

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

Contribuição ao estudo do metabolismo
micromolecular de *Xylaria* sp., um fungo endofítico
isolado de *Sapindus saponaria*

Luiz Fernando Arruda Santos*

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a obtenção
do título de MESTRE EM QUÍMICA
ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

* Bolsista CNPq

SÃO CARLOS – SP

Dezembro de 2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237ce

Santos, Luiz Fernando Arruda.

Contribuição ao estudo do metabolismo micromolecular de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Sapindus saponaria* / Luiz Fernando Arruda Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
132 f.

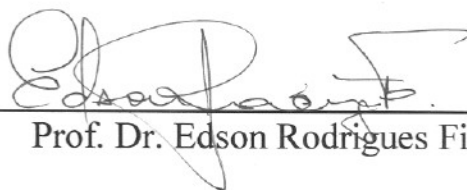
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Saponinas.
4. *Sapindus saponaria*. 5. Espectrometria de massa. I.
Título.

CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado do candidato **Luiz Fernando Arruda Santos** realizado em 15 de dezembro de 2006:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes



Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

À minha avó Norma, sei que deve estar me observando e devo grande parte de tudo isso que venho conquistando a ela.

*“A face clara da lua todos vêem. Mas só
o louco vê o lado oculto da lua e das
coisas”*

Roger Waters

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, José Carlos e Marilda, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos e situações.

À minha irmã Carol, pelas pequenas brigas e discussões.

À minha namorada Tallita, pela paciência, carinho e momentos de diversão e alegria durante esses anos de convivência.

Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho, DQ – UFSCar, pela oportunidade, orientação, aprendizagem, ensinamentos e amizade.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais (PN), CLAE, RMN e Síntese.

Aos professores Dra. Regina Vincenzi Oliveira e Dr. Luiz Alberto Beraldo, pela participação na banca examinadora.

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas: Bianca, Lú, Renata, Taícia, Patrícia, Lívia, Thaís, Jú e, em especial ao Rodrigo, LH e Gezimar, pelas dicas, conselhos e momentos descontraídos. Não tenho palavras para descrever o quanto fico orgulhoso por fazer parte deste grupo.

Aos meus amigos do PN.

Aos amigos dos laboratórios de CLAE, RMN e Síntese.

A toda minha família, em especial ao meu avô Álvaro, pelo apoio.

Ao pessoal da turma de Química 2001 - UFSCar.

Ao Fernando, meu grande amigo de todos os momentos.

Aos amigos de república: Ricas, Rubão, Caio e Bereba pelas conversas descontraídas.

Aos demais professores do DQ-UFSCar pelos ensinamentos.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar pela constante ajuda.

A todos que puderam contribuir para que este trabalho fosse realizado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Fapesp e Capes pelo suporte financeiro.

ABREVIACOES

As siglas foram mantidas em inglês pois várias não possuem tradução estabelecida para o português, enquanto que outras, apesar de já haver tradução para o termo, foram mantidas em inglês para uniformidade do texto, evitando o uso de siglas nos dois idiomas.

| | |
|--------------------|--|
| APCI | - Atmospheric pressure chemical ionization |
| atm | - Atmosphere |
| BSA | - N,O-bis(trimethylsilyl)-acetamide |
| <i>br. s</i> | - Broad range singlet |
| PTLC | - Preparative thin layer chromatography |
| CH ₃ CN | - Acetonitrile |
| COSY | - Correlation Spectroscopy |
| <i>d</i> | - Doublet |
| <i>dd</i> | - Double Doublet |
| Da | - Dalton |
| DMSO | - Dimethyl sulphoxide |
| ESI | - Electrospray Ionization |
| EI | - Electron Ionization |
| GC-MS | - Gas Chromatography - Mass Spectrometry |
| HPLC | - High pressure liquid chromatography |
| HMBC | - Heteronuclear multiple bond correlation |
| HSQC | - Heteronuclear single Quantum coherence |
| IV | - Infra-Red |
| <i>j</i> | - Coupling constant |
| <i>m</i> | - Multiplet |
| MeOH | - Methanol |
| MHz | - Megahertz |

| | |
|---------------------|--|
| MS | - Mass Spectrometry |
| MS/MS | - Tandem Mass Spectrometry |
| <i>m/z</i> | - Mass / Range |
| NIST | - National Institute of Standards and Technology |
| NMR | - Nuclear Magnetic Resonance |
| NMR ¹³ C | - Nuclear Magnetic Resonance - Carbon 13 |
| NMR ¹ H | - Nuclear Magnetic Resonance - Hydrogen 1 |
| rpm | - Rotation per minute |
| SPE | - Solid phase extraction |
| NOE | - Nuclear Overhauser effect |
| ODS ou C18 | - Octadecyl silica |
| OGSA | - Acyclic Sesquiterpene Oligoglycosides |
| Pyr | - Pyridine |
| <i>s</i> | - Singlet |
| <i>t</i> | - Triplet |
| TFA | - Trifluoroacetic acid |
| TLC | - Thin layer chromatography |
| TIC | - Total ion chromatogram |
| a.m.u. | - Atomic mass unit |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1. – Substituintes presentes nos OGSA encontrados em <i>S. saponaria</i> por M. MURGU (2002). | 3 |
| Tabela 1.2. - Massas molares dos derivados acetilados de o1. | 4 |
| Tabela 1.3. – Substituintes presentes nas saponinas isoladas e identificadas nos extrato de <i>S. saponaria</i> , por MURGU, 2002. | 8 |
| Tabela 3.1. – Condições de análise para Saponinas e OGSA obtidas a partir da coluna de Sephadex. | 24 |
| Tabela 3.2. – Códigos das amostras dos experimentos de biotransformação. | 26 |
| Tabela 3.3. – Amostras analisadas por HPLC provenientes do experimento de biotransformação envolvendo saponinas e OGSA. | 28 |
| Tabela 3.4. – Eluição utilizada na coluna de separação do extrato XL. | 29 |
| Tabela 3.5. – Período de extração do micélio e tipo de solvente. | 30 |
| Tabela 3.6. – Eluição utilizada na coluna de separação do extrato XM. | 31 |
| Tabela 3.7. – Condições de análise para a substância presente nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 38 |
| Tabela 3.8. – Códigos das amostras envolvendo o meio líquido dos experimentos de comparação de meios de cultura. | 39 |
| Tabela 3.9. – Códigos das amostras envolvendo os micélios dos experimentos de comparação de meios de cultura. | 40 |
| Tabela 3.10. – Sistema de eluição utilizado na etapa de pré-purificação utilizando SPE dos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura. | 41 |
| Tabela 4.1.1. – Dados de ^{13}C para o OGSA o1 isolado e dados da literatura (KASAI <i>et al.</i> , 1986). | 48 |
| Tabela 4.1.2. – Dados de ^{13}C da literatura (KOJIMA <i>et al.</i> , 1997) e obtidos neste trabalho (em ppm). | 58 |
| Tabela 4.2.1. – Deslocamentos químicos (^{13}C) das agliconas de: saponina S1, do produto de biotransformação e da literatura. Lit. 1 = ROMUSSI <i>et al.</i> , 1985 e Lit. 2 = YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1997. | 67 |
| Tabela 4.3.1. – Dados de ^1H NMR para a 8-hidroxiidroisocumarina. Legenda: ^1H = posição dos hidrogênios, $n^\circ \text{H}$ = número de hidrogênios (integração), δ = deslocamento (ppm), mult. = multiplicidade e J = constante de acoplamento. | 74 |

Tabela 4.3.2. – Dados de ^1H NMR para a meleína metil éter. Legenda: ^1H = 78 posição, n° H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), mult. = multiplicidade e J = constante de acoplamento.

Tabela 4.3.3. – Dados de ^1H NMR para a 5-formil-meleína. Legenda: ^1H = 82 posição, n° H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), mult. = multiplicidade e J = constante de acoplamento.

Tabela 4.3.4. – Dados de ^1H NMR para a 3R,4R-hidroxi-meleína. Legenda: 91 ^1H = posição, n° H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), mult. = multiplicidade, J = constante de acoplamento e OH_{quel} = hidroxila quelada.

Tabela 4.3.5. – Dados de ^1H NMR para a 3R,4S-hidroxi-meleína. Legenda: 91 ^1H = posição, n° H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), mult. = multiplicidade, J = constante de acoplamento e OH_{quel} = hidroxila quelada.

Tabela 4.3.6. – Dados de NMR para o ácido pilifórmico. Legenda: ^1H = 100 posição, δ = deslocamento (ppm), mult. = multiplicidade, J = constante de acoplamento em Hz, correlações dos experimentos de COSY, HSQC e HMBC.

Tabela 4.3.7. – Dados de ^1H e ^{13}C do ácido pilifórmico isolado e os dados 100 encontrados na literatura (TELES, 2005).

Tabela 4.3.8. – Dados de NMR para o diplodiol. Legenda: Pos. = posição, δ 108 = deslocamentos (ppm), correlações observados nos experimentos de COSY, HSQC e HMBC.

Tabela 4.3.9. – Dados de ^1H e ^{13}C do diplodiol isolado e os dados 110 encontrados na literatura (CUTLER *et al.*, 1979).

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1.1** – Isolamento dos metabólitos secundários do micélio (XM) 32
de *Xylaria* sp. As frações representadas tratam da primeira e última fração de cada coluna, assim como as frações que mostraram conteúdo interessante.
- Fluxograma 1.2** – Isolamento dos metabólitos secundários do meio líquido 35
(XL) de *Xylaria* sp. As frações representadas tratam da primeira e última fração de cada coluna, assim como as frações que mostraram conteúdo interessante.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** – *Sapindus saponaria* utilizada em paisagismo urbano. 1
- Figura 1.2.** – Esqueleto base dos OGSA encontrados em *S. saponaria* por M. MURGU (2002). 3
- Figura 1.3.** – Exemplo de uma saponina esteroidal da planta *Yucca filamentosa* L. 5
- Figura 1.4.** – Estrutura de uma saponina triterpênica bidesmosídica de *Saponaria officinalis*. 6
- Figura 1.5. – Esqueleto triterpênico das saponinas isoladas e identificadas nos extrato de *S. saponaria*, por MURGU, 2002. 8
- Figura 1.6.** - Estrutura química da α -tomatina. Setas indicam os sítios de clivagem por diferentes fungos. (A) *Botrytis cinerea*; (B) *Septoria lycopersici*; (C) *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *B. cinerea*. 10
- Figura 1.7.** – (a) Espectros de massas (ESI(-)) das soluções de meio de cultura (b), meio com o fungo (c), meio com o extrato de *S. saponaria* (d), e o meio contendo o fungo e o extrato (b-4), (MURGU, 2002). 11
- Figura 1.8.** – Espectros de MS/MS dos picos de m/z (a) 881 e (b) 897 referentes à saponina antes e depois da biotransformação (MURGU, 2002). 12
- Figura 1.9.** – Algumas reações de hidroxilação proporcionadas por microrganismos (HE et al. 2005). 13
- Figura 1.10.** – Fungo do gênero *Xylaria* isolado de *S. saponaria* (a) e mostrando corpo de frutificação (b). 14

| | |
|---|----|
| Figura 1.11. – Alguns metabólitos secundários isolados de fungos do gênero <i>Xylaria</i> descritos na literatura. | 16 |
| Figura 1.12. – Esqueleto do composto meleína, um importante representante da classe das isocumarinas. | 17 |
| Figura 1.13. – Proposta biossintética para a 6-hidroxi-meleína (KUROSAKI <i>et al.</i> , 1989). | 18 |
| Figura 1.14. – Compostos que possuem a meleína (Figura.9) como precursor. | 19 |
| Figura 3.1. – Esquema ilustrativo para obtenção do diazometano. | 37 |
| Figura 4.1.1. – Espectros de MS das frações 14 – 18 do extrato hidrolisado de <i>S. saponaria</i> . | 42 |
| Figura 4.1.2. – Espectro de massas da fração 16, indicando a presença do OGSA o1, em destaque temos: $[M-H]^-$ e $[M-2H]^{2-}$. | 44 |
| Figura 4.1.3. – Espectros de MS/MS da fração 16, indicando a presença de OGSA. | 45 |
| Figura 4.1.4. – Proposta de fragmentação para o espectro mostrado na Figura 4.1.3. | 46 |
| Figura 4.1.5. – Estrutura do OGSA o1. | 47 |
| Figura 4.1.6. – Espectro de ^{13}C do OGSA o1 presente na fração 16. | 48 |
| Figura 4.1.7. – Espectro de HSQC do OGSA o1 presente na fração 16, mostrando as ligações dos carbonos anoméricos. | 49 |
| Figura 4.1.8. – Estrutura da Saponina S1 com a numeração do esqueleto triterpênico e açúcares. | 50 |
| Figura 4.1.9. – Espectro de massas da fração 28, indicando a presença do saponina S1, em destaque temos: $[M-H]^-$ e $[M-2H]^{2-}$. | 51 |
| Figura 4.1.10. – Espectros de MS/MS da fração 27, indicando a presença da saponina S1 com as respectivas perdas dos açúcares até a aglicona. | 52 |
| Figura 4.1.11. – Proposta de fragmentação para o espectro mostrado na Figura 4.1.10. | 53 |
| Figura 4.1.12. – Espectro de 1H da fração 27, evidenciando a presença da saponina S1. | 54 |
| Figura 4.1.13. – Espectro de ^{13}C da fração 27. | 55 |
| Figura 4.1.14. – Espectro de HSQC, indicando a presença das ligações de H-C anoméricas dos açúcares: arabinose, ramnose e xilose. | 56 |

- Figura 4.1.15.** – Espectro de HMBC da fração 27, destacando as ligações que possibilitaram a atribuição das posições dos açúcares. 57
- Figura 4.2.1.** – Espectro de massas do extrato do fungo *Xylaria* sp. contendo a saponina S1 (m/z 881) e o provável produto de biotransformação (m/z 897). 60
- Figura 4.2.2.** – Cromatogramas: (a) padrão OGSA, (b) meio de cultura, (c) meio de cultura com o padrão e (d) meio de cultura, fungo e OGSA. 62
- Figura 4.2.3.** – Cromatogramas: (a) padrão saponina S1, (b) meio de cultura, (c) meio de cultura com saponina e (d) meio de cultura, fungo e saponina, a seta indica o provável produto de biotransformação. 63
- Figura 4.2.4.** – Cromatogramas do extrato contendo a saponina S1 e o fungo *Xylaria* sp. (a), abaixo estão ilustrados os espectros de UV das bandas referentes à saponina S1 (c) e do provável produto da biotransformação (b). 64
- Figura 4.2.5.** – Espectro de ^{13}C da saponina biotransformada. 65
- Figura 4.2.6.** – (a) Estrutura do triterpeno contendo hidroxilação em C-21 (ROMUSSI *et al.*, 1985) e (b) Estrutura da saponina hidroxilada no C-22, isolada por YSHIKAWA *et al.* (1997), (c) Saponina S1 isolada e (d) Provável produto de biotransformação 66
- Figura 4.2.7.** – Provável estrutura do produto de biotransformação da saponina S1 (OH em C-17). 68
- Figura 4.3.1.** – Substâncias produzidas por *Xylaria* sp. e isoladas neste trabalho: (A) meleína, (B) meleína metil éter, (C) 5-formil-meleína, (D) 3R,4R-hidroxi-meleína, (E) 3R,4S-hidroxi-meleína, (F) ácido pilifórmico e (G) diplodiol. 69
- Figura 4.3.2.** – Espectro de ^1H NMR da fração XM5-15 e XM6-15A com 200 MHz em CDCl_3 . 70
- Figura 4.3.3.** – Espectro de COSY com 400MHz para as frações XM5-15 e XM6-15A em CDCl_3 . 71
- Figura 4.3.4.** – Espectro de HSQC com 400MHz para as frações XM5-15 e XM6-15A em CDCl_3 . 71
- Figura 4.3.5.** – Hidrogênio quelado, indicando o deslocamento observado no espectro da Figura 4.3.2. 72
- Figura 4.3.6.** – Ampliação da região de aromáticos do espectro mostrado 73

na Figura 4.3.2.

| | |
|---|----|
| Figura 4.3.7. – Anel aromático presente nas frações XM5-15 e XM6-15A. | 73 |
| Figura 4.3.8. – Possível grupo presente nas frações XM5-15 e XM6-16A. | 74 |
| Figura 4.3.9. – Estrutura da 8-hidroxidiidroisocumarina ou meleína. | 74 |
| Figura 4.3.10. – Espectro de massas (EI) da meleína. | 75 |
| Figura 4.3.11. – Proposta de fragmentação para meleína. | 76 |
| Figura 4.3.12. – Espectro ^1H NMR de XM6-67-12 ^a (200MHz). | 77 |
| Figura 4.3.13. – Estrutura da substância presente na fração XM6-67-12A. | 78 |
| Figura 4.3.14. – Espectro de massas da meleína metil éter, presente em XM6-67-12A. | 79 |
| Figura 4.3.15. – Proposta de fragmentação para a meleína metil éter. | 79 |
| Figura 4.3.16. – Espectro de ^1H NMR das frações XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B. | 80 |
| Figura 4.3.17. – Espectro de massas da fração XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B. | 81 |
| Figura 4.3.18. – Possíveis estruturas para as frações XM6-21-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B. | 82 |
| Figura 4.3.19. – Proposta de fragmentação para a 5-formil-meleína. | 83 |
| Figura 4.3.20. – Espectro de ^1H NMR das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4 | 84 |
| Figura 4.3.21. – Ampliação de duas regiões do espectro de ^1H NMR das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4, destacando a duplicação dos sinais. | 84 |
| Figura 4.3.22. – Cromatograma e espectros de UV das bandas observadas no cromatograma das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4. | 85 |
| Figura 4.3.23. – Espectro de ^1H NMR das amostras (A) XM6-PPB-1 e (B) XM6-PPB-2. | 86 |
| Figura 4.3.24. – Cromatograma da amostra contendo a mistura epimérica, mostrando apenas uma banda cromatográfica. | 87 |
| Figura 4.3.25. – Cromatograma da amostra após a reação de sililação, mostrando duas bandas cromatográficas, além do material de partida (10,21 min.). | 88 |
| Figura 4.3.26. – Espectro de massas dos epímeros sililados analisados por GC-MS. | 89 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.3.27. – Espectro de massas da mistura de epímeros encontrado nas frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4. | 90 |
| Figura 4.3.28. – Esqueleto da 4-hidroxi-meleína. | 90 |
| Figura 4.3.29. – Proposta de fragmentação do espectro mostrado na Figura 4.3.25. | 92 |
| Figura 4.3.30. – Proposta de fragmentação do espectro mostrado na Figura 4.3.26., composto sililado. | 93 |
| Figura 4.3.31. – Estrutura dos epímeros isolados das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4. (A) 3R,4R – hidroxi-meleína e (B) 3R,4S – hidroxi-meleína. | 93 |
| Figura 4.3.32. – Espectro de ^1H NMR das frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 95 |
| Figura 4.3.33. – Espectro de COSY das frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 95 |
| Figura 4.3.34. – Espectro de HSQC das frações XM8-13-2 e XL6-4-2, mostrando as correlações <i>J</i> -1. | 96 |
| Figura 4.3.35. – Espectro de HMBC das frações XM8-13-2 e XL6-4-2, mostrando algumas correlações <i>J</i> -2 e <i>J</i> -3. | 96 |
| Figura 4.3.36. – Estrutura parcial do composto encontrado nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 97 |
| Figura 4.3.37. – Estrutura parcial do composto encontrado nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 97 |
| Figura 4.3.38. – Espectro de massas para o composto presente nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 98 |
| Figura 4.3.39. – Estrutura do composto (ácido pilifórmico) encontrado nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2. | 98 |
| Figura 4.3.40. – Correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 4.35.) que contribuíram para elucidação estrutural do ácido pilifórmico. | 99 |
| Figura 4.3.41. – Espectro de MS/MS do ácido pilifórmico com 10eV. | 101 |
| Figura 4.3.42. – Proposta de fragmentação do ácido pilifórmico. | 102 |
| Figura 4.3.43. – Espectro de ^1H NMR da fração XM8-10-17-2. | 102 |
| Figura 4.3.44. – Ampliação da região de 0,80 a 2,75 do espectro de ^1H NMR da fração XM8-10-17-2. | 103 |
| Figura 4.3.45. – Espectro de COSY da fração XM8-10-17-2. | 103 |
| Figura 4.3.46. – Espectro de HSQC da fração XM8-10-17-2, mostrando as correlações H-C <i>J</i> -1. | 104 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.3.47. – Espectro de HMBC da fração XM8-10-17-2, mostrando as principais correlações H-C <i>J</i> -2 e <i>J</i> -3. | 104 |
| Figura 4.3.48. – Espectro de ¹³ C NMR da fração XM8-10-17-2. | 105 |
| Figura 4.3.49. – Espectro de massas (GC-MS) da fração XM8-10-17-2. | 105 |
| Figura 4.3.50. – Estrutural parcial presente em XM8-10-17-2, com os deslocamentos de ¹³ C. | 106 |
| Figura 4.3.51. – Estrutural parcial presente em XM8-10-17-2, com os deslocamentos de ¹³ C. | 106 |
| Figura 4.3.52. – Estrutural proposta para o composto em XM8-10-17-2. | 107 |
| Figura 4.3.53. – Algumas correlações observadas no HMBC. | 108 |
| Figura 4.3.54. – Proposta de fragmentação para o diplodiol. | 109 |
| Figura 4.3.55. – Compostos identificados por GC-MS. | 111 |
| Figura 4.3.56. – Ergosterol e Peróxido de Ergosterol, isolados de <i>Xylaria</i> sp. | 111 |
| Figura 4.4.1. – Cromatograma e UV das isocumarinas isoladas: (A) meleína; (B) mistura epimérica da 4-hidroxi-meleína; (C) 5-formil-meleína e (D) meleína metil éter. | 113 |
| Figura 4.4.2. – Cromatograma do micélio dos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura: sacarose, glicose e sacarose/glicose (1:1), em 332 nm. | 114 |
| Figura 4.4.3. – Cromatograma do meio líquido dos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura: sacarose, glicose e sacarose/glicose (1:1), em 332 nm. | 115 |
| Figura 4.4.4. – (A) Espectro de UV da 4-hidroxi-meleína. (B) Cromatograma do micélio com glicose e alguns espectros de UV das principais bandas cromatográficas (indicadas). | 116 |
| Figura 4.4.5. – Cromatograma de íons totais (TIC) das isocumarinas. | 118 |
| Figura 4.4.6. – Cromatogramas de íons totais (TIC) do micélio: (A) glicose, (B) sacarose e (C) sacarose/glicose. | 118 |
| Figura 4.4.7. – Cromatogramas de íons selecionados referentes às isocumarinas. Extrato do micélio contendo glicose. | 119 |
| Figura 4.4.8. – Espectro de massas das bandas em 10,9 e 12, 3 min. presentes no cromatograma de íons selecionados do micélio em glicose, referentes ao íon de <i>m/z</i> 194. | 120 |

- Figura 4.4.9.** – Cromatogramas de íons totais (TIC) do meio líquido: (A) glicose, (B) sacarose e (C) sacarose/glicose. 121
- Figura 4.4.10.** – Cromatogramas de íons selecionados referentes às isocumarinas, extratos do meio líquido contendo glicose. 121
- Figura 4.4.11.** – Espectro de massas do meio líquido com glicose (10,65 min.), indicando a presença da meleína metil éter. 122
- Figura 4.4.12.** – Cromatogramas de íons selecionados referentes à meleína metil éter (m/z 192), extratos do meio líquido contendo glicose (A), sacarose (B) e sacarose/glicose (C). 123

RESUMO

“ESTUDO DO METABOLISMO DE *Xylaria* sp., UM FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Sapindus saponaria*” – Esse trabalho relata o estudo de uma surpreendente relação planta-microrganismo envolvendo a planta *Sapindus saponaria*, uma espécie extremamente rica em saponinas, em concentrações elevadas, as quais são compostos que possuem ação antifúngica bastante acentuada e, e um fungo do gênero *Xylaria*. O trabalho em questão teve por objetivo compreender o mecanismo de sobrevivência deste fungo em um ambiente tão inóspito. A resposta encontrada para esta questão foi que o fungo realiza uma biotransformação na estrutura das saponinas presentes em *S. saponaria*, possibilitando assim a sobrevivência deste nos tecidos da planta. Trata-se de uma reação de hidroxilação localizada no esqueleto triterpênico das saponinas presentes em *S. saponaria*. Outro objetivo do estudo foi encontrar um método rápido para o isolamento e identificação de saponinas e OGSA (Oligoglicosídeos Sesquiterpênicos Acíclicos) presentes nos frutos da planta. Para o isolamento destes compostos a fase estacionária Sephadex[®] LH-20 apresentou grande eficiência e a técnica de espectrometria de massas (MS) foi utilizada como um método rápido para identificação destas substâncias. O fungo *Xylaria* sp. foi cultivado em meios sintéticos para isolamento de metabólitos secundários. O microrganismo apresentou grande potencial para produção de diversos compostos, dando destaque para a classe das isocumarinas. Para realização deste trabalho foram utilizadas técnicas cromatográficas e espectrométricas como HPLC, GC, cromatografia em coluna, MS e MS/MS, 1D NMR e 2D NMR. Foram realizadas propostas de fragmentação para todos os compostos estudados por espectrometria de massas.

ABSTRACT

“STUDY OF THE METABOLISM OF *Xylaria* sp., AN ENDOPHYTE FUNGUS ISOLATED FROM THE FRUITS OF *Sapindus saponaria*” – This work reports the study of a surprising plant – microorganism relationship, involving the plant *Sapindus saponaria*, which is rich in antigungal saponins, and an endophyte fungus isolated from the pericarp of the fruits collected in the host plant, and identified as *Xylaria* sp. The main objective of this work was to understand the survival mechanism of this fungus in such inhospitable ambient. It was found that this fungus biotransforms the structure of the saponins present in *S. saponaria*, making it less toxic, allowing the fungus to survive in the plant tissue. The reaction involved in this survival mechanism was a hydroxylation at ring C of the aglicone skeleton of saponins present in *S. saponaria*. This study also had as objective the establishment of a fast method for the isolation and identification of saponins and ASOG (Acyclic Sesquiterpene Oligoglycosides) present in the plant’s fruits. For the isolation of these compounds, the Sephadex[®] LH-20 column showed to be very efficient and the mass spectrometry technique (ESI-MS) was used as a rapid method of identification of these substances. The *Xylaria* sp. fungus was cultivated in synthetic mediums for the isolation of secondary metabolites. The microorganism showed a great potential for the production of several compounds, especially the isocoumarins. The analytical tools used to monitor all the experiments reported here comprises chromatographic and spectrometric techniques as HPLC, GC, open column chromatography, MS and MS/MS, 1D NMR and 2D NMR. Mechanisms of fragmentation were tentatively suggested for all compounds studied by mass spectrometry.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - <i>Sapindus saponaria</i> | 1 |
| 1.2 - Oligoglicosídeos Sesquiterpênicos Acíclicos (OGSA) | 2 |
| 1.3 - Saponinas..... | 4 |
| 1.4 - Saponinas vs. Fungos Endofíticos | 9 |
| 1.5 - Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero <i>Xylaria</i> | 13 |
| 2 - OBJETIVOS | 20 |
| 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 21 |
| 3.1 - Materiais | 21 |
| 3.2 - Equipamentos..... | 22 |
| 3.3 - Obtenção de saponinas e OGSA a partir dos frutos de <i>S. saponaria</i> | 23 |
| 3.3.1 - Obtenção do extrato de <i>S. saponaria</i> | 23 |
| 3.3.2 - Isolamento e análise de saponinas e OGSA..... | 23 |
| 3.4 - Experimentos de Biotransformação..... | 24 |
| 3.4.1 - Obtenção do microrganismo..... | 24 |
| 3.4.2 - Cultivo de <i>Xylaria</i> sp. | 25 |
| 3.4.3 - Introdução dos substratos (saponinas e OGSA) no meio de cultura | 26 |
| 3.4.4 - Análises dos experimentos de biotransformação | 27 |
| 3.4.5 - Isolamento da saponina biotransformada..... | 28 |
| 3.5 - Isolamento de metabólitos secundários..... | 28 |
| 3.5.1 - Cultivo de <i>Xylaria</i> sp | 28 |
| 3.5.2 - Obtenção e fracionamento dos extratos de <i>Xylaria</i> sp. | 29 |
| 3.5.3 - Isolamento de metabólitos secundários..... | 31 |
| 3.5.4 - Análises por GC-MS | 36 |
| 3.5.5 - Análises por MS e MS/MS..... | 37 |
| 3.6 - Experimento envolvendo diferentes meios de cultura | 38 |
| 3.6.1 - Preparação e inoculação nos diferentes meios de cultura | 38 |
| 3.6.2 - Análises dos diferentes meios de cultura | 40 |
| 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 4.1 - Isolamento e identificação de saponinas e OGSA..... | 42 |

| | |
|---|------------|
| 4.2 - Biotransformação de saponinas e OGSA | 60 |
| 4.3 - Isolamento de metabólitos secundários..... | 69 |
| 4.3.1 - Substâncias isoladas. | 69 |
| 4.3.2 - Identificação dos metabólitos secundários | 70 |
| 4.3.2.1 - Frações XM5-15 e XM6-15A - meleína | 70 |
| 4.3.2.2 - Frações XM6-67-12A - meleína metil éter | 76 |
| 4.3.2.3 - Frações XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B - 5-formíl-meleína | 80 |
| 4.3.2.4 - Frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4 - 4-hidroxi-meleína | 83 |
| 4.3.2.5 - Frações XM8-13-2 e XL6-4-2 - ácido pilifórmico..... | 94 |
| 4.3.2.6 - Fração XM8-10-17-2 - diplodiol | 102 |
| 4.3.2.7 - Ácidos graxos e esteróides..... | 110 |
| 4.4 - Comparação de meios de cultivo. | 112 |
| 4.4.1 - Escolha dos meios de cultivo. | 112 |
| 4.4.2 - Análise por HPLC. | 112 |
| 4.4.3 - Análise por GC-MS..... | 117 |
| 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 125 |
| 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 127 |

1. Introdução

1.1. *Sapindus saponaria* L.

Sapindus saponaria L. é uma espécie de planta pertencente à família Sapindaceae. A ocorrência dessa espécie é verificada nas regiões tropicais do globo, sendo que no Brasil encontra-se principalmente nas regiões sudeste e nordeste. Frutos de plantas do gênero *Sapindus* são utilizados como sabão em diversas culturas a milhares de anos (LEMOS *et al.*, 1992). Esta espécie de planta recebe diversos nomes populares como sabãozinho, sabão-de-soldado, saboneteira, fruta-de-sabão, pau-de-sabão, sabão-de-mico entre outros. Além disso, árvores de *S. saponaria* são bastante utilizadas em paisagismo urbano (Figura 1.1., SWSBM, 2006).



Figura 1.1. – *Sapindus saponaria* L.

Plantas da família Sapindaceae constituem a base da medicina popular oriental, principalmente devido à presença de saponinas nessa família (SPARG *et al.* 2004). Extratos dos frutos *Sapindus trifoliatum* mostraram atividade no sistema nervoso central de mamíferos (ARULMOZHI *et al.*, 2005). Em outro estudo realizado, envolvendo *Sapindus saponaria*, constatou-se que seus frutos possuem atividade antiúlcera (ALBIERO *et al.*, 2001). As principais classes de compostos encontrados em plantas do gênero *Sapindus* são flavonóides, triterpenos, esteróides, glicosídeos e saponinas (WAHAB *et al.*, 1985).

Em trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório por M. MURGU (2002) foi verificado que uma espécie de fungo endofítico, identificado como *Xylaria* sp., mostrou-se capaz de habitar os tecidos da planta *Sapindus saponaria*, de modo que o estudo dessa planta continuou sendo de interesse para este trabalho. De acordo com PETRINI (1992), fungos endofíticos são aqueles que, por toda ou determinado período de suas vidas, desenvolvem-se no interior dos tecidos das plantas, sem causar-lhes nenhum dano aparente. O isolamento deste fungo dos frutos de *S. saponaria* trata-se de um fato surpreendente, uma vez que esta planta possui como característica a produção elevada de saponinas, compostos que apresentam atividade antifúngica (SPARG *et al.*, 2004)

Partindo dos frutos de *S. Saponaria*, o estudo realizado por M. MURGU (2002) levou ao isolamento de duas principais classes de substâncias: saponinas e oligoglicosídeos sesquiterpênicos acíclicos (OGSA), ambos em quantidade bastante elevada.

1.2. Oligoglicosídeos Sesquiterpênicos Acíclicos (OGSA)

Oligoglicosídeos sesquiterpênicos acíclicos (OGSA), como o próprio nome sugere, são glicosídeos formados por uma ou mais cadeia(s) de açúcar(es) e uma unidade sesquiterpênica. Essa classe de compostos possui como característica massa molecular elevada, normalmente acima de 1000 Da. Poucas atividades biológicas são atribuídas a esses compostos, no entanto atuam como surfactantes naturais e agentes expectorante, principalmente em culturas orientais (WONG *et al.*, 1991 e SUN *et al.*, 2002). O estudo dessa classe de substâncias é bastante escasso

devido, possivelmente, à sua elevada polaridade. Assim sendo, são raros os trabalhos que relatam o isolamento e identificação desses compostos.

O estudo anterior realizado em nosso laboratório mostrou que OGSA são os principais componentes dos frutos de *S. saponaria*. Na Figura 1.2. temos o esqueleto base de OGSA encontrados na literatura (KASAI *et al.*, 1986; KASAI *et al.*, 1988 e WONG *et al.*, 1991) e a Tabela 1.1. ilustra as cadeias de açúcares substituintes encontradas no trabalho realizado por MURGU (2002).

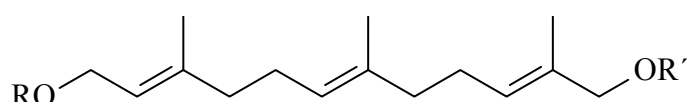


Figura 1.2. – Esqueleto base dos OGSA encontrados em *S. saponaria* por M. MURGU (2002) e descritos na literatura (KASAI *et al.*, 1986; KASAI *et al.*, 1988 e WONG *et al.*, 1991).

Tabela 1.1. – Substituintes presentes nos OGSA encontrados em *S. saponaria* por M. MURGU (2002).

| Código | R | R' | Massa Molar (Da) |
|--------|--|--|------------------|
| o1 | Glc - ² Rha \ ³ Rha | Glc - ² Rha \ ³ Rha | 1146 |
| o2 | Glc - ² Rha \ ³ Rha | Glc - ² Rha | 1000 |
| o3 | Glc - ² Rha \ ³ Rha | Glc - ² Rha \ ³ Ara | 1132 |
| o4 | Glc - ² Rha \ ³ Rha | - H | 692 |
| o5 | Glc - ² Rha \ ³ Ara | - H | 678 |
| o6 | Glc - ² Rha \ ³ Xyl | Glc - ² Rha \ ³ Xyl | 1118 |

Glc = glicose
Xyl = xilose
Rha = ramnose
Ara = arabinose

Fato interessante é que, até o trabalho realizado por MURGU (2002), nenhum OGSA acetilado nos açúcares havia sido descrito, embora KASAI *et al.* (1988) cite a presença de substâncias menos polares nos extratos de *S. trifoliatum*, e estas desaparecem em meio básico. A acetilação dos açúcares ocorre de forma não específica, gerando uma mistura bastante complexa. A localização das posições acetiladas nestes glicosídeos é uma tarefa bastante complexa, considerando-se que estas substâncias são formadas por várias unidades do mesmo açúcar (ramnose).

A TABELA 1.2. nos mostra o número de acetatos encontrados no OGSA o1, com suas respectivas massas moleculares, encontrados nos extratos de *S. saponaria*. Um total de até seis acetatos pôde ser identificado. A identificação destes compostos (MURGU, 2002) foi realizada através de técnicas de espectrometria de massas.

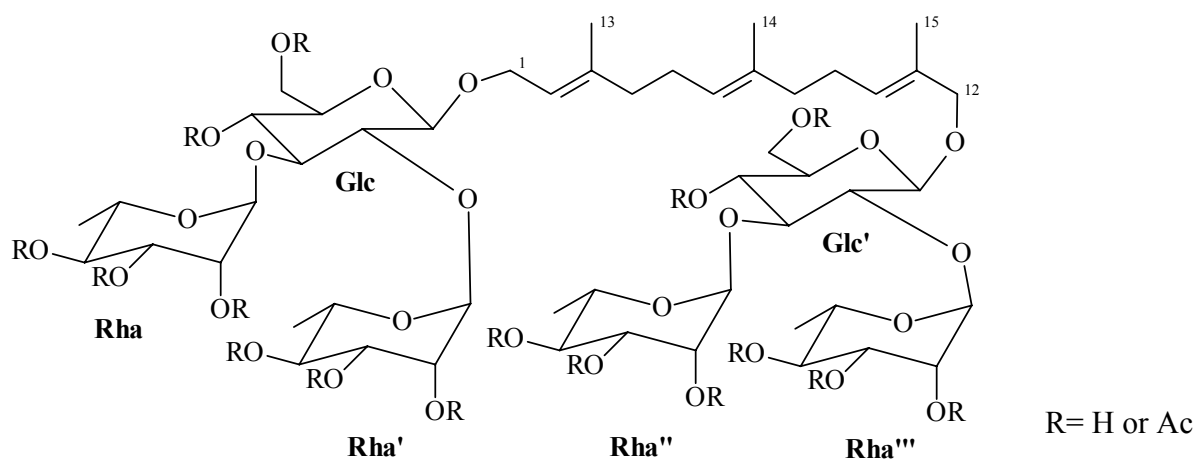


Tabela 1.2. - Massas molares dos derivados acetilados de o1.

| Nº de acetatos (R= COCH ₃) | Nº de hidroxilas (R= OH) | Massa molecular (Da) |
|--|--------------------------|----------------------|
| 0 | 16 | 1146 |
| 1 | 15 | 1188 |
| 2 | 14 | 1230 |
| 3 | 13 | 1272 |
| 4 | 12 | 1314 |
| 5 | 11 | 1356 |
| 6 | 10 | 1398 |

1.3. Saponinas

Saponinas compreendem um vasto grupo de glicosídeos, amplamente distribuído em todo reino vegetal. Geralmente, são solúveis em água e formam espuma devido à presença de uma parte lipofílica, conhecida como aglicona e outra

parte hidrofílica (açúcares). Com base em suas aglicona, saponinas podem ser classificadas em dois grupos: esteroidais ou triterpênicas. Saponinas esteroidais são normalmente encontradas em monocotiledôneas, principalmente nas famílias Liliaceae, Dioscoreaceae e Agavaceae, já as triterpênicas ocorrem em dicotiledôneas, nas famílias Sapindaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Cariofiyllaceae e outras (SPARG *et al.*, 2004). As saponinas, em geral, apresentam massa molecular elevada, de 600 a 2000 Da, e normalmente ocorrem em misturas complexas devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares e grupos acetatos ou ainda devido à presença de diversas agliconas. Saponinas podem ainda ser classificadas de acordo com o número de cadeias de açúcares, ou seja, as que possuem apenas uma cadeia de açúcar são denominadas monodesmosídicas, já as que possuem duas são conhecidas como bidesmosídicas. Na Figura 1.3. (PLOCK *et al.*, 2001) temos um exemplo de saponina esteroidal monodesmosídica, enquanto que na Figura 1.4. (JIA *et al.*, 1998), temos um exemplo de saponina triterpênica bidesmosídica. Essa diferenciação é considerada importante, pois as saponinas monodesmosídicas possuem atividades biológicas diferentes de saponinas bidesmosídicas, e vice-versa.

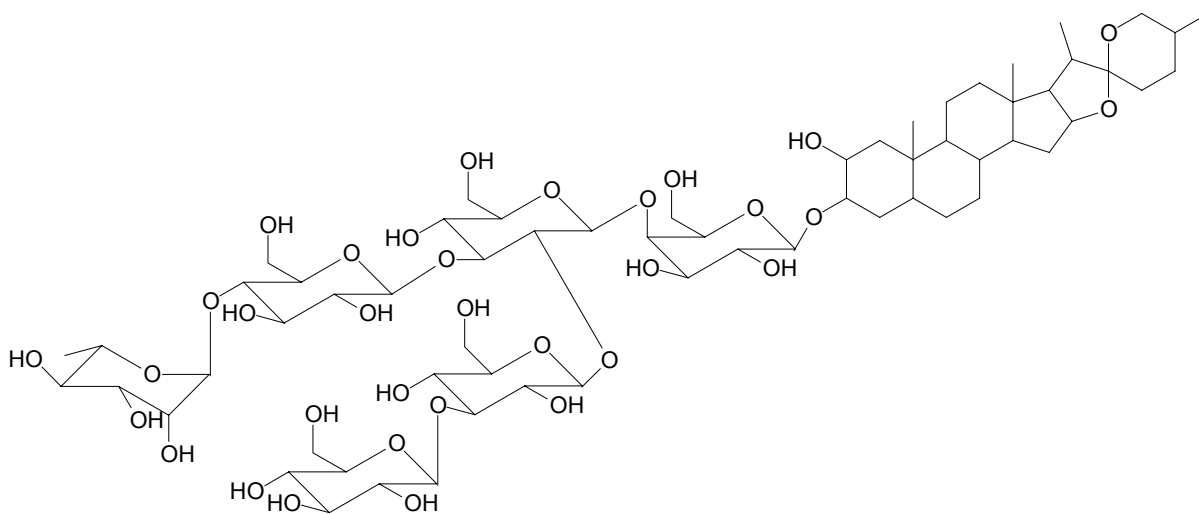


Figura 1.3. – Exemplo de uma saponina esteroidal da planta *Yucca filamentosa L.*

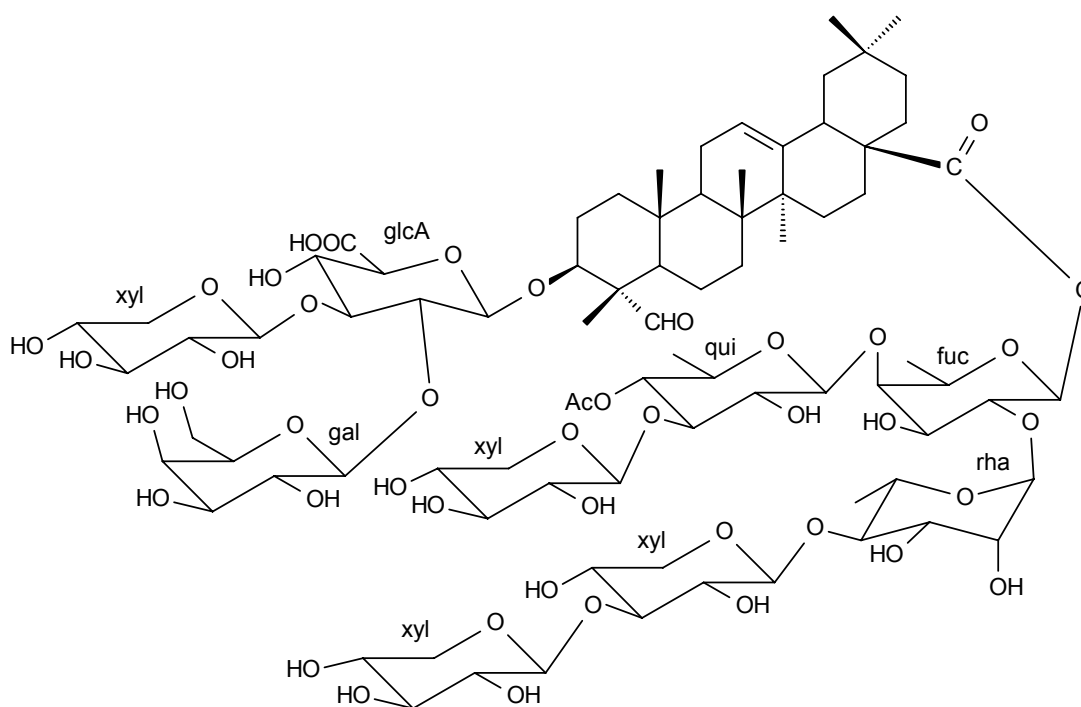


Figura 1.4. – Estrutura de uma saponina triterpênica bidesmosídica de *Saponaria officinalis*.

Saponinas são amplamente utilizadas na medicina, alimentação e higiene. A principal atividade dessas substâncias é a ação sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando a destruição das células. As seguintes atividades estão relacionadas com essa ação sobre membranas: ação espermicida, ictiotóxica e moluscicida. Saponinas possuem ainda, atividades anti-inflamatória, analgésica, expectorante, diurética e, como citado anteriormente e de principal relevância nesse projeto de pesquisa, atividade antifúngica (SPARG *et al.* 2004). Elas são também utilizadas na fabricação de pastas de dente, *shampoos* e como agente espumante em cervejas. Saponinas esteroidais são essenciais na fabricação de contraceptivos orais e outros hormônios (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995).

O isolamento de saponinas através de métodos clássicos de cromatografia, como cromatografia em coluna utilizando sílica como fase estacionária, é uma tarefa bastante complexa, uma vez que esses compostos possuem polaridade bastante elevada. Além disso, eles ocorrem normalmente em misturas de substâncias com pequenas variações estruturais na aglicona ou nas unidades de açúcar. O uso de novas técnicas cromatográficas como cromatografia em contracorrente (CCC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparativa ou ainda o uso de polímeros como Sephadex® como fase estacionária tornam-se bastante viáveis no procedimento para isolamento de tais substâncias. O uso destas técnicas para isolamento de saponinas torna desnecessário o processo de derivação desses

compostos, procedimento bastante comum quando utilizadas técnicas clássicas de isolamento. Outro fator que dificulta ainda mais o isolamento destas substâncias é a ausência de grupos cromóforos, o que torna limitada a detecção de saponinas. Esse fato faz com que a análise por HPLC-UV seja bastante limitada, uma vez que o detector de ultravioleta deve ser utilizado em baixos comprimentos de onda (em torno de 206 nm, onde saponinas absorvem), região onde temos a absorção de diversas substâncias, e também de um número expressivo de solventes. Além de problemas encontrados no isolamento e detecção, o processo de elucidação estrutural de saponinas também é complexo. Os métodos mais antigos para elucidação estrutural destes compostos envolvem procedimentos de clivagem dos mesmos, principalmente entre a aglicona e a(s) cadeia(s) de açúcar(es), levando à análises dos fragmentos separadamente. Atualmente, as análises de saponinas são realizadas por espectrometria de massas (FAB, LSIMS, *electrospray*), para determinação do peso molecular, natureza e seqüência de açúcares e ^{13}C NMR que permite a determinação das posições de ligação das cadeias glicosídicas com a aglicona, seqüência, natureza e número de monossacarídeos (TORI et al., 1976), configuração e conformação das ligações interglicosídicas (TORI et al., 1974; MARSTON e HOSTETTMANN, 1991). São utilizadas também técnicas de ^1H NMR uni e bidimensionais (RASTRELLI et al., 1998) que possibilitam a identificação dos açúcares e a posição das ligações entre os açúcares e a aglicona. Técnicas não destrutivas visam elucidação da estrutura sem a clivagem das cadeias de açúcar, e as mais utilizadas são as de espectrometria de massas e NMR uni e bidimensionais. ^1H NMR gera espectros muito complexos, já que em alguns casos saponinas chegam a ter mais de 100 átomos de hidrogênio, de forma que sua interpretação nem sempre é possível. Entretanto, com o avanço das técnicas de 2D NMR (COSY, HMQC, HMBC, TOCSY e NOESY) e MS, principalmente quando faz-se uso de *electrospray* como fonte de ionização, e técnicas *tandem* (MS/MS) como analisador, saponinas bastante complexas têm sido identificadas sem a necessidade de clivagem.

A espectrometria de massas é atualmente uma das ferramentas de análise mais apropriadas para a análise estrutural destas substâncias, pois fornece informação sobre peso molecular, seqüência de açúcares e estrutura da aglicona, principalmente com a disponibilidade de recursos de MS/MS. Além disso, permite a análise de misturas e necessita de uma quantidade muito pequena de amostra.

da cadeia de açúcar, em S1 temos uma Xylose, em S2 uma Arabinose. Dentro de cada grupo a diferença entre as saponinas consiste na presença de grupos acetatos ligados aos açúcares terminais, Xylose em S1 e Arabinose em S2.

1.4. Saponinas vs. Fungos Endofíticos

A interação entre os seres vivos de diferentes espécies é uma condição vital para aquelas que não possuem capacidade de conseguir por si próprias seus meios de sobreviver. Essas interações são fundamentais para a manutenção e evolução da vida (ZOBBERI, 1972). Fungos podem se associar com plantas de diversas maneiras, sendo elas prejudiciais, benéficas ou neutras. As interações prejudiciais ocorrem quando um organismo, no caso o fungo ou até mesmo a planta, atinge de modo adverso o ambiente do outro. Nas associações benéficas, também conhecidas como simbióticas, ambos organismos são favorecidos (planta e fungo). Nas associações neutras, os organismos desenvolvem-se sem qualquer efeito recíproco, ou seja, não há dependência entre um ser e outro (MAGNANI, 2002). A compreensão da associação entre plantas e microrganismos é extremamente importante. Estudos desta natureza podem levar ao isolamento de novos produtos naturais, produzidos apenas quando estes seres encontram-se associados.

Como dito anteriormente, foi verificado que um fungo endofítico, identificado como *Xylaria* sp., é capaz de habitar os tecidos da planta *S. saponaria*. Esse é considerado um fato surpreendente pois, como já relatado, a espécie *S. saponaria* é extremamente rica em saponinas, compostos com atividade antifúngica. Desse modo, o fungo deve ter algum mecanismo para que o mesmo sobreviva em um ambiente tão inóspito (devido a elevada concentração de saponinas). A atividade antifúngica das saponinas não é completamente conhecida, no entanto acredita-se que estas possuem a capacidade de se complexar com esteróides presentes nas membranas celulares dos microrganismos (fungos), levando a degradação destas membranas (MERT-TURK, 2006).

Saponinas são armazenadas em partes especiais das células das plantas, como os vacúolos, e liberadas quando essas células são rompidas por algum agente externo como, por exemplo, fungos endofíticos (MARSTON & HOSTETTMANN,

1991). Supõe-se que existam dois mecanismos de resistência dos fungos contra a atividade de saponinas (OSBOURN *et al.*, 1996). Um dos mecanismos consiste no fato dos fungos atacarem plantas sem danificar seus tecidos internos, evitando assim a liberação das saponinas. O outro modo seria a capacidade destes de causar uma modificação química na estrutura das mesmas, levando a detoxificação das mesmas.

Como exemplo de mecanismo de defesa de fungos contra saponinas podemos citar o caso clássico do tomate (*Lycopersicon esculentum*), onde vários microrganismos, inclusive fungos endofíticos, são capazes de detoxificar, ou seja, tornar menos tóxicas para si, a saponina anti-fúngica α -tomatina rompendo suas unidades da cadeia de açúcar, como mostrado na Figura 1.6. (QUIDDE *et al.*, 1998 e QUIDDE *et al.*, 1999).

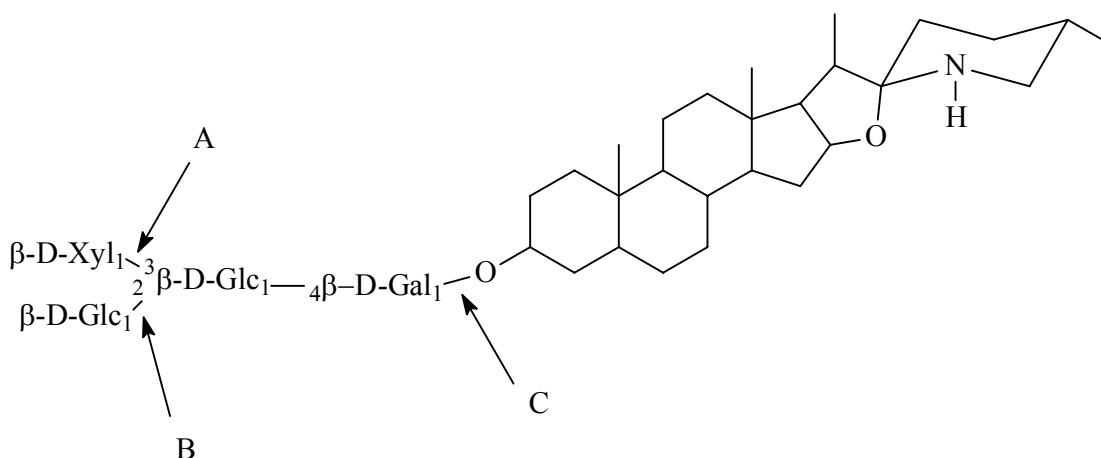


Figura 1.6. - Estrutura química da α -tomatina. Setas indicam os sítios de clivagem por diferentes fungos. (A) *Botrytis cinerea*; (B) *Septoria lycopersici*; (C) *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *B. cinerea*.

O estudo do mecanismo de defesa do fungo endofítico *Xylaria* sp. isolado de *S. saponaria* frente a presença de saponinas da planta foi iniciado no trabalho realizado anteriormente em nossos laboratórios por MURGU (2002) que, com o auxílio de técnicas de espectrometria de massas (MS e MS/MS, utilizando como fonte de ionização *electrospray* no modo negativo, ESI(-)), foi possível notar que o fungo mostrou-se capaz de realizar uma transformação na estrutura das saponinas (Figura 1.7.). Uma vez que as análises foram realizadas utilizando ionização por *electrospray*, os íons mostrados no espectro não representam a massa molecular real dos compostos. Como os experimentos foram realizados no modo negativo, onde temos a perda de um próton das moléculas analisadas, observamos no

espectro a massa molecular com uma unidade de massa a menos, referente à $[M - H]^-$.

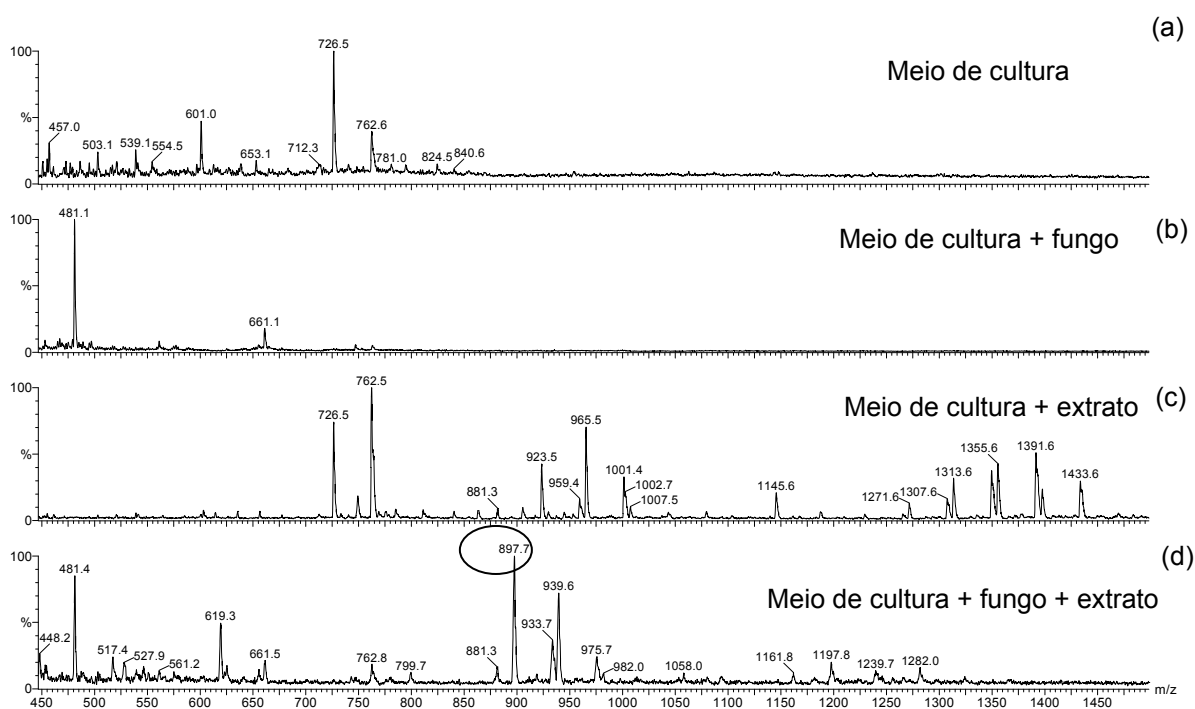


Figura 1.7. – (a) Espectros de massas (ESI(-)) das soluções de meio de cultura (b), meio com o fungo (c), meio com o extrato de *S. saponaria* (d), e o meio contendo o fungo e o extrato (b-4), (MURGU, 2002).

As modificações causadas nas saponinas presentes no extrato de *S. saponaria* quando em contato com o fungo referem-se a desacilação das saponinas e, principalmente, à soma de 16 u.m.a. (unidades de massa atômica, Figura 1.7.). Na Figura 1.7. (a) temos o espectro do meio de cultura e em (b) temos o meio de cultura contendo o fungo. Notamos na Figura 1.7.(c) a presença dos sinais referentes às saponinas, m/z 881 (pouco intenso) deacilada, m/z 923 mono-acetilada e m/z 965, di-acetilada. Já no espectro mostrado na Figura 1.7.(d) verificamos a presença do íon de m/z 897 bastante intenso, referente à saponina totalmente deacilada (882) com adição de 16 u.m.a.

Embora tenha sido relatada no trabalho anterior a capacidade do fungo endofítico *Xylaria* sp. realizar a biotransformação das saponinas presentes em *S. saponaria* (com adição de 16 u.m.a.), a elucidação estrutural deste produto biotransformado não foi realizada. A única informação sobre a biotransformação, com base no trabalho já realizado foi que, através dos experimentos de íons

fragmentos (MS/MS, ESI(-)), comparando a saponina intacta (substrato) com o produto biotransformado foi que a modificação estrutural da saponina ocorreu no seu núcleo triterpênico. Esse fato pode ser comprovado analisando os espectros de íons fragmentos obtidos (Figura 1.8.).

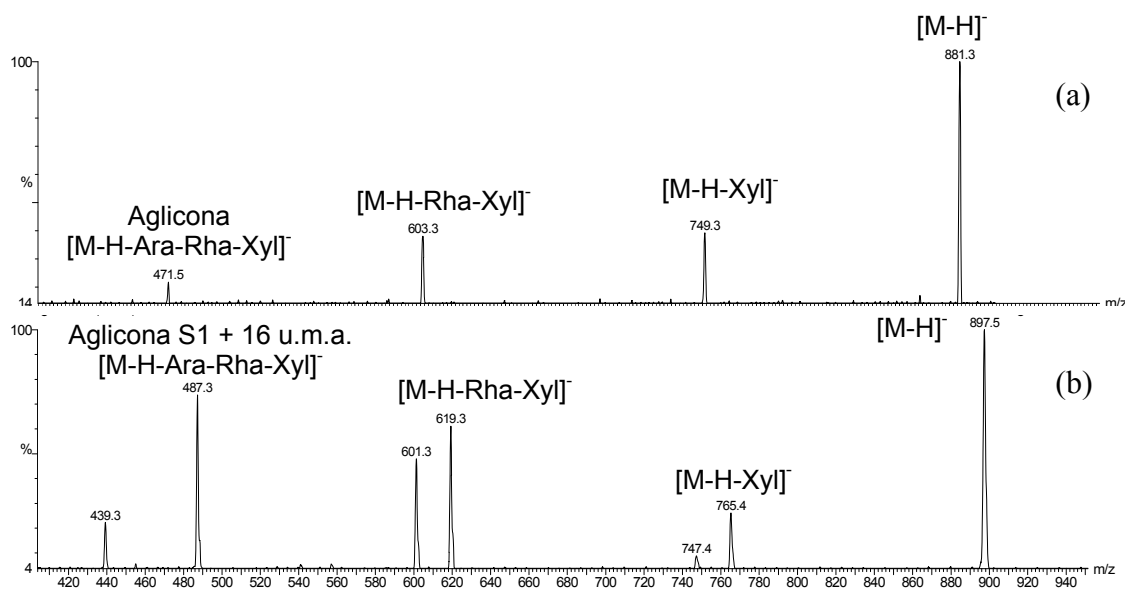


Figura 1.8. – Espectros de MS/MS dos picos de m/z (a) 881 e (b) 897 referentes a saponina S1 antes e depois da biotransformação (MURGU, 2002).

No primeiro espectro (Figura 1.8.(a)) temos os íons fragmentos de m/z 881, sendo o íon de m/z 471 referente a aglicona da saponina intacta. Já no segundo espectro (Figura 1.8.(b)) temos o experimento de íons fragmentos do íon m/z 897, produto da adição de 16 u.m.a. do substrato de m/z 881. Assim, como no primeiro caso, foi possível observar íons fragmentos relativos à perda das unidades de açúcares, chegando a aglicona. No entanto, dessa vez, todos os íons relativos às perdas sequenciais dos açúcares (m/z 765 e 619) e a formação da aglicona (m/z 487) continuam a adição de 16 u.m.a., o que representa que esta adição ocorreu na aglicona.

A capacidade de biotransformação apresentada por fungos endofíticos do gênero *Xylaria* foi recentemente estudada por SHIBUYA *et al.* (2003). O estudo citado mostrou que uma espécie de *Xylaria* realizou alterações no esqueleto de alcalóides presentes em *Cinchona pubescens* (Rubiaceae), mesma planta de onde o microrganismo foi isolado. No caso em questão o fungo foi capaz de realizar 1-N-oxidação dos seguintes alcalóides encontrados na planta: quinina, quinidina, cinchonidina e cinchonina.

Transformações estruturais realizadas por microrganismos vêm recebendo grande atenção nas últimas décadas. Em especial, a habilidade que certos fungos filamentosos possuem em promover reações de hidroxilação estereoespecíficas em compostos está sendo bastante explorada por diversos segmentos industriais como alimentícios, farmacêutico, agro-defensivo e outros (LACROIX *et al.*, 1999). Temos um exemplo onde fungos da espécie *Mucor spinosus* e *Aspergillus niger* são utilizados para realizar reações de hidroxilação em compostos que apresentam atividade anticancerígenas, aumentando assim a solubilidade em água e diminuindo sua toxicidade para seres humanos (HE *et al.*, 2006). A Figura 1.9. ilustra algumas reações de hidroxilação proporcionadas pelo fungo *M. Spinosus* e descritas por HE *et al.*, 2006. Notamos que, neste caso, o fungo em questão não foi capaz de realizar a hidroxilação em uma posição específica da molécula em questão.

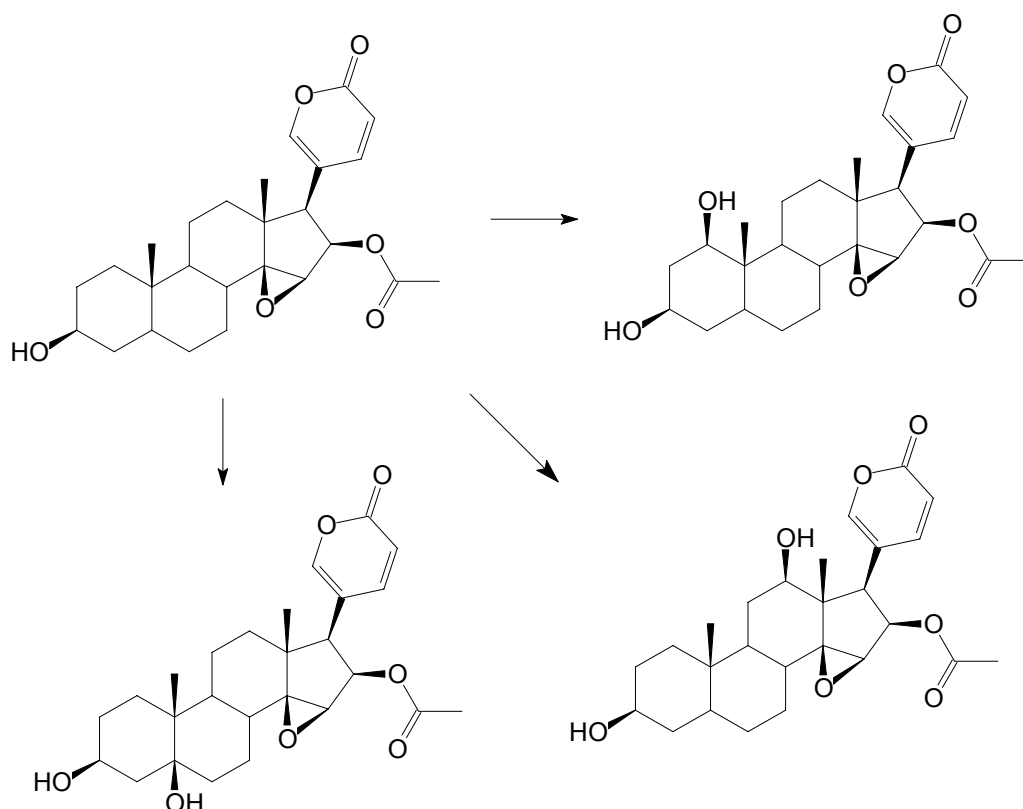


Figura 1.9. – Algumas reações de hidroxilação proporcionadas por microrganismos (HE *et al.* 2006).

1.5. Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Xylaria*

O gênero *Xylaria* pertence à família Xylariaceae, uma grande família de fungos que compreende aproximadamente 40 gêneros com representantes em praticamente todos os continentes. A identificação de fungos endofíticos dessa

família é uma tarefa bastante dificultada devido a variações em sua coloração, forma, tamanho e estágio de desenvolvimento. (LEE *et al.*, 2000). A espécie pertencente ao gênero *Xylaria*, isolada da planta *Sapindus saponaria* (Figura 1.10.(a)), não foi identificada até o momento. Esse gênero é normalmente isolado como endofíticos de plantas encontradas principalmente nas regiões tropicais do globo, e ainda existem muitas questões sobre a biologia desse gênero (BAYMAN *et al.*, 1998). Temos alguns casos onde fungos desse gênero chegam a formar corpo de frutificação, como pode ser observado na Figura 1.10.(b) (VOLK, T. 2006).



Figura 1.10. – Fungo do gênero *Xylaria* isolado de *S. saponaria* (a) e mostrando corpo de frutificação (b).

Grande parte dos fármacos disponíveis para consumo é derivada de produtos naturais (WILLITS *et al.*, 2003). Porém um grande número de estudos aponta os microrganismos, organismos marinhos e até mesmo pequenos animais, dentre tantos outros, como potentes produtores de novas substâncias (NATORI *et al.*, 1981).

Além do fato do fungo *Xylaria* sp. ser capaz de realizar biotransformações em saponinas, fungos do gênero *Xylaria* têm mostrado elevado potencial de produção de metabólitos secundários, muitos desses com atividades biológicas bastante úteis. Dessa forma, o estudo do metabolismo secundário do fungo *Xylaria* sp. será abordado durante a execução desse projeto de pesquisa.

Alguns compostos produzidos por fungos do gênero *Xylaria* (Figura 1.11.), encontrados em trabalhos recentes são as xantonas (a), isoladas de uma espécie de *Xylaria* encontrada em *Glochidion ferdinandi* na Austrália. Essa classe de substâncias possui atividades anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e antiviral (HEALY *et al.*, 2004). 21-Acetilengleromicina (b), pertencente à classe das citocalasinas, isolada de *Xylaria hypoxylon*, que apresentou atividade inibidora de HIV-1 protease, antibiótico e antitumoral (ESPADA *et al.*, 1997). As substâncias c e d produzidas por *Xylaria mellisii*, apresentaram

atividade antiherpes (PITTAYAKHAJONWUT *et al.*, 2005). Xylobovide (**e**), foi isolado de *Xylaria obavata* (ABATE *et al.*, 1996); no mesmo trabalho temos o relato de Clonostachydiol (**f**), também isolado dessa espécie de microorganismo e primeiramente reportado na classe Xylariales. Além desses dois compostos, o trabalho descreve o isolamento e identificação de (E)-methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoate (**g**). O composto Xyloallenolide A (**h**) foi encontrado em uma espécie de *Xylaria* isolada das sementes de uma angiosperma encontrada na China (LIN *et al.*, 2001). A substância (-)-Xylaramide A (**i**) (SCHNEIDER *et al.*, 1996), até então inédita, foi isolada da espécie de *Xylaria* presente em *Glochidion ferdinandi*, árvore de clima tropical da Austrália. O trabalho realizado por ARAÚJO, *et al.* 2005, levou ao isolamento e identificação dos seguintes compostos produzidos por *Xylaria* sp.: ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico (**j**), 7-declorogriseofulvina (**k**), citocalasina B (**l**) e griseofulvina (**m**).

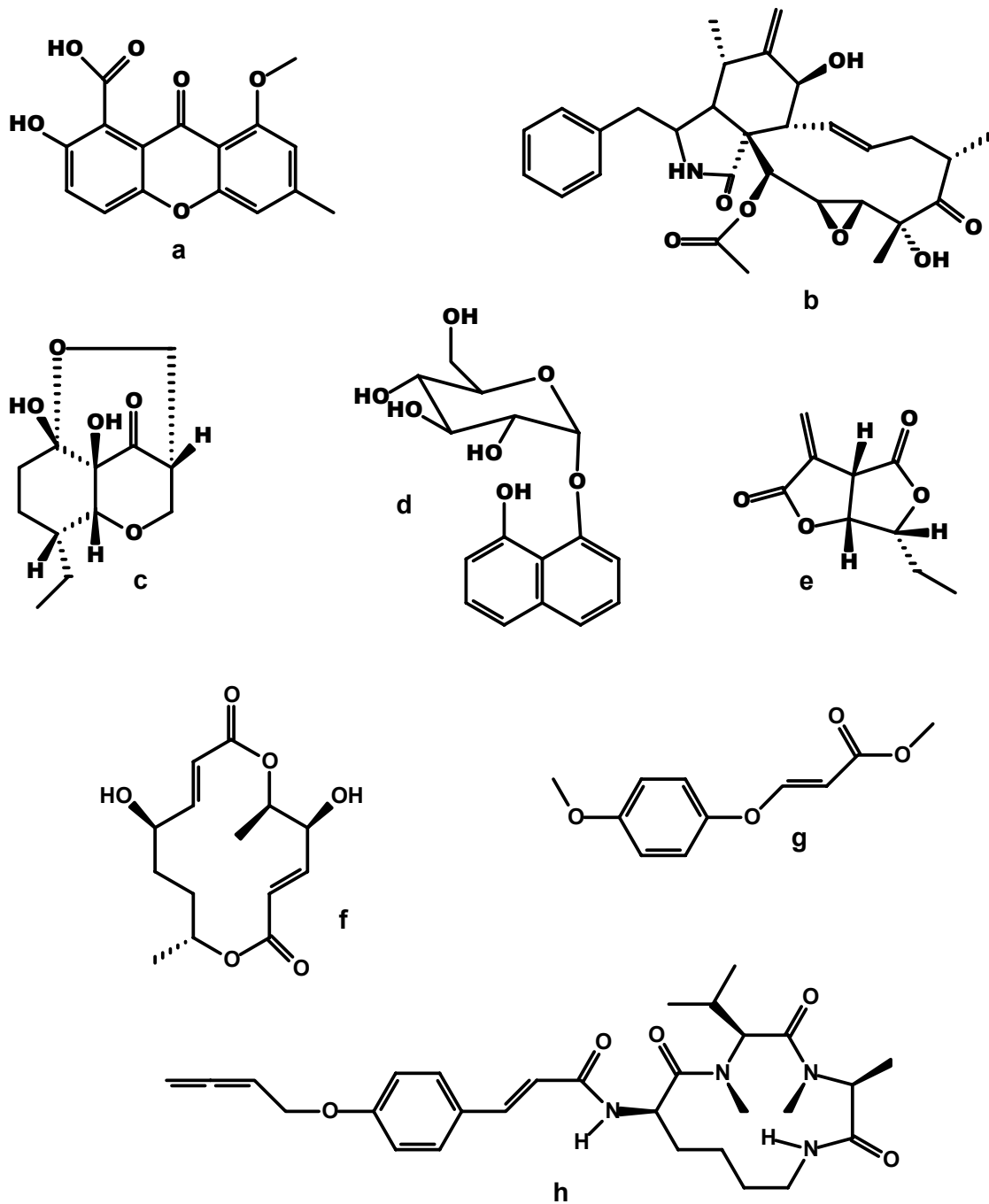


Figura 1.11. – Alguns metabólitos secundários isolados de fungos do gênero *Xylaria* descritos na literatura.

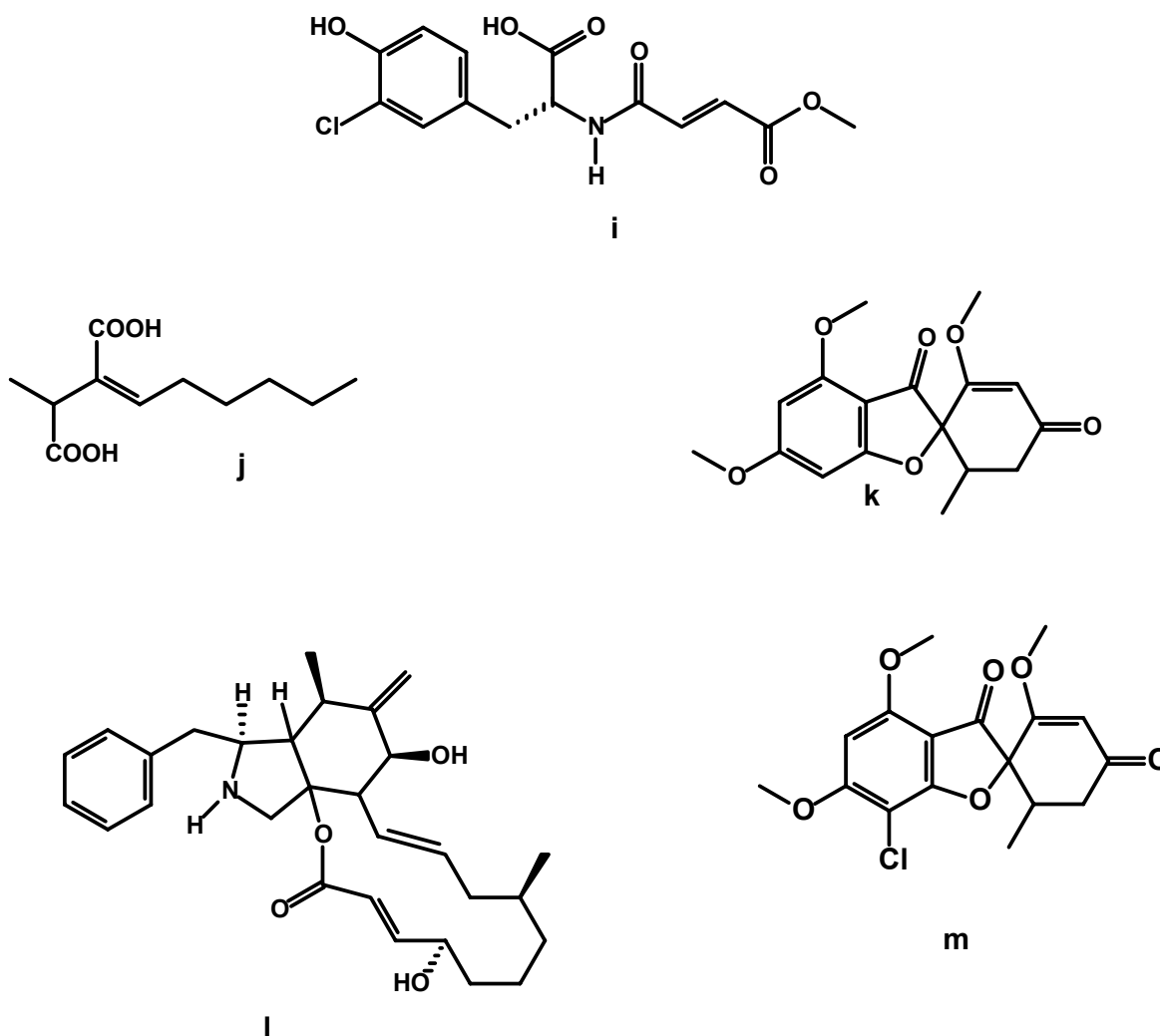


Figura 1.11. (Continuação)– Alguns metabólitos secundários isolados de fungos do gênero *Xylaria* descritos na literatura.

Uma classe de substâncias que devemos dar destaque entre os compostos produzidos por fungos da família Xylariaceae são as isocumarinas. Na Figura 1.12. temos a estrutura da meleína, um composto representante dessa classe. É importante salientar que esses compostos já foram isolados a partir de fungos da família Xylariaceae (EDWARDS *et al.*, 1983), no entanto nenhum relato é descrito sobre a presença de isocumarinas em fungos do gênero *Xylaria*.

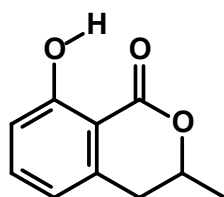


Figura 1.12. – Esqueleto do composto meleína, um importante representante da classe das isocumarinas.

Isocumarinas são metabólitos secundários normalmente isoladas de fungos. Sabe-se que essas substâncias são policetídeos logo, obedecem a rota biossintética do acetato (NAKANISHI, K; 1999). O estudo realizado por KUROSAKI *et al.* (1989) comprovou, por experimentos usando precursores contendo átomos marcados (^{13}C), que a rota biossintética (Figura 1.13) destes compostos, no caso a 6-Hidroxi-Meleína, envolve uma unidade de acetil CoA e quatro unidades de malonil CoA. Após a formação do intermediário com 10 átomos de carbono podem ocorrer dois mecanismos: no primeiro temos as condensações até a formação do composto contendo uma ligação dupla entre C-3 e C-4, posteriormente essa reação sofre uma redução levando ao produto final. Já no segundo mecanismo há uma redução da carbonila do C-3 à hidroxila, com posterior ataque desta hidroxila a carbonila do C-1, levando a 6-Hidroxi-Meleína.

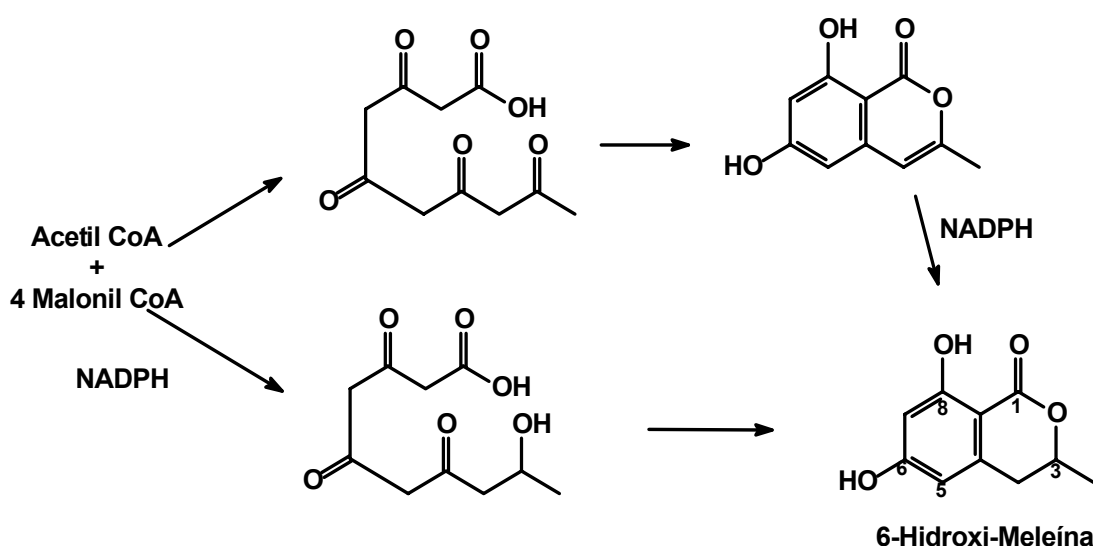


Figura 1.13. – Proposta biossintética para a 6-hidroxi-meleína (KUROSAKI *et al.*, 1989).

As demais isocumarinas devem obedecer uma rota biossintética semelhante a 6-Hidroxi-Meleína, seguido, por exemplo, por reações de redução e/ou oxidação em determinadas posições.

Estudos comprovaram que isocumarinas, no caso a meleína, são precursores para diversos metabólitos. Na Figura 1.14.(a) temos o caso da Canesceína, produzida por *Aspergillus malignus* (LEWIS *et al.*, 1986); em (b) temos a Terreína, isolada de *Aspergillus terreus* (HILL *et al.*, 1975); em (c) temos a Ocratoxina A, uma toxina bastante estudada, produzida por *Aspergillus ochraceus* (WEISLEDER and LILLEHOJ, 1980).

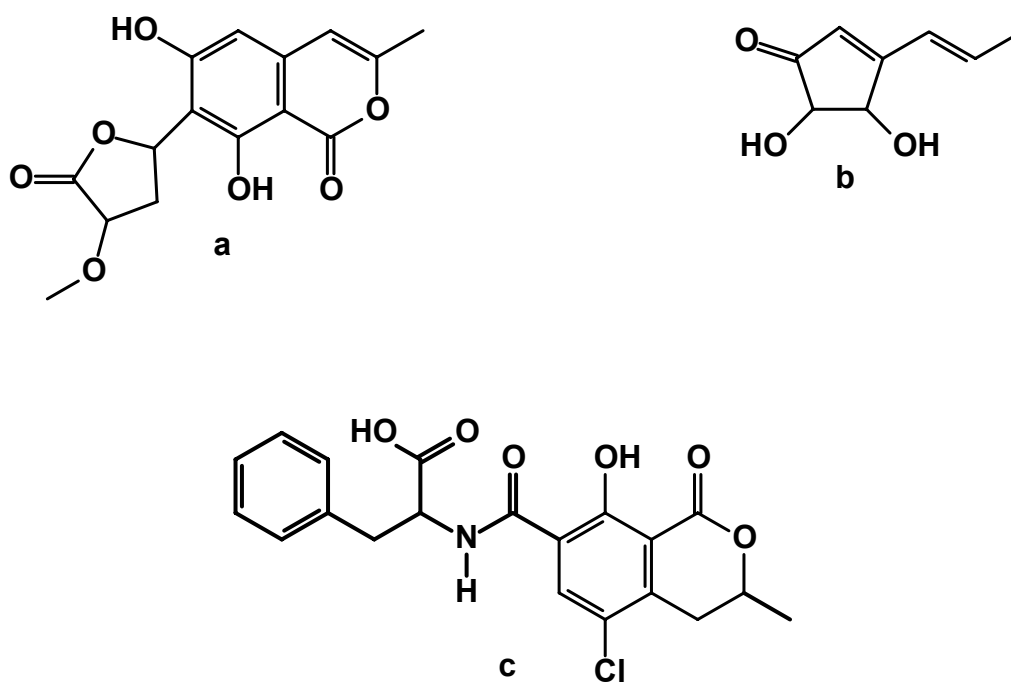


Figura 1.14. – Compostos que possuem a meleína (Figura 1.12.) como precursor.

Além de atuarem como precursoras para diversos metabólitos secundários, isocumarinas possuem ainda diversas atividades biológicas de interesse (RUANGRUNGSI *et al.*, 1995). Em especial compostos análogos da meleína mostraram atividades como: antifúngica, antibacteriana, inseticida e antimicrobiana (KOKUBUN *et al.* 2003). O trabalho recentemente realizado por HEYNEKAMP (2006) mostrou que isocumarinas estão sendo testadas no tratamento de câncer, onde devem atuar como inibidoras no crescimento de células cancerígenas.

Embora isocumarinas sejam encontradas normalmente em fungos, alguns estudos mostraram que plantas da espécie *Daucus carota* (Umbelliferae) são capazes de produzir 6-Hidroxi-Meleína (Figura 1.13.) como fitoalexinas, no entanto a presença desses compostos em plantas superiores é bastante rara (KUROSAKI, S. 1996). Outra incidência de compostos pertencentes à classe das isocumarinas, em especial a Meleína (Figura 1.12.), é de sua atuação como feromônios em formigas machos do gênero *Camponotus* (TORRES *et al.*, 2001).

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- A.** Obter um método eficiente para isolamento de saponinas e oligoglicosídeos sesquiterpênicos acíclicos (OGSA) em larga escala, utilizando métodos cromatográficos;
- B.** estudar o mecanismo de tolerância do fungo *Xylaria* sp. frente as saponinas obtidas da planta *Sapindus saponaria*;
- C.** investigar os produtos da biotransformação de saponinas e dos OGSA encontrados em *S. saponaria*, por *Xylaria* sp. fazendo uso de espectrometria de massas (MS e MS/MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- D.** isolar e identificar os metabólitos secundários produzidos por *Xylaria* sp., fazendo uso de técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas;
- E.** cultivar o fungo endofítico *Xylaria* sp. em diferentes meios de cultura, comparar o metabolismo do fungo nestes meios;
- F.** propor mecanismos de fragmentação para as substâncias isoladas.

3. Procedimento Experimental

3.1. Materiais

a) Solventes e eluentes para cromatografia

- Para cromatografia em coluna e em camada delgada foram utilizados solventes destilados no DQ-UFSCar;
- Para uso em HPLC e MS foram utilizados solventes de grau cromatográfico MERCK, ALDRICH e MALLINCKRODT e H₂O purificada em sistema Millipore Milli-Q.

b) Suporte para cromatografia

- Sílica gel 70-230 mesh (sílica comum), utilizada em funil de placa sinterizada;
- Sílica gel 230-400 mesh (tipo flash), utilizada em cromatografia em coluna e camada delgada preparativa;
- Lipophilic Sephadex® LH-20 (SIGMA).

c) Solventes para RMN

- Solventes deuterados da Acros Organics, Cil (Cambridge Isotope Laboratories) e Aldrich 98-99,9%

d) Substratos e sais minerais utilizados na preparação de meios de cultura líquidos para cultivo dos fungos endofíticos

- dextrose – MALLINCKRODT
- K₂HPO₄ – MALLINCKRODT
- NaCl – MERCK
- MgSO₄ – MALLINCKRODT
- CaCl₂ – REAGEN
- NH₄NO₃ – CINÉTICA QUÍMICA
- FeSO₄ – REAGEN
- CuSO₄ – CINÉTICA QUÍMICA
- ZnSO₄ – MALLINCKRODT
- MnSO₄ – MALLINCKRODT

- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ - MALLINCRODT

3.2. Equipamentos

a) HPLC

- Equipamento Shimadzu, com bombas LC-10AD e LC-10ADvp, detector Diode Array SPD-M10A, auto injetor SIL-10AD e sistema de controle SCL-10A

- HPLC PREPARATIVO Shimadzu, bomba LC-8A, detector SP D-6AV, controladora CBM-10A e software Shimadzu Class-LC

b) Cromatógrafo a gás

- Carlo Erba GC 8000, utilizando coluna J & W Scientific DB 5 MS, 15 m, 0,25 mm

c) Espectrometria de Massas

- Equipamento Quattro LC Micromass

- VC Plataform, Fisons Instruments

d) Espectrômetro de RMN

- Bruker ARX-200, de campo de 4,7 Tesla, onde foram realizados os experimentos de ^1H e ^{13}C .

- Bruker AVANCE DRX-400 de campo de 9,4 Tesla, onde foram realizados todos os experimentos bi-dimensionais.

e) Evaporadores Rotativos

- Rotoevaporador rotativo Tecnal (TE 20)

- Rotoevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)

e) Câmara de Fluxo Laminar

- Veco VL FS-12M

f) Autoclave Vertical

- Phoenix AV 70

g) Triturador

- Turratec Tecnal

h) phmetro

- Tecnal Tec-3MP

3.3. Obtenção de Saponinas e OGSA a partir dos frutos de *S. saponaria***3.3.1. Obtenção do extrato de *S. saponaria***

Para o isolamento de saponinas e OGSA, foram utilizados 4,5 g de extrato hidrometanólico do pericarpo dos frutos de *S. saponaria*, obtidos anteriormente em nossos laboratórios (MURGU, 2002). Esse extrato foi submetido à hidrólise básica, utilizando 500 ml de hidróxido de sódio, NaOH 1 M, seguido de agitação durante 30 minutos, posteriormente houve adição de ácido clorídrico (HCl, 0,5 M), até neutralização, com intuito de converter os grupos acetatos, presentes nas cadeias de açúcar em hidroxilas, simplificando a mistura de saponinas (como dito no item 1.3. há uma grande variação de saponinas devido a presença de diversos grupos acetatos nas cadeias de açúcar). A neutralização da reação foi realizada sob monitoramento do pH, com auxílio de phmetro. De acordo com o estudo anterior (MURGU, 2002) saponinas são resistentes à alterações do pH.

3.3.2. Isolamento e análise de Saponinas e OGSA

Posteriormente esse extrato hidrolisado foi submetido a uma coluna de Sephadex® LH-20, de dimensões 1,5 m de altura e 8 cm de diâmetro, usando método isocrático de eluição, de modo que o eluente utilizado foi metanol:água (1:1). Foram recolhidos um total de 88 frações em frascos de 25 mL. Essas frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (TLC) e as que apresentaram maior interesse foram analisadas por espectrometria de massas (MS), no modo *full scan* de aquisição, com intuito de verificar a presença de saponinas e/ou OGSA.

As condições de otimização de análises por espectrometria de massas utilizadas para análise das frações obtidas, são mostradas na Tabela 3.1. a seguir:

Tabela 3.1. – Condições de análise das frações obtidas de Saponinas e OGSA por espectrometria de massas.

| Experimento | Full Scan |
|---------------------|--|
| Ionization Source | <i>Electrospray</i> negativo, (ESI(-)) |
| <i>Capillary</i> | 3,25 kVolts |
| <i>Cone</i> | 45 Volts |
| <i>Extractor</i> | 5 Volts |
| <i>RF Lens</i> | 0,6 Volts |
| <i>Source Temp.</i> | 135 °C |
| <i>Probe Temp.</i> | 350 °C |

No caso das frações que indicaram a presença de saponinas e OGSA (fração 14, 15, 16 e 17 e 27, 28 e 29), foram realizados também experimentos de íons fragmentos (MS/MS), utilizando às mesmas condições citadas na Tabela 3.1. com energia de colisão de 40 eV.

3.4. Experimentos de Biotransformação

3.4.1. Obtenção do microrganismo

Para as reações de biotransformação foi utilizado o fungo *Xylaria* sp., que se encontrava catalogado na micoteca do LaBioMMi (nº de registro: 206), isolado anteriormente dos frutos de *S. saponaria*. O fungo foi isolado de acordo com o seguinte procedimento (MURGU, 2002): primeiramente foi realizada a esterilização da superfície dos frutos para evitar o crescimento de microorganismos não endofíticos. Posteriormente os frutos foram lavados em água corrente. Em seguida,

já em ambiente asséptico, tiveram a superfície esterilizada, sendo mergulhados em EtOH 70% por um minuto, NaOCl 11% por 1 minuto e novamente EtOH por um minuto, sendo transferidos para placa de BDA (batata, dextrose e agar), estas foram fechadas e colocadas na estufa a 25 °. Após 10 dias de crescimento do microrganismo, as placas contendo o fungo foram repicadas (2 x 2 cm), e alguns destes pequenos pedaços foram transferidos para dois frascos de 10 mL contendo apenas águas Milli-Q, estes frascos foram então estocados na micoteca do LaBioMMI, DQ-UFSCar.

3.4.2. Cultivo de *Xylaria* sp.

O fungo foi inoculado em 5 placas de Petri (9 cm de diâmetro) para crescimento, contendo em cada placa meio BDA (batata, dextrose e agar). O meio de cultura BDA seguiu o seguinte procedimento: 200 g de batatas descascadas, cortadas em cubos, 20,0 g de glicose, 15,0 g de ágar por litro de água destilada, sendo que foi preparado um total de 500 mL de meio. As batatas foram fervidas em água destilada até cozimento completo, e em seguida filtradas em gaze. Ao filtrado foi adicionado o ágar, dissolvido sob aquecimento, e então acrescentou-se a glicose. A solução, em um Erlenmeyer, foi então esterilizada em autoclave a 120 °C. O meio BDA foi colocado em cinco placas de Petri esterilizadas, estando prontas para inoculação após esfriarem.

A inoculação foi realizada em meio asséptico, utilizando a técnica de semeadura de superfície, com haste de metal esterilizada em bico de Bunsen ao rubro, capela de fluxo laminar esterilizada por luz ultravioleta por 40 minutos, os demais frascos e soluções foram esterilizados previamente em autoclave vertical. As placas de Petri foram fechadas e estocadas durante 10 dias para crescimento do fungo. Todos os experimentos envolvendo o cultivo do fungo ocorreram neste mesmo ambiente de trabalho.

Após o crescimento nas placas de Petri (10 dias), o fungo foi inoculado em 36 Erlenmeyers de 500mL contendo meio líquido descrito a seguir, previamente esterilizados em autoclave.

Foi utilizado para as reações de biotransformação o meio Czapek's, trata-se de um meio líquido com a seguinte composição por litro de água: 15,0 g de glicose, 0,480 g de NH_4NO_3 ; 5,00 g de KH_2PO_4 ; 1,00 g de MgSO_4 ; 0,100 g de FeSO_4 ; 0,150

g de CuSO_4 ; 0,160 g de ZnSO_4 ; 0,0100 g de MnSO_4 ; 0,100 g de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$. Foram preparados um total de 36 Erlenmeyers de 500 ml, contendo 100 ml do meio líquido cada. Pequenos pedaços do fungo, aproximadamente 3 x 3 cm, foram repicados e transferidos das placas de Petri para 27 Erlenmeyers contendo o meio líquido.

3.4.3. Introdução dos substratos (Saponinas e OGSA) no meio de cultura

Após 15 dias de cultivo, uma solução com 240 mg/L de saponinas foi distribuída em 12 Erlenmeyers que continham o fungo; o mesmo processo foi repetido, utilizando uma solução de OGSA 540 mg/L e adicionada em outros 12 Erlenmeyers contendo o fungo. Também foi adicionado 20,0 mg de saponinas em 3 Erlenmeyers contendo apenas o meio líquido, da mesma forma procedeu-se pra outros 3 Erlenmeyers, adicionando em cada um 45,0 mg de OGSA. Dessa maneira obteve-se 12 Erlenmeyers contendo o fungo e saponinas, outros 12 contendo o fungo e OGSA, 3 contendo apenas o fungo, usados como controle; 3 contendo saponina e o meio de cultura, 3 contendo OGSA e o meio de cultura e, finalmente, os 3 restantes contendo apenas o meio de cultura. A Tabela 3.2. mostra um esquema dos experimentos de biotransformação

Tabela 3.2. – Códigos das amostras dos experimentos de Biotransformação.

| Nº Erlenmeyers (500 mL) | Código da Amostra | Quantidade de Substrato | Conteúdo da Amostra |
|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 12 | MFSap. | 240 mg | Meio de cultura, fungo e saponinas |
| 12 | MFOGSA. | 540 mg | Meio de cultura, fungo e OGSA |
| 3 | MF | 0 | Meio de Cultura, fungo (Controle) |
| 3 | MSap. | 60 mg | Meio de cultura, saponinas (Branco) |
| 3 | MOGSA | 135 mg | Meio de cultura, OGSA (Branco) |
| 3 | M | 0 | Meio de cultura (Branco) |

Após a introdução dos substratos os experimentos foram incubados durante outros 15 dias, totalizando 30 dias de cultivo, em ambiente escuro e estático. Após esse período foi realizada filtração à vácuo de todos os meios. Os micélios foram descartados e os meios líquidos foram concentrados através de liofilizador e estocados em geladeira.

3.4.4. Análises dos experimentos de biotransformação

Devido a problemas envolvendo a bomba turbomolecular do espectrômetro de massas (tal peça é responsável pelo vácuo no equipamento) as análises envolvendo os experimentos de biotransformação foram realizadas utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de dióxido (DAD). O equipamento utilizado foi previamente descrito no item 3.2.a.

Baseando-se no estudo anterior (MURGU, 2002) e no trabalho realizado por DELFEL *et al.* (1986) utilizou-se uma coluna cromatográfica C₁₈, empacotada no DQ-UFSCar, utilizando sílica ODS LiChrosorb RP-18 com dimensões: 0,46 x 25,0 cm. Baseado ainda no trabalho de DELFEL *et al.* (1986), que efetuou um estudo sobre a presença do ácido trifluoracético (TFA) na fase móvel, os eluentes utilizados nas análises foram água Milli-Q Millipore 0,1 %TFA (A) e acetonitrila 0,1% TFA (B). Utilizou-se o modo gradiente de eluição, variando de 25% até 100 % de B em 40 min. Para cada substrato foram realizadas análises envolvendo as amostras descritas na Tabela 3.3. Todas as amostras provenientes dos experimentos de biotransformação foram preparadas em uma concentração de 5 mg/mL (em solução ACN/H₂O 1:1 v/v). Apenas as soluções contendo os padrões (saponinas e OGSA) foram preparadas em concentração de 1 mg/mL. Foi utilizado uma vazão de 1 mL/min.

Tabela 3.3. – Amostras analisadas por HPLC provenientes do experimento de biotransformação envolvendo saponinas e OGSA.

| Experimento envolvendo Saponinas | Experimento envolvendo OGSA |
|--|--|
| Padrão – Saponina isolada, diluída em MeOH | Padrão – OGSA isolada, diluída em Água Milli-Q |
| Meio Líquido e Saponina | Meio Líquido e OGSA |
| Meio Líquido e Fungo | Meio Líquido e Fungo |
| Meio Líquido, Saponina e Fungo | Meio Líquido, OGSA e Fungo |

3.4.5. Isolamento da saponina biotransformada

Para o isolamento do produto de biotransformação envolvendo a saponina isolada utilizamos, principalmente, a técnica de HPLC preparativo.

O extrato proveniente dos experimentos de biotransformação foram, inicialmente, submetidos a uma separação cromatográfica utilizando-se uma coluna de sílica flash (50 x 4,5 cm) e eluição gradiente com CH₂Cl₂/MeOH (95:5 v/v) até 100% MeOH. As frações ricas em saponinas foram, então, reunidas e submetidas à análise por HPLC preparativo, nesta etapa foi utilizada coluna Shimadzu Prep K (2 x 25 cm) e como fase móvel ACN:H₂O (1:1 v/v), com vazão de 1 mL/min e detecção em 206 nm.

3.5. Isolamento de Metabólitos Secundários

3.5.1. Cultivo de *Xylaria* sp.

Para o estudo dos metabólitos secundários produzidos por *Xylaria* sp. foram utilizadas as mesmas técnicas de inoculação, ambientes de trabalho (condições assépticas) e meio de cultura (contendo glicose) citadas no item 3.2. Foram preparados um total de 36 Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio líquido em cada um.

Após 30 dias o fungo foi retirado do meio líquido para ser extraído e analisado. A separação entre o micélio e o meio líquido foi realizada a vácuo.

3.5.2. Obtenção e fracionamento dos extratos de *Xylaria* sp.

O meio líquido sofreu partição líquido-líquido com acetato de etila. A fase orgânica foi reservada enquanto que a fase aquosa sofreu nova partição líquido-líquido com 1-butanol. Os extratos obtidos após a concentração das fases orgânicas em rotaevaporador foram chamados de XL-1 (referente a partição com acetato de etila) e XL-2 (referente a partição com 1-butanol).

Foi realizada cromatografia em camada delgada (TLC) com os extratos obtidos e, a semelhança de polaridade e coloração, os extratos XL-1 e XL-2 foram reunidos. Esse novo extrato foi denominado então XL. Com esse extrato, foi realizado uma coluna cromatográfica de sílica gel 230-400mesh (sílica tipo flash) em um funil de placa sinterizada com o gradiente de eluição ilustrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. – Eluição utilizada na coluna de separação do extrato XL.

| Eluente | Quantidade |
|-------------------------------------|------------|
| Hexano | 500 ml |
| Hexano : Diclorometano (7:3) | 500 ml |
| Hexano : Diclorometano (3:7) | 500 ml |
| Diclorometano | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9,5 : 0,5) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9 : 1) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (7 : 3) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (3 : 7) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9,5 : 0,5) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9 : 1) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (7 : 3) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (3 : 7) | 500 ml |
| Metanol | 500 ml |
| Metanol : Água (9 : 1) | 500 ml |

Foram recolhidas deste extrato um total de 10 frações e denominadas XL1 a XL10. Essas frações foram submetidas a experimentos de RMN de ^1H . Com base nos espectro de RMN obtidos, trabalhou-se as frações posteriores à XL4.

O micélio foi extraído com metanol durante duas semanas. Este foi triturado em um aparelho Turratec, com ajuda de nitrogênio líquido. O micélio triturado foi submetido a sucessivas extrações sólido líquido como mostrado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. – Período de extração do micélio e tipo de solvente.

| Tempo em dias | Solvente | Volume de Solvente |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 3 | Diclorometano | 1,5 L |
| 3 | Diclorometano | 1,5 L |
| 3 | Diclorometano : Metanol (1:1) | 1,5 L |
| 3 | Diclorometano : Metanol (1:1) | 1,5 L |
| 3 | Metanol | 1,5 L |
| 3 | Metanol | 1,5 L |

Os extratos obtidos dessas extrações foram reunidos e denominados XM. Estes foram então submetido à uma coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash) em um funil de placa sinterizada, com o gradiente de eluição mostrado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. – Eluição utilizada na coluna de separação do extrato XM.

| Eluente | Quantidade |
|-------------------------------------|------------|
| Hexano | 500 ml |
| Hexano : Diclorometano (7:3) | 500 ml |
| Hexano : Diclorometano (3:7) | 500 ml |
| Diclorometano | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9,5 : 0,5) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9 : 1) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (7 : 3) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (3 : 7) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9,5 : 0,5) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (9 : 1) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (7 : 3) | 500 ml |
| Diclorometano : Metanol (3 : 7) | 500 ml |
| Metanol | 500 ml |
| Metanol : Água (9 : 1) | 500 ml |

Foram recolhidas dez frações desse extrato, denominadas de XM1 a XM10. Realizou-se então CCD dessas frações, e devido ao perfil cromatográfico similar as frações XM3 à XM4 foram reunidas, agora denominada XM3,4. Posteriormente realizou-se experimentos de RMN ^1H 1D de todas as frações obtidas.

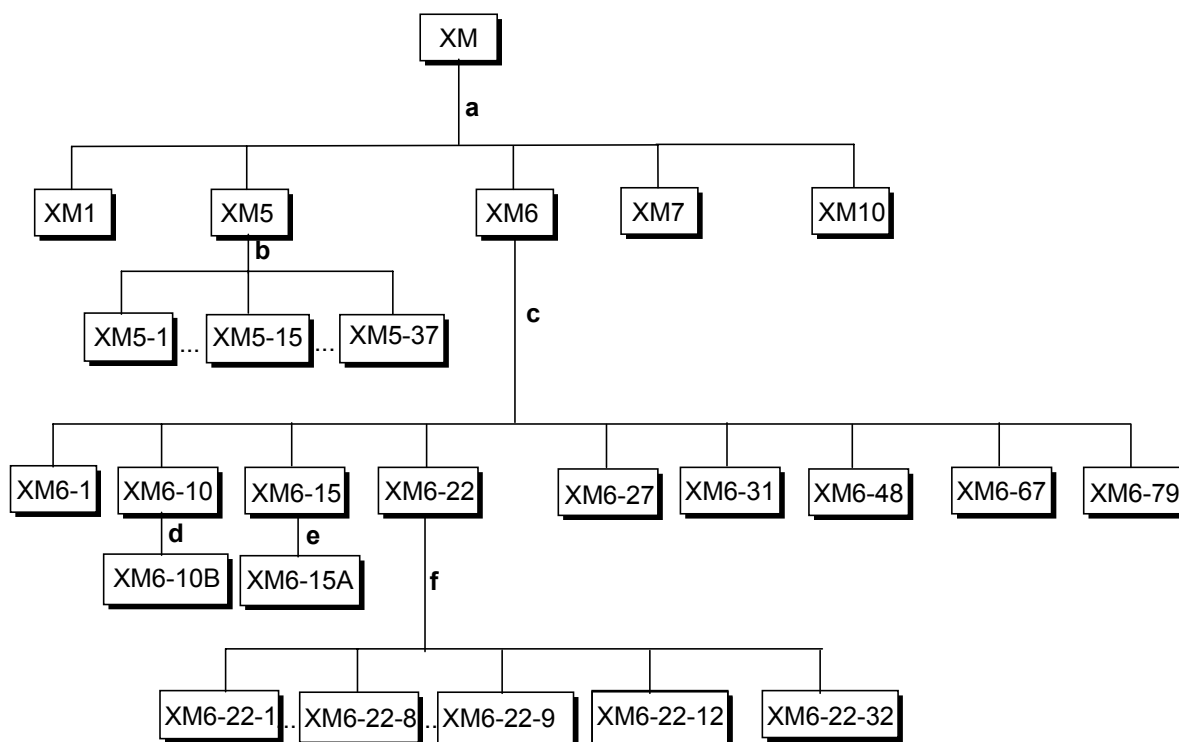
Os espectros de RMN das frações XM1 a XM3,4 mostraram não conter compostos de interesse, desse modo foi dado início ao processo de isolamento dos metabólitos produzidos por *Xylaria* sp. presentes nas frações XM5 e seguintes.

3.5.3. Isolamento de metabólitos secundários

Tanto as frações obtidas, tanto a partir do micélio (XM) quanto do meio líquido (XL), foram submetidas a diversas colunas cromatográficas.

O Fluxograma 1.1. ilustra os procedimentos cromatográficos pelos quais as frações obtidas do micélio (aproximadamente 6 g) foram submetidas. O mesmo fluxograma mostra as condições, eluentes e fase estacionária, utilizadas para isolamento dos metabólitos secundários presentes no micélio, produzidos por *Xylaria* sp.

Fluxograma 1.1 – Isolamento dos metabólitos secundários do micélio (XM) de *Xylaria* sp. As frações representadas tratam da primeira e última fração de cada coluna, assim como as frações que mostraram conteúdo interessante.



a: coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash) em um funil de placa sinterizada, com o gradiente de eluição mostrado na Tabela 3.6.

b: coluna cromatográfica de dimensões 13 x 4,3 cm. Fase estacionária: sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 37 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas devido à similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 3 a 6, 7 a 9, 10 a 14, 15 a 22, 23 a 37.

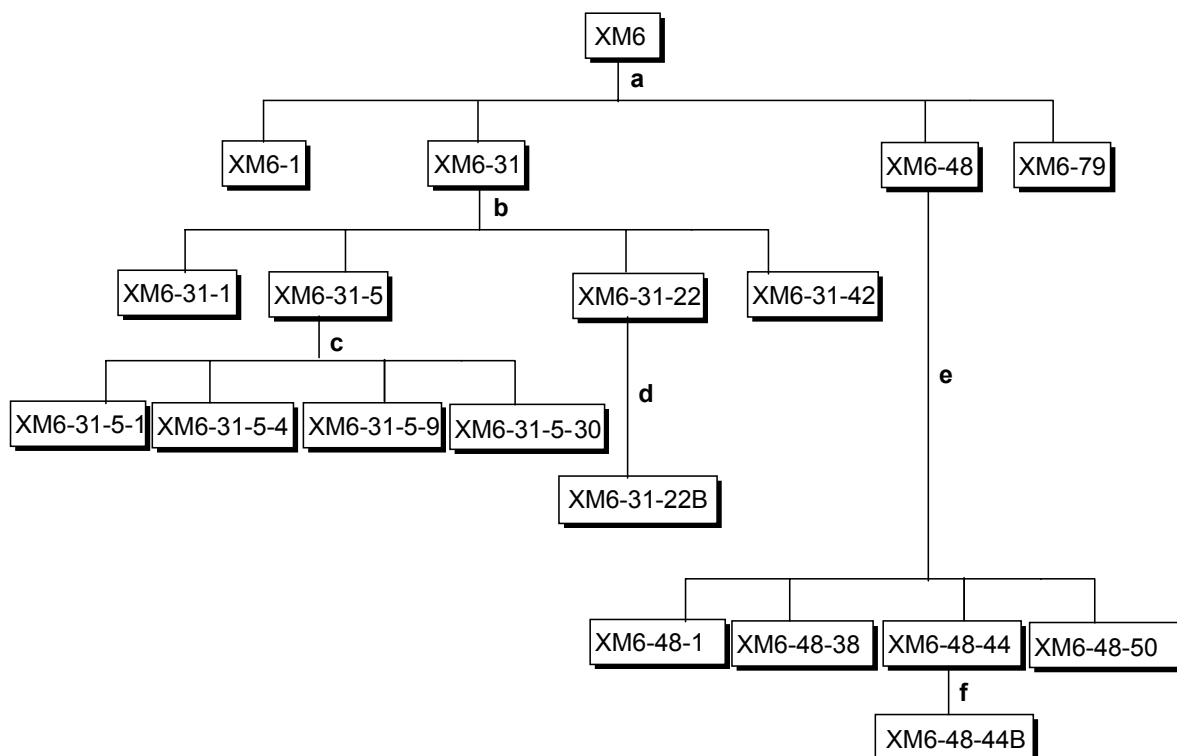
c: coluna cromatográfica de dimensões 15 x 3,8 cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 79 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas de devido à similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 3 a 9, 10 a 14, 15 a 21, 22 a 26, 27 a 30, 31 a 47, 48 a 54, 55 a 66, 67 a 75, 76 a 79.

d: Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente hexano/acetato de etila (90:10 v/v). Foram coletadas as quatro bandas cromatográficas observadas.

e: Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente hexano/acetato de etila (90:10 v/v). Foram coletadas as três bandas cromatográficas observadas.

f: coluna cromatográfica de dimensões 15 x 3,8 cm. Fase estacionária: sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 37 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas de devido à similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 1 a 7, 8, 9 a 11, 12 a 13, 14 a 22, 23 a 32.

Continuação 1 do Fluxograma 1.1. - Isolamento dos metabólitos secundários do micélio (XM) de *Xylaria* sp.



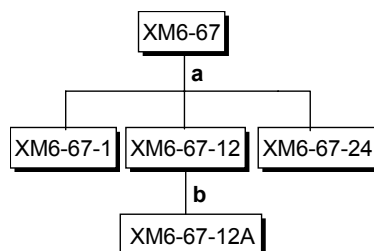
a: coluna cromatográfica de dimensões 15 x 3,8 cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 79 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas de devido à similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 3 a 9, 10 a 14, 15 a 21, 22 a 26, 27 a 30, 31 a 47, 48 a 54, 55 a 66, 67 a 75, 76 a 79.

b: coluna cromatográfica de dimensões 8 x 1,8 cm. Separação cromatográfica sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Fase móvel foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 42 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas de devido à similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 5 a 16, 17 a 21, 22 a 23, 24 a 37, 38 a 42.

c: coluna cromatográfica de dimensões 12 x 1,8 cm. Separação cromatográfica sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Fase móvel foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 30 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas de devido à similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 4 a 8, 9 a 11, 12 a 30.

d: Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente hexano/acetato (80 :20). Foram coletadas as três bandas cromatográficas observadas.

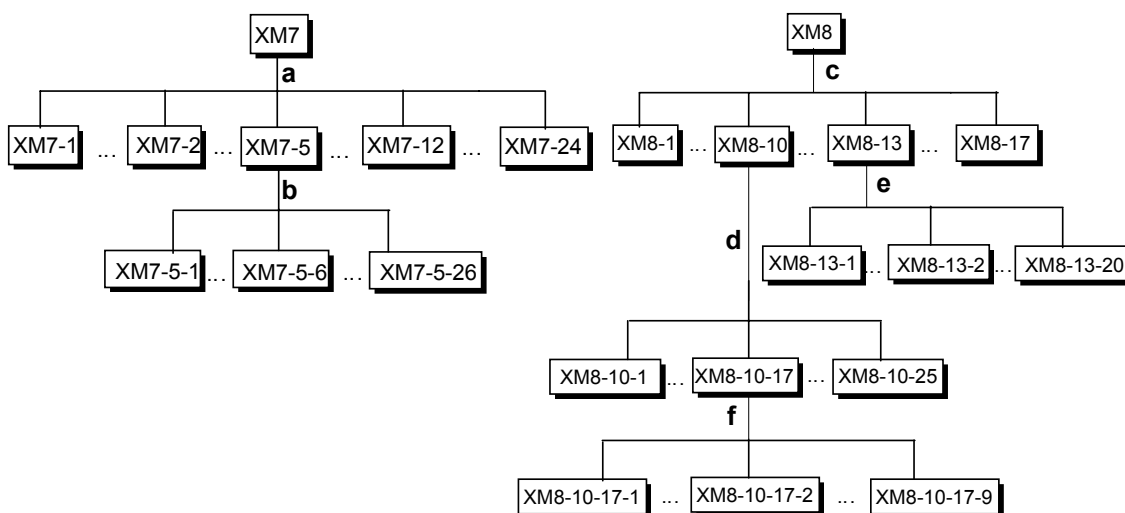
Continuação 2 do Fluxograma 1.1. - Isolamento dos metabólitos secundários do micélio (XM) de *Xylaria* sp.



a: coluna cromatográfica de dimensões 12 x 1,6 cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 22 frações, recolhidas em frascos com 20 ml. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 3 a 11, 12 a 13, 13 a 18, 18 a 22.

b: Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente hexano/acetato de etila (85 :15 v/v). Foram coletadas as três bandas cromatográficas observadas.

Continuação 3 do Fluxograma 1.1. – Isolamento dos metabólitos secundários do micélio (XM) de *Xylaria* sp.



a: coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash), dimensões 15 x 3,8 cm; eluente hexano 100% hexano até 100% acetato de etila, última fração com acetato/metanol (1:1 v/v). 24 frações no total, agrupadas de acordo com a similaridade.

b: coluna cromatográfica de dimensões 10 x 3,5 cm. Fase estacionária: sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Fase móvel: 100% de CH₂Cl₂ até 100% de acetato, obtendo 26 frações, recolhidas em frascos com 10ml. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica apresentada em TLC.

c: coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash), dimensões 15 x 3,8 cm; eluente hexano 100% hexano até 100% acetato de etila, última fração com acetato/metanol (1:1 v/v). 24 frações no total, agrupadas de acordo com a similaridade.

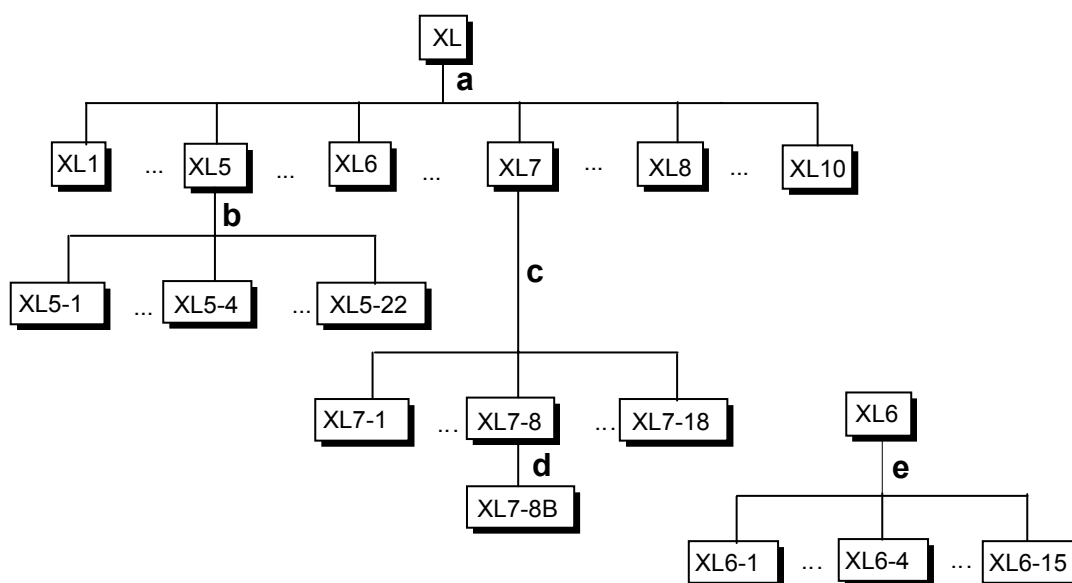
d: coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh, dimensões 10 x 3,8 cm; eluente hexano 100% hexano até 100% acetato de etila, seguido por 100% MeOH. 25 frações no total, agrupadas de acordo com a similaridade.

e: coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh, dimensões 10 x 3,8 cm; eluente hexano 100% hexano até 100% acetato de etila, seguido por 100% MeOH. 20 frações no total, agrupadas de acordo com a similaridade.

f: coluna cromatográfica de dimensões 12 x 2,5 cm. Fase estacionária: sílica gel 230-400 mesh. Fase móvel foi realizada no modo gradiente, com 100% de CH₂Cl₂ até 100% de MeOH, obtendo 9 frações, recolhidas em frascos com 10 ml.

Seguindo o mesmo procedimento aplicado ao micélio, os extratos obtidos do meio líquido foram fracionados de acordo com suas polaridades, sendo submetidos a diversos sistemas cromatográficos, como pode ser observado no Fluxograma 3.2. O procedimento utilizado para obtenção do extrato do meio líquido forneceu aproximadamente 3,4 g de amostra, quantidade inferior a obtida a partir do micélio.

Fluxograma 1.2 – Isolamento dos metabólitos secundários do meio líquido (XL) de *Xylaria* sp. As frações representadas tratam da primeira e última fração de cada coluna, assim como as frações que mostraram conteúdo interessante.



a: coluna cromatográfica de sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash) em um funil de placa sinterizada, com o gradiente de eluição mostrado na Tabela 3.4.

b: coluna cromatográfica de dimensões 12 x 4,0 cm. Fase estacionária: sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 22 frações, recolhidas em frascos com 20 ml. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 4 a 10, 11 a 17, 18 a 22.

c: coluna cromatográfica de dimensões 15 x 3,8 cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 18 frações, recolhidas em frascos com 20ml. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 1 a 7, 8 a 12, 12 a 14 e 15 a 18.

d: cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente hexano/acetato (90:10 v/v). Foram coletadas as duas bandas cromatográficas observadas.

e: coluna cromatográfica de dimensões 10 x 2,8 cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh (sílica tipo flash). Separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente de eluição, com 100% de hexano até 100% de acetato, obtendo 15 frações, recolhidas em frascos com 20 ml. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica apresentada em TLC da seguinte maneira: 1 a 3, 4 a 6, 7 a 11 e 12 a 15.

As análises das frações, obtidas a partir do micélio e meio líquido, foram realizadas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (H^1 NMR)

e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). As frações que apresentaram dados interessantes foram submetidas a outros experimentos de NMR como ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC e TOCSY. Todas as análises citadas aqui foram realizadas nos equipamentos descritos no item 3.2.

3.5.4. Análise por GC-MS

As análises envolvendo a técnica GC-MS foram realizadas utilizando a seguinte rampa de temperatura: três minutos em 120°C seguido por um aumento de 10°C/min até 250°C, posteriormente a temperatura foi elevada 4°C/min até 300°C e permaneceu nesta temperatura por 8 minutos, após esse tempo houve um aumento de 1,5°C/min até 320°C, totalizando 51 minutos de corrida cromatográfica.

Devido à polaridade relativamente elevada de algumas frações as mesmas necessitaram sofrer derivações, como Reação de Metilação e Reação de Sililação. Os procedimentos para realização das duas reações mencionadas são descritos abaixo.

- Reação de Sililação: em um frasco de 15 mL com tampa foi adicionado aproximadamente 2,0 mg de amostra, 200 uL de piridina e 200 uL de BSA (N,O-bis(trimethylsilyl)-acetamide), o frasco foi então fechado e submetido à aquecimento a 40°C e agitação durante 30 minutos, após esse tempo foram adicionados 200 uL de hexano e 1000 uL de água Milli-Q. A fração hexânica foi coletada e analisada por GC-MS de acordo com as condições mencionadas anteriormente.

- Reação de Metilação: o primeiro passo dessa reação envolveu a preparação do diazometano, reagente necessário para a reação em questão. O processo para obtenção desse reagente (Figura 3.1.) foi realizado utilizando material adequado, usando um sistema que envolve um balão de fundo redondo fundido a um condensador, aquecido por meio de banho de água à 60°C, na outra extremidade deste condensador o produto foi coletado em um Erlenmeyer resfriado em gelo.

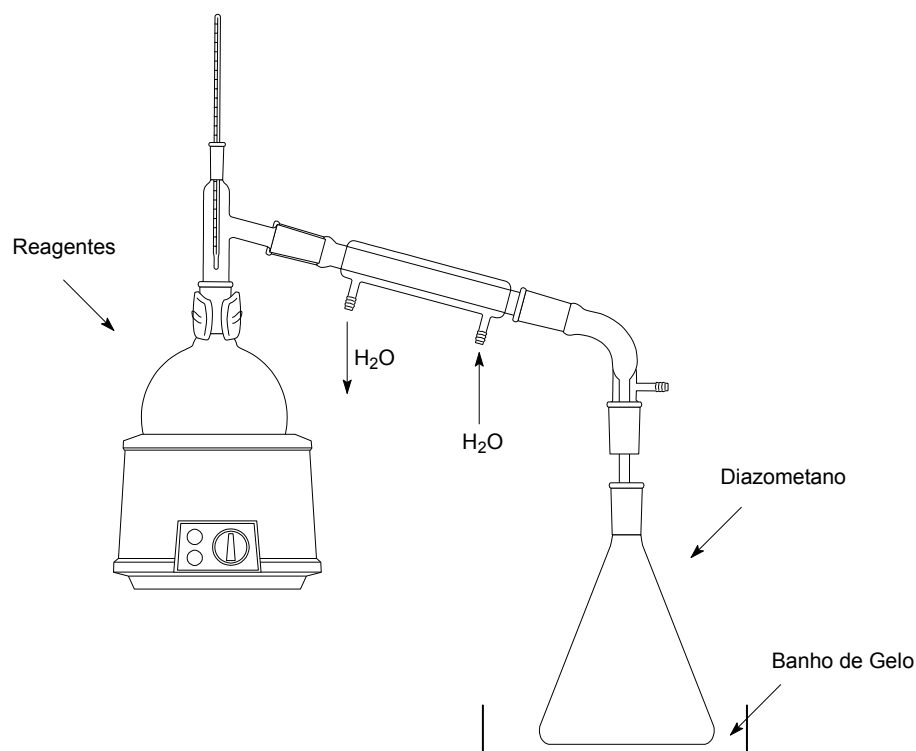


Figura 3.2. – Esquema ilustrativo para obtenção do Diazometano.

O procedimento para preparação do Diazometano envolveu a preparação de uma solução contendo 1,0 g de KOH em 1,5 mL de água destilada e posteriormente adicionada em 5,0 mL de Etanol 96%. Essa solução foi transferida para o balão mostrado na Figura 3.2., posteriormente à esse balão foi adicionado uma solução contendo 4,3 g de Diesaldi® (N-metil-N-nitroso-4-toluolsulfoamida, SIGMA-ALDRICH) em 25 mL de éter etílico. Como dito anteriormente o produto da reação, diazometano, foi coletado no Erlenmeyer resfriado por banho de gelo, num total de 10 mL de solução etérea. O procedimento para obtenção do Diazometano utilizado foi obtido de acordo com FURNISS (VOGEL'S 1989).

Após a etapa de preparação do diazometano, este (50uL) foi transferido para um frasco contendo aproximadamente 2mg de amostra, o frasco foi fechado e agitado durante 5 minutos, seguido pela injeção no sistema GC-MS.

3.5.5. Análises por MS e MS/MS

Diferente dos outros metabólitos produzidos por *Xylaria* sp., as frações XM8-13-2 e XL6-4-2 devido a polaridade elevada foram analisadas utilizando o espectrômetro de massas descrito no item 3.2.c.. A fonte de ionização utilizada foi ionização a pressão atmosférica no modo negativo (APCI(-)). As condições utilizadas são mostradas na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. – Condições de análise para a substância presente nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

| Experimento | Full Scan |
|--------------------------|------------------|
| <i>Ionization Source</i> | APCI(-) |
| <i>Corona</i> | 3,61 kVolts |
| <i>Cone</i> | 21 Volts |
| <i>Extractor</i> | 2 Volts |
| <i>RF Lens</i> | 0,59 Volts |
| <i>Source Temp.</i> | 120 °C |
| <i>Probe Temp.</i> | 200 °C |

3.6. Experimento envolvendo diferentes meios de cultura.

3.6.1. Preparação e inoculação nos diferentes meios de cultura

Posteriormente aos experimentos envolvendo o isolamento de metabólitos secundários e utilizando as mesmas técnicas de inoculação e ambientes de trabalhos (condições assépticas) o fungo foi cultivado em três diferentes meios de cultura. Além do meio descrito no item 3.4.2., que usava glicose como fonte de carbono, outros dois meios foram preparados: em um deles, a glicose foi substituída por sacarose e no outro caso foi utilizada uma mistura contendo 50% de glicose e 50% de sacarose. Com exceção da glicose toda a composição do meio descrito no item 3.4.2. foi mantida.

Para esse experimento foram utilizados um total de 15 Erlenmeyers de 500 ml, contendo em cada um 100 ml de meio líquido. Três Erlenmeyers contendo o

fungo e o meio líquido com glicose; seis contendo o fungo e meio líquido com sacarose e outros seis com o fungo e a mistura de 50% de glicose e 50% de sacarose.

Após 45 dias de incubação em ambientes sem luz e estático foi realizada, para cada Erlenmeyer, a separação entre o meio líquido e o micélio, fazendo uso de filtração a vácuo.

Para cada meio líquido obtido foi adicionado 5 g de NaCl, seguido de partição líquido-líquido com acetato de etila (duas vezes, 100mL de acetato de etila em cada vez). As partes aquosas foram descartadas, enquanto que as frações orgânicas foram concentradas através do uso de rotaevaporador. Essas amostras foram estocadas em geladeira e nomeadas conforme os códigos mostrados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. – Códigos das amostras envolvendo o meio líquido dos experimentos de comparação de meios de cultura.

| Nº de Amostras Estocadas em Geladeira | Código da Amostra | Conteúdo da Amostra |
|--|--------------------------|---|
| 3 | MLGF | Meio Líquido com Glicose e o fungo |
| 6 | MLSF | Meio Líquido com Sacarose e o fungo |
| 6 | MLGSF | Meio Líquido com Glicose e Sacarose (1:1) e o fungo |

Os micélios de cada experimento foram triturados com etanol, seguido de extração com este mesmo solvente por três vezes, de 100mL cada, durante 30 minutos em ultrassom. Após a sequência de extrações o solvente foi evaporado. As amostras obtidas provenientes dos micélios foram então estocadas em geladeira, e nomeadas conforme a Tabela 3.9.

Tabela 3.9. – Códigos das amostras envolvendo os micélios dos experimentos de comparação de meios de cultura.

| Nº de Amostras Estocadas em Geladeira | Código da Amostra | Conteúdo da Amostra |
|--|--------------------------|--|
| 3 | MCGF | Micélio com Glicose e o fungo |
| 6 | MCSF | Micélio com Sacarose e o fungo |
| 6 | MCGSF | Micélio com Glicose e Sacarose (1:1) e o fungo |

3.6.2. Análises dos diferentes meios de cultura

Os extratos referentes aos experimentos de comparação de meios foram analisados por técnica de HPLC-UV(DAD) e GC-MS.

Os experimentos utilizando a técnica de HPLC-UV foram realizados usando coluna Synergy ODS, Phenomenex; os eluente foram: água Milli-Q Millipore (A) e Acetonitrila grau HPLC (B). Foi usado modo gradiente de eluição, variando de 25% a 100% de B em 50 min. Com vazão de 1 mL/min. Os três meios (glicose, sacarose e glicose e sacarose (1:1)) foram submetidos às mesmas condições cromatográficas. A concentração dos extratos analisados foi de 5 mg/mL.

As análises efetuadas envolvendo a técnica de GC-MS utilizaram os equipamentos descritos nos itens 3.2.b e 3.2.c. Os extratos foram submetidos a técnica de extração em fase sólida (SPE) antes da análise no cromatógrafo gasoso, de modo que apenas os compostos mais apolares fossem analisados. Os cartuchos de SPE foram empacotados com 500 mg de sílica ODS LiChrosorb RP-18. A ordem de eluição utilizada pode ser observada conforme a Tabela 3.10.

Tabela 3.10. – Sistema de eluição utilizado na etapa de pré-purificação utilizando SPE dos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura.

| Ordem de Eluição | Eluentes |
|-------------------------|---|
| 1° | Ativação com MeOH, 12 mL |
| 2° | Condicionamento com H ₂ O-MeOH (95:5), 12 mL |
| 3° | Aplicação da amostra (1mg/mL) |
| 4° | Eluição com H ₂ O-MeOH (90:10), 6 mL |
| 5° | Eluição com CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:9), 6 mL |

Foi utilizada a seguinte rampa de temperatura no GC: três minutos em 120°, depois 12°C/min. até 250°C, seguido por 4°C/min. até 300°C durante 8 min. finalmente 2°C/min. até 320°C. Totalizando 35 minutos de corrida.

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento e Identificação de Saponinas e OGSA

O isolamento de saponinas e OGSA envolveu hidrólise básica do extrato de *Sapindus saponaria*. Como dito no item 1.3. a principal diferença entre as saponinas encontradas no extrato deve-se a presença de grupos acetato em algumas cadeias de açúcar. Logo, a hidrólise básica foi realizada com intuito de converter estes grupos acetato em hidroxilas, simplificando a mistura de saponinas. Devemos levar em consideração ainda que, de acordo com MURGU (2002), o principal grupo de saponinas relatados para esta planta é o S1, mostrado na Tabela 1.3. Desse modo devemos encontrar no extrato hidrolisado a presença majoritária da saponina S1, com massa 882 Da. Com relação aos OGSA a Tabela 1.1. mostra as principais substâncias desta classe encontradas em *S. saponaria*, de modo que o composto o1, com 1146 Da, é encontrado em quantidade superior (MURGU, 2002). A hidrólise teve como objetivo converter alguns possíveis grupos acetatos nos açúcares dos OGSA em hidroxilas.

Na Figura 4.1.1. temos os espectros obtidos para a análise por inserção direta no espectrômetro de massa de algumas frações (14 a 29) obtidas da coluna Sephadex® LH-20 (item 3.3.).

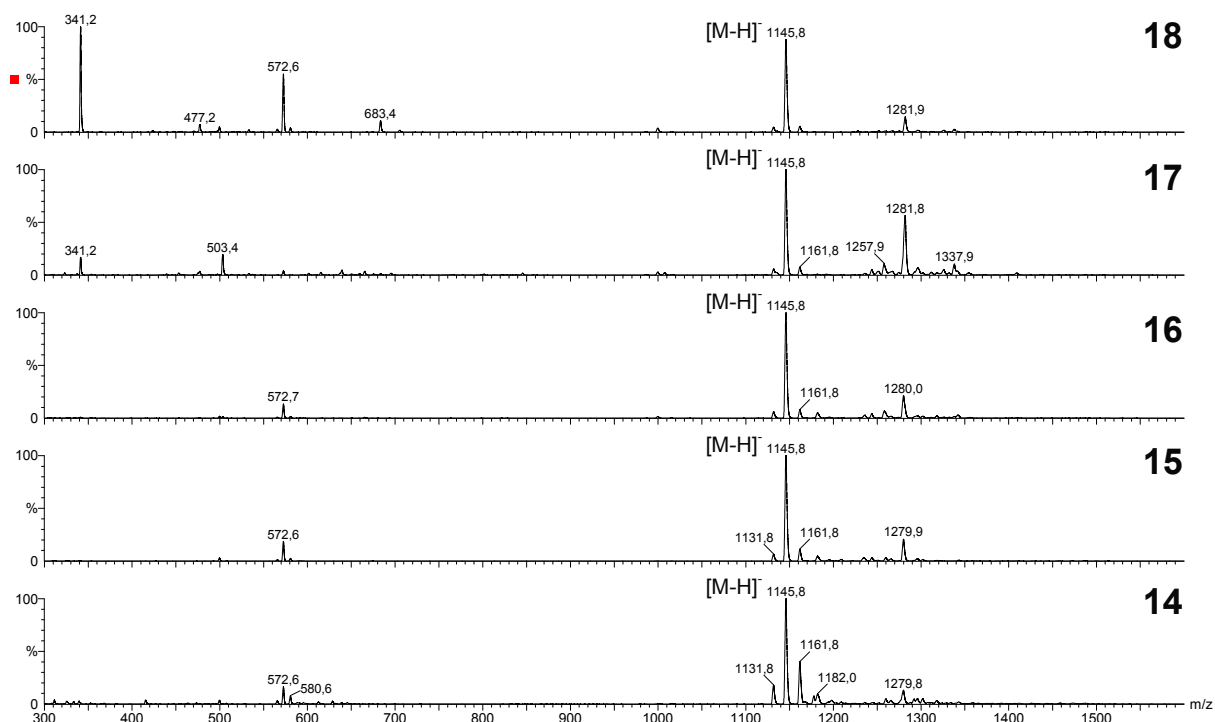


Figura 4.1.1. – Espectros de MS das frações 14 – 18 do extrato hidrolisado de *S. saponaria*.

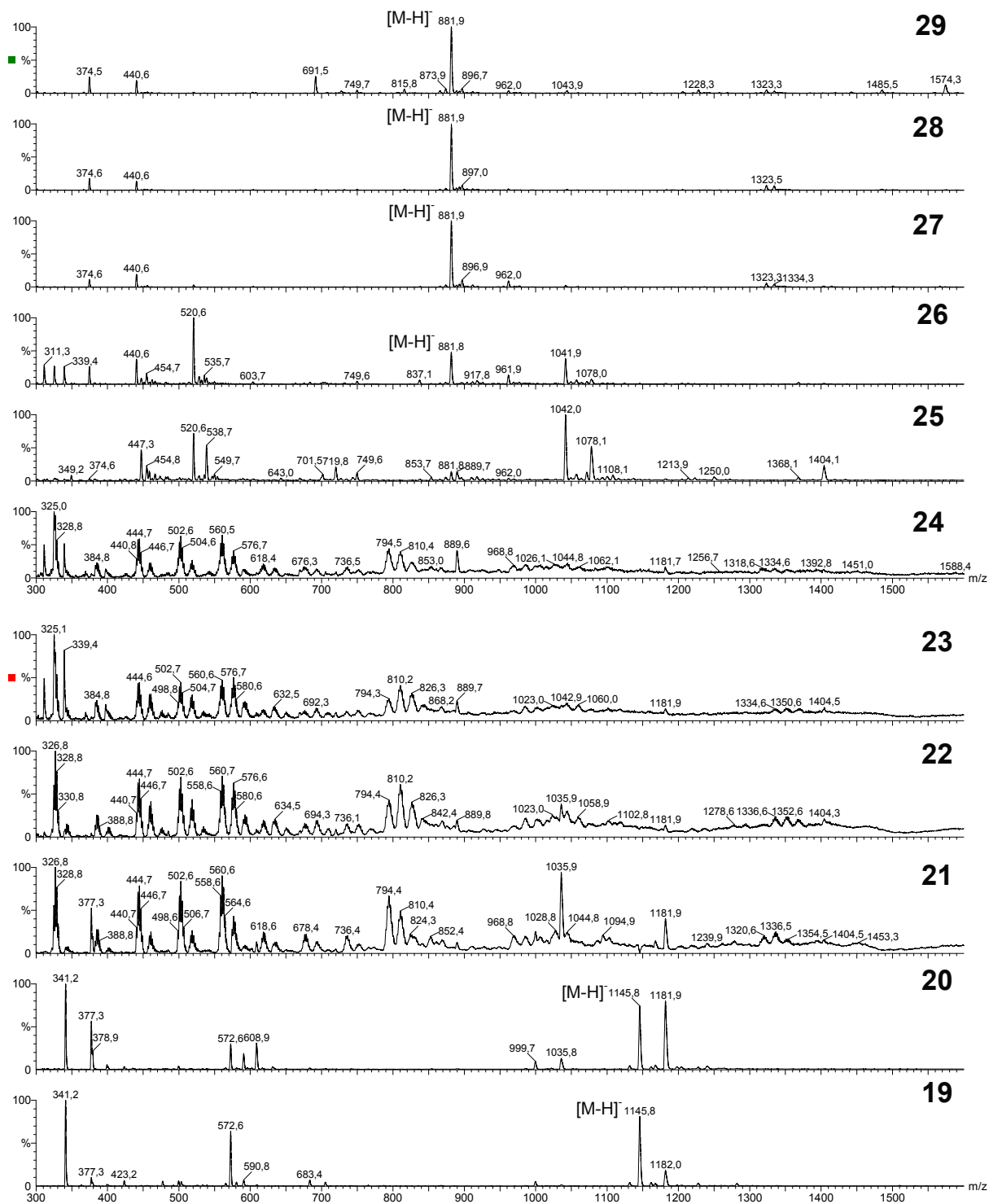


Figura 4.1.1. (continuação) – Espectros de MS das frações 19 – 29 do extrato hidrolisado de *S. saponaria*.

A análise dos espectros mostrados na Figura 4.1.1. indicou a presença de OGSA nas frações de número 14 a 19, resultando num total de 2,3 g, onde observamos o íon com m/z 1145 claramente, sendo que na fração 16 observamos um grau de pureza bastante elevado para o OGSA o1 (Figura 4.1.4.). O valor de m/z

observado para possível presença deste OGSA indica que o processo de hidrólise utilizado foi bastante eficiente, uma vez que não verificamos a presença de outros OGSA com grupos acetatos, como descrito previamente por MURGU (2002). Na Figura 4.1.2. temos o espectro de massas da fração 16, indicando a presença do OGSA o1, com m/z 1145. Neste mesmo espectro observamos ainda o pico de m/z 572 proveniente, provavelmente, da presença do OGSA carregado com duas cargas negativas ($[M-2H]^{2-}$).

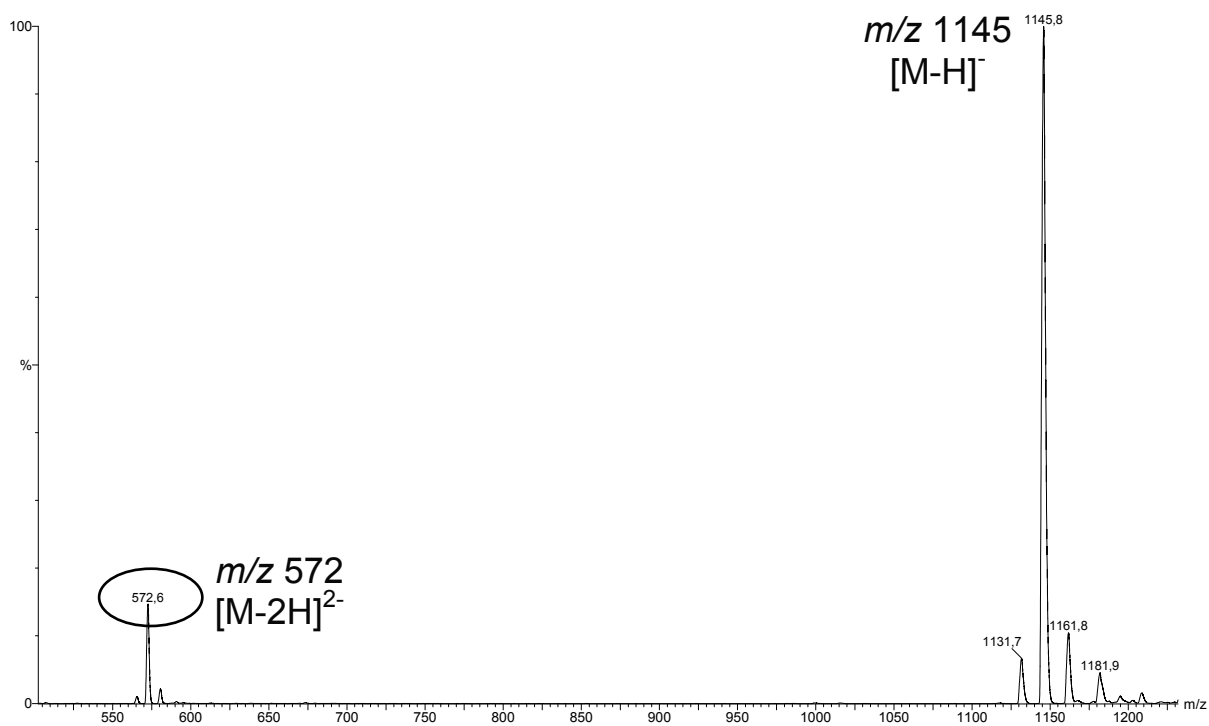


Figura 4.1.2. – Espectro de massas da fração 16, indicando a presença do OGSA o1, em destaque temos: $[M-H]^-$ e $[M-2H]^{2-}$

Para confirmar a presença deste composto realizamos experimentos de íons fragmentos (MS/MS), com as condições de análise descritas na Tabela 3.1. e com energia de colisão de 50 eV, para a fração 16. O espectro de MS/MS da fração 16 é mostrado na Figura 4.1.3.

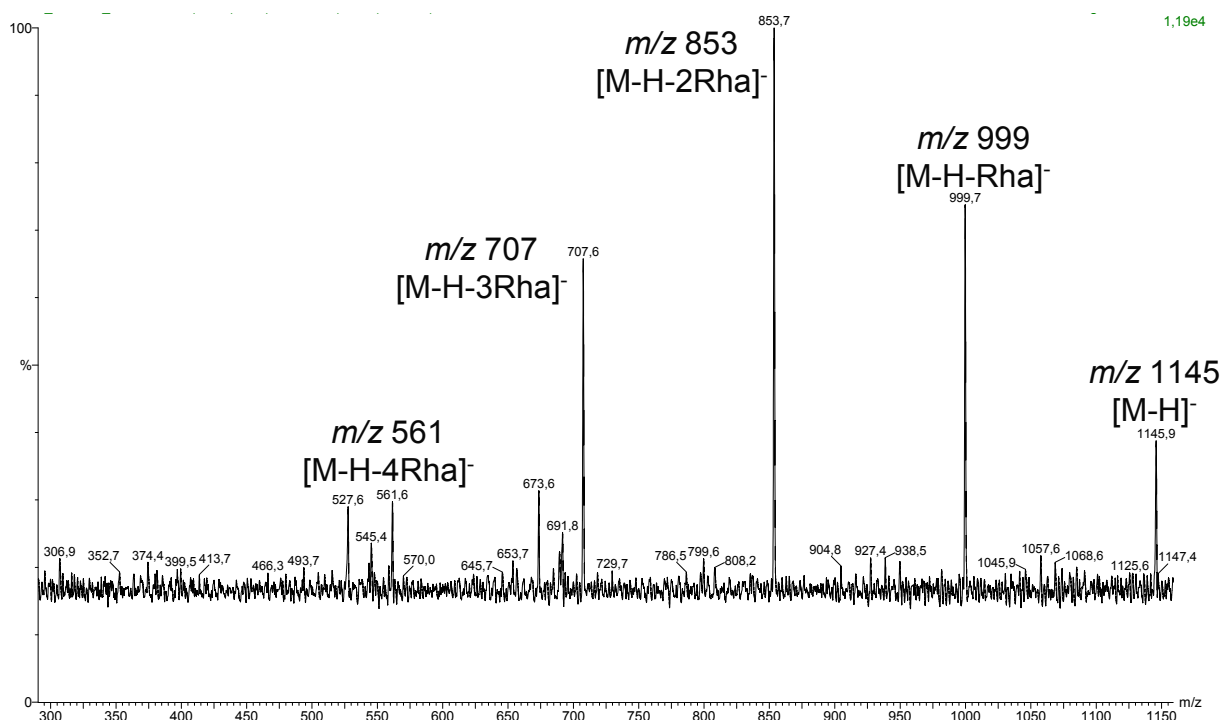


Figura 4.1.3. – Espectros de MS/MS da fração 16, indicando a presença de OGSA.

Dê acordo com o espectro de massas de íons fragmentos obtido (Figura 4.1.3.) notamos grande similaridade com o espectro de íons-fragmentos obtidos por MURGU (2002). Verificamos a perda seqüencial das ramnosas presentes no composto, de modo que o sinal referente de m/z 561 deve-se ao sesquiterpeno com duas unidades de glicose. Estas perdas de açúcares podem ser verificadas na proposta de fragmentação ilustrada na Figura 4.1.4. realizada com o intuito de confirmar a estrutura do OGSA o1 e baseada nos íons m/z observados no espectro de íons fragmentos da Figura 4.1.3.

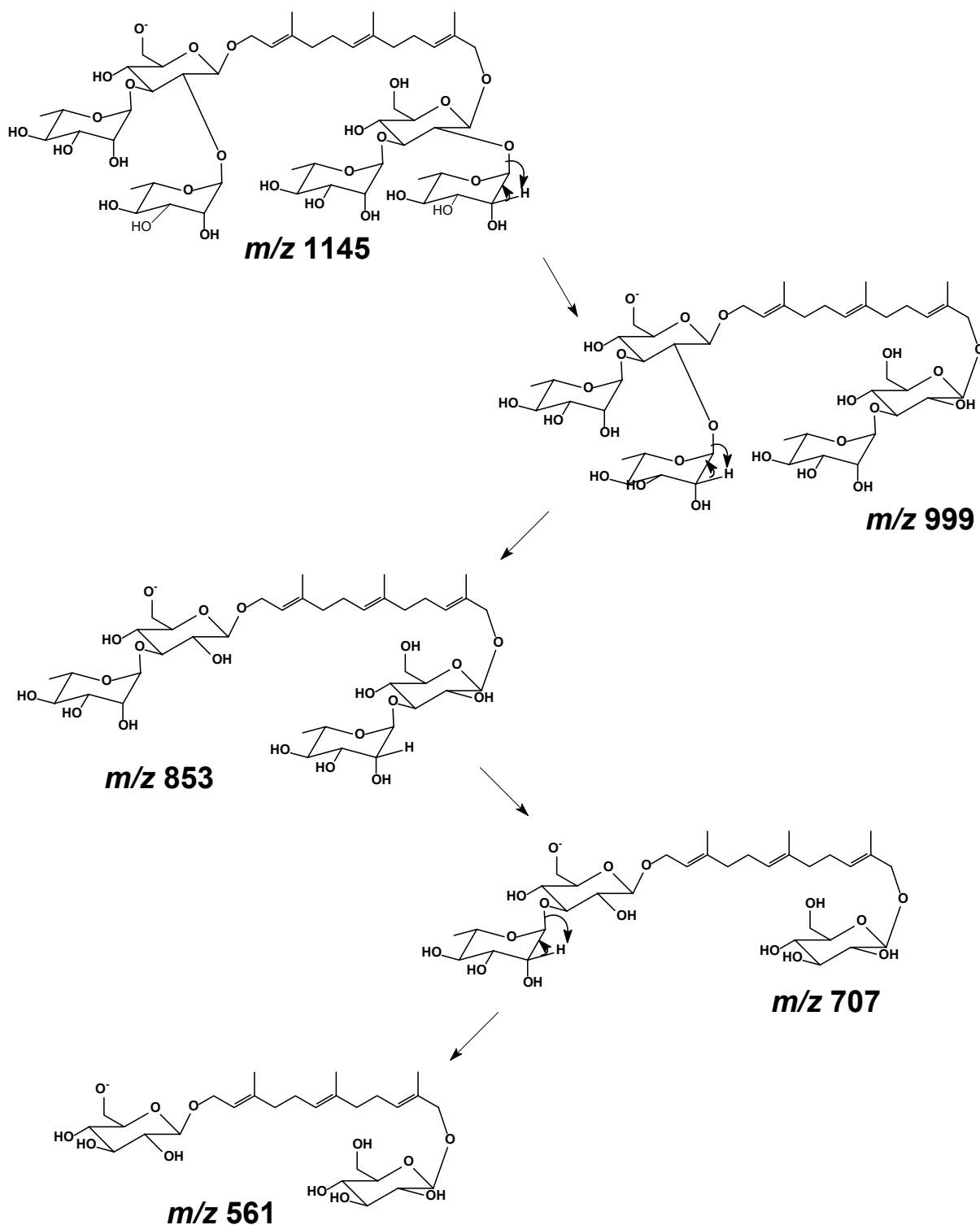


Figura 4.1.4. – Proposta de fragmentação para o espectro mostrado na Figura 4.1.3.

A proposta ilustrada na Figura 4.1.4 consta que após perder quatro unidades de ramnose, temos o esqueleto sesquiterpênico com duas unidades de glicose (*m/z* 561). Essas perdas estão em total acordo com a estrutura da substância, onde temos as duas unidades de glicose ligadas diretamente ao esqueleto sesquiterpênico, gerando assim uma informação muito útil na caracterização

estrutural. A proposta observada na Figura 4.1.4. ajuda a confirmar a presença do OGSA o1 no extrato hidrolisado de *S. saponaria*, no entanto devido a possível presença de outros OGSA com mesma massa molecular, mas contendo pequenas diferenças no esqueleto sesquiterpênico ou nas unidades de açúcar, realizamos experimentos de NMR: ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC. Devido a grande complexidade dos espectros de ^1H , COSY e HMBC as informações necessárias para identificação do composto em questão foram baseadas, principalmente, nos espectros de ^{13}C e HSQC (Figura 4.1.6. e Figura 4.1.7., respectivamente).

Embora hajam pouquíssimos trabalhos descrevendo o isolamento e identificação desta classe de compostos (OGSA), a atribuição dos sinais observados por NMR foi realizada em comparação com o trabalho realizado por KASAI *et al.*, 1986, onde este composto foi isolado de *Sapindus mukurossi*, e denominado Mukuroziosides IIb. Os espectros obtidos foram realizados utilizando como solvente piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Os experimentos bi-dimensionais (HSQC e HMBC) foram fundamentais para atribuição das posições dos açúcares. Na Figura 4.1.5. ilustramos a estrutura do OGSA o1 com a numeração dos carbonos do esqueleto sesquiterpeno. O espectro de ^{13}C é observado na Figura 4.1.6., na Tabela 4.1.1. temos os dados de ^{13}C obtidos neste trabalho e os dados relatados na literatura (KASAI *et al.*, 1986).

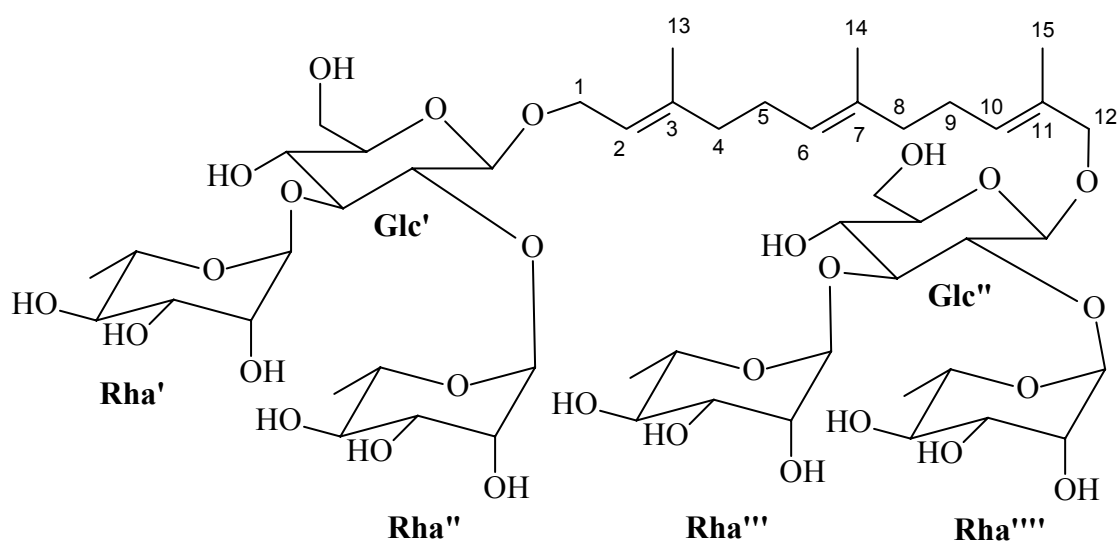


Figura 4.1.5. – Estrutura do OGSA o1.

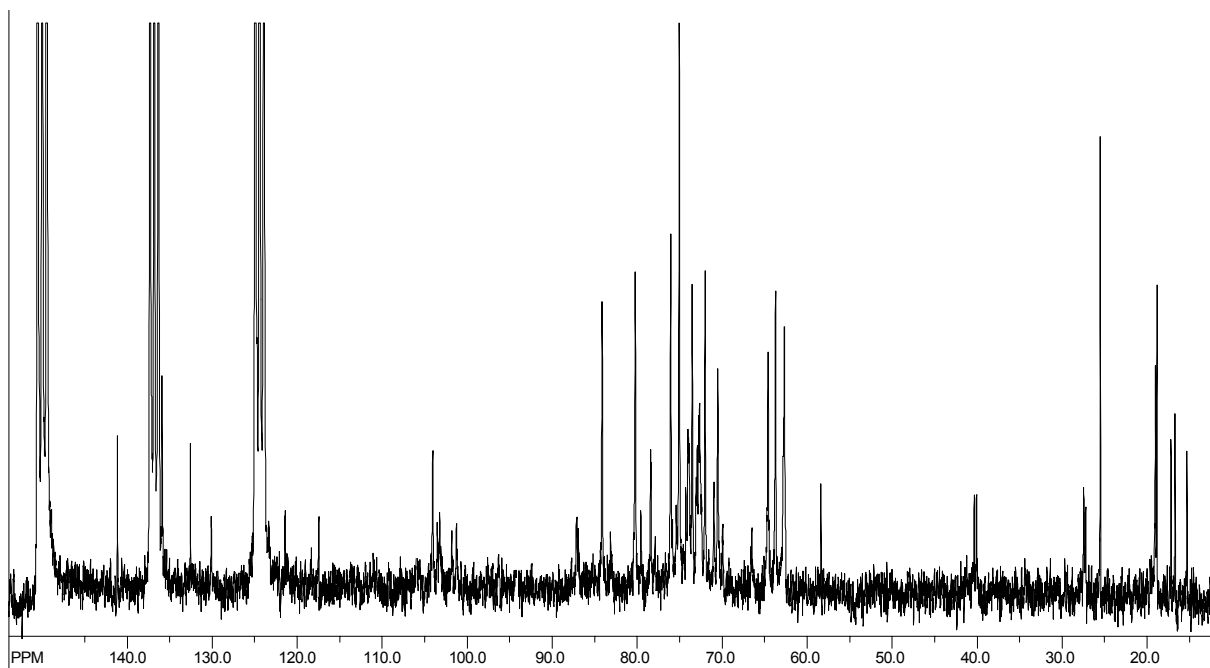


Figura 4.1.6. – Espectro de ^{13}C do OGSA o1 presente na fração 16.

Tabela 4.1.1. – Dados de ^{13}C para o OGSA o1 isolado e dados da literatura (KASAI *et al.*, 1986).

| C(Sesq.) | o1 | Lit. | Açúcar | C | o1 | Lit. | Açúcar | C | o1 | Lit. |
|----------|-------|-------|--------|---|-------|--------------------|---------|---|-------|--------------------|
| 1 | 66,5 | 66,3 | Glc' | 1 | 101,8 | 103.6 ^c | Rha'' | 1 | 104,2 | 103.0 ^c |
| 2 | 121,4 | 121,4 | | 2 | 80,2 | 80.2 | | 2 | 72,5 | 72.3 |
| 3 | 141,2 | 141,8 | | 3 | 87,2 | 87.9 | | 3 | 72,5 | 72.3 |
| 4 | 40,1 | 40,4 | | 4 | 70,5 | 70.4 ^d | | 4 | 73,8 | 73.6 |
| 5 | 27,2 | 27,4 | | 5 | 77,8 | 77.5 | | 5 | 70,4 | 70.4 ^d |
| 6 | 125,2 | 125,3 | | 6 | 62,5 | 62.5 | | 6 | 17,6 | 17.8 |
| 7 | 135,9 | 136,0 | Glc'' | 1 | 101,1 | 102.7 ^e | Rha''' | 1 | 103,8 | 101.2 ^c |
| 8 | 40,4 | 40,5 | | 2 | 75,1 | 79.4 | | 2 | 72,3 | 72.3 |
| 9 | 27,4 | 27,4 | | 3 | 87,2 | 88.1 | | 3 | 72,6 | 72.3 |
| 10 | 130,1 | 130,6 | | 4 | 70,4 | 70.1 ^d | | 4 | 73,6 | 73.6 |
| 11 | 132,5 | 132,6 | | 5 | 78,3 | 77.5 | | 5 | 70,1 | 70.7 ^d |
| 12 | 76,1 | 76,0 | | 6 | 62,8 | 62.5 | | 6 | 19,0 | 18.0 |
| 13 | 17,2 | 16,2 | Rha' | 1 | 103,5 | 103.6 ^e | Rha'''' | 1 | 104,3 | 100.9 ^e |
| 14 | 16,7 | 16,1 | | 2 | 72,0 | 72.3 | | 2 | 72,4 | 72.3 |
| 15 | 15,3 | 14,8 | | 3 | 72,4 | 72.3 | | 3 | 72,5 | 72.3 |
| | | | | 4 | 73,5 | 73.6 | | 4 | 73,7 | 73.6 |
| | | | | 5 | 70,5 | 70.7 ^d | | 5 | 69,9 | 70.4 ^d |
| | | | | 6 | 19,1 | 18.0 | | 6 | 18,7 | 17.8 |

a,b,c,d,e - sinais que podem estar trocados entre si.

O trabalho realizado por KASAI *et al.* (1986) identificou este composto (Mukuroziosides IIb) fazendo uso, apenas, da técnica de ^{13}C . Através de experimentos de HSQC pudemos confirmar a presença dos açúcares partindo dos hidrogênios anoméricos das unidades de ramnose e glicose. Ao contrário do que foi descrito no trabalho encontrado na literatura, fica claro que os sinais de hidrogênio anomérico das ramnoses, que ocorrem como singletos largos por volta de 6,0 ppm, se relacionam com carbonos próximos de 103 ppm enquanto que os sinais dos hidrogênios anoméricos da glicose aparecem como dubletos entre 4,5-5,0 ppm e se relacionam com carbonos próximos de 101 ppm. Como esperado, notamos um maior número de sinais para a ramnose, uma vez que temos quatro unidades desta enquanto que para a glicose temos apenas duas. O espectro de HSQC ilustrado na Figura 4.1.6. comprova as informações citadas. observamos neste espectro a correlação entre os H-1 e C-1 das unidades de glicose e os H-1 e C-1 das unidades de ramnose.

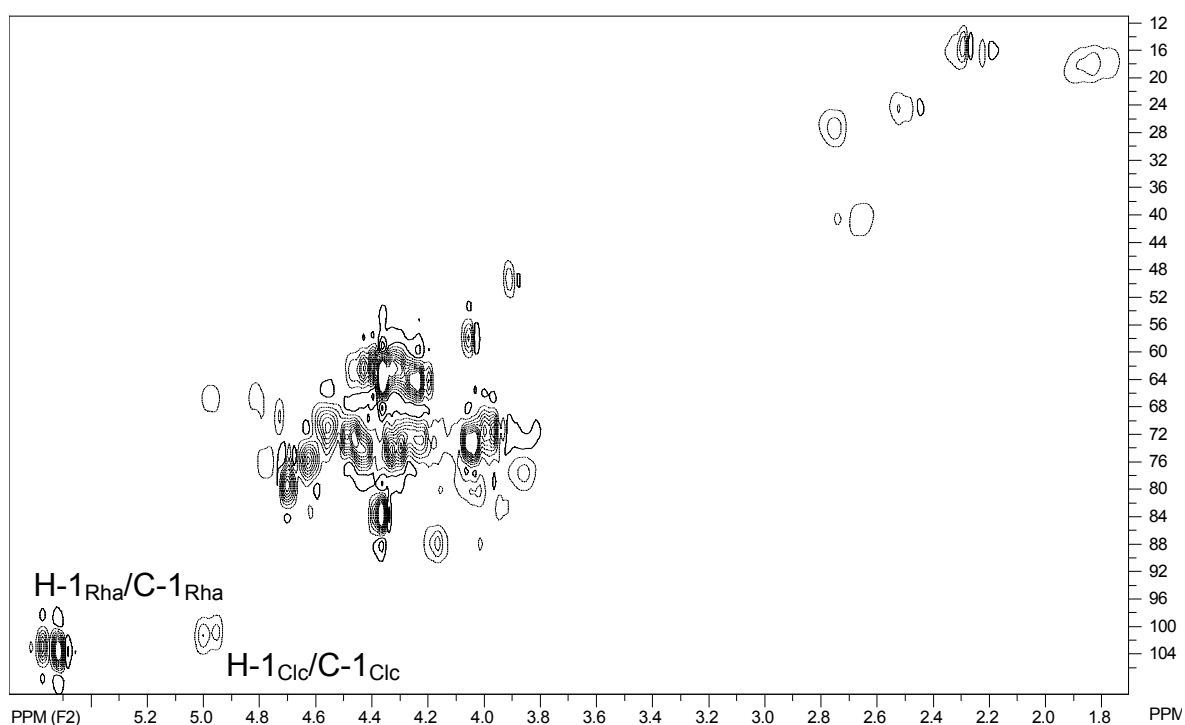


Figura 4.1.7. – Espectro de HSQC do OGSA o1 presente na fração 16, mostrando as ligações dos carbonos anoméricos.

O espectro de HSQC da Figura 4.1.7. nos mostra ainda uma região bastante conturbada, entre 45 e 90 ppm, onde temos, principalmente as interações H-C dos açúcares e do próprio esqueleto sesquiterpênico.

De acordo com os espectros da Figura 4.1.1. notamos ainda que as frações de número 27, 28 e 29, que resultaram em um total de 946 mg, devem conter a saponina S1 com elevado grau de pureza (Figura 4.1.8. com numeração dos carbonos do triterpeno e açúcares). Para comprovar a presença deste composto nas frações citadas seguimos a mesma metodologia adotada para a identificação do OGSA o1. Na Figura 4.1.9. é ilustrado o espectro de massas da fração 28, onde verificamos a presença do pico de m/z 881 ($[M-H]^-$) com uma carga negativa e m/z 440, com duas cargas negativas ($[M-2H]^{2-}$).

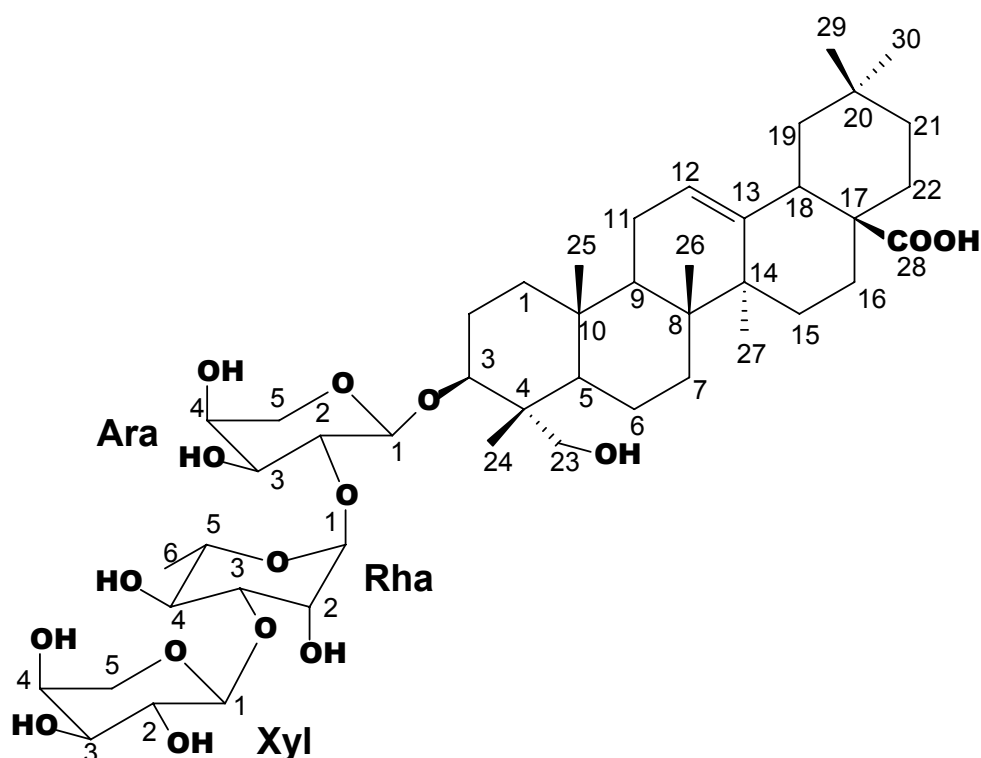


Figura 4.1.8. – Estrutura da Saponina S1 com a numeração do esqueleto triterpênico e açúcares.

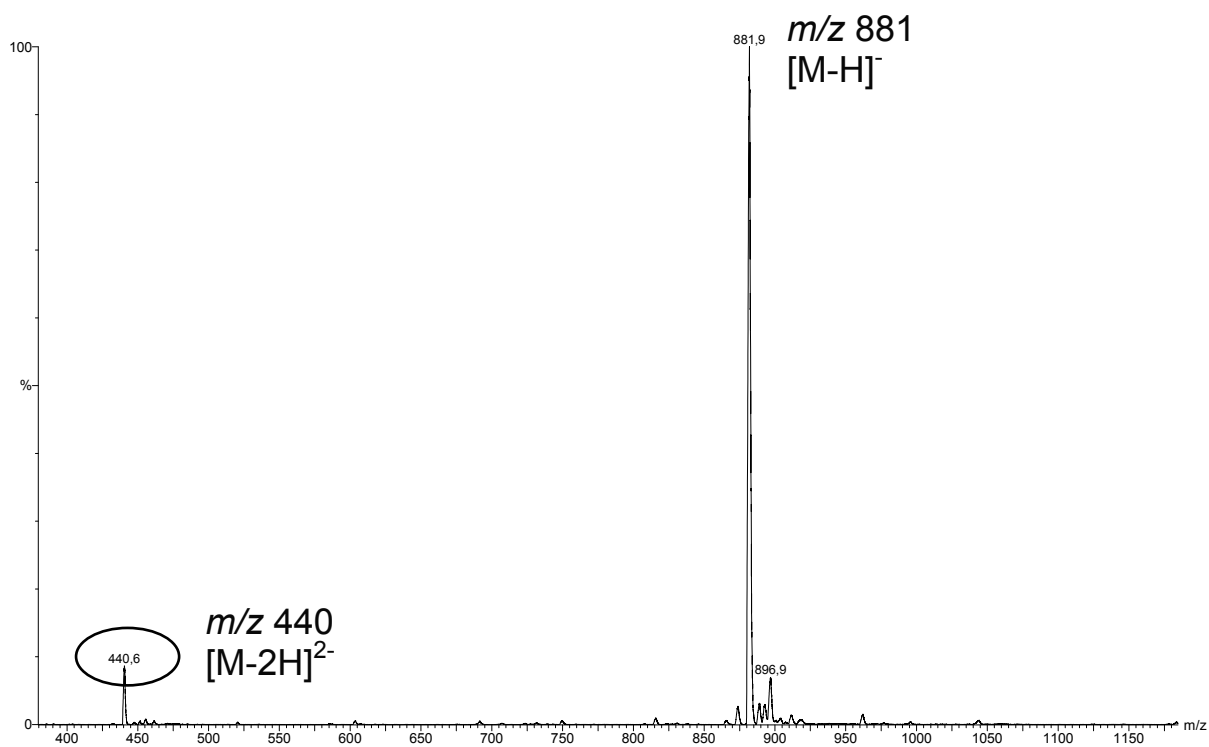


Figura 4.1.9. – Espectro de massas da fração 28, indicando a presença do saponina S1, em destaque temos: $[M-H]^{-}$ e $[M-2H]^{2-}$.

Na Figura 4.1.10. temos o espectro de MS/MS para m/z 881 observado na fração 27, com as mesmas condições de análise descritas na Tabela 3.1. e com energia de colisão de 45 eV.

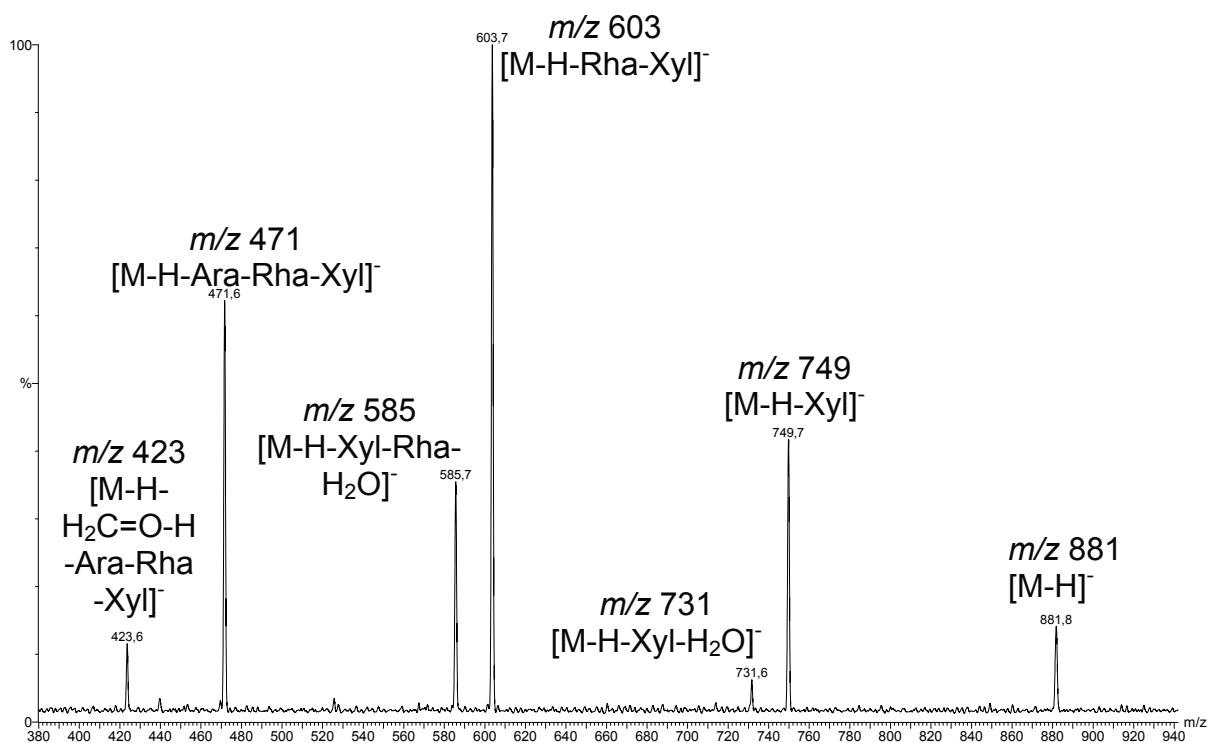


Figura 4.1.10. – Espectros de MS/MS da fração 27, indicando a presença da saponina S1 com as respectivas perdas dos açúcares até a aglicona.

Com base no espectro de MS/MS ilustrado na Figura 4.1.10. devemos encontrar a saponina S1 ([M-H]⁻ *m/z* 881, ver Figura 4.1.1.) na frações em questão. A análise do espectro de MS/MS nos permitiu observar as perdas dos açúcares xilose (150 Da), ramnose (164 Da) e arabinose ([M-H-Xyl]⁻ *m/z* 731, [M-H-Rha-Xyl]⁻ *m/z* 585) até chegarmos ao fragmento referente à aglicona ([M-H-Ara-Rha-Xyl]⁻ *m/z* 471). Verificamos ainda que os íons mais intensos no espectro, como *m/z* 603 e 749, são referentes a perda de unidades de açúcar com ligação dupla. As perdas aqui citadas podem ser observadas na Figura 4.1.11., onde é mostrado uma proposta de fragmentação para a saponina S1 encontrada na fração 27.

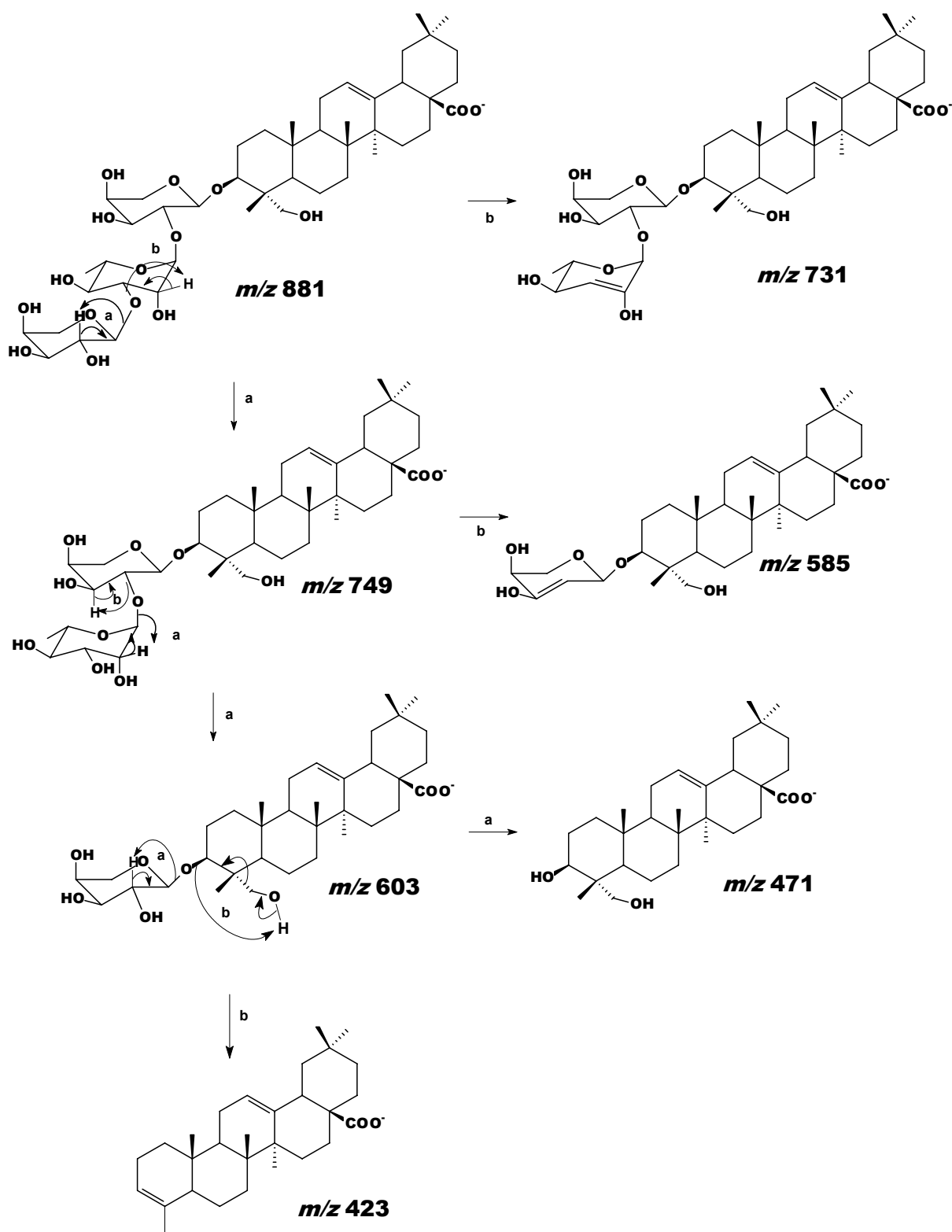


Figura 4.1.11. – Proposta de fragmentação para o espectro mostrado na Figura 4.1.10.

O espectro de MS/MS, juntamente com a proposta de fragmentação, indicaram a presença da saponina S1 nos extratos de *S. saponaria*. Todos os dados aqui presentes conferem com os dados obtidos anteriormente por MURGU (2002). Para uma informação mais detalhada sobre a estrutura da saponina isolada

realizamos experimentos de NMR da fração 27. Os dados obtidos por espectrometria de massas foram suficientes para concluirmos que, assim como para os OGSA, o processo de hidrólise básica foi bastante eficiente, uma vez que notamos apenas a presença da saponina S1, ou seja, todos os possíveis grupos acetatos foram convertidos em hidroxilas. Devemos salientar que o trabalho realizado por MURGU (2002) descreveu a identificação estrutural apenas das saponinas que apresentavam grupos acetatos (ver Tabela 1.2.), uma vez que estas encontravam como majoritárias nos extratos obtidos. Devido a elevada eficiência da hidrólise realizada, obtivemos a saponina S1 em grande quantidade, de modo que a identificação estrutural por NMR tornou-se totalmente viável. Na Figura 4.1.12. ilustramos o espectro de ^1H obtido para a fração 27.

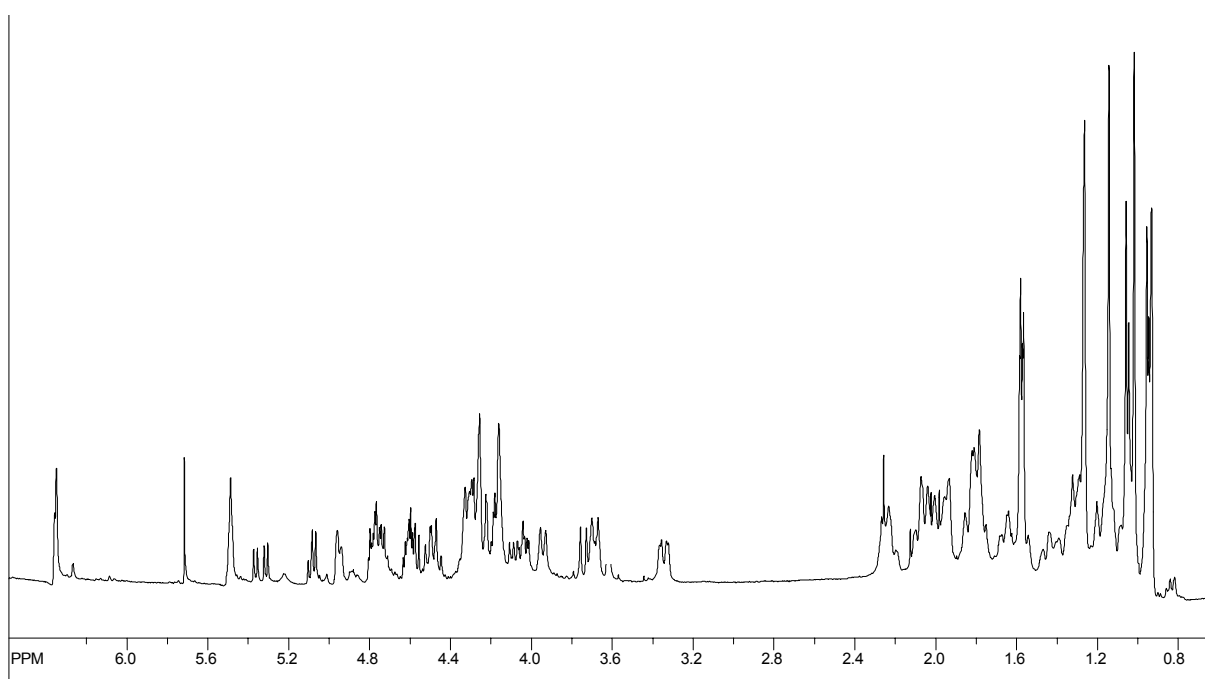


Figura 4.1.12. – Espectro de ^1H da fração 27, evidenciando a presença da saponina S1.

Alguns aspectos do espectro ilustrado na Figura 4.1.12. evidencia a presença da saponina S1 na fração 27. Na região de 0,8 a 2,2 ppm temos, principalmente, os sinais provenientes da aglicona da molécula, enquanto que de 3,4 a 5,5 ppm temos os sinais dos açúcares. Não notamos a presença de nenhum sinal referente aos hidrogênios de grupos acetatos, que deveriam ficar próximos de 2 ppm (MURGU,

2002). Realizamos experimentos de ^{13}C e bi-dimensionais para atribuição precisa dos sinais da saponina S1. O espectro de ^{13}C é ilustrado na Figura 4.1.13.

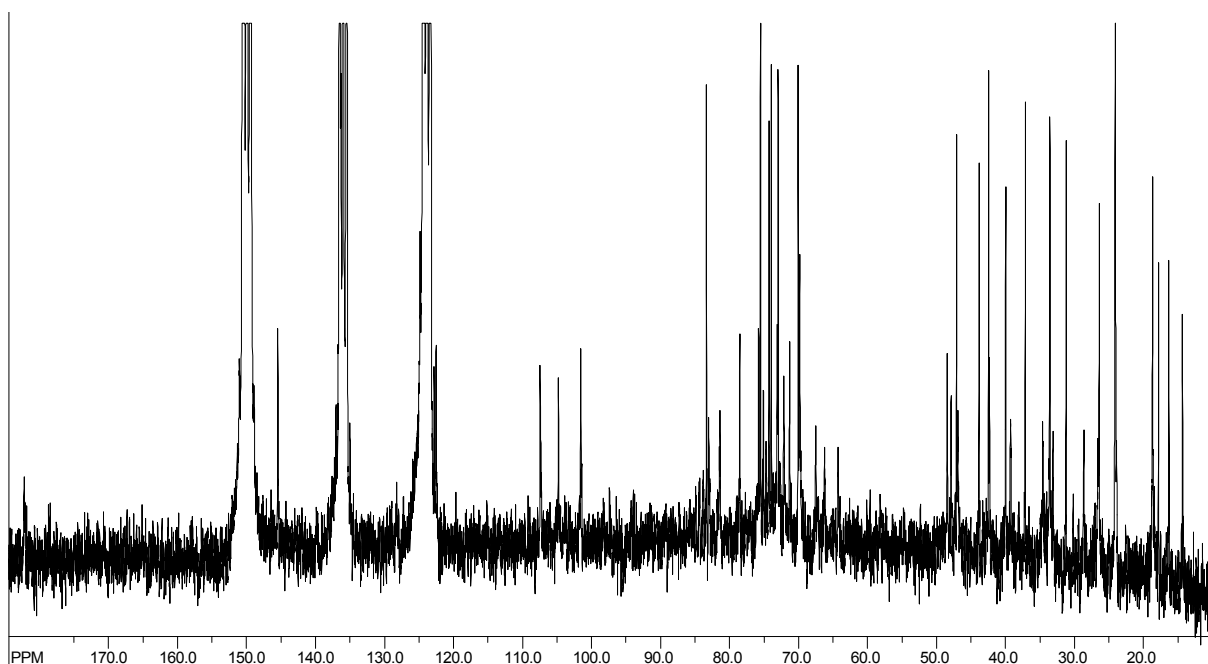


Figura 4.1.13. – Espectro de ^{13}C da fração 27.

O espectro de ^{13}C (Figura 4.1.13.) nos forneceu algumas informações importantes para atribuição dos sinais para a saponina S1. Em 182,0 temos o sinal referente à carboxila (C-28), em 101,6; 104,8 e 107,6 temos os sinais dos carbonos anoméricos dos açúcares (ramnose, arabinose e xilose, respectivamente). Na região de 15 a 50 ppm temos, principalmente, os sinais do núcleo triterpênico. Entre 65 e 82 ppm temos os sinais dos carbonos dos açúcares. Em 122,6 ppm temos o sinal do C-12 e em 145,5 temos o sinal referente ao C-13. Os experimentos de COSY, HSQC e HMBC foram fundamentais para confirmação da estrutura proposta. Baseando-se no espectro de HSQC (Figura 4.1.14.) verificamos claramente a posição dos hidrogênios anoméricos, que juntamente com os dados fornecidos pelo experimento de COSY, tornou mais fácil a atribuição dos açúcares presentes na molécula. O espectro da Figura 4.1.14. (HSQC) nos fornece informação da presença da arabinose através da correlação do H-1 em 5,1 ppm com C-1 em 104,8 ppm, também podemos verificar a presença da ramnose devido à correlação entre o H-1 com C-1 deste açúcar em 6,4 e 101,6 ppm, respectivamente e finalmente, a presença da xilose é comprovada devido ao sinal entre o H-1 e o C-1 em 5,4 e 107,6

ppm. Como dito anteriormente a presença destes açúcares também foram comprovadas baseando-se no estudo do espectro de COSY.

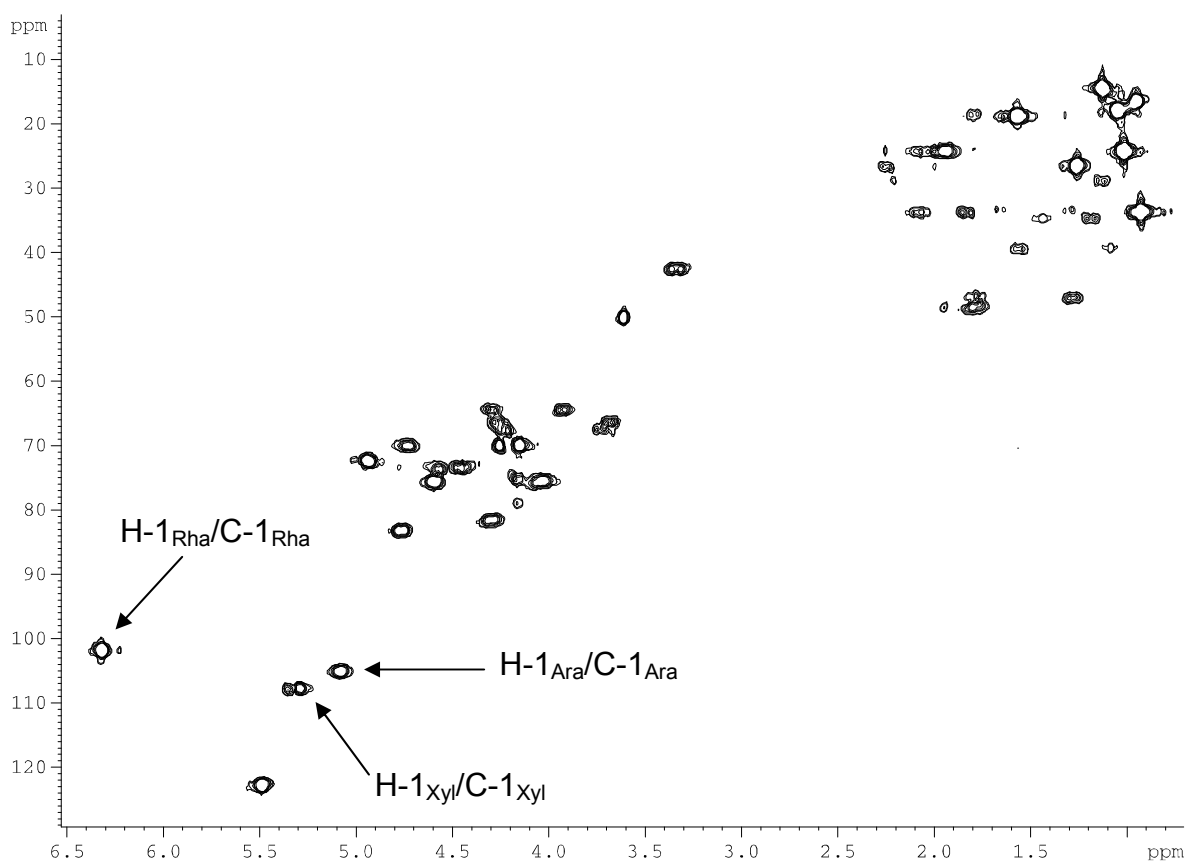


Figura 4.1.14. – Espectro de HSQC, indicando a presença das ligações de H-C anoméricas dos açúcares: arabinose, ramnose e xilose.

O experimento de HMBC foi fundamental para atribuímos como os açúcares estão ligados entre si e à aglicona, uma vez que neste experimento é possível verificar a correlação entre hidrogênio e carbono até três ligações. Na Figura 4.1.15. é ilustrado o espectro de HSQC para a fração 27.

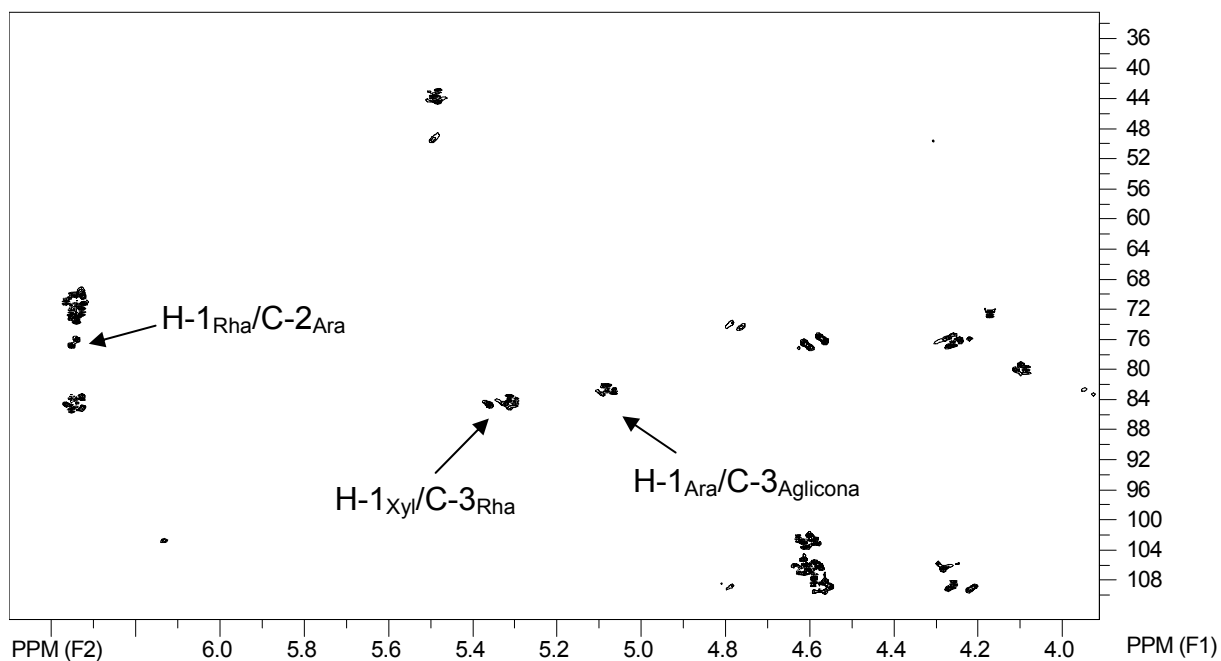


Figura 4.1.15. – Espectro de HMBC da fração 27, destacando as ligações que possibilitaram a atribuição das posições dos açúcares.

A análise do espectro de HMBC ilustrado no Figura 4.1.15. nos mostrou que o H-1 da ramnose em 6,4 ppm se relaciona com o sinal em 76,1 ppm do C-2 da arabinose; em 5,3 ppm temos a correlação do H-1 da xilose com o C-3 da ramnose em 83,7 ppm e o sinal em 5,1 ppm da arabinose com sinal em 81,3 do C-3 da aglicona.

Há relatos do isolamento da saponina S1 por KOJIMA *et al.* (1998) de *Gliricidina sepium* onde este composto recebeu o nome de hederagenina-3-O-β-D-xilopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-arabinosideo. Na Tabela 4.1.2. são mostrados os deslocamentos químicos de ¹³C do composto descrito na literatura e os dados da saponina S1 obtidos neste trabalho.

Tabela 4.1.2. – Dados de ^{13}C da literatura (KOJIMA *et al.*, 1997) e obtidos neste trabalho (em ppm).

| Saponina S1 | | | | Literatura (KOJIMA <i>et al.</i> 1997) | | | |
|-------------|-------|-----------|-------|--|-------|-----------|-------|
| Aglicona | des. | Arabinose | des. | Aglicona | des. | Arabinose | des. |
| 1 | 39,3 | 1 | 104,8 | 1 | 39,0 | 1 | 104,8 |
| 2 | 26,5 | 2 | 76,1 | 2 | 26,4 | 2 | 75,2 |
| 3 | 81,3 | 3 | 75,1 | 3 | 81,3 | 3 | 75,2 |
| 4 | 43,8 | 4 | 69,9 | 4 | 43,7 | 4 | 69,7 |
| 5 | 47,9 | 5 | 66,2 | 5 | 47,8 | 5 | 66,3 |
| 6 | 18,4 | Ramnose | des. | 6 | 18,2 | Ramnose | des. |
| 7 | 33,2 | 1 | 101,6 | 7 | 32,9 | 1 | 101,4 |
| 8 | 40,0 | 2 | 72,1 | 8 | 39,8 | 2 | 72,0 |
| 9 | 48,5 | 3 | 83,7 | 9 | 48,2 | 3 | 82,7 |
| 10 | 37,2 | 4 | 73,0 | 10 | 36,9 | 4 | 73,1 |
| 11 | 24,0 | 5 | 70,0 | 11 | 23,8 | 5 | 69,6 |
| 12 | 122,6 | 6 | 18,7 | 12 | 122,9 | 6 | 18,4 |
| 13 | 145,5 | Xilose | des. | 13 | 145,0 | Xilose | des. |
| 14 | 42,4 | 1 | 107,6 | 14 | 42,2 | 1 | 107,2 |
| 15 | 28,7 | 2 | 75,8 | 15 | 28,4 | 2 | 75,8 |
| 16 | 24,0 | 3 | 78,5 | 16 | 23,8 | 3 | 78,1 |
| 17 | 46,9 | 4 | 71,3 | 17 | 46,7 | 4 | 70,8 |
| 18 | 42,4 | 5 | 67,5 | 18 | 42,1 | 5 | 67,1 |
| 19 | 47,0 | | | 19 | 46,5 | | |
| 20 | 31,2 | | | 20 | 31,0 | | |
| 21 | 34,6 | | | 21 | 34,3 | | |
| 22 | 33,6 | | | 22 | 33,3 | | |
| 23 | 64,4 | | | 23 | 64,1 | | |
| 24 | 14,4 | | | 24 | 14,2 | | |
| 25 | 16,4 | | | 25 | 16,1 | | |
| 26 | 17,9 | | | 26 | 17,5 | | |
| 27 | 26,4 | | | 27 | 26,2 | | |
| 28 | 182,0 | | | 28 | 180,7 | | |
| 29 | 33,1 | | | 29 | 33,3 | | |
| 30 | 23,9 | | | 30 | 23,8 | | |

Os dados obtidos pelos experimentos de NMR (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC) e em comparação com a literatura (Tabela 4.1.2.) não nos deixou dúvidas sobre a presença da saponina S1 (Figura 4.1.8.) na fração 27 da coluna de Sephadex®.

Os dados de NMR foram fundamentais para a confirmação dos compostos (OGSA o1 e saponina S1). No entanto, as análises por espectrometria de massas foram extremamente rápidas e os dados fornecidos por tal técnica são interpretados mais facilmente.

4.2. Biotransformação de saponinas e OGSA

Posteriormente ao isolamento e identificação da saponina S1 e do OGSA o1 foram realizados experimentos para verificar a biotransformação destes compostos (saponinas e OGSA) pelo fungo endofítico *Xylaria* sp.

Como dito no item 3.4., o fungo endofítico *Xylaria* sp. encontrava-se estocado na micoteca do LaBioMMI e havia sido isolado dos frutos de *Sapindus saponaria* após uma série de procedimentos que foram realizados com intuito de esterilizar a superfície do fruto, garantindo assim que apenas fungos endofíticos fossem isolados. Após 15 dias de cultivo foram adicionados nos meios líquidos contendo o fungo a saponina e OGSA. Passados outros 15 dias da introdução dos substratos (saponina e OGSA) nos meios de cultura estes foram extraídos e analisados.

Após o total de 30 dias, a análise envolvendo o extrato contendo o meio de cultura, o fungo *Xylaria* sp. e a saponina S1 foi realizada no espectrômetro de massas e o espectro obtido é ilustrado na Figura 4.2.1. As condições de análise do equipamento foram as mesmas descritas no item 3.3.

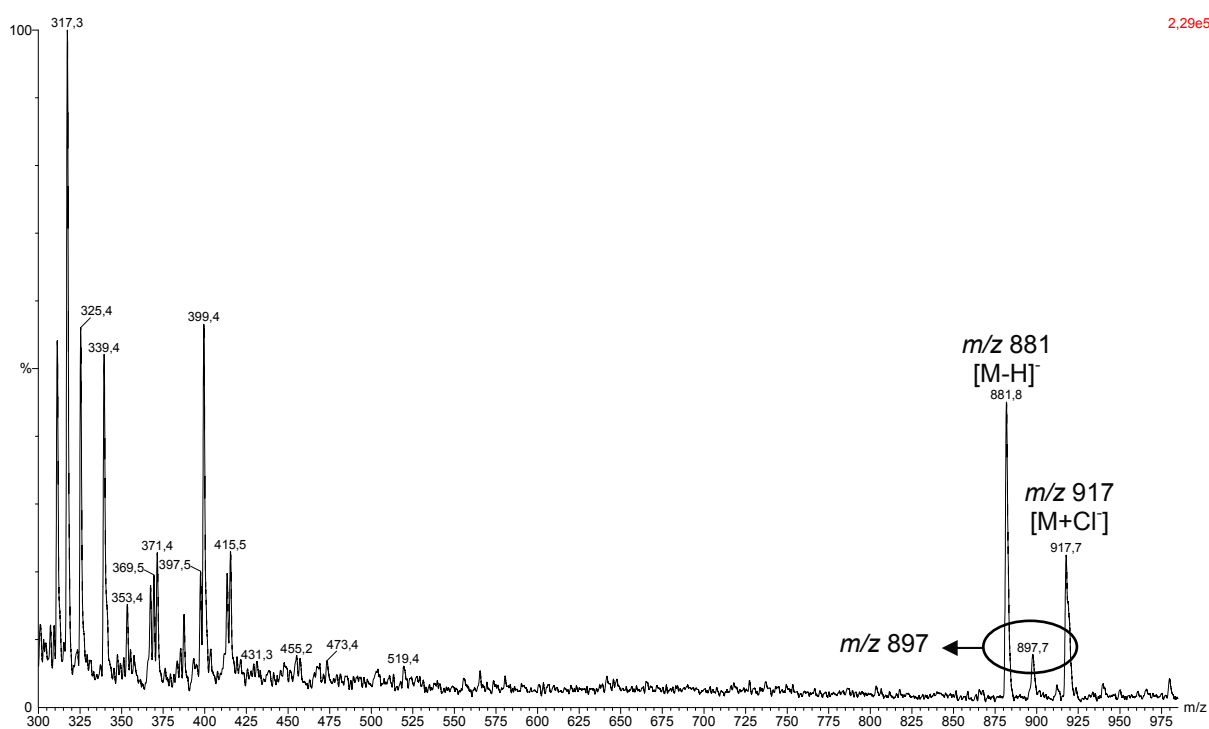


Figura 4.2.1. – Espectro de massas do extrato do fungo *Xylaria* sp. contendo a saponina S1 (m/z 881) e o provável produto de biotransformação (m/z 897).

O estudo do espectro observado na Figura 4.2.1. nos fornece a informação de que, no extrato em questão, temos a saponina S1 ainda intacta, representa por m/z 881 ($[M-H]^-$) com seu respectivo *cluster* de cloro ($[M+Cl]^-$). Notamos ainda a presença do provável produto de biotransformação, indicado por um pico pouco intenso, de m/z 897. A presença do pico referente à m/z 897, confirma o fato citado no item 1.4., onde MURGU (2002) constatou que a saponina S1 sofreu adição de 16 u.m.a., referente à adição de um átomo de oxigênio ao núcleo triterpênico da molécula, levando a uma massa de 898 Da, observado claramente no espectro como m/z 897. Essa mudança no valor da massa do composto possivelmente refere-se a uma hidroxila.

As análises dos demais extratos envolvidos nos experimentos de biotransformação seriam realizadas utilizando também a técnica de espectrometria de massas, no entanto, devido aos problemas já relatados, as análises passaram a ser realizadas por HPLC-UV. Uma vez que realizamos experimentos envolvendo frascos contendo o fungo com os substratos (saponina e OGSA), outros meios contendo apenas o fungo e outros contendo somente os padrões (saponina e OGSA isolados), poderíamos comparar, facilmente, os espectros de massas obtidos em todos os meios de cultura, como foi relatado anteriormente para o meio contendo a saponina.

Uma alternativa encontrada para realizar o estudo dos experimentos de biotransformação envolvendo o fungo *Xylaria* sp., saponinas e OGSA foi utilizar o HPLC equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). O procedimento adotado para análise dos extratos obtidos foi o mesmo planejado para o estudo que envolveria o espectrômetro de massas, ou seja, comparamos os meios contendo o fungo e os substratos com os meios de cultura contendo apenas o fungo, outros meios contendo apenas os padrões isolados e outro contendo apenas o meio de cultura utilizado. Na Tabela 3.3. foram ilustradas todas as amostras que foram analisadas por HPLC-DAD e, posteriormente, comparadas. Devemos notar a presença de bandas cromatográficas referentes ao produto de biotransformação que não são observadas nos cromatogramas referentes às análises do meio contendo o fungo, do meio contendo os padrões isolados (saponina e OGSA) e apenas o meio.

As condições cromatográficas utilizadas para análises dos extratos foram descritas no item 3.4.3. Na Figura 4.2.2. são ilustrados os cromatogramas provenientes das análises envolvendo o OGSA o1, isolado de *Sapindus saponaria* e

o fungo endofítico *Xylaria* sp. Os cromatogramas da Figura 4.2.2. referem-se à amostra contendo somente o padrão (a), um extrato contendo apenas o meio de cultura (b), outro extrato contendo o meio de cultura com o OGSA (c) e, finalmente, uma amostra contendo o fungo e o substrato (OGSA) (d).

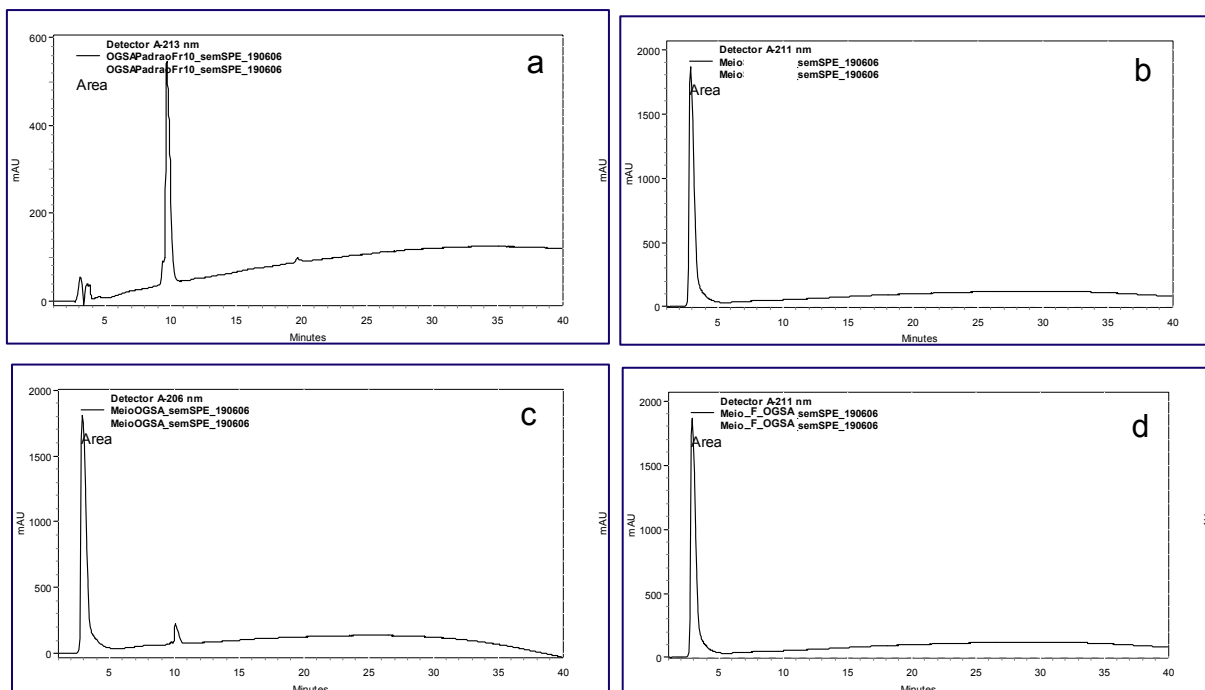


Figura 4.2.2. – Cromatogramas: (a) padrão OGSA, (b) meio de cultura, (c) meio de cultura com o padrão e (d) meio de cultura, fungo e OGSA.

Como pode ser observado nos cromatogramas (a) e (c) da Figura 4.2.2. notamos a presença da banda referente ao OGSA o1, previamente isolado, próximo de 10 minutos. No entanto, quando partimos para análise do cromatograma (d) não verificamos nenhuma banda cromatográfica. Este fato nos confirma a informação obtida pela técnica de espectrometria de massas, relatada por MURGU (2002), ou seja, o fungo endofítico *Xylaria* sp. apresentou a capacidade de degradar completamente o OGSA presente em *Sapindus saponaria*.

O mesmo procedimento utilizado para análise da degradação do OGSA foi empregado para o estudo da biotransformação da saponina S1 por *Xylaria* sp. Na Figura 4.2.3. são ilustrados os cromatogramas provenientes da amostra contendo somente o padrão (a), um extrato contendo apenas o meio de cultura (b), outro extrato contendo o meio de cultura com a saponina S1 (c) e, finalmente, uma amostra contendo o fungo e o substrato (saponina) (d).

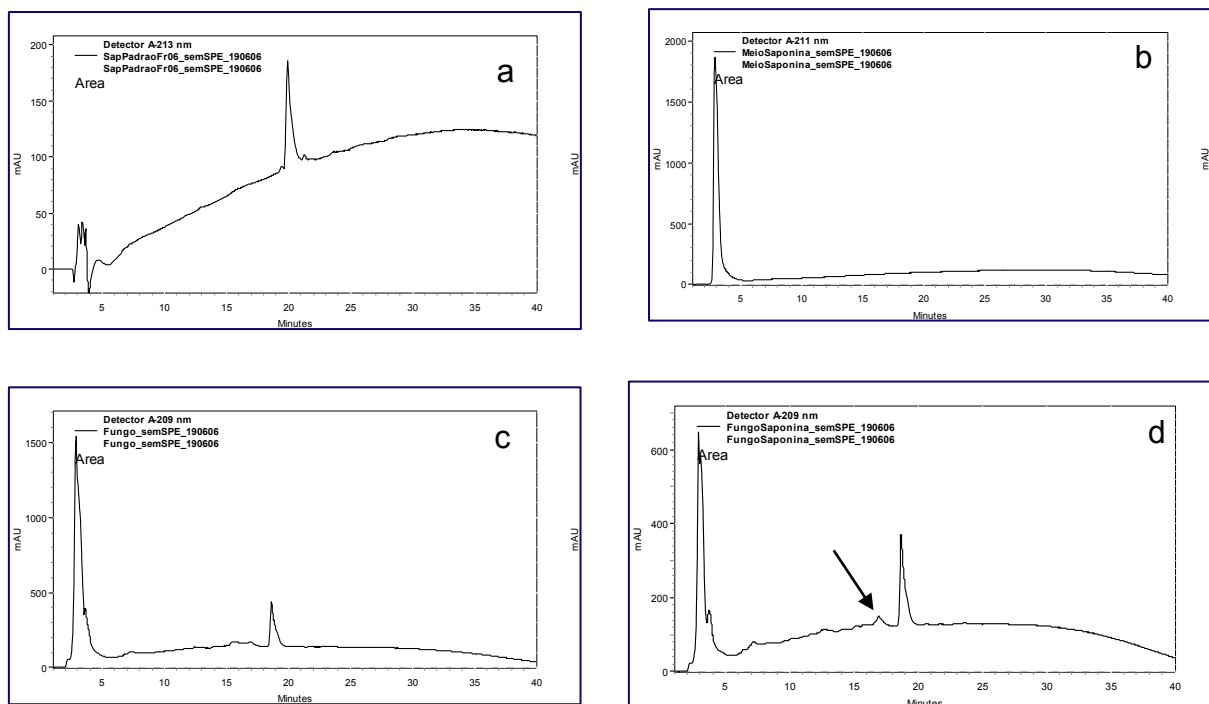


Figura 4.2.3. – Cromatogramas: (a) padrão saponina S1, (b) meio de cultura, (c) meio de cultura com saponina e (d) meio de cultura, fungo e saponina, a seta indica o provável produto de biotransformação.

Assim como o estudo envolvendo o OGSA, observamos nos cromatogramas (a) e (c) da Figura 4.2.3. a presença da banda referente à saponina S1, próximo de 20 minutos. Como era esperado, no cromatograma (b) não observamos nenhuma banda cromatográfica. No entanto, quando partimos para análise do cromatograma contendo o fungo e a saponina (d) verificamos a banda referente à saponina S1 intacta e, como indica a seta, uma banda pouco intensa, com tempo de retenção menor do que o da saponina. Este resultado reforça a ocorrência da biotransformação conforme as informações fornecidas pelo espectro de massas ilustrado na Figura 4.2.1. A presença da banda cromatográfica com menor tempo de retenção do que o material de partida ajuda na proposta de que a adição de 16 u.m.a. refere-se a uma hidroxila, uma vez que o experimento foi realizado no modo reverso de eluição, e um composto mais polar deve possuir tempo de retenção menor do que o material de partida (saponina S1).

O mesmo experimento envolvendo a saponina e o fungo foi realizado com o dobro da concentração utilizada nos cromatogramas da Figura 4.2.3 (10 mg/mL contra 5 mg/mL). Os cromatogramas obtidos nesta nova análise são verificados na Figura 4.2.4.

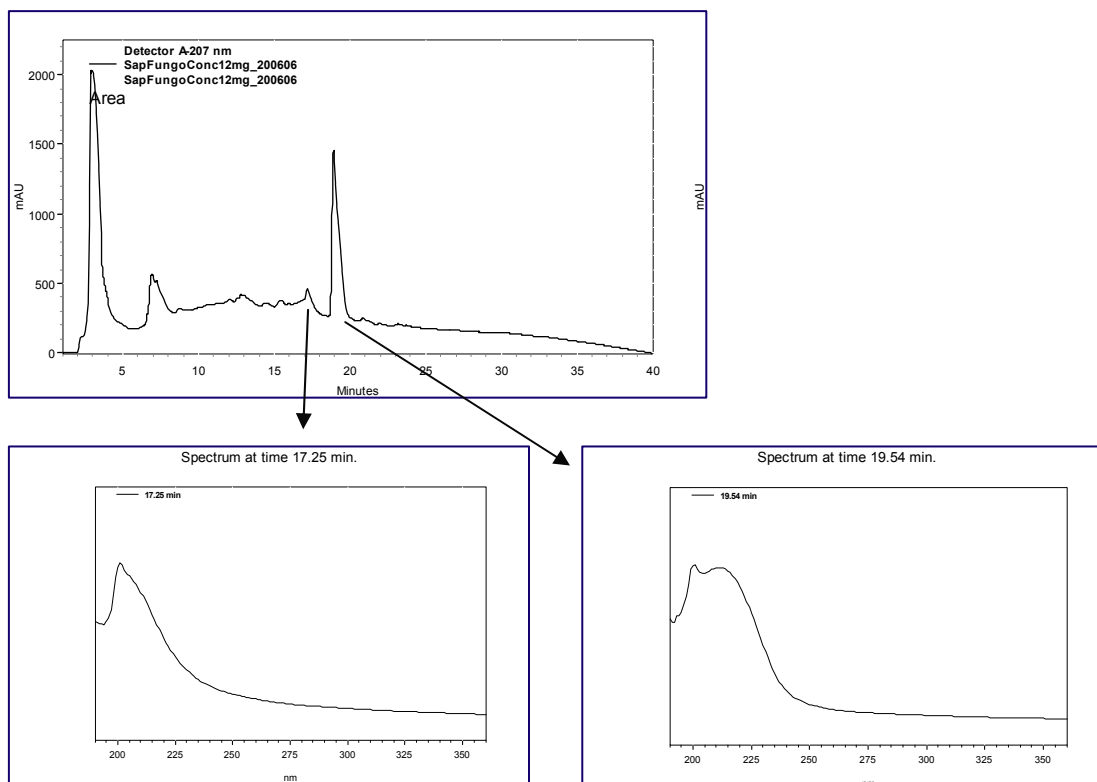


Figura 4.2.4. – Cromatogramas do extrato contendo a saponina S1 e o fungo *Xylaria* sp. (a), abaixo estão ilustrados os espectros de UV das bandas referentes à saponina S1 (c) e do provável produto da biotransformação (b).

Na Figura 4.2.4.(a) foram ilustrados o cromatograma do extrato contendo o fungo *Xylaria* sp., a saponina S1 e o possível produto de biotransformação. Em (b) temos o espectro de UV do possível produto de biotransformação e em (c) o espectro da saponina S1. É possível notar uma grande semelhança entre os dois espectros de UV.

Para confirmar a presença do produto de biotransformação atribuído a banda próxima de 17 min. e obter dados para elucidação estrutural deste composto passamos para o uso do HPLC preparativo. A técnica preparativa forneceu massa aproximada de 4 mg do produto de biotransformação. Embora a quantidade obtida proporcionou realizar experimentos bi-dimensionais (COSY, HSQC e HMBC), as informações fornecidas por estes experimentos não foram suficientes para uma atribuição precisa sobre a estrutura do produto de biotransformação. Esse fato deve-se à grande sobreposição de sinais referentes aos açúcares e à aglicona da molécula em questão. A principal ferramenta utilizada para determinação estrutural da saponina biotransformada foi a técnica de ^{13}C NMR. Na Figura 4.2.5. temos o

espectro de ^{13}C obtido para o composto em questão. O experimento foi realizado utilizando $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ como solvente e utilizou-se em um tubo capilar de ressonância.

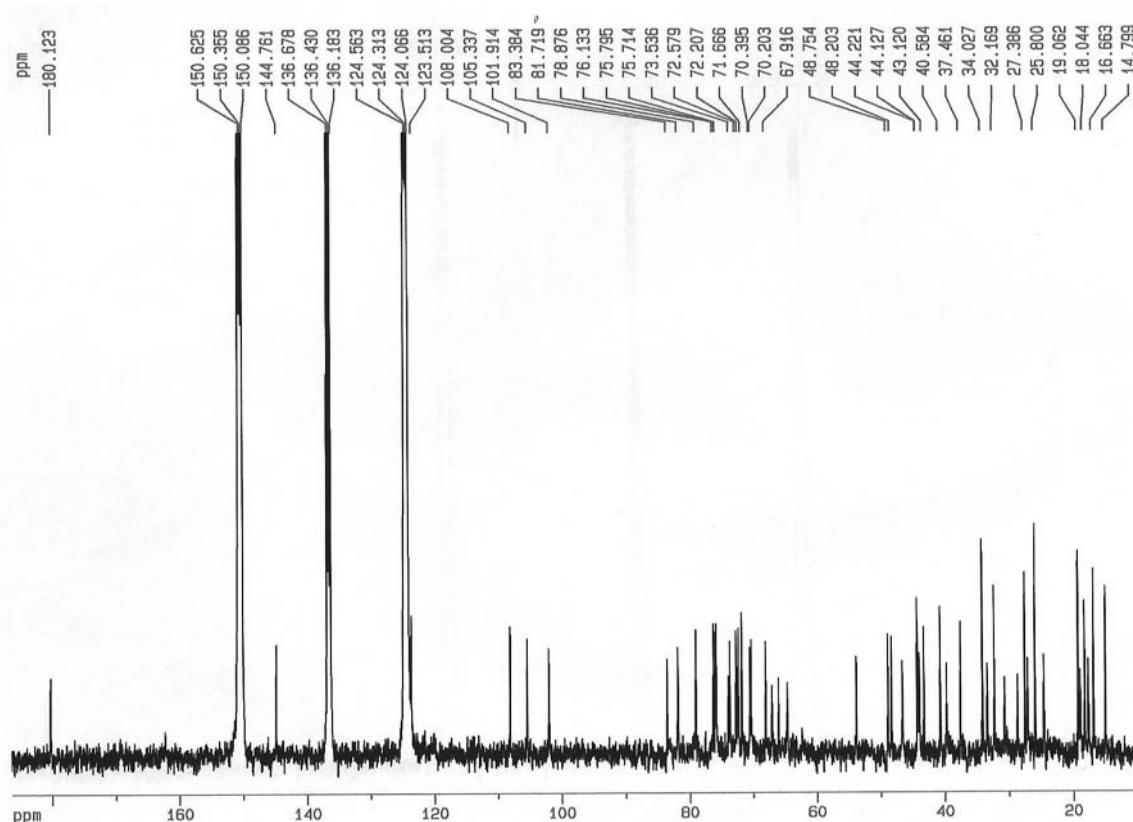


Figura 4.2.5. – Espectro de ^{13}C da saponina biotransformada.

Para determinação estrutural do produto de biotransformação foi realizado um estudo baseado no espectro de ^{13}C da saponina biotransformada com auxílio de uma refinada busca na literatura (Web of Science e SciFinder) envolvendo saponinas e triterpenos similares à aglicona da saponina S1, mas com hidroxila presente no esqueleto triterpênico. A reunião dos dados obtidos, ^{13}C e literatura, indicaram que a hidroxila deve estar presente no C-21 (Figura 4.2.6(a); ROMUSSI *et al.*, 1985) ou no C-22 (Figura 4.2.6.(b); YOSHIKAWA *et al.*, 1997). Na Tabela 4.2.1. são ilustrados os deslocamentos químicos de ^{13}C da aglicona da saponina S1, do produto da biotransformação e os dados da literatura (ROMUSSI *et al.*, 1985 e YOSHIKAWA *et al.*, 1997). Na Figura 4.2.7. (c) e (d) temos, respectivamente, a Saponina S1 isolada e o provável produto de biotransformação.

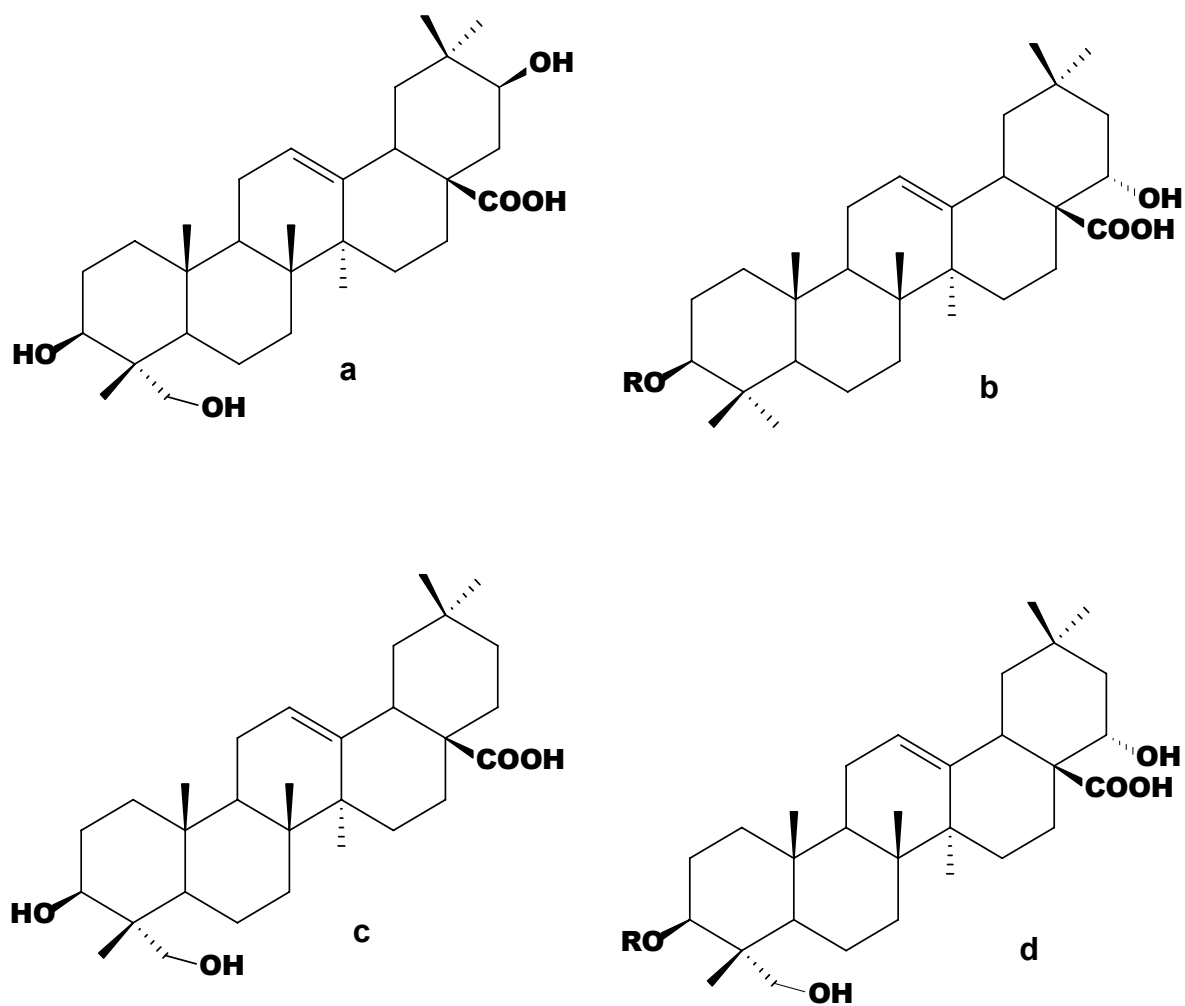


Figura 4.2.6. – (a) Estrutura do triterpeno contendo hidroxilação em C-21 (ROMUSSI *et al.*, 1985), (b) Estrutura da saponina hidroxilada no C-22, isolada por YSHIKAWA *et al.* (1997), (c) Saponina S1 isolada e (d) Provável produto de biotransformação

Tabela 4.2.1. – Deslocamentos químicos (^{13}C) das agliconas de: saponina S1, do produto de biotransformação e da literatura. Lit. 1 = ROMUSSI *et al.*, 1985 e Lit. 2 = YOSHIKAWA *et al.*, 1997.

| C | Sap. S1 | Biot. Sap. | Lit. 1 | Lit. 2 |
|----|---------|------------|--------|--------|
| 1 | 39,3 | 39,6 | 38,8 | 38,4 |
| 2 | 26,5 | 27,4 | 27,2 | 26,4 |
| 3 | 81,3 | 81,7 | 73,5 | 89,1 |
| 4 | 43,8 | 43,9 | 42,8 | 39,4 |
| 5 | 47,9 | 48,8 | 48,7 | 55,5 |
| 6 | 18,4 | 18,7 | 18,6 | 18,3 |
| 7 | 33,2 | 34,0 | 32,9 | 32,9 |
| 8 | 40,0 | 40,6 | 39,7 | 39,8 |
| 9 | 48,5 | 48,2 | 48,2 | 47,8 |
| 10 | 37,2 | 37,5 | 37,2 | 36,8 |
| 11 | 24,0 | 24,5 | 23,9 | 23,6 |
| 12 | 122,6 | 123,5 | 122,9 | 122,7 |
| 13 | 145,5 | 144,8 | 144,0 | 144,0 |
| 14 | 42,4 | 43,1 | 42,6 | 42,4 |
| 15 | 28,7 | 28,6 | 28,5 | 27,8 |
| 16 | 24,0 | 17,5 | 25,2 | 16,8 |
| 17 | 46,9 | 53,7 | 48,7 | 53,0 |
| 18 | 42,4 | 44,1 | 41,9 | 43,4 |
| 19 | 47,0 | 46,5 | 47,7 | 45,8 |
| 20 | 31,2 | 32,2 | 36,9 | 31,4 |
| 21 | 34,6 | 44,2 | 72,3 | 43,1 |
| 22 | 33,6 | 71,7 | 41,9 | 71,3 |
| 23 | 64,4 | 64,5 | 68,1 | 27,9 |
| 24 | 14,4 | 14,8 | 13,1 | 16,8 |
| 25 | 16,4 | 16,7 | 15,9 | 15,2 |
| 26 | 17,9 | 18,0 | 17,5 | 17,2 |
| 27 | 26,4 | 27,0 | 26,0 | 26,6 |
| 28 | 182,0 | 180,1 | 179,3 | 179,3 |
| 29 | 33,1 | 33,3 | 29,8 | 33,3 |
| 30 | 23,9 | 25,8 | 17,6 | 25,0 |

Podemos verificar, de acordo com a Tabela 4.2.1., uma grande similaridade entre os quatro compostos (ilustrados na Figura 4.2.6.). Devemos salientar que os dados do C-21 e C-22 da saponina biotransformadas podem estar trocados dependendo da posição exata da hidroxila. O valor do deslocamento do C-23 para o composto relatado por YOSHIKAWA *et al.*, (1997, lit. 2) é menor pois, ao contrário dos outros, não apresenta hidroxila nesta posição.

Devemos notar o deslocamento do C-17 relatado por YOSHIKAWA *et al.*, (1997), trata-se de um carbono α -carbonila e α em relação ao C-22, por isso possui um deslocamento elevado (53,0 ppm). O espectro da saponina biotransformada apresentou um sinal em 53,7 ppm (observado claramente no espectro da Figura 4.2.5.), indicando que, possivelmente, a hidroxilação ocorreu na posição 22. O possível produto de biotransformação é mostrado na Figura 4.2.7. e sua estrutura foi proposta baseando-se nos dados de ^{13}C e em comparação com a literatura.

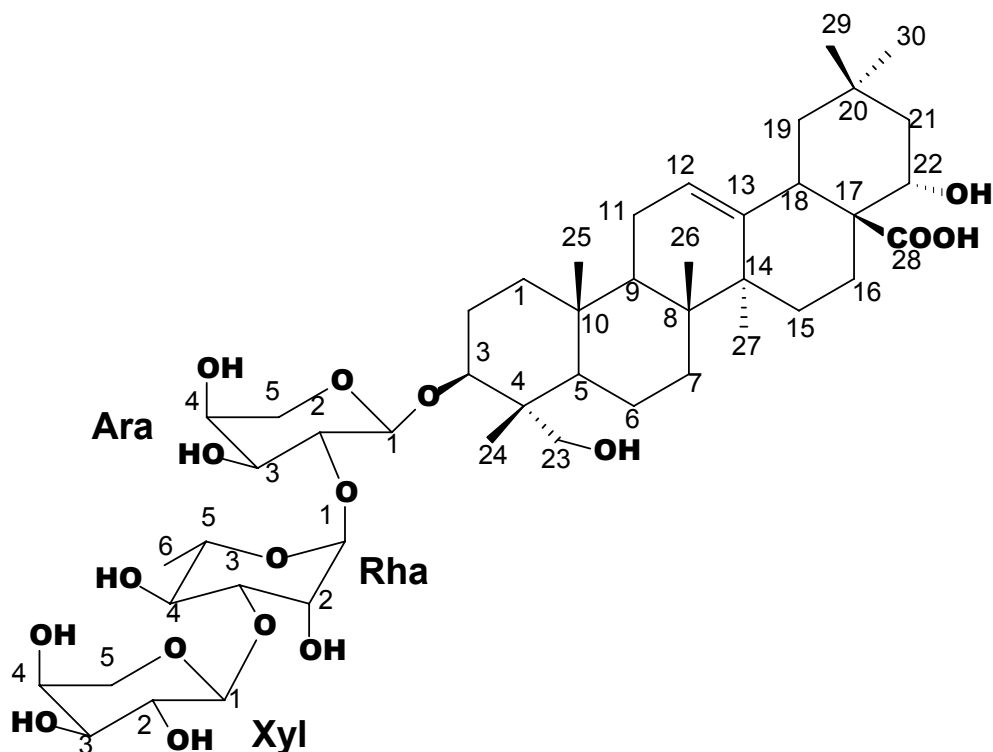


Figura 4.2.7. – Povável estrutura do produto de biotransformação da saponina S1 (OH em C-22).

Devemos salientar que, embora haja relatos de outros fungos que apresentam a capacidade de biotransformar saponinas (BAMFORD *et al.*, 2004), esta é a primeira vez que temos a detoxificação de uma saponina por um microorganismo, ou seja, tornar a substância não tóxica para si, através da inclusão de uma hidroxila em sua estrutura. Os outros relatos de detoxificação de saponinas por fungos envolvem a clivagem da ligação entre os açúcares ou entre toda a cadeia de açúcar e a aglicona (MORRISEY and OSBOURN, 1999). A Figura 1.6. (QUIDDE *et al.*, 1998) ilustra como alguns fungos são capazes de hidrolisar a saponina α -tomatina.

4.3. Isolamento de Metabólitos Secundários

4.3.1. Substâncias isoladas

O estudo de metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico *Xylaria* sp., isolado do pericarpo dos frutos de *Sapindus saponaria* levou à identificação de sete compostos de interesse. A classe das isocumarias se destacou, já que cinco substâncias desta classe foram isoladas, sendo elas a meleína, meleína metil éter, 5-formil-meleína, 3R,4R-hidroxi-meleína e 3R,4S-hidroxi-meleína. Como descrito na seção 1.5., não há relatos na literatura da meleína, ou de seus análogos, produzidos por fungos do gênero *Xylaria*. Foram isolados ainda o ácido pilifórmico, já descrito como metabólito produzido por fungos do gênero *Xylaria* e o diplodiol, outro policetídeo também inédito para este gênero. As estruturas destes compostos são ilustradas na Figura 4.3.1.

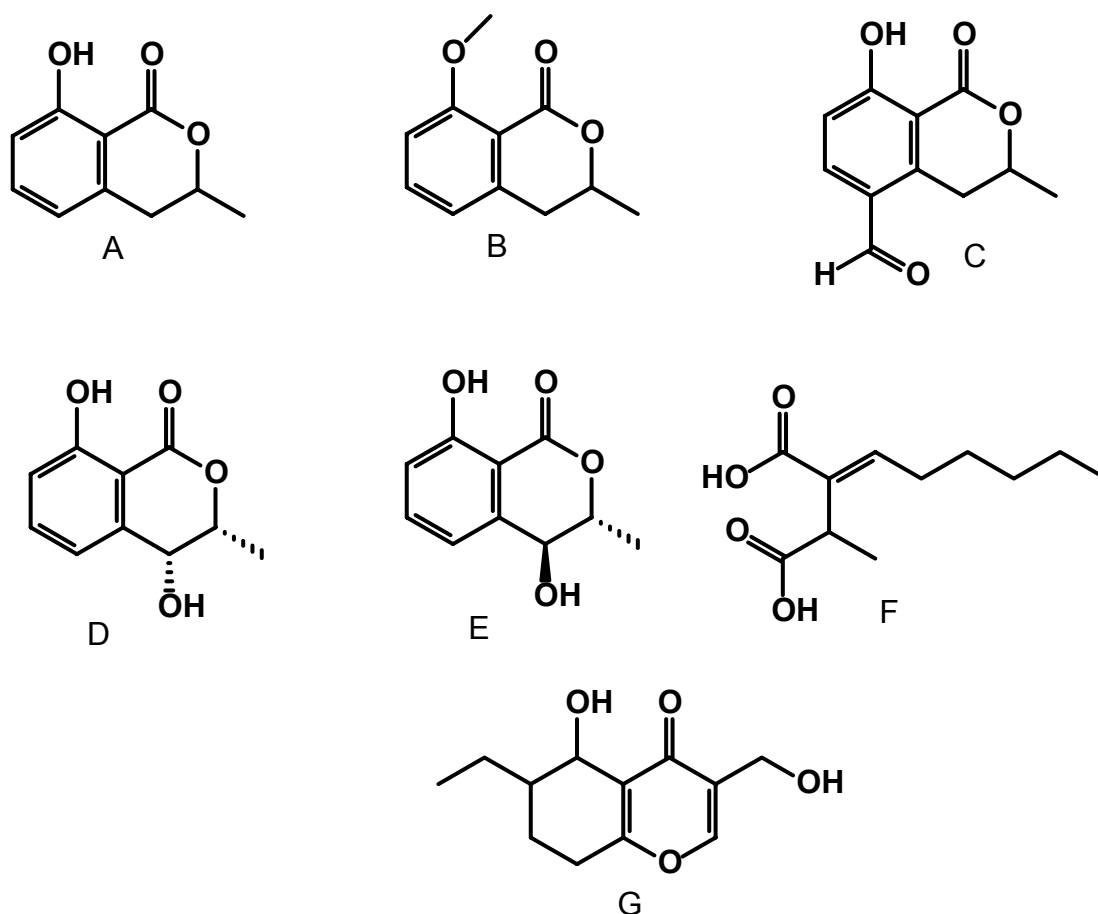


Figura 4.3.1. – Substâncias produzidas por *Xylaria* sp. e isoladas neste trabalho: (A) Meleína, (B) Meleína Metil Éter, (C) 5-Formil-Meleína, (D) 3R,4R-Hidroxi-Meleína, (E) 3R,4S-Hidroxi-Meleína, (F) Ácido Pilifórmico e (G) Diplodiol.

O uso da técnica de GC-MS permitiu ainda a detecção de outros compostos como ácidos graxos e substâncias típicas encontradas em fungos, como o Ergosterol e o Peróxido de Ergosterol. Nos itens seguintes serão discutidas as análises que levaram a elucidação estrutural dos compostos citados com base nos dados obtidos.

4.3.2. Identificação dos metabólitos secundários

4.3.2.1. Frações XM5-15 e XM6-15A – meleína

Devido aos perfis químicos semelhantes constatados por cromatografia em camada delgada (CCD) e aos espectros de ^1H NMR, as frações XM5-15 e XM6-15A foram reunidas, resultando num total de 4,4 mg. O espectro de ^1H NMR, utilizando como solvente o clorofórmio deuterado, CDCl_3 , é ilustrado na Figura 4.3.2.

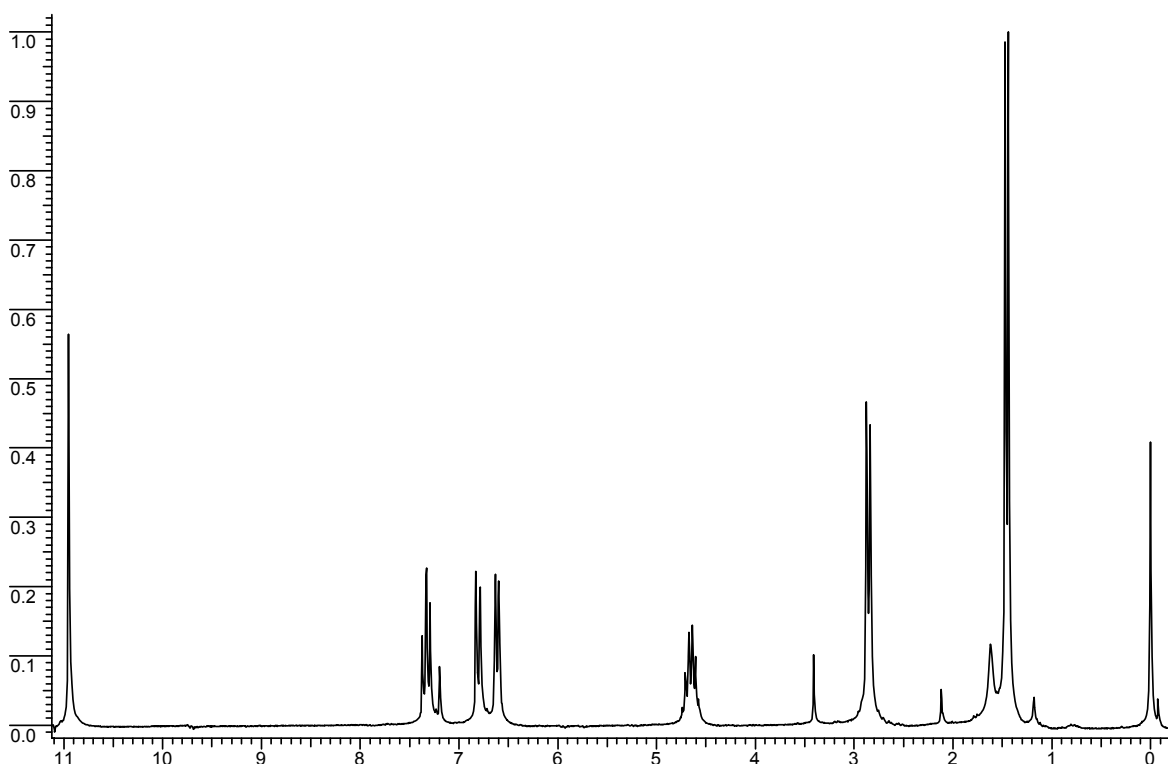


Figura 4.3.2. – Espectro de ^1H NMR da fração XM5-15 e XM6-15A com 200 MHz em CDCl_3 .

Para uma atribuição estrutural mais precisa a amostra presente nas frações XM5-15 e XM6-15A foi submetida a experimentos de COSY e HSQC. Os espectros

obtidos para estes experimentos são mostrados na Figura 4.3.3. e Figura 4.3.4., respectivamente.

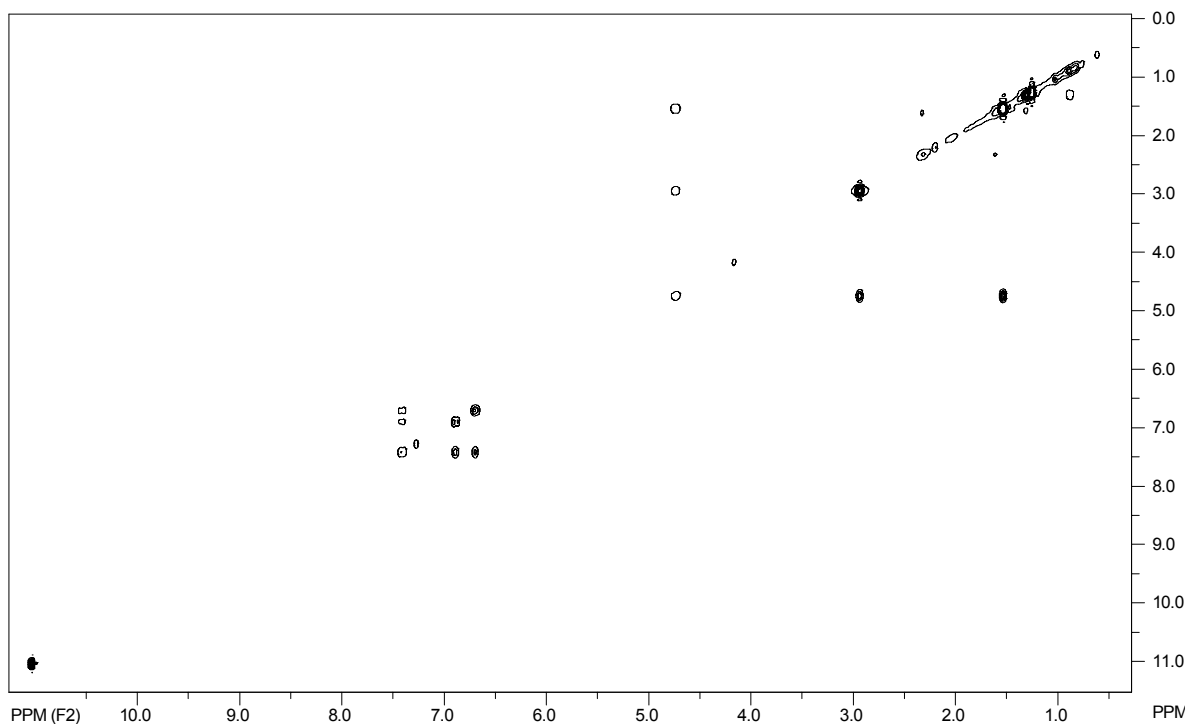


Figura 4.3.3. – Espectro de COSY com 400MHz para as frações XM5-15 e XM6-15A em CDCl_3 .

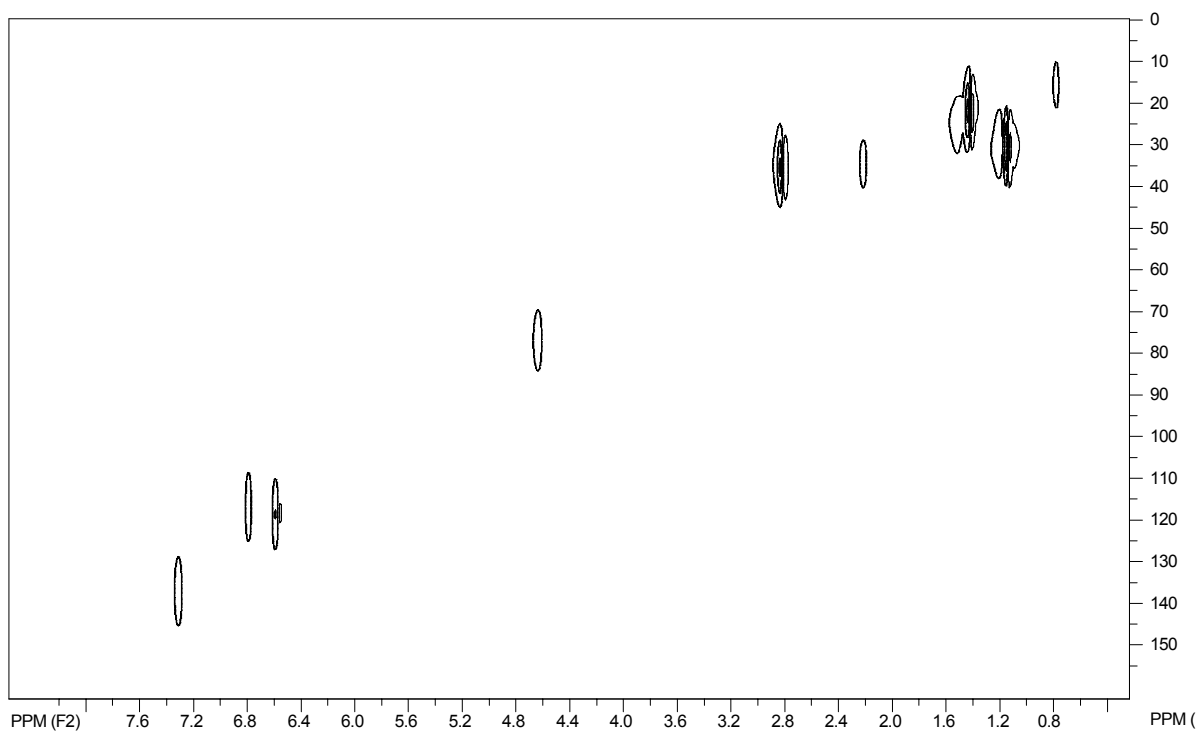


Figura 4.3.4. – Espectro de HSQC com 400MHz para as frações XM5-15 e XM6-15A em CDCl_3 .

Notamos nos espectros (Figura 4.3.2. e Figura 4.3.3.) um sinal bastante deslocado, em 11,05 ppm, como singlete (s), integrando para um hidrogênio, que não mostra acoplamento com nenhum hidrogênio e, de acordo com o HSQC (Figura 4.3.4.), não está se relacionando com nenhum carbono. Com base nestas informações devemos ter hidrogênio quelado (hidroxila), como pode ser observado na Figura 4.3.5.

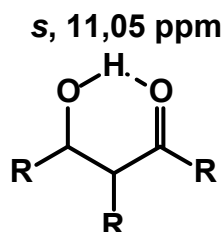


Figura 4.3.5. – Hidrogênio quelado, indicando o deslocamento observado no espectro da Figura 4.3.2.

Na região de aromáticos (Figura 4.3.6.) temos em 7,3 ppm, um duplo-dublete (*dd*), com integração para um hidrogênio e acoplamento com outros dois hidrogênios que, com base nos espectros de ^1H e COSY (Figura 4.3.2. e Figura 4.3.3.), devem estar posições orto a ele, com constantes de acoplamento de 7,4 Hz e 8,4 Hz. Em 6,7 ppm temos um duplo-dublete (*dd*), com constante de acoplamento de 7,4 Hz, típica de acoplamentos em posição orto; outra constante pequena, 0,9 Hz, típica de acoplamento meta. Em 6,9 ppm temos um dubleto-largo (*brd*), acoplado com 8,5 Hz, constante característica de posição orto. Estes sinais, de acordo com o HSQC (Figura 4.3.4.), mostram acoplamento com carbonos aromáticos.

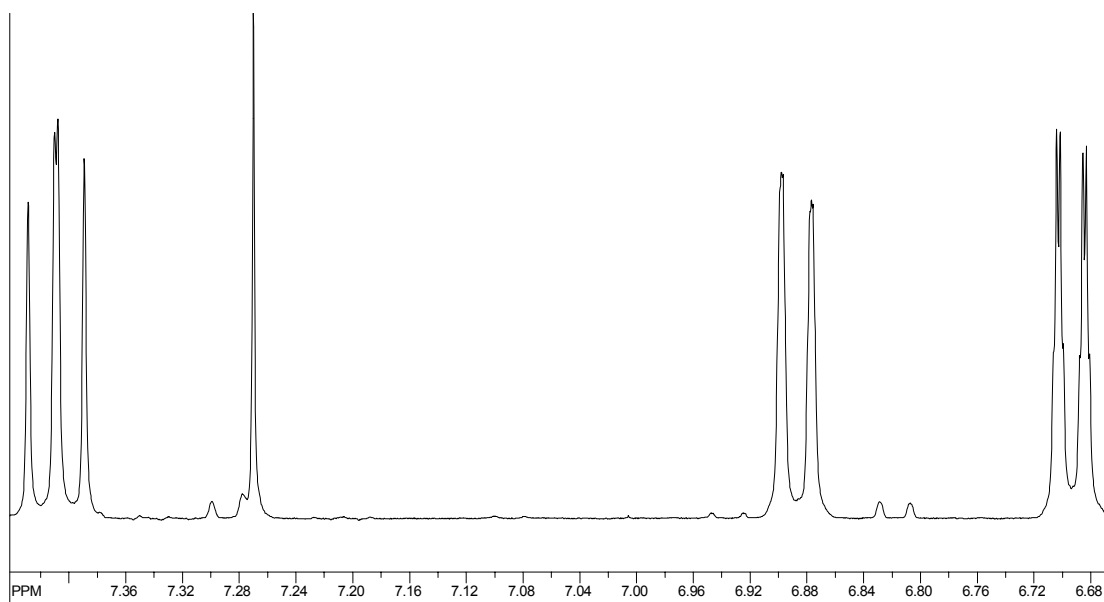


Figura 4.3.6. – Ampliação da região de aromáticos do espectro mostrado na Figura 4.3.2.

A análise da região típica de aromáticos (Figura 4.3.6.) nos levou a um anel tri-substituído, como pode ser observado na Figura.4.3.7.

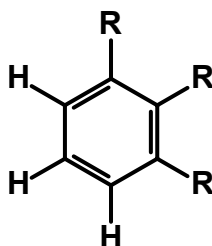


Figura 4.3.7. – Anel aromático presente nas frações XM5-15 e XM6-15A.

Com base nos espectros de ^1H e COSY notamos, em 1,5 ppm, um dupletto (*d*), integrando para três hidrogênios, e com constante de acoplamento de 6,3 Hz, sugerindo a presença de uma metila adjacente a um grupo metílico que, de acordo com seu deslocamento (^1H e HSQC), deve estar ligado a oxigênio. O hidrogênio do grupo metílico é observado como um multipletto (*m*) em 4,7 ppm, integrando para um hidrogênio e acopla com o carbono em 75 ppm. Em 2,9 ppm temos outro dupletto (*d*, $J = 7,3$ Hz), integrando para dois hidrogênios, indicando um grupo metileno que, de acordo com o espectro de COSY, deve estar vizinho ao grupo metílico. O grupo metileno está se relacionando com o carbono em 34 ppm. A reunião destes dados sugere o grupo observado na Figura 4.3.8.

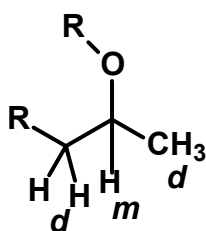


Figura 4.3.8. – Possível grupo presente nas frações XM5-15 e XM6-16A.

A reunião dos dados obtidos e em comparação com a literatura (KROHN *et al.*, 1997, KOKUBUN *et al.*, 2003 e HOLLER, 1999) nos levou a propor a estrutura da 8-hidroxiidrosocumarina ou meleína, mostrada na Figura 4.3.9.

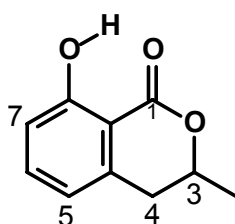


Figura 4.3.9. – Estrutura da 8-hidroxiidrosocumarina ou meleína.

A Tabela 4.3.1. mostra os dados obtidos para a meleína isolada no presente trabalho e dados obtidos na literatura (HOLLER, 1999).

Tabela 4.3.1. – Dados de ^1H NMR para a 8-hidroxiidrosocumarina. Legenda: ^1H = Posição dos hidrogênios, N° H = número de hidrogênios (integração), δ = deslocamento (ppm), Mult. = multiplicidade e J = constante de acoplamento.

| Fração XM5-15 e XM6-15A | | | | | Literatura (HOLLER, 1999) | | | | |
|-------------------------|------|----------------------|-------|----------|---------------------------|------|----------------------|-------|----------|
| ^1H | N° H | $\delta(\text{ppm})$ | Mult. | J (Hz) | ^1H | N° H | $\delta(\text{ppm})$ | Mult. | J (Hz) |
| Me | 3 | 1,5 | d | 6,3 | Me | 3 | 1,54 | d | 6,3 |
| 4 | 2 | 2,9 | d | 7,3 | 4 | 2 | 2,92 | d | 7,3 |
| 3 | 1 | 4,7 | m | - | 3 | 1 | 4,73 | m | - |
| 5 | 1 | 6,7 | dd | 7,4-0,9 | 5 | 1 | 6,68 | dd | 7,4-0,9 |
| 7 | 1 | 6,9 | brd | 8,5 | 7 | 1 | 6,88 | brd | 8,3 |
| 6 | 1 | 7,4 | dd | 7,4-8,4 | 6 | 1 | 7,42 | dd | 7,4-8,3 |
| OH | 1 | 11,05 | s | - | OH | 1 | 11,07 | s | - |

As frações reunidas, XM5-15 e XM6-15A, foram analisadas utilizando a técnica de GC-MS de acordo com o item 3.6.4. O composto identificado como meleína apresentou tempo de retenção de 8,56 minutos e o espectro de massas utilizando ionização por elétrons (EI) é ilustrado na Figura 4.3.10.

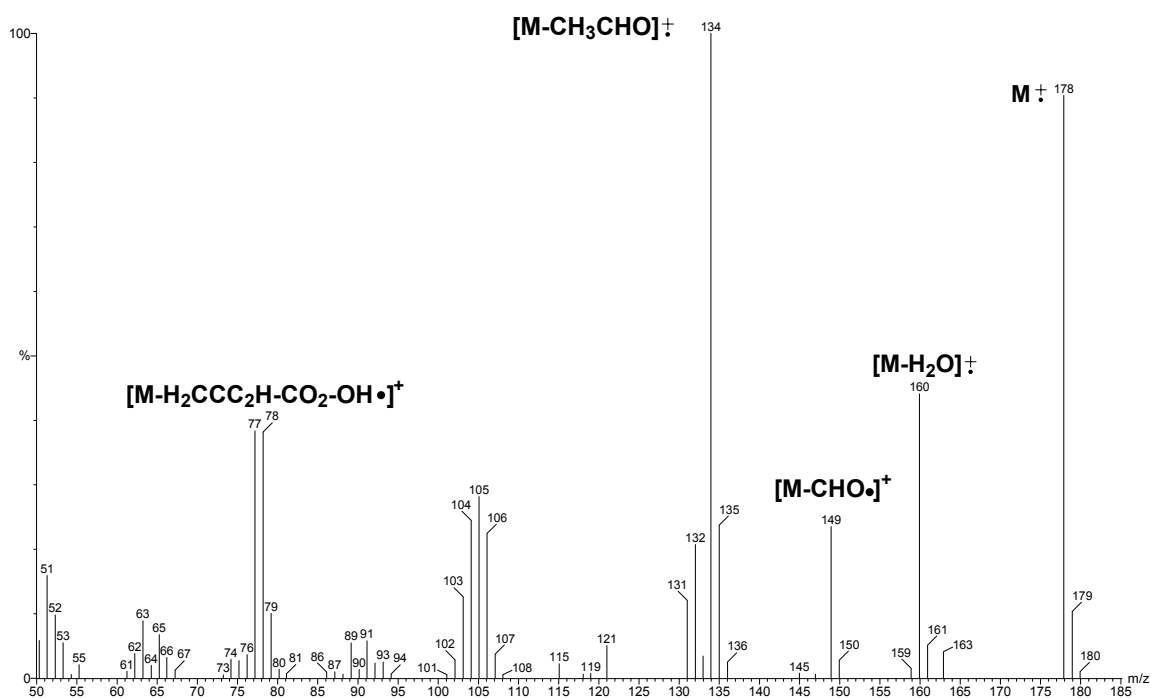


Figura 4.3.10. – Espectro de massas (EI) da Meleína

O espectro mostrado na Figura 4.3.10. permitiu confirmar a estrutura proposta para a meleína, uma vez que íon molecular observado, m/z 178, condiz com a massa molecular da estrutura proposta, $C_{10}H_{10}O_4$. Na Figura 4.3.11. mostramos uma proposta de fragmentação para a molécula isolada.

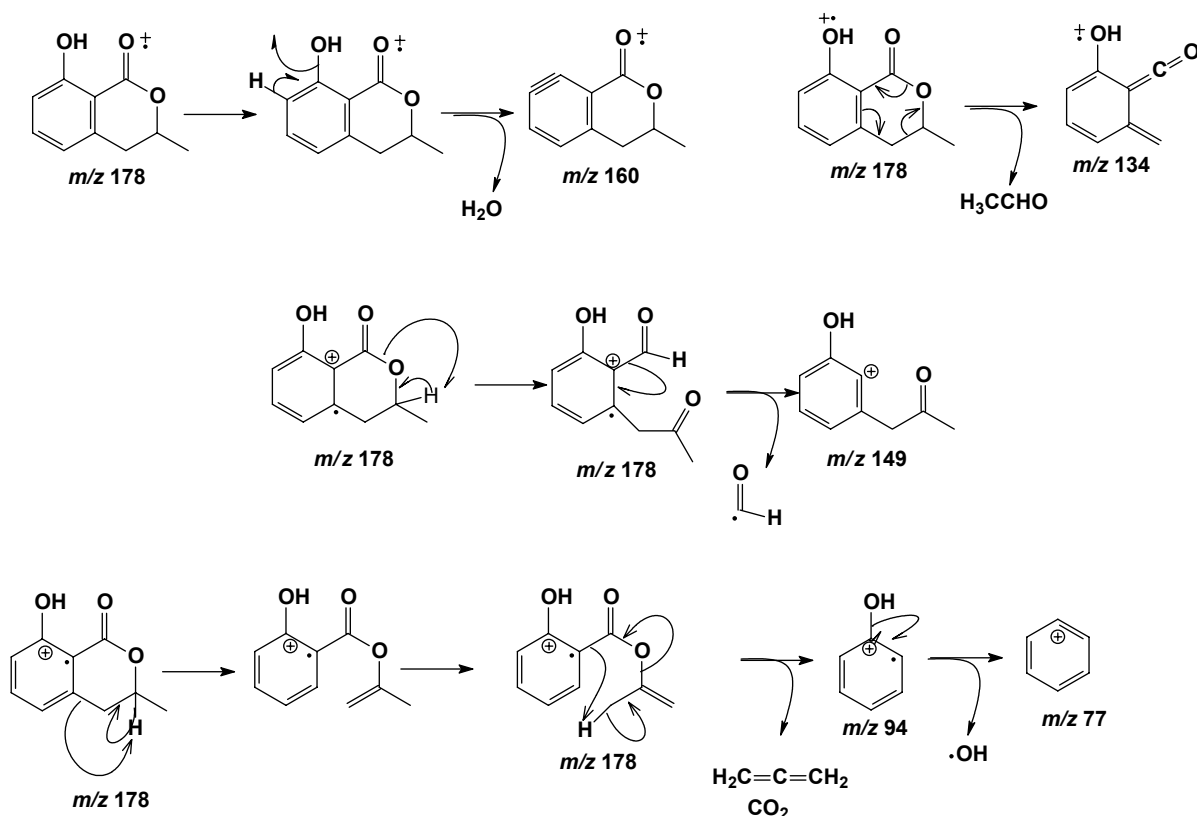


Figura 4.3.11. – Proposta de fragmentação para Meleína.

Com base nos dados obtidos, tanto por NMR e MS, e comparando-os com a literatura, podemos afirmar, com confiança, que a substância presente nas frações XM5-15 e XM6-15A trata-se da 8-hidroxiidroisocumarina, ou simplesmente meleína, um composto pertencente à classe das isocumarinas, sendo encontrado normalmente como metabólito secundário de fungos endofíticos (KROHN *et al.*, 1997).

4.3.2.2. Fração XM-67-12A – meleína metil éter

A análise por TLC da fração XM6-67-12A mostrou grande similaridade com XM5-15 e XM6-15A, tanto em relação ao fator de retenção (R_f) quanto ao aspecto observado na luz ultravioleta (UV – 254 e 306 nm). A quantidade de amostra presente nessa fração foi de 3,5 mg. O espectro de ^1H NMR, utilizando como solvente CDCl_3 , encontra-se ilustrado na Figura 4.3.12.

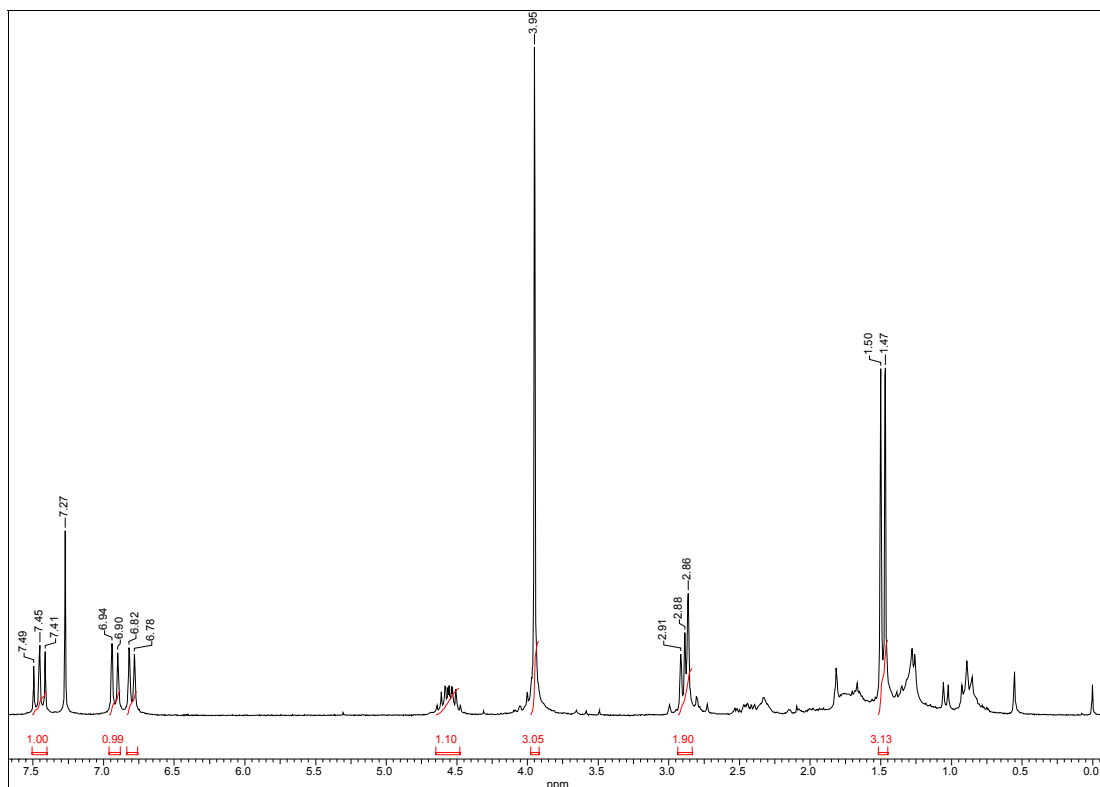


Figura 4.3.12. – Espectro ^1H NMR de XM6-67-12A (200MHz).

O espectro mostrado na Figura 4.3.12. mostrou uma similaridade bastante grande com o espectro da meleína (Figura 4.3.2.) no entanto não notamos no espectro da Figura 4.3.12. o singlete deslocado, próximo de 11 ppm, anteriormente mencionado para a Meleína. Devido ao perfil bastante similar entre os dados obtidos, a presente fração, XM6-67-12A, deveria conter uma substância análoga à meleína, relatada em XM5-15 e XM6-15A. Esse fato pode ser confirmado devido aos sinais presentes na região de hidrogênios aromáticos que apresentam, assim como a meleína, dois dubletos mais blindados, um em 6,80 e outro em 6,92 ppm e um duplo-dublete, mais desblindado, em 7,45 ppm, sendo que todos estes sinais integram para um hidrogênio cada, sugerindo a presença do anel aromático tri-substituído, como para a meleína. Em 1,49 ppm temos um dublete com $J = 6,0$ Hz, integrando para três hidrogênios, indicando a presença de um grupo metila. Com deslocamento de 2,89 ppm temos um multiplete, integrando para dois hidrogênios (metilênicos). Assim como na Meleína, temos um multiplete em 4,60 ppm, integrando para um hidrogênio. Além da ausência do singlete referente à hidroxila quelata, outra diferença observada quando comparamos os dois espectros é a presença de um singlete bastante intenso em 3,97 ppm, que integra para três hidrogênios, região característica de hidrogênios de metoxila. Com base nesses fatos foi atribuída para a

substância presente na fração XM6-67-12A a estrutura ilustrada na Figura 4.3.13., de modo que não foi necessário realizar experimentos de NMR como COSY e HSQC.

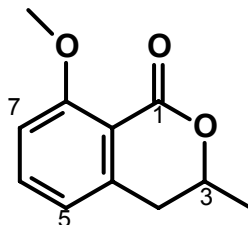


Figura 4.3.13. – Estrutura da substância presente na fração XM6-67-12A.

O composto mostrado na Figura 4.3.13. denomina-se meleína metil éter, sendo relatada por DIMITRIADIS (1997) e, como dito anteriormente, trata-se de um análogo da meleína (Figura 4.3.9.). Na Tabela 4.3.2. são apresentados os dados de ^1H NMR do composto isolado encontrados na literatura.

Tabela 4.3.2. – Dados de ^1H NMR para a meleína metil éter. Legenda: ^1H = posição, nº H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), Mult. = multiplicidade e J = constante de acoplamento.

| Fração XM6-67-12A | | | | | Literatura (DIMITRIADIS, 1997) | | | | |
|-------------------|------|----------------------|-------|----------|--------------------------------|------|----------------------|-------|----------|
| ^1H | Nº H | $\delta(\text{ppm})$ | Mult. | J (Hz) | ^1H | Nº H | $\delta(\text{ppm})$ | Mult. | J (Hz) |
| 3-Me | 3 | 1,49 | d | 6,0 | 3-Me | 3 | 1,48 | d | 6,1 |
| 4 | 2 | 2,82 | m | - | 4 | 2 | 2,87 | m | - |
| 3 | 1 | 4,52 | m | - | 3 | 1 | 4,55 | m | - |
| 5 | 1 | 6,80 | d | 7,3 | 5 | 1 | 6,80 | d | 7,3 |
| 7 | 1 | 6,92 | d | 8,5 | 7 | 1 | 6,92 | d | 8,5 |
| 6 | 1 | 7,45 | dd | 7,3-8,5 | 6 | 1 | 7,45 | m | - |
| OMe | 3 | 3,97 | s | - | OMe | 3 | 3,95 | s | - |

Para comprovar massa da estrutura proposta foi realizado experimentos de GC-MS, conforme as condições descritas no item 3.6.4. O cromatograma de íons totais obtido apresentou uma única banda, com tempo de retenção de 9,12 minutos. O

espectro de massas obtido para a banda em questão encontra-se ilustrado na Figura 4.3.14.

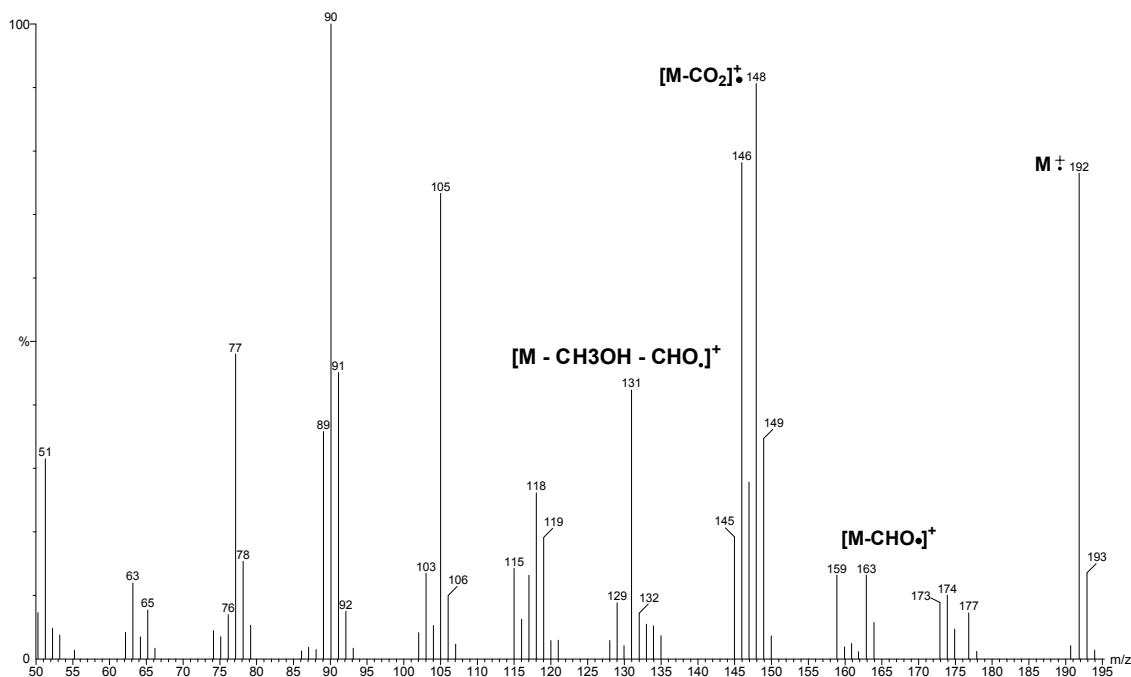


Figura 4.3.14. – Espectro de massas da meleína metil éter, presente em XM6-67-12A.

A massa referente ao íon-molecular (M^+), m/z 192, comprova a fórmula molecular da estrutura proposta, $C_{11}H_{12}O_3$. Efetuamos uma proposta de fragmentação para a meleína metil éter, tal proposta é ilustrada na Figura 4.3.15.

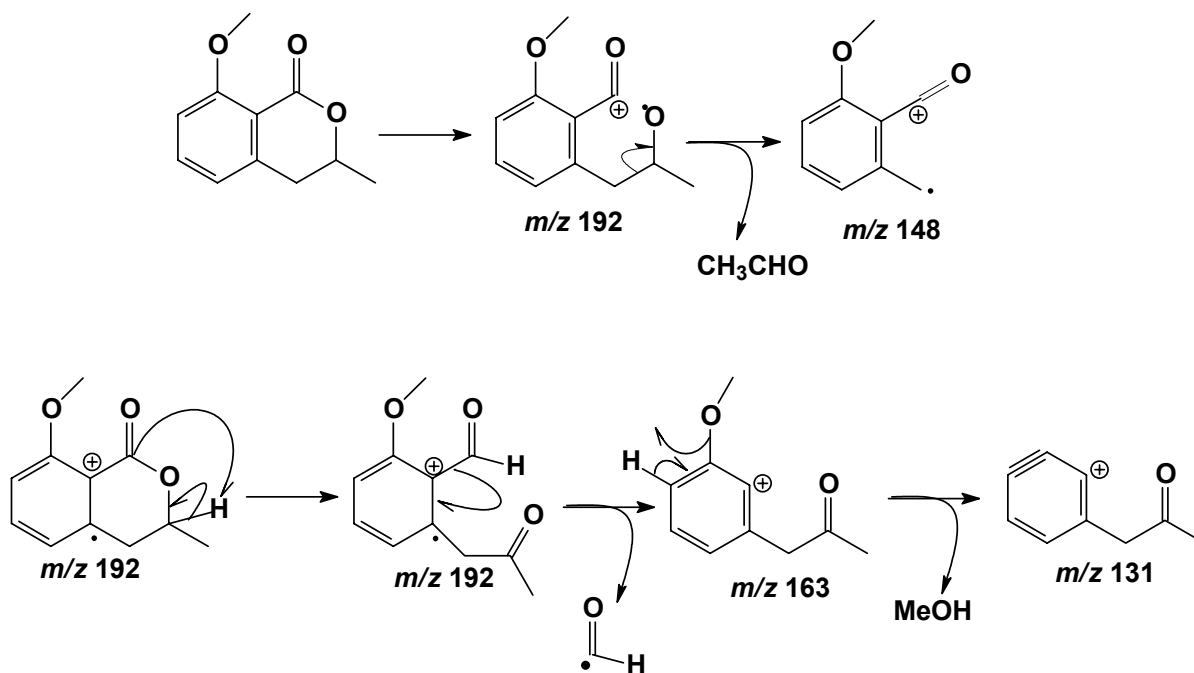


Figura 4.3.15. – Proposta de Fragmentação para a meleína metil éter.

Com base nos dados obtidos, MS e NMR e, em comparação com os dados da literatura (DIMITRIADIS, 1997 e DEVYS *et al.*, 1980), foi possível a confirmação da estrutura referente à substância presente na fração XM6-67-12A como sendo a 3-metil-3-metoxi-8diidroisocumarina ou simplesmente meleína metil éter. Esta substância foi anteriormente isolada por DEVYS *et al.* (1980) do fungo fitopatogêno *Septoria nodorum* juntamente com a Meleína e outros análogos.

4.3.2.3. Frações XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B – 5-formil-meleína

Devido ao perfil cromatográfico semelhante, as frações XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B, foram reunidas resultando em um total de 4,1 mg de amostra. O espectro de ^1H NMR, utilizando como solvente CDCl_3 , encontra-se ilustrado na Figura 4.3.16.

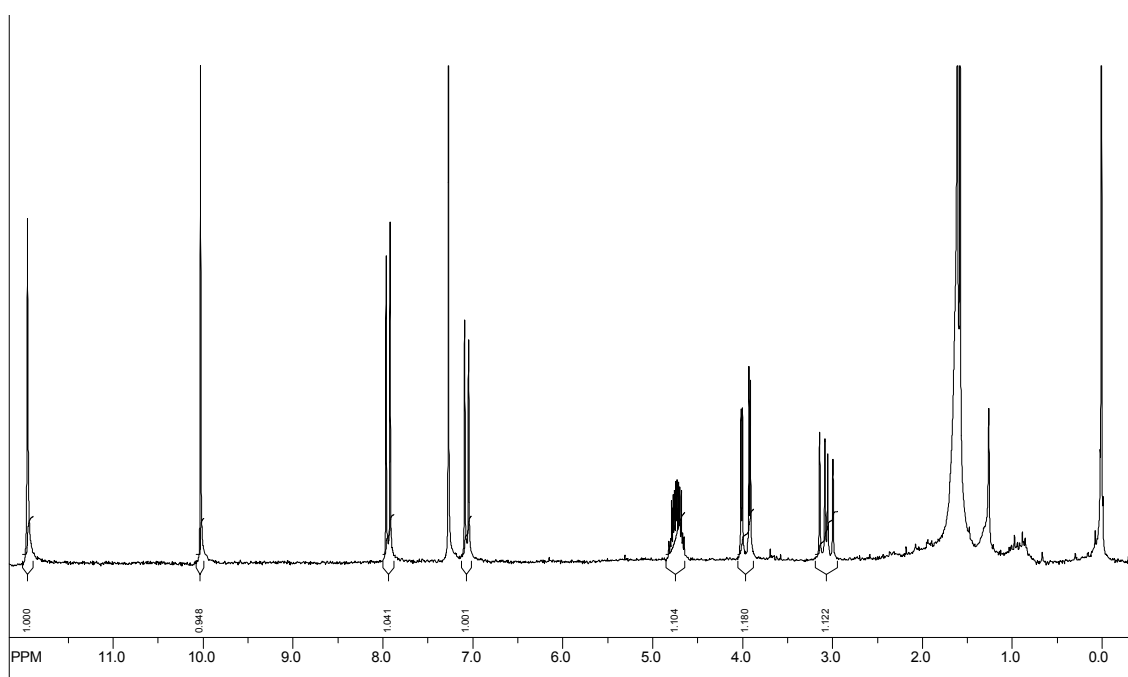


Figura 4.3.16. – Espectro de ^1H NMR das frações XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B.

O espectro mostrado na Figura 4.3.16. apresentou semelhança com o espectro referente a meleína, no entanto temos aqui dois singletos bastante desblindados, um em 11,95 ppm e outro em 10,02 ppm, integrando para um hidrogênio cada. Este fato sugere a presença de um outro hidrogênio quelado, ou ainda um grupo aldeído na molécula. Na região de aromáticos temos agora apenas dois sinais, em 7,94 e 7,07 ppm, referentes a um hidrogênio cada, sendo que cada

sinal é observado como dubleto (*d*), o primeiro com $J = 8,60$ Hz, o segundo com $J = 8,64$ Hz, sugerindo que estão em posição orto entre si. Em 4,74 ppm temos um multiplete, que integra para um hidrogênio, notamos um sinal similar, tanto em relação à multiplicidade quanto ao deslocamento, no espectro da meleína (Figura 4.3.9.), tal sinal é oriundo do grupo metílico. Temos outros dois sinais, ambos integrando para um hidrogênio, o primeiro em 3,96 ppm como um duplo-dubleto (*dd*), acoplado com $J = 3,29$ e $17,95$ Hz; o segundo em 3,10 ppm como outro *dd*, esse com $J = 11,82$ e $17,88$ Hz. A constante de acoplamento elevada para estes dois últimos sinais (de 17 Hz) sugere o acoplamento de hidrogênios geminais. O sinal mais blindado no espectro é um dubleto (*d*), que integra para três hidrogênios, com $J = 1,59$ Hz, referente à metila vizinha ao grupo metílico. Para ajudar na determinação estrutural foi realizado experimento de GC-MS para a amostra em questão. O espectro de massas é observado na Figura 4.3.17.

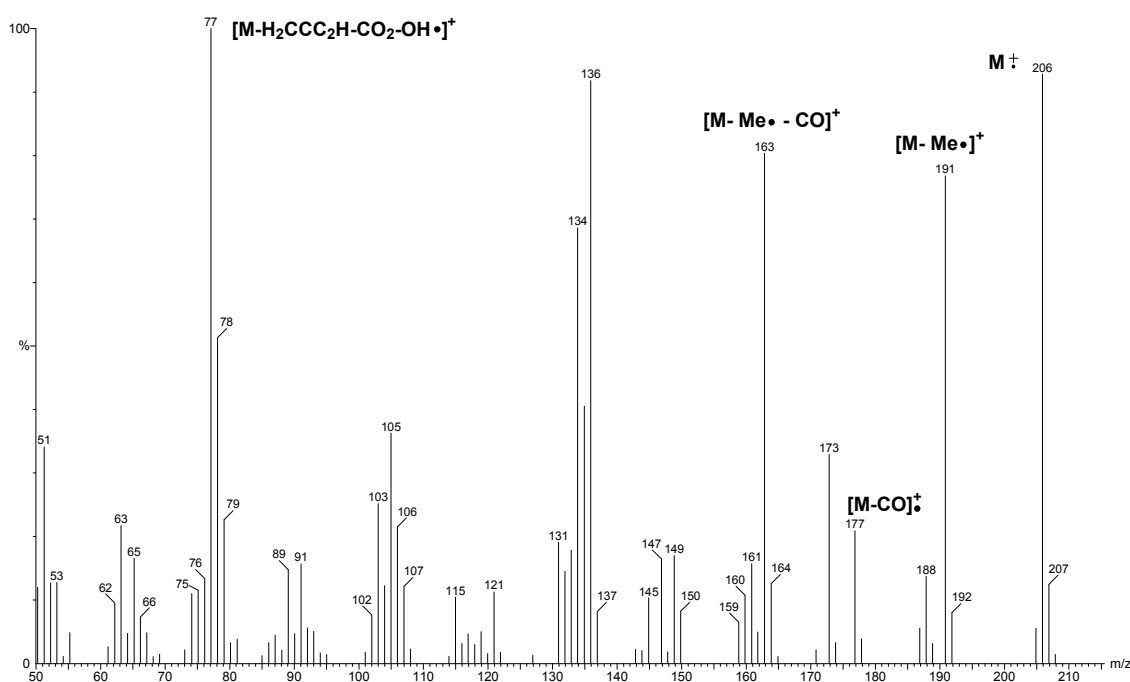


Figura 4.3.17. – Espectro de massas da fração XM6-31-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B.

O espectro mostrado na Figura 4.3.17. refere-se à única banda cromatográfica observado no cromatograma, com tempo de retenção de 12,18 minutos. Baseando-se no espectro, observamos o íon molecular com m/z 206, referindo-se, possivelmente, a 178 Da (massa da meleína) adicionado de 28 u.m.a. (referente à C=O). Essa suposição pode ser atribuída a um grupo aldeído, como já

foi sugerido no início desta discussão. Duas possíveis estruturas, devido aos sinais na região de aromáticos, são mostradas na Figura 4.3.18.

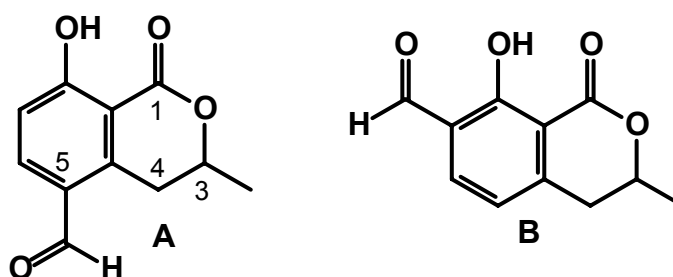


Figura 4.3.18. – Possíveis estruturas para as frações XM6-21-5-4, XM7-5-6 e XL7-8B.

A estrutura mostrada Figura 4.3.18.A é mais plausível para o composto presente nas frações em questão, uma vez que, devido à atuação do cone de proteção da carbonila do aldeído na posição 5 temos dois duplos-dubletos, com deslocamentos diferentes, em 3,10 e 3,96 ppm. A substância em questão recebe o nome de 5-formil-meleína, sendo relatada por BRAZ-FO *et al.* (1978). Não há relatos na literatura da substância ilustrada na Figura 4.3.18B. Na Tabela 4.3.3. são mostrados os dados deste composto obtido neste trabalho e na literatura.

Tabela 4.3.3. – Dados de ^1H NMR para a 5-formil-meleína. Legenda: ^1H = Posição, N° H = número de hidrogênios, δ . = deslocamento (ppm), Mult. = multiplicidade e J = constante de acoplamento.

| Fração XM6-31-5-4 | | | | | Literatura (BRAZ-FO <i>et al.</i> , 1978) | | | | |
|-------------------|------|--------------|-----------|-----------------|---|------|--------------|-----------|----------|
| ^1H | N° H | δ ppm | Mult | J (Hz) | ^1H | N° H | δ ppm | Mult. | J (Hz) |
| 3-Me | 3 | 1,59 | <i>d</i> | 6,31 | 3-Me | 3 | 1,60 | <i>d</i> | 6 |
| 3 | 1 | 4,74 | <i>m</i> | - | 3 | 1 | 4,75 | <i>m</i> | - |
| 4ax | 1 | 3,10 | <i>dd</i> | 17,88; 11,82 | 4ax | 1 | 3,31 | <i>dd</i> | 18; 10 |
| 4eq | 1 | 3,96 | <i>dd</i> | 3,29; 17,95 | 4eq | 1 | 4,00 | <i>dd</i> | 18; 4 |
| 6 | 1 | 7,94 | <i>d</i> | 8,60 | 6 | 1 | 7,95 | <i>d</i> | 8 |
| 7 | 1 | 7,07 | <i>d</i> | 8,64 | 7 | 1 | 7,07 | <i>d</i> | 8 |
| CHO | 1 | 10,02 | <i>s</i> | - | CHO | 1 | 10,01 | <i>s</i> | - |
| OH | 1 | 11,95 | <i>s</i> | - | OH | 1 | 12,03 | <i>s</i> | - |

A proposta de fragmentação para a 5-formil-meleína é ilustrado na Figura 4.3.19.

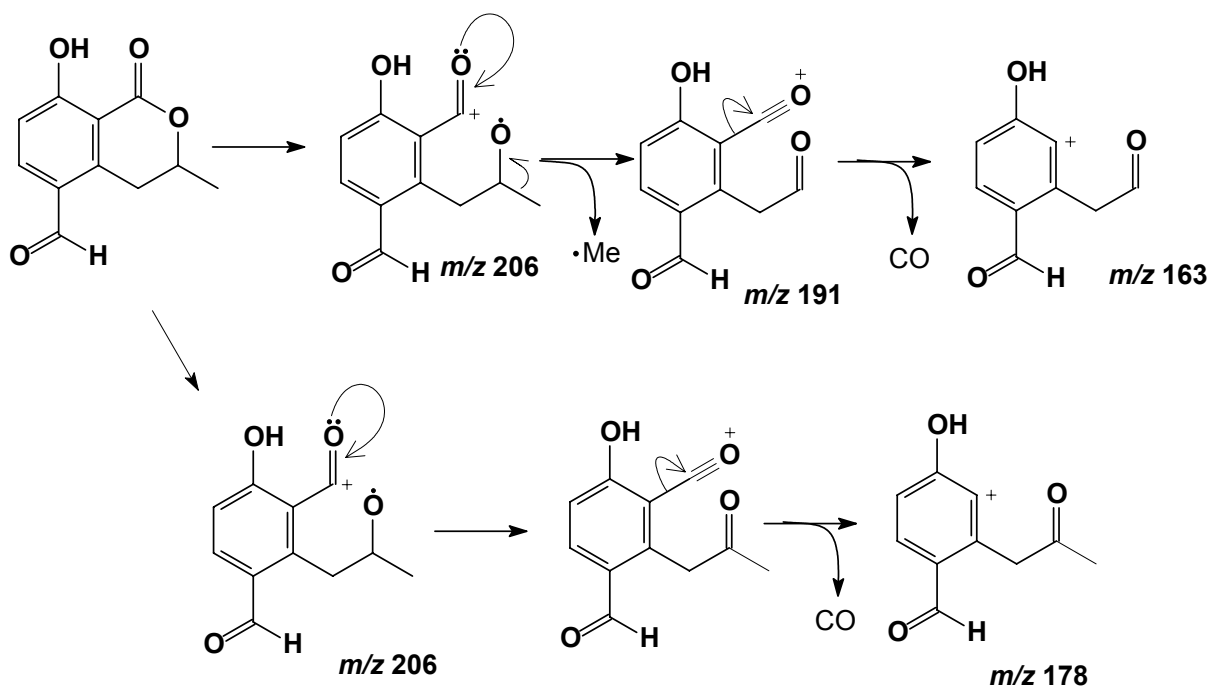


Figura 4.3.19. – Proposta de fragmentação para a 5-formil-meleína.

De acordo com os dados obtidos e devido a enorme similaridade com as informações da literatura (BRAZ-FO *et al.*, 1978) podemos afirmar que a estrutura em questão é, sem dúvida, a 5-Formil-Meleína.

4.3.2.4. Frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4 – 4-hidroxi-meleína

As frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4 apresentaram elevado grau de pureza em TLC, os tempos de retenção observados para as amostras em questão foram idênticos, viabilizando a reunião destas frações e resultando em um total de 12 mg. O espectro de ^1H NMR é mostrado na Figura 4.3.20., utilizando como solvente CDCl_3 .

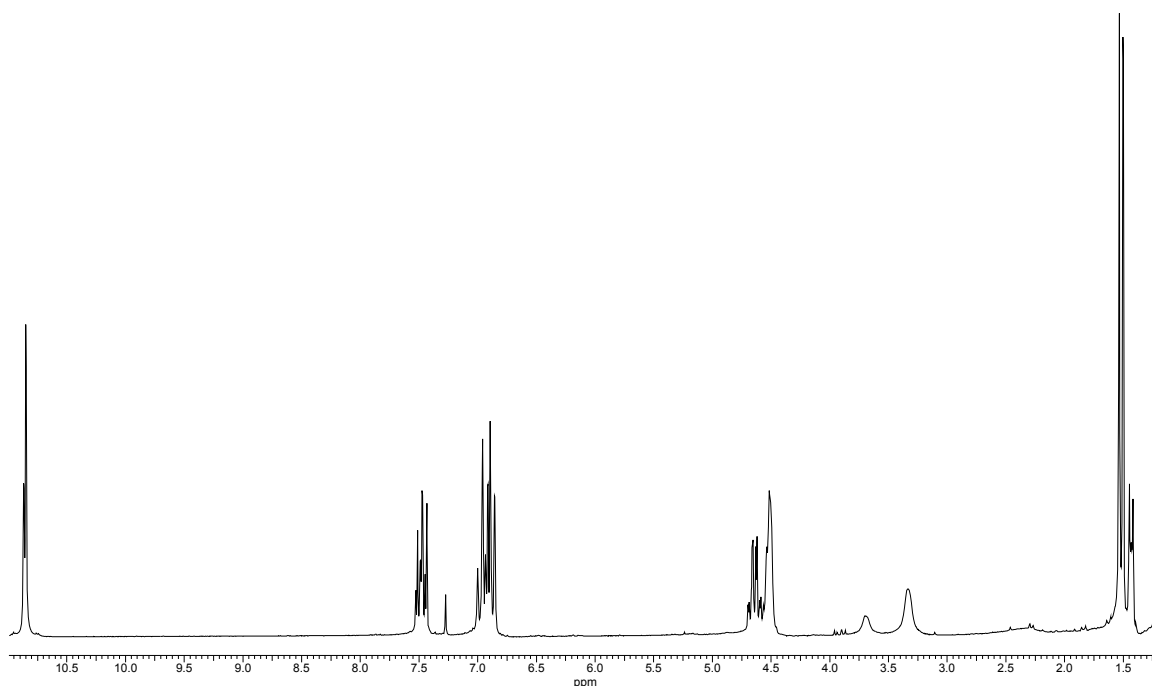


Figura 4.3.20. – Espectro de ^1H NMR das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4

Observando o espectro da Figura 4.3.20. notamos uma grande similaridade com o espectro da meleína, Figura 4.3.2., principalmente devido ao sinal bastante desblindado, próximo de 11 ppm, e ao perfil referente à região de aromáticos. De modo que devemos encontrar nestas frações outro composto análogo à meleína. Quando temos uma expansão das regiões citadas verificamos que tais sinais encontram-se duplicados, como mostrado na Figura 4.3.21.

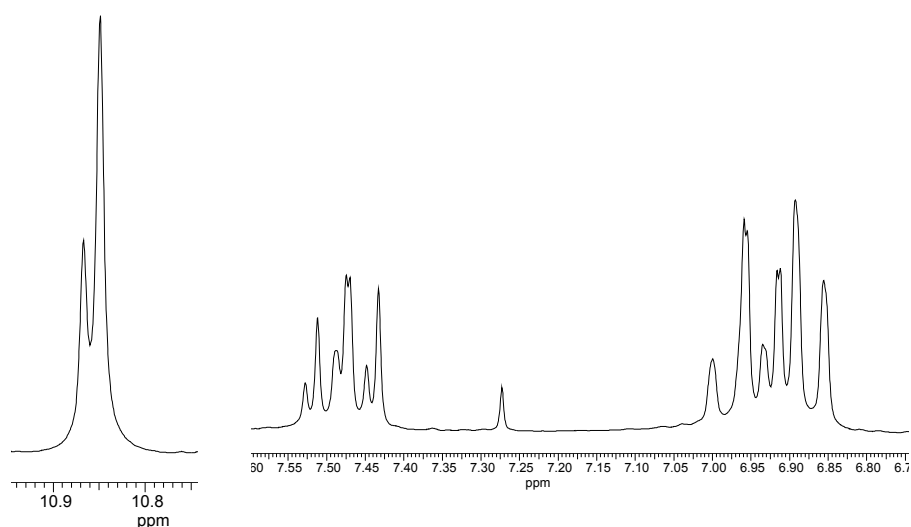


Figura 4.3.21. – Ampliação de duas regiões do espectro de ^1H NMR das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4, destacando a duplicação dos sinais.

A presença destes sinais duplicados sugeriu que nestas temos a ocorrência de uma mistura epimérica. Para chegar a uma conclusão perante esta hipótese foi realizada análise por HPLC, utilizando o equipamento descrito no item 3.2. e uma coluna Synergy ODS, Phenomenex. Os eluentes usados foram água (A) e acetonitrila (B), com gradiente de 25 a 100% de B em 50 minutos, com vazão de 1mL/min. O cromatograma obtido, com o gradiente utilizado, e os espectros de UV (em 310 nm) são mostrados na Figura 4.3.22.

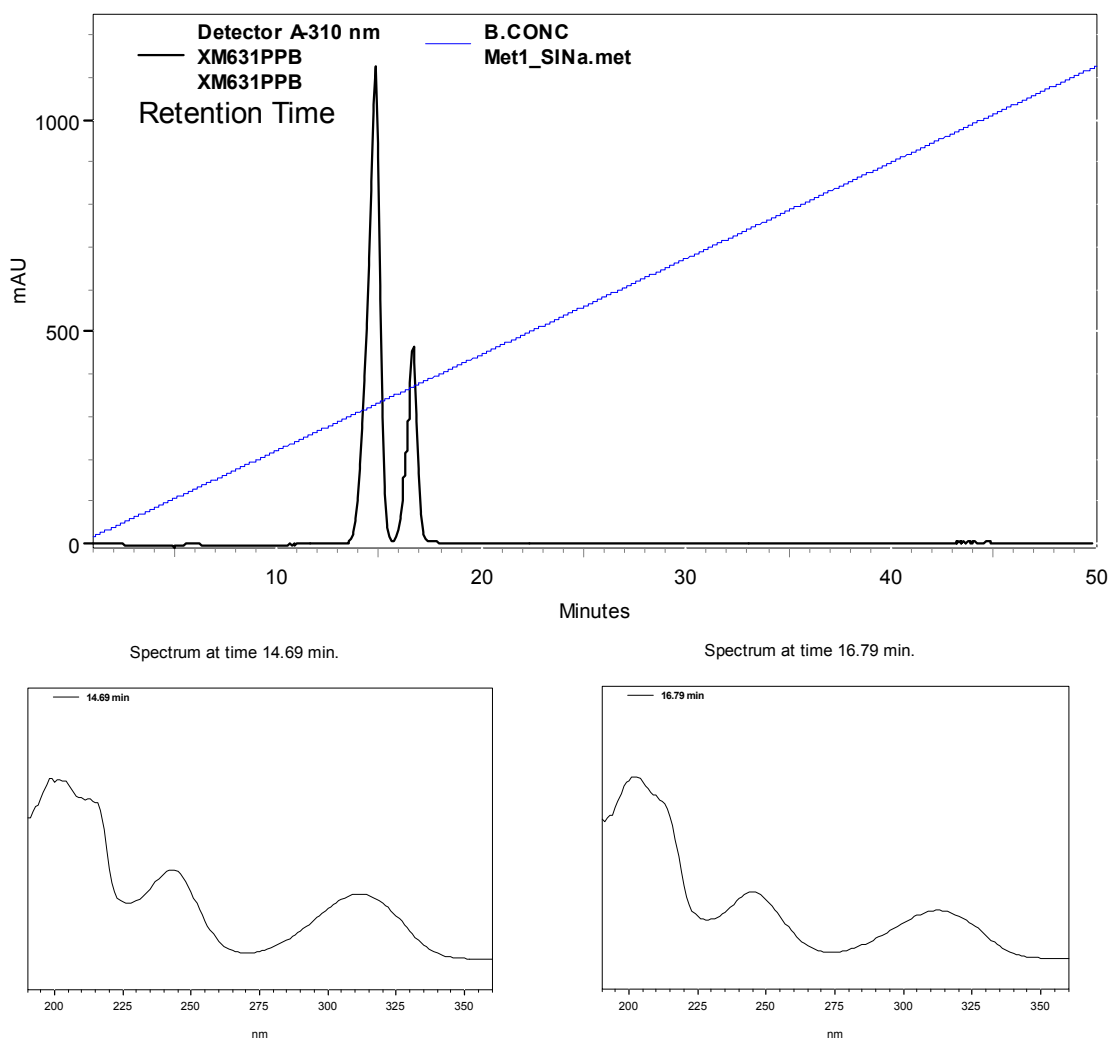


Figura 4.3.22. – Cromatograma e espectros de UV das bandas observadas no cromatograma das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4.

A análise realizada indicou a presença de duas substâncias nas frações em questão. Notamos uma grande similaridade entre os espectros de UV mostrados na Figura 4.3.22. sustentando a hipótese de que temos uma mistura de epímeros. Com

o intuito de separá-las partimos para o uso do HPLC preparativo, conforme descrito no item 3.2., utilizando uma coluna semi-preparativa Waters u-Bondapak C-18, a fase móvel sendo H₂O-Acetonitrila (75:25), com vazão de 3 mL/min. As duas frações foram coletadas e denominadas XM6-PPB-1 (7,2 mg) e XM6-PPB-2 (3,4 mg), os espectros de ¹H NMR destas amostras são mostrados na Figura 4.3.23. A e B, respectivamente.

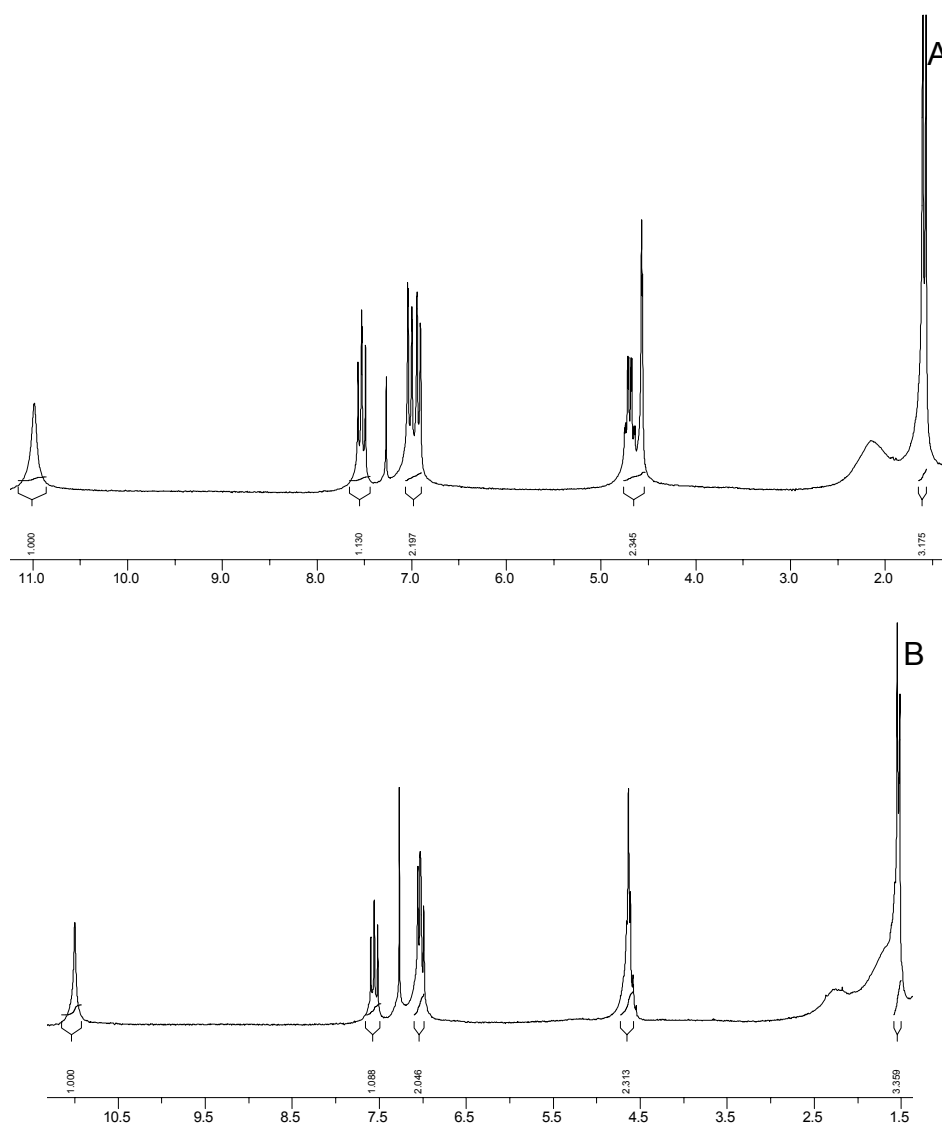


Figura 4.3.23. – Espectro de H1 NMR das amostras (A) XM6-PPB-1 e (B) XM6-PPB-2.

Analisando os espectros mostrados na Figura 4.3.23.(A) e (B) podemos concluir que temos uma mistura epimérica, no entanto notamos algumas diferenças, principalmente na região próxima de 4,5 ppm. Quando comparamos estes espectros com o referente à meleína (Figura 4.3.2.) notamos a ausência do dubleto em 2,9 ppm, referentes ao grupo metileno. Tal fato sugeriu que temos uma substituição de um

dos prótons desse grupo por algum outro substituinte, o que comprova a ocorrência de uma possível mistura epimérica. Uma busca na literatura mostrou que a 4-hidroxi-meleína possui sinais com deslocamentos similares aos observados para as amostras em questão, outro fato interessante é que os epímeros da 4-hidroxi-meleína são, normalmente, isolados juntamente com a meleína (DIMITRIADIS *et al.*, 1997, KOKUBUN *et al.*, 2003, MOORE *et al.*, 1972).

Para auxiliar na elucidação estrutural destes compostos foi realizado experimentos de GC-MS. A análise da amostra contendo a mistura epimérica seria suficiente para fornecer a informação referente à massa molecular dos compostos, no entanto, o fato surpreendente foi que cromatograma fornecido a partir da técnica de GC-MS resultou em apenas uma banda cromatográfica, como pode ser verificado na Figura 4.3.24.

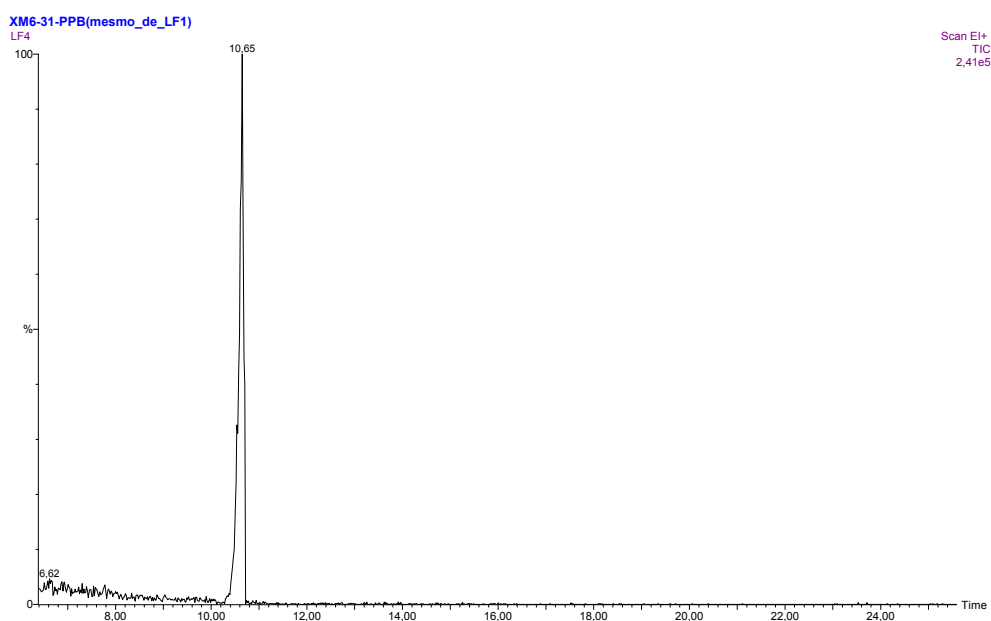


Figura 4.3.24. – Cromatograma da amostra contendo a mistura epimérica, mostrando, surpreendentemente, apenas uma banda cromatográfica.

Para confirmar a presença de uma mistura epimérica e obter a separação cromatográfica dos componentes da mistura, foi realizada uma reação de sililação. Tal reação promove a substituição da hidroxila não quelada por um grupo trimetilsilano (TMS), mais volumoso. O produto desta reação foi analisado por GC-MS e o cromatograma é mostrado na Figura 4.3.25.

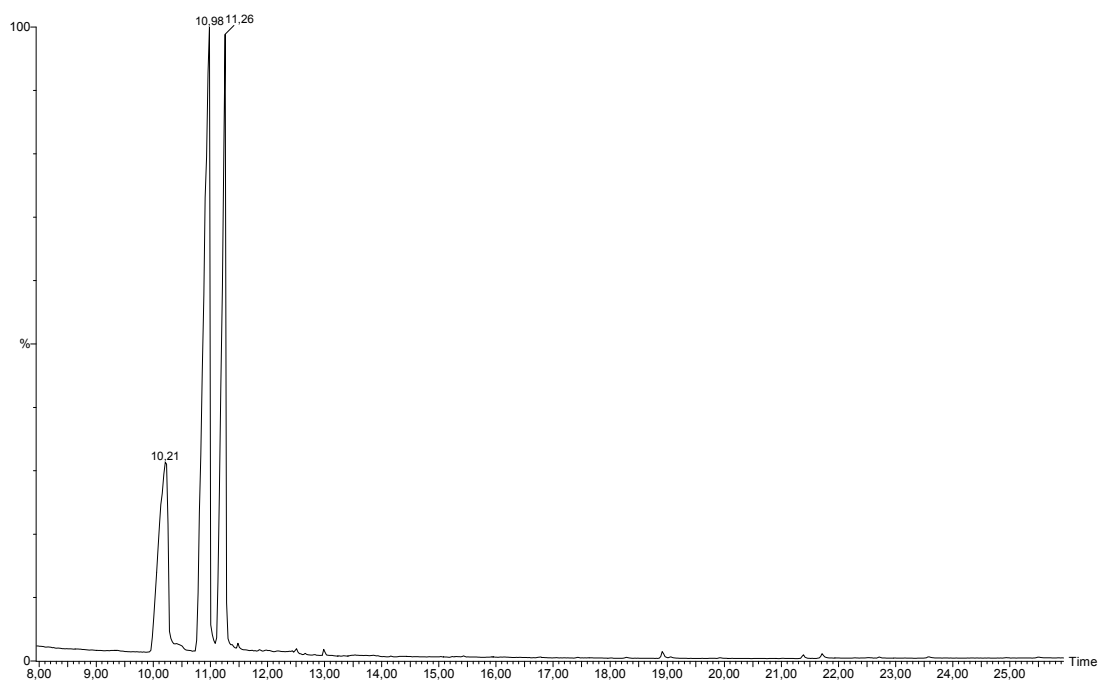


Figura 4.3.25. – Cromatograma da amostra após a reação de sililação, mostrando duas bandas cromatográficas, além do material de partida (10,21 min.)

Na Figura 4.3.25. temos o cromatograma da amostra contendo os epímeros após a reação de derivação. Notamos a presença de três bandas, uma referente ao material de partida (em 10,21 min), as outras duas bandas (10,98 e 11,26 min.) são referentes aos dois isômeros, que após a reação de sililação eluem em tempos de retenção diferentes. Tal separação só foi possível, provavelmente, devido à substituição da hidroxila não quelada por um grupo mais volumoso, como já citado anteriormente. Os espectros de massas das duas bandas, em 10,98 e 11,26 minutos, referentes aos isômeros após a reação de sililação são mostrados na Figura 4.3.26. (A) e (B) respectivamente.

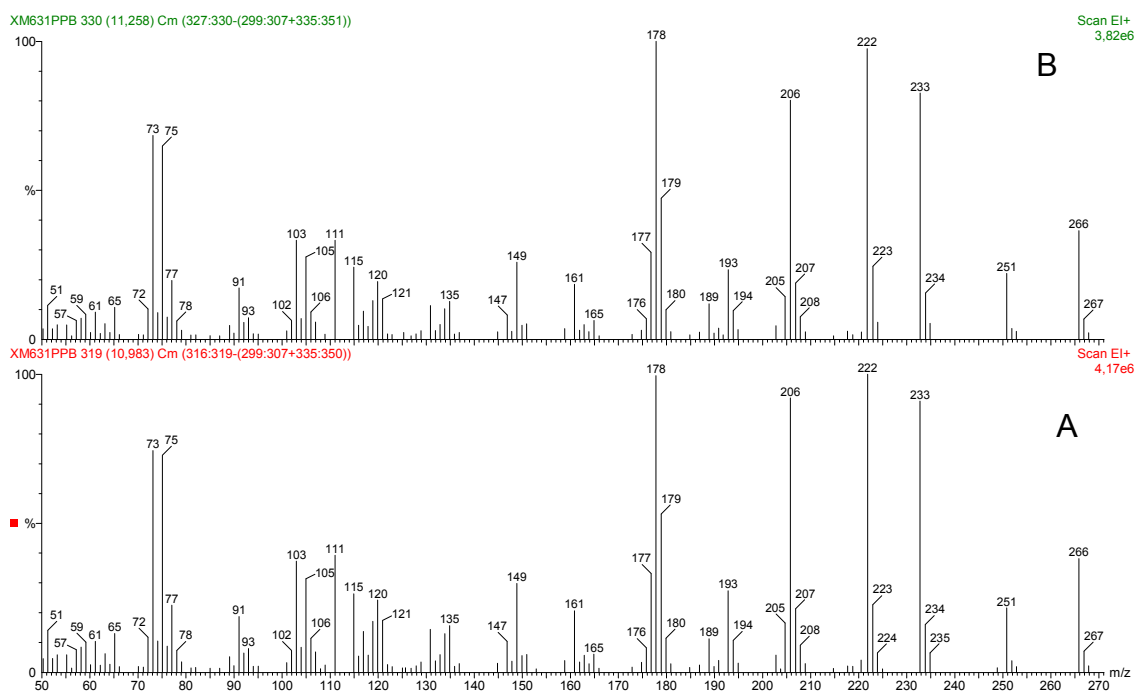


Figura 4.3.26. – Espectro de massas dos epímeros siliados analisados por GC-MS

A grande similaridade observada entre os dois espectros mostrados na Figura 4.26., comprova, mais uma vez, que temos uma mistura de epímeros na amostra, sendo as únicas diferenças a intensidade de alguns íons, como por exemplo, no espectro mostrado na Figura 4.3.26.A, onde o íon de m/z 206 aparece com intensidade um pouco maior do que observado na Figura 4.3.26.B. Para obtermos uma informação referente à massa real dos compostos (antes da reação de silição) verificamos o espectro de massas (Figura 4.3.27.) da banda cromatográfica do material de partida, antes da reação.

Amostra XM6-31-PPB, 08-05-2006, 3 uL, por LF

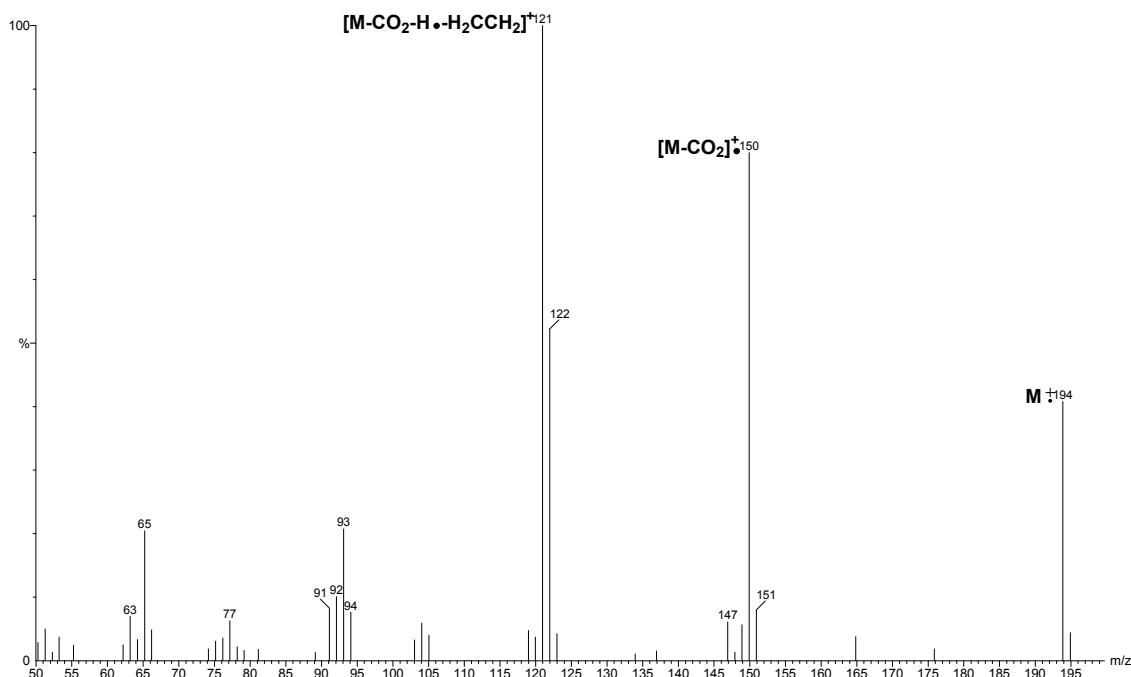


Figura 4.3.27. – Espectro de massas da mistura de epímeros encontrado nas frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4.

Os dados fornecidos pelos espectros da Figura 4.3.23., juntamente com os espectros de massas fornecidos por GC-MS (Figura 4.3.24. (A) e (B) e Figura 4.3.27.) levaram a confirmação da presença da mistura epimérica da 4-hidroxi-meleína (Figura 4.3.28.).

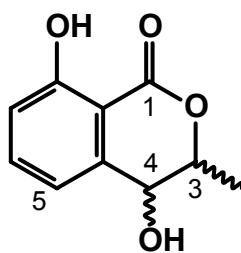


Figura 4.3.28. – Esqueleto da 4-hidroxi-meleína.

Para determinarmos a estrutura, com a conformação exata dos epímeros isolados, realizamos experimentos de α_D , utilizando um polarímetro Perkin-Elmer 241 Polarimeter, com soluções de concentração 2 mg/mL, e comparamos com dados da literatura (HOLLER, 1999). A Tabela 4.3.4. mostra os dados de ^1H NMR da fração XM6-PPB-1 (espectro de ^1H NMR mostrado na Figura 4.3.23. A) e os dados da 3R,4R - hidroxi-meleína.

Tabela 4.3.4. – Dados de ^1H NMR para a 3R,4R-hidroxi-meleína. Legenda: ^1H = posição, n° H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), Mult. = multiplicidade, J = constante de acoplamento e OH_{quel} = hidroxila quelada.

| Fração XM6-PPB-1 | | | | | Literatura (HOLLER, 1999) | | | | |
|---|------|----------|-----------|-------------|--|------|----------|-----------|-----------|
| ^1H | N° H | δ | Mult | J (Hz) | ^1H | N° H | δ | Mult. | J (Hz) |
| 3-Me | 3 | 1,59 | <i>d</i> | 6,62 | 3-Me | 3 | 1,60 | <i>d</i> | 6,6 |
| 3 | 1 | 4,70 | <i>dq</i> | 6,61 - 2,01 | 3 | 1 | 4,72 | <i>dq</i> | 6,6 – 1,8 |
| 4 | 1 | 4,57 | <i>d</i> | 1,99 | 4 | 1 | 4,58 | <i>d</i> | 1,8 |
| 5 | 1 | 6,92 | <i>dd</i> | 7,28 | 5 | 1 | 6,94 | <i>dd</i> | 7,4 |
| 6 | 1 | 7,53 | <i>dd</i> | 7,31 – 8,50 | 6 | 1 | 7,54 | <i>dd</i> | 7,4 – 8,5 |
| 7 | 1 | 7,02 | <i>d</i> | 8,50 – 0,98 | 7 | 1 | 7,04 | <i>d</i> | 8,5 – 1,0 |
| OH_{quel} | 1 | 10,9 | <i>s</i> | - | OH_{quel} | 1 | 11,02 | <i>s</i> | - |
| $\alpha_{\text{D}} = -32,17^\circ$ (MeOH) | | | | | $\alpha_{\text{D}} = -39,6^\circ$ (MeOH) | | | | |

Na Tabela 4.3.5. é mostrado os dados de ^1H NMR da fração XM6-PPB-2 (espectro de ^1H NMR na Figura 4.3.23. B) e os dados da 3R,4S - hidroxi-meleína da literatura (HOLLER, 1999).

Tabela 4.3.5. – Dados de ^1H NMR para a 3R,4S-hidroxi-meleína. Legenda: ^1H = posição, n° H = número de hidrogênios, δ = deslocamento (ppm), Mult. = multiplicidade, J = constante de acoplamento e OH_{quel} = hidroxila quelada.

| Fração XM6-PPB-2 | | | | | Literatura (HOLLER, 1999) | | | | |
|---|------|----------|-----------|-------------|---|------|----------|-----------|-----------|
| ^1H | N° H | δ | Mult | J (Hz) | ^1H | N° H | δ | Mult. | J (Hz) |
| 3-Me | 3 | 1,53 | <i>d</i> | 6,11 | 3-Me | 3 | 1,52 | <i>d</i> | 6,1 |
| 3 e 4 | 2 | 4,63 | <i>m</i> | - | 3 e 4 | 2 | 4,61 | <i>m</i> | - |
| 5 | 1 | 6,99 | <i>d</i> | 7,66 | 5 | 1 | 6,99 | <i>d</i> | 7,5 |
| 6 | 1 | 7,55 | <i>dd</i> | 7,72 - 6,85 | 6 | 1 | 7,56 | <i>dd</i> | 7,5 – 6,5 |
| 7 | 1 | 7,04 | <i>d</i> | 6,85 | 7 | 1 | 7,02 | <i>d</i> | 6,5 |
| OH_{quel} | 1 | 10,9 | <i>s</i> | - | OH_{quel} | 1 | 11,01 | <i>s</i> | - |
| $\alpha_{\text{D}} = -13$ (CHCl_3) | | | | | $\alpha_{\text{D}} = -13$ (CHCl_3) | | | | |

Foi realizada uma proposta de fragmentação para o espectro da mistura epimérica mostrada na Figura 4.3.27. Esta proposta de fragmentação auxiliou a comprovar as estruturas propostas e é verificada na Figura 4.3.29. Também foi realizada uma proposta de fragmentação para o composto sililado (Figura 4.3.30).

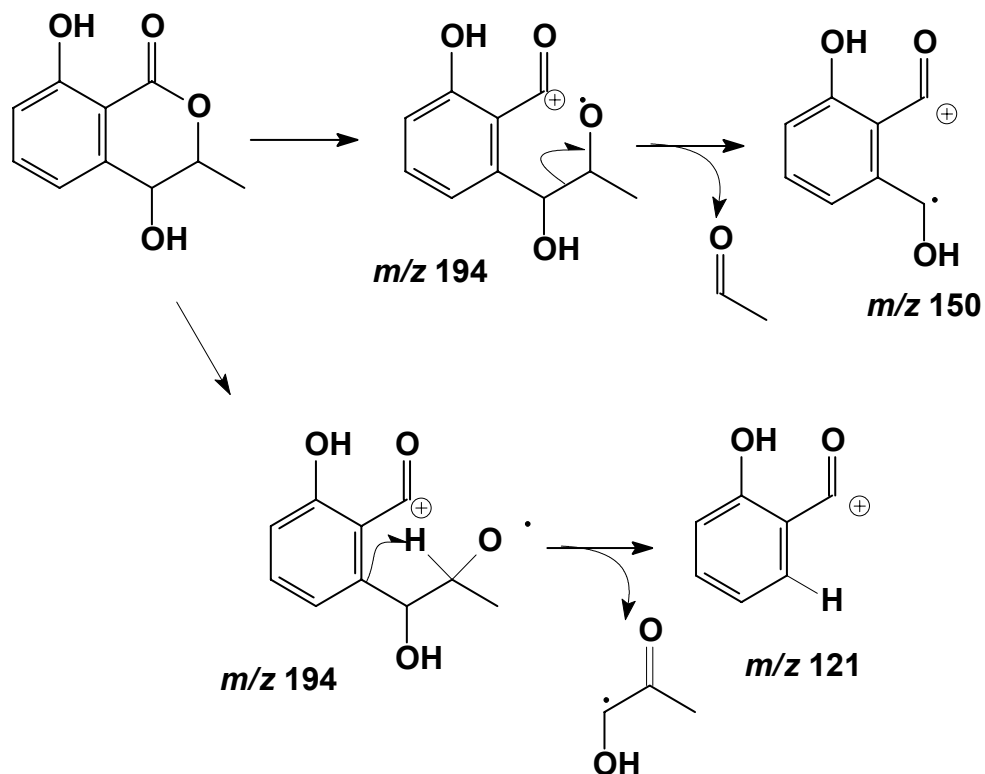


Figura 4.3.29. – Proposta de fragmentação do espectro mostrado na Figura 4.3.25.

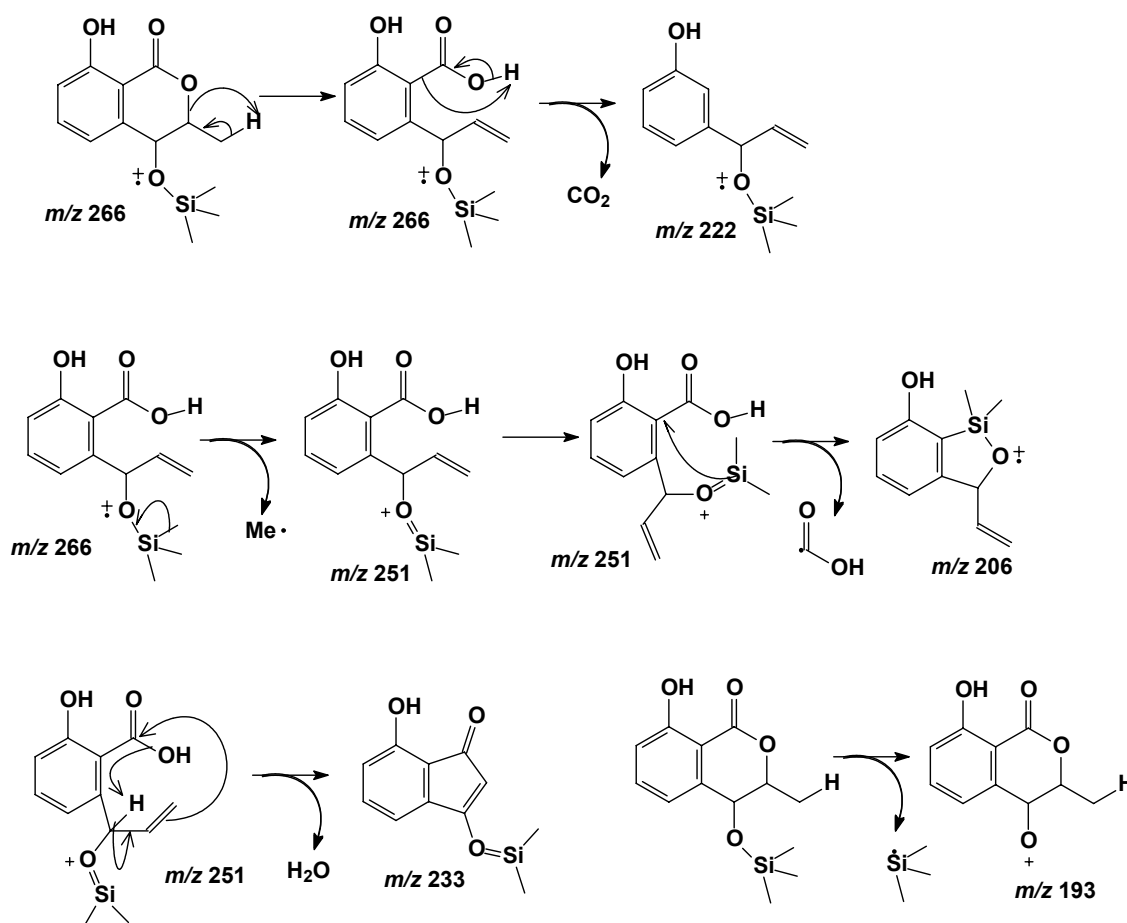


Figura 4.3.30. – Proposta de fragmentação do espectro mostrado na Figura 4.3.26., composto sililado.

Os dados fornecidos por ^1H NMR, espectrometria de massas e α_D foram conclusivos para a atribuição das estruturas das substâncias encontradas nas frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4. As estruturas dos epímeros isolados, XM6-PPB-1 e XM6-PPB-2, são mostradas na Figura 4.3.31.

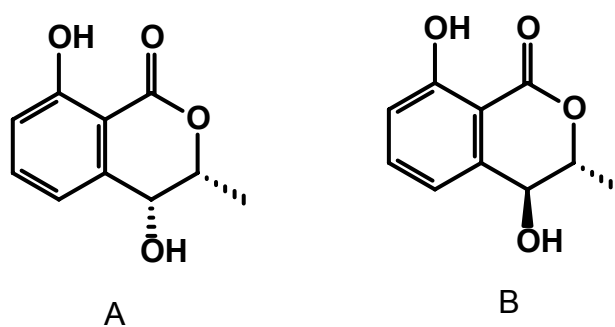


Figura 4.3.31. – Estrutura dos epímeros isolados das frações XM6-48-44B, XM6-31-22B, XM7-12 e XL5-4. (A) 3R,4R – hidroxi-meleína e (B) 3R,4S – hidroxi-meleína.

4.3.2.5. Frações XM8-13-2 e XL6-4-2 – ácido pilifórmico

As frações XM8-13-2 e XL6-4-2 apresentaram grande semelhança tanto em relação ao fator de retenção como absorção no UV, quando submetidas à TLC.

Para identificação estrutural do composto presente nestas frações foram realizados experimentos de ^1H NMR, COSY, HMBC e HSQC.

No espectro de ^1H NMR das frações em questão (Figura 4.3.32., solvente CDCl_3) o primeiro sinal que nos chamou a atenção foi o tripleto em 6,98 ppm que integra para um hidrogênio e com constante de acoplamento de 7,4 Hz. No espectro de COSY (Figura 4.3.33.) este hidrogênio se relaciona com um multipletto em 2,22 ppm que integra para dois hidrogênios. Verificamos uma correlação entre o hidrogênio em 6,98 ppm com o carbono em 146 ppm, como mostrado no espectro de HSQC (Figura 4.3.34.), que também nos forneceu a informação de que os hidrogênios em 2,22 ppm se relacionam com o carbono em 32 ppm. Já no espectro de HMBC (Figura 4.3.35.) verificamos a correlação do hidrogênio em 6,98 ppm com o carbono em 32 ppm, sugerindo um acoplamento de duas ligações entre este hidrogênio e o carbono ligado aos hidrogênios em 2,22 ppm. Com base no experimento de HMBC foi verificado também um acoplamento entre o sinal em 6,98 ppm com um carbono em 131 ppm, sendo que este não mostra correlação com nenhum sinal de hidrogênio, como mostrado no HSQC. Também observamos no HMBC uma relação de 6,98 ppm com um sinal em 172 ppm, região típica de carboxilas, a quarta e última correlação observada entre este hidrogênio (6,98 ppm) é verificada com o sinal em 37 ppm. Essas informações foram suficientes para sugerirmos que temos um hidrogênio olefínico (H-1' em 6,98 ppm e C-1' em 146 ppm) vizinho a dois hidrogênios alílicos (H-2' em 2,22 ppm e C-2' em 32 ppm), como mostra a Figura 4.3.36.

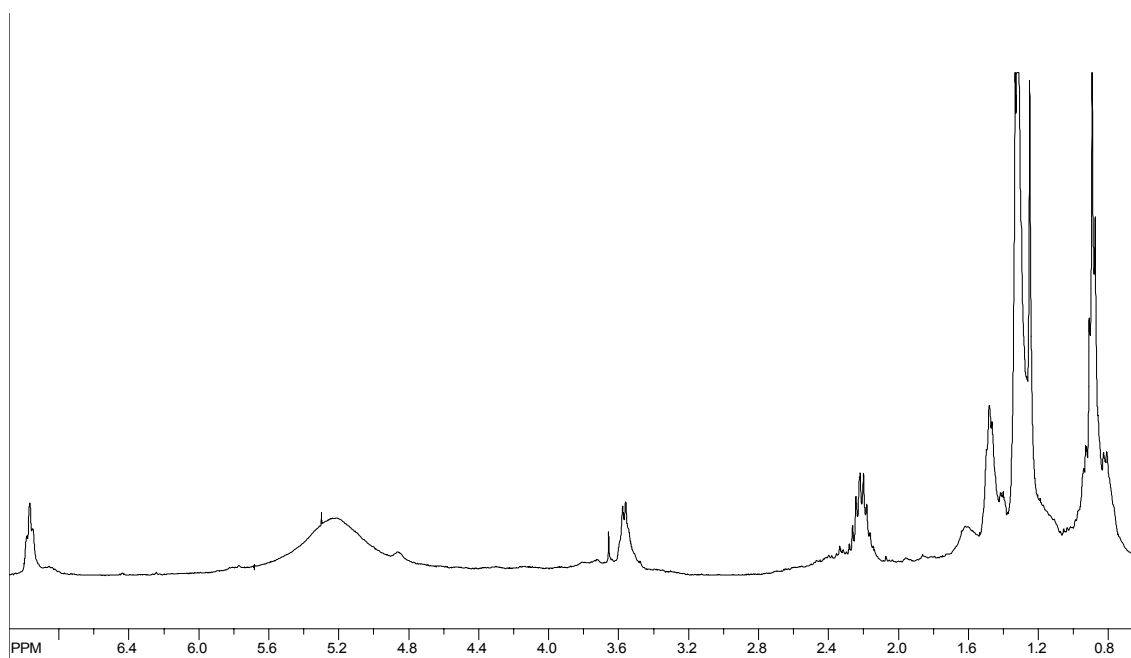


Figura 4.3.32. – Espectro de ^1H NMR das frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

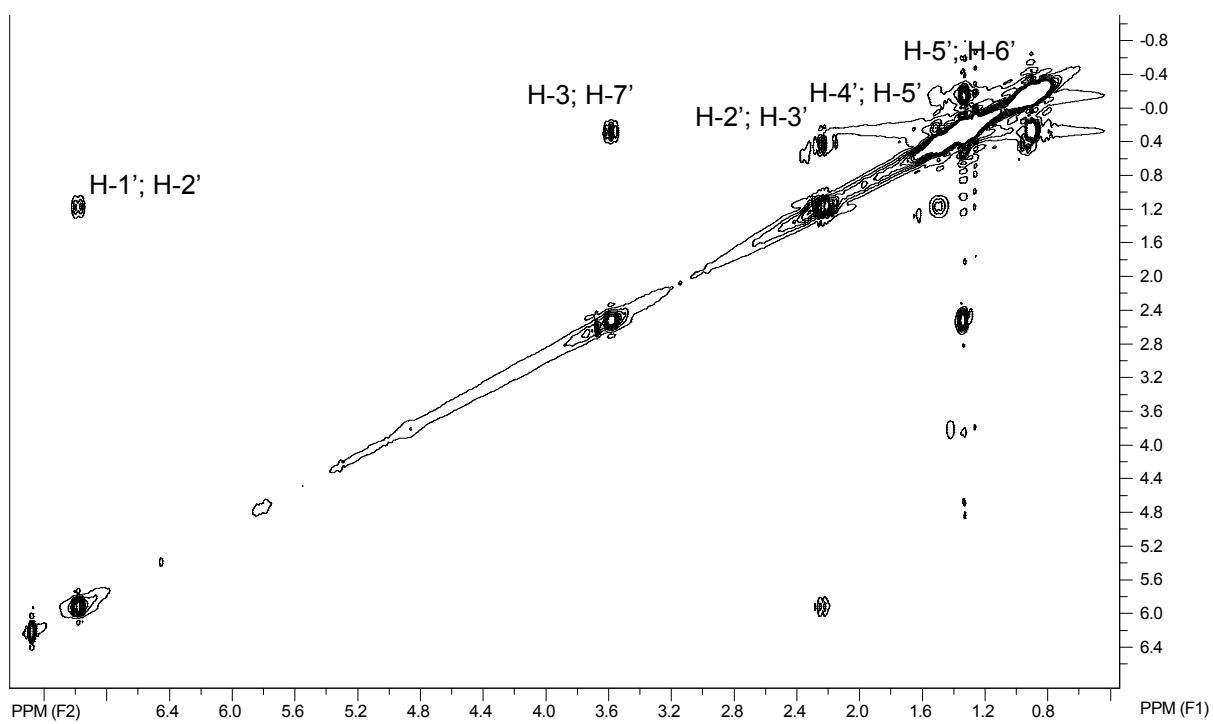


Figura 4.3.33. – Espectro de COSY das frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

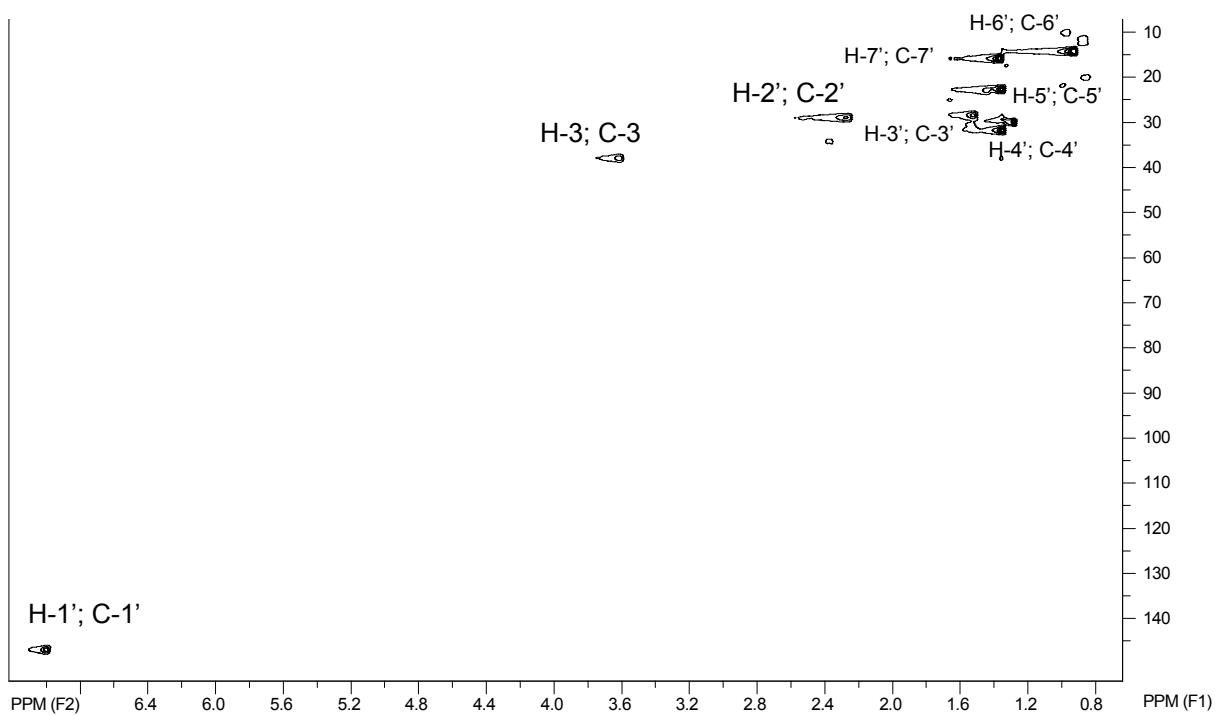


Figura 4.3.34. – Espectro de HSQC das frações XM8-13-2 e XL6-4-2, mostrando as correlações *J-1*.

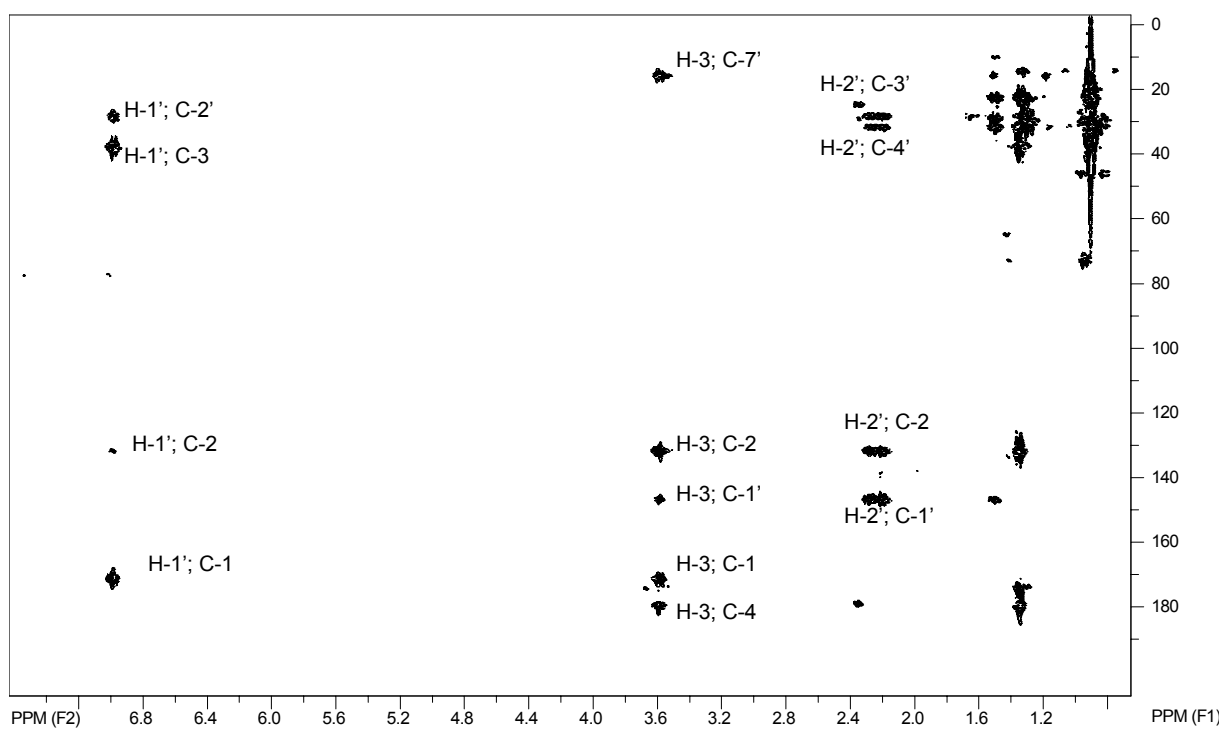


Figura 4.3.35. – Espectro de HMBC das frações XM8-13-2 e XL6-4-2, mostrando algumas correlações *J-2* e *J-3*.

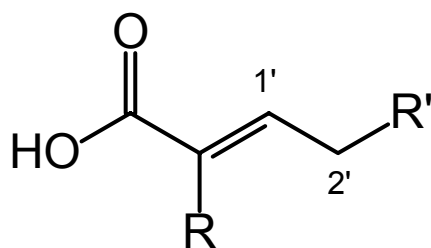


Figura 4.3.36. – Estrutura parcial do composto encontrado nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

O espectro de ^1H NMR (Figura 4.3.32.) nos mostrou que em 3,60 ppm temos um quadrupeto, integrando para um hidrogênio e com constante de 7,1 Hz, sugerindo a presença de um grupo metílico vizinho a uma metila. No espectro de COSY (Figura 4.3.33.) verificamos a correlação entre este possível grupo metílico com um sinal em 1,31 ppm, região onde temos sobreposição de sinais referentes a vários hidrogênios, provavelmente devido à presença de grupos metilas e metilenos. No HSQC (Figura 4.3.34.) verificamos o acoplamento entre o sinal em 3,60 ppm com um carbono em 37 ppm e o sinal em 1,31 ppm com o carbono em 16 ppm. Quando passamos para análise do espectro de HMBC observamos que este sinal, em 3,60 ppm, mostrou correlação com os carbonos em 16, 131, 146, 172 e 182 ppm. Como já descrito anteriormente, o sinal em 172 ppm refere-se, provavelmente, a uma carboxila e o sinal em 146 ppm é oriundo do carbono olefínico (posição C-1'). O sinal em 182 ppm deve se referir a uma outra carboxila, enquanto que em 131 ppm temos o carbono α -carboxila já discutido. Os hidrogênios da metila (1,31 ppm) mostraram correlação com os carbonos em 37, 131 e 182 ppm. De acordo com tais informações definimos o grupo R mostrado na Figura 4.3.36., chegando à estrutura mostrada na Figura 4.3.37., de modo que a posição 1' temos o carbono em 146 ppm; 2' - 32 ppm; 7' - 16 ppm; 1 - 172 ppm; 2 - 131 ppm; 3 - 37 ppm e 4 - 182 ppm.

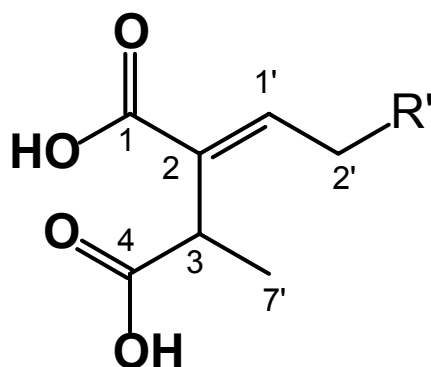


Figura 4.3.37. – Estrutura parcial do composto encontrado nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

Para definirmos o grupo R' estudamos as correlações entre os sinais referentes à posição 2' (Figura 4.3.37.). O espectro de COSY mostrou que além do acoplamento com o hidrogênio em 6,98 ppm (1') os hidrogênios da posição 2', que aparecem como um multipletto em 2,22 ppm mostraram interação com o sinal em 1,42 ppm, observado como um multipletto, que correlaciona com o carbono em 29 ppm. Já este hidrogênio (1,42 ppm) se correlaciona com outros sinais na região entre 0,90 e 1,40 ppm, típica de metilenos e metilas, de modo que não ficaram claros os deslocamentos e multiplicidades dos sinais, sugerindo a presença de uma cadeia alifática. Para chegarmos a uma definição sobre a estrutura do composto passamos para o uso da técnica de espectrometria de massas, assim obtivemos a massa molecular da substância e sendo possível definir o tamanho da cadeia lateral referente ao grupo R da molécula (Figura 4.3.36.). Devido à possível presença de dois grupos ácidos e sua baixa massa molecular optamos por utilizar o modo negativo de ionização química à pressão atmosférica (APCI(-)). As condições da análise foram descritas na Tabela 3.10.

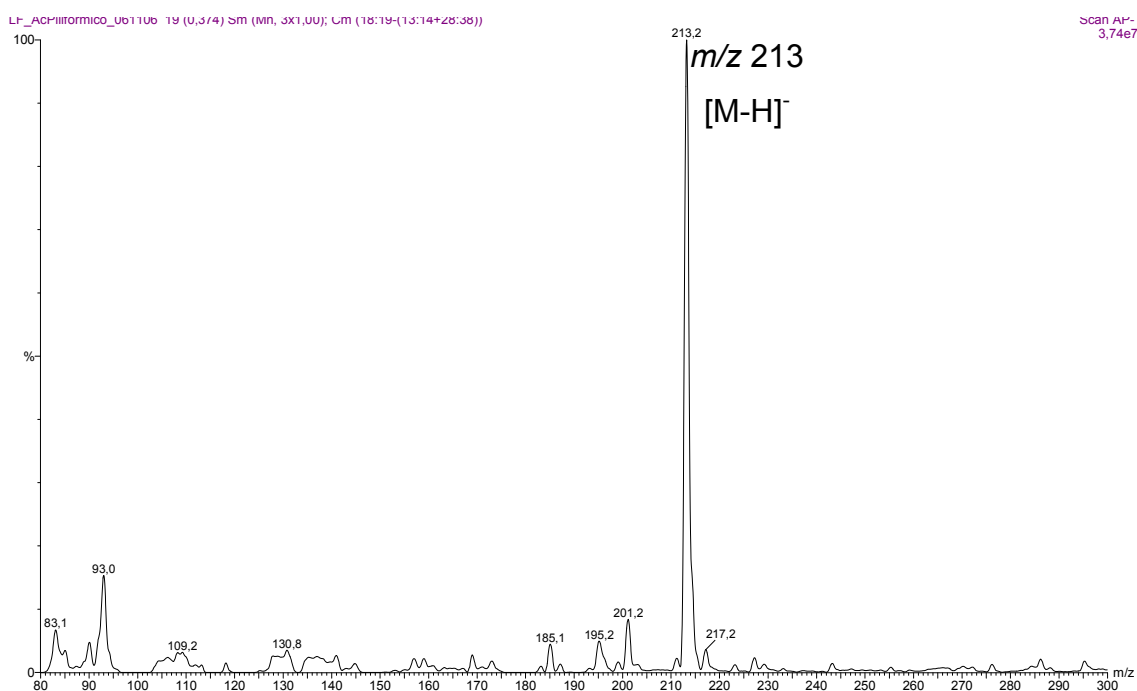


Figura 4.3.38. – Espectro de massas para o composto presente nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

O espectro ilustrado na Figura 4.3.38. apresentou como pico base o íon de m/z 213 (100 %), indicando a formação da molécula deprotonada ($[M-H]^-$), desse modo o composto em questão deve apresentar massa de 214 Da. Levando em

consideração a estrutura apresentada na Figura 4.3.37. foi possível atribuir, com auxílio da espectrometria de massas, a estrutura apresentada na Figura 4.3.39.

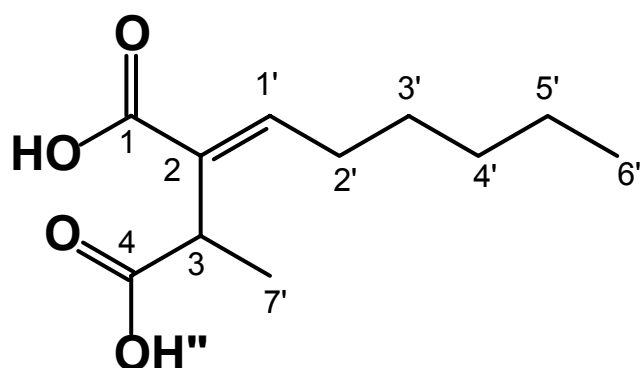


Figura 4.3.39. – Estrutura do composto (ácido pilifórmico) encontrado nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2.

A estrutura molecular da substância encontrada nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2 é mostrada na Figura 4.3.39. e recebe o nome de Ácido Pilifórmico, composto com massa 214 Da. Ainda, para confirmar a estrutura proposta foi realizada a atribuição das correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 4.3.35.). Estas correlações estão ilustradas na Figura 4.3.40.

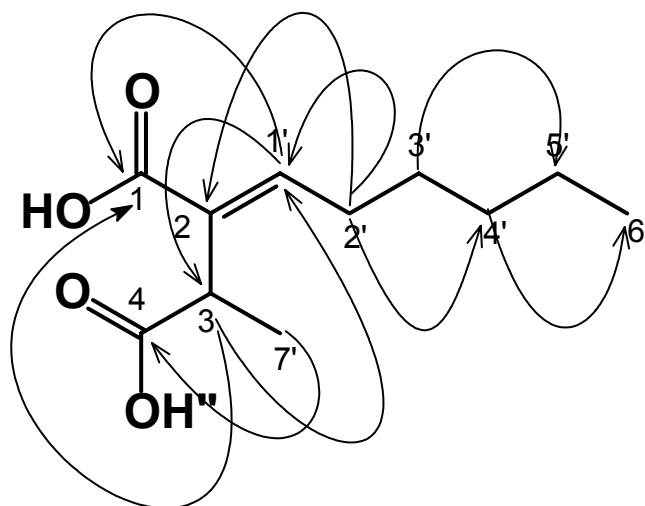


Figura 4.3.40. – Correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 4.35.) que contribuíram para elucidação estrutural do Ácido Pilifórmico.

Na Tabela 4.3.6. temos os dados de NMR (^1H , COSY, HMBC e HSQC) do Ácido Pilifórmico isolado.

Tabela 4.3.6. – Dados de NMR para o ácido pilifórmico. Legenda: ^1H = posição, δ = deslocamento (ppm), Mult. = multiplicidade, J = constante de acoplamento em Hz, correlações dos experimentos de COSY, HSQC e HMBC.

| ^1H | δ | Mult | J | COSY | HSQC | HMBC |
|--------------|----------|----------|-----|------------|------|------------------------|
| 3 | 3,60 | <i>q</i> | 7,1 | 1,31 | 37 | 16; 131; 146; 172; 182 |
| 1' | 6,98 | <i>t</i> | 7,4 | 2,22 | 146 | 32; 37; 131; 172 |
| 2' | 2,22 | <i>m</i> | - | 6,98; 1,42 | 32 | 131; 146; 29; 33 |
| 3' | 1,42 | <i>m</i> | - | 2,22; 1,32 | 29 | 32; 146; 33 |
| 4' | 1,32 | <i>m</i> | - | 1,41 | 33 | 29; 23; 15 |
| 5' | 1,32 | <i>m</i> | - | 0,90 | 23 | 15; 33; 29 |
| 6' | 0,90 | <i>t</i> | 7,0 | 1,32 | 15 | 23; 33 |
| 7' | 1,31 | <i>m</i> | - | 3,60 | 16 | 37, 131; 182 |

Na Tabela 4.3.7 temos os dados de ^1H e ^{13}C do ácido pilifórmico isolado e os dados encontrados na literatura (TELES, 2005).

Tabela 4.3.7. – Dados de ^1H e ^{13}C do ácido pilifórmico isolado e os dados encontrados na literatura (TELES, 2005).

| Fração XM8-13-2 | | | Literatura (TELES, 2005) | | |
|-----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|
| Pos. | δH^1 | δC^{13} | Pos. | δH^1 | δC^{13} |
| 1' | 6,98 | 146 | 1' | 6,96 | 146,8 |
| 2' | 2,22 | 32 | 2' | 2,22 | 28,9 |
| 3' | 1,42 | 29 | 3' | 1,42 | 28,3 |
| 4' | 1,32 | 33 | 4' | 1,32 | 31,7 |
| 5' | 1,32 | 23 | 5' | 1,32 | 22,6 |
| 6' | 0,90 | 15 | 6' | 0,89 | 14,1 |
| 7' | 1,31 | 16 | 7' | 1,32 | 15,8 |
| 1 | - | 172 | 1 | - | 171,6 |
| 2 | - | 131 | 2 | - | 131,8 |
| 3 | 3,60 | 37 | 3 | 3,61 | 38,0 |
| 4 | - | 182 | 4 | - | 179,9 |

De acordo com todos os dados obtidos (NMR e MS) e em comparação com a literatura (TELES, 2005) chegamos à conclusão de que o composto presente nas frações XM8-13-2 e XL6-4-2 é, sem dúvida, o Ácido Pilifórmico. Trata-se de uma substância encontrada normalmente como metabólito secundário de fungos endofíticos da família Xylariaceae, em especial do gênero *Xylaria* (MANGALESWARAM *et al.*, 2000), os relatos do isolamento desse composto mostram que a conformação *E* já foi encontrada na natureza, enquanto que a *Z* só foi obtida sinteticamente (CULCETH *et al.*, 1998), os dados obtidos neste trabalho nos fornecem a informação de que o composto encontra-se na conformação *E* pois, de acordo com CULCETH (1998), quando temos a conformação *Z* o sinal referente ao hidrogênio vinílico (posição 1') deve cair próximo de 6,2 ppm, e os hidrogênios do metileno alílico (posição 2') em 2,6 ppm, no presente trabalho temos 6,98 e 2,22 ppm respectivamente. Este composto é derivado da condensação de um intermediário do ácido cítrico e de ácidos graxos (CHESTERS and O'HAGAN, 1997). Foram realizados ainda diversos experimentos de MS/MS, utilizando as mesmas condições do equipamento da Tabela 4.6. e variando a energia de colisão. Todos os espectros obtidos (com as diversas energias de colisão) apresentaram um único íon fragmento, com m/z 169. Na Figura 4.3.41. temos o espectro de MS/MS com 10 eV. Uma proposta de fragmentação encontra-se ilustrada na Figura 4.3.42.

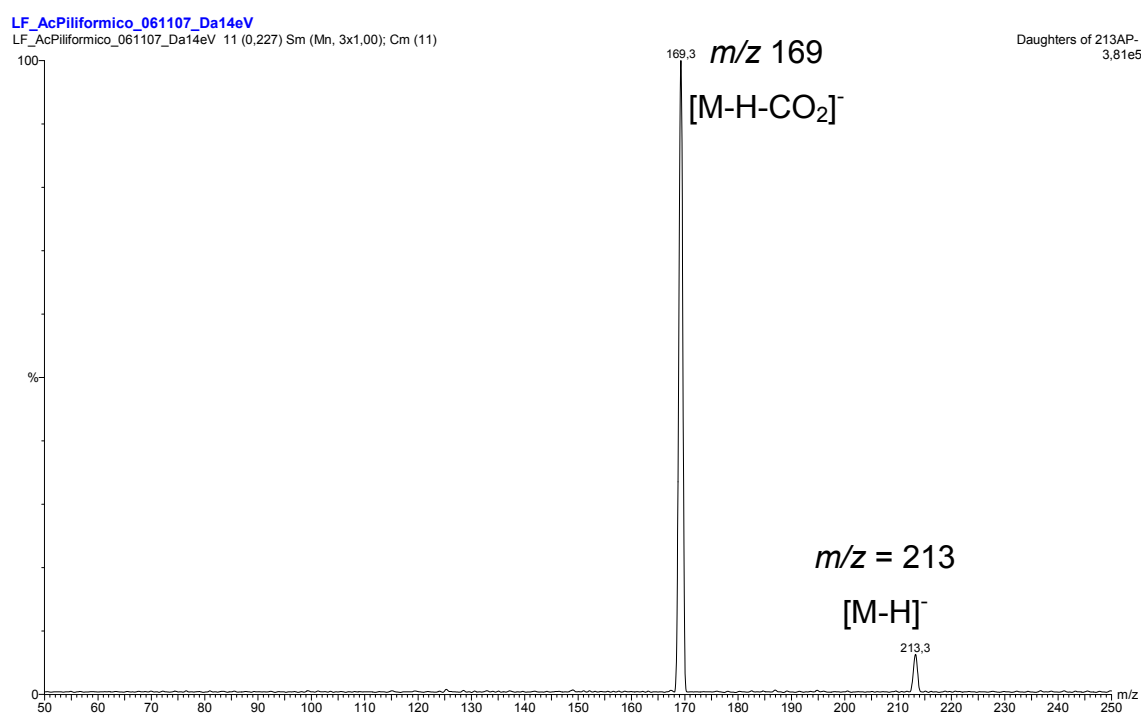


Figura 4.3.41. – Espectro de MS/MS do Ácido Pilifórmico com 10eV.

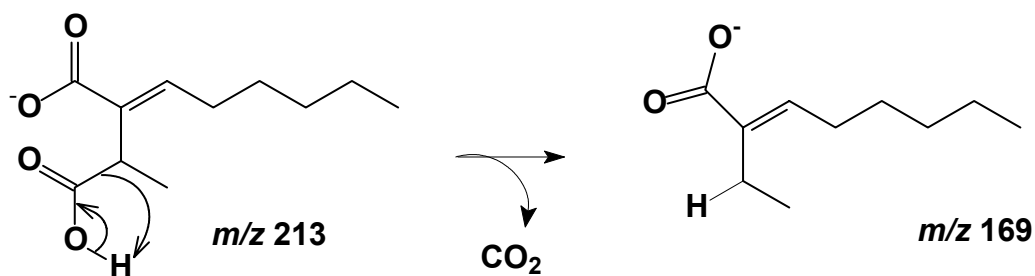


Figura 4.3.42. – Proposta de fragmentação do ácido pilifórmico

4.3.2.6. Fração XM8-10-17-2 – diplodiol

O espectro de ^1H NMR referente à fração XM8-10-17-2 (10,2 mg) apresentou sinais bastante interessantes, como pode ser observado na Figura 4.3.43. A região ampliada, de 0,80 até 2,75 ppm é ilustrada na Figura 4.3.44.

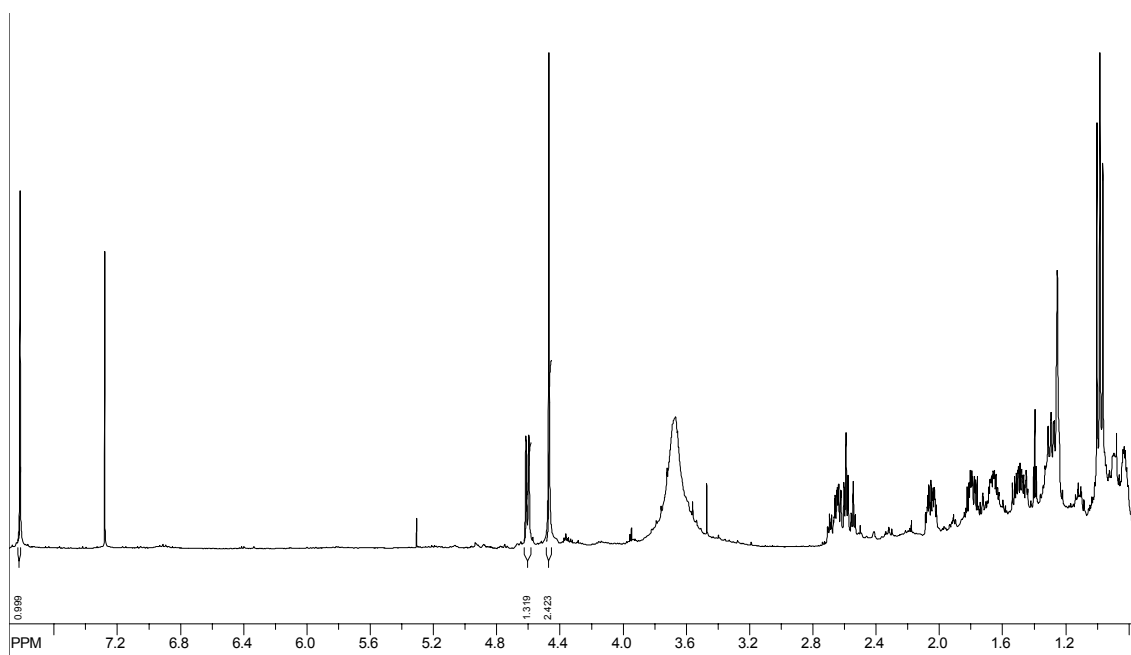


Figura 4.3.43. – Espectro de ^1H NMR da fração XM8-10-17-2.

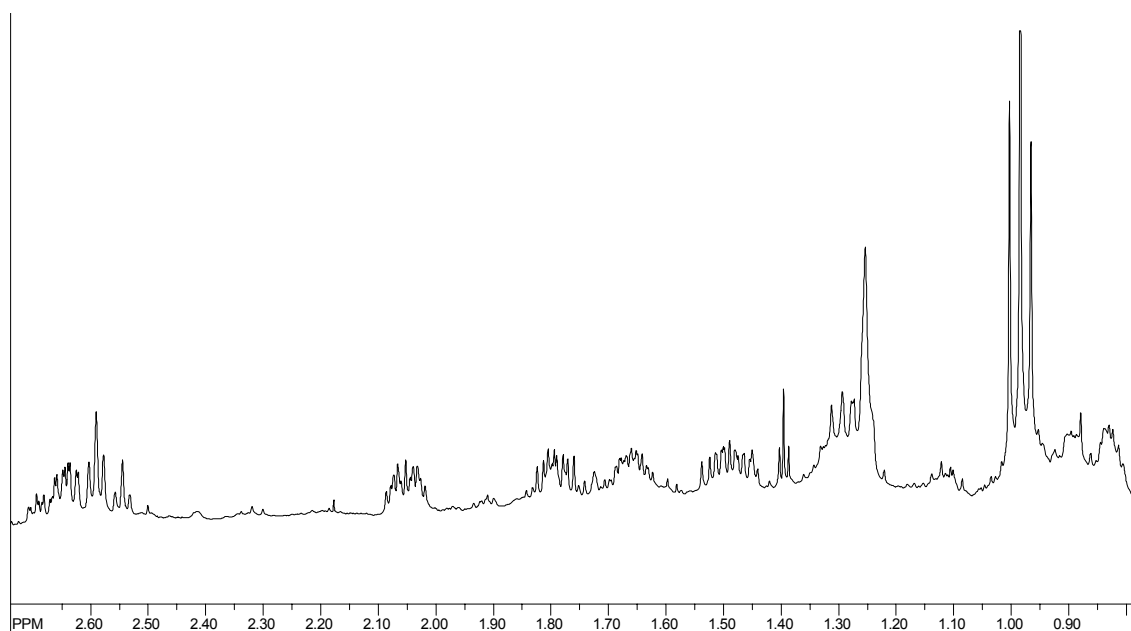


Figura 4.3.44. – Ampliação da região de 0,80 a 2,75 do espectro de ^1H NMR da fração XM8-10-17-2.

Como ilustrado na Figura 4.3.44. notamos um grande número de sinais na região ampliada, no entanto, verificamos um singlete que integra para um hidrogênio, em 7,81 ppm. Em 4,60 ppm temos um dubleto integrando para um hidrogênio e em 4,47 ppm outro singlete, este integra para dois hidrogênios. Devido à complexidade dos dados fornecidos pelo espectro de ^1H NMR realizou-se ainda experimentos de COSY (Figura 4.3.45.), HSQC (Figura 4.3.46.), HMBC (Figura 4.3.47.) e C^{13} (Figura 4.3.48.). O espectro de massas obtido por GC-MS é ilustrado na Figura 4.3.49.

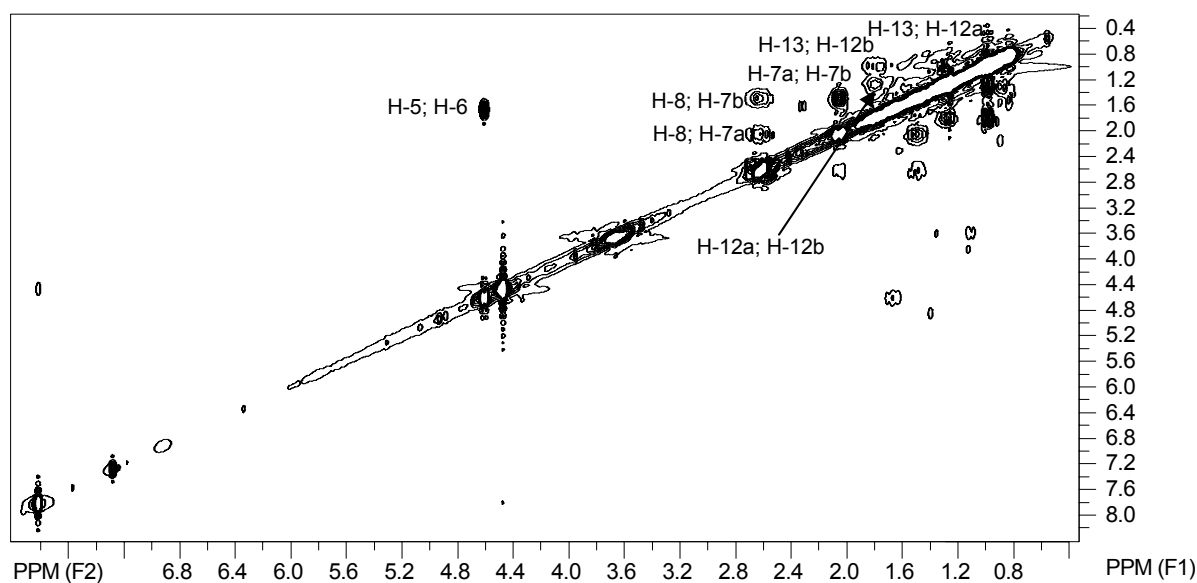


Figura 4.3.45. – Espectro de COSY da fração XM8-10-17-2.

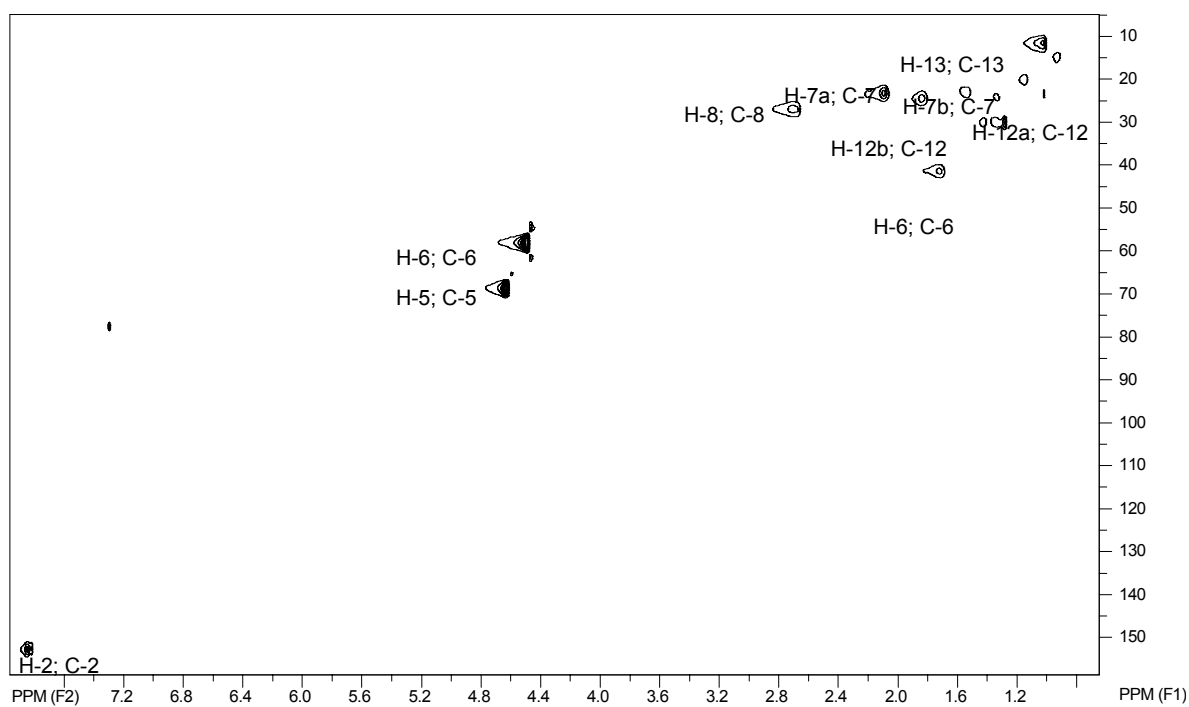


Figura 4.3.46. – Espectro de HSQC da fração XM8-10-17-2, mostrando as correlações H-C *J*-1.

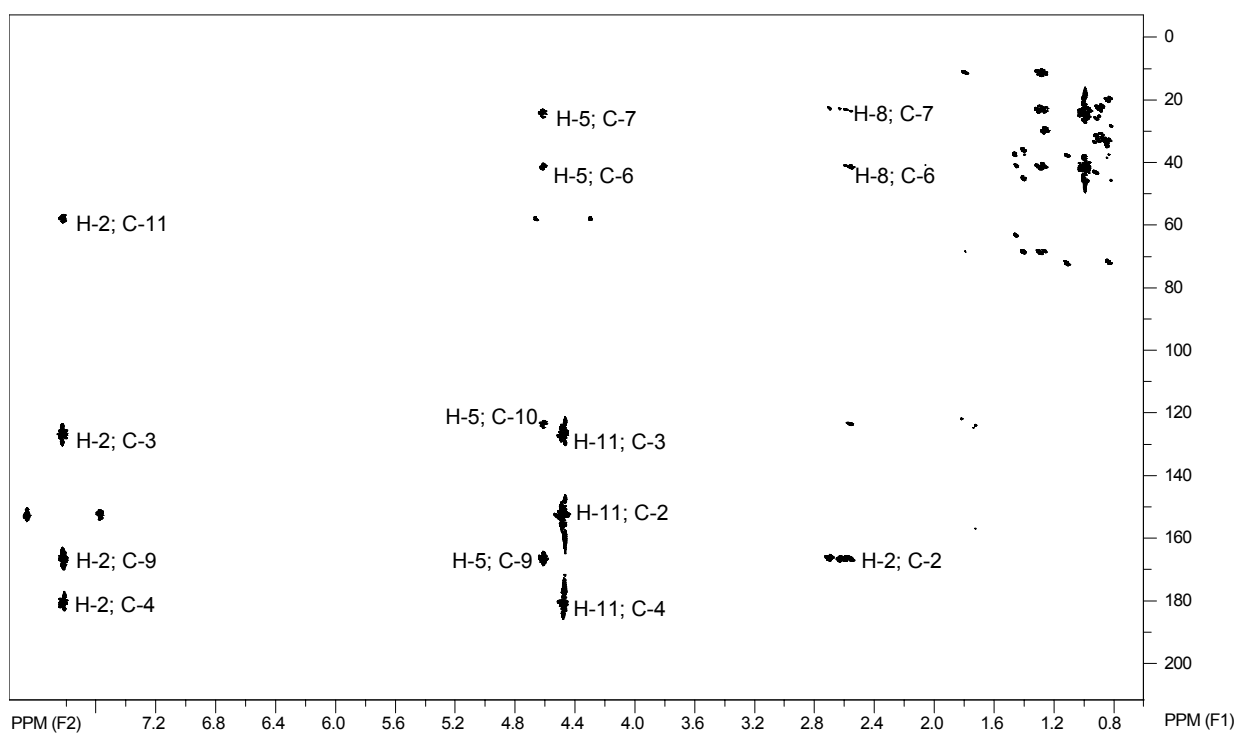


Figura 4.3.47. – Espectro de HMBC da fração XM8-10-17-2, mostrando as principais correlações H-C *J*-2 e *J*-3.

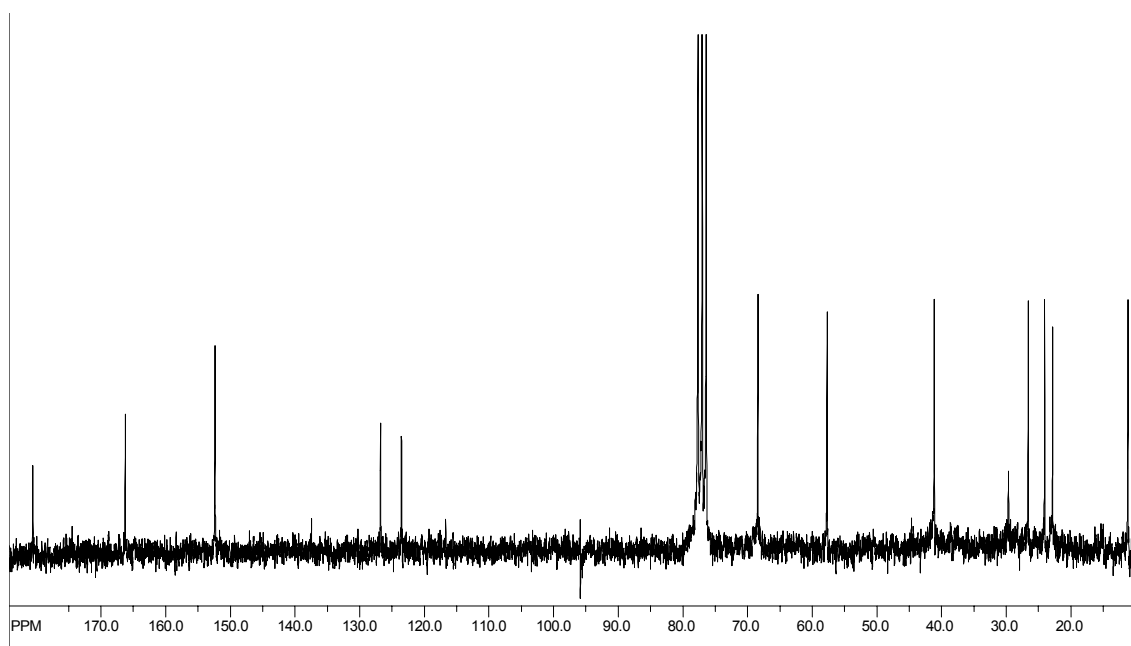


Figura 4.3.48. – Espectro de ^{13}C NMR da fração XM8-10-17-2.

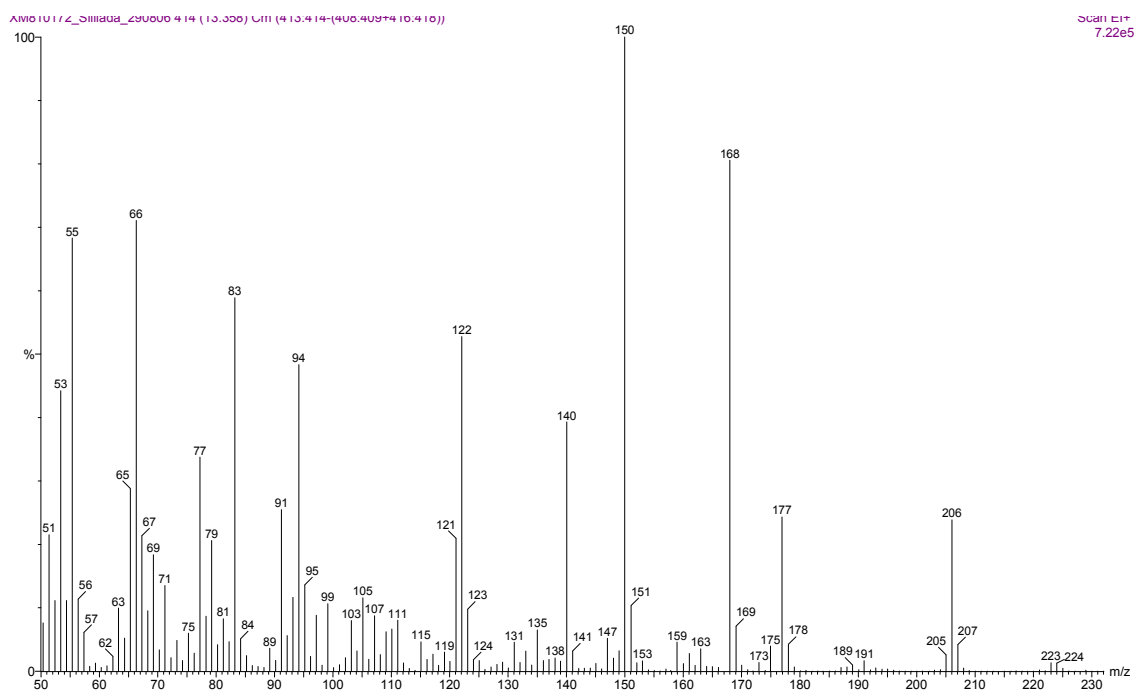


Figura 4.3.49. – Espectro de Massas (GC-MS) da fração XM8-10-17-2.

O espectro de massas obtido por GC-MS nos forneceu a informação de que temos um composto com massa 224 Da, observamos o íon molecular m/z 224, pouco intenso. O espectro de ^{13}C (Figura 4.3.48.) mostrou 12 sinais, de modo que essas informações (espectro de massas e ^{13}C) nos levaram a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{O}_4\text{H}_{16}$ e grau de insaturação igual a cinco. A perda de 18 u.m.a. sugere a presença de, pelo menos, uma hidroxila. Comparando os dados de HSQC e C^{13}

observamos a presença de quatro carbonos quaternários, de modo que devemos ter uma carbonila (sinal em 180,3 ppm). Pelo espectro de HSQC ($J = 1$) notamos que o singlete em 7,80 ppm mostrou acoplamento com o carbono em 152,1 ppm e, pelo HMBC, correlaciona com os carbonos 57,5; 126,8; 165,9 e 180,3 ppm ($J = 2$ ou $J = 3$). De acordo com o HSQC, o singlete em 4,4 ppm correlaciona-se com o carbono em 57,5 ppm e, pelo HMBC, com os carbonos em 126,8; 152,1 e 180,3 ppm. Essas informações nos levaram ao grupo ilustrado na Figura 4.3.50., onde estão representados os deslocamentos de ^{13}C .

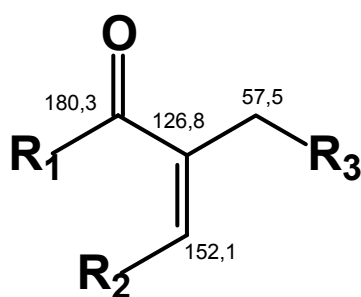


Figura 4.3.50. – Estrutural parcial presente em XM8-10-17-2, com os deslocamentos de ^{13}C .

O dubleto em 4,6 ppm, região típica de carbinólicos, se relaciona, baseando-se no HSQC, com o carbono em 68,5 ppm e, pelo HMBC, com 26,7; 41,3; 123,4; 165,9 e 180,3 ppm. De acordo com o HSQC, não foi verificada correlação para os sinais em 123,4 e 165,9 ppm, sugerindo que tais carbonos devam ser quaternários e, devido aos valores de deslocamento, temos carbonos vinílicos α , β à carbonila (respectivamente). O carbono em 41,3 ppm mostrou correlação com o hidrogênio em 1,7 ppm. Pelo COSY verificamos acoplamento entre o sinal em 1,7 ppm e 4,59 ppm. Devemos notar que o sinal 1,7 ppm é observado como um multipletto. Estas informações nos levaram à elucidação dos grupos R_1 e R_2 mostrados na Figura 4.3.50., a estrutura proposta pode ser observada na Figura 4.3.51.

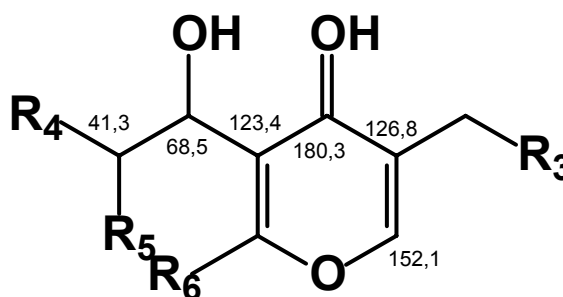


Figura 4.3.51. – Estrutural parcial presente em XM8-10-17-2, com os deslocamentos de ^{13}C .

O sinal mais blindado no espectro de ^1H NMR aparece como um tripleto em 0,98 ppm e correlaciona-se com o carbono em 11,3 ppm. De acordo com o espectro de COSY estes hidrogênios acoplam com os sinais em 1,3 e 1,8 ppm e estes sinais, pelo HSQC, se relacionam com o mesmo carbono, em 24,1 ppm. Estas informações foram suficientes para deduzir a presença de um grupo etila na molécula. Os hidrogênios da metila (0,98 ppm) correlacionam ainda, pelo HMBC, com os carbonos em 24,1 e 41,3 ppm.

A análise do espectro de COSY mostrou que o hidrogênio em 1,7 ppm (ligado ao C em 41,3 ppm) acopla com o sinal em 1,5 ppm e este, pelo HSQC, mostra correlação com o carbono em 22,8 ppm. Pelo HSQC, o sinal em 2,1 ppm está ligado ao mesmo carbono (22,8 ppm) que o sinal em 1,5 ppm. Estes dois sinais (1,5 e 2,1 ppm) mostraram acoplamento, pelo COSY, com o sinal em 2,6 ppm, que, pelo HSQC, está fazendo ligação com o carbono em 26,3 ppm. Pelo espectro de HMBC verificamos correlação de 2,6 ppm com os carbonos em 24,2; 41,3; 123,4 e 165,9 ppm. Com base nestas informações, NMR e MS, chegamos à estrutura ilustrada na Figura 4.3.52.

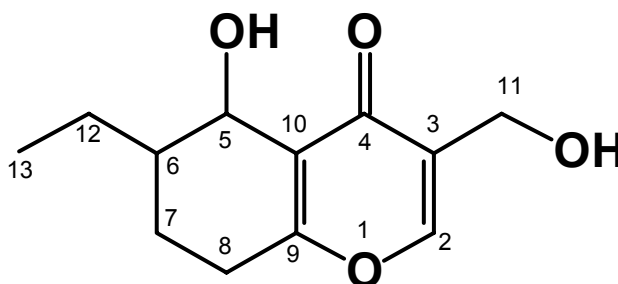


Figura 4.3.52. – Estrutural proposta para o composto em XM8-10-17-2.

Na Tabela 4.3.8. são mostradas as correlações observadas nos espectros de ^1H , COSY, HSQC e HMBC Figuras 4.3.44., 4.3.45., 4.3.46. e 4.3.47.

Tabela 4.3.8. – Dados de NMR para o diplodiol. Legenda: Pos. = posição, δ = deslocamentos (ppm), correlações observados nos experimentos de COSY, HSQC e HMBC.

| Pos. | δ H ¹ | COSY | HSQC | HMBC |
|------|-------------------------|----------------|-------|---------------------------------|
| 2 | 7,8 | - | 152,1 | 57,5; 126,8; 165,9 |
| 5 | 4,6 | 1,7 | 68,5 | 26,7; 41,3; 123,4; 165,9; 180,3 |
| 6 | 1,7 | 4,6; 1,3; 1,5 | 41,3 | 11,3; 26,7; 68,5; 24,2; 26,3 |
| 7a | 1,5 | 2,1; 1,7; 2,6 | 24,2 | 26,3; 41,3; 68,5 |
| 7b | 2,1 | 1,5; 2,6 | 24,2 | 26,3; 41,3; 68,5 |
| 8 | 2,6 | 1,5; 2,1 | 26,3 | 22,8; 41,3; 123,4; 165,9 |
| 11 | 4,4 | - | 57,5 | 126,8; 152,1; 180,3 |
| 12a | 1,3 | 1,8; 0,98; 1,7 | 26,7 | 11,3; 22,8; 41,3; 68,5 |
| 12b | 1,8 | 0,98; 1,3 | 26,7 | 11,3; 22,8; 41,3; 68,5 |
| 13 | 0,98 | 1,3; 1,8 | 11,3 | 24,2; 41,3 |

As correlações de COSY, HSQC e HMBC foram representadas nos espectros das Figuras 4.3.45., 4.3.46. e 4.3.47. respectivamente. Na Figura 4.3.53. são ilustradas as correlações observadas no espectro de HMBC.

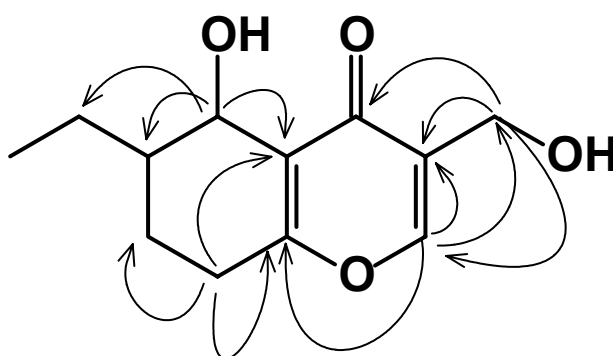


Figura 4.3.53. – Algumas correlações observadas no HMBC.

Ainda com o intuito de comprovar a estrutura atribuída foi realizada uma proposta de fragmentação para justificar o espectro mostrado na Figura 4.3.48. Tal proposta pode ser observada na Figura 4.3.54.

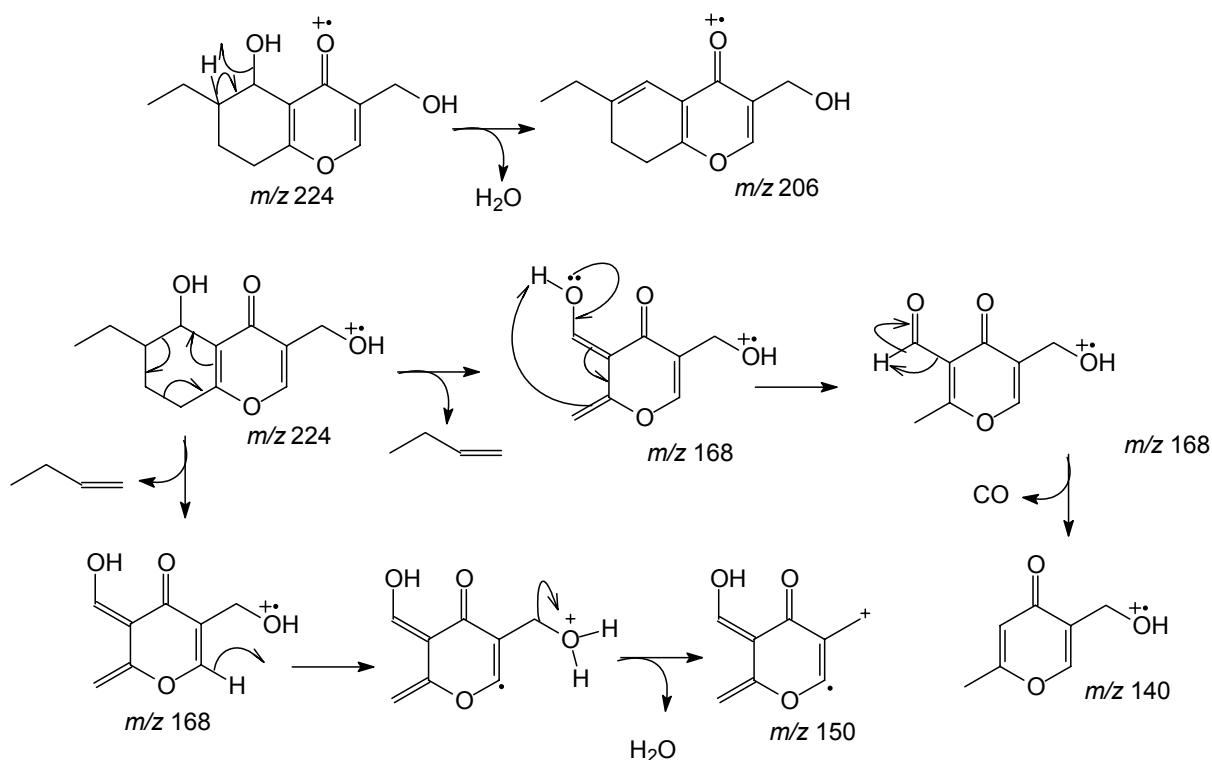


Figura 4.3.54. – Proposta de fragmentação para o Diplodiol.

O valor da constante de acoplamento calculada para o dubleto em 4,6 ppm foi de 7,04 Hz, sugerindo que os hidrogênios H-5 e H-6 encontram-se na conformação *trans*. A estrutura proposta (Figura 4.3.52.) recebe o nome de *trans*-6-etil-5-hidroxi-3hidroximetil-5,6,7,8-tetrahidrocromona ou, simplesmente, diplodiol, sendo relatada pela primeira vez por CUTLER *et al.* em 1979, isolada como uma toxina produzida pelo fungo *Diplodia macrospora*, um patógeno do milho. Poucos relatos foram realizados sobre o isolamento desta substância. Na Tabela 4.3.9. são descritos os dados de ^1H e ^{13}C do composto isolado e dados da literatura (CUTLER *et al.*, 1979).

Tabela 4.3.9. – Dados de ^1H e ^{13}C do diplodiol isolado e os dados encontrados na literatura (CUTLER *et al.*, 1979).

| Fração XM8-10-17-2 | | | Literatura (CUTLER <i>et al.</i> , 1979) | | |
|--------------------|----------------|-----------------|--|----------------|-----------------|
| Pos. | ¹ H | ¹³ C | Pos. | ¹ H | ¹³ C |
| 2 | 7,8 | 152,1 | 2 | 7,79 | 152,05 |
| 3 | - | 126,8 | 3 | - | 126,72 |
| 4 | - | 180,3 | 4 | - | 180,29 |
| 5 | 4,6 | 68,5 | 5 | 4,59 | 68,48 |
| 6 | 1,7 | 41,3 | 6 | 1,40 | 41,22 |
| 7 | 2,1; 1,5 | 22,8 | 7 | 2,05; 1,75 | 24,17 |
| 8 | 2,65 | 26,3 | 8 | 2,60 | 22,96 |
| 9 | - | 165,9 | 9 | - | 165,91 |
| 10 | - | 123,4 | 10 | - | 123,43 |
| 11 | 4,4 | 57,8 | 11 | 4,46 | 57,73 |
| 12 | 1,8; 1,3 | 24,1 | 12 | 1,67 | 26,73 |
| 13 | 0,98 | 11,3 | 13 | 0,98 | 11,28 |

4.3.2.7. Ácidos graxos e esteróides

Devido aos sinais observados em seus espectros de ¹H NMR algumas frações indicaram a presença de ácidos graxos. Essas frações, XM5-3, XM8-13-3 e XL6-4-1, foram submetidas à reação de sililação conforme descrito no item 3.5.4. e analisados por GC-MS. Os compostos identificados nestas frações, com os nomes e tempos de retenção, são ilustrados na Figura 4.3.55.

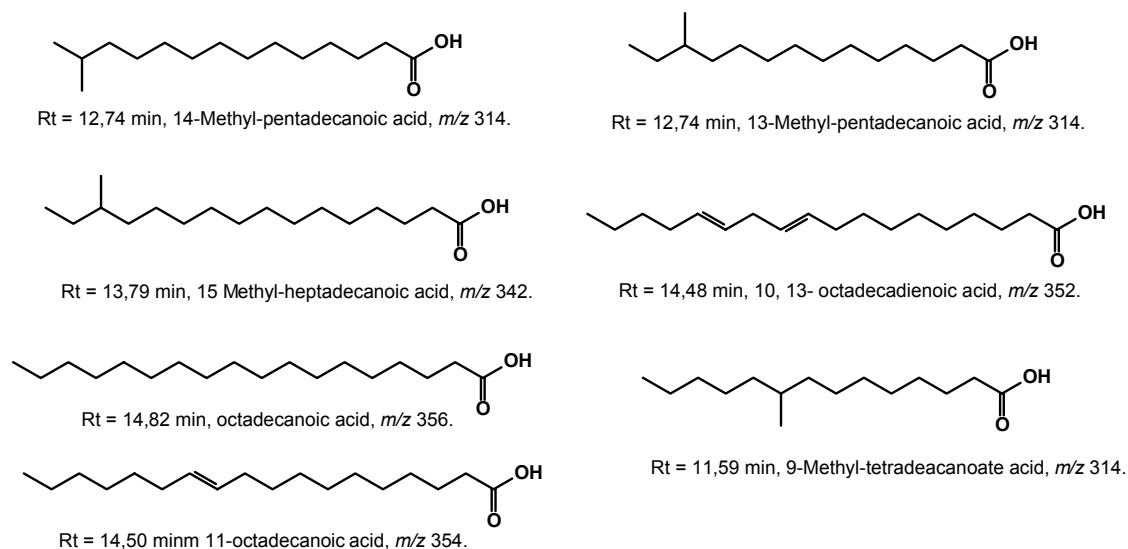


Figura 4.3.55. – Compostos identificados por GC-MS.

Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas e os espectros presentes na biblioteca NIST. Além destes ácidos graxos mostraram-se presentes em diversas frações o Ergosterol e o Peróxido de Ergosterol. A identificação destes ocorreu, também, por comparação com os espectros da biblioteca NIST. Estes dois compostos estão presentes em, praticamente, todos os fungos. Suas estruturas são representas na Figura 4.3.56.

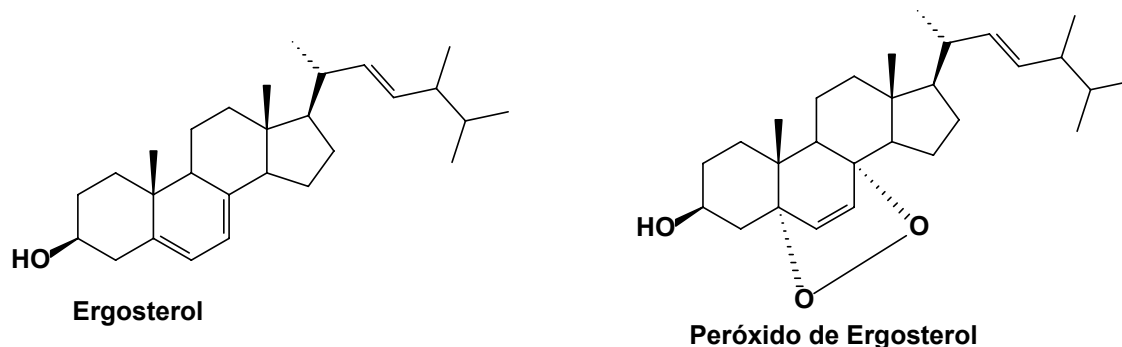


Figura 4.3.56. – Ergosterol e Peróxido de Ergosterol, isolados de *Xylaria* sp.

4.4. Comparação de meios de cultivo

4.4.1. Escolha dos meios de cultivo

O principal objetivo deste tópico foi comparar a produção de metabólitos secundários produzidos por *Xylaria* sp., traçando um perfil químico para os diferentes meios utilizados. Experimento similar foi realizado por MOORE et al. (1972), envolvendo o fungo *Aspergillus ochraceus* e visando encontrar um meio adequado para produção de isocumarinas.

Foram escolhidos três meios líquidos de cultura: o primeiro deles foi o mesmo utilizado no item 3.4.2., que utilizava a glicose como fonte de carbono; para o segundo meio, substituímos a glicose pela sacarose, tendo em vista que a sacarose possui um valor comercial ainda menor que a glicose, de modo que seria bastante interessante encontrarmos um meio de cultura mais em conta e capaz de fornecer as mesmas condições encontradas que a glicose; para o terceiro meio de cultura foi utilizada uma mistura contendo 50% de glicose e 50% de sacarose. Com exceção da fonte de carbono (glicose e/ou sacarose) todos os outros componentes foram mantidos (item 3.4.2.).

Para traçarmos um perfil químico dos diferentes meios foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra-violeta (HPLC-UV) e a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). As condições cromatográficas utilizadas foram descritas na seção 3.6.2.

De acordo com o item 4.3. o fungo *Xylaria* sp. mostrou grande capacidade para produção de isocumarinas. Com base neste fato, buscamos encontrar compostos desta classe nos meios utilizados, tendo assim um referencial de comparação. Devemos salientar ainda que compostos da classe das isocumarinas possuem boa absorção no UV, além de terem sido realizados estudos sobre os espectros de massas destes compostos (item 4.3.2).

4.4.2. Análise por HPLC

As análises por HPLC envolveram, primeiramente, a injeção das soluções dos padrões: soluções contendo 500 ug/mL das isocumarinas isoladas durante este

trabalho (item 4.3.). Na Figura 4.4.1. temos os cromatogramas com os respectivos espectros de UV da (A) meleína; (B) mistura epimérica da 4-hidroxi-meleína; (C) 5-formil-meleína e (D) meleína metil éter.

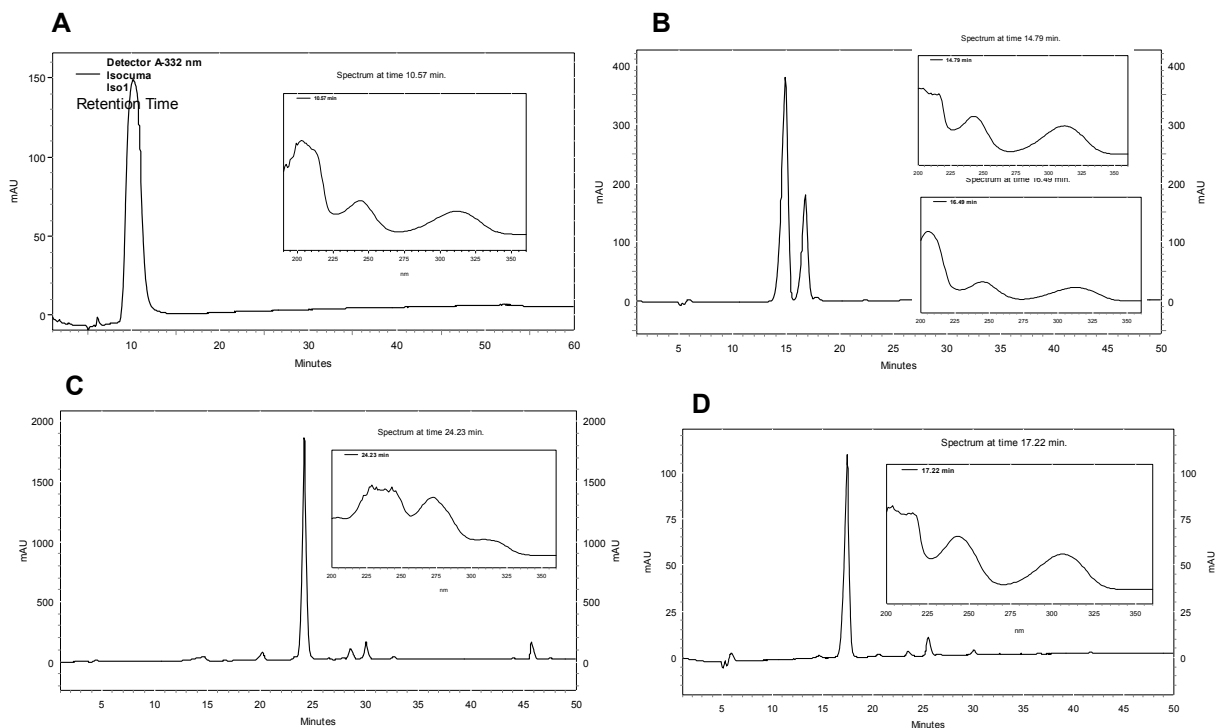


Figura 4.4.1. – Cromatograma e UV das isocumarinas isoladas: (A) Meleína; (B) Mistura epimérica da 4-Hidroxi-Meleína; (C) 5-Formil-Meleína e (D) Meleína Metil Éter.

A análise destes espectros nos forneceu a informação de que as isocumarinas isoladas possuem espectros de UV bastante similares, fato que facilita a identificação de isocumarinas nos extratos obtidos. Levando em consideração os espectros de UV, o comprimento de onda selecionado para as análises foi 332 nm.

Na seqüência foram injetadas as amostras dos diferentes meios de cultivo (glicose, sacarose e glicose/sacarose (1:1)). A concentração das soluções dos meios de cultivo foi de 5000 ug/mL, uma vez que temos agora a análise de extratos e a presença de isocumarinas deve ser reduzida. Para obtenção dos dados foi usado o mesmo comprimento de onda, 332nm. Os cromatogramas do micélio são verificados na Figura 4.4.2.

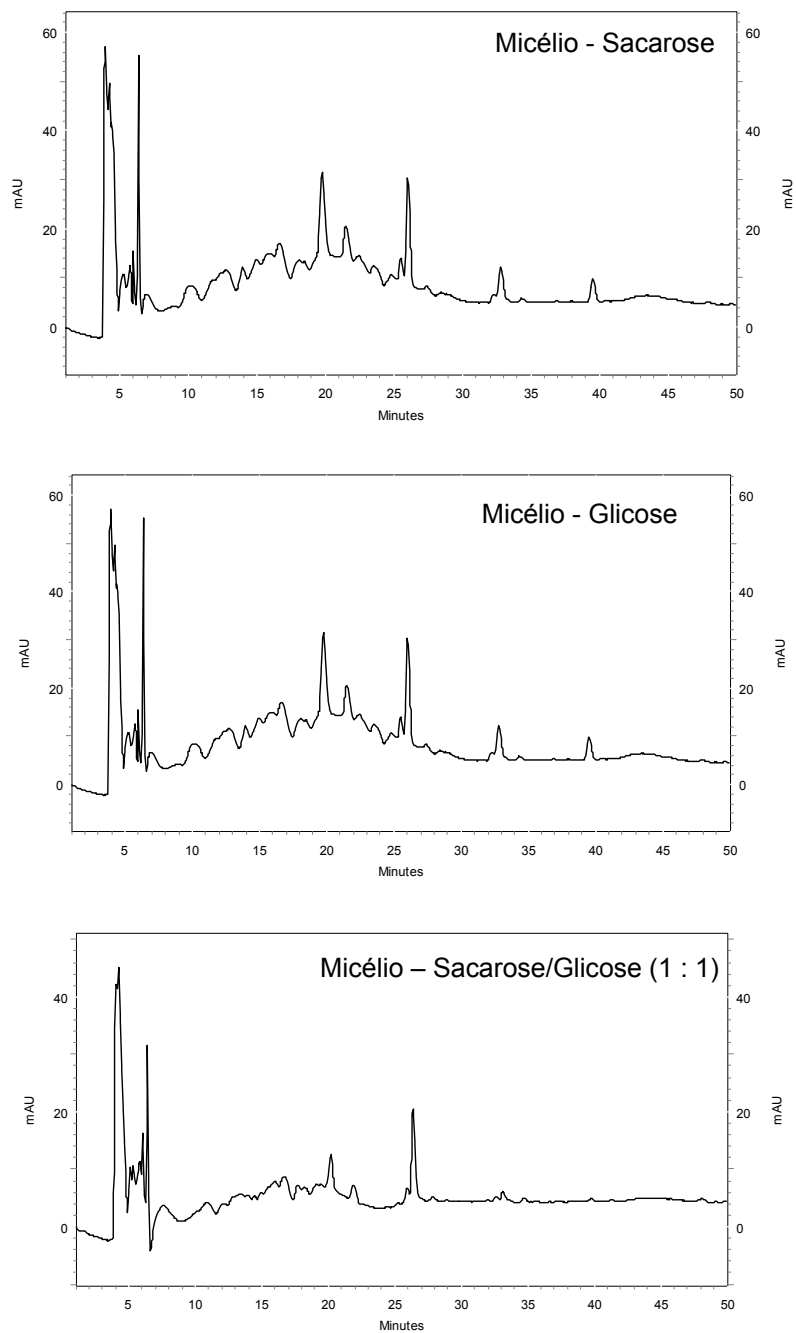


Figura 4.4.2. – Cromatograma do micélio dos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura: sacarose, glicose e sacarose/glicose (1:1), em 332 nm.

Também foram realizadas análises por HPLC, sob as mesmas condições (item 3.2.6.), para os extratos obtidos a partir dos Meios Líquido dos diferentes meios de cultura (sacarose, glicose e glicose/sacarose (1 : 1)). Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 4.4.3.

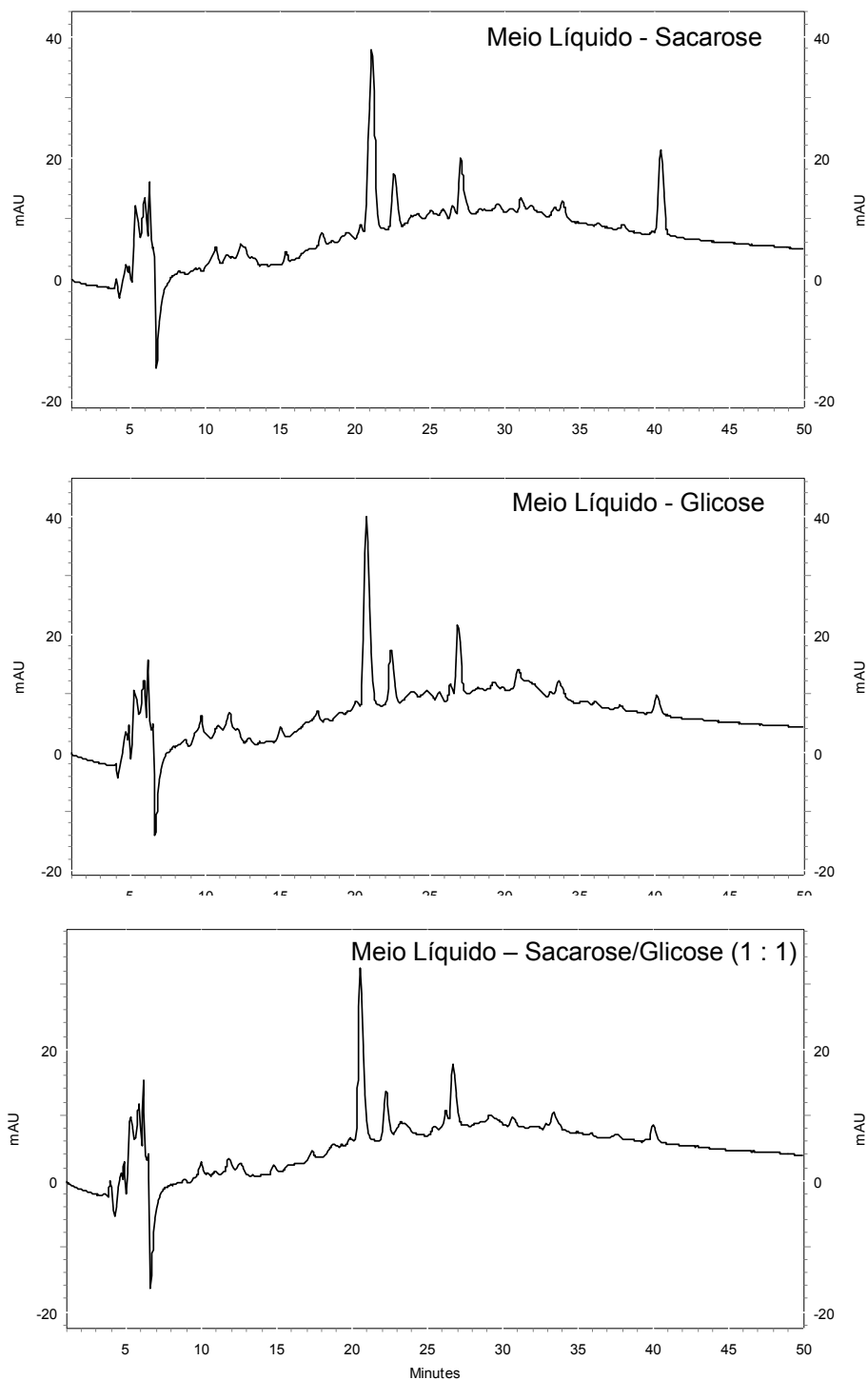


Figura 4.4.3. – Cromatograma do meio líquido dos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura: sacarose, glicose e sacarose/glicose (1:1), em 332 nm.

Através da análise dos cromatogramas, tanto do micélio (Figura 4.4.2.) quanto do meio líquido (Figura 4.4.3.), verificamos uma grande semelhança entre os meios utilizados. Notamos ainda que, embora algumas bandas presentes nos extratos possuam tempo de retenção similar aos padrões analisados (Figura 4.4.1.), um estudo mais aprofundado, envolvendo os espectros de UV das principais bandas

cromatográficas dos diferentes meios e comparando-os com os UV dos padrões foi realizado, visando buscar alguma banda que possuísse um espectro similar aos padrões. Na Figura 4.4.4. temos uma ilustração deste estudo, onde são mostrados o espectro de UV da 4-hidroxi-meleína (A) e os espectros de UV das principais bandas do cromatograma do micélio com 100% de glicose (B).

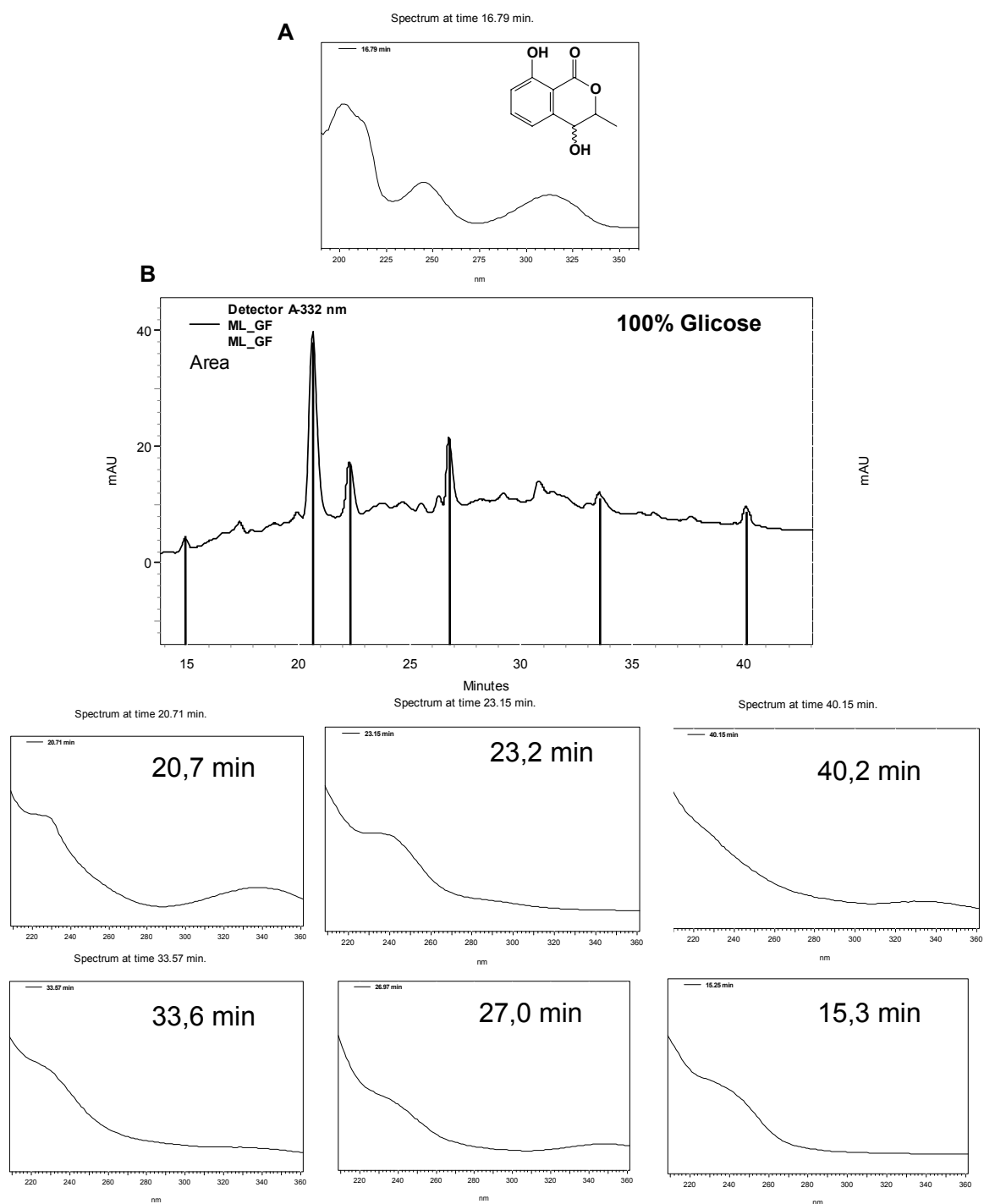


Figura 4.4.4. – (A) Espectro de UV da 4-hidroxi-meleína (B) Cromatograma do micélio com glicose e alguns espectros de UV das principais bandas cromatográficas (indicadas).

O procedimento envolvendo a comparação entre o espectro de UV dos padrões e das bandas cromatográficas dos extratos, mostrado na Figura 4.4.4., foi realizado para todos os extratos obtidos (micélio com glicose, micélio com sacarose, micélio com glicose/sacarose e meio líquido com glicose, meio líquido com sacarose e meio líquido com glicose/sacarose). Todos os resultados levaram a mesma conclusão, nenhuma das bandas observadas nos cromatogramas dos extratos deve ser proveniente de isocumarinas.

Para realizarmos uma busca mais sensível à presença de isocumarinas nos extratos passamos para análises utilizando a técnica de GC-MS.

4.4.3. Análise por GC-MS

Com o intuito de confirmarmos a presença ou ausência de isocumarinas nos extratos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura passamos a utilizar a técnica de GC-MS. Trata-se de uma técnica mais seletiva, sendo possível selecionar que m/z desejamos que o espectrômetro de massas (MS) detecte. No entanto, como os extratos obtidos continham compostos de polaridade bastante elevada realizamos extração em fase sólida (SPE) para *clean-up* desses extratos, conforme foi mostrado na Tabela 3.12. no item 3.6.2. Para garantir a eficiência do sistema de SPE empregado, os padrões (isocumarinas) também foram submetidos seguindo as mesmas condições cromatográficas.

Primeiramente foram analisados os padrões (isocumarinas). Os cromatogramas de íons totais (TIC – experimento onde são registrados todos os íons que chegam ao detector) são mostrados na Figura 4.4.5.

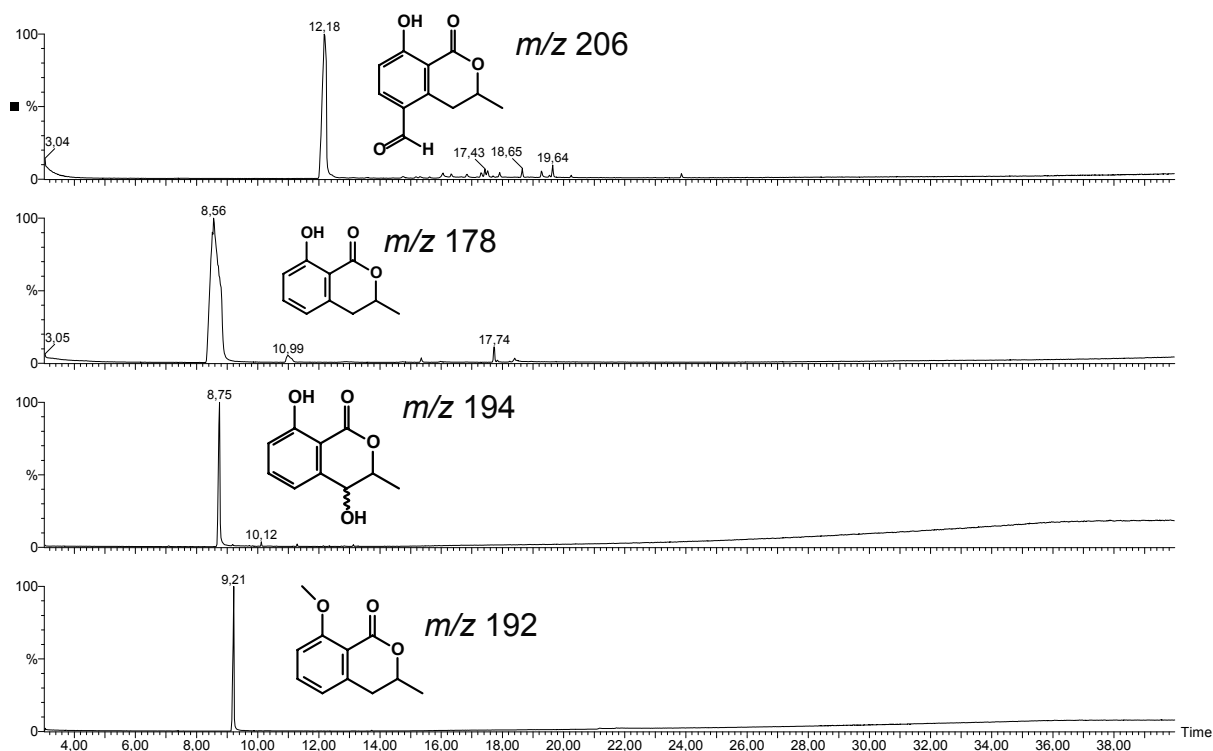


Figura 4.4.5. – Cromatograma de íons totais (TIC) das isocumarinas.

Na seqüência foram analisados os extratos obtidos a partir do micélio e do meio líquido dos diferentes meios de cultivo. Os cromatogramas obtidos para o micélio são mostrados na Figura 4.4.6.

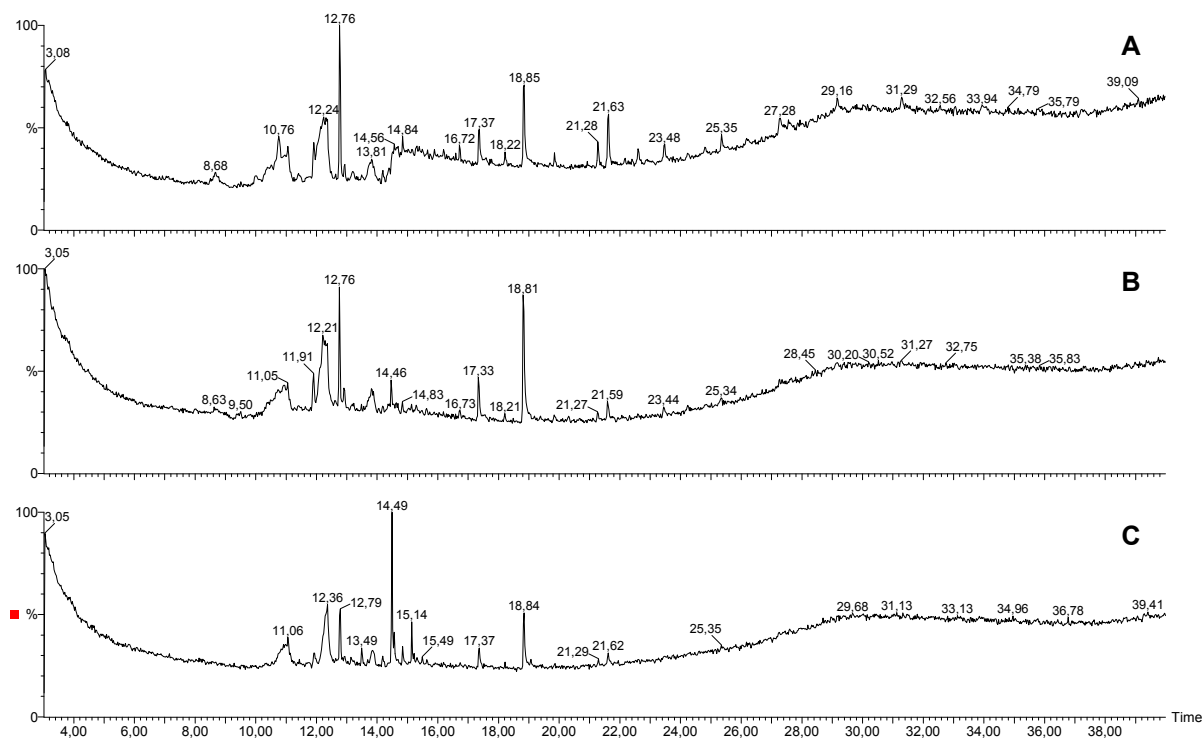


Figura 4.4.6. – Cromatogramas de íons totais (TIC) do micélio: (A) glicose, (B) sacarose e (C) sacarose/glicose.

De acordo com os dados insuficientes fornecidos pelo cromatograma da Figura 4.4.6. para indicar a presença de isocumarinas, foram realizados experimentos de íons selecionados, onde foi possível buscar em cada cromatograma (glicose, sacarose e sacarose/glicose) os íons referentes às isocumarinas. Na Figura 4.4.7. temos o experimento de íons selecionados para o extrato contendo o micélio com glicose (cromatograma mostrado na Figura 4.4.6. (A)).

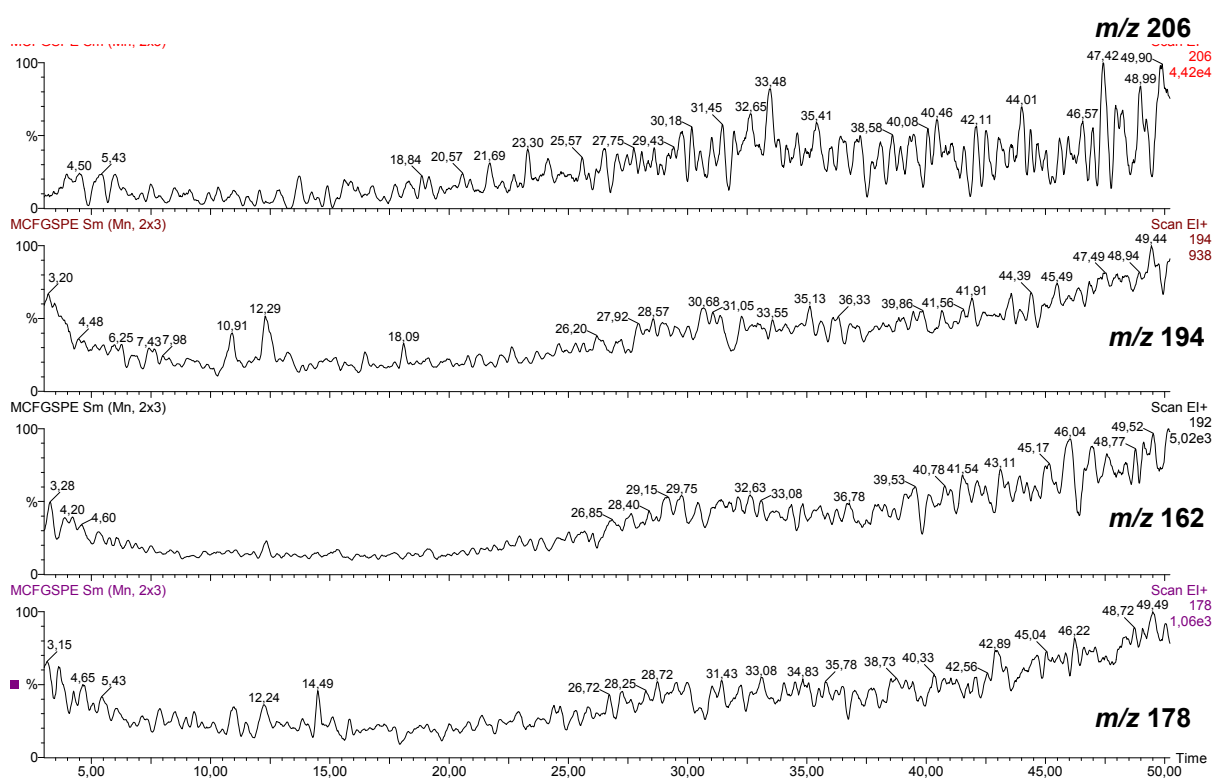


Figura 4.4.7. – Cromatogramas de íons selecionados referentes às isocumarinas. Extrato do micélio contendo glicose.

Analisando o cromatograma referente ao íon de m/z 194 (Figura 4.4.7.) verificamos duas bandas que poderiam ser atribuídas a 4-hidroxi-meleína (ou outra isocumarina, em 10,9 e 12,3 min., devido a massa observada), com tempo de retenção superior ao composto padrão. No entanto os espectros de massas destas bandas comprovaram a ausência de isocumarinas nas bandas citadas. Na Figura 4.4.8 são ilustrados os espectros de massas das bandas em 10,9 e 12,3 min. (Figura 4.4.8.(a) e Figura 4.4.8.(b), respectivamente).

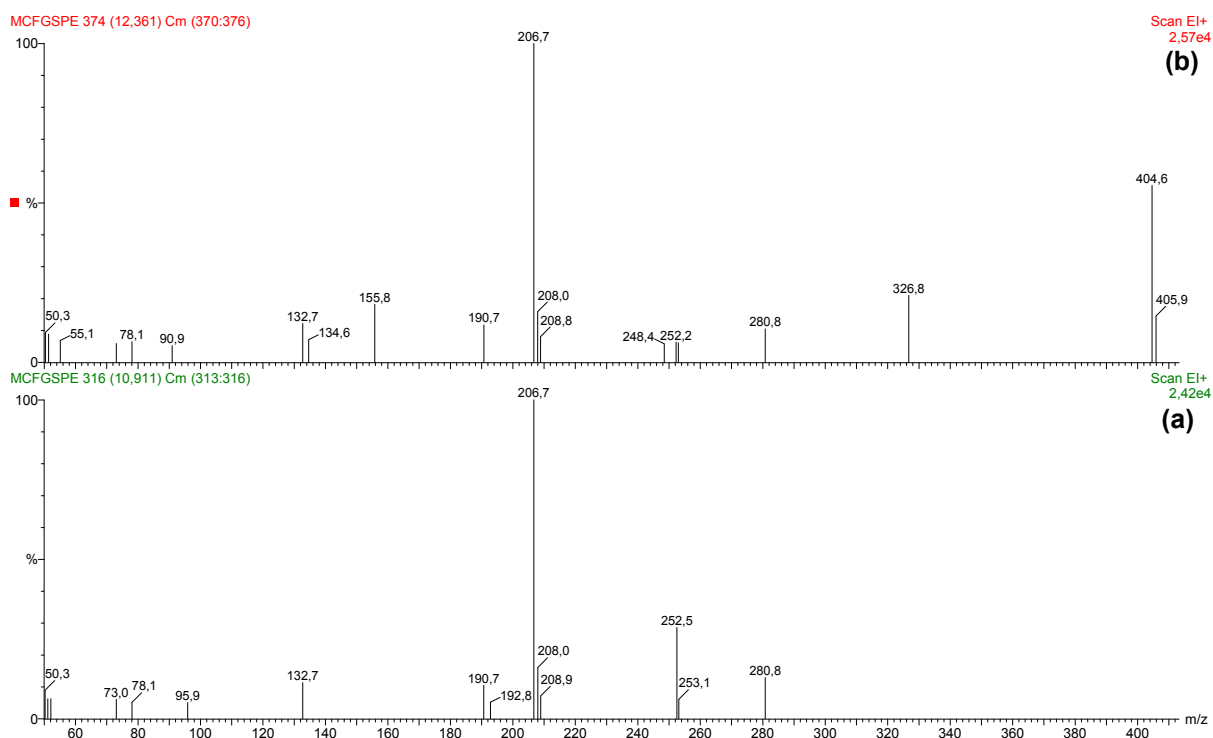


Figura 4.4.8. – Espectro de massas das bandas em 10,9 e 12,3 min. presentes no cromatograma de íons selecionados do micélio em glicose, referentes ao íon de m/z 194.

Baseando-se nos cromatogramas de íons selecionados, mostrado na Figura 4.4.7., podemos concluir que os extratos do micélio, contendo glicose como fonte de carbono, não apresentaram nenhuma das isocumarinas previamente isoladas. Também foram realizados experimentos de íons selecionados para os outros dois extratos (sacarose e sacarose/glicose) proveniente do micélio e nenhum destes extratos indicou a presença das isocumarinas.

As análises por GC-MS dos meios líquidos contendo as diferentes fontes de carbonos são mostradas na Figura 4.4.9., onde temos os cromatogramas de íons totais.

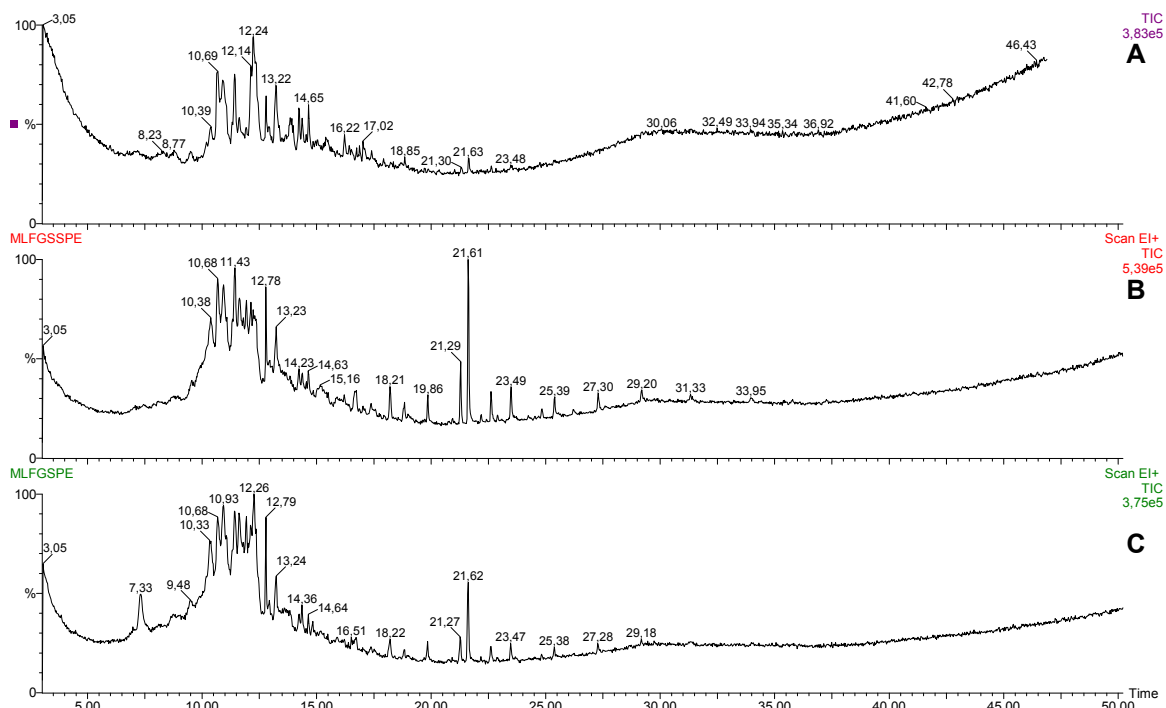


Figura 4.4.9. – Cromatogramas de íons totais (TIC) do meio líquido: (A) glicose, (B) sacarose e (C) sacarose/glicose.

Para os extratos provenientes do meio líquido também foram realizados experimentos de íons selecionados, buscando encontrar as isocumarinas isoladas previamente. Na Figura 4.4.10. são mostrados os espectros de íons selecionados para o extrato do meio líquido contendo glicose.

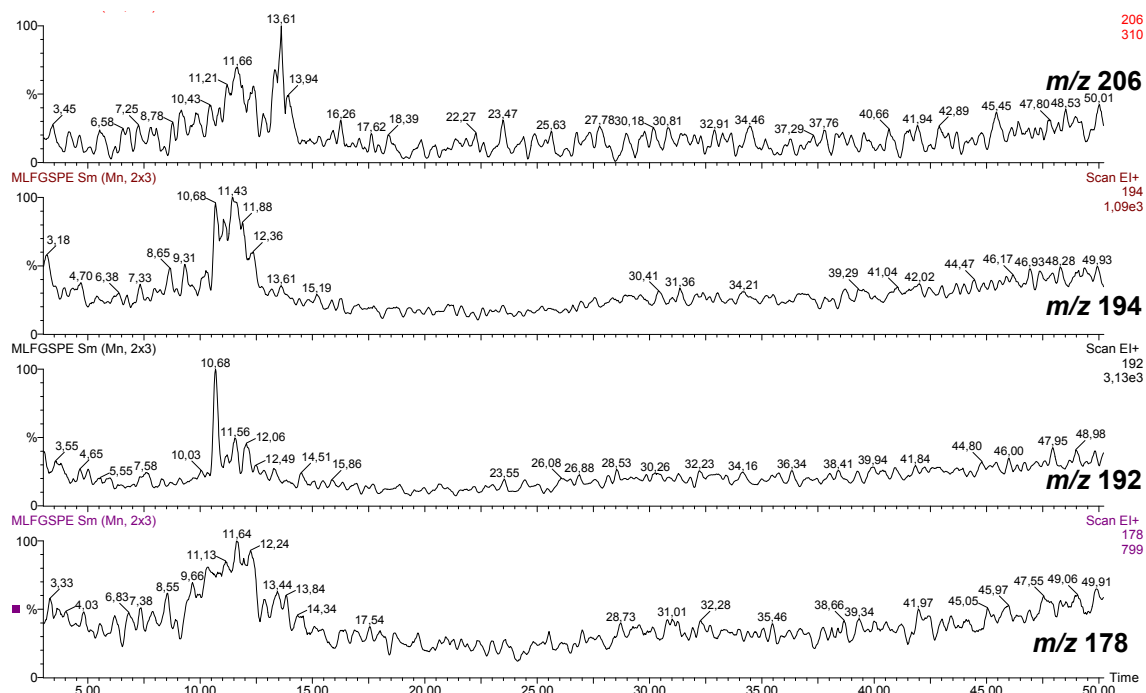


Figura 4.4.10. – Cromatogramas de íons selecionados referentes às isocumarinas, extratos do meio líquido contendo glicose.

Como podemos notar na Figura 4.4.10. verificamos que o cromatograma de íons selecionados referente à m/z 192 apresentou uma banda em 10,65 min., tempo superior à banda da meleína metil éter, mostrada no cromatograma da Figura 4.4.5. mas com espectro de massas (Figura 4.4.11) semelhante ao espectro da meleína metil éter, mostrado na Figura 4.3.13., de modo que podemos atribuir a presença deste composto no extrato obtido a partir do meio líquido contendo glicose.

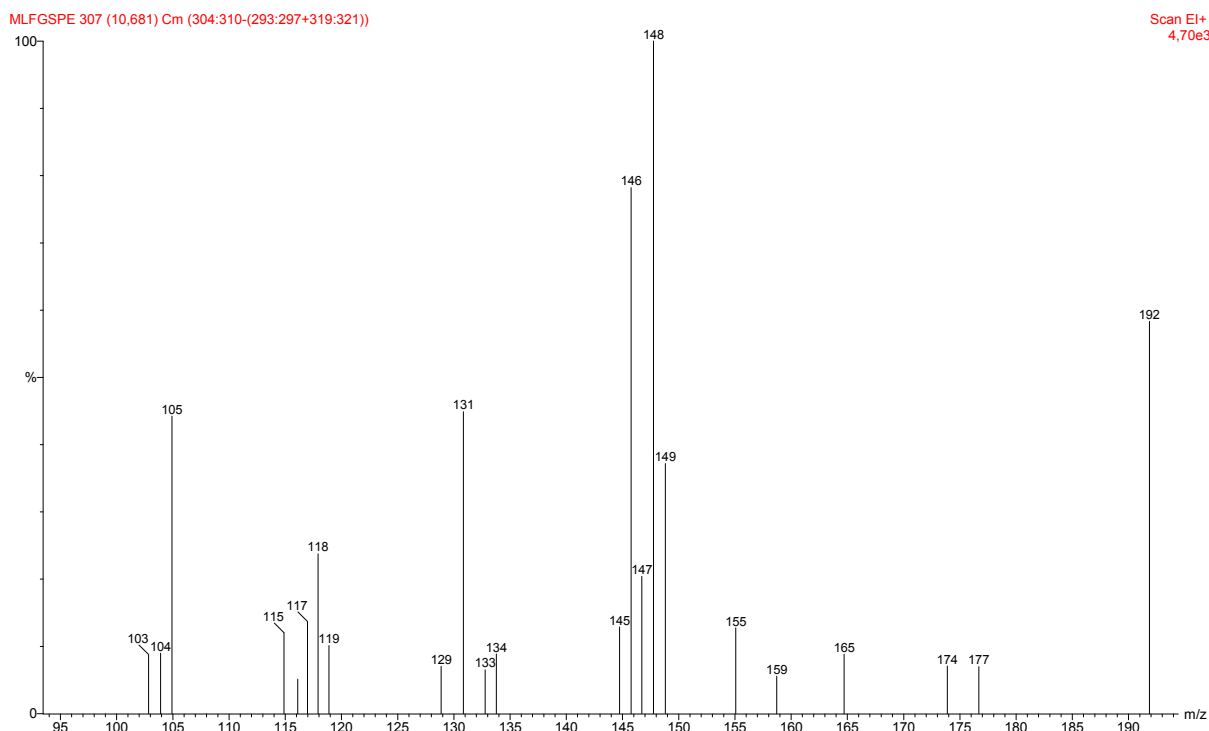


Figura 4.4.11. – Espectro de massas do meio líquido com glicose (10,65 min.), indicando a presença da meleína metil éter.

Foram realizados experimentos de íons selecionados para os extratos provenientes do meio líquido (sacarose e sacarose/glicose). Assim como para o meio líquido contendo glicose, os outros meios indicaram a presença, apenas, da meleína metil éter. Na Figura 4.4.12. são mostrados os cromatogramas de íons selecionados referentes a meleína metil éter (m/z 192), dos extratos contendo glicose, sacarose e glicose/sacarose.

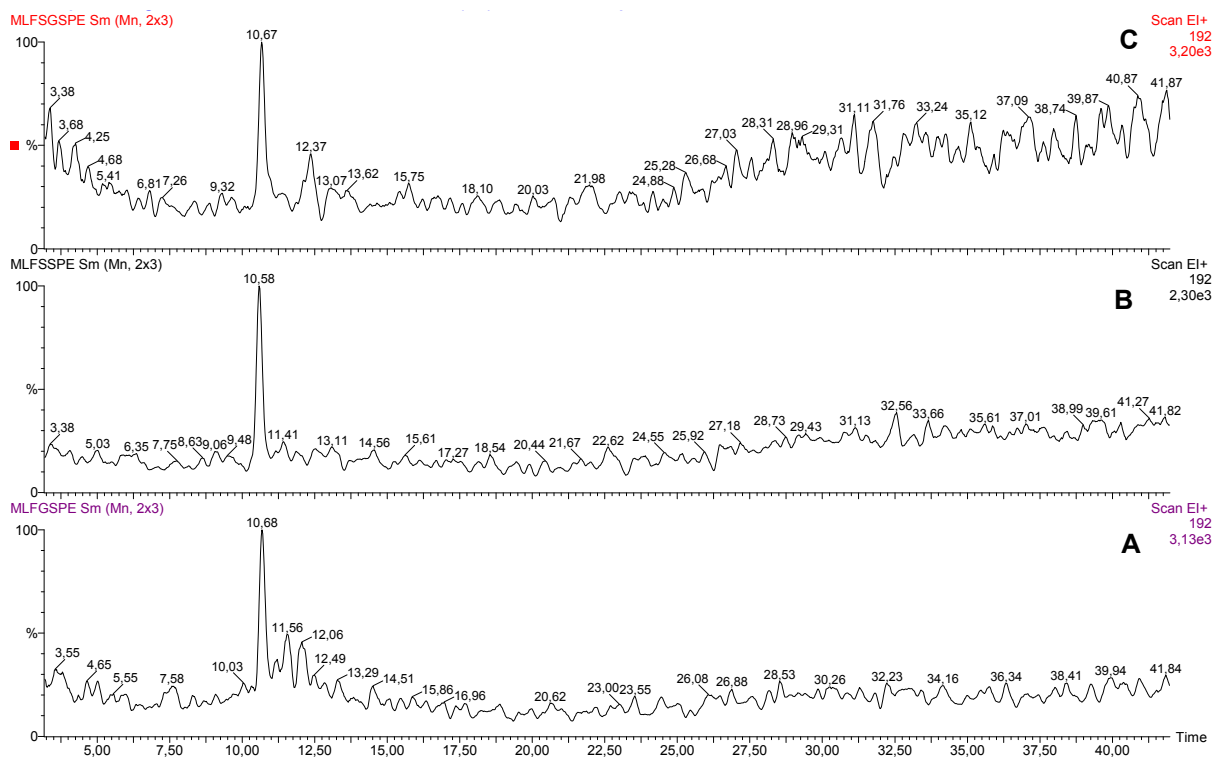


Figura 4.4.12. – Cromatogramas de íons selecionados referentes à Meleína Metil Éter (m/z 192), extratos do meio líquido contendo glicose (A), sacarose (B) e sacarose/glicose (C).

A única isocumarina encontrada, e isolada anteriormente (item 4.3.2.2.), foi a meleína metil éter, sendo que esta foi detectada em todos os extratos do meio líquido. O estudo dos extratos do micélio não indicou a presença de nenhum dos compostos análogos à Meleína. É importante ressaltar que todas as isocumarinas isoladas (descritas no item 4.3.2.) estavam presentes no micélio (com glicose como fonte de carbono), este fato contraria os resultados obtidos nos experimentos de comparação de meios, uma vez que constatamos apenas uma das isocumarinas e esta foi encontrada no meio líquido. No entanto devemos lembrar que o experimento que envolveu o isolamento de metabólitos secundários foi realizado durante 30 dias de cultivo, enquanto o experimento de comparação de meios durou 45 dias. Outro fator que pode ter influenciado os experimentos de cultivo do fungo em diferentes meios deve ser o fato de terem sido cultivados em escalas menores do que os experimentos de isolamento e identificação de metabólitos (comparar os itens 3.5. e 3.6.), isso dificultaria muito a detecção de substâncias em pequenas quantidades. Devemos salientar o fato que a técnica HPLC não forneceu informações suficientes sobre a presença ou não de isocumarinas, já o uso de GC-MS foi capaz de detectar um destes compostos nos extratos obtidos a partir dos meios líquidos.

Embora a detecção de isocumarinas tenha sido uma tarefa bastante complexa (apenas a Meleína Metil Éter foi detectada nos diferentes meios, usando a técnica de GC-MS) as duas técnicas utilizadas, HPLC e GC-MS, mostraram que, tanto para o micélio quanto para o meio líquido, os extratos do fungo *Xylaria* sp. cultivados em meio contendo glicose, sacarose e sacarose/glicose foram bastante similares, com algumas diferenças aparentes em relação as intensidades de certas bandas cromatográficas.

5. Conclusões e Perspectivas

Em relação aos procedimentos utilizados para isolamento e identificação de saponinas e OGSA a partir dos frutos de *Sapindus saponaria* obtivemos resultados significativos. O processo de hidrólise básica mostrou-se eficiente, de modo que não observamos tanto por espectrometria de massas quanto por NMR, a presença de grupos acetatos nos açúcares da saponina e OGSA. A coluna de Sephadex® LH-20 apresentou ótima capacidade para o isolamento das substâncias em questão, sendo que estas foram obtidas em grande quantidade e com elevado grau de pureza. Embora as técnicas de NMR tenham sido fundamentais para uma atribuição precisa das estruturas de saponinas e OGSA a técnica de MS e MS/MS foram práticas e rápidas para identificação e caracterização dos compostos isolados, onde a presença de diversos açúcares dificulta bastante a identificação por NMR.

As técnicas de HPLC e MS comprovaram a capacidade do fungo endofítico *Xylaria* sp., isolada de *S. saponaria*, em relação a biotransformação de saponinas e degradação dos OGSA isolados. Os experimentos de NMR foram fundamentais para atribuição da estrutura da saponina biotransformada, no entanto outros experimentos devem ser realizados para uma precisa proposta estrutural para o produto de biotransformação. O estudo envolvendo a interação entre o fungo *Xylaria* sp. e *S. saponaria* foi de extrema importância para uma melhor compreensão sobre a interação planta-microrganismo, ainda mais se tratando de uma planta (*Sapindus saponaria*) capaz de produzir grande quantidade de compostos com atividade antifúngica (saponinas).

Além de mostrar a capacidade de sobreviver nos tecidos de *S. saponaria*, o fungo *Xylaria* sp. mostrou-se com elevado potencial para produção de metabólitos secundários, dando destaque para a classe das isocumarinas. As técnicas espectrométrica (MS e NMR) foram fundamentais para determinação estrutural dos compostos isolados.

O fungo *Xylaria* sp. demonstrou capacidade de desenvolvimento nos três meios utilizados (glicose, sacarose e glicose e sacarose 1:1). Os perfis cromatográficos, tanto por HPLC quanto GC, dos extratos obtidos a partir destes três meios de cultura apresentaram grande similaridade. De modo que a sacarose, que possui um valor comercial reduzido em relação à glicose, pode ser utilizada para cultivo deste fungo em experimentos futuros. Fato surpreendente foi que, ao

contrário do primeiro cultivo de *Xylaria* sp. em glicose, o experimento envolvendo os três meios de cultura (incluindo glicose) não apresentaram a presença de isocumarinas em grande quantidade, sendo que apenas a Meleína Metil Éter foi detectada nos meios de cultura. Alguns fatos podem explicar a ausência desta classe de compostos nos meios utilizados: o experimento que envolveu o isolamento de metabólitos secundários foi realizado durante 30 dias de cultivo, enquanto o experimento de comparação de meios durou 45 dias. Outro fator que pode ter influenciado os experimentos de cultivo do fungo em diferentes meios deve ser o fato de terem sido cultivados em escalas menores do que os experimentos de isolamento e identificação de metabólitos. A presença da Meleína Metil Éter só pode ser detectada através do uso de GC-MS.

6. Referências Bibliográficas

- ABATE, D; ABRAHAM, WR; MEYER, H – “Cytochalasins and Phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*” - *Phytochemistry*, 44,1443-1448, **1997**.
- ALBIERO, ALM; SARRAGIOTTO, MH; FUJIMURA, A; BACCHI, EM – “Cytotoxic-activity of *Sapindus saponaria* L. fruits on Ehrlich ascitic tumor cells” – *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 20(3), 169-171, **2001**.
- ARAUJO, AR; CAFEU, MC; SILVA, GH; TELES, HL; BOLZANI, VS; YOUNG, MCM; PFENNING, LH – “Antifungal compounds of *Xylaria* sp., an endophytic fungus isolated from *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae)” – *Química Nova*, 28(6), 991 – 995, **2005**.
- ARULMOZHI, DK; VEERANJANEYULU, A; BODHNAKAR, SL; ARORA, SK – “Investigations of *Sapindus trifoliatus* in dopaminergic and serotonergic systems: Putative antimigraine mechanisms” – *Indian Journal of Pharmacology*, 37(2), 120-125, **2005**.
- BAMFORD, VA; KOLADE, OO; OSBOURN, AE; HEMMINGS, AM – “Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a fungal saponin-detoxifying enzyme” - *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D60, 1331 – 1333, **2004**.
- BAYMAN, P; ANGULO-SANDOVAL, P; BÁEZ-ORTIZ, Z; LODGE, DJ – “Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico” - *Mycol. Res.* 102, 944–948, 1998.
- BRAZ-FO, R; ALVARENGA, MA; GOTTLIEB, OR; DIAS, JP; MAGALHÃES, AF; MAIA, JGS; MARSAIOLI, AJ; - “Dihydroisocoumarins and Phthalide from wood samples infested by fungi” – *Phytochemistry*, 23(10), 511 – 516, **1978**.
- CHESTERS, NCJE; O’HAGAN, D – “Biosynthesis of the fungal metabolite, piliformic acid (2-hexylidene-3-methylsuccinic acid)” – *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 827 – 834, **1997**.
- CULCETH, H; FUCHSER, J; MOSS, SJ; NIESCHALK, J; O’HAGAN, D – “Evidence for an octanoate synthase operating during the biosynthesis of piliformic acid in *Poronia piliformis*” – *Tetrahedron Letters*, 39, 1949 – 1952, **1998**.
- CUTLER, HG; CRUMLEY, FG; COX, RH, COLE, RJ, DORNER, JW, LETTERELL, FM, ROSSI, AE – “Diplodiol: a new toxin from *Diplodia macrospora*” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(1), 135 – 138, **1980**.
- DEL FEL, NE; RADOSEVICH, MB – “High-performance liquid chromatography of triterpene saponins” – *Journal of Chromatography*, 368, 433 – 438, **1986**.
- DEVYS, M; BOUSQUET, JF; KOLLMANN, A; BARBIER, M – “Dihydroisocoumarines et acide mycophenolique du milieu du culture du champignon phytopathogene *Septoria nodorum*” – *Phytochemistry*, 19, 2221-2222, **1980**.

- DIMITRIADIS, C; GILL, M; HARTE, MF – “The first stereospecific approach to both enantiomers of mullein” - *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(13), 2153 - 2158, **1997**.
- EDWARDS, RL; ANDERSON, JR; WHALLEY, AJS – “Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family Xylariaceae” – *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, 9, 2185 – 2192, **1983**.
- ESPADA, A; RIVERA-SAGREDO, A; FUENTE, JM; RODRIGUÉZ, JAH; ELSON, SW – “New Cytochalasins from the Fungus *Xylaria hypoxylon*” - *Tetrahedron*, 53, 6485-6492, **1997**.
- FURNISS, BS; HANNAFORD, AJ; SMITH, PW; TATCHELL, AR – “VOGEL'S HANDBOOK of PRATICAL ORGANIC CHEMISTRY” – fifth edition, Longman Scientific & Technichal, pg 432, NY, **1989**.
- HE, X; TANG, J; QIAO, A; WANG, G; JIANG, M; LIU, RH; YAO, X – “Cytotoxic biotransformed products from cinobufagin by *Mucor spinosus* and *Aspergillus Niger*” – *Steroids*, 71, 392 – 402, **2006**.
- HEALY, PC; HOCKING, A; TRAN-DINH, N; PITT, JI; SHIVAS, RG; MITCHELL, JK; KOTIW, M; DAVIS, RA – “Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*” - *Phytochemistry*, 65, 2373-2378, **2004**.
- HEYNEKAMP, JJ; HUNSAKER, LA; JAGT, TAV; DECK, LM; JAGT, DLV – “Uncharged isocoumarin-based inhibitors of urokinase-type plasminogen activator” – *BMC Chemical Biology*, in press, **2006**.
- HILL, RA; CARTER, RH; STAUNTON, J – “Biosynthesis of Terrein, a metabolite of *Aspergillus terreus* Thom.” - *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 380 - 381, **1975**.
- HOLLER, U – “Isolation, Biological Activity and Secondary Metabolite Investigations of Marina-Derived Fungiant Selected Host Sponges” – Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, Alemanha, **1999**, Dissertação de Mestrado.
- JIA, Z; KOIKE, K; NIKAIDO, T – “Major triterpenoid saponins from *Saponaria officinalis*” – *Journal of Natural Products*. 61, 1368-1373, **1998**.
- KASAI, R; FUJINO, H; KUZUKI, T; WONG, WH; GOTO, C; YATA, N; TANAKA, O; YASUHARA, F; YAMAGUCHI, S – “Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus mukurossi*”- *Phytochemistry*, 25(4), 871 – 876, **1986**.
- KASAI, R; NISHI, M; MIZUTANI, K; MIYAHARA, I; MORIYA, T; MIYAHARA, K; TANAKA, O – “Trifolioside-li, an Acyclic Sesquiterpene Oligoglycoside from Pericarps of *Sapindus trifoliatus*” - *Phytochemistry* 27, 2209-2211 **1988**.

- KOJIMA, K; ZHU, XB; OGIHARA, Y – “Saponins from *Gliricidia sepium*” – *Phytochemistry*, 48(5), 885 – 888, **1998**.
- KOKUBUN, T; VEITCH, NC; BRIDGE, PD; SIMMONDS, MSJ – “Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*” – *Phytochemistry*, 62, 779–782, **2003**.
- KROHN, K; BAHRAMSARI, R; FLÖRKK, U; LUDEWIG, K; Kliche-Spory, C; MICHEL, A; AUST, HJ; DRAEGER, S; SCHULZ, B; ANTUS, S – “Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity” – *Phytochemistry*, 45(2), 313-320, **1997**.
- KUROSAKI, F – “Partial purification and characterization of 6-hydroxymellein-O-methyltransferase from elicitor-treated carrot cells” – *Phytochemistry*, 41(4), 1023-1027, **1996**.
- KUROSAKI, F; KIZAWA, Y; NISHI, A – “Derailment product in NADPH-dependent synthesis of a dihydroisocoumarin 6-hydroxymellein by elicitor-treated carrot cell extracts” – *European Journal of Biochemical*, 185, 85 – 89, **1989**.
- LACROIX, I; BITON, J; AZERAD, R – “Microbial Models of Drug Metabolism: Microbial Transformations of Trimegestone1 (RU27987), a 3-Keto-4,9(10)-19-norsteroid Drug” – *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, 2329-2341, **1999**.
- LEE, JS; KO, KS; JUNG, HS – “Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequence” – *FEMS Microbiology Letters*, 187(1), 89 – 93, **2000**.
- LEMOS, TLG; MENDES, AL; SOUSA, MP; BRAZ FILHO, R - “New saponins from *Sapindus saponaria*” - *Fitoterapia* LXIII, 6, 515-517, **1992**.
- LEWIS, CN; STAUNTON, J; SUNTER, DC – “A ^2H and ^{13}C NMR study of the biosynthesis of the polyketide isocoumarin residue of canescin in *Aspergillus malignus* from [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-, and [1- ^{13}C , 2- $^2\text{H}_3$] acetates, [Me- ^{13}C , $^2\text{H}_3$] Methionine, 6,8-dihydroxy-3,7-dimethylisocoumarin, and 6,8-dihydroxy-7-formyl-3-methylisocoumarin” – *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, 58 – 60, **1986**.
- LIN; WU X; FENG; JIANG, G; ZOU, S; VEIJMOED, L; JONES, G – “A novel *N*-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain c2508) from the South China Sea” – *Tetraedron Letters*, 42, 449-451, **2001**.
- MAGNANI, RF – “Contribuições ao entendimento do conceito de microrganismos endofíticos: biotransformação de ácido abiético por *Fusarium graminearum*; estudo químico de *Pestalopsis* sp.; e estudo da doença pinta-preta em *Citrus* causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*” – São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, **2002**. Dissertação de mestrado, 140 p.
- MANGALESWARAM, S; ARGADE, NP – “An efficient synthesis of (\pm)-piliformic acid” – *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 3290 – 3291, **2000**.

- MARSTON, A; HOSTETTMANN, K – “Plant Saponins: Chemistry and molluscicidal action” - *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids* - Clarendon Press - Oxford - **1991**.
- MARSTON, A; HOSTETTMANN, K– “Saponins. Chemistry & Pharmacology of Natural Products” – Cambridge University Press, Cambridge, **1995**.
- MERT-TURK, F – “Saponins versus plant fungal pathogens” – *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5, 13-17, **2006**.
- MOORE, JH; DAVIS, ND; DIENER, UL – “Mellein and 4-Hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm” – *Applied Microbiology*, 23(6), 1067 – 1072, **1972**.
- MORRISSEY, JP; OSBOURN, AE – “Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis” – *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 708 – 724, **1999**.
- MURGU, M – “Saponinas e Glicosídeos de *Sapindus saponaria*: Metodologias de Análise por Espectrometria de Massas com Fungos Endofíticos” – São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, **2002**. Tese de doutorado, 143 p.
- NAKANISHI, K; SANKAWA, U; BARTON, D;– “Comprehensive Natural Products Chemistry” – Vol. 1, Elsevier, Glasgow, UK, **1999**.
- NATORI, S, IKEKAWA, N; ZUZUKI, M – “Advances in Natural Products Chemistry” – 1st ed. New York, John Wiley & Sons, **1981**.
- OSBOURN, AE; BOWYER, P; DANIELS, MJ - "Saponin Detoxification by Plant Pathogenic Fungi". IN: *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*. WALLER, GR and YAMASAKI, K (Eds.). Nova Iorque, Plenum Press, 547-555, **1996**.
- PETRINI, O; SIEBER, TN; TOTI, L; VIRET, O – “Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi” – *Natural Toxins*, 1, 185-196, **1992**.
- PITTAYAKHAJONWUT, P; SUVANNAKAD, R; THIENHIRUN, S; PRABPAI, S; KONGSAEREE, P; TANTICHAROEN, M – “An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005)” - *Tetrahedron Letters*, 46, 1341–1344, **2005**.
- PLOCK, A; BEYER, G; HILLER, K; GRUNDEMANN, E; KRAUSE, E; NIMTZ, M; WRAY, V – “Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L.” – *Phytochemistry*, 57(3), 489-496, **2001**.
- QUIDDE, T; BUTTNER, P; TUDZYNSKI, P – “Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional

analysis of a gene coding for a putative avenacinase” – *European Journal of Plant Pathology*, 105(3), 273-283, **1999**.

QUIDDE, T; OSBOURN, AE; TUDZYNSKI, P – “Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*” – *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52(3), 151-165, **1998**.

RASTRELLI, L; AQUINO, R; ABDO, S; PROTO, M; DE SIMONE, F; DE TOMMASI, N - “Studies on the constituents of *Amaranthus caudatus* leaves: Isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and Ionol-derived glycosides” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1797-1804, **1998**.

ROMUSSI, G; FALSONE, G – “Constituents of Boraginaceae, VI: Anchusoside-4, a new triterpene saponin from *Anchusa officinalis* L.” – *Archieve Pharm. (Weinheim)* 318, 219-221, **1985**.

RUANGRUNGSI, N; SEKINE, T; PHADUNGCHAROEN, T; SURIYAGAN, S; MURAKOSHI, I – “Isocoumarins from *Xyris indica*” – *Phytochemistry*, 38(2), 481 – 483, **1995**.

SCHNEIDER, G; ANKE, H; STERNER, O – “Xylaramide, a new antifungal compound, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*” – *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Biosciences*, 51(11/12), 802-806, **1996**.

SHIBUYA, H; KITAMURA, C; MAEHARA, S; NAGAHATA, M; WINARNO, H; SIMANJUNTAK, P; KIM, HS; WATAYA, Y; OHASHI, K – “Transformation of cinchona alkaloids into 1-N-Oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. isolated from *Cinchona pubescens*” – *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 51(1), 71-74, **2003**.

SPARG, SG; LIGHT, ME; STADEN J – “Biological activities and distribution of plant saponins” – *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243, **2004**.

SWSBM – “Southwest School of Botanical Medicine” – em 02 de agosto de **2006**.
http://www.swsbm.com/images/images_S.html

SUN, JR; CHENG, KC; PAN, TY; SI, XM – “A new acyclic sesquiterpene oligoglycoside from pericarps of *Sapindus mukurossi*” – *Chinese Chemical Letters*, 13(6), 555-556, **2002**.

TELES, HL – “Estudo Químico de Metabólitos Secundários Produzidos por Fungos Endofíticos e Micoparasitas” – Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Química - UNESP, **2005**. Tese de doutorado, 551p.

TORRES, JA; SNELLING, RR; BLUM, MS; FLOURNOY, RC; JONES, TH; DUFFIELD, RM – “Mandibular gland chemistry of four Caribbean species of *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae)” – *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 673 – 680, **2001**.

- TORI, K.; SEO, S; TOMITA, Y – “C-13 NMR-Spectra of Olean-12-enes - full signal assignments including quaternary carbon signals assigned by use of indirect C-13, H-1 spin couplings” – *Tetrahedron Letters*, 48, 4227-4230, **1974**.
- TORI, K; SEO, S; YOSHIMURA, Y; NAKAMURA, M; TOMITA, Y; ISHII, H – “Carbon-13 NMR spectra of saikosaponins A, C, D, and F isolated from *Bupleurum falcatum* L.” – *Tetrahedron Letters*, 46, 4167-4170, **1976**.
- VOLK, T. – “Tom Volk’s Fungi” – em 2 de agosto de **2006**. tomvolkfungi.net.
- WAHAB, SMA; SELIM, MA – “Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*” – *Fitoterapia*, 56 (3), 167-168, **1985**.
- WEISLEDER, D and LILLEHOJ, E – “Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance assignments and biosynthesis of Ochratoxin A” – *Tetrahedron Letters*, 21, 993-996, **1980**.
- WILLITS, MG, GIOVANNI, M, PRATA, RTN, KRAMER, CM, DE LUCA, V, STEFFENS, JC; GRASER, G – “Bio-fermentantion of modified flavonoids: an example of *in vivo* diversification of secondary metabolites” – *Phytochemistry*, (65), 31-41, **2004**.
- WONG, W-H; KASAI, R; CHOSHI, W; NAKAGAWA, Y; MIZUTANI, K; OHTANI, K; TANAKA, O - “Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus delavayi*” - *Phytochemistry*, 30, 2699-2702, **1991**.
- YOSHIKAWA, M; SHIMADA, H; MORIKAWA, T; YOSHIZUMI, S; MATSUMURA, N; MURAKAMI, T; MATSUDA, H; HORI, K; YAMAHARA, J – “Medicinal Foodstuffs VII. on the saponin constituents with glucose and alcohol absorption-Inhibitory activity from a food guarnish “Tonburi”, the fruit of Japanese *Koshia scoparia* (L.): structures of Scoparianosides A, B and C.” – *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(8), 1300-1305, **1997**.
- ZOBERI, MH – “Tropical Macrofungi” – 1st ed, The MacMillan Press, London, **1972**.