3.1. Identificação do Metabólito <b>B-2</b>           | 241 |
| 5. Conclusões   | 243 |

## **Capítulo 6: Análise de Substâncias de *Penicillium* sp e *Melia azedarach* por Espectrometria de Massas**

|  |     |
|--|-----|
| 1. Introdução  | 244 |
| 2. Objetivos   | 245 |
| 3. Parte Experimental  | 245 |
| 3.1. Reagentes e Equipamentos  | 245 |
| 3.2. Derivatização das Amostras  | 247 |
| 3.3. Experimentos de GC/MS   | 248 |
| 3.3.1. Análise das Frações Apolares de <i>Penicillium</i> sp                         | 248 |
| 3.3.2. Estudo do Perfil Químico de <i>Penicillium</i> sp sobre Diferentes Substratos | 250 |
| 3.4. Experimentos de LC/MS   | 252 |
| 3.4.1. Estudo dos Meroterpenos e outros Metabólitos de <i>Penicillium</i> sp         | 252 |
| 3.4.2. Estudo dos Limonóides nos extratos de <i>Melia azedarach</i>                  | 255 |
| 4. Resultados e Discussão  | 257 |
| 4.1. Experimentos de GC/MS   | 257 |
| 4.1.1. Análise das Frações Apolares de <i>Penicillium</i> sp                         | 257 |
| 4.1.2. Estudo do Perfil Químico de <i>Penicillium</i> sp sobre Diferentes Substratos | 266 |
| 4.2. Experimentos de LC/MS   | 271 |
| 4.2.1. Estudo dos Meroterpenos e outros Metabólitos de <i>Penicillium</i> sp         | 271 |
| 4.2.2. Estudo dos Limonóides nos extratos de <i>Melia azedarach</i>                  | 283 |
| 5. Conclusões  | 292 |

## **Capítulo 7: Atividade Biológica das Frações e Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme***

|  |     |
|--|-----|
| 1. Introdução  | 293 |
| 2. Objetivos   | 293 |
| 3. Parte Experimental  | 294 |
| 3.1. Materiais e Reagentes                                   | 294 |
| 3.2. Teste antibacteriano                                    | 295 |
| 3.3. Teste Inseticida contra <i>Aedes aegyptii</i>           | 298 |
| 3.4. Teste Inseticida contra <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | 299 |
| 4. Resultados e Discussão                                    | 301 |
| 4.1. Atividade Antibacteriana                                | 301 |
| 4.2. Teste Inseticida contra <i>Aedes aegyptii</i>           | 303 |
| 4.3. Teste Inseticida contra <i>Atta sexdens rubropilosa</i> | 305 |
| 5. Conclusões  | 309 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Considerações Finais e Perspectivas</b> | 311 |
|--|-----|

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| <b>Referências Bibliográficas</b> | 314 |
|-----------------------------------|-----|

### **Apêndices**

|   |     |
|---|-----|
| Apêndice 1: Espectros das Substâncias Isoladas de <i>Fusarium moniliforme</i> | 339 |
| Apêndice 2: Espectros das Substâncias Isoladas de <i>Penicillium</i> sp       | 348 |
| Apêndice 3: Dados Espectrais das Substâncias Isoladas no Capítulo 5           | 425 |

## PRINCIPAIS ABREVIACÕES<sup>1</sup>

|       |   |   |
|-------|---|---|
| Ac    | - | Acetato   |
| ACN   | - | Acetonitrila  |
| AcOEt | - | Acetato de etila                                    |
| BDA   | - | Batata Dextrose Ágar                                |
| CC    | - | Cromatografia em Coluna                             |
| CCD   | - | Cromatografia em Camada Delgada                     |
| CCDP  | - | Cromatografia em Camada Delgada Preparativa         |
| GC/MS | - | Gas Chromatography Mass Spectrometry                |
| HPLC  | - | High Performance Liquid Chromatography              |
| COSY  | - | Correlation Spectroscopy                            |
| d     | - | Dubleto   |
| dd    | - | Duplo-dubleto                                       |
| dt    | - | Duplo-triplete                                      |
| dl    | - | Dubleto largo                                       |
| DEPT  | - | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| LC/MS | - | Liquid Chromatography Mass Spectrometry             |
| MS    | - | Mass Spectrometry                                   |
| HMBC  | - | Heteronuclear Multiple Bond Correlation             |
| HSQC  | - | Heteronuclear Single Quantum Coherence              |
| Hz    | - | Hertz   |
| IV    | - | Infravermelho                                       |
| J     | - | Constante de Acoplamento (em Hertz)                 |
| L     | - | Litro   |
| l     | - | Comprimento   |
| m     | - | Multiplete  |
| mA    | - | Mili-Ampere   |
| Me    | - | Metila  |
| mg    | - | Miligrama   |
| MHz   | - | Mega-Hertz  |

---

<sup>1</sup> Algumas abreviações foram mantidas em inglês por já estarem estabelecidas na literatura e entre pesquisadores.

|                     |   |   |
|---------------------|---|---|
| mL                  | - | $10^{-3}$ L   |
| min                 | - | Minuto  |
| <i>m/z</i>          | - | Relação massa/carga   |
| NOE                 | - | Nuclear Overhouser Effect   |
| gNOESY              | - | Nuclear Overhouser Effect Spectroscopy                                    |
| PENDANT             | - | Polarization Enhancement that is Nurtured During Attached Nucleus Testing |
| pf                  | - | Ponto de Fusão  |
| ppm                 | - | Partes por Milhão   |
| q                   | - | Quarteto  |
| Ref                 | - | Referência  |
| RMN $^1\text{H}$    | - | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1                             |
| RMN $^{13}\text{C}$ | - | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13                               |
| rpm                 | - | Rotações por Minuto   |
| s                   | - | Singleto  |
| sl                  | - | Singleto largo  |
| sp                  | - | Espécie   |
| $t_R$               | - | Tempo de Retenção   |
| t                   | - | Tripleto  |
| td                  | - | Triplo-dublete  |
| UV                  | - | Ultravioleta  |
| V                   | - | Voltz   |

## PRINCIPAIS SÍMBOLOS

|              |   |   |
|--------------|---|---|
| $M^+$        | - | Pico do íon molecular                     |
| $\delta$     | - | Deslocamento químico em partes por milhão |
| $[\alpha]_D$ | - | Rotação óptica específica                 |
| $\phi$       | - | Diâmetro                                  |
| $\lambda$    | - | Comprimento de onda                       |

## RESUMO

“METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS *Penicillium* sp E *Fusarium moniliforme* ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE *Melia azedarach* (MELIACEAE)” –Dos tecidos sadios de *M. azedarach* foram obtidos 59 isolados de fungos endofíticos, representando oito gêneros (um Ascomycetes, um Basidiomycetes e seis Hyphomycetes), sendo *Aspergillus* e *Penicillium* os mais encontrados neste estudo. Os extratos de dois fungos, *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* foram investigados quimicamente. Essa investigação resultou no isolamento de 34 compostos. Três deles foram obtidos de *F. moniliforme*: dois depsidipeptídeos (bassiatina e um novo produto natural) e o peróxido de ergosterol. Dos extratos de *Penicillium* sp foram isolados 10 meroterpenos de estruturas inéditas (preaustinóide A, preaustinóide B, preaustinóide A2, preaustinóide A1, austinolídeo, preaustinóide B1, iso-austinona, austinoneol, preaustinóide B2 e preaustinóide A3), três já descritos na literatura (acetoxidehidroaustina, dehidroaustina e neoaustina) e dois meroterpenos em identificação. Também foram isoladas cinco lignanas (duas foram identificadas como novos produtos naturais), seis alcalóides (três identificados como verruculogenina, TR-2 e seu isômero), duas lactonas (ácido penicílico e ácido desidropenicílico), um nucleosídeo (uridina) e dois polióis (eritritol e manitol). Alguns extratos e frações desses dois microrganismos foram submetidos a ensaios biológicos (antibacteriano e inseticida) e o meroterpeno dehidroaustina destacou-se por sua atividade contra as larvas do mosquito *Aedes aegyptii*. Outros estudos paralelos foram realizados com o fungo *Penicillium* sp, como o desenvolvimento de metodologias de análises por técnicas hífenadas a espectrometria de massas para a análise dos extratos oriundos do cultivo para averiguação da produção dos metabólitos secundários frente a um determinado substrato. Os métodos utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas permitiram a identificação dos meroterpenos utilizados como padrões, bem como os metabólitos verruculogenina, uridina e a lignana nos extratos desse microrganismo cultivado em arroz e milho. Adicionalmente foi realizado o estudo dos limonóides nos extratos a partir dos tecidos de *M. azedarach* por estas metodologias, com o objetivo de comparar o perfil metabólico dos dois organismos associados. As análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas permitiram a identificação dos constituintes apolares do fungo cultivado na presença de diferentes substratos. Os estudos biogenéticos envolvendo biologia molecular dos meroterpenos foram realizados com o tetracetídeo precursor, o ácido 3,5-dimetilorselínico. Como resultado, foram encontrados três genes relacionados a policetídeos não reduzidos, parcialmente reduzidos e totalmente modificados e um gene que expressa a produção das enzimas C-metiltransferases, sugerindo uma possível relação desses genes na produção de meroterpenos, a qual dever ser constatada através da continuidade deste trabalho, agora envolvendo ambos os precursores policetídeo e terpenoídico dessa classe de substâncias.



## ABSTRACT

“SECONDARY METABOLISM FROM THE FUNGI *Penicillium* sp AND *Fusarium moniliforme* FOUND AS ENDOPHYTIC OF *Melia azedarach* (MELIACEAE)” – From healthy tissues of *M. azedarach*, 59 isolates of endophytic fungi were obtained, representing eight genera (one Ascomycetes, one Basidiomycetes and six Hyphomycetes). Genera *Aspergillus* and *Penicillium* were the most found in this present study. Extracts of two fungal strains, *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* were investigated chemically. This investigation resulted in the isolation of 34 pure compounds. Three were obtained from *F. moniliforme*: two depsidipeptides (bassiatin and a new natural product) and the ergosterol peroxide. From the *Penicillium* sp were isolated 10 novel meroterpenes (preaustinoid A, preaustinoid B, preaustinoid A2, preaustinoid A1, austinolide, preaustinoid B1, isoaustinone, austinoneol, preaustinoid B2, and preaustinoid A3), three known meroterpenes (acetoxydehydroaustin, dehydroaustin, and neoaustin). The other two meroterpenes are still to be identified. In addition, it has been found five lignans compounds (two were identified as novel natural products), six alkaloids (three of them identified as verruculogen, Tr-2 and its isomer), two lactones derivatives (penicillic acid and dehidropenicillic acid), one nucleoside (uridine) and two poliols (eritritol and mannitol). Some extracts and fractions from these two microorganisms were submitted to biological assays (antibacterial and insecticidal). The meroterpene dehydroaustin showed a great insecticidal activity against the mosquito *Aedes aegyptii*. An analytical strategy, based on liquid-chromatography-mass spectrometry hyphenation was established for the comparison of the secondary metabolites composition of the host plant and the fungus *Penicillium* sp. This methodology had the meroterpenes and limonoids from *M. azedarach* as targets in order to compare the metabolism between these two associated organisms. Liquid chromatography-mass spectrometry methodology allowed the standard meroterpenes identification in the extracts derived from this microorganism cultivated on rice and maize, as well as, other metabolites, verruculogen, uridine and a new lignan. Gas chromatography-mass spectrometry analysis supplied the apolar constituents' identification of the fungus on distinct substrates. Biogenetics studies involving molecular biology related to meroterpenes

were carried out using the tetraketide precursor – 3,5 dimethyl orsellinic acid. As a result of this, were found three related genes to polyketides (non-reduced, partially reduced, and highly modified) and C-methyltransferase gene. It suggests a relationship between these genes and the meroterpenoid production. Further studies should be carried out in order to investigate this relation.

## APRESENTAÇÃO

O projeto de doutorado envolveu uma série de assuntos e como conseqüência desta diversidade a tese encontra-se dividida em sete capítulos, os quais descrevem alguns aspectos da pesquisa com microrganismos associados a *Melia azedarach*. O capítulo 1, basicamente a introdução da tese, descreve a interação planta-fungo e o envolvimento dos metabólitos secundários nestas interações. A diversidade fúngica encontrada na planta estudada (*M. azedarach*) é explorada no capítulo 2. A ênfase nos estudos químicos de isolamento e identificação dos metabólitos secundários dos fungos estudados foi dada no capítulo 3, apresentando uma variedade de classes químicas de substâncias, bem como propostas biogênicas para as mesmas. Entretanto, a biossíntese dos meroterpenos foi discutida mais intensamente e, portanto, encontra-se no capítulo 4. Alguns experimentos de adição de substratos exógenos foram realizados e são discutidos no capítulo 5. No capítulo 6 encontram-se os estudos envolvendo metodologias de análise de substâncias sem a necessidade de seu isolamento por técnicas de GC/MS e LC/MS. A atividade biológica de extratos, frações e substâncias puras é apresentada no capítulo 7. Em seguida encontram-se as considerações finais e as perspectivas deste trabalho e as referências bibliográficas consultadas para a execução do mesmo. Os espectros obtidos para os metabólitos estudados são mostrados nos Apêndices 01, 02 e 03.

## OBJETIVOS GERAIS

Os principais objetivos deste projeto de pesquisa foram:

- O estudo da relação de fungos com alguns metabólitos (produção de metabólitos característicos dos fungos e das plantas estudadas, biotransformações, atividade biológica, estudos genéticos), utilizando fungos que se desenvolvem nos tecidos internos de *Melia azedarach* (*Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme*).
- O desenvolvimento e a aplicação das metodologias já conhecidas para análise dos metabólitos secundários (limonóides, triterpenos, e outros), utilizando para isso técnicas de separação (HPLC) acopladas à espectrometria de massas, com as formas de ionização APCI e *electrospray*, além do recurso *tandem*, bem como o emprego de GC/MS para a análise de frações apolares.
- O estudo, utilizando estas metodologias, da composição química dos extratos obtidos das várias partes de *Melia azedarach* e de *Penicillium* sp.



# CAPÍTULO 1: ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO ENVOLVENDO METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

## 1 - Generalidades

A busca de substâncias de uso prático para o homem na natureza é uma das mais antigas atividades da nossa civilização. No Brasil, as plantas têm sido os organismos vivos mais investigados como fonte de produtos naturais (BRÁS-F<sup>o</sup>, 1994). No entanto, os microrganismos, organismos marinhos, pequenos insetos e animais também têm se mostrado uma fonte rica de substâncias para a humanidade (SCHEUR, 1978; NATORI *et al.*, 1981). Como o Brasil ocupa destaque na biodiversidade de plantas e animais, é de se esperar que ocorra uma alta diversidade de bactérias e fungos e, como consequência, uma fonte versátil de substâncias pode ser encontrada.

No caso de substâncias quirais e de estruturas moleculares complexas, a obtenção das mesmas por meio de fontes naturais é uma grande vantagem em relação à via sintética *in vitro*, onde os baixos rendimentos podem inviabilizar sua produção. Por outro lado, uma característica dessas substâncias é que elas, em geral, são produzidas em baixas concentrações nas fontes naturais (HARBORNE e TOMAS-BARBERAN, 1991). Esse obstáculo vem sendo elegantemente abordado por muitos pesquisadores que tem investido em estudos visando maneiras de melhorar o rendimento e o acesso a vários produtos naturais utilizando cultura de células e modificações genéticas (VERPOORTE *et al.*, 1999).

A grande maioria dessas substâncias é classificada como metabólitos secundários para diferenciá-las daquelas de função primária básica para os organismos vivos. Os metabólitos primários são em geral macromoleculares, possuem as mesmas funções e são amplamente produzidos pelos seres vivos independentemente da sua classificação taxonômica (HARBORNE e TOMAS-BARBERAN, 1991). Ao contrário, os metabólitos secundários geralmente são micromoleculares, não apresentam funções básicas aparentes, e sua produção depende do tipo de organismo e de sua espécie (NOSOV, 1994).

O estudo dos fatores motivadores da biossíntese é também uma maneira que pode ser utilizada para maximizar o rendimento de produtos naturais (YEOMAN e YEOMAN, 1996). A indução de rotas biossintéticas específicas tem sido possível em alguns casos utilizando esses fatores que podem ser de origem biótica ou abiótica. Muitos metabólitos secundários acumulados pelas plantas são induzidos por microrganismos fitopatogênicos e são denominados de fitoalexinas (BAILEY e MANSFIELD, 1982; PAXTON, 1981; DESJARDINS *et al.*, 1989).

Mais recentemente, o estudo das interações entre plantas e microrganismos tem revelado novos caminhos para a obtenção de produtos naturais. Entre essas interações, as associações entre plantas e microrganismos endofíticos parecem ocorrer em um nível de intimidade bioquímica surpreendente. Possivelmente durante o desenvolvimento das mesmas, os organismos associados adquirem potencial genético para biossintetizar as mesmas classes de substâncias.

## **2 - Biologia das Interações entre Fungos e Plantas**

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies incapazes de conseguir por si próprias os seus meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predatórias. Entre os microrganismos (vírus, bactérias e fungos) os fungos são aqueles que se encontram mais freqüentemente associados às plantas (ZOBERI, 1972). Ao contrário das plantas, os fungos, segundo maior grupo de organismos no mundo após os insetos (HAWKSWORTH, 1991), e pertencentes ao reino *Fungi*, não produzem clorofila (são heterotróficos) e sua parede celular é constituída de quitina ao invés de celulose (WEBSTER, 1989) (Figura 1.1). Assim, a sobrevivência dos fungos é dependente do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente com as plantas.

Em geral, essas associações podem ser parasitárias ou simbióticas (ZOBERI, 1972; MAYER, 1989). No caso das associações parasitárias, o parasita (fungo) vive sobre ou dentro de outro organismo (planta), obtendo deste o alimento necessário para seu crescimento e desenvolvimento (AGRIOS, 1988) sendo que, quase sempre, o metabolismo do fungo é prejudicial à planta ou pelo consumo dos seus

elementos vitais (minerais, hormônios, proteínas, carboidratos, etc.) ou pela biossíntese de metabólitos tóxicos à planta (fitotoxinas). Assim, o parasitismo está intimamente relacionado com a patogenicidade, que seria a habilidade do parasita (patógeno) de interferir em uma ou mais funções essenciais da planta causando-lhe doenças que podem eventualmente levá-la à morte (AGRIOS, 1988).

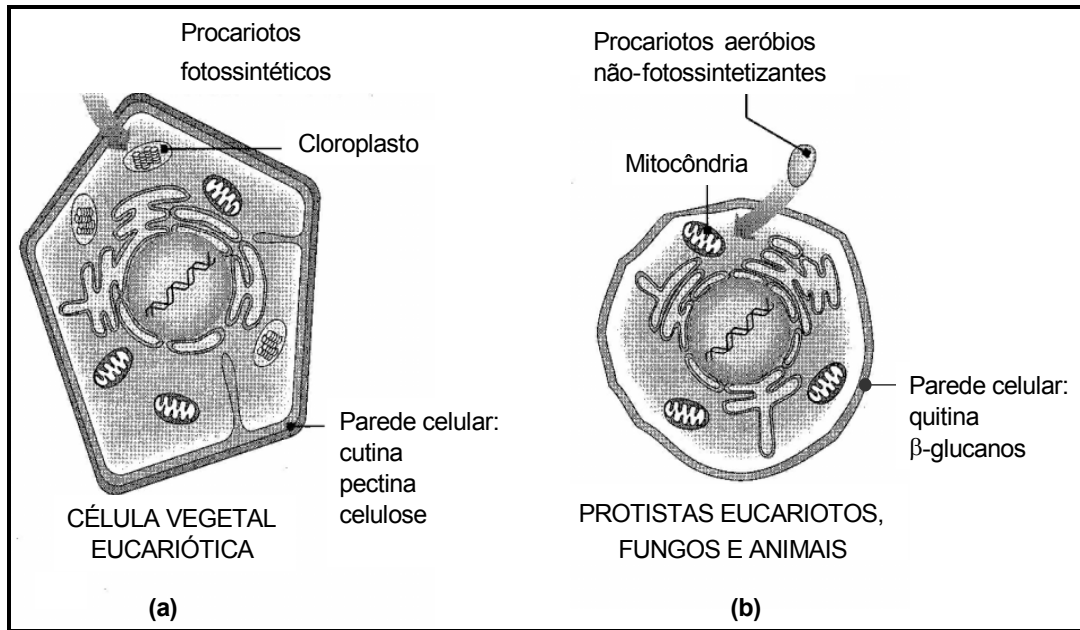


FIGURA 1.1 – Representação esquemática da estrutura e composição da parede celular: a) da planta; e b) do fungo. Adaptado de PELCZAR *et al.*, 1996.

No caso da associação simbiótica, entende-se que a “convivência” entre fungos e plantas no nível molecular é pacífica uma vez que os dois seres vivos sobrevivem à associação assintomaticamente. Os líquens são exemplos das associações simbióticas entre Ascomicetos (e poucos Basidiomicetos) e algas verdes e/ou cianobactérias (AHMADJIAN, 1993 citado por SELOSSE e TACON, 1998). O fungo obtém alimento de seus parceiros fotossintetizantes cercandoo-os com suas hifas, como também através da penetração direta em suas células, ao passo que as algas são protegidas pelo estroma fúngico, tolerando situações inconvenientes (SELOSSE e TACON, 1998). Um líquen é morfológica e fisiologicamente diferente de qualquer um dos dois organismos isoladamente (HAVEN *et al.*, 1992). Eles crescem sobre rochas,



cascas de árvores e em outros substratos normalmente impróprios ao desenvolvimento da planta. Muitos líquens podem crescer nas baixas temperaturas existentes nas elevadas altitudes e nos ambientes polares (PELCZAR, 1996). A habilidade do líquen de sobreviver sob condições adversas está relacionada à sua capacidade em suportar dessecação e permanecer em estado de dormência enquanto seco.

Um outro exemplo de interação simbiótica são as chamadas micorrizas (Figura 1.2), as quais correspondem às associações entre raízes de plantas e fungos ou bactérias, caracterizando-se pela ocorrência em quase todas as famílias de plantas. Elas podem ser de dois tipos: endomicorrizas e ectomicorriza (HAVEN *et al.*, 1992). As endomicorrizas, nas quais os fungos geralmente encontram-se classificados como zigomicetos, ocorrem em cerca de 80 % de todos os tipos de plantas vasculares. Em tais associações, o fungo penetra nas células corticais do hospedeiro (HAVEN *et al.*, 1992), onde forma arbúsculos ou rolos (espirais) (Figura 1.2) (SMITH e READ, 1997, citado por SELOSSE e TACON, 1998). No caso das ectomicorrizas, o fungo não penetra nas células do hospedeiro, mas forma uma camada feltrosa sobre suas raízes e uma rede ao redor das células corticais (HAVEN *et al.*, 1992).

As associações micorrízicas são importantes para a planta em termos de obtenção de fósforo e outros nutrientes, através das hifas que aumentam a área de superfície de absorção de nutrientes e minerais das raízes. Em outros casos, estas associações podem também proteger as raízes do ataque de patógenos. O fungo é beneficiado pelo fornecimento de carbono orgânico (AGRIOS, 1988). Talvez essas associações sejam as simbioses mais perfeitamente estabelecidas.

Embora o mecanismo do estabelecimento das associações, desde o primeiro contato do microrganismo com a planta até as conseqüências finais para os dois organismos, vem sendo extensivamente estudado em muitos casos, principalmente àqueles envolvendo fitopatógenos (AGRIOS, 1988; ARORA *et al.*, 1992; PASCHOLATI, 1998), o interesse pelas associações mutualistas tem crescido devido à importância já demonstrada das micorrizas e, mais recentemente, pelos aspectos envolvendo metabólitos secundários úteis na medicina humana.

Evidências sugerem que as associações mutualísticas podem ter sido responsáveis pelo início da colonização do planeta por plantas, conduzindo, portanto, a hipótese de que tais plantas são produtos de uma associação entre algas verdes e

fungos (HAWKSWORTH, 1991). Em um ambiente terrestre pobre em nutrientes e exposto a rigores climáticos, as associações simbióticas mutualísticas teriam sido uma estratégia de sobrevivência bem sucedida (BLACKWELL, 2000). Um bom exemplo foi o isolamento de esporos e hifas de fungos fossilizados com idade de 460 milhões de anos comprovando a coexistência de fungos potencialmente mutualistas em briófitas (REDECKER *et al.*, 2000). Além disso, os fungos tiveram um papel relevante no aparecimento subsequente de outros grupos de plantas, através do desenvolvimento do mutualismo, especialmente as plantas vasculares. Esta adaptação à vida terrestre é resultante da troca de materiais genéticos durante a simbiose, contendo características complementares e diferentes criando então novas entidades com novas habilidades (SELOSSE e TACON, 1998). Como exemplo, podemos citar a influência de plantas com fungos endofíticos na qual, a interação simbiótica apresentou-se como uma vantagem competitiva, contra herbívoros e pragas de insetos (HAWKSWORTH, 1991).

Hoje em dia, as associações íntimas continuam a ser importantes na evolução e a repercussão desse estado co-evolucionário envolvendo fungos, é impressionante. Esses organismos mutualistas são especialmente importantes nesta conexão e, realmente, está se tornando evidente que dentro de um contexto evolucionário, uma planta (ou inseto) não deveria ser visto como um único organismo, mas como uma associação mutualista incluindo os seus habitantes como, por exemplo, os fungos endofíticos e os fungos micorrízicos (ou endosimbiontes intestinais) (HAWKSWORTH, 1991).

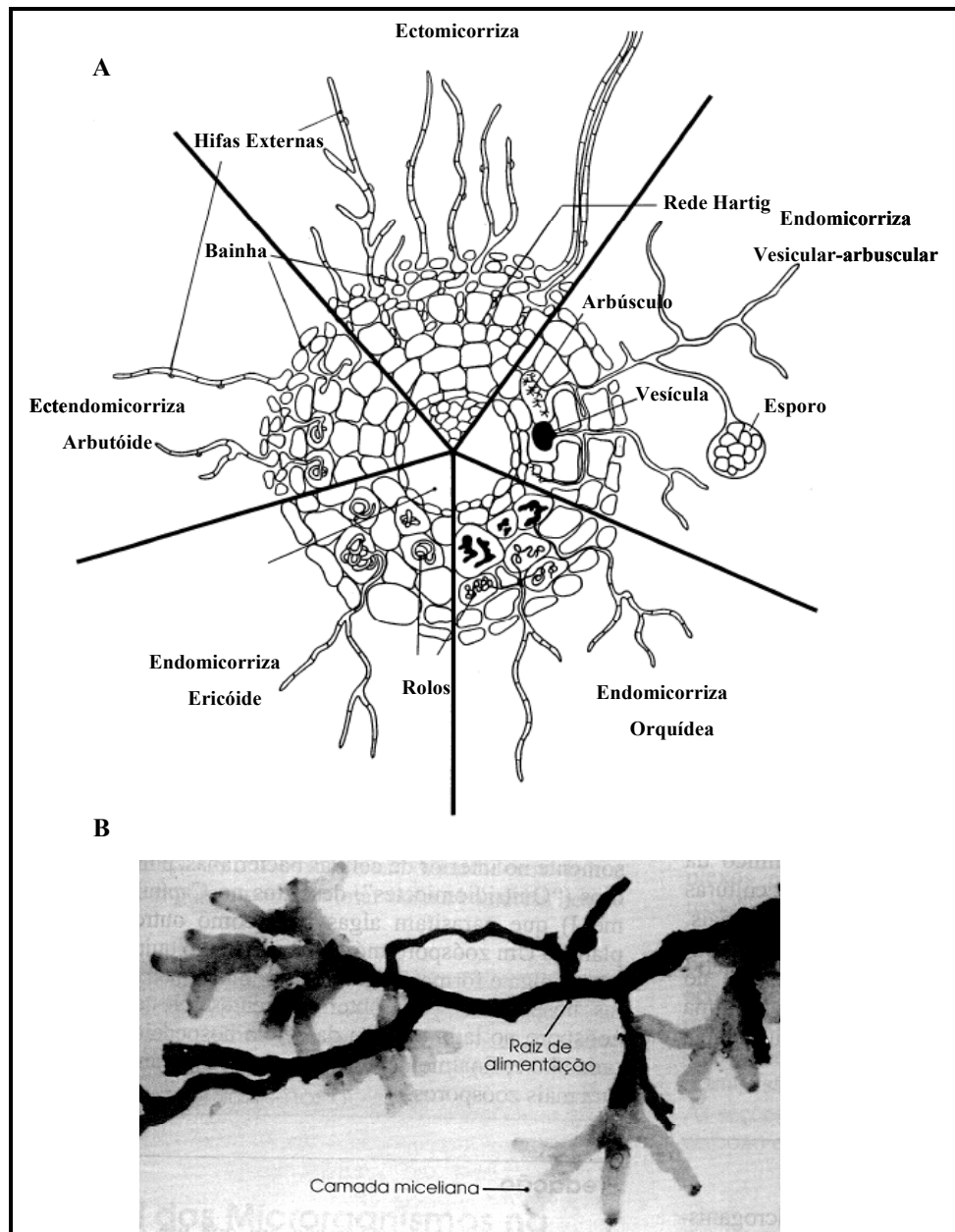


FIGURA 1.2 – (A) Associações Endomicorrízicas: O fungo cresce intercelularmente e forma vesículas e arbúsculos intracelulares. Adaptado de SELOSSE e TACON, 1998; (B) Exemplo de Ectomicorriza: uma associação de um fungo com raiz de planta, na qual o fungo desenvolve uma camada de micélio (áreas brancas) nas extremidades das raízes alimentadoras do pinheiro de folhas curtas. Adaptado de PELCZAR *et al*, 1996.

### 3 - Interações de Plantas com Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos fitopatogênicos recebem grande atenção de pesquisadores de várias áreas devido à sua importância, principalmente na agricultura, por causar enormes prejuízos anuais, muitas vezes destruindo plantações inteiras (RIBEIRO do VALE e ZAMBOLIM, 1996). Mais recentemente, o estudo de fitopatógenos e seus mecanismos de ação vêm destacando os microrganismos endofíticos como importantes em vários setores (PETRINI, 1996) e, sua taxonomia, biologia e evolução têm sido intensamente revisadas e discutidas por diversos pesquisadores (PETRINI *et al.*, 1992; PETRINI, 1996; SCHULZ *et al.*, 1998).

O estudo dos fungos endofíticos foi intensificado nos últimos 25 anos, conseqüente de um aumento no interesse nos endofíticos de gramíneas em países de clima temperado (TAYLOR *et al.*, 1999). Mais recentemente, o estudo de endofíticos de hospedeiros tropicais, incluindo as palmas, vem sendo destacado (TAYLOR *et al.*, 1999). Além disso, essa atenção aos endofíticos deve ser possivelmente por eles terem desenvolvido uma associação biológica muito íntima com os seus hospedeiros, compreendendo os patógenos, comensais e mutualistas (STROBEL, 2002).

Evidências baseadas na morfologia, química e relação com o hospedeiro sugerem que os fungos no estágio não patogênico possam ter evoluído de um ancestral similar aos fungos no estágio patogênico nas plantas (CLAY, 1988). Estudos taxonômicos dão suporte a essa relação na qual os endofíticos são ditos como espécies ‘irmãs’ dos patógenos virulentos sobre o mesmo hospedeiro ou hospedeiros intimamente relacionados. Como exemplo, *Acremonium coenophialum*, um importante endofítico do gramado, é intimamente relacionado a *Epichlõe typhina*, um patógeno (CARROLL, 1988) por apresentar semelhança com o estágio assexual e, conseqüentemente, colocado com a forma assexual de *E. typhina* na classe Deuteromycetes, baseado nas características de crescimento em cultura (CLAY, 1988). Além disso, os fungos não patogênicos sobre condições de estresse podem causar os mesmos sintomas que os patógenos desencadeiam (CARROLL, 1988).

Um outro exemplo dessa relação endofítico patogênico pode ser visto com *Fusarium moniliforme*, um patógeno não obrigatório do milho (BACON e HINTON, 1996). Em um experimento realizado por Bacon e Hinton (1996), foram

utilizados dois isolados de *F. moniliforme* para examinar a relação entre parasita-hospedeiro quanto à produção ou ausência dos sintomas da doença. Nas plantas assintomáticas foram encontrados os fungos durante as oito semanas do período experimental; já as plantas que apresentaram os sintomas da doença, morreram dentro de um período de 2-3 semanas. Durante todo o período de colonização do hospedeiro assintomático, não houve efeito aparente das hifas intercelulares sobre a integridade da estrutura celular do hospedeiro e de suas organelas, sugerindo que durante o estado assintomático não houve a produção de toxinas pelo fungo, as quais rompem a estrutura celular do hospedeiro e, que também não houve reações do hospedeiro indicativas de doenças, como por exemplo, a resposta hipersensitiva. Os dados deste estudo indicaram que a infecção nem sempre resulta em doença. A incapacidade de produzir a doença pode refletir em cada geração da planta, na detoxificação de fitoalexinas e (ou) uma interação desses fatores com adequadas condições ambientais. Assim, as infecções endofíticas com ausência de sintomas são referidas como dormente, latente, ou quiescente (BACON e HINTON, 1996).

Esforços vêm sendo feitos para distinguir infecção de plantas por microrganismos endofíticos mutualistas e patógenos latentes (SCHULZ *et al.*, 1999). Essa distinção é dificultada pela ausência de sintomas no hospedeiro durante a fase de estabelecimento de colônias e por dificuldades de encontrar metodologias de isolamento que permitam essa distinção. No entanto, alguns métodos histológicos e sorológicos foram utilizados de forma eficiente para a identificação de patógenos (SINCLAIR e CERKAUSKAS, 1996). O possível papel de tais estágios “latente” ou “endofítico” na história da interação de plantas com fungos, recebeu pouca atenção até recentemente, com respeito aos seus potenciais relevantes para explicar as estratégias de colonização e desenvolvimento das várias espécies fúngicas (CHAPELA, 1989).

Estrategicamente, o mutualismo endofítico apresenta dois modelos (CARROLL, 1988). O primeiro denominado de mutualismo constitutivo é representado pelos gramados e seus endofíticos, os quais são transportados através de sementes, resultando no desenvolvimento de uma infecção sistêmica através das partes aéreas das plantas envolvendo uma biomassa fúngica substancial. As toxinas fúngicas produzidas podem deter os herbívoros, os quais mostram uma preferência por plantas não infectadas, apresentando conseqüentemente, benefícios imediatos à planta

hospedeira. Os custos para a planta podem ser altos, envolvendo a energia para o metabolismo fúngico e, algumas vezes, a perda da função reprodutiva (CLAY, 1988). Já o mutualismo induzido envolve uma associação mais livre entre o endofítico e a planta (CARROLL, 1988). A abundância do endofítico pode variar muito com a distribuição geográfica e a idade do hospedeiro. Os fungos normalmente vivem em tecidos mais velhos ou em tecidos metabolicamente inativos, tais como o córtex e a epiderme, colonizando os tecidos vitais apenas quando o hospedeiro é cercado ou estressado por ataques de insetos ou patógenos. Os endofíticos não servem como um dissuasivo direto dos insetos, mas como uma fonte de inóculo dispersa. A infecção dos tecidos afetados resulta na morte ou decréscimo do desempenho do herbívoro levando a uma diminuição geral nos níveis de herbívoros sobre as populações das plantas hospedeiras. Em tais situações, os benefícios para o indivíduo hospedeiro são difusos e os custos metabólicos são provavelmente pequenos enquanto que para a população hospedeira esses benefícios podem ser altos (CARROLL, 1988).

Embora as associações simbióticas possam ser parasíticas, mutualísticas ou comensalistas, as bases genéticas destes diferentes estilos de vida permanecem enigmáticas (FREEMAN e RODRIGUEZ, 1996). Contudo, em um estudo para analisar a genética da especificidade do hospedeiro e patogênese do fungo, no qual plântulas de melancia foram expostas a um patógeno e ao seu mutante, foi observado que as plântulas expostas ao fungo patogênico expressaram necrose e morte dentro de sete dias após a inoculação, mas na plântula exposta ao mutante, não foram observados os efeitos detrimenais. Num primeiro momento, as duas linhagens produziram apressórios idênticos morfolologicamente e funcionalmente sobre a superfície da planta e dentro do tecido hospedeiro. Contudo, depois de um certo período de crescimento, houve uma inversão da relação entre o número de apressórios e micélio produzidos pelo mutante. Também não houve esporulação desse fungo nas plantas. Portanto, o fungo fitopatogênico pode ser modificado por mutação para crescer como um endofítico não patogênico (FREEMAN e RODRIGUEZ, 1996).

Os fungos ou bactérias endofíticas podem estar presentes em todos os órgãos de uma dada planta hospedeira (PETRINI *et al.*, 1992) e como muitas dessas associações envolvendo esses organismos e plantas mostraram-se benéficas para ambos, o termo endofítico tem sido utilizado muitas vezes como sinônimo de

mutualismo. Os endofíticos são isolados dos tecidos internos do hospedeiro após esterilização da superfície dos mesmos, seguido de incubação sobre uma variedade de meios para estimular o crescimento dos isolados (PETRINI *et al.*, 1992). No entanto, essa metodologia de isolamento não distingue os microrganismos fitopatogênicos, vivendo em estado de latência nos tecidos da planta, dos microrganismos mutualísticos. Por esse motivo, as definições de microrganismos endofíticos têm causado confusão na interpretação das conseqüências bioquímicas dessas interações. **Segundo PETRINI *et al.* (1992) "fungos endofíticos são aqueles que durante um período de suas vidas colonizam os tecidos internos de seus hospedeiros, sem lhes causar sintomas"**. Esta definição engloba as associações simbióticas mutualísticas e os patógenos em latência. Assim, conforme essa definição, um mutualista pode vir a se tornar patogênico se a planta não controlar seu desenvolvimento dentro dos seus tecidos (CHAPELA, 1989). Outros pesquisadores têm demonstrado que, da mesma maneira dos fitopatógenos, os fungos endofíticos quando reinoculados na planta hospedeira podem estimular a enzima fenil-alanina-amonialase (PAL) (PETERS *et al.*, 1998; REDMAN *et al.*, 1999), que é responsável em muitos casos pela biossíntese de fitoalexinas (YOSHIOKA *et al.*, 1992).

O estabelecimento de um fungo endofítico num dado órgão da planta hospedeira ocorre com um certo grau de especificidade relacionado às condições fisiológicas do hospedeiro, que provavelmente sofreu um processo de adaptação ao longo do tempo (SELOSSE e TACON, 1998). Os endofíticos podem infectar virtualmente 100% de uma população hospedeira, e podem ser transmitidos de uma geração a outra através do tecido da semente hospedeira ou propágulos vegetativos. Exceto nas gramíneas, a maioria dos endofíticos parecem ser transmitidos horizontalmente por esporos. O clima pode influenciar a germinação do esporo e a freqüência de infecção resultante nas plantas hospedeiras (CHAPELA, 1989) como, por exemplo, o aumento da umidade e chuva, facilitando a dispersão dos esporos, a germinação e o crescimento das hifas após as secas sazonais (SCHULTHESS e FAETH, 1998).

Em termos ecológicos, estudos citados por PETRINI *et al.* (1992) demonstram que vários endofíticos podem ser isolados de diferentes órgãos e tecidos

de uma mesma espécie de planta podendo chegar a centenas. No entanto, o número de endofíticos dominantes em uma espécie varia entre 1 e 10.

A patogênese de plantas hospedeira de fungos envolve a penetração do tecido hospedeiro, a compatibilidade patógeno/hospedeiro, a disseminação através do tecido hospedeiro, a indução dos sintomas da doença e a amplificação do patógeno por esporulação (AGRIOS, 1988; MAYER, 1989; JACKSON e TAYLOR, 1996; PASCHOLATI; *et al.*, 1998; PINHEIRO e *col.*, 1999). Fisiologicamente, os fungos endofíticos utilizam as mesmas armas de um patógeno para penetrar no hospedeiro. A planta, por sua vez, responde a esta invasão com suas armas de defesa e de reconhecimento, tornando as infecções endofíticas geralmente localizadas, ou seja, o fungo desenvolve-se no local da inoculação, atingindo raramente outras partes da planta (PETRINI *et al.*, 1992; PASCHOLATI; *et al.*, 1998) (Figura 1.3). No entanto, existem poucos estudos realizados sobre a fisiologia das interações planta-endofíticos referentes a métodos de penetração, produção de enzimas e fitohormônios (CARROLL e PETRINI, 1983; HOWARD *et al.*, 1991). Quanto à taxonomia, as espécies de endofíticos identificadas são pertencentes à classe dos *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*, *Basidiomycetes* e poucos *Oomycetes* (PETRINI *et al.*, 1992).

#### **4 - O Envolvimento de Metabólitos Secundários na Interação Fungo-Planta**

As plantas são capazes de responder de diversas maneiras ao ataque por microrganismos. As maneiras mais conhecidas são o estabelecimento de barreiras físicas (enrijecimento da parede celular com acúmulo de ligninas) e químicas (produção de fitoalexinas) (KEEN *et al.*, 1982; AGRIOS, 1988). A indução da biossíntese de fitoalexinas é uma das possíveis maneiras para promover o aumento da produção de metabólitos secundários em plantas (PAXTON, 1981; DESJARDINS *et al.*, 1989). Por sua vez, o microrganismo invasor pode degradar enzimaticamente essas barreiras, estabelecendo uma verdadeira “batalha” química (Figura 1.4), dificultando a identificação das fitoalexinas como metabólitos finais produzidos pelo hospedeiro



(SNYDER e NICHOLSON, 1990; SOBY *et al.*, 1996; WELTRING *et al.*, 1998). Além disso, os metabólitos isolados da planta podem ter sido produzidos por microrganismos invasores. A habilidade dos patógenos em produzir substâncias fitotóxicas *in situ* durante a infecção foi recentemente demonstrada por fungos do gênero *Fusarium* infectando espigas de trigo no campo (EVANS *et al.*, 2000). Essas micotoxinas são tricotecenos do grupo deoxinivalenol e são bastante agressivas inibindo o desenvolvimento de várias plantas (WANG e MILLER, 1988).

Os fungos endofíticos além de conferir certas vantagens à sua planta hospedeira, eles também são reconhecidos como um armazém de novos metabólitos secundários, alguns dos quais apresentam atividades biológicas benéficas (SURYANARAYANAN *et al.*, 1998).

Muitas vezes, essas substâncias podem ter atividades biológicas que levam a concluir que elas apresentam a função de manter a associação mutualista. Essas substâncias produzidas por microrganismos, e que tem apresentado possíveis papéis na proteção do hospedeiro, são denominadas de “metabólitos terciários” (HABERMEHL, 1998). Plantas infectadas por endofíticos podem ser protegidas de insetos predadores através da produção de toxinas por estes organismos. Algumas plantas infectadas com fungos da família Clavicipitaceae exibem uma melhor tolerância e apresentam resistência aumentada aos microrganismos fitopatogênicos (CLAY, 1988), e diferentes toxinas produzidas por esses fungos são ativas contra diferentes espécies de insetos (BALL *et al.*, 1997). Os endofíticos das folhas de algumas gramíneas produzem toxinas que parecem limitar o ataque por herbívoros (BUSH *et al.*, 1997). Isto poderia se a razão pela qual algumas plantas com endofíticos especiais são geralmente competitivas o suficiente para tornarem-se espécies dominantes em um determinado campo (CLAY e HOLAH, 1999).

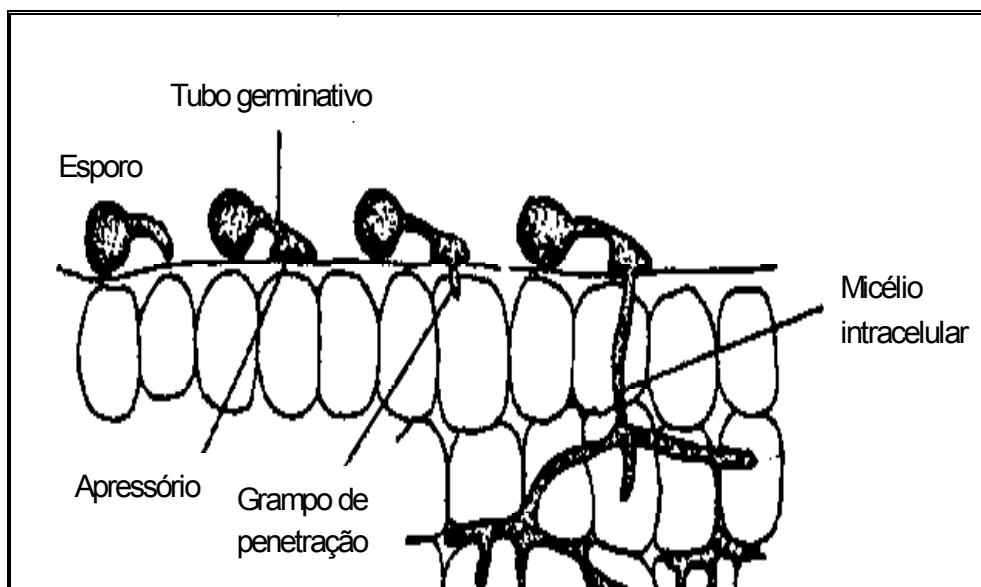


FIGURA 1.3 – Método de penetração e invasão pelo fungo, adaptado de Agrios (1988).

Os alcalóides produzidos por endofíticos parecem ser a base da resistência aos insetos e toxicidade aos mamíferos. As evidências sugerem que os próprios fungos são os responsáveis pela produção dessas substâncias, pois as plantas infectadas não as contêm e que os fungos produzem em culturas puras. Todas as espécies de *Balansiae* examinadas produzem alcalóides do *ergot* (CLAY, 1988). A ação dos alcalóides do *ergot* sobre os mamíferos é vasoconstritora e alguns deles possuem uso medicinal. Por exemplo, a ergotamina é utilizada no tratamento da enxaqueca, e outros compostos similares têm poderosos efeitos alucinógenos; a dietilamida do ácido lisérgico é um derivado sintético ocorrendo naturalmente como alcalóides do *ergot* do ácido lisérgico. Em altas concentrações, esse composto pode ser fatal (CLAY, 1988).

Os alcalóides **1-19** foram isolados em algumas de plantas infectadas por fungos endofíticos, os quais apresentam estruturas moleculares complexas. Além da atividade inseticida, alguns apresentam também outras importantes atividades biológicas, conforme apresenta a Tabela 1.1. Muitos desses alcalóides são também produzidos por fungos em meios de cultivos artificiais (DIDEKBRUMEC *et al.*, 1996).

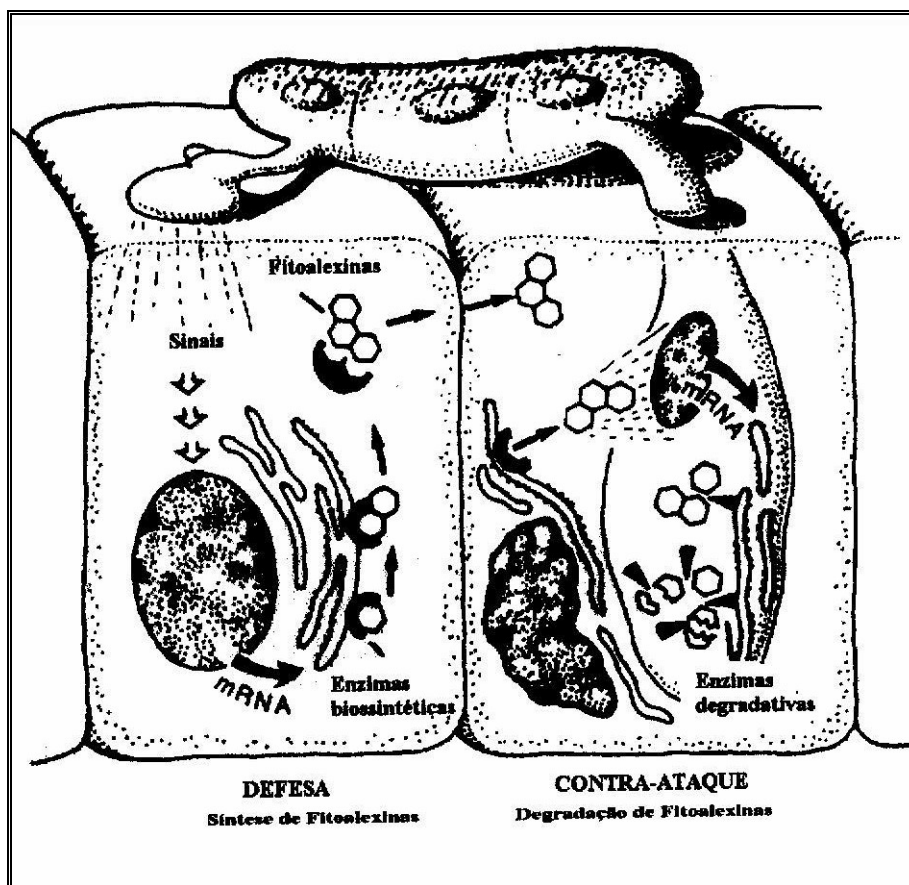


FIGURA 1.4 – Representação diagramática da interação do fitopatógeno *Nectria haematococca* e células de ervilha. Referência à capacidade de patógenos promoverem a detoxificação de fitoalexinas produzidas por hospedeiros. Adaptado de PASCHOLATI *et al.*, 1998.

Mais recentemente foi descoberto que o fungo *Taxomyces andreanae* isolado como endofítico em *Taxus brevifolia* produz paclitaxel (Taxol<sup>TM</sup>, 86) em meio de cultura artificial na ausência de células da planta (STIERLE *et al.*, 1993; STIERLE e STROBEL,1995). Essa descoberta causou grande impacto no meio acadêmico devido às propriedades anticancerígenas diferenciadas desse diterpeno (SCHIFF *et al.*, 1979). O rendimento de taxol na planta *T. brevifolia* é muito baixo, (uma quantidade menor do que < 0.02 % da planta seca) (WANI *et al.*, 1971) e devido à grande demanda dessa substância, certamente e, principalmente por razões ecológicas, a planta não apresenta condições de ser uma fonte sustentável do taxol. Muitas outras espécies de fungos produtores de taxol em rendimentos bastante razoáveis foram isolados dos tecidos de *T. brevifolia* (STIERLE e STROBEL,1995) e também de

outras espécies de *Taxus* (STROBEL *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1996; BASHYAL *et al.*, 1999).

Há ainda alguns dados intrigantes sobre a biossíntese de taxóides por fungos endofíticos. Por exemplo, o fungo *Periconia* sp, endofítico em *Torreya grandifolia*, planta da mesma família do gênero *Taxus*, mas que não produz taxanos, produz taxol quando recém isolado e cultivado em meio artificial (LI *et al.*, 1998). A biossíntese de taxol diminui com sucessivas transferências do fungo para os meios de cultura, mas é reativada com a adição de ácidos carboxílicos e fenóis, sendo o ácido benzóico o melhor estimulante (LI *et al.*, 1998). O fungo *Pestalotiopsis guepinii*, endofítico em *Wolemia nobilis*, uma espécie da família Araucaraceae, não relacionada com *Taxus*, é também produtor de taxol. Os autores desse trabalho sugerem que o fungo tenha adquirido a “habilidade” de produzir taxol hospedando alguma espécie de *Taxus* e então transferido para *Wollemia nobilis* através de insetos ou pássaros (LI *et al.*, 1997). No mesmo sentido, o fungo *Seimatoantherium tepuiense* gen.nov. foi relatado recentemente como o primeiro caso de um fungo epifítico produtor de taxol (86) (LI *et al.*, 1997), isolado de *Maguireothamnus speciosus*, uma planta da família Rubiaceae.

Os três casos discutidos acima - a produção de giberelinas por fungos, o acúmulo de micotoxinas tricotecenos em plantas do gênero *Baccharis* e a produção de taxol por fungos endofíticos em *Taxus* e plantas afins - definitivamente têm motivado pesquisadores a investigar os mecanismos desse fenômeno bioquímico-ecológico. Embora ainda não unanimemente aceito, este fenômeno tem sido interpretado do ponto de vista bioquímico, como sendo uma “transferência genética horizontal” entre plantas e fungos (HORR, 1997). O metabolismo secundário é uma consequência fenotípica do organismo e é, portanto, uma expressão do seu conteúdo genético (VOET e VOET, 1990). Imitando a natureza, os seres humanos têm sido bem sucedidos efetuando manipulações genéticas em vários seres vivos (HOWE, 1995). Isso, muito resumidamente, se procede em poucas etapas: 1) identificação do gene responsável pelas características desejadas (inserido em um vetor, o plasmídeo); 2) introdução deste vetor no DNA do organismo receptor e; 3) expressão da modificação genética. Muitos metabólitos secundários podem atualmente ser obtidos por esse tipo de transformação genética. Por exemplo, a transferência de plasmídeo que codifica a

enzima tricodieno sintetase em fungos do gênero *Fusarium*, que são produtores de micotoxinas do grupo dos tricotecenos, para a planta *Nicotiana tabacum*, leva a planta a produzir tricodieno (o precursor dos tricotecenos) (ZOOK *et al.*, 1996).

No caso do taxol (86), o gene que codifica a enzima taxadieno sintetase, uma enzima chave na ciclização do difosfato de geranylgeraniol para produzir taxadieno, foi recentemente clonado e introduzido na bactéria *Escherichia coli*. Essa transferência genética levou a uma superprodução de taxadieno sintetase pela bactéria (HUANG *et al.*, 1998) e poderá vir a ser uma poderosa ferramenta na síntese de taxol. Essa estratégia (engenharia genética) vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de metabólitos secundários (BEYER *et al.*, 1999), principalmente com atividades anticancerígenas (STROBEL, 2002).

Embora ainda aceita por poucos, a transferência genética entre fungos e plantas parece ser a melhor explicação para o "aprendizado" que os organismos associados adquirem na produção de metabólitos secundários. A associação entre fungos e plantas pode ter sido iniciada no começo da vida na terra (BLACKWELL, 2000; REDECKER *et al.*, 2000). LAMBOY e PIROZYNSKI (1988), citado por HAWKSWORTH (1991) sugeriram que a "transferência horizontal" de genes pela incorporação de DNA do fungo no genoma de plantas vasculares pode ter contribuído para o desenvolvimento e, especialmente, para a diversificação das folhas, flores e frutos. Depois de um longo período de co-evolução, plantas e fungos certamente desenvolveram mecanismos que delimitam a extensão dos benefícios e prejuízos obtidos na associação. Essas interações devem envolver um conjunto complexo de passos onde os genes em ambos os parceiros são ativados ou desativados por sinais específicos. Esses sinais são freqüentemente efetivos em determinados estágios ou condições fisiológicas a uma dada condição ambiental, e inativos em outras (MAYER, 1989).

Os microrganismos podem trocar materiais genéticos com a planta quando ocorre a penetração de suas organelas no interior das células do hospedeiro (Figura 1.5) (AGRIOS, 1988), ou quando a planta libera parte desse material genético para fora da célula. Deste ponto de vista, a transferência de características genéticas é bastante provável, não somente de forma intraespecífica durante a reprodução, mas também de forma interespecífica através de possíveis "trocas naturais" de plasmídeo.

Alguns trabalhos envolvendo biologia molecular têm demonstrado a ocorrência desse fenômeno ecológico, onde foi constatado que as seqüências de bases no DNA de espécies de bambu (*Bambusoideae*) estavam contaminadas com DNA de fungos endofíticos (CAMACHO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1997).

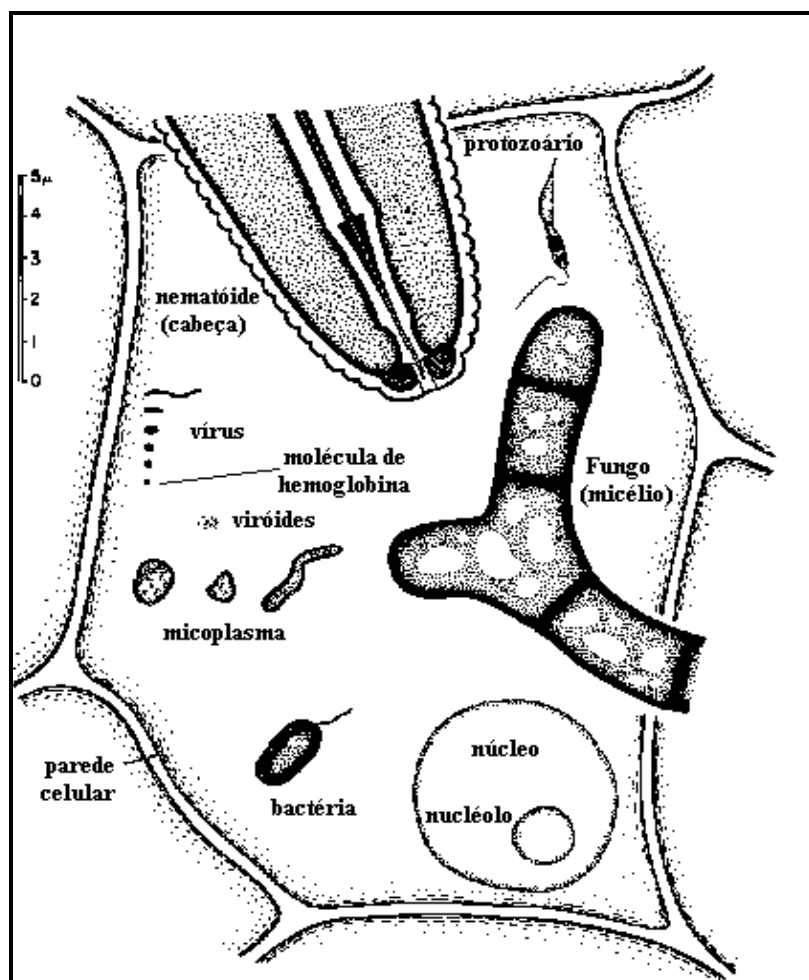


FIGURA 1.5 – Microrganismos capazes de penetrar no interior da célula da planta e comparação das dimensões desses microrganismos com uma célula vegetal típica. Adaptado de AGRIOS, 1988.

A introdução de genes em plantas ou células vegetais através de técnicas de engenharia genética permite a alteração da expressão de genes envolvidos em vias biossintéticas de interesse e assim modificar a produção de metabólitos secundários (MARASCHIN e VERPOORTE). Num contexto mais amplo, a engenharia metabólica objetiva o incremento do fluxo de carbono em direção ao produto final de interesse.

Neste sentido, diversas estratégias têm sido utilizadas buscando superar o(s) evento(s) limitante(s), bloqueando vias metabólicas competitivas ou do catabolismo pela utilização de genes com transcrição no sentido inverso (*anti-sense*), ou ainda pelo uso de anticorpos. O aumento da atividade de uma determinada enzima poderá ser conseguido com a modificação genética de seu(s) gene(s) o(s) qual(s) poderá(ão) ser oriundo(s) da planta em si, de outra espécie vegetal, ou ainda de outro organismo (bactérias, fungos, etc) (MARASCHIN e VERPOORTE).

As conseqüências previstas para essa troca de informação são observadas na biossíntese de moléculas idênticas às produzidas pelo hospedeiro (ou vetor), ou na codificação de enzimas que têm papel chave na biossíntese de classes de substâncias ou que atuam em parte da rota biossintética. A Tabela 1.2 apresenta uma ampla ilustração das classes de metabólitos secundários que têm sido isolados de fungos endofíticos cultivados em meio de cultivo artificial. Assim, *Pestalotiopsis* spp, isolado de *Taxus brevifolia*, produz sesquiterpenos (68 - 72) (PULICI *et al.*, 1997) que podem ser conseqüência da ação de enzimas parecidas com taxadieno sintase, sobre farnesil pirofosfato; os fungos *Hormononema dermatioides* e *Phyllosticta* sp isolados da planta *Abies balsamea* produzem uma série de diterpenos (87, 88) de estruturas similares àquelas produzidas pelo hospedeiro (FINDLAY *et al.*, 1995).

A química de microrganismos endofíticos tem sido muito pouco estudada se considerarmos a vasta biodiversidade fúngica e a especificidade nas colonizações das plantas hospedeiras por fungos. O estudo dessas interações entre plantas e microrganismos, além de dar grande contribuição para o entendimento de muitos processos químicos na natureza e da ecologia, pode resultar no estabelecimento de fontes alternativas de substâncias de interesse para a humanidade. Como o ciclo de vida de microrganismos é sempre muito mais curto do que de plantas, sua exploração na produção de metabólitos secundários pode ser mais viável. Por exemplo, enquanto *Taxus brevifolia* é coletada aos cinco anos de crescimento para produzir taxol em um rendimento muito baixo, alguns fungos endofíticos em *Taxus* podem produzir esse diterpeno em excelentes rendimentos em uma ou duas semanas (HORR, 1997).

As substâncias 20-237, todas isoladas de fungos endofíticos, são representantes de várias classes de metabólitos secundários, incluindo oligopeptídeos (121-128); esteróides (52-64); policetídeos (110-120); e alcalóides derivados de bases

purínicas (30, 31), de rotas mistas (38-44) e, principalmente indólicos (20-29). Os diterpenos 89-91, isolados de *Zythiostroma* sp, só haviam sido identificados até então em plantas (AYER e KHAN, 1996). As atividades biológicas apresentadas pela maioria dessas substâncias (Tabela 1.2), são principalmente relacionadas à toxicidade a outros microrganismos. Isso sugere um papel fitoprotetor do fungo na relação simbiótica.

TABELA 1.1 – Produção de metabólitos secundários por plantas infectadas por fungos endofíticos.

| Fungo                            | Planta Hospedeira           | Metabólitos                   | Efeito       | Ref.   |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------|--|
| <i>Neotyphodium lolii</i>        | <i>Lolium perenne</i> L.    | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 | Tremorgênico | FINCH <i>et al.</i> , 1998; GATENBY <i>et al.</i> , 1999   |
| <i>Acremonium lolii</i>          | <i>Lolium perenne</i> L.    | 5                             | Neurotóxico  | GALLAGHER <i>et al.</i> 1984; BERNY <i>et al.</i> , 1997   |
| <i>Neotyphodium coenophialum</i> | <i>Festuca arundinaceae</i> | 11, 12, 15                    | Toxicoses    | BERNY <i>et al.</i> , 1997   |
| <i>Acremonium coenophialum</i>   | <i>F. arundinacea</i>       | 14, 17, 18, 19                | Toxicoses    | YATES <i>et al.</i> , 1985; LYONS <i>et al.</i> , 1986; BELESKY <i>et al.</i> , 1988; YATES <i>et al.</i> , 1988; YATES <i>et al.</i> , 1989 |

Substâncias de alta complexidade estrutural, inviáveis pela síntese orgânica *in vitro*, podem ser obtidas cultivando-se fungos endofíticos em meios artificiais. Além disso, a produção *in vitro* de enzimas codificadas por transferência genética da planta para o fungo, pode ser uma ferramenta útil para biotransformação de substratos levando a substâncias análogas e produtos naturais bioativos. Isso seria muito importante para estudos de relação estrutura-atividade biológica de substâncias de alta complexidade estrutural.



O isolamento de microrganismos endofíticos e seu uso para a produção de metabólitos secundários podem contribuir decisivamente para a preservação da flora no planeta mantendo as plantas hospedeiras intactas no seu *habitat* natural (STROBEL *et al.*, 1996b).

TABELA 1. 2 – Produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos.

| Fungo                               | Planta Hospedeira                                       | Metabólito                         | Efeito  | Ref.   |
|-------------------------------------|---|------------------------------------|---|--|
| <i>Claviceps purpurea</i>           | <i>Festuca arundinaceae</i>                             | 13, 14, 16, 20, 21                 | Tóxico  | PORTER <i>et al.</i> , 1987; PORTER <i>et al.</i> , 1977                         |
| <i>Epichloe typhina</i>             | <i>F. arundinaceae</i>                                  | 14, 22, 23                         | Tóxico  | PLIENINGER <i>et al.</i> , 1975; PORTER <i>et al.</i> , 1979                     |
| <i>Balansia epichloe</i> (Weese)    | <i>F. arundinaceae</i><br><i>Cynodon dactylon</i> L     | 24, 25, 26                         | Tóxico  | PORTER <i>et al.</i> , 1977  |
| <i>Colletotrichum</i> sp            | <i>Artemisia annua</i>                                  | 27, 53–61                          | Antimicrobiano  | LU <i>et al.</i> , 2000  |
| <i>Aspergillus ochraceus</i>        | <i>Coffea arabica</i>                                   | 28                                 | Micotoxina  | MANTLE e CHOW, 2000  |
| <i>Aureobasidium</i> sp             | <i>Triticum vulgare</i> Vill                            | 29                                 | Promove germinação de sementes                        | PETRINI <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>Hypoxylon serpens</i>            | <i>Nicotiana tabacum</i>                                | 30,31                              | Estimulam o processo de florescência                  | PETRINI <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>Pleurophomopsis</i>              | <i>Cardamine heptaphylla</i>                            | 32                                 | Antimicrobiano  | PETRINI <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>Xylaria</i> sp                   | n.i.  | 33                                 | n.t.  | PETRINI <i>et al.</i> , 1992   |
| Não identificado                    | <i>Artemisia microcarpa</i> L                           | 34                                 | Citotóxico  | RATNAYAKI <i>et al.</i> , 2001b  |
| <i>Rhinocladiella</i> sp            | <i>Tripterygium wilfordii</i>                           | 35–38                              | Citotóxico  | WAGENAAR <i>et al.</i> , 2000  |
| <i>Phomopsis</i> sp                 | <i>Artemisia gracilostyla</i> var. <i>Melanostachys</i> | 40                                 | Antibacteriano  | HORN <i>et al.</i> , 1995.   |
| <i>Cryptosporiopsis cf quercina</i> | <i>Tripterygium wilfordii</i>                           | 41 <sup>1</sup> , 121 <sup>2</sup> | <sup>1</sup> Antifúngico<br><sup>2</sup> Antimicótico | <sup>1</sup> LI <i>et al.</i> 2000;<br><sup>2</sup> STROBEL <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Neotyphodium</i> sp              | ni  | 42–44                              | Tóxico  | POWEL e PETROSKI, 1992   |

| Fungo  | Planta Hospedeira                                      | Metabólito                      | Efeito                                    | Ref.   |
|--|--|---------------------------------|---|--|
| <i>Neotyphodium coenophialum</i> ;<br><i>N. uncinatum</i>                                    | <i>Festuca arundinacea</i><br><i>F. pratenses</i>      | <b>45–51</b>                    | Inseticidas                               | SCHARDL e PHILLIPS, 1997   |
| <i>Pleospora herbarum</i>  | <i>Medicago lupulina</i>                               | <b>52</b>                       | Algicida,<br>Herbicida,<br>Antimicrobiano | KROHN <i>et al.</i> , 1999   |
| <i>Gliocadium</i> sp   | <i>Taxus chinensis</i>                                 | <b>62-64</b>                    |   | ZHANG <i>et al.</i> , 2002   |
| <i>Fusarium</i> sp<br><i>Myrothecium</i> sp  | <i>Baccharis megapotamica</i><br><i>B. coridifolia</i> | <b>65–67</b>                    | Fitotóxico                                | JARVIS <i>et al.</i> , 1987  |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp  | <i>T. brevifolia</i>                                   | <b>68–72,</b><br><b>202-204</b> | n.t.                                      | PULICI <i>et al.</i> , 1996a, b, c,<br>PULICI <i>et al.</i> , 1997           |
| <i>Phyllosticta</i> sp   | <i>Abies balsamea</i>                                  | <b>73, 74</b>                   | Tóxico                                    | CALHOUN <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>Epichloë typhina</i>  | <i>Phleum pratense</i>                                 | <b>75-81</b>                    | Fungitóxicos                              | KOSHINO <i>et al.</i> , 1989   |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp   | <i>Pinus taeda</i>                                     | <b>82-84</b>                    | n.t.                                      | MAGNANI <i>et al.</i> , 2003   |
| <i>Gibberella fujikuroi</i>  | <i>Curcubita maxima</i>                                | <b>85</b>                       | Hormônio de crescimento                   | AGRIOS, 1988,<br>STOWE e YAMAKI, 1957  |
| <i>Periconia</i> sp  | <i>Torreya grandifolia</i>                             | <b>86</b>                       | Antifúngico,<br>antiviral e anticâncer    | LI <i>et al.</i> , 1998  |
| <i>Taxomyces andreanae</i> ,<br><i>Alternaria alternata</i> ,<br><i>Fusarium graminearum</i> | <i>Taxus brevifolia</i>                                | <b>86</b>                       | Antifúngico,<br>antiviral e anticâncer    | STIERLE <i>et al.</i> , 1993, STIERLE e STROBEL, 1995, JARVIS e MILLER, 1996 |
| <i>Pestalotiopsis microspora</i>   | <i>T. wallachiana</i>                                  | <b>86</b>                       | Anticâncer                                | STROBEL <i>et al.</i> , 1996   |
| <i>Tubercularia</i> sp   | <i>Taxus mairei</i>                                    | <b>39, 86</b>                   | Antifúngico,<br>antiviral e anticâncer    | WANG <i>et al.</i> , 2000; WANG <i>et al.</i> , 2003                         |
| <i>Hormononema dermatioides</i> ,<br><i>Phyllosticta</i> sp                                  | <i>Abies balsamea</i> (L.)                             | <b>87, 88</b>                   | Inibidor de alimentação dos insetos       | FINDLAY <i>et al.</i> , 1995   |
| <i>Zythiostroma</i> sp   | <i>Populus tremuloides</i>                             | <b>89-91</b>                    | Antifúngico                               | AYER e KHAN, 1996  |

| Fungo  | Planta Hospedeira             | Metabólito      | Efeito                                 | Ref.  |
|--|-------------------------------|-----------------|--|---|
| <i>Artemisia subglutinans</i>  | <i>Tripterygium wilfordii</i> | <b>92, 93</b>   | Imunossupresivos                       | LEE <i>et al.</i> , 1995                                    |
| <i>Geniculosporium sp</i>  | <i>Teucrium scorodonia</i>    | <b>33, 94</b>   | Algicida                               | KONIG <i>et al.</i> , 1999                                  |
| Basidiomycete CR115  | <i>Daphnopsis americana</i>   | <b>95-109</b>   | Antibiótico                            | BRADY <i>et al.</i> , 2000a<br>BRADY <i>et al.</i> , 2001   |
| <i>Penicillium sp</i>  | <i>Taxus brevilolia</i>       | <b>110, 111</b> | Antifúngicos                           | STIERLE <i>et al.</i> , 1999                                |
| <i>Sphaeropsis sp</i>  | <i>Taxus globosa</i>          | <b>112</b>      | n.t.                                   | WILKINSON <i>et al.</i> , 1999                              |
| <i>Fusarium sp</i> CR377   | <i>Selaginella pallescens</i> | <b>113</b>      | Antibiótico                            | BRADY e CLARDY, 2000  |
| <i>Phoma sp</i>  | Juniper twig                  | <b>114, 115</b> | Inibidor da farnesilação               | DABRAH <i>et al.</i> , 1997                                 |
| <i>Cytospora sp</i>  | <i>Conocarpus erecta</i>      | <b>116-120</b>  | Antibiótico                            | BRADY <i>et al.</i> , 2000c                                 |
| <i>Diaporthe sp</i>  | <i>Forsteronia spicata</i>    | <b>116-120</b>  | Antibiótico                            | BRADY <i>et al.</i> , 2000c                                 |
| <i>Acremonium sp</i>   | <i>Taxus baccata</i>          | <b>122, 123</b> | Antifúngico, anticâncer                | STROBEL <i>et al.</i> , 1997,<br>STROH <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Phomopsis leptostromiformis</i>   | <i>Lupinus spp</i>            | <b>124</b>      | Micotoxina                             | CULVENOR <i>et al.</i> , 1989                               |
| <i>Cryptosporiopsis sp</i>   | <i>Pinus silvestris</i>       | <b>125-128</b>  | Antimicrobiano                         | NOBLE <i>et al.</i> , 1991                                  |
| <i>Pezicula sp</i>   | <i>Fagus sylvatica</i>        | <b>125-128</b>  | Antimicrobiano                         | NOBLE <i>et al.</i> , 1991                                  |
| <i>Pezicula livida</i><br><i>Plectophomella sp</i><br><i>Cryptosporiopsis malicorticis</i><br><i>Cryptosporiopsis sp</i> | n.i                           | <b>129</b>      | n.t.                                   | KROHN <i>et al.</i> , 1997                                  |
| <i>Pezicula livida</i>   | n.i.                          | <b>129</b>      | Antibiótico e Algicida                 | KROHN <i>et al.</i> , 1997                                  |
| <i>Phomopsis sp</i>  | n.i.                          | <b>130</b>      | Antibacteriano, Antifúngico e Algicida | KROHN <i>et al.</i> , 1997                                  |

| Fungo                          | Planta Hospedeira            | Metabólito         | Efeito                                       | Ref.                              |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------|--|-----------------------------------|
| <i>Cryptosporiopsis</i> sp     | n.i.                         | 129, 131           | Antibiótico e Algicida                       | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| <i>Plectophomella</i> sp       | n.i.                         | 129, 131           | Antibiótico e Algicida                       | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| <i>Phomopsis</i> sp            | n.i.                         | 130                | n.t.   | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| <i>Plectophomella</i> sp       | n.i.                         | 131                | n.t.   | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| <i>Cryptosporiopsis</i> sp     | n.i.                         | 132, 133           | n.t.   | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| <i>Plectophomella</i> sp       | n.i.                         | 132, 133           | n.t.   | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| <i>Cryptosporiopsis</i> sp     | n.i.                         | 134                | n.t.   | KROHN <i>et al.</i> , 1997        |
| n.i.                           | <i>Avicennia marina</i>      | 135-138, 214       | n.t.   | YONGCHENG <i>et al.</i> , 2001    |
| <i>E. typhina</i>              | <i>P. pratense</i>           | 139                | Antifúngico                                  | KOSHINO <i>et al.</i> , 1992      |
| <i>Cytospora eucalypticola</i> | <i>Eucalyptus perriniana</i> | 130, 140-143, 222* | Antibiótico, Antifúngico<br>*Inseticida      | KOKUBUN <i>et al.</i> , 2003      |
| <i>Mycelia sterila</i>         | <i>Cirsium arvense</i>       | 144-147, 223, 224  | n.t.   | KROHN <i>et al.</i> , 2001b       |
| <i>Phomopsis</i> sp            | <i>Tectona grandis</i> L.    | 148, 149           | Citotóxico                                   | ISAKA <i>et al.</i> , 2001        |
| <i>Wardomyces anomalus</i>     | <i>Enteromorpha</i> sp       | 150-152, 225       | Antioxidante, Inibidores da tirosina quinase | ABDEL-LATEFF <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Phomopsis longicolla</i>    | <i>Dicerandra frutescens</i> | 153, 154           | Antibiótico e Citotóxico                     | WAGENAAR e CLARDY, 2001           |
| n.i.                           | Árvore do Panamá             | 155-158            | Antibiótico                                  | SCHLINGMANN <i>et al.</i> , 1993  |
| <i>Coniothyrium palmarum</i>   | n.i.                         | 159-167            | Antibacteriano, Antifúngico e Herbicida      | RAGOT <i>et al.</i> , 1999        |
| <i>Hormonema dematioides</i>   | n.i.                         | 168-170, 172       | Antibacteriano e Antifúngico                 | RAGOT <i>et al.</i> , 1999;       |
| <i>Mycelia sterila</i>         | <i>Atropa belladonna</i>     | 170-175            | Antibacteriano e Antifúngico                 | KROHN <i>et al.</i> , 2001a       |
| N. 1893                        | <i>Kandelia candel</i>       | 176, 177           | Citotóxico                                   | CHEN <i>et al.</i> , 2003         |
| <i>Paecilomyces</i> sp         | <i>Taxus mairei</i>          | 178                | Citotóxico                                   | WANG <i>et al.</i> , 2002         |
| <i>Artemisia clavatus</i>      | <i>Torreya grandis</i>       | 178                | Citotóxico                                   | WANG <i>et al.</i> , 2002         |

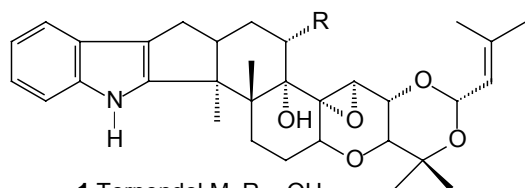
| Fungo                            | Planta Hospedeira   | Metabólito                    | Efeito                                 | Ref.  |
|----------------------------------|---|-------------------------------|--|---|
| <i>Fusidium</i> sp               | <i>Mentha arvensis</i>  | <b>179-181, 231</b>           | Sob investigação                       | KROHN <i>et al.</i> , 2002                                    |
| n.i.                             | <i>Poa ampla</i>  | <b>182-185</b>                | Larvicida                              | JU <i>et al.</i> , 1988                                       |
| <i>Epichlœ typhina</i>           | <i>Phleum pratense</i>  | <b>186, 187, 190, 205-208</b> | n.t.                                   | KOSHINO <i>et al.</i> , 1988;<br>KOSHINO <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Xylariaceae</i> spp           | n.i   | <b>188, 189</b>               | Sinalizadores                          | CHAPELA <i>et al.</i> , 1991                                  |
| <i>Cytospora</i> sp              | <i>Conocarpus erecta</i>  | <b>191, 192</b>               | Provável inibidor da síntese DNA       | BRADY <i>et al.</i> , 2000a                                   |
| n. i.                            | <i>Gaultheria procumbens</i>  | <b>193, 194</b>               | Tóxico                                 | FINDLAY <i>et al.</i> , 1997a                                 |
| Fungo estéril não identificado   | Planta da Costa Rica  | <b>195</b>                    | Inibidor da síntese de esfingolipídios | MANDALA <i>et al.</i> , 1997                                  |
| <i>Epichloe typhina</i>          | <i>Phleum pratense</i>  | <b>196-199</b>                | Fungitóxicos                           | KOSHINO <i>et al.</i> , 1987                                  |
| <i>Cytonaema</i> sp              | <i>Quercus</i> sp   | <b>200, 201</b>               | Antiviral                              | GUO <i>et al.</i> , 1999                                      |
| L 1930                           | <i>Larix laricina.</i>  | <b>209</b>                    | Antibacteriano                         | FINDLAY <i>et al.</i> , 1997b                                 |
| <i>Phomopsis</i> spp             | <i>Salix</i> sp   | <b>210, 211</b>               | Marcadores Taxonômicos                 | HORN <i>et al.</i> , 1996                                     |
| <i>Aspergillus parasiticus</i>   | “Redwood”   | <b>212, 213</b>               | Antitumorais                           | STIERLE <i>et al.</i> , 1999b                                 |
| <i>Pestalotiopsis microspora</i> | <i>Taxus baccata</i><br><i>Torreya taxifolia</i><br><i>Taxodium disticum</i><br><i>Dendrobium speciosum</i> | <b>215</b>                    | Antifúngico                            | LI <i>et al.</i> , 2001b                                      |
| <i>Pestalotiopsis guepinii</i>   | <i>Wollemia nobelis</i>   | <b>215</b>                    | Antifúngico                            | LI <i>et al.</i> , 2001b                                      |
| <i>Monochaetia</i>               | <i>Taxus wallichiana</i>  | <b>215</b>                    | Antifúngico                            | LI <i>et al.</i> , 2001b                                      |
| Não identificado                 | <i>Artemisia microcarpa</i>   | <b>216, 217</b>               | Citotóxico                             | RATNAYAKI <i>et al.</i> , 2001a                               |
| Linhagem 112/13                  | <i>L.</i>   |                               |  |   |
| <i>Pestalotiopsis jesteri</i>    | <i>Fragraea bodenii</i>   | <b>218, 219</b>               | Antimicótico                           | LI & STROBEL, 2001  |
| <i>Pestalotiopsis microspora</i> | <i>Torreya taxifolia</i>  | <b>220</b>                    | Citotóxico                             | LEE <i>et al.</i> , 1996                                      |
| <i>Guignardia</i> sp             | <i>Spondias mombin</i>  | <b>221</b>                    | -                                      | RODRIGUES-H <i>et al.</i> , 2001                              |
| <i>Muscodor vitigenus</i>        | <i>Paullinia paullinioides</i>  | <b>226</b>                    | Repelente Insetos                      | DAISY <i>et al.</i> , 2002                                    |

| Fungo                                 | Planta Hospedeira            | Metabólito      | Efeito                       | Ref.   |
|---------------------------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|--|
| <i>Pestalotiopsis microspora</i>      | <i>Terminalia morobensis</i> | <b>227, 228</b> | Antifúngico,<br>Antioxidante | STROBEL <i>et al.</i> , 2002;<br>HARPER <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Leptosphaeria</i> sp               | <i>Artemisia annua</i>       | <b>229, 230</b> | n. t.                        | LIU <i>et al.</i> , 2002; LIU <i>et al.</i> , 2003           |
| AHU 9748                              | <i>Abelmoschus</i> sp        | <b>232</b>      | Alelopático                  | TANAKA <i>et al.</i> , 2002                                  |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | <i>Artemisia mongolica</i>   | <b>233</b>      | Antimicrobiano               | ZOU <i>et al.</i> , 2000                                     |
| <i>Penicillium</i> sp                 | <i>Taxus cuspidata</i>       | <b>234-237</b>  | n.t.                         | KAWAMURA <i>et al.</i> , 2000                                |

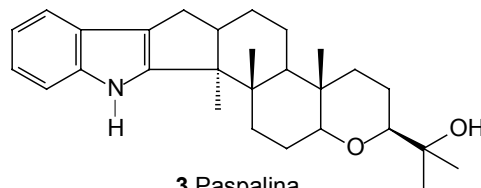
n.i. = não identificado

n.t. = não testado

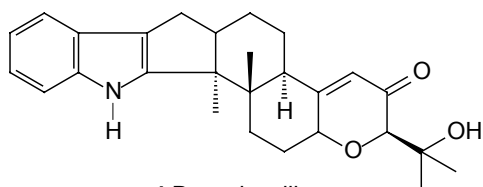
Alcalóides



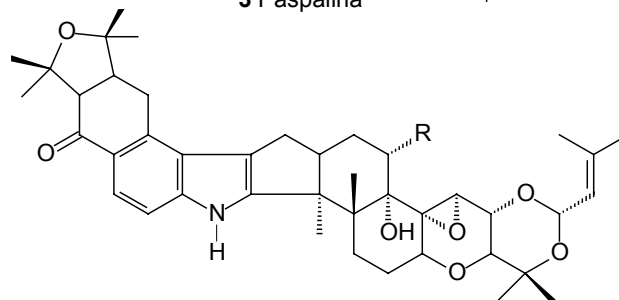
1 Terpendol M R = OH  
2 Terpendol C R = H



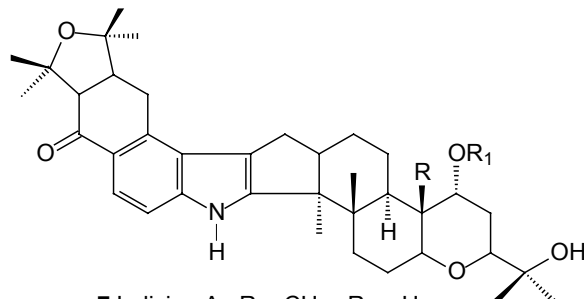
3 Paspalina



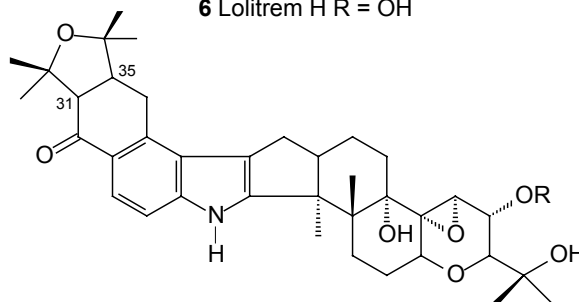
4 Desoxipaxilina



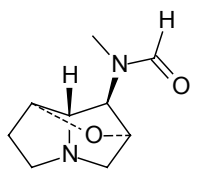
5 Lolitrem B R = H  
6 Lolitrem H R = OH



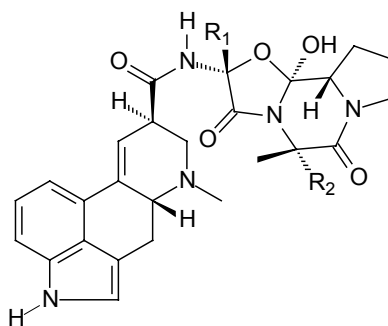
7 Lolicina A R = CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub> = H  
8 Lolicina B R = CHO R<sub>1</sub> = H



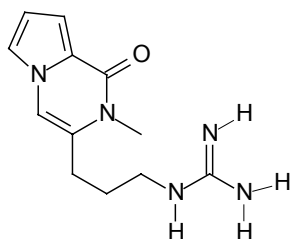
9 Lolitriol R = H 31alfa, 35beta  
10 Lolitrem N R = H 31alfa, 35alfa



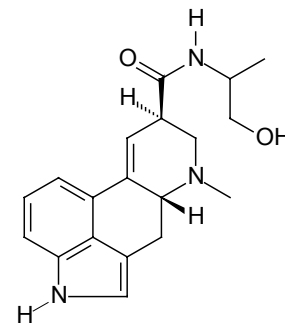
11 N-formilnornolina



13 Ergotamina R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = PhCH<sub>2</sub>  
14 Ergosina R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = i-Bu  
15 Ergovalina R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = i-Pr  
16 Ergostina R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> R<sub>2</sub> = PhCH<sub>2</sub>  
17 Ergoptina R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> R<sub>2</sub> = i-Bu  
18 Ergonina R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> R<sub>2</sub> = i-Pr  
19 Ergocornina R<sub>1</sub> = i-Pr R<sub>2</sub> = i-Pr  
20 Ergocristina R<sub>1</sub> = i-Pr R<sub>2</sub> = PhCH<sub>2</sub>

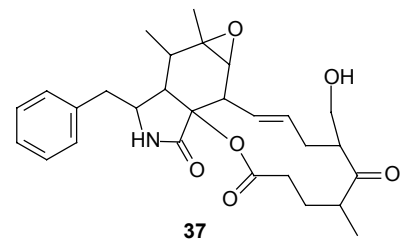
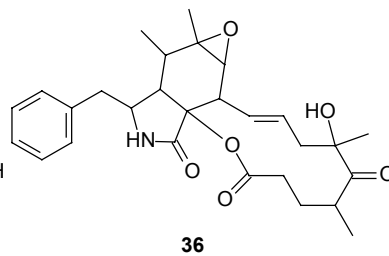
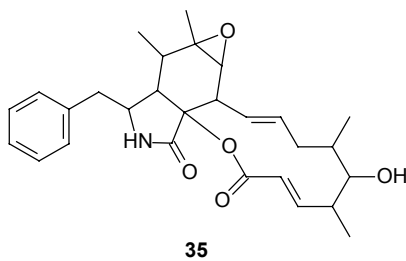
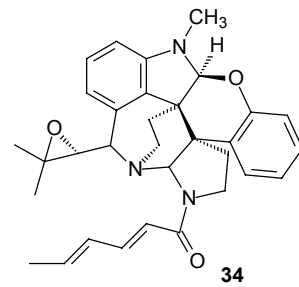
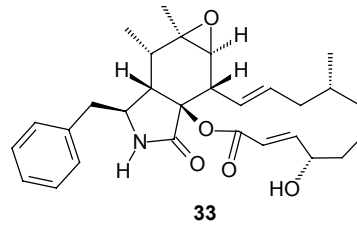
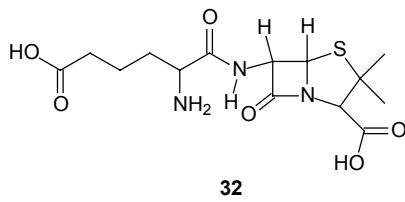
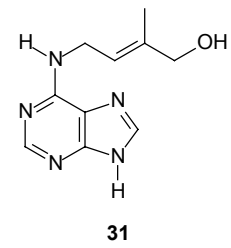
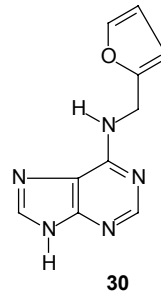
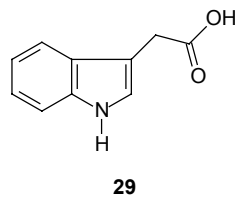
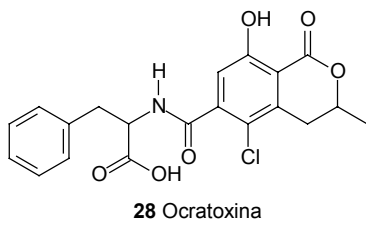
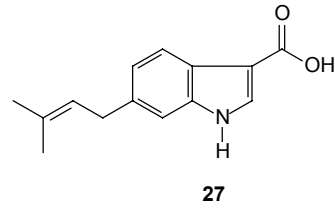
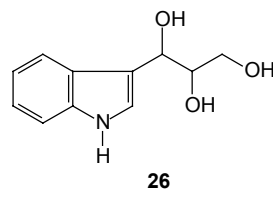
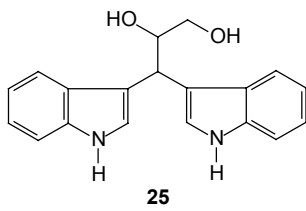
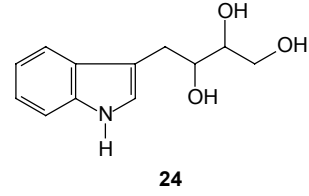
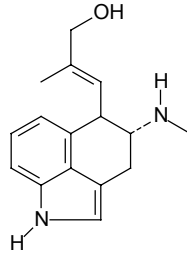
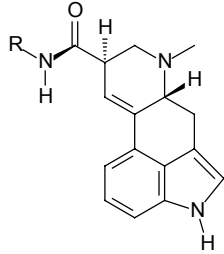


12



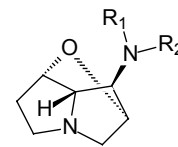
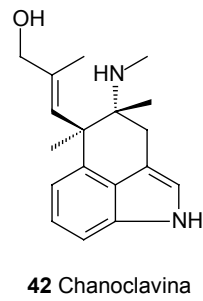
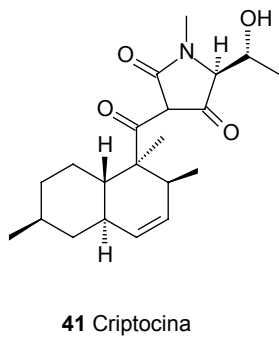
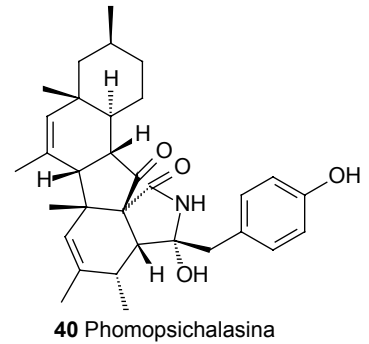
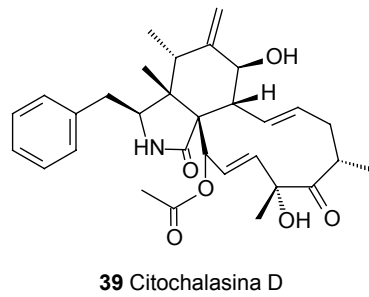
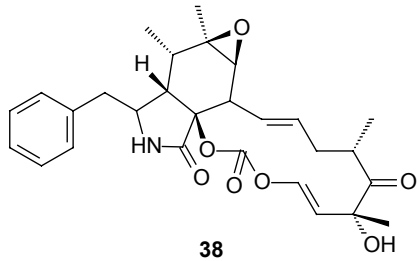
21 Ergonovina

Alcalóides





Alcalóides



45 Lolina  $R_1 = H$   $R_2 = CH_3$

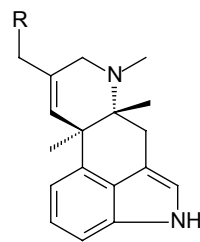
46 Norlolina  $R_1 = R_2 = H$

47 N-metil-lolina  $R_1 = R_2 = CH_3$

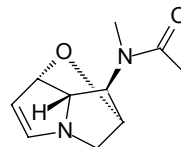
48 N-acetil-norlolina  $R_1 = H$   $R_2 = Ac$

49 N-formil-lolina  $R_1 = CH_3$   $R_2 = CHO$

50 N-acetil-lolina  $R_1 = CH_3$   $R_2 = Ac$

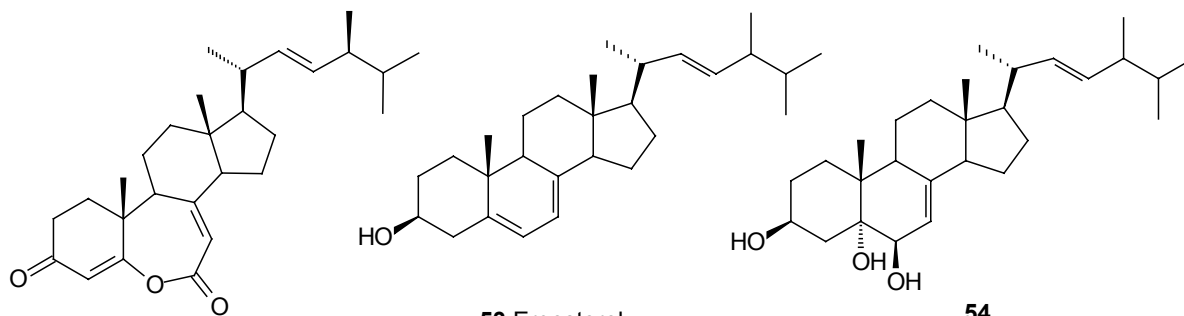


43 Agroclavina  $R = H$   
44 Elimoclavina  $R = OH$



51 5,6-dehidro-N-acetil-lolina

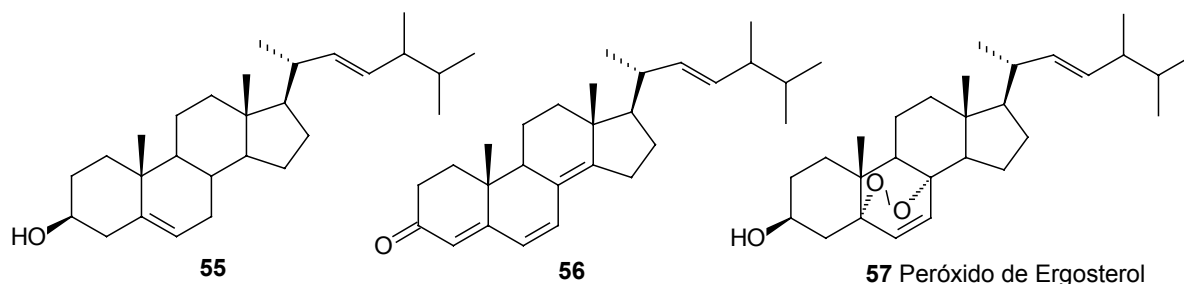
Esteróides



52

53 Ergosterol

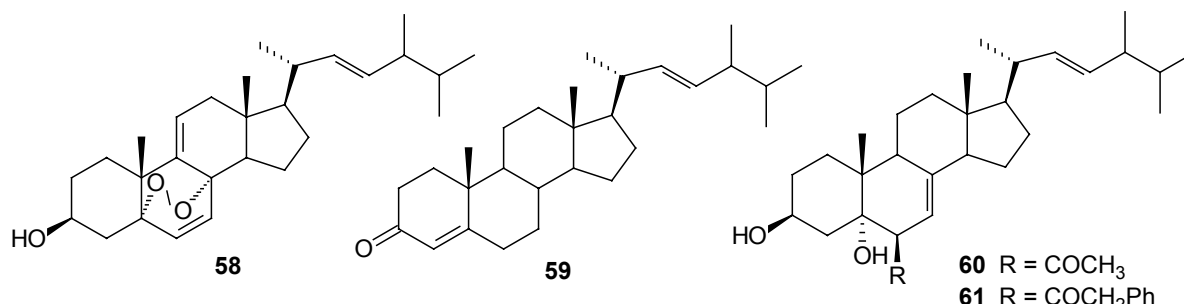
54



55

56

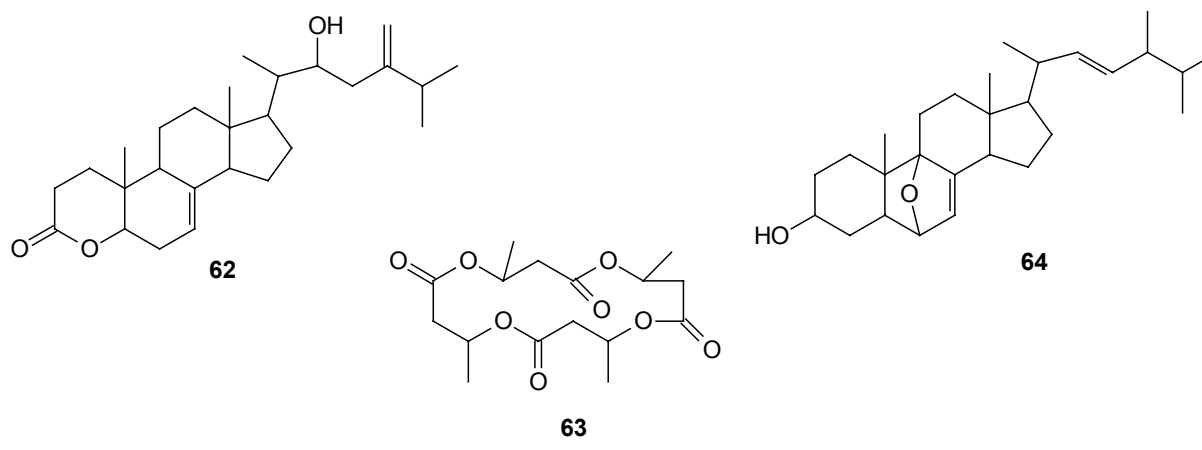
57 Peróxido de Ergosterol



58

59

60 R = COCH<sub>3</sub>  
61 R = COCH<sub>2</sub>Ph



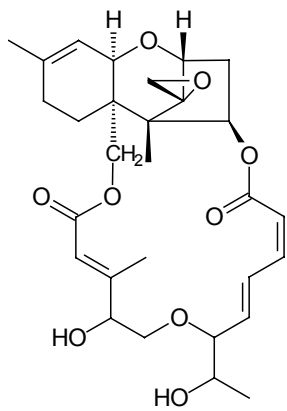
62

63

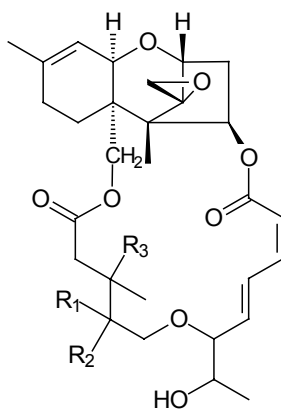
64

Terpenos

Sesquiterpenos

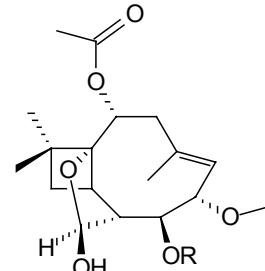


65



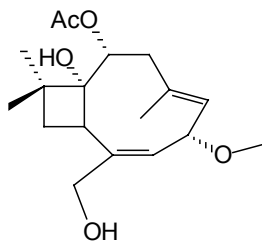
66  $R_1 = R_2 = O$   $R_3 = H$

67  $R_1 = H$   $R_2 = OH$   $R_3 = OAc$

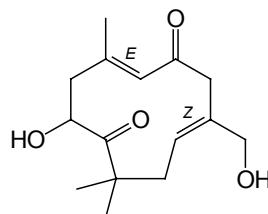


68 Pestalotiopsina A  $R = H$

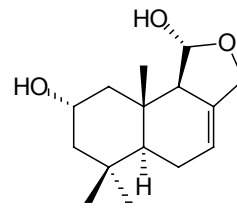
69 Pestalotiopsina C  $R = CH_3$



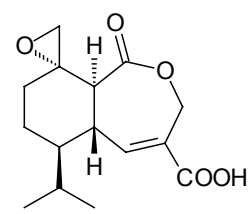
70 Pestalotiopsina B



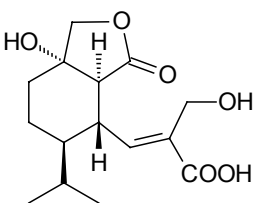
71



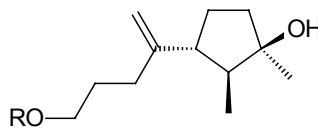
72 2- $\alpha$ -Hidroxi-dimeninol



73 Ác. Heptelídico

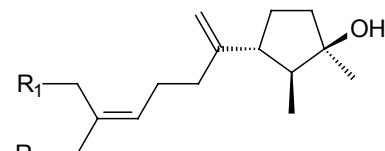


74 Ác. Hidroheptelídico



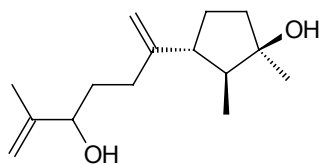
75 Chokol A  $R = H$

76 Chokol F  $R = Ac$

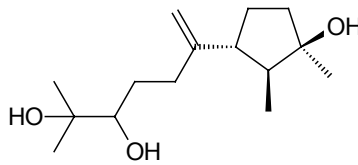


77 Chokol C  $R_1 = H$   $R_2 = OH$

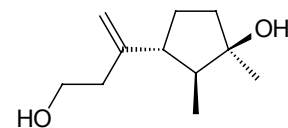
78 Chokol D  $R_1 = OH$   $R_2 = H$



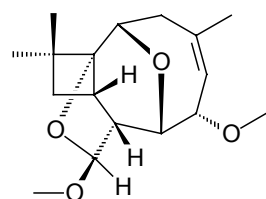
79 Chokol B



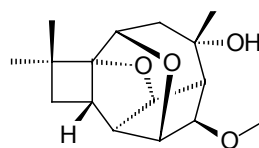
80 Chokol E



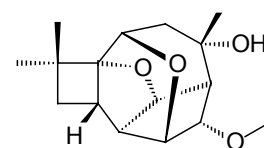
81 Chokol G



82 Pestalotiopsolideo A

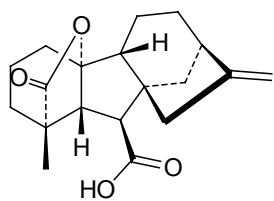


83 Taedolidol

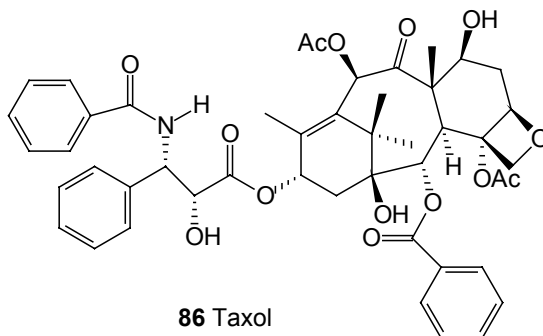


84 6-Epitaedolidol

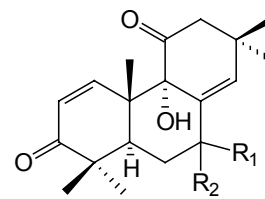
Diterpenos



85 Ác. Giberélico

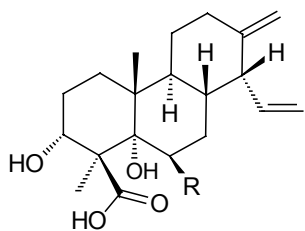


86 Taxol



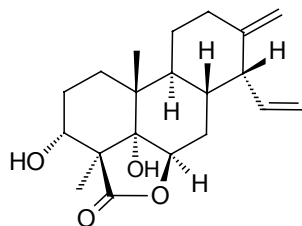
87  $R_1 = R_2 = O$

88  $R_1 = R_2 = H$

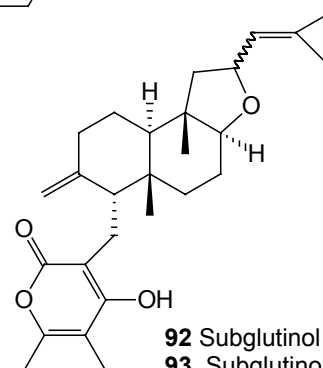


89 Ác. Zitiostromico A  $R = OH$

90 Ác. Zitiostromico B  $R = H_2$

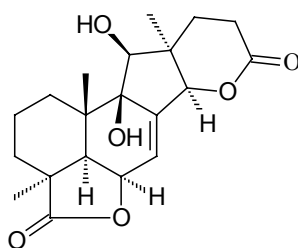


91 Zitiostromolideo



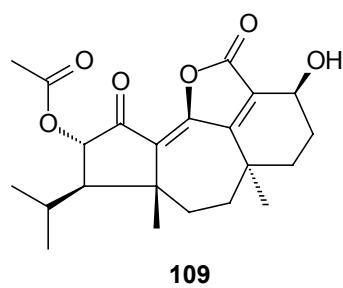
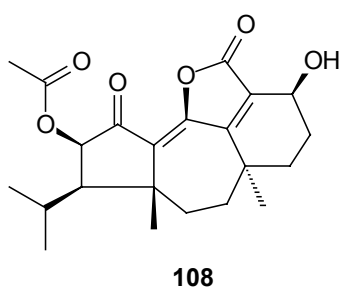
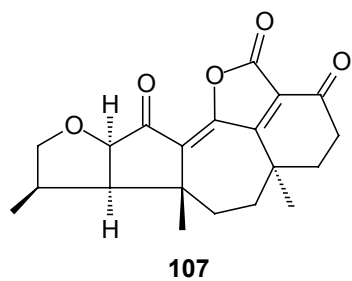
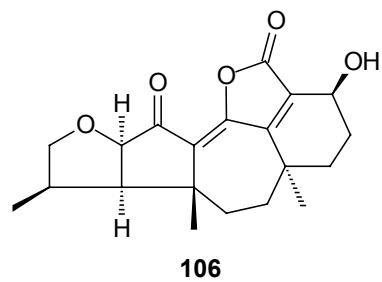
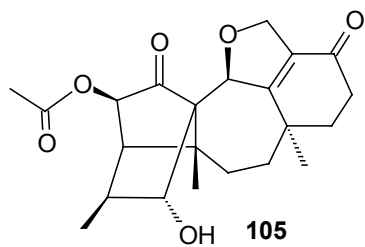
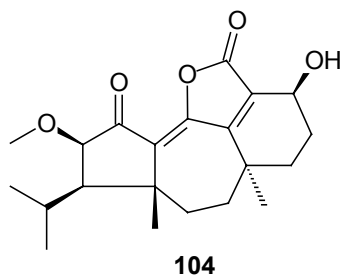
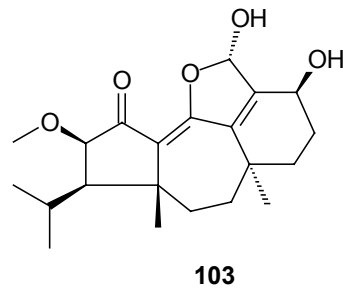
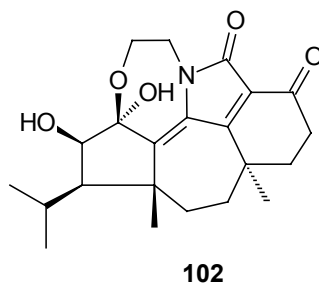
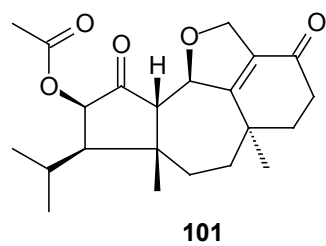
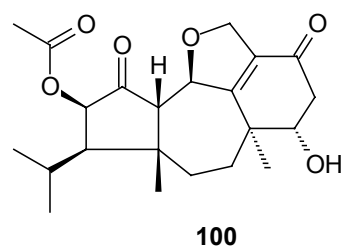
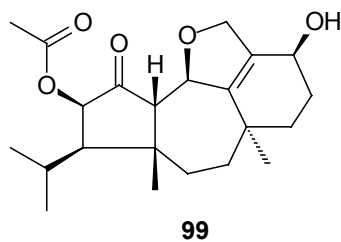
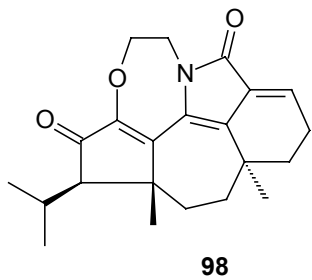
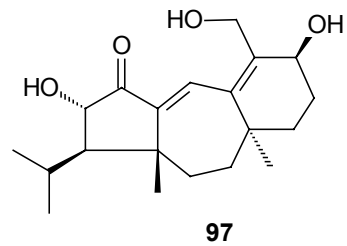
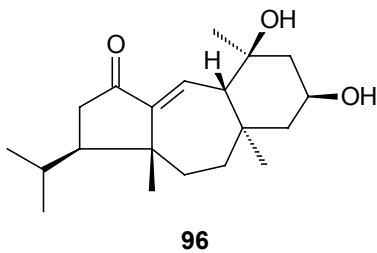
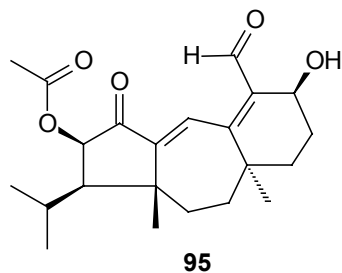
92 Subglutinol A 12 S

93 Subglutinol B 12 R

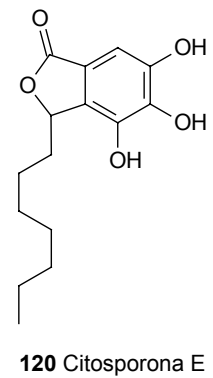
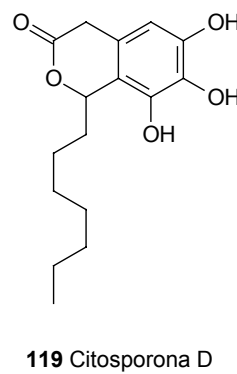
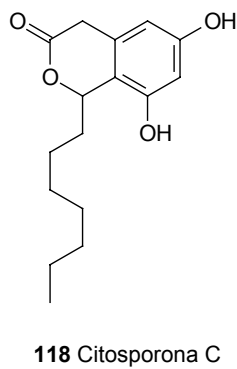
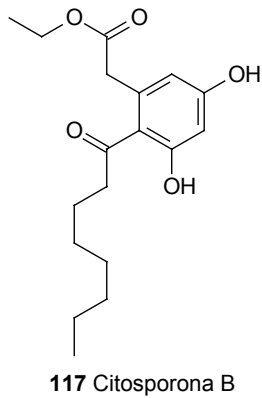
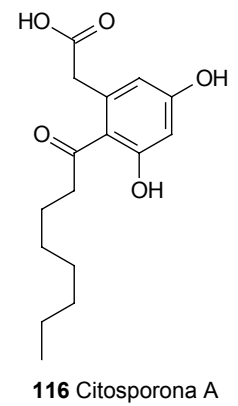
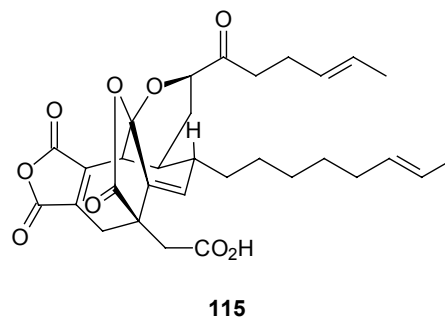
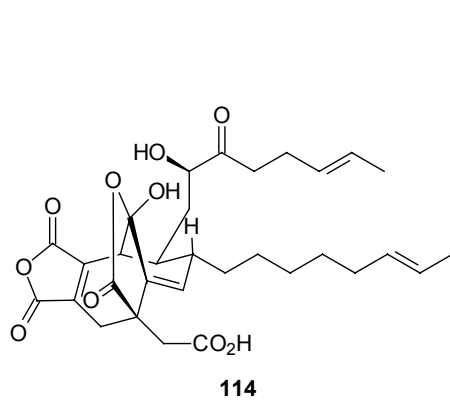
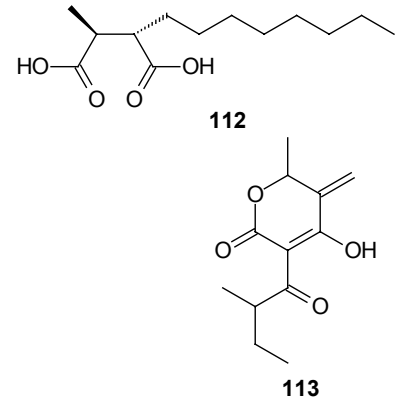
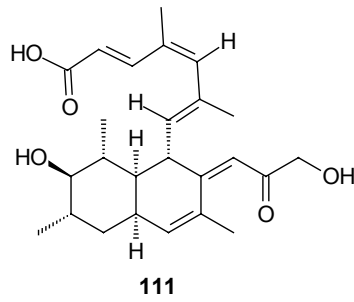
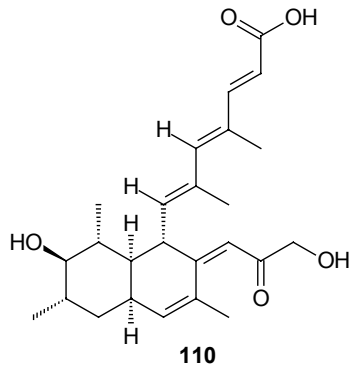


94 Geniculol

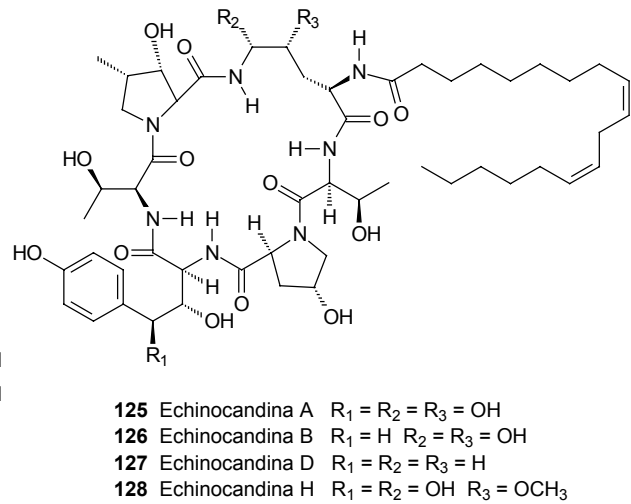
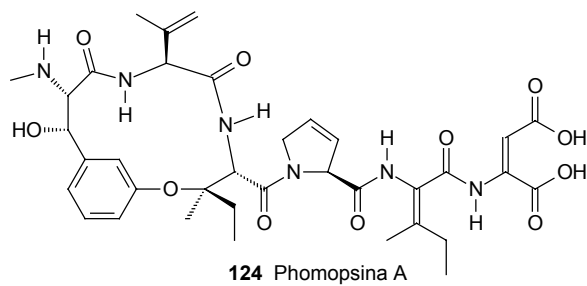
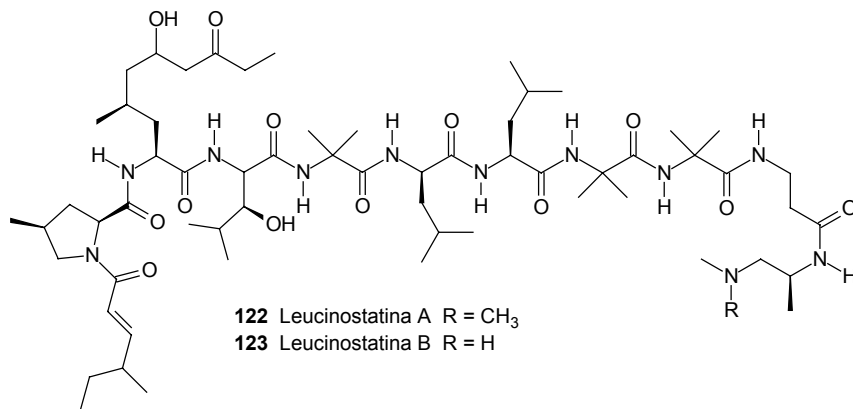
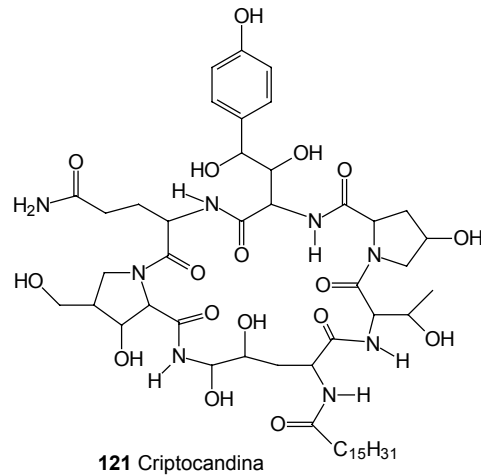
Diterpenos



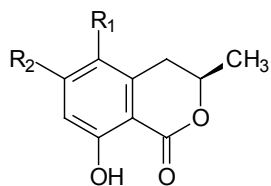
*Policetídeos*



Peptídeos



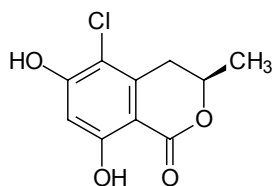
Isocumarinas



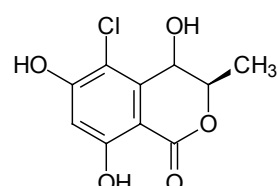
129 Meleína R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H

130 5-Metil-Meleína R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

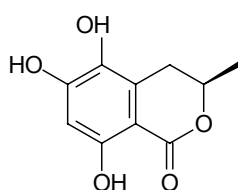
131 6-Hidroxi-Meleína R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH



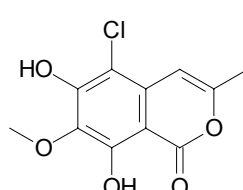
132 5-Chloro-6-Hidroxi-Meleína



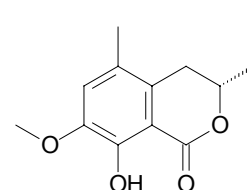
133 5-Chloro-4,6-Dihidroxi-Meleína



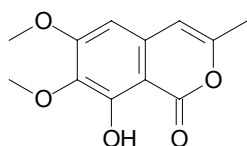
134 5,6-Dihidroxi-Meleína



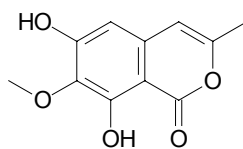
135 Avinecina A



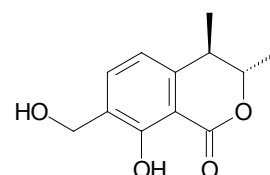
136 Avinecina B



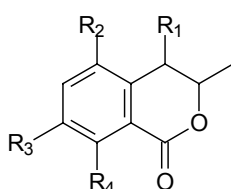
137



138



139 Gamahorina

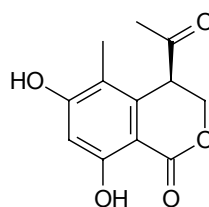


140 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OH

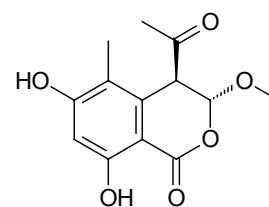
141 R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = OCH<sub>3</sub>

142 5-Hidroxi-Metil-Meleína R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>OH, R<sub>4</sub> = OH

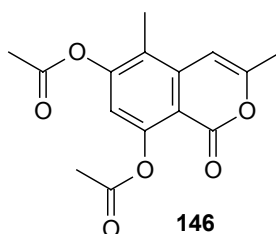
143 4-Hidroxi-5-Metil-Meleína R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H



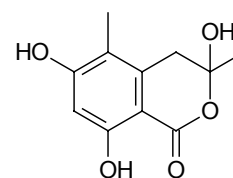
144



145



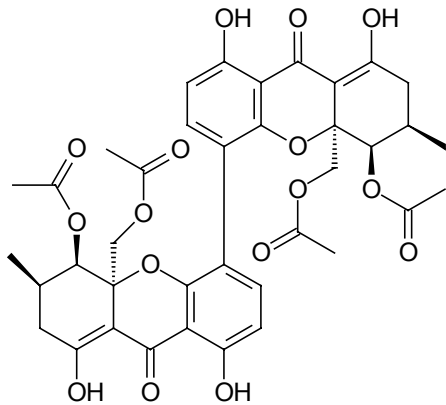
146



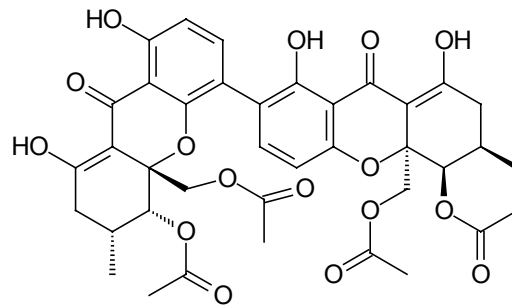
147



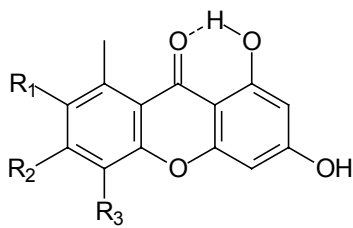
*Xantonas*



**148** Phomoxantona A



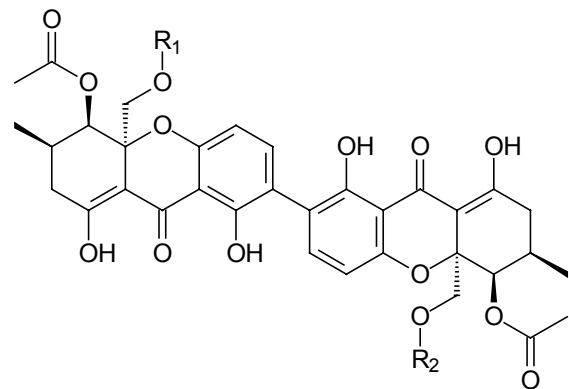
**149** Phomoxantona B



**150** Anomalina A  $R_1=R_2=OH, R_3=H$

**151** Anomalina B  $R_1=R_2=R_3=OH$

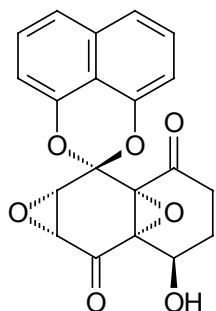
**152**  $R_1=R_3=H, R_2=OH$



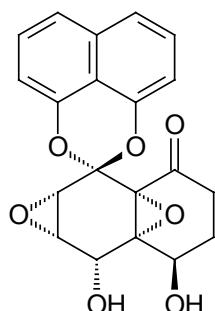
**153** Dicerandrol A  $R_1=R_2=H$

**154** Dicerandrol B  $R_1=Ac, R_2=H$

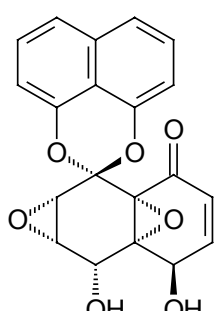
Quinonas



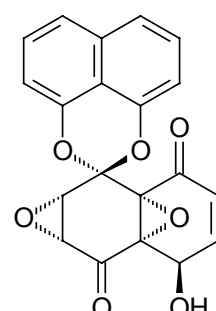
155 Diepoxina  $\alpha$



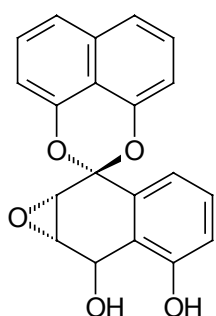
156 Diepoxina  $\nu$



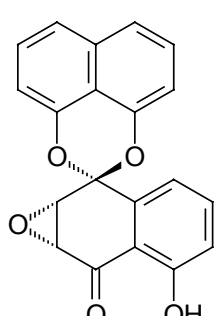
157 Diepoxina  $\epsilon$



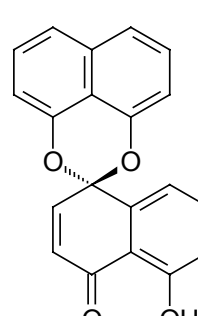
158 Diepoxina  $\delta$



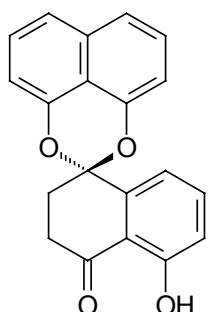
159 Palmarumicina  $C_{11}$



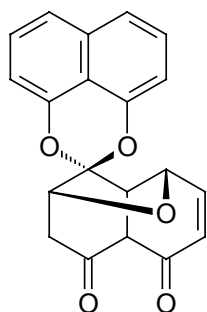
160 Palmarumicina  $C_2$



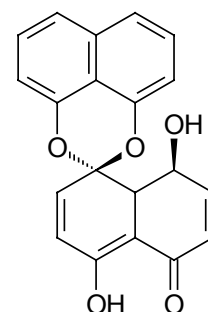
161 Palmarumicina  $CP_1$



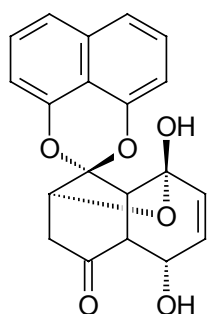
162 Palmarumicina  $CP_2$



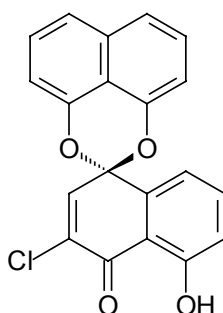
163 Palmarumicina  $CP_3$



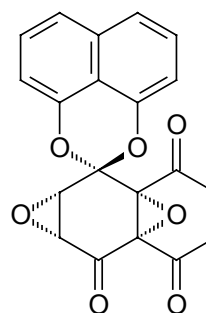
164 Palmarumicina  $C_2$



165 Palmarumicina  $CP_5$

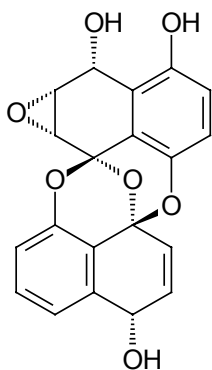


166 Palmarumicina  $C_1$

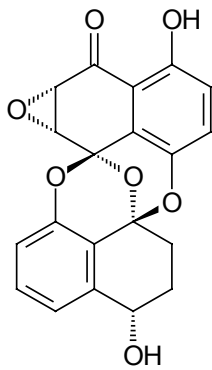


167 Palmarumicina  $C_9$

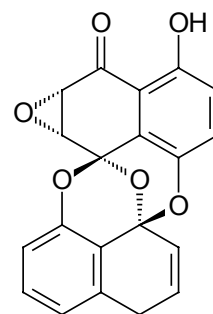
Quinonas



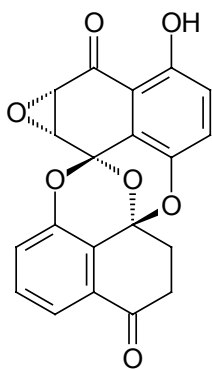
168 Preussomerina A



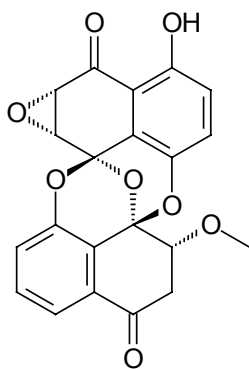
169 Preussomerina F



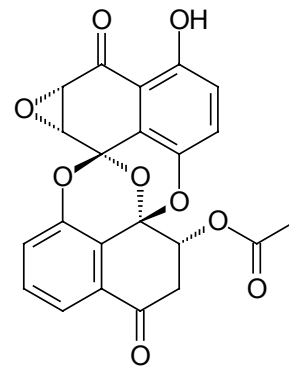
170 Preussomerina G



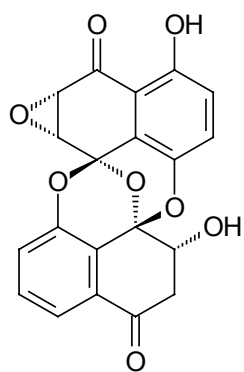
171 Preussomerina H



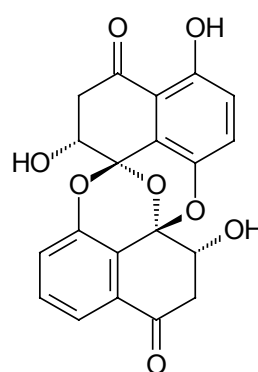
172 Preussomerina I



173 Preussomerina J

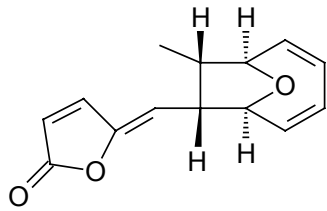


174 Preussomerina K

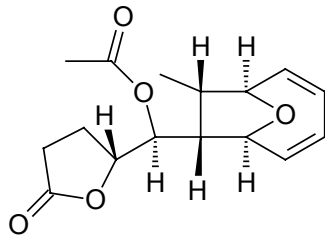


175 Preussomerina L

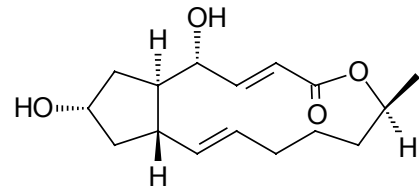
Lactonas



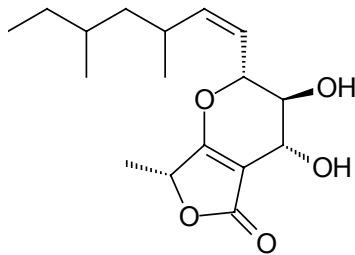
176 1893 A



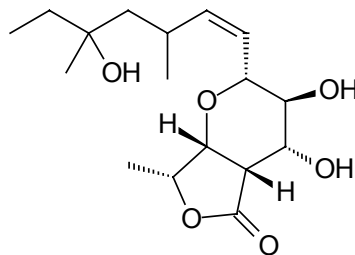
177 1893 B



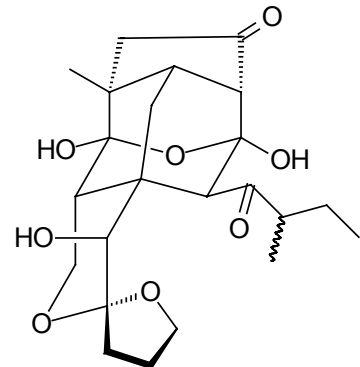
178 Brefeldina A



179 Fusidilactona A

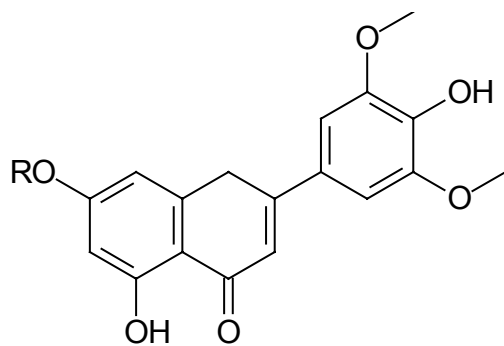


180 Fusidilactona B



181 Fusidilactona C

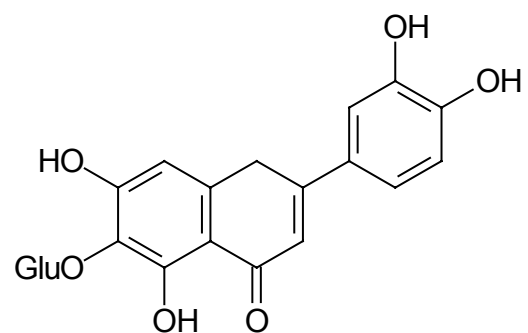
Flavonóides



182 Tricina R = H

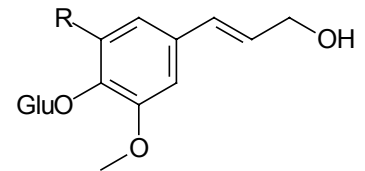
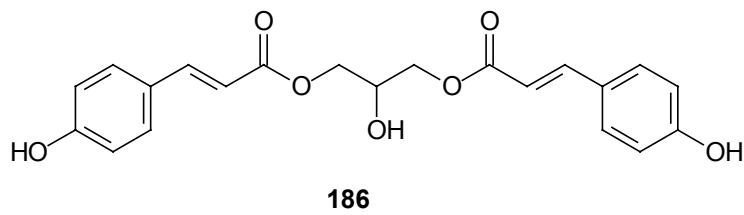
183 R = Glu

184 R = Rha-Glu



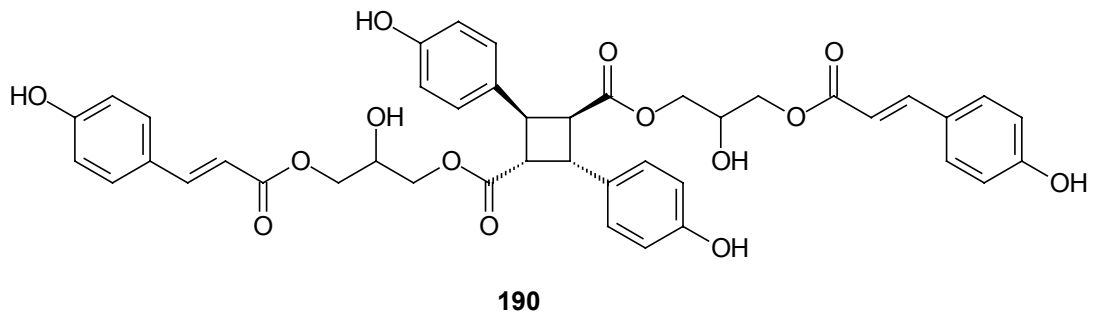
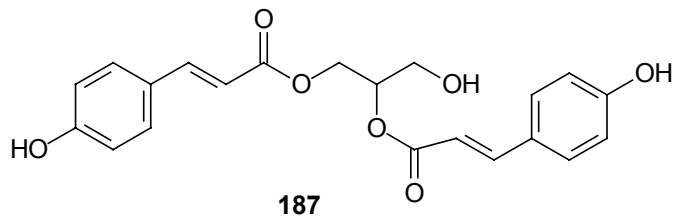
185

*Fenilpropanóides e Lignanas*

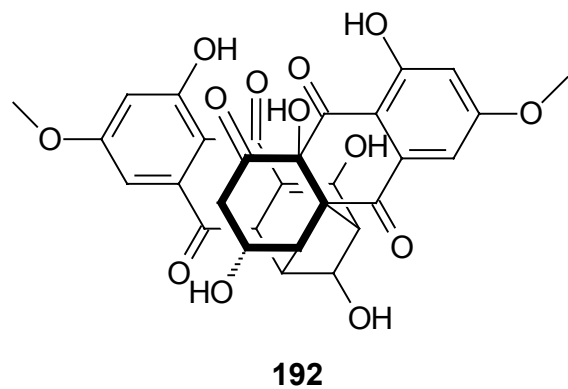
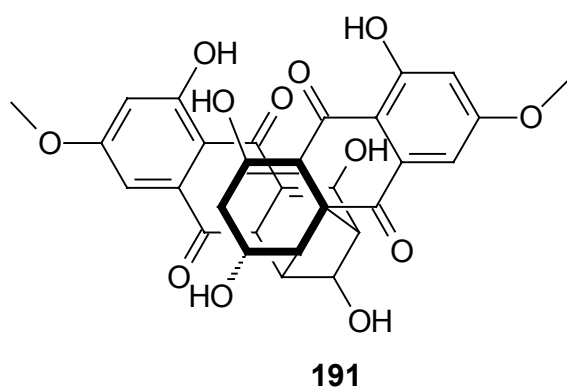


**188** Coniferina R = H

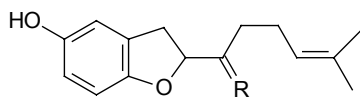
**189** Syringina R = OMe



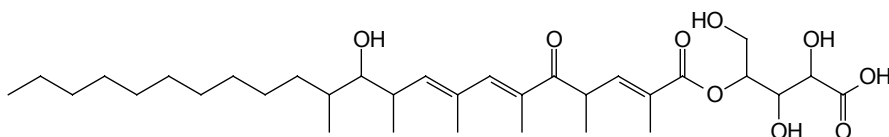
*Antraquinonas*



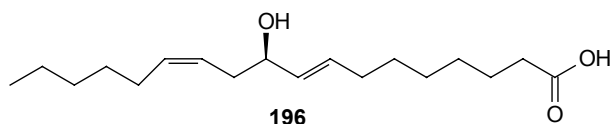
Outros



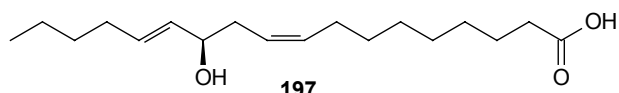
**193** R = O  
**194** R = OH, H



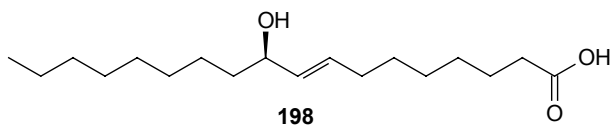
**195** Khafrefungina



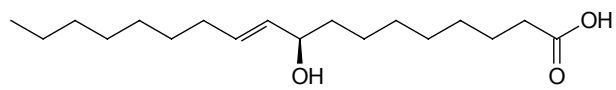
**196**



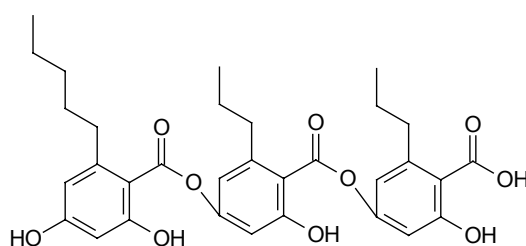
**197**



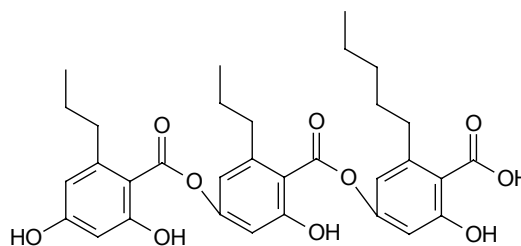
**198**



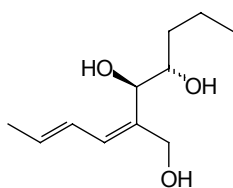
**199**



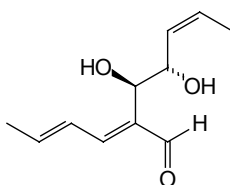
**200** Ác. Citônico A



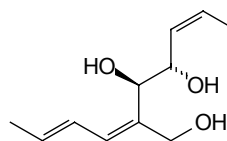
**201** Ác. Citônico B



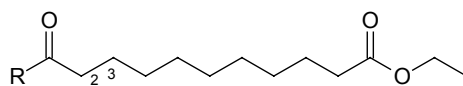
**202**



**203**

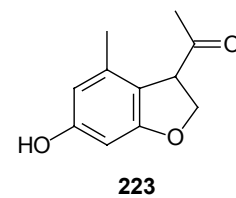
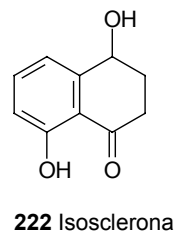
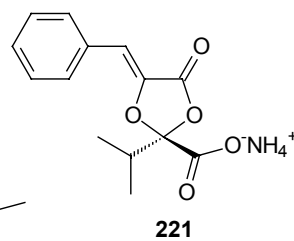
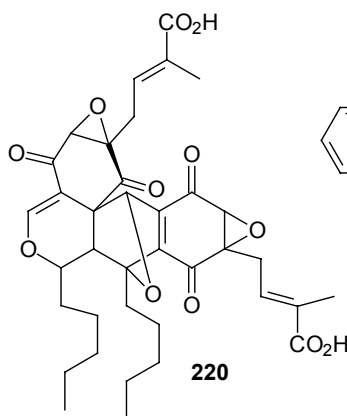
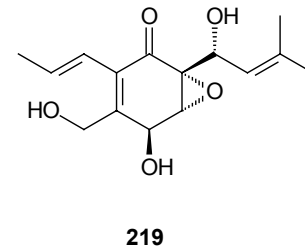
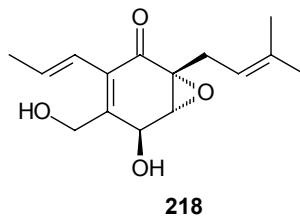
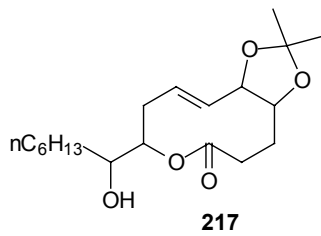
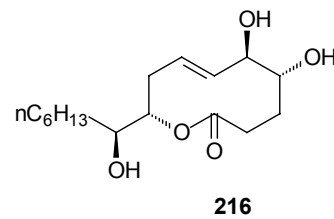
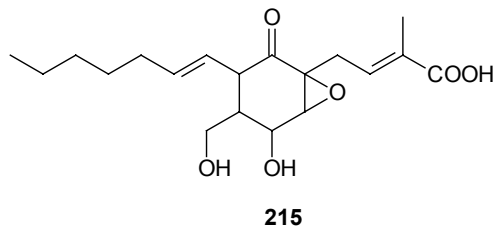
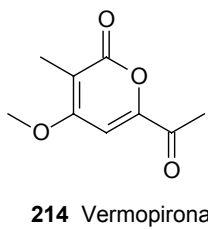
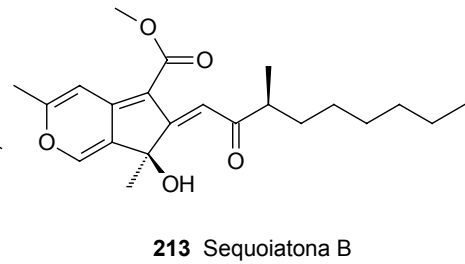
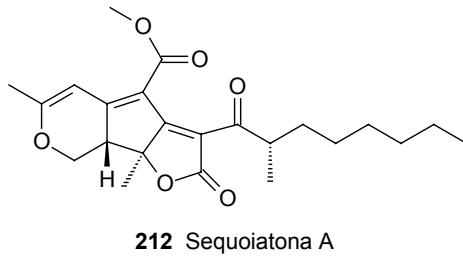
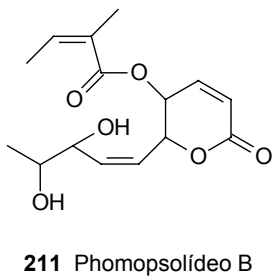
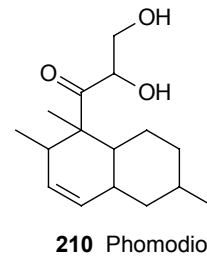
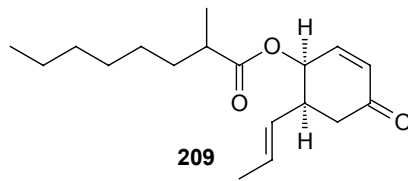
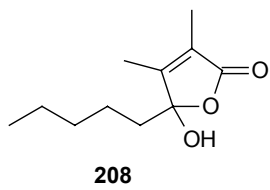


**204**

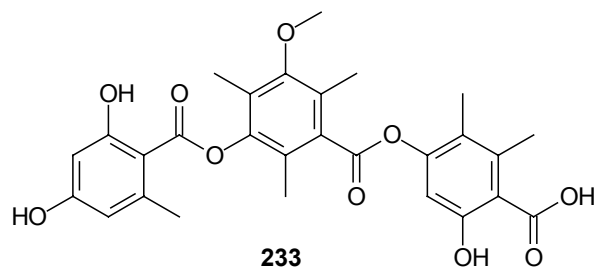
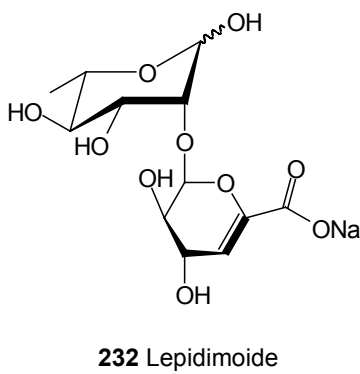
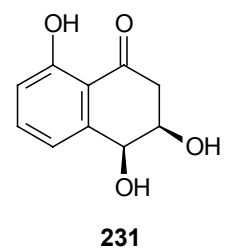
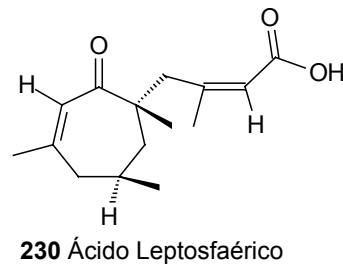
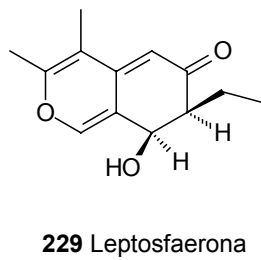
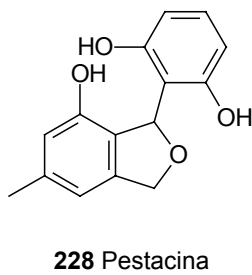
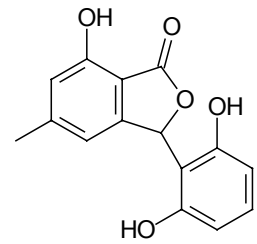
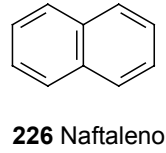
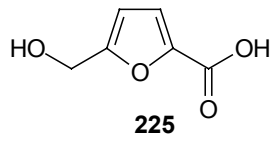
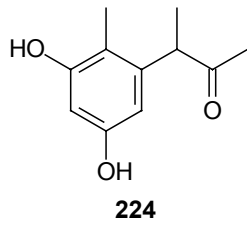


**205** R = H  
**206** R = H, 2,3-epóxido  
**207** R = OH

Outros



Outros





## **CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Melia azedarach***

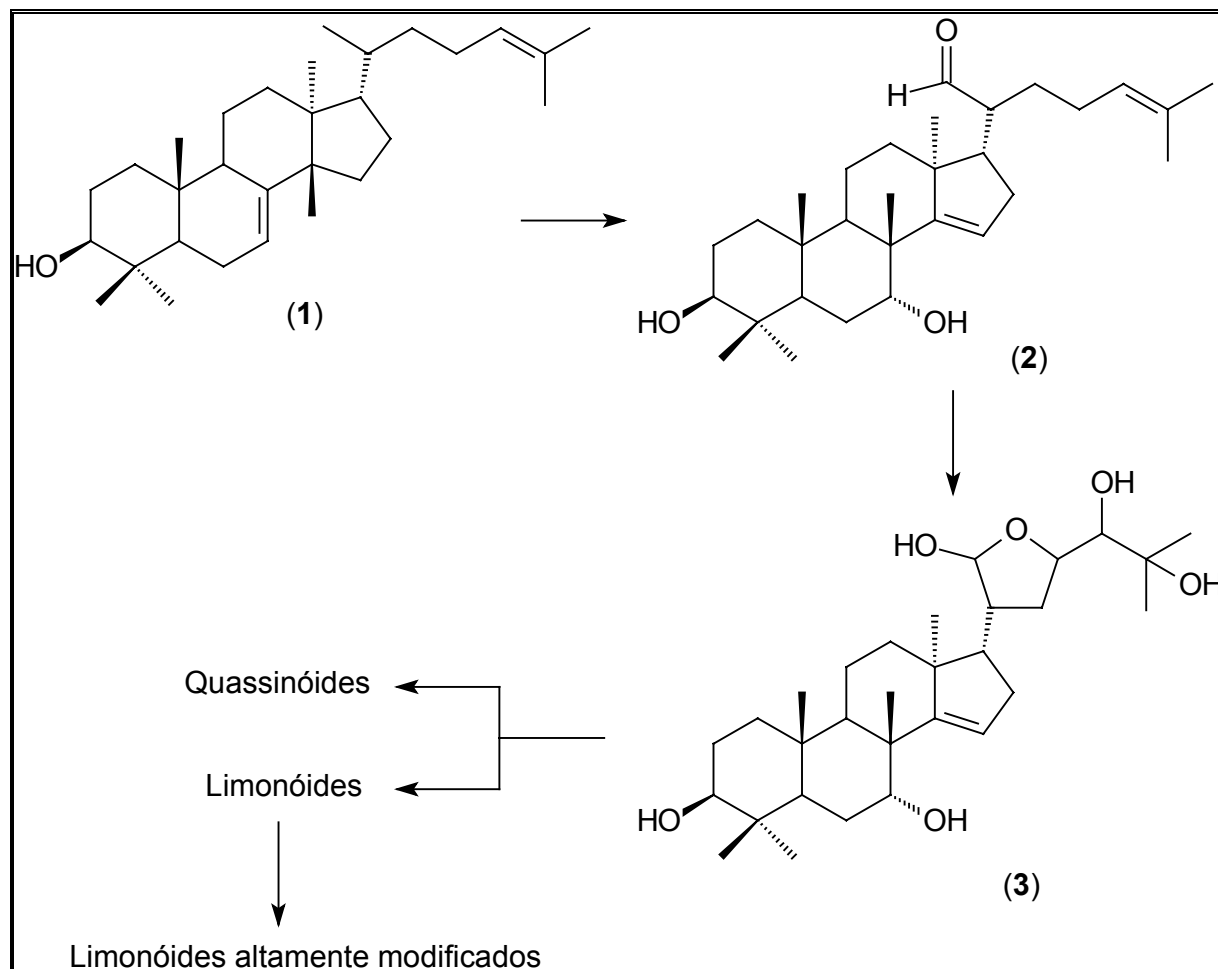
### **1. INTRODUÇÃO**

A família Meliaceae, compreendendo cerca de 50 gêneros e 1400 espécies, tem distribuição predominantemente tropical. São plantas em geral arbóreas, às vezes de grande porte, conhecidas pelas qualidades de suas madeiras como, por exemplo, o mogno (*Swietenia macrophylla*), o cedro-rosa (*Cedrela* sp), a cangerana (*Cabralea cangerana*), etc (JOLY, 1966). Além de fornecedoras de madeira de alto valor comercial, as plantas desta família são também conhecidas por serem fontes de substâncias micromoleculares as quais apresentam diversas atividades biológicas, entre elas a atividade inseticida (limonóides do tipo *C-seco*, como por exemplo, a azadiractina encontrada em *Azadiracta indica*), anticâncer (12-hidroxi-amoorastatina, por exemplo), antibacteriana, antifúngica e antiviral (limonóides do tipo *C-seco*) (KAPOOR e CHAWLA, 1986; CHAMPAGNE *et al.*, 1992). O grupo de pesquisa da Universidade Federal de São Carlos tem investigado a química da família Meliaceae com vários objetivos. Entre eles estão a busca de substâncias com bioatividade, o uso do conhecimento químico em questões quimiossistemáticas e a interação inseto-planta (OLMO *et al.*, 1996, OLMO *et al.*, 1997; DI PAULA *et al.*, 1997).

Em termos de metabolismo secundário, as plantas da ordem Rutales têm em comum a degradação de triterpenos tirucalanos levando aos limonóides (famílias Rutaceae, Meliaceae e Cneoraceae) e quassinóides (família Simaroubaceae) (WATERMAN e GRUNDON, 1983) como mostrado no Esquema 2.1.

A principal classe de metabólitos micromoleculares produzidos por Meliaceae consiste de triterpenos modificados denominados de limonóides, do qual a azadiractina é a substância mais conhecida devido as suas propriedades inseticidas (PENNINGTON e STYLES, 1975; NAKATANI *et al.*, 1981). Os limonóides podem ser encontrados em todos os tecidos da planta, mas diferentes órgãos dentro de uma planta podem produzir tipos distintos dessas substâncias (TAYLOR, 1984; CHAMPAGNE *et al.*, 1992). A produção de limonóides através da degradação dos

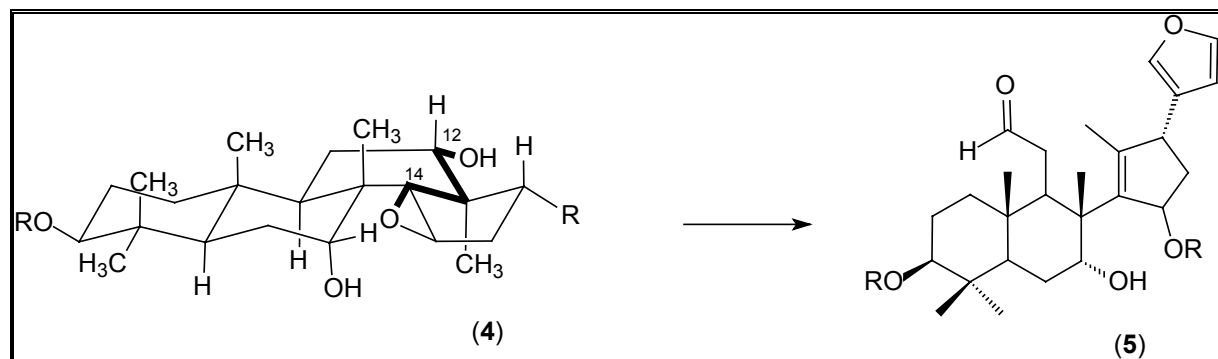
triterpenos nas plantas parece ocorrer em uma série de passos, incluindo a oxidação do tipo Baeyer-Villiger e rearranjos estruturais (WATERMAN e GRUNDON, 1983).



ESQUEMA 2.1 – Caminho de degradação de triterpenos seguido pelas plantas da ordem *Rutales*.

A ocorrência de limonóides com anel C seco do tipo da azadiractina parece estar restrita às espécies dos gêneros *Melia* e *Azadirachta* na família Meliaceae (OLMO, 1995). Acredita-se que a clivagem da ligação entre os carbonos C-12 e C-13 deve ocorrer como mostrado no Esquema 2.2, onde um grupo abandonador ligado ao carbono C-14 está orientado na forma anti-periplanar com uma função oxigenada com configuração  $\beta$  no carbono C-12 (RODRIGUES-Fo, não publicado). Os limonóides com todos os anéis intactos também são encontrados nos extratos de *M. azedarach*.

Exemplos de limonóides com anéis intactos e com o anel C-seco podem ser vistos na Figura 2.1.



ESQUEMA 2.2 - Clivagem do anel C em *Melia* e *Azadiracta*.

Em *Melia azedarach* - Meliaceae nativa no nordeste da Índia e introduzida nos trópicos (PENNINGTON e STYLES, 1975) - os limonóides parecem se concentrar nas raízes, conforme estudos fitoquímicos feitos com espécies coletadas em outros países (TAKEYA *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1996). Embora essas substâncias sejam conhecidas por suas atividades inseticidas (CHAMPAGNE *et al.*, 1992), outras atividades biológicas, incluindo as propriedades anticancerígenas, antibióticas, antifúngicas e antivirais sugerem que essas substâncias devam representar um papel na defesa da planta.

Como discutido anteriormente, os estudos sobre a química dos microrganismos têm sido retomados por muitos pesquisadores com uma nova abordagem considerando agora a bioquímica das associações desses microrganismos com suas respectivas plantas hospedeiras.

Com o conhecimento já acumulado por diversos grupos de pesquisas no mundo sobre a fitoquímica das plantas da ordem *Rutales*, a investigação sobre o metabolismo secundário de fungos associados a espécies pertencentes à família Meliaceae torna-se indispensável. De acordo com o nosso conhecimento, não tem sido registrado, até o momento, publicações de fungos endofíticos de plantas da família Meliaceae no Brasil. Conforme levantamento bibliográfico realizado em diversas bases de dados (Web of Science, Scirus, Probe, Google, entre outras), dois grupos de

pesquisadores realizam pesquisa de fungos endofíticos em duas plantas da família Meliaceae, *Guarea guidonea*, onde o enfoque foi verificar a diversidade microbiana nesta planta (POLISHOOK *et al.*, 1996; GAMBOA e BAYMAN, 2001) e *Carapa guianensis* com o objetivo de verificar a especificidade dos fungos hospedeiros em plantas tropicais (CANNON e SIMMONS, 2002).

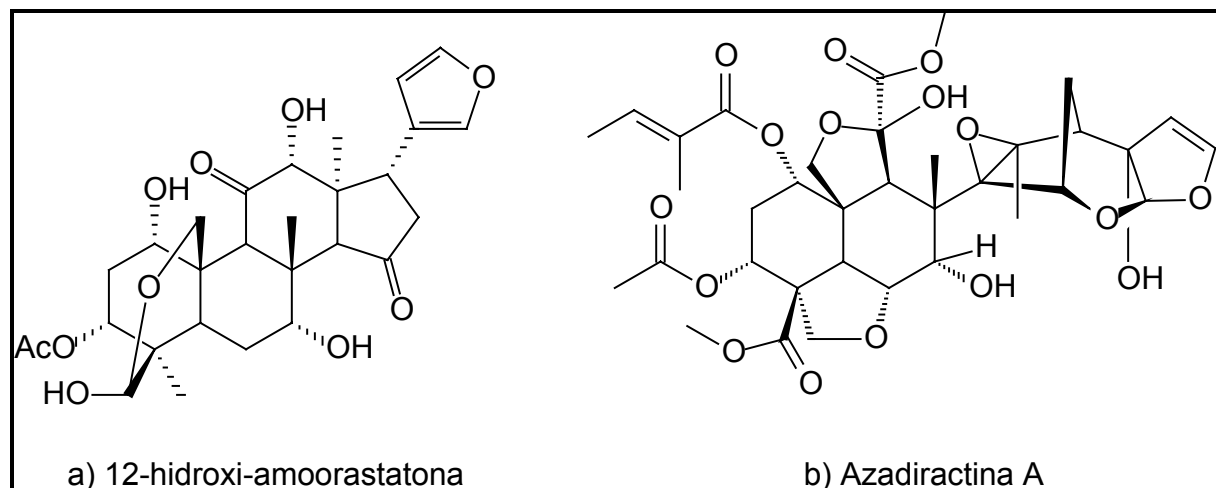


FIGURA 2.1 – Exemplos de limonóides presentes em *M. azedarach*. a) com todos os anéis intactos, b) com anel C-seco (TAYLOR, 1984).

Entretanto, alguns fitopatógenos são encontrados em plantas da família Meliaceae, os quais causam sérios danos como, por exemplo, as manchas foliares, verrucoses, ferrugens, entre outras (FERREIRA, 1989; MENDES *et al.*, 1998). Alguns exemplos são mostrados na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 – Relação de Fungos Fitopatogênicos a Plantas da Família Meliaceae.

| Planta Hospedeira                                     | Patógeno   | Efeito   | Referência   |
|---|--|--|--|
| <i>Melia azedarach</i>                                | <i>Cercospora meliae</i> Ellis e Verhart <sup>1</sup> ;<br><i>Sphaceloma meliae</i> <sup>2</sup>   | <sup>1</sup> Manchas foliares<br><sup>2</sup> Verrucose                          | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>Azadiracta indica</i><br><i>Cabralia canjerana</i> | <i>Sclerotium rolfsii</i><br><i>Scolecopeltidium cabraliae</i><br><i>Sydowiellina cabraliae</i>  | Murcha de mudas<br>n.m. <sup>1</sup>   | SILVA, 1994<br>FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998 |
| <i>C. multifuga</i>                                   | <i>Diplodia</i> sp; <i>Penicillium</i> sp;<br><i>Rhizopus</i> sp   | Queda da<br>viabilidade e<br>germinação das<br>sementes                          | CARNEIRO, 1990   |
| <i>Cabralia</i> sp                                    | <i>Botryosphaeria uleana</i>   | n.m.   | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>Carapa guianensis</i>                              | <i>Arthonia platygraphidea</i><br><i>Chiodecton</i> sp; <i>Chroococcum</i> sp;<br><i>Lopadium</i> sp; <i>Trentefolia</i> sp  | n.m.   | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>Carapa</i> sp                                      | <i>Actinoteichus</i> sp;<br><i>Ainsworthia lecythidacearum</i> ;<br><i>Aulaxina quadrangular</i> ; <i>Bacidia</i> sp;<br><i>Didymopyrostoma xylopieae</i> ;<br><i>Lasinectria</i> sp; <i>Meliola trifurcata</i> ;<br><i>Micropeltella allomarginata</i> ;<br><i>Podosporium insipidum</i> ;<br><i>Spegazziniela congoensis</i> | n.m.   | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998)               |
| <i>Cedrela fissilis</i> ,<br><i>C. mexicana</i>       | <i>Phyllachora balansae</i>  | n.m.   | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>C. odorata</i>                                     | <i>Aspergillus</i> spp; <i>Botryodiplodia</i> sp;<br><i>Fusarium</i> spp; <i>Monocillium</i> sp;<br><i>Penicillium</i> sp; <i>Phomopsis</i> sp;<br><i>Phyllachora balansae</i>   | Queda no poder<br>germinativo,<br>redução no vigor e<br>podridão das<br>sementes | CARNEIRO, 1986   |
| <i>Cedrela</i> sp                                     | <i>Acremoniella cedrelae</i>   | n.m.   | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>Guarea trichilioides</i>                           | <i>Atichia glomerulosa</i> ; <i>Balansiopsis guareae</i> ; <i>Micropeltis guareae</i> ;<br><i>Microthyriella guareae</i>   | n.m.   | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>Guarea</i> sp                                      | <i>Aecidium guarae</i> , <i>A. muryense</i> <sup>1</sup><br><i>Meliola dysoxylicola</i> , <i>Meliola</i> sp <sup>2</sup> ;<br><i>Parasterina guaranítica</i>   | <sup>1</sup> Ferrugem<br><sup>2</sup> Manchas foliares                           | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998                |
| <i>Switenia macrophylla</i>                           | <i>Calonectria crotalariae</i> ;<br><i>Cylindrocladium scoparium</i>   | Manchas foliares   | REIS, 1976;<br>ALFENAS &<br>FERREIRA, 1979                       |

Cont. Tabela 2.1

| Planta Hospedeira          | Patógeno                | Efeito   | Referência  |
|----------------------------|-------------------------|----------|---|
| <i>Trichilia weddellii</i> | <i>Uredo trichiliae</i> | Ferrugem | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998 |
| <i>Trichilia</i> sp        | <i>Uredo trichiliae</i> | n.m.     | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998 |
| Meliaceae                  | <i>Meliola khayae</i>   | n.m.     | FERREIRA, 1989;<br>MENDES <i>et al.</i> ,<br>1998 |

<sup>1</sup>n.m. = esses microrganismos são conhecidos por serem fitopatógenos em geral.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi isolar e identificar a composição da comunidade de fungos endofíticos nos tecidos sadios de *Melia azedarach* L (Meliaceae) e conservar estes microrganismos em condições viáveis através da construção de uma Micoteca.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Materiais e Equipamentos

#### a) Materiais Utilizados para o Isolamento e Cultivo dos Fungos Endofíticos

- Álcool 70%
- Hipoclorito de sódio 11%
- Dextrose – Mallinckrodt
- Ágar bacteriológico – DIFCO, Henrifarma
- Batata inglesa

### **b) Instrumentação Utilizada**

- Câmara de Fluxo Laminar - Veco VL FS – 12M
- Estufa Incubadora - FANEM 347 CD
- Autoclave Vertical - Phoenix AV 75
  - Soc. FABBE 103
- Microscópio Óptico Comum - Nikon – Eclipse E2000

## **3.2. Fungos Endofíticos de *Melia azedarach***

### **3.2.1. Material Botânico**

Os tecidos sadios de *Melia azedarach* L. (córtex das raízes, xilema das raízes, córtex do caule, folhas e frutos) foram coletados em 1998 (agosto, estação seca) e em 1999 (março, estação úmida). Um exemplar do espécime encontra-se depositado no Herbário do Departamento de botânica da Universidade Federal de São Carlos. A planta selecionada para este estudo é uma árvore de porte médio e encontra-se no estacionamento do Departamento de Química desta Universidade.

### **3.2.2. Cultura, Isolamento e Identificação**

Para determinar a distribuição de fungos endofíticos em *Melia azedarach*, todos os tecidos estudados tiveram a sua superfície esterilizada. O procedimento geral adotado seguiu a metodologia descrita por PETRINI *et al.* (1992). As hifas e esporos de fungos epifíticos foram eliminados por imersão da planta em etanol a 70% por 2 sec., seguido da imersão em uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 11% durante 1-5 min., etanol 70% por 2 sec. e por último, a lavagem em água destilada esterilizada para a remoção dos agentes esterilizantes. Os fragmentos foram então depositados sobre placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose, ágar) e incubados no escuro a 25 °C e observados diariamente. Os exemplares de crescimento

rápido foram re-inoculados sobre outras placas de Petri contendo BDA. A Figura 2.2 apresenta os procedimentos para o isolamento dos fungos endofíticos.

As culturas puras foram enviadas para identificação e as culturas em mistura foram conservadas para estudos futuros. A identificação dos fungos foi realizada através da colaboração com a Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas. O número de espécies e suas identidades foram registrados para cada tecido da planta estudado. Estes fungos foram identificados conforme suas características macro e microscópicas, modo de reprodução e submissão aos testes fisiológicos em métodos de cultivo utilizando meios seletivos. A identificação dos gêneros e das espécies foi obtida através dos estudos descritos por BARNETT e HUNTER (1987), BOOTH (1977), PITT (1988), RAPER e TOM (1949), RAPER e FENNEL (1965), e RIFAI (1969). Após a identificação, estes fungos foram depositados na Micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular (LaBioMi) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

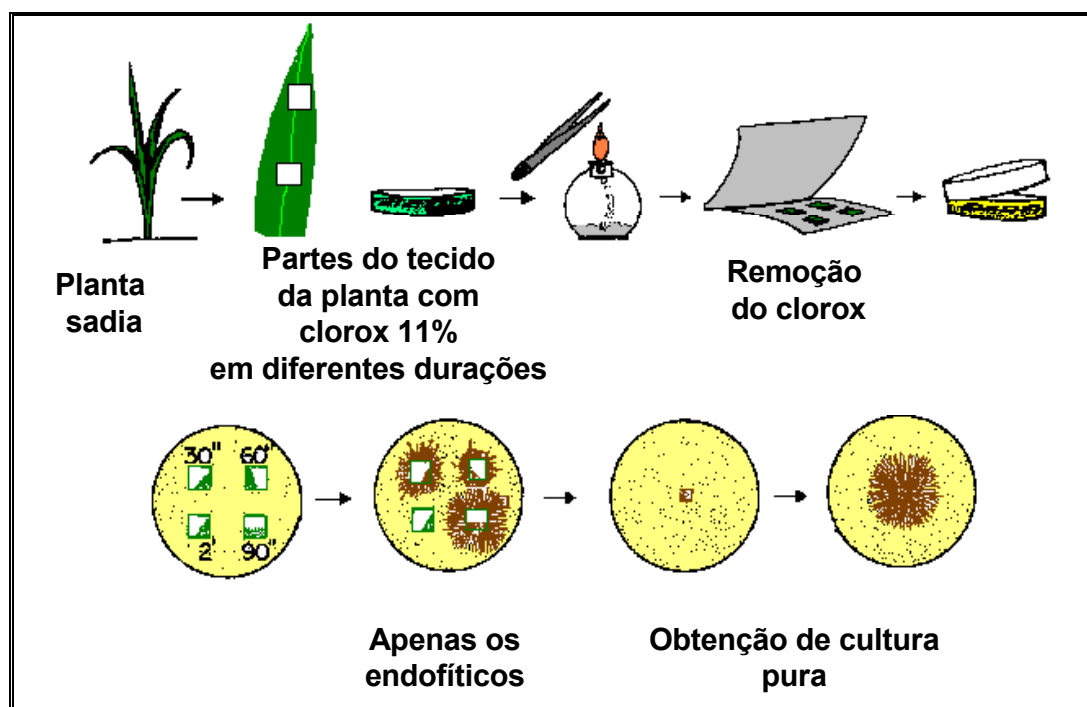


FIGURA 2.2 – Procedimentos gerais para o isolamento dos fungos endofíticos dos tecidos de plantas saudáveis.



### 3.3. Micoteca

Para a elaboração da micoteca, os fungos isolados anteriormente foram reativados através da semeadura em superfície em placas de Petri contendo BDA (ágar, batata e dextrose) e incubados à temperatura ambiente (25°C), até que apresentasse um bom crescimento, ou seja, que apresentassem esporulação.

Ocorrida a esporulação, a colônia foi cortada em blocos de aproximadamente 6.0 a 8.0 mm com o auxílio de bisturi e cerca de 10 blocos foram transferidos para dois frascos do tipo penicilina contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Esses frascos foram imediatamente tamponados e vedados com aro de metal e mantidos a temperatura ambiente.

Para a visualização das características macroscópicas um exemplar de cada microrganismo catalogado foi cultivado em tubos de cultura com meio BDA. Foi adicionada água destilada esterilizada nestes tubos até recobrir a cultura pura e esporulada. Em seguida foi adicionado cerca de 1mL de óleo mineral esterilizado. Os frascos foram tamponados e conservados a temperatura ambiente.

Durante a realização desse trabalho, foram confeccionadas as lâminas para verificar se houve frutificação e também possibilitar alguma identificação desses microrganismos. Estas lâminas foram preparadas por meio da coleta de uma alçada do material fúngico e colocada sobre a lâmina de vidro contendo uma gota do corante lactofenol. Em seguida, esses materiais foram cobertos com uma lamínula e observados no microscópio sob aumento de 200 e 400 vezes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Micoteca

Em função da grande quantidade de fungos endofíticos isolados dos tecidos de *Melia azedarach* e *Cedrela fissilis* durante o trabalho do doutorado e de outros microrganismos obtidos pelos alunos orientados pelo Professor Doutor Edson Rodrigues Filho, foi implantado uma Micoteca em nosso laboratório de Bioensaios - Laboratório de Bioquímica Micromolecular – LaBioMi, com a valiosa colaboração da doutoranda Francinete Ramos Campos.

Esta micoteca teve o início com os fungos endofíticos isolados de *M. azedarach* e em seguida, os fungos associados a *C. fissilis*. Posteriormente, outros alunos serão envolvidos e depositarão seus microrganismos nesta micoteca. Alguns exemplos são os trabalhos em andamento com os fungos associados a *Murraya paniculata* e *Coffeae arabica* (Rutaceae), *Pinus taeda* e *Sapindus saponaria*.

Até o presente momento foram catalogados 89 isolados fúngicos. A Figura 2.3 apresenta os gêneros catalogados, e que posteriormente serão enviados para a identificação de suas espécies. Essa figura mostra ainda a predominância de dois gêneros de fungos: *Penicillium* e *Aspergillus* em *M. azedarach* e *C. fissilis*. Embora não documentados esses dois gêneros também foram encontrados em uma outra Meliaceae – *Azadiracta indica*. Contrariamente, em plantas das outras famílias estudadas, principalmente *Murraya paniculata* (Rutaceae) não foi observada a predominância desses gêneros, como também não foi observado algum em destaque. Foi encontrado um outro nicho com uma grande diversidade de microrganismos, sugerindo, portanto, que estes resultados poderiam indicar uma possível relação entre os fungos e seus hospedeiros.

Todos os microrganismos isolados, inclusive os ainda não identificados em nível de gênero receberam um número de registro (Figura 2.4). No registro de cada fungo catalogado consta-se dados macro e micromorfológicos, a origem, o meio de cultura utilizado. O modelo deste catálogo pode ser visto na Figura 2.5. As Figuras 2.6 e 2.7 apresentam os fungos conservados em água destilada estéril e em tubos de cultura com água destilada estéril e óleo mineral.

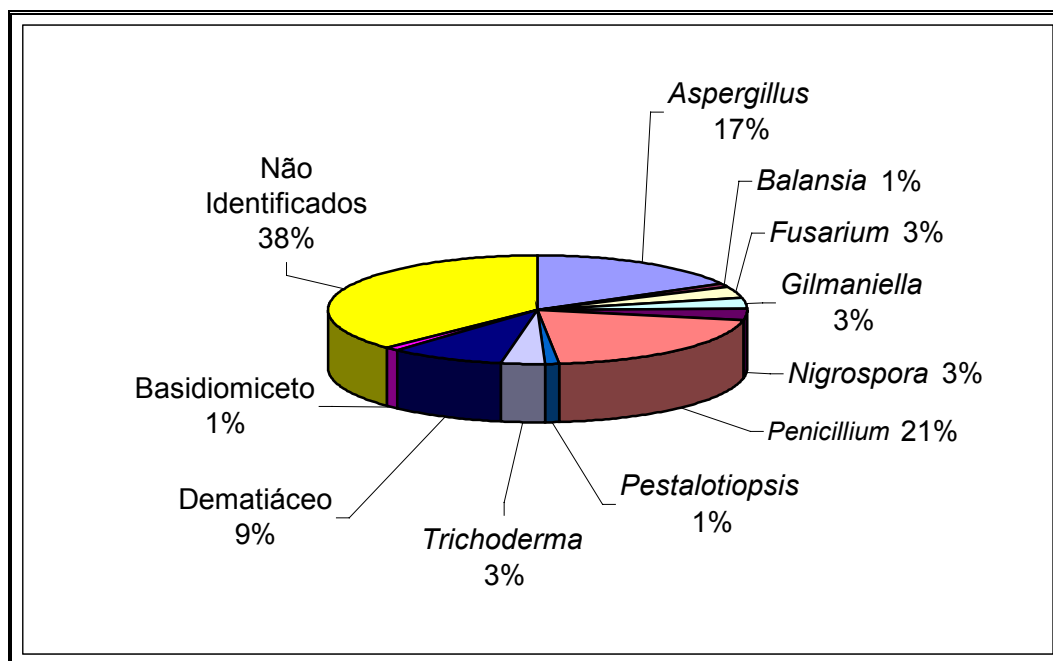


FIGURA 2.3 – Principais gêneros catalogados na Micoteca do LaBioMi.

Existem vários métodos de preservação dessas culturas como, por exemplo, o armazenamento em solo esterilizado, blocos de ágar em água destilada estéril, imersão em óleo mineral esterilizado, estocagem sob refrigeração, sílica gel e liofilização (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

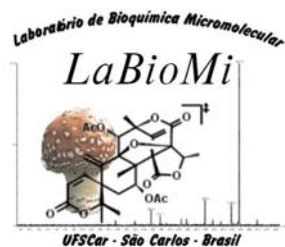
Para que ocorra uma perfeita manutenção da coleção, foi adotado um esquema de checagem para monitorar a pureza das culturas e demais caracteres. Conseqüentemente, foi necessário preencher alguns requisitos para que o método de preservação fosse validado, onde, 1) a cultura deveria estar em bom estado e; 2) deveria dispor de condições ótimas de crescimento, tais como: temperatura, umidade, oxigenação, iluminação, meios de cultura, etc.

A micoteca surgiu como uma exigência das próprias atividades que estavam sendo desenvolvidas, pois como era uma demanda muito grande desses microrganismos, necessitava-se de espaço físico, materiais de consumo e vidrarias. Essa coleção de culturas tem por objetivo a catalogação de fungos filamentosos (endofíticos e epifíticos) de ocorrência nas plantas estudadas por nosso grupo e manutenção dos mesmos em estado de viabilidade, pureza e estabilidade, conservando suas características morfo-fisiológicas e genéticas originais. Esses microrganismos

foram e estão sendo conservados em blocos de ágar em água destilada estéril, sob monitoramento de suas purezas.

Os fungos identificados pela Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira foram catalogados nessa coleção, recebendo um número de registro. Os fungos que ainda não foram submetidos à identificação foram reativados e conservados. Alguns fungos que estavam em misturas foram separados e outros foram conservados em mistura, pois para a separação dos mesmos é preciso a utilização de técnicas adicionais e aprimoradas para o isolamento dos mesmos, as quais não foram possíveis de serem realizadas durante a execução deste trabalho.

Como foi adquirido um bom microscópio que permite captura de imagens, alguns fungos estão sendo identificados em nível de gênero no nosso laboratório. Dessa forma, uma busca prévia na literatura do fungo que está sendo trabalhado tornou-se mais fácil, além de enviarmos esses microrganismos para identificação com informações adicionais que podem assegurar a caracterização taxonômica dos mesmos.



Universidade Federal de São Carlos  
 Centro de Ciências Exatas  
 DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
**Laboratório de Bioquímica Micromolecular – LaBioMi**  
 Via Washington Luiz, km 235 – Caixa Postal 676  
 Fone: (016) 260-8208 – FAX 260-8350 – Telex 162369 – SCUF – Br  
 Responsável: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
 e-mail: [edson@dq.ufscar.br](mailto:edson@dq.ufscar.br)

## CATÁLOGO DA COLEÇÃO DE CULTURA

| Espécie  | N. Registro | Procedência   |
|--|-------------|---------------|
| <i>Aspergillus aculeatus</i> Lizuka            | LaBioMi 001 | LaBioMi – FE* |
| <i>Aspergillus carbonarius</i> Bain            | LaBioMi 002 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus flavus</i>                      | LaBioMi 003 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus japonicus</i> Saito             | LaBioMi 004 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem           | LaBioMi 005 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus pulvulentus</i> Mc Alpine       | LaBioMi 006 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus</i> sp                          | LaBioMi 007 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus</i> sp                          | LaBioMi 008 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus</i> sp                          | LaBioMi 009 | LaBioMi - FE  |
| <i>Balansia</i> sp                             | LaBioMi 010 | LaBioMi - FE  |
| <i>Fusarium moniliforme</i>                    | LaBioMi 011 | LaBioMi - FE  |
| <i>Fusarium nivale</i>                         | LaBioMi 012 | LaBioMi - FE  |
| <i>Gilmaniella</i> sp                          | LaBioMi 013 | LaBioMi - FE  |
| <i>Nigrospora</i> sp                           | LaBioMi 014 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium citrinum</i>                    | LaBioMi 015 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium herquei</i> Bainier and Sartory | LaBioMi 016 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium implicatum</i> Biorgue          | LaBioMi 017 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium janthinellum</i>                | LaBioMi 018 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium janthinellum</i>                | LaBioMi 019 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium janthinellum</i>                | LaBioMi 020 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium rubrum</i> Stoel                | LaBioMi 021 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium rugulosum</i> TOM               | LaBioMi 022 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium simplicissimum</i>              | LaBioMi 023 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium</i> sp                          | LaBioMi 024 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium</i> sp                          | LaBioMi 025 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium</i> sp                          | LaBioMi 026 | LaBioMi - FE  |
| <i>Penicillium</i> sp                          | LaBioMi 027 | LaBioMi - FE  |
| <i>Pestalotiopsis versicolor</i>               | LaBioMi 028 | LaBioMi - FE  |
| <i>Trichoderma koningii</i> Oudem              | LaBioMi 029 | LaBioMi - FE  |
| <i>Trichoderma nivale</i>                      | LaBioMi 030 | LaBioMi - FE  |
| <i>Trichoderma</i> sp                          | LaBioMi 031 | LaBioMi - FE  |
| <i>Aspergillus</i> sp                          | LaBioMi 032 | LaBioMi - FE  |
| Dematiáceo                                     | LaBioMi 033 | LaBioMi - FE  |
| Dematiáceo                                     | LaBioMi 034 | LaBioMi - FE  |
| NI   | LaBioMi 035 | LaBioMi - FE  |
| NI   | LaBioMi 036 | LaBioMi - FE  |
| Basidiomiceto                                  | LaBioMi 037 | LaBioMi - FE  |

|                        |             |              |
|------------------------|-------------|--------------|
| NI                     | LaBioMi 038 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 039 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 040 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 041 | LaBioMi - FE |
| Dematiáceo             | LaBioMi 042 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 043 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 044 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 045 | LaBioMi - FE |
| Dematiáceo             | LaBioMi 046 | LaBioMi - FE |
| Dematiáceo             | LaBioMi 047 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 048 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 049 | LaBioMi - S* |
| <i>Aspergillus</i> sp  | LaBioMi 050 | LaBioMi - FE |
| <i>Aspergillus</i> sp  | LaBioMi 051 | LaBioMi - FE |
| <i>Aspergillus</i> sp  | LaBioMi 052 | LaBioMi - FE |
| <i>Penicillium</i> sp  | LaBioMi 053 | LaBioMi - FE |
| <i>Penicillium</i> sp  | LaBioMi 054 | LaBioMi - FE |
| Dematiáceo             | LaBioMi 055 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 056 | LaBioMi - FE |
| Dematiáceo             | LaBioMi 057 | LaBioMi - FE |
| Dematiáceo             | LaBioMi 058 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 059 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 060 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 061 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 062 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 063 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 064 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 065 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 066 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 067 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 068 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 069 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 070 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 071 | LaBioMi - FE |
| NI                     | LaBioMi 072 | LaBioMi - FE |
| FE: fungos endofíticos |             |              |
| S: solo                |             |              |

FIGURA 2.4 – Modelo dos fungos catalogados na Micoteca do LaBioMi. \* FE: fungos endofíticos; S: solo.



Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
**Laboratório de Bioquímica Micromolecular – LaBioMi**  
Via Washington Luiz, km 235 – Caixa Postal 676  
Fone: (016) 260-8208 – FAX 260-8350 – Telex 162369 – SCUF – Br  
Responsável: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
e-mail: [edson@dq.ufscar.br](mailto:edson@dq.ufscar.br)

## CATÁLOGO DE CULTURA

### CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROMORFOLÓGICAS DOS MICRORGANISMOS

#### ISOLADOS

Número de Registro: LaBioMi-001

#### 1. Identificação:

- Microrganismo: *Aspergillus aculeatus* Lizuka
- Número ou código da amostra: **G22a, G51a**
- Origem: **Fungo associado às folhas de *Melia azedarach***
- Meio de cultura utilizado: **BDA (ágar, batata, dextrose)**
- Período de incubação: **sete dias**

#### 2. Características Macromorfológicas:

- Diâmetro de crescimento da colônia: **08 cm**
- Cor e textura do micélio: **branco cotonoso**
- Abundância e disposição da frutificação, esclerócio, cleistotécio: **abundante frutificação**
- Cor do reverso da colônia: **amarela**
- Pigmento difuso ou não no agar: **amarelo**

#### 3. Características Micromorfológicas:

##### 3.1. Hifas

- presença de septos: **sim**
- coloração: **hifas hialinas**

##### 3.2. Estruturas Reprodutivas

##### 3.2.1. Estado Anamórfico:

- conídios: **globosos**
- conidióforos: **hialinos**
- cabeça conidial: **globosa**
- forma: \_\_\_\_\_

##### 4.1.1. Estado Teleomórfico:

- Ascocarpo/ Basidiocarpo: **ausente**
- Asco/ Basídio: \_\_\_\_\_
- Ascósporo/ Basidiósporo: \_\_\_\_\_
- cor: \_\_\_\_\_
- forma: \_\_\_\_\_

#### 4. Fotos

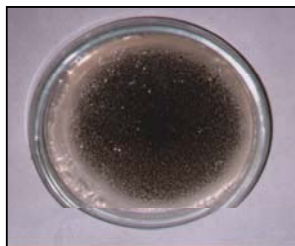


FIGURA 2.5 – Dados macro e micromorfológico dos fungos catalogados na Micoteca do LaBioMi.



FIGURA 2.6 – Representação dos fungos conservados em água destilada estéril em frascos de penicilina.



FIGURA 2.7 – Representação dos fungos conservados em água destilada estéril e óleo mineral estéril em tubos de cultura.



## 4.2. Fungos Endofíticos de *Melia azedarach*

Um total de 59 isolados fúngicos foi obtido dos tecidos sadios de *Melia azedarach*. Estes isolados foram agrupados em 18 espécies, sendo uma delas pertencente à classe Coelomycetes<sup>1</sup> e 17 Hyphomycetes<sup>2</sup>. Foram identificados oito gêneros, entre eles um Ascomycetes<sup>3</sup> (*Balansia* sp) e um Basidiomycetes<sup>4</sup> (ainda não identificado em nível de gênero e espécie). Este total de isolados fúngicos não incluem os fungos *Mycelia sterilia*. Vale ressaltar que nenhum procedimento para induzir a esporulação foi realizado e como consequência, alguns fungos que não apresentaram as suas estruturas de reprodução não foram considerados. A distribuição dos fungos endofíticos nos tecidos sadios de *M. azedarach* encontra-se na Tabela 2.2.

Os fungos isolados dos tecidos sadios de *M. azedarach* foram identificados no laboratório do Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas, pela pesquisadora Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, embora alguns ainda permaneçam sem identificação. Alguns gêneros de fungos foram identificados no nosso laboratório.

Mais do que uma espécie endofítica foi isolada do mesmo tecido, corroborando com os estudos similares com outros hospedeiros na qual foi encontrada uma grande variedade de espécies fúngicas decorrentes de uma única espécie hospedeira (PETRINI *et al.*, 1992). Essas evidências sugerem que os grupos endofíticos estão distribuídos especificamente em cada tecido ou órgão como apresenta a Tabela 2.2. Estas diferenças poderiam ser refletidas na preferência dos fungos pelos tecidos do hospedeiro, conforme PETRINI *et al.* (1992), que concluíram em seus estudos que diferentes tecidos de plantas e órgãos podem exibir microhabitats distintos. TAYLOR *et al.* (1999) confirmou esta hipótese, verificando que cada tecido de uma espécie hospedeira poderia funcionar como ecossistemas distintos. Além disso,

---

<sup>1</sup> COELOMYCETES: Fungos mitospóricos com conidioma (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

<sup>2</sup> HYPHOMYCETES: Fungos mitospóricos que contêm os conidióforos livres sobre o micélio, isto é, não produzem conidioma (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

<sup>3</sup> ASCOMYCETES: Fungos meiósoros que produzem os seus esporos sexuais, denominados de ascósporos, no interior de ascos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

<sup>4</sup> BASIDIOMYCETES: Fungos meiósoros que produzem os seus esporos sexuais, denominados de basidiósporos, no interior de basídios (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

geralmente um e na maioria das vezes, poucas espécies dominam a comunidade fúngica (PETRINI *et al.*, 1992).

A maioria dos fungos isolados dos tecidos sadios de *M. azedarach* foram pertencentes a classe Hyphomycetes. Os gêneros mais comuns encontrados foram *Aspergillus* e *Penicillium* (Figuras 2.8 e 2.9). Estes fungos são cosmopolitas e geralmente epifíticos, mas também podem ocorrer endofiticamente (SCHULTHESS e FAETH, 1998).

Espécies endofíticas de *Balansia* são conhecidas como produtoras de metabólitos secundários (alcalóides), os quais protegem suas plantas hospedeiras do ataque por herbívoros (REDDY *et al.*, 1996). Espécies de *Fusarium* e *Trichoderma* foram registrados apenas nos fragmentos provenientes do córtex das raízes (Tabela 2.2, Figura 2.3). Os fungos do gênero *Fusarium* são de particular importância do ponto de vista fitopatológico por serem patógenos de plantações. *Fusarium moniliforme* é um parasita não obrigatório do milho (*Zea mays* L.) e existe uma série de doenças do milho que são resultantes da infecção por *F. moniliforme*, incluindo a podridão das sementes e raízes e produção de micotoxinas (BACON e HINTON, 1996). Como visto anteriormente no capítulo 1, um fungo fitopatogênico poder ser modificado através de mutação e então crescer como um endófito não patogênico (FREEMAN e RODRIGUÉZ, 1993) e a infecção, portanto, nem sempre resulta no aparecimento da doença. A incapacidade em manifestar uma doença pode ser reflexa da seletividade da planta contra a enfermidade, da detoxificação de fitoalexinas pelos fungos, e/ou uma interação de desses fatores mencionados acima com condições ambientais adequadas, freqüentemente ocorrendo posteriormente na vida da planta (BACON e HINTON, 1996).

A forma de reprodução dos fungos ocorre nos modos assexuado e sexuado, onde o agente de reprodução é denominado de esporo (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). O desenvolvimento deste órgão é um processo de diferenciação das células reprodutivas e suas estruturas de suporte, envolvendo mudanças na aparência (diferenciação morfológica), na função (diferenciação fisiológica) e na composição química (diferenciação bioquímica). Com relação à morfologia, os esporos diferem na forma, tamanho, motilidade, etc. É com base nessas diferenças entre outras (bioquímicas, por exemplo), que a classificação taxonômica dos fungos filamentosos é

realizada, permitindo uma identificação segura do material examinado. Por exemplo, fungos do gênero *Penicillium* (Figura 2.9-3) são identificados através da observação microscópica de conidióforos com fiálides e de cadeias de conídios. Este gênero não apresenta vesículas como ocorre com *Aspergillus* (Figura 2.9-1). Para fungos do gênero *Fusarium* os aspectos macroscópicos de suas colônias podem variar de branco a cor púrpura e microscopicamente podem ser observados desde microconídios ovóides a elipsóides e macroconídios fusiformes septados, formados em conidióforos com fiálides. Como mostra a Figura 2.9-2, o fungo *Fusarium moniliforme* foi identificado em nível de gênero com base nos seus macroconídios fusiformes multiseptados e em nível de espécie através da análise em conjunto dos aspectos macro e microscópicos com o auxílio das chaves taxonômicas.

Baseado nos nossos resultados, a micota de *M. azedarach*, como também de *C. fissilis* parece ser altamente variada com predominância de dois gêneros: *Aspergillus* e *Penicillium*. Estudos realizados com outras plantas da família Meliaceae levaram ao isolamento de nichos bastante diferentes, entre eles espécies de *Colletotrichum*, *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis* e *Phomopsis* (POLISHOOK et al., 1996; GAMBOA e BAYMAN, 2001; CANNON e SIMMONS, 2002). Algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foram encontradas nas folhas de *Guarea guidonea* coletada em Porto Rico. A comparação dos fungos isolados de *M. azedarach* com os fitopatogênicos descritos na literatura (Tabela 2.1) sugeriu que esses microrganismos isolados como endofíticos pertencem a comunidades diferentes.

A identificação das espécies é de grande importância para os estudos de biodiversidade e relação com os hospedeiros. Como é conhecida, toda a forma de vida requer certas exigências nutritivas, em termos de substâncias químicas indispensáveis ao seu crescimento e ao seu funcionamento normal. Alguns fungos embora cresçam bem no ágar, outros o fazem pobremente ou simplesmente não se desenvolvem, exigindo nutrientes específicos como vitaminas e outras substâncias estimulantes (PELCZAR et al., 1996). O uso de diferentes meios, portanto, pode expandir a variedade e o número de espécies distintas dos isolados. Além disso, fatores como a temperatura de isolamento pode influenciar na biodiversidade dos microrganismos isolados, pois existem fungos que crescem exageradamente na temperatura ótima, impedindo, por falta de nutrientes e espaço físico, outros fungos crescerem

(antagonismo competitivo). Além disso, os métodos de isolamento da diversidade fúngica tem algumas limitações sérias em que muitos fungos não esporulam e uma vez estabelecida a cultura, a identificação dos mesmos foi feita baseada nos métodos de estruturas que esporularam e como conseqüência, não foi possível caracterizar todas as espécies.

As associações entre plantas e endofíticos podem fornecer excelentes modelos de sistemas para o estudo da evolução da simbiose microbiana. Se os endofíticos podem ser evoluídos de patógenos, as toxinas ativas contra os animais são provavelmente originárias de toxinas contra as plantas (CARROLL, 1988). Um estudo minucioso dos produtos secundários nos patógenos de plantas e endófitos poderia fornecer uma história fascinante da evolução bioquímica como, por exemplo, as toxinas alteradas das plantas para os animais. Isto significaria que a infecção microbiana dos hospedeiros indesejáveis pode proteger contra, no mínimo, alguns patógenos virulentos, os quais podem “imunizar” plantas hospedeiras contra patógenos fúngicos (CARROL, 1988).

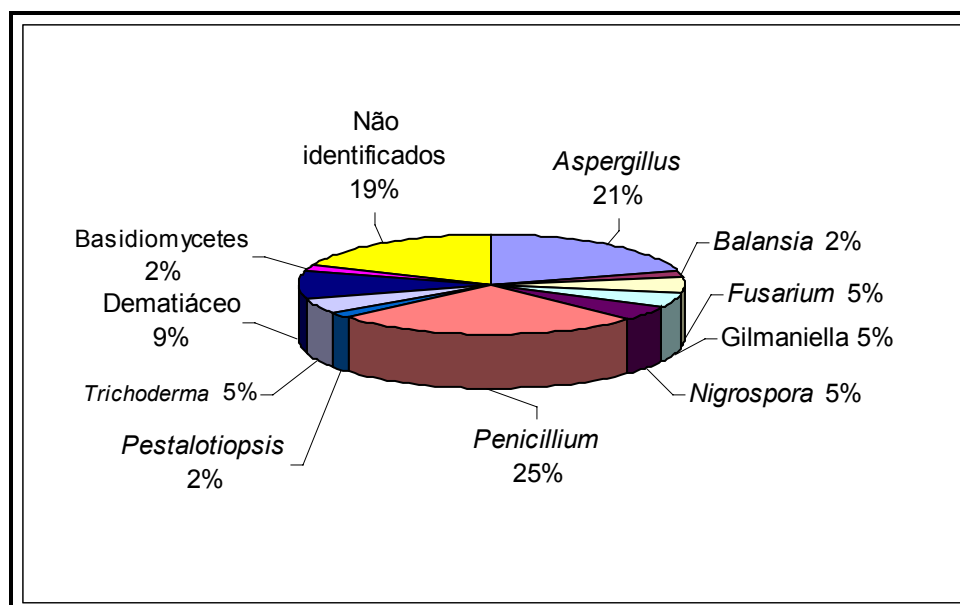


FIGURA 2.8 – Relação dos principais gêneros encontrados nos tecidos saudáveis de *Melia azedarach*.

TABELA 2.2 – Ocorrência das espécies fúngicas em cada tecido sadio de *Melia azedarach*.

| Grupo Fúngico                         | Tecidos |    |    |    |    | N. Total de Isolados |
|---------------------------------------|---------|----|----|----|----|----------------------|
|                                       | CR*     | XR | CC | L  | F  |                      |
| Ascomycetes                           |         |    |    |    |    | 01                   |
| <i>Balansia</i> sp                    | -       | -  | 01 | -  | -  |                      |
| Coelomycetes                          |         |    |    |    |    | 01                   |
| <i>Pestalotiopsis versicolor</i>      | -       | -  | 01 | -  | -  |                      |
| Basidiomycetes                        |         |    |    |    |    | 01                   |
| No identification                     | -       | -  | -  | -  | 01 |                      |
| Hyphomycetes                          |         |    |    |    |    | 40                   |
| <i>A. aculeatus</i> Lizuka            | -       | -  | -  | 02 | -  |                      |
| <i>A. carbonarius</i> Bain            | -       | -  | -  | 01 | -  |                      |
| <i>A. flavus</i> Link                 | -       | -  | -  | 01 | -  |                      |
| <i>A. japonicus</i> Saito             | -       | -  | -  | 01 | 01 |                      |
| <i>A. niger</i> van Tieghem           | -       | -  | -  | 01 | -  |                      |
| <i>A. pulvurulentus</i> Mc Alpine     | 01      | -  | -  | -  | -  |                      |
| <i>Aspergillus</i> sp                 | -       | -  | -  | 03 | 01 |                      |
| <i>F. nivale</i> (Fr.) Ces            | 02      | -  | -  | -  | -  |                      |
| <i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon   | 01      | -  | -  | -  | -  |                      |
| <i>Gilmaniella</i> sp. Barron         | -       | -  | 01 | -  | 02 |                      |
| <i>Nigrospora</i> sp. Zimm            | -       | -  | -  | 03 | -  |                      |
| <i>Penicillium citrinum</i>           | -       | -  | 01 | 01 | -  |                      |
| <i>P. herquei</i> Bainier and Sartory | -       | -  | -  | -  | 01 |                      |
| <i>P. janthinellum</i>                | -       | -  | -  | -  | 01 |                      |
| <i>P. rubrum</i> Stoll                | -       | -  | -  | 02 | 01 |                      |
| <i>P. rugulosum</i> Thom.             | -       | 01 | -  | -  | -  |                      |
| <i>P. simplicissimum</i>              | -       | -  | 01 | -  | -  |                      |
| <i>P. implicatum</i> Biorgue          | -       | -  | -  | -  | 01 |                      |
| <i>Penicillium</i> sp.                | 02      | -  | -  | 03 | -  |                      |
| <i>Trichoderma koningii</i>           | 01      | -  | -  | -  | -  |                      |
| Oudem                                 |         |    |    |    |    |                      |
| <i>T. nivale</i>                      | 02      | -  | -  | -  | -  |                      |
| <i>Trichoderma</i> sp. Pers.          | 01      | -  | -  | -  | -  |                      |
| Outros                                |         |    |    |    |    | 16                   |
| Dematiaceae                           | -       | -  | 02 | 01 | 02 |                      |
| No identification                     | 01      | -  | 03 | 05 | 02 |                      |
| N. Total de Isolados em cada Tecido   | 11      | 01 | 10 | 24 | 13 | 59                   |

\* CR (cortex das raízes), XR (xilema das raízes), CC (córTEX do caule), L (folhas), F (frutos)

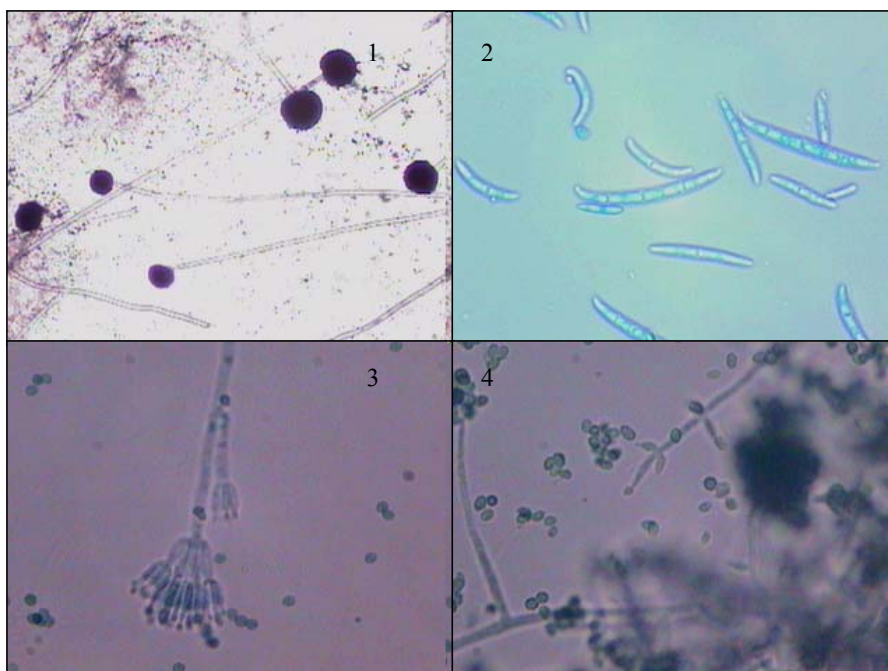


FIGURA 2.9 – Algumas espécies fúngicas isoladas dos tecidos saudáveis de *Melia azedarach*. 1) *Aspergillus aculeatus* Lizuka; 2) *Fusarium moniliforme* Sheldom; 3) *Penicillium* sp; 4) *Trichoderma nivale*. Aumento 400x.

## 5. CONCLUSÕES

Baseado em nossos resultados, a micota de *M. azedarach* parece ser altamente variada e extensiva com predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Utilizando mais amostragens e introduzindo variações complementares (temperatura, meios cultura, entre outros) poderia esperar um número maior dessa diversidade nos tecidos de *M. azedarach*.

Com exceção dos grandes animais e plantas, o conhecimento da diversidade biológica em termos de riqueza de espécies, distribuição local e global e ecossistema dos microrganismos permanece muito incompleto. Sendo assim, o nosso trabalho de isolamento e identificação dos fungos de *M. azedarach* contribuiu através da divulgação dos grupos fúngicos existentes nesta planta.

As coleções de culturas têm por objetivo a prestação de serviços para a comunidade científica, fornecendo culturas autênticas e informações sobre o modo de cultivo e preservação para propósitos científicos e industriais. Paralelamente, a preservação dos microrganismos isolados torna-se indispensável principalmente para aqueles organismos isolados de amostras ambientes que nem sempre podem ser encontrados novamente, e até mesmo, a tentativa de re-isolamento uma vez que podem faltar as propriedades desejadas exibidas pelas linhagens anteriores para o seu crescimento no interior de suas hospedeiras.

## **CAPÍTULO 3: ESTUDO QUÍMICO DOS FUNGOS *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme***

### **1. INTRODUÇÃO**

As diversidades bioquímicas e metabólicas dos fungos são fatores que permitem aos fungos a adaptação e a exploração de ambientes inóspitos (ARORA *et al.*, 1992) e, conseqüentemente a produção de uma vasta variedade de metabólitos secundários. Apenas 7% das 5000 espécies fúngicas conhecidas foram estudadas e documentadas e estes microrganismos continuam produzindo novos produtos comercialmente importantes com uma ampla variedade de aplicações como, por exemplo, na indústria alimentícia, farmacêutica e na agricultura (HAWKSWORTH, 1991).

Os fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados dos tecidos sadios de *Melia azedarach* foram escolhidos para serem estudados quimicamente. O critério para seleção desses microrganismos foi baseado no crescimento rápido em meio contendo apenas batata, dextrose e ágar (BDA), como também nas características macroscópicas observadas durante o cultivo como a coloração e aspecto das colônias. Taxonomicamente, esses fungos encontram-se situados na ordem Hyphales, na classe Hyphomycetes, pertencente ao grupo dos Fungos Mitospóricos (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Conforme levantamento bibliográfico realizado para conhecer e comparar o metabolismo desses fungos estudados foram encontrados metabólitos tóxicos, as micotoxinas como também àqueles possuindo alguma propriedade biológica tais como antibacterianos, inseticidas, entre outros. A diversidade estrutural desses dois fungos é bastante ampla encontrando policetídeos, terpenóides, esteróides, aminoácidos, entre outros. As Tabelas 3.1 e 3.2 apresentam alguns exemplos de substâncias encontradas nos extratos fúngicos de *Penicillium* sp e *Fusarium* sp, respectivamente.



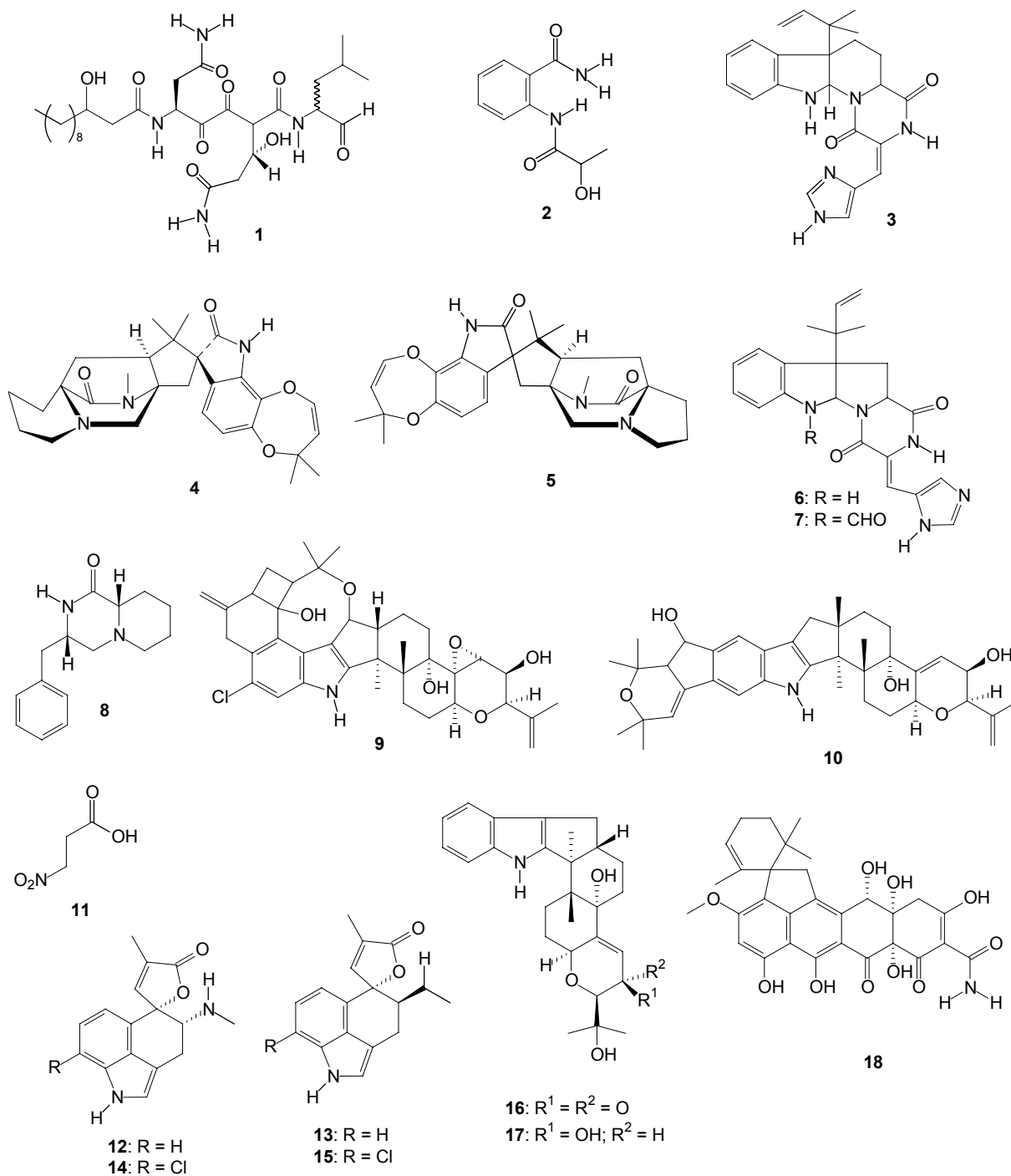
TABELA 3.1 – Produção de metabólitos secundários por fungos do gênero *Penicillium*.

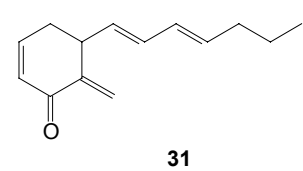
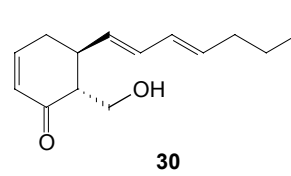
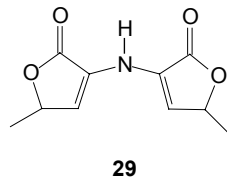
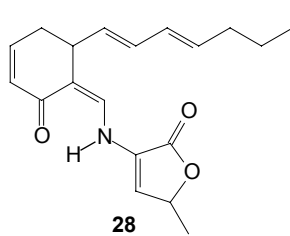
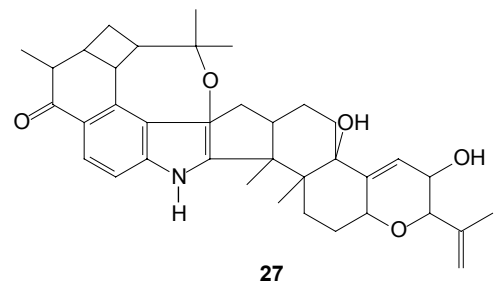
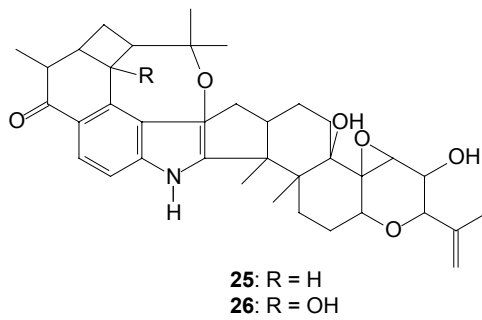
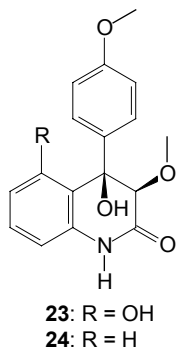
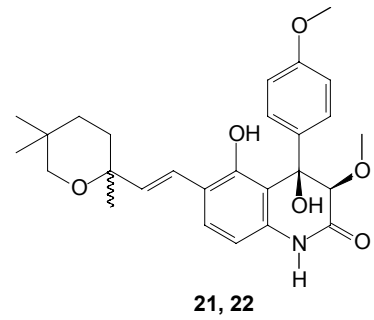
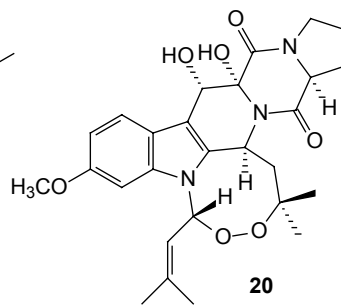
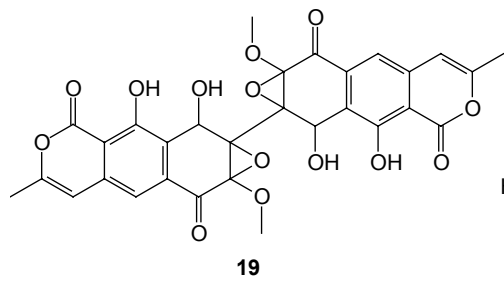
| Espécie                     | Metabólito                                   | Atividade Biológica                                | Ref.  |
|-----------------------------|--|--|---|
| <i>P. fellutanum</i>        | 1: Tripeptídeo                               | Promotor crescimento dos nervos                    | LEWIS, 1996   |
| <i>P. chrysogenum</i>       | 2: 2-[(2-hidroxi-propionil)-amino] benzamida | -  | LEWIS, 1996   |
| <i>P. roqueforti</i>        | 3: Roquefortina                              | -  | IHARA e FUKUMOTO, 1995  |
| <i>P. paraherquei</i>       | 4: Marcfortina                               | -  | IHARA e FUKUMOTO, 1995  |
| <i>P. verruculosum</i>      | 5: Paraherquamida B                          | -  | IHARA e FUKUMOTO, 1995  |
|                             | 6: Roquefortina C                            | Micotoxinas  | IHARA e FUKUMOTO, 1996;   |
|                             | 7  |  | MACMILLAN <i>et al.</i> , 1976;   |
|                             | 8: Verruculotoxina                           |  | HORAK e VLEGGGAAR, 1987   |
|                             | 20: Verruculogenina                          |  | HERBERT, 1996   |
| <i>P. janczewskii</i>       | 9: Penitrem A                                | Inseticida   | HERBERT, 1996   |
| <i>P. janthinellum</i>      | 10: Jantitrem B                              | Inseticida   | HERBERT, 1996   |
| <i>P. atrovenetum</i>       | 11: Ácido 3-nitropropiónico                  | -  | HERBERT, 1996   |
| <i>P. islandicum</i>        | 12: Rugulovasina A                           | Micotoxinas  | COLE <i>et al.</i> , 1976   |
|                             | 13: Rugulovasina B                           |  |   |
|                             | 14: 8-Clororugulovasina A                    |  |   |
|                             | 15: 8-Clororugulovasina B                    |  |   |
| <i>P. concavo-rugulosum</i> | 12, 13                                       | Micotoxinas  | COLE <i>et al.</i> , 1976   |
| <i>P. paxilli</i>           | 16: Paxilina                                 | Toxina tremorgênica                                | SPRINGER <i>et al.</i> , 1975   |
| <i>P. expansum</i>          | 18: Viridicatumtoxina                        | Micotoxina   | HORAK <i>et al.</i> , 1988  |
| <i>P. simplicissimum</i>    | 19: Xantoepocina                             | Antibiótico  | IGARASHI <i>et al.</i> , 2000.  |
| <i>Penicillium</i> sp       | 9, 10, 16, 17                                | <sup>1</sup> Reguladores do crescimento de plantas | MICHAEL, 1998;  |
|                             | 21: Penigequinolona A                        |  | IHARA e FUKUMOTO, 1995; IHARA e FUKUMOTO, 1996; KIMURA <i>et al.</i> , 2000 |
|                             | 22: Penigequinolona B                        |  |   |
|                             | 23, 24                                       |  |   |
|                             | 25: Penitremona A                            |  |   |
|                             | 26: Penitremona B                            |  |   |
|                             | 27: Penitremona C                            |  |   |
|                             | 28: Peniamidienona <sup>1</sup>              |  |   |
|                             | 29: Penidilamina <sup>1</sup>                |  |   |
|                             | 30: Penienona <sup>1</sup>                   |  |   |
|                             | 31: Penidienona <sup>1</sup>                 |  |   |

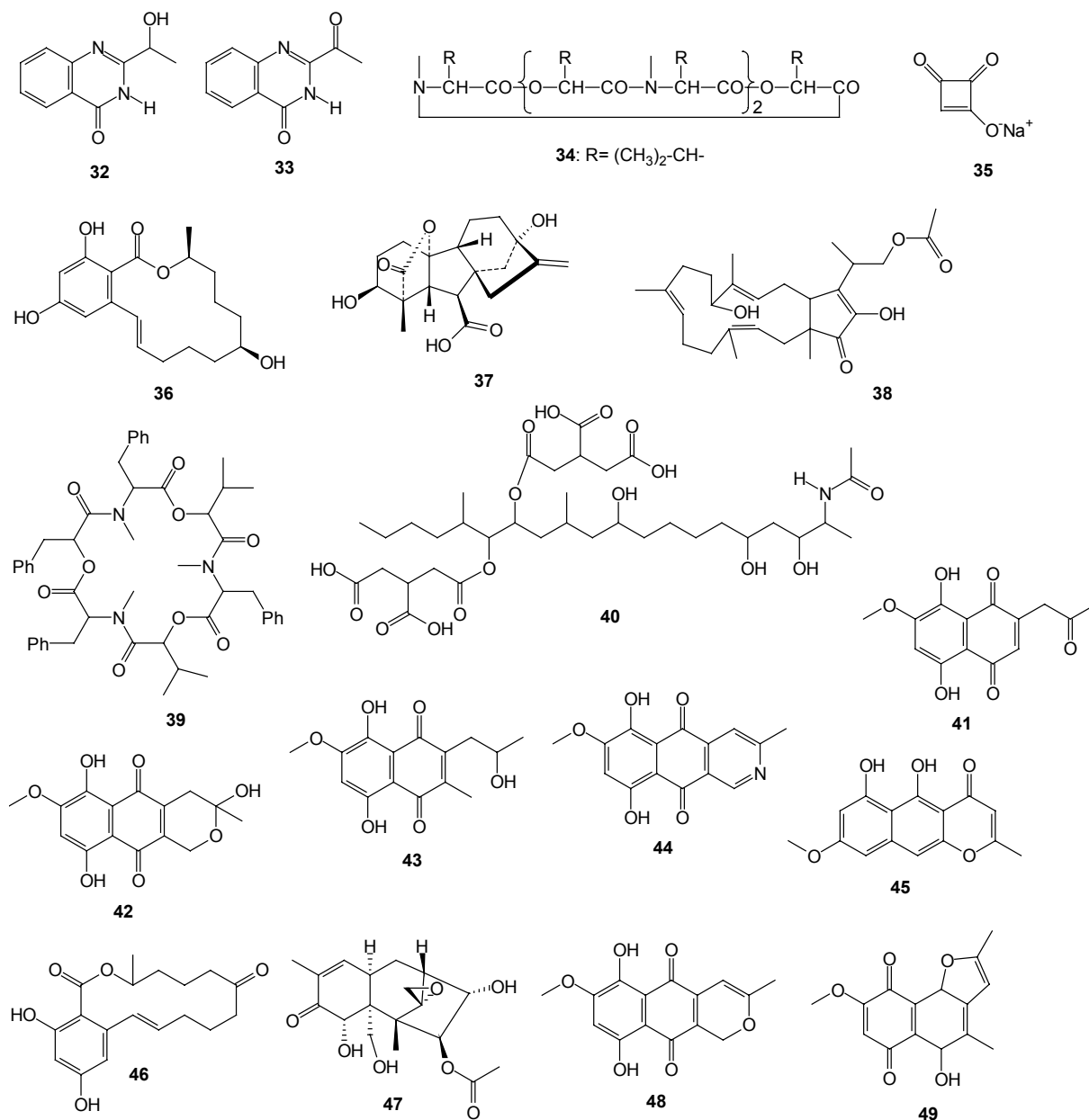
TABELA 3.2 – Produção de metabólitos secundários por fungos do gênero *Fusarium*.

| Fungo                    | Metabólito   | Atividade Biológica | Ref.  |
|--------------------------|--|---------------------|---|
| <i>F. lateritium</i>     | <b>32:</b> 2-(1-hidroxietyl)-4-(3H)-quinazolinona<br><b>33:</b> 2-acetil-4-(3H)-quinazolinona<br><b>34:</b> Eniatina B | Fungicidas          | TURNER, 1971;<br>LEWIS, 1996                      |
| <i>F. moniliforme</i>    | <b>35:</b> Moniliformina<br><b>36:</b> Zearalenona<br><b>37:</b> Gibberelina A   | Micotoxinas         | TURNER, 1971;<br>APRINGER <i>et al.</i> ,<br>1974 |
| <i>F. proliferatum</i>   | <b>38:</b> Fusaproliferina<br><b>39:</b> Beauvericina<br><b>40:</b> Fumonisina A1                                      | Micotoxinas         | TURNER, 1971;<br>SANTINI <i>et al.</i> ,<br>1996  |
| <i>F. javanicum</i>      | <b>41:</b> Javanicina<br><b>42:</b> Fusarubina   |                     | TURNER, 1971                                      |
| <i>F. solani</i>         | <b>43:</b> Solaniol<br><b>44:</b> Bostricoidina  |                     | TURNER, 1971                                      |
| <i>F. bostrycoides</i>   | <b>44</b>  |                     | TURNER, 1971                                      |
| <i>F. graminearum</i>    | <b>45:</b> Rubrofusarina   |                     | TURNER, 1971                                      |
| <i>F. culmorum</i>       |  |                     |   |
| <i>F. nivale</i>         | <b>46:</b> Nivalenol<br><b>47:</b> Fusarenona  |                     | TURNER, 1971                                      |
| <i>F. decemcellulare</i> | <b>41, 42, 44</b><br><b>48:</b> Anidrofusarubina<br><b>49:</b> Anidrojavanicina  |                     | MEDENTSEV e<br>AKIMENKO, 1988                     |

Capítulo 3: Estudo Químico dos Fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme*







## 2. OBJETIVOS

O foco deste trabalho foi o estudo químico dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* visando o isolamento dos metabólitos secundários e suas identificações através dos métodos espectroscópicos usuais. Os metabólitos obtidos foram ensaiados para verificar as suas propriedades biológicas, bem como averiguar possíveis semelhanças com os metabólitos da planta objetivando-se avaliar a possibilidade de transferências genéticas horizontais.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Suportes para Cromatografia**

As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando como fases estacionárias, sílica gel 230-400 mesh (flash), sílica gel 70-230 mesh (comum), florisil e sephadex LH-20, para cromatografia em coluna (CC). Para os fracionamentos por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizada sílica gel 60 PF<sub>254</sub>. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram feitas usando folhas de alumínio contendo sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

##### **3.1.2. Eluentes para Cromatografia**

Para os fracionamentos cromatográficos foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar, como também solventes PA da Merck, Synth, Reagen e outros.

##### **3.1.3. Solventes Utilizados para Obtenção dos Espectros**

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando solventes deuterados com 98-99.9% (Merck, Isotec e Aldrich).

#### **3.2. Elucidação Estrutural**

As estruturas foram elucidadas utilizando, principalmente, as técnicas de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas. Alguns parâmetros adicionais tais como rotação ótica, ultravioleta e infravermelho, foram realizados quando necessário para auxiliar nas determinações estruturais. A identidade das substâncias isoladas com as reportadas na literatura foi considerada e para algumas delas contendo dados incompletos de RMN foram realizados estudos mais detalhados os quais foram

publicados posteriormente. Pesquisas na literatura usando bases de dados *on-line* e *Chemical Abstract* foram feitas e com base nos resultados dos levantamentos bibliográficos algumas substâncias foram consideradas inéditas.

### 3.2.1. Experimentos de CCD

Os cromatogramas obtidos com CCD foram detectados sobre luz UV (254 e 366 nm) e reagente vanilina-ácido sulfúrico (1g vanilina dissolvida em 100 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e aquecida após imersão).

### 3.2.2. Espectroscopia por RMN

Os espectros de RMN dos extratos, frações e substâncias puras foram registrados nos espectrofotômetros Brüker ARX-200 e DRX-400 operando em 200 e 400 MHz (<sup>1</sup>H) e 50 e 100 MHz (<sup>13</sup>C), respectivamente. Os espectros foram obtidos com solventes deuterados (CDCl<sub>3</sub>, MeOD, D<sub>2</sub>O, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) e calibrados com o padrão interno de referência tetrametilsilano (TMS). A multiplicidade para <sup>13</sup>C foi deduzida através dos experimentos de DEPT 135, PENDANT e HSQC.

### 3.2.3. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo e negativo usando o espectrômetro MICROMASS QUATTRO LC equipado com a fonte ESI/APCI “Z-spray”.

### 3.2.4. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados sobre o espectrofotômetro Bomen MB-102 na forma de pastilhas com brometo de potássio (KBr).

### 3.2.5. Espectroscopia no Ultravioleta

Os espectros de ultravioleta foram obtidos sobre o espectrofotômetro Shimadzu, utilizando células de quartzo de 1.0 cm.

### 3.2.6. Rotação Óptica

As rotações ópticas foram medidas em um polarímetro Perkin Elmer 241 equipado com uma cubeta de 1.0 cm.

## 3.3. Cultivo dos Fungos *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* sp

Os microrganismos *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* sp, isolados do córtex das raízes de *Melia azedarach* (capítulo 2), foram cultivados em três meios de cultivo: arroz, milho e meio líquido Czapek enriquecido com extrato de levedura.

Para o cultivo em arroz (meio de cultivo A) foram utilizados 50 frascos de Erlenmeyers contendo aproximadamente 90 g de arroz parbolizado (marca *Uncle Bens*) e 75 mL de água destilada autoclavados duas vezes por 40 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão. Pequenos fragmentos do meio BDA contendo micélio e esporos dos microrganismos em estudo foram transferidos assepticamente para 47 dos 50 frascos contendo o substrato esterilizado. Três frascos foram mantidos como controle. Após 20 dias de crescimento a 25°C foi observado o acúmulo de água nos frascos contendo os microrganismos, a qual foi removida da biomassa fúngica por filtração e liofilizada originando os extratos aquosos (**FMR-1**<sup>1</sup> para *Fusarium moniliforme*, e **PR-1** para *Penicillium* sp). Em seguida, foi adicionado metanol (aproximadamente 150 mL) em cada um desses frascos e a extração foi

---

<sup>1</sup> **Códigos:** Os códigos dos experimentos com o fungo *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* sp foram dados da seguinte maneira: *Fusarium moniliforme* (**FM**), cultivado em arroz (**FMR**), milho (**FMM**), e meio líquido (**FML**, micélio **FMLM**). As substâncias isoladas foram codificadas como **FM** seguido de um número de identificação (exemplo: **FM-1**). *Penicillium* sp(**P**), cultivado em arroz (**PR**), milho (**PM**), e meio líquido (**PL**, micélio **PLM**). As substâncias isoladas foram codificadas como **PSP** seguido de um número de identificação (exemplo: **PSP-1**).



realizada durante 5 horas à temperatura ambiente e em repouso. Após esse período, o material obtido para *Fusarium moniliforme* foi separado por filtração, obtendo o extrato metanólico (**FMR-2**). Durante o período de extração do material contendo *Penicillium* sp foi observada a formação de um resíduo amarelo o qual foi removido através da filtração por gravidade originando o extrato **PR-2**. O filtrado foi posteriormente particionado com acetato de etila, produzindo, portanto dois extratos, o acetoacético (**PR-3**) e o aquoso (**PR-4**). Finalmente o arroz contendo esses microrganismos foi seco em estufa à temperatura de 60°C, moído e em seguida extraído com diclorometano, diclorometano:metanol (1:1) e metanol por duas vezes consecutivas para dar os extratos brutos **FMR-3** (*F.moniliforme*) e **PR-5** (*Penicillium* sp), os quais foram posteriormente particionados com *n*-hexano e metanol para dar origem as frações hexânica (**FMR-3-1**, *F. moniliforme*; **PR-5-H**, *Penicillium* sp) e metanólica (**FMR-3-2**, *F. moniliforme*; **PR-5-PM** e **PR-5-M**, *Penicillium* sp). Essas frações foram ensaiadas biologicamente (capítulo 7). As quantidades obtidas para cada um desses extratos são apresentadas na Tabela 3.3.

Para o cultivo em milho (milho para canjica, *Yoki*) foi adotado o mesmo protocolo experimental realizado para o cultivo em arroz. Foram obtidos três extratos para cada um dos microrganismos ensaiados [*F. moniliforme* (**FMM-1**, **FMM-2** e **FMM-3**); *Penicillium* sp (**PM-1**, **PM-2** e **PM-3**)] e as quantidades produzidas são mostradas na Tabela 3.3. Após extração com solventes em ordem crescente de polaridade o extrato bruto foi particionado com *n*-hexano e metanol produzindo as frações hexânica (**FMM-3-1**, *F. moniliforme*; **PM-5-H**, *Penicillium* sp) e metanólica (**FMM-3-2**, *F. moniliforme*; **PM-5-M**, *Penicillium* sp), as quais frações foram ensaiadas biologicamente (capítulo 7).

O meio de cultivo líquido foi preparado com 35 frascos de Erlenmeyer (1L) contendo o meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura (Tabela 3.4) autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Pequenos fragmentos do meio BDA contendo micélio e esporos dos microrganismos em estudo foram transferidos assepticamente para 32 dos 35 frascos contendo o substrato esterilizado. Três frascos foram mantidos como controle. Após 16 dias de crescimento a 25°C, o micélio dos fungos estudados foram separados dos filtrados através da filtração a vácuo, seco e moído. Subseqüentemente estes materiais (150 g micélio *F. moniliforme*; 170.5 g

micélio *Penicillium* sp) foram extraídos com diclorometano, diclorometano:metanol (1:1) e metanol durante 3 dias para cada sistema de solvente, produzindo, respectivamente, os extratos **FMLM** e **PLM**. O rendimento desses extratos é mostrado na Tabela 3.3.

TABELA 3.3 – Extratos obtidos a partir do cultivo dos fungos *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* sp.

| Fungo                 | Código         | Extrato                              | Quantidades (g)             |       |
|-----------------------|----------------|--------------------------------------|-----------------------------|-------|
| <i>F. moniliforme</i> |                |                                      |                             |       |
| Arroz                 | <b>FMR-1</b>   | Extrato aquoso em arroz              | 1.0                         |       |
|                       | <b>FMR-2</b>   | Extrato metanólico em arroz          | 5.4                         |       |
|                       | <b>FMR-3</b>   | Extrato bruto em arroz               | 249.3                       |       |
|                       | <b>FMR-3-1</b> | Fração hexânica do extrato bruto     | 150.3                       |       |
|                       | <b>FMR-3-2</b> | Fração metanólica do extrato bruto   | 98.5                        |       |
|                       | Milho          | <b>FMM-1</b>                         | Extrato aquoso em milho     | 3.0   |
| <b>FMM-2</b>          |                | Extrato metanólico em milho          | 88.6                        |       |
| <b>FMM-3</b>          |                | Extrato bruto em milho               | 209.9                       |       |
| <b>FMM-3-1</b>        |                | Fração hexânica do extrato bruto     | 124.2                       |       |
| <b>FMM-3-2</b>        |                | Fração metanólica do extrato bruto   | 85.2                        |       |
| Meio Líquido          |                | <b>FMLM</b>                          | Extrato bruto micelial      | 63.0  |
|                       | <b>FMLF-1</b>  | Extrato bruto filtrado em pH 7.0     | 1.1                         |       |
|                       | <b>FMLF-2</b>  | Extrato bruto filtrado em pH 3.0     | 2.46                        |       |
| <i>Penicillium</i> sp |                |                                      |                             |       |
| Arroz                 | <b>PR-1</b>    | Extrato aquoso em arroz              | 62.5                        |       |
|                       | <b>PR-2</b>    | Extrato metanólico em arroz          | 6.3                         |       |
|                       | <b>PR-3</b>    | Extrato acetoacético em arroz        | 10.24                       |       |
|                       | <b>PR-4</b>    | Extrato aquoso em arroz              | 1.86                        |       |
|                       | <b>PR-5</b>    | Extrato bruto em arroz               | 160.20                      |       |
|                       | <b>PR-5-H</b>  | Fração hexânica do extrato bruto     | 105.92                      |       |
|                       | <b>PR-5-PM</b> | Fração metanólica-1 do extrato bruto | 9.28                        |       |
|                       | <b>PR-5-M</b>  | Fração metanólica-2 do extrato bruto | 45.0                        |       |
|                       | Milho          | <b>PM-1</b>                          | Extrato aquoso em milho     |       |
|                       |                | <b>PM-2</b>                          | Extrato metanólico em milho | 143.3 |
| <b>PM-3</b>           |                | Extrato bruto em milho               | 86.73                       |       |
| <b>PM-3-H</b>         |                | Fração hexânica do extrato bruto     | 63.53                       |       |
| <b>PM-3-M</b>         |                | Fração metanólica do extrato bruto   | 23.20                       |       |
| Meio Líquido          | <b>PLM</b>     | Extrato bruto micelial               | 50.75                       |       |
|                       | <b>PLF-1</b>   | Extrato bruto filtrado em pH 7.0     |                             |       |
|                       | <b>PLF-2</b>   | Extrato bruto filtrado em pH 3.0     |                             |       |

O filtrado remanescente (pH 6.5) foi particionado com acetato de etila obtendo os extratos **FMLF-1** e **PLF-1**. A fase aquosa foi então acidificada com ácido clorídrico (HCl, 1N) e em seguida particionado novamente para originar os extratos **FMLF-2** e **PLF-2**. Os rendimentos desses extratos também são mostrados na Tabela 3.3.

TABELA 3.4 - Meio Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura

| Reagentes                            | Quantidades |
|--------------------------------------|-------------|
| NaNO <sub>3</sub>                    | 3.0 g       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1.0 g       |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.5 g       |
| KCl                                  | 0.5 g       |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.01 g      |
| Glucose                              | 30.0 g      |
| Extrato de Levedura                  | 20.0 g      |
| H <sub>2</sub> O                     | qsp 1 L     |

### 3.4. Estudo Químico de *Fusarium moniliforme*

#### 3.4.1. Extrato Micelial (FMLM)

##### 3.4.1.1. Isolamento dos Metabólitos FM-1, FM-2 e FM-3

O extrato obtido a partir do micélio cultivado em meio líquido (**FMLM**) foi purificado empregando uma combinação de técnicas cromatográficas. Inicialmente esse material foi particionado com *n*-hexano (**FMLM-1**) e metanol (**FMLM-2**). A fração metanólica (51.0 g) passou por uma coluna de cromatografia a pressão reduzida contendo como fase estacionária sílica de fase normal com um gradiente de partida iniciando com *n*-hexano, diclorometano e finalmente metanol como fases móveis para produzir 07 frações. A fração 2 (**FMLM-2-2**, 928 mg, eluída com Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1) foi fracionada por cromatografia em coluna com sílica normal (flash) e hexano,

diclorometano, acetona e metanol como solventes produzindo 6 subfrações. A subfração 5 (180.8 mg) foi re-cromatografada novamente nas mesmas condições originando 8 subfrações, na qual as subfrações 4 e 5 foram combinadas após análise por CCD (30,2 mg) produzindo a substância **FM-3** (1.5 mg) após purificação por CC (sílica normal flash, hexano, diclorometano e metanol). Todas as frações e subfrações foram examinadas por CCD e por espectros de RMN  $^1\text{H}$ , observando uma predominância de ácidos graxos e triglicerídeos.

A fração 4 (**FMLM-2-3**, 2.99 g, eluída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) da primeira separação foi fracionada por CC, usando sílica de fase normal e um gradiente solvente com hexano, diclorometano e metanol, totalizando 9 subfrações. A fração 2 (257.6 mg) foi purificada por CCDP ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95:5), produzindo a substância **FM-2** (50.4 mg) e a fração 3 (96.9 mg) contendo a substância **FM-1**.

#### *Depsidipeptídeo FM-1*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 97.2–98.9°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 18.52^\circ$  ( $c$  88.1x10<sup>-3</sup>,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 214, 260(s); IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 1738, 1652, 1110; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Tabela 3.6; dados de  $^{13}\text{C}$  obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Tabela 3.7; APCIMS (Íons filhos, 15 eV)  $m/z$  262 (62) ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 206 (17), 180 (49), 160(19), 134 (100), 83 (21); HREIMS  $m/z$  261.1360 (calcd para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ : 261.1364).

#### *Depsidipeptídeo FM-2*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 139.9-142.3°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 22.70^\circ$  ( $c$  49.2x10<sup>-3</sup>  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 218, 256(s), 266(s); IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 1749, 1654, 1041; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Tabela 3.6; dados de  $^{13}\text{C}$  obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Tabela 3.7; APCIMS (Íons filhos, 15 eV)  $m/z$  262 (81) ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 206 (25), 180 (51), 160 (35), 134 (100), 83 (28); HREIMS  $m/z$  261.1359 (calcd para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ : 261.1364).

#### *Peróxido de Ergosterol FM-3*

Obtido como um pó branco amorfo; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Tabela 3.10.

### 3.4.1.2. Outras frações de *F. moniliforme*

As frações obtidas a partir do meio líquido de cultivo de *F. moniliforme* foram analisadas mostrando uma grande predominância de ácidos graxos e triglicerídeos nas frações mais apolares e de peptídeos e açúcares nas frações mais polares de acordo com os estudos feitos através dos espectros de RMN <sup>1</sup>H.

Os extratos e as frações obtidos a partir do cultivo do fungo com arroz e milho foram ensaiados biologicamente.

## 3.5. Estudo Químico de *Penicillium* sp

### 3.5.1. Fracionamento do Extrato em Arroz

#### 3.5.1.1. Extrato PR-1

O extrato obtido por liofilização da água excretada pelo fungo (62.5 g) quando cultivado em arroz foi analisado por RMN <sup>1</sup>H. Os dados mostraram deslocamentos químicos indicando uma provável presença de açúcares, os quais estão em mistura. Portanto, uma pequena parte desse extrato (3.0 g) foi submetida a um fracionamento em uma coluna com sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, no modo isocrático. Nove frações foram obtidas após a reunião das frações semelhantes, e em seguida, algumas delas foram novamente fracionadas.

##### 3.5.1.1.1. Isolamento do Metabólito PR-1-2-3 e PSP-18

A fração 2 obtida do fracionamento do extrato **PR-1** (**PR-1-2**) foi submetida a CC nas mesmas condições mencionadas no item 3.5.1.1 produzindo um total de 7 frações. Um metabólito ainda não identificado (fração 3, **PR-1-2-3**, 97.6 mg) e a substância **PSP-18** (frações 6 e 7, respectivamente 12.1 e 12.5 mg) foram obtidos durante este processo de purificação.

O metabólito **PSP-18** também foi encontrado nas frações 3 (**PR-1-3**, 290.3 mg), 4 (**PR-1-4**, 418.8 mg) e 4 (**PR-1-5**, 345.1 mg).

*Manitol*(**PSP-18**):

Obtido como um pó branco amorfo; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Apêndices 2.2.2 e 2.2.3 (acetilado); dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Apêndice 2.2.4; APCIMS (Íons filhos, 15 eV) *m/z* 457(100) ([M+H]<sup>+</sup>), 397(40), 337(8), 277(5), 217(3), 153(10).

### 3.5.1.2. Extrato PR-2

Do extrato metanólico obtido a partir do cultivo de *Penicillium* sp em arroz foi encontrado um precipitado amarelo o qual foi separado do filtrado através de filtração a vácuo para formar o extrato **PR-2** (6.3 g). Esse material foi purificado empregando uma combinação de técnicas cromatográficas. Primeiramente o extrato foi submetido a cromatografia a pressão reduzida contendo sílica normal como fase estacionária e os solventes *n*-hexano, diclorometano e metanol no modo gradiente como fase móvel, produzindo um total de 7 frações (**PR-2-1** a **PR-2-7**).

#### 3.5.1.2.1. Isolamento das Substâncias PSP-1 e PSP-2

A fração **PR-2-2** (444.8 mg) foi fracionada em CC (sílica normal, com *n*-hexano, diclorometano, isopropanol e metanol como eluentes no modo gradiente) obtendo 5 subfrações. A substância **PSP-1** (32.7 mg) foi obtida da subfração 2 (**PR-2-2-2**, 89.1 mg) após lavagem do precipitado. O sobrenadante foi então re-cromatografado sobre cromatografia de camada delgada preparativa utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acet, 59:39:2 obtendo os metabólitos **PSP-1** (4.0 mg) e **PSP-2** (6.0 mg). Esses dois metabólitos também foram encontrados nas frações subseqüentes (como substâncias puras e também em mistura com outros metabólitos). Foram encontrados aproximadamente 75.3 mg de **PSP-1** e 23.2 mg de **PSP-2**.

*Preaustinóide A (PSP-1):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 244-245°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -4.97° (*c* 110.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); UV (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 238, 308(s), 344(s); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3391, 1746, 1728, 1701, 1692, 1637; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.15; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.15; APCIMS (Íons filhos, 20 eV) *m/z* 445 (22) ([M+H]<sup>+</sup>), 427(20), 413(100), 395(38), 385(19), 327(5); HREIMS *m/z* 444.2508 (calcd para C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>, 444.2512).

*Preaustinóide B (PSP-2):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 198-200°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -78.83° (*c* 6.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); UV (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 234, 312(s); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3438, 1738, 1702, 1656; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.15; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.15; APCIMS (Íons filhos, 20 eV) *m/z* 445(29) ([M+H]<sup>+</sup>), 427(29), 413(100), 395(87), 385(30), 327(5); HREIMS *m/z* 444.2505 (calcd para C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>, 444.2512).

### 3.5.1.2.2. Isolamento da Substância PSP-4

A subfração **PR-2-2-3** (188.1 mg) foi fracionada em CC (sílica normal, com *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes no modo gradiente) obtendo 3 subfrações. A substância **PSP-4** (6.2 mg) foi obtida a partir do fracionamento da subfração 2 (**PR-2-2-3-2**, 41.1 mg), como também de outras subfrações subseqüentes totalizando 24.0 mg.

*Preaustinóide A2 (PSP-4):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf. 243.9-246.0°C;  $[\alpha]_D^{25}$  - 51,56 (*c* 7.7, CHCl<sub>3</sub>); UV (CH<sub>3</sub>OH)  $\lambda_{\max}$  nm: 230(s); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3422, 1745, 1730, 1705, 1674, 1630; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.17; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por

Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.17; APCIMS (Íons filhos, 15 eV): *m/z* 459 (10) ([M+H]<sup>+</sup>), 441 (44), 423 (22), 409 (50), 391 (18), 349 (100); HREIMS *m/z* 458.2257. Calcd. para C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>: 458.230453.

### 3.5.1.2.3. Isolamento da Substância PSP-3

A subfração **PR-2-2-4** (93.9 mg) foi fracionada em CC (sílica normal, com *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes no modo gradiente) obtendo 5 subfrações. A substância **PSP-3** (3.8 mg) foi obtida a partir do fracionamento da subfração 1 (**PR-2-2-4-1**, 37.0 mg), como também de outras subfrações subseqüentes em um total de 14.8 mg de substância pura.

#### *7-β-acetoxidehidroaustina (PSP-3):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 237-240°C; [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +36.0 (*c* 0.25, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); [Literatura: pf > 300°C; [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +170 (*c* 0.30, CHCl<sub>3</sub>)] (HAYASHI *et al.*, 1994); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 234; IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 1776, 1757, 1739, 1722; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.21; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.21; APCIMS (Íons filhos, 20 eV): *m/z* 557 (13) ([M+H]<sup>+</sup>), 539 (41), 497 (18), 479 (100), 437 (28), 319 (18).

### 3.5.1.2.4. Isolamento das Substâncias PSP-9 e PSP-6

A fração **PR-2-3** (1.8919 g) foi fracionada em CC (sílica normal, com *n*-hexano, diclorometano, isopropanol e metanol como eluentes no modo gradiente) obtendo 5 subfrações (**PR-2-3-1** a **PR-2-3-5**). A subfração 3 foi submetida a CC usando florisil como fase estacionária e *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes no modo gradiente para obter 5 subfrações (**PR-2-3-3-1** a **PR-2-3-3-5**). A substância **PSP-9** (3.5 mg) foi obtida após o fracionamento da subfração **PR-2-3-3-**



**1** (42.2 mg) por cromatografia de camada delgada preparativa utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/EtOEt (20:80). A substância **PSP-6** (24.6 mg) foi isolada da subfração **PR-2-3-3-3** (94.1 mg) após CCDP com *n*-Hex/AcOEt (50:50). Esses dois metabólitos também foram encontrados nas frações subseqüentes (**PSP-6** = 54.4 mg; **PSP-9** = 6.9 mg).

*Preaustinóide A1 (PSP-9):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 240.5-241.4°C;  $[\alpha]_D^{25} - 25,55$  (*c* 2.7, CHCl<sub>3</sub>); UV (CH<sub>3</sub>OH)  $\lambda_{\max}$  nm: 210, 308(s); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3375, 1742, 1730, 1705, 1689; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.17; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.17; APCIMS (Íons filhos, 15 eV): *m/z* 461 (5) ([M+H]<sup>+</sup>), 429 (18), 411 (28), 393 (100), 369 (21), 351 (28), 323 (33), 273 (42), 235 (90), 167 (79); HREIMS *m/z* 460.24610. Calcd. para C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub>: 460.246103.

*Dehidroaustina (PSP-6):*

Obtido como um óleo amarelado;  $[\alpha]_D^{25} +58.46$  (*c* 0.39, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); [Literatura:  $[\alpha]_D^{25} +140$  (*c* 0.25, CHCl<sub>3</sub>)] (HAYASHI *et al.*, 1994); UV (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 238; IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 1769, 1719, 1722; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.21; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.21; APCIMS (Íons filhos, 20 eV): *m/z* 499 (71) ([M+H]<sup>+</sup>), 481 (5), 457 (100), 439 (69), 421 (13), 411 (23), 321 (58), 293 (20), 251 (26).

### 3.5.1.2.5. Isolamento das Substâncias PSP-19 e PSP-17

Os metabólitos **PSP-19** (1.2 mg) e **PSP-17** (1.6 mg) foram obtidos após o fracionamento cromatográfico da subfração **PR-2-3-3-4** (38.5 mg) por cromatografia de camada delgada preparativa utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/AcOEt (50:50). A substância **PSP-17** (24.6 mg) também foi obtida de uma fração subseqüente (6.9 mg).

*Preaustinóide A3 (PSP-19):*

Obtido como um pó branco amorfo; RMN <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.18; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.18.

*Preaustinóide B2 (PSP-17):*

Obtido como um pó branco amorfo; RMN <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.16; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.16.

### 3.5.1.2.6. Isolamento das Substâncias PSP-10 e PSP-12

A subfração **PR-2-3-4** (1.2974 g) foi fracionada por CC usando florisil como fase estacionária e *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes no modo gradiente para obter 7 subfrações (**PR-2-3-4-1** a **PR-2-3-4-7**). A subfração **PR-2-3-4-3** (175.7 mg) foi submetida a CCDP com *n*-Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acet (37:57:6) como fase móvel para produzir 6 subfrações. A substância **PSP-10** (1.0 mg) foi obtida do fracionamento da subfração **PR-2-3-4-3-4-4** (2.0 mg) por CCDP utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/AcOEt (50:50). A substância **PSP-12** (1.5 mg) foi isolada da subfração **PR-2-3-4-3-4-5** (2.4 mg) após CCDP com *n*-Hex/AcOEt (50:50).

*Austinolídeo (PSP-10):*

Obtido como um pó branco amorfo; RMN <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.19; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.20.

*Isoaustinona (PSP-12):*

Obtido como um pó branco amorfo; RMN <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.19; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.20.

### 3.5.1.2.7. Isolamento da Substância PSP-5

A substância **PSP-5** (19.4 mg) foi obtida a partir do fracionamento da subfração **PR-2-3-4-4** (138.40 mg) através da CCDP utilizando *n*-Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acet (37:57:6) como fase móvel. Essa substância também foi encontrada nas subfrações subsequentes (63.6 mg).

*Verruculogenina (PSP-5):*

Obtido como um pó amarelo claro, IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3453, 2923, 1663, 1625, 1163; RMN <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.11; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.11; APCIMS (Íons filhos, 25 eV): *m/z* 510 (22) [M-H]<sup>-</sup>, 492 (5), 306 (47), 253 (13), 197 (12), 167 (100).

### 3.5.1.2.8. Isolamento da Substância PSP-11 e da Substância Não Identificada PR-234 561-4

A subfração **PR-2-3-4-5** (85.7 mg) foi fracionada por CCDP com *n*-Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acet (37:57:6) como fase móvel para produzir 6 subfrações (**PR-2-3-4-5-1** a **PR-2-3-4-5-7**). A subfração **PR-2-3-4-5-6** (7.2 mg) foi submetida a CCDP com *n*-Hex/AcOEt (50:50) como fase móvel resultando 2 subfrações. A substância **PSP-11** (3.5 mg) foi obtida desse fracionamento (subfração 2) e o metabólito ainda não identificado **PR-2-3-4-5-6-1-4** (0.5 mg) foi obtido a partir do fracionamento da subfração **PR-2-3-4-5-6-1** (3.3 mg) por CCDP utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/AcOEt (50:50).

*Preaustinóide B1 (PSP-11):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 46.4-48.0 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  - 35,7 (*c* 2.7, CHCl<sub>3</sub>); UV (CH<sub>3</sub>OH)  $\lambda_{\max}$  nm: 210, 222(s), 304(s); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3405, 1758, 1739, 1706, 1622; RMN <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.16; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (400 MHz,

CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.16; APCIMS (Íons filhos, 15 eV): *m/z* 445 (21) [M+H]<sup>+</sup>, 413 (37), 385 (10), 371 (10), 353 (100), 251 (12); HREIMS *m/z* 444.25119. Calc. para C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>: 444.251189.

### 3.5.1.2.9. Isolamento da Substância PSP-13 e da Substância Não Identificada PR-234 652-3

A subfração **PR-2-3-4-6** (54.4 mg) foi fracionada por CCDP com *n*-Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acet (37.5:57.5:5) como fase móvel para produzir 5 subfrações (**PR-2-3-4-6-1** a **PR-2-3-4-6-5**). As subfrações **PR-2-3-4-6-2** (5.5 mg) e **PR-2-3-4-6-3** (21.5 mg) foram reunidas e submetidas a CCDP com *n*-Hex/EtOEt (10:90) como fase móvel resultando 5 subfrações. A substância **PSP-13** (2.7 mg) foi obtida desse fracionamento (subfração 5). O fracionamento da subfração **PR-2-3-4-6-5** (5.0 mg) por CCDP utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/EtOEt (10:90) resultou em duas subfrações e o metabólito ainda não identificado **PR-2-3-4-6-5-2-3** (0.6 mg) foi obtido a partir do fracionamento da subfração **PR-2-3-4-6-5-2** (1.5 mg) através de CCDP utilizando como fase móvel misturas de *n*-Hex/AcOEt (50:50).

#### *Austinoneol A (PSP-13)*

Obtido como um pó branco amorfo; pf. 224-226°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 385.9 (*c* 0.22, CHCl<sub>3</sub>); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 222, 260 (s); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3413, 1749, 1727, 1704; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.18; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.18; ESIMS (Íons filhos, 15 eV): *m/z* 415 (12) ([M+H]<sup>+</sup>), 397 (12), 383 (9), 365 (100), 347 (27), 319 (39); HREIMS *m/z* 414.20411 (calcd para C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub> 414.204238).

### 3.5.1.2.10. Isolamento das Substâncias PSP-7 e PSP-8

As substâncias **PSP-7** (25.5 mg) e **PSP-8** (32.0 mg) foram obtidas a partir da fração **PR-2-4** (1.19 g) fracionada em CC (sílica normal, com *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes no modo gradiente, obtendo 7 subfrações: **PR-2-4-1** a **PR-2-4-7**). PSP-8 foi obtida nas frações subseqüentes, totalizando 114.6 mg.

#### *Ácido Penicílico (PSP-7):*

Obtido como um sólido alaranjado;  $[\alpha]_D^{25} -5.75$  (*c* 0.087, CHCl<sub>3</sub>) IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3426, 2925, 1760, 1640; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.12; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.12.

#### *Neoaustina (PSP-8):*

Obtido como um pó branco amorfo; pf 325-327°C;  $[\alpha]_D^{25} +166.91$  (*c* 1.21, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); [Literatura: pf > 300°C;  $[\alpha]_D^{25} +190$  (*c* 0.15, CHCl<sub>3</sub>)] (HAYASHI *et al.*, 1994); UV (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 244, 312(s); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3411, 1772, 1753, 1686; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.21; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.21; APCIMS (Íons filhos, 20 eV): *m/z* 427 (26) ([M+H]<sup>+</sup>), 409 (28), 381 (14), 353 (12), 329 (100).

### 3.5.1.2.11. Isolamento da Substância PSP-21

A subfração **PR-2-4-5** (21.7 mg) foi submetida a CCDP com *n*-hexano, diclorometano e acetona (36.5:56.5:7) como eluentes obtendo 4 subfrações (**PR-2-4-5-1** a **PR-2-4-5-4**). A substância **PSP-21** (3.1 mg) foi obtida após o fracionamento da subfração **PR-2-4-5-2** (5.8 mg) por CCDP utilizando como fase móvel *n*-Hex/AcOEt (50:50).

### 3.5.1.2.12. Isolamento de PSP-20 e das Substâncias Não Identificadas PR-24611, PR-24614 e PR-24615

A subfração **PR-2-4-6** (229.6 mg) foi submetida a CC usando sílica flash como fase estacionária e *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol como eluentes no modo gradiente para obter 5 subfrações (**PR-2-4-6-1** a **PR-2-4-6-5**). A subfração **PR-2-4-6-1** (124.2 mg) foi posteriormente purificada através de CC (fase móvel: *n*-hexano, diclorometano, acetona e metanol no modo gradiente), produzindo as subfrações **PR-2-4-6-1-1** (1.0 mg, substância ainda não identificada), **PR-2-4-6-1-4** (4.0 mg, substância ainda não identificada), **PR-2-4-6-1-5** (8.8 mg, substância ainda não identificada), **PR-2-4-6-1-6** e **PR-2-4-6-1-7** (substância **PSP-20**, 42.6 mg e 42.5 mg, respectivamente).

**(PSP-20):**

Obtido como um óleo amarelo;  $[\alpha]_D^{25} -0.45$  (*c* 2.67, CHCl<sub>3</sub>); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3455, 3288, 1700, 1672, 1636; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 3.13; dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos por HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) – Tabela 3.13; ESIMS (Íons filhos, 10 eV): *m/z* 439 (40) [M+H]<sup>+</sup>, 380 (100), 338 (30); ESIMS (Íons filhos, 20 eV): *m/z* 437 (5) [M-H]<sup>-</sup>, 419 (15), 395 (5), 378 (30), 336 (50), 58 (100).

### 3.5.1.3. Extrato PR-3

O extrato **PR-3** (10,24 g) foi obtido da partição com acetato de etila do extrato metanólico e fracionado por coluna em sílica flash. As frações foram eluídas seguindo a técnica de gradiente com *n*-hexano, acetato de etila e metanol. As frações semelhantes foram reunidas, totalizando doze frações (**PR-3-1** a **PR-3-12**). Algumas delas foram fracionadas novamente (**PR-3-3**, **PR-3-4** e **PR-3-5**) e outras foram estudadas via LC/MS para a pesquisa de substâncias de interesse (**PR-3-6**, 734.3 mg; **PR-3-7**, 1.482 g e **PR-3-8**, 1.12 g). As frações **PR-3-9** (587.1 mg), **PR-3-10** (1.58 g),

**PR-3-11** (194.0 mg) e **PR-3-12** (1.25 g) mostraram espectros de RMN <sup>1</sup>H sugestivos de cerebrosidas e ceramidas e, portanto, estão sob investigação no nosso laboratório.

As subfrações **PR-3-4** (120.9 mg) e **PR-3-5** (2.04 mg) foram re-fraçionadas obtendo, respectivamente, 8 e 9 subfrações, com a finalidade de serem submetidas aos ensaios biológicos e estudos de LC/MS (**PR-3-5-4**, 62.4 mg; **PR-3-5-5**, 169.0 mg; **PR-3-5-6**, 233.5 mg).

#### 3.5.1.4. Extrato PR-4

O extrato obtido por liofilização da água excretada pelo fungo (1.86 g) resultante da partição com acetato de etila do extrato metanólico quando analisado por RMN apresentou deslocamentos químicos indicando uma provável presença de açúcares, os quais estão em mistura, e são muito similares aos açúcares encontrados no extrato **PR-1**. Portanto, este extrato não foi estudado.

#### 3.5.1.5 Extrato PR-5

Primeiramente o extrato bruto **PR-5** foi particionado com *n*-hexano e metanol. Durante este procedimento foi verificada a formação de um precipitado, o qual foi separado das duas fases orgânicas, formando, portanto, três frações (**PR-5-H**, 105.918 g; **PR-5-PM**, 9.2849 g e **PR-5-M**, 45.0 g). Essas frações foram cromatografadas por filtração a vácuo em sílica normal com *n*-hexano, diclorometano e metanol como fase móvel seguindo a técnica de gradiente de polaridade, produzindo, respectivamente, 8, 9 e 9 frações (Tabela 3.5), as quais foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H. As frações apolares obtidas destes experimentos foram estudadas por GC/MS e algumas frações polares por LC/MS (capítulo 6).

## 3.5.2. Fracionamento do Extrato em Milho

### 3.5.2.1. Extrato PM-1

O extrato obtido por liofilização da água excretada pelo fungo quando cultivado em milho (**PM-1**) foi analisado por RMN <sup>1</sup>H e apresentou deslocamentos químicos indicando uma provável presença de açúcares, os quais são muito similares aos encontrados no extrato **PR-1**. Portanto, este extrato não foi estudado.

### 3.5.2.2. Extrato PM-2

O extrato **PM-2** (143.3 g) foi submetido à cromatografia de alto vácuo, utilizando os solventes *n*-hexano, diclorometano e metanol com fase móvel sobre a fase estacionária sílica comum. Foram obtidas nove frações, as quais são apresentadas no na Tabela 3.5.

### 3.5.2.3. Extrato PM-3

Primeiramente o extrato bruto **PM-3** foi particionado com *n*-hexano e metanol, obtendo duas frações (**PM-3-H**, 63.5290 g e **PM-3-M**, 23.1973 g). Essas frações foram cromatografadas por CC de alto vácuo em sílica normal com *n*-hexano, diclorometano e metanol como fase móvel seguindo a técnica de gradiente de polaridade, produzindo, respectivamente, 8 e 9 frações (Tabela 3.5), as quais foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H. As frações apolares obtidas destes experimentos foram estudadas por GC/MS e algumas frações polares por LC/MS (capítulo 6).



TABELA 3.5 – Rendimento das Frações Resultantes do Fracionamento Cromatográfico de PR-5-H, PR-5-PM, PR-5-M, PM-2, PM-3H e PM-3-M.

| Frações        | Rendimento (g) | Comentários                                      |
|----------------|----------------|--|
| <b>PR-5-H</b>  |                |  |
| PR-5-H-1       | 52.5502        | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PR-5-H-2       | 10.3294        | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PR-5-H-3       | 13.4121        | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PR-5-H-4       | 4.6839         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-H-5       | 5.0597         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-H-6       | 5.5651         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-H-7       | 1.1436         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-H-8       | 10.5210        | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| <b>PR-5-PM</b> |                |  |
| PR-5-PM-1      | 0.0611         | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PR-5-PM-2      | 0.0152         | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PR-5-PM-3      | 0.0187         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-PM-4      | 0.0558         | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PR-5-PM-5      | 0.0307         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-PM-6      | 2.4451         | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| PR-5-PM-7      | 1.8102         | Açúcares e derivados                             |
| PR-5-PM-8      | 0.9719         | Açúcares e derivados                             |
| PR-5-PM-9      | 1.8550         | Açúcares e derivados                             |
| <b>PR-5-M</b>  |                |  |
| PR-5-M-1       | 0.0104         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-M-2       | 0.007          | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-M-3       | 0.009          | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-M-4       | 0.041          | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PR-5-M-5       | 0.2915         | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| PR-5-M-6       | 12.5959        | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| PR-5-M-7       | 14.0351        | Açúcares e derivados                             |
| PR-5-M-8       | 2.5778         | Açúcares e derivados                             |
| PR-5-M-9       | 2.2958         | Açúcares e derivados                             |
| <b>PM-2</b>    |                |  |
| PM-2-1         | 0.4951         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-2-2         | 0.0028         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-2-3         | 0.0989         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-2-4         | 0.3189         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-2-5         | 5.0857         | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| PM-2-6         | 21.7514        | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| PM-2-7         | 94.5701        | Açúcares e derivados                             |
| PM-2-8         | 13.1288        | Açúcares e derivados                             |
| PM-2-9         | 3.4092         | Açúcares e derivados                             |
| <b>PM-3-H</b>  |                |  |
| PM-3-H-1       | 27.4257        | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PM-3-H-2       | 4.3709         | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PM-3-H-3       | 5.2078         | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PM-3-H-4       | 2.5597         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-3-H-5       | 2.0539         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |

| Frações       | Rendimento (g) | Comentários                                      |
|---------------|----------------|--|
| PM-3-H-6      | 2.2109         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-3-H-7      | 2.1500         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-3-H-8      | 7.4381         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| <b>PM-3-M</b> |                |  |
| PM-3-M-1      | 0.0166         | Ácidos graxos e glicerídeos analisados por GC/MS |
| PM-3-M-2      | 0.0109         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-3-M-3      | 0.0688         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-3-M-4      | 0.3467         | Ácidos graxos analisados por GC/MS               |
| PM-3-M-5      | 1.0350         | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| POM-3-M-6     | 15.3400        | Outras substâncias analisadas por LC/MS          |
| PM-3-M-7      | 6.7943         | Açúcares e derivados                             |
| PM-3-M-8      | 0.9490         | Açúcares e derivados                             |
| PM-3-M-9      | 0.6010         | Açúcares e derivados                             |

### 3.5.3. Fracionamento do Extrato em Meio Líquido (PL)

#### 3.5.3.1. Extrato PLM

O extrato **PLM** (50.7559 g) obtido da extração do micélio de *Penicillium* sp cultivado em meio líquido, foi submetido à cromatografia sob vácuo utilizando sílica comum e os solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol seguindo a técnica de gradiente de polaridade. Foram obtidas seis frações (**PLM-1** a **PLM-6**). Algumas delas foram fracionadas seguindo as técnicas cromatográficas usuais. A análise das subfrações obtida revelou a presença de uma mistura de substâncias incluindo os meroterpenos (**PSP-3**, 24.9 mg e **PSP-8**, 13.3 mg, entre outros), o alcalóide verruculogenina (**PSP-5**, 625.4 mg), cerebrosidas e ceramidas, açúcares, peróxido de ergosterol.

### 3.5.3.1.1. Isolamento da Substância PSP-14

A fração **PLM-4-7** (1.4916 g) foi fracionada em CC utilizando como fase estacionária sephadex LH-20 e metanol como fase móvel obtendo 7 subfrações (**PLM-4-7-1** a **PLM-4-7-7**). A subfração 5 (**PLM-4-7-5**, 186.8 mg) apresentou um precipitado (**PSP-14**, 45.4 mg) o qual foi separado por filtração e analisado posteriormente.

#### *Uridina (PSP-14):*

Obtido como cristais brancos; IV (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3412, 1682, 1269, 1098; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO-*d*6): Tabela 3.14; dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 3.14; ESIMS (Íons filhos, 15 eV):  $m/z$  243 (10) ( $[\text{M-H}]^-$ ), 200 (37), 152 (23), 140 (17), 110 (100).

### 3.5.3.1.2. Isolamento da Substância PSP-15

A fração **PLM-4-8** (3.1742 g) foi fracionada em CC utilizando como fase estacionária sephadex LH-20 e metanol como fase móvel obtendo quatro subfrações (**PLM-4-8-1** a **PLM-4-8-4**). A subfração 4 (**PLM-4-8-4**, 692.2 mg) apareceu como um sólido branco cristalino (**PSP-15**) o qual foi analisado posteriormente.

#### *Eritritol (PSP-15):*

Obtido como cristais brancos; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO-*d*6): Apêndice 2.1.2; dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos por Pendant (HOMER e PERRY, 1995), HSQC e HMBC (50 MHz, DMSO-*d*6): Apêndice 2.1.4; MS (*Full-scan*)  $m/z$  121(100) ( $[\text{M-H}]^-$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Substâncias Isoladas de *Fusarium moniliforme*

#### 4.1.1. Identificação dos Ciclopeptídeos FM-1 e FM-2

As substâncias **FM-1** e **FM-2** foram produzidas durante o cultivo de *Fusarium moniliforme* em meio líquido Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura, e isoladas como sólidos brancos amorfos após cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária, do extrato metanólico da cultura.

O metabólito **FM-1** teve a sua fórmula molecular,  $C_{15}H_{19}NO_3$ , deduzida por espectrometria de massas de alta resolução [experimental 261.1360 (EI); calc.261.1364] e por análise dos dados espectrais. O espectro na região do infravermelho (Ap.<sup>2</sup>. 1.1.2) mostrou uma forte absorção em  $1738\text{ cm}^{-1}$  (grupo éster ou lactona), e  $1652\text{ cm}^{-1}$  (grupo amida ou lactama). Além disso, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.6; Ap.1.1.3) e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.7; Ap. 1.1.6) de **FM-1** apresentaram os deslocamentos químicos e acoplamentos típicos do grupo benzila, bem como o grupo isopropila, os quais foram confirmados através da análise dos dados de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY (Figura 3.1; Ap. 1.1.5). O sinal em  $\delta$  4.80 (H-6, ligado no carbono em  $\delta$  75.7) apresentou uma correlação com o hidrogênio em  $\delta$  1.93 (H-7), o qual, por sua vez, tem uma correlação com os grupos metílicos em  $\delta$  0.33 (H-9) e  $\delta$  0.80 (H-8), sugerindo a presença de um  $\alpha$ -hidroxi-ácido derivado de um aminoácido - valina (Val). O grupo benzila foi deduzido pela presença dos hidrogênios nos carbonos do tipo  $sp^2$  [ $\delta$  7.17 (H-14), 7.23 (H-13, H-15), e 7.28 (H-12, H-16)], e o hidrogênio metínico H-3 em  $\delta$  5.67 (*dd*) que acopla com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-10a e H-10b (Figura 3.1) em  $\delta$  2.93 e 3.40, respectivamente, estabelecendo a estrutura parcial de **FM-1** como sendo um derivado do aminoácido fenilalanina (Phe).

A presença dos sinais de duas carbonilas em  $\delta$  170.2 e 169.8 sugeriu que a molécula fosse um dipeptídeo, pertencente à classe das dioxopiperazinas. Entretanto, o sinal no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Ap. 1.1.6) de um carbono metínico muito desblindado em  $\delta$  75.7 e a absorção de um grupo éster ou lactona em  $1738\text{ cm}^{-1}$  observada no espectro na região do infravermelho (Ap. 1.1.2), essa substância foi

<sup>2</sup> Ap: Apêndice. Os espectros das substâncias discutidas são mostrados nos apêndices.

denominada como ciclodepsidipeptídeo (ou peptídeo lactona). Essa classe de metabólitos é definida como peptídeos cíclicos onde uma ou mais ligações amidas são substituídas por uma ligação éster (BYCROFT e HIGTON, 1985).

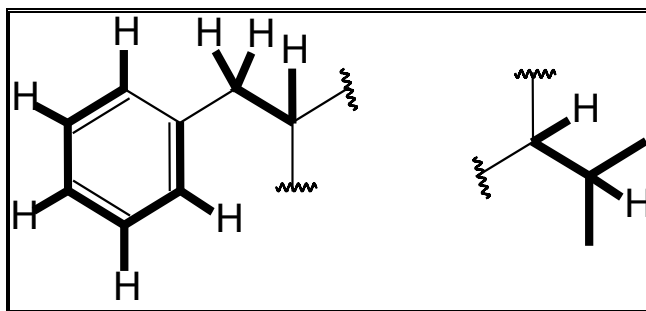


FIGURA 3.1 – Estruturas parciais de **FM-1** deduzidas das correlações  $^1\text{H}\times^1\text{H}$  COSY.

A análise dos dados de correlações a uma ligação (HSQC, Ap. 1.1.7) e de correlações de longo alcance (HMBC, Ap. 1.1.8) estabeleceu as correlações dos carbonos carbonílicos dos grupos amida e éster, bem como do grupo N-metil do resíduo de Phe para **FM-1**. A conexão do resíduo de Phe com Val foi estabelecida no espectro de HMBC pela presença das correlações do hidrogênio em  $\delta$  4.80, (H-6) com a carbonila de Phe ( $\delta$  170.2). O resíduo Val está ligado a Phe através das correlações do hidrogênio N-metílico da Phe ( $\delta$  3.04) ao grupo carbonílico da Val em  $\delta$  169.8. Além disso, a interpretação desses dados confirmou os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de Phe, bem como do sistema isopropila originado do resíduo Val. Estas e outras correlações são mostradas na Figura 3.2.

A presença de um grupo metílico altamente blindado em  $\delta$  0.33 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pode ser explicado através do efeito anisotrópico dos elétrons- $\pi$  do sistema aromático do resíduo Phe, corroborando para a geometria proposta para **FM-1**, mostrada na Figura 3.3, o qual foi confirmada pelos experimentos de gNOESY (Tabela 3.8). O hidrogênio H-3 ( $\delta$  5.67) apresentou uma correlação com os hidrogênios de N-metil ( $\delta$  3.04) no espectro de gNOESY. Por sua vez, estes hidrogênios N-metil também apresentaram correlações com o hidrogênio H-6 ( $\delta$  4.80). Como consequência, estes dados sugerem que o grupo N-metílico está localizado na

mesma face de H-3 e H-6, ao passo que os grupos isopropila e benzila estão ambos localizados na face oposta (Figura 3.4).

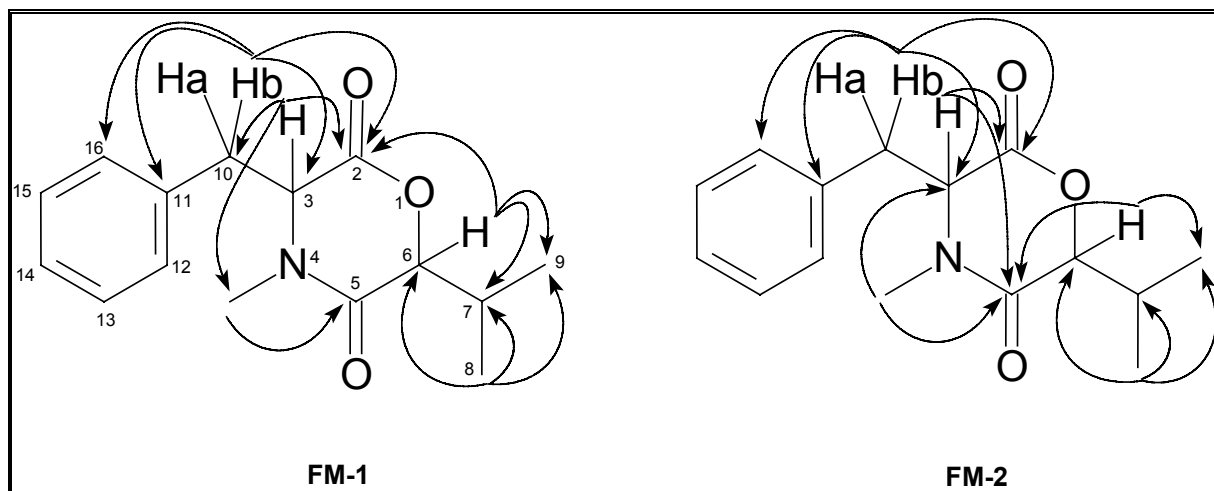


FIGURA 3.2 – Correlações de HMBC detectadas para **FM-1** e **FM-2**.

Os espectros de massas obtidos por HREIMS e APCI/MS (Ap. 1.2.1) para a substância **FM-2** foram consistentes para a proposta de um isômero da substância **FM-1**  $[[M]^+ 261.1359$  (calc. 261.1364) e  $[M+H]^+ 262$ , respectivamente]. O espectro na região do infravermelho (Ap. 1.2.2) mostrou deformações referentes a dois grupos carbonilas em  $1749$  e  $1654\text{ cm}^{-1}$ , respectivas aos grupos éster/lactona e amida/lactama. Uma comparação dos dados de RMN obtidos (Tabelas 3.6 e 3.7) indicou que **FM-1** e **FM-2** são dois depsidipeptídeos que apresentam os mesmos resíduos de aminoácidos. Contudo, a presença de um grupo metínico altamente blindado em  $\delta 2.98$  foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **FM-2** (Ap. 1.2.3). As correlações deste hidrogênio com um carbono em  $\delta 81.2$  ( $^1J$ ) e com um carbono carbonílico em  $\delta 165.2$  ( $^2J$ ) nos espectros de HETCOR (Ap. 1.2.7) e HMBC (Ap. 1.2.8), respectivamente, sugeriram um hidrogênio carbinólico que está altamente protegido provavelmente pelos efeitos anisotrópicos dos elétrons- $\pi$  do anel aromático do resíduo de Phe. No depsidipeptídeo **FM-1** este efeito era observado sobre o grupo metila H-8. Finalmente a estereoquímica em C-6 foi estabelecida com base nos efeitos de NOE observados entre o hidrogênio H-6 ( $\delta 2.98$ ) com o hidrogênio H-10b ( $\delta 3.29$ )

e H-12,16 ( $\delta$ 7.13) (Tabela 3.8). Para **FM-2** não foram observadas as correlações de H-6 com os hidrogênios H-3 e N-metil, sugerindo que H-6 deve estar na face oposta desses hidrogênios (Figura 3.4). Como resultado, os dados indicaram que a substância **FM-2** é um diastereoisômero de **FM-1**.

Otimizações geométricas e estudos de dinâmica molecular (FROIMOWITZ, 1993) têm indicado que as conformações mais estáveis dos anéis morfolidionas nestes dois depsidipeptídeos são algo entre a conformação barco e meia-cadeira (Figura 3.3). O posicionamento dos substituintes benzila e isopropila dados por estes cálculos estão em perfeita concordância com os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e dos dados experimentais de NOE os quais foram discutidos acima.

Experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e gNOESY a baixas temperaturas também foram realizados no sentido de corroborar para a atribuição dos valores de NOE observados e estabelecimento da estereoquímica devido a grande mobilidade conformacional apresentada por estas substâncias. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para **FM-1** nas diferentes temperaturas, 253, 273 e 293 K (Ap. 1.1.4) mostrou que conforme a temperatura diminuía, o sinal da metila H-9 tornava-se mais blindado, sugerindo que a conformação mais estável favorece o efeito de blindagem de H-9. Entretanto, as irradiações de NOE obtidas nessa temperatura para os hidrogênios H-3, H-6 e N-metila revelou a ausência de correlações entre esses hidrogênios.

A estrutura proposta para esses metabólitos contém três estereocentros - C-3, C-6 e N – conduzindo, portanto, a formação de oito estereoisômeros, conforme mostra a Figura 3.4. Os diastereoisômeros apresentam propriedades físicas diferentes e, portanto podem ser separados e identificados por espectroscopia de RMN como por rotação óptica, ao passo que os enantiômeros, por apresentar propriedades físicas idênticas, são diferenciados através da medida da rotação óptica, e eventualmente podem ser separados por colunas quirais. Além disso, a presença de dois hidrogênios  $\alpha$ -carbonílicos pode influenciar muito na estereoquímica dessas substâncias uma vez que por serem hidrogênios ácidos podem migrar e retornar em ambas as faces da molécula produzindo duas formas estereoisoméricas de cada um desses hidrogênios. O átomo de nitrogênio também é um centro estereogênico que pode conduzir a formação de isômeros. No caso de amidas dissustituídas de cadeia aberta, a quiralidade é conseqüência de uma alta barreira de torsão entre o substituinte e o átomo de

nitrogênio, como é o caso das substâncias derivadas de N-arilamidas (CASS *et al.*, 1997). Por analogia, para amidas cíclicas a possibilidade de interconversão é dificultada pela rigidez do anel, dificultando a racemização desse centro.

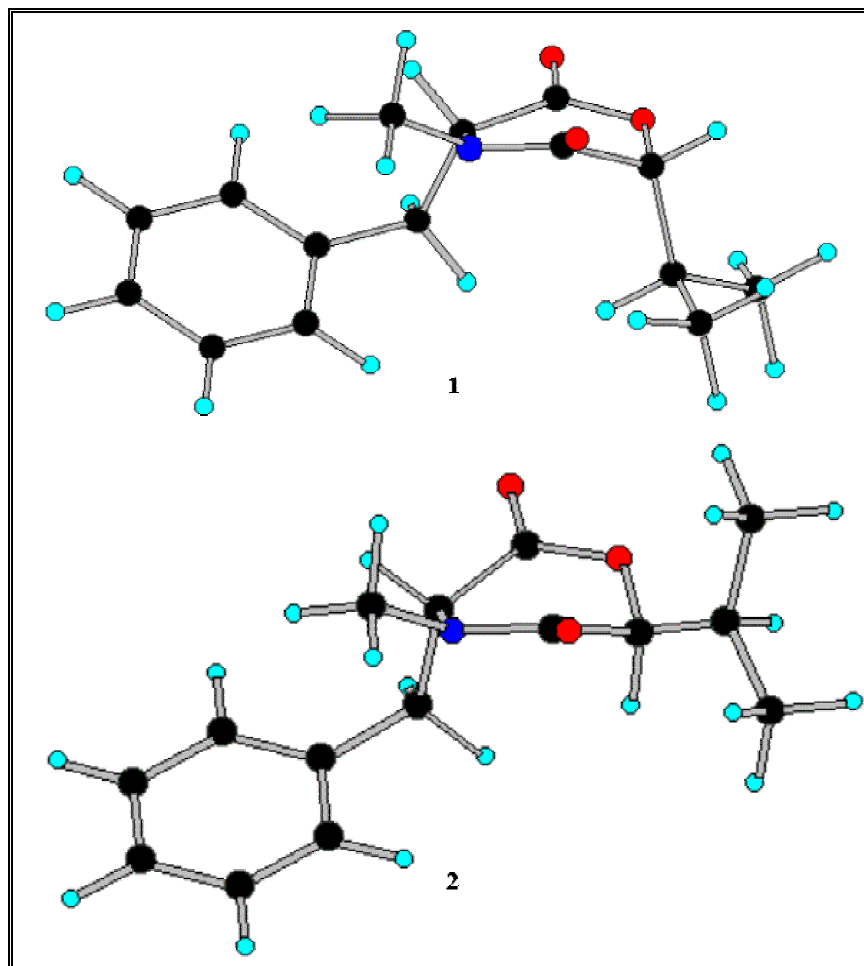


FIGURA 3.3 – Conformações sugeridas para **FM-1** e **FM-2** baseada nos espectros de gNOESY. As numerações 1 e 2 correspondem, respectivamente, aos compostos **FM-1** e **FM-2**.

Considerando esta hipótese juntamente com os dados de NOE (Tabela 3.8) os quais revelam que **FM-1** contém os hidrogênios H-3, H-6 e N-metil na mesma face da molécula e **FM-2** apenas H-3 e N-metil, duas formas enantioméricas poderiam ser esperadas para cada um desses depsidipeptídeos (Figura 3.4).



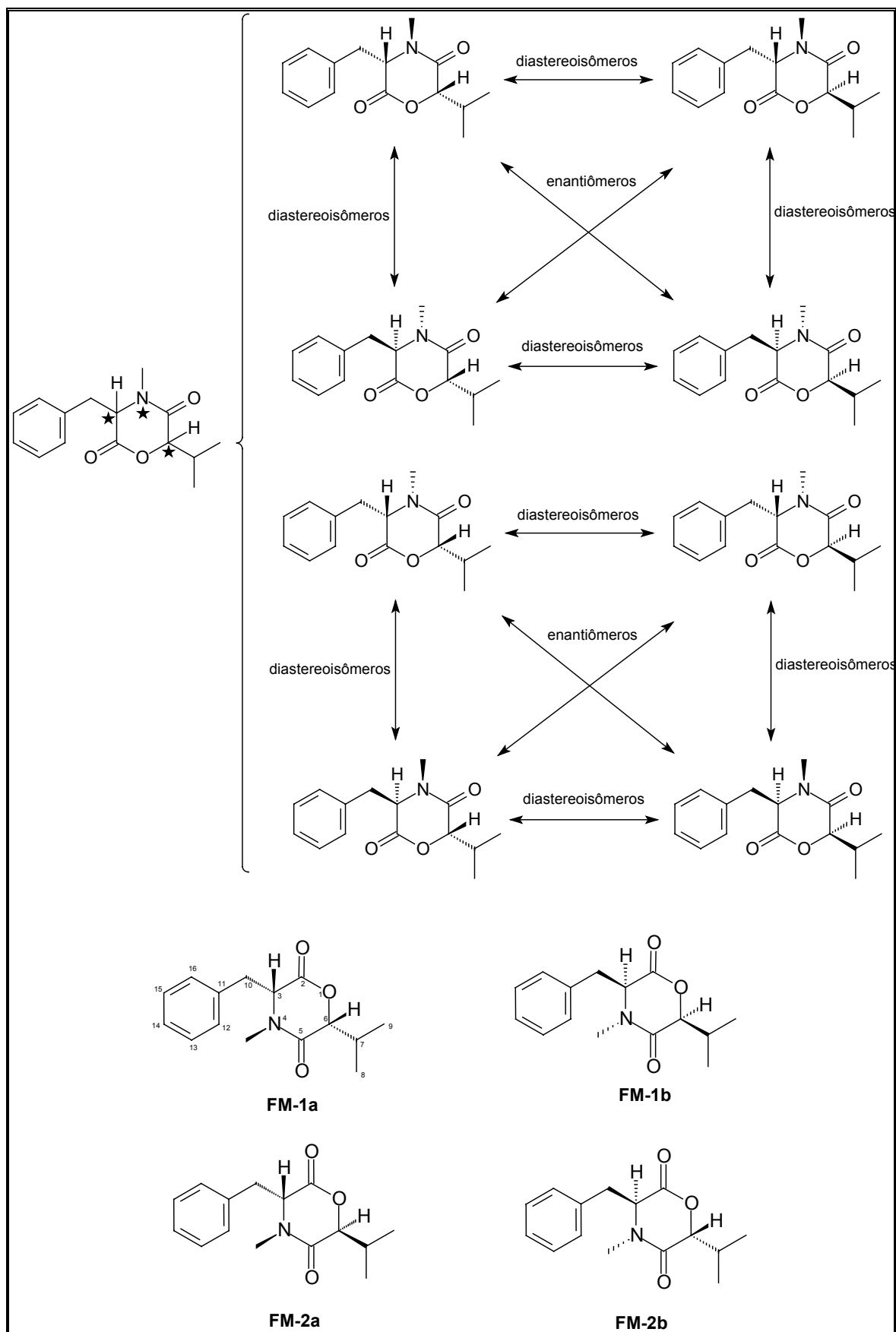


FIGURA 3.4 – Estrutura dos estereoisômeros para a substância de fórmula molecular  $C_{15}H_{19}NO_3$  e as formas enantioméricas para os depsidipeptídeos **FM-1** e **FM-2**.

TABELA 3.6 - Dados de RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , J em Hz, 400 MHz) para os depsidipeptídeos **FM-1** e **FM-2** e comparação com os dados descritos na literatura (HASUMI *et al.*, 1993; KAGAMIZONO *et al.*, 1995; OH *et al.*, 2001).

| Posição           | FM-1                                    | FM-2                                   | L-1                               | L-2                              | L-3                              | L-4                              | L-5                              | L-6                               | L-7  |
|-------------------|---|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| 3                 | 5.67 <i>dd</i><br>(12.0;<br>4.0)        | 4.41 <i>t</i><br>(4.0)                 | 5.51 <i>dd</i><br>(11.8;<br>4.8)  | 4.38 <i>t</i><br>(4.5)           | 4.41 <i>t</i><br>(4.3)           | 4.40 <i>t</i><br>(4.9)           | 4.40 <i>t</i><br>(4.9)           | 5.47 <i>dl</i>                    | 4.40 <i>dd</i><br>(5.1;<br>5.1)                    |
| 6                 | 4.8 <i>d</i><br>(9.0)                   | 2.98 <i>d</i><br>(2.2)                 | 4.89 <i>d</i><br>(8.43)           | 2.98 <i>d</i><br>(2.2)           | 3.01 <i>d</i><br>(2.3)           | 4.35 <i>d</i><br>(6.8)           | 4.35 <i>d</i><br>(6.8)           | 4.92 <i>d</i><br>(8.7)            | 4.36 <i>d</i><br>(7.4)                             |
| 7                 | 1.93 <i>oct</i><br>(6.7)                | 2.31<br><i>dhept</i><br>(7.0;<br>2.2)  | 1.99 <i>m</i>                     | 2.29 <i>m</i>                    | 2.31 <i>m</i>                    | 1.20 <i>m</i>                    | 1.20 <i>m</i>                    | 2.02 <i>m</i>                     | 1.18 <i>m</i>                                      |
| 8                 | 0.80 <i>d</i><br>(7.0)                  | 0.84 <i>d</i><br>(7.0)                 | 0.41 <i>d</i><br>(6.6)            | 0.82 <i>d</i><br>(7.1)           | 0.85 <i>d</i><br>(6.9)           | 0.86 <i>d</i><br>(6.8)           | 0.86 <i>d</i><br>(6.8)           | 0.42 <i>d</i><br>(6.9)            | 0.59 <i>d</i><br>(6.5)                             |
| 9                 | 0.33 <i>d</i><br>(7.0)                  | 0.76 <i>d</i><br>(7.0)                 | 0.85 <i>d</i><br>(6.96)           | 0.74 <i>d</i><br>(6.7)           | 0.77 <i>d</i><br>(6.9)           | 0.60 <i>d</i><br>(6.8)           | 0.60 <i>d</i><br>(6.8)           | 0.80 <i>d</i><br>(6.9)            | 0.85 <i>d</i><br>(6.9)                             |
| 10                | a: 2.93<br><i>dd</i><br>(15.0;<br>12.0) | a: 3.19<br><i>dd</i><br>(14.0;<br>4.0) | 2.97 <i>dd</i><br>(11.8;<br>14.5) | 3.17 <i>dd</i><br>(14.0;<br>4.5) | 3.20 <i>dd</i><br>(14.0;<br>4.3) | 3.28 <i>dd</i><br>(14.2;<br>4.9) | 3.28 <i>dd</i><br>(14.2;<br>4.9) | 2.98 <i>dd</i><br>(14.5;<br>11.9) | 3.30 <i>dd</i><br>(14.2;<br>5.1)                   |
|                   | b: 3.40<br><i>dd</i><br>(15.0;4.<br>0)  | b: 3.29<br><i>dd</i><br>(14.0;<br>4.0) | 3.38 <i>dd</i><br>(14.5;<br>4.8)  | 3.26 <i>dd</i><br>(14.0;<br>4.1) | 3.29 <i>dd</i><br>(14.0;<br>4.3) | 3.34 <i>dd</i><br>(14.2;<br>4.9) | 3.34 <i>dd</i><br>(14.2;<br>4.9) | 3.36 <i>dd</i><br>(14.5;<br>5.1)  | 3.34 <i>dd</i><br>(14.2;<br>5.1)                   |
| 12,16             | 7.28 <i>m</i>                           | 7.13 <i>m</i>                          | 7.2 <i>m</i>                      | 7.09 –<br>7.13 <i>m</i>          | 7.09 –<br>7.18                   | 7.12 –<br>7.18 <i>m</i>          | 7.12 –<br>7.18 <i>m</i>          | 7.23 –<br>7.26 <i>m</i>           | 7.26 –<br>7.34 <i>m</i>                            |
| 13,15             | 7.23 <i>m</i>                           | 7.33 <i>m</i>                          | 7.2 <i>m</i>                      | 7.27 –<br>7.33 <i>m</i>          | 7.30 –<br>7.36                   | 7.24 –<br>7.36 <i>m</i>          | 7.24 –<br>7.36 <i>m</i>          | 7.23 –<br>7.26 <i>m</i>           | 7.15 –<br>7.16 <i>m</i><br>7.26 –<br>7.34 <i>m</i> |
| 14                | 7.17 <i>m</i>                           | 7.33 <i>m</i>                          | 7.2 <i>m</i>                      | 7.27 –<br>7.33 <i>m</i>          | 7.30 –<br>7.36                   | 7.24 –<br>7.36 <i>m</i>          | 7.24 –<br>7.36 <i>m</i>          | 7.17 <i>m</i>                     | 7.15-<br>7.16 <i>m</i>                             |
| N-CH <sub>3</sub> | 3.04 <i>s</i>                           | 3.03 <i>s</i>                          | 2.99 <i>s</i>                     | 3.00 <i>s</i>                    | 3.02 <i>s</i>                    | 2.98 <i>s</i>                    | 2.98 <i>s</i>                    | 3.00 <i>s</i>                     | 2.99 <i>s</i>                                      |

Conforme levantamento bibliográfico realizado para essas substâncias foram encontradas três referências as quais descrevem o isolamento e a atividade biológica de metabólitos muito similares aos isolados da cultura de *F. moniliforme*. A primeira delas relata o isolamento da lateritina (**L-1**) (Figura 3.5), um depsidipeptídeo com atividade inibidora da acil-CoA:colesterol aciltransferase, enzima responsável

pela esterificação do colesterol resultando na formação de lesões de aterosclerose (HASUMI *et al.*, 1993). Os dados espectroscópicos (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , Tabelas 3.6 e 3.7) para **L-1** são muito similares aos encontrados para **FM-1**, porém a estereoquímica de **L-1** não foi definida pelos autores. Além disso, **FM-1** é um sólido branco amorfo enquanto que **L-1** aparece como um óleo marrom claro (Tabela 3.9).

TABELA 3.7 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , multiplicidade<sup>a</sup>, 100 MHz) para os depsidipeptídeos **FM-1** e **FM-2** e comparação com os dados descritos na literatura (HASUMI *et al.*, 1993; KAGAMIZONO *et al.*, 1995; OH *et al.*, 2001).

| Posição           | FM-1           | FM-2           | L-1            | L-2            | L-3            | L-4            | L-5            | L-6            | L-7            |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 2                 | 170.2 <i>s</i> | 167.0 <i>s</i> | 169.9 <i>s</i> | 167.3 <i>s</i> | 167.3 <i>s</i> | 165.9 <i>s</i> | 165.9 <i>s</i> | 170.2 <i>s</i> | 165.9 <i>s</i> |
| 3                 | 56.5 <i>d</i>  | 62.7 <i>d</i>  | 57.3 <i>d</i>  | 62.8 <i>d</i>  | 62.8 <i>d</i>  | 61.9 <i>d</i>  | 61.9 <i>d</i>  | 57.6 <i>d</i>  | 61.9 <i>d</i>  |
| 5                 | 169.8 <i>s</i> | 165.2 <i>s</i> | 169.3 <i>s</i> | 165.5 <i>s</i> | 165.5 <i>s</i> | 164.6 <i>s</i> | 164.6 <i>s</i> | 169.5 <i>s</i> | 164.5 <i>s</i> |
| 6                 | 75.7 <i>d</i>  | 81.2 <i>d</i>  | 75.5 <i>d</i>  | 81.3 <i>d</i>  | 81.3 <i>d</i>  | 83.8 <i>d</i>  | 83.8 <i>d</i>  | 75.7 <i>d</i>  | 83.8 <i>d</i>  |
| 7                 | 29.7 <i>d</i>  | 29.6 <i>d</i>  | 29.7 <i>d</i>  | 29.7 <i>d</i>  | 29.7 <i>d</i>  | 32.4 <i>d</i>  | 32.4 <i>d</i>  | 29.9 <i>d</i>  | 32.4 <i>d</i>  |
| 8                 | 18.3 <i>q</i>  | 18.5 <i>q</i>  | 17.5 <i>q</i>  | 18.6 <i>q</i>  | 18.6 <i>q</i>  | 18.9 <i>q</i>  | 18.9 <i>q</i>  | 17.8 <i>q</i>  | 17.5 <i>q</i>  |
| 9                 | 17.0 <i>q</i>  | 15.1 <i>q</i>  | 18.3 <i>q</i>  | 15.1 <i>d</i>  | 15.2 <i>q</i>  | 17.5 <i>q</i>  | 17.5 <i>q</i>  | 18.5 <i>q</i>  | 18.9 <i>q</i>  |
| 10                | 34.5 <i>t</i>  | 37.1 <i>t</i>  | 34.7 <i>t</i>  | 37.1 <i>t</i>  | 37.1 <i>t</i>  | 38.1 <i>t</i>  | 38.1 <i>t</i>  | 35.0 <i>t</i>  | 38.1 <i>t</i>  |
| 11                | 136.2 <i>s</i> | 134.1 <i>s</i> | 136.6 <i>s</i> | 134.1 <i>s</i> | 134.2 <i>s</i> | 134.8 <i>s</i> | 134.8 <i>s</i> | 136.9 <i>s</i> | 134.8 <i>s</i> |
| 12,16             | 128.4 <i>d</i> | 129.7 <i>d</i> | 128.9 <i>d</i> | 129.8 <i>d</i> | 129.8 <i>d</i> | 129.8 <i>d</i> | 129.8 <i>d</i> | 129.1 <i>d</i> | 129.8 <i>d</i> |
| 13,15             | 128.5 <i>d</i> | 129.1 <i>d</i> | 128.5 <i>d</i> | 129.2 <i>d</i> | 129.2 <i>d</i> | 129.1 <i>d</i> | 129.1 <i>d</i> | 128.8 <i>d</i> | 129.1 <i>d</i> |
| 14                | 126.0 <i>d</i> | 128.0 <i>d</i> | 126.7 <i>d</i> | 128.2 <i>s</i> | 128.2 <i>d</i> | 127.8 <i>d</i> | 127.8 <i>d</i> | 127.0 <i>d</i> | 127.8 <i>d</i> |
| N-CH <sub>3</sub> | 31.7 <i>q</i>  | 32.4 <i>q</i>  | 32.34 <i>q</i> | 32.4 <i>s</i>  | 32.4 <i>q</i>  | 32.9 <i>q</i>  | 32.9 <i>q</i>  | 32.6 <i>q</i>  | 32.9 <i>q</i>  |

<sup>a</sup> As multiplicidades de  $^{13}\text{C}$  foram obtidas através dos dados obtidos de DEPT, HETCOR e HSQC.

A segunda referência apresenta o depsidipeptídeo bassiatina (**L-2**) isolado de *Beauveria bassiana* que possui atividade inibidora da agregação plaquetária (KAGAMIZONO *et al.*, 1995). A estereoquímica relativa de **L-2** foi determinada por análises de cristalografia por raios-X indicando que as estereoquímicas relativas nos carbonos C-3 e C-6 poderiam ser *S/R* ou *R/S* (KAGAMIZONO *et al.*, 1995). A configuração absoluta para **L-2** foi determinada através da síntese de isômeros por combinação do aminoácido D- e L- fenilalanina com o ácido (+)-(*S*)- e (+)-2-hidroxi-

3-metilbutírico como sendo (3*S*,6*R*)-4-metil-6-(1-metil-etil)-3-fenilmetil-1,4-peridro-oxazina-2,5-diona (KAGAMIZONO *et al.*, 1995). Nesse trabalho o autor sintetizou os quatro estereoisômeros (L-2, L-3, L-4 e L-5) e quando comparado os dados físico-químicos e espectroscópicos com a lateritina (L-1) (Figura 3.5, Tabelas 3.6, 3.7 e 3.9) o autor deduziu que os deslocamentos químicos referentes aos estereoisômeros sintéticos são diferentes dos obtidos para L-1, questionando a estrutura proposta para L-1 (KAGAMIZONO *et al.*, 1995).

TABELA 3.8 – Correlações espaciais sugeridas para FM-1 e FM-2 baseados nos espectros de gNOESY.

| $\delta$ irradiado | FM-1  | $\delta$ irradiado | FM-2   |
|--------------------|---|--------------------|--|
|                    | $\delta$ afetado  |                    | $\delta$ afetado   |
| 7.28 (H-12,16)     | 5.60 (H-3); 4.8 (H-6);<br>3.40 (H-10b); 3.04 (N-Metil); 2.93 (H-10a)                    | 7.13 (H-12,16)     | 7.33 (H-13,15; H-14);<br>3.29 (H-10b); 3.19 (H-10a); 3.03 (N-Metil);<br>2.98 (H-6) |
| 3.04 (N-Metil)     | 7.28; 5.67 (H-3);<br>4.8 (H-6); 2.95 (H-10a);<br>1.93 (H-7)                             | 3.03(N-Metil)      | 7.13 (H-12,16); 4.40 (H-3); 3.29 (H-10b);<br>3.19 (H-10a);<br>3.03 (N-Metil);      |
| 5.67 (H-3)         | 7.28; 3.04 (N-Metil);<br>H-10b; H-10a   | 4.40 (H-3)         | 3.03 (N-Metil);  |
| 3.40 (H-10b)       | 7.28; 5.67 (H-3);<br>2.93 (H-10a)   | 3.29 (H-10b)       | 7.13 (H-12,16); 4.40 (H-3); 3.19 (H-10a); 3.03 (N-Metil); 2.98 (H-6)               |
| 2.93 (H-10a)       | 7.28; 3.40 (H-10b)  | 3.19 (H-10a)       | 7.13 (H-12,16); 4.40 (H-3); 3.31 (H-10b);<br>3.03 (N-Metil);                       |
| 4.8 (H-6)          | 3.04 (N-Metil); 1.93 (H-7); 0.80 (H-8);<br>0.33 (H-9)                                   | -                  | -  |
| 0.33 (H-9)         | 7.28; 4.8 (H-6);<br>3.03 (N-Metil);<br>1.93 (H-7); 0.80 (H-8)                           | 0.76 (H-9)         | 2.98 (H-6); 2.31 (H-7);<br>0.85 (H-8)  |
| 0.80 (H-8)         | 7.28; 5.67 (H-3);<br>4.8 (H-6); 3.40 (H-10b);<br>3.04 (N-Metil); 1.93 (H-7); 0.33 (H-9) | 0.84 (H-8)         | 2.98 (H-6); 2.31 (H-7);<br>0.76 (H-9)  |

Entretanto, OH *et al.* (2001) isolaram outro depsidipeptídeo [**L-6**: (3*R*,6*R*)-4-metil-6-(1-metil-etil)-3-fenil-metil-peridro-1,4-oxazine-2,5-diona] do corpo de frutificação de *Isaria japonica*, um agente indutor de apoptose (morte programada da célula regulada por processos genéticos) (McCONKEY, 1998 citado por OH *et al.*, 2001). Os dados de RMN para **L-6** são muito semelhantes aos apresentados para **L-1**, comprovando a estrutura proposta por HASUMI *et al.* (1993) exceto a definição da estereoquímica. A confirmação da estrutura de **L-6**, como também as configurações absolutas para os carbonos C-3 e C-6, foi obtida através da análise da substância **L-7** formada através da hidrólise de **L-6**.

A análise dos dados fornecidos pela literatura mostrou uma certa confusão (Figura 3.5, Tabelas 3.6, 3.7 e 3.9). Por exemplo, as substâncias **L-6** e **L-4** são idênticas, mas os dados obtidos para cada uma delas são muito divergentes, com sinais de rotação óptica para um mesmo enantiômero, necessitando, portanto, de maiores esclarecimentos.

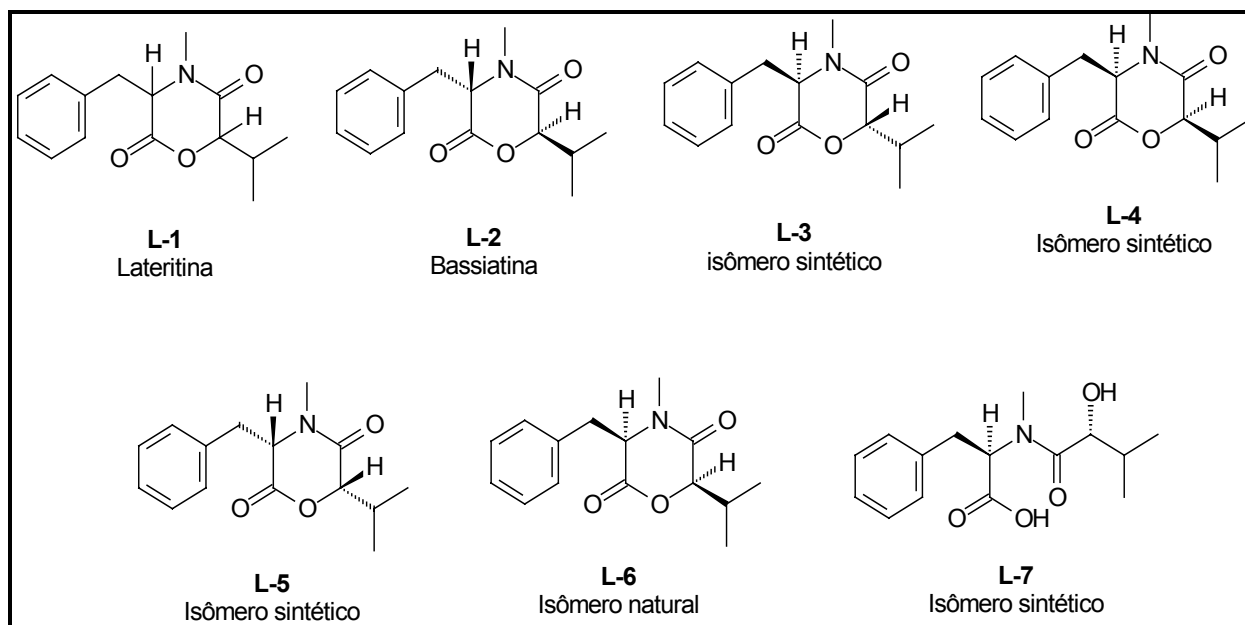


FIGURA 3.5 – Estrutura dos estereoisômeros de FM-1 e FM-2 descritos na literatura.

TABELA 3.9 – Dados físicos obtidos para **FM-1** e **FM-2** e dos depsidipeptídeos encontrados na literatura.

| Substâncias | Aspecto           | Ponto de fusão (°C) | [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> |
|-------------|-------------------|---------------------|---------------------------|
| <b>FM-1</b> | Pó branco amorfo  | 97.2 – 98.9         | + 18.52                   |
| <b>FM-2</b> | Pó branco amorfo  | 139.9 – 142.3       | + 22.70                   |
| <b>L-1</b>  | Óleo marrom claro |                     |                           |
| <b>L-2</b>  | Cristais sem cor  | 143 – 148           | + 181.05                  |
| <b>L-3</b>  | Cristais sem cor  | 143 - 148           | - 167.0                   |
| <b>L-4</b>  | Óleo              |                     | + 23.0                    |
| <b>L-5</b>  | Óleo              |                     | - 24.3                    |
| <b>L-6</b>  | Pó branco amorfo  |                     | - 48.8                    |
| <b>L-7</b>  | Pó branco amorfo  |                     | + 25.0                    |

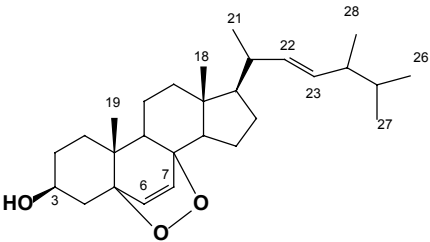
No caso das substâncias **FM-1** e **FM-2**, foram obtidos os valores de [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> positivo para ambas, sugerindo a presença dos dois diastereoisômeros na sua forma pura ou pelo menos com excesso enantiomérico dos mesmos. Através da comparação dos dados físicos, a substância **FM-1** contém os dados espectroscópicos similares aos obtidos para a lateritina (**L-1**) e para o isômero natural (**L-6**), porém com valores de rotação óptica diferentes, sugerindo a configuração **FM-1a** para esse metabólito e, portanto, um novo produto natural. A substância **FM-2** provavelmente é o depsidipeptídeo bassiatina (**L-2**) na forma enantiomérica **FM-2b**.

### 5.1.2. Identificação do Esteróide Peróxido de Ergosterol **FM-3**

A determinação estrutural de **FM-3** foi realizada por comparação do seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (Ap. 1.3.1) com os dados da literatura para o esteróide peróxido de ergosterol, revelando uma íntima similaridade entre eles. Os valores dos deslocamentos químicos de **FM-3** e da literatura encontram-se na Tabela 3.10. Os sinais que caracterizam essa substância são os dubletos em  $\delta$  6.24 e 6.50, respectivos aos hidrogênios olefínicos H-6 e H-7, além dos sinais dos hidrogênios da dupla da

cadeia lateral, H-22 e H-23 em  $\delta$  5.18 (dd, 13.4; 6.1), do hidrogênio carbinólico H-3 em  $\delta$  3.97 (m) e dos sete grupos metílicos 3H-18, 3H-19, 3H-21, 3H-26/3H-27 e 3H-28, respectivamente em  $\delta$  1.22 (s), 0.88 (s), 0.90 (d, 6.5), 0.81 (d, 6.5)/0.82 (d, 6.5) e 0.99 (d, 6.5).

TABELA 3.10 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $J$  em Hz, 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para o esteróide FM-3 e comparação com os dados descritos na literatura (BARROS, 2002).

|  | FM-3                | Peróxido de Ergosterol |
|--|---------------------|------------------------|
|  |                     |                        |
| 3  | 3.97 m              | 3.96 m                 |
| 6  | 6.24 d (8.4)        | 6.24 d (8.5)           |
| 7  | 6.50 d (8.4)        | 6.50 d ((8.5)          |
| 18   | 1.22 s              | 1.23 s                 |
| 19   | 0.88 s              | 0.88 s                 |
| 21   | 0.90 d (6.5)        | 0.90 d (6.6)           |
| 22   | 5.18 dd (13.4; 6.1) | 5.20 dd (15.2; 7.4)    |
| 23   | 5.18 dd (13.4; 6.1) | 5.20 dd (15.2; 8.2)    |
| 26/27  | 0.82 d (6.5)        | 0.84 d (6.7)           |
| 26/27  | 0.81 d (6.5)        | 0.81 d (6.7)           |
| 28   | 0.99 d (6.5)        | 1.0 d (6.6)            |

## 4.2. Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

O estudo químico dos extratos de *Penicillium* sp cultivados nos meios arroz, milho e Czapek com extrato de levedura detectou a presença de uma grande quantidade de ácidos graxos, muito deles altamente oxigenados e insaturados como também glicerídeos e polióis através de seus espectros de RMN <sup>1</sup>H.

Nos extratos obtidos a partir do arroz, foi encontrada uma série de meroterpenos (**PSP-1, PSP-2, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9, PSP-10, PSP-11, PSP-12, PSP-13, PSP-16, PSP-17, PSP-19 e PSP-22**), alcalóides (**PSP-5** e outros em identificação), lignanas (**PSP-20 e PSP-21**), polióis (**PSP-18** e outros não identificados), e outros metabólitos como, por exemplo, o ácido penicílico (**PSP-7**) e um peptídeo ainda não identificado (**PR-1-2-3**).

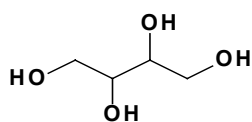
O cultivo de *Penicillium* sp em meio líquido produziu, pequenas quantidades, o esteróide peróxido de ergosterol, o qual não foi detectado nos extratos obtidos do milho e do arroz. Nestes extratos também foram encontrados os meroterpenos **PSP-3 e PSP-8**, o alcalóide **PSP-5**, o nucleosídeo **PSP-14** e o poliól **PSP-15**. Outros alcalóides, nucleosídeos, cerebrosidas e açúcares (que necessitam ser purificados para a atribuição de suas estruturas) também foram detectados, através da análise de seus espectros de RMN <sup>1</sup>H.



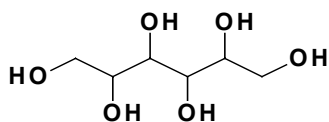
### 4.2.1. Identificação dos Polióis PSP-15 e PSP-18

Durante o cultivo do fungo *Penicillium* sp em arroz foi observado a formação de um exsudato. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  deste extrato revelou a presença majoritária de açúcares e, portanto, uma alíquota foi fracionada em coluna sephadex (procedimentos descritos na seção experimental), obtendo a fração PR-1-3 da qual o poliol denominado **PSP-18** foi isolado. No meio de cultivo líquido também foram encontradas várias frações contendo carboidratos. A fração PLM-4-8-4 apresentou um precipitado branco (**PSP-15**) solúvel em solventes polares.

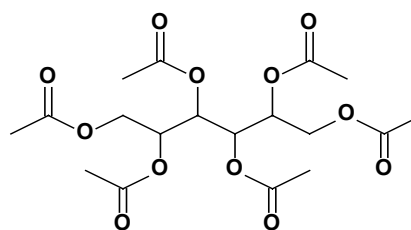
Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  desses polióis (**PSP-15**, Ap.2.1.2 e **PSP-18**, Ap. 2.2.2) mostram os sinais referentes a hidrogênios carbinólicos na região entre  $\delta$  3.0-5.0. A análise desses dados juntamente com àqueles fornecidos pelos espectros de Pendant (**PSP-15**, Ap. 2.1.4 e **PSP-18**, Ap. 2.2.4), nos quais foram encontrados apenas dois átomos de carbonos nos espectros de **PSP-15** e três para **PSP-18**, forneceu subsídios para sugerir que esses metabólitos são polióis simétricos. Os valores de massas (**PSP-15**, Figura Ap. 2.1.1 e **PSP-18**, Ap. 2.2.1) desses compostos permitiram propor a estrutura de **PSP-15** como sendo um poliol com quatro átomos de carbono ( $[\text{M}-\text{H}]^- = 121$ ,  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4$ ) e **PSP-18** ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ 457$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{12}\text{Na}$ , derivado acetilado) contendo seis. A acetilação de **PSP-18** permitiu a atribuição dos valores de deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio [ $\delta$  4.06 (dd,  $J = 12.5; 5.0$ ; H-1a), 4.22 (dd,  $J = 12.5; 2.7$ ; H-1b), 5.07 (m; H-2) e 5.45 (d,  $J = 8.7$ ; H-3)] (Ap. 2.2.3). A análise comparativa desses dados com os descritos na literatura (BREITMAIER, 1987) indicaram que os metabólitos **PSP-15** e **PSP-18** são, respectivamente, os polióis eritritol e manitol.



**AO-15**  
 $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4$   
 122.12



**AO-18**  
 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$   
 182.17



**AO-18 acetilado**

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$   
 434.39

## 4.2.2. Identificação dos Alcalóides

### 4.2.2.1. Verruculogenina (PSP-5)

A substância **PSP-5** apresentou a fórmula molecular  $C_{27}H_{33}N_3O_7$ , baseada nos dados de espectrometria de massas com  $[M-H]^-$  a  $m/z$  510, obtidos por *electrospray* no modo negativo (Ap. 2.3.1). A presença do grupo hidroxila foi deduzida pela observação de uma banda larga de absorção na região do infravermelho (Ap. 2.3.2) em  $3454\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, foram observadas bandas relativas às absorções de carbonilas lactâmicas em  $1663$  e  $1625\text{ cm}^{-1}$ .

A interpretação dos dados obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.11, Ap. 2.3.3) e  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY (Ap. 2.3.4), indicou os sinais correspondentes ao aminoácido triptofano devido aos deslocamentos químicos dos hidrogênios do esqueleto indólico em  $\delta$  7.89 d (H-4), 6.82 dd (H-5) e 6.59 d (H-7), sugerindo um anel aromático tri-substituído. A confirmação do indol-6-metoxi-substituído foi obtida dos estudos de RMN 2D (HSQC, Ap. 2.3.7, e HMBC, Ap. 2.3.8). O sinal referente à metoxila ( $\delta$  55.9) apresentou correlações a longa distância ( $J^3$ ) com o carbono C-6 ( $\delta$  156.4). Adicionalmente, os hidrogênios aromáticos H-4 e H-7 ( $\delta$  7.89 e 6.59, respectivamente) também apresentaram HMBC com o carbono C-6, além dos outros carbonos do anel, corroborando com a presença desse aminoácido. Além disso, esses espectros mostraram os deslocamentos químicos das posições 10 e 11 do esqueleto indólico oxidadas, fato este comprovado pelos deslocamentos químicos dos carbonos em  $\delta$  68.8 (C-10) e 82.7 (C-11), conforme apresentam os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.11, Ap. 2.3.5), DEPT 135 (Ap. 2.3.6) e HSQC (Ap. 2.3.7). O hidrogênio carbinólico em  $\delta$  5.65 (H-10) mostrou correlações com os carbonos em  $\delta$  105.7 (C-3), 131.7 (C-2) do esqueleto indólico, como também com a carbonila em  $\delta$  166.3 (C-19).

O esqueleto do aminoácido prolina foi deduzido pelos acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Ap. 2.3.4) em  $\delta$  4.48 (H-14, dd,  $J = 9.7, 7.0$ ),  $\delta$  2.49 (H-15 $\alpha$ , m),  $\delta$  2.06 (H-15 $\beta$ , m),  $\delta$  2.09 (H-16 $\alpha$ , m),  $\delta$  1.96 (H-16 $\beta$ , m),  $\delta$  3.64 (2H-17, dt,  $J = 7.6, 7.6$ ), estabelecendo assim, as conexões C14-C15-C16-C17. Os experimentos de HMBC apresentaram as correlações do hidrogênio em  $\delta$  4.48 (H-14) com o carbono carbonílico da prolina em  $\delta$  170.9 (C-13) e de H-17 em  $\delta$  3.64 com o carbono

carbonílico do aminoácido triptofano em  $\delta$  166.3 (C-19), estabelecendo, portanto, a formação do anel 2,5-dioxopiperazina conseqüente da união dos aminoácidos triptofano e prolina. Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos, bem como as correlações observadas no espectro de HMBC, são apresentados na Tabela 3.11.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta ainda os sinais de deslocamentos químicos para duas prenilas, ligadas no nitrogênio e no carbono C-2 do anel indólico. A prenila ligada ao N indólico foi confirmada por apresentar um sinal em  $\delta$  6.65 (d,  $J = 8.1$ ), o qual corresponde ao carbono carbinólico em  $\delta$  85.9 (C-25). Esse próton apresentou um acoplamento com o hidrogênio vinílico em  $\delta$  5.04 (dt,  $J = 8.1, 1.3, 1.3$ ) do carbono em  $\delta$  118.6 (C-26) o qual apresenta correlações de longo alcance (HMBC) com as metilas vinílicas em  $\delta$  18.9 e 25.9, correspondentes respectivamente, aos carbonos C-28 e C-29, como também com o carbono carbinólico em  $\delta$  85.9 (C-25). Por outro lado, a prenila ligada ao C-2 do anel indólico é consistente com o sinal em  $\delta$  6.05 (d,  $J = 10.0$ ) correspondente ao H-20, o qual apresenta acoplamento com apenas um dos hidrogênios do C-21 localizado em  $\delta$  1.68 (d,  $J = 10.0$ ), o que é justificado pelo ângulo das ligações. A estereoquímica relativa *alfa* do H-20 foi atribuída pela correlação com os hidrogênios H-21 $\alpha$  ( $\delta$  2.03, s) e H-23 $\alpha$  ( $\delta$  1.72, s) observada no espectro de NOESY (Tabela 3.11, Ap. 2.3.9) e também com a comparação com os dados da literatura (HORAK e VLEGGAR, 1987). Conforme será mostrado adiante, a união das duas prenilas ocorreu por um processo oxidativo, com a formação do anel peróxido de oito membros. A análise destes dados, juntamente com aqueles obtidos na literatura (HORAK e VLEGGAR, 1987), indicam que a substância **PSP-5** é o alcalóide verruculogenina.

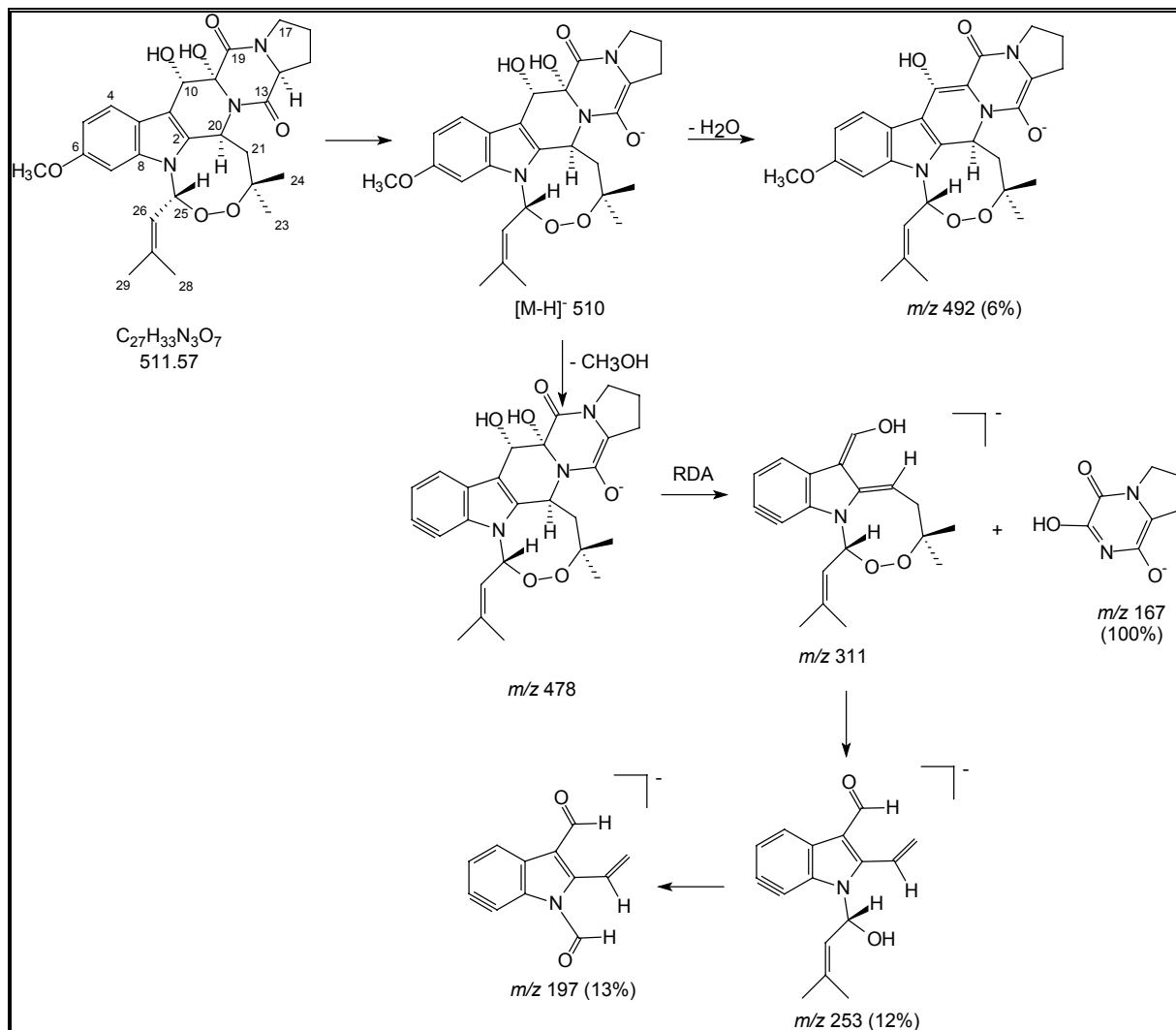
Os íons propostos no esquema de fragmentação (Esquema 3.1), foram obtidos utilizando 25 eV como energia para fragmentação de  $[\text{M}-\text{H}]^- = 511$  na célula de colisão, contribuindo, assim, para a caracterização da verruculogenina (**PSP-5**).

TABELA 3.11 - Dados de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC e NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância PSP-5 e dados de literatura (500 MHz, HORAK e VLEGGAR, 1987).

| Posição           | H                                    | PSP-5                |                        |             | Verruculogenina                                   |         |
|-------------------|--------------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|---|---------|
|                   |                                      | C                    | HMBC                   | NOESY       | H   | C       |
| 2                 | -                                    | 131.7 s <sup>b</sup> | 10, 20, 21, 25         | -           | -   | -       |
| 3                 | -                                    | 105.7 s              | 4, 10                  | -           | -   | -       |
| 4                 | 7.89 d (8.7) <sup>a</sup>            | 121.8 d              | 5                      | -           | -   | -       |
| 5                 | 6.82 dd (8.7; 2.2)                   | 109.5 d              | 7, 20                  | -           | -   | -       |
| 6                 | -                                    | 156.4 s              | 4, 7, OCH <sub>3</sub> | -           | -   | 156.4 s |
| 7                 | 6.59 d (2.2)                         | 94.0 d               | 5                      | -           | -   | -       |
| 8                 | -                                    | 136.5 s              | 4                      | -           | -   | -       |
| 9                 | -                                    | 120.9 s              | 5, 7                   | -           | -   | -       |
| 10                | 5.65 s                               | 68.8 d               | -                      | -           | 5.63 dd (2.6; 1.1)                                | 68.6 d  |
| 11                | -                                    | 82.7 s               | -                      | -           | -   | 82.5 s  |
| 13                | -                                    | 170.9 s              | 12                     | -           | -   | -       |
| 14                | 4.48 dd (9.6; 7.0)                   | 58.9 d               | -                      | 15α         | -   | -       |
| 15                | α: 2.49 m<br>β: 2.06 m               | 29.2 t               | 12, 13                 | 14α,<br>16α | -   | -       |
| 16                | α: 2.09 m<br>β: 1.96 m               | 22.8 t               | -                      | 15α,<br>17α | -   | -       |
| 17                | 3.64 dt (7,6)                        | 45.5 t               | -                      | -           | -   | -       |
| 19                | -                                    | 166.3 s              | 10, 15                 | -           | -   | -       |
| 20                | 6.05 d (10.0)                        | 49.0 d               | 21                     | 21α, 23     | 6.03 dd (10.1; 1.1; 1.1)                          | 48.9 d  |
| 21                | α: 2.03 sl<br>β: 1.68 dd (10.0; 3.3) | 51.3 t               | 20, 23                 | -           | α: 1.99 dd (13.4; 1.1)<br>β: 1.65 dd (13.4; 10.1) | 51.2 t  |
| 22                | -                                    | 82.3 s               | 23                     | -           | -   | 82.1 s  |
| 23                | 1.72 s                               | 24.4 q               | -                      | -           | 1.70s   | 24.2 q  |
| 24                | 1.01 s                               | 27.3 q               | 21, 23                 | 21β         | 0.99s   | 27.1 q  |
| 25                | 6.65 d (8.1)                         | 85.9 d               | -                      | -           | 6.62 d (8.0)                                      | 85.8 d  |
| 26                | 5.04 dt (8.1; 1.3; 1.3)              | 118.6 d              | 25, 28, 29             | -           | 5.03 dq (8.1; 1.3; 1.4)                           | 118.5 d |
| 27                | -                                    | 143.3 s              | 25, 28                 | -           | -   | -       |
| 28                | 2.0 d (1.2)                          | 18.9 q               | 26, 29                 | -           | 1.98 d (1.3)                                      | 18.7 q  |
| 29                | 1.73 d (1.2)                         | 25.9 q               | 26, 28                 | -           | 1.71 d (1.4)                                      | 25.6 q  |
| O-CH <sub>3</sub> | 3.84 s                               | 55.9 q               | -                      | -           | 3.81 s  | -       |

<sup>a</sup> os valores em δ são expressos em ppm, com valores de J em Hz entre parênteses.

<sup>b</sup> as multiplicidades dos sinais foram determinadas por DEPT 135 e HSQC; s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto.



ESQUEMA 3.1 – Principais fragmentações do alcalóide verruculogenina (PSP-5), obtida através de MS/MS com energia de colisão de 25 eV.

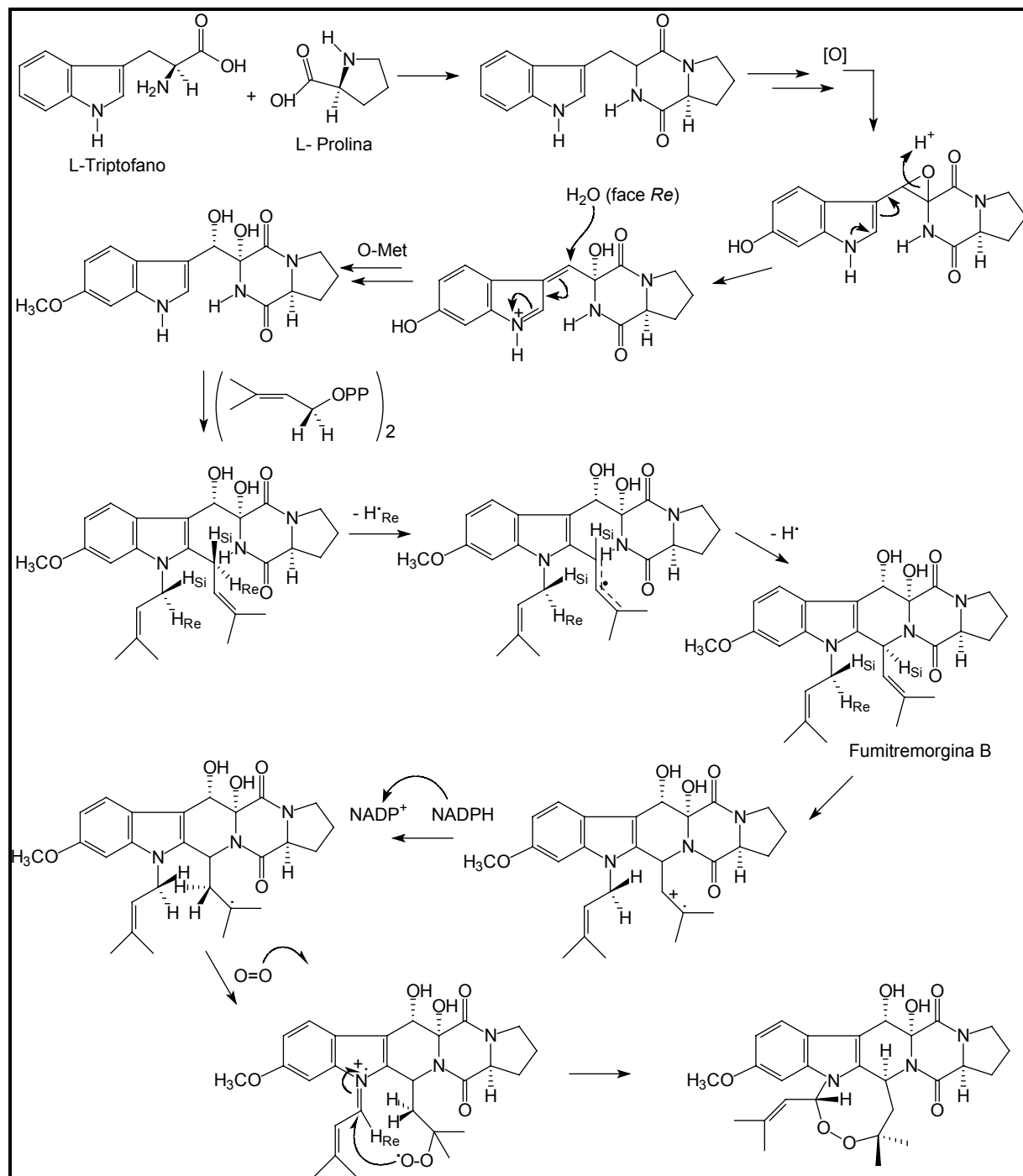
A proposta biossintética para o alcalóide verruculogenina foi estabelecida com base nas referências bibliográficas consultadas (HORAK e VLEGGAR, 1987; VLEGGAR *et al.*, 1993), nas quais foram realizados os estudos de marcação isotópica e de incorporação de substratos na forma de mevalono-lactonas e acetatos para observar o enriquecimento de alguns grupos e, dessa forma, propor o caminho biossintético e a estereoquímica desse metabólito realizada pelos microrganismos. Dessa forma, foi demonstrado que os átomos de oxigênio presentes nos carbonos C-6, C-11, C-22 e C-25 são provenientes de processos oxidativos. A origem do átomo de oxigênio em C-10 (proveniente da água) e em C-11 (proveniente do gás oxigênio) pode ser explicada através do envolvimento do átomo de N-indólico na abertura do

precursor (10*S*, 11*R*)-oxirana. Subseqüentemente, ocorre o ataque da água na face-*Re* em C-10 gerando a quiralidade presente na verruculogenina 10*S*, 11*R*.

Um possível mecanismo para a formação do anel C é a introdução de 3,3-dimetil-alil no átomo de N e no C-2 do núcleo indólico com inversão de configuração. A perda de um dos prótons metilênicos diastereotópicos em C-20 gera um carbocátion alílico o qual permite rotação ao redor da ligação C-20-C-21 e nenhum dos átomos de hidrogênio de C-23 e C-24 são perdidos neste processo. O ataque do N-12 sobre a face Si-20 do carbocátion alílico gera a estereoquímica correta em C-20 em fumitremorgina B, o qual pode ser procedido por um mecanismo iônico ou radicalar. Os resultados obtidos para a verruculogenina estabelecem a estereoquímica na qual o próton da lactona do ácido mevalônico 5*Si* é retido em C-20, onde o próton 5*Re* é retido em C-25 (HORAK e VLEGGAR, 1987; VLEGGAR *et al.*, 1993).

A formação do radical-cátion na dupla ligação 21,22 e conseqüente di-oxigenação do co-metabólito fumitremorgina B é assistida por uma enzima dioxigenase. Uma adição de um íon hidreto (derivado de NADPH) no C-21 gera o radical C-22, o qual reage com a molécula de gás oxigênio formando o hidroperóxido. Esta adição do íon hidreto e da molécula de gás oxigênio ocorre em faces opostas da dupla ligação, isto é, as faces 21*Si*, 22*Re* e 21*Re*, 22*Si*, respectivamente, para formar a correta proquiralidade em C-21 e C-22 na molécula da verruculogenina (VLEGGAR *et al.*, 1993). O mecanismo biossintético pode ser visto no Esquema 3.2.

O alcalóide verruculogenina pertence a uma classe de metabólitos tremorgênicos, que constituem de unidades de triptofano, prolina, mevalonatos e de oxigênio (EICKMAN *et al.*, 1975). Seu papel junto com outras toxinas tremorgênicas é de causar desordens neurológicas em animais vertebrados (HORAK e VLEGGAR, 1987). Essa micotoxina pode ser encontrada nos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, como por exemplo, os fungos *P. verruculosum* (EICKMAN *et al.*, 1975; HORAK e VLEGGAR, 1987), *P. raistrickii* e *P. simplicissimum* (MANTLE e PENNY, 1981), *P. estinogenum* (DAY e MANTLE, 1982), *P. piscarium* (GALLAGHER e LATCH, 1977), *A. caespitosus* (HORAK e VLEGGAR, 1987) e *A. fumigatus* (FISCHER *et al.*, 1999).



ESQUEMA 3.2 – Proposta biossintética para o alcalóide Verruculogenina (PSP-5).

### 4.2.3. Identificação do Ácido Penicílico (PSP-7)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **PSP-7** (Tabela 3.12, Ap. 2.4.3) apresentou os deslocamentos químicos correspondentes a um grupo metileno vinílico em  $\delta$  5.14 e 5.22, um sinal de hidrogênio em  $\delta$  5.59, uma metila sobre dupla ligação em  $\delta$  1.76 e um singlete correspondente a metoxila em  $\delta$  3.91. Esses dados juntamente com os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos obtidos através do espectro de PENDANT [ $\delta$  171.9 (carbonila de ésteres),  $\delta$  89.1,  $\delta$  139.8 e 116.3 (carbonos olefinicos) e  $\delta$  60.2 (carbono da metoxila) (Tabela 3.12, Ap. 2.4.4)], sugeriram um derivado prenilado hidroximetoxilado (Figura 3.6). No espectro na região do infravermelho (Ap. 2.4.2) de **PSP-7** pôde ser observado os sinais em 3426, 1760 e 1640  $\text{cm}^{-1}$  sugerindo a presença dos grupos hidroxila, carbonila de éster e de um grupo vinil, corroborando com os dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Entretanto, os espectros de massas obtidos por *electrospray* nos modos positivo e negativo (Ap. 2.4.1) apresentaram os picos dos íons pseudomoleculares  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $[\text{M}-\text{H}]^-$  respectivamente a  $m/z$  195 e 169, sugerindo a fórmula molecular  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4$ , para essa substância, eliminando a possibilidade do derivado prenilado como a estrutura para **PSP-7** por apresentar 40 unidades de massas adicionais.

A análise comparativa dos dados de **PSP-7** com os fornecidos pela literatura através de levantamento bibliográfico indicou que **PSP-7** é uma micotoxina conhecida como ácido penicílico (ácido 3-metoxi-5-metil-4-oxo-2,5-hexadienóico em equilíbrio tautomérico com sua lactona) (TURNER, 1971) (Figura 3.6). O ácido penicílico foi isolado em 1913 de *Penicillium puberulum* e sua estrutura foi estabelecida por Raistrick e colaboradores ao isolar esse metabólito de *P. cyclopium* (TURNER, 1971). O ácido penicílico é um produto natural com atividade carcinogênica (COLE e COX) que apresenta também atividade antibiótica e anti-HIV (site na Internet), entre outras em verificação.

A biossíntese desta substância tem sido investigada com base nos experimentos de marcação isotópica, principalmente para averiguar a produção da cadeia C-7 ramificada (BIRCH *et al.*, 1958). Dois possíveis caminhos, o ácido mevalônico como intermediário e a introdução de unidades  $\text{C}_1$  sobre átomos de



carbonos de cadeias simples (unidades acetato) foram descartados: a ramificação da metila não correspondeu às tais origens e a rota de uma substância contendo uma unidade “isoprênica” a qual não envolveu o ácido mevalônico.

TABELA 3.12 – Dados espectrais da substância **PSP-7** obtidos por RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e PENDANT (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e do ácido penicílico obtido através da simulação dos espectros de RMN no programa ACD.

| Posição | PSP-7        |                      | Ácido Penicílico |
|---------|--------------|----------------------|------------------|
|         | C<br>δ multi | H<br>δ multi, J (Hz) | C                |
| 2       | 171.9 s      | -                    | 177.0 s          |
| 3       | 89.1 d       | 5.22 s               | 94.0 s           |
| 4       | 179.4 s      | -                    | 183.0 s          |
| 5       | 103.2        | -                    | 102 s            |
| 6       | 139.8 s      | -                    | 139.0 s          |
| 7       | 117.2 t      | 5.14 s<br>5.49 s     | 112.0 t          |
| 6-Me    | 17.7 q       | 1.77 s               | 19.0 q           |
| O-Me    | 60.2 q       | 3.91 s               | 53.0 q           |
| OH      | -            | -                    | -                |

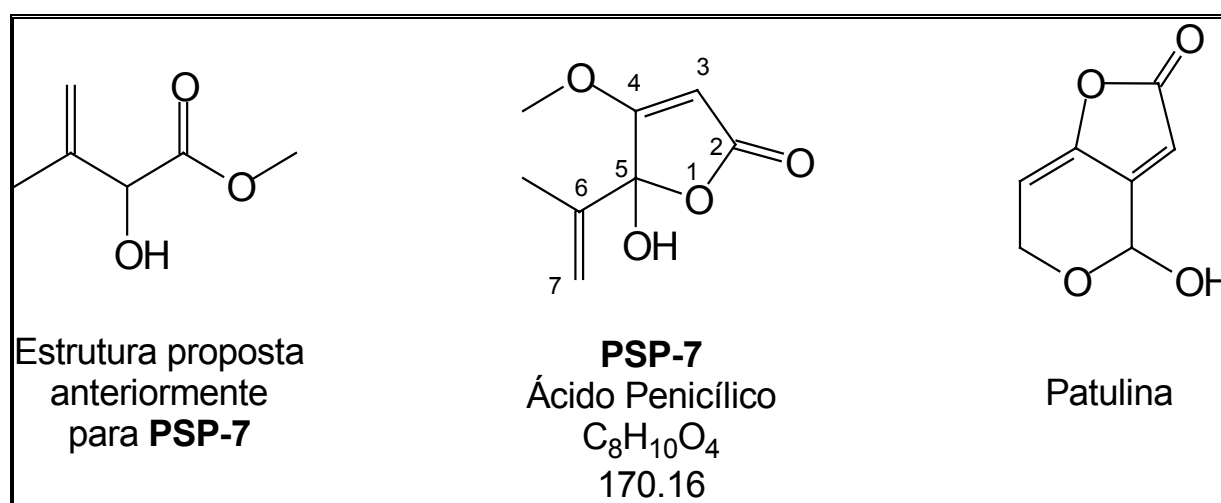
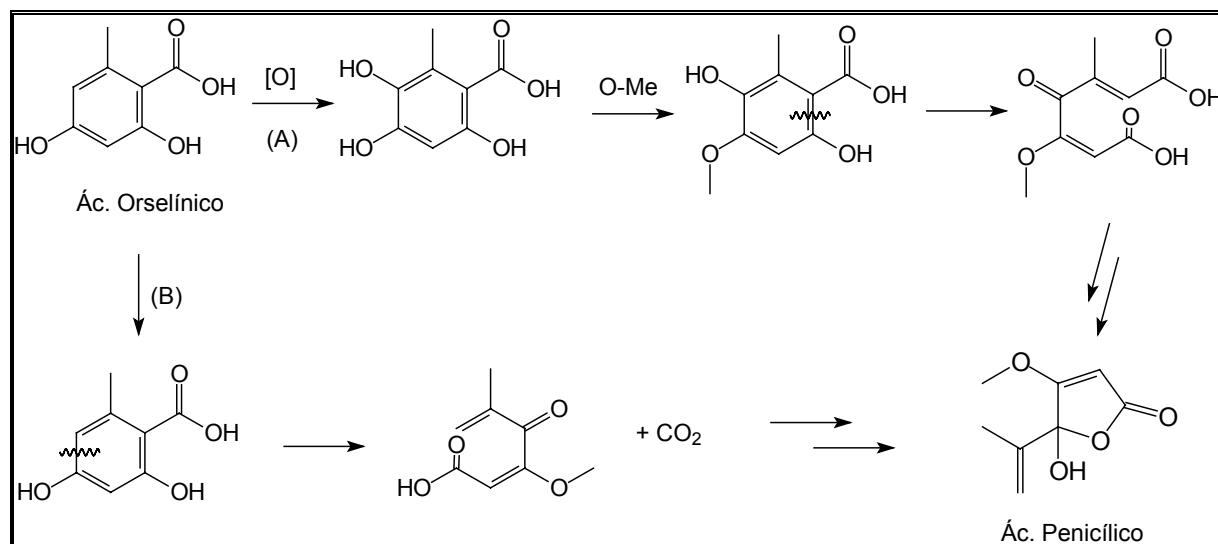


FIGURA 3.6 – Estruturas do Ácido Penicílico (**PSP-7**) e Patulina.

Uma outra possibilidade é que esse metabólito poderia ser formado por oxidação e clivagem do anel (C-1-C-2) de um precursor relacionado ao ácido orselínico, possivelmente o 4-metiléter, derivado do caminho do ácido acético, de maneira análoga à clivagem do ácido gentísico na produção de patulina por *P. patulum* (BIRCH *et al.*, 1958). Essa hipótese foi confirmada por MOSBACH (1960), através da conversão do ácido orselínico para ácido penicílico por *P. baarnense*, mas com a clivagem do anel aromático entre os carbonos C-4-C-5, conforme apresenta o Esquema 3.3.



ESQUEMA 3.3 – Propostas biossintéticas para a formação do ácido penicílico (PSP-7). (A): Clivagem entre os carbonos C-1-C-2 (BIRCH *et al.*, 1958); (B): Clivagem entre os carbonos C-4-C-5 (MOSBACH, 1960).

#### 4.2.4. Identificação da Lignana PSP-20

Os espectros de massas de **PSP-20** obtidos por *electrospray* nos modos positivo e negativo apresentaram os íons pseudomoleculares  $[M+H]^+$  e  $[M-H]^-$  em  $m/z$  439 e 438 (Ap. 2.5.1), respectivamente. O espectro na região do infravermelho (Ap. 2.5.2) indicou a presença de anéis aromáticos, amidas secundárias e cetonas devido às deformações em 3455 e 3288  $\text{cm}^{-1}$  (amida secundárias), 1700  $\text{cm}^{-1}$  (carbonila de dialquilcetona) e 1672  $\text{cm}^{-1}$  (carbonila de amida/lactama). A análise comparativa desses dados juntamente com os obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.13) sugeriram a fórmula molecular  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$  para o metabólito **PSP-20**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.13, Ap. 2.5.3) mostrou os sinais de hidrogênios aromáticos [H-2 em  $\delta$  6.23 (J 1.45) e H-6 em 6.28 (J 1.45)], o grupo metilenodioxi (H-7''a em  $\delta$  5.94 e H-7''b em  $\delta$  5.96) e um grupo metoxila (H-8'' em  $\delta$  3.84). As correlações apresentadas por estes hidrogênios no espectro de HMBC (Ap. 2.5.8) com os carbonos aromáticos C-3 ( $\delta$  143.7), C-4 ( $\delta$  134.2) e C-5 ( $\delta$  149.1), sugeriram a presença do anel aromático metilenodioxi-metoxi-substituído (anel A) (Figura 3.6). Além disso, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou sinais para um grupo metileno em  $\delta$  3.19 e 3.30 (H-7a e H-7b, respectivamente), um hidrogênio olefínico em  $\delta$  6.92 (H-9), o qual mostra um acoplamento com o hidrogênio desblindado em  $\delta$  9.63 observado no espectro de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY (J = 10.0 Hz) (Ap. 2.5.5). O acoplamento a longa distância entre os hidrogênios H-7a e H-7b com H-9 foi deduzido do espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido com TD de 128k. Além disso, esses hidrogênios mostraram correlações  $J^3$  com os carbonos em  $\delta$  108.9 (C-2),  $\delta$  102.9 (C-6) e  $\delta$  122.1 (C-9). Também foram observados outros acoplamentos a longa distância no espectro de HMBC (Ap. 2.5.8) como a correlação da metila em  $\delta$  2.10 com a carbonila em  $\delta$  168.2 (C-2''). Estes dados confirmaram a presença de um derivado C6-C3 metilenodioxi-metoxi substituído contendo um grupo amida terminal como estrutura parcial de **PSP-20**. Estas e outras correlações estão sumarizadas na Figura 3.6.

Os sinais remanescentes no espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriram a presença adicional de um anel aromático di-substituído [ $\delta$  7.18 (H-6'), 7.26, 7.30 e 7.34 (H-3', H-4' e H-5')], dois grupos metilênicos [ $\delta$  3.74 (H-7'a), 3.82 (H-7'b), 3.03 (H-9'a) e

4.53 (H-9'b)], um grupo metila em  $\delta$  1.87 e um sinal sobreposto em  $\delta$  7.16 sugerindo o hidrogênio de outra amida secundária. Esses dados analisados juntamente com os espectros de RMN 2D sugeriram uma segunda unidade C6-C3 como parte de **PSP-20** (anel B) (Figura 3.6). As correlações observadas entre os hidrogênios metilênicos (2H-7' e 2H-9') com um carbono carbonílico em  $\delta$  206.5 no espectro de HMBC (Figura 3.6, Ap. 3.5.8) confirmaram o posicionamento dessa carbonila (C-8'). Uma outra correlação dos hidrogênios metilênicos H-7' pode ser observada com os carbonos do anel B em  $\delta$  132.7 (C-2') e 129.3 (C-6') e, em conjunto com o padrão de acoplamento dos hidrogênios aromáticos di-substituídos observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido em benzeno (Ap. 2.5.4), indicaram que o anel aromático B de **PSP-20** está *orto*-disubstituído. Para corroborar com essa suposição o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-20** foi comparado com as simulações de espectros obtidas dos isômeros *orto* e *meta*-disubstituídos com o uso de programas computacionais (ACD) (Ap. 2.5.10). Conseqüentemente, a ligação entre as duas estruturas parciais deve ocorrer entre as posições C-8 (anel A) e C-2' (anel B).

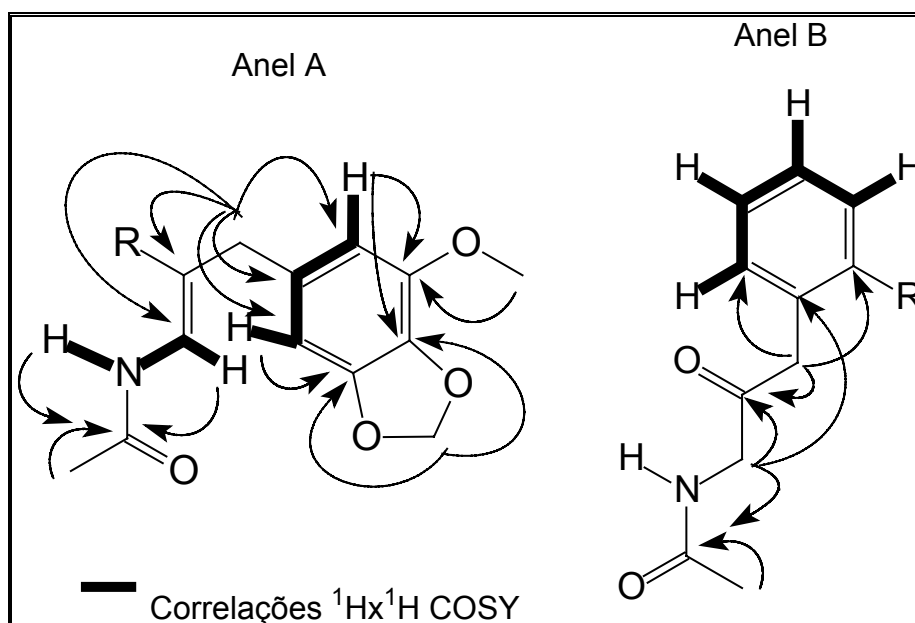


FIGURA 3.6 – Estruturas parciais de **PSP-20** estabelecidas com base nas correlações  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY e HMBC.

Finalmente a elucidação final da estrutura e a estereoquímica da dupla ligação foi obtida através dos estudos de gNOESY (Figura 3.7, Ap. 2.5.9). A irradiação do hidrogênio H-9 em  $\delta$  6.92 produziu um acentuamento dos sinais em  $\delta$  9.63 (N-H 1''), 6.28 (H-6), 6.23 (H-2), 3.30 (H-7b), 3.19 (H-7a), 2.10 (H-3'') e 1.87 (H-6''). Entretanto, o hidrogênio do grupo amida em  $\delta$  9.63 (N-H 1'') mostrou acentuamento dos sinais referentes ao hidrogênio olefínico H-9 em  $\delta$  6.92, e dos hidrogênios metilênicos H-7'a ( $\delta$  3.74), H-7'b ( $\delta$  3.82), H-9'a ( $\delta$  3.03) e H-9'b ( $\delta$  4.53). Além disso, a irradiação desses hidrogênios metilênicos produziu um acentuamento de um sinal em  $\delta$  7.18 (H-6'). A análise em conjunto dessas irradiações conduziu a suposição de que a conformação mais estável para **PSP-20** apresenta o hidrogênio H-9 do mesmo lado do anel A, enquanto que o hidrogênio de N-H encontra-se mais próximo da cadeia lateral do anel B, sugerindo, portanto, a isomeria *Z* para a dupla ligação de **PSP-20**. Essas e outras irradiações são apresentadas na Figura 3.7). Aparentemente esse metabólito é um novo produto natural e, por apresentar duas unidades C6-C3 (derivado fenilpropanóide) foi incluído dentro da classe das lignanas.

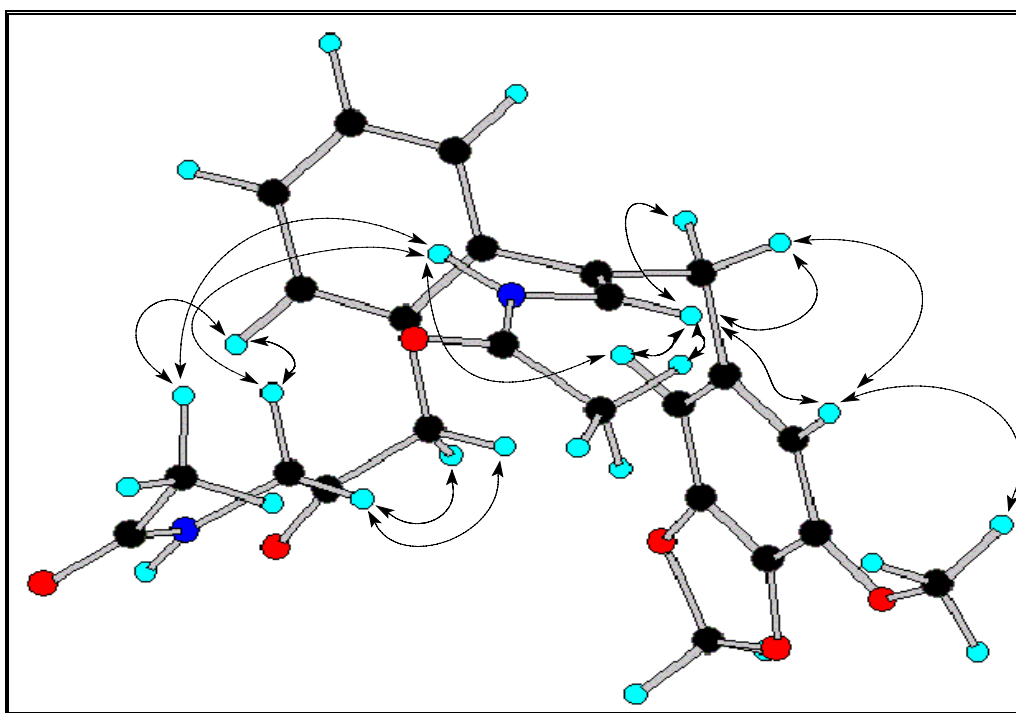
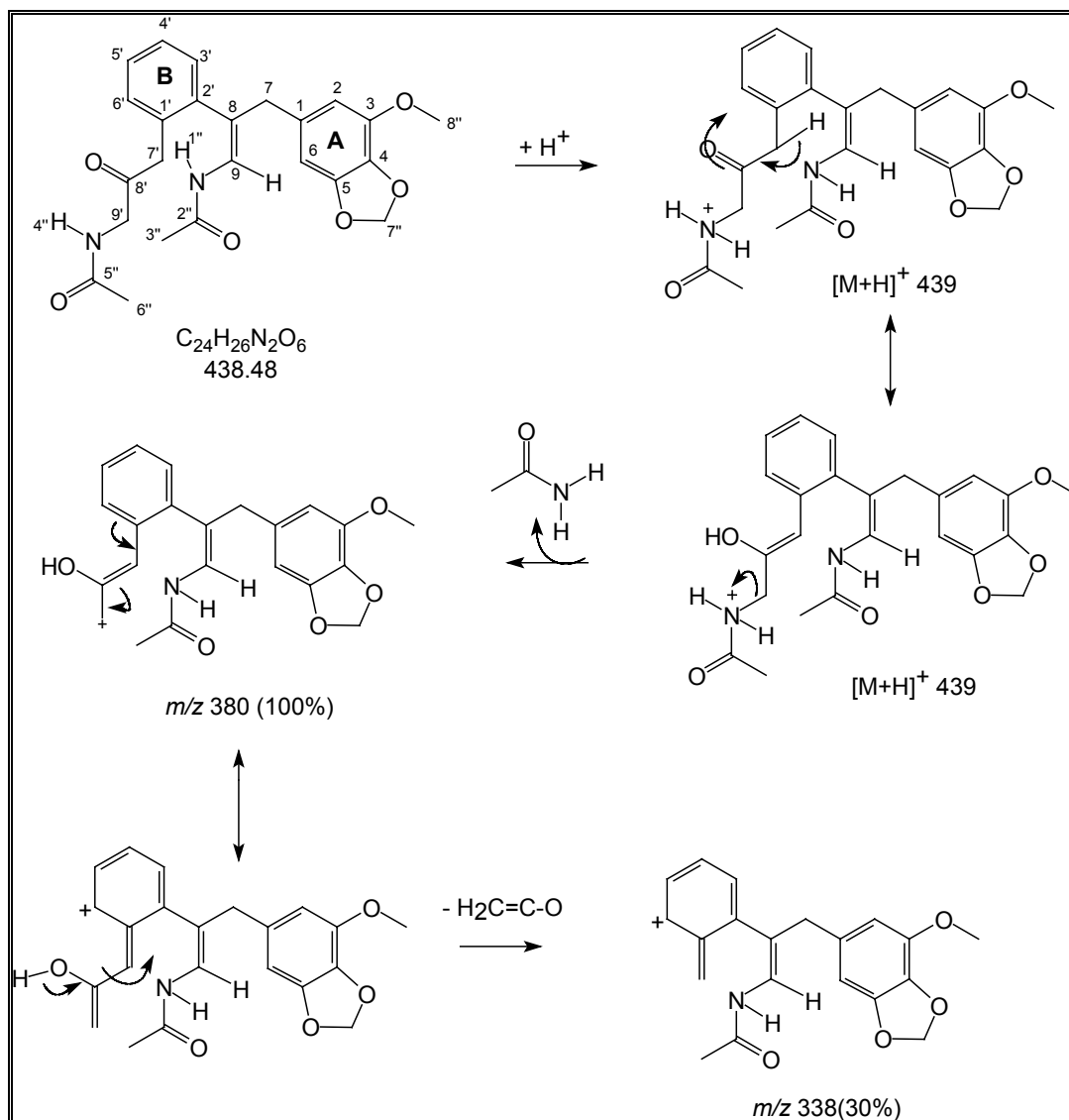


FIGURA 3.7 – Correlações espaciais para **PSP-20** baseada nos espectros de gNOESY.

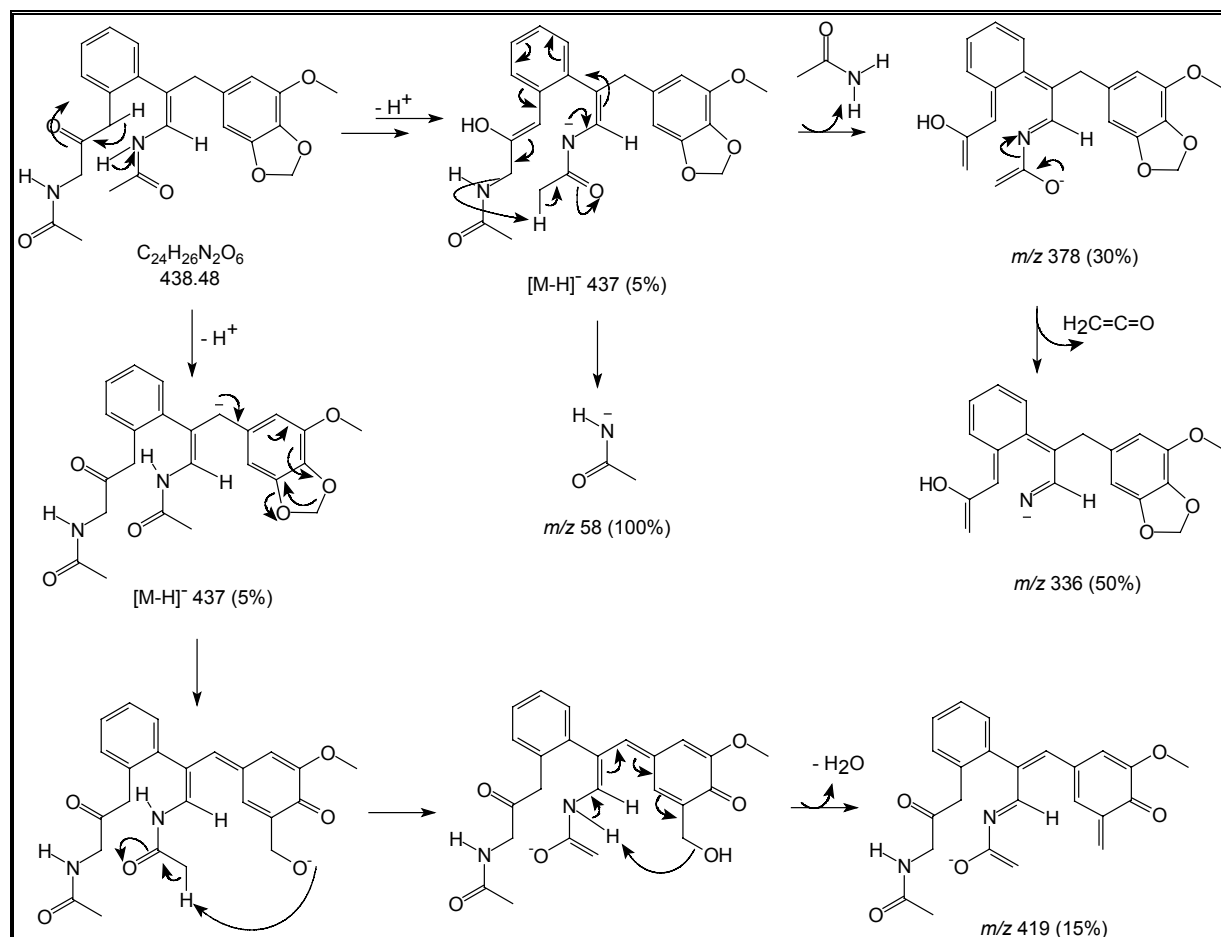
Alguns esquemas de fragmentação foram propostos para **PSP-20** em ambos os modos positivo e negativo de ionização e são apresentados nos Esquemas 3.3 e 3.4. Em ambos os espectros houve a perda dos grupos acetamida e ceteno.



ESQUEMA 3.3 – Principais fragmentações da lignana **PSP-20**, obtido via ESIMS/MS, no modo positivo com energia de colisão de 10 eV.

A biogênese do metabólito **PSP-20** provavelmente deve ocorrer através do caminho geral de biossíntese para os fenilpropanóides, os quais contém boa parte das enzimas caracterizadas. Os passos posteriores à formação dos esqueletos precursores (ácido cinâmico e ácido sinápico) podem ser consequência de uma

redução aminativa com formação de imina seguida de reações de redução e oxidação para finalmente ocorrer o processo de acoplamento entre essas duas unidades. A proposta biossintética mecanística é sugerida no Esquema 3.5.



ESQUEMA 3.4 – Principais fragmentações da lignana **PSP-20**, obtido via ESIMS/MS, no modo negativo com energia de colisão de 20 eV.

Os trabalhos de BACHER *et al.* (1999) e NUGROHO *et al.* (1999) com os metabólitos de esqueleto ciclopentabenzofurano encontrado nas plantas do gênero *Aglaia* (Meliaceae) - as rocaglamidas e tapsakinas (Figura 3.8) - deduzem uma possível rota biossintética para essas substâncias. Esse mecanismo que envolve uma mistura de um derivado flavonóide com o ácido cinâmico e a ligação ocorre entre o carbono C-2 do flavonóide com o C-3 do ácido cinâmico não é bem estabelecido, uma vez que ainda não foi realizado o estudo de marcação isotópica que comprove essa

rota. Entretanto, algumas semelhanças entre essas substâncias com o metabólito **PSP-20** (anel metilenodioxi e derivados do ácido cinâmico) sugerem que **PSP-20** pode ter uma biogênese similar às flavaglinas.

TABELA 3.13 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ , J em Hz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , m) para as lignanas **PSP-20** em Clorofórmio-*d* (400 MHz).

| Posição | PSP-20<br>C          | H   |
|---------|----------------------|---|
| 1       | 131.3 s <sup>a</sup> | -   |
| 2       | 108.9 d              | 6.23 d (1.45)                                 |
| 3       | 143.7 s              | -   |
| 4       | 134.2 s              | -   |
| 5       | 149.1 s              | -   |
| 6       | 102.9 d              | 6.28 d (1.45)                                 |
| 7       | 40.1 t               | a: 3.19 d (14.5)<br>b: 3.30 d (14.5)          |
| 8       | 129.3 s              | -   |
| 9       | 122.1 d              | 6.92 d (10.5)                                 |
| 1'      | 122.4 s              | -   |
| 2'      | 132.7 s              | -   |
| 3'      | 127.3 <sup>b</sup> d | 7.26 m <sup>b</sup> (6.96 d 7.2) <sup>c</sup> |
| 4'      | 128.7 <sup>b</sup> d | 7.30 m <sup>b</sup> (7.02 t)                  |
| 5'      | 128.7 <sup>b</sup> d | 7.34 m <sup>b</sup> (7.09 t)                  |
| 6'      | 129.3 d              | 7.18 (6.96 d, 7.2) <sup>c</sup>               |
| 7'      | 47.7 t               | a: 3.74 d (16.0)<br>b: 3.82 d (16.0)          |
| 8'      | 206.5 s              | -   |
| 9'      | 56.5 t               | a: 3.03 d (17.0)<br>b: 4.53 d (17.0)          |
| 1''     | -                    | 9.63 d (10.5)                                 |
| 2''     | 168.2 s              | -   |
| 3''     | 23.1 q               | 2.10 s  |
| 4''     | -                    | 7.16 t (1.26) (7.16 s) <sup>c</sup>           |
| 5''     | 170.7 s              | -   |
| 6''     | 19.9 q               | 1.87 s  |
| 7''     | 101.4 t              | a: 5.94 d (1.42)<br>b: 5.96 d (1.42)          |
| 8''     | 56.6 q               | 3.84 s  |

<sup>a</sup> : As multiplicidades para  $^{13}\text{C}$  foram obtidas através da análise dos espectros de Pendant e HSQC.

<sup>b</sup> : Estes valores podem estar trocados.

<sup>c</sup> : Os deslocamentos químicos entre parênteses e as multiplicidades destes hidrogênios foram obtidos usando benzeno deuterado como solvente.



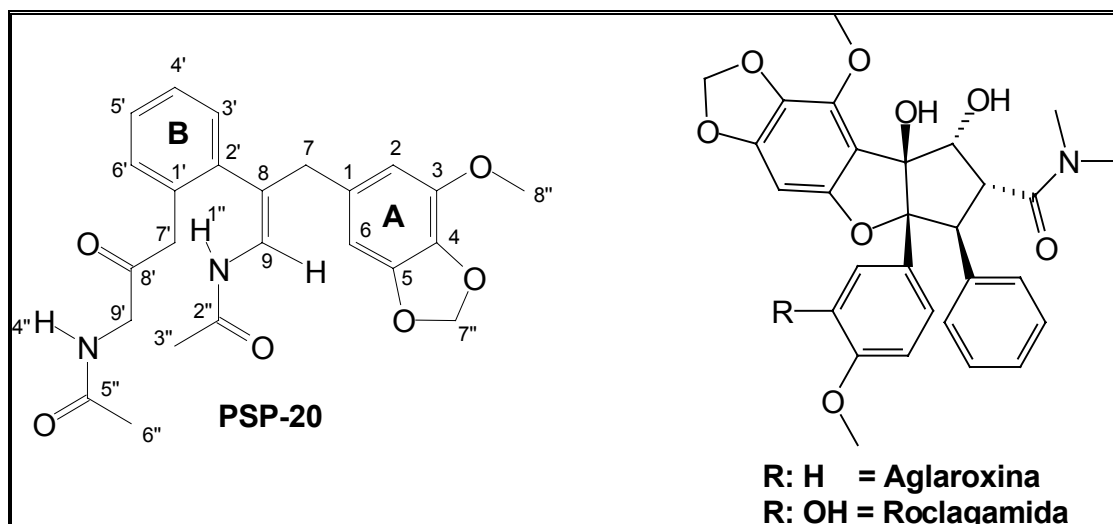
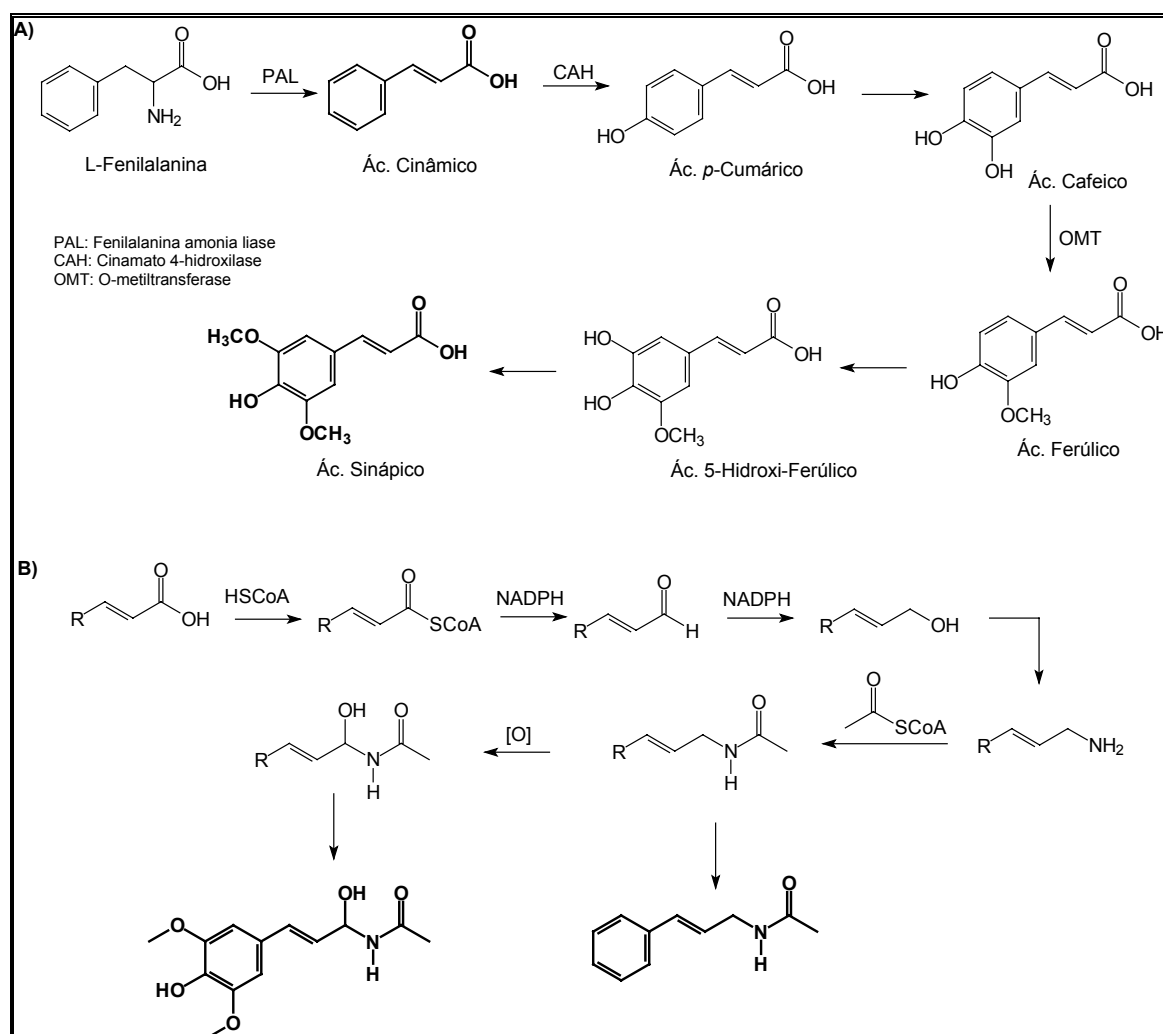
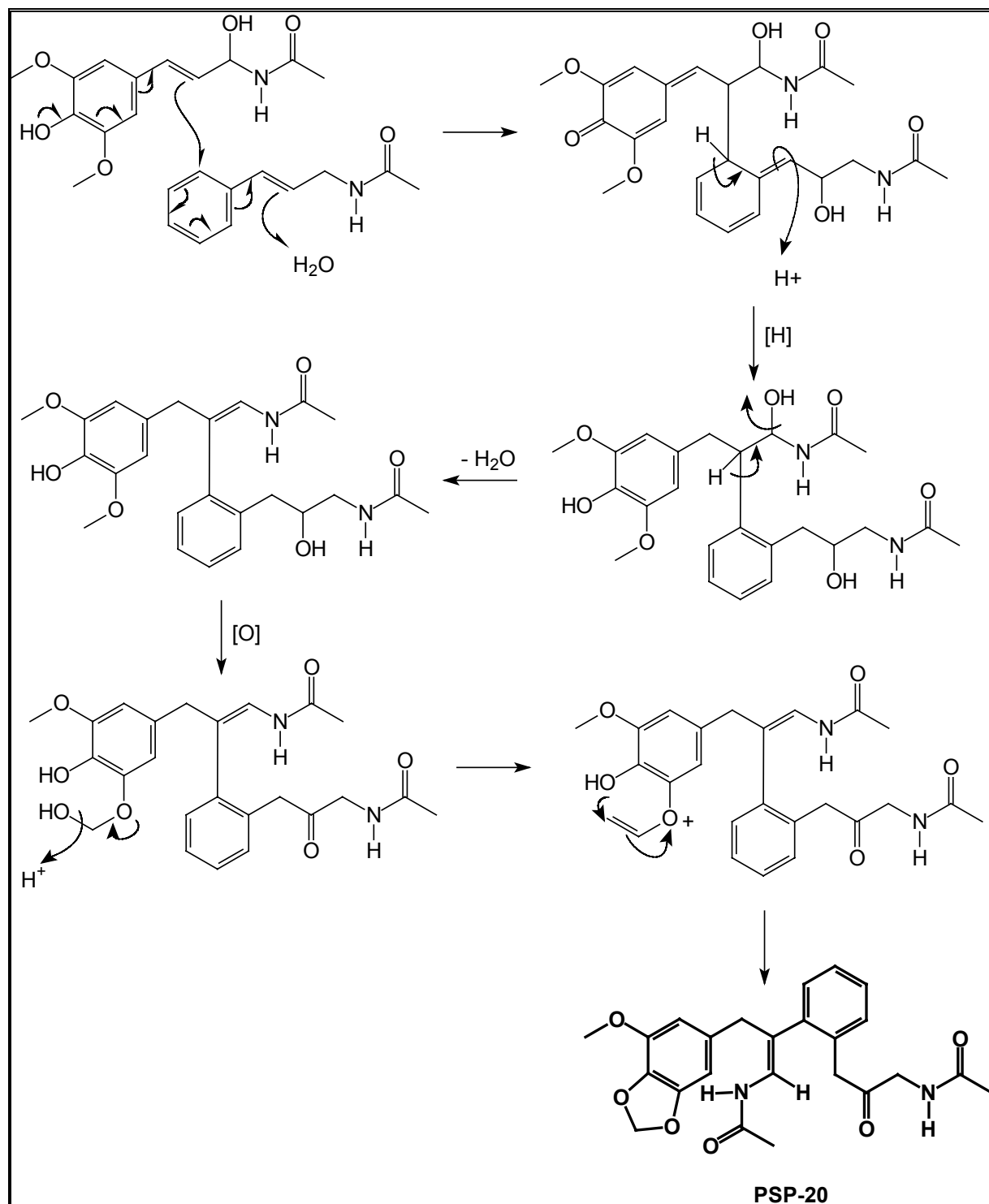


FIGURA 3.8 – Estruturas químicas de **PSP-20**, aglaroxina e rocaglamida.



ESQUEMA 3.5 - Proposta biossintética para a formação da substância **PSP-20**. A) Formação dos esqueletos precusores (ácido cinâmico e ácido sinápico); B) Redução aminativa dos precusores.



ESQUEMA 3.5 - Proposta biossintética para a formação da substância **PSP-20**. Acoplamento oxidativo dos esqueletos para dar origem a **PSP-20**.

#### 4.2.5 Identificação do Nucleosídeo PSP-14

O espectro de massas obtido por *electrospray*, no modo negativo da substância **PSP-14** apresentou o íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  243, sugerindo, portanto, a fórmula molecular  $C_9H_{12}N_2O_6$  (Ap. 2.6.1). O espectro na região do infravermelho (Ap. 2.6.2) mostrou deformações em  $3412\text{ cm}^{-1}$  (sobreposição dos sinais referentes a hidroxilas e amidas) e em  $1682\text{ cm}^{-1}$  (grupo carbonila de amida/lactama).

Os sinais detectados no espectro de RMN  $^1H$  (Tabela 3.14, Ap. 2.6.3) em  $\delta$  5.63 (dd,  $J = 8.0; 2.0$ ) e 7.87 (d,  $J = 8.0$ ) foram atribuídos para os hidrogênios olefínicos H-5 e H-6, respectivamente. O acoplamento do hidrogênio em  $\delta$  11.30 ( $J = 2.0$ ) com um desses hidrogênios ( $\delta$  5.63) foi deduzido através da análise do espectro de  $^1Hx^1H$  COSY (Ap. 2.6.4) e é resultante de um acoplamento em  $W$  entre esses dois hidrogênios. Esses dados juntamente com os sinais dos carbonos em  $\delta$  163.2 (C-4), 150.8 (C-2), 101.8 (C-5) e 140.8 (C-6) (Tabela 3.14, Ap. 2.7.5) indicaram a presença de uma base nitrogenada pirimidínica e, através da comparação com dados de literatura<sup>3</sup> (BREITMAIER *et al.*, 1979; FOLDESI *et al.*, 2001), foi sugerida a base uracila como parte da estrutura de **PSP-14**. O espectro de Pendant (Tabela 3.14, Ap. 2.6.5) mostrou cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos ( $\delta$  69.9, 73.6, 84.9 e 87.7) e um metileno em  $\delta$  60.9, indicando uma ribose. Os acoplamentos observados no espectro de  $^1Hx^1H$  COSY (Ap. 2.6.4) para os hidrogênios carbinólicos foram decisivos para o posicionamento dos mesmos, conforme apresenta a Tabela 3.14.

Portanto, **PSP-14** é um nucleosídeo constituído da base nitrogenada pirimidínica uracila ligada ao açúcar ribose através de uma ligação glicosídica  $\beta$ , para formar o nucleosídeo uridina. Quando um grupo fosfato é adicionado ao açúcar, os nucleosídeos passam a serem denominados de nucleotídeos, os quais constituem os ácidos nucléicos (RNA), que são macromoléculas de extrema importância biológica em todos os organismos vivos, responsáveis pela transmissão da informação genética na célula.

---

<sup>3</sup> Os dados obtidos por FOLDESI *et al.* (2001) foram adquiridos com água deuterada e os nossos em dimetilsulfóxido. Embora alguns valores de deslocamentos químicos sejam diferentes devido a diferença do solvente, foi possível uma comparação entre eles e então sugerir a estrutura de **PSP-14**.

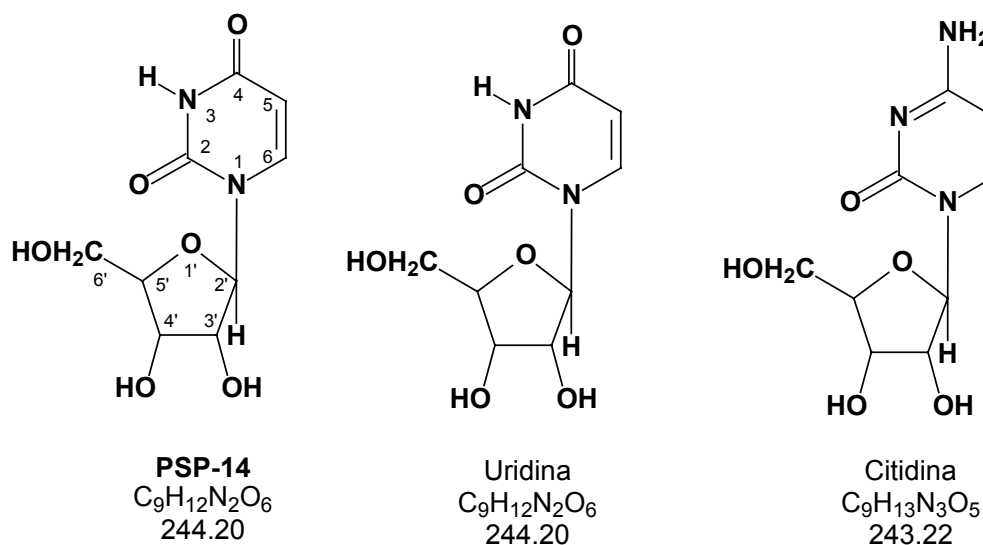


TABELA 3.14 - Dados dos espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  (obtido por Pendant) do nucleosídeo **PSP-14** e dados da literatura da citosina e uridina (BREITMAIER *et al.*, 1979; FOLDESI *et al.*, 2001), (50 MHz, dimetilsulfóxido).

| Posição         | PSP-14 <sup>1</sup> |                        | Uridina |        | Citosina <sup>2</sup> |              |
|-----------------|---------------------|------------------------|---------|--------|-----------------------|--------------|
|                 | C                   | H                      | C       | H      | C                     | H            |
| 1               | -                   | -                      | -       | -      | -                     | -            |
| 2               | 150.8 s             | -                      | 151.4   | -      | 157.8                 | -            |
| 3               | -                   | -                      | -       | -      | -                     | -            |
| 4               | 163.2 s             | -                      | 164.2   | -      | 166.4                 | -            |
| 5               | 101.8 d             | 5.63 dd (8.0; 2.0)     | 100.3   | -      | 96.4                  | 5.97 d (7.6) |
| 6               | 140.8 d             | 7.87 d (8.0)           | 142.1   | -      | 141.9                 | 7.76 d (7.6) |
| 1'              | -                   | -                      | -       | -      | -                     | -            |
| 2'              | 87.7 d              | 5.77 d (5.0)           | 90.5    | 5.81 s | 90.5                  | 5.81 s       |
| 3'              | 73.6 d              | 4.0 m                  | 75.6    | -      | 75.6                  | -            |
| 4'              | 69.9 d              | 5.37 d (5.0)           | 70.8    | -      | 70.8                  | -            |
| 5'              | 84.9 d              | 5.09 t (5.0)           | 83.6    | -      | 83.6                  | -            |
| 6'              | 60.9 t              | a: 3.95 m<br>b: 3.58 m | 62.9    | -      | 62.9                  | -            |
| N-H             | -                   | 11.30 d (2.0)          | -       | -      | -                     | -            |
| NH <sub>2</sub> | -                   | -                      | -       | -      | -                     | -            |

<sup>1</sup>: espectros obtidos em D<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup>: espectros obtidos em DMSO.

## 4.2.6. Identificação dos Meroterpenos

### 4.2.6.1. Identificação dos Meroterpenos PSP-1 e PSP-2

O espectro de massas, obtido via ionização no modo positivo por APCI da substância **PSP-1** (Ap. 2.7.1), mostrou um íon abundante  $[M + H]^+$  em  $m/z$  445, do qual a fórmula molecular  $C_{26}H_{36}O_6$  foi deduzida e confirmada pela espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) (calc. 444.2512; experimental 444.2508). O espectro na região do infravermelho (Ap. 2.7.2) apresentou as deformações axiais dos grupos hidroxila e carbonilas, respectivamente a 3391 (grupo hidroxila), 1746 (grupo carboximetil éster), 1728 (grupo ceto), 1701 (grupo ceto) e  $1692\text{ cm}^{-1}$  (grupo  $\delta$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturada). Foi observado também um sinal em  $1637\text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação axial de carbonos do grupo vinil.

A análise dos dados de RMN (Tabela 3.15) e sua comparação com compostos modelos indicou a presença de uma estrutura parcial 4,4,8,10-tetrametildecalina na substância **PSP-1**, similar as estruturas observadas em muitos terpenóides (AMMANN *et al.*, 1982). Os sinais observados em  $\delta$  2.38 (H-2 $\alpha$ , m e H-2 $\beta$ , m) no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Ap. 2.7.3) e RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY (Ap. 2.7.4) e as correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância entre dois grupos metila [ $\delta$  1.00 (3H-14) e 1.05 (3H-15)] com o carbono carbonílico ( $\delta$  217.0) no espectro HMBC (Figura 3.9, Ap. 2.7.8) estabeleceu a posição do grupo ceto em C-3. Ainda no espectro de hidrogênio são observados os sinais de seis metilas quaternárias com deslocamentos químicos a  $\delta$  0.85, 1.00, 1.05, 1.26, 1.38 e 1.48, atribuídos, respectivamente, para os hidrogênios, H-13, H-14, H-15, H-12, H-10' e H-9'. São observados também os sinais de um singlete em  $\delta$  3.73, atribuído a um grupo metoxi e um singlete largo dos prótons olefínicos da dupla exocíclica a  $\delta$  4.89 e 5.40. Essa dupla está posicionada no anel C, confirmada através das correlações a três ligações de H-1' ( $\delta$  4.89 e 5.40) com os carbonos C-3' e C-7' ( $\delta$  51.0 e 72.5, respectivamente). Essas e outras correlações encontram-se sumarizadas na Figura 3.9.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Ap. 2.7.5), PENDANT (Ap. 2.7.6) e HSQC (Ap. 2.7.7) mostraram sinais para dois grupos cetocarbônicos adicionais ( $\delta$  207.8 e 203.9), um carboximetil éster ( $\delta$  168.5), uma dupla ligação carbono-carbono exocíclica

( $\delta$  112.7 e 145.0), dois grupos metila ( $\delta$  22.1 e 15.1) e um carbono carbinólico quaternário ( $\delta$  80.1). A conexão de todas essas funções foi baseada no espectro de HMBC (Figura 3.9, Ap. 2.7.8). Os hidrogênios da metila em  $\delta$  1.38 mostraram correlação com o carbono carbinólico quaternário em  $\delta$  80.1 (o qual apresentou correlações com o hidrogênio do grupo hidroxila em  $\delta$  3.30) e com os dois carbonos carbonílicos em  $\delta$  207.8 e 203.9 estabelecendo, assim, a estrutura parcial 2-hidroxi-2-metil-1,3-dioxo. A correlação de 3H em  $\delta$  1.48 (3H-9) com o carbono carbonílico em  $\delta$  207.8 (C-4') e a presença de um átomo de carbono não oxigenado altamente desblindado em  $\delta$  72.5 (C-7'), na correlação com hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5.40 (H-1'b) no espectro de HMBC, sugeriu um sistema biciclo-[3:3:1] como a estrutura parcial de **PSP-1**.

O espectro de massas obtido por APCI no modo positivo com energia de colisão de 25 eV sobre o íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  apresentou uma série de fragmentos iônicos, os quais são propostos no Esquema 3.7.

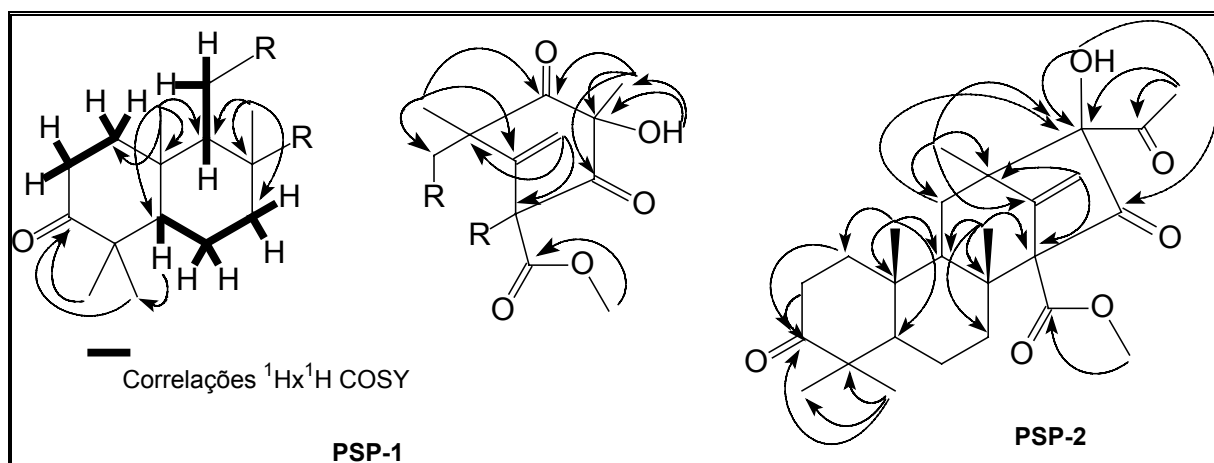
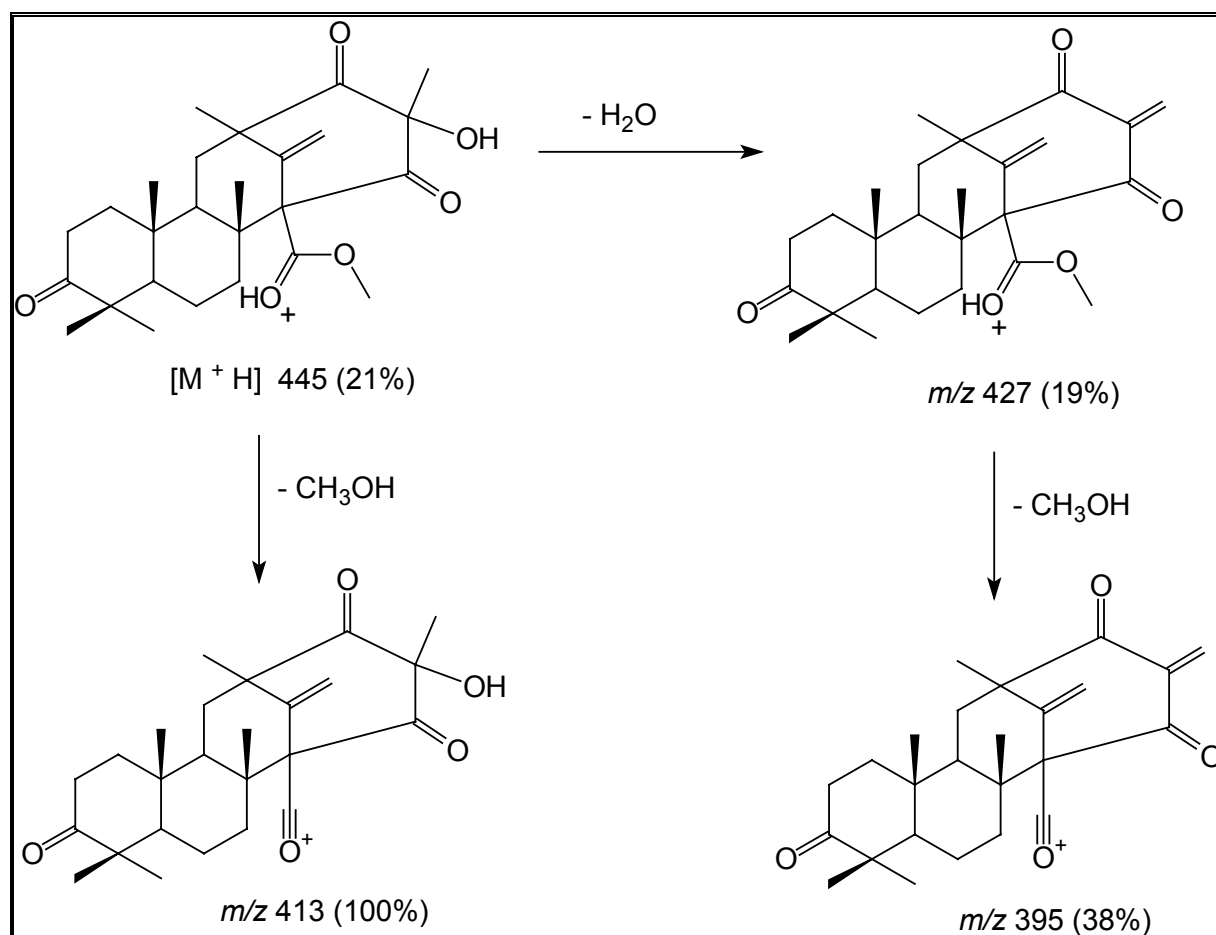


FIGURA 3.9 – Estruturas parciais de **PSP-1** e correlações de HMBC detectadas para **PSP-1** e **PSP-2**.

Finalmente, a identificação do grupo metil-éster e as configurações relativas nos estereocentros foram obtidas através da análise dos dados de 1D-NOE. A irradiação do sinal em  $\delta$  3.73 (OCH<sub>3</sub>) no espectro de RMN  $^1\text{H}$  produziu um

acentuamento dos sinais em  $\delta$  4.89 (H-1'a), 3.30 (OH) e 1.26 (3H-12), enquanto que a irradiação do sinal em  $\delta$  1.38 (3H-10') mostrou acentuamento do duplo-dublete em  $\delta$  0.61 (H-9). Estes dados sugerem que o grupo metil 3H-10' esteja localizado na face *endo* no sistema biciclo-[3:3:1] enquanto que o grupo hidroxila está localizada na face *exo*. Outros dados importantes de NOE são representados na Figura 3.10 e Apêndice 2.7.9. Portanto, a estrutura deste meroterpeno identificado como **PSP-1** foi denominada preaustinóide A e é um produto natural inédito na literatura.



ESQUEMA 3.7 – Principais fragmentações do meroterpenóide **PSP-1**, obtido via APCI-MS/MS, modo positivo com energia de colisão de 25 eV.

TABELA 3.15 – Dados de RMN <sup>1</sup>H (δ, J em Hz) e <sup>13</sup>C (δ, m) para os meroterpenos PSP-1 e PSP-2 em clorofórmio-d (400 MHz).

| Posição          | PSP-1               |   | PSP-2                |   |
|------------------|---------------------|---|----------------------|---|
|                  | C                   | H   | C                    | H   |
| 1                | 39.0 t <sup>a</sup> | α: 1.11 m<br>β: 1.78 ddd (13.0; 6.4;<br>6.4)      | 37.8 t               | α: 1.65 m<br>β: 1.75 m                            |
| 2                | 33.5 t              | α: 2.38 m<br>β: 2.38 m                            | 33.5 t               | α: 2.44 m<br>β: 2.44 m                            |
| 3                | 217.0 s             |   | 217.0 s              |   |
| 4                | 47.0 s              |   | 47.0 s               |   |
| 5                | 53.8 d              | α: 1.23 dd (8; 4)                                 | 53.8 d               | α: 1.46 m   |
| 6                | 19.6 t              | α: 1.52 m<br>β: 1.52 m                            | 20.0 t               | α: 1.58 m<br>β: 1.58 m                            |
| 7                | 32.2 t              | α: 2.02 m<br>β: 2.26 dt (13.5; 3.3; 3.3)          | 31.9 t               | α: 1.65 m<br>β: 2.05 dt (13.2; 3.3; 3.3)          |
| 8                | 47.7 s              |   | 48.4 s               |   |
| 9                | 51.9 d              | α: 0.61 dd (13.0; 3.0)                            | 50.9 d               | α: 1.59 dd (13.0; 3.0)                            |
| 10               | 37.2 s              |   | 37.2 s               |   |
| 11               | 39.2 t              | α: 1.93 dd (13.0; 3.0)<br>β: 1.65 dd (13.0; 13.0) | 35.9 t               | α: 2.01 dd (12.6; 3.3)<br>β: 1.40 dd (12.6; 12.6) |
| 12               | 16.8 q              | 1.26 s  | 16.9 q               | 1.27 s  |
| 13               | 16.0 q              | 0.85 s  | 16.7 q               | 0.86 s  |
| 14               | 20.9 q              | 1.0 s   | 20.6 q               | 1.01 s  |
| 15               | 26.9 q              | 1.05 s  | 26.9 q               | 1.05 s  |
| 1'               | 112.7 t             | a: 4.89 sl<br>b: 5.40 s                           | 107.7 t              | a: 5.02 sl<br>b: 5.24 sl                          |
| 2'               | 145.0 s             |   | 151.0 s              |   |
| 3'               | 51.0 s              |   | 49.6 s               |   |
| 4'               | 207.8 s             |   | 92.0                 |   |
| 5'               | 80.1 s              |   | 207.0 s <sup>b</sup> |   |
| 6'               | 203.9 s             |   | 203.0 s <sup>b</sup> |   |
| 7'               | 72.5 s              |   | 74.6 s               |   |
| 8'               | 168.5 s             |   | 169.0 s              |   |
| 9'               | 22.1 q              | 1.48 s  | 17.1 q               | 1.04 s  |
| 10'              | 15.1 q              | 1.38 s  | 28.2 q               | 2.24 s  |
| OCH <sub>3</sub> | 52.5 q              | 3.73 s  | 52.2 q               | 3.72 s  |
| OH               |                     | 3.30 s  |                      | 4.89 s  |

<sup>a</sup> : As multiplicidades para <sup>13</sup>C foram obtidas através da análise dos espectros de Pendant e HSQC.

<sup>b</sup> : Estes valores podem estar trocados.



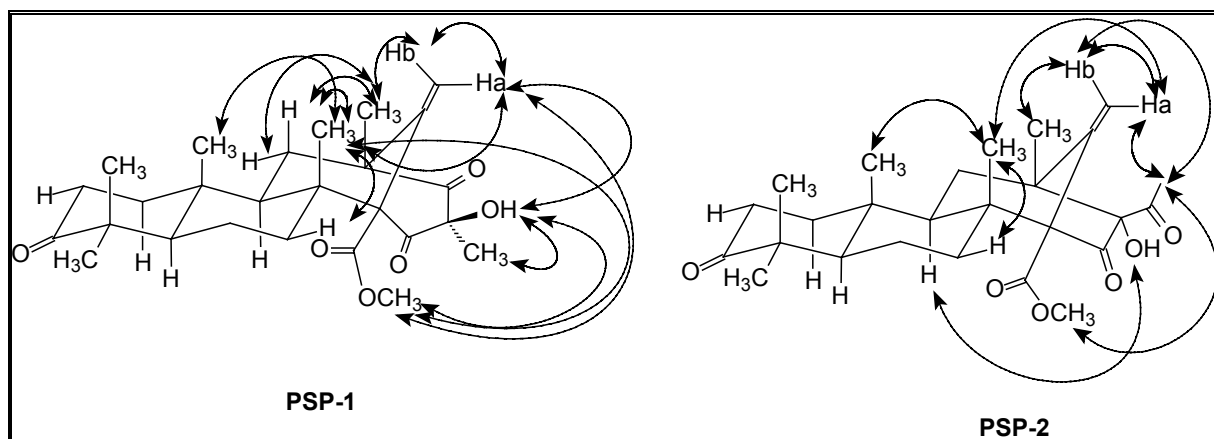
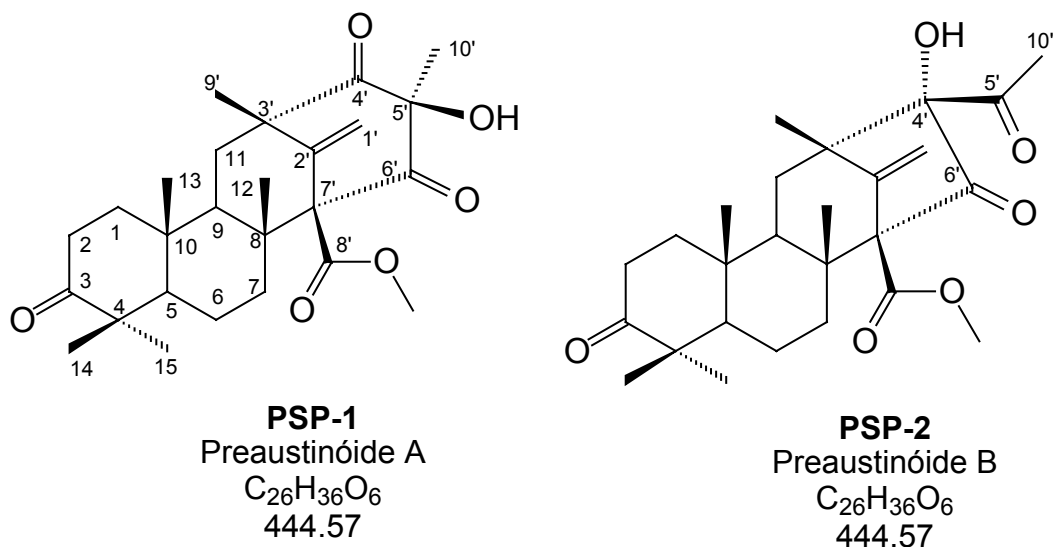


FIGURA 3.10 – Correlações espaciais sugeridas para **PSP-1** e **PSP-2**, baseados no espectro de NOEDIFF.

O espectro de massas obtido por HREIMS e APCI/MS (Ap. 2.8.1) para a substância **PSP-2** foi consistente com o isômero do meroterpeno **PSP-1** ( $[M]^+$  a  $m/z$  444.2505 (calc. 444.2512) e  $[M+H]^+$  a  $m/z$  445, respectivamente). Quatro grupos carbonilas [ $1738\text{ cm}^{-1}$  (metil-éster) e  $1702\text{ cm}^{-1}$  (largo, três cetonas)] e um grupo hidroxila ( $3438\text{ cm}^{-1}$ ) foram detectados no espectro de infravermelho (Ap. 2.8.2). A comparação entre os dados dos espectros de RMN (Tabela 3.15, Ap. 2.8.3 – 2.8.8) indicou que esses dois meroterpenos possuem os anéis A, B e C idênticos. Contudo, a presença de um grupo metila em  $\delta$  2.24 foi observada no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Ap. 2.9.3) de **PSP-2**. A correlação destes hidrogênios da metila com o carbono carbonílico em  $\delta$  203.0 no espectro de HMBC ( $J^2$ , Figura 3.9, Ap. 2.8.7) sugeriu a presença de uma metil-cetona na molécula. Adicionalmente, o espectro de HMBC apresenta uma correlação dos hidrogênios desta metil-cetona com o átomo de carbono quaternário ligado a um átomo de oxigênio ( $\delta$  92.0,  $J^3$ ), o qual também correlaciona com o hidrogênio do grupo hidroxila ( $\delta$  4.89,  $J^2$ ). A fórmula molecular ( $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$ ) deduzida do espectro de massas e a correlação a três ligações ( $J^3$ ) do hidrogênio da hidroxila com os dois carbonos da carbonila ( $\delta$  207.0 e 203.0) sugere a presença de uma unidade  $\text{C}_4$  (3-hidroxi-2,4-dioxo) como a estrutura parcial deste meroterpeno. A conexão destes quatro átomos de carbono com a parte peridrofenantreno da molécula foi obtida pela correlação a longa distância observada no espectro de HMBC ( $J^3$ ) detectada para os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1.04 (3H-9') com o carbono em  $\delta$  92.0 (C-4'), do qual o

deslocamento químico é consistente com a presença de uma 2-hidroxiciclopentanona. A estereoquímica em C-4' foi estabelecida através do NOE (Figura 3.10, Ap. 2.8.8) observado entre os hidrogênios metílicos na metil-cetona ( $\delta$  2.24) com os dois hidrogênios vinílicos no grupo metileno exocíclico [ $\delta$  5.02 (H-1'a) e  $\delta$  5.24 (H-1'b)] e os átomos de hidrogênio metoxílicos no metil-éster ( $\delta$  3.73). Adicionalmente, o átomo de hidrogênio da hidroxila ( $\delta$  4.89) apresentou um intenso NOE com H-9 ( $\delta$  1.59). Conseqüentemente, os dados relatados acima indicaram que a substância **PSP-2** apresenta uma *exo*-metilcetona e uma *endo*-hidroxila em um sistema biciclo-[3:2:1] formando o meroterpeno denominado Preaustinóide B, o qual é um novo produto natural.



#### 4.2.6.2. Identificação dos Meroterpenos PSP-11 e PSP-17

O espectro de massas do meroterpeno **PSP-11** obtido por APCI (Ap. 2.9.1) exibiu um íon abundante  $[M+H]^+$  detectado a  $m/z$  445. Sua fórmula molecular ( $C_{29}H_{32}O_{11}$ ) foi obtida através dos dados de HREIMS (calç. 444.2512; experimental 444.2508). O espectro na região do infravermelho (Ap. 2.9.2) apresentou absorções em 1758 (grupo acetila), 1739 (grupo carbometoxila), 1706 (grupo ceto) e  $1622\text{ cm}^{-1}$  (grupo vinílico).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.16, Ap. 2.9.3) analisado com o auxílio dos dados de RMN 2D ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$  COSY, Ap. 2.9.4, HMBC, Ap. 2.9.8), mostrou a presença da estrutura parcial 4,4,8,10-tetrametil decalina com um grupo ceto localizado no carbono C-3, idêntico aos àqueles vistos nos meroterpenos preaustinóides A (**PSP-1**) e B (**PSP-2**). Isto foi estabelecido pela observação de uma correlação a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre os dois grupos metila [ $\delta$  1.02 (3H-14 e 1.07 (3H-15)] com a carbono carbonílico ( $\delta$  217.1) no espectro de HMBC (Figura 3.11) e também pela comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.16) nos anéis B e C de **PSP-11** e **PSP-2**. Essas e outras correlações as quais corroboraram com esta afirmação são sumarizados na Figura 3.11.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Ap.2.9.5) e HSQC (2.9.7) mostraram sinais para uma carbonila cetônica adicional em  $\delta$  206.6 (C-6'), um éster carboximetil em  $\delta$  168.0 (C-8') e uma dupla ligação carbono-carbono exocíclica em  $\delta$  107.5 e 148.1 correspondendo, respectivamente, aos carbonos C-1' e C-2', estabelecendo assim, a estrutura parcial 2-acetoxi-1-dioxo. De acordo com os dados de RMN [ $^1\text{H}$ :  $\delta$  2.21 (s, 3H-10'),  $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  169.8 (C-5') e 21.2 (C-10')] e o espectro de infravermelho ( $1758\text{ cm}^{-1}$ ), o meroterpeno **PSP-11** contém um grupo acetil. O sinal do hidrogênio em  $\delta$  5.12 (s), um próton carbinólico altamente desblindado (H-4'), exibiu correlações com o carbono cetônico em  $\delta$  206.6 (C-6'), com a acetoxicarbonila em  $\delta$  169.8 (C-5') e com o carbono metilênico em  $\delta$  31.9 (C-11). Esses dados são consistentes com a presença de uma  $\alpha$ -acetoxi-ciclopentanona como o anel D deste meroterpeno.

A elucidação final da estrutura foi obtida através dos estudos NOE diferencial (gNOESY) sumarizados na Figura 3.12. A irradiação do hidrogênio H-1'a resultou no acentuamento dos sinais referentes ao hidrogênio H-1'b em  $\delta$  4.87, do grupo metílico 3H-12 e do éster metílico, respectivamente a  $\delta$  1.21 e 3.65. A irradiação do sinal em  $\delta$  5.12 (H-4') mostrou um acentuamento do sinal do grupo metila em  $\delta$  1.23 (H-9'), sugerindo que o grupo acetoxi esteja localizado na *endoface* do sistema biciclo - [3:2:1]-bicyclo enquanto que o hidrogênio carbinólico H-4' está localizado na *exoface*. Conseqüentemente, o meroterpeno **PSP-11** foi denominado de Preaustinóide B1 e é um novo produto natural. Os carbonos no grupo acetil foram numerados como C-5' (carbonila) e C-10' (metila) apenas por conveniência. Embora quimicamente o

acetil pode ser formado da metil cetona do preaustinóide B (**PSP-2**), ainda se faz necessário provar se esses dois carbonos fazem parte do precursor 3,5-dimetilorselinato ou apenas resultado de uma reação normal de acetilação natural.

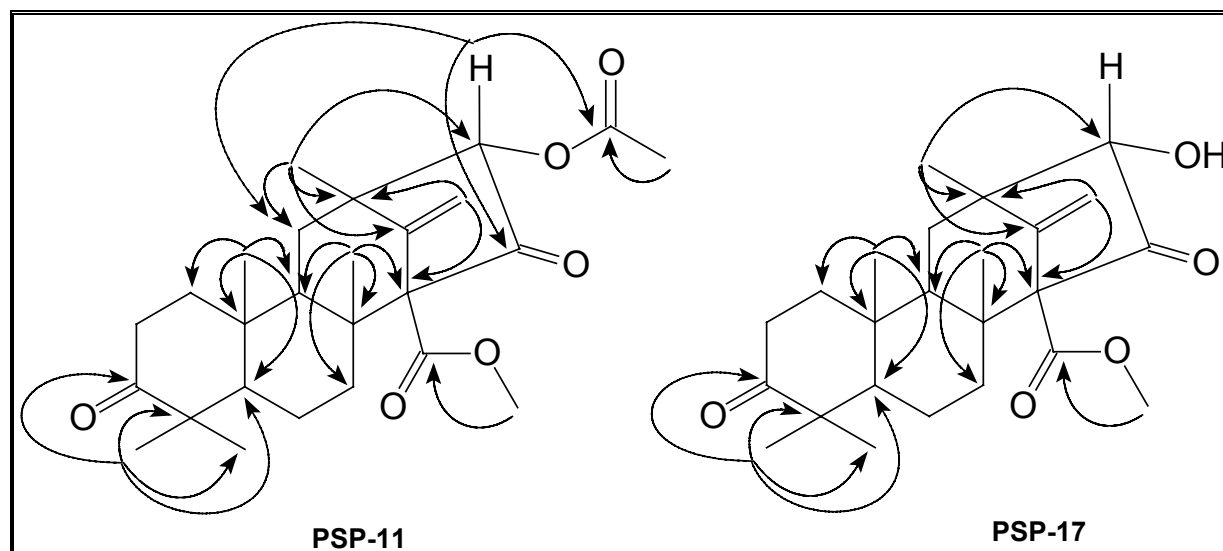


FIGURA 3.11 – Correlações de HMBC detectadas para **PSP-11** e **PSP-17**.

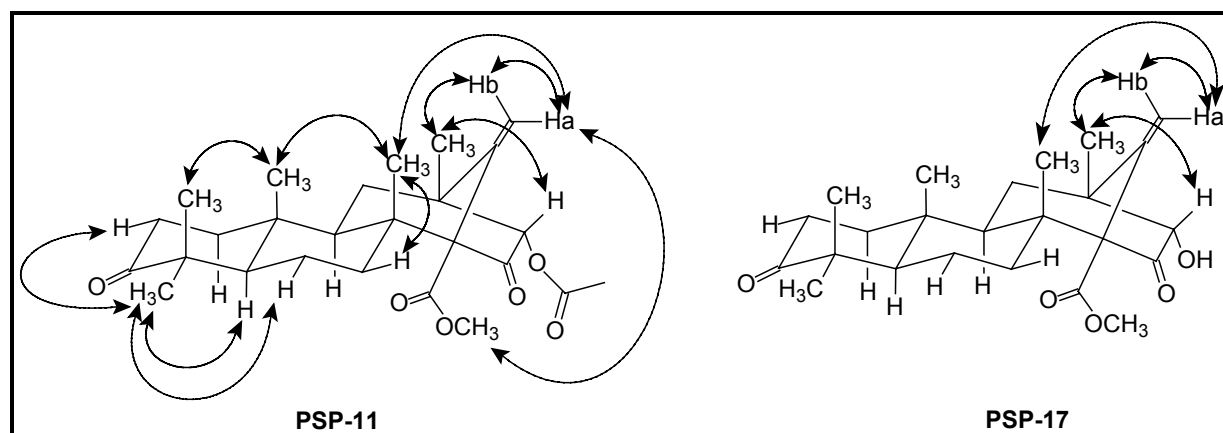


FIGURA 3.12 – Correlações espaciais sugeridas para **PSP-11** e **PSP-17**, baseados nos espectros de gNOESY.

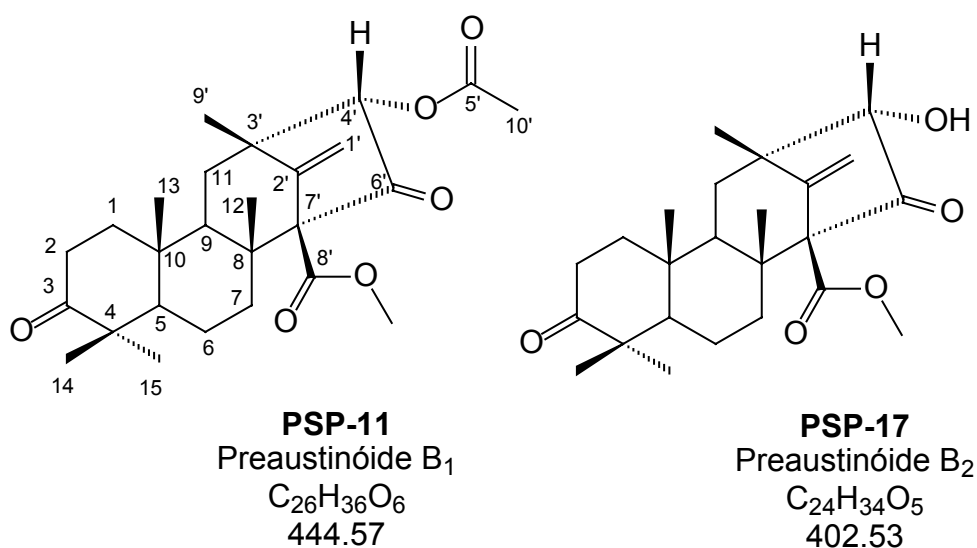
TABELA 3.16 – Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para o meroterpeno **PSP-11** e dados sugeridos para **PSP-17**.

| Pos.             | PSP-11  |  | PSP-17          |  |
|------------------|---------|--|-----------------|--|
|                  | C       | H  | C               | H  |
| 1                | 38.6 t  | $\alpha$ : 1.45 dd (13.0; 13.0)<br>$\beta$ : 1.83 ddd (13.0; 3.0; 3.0)       | 38.5 t          | $\alpha$ : 1.79 td (13.0; 13.0; 5.0)<br>$\beta$ : 1.47 dt (13.0; 5.0; 5.0) |
| 2                | 33.7 t  | $\alpha$ : 2.44 m<br>$\beta$ : 2.49 m  | 33.6 t          | 2.42 m   |
| 3                | 217.1 s | -  | 217.2 s         | -  |
| 4                | 47.3 s  | -  | 48.0 s          | -  |
| 5                | 54.3 d  | $\alpha$ : 1.38 m  | 54.2 d          | $\alpha$ : 1.34 dd (7.0; 3.0)  |
| 6                | 19.8 t  | $\alpha$ : 1.57 ddd (10.0; 7.0; 4.0)<br>$\beta$ : 1.56 m                     | 19.8 t          | $\alpha$ : 1.50 m  |
| 7                | 31.5 t  | $\alpha$ : 1.77 ddd (13.0; 13.0; 4.0)<br>$\beta$ : 2.03 ddd (13.0; 4.0; 4.0) | 31.7 t          | $\alpha$ : 1.70 m<br>$\beta$ : 1.98 dt (13.1; 3.5; 3.5)                    |
| 8                | 46.9 s  | -  | 46.8 s          | -  |
| 9                | 50.8 d  | $\alpha$ : 1.30 dd (13.0; 4.0)   | 50.9 d          | $\alpha$ : 1.19 dd (7.0; 3.2)  |
| 10               | 37.2 s  | -  | 36.9 s          | -  |
| 11               | 31.9 t  | $\alpha$ : 1.44 m<br>$\beta$ : 1.83 dd (13.0; 13.0)                          | 31.9 t          | $\alpha$ : 1.87 dd (13.0; 3.7)<br>$\beta$ : 1.50 m                         |
| 12               | 16.5 q  | 1.21 s   | 16.5 q          | 1.20 s   |
| 13               | 16.2 q  | 0.91 s   | 16.2 q          | 0.88 s   |
| 14               | 20.8 q  | 1.02 s   | 20.8 q          | 1.01 s   |
| 15               | 26.5 q  | 1.07 s   | 26.7 q          | 1.05 s   |
| 1'               | 107.5 t | a: 4.87 s<br>b: 5.15 s   | 106.8 t         | a: 4.86 s<br>b: 5.11 s   |
| 2'               | 148.1 s | -  | 149.1 s         | -  |
| 3'               | 45.7 s  | -  | 46.0 s          | -  |
| 4'               | 80.5 d  | 5.12 s   | 82.1 d          | 3.69 s   |
| 5'               | 169.8 s | -  | -               | -  |
| 6'               | 206.6 s | -  | nd <sup>1</sup> | -  |
| 7'               | 70.7 s  | -  | 71.0 s          | -  |
| 8'               | 168.0 s | -  | 167.8 s         | -  |
| 9'               | 20.6 q  | 1.23 s   | 22.7 q          | 1.31 s   |
| 10'              | 21.2 q  | 2.21 s   | -               | -  |
| OCH <sub>3</sub> | 52.0 q  | 52.0 s   | 52.0 q          | 3.66 s   |
| OH               | -       | -  | -               | 2.41 s   |

<sup>1</sup> nd = não detectado

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Ap. 2.10.3, Tabela 3.16) para **PSP-17** mostrou-se muito similar aos obtidos para os meroterpenos **PSP-2** e **PSP-11**, exceto os sinais referentes aos grupos metilcetona e acetila, respectivamente. De acordo com os dados de RMN para esse meroterpeno, o carbono C-4' a  $\delta$  82.1 contém um grupo hidroxila e um hidrogênio carbinólico a  $\delta$  3.69 (s) enquanto que o carbono C-4' em **PSP-11** contém o grupo acetil e o hidrogênio carbinólico a  $\delta$  5.12 (s). A diferença nos valores de deslocamento químico desse hidrogênio pode ser resultado da ausência do cone de desblindagem da carbonila do acetil no H-4' de **PSP-11**. A correlação  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC) observada entre o hidrogênio de 3H-9' a  $\delta$  1.31 (s) com o carbono carbinólico altamente desblindado a  $\delta$  82.1 (C-4') corroborou com essa suposição. Esta e outras correlações obtidas para essa substância são apresentadas na Figura 3.11.

Finalmente a elucidação final da estrutura foi obtida através dos experimentos de gNOESY (Figura 3.12, Ap. 2.10.7) sugerindo que **PSP-17** possui a mesma estereoquímica que **PSP-11**, onde o grupo hidroxila está localizado na face *endo* da molécula enquanto que o hidrogênio H-4' encontra-se na face *exo*. Conseqüentemente o meroterpeno **PSP-17** é um novo produto natural e foi denominado de preaustinóide B2.



#### 4.2.6.3. Identificação dos Meroterpenos PSP-9 e PSP-4

A fórmula molecular ( $C_{26}H_{36}O_7$ ) para o meroterpeno **PSP-9** foi deduzida baseada nos dados dos espectros de massas de alta resolução (HREIMS) e APCI (Ap. 2.11.1), os quais detectaram  $[M]^+$  a  $m/z$  460.24610 (calcd. 460.24610) e  $[M+H]^+$  a  $m/z$  461, respectivamente. Os sinais no espectro no infravermelho (Ap. 2.11.2) mostraram absorções intensas como consequência das deformações referentes aos grupos hidroxila em  $3375\text{ cm}^{-1}$ , e aos quatro grupos carbonilas em 1742, 1730, 1705 e  $1689\text{ cm}^{-1}$ .

A comparação dos dados de RMN do meroterpeno **PSP-9** com àqueles obtidos para o preaustinóide A (**PSP-1**) indicou uma certa similaridade entre eles. O meroterpeno **PSP-1** contém a estrutura parcial 2-hidroxi-2-metil-1,3-dioxo (anel D) provavelmente derivada do pentacetídeo 3,5-dimetilorselinato após sua alquilação com o farnesil para formar o esqueleto dos meroterpenos. A substância **PSP-9** possui um grupo metila ( $\delta$  1.36) que correlaciona no espectro de HMBC (Figura 3.13, Ap. 2.11.8) com o carbono carbinólico ( $\delta$  70.0, C-5',  $^2J$ ) e dois carbonos carbonílicos ( $\delta$  203.3, C-4',  $^3J$ ;  $\delta$  207.1, C-6',  $^3J$ ). Estes dados juntamente com a comparação dos deslocamentos químicos para os carbonos (Tabela 3.17, Ap. 2.11.5) dos anéis C e D do preaustinóide A confirmou a presença da estrutura parcial 2-hidroxi-2-metil-1,3-dioxo no meroterpeno **PSP-9**.

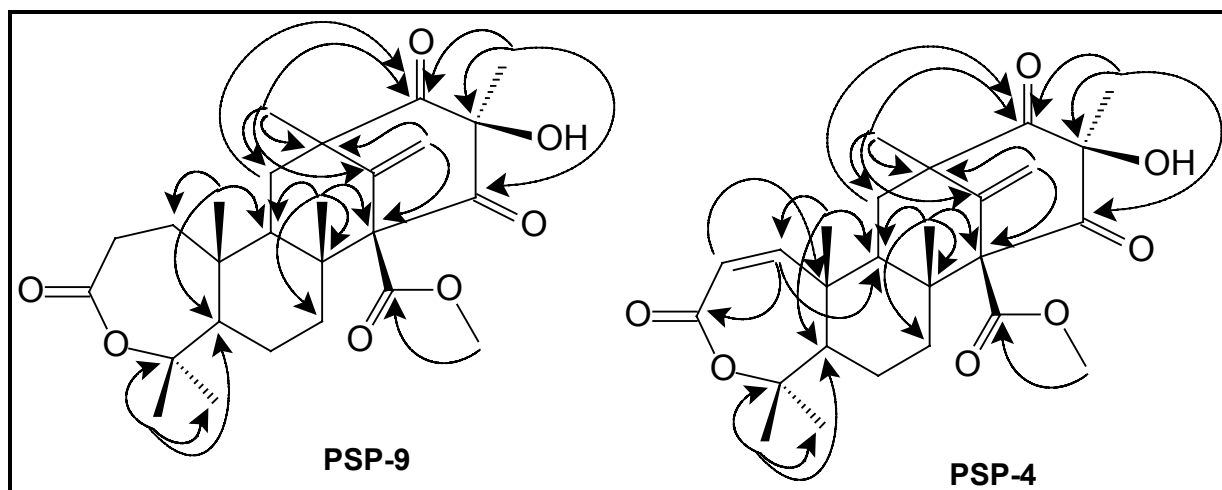


FIGURA 3.13 – Correlações de HMBC detectadas para **PSP-9** e **PSP-4**.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.17, Ap. 2.11.3) indicou a presença de seis grupos metílicos terciários em  $\delta$  1.02, 1.29, 1.36, 1.36, 1.45 e 1.49, os quais correspondem, respectivamente, aos hidrogênios 3H-13, 3H-12, 3H-14, 3H-10', 3H-15 e 3H-9'. Dois destes grupos metila ( $\delta$  1.36, 3H-14 e 1.45, 3H-15) são geminais, conforme os dados encontrados nos espectros de HSQC (Ap. 2.11.7) e HMBC (Ap. 2.11.8), uma vez que esses hidrogênios mostram correlação com o mesmo carbono quaternário ( $\delta$  85.4, C-4,  $^2\text{J}$ ), como também entre os carbonos correspondentes ( $\delta$  30.6, C-15,  $^3\text{J}$  e 27.0, C-14,  $^3\text{J}$ ). Para este meroterpeno as correlações a longa distância desses hidrogênios metílicos dos carbonos C-14 e C-15 com o carbono carbonílico em C-3 não foram detectadas como observadas nos meroterpenos preaustinóides A e B. Além disso, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Ap. 2.11.5) de **PSP-9** contém um pico em  $\delta$  174.2, atribuído para C-3, cujo valor do deslocamento químico indica a presença de um éster ou lactona. Estes dados, juntamente com a presença de um complexo sistema de spins observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  1.12, H-1 $\alpha$ ;  $\delta$  1.70, H-1 $\beta$ ;  $\delta$  2.41, H-2 $\alpha$  e  $\delta$  2.49, H-2 $\beta$ ) e com os dados de massas e infravermelho sugeriu que o anel A de **PSP-9** como uma  $\epsilon$ -lactona provavelmente formada por uma oxidação do tipo Baeyer-Villiger da ciclohexanona em preaustinóide A (**PSP-1**). Os dados de RMN  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY (Ap. 2.11.4) e HMBC (Ap. 2.11.8) foram decisivos para a elucidação estrutural desta substância (Figura 3.13). Portanto, este novo meroterpeno foi denominado de preaustinóide A1.

Finalmente as configurações relativas nos estereocentros presentes em **PSP-9** foram propostas através das análises dos dados de 1D-NOE (NOEDIFF e gNOESY, Figura 3.14, Ap. 2.11.9). A irradiação do sinal em  $\delta$  4.9 (H-1'a) no espectro de RMN  $^1\text{H}$  produziu um acentuamento dos sinais em  $\delta$  5.43 (H-1'b), 3.73 (OCH<sub>3</sub>) e 1.29 (3H-12), enquanto que a irradiação do sinal em  $\delta$  5.43 (H-1'b) acentuou o sinal do singlete em  $\delta$  1.49 (3H-9'). Adicionalmente, o hidrogênio do grupo hidroxila em  $\delta$  3.26 mostrou NOE com o hidrogênio H-12 ( $\delta$  1.29), o qual indicou que o meroterpeno **PSP-9** apresenta um grupo hidroxila localizado na face *exo* do anel. Estas e outras irradiações realizadas nesta substância são mostradas na Figura 3.14.



TABELA 3.17 – Dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) para os meroterpenos PSP-9 e PSP-4.

| Pos.             | PSP-9               |   | PSP-4   |   |
|------------------|---------------------|---|---------|---|
|                  | C                   | H   | C       | H   |
| 1                | 39.7 t <sup>a</sup> | α: 1.12 ddd (14.0; 14.0; 5.0)<br>β: 1.70 m                    | 157.3 d | α: 6.04 d (12.0)  |
| 2                | 32.1 t              | α: 2.41 ddd (14.0; 5.0; 5.0)<br>β: 2.49 ddd (14.0; 14.0; 5.0) | 122.5 d | α: 5.81 d (12.0)  |
| 3                | 174.2 s             | -   | 167.6 s | -   |
| 4                | 85.4 s              | -   | 85.6 s  | -   |
| 5                | 51.7 d              | α: 1.63 m   | 56.0 d  | α: 1.79 dd (13.0; 3.0)  |
| 6                | 23.4 t              | α: 1.47 m<br>β: 1.70 m  | 23.3 t  | α: 1.49 m<br>β: 1.70 m  |
| 7                | 31.8 t              | α: 1.89 ddd (13.0; 13.0; 4.0)<br>β: 2.23 ddd (13.0; 4.0; 4.0) | 31.5 t  | α: 1.87 ddd (13.0; 13.0; 3.0)<br>β: 2.24 ddd (13.0; 3.0; 3.0) |
| 8                | 47.7 s              | -   | 47.3 s  | -   |
| 9                | 52.6 d              | α: 0.56 dd (13.0; 3.0)  | 49.4 d  | α: 0.65 dd (13.0; 3.0)  |
| 10               | 39.7 s              | -   | 43.2 s  | -   |
| 11               | 39.6 t              | α: 1.93 dd (13.0; 3.0)<br>β: 1.65 dd (13.0; 13.0)             | 39.9 t  | α: 2.0 dd (13.0; 3.0)<br>β: 1.75 dd (13.0; 13.0)              |
| 12               | 16.3 q              | 1.29 s  | 16.6 q  | 1.33 s  |
| 13               | 18.6 q              | 1.02 s  | 14.7 q  | 1.18 s  |
| 14               | 27.0 q              | 1.36 s  | 32.5 q  | 1.39 s  |
| 15               | 30.6 q              | 1.45 s  | 27.1 q  | 1.42 s  |
| 1'               | 112.9 t             | a: 4.9 s<br>b: 5.43 s   | 113.1 t | a: 4.92 s<br>b: 5.45 s  |
| 2'               | 145.5 s             | -   | 145.3 s | -   |
| 3'               | 51.1 s              | -   | 51.1 s  | -   |
| 4'               | 207.3 s             | -   | 207.9 s | -   |
| 5'               | 80.6 s              | -   | 80.6 s  | -   |
| 6'               | 204.0 s             | -   | 203.4 s | -   |
| 7'               | 72.5 s              | -   | 72.2 s  | -   |
| 8'               | 168.5 s             | -   | 168.2 s | -   |
| 9'               | 22.1 q              | 1.49 s  | 21.9 q  | 1.52 s  |
| 10'              | 14.9 q              | 1.36 s  | 14.9 q  | 1.37 s  |
| OCH <sub>3</sub> | 53.0 q              | 3.73 s  | 52.6 q  | 3.74 s  |
| OH               | -                   | 3.26 s  | -       | 3.28 sl   |

<sup>a</sup>: As multiplicidades foram obtidas através dos espectros de Pendant e HSQC.

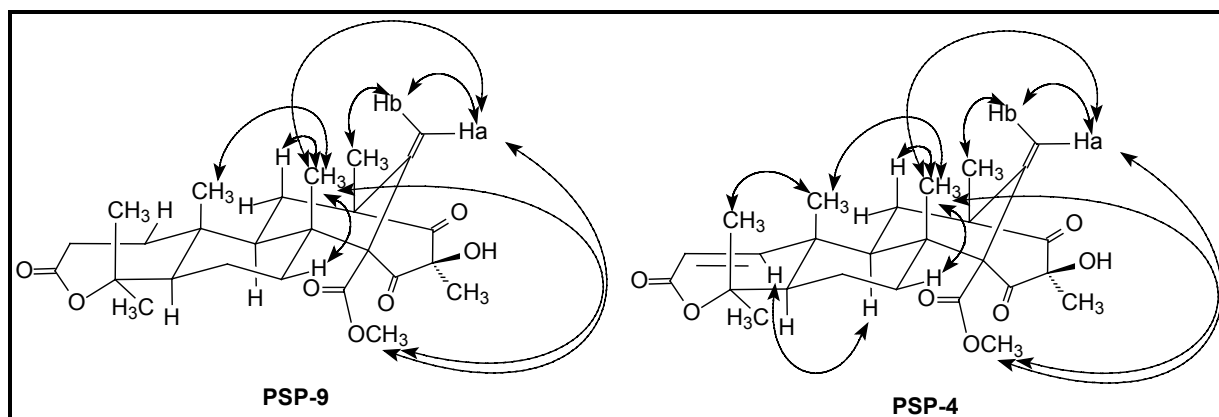


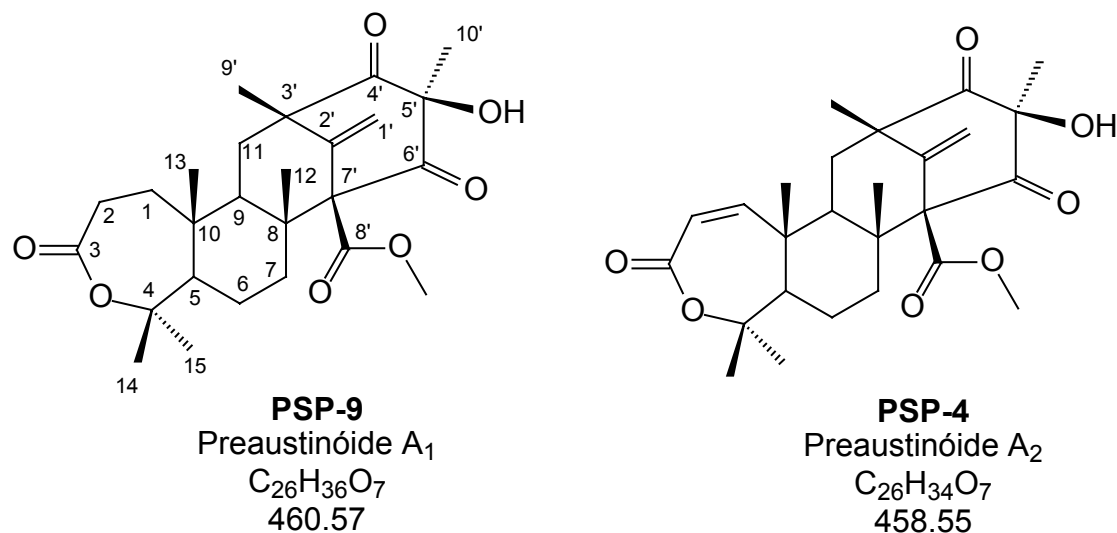
FIGURA 3.14 – Correlações espaciais sugeridas para **PSP-9**, baseados no espectro de NOEDIFF.

A análise da fórmula molecular do meroterpeno **PSP-4** ( $C_{26}H_{34}O_7$ ), deduzida através dos espectros obtidos por HREIMS ( $M^+$  em 458.2257; calcd. 458.2304) e APCI/MS ( $[M+H]^+$  em  $m/z$  459, Ap. 2.12.1) indicou que **PSP-4** contém 10 graus de insaturação, um adicional ao calculado para **PSP-9**. Além dos dados de massas, os espectros na região do infravermelho (3422, 1745, 1730, 1705 e 1674  $cm^{-1}$ , Ap. 2.12.2) e em RMN  $^1H$  (Ap. 2.12.3) e  $^{13}C$  (Ap. 2.12.5) indicou que **PSP-9** e **PSP-4** são meroterpenos intimamente similares, com os anéis B, C e D idênticos.

O espectro de RMN  $^1H$  de **PSP-4** (Tabela 3.17, Ap. 2.12.3) contém um par de dubletos correspondente aos hidrogênios *cis*-olefínicos em  $\delta$  5.81 (d,  $J = 12.0$  Hz) e 6.04 (d,  $J = 12.0$  Hz) para os hidrogênios H-2 e H-1, respectivamente, no anel A. A correlação de H-1 ( $^3J$ ) e H-2 ( $^2J$ ) com o carbono carbonílico em  $\delta$  167.6 no espectro de HMBC (Ap. 2.12.7) indicou claramente que o anel A do meroterpeno **PSP-4** é formado por uma  $\epsilon$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Esta correlação e outras obtidas para esse meroterpeno são apresentadas na Figura 3.13.

Estudos de NOE diferencial (gNOESY e NOEDiff, Figura 3.14, Ap. 2.12.8) contribuíram para a completa elucidação desta estrutura na qual, a irradiação de H-12 ( $\delta$  1.33) produziu um acentuamento dos sinais referentes aos hidrogênios H-1'a, H-11 $\beta$ , H-7 $\beta$ , H-13 e grupo metoxila, respectivamente em  $\delta$  4.92, 1.75, 2.24, 1.18 e 3.74. Além disso, o grupo metílico 3H-10' ( $\delta$  1.37) mostrou um NOE com H-9 ( $\delta$  0.65), indicando que **PSP-4** contém um grupo hidroxila na *exoface*. Este e os outros

resultados são apresentados na Figura 3.14. Este meroterpeno inédito na literatura foi denominado de preaustinóide A<sub>2</sub>, uma vez que está estruturalmente relacionado aos meroterpenos preaustinóides A (**PSP-1**) e A<sub>1</sub> (**PSP-9**).



#### 4.2.6.4. Identificação dos Meroterpenos **PSP-19** e **PSP-13**

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-19** (Tabela 3.18, Ap. 2.13.3) analisado com o auxílio dos dados obtidos de RMN 2D [<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H COSY (Ap. 2.13.4), HMBC (Figura 3.15, Ap. 2.13.7)] e comparação com os dados obtidos para **PSP-1** e **PSP-9** revelou uma certa similaridade entre eles no anel D, com a estrutura parcial 2-hidroxi-2-metil-1,3-dioxo. O grupo metílico 3H-10' em δ 1.19 mostrou correlações com o carbono carbinólico C-5' em δ 77.9 (<sup>2</sup>J) e os carbonos carbonílicos C-4' e C-6', respectivamente em δ 205.9 (<sup>3</sup>J) e 203.5 (<sup>3</sup>J), corroborando com essa afirmação. A correlação da metila 3H-9' com o carbono carbonílico em δ 205.9 foi decisiva para atribuir corretamente os valores dos deslocamentos químicos dessas carbonilas.

Contudo, o estudo comparativo desses espectros mostrou que os anéis A e B de **PSP-19** são bem diferentes dos encontrados para **PSP-1** (cetona no anel A) como para **PSP-9** (ε-lactona α,β-insaturada) sugerindo a presença de uma δ-espirolactona α,β-insaturada no anel A. Os espectros de RMN <sup>13</sup>C (Ap. 2.13.5) e

HSQC (Ap. 2.13.6) mostraram a presença de quatro sinais correspondentes a carbonos carbonílicos, sendo dois deles cetônicos ( $\delta$  203.5, C-6' e 205.9, C-4') e dois derivados de ésteres e lactonas em  $\delta$  164.0 (C-3) e 168.4 (C-8'). Foram observados também os sinais oriundos de carbonos olefínicos. Dois sinais em  $\delta$  113.9 e 143.5 indicaram a presença de uma dupla ligação exocíclica no anel D, respectivos aos carbonos C-1' e C-2'. As duas duplas endocíclicas adicionais foram atribuídas através das correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 3.15, Ap. 2.13.7). O par de carbonos C-1 e C-2 encontra-se, respectivamente, em  $\delta$  145.8 e 119.6 e a dupla nos carbonos C-9 e C-10 em  $\delta$  135.9 e 131.8, respectivamente.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-19** (Ap. 2.13.3) apresentou ainda seis sinais na forma de singlete em  $\delta$  1.19; 1.22; 1.36; 1.48; 1.49 e 1.50, correspondendo, respectivamente, aos hidrogênios 3H-10', 3H-14, 3H-15, 3H-12, 3H-13 e 3H-9' e a presença do sistema espiro foi determinado pelas correlações observadas das metilas 3H-14 e 3H-15 com o carbono carbinólico (C-4) em  $\delta$  85.0 ( $^2\text{J}$ ) e com o carbono quaternário (C-5) em  $\delta$  45.2 ( $^3\text{J}$ ). Adicionalmente, a metila olefínica 3H-13 (comprovada pelas correlações com os carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  135.9, C-9,  $^3\text{J}$  e 131.8, C-10,  $^2\text{J}$ ) em  $\delta$  1.49 ( $^3\text{J}$ ) também apresentou correlação com esse carbono C-5 corroborando com essa afirmação. O par de dubletos *cis*-olefínicos em  $\delta$  6.36 (H-1, d, J = 9.8) e 6.03 (H-2, d, J = 9.8) apresentou correlação com o carbono carbonílico C-3 em  $\delta$  164.0, indicando uma lactona de seis membros  $\alpha,\beta$ -insaturada. Essas correlações e outras que foram decisivas para a atribuição da estrutura de **PSP-19** são apresentadas na Figura 3.15.

A elucidação final juntamente com a indicação das configurações relativas dos estereocentros foi obtida através dos estudos de gNOESY (Figura 3.16, Ap. 2.13.8). A irradiação do hidrogênio H-1'a em  $\delta$  4.99 produziu um acentuamento dos hidrogênios H-1'b ( $\delta$  5.49) e 3H-12 ( $\delta$  1.48) enquanto que o hidrogênio H-1'b em  $\delta$  5.49 causou um incremento dos sinais dos hidrogênios H-1'a e 3H-9', respectivamente em  $\delta$  4.99 e 1.50. Estas e outras correlações são mostradas na Figura 3.16. Conseqüentemente, o meroterpeno **PSP-19** é um novo produto natural e foi denominado de preaustinóide A3 por conter o mesmo anel D observado nos meroterpenos **PSP-1**, **PSP-9** e **PSP-4**.

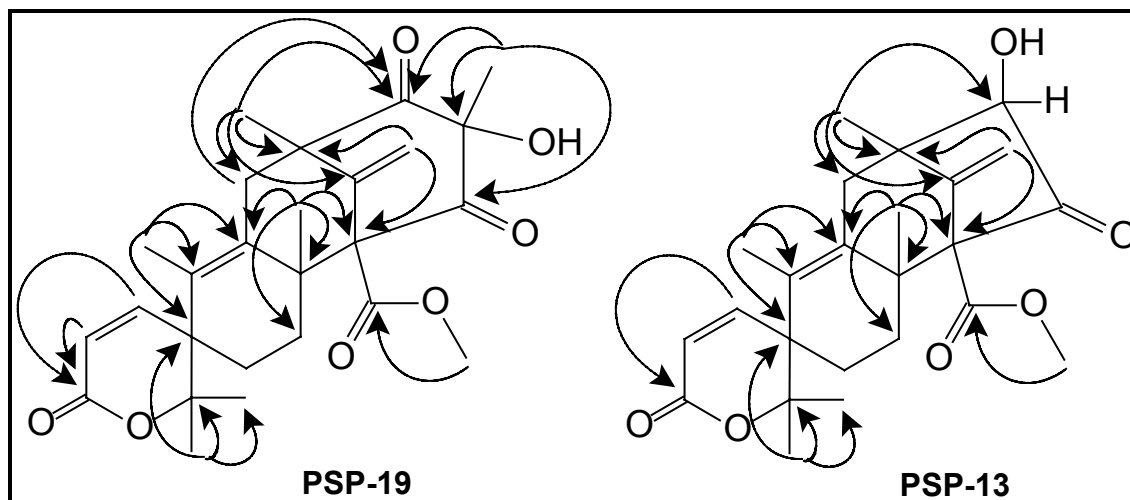


FIGURA 3.15 – Correlações de HMBC detectadas para **PSP-19** e **PSP-13**.

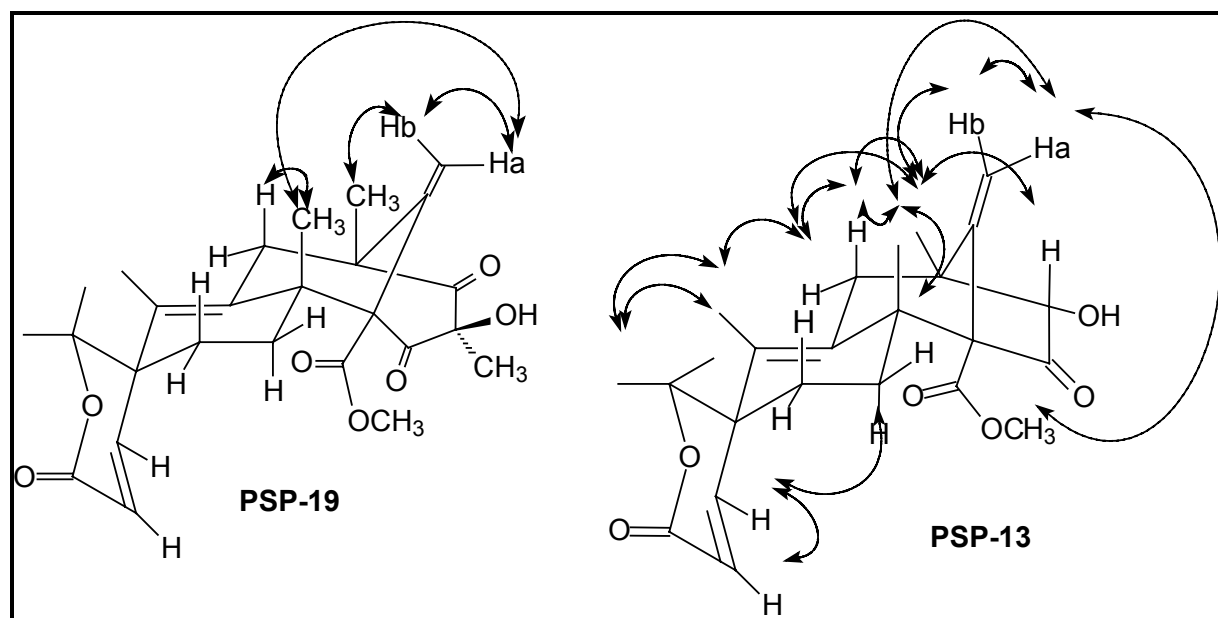


FIGURA 3.16 – Correlações espaciais sugeridas para **PSP-19** e **PSP-13**, baseados no espectro de gNOESY.

TABELA 3.18 – Dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) para os meroterpenos PSP-19 e PSP-13.

| Posição            | PSP-19  |   | PSP-13  |   |
|--------------------|---------|---|---------|---|
|                    | C       | H   | C       | H   |
| 1                  | 145.8 d | 6.36 d (9.8)  | 146.5 d | 6.42 d (10.0)                               |
| 2                  | 119.6 d | 6.03 d (9.8)  | 119.3 d | 6.03 d (10.0)                               |
| 3                  | 164.0 s | -   | 164.2 s | -   |
| 4                  | 85.0 s  | -   | 85.7 s  | -   |
| 5                  | 45.2 s  | -   | 45.6 s  | -   |
| 6                  | 26.1 t  | α: 1.57 m<br>β: 1.59 m  | 26.5 t  | 1.60 m                                      |
| 7                  | 24.5 t  | α: 2.04 dt (13.5; 3.4;<br>3.4)<br>β: 2.66 td (14.7; 14.7;<br>3.4) | 24.5 t  | α: 2.34 m<br>β: 1.74 dt (14.0; 4.0;<br>4.0) |
| 8                  | 46.9 s  | -   | 46.1 s  | -   |
| 9                  | 135.9 s | -   | 136.9 s | -   |
| 10                 | 131.8 s | -   | 130.8 s | -   |
| 11                 | 41.1 t  | α: 2.22 d (14.6)<br>β: 2.96 d (15.0)                              | 36.1 d  | α: 2,96 d (15.0)<br>β: 1,98 d (15.0)        |
| 12                 | 27.0 q  | 1.48 s  | 21.1q   | 1.40 s                                      |
| 13                 | 15.4 q  | 1.49 s  | 15.4 q  | 1.65 d (1.0)                                |
| 14                 | 22.9 q  | 1.22 s  | 25.8 q  | 1.36 s                                      |
| 15                 | 25.9 q  | 1.36  | 23.1 q  | 1.23 s                                      |
| 1'                 | 113.9 t | a: 4.99 s<br>b: 5.49 s  | 107.4 t | a: 5.01 s<br>b: 5.25 s                      |
| 2'                 | 143.5 s | -   | 148.5 s | -   |
| 3'                 | 50.8 s  | -   | 46.6 s  | -   |
| 4'                 | 205.9 s | -   | 82.7 d  | 3.68 s                                      |
| 5'                 | 77.9 s  | -   | -       | -   |
| 6'                 | 203.5 s | -   | 210.4 s | -   |
| 7'                 | 71.6 s  | -   | 69.2 s  | -   |
| 8'                 | 168.4 s | -   | 167.9 s | -   |
| 9'                 | 22.7 q  | 1.50 s  | 19.8 q  | 1.33 s                                      |
| 10'                | 16.6 q  | 1.19 s  | -       | -   |
| CH <sub>3</sub> CO | 52.6 q  | 3.76 s  | 52.1 q  | 3.70 s                                      |
| OH                 | -       | 2.89 s  | -       | 3.6 s                                       |

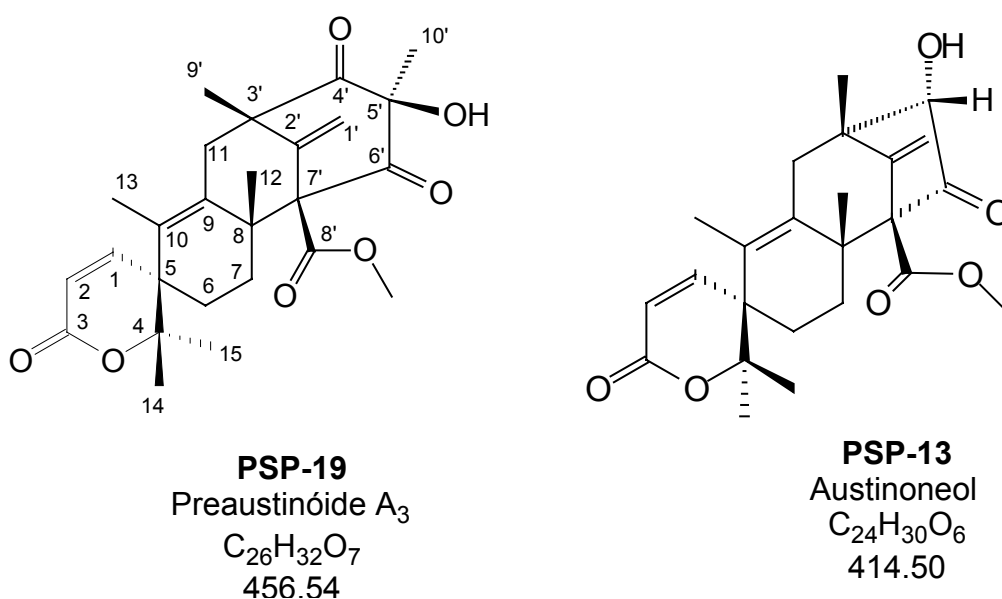
O espectro de massas de alta resolução e o espectro de massas obtido via ionização por *electrospray* no modo positivo (Ap. 2.14.1) do meroterpeno **PSP-13** exibiram  $[M]^+$  em 414.20411 (calcd. 414.20423) e  $[M + H]^+$  a  $m/z$  415, respectivamente, para os quais a fórmula molecular  $C_{24}H_{30}O_6$  foi estabelecida. O espectro na região do infravermelho (Ap. 2.14.2) indicou a presença do grupo hidroxila em  $3413\text{ cm}^{-1}$  e os grupos carbonilas em  $1727$ ,  $1749$  e  $1704\text{ cm}^{-1}$ , o qual sugeriu, juntamente com outros dados, a presença de uma ciclopentanona, um grupo carbometoxi e uma  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, respectivamente.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.18, Ap. 2.14.3) analisado com o auxílio dos dados obtidos das técnicas de RMN 2D ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$  COSY, Ap. 2.14.4 e HMBC, Figura 3.15, Ap. 2.14.7), mostrou a presença de quatro singletos para os grupos metílicos terciários em  $\delta$  1.23, 1.33, 1.36 e 1.40, os quais correspondem respectivamente aos hidrogênios 3H-14, 3H-9', 3H-15 e 3H-12. Foi observado também um dubleto correspondendo a um grupo metílico em  $\delta$  1.65 (3H-13', J 1 Hz), resultante de um acoplamento em W com o hidrogênio em  $\delta$  1.98 (H-11 $\beta$ ). Os sinais dos hidrogênios vinílicos foram observados para apenas um metileno exocíclico [H-1'a em  $\delta$  5.01 (s) e H-1'b em  $\delta$  5.25 (s)]. Adicionalmente, foram observados os sinais para o par de hidrogênios vinílicos desblindados em  $\delta$  6.42 (d, 10 Hz, H-1) e  $\delta$  6.03 (d, 10 Hz, H-2) correspondente ao anel  $\delta$ -lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado. O experimento de HMBC (Ap.2.14.8) detectou acoplamentos de longa distância de 3H-13 com os carbonos C-5, C-9 e C-10 e de H-1' com os carbonos C-3' e C-7'. Estas correlações, bem como outras observadas mostradas na Figura 3.16, foram decisivas para o posicionamento dos hidrogênios metilênicos exocíclicos como H-1' e da  $\delta$ -lactona insaturada.

Uma comparação dos espectros de RMN de **PSP-13** com os outros meroterpenos já isolados e os relatados na literatura, indicou a presença de uma cetona adicional ( $1727\text{ cm}^{-1}$ ) e um grupo hidroxila ( $3413\text{ cm}^{-1}$ ). O grupo ceto adicional encontra-se localizado no carbono C-6' em  $\delta$  210.4, com base nos espectros de HMBC onde foram observadas as correlações de H-4' ( $\delta$  3.68) com os carbonos C-9' ( $\delta$  19.8) e C-6' ( $\delta$  210.4). Além disso, a metila 3H-9' ( $\delta$  1.33) mostrou correlação com o carbono em  $\delta$  82.7 (C-4') (Figura 3.16, Ap. 2.14.8).

A elucidação final da estrutura foi obtida dos estudos dos acoplamentos de longo alcance  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , observadas no espectro de HMBC e dos experimentos de NOEs (NOE-Diff e gNOESY, Figura 3.16, Ap. 2.14.8) observado para esse meroterpenóide. As atribuições dos sinais dos grupos metílicos, dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos e hidrogênios vinílicos resultaram dos estudos de NOES diferenciais. A irradiação de H-1 ( $\delta$  6.42) resultou no acentuamento do dubleto em  $\delta$  6.03, o qual deve ser, portanto, o hidrogênio H-2, e do multiplete em  $\delta$  2.34, correspondente ao hidrogênio H-7 $\alpha$ . A irradiação de  $\delta$  5.01 (H-1'a) resultou no acentuamento dos sinais de H-12 em  $\delta$  1.40 e do grupo metoxila em  $\delta$  3.70, indicando que o grupo carbometoxi estaria em uma configuração  $\beta$ . A irradiação do sinal da metila em  $\delta$  1.33 (3H-9') causou um acentuamento do sinal correspondente ao hidrogênio H-4' em  $\delta$  3.68, o qual corrobora com a configuração  $\alpha$  do grupo hidroxila. Finalmente, a irradiação do sinal em  $\delta$  1.40 (3H-12) conduziu a um acentuamento do sinal de H-1'a, H-11 $\beta$  e H-7 $\beta$  em  $\delta$  5.01, 1.98 e 1.74, respectivamente. Estes resultados são mostrados na Figura 3.16.

Estes dados indicaram que o meroterpeno **PSP-13** é um precursor ciclopentanona dos outros meroterpenos e como ainda não foi relatado na literatura, recebeu a denominação de Austinoneol A.





#### 4.2.6.5. Identificação dos Meroterpenos PSP-10 e PSP-12

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Ap. 2.15.3) de **PSP-10** analisado com o auxílio dos dados obtidos das técnicas de RMN 2D ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$  COSY, Ap. 2.15.4 e HMBC, Figura 3.17, Ap. 2.15.7), como também dos valores encontrados na literatura para meroterpenos relacionados descritos nas Tabelas 3.19 e 3.20 (**M-27**, **M-70**, **M-71** e **M-72**) (Capítulo 4, HAYASHI *et al*, 1994), mostrou a presença de quatro sinais na forma de singlete para os grupos metílicos terciários em  $\delta$  1.18, 1.31, 1.32 e 1.60, os quais correspondem respectivamente aos hidrogênios 3H-14, 3H-12, 3H-15 e 3H-9'. Também foram observados dois sinais de dubleto para os grupos metílicos em  $\delta$  1.22 (H-10', J 6.0 Hz) e em  $\delta$  1.61 (H-13, J 1.0), sendo este último, resultante de um acoplamento em W com o hidrogênio H-11. Os sinais dos hidrogênios vinílicos foram detectados em  $\delta$  5.55 (d, J 1.0) e  $\delta$  5.27 (d, J 1.0), correspondendo ao grupo metilênico exocíclico H-1'a e H-1'b, respectivamente. Adicionalmente, foram observados os sinais para os hidrogênios do anel  $\delta$ -lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado em  $\delta$  6.63 (d, 10 Hz, H-1) e  $\delta$  6.0 (d, 10 Hz, H-2). O experimento de HMBC (Ap. 2.15.7) detectou acoplamentos de longa distância dos hidrogênios metilênicos e olefínicos e as correlações observadas são mostradas na Figura 3.23, as quais foram decisivas para o posicionamento dos hidrogênios metilênicos exocíclicos e endocíclicos.

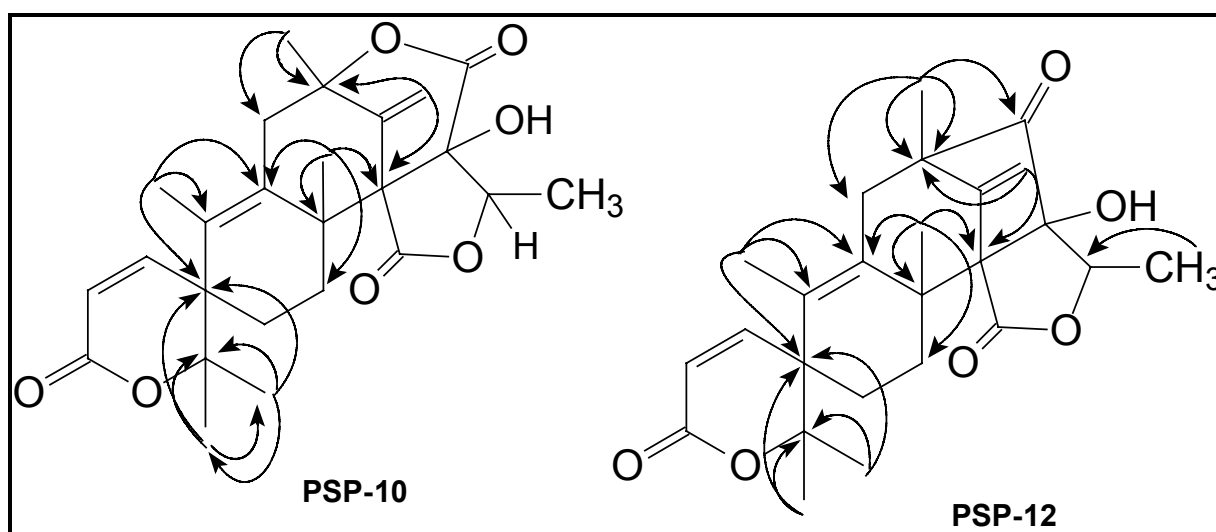


FIGURA 3.17– Correlações de HMBC detectadas para **PSP-10** e **PSP-12**.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Ap. 2.15.5) juntamente com os espectros de HSQC e HMBC (Ap. 2.15.6 e Ap. 2.15.7, respectivamente) permitiu uma atribuição precisa dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos de **PSP-10**, os quais são apresentados na Tabela 3.20. Esses espectros relatam a presença de seis carbonos olefínicos em  $\delta$  115.1 (C-1'), 119.6 (C-2), 132.2 (C-9), 133.8 (C-2'), 139.8 (C-10) e 146.9 (C-2). Os valores desses carbonos foram comparados com os dados literatura (HAYASHI *et al.*, 1994), apresentando concordância entre eles. Além disso, foi possível a confirmação da atribuição dos valores de deslocamentos químicos para os carbonos carbonílicos lactônicos, uma vez que os espectros não apresentaram uma boa resolução.

A confirmação final da estrutura foi possível com base nos experimentos de NOEs (NOESY e gNOESY, Figura 3.19, Ap. 2.15.8) observado para esse meroterpenóide. A irradiação de H-1 ( $\delta$  6.63) resultou em um acentuamento do dubleto em  $\delta$  6.0, o qual deve ser, portanto, o hidrogênio H-2, e dos sinais em  $\delta$  1.55 e  $\delta$  2.95, respectivos aos hidrogênios H-6 $\alpha$  ou  $\beta$  e H-7 $\alpha$  ou  $\beta$ . A irradiação do dubleto em  $\delta$  1.61 (H-13) resultou no acentuamento do hidrogênio em  $\delta$  3.15 (H-11), corroborando então para atribuir a configuração  $\alpha$  para esse hidrogênio. A correlação entre os hidrogênios H-12 ( $\delta$  1.31) com H-11 $\beta$  ( $\delta$  2.34) corroborou com essa suposição. A irradiação de H-9' em  $\delta$  1.60 resultou no acentuamento de H-1'a em  $\delta$  5.55, ao passo que H-1'b em  $\delta$  5.27 foi acentuado quando houve irradiação da metila H-12. A confirmação desses hidrogênios foi obtida após observar a correlação entre a metila H-10' com o hidrogênio vinílico H-1'a. Finalmente, a irradiação do grupo hidroxila em  $\delta$  3.49 conduziu a um acentuamento dos sinais em  $\delta$  1.22, 1.55 e 6.63, respectivos aos hidrogênios H-10', H-7 $\alpha$  e H-1, indicando que estes hidrogênios estão na mesma face da molécula. Estas correlações são apresentadas na Figura 3.20.

Estes dados indicaram que o meroterpeno **PSP-10** é um precursor dos outros meroterpenos relacionados a austina (**M-27**) e como ainda não foi relatado na literatura, recebeu a denominação de Austinolídeo.

Os dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.19, Ap. 2.16.3) e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.20, Ap. 2.16.5 e Ap. 2.16.6) para **PSP-12** mostraram-se similares com àqueles do meroterpeno **PSP-10** (Tabelas 3.19 e 3.20) exceto que em **PSP-12** os

deslocamentos dos hidrogênios vinílicos da dupla exocíclica em C-1' encontram-se mais próximos [ $\delta$  5.25 (s, H-1'a),  $\delta$  5.23 (s, H-1'b)]. Além disso, os sinais dos hidrogênios metilênicos encontram-se mais desblindados, absorvendo em  $\delta$  1.24 (3H-14), 1.28 (3H-10'), 1.30 (3H-9'), 1.37 (3H-15), 1.43 (3H-12) e 1.56 (3H-13).

A correta atribuição dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  desse meroterpeno só foi possível com o auxílio das técnicas de RMN 2D. O espectro de RMN  $^1\text{H}_x^1\text{H}$  COSY (Ap. 2.16.4) apresentou os acoplamentos entre os hidrogênios olefínicos da  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada em  $\delta$  6.58 (H-1) e 6.02 (H-2), com uma constante de acoplamento de 9.8 Hz para o dubleto observado. Adicionalmente, podem ser vistos os acoplamentos entre os hidrogênios H-6 e H-7, como também H-5' e 3H-10'. As correlações de longo alcance presentes no espectro de HMBC (Ap. 2.16.7) também corroboraram para a confirmação da estrutura por permitir a atribuição dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos quaternários. A correlação da metila vinílica em  $\delta$  1.56 (3H-13) com os sinais em  $\delta$  135.9 e 139.9, os quais foram atribuídos aos carbonos C-9 e C-10, respectivamente, foi observada. Os hidrogênios da metila em  $\delta$  1.43 (3H-12) apresentaram acoplamento a longa distância com os carbonos em  $\delta$  135.9 (C-9), 66.2 (C-7') e 40.8 (C-8).

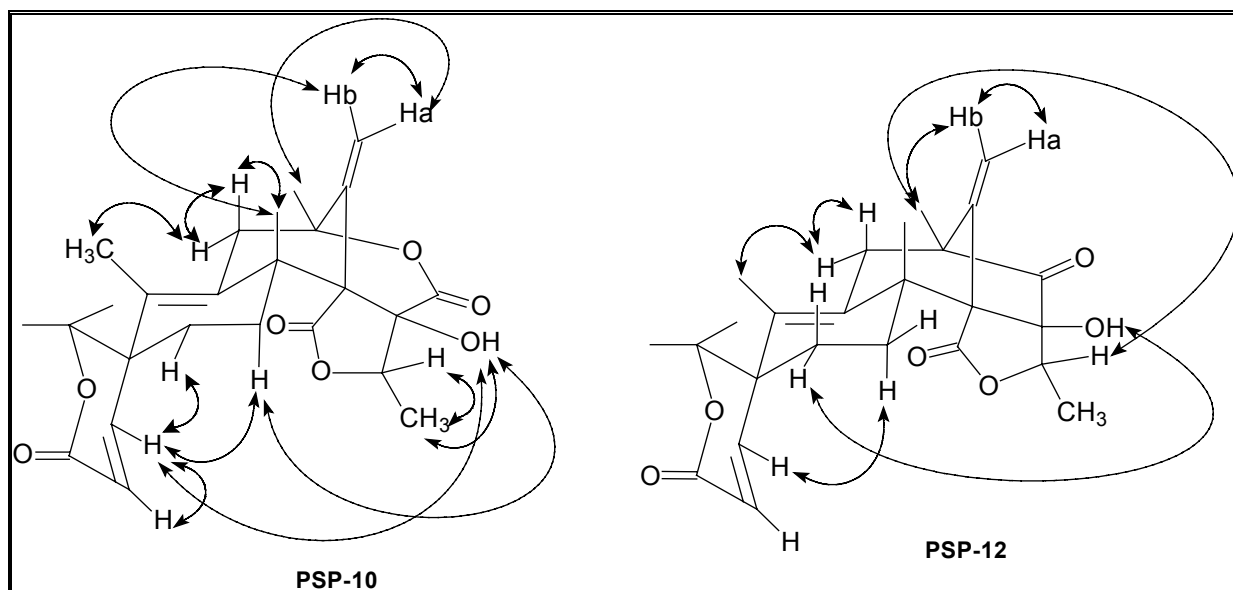


FIGURA 3.18 – Correlações espaciais sugeridas para **PSP-10** e **PSP-12**, baseados no espectro de NOESY e gNOESY.

A contribuição mais importante do espectro de HMBC foi a correlação do hidrogênio metilênico (3H-9') em  $\delta$  1.24 com os carbonos C-2', C-3', C-11 e com um sinal em  $\delta$  212.5, confirmando, portanto, a suposição de um grupo cetocarbonílico em C-4', diferindo este meroterpeno de **PSP-10** no qual tem-se uma carbonila lactônica. Esta e outras correlações podem ser visualizadas na Figura 3.19.

TABELA 3.19 – Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias descritas na literatura (**M-27**, **M-70**, **M-71** e **M-72**) e das substâncias isoladas **PSP-10** e **PSP-12** (400 MHz, clorofórmio).

|          | <b>M-27</b>                                | <b>M-70</b>                | <b>M-71</b>        | <b>M-72</b>  | <b>PSP-10</b>   | <b>PSP-12</b>   |
|----------|--|----------------------------|--------------------|--|---|---|
| 1        | 6.72 d (9.9)                               | 6.73 d (9.8)               | 6.82 d (9.9)       | 6.75 d<br>(10.0)   | 6.63 d<br>(10.0)  | 6.58 d (9.8)  |
| 2        | 6.11 d (9.9)                               | 5.98 d (9.8)               | 5.89 d (9.8)       | 6.13 d<br>(10.0)   | 6.00 d<br>(10.0)  | 6.02 d (9.8)  |
| 6        | *  | *                          | *                  | 4.89 dd<br>(13.1;3.9)  | $\alpha$ : 1.55 m<br>$\beta$ : 1.46 dd<br>(14.2; 3.6)                 | 1.62 m  |
| 7        | $\alpha$ : 3.21 ddd<br>(13.2;<br>13.2;3.0) | 3.28 m                     | *                  | 3.16 dd<br>(13.2;<br>13.1)<br>$\beta$ : 1.94 dd<br>(13.2;3.9)  | $\alpha$ : 2.95 td<br>(13.8; 3.6)<br>$\beta$ : 1.68 dt<br>(14.0; 3.6) | $\alpha$ : 2.57 td<br>(13.3; 4.8)<br>$\beta$ : 1.82 dt<br>(13.3; 4.8) |
| 11       | $\alpha$ : 6.03 s                          | $\alpha$ : 4.59 d<br>(5.5) | $\alpha$ : 5.63 s  | $\alpha$ : 3.18 d<br>(16.3)<br>$\beta$ : 2.38 dq<br>(16.3;1.6) | $\alpha$ : 3.15 d<br>(16.0)<br>$\beta$ : 2.34 dd<br>(16.0; 1.0)       | $\alpha$ : 2.88 d<br>(14.2)<br>$\beta$ : 2.27 dd<br>(14.2; 1.5)       |
| 12       | 1.19 s                                     | 1.27 s                     | 1.28 s             | 1.23 s   | 1.31 s  | 1.43 s  |
| 13       | 1.85 s                                     | 1.63 s                     | 5.73 t             | 1.66 d (1.6)   | 1.61 d (1.0)  | 1.56 d (1.5)  |
| 14       | 1.53 s                                     | 1.45 s                     | 1.40 s             | 1.43 s   | 1.18 s  | 1.24 s  |
| 15       | 1.38 s                                     | 1.39 s                     | 1.46 s             | 1.29 s   | 1.32 s  | 1.37 s  |
| 1'a      | 5.76 d (1.6)                               | 5.61 d (1.6)               | 6.13 d (1.8)       | 5.62 d (1.5)   | 5.55 d (1.0)  | 5.25 s  |
| 1'b      | 5.49 d (1.6)                               | 5.16 d (1.6)               | 5.87 d (1.8)       | 5.32 d (1.5)   | 5.27 d (1.0)  | 5.23 s  |
| 5'       | 4.46 q (6.5)                               | 4.41 q (6.6)               | 5.28 q (6.9)       | 4.37 q (6.3)   | 4.34 q (6.0)  | 4.28 q (6.4)  |
| 9'       | 1.61 s                                     | 1.57 s                     | 1.53 s             | 1.64 s   | 1.60 s  | 1.30 s  |
| 10'      | 1.29 d (6.5)                               | 1.13 d (6.6)               | 1.61 d (6.7)       | 1.26 d (6.3)   | 1.22 d (6.0)  | 1.28 d (6.4)  |
| OAc (11) | 2.02 s                                     | -                          | 1.99 s             | 1.97   | -   | -   |
| OAc (7)  | -  | -                          | -                  | -  | -   | -   |
| OH       | 4.19 s                                     | 5.77 d (5.5)               | -                  | 3.74   | 3.49 s  | 2.70 s  |
| Outros   | 1.5-1.8<br>(3H, m)                         | 1.5-1.9<br>(3H, m)         | 1.2-2.1<br>(4H, m) | -  | -   | -   |

TABELA 3.20 –Dados dos espectros de RMN <sup>13</sup>C das substâncias descritas na literatura (M-27, M-70, M-71 e M-72) e das substâncias isoladas PSP-10 e PSP-12 (50 MHz, Clorofórmio).

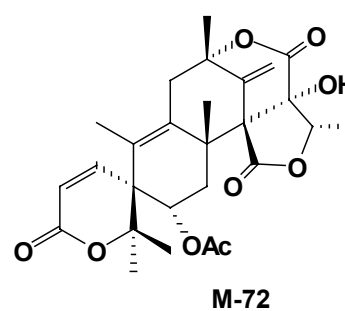
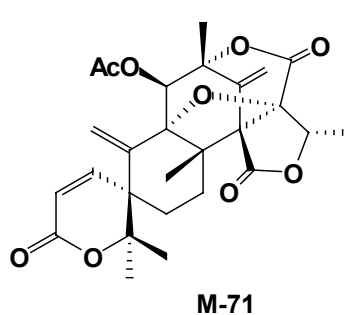
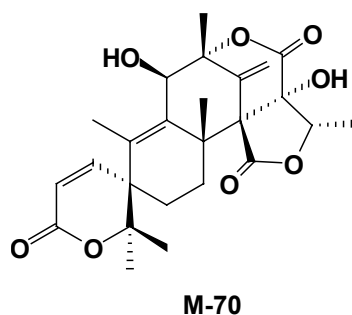
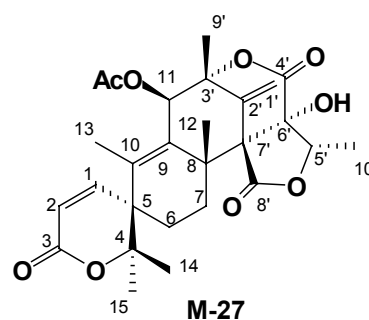
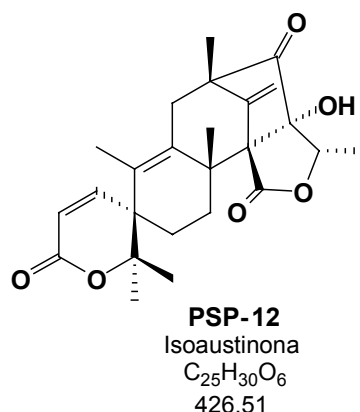
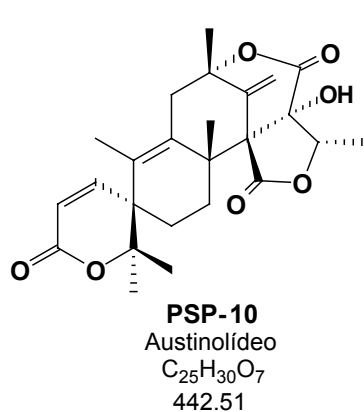
|                         | M-27    | M-70    | M-71    | M-72    | PSP-10          | PSP-12          |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|-----------------|-----------------|
| 1                       | 146.5 d | 147.9 s | 150.8 d | 144.5 d | 146.9 d         | 147.0 d         |
| 2                       | 120.2 d | 118.2 s | 115.9 d | 119.9 d | 119.6 d         | 119.2 d         |
| 3                       | 163.6 s | 163.7 s | 163.1 s | 163.7 s | nd <sup>1</sup> | nd <sup>1</sup> |
| 4                       | 85.5 s  | 85.6 s  | 86.0 s  | 85.6 s  | 85.9 s          | 85.9 s          |
| 5                       | 46.6 s  | 45.7 s  | 50.4 s  | 50.4 s  | 46.3 s          | 45.6 s          |
| 6                       | 27.0 t  | 26.1 t  | 27.0 t  | 70.3 d  | 28.4 t          | 26.9 t          |
| 7                       | 26.5 d  | 26.1 t  | 26.5 t  | 32.1 t  | 25.6 t          | 25.9 t          |
| 8                       | 42.1 s  | 41.4 s  | 44.0 s  | 42.4 s  | 41.7 s          | 40.8 s          |
| 9                       | 132.6 s | 135.6 s | 90.5 s  | 132.5 s | 132.2 s         | 139.9 s         |
| 10                      | 143.8 s | 138.3 s | 139.2 s | 138.9 s | 139.4 s         | 135.9 s         |
| 11                      | 74.7 d  | 73.5 d  | 74.1 d  | 42.0 t  | 41.8 t          | 42.4 t          |
| 12                      | 23.5 q  | 23.7 q  | 16.9 q  | 23.6 q  | 22.7 q          | 22.2 q          |
| 13                      | 15.4 q  | 13.9 q  | 125.4 t | 16.0 q  | 15.4 q          | 15.1 q          |
| 14                      | 22.4 q  | 22.7 q  | 23.7 q  | 23.7 q  | 22.9 q          | 23.1 q          |
| 15                      | 25.9 q  | 25.8 q  | 25.6 q  | 26.8 q  | 25.9 q          | 25.7 q          |
| 1'                      | 118.0 t | 115.9 t | 114.6 t | 115.6 t | 115.1 t         | 108.1 t         |
| 2'                      | 137.5 s | 137.7 s | 137.1 s | 134.0 s | 133.8 s         | 146.2 s         |
| 3'                      | 84.1 s  | 85.2 s  | 82.5 s  | 83.5 s  | 84.0 s          | 55.2 s          |
| 4'                      | 170.1 s | 168.9 s | 167.3 s | 170.7 s | 171.1 s         | 212.5 s         |
| 5'                      | 78.7 d  | 78.6 d  | 76.3 d  | 79.0 d  | 78.9 d          | 76.2 d          |
| 6'                      | 80.6 s  | 80.5 s  | 84.9 s  | 80.6 s  | 79.1 s          | 90.6 s          |
| 7'                      | 62.8 s  | 62.8 s  | 64.3 s  | 62.7 s  | 63.3 s          | 66.2 s          |
| 8'                      | 170.8 s | 171.4 s | 168.9 s | 170.8 s | nd <sup>1</sup> | 174.4 s         |
| 9'                      | 20.2 q  | 20.7 q  | 18.9 q  | 22.5 q  | 23.7 q          | 15.2 q          |
| 10'                     | 11.3 q  | 11.7 q  | 13.3 q  | 11.5 q  | 11.4 q          | 12.6 q          |
| CH <sub>3</sub> CO (11) | 168.4 s | -       | 168.3 s | 169.6 s | -               | -               |
| CH <sub>3</sub> CO (11) | 20.6 q  | -       | 20.6 q  | 21.4 q  | -               | -               |
| CH <sub>3</sub> CO (7)  | -       | -       | -       | -       | -               | -               |
| CH <sub>3</sub> CO (7)  | -       | -       | -       | -       | -               | -               |

<sup>1</sup> nd = não detectado

A estereoquímica (configuração relativa) de **PSP-12** foi estabelecida através do experimento de gNOESY (Figura 3.20, Ap. 2.16.8), como também através dos dados da literatura para meroterpenos relacionados (HAYASHI *et al.*, 1994). A

irradiação de  $^1\text{H}$  resultou em um acentuamento do sinal em  $\delta$  2.57 o qual deve ser o hidrogênio H-7 $\alpha$ . A irradiação do dubleto em  $\delta$  1.56 (3H-13) produziu um acentuamento do hidrogênio diastereotópico H-11 em  $\delta$  2.88, sugerindo a configuração  $\alpha$ . A irradiação da metila 3H-9' em  $\delta$  1.24 resultou em um acentuamento do quarteto em  $\delta$  4.28 (H-5), indicando que ambos estão na mesma face da molécula. Conseqüentemente, a metila em  $\delta$  1.29 (3H-10') encontra-se na face oposta.

Estes dados indicam que o meroterpeno (**PSP-12**) é um precursor ciclopentanona dos outros meroterpenóides  $\delta$ -lactonas, e, conforme levantamento bibliográfico realizado, **PSP-12** não foi relatado, sendo, portanto uma estrutura inédita e nomeada de Isoaustinona.



#### 4.2.6.6. Identificação dos Meroterpenos PSP-3, PSP-6 e PSP-8

A substância **PSP-3**, de fórmula molecular C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub> foi detectada no espectro de massas, obtido por ionização por *electrospray* no modo positivo com energia de colisão de 25 eV, sob a forma do íon [M+H]<sup>+</sup> em m/z 557. Os fragmentos que caracterizam essa substância podem ser vistos no espectro de massas dos íons filhos de 557 (Ap. 2.17.1) e as propostas de fragmentação são apresentadas no Esquema 3.8. O espectro de infravermelho (Ap. 2.17.2) indicou a ausência dos grupos hidroxila presentes na austina (**M-27**) (SCOTT *et al.*, 1986) e mostrou fortes absorções resultantes das deformações axiais da ligação carbono-oxigênio de carbonilas em 1776, 1757, 1740 e 1722 cm<sup>-1</sup>.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-3** (Ap. 2.17.3, Tabela 3.21) analisados com o auxílio de dados de RMN 2D [<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H COSY (Ap. 2.17.4), HMBC (Figura 3.19, Ap. 2.17.8)], mostrou a presença de quatro sinais de singletos para grupos metilas terciárias em δ 1.41; 1.42; 1.48 e 1.57, os quais correspondem, respectivamente, aos hidrogênios 3H-14, 3H-12, 3H-15 e 3H-9' e de um dubleto para um grupo metila em δ 1.67 (3H-10') resultante de um acoplamento com o próton carbinólico em δ 5.25 (H-5', J = 7.0 Hz). Adicionalmente, também foram observados os sinais de hidrogênios vinílicos para dois metilenos exocíclicos presentes na estrutura [H-13a em δ 5.82 (d, J = 2.1 Hz) e H-13b em δ 6.14 (d, J = 2.1 Hz); H-1'a em δ 5.73 (s) e H-1'b em δ 6.13 (s)]. Também foram observados os sinais dos hidrogênios da δ-lactona α,β-insaturada [δ 6.96 (d, J = 10.0 Hz, H-1) e δ 5.94 (d, J = 10.0 Hz, H-2)]. O experimento de detecção à longa distância, HMBC (Figura 3.19, Ap. 2.17.8) detectou a correlação de longo alcance do hidrogênio H-13 com os carbonos C-5 e C-10 e de H-1' com os carbonos C-2', C-3' e C-7'. Essas e outras correlações apresentadas na Figura 3.19 foram decisivas para o posicionamento dos dois grupos metileno exocíclicos, os quais esclareceram os dados publicados na literatura (HAYASHI *et al.*, 1994).

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C (Ap. 2.17.5, Tabela 3.21) e HSQC (Ap. 2.17.7) mostraram a presença dos dois grupos acetoxi em δ 168.4 e 170.6 (C=O), respectivamente ligadas nos carbonos C-11 e C-7. O grupo acetoxi no carbono C-7 é confirmado pela presença de correlações do carbono carbinólico C-7 com os

hidrogênios em H-6 e H-12. O H-7 em  $\delta$  5.37 apresenta como ressonância um duplo dubleto com valores de J de 11.8 e 4.0 Hz, conseqüentes dos acoplamentos com os hidrogênios H-6 $\beta$  e H-6 $\alpha$ , respectivamente (COSY, Ap. 2.17.4) e mostra correlações a longa distância com os carbonos C-5, C-8, C-12 e C-9. A multiplicidade desses hidrogênios e o NOE observado entre H-7 e H-2 (Figura 3.20, Ap. 2.17.9) confirmou o grupo acetil em C-7 na configuração  $\beta$ .

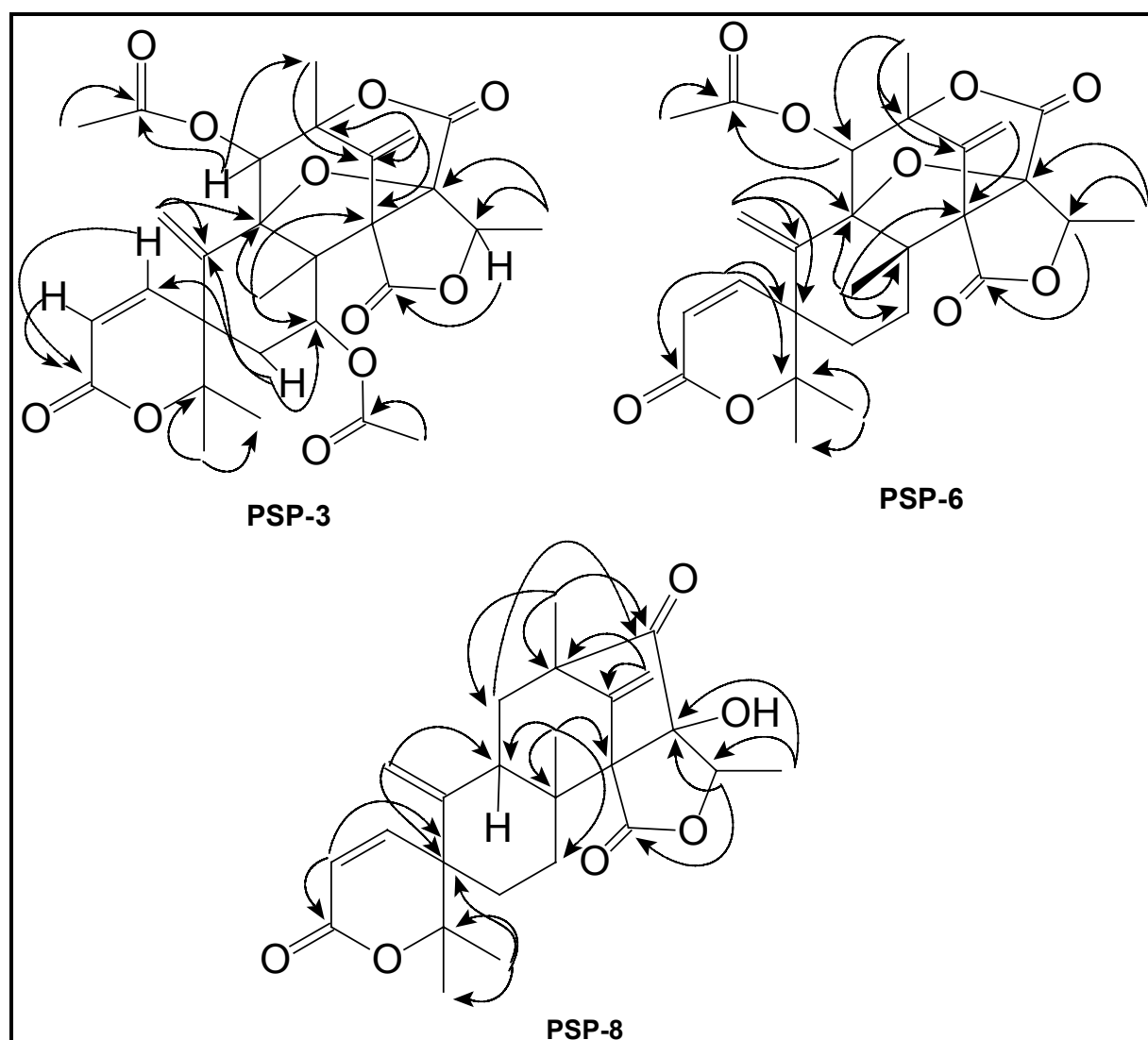


FIGURA 3.19 – Correlações de HMBC detectadas para **PSP-3**, **PSP-6** e **PSP-8**.



Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do meroterpeno **PSP-3** foram então comparados com os dados publicados na literatura para os meroterpenos derivados da austina, os quais são produzidos por *Penicillium diversum* e *Aspergillus ustus* (HAYASHI *et al.*, 1994). Os dados obtidos para **PSP-3** são muito similares aos obtidos para a acetoxidehidroaustina de acordo com HAYASHI *et al.*, 1994. Conseqüentemente a substância isolada (**PSP-3**) de *Penicillium* sp corresponde a 7- $\beta$  acetoxidehidroaustina, representando o primeiro meroterpeno diacetato pertencente à classe da austina. Por se tratar de substâncias de complexidade estrutural relativamente alta, esses meroterpenos descritos na literatura foram identificados através de análises por raios-X (SIMPSON *et al.*, 1982). Contudo os dados de RMN utilizados para a confirmação da identidade dos meroterpenos acetoxi-dehidroaustina e dehidroaustina não foram cuidadosamente estudados. O isolamento desses metabólitos nos extratos de *Penicillium* sp e o estudo dos dados espectrais, especialmente RMN 2D, obtidos para os mesmos foram extremamente úteis para a correta atribuição dos valores de deslocamento químico para essas substâncias.

A substância **PSP-6**, de fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_9$  determinada por espectrometria de massas obtida por APCI no modo positivo de ionização (Ap. 2.18.1.), e por comparação com o espectro na região do infravermelho (Ap. 2.18.2) e com os dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.21) da dehidroaustina (**M-71**) (HAYASHI *et al.*, 1994), indicou uma similaridade significativa entre esses dois compostos. A presença do anel  $\delta$ -lactônico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado no anel A pode ser confirmada através dos sinais dos deslocamentos químicos dos prótons *cis*-vinílicos em  $\delta$  6.83 (d, J = 10.0 Hz) e 5.89 (d, J = 10.0 Hz), respectivamente relacionados aos hidrogênios H-1 e H-2, os quais apresentaram uma correlação a longa distância (HMBC, Figura 3.19, Ap. 2.18.8) com o sinal da carbonila em  $\delta$  163.0.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Ap. 2.18.3) são encontrados os deslocamentos químicos das metilas quaternárias em  $\delta$  1.31, 1.43, 1.50 e 1.57, todos singletos respectivos aos hidrogênios 3H-12, 3H-14, 3H-15 e 3H-9'. O sinal da metila em  $\delta$  1.65 aparece como um dubleto resultante do acoplamento com um próton carbinólico bastante desblindado em  $\delta$  5.29 (q) com valor da constante de 7.0 Hz. Os sinais dos deslocamentos dos hidrogênios olefinicos em  $\delta$  5.74 (d, 2) e 6.14 (d, 2) para o 2H-13 e

em  $\delta$  5.65 (sl) e 5.87 (sl) para 2H-1', foram confirmados através das correlações a longa distância de H-13 com os carbonos C-5, C-9 e C-10 e de H-1' com o carbono C-7' observados no espectro de HMBC (Ap. 2.18.8).

A estereoquímica de **PSP-6** foi atribuída pela técnica NOESY (Ap. 2.18.9) e a estrutura 3D foi sugerida (Figura 3.20), sendo consistente com os dados publicados por HAYASHI *et al.* (1994).

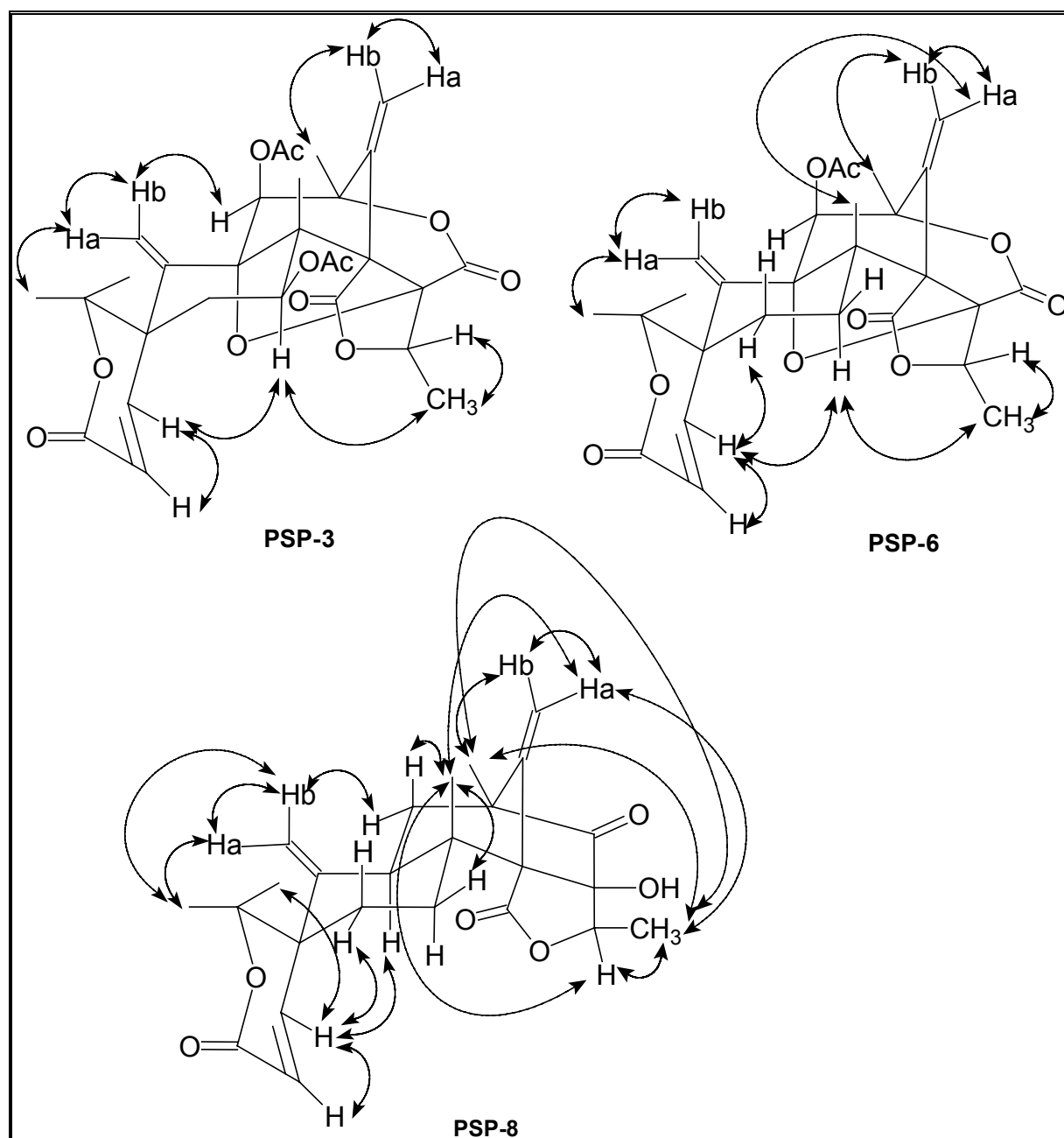
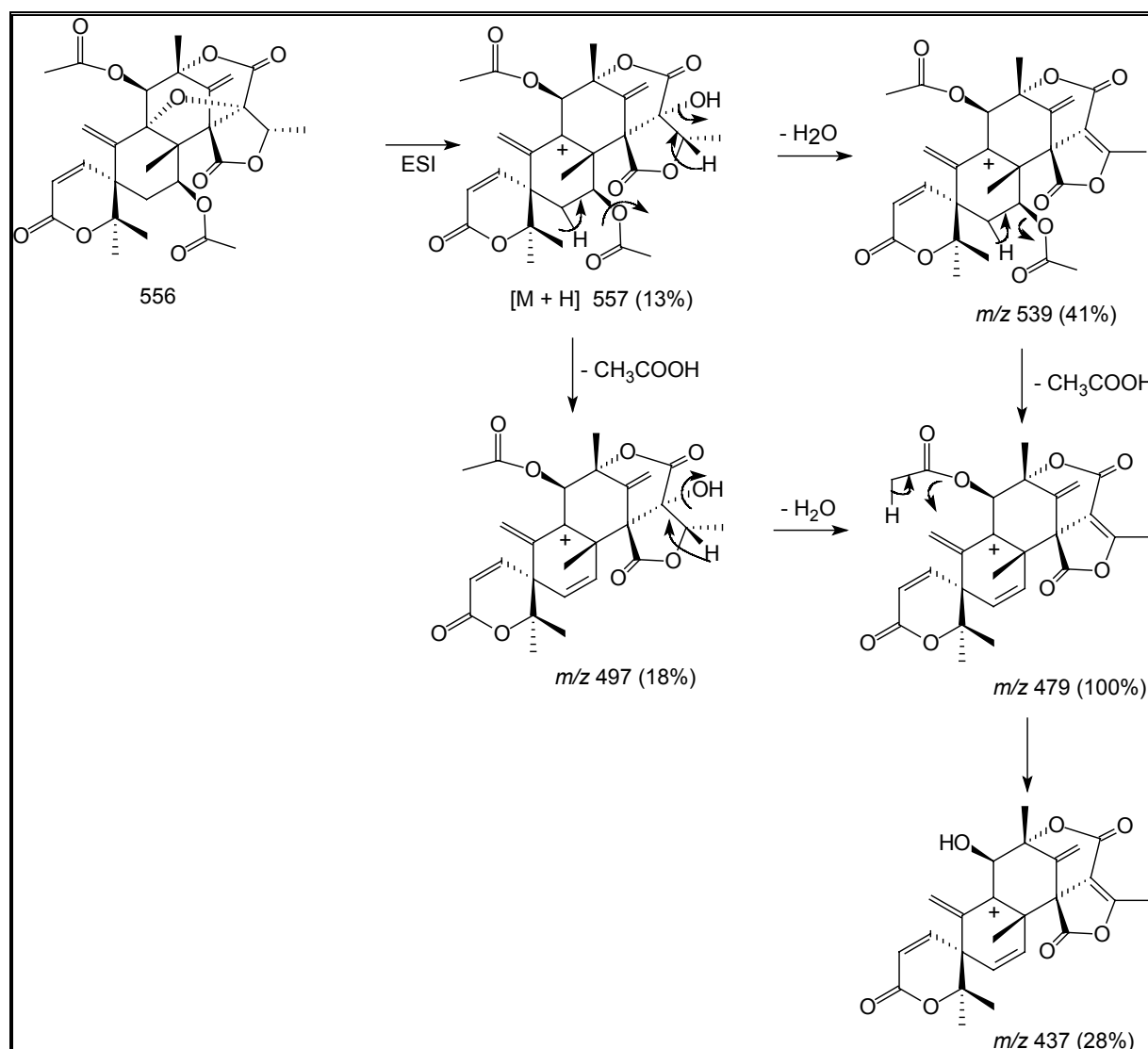


FIGURA 3.20 – Correlações espaciais sugeridas para **PSP-3**, **PSP-6** e **PSP-8**, baseados no espectro de NOEDIFF.



ESQUEMA 3.8– Principais fragmentações de **PSP-3**, obtido via APCI/MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

O meroterpeno **PSP-8**, exibiu um pico de  $[M+H]^+$  em  $m/z$  426 no espectro de massas (Ap. 2.19.1) do qual foi deduzida a fórmula molecular  $C_{25}H_{30}O_6$ . O espectro na região do infravermelho (Ap. 2.19.2) indicou a presença do grupo hidroxila em  $3411\text{ cm}^{-1}$ , das carbonilas dos anéis  $\gamma$ -lactona e ciclopentanona em  $1772$  e  $1753\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, e da presença do anel  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado em  $1686\text{ cm}^{-1}$ .

TABELA 3.21 – Dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) para os meroterpenos PSP-3, PSP-6 e PSP-8.

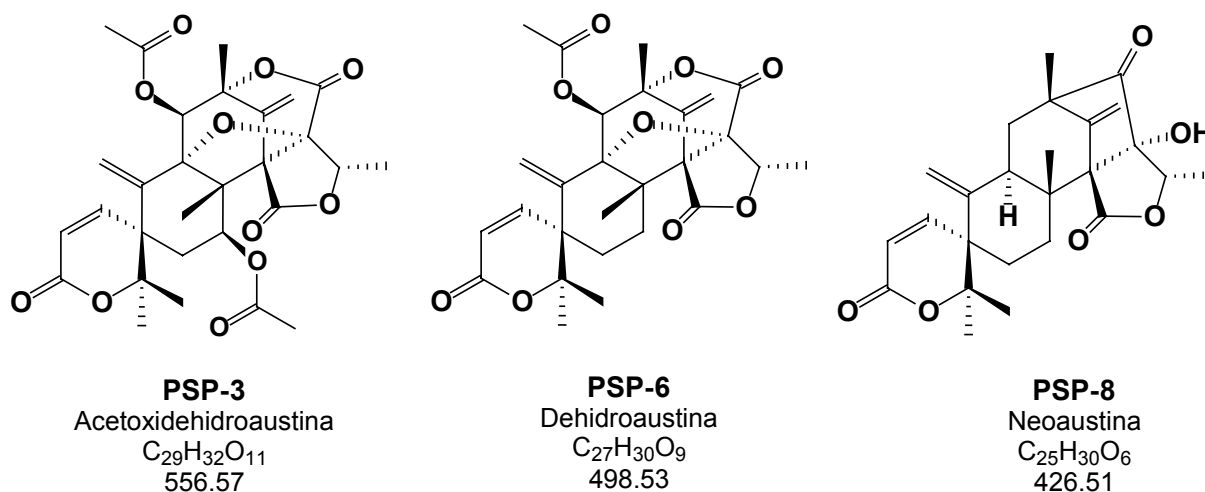
| Posição                    | PSP-3   |  | PSP-6   |  | PSP-8   |  |
|----------------------------|---------|--|---------|--|---------|--|
|                            | C       | H  | C       | H                                      | C       | H                                      |
| 1                          | 150.8 d | 6.96 d (10.0)                                      | 151.0 d | 6.83 d (10.0)                          | 152.2 d | 7.14 d (10.0)                          |
| 2                          | 116.4 d | 5.94 d (10.0)                                      | 115.9 d | 5.89 d (10.0)                          | 118.6 d | 5.88 d (10.0)                          |
| 3                          | 163.1 s | -  | 163.0 s | -                                      | 164.8 s | -                                      |
| 4                          | 85.7 s  | -  | 86.2 s  | -                                      | 86.6 s  | -                                      |
| 5                          | 45.6 s  | -  | 44.2 s  | -                                      | 49.9 s  | -                                      |
| 6                          | 32.2 t  | α: 1.94 dd<br>(14.0; 10.0)<br>β: 1.74 dl<br>(12.0) | 26.9 t  | α: 1.72 m<br>β: 1.78 dd<br>(14.0; 4.0) | 27.1 t  | α: 2.92 m<br>β: 1.73 m                 |
| 7                          | 67.3 d  | α: 5.37 dd<br>(12.0; 4.0)                          | 27.0 t  | α: 2.13 dd<br>(14.0; 4.0)<br>β: 1.37 m | 27.6 t  | α: 1.58 dd<br>(14.0; 5.0)<br>β: 1.78 m |
| 8                          | 55.1 s  | -  | 50.7 s  | -                                      | 42.3 s  | -                                      |
| 9                          | 92.2 s  | -  | 90.6 s  | -                                      | 40.5 d  | α: 2.90 m                              |
| 10                         | 138.3 s | -  | 139.1 s | -                                      | 146.7 s | -                                      |
| 11                         | 74.1 d  | α: 5.75 s  | 74.1 d  | α = 5.74 s                             | 42.6 t  | α: 1.67 m<br>β: 1.77 m                 |
| 12                         | 12.2 q  | 1.42 s   | 17.1 q  | 1.31 s                                 | 15.1 q  | 1.08 s                                 |
| 13                         | 126.5 t | a: 6.14 d (2.0)<br>b: 5.82 d (2.0)                 | 125.6 t | a: 6.14 d (2.0)<br>b: 5.74 d (2.0)     | 111.6 t | a: 5.52 s<br>b: 4.63 s                 |
| 14                         | 25.8 q  | 1.48 s   | 25.7 q  | 1.50 s                                 | 23.3 q  | 1.70 s                                 |
| 15                         | 23.9 q  | 1.41 s   | 23.8 q  | 1.43 s                                 | 25.9 q  | 1.46 s                                 |
| 1'                         | 116.7 t | a: 6.13 s<br>b: 5.73 s                             | 114.9 t | a: 5.87 sl<br>b: 5.65 sl               | 108.7 t | a: 5.20 s<br>b: 5.15 s                 |
| 2'                         | 136.9 s |  | 137.4 s |  | 148.4 s | -                                      |
| 3'                         | 82.3 s  |  | 82.8 s  |  | 55.9 s  | -                                      |
| 4'                         | 168.8 s |  | 170.7 s |  | 215.0 s | -                                      |
| 5'                         | 76.2 d  | 5.25 q   | 76.5 d  | 5.29 q (7.0)                           | 85.1 d  | 4.56 q (7.0)                           |
| 6'                         | 84.7 s  |  | 85.1 s  |  | 90.6 s  | -                                      |
| 7'                         | 61.5 s  |  | 64.5 s  |  | 65.1 s  | -                                      |
| 8'                         | 167.1 s |  | 168.8 s |  | 173.5 s | -                                      |
| 9'                         | 19.3 q  | 1.57 s   | 19.1 q  | 1.57 s                                 | 15.9 q  | 1.24 s                                 |
| 10'                        | 13.2 q  | 1.67 d (7.0)                                       | 13.5 q  | 1.65 d (7.0)                           | 18.2 q  | 1.18 d (7.0)                           |
| CH <sub>3</sub> CO<br>(11) | 168.4 s | -  | 168.8 s | -                                      | -       | -                                      |
| CH <sub>3</sub> CO<br>(11) | 20.6 q  | 2.04 s   | 20.8 q  | 2.03 s                                 | -       | -                                      |
| CH <sub>3</sub> CO (7)     | 170.6 s | -  | -       | -                                      | -       | -                                      |
| CH <sub>3</sub> CO (7)     | 20.8 q  | 2.09 s   | -       | -                                      | -       | -                                      |
| CH <sub>3</sub> CO (8')    | -       | -  | -       | -                                      | -       | -                                      |
| OH                         | -       | -  | -       | -                                      | -       | 3.9 sl                                 |

Os dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Ap. 2.19.3, Tabela 3.21) e  $^{13}\text{C}$  (Ap. 2.19.5, Tabela 3.21) para **PSP-8** mostraram-se similares aos observados para o meroterpeno **PSP-3** exceto que **PSP-8** não exibe os sinais para os grupos acetil. Contrariamente, esta substância contém três sinais de carbonos metilênicos [ $\delta$  27.1 (C-6), 27.6 (C-7) e 42.6 (C-11)]. Adicionalmente, a presença de um carbono metínico ( $\delta$  40.5, C-9) juntamente com a diminuição do grau de insaturação (dupla ligação equivalente) quando comparado com **PSP-3** (14 para **PSP-3** e 11 para **PSP-8**), indicou que o éter tetrahidrofurano encontra-se aberto na substância **PSP-8**. Finalmente, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou um sinal para o grupo cetocarbonílico detectado em  $\delta$  215.0 o qual apresenta correlações com os hidrogênios 3H-9' e 2H-11 no espectro de HMBC (Figura 3.19, Ap. 2.19.7). Pode ser observado também o sinal para C-3' detectado em  $\delta$  55.9.

A confirmação final da estrutura foi definida pelos acoplamentos de longo alcance detectados no espectro de HMBC e também dos experimentos de NOEs (Ap. 2.19.8) observados para **PSP-8**. Essas correlações são sumarizadas nas Figura 3.20. As atribuições das configurações das metilas, dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos e dos hidrogênios vinílicos foram obtidos dos resultados dos estudos de NOE diferenciais. A irradiação de H-1 resultou em um acentuamento do sinal em  $\delta$  5.88 ppm o qual deve ser o hidrogênio H-2 e dos multipletos em  $\delta$  2.9 correspondendo aos hidrogênios H-6 e H-9 enquanto que o singlete em  $\delta$  5.52 mostrou correlações espaciais com o hidrogênio diastereotópico H-13b, o hidrogênio vinílico em  $\delta$  4.63 e também os hidrogênios da metila em  $\delta$  1.70 e, portanto, estes dois sinais foram atribuídos como H-13a, b e H-14 $\beta$ , onde a irradiação dos hidrogênios vinílicos em  $\delta$  4.63 resultou em um acentuamento do hidrogênio H-11 $\alpha$ . Estes resultados foram consistentes com as atribuições dos sinais em 5.52 e 4.63 para os hidrogênios vinílicos 13a e 13b, respectivamente. A irradiação em  $\delta$  5.2 alterou os sinais de 3H-12, 3H-9' e 3H-10'. A irradiação do sinal de metila em 1.70 ppm corrobora com a atribuição para os sinais dos hidrogênios 3H-13 e 3H-15 e a irradiação da metila em 1.24 ppm (H-9') e 1.19 ppm (H-10') causou um acentuamento dos sinais de H-1'b e H-5', respectivamente em 5.15 e 4.56 ppm. Finalmente a irradiação de 3H-12 resultou em um acentuamento do sinal atribuído para H-1a, H-11 $\beta$  e H-7 $\beta$ , respectivamente em

5.2, 1.77 e 1.78 ppm. Estes resultados estão sumarizados na Figura 3.20, e indicam como os valores de NOEs permitem propor a relação espacial dos hidrogênios nas duas faces da molécula estudada.

Estes dados indicam que este meroterpeno é um precursor ciclopentanona dos outros meroterpenoides  $\delta$ -lactonas. De acordo com a comparação dos dados da literatura (HAYASHI *et al.*, 1994), o meroterpeno **PSP-8** é denominado de neoaustina e os dados obtidos por RMN 2D corroboraram para as atribuições de alguns sinais de deslocamentos químicos inconsistentes. Entretanto, a estereoquímica  $\beta$  foi atribuída para o carbono C-10' através do experimento de raios-X (HAYASHI *et al.*, 1994). Os dados encontrados nos experimentos de NOE sugerem a configuração  $\alpha$  para este carbono uma vez que a irradiação da metila 3H-12 em  $\delta$  1.08 produziu um acentuamento do quadrupeto em  $\delta$  4.56 (H-5'), sugerindo que ambos estão na mesma face da molécula (*beta*). Analisando a estrutura determinada por raios-X e a proposta biossintética para essa classe de substâncias é possível que tenha havido alguma confusão na interpretação desses dados, uma vez que os carbonos C-10' encontra-se na configuração *alfa* em todos os metabólitos isolados.



## 5. CONCLUSÕES

Embora não realizado o estudo dos extratos de *Fusarium moniliforme* cultivado em meio sólido (arroz e milho), os resultados apresentados no cultivo deste microrganismo em meio líquido mostraram uma produção significativa dos depsidipeptídeos **FM-1** e **FM-2**, os quais conforme levantamento bibliográfico possuem ampla atividade biológica dependendo de sua estereoquímica. Além disso, foram encontrados, o esteróide peróxido de ergosterol, ácidos graxos e triglicerídeos em grande quantidade. Ainda foi detectada a presença de pigmentos os quais não foram estudados, mas que aparentemente são interessantes devido à mudança de coloração com a alteração do pH (pH ácido, coloração rosa intenso e pH básico, coloração violeta intenso).

O cultivo de *Penicillium* sp em arroz mostrou que esse substrato é ideal para a pesquisa de meroterpenos. A metodologia de extração e obtenção das frações foi adequada para o posterior isolamento dessas substâncias. Nos extratos obtidos do arroz ainda foram detectados açúcares (em grande quantidade no extrato PR-1), alcalóides e lignanas.

O meio Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura levou a produção, por *Penicillium* sp, de outros metabólitos como o alcalóide verruculogenina (**PSP-5**), nucleosídeos (**PSP-14**), açúcares, cerebrosidas, peróxido de ergosterol (em quantidades bem pequenas). Contudo, esse meio não é adequado para que esse microrganismo produza os meroterpenos, uma vez que foram detectados apenas dois deles (**PSP-3** e **PSP-8**).

A observação dos espectros de RMN <sup>1</sup>H dos extratos e frações de *Penicillium* sp quando cultivado em milho revelou que esse microrganismo é capaz de produzir meroterpenos, como também o alcalóide **PSP-5** e o ácido enicílico, **PSP-7**. Quando crescido nesse meio, o fungo também produz uma grande quantidade de óleos, açúcares e pigmentos.

Causou muita curiosidade a ausência de isolamento de esteróides, principalmente os esteróides comuns em fungos (ergosterol e peróxido de ergosterol) nos extratos obtidos quando este microrganismo foi cultivado em meio sólido.

O alcalóide verruculogenina (**PSP-5**) foi isolado em grandes quantidades e em todos os meios de cultivo utilizados, sugerindo que esse metabólito poderia funcionar como um marcador quimiosistemático para esse fungo ou pelo menos pelo gênero *Penicillium*. Um outro marcador poderia ser a substância **PSP-7**, uma micotoxina encontrada também em todos os cultivos, o que dificultou, em partes, o isolamento dos outros metabólitos, principalmente os meroterpenos.



# CAPÍTULO 4: ESTUDOS BIOGENÉTICOS DOS MEROTERPENOS

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Meroterpenos

#### 1.1.1. Aspectos Gerais

O termo “meroterpenóide” ou “meroterpeno” foi aplicado pela primeira vez por CORNFORTH em 1968 para descrever os metabólitos secundários que tinham uma biogênese mista, com uma parte de origem terpenóide. Os meroterpenos vêm sendo isolados de uma grande variedade de espécies de fungos e organismos marinhos e, neste grupo de produtos naturais, encontra-se uma diversidade estrutural significativa, desde meroterpenos simples até os mais complexos, os quais são originados de uma série de modificações durante a sua biogênese.

Os meroterpenos mostrados na Figura 4.1 são representantes dos mais diversos esqueletos utilizados em suas biogêneses. Alguns deles apresentam alguma atividade biológica, como por exemplo, o meroterpeno citotóxico montadial A (**M-1**), isolado do fungo *Bondarzewia montana*; **M-1**, contém apenas uma unidade prenila ligada a um derivado fenólico (SONTAG *et al.*, 1999).

Precusores biossintéticos derivados de duas unidades prenilas podem estar associados a grupos aril-substituídos, como é o caso do agente psicoativo  $\Delta^9$  – tetrahydrocannabinol (**M-2**) em plantas do gênero *Cannabis* (ASHTON, 2001), ou a naftoquinonas, formando os meroterpenos do grupo das cordiaquinonas (**M-3 a M-8**), encontrados nas raízes de *Cordia linnaei* (IOSET *et al.*, 1998).

Os exemplos mais comuns de meroterpenos são aqueles originários do precursor biossintético farnesila, incluindo os mais simples, onde a cadeia farnesila permanece inalterada como é o caso da grifolina (**M-9**) (GOTO *et al.*, 1963), ou ainda quando ocorre ciclização e modificação como na sicanina (**M-10**) (HIRAI *et al.*, 1964). Um outro exemplo é o ácido micofenólico (**M-11**) isolado de *Penicillium brevicompactum*. O núcleo aromático (5,7-dihidroxi-4-metilftalídeo) dessa substância contém uma cadeia lateral derivada da clivagem que ocorre com o intermediário

farnesil-ftalídeo durante a biossíntese (BIRCH *et al.*, 1958). Outros meroterpenos mais complexos passam por um extenso metabolismo oxidativo, como é o caso dos metabólitos austalídeo (**M-12**) isolado de *Aspergillus ustus* (JESUS *et al.*, 1983), citreohidridonas e derivados (**M-13** a **M-25**) isolados de espécies do género *Penicillium* com potente atividade inseticida (inibidora da alimentação) (KOSEMURA *et al.*, 1996; KOSEMURA, 2002). Neste grupo encontram-se também os meroterpenos isolados de espécies do género *Aspergillus* como a andibenina (**M-26**) (DUNN *et al.*, 1976), austina (**M-27**) (CHEXAL *et al.*, 1976), anditomina (**M-28**) (SIMPSON e WALKINSHAW, 1981), terretonina (**M-29**) (MCINTYRE *et al.*, 1989) e terreulactona (**M-30**), sendo este último, uma lactona sesquiterpênica inibidora da acetilcolinesterase isolada de *Aspergillus terreus* (KIM *et al.*, 2002).

Substâncias pertencentes à classe das cacosponginas (**M-31** a **M-33**) isoladas de esponjas marinhas do género *Cacospongia* tem sua origem a partir do precursor geranil com um grupo fenólico (TASDEMIR *et al.*, 2000). Adicionalmente, as substâncias usneoidol *Z* e *E* (**M-34** e **M-35**) são meroterpenóides tetrapreniltoluquinóis encontrados em algas do género *Cystoseira usneoides*, os quais apresentam atividades antivirais e antitumorais (URONES *et al.*, 1992).

Poucos estudos dos caminhos biossintéticos conduzindo a estes compostos tem sido realizados. A aplicação de métodos de marcação isotópica utilizando precursores duplamente marcados contribuiu para o entendimento do caminho biossintético dessas substâncias. Estudos de precursores <sup>13</sup>C duplamente marcados para meroterpenos de origem policetílica-terpenoil (**M-26** a **M-29**) forneceram informações sobre o modo de união, ciclização e rearranjos dos esqueletos carbônicos desses policetídeos e terpenóides (SIMPSON, 1998). Adicionalmente, outros precursores marcados como <sup>2</sup>H e <sup>18</sup>O foram associados, fornecendo assim, detalhes sobre as modificações oxidativas e redutivas ocorridas durante os estágios da biogênese.

De modo geral, os vários métodos isotópicos utilizados para compreender os caminhos biossintéticos de um metabólito secundário têm por finalidade: a) traçar o curso da biossíntese e outros arranjos; b) determinar a origem biossintética dos átomos de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio; e c) estabelecer, através

de métodos indiretos, os níveis de oxidação dos intermediários envolvidos na biossíntese (SIMPSON, 1998).

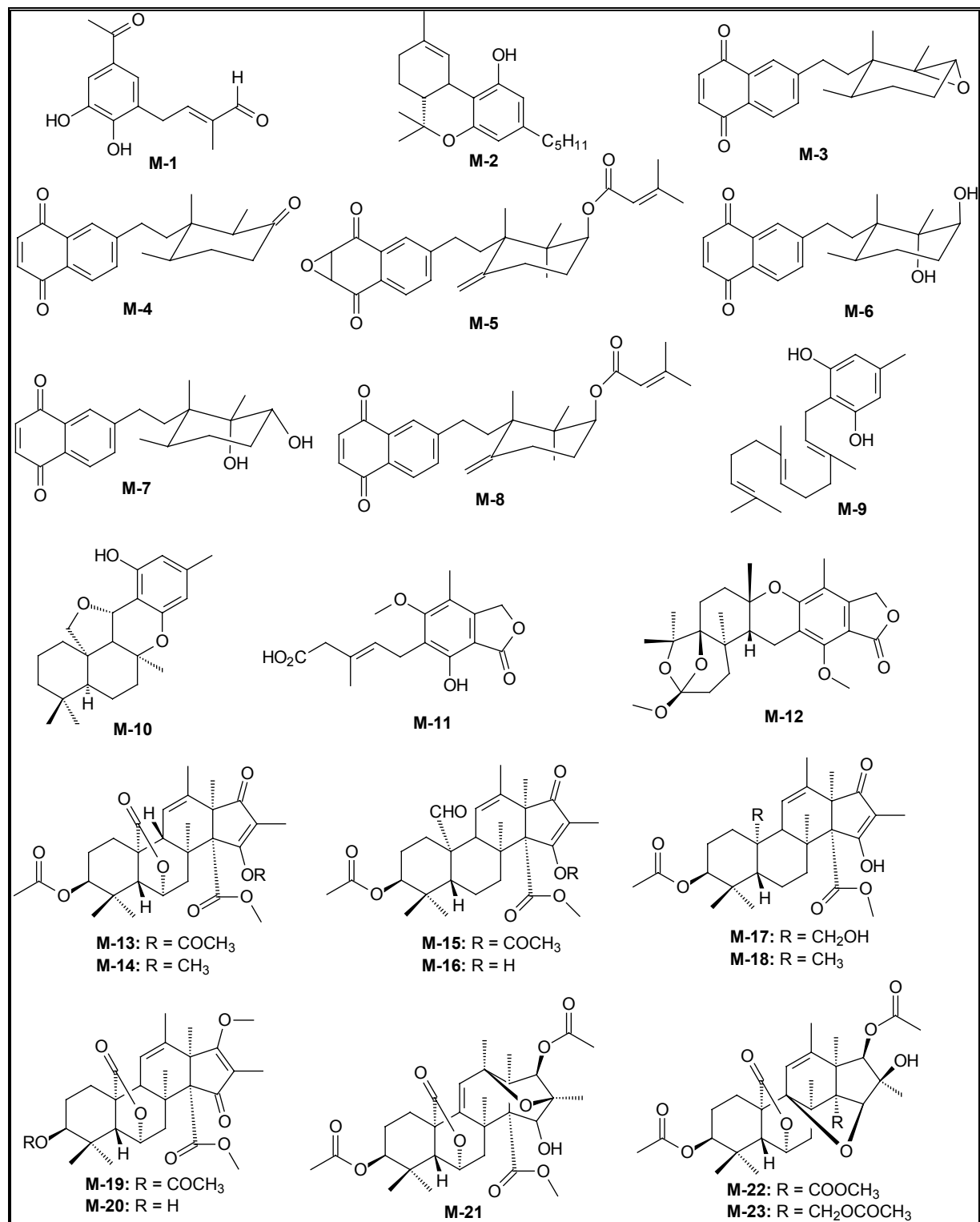


FIGURA 4.1 – Exemplos de metabólitos meroterpenoídicos.

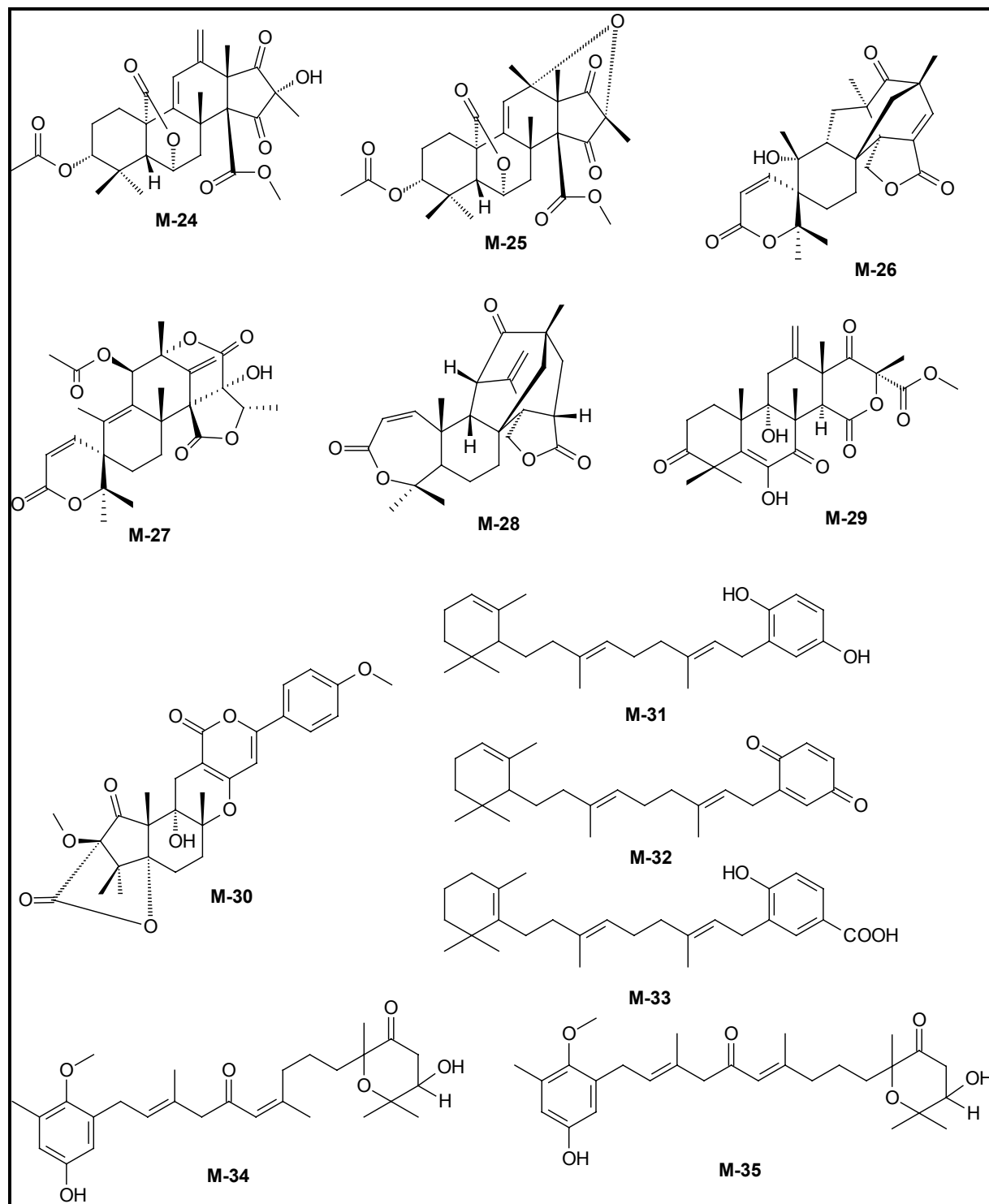
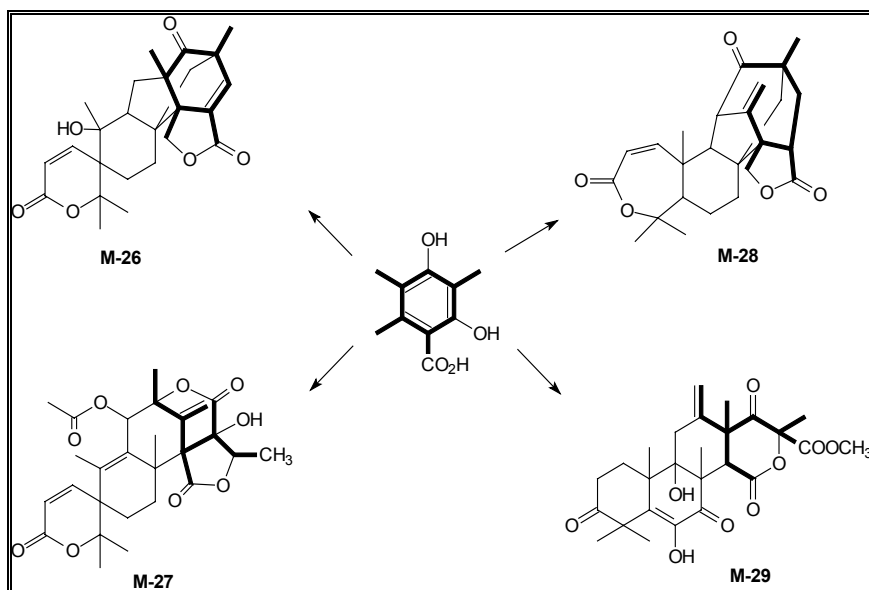


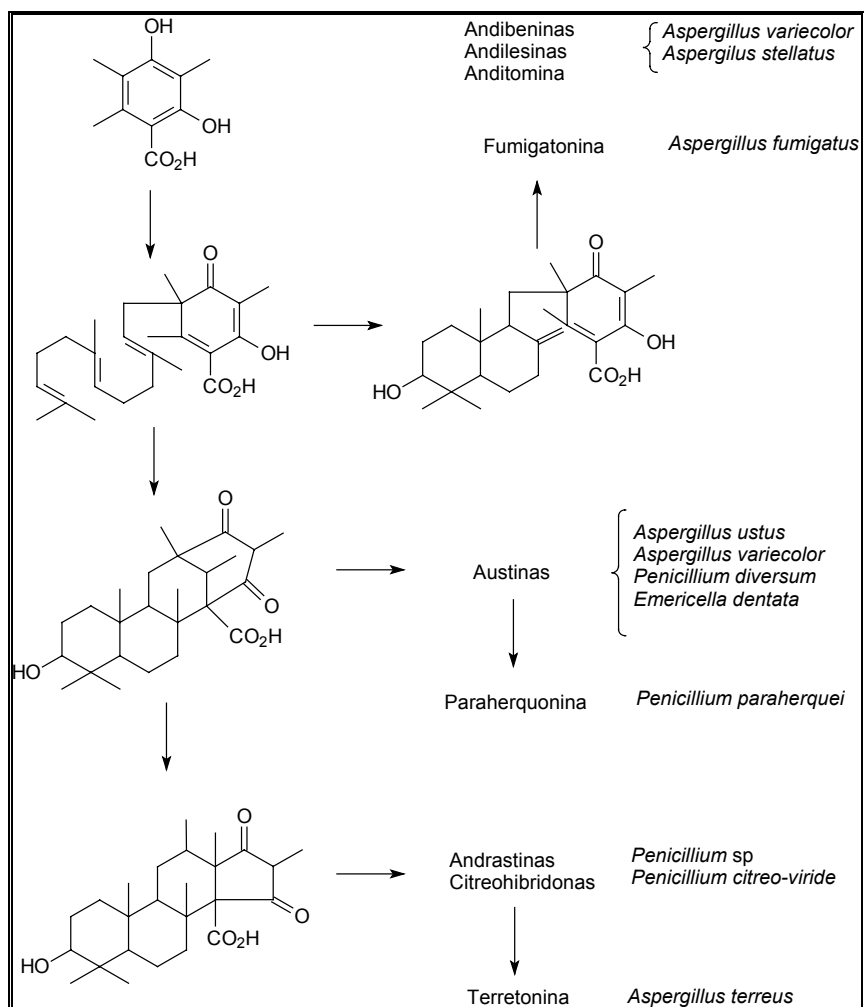
FIGURA 4.1 – Exemplos de metabólitos meroterpenoídicos (continuação).

### 1.1.2. Biossíntese de Meroterpenos Derivados de Farnesil-Pirofosfato e 3,5-Dimetilorselinato

O primeiro membro deste grupo, a andibenina, foi descrito pela primeira vez em 1976 por DUNN *et al.* Estudos de marcação isotópica mostraram que a biossíntese desses meroterpenos é resultante de uma mistura de policetídeos e terpenos (HOLKER e SIMPSON, 1978). Conseqüentemente, um vasto número de metabólitos com ampla e aparente diversidade estrutural está intimamente relacionado biossinteticamente (SIMPSON *et al.*, 1997). Eles são formados via um intermediário comum, do qual tem o início biossintético através da alquilação do intermediário policetídeo – 3,5-dimetilorselinato – por um precursor farnesil pirofosfato e o modo de incorporação do esqueleto carbônico desse precursor dentro desses metabólitos é resumido no Esquema 4.1. Nos metabólitos andibenina (**M-26**) e andilesina o anel carbocíclico é incorporado intacto, enquanto que na anditamina (**M-28**), ocorre clivagem de uma ligação do anel. Os metabólitos derivados da austina (**M-27**) e terretonina (**M-29**) apresentam um uma série de modificações drásticas, as quais foram propostas através de extensivos estudos de marcação isotópica, utilizando precursores marcados nos átomos  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  e  $^{18}\text{O}$  (SIMPSON, 1998). Conseqüentemente, uma provável relação biogénética pode ocorrer entre esses metabólitos estruturalmente distintos, como, por exemplo, os meroterpenos austina, terretonina, paraherquonina, fumigatonina, citreohibridonas e andrastatinas, apresentados no Esquema 4.2 (SIMPSON *et al.*, 1997).



ESQUEMA 4.1 – Modificações da porção orselinato nos metabólitos meroterpenóidicos (SIMPSON *et al.*, 1997).



ESQUEMA 4.2 – O caminho biossintético dos meroterpenóides fúngicos (SIMPSON *et al.*, 1997).

### 1.1.2.1. Biossíntese da Andibenina e Derivados

Os meroterpenos isolados de *Aspergillus varicolor* e identificados como andilesinas A (**M-36**), B (**M-37**) (DUNN *et al.*, 1976), e C (**M-38**) (SIMPSON, 1979), juntamente com as andibeninas A (**M-39**) (SIMPSON, 1979), B (**M-26**) (DUNN *et al.*, 1976) e C (**M-40**) (SIMPSON, 1979), constituem um grupo de metabólitos biossinteticamente relacionados (Figura 4.2). Os estudos de marcação isotópica de precursores permitiram propor a biogênese para a andilesina A (**M-36**) (MCINTYRE *et al.*, 1986) e andibenina B (**M-26**) (DUNN *et al.*, 1976; HOLKER e SIMPSON, 1978, SIMPSON *et al.*, 1997). O passo chave envolve a alquilação de um derivado fenólico tetracetídico bis-C-metilado (**M-41**), com farnesilpirofosfato formando o intermediário (**M-42**), o qual após epoxidação, sofre ciclização (**M-43**) que em seguida passa por uma reação de cicloadição 4+2 intramolecular gerando o esqueleto carbônico desses meroterpenos (**M-44**), conforme apresenta o Esquema 4.3 (SIMPSON *et al.*, 1997). Portanto a formação do sistema octano biciclo [2.2.2] nestes metabólitos fornece um raro exemplo de uma reação Diels-Alder biossintética.

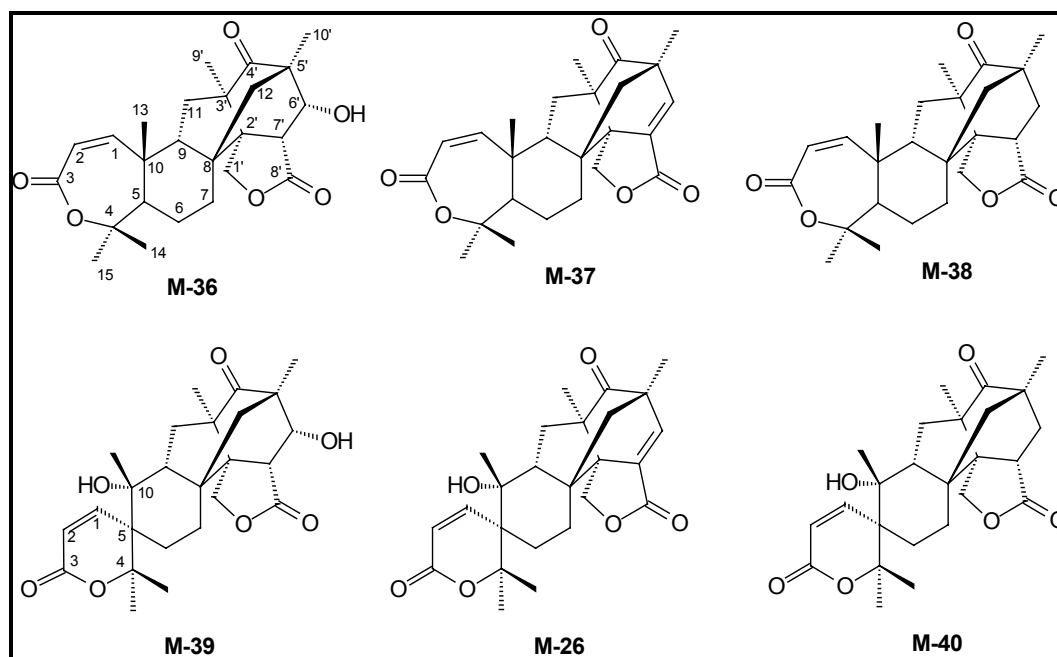
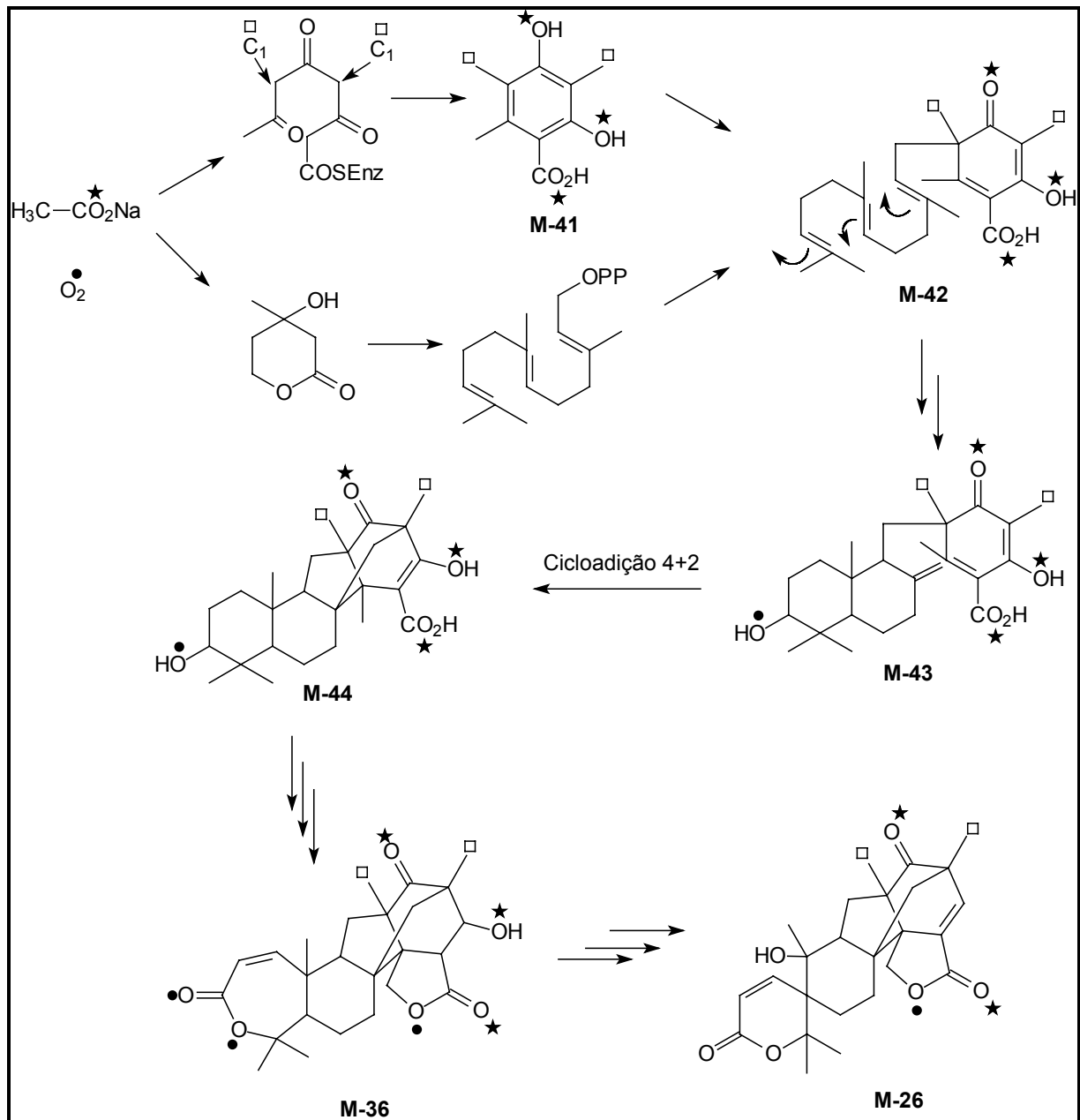


FIGURA 4.2 - Estruturas dos meroterpenos do grupo das andibeninas e andilesinas.

Experimentos utilizando metionina marcada [ $^{13}\text{C}$ -metil], resultou em um enriquecimento de ambas as metilas 9' e 10' observado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , confirmando que elas devem ser incorporadas no precursor tetracetídeo antes da aromatização do fenol, confirmando assim, a incorporação intacta desse precursor, como também, a prenilação que provavelmente ocorre após a aromatização, embora seja um processo eletrofílico similar (SIMPSON *et al.*, 1997).



ESQUEMA 4.3 – O caminho biossintético da andibenina e derivados.

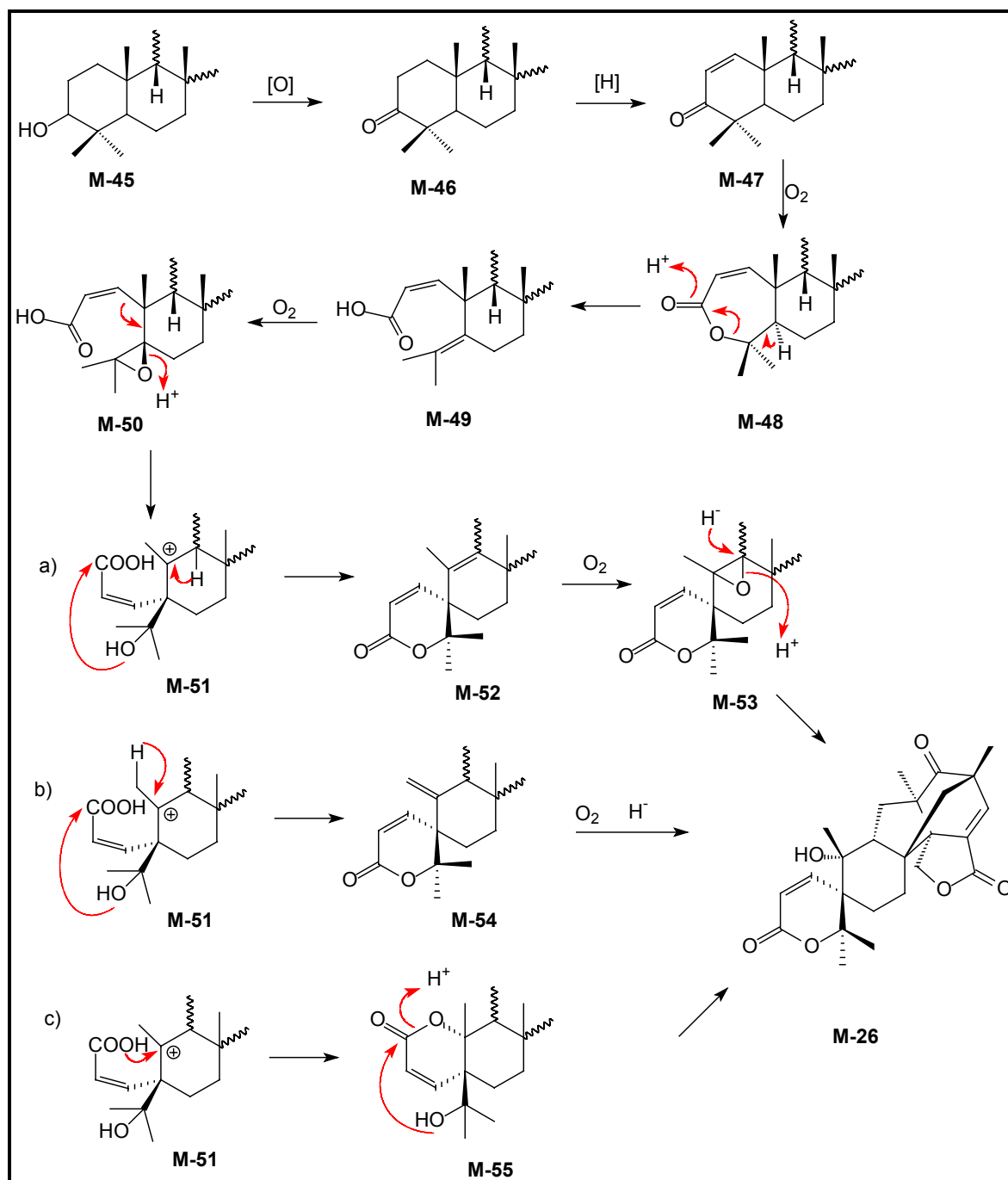


Os estudos de marcação no átomo de  $^{18}\text{O}$  permitiram atribuir a origem dos átomos de oxigênio ligados aos carbonos C-3, C-4, C-1' através de processos oxidativos (derivados do oxigênio atmosférico), como também a formação da  $\gamma$ -lactona, a qual é formada pelo ataque de um grupo hidroxila em C-1' sobre C-8' existindo como um carboxilato livre em algum estágio durante a biossíntese. Experimentos de dupla marcação  $^{13}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}$  contribuíram para definir que 6'-hidroxi-orselinato (**M-41**) é um intermediário obrigatório para a biossíntese da andilesina A (**M-36**). Além disso, esses resultados indicam que a andilesina A (**M-36**) é o primeiro metabólito a ser formado da série das andilesinas e é posteriormente convertido por eliminação de água para andilesina B (**M-37**), a qual é então reduzida para andilesina C (**M-38**) (MCINTYRE *et al.*, 1986).

Na porção farnesil do metabólito, o sistema decalínico ciclizado passa por uma série de modificações para dar origem ao anel espiro-lactônico. Para a formação desse sistema espiro é necessária a migração da ligação C-1 para C-5. A presença de oxigênio atmosférico em C-4 (**M-36**) sugere um possível mecanismo para a biossíntese do sistema espiro-lactona, o qual deve ter sua origem por uma oxidação biológica do tipo Baeyer-Villiger do precursor 3-ceto (**M-46**) e posterior rearranjo da lactona de 7 membros (**M-48**). A perda de H-5 resultaria no alceno tetrasubstituído (**M-49**) e a oxidação subsequente da dupla com formação do epóxido (**M-50**), seguiria um rearranjo para formar um intermediário carbocátion (**M-51**), o qual seria convertido a espirolactona. Para essa conversão, existem três caminhos biossintéticos propostos, os quais são apresentados no Esquema 4.4 (SIMPSON *et al.*, 1997).

Esses possíveis mecanismos têm sido distinguidos através de uma série de experimentos com  $^2\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  marcados. A incorporação de  $[5\text{-}^{13}\text{C}, 4\text{-}^2\text{H}_2]$  mevalonato apresenta um deslocamento  $\beta$ -isotópico atribuído ao carbono C-11, conseqüente da incorporação de  $^2\text{H}$  em C-9, concluindo, portanto, a não ocorrência de um intermediário contendo uma dupla ligação C-9,10 (**M-52**), invalidando a proposta *a*. Com a ocorrência de retenção de todos os três hidrogênios marcados em C-13, elimina a hipótese do envolvimento de um intermediário com uma dupla ligação exocíclica (**M-54**), como apresenta a proposta *b*. Os resultados destes experimentos então, fornecem fortes evidências da ocorrência do caminho *c* (SIMPSON *et al.*, 1997).

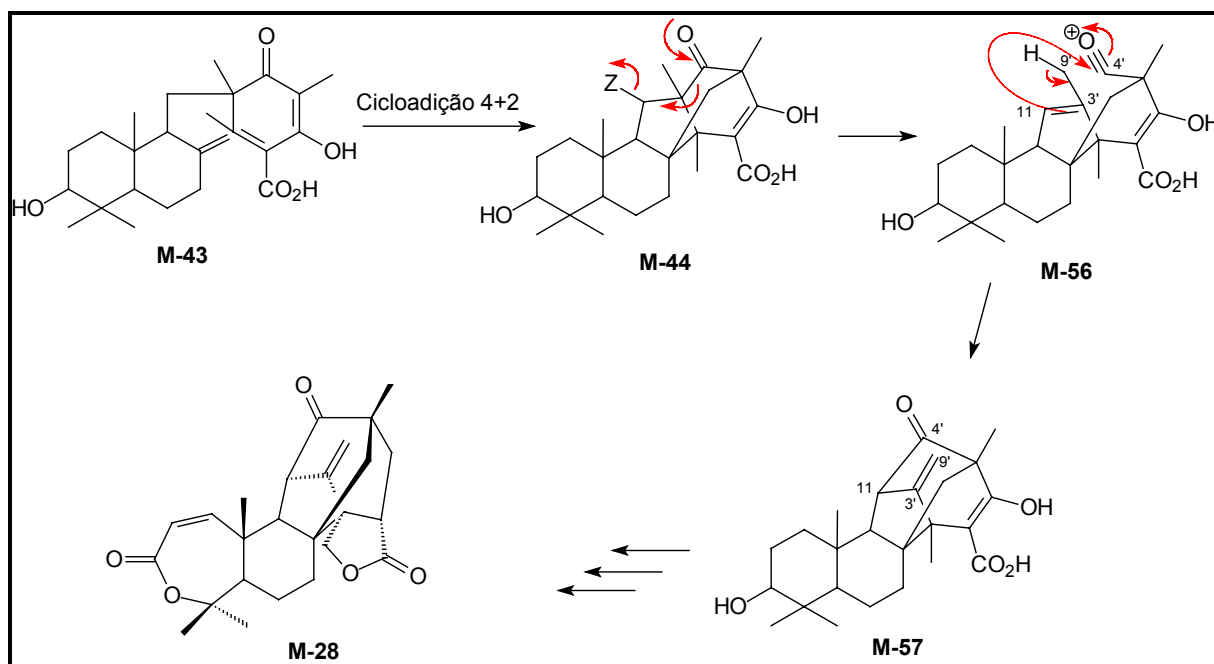
Além disso, essas modificações envolvidas sugerem que o anel  $\gamma$ -lactona da porção tetracetídica será formado antes da adição e subsequente modificação da porção farnesil e que a  $\epsilon$ -lactona encontrada nas andilesinas é a progenitora do sistema espirolactona das andibeninas (SIMPSON *et al.*, 1997).



ESQUEMA 4.4– Caminho biossintético para a formação do intermediário carbocátion e do anel espirolactona (SIMPSON *et al.*, 1997).

### 1.1.2.2. Biossíntese da Anditomina

A anditomina (**M-28**) representa uma importante modificação do caminho biossintético dos meroterpenos por ser o primeiro metabólito no qual o anel carbocíclico da porção tetracetídica apresenta-se fragmentado (SIMPSON *et al.*, 1997). Esse meroterpeno foi isolado de culturas de *Aspergillus varicolor* (SIMPSON e WALKINSHAW, 1981) e relacionado ao metabólito andilesina C (**M-38**), diferindo apenas na presença do grupo metileno exocíclico na posição 9'. Como consequência, tem-se o surgimento de um novo esqueleto desta classe de compostos (meroterpenos) com rearranjo de uma ligação, conforme mostra o Esquema 4.5.



ESQUEMA 4.5 – Provável caminho biossintético para meroterpenos do tipo anditomina (**M-28**).

### 1.1.2.3. Biossíntese da Austina e Derivados

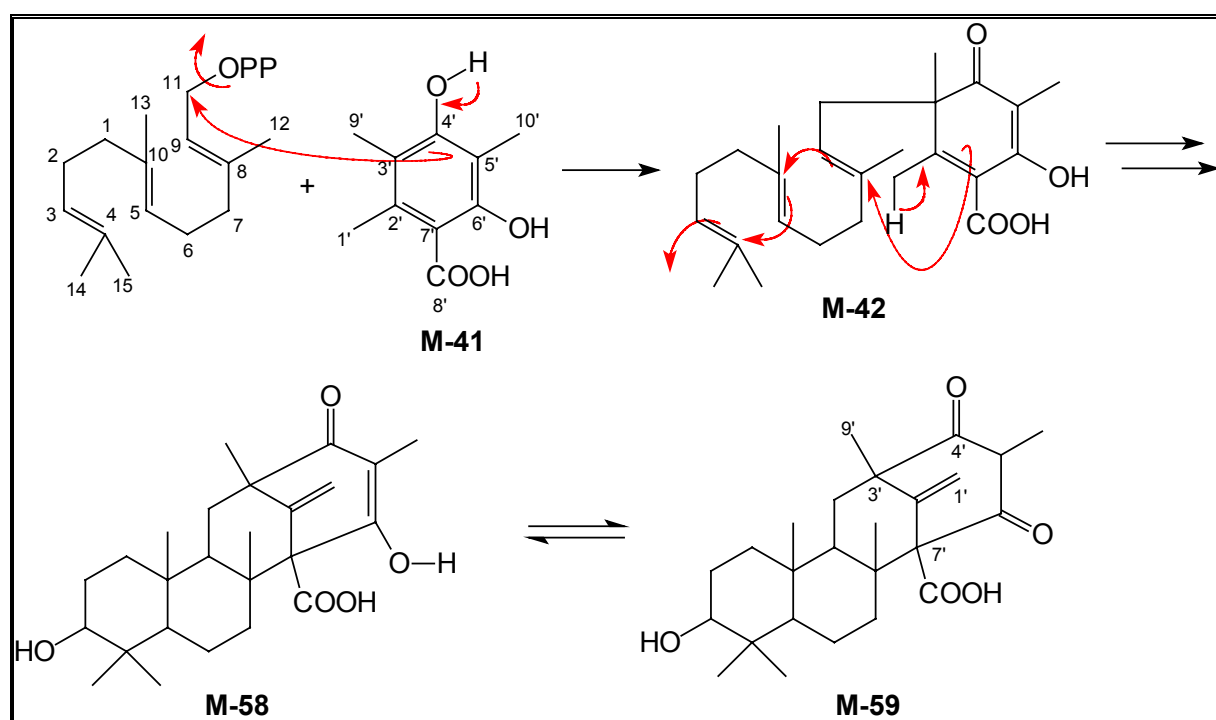
O meroterpeno austina (**M-27**) foi isolado das culturas de *Aspergillus ustus* e identificado por raios-X em 1976 por CHEXAL *et al.*, que propuseram uma origem poliisoprenóide para esta substância, como um sesterterpeno ou um triterpeno degradado. Contudo, SIMPSON e STENZEL (1981), através de estudos de marcação isotópica, constataram que **M-27** tem sua biogênese através de um caminho triprenilfenol, onde um precursor tetracetídeo bis-C-metilado (**M-41**) é alquilado por farnesil pirofosfato, de maneira análoga ao que ocorre para as andilesinas e andibeninas. A formação do intermediário-chave (**M-58**) é seguida pela formação da ligação entre os carbonos C-8 e C-7', contração do anel e clivagem oxidativa do anel fenólico.

O tetracetídeo 3,5-dimetilorselinato (**M-41**) considerado como o precursor específico para os metabólitos austina (**M-27**) e terretonina (**M-29**) (MCINTYRE *et al.*, 1982), foi comprovado através da incorporação de metionina marcada [Me-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>], indicando que os grupos metila são incorporados na austina sem a perda do hidrogênio marcado. Essa incorporação foi analisada através da espectrometria de massas, utilizando FAB como método de ionização (SIMPSON *et al.*, 1984).

Segundo os resultados obtidos por SCOTT *et al.* (1986), a modificação drástica na porção derivada do orselinato do intermediário ciclizado (**M-58**) na rota da austina, ocorre por clivagens oxidativas e os átomos de oxigênio ligados em C-3' e em C-5' tem sua origem da atmosfera (reações de oxidações do oxigênio atmosférico e por reações similares a Baeyer-Villiger). Os átomos de oxigênio existentes na austina em C-3' e C-5' são derivados de processos oxidativos (oxigênio atmosférico) e aqueles ligados em C-4' e C-8', são derivados via 3,5-dimetilorselinato (**M-41**). Adicionalmente, o átomo de oxigênio em C-8', em algum estágio durante a biossíntese deve ocorrer como um carboxilato livre, seguido por ataque nucleofílico do grupo hidroxil em C-5' sobre C-8' para formar a  $\gamma$ -lactona da austina (SCOTT *et al.*, 1986).

Ao contrário da andibenina (**M-26**) onde o esqueleto carbônico do precursor fenólico permanece intacto, a biogênese da austina necessita de um grau de

modificação sem precedentes de seu derivado tetracetídeo (AHMED *et al.*, 1989). A presença de um grupo hidroxila em posição *orto* a função carboxila é necessária para o rearranjo subsequente da porção tetracetídica do intermediário (**M-58**). Este grupo hidroxila poderia estar envolvido na segunda alquilação do tetracetídeo pelo farnesil. Então a ciclização poderia produzir a estrutura tetracíclica e adição de oxigênio e contração do anel produz a ciclopentanona (**M-59**) (AHMED *et al.*, 1989), conforme apresenta o Esquema 4.6.



ESQUEMA 4.6 – Proposta biossintética para a formação do intermediário **M-58**. O intermediário (**M-58**) passa por oxidação e metilação.

Essa modificação do anel aromático não é comum e, portanto, vários caminhos quimicamente favoráveis e racionais surgem para explicar como as modificações que ocorrem nos derivados da austina surgem, justamente devido às diferentes origens dos átomos de oxigênio e hidrogênio que são incorporados no caminho biossintético (SIMPSON *et al.*, 1984). Para a modificação da parte tetracetídica foram propostos três caminhos para a formação dos anéis lactonas presentes na austina (**M-27**), apresentados no Esquema 4.7. O caminho *a* envolve um

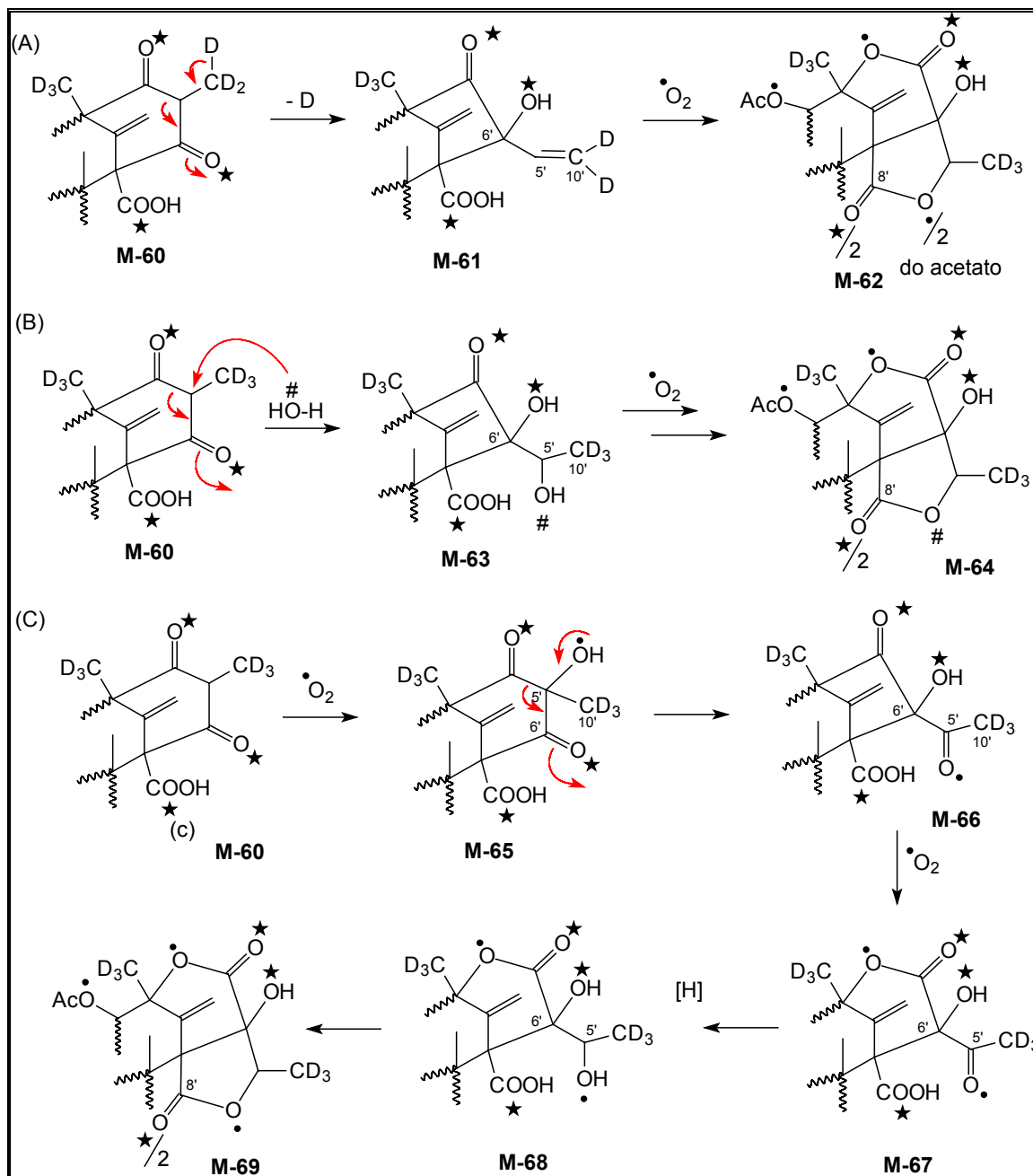
rearranjo catalisado por ácido resultando na contração do anel e formação do sistema etilideno através da perda de um hidrogênio em C-10' (**M-61**). A formação da  $\gamma$ -lactona procederá pela protonação da dupla ligação e subsequente ataque pelo grupo carboxi sobre o carbocátion resultante (**M-62**). Através dos estudos de incorporação de metionina marcada, percebeu-se que não era um mecanismo viável. O caminho *b* envolve um rearranjo catalisado por ácido, seguido por contração do anel (**M-63**), hidratação do intermediário carbocátion e formação da lactona por ataque do grupo hidroxil sobre o carboxil (**M-64**). O caminho *c* procede por hidroxilação em C-5' (**M-65**), seguido de um rearranjo  $\alpha$ -cetol (**M-66**), e redução da cetona resultante com formação da lactona (**M-68**) ocorrendo como em *b* pelo ataque do grupo hidroxil sobre o grupo carboxil. Estudos utilizando oxigênio marcado  $^{18}\text{O}$  forneceram dados que indicam o caminho *c* mais consistente, embora em ambos os caminhos, os oxigênios em C-6' e C-8' são derivados do 3,5-dimetilorselinato e os oxigênios da lactona em C-3' e C-5' são incorporados via processos oxidativos (AHMED *et al.*, 1989).

Na porção farnesil do metabólito, o sistema decalina ciclizado é modificado com a formação do anel espiro-lactona, de maneira análoga ao que ocorre para os meroterpenos andilesinas e andibeninas (AHMED *et al.*, 1989; SIMPSON *et al.*, 1997).

Uma série de metabólitos isolados de diferentes espécies de fungos são estruturalmente relacionados à austina, e portanto, um caminho biossintético comum (Figura 4.3). Austinol (**M-70**), dehidroaustina (**M-71**) foram isolados de *Aspergillus ustus* e os metabólitos isoaustina (**M-72**) e dehidroaustinol (**M-73**) encontrados nas culturas de *Penicillium diversum* e *Emericella dentata*, respectivamente (SIMPSON *et al.*, 1984). Dois metabólitos adicionais, acetoxi-dehidroaustina (**M-74**) e neoaustina (**M-75**) foram isolados de uma espécie não identificada do gênero *Penicillium* (HAYASHI *et al.*, 1994).

Os limonóides, ou meliacinas, são triterpenóides produzidos por plantas da ordem Rutales (CHAMPAGNE *et al.*, 1992), com uma variedade de atividades biológicas e de origem biossintética a partir dos triterpenos modificados com o esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanil-esteróide (TAYLOR, 1984; CHAMPAGNE *et al.*, 1992). Os limonóides pertencentes ao grupo obacunol (**M-76**), os quais apresentam os

anéis A e D abertos, são característicos da família Rutaceae e raros em Meliaceae (TAYLOR, 1984).



ESQUEMA 4.7 - Prováveis caminho biossintético para a formação da austina.

Neste grupo estão incluídos alguns limonóides muito incomuns (M-77, M-78), isolados de *Carapa procera* e *Carapa grandiflora* (Figura 4.3) (TAYLOR, 1984; AHMED *et al.*, 1989). Essas substâncias apresentam algumas similaridades

estruturais com a austina e seus derivados, especialmente o sistema espiro-lactona (SIMPSON, 1979; AHMED *et al.*, 1989). O rearranjo espiro-lactona de **M-77** provavelmente poderia ser formado de uma  $\epsilon$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, seguida por adição de Michael do grupo  $7\alpha$ -hidroxi ao sistema conjugado do obacunol (AHMED *et al.*, 1989). Essas “semelhanças” tornam-se mais evidentes se considerar o sistema enzimático usado na biossíntese das duas classes de substâncias, como será visto neste capítulo.

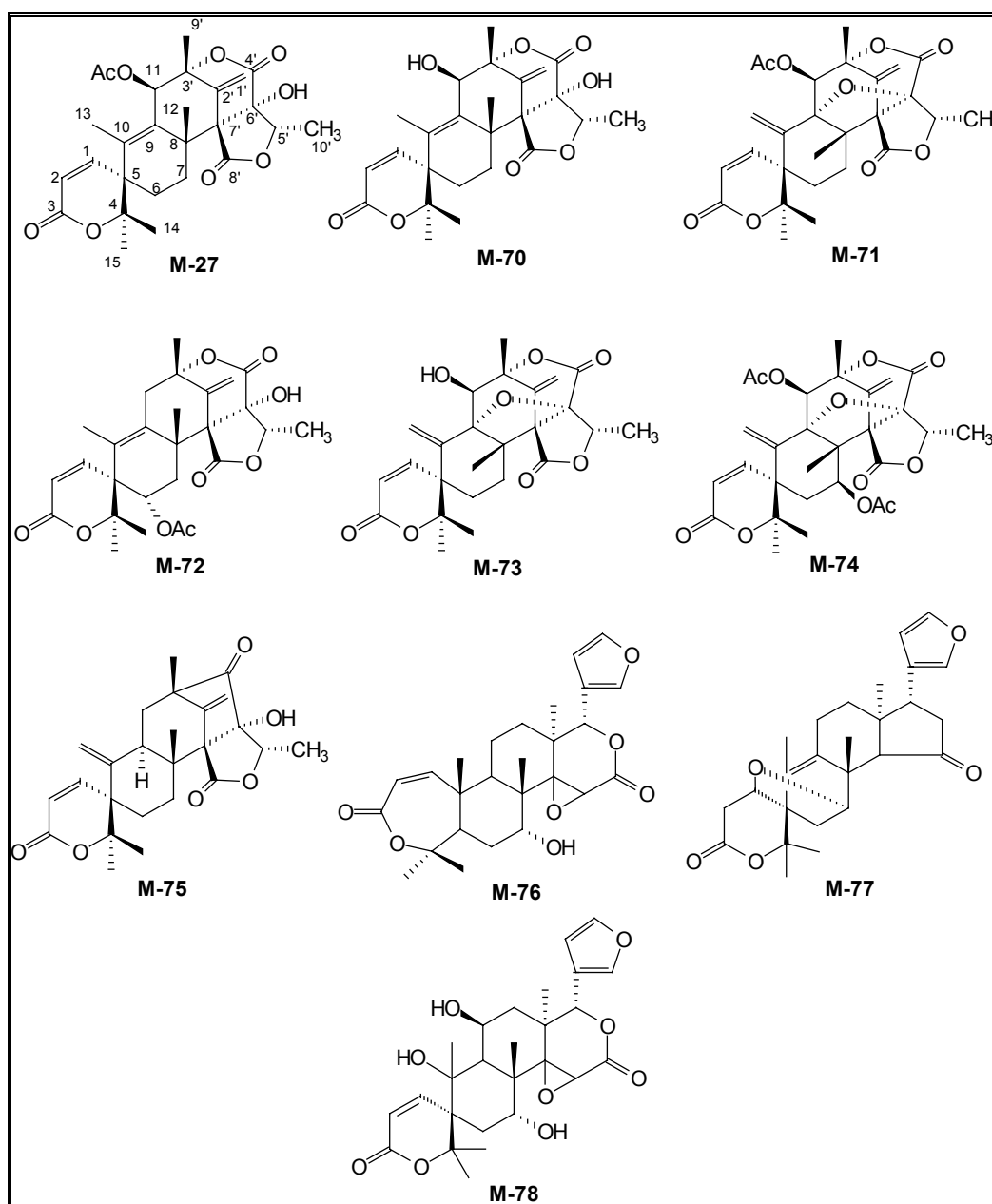
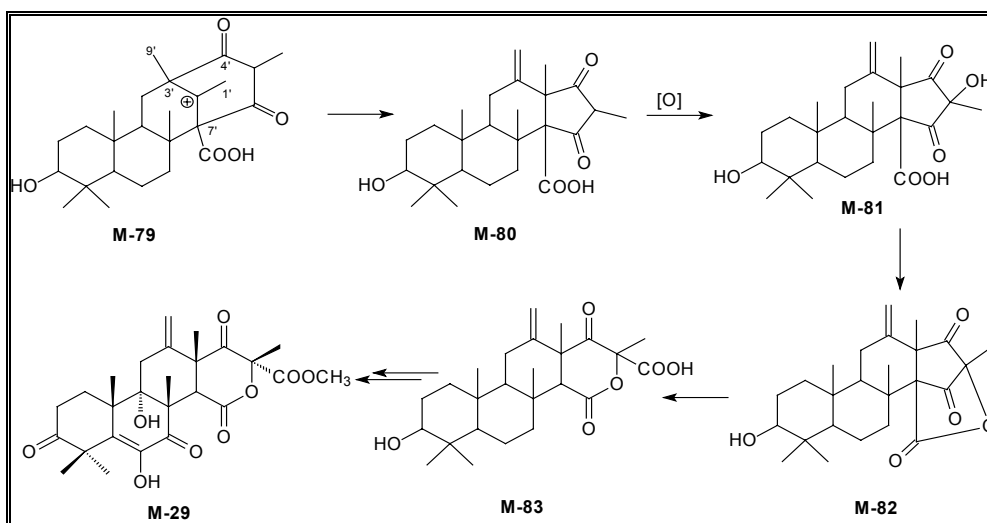


FIGURA 4.3 – Meroterpenos relacionados a austina e limonóides



### 1.1.2.4. Biossíntese da Terretonina e Derivados

A terretonina (**M-29**) (Esquema 4.8) é uma micotoxina isolada de *Aspergillus terreus* (SPRINGER *et al.*, 1979). O caminho biossintético deste meroterpeno foi primeiramente proposto por MCINTYRE e SIMPSON em 1981, através de marcadores isotópicos, confirmando que o intermediário chave para a formação da terretonina é o mesmo da austina (**M-27**). Adicionalmente a esses estudos, foram utilizados precursores duplamente marcados  $^{18}\text{O}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitindo propor um caminho de biogênese, mostrado no Esquema 4.8 (MCINTYRE *et al.*, 1989). A oxidação aeróbica do lado terminal da cadeia olefínica, seguida por catálise ácida abrindo o epóxido e ciclização do esqueleto carbônico poderia dar o carbocátion (**M-79**), formando o sistema de anéis A/B requerido para **M-29**. O caminho proposto para a formação dos anéis C/D envolve um deslocamento acil com a perda de um próton para gerar a dupla ligação exocíclica (**M-80**). A hidroxilação aeróbica (**M-81**), lactonização intramolecular (**M-82**) (o anel lactona é formado via ataque de um grupo hidroxil introduzido aerobicamente em C-5' sobre o ácido livre ou éster) e clivagem da ligação C-C hidrolítica forneceria um intermediário ácido carboxílico (**M-83**). A oxidação aeróbica para introduzir funcionalidade ao sistema de anéis A/B e metilação do ácido carboxílico livre C-6' por metionina daria a terretonina (**M-29**) (MCINTYRE *et al.*, 1989).



ESQUEMA 4.8 – Provável caminho biossintético para a terretonina (**M-29**) (MCINTYRE *et al.*, 1989).

## 1.2. Meroterpenos e sua Relação com Policetídeos

Poucos estudos biossintéticos envolvendo os últimos estágios da biogênese dos meroterpenos foram realizados (SIMPSON *et al.*, 1997). Durante o desenvolvimento deste trabalho foi verificado que o fungo *Penicillium* sp associado à *Melia azedarach*, produziu novos meroterpenos os quais foram denominados de preaustinóides A (1), B (2) e austinoneol (3) (Figura 4.4) (SANTOS e RODRIGUES, 2002, SANTOS e RODRIGUES, 2003). Estes metabólitos provavelmente podem ser os intermediários biossintéticos do meroterpeno austina (M-27) (SIMPSON *et al.*, 1997).

Como visto anteriormente (capítulo 2), a principal classe de metabólitos naturais produzidos por plantas da família Meliaceae consiste de triterpenos modificados conhecidos como limonóides (PENNINGTON e STYLES, 1975; NAKATANI *et al.*, 1981). A produção dos limonóides através da degradação dos triterpenos nas plantas ocorre em uma série de passos, incluindo as oxidações do tipo Baeyer-Villiger e rearranjos estruturais (WATERMAN e GRUNDON, 1983). A intrigante similaridade entre as modificações encontradas nos limonóides e na porção terpenoídica dos meroterpenóides sugere fortemente que as enzimas responsáveis por estas modificações nestas substâncias possam ser oriundas dos genes biossintéticos dos limonóides adquiridos pelas espécies fúngicas através das trocas de plasmídeos<sup>1</sup>.

As similaridades entre genes<sup>2</sup>, os quais parecem variar com as relações taxonômicas, são altamente sugestivas de transferência genética horizontal. Este termo descreve a hipótese de que genes possam ser adquiridos de um organismo pelo outro, não taxonomicamente relacionados entre si, por um processo diferente dos ancestrais. A transferência genética é difícil de provar, mas poderia ser suportada pelos estudos genéticos envolvendo a construção de árvores filogenéticas<sup>3</sup> (baseadas nas seqüências e árvores construídas através dos genes) tais como àquelas obtidas para os metabólitos primários (HOPWOOD, 1997).

---

<sup>1</sup> **Plasmídeos:** Moléculas de DNA circular, fita dupla, extracromossomais que ocorre naturalmente em bactérias e possuem capacidade de replicação autônoma (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

<sup>2</sup> **Genes:** São unidades funcionais do DNA cromossomal capazes de fazer transcrições (GRIFFITHS *et al.*, 1999)

<sup>3</sup> **Árvores Filogenéticas:** Diagramas que indicam a possível relação evolucionária entre diferentes genes

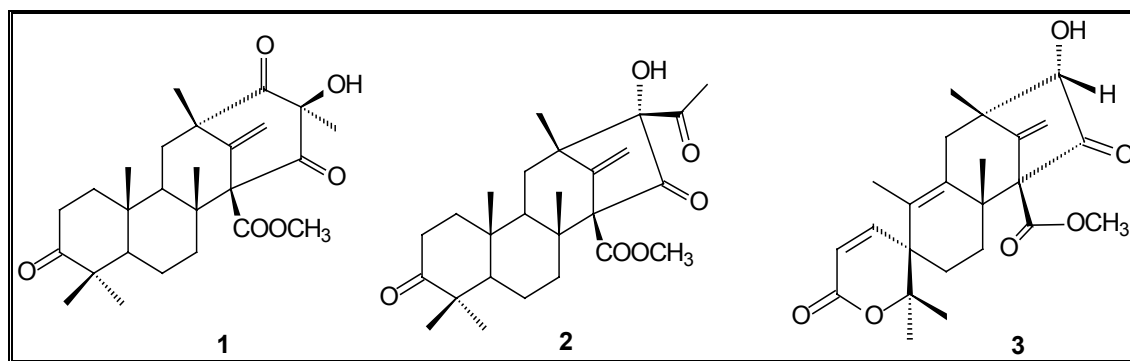


FIGURA 4.4 – Preaustinóides A (1), B (2) e austinoneol (3).

Conforme levantamento bibliográfico não foram constatados estudos de genética molecular dos caminhos biossintéticos para a produção de austina (**M-27**) e meroterpenos relacionados. Sabe-se que a manipulação genética dos genes que governam o metabolismo secundário oferece uma alternativa promissora para obter produtos naturais complexos biossinteticamente. O sucesso desta metodologia depende da clonagem<sup>4</sup> e da caracterização genética e bioquímica do precursor biossintético dos metabólitos. Uma análise detalhada da organização genética da biossíntese de um produto natural pode informar não apenas o número de enzimas envolvidas, mas também fornecer a seqüência e as posições relativas dos genes relevantes nos cromossomos dos organismos em estudo e, conseqüentemente, obter alguma informação se estes genes evoluíram isoladamente ou foram selecionados como um grupo (STONE e WILLIAMS, 1992).

A compreensão da bioquímica e genética molecular da biossíntese de policetídeos tem o potencial de fornecer uma pista para a biossíntese dos meroterpenos, incluindo os métodos para permitir o isolamento do(s) gene(s) envolvido(s) na formação do esqueleto dos meroterpenos, o derivado tetracetídeo 3,5-dimetil orselinato. Para estudar a parte policetídica desse esqueleto, o método da reação de polimerização em cadeia (PCR<sup>5</sup>) usando como molde o DNA genômico<sup>6</sup> ou

<sup>4</sup> **Clonagem:** Tecnologia que envolve o isolamento e a propagação de moléculas idênticas de DNA (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

<sup>5</sup> **PCR:** Amplificação 'in vitro' de seqüências específicas de ácidos nucléicos direcionada por primers através de ciclos repetidos (BUFFERY, 1993).

<sup>6</sup> **DNA genômico (gDNA):** DNA que contém as seqüências transcritas e não transcritas (PASSAGLIA e ZAHA, 1996)

complementar<sup>7</sup> (gDNA ou cDNA) e iniciadores<sup>8</sup> degenerados<sup>9</sup> com seqüências baseadas sobre os domínios<sup>10</sup> fúngicos PKS-tipo I cetosintase (KS) e C-metiltransferases (CMeT) poderia ser um bom método.

Uma vez clonada e analisada a enzima policetídeo sintase (PKS), o próximo passo seria codificar o agregados de genes<sup>11</sup> permitindo, então a construção de um banco de dados para a detecção e sequenciamento do restante desse cluster, o qual pode estar envolvido na biossíntese do meroterpeno ou possivelmente em parte de seu caminho biossintético. Paralelamente a esse trabalho, os genes terpenoídicos deste cluster poderiam também ser analisados. A seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento PKS revelaria similaridades que permitiria os genes associados com a modificação da porção terpenoídica do meroterpeno ser isolado e sequenciado. Em seguida, estes genes poderiam servir como sondas ideais para os genes de limonóides das plantas Meliaceae.

### **1.3. Policetídeos**

Os policetídeos (PKs) são produtos naturais sintetizados por bactérias, fungos e plantas através de condensações sucessivas de ácidos carboxílicos simples (Figura 4.5)(BIRCH, 1958). Eles podem variar amplamente na estrutura e são responsáveis pela variedade de produtos naturais. Este grupo inclui aflatoxinas de fungos e compostos com várias atividades biológicas tais como os antibióticos, agentes anticancerígenos, antifúngicos, antiparasitários, agentes que diminuem o colesterol (SIMPSON, 1995; KATZ, 1997). Além disso, outras classes de metabólitos contêm uma porção policetídica como parte de suas origens biogênicas, como por exemplo os meroterpenos, peptídeos e ciclosporinas (SIMPSON, 1995). O papel exato dos policetídeos nos ciclos de vida dos organismos que os produzem ainda permanece

---

<sup>7</sup> **DNA complementar (cDNA):** Síntese de DNA a partir de uma molécula de RNA (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

<sup>8</sup> **Iniciadores:** Pequena seqüência de oligonucleotídeos que dão início a polimerização de nucleotídeos (primers) (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

<sup>9</sup> **Iniciadores degenerados:** Contém misturas de bases ou inosinas que maximizam as chances de ter uma reação PCR com sucesso (NICHOLSON *et al.*, 2001).

<sup>10</sup> **Domínios:** Unidades funcionais e/ou estruturais discretas das proteínas (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

<sup>11</sup> **Agregados de genes:** Série de genes agrupados numa mesma região (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

desconhecido, mas estes metabólitos secundários são provavelmente sintetizados para eliminar os microrganismos competitivos durante os períodos de limitação de nutrientes (PFEIFER e KHOSLA, 2001).

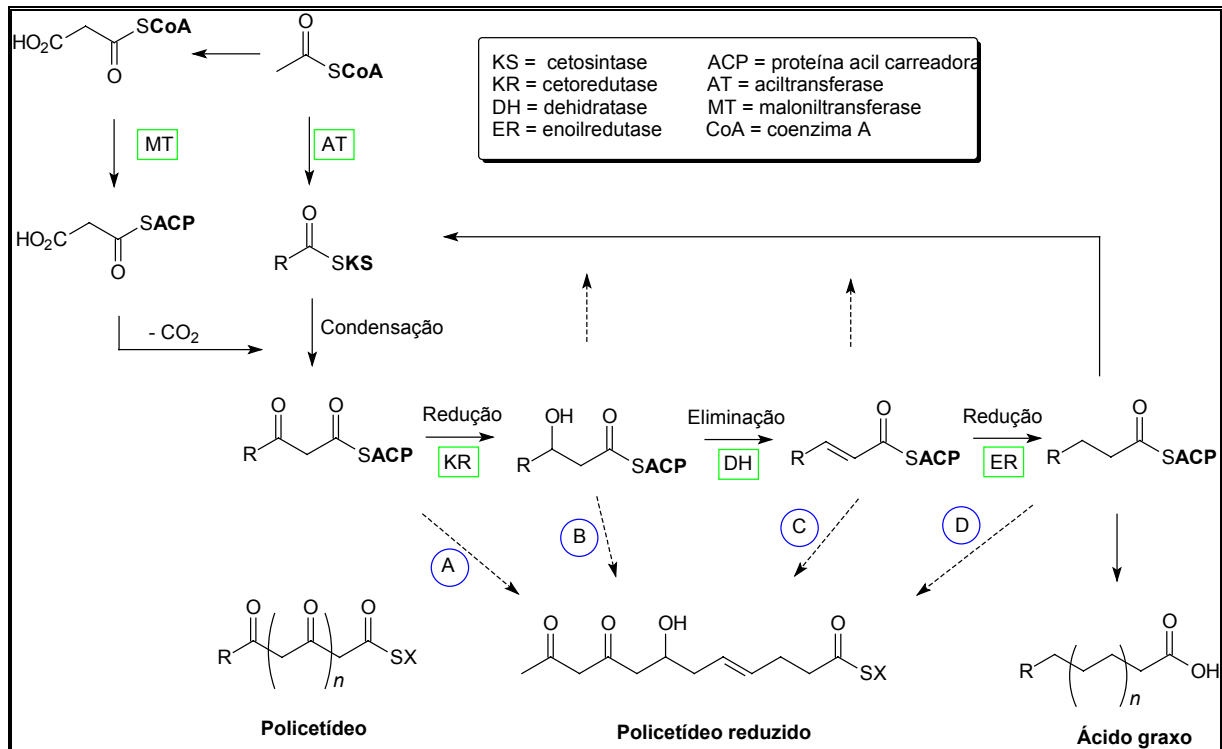


FIGURA 4.5– A formação dos ácidos graxos, policetídeos e policetídeos reduzidos (SIMPSON, 1995).

A formação de grupos de esqueletos carbonos iniciais de um policetídeo é catalisada por uma grande família de enzimas conhecidas como policetídeo sintase (PKS) que é estruturalmente similar a ácido graxo sintase (FAS) (HOPWOOD, 1997). As diferentes policetídeo sintases (PKSs) parecem usar basicamente o mesmo conjunto de enzimas componentes mas diferem na frequência e na ordem sequencial nas quais as enzimas individuais agem sobre os intermediários da reação, determinando o produto final de cada sintase (BECK *et al*, 1990).

Por serem extraordinariamente similares nas seqüências primárias e em todos os exemplos fúngicos e bacterianos, os genes PKS são encontrados na forma de clusters simplificando o seu isolamento genético bem como a sua expressão heteróloga

(PFEIFER e KHOSLA, 2001). As PKSs são classificadas dentro de duas categorias: Tipo I ou Tipo II baseada na semelhança que elas imitam a arquitetura das ácido graxos sintases Tipo I (vertebrados) ou tipo II (bactérias e plantas) (PFEIFER e KHOSLA, 2001). As sintases do Tipo I consistem de um grande polipeptídeo multifuncional contendo todas as enzimas necessárias como discretos domínios catalíticos e, as sintases do Tipo II nas quais as mesmas funções catalíticas são encontradas em enzimas isoladas associadas dentro de um complexo de multi-enzima (SIMPSON, 1995). Completamente diferente dos sistemas Tipo I e Tipo II são os complexos policetídeo sintases, as quais possuem conjuntos múltiplos, ou módulos, de sítios ativos (HOPWOOD, 1997) e as PKS responsáveis por muitos policetídeos produzidos por plantas [chalcona sintase (CHS)] (HOPWOOD, 1997).

Na maioria dos casos, os produtos iniciais formados por uma PKS são modificados por reações como, por exemplo, as reações de oxidação, redução, metilação que conduzem os policetídeos ao amplo espectro de metabólitos específicos (HUTCHINSON e FUJII, 1995). A formação de policetídeos biologicamente ativos algumas vezes requer a atividade de várias enzimas “alfaiate” que agem sobre o intermediário derivado de PKS para produzir o produto final. As enzimas alfaiate são entidades evolucionárias diversas que comumente incluem as ciclases, grupos transferases (C-, O- e N- metiltransferases, glicosiltransferases e aciltransferases), oxidoreduases NADP(H)- ou FAD(H)-dependentes e oxigenases do tipo citocromo P450. Estas enzimas são invariavelmente codificadas por genes adjacentes aos genes PKS e podem, portanto ser clonadas facilmente (PFEIFER e KHOSLA, 2001).

Nos sistemas PKS fúngicos as O- e N-metilações são catalisadas por enzimas separadas da PKS, ocorrendo no final do caminho biossintético. Contrariamente, as C-metilações ocorrem durante a formação da cadeia policetídica, com CMeT presente como um domínio catalítico bem definido na própria PKS. Por exemplo, as PKS Tipo I LNKS<sup>12</sup> e LDKS<sup>13</sup> responsáveis pela biossíntese da lovastatina em *Aspergillus terreus* ambos contém os domínios CMeT catalisando as C-metilações em pontos específicos sobre as respectivas cadeias nascentes de policetídeos (NICHOLSON *et al.*, 2001).

---

<sup>12</sup> **PKS LNKS:** Lovastatin nonaketide synthase gene (NICHOLSON *et al.*, 2001)

<sup>13</sup> **PKS LDKS:** ..Lovastatin diketide synthase gene (NICHOLSON *et al.*, 2001)

### 1.3.1. PKS de Sistemas Fúngicos

As PKSs fúngicas representam uma classe de PKSs que parecem intimamente com as ácido graxos sintases do Tipo I (vertebrados). As proteínas são multidomínio e agem num modo interativo, isto é, todas as funções catalíticas necessárias são contidas em regiões distintas sobre uma única e grande proteína codificada por um único gene (SIMPSON, 1995).

A enzima ácido 6-metilsalicílico sintase (MSAS) do fungo *Penicillium patulum* foi a primeira PKS microbiana purificada. É a PKS fúngica que catalisa as sete reações iniciais na biossíntese do ácido 6-metilsalicílico (6-MAS), o qual é posteriormente convertido para o antibiótico patulina. O complexo multienzimático realiza um total de 11 passos individuais da reação, os quais são catalisados por 7 diferentes enzimas componentes (Figura 4.6b) (BECK *et al.*, 1990).

Outras PKSs Tipo I de fungos incluem uma PKS de 130 kDa de *Penicillium cyclopium* responsável pela síntese do ácido orselínico, a forma 4-hidroxi do ácido 6-metilsalicílico (cuja síntese não requer atividades de KR e DH), e a proteína codificada por um gene PKS de 7.6 kb envolvida na biossíntese do tetrahidroínaftaleno e melanina (Figura 4.6a) (HUTCHINSON e FUJII, 1995).

O outro exemplo são as PKS altamente reduzidas obtido a partir do acetil e malonil-CoA, como a mevinolina (sinonímia de lovastatina), um importante inibidor da biossíntese do colesterol isolado de *Aspergillus terreus* (Figura 4.6c) (HUTCHINSON e FUJII, 1995).

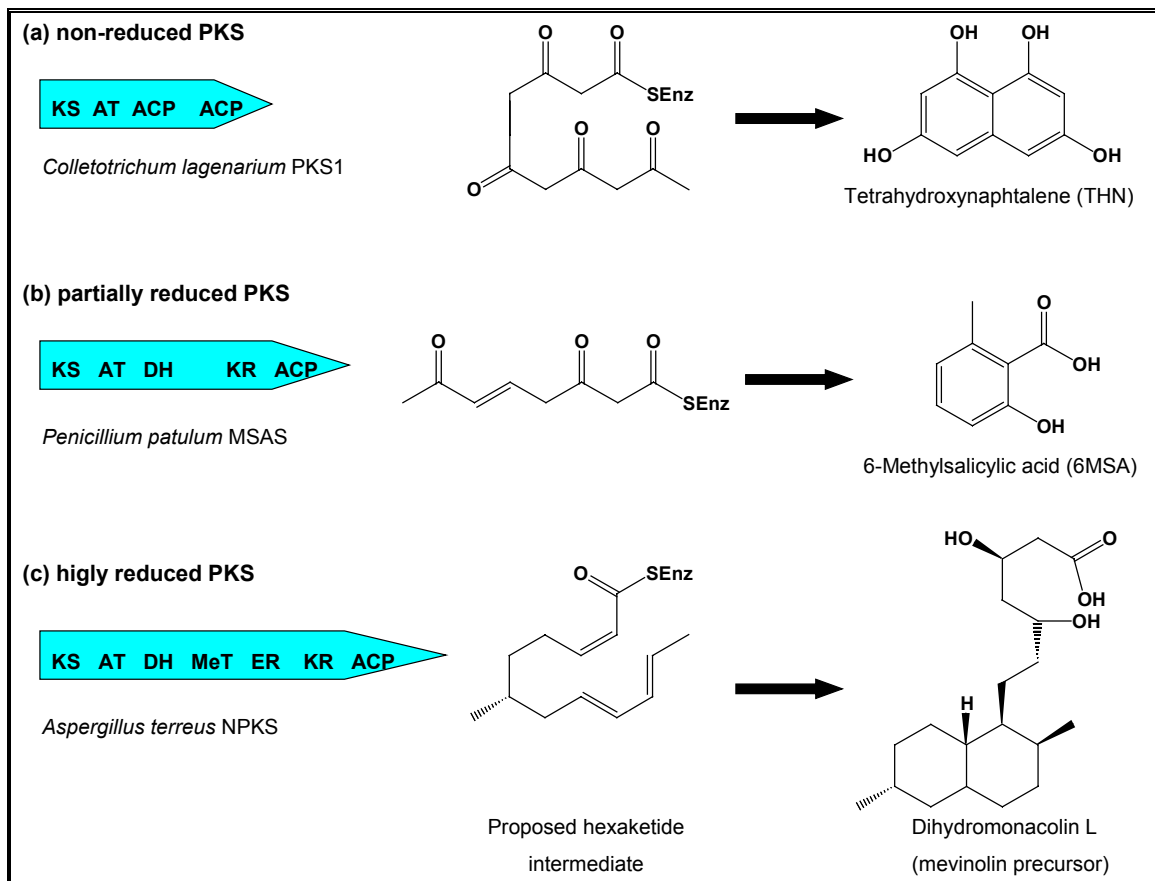


FIGURA 4.6 – Exemplos de domínios dos genes policetídeo sintases Tipo I e os metabólitos relacionados (NICHOLSON, 2000).

## 2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve dois objetivos. O primeiro visou a procura de genes relacionados ao esqueleto dos meroterpenos, o precursor tetracetídeo 3,5-dimetilorselinato, para detecção, isolamento, clonagem e sequenciamento dos mesmos utilizando iniciadores com seqüências baseadas sobre os domínios fúngicos PKS-tipo I cetocintase (KS) e C-metiltransferases (CmeT) para futuramente colaborar com os estudos da interação entre meroterpenos e limonóides. O segundo objetivo foi sugerir uma possível rota biossintética para os meroterpenos com base na série desses metabólitos isolados de *Penicillium* sp (capítulo 03).



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes

- Reagentes Usados na Extração do DNA Genômico:

- Gen Elute™ Plant Genomic DNA kit – SIGMA
- Reagentes para obter gDNA (SAMBROOK e RUSSEL, 2001; NICHOLSON *et al.*, 2001)

- Reagentes Usados nos Experimentos de PCR:

- Red *Taq* polymerase e *Taq* polymerase – SIGMA
  - LC1/LC2c, LC2/LC5c, CMeT1/T2c and CMeT1/T3c pares de primers (BINGLE *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 2000)
- High Pure PCR Product Purification kit - ROCHE

- Reagente Usado para a Reação de Ligação:

- Vetor: pGEM®-T Easy Vector System I – PROMEGA

- Reagente Usado nos Experimentos de Transformação e Clonagem:

- TAM-1 F $\alpha$  comp *E. coli* – ACTIVE MOTIF (células competentes)

- Reagente Usado para Purificação do Plasmídeo contendo DNA Recombinante:

- Spin Prep™ Plasmid kit – NOVAGEN

-Reagente Usado para a Reação de Restrição:

- Enzima de Restrição: *EcoR* I – SIGMA

#### 3.2. Materiais e Equipamentos

- Experimentos de PCR:

- Ciclador Térmico: Thermal Controller PTC-100™ – Genetic Research Instruments Ltd.

- Todos os equipamentos necessários para realizar o trabalho biológico.

### 3.3. Microrganismos e Meios de Cultivo

O fungo utilizado para esse estudo foi o *Penicillium* sp isolado do córtex das raízes de *Melia azedarach* como uma colônia azul-esverdeada seguindo a metodologia descrita por PETRINI *et al.* (1992) citada no capítulo 2. O fungo foi mantido em meio BDA e o DNA genômico fúngico foi obtido após o crescimento do fungo em meio líquido Czapek (50 mL) durante 4 dias a 25°C, sob agitação (140 rpm).

### 3.4. Extração do gDNA Fúngico

#### 3.4.1. Experimentos de PCR

O gDNA fúngico foi preparado filtrando a cultura e imediatamente triturando aproximadamente 3 gramas do micélio filtrado sob nitrogênio líquido usando um grau e pistilo previamente resfriados com nitrogênio líquido. O micélio moído (aproximadamente 100 mg) foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e o DNA genômico foi obtido através do uso de um kit de extração de DNA - GenElute™ Plant Genomic DNA kit. A concentração do gDNA foi determinada por análise espectroscópica medindo a absorvância (A) em 260 nm. Uma absorvância de 1.0 em 260 nm corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de DNA dupla fita. O tamanho e a qualidade do DNA foram determinados por eletroforese em gel de agarose. Um gel contendo 0.7% de agarose em uma solução tampão TAE foi usada sob 92 mA, 200 V e o DNA foi visualizado após corado com o agente intercalante brometo de etídio.

#### 3.4.2. Construção do Banco de Dados

Aproximadamente 5.0 gramas de micélio foram pulverizados até a obtenção de um pó fino sob nitrogênio líquido usando um pistilo e um grau previamente resfriados. O micélio foi colocado em um tubo de centrífuga de polipropileno Oak Ridge Nalgene 35 mL (Fisher Scientific) e ressuspensão a 0°C em 10 mL de tampão de extração de DNA (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM ácido etileno-

diamino-tetra-acético (EDTA), 0.5% lauril-sulfato (SDS)). Foram adicionados 10.0 mL de uma solução de extração contendo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e misturados levemente durante 15-30 minutos em um rotor cilíndrico horizontal (Denley Spiramix 5). As fases foram separadas por centrifugação (Sorvall Instruments, SS-34 rotor) a 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e mantida e a fase fenólica foi novamente extraída e separada da fase aquosa novamente e este procedimento foi repetido até que a interface entre as duas fases estivesse clara.

Os traços remanescentes de fenol foram removidos após o tratamento da fase aquosa com a mistura de clorofórmio e álcool iso-amílico (24:1) e as fases foram separadas como descrito acima. Foi adicionado 10 µl de uma solução de Ribonuclease A (pâncreas bovino) a 20.0 g/L na fase aquosa e esta foi incubada a 37°C por 30 minutos. A extração com fenol seguida da extração com clorofórmio foi repetida mais uma vez e o DNA precipitou da solução aquosa após a adição de 2.5 volumes de etanol 100% e  $\frac{1}{10}$  volume de solução de cloreto de lítio 4M a -20°C durante a noite. O DNA foi recuperado através da centrifugação a 13.000 rpm durante 10 min e o pelete foi lavado com etanol 70% a 4°C, seco no ar e ressuspenso durante a noite em aproximadamente 1 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). O gDNA para uso como template em reações PCR foi armazenado a 4°C. Durante todo o processo de extração foi tomado bastante cuidado para garantir que os prejuízos ao DNA resultante dos processos mecânicos fossem minimizados. O processo de pipetar as soluções de DNA foi realizado lentamente utilizando ponteiras de grosso calibre.

O gDNA foi posteriormente purificado por dois ciclos de centrifugação em equilíbrio em um gradiente contínuo de uma solução de cloreto de cério (CsCl) com brometo de etídio (EtBr) (tampão TE contendo CsCl (densidade – 1.56 g/mL) e EtBr (0.4 mg/mL). As amostras foram centrifugadas a 100.000 rpm por aproximadamente 16 horas a 15°C usando uma ultracentrífuga TL-100 (Beckman) com um rotor de ângulo fixo TLA-100.2. A banda de gDNA foi visualizada com uma lâmpada de comprimento de onda longo UVL-21(Ultra-Violet Products Inc.) e removida com o auxílio de uma agulha hipodérmica e seringa e então diluída em 2.5 volumes de água. EtBr e CsCl foram removidos por adição de 0.6 – 1 volumes de isopropanol resfriado e precipitação a -20°C por 15 minutos. A solução foi

centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm e o pelete de DNA obtido foi seco e ressuspenso em 200 µl de solução TE durante a noite a 4°C.

### 3.5. Fragmentos de gDNA de *Penicillium* sp

#### 3.5.1. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)<sup>14</sup>

##### 3.5.1.1. Séries LC (PKS)

##### 3.5.1.1.1. Primers PK não reduzidos e parcialmente reduzidos

O experimento de PCR utilizando uma série de primers degenerados LC não reduzidos (NR) e parcialmente reduzidos (PR) foi realizado com o uso da enzima red-*Taq* DNA polymerase numa concentração de 1 U.µL<sup>-1</sup> em tampão fornecido pelo fabricante em um volume final de 50 µL sob condições padrão. As soluções reação continham o tampão PCR 10x, primers degenerados nas seguintes concentrações: LC1EXT, 3.2 µM; LC2cEXT, 0.4 µM; LC3EXT, 1.2 µM, LC5cEXT, 0.8µM, dNTPs<sup>15</sup> em 5 mM, 1 U da enzima e 64-96 ng de template (gDNA). Esse experimento foi otimizado variando a quantidade de solução de MgCl<sub>2</sub> (25 mM, 0-8 µL). As amostras foram cobertas com óleo mineral para evitar a evaporação e então foram amplificadas em um ciclador térmico. O processo de desnaturação inicial a 94°C durante 3 min foi realizado antes da adição da enzima *Taq* polymerase. O perfil da ciclagem térmica ocorreu durante 34 ciclos, desnaturação a 94°C por 30 sec, anelamento dos primers a 50°C por 30 sec e extensão a 72°C por 45 sec. O processo de extensão final ocorreu a 72°C por 10 min. Foi realizado um controle positivo usando como molde o gDNA do fungo *Phoma* sp para cada conjunto de iniciadores nos experimentos de PCR.

##### 3.5.1.1.2. Primer HR LC

Experimentos de PCR usando um par de primers altamente reduzidos (HR) KS3/KS4c foi realizado usando *Taq* polymerase, dNTP a 5 mM, MgCl<sub>2</sub> a 25 mM

---

<sup>14</sup> PCR: Polymerase Chain Reaction (BUFFERY, 1993).

<sup>15</sup> dNTPs: dideoxy nucleotide triphosphates (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

(5 µL), Tampão 10x Buffer sem MgCl<sub>2</sub>, primers a 25 µM e 32 ng de gDNA template em um volume final de 50 µL. Os parâmetros da ciclagem térmica consistiu de 34 ciclos de 94°C para 30 sec (desnaturação), a 50°C por 30 sec (anelamento), 72°C por 45 sec (extensão) e uma extensão final a 72°C por 10 min.

### **3.5.1.2. Primers CMeT**

PCR usando uma série de primers degenerados de C-methyltransferases (CMeT) foi realizado com as enzimas red *Taq* polymerase e *Taq* polymerase em um volume final de 50 µL sob as seguintes condições: Soluções reagentes continham tampão PCR10x, dNTPs a 5 mM, primers a 25 µM (CMeT1/T2c e CMeT1/T3c, 1-4 µL), 1 U da enzima adicionado após a desnaturação inicial e 32 ng de gDNA template. As amostras foram recobertas com óleo mineral e amplificadas por uma desnaturação inicial a 96°C por 3 min, seguida por 34 ciclos a 94°C por 15 sec (desnaturação), 50°C por 30 sec (anelamento), 72°C por 30 sec (extensão) e uma extensão final a 72°C por 10 min.

### **3.5.2. Purificação dos Fragmentos de DNA (Produtos de PCR)**

O fragmento de DNA de interesse foi cortado em um volume mínimo possível de gel de agarose (0.7 – 2.0 % LMP<sup>16</sup> agarose gel) e purificados pelo uso de um kit de purificação - High Pure PCR product purification kit.

### **3.5.3. Ligação<sup>17</sup>**

As reações de ligação foram realizadas utilizando um sistema de vetor<sup>18</sup> denominado pGEM-T Easy Vector. O plasmídeo de DNA foi ligado ao inserto de

---

<sup>16</sup> **LMP agarose gel:** gel de agarose de baixo ponto de fusão

<sup>17</sup> **Ligação:** união de dois finais de duas moléculas de DNA e a formação de uma ligação covalente em uma ou ambas as fitas através da ação das enzimas ligases (Howe, 1995).

<sup>18</sup> **Vetor:** nome dado as moléculas de DNA na qual o DNA estranho é inserido para a subsequente propagação em uma célula hospedeira. Exemplos de vetores são os plasmídeos e fagos (Howe, 1995).

DNA<sup>19</sup> (proporção de vetor:inserto, 1:3) na presença do tampão 2x Rapid Ligation Buffer T4 DNA ligase e de 1 unidade da enzima T4 DNA ligase em um volume total de 10 µL. As ligações foram realizadas a temperatura ambiente com duração de uma hora.

### **3.5.4. Transformação<sup>20</sup>**

As transformações foram realizadas utilizando como células competentes<sup>21</sup> as células TAM-1 Fα comp *E. coli* (Active Motif) em um volume de 25 ou 50 µL, o qual foi adicionado dentro dos tubos contendo os produtos de ligação. Após o choque térmico foi adicionado 1 mL de meio de cultura SOC (1 mL meio TY, 10 µL MgCl<sub>2</sub> 2,5 M e 10 µL Glucose 1,0 M) e a cultura foi incubada a 37°C durante 1.5 h, sob agitação (230 rpm). As culturas transformadas foram colocadas dentro de placas de Petri contendo ágar LB (liquid broth, 20 mL) com carbenicilina (100 mg/mL, 20 µL), IPTG (isopropil-P-D-tiogalactopiranosideo, 1 M, 4 µL) e X-Gal (X-galactose, 50 mg/mL, 20µL) e incubadas durante a noite a 37°C.

### **3.5.5. Clonagem**

Cerca de 4 transformantes de cada placa foram colocados separadamente dentro de tubos contendo o meio L (3 mL) e carbenicilina (100 mg/mL, 3 µL). Esses tubos foram incubados durante a noite a 37°C, sob agitação (230 rpm).

---

<sup>19</sup> **Inserto de DNA:** fragmento de DNA que deseja ser clonado

<sup>20</sup> **Transformação:** processo de introdução do DNA nas células (Howe, 1995).

<sup>21</sup> **Células competentes:** células com capacidade de adquirir o vetor contendo o inserto (DNA recombinante) e que tem a função de propagação do DNA recombinante (Howe, 1995).

### 3.5.6. Obtenção do Plasmídeo contendo DNA Recombinante

Os plasmídeos contendo o DNA recombinante foram obtidos seguindo os procedimentos padrão para obtê-los do meio de cultura. Para esses fins foi utilizado o kit Spin Prep™ Plasmid kit.

### 3.5.7. Restrição<sup>22</sup>

As reações de restrição foram realizadas utilizando a enzima de restrição *EcoR* I (geralmente utilizada quando o vetor utilizado for pGEM®-T Easy).

### 3.5.8. Sequenciamento

As amostras de concentração 50 ng.µL<sup>-1</sup> foram submetidas ao sequenciamento utilizando os primers T7P/SP6 primers. O sequenciamento do DNA foi realizado pela companhia Lark Company.

### 3.5.9. Análise dos Dados

A análise das seqüências foram realizadas utilizando o programa Vector NTI® Suite V.6 contendo os seguintes programas de aplicação: Vector NTI®, BioPlot®, Align X®, e Contig Express™.

### 3.5.10. Análise Filogenética

O alinhamento das seqüências múltiplas foi realizado utilizando o programa Vector NTI® Suite V.6. A partir deste alinhamento foi contruído um filograma usando o software Align X®.

---

<sup>22</sup> **Restrição:** processo de corte do DNA em regiões previamente conhecidas realizado por enzimas de restrição (GINGOLD, 1993).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DNA Genômico Fúngico

O gDNA de *Penicillium* sp foi obtido através do kit GenElute™ Plant Genomic DNA kit para realizar os experimentos de PCR, e também do método químico para preparar o banco de dados de gDNA. O gDNA obtido pelo primeiro método apresentou uma concentração de 32 ng/mL de DNA de dupla fita e um tamanho de 42 kb (kilobase de pares) como mostrado na Figura 4.7.

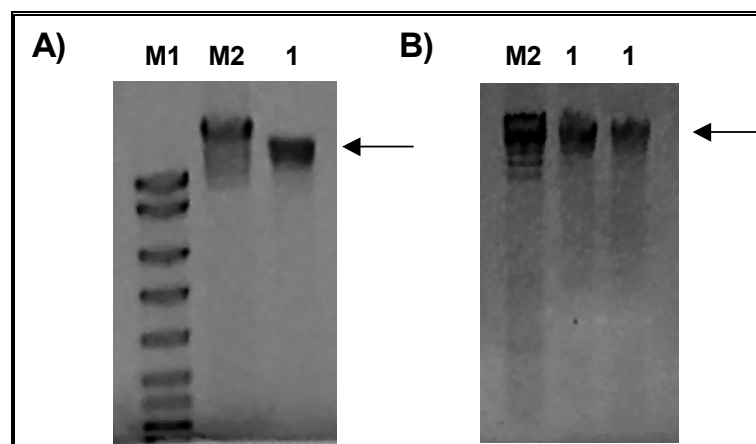


FIGURA 4.7 – Detecção do tamanho do gDNA. a) M1, M2 = marcadores Hyper Ladder I e VI, respectivamente. 1 = gDNA. b) M2 = marcador Hyper Ladder VI; 1 = gDNA. gDNA foi analisado sobre um gel de agarose a 0.4% em um tampão TAE a 100 mA, 200 V, marcadores de tamanho 1kb e 6 kb DNA de marcador de tamanho (Bioline).

### 4.2. Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram obtidos utilizando os primers degenerados projetado para amplificar os fragmentos contendo os domínios de condensação (LC) dos genes PKS (Figuras 4.8, 4.9 e 4.10) (BINGLE *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 2001). Para os primers LC1, LC2c, LC3 e LC5c foram utilizadas as suas versões extendidas as quais contém extremidades não degeneradas curtas acrescentadas do final 5' preparadas por BINGLE *et al* (1999). As extremidades têm a função de permitir o



anelamento das seqüências de primers complementares a extremidade da seqüência sobre o produto amplificado para facilitar o sequenciamento direto dos produtos de PCR, bem como fazer a clonagem “sticky-ended” (das extremidades coesivas) do produto devido aos seus sítios de restrição. Estes primers foram manufacturados conforme segue: LC1EXT (GATCGTTGGATCCTCTA-LC1), LC2cEXT (TAAGATCTCGAGCTCTAGA-LC2c). LC3EXT (GATCGTTGGATCCTCTA-LC3) e LC5Cext (TAAGATCTCGAGCTCTAGA-LC5c) (BINGLE *et al.*, 1999).

Os primers degenerados de DNA contém bases mistas ou inosinas e desta forma maximizam as chances de obter um experimento de PCR com sucesso de genes PKS desconhecidos permitindo a amplificação dos códons<sup>23</sup> desconhecidos (NICHOLSON *et al.*, 2001).

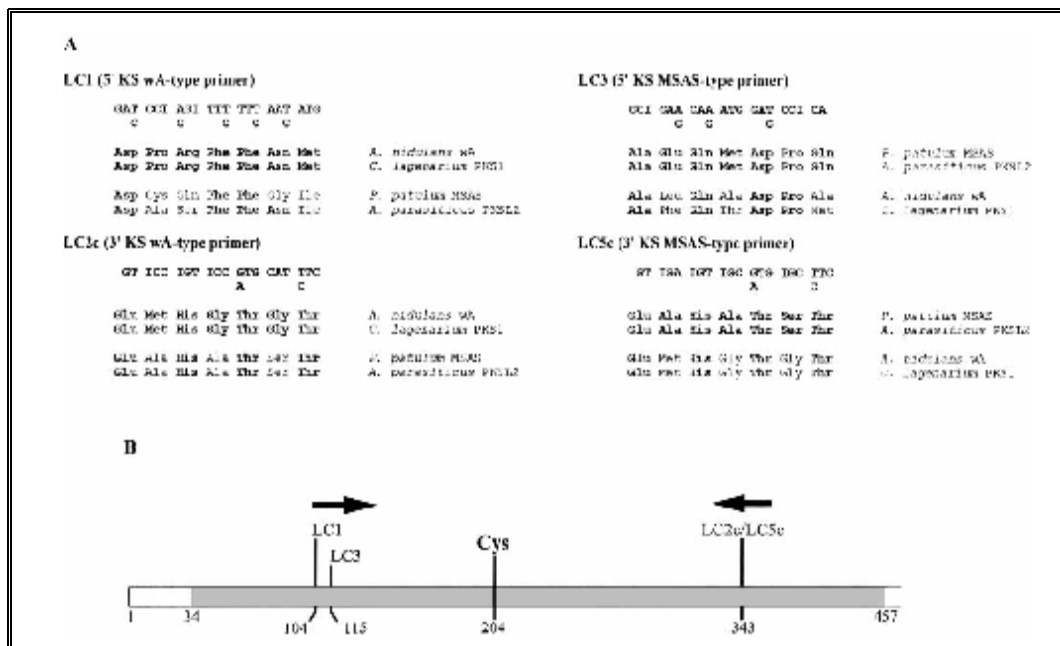


FIGURA 4.8 – Séries LC de primers degenerados. (A) Seqüência dos primers LC1, LC2c, LC3 e LC5c. (B) Posições relativas dos sítios de ligação da séries de LC dos primers degenerados. I = inosina, c = seqüência nucleotídeos complementar reversa (BINGLE *et al.*, 1999).

<sup>23</sup> **Códon:** Seqüência de três nucleotídeos (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

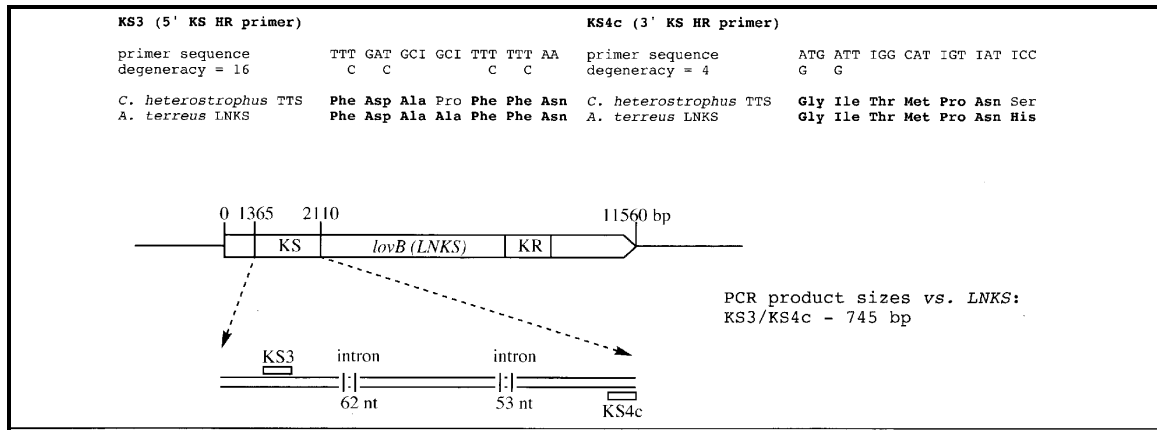


FIGURA 4.9 – Sequência de primers e design dos primers de PCR degenerados HR KS3/4c. I = inosina, c = seqüência de nucleotídeos complementar reversa (NICHOLSON *et al.*, 2001).

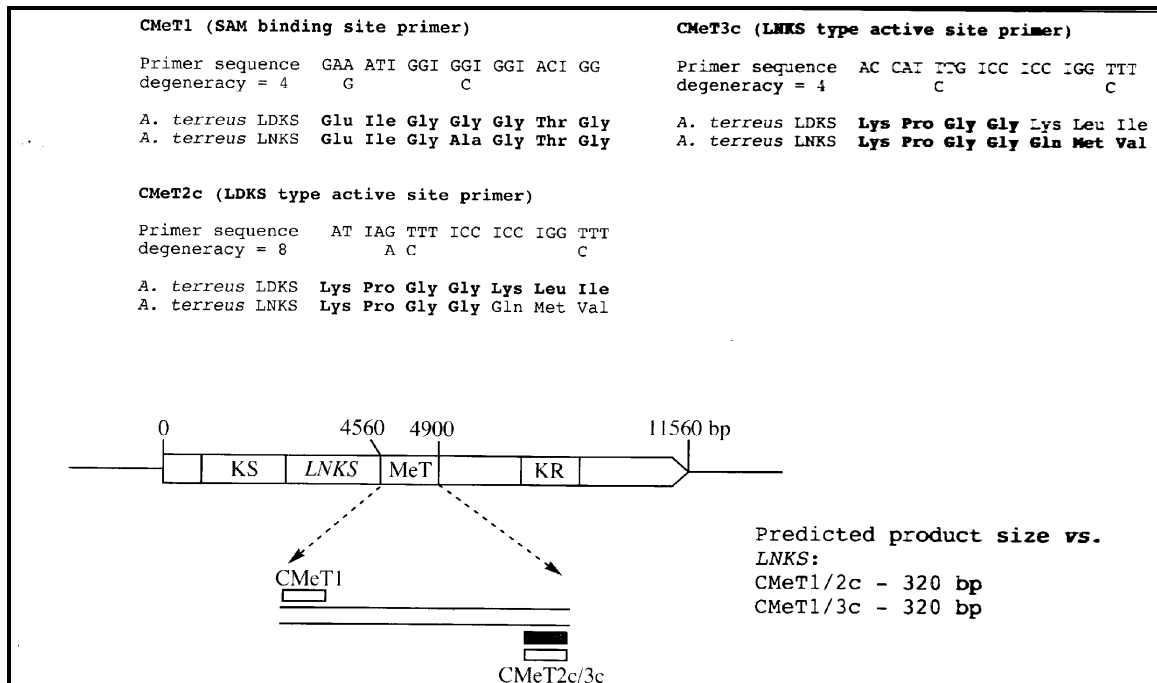


FIGURA 4.10 – Sequência de primers e design dos primers de PCR degenerados CMeT. I = inosina, c = seqüência de nucleotídeos complementar reversa (NICHOLSON *et al.*, 2001).

### 4.2.1. Primers NR/PR PKS

Produtos de PCR de aproximadamente 740 e 760 pb (pares de bases) em extensão foram obtidos utilizando os primers LC1/2c e LC3/5c, respectivamente. Estes resultados são mostrados na Figura 4.11A e estão de acordo com os valores propostos para estes primers os quais foram projetados como LC1/LC2c para policetídeos não reduzidos (NR) e LC3/LC5c para policetídeos parcialmente reduzidos (PR), onde os tamanhos dos produtos PCR, obtidos a partir do gDNA, podem ser estimados em 720 pb e 680 pb, respectivamente (NICHOLSON *et al.*, 2001). Foram realizados experimentos com a troca dos pares de primers (LC1/LC5c e LC3/LC2c) e os resultados obtidos para estes estão apresentados na figura 4.11A.

As reações de PCR foram realizadas sob concentração constante de primers, mas com o objetivo de otimizar a formação dos produtos as reações foram realizadas com variações nas concentrações do template e de íons magnésio ( $Mg^{2+}$ ) (Figura 4.11A). As reações de PCR com template gDNA foram visualizadas sob eletroforese em gel usando os primers mencionados acima e mostraram múltiplos produtos, incluindo o tamanho prognosticado em todos os casos. Isto pode ter acontecido devido a baixa temperatura de anelamento ( $50^{\circ}C$ ) durante a reação de PCR porque com essa temperatura aumentam as chances de ligar os primers aos genes PKS menos homólogos (NICHOLSON *et al.*, 2001). Apenas os produtos que migraram consistentes com o tamanho esperado entre 600 e 800 pb foram purificados. O tamanho de 1.4 – 1.5 kb (Figura 4.11A, linhas 5-7, 9-11, e 13) sugere que estes podem ser dímeros dos produtos iniciais de 700-800 pb.

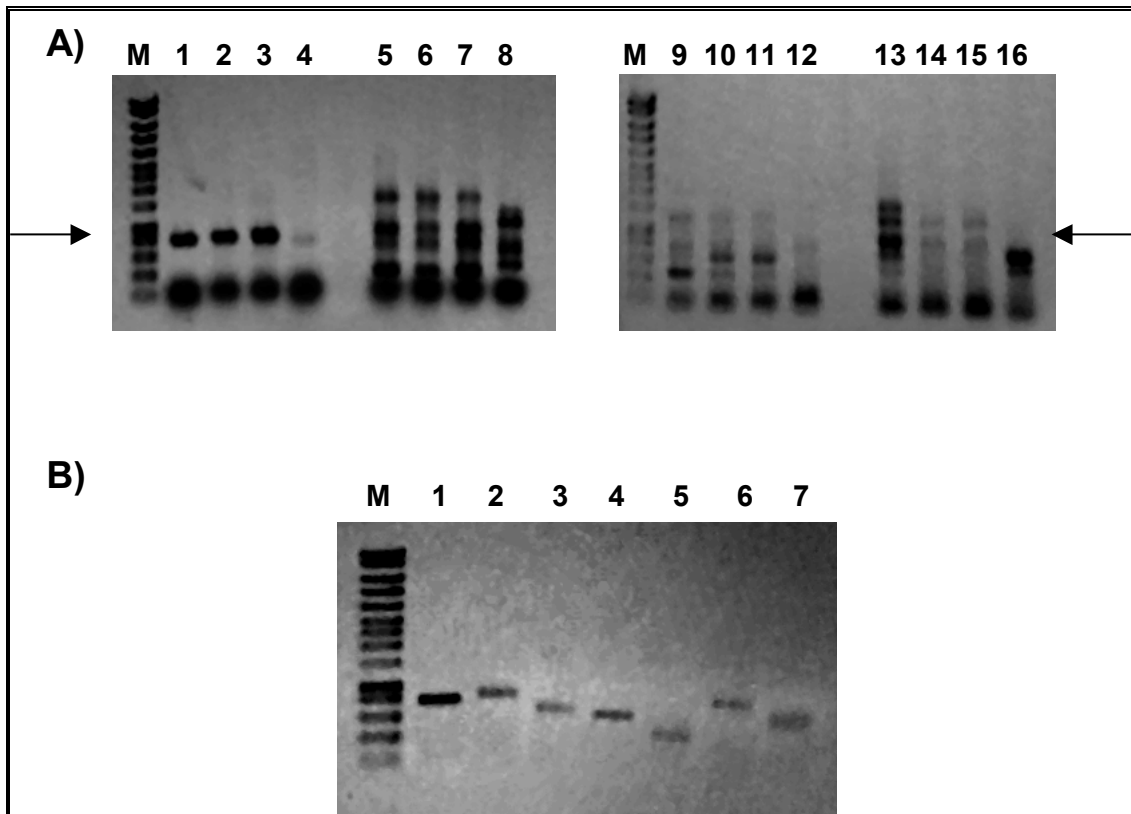


FIGURA 4.11 – Produtos de PCR obtido do template gDNA de *Penicillium* sp usando os primers LC NR/PR. (A) Produtos de PCR de aproximadamente 700 pb (indicado por setas) foram obtidos usando os pares de primers LC1/2c (linhas 1-3), LC1/5c (linhas 5-7), LC3/2c (linhas 9-11) e LC3/5c (linhas 13-15). *Phoma* sp foi usado como controle positivo para cada conjunto de pares de primers (linhas 4, 8, 12, 16). Os parâmetros da ciclagem térmica foram: (94°C, 3 min) x 1, (94°C, 30 sec; 50°C, 30 sec; 72°C, 45 sec) x 34, (72°C, 10 min). Os primers PCR foram usados nas seguintes concentrações: LC1 3,2 µM, LC2c 0.4 µM, LC3 1.2 µM, LC5c 0.8 µM. Volume de template usado (32ng. µL<sup>-1</sup>): linhas 1-2, 5-6, 9-10, 13-14, 2.0 µL e linhas 3-4, 7-8, 11-12, e 15-16, 3.0 µL. Volume de MgCl<sub>2</sub> usado (25 mM): linhas 1, 5, 9, 13, 4.0 µL; 2-4, 6-8, 10-12, e 14-16, 8.0 µL. (B) Produtos de PCR purificados derivados de LC1/2c (linha 1), LC1/5c (linhas 2-3), LC3/2c (linhas 4-5) e LC3/5c (linhas 6-7). Os produtos de reação foram fracionados sobre um gel de agarose a 0.7% imerso em tampão TAE a 100 mA, 200 V, Marcador de tamanho Hyper Ladder I.

Após a purificação (Figura 4.11B) os produtos de PCR foram clonados utilizando a célula competente *E. coli* e os plasmídeos foram obtidos de pelo menos 4 clones de cada produto de PCR e esses clones foram seqüenciados. Como existe a possibilidade de que bandas individuais de PCR contenha seqüências múltiplas heterólogas, estes clones pertencendo ao mesmo fragmento de PCR mas mostrando

diferentes tamanhos de bandas na eletroforese em gel após a reação de restrição também foram clonados (Figura 4.12, linhas 11-12).

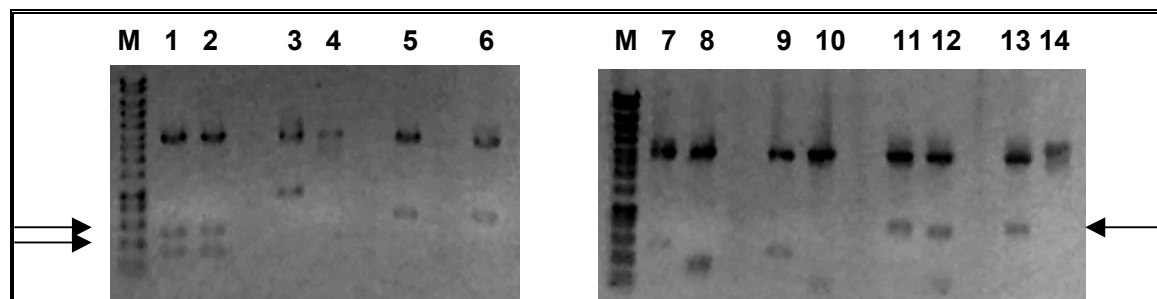


FIGURA 4.12 – Fragmentos de genes após a reação de restrição. Os produtos da reação foram fracionados sobre um gel de agarose a 0.7% em tampão TAE a 100 mA, 200 V, Marcador de tamanho Hyper Ladder I. LC1/2c (linhas 1-2), LC1/5c (linhas 3-6), LC3/2c (linhas 7-10) e LC3/5c (linhas 11-14).

A seqüência dos dados revelou a presença de um fragmento KS amplificado pelos pares de primers LC1/2c e LC3/5c, e a seqüência de nucleotídeos e a predição dos aminoácidos para a região analisada são mostrados na Figura 4.13 e 4.14, respectivamente. A análise das seqüências de LC1/5c e LC3/2c não apresentaram correlações com os domínios KS.

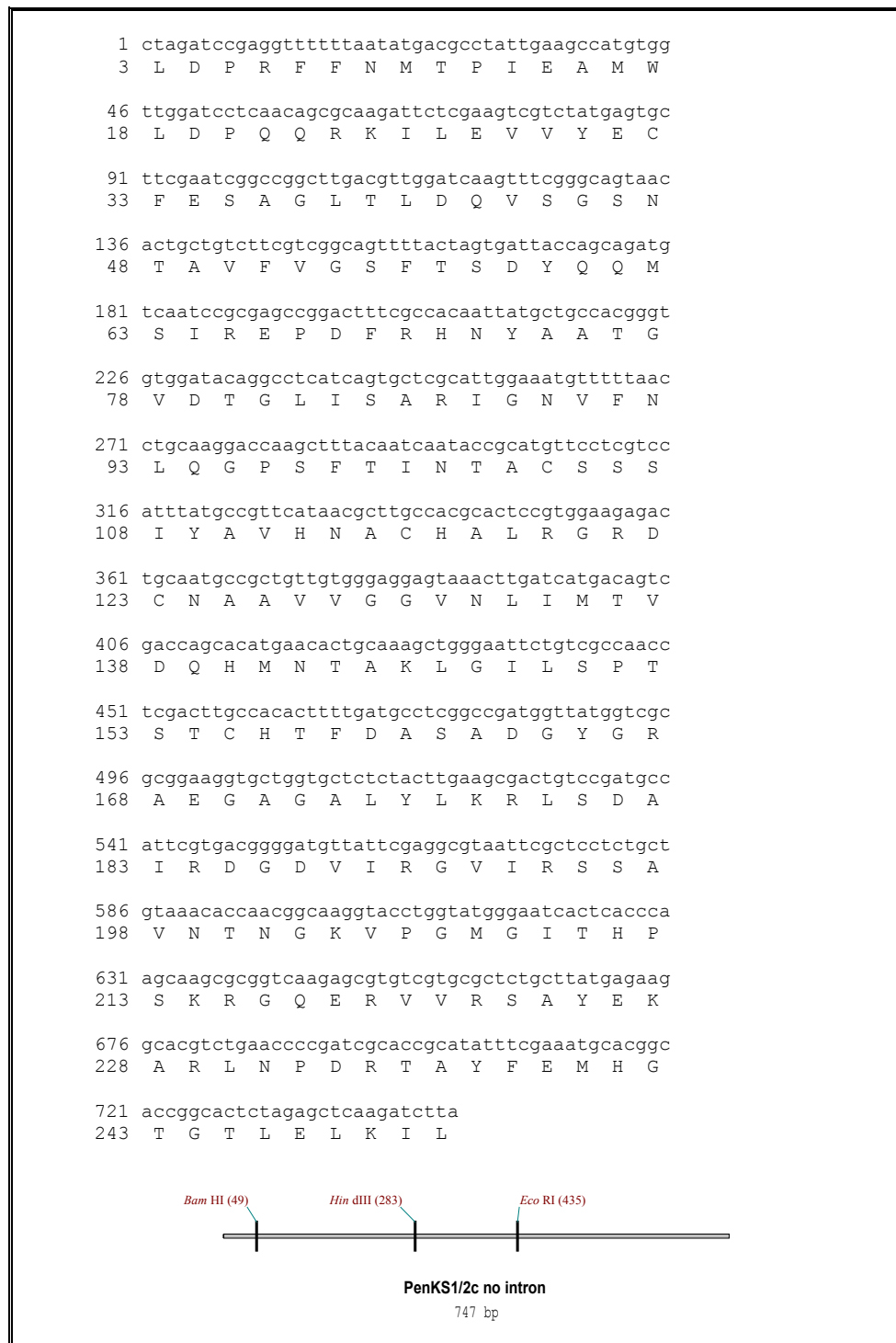


FIGURA 4.13 – Seqüência de nucleotídeos e predição dos aminoácidos para a região analisada usando o par de primer LC1/2c (NR) com template de gDNA de *Penicillium* sp. A seqüência foi alinhada usando o programa Vector NTI<sup>®</sup> Suite program. A seqüência é mostrada na direção LC1→ LC2c sem a presença de íntrons.

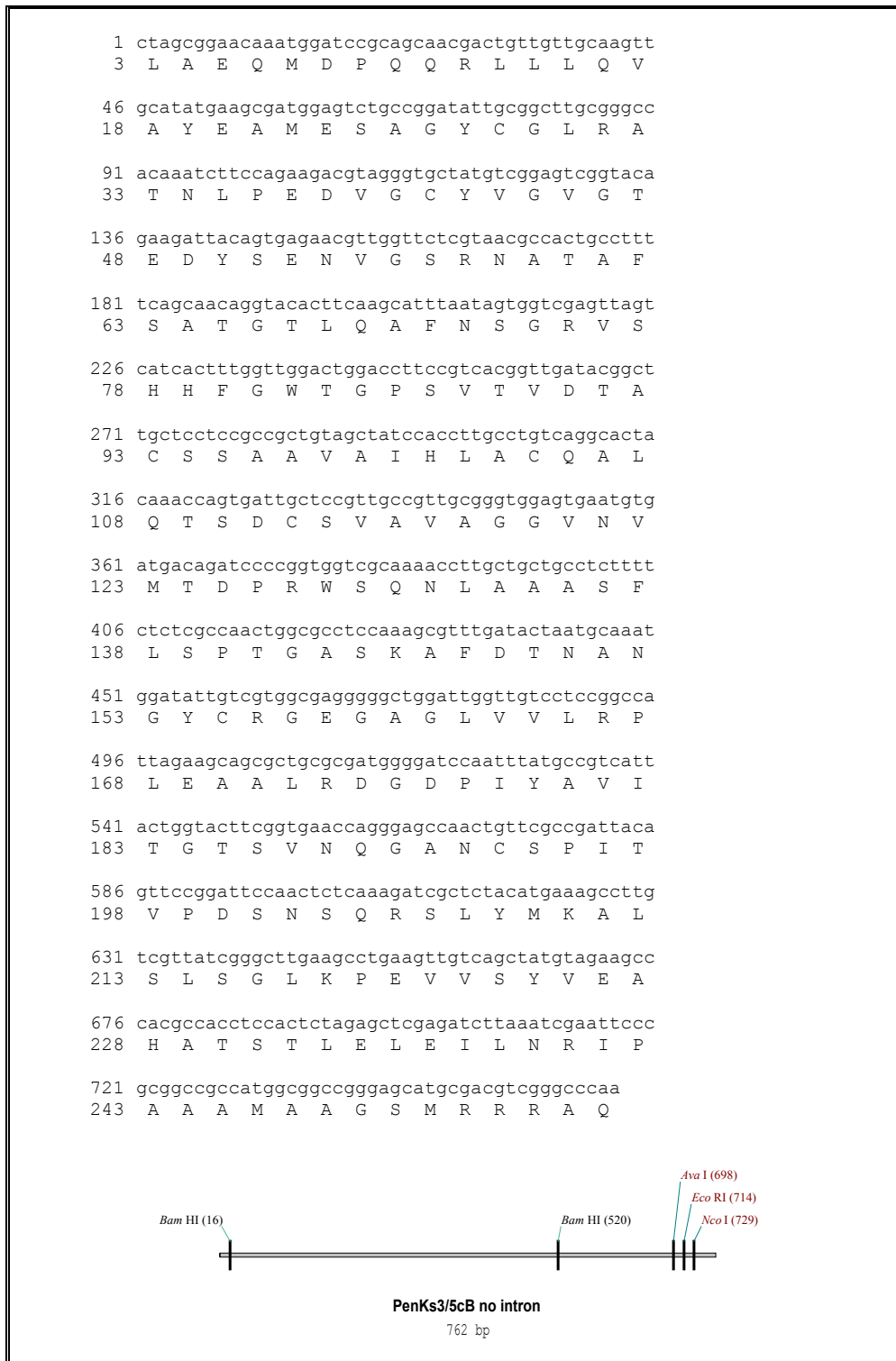


FIGURA 4.14 – Seqüência de nucleotídeos e predição dos aminoácidos para a região analisada usando o par de primer LC3/5c (PR) com template de gDNA de *Penicillium* sp. A seqüência foi alinhada usando o programa Vector NTI<sup>®</sup> Suite program. A seqüência é mostrada na direção LC3→ LC5c sem a presença de íntrons.

### 4.2.2. Primer HR PKS

Os primers degenerados KS3/KS4c foram usados e um produto de PCR de tamanho de Ca 600 pb foi obtido (Figura 4.15). Esta banda foi clonada e seqüenciada (Figura 4.16). A análise da seqüência revelou uma região contendo o domínio HR PKS KS (Figura 4.16), mas com um tamanho menor do que o esperado de 745 pb quando este par de primer foi usado (NICHOLSON *et al.*, 2001).

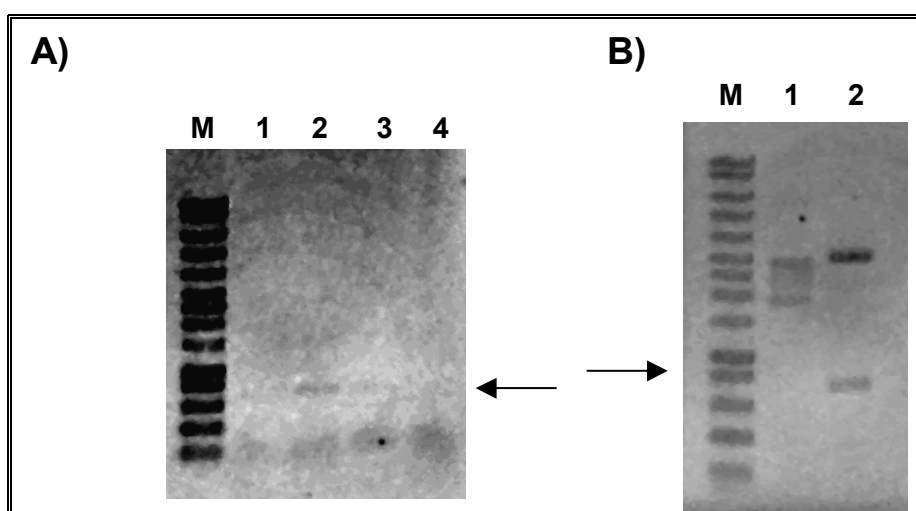


FIGURA 4.16 – Produto de PCR obtido do gDNA de *Penicillium* sp usando os primers KS3/4c. (A) Produtos de PCR de aproximadamente 700 pb (indicado por setas, linha 2) foi obtido usando 2  $\mu\text{L}$  de primers a 25  $\mu\text{M}$ , concentração de  $\text{MgCl}_2$  de 25 mM e 1  $\mu\text{L}$  de template de DNA (32 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ ). (B) Produtos de PCR purificados (linha 2). O produto de reação foi fracionado sobre um gel de agarose a 0.7% em tampão TAE a 100 mA, 200 V, Marcador de tamanho Hyper Ladder I.



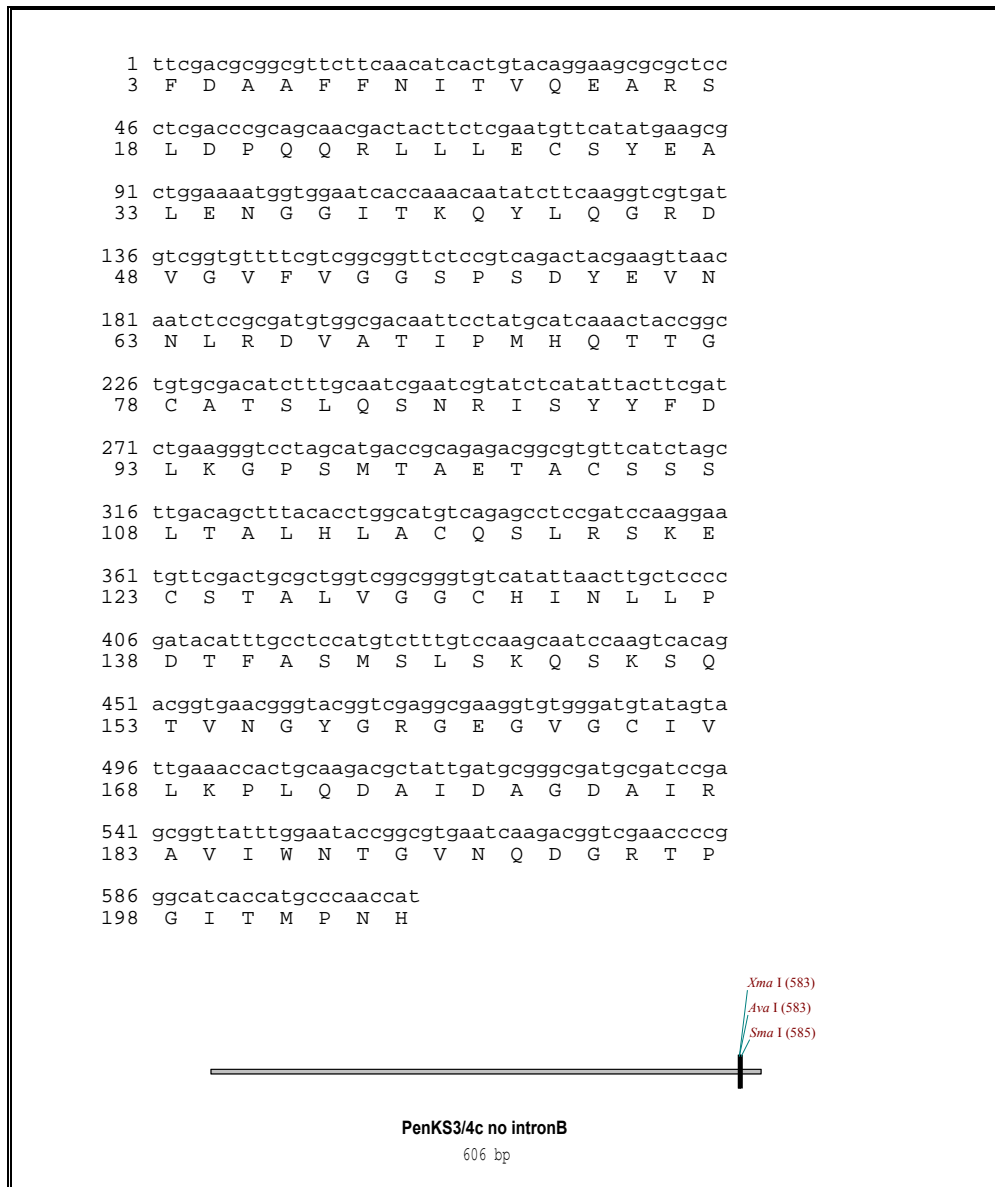


FIGURA 4.16 – Sequência de nucleotídeos e predição dos aminoácidos para a região analisada obtida usando o par de primers KS3/4c (HR). A sequência mostrada na direção KS3 → KS4 foi alinhada utilizando o programa Vector NTI® Suite program, não apresentando os íntrons<sup>24</sup>.

### 4.2.3. Primers CMeT

<sup>24</sup> **Introns:** Segmentos de DNA que não contém informação intercalado na região de transcrição dos genes (éxons) (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

Os pares de primers degenerados CMeT1/T2c e T1/T3c foram usados e ambos apresentaram múltiplos produtos sobre o gel de eletroforese, sob as condições usadas para a temperatura de anelamento nos experimentos de PCR (50<sup>0</sup>C), incluindo as bandas desejadas na região entre 300-350 pb (Figura 4.17A, C).

As bandas de tamanho desejados para CMeT (Figura 4.17B, D) foram clonadas e seqüenciadas. As seqüências dos produtos CMeT1/T2c e CMeT1/T3c foram analisadas e comparadas com outros domínios PKS CMeT já conhecidos.

Produtos de PCR de 200, 300, 350 e 400 pb foram obtidos quando o par de primer CMeT1/T2c foi usado. Estes fragmentos de DNA foram seqüenciados e a comparação com a seqüência dos polipeptídios derivados revelou a ausência de relação com o domínio CMeT (dados não mostrados). Isto sugere que estes fragmentos podem ser artefatos provenientes da reação de PCR. Uma tentativa foi feita para este polipeptídio usando o mesmo par de primer, mas aumentando a temperatura de anelamento no experimento de PCR para 55<sup>0</sup>C. Neste caso, nenhuma banda de tamanho desejado foi obtida.

O fragmento de DNA de 300 pb foi obtido quando foi utilizado o par de primer CMeT1/T3c no experimento de PCR. Este fragmento foi clonado e seqüenciado (Figura 3.18). A seqüência foi consistente com o domínio PKS CMeT fúngico após a análise e comparação com outras seqüências através do alinhamento e então esses dados revelaram a similaridade mas não a identidade dos domínio de PKS CMeT fúngicos já conhecidos. Isto sugeriu que o fragmento de DNA foi derivado de um novo domínio PKS CMeT (Figura 4.22). O produto foi denominado de PenCMeT1/T3c.

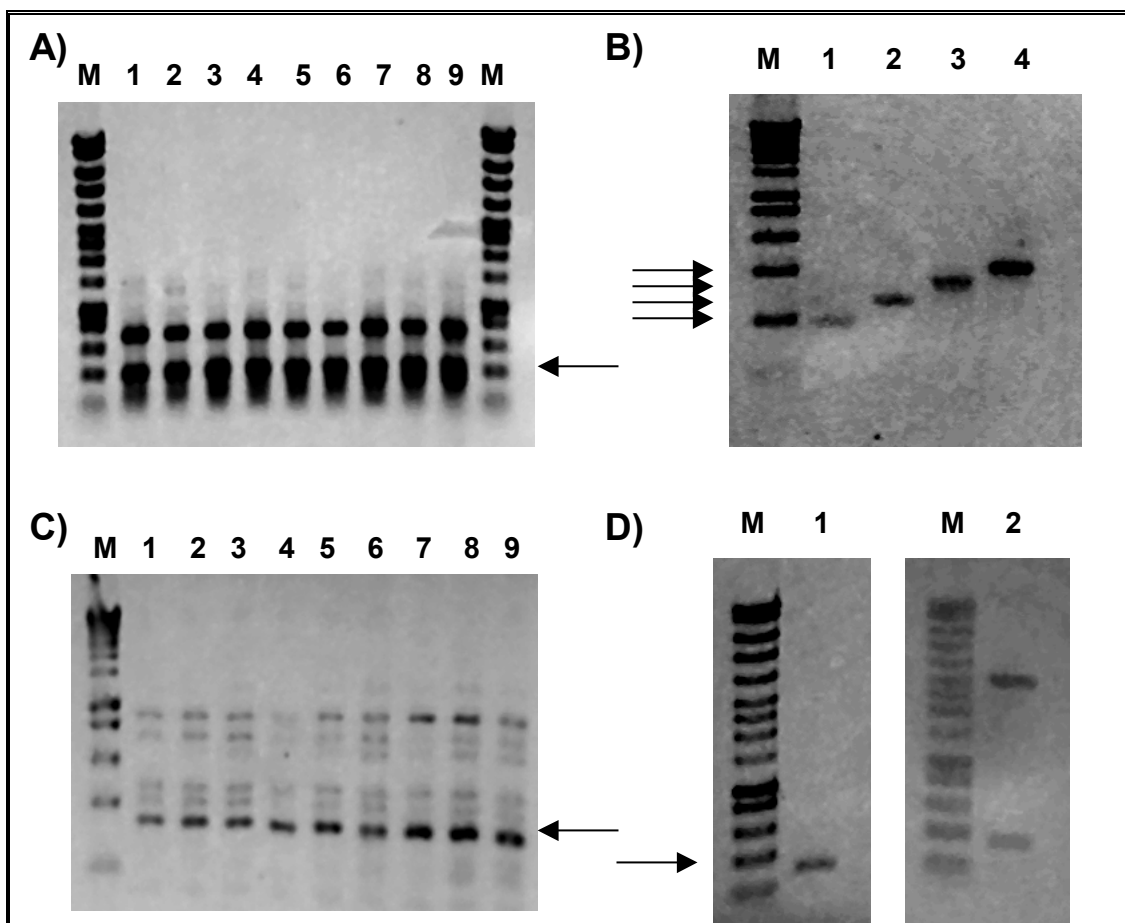


FIGURA 4.17 – Produtos de PCR obtidos do gDNA de *Penicillium* sp usando os primers CMET. (A) Produtos de PCR de aproximadamente 400 pb foram obtidos usando o par de primer CMET1/T2c. (B) Produtos de PCR purificados de CMET1/T2c (200, 300, 350, e 400 pb, indicado por setas). (C) Produto de PCR de aproximadamente 350 pb foi obtido usando o par de primer CMET1/T3c. (D) Produto PCR purificado e após a restrição quando usado os primers CMET1/T3c. Os produtos de reação foram fracionados sobre um gel de agarose a 2% em tampão TAE a 100 mA, 200 V, Marcador de tamanho Hyper Ladder I.

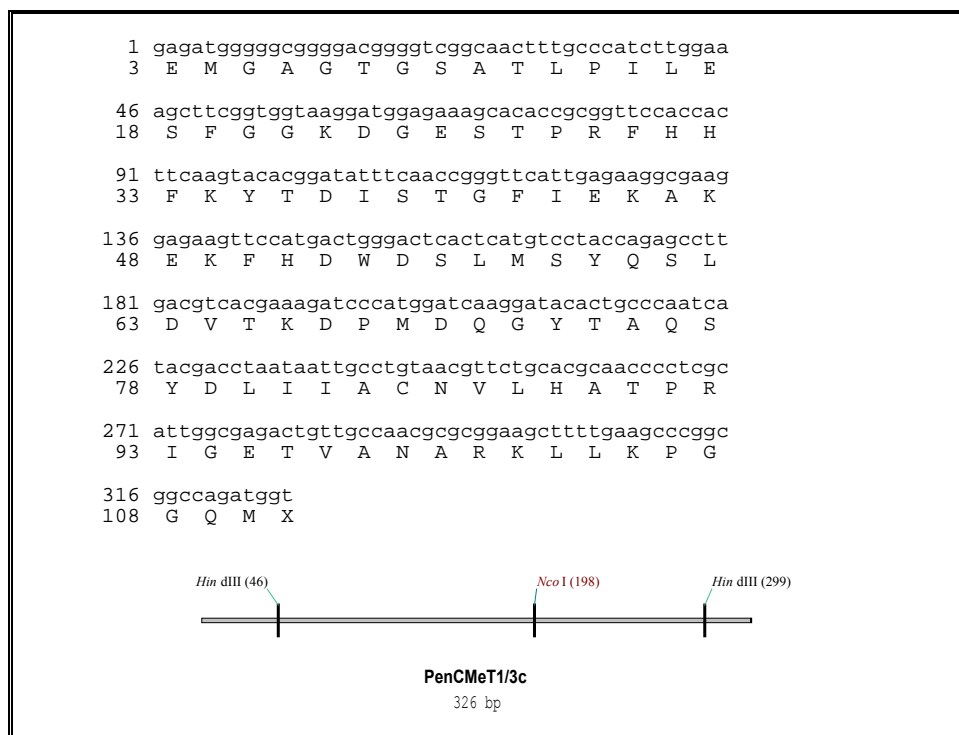


FIGURA 4.18 – Seqüência de nucleotídeos e predição dos aminoácidos para a região analisada usando o par de primer CMeT1/3c. A seqüência encontra-se na direção CMeT1 → T3c e foi alinhada usando o programa Vector NTI<sup>®</sup> Suite program.

### 4.3. Alinhamento e Análise Filogenética

#### 4.3.1. Domínio KS

A comparação da seqüência predita dos aminoácidos por Align X<sup>®</sup> com as seqüências PKS disponíveis confirmou os produtos LC PCR (LC1/2c, LC3/5c e KS3/4c) serem novos produtos de origem PKS KS (Figura 4.19).

O filograma foi construído para as proteínas prognosticadas codificadas pelos produtos de PCR com os primers LC- e KS juntos com os vários genes PKS fúngicos conhecidos (Figura 4.20). Este diagrama indica uma possível relação evolucionária entre os diferentes genes PKS fúngicos e os genes representados pelos produtos de PCR LC1/2c, LC3/5c, e KS3/4c. O gene PKS fúngico caiu dentro de três clusters distintos: não reduzido (genes de pigmentos dos esporos, melanina e aflatoxina), parcialmente reduzido (gene tipo MSAS), e altamente reduzido.

Capítulo 4: Estudos Biogenéticos dos Meroterpenos

Os genes em um cluster provavelmente compartilham o progenitor comum com cada um mais recentemente do que com genes de outros clusters (BINGLE *et al.*, 1999). Uma distinção significativa entre os genes nos clusters poder ser a presença ou ausência do domínio cetoreductase (BINGLE *et al.*, 1999).

|                      |       |                                   |                                     |
|----------------------|-------|-----------------------------------|-------------------------------------|
|                      |       | 1                                 | 50                                  |
| ATER                 | (1)   | -----                             | GEIPSMRWEPYY                        |
| FAS_RAT              | (1)   | -----                             | QEFWANLIGGVD                        |
| MFINT13B             | (1)   | -----                             | -----                               |
| LDKS                 | (1)   | -----                             | SKIPPSRFNVGG                        |
| ATPKS3INT12B         | (1)   | -----                             | -----                               |
| CHET                 | (1)   | -----                             | AEVQAKKWDPEG                        |
| ANWA                 | (1)   | -----                             | DADA                                |
| PenKS3/4c no intronB | (1)   | -----                             | -----                               |
| PenKS3/4c no intron  | (1)   | -----                             | -----                               |
| PenKs3/5cB no intron | (1)   | -----                             | -----                               |
| PenKS1/2c            | (1)   | -----                             | -----                               |
| AviM KS              | (1)   | PADSLSPVAVVGIGCRFP                | GGVNSPGEFWDLLTAGRNTVGEMPDRWEEYR     |
| CalO5 KS             | (1)   | -----                             | CRLPSDVTDPDALWELLKGGQTAGEIPAQRWRAYR |
| Consensus            | (1)   | -----                             | -----                               |
|                      |       | 51                                | 100                                 |
| ATER                 | (13)  | RRDIRNPKILDQTTKRGYFLD--H-VEN      | FDAAFFGVSPKEAEQMDPQQL               |
| FAS_RAT              | (13)  | MVTDDDRRWKAGLYGLPKRSGKLDLSK       | FDAFFGVHPKQAHTMDPQLRL               |
| MFINT13B             | (1)   | -----                             | FDAFFSITELEATSMDHQQL                |
| LDKS                 | (13)  | VYHPNGQRVGSMHVRRGGHFLD--EDPAL     | FDAFFNMSTEVASCMDPQYRL               |
| ATPKS3INT12B         | (1)   | -----                             | FDAFFNLNADVRSMDLQHFM                |
| CHET                 | (13)  | FYHPDSSRHGTHNVEYGHWFQ--QDVYN      | FDAFFNVSPAEAAALDPQQR                |
| ANWA                 | (5)   | HVDLTGTATNTSKVPYGCWI---REPLG      | FDPFFNMSPREALQADPAQRL               |
| PenKS3/4c no intronB | (1)   | -----                             | FDAFFNITVQEARSLDPQQL                |
| PenKS3/4c no intron  | (1)   | -----                             | FDAFFNITVQEARSLDPQQL                |
| PenKs3/5cB no intron | (1)   | -----                             | AEQMDPQQL                           |
| PenKS1/2c            | (1)   | -----                             | DPRFFNMTPIEAMWLDPQQR                |
| AviM KS              | (51)  | DFGPRFDAALRTAIRSGSFLD--DDIAG      | FDAEFFGISPREAELMDPQQL               |
| CalO5 KS             | (37)  | ERGPEYEAVLRDVTVAGSYLR---DVAG      | FDPPEFFGLSPREAAEMDPQQL              |
| Consensus            | (51)  | -----                             | FDA FFN P EA MDPQQL                 |
|                      |       | 101                               | 150                                 |
| ATER                 | (60)  | SEVETWEALEDAGIPPPQSLSGSE---       | TAVFMGVNSDDYSKLL---LEDIP            |
| FAS_RAT              | (63)  | LEVSYEAIVDGGINPASLRGTN---         | TGVVWGVSGSEASEALSRDPETLL            |
| MFINT13B             | (23)  | LECAFREALDNAGIQKHATVQKD---        | IGVFMGAGSPEYEFDLFRDSDTMP            |
| LDKS                 | (61)  | LEVVEALEAAGIPLEQVSGSK---          | TGVFAGTMYHDYQGSFQRQPEALP            |
| ATPKS3INT12B         | (23)  | LECAFEEAASARITLAKLHGTK---         | TGVLPPWSDADMEKSSSM---TCP            |
| CHET                 | (61)  | LECSYEAFENSPTMSKIVGTD---          | TSVFFVSSFATDYDMLWRDPESVP            |
| ANWA                 | (52)  | ALLTAYEALLEGAGFVPDSTPSTQRDRV      | GFYGMTSDDYREVNSG--QDID              |
| PenKS3/4c no intronB | (23)  | LECSYEALENGGITKQYLQGRD---         | VGVFVGGSPSDYEVNNLRDVATIP            |
| PenKS3/4c no intron  | (23)  | LECSYEALENGGITKQYLQGRD---         | VGVFVGGSPSDYEVNNLRDVATIP            |
| PenKs3/5cB no intron | (11)  | LQVAYEAMESAGYCGLRATNLP-EDV        | GCYVGVGTEDYSENVRG---SR              |
| PenKS1/2c            | (22)  | LEVVEYECFESAGLTLQVSGSN---         | TAVFVGSFTSDYQQMSIREPDFRH            |
| AviM KS              | (99)  | MEVAVQALEHAGIPPHLAGTD---          | TGVFAGVCTYDYGAGR---LEDLP            |
| CalO5 KS             | (84)  | LEVGWALEHAGLPPTRLAGTD---          | TGVFVGVSTTDYGDRL---LEDLP            |
| Consensus            | (101) | LLEV YEAL E AGI L G TGVFVG DY R P |                                     |
|                      |       | 151                               | 200                                 |
| ATER                 | (104) | NVEAWMGIGTAYCGVPRISYHLNLM         | GPS-----TAVD                        |
| FAS_RAT              | (110) | GYS-MVGCQRA---MMANRLSFFDFK        | GPS-----IALD                        |
| MFINT13B             | (70)  | MFQA-TGNHLMQ--SNRISHFFDWR         | GPS-----VTMD                        |
| LDKS                 | (108) | RYFI-TG--NAGTMLANRVSHFYDLR        | GPS-----VSID                        |
| ATPKS3INT12B         | (67)  | -----G-----CMAANRYPNF             | GLEGPS-----ISLD                     |
| CHET                 | (108) | MYQC-TNSGFSRNLANRISYSFDLK         | GPS-----VLVD                        |
| ANWA                 | (100) | TYFIPGGR---AFTPGRINYFKFS          | GPS-----VSDV                        |
| PenKS3/4c no intronB | (70)  | MHQT-TG--CATSLQSNRISYYFDLK        | GPS-----MTAE                        |
| PenKS3/4c no intron  | (70)  | MHQT-TG--CATSLQSNRISYYFDLK        | GPS-----MTAE                        |
| PenKs3/5cB no intron | (55)  | NATAFSATGTLQAFNSGRVSHHF           | GWTGPS-----VTVD                     |
| PenKS1/2c            | (69)  | NYAA-TG--VDTGLISARIGNVFN          | LQGRVQLLPIGAMKSLTILTSFTIN           |
| AviM KS              | (143) | NIDAWTGIGAAVCAVSNRVSHALDLR        | GPS-----LSID                        |
| CalO5 KS             | (128) | TVEAYTGIGAATCALANRISYALDLR        | GPS-----VAVD                        |
| Consensus            | (151) | TG A NRIS FDL GPS                 | D                                   |
|                      |       | 201                               | 250                                 |
| ATER                 | (137) | ACASSLVAIHHRQAIIQGESEVAIVGG       | VNALCGPGLTRVLDKAGATST               |
| FAS_RAT              | (140) | TACSSSLLALQNAIQAIRSGECPAAI        | VGGINLLKPNTSVQFMKLGMLSP             |
| MFINT13B             | (100) | TACSSSLLAVHFACQSIRNRESEVAL        | VGGCNLNIIPYFINYSTRMLMGD             |
| LDKS                 | (138) | TACSTTLTALHLAIQSLRAGESDMAI        | VAGANLLNPDVFTTMSNLGLFSS             |
| ATPKS3INT12B         | (89)  | SACSSSVYALHLACQSLRMAECSAA         | FVGAATLIINAKPIIALDTMGALSP           |

Capítulo 4: Estudos Biogénéticos dos Meroterpenos

|                      |       |  |
|----------------------|-------|--|
| CHET                 | (140) | TACSSGGLTALHLACQSLVGDVVRQALAAAGSSLIIGPEMMVTMSMMKFLSP |
| ANWA                 | (130) | TACSSSLAAIHLACNSIWRNDCDTAITGGVNIILTNPDNHAGLDRGHFLSR  |
| PenKs3/4c no intronB | (100) | TACSSSLTALHLACQSLRSKECSTALVGGCHINLLPDTFASMSLSKQSKS   |
| PenKs3/4c no intron  | (100) | TACSSSLTALHLACQSLRSKECSTALVGGCHINLLPDTFASMSLSKQSKS   |
| PenKs3/5cB no intron | (88)  | TACSSAAVAIHLACQALQTSDCSVAVAGGVNVMTPRWSQNLAASFLSP     |
| PenKs1/2c            | (116) | TACSSSIYAVHNACHALRGRDCNAAVVGGVNLIMTVDQHMNTAKLGIILSP  |
| AviM KS              | (176) | TACSASLVALHTAAQSLRLGECTVALAGGVNLLVSPGQTIALGTAGALAP   |
| CalO5 KS             | (161) | TACSASLVAVHLACQSLLLRESTVALAGGVNLLVTPGQNASLQAAGTFLSP  |
| Consensus            | (201) | TACSSSL ALHLACQSLR EC A VGG NL P G LSP<br>251 300    |
| ATER                 | (187) | EGRCL-----SFDEDAKGYGRGEGAAVVILKRLSTAIRDGDHIRAI       |
| FAS_RAT              | (190) | DGTCR-----SFDDSGNYCRAEAVVAVLLTKKSLARR----VYAT        |
| MFINT13B             | (150) | DGRSY-----SFDARGTGYGRGEGCGMLLLKPLDQALKNDYVRAV        |
| LDKS                 | (188) | DGISY-----SFDSRADGYGRGEGVAAIVLKTLPDAVRDGDPIRLI       |
| ATPKS3INT12B         | (139) | DGKSY-----AYDSRRNGFGMGGGGCLILKRLLEDALEAGDPIQAV       |
| CHET                 | (190) | DGRCY-----AFDERANGYARGEGVAVLLKRLLEDAALADNDPIRAV      |
| ANWA                 | (180) | TGNCN-----TFDDGADGYCRADGVGTIVLKRLEDAALADNDPIILGV     |
| PenKs3/4c no intronB | (150) | Q-----TVNNGYGRGEGVGCIVLKPLQDAIDAGDAIRAV              |
| PenKs3/4c no intron  | (150) | PFDDQ-----SKSQTVNNGYGRGEGVGCIVLKPLQDAIDAGDAIRAV      |
| PenKs3/5cB no intron | (138) | TGASK-----AFDTNANGYCRGEGAGLVLRPLEAALRDGDPIYAV        |
| PenKs1/2c            | (166) | TSTCH-----TFDASADGYGRAEGAGALYKRLSDAIRDGDVIRGV        |
| AviM KS              | (226) | DGRSKPFAASAGRYAVAASADGYGRGEGCGVLVIKLLTDAVRDGDRLAV    |
| CalO5 KS             | (211) | DGVSK-----SFDRDADGYGRGEGCGVLVLRLEDAERDGDRLAV         |
| Consensus            | (251) | DG FD A GYGRGEG G VLK L DA RDGD IRAV<br>301 350      |
| ATER                 | (228) | IKGSAVAQDG--KTINGIMAPNAKAQELVAVNLRATAGVD-PLTVGYVEAH  |
| FAS_RAT              | (227) | ILNAGTNTDG-CKEQGVTFPSGGEAQELIRSLYQPGGV-APESLEYIEAH   |
| MFINT13B             | (191) | ISASGVNQDG--YTPGITMPNH-----                          |
| LDKS                 | (229) | VRETAINQDG--RTPAISTPSGGEAQELIQDCYQKAQLD-PKQTSYVEAH   |
| ATPKS3INT12B         | (180) | IRHTVCNHSG--RTRGITMPNH-----                          |
| CHET                 | (231) | IRGTGCNQDG--KTPGITMPNSVQEAALIRSVYKKAALD-PLDTTYVECH   |
| ANWA                 | (221) | INGAYTNHS--AEAVSITRPHVGAQAFIFKLLNEANVD-PKNISYIEMH    |
| PenKs3/4c no intronB | (183) | IWNVTGNQDG--RTPGITMPNH-----                          |
| PenKs3/4c no intron  | (191) | IWNVTGNQDG--RTPGITMPNH-----                          |
| PenKs3/5cB no intron | (179) | ITGTSVNQGAN--CSPITVPDSNSQRSLYMKALSLSGLK-PEVVSYVEAH   |
| PenKs1/2c            | (207) | IRSSAVNTNGKVPGMGITHPSKRGQERVRSAYEKARLN-PDRTAYFEMH    |
| AviM KS              | (276) | LRGSFAFNQDG--RTINGIMAPCGQAQEHVMRRALTAGVA-ADTVDFVEAH  |
| CalO5 KS             | (252) | IRGSAVNQDG--HTDGIMAPSGPAQQHVRRACDRAGVA-PASVDYVEAH    |
| Consensus            | (301) | I VNQDG T GIT P Q A P Y E H<br>351 400               |
| ATER                 | (275) | ATSTPLGDPTEVSAVSA-----                               |
| FAS_RAT              | (275) | GTGTKVGDPELNGITR-----                                |
| MFINT13B             | (211) | -----  |
| LDKS                 | (276) | GTGTRAGDPLELAV-----                                  |
| ATPKS3INT12B         | (200) | -----  |
| CHET                 | (278) | GTGTQAGDTTEAS-----                                   |
| ANWA                 | (268) | GTGTQAGDAVEMQSVLD-----                               |
| PenKs3/4c no intronB | (203) | -----  |
| PenKs3/4c no intron  | (211) | -----  |
| PenKs3/5cB no intron | (226) | ATSTLELEILNRIPA-----                                 |
| PenKs1/2c            | (256) | GTGTLELEKIL-----                                     |
| AviM KS              | (323) | GTGTRLGDPMEIGAIAAVYGRDRSQEPCAVGSVKSNIGHLEGAAGVAGV    |
| CalO5 KS             | (299) | GTGTQLGDPVEATALAAVYGAGRPDDRPLIGSIKSNVGHLEGAAGVAGL    |
| Consensus            | (351) | GTGT GD E<br>401 450                                 |
| ATER                 | (292) | -----  |
| FAS_RAT              | (292) | -----  |
| MFINT13B             | (211) | -----  |
| LDKS                 | (290) | -----  |
| ATPKS3INT12B         | (200) | -----  |
| CHET                 | (291) | -----  |
| ANWA                 | (285) | -----  |
| PenKs3/4c no intronB | (203) | -----  |
| PenKs3/4c no intron  | (211) | -----  |
| PenKs3/5cB no intron | (241) | -----  |
| PenKs1/2c            | (266) | -----  |
| AviM KS              | (373) | IKAILALDEDRIPASLLDGDPNPEIDWAGLDIRLATRALPWPERPHPRRA   |
| CalO5 KS             | (349) | MKAILALHRGQIPGTPPLRQAIP-AVGDGTGLRLVTGTLPWPERDGPARRA  |
| Consensus            | (401) | -----<br>451 500                                     |
| ATER                 | (292) | -----  |
| FAS_RAT              | (292) | -----  |
| MFINT13B             | (211) | -----  |
| LDKS                 | (290) | -----  |
| ATPKS3INT12B         | (200) | -----  |
| CHET                 | (291) | -----  |
| ANWA                 | (285) | -----  |
| PenKs3/4c no intronB | (203) | -----  |

|                      |       |   |
|----------------------|-------|---|
| PenKS3/4c no intron  | (211) | -----   |
| PenKs3/5cB no intron | (241) | -----   |
| PenKS1/2c            | (266) | -----   |
| AviM KS              | (423) | AVSGFGYGGTVAHVVLEQAPTAPARPAPEPAGTLFFVSAA-----     |
| Cal05 KS             | (398) | AVSGFGYGGTIAHVVLEEAPPVPADGDAPAADAARPLFPLSARSDAALR |
| Consensus            | (451) |   |
|                      | 501   | 517   |
| ATER                 | (292) | -----   |
| FAS_RAT              | (292) | -----   |
| MFINT13B             | (211) | -----   |
| LDKS                 | (290) | -----   |
| ATPKS3INT12B         | (200) | -----   |
| CHET                 | (291) | -----   |
| ANWA                 | (285) | -----   |
| PenKS3/4c no intronB | (203) | -----   |
| PenKS3/4c no intron  | (211) | -----   |
| PenKs3/5cB no intron | (241) | -----   |
| PenKS1/2c            | (266) | -----   |
| AviM KS              | (463) | -----   |
| Cal05 KS             | (448) | QQAARLADRLDGDDRPD                                 |
| Consensus            | (501) |   |

FIGURA 4.19 – Alinhamento dos produtos clonados de PCR usando os primers LC e KS com outros domínios cetosintase PKS. O sítio ativo cisteína está indicado pelo asterisco. Os códigos de identificação das seqüências são: ATER: *Aspergillus terreus* (PR); FAS RAT (rat fatty acid synthases); MF INT 13B (unknown fungus, HR); LDKS (*Aspergillus terreus*); ATPKS3INT12B (*Aspergillus terreus*, HR); CHET (*Clostridium heterostrophus* PKS1, HR); ANWA (*Aspergillus nidulans* WA, NR), PenKS3/4c no intronB (*Penicillium* sp, KS3/4c, HR), PenKS3/4c no intron (*Penicillium* sp, KS3/4c, HR), PenKS3/5cB no intron (*Penicillium* sp, LC3/5c, PR), PenKS1/2c (*Penicillium* sp, LC1/2c, NR), AviM KS; Cal05 KS (*Clostridium lagenarium*, NR).

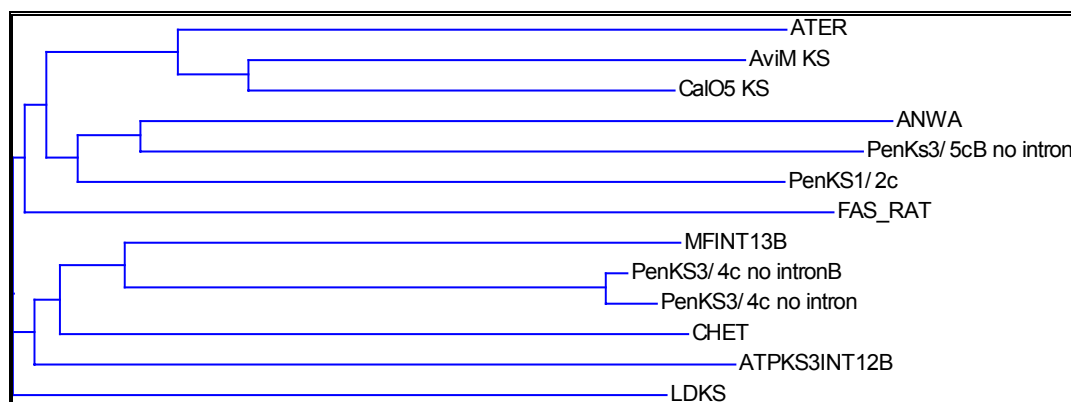


FIGURA 4.20 – Relação filogenética dos produtos PCR com os primers LC- e KS e outros domínios cetosintase PKS fúngicos. Os códigos de identificação das seqüências são: ATER: *Aspergillus terreus* (PR); AviM KS; Cal05 KS (*Clostridium lagenarium*, NR); ANWA (*Aspergillus nidulans* WA, NR); PenKS3/5cB no intron (*Penicillium* sp, LC3/5c, PR); PenKS1/2c (*Penicillium* sp, LC1/2c, NR); FAS RAT (rat fatty acid synthases); MF INT 13B (unknown fungus, HR); PenKS3/4c no intronB (*Penicillium* sp, KS3/4c, HR); PenKS3/4c no intron (*Penicillium* sp, KS3/4c, HR); CHET (*Clostridium heterostrophus* PKS1, HR); ATPKS3INT12B (*Aspergillus terreus*, HR); LDKS (*Aspergillus terreus*).

### 4.3.2. Domínio CMeT

A seqüência deduzida dos aminoácidos do fragmento isolado revelou uma similaridade extraordinária com as CMeTransferases dadas na Figura 4.21(A). A filogenia para as proteínas deduzidas é mostrada na Figura 4.21(B).

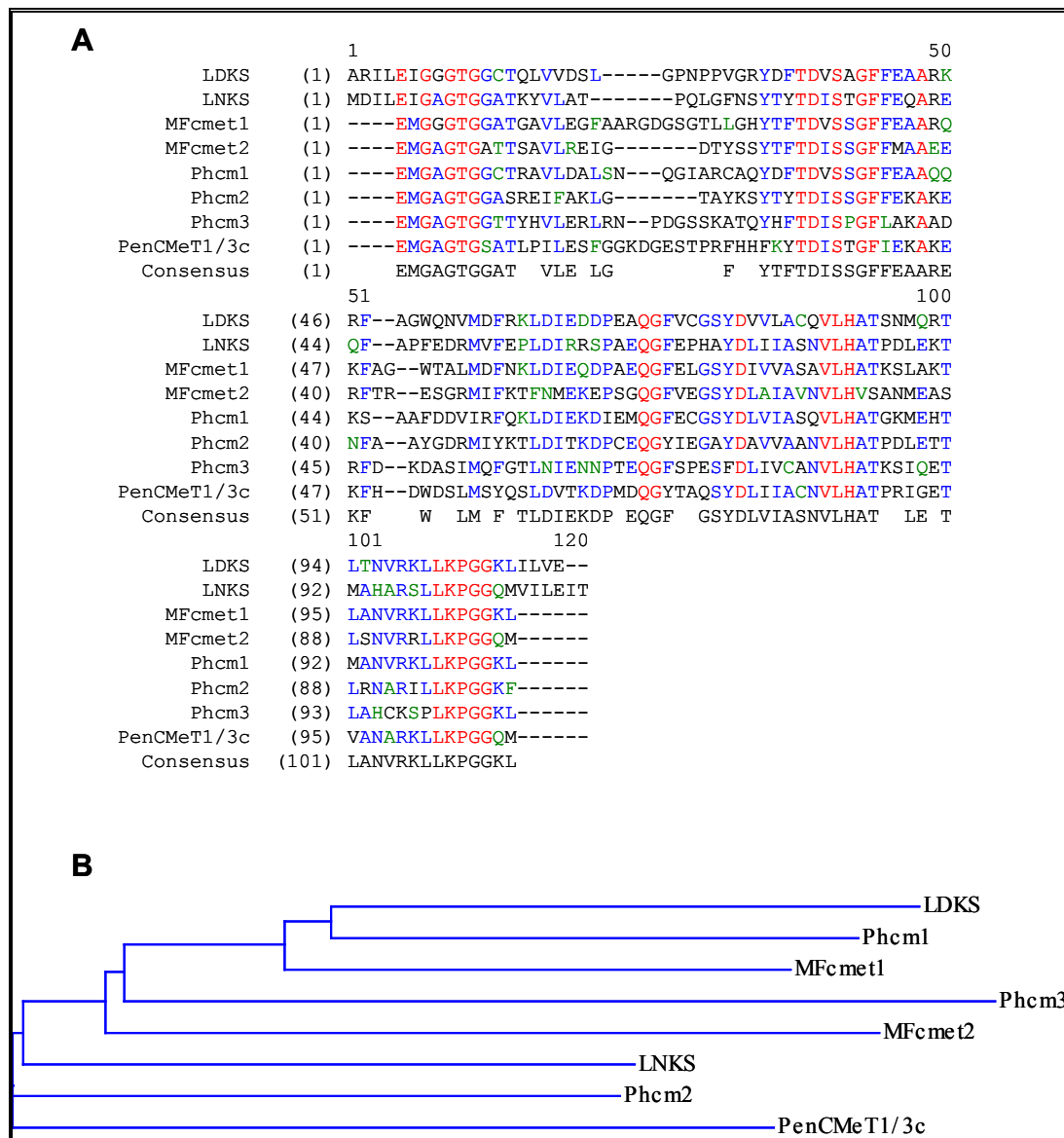


FIGURA 4.21 – (A): Alinhamento do produto clonado de PCR com o primer de C-Methyl Transferases com outros domínios de CMeT. Os códigos de identificação das seqüências são: LDKS (*Aspergillus terreus*, LDKS); LNKS (*Aspergillus terreus*, LDKS); MF CMeT1 (MF5453, CMeT1, SAM); MF CMeTt2 (MF5453, CMeT2, LDKS); Phcm1 (*Phoma* sp, CMeT1, SAM); Phcm2 (*Phoma* sp, CMeT2, LDKS); Phcm3 (*Phoma* sp, CMeT3, LNKS); PenCMeT1/3c (*Penicillium* sp, CMeT1/T3c). (B): Relação filogenética dos produtos PCR com primers de CMeT e outros domínios fúngicos de CMethyl Transferases.

## 5. DISCUSSÃO



## 5.1. Genes PKS

Os resultados indicaram três diferentes classes de genes PKS fúngicos derivados do genoma de *Penicillium* sp. Esta observação já seria esperada uma vez que alguns gêneros de fungos filamentosos são conhecidos por produzir vários metabólitos policetídeos, com várias classes de esqueletos policetídeos (NICHOLSON, 2000). Por exemplo, uma grande classe de policetídeos fúngicos (1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno, ácido orselínico) onde não tem os passos de redução durante suas biossínteses, são referidos como policetídeos não reduzidos (NR). Uma outra classe mostra uma redução parcial (PR) e é representada pelo ácido metil-salicílico. Uma terceira classe mostra níveis muito maiores de redução (HR) e é representada por compostos tais como a lovastatina e esqualestatina (NICHOLSON *et al.*, 2001).

Este trabalho foi realizado usando primers específicos degenerados de PCR para certas classes de PKS projetadas por BINGLE *et al.*, (1999) e NICHOLSON *et al.*, (2001). A seqüência dos dados mostrou que para cada par de primer foi amplificada apenas uma única seqüência de *Penicillium* sp e elas foram denominadas como PenKS1/2c (Figura 4.13), Pen KS3/5cB no intron (Figura 4.14), e Pen KS3/4c no intron (Figura 4.16) derivadas, respectivamente, dos pares de primers LC1/2c (NR), LC3/5c (PR), e KS3/4c (HR).

A comparação destes produtos através do alinhamento com as regiões que circundam o sítio ativo cetosintase de um número de genes PKS (Figura 4.19) mostrou alguma homologia entre as classes de policetídeo sintases NR, PR e HR. Por exemplo, o fragmento PenKS1/2c mostra alguma homologia com *Aspergillus nidulans* WA (ANWA), um tipo de PKS não reduzido. O gene PenKS3/5c foi obtido através do par de primer LC3/5c baseado no gene 6-MSAS, mas de acordo com este alinhamento não foi observada alguma relação com esse gene. O gene HR PenKS3/4c apresentou homologia com outros derivados PKS3/4c (como MFINT13B, CHET, ATPKS 3INT12B). A seqüência predita dos aminoácidos através do programa Vector NTI confirmou que esses genes são novos produtos de origem LC PKS.

## 5.2. Gene CMeT

O propósito de estudar os genes C-metil-transferases é que uma possível relação com a biossíntese dos meroterpenos onde eventos de metilação ocorrem durante a biogênese destas substâncias. Dois deles envolvem a C-metilação dos carbonos C-3, C-5 do ácido orselínico, um dos esqueletos dos compostos meroterpenoídicos. Experimentos realizados por SIMPSON *et al.* (1997) demonstraram que essas duas reações de metilação ocorrem antes da aromatização do tetracetídeo, dando origem ao ácido 3,5-dimetilorselínico. Esta reação é um evento importante na biossíntese dos meroterpenos uma vez que a introdução desses grupos metila é essencial para dar seqüência ao passo posterior que é a incorporação intacta do farnesil pirofosfato a parte terpenoídica dos meroterpenos. Então a metiltransferase seria a responsável pelas C-metilações no precursor ácido orselínico.

De acordo com estes propósitos os primers CMeT foram usados nas reações de PCR e um fragmento de DNA do tipo CMeT foi obtido. A seqüência obtida usando o primer CMeT1/T3c mostrou ser similar, mas não idêntico aos domínios PKS CMeT fúngicos já conhecidos (Figura 4.21). A seqüência encontra-se dentro da classe LNKS, como mostrado na Figura 4.22.

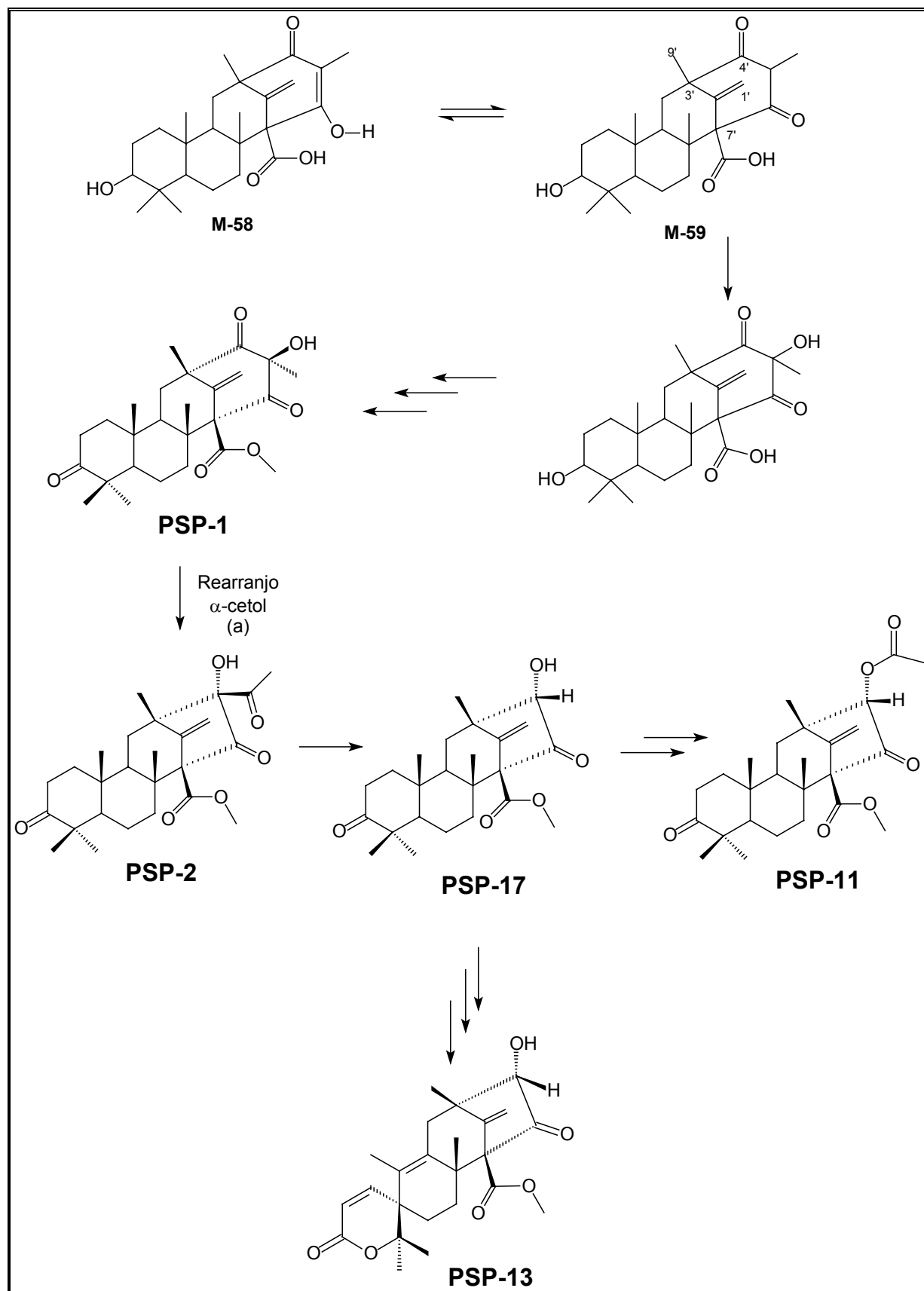
## 6. PROPOSTAS BIOSSINTÉTICAS

Os meroterpenos, **PSP-1**, **PSP-2**, **PSP-3**, **PSP-4**, **PSP-6**, **PSP-8**, **PSP-9**, **PSP-10**, **PSP-11**, **PSP-12**, **PSP-13**, **PSP-17** e **PSP-19**, isolados dos extratos do fungo *Penicillium* sp apresentam uma relação estrutural significativa com o meroterpeno austina (**M-27**). Isto nos permite propor que algumas dessas substâncias sejam precursoras biossintéticas de **M-27**, como também de outros meroterpenos análogos.

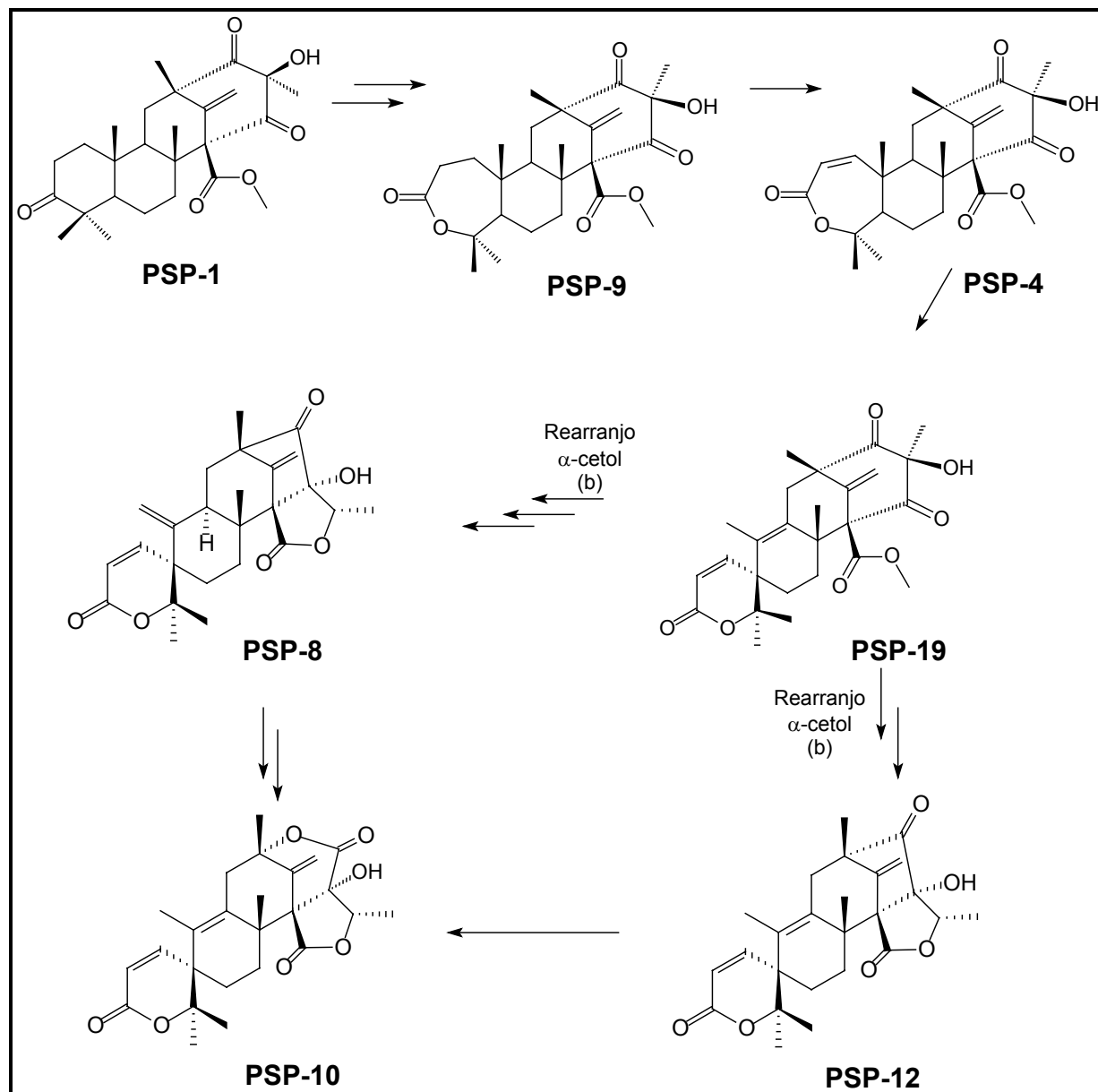
Os Esquemas 4.9, 4.10 e 4.11 sugerem uma possível relação entre essas substâncias, a qual deve ser, de fato, comprovada através de estudos de marcação isotópica e re-isolamento dessas substâncias com alguns átomos marcados. O intermediário chave (**M-58**) para a formação da austina (**M-27**) e seus correlatos é formado pela alquilação do tetracetídeo 3,5-dimetilorselinato (**M-41**) pelo farnesil-

pirofosfato, conforme apresentado anteriormente no Esquema 4.6. Como visto anteriormente, a partir deste intermediário uma série de transformações ocorre em ambas as partes terpenoídica e policetídica. Na porção farnesil do metabólito, o sistema decalina ciclizado passa por uma série de modificações para dar origem ao anel espiro-lactona, passando por oxidações biológicas do tipo Baeyer-Villiger e posterior rearranjo da lactona de 7 membros. Na parte tetracetídica, o anel aromático é alquilado, sofre oxidação, passa por um rearranjo  $\alpha$ -cetol com a possibilidade de formação de dois intermediários. Posteriormente ocorre a redução da carbonila cetônica em um desses intermediários com formação da lactona.

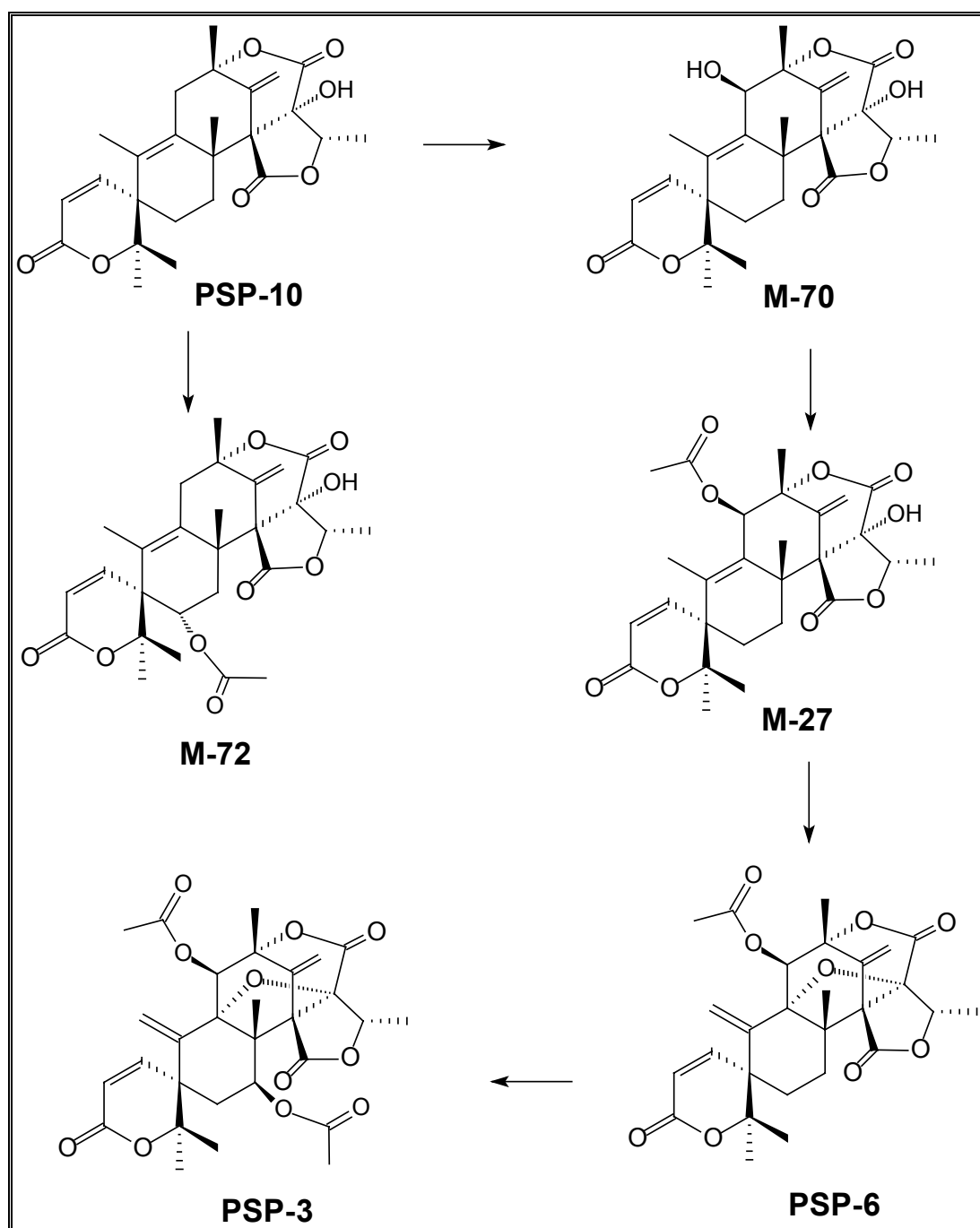
Os meroterpenos isolados sugerem fortemente que as transformações nas duas partes que compõe essa classe de metabólitos ocorram concomitantemente, diferentemente do proposto para as andibeninas, na qual SIMPSON *et al.* (1997) propõe que a modificação do tetracetídeo para formar o anel  $\gamma$ -lactona antecede as modificações ocorridas na porção farnesil. Uma possível explicação seria a utilização do mesmo arsenal enzimático ou similar em ambas as partes envolvidas, visto que as modificações, na maioria das vezes, são de oxidações biológicas do tipo Baeyer-Villiger.



ESQUEMA 4.9 – Proposta biogênica para a formação dos meroterpenos **PSP-1**, **PSP-2**, **PSP-17**, **PSP-11** e **PSP-13**.

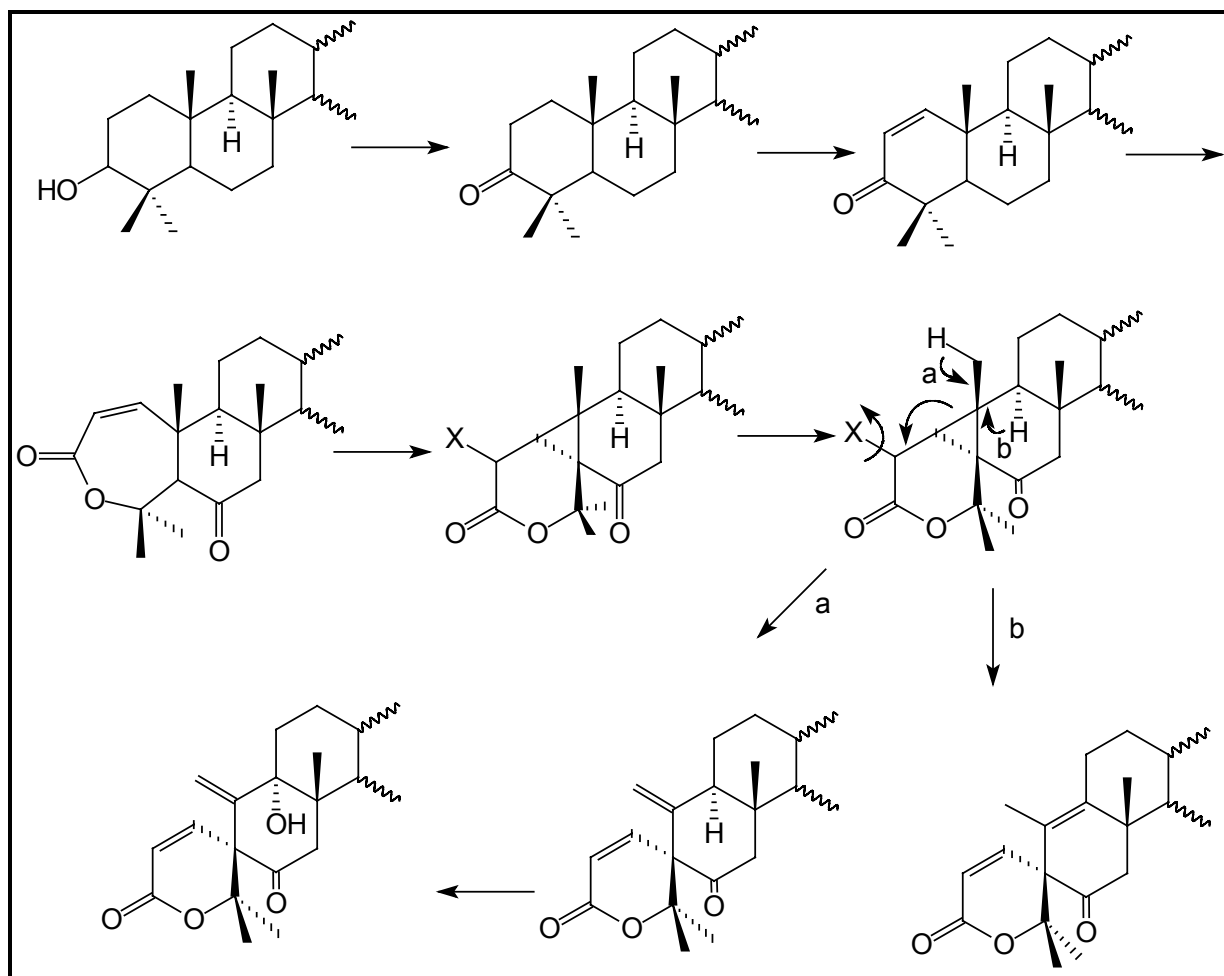


ESQUEMA 4.10 – Proposta biogênica para a formação dos meroterpenos **PSP-9**, **PSP-4**, **PSP-19**, **PSP-8**, **PSP-12** e **PSP-10**.



ESQUEMA 4.11 – Proposta biogênica para a formação dos meroterpenos **PSP-3**, **PSP-6**, **M-27**, **M-70** e **M-72**.

O fato da similaridade entre os limonóides e os meroterpenos e a possibilidade de possuir um sistema enzimático muito semelhante, nos motivou a propor uma biossíntese para a formação do anel espiro nestes metabólitos baseado nos limonóides, conforme mostra o Esquema 4.12.



ESQUEMA 4.12 – Proposta biossintética para a formação do sistema espiro em limonóides.

## 7. CONCLUSÕES

A análise filogenética das seqüências deduzidas de aminoácidos de produtos de PCR LC e CMeT obtidos do gDNA de *Penicillium* sp mostrou três novos genes PKS fúngicos e um gene CMeT.

O gene PenKS1/2c pode estar envolvido na biossíntese da classe de policetídeos não reduzidos do qual o ácido orselínico é membro. Isto poderia sugerir uma possível relação com a biossíntese dos meroterpenos. O gene CMeT também foi obtido. Conseqüentemente estudos posteriores usando DNA complementar (cDNA)

como molde para obter sondas para triagem do banco de dados de gDNA devem ser realizados para encontrar o gene relacionado a biossíntese dos meroterpenos. Adicionalmente, este gene poderia ser checado pela abolição da produção dos meroterpenos através da disrupção da unidade de transcrição (deletando os genes do genoma), ou introduzindo este gene em um hospedeiro adequado e ensaiar a produção dos meroterpenos.

Os genes PKS relacionados aos meroterpenos oferecem a oportunidade de decifrar o caminho biogênico dos meroterpenos e posteriormente estabelecer uma possível relação com as enzimas envolvidas na biossíntese dos limonóides e em longo prazo, auxiliar no entendimento das interações planta-microrganismo. Investigações das bases genéticas e bioquímicas para a biossíntese de produtos naturais complexos são essenciais para a completa compreensão de suas formações e o mecanismo das transformações biossintéticas.



# CAPÍTULO 5: METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO *Penicillium* sp NA PRESENÇA DE SUBSTRATOS EXÓGENOS

## 1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica tem recentemente, voltada sua atenção para a obtenção de substâncias enantiomericamente puras (LIMA, 1997; BARREIRO *et al.*, 1997), uma vez que a existência de enzimas e receptores no organismo conduz a características biológicas diferentes para as estruturas quirais. A síntese de produtos naturais que possuem estereocentros é uma tarefa de grande dificuldade na obtenção por métodos exclusivamente químicos devido à produção de isômeros. Nestes casos, os processos de biotransformação são de grande interesse (GRANADOS *et al.*, 1999). Entende-se por biotransformação as reações químicas que consistem em converter uma substância orgânica em um ou mais produtos orgânicos, catalizadas por microrganismos ou por enzimas isoladas dos mesmos (FABER, 1995). Além disso, nos diversos cultivos fúngicos a produção de metabólitos secundários pode ser positivamente afetada pela adição de intermediários da via biossintética.

Como visto anteriormente no capítulo 2 a planta hospedeira do fungo *Penicillium* sp, *Melia azedarach*, produz uma classe de metabólitos denominada limonóides. O estudo dos extratos obtidos a partir de suas raízes mostrou também o aparecimento de ésteres de ferulatos e flavanonas (SANTOS, 1999). O papel dos limonóides nesta planta foi discutido nos capítulos 2, 3 e 4, como também no capítulo 7. Biossinteticamente a planta possui um arsenal enzimático para a produção desses metabólitos que incluem as oxidases (principalmente as Baeyer-Villiger oxidases), bem como uma série de rearranjos estruturais conduzindo para a obtenção destas substâncias. De maneira análoga, o fungo *Penicillium* sp possui um arsenal muito similar ao da planta para a produção dos meroterpenos.

O isolamento dos compostos fenólicos de *M. azedarach* é comum uma vez que os ácidos fenólicos são predominantes nas raízes, ocorrendo quase universalmente nas plantas superiores (SIQUEIRA *et al.*, 1991). Os fenólicos são pertencentes a uma ampla classe de metabólitos secundários derivados dos caminhos

fenilpropanóides e chalconas/flavonas e são conhecidos pelo papel que representam nos sistemas planta-solo. A maioria dessas substâncias é considerada como metabólitos de estresse e sua síntese é induzida ambientalmente. Além disso, os fenólicos são importantes agentes alelopáticos, agentes antimicrobianos (fitoalexinas) e podem agir como sinais moleculares nas interações entre plantas e microrganismos (SIQUEIRA *et al.*, 1991).

Os fenólicos livres no solo estão sujeitos a processos mediados por microrganismos, os quais são capazes de polimerizar os ácidos fenólicos através da atividade das enzimas polifenol-oxidases e peroxidases, como também utilizá-los como fontes de carbono. Esses dois processos são importantes mecanismos de detoxificação nos sistemas planta-solo (HAIDER e MARTIN, 1975; RAHOUTI *et al.*, 1989). O ácido ferúlico é um agente alelopático<sup>1</sup> bem conhecido exsudado para o solo através das raízes das plantas. Isto sugere que esse ácido seqüestrado na forma de ésteres de cadeia longa não é tóxico à planta hospedeira. Esses ésteres são clivados para liberar o ácido para agir no solo como um aleloquímico (NAIR *et al.*, 1988).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento através da produção de algum produto de biotransformação ou indução de algum metabólito do fungo *Penicillium* sp na presença de alguns substratos. Os substratos utilizados foram três derivados fenólicos (ácido cinâmico, ácido ferúlico e flavona) para verificar a indução de resposta contra fitoalexinas e seis terpenos (quatro limonóides e dois triterpenos) para verificar a expressão das enzimas Baeyer-Villiger oxidases.

---

<sup>1</sup> **Alelopatia:** refere a produção de metabólitos ativos por plantas vivas ou seus tecidos os quais interferem no crescimento de plantas vizinhas (RICE, 1984 citado por SIQUEIRA *et al.*, 1991).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais

##### a) Substâncias utilizadas para os experimentos de biotransformação:

Os ácidos cinâmico (**PBC**<sup>2</sup>, 1000 mg) e ferúlico (**PBF**, 500 mg) foram sintetizados no laboratório a partir de seus aldeídos correspondentes (SANTOS, 1999). Alguns limonóides e triterpenos, como a limonina (**PBLI**, 66,1 mg), odoratol (**PBOD**, 63,5 mg), gedunina (**PBGE**, 65,6 mg), fotogedunina (**PBFO**, 57,3 mg), pentaol (**PBPE**, 61,4 mg) e  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina (**PBAM**, 70,0 mg), bem como a flavona (**BFP**, 100 mg) foram isolados no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.

##### b) Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse experimento foi o fungo *Penicillium* sp isolado do córtex das raízes de *Melia azedarach* (cap. 2).

#### 3.2. Cultivo e Obtenção dos Extratos

Em cada frasco de Erlenmeyer contendo os meios de cultivos autoclavados a 121°C por 15 minutos foi introduzida uma alíquota da suspensão de esporos de *Penicillium* sp. Esses frascos foram incubados a 25°C durante quatro dias sob agitação e em seguida foram adicionados os respectivos substratos dissolvidos em acetona e distribuídos para um número total de frascos Erlenmeyers, os quais foram incubados nas mesmas condições por mais quatorze dias. Uma duplicata de frascos de Erlenmeyers foi preparada contendo apenas o meio de cultivo com o fungo (controle). As condições específicas para cada substrato encontram-se na Tabela 5.1.

Finalizado o período de incubação, o meio de cultivo contendo o fungo e os substratos, como também os frascos Erlenmeyers controle foram filtrados por gravidade, obtendo-se assim, o micélio e o filtrado (Figura 5.1). O micélio foi submetido à secagem em estufa a 60°C e após a moagem, foi extraído com os

---

<sup>2</sup> Códigos: Os códigos para as frações obtidas dos experimentos de biotransformação estão descritos no decorrer do texto, em parênteses após a primeira citação.

solventes, conforme descrito na Tabela 5.1. Para todos os extratores, a extração foi realizada durante 20 minutos por duas vezes a temperatura ambiente e em ultra-som. O filtrado obtido foi particionado com acetato de etila por duas vezes. No caso do experimento II (flavona) foi adicionado acetato de etila no meio de cultivo e sonicados durante 20 minutos e em seguida o material foi filtrado, particionado e a fase orgânica concentrada. Os fluxogramas a seguir esquematizam os procedimentos adotados e as quantidades obtidas para cada um dos substratos estudados.

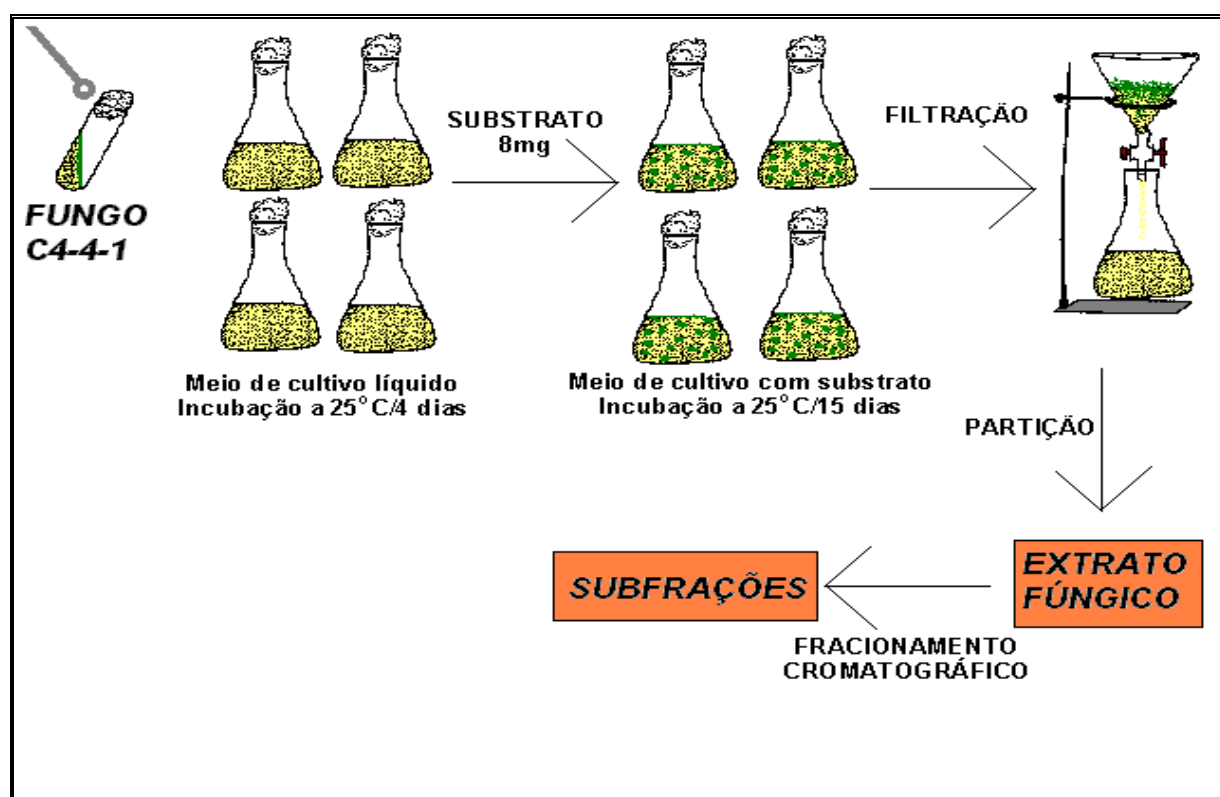


FIGURA 5.1. – Procedimentos gerais utilizados para os ensaios de biotransformação.

TABELA 5.1 – Relação dos substratos exógenos adicionados no meio de cultivo contendo o fungo *Penicillium* sp e as condições experimentais utilizadas.

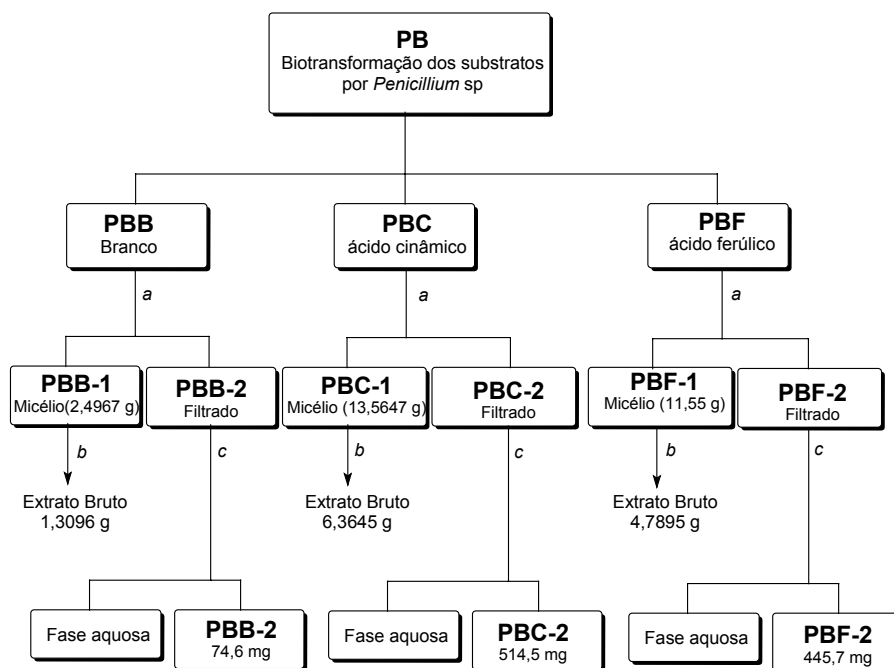
| Experimento                           | Substrato (mg) | Meio de Cultivo (mL)    | Nº frascos Erlenmeyer (capacidade) | Solvente Extração   |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------------------|---|
| <b>I = Fenólicos</b>                  |                | A <sup>1</sup> (100 mL) | 12 (250 mL)                        | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ;<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (1:1); MeOH (micélio)<br>Acetato de Etila (filtrado) |
| Ac. Ferúlico ( <b>PBF</b> )           | 500            |                         |                                    |   |
| Ac. Cinâmico ( <b>PBC</b> )           | 1000           |                         |                                    |   |
| <b>II = Fenólicos</b>                 |                | B <sup>2</sup> (300 mL) | 05 (1000 mL)                       | Acetato de Etila  |
| Flavona ( <b>BFP</b> )                | 100            |                         |                                    |   |
| <b>III = Limonóides e Triterpenos</b> |                | C <sup>3</sup> (100 mL) | 05 (500 mL)                        | Acetato de Etila  |
| Limonina ( <b>PBLI</b> )              | 66.1           |                         |                                    |   |
| Odoritol ( <b>PBOD</b> )              | 63.5           |                         |                                    |   |
| Gedunina ( <b>PBGE</b> )              | 65.6           |                         |                                    |   |
| Fotogedunina ( <b>PBFO</b> )          | 57.3           |                         |                                    |   |
| Pentaol ( <b>PBPE</b> )               | 61.4           |                         |                                    |   |
| α,β-amirina ( <b>PBAM</b> )           | 70.0           |                         |                                    |   |

<sup>1</sup> **Meio de Cultivo A:** Glucose (160 g), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0.96 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 g), MgSO<sub>4</sub> (2 g), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.2 g), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0.3 g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.322 g), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0.02 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0.2 g) e H<sub>2</sub>O (Qsp 2 L).

<sup>2</sup> **Meio de Cultivo B:** Meio Czapek.

<sup>3</sup> **Meio de Cultivo C:** Meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura.

a) *Experimento I*

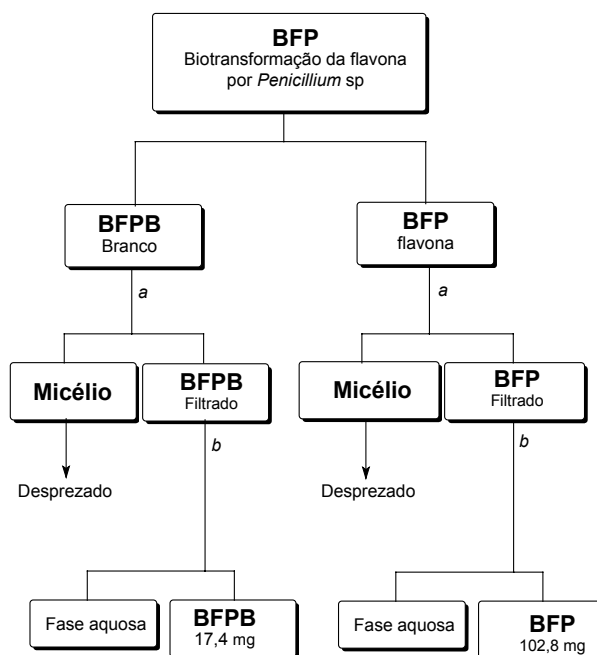


a) Filtração por gravidade.

b) Extração com diclorometano, diclorometano:metanol (50:50) e metanol, 20 minutos em ultra-som, duas vezes.

c) Partição líquido-líquido com acetato de etila, duas vezes.

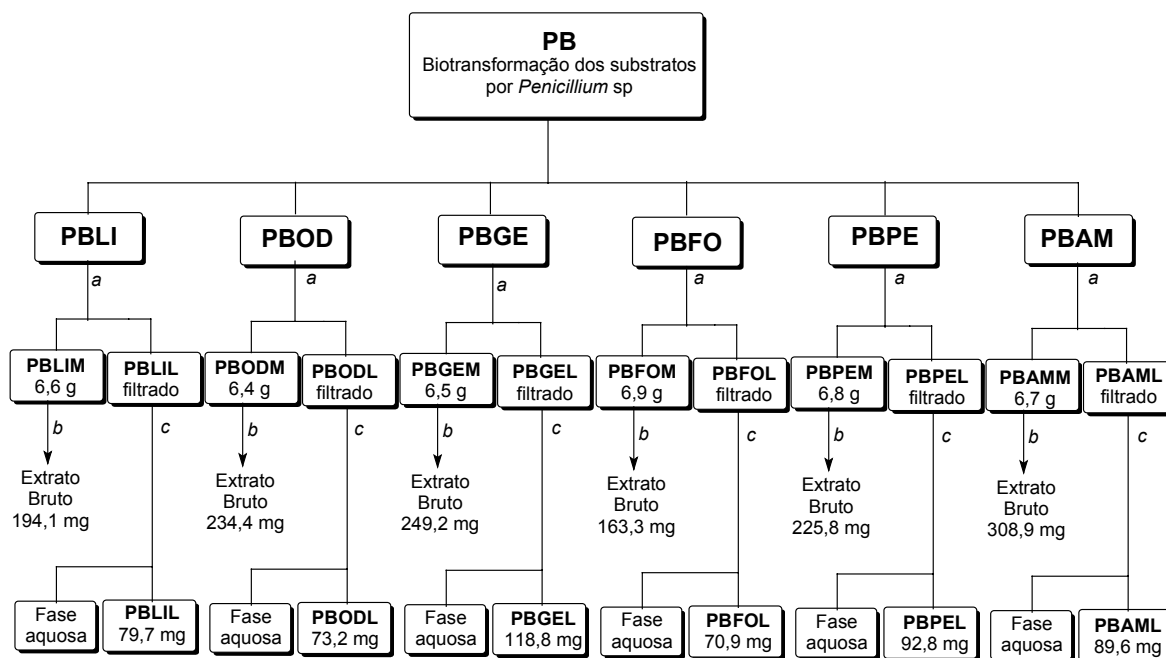
b) *Experimento II*



a) Filtração por gravidade.

b) Partição líquido-líquido com acetato de etila, duas vezes.

c) Experimento III



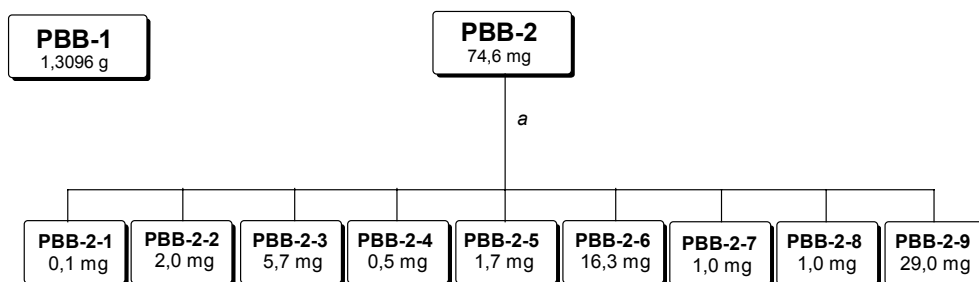
a) Filtração por gravidade.

b) Extração com acetato de etila em ultra-som por 20 minutos.

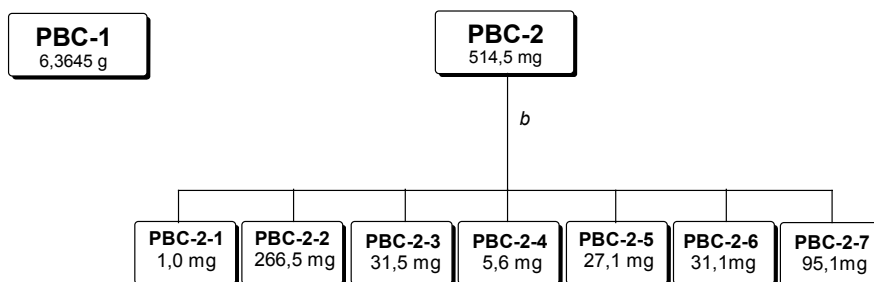
c) Partição líquido-líquido com acetato de etila, duas vezes.

### 3.3. Análise dos Extratos do Experimento I

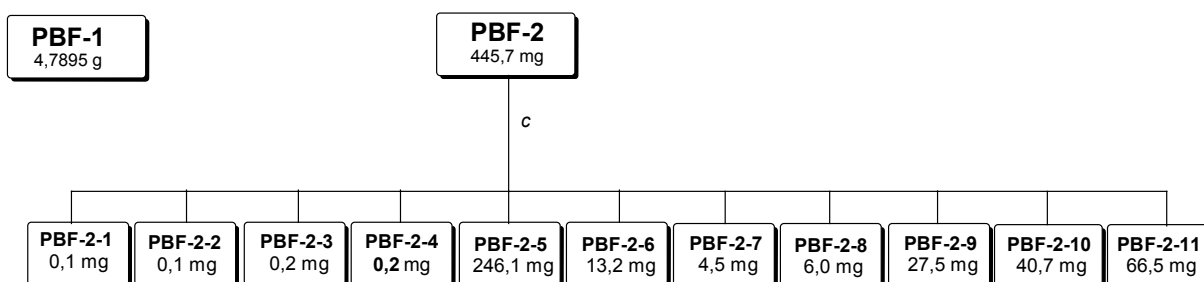
Inicialmente os extratos fúngicos foram fracionados em coluna utilizando sílica flash. Como eluentes, foram utilizados hexano, diclorometano e metanol, seguindo a técnica de gradiente de polaridade. As frações obtidas estão esquematizadas nos fluxogramas a seguir.



Subfrações analisadas por RMN <sup>1</sup>H e CCD



Subfrações analisadas por RMN <sup>1</sup>H e CCD



Subfrações analisadas por RMN <sup>1</sup>H e CCD

- Coluna em sílica flash. Eluente: diclorometano e metanol por gradiente com gotas de ácido acético.  $\phi = 2$  cm,  $l = 26$  cm.
- Coluna em sílica flash. Eluente: diclorometano e metanol por gradiente com gotas de ácido acético.  $\phi = 3$  cm,  $l = 30$  cm.
- Coluna em sílica flash. Eluente: diclorometano e metanol por gradiente com gotas de ácido acético.  $\phi = 3$  cm,  $l = 27$  cm.

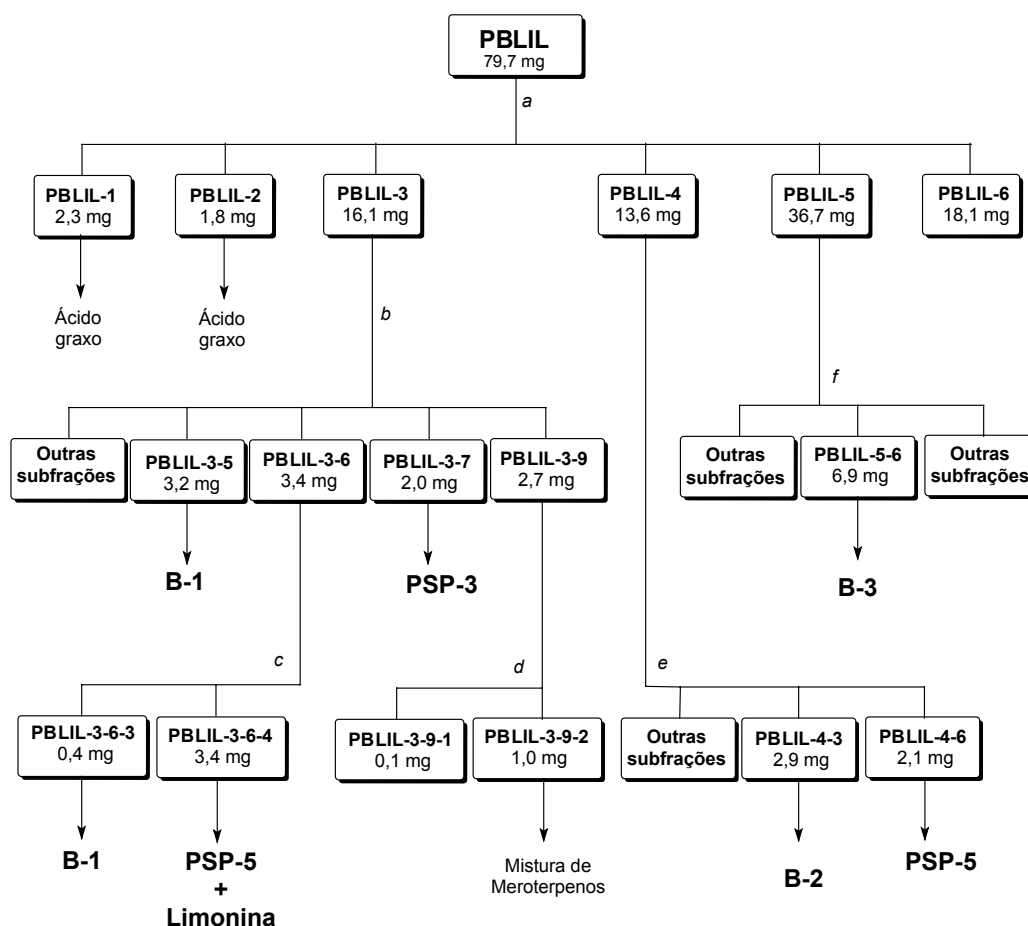


### 3.4. Análise dos Extratos do Experimento III

#### 3.4.1. Biotransformação da Limonina (PBLI)

Inicialmente os extratos fúngicos foram fracionados em coluna utilizando sílica flash. Como eluentes, foram utilizados hexano, diclorometano e metanol, seguindo a técnica de gradiente de polaridade. As frações obtidas estão esquematizadas nos fluxogramas a seguir.

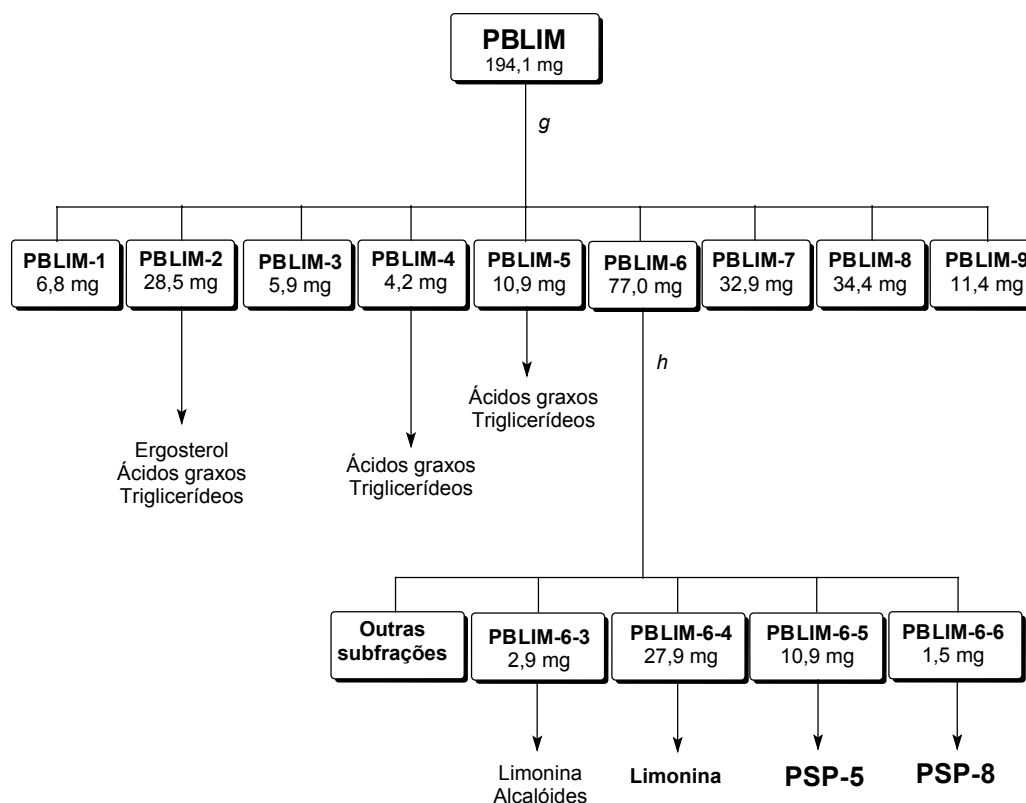
##### A) Filtrado (PBLIL)



- Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 13$  cm.
- CCDP. Eluente: hexano:acetato de etila (30:70). Foram aplicados cerca de 16,1 mg da amostra.
- CCDP. Eluente: diclorometano:metanol (95:5). Foram aplicados cerca de 3,4 mg da amostra.
- CCDP. Eluente: diclorometano:metanol (95:5). Foram aplicados cerca de 2,7 mg da amostra.

- e) CCDP. Eluente: hexano:acetato de etila (30:70). Foram aplicados cerca de 13,6 mg da amostra.
- f) CCDP. Eluente: diclorometano:metanol (95:5). Foram aplicados cerca de 36,7 mg da amostra.

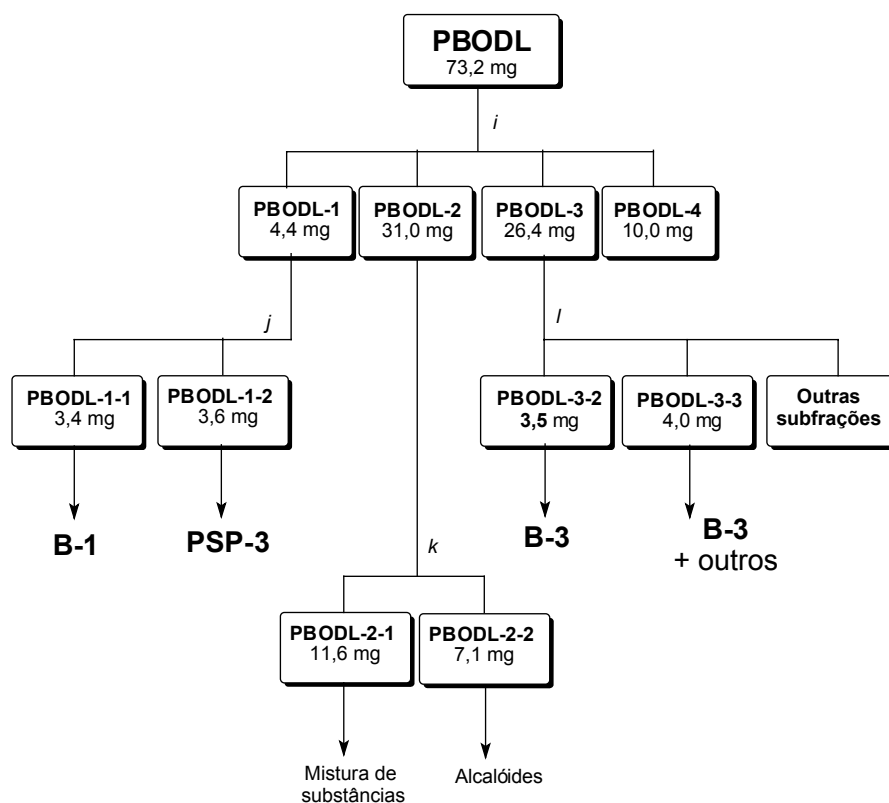
## B) Micélio (PBLIM)



- g) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 5$  cm,  $l = 15$  cm.
- h) CCDP. Eluente: diclorometano:acetona (90:10). Foram aplicados cerca de 77,0 mg da amostra.

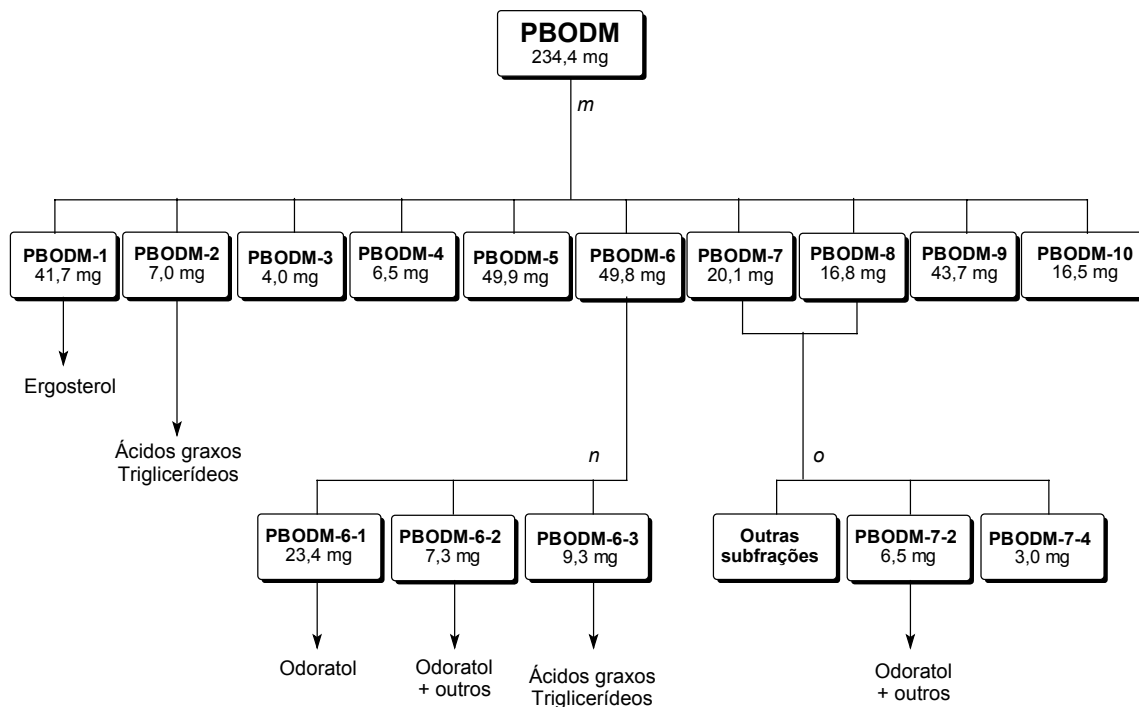
### 3.4.2. Biotransformação da Odoratol (PBOD)

#### A) Filtrado (PBODL)



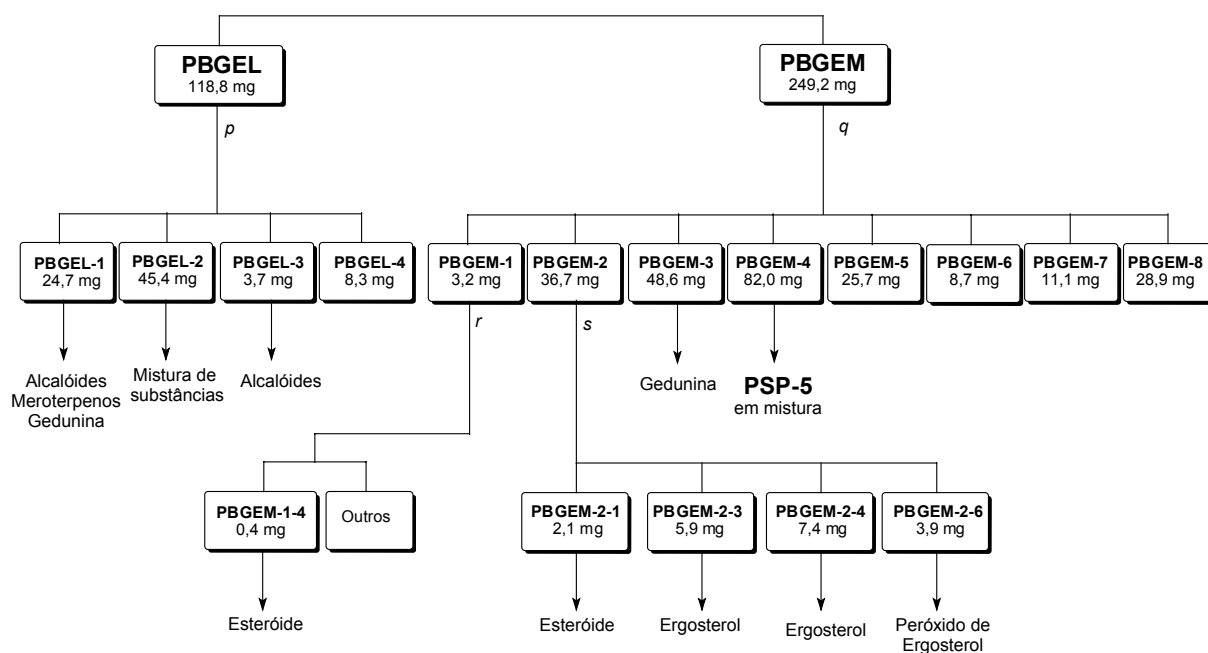
- i)* Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 13$  cm.
- j)* CCDP. Eluente: diclorometano:acetona (90:10). Foram aplicados cerca de 4,4 mg da amostra.
- k)* Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano:acetona e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 16$  cm.
- l)* Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano:acetona e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 15$  cm.

## B) Micélio (PBODM)



- m)* Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 5$  cm,  $l = 15$  cm.
- n)* Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano:acetona e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 15$  cm.
- o)* Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano:acetona e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 15$  cm.

### 3.4.3. Biotransformação da Gedunina (PBGE)



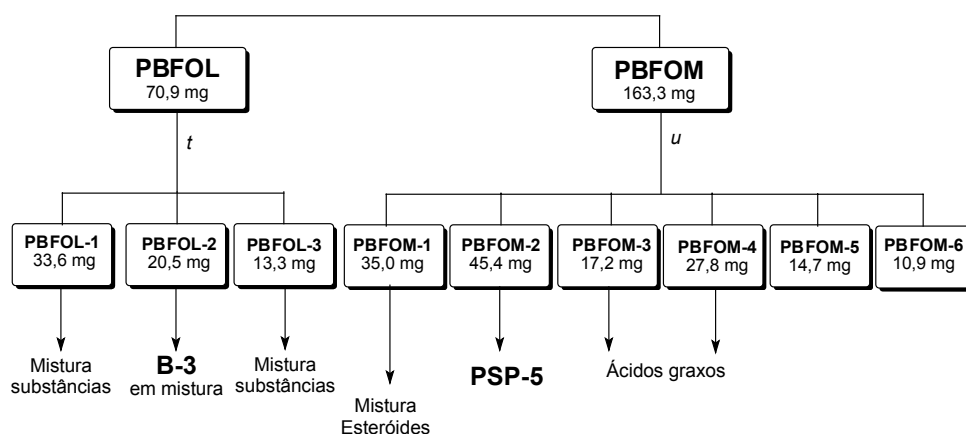
p) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 14$  cm.

q) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 5$  cm,  $l = 17$  cm.

r) CCDP. Eluente: hexano:acetato de etila (50:50). Foram aplicados cerca de 3,2 mg de amostra.

s) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:acetato de etila e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 16$  cm.

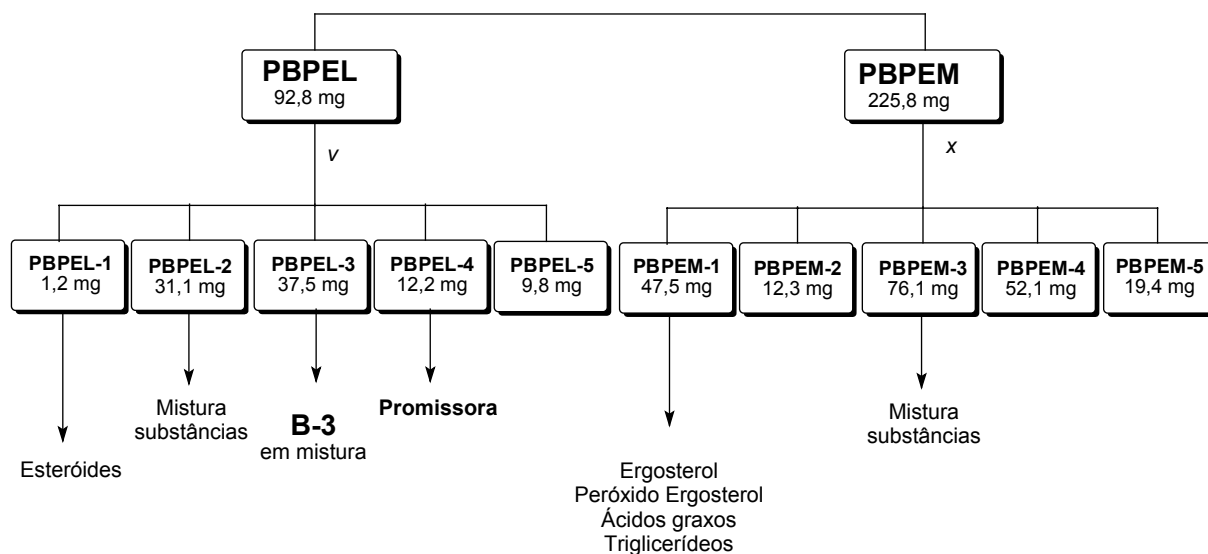
### 3.4.4. Biotransformação da Fotogedunina (PBFO)



t) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 14$  cm.

u) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 5$  cm,  $l = 17$  cm.

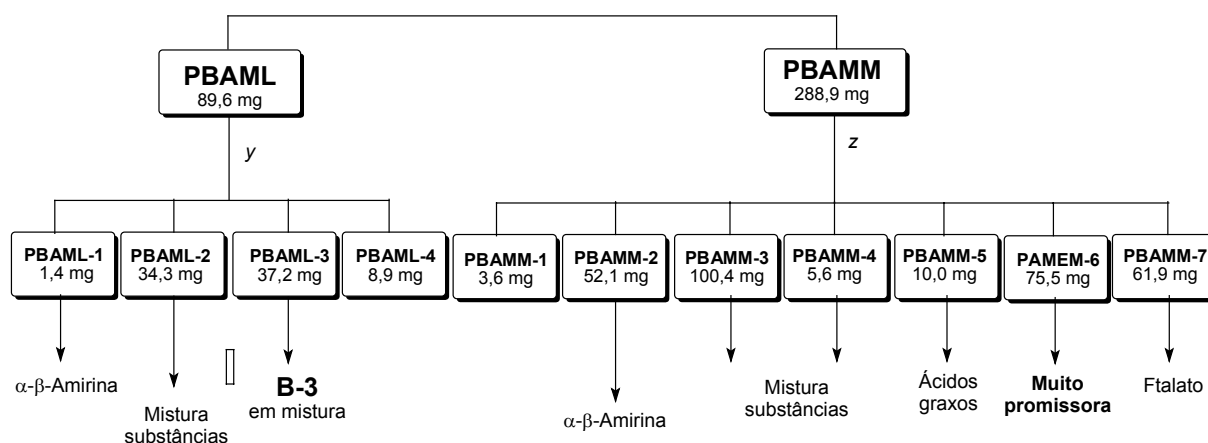
### 3.4.5. Biotransformação do Pentaol (PBPE)



v) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 14$  cm.

x) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 5$  cm,  $l = 18$  cm.

### 3.4.6. Biotransformação da $\alpha,\beta$ -Amirina (PBAM)



y) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 3$  cm,  $l = 18$  cm.

z) Coluna em sílica flash. Eluente: hexano:diclorometano e metanol por gradiente.  $\phi = 5$  cm,  $l = 17$  cm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento com o Ácido Cinâmico e Ácido Ferúlico

Os ácidos cinâmico e ferúlico foram introduzidos nos cultivos de *Penicillium* sp com a intenção de verificar algum produto de biotransformação desses substratos, uma vez que nos extratos das raízes da planta *Melia azedarach*, da qual esse microrganismo foi isolado, foram encontrados ésteres do ácido *cis* e *trans*-ferúlico (SANTOS, 1999), como também pelas inúmeras atividades atribuídas aos fenólicos discutidas anteriormente.

As frações obtidas após o período de cultivo do fungo foram estudadas através de CCD e RMN <sup>1</sup>H e mostraram-se promissoras. Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H foram observados sinais na região de hidrogênios aromáticos ( $\delta$  6.0-8.5), hidrogênios olefínicos ( $\delta$  5.0-6.0) e hidrogênios carbinólicos ( $\delta$  3.5-4.5) onde além do sinal do grupo metoxila em  $\delta$  3.93, outros sinais foram detectados nessa região. Ainda foram encontrados os sinais de grupos metila blindados ( $\delta$  0.71, d, J 7.0) e desblindadas (1.98 e 2.22). Os espectros mostraram ainda que nenhum metabólito do fungo, em particular os meroterpenos, foi induzido pela adição desses substratos.

A análise geral desses materiais sugere a presença de derivados fenólicos com alguma possibilidade de biotransformação. O próximo passo seria a análise dessas frações por GC/MS para a caracterização de algum produto de biotransformação, mas infelizmente esta etapa não pôde ser concluída devido a problemas de manutenção do aparelho.

Uma série de microrganismos do ambiente é conhecida por metabolizar uma ampla variedade de compostos aromáticos e hidrocarbonetos alifáticos. O princípio básico do catabolismo aeróbico microbiano dessas substâncias é a sua ativação inicial por oxigenação via mono ou dioxigenases (FABER, 1995).

## 4.2. Experimentos com a Flavona

As duas frações BFP (*Penicillium* sp com o substrato flavona) e BFPB (branco) foram analisadas através de cromatografia em camada delgada através de comparação com o padrão (flavona) para verificar se a presença de alguma mancha apresentando um *rf* diferente que pudesse indicar a presença de produtos de biotransformação. Concomitantemente, a análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H dessas duas frações revelou que não houve, aparentemente, algum produto biotransformado, além dos sinais respectivos à flavona. Provavelmente se houve alguma transformação, foi em pequena quantidade e conseqüentemente, as técnicas utilizadas tornam-se inviáveis para a sua detecção necessitando do estudo das mesmas por GC/MS.

## 4.3. Experimentos com os Limonóides e Triterpenos

Os extratos contendo os limonóides e triterpenos como substratos foram fracionados e parte deles foram purificados e identificados. As frações foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H e por cromatografia de camada delgada (CCD), realizando um ponto misto, ou seja, co-injeção do substrato padrão com a fração para averiguar o fator de retenção das mesmas (*rf*).

As frações obtidas do cultivo de *Penicillium* sp na presença da limonina (PBLI) foram estudadas extensivamente através de re-fracionamento, análises por RMN <sup>1</sup>H e CCD de ponto misto com substrato de partida e nenhum produto resultante de biotransformação foi detectado. Entretanto, foram encontradas algumas substâncias como o derivado deo ácido penicílico codificado como **B-1** e dois alcalóides, **B-2** e **B-3**. Outros metabólitos mais comuns também foram encontrados, tais como, ergosterol, peróxido de ergosterol, ácidos graxos, triglicerídeos, verruculogenina (**PSP-5**) e acetoxi-dehidroaustina (**PSP-3**). Algumas frações continham mistura complexa de substâncias as quais não puderam ser caracterizadas devido às quantidades insuficientes para o seu isolamento.



As frações originadas a partir do cultivo com os limonóides odoratol e gedunina também foram extensivamente estudadas e aparentemente não mostraram produtos de biotransformação. Nelas também foram encontradas as mesmas substâncias detectadas nos extratos contendo limonina. Em algumas frações do cultivo com a gedunina foram encontrados os esteróides ergosterol, peróxido de ergosterol além de um outro em pequeníssimas quantidades, o qual deverá ser identificado através de GC/MS e comparação com os dados da biblioteca do espectrômetro.

O estudo das frações contendo fotogedunina também apresentou resultados similares aos anteriores, mas com um detalhe bastante interessante que foi a ausência do substrato de partida nas frações mostrado através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e CCD de ponto misto. As frações **PBPEL-4** e **PBAMM-6** originadas respectivamente do cultivo do fungo com pentaol e  $\alpha,\beta$ -amirina, mostraram-se sugestivas para o encontro de algum produto uma vez que os espectros de RMN  $^1\text{H}$  dessas frações mostraram sinais similares aos substratos de partida, mas a análise das mesmas usando CCD de ponto misto detectou valores de *rf* diferentes (menores) da dos padrões.

#### 4.3.1. Identificação do Metabólito B-1 (PBLIL3-5)

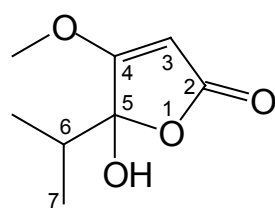
Os espectros de massas de **B-1** obtidos via *electrospray* nos modos positivo e negativo (Apêndice 3.1.1) apresentaram os picos dos íons pseudo-moleculares  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , respectivamente em *m/z* 195 e 171, sugerindo, portanto, a fórmula molecular  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4$ . O espectro na região do infravermelho (Ap. 3.1.2) apresentou absorções em 3382, 1748 e 1639  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo, respectivamente, a presença de grupos hidroxila, carbonila e olefinas.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 5.2, Ap. 3.1.3) de **B-1** mostrou os sinais em  $\delta$  0.91 e 1.10 na forma de dubleto ( $J = 6.9$ ) os quais apresentaram acoplamento com o septeto em  $\delta$  2.22 ( $J = 6.9$ ) observado no espectro de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY (Ap. 3.1.4), estabelecendo a presença do grupo isopropil como estrutura parcial de **B-1**. Neste espectro foi observado dois singletos desblindados em  $\delta$  3.91 e 5.07, sugerindo a

presença de hidrogênios, os quais correspondem aos carbonos em  $\delta$  59.9 e 89.8 (HSQC, Ap. 3.1.6). Os sinais restantes observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 5.2, Ap. 3.1.5) em  $\delta$  105.1, 170.0 e 179.5 sugerem a presença de um carbono quaternário muito desblindado e carbonilas de éster/lactona.

A análise comparativa dos dados de **B-1** com àqueles obtidos para **PSP-7** (Tabela 5.2) revelou uma similaridade entre eles, exceto a presença do sistema isopropil em **B-1**, sugerindo, portanto, que este metabólito é um derivado hidrogenado do ácido penicílico.

TABELA 5.2 – Dados espectrais das substâncias **B-1** e ácido penicílico (**PSP-7**) obtidos por RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e PENDANT (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**B-1**

**B-1**

**PSP-7 (Ácido Penicílico)**

| Posição | <b>B-1</b>           |                             | <b>PSP-7 (Ácido Penicílico)</b> |                     |
|---------|----------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------|
|         | C<br>$\delta$ multi  | H<br>$\delta$ multi, J (Hz) | C<br>$\delta$ multi             | H<br>$\delta$ multi |
| 2       | 170.0 s <sup>a</sup> | -                           | 171.9 s                         | -                   |
| 3       | 89.8 d               | 5.07 s                      | 89.7 d                          | 5.22 s              |
| 4       | 179.4 s              | -                           | 179.4 s                         | -                   |
| 5       | 105.4 s              | -                           | nd <sup>b</sup>                 | -                   |
| 6       | 33.6 d               | 2.22 hept (6.9)             | 139.8 s                         | -                   |
| 7       | 15.4 qt              | 1.10 d (6.9)                | 117.2 t                         | 5.14 s<br>5.49 s    |
| 6-Me    | 16.6 q               | 0.91 d (6.9)                | 17.7 q                          | 1.77 s              |
| O-Me    | 59.9 q               | 3.91 s                      | 60.2 q                          | 3.91 s              |
| OH      | -                    | 3.33 s                      | -                               | -                   |

<sup>a</sup>: As multiplicidades dos sinais foram determinadas por HSQC

<sup>b</sup> nd = não detectado

### 4.3.2. Identificação do Metabólito B-3 (PBODL3-2)

A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 5.3, Ap. 3.2.2) de **B-3** com os obtidos para a verruculogenina (**PSP-5**) indicou uma certa similaridade entre eles. A substância **B-3** apresentou os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos H-4, H-5 e H-7 em  $\delta$  7.42, 6.76 e 6.84, respectivamente. A atribuição desses deslocamentos foi realizada através dos valores das constantes de acoplamento apresentada por estes hidrogênios e através do espectro de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY (Ap. 3.2.3). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou ainda sinais de hidrogênios metilênicos, metínicos e metílicos. Do espectro de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY (Figura 5.2) dois fragmentos de **B-3** puderam ser deduzidos. Acoplamentos  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  foram observados entre os hidrogênios metilênicos indicando a presença do aminoácido prolina e de um grupo prenila, o qual encontra-se ligado no C-2 do indol. Esta suposição foi confirmada pelas correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 5.3, Ap. 3.2.5) do hidrogênio em  $\delta$  5.96 (H-20) e 2.28 (H-21 $\beta$ ) com o carbono C-2 em  $\delta$  104.1. Estes dados, juntamente com a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos (HSQC, Ap. 3.2.4), confirmaram a presença do alcalóide **B-3** cuja estrutura consiste da mistura de dois aminoácidos 6-metoxitriptofano e prolina combinados para formar uma dicetopiperazina e uma unidade isoprenóide.

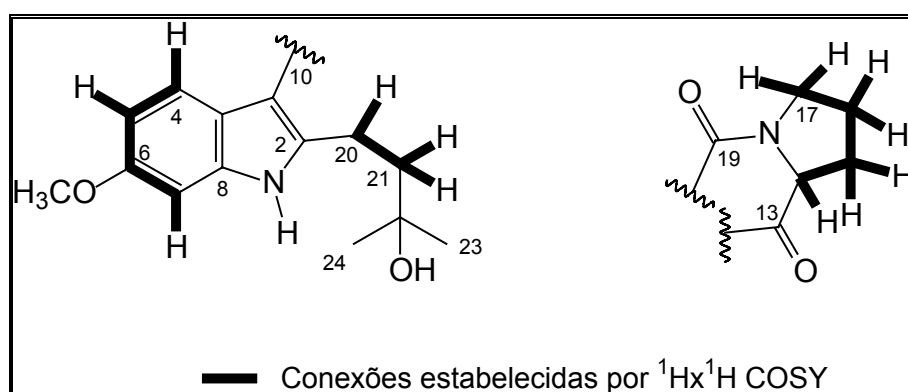


FIGURA 5.2 – Estruturas parciais de **B-3** deduzidas das correlações  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY.

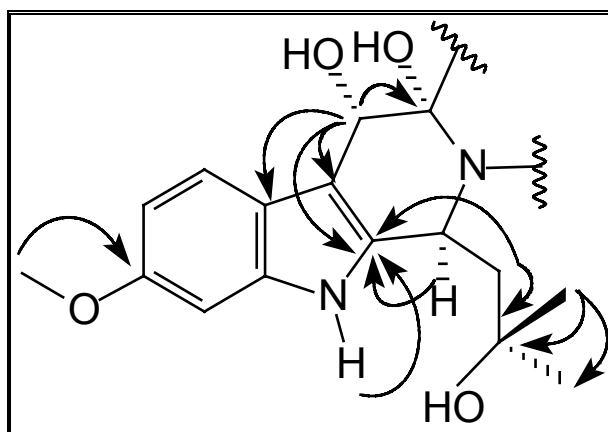


FIGURA 5.3 – Correlações de HMBC detectadas para **B-3**.

As configurações relativas nos estereocentros de **B-3** foram propostas conforme a literatura descreve para **TR-2**, pois essa substância degradou em seguida a adição de clorofórmio deuterado, sendo possível a obtenção de alguns espectros. Futuramente, **B-3** deverá ser isolada das frações que a contenham para então finalizar os estudos espectrais.

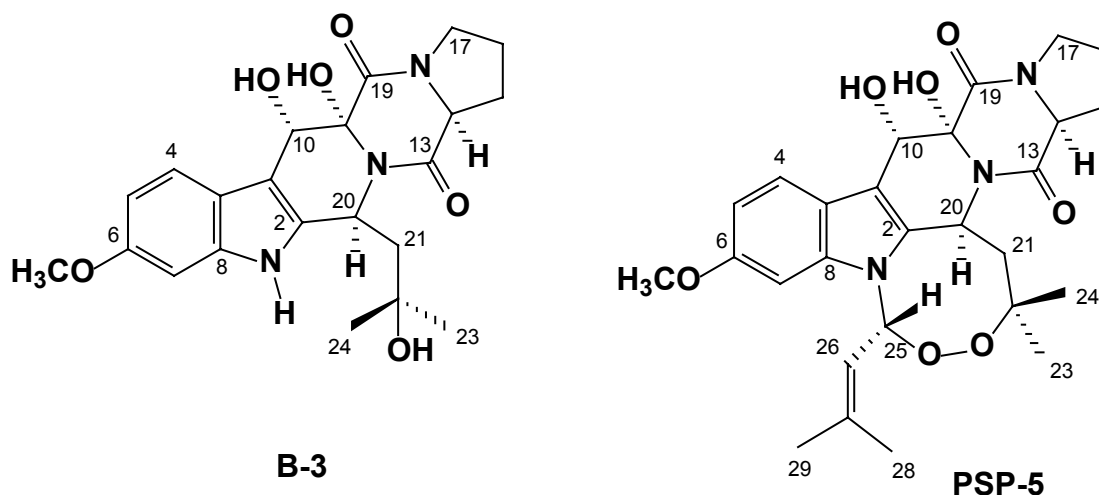


TABELA 5.3 - Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **B-3**, **PSP-5** e **TR-2**.

| Posição           | B-3                  |   | TR-2    |                    | PSP-5   |   |
|-------------------|----------------------|---|---------|--------------------|---------|---|
|                   | C                    | H   | C       | H <sup>c</sup>     | C       | H   |
| 1                 | -                    | 9.51 s <sup>a</sup>   | -       | -                  | -       | -   |
| 2                 | 135.4 s <sup>b</sup> | -   | 131.8 s | -                  | 131.7 s | -   |
| 3                 | 104.1 s              | -   | 105.5 s | -                  | 105.7 s | -   |
| 4                 | 118.0 d              | 7.42 d (8.5)  | 121.2 d | 7.71 d (9.0)       | 121.8 d | 7.89 d (8.7) <sup>a</sup>                           |
| 5                 | 110.2 d              | 6.76 dd (8.5; 1.9)  | 109.8 d | 6.60 dd (9.0; 3.0) | 109.5 d | 6.82 dd (8.7; 2.2)                                  |
| 6                 | 156.4 s              | -   | 156.6 s | -                  | 156.4 s | -   |
| 7                 | 95.4 d               | 6.84 d (1.9)  | 95.2 d  | 6.87 d (3.0)       | 94.0 d  | 6.59 d (2.2)  |
| 8                 | 136.2 s              | -   | 120.8 s | -                  | 136.5 s | -   |
| 9                 | 119.0 s              | -   | 137.2 s | -                  | 120.9 s | -   |
| 10                | 69.1 d               | 5.04 s  | 68.8 d  | 5.50 d             | 68.8 d  | 5.65 s  |
| 11                | 84.9 s               | -   | 83.4 s  | -                  | 82.7 s  | -   |
| 13                | -                    | nd <sup>d</sup>   | 166.2 s | -                  | 168.5 s | -   |
| 14                | 59.9 d               | 4.36 dd (10.5; 6.0)   | 58.8 d  | 4.4 m              | 58.9 d  | 4.48 dd (9.6; 7.0)                                  |
| 15                | 29.9 t               | $\alpha$ : 2.43 m<br>$\beta$ : 1.90 m                           | 29.6 t  | 1.9 m              | 29.2 t  | $\alpha$ : 2.49 m<br>$\beta$ : 2.06 m               |
| 16                | 22.0 t               | $\alpha$ : 2.12 m<br>$\beta$ : 1.93 m                           | 22.7 t  | 2.0 m              | 22.8 t  | $\alpha$ : 2.09 m<br>$\beta$ : 1.96 m               |
| 17                | 45.9 t               | $\alpha$ : 3.61 m<br>$\beta$ : 3.72 m                           | 49.9 t  | 3.6 m              | 45.5 t  | 3.64 dt (7,6)                                       |
| 19                | 167.1 s              | -   | 171.4 s | -                  | 170.9 s | -   |
| 20                | 47.7 d               | 5.95 dd (7.3; 2.7)  | 49.0 d  | 5.37 m             | 49.0 d  | 6.05 d (10.0)                                       |
| 21                | 49.6 t               | $\alpha$ : 2.05 dd (14.7; 2.7)<br>$\beta$ : 2.28 dd (14.7; 7.3) | 45.2 t  | 1.9 m              | 51.3 t  | $\alpha$ : 2.03 sl<br>$\beta$ : 1.68 dd (10.0; 3.3) |
| 22                | 71.4 s               | -   | 71.1 s  | -                  | 82.3 s  | -   |
| 23                | 28.9 q               | 1.47 s  | 29.7 q  | 1.30 s             | 24.4 q  | 1.72 s  |
| 24                | 33.6 q               | 1.29 s  | 32.0 q  | 1.10 s             | 27.3 q  | 1.01 s  |
| 25                | -                    | -   | -       | -                  | 85.9 d  | 6.65 d (8.1)  |
| 26                | -                    | -   | -       | -                  | 118.6 d | 5.04 dt (8.1; 1.3; 1.3)                             |
| 27                | -                    | -   | -       | -                  | 143.3 s | -   |
| 28                | -                    | -   | -       | -                  | 18.9 q  | 2.0 d (1.2)   |
| 29                | -                    | -   | -       | -                  | 25.9 q  | 1.73 d (1.2)  |
| O-CH <sub>3</sub> | 56.0 q               | 3.91 s  | 55.7 q  | 3.75 s             | 55.9 q  | 3.84 s  |
| 10-OH             | -                    | 4.43 s  | -       | 4.9 d              | -       | -   |
| 11-OH             | -                    | 3.80 s  | -       | 4.2 s              | -       | -   |
| 22-OH             | -                    | 5.50 s  | -       | 5.94 m             | -       | -   |

<sup>a</sup> os valores em  $\delta$  são expressos em ppm, com valores de J em Hz em parênteses.

<sup>b</sup> as multiplicidades dos sinais foram determinadas por HSQC; s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto

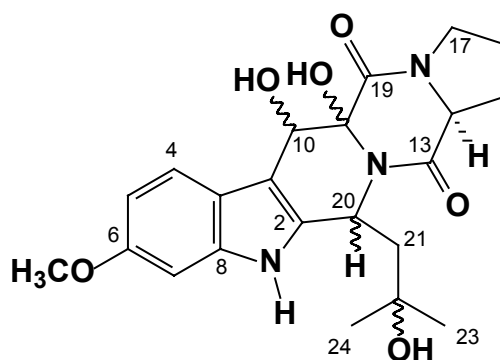
<sup>c</sup> dados obtidos em DMSO

<sup>d</sup> nd = não detectado

Conforme comparação dos dados espectroscópicos a substância **B-3** parece ser um derivado da verruculogenina (**PSP-5**). Esta suposição foi confirmada por COLE e KIRKSEY, (1973), após a hidrogenação da verruculogenina em solução etanólica na presença de paládio sobre carbono (5%) a temperatura ambiente, formando dois produtos, isovaleraldeído e **TR-2**. Em 1977, esse derivado sintético **TR-2** foi obtido como produto natural isolado de *Aspergillus fumigatus* por COLE *et al.* (1977). A comparação dos dados indica que a substância **B-3** corresponde ao alcalóide **TR-2** e agora foi isolada pela primeira vez dos extratos de *Penicillium* sp.

#### 4.3.3. Identificação do Metabólito B-2 (PBLIL4-3)

Os dados espectroscópicos obtidos para a substância **B-2** mostraram-se muito similares aos obtidos para o alcalóide **B-3** (Tabela 5.4), exceto para os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-20, H-21  $\alpha$ , H-21  $\beta$ , 3H-23 e 3H-24, respectivamente em  $\delta$  5.95, 2.02, 1.71, 1.53 e 1.17, sugerindo que **B-2** seja um isômero de **B-3**. Essa suposição deveria ser confirmada através dos estudos de NOE, mas infelizmente a amostra degradou após a introdução de clorofórmio deuterado para obter os primeiros espectros.



**B-2**

TABELA 5.4 - Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **B-2** e **B-3**.

| Posição           | B-2             |   | B-3                  |   |
|-------------------|-----------------|---|----------------------|---|
|                   | C               | H   | C                    | H   |
| 1                 | -               | 9.03 s  | -                    | 9.51 s  |
| 2                 | nd <sup>b</sup> | -   | 135.4 s <sup>c</sup> | -   |
| 3                 | nd              | -   | 104.1 s              | -   |
| 4                 | 120.9 d         | 7.81 d (8.6)  | 118.0 d              | 7.42 d (8.5)  |
| 5                 | 109.3 d         | 6.79 dd (8.6; 2.1)  | 110.2 d              | 6.76 dd (8.5; 1.9)  |
| 6                 | nd              | -   | 156.4 s              | -   |
| 7                 | 95.0 d          | 6.85 d (2.1)  | 95.4 d               | 6.84 d (1.9)  |
| 8                 | nd              | -   | 136.2 s              | -   |
| 9                 | nd              | -   | 119.0 s              | -   |
| 10                | 68.7 d          | 5.72 s  | 69.1 d               | 5.04 s  |
| 11                | nd              | -   | 84.9 s               | -   |
| 13                | nd              | -   | nd                   | -   |
| 14                | 58.8 d          | 4.46 dd (9.0; 6.4)  | 59.9 d               | 4.36 dd (10.5; 6.0)   |
| 15                | 29.1 t          | $\alpha$ : 2.48 dd (12.7; 6.4)<br>$\beta$ : 2.05 m              | 29.9 t               | $\alpha$ : 2.43 m<br>$\beta$ : 1.90 m                           |
| 16                | 22.2 t          | 2.04 m  | 22.0 t               | $\alpha$ : 2.12 m<br>$\beta$ : 1.93 m                           |
| 17                | 45.0 t          | 3.64 dd (8.9; 4.7)  | 45.9 t               | $\alpha$ : 3.61 m<br>$\beta$ : 3.72 m                           |
| 19                | nd              | -   | 167.1 s              | -   |
| 20                | 48.5 d          | 5.46 dd (8.2; 2.3)  | 47.7 d               | 5.95 dd (7.3; 2.7)  |
| 21                | 49.7 t          | $\alpha$ : 2.02 dd (14.0; 2.3)<br>$\beta$ : 1.71 dd (14.0; 8.2) | 49.6 t               | $\alpha$ : 2.05 dd (14.7; 2.7)<br>$\beta$ : 2.28 dd (14.7; 7.3) |
| 22                | nd              | -   | 71.4 s               | -   |
| 23                | 29.7 q          | 1.53 s  | 28.9 q               | 1.47 s  |
| 24                | 32.2 q          | 1.17 s  | 33.6 q               | 1.29 s  |
| O-CH <sub>3</sub> | 55.2 q          | 3.83 s  | 56.0 q               | 3.91 s  |
| 10-OH             | -               | 4.62 s  | -                    | 4.43 s  |
| 11-OH             | -               | 3.92 s  | -                    | 3.80 s  |
| 22-OH             | -               | 5.12  | -                    | 5.50 s  |

<sup>a</sup> os valores em  $\delta$  são expressos em ppm, com valores de J em Hz em parênteses.

<sup>b</sup> nd = não detectado

<sup>c</sup> as multiplicidades dos sinais foram determinadas por HSQC; s = singlete, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos do cultivo de *Penicillium* sp com a introdução de substratos exógenos mostraram a ausência de produtos de biotransformação, sugerindo que deve ser realizada uma série de otimizações para que essas reações possam ocorrer. Há muito que debater sobre a propriedade desses substratos nos meios de cultivo, como por exemplo, a seleção dos procedimentos experimentais favoráveis para que alguma reação possa ser realizada (cultivo, modo de extração).

Das frações estudadas foram encontrados dois alcalóides (**B-2** e **B-3**) os quais provavelmente participam do caminho biossintético do alcalóide verruculogenina (**PSP-5**).

As substâncias exógenas adicionadas nos meios de cultivo de *Penicillium* sp não estimularam a biossíntese dos meroterpenos nas culturas, mas alteraram a biossíntese dos alcalóides, como também o aparecimento do derivado hidrogenado do ácido penicílico.



# **CAPÍTULO 6: ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE *Penicillium* sp E *Melia azedarach* POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

## **1. INTRODUÇÃO**

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura descrevem o isolamento e a identificação de produtos naturais, os quais são realizados através das metodologias clássicas de fitoquímica. Entretanto, algumas técnicas de análise como a espectrometria de massas acoplada a um método cromatográfico vêm sendo utilizadas para a caracterização dessas substâncias em misturas complexas sem a necessidade de isolamento.

Uma série de metabólitos secundários foi obtida do extrato metanólico do fungo *Penicillium* sp quando cultivado em arroz, os quais foram isolados e identificados em sua maioria por estas técnicas clássicas, descritas no capítulo 3. Contudo, alguns extratos provenientes deste cultivo não foram estudados seguindo esta metodologia, pois demandaria um certo tempo de trabalho em bancada. Paralelamente, este microrganismo também foi cultivado em outros meios de cultivo produzindo outros extratos com o objetivo de verificar se ocorre diferenciação na produção de substâncias alterando as fontes nutricionais.

Num esforço para analisar todos os extratos oriundos do cultivo de *Penicillium* sp nos variados substratos e checar a produção dos metabólitos secundários frente a um determinado substrato, as técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS) foram aplicadas para analisar as frações apolares e polares, respectivamente.

Adicionalmente a esses trabalhos foi realizado o estudo dos limonóides nos extratos a partir dos tecidos de *Melia azedarach* por LC/MS devido a grande semelhança dessas substâncias com os meroterpenos produzidos pelo fungo, sendo possível comparar o perfil metabólico dos dois organismos associados.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- A análise das frações apolares de *Penicillium* sp utilizando a técnica acoplada GC/MS;
- Traçar o perfil químico do fungo *Penicillium* sp quando submetido a diferentes meios de cultivo utilizando como ferramenta de análise GC/MS;
- Desenvolver uma metodologia de análise por LC/MS para os meroterpenos e outros metabólitos de *Penicillium* sp e analisar a presença destas substâncias variando-se os meios de cultivo do fungo.
- Desenvolver uma metodologia de análise por LC/MS para os limonóides de *Melia azedarach* e avaliar a detecção dos mesmos nos diferentes tecidos estudados;

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Reagentes e Equipamentos

#### a) Reagentes para Derivatização

Os reagentes utilizados na derivatização das amostras foram: N-metil-N-nitroso-4-toluol-sulfonamida (Diazald) (Aldrich), KOH PA (Merck), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> PA (Merck), éter etílico PA (Mallinckrodt), álcool etílico PA (Mallinckrodt), ácido acético glacial PA (Merck) e ácido clorídrico (Merck).

### **b) Cromatógrafo para HPLC**

Os cromatogramas foram obtidos usando um HPLC Shimadzu LC-8a (Preparative Liquid Chromatography), com o detector de diodos *Diode Array* Shimadzu SPD-6AV.

### **c) Cromatógrafo a gás**

As análises por GC/MS foram realizadas em um espectrômetro CARLO ERBA GC 8000 equipado com uma coluna DB 1 MS (30m, 0.25mm ID).

### **d) Espectrômetro de massas**

Os espectros de massas foram adquiridos em dois aparelhos: o espectrômetro MICROMASS QUATTRO II (quadropole-hexapole-quadropole tandem mass spectrometer) usando a interface ESI/APCI (*Z-spray*) e o espectrômetro MICROMASS PLATFORM II equipado com a interface por impacto eletrônico. Os programas utilizados para as análises dos espectros foram os software MassLynx 3.1 (Quattro) e MassLynx 3.11 (Platform)

### **e) Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas**

O cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GCMS – QP 5000, Shimadzu) equipado com a coluna HP 5 MS (30m, 0.25 mm ID, 0.25 $\mu$ ), hélio como gás de arraste e a interface por impacto eletrônico. O programa Class 5000 foi usado para analisar os cromatogramas resultantes.

## 3.2. Derivatização das Amostras

### 3.2.1. Hidrólise e Metilação

A reação de hidrólise das frações contendo tri- di- e mono-glicerídeos foi realizada adicionando-se 10 mL de álcool etílico e 5 mL de hidróxido de potássio aquoso 5% (p/p) em um balão contendo aproximadamente 200 mg da amostra a ser hidrolisada. A reação procedeu-se sob refluxo e agitação a uma temperatura de 60°C durante 30 min. Em seguida a mistura foi particionada com éter etílico e a fase orgânica foi seca e reservada. A fase aquosa foi acidificada com HCl 1N e particionada novamente com éter etílico. A fase orgânica foi recolhida e seca e em seguida foi metilada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.1. e analisadas por GC/MS.

### 3.2.2. Preparo do Diazometano e Metilação

A solução de diazometano foi preparada dissolvendo-se 2.14 g de n-metil-n-nitroso-p-toluenosulfonamida (Diazald) em 30 mL de éter etílico. Esta solução foi resfriada em banho de gelo e transferida para um balão de destilação, acrescentando-se 0.4 g de hidróxido de potássio dissolvido em 10 mL de etanol. O sistema foi colocado em repouso por 5 min em banho de gelo. Em seguida iniciou-se a destilação do éter em um sistema sem juntas esmerilhadas em banho-maria a 60°C. Finalizada a destilação a solução de diazometano foi mantida no freezer e a solução restante foi neutralizada com ácido acético glacial para ser descartada.

Para metilar as frações uma alíquota do destilado (diazometano em éter etílico) foi adicionada às amostras resfriadas em banho de gelo. Os frascos foram agitados e deixados no banho de gelo durante cinco minutos. Em seguida as amostras foram secas e então analisadas por GC/MS.

### 3.3. Experimentos de GC/MS

#### 3.3.1. Análise das Frações Apolares de *Penicillium* sp

As frações apolares obtidas através do cultivo do fungo *Penicillium* sp em arroz e milho (seção experimental do capítulo 3) foram analisadas por GC/MS após tratamento prévio (metilação e hidrólise seguida de metilação) conforme apresenta a Tabela 6.1. As condições cromatográficas de análise destas frações são descritas na Tabela 6.2.

TABELA 6.1 – Relação das frações que foram analisadas por GC/MS e o tipo de tratamento recebido.

| FRAÇÕES   | TIPO DE TRATAMENTO    |
|---|-----------------------|
| ARROZ   |                       |
| PR-5H-1, PR-5H-2, PR-5H-3, PR-5H-4, PR-5H-5, PR-5H-6, PR-5H-7, AOR-5H-8 | Hidrólise e Metilação |
| PR-5PM-3, PR-5PM-5  | Metilação             |
| PR-5PM-1, PR-5PM-2, PR-5PM-4  | Hidrólise e Metilação |
| PR-5M-1, PR-5M-2, PR-5M-3, PR-5M-4                                      | Metilação             |
| BRANCO  | Hidrólise e Metilação |
| MILHO   |                       |
| PM-2-1, PM-2-2, PM-2-3, PM-2-4,   | Metilação             |
| PM-3H-1, PM-3H-2, PM-3H-3, PM-3H-4, PM-3H-5, PM-3H-6, PM-3H-7, PM-3H-8  | Hidrólise e Metilação |
| PM-3M-1   | Hidrólise e Metilação |
| PM-3M-2, PM-3M-3, PM-3M-4   | Hidrólise e Metilação |
| BRANCO  | Hidrólise e Metilação |

Juntamente com essas frações foram preparados dois extratos a partir dos substratos utilizados para o crescimento do microrganismo (arroz e milho). Cerca de 5.0 g de cada um dos substratos moídos obtidos nas mesmas condições de cultivo dos experimentos (90.0 g substrato em 75 mL de água, esterilizados e mantidos por 20 dias) foram suspensas em 100 mL de solvente (diclorometano: metanol, 80:20) e sonicadas por 20 minutos e em seguida filtradas. As soluções foram concentradas e o extrato bruto obtido apresentou um rendimento de 2.4 mg e 11.3 mg para o arroz e milho, respectivamente.

TABELA 6.2 – Condições Cromatográficas de Análise das Frações Apolares de *Penicillium* sp.

| EQUIPAMENTO                        | CONDIÇÕES   |
|------------------------------------|---|
| GC                                 |   |
| Coluna                             | HP 5 MS, 30 metros, 0.25 mm m, 0.25 $\mu$ de espessura do filme de diâmetro interno |
| Temperatura do Injetor             | 250°C   |
| Temperatura da Interface           | 280°C   |
| Volume de Injeção                  | 1 $\mu$ L   |
| Espectrômetro de Massas            |   |
| Temperatura da Fonte               | 130°C   |
| Aquisição “ <i>solvent delay</i> ” | 3 min   |
| Intervalo de massa ( <i>m/z</i> )  | 50 - 550  |

### 3.3.2. Estudo do Perfil Químico de *Penicillium* sp sob Diferentes Substratos

#### 3.3.2.1. Cultivo do Fungo

O fungo *Penicillium* sp foi cultivado em diferentes substratos os quais são descritos na Tabela 6.3. Quatro frascos Erlenmeyers foram preparados para cada substrato sendo um deles mantidos como controle (ausência do microrganismo). Após a esterilização desses frascos foram introduzidas alíquotas de 100 µL de uma suspensão de esporos desse microrganismo (uma alçada do fungo crescido em BDA foi adicionada a 10 mL de água destilada estéril e agitadas com o auxílio de um agitador) e estes frascos foram incubados a uma temperatura de 25°C durante 15 dias.

TABELA 6.3 – Relação dos substratos utilizados nesse experimento e o modo de preparo de cada um deles.

| Meio de Cultivo                   | Modo de Preparo   |
|-----------------------------------|---|
| BDA<br>(Batata, Dextrose, Ágar)   | Foram preparados 200 mL de meio BDA (60.0 g de batata, 4.0 g de dextrose e 3.0 g de ágar bacteriológico), os quais foram distribuídos para quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL.   |
| BD<br>(Batata, Dextrose)          | Foram preparados 200 mL de meio BD (60.0 g de batata e 4.0 g de dextrose), os quais foram distribuídos para quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL.                                  |
| MDA<br>(Mandioca, Dextrose, Ágar) | Foram preparados 200 mL de meio MDA (60.0 g de mandioca, 4.0 g de dextrose e 3.0 g de ágar bacteriológico), os quais foram distribuídos para quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL. |
| MD<br>(Mandioca, Dextrose)        | Foram preparados 200 mL de meio MD (60.0 g de mandioca e 4.0 g de dextrose), os quais foram distribuídos para quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL.                                |
| AM<br>(Amido de Milho)            | Foram preparados 200 mL de meio AM (40.0 g de amido de milho da marca Maisena), os quais foram distribuídos para quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL.                             |
| FM<br>(Fécula de Mandioca)        | Foram preparados 200 mL de meio FM (20.0 g de fécula de mandioca da marca Yoki – polvilho azedo), os quais foram distribuídos para quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL.           |

### 3.3.2.2. Obtenção dos Extratos

#### a) Extratos a partir dos substratos BDA, MDA e AM

Os frascos Erlenmeyer contendo o fungo incubado nos meios de cultura BDA, MDA e AM e seus respectivos frascos controle foram extraídos com 100 mL de clorofórmio:metanol (3:2) em ultra-som durante 20 min. Estes frascos foram filtrados em seguida e concentrados, apresentando rendimentos conforme mostra a Tabela 6.4. Foram pesados 1.0 mg de cada um dos extratos obtidos e ressuspensos com 1 mL de clorofórmio. Estas soluções foram filtradas com algodão e 4.0  $\mu$ L foram injetados no cromatógrafo.

#### b) Extratos a partir dos substratos BD, MD e FM

Os frascos Erlenmeyer contendo o fungo incubado nos meios de cultura BD, MD e FM e seus respectivos frascos controle foram primeiramente filtrados com gaze e o filtrado foi então particionado com 100 mL de acetato de etila, com uma pequena quantidade de cloreto de sódio para garantir que todos os compostos orgânicos fossem para a fase orgânica. Em seguida esses extratos foram filtrados e concentrados, apresentando rendimentos conforme mostra a Tabela 6.4. Foram pesados 1.0 mg de cada um dos extratos obtidos e ressuspensos com 1.0 mL de clorofórmio. Estas soluções foram filtradas com algodão e 4.0  $\mu$ L foram injetados no cromatógrafo.

TABELA 6.4 – Código dos Meios de Cultivo e seus Rendimentos

| Meio de Cultivo | Rendimento (mg) | Meio de Cultivo | Rendimento (mg) |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| BDA             | 497.1           | BD              | 38.7            |
| Branco          | 85.9            | Branco          | 2.7             |
| MDA             | 67.9            | MD              | 82.4            |
| Branco          | 141.6           | Branco          | 1.7             |
| AM              | 64.3            | FM              | 2.6             |
| Branco          | 6.7             | Branco          | 3.4             |



### 3.3.2.3. Parâmetros das Análises por GC/MS

As condições de análises estabelecidas são descritas na Tabela 6.5.

TABELA 6.5 – Condições cromatográficas utilizadas para a análise dos diferentes substratos contendo o fungo *Penicillium* sp.

| EQUIPAMENTO                        | CONDIÇÕES   |
|------------------------------------|---|
| GC                                 |   |
| Coluna                             | DB-1, 30 metros, 0.25 mm, 25 µm de espessura do filme de diâmetro interno   |
| Temperatura do Injetor             | 250°C   |
| Temperatura da Interface           | 280 °C  |
| Volume de Injeção                  | 4 µL  |
| Programação de Temperatura         | 3 min - 80 °C a uma velocidade de 7.0 °C/min<br>4 min - 290 °C a uma velocidade de 5.0 °C/min<br>temperatura final de 325°C |
| Espectrômetro de Massas            |   |
| Temperatura da Fonte               | 180 °C  |
| Aquisição “ <i>solvent delay</i> ” | 3 min   |
| Intervalo de massa ( <i>m/z</i> )  | 50 – 550  |

## 3.4. Experimentos de LC/MS

### 3.4.1. Estudo dos Meroterpenos e outros Metabólitos de *Penicillium* sp

#### 3.4.1.1. Padrões

Os padrões de meroterpenos **PSP-1**, **PSP-2**, **PSP-3**, **PSP-4**, **PSP-6**, **PSP-8**, **PSP-9**, **PSP-11** e **PSP-13**, como também o alcalóide verruculogenina (**PSP-5**), o nucleosídeo (**PSP-14**) e a lignana (**PSP-20**) foram obtidos do cultivo de *Penicillium* sp em arroz, conforme apresenta a seção experimental do capítulo 3. As soluções de meroterpenos foram preparadas dissolvendo esses padrões em acetonitrila em um banho de ultra-som.

### 3.4.1.2. Preparo das Frações

Algumas frações obtidas durante os procedimentos de obtenção dos meroterpenos (capítulo 3) foram ensaiadas para verificar a presença destas substâncias e testar a metodologia. As frações estudadas mostradas na Tabela 6.6 foram preparadas dissolvendo-se 1.0 mg de cada uma delas em acetonitrila e analisadas em HPLC.

TABELA 6.6 – Relação das frações que foram analisadas por LC/MS.

| ARROZ   | MILHO   |
|---|---|
| PR-5PM-6, PR-5M-5, PR-5M-6,<br>PR-3-5-4, PR-3-5-5, PR3-5-6, PR-3-5-9,<br>PR-3-6, PR-3-7, PR-3-8 | PM-2-5, PM-2-6, PM-2-5-4, PM-2-5-5,<br>PM-2-6-4, PM-2-6-5, PM-2-6-6,<br>PM-3M-5 e PM-3M-6 |

### 3.4.1.3. Condições Experimentais usadas nas Análises por HPLC

Para essas análises foi utilizada como fase estacionária uma coluna de fase reversa, Hypersil 5-ODS (25 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm de diâmetro do poro) e como fase móvel um gradiente entre água e acetonitrila (ACN). A variação do gradiente ocorreu da seguinte forma: 0-5 min 25% ACN; 5-15 min 60% ACN; 15-25 min 60% ACN; 25-30 min 80% ACN; 30-50 min 100% ACN. A fase móvel foi degaseificada por 20 minutos em banho de ultra-som antes de ser utilizada. A velocidade do fluxo foi de 0.5 mL/min e o volume injetado de amostra foi de 35 µL. Os sinais de UV foram registrados em 211 nm.

#### 3.4.1.4. Condições Experimentais usadas nas Análises por Espectrômetro de Massas

Os estudos foram realizados utilizando como forma de ionização *electrospray* no modo negativo com uma temperatura da sonda de 350°C e temperatura do bloco da fonte de 135°C. O gás nitrogênio (318 lit/h) foi utilizado como gás secante e o gás argônio ( $1.4 \times 10^{-3}$  mBar) como o gás de colisão para os experimentos de fragmentação MS/MS (recurso *tandem*) do íon molecular.

A introdução da fase móvel no espectrômetro de massas procedeu-se através de um sistema de “splitter”, permitindo apenas a entrada de 150 µL/min provenientes do HPLC. A fonte foi operada com a voltagem do capilar a 4,06 kV e o cone de voltagem com 39 V. A fragmentação do íon molecular foi obtida utilizando uma energia de colisão de 25 eV (gás de colisão: argônio).

#### 3.4.1.5. Análises

Com o objetivo de comparar a sensibilidade e a seletividade de diferentes métodos de análises dos meroterpenos, os padrões bem como as frações foram analisadas através da obtenção de espectros por *full-scan* e íons filhos usando a interface *electrospray*. Para a mistura contendo os padrões e as frações, os íons selecionados foram escaneados para cada substância, restrito à uma janela de retenção como se segue: **PSP-1**: 22.50 – 24.40 min; **PSP-2**: 26.59 – 27.60 min; **PSP-4**: 20.01 – 20.60 min; **PSP-8**: 19.51 – 20.0 min; **PSP-9**: 17.80 – 18.35 min; **PSP-11**: 29.00 – 30.30 min; **PSP-13**: 18.50 – 19.50 min. Os meroterpenos **PSP-3** e **PSP-6** foram analisados por inserção direta devido as suas baixas concentrações na mistura e as substâncias **PSP-5**, **PSP-14** e **PSP-20** também foram analisadas por *full-scan* e inserção direta. Os meroterpenos e outras substâncias nas frações de *Penicillium* sp foram identificados por comparação de seus tempos de retenção e espectro de massas (ESI) com os padrões correspondentes.

### 3.4.2. Estudo dos Limonóides nos Extratos de *Melia azedarach*

#### 3.4.2.1. Preparo dos padrões

Os limonóides azadiractina A (STD-1), azadiractina B (STD-2), azadiractina D (STD-3), nimonol (STD-4), isomeldinina (STD-5), salanina (STD-6), 3-desacetilsalanina (STD-7), nimbina (STD-8), 6-desacetilnimbina (STD-9), 12-hidroxi-amoorastatona (STD-10), gedunina (STD-12), nimbolina A (STD-13) e o protolimonóide melianona (STD-11) foram usados como padrões para analisar o conteúdo de limonóides no extrato dos frutos de *M. azedarach*. Esses padrões de limonóides foram dissolvidos em metanol para análise por HPLC, dando uma concentração final de 50 ng/ $\mu$ L. Os limonóides STD-1-9 foram gentilmente cedidos pelo professor Gulab, da Universidade Federal de Viçosa e os demais padrões foram isolados de *M. azedarach*.

#### 3.4.2.2. Preparo dos extratos

**Material Botânico:** Foram utilizados 2.0 g das raízes (córtex e xilema), córtex do caule, folhas e frutos (verdes e maduros) de *Melia azedarach* coletada no estacionamento do Departamento de Química da UFSCar e, após secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 60°C, cada um desses materiais foi pulverizado em moinho tipo Willey. Em seguida, esses materiais foram extraídos com 50 mL de metanol sonificados por 20 minutos e filtrados por gravidade. Esses materiais foram codificados como mostra a Tabela 6.7.

**Extração em Fase Sólida dos Extratos:** Os vários extratos passaram por esta etapa de pré-purificação antes de serem analisados. Foram retirados 5 mL de cada um dos filtrados dos extratos descritos acima e ressuspensos em 45 mL de água mili-Q. Esta suspensão foi submetida à extração de fase sólida (SPE) utilizando um cartucho LC-18 (6 mL) sob vácuo e a fração eluída com 10 mL de metanol foi

distribuída em 5 frascos, evaporadas e ressuspendidas com 1.0 mL de metanol para análise por HPLC.

TABELA 6.7 - Extratos de *Melia azedarach*.

| EXTRATOS          | CÓDIGOS |
|-------------------|---------|
| Córtex das raízes | MCR     |
| Xilema das raízes | MXR     |
| Córtex do caule   | MCC     |
| Folhas            | ML      |
| Frutos Verdes     | MFV     |
| Frutos Secos      | MFS     |

### 3.4.3.3. Análises por HPLC-DAD

Uma alíquota de 35 µL dos padrões e dos extratos foi injetada sobre uma coluna de fase reversa (Hypersil 5 ODS) e eluída com metanol e mistura de acetonitrila:água (20:80) seguindo o gradiente: 0-5 min., 25% de metanol; 5-15 min., 60% de metanol; 15-25 min., 80% de metanol; 25-35 min., 100% de metanol, em um fluxo de 0.6 mL/min. Os limonóides foram monitorados por absorção UV entre 205-400 nm usando detector *diode-array*. Os cromatogramas foram plotados a 219 nm.

### 3.4.3.4. Análises por HPLC-MS

A interface entre os sistemas HPLC e MS foi do tipo APCI (Chemical Ionisation Atmosphere Pressure), operada no modo negativo de ionização. A temperatura da fonte foi de 140°C e foram registrados os cromatogramas em *full-scan* e *daughter ions* (íons filhos).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimentos de GC/MS

#### 4.1.1. Análise das Frações Apolares de *Penicillium* sp

O fungo *Penicillium* sp quando cultivado em arroz e milho produziu uma quantidade expressiva de óleo. O extrato obtido para cada um dos substratos foi particionado com *n*-hexano e metanol, os quais foram fracionados com solventes de ordem crescente de polaridade, conforme relatado na seção experimental do capítulo 3. Essas frações apresentaram diferentes colorações (amarelo claro até alaranjado) e viscosidades e quando analisadas por RMN <sup>1</sup>H mostraram uma presença majoritária de ácidos graxos e glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos). Assim, as análises por GC/MS foram realizadas com o objetivo de detectar esses componentes químicos nas frações, detectando esses ácidos graxos bem como as substâncias encontradas em baixas quantidades (Figuras 6.1 a 6.4). As frações contendo apenas ácidos graxos foram metiladas e injetadas no cromatógrafo e as que continham glicerídeos foram previamente hidrolisadas seguidas da metilação.

Os extratos obtidos a partir dos substratos controle (arroz e milho) também foram analisados por RMN <sup>1</sup>H, confirmando a presença de glicerídeos e conseqüentemente, foram hidrolisados e metilados para serem analisados.

A Figura 6.5 apresenta a série homóloga dos ácidos alifáticos, sendo os compostos **3**, **6**, **9**, **10** e **11** os ácidos graxos mais abundantes. Esses ácidos alifáticos foram detectados através da comparação do padrão de fragmentação com os espectros de massas fornecidos pela biblioteca do espectrômetro por apresentar os fragmentos iônicos característicos de ácidos graxos a *m/z* 74 e *m/z* 87.

Os ácidos graxos majoritários (livres e na forma de glicerídeos) também foram encontrados nos cromatogramas dos extratos controle, sugerindo serem provenientes do substrato. Entretanto a quantidade expressiva de óleos observada nas frações do fungo *Penicillium* sp presume que esses ácidos graxos também são produzidos pelo fungo e para confirmar essa suposição seria necessário cultivar esse microrganismo em um meio de cultivo contendo apenas glucose como fonte de carbono e fazer análises quantitativas desses metabólitos.

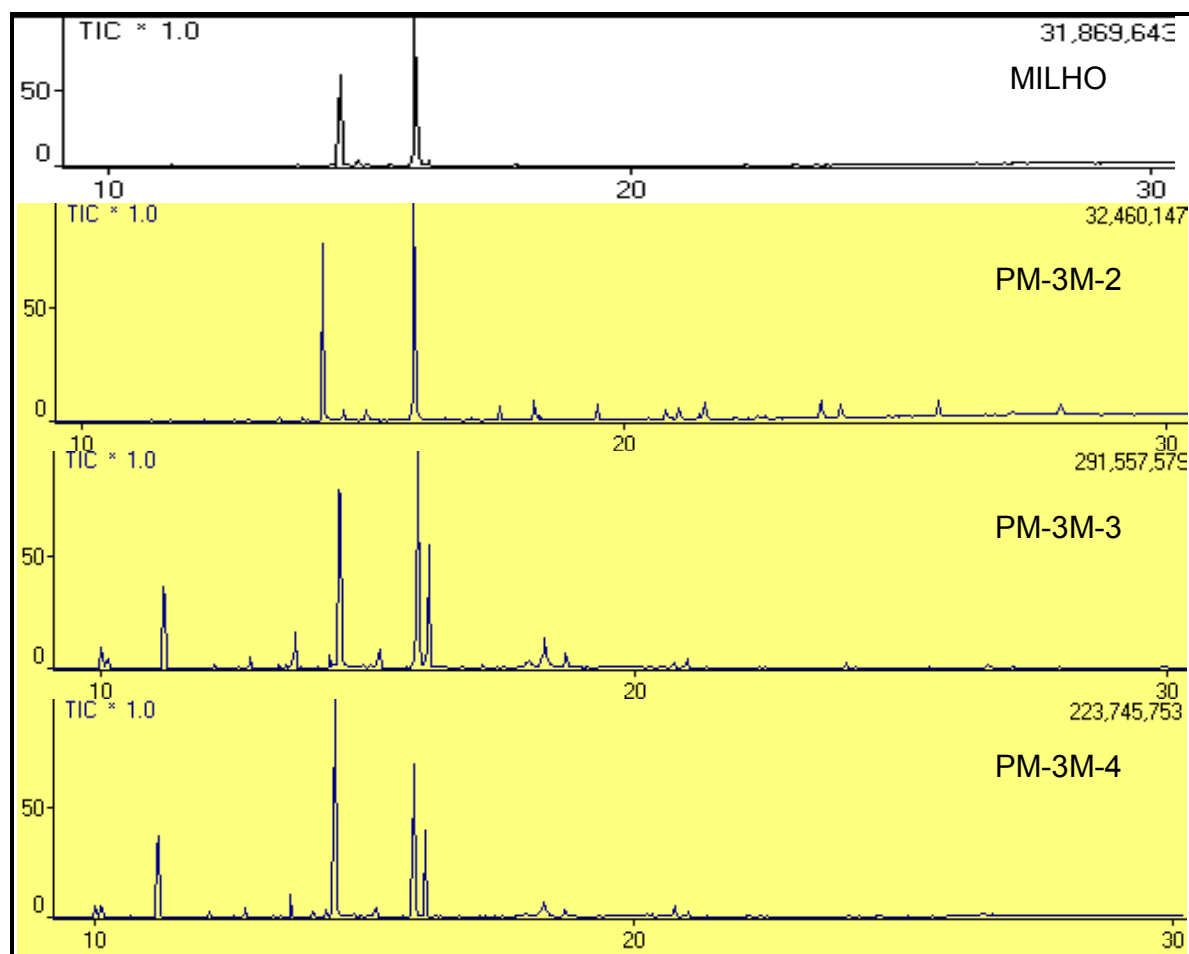


FIGURA 6.1 - Cromatogramas das frações de *Penicillium* sp cultivado no milho.

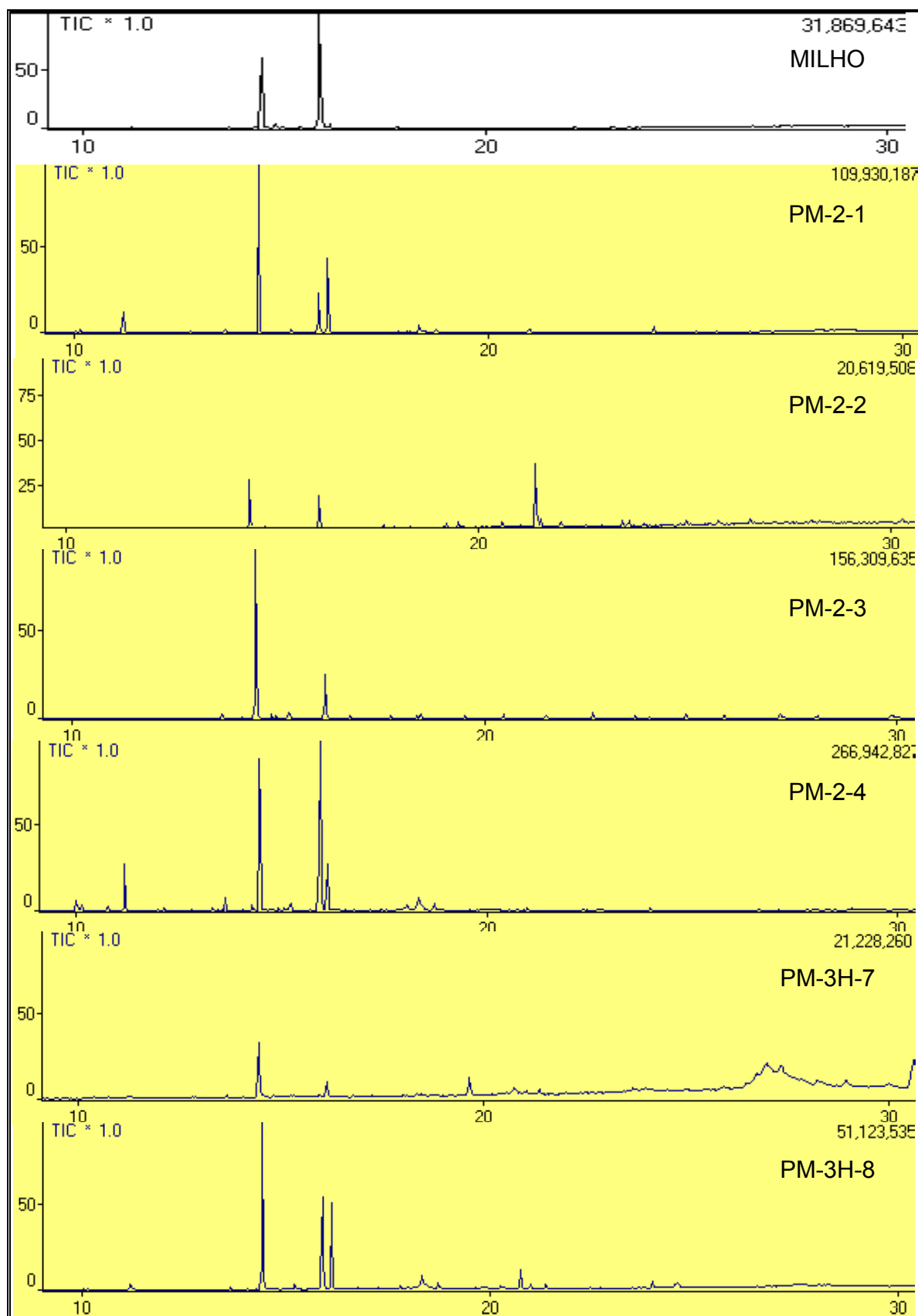


FIGURA 6.2 - Cromatogramas das frações de *Penicillium* sp cultivado no milho.



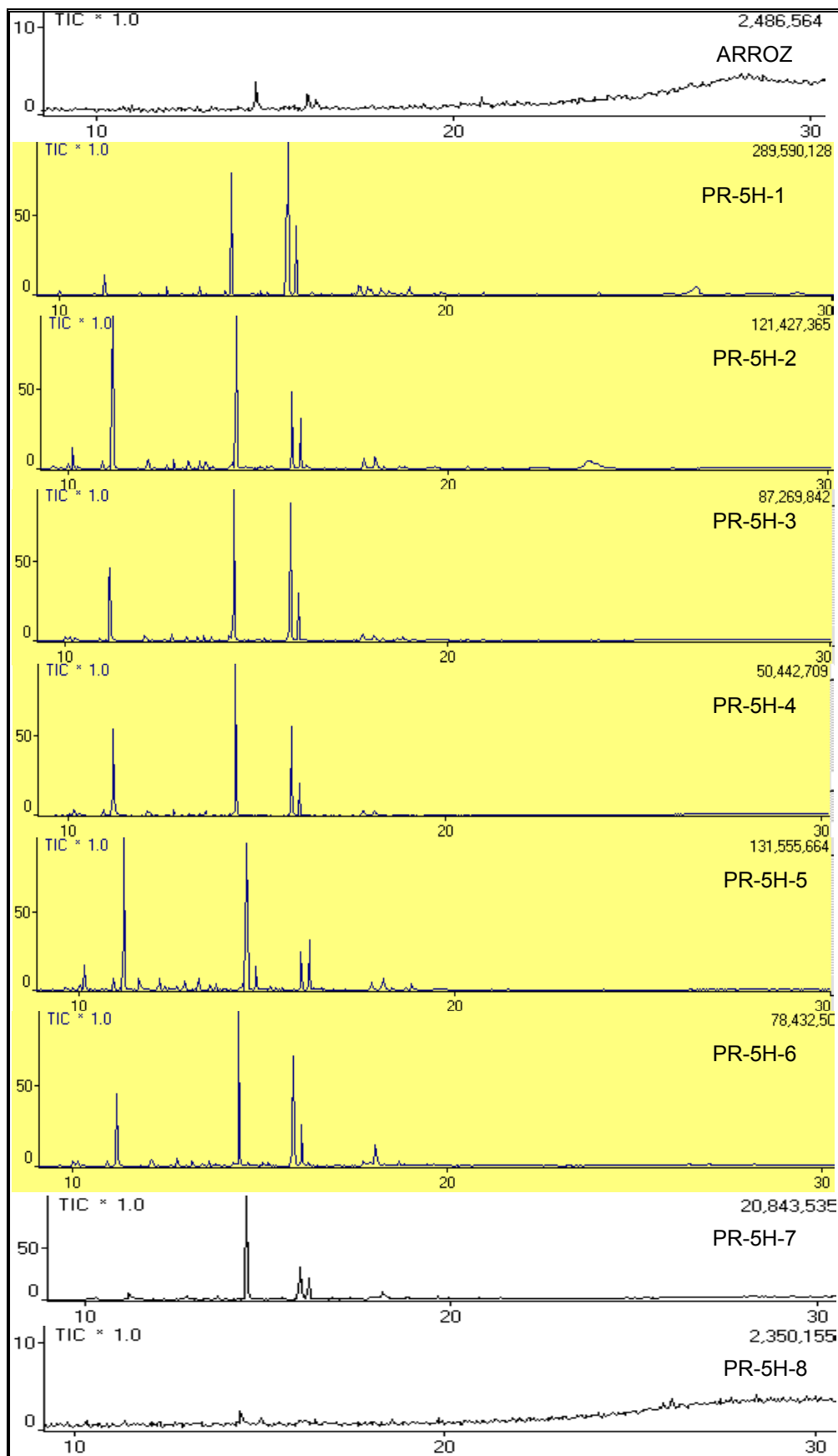


FIGURA 6.3 - Cromatogramas das frações de *Penicillium* sp cultivado no arroz.

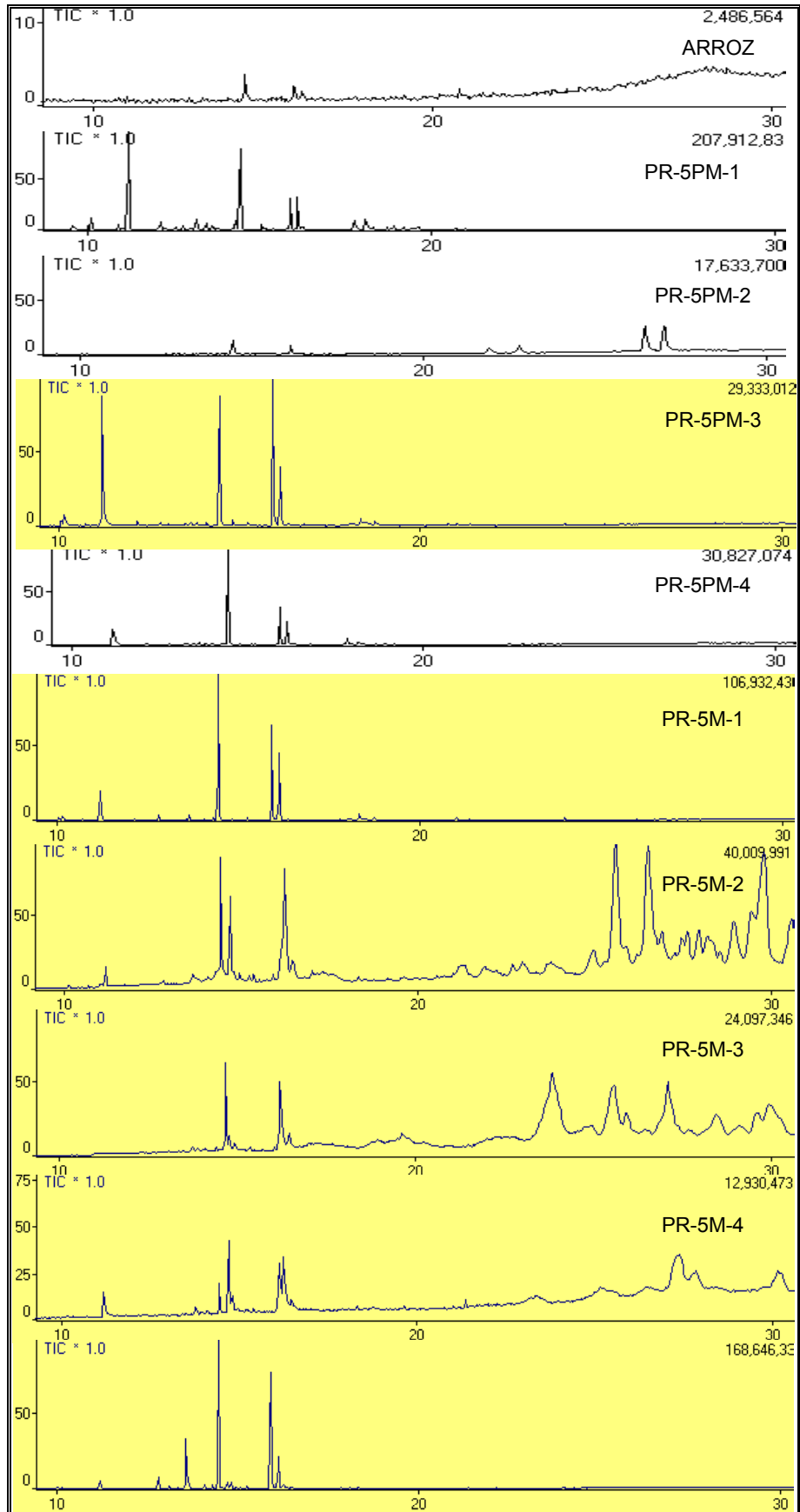


FIGURA 6.4 - Cromatogramas das frações de *Penicillium* sp cultivado no arroz.

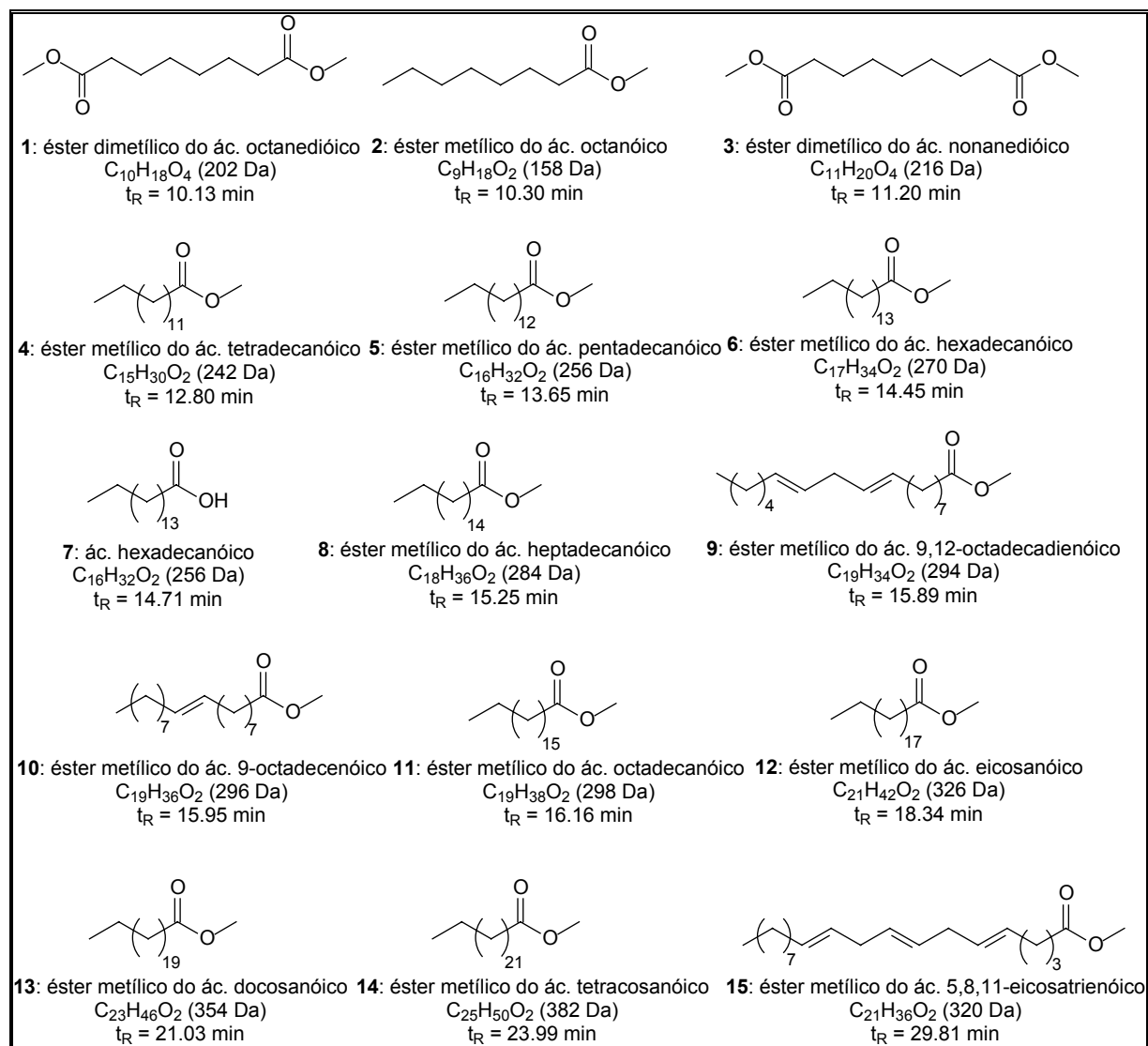


FIGURA 6. 5 – Estruturas químicas propostas para os ácidos graxos.

Outros metabólitos detectados em pequenas quantidades, pertencentes a classe dos hidrocarbonetos, esteróides entre outros, foram propostos com base na comparação de seus espectros com os fornecidos pela biblioteca do espectrômetro (Figura 6.6). Os esteróides (P-12 a P-15) detectados provavelmente são oriundos do meio de cultivo, pois são bastante conhecidos como esteróides de plantas.

Os hidrocarbonetos saturados lineares (P-4 a P-10) foram detectados no espectro de massas por apresentarem perdas consecutivas de [M-14]<sup>+</sup> com diminuição progressiva das intensidades dos picos e também pelo aparecimento dos fragmentos

iônicos a  $m/z$  71 e 85. Já os hidrocarbonetos saturados ramificados apresentam um modelo distinto dos anteriores devido à ocorrência de fragmentações preferenciais correspondente a essas ramificações.

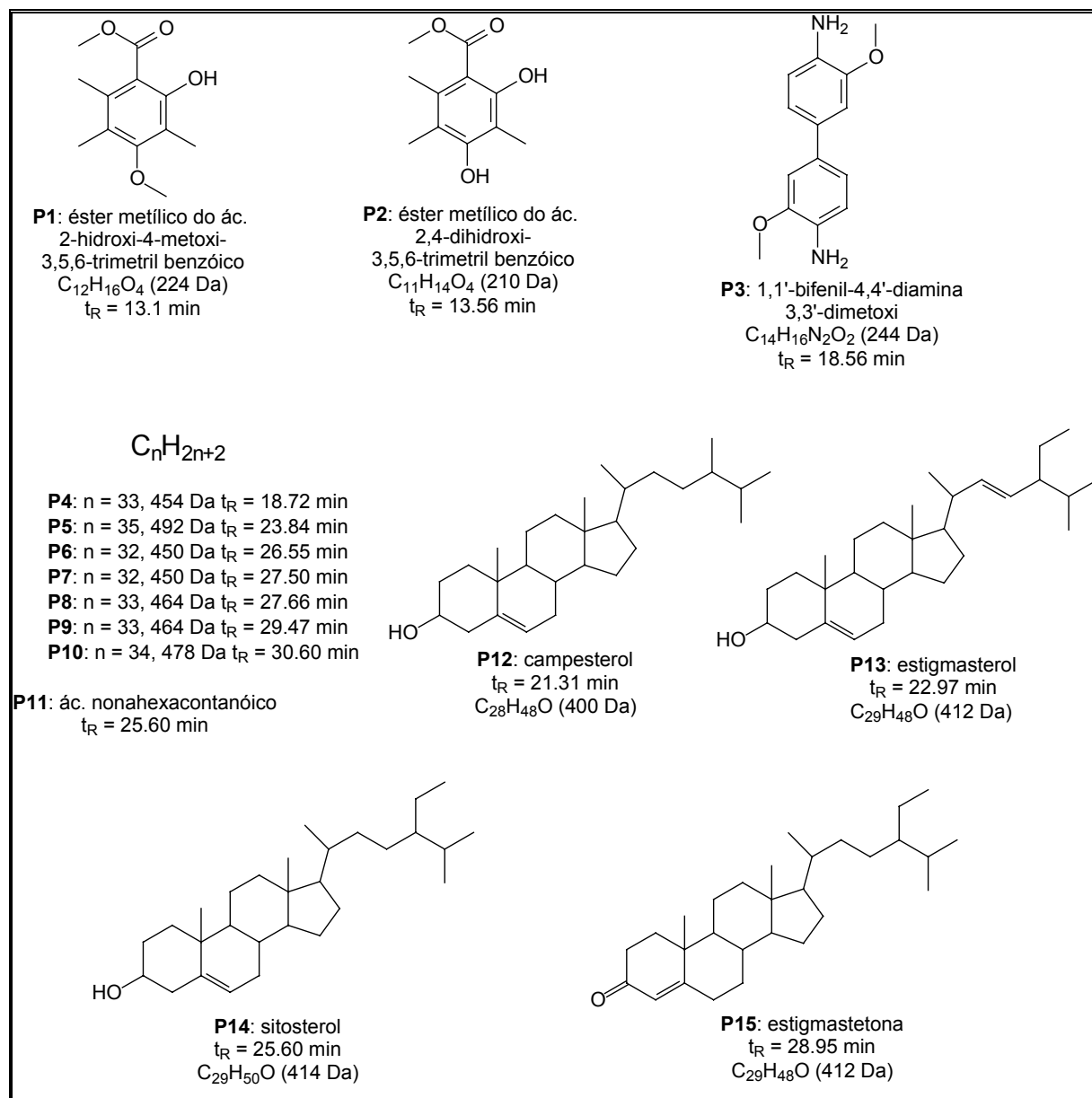
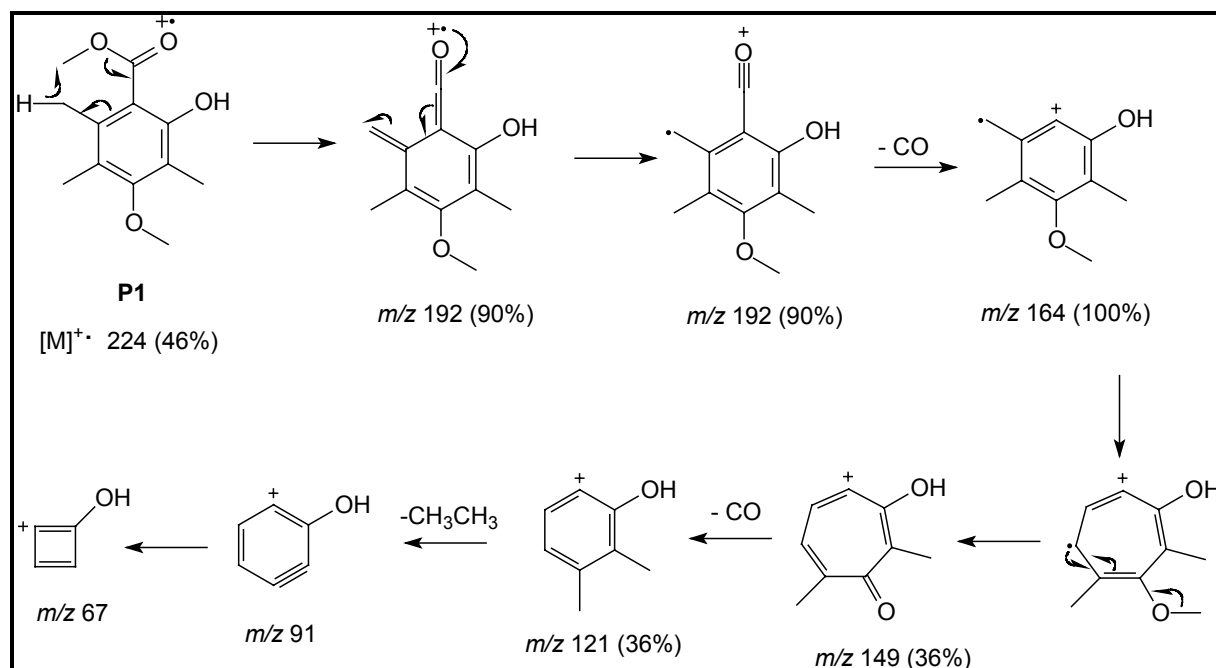


FIGURA 6.6 – Estruturas químicas propostas para as substâncias detectadas nas frações de *Penicillium* sp.

As substâncias **P1** ( $t_R = 13.1$  min) e **P-2** ( $t_R = 13.56$  min) foram detectadas na fração proveniente do cultivo do fungo em arroz, (**PR-5M-4**) e as estruturas foram sugeridas com base na comparação de seus espectros de massas com os fornecidos pela biblioteca do espectrômetro. Os picos dos íons moleculares  $[M]^{+\bullet}$  a  $m/z$  224 (46%) e 210 (40%) foram observados no espectro de massas para **P-1** e **P-2**, respectivamente (Figuras 6.7 e 6.8). A perda de uma molécula neutra ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) é resultante da presença de um substituinte contendo um átomo de hidrogênio na posição *orto* ao éster metílico, facilitando a eliminação por formar um estado de transição de seis átomos (SILVERSTEIN, *et al.*, 1994). O fragmento iônico resultante (90%) passa por nova fragmentação levando a perda da molécula de monóxido de carbono (CO) produzindo o pico base de ambos os espectros. Estas e outras fragmentações propostas são mostradas no Esquema 6.1.

Esses dois metabólitos pertencem à classe dos policetídeos e, particularmente **P-2** é o éster do ácido 3,5-dimetilorselínico, um dos precursores biossintéticos dos meroterpenos (capítulo 4).



ESQUEMA 6.1 – Propostas de fragmentação para a substância **P-1**.

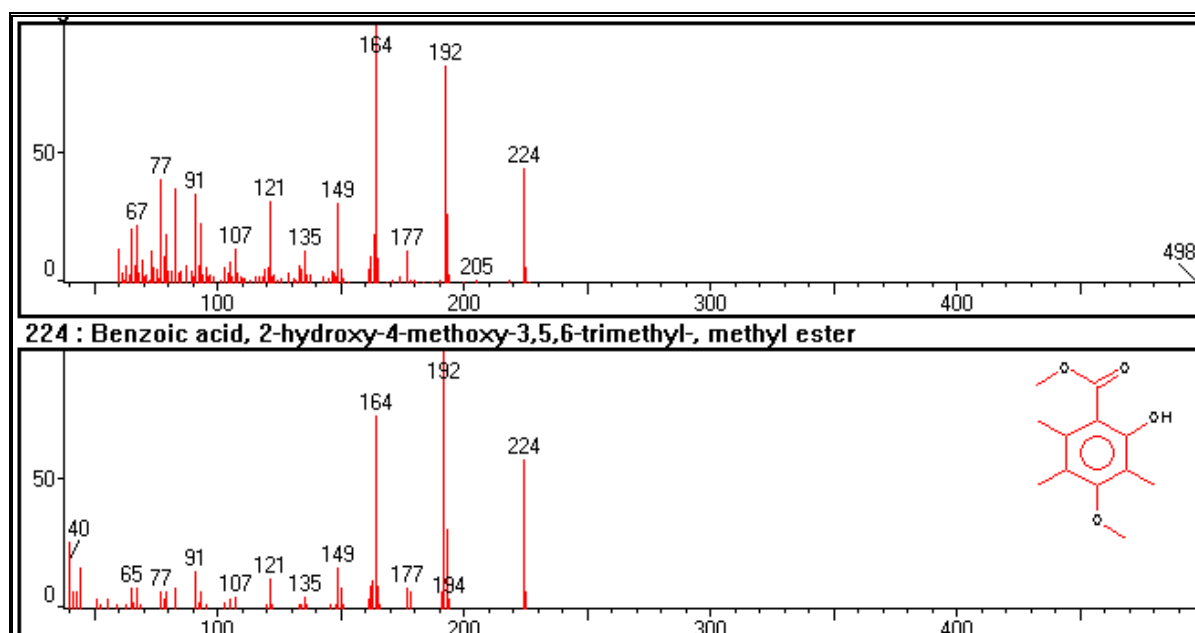


FIGURA 6.7 – Espectro de massas obtido para P-1.

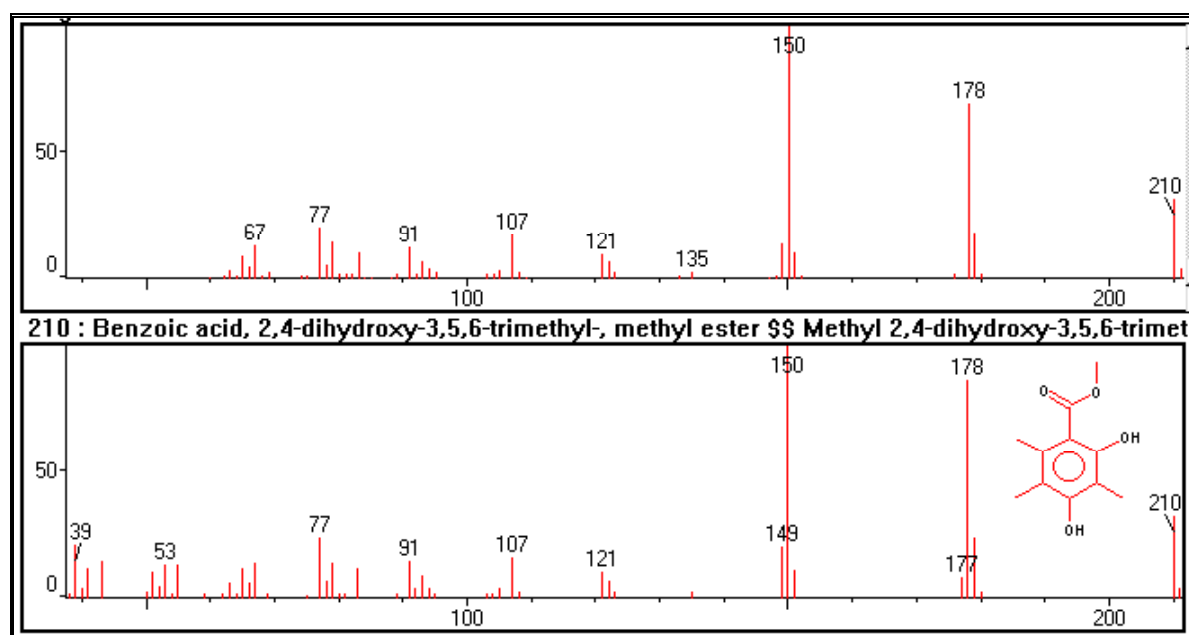


FIGURA 6.8 – Espectro de massas obtido para P-2.

#### 4.1.2. Estudo do Perfil Químico de *Penicillium* sp sob Diferentes Substratos

Os extratos obtidos a partir dos substratos batata, mandioca e derivados foram submetidos a análises por GC/MS. Os cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos nesta análise (Figura 6.9) foram comparados com a finalidade de buscar um meio de cultura adequado para a produção de metabólitos secundários pelo fungo sem maiores interferências de substâncias do próprio meio de cultivo. Aparentemente não foram detectadas diferenças significantes entre os meios de cultivo usando a batata nos meios sólido (BDA) e líquido (BD), exceto a presença de um pico em 21.05 min (266 Da) no cromatograma de BD. O inconveniente deste meio foi os metabólitos do próprio substrato (controles, BDA<sub>b</sub> e BD<sub>b</sub>).

Os cromatogramas obtidos dos extratos contendo mandioca como substrato nos meios sólido (MDA) e líquido (MD) mostraram uma série de picos e, portanto, um número maior de metabólitos foi produzido nesse meio de cultivo. Além disso, os cromatogramas dos substratos controle estavam aparentemente limpos. Um fato curioso foi a presença de um sinal correspondente a uma flavona nos extratos de MDA e seu controle, MDA<sub>b</sub> (respectivamente em 21.13 e 20.97 min), sugerindo uma possível contaminação desse material, uma vez que o ágar e a mandioca também foram usados nesses experimentos e nenhum pico relacionado a flavona foi detectado nos cromatogramas de BDA e MD. Os cromatogramas referentes aos meios comerciais amido de milho (AM) e fécula de mandioca (FM) apresentaram uma série de picos pertencentes ao substrato, não observando uma produção de metabólitos secundários pelo fungo.

As análises dos diversos extratos utilizados para o crescimento do fungo *Penicillium* sp mostraram que os metabólitos produzidos por este fungo são pertencentes à classe dos ácidos graxos e esteróides em sua maioria (Figura 6.10). Esses metabólitos foram identificados por comparação com os espectros da biblioteca do espectrômetro e também com a análise dos dados de literatura. Também foram detectados um sesquiterpeno (**12**) e cinco esteróides (**7-9**, **13**, **14**) cujas estruturas de **13** e **14** (Figuras 6.11 e 6.12) foram propostas através de esquemas de fragmentação.

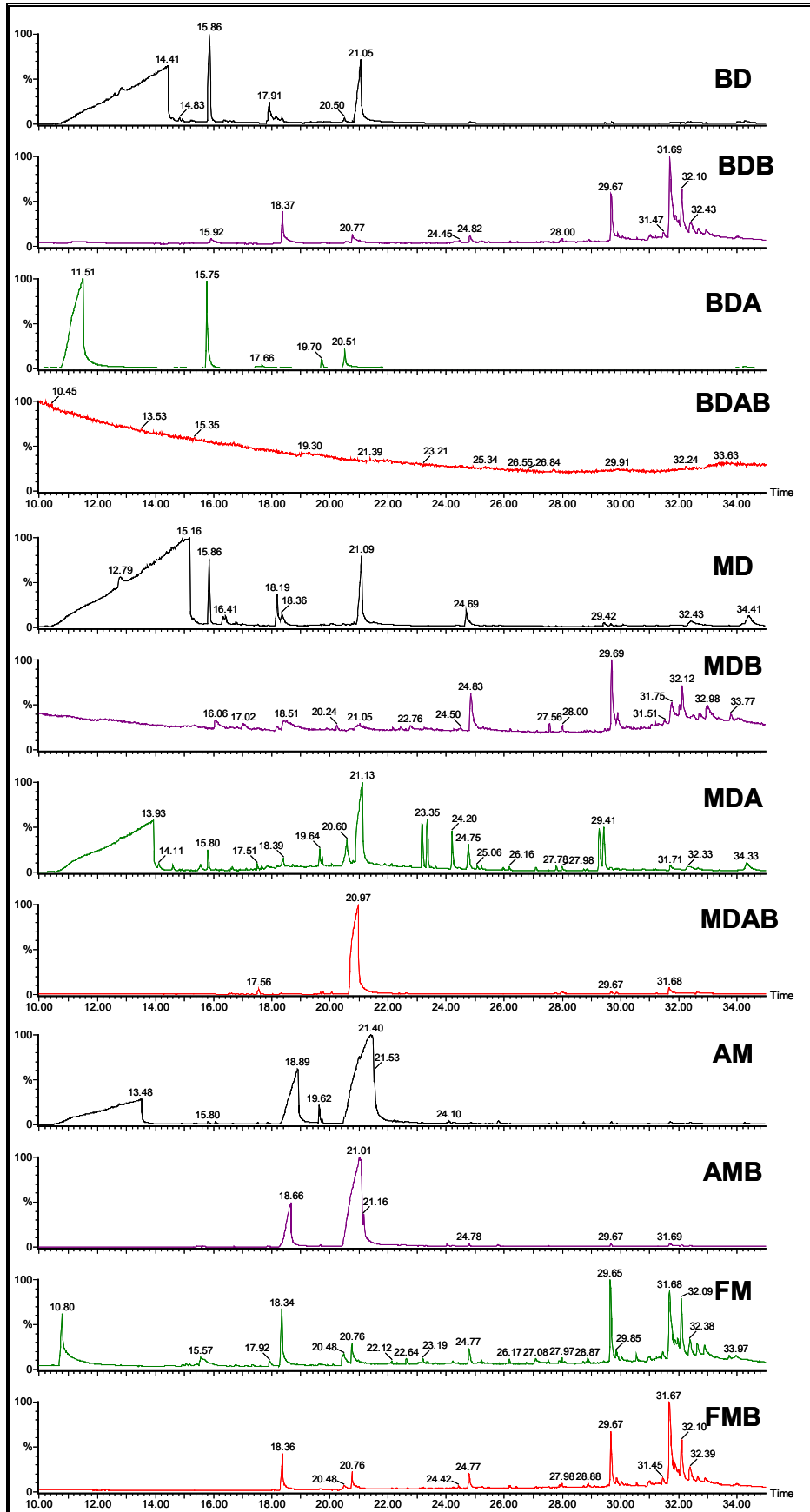


FIGURA 6.9 - Cromatogramas das frações de *Penicillium* sp cultivado em diferentes substratos.



Vários outros metabólitos não tiveram suas estruturas estabelecidas, mas conforme o perfil cromatográfico, mostraram espectros sugestivos de esteróides. Vale ressaltar que não foram detectados meroterpenos e outras substâncias isoladas nos cultivos em larga escala do fungo *Penicillium* sp. Como essas substâncias possuem uma certa polaridade devido aos grupos hidroxila presentes em sua estrutura, como também valores de massas relativamente altos, provavelmente não puderam ser analisadas através da técnica de GC/MS.

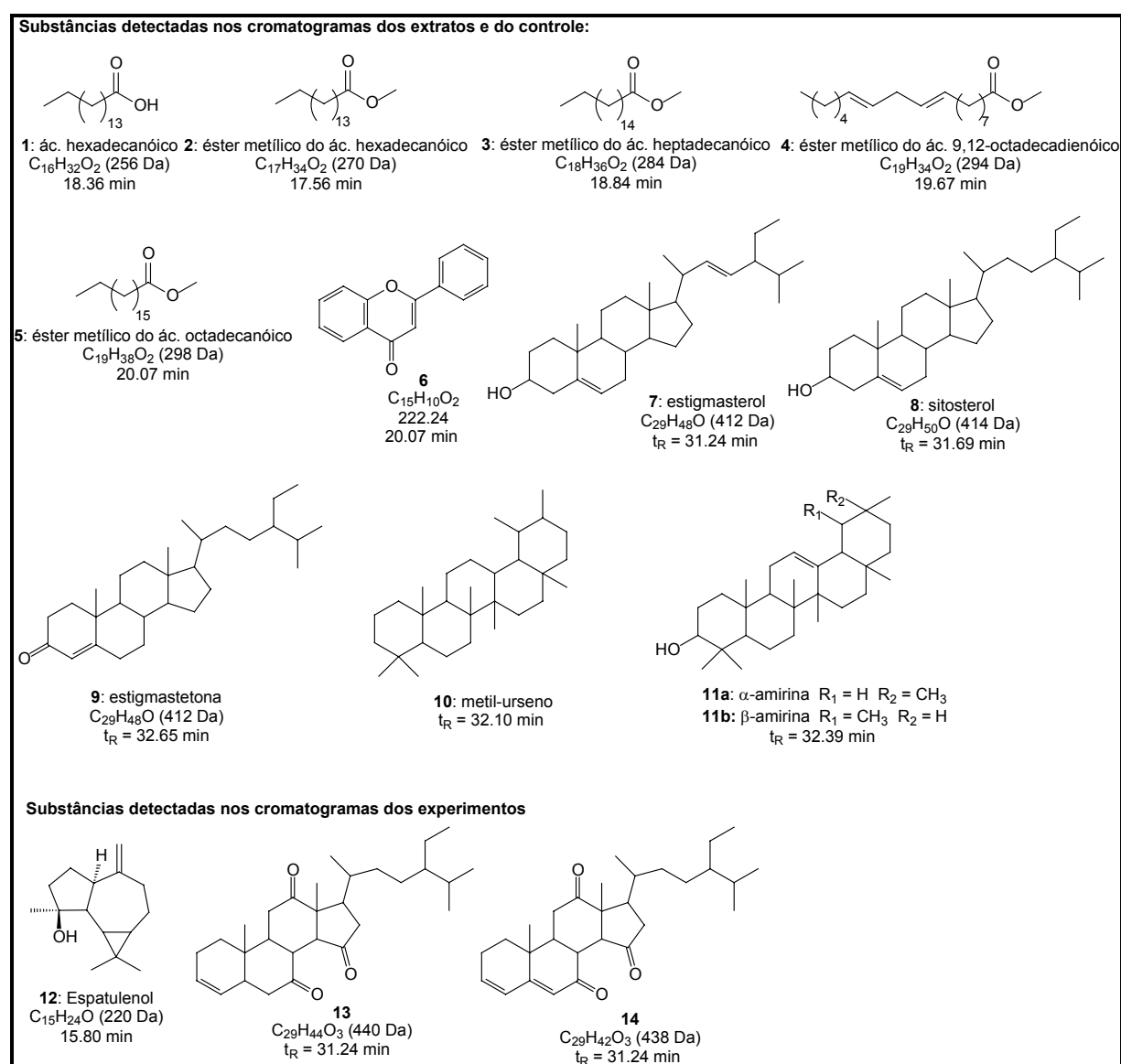


FIGURA 6.10 – Estruturas químicas propostas para as substâncias detectadas nas frações de *Penicillium* sp e nos extratos controle.

Os metabólitos **1-11** foram encontrados em ambos os extratos do fungo e do controle. Já as substâncias **12-14** foram detectadas somente nos experimentos contendo o microrganismo.

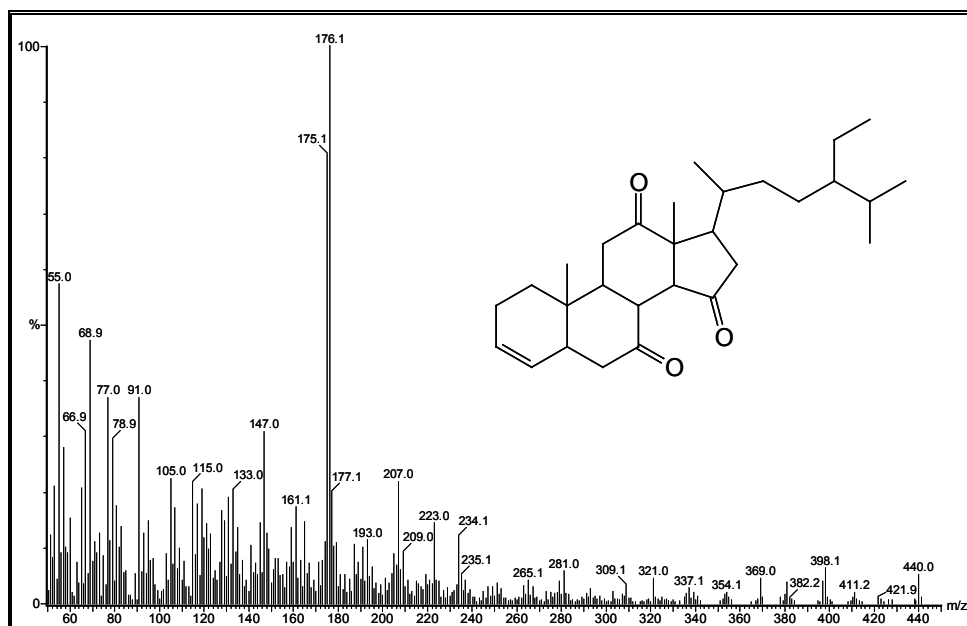


FIGURA 6.11 – Espectro de massas obtido para o esteróide **13**.

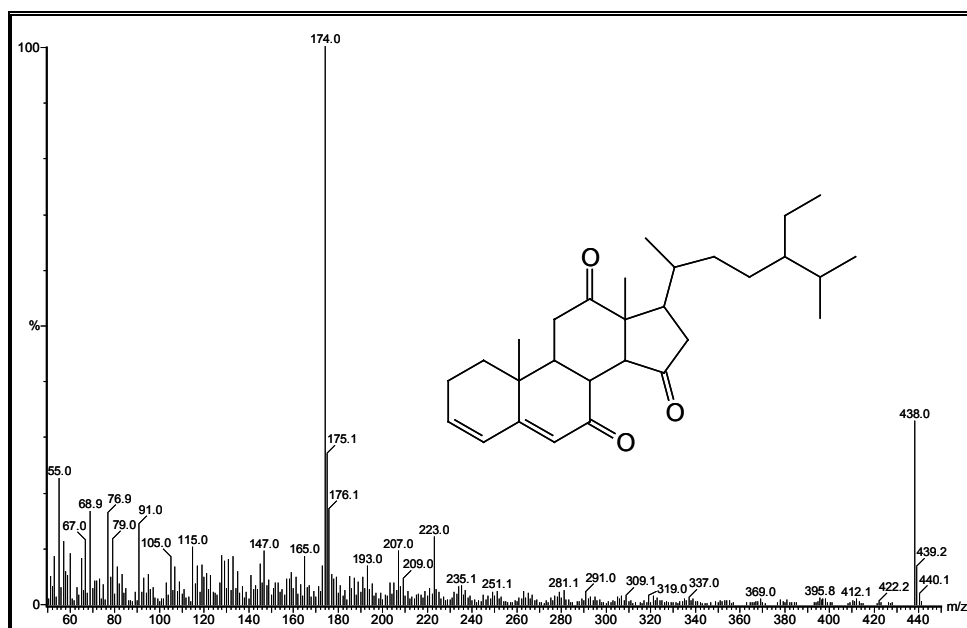


FIGURA 6.12 – Espectro de massas obtido para o esteróide **14**.

O sesquiterpeno espatulenol (**12**) é uma substância natural de ocorrência comum em plantas. O aparecimento de **12** nos extratos fúngicos sugere que esse microrganismo possa também biossintetizar esse metabólito, o qual já foi isolado desse fungo nos experimentos realizados por SANTOS (1999). A identificação de **12** foi realizada através da comparação do espectro (Figura 6.13) com os dados fornecidos pela literatura (ADAMS, 1995).

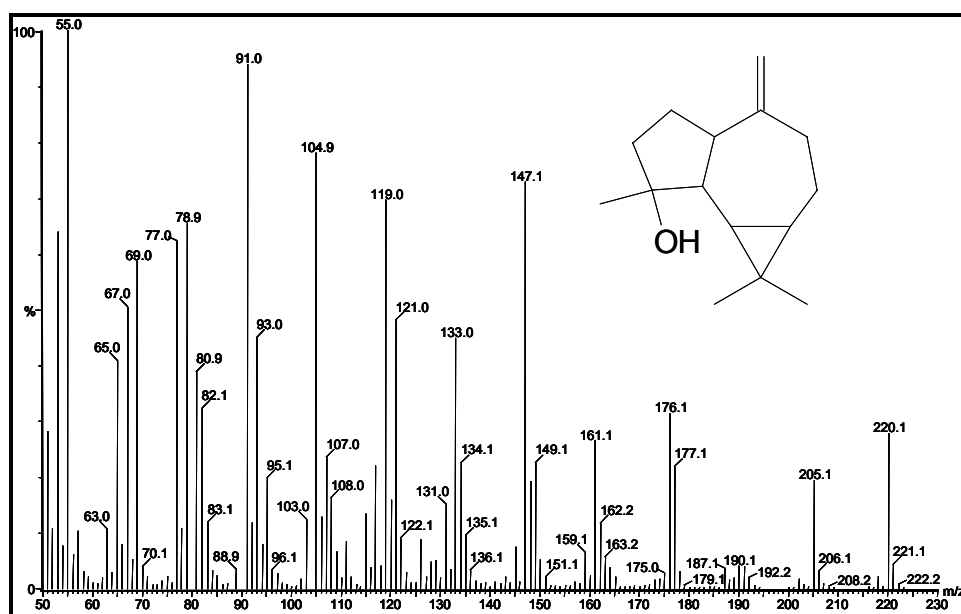


FIGURA 6.13 – Espectro de massas obtido para o sesquiterpeno **12**.

## 4.2. Experimentos de LC/MS

### 4.2.1. Estudo dos Meroterpenos e Outros Metabólitos de *Penicillium* sp

Este trabalho foi focado na separação e identificação de meroterpenos padrões e outros metabólitos produzidos pelo fungo *Penicillium* sp através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e utilização do recurso *tandem* (LC-ESI-MS/MS). Além disso, esta metodologia mostrou-se adequada para a detecção destas substâncias em algumas frações oriundas do cultivo deste microrganismo em arroz e milho.

#### 4.2.1.1. Otimização do HPLC

Em linhas gerais as análises com espectrometria de massas *tandem* não requerem uma ótima separação cromatográfica. Contudo, uma resolução cromatográfica razoável entre os compostos meroterpenóides foi necessária. Portanto, para otimizar as separações dessas substâncias foram utilizadas como fase móvel misturas de água/metanol e água/acetonitrila, e a melhor condição foi obtida utilizando uma coluna de fase reversa (ODS) com água/acetonitrila como fase móvel. Uma série de variações no gradiente foi desenvolvida para obter uma alta seletividade para esses compostos e o método selecionado encontra-se descrito na seção experimental (seção 3.4.1.3).

Os meroterpenos preaustinóides A (**PSP-1**), B (**PSP-2**) e B1 (**PSP-11**), isômeros estruturais de massa 444, apresentaram tempos de retenção bem distintos, provavelmente devido às modificações no anel D, as quais influenciaram na interação dessas substâncias com a fase estacionária, conforme mostra a Figura 6.14. A injeção individual possibilitou a indicação dos tempos de retenção em 23.03, 26.53 e 29.50 minutos para **PSP-1**, **PSP-2** e **PSP-11**, respectivamente. Entretanto, os meroterpenos **PSP-3**, **PSP-4**, **PSP-6**, **PSP-8**, **PSP-9** e **PSP-13** tiveram tempos de retenção muito próximos levando à formação de um único e intenso pico no cromatograma e,

portanto, foram injetados individualmente com o objetivo de obter seus respectivos tempos de retenção (Tabela 6.8).

Os metabólitos **PSP-5**, **PSP-14** e **PSP-20** foram analisados separadamente dos meroterpenos e o cromatograma, mostrado na Figura 6.15, mostrou tempos de retenções muito distintos. O primeiro metabólito eluído foi o nucleosídeo **PSP-14** ( $t_R = 5.09$  min) devido a presença da ribose ligado a base nitrogenada. Em seguida foi observado o pico referente a lignana **PSP-20** ( $t_R = 16.58$  min) e por fim, o pico do alcalóide verruculogenina, **PSP-5** ( $t_R = 20.20$  min).

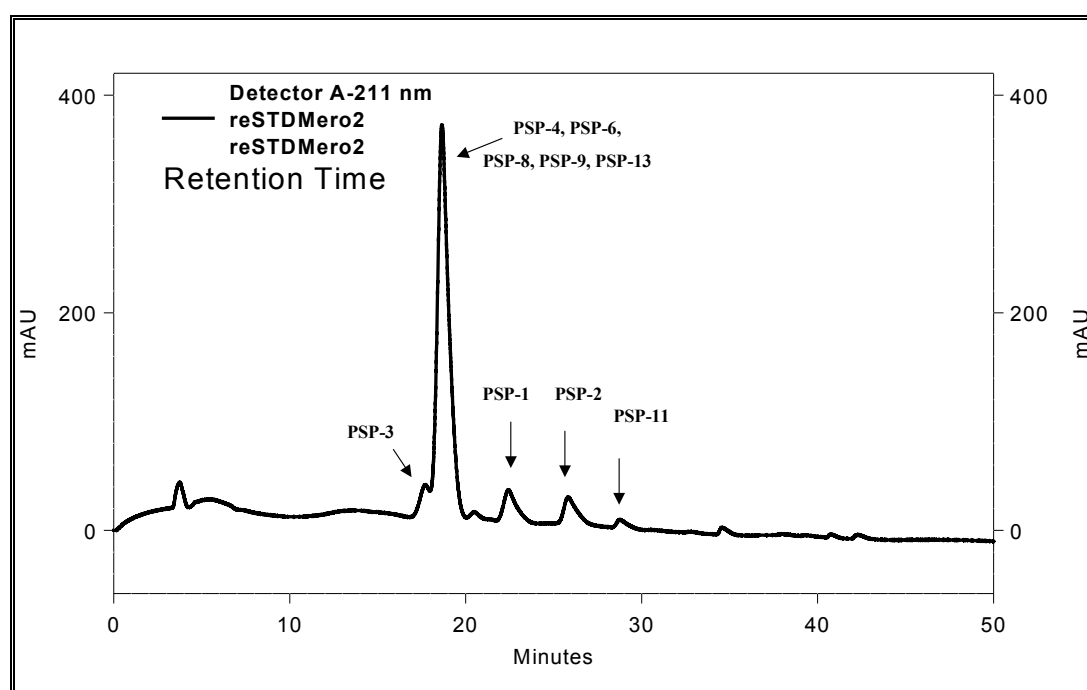


FIGURA 6.14 – Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos.

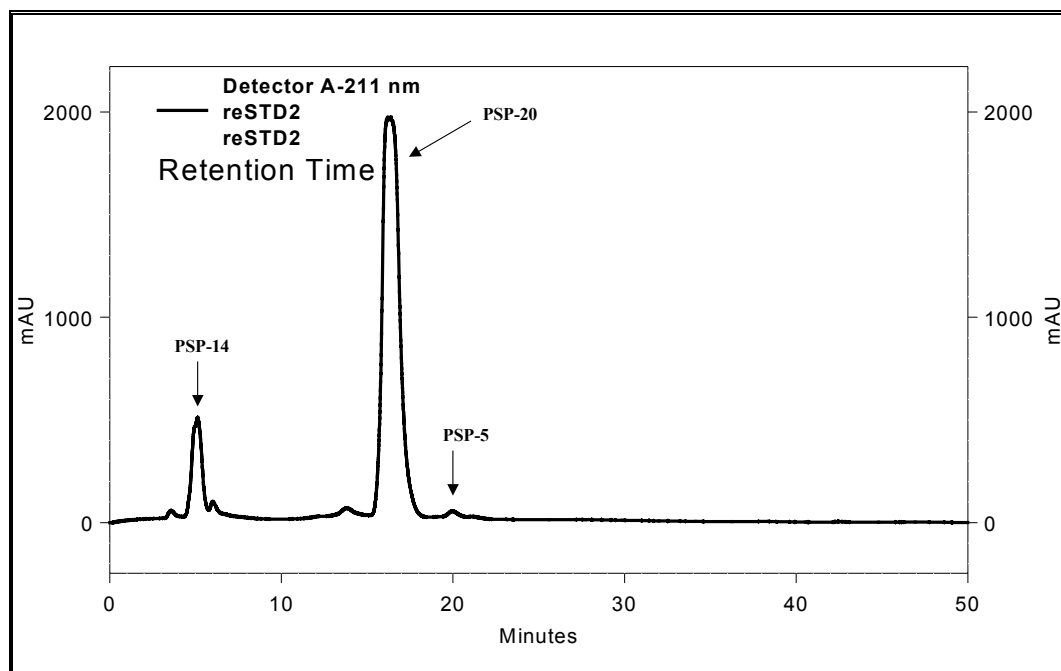


FIGURA 6.15 – Cromatograma (HPLC) da mistura de padrões de **PSP-5**, **PSP-14** e **PSP-20**.

#### 4.2.1.2. Otimização do MS

A análise dos compostos foi primeiramente investigada através da inserção direta do meroterpeno Preaustinóide A (**PSP-1**) dissolvido em acetonitrila usando a interface *electrospray* no modo negativo de ionização. Os parâmetros como o capilar e cone de voltagem foram otimizados para gerar maior número de íons moleculares protonados, conforme apresentada na seção 3.4.1.4.

O cromatograma obtido por HPLC para os padrões de meroterpenos estava resolvido, porém sem a distinção dos sinais de cada um deles como apresentado na Figura 6.14 e, portanto, não forneceu uma seletividade satisfatória, resultando na sobreposição e picos não resolvidos dos compostos que co-eluíram na mistura. Entretanto, a detecção por MS forneceu picos claros, resolvidos no cromatograma de íons totais (TIC) (Figura 6.16). Através da ferramenta de monitoramento, os íons de  $m/z$  de interesse foram selecionados, possibilitando a visualização de seus picos nos cromatogramas com seus respectivos tempos de retenção, os quais podem ser comparados com os valores obtidos através do detector *diode-array* (Tabela 6.8). Para os meroterpenos **PSP-3** e **PSP-6** as condições estabelecidas não foram adequadas para

a aquisição de seus espectros e, portanto, eles foram injetados isoladamente por inserção direta. Para a mistura das substâncias PSP-5, PSP-14 e PSP-20 os espectros foram obtidos apenas por *full-scan* como mostra a Figura 6.18.

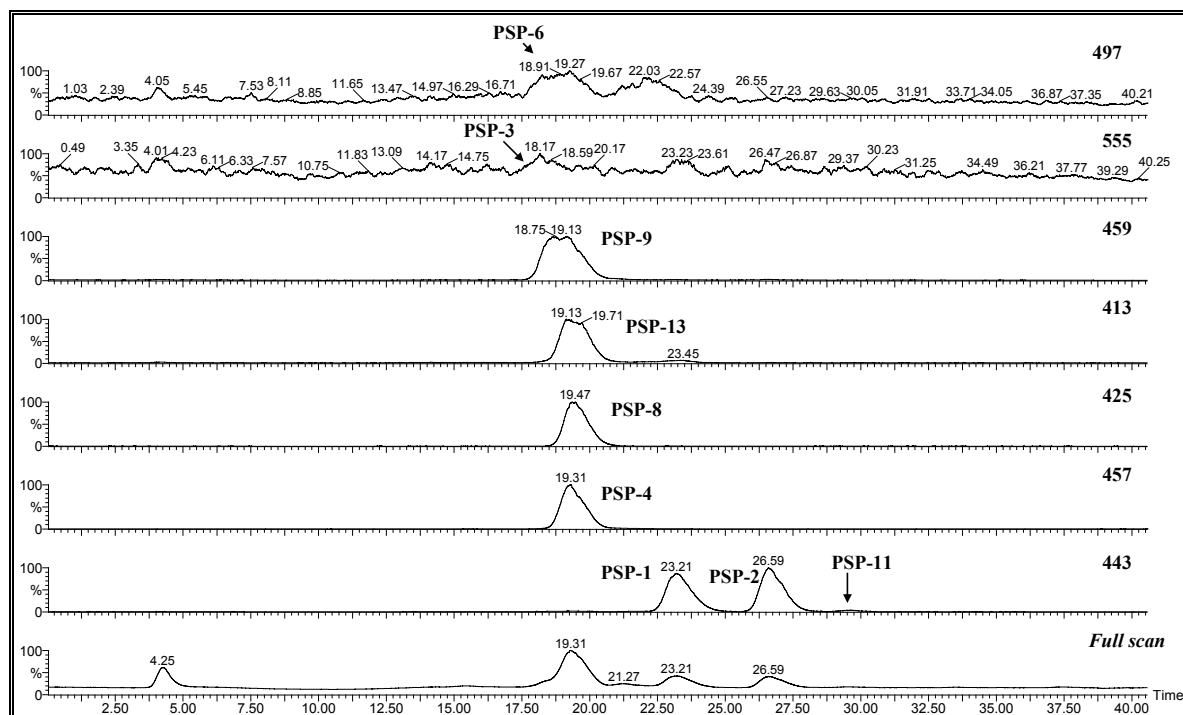


FIGURA 6.16 – Cromatograma obtido por LC/MS para a mistura de padrões de meroterpenos obtidos por *full-scan*. TIC e valores de *m/z*.

A obtenção dos espectros por *full-scan* forneceu a massa molar dos constituintes da mistura de substâncias. Contudo, os espectros resultantes fornecem pouca informação estrutural, o que dificultaria uma atribuição segura no caso da análise dessas substâncias em misturas complexas. Para contornar esse problema, a mistura de padrões foi analisada através do recurso *tandem* (LC-ESI-MS-MS) e os cromatogramas podem ser vistos na Figura 6.17. Esse experimento foi setado direcionando os íons de interesse restrito a uma janela espectral para o segundo quadrupolo (célula de colisão), os quais colidiram com o gás argônio para induzir a fragmentação. Os fragmentos resultantes foram varridos no terceiro quadrupolo e são mostrados nos espectros das Figuras 6.19 – 6.21.

Capítulo 6: Análise de Substâncias Detectadas em *Melia azedarach* e *Penicillium* sp através da Espectrometria de Massas

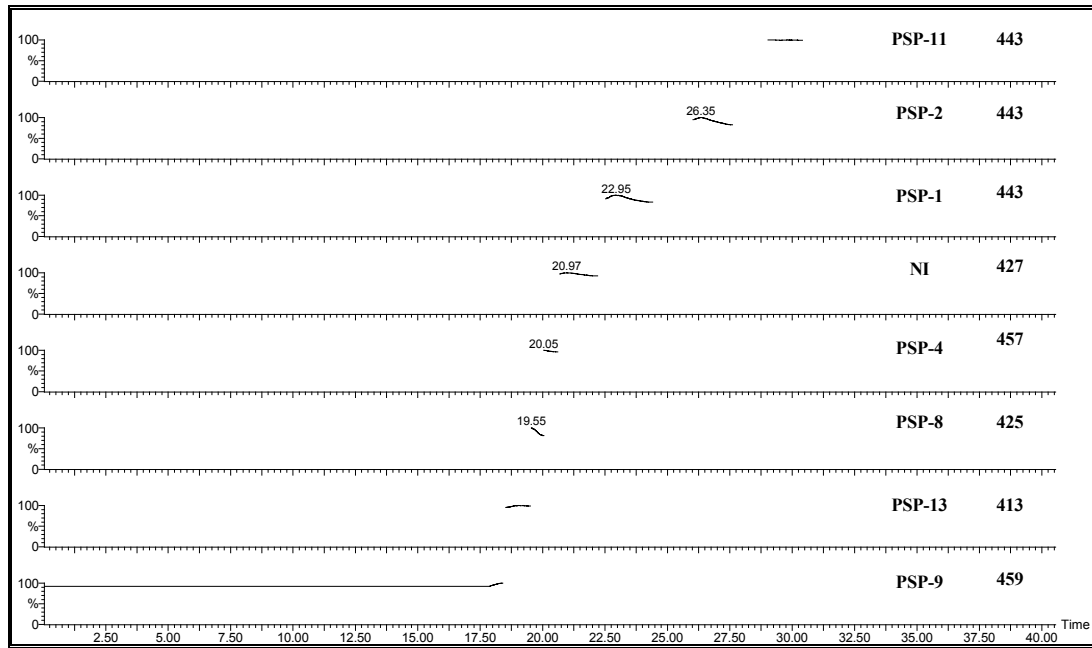


FIGURA 6.17 – Cromatograma dos padrões de meroterpenos obtidos por LC-ESI-MS-MS. NI = não identificado

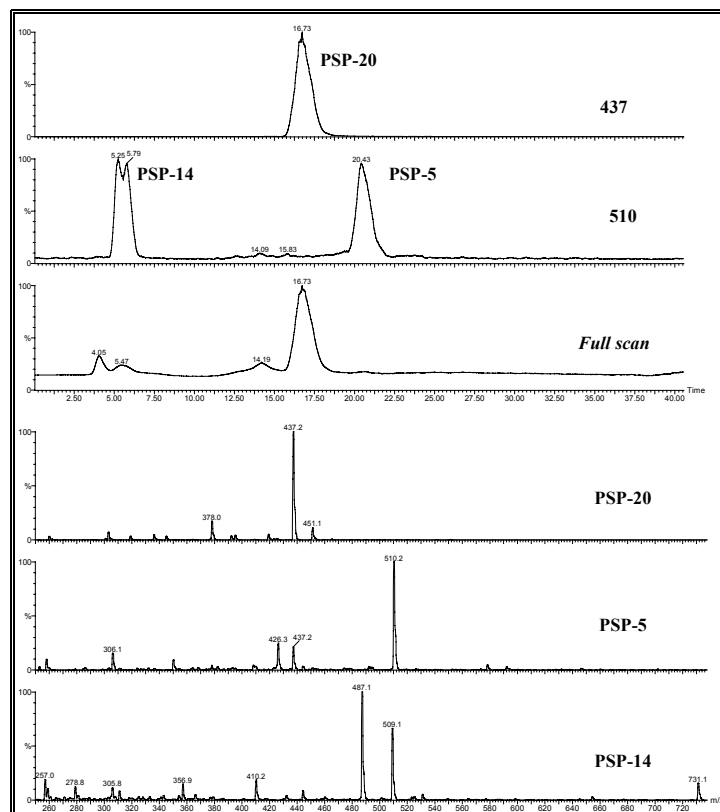


FIGURA 6.18 – Cromatograma obtido por LC/MS para a mistura de padrões de **PSP-5**, **PSP-14** e **PSP-20** obtidos por *full-scan* e seus respectivos espectros de massas obtidos por *electrospray* no modo negativo.



TABELA 6.8 – Tempos de retenção (HPLC e MS) para os meroterpenos e outras substâncias com os seus respectivos íons moleculares e principais fragmentações.

| Padrões de Meroterpenos | PM  | t <sub>R</sub><br>HPLC<br>(min) | t <sub>R</sub><br>MS<br>(min) | [M-H] <sup>-</sup>   | Principais fragmentações   |
|-------------------------|-----|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|--|
| PSP-1                   | 444 | 23.03                           | 23.21                         | 443(10) <sup>a</sup> | 401(100), 383(25), 367(27), 341(32)  |
| PSP-2                   | 444 | 26.53                           | 26.59                         | 443(12)              | 401(100), 383(20), 367(20), 341(29)  |
| PSP-3                   | 556 | 17.97 <sup>b</sup>              |                               | 555                  |  |
| PSP-4                   | 458 | 19.31 <sup>b</sup>              | 19.31                         | 457(19)              | 415(100), 383(36), 355(60)   |
| PSP-6                   | 498 | 18.23 <sup>b</sup>              |                               | 497                  |  |
| PSP-8                   | 426 | 19.25 <sup>b</sup>              | 19.47                         | 425(27)              | 407(30), 397(37), 381(10), 365(20), 355(47), 259(32), 195(100), 176(27), 151(38) |
| PSP-9                   | 460 | 18.31 <sup>b</sup>              | 18.61                         | 459(28)              | 427(20), 417(100), 399(40), 385(50), 357(90), 341(30), 329(40)                   |
| PSP-11                  | 444 | 29.50                           | 29.62                         | 443(30)              | 401(100), 383(51)  |
| PSP-13                  | 414 | 19.14 <sup>b</sup>              | 19.13                         | 413(100)             | 353(31), 309(18)   |
| PSP-5                   | 511 | 20.20                           | 20.43                         | 510                  |  |
| PSP-14                  | 244 | 5.09                            | 5.25                          | 487                  |  |
| PSP-20                  | 438 | 16.58                           | 16.73                         | 437                  | 378  |

<sup>a</sup>: intensidade relativa (%).

<sup>b</sup>: t<sub>R</sub> obtidos com a injeção dos padrões isoladamente.

### 4.2.1.3. Espectro de Massas dos Meroterpenos

Os fragmentos iônicos dos íons selecionados foram obtidos no modo negativo de ionização por *electrospray* com energia de colisão de 25 eV. Os espectros de massas obtidos são apresentados nas Figuras 6.19 – 6.21.

Os espectros de massas dos meroterpenos **PSP-1**, **PSP-2**, **PSP-11**, **PSP-4**, **PSP-9** e **PSP-13** apresentaram dois picos principais. O primeiro, o pico base do espectro, é resultante de uma eliminação do grupo ceteno ( $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ ) produzindo a espécie iônica  $[\text{M}-\text{H}-42]^-$ . O segundo pico resultou da perda da molécula de acetato formando  $[\text{M}-\text{H}-42-60]^-$  como fragmento iônico, os quais podem ser observados nas Figuras 6.19 e 6.20. Este modelo de dissociação pode ser explicado para os meroterpenos contendo o sistema biciclo [3:2:1] no anel D. A perda do fragmento 42 deve ser resultante do rearranjo  $\alpha$ -cetol (caminho *a*) na dicetona, conforme apresenta o Esquema 6.2. A perda do grupo acetato ocorre com o rearranjo  $\alpha$ -cetol no caminho *b* com a assistência do hidrogênio da metila 3H-9'.

Embora os esforços realizados para padronizar as condições, ainda assim foram observadas mudanças nas intensidades relativas dos íons, como foi o caso do meroterpeno acetoxidehidroaustina que exibiu uma alta fragmentação no espectro de MS, utilizando as mesmas condições como mostrado na Figura 6.21.

**Capítulo 6: Análise de Substâncias Detectadas em *Melia azedarach* e *Penicillium* sp através da Espectrometria de Massas**

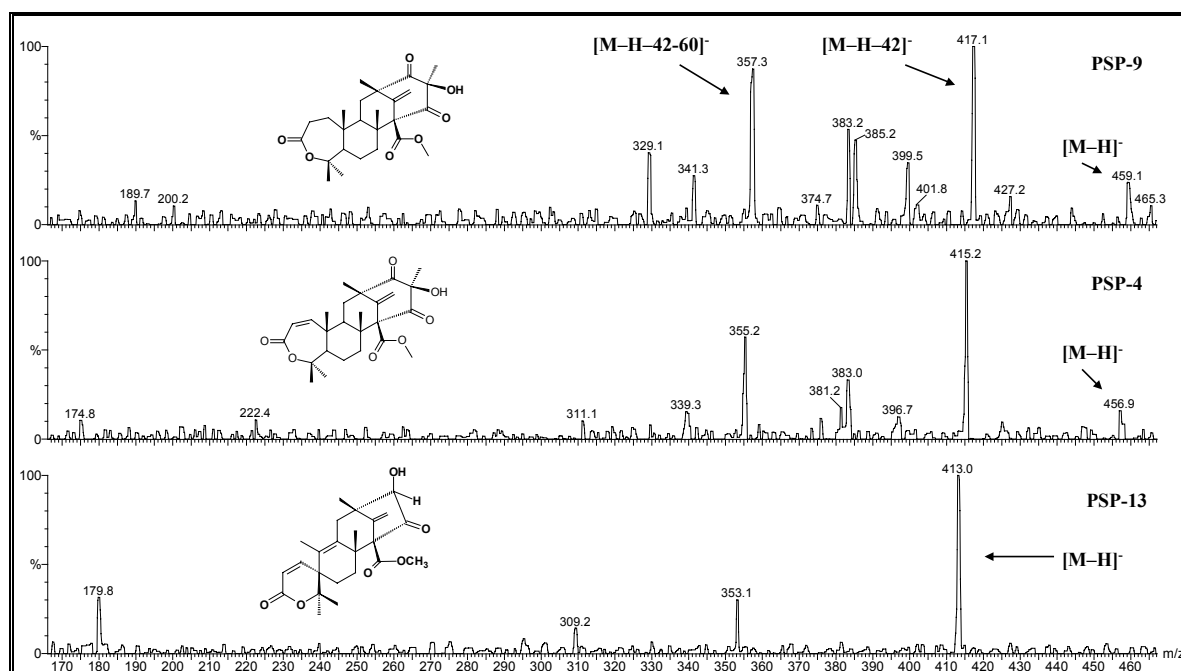


FIGURA 6.19 – Espectro de massas dos meroterpenos **PSP-9**, **PSP-4** e **PSP-13** obtidos por *electrospray* no modo negativo com 25 eV de energia de colisão.

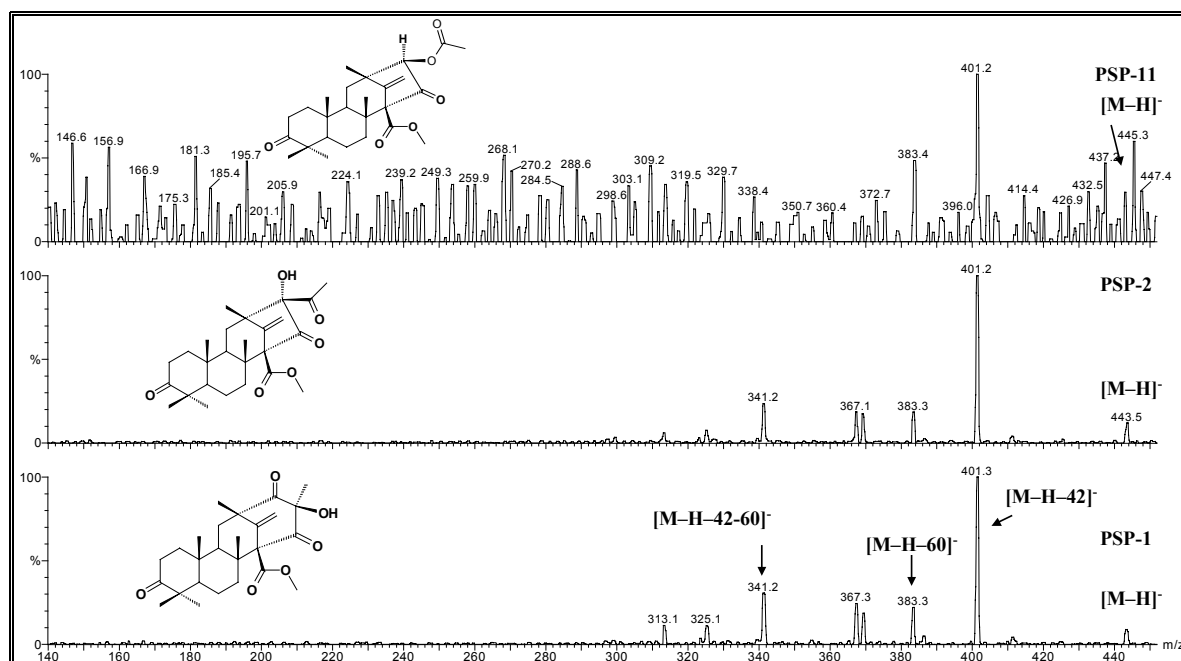
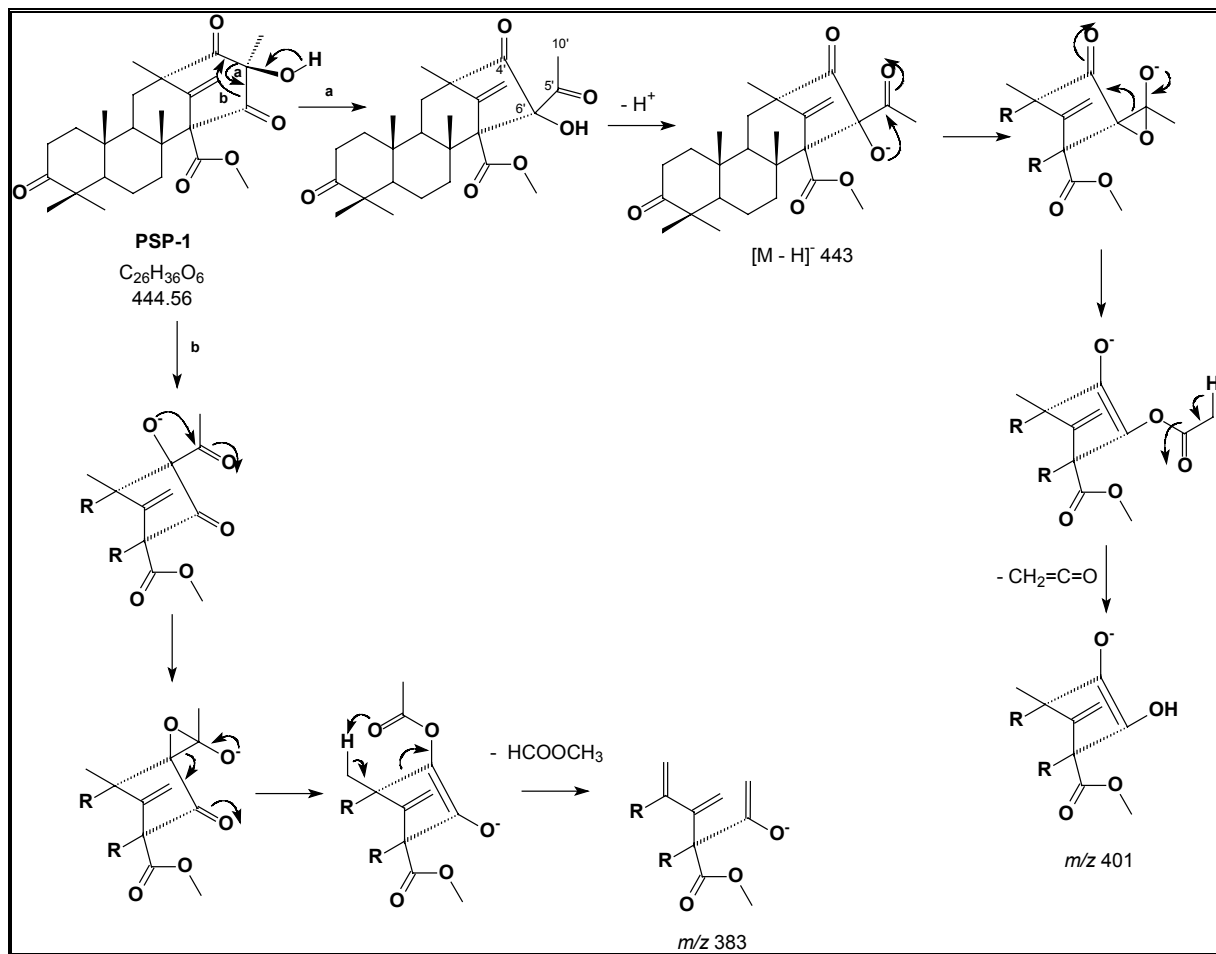


FIGURA 6.20 – Espectro de massas dos meroterpenos **PSP-1**, **PSP-2** e **PSP-11** obtidos por *electrospray* no modo negativo com 25 eV de energia de colisão.



ESQUEMA 6.2 – Proposta de fragmentação para o meroterpeno **PSP-1**.

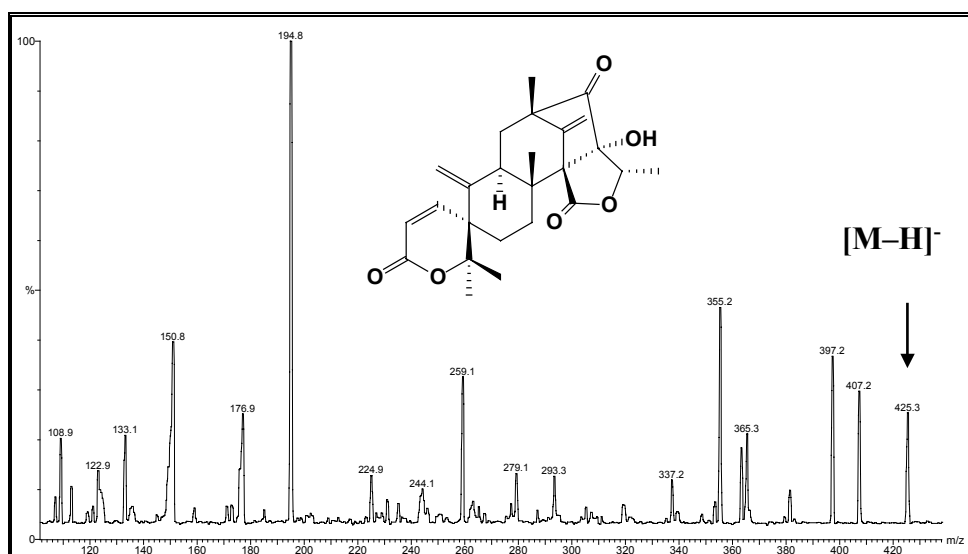


FIGURA 6.21 – Espectro de massas do meroterpeno **PSP-8** obtido por *electrospray* no modo negativo com 25 eV de energia de colisão.

#### 4.2.1.4. Análise das Frações de *Penicillium* sp

Uma vez as condições de LC e MS totalmente otimizadas, as identificações dos meroterpenos e das outras substâncias foram obtidas sobre duas frações produzidas pelo fungo *Penicillium* sp (**PR-3-6** e **PM-2-5**). As outras frações foram submetidas às análises por HPLC e, em quase todas, os picos referentes aos meroterpenos puderam ser detectados. As Figuras 6.22 e 6.23 apresentam os cromatogramas obtidos para as frações obtidas a partir do cultivo de *Penicillium* sp em arroz e milho, respectivamente. Adicionalmente, esses cromatogramas indicam que outros metabólitos mais polares estão presentes nestas frações.

O cromatograma obtido por *full-scan* (Figura 6.24) e o espectro de massas (ESI/MS-MS) da fração **PR-3-6** mostrou picos correspondentes aos meroterpenos padrões (**PSP-1, PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9** e **PSP-13**), bem como outros sugestivos de meroterpenos não utilizados neste ensaio e que posteriormente poderão ser sugeridos com base nos padrões de fragmentação para os meroterpenos. O cromatograma de **PM-2-5** também detectou a presença de meroterpenos (**PSP-1, PSP-3, PSP-4, PSP-6** e **PSP-8**), conforme apresentado na Figura 6.25.

**Capítulo 6: Análise de Substâncias Detectadas em *Melia azedarach* e *Penicillium* sp através da Espectrometria de Massas**

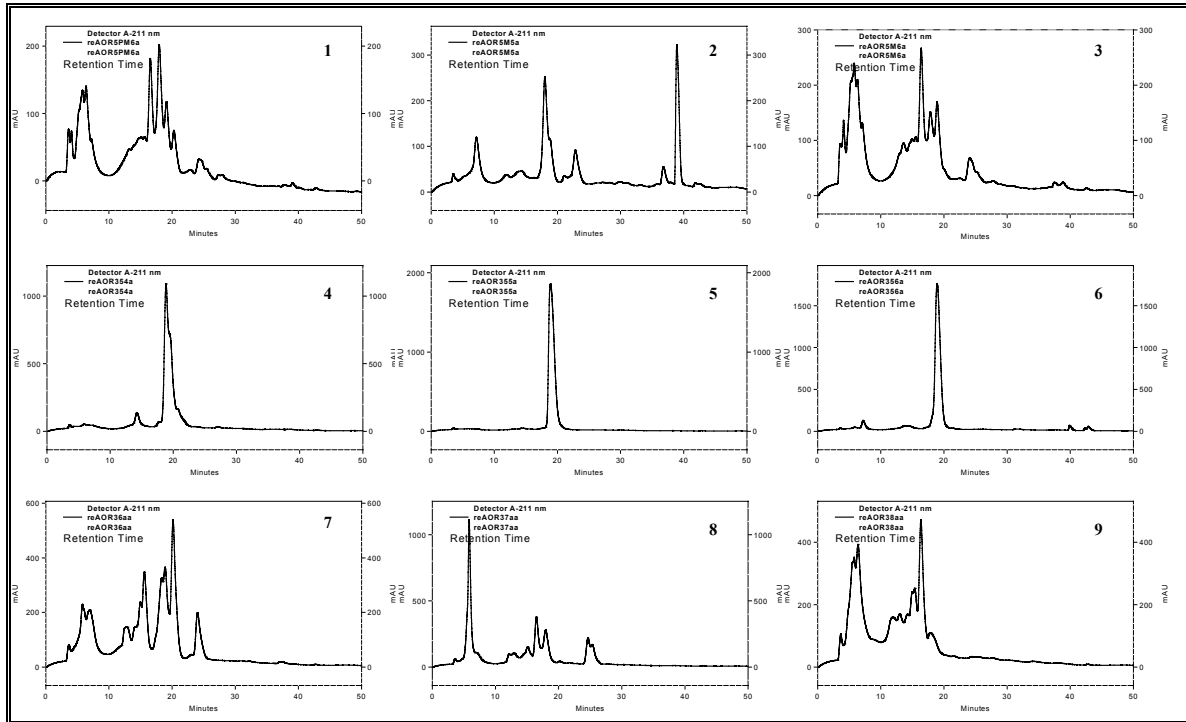


FIGURA 6.22 – Cromatograma (HPLC) das frações obtidas do cultivo de *Penicillium* sp em arroz. (1): PR-5PM-6, (2): PR-5M-5, (3): PR-5M-6, (4): PR-3-5-4, (5): PR-3-5-5, (6): PR-3-5-6, (7): PR-3-6, (8): PR-3-7 e (9): PR-3-8.

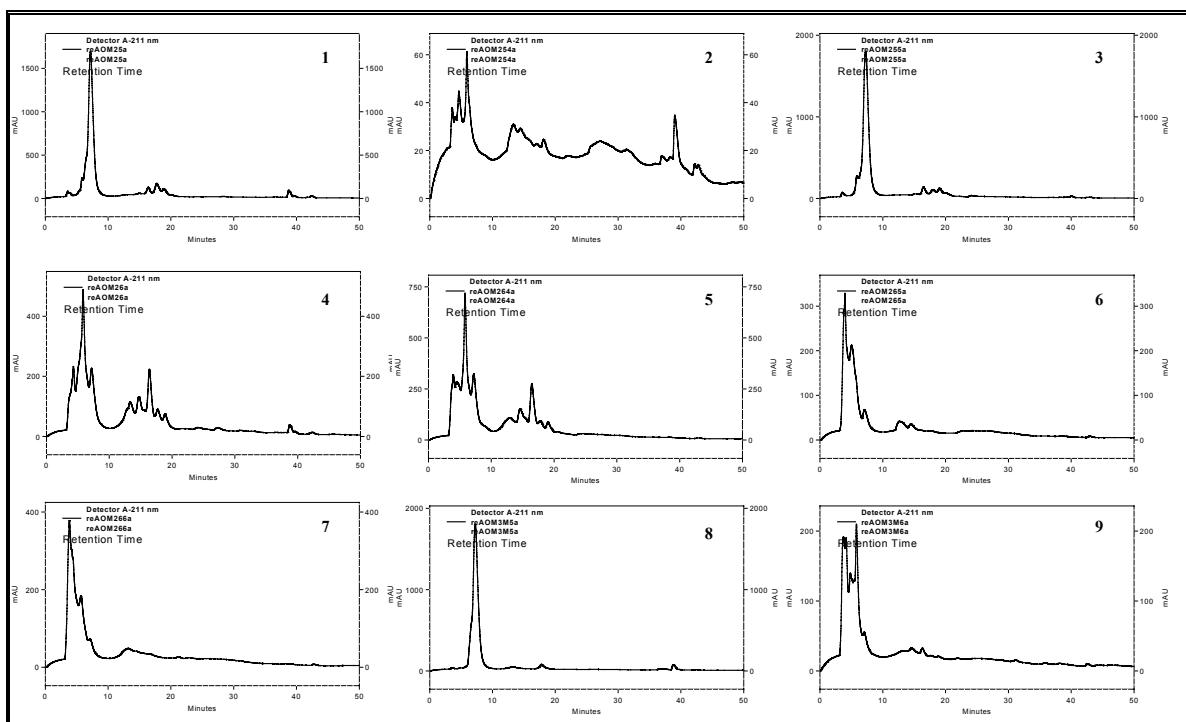


FIGURA 6.23 – Cromatograma (HPLC) das frações obtidas do cultivo de *Penicillium* sp em milho. (1): PM-2-5, (2): PM-2-5-4, (3): PM-2-5-5, (4): PM-2-6, (5): PM-2-6-4, (6): PM-2-6-5, (7): PM-2-6-6, (8): PM-3M-5 e (9): PM-3M-6.

**Capítulo 6: Análise de Substâncias Detectadas em *Melia azedarach* e *Penicillium* sp através da Espectrometria de Massas**

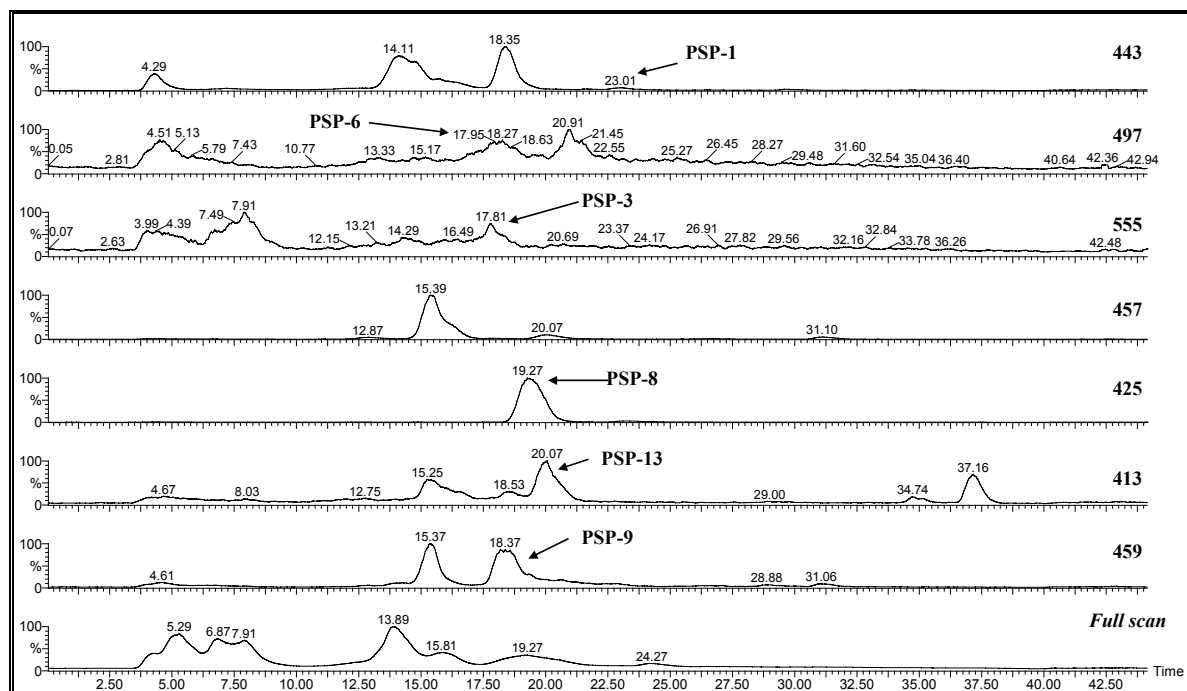


FIGURA 6.24 – Cromatogramas dos meroterpenos obtidos por LC-ESI-MS-MS na fração PR-3-6 de *Penicillium* sp.

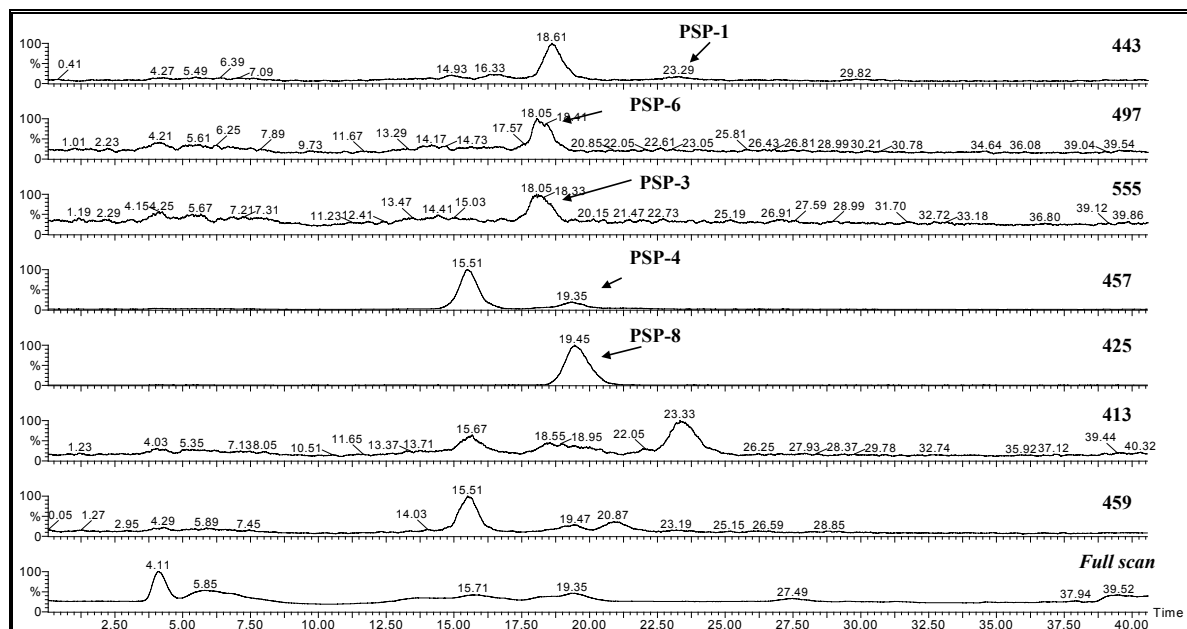


FIGURA 6.25 – Cromatograma dos meroterpenos obtidos por LC-ESI-MS-MS na fração PM-2-5 de *Penicillium* sp.

#### 4.2.2. Estudo dos Limonóides nos Extratos de *Melia azedarach*

Com o desenvolvimento das técnicas de análise, somado ao conhecimento estrutural e taxonômico acumulado em várias décadas de estudos dos constituintes das plantas da família Meliaceae, é possível a identificação de vários limonóides e outros constituintes destas plantas sem a necessidade do trabalho de isolamento, que muitas vezes é bastante complexo e leva a identificação de compostos já conhecidos. Conseqüentemente, na presença de padrões, estudamos a obtenção de uma metodologia que nos fosse útil para detectar os limonóides nos vários extratos de *Melia azedarach* e para comparar com os extratos fúngicos.

O uso de colunas de fase reversa (ODS) na extração em fase sólida (SPE), permitiu uma pré-purificação dos extratos, retendo as substâncias de interesse, as quais foram eluídas posteriormente com metanol. A análise de padrões serviu para a otimização das condições cromatográficas que permitissem a separação dos mesmos, para posterior utilização nas análises dos extratos. Os padrões de limonóides (Figura 6.26) foram analisados individualmente por HPLC com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. O cromatograma típico obtido por HPLC da mistura desses padrões é mostrado na Figura 6.27 e os seus respectivos tempos de retenção são listados na Tabela 6.9. Os valores de tempos de retenção foram utilizados como indicadores para a identificação de cada limonóide em mistura.



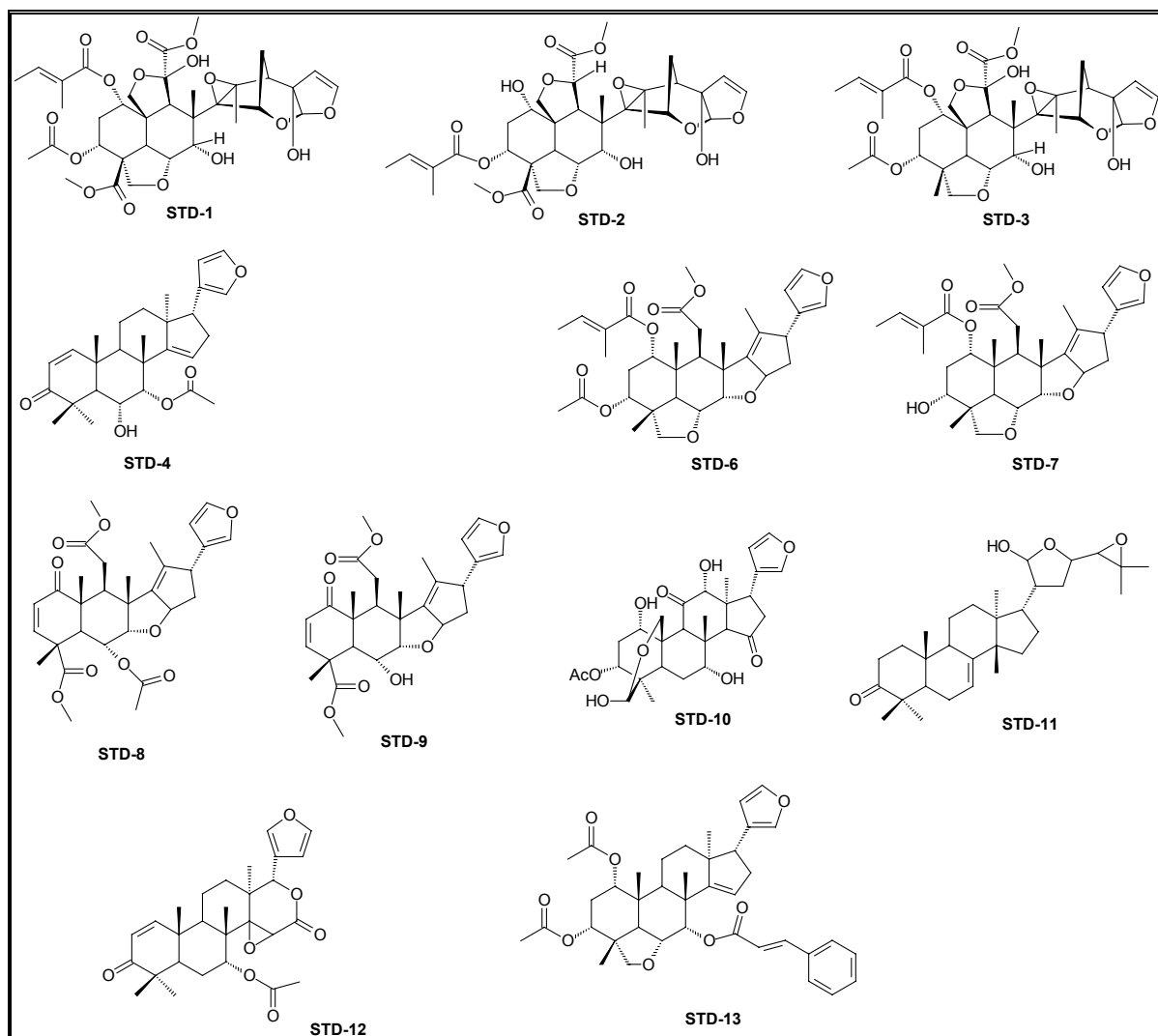


FIGURA 6.26 –Estruturas dos padrões de limonóides **STD-1-13**.

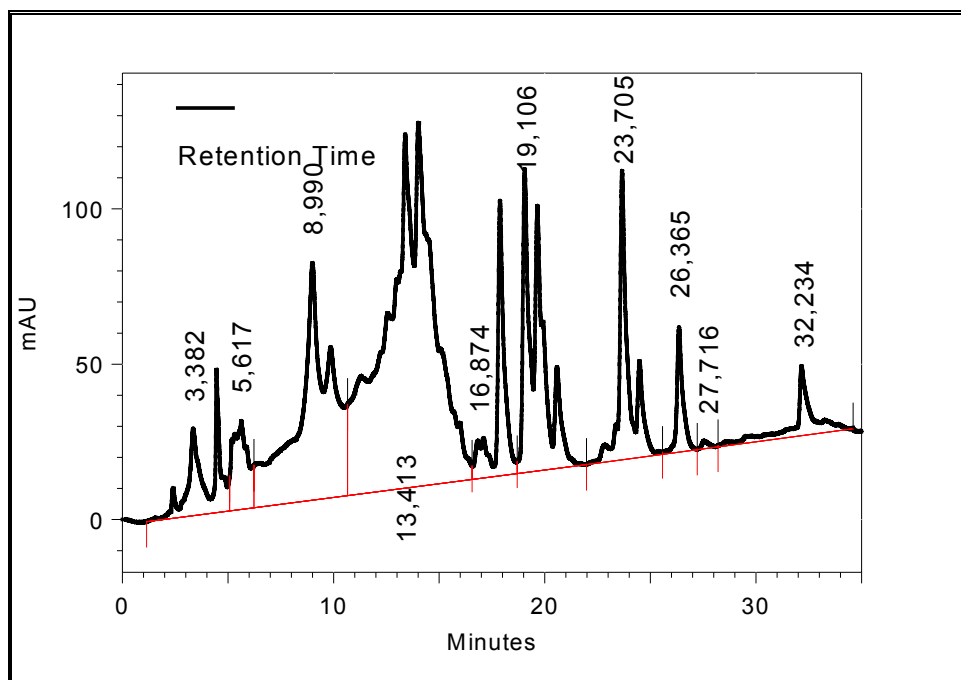


FIGURA 6.27 - Cromatograma obtido por HPLC de padrões de limonóides em mistura a  $\lambda$  219nm, com detecção por *diode-array*.

TABELA 6.9 – Valores de tempos de retenção dos limonóides analisados por HPLC.

| Limonóides | $T_R$ (minutos) |         |
|------------|-----------------|---------|
|            | Individual      | Mistura |
| STD-1      | 13,42           | 13,40   |
| STD-2      | 13,99           | 14,03   |
| STD-3      | 14,32           | 14,4    |
| STD-4      | 23,05           | 23,6    |
| STD-5      | 23,89           | 24,3    |
| STD-6      | 20,13           | 20,1    |
| STD-7      | 19,28           | 19,76   |
| STD-8      | 18,59           | 19,07   |
| STD-9      | 17,46           | 17,89   |
| STD-10     | 9,76            | 9,93    |
| STD-11     | nd <sup>1</sup> | nd      |
| STD-12     | 19,27           | 20,5    |
| STD-13     | 25,61           | 26,38   |

<sup>1</sup>nd = não detectado

Os cromatogramas obtidos através de LC/MS foram comparados e combinados. A Figura 6.28 descreve o cromatograma da mistura dos padrões em *full-scan* e análise de íons selecionados referente a cada limonóide. Os espectros de massas de cada um dos padrões foram comparados quando os mesmos foram injetados via inserção direta e via HPLC, como forma de caracterização desses limonóides. Os principais fragmentos que caracterizam essas substâncias são descritos na Tabela 6.10 e os seus respectivos espectros encontram-se na Figura 6.29.

TABELA 6.10 – Dados obtidos para os limonóides STD-1-13.

| Limonóide | PM  | [M – H] <sup>-</sup> | Principais fragmentos (m/z)                 |
|-----------|-----|----------------------|---|
| STD-1     | 720 | 719                  | 689, 675, 662, 657, 426, 395, 384, 196, 195 |
| STD-2     | 662 | 661                  | 561, 385, 195                               |
| STD-3     | 676 | 675                  | 657, 617, 384                               |
| STD-4     | 452 | 451                  | 409, 392, 384                               |
| STD-5     |     |                      | 613, 513, 485,                              |
| STD-6     | 596 | 595                  | 530, 498, 362                               |
| STD-7     | 554 | 553                  | 471, 385                                    |
| STD-8     | 540 | 540                  | 466, 439, 385                               |
| STD-9     | 498 | 497                  | 466, 407                                    |
| STD-10    | 532 | 531                  | 514, 485, 425, 369, 327                     |
| STD-11    | 470 | 470                  | 449, 424, 385                               |
| STD-12    | 482 | 481                  | 439   |
| STD-13    | 642 | 641                  | 632, 599, 367                               |

A forma de ionização por APCI no modo negativo, por se mostrar mais sensível e eficiente que a análise de íons positivos, os quais não forneceram resultados satisfatórios foi utilizada neste estudo. Esse modo de ionização foi aplicado para os padrões inseridos diretamente no aparelho obtendo um cromatograma *full-scan* e, a partir dos seus respectivos espectros de massas foi possível, propormos com total segurança e confiabilidade os caminhos de fragmentações desse limonóides.

Capítulo 6: Análise de Substâncias Detectadas em *Melia azedarach* e *Penicillium* sp através da Espectrometria de Massas

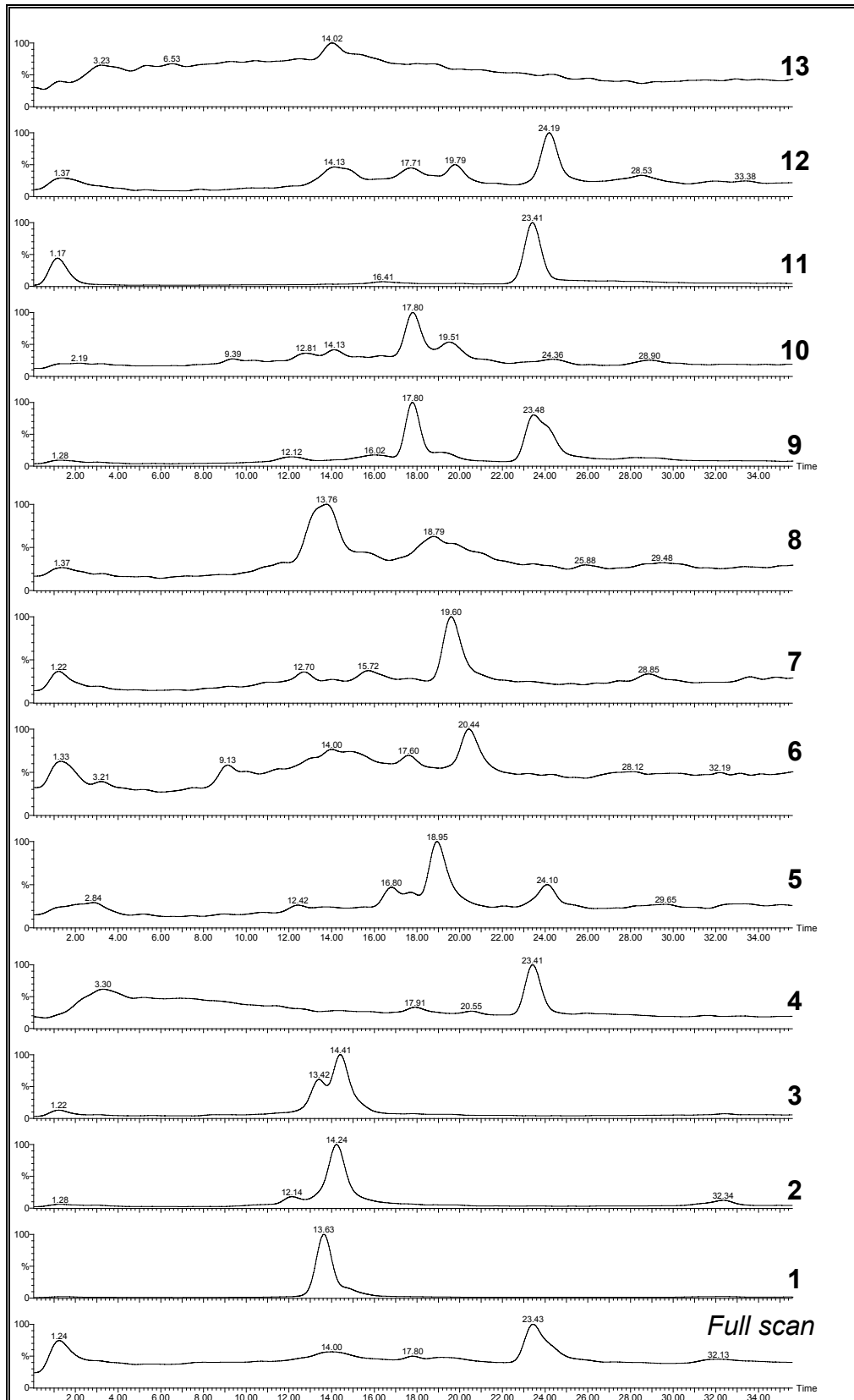


FIGURA 6.28 – Cromatogramas obtidos por HPLC/MS da mistura de padrões dos limonóides STD-1-13.

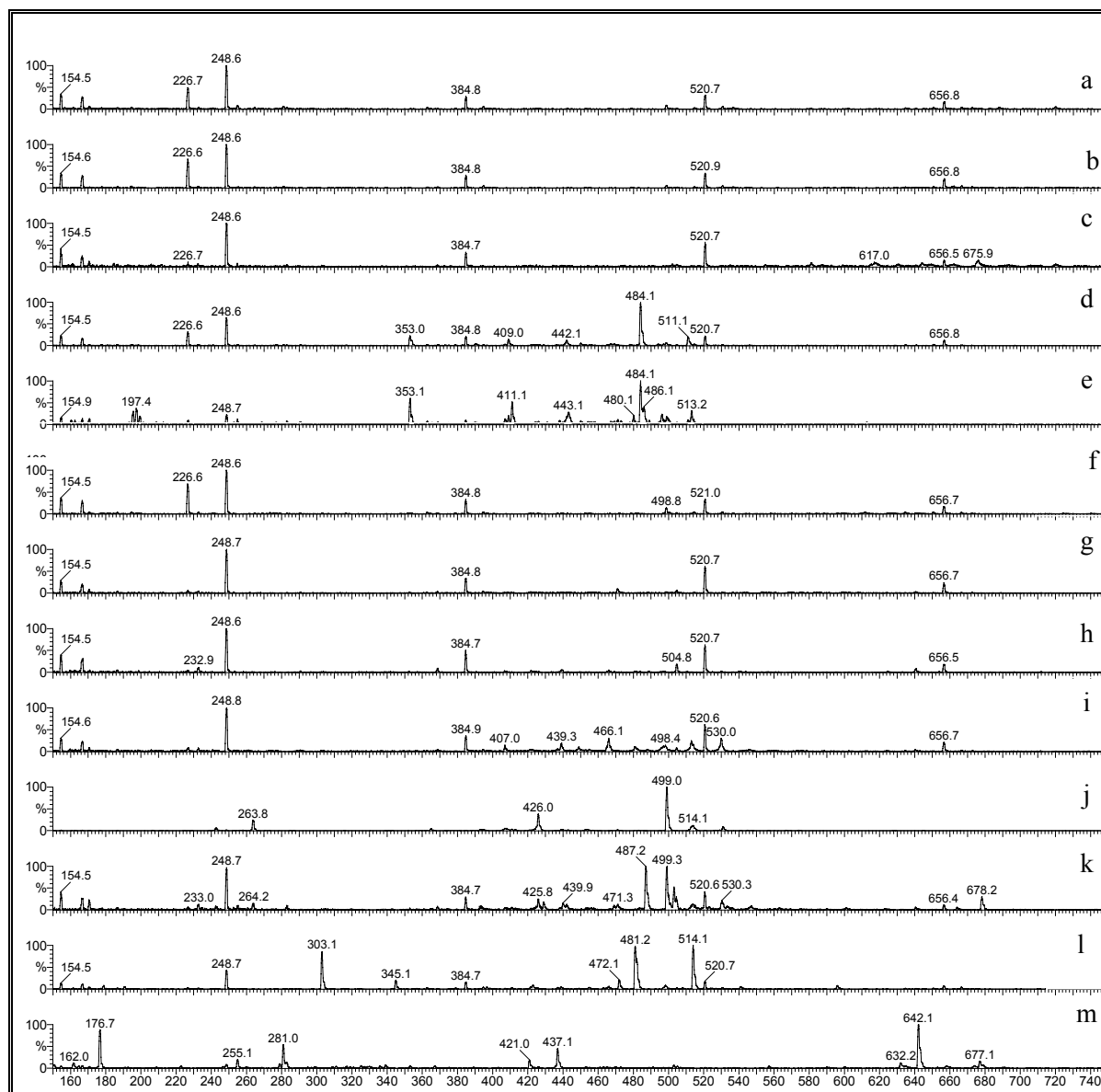


FIGURA 6.29 - Espectros de massas dos limonóides padrões **STD1-13**, obtido via inserção direta (APCI). a) Azadiractina; b) Azadiractina B; c) Azadiractina D; d) Nimonol; e) Isomeldinina; f) Salanina; g) 3-Desacetilsalanina; h) Nimbina; i) 6-Desacetilnimbina; j) 12-Hidroxiroomorastatona; k) Melianona; l) Gedunina; m) Nimbolina A.

Os estudos de LC/MS-MS dos padrões de limonóides tornaram-se viáveis para a confirmação de estruturas idênticas a esses padrões presentes nos extratos, bem como diferenciar substâncias que apresentem tempos de retenção muito próximos, mas diferentes massas molares e/ou caminhos de fragmentação. A alta sensibilidade da espectrometria de massas permite a obtenção de espectros a partir de

frações coletadas de uma análise por HPLC analítica, partindo-se de uma quantidade pequena de extrato. Isto torna a análise mais confiável, já que o espectro fornecerá uma identificação dos constituintes mais segura que apenas pelo tempo de retenção, que também foi verificado com a injeção de uma mistura de padrões.

Uma boa separação dos limonóides presentes nos extratos de *M.azedarach* foi obtida usando o sistema de gradiente de solvente. A Figura 6.30 apresenta os cromatogramas adquiridos através da análise com HPLC-DAD. O espectro UV-Vis de cada pico foi adquirido, mostrando uma absorbância típica descrita para a maioria dos limonóides.

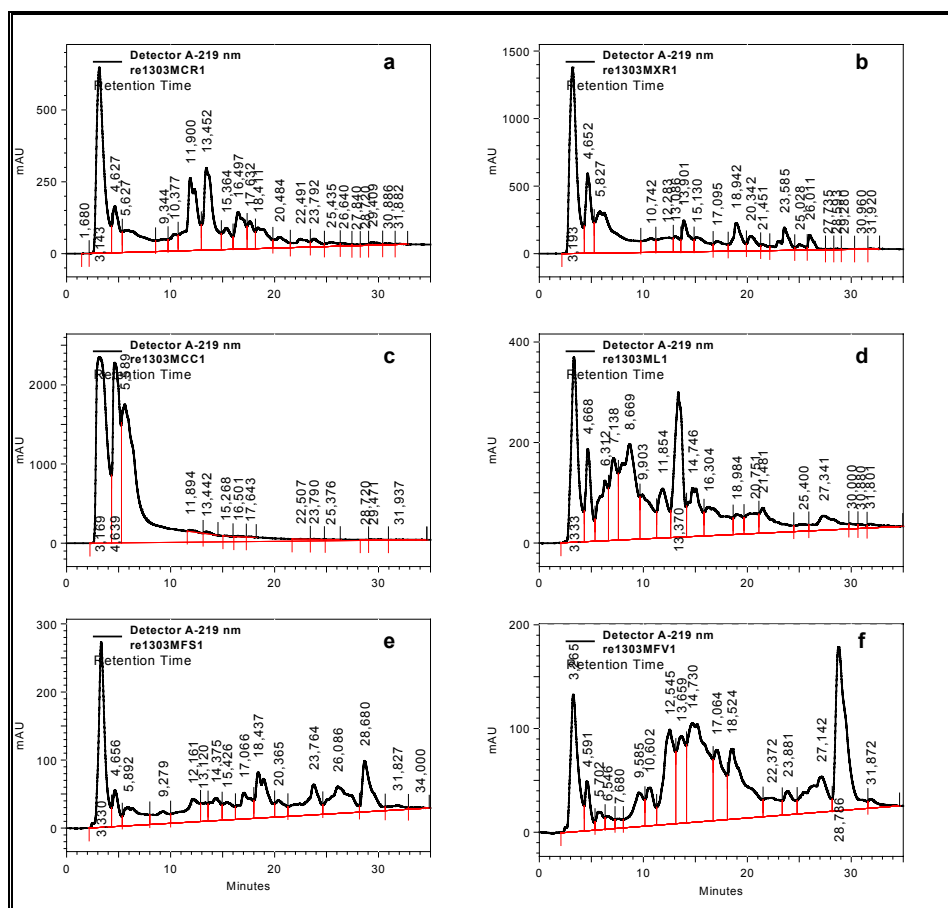


FIGURA 6.30 – Separação analítica por HPLC dos extratos metanólicos de *Melia azedarach*. a) córtex das raízes; b) xilema das raízes; c) córtex do caule; d) folhas; e) frutos secos; f) frutos verdes.

Ambos espectros *diode-array* (DAD) e massas (MS) foram obtidos para cada substância. Desse modo os dados obtidos nos diferentes sistemas analíticos foram comparados e combinados. Os limonóides foram identificados através dos seus respectivos tempos de retenção. As análises dos extratos via HPLC/MS foram realizadas em *full scan* obtendo os íons selecionados. A Figura 6.31 apresenta o cromatograma obtido para o extrato do córtex das raízes de *M. azedarach*. Os modos de fragmentação dos íons selecionados ( $[M - H]^-$ ) que representam cada limonóide foram comparados com os modelos de fragmentação desses íons nos extratos, permitindo a identificação de alguns dos limonóides analisados, como mostra a Tabela 6.11.

TABELA 6.11 – Dados de MS obtidos através do cromatograma dos extratos de *M. azedarach*.

| [M-H] | Tr<br>(min.) | Limonóide             | Localização <sup>a</sup> | Principais fragmentos<br>(m/z) |
|-------|--------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 719   | 13,5         | <b>1</b>              | XR, CC, FV               | 689, 675, 661, 426             |
| 661   | 13,2         | <b>2</b>              | CR, XR, CC, FV           | 662, 467                       |
| 675   | 16,2         | <b>3</b>              | CR, XR, FV, FS           | 657, 617                       |
| 451   | 23,6         | <b>4</b>              | FV, FS                   | 409                            |
| 525   | 16,1         | <b>NI<sup>b</sup></b> | CR, XR, CC               | 496, 451, 436, 324             |
| 595   | 19,5         | <b>6</b>              | XR, CC                   | 595, 530, 498, 362             |
| 553   | -            | <b>7</b>              | ND <sup>c</sup>          | -                              |
| 539   | -            | <b>8</b>              | ND                       | -                              |
| 497   | 23,1         | <b>9</b>              | CC, FS                   | 466                            |
| 531   | 11,6         | <b>10</b>             | CR, XR, CC, FS           | 514, 485, 425                  |
| 469   | 23,4         | <b>11</b>             | CR                       | 469                            |
| 481   | -            | <b>12</b>             | ND                       | -                              |
| 641   | 26,1         | <b>13</b>             | XR                       | 583, 435, 429, 215             |

<sup>a</sup> CR: córtex das raízes; XR: xilema das raízes; CC: córtex do caule; L: folhas; FV: frutos verdes; FS: frutos secos;

<sup>b</sup> NI: não identificado;

<sup>c</sup> ND: não detectado nos extratos

Capítulo 6: Análise de Substâncias Detectadas em *Melia azedarach* e *Penicillium* sp através da Espectrometria de Massas

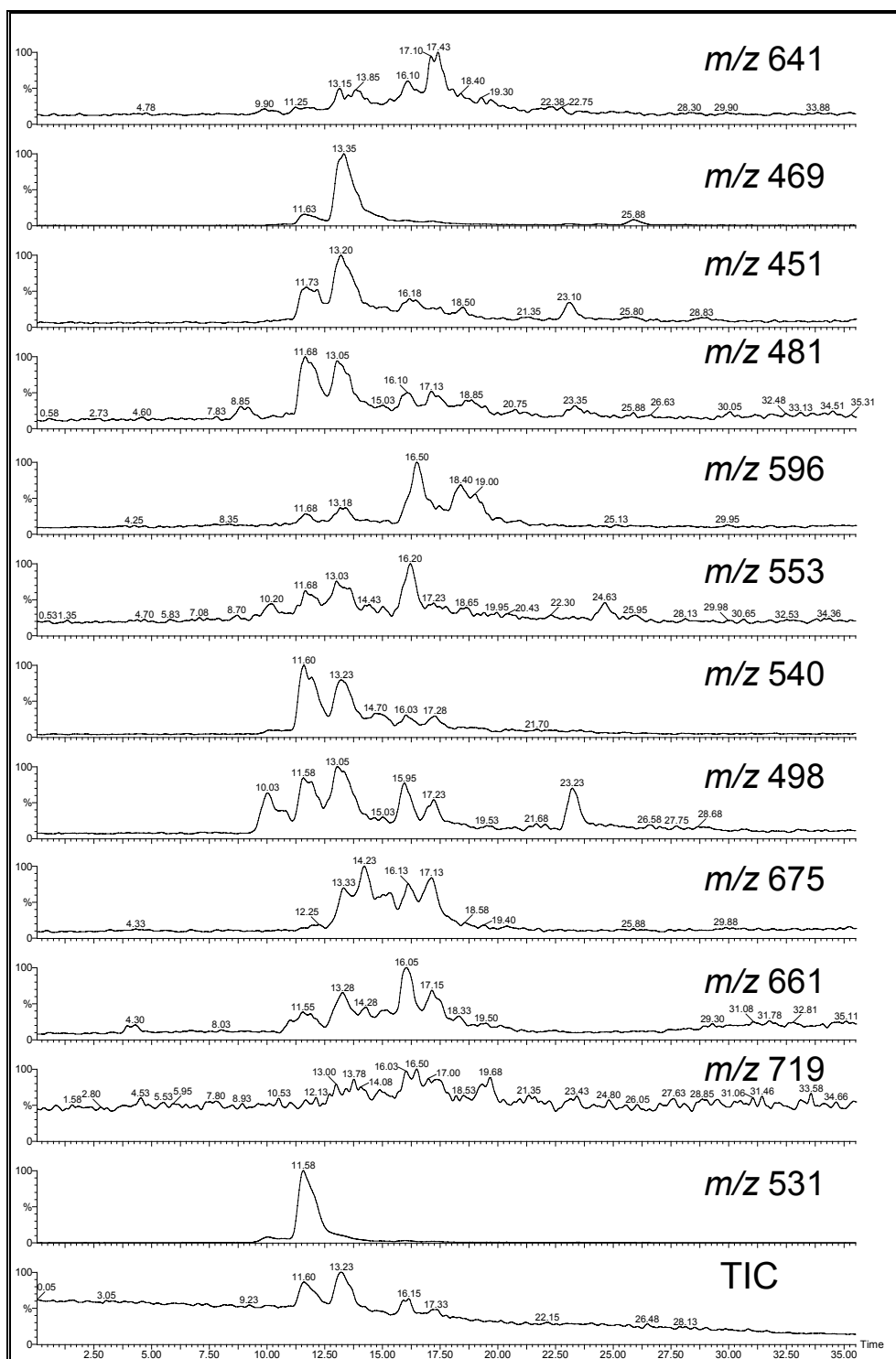


FIGURA 6.31 – Separação analítica por HPLC/MS do extrato do córtex das raízes de *Melia azedarach* (APCI, -). TIC e valores de m/z.



## 5. CONCLUSÕES

Um estudo dos extratos apolares do fungo *Penicillium* sp cultivado em arroz e milho foi realizado por GC/MS para a determinação dos componentes apolares presentes nos extratos oriundos deste meio de cultivo. A interpretação dos cromatogramas e espectros permitiu a identificação de ácidos graxos, hidrocarbonetos, esteróides e dois derivados do ácido 3,5-dimetil-orselínico. A detecção desses dois últimos compostos é extremamente relevante para os estudos biogenéticos dos meroterpenos uma vez que esse ácido é o precursor biossintético da parte policetílica desses metabólitos.

Com o objetivo de investigar a produção de metabólitos secundários por esse microrganismo variando a fonte de carbono seis meios de cultivo foram selecionados e o meio contendo mandioca como substrato mostrou um número maior de picos nos cromatogramas. Alguns deles foram comparados com os espectros da biblioteca do espectrômetro e foram identificados. A análise comparativa dos espectros provenientes dos meios contendo batata e mandioca sugeriu uma boa similaridade entre os cromatogramas. O próximo passo seria a análise da parte polar desses extratos para finalmente traçar o perfil metabólico deste fungo.

O trabalho com LC-ESI-MS-MS mostrou-se como uma técnica rápida, sensível e seletiva para a identificação dos meroterpenos, bem como as outras substâncias analisadas e dos limonóides. A metodologia analítica desenvolvida permitiu a determinação destes compostos em alguns extratos e frações obtidas de *Penicillium* sp e *Melia azedarach* e posteriormente poderá ser aplicada para investigar a produção de meroterpenos e substâncias correlatas nos extratos de outras espécies do gênero *Penicillium* e futuramente nos extratos da planta hospedeira.

A análise dos limonóides por LC/MS apresentou-se como um método conveniente e pode ser estendido para análises quimiotaxonômicas das famílias Rutaceae e Meliaceae.

# **CAPÍTULO 7: ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Penicillium* sp E *Fusarium moniliforme***

## **1. INTRODUÇÃO**

As plantas da ordem Rutales são bastante conhecidas por suas propriedades inseticidas (atividade inibidora da alimentação e de regulação do crescimento e desenvolvimento), atribuídas aos limonóides (CHAMPAGNE *et al.*, 1992). A azadiractina, encontrada nas plantas *Azadiracta indica* A. Juss e *Melia azedarach* L. (Meliaceae), é o exemplo mais notável dessa classe de metabólitos. Além disso, várias espécies de Meliaceae são também conhecidas por outras propriedades medicinais tais como a atividade anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiviral, malária, desordens circulatórias conforme levantamento feito por CHAMPAGNE *et al.* (1992), as quais são atribuídas aos limonóides. Isto sugere que a vantagem primária da produção dessas substâncias por estas plantas seja a proteção contra os insetos herbívoros e outros potenciais inimigos (CHAMPAGNE *et al.*, 1992).

De maneira similar as pesquisas para averiguar as atividades biológicas dos metabólitos secundários oriundos de fungos endofíticos têm sido motivadas pelo desejo de encontrar compostos úteis para aplicação na medicina ou na agricultura, uma vez que esses microrganismos conferem certas vantagens à suas plantas hospedeiras com a função de manter a associação mutualista.

## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivos verificar as atividades antibacterianas e inseticidas dos extratos, frações e substâncias isoladas dos fungos endofíticos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* associados a *M. azedarach*.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais e Reagentes

##### a) Material utilizado nos ensaios antimicrobianos:

Os materiais utilizados neste experimento estão relacionados abaixo:

- Caldo Mueller Hinton - Difco
- Ágar Mueller Hinton - Acumedia
- Caldo Sabouraud - Oxoid
- Ágar Bacteriológico - Acumedia
- Cloreto de sódio - Sigma
- Solução Reveladora TTC (sal de 2,3,5-trimetil-tetrazólio) - Mallinckrodt
- Dimetilsulfóxido - Sigma
- Penicilina – Bristol-Meyers Squib
- Nistatina
- Placas 96 Well (placas ELISA)
- Tubo padrão de sulfato de bário (0.5 da escala de McFarland:  $10^8$  UFC/mL)
- Vidrarias e materiais de laboratório em geral
  
- Cepas de bacterias (cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá – UEM):
  - *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) 25923
  - *Escherichia coli* ATCC 25922
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
  - *Bacillus* sp
- Antibióticos padrões: Padrões secundários:
  - Penicilina G procaína (Wycillin<sup>®</sup>)
  - Cloridrato de tetraciclina (FURP)
  - Cloridrato de vancomicina (Lilly<sup>®</sup>)

**b) Material utilizado nos ensaios larvicidas contra *Aedes aegypti*:**

Todos os materiais e equipamentos necessários para os ensaios com as larvas de *Aedes aegyptii* foram utilizados.

As larvas de terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* [mantidas no Laboratório de Biologia, Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG)] foram utilizadas por serem mais tolerantes.

**c) Material utilizado nos ensaios inseticidas contra *Atta sexdens rubropilosa*:**

Todos os materiais e equipamentos necessários para os ensaios com as formigas foram utilizados.

As operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram isoladas do formigueiro, permanecendo na ausência do fungo simbionte e de folhas considerados como alimentos e mantidas com uma dieta sólida.

### **3.2. Teste Antibacteriano**

Os ensaios antibacterianos foram realizados aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória, segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 1997.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços (ELISA), onde diluições seriadas em duplicata das amostras e antibióticos de referência foram preparadas usando caldo de Mueller-Hinton (CMH) para o crescimento das bactérias. As amostras foram transferidas para as placas de microdiluição depois de dissolvidas em DMSO e caldo seletivo de crescimento bacteriano numa concentração inicial de 1000 µg/mL para os extratos e frações e 500 µg/mL para as substâncias puras. Os inóculos bacterianos foram preparados nestes meios e a concentração ajustada frente ao tubo 0.5 McFarland de turbidez padrão ( $10^8$  unidades formadoras de colônia –

UFC/mL) e respectivamente diluídos nas razões de 1:10 e 1:100 no caldo, para os procedimentos de microdiluição.

Porções de 5 µL de cada suspensão bacteriana foram transferidas para todos os poços da placa de microdiluição contendo 100 µL da amostra a ser testada ou do antibiótico de referência (controle). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas. Após o crescimento e leitura dos resultados em cada poço da placa foram adicionados 10 µL de um revelador de crescimento bacteriano – o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Esta substância muda de coloração (incolor para vermelho) quando há crescimento bacteriano, tornando as culturas de bactérias avermelhadas.

A concentração mínima inibitória (CMI) nestes ensaios foi considerada a menor concentração da amostra que impede visivelmente o crescimento microbiano. A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada pela subcultura de 10 µL de cada poço negativo (ausência de crescimento bacteriano) e do controle de crescimento positivo. A CMB foi definida como a menor concentração que forneceu uma subcultura negativa ou apresentou somente uma colônia de crescimento. A Tabela 7.1 relaciona as bactérias utilizadas neste ensaio, os antibióticos controle e suas respectivas concentrações mínimas inibitórias.

TABELA 7.1 – Relação das bactérias utilizadas nos ensaios antibacterianos, os respectivos antibióticos de referência, as concentrações iniciais utilizadas nas placas de microdiluição e as concentrações mínimas inibitórias (CMI).

| Bactérias                                | Antibióticos referência | Concentrações iniciais (µg/mL) | CMI (µg/mL) |
|--|-------------------------|--------------------------------|-------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923   | Penicilina              | 2.50                           | 0.04        |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | Tetraciclina            | 25.0                           | 0.40        |
| <i>Bacillus</i> sp                       | Vancomicina             | 25.0                           | 0.10        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 | Tetraciclina            | 25.0                           | 8.00        |

As amostras ensaiadas estão relacionadas na Tabela 7.2 e correspondem aos extratos, frações e substâncias puras obtidas de *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* (seção experimental do capítulo 3).

TABELA 7.2 – Extratos, frações e substâncias puras submetidas ao ensaio antibacteriano.

| Código          | Substância  | Concentração (µg/mL) |
|-----------------|---|----------------------|
| <b>EXTRATOS</b> |   |                      |
| PR-1            | Extrato aquoso de <i>Penicillium</i> sp em arroz  | 1000                 |
| PR-3            | Extrato acetoacético de <i>Penicillium</i> sp em arroz  | 1000                 |
| PR-4            | Extrato aquoso de <i>Penicillium</i> sp em arroz  | 1000                 |
| PR-5            | Extrato bruto de <i>Penicillium</i> sp em arroz   | 1000                 |
| PM-1            | Extrato aquoso de <i>Penicillium</i> sp em milho  | 1000                 |
| PM-2            | Extrato metanólico de <i>Penicillium</i> sp em milho  | 1000                 |
| PLM             | Extrato bruto do micélio de <i>Penicillium</i> sp em meio líquido   | 1000                 |
| PLF-1           | Extrato acetoacético do filtrado de <i>Penicillium</i> sp em meio líquido com pH ácido                                  | 1000                 |
| PLF-2           | Extrato acetoacético do filtrado de <i>Penicillium</i> sp em meio líquido com pH básico                                 | 1000                 |
| FMR-2           | Extrato metanólico de <i>F. moniliforme</i> em arroz  | 1000                 |
| FMM-2           | Extrato metanólico de <i>F. moniliforme</i> em milho  | 1000                 |
| FMLF-1          | Extrato acetoacético do filtrado de <i>F. moniliforme</i> em meio líquido com pH ácido                                  | 1000                 |
| FMLF-2          | Extrato acetoacético do filtrado de <i>F. moniliforme</i> em meio líquido com pH básico                                 | 1000                 |
| <b>FRAÇÕES</b>  |   |                      |
| PR-3-1 - 12     | Frações resultantes da cromatografia sob alto vácuo do extrato acetoacético de <i>Penicillium</i> sp cultivado em arroz | 1000                 |
| PM3H-1          | Fração hexânica do extrato acetoacético de <i>Penicillium</i> sp cultivado em arroz                                     | 1000                 |
| PM3M-5          | Fração diclorometânica do extrato acetoacético de <i>Penicillium</i> sp cultivado em arroz                              | 1000                 |
| PM3M-8          | Fração metanólica do extrato acetoacético de <i>Penicillium</i> sp cultivado em arroz                                   | 1000                 |
| FMR3-1          | Fração hexânica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em arroz  | 1000                 |
| FMR3-2          | Fração metanólica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em arroz  | 1000                 |
| FMM3-1          | Fração hexânica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em milho  | 1000                 |

| Código             | Substância   | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--------------------|--|--------------------------------------|
| FMM3-2             | Fração metanólica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em milho | 1000                                 |
| FMLM2-3-4          | Fração obtida do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i>                     | 1000                                 |
| FMLM2-4            | Fração obtida do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i>                     | 1000                                 |
| FMLM2-5            | Fração obtida do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i>                     | 1000                                 |
| FMLM2-6            | Fração obtida do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i>                     | 1000                                 |
| <b>SUBSTÂNCIAS</b> |  |                                      |
| PSP-1              | Preaustinóide A  | 500                                  |
| PSP-2              | Preaustinóide B  | 500                                  |
| PSP-3              | Acetoxidehidroaustina  | 500                                  |
| PSP-5              | Verruculogenina  | 500                                  |
| PSP-6              | Dehidroaustina   | 500                                  |
| PSP-8              | Neoaustina   | 500                                  |

### 3.3. Teste larvicida contra *Aedes aegyptii*

Os ensaios larvicidas foram realizados no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pelos professores Ionizeti Silva e Heloísa Silva.

Os bioensaios foram realizados em câmara biológica climatizada similarmente à de criação (GUIMARÃES, 2000). Para cada amostra analisada (Tabela 7.3) foi preparada uma solução-mãe, dissolvendo-as em DMSO (cerca de 0.2 mL) e acrescentando-se água até a concentração final de 500 ppm. A partir desta solução as concentrações desejadas foram obtidas por diluições seriadas. Para cada bioensaio foram utilizados 15 mL de cada solução-teste e 20 larvas de 3º estágio de *A. aegyptii*, para determinação das concentrações letais. Foi realizado um controle colocando a mesma quantidade de larvas em copinhos contendo somente água destilada e DMSO. As leituras foram feitas após 24 e 48 horas do início dos testes. As larvas foram consideradas mortas quando havia ausência total de movimentos, com escurecimento do corpo e cápsula cefálica (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

TABELA 7.3 – Frações e substâncias puras submetidas ao ensaio larvicida.

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| Frações Testadas  | FMLM-2-3: Fração derivada do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i><br>FMDLM-2-4: Fração derivada do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i><br>FMLM-2-5: Fração derivada do extrato micelial de <i>F. moniliforme</i>                           |
| Substâncias Puras | <b>PSP-1:</b> Preaustinóide A<br><b>PSP-2:</b> Preaustinóide B<br><b>PSP-3:</b> Acetoxidehidroaustina<br><b>PSP-4:</b> Preaustinóide A2<br><b>PSP-5:</b> Verruculogenina<br><b>PSP-6:</b> Dehidroaustina<br><b>PSP-7:</b><br><b>PSP-8:</b> Neoaustina |

---

### 3.4. Teste inseticida contra *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios inseticidas contra as formigas cortadeiras foram realizados no Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) – Rio Claro liderado pelo grupo do Professor Doutor Odair Bueno.

As formigas isoladas do formigueiro foram mantidas com uma dieta sólida [5% de glicose, 1% de peptona bacteriológica, 0.1% de extrato de levedura e 1.5% de ágar bacteriológico, dissolvidos em água destilada, e preparada em forno de microondas por aproximadamente 4 minutos e autoclavada a 120°C e 1 atm por 15 minutos, conforme metodologia descrita por BUENO *et al.* (1997)] em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. A dieta contendo os extratos ou substâncias a serem avaliados (Tabela 7.4) foi preparada pelo método “dry mix”, que consistiu em misturá-los aos ingredientes sólidos da dieta, com adição subsequente de água. O controle consistiu apenas da dieta pura.

Lotes de 50 operárias foram distribuídas em grupos de dez mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Essas placas foram colocadas em estufa para B.O.D com temperatura de 25 ± 1°C e umidade relativa acima de 70% e examinadas, diariamente, para retirada e anotação do número de formigas mortas. Os dados foram



analisados graficamente através da curva de sobrevivência para cada agrupamento e comparados através do teste “log-rank”, utilizando o programa Prisma 3.

TABELA 7.4 – Extratos, frações e substâncias puras submetidas ao ensaio inseticida.

| <b>Código</b>      | <b>Substância</b>   | <b>Concentração (mg/mL)</b> |
|--------------------|---|-----------------------------|
| <b>EXTRATOS</b>    |   |                             |
| FMR-2              | Extrato metanólico de <i>F. moniliforme</i> em arroz  | 2.0                         |
| FMM-2              | Extrato metanólico de <i>F. moniliforme</i> em milho  | 2.0                         |
| <b>FRAÇÕES</b>     |   |                             |
| PM-2-5             | Fração diclorometânica do extrato metanólico de <i>Penicillium</i> sp cultivado em milho                    | 2.0                         |
| PM-2-6             | Fração diclorometânica/metanólica (90:10) do extrato metanólico de <i>Penicillium</i> sp cultivado em milho | 2.0                         |
| FMR3-1             | Fração hexânica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em arroz                                | 2.0                         |
| FMR3-2             | Fração metanólica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em arroz                              | 2.0                         |
| FMM3-1             | Fração hexânica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em milho                                | 2.0                         |
| FMM3-2             | Fração metanólica do extrato bruto de <i>F. moniliforme</i> cultivado em milho                              | 2.0                         |
| <b>SUBSTÂNCIAS</b> |   |                             |
| PSP-1              | Preaustinóide A   | 0.15                        |
| PSP-5              | Verruculogenina   | 0.15                        |
| PSP-8              | Neoaustina  | 0.18                        |
| FM-1               | Depsidipeptídeo   | 0.18                        |

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Atividade Antibacteriana

Os extratos, frações e substâncias puras (Tabela 7.2) obtidos do cultivo dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* foram ensaiados para verificar a atividade antibacteriana frente às bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* sp.

As análises das propriedades antibacterianas dos extratos brutos, frações e substâncias puras foram avaliadas pelo método de microdiluição em placas de cultura 96 poços como teste de suscetibilidade para a obtenção da concentração mínima inibitória (CMI) e eventualmente a concentração mínima bactericida (CMB).

A Tabela 7.5 expressa a dose inibitória mínima (CMI) obtida com os extratos, frações e substâncias puras. Alguns extratos numa concentração de 1000 µg/mL não apresentaram atividade contra as bactérias testadas. As frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato de *Penicillium* (**PR-3**), o qual destacou-se por uma boa atividade antibacteriana, principalmente contra *Staphylococcus aureus*, também foram ensaiadas e apresentaram uma excelente atividade antibacteriana. Já os meroterpenos (**PSP-1**, **PSP-2**, **PSP-3**, **PSP-6** e **PSP-8**) e o alcalóide verruculogenina (**PSP-5**) apresentaram um valor de CMI de 250 µg/mL para as bactérias testadas, mas apenas o meroterpeno **PSP-1** apresentou atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL. Os extratos e frações de *Fusarium moniliforme* não mostraram atividade antibacteriana significativas quando comparado com os extratos e frações de *Penicillium* sp.

As amostras não discriminadas na Tabela 7.5 apresentaram uma baixa atividade ou foram inativas. Todos os resultados descritos acima foram acompanhados de experimentos de controles do solvente, da amostra e dos antibióticos padrões, evitando, portanto, a possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos.

TABELA 7.5 – Resultados do ensaio antibacteriano e os valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) das amostras testadas.

| Amostras               | Atividade Antibacteriana (µg/mL) |     |                |     |                      |     |                    |     |
|------------------------|----------------------------------|-----|----------------|-----|----------------------|-----|--------------------|-----|
|                        | <i>S. aureus</i>                 |     | <i>E. coli</i> |     | <i>P. aeruginosa</i> |     | <i>Bacillus</i> sp |     |
|                        | CMI                              | CMB | CMI            | CMB | CMI                  | CMB | CMI                | CMB |
| <b>Extratos</b>        |                                  |     |                |     |                      |     |                    |     |
| PR-1                   | 500                              | -   | -              | NO  | 500                  | -   | NO                 | -   |
| PR-3                   | 62.5                             | NO  | 250            | NO  | 500                  | NO  | 250                | 500 |
| PR-5                   | 250                              | NO  | NO             | NO  | 500                  | NO  | 500                | 500 |
| PM-1                   | NO                               | -   | NO             | -   | 500                  | -   | NO                 | -   |
| PM-2                   | 250                              | 500 | 250            | NO  | 500                  | 500 | 250                | 500 |
| FMR-2                  | NO                               | -   | 500            | -   | NO                   | -   | 500                | -   |
| FMM-2                  | NO                               | -   | NO             | -   | 500                  | -   | 500                | -   |
| FMLF-1                 | 500                              | -   | NO             | -   | NO                   | -   | 500                | -   |
| FMLF-2                 | 500                              | -   | NO             | -   | NO                   | -   | NO                 | -   |
| <b>Frações</b>         |                                  |     |                |     |                      |     |                    |     |
| PR3-1                  | 62.5                             | NO  | 500            | 500 | 500                  | 500 | 125                | 125 |
| PR3-2                  | 21.25                            | 125 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 125                | 250 |
| PR3-3                  | 62.5                             | 250 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 250                | 250 |
| PR3-4                  | 62.5                             | 250 | 250            | NO  | 500                  | 250 | 500                | 250 |
| PR3-5                  | 250                              | 250 | 250            | NO  | 500                  | NO  | 250                | 250 |
| PR3-6                  | 250                              | 500 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 250                | 500 |
| PR3-7                  | 125                              | 500 | 500            | 500 | 500                  | NO  | 250                | 500 |
| PR3-8                  | 125                              | 500 | 500            | NO  | NO                   | NO  | 62.5               | 500 |
| PR3-9                  | 62.5                             | 500 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 62.5               | 250 |
| PR3-10                 | 62.5                             | 500 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 125                | 250 |
| PR3-11                 | 125                              | 500 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 500                | 500 |
| PR3-12                 | 125                              | 500 | 500            | NO  | 500                  | NO  | 125                | 250 |
| PM3M5                  | 250                              | NO  | 250            | NO  | NO                   | -   | 250                | NO  |
| PM3M8                  | NO                               | -   | 250            | NO  | NO                   | -   | 500                | NO  |
| FMR3-1                 | 500                              | NO  | NO             | -   | NO                   | -   | NO                 | -   |
| FMR3-2                 | 500                              | NO  | NO             | -   | 500                  | NO  | 250                | NO  |
| FMM3-2                 | 500                              | NO  | 500            | NO  | 250                  | NO  | 500                | NO  |
| FMLM2-4                | 500                              | NO  | NO             | -   | NO                   | -   | 500                | NO  |
| <b>Substância pura</b> |                                  |     |                |     |                      |     |                    |     |
| PSP-1                  | 250                              | NO  | 125            | 250 | 250                  | 250 | 250                | 250 |
| PSP-2                  | 250                              | NO  | 250            | NO  | 250                  | NO  | 250                | NO  |
| PSP-3                  | NO                               | -   | 250            | NO  | NO                   | -   | NO                 | -   |
| PSP-5                  | NO                               | -   | 250            | NO  | NO                   | -   | NO                 | -   |
| PSP-8                  | NO                               | -   | 250            | NO  | NO                   | -   | NO                 | -   |

<sup>a</sup>: NO: nenhum efeito observado

## 4.2. Atividade larvicida contra *Aedes aegyptii*

A Tabela 7.6 apresenta as atividades das substâncias testadas observando a porcentagem de mortalidade das larvas de *A. aegyptii* após exposição em diferentes concentrações. As substâncias são pertencentes à classe dos meroterpenóides (**PSP-1**, **PSP-2**, **PSP-3**, **PSP-4**, **PSP-6** e **PSP-8**), e o alcalóide verruculogenina (**PSP-5**).

O meroterpeno **PSP-6** foi o que apresentou maior atividade e portanto foi realizada diluição sucessiva para encontrar o valor da dose que mata 50% das larvas, a  $CL_{50}$ . O valor de  $CL_{50}$  para **PSP-6** encontrado para o 3º estágio de *A. aegyptii*, em laboratório, foi de 5ppm (Tabela 7.7), mostrando-se como uma substância bastante promissora para o controle de *A. aegyptii*.

Para as frações oriundas de *Fusarium moniliforme* (FMLM-2-3, 2-4 e 2-5) não houve alguma que se destacasse tanto, apresentando atividade na concentração de 500 ppm.

A atividade inseticida das substâncias isoladas dos fungos endofíticos associados a *M. azedarach* poderia indicar que estes microrganismos são potencialmente capazes de auxiliar a planta protegendo-as contra insetos, embora seja conhecido que as plantas da família Meliaceae são exímias produtoras de compostos inseticidas, os limonóides (HUANG *et al.*, 1994).

TABELA 7.6 – Mortalidade (%) de larvas de 3º estágio de *Aedes aegyptii*, após 24 e 48 horas de exposição à diferentes concentrações das substâncias analisadas.

| Conc (ppm) | 500 | 500 | 250 | 250 | 100 | 100 | 50  | 50  | 20 | 20  | 10 | 10 | 8   | 8   | 5  | 5  |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|----|
| Mort (h)   | 24  | 48  | 24  | 48  | 24  | 48  | 24  | 48  | 24 | 48  | 24 | 48 | 24  | 48  | 24 | 48 |
| PSP1       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP1       | 0   | 10  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP2       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP2       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP3       | 70  | 70  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP3       | 70  | 85  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP4       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP4       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP5       | 5   | 5   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP5       | 10  | 10  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP6       | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 | 100 | 75 | 95 | 100 | 100 | 50 | 60 |
| PSP6       | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 | 100 | 85 | 95 | 95  | 95  | 50 | 50 |
| PSP8       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |
| PSP8       | 0   | 0   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  |

TABELA 7.7 – Mortalidade (%) de larvas de 3º estágio de *Aedes aegyptii* após 24 e 48 horas de exposição à substância PSP-6.

| Concentração (ppm) | Mortalidade após 24 horas | Mortalidade após 48 horas |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| 500                | 100                       | 100                       |
| 250                | 100                       | 100                       |
| 100                | 100                       | 100                       |
| 50                 | 100                       | 100                       |
| 20                 | 90                        | 100                       |
| 10                 | 80                        | 95                        |
| 8                  | 97,5                      | 97,5                      |
| 5                  | 50                        | 55                        |
| 1                  | 0                         | 0                         |
| Controle           | 0                         | 0                         |

### 4.3. Atividade Inseticida contra *Atta sexdens rubropilosa*

Os resultados obtidos no ensaio inseticida contra as formigas *Atta sexdens rubropilosa* encontram-se divididos em três agrupamentos para facilitar a discussão. O primeiro apresenta os estudos com os extratos e substâncias puras do fungo endofítico *Penicillium* sp (Figura 7.1, Tabela 7.8), e os dois últimos com relação a *Fusarium moniliforme* (Figuras 7.2 e 7.3, Tabelas 7.9 e 7.10).

A Figura 7.1 apresenta as curvas de sobrevivência das formigas operárias quando alimentadas por dietas contendo frações (**PM-2-5** e **PM-2-6**) e substâncias puras (**PSP-1**, **PSP-5** e **PSP-8**) de *Penicillium* sp. As frações, na concentração de 2.0 mg/mL, causou a morte de 50% desses insetos em um período entre seis e oito dias, enquanto que nos experimentos controle este efeito ocorreu no 14º dia (Tabela 7.8). Conforme visto no gráfico da Figura 7.1, o meroterpeno **PSP-1** mostrou um apreciável efeito tóxico durante os primeiros dias (20% de mortalidade), mas a morte de 50% foi observada apenas no 13º dia, enquanto que para as substâncias **PSP-8** e **PSP-5** ocorreu nos 11º e 12º dias, respectivamente (observado através da análise do teste de “long rank”). Comparando os efeitos produzidos pelas substâncias puras e as frações, estas últimas apresentaram uma boa atividade tóxica, o que deve estar relacionado com as diferenças de concentração das frações (2.0 mg/mL) e das substâncias puras (0.15 mg/mL para **PSP-1**, 0.18 mg/mL para **PSP-5** e **PSP-8**). Estes dados sugerem que essas substâncias também são promissoras, necessitando agora, avaliar esse efeito tóxico com a variação da concentração.

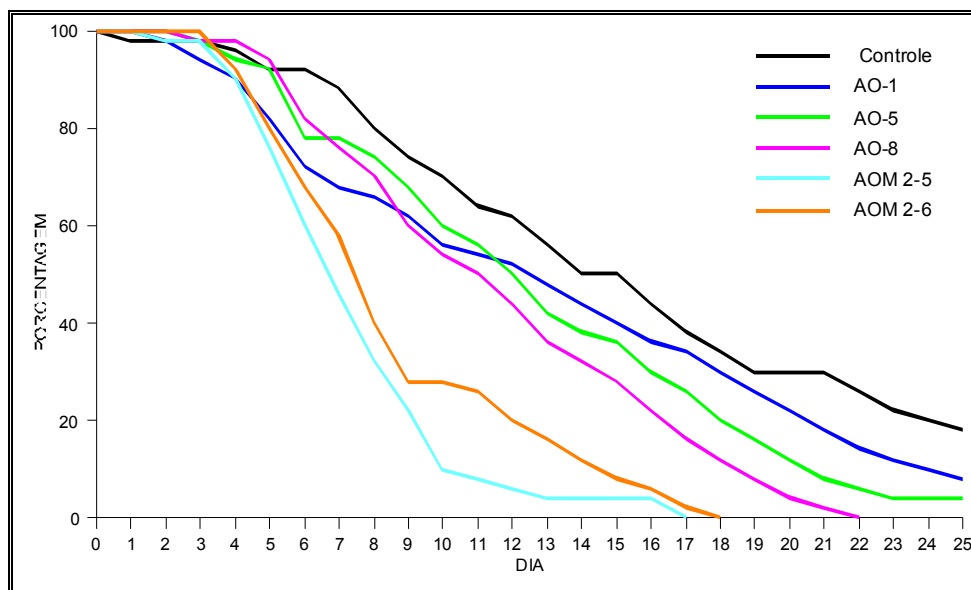


FIGURA 7.1 - Curvas de sobrevivência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas à dieta artificial contendo as frações **PM 2-5** (codificada como AOM-2-5) e **PM 2-6** (AOM-2-6) e as substâncias puras **PSP-1** (AO-1), **PSP-5** (AO-5), **PSP-8** (AO-8) oriundas de *Penicillium* sp.

TABELA 7.8 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com as frações **PM 2-5** e **PM 2-6** e as substâncias puras **PSP-1**, **PSP-5**, **PSP-8** oriundos de *Penicillium* sp.

| Substância    | % Acumulada de Mortalidade por Dia |   |   |    |    |    |    |     |     |     | Md               |
|---------------|------------------------------------|---|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|------------------|
|               | 1                                  | 2 | 3 | 6  | 8  | 10 | 14 | 17  | 21  | 25  |                  |
| Controle      | 2                                  | 2 | 2 | 8  | 20 | 30 | 50 | 62  | 70  | 82  | 14 <sup>a1</sup> |
| <b>PSP-1</b>  | 0                                  | 2 | 6 | 28 | 34 | 44 | 56 | 66  | 82  | 92  | 13 <i>a</i>      |
| <b>PSP-5</b>  | 0                                  | 0 | 2 | 22 | 26 | 40 | 62 | 74  | 92  | 96  | 12 <i>b*</i>     |
| <b>PSP-8</b>  | 0                                  | 0 | 2 | 18 | 30 | 46 | 68 | 84  | 98  | 100 | 11 <i>b**</i>    |
| <b>PM 2-5</b> | 0                                  | 2 | 2 | 40 | 68 | 90 | 96 | 100 |     |     | 7 <i>b**</i>     |
| <b>PM 2-6</b> | 0                                  | 0 | 0 | 32 | 60 | 72 | 88 | 98  | 100 |     | 8 <i>b**</i>     |

<sup>1</sup> Letras distintas, em relação ao controle, indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank”: \* = 5 %; \*\* = 1%.

Os resultados dos ensaios com os extratos obtidos a partir do cultivo de *Fusarium moniliforme* em arroz (**FMR-2**, **FMR-3-1** e **FMR-3-2**) e da substância pura **FM-1** isolada do extrato micelial deste microrganismo são mostrados na Figura 7.2 e na Tabela 7.9. A análise comparativa mostrou que o extrato **FMR-3-2** apresentou uma significativa atividade tóxica, o que não foi observado para **FM-1**.

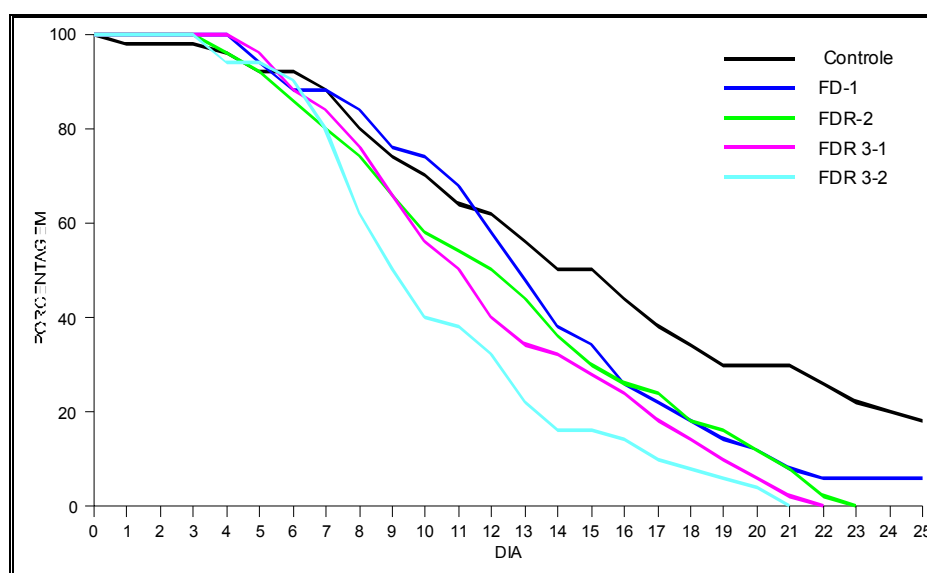


FIGURA 7.2 - Curvas de sobrevivência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas à dieta artificial contendo o extrato **FMR-2** (codificado como FDR-2), as frações **FMR 3-1** (FDR-3-1) e **FMR 3-2** (FDR-3-2) e a substância pura **FM-1** (FD-1).

TABELA 7.9 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com extratos e substâncias puras isolados de *Fusarium moniliforme*.

| Substância | % Acumulada de Mortalidade por Dia |   |   |    |    |    |    |    |     |     | Md                |
|------------|------------------------------------|---|---|----|----|----|----|----|-----|-----|-------------------|
|            | 1                                  | 2 | 3 | 6  | 8  | 10 | 14 | 17 | 21  | 25  |                   |
| Controle   | 2                                  | 2 | 2 | 8  | 20 | 30 | 50 | 62 | 70  | 82  | 14 a <sup>1</sup> |
| FM-1       | 0                                  | 0 | 0 | 12 | 16 | 26 | 62 | 78 | 92  | 94  | 13 a              |
| FMR-2      | 0                                  | 0 | 0 | 14 | 26 | 42 | 64 | 76 | 92  | 100 | 12b**             |
| FMR 3-1    | 0                                  | 0 | 0 | 12 | 24 | 44 | 68 | 82 | 98  | 100 | 12b**             |
| FMR 3-2    | 0                                  | 0 | 0 | 10 | 38 | 60 | 84 | 90 | 100 |     | 9 b**             |

<sup>1</sup> Letras distintas, em relação ao controle, indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank”: \* = 5 %; \*\* = 1%.



A comparação com os resultados obtidos dos ensaios com a adição dos extratos de *F. moniliforme* cultivado em milho (FMM-2, FMM-3-1 e FMM-3-2) (Figura 7.3 e Tabela 7.10) indicou uma toxicidade em menor intensidade para este último agrupamento.

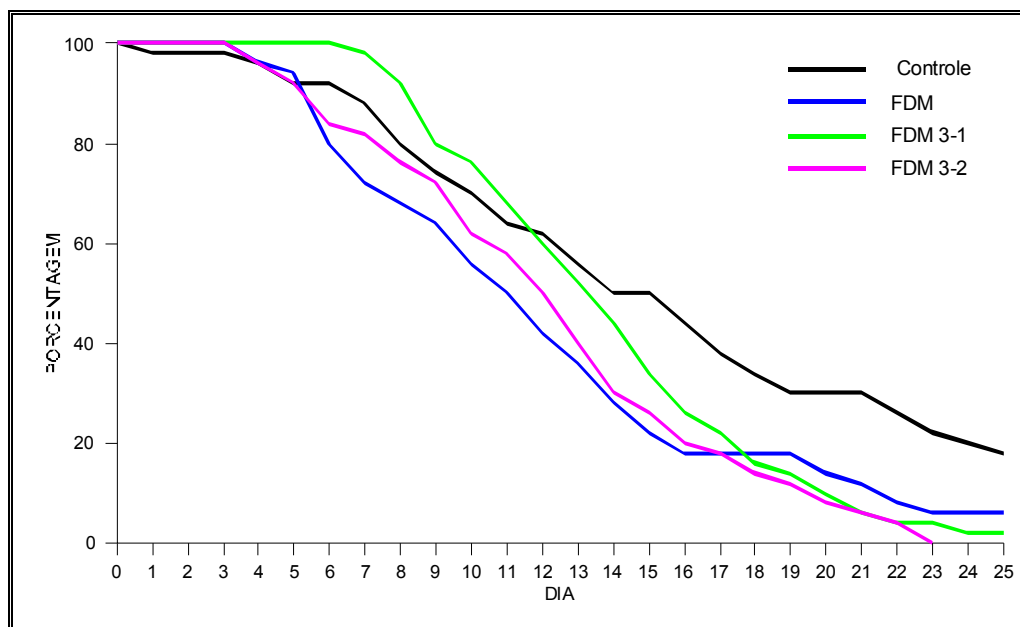


FIGURA 7.3 - Curvas de sobrevivência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas à dieta artificial contendo os extratos **FMM-2** (codificado como FDM-2), **FMM-3-1** (FDM-3-1), **FMM-3-2** (FDM-3-2) de *F. moniliforme*.

TABELA 7.10. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com extratos de *F. moniliforme*.

| Substância     | % Acumulada de Mortalidade por Dia |   |   |    |    |    | Md |    |    |     |                   |
|----------------|------------------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|-----|-------------------|
|                | 1                                  | 2 | 3 | 6  | 8  | 10 |    | 14 | 17 | 21  | 25                |
| Controle       | 2                                  | 2 | 2 | 8  | 20 | 30 | 50 | 62 | 70 | 82  | 14 <sup>a</sup>   |
| <b>FMM-2</b>   | 0                                  | 0 | 0 | 20 | 32 | 44 | 72 | 82 | 88 | 94  | 11 <sup>b*</sup>  |
| <b>FMM 3-1</b> | 0                                  | 0 | 0 | 0  | 8  | 24 | 56 | 78 | 94 | 98  | 14 <sup>a</sup>   |
| <b>FMM 3-2</b> | 0                                  | 0 | 0 | 16 | 24 | 38 | 70 | 82 | 94 | 100 | 13 <sup>b**</sup> |

<sup>1</sup> Letras distintas, em relação ao controle, indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank”: \* = 5 %; \*\* = 1%.

Em linhas gerais, os extratos que mostraram marcada atividade tóxica contra essas formigas foram oriundos do fungo *Penicillium* sp, isolado como endofítico de *M. azedarach*, a qual contém os limonóides que possuem atividade inseticida significativa. As substâncias **PSP-1** e **PSP-8** são meroterpenos de estruturas muito similares aos limonóides, conforme visto no capítulo 4 e as frações analisadas (**PM-2-5** e **PM-2-6**) também possuem uma variedade de meroterpenos (capítulo 6), sugerindo que esses metabólitos possam ser os responsáveis pela atividade observada nessas frações.

## 5. CONCLUSÕES

Com a finalidade de investigar alguma propriedade biológica, os extratos e metabólitos secundários oriundos dos fungos endofíticos *Penicillium* sp e *F. moniliforme* foram submetidos aos ensaios antibacterianos e inseticidas.

As frações obtidas do extrato **PR-3** de *Penicillium* sp apresentaram uma excelente atividade antibacteriana, principalmente contra a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, na qual a fração **PR-3-2** apresentou uma concentração mínima inibitória de 21.25 µg/mL. Esta e outras frações deverão ser submetidas ao fracionamento cromatográfico para posterior isolamento das substâncias bioativas.

A atividade larvicida dos meroterpenos contra *Aedes aegyptii*, bem como a atividade inseticida contra as formigas cortadeiras sugere que estas substâncias bem como outras oriundas de microrganismos, podem ser excelentes alvos de pesquisa de novos princípios ativos com atividades inseticidas similares àquelas apresentadas pelos limonóides.

O meroterpeno **PSP-6** não apresentou atividade antibacteriana, porém a sua atividade larvicida contra *Aedes aegyptii* foi marcadamente notável. Esse fato é

bastante interessante, sugerindo que essa substância pode ter um efeito seletivo e, portanto, futuramente poderá ser estudada a hipótese de utilizá-la como um inseticida natural.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo teve por objetivo a investigação dos fungos endofíticos associados a uma planta da família Meliaceae e seus papéis no metabolismo secundário da hospedeira. Através da utilização de técnicas especiais para o isolamento destes microrganismos, foram encontrados 59 isolados fúngicos dos tecidos saudáveis de *Melia azedarach* sendo este o primeiro estudo de fungos endofíticos com essa planta.

Como ilustrado no capítulo 1, os fungos endofíticos são considerados uma nova fonte de produtos naturais. Os estudos com *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* corroboraram com essa afirmação através de uma série de metabólitos secundários que foram detectados, isolados de seus extratos e identificados, os quais foram discutidos no capítulo 3.

De acordo com SCHULZ *et al.* (1998), os fungos endofíticos podem colonizar os tecidos internos sem causar danos aparentes em seus hospedeiros. Portanto, supõe-se que ocorra alguma forma de interação entre a planta hospedeira e o fungo associado, como por exemplo, a proteção da planta pelo fungo (através da produção de metabólitos) contra inimigos naturais. Neste projeto, algumas investigações biológicas foram realizadas com os extratos brutos, frações e substâncias puras e os resultados mostraram que os dois fungos estudados possuem um bom potencial para a produção de metabólitos bioativos (capítulo 7). Isto pode ser melhor ilustrado pelo isolamento do meroterpeno **PSP-6**, o qual mostrou ser um potente larvicida. Nossos resultados mostraram também que os fungos endofíticos representam uma interessante área de pesquisa, justificando a necessidade de investigações químicas destas fontes.

A investigação do metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *F. moniliforme*, constatou uma diversidade estrutural significativa dos compostos isolados, pertencentes à diferentes classes de produtos naturais. Do total de 34

substâncias isoladas de *Penicillium* sp e três de *F. moniliforme*, 18 representam novos produtos naturais sendo 15 meroterpenos, duas lignanas e um depsidipeptídeo.

Com o objetivo de verificar o potencial biossintético do fungo alguns experimentos com introdução de substratos exógenos foram realizados. Embora não sendo verificada a presença de produtos de biotransformação, os substratos induziram uma diferenciação do metabolismo secundário do fungo, como por exemplo a indução da formação de precursores do alcalóide verruculogenina quando esse microrganismo é cultivado na presença dos limonóides. Esta metodologia mostrou-se promissora se otimizada para induzir ou até mesmo inibir a produção de um determinado metabólito.

O fato dos compostos derivados do mesmo caminho biossintético (provavelmente sobre o mesmo controle genético) agirem como sinais positivos nos sistemas mutualísticos e como fatores dissuasivos em alguns sistemas patogênicos, podem indicar um alto grau de conveniência bioquímica destes simbiontes evoluídos a longo termo. Uma melhor compreensão dos fatores controladores da biossíntese, o acúmulo e a liberação destes metabólitos secundários pode representar um novo caminho para manipular os sistemas simbióticos com plantas. A biossíntese de meroterpenos com uma significativa similaridade estrutural e rotas biossintéticas envolvendo algumas reações em comum, sugerem um possível aprendizado ou captura do sistema enzimático durante o período de evolução entre a interação desses organismos. Experimentos envolvendo biologia molecular e marcação isotópica poderia contribuir para a compreensão desses fenômenos.

O fungo *Penicillium* sp mostrou-se um exímio produtor de compostos meroterpenóides. Entretanto, outras espécies de *Penicillium* (*P. diversum* e *Penicillium* sp MG-11) e *Aspergillus* (*A. ustus* e *A. varicolor*) isoladas do solo e de cereais comestíveis armazenados também produzem essas substâncias (CHEXAL *et al.*, 1976; SIMPSON *et al.*, 1982; HAYASHI *et al.*, 1994; SIMPSON *et al.*, 1998). Essas informações sugerem que a produção de meroterpenos esteja relacionada a poucas espécies desses dois gêneros de fungos. Para colaborar com essa suposição estudos envolvendo cepas fúngicas desses dois microrganismos endofíticos e epifíticos

associados e não associados a *Melia azedarach* poderiam ser realizados para avaliar o potencial de produção dessas substâncias, como também determinar se esse fato está associado aos fungos com alguma interação com a planta (como endofíticos ou microrganismos do solo). Uma boa sonda para uma metodologia eficaz na distinção desses microrganismos seria o conjunto de genes responsáveis pela biossíntese das enzimas Baeyer-Villiger oxidases expressada nesses tipos de substâncias, como também por outras como é o caso dos limonóides.

Alguns estudos preliminares feitos no nosso laboratório indicam que fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* estão associados a outras espécies de Meliaceae, não somente a *M. azedarach*. Trabalhos de isolamento de fungos endofíticos dos tecidos de *Cedrela fissilis* e dos frutos de *Azadiracta indica* também mostraram a presença de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Aparentemente, um isolado de *Penicillium* de *A. indica* é muito similar ao encontrado em *M. azedarach* e estudos posteriores de identificação poderão esclarecer essa similaridade. Por outro lado, alguns experimentos adicionais em nosso laboratório mostraram o encontro de um outro isolado de *Penicillium* em tecidos de *M. azedarach* coletados de uma outra localidade, como também dos tecidos dessa planta enxertada com *A. indica*. Esse isolado apresenta características macroscópicas muito similares ao fungo deste trabalho, sugerindo uma associação mais íntima entre esses o fungo e a planta.

## CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Capítulo 1: *Estudo da Interação Planta-Fungo Envolvendo Metabólitos Secundários*

- ABDEL-LATEFF, A.; KLEMKE, C.; KÖNIG, G. M. & WRIGHT, A. D. "Two New Xanthone Derivatives from the algicolous Marine Fungus *Wardomyces anomalus*". *Journal of Natural Products*, **66**: 706-708, 2003.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Academic Press, 1988.
- ARORA, D. K.; ELANDER, R. P. & MUKERJI, K.G. *Handbook of Applied Mycology: Fungal Biotechnology*. V.4, Marcel Dekker, 1991. ISBN: 0824785010.
- AYER, W. A. & KHAN, A. Q. "Zythiostromic Acids, Diterpenoids from an Antifungal *Zythiostroma* Species Associated with Aspen". *Phytochemistry*, **42**(6): 1647-1652, 1996.
- BACON, C. W. & HINTON, D. M. "Symptomless Endophytic Colonization of Maize by *Fusarium moniliforme*". *Canadian Journal of Botany*, **74**: 1195-1202, 1996.
- BAILEY, J. A. & MANSFIELD, J. W. *Phytoalexins*. eds, New York, John Wiley & Sons, 1982.
- BALL, O. J. P.; MILES, C. O. & PRESTIDGE, R. A. "Ergopeptine Alkaloids and *Neotyphodium lolii* - Mediated Resistance in Perennial Ryegrass Against Adult *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae)". *Plant resistance*, **90**(5): 1382-1391, 1997.
- BASHYAL, B.; LI J. Y.; STROBEL, G.; HESS, W. M. & SIDHU, R. "*Seimatoantlerium nepalense*, an Endophytic Taxol Producing Coelomycete from Himalaya Yew (*Taxus wallachiana*)". *Mycotaxon*, **72**: 33-42, 1999.
- BELESKY, D. P.; STUEDEMANN, J. A.; PLATTNER, R. D. & WILKINSON, S. R. "Ergopeptine Alkaloids in Grazed Tall Fescue". *Agronomy Journal*, **80**: 209-212, 1988.
- BERNY, P.; JAUSSAUD, P.; DURIX, A.; RAVEL, C. & BONY, S. "Rapid Determination of the Mycotoxin Lolitrem B in Endophyte-Infected Perennial Ryegrass by High-Performance Thin-Layer Chromatography, a Validated Assay". *Journal of Chromatography A*, **769**:343-348, 1997.
- BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B. & MULLER, R. "Metabolic Diversity in Myxobacteria: Identification of the Myxalamid and the *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a Combined Polyketide-(Poly)Peptide Gene Cluster from the Epithilone Producing Strain *Sorangium cellulosum* So ce90". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1445**: 185-195, 1999.
- BLACKWELL, M. "Enhanced: Terrestrial Life - Fungal from the Start?". *Science*, **289**: 1884-1885, 2000.

## Referências Bibliográficas

- BRADY, S. F.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E. & CLARDY, J. "Guanacastepene, a Fungal-Derived Diterpene Antibiotic with a New Carbon Skeleton". *Journal of the American Chemical Society*, **122**: 2116-2117, 2000a.
- BRADY, S. F.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E. & CLARDY, J. "Cytoskyrins A and B, New Bisanthraquinones Isolated from an Endophytic Fungus". *Organic Letters*, **2**(5): 4047-4049, 2000b.
- BRADY, S. F.; WAGENAAR, M. M.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E. & CLARDY, J. "The Cytosporones, New Octaketide Antibiotics Isolated from an Endophytic Fungus". *Organic Letters*, **2**(25): 4043-4046, 2000c.
- BRADY, S. F. & CLARDY, J. "CR377, a New Pentaketide Antifungal Agent Isolated from an Endophytic Fungus". *Journal of Natural Products*, **63**: 1447-1448, 2000.
- BRADY, S. F.; BONDI, S. M. & CLARDY, J. "The Guanacastepenes: a Highly Diverse Family of Secondary Metabolites Produced by an Endophytic Fungus". *Journal of the American Chemical Society*, **123**: 9900-9901, 2001.
- BRAS-FILHO, R. "Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano". *Química Nova*, **17**(5): 405-445, 1994.
- BUSH, L.P.; WILKINSON, H. H. & SCHARDL, C. L. "Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses". *Plant Physiology*, **114**: 1-7, 1997.
- CALHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J. D. & WHITNEY, N. J. "Metabolites Toxic to Spruce Budworm from Balsam Fir Needle Endophytes". *Mycological Research*, **96**: 281-286, 1992.
- CAMACHO, F. J.; GERNANDT, D. S.; LISTON, A.; STONE, J. K. & KLEIN, A. S. "Endophytic Fungal DNA, The Source of Contamination in spruce Needle DNA". *Molecular Ecology*, **6**: 983-987, 1997.
- CARROL, G. C. & PETRINI, O. "Patterns of Substrate Utilization by Some Endophytes from Coniferous Foliage". *Mycologia*, **75**: 53-63, 1983.
- CARROL, G. "Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont". *Ecology*, **69**(1): 2-9, 1988.
- CHAPELA, I. H. "Fungi in Healthy Stems and Branches of American Beech and Aspen: a Comparative Study". *New Phytologist*, **113**: 65-75, 1989.
- CHAPELA, I. H.; PETRINI, O. & HAGMANN, L. "Monolignol Glucosides as Specific Recognition Messengers in Fungus-Plant Symbiosis" *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **39**: 289, 1991.
- CHEN, G.; LIN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L. L. P. & JONES, E. B. G. "Two New Metabolites of a Marine Endophytic Fungus (N. 1893) from an Estuarine Mangrove on the South China Sea Coast". *Tetrahedron*, **59**: 4907-4909, 2003.



## Referências Bibliográficas

- CLAY, K. "Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi". *Ecology*, **69**(1): 10-16, 1988.
- CLAY, K. & HOLAH, J. "Fungal Endophyte Symbiosis and Plant Diversity in Successional Fields". *Science*, **285**(5434): 1742-1744, 1999.
- CULVENOR, C. C. J.; EDGAR, J. A. & MACKAY, M. F. "Structure Elucidation and Absolute Configuration of Phomopsin A, a Hexapeptide Mycotoxin Produced by *Phomopsis leptostromiformis*". *Tetrahedron*, **45**(8): 2351-2372, 1989.
- DABRAH, T. T.; KANEKO, T.; MASSEFISHI, W. & WHIPPLE, E. B. "CP-225, 917 and CP-263, 114: Novel Farnesylation Inhibitors from an Unidentified Fungus 2. Structure Elucidation". *Journal of the American Chemical Society*, **119**: 1594-1598, 1997.
- DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D. K. & RUNYON, J. B. "Naphtalene, an Insect Repellent, is Produced by *Muscodor vitigenus*, a Novel Endophytic Fungus". *Microbiology*, **148**: 3737-3741, 2002.
- DESJARDINS, A. E.; SPENCER, G. F.; PLATTNER, R. D. & BEREMAND, M. N. "Furanocoumarin Phytoalexins, Trichothecene Toxins and Infection of *Pastinaca sativa* by *Fusarium sporotrichioides*". *Phytopathology*, **79**: 170-175, 1989.
- DIDEKBRUMEC, M.; GABERCPOREKAR, V. & ALACEVIC, M. "Relationshiup Between the *Claviceps* Life Cycle and Productivity of Ergot Alkaloids". *Critical Reviews in Biotechnology*, **16**(3): 257-299, 1996.
- EVANS, C. K.; XIE, W.; DILL-MACKY, R. & MIROCHA, C. J. "Biosynthesis of Deoxynivalenol in Spikelets of Barley Inoculated with Macroconidia of *Fusarium graminearum*". *Plant disease*, **84**(6): 654-660, 2000.
- FINCH, S. C. M.; WILKINS, A. L. & MILES, C. O. "Isolation of Lolicine A, Lolicine B, Lolitriol, and Lolitrem N from *Lolium perenne* Infected with *Neotyphodium lolii* and Evidence for the Natural Occurrence of 31-Epilolitrem N and 31-Epilolitrem F". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **46**: 590-598, 1998.
- FINDLAY, J. A.; LI, G.; PENNER, P. E. & MILLER, J. D. "Novel Diterpenoid Insect Toxins from a Conifer Endophyte". *Journal of Natural Products*, **58**(2): 197-200, 1995.
- FINDLAY, J. A.; BUTHELEZI, S.; LI, G. Q.; SEVECK, M. & MILLER, J. D. "Insect Toxins from an Endophytic Fungus from Wintergreen". *Journal of Natural Products*, **60**(11): 1214-1215, 1997a.
- FINDLAY, J. A.; LI, G. & JOHNSON, J. A. "Bioactive Compounds from an Endophytic fungus from Eastern Larch (*Larix laricina*) Needles". *Canadian Journal Chemistry*, **75**: 716-719, 1997b.
- FREEMAN, S. & RODRIGUEZ, R. J. "Genetic Conversion of a Fungal Plant Pathogen to a Nonpathogenic, Endophytic Mutualist". *Science*, **260**: 75-78, 1993.
- GALLACHER, R. T.; HAWKES, A. D. & STEWART, J. M. "Rapid Determination of the Neurotoxin Lolitrem B in Perennial Ryegrass by High-Performance Liquid

## Referências Bibliográficas

- Chromatography with Fluorescence Detection". *Journal of Chromatography*, 321: 217-226, 1985.
- GATENBY, W. A.; MUNDAY-FINCH, S. C.; WILKINS, A. L. & MILES, C. O. "Terpendole M, a Novel Indole-Diterpenoid Isolated from *Lolium perenne* Infected with the Endophytic Fungus *Neotyphodium lolii*". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47: 1092-1097, 1999.
- GUO, B.; DAI, J.; NG, S.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W. & CARTÉ, B. K. "Cytonic Acids A and B: Novel Tridepside Inhibitors of hCMV Protease from the Endophytic Fungus *Cytospora Species*". *Journal of Natural Products*, 63: 602-604, 2000.
- HABERMEHL, G. G.; BUSAM, L. & STEGEMANN, J. "Miotoxin-A. A Novel Macrocyclic Trichothecene from the Brazilian Plant *Baccharis coridifolia*". *Z. Naturforschung C*, 39(3-4): 212-216, 1984.
- HABERMEHL, G. G. "Secondary and Tertiary Metabolites as Plant Toxins". *Toxicon*, 36(11): 1707-1719, 1998.
- HARBORNE, J. B. & TOMAS-BARBERAN, F.A. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Clarendon Press, 1991.
- HARBORNE, J.B. "Advances in Chemical Ecology". *Natural Products Reports*, 10(4): 327-348, 1993.
- HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; PORCO JR., J. A.; TOMER, D. P.; ONEILL, K. L.; HEIDER, E. M. & GRANT, D. M. "Pestacin: a 1,3-Dihydro Isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* Possessing Antioxidant and Antimycotic Activities". *Tetrahedron*, 59: 2471-2476, 2003.
- HAVEN, P.H.; RAY, F.E. & EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 5<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A, 1992.
- HAWKSWORTH, D. L. "The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, Significance, and Conservation". *Mycological Research*, 95(6): 641-655, 1991.
- HORN, W. S.; SIMONDS, M. S. J.; SCHWARTZ, R. E. & BLANEV, W. M. "Phomopsichalasin, a Novel Antimicrobial Agent from an Endophyte *Phomopsis* sp". *Tetrahedron*, 51(14): 3969-3978, 1995.
- HORN, B. W.; GREENE, R. L.; SOBOLEV, V. S.; DORNER, J. W.; POWELL, J. H. & LAYTON, R. C. "Association of Morphology and Mycotoxin Production with Vegetative Compatibility Groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*". *Mycologia*, 88(4): 574-587, 1996.
- HORR, J. "Biosynthesis of Taxol". *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 36(20): 2190-2195, 1997.
- HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A.; ROACH, D. H. & MONEY, N. P. "Penetration of Hard Substrates by a Fungus Employing Enormous Turgor Pressures". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88(24): 11281-11284, 1991.

## Referências Bibliográficas

- HOWE, C. *Gene Cloning Manipulation*. Cambridge, University Press, 1995.
- HUANG, E. X.; HUANG, T. L.; WILDUNG, M. R.; CROTEAU, R. & SCOTT, A. I. "Overproduction, in *Escherichia coli*, of Soluble Taxadiene Synthase, a Key Enzyme in the Taxol Biosynthetic Pathway". *Protein Expression and Purification*, **13**(1): 90-96, 1998.
- ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.L DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M. & THEBTARANONTH, Y. "Phomoxanthones A and B, Novel Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* species". *Journal of Natural Products*, **64**: 1015-1018, 2001.
- JACKSON, A. O. & TAYLOR, C. B. "Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface". *The plant cell*, **8**: 1651-1668, 1996.
- JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O. & ABOULNASR, M. B. "The Mystery of Trichothecene Antibiotics in *Baccharis* Species". *Journal of Natural Products*, **51**(4): 736-744, 1988.
- JARVIS, B. B.; COMEZOGLU, S. N.; AMMON, H. L.; BREEDLOVE, C. K.; MILLER, R. W.; WOOD, M. K.; STREELMAN, D. R.; SNEDEN, A. T.; DAILEY, R. G. & KUPCHAN, S. M. "New Macrocyclic Trichothecens from *Baccharis megapotamica*". *Journal of Natural Products*, **50**(5): 815-828, 1987.
- JARVIS, B. B.; MOKHTARI-REJALI, N. & SCHENKEL, E. P. "Trichothecene Mycotoxins from Brazilian *Baccharis* Species". *Phytochemistry*, **30**(3): 789-797, 1991.
- JARVIS, B. B. & MILLER, J. D. "Natural Products, Complexity and Evolution" IN: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecology Interactions*. ROMEO *et al.* New York, Plenum Press, 1996, p. 265-293.
- JU, Y.; SACALIS, J. N. & STILL, C. C. "Bioactive Flavonoids from endophyte-Infected Blue grass (*Poa ampla*)". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **46**(9): 3785-3788, 1998.
- KAWAMURA, H.; KANEKO, T.; KOSHINO, H.; ESUMI, Y.; UZAWA, J. & SUGAWARA, F. "Penicillides from *Penicillium* sp isolated from *Taxus cuspidata*". *Natural Product Letters*, **14**(6): 477-484, 2000.
- KEEN, N. T.; HOLLIDAY M. J. & YOSHIKAWA, M. "Effects of Glyphosate on Glyceollin Production and the Expression of Resistance to *Phytophthora megasperma* Fsp Glycinea in Soybean". *Phytopathology*, **72**(11): 1467-1470, 1982.
- KAWAMURA, H.; KANEKO, T.; KOSHINO, H.; ESUMI, Y.; UZAWA, J. & SUGAWARA, F. "Penicillides from *Penicillium* sp isolated from *Taxus cuspidata*". *Natural Product Letters*, **14**(6): 477-484, 2000.
- KOKUBUN, T.; VEITCH, N. C.; BRIDGE, P. D. & SIMMONDS, M. S. J. "Dihydroisocoumarins and a Tetralone from *Cytospora eucalypticola*". *Phytochemistry*, **62**: 779-782, 2003.

## Referências Bibliográficas

- KONIG, G. M.; WRIGHT, A.D.; AUST, H.H.; DRAEGER, S. & SCHULZ, B. "Geniculol, a New Biologically Active Diterpene from the Endophytic Fungus *Geniculosporium*". *Journal of Natural Products*, **62**: 155-157, 1999.
- KOSHINO, H.; TOGIYA, S.; YOSHIHARA, T.; SAKAMURA, S. & SHIMANUKI, T. "Four Fungitoxic C-18 Hydroxy Unsaturated Fatty Acids from Stromata of *Epichloë typhina*". *Tetrahedron Letters*, **28**(1): 73-76, 1987.
- KOSHINO, H.; TERADA, S. I.; YOSHINARA, T.; SAKAMURA, S.; SHIMANUKI, T.; SATO, T. & TAJIMI, A. "Three Phenolic Acid Derivatives from Stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*". *Phytochemistry*, **27**(5): 1333-1338, 1988.
- KOSHINO, H.; TOGIYA, S.; TERADA, S. I.; YOSHINARA, T.; SAKAMURA, S.; SHIMANUKI, T.; SATO, T. & TAJIMI, A. "New Fungitoxic Sesquiterpenoids, Choclos A-G, from Stromata of *Epichloe typhina* and the Absolute Configuration of Chokol E". *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**(3): 789-796, 1989a.
- KOSHINO, H.; YOSHINARA, T.; SAKAMURA, S.; SHIMANUKI, T.; SATO, T. & TAJIMI, A. "Novel C-11 Epoxy Fatty Acid from Stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*". *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**(9): 2527-2528, 1989b.
- KOSHINO, H.; YOSHINARA, T.; OKUNO, M.; SAKAMURA, S.; TAJIMI, A. & SHIMANUKI, T. "Gamahonolides A, B, and Gamahorin, Novel Antifungal Compounds from Stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*". *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(7): 1096-1099, 1992.
- KROHN, K.; BAHRAMSARI, R.; FLÖRKE, U.; LUDEWIG, K.; KLICHESPOR, C.; MICHEL, A.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. & ANTUS, S. "Dihydroisocoumarins from Fungi: Isolation, Structure Elucidation, Circular Dichroism and Biological Activity". *Phytochemistry*, **45**(2): 313-320, 1997.
- KROHN, K.; BIELE, C.; AUST, H.J.; DRAEGER, S. & SCHULZ, B. "Herbarulide, a Ketodivinyllactone Steroid with an Unprecedented Homo-6-Oxaergostane Skeleton from the Endophytic Fungus *Pleospora herbarum*". *Journal of Natural Products*, **62**: 629-630, 1999.
- KROHN, K.; FLÖRKE, U.; JOHN, M.; ROOT, N.; STEINGRÖVER, K.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S.; SIMONYI, M. & ZSILA, F. "Biological Active Metabolites from Fungi. Part 16: New Preussomerins J, K, and L from an Endophytic Fungus: Structure Elucidation, Crystal Structure Analysis and Determination of Absolute Configuration by CD Calculations". *Tetrahedron*, **57**: 4343-4348, 2001a.
- KROHN, K.; FLÖRKE, U.; RAO, M. S.; STEINGRÖVER, K.; AUST, H. J.; DRAEGER, S. & SCHULZ, B. "Metabolites from Fungi 15: New Isocoumarins from an Endophytic Fungus Isolated from the Canadian Thistle *Cirsium arvense*". *Natural Product Letters*, **15**(5): 353-361, 2001b.
- KROHN, K.; BIELE, C.; DROGIES, K. H.; STEINGRÖVER, K.; AUST, H. J.; DRAEGER, S. & SCHULZ, B. "Fusidilactones, a New Group of Polycyclic Lactones from an Endophyte, *Fusidium* sp". *European Journal Organic Chemistry*, 2331-2336, 2002.

## Referências Bibliográficas

- LEE, J. C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N. B.; STROBEL, G. & CLARDY, J. "Subglutinols A and B: Immunosuppressive Compounds from the Endophytic Fungus *Fusarium subglutinans*". *Journal of Organic Chemistry*, **60**: 7076-7077, 1995.
- LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOVSKY, E. & CLARDY, J. "Torreyanic Acid: a Selectively Cytotoxic Quinone Dimmer from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis microspora*". *Journal of Organic Chemistry*, **61**: 3232-3233, 1996.
- LI, J. Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W. M. & FORD, E. J. "Endophytic Taxol-Producing Fungi from Bald Cypress, *Taxodium distichum*". *Microbiology UK*, **142**: 2223-222, 1996.
- LI J. Y.; SIDHU, R.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; SUMMERELL, B. & STROBEL, G. A. "*Pestalotiopsis guepinii*, a Taxol-Producing Endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*". *Australian Journal of Botany*, **45**(6): 1073-1082, 1997.
- LI J. Y.; SIDHU, R.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; LONG D. M. & STROBEL, G. A. "The Induction of Taxol Production in the Endophytic Fungus *Periconia* sp from *Torrea grandifolia*". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **20**(5): 259-264, 1998.
- LI, J. Y.; STROBEL, G.; HARPER, J.; LOBKOVSKY, E. & CLARDY, J. "Cryptocin, a Potent Tetramic Acid Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis cf quercina*". *Organic Letters*, **2**(6): 767-770, 2000.
- LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M. & STROBEL, G. A. "Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp and *Monochaetia* sp". *Phytochemistry*, **56**: 463-468, 2001.
- LI, J. Y. & STROBEL, G. A. "Jesterone and Hydroxy-Jesterone Antioomycete Cyclohexenone Epoxides from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis jesteri*". *Phytochemistry*, **57**: 261-265, 2001.
- LIU, J. Y.; LIU, C. H.; ZOU, W. X.; TIAN, X. & TAN, R. X. "Leptosphaerone, a Metabolite with a Novel Skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an Endophyte Fungus in *Artemisia annua*". *Helvetica Chimica Acta*, **85**: 2664-2667, 2002.
- LIU, J. Y.; LIU, C. H.; ZOU, W. X. & TAN, R. X. "Leptosphaeric Acid, a Metabolite with a Novel Skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an Endophyte Fungus in *Artemisia annua*". *Helvetica Chimica Acta*, **86**: 657-660, 2003.
- LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J. & TAN, R. X. "New Bioactive Metabolites Produced by *Colletotrichum* sp., an Endophytic Fungus in *Artemisia annua*". *Plant Science*, **151**: 67-73, 2000.
- LYONS, P. C.; PLATTNER, R. D. & BACON, C. W. "Occurrence of Peptide and Clavine Ergot Alkaloids in Tall Fescue Grass". *Science*, **232**: 487-489, 1986.
- MacMILLIAN, J. "Biosynthesis of the Gibberellin Plant Hormones". *Natural Products Reports*, **14**(3): 221-243, 1996.

## Referências Bibliográficas

- MANDALA, S. M.; THORNTON, R. A.; ROSENBACH, M.; MILLIGAN, J.; CALVO, M. G.; BULL, H. G. & KURTZ, M. B. “Khafrefungin, a Novel Inhibitor of Sphingolipid Synthesis”. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(51): 32709-32714, 1997.
- MAGNANI, R. F.; RODRIGUES-FO, E.; DAOLIO, C.; FERREIRA, A. G. & SOUZA, A. Q. L. “Three Highly Oxygenated Caryophyllene Sesquiterpenes from *Pestalotiopsis* sp., a Fungus Isolated from Bark of *Pinus taeda*”. *Zeitschrift für Naturforschung*, in press.
- MANTLE, P. G. & CHOW, A.M. “Ochratoxin Formation in *Aspergillus ochraceus* with Particular Reference to Spoilage of Coffee”. *International Journal of Food Microbiology*, **56**: 105-109, 2000.
- MARASCHIN, M. & VERPOORTE, R. “Engenharia do Metabolismo Secundário”. <http://www.biotecnologia.com.br/10.d.htm>.
- MAYER, A. M. “Plant-Fungal Interactions: a Plant Physiologists Viewpoint”. *Phytochemistry*, **28**(2): 311-317, 1989.
- NATORI, S.; IKEKAWA, N. & ZUZUKI, M. *Advances in Natural Products Chemistry*. 1<sup>st</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, 1981.
- NOBLE, H. M.; LANGLEY, D.; SIDEBOTTOM, P. J.; LANE, S. J.; FISHER, P. J. “An Echinocandin from an Endophytic *Cryptosporiopsis* sp and *Pezicula* sp in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*”. *Mycological Research*, **95**:1439-1440, 1991.
- NOSOV, A. M. “Functions of Plant Secondary Metabolites *in vivo* and *in vitro*”. *Russian Journal of Plant Physiology*, **41**(6): 767-771, 1994.
- PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE, B. & SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. “Mecanismos de Patogenicidade em Fungos”. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, **6**: 1-47, 1998.
- PAXTON J. D. “Phytoalexins – A Working Redefinition”. *Phytopath. Z.*, **101**: 106-109, 1981.
- PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. V. 1 e 2. SÃO PAULO, Mc Graw-Hill, 1996.
- PETERS, S.; DAMMEYER, B. & SCHULZ, B. “Endophyte-Host Interaction. I. Plant Defense Reactions to Endophytic and Pathogenic Fungi”. *Symbiosis*, **25**: 193-211, 1998.
- PETRINI, O. “Taxonomy of Endophytic Fungi of Aerial Plant Tissues”. IN Fokkema NJ, VAN DEN HEUVEL (Eds): *Microbiology of Phyllosphere*. Cambridge University Press, 1986. p.175-187.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. “Ecology, Metabolite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi”. *Natural Toxins*, **1**: 185-196, 1992.
- PETRINI, O. “Ecological and Physiological Aspects of Host Specificity in Endophytic Fungi”. *Endophytic Fungi in Grasses and woody Plants*, 2<sup>nd</sup> ed. Chapter 4: 87-100, Minnesota, APS Press, 1996.

## Referências Bibliográficas

- PINHEIRO, M. M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M. & OLIVEIRA, D. E. "A Defesa das Plantas Contra as Doenças". *Ciência Hoje*, **25**(147): 25-31, 1999.
- PLIENINGER, H.; LEHNERT, W.; MANGOLD, D.; SCHMALZ, D.; VOLKL, A. & WESTPHAL, J. "Total Synthesis of (+)-Chanoclavin 1". *Tetrahedron Letters*, **22**(2): 1827-1830, 1975.
- PORTER, J. K.; BACON, C. W.; ROBBINS, J. D.; HIMMELSBACH, D. S. & HIGMAN, H. C. "Indole Alkaloids from *Balansia epichloë* (Weese)". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **25**(1): 88-93, 1977.
- PORTER, J. K.; BACON, C. W. & ROBBINS, J. D. "Ergosine, Ergosinine and Chanoclavine I from *Epichloë typhina*". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **27**(3): 595-598, 1979.
- PORTER, J. K.; BACON, C. W.; PLATTNER, R. D. & ARRENDALE, R. F. "Ergot Peptide Alkaloid Spectra of Claviceps-Infected Tall Fescue, Wheat and Barley". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **35**: 359-361, 1987.
- POWELL, R. G. & PETROSKI, R. J. "Alkaloid Toxins in Endophyte-Infected Grasses". *Natural Toxins*, **1**: 163-170, 1992.
- PULICI, M.; FUMIO, S.; KOSHINO, H.; UZAWA, J. & YOSHIDA, S. "Pestalotiopsins A and B: New Caryophyllenes from an Endophytic Fungus of *Taxus brevifolia*". *Journal of Organic Chemistry*, **61**(6): 2122-2124, 1996a.
- PULICI, M.; FUMIO, S.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; YOSHIDA, S.; LOBKOVSKY, E. & CLARDY, J. "A New Isodrimeninol from *Pestalotiopsis* sp". *Journal of Natural Products*, **59**(1): 47-48, 1996b.
- PULICI, M.; FUMIO, S.; KOSHINO, H.; UZAWA, J. & YOSHIDA, S. "Metabolites of Endophytic Fungi of *Taxus brevifolia*: the First Highly Functionalized Humulane of Fungal Origin". *Journal of Chemical Research*, 378-379, 1996c.
- PULICI, M.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H.; OKADA, G.; ESUME, Y.; UZAWA, J. & YOSHIDA, S. "Metabolites of *Pestalotiopsis* spp., Endophytic Fungi of *Taxus brevifolia*". *Phytochemistry*, **46** (2) 313-319, 1997.
- RAGOT, J. P.; STEENECK, C.; ALCARAZ, M. & TAYLOR, R. J. K. "The Synthesis of 1,8-Dihydroxynaphthalene-Derived Natural Products: Palmarumycin CP<sub>1</sub>, Palmarumycin CP<sub>2</sub>, Palmarumycin C<sub>11</sub>, CJ-12, 371, Deoxypreussomerin A and Novel Analogues". *Journal of Chemical Society, Perkin Trans 1*, 1073-1082, 1999.
- RATNAYAKE, A. S.; YOSHIDA, W. Y.; MOOBERRY, S. L. & HEMSCHEIDT, T. "The Structure of a Microcarpalide, a Microfilament Disrupting Agent from an Endophytic Fungus". *Organic Letters*, **3**(22): 3479-3481, 2001a.
- RATNAYAKE, A. S.; YOSHIDA, W. Y.; MOOBERRY, S. L. & HEMSCHEIDT, T. "Nomofungin: a New Microfilament Disrupting Agent". *Journal of Organic Chemistry*, **66**: 8717-8721, 2001b.

## Referências Bibliográficas

- REDECKER, D.; KODNER, R. & GRAHAM, L. E. “Glomalean Fungi from the Ordovician”. *Science*, **289**: 1920-1921, 2000.
- REDMAN, R.; FREEMAN, S.; CLIFTON, D. R.; MORREL, J.; BROWN, G. & RODRIGUEZ, R. J. “Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic Endophytic Mutant of *Colletotrichum magna*”. *Plant Physiology*, **119**(2): 795-804, 1999.
- RIBEIRO do VALE, F. X. & ZAMBOLIM, L. “Influência da Temperatura e da Umidade nas Epidemias de Doenças de Plantas”. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, **4**: 149-207, 1996.
- RIZZO, I.; VARSAVKY, M.; HAIDUKOWSKI, M. & FRADE, H. “Macrocyclic Trichothecene in *Baccharis coridifolia* Plants and Endophytes and *Baccharis artemisioides* Plants”. *Toxicon*, **35**(5): 753-759, 1997.
- 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*, **84**(12): 3766-3772, 2001.
- SCHARDL, C. L. & PHILLIPS, T. D. “Protective Grass Endophytes: Where are they from and where are they going?”. *Plant Disease*, **81**(5): 430-438, 1997.
- SCHEUER, P.J. “Products of Chemistry – Exploring the Ocean – Stating the Case for Chemistry”. *Journal of Chemical Education*, **76**(8): 1075-1079, 1999.
- SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. “Promotion of Microtubule Assembly *in vitro* by Taxol”. *Nature*, **277**(5698): 665-667, 1979.
- SCHLINGMANN, G.; WEST, R. R.; MILNE, L.; PEARCE, C. J. & CARTER, G. T. “Diepoxins, Novel Fungal Metabolites with Antibiotic Activity”. *Tetrahedron Letters*, **34**(45): 7225-7228, 1993.
- SCHULTHESS, F. M. & FAETH, S. H. “Distribution, Abundances, and Associations of the Endophytic Fungal Community of Arizona Fescue (*Festuca arizonica*)”. *Mycologia*, **90**(4): 569-578, 1998.
- SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U. & BOYLE, C. “Endophytic-Host Interactions II. Defining Symbiosis of the Endophytic-Host Interaction”. *Symbiosis*, **25**: 213-227, 1998.
- SCHULZ, B.; RÖMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J. & STRACK, D. “The Endophyte-Host Interaction: A Balanced antagonism?”. *Mycological Research*, **103**: 1275-1283, 1999.
- SELOSSE, M. A.; Le TACON, F. “The Land Flora: a Phototroph-Fungus Partnership?”. *Trends in Ecology & Evolution*, **13**(1): 15-20, 1998.
- SHELBY, R. A.; OLSOVSKA, J.; HAVLICEK, V. & FLIEGER, M. “Analysis of Ergot Alkaloids in Endophyte-Infected Tall Fescue by Liquid Chromatography/Electrospray



## Referências Bibliográficas

- Ionization Mass Spectrometry". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **45**: 4674-4679, 1997.
- SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R.F. "Latent Infection vs. Endophytic Colonization by Fungi". *Endophytic Fungi in Grasses and woody Plants*, 2<sup>nd</sup> ed. Minnesota, APS Press, 1996. Chapter 1, p. 3-30
- SNYDER, B. A. & NICHOLSON, R. L. "Synthesis of Phytoalexins in Sorghum as a Site-Specific Response to Fungal Ingress". *Science*, **248**(4963): 1637-1639, 1990.
- SOBY, S.; CALDERA, S.; BATES, R. & VANETTEN, H. "Detoxification of the Phytoalexins Maackiain and Medicarpin by Fungal Pathogens of Alfafa". *Phytochemistry*, **41**(3): 759-765, 1996.
- STIERLE, A.; STROBEL, G. & STIERLE, D. "Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew". *Science*, **260**: 214-216, 1993.
- STIERLE, A. & STROBEL, G. "The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*". *Journal of Natural Products*, **58**(9): 1315-1324, 1995.
- STIERLE, D. B.; STIERLE, A. A. & GANSER, B. K. "Isolation of Two Highly Methylated Polyketide Derivatives from a Yew Associated *Penicillium* Species". *Journal of Natural Products*, **62**(8): 1147-1150, 1999a.
- STIERLE, A.; STIERLE, D. & BUGNI, T. "Sequoiatones A and B: Novel Antitumor Metabolites Isolated from a Redwood Endophyte". *Journal of Organic Chemistry*, **64**(15): 5479-5479, 1999b.
- STOWE, B. B. & YAMAKI, T. "The History and Physiological Action of the Gibberelins". *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **8**: 181-216, 1957.
- STROBEL, G.; YAN, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; RAJINDER, SIDHU, R. J. & HESS, W. M. "Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an Endophytic Fungus of *Taxus wallachiana*". *Microbiology*, **142**: 435-440, 1996a.
- STROBEL, G.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R. S. & YANG, X. "Taxol from Fungal Endophytes and the Issue of Biodiversity". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **17**(5-6): 417-423, 1996.
- STROBEL, G. A.; TORCZYNSKI, R. & BOLLON, A. "*Acremonium* sp – a Leucinostatin A Producing Endophyte of European Yew (*Taxus baccata*)". *Plant Science*, **128**:97-108, 1997.
- STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M. M.; TEPHOW, D. B. & HESS, W. M. "Cryptocandin, a Potent Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis cf quercina*" *Microbiology*, **145**(8):1919-1926, 1999.
- STROBEL, G. "Microbial Gifts from Rain Forests". *Canadian Journal Plant Pathology*, **24**: 14-20, 2002.

## Referências Bibliográficas

- STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W. & CHAU, R. M. W. "Isopestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, Possessing Antifungal and Antioxidant Activities". *Phytochemistry*, **60**: 179-183, 2002.
- STROH, J. G.; RINEHART, K. L.; COOK, J. C.; KIHARA, T.; SUZUKI, M. & ARAI, T. "Identification and Structure Assignment of Components of Leucinostatin and CC-1014 by Directly Coupled Liquid Chromatography/Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry". *Journal of American Chemical Society*, **108**: 858-859, 1986.
- SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V. & JOHNSON, J. A. "Foliar Fungal Endophytes from Two Species of the Mangrove *Rhizophora*". *Canadian Journal of Microbiology*, **44**: 1003-1006, 1998.
- TANAKA, M.; YOSHIMURA, M.; SUTO, M.; YOKOTA, A.; ASANO, K.; SUKARA, E. & TOMITA, F. "Production of Lepidimoide by an Endophytic Fungus from Polysaccharide extracted from *Abelmoschus* sp.: Identification of the Product and the Organism Producing it". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93**(6): 531-536, 2002.
- TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D. & JONES, E. B. G. "Endophytic Fungi Associated with the Temperate Palm, *Trachycarpus fortunei*, Within and Outside its Natural Geographic Range". *New Phytologist*, **142**: 335-346, 1999.
- TRAP, S.C.; HOHN, T. M.; McCORMICK, S. & JARVIS, B. B. "Characterization of the Gene Cluster for Biosynthesis of Macrocyclic Trichothecenes in *Myrothecium roridum*". *Molecular and General Genetics*, **257**(4): 421-432, 1998.
- VERPOORTE, R.; van der HEIJDEN, R.; ten HOOPEN, H.J.G. & MEMELINK, J. "Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathway for Production of Fine Chemicals". *Biotechnology Letters*, **21**(6): 467-479, 1999.
- VOET, D.; VOET, J. *Biochemistry*. 1<sup>st</sup> ed., New York, John Wiley & Sons, 1990. ISBN: 047158651X
- YATES, S. G.; PLATTNER, R. D. & GARNER, G. B. "Detection of Ergopeptine Alkaloids in Endophyte Infected, Toxic Ky-31 Tall Fescue by Mass Spectrometry/Mass Spectrometry". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **33**: 719-722, 1985.
- YATES, S. G. & POWELL, R. G. "Analysis of Ergopeptine Alkaloids in Endophyte-Infected Tall Fescue". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **36**: 337-340, 1988.
- YATES, S. C.; FENSTER, J. C. & BARTELT, R. J. "Assay of Tall Fescue Seed Extracts, Fractions, and Alkaloids Using the Large Milkweed Bug". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **37**: 354-357, 1989.
- YEOMAN, M. M. & YEOMAN, C. L. "Tansley Review on 90: Manipulating Secondary Metabolism in Culture Plant Cells". *New Phytologist*, **134**(4): 553-569, 1996.
- YONGCHENG, L.; JUN, W.; SHINING, Z. & JONES, G. "New Isocoumarins from the Mangrove Endophytic fungus #2533". *Chemical Journal on Internet* **3**(7): 30, 2001.

## Referências Bibliográficas

- YOSHIOKA, H.; SHIRAISHI, T.; KAWAMATA, S.; NASU, K.; YAMADA, T.; ICHINOSE, Y. & OKU, H. "Orthovanadate Suppresses Accumulation of Phenylalanine-Ammonia-Lyase Messenger-RNA and Chalcone Synthase Messenger-RNA in Pea Epicotyls Induced by Elicitor from *Mycosphaerella pinodes*". *Plant and Cell Physiology*, **33**(2): 201-204, 1992.
- ZHANG, W.; WENDEL, J. F. & CLARK, L. G. "Bamboozled Again! Inadvertent Isolations of Fungal rDNA Sequences from Bamboos (Poaceae: Bambusoideae)". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8**(2): 205-217, 1997.
- ZHANG, J. H.; GUO, S. X.; YANG, J. S. & XIAO, P. G. "Chemical Constituents of One Species of Endophytic Fungus in *Taxus chinensis*". *Acta Botanica Sinica*, **44**(10): 1239-1242, 2002.
- ZOBERI, M. H. *Tropical Macrofungi*. 1<sup>st</sup> ed. London, The MacMillan Press, 1972.
- ZOOK, M.; HOHN, T.; TSUJI, J. & HAMMERSCHMIDT, R. "Characterization of Novel Sesquiterpenoid Biosynthesis in Tobacco Expressing a Fungal Sesquiterpene Synthase". *Plant Physiology*, **112**(1): 311-318, 1996.
- 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*, **63**(12): 1692, 1695, 2000.
- WAGENAAR, M. M. & CLARDY, J. "Dicerandrols, New Antibiotic and Cytotoxic Dimers Produced by the Fungus *Phomopsis longicolla* Isolated from an Endangered Mint". *Journal of Natural Products*, **64**(8): 1006-1009, 2001.
- WANG, Y. Z.; MILLER, J. D. "Effects of *Fusarium graminearum* Metabolites on Wheat Tissue in Relation to *Fusarium* Head Blight Resistance". *Journal of Phytopathology*, **122**: 118-125, 1988.
- WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y. & SU, W. "Taxol from *Tubercularia* sp Strain TF5, an Endophytic Fungus of *Taxus mairei*". *FEMS Microbiology Letters*, **193**: 249-253, 2000.
- WANG, J. ; HUANG, Y. J.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; 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*, **34**: 51-57, 2002.
- WANG, J. F.; HUANG, Y. J.; XU, Q. Y.; ZHENG, Z. H.; ZHAO, Y. F. & SU, W. J. "X-Ray Crystal Structure of Cytochalasin D Produced by *Tubercularia* sp., a Novel Endophytic Fungus of *Taxus mairei*". *Journal of Chemical Crystallography*, **33**(1): 51-55, 2003.
- WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGOON, P. & MCPHAIL, A. T. "Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*". *Journal of the American Chemical Society*, **93**(9): 2325-2327, 1971.

## Referências Bibliográficas

WELTRING, K. M.; WESSELS, J. & PAULI G. F. “Metabolism of the Tomato Saponin  $\alpha$ -Tomatine by *Gibberella pulicaris*”. *Phytochemistry*, **48**(8): 1321-1328, 1998.

WEBSTER, J. *Introduction to Fungi*. 1<sup>st</sup> ed., Cambridge, Cambridge University Press, 1989.

WILKINSON, R. A.; STROBEL, G. & STIERLE, A. A. “Sphaeric Acid: a New Succinic Acid Derivative from a *Sphaeropsis* sp”. *Journal of Natural Products*, **62**(2): 358-360, 1999.

## Capítulo 2: Isolamento de Fungos Endofíticos de Melia azedarach

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, 1995. ISBN: 0471110930.

ALFENAS, A. C. & FERREIRA, F.A. “Ocorrência de *Calonectria crotalariae* (Estádio Conidial de *Cylindrocladium crotalariae*) em *Swietenia macrophylla* King, na Região Amazônica”. *Fitopatologia Brasileira*, **4**: 87, 1979.

BACON, C. W. & HINTON, D. M. “Symptomless Endophytic Colonization of Maize by *Fusarium moniliforme*”. *Canadian Journal of Botany*, **74**: 1195-1202, 1996.

BARNETT, H. L. & HUNTER, B. B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. New York, Mac Millan Publ. Co., 1987.

BOOTH, C. *Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species*. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute, 1977. ISBN: 0851983855.

CANNON, P. F. & SIMMONS, C. M. “Diversity and Host Preference of Leaf Endophytic fungi in the Iwokrama forest Reserve, Guyana”. *Mycologia*, **94**(2): 210-220, 2002.

CARNEIRO, J. S. “Microflora Associada à Sementes de Essências Florestais”. *Fitopatologia Brasileira*, **11**: 557-566, 1986.

CARNEIRO, J. S. “Qualidade Sanitária de Sementes de Espécies Florestais em Paraopeba - MG”. *Fitopatologia Brasileira*, **15**(1): 77-77, 1990.

CARROL, G. “Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont”. *Ecology*, **69**(1): 2-9, 1988.

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. “Biological Activity of Limonoids from the Rutales”. *Phytochemistry*, **31**(2): 377-394, 1992.

FERREIRA, F. A. *Patologia Florestal – Principais Doenças Florestais no Brasil*. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 1989.

FREEMAN, S. & RODRIGUEZ, R. J. “Genetic Conversion of a Fungal Plant Pathogen to a Nonpathogenic, Endophytic Mutualist”. *Science*, **260**: 75-78, 1993.

## Referências Bibliográficas

- GAMBOA, M. A. & BAYMAN, P. "Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae)". *Biotropica* **33**(2): 352-360, 2001.
- HUANG, R.C.; TADERA, K.; YAGI, F.; MINAMI, Y.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T & NAKATANI, M. "Limonoids from *Melia azedarach*". *Phytochemistry* **43**(3): 581, 1996.
- JOLY, A. B. *Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo, EDUSP, 1966, 355-6.
- KAPOOR, V. K. & CHAWLA, A. S. "Biological Significance of Triterpenoids" *J. Scient. Ind. Res.* **45**(11): 503-11, 1986.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F. & CASTRO, C. *Fungos em Plantas no Brasil*. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. ISBN: 85-7383-031-X.
- NAKATANI, M.; JAMES, J. C. & NAKANISHI, K. "Isolation and Structures of Trichilins, Antifeedants Against the Southern Army worm" *J. Am. Chem. Soc.*, **103**(5): 1228-1230, 1981.
- OLMO, L. R.V. *Evolução de Limonóides em Meliaceae e Estudo Fitoquímico de *Khaya senegalensis* (Meliaceae)*. SÃO CARLOS, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995. Tese de Doutorado.
- OLMO, L. R. V.; DA SILVA, M. F. G. F., RODRIGUES FO., E.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; MARSAIOLI, A. J.; PINHEIRO, A. L. & VILELA, E. F. "Rearranged Limonoids from *Khaya senegalensis*" *Phytochemistry*, **42**(3): 831, 1996.
- OLMO, L. R. V.; DA SILVA, M. F. G. F., RODRIGUES FO., E.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; MARSAIOLI, A. J.; PINHEIRO, A. L. & VILELA, E. F. "Limonoids from Leaves of *Khaya senegalensis*" *Phytochemistry*, **44**(6): 1157, 1997.
- PAULA, J. R.; VIEIRA, I. J. C.; SILVA, M. F. G. F., RODRIGUES FO, E.; FERNANDES J. B.; VIEIRA, P. C.; PINHEIRO, A. L. & VILELA, E. F.. "Sesquiterpenes, Triterpenoids, Limonoids and Flavonoids of *Cedrela odorata* Graft and Speculations on the Induced Resistance Against *Hypsipyla grandela*". *Phytochemistry*, **44**(8): 1449, 1997.
- PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. V. 1 e 2. SÃO PAULO, McGraw-Hill, 1996.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. "Ecology, Metabolite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi". *Natural Toxins*, **1**: 185-196, 1992.
- PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. T. "A Generic Monography of the Meliaceae". *Blumea*, **22**: 419-540, 1975.
- PITT, J. I. *A laboratory guide to common *Penicillium* species*. Sydney, CSIRO, 1988

## Referências Bibliográficas

- POLISHOOK, J. D.; BILLS, G. F. & LODGE, D. J. “Microfungi from Decaying Leaves of Two Rain Forest Trees in Puerto Rico”. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**: 284-294, 1996.
- RAPER, K. B. & THOM, C. *A Manual of the Penicillia*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Biomedical Press, 1949.
- RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. *The genus Aspergillius*. Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins Co., 1965.
- REDDY, P. V.; LAM, C. K. & BELANGER, F. C. “Mutualistic Fungal Endophytes Express a Proteinase that is Homologous to Proteases Suspected to be Important in Fungal Pathogenicity”. *Plant Physiology*, **11**, 1209-1218. 1996.
- REIS, M. S. “Status of Forest Diseases in Latin América – Emphasis in Brazil”. *Summa Phytopathologica*, **1**(2): 16-20, 1976.
- RIFAI, A. M. “A revision of the genus *Trichoderma*”. *Mycological Papers*, **116**. 1969.
- SCHULTHESS, F. M. & FAETH, S. H. “Distribution, Abundances, and Associations of the Endophytic Fungal Community of Arizona Fescue (*Festuca arizonica*)”. *Mycologia*, **90**(4): 569-578, 1998.
- SILVA, G. S. “Ocorrência de *Sclerotium olfsii* em ‘Neem’ (*Azadirachta indica*)”. *Fitopatologia Brasileira*, **19**: 333, 1994.
- TAKEYA, K.; QIAO, Z.S.; HIROBE, C. & ITOKAWA, H.; *J. Chem & Pharm. Bull.* **43**(7): 1171, 1995.
- TAYLOR, D.A.H. “The Chemistry of the Limonoids from Meliaceae”. *Prod. Chem. Org. Nat. Prod.*, **45**: 1-102, 1984.
- TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D. & JONES, E. B. G. “Endophytic Fungi Associated with the Temperate Palm, *Trachycarpus fortunei*, Within and Outside its Natural Geographic Range”. *New Phytologist*, **142**: 335-346, 1999.
- TEIXEIRA, M. F. S.; CARVALHO, S. M. S. & SILVA, M. I. L. “Catálogo da Coleção de Cultura – DPVA. Fungos Filamentosos e Leveduras. 2<sup>nd</sup> ed. Manaus, Universidade do Amazonas, 1995. ISBN: 85-85482-19-2.
- WATERMAN, P. G. e GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. London, Academic Press, 1983.

## Capítulo 3: Estudo Químico dos Fungos Penicillium sp e Fusarium moniliforme

- APRINGER, J. P.; CLARDY, J.; COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; HILL, R. K.; CARLSON, R. M. & ISIDOR, J. L. “Structure and Synthesis of Moniliformin, a Novel Cyclobutane Microbial Toxin”. *Journal of American Chemical Society*, **96**(7): 2267-2268, 1974.

## Referências Bibliográficas

- ARORA, D.K.; ELANDER, P.E. & MUKERJI, K.G. *Handbook of Applied Mycology*. Vol.4, Dekker, 1992.
- BACHER, M.; HOFER, O.; BRADER, G.; VAJRODAYA, S. & GREGER, H. “Thapsakins: Possible Biogenetic Intermediates Towards Insecticidal Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia edulis*”. *Phytochemistry*, **52**: 253-263, 1999.
- BARROS, F. A. P. *Metabólitos Secundários de *Eupenicillium* sp, um Fungo Endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002. Dissertação de Mestrado, 158p.
- BIRCH, A. J.; BLANCE, G. E. & SMITH, H. “Studies in Relation to Biosynthesis. Part XVIII. Penicillic acid”. *Journal of Chemical Society*, 4582-4583, 1958.
- BREITMAIER, E.; HAAS, G. & VOELTER, W. *Atlas of Carbon-13 NMR Data*. London, Heyden & Son Ltd, v.2, 1979. ISBN: 0-85501-482-2.
- BREITMAIER, E. *Carbon-13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. New York, Wolfgang Coelter, 3<sup>rd</sup> ed., 1987. ISBN: 0-89573-493-1.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; TIRITAN, E.; MATLIN, S. A.; CURRAN, D. P. & BALOG, A. “Enantiomeric Resolution by HPLC of Axial Chiral Amides Using Amylose Tris[(S)-1-Phenylethylcarbamate]”. *Chirality*, **9**: 109-112, 1997.
- COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; CLARDY, J.; EICKMAN, N.; WEINREB, S. M.; SINGH, P. & KIM D. “Structures of Rugulovasine-A and -B and 8-Chlororugulovasine-A and -B”. *Tetrahedron Letters*, **43**: 3849-3852, 1976.
- COLE, R. J. & COX, R. H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, 1999. ISBN: 0121797600.
- DAY, J. B. & MANTLE, P. G. “Biosynthesis of Radiolabeled Verruculogen by *Penicillium simplicissimum*”. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**(3): 514-516, 1982.
- EICKMAN, N.; CLARDY, J.; COLE, R. J. & KIRKSEY, J. W. “Structure of Fumitremorgin-A”. *Tetrahedron Letters*, **12**: 1051-1054, 1975.
- FISCHER, G.; MULLER, T. & OSTROWSKI, R. “Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in Pure Culture and in Native Bioaerosols from Compost Facilities”. *Chemosphere*, **38**(8): 1745-1755, 1999.
- FROIMOWITZ M. “HyperChem: a Software Package for Computational Chemistry and Molecular Modeling”. *Biotechniques* **14**: 1010-1013, 1993.
- GALLAGHER, R. T. & LATCH, G. C. M. “Production of Tremorgenic Mycotoxins Verruculogen and Fumitremorgin-B by *Penicillium piscarium* Westling”. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**(3): 730-731, 1977.

## Referências Bibliográficas

- HASUMI, K.; SHINOHARA, C.; IWANAGA, T. & ENDO, A. "Lateritin, a New Inhibitor of Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Produced by *Gibberella lateritium* IFO 7188". *The Journal of Antibiotics*, **46**(12): 1782-1787, 1993.
- HAYASHI, H.; MUKAIHARA, M.; MURAO, S.; ARAI, M.; LEE, A. & CLARDY, J. "Acetoxydehydroaustin, a New Bioactive Compound, and Related Compound Neoaustin from *Penicillium* sp. MG-11". *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **58**(2): 334-338, 1994.
- HAWKSWORTH, D. L. "The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, Significance, and Conservation". *Mycological Research*, **95**(6): 641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; PEGLER, D. N.; SUTTON, B. C. & AINSWORTH, G. C. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8<sup>th</sup> ed. Cabi Publishing, 1995. ISBN: 0851988857.
- HERBERT, R. B. "The Biosynthesis of Plant Alkaloids and Nitrogenous Microbial Metabolites". *Natural Products Reports*, 45-58, 1996.
- HORAK, R. M. & VLEGGAR, R. "Biosynthesis of Verruculogen, a Tremorgenic Metabolite of *Penicillium verruculosum*: Stereochemical Course of Peroxide Ring Formation". *J. Chem. Soc., chem. Commun.*, 1568-1570, 1987.
- HORAK, R. M.; MAHARAJ, V. J.; MARAIS, S. F.; HEERDEN, F. R. & VLEGGAR, R. "Stereochemical Studies on the Biosynthesis of Viridicatumtoxin: Evidence for a 1,3-hydride Shift in the Formation of the Spirobicyclic Ring System". *Journal Chemical Society, Chemical Communication*, 1562-1564, 1988.
- IGARASHI, Y.; KUWAMORI, Y.; TAKAGI, K.; ANDO, T.; FUDOU, R.; FURUMAI, T. & OKI, T. "Xanthoepocin, a New Antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IFO5762". *The Journal of Antibiotics*, **53**(9): 928-933, 2000.
- IHARA, M. & FUKUMOTO, K. "Recent Progress in the Chemistry of Non-Monoterpenoid Indole Alkaloids". *Natural Products Reports*, **12**:277-301, 1995.
- IHARA, M. & FUKUMOTO, K. "Recent Progress in the Chemistry of Non-Monoterpenoid Alkaloids". *Natural Products Reports*, 241-261, 1996.
- KAGAMIZONO, T.; NISHINO, E.; MATSUMOTO, K.; KAWASHIMA, A.; KISHIMOTO, M.; SAKAI, N.; HE, B. M.; CHEN, Z. X.; ADACHI, T.; MORIMOTO, S. & HANADA, K. "Bassiatin, a New Platelet Aggregation Inhibitor Produced by *Beauveria bassiana* K-717". *The Journal of Antibiotics*, **48**(12): 1407-1412, 1995.
- KIMURA, Y.; MIZUNO, T.; KAWANO, T.; OKADA, K. & SHIMADA, A. "Peniamidienone and Penidilamine, Plant Growth Regulators Produced by the Fungus *Penicillium* sp N. 13". *Phytochemistry*, **53**:829-831, 2000.
- LEWIS, J. R. "Muscarine, Imidazole, Oxazole, Thiazole and Peptide Alkaloids, and Other Miscellaneous Alkaloids". *Natural Products Reports*, 435-467, 1996.



## Referências Bibliográficas

- MACMILLAN, J. G.; SPRINGER, J. P.; CLARDY, J.; COLE, R. J. & KIRKSEY, J. W. "Structure and Synthesis of Verruculotoxin, a New Mycotoxin from *Penicillium verruculosum* Peyronel". *Journal of the American Chemical Society*, **98**(1): 246-247, 1976.
- MEDENTSEV, A. G.; AKIMENKO, V. K. "Effect of Naphthazarin Pigments Produced by *Fusarium decemcellulare* on Oxygen Uptake by Yeasts and Bacterial Microorganisms". *Biokhimiya*, **53**(2): 289-96, 1988.
- MICHAEL, J. P. "Quinoline, Quinazoline and Acridone Alkaloids". *Natural Products Reports*, 595-606, 1998.
- MOSBACH, K. "Die Biosynthese der Orsellinsäure und Penicillinsäure (1)". *Acta Chemica Scandinavica*, **14**: 457-464, 1960.
- NUGROHO, B. W.; EDRADA, R. A.; WRAY, V.; WITTE, L.; BRINGMANN, G.; GEHLING, M. & PROKSCH, P. "An Insecticidal Rocaglamide Derivatives and Related Compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae)". *Phytochemistry*, **51**: 367-376, 1999.
- OH, H.; KIM, T.; OH, G. S.; PAE, H.O.; HONG, K. H.; CHAI, K. Y.; KWON, T. O.; CHUNG, H. T. & LEE, H. S. "(3R,6R)-4-Methyl-6-(1-methyl)-3-phenylmethyl-perhydro-1,4-oxazine-2,5-dione: An Apoptosis-Inducer from the Fruiting Bodies of *Isaria japonica*". *Planta Medica*, **68**: 345-348, 2002.
- SANTINI, A.; RITIENI, A.; FOGLIANO, V.; RANDAZZO, G.; MANNINA, L.; LOGRIECO, A. & BENEDETTI, E. "Structure and Absolute Stereochemistry of Fusaproliferin, a Toxic Metabolite from *Fusarium proliferatum*". *Journal of Natural Products*, **59**: 109-112, 1996.
- SIMPSON, T. J.; STENZEL, D. J.; BARTLETT, A. J.; O'BRIEN, E. & HOLKER, J. S. E. "Studies on Fungal Metabolites. Part 3. <sup>13</sup>C NMR Spectra and Structural Studies on Austin and New Related Meroterpenoids from *Aspergillus ustus*, *Aspergillus varicolor*, and *Penicillium diversum*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 2687-2692, 1982.
- SPRINGER, J. P.; CLARDY, J.; WELLS, J. M.; COLE, R. J. & KIRKSEY, J. W. "The Structure of Paxilline, a Tremorgenic Metabolite of *Penicillium paxilli* Bainier". *Tetrahedron Letters*, **30**: 2531-2534, 1975.
- TURNER, W. B. *Fungal Metabolites*. New York, Academic Press, 1971.
- VLEGGAR, R.; HORAK, R. M. & MAHARAJ, V. J. "Stereochemical Course of Ring Formation in Fumitremorgin-B and Verruculogen, Metabolites of *Penicillium verruculosum* - Investigation Into the Loss of Stereochemical Integrity of the Geminal Methyl-Groups" *J. Chem. Soc., chem. Commun.*, **3**: 274-275, 1993.

## Capítulo 4: Estudos Biogénicos dos Meroterpenos

- AHMED, S. A.; SCOTT, F. E.; STENZEL, D. J.; SIMPSON, T. J.; MOORES, R. N.; TRIMBLE, L. A.; ARAI, K. & VEDERAS, J. C. "Studies on the Biosynthesis of the Mycotoxin Austin, a Meroterpenoid Metabolite of *Aspergillus ustus*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 807-816, 1989.
- ASHTON, C. H. "Pharmacology and Effects of *Cannabis*: a Brief Review". *British Journal of Psychiatry*, **178**: 101-106, 2001.
- BECK, J.; RIPKA, S.; SIEGNER, A.; SCHILTZ, E. & SCHWEIZER, E. "The Multifunctional 6-Methylsalicylic Acid Synthase Gene of *Penicillium patulum*. Its Gene Structure Relative to that of Other Polyketide Synthases". *European Journal of Biochemistry*, **192**: 487-498, 1990.
- BINGLE, L. E. H.; SIMPSON, T. J. & LAZARUS, C. L. "Ketosynthase Domain Probes Identify Two Subclasses of Fungal Polyketide Synthase Genes". *Fungal Genetics and Biology*, **26**: 209-223, 1999.
- BIRCH, A. J.; ENGLISH, R. J.; MASSY-WESTROPP, R. A. & SMITH, H., *J. Chem. Soc.*, 369-375, 1958.
- BUFFERY, C.. "The Polymerase Chain Reaction". IN: *Molecular Biology and Biotechnology*. WALKER, J. M. & GINGOLD, E. B. (Eds)., Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 1993, cap.3.
- CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. "Biological Activity of Limonoids from the Rutales". *Phytochemistry*, **31**(2): 377-394, 1992.
- CORNFORTH, J. W. "Terpenoids Biosynthesis". *Chemistry in Britain*, **4**(1): 102-106, 1968.
- CHEXAL, K. K.; SPRINGER, J. P., CLARDY, J.; COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; DORNER, J. W.; CUTLER, H. G. & STRAWTER, B. J. "Austin, a Novel Polyisoprenoid Mycotoxin from *Aspergillus ustus*". *Journal of the American Chemical Society*, **98**(21): 6748-6750, 1976.
- DUNN, A. W.; JOHNSTONE, R. A. W.; SKLARZ, B. & KING, T. J. "Isolation of C<sub>25</sub> Polyisoprenoids from *Aspergillus* sp: Crystal Structure of Andibenin". *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, 270, 1976.
- GINGOLD, E. B. "An Introduction to Recombinant DNA Technology". IN: *Molecular Biology and Biotechnology*. WALKER, J. M. & GINGOLD, E. B. (Eds)., Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 1993, cap.2.
- GOTO, T.; KAKISAWA, H. & HIRATA, Y. "Structure of Grifolin an Antibiotic from a Basidiomycete". *Tetrahedron*, **19**: 2079, 1963.
- GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H. & LEWONTIN, R. C. *Modern Genetic Analysis*. New York, W. H. Freeman and Company, 1999.

## Referências Bibliográficas

- JESUS, A. E.; HORAK, R. M.; STEYN, P. S. & VLEGGAR, R. J., *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, 716-718, 1983.
- HAYASHI, H.; MUKAIHARA, M.; MURAO, S.; ARAI, M.; LEE, A. & CLARDY, J. "Acetoxydehydroaustin, a New Bioactive Compound, and Related Compound Neoaustin from *Penicillium* sp. MG-11". *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **58**(2): 334-338, 1994.
- HIRAI, K.; NOZOE, S.; TSUDA, K.; IITAKA, Y.; ISHIBASHI, K. & SHIRASAKA, M. "Structure of Siccanin". *Tetrahedron Letters*, **23**: 2177, 1967.
- HOLKER, J. S. E. & SIMPSON, T. J. "Biosynthesis of Andibenin, a Novel Polyketide-Terpenoid Metabolite of *Aspergillus varicolor*". *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, 626-627, 1978
- HOPWOOD, D. A.; MALPARTIDA, F.; KIESE, H. M.; IKEDA, H.; DUNCAN, J.; FUJII, I.; RUDD, B. A. M.; FLOSS, H. G. & OMURA, S. "Production of Hybrid Antibiotics by Genetic Engineering". *Nature*, **314**(6012):642-644, 1985.
- HOPWOOD, D. A. "Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases". *Chemical Reviews*, **97**: 2465-2497, 1997.
- HOWE, C. *Gene Cloning Manipulation*. Cambridge, University Press, 1995.
- HUTCHINSON, C. R. & FUJII, I. "Polyketide Synthase Gene Manipulation: a Structure-Function Approach in Engineering Novel Antibiotics". *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**: 201-238, 1995.
- IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P. & HOSTTETTMANN, K. "Antifungal and Larvicidal Meroterpenoids Naphthoquinones and a Naphthoxirene from the Roots of *Cordia linnaei*". *Phytochemistry*, **47**(5): 729-734, 1998.
- KATZ, L. "Manipulation of Modular Polyketide Synthases". *Chemical Reviews*, **97**: 2557-2575, 1997.
- KIM, W.; CHO, K.; LEE, C. & YOO, I. "Terreulactone A, a Novel Meroterpenoid with Anti-Acetylcholinesterase Activity from *Aspergillus terreus*". *Tetrahedron Letters*, **43**: 3197-3198, 2002.
- KOSEMURA, S.; MATSUO, S. & YAMAMURA, S. "Citreohybridione C, a Meroterpenoid of a Hybrid Strain KO 0031 Derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692". *Phytochemistry*, **43**(6):1231-1234, 1996.
- KOSEMURA, S. "Structure and Absolute Configuration of Citreohybridiones Isolated from *Penicillium* Species". *Tetrahedron Letters*, **43**: 1253-1256, 2002.
- McINTYRE, C. R. & SIMPSON, T. J. "Biosynthesis of Terretonin, a Polyketide-Terpenoid Metabolite of *Aspergillus terreus*". *J. Chem. Soc., chem. Commun.*, 1043-1044, 1981.
- McINTYRE, C. R.; SIMPSON, T. J.; STENZEL, D. J.; BARTLETT, A. J.; O'BRIEN, E. & HOLKER, J. S. E. "Biosynthesis of the Meroterpenoid Metabolites, Austin and

## Referências Bibliográficas

- Terretonin: Incorporation of 3,5-Dimethylorsellinate". *J. Chem. Soc., chem. Commun.*, 781-782, 1982.
- MCINTYRE, C. R.; SCOTT, F. E.; SIMPSON, T. J.; TRIMBLE, L. A. & VEDERAS, J. C. "Biosynthesis of the Meroterpenoids Metabolite, Andilesin A, by *Aspergillus variegator*: Origins of the Oxygen Atoms". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 501-503, 1986.
- MCINTYRE, C. R.; SCOTT, F. E.; SIMPSON, T. J.; TRIMBLE, L. A. & VEDERAS, J. C. "Application of Stable Isotope Labeling Methodology to the Biosynthesis of the Mycotoxin, Terretonin, by *Aspergillus terreus*: Incorporation of <sup>13</sup>C-Labelled Acetates and Methionine, <sup>2</sup>H- and <sup>13</sup>C, <sup>18</sup>O-Labelled Ethyl 3,5-Dimethylorsellinate and Oxygen-18 Gas". *Tetrahedron*, **45**(8): 2307-2321, 1989.
- NAKATANI, M.; JAMES, J. C. & NAKANISHI, K. "Isolation and Structures of Trichilins, Antifeedants Against the Southern Army Worm". *Journal of the American Chemical Society*, **103**: 1228-1230, 1981.
- NICHOLSON, T. P.; RUDD, B. A. M.; DAWSON, M.; LAZARUS, C. M.; SIMPSON, T. J. & COX, R. J. "Design and Utility of Oligonucleotide Gene Probes for Fungal Polyketide Synthases". *Chemistry & Biology*, **8**: 157-178, 2001.
- NICHOLSON, T. P. "Design and Development of Oligonucleotide Probes for Novel Fungal Polyketide Synthase Genes". *PhD Thesis*. Bristol University, 2000.
- PASSAGLIA, L. M. P. & ZAHA, A. "Técnicas de DNA Recombinante". IN: *Biologia Molecular Básica*. 3<sup>rd</sup> ed. ZAHA, A. (Ed.) São Paulo, Mercado Aberto, 1996, cap. 15.
- PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. T. "A Generic Monography of the Meliaceae". *Blumea*, **22**: 419-540, 1975.
- PFEIFER, B. A. & KHOSLA, C. "Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**(1): 106-118, 2001.
- SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-Fo, E. "Meroterpenes from *Penicillium* sp with *Melia azedarach*". *Phytochemistry*, **61**: 907-912, 2002.
- SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-Fo, E. "Structures of Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp, an Endophytic Fungus Found Associate with *Melia azedarach*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003.
- SCOTT, F. E.; SIMPSON, T. J.; TRIMBLE, L. A. & VEDERAS, J. C. "Biosynthesis of the Meroterpenoid Austin, by *Aspergillus ustus*: Synthesis and Incorporation of <sup>13</sup>C, <sup>18</sup>O-Labelled Ethyl- 3,5-Dimethylorsellinate". *J. chem. Soc., Chem. Commun.*, 214-215, 1986.
- SIMPSON, T. J. "Studies on Fungal Metabolites. Part 1. The Structures of Andibenins-A and -C, and Andilesins-A, -B, and -C, Meroterpenoids from *Aspergillus variegator*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 2118-2121, 1979.

## Referências Bibliográficas

- SIMPSON, T. J. & WALKINSHAW, M. D. "Anditomin, a New C<sub>25</sub> Metabolite from *Aspergillus variegator*". *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, 914-915, 1981.
- SIMPSON, T. J. & STENZEL, D. J. "Biosynthesis of Austin, a Polyketide-Terpenoid Metabolite of *Aspergillus ustus*". *J. Chem. Soc., chem. Commun.*, 1042-1043, 1981.
- SIMPSON, T. J.; STENZEL, D. J.; BARTLETT, A. J.; O'BRIEN, E. & HOLKER, J. S. E. "Studies on Fungal Metabolites. Part 3. <sup>13</sup>C NMR Spectra and Structural Studies on Austin and New Related Meroterpenoids from *Aspergillus ustus*, *Aspergillus variegator*, and *Penicillium diversum*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 2687-2692, 1982.
- SIMPSON, T. J.; STENZEL, D. J.; MOORE, R. N.; TRIMBLE, L. A. & VEDERAS, J. C. "Biosynthesis of the Meroterpenoid, Austin, by *Aspergillus ustus*: Incorporation of <sup>18</sup>O<sub>2</sub>, Sodium [1-<sup>13</sup>C, <sup>18</sup>O<sub>2</sub>] Acetate, and [Me-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>] Methionine". *J. Chem. Soc., chem. Commun.*, 1242-1243, 1984.
- SIMPSON, T. J. "Polyketide Biosynthesis". *Chemistry & Industry*, 407-411, 1995.
- SIMPSON, T. J.; AHMED, S. A.; McINTYRE, C. R.; SCOTT, F. E. & SADLER, I. H. "Biosynthesis of Polyketide-Terpenoid (Meroterpenoid) Metabolites Andibenin B and Andilesin A in *Aspergillus variegator*". *Tetrahedron*, **53**(11): 4013-4034, 1997.
- SIMPSON, T. J. "Application of Isotopic Methods to Secondary Metabolic Pathways". *Topics in Current Chemistry*, **195**: 1-48, 1998.
- SONTAG, B.; ARNOLD, N.; STEGLICH, W. & ANKE, T. "Montadial a, a Cytotoxic Metabolite from *Bondarzewia montana*". *Journal of Natural Products*, **62**: 1425-1426, 1999.
- SPRINGER, J. P.; DORNER, J. W.; COLE, R. J. & COX, R. H. "Terretonin, a Toxic Compound from *Aspergillus terreus*", *Journal of Organic Chemistry*, **44**(26): 4852-4854, 1979.
- STONE, M. J. & WILLIAMS, D. H. "On the Evolution of Functional Secondary Metabolites (Natural Products)". *Molecular Microbiology*, **6**(1): 29-34, 1992.
- TASDEMIR, D.; CONCEPCIÓN, G. P.; MANGALINDAN, G. C.; HARPER, M. K.; HAJDU, E. & IRELAND, C. M. "New Terpenoids from a *Cacospongia* sp. from the Philippines". *Tetrahedron*, **56**: 9025-9030, 2000.
- TAYLOR, D. A. H. "The Chemistry of the Limonoids from Meliaceae". *Prod. Chem. Org. Nat. Prod.*, **45**: 1-102, 1984.
- URONES, J. G.; ARAUJO, M. E. M.; PALMA, F. M. S. B.; BASABE, P.; MARCOS, I. S.; MORO, R. F.; LITHGOW, A. M. & PINEDA, J. "Meroterpenes from *Cystoseira usneoides* II". *Phytochemistry*, **31**(6): 2105-2109, 1992.
- Vector NTI Suite User's Manual V 6.0. Infor Max, Inc. Bethesda, MD, 2000 ([www.informaxinc.com](http://www.informaxinc.com); e-mail: techsupport@informaxinc.com).

WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. "Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales". Academic Press, London, 1983.

## **Capítulo 5: *Metabolismo Secundário do Fungo Penicillium sp na Presença de Substratos Exógenos***

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F. & COSTA, P. R. R. "Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais". *Química Nova*, **20**(6): 647-656, 1997.

COLE, R. J. & KIRKSEY, J. W. "The Mycotoxin Verruculogen: a 6-O-Methylindole". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **21**(5): 927-929, 1973.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; DORNER, J. W.; WILSON, D. M.; JOHNSON, J. C.; Jr JOHNSON, A. N.; BEDELL, D. M.; SPRINGER, J. P.; CHEXAL, K. K.; CLARDY, J. & COX, R. H. "Mycotoxins Produced by *Aspergillus fumigatus* Species Isolated from Molded Silage". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **25**(4): 826-830, 1977.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry – A Textbook*. Berlim, Springer-Verlag, 1995.

GRANADOS, A. G.; MARTÍNEZ, A. & QUIRÓS, R. "Chemical-Microbiological Semisynthesis of *enantio*-Ambrox Derivatives". *Tetrahedron*, **55**: 8567-8578, 1999.

HAIDER, K. & MARTIN, J. P. "Synthesis and Transformations of Phenolic Compounds by *Epicoccum nigrum* in Relation to Humic Acid Formation". *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, **31**: 657, 1975.

LIMA, V. L. E. "Os Fármacos e a Quiralidade: uma Breve Abordagem". *Química Nova*, **20**(6): 657-663, 1997.

NAIR, M. G.; EPP, M. D. & BURKE, B. A. "Ferulate Esters of Higher Fatty Alcohols and Allelopathy in *Kalanchoe daigremontiana*". *Journal of Chemical Ecology*, **14**: 589-603, 1988.

RAHOUTI, M.; SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R. & ERIKSSON, K. E. "Metabolism of Ferulic Acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*". *Applied Environmental Microbiology*, **55**: 2391, 1989.

SANTOS, R. M. G. *Interação Planta-Microrganismo: O Papel de Metabólitos Secundários na Interação de Melia azedarach com Fungos Filamentosos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1999. Dissertação de Mestrado, 211p.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R. & SAFIR, G. R. "Significance of Phenolic Compounds in Plant-Soil-Microbial Systems". *Critical Reviews in Plant Science*, **10**(1): 63-121, 1991.

## Capítulo 6: *Análise de Substâncias Detectadas em Melia azedarach e Penicillium sp através da Espectrometria de Massas*

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry*. Illinois, Allured Publishing Corporation, 1995.

McMASTER, M. & McMASTER, C. *GC/MS: A Pratical User's Guide*. New York, John Wiley & Sons, Inc, 1998, cap. 1 e 14.

SANTOS, R. M. G. *Interação Planta-Microrganismo: O Papel de Metabólitos Secundários na Interação de Melia azedarach com Fungos Filamentosos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1999. Dissertação de Mestrado, 211p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. & MORRILL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos* 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995.

## Capítulo 7: *Atividade Biológica das Frações e das Substâncias Isoladas dos fungos e Penicillium sp e Fusarium moniliforme*

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. “Biological Activity of Limonoids from the Rutales”. *Phytochemistry*, **31**(2): 377-394, 1992.

GUIMARÃES, V. P. *Atividade Larvicida do Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule de Magonia pubescens St. Hil. Sobre Aedes albopictus (Skuse, 1894) e Aedes aegypti (Linnaeus 1762) (Díptera, Culicidae)*. Goiânia, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia – Universidade Federal de Goiás, 2000. Dissertação de Mestrado, 38p.

GUIMARÃES, V. P.; SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; ROCHA, C. “Atividade Larvicida do Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule de Magonia pubescens St. Hill sobre Aedes albopictus (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae)”. *Rev. Pat. Trop.* **30**(2): 243-249, 2001.

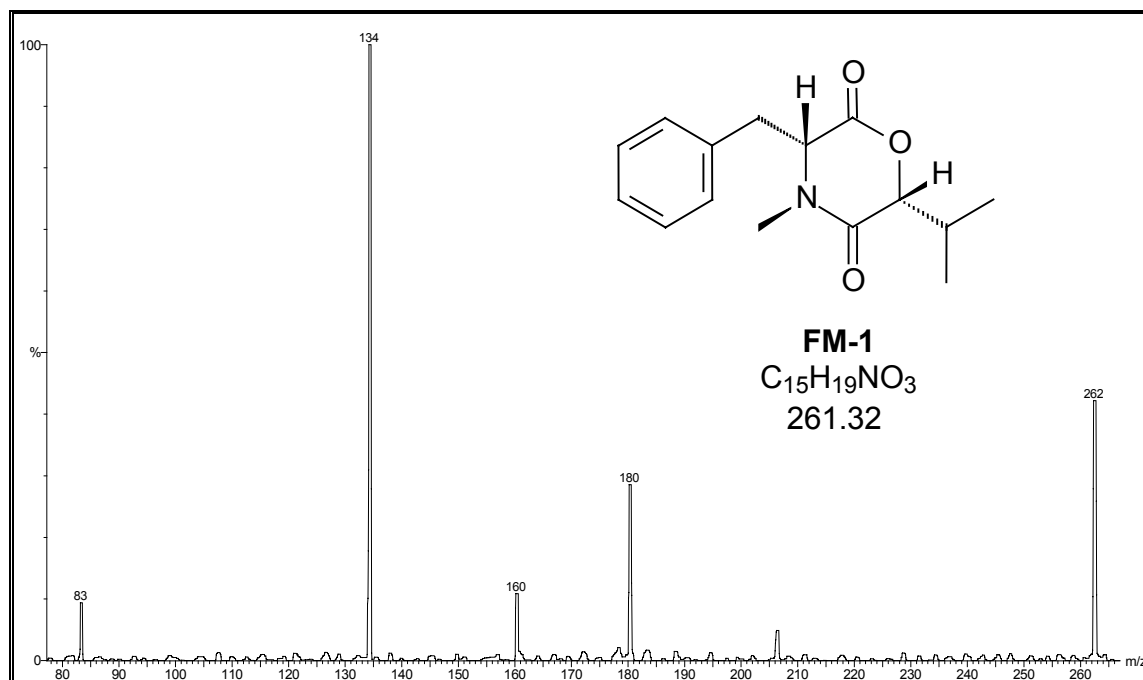
HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T. & NAKATANI, M. “The Structures of Azedarachins, Limonoids Antifeedants from Chinese Melia azedarach Linn”. *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **67**(9): 2468-2472, 1994.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 4<sup>th</sup> ed., Approved Standard (M7-A4), *National Committee For Clinical Laboratory Standards*, Wayne, P.A., 1997.

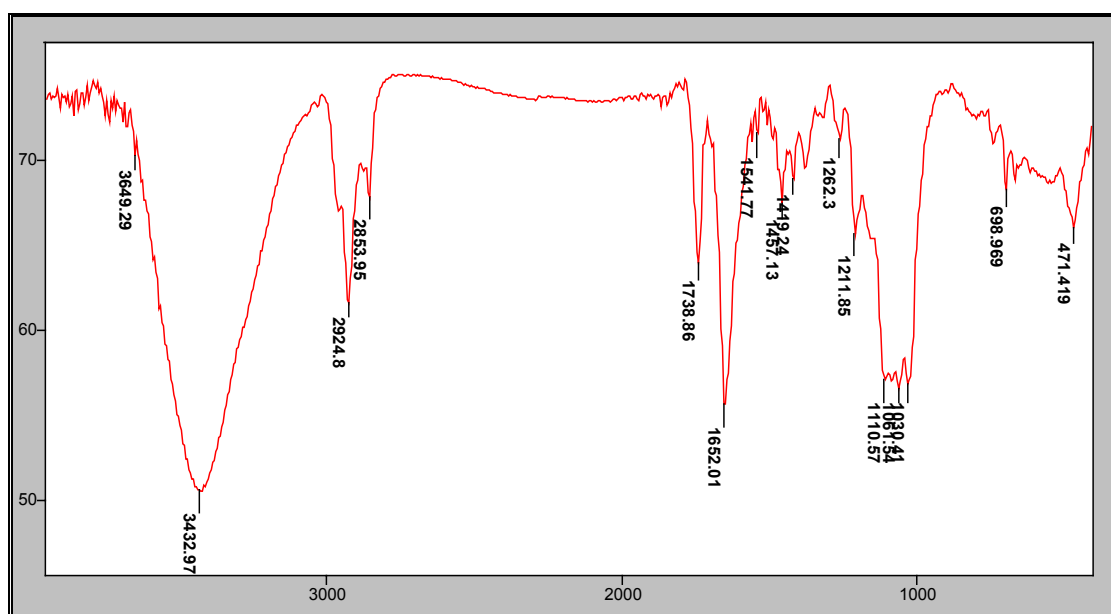
TORRES, M.; BALCELLS, M.; SALA, N.; SANCHIS, V. & CANELA, R. “Bactericidal and Fungicidal Activity of Aspergillus ochraceus Metabolites and Some Derivatives”. *Pesticide Science*, **53**: 9-14, 1998.

# APÊNDICE 01: Espectros das Substâncias Isoladas de *Fusarium moniliforme*

## 1.1. FM-1



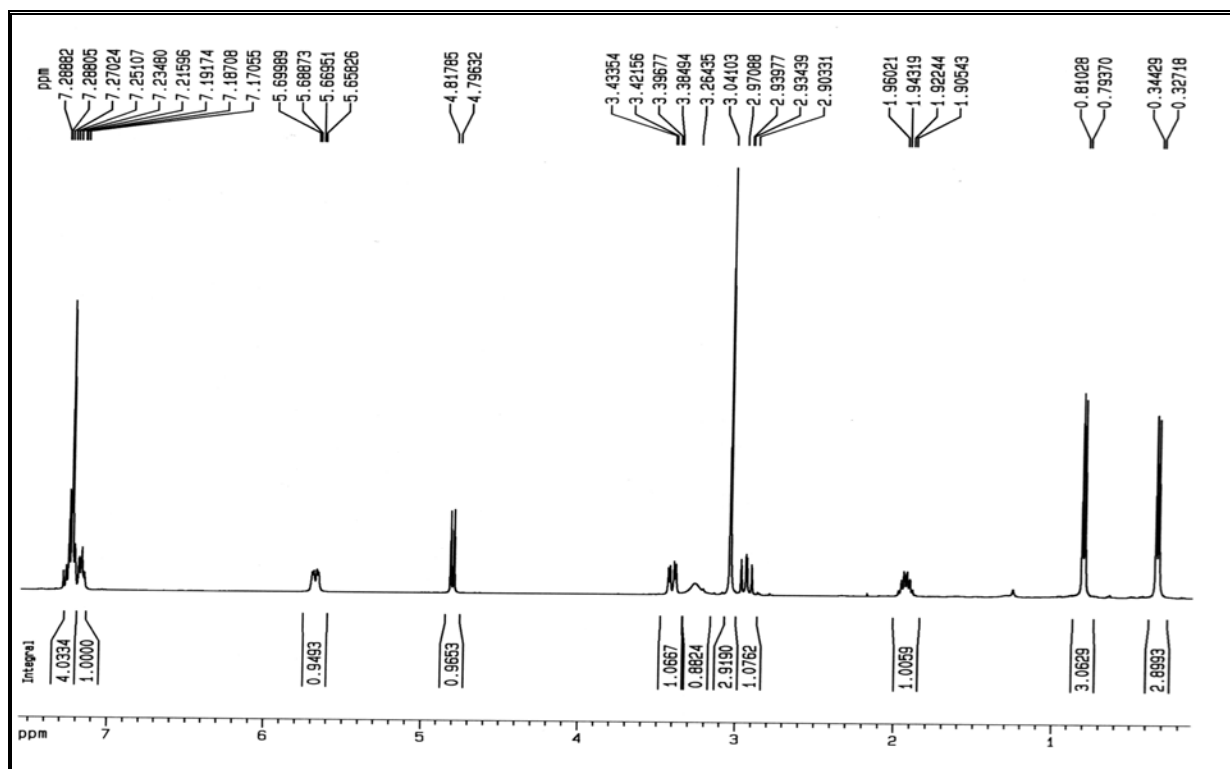
APÊNDICE 1.1.1 – Espectro de massas de **FM-1**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.



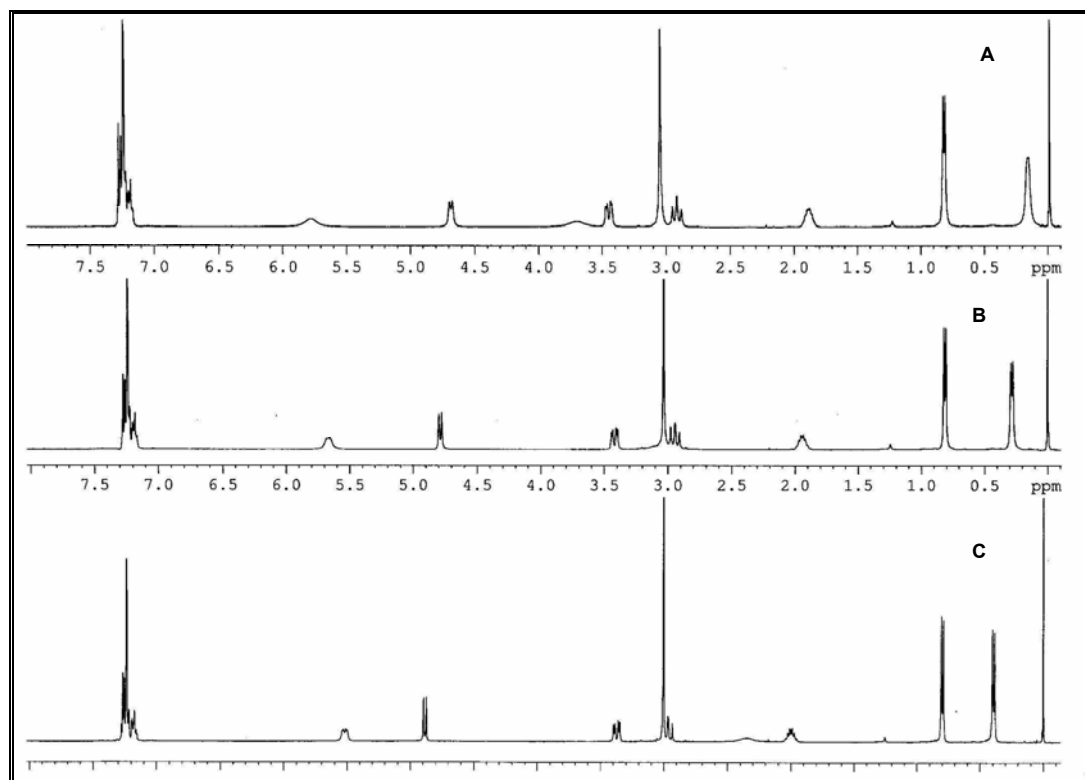
APÊNDICE 1.1.2 – Espectro de absorção no IV de **FM-1** (KBr, pastilha).



Apêndice 01: Espectros das Substâncias Isoladas de *Fusarium moniliforme*

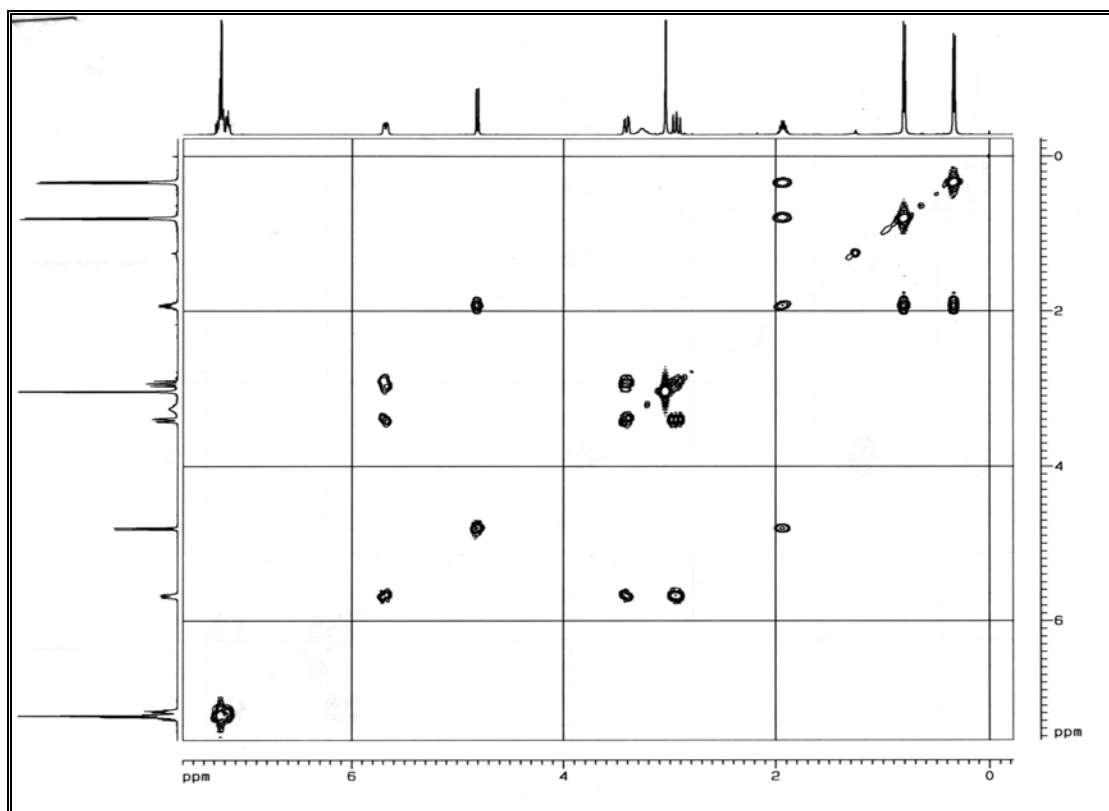


APÊNDICE 1.1.3– Espectro de RMN <sup>1</sup>H de FM-1 (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

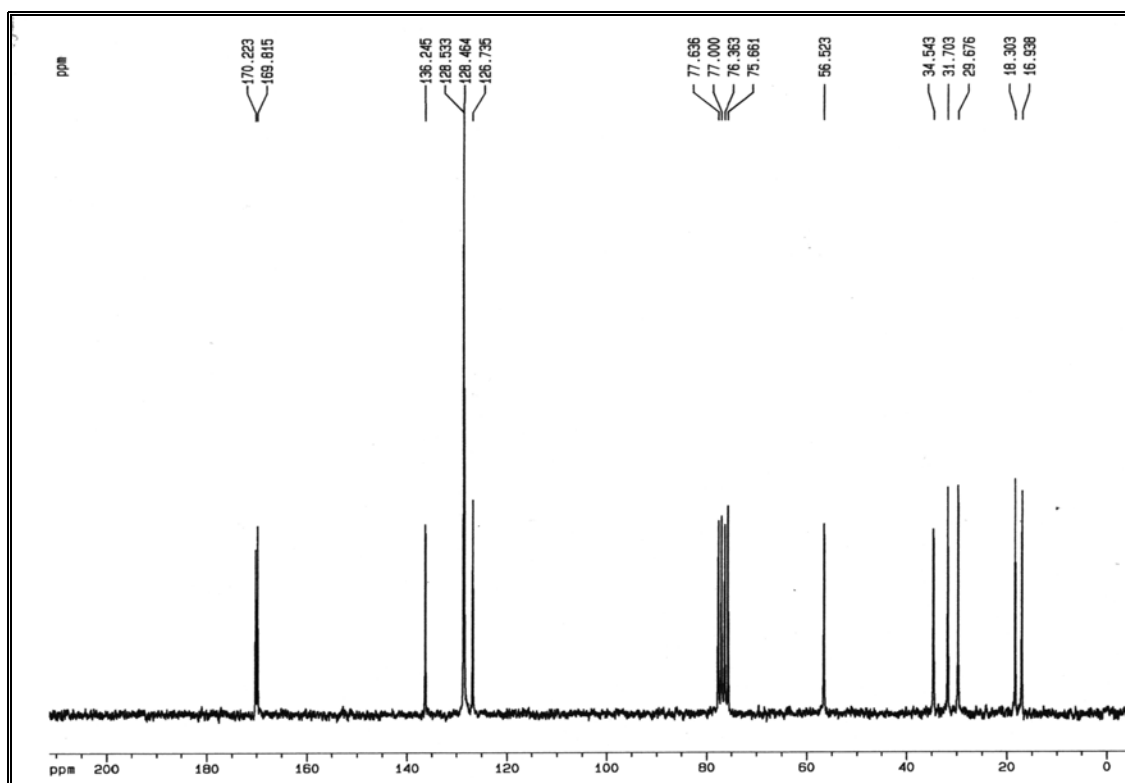


APÊNDICE 1.1.4– Espectro de RMN <sup>1</sup>H de FM-1 obtido em diferentes temperaturas (400 MHz, Clorofórmio-*d*). A) 253 K; B) 273 K; C) 293 K.

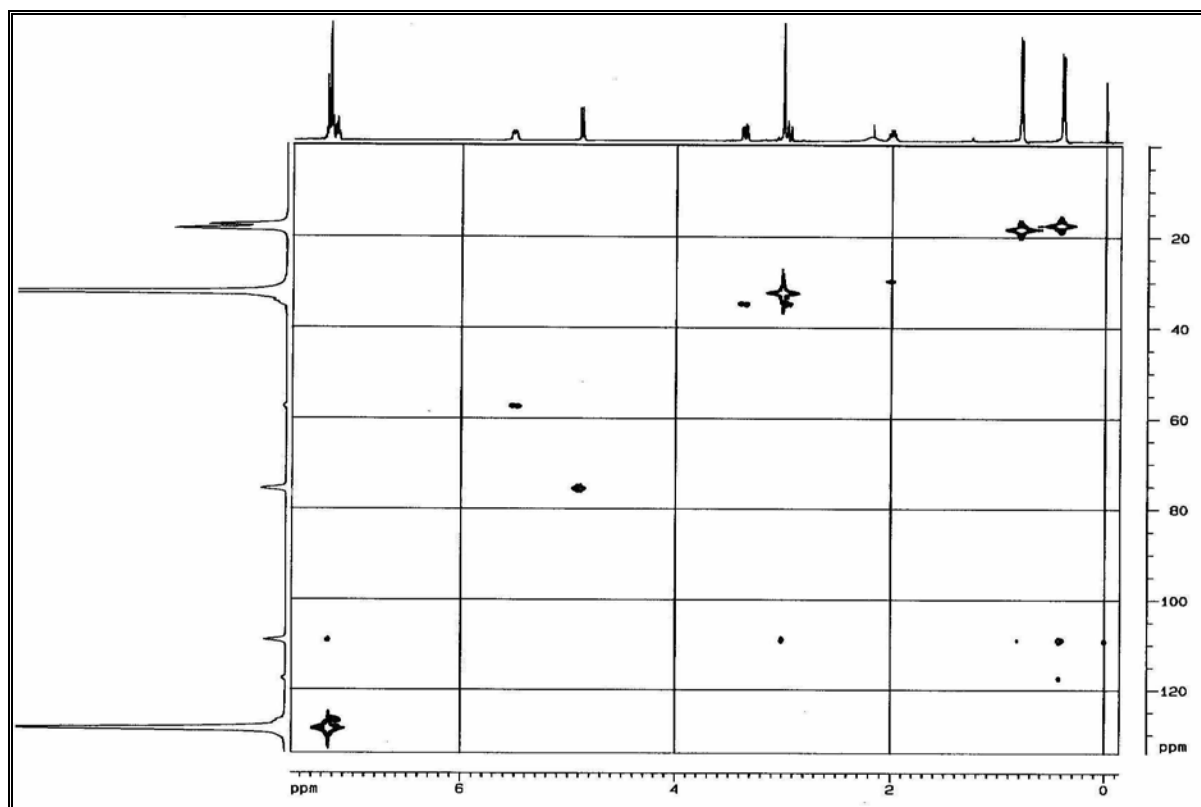
Apêndice 01: Espectros das Substâncias Isoladas de *Fusarium moniliforme*



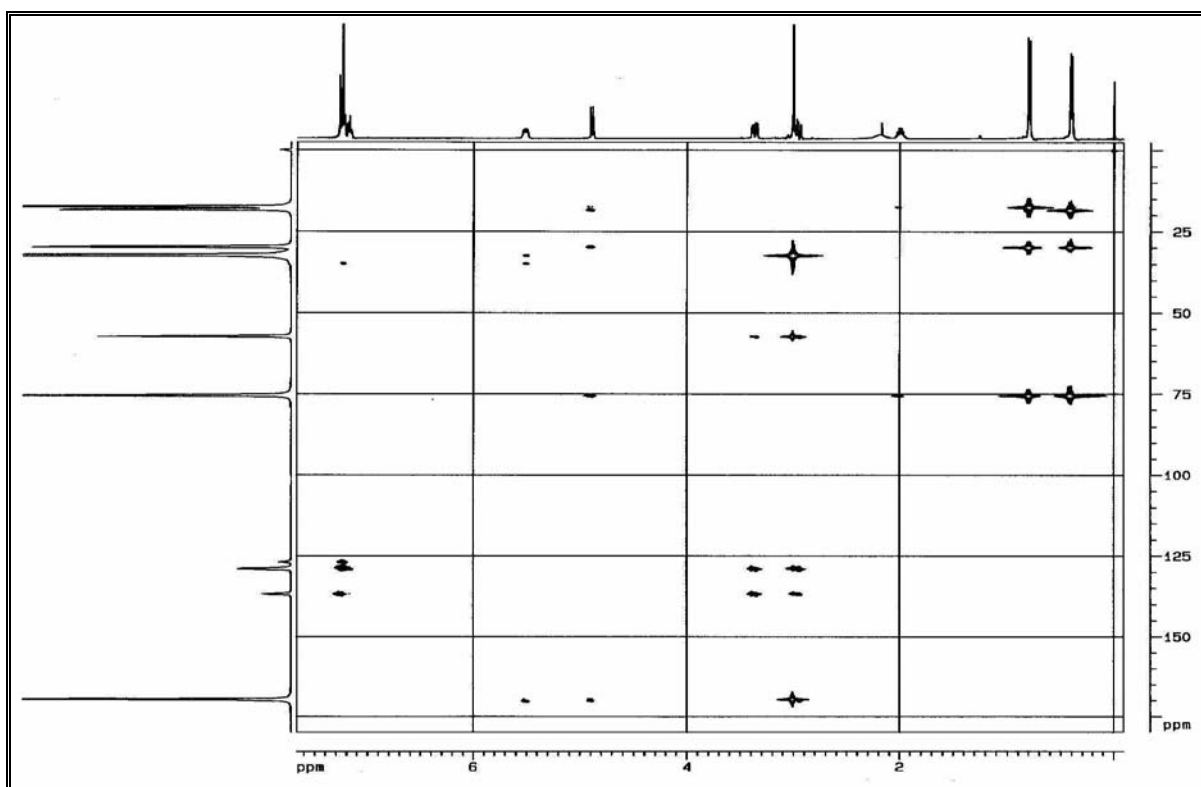
APÊNDICE 1.1.5– Espectro de RMN  $^1\text{H}$  – COSY de **FM-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



APÊNDICE 1.1.6– Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **FM-1** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

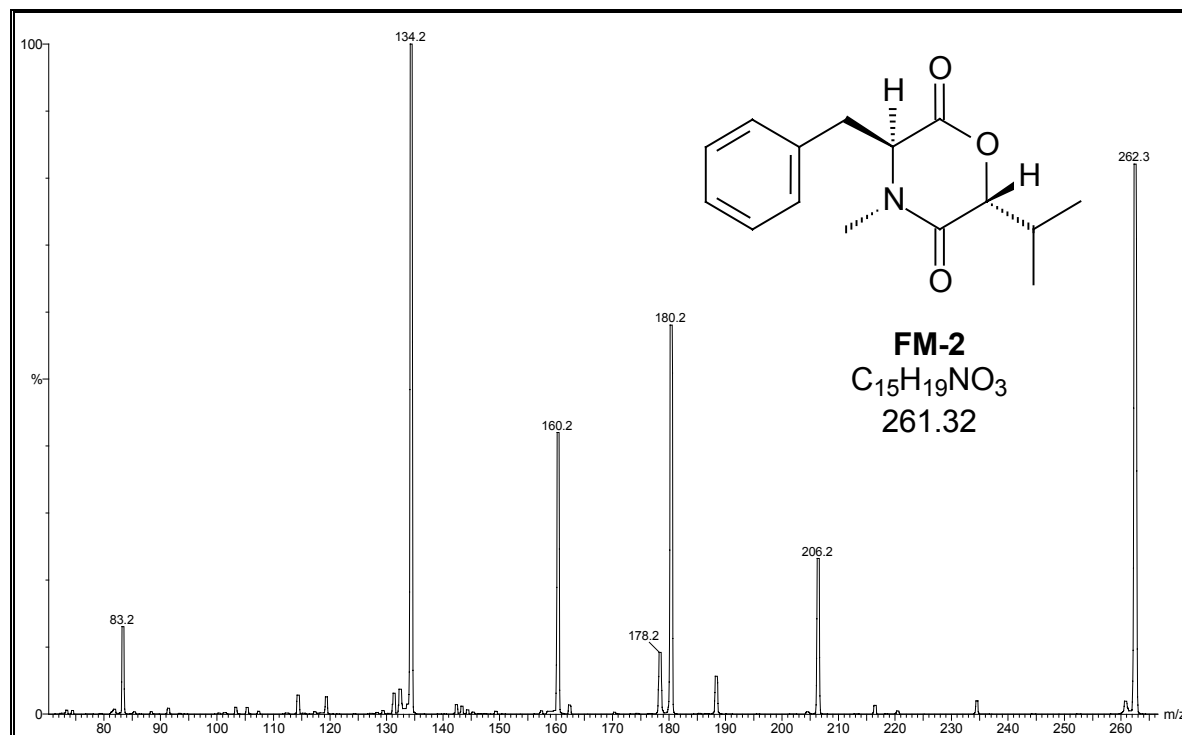


APÊNDICE 1.1.7– Espectro de HSQC de **FM-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

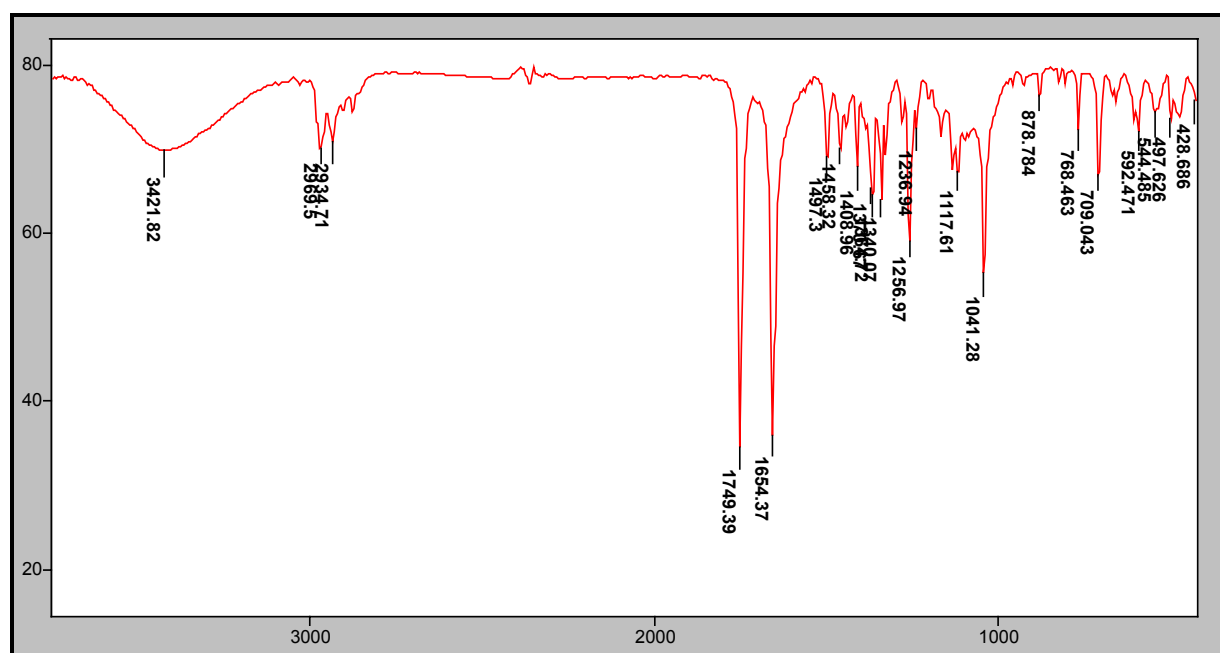


APÊNDICE 1.1.8– Espectro de HMBC de **FM-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

## 1.2. FM-2

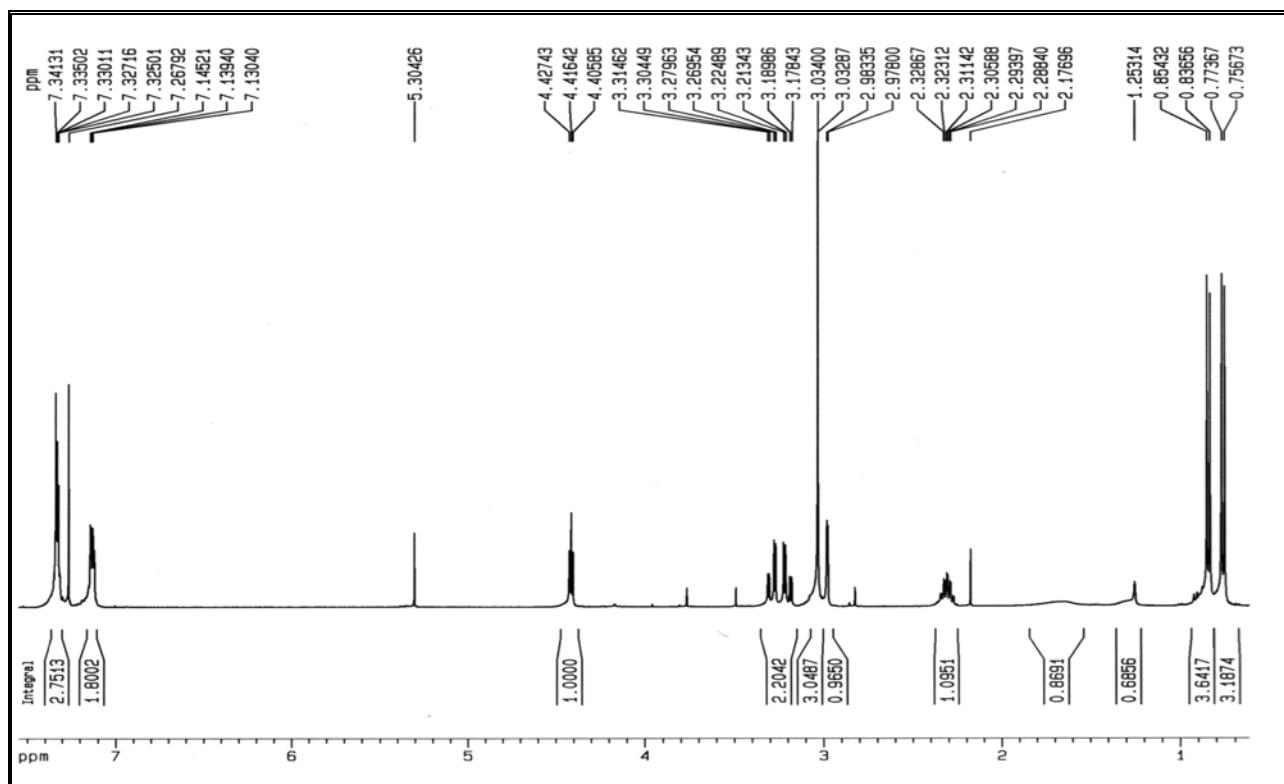


APÊNDICE 1.2.1– Espectro de massas de **FM-2**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

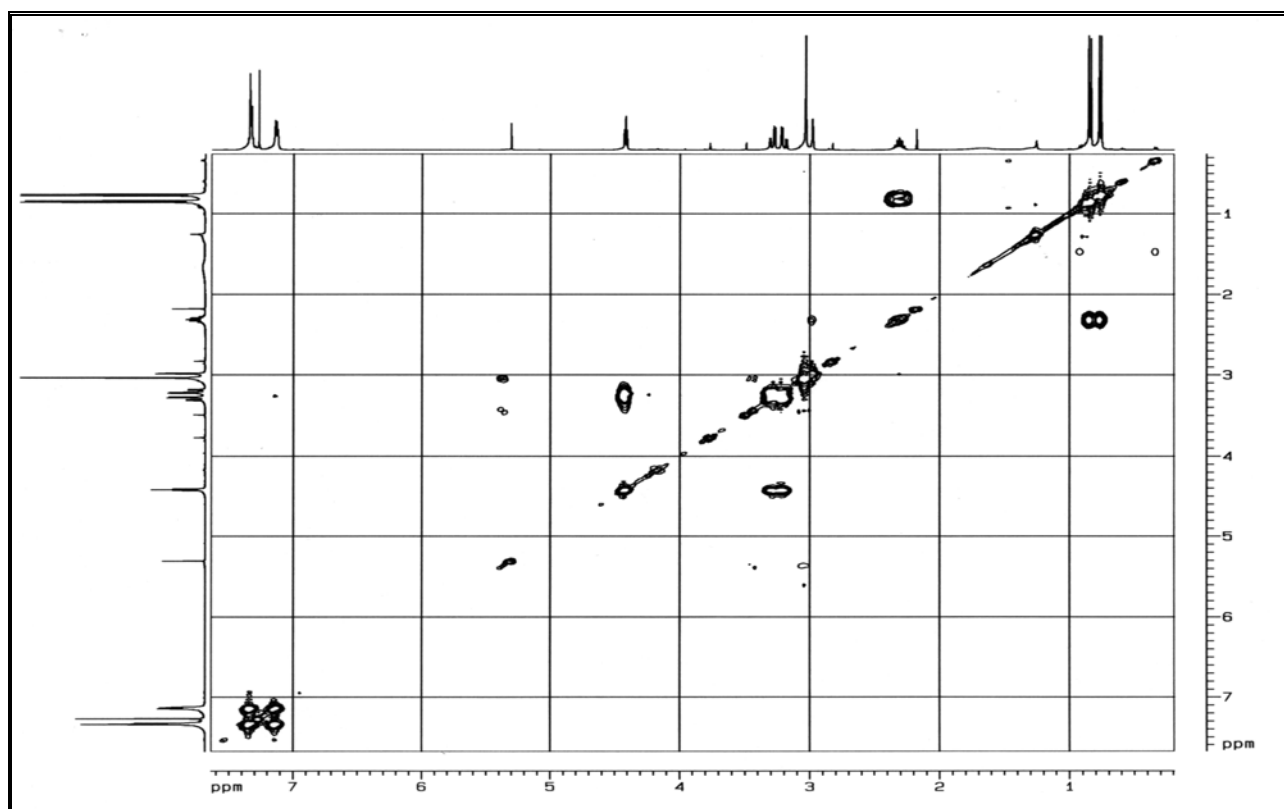


APÊNDICE 1.2.2– Espectro de absorção no IV de **FM-2** (KBr, pastilha).

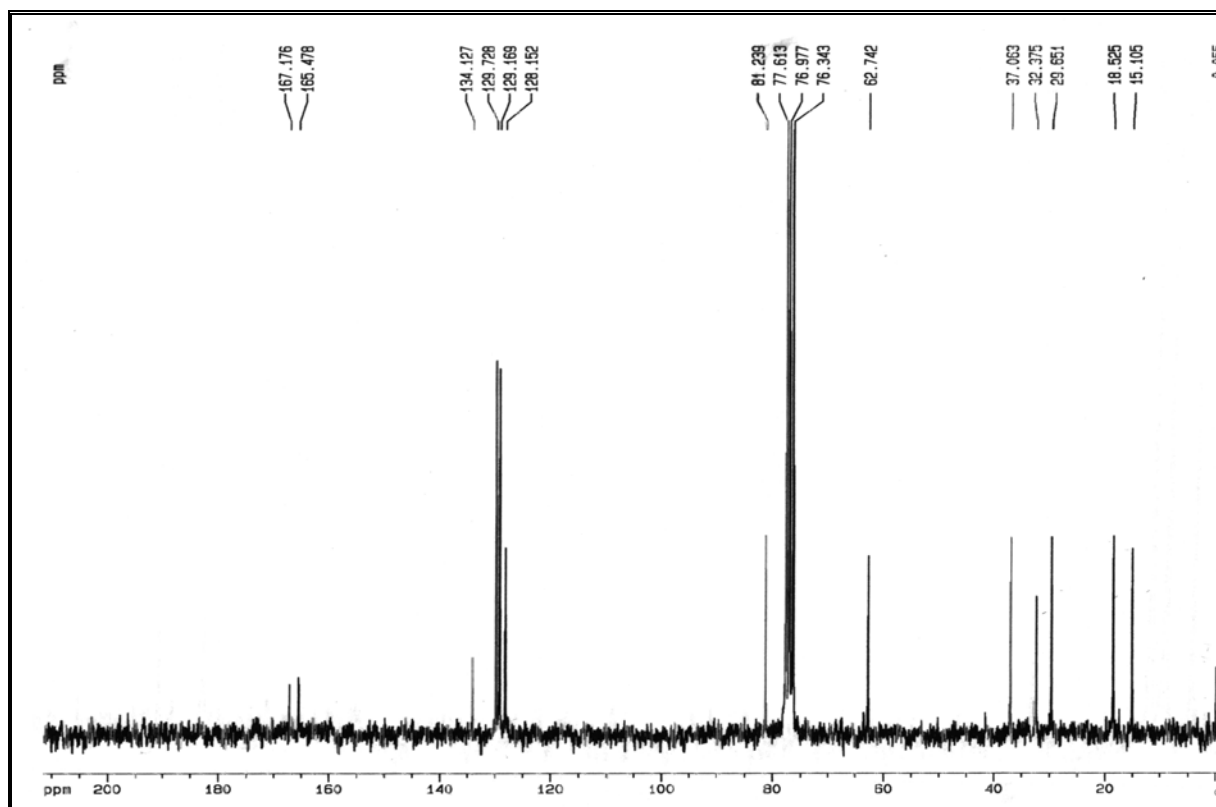
Apêndice 01: Espectros das Substâncias Isoladas de *Fusarium moniliforme*



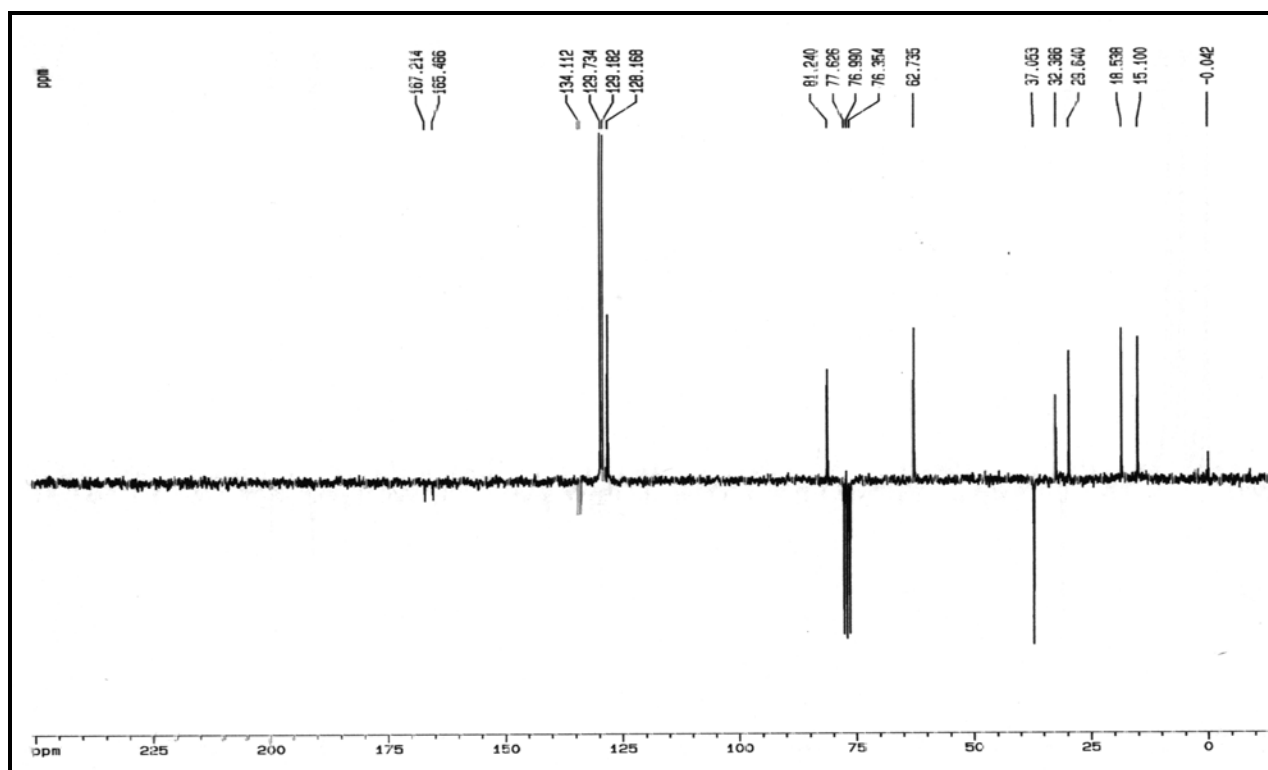
APÊNDICE 1.2.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **FM-2** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



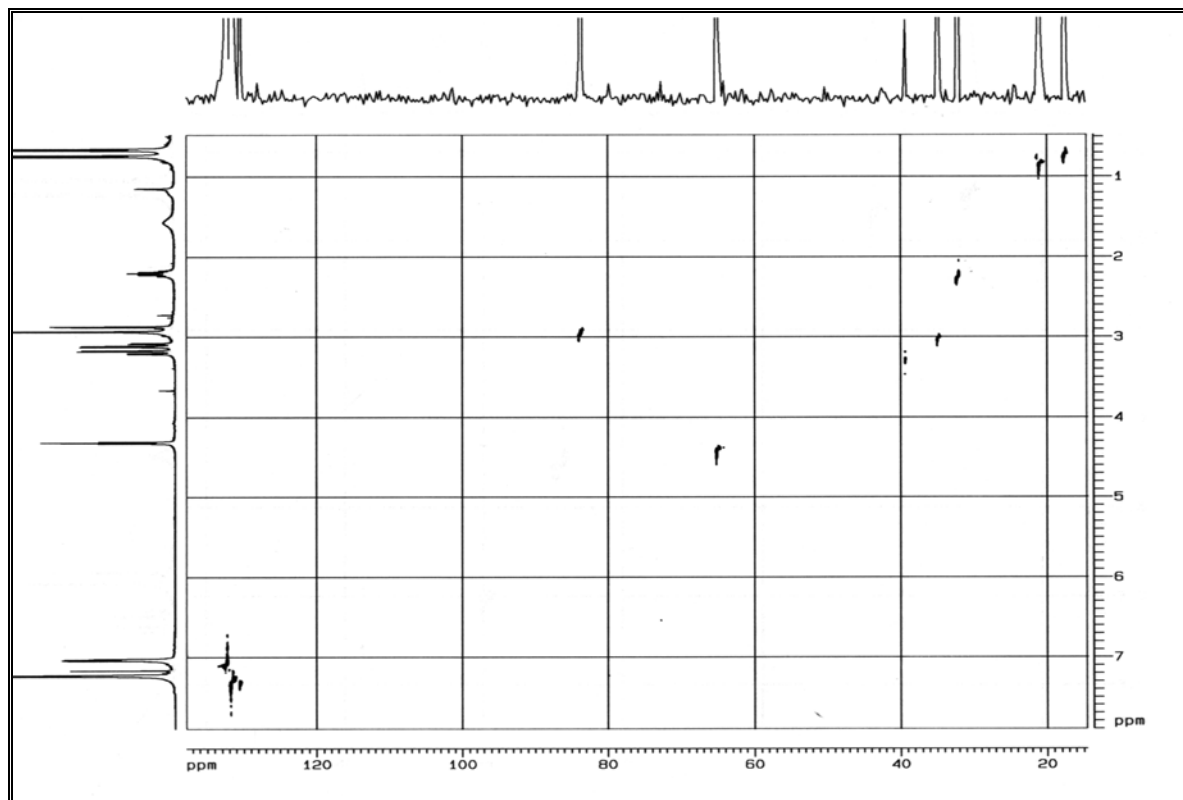
APÊNDICE 1.2.4– Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **FM-2** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



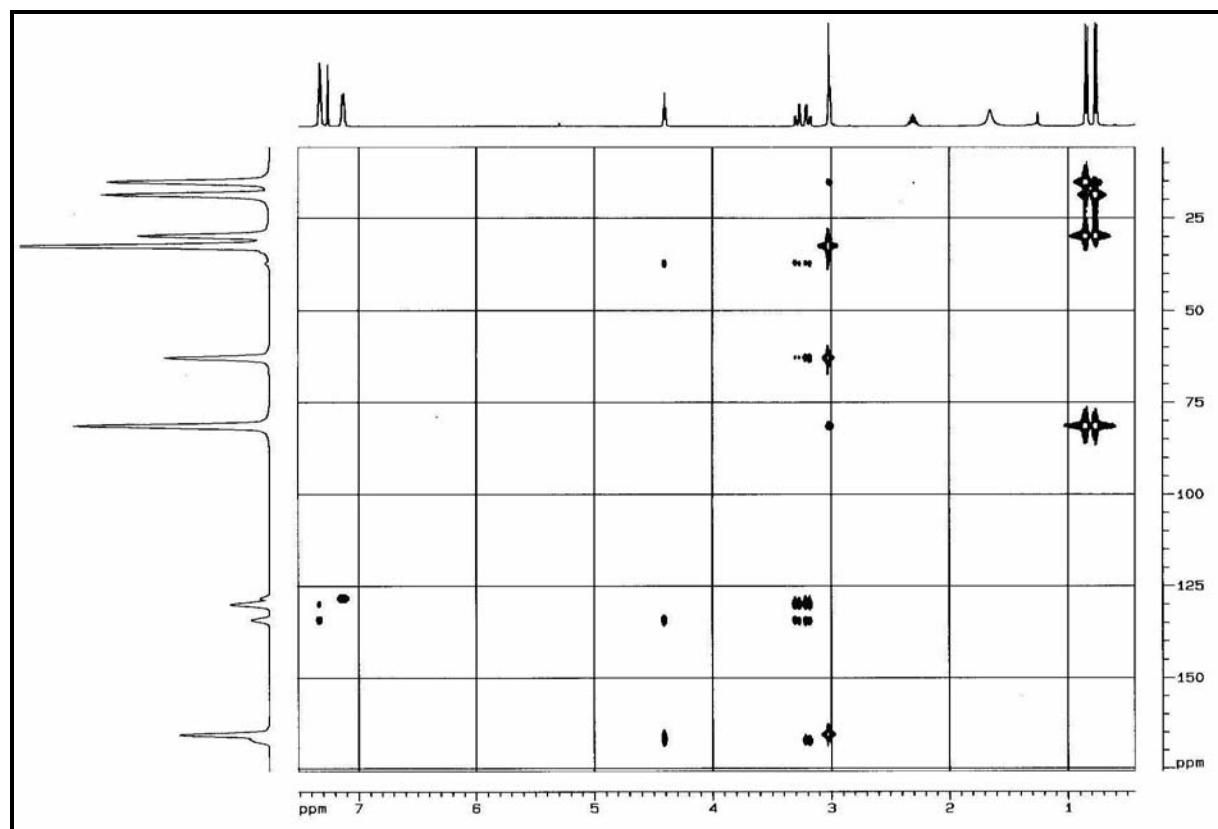
APÊNDICE 1.2.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de FM-2 (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



APÊNDICE 1.2.6 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C - DEPT de FM-2 (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

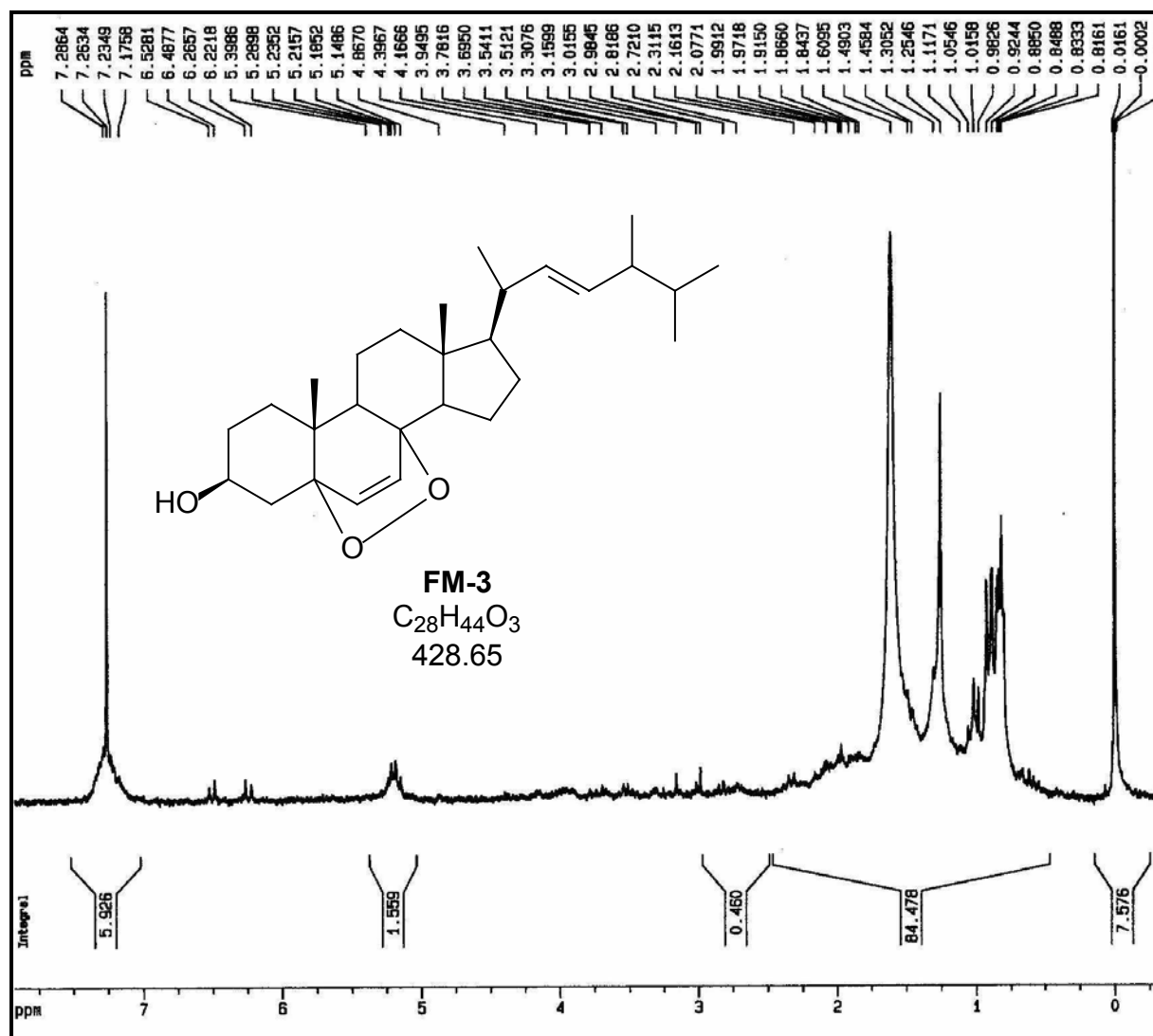


APÊNDICE 1.2.7– Espectro de HETCOR de FM-2 (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



APÊNDICE 1.2.8 – Espectro de HMBC de FM-2 (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

### 1.3. Peróxido de Ergosterol

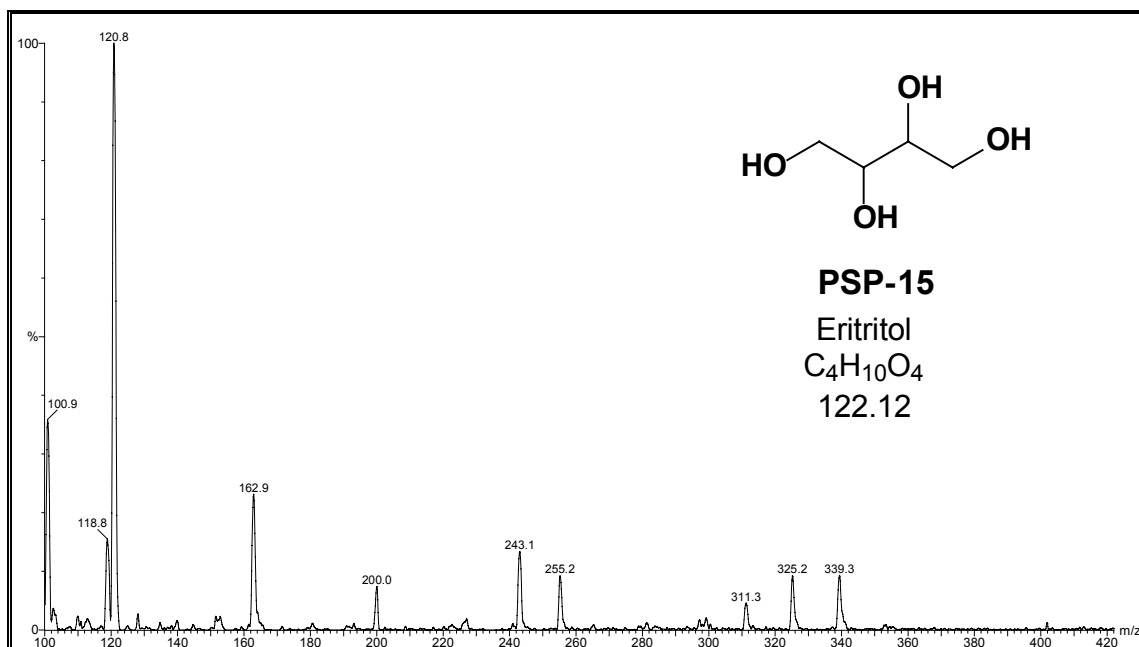


APÊNDICE 1.3.1– Espectro de RMN <sup>1</sup>H de FM-3 (200 MHz, Clorofórmio-*d*).

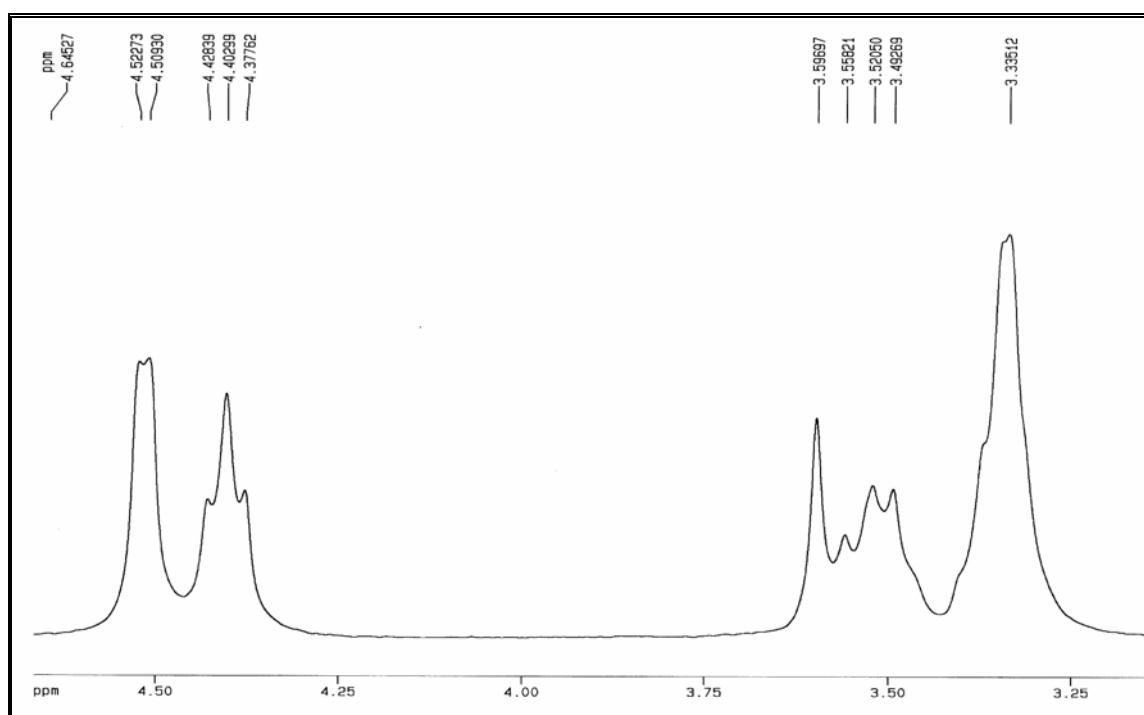


## APÊNDICE 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

### 2.1. PSP-15

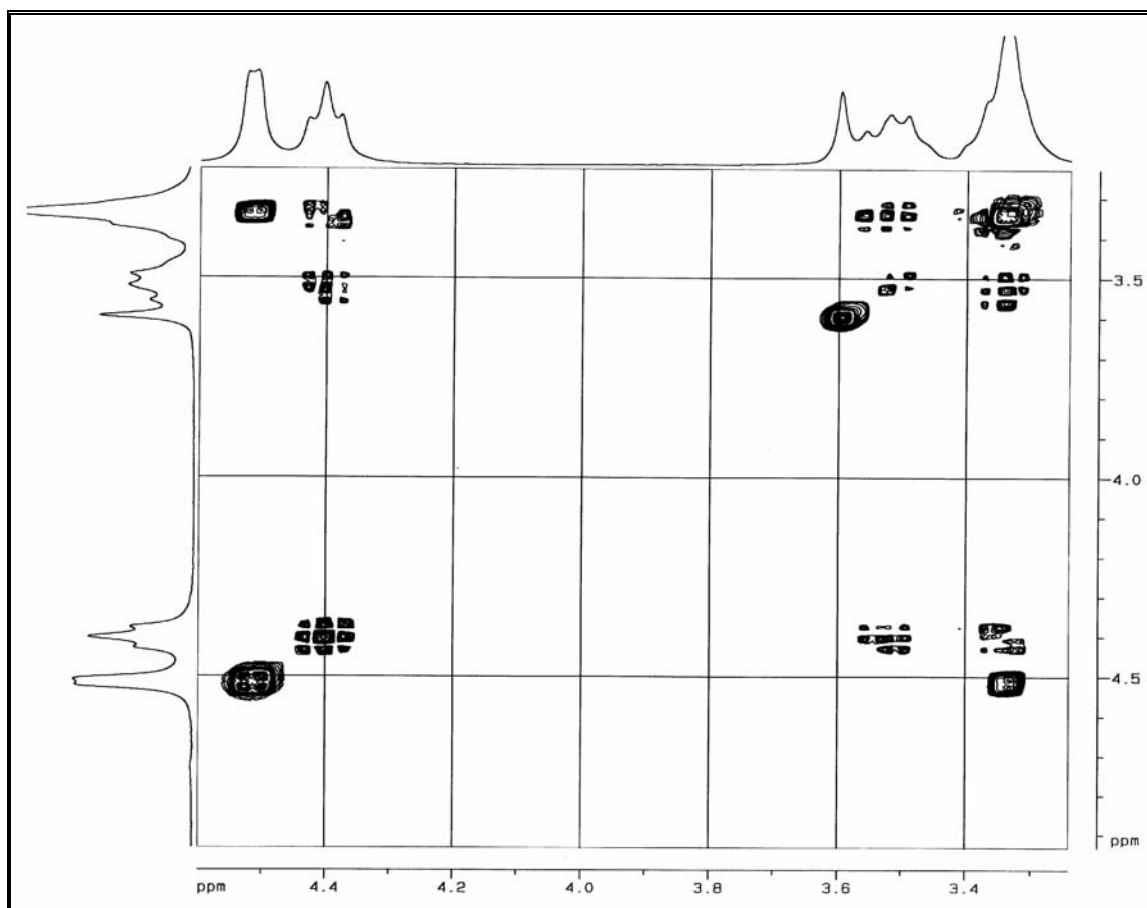


Apêndice 2.1.1 – Espectro de massas de **PSP-15**, obtido via MS-MS, modo negativo, *full scan*.

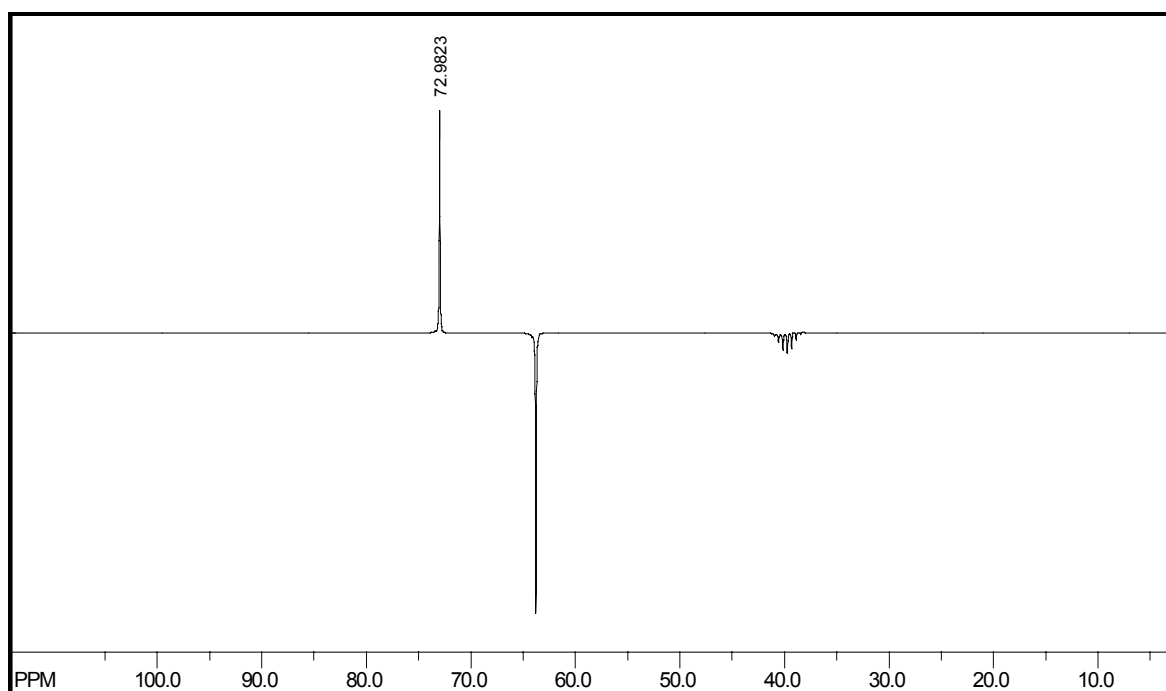


Apêndice 2.1.2 – Espectro de RMN  $^1H$  de **PSP-15** (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium sp*

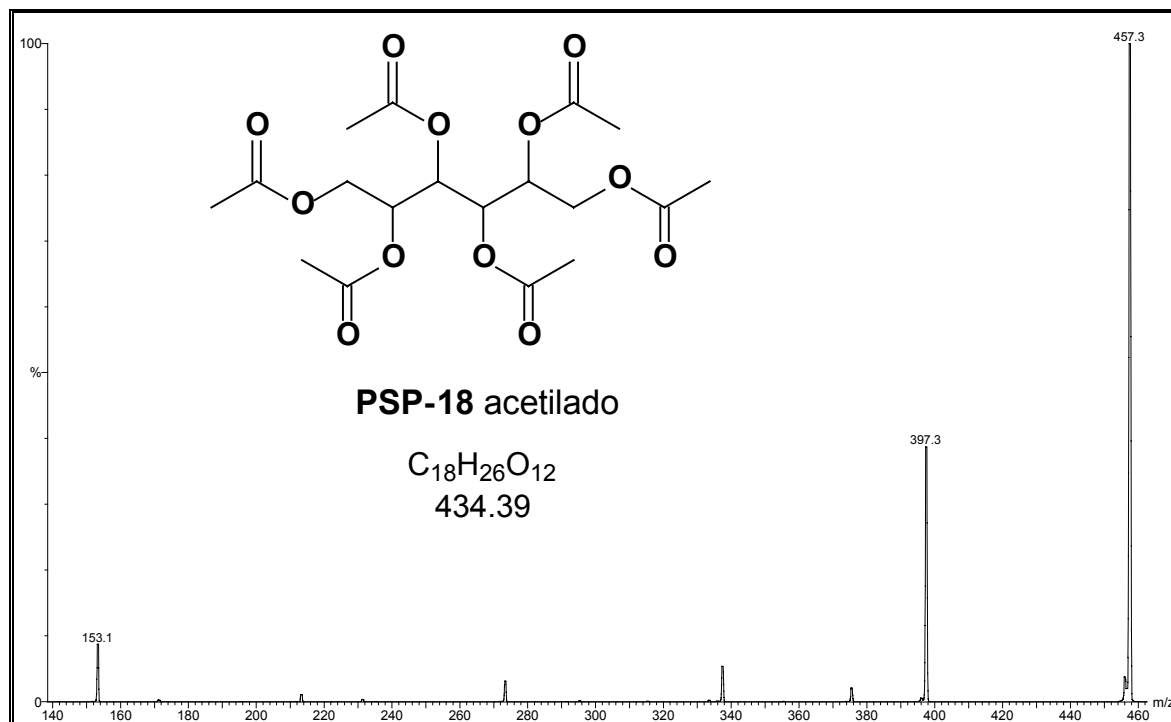


Apêndice 2.1.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-15** (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

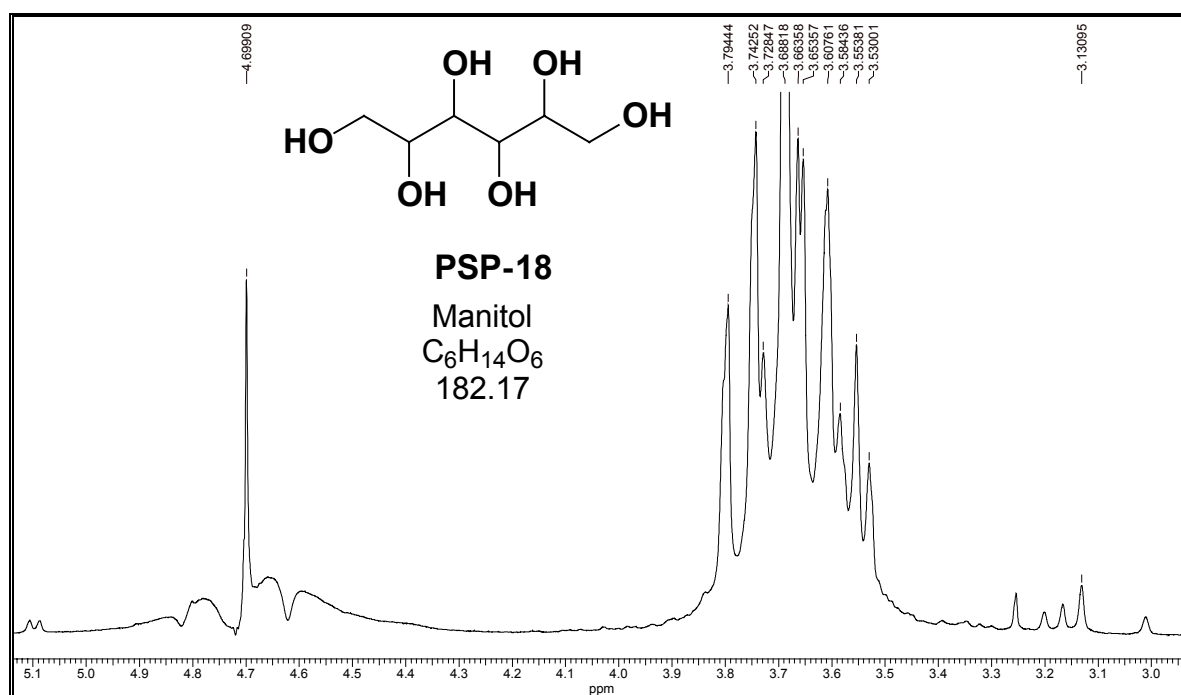


Apêndice 2.1.4 – Espectro de PENDANT de **PSP-15** (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

## 2.2. PSP-18

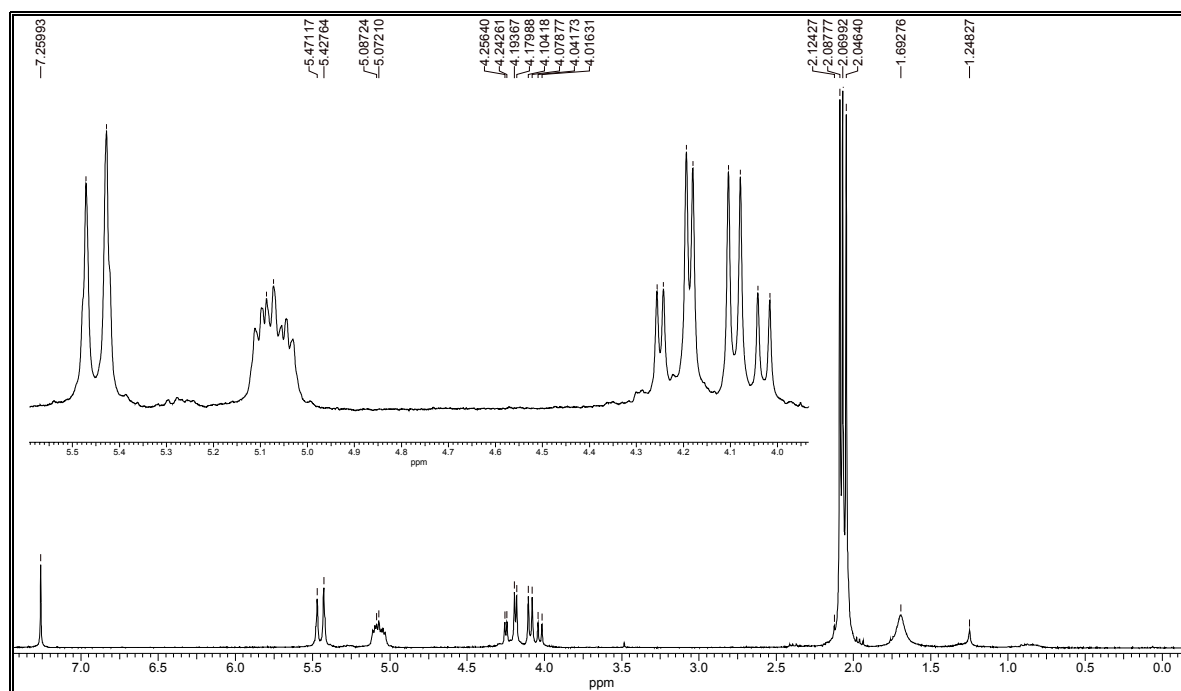


Apêndice 2.2.1 – Espectro de massas de **PSP-18**, obtido via MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

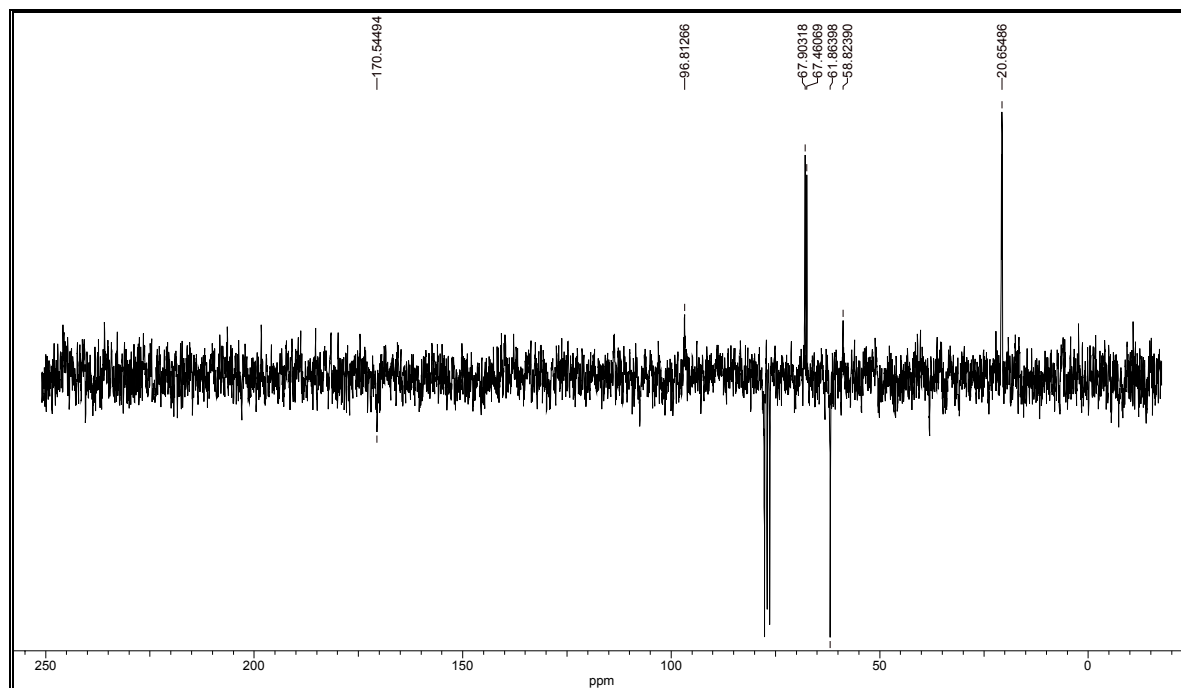


Apêndice 2.2.2 – Espectro de RMN  $^1H$  de **PSP-18** (200 MHz,  $D_2O$ ).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

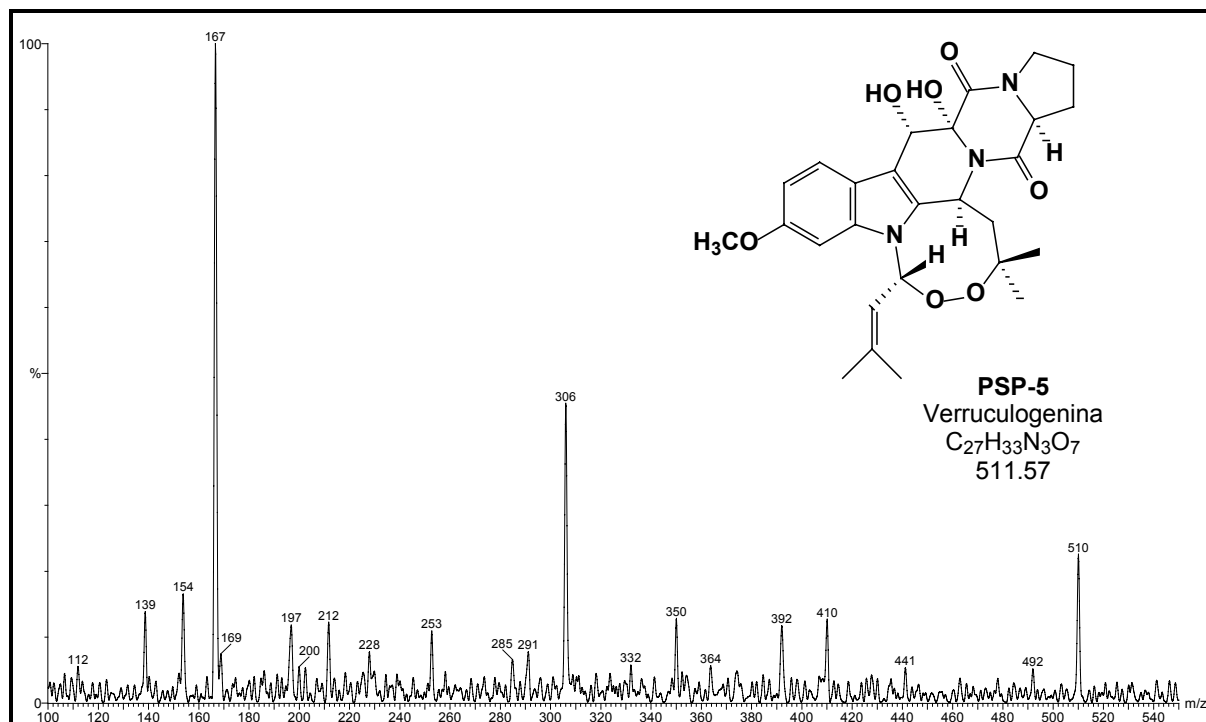


Apêndice 2.2.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-18** acetilado (200 MHz, Clorofórmio-*d*).

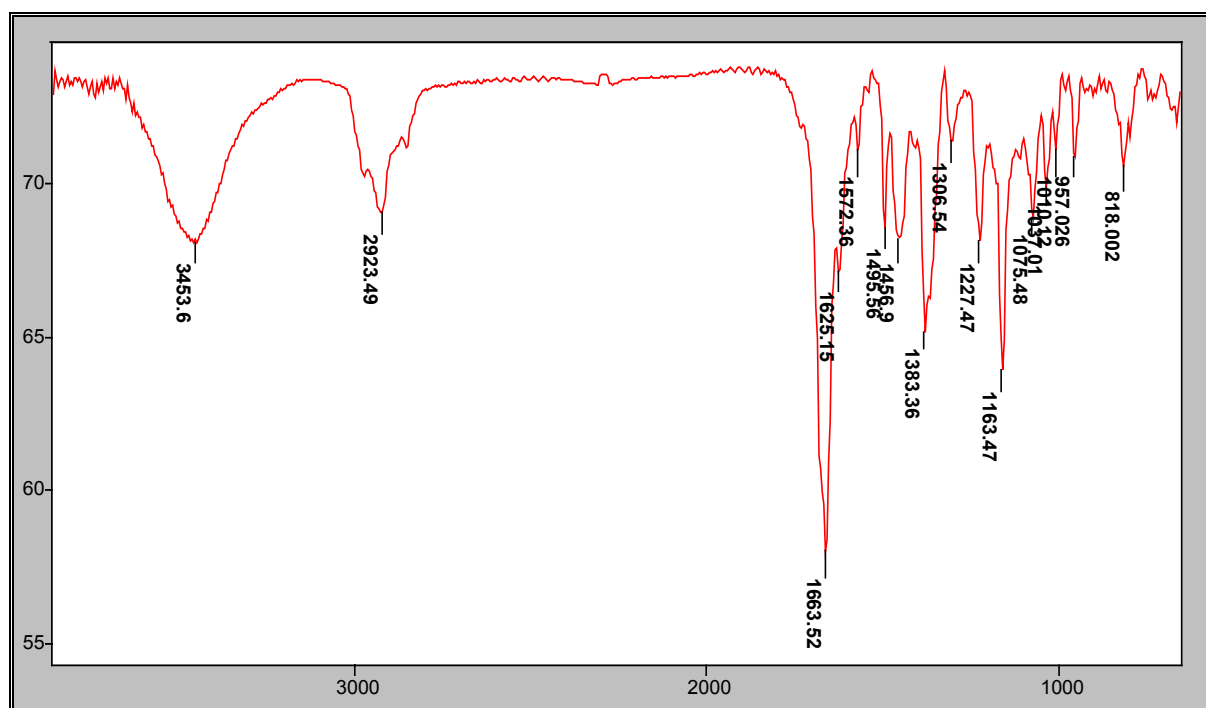


Apêndice 2.2.4 – Espectro de PENDANT de **PSP-18** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

### 2.3. PSP-5

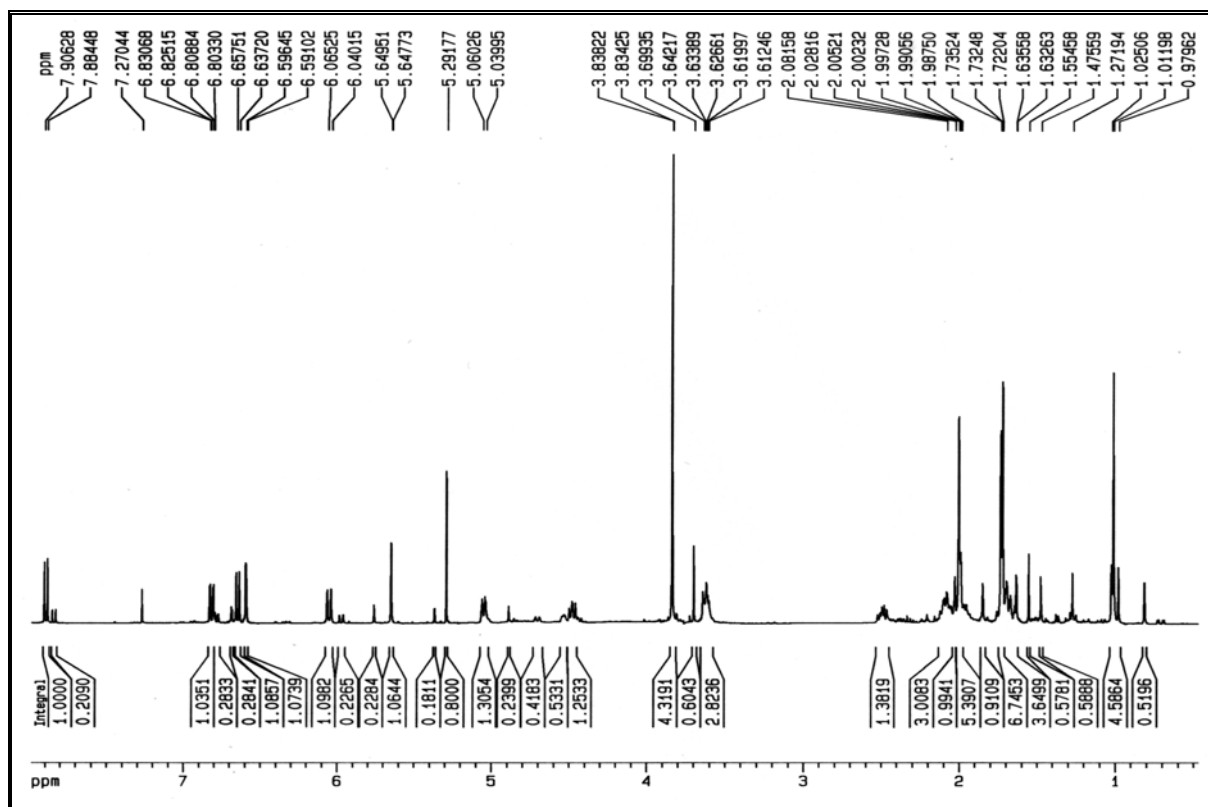


Apêndice 2.3.1 – Espectro de massas de **PSP-5**, obtido via ESI/MS-MS, modo negativo com energia de colisão de 25 eV.

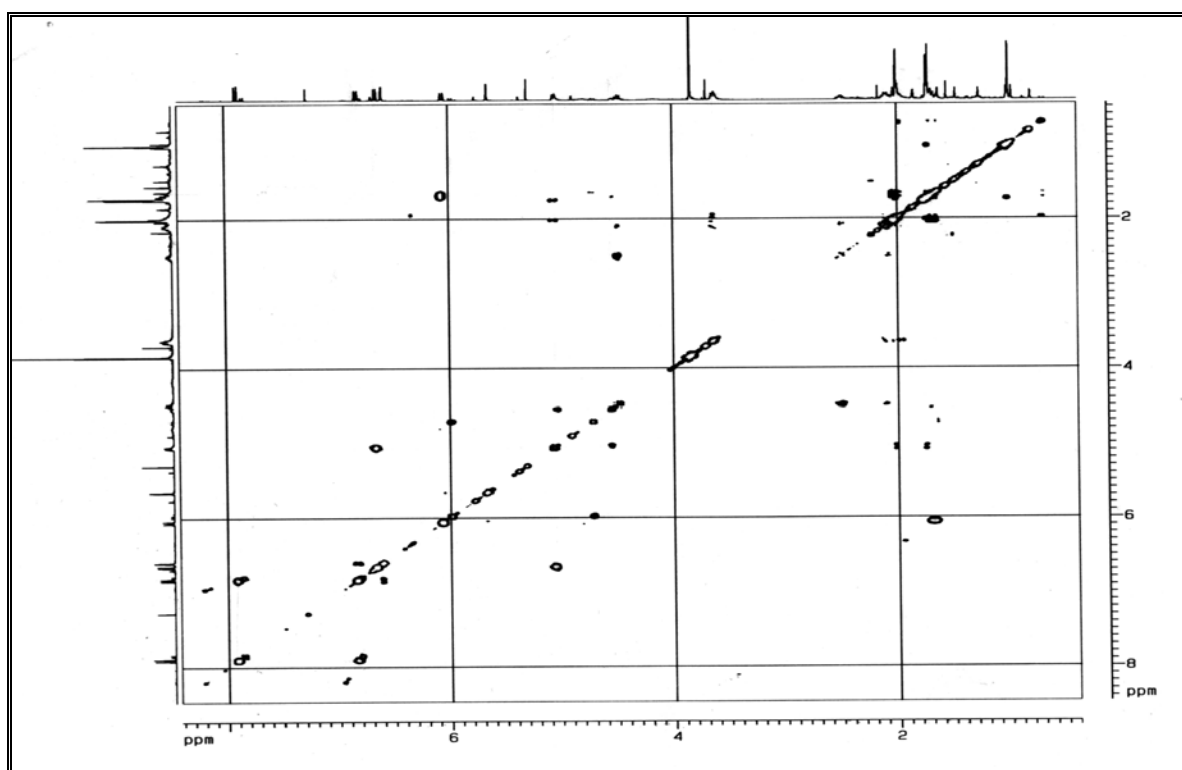


Apêndice 2.3.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-5** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

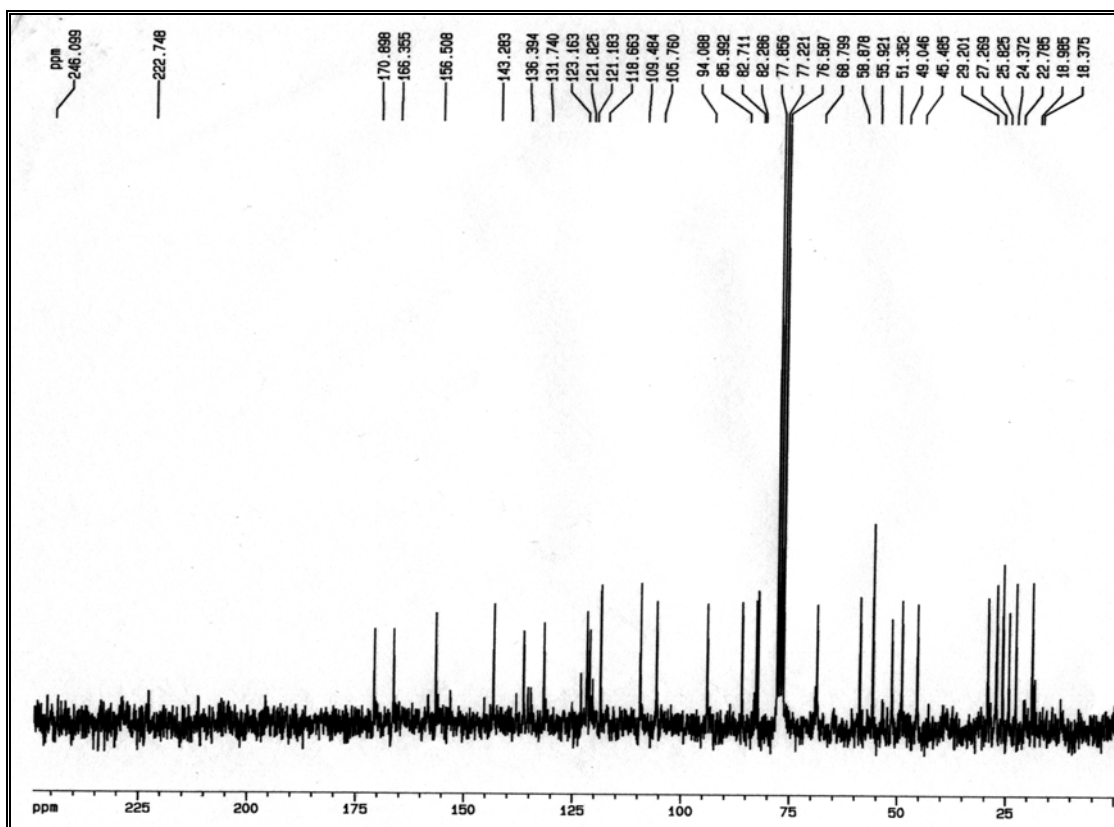


Apêndice 2.3.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-5** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

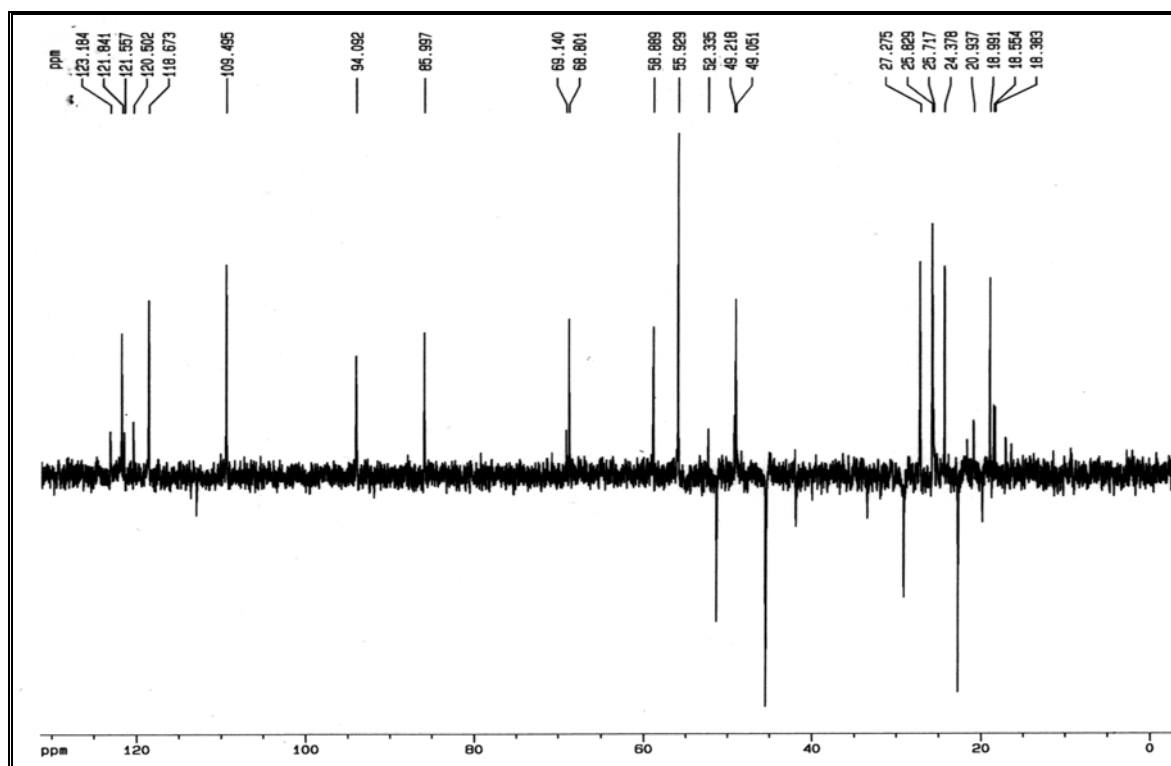


Apêndice 2.3.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-5** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

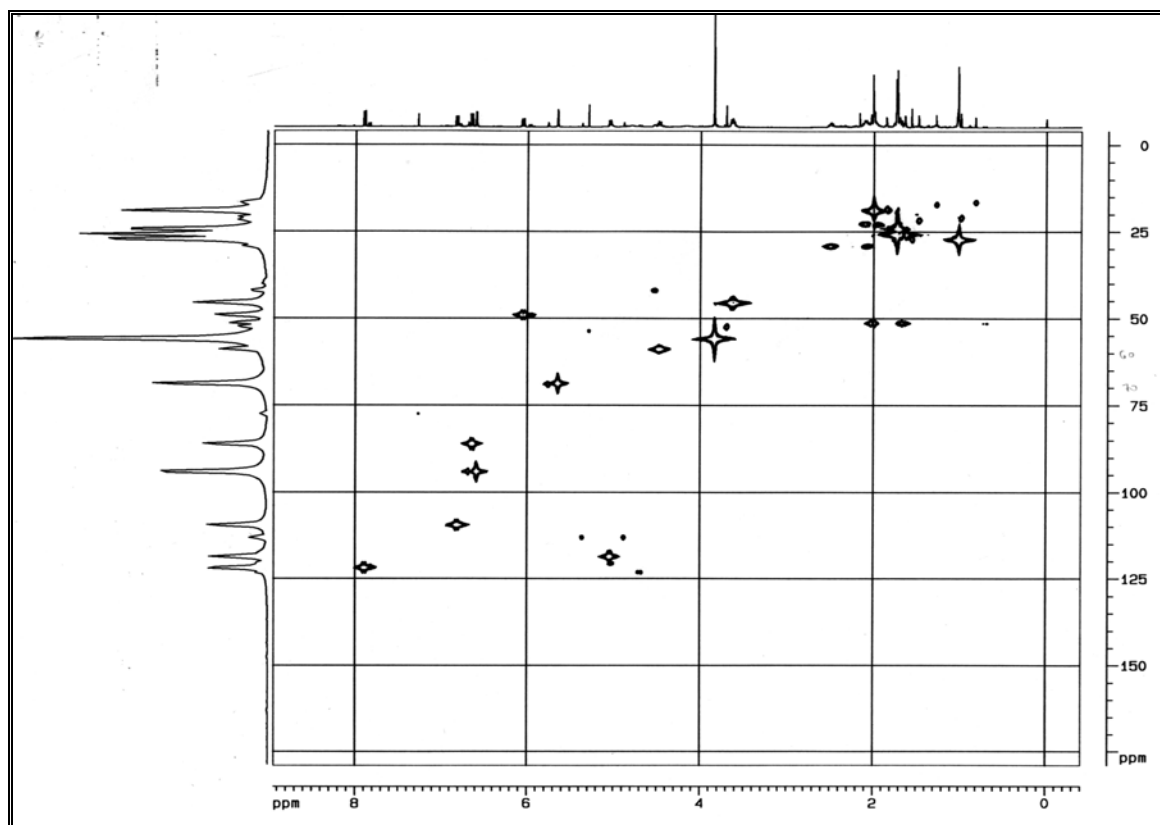
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



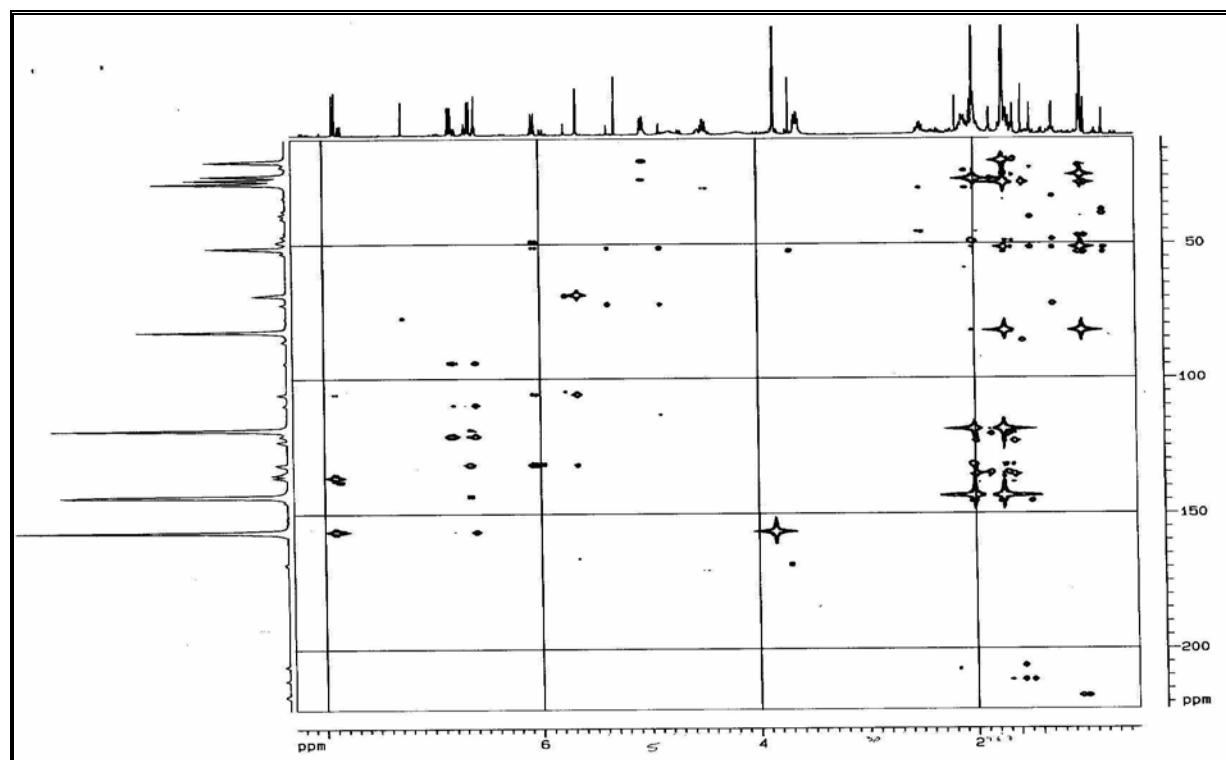
Apêndice 2.3.5 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **PSP-5** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



Apêndice 2.3.6 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT de **PSP-5** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

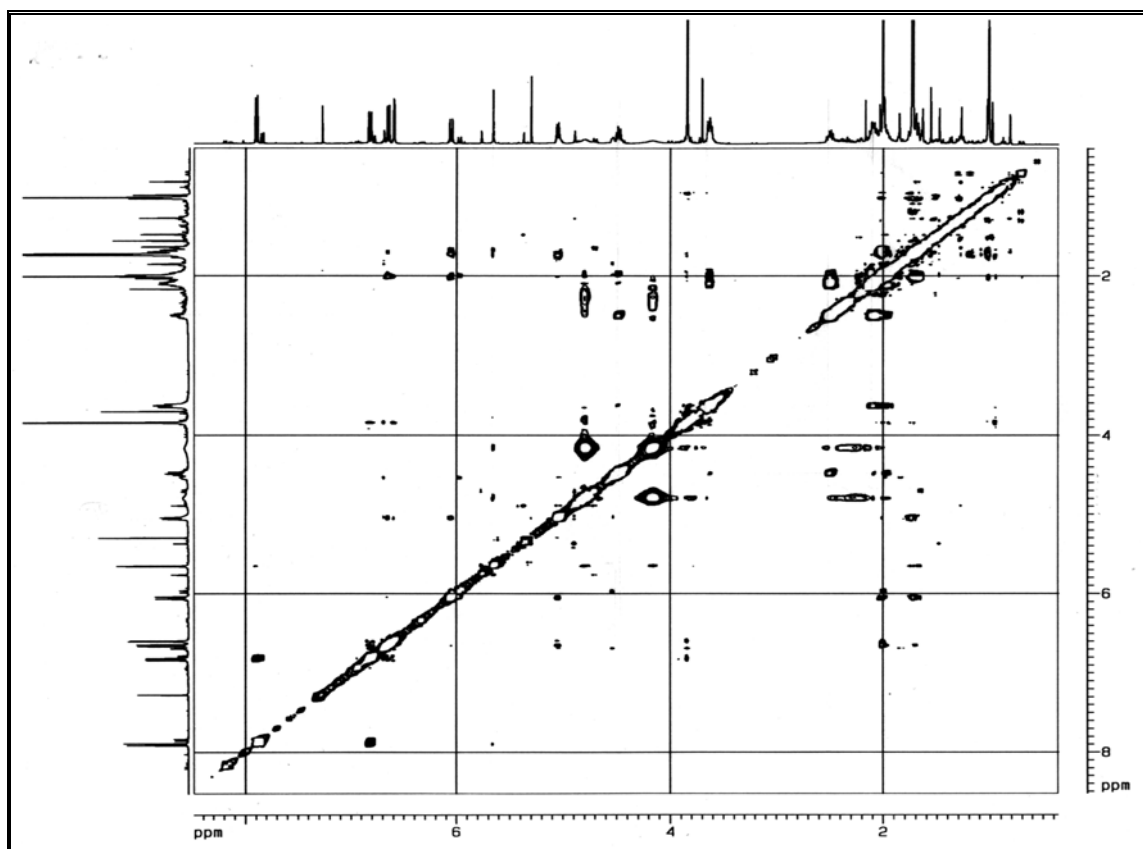


Apêndice 2.3.7 – Espectro de HSQC de **PSP-5** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



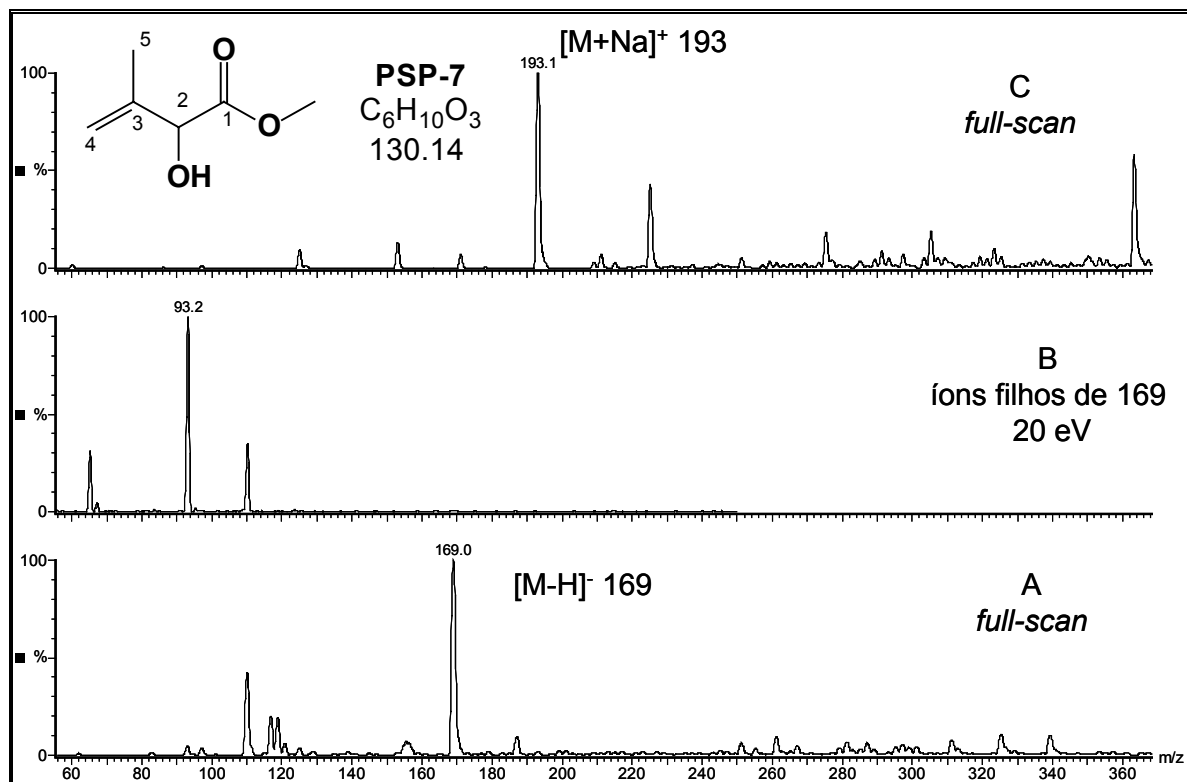
Apêndice 2.3.8 – Espectro de HMBC de **PSP-5** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



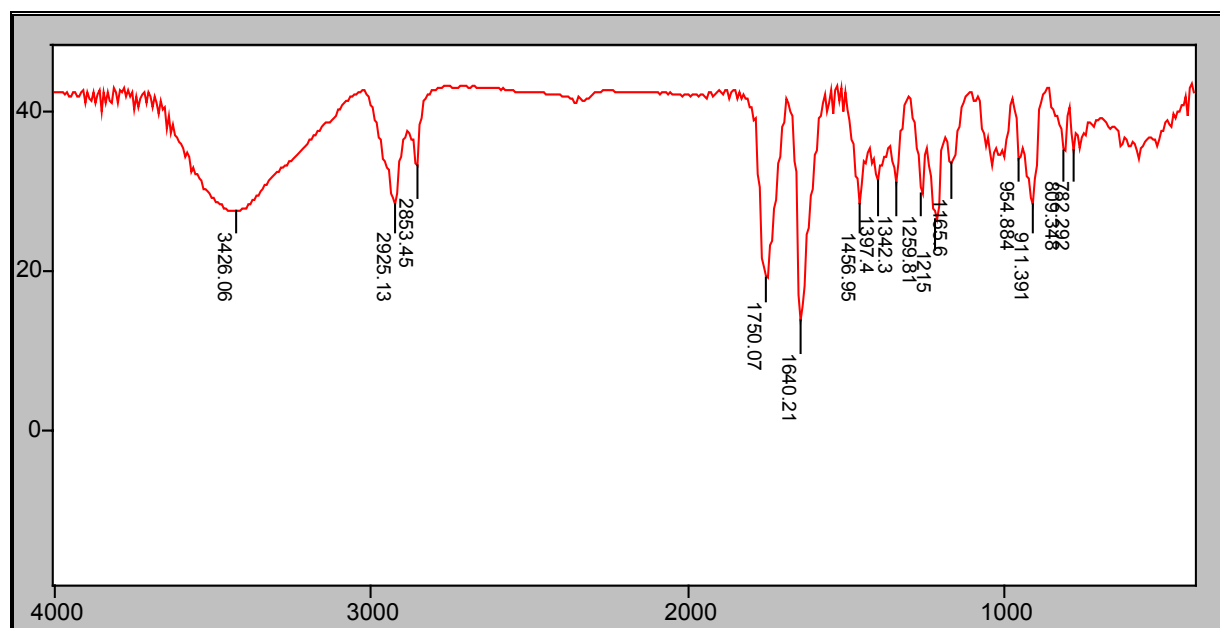


Apêndice 2.3.9 – Espectro de NOESY de **PSP-5** (400 MHz, Clorofórmio-*d*, Mixing time, D8, 750 ms).

## 2.4. PSP-7

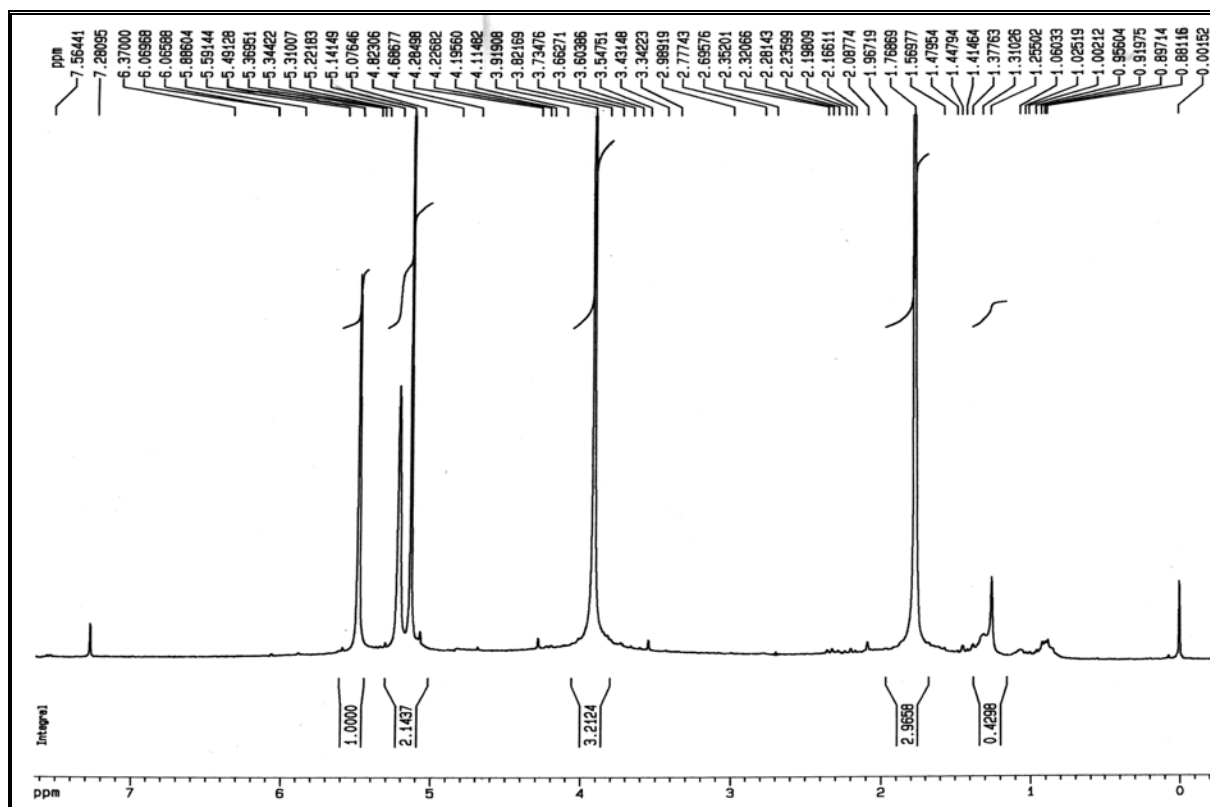


Apêndice 2.4.1 – Espectros de massas de **PSP-7**, obtido via *electrospray*. A) modo negativo, *full-scan*; B) modo negativo, íons filhos de 169 e C) modo positivo.

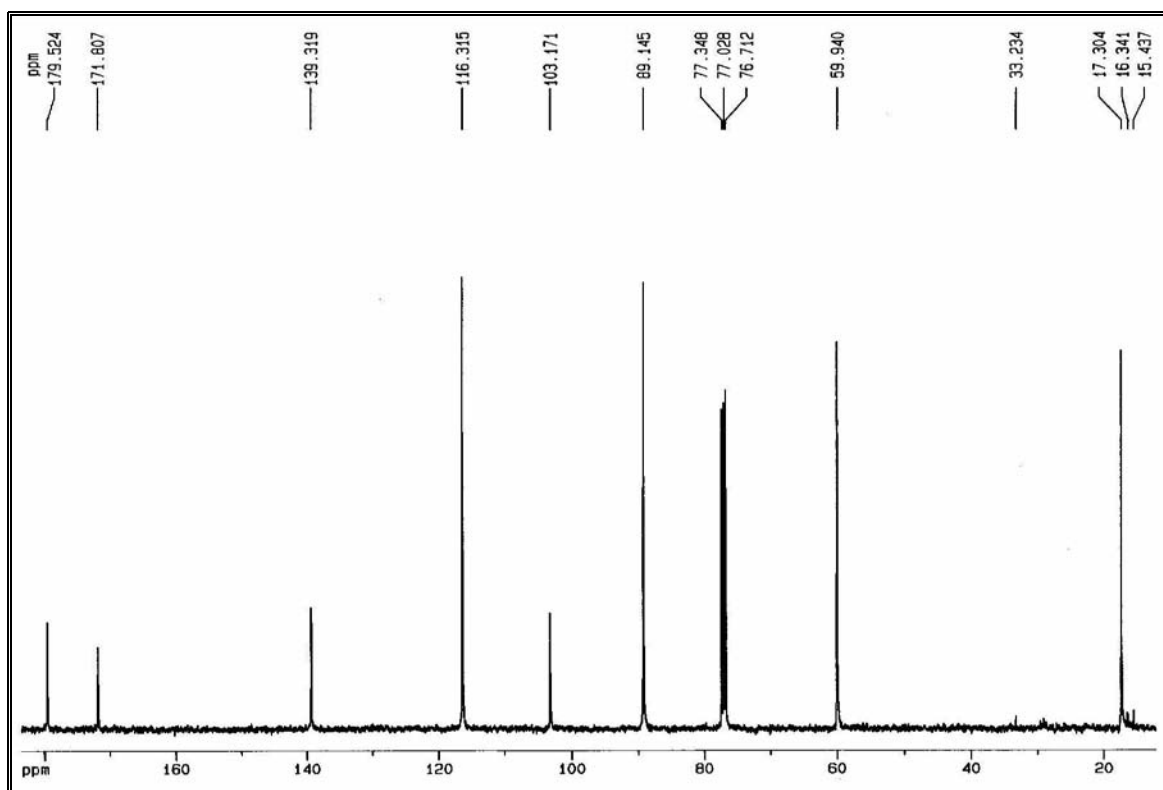


Apêndice 2.4.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-7** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

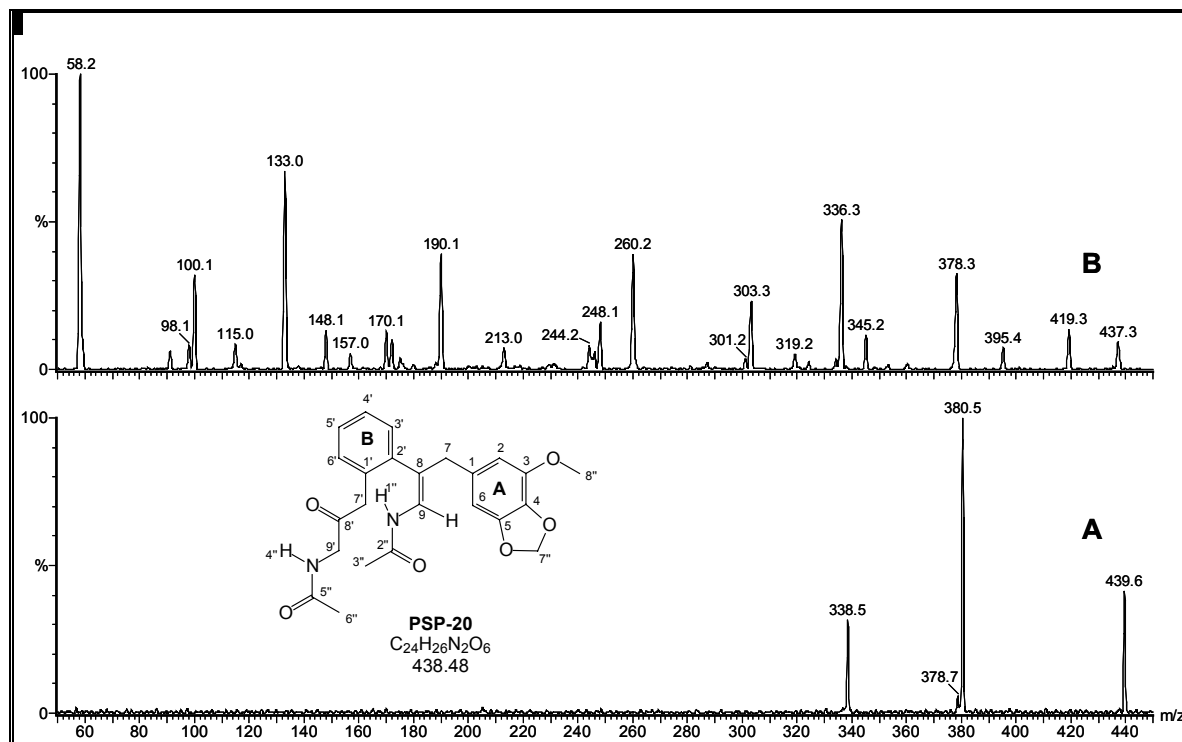


Apêndice 2.4.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-7** (200 MHz, Clorofórmio-*d*).

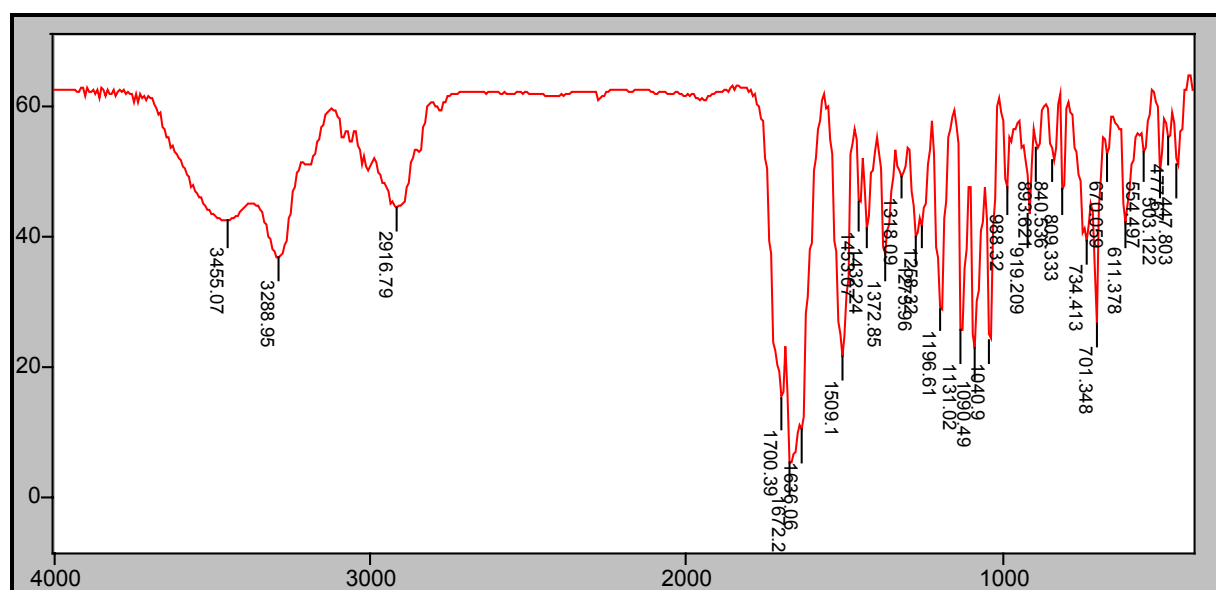


Apêndice 2.4.4 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C - PENDANT de **PSP-7** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

## 2.5. PSP-20

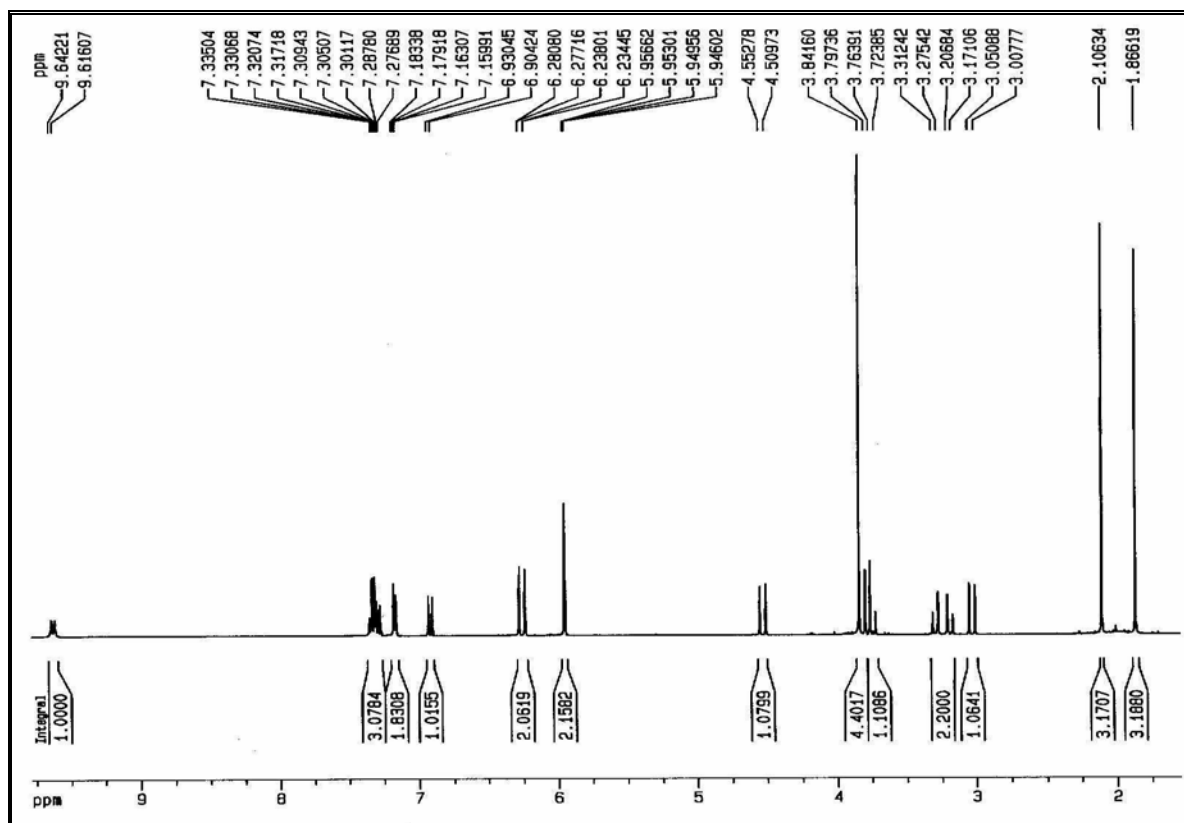


Apêndice 2.5.1 – Espectro de massas de **PSP-20**, obtido via ESI-MS-MS: A, modo positivo (10 eV); B, modo negativo (20 eV).

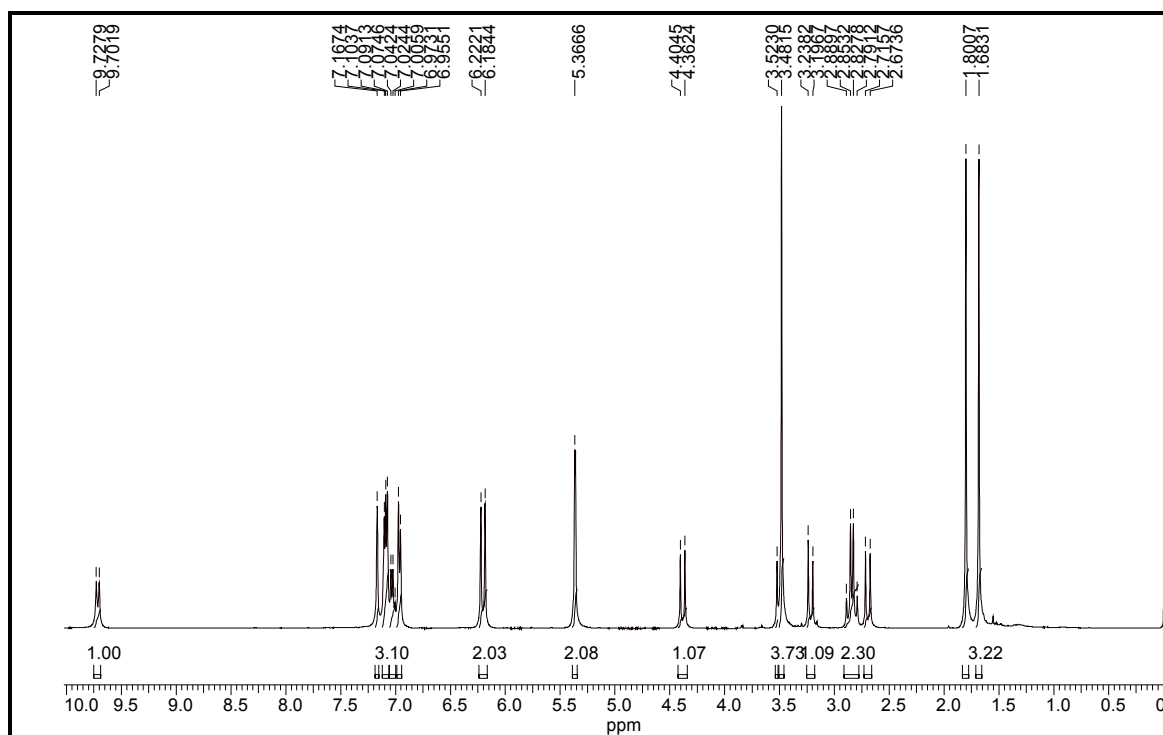


Apêndice 2.5.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-20** (KBr, pastilha).

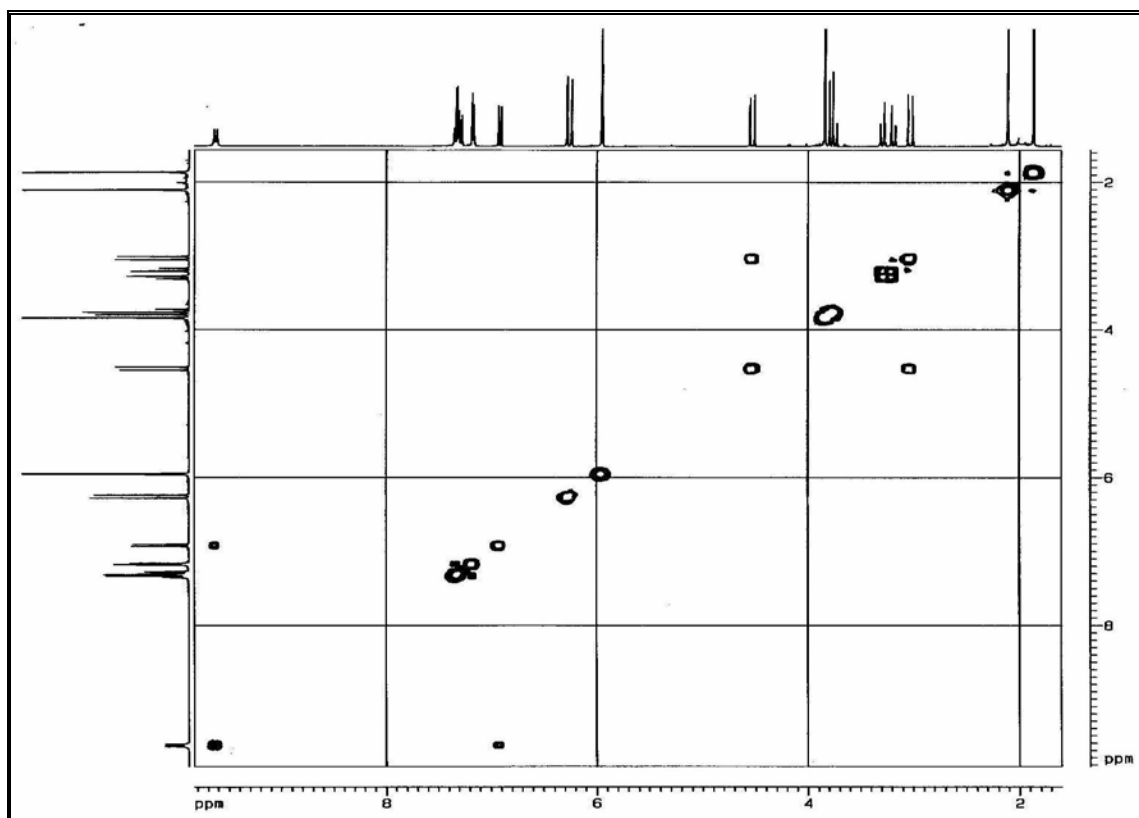
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



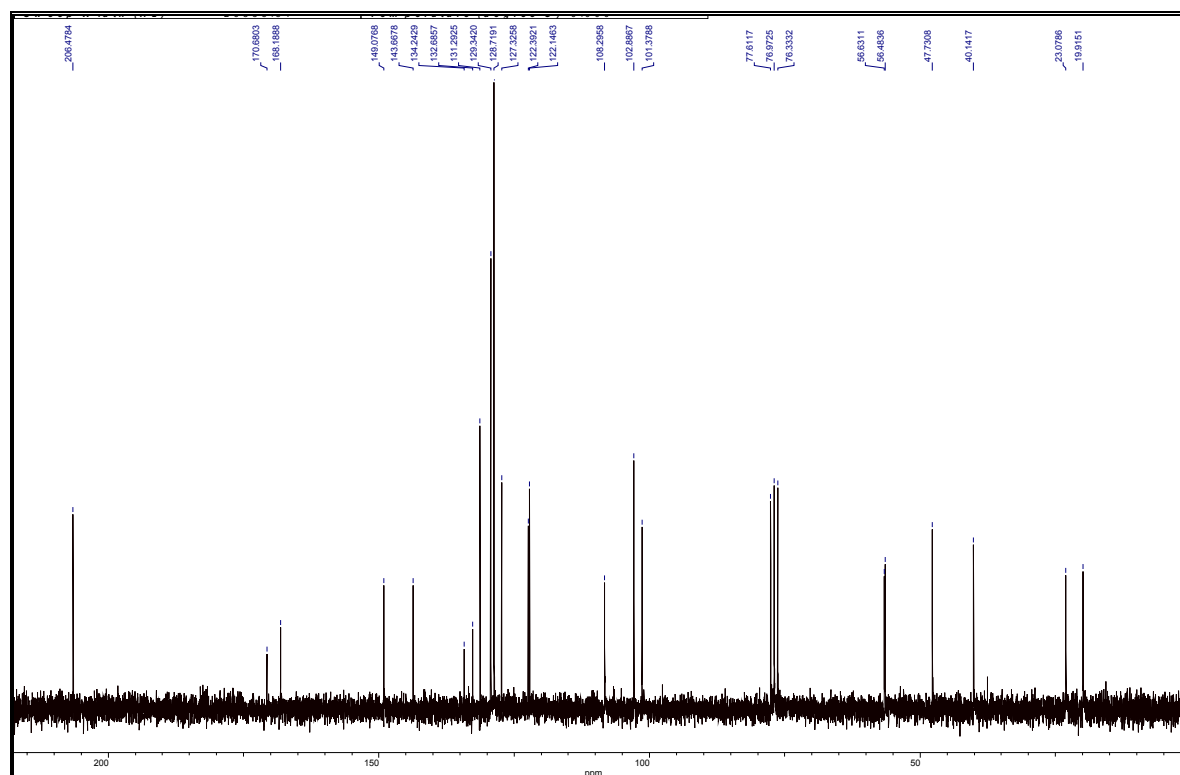
Apêndice 2.5.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-20** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



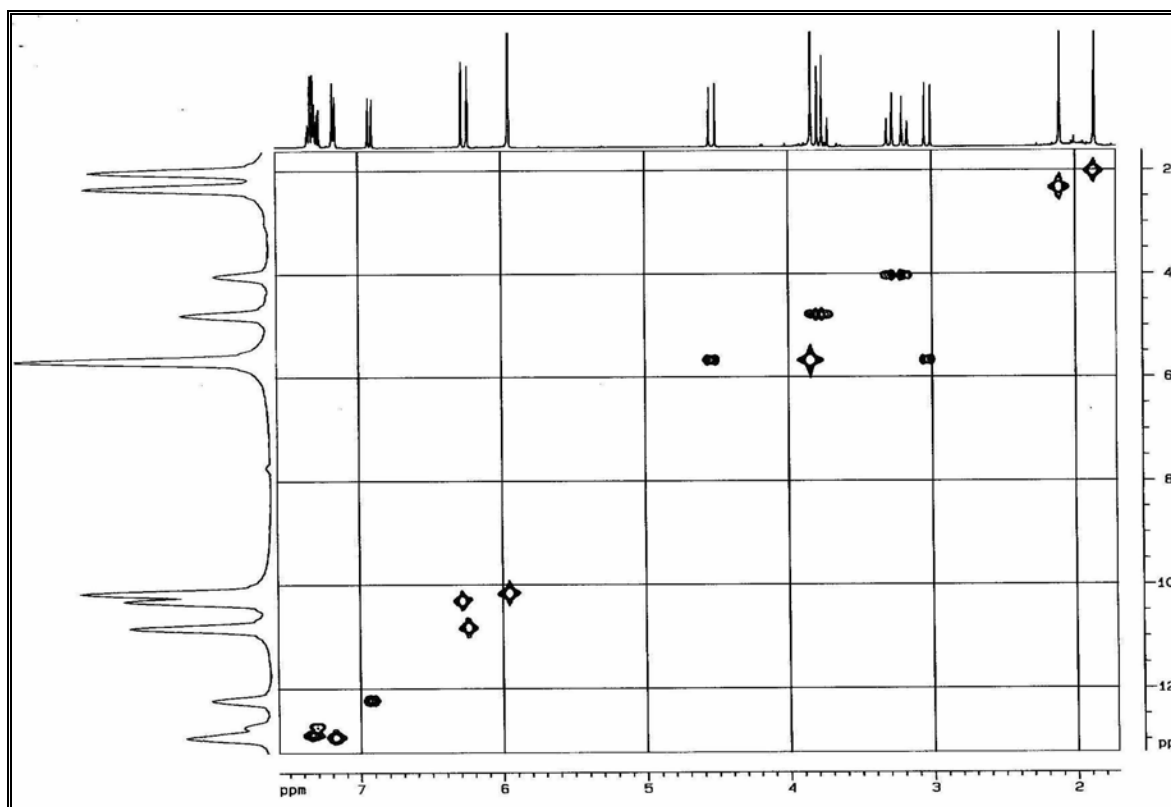
Apêndice 2.5.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-20** (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).



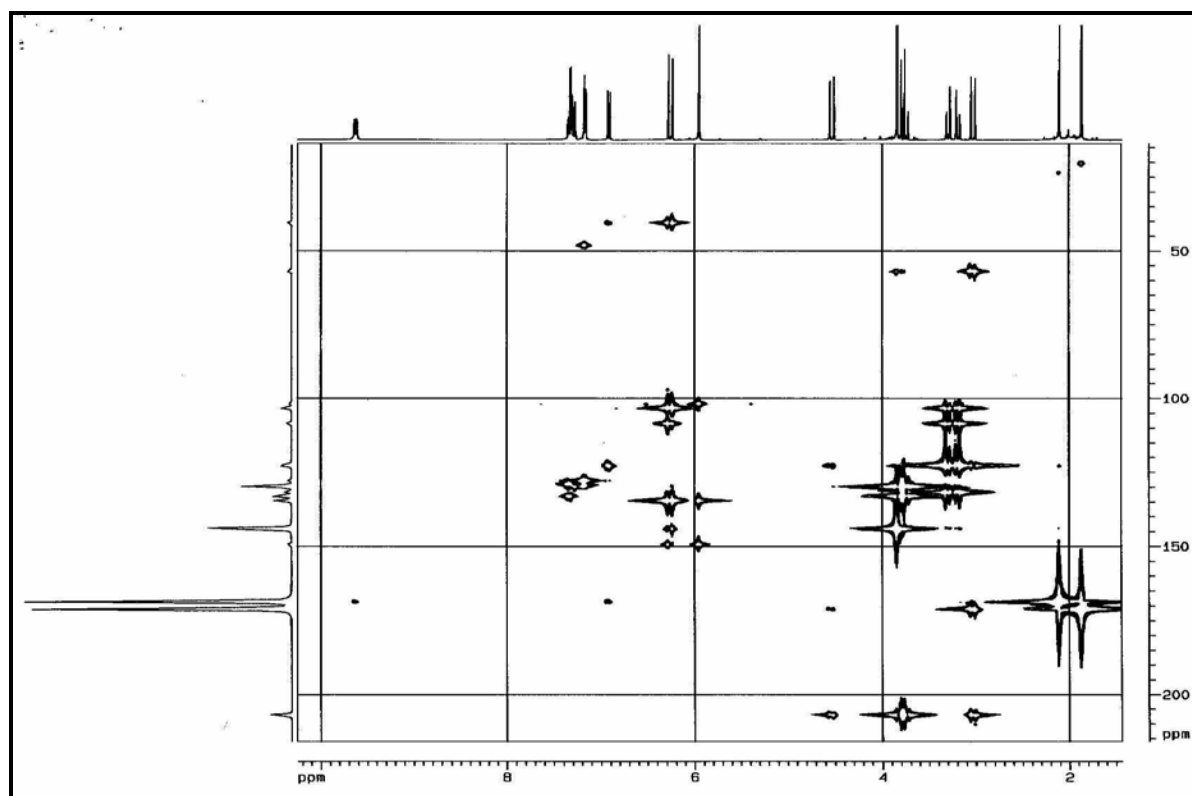
Apêndice 2.5.5 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  – COSY de **PSP-20** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



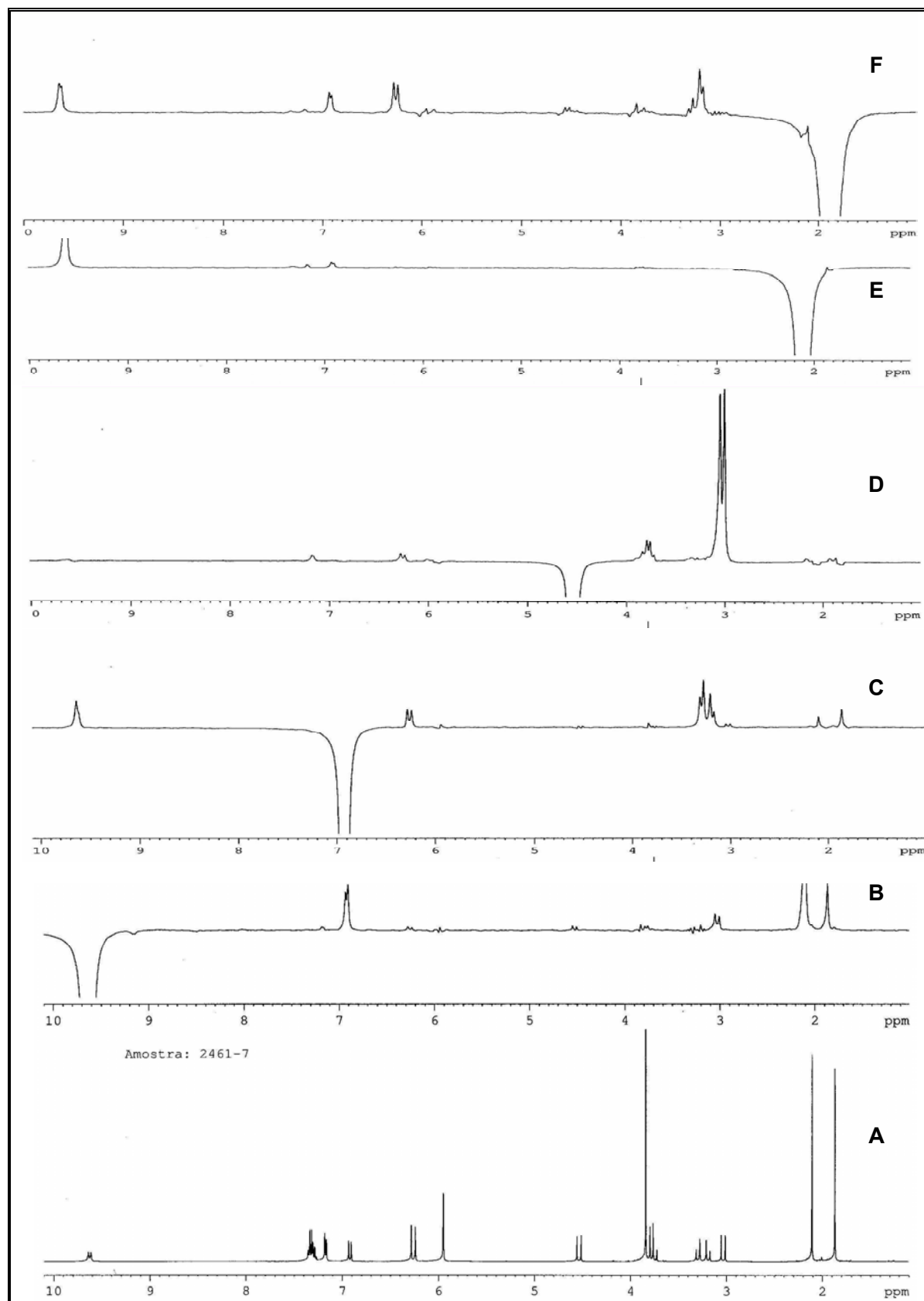
Apêndice 2.5.6 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **PSP-20** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



Apêndice 2.5.7 – Espectro de HSQC de **PSP-20** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

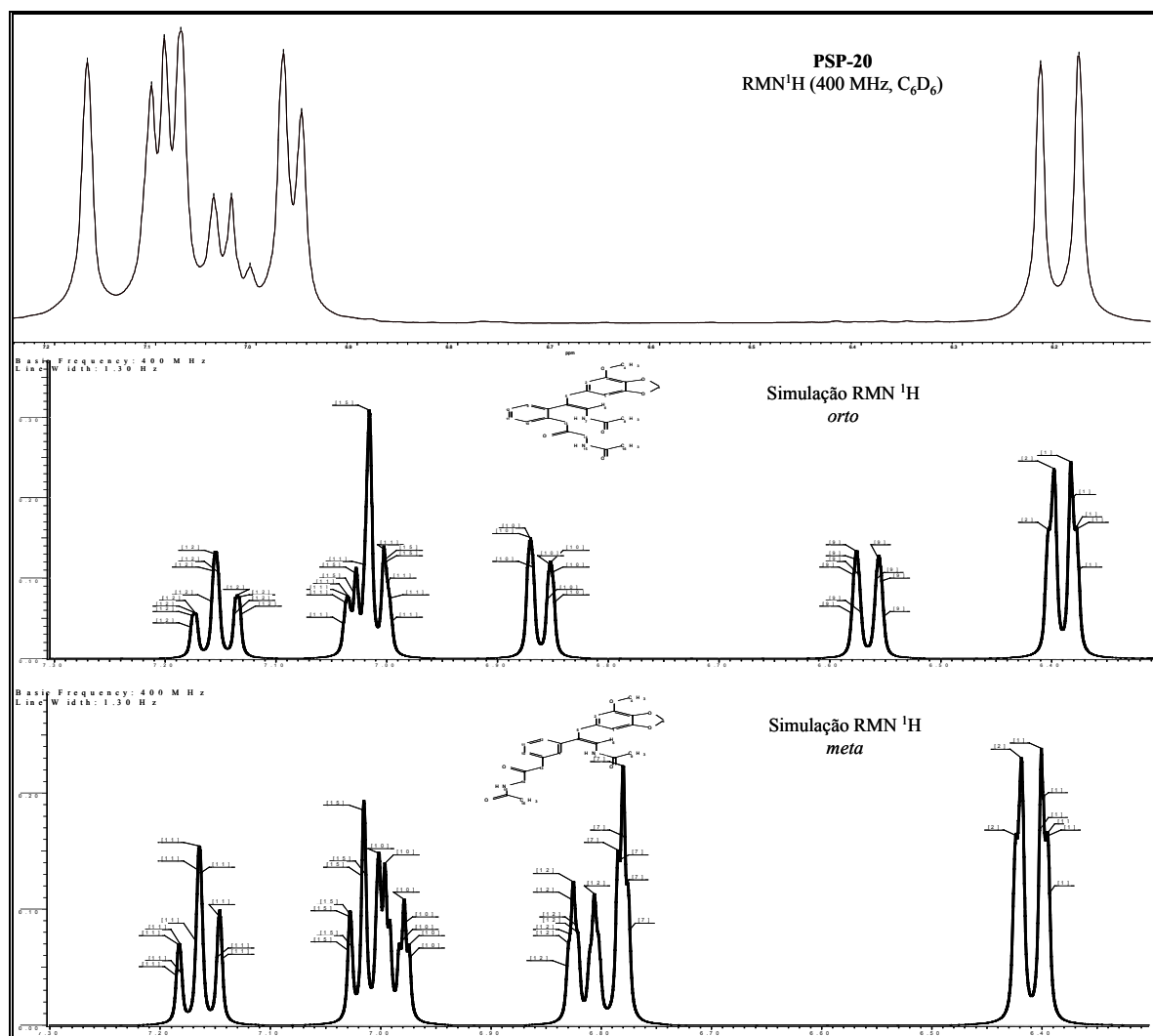


Apêndice 2.5.8 – Espectro de HMBC de **PSP-20** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



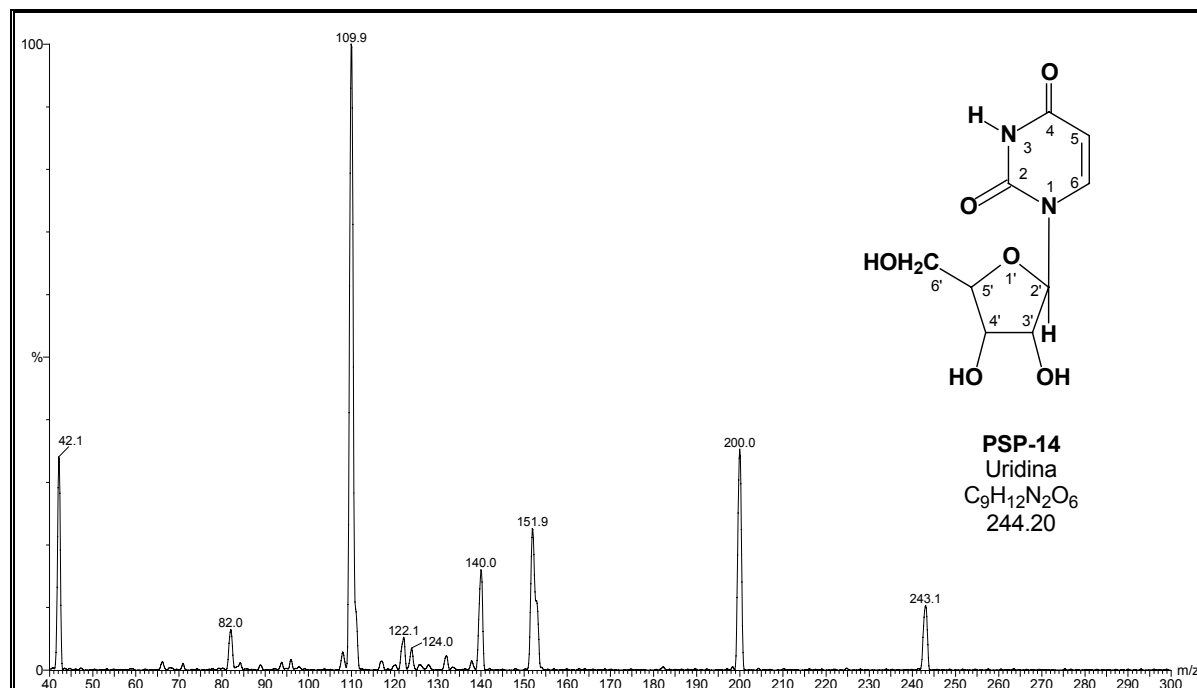
Apêndice 2.5.9 – Espectro de gNOESY de **PSP-20** (400 MHz, Clorofórmio-*d*). A: RMN  $^1\text{H}$ ; B: Irradiação do hidrogênio H-1'; C: Irradiação do hidrogênio H-9; D: Irradiação do hidrogênio H-9'b; E: Irradiação do hidrogênio H-3''; F: Irradiação do hidrogênio H-6''.



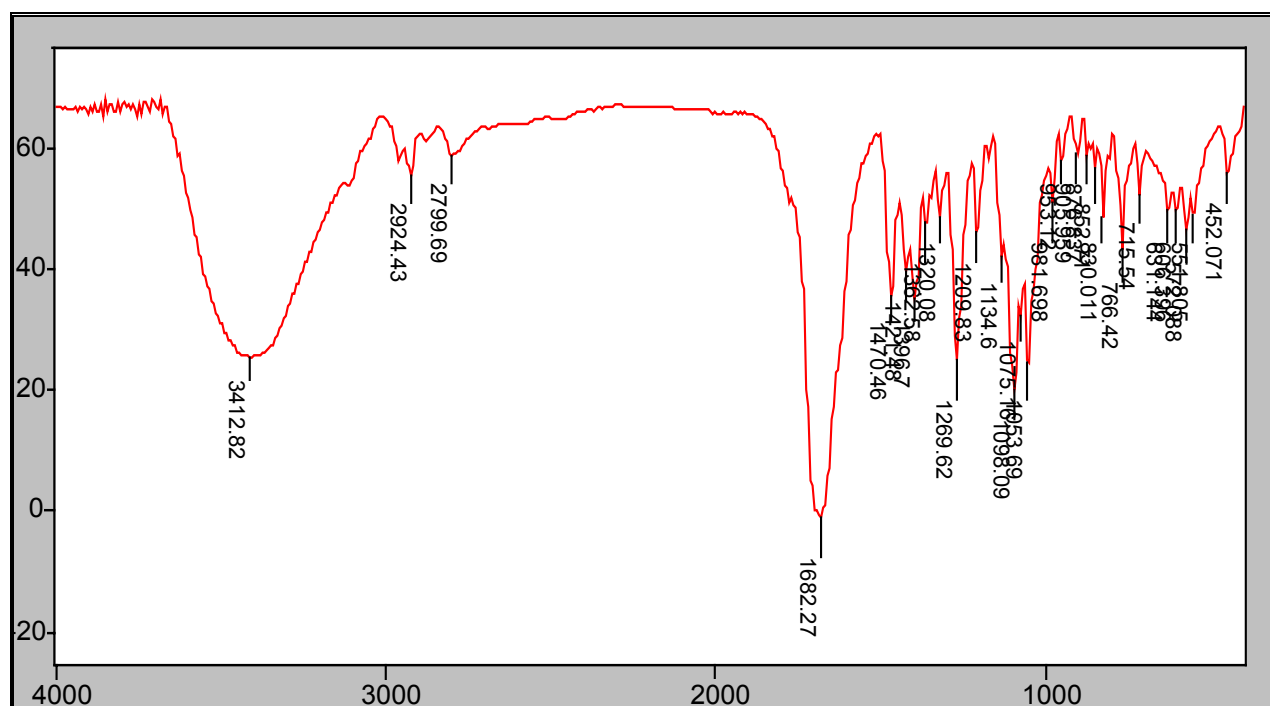


Apêndice 2.5.10 – Região ampliada do espectro de RMN <sup>1</sup>H de PSP-20 (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) e espectros simulados para o modo *orto* e *meta*-dissubstituído do anel B

## 2.6. PSP-14

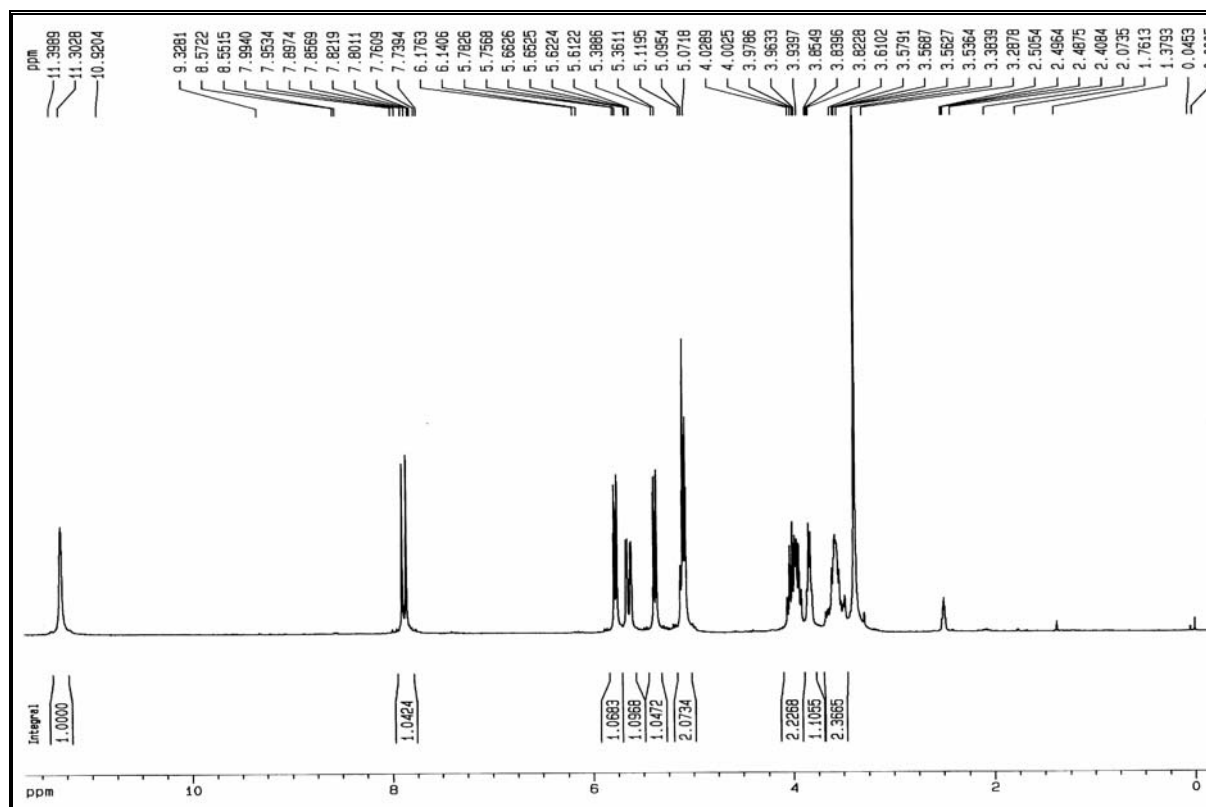


Apêndice 2.6.1 – Espectro de massas de **PSP-14**, obtido via MS-MS, modo negativo com energia de colisão de 15 eV.

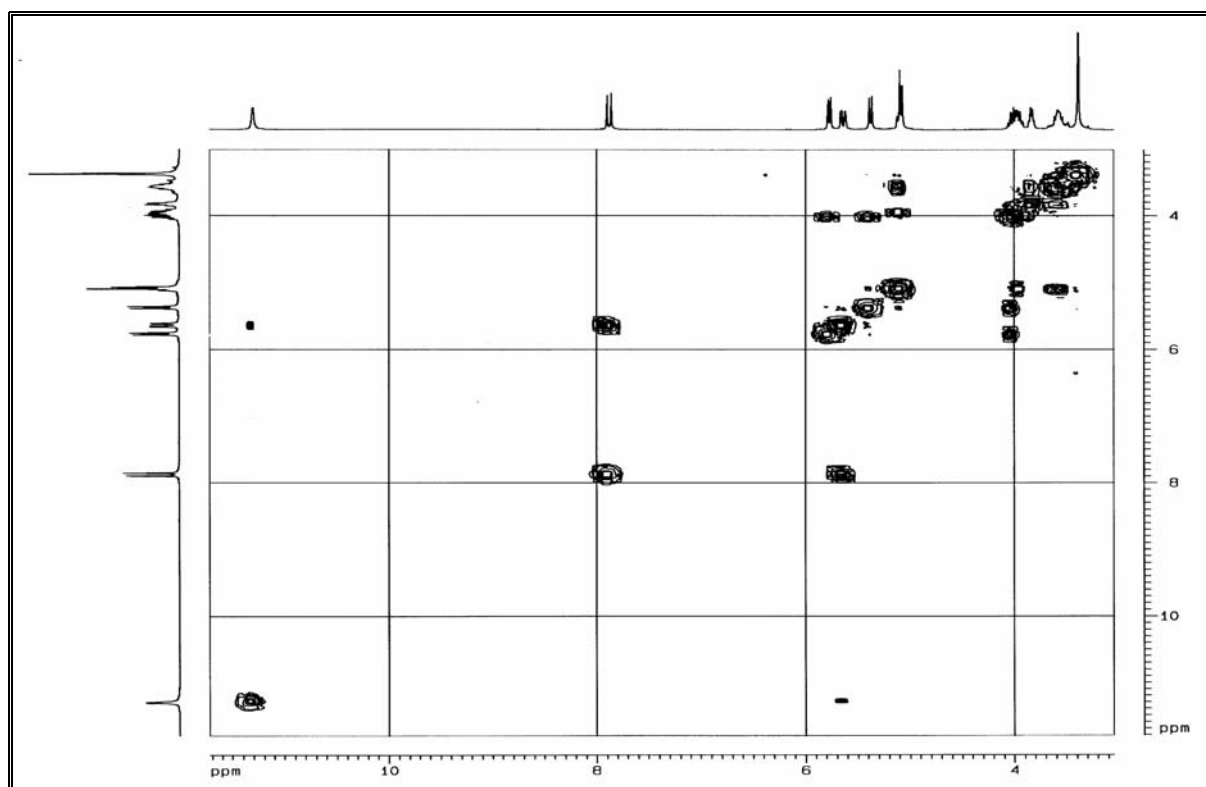


Apêndice 2.6.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-14** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium sp*

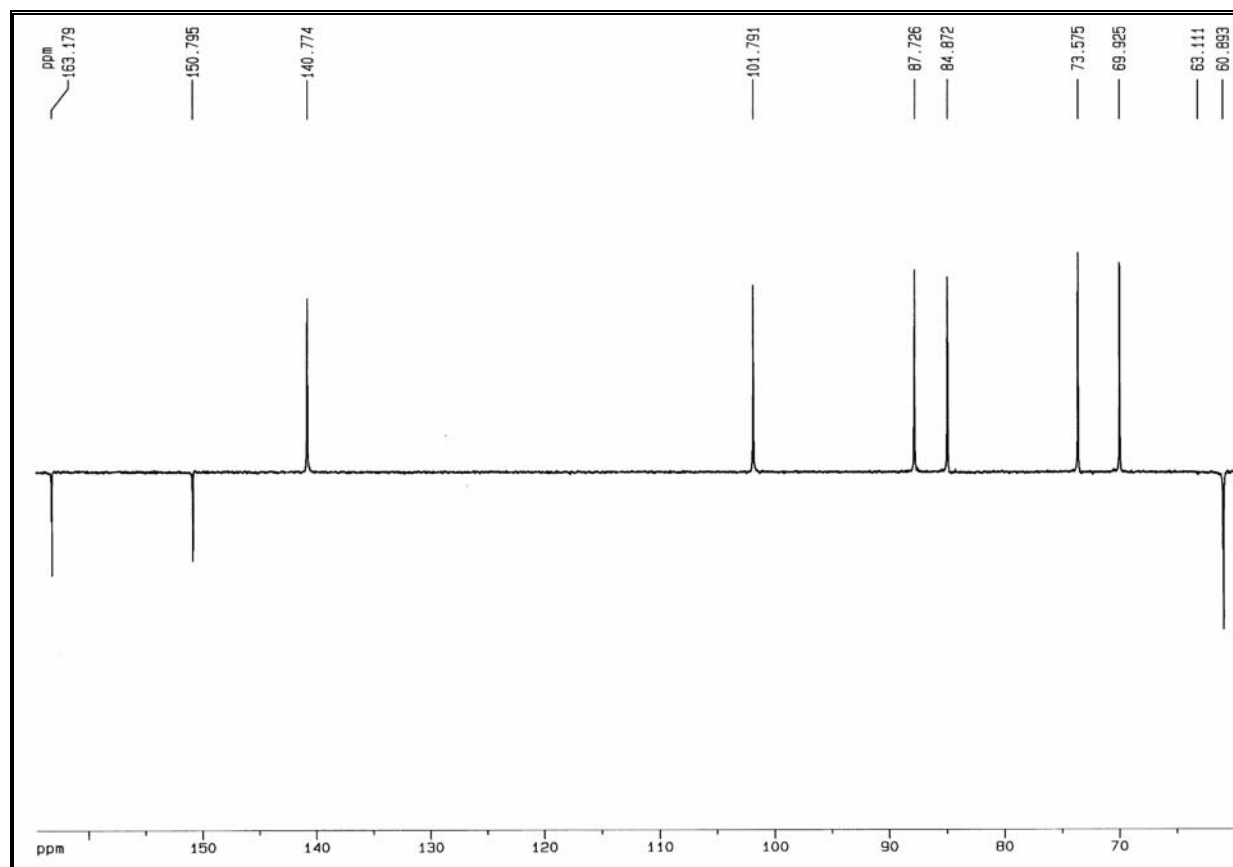


Apêndice 2.6.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-14** (200 MHz, DMSO- $d_6$ ).



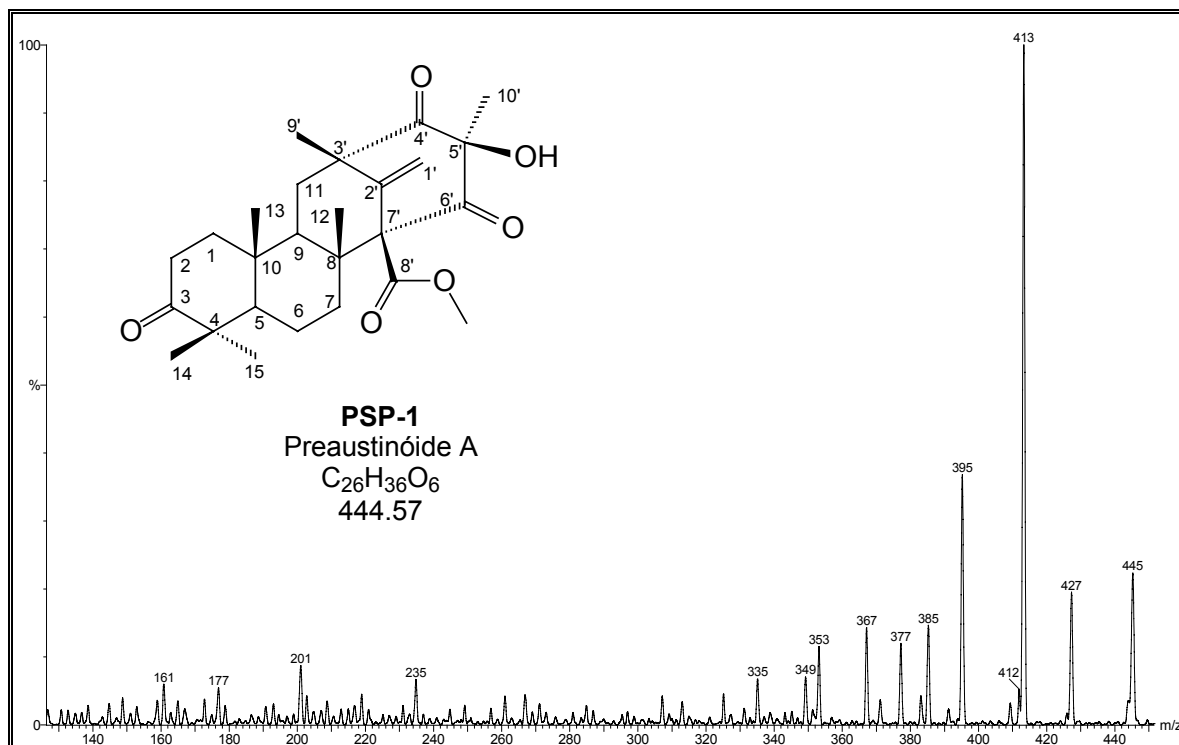
Apêndice 2.6.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  – COSY de **PSP-14** (200 MHz, DMSO- $d_6$ ).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

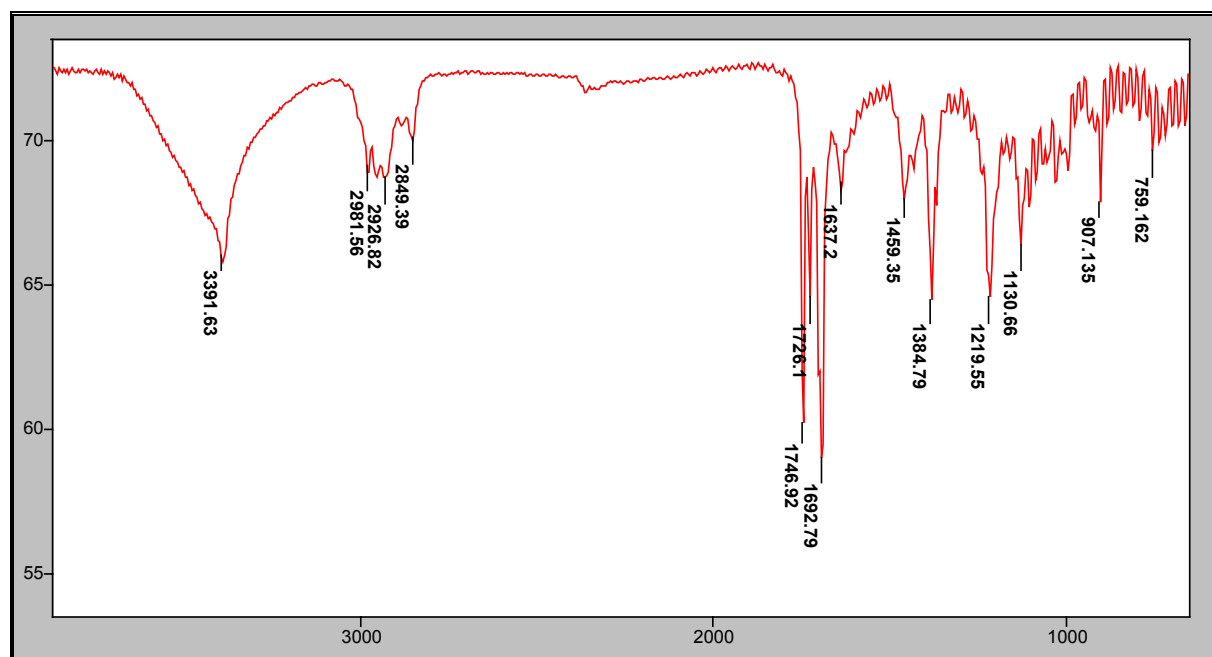


Apêndice 2.6.5 – Espectro de PENDANT de **PSP-14** (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

## 2.7. PSP-1

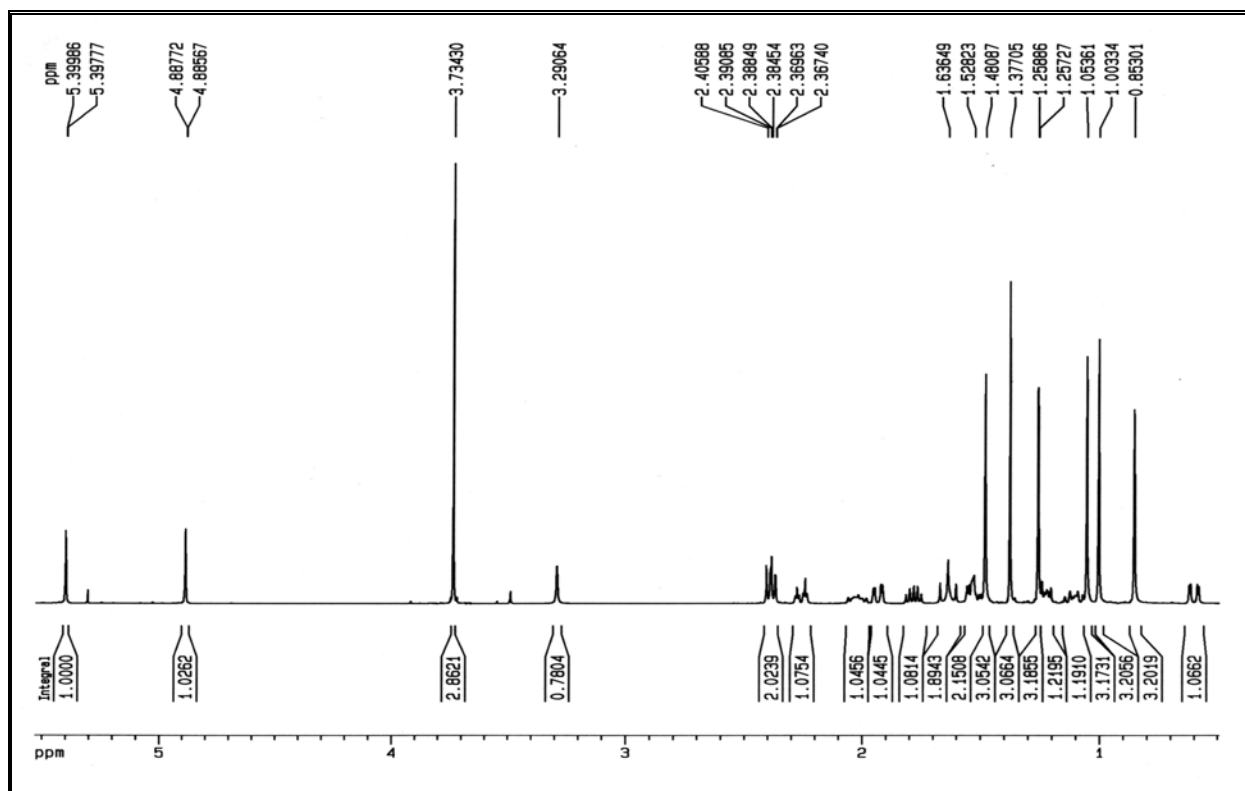


Apêndice 2.7.1 – Espectro de massas de **PSP-1**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 20 eV.

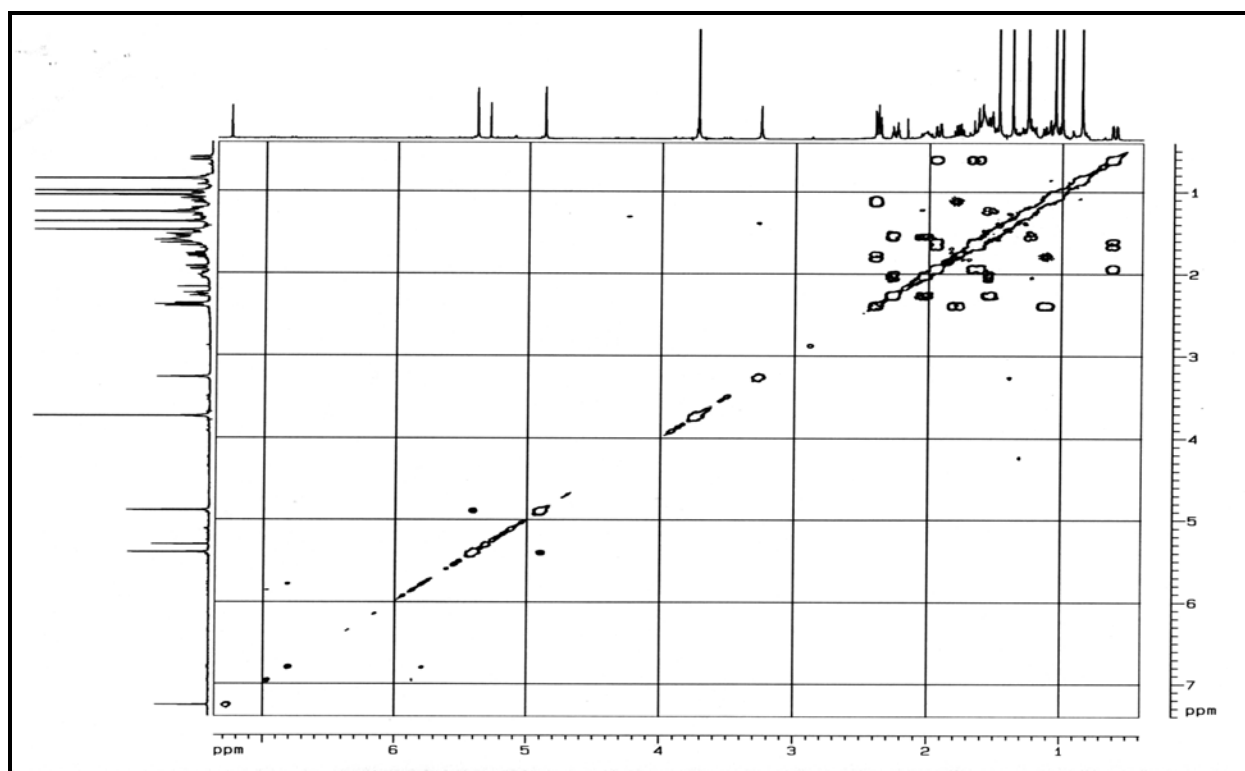


Apêndice 27.2– Espectro de absorção no IV de **PSP-1** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

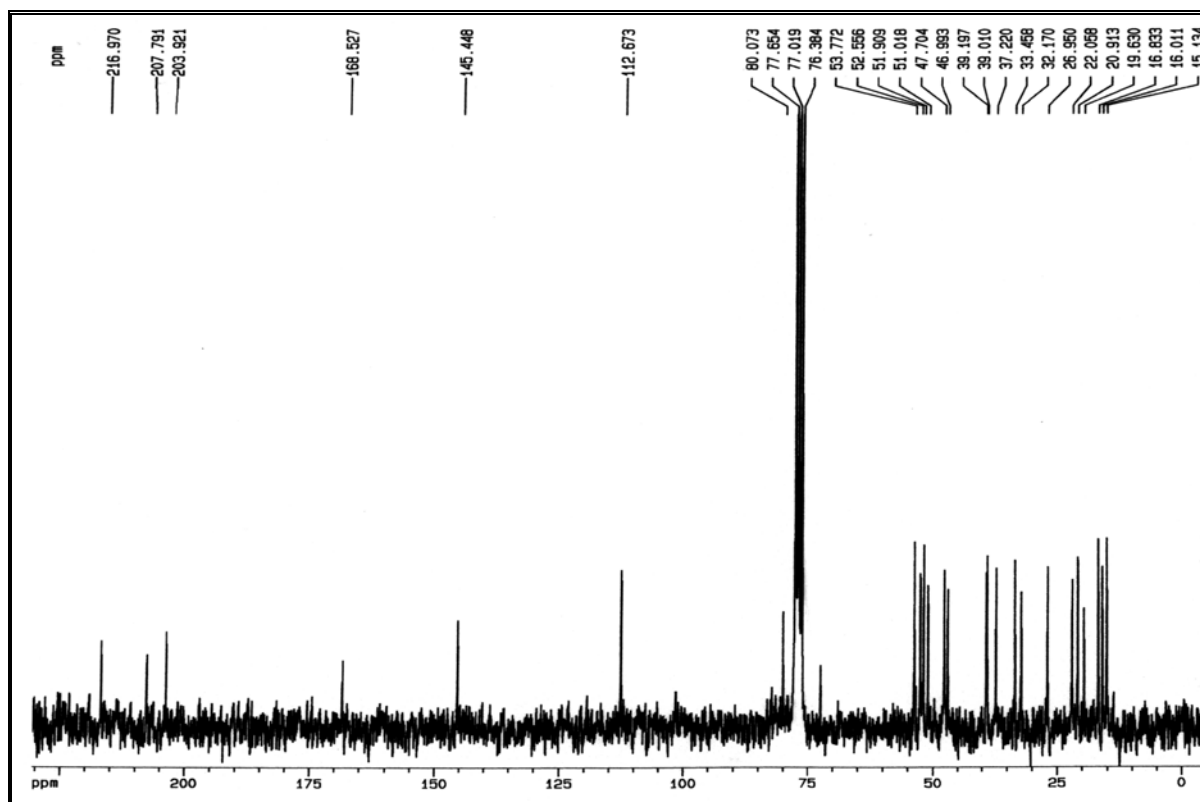


Apêndice 2.7.3– Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

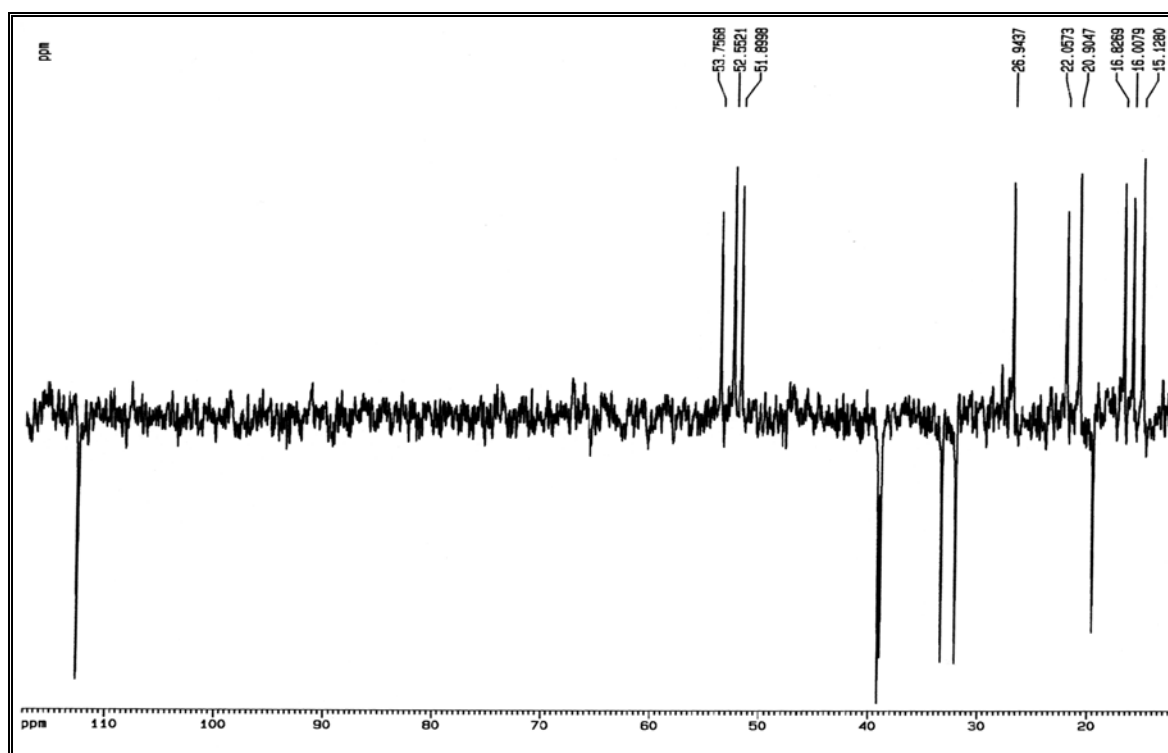


Apêndice 2.7.4– Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

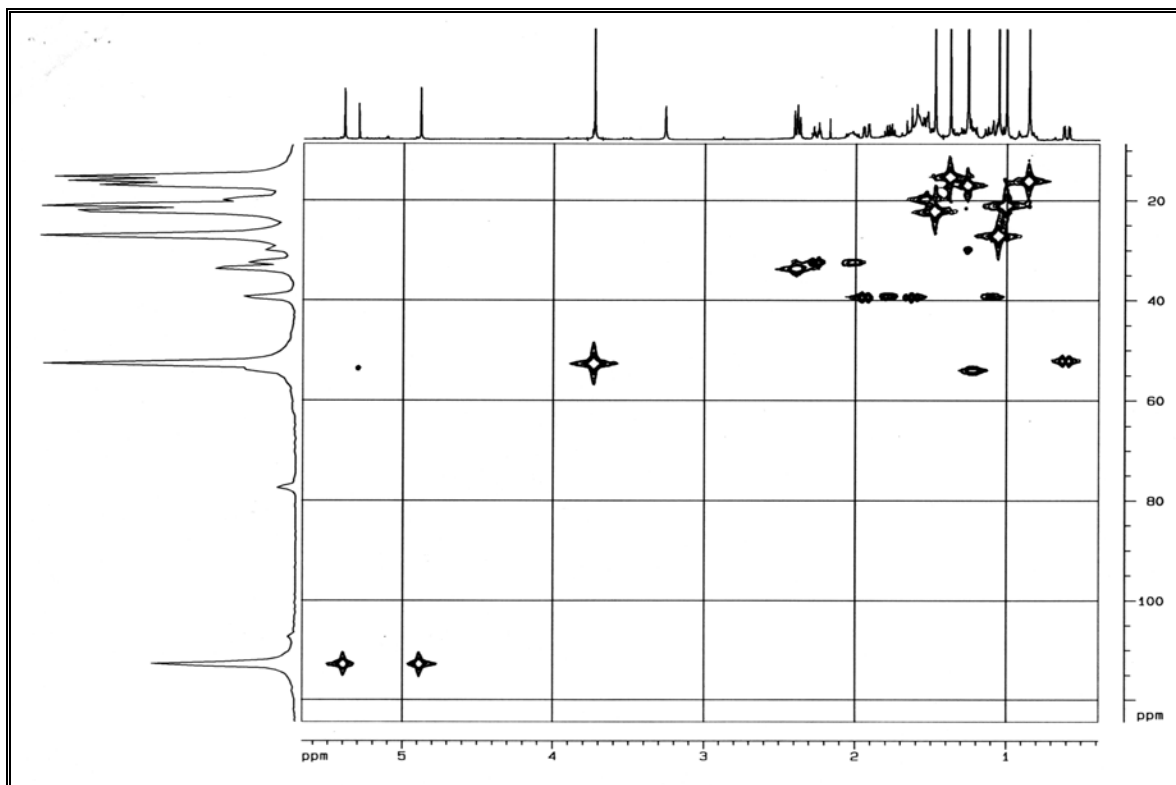


Apêndice 2.7.5– Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-1** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

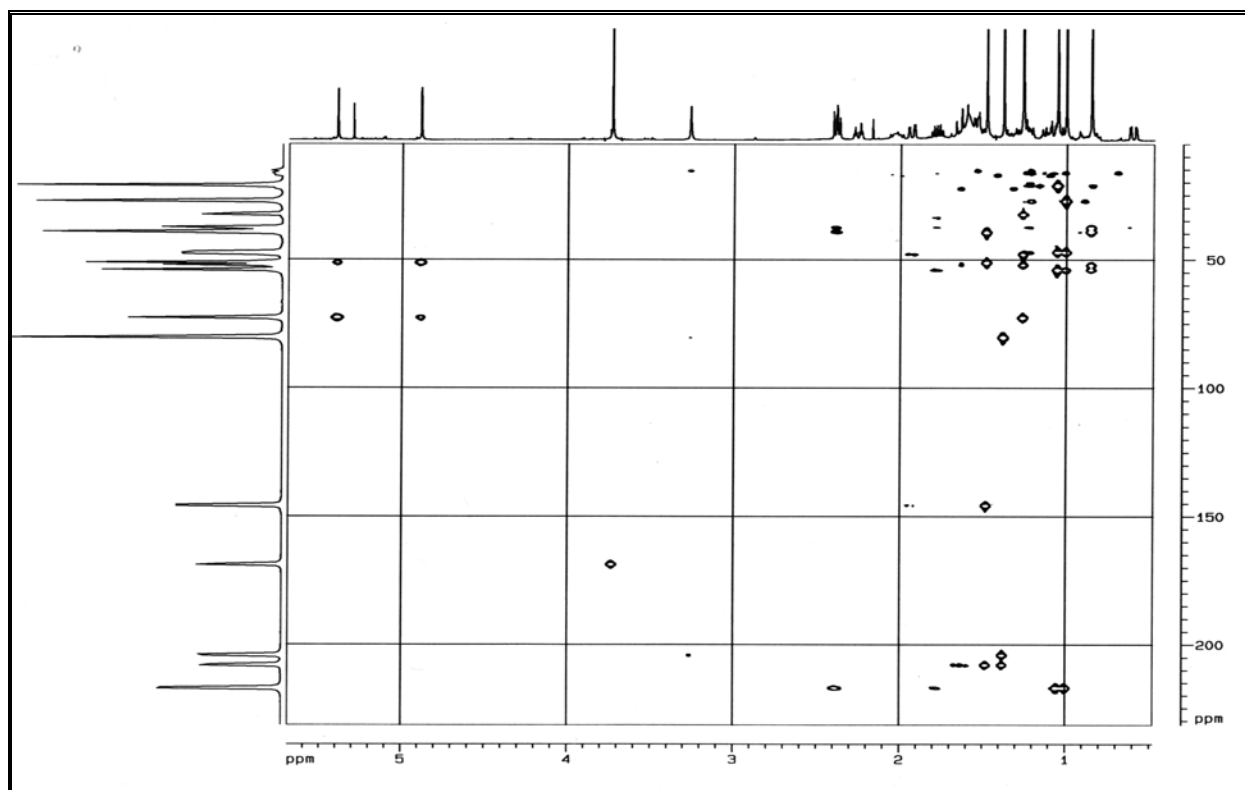


Apêndice 2.7.6– Espectro de RMN <sup>13</sup>C - DEPT de **PSP-1** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

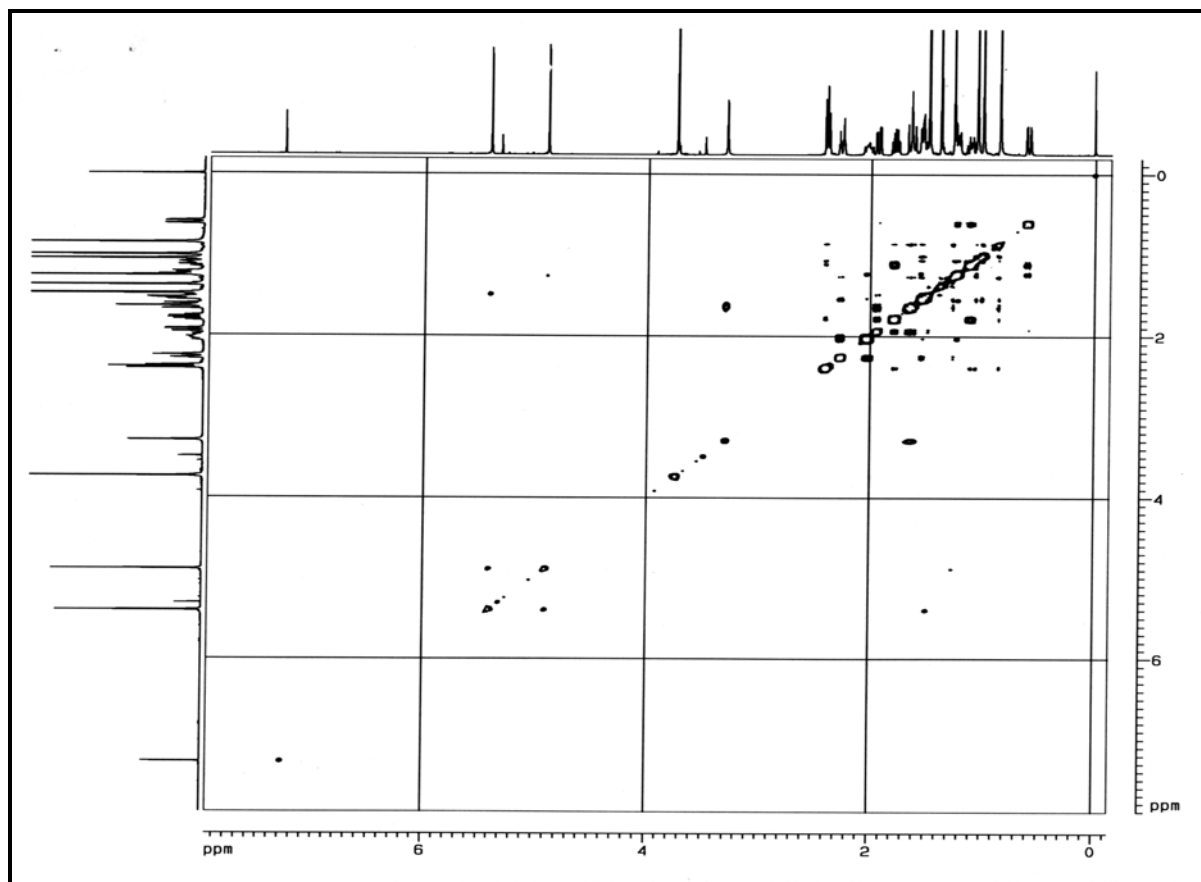


Apêndice 2.7.7– Espectro de HSQC de **PSP-1** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).



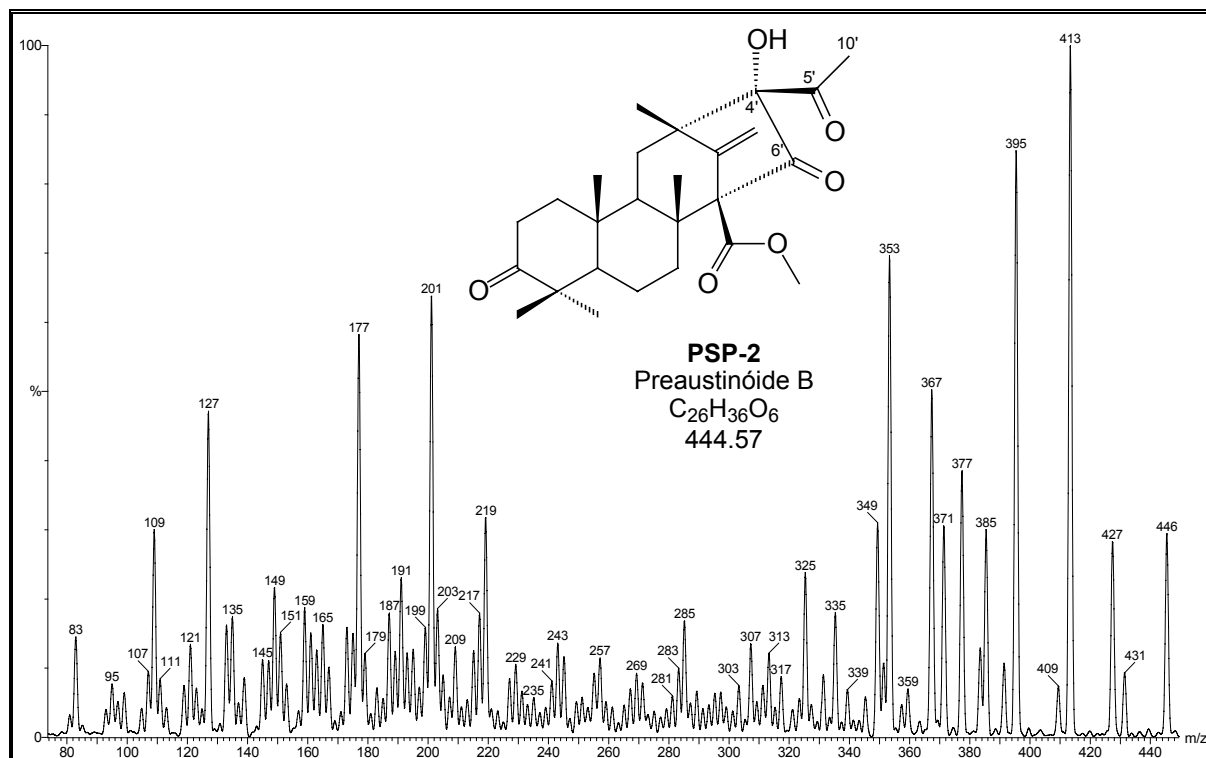
Apêndice 2.7.8– Espectro de HMBC de **PSP-1** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).



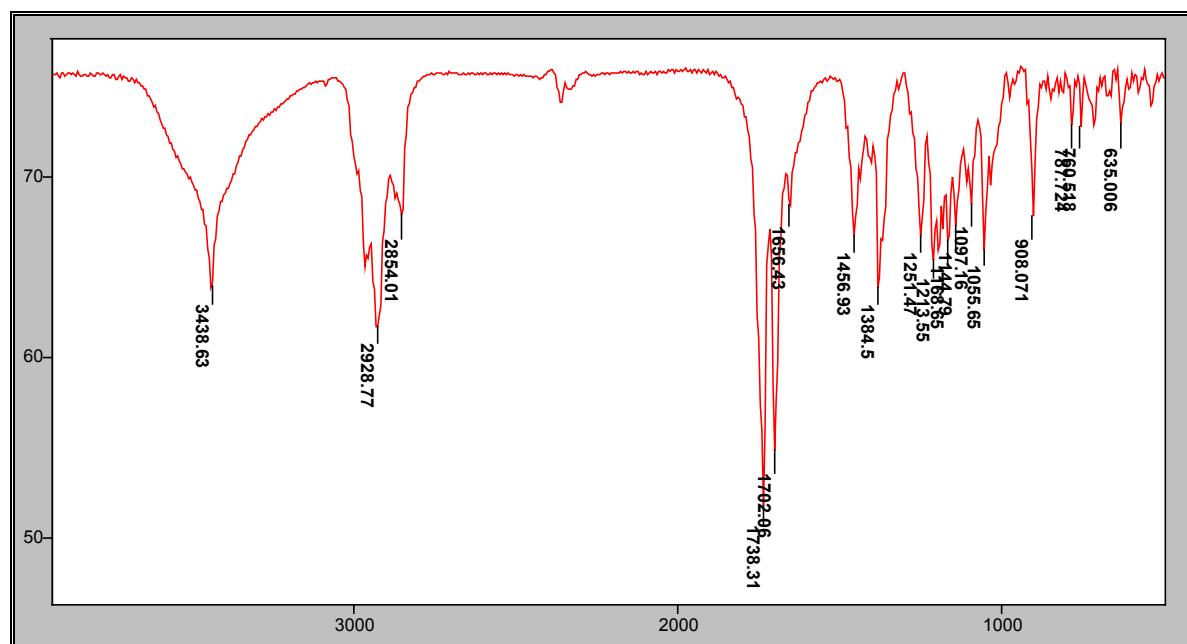


Apêndice 2.7.9– Espectro de NOESY de PSP-1 (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

## 2.8. PSP-2

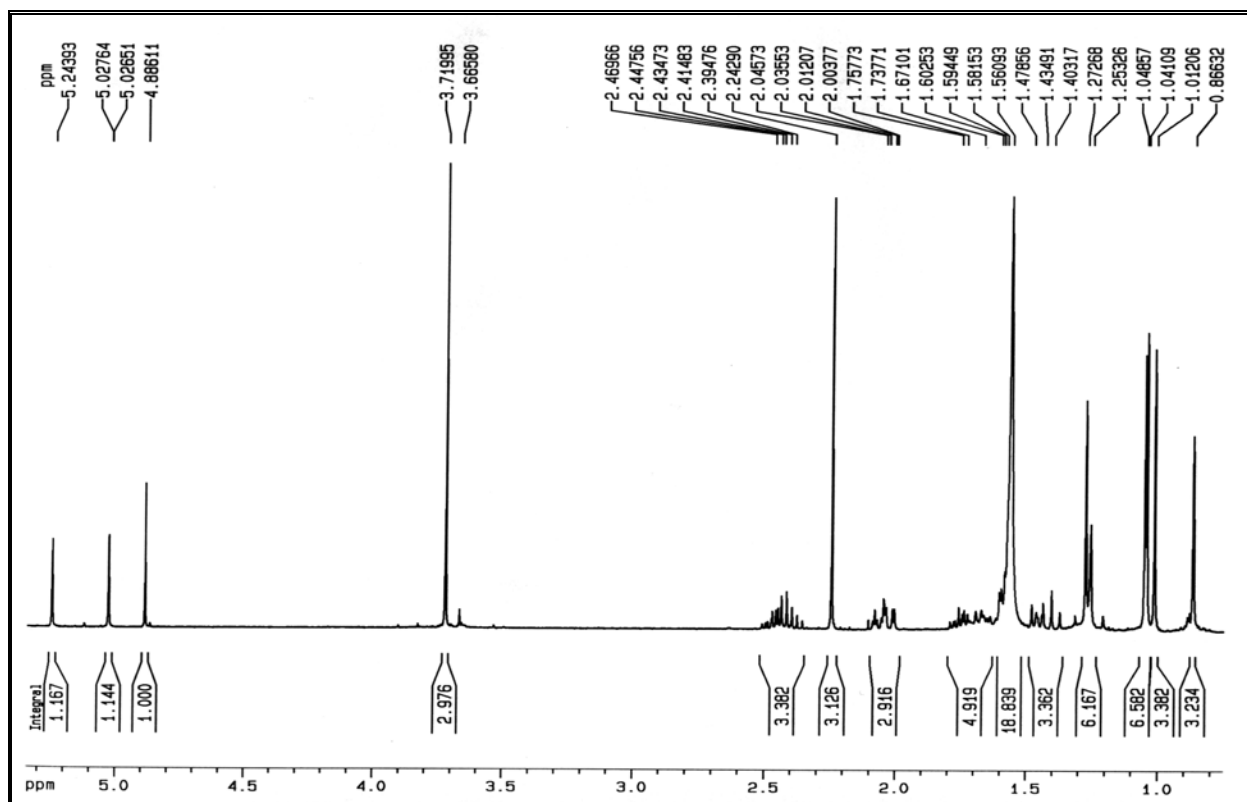


Apêndice 2.8.1– Espectro de massas de **PSP-2**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 20 eV.

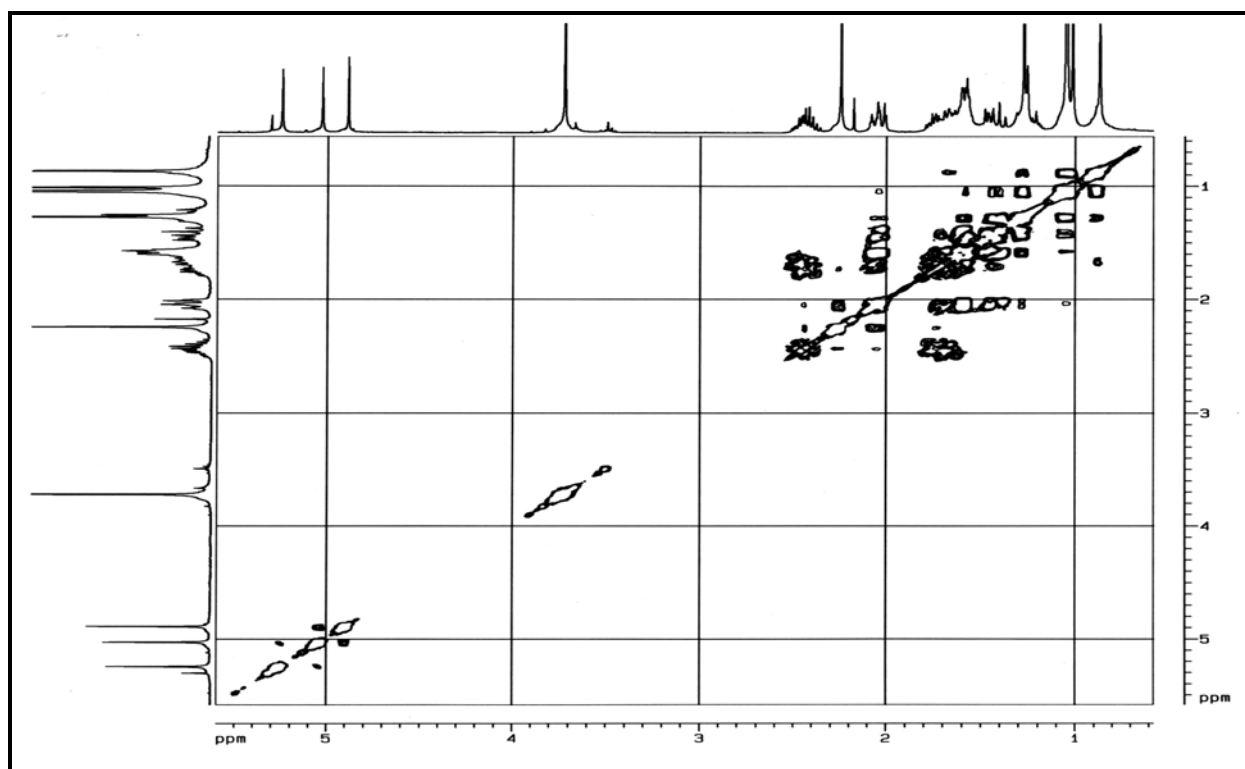


Apêndice 2.8.2– Espectro de absorção no IV de **PSP-2** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

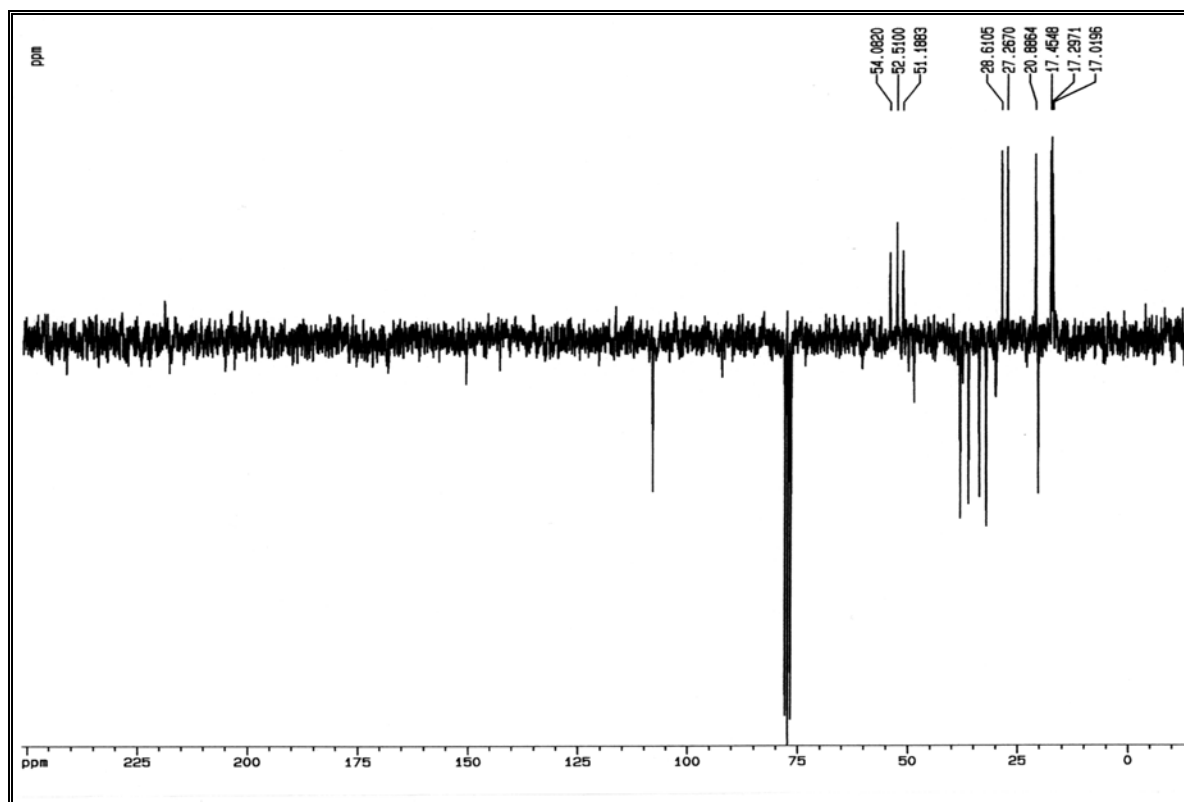


Apêndice 2.8.3– Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PSP-2 (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

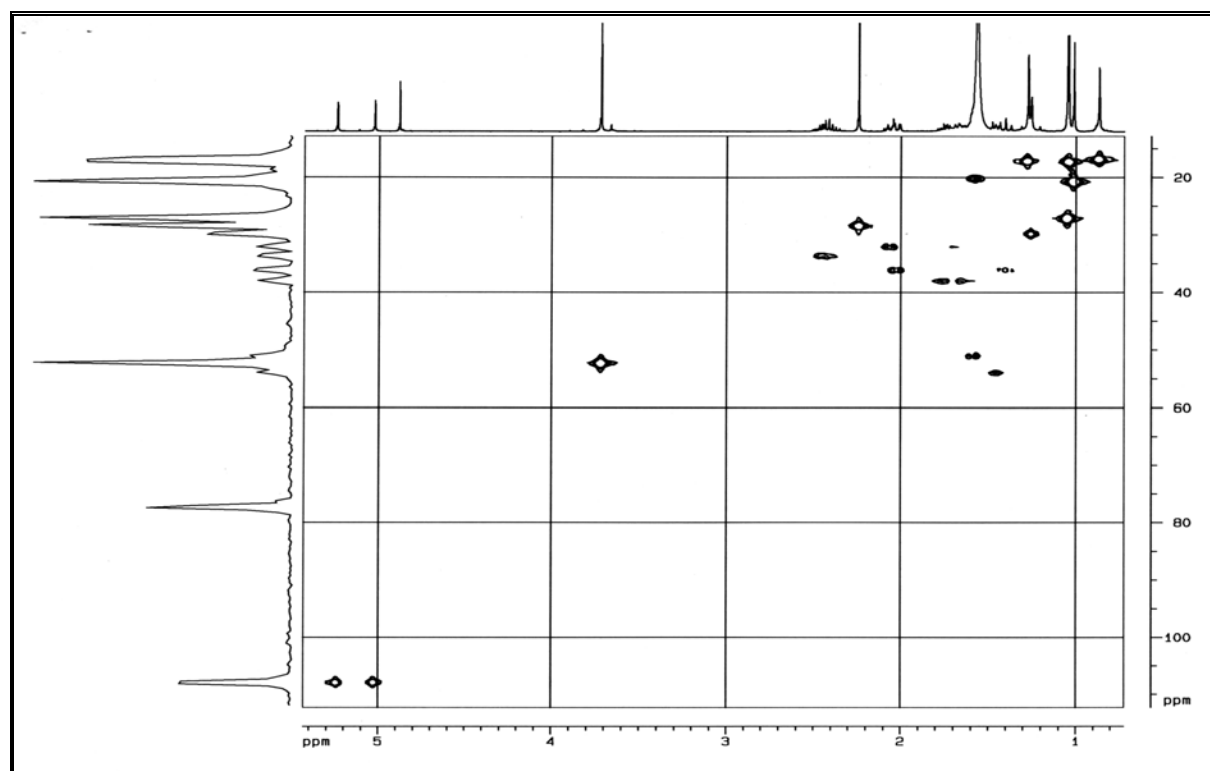


Apêndice 2.8.4– Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de PSP-2 (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

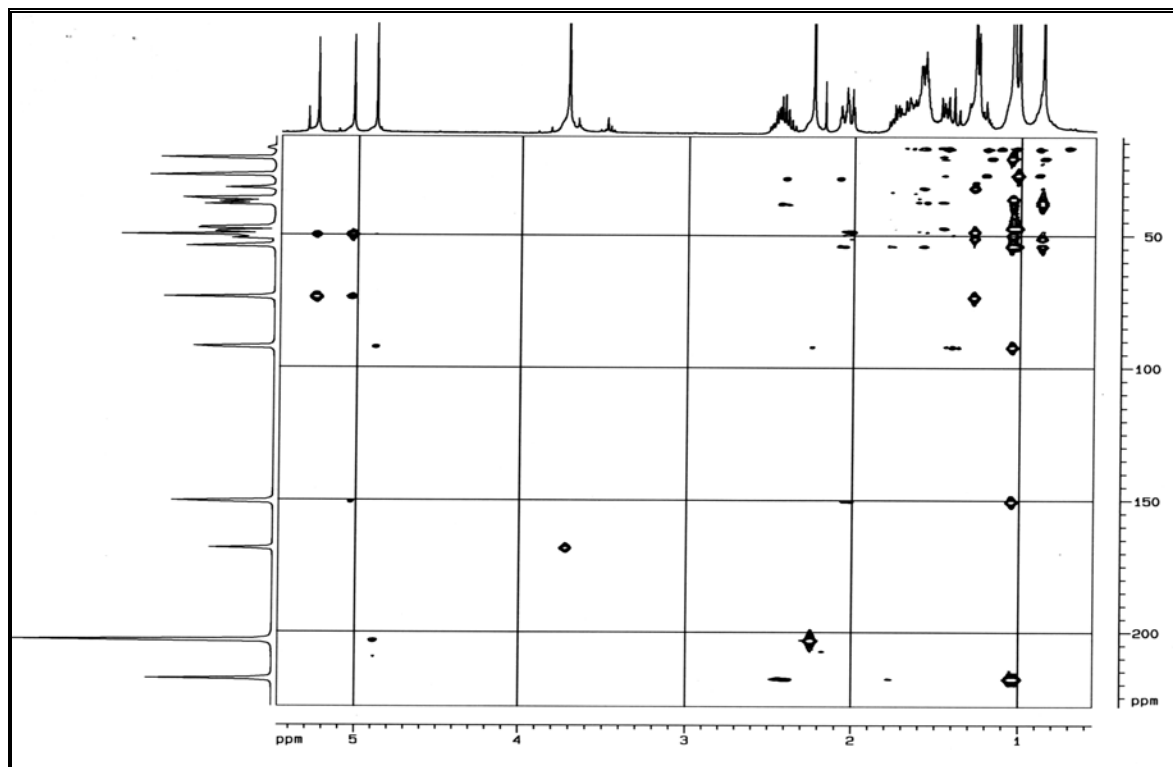
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



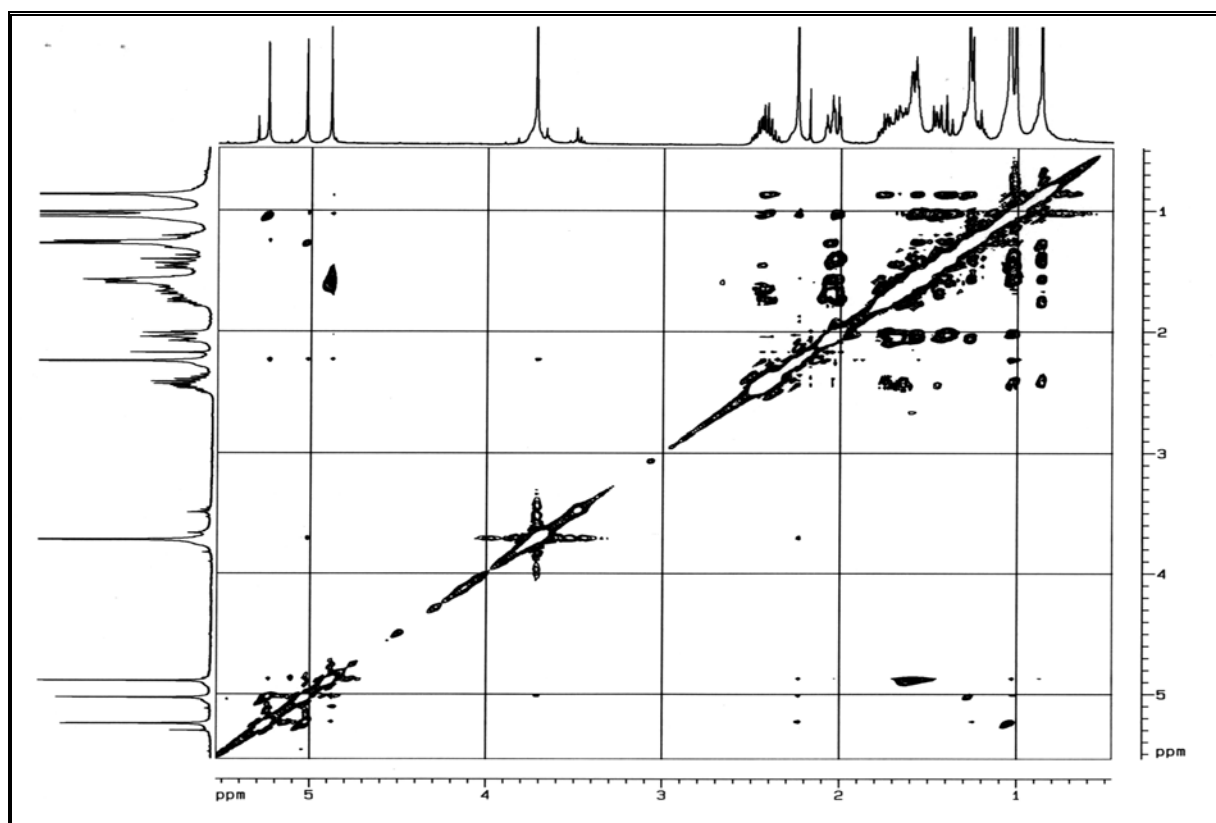
Apêndice 2.8.5– Espectro de RMN <sup>13</sup>C - PENDANT de **PSP-2** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).



Apêndice 2.8.6– Espectro de HSQC de **PSP-2** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

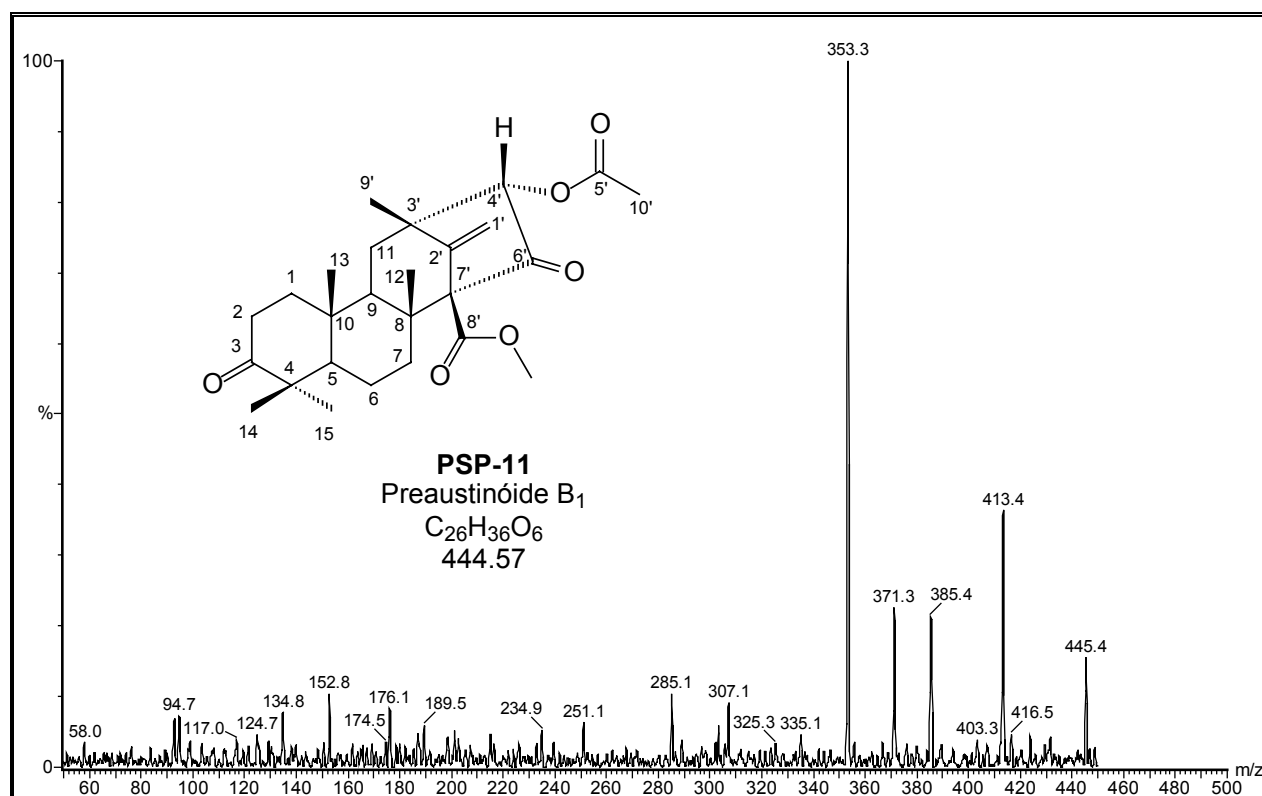


Apêndice 2.8.7– Espectro de HMBC de **PSP-2** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

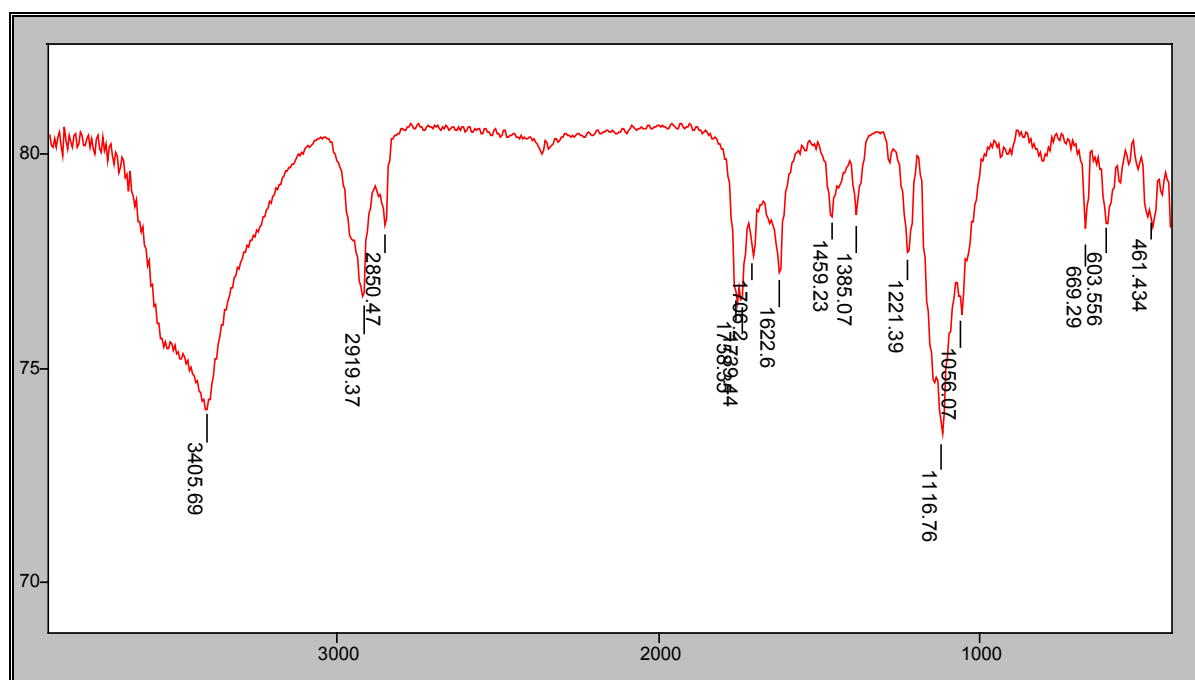


Apêndice 2.8.8 – Espectro de NOESY de **PSP-2** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

## 2.9. PSP-11

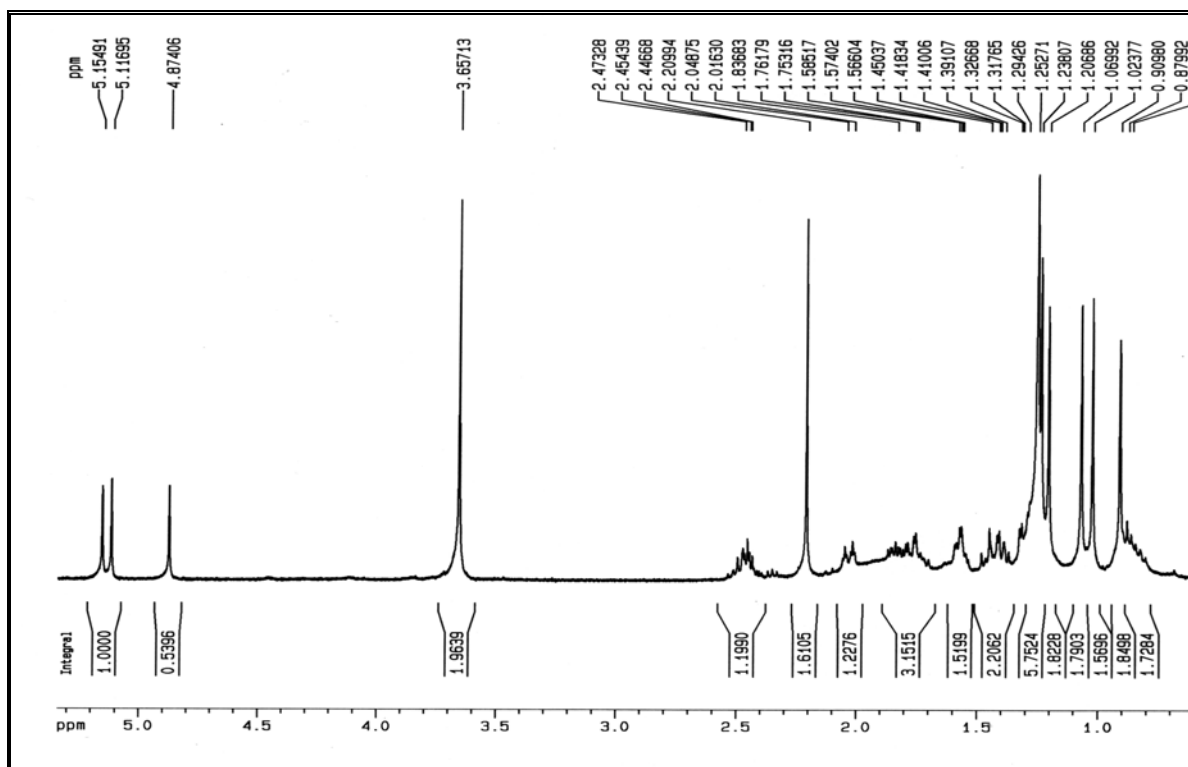


Apêndice 2.9.1 – Espectro de massas de **PSP-11**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

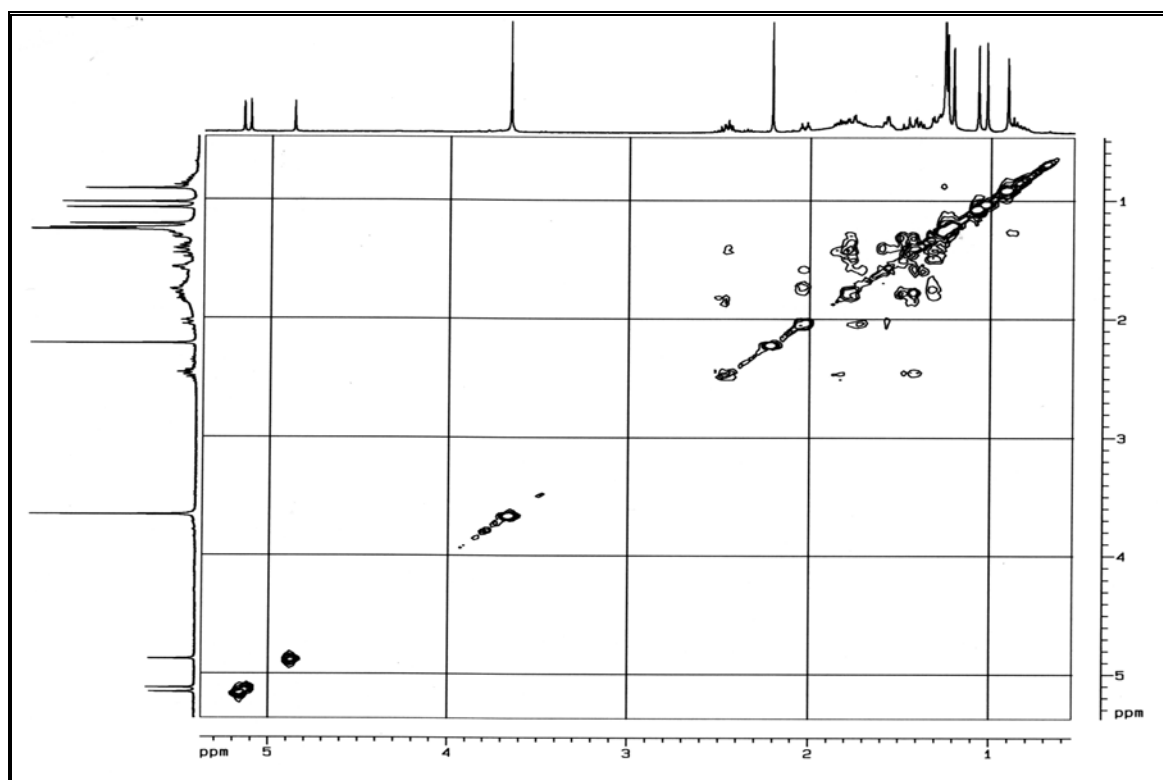


Apêndice 2.9.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-11** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

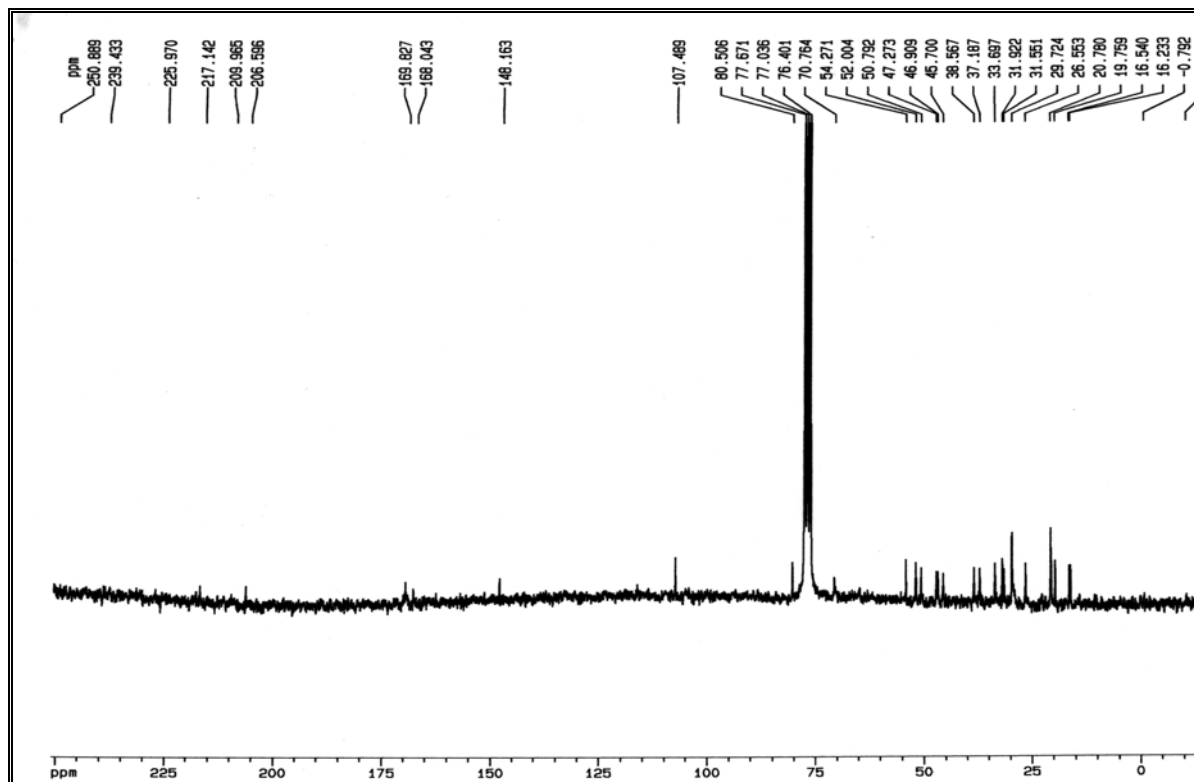


Apêndice 2.9.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-11** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

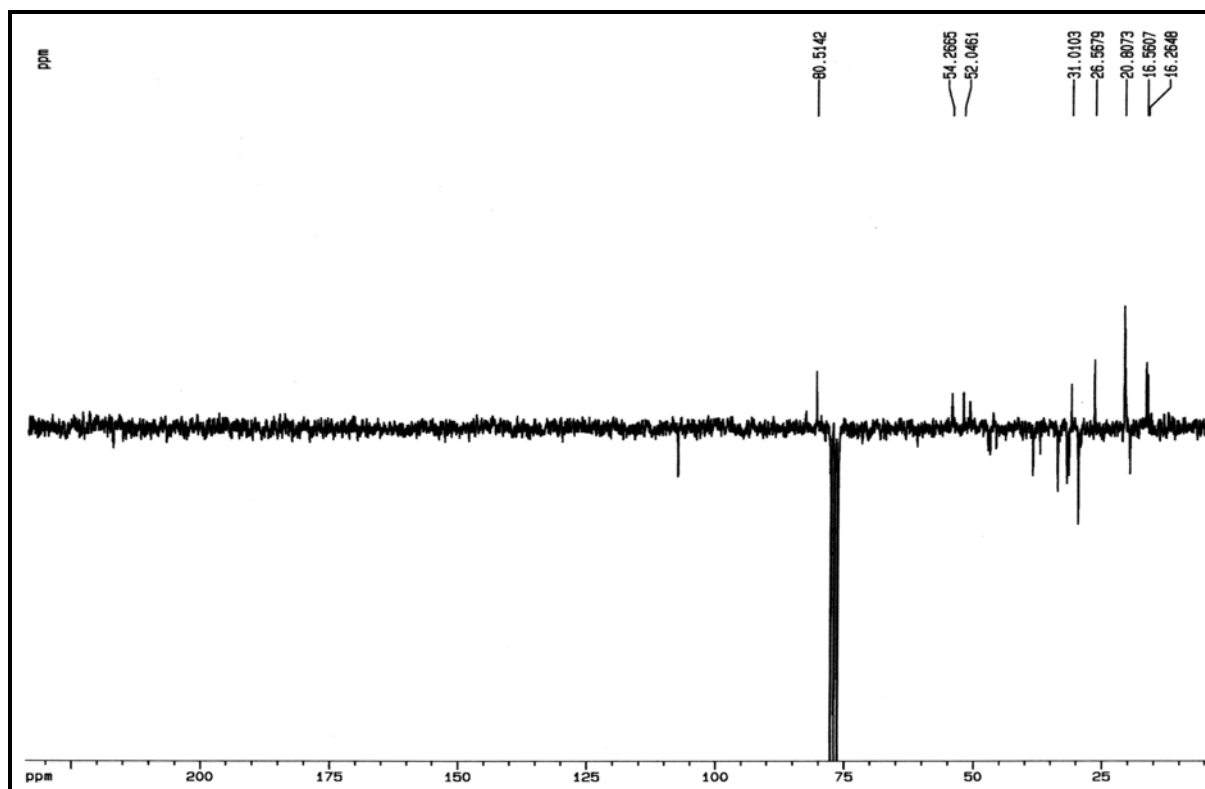


Apêndice 2.9.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-11** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

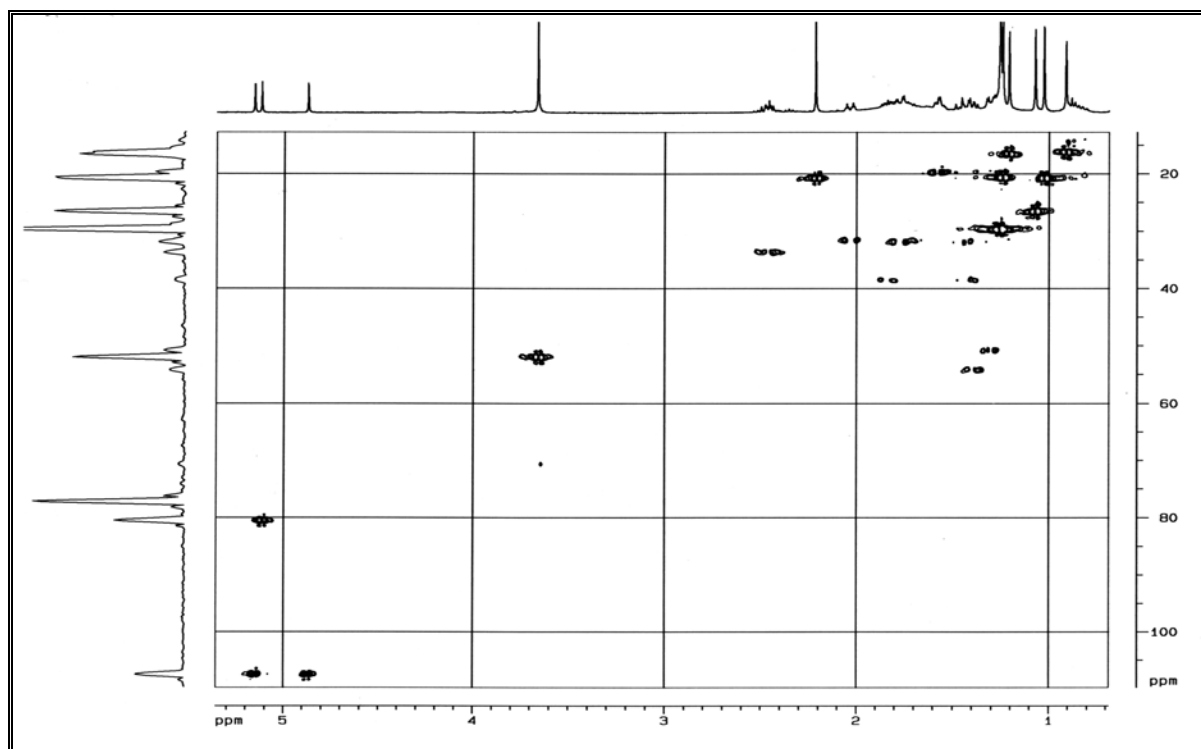


Apêndice 2.9.5 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **PSP-11** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).

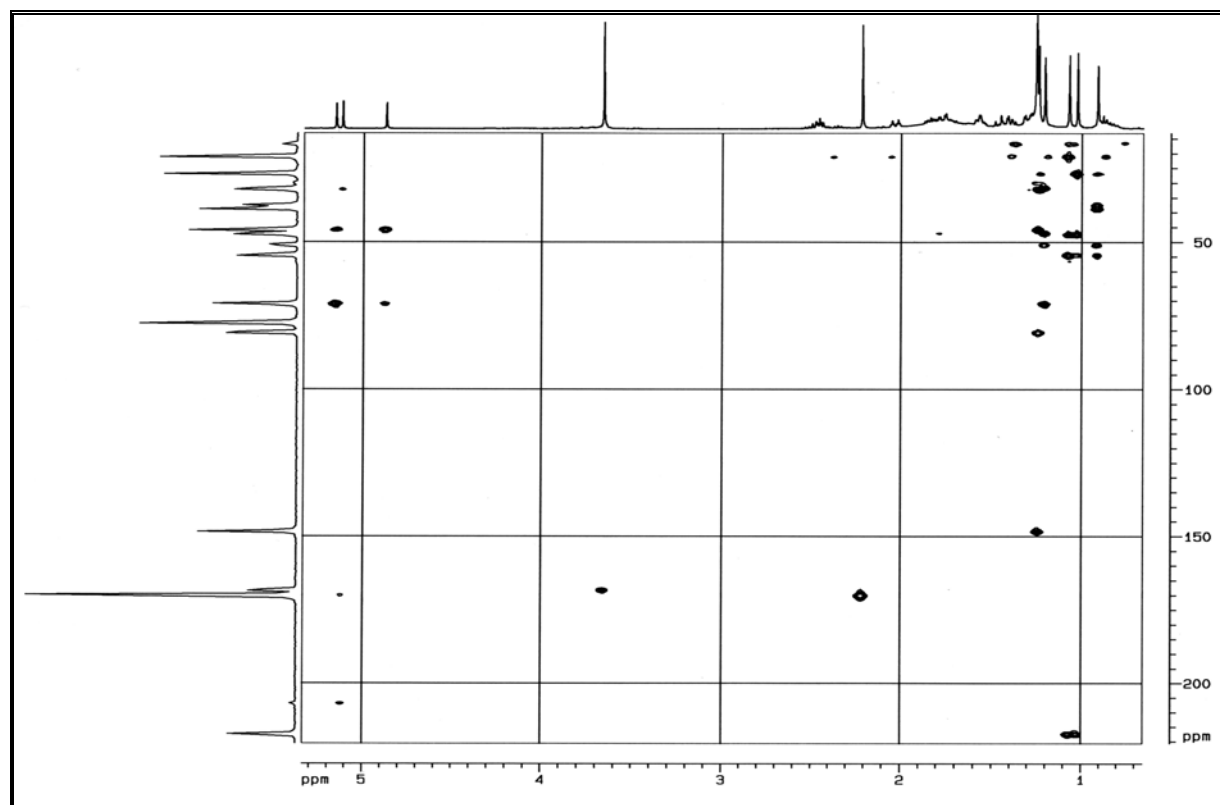


Apêndice 2.9.6 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - PENDANT de **PSP-11** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).

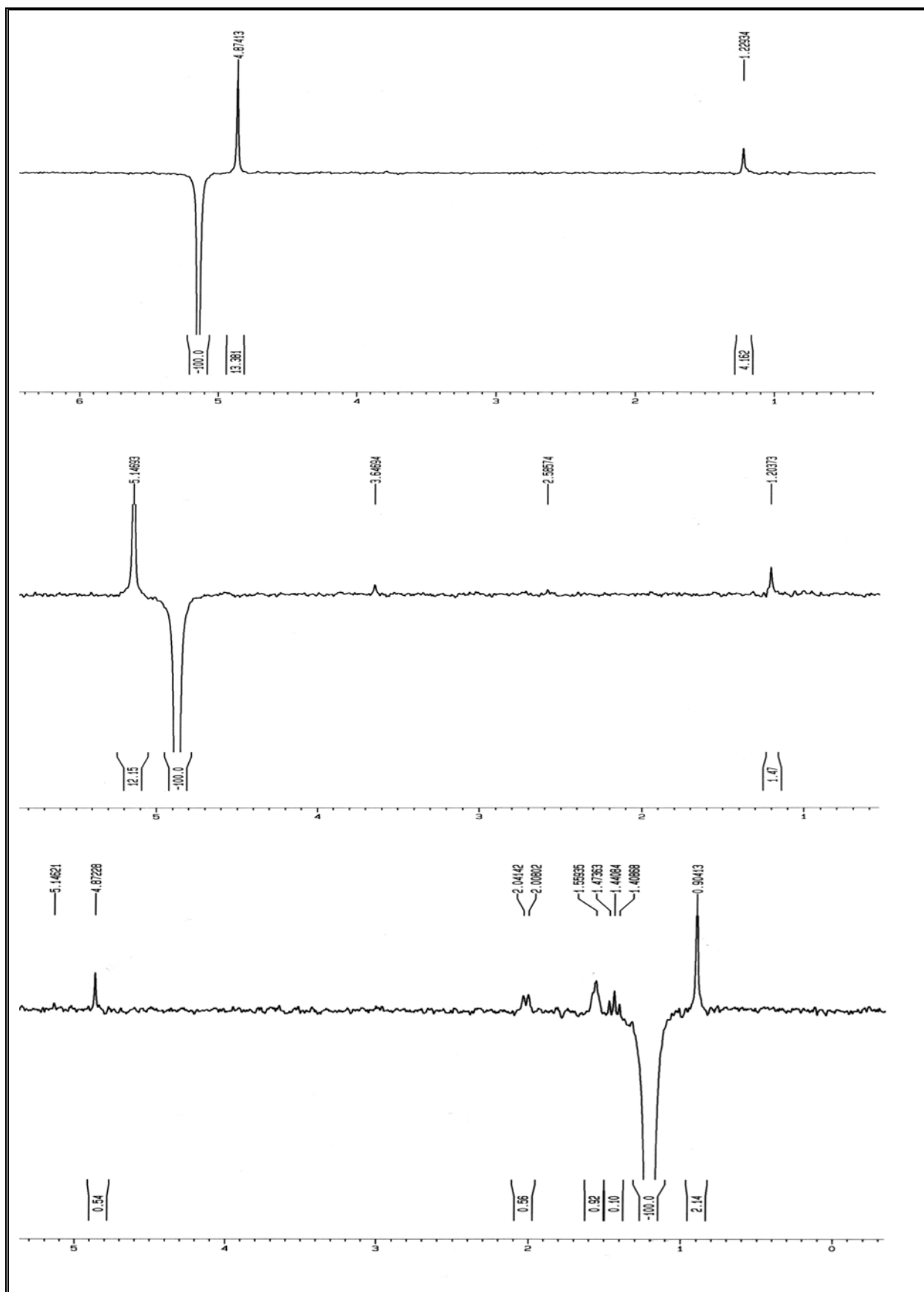




Apêndice 2.9.7– Espectro de HSQC de **PSP-11** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

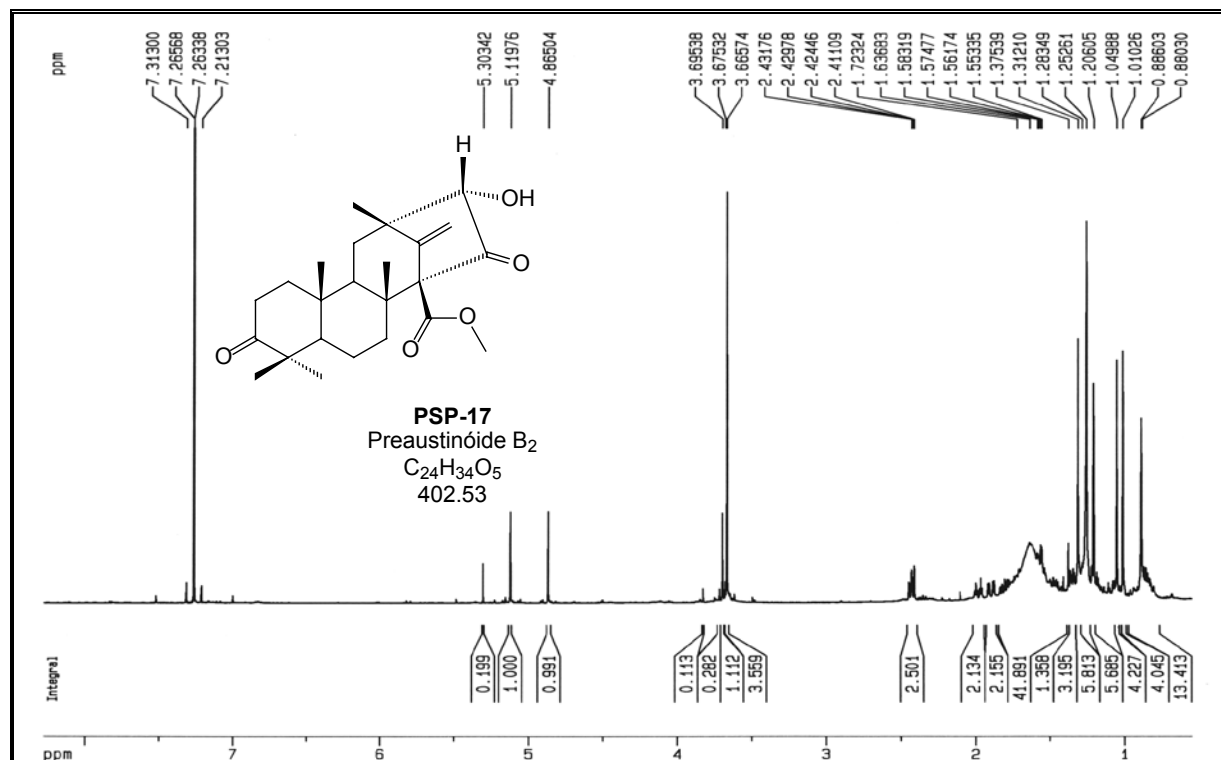


Apêndice 2.9.8 – Espectro de HMBC de **PSP-11** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

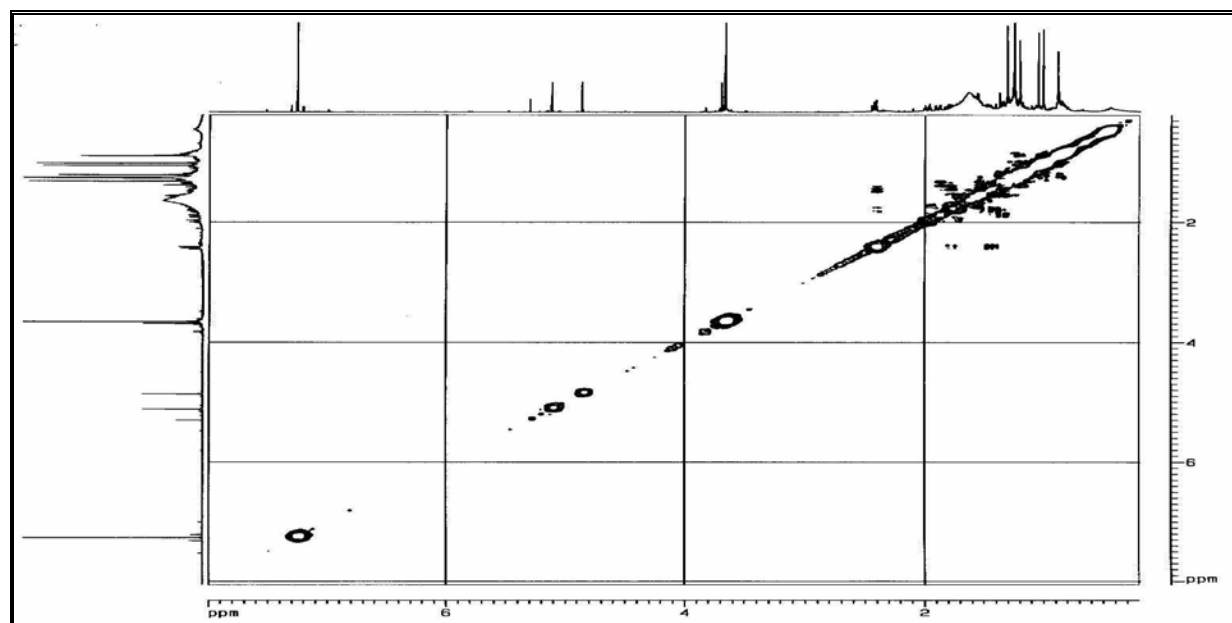


Apêndice 2.9.9 – Espectro de NOESY de **PSP-11** (400 MHz, Clorofórmio-*d*). Hidrogênios irradiados: H-1'b (espectro superior); H-1'a (intermediário) e H-12 (inferior).

## 2.10. PSP-17

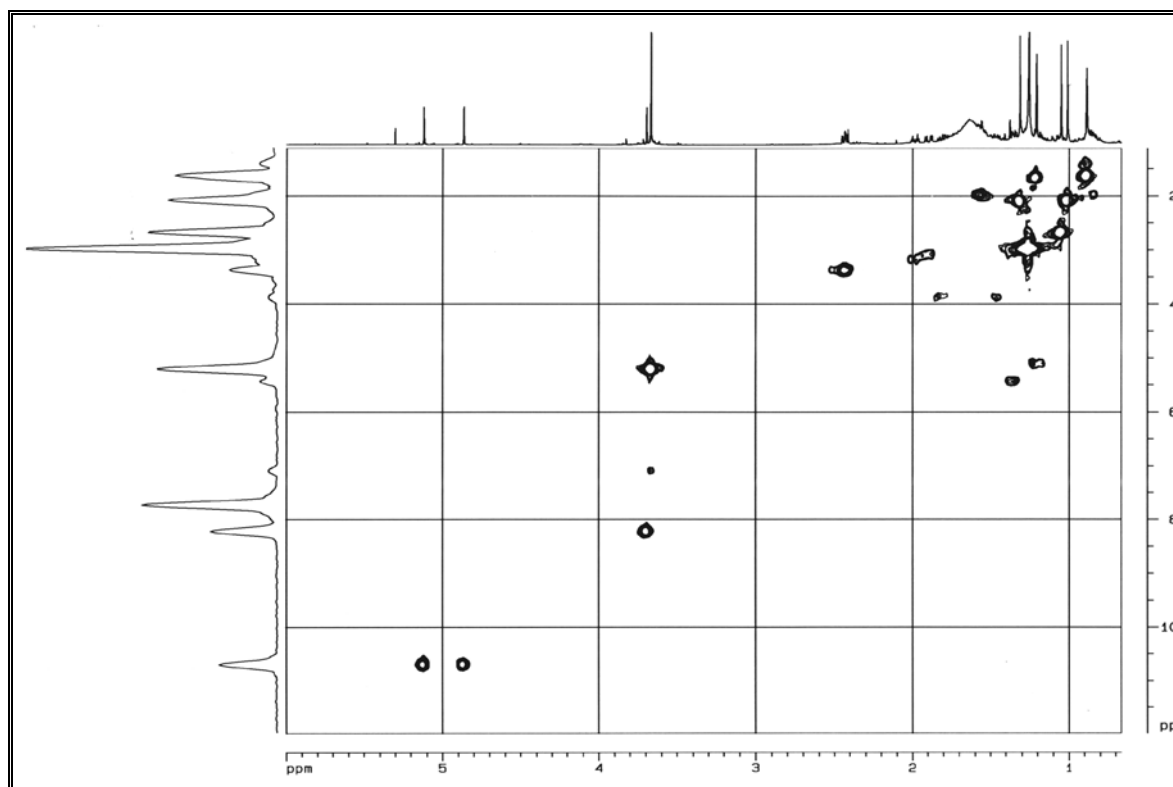


Apêndice 2.10.3– Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-17** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

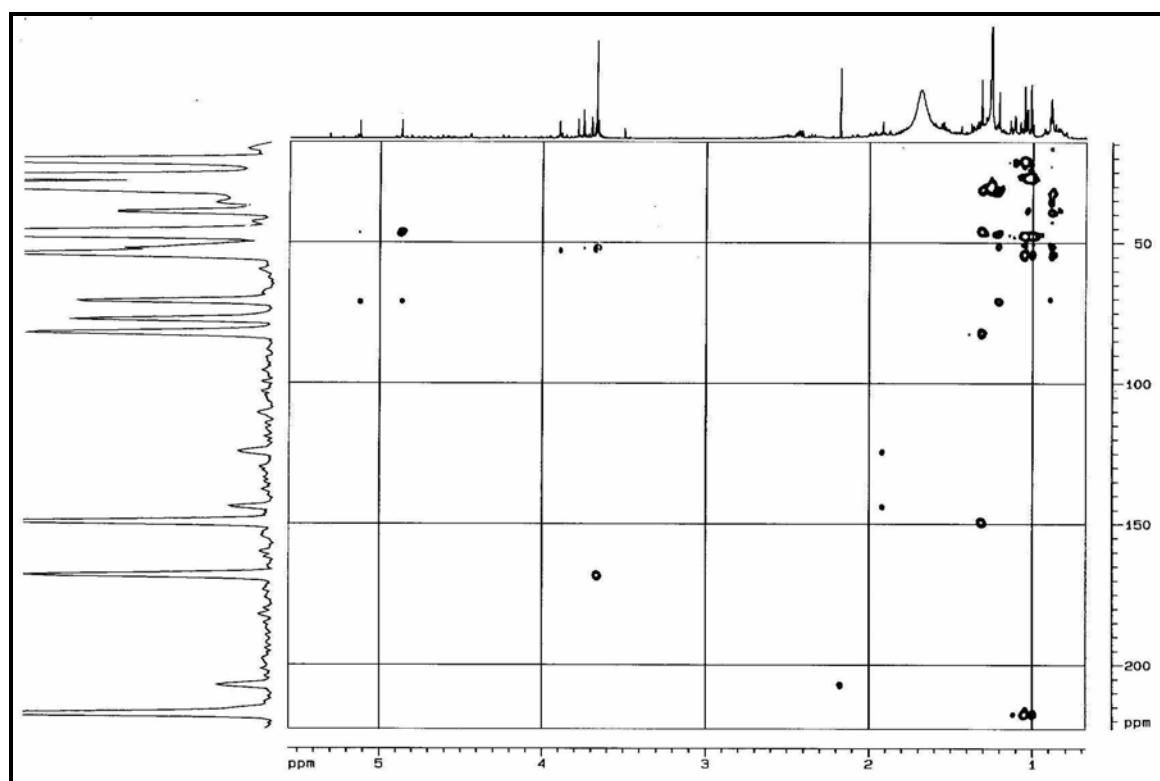


Apêndice 2.10.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-17** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

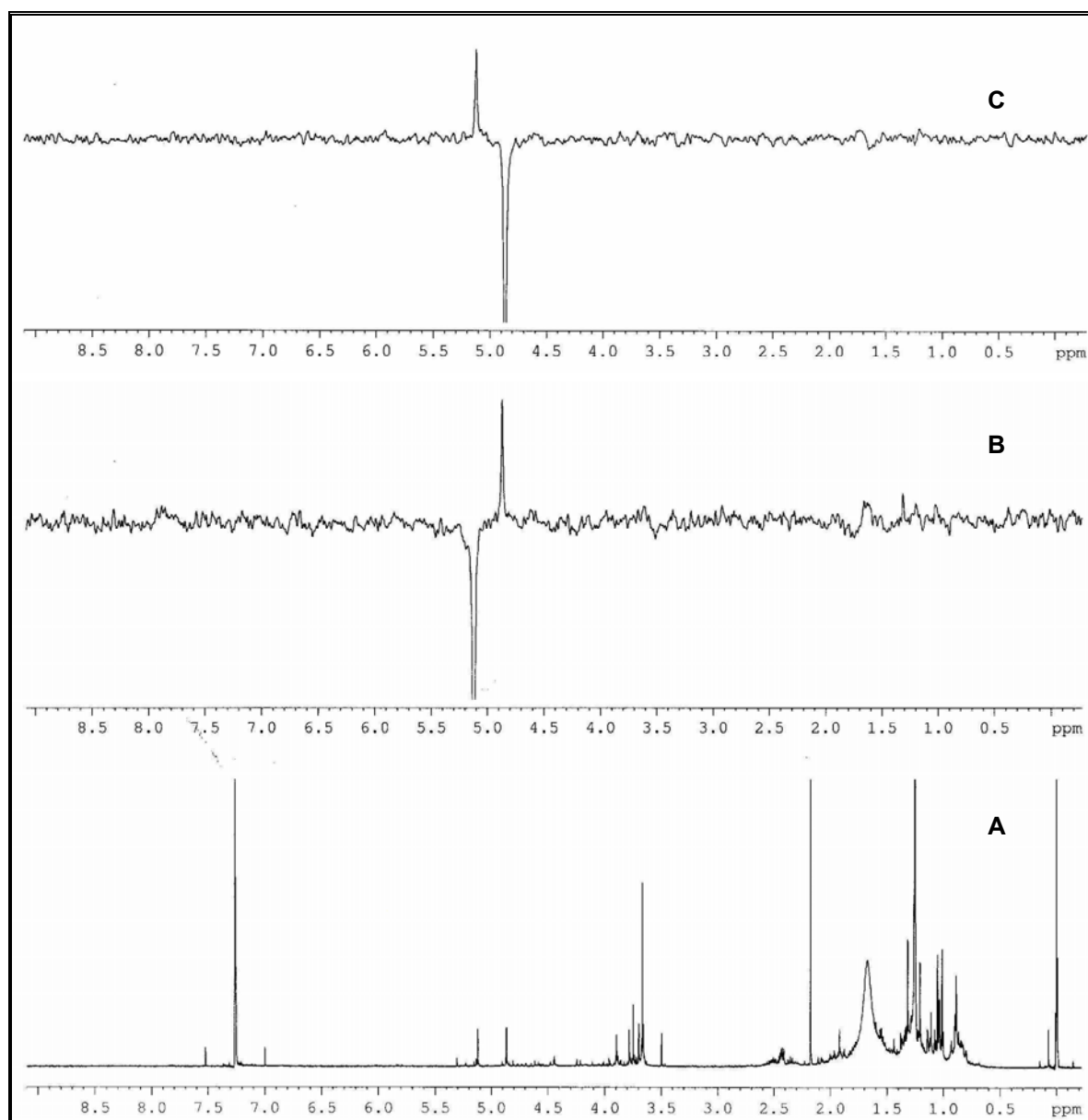
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



Apêndice 2.10.5– Espectro de HSQC de **PSP-17** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

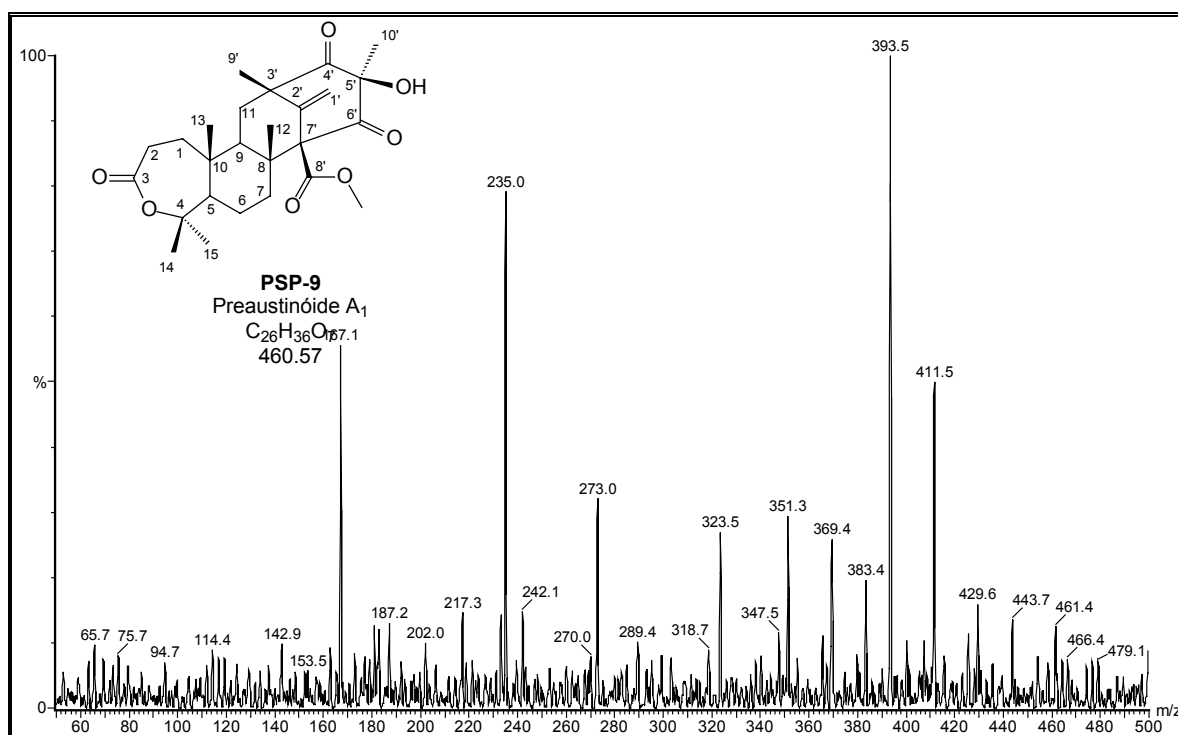


Apêndice 2.10.6– Espectro de HMBC de **PSP-17** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

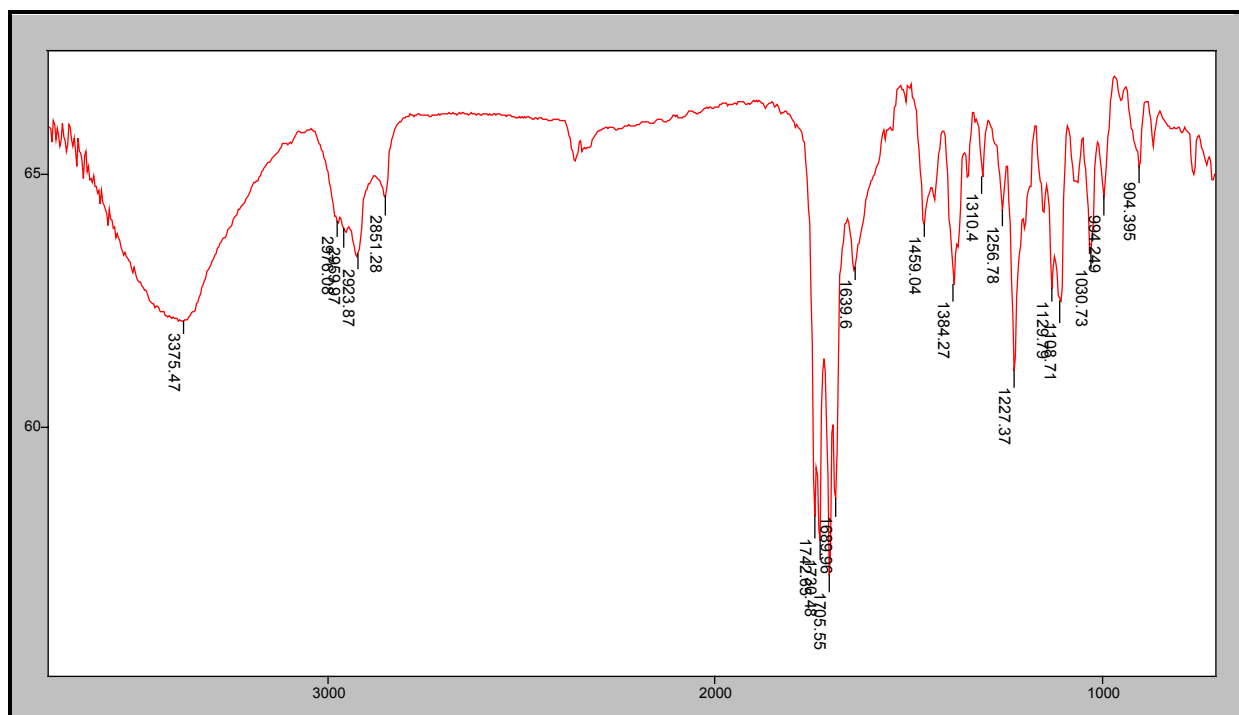


Apêndice 2.10.7 – Espectro de NOESY de **PSP-17** (400 MHz, Clorofórmio-*d*). A: Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ; Hidrogênios irradiados: H-1'b (B) e H-1'a (C).

## 2.11. PSP-9

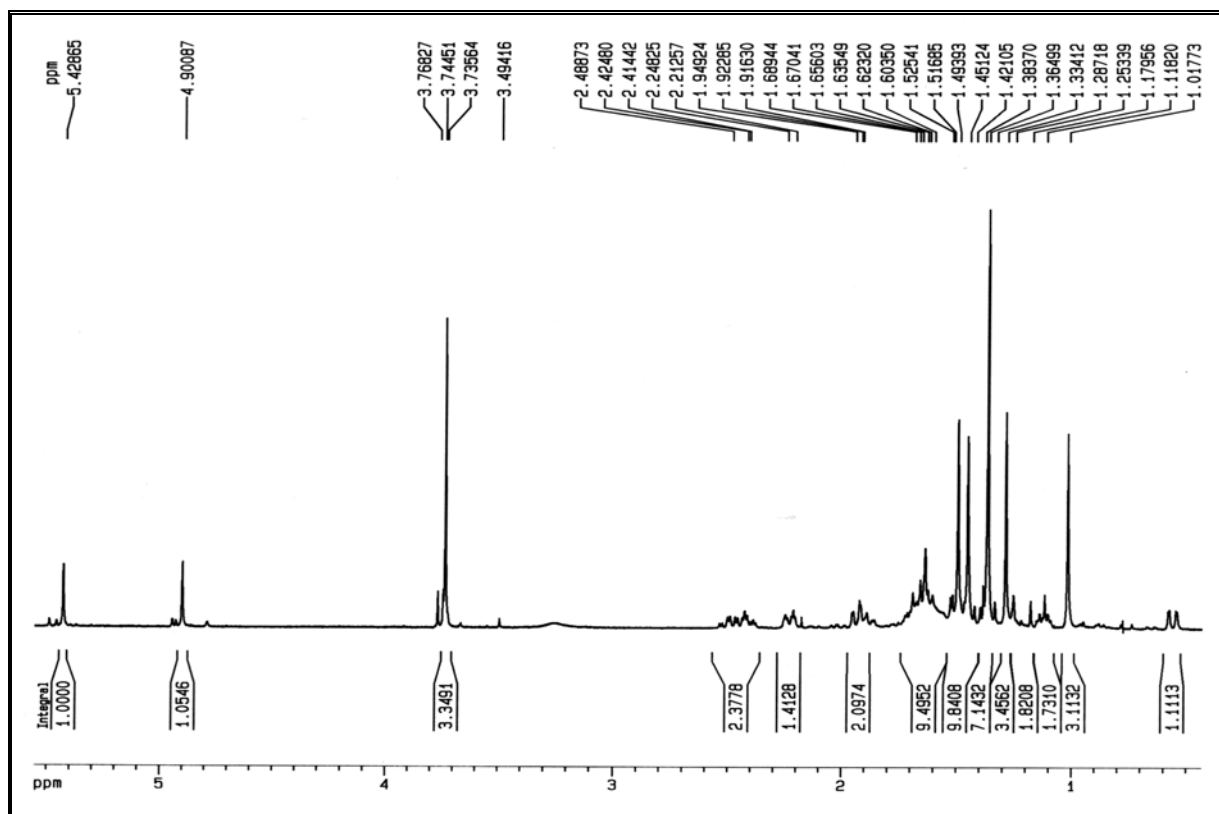


Apêndice 2.11.1 – Espectro de massas de **PSP-9**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

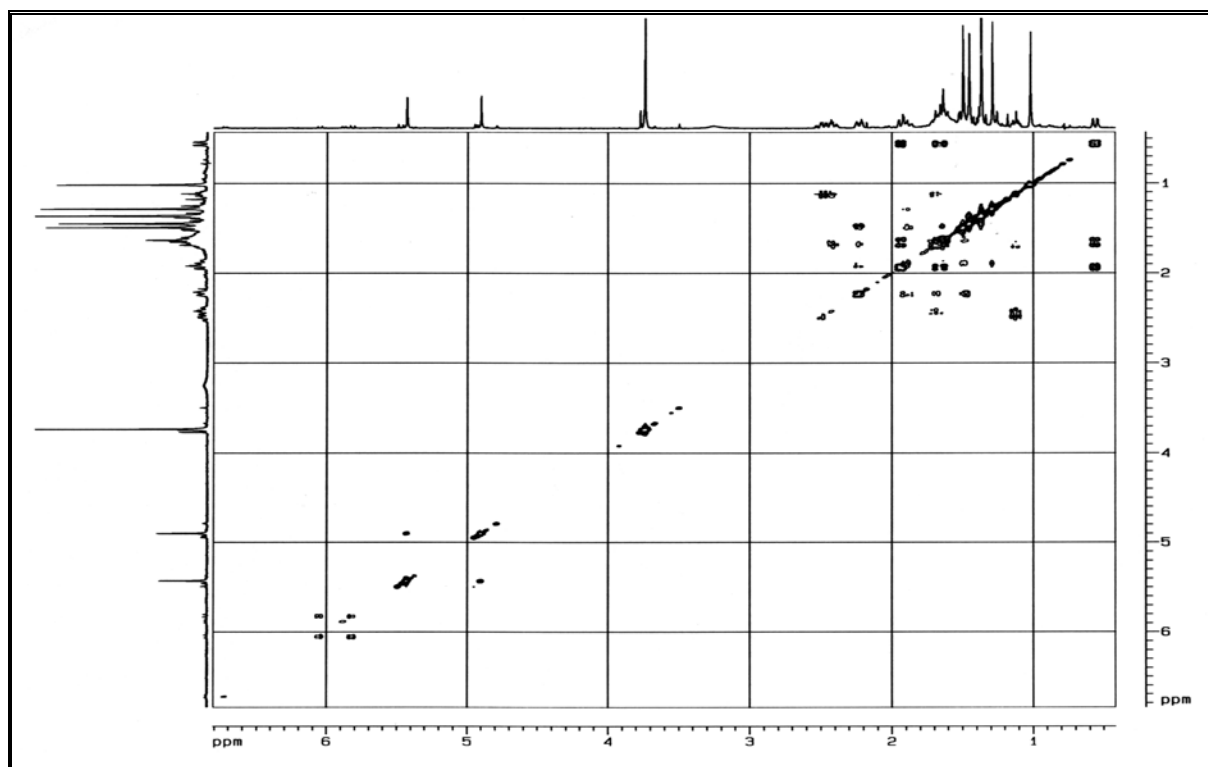


Apêndice 2.11.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-9** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

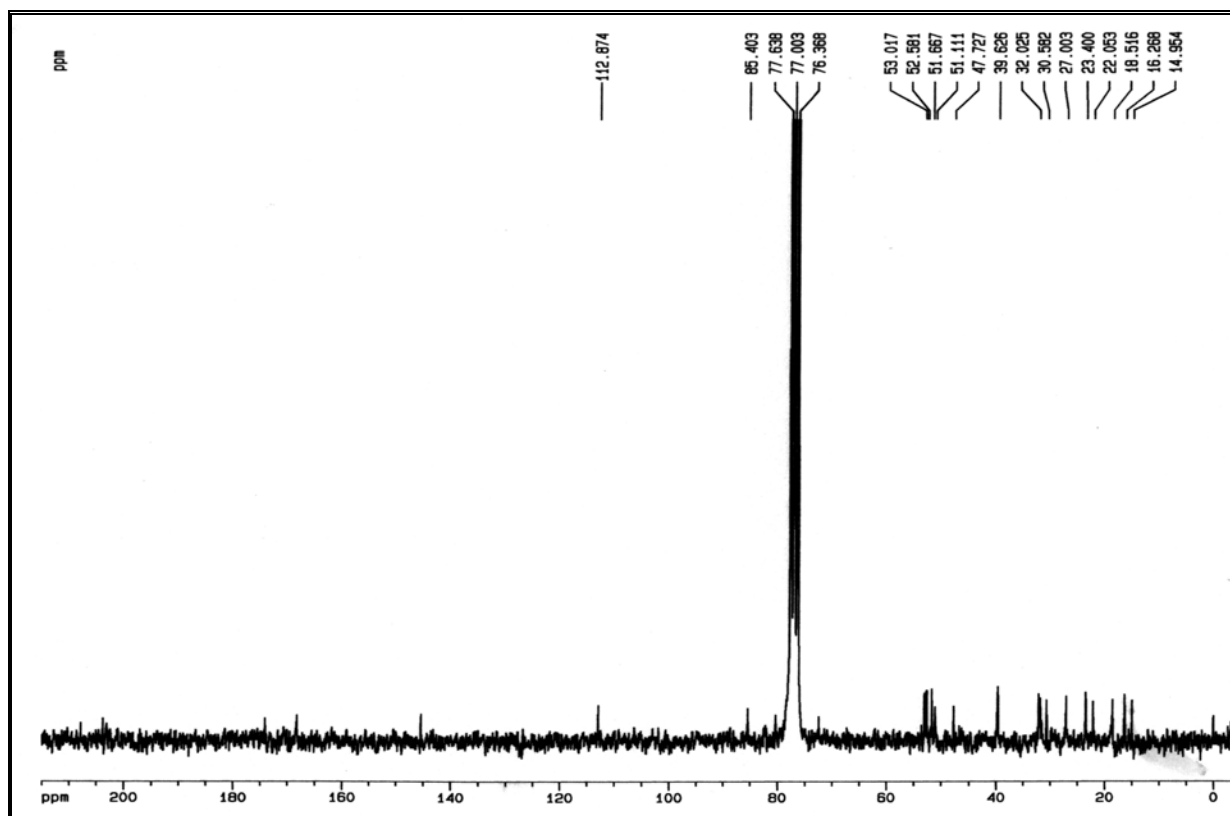


Apêndice 2.11.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PSP-9 (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

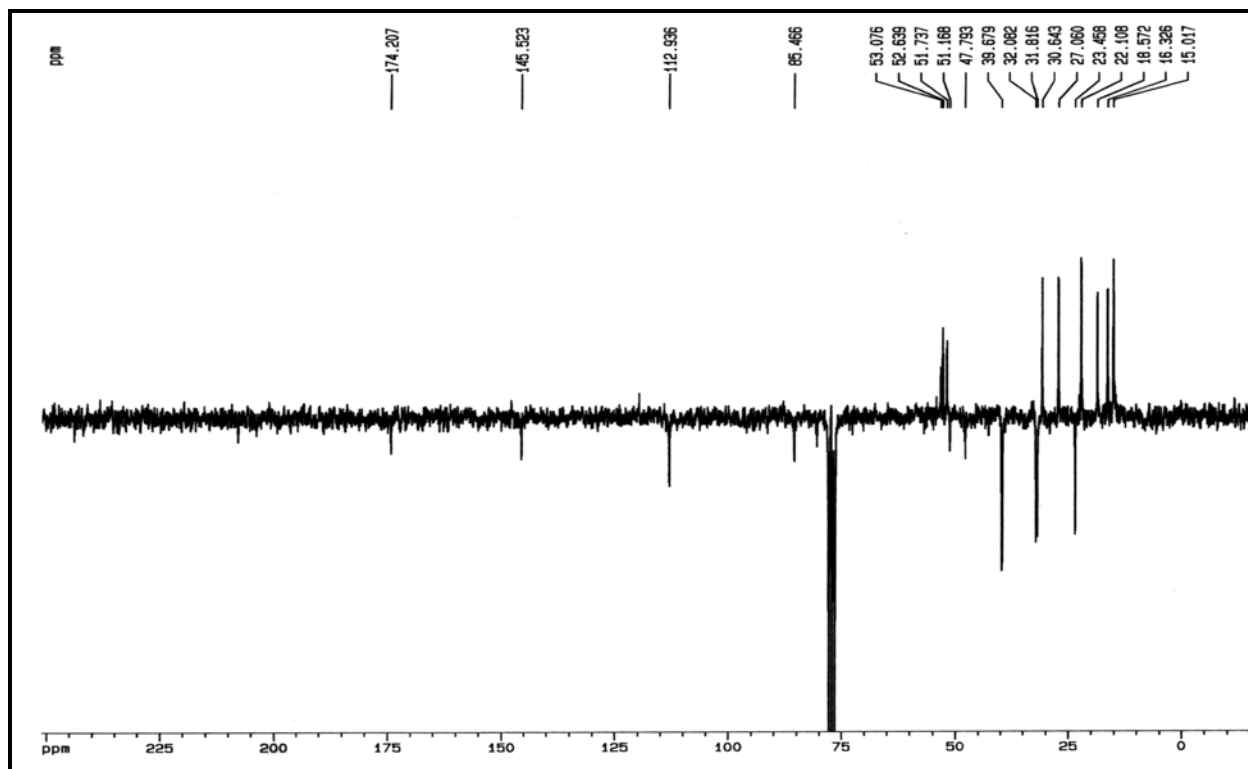


Apêndice 2.11.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de PSP-9 (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium sp*



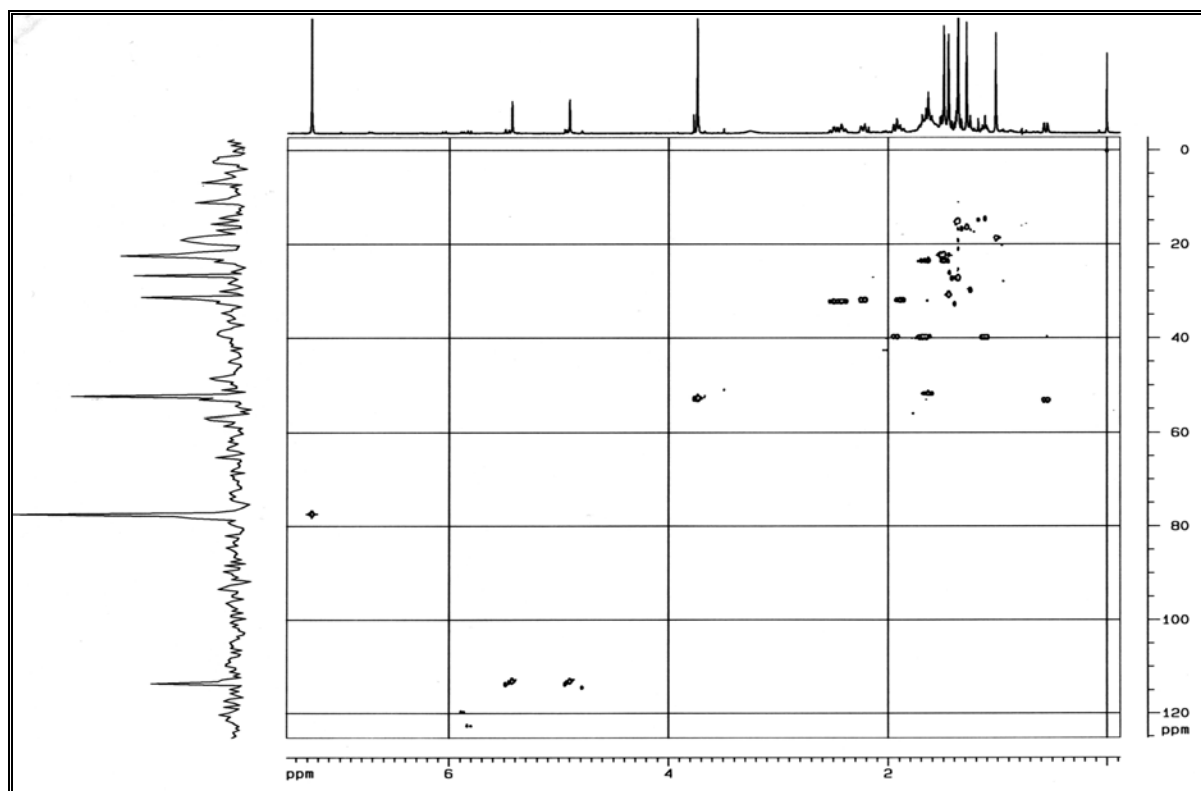
Apêndice 2.11.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-9** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).



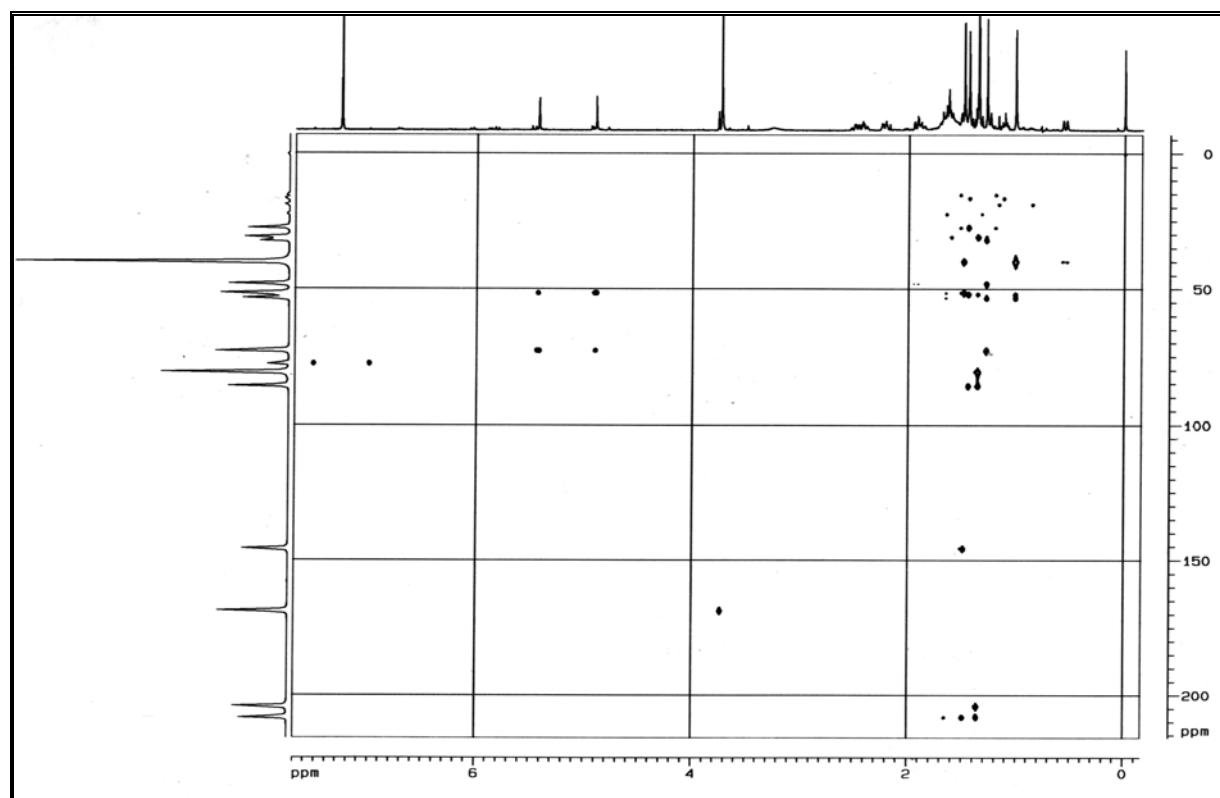
Apêndice 2.11.6 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C - PENDANT de **PSP-9** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).



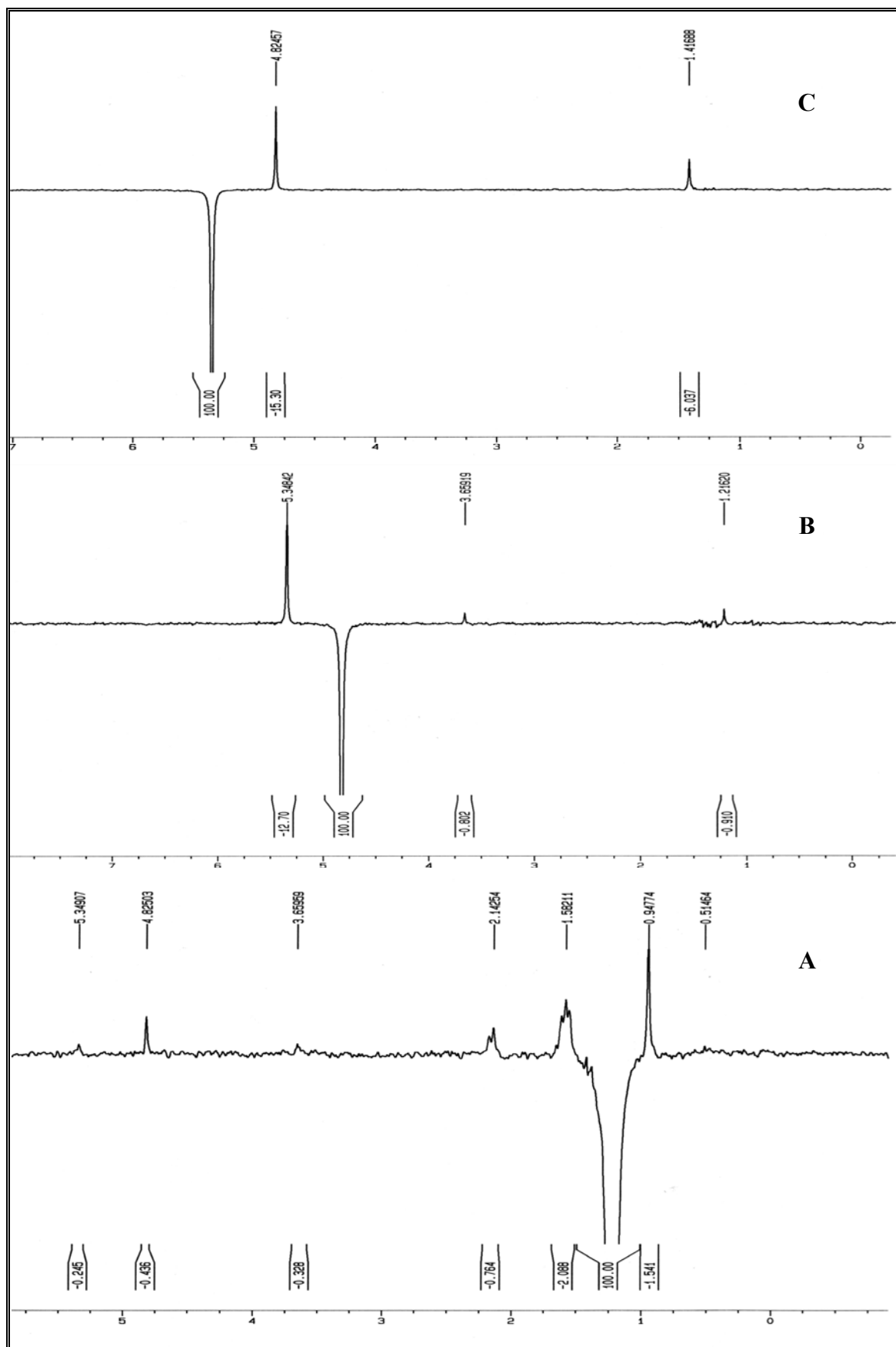
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



Apêndice 2.11.7 – Espectro de HSQC de PSP-9 (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

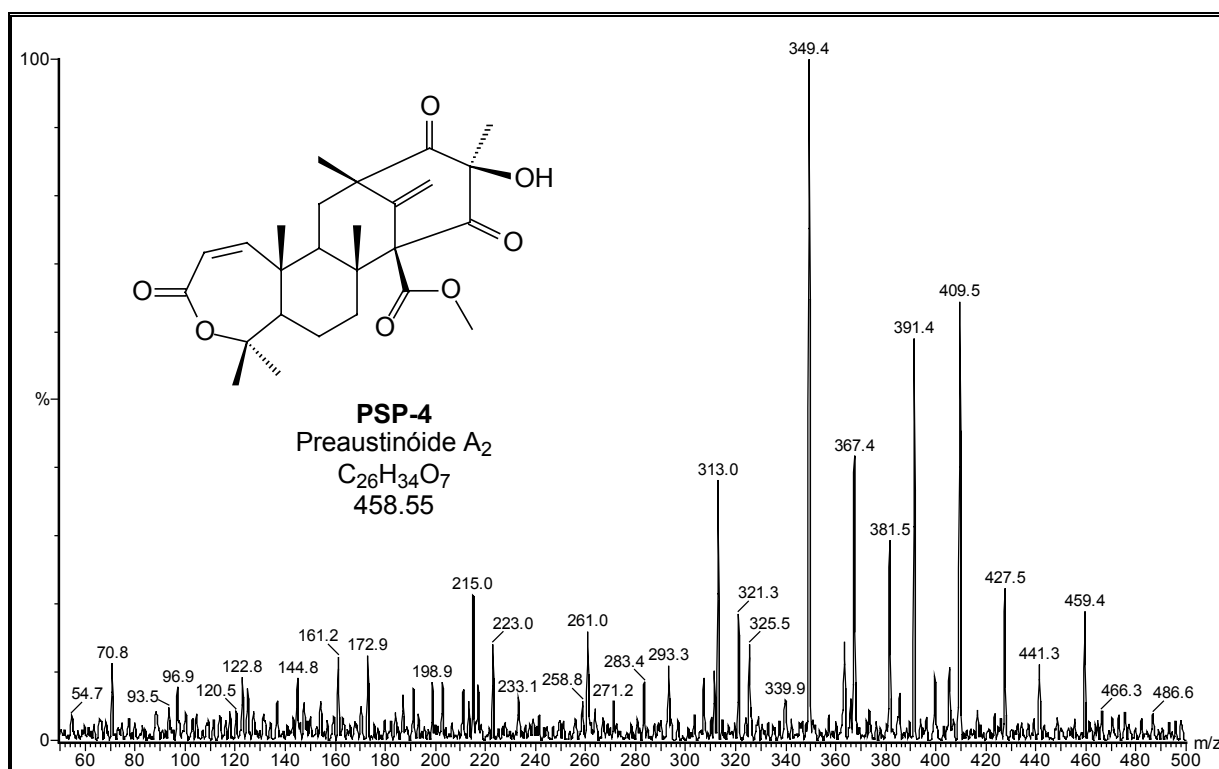


Apêndice 2.11.8 – Espectro de HMBC de **PSP-9** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

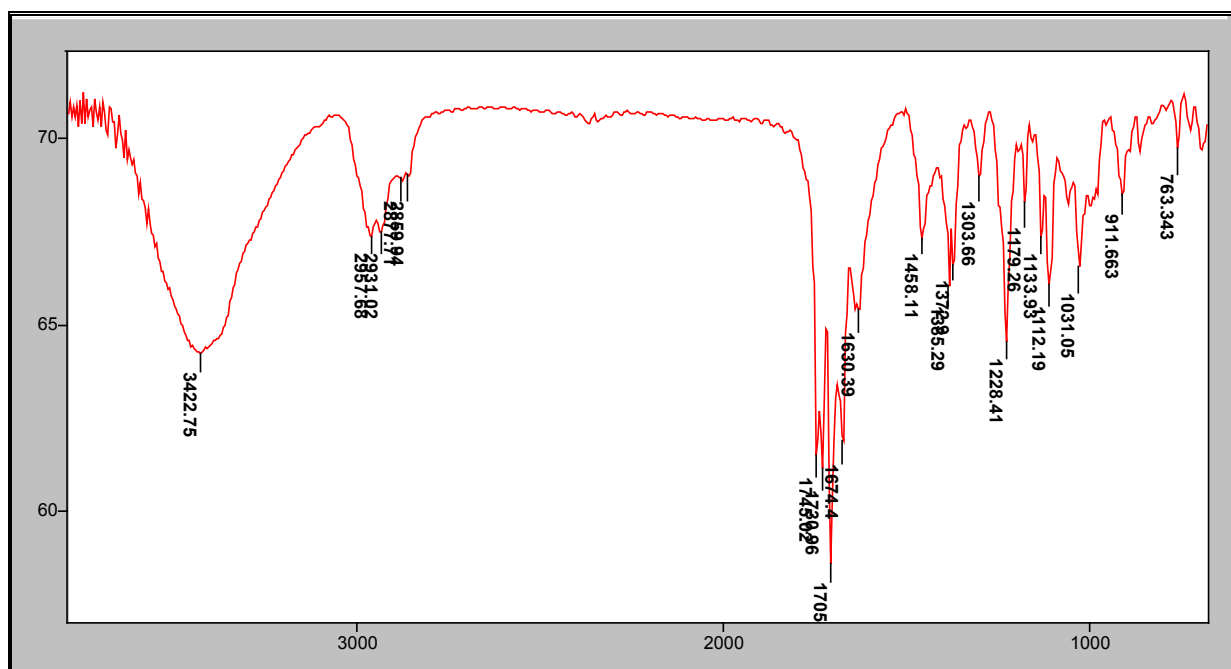


Apêndice 2.11.9 – Espectro de NOESY de **PSP-9** (400 MHz, Clorofórmio-*d*). A) Irradiação do hidrogênio H-12; B) Irradiação do hidrogênio H-1'a; C) Irradiação do hidrogênio H-1'b.

## 2.12. PSP-4

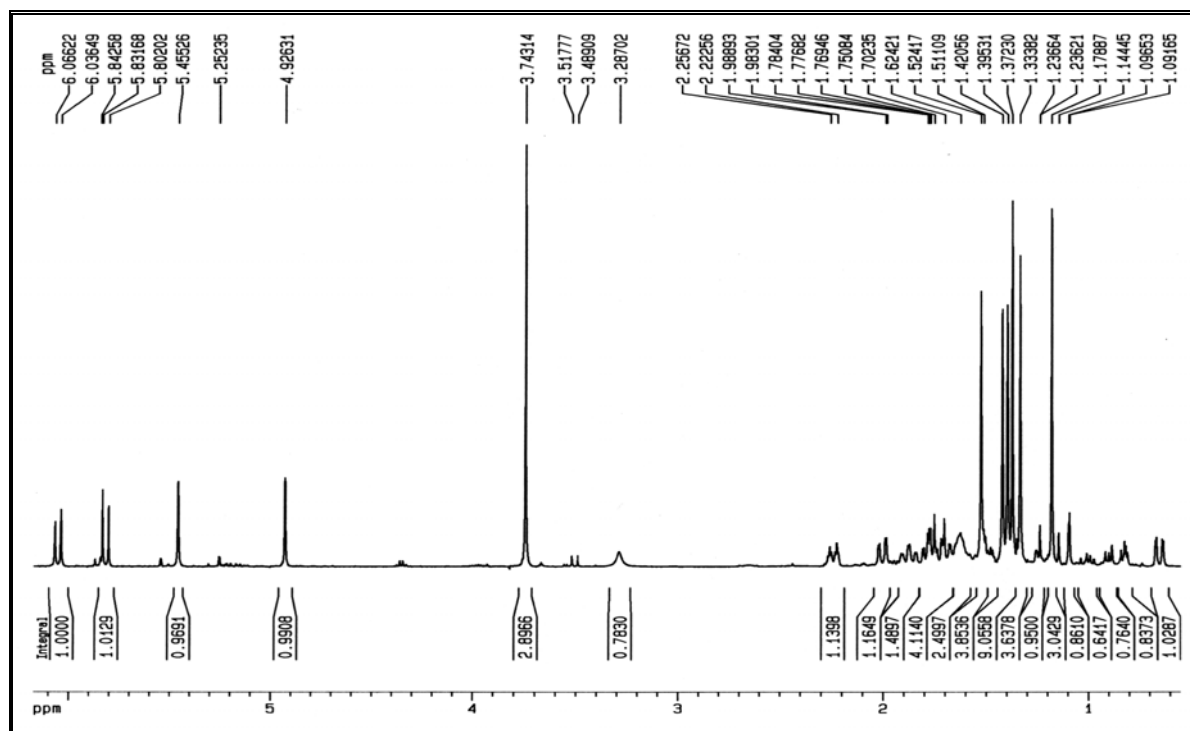


Apêndice 2.12.1 – Espectro de massas de **PSP-4**, obtido via APCI-MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

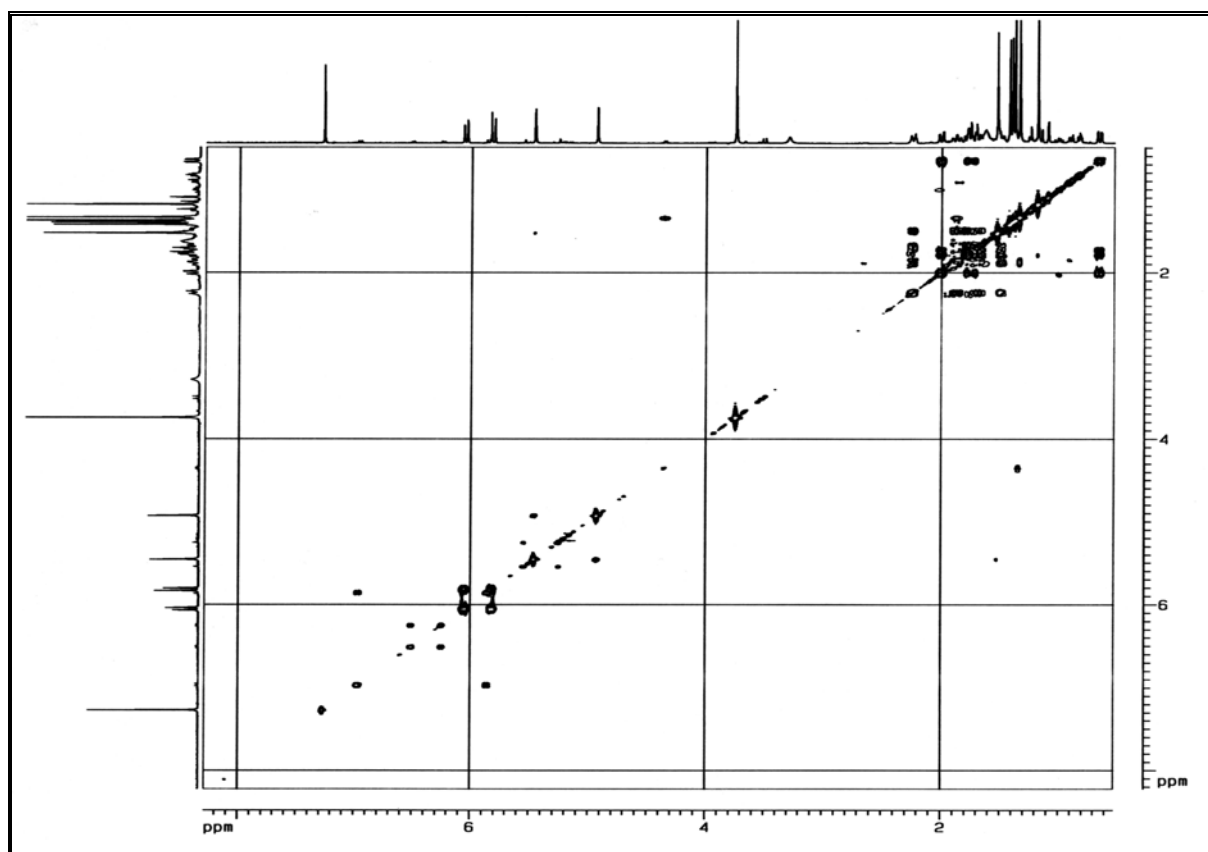


Apêndice 2.12.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-4** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

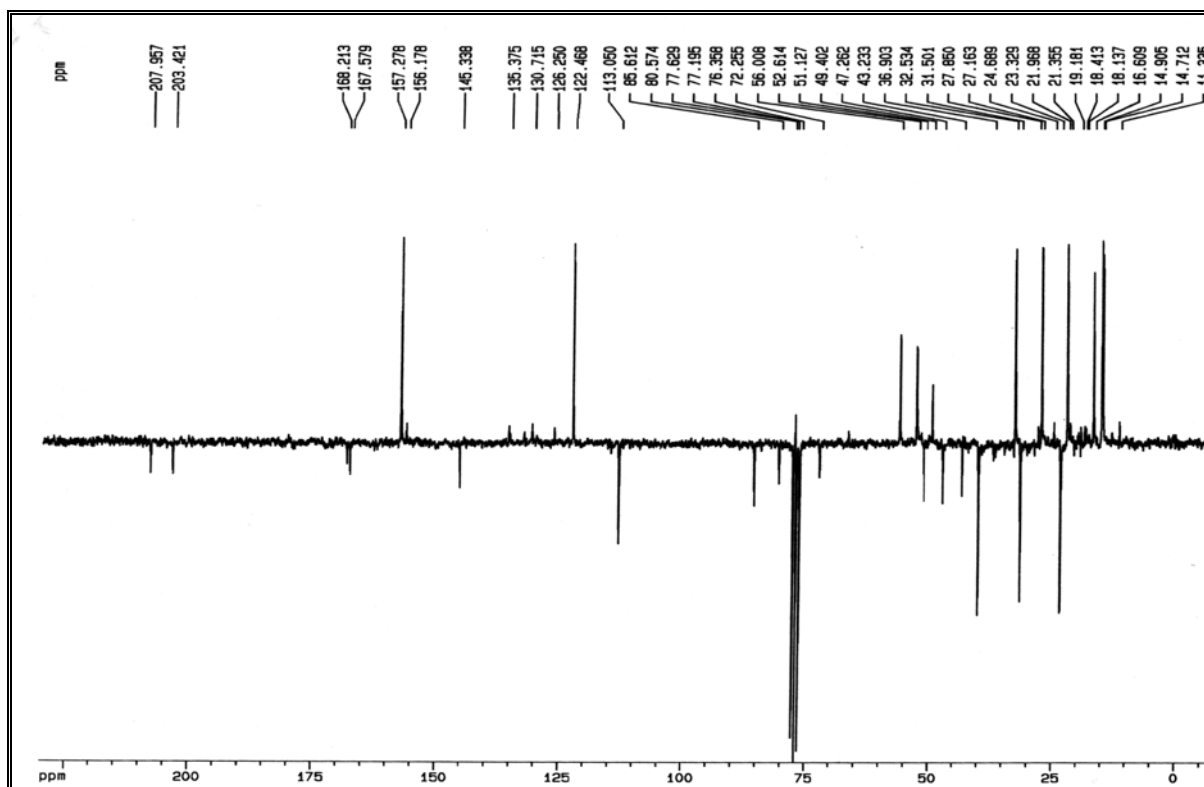


Apêndice 2.12.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-4** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

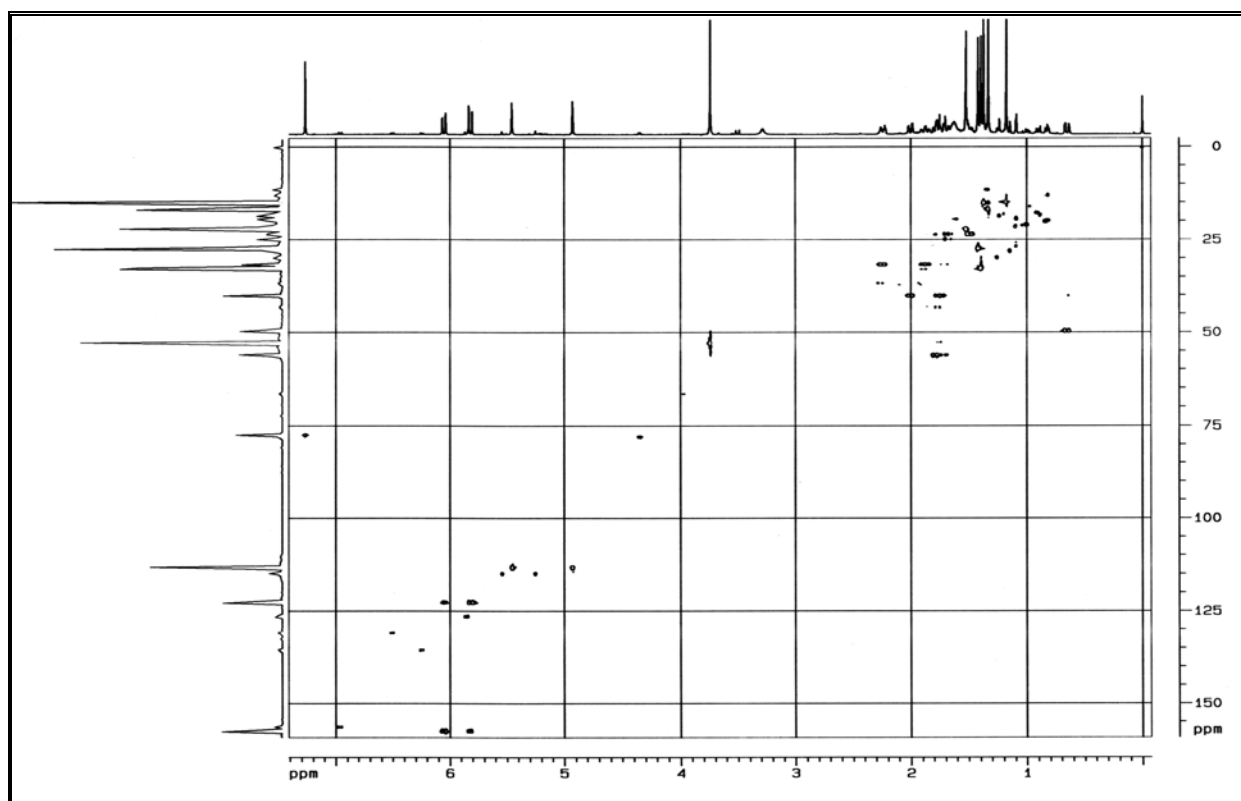


Apêndice 2.12.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-4** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

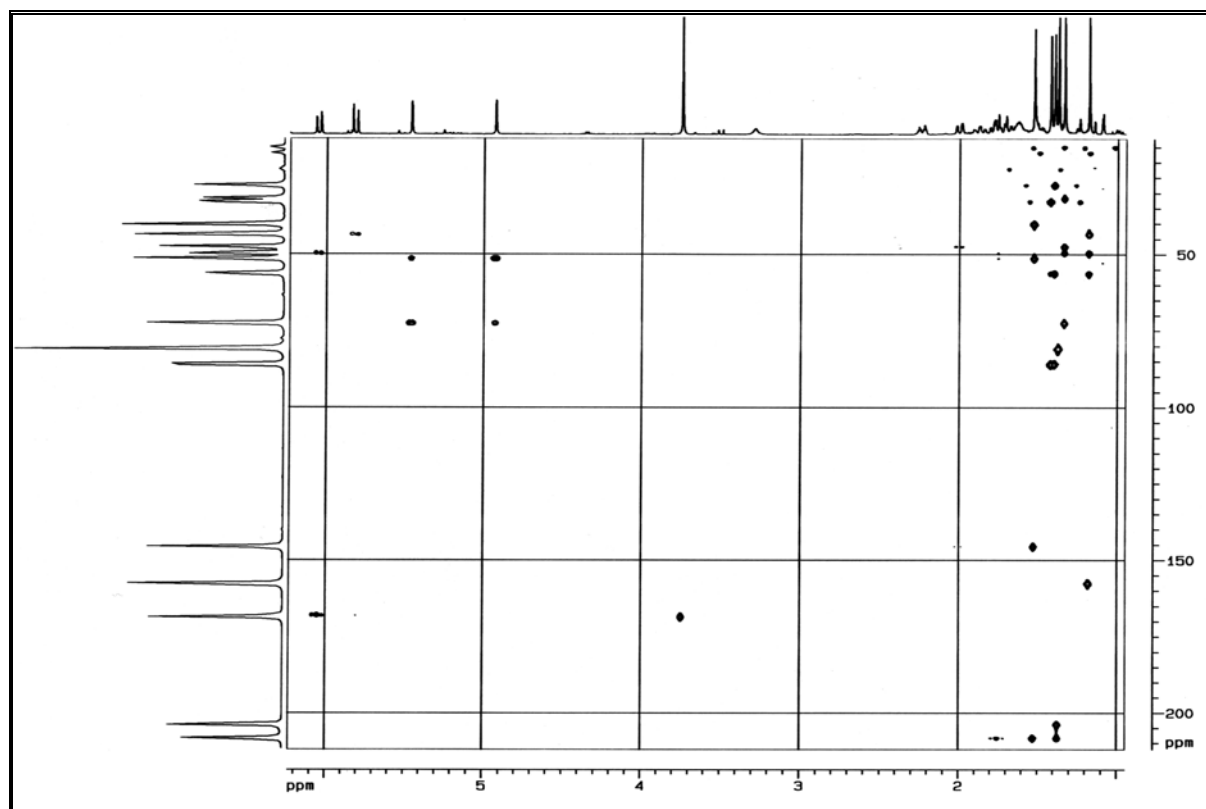
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



Apêndice 2.12.5 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - PENDANT de **PSP-4** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



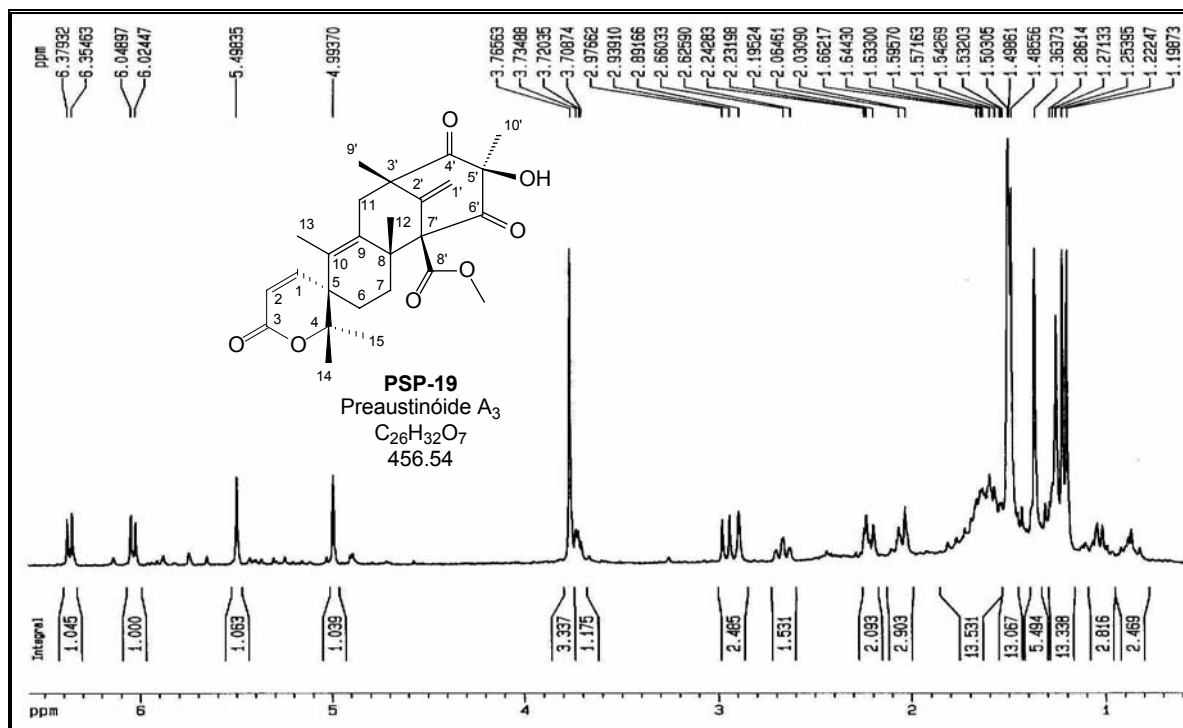
Apêndice 2.12.6 – Espectro de HSQC de **PSP-4** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



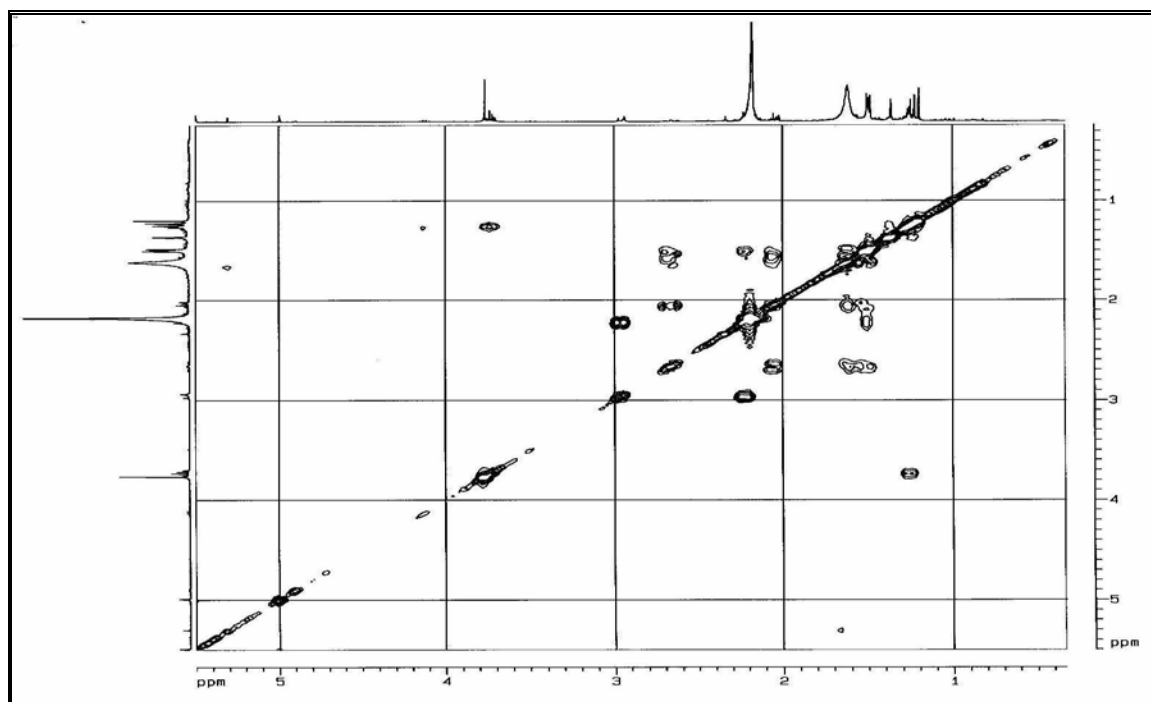
Apêndice 2.12.7 – Espectro de HMBC de **PSP-4** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



## 2.13. PSP-19



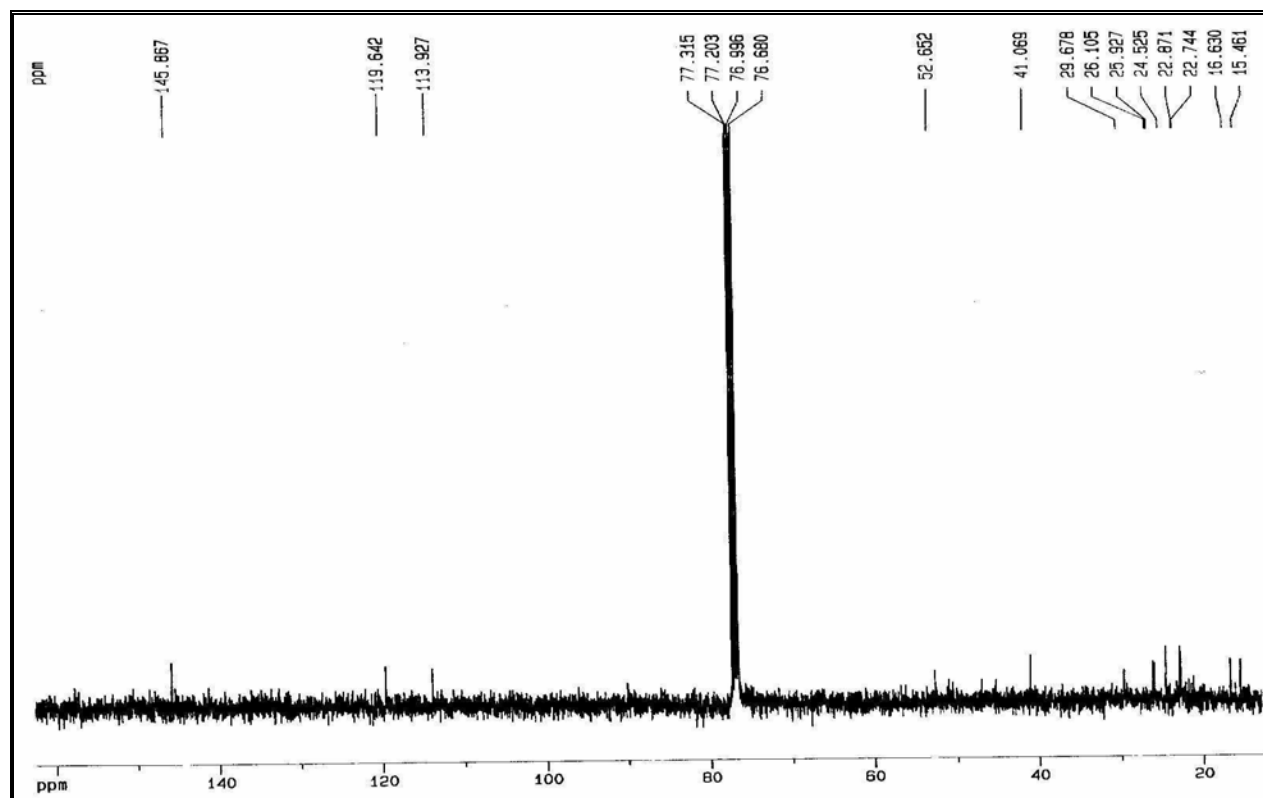
Apêndice 2.13.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-19** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



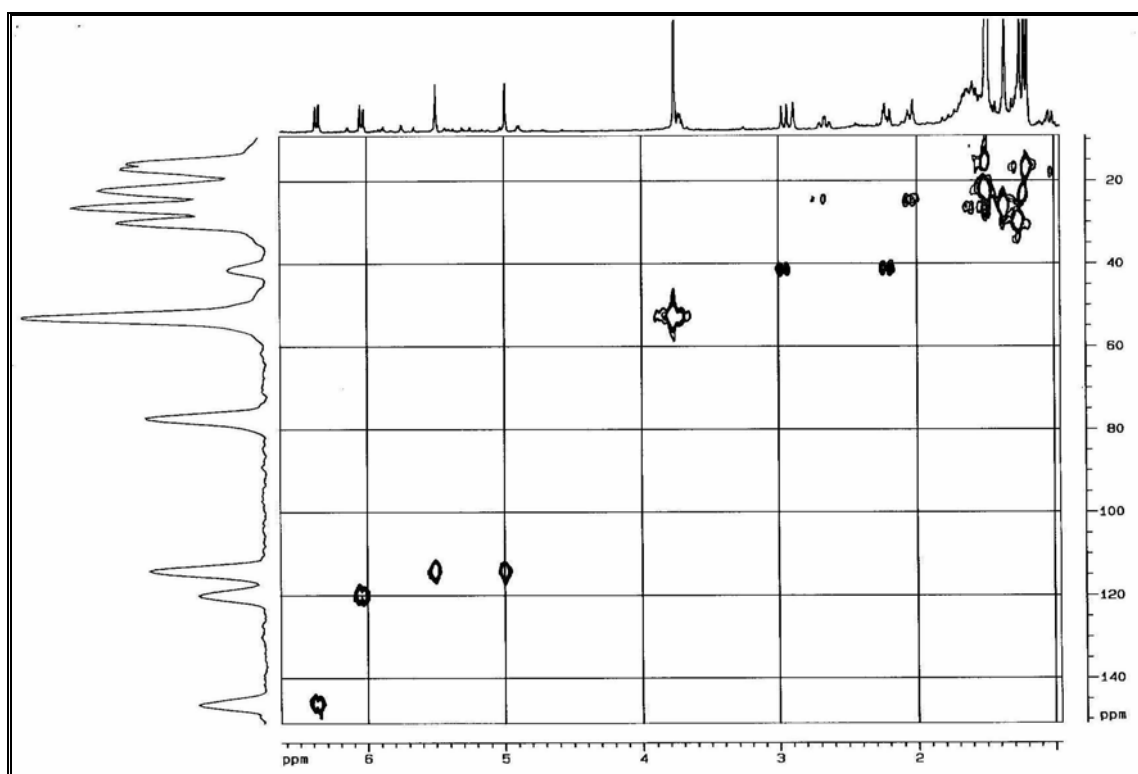
Apêndice 2.13.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-19** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



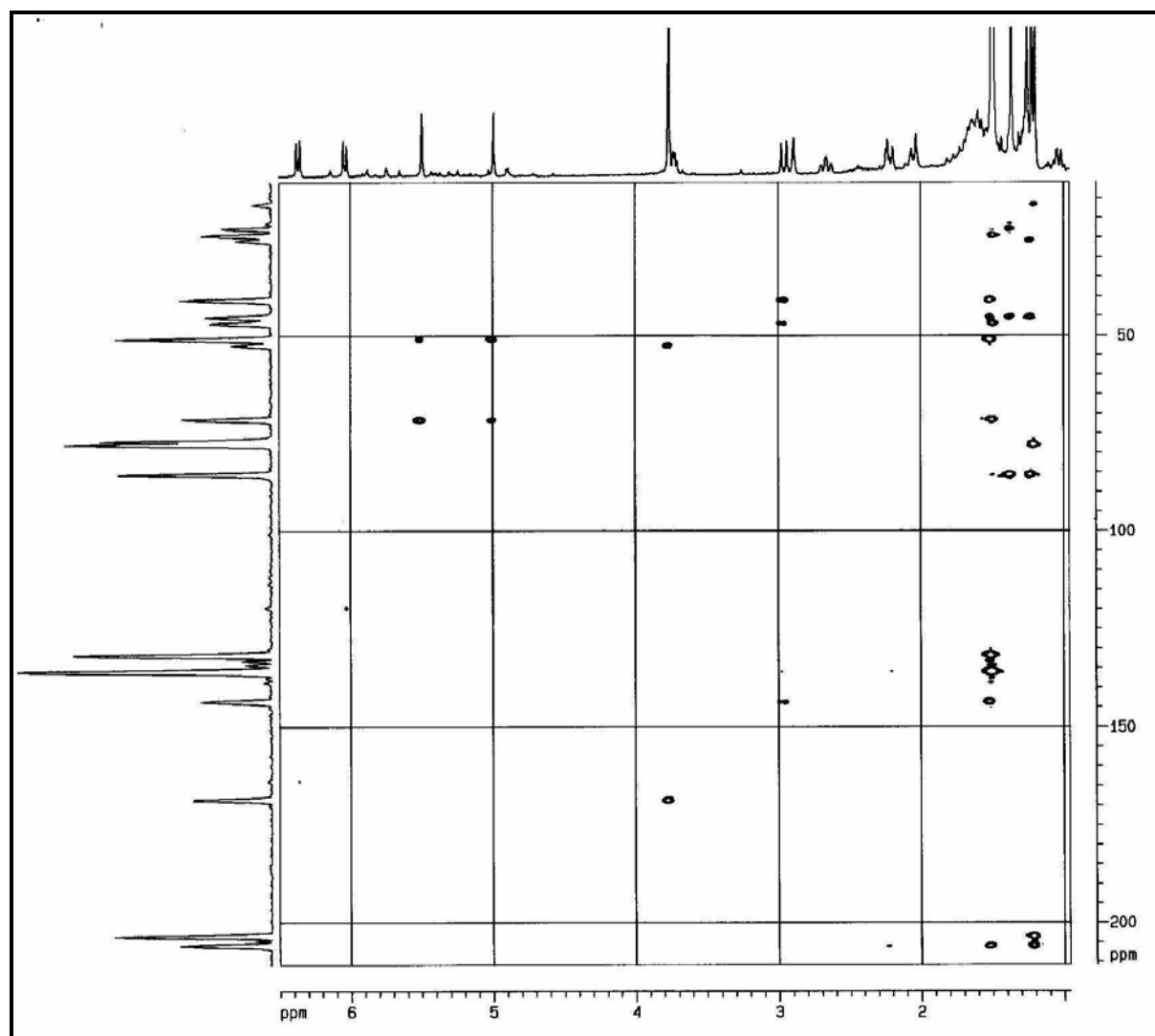
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



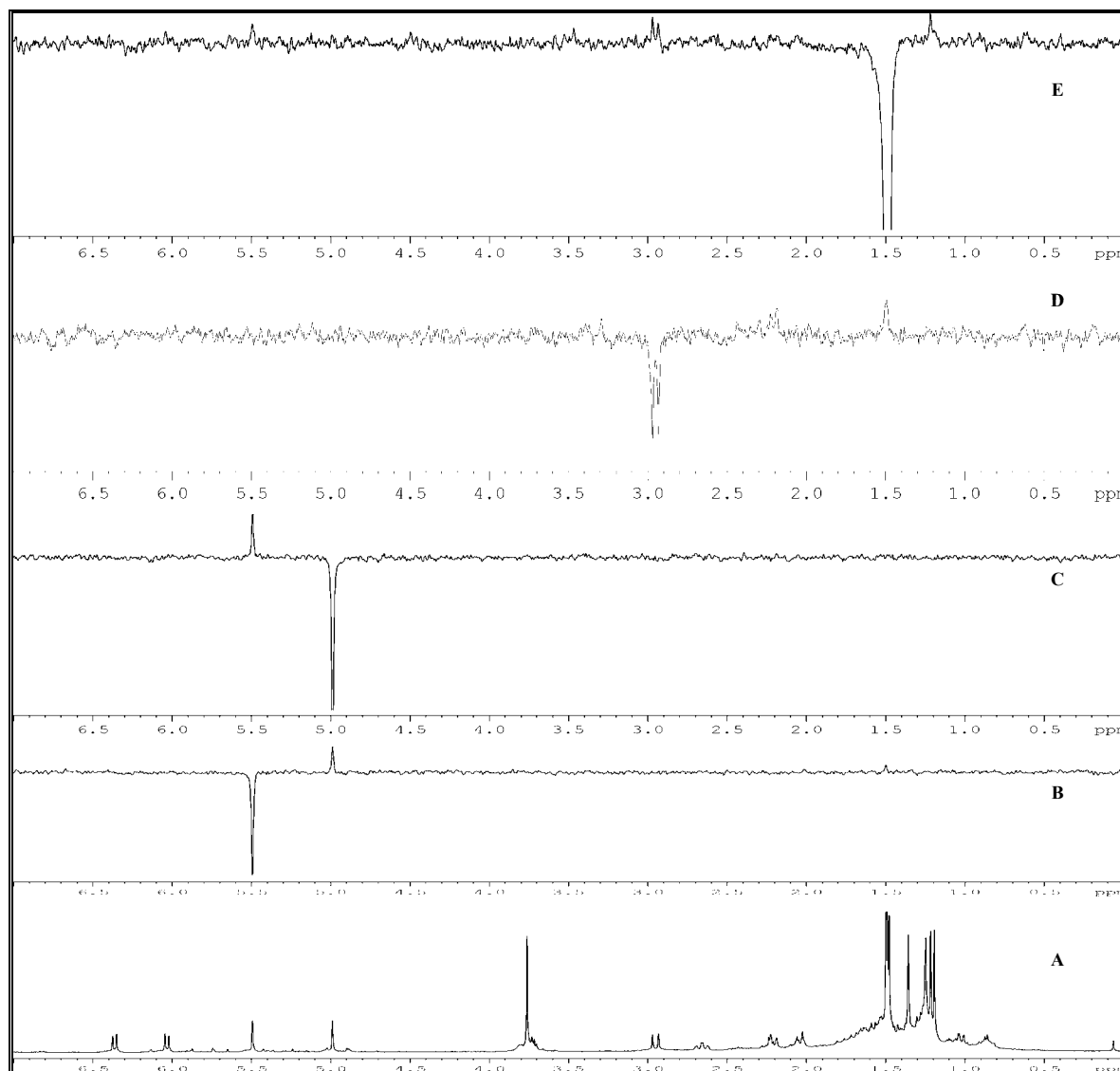
Apêndice 2.13.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-19** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



Apêndice 2.13.6 – Espectro de HSQC de **PSP-19** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

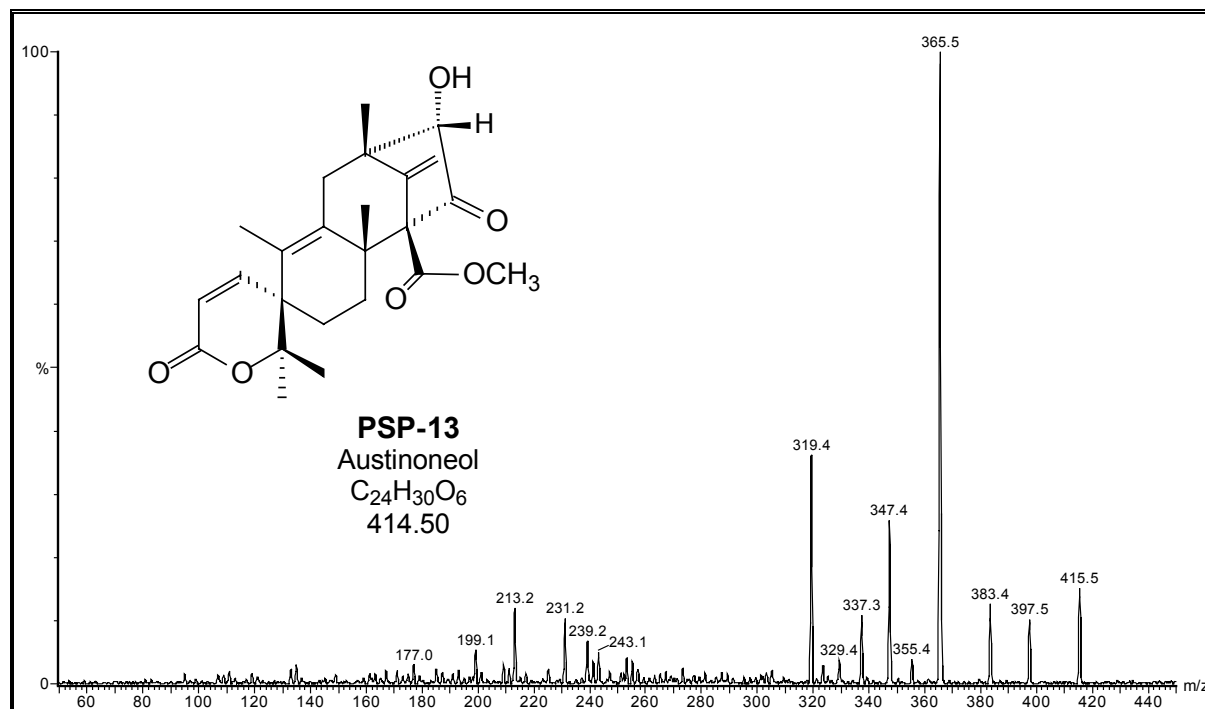


Apêndice 2.13.7 – Espectro de HMBC de **PSP-19** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

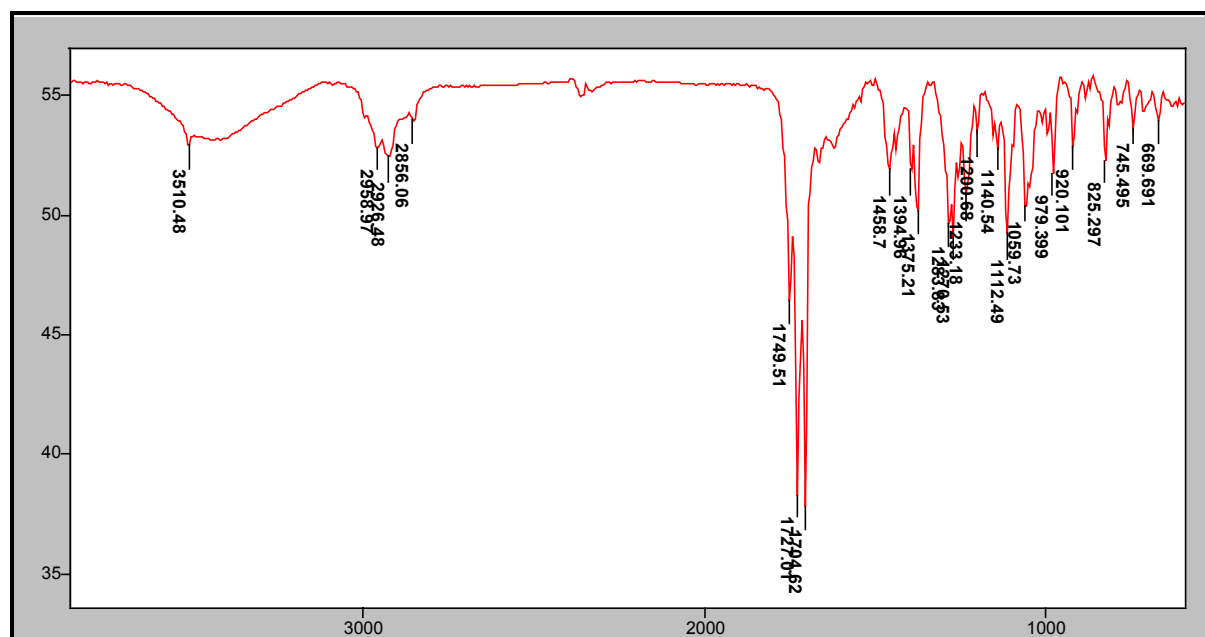


Apêndice 2.13.8 – Espectro de NOESY de **PSP-19** (400 MHz, Clorofórmio-*d*). A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ; B) Irradiação do hidrogênio H-1'b; C) Irradiação do hidrogênio H-1'a; D) Irradiação do hidrogênio H-11β; E) Irradiação dos hidrogênios H-9'e H-12.

## 2.14. PSP-13

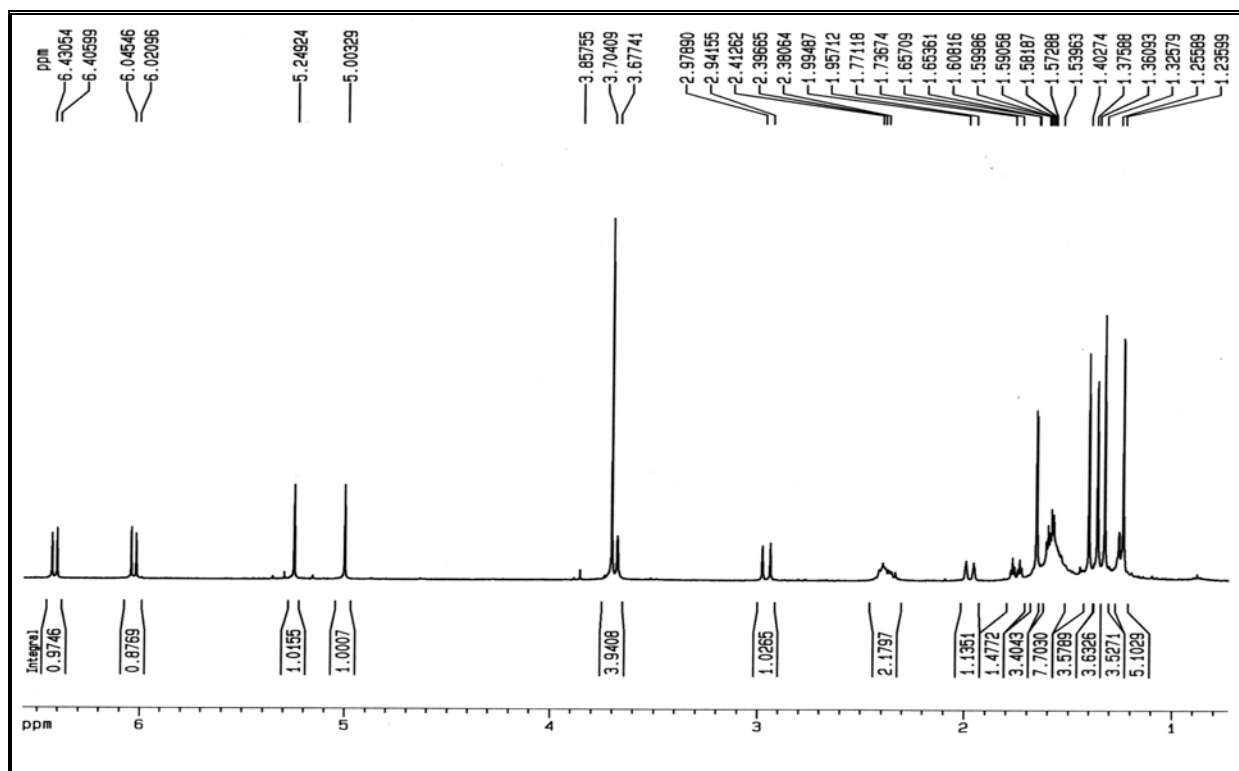


Apêndice 2.14.1 – Espectro de massas de **PSP-13**, obtido via APCI/MS-MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

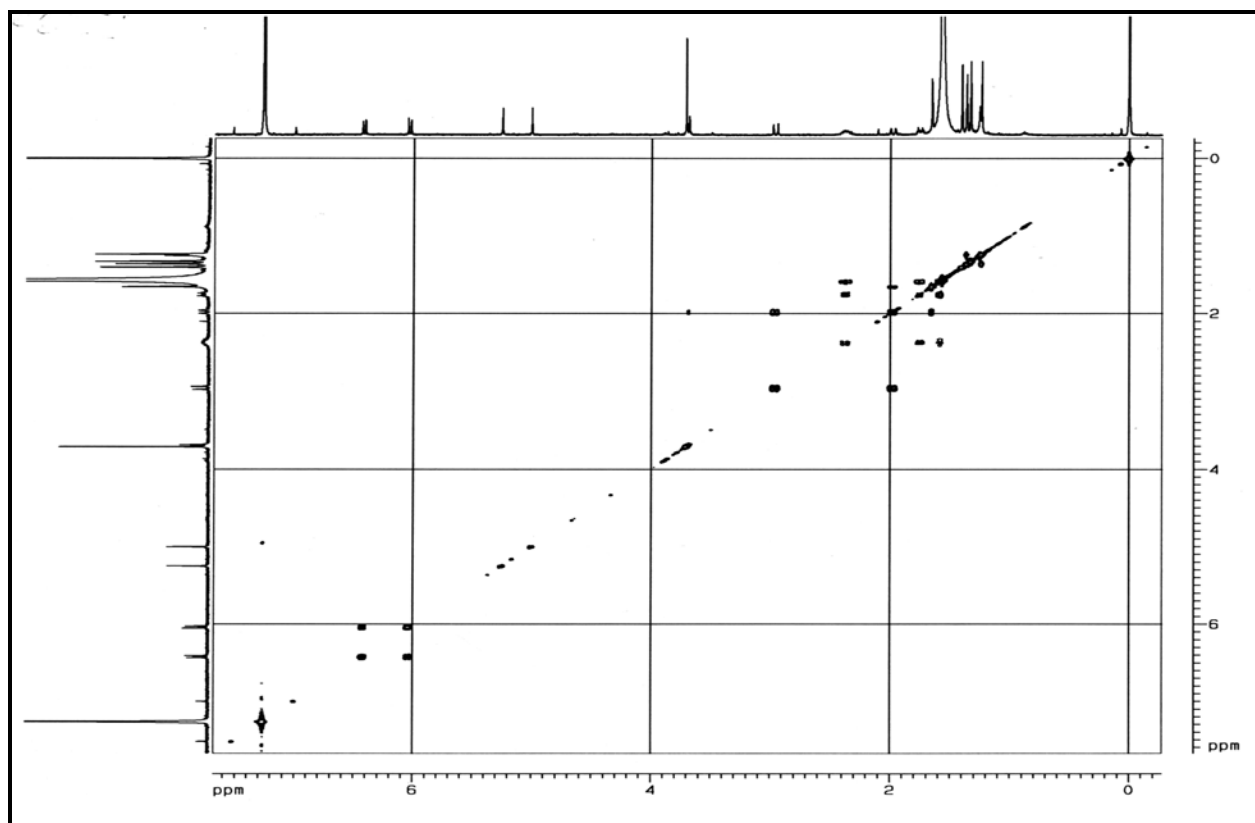


Apêndice 2.14.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-13** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

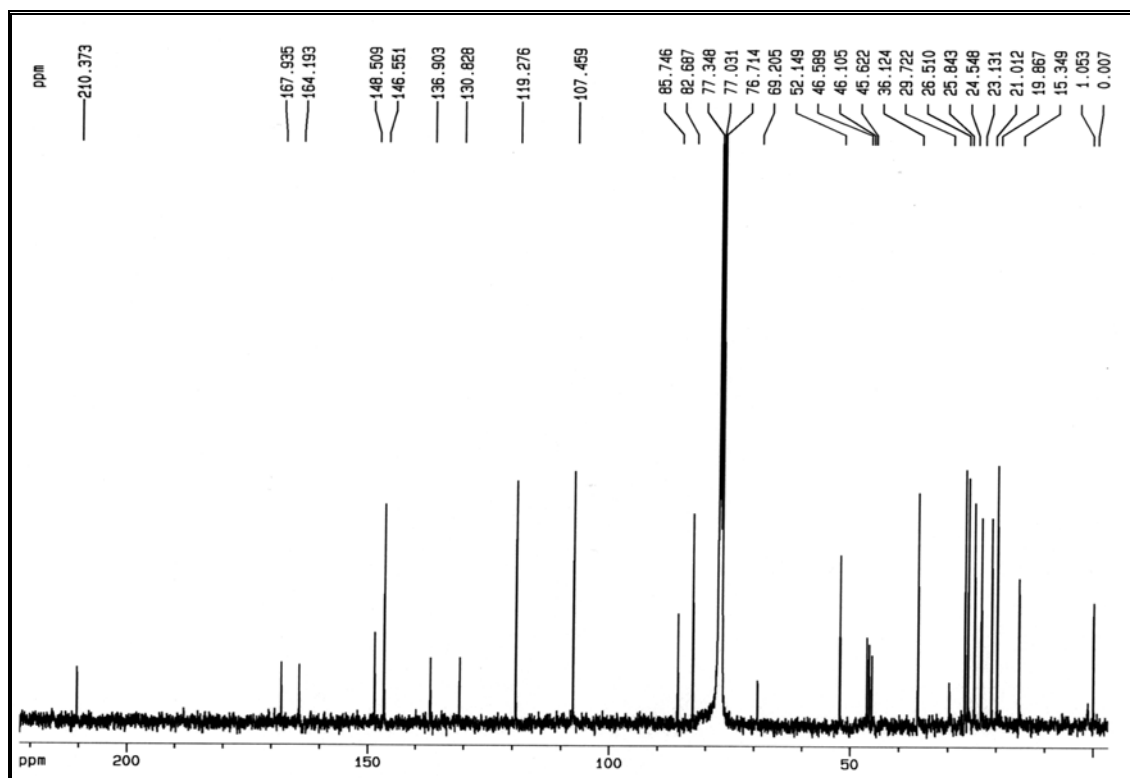


Apêndice 2.14.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-13** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

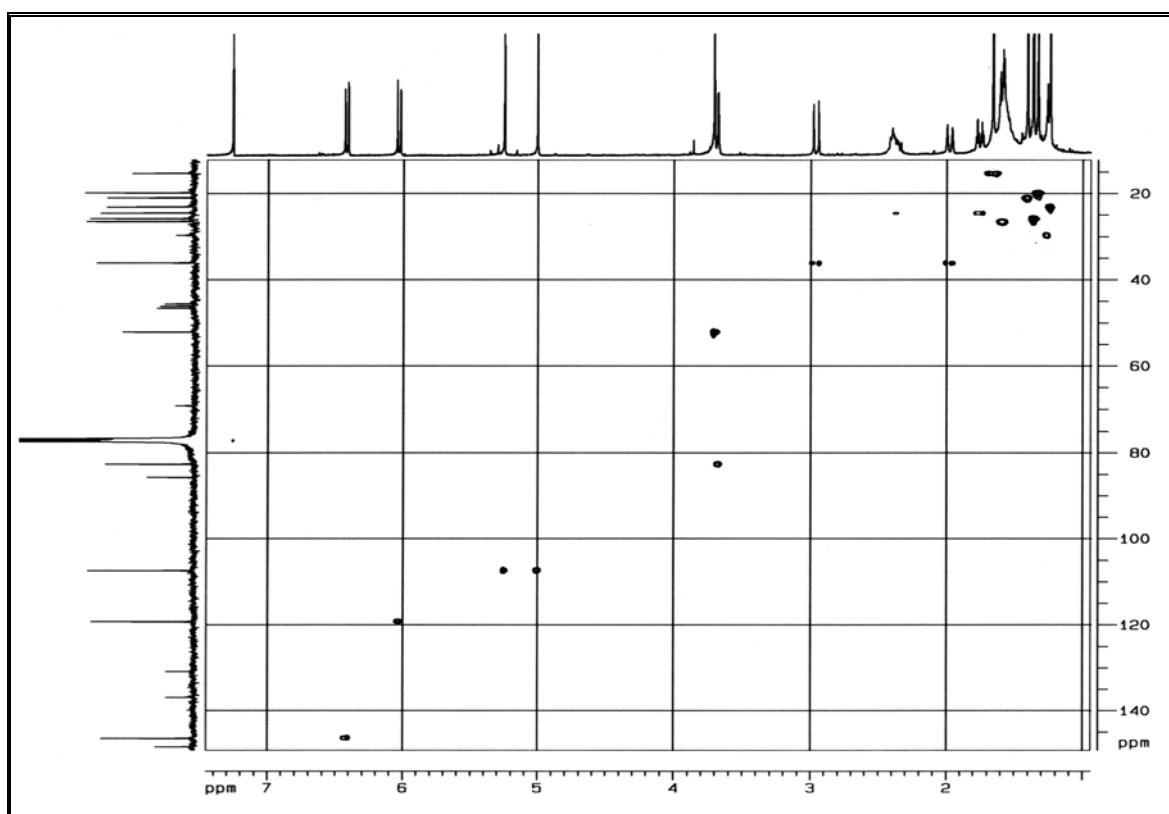


Apêndice 2.14.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  – COSY de **PSP-13** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

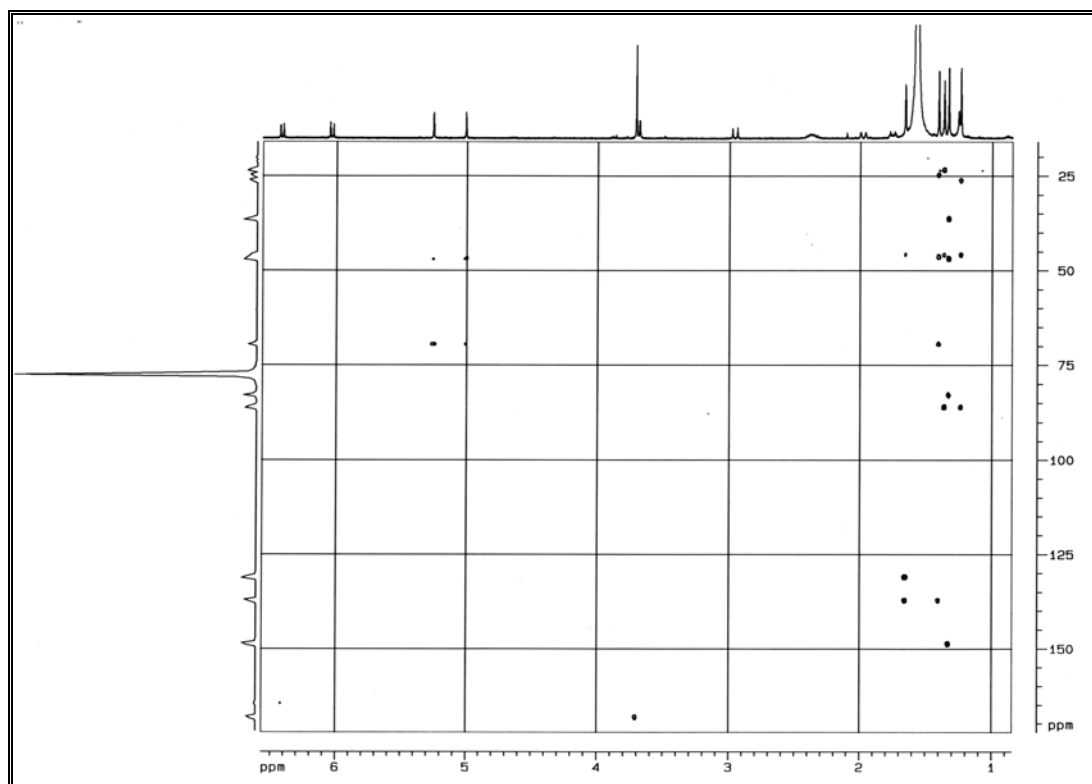


Apêndice 2.14.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-13** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).

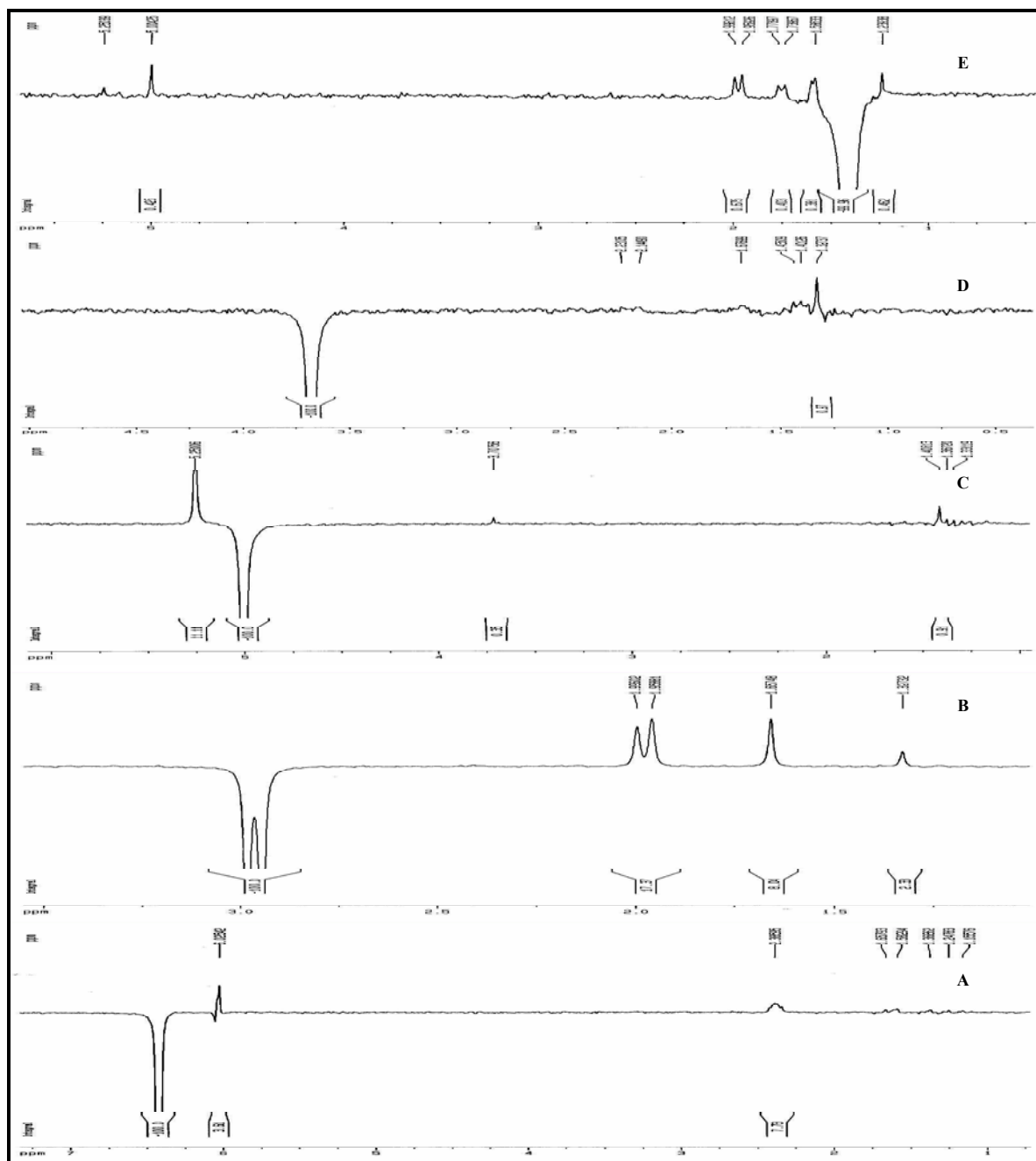


Apêndice 2.14.6 – Espectro de HMQC de **PSP-13** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



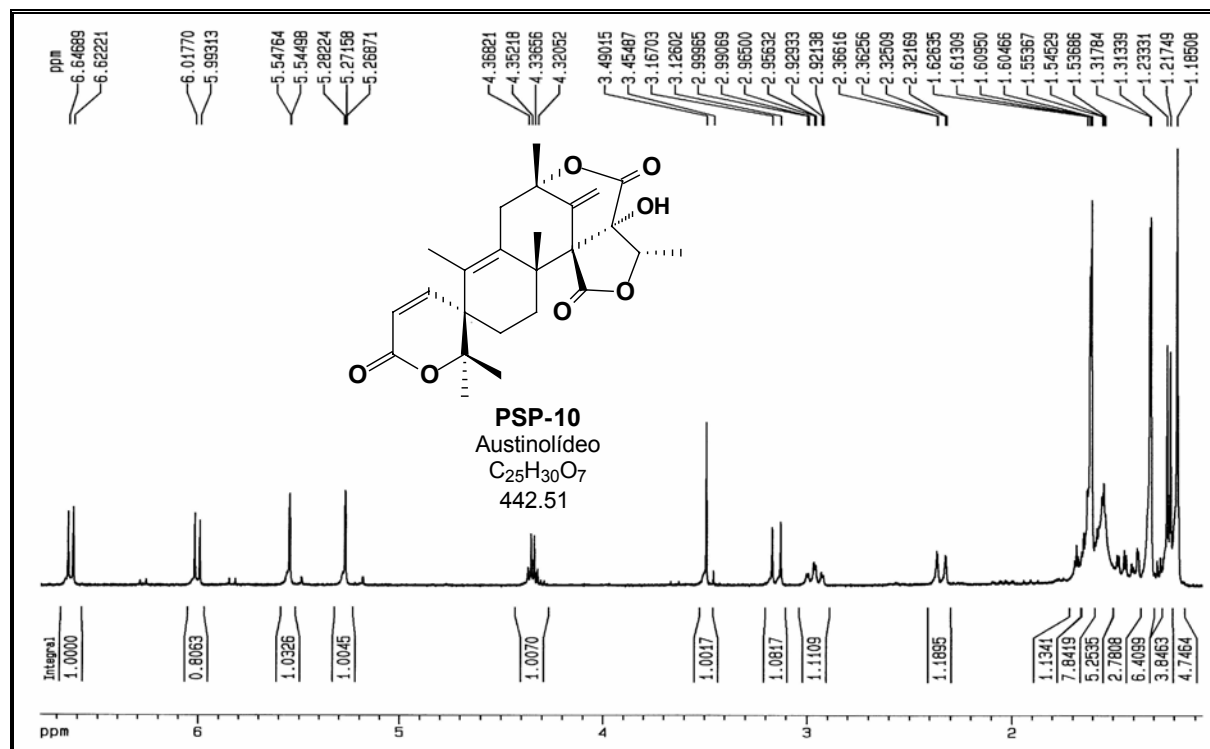
Apêndice 2.14.7 – Espectro de HMBC de **PSP-13** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



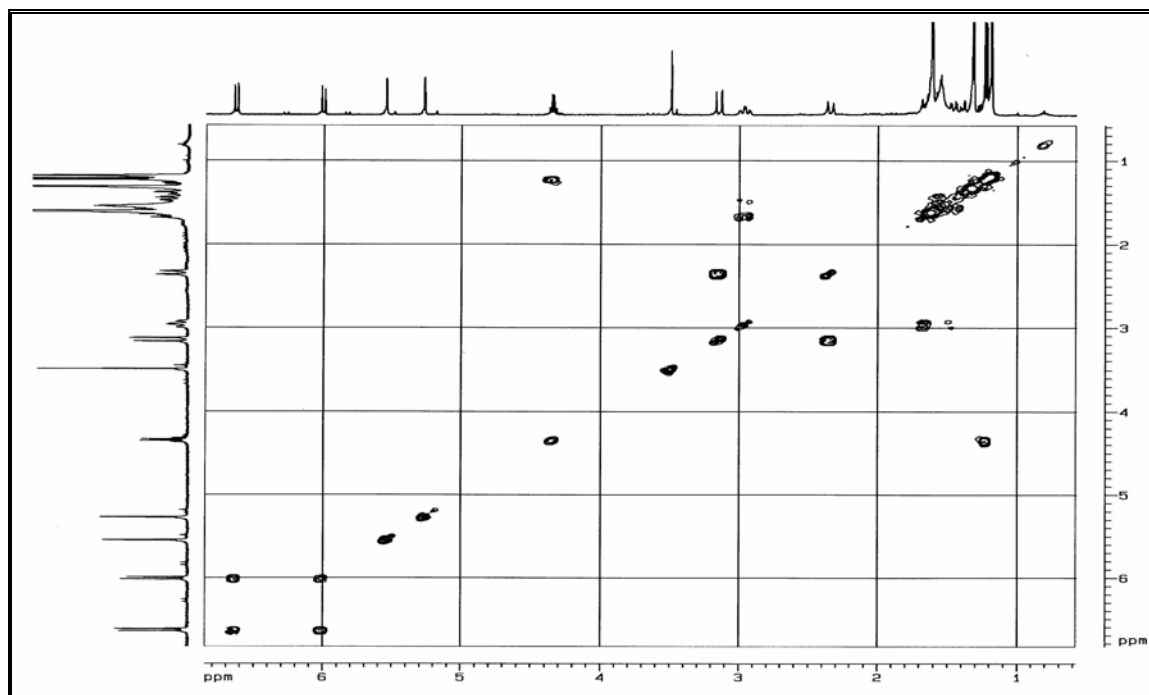
Apêndice 2.14.8 – Espectro de gNOESY de **PSP-13** (400 MHz, Clorofórmio- *d*). A) Irradiação do hidrogênio H-9'; B) Irradiação do hidrogênio H-4'; C) Irradiação do hidrogênio H-1'a; D) Irradiação do hidrogênio H-11β; E) Irradiação do hidrogênio H-1'b.



## 2.15. PSP-10

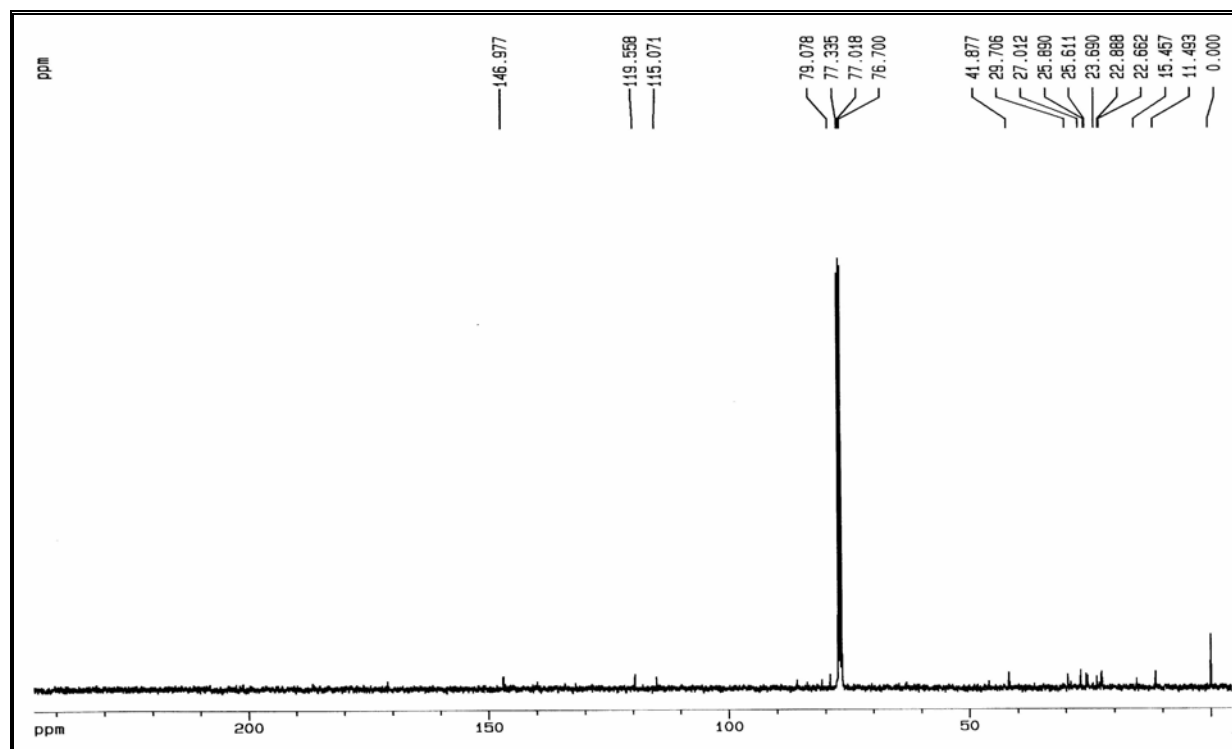


Apêndice 2.15.3 – Espectro de RMN  $^1H$  de **PSP-10** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

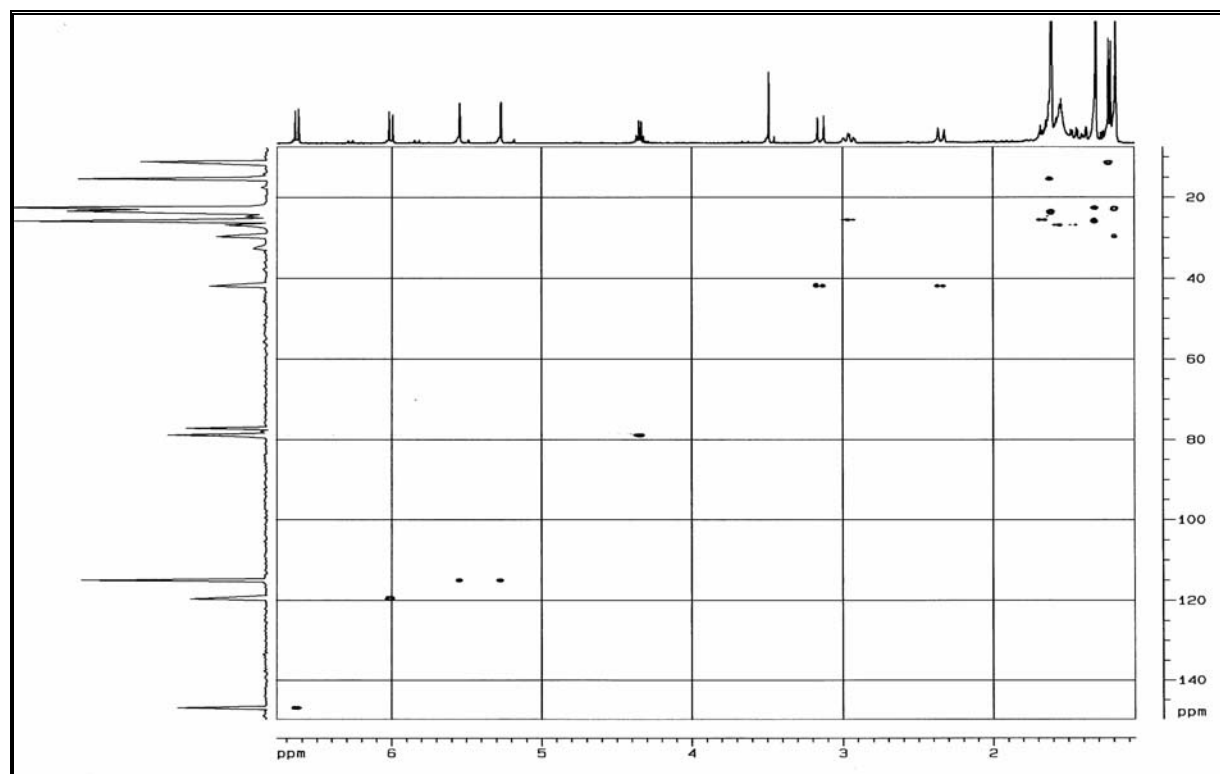


Apêndice 2.15.4 – Espectro de RMN  $^1H$  – COSY de **PSP-10** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

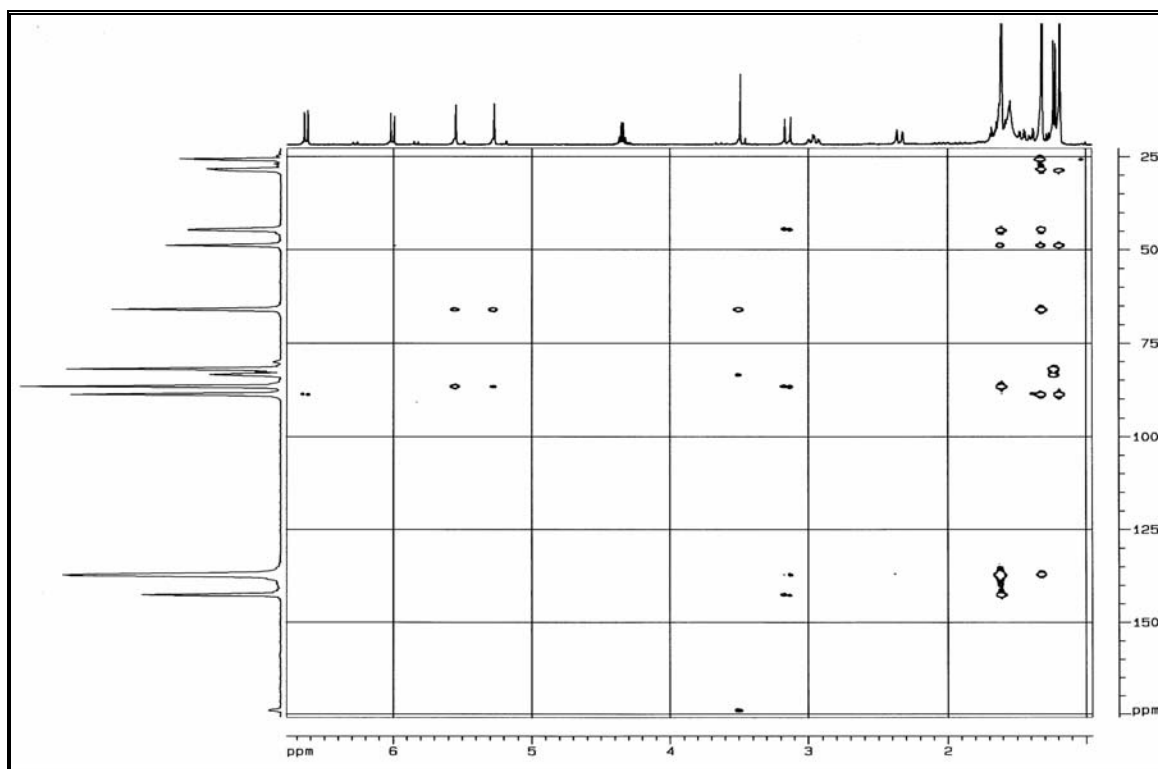
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



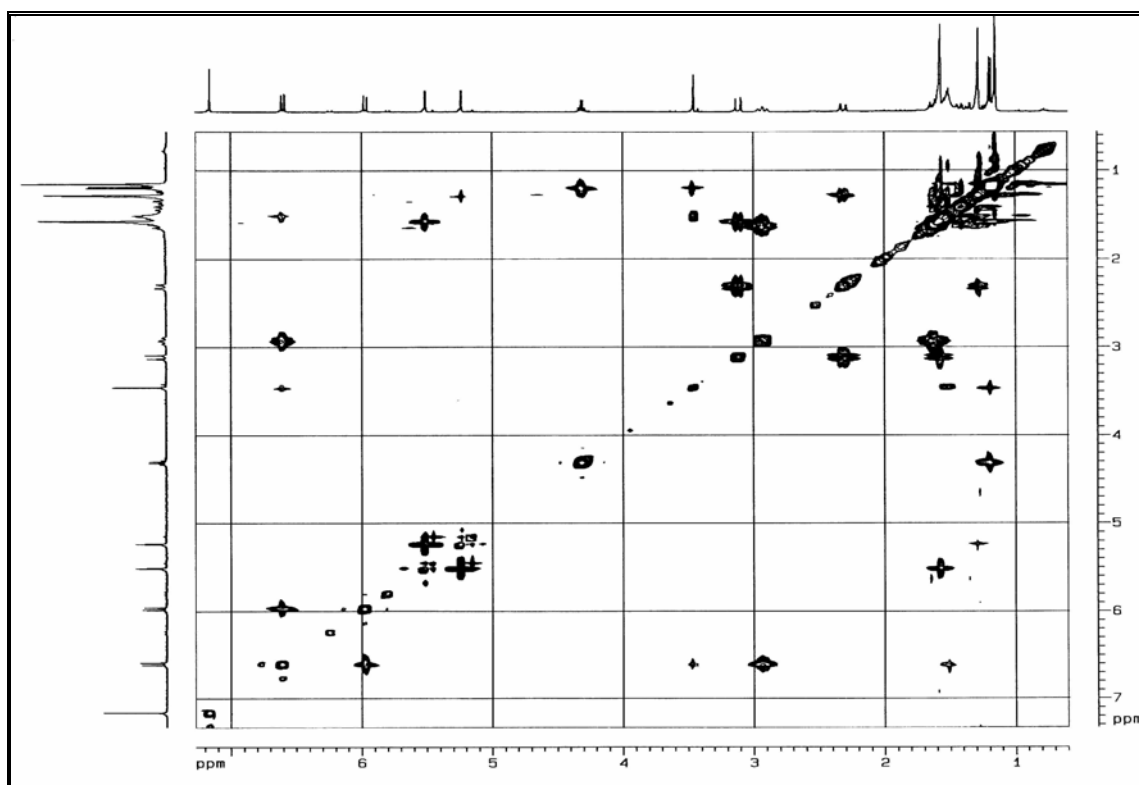
Apêndice 2.15.5 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **PSP-10** (100 MHz, Clorofórmio- *d*).



Apêndice 2.15.6 – Espectro de HSQC de **PSP-10** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

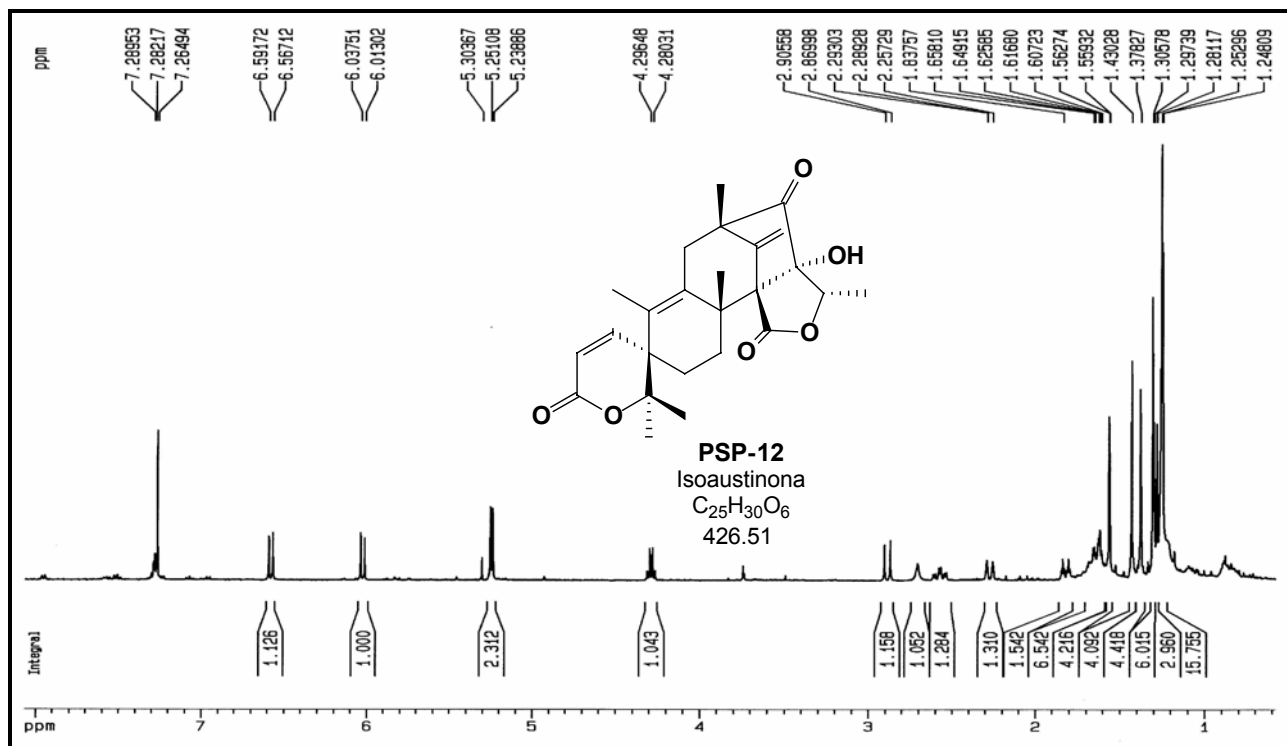


Apêndice 2.15.7 – Espectro de HMBC de **PSP-10** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

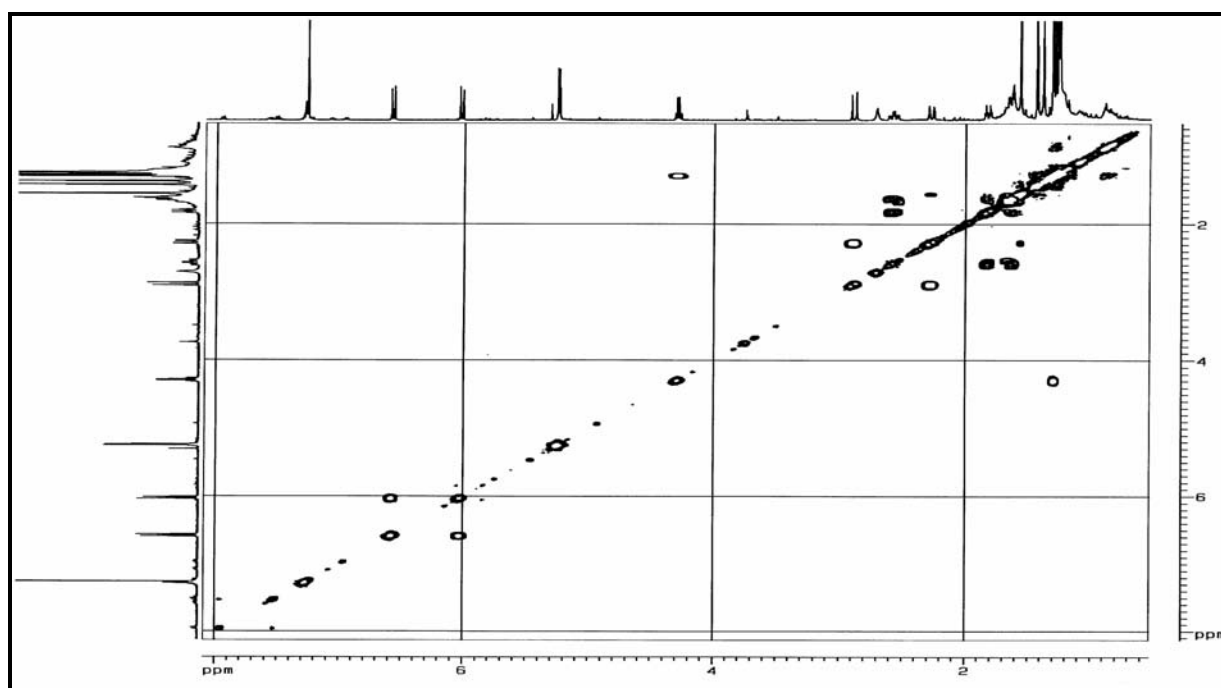


Apêndice 2.15.8 – Espectro de NOESY de **PSP-10** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

## 2.16. PSP-12

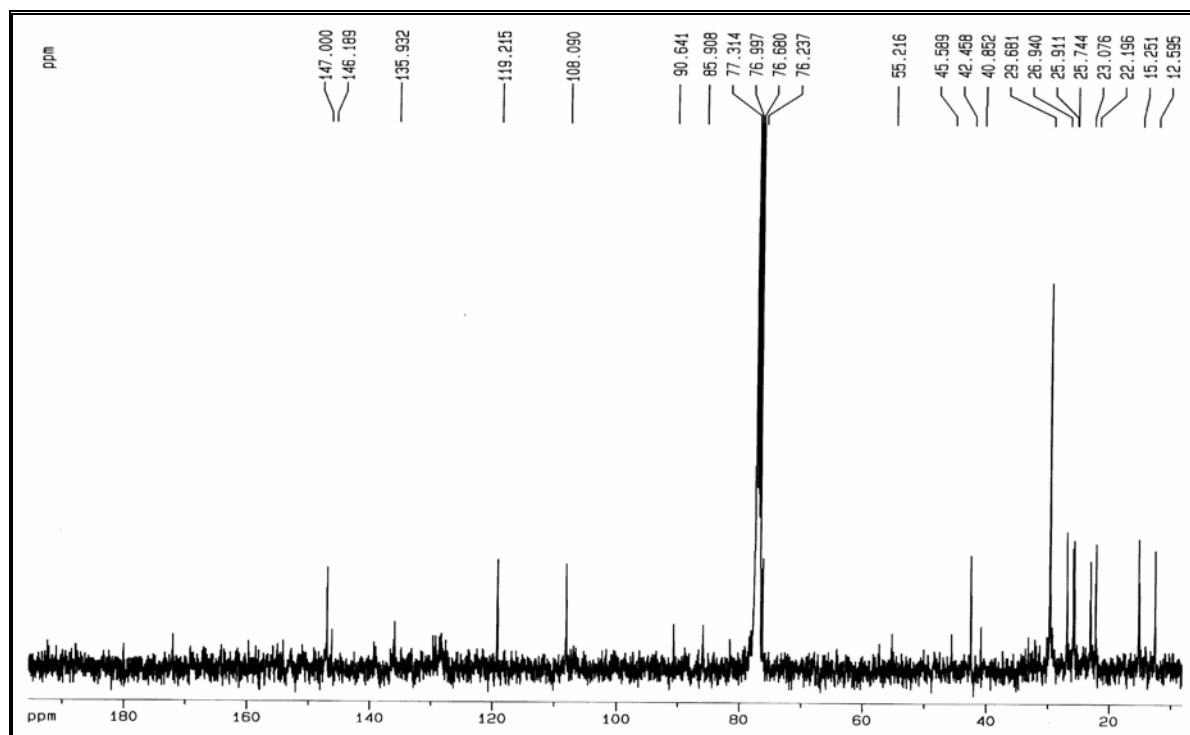


Apêndice 2.16.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PSP-12 (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

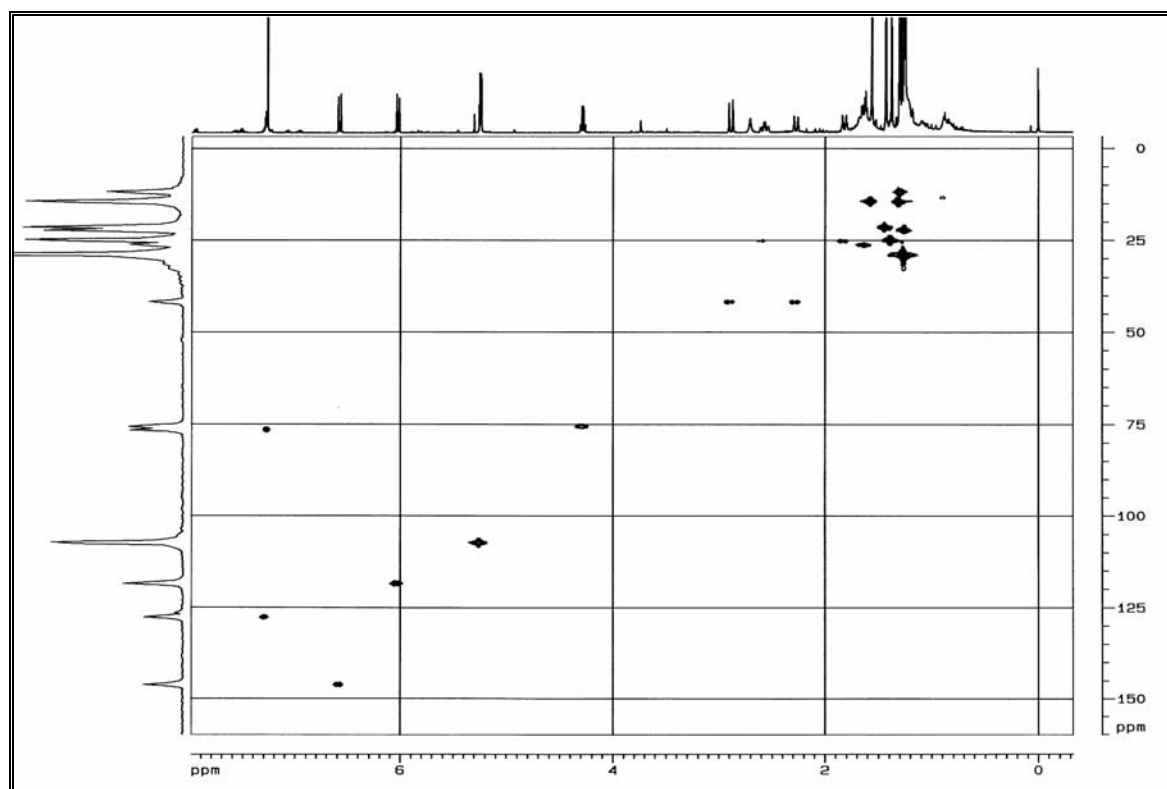


Apêndice 2.16.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de PSP-12 (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

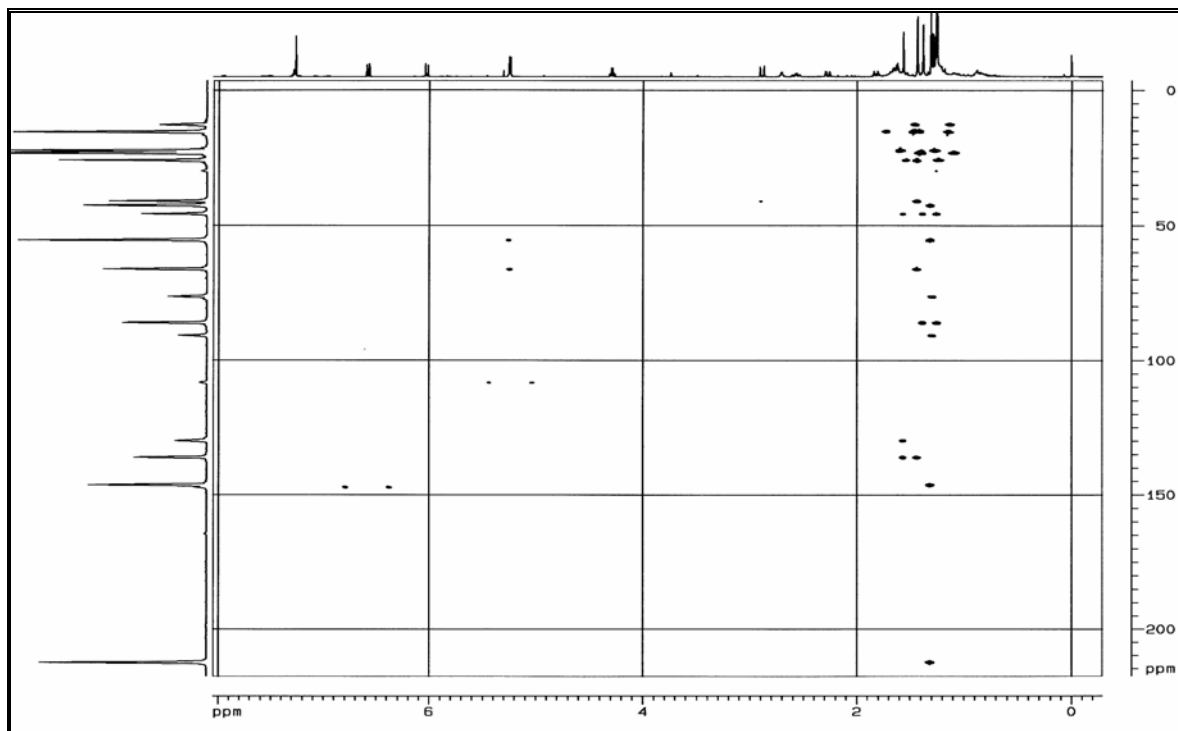
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



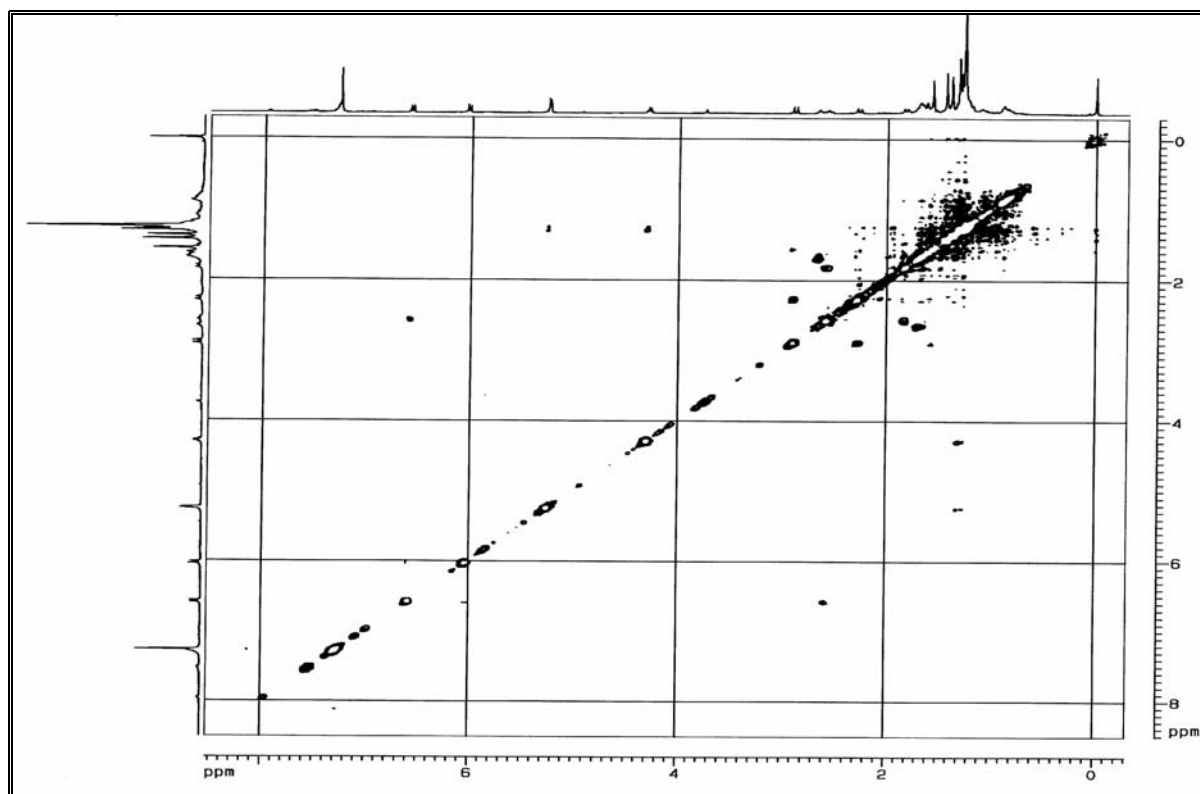
Apêndice 2.16.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-12** (100 MHz, Clorofórmio- *d*).



Apêndice 2.16.6 – Espectro de HSQC de **PSP-12** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

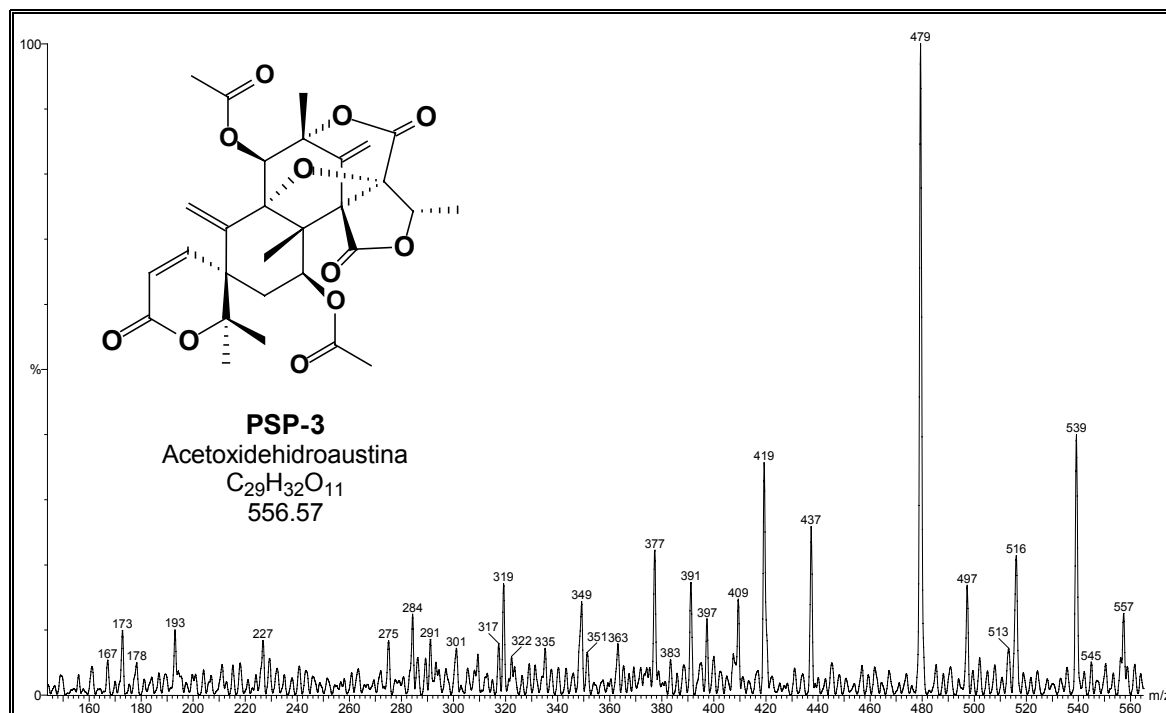


Apêndice 2.16.7 – Espectro de HMBC de **PSP-12** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

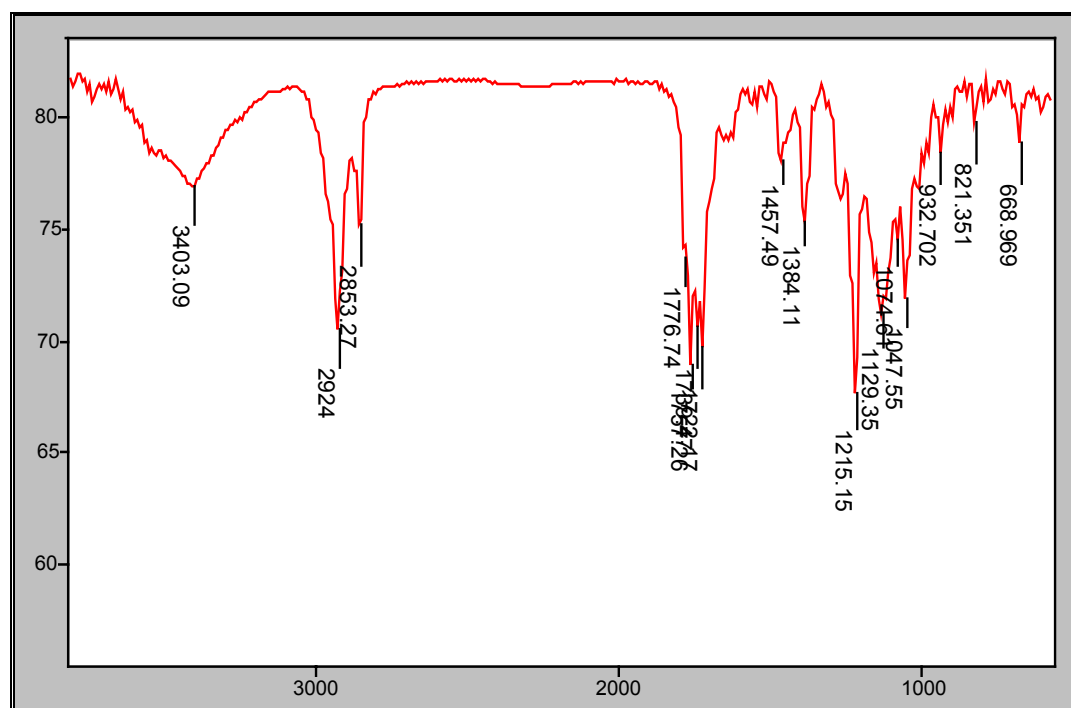


Apêndice 2.16.8 – Espectro de NOESY de **PSP-12** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

## 2.17. PSP-3

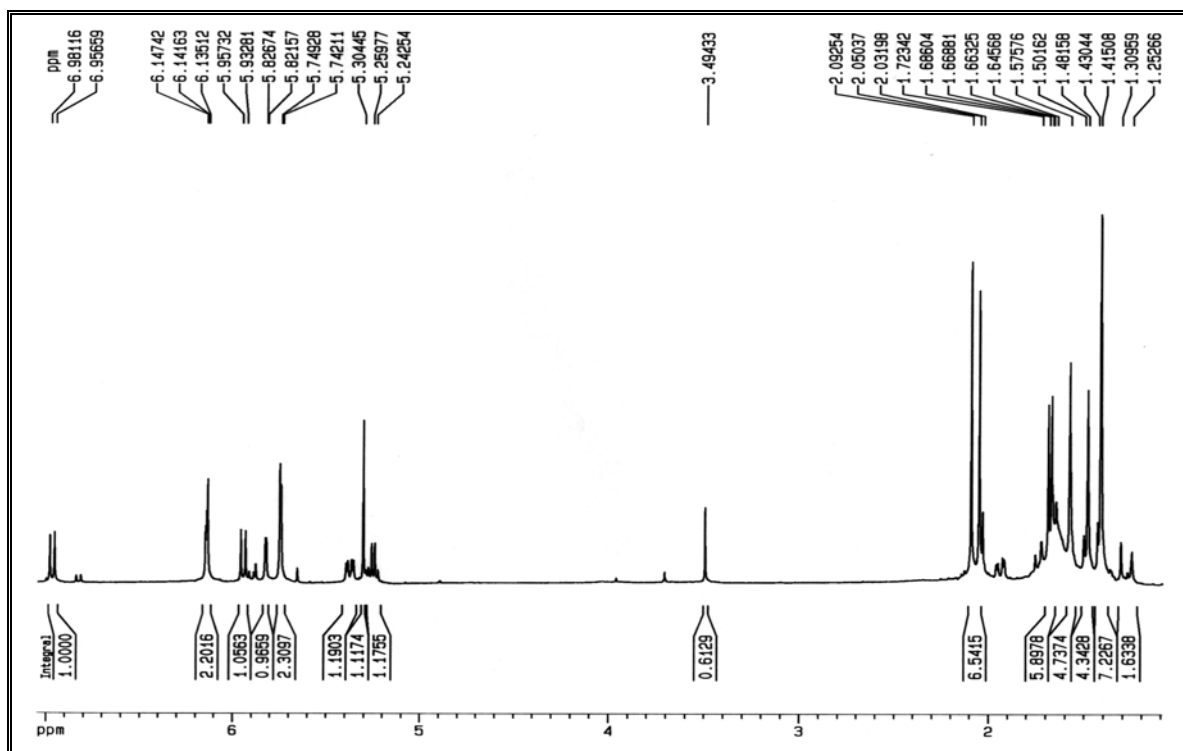


Apêndice 2.17.1 – Espectro de massas de **PSP-3**, obtido via APCI-MS/MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

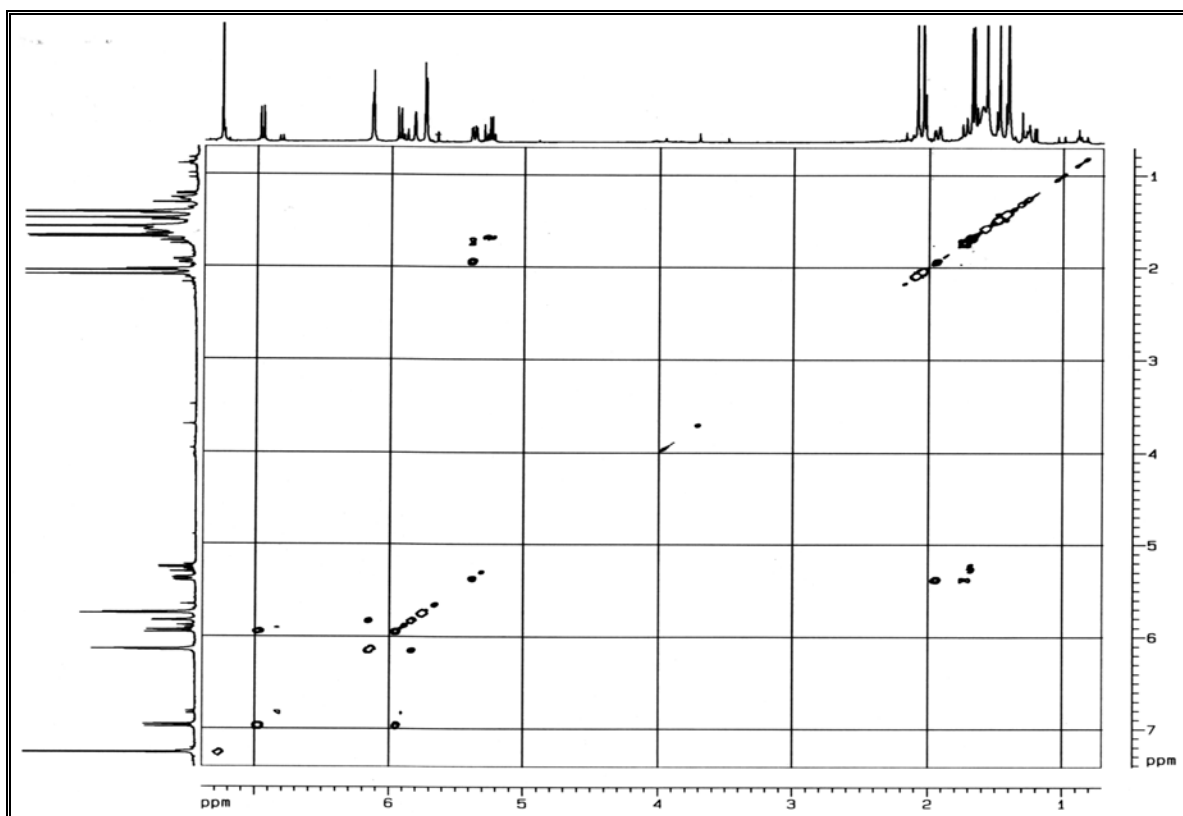


Apêndice 2.17.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-3** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



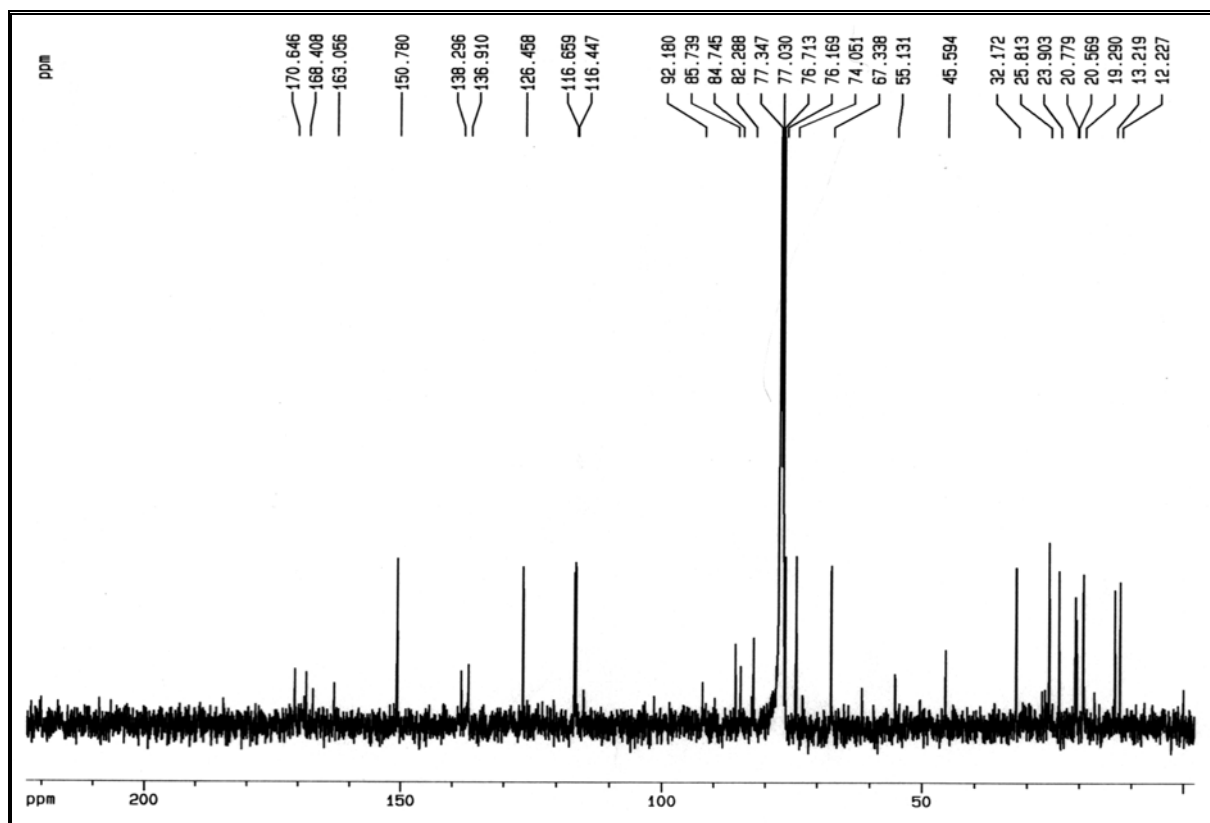
Apêndice 2.17.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-3** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



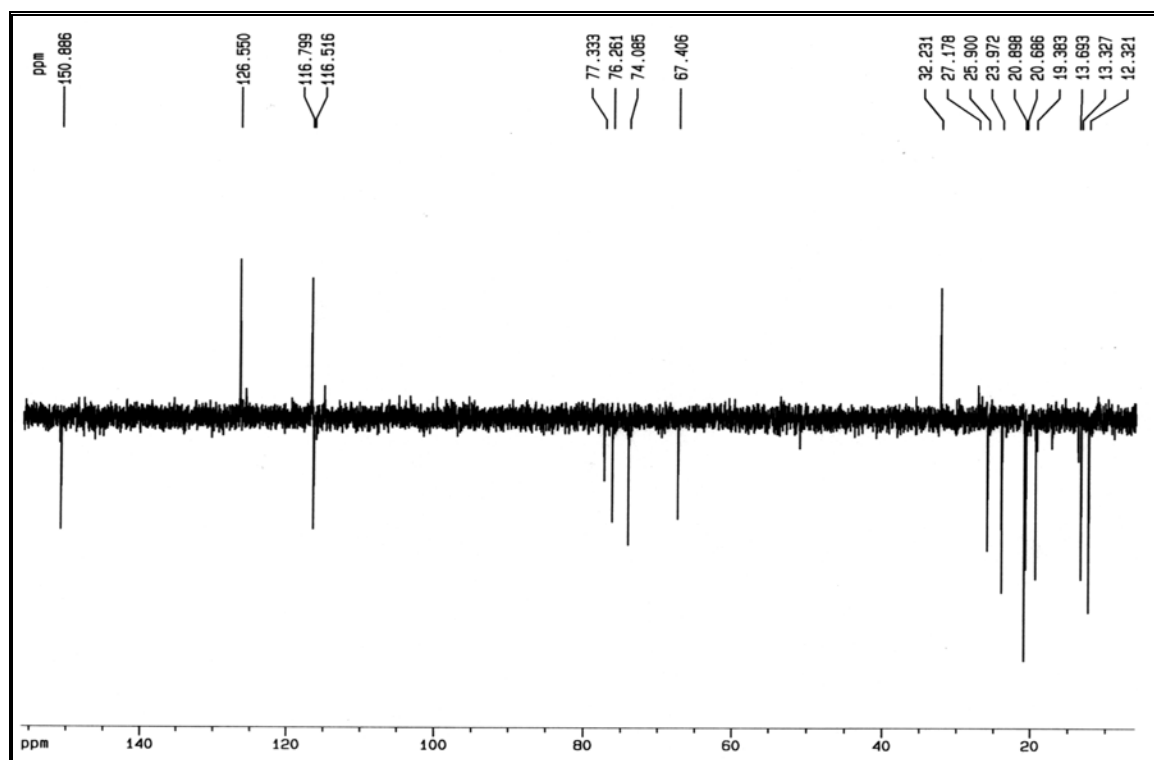
Apêndice 2.17.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-3** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



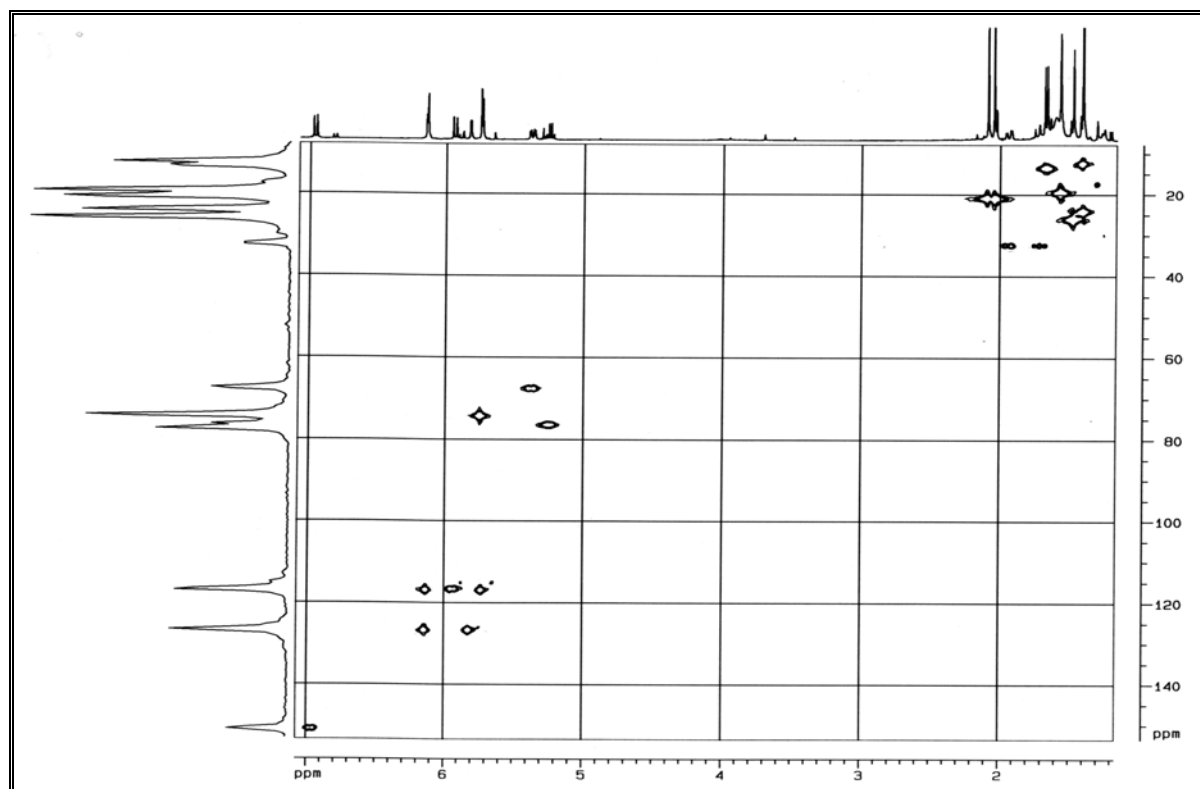
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium sp*



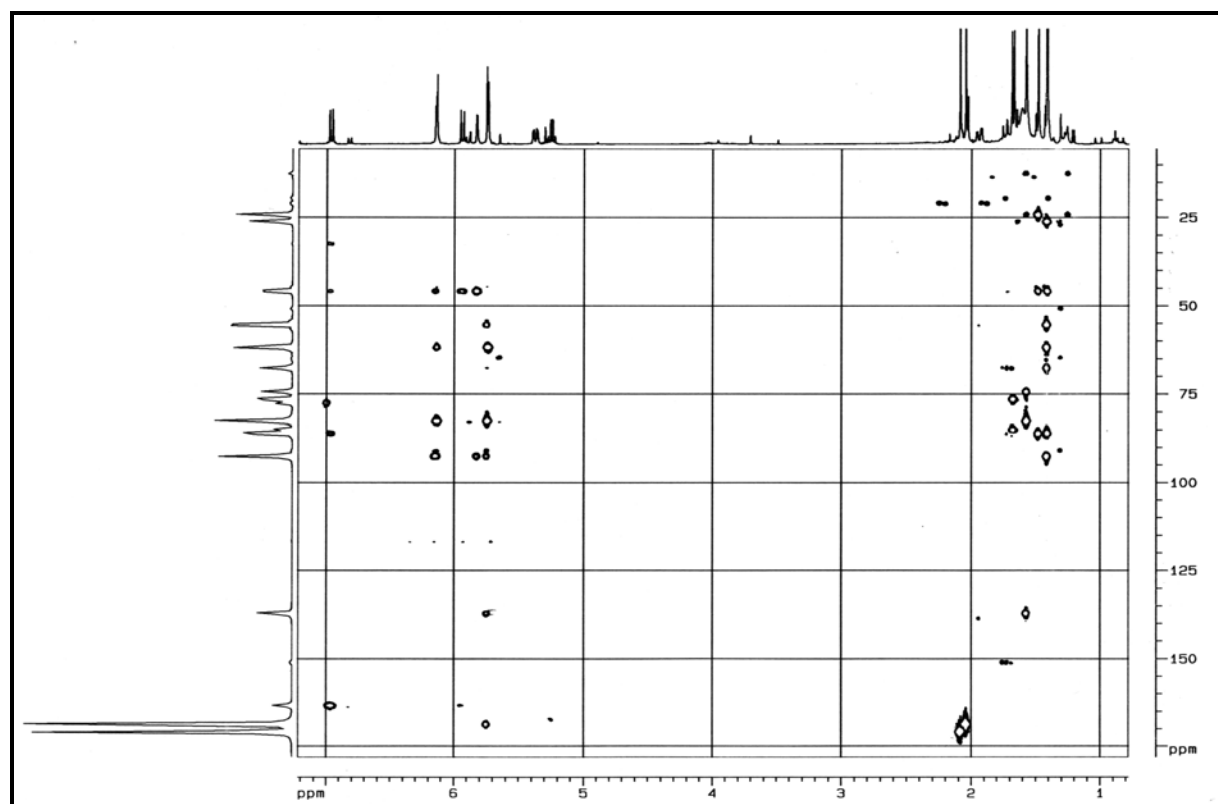
Apêndice 2.17.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-3** (50 MHz, Cclorofórmio- *d*).



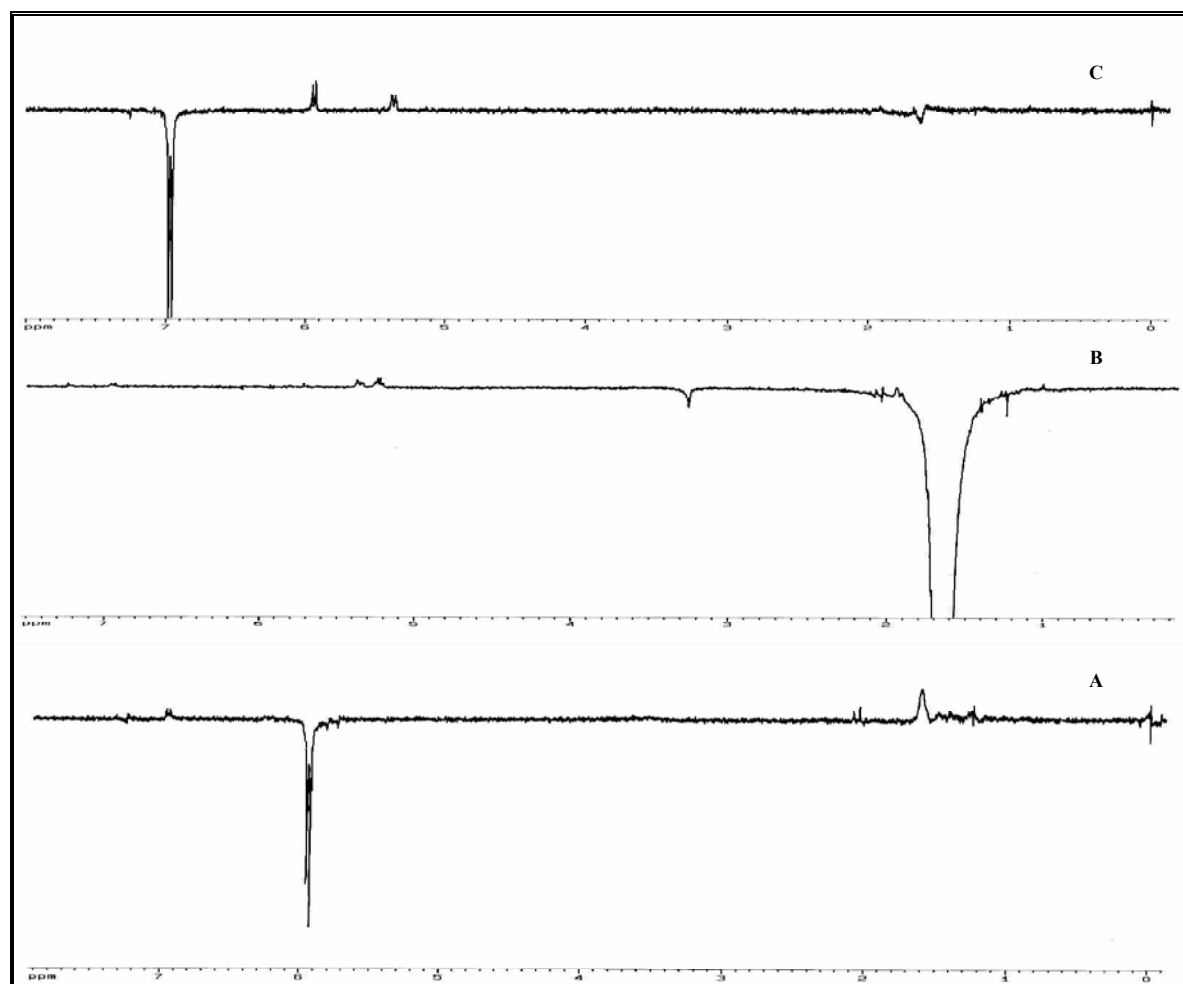
Apêndice 2.17.6 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C – DEPT 135 de **PSP-3** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).



Apêndice 2.17.7 – Espectro de HSQC de **PSP-3** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

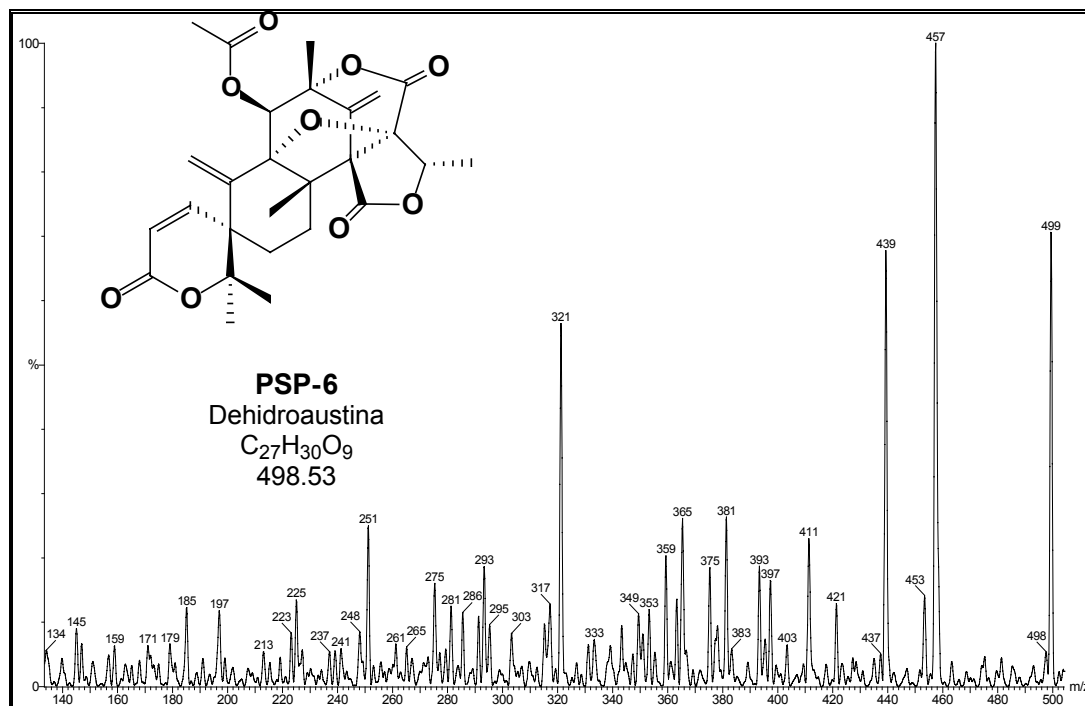


Apêndice 2.17.8 – Espectro de HMBC de **PSP-3** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).

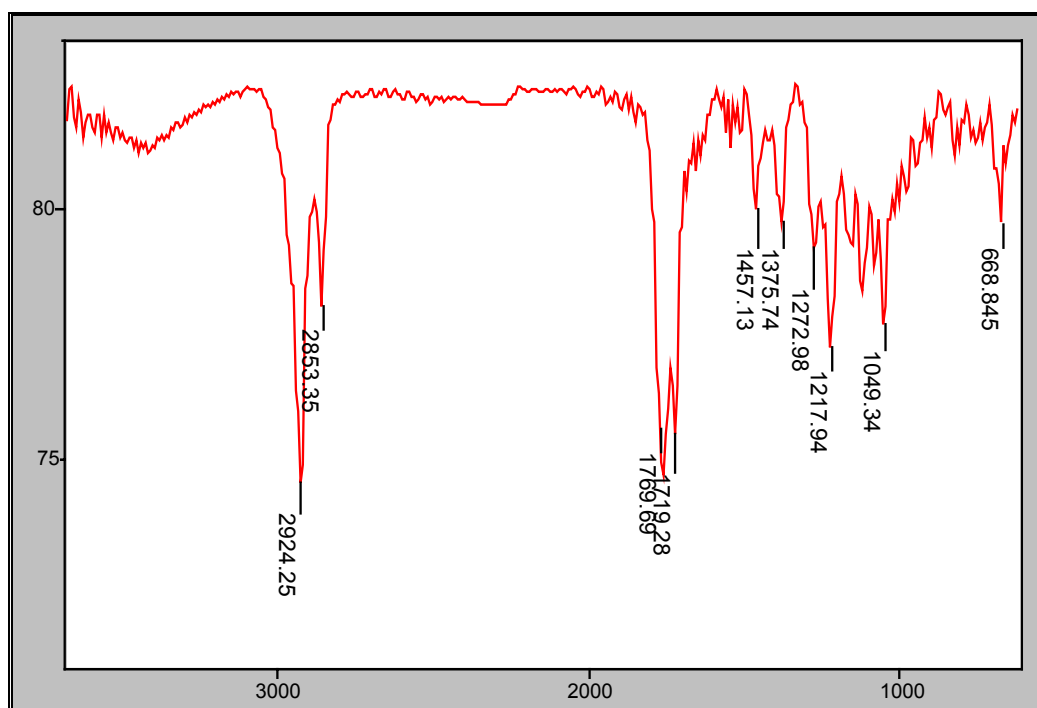


Apêndice 2.17.9 – Espectro de NOESY de **PSP-3** (400 MHz, Clorofórmio- *d*). A) Espectro RMN  $^1\text{H}$ ; B) Hidrogênio irradiado em  $\delta$  5.20; C) Hidrogênio irradiado em  $\delta$  1.18; D) Hidrogênio irradiado em  $\delta$  4.54.

## 2.18. PSP-6

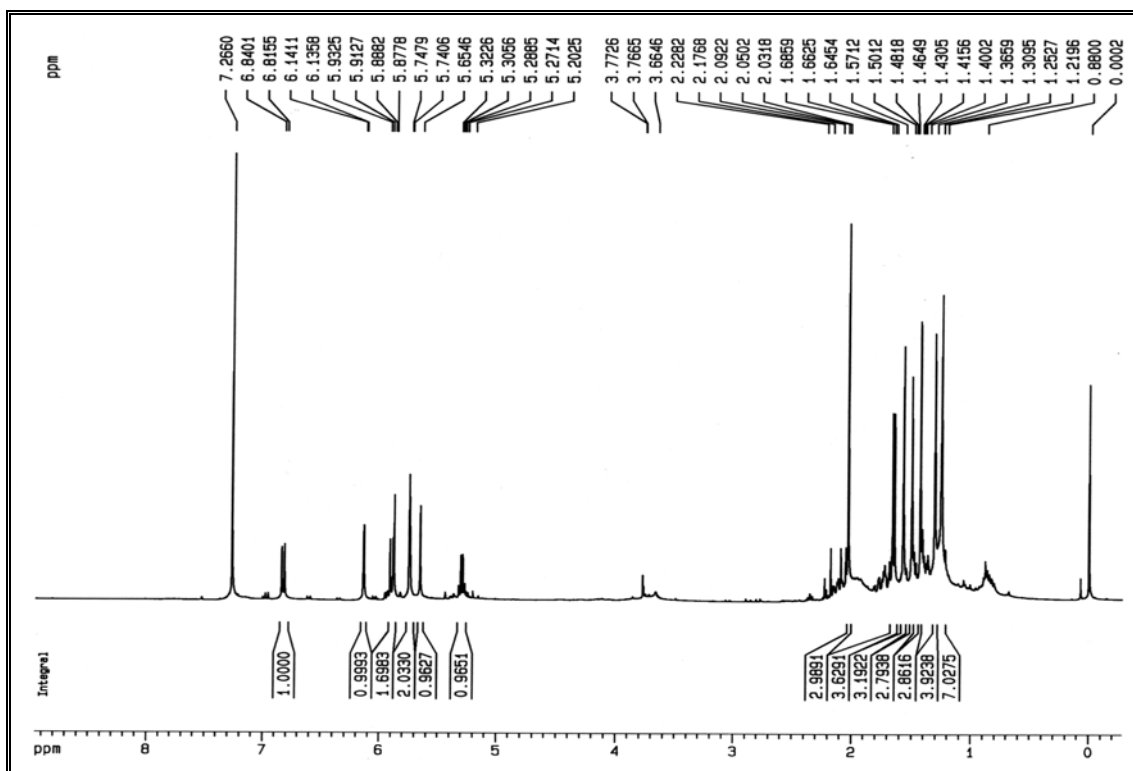


Apêndice 2.18.1 – Espectro de massas de **PSP-6**, obtido via APCI-MS/MS, modo positivo com energia de colisão de 15 eV.

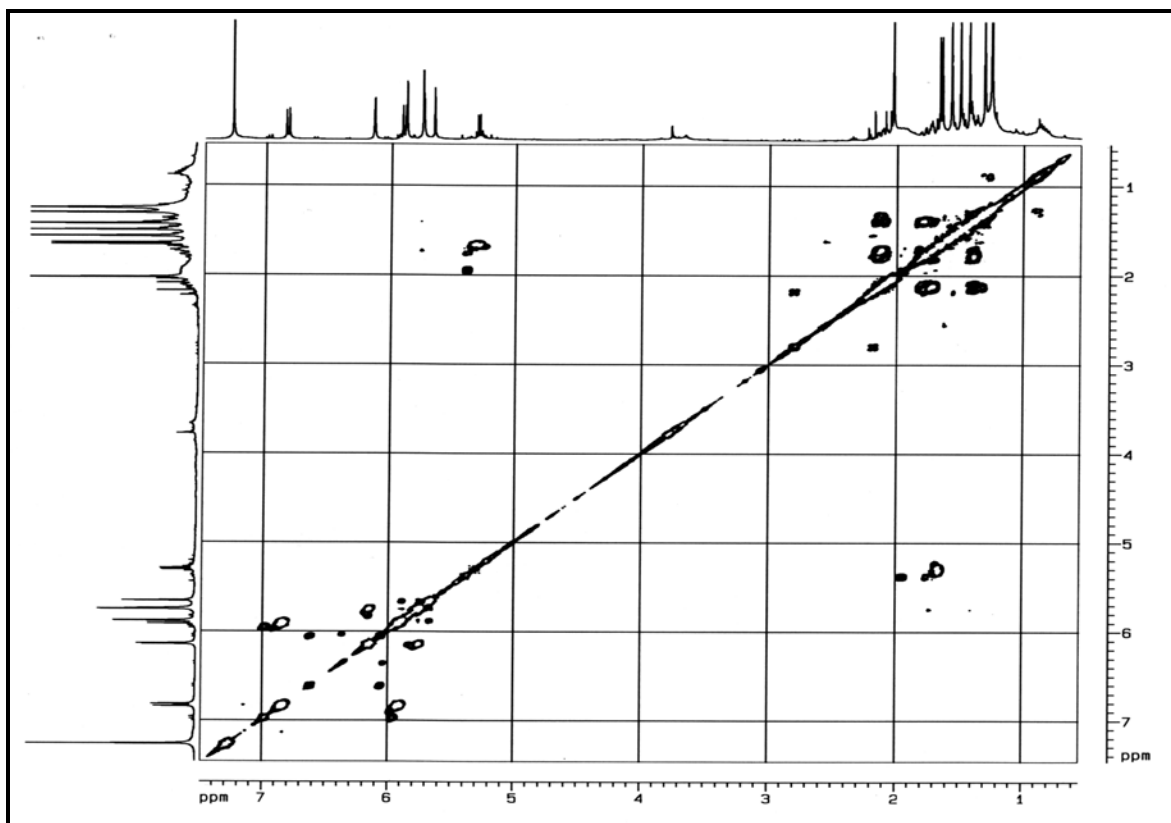


Apêndice 2.18.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-6** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp

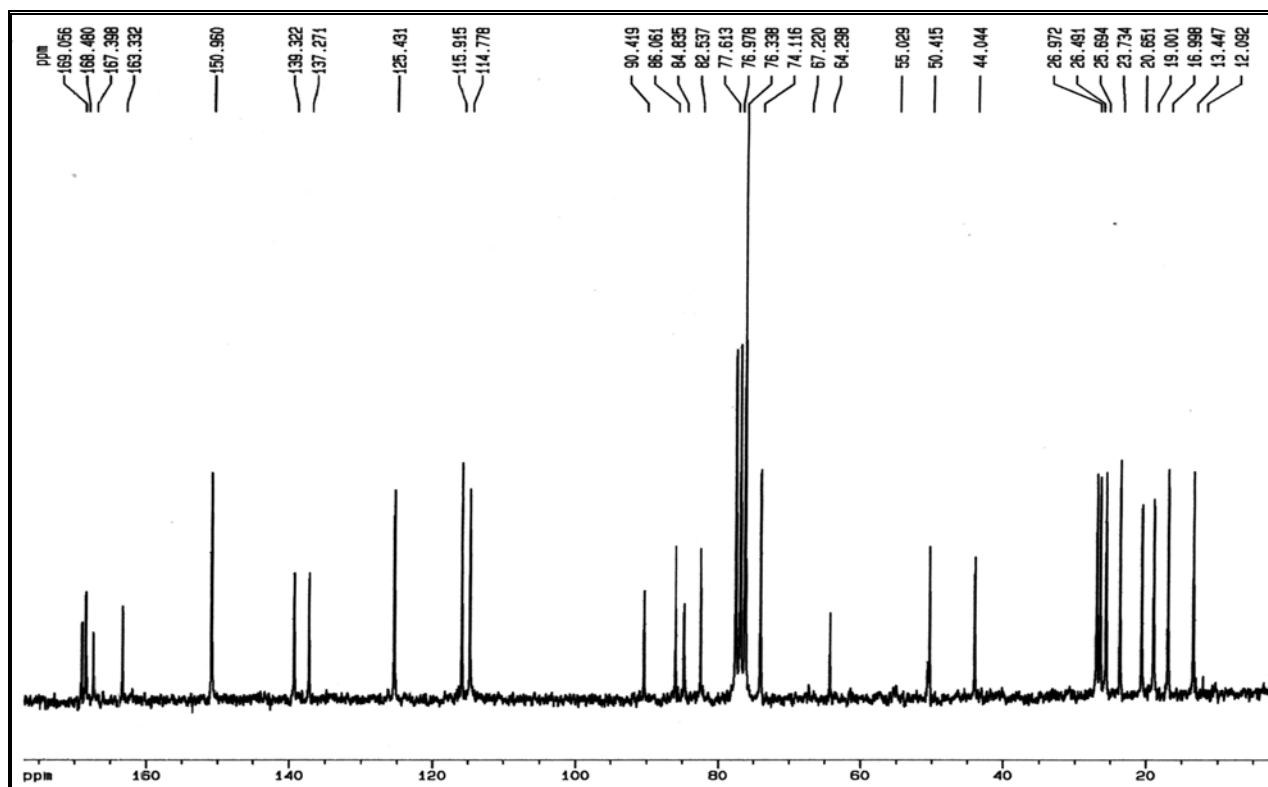


Apêndice 2.18.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **PSP-6** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

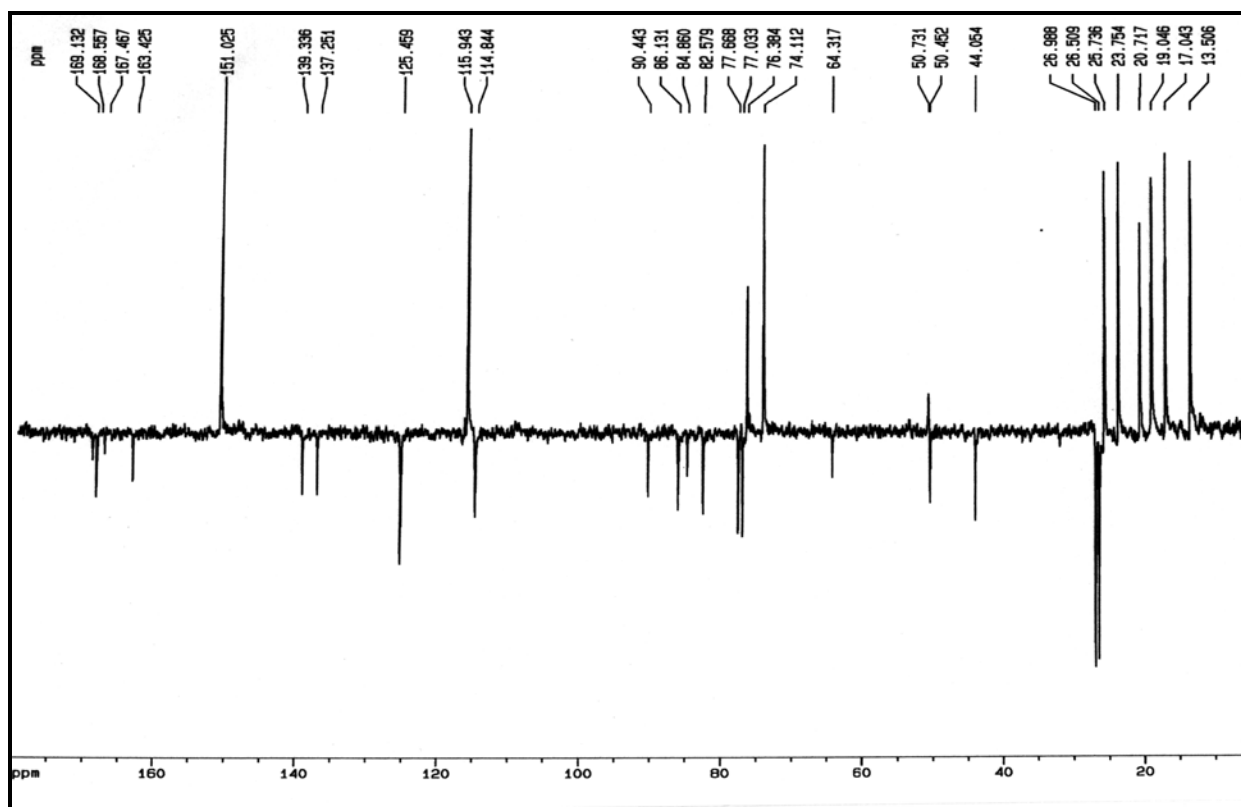


Apêndice 2.18.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H – COSY de **PSP-6** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

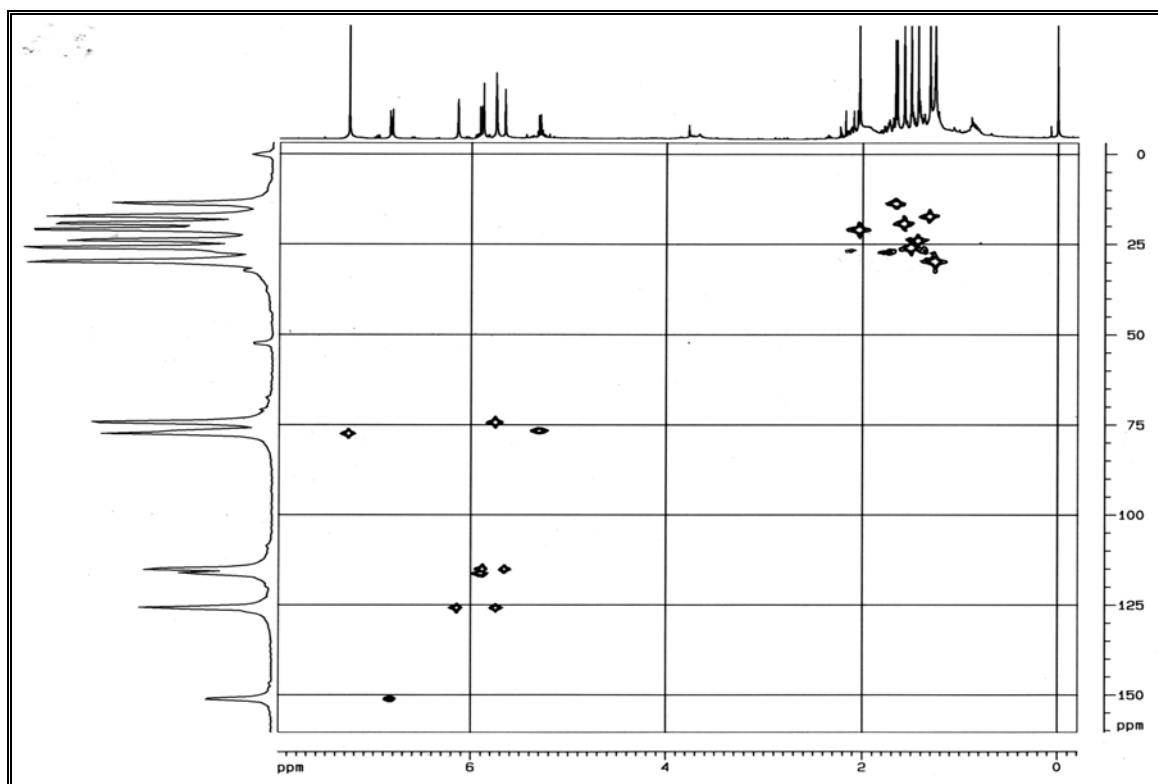
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



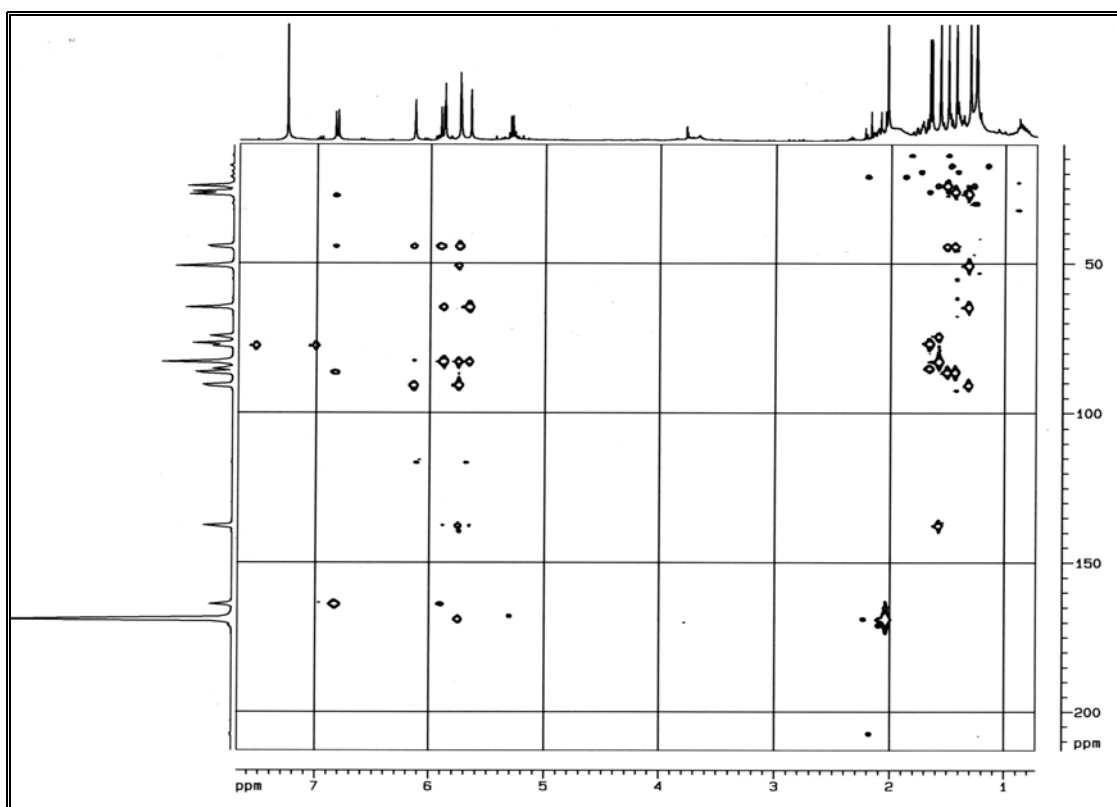
Apêndice 2.18.5 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **PSP-6** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).



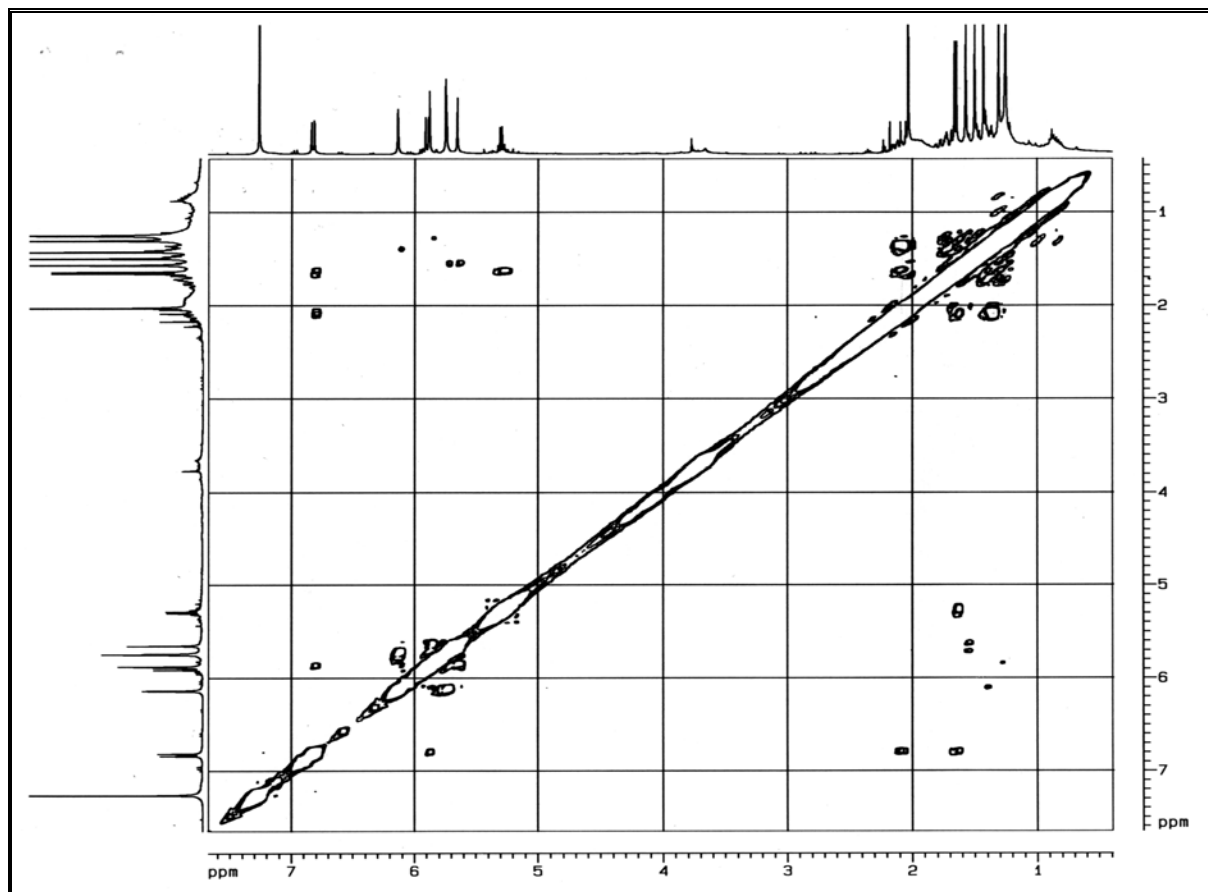
Apêndice 2.18.6 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C - PENDANT de **PSP-6** (50 MHz, Clorofórmio- *d*).



Apêndice 2.18.7 – Espectro de HSQC de **PSP-6** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).



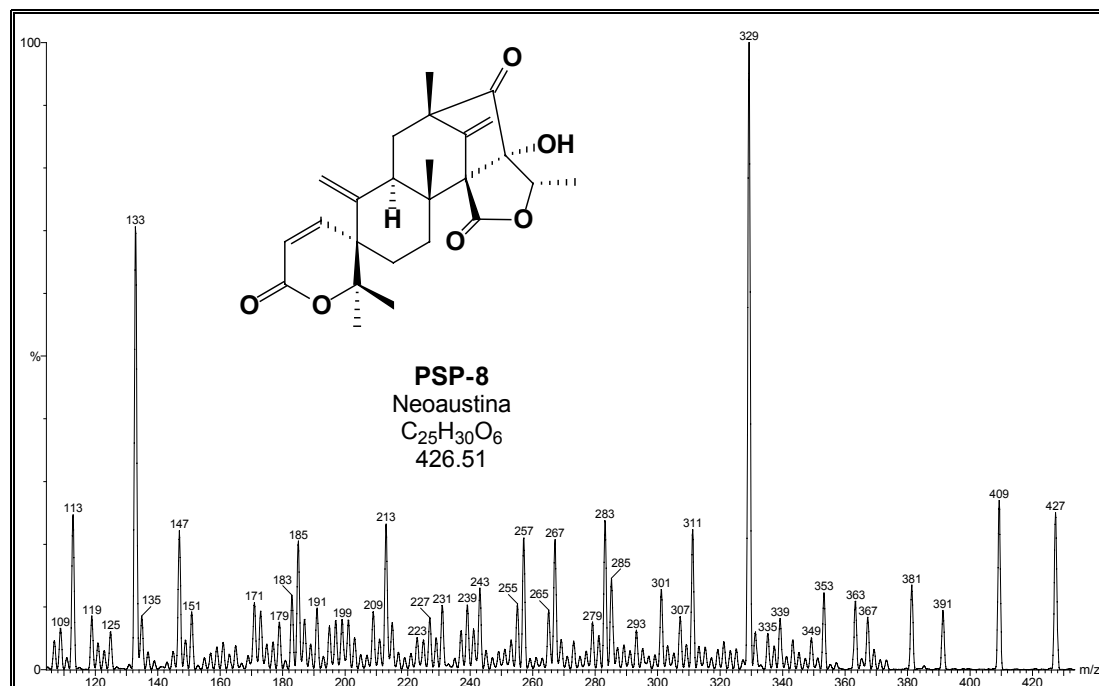
Apêndice 2.18.8 – Espectro de HMBC de **PSP-6** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).



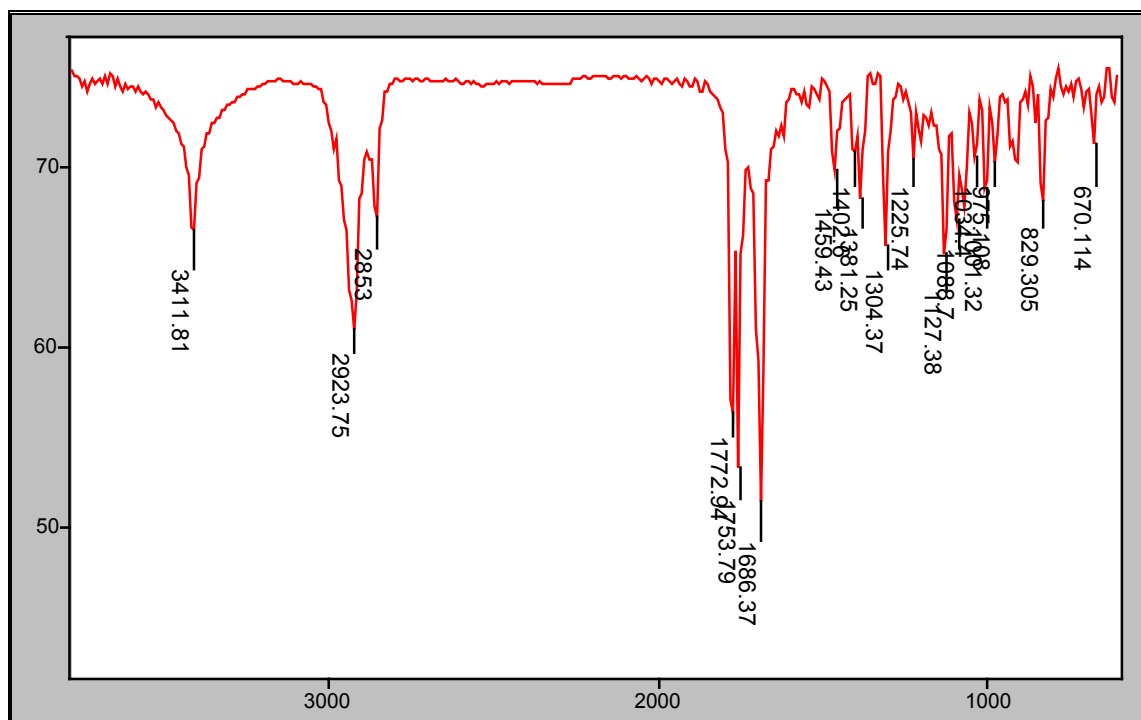
Apêndice 2.18.9 – Espectro de NOESY de **PSP-6** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).



## 2.19. PSP-8

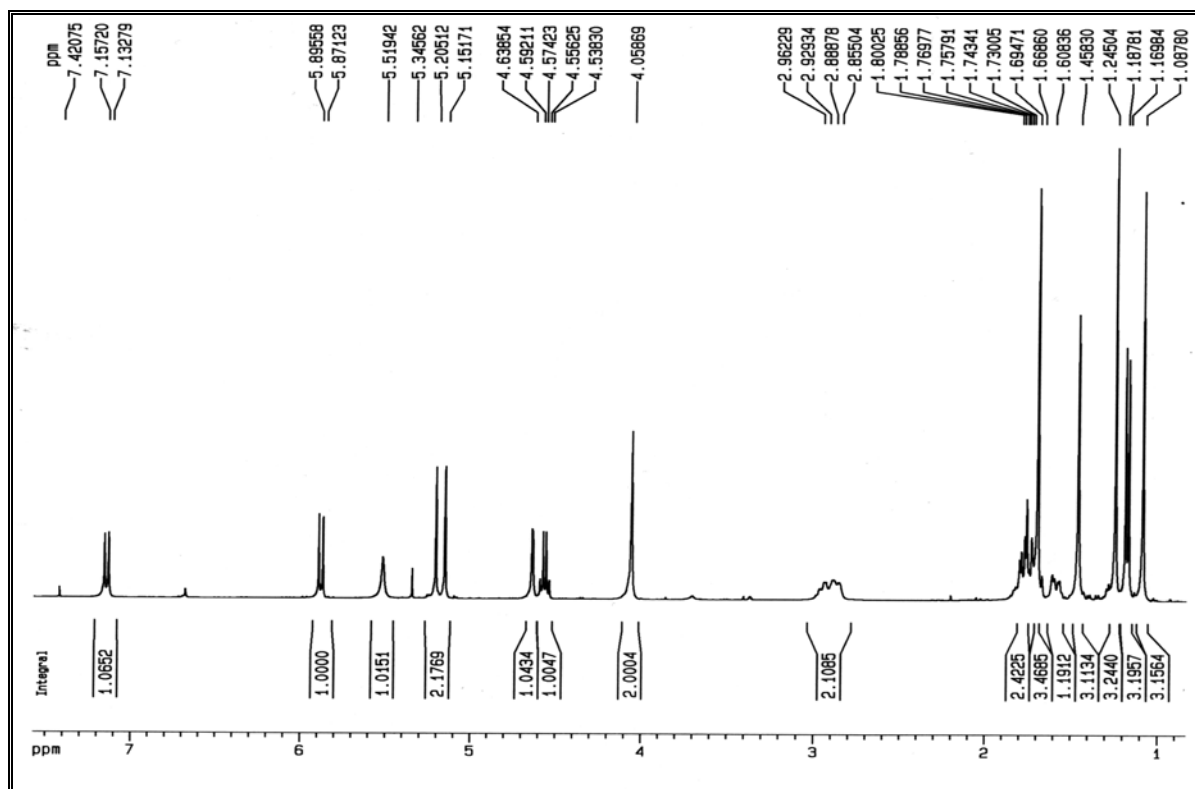


Apêndice 2.19.1 – Espectro de massas de **PSP-8**, obtido via APCI-MS/MS, modo positivo com energia de colisão de 20 eV.

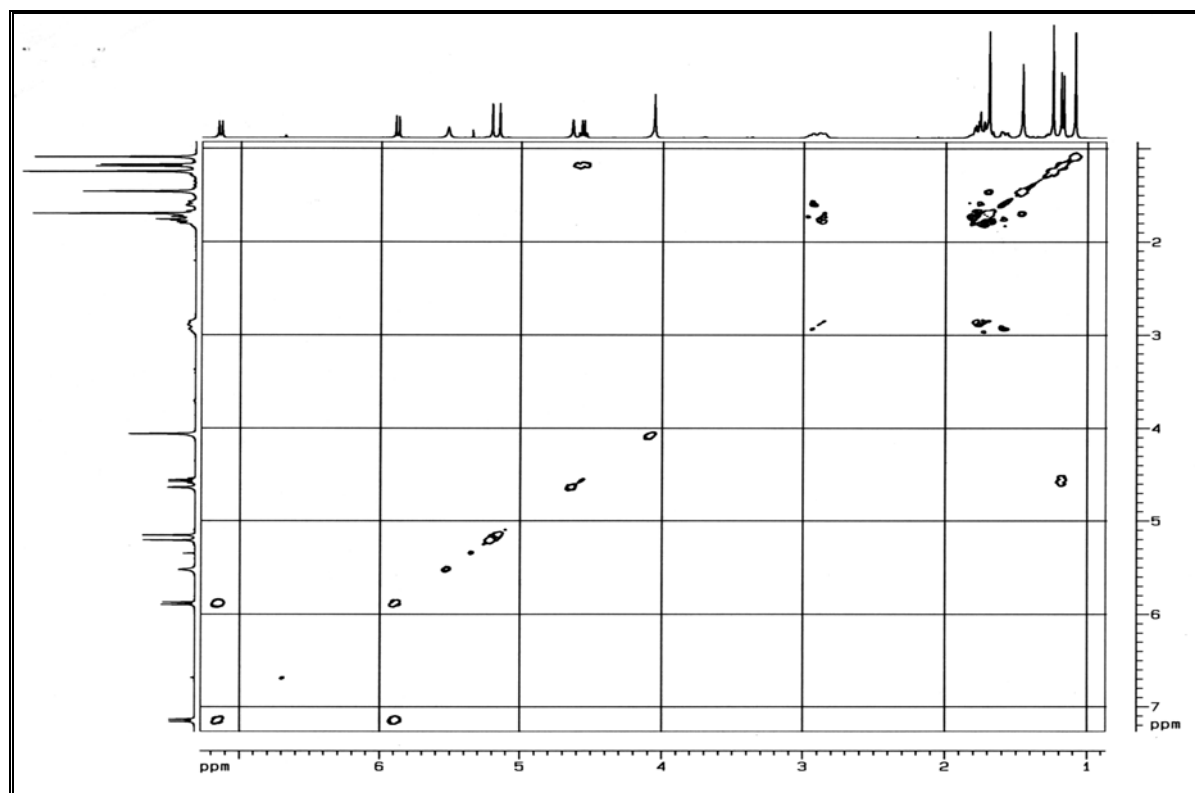


Apêndice 2.19.2 – Espectro de absorção no IV de **PSP-8** (KBr, pastilha).

Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium sp*

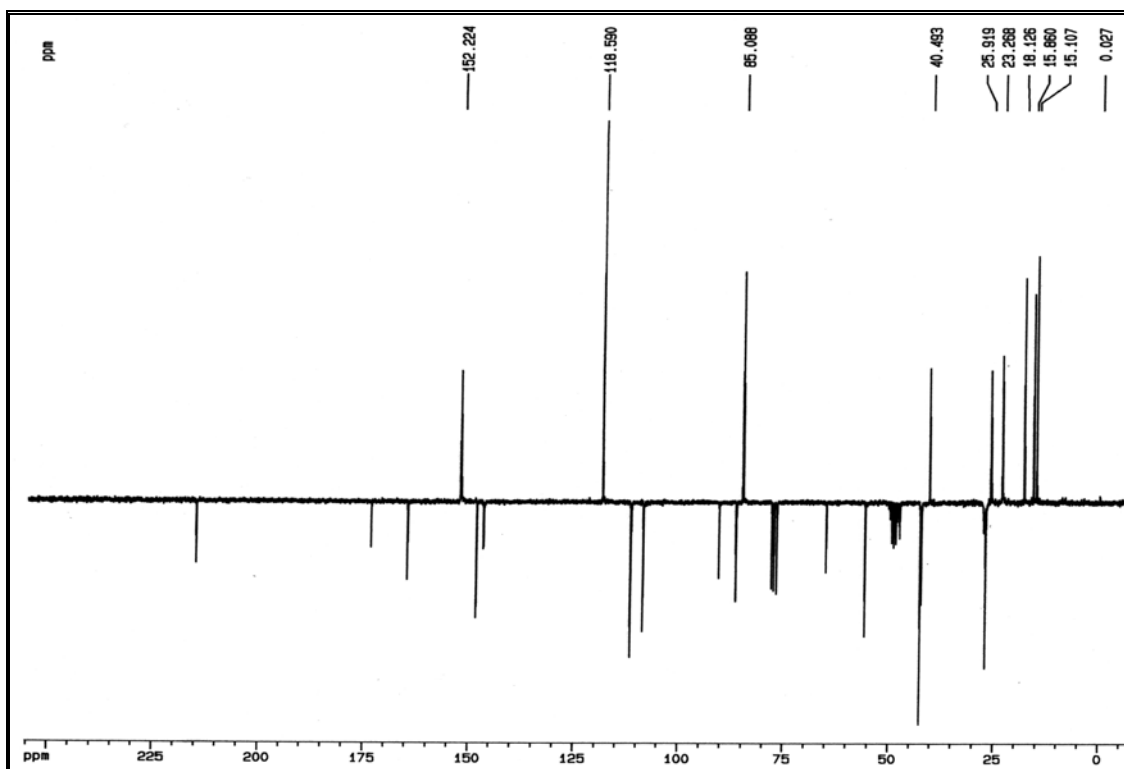


Apêndice 2.19.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **PSP-8** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

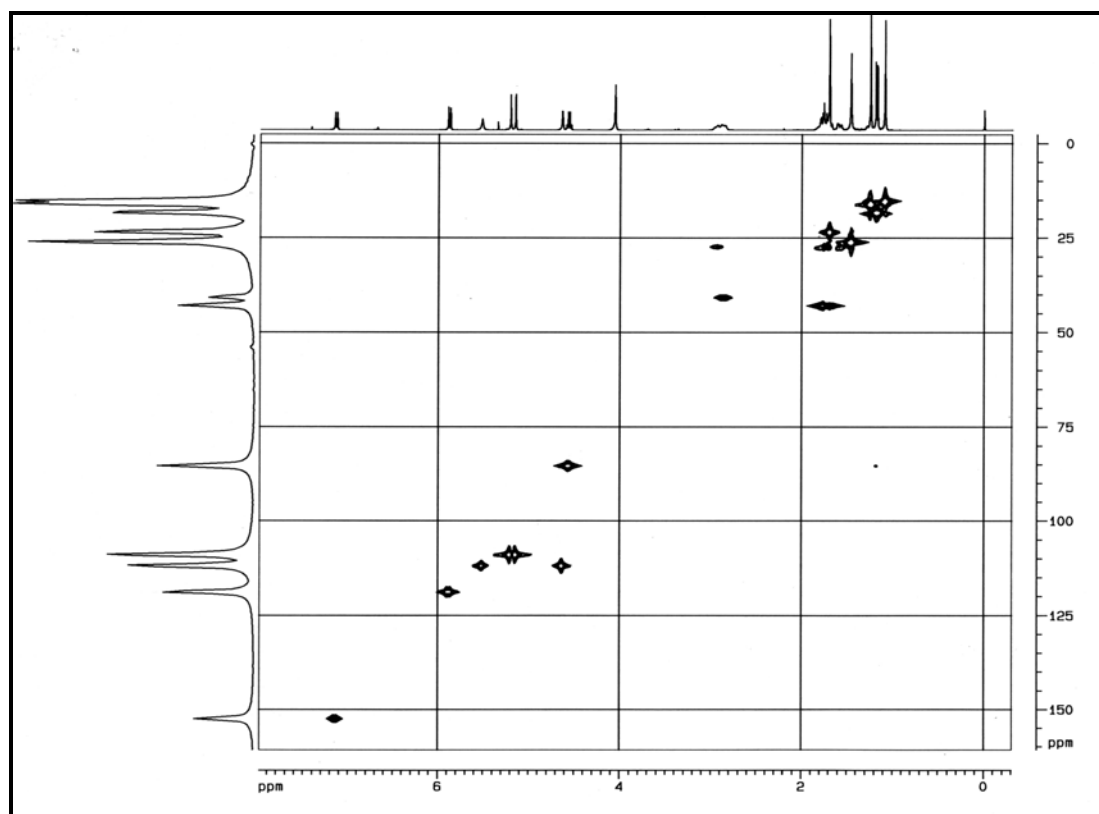


Apêndice 2.19.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  – COSY de **PSP-8** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

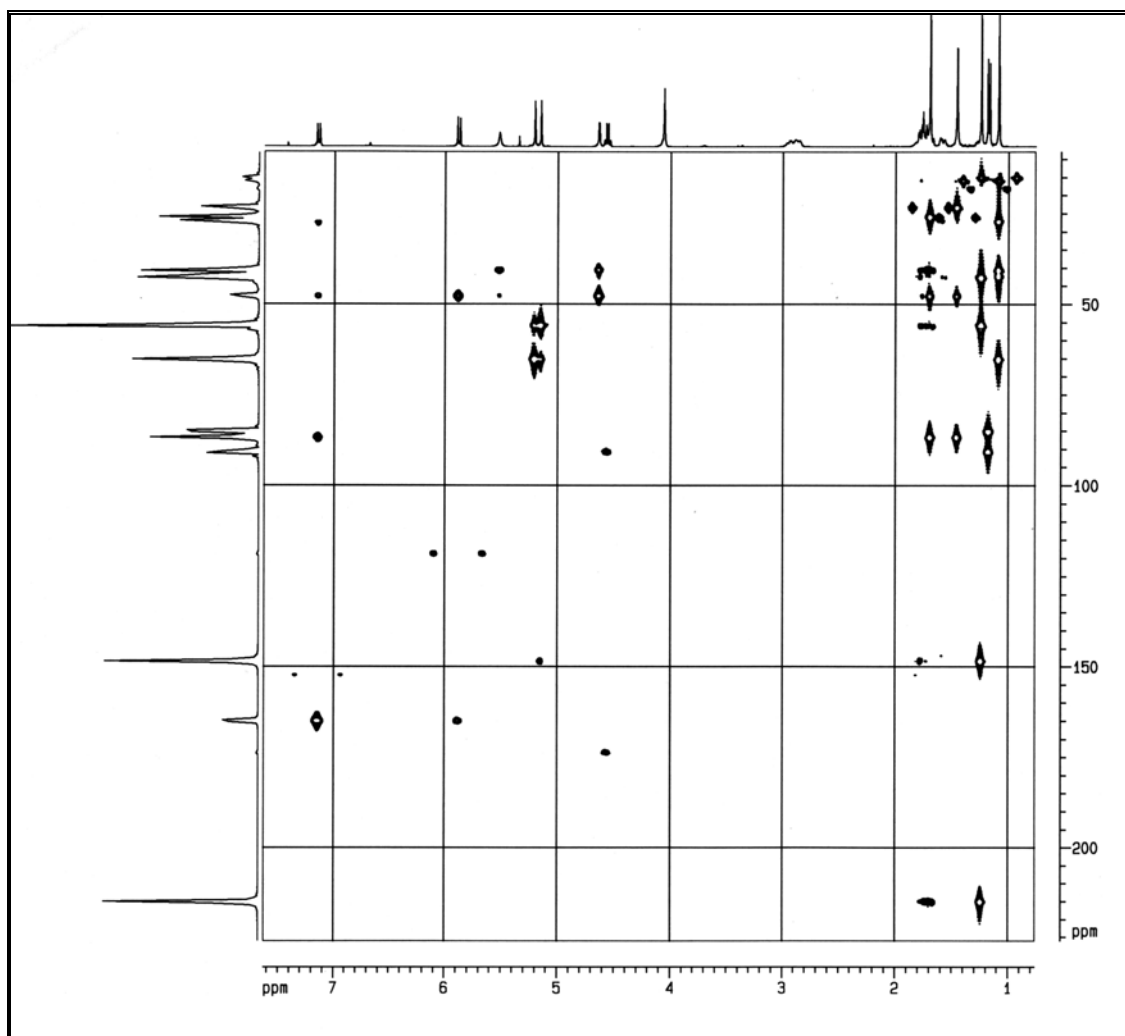
Apêndice 02: Espectros das Substâncias Isoladas de *Penicillium* sp



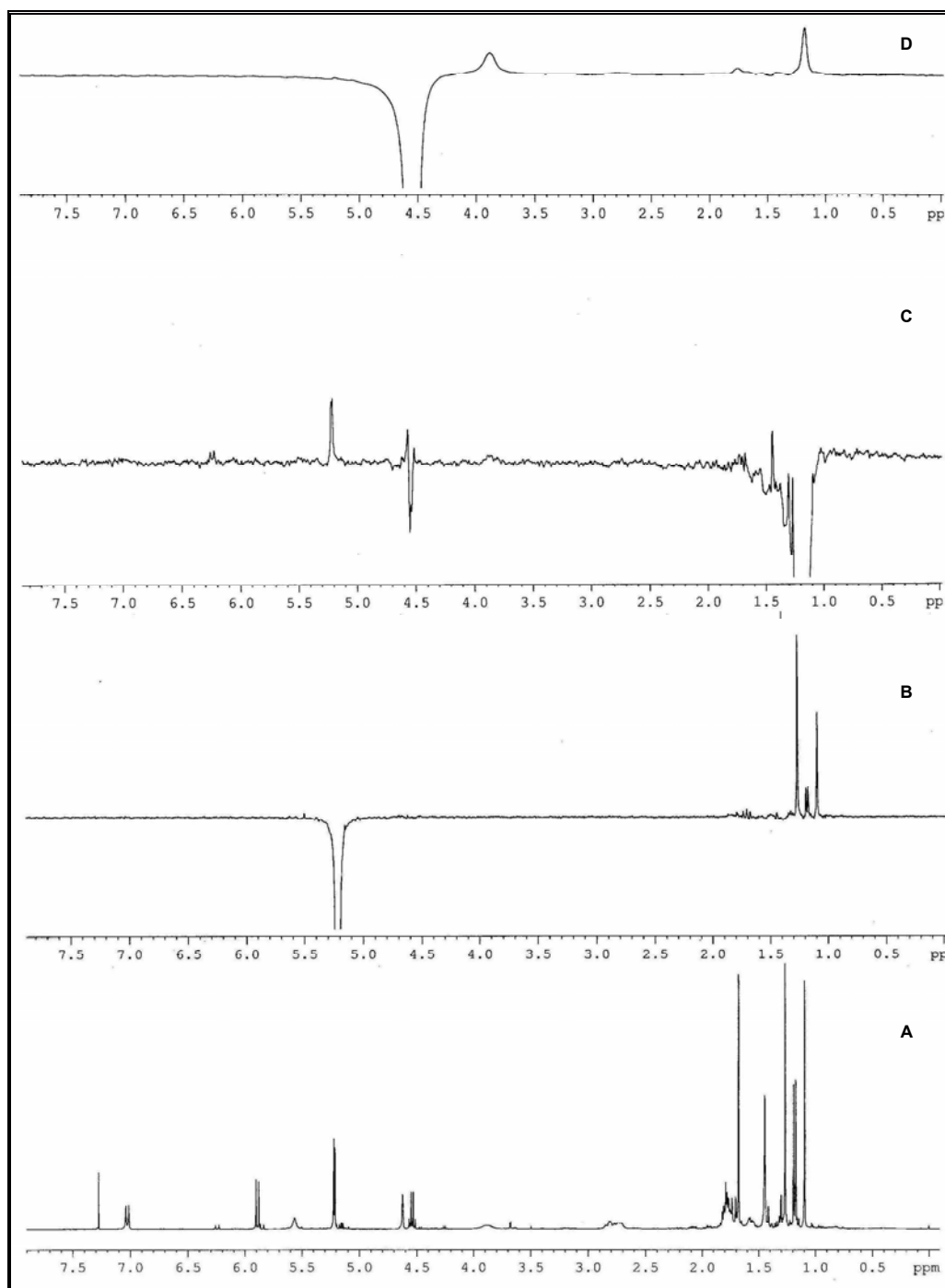
Apêndice 2.19.5 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - PENDANT de **PSP-8** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



Apêndice 2.19.6 – Espectro de HSQC de **PSP-8** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



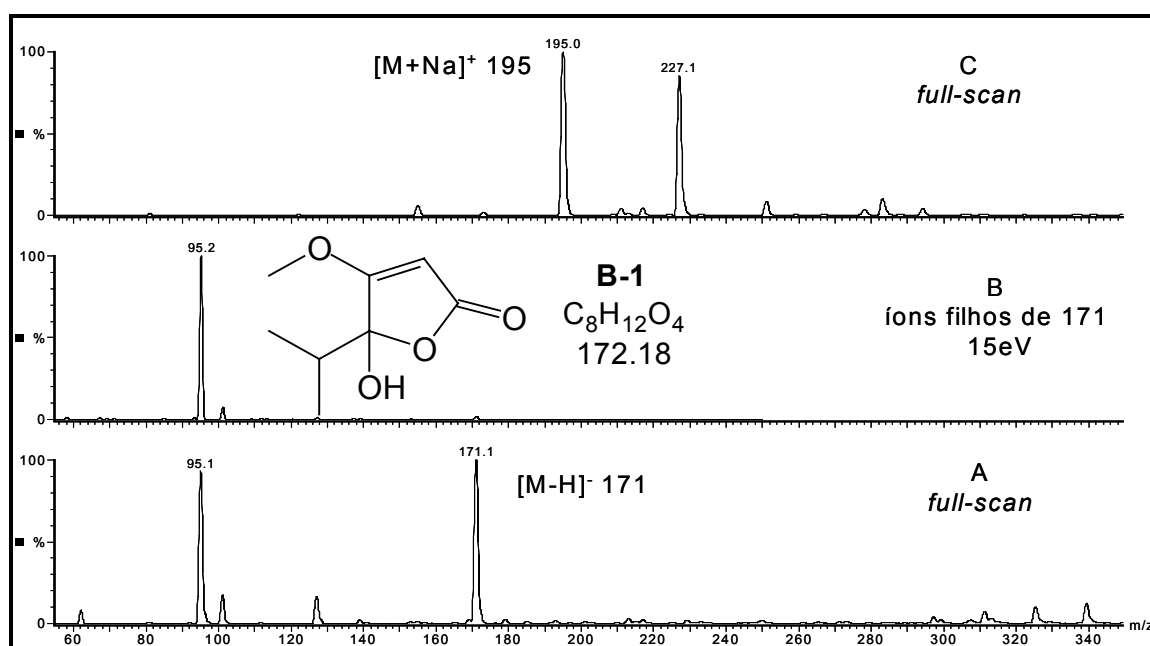
Apêndice 2.19.7– Espectro de HMBC de **PSP-8** (400 MHz, Clorofórmio- *d*).



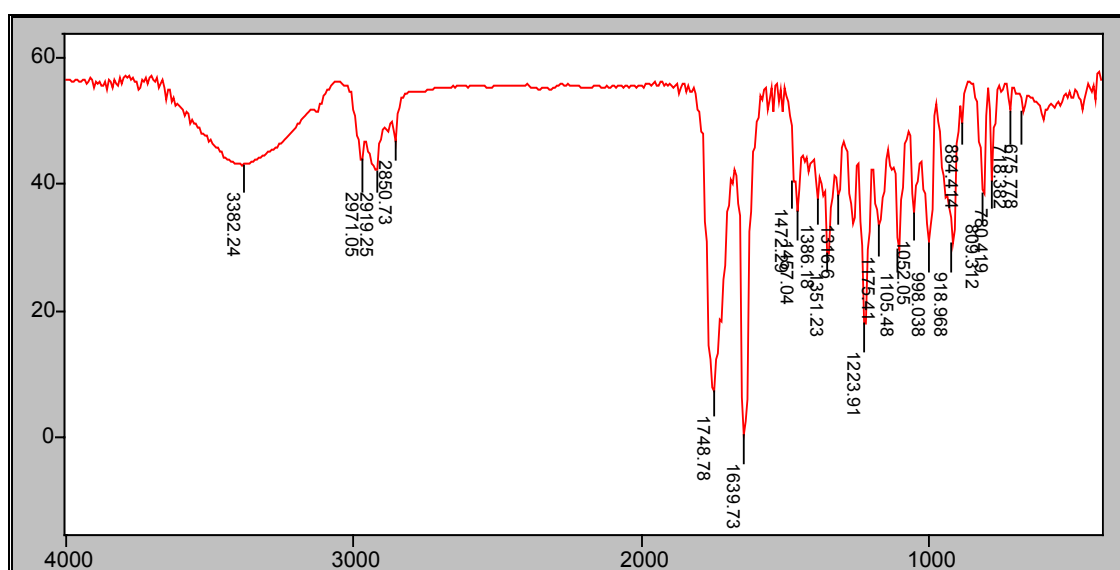
Apêndice 2.19.9 – Espectro de NOESY de **PSP-8** (400 MHz, Clorofórmio-*d*). A) Espectro RMN <sup>1</sup>H; B) Hidrogênio irradiado em δ 5.20; C) Hidrogênio irradiado em δ 1.18; D) Hidrogênio irradiado em δ 4.54.

# APÊNDICE 03: Dados Espectrais das Substâncias Isoladas do Capítulo 5 (Metabolismo Secundário do Fungo *Penicillium* sp na Presença de Substratos Exógenos)

## 3.1. Espectros do Metabólito B-1 (PBLIL3-5)

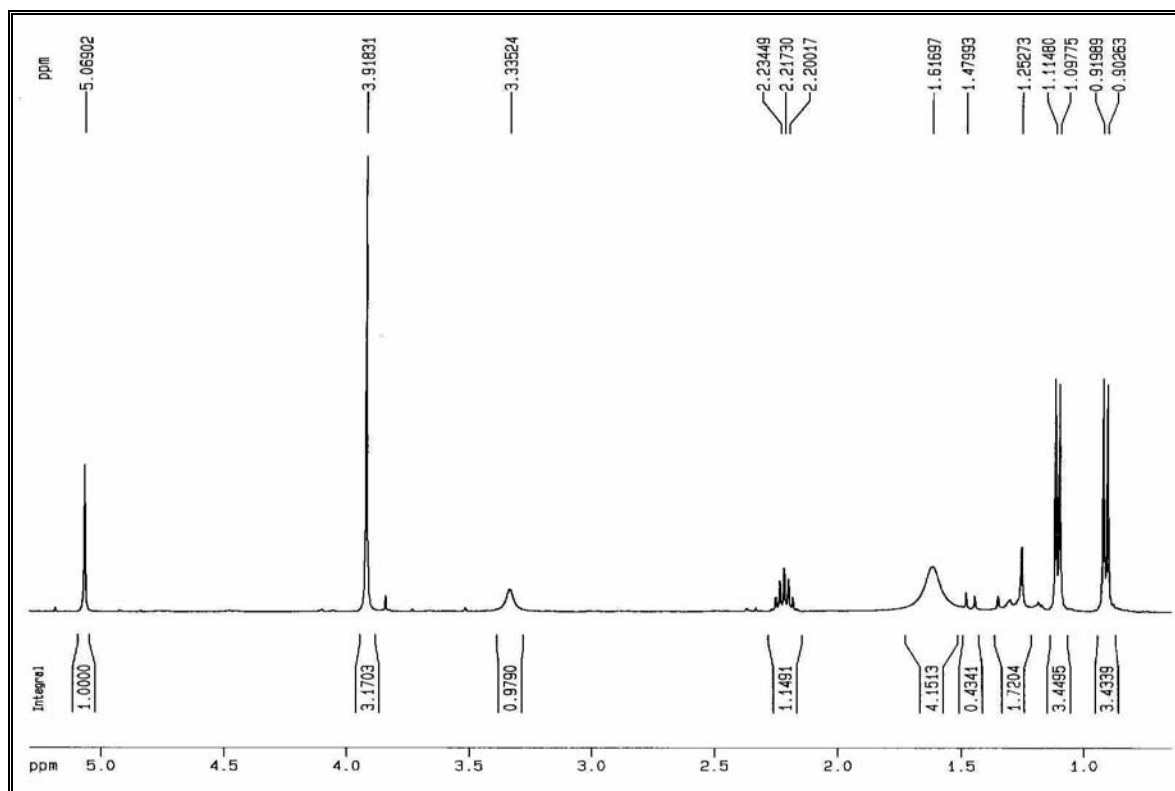


Apêndice 3.1.1 – Espectros de massas de **B-1**, obtido via *electrospray* nos modos positivo (A) e negativo (B).

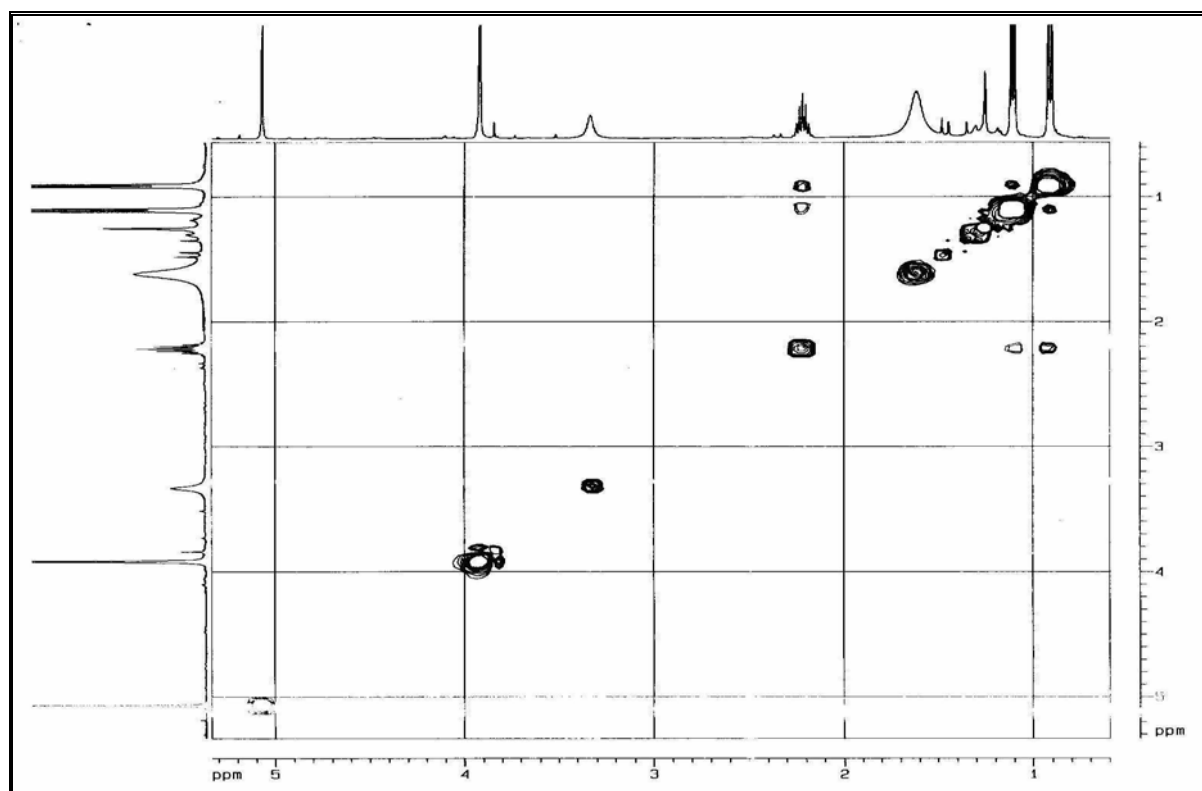


APÊNDICE 3.1.2 – Espectro de absorção no IV de **B-1** (KBr, pastilha).

Apêndice 3: Dados Espectrais das Substâncias Isoladas no Capítulo 5

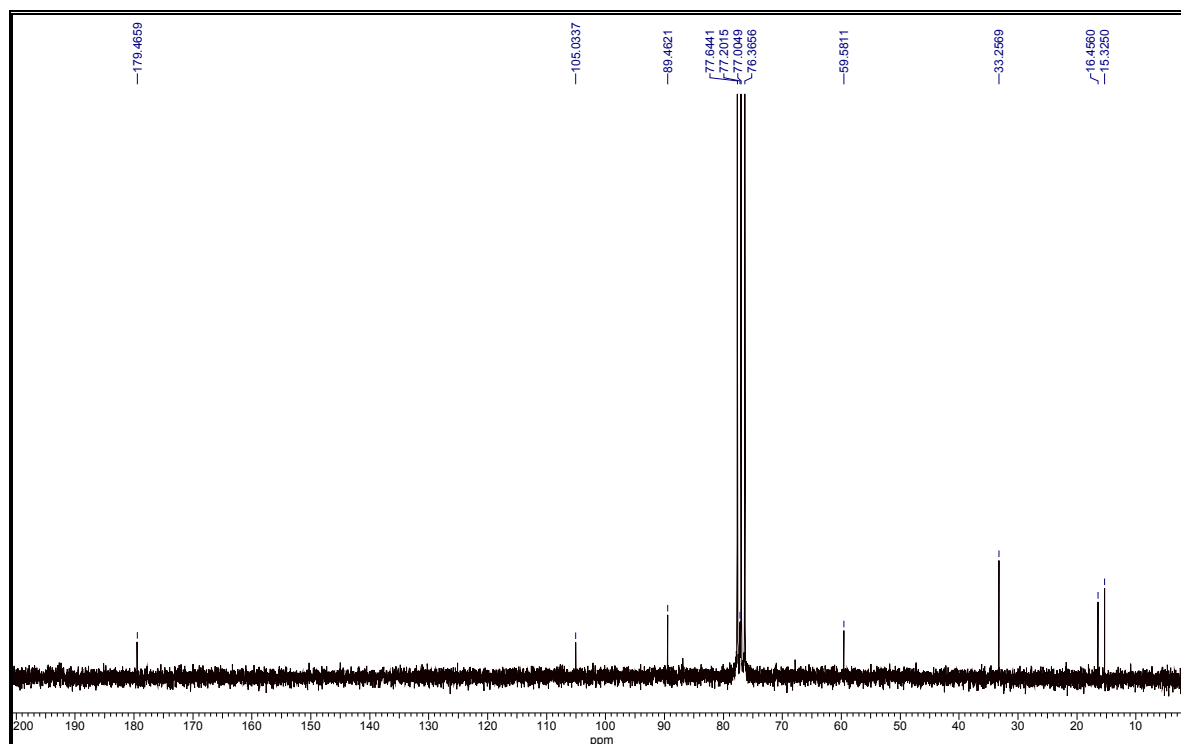


APÊNDICE 3.1.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **B-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

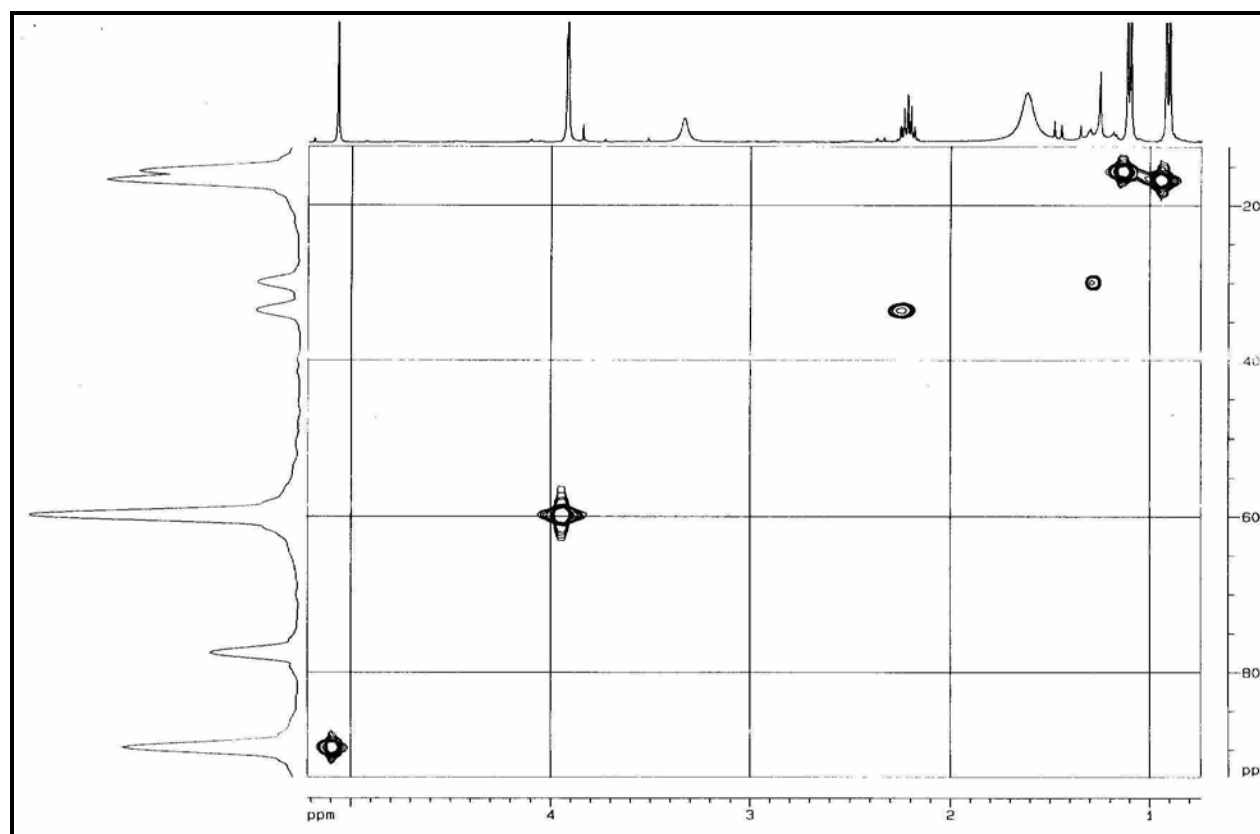


APÊNDICE 3.1.4 – Espectro de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY de **B-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).

Apêndice 3: Dados Espectrais das Substâncias Isoladas no Capítulo 5



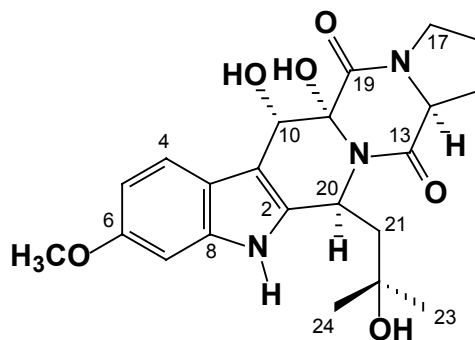
APÊNDICE 3.1.5 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **B-1** (50 MHz, Clorofórmio-*d*).



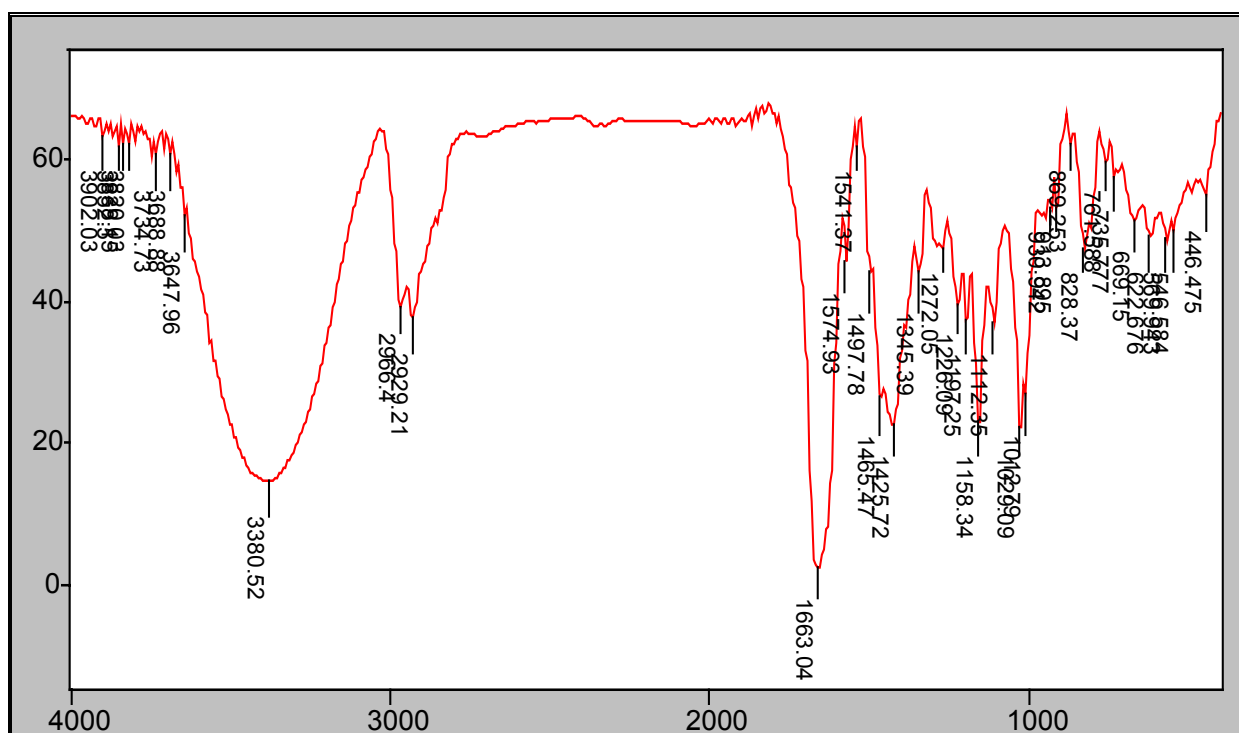
APÊNDICE 3.1.6 – Espectro de HSQC de **B-1** (400 MHz, Clorofórmio-*d*).



### 3.2. Espectros do Metabólito B-3 (PBODL3-2)

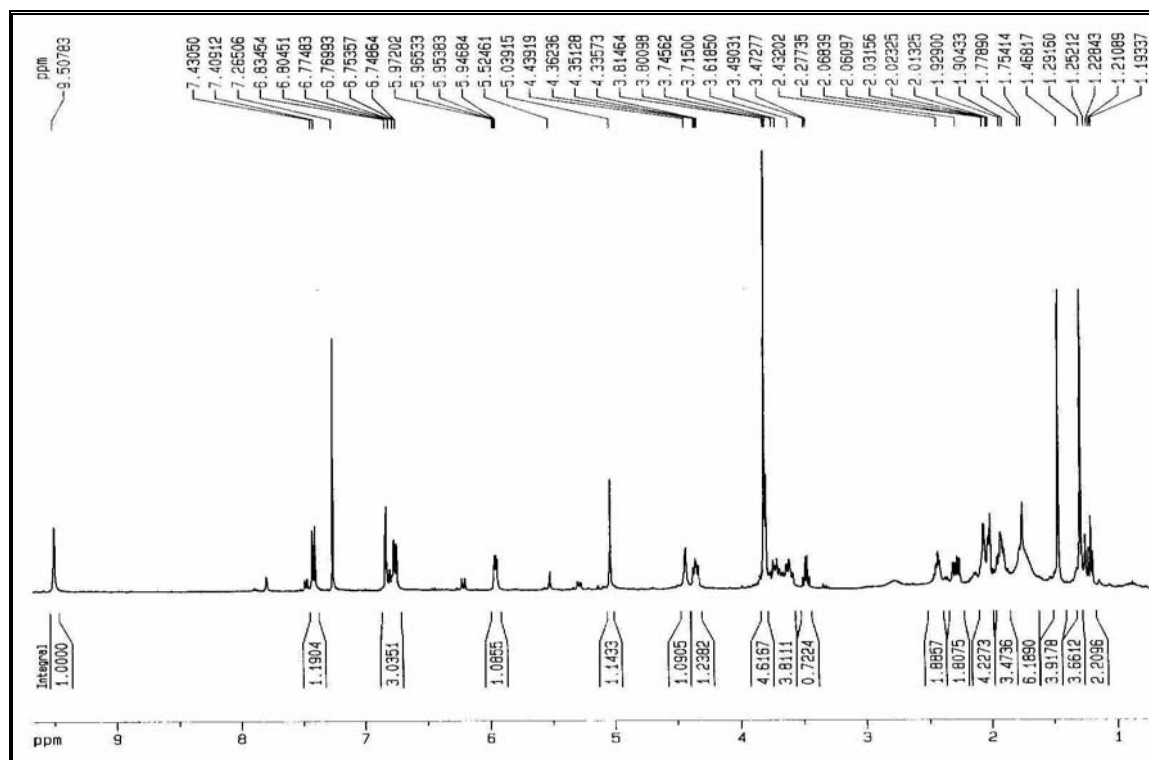


B-3

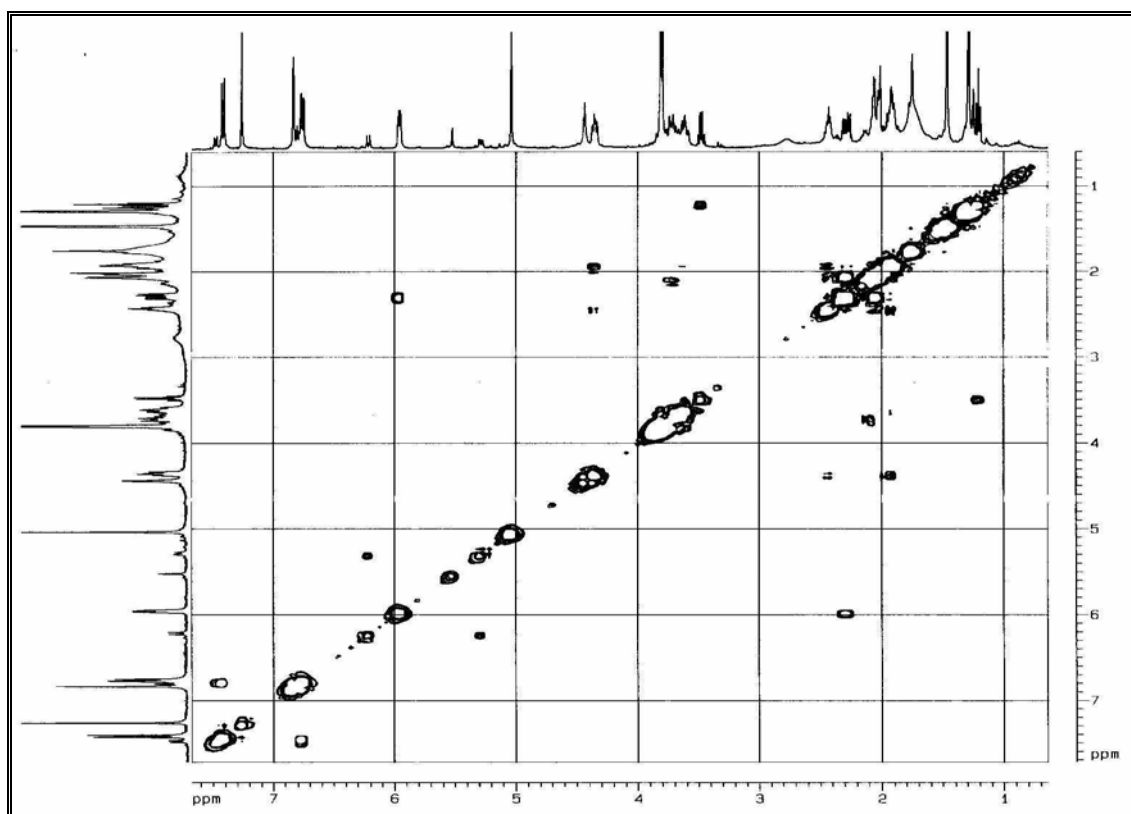


APÊNDICE 3.2.1 – Espectro de absorção no IV de B-3 (KBr, pastilha).

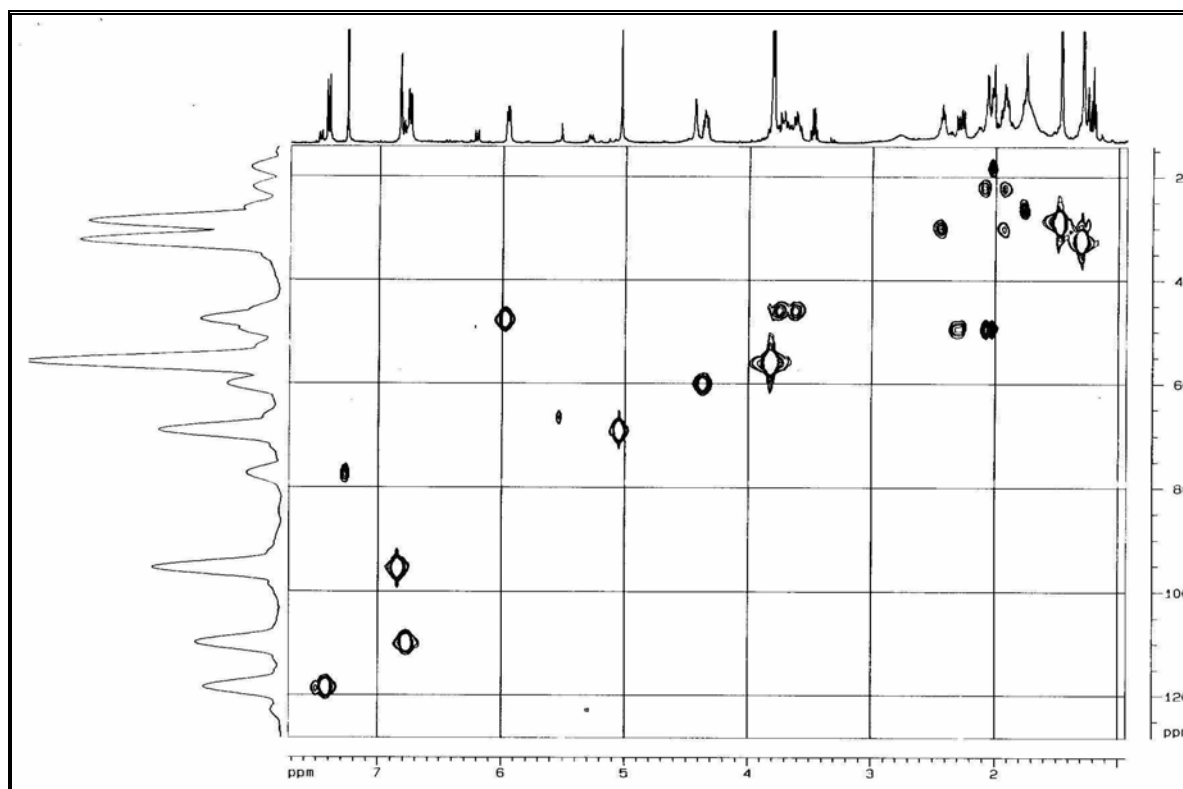
Apêndice 3: Dados Espectrais das Substâncias Isoladas no Capítulo 5



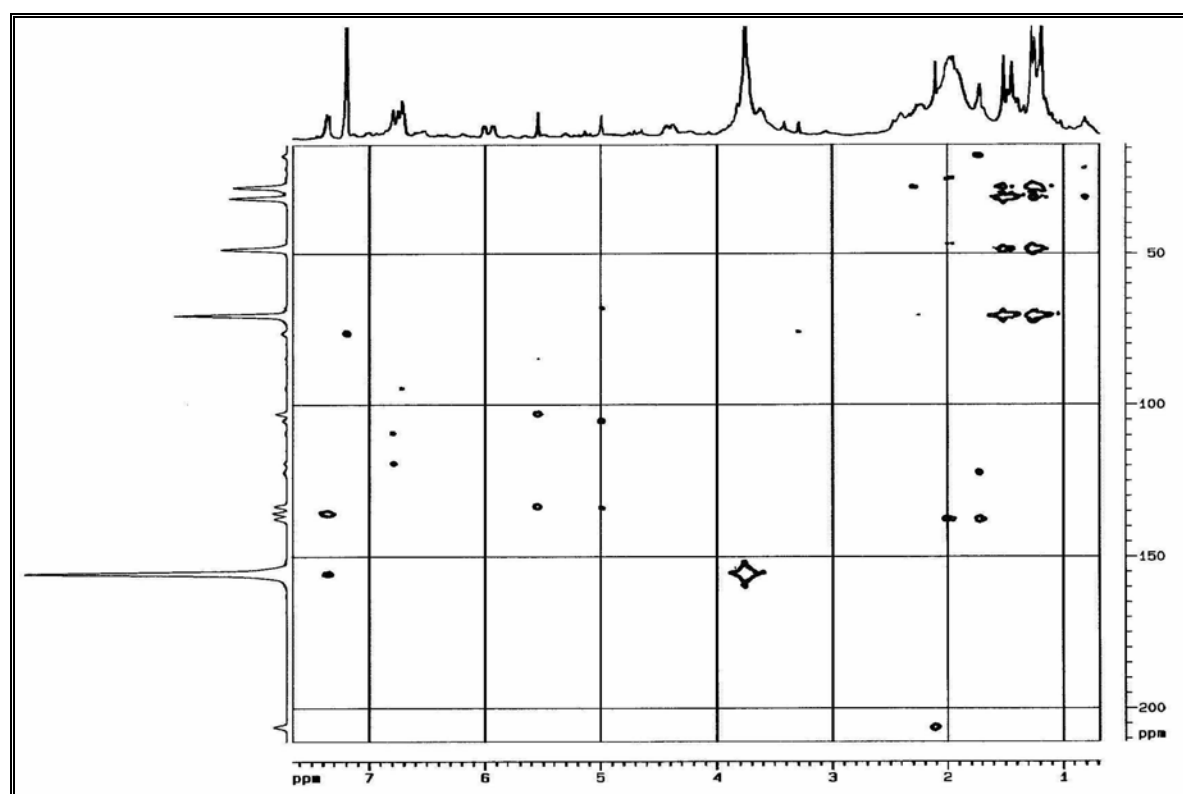
APÊNDICE 3.2.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **B-3** (400 MHz, clorofórmio-*d*).



APÊNDICE 3.2.3 – Espectro de  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  COSY de **B-3** (400 MHz, clorofórmio-*d*).

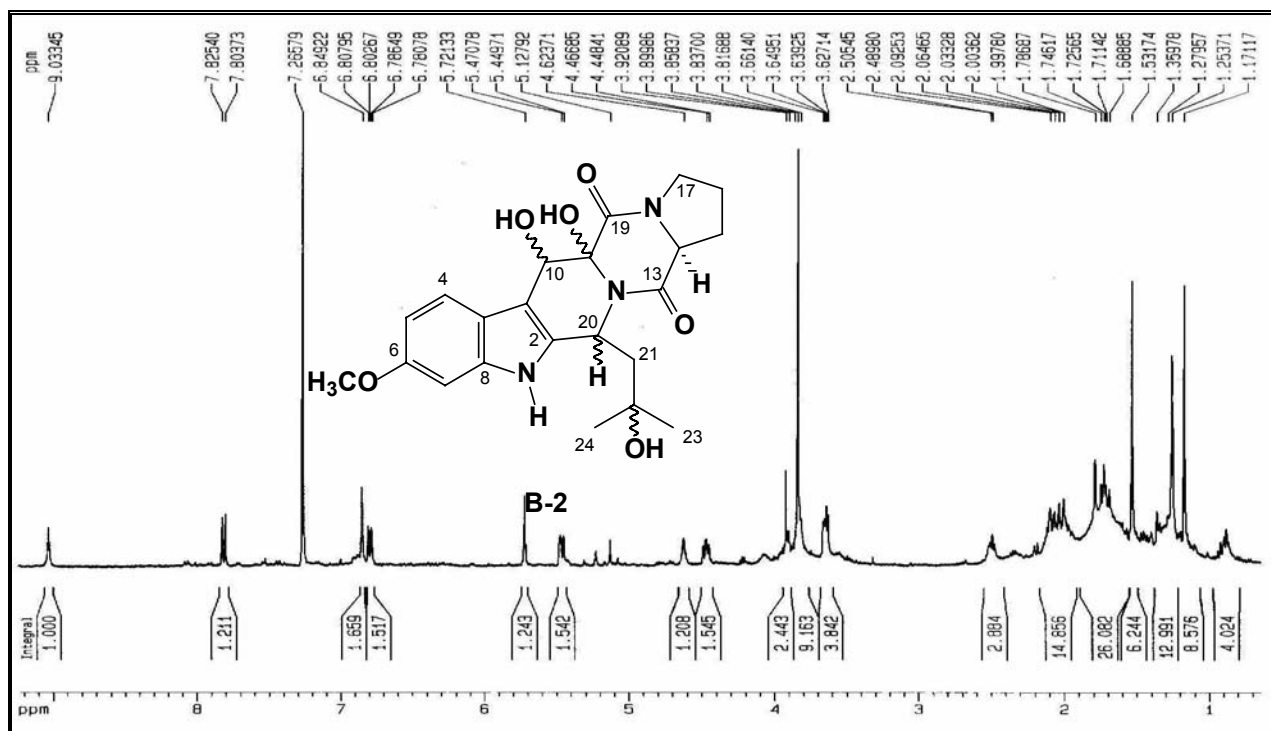


APÊNDICE 3.2.4 – Espectro de HSQC de **B-3** (400 MHz, clorofórmio-d).

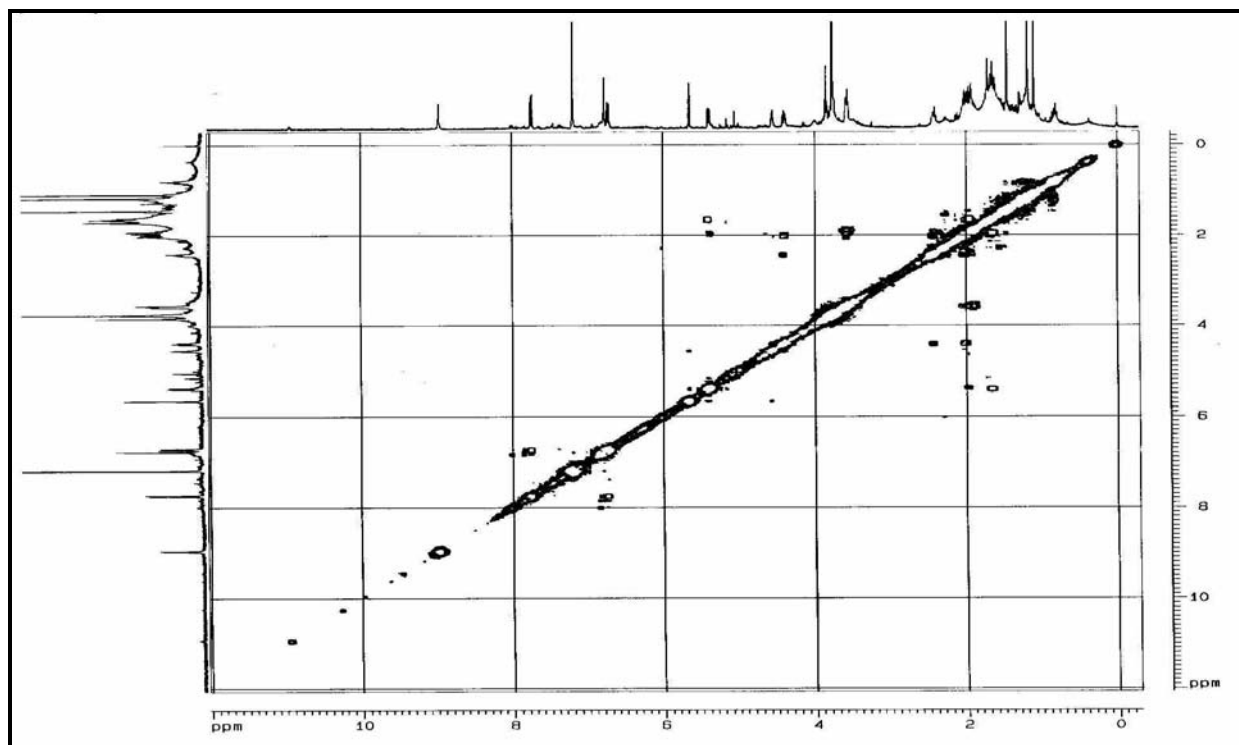


APÊNDICE 3.2.5 – Espectro de HMBC de **B-3** (400 MHz, clorofórmio-d).

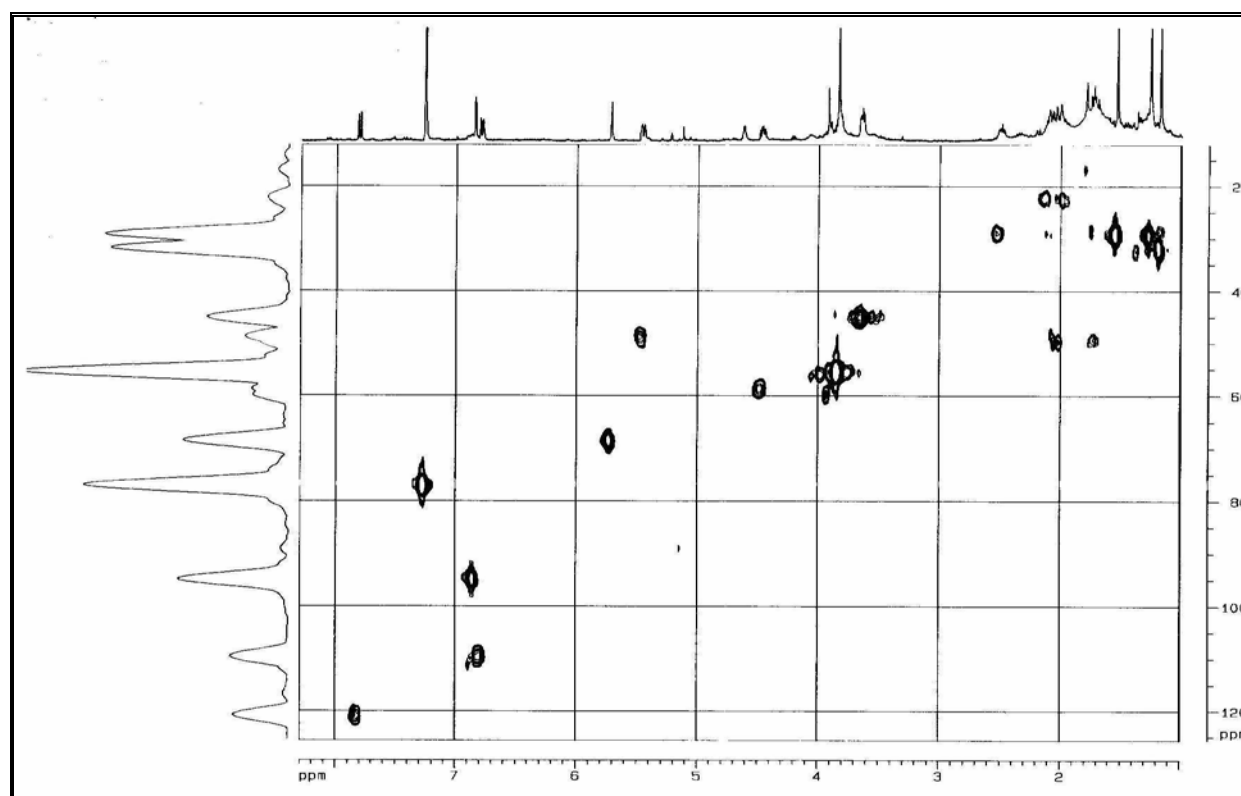
### 3.3. Espectros do Metabólito B-2 (PBLIL4-3)



APÊNDICE 3.3.1 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de B-2 (400 MHz, clorofórmio-d).



APÊNDICE 3.3.2 – Espectro de <sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H – COSY de B-2 (400 MHz, clorofórmio-d).



APÊNDICE 3.3.3 – Espectro de HSQC de **B-2** (400 MHz, clorofórmio-d).