

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

**“Análise de metabólitos secundários produzidos por
fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica*”**

Luciana da Silva Amaral*

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista FAPESP**

São Carlos - SP
Fevereiro de 2009

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

A485am

Amaral, Luciana da Silva.

Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica* / Luciana da Silva Amaral. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 164 f.

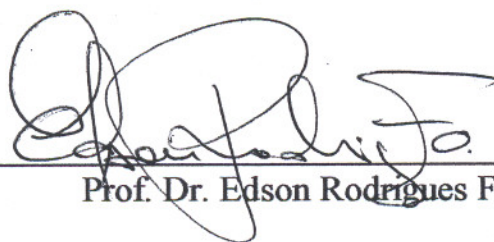
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fungos endofíticos. 2. *Cupressus lusitanica*. 3. Sesquiterpenos eremofilanos. 4. Citocalasinas. I. Título.

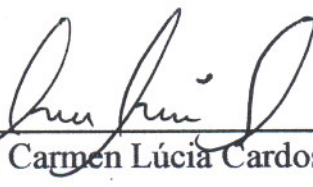
CDD: 547 (20^a)

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 da candidata **Luciana da Silva Amaral**, realizada em 12 de fevereiro de 2009:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dra. Carmen Lúcia Cardoso



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

Agradecimentos

A Deus, pela dádiva da vida.

Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho, pela valiosa oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade.

Aos meus pais, Maria Helena e Arnaldo, por sempre me mostrarem a importância de uma boa formação, pelo apoio e constante incentivo.

Aos meus irmãos Reginaldo e Juliana pela bela amizade e companheirismo.

Aos meus sobrinhos Bruno, Ísis e Danilo pela alegria transmitida em seus lindos rostinhos.

Aos meus familiares, em especial meus avós, pelo constante carinho nesta trajetória.

Ao meu amor, Fabio, pela paciência, apoio, incentivo e por tudo que nos pertence.

Aos amigos Victor e José Vinícius pela preciosa colaboração neste trabalho.

Aos amigos do LaBioMMi, Diana, Amanda, Malu, Cíntia, Mariana, Thais, Natália, Jucimar, Bianca, Heloisa, Marília, Angelo, Diego, Matiello, Enzo, Gezimar, Rodrigo, Luis Fernando, Florim, pela convivência, amizade e diversão.

As amigas Lívia e Taícia, pelo companheirismo, amizade, cooperação e muitos risos.

Ao QUARTETO QUI 03, Juliana, Maiara e Renata, pelos ótimos anos de convivência, luta e acima de tudo AMIZADE.

Aos professores Carmen Lúcia Cardoso e Ian Castro-Gamboa, pela participação na banca examinadora.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais.

Aos professores e colaboradores do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará, pela realização dos ensaios citotóxicos.

Aos demais professores do DQ-UFSCar, pelos ensinamentos.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar, pelos serviços prestados durante a execução deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

PRINCIPAIS ABREVIações

atm	-	Atmosfera
BDA	-	Batata, dextrose, ágar
BD	-	Batata, dextrose
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	-	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	-	Correlation spectroscopy
d	-	Dubleto
Da	-	Dalton
dl	-	Dubleto largo
dd	-	Duplo dubleto
ddd	-	Duplo duplo dubleto
dt	-	Duplo tripleto
EFS	-	Extração em fase sólida
EM	-	Espectrometria de massas
ESI	-	ionização por <i>Electrospray</i>
HMBC	-	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	-	Heteronuclear single Quantum coherence
Hz	-	Hertz
J	-	Constante de acoplamento
LaBioMMi	-	Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos
m	-	Multiplete
MHz	-	Mega-Hertz
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
NOE	-	Nuclear Overhouser effect
ODS	-	Octadecilsilano
s	-	Singleto
sl	-	Singleto largo
t	-	Tripleto
TIC	-	Cromatograma de íons totais
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
¹ H RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
¹³ C RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
UV	-	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação de algumas variedades de fungos e estruturas reprodutivas.....	1
Figura 1.2. Microrganismos capazes de penetrar e associar-se a plantas (AGRIOS, 1988).....	4
Figura 1.3. Hipótese: o equilíbrio entre a virulência do endofítico e a resposta de defesa da planta resulta em uma colonização assintomática.....	6
Figura 1.4. Método de penetração e invasão pelo fungo (AGRIOS, 1988).....	7
Figura 1.5. Exemplos de alcalóides do <i>ergot</i>	9
Figura 1.6. Fórmula estrutural (A) Camptotecina, (B) Podofilotoxina, (C) Hipericina.....	11
Figura 1.7. (A) <i>Cupressus lusitanica</i> localizada no campus da UFSCar, (B) ramo de <i>C. lusitanica</i> com cones masculinos e femininos.....	12
Figura 1.8. Diterpenos produzidos por <i>C. lusitanica</i> ; (A) abietanos (B) labdanos e (C) pimaranos.....	13
Figura 1.9. Estruturas moleculares das tropolonas glicosiladas (A) e (B) e a β -tujaplicina (C) produzidas por <i>C. lusitanica</i>	14
Figura 1.10. Fórmula estrutural das lignanas arctigenina e matairesinol isoladas de <i>C. lusitanica</i>	15
Figura 1.11. Fórmula estrutural dos biflavonóides isolados de <i>C. lusitanica</i> (A) Amentoflavona e (B) Cupressoflavona.....	16
Figura 1.12. (A) Folhas secas de <i>C. lusitanica</i> devido ao ataque de <i>Seiridium unicorne</i> , (B) resina exsudada em decorrência da infecção.....	17
Figura 1.13. Estruturas das fitotoxinas produzidas por espécies de <i>Seiridium</i> : (A) Seiridina, (B) Isoleiridina, (C) 7-hidroxi seiridina, (D) 7-hidroxi isoleiridina, (E) Seiricuprolida, (F) Ácido ciclopáldico, (G) Seiricardina A, (H) Seiricardina B, (I) Seiricardina C.....	17
Figura 1.14. Estrutura das spaheropsidinas A - F, respectivamente, produzidas por <i>S. sapinea</i>	18
Figura 3.1. Partes nas quais os galhos de <i>Cupressus lusitanica</i> foram divididos.....	27
Figura 3.2. Ilustração do sistema reacional para obtenção de diazometano.....	31
Figura 3.3. Coluna SEPHADEX LH-20 utilizada na pré-purificação do extrato PECL.....	42
Figura 3.4. Representação do procedimento adotado para realização do ensaio antifúngico pelo método de dispersão em ágar. (A), (B) e (C) representam as concentrações das soluções em DMSO dos extratos testados. (A) 5 mg/mL, (B) 2,50 mg/mL e (C) 1,25 mg/mL.....	49
Figura 4.1.1. Fungos endofíticos isolados das folhas de <i>Cupressus lusitanica</i>	52
Figura 4.1.2. Placas de Petri que monitoraram a assepcia do processo de isolamento dos microrganismos de <i>C. lusitanica</i>	53
Figura 4.1.3. Fungos endofíticos isolados de <i>C. lusitanica</i> e seus respectivos códigos.....	53
Figura 4.2.1 Crescimento micelial de NICL1, NICL3, NICL4 e NICL5 após 20 dias de cultivo.....	55

Figura 4.2.2. Características observadas: (A) N1CL1 após 20 dias de cultivo e coloração esverdeada do extrato PN1CL1, (B) modificação na aparência de N1CL4 em meios diferentes e (C) estruturas delgadas e longas de N1CL5.....	55
Figura 4.3.1. Cromatograma das frações ricas nos diterpenos ácido abiético (AA), ácido diidroabiético (ADA) e ácido diidro-isoestérvico (ADIE) em 236 nm.....	56
Figura 4.3.2. Cromatogramas das frações PHCL (A-F) $\lambda = 236$ nm.....	57
Figura 4.3.3. Cromatogramas das frações N1CL1 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	58
Figura 4.3.4. Cromatogramas das frações MN1CL2 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	59
Figura 4.3.5. Cromatogramas das frações PN1CL2 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	59
Figura 4.3.6. Cromatogramas das frações MN1CL3 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	60
Figura 4.3.7 Cromatogramas das frações PN1CL3 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	60
Figura 4.3.8 Cromatogramas das frações N1CL4 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	61
Figura 4.3.9. Cromatogramas das frações MN1CL5 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	62
Figura 4.3.10. Cromatogramas das frações PN1CL5 (A-F), $\lambda = 236$ nm.....	62
Figura 4.4.1. Cromatograma de íon totais do extrato botânico PHCL.....	64
Figura 4.4.2. Diterpenos propostos pela biblioteca do espectrômetro de massas.....	64
Figura 4.4.3. (A) espectros de massas referente à banda com $t_r = 29,00$ min e (B) espectro da de massas da biblioteca e (C) diterpeno abietato.....	65
Figura 4.4.4. (A) Cromatograma de íon selecionados a m/z 286 e seus respectivos espectros de massas.....	65
Figura 4.4.5. (A) Cromatograma de íons selecionados a m/z 328 (B) Espectros de massas de CL5 e comparação com a biblioteca e (C) espectros de massas de CL6 e comparação com a biblioteca.....	66
Figura 4.4.6. Espectro de massas com tempo de retenção 34,08 min e (B) ácido abiético.....	67
Figura 4.4.7. Cromatograma de íon totais do extrato hexânico da folhas de <i>Cupressus lusitanica</i>	68
Figura 4.4.8. Substâncias detectadas por CG/EM no extrato de <i>C. lusitanica</i>	68
Figura 4.4.9. (A) Espectro de massas de CL7, (B) comparação do espectro de CL7 com os dados da biblioteca e (C) 3-careno.....	69
Figura 4.4.10. Espectro de massas de CL8, (B) Comparação com biblioteca e (C) naftaleno.....	69
Figura 4.4.11. (A) Espectro de massas de CL9, (B) comparação do espectro de CL9 com os dados da biblioteca e (C) calameno.....	70
Figura 4.4.12. Cromatograma de íons selecionados a m/z 316.....	70
Figura 4.4.13. Espectros de massas de: (A) CL14 éster metílico do ácido pimárico e (B) CL15 éster metílico do ácido abiético.....	71
Figura 4.4.14. (A) Espectro de massas da substância com t_r em 31,39 min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) ácido octadecanóico.....	72

Figura 4.4.15. (A) Espectro de massas da substância com tr em 34,34 min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) estrutura do ácido dicarboxílico.....	72
Figura 4.4.16. (A) Espectro de massas da substância com tr em 34,59 min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) hidrocarboneto tritetracontano.....	73
Figura 4.4.17. (A) Espectro de massas da substância com tr em 34,59 min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) z-9-octadecenoato de metila.....	74
Figura 4.4.18. (A) Espectro de massas da substância com tempo de retenção em 30,05 minuto, (B) espectro de massas da biblioteca do espectrômetro e (C) 16-metil, heptadecanoato de metila.....	74
Figura 4.4.19. Cromatograma de íons totais derivados com diazometano : (A) extrato PNICL2 e (B) MNICL2.....	75
Figura 4.4.20. (A) Espectro de massas da substância eluída em 22,74 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) 12-metil, tridecanoato de metila.....	75
Figura 4.4.21. (A) Espectro de massas da substância eluída em 26,54 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) 14-metil, pentadecanoato de metila.....	75
Figura 4.4.22. (A) Espectro de massas da substância eluída em 30,03 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) 16-metil, heptadecanoato de metila.....	76
Figura 4.4.23. (A) Espectro de massas da substância eluída em 33,27 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) eicosanoato de metila.....	76
Figura 4.4.24. (A) Espectro de massas, (B) comparação com a biblioteca e (C) 2-hidroxi fenil etanol.....	77
Figura 4.4.25. (A) Comparação dos espectros obtido do extrato MNICL3 e da biblioteca do espectrômetro e (B) diterpeno eremofilano valenceno.....	77
Figura 4.4.26. (A) Banda com tempo de retenção = 19,35 min do cromatograma de íons selecionados a m/z 178 e seu respectivo espectro de massas (B). (C) comparação dos espectros de massas e (D) estrutura molecular da meleína.....	87
Figura 4.4.27. Espectros de massas com íon molecular m/z 192 (A) de PNICL3 com tr = 22,32 min e (B) MNICL3 22,23 min e (C) éster metílico da meleína.....	80
Figura 4.4.28. (A) Espectros de massas com íon molecular m/z 206 em PNICL3 (tr = 23,83 min) e (B) 5-formil meleína.....	81
Figura 4.4.29. (A) Espectro de massas da substância com tr= 24,78 min, (B) espectro relacionado a biblioteca e (C) tetradecanoato de metila.....	82
Figura 4.4.30. (A) Espectro de massas da substância com tr= 27,13 min, (B) espectro relacionado a biblioteca e (C) 14-metil, pentadecanoato de metila.....	82
Figura 4.4.31. (A) Cromatogramas de íons totais de (A) MNICL4 e (B) PNICL4.....	83
Figura 4.4.32. (A) Espectro de massas da substância com tr = 30,03 min, (B) espectro da biblioteca, (C) 16-metil, heptadecanoato de metila.....	84
Figura 4.4.33. (A) Espectro de massas da substância com tr = 31,66 min, (B) espectro da biblioteca, (C) nonadecanoato de metila.....	84

Figura 4.4.34. (A) Espectro de massas da substância com $t_r = 33,31$ min, (B) espectro da biblioteca, (C) eicosanoato de metila.....	84
Figura 4.4.35. (A) espectro de massas da substância eluída em 22,25 min do extrato PNICL5 e (B) espectro de massas do éster metílico da meleína detectada no extrato PNICL3.....	85
Figura 4.4.36. Ácido Pilifórmico.....	86
Figura 4.4.37. (A) e (C) banda cromatográfica e espectro de massas do éster metílico do ácido pilifórmico, (B) e (D) detecção do referido éster no extrato PNICL5.....	86
Figura 4.5.1. Espectro de ^1H RMN em 400 MHz da fração PNICL3B68 em CDCl_3	89
Figura 4.5.2. Espectro de COSY em 400 MHz da fração PNICL3B68 em CDCl_3 (A) região de aromáticos e (B) correlação dos hidrogênios na região mais blindada do espectro.....	89
Figura 4.5.3. Estrutura presente na fração PNICL3B68.....	89
Figura 4.5.4. Espectro de massas da fração PNICL3B68.....	90
Figura 4.5.5. Espectro de ^1H RMN de PNICL3C15 em CDCl_3 (400MHz).....	91
Figura 4.5.6. Estrutura parcial proposta para PNICL3C15.....	91
Figura 4.5.7. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 400MHz de PNICL3C28.....	92
Figura 4.5.8. Espectro de ^{13}C RMN em CDCl_3 de PNICL3C28.....	93
Figura 4.5.9. Espectro de DEPT 135 em CDCl_3 de PNICL3C28.....	93
Figura 4.5.10. Espectro de COSY em CDCl_3 de PNICL3C28.....	94
Figura 4.5.11. Espectro de HSQC de PNICL3C28.....	94
Figura 4.5.12. Espectro de HMBC de PNICL3C28.....	95
Figura 4.5.13. Estrutura parcial da substância PNICL3C28 e as correlações observadas no COSY, HSQC e HMBC.....	95
Figura 4.5.14. Grupo pertencente à fração PNICL3C28 e as correlações observadas no COSY e HSQC.....	96
Figura 4.5.15. Estrutura proposta para a substância da fração PNICL3C28 e as correlações observadas no COSY, HSQC e HMBC.....	96
Figura 4.5.16. Estereoquímica proposta para a substância da fração PNICL3C28.....	97
Figura 4.5.17. Espectro de NOE de PNICL3C28.....	97
Figura 4.5.18. Espectro de Massas da molécula presente na fração PNICL3C28.....	98
Figura 4.5.19. Espectro de íons produtos de m/z 265.....	98
Figura 4.5.20. Espectro de ^1H RMN de PNICL3B37 em CDCl_3 (200 MHz).....	100
Figura 4.5.21. Estrutura de PNICL3B37.....	100
Figura 4.5.22. Espectro de ^1H RMN em 400MHz de PNICL3D11 em CDCl_3	101
Figura 4.5.23. Espectro de COSY de PNICL3D11 em CDCl_3	102
Figura 4.5.24. Espectro de HSQC de PNICL3D11 em CDCl_3	102
Figura 4.5.25. Estrutura parcial proposta para a molécula PNICL3C11 através das correlações de COSY.....	103
Figura 4.5.26. Espectro de HMBC de PNICL3D11 em CDCl_3	103

Figura 4.5.27. Estrutura parcial proposta para a molécula PNICL3C11 através das correlações de COSY e HMBC.....	104
Figura 4.5.28. Estrutura proposta para a molécula PNICL3C11.....	104
Figura 4.5.29. Estereoquímica relativa proposta para a substância PNICL3D11.....	105
Figura 4.6.1 Desenvolvimento do fungo NICK3 em diferentes meios de cultura; (A) arroz, (B) milho, (C) extrato de soja e (D) Czapeck + 2% de extrato de levedura.....	106
Figura 4.6.2. Cromatogramas dos meios de cultura sem crescimento fúngico; (A) Arroz ($\lambda= 225$ nm), (B) Milho ($\lambda= 285$ nm), (C) Czapeck com 2% de extrato de levedura ($\lambda= 287$ nm) e (D) Extrato de Soja ($\lambda= 248$ nm).....	107
Figura 4.6.3. Cromatogramas ($\lambda = 225$ nm) dos extratos obtidos a partir de EtOH dos diferentes meios de cultivo de NICK3: (A) Arroz, (B) Milho, (C) Czapeck com 2% extrato de levedura e (D) Extrato de soja.....	108
Figura 4.6.4. Cromatogramas ($\lambda = 225$ nm) dos extratos obtidos a partir de AcOEt dos diferentes meios de cultivo de NICK3: (A) Arroz, (B) Milho, (C) Czapeck com 2% extrato de levedura e (D) Extrato de soja.....	108
Figura 4.7.1. (A) Cromatograma de íons totais (TIC) da fração PNICL5B e (B) Cromatogramas de íons selecionados a m/z 508.....	109
Figura 4.7.2. Espectros de massas <i>full scan</i> das substâncias presentes na fração PNICL5B: (A) 12,80 min, (B) 15,34 min e (C) 16,42 min.....	110
Figura 4.7.3. Espectros de íons produtos de m/z 508 das substâncias presentes na fração PNICL5B: (A) 12,80 min, (B) 15,34 min e (C) 16,42 min.....	110
Figura 4.7.4. Cromatograma da fração PNICL5B.....	111
Figura 4.7.5. Espectro de ^1H RMN em 400MHz de PNICL5B1 em CDCl_3	112
Figura 4.7.6. Espectro de COSY de PNICL5B1 em CDCl_3	112
Figura 4.7.7. Espectro de HSQC de PNICL5B1 em CDCl_3	113
Figura 4.7.8. Espectro de HMBC de PNICL5B1 em CDCl_3	114
Figura 4.7.9. Estrutura parcial da substância PNICL5B1.....	114
Figura 4.7.10. Estrutura molecular da citocalasina D.....	117
Figura 4.7.11 Estruturas químicas das citocalasinas C e Q.....	119
Figura 4.7.12. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (400 MHz) da fração PNICL5B2.....	120
Figura 4.7.13. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (400 MHz) da fração PNICL5B3.....	120
Figura 4.7.14. Espectro de HSQC de PNICL5B3.....	121
Figura 4.7.15. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (400 MHz) de MNICL5B16.....	122
Figura 4.7.16. Estrutura molecular do ergosterol.....	122
Figura 4.7.17. Espectro de ^1H RMN de MNICL5F' (D_2O) em 400 MHz.....	123
Figura 4.7.18. Espectro de ^{13}C RMN de MNICL5F' (D_2O) em 200 MHz.....	123
Figura 4.7.19. Estrutura química do Sorbitol.....	123
Figura 4.8.1. Crescimento do fungo endofítico NICK5 em diferentes meios de cultura: (A) Arroz, (B) Milho, (C) Extrato de Soja, (D) Czapeck + 2% extrato de levedura, (E) BD e (F) expansão de (E); presença de corpos de frutificação no meio BD.....	125

Figura 4.8.2. Perfil da produção de Citocalasina D em diferentes meios de cultura dos extratos obtidos a partir de EtOH (cromatogramas monitorados em $\lambda = 221$ nm): (A) Citocalasina D em 22,26 min, (B) Arroz, (C) Milho, (D) Czapeck + 2% de extrato de levedura, (E) BD e (F) extrato de soja.....	126
Figura 4.8.3 Perfil da produção de Citocalasina D em diferentes meios de cultura dos extratos obtidos a partir de AcOEt (cromatogramas monitorados em $\lambda = 221$ nm): (A) Citocalasina D em 22,26 min, (B) Arroz, (C) Milho, (D) Czapeck + 2% extrato de levedura, (E) BD e (F) Extrato de Soja.....	127
Figura 4.9.1. Citocalasinas de provenientes dos aminoácidos fenilalanina, triptofano e leucina, respectivamente.....	128
Figura 4.9.2. Crescimento do fungo N1CL5 em diferentes meios de cultivo: (A) Czapeck, (B) Czapeck com 2% de extrato de levedura, (C) Czapeck com alanina, (D) Czapeck com fenilalanina, (E) Czapeck com tirosina e (F) Czapeck com triptofano.....	129
Figura 4.9.3. Cromatograma de íons totais dos extratos provenientes dos diversos meios de cultura.....	130
Figura 4.9.4. Cromatograma de íons selecionados a m/z 508.....	131
Figura 4.9.5. Estruturas dos íons monitorados no experimento de íons precursores.....	132
Figura 4.9.6. Cromatograma do experimento de íons precursores de m/z 120 e diferentes meios de cultura: (A) Czapeck, (B) Czapeck com extrato de levedura, (C) Czapeck com alanina, (D) Czapeck com fenilalanina, (E) Czapeck com tirosina e (F) Czapeck com triptofano.....	133
Figura 4.9.7. Espectros de massas da substância em 21,01 min: (A) <i>full scan</i> , (B) íons produtos de m/z 492 e (C) íons precursores de m/z 120.....	134
Figura 4.9.8. Cromatograma do experimento de íons precursores de m/z 158 em diferentes meios de cultura: (A) Czapeck, (B) Czapeck com extrato de levedura, (C) Czapeck com alanina, (D) Czapeck com fenilalanina, (E) Czapeck com tirosina e (F) Czapeck com triptofano.....	134
Figura 4.9.9. Espectros de massas da substância em 27,20 min do extrato Czapeck enriquecido com triptofano: (A) <i>full scan</i> , (B) íons produtos de m/z 403 e (C) íons precursores de m/z 185.....	135
Figura 4.9.10. (A) espectro de massas no <i>full scan</i> da banda cromatográfica com tr de 11,22 min e, (B) espectro de íons produtos de m/z 256 obtidos com 10 eV.....	136
Figura 4.10.1. Cromatogramas das frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL168 obtidos no método polares 21, com detector a 320 nm.....	138
Figura 4.10.2. Cromatogramas das frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL168 obtidos no método apolares 2, com detector a 320 nm.....	139
Figura 4.10.3. Espectro de RMN ^1H de PECL170A (400 MHz-MeOD).....	140
Figura 4.10.4. Cromatograma de íons selecionados m/z 537.....	140
Figura 4.10.5. Espectros de <i>full scan</i> no modo negativo de PECL170A.....	141

Figura 4.10.6. Espectros de íons produtos ampliados 8 e 10 vezes nos intervalos de massas de 90 a 360 e 440 a 520 respectivamente.....	142
Figura 4.10.7. (A) Cromatograma de íons selecionados a m/z 551 e (B) seus respectivos espectros de massas.....	145
Figura 4.11.1. Cromatogramas a 323 nm e espectros no UV dos extratos de <i>Araucaria angustifolia</i>	147
Figura 4.11.2. Cromatogramas a 323 nm e espectros no UV dos extratos de <i>C. lusitanica</i>	149
Figura 4.12.1. Ensaio antifúngico. Da esquerda para a direita: PHCL, PECL e Bifl.....	150
Figura 4.12.2. Ensaio de inibição bacteriana; (A) <i>E. coli</i> , (B) <i>B. subtilis</i> , (C) <i>S. aureus</i> , (D) <i>M. luthesus</i>	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Massa dos materiais vegetais das árvores em estudo.....	27
Tabela 3.2. Sistema de eluição para coluna filtrante.....	28
Tabela 3.3. Método cromatográfico terp_261007. Sistema de eluição dos extratos fúngicos e extrato botânico PHCL.....	29
Tabela 3.4. Eluição gradiente utilizada nas análises do cultivo de NICL3 em diferentes meios de cultura.....	34
Tabela 3.5. Condições de análise do espectrômetro de massas.....	37
Tabela 3.6. Eluição gradiente empregada na análise de CLAE/EM.....	37
Tabela 3.7. Método cromatográfica empregado na análise de comparação de meios de cultura.....	39
Tabela 3.8. Aminoácidos e suas respectivas massas adicionadas ao meio de cultura.....	40
Tabela 3.9. Códigos dos extratos obtidos dos diferentes meios de cultura.....	40
Tabela 3.10. Método cromatográfico utilizado nas análises para se verificar o efeito da adição de aminoácidos no metabolismo de NICL5.....	41
Tabela 3.11. Condições do Espectrômetro de Massas para se verificar o efeito da adição de aminoácidos no metabolismo de NICL5.....	42
Tabela 3.12. Métodos cromatográficos empregados nas análises das frações PECL.....	43
Tabela 3.13. Método cromatográfico para análise de PECL170A.....	44
Tabela 3.14. Condições de análise do espectrômetro de massas para a análise de PECL170A.....	44
Tabela 3.15. Método cromatográfico bf_ab_250907 utilizado no modo de extração AB.....	47
Tabela 4.2.1. Massas dos extratos particionado e micelial.....	54
Tabela 4.5.1. Dados espectroscópicos de PNICL3C28.....	97
Tabela 4.5.2. Comparação dos dados de ^1H RMN de PNICL3B37 com os dados da literatura (PÉREZ-CASTORENA, <i>et al.</i> , 2007).....	100

Tabela 4.5.3. Dados espectroscópicos de RMN.....	105
Tabela 4.7.1. Dados espectroscópicos de PNICL5B1.....	116
Tabela 4.9.1. Citocalasinas detectadas no meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura.....	132
Tabela 4.12.1. - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média \pm DPM.....	152

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 3.1. Isolamento dos metabólitos secundários do extrato PNICL3.....	32
Fluxograma 3.2. Isolamento dos metabólitos secundários do extrato PNICL5.....	35
Fluxograma 3.3. Isolamento dos metabólitos secundários do extrato PNICL5.....	36

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.1. Procedimento de cultivo e extração dos fungos endofíticos.....	26
Esquema 4.4.1. Proposta de fragmentação para o diterpeno ácido abiético.....	67
Esquema 4.4.2. Proposta de fragmentação para a meleína.....	79
Esquema 4.4.3. Proposta de fragmentação para a 5-formil meleína.....	81
Esquema 4.4.4. Proposta de fragmentação do Ácido Pilifórmico metilado.....	87
Esquema 4.5.1. Proposta de fragmentação da substância majoritária na fração PNICL3B68.....	90
Esquema 4.5.2. Proposta de fragmentação do sesquiterpeno elucidado.....	99
Esquema 4.7.1. Proposta de fragmentação da Citocalasina D.....	118
Esquema 4.10.1. Proposta de fragmentação para a Amentoflavona.....	143
Esquema 4.10.2. Proposta de fragmentação para a Cupressoflavona.....	144

RESUMO

“Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica*”. Alguns fungos fitopatogênicos a *Cupressus* produzem fitotoxinas bastante agressivas à hospedeira. Surpreendentemente, essas fitotoxinas são, em geral, de estruturas diterpenoídicas, assim como vários metabólitos endógenos nas espécies de *Cupressus*. Essa habilidade mostrada pelo fungo parece ser uma estratégia bastante especializada de associação fungo-planta. Essas observações motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, o qual se refere ao isolamento de microrganismos associados à espécie *Cupressus lusitanica*, e o seu estudo visando uma correlação do perfil químico entre os organismos envolvidos nessa associação. Durante duas coletas de material vegetal a partir de um indivíduo encontrado no *campus* da UFSCar, foram isolados cinco fungos endofíticos, denominados NICL1-5. Identificação preliminar indicou que possivelmente quatro deles pertencem ao gênero *Xylaria* e um ao gênero *Guignardia* (NICL4). Através de análises por CG-EM, detectou-se três isocumarinas (meleína, éter metílico da meleína e 5-formil meleína), bem como um sesquiterpeno eremofilano (valenceno) em extratos do fungo NICL3. Dos extratos deste mesmo fungo, foram obtidos três sesquiterpenos eremofilanos (sendo dois novos na literatura), usando metodologias clássicas de cromatografia. Esses sesquiterpenos foram identificados usando uma série de dados de RMN em 1D e 2D. Do estudo dos metabólitos secundários de NICL5 foram obtidos o ergosterol, o sorbitol e três citocalasinas (citocalasina C, citocalasina D e citocalasina Q). Foi estudado também o metabolismo de NICL5 frente à adição de aminoácidos livres ao meio de cultura. Usando análises por CLAE-EM, detectaram-se significantes alterações no metabolismo de NICL5, como uma possível indução da biossíntese de uma nova citocalasina, a partir do aminoácido triptofano. As análises do material vegetal indicaram a presença de biflavonóides e vários diterpenos. Porém, esses compostos não foram detectados nos extratos fúngicos, sendo identificados apenas sesquiterpenos.

ABSTRACT

“Analysis of secondary metabolites produced by endophytic fungi associated to *Cupressus lusitanica*”. Some phytopatogenic fungi found in *Cupressus* species produces phytotoxins very aggressive to the host plant. Surprisingly, these toxins are diterpenoids structures, as well as some endogenous metabolites in *Cupressus* species. This fungi ability appears to be a specialized strategy in the association fungi-plant. These observations motivated the development of the present work, which relates the isolation of microorganisms associated to the species *Cupressus lusitanica*, and to its study, aiming a correlation of the chemical profile among the organisms involved in this association. During two collects of plant material from an exemplar found in the *campus* of the UFSCar, five endophytic fungi had been isolated and called NICL1-5. A preliminary identification indicated that possibly four of them belong to the *Xylaria* genus, and one to the *Guignardia* genus (NICL4). The analysis with GC-MS had detected three isocoumarins (mellein, mellein methyl ether, 5-formylmellein), as well as an eremophilane sesquiterpene (valencene) in extracts of NICL3 fungi. From the extracts of the same fungi, had been obtained three eremophilanes sesquiterpenes (two news in literature) by the use of classical methodologies of chromatography. These compounds had been identified using a series of NMR data in 1D and 2D. From the study of the secondary metabolites of NICL5 had been obtained ergosterol, sorbitol and three cytochalasins (cytochalasin C, cytochalasin D and cytochalasin Q). The metabolism of NICL5 had also been studied, when free amino acids were added in the culture medium. By the analysis with HPLC-MS significant alterations in the NICL5 metabolism had been detected, as a possible induction of the biosynthesis of a new cytochalasin, from the amino acid tryptofane. The analysis of the plant material indicated the presence of biflavonoids and some diterpenes. However, these compounds had not been detected in fungi extracts, being identified only sesquiterpenes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fungos.....	1
1.1.1 Fungos e sua importância econômica.....	2
1.2 Interações entre planta-microrganismos.....	3
1.2.1 Associação planta-fungo endofítico.....	4
1.2.1.1 Resposta da planta em virtude ao ataque de patógenos – ativação da enzima PAL (phenylalanine ammonia-lyase) e a consequente produção de compostos fenólicos.....	7
1.2.2. Metabólitos secundários e sua relevância.....	8
1.3 <i>Cupressus lusitanica</i>	11
1.3.1 Constituintes químicos de <i>Cupressus lusitanica</i>	12
1.3.2 <i>Cupressus</i> e o cancro.....	16
2. OBJETIVOS.....	20
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1 Materiais e equipamentos.....	21
3.1.1 Materiais utilizados para o isolamento, cultivo e conservação dos fungos endofíticos.....	21
3.1.2 Equipamentos utilizados para o isolamento, cultivo e conservação dos fungos endofíticos.....	21
3.1.3 Equipamentos utilizados.....	21
3.1.4 Material utilizado nos ensaios biológicos.....	22
3.1.5 Suportes cromatográficos.....	22
3.1.6 Solventes empregados.....	23
3.2 Procedimento experimental.....	23
3.2.1 Isolamento dos fungos endofíticos de <i>Cupressus lusitanica</i>	23
3.2.1.1 Preparo do meio de cultura BDA.....	23
3.2.1.2 Isolamento dos endófitos de <i>Cupressus lusitanica</i>	24
3.2.1.3 Conservação dos fungos endofíticos isolados de <i>C. lusitanica</i>	24
3.2.2 Cultivo dos microrganismos.....	25
3.2.2.1 Cultivo dos microrganismos em meio líquido e obtenção dos extratos.....	25

3.2.3 Obtenção do material botânico.....	26
3.2.3.1 Coleta de material vegetal para obtenção dos extratos.....	26
3.2.4 Estudo dos extratos fúngicos e botânico.....	28
3.2.4.1 Fracionamento dos extratos fúngicos “P” e “M” e botânico “PHCL”	28
3.2.5 Análise por CLAE/UV.....	29
3.2.5.1 Condições CLAE/UV para análise dos extratos fúngicos “P” e “M” e do extrato botânico “PHCL”.....	29
3.2.6 Análise por CG/EM.....	30
3.2.6.1 Tratamento da amostra utilizando extração em fase sólida.....	30
3.2.6.2 Tratamento da amostra utilizando derivação com diazometano.....	30
3.2.7 Isolamento e identificação dos metabólitos secundários do microrganismo NICL3.....	31
3.2.8 Comparação do perfil metabólico de NICL3 em diferentes meios de cultura.....	33
3.2.8.1 Preparo dos diferentes meios de cultura.	33
3.2.8.2 Obtenção dos extratos.....	34
3.2.8.3 Análise dos extratos por CLAE/UV.....	34
3.2.9 Isolamento e identificação dos metabólitos secundários do microrganismo NICL5.....	35
3.2.9.1 Análise por CLAE/EM.....	36
3.2.10 Comparação do perfil metabólico de NICL5 em diferentes meios de cultura.....	38
3.2.10.1 Preparo dos diferentes meios de cultura e obtenção dos extratos.....	38
3.2.10.2 Análise dos extratos por CLAE/UV.....	38
3.2.11 Efeito da adição de aminoácidos no metabolismo do fungo NICL5.....	39
3.2.11.1 Preparo dos meios de cultura e obtenção dos extratos de NICL5.....	39
3.2.11.2 Análise dos extratos por CLAE/EM.....	41
3.2.12. Estudo da fração PECL.....	42
3.2.12.1 Tratamento do extrato botânico “PECL”	42
3.2.12.2 Condições CLAE/UV para análise das frações PECL.....	43

3.2.12.3 Separação das substâncias da fração PECL170.....	43
3.2.12.4 Análise por CLAE/EM.....	44
3.2.13 Detecção de biflavonóides nas folhas de <i>Cupressus lusitanica</i> e <i>Araucaria angustifolia</i>	45
3.2.14 Ensaio biológicos.....	47
3.2.14.1 Ensaio de inibição bacteriana pelo método de difusão em ágar.....	47
3.2.14.1.1 Preparo dos meios de cultura.....	47
3.2.14.1.2 Ativação das bactérias.....	47
3.2.14.1.3 Padronização das culturas.....	48
3.2.14.1.4 Preparo das amostras.....	48
3.2.14.1.5 Preparo do antibiótico controle.....	48
3.2.14.1.6 Ensaio antibacteriano contra as bactérias <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>M. Luthesus</i>	48
3.2.14.2 Ensaio de inibição fúngica pelo método de difusão em ágar.....	49
3.2.14.3 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais....	50
3.2.14.3.1 Preparo das amostras.....	50
3.2.14.3.2 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	50
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Isolamento de fungos endofíticos de <i>Cupressus lusitanica</i>	52
4.2 Extratos fúngicos.....	54
4.3 Monitoramento dos extratos fracionados (fúngicos e vegetal) por CLAE/UV	56
4.4 Monitoramento dos extratos por CG/EM.....	63
4.4.1 Monitoramento do extrato das folhas de <i>C. lusitanica</i>	63
4.4.2 Monitoramento dos extratos fúngicos.....	71
4.4.2.1 Análise dos extratos PNICL1 e MNICL1.....	71
4.4.2.2 Análises dos extratos PNICL2 e MNICL2.....	74
4.4.2.3 Análise dos extratos PNICL3 e MNICL3.....	76
4.4.2.4 Análises dos extratos PNICL4 e MNICL4.....	83
4.4.2.5 Análise dos extratos PNICL5 e MNICL5.....	85
4.5 Isolamento de metabólitos secundários produzido pelo microrganismo NICL3.....	88
4.5.1. Identificação da fração PNICL3B68.....	88

4.5.2 Identificação da fração PNICL3C15.....	91
4.5.3 Elucidação estrutural da fração PNICL3C28.....	92
4.5.4 Elucidação estrutural da fração PNICL3B37.....	99
4.5.5 Elucidação estrutural da fração PNICL3D11.....	101
4.6 Comparação do perfil metabólico de N1CL3 em diferentes meios de cultura.....	106
4.7 Isolamento de metabólitos secundários produzidos pelo fungo N1CL5.....	109
4.7.1. Isolamento das substâncias na fração PNICL5B.....	109
4.7.1.1 Identificação estrutural de PNICL5B1.....	111
4.7.1.2 Identificação estrutural de PNICL5B2 e PNICL5B3.....	119
4.7.2 Identificação estrutural da fração MNICL5B16.....	121
4.7.3 Identificação estrutural da fração MNICL5F'.....	123
4.8 Comparação do perfil metabólico de N1CL5 em diferentes meios de cultura.....	124
4.9 Efeito da adição de aminoácidos no metabolismo do fungo N1CL5.....	128
4.10 Caracterização e isolamento de biflavonóides de <i>Cupressus lusitanica</i>	136
4.11 Monitoramento de biflavonóides nos extratos de <i>Cupressus lusitanica</i> e <i>Araucaria angustifolia</i> por CLAE/UV.....	145
4.12 Ensaio Biológicos.....	150
4.12.1 Ensaio de inibição fúngica.....	150
4.12.2 Ensaio para detecção de metabólitos secundários bioativos.....	151
4.12.3 Ensaio Citotóxico.....	152
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos

Os fungos possuem uma grande variedade de formas, comportamentos e ciclos de vida (Figura 1.1) e por isso, segundo WEBSTER (1989), são de difícil definição. Porém, algumas características lhes são intrínsecas. Os fungos são organismos eucarióticos desprovidos de clorofila, ou seja, são heterotróficos. Em geral, eles são filamentosos e ramificados. Os filamentos, denominados hifas, apresentam paredes celulares constituídas por quitina, resultando no micélio, o qual pode formar um tecido compacto (cogumelos) ou uma rede frouxa. Naturalmente reproduzem-se, com algumas exceções, por meio de esporos, os quais são dispersos pelo meio ambiente (PELCZAR, 1997, TORTORA *et al.*, 2006, WEBSTER, 1989).

A classificação dos fungos baseia-se nos seguintes critérios:

- Características dos esporos sexuais e corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais dos ciclos de vida.
- Natureza dos ciclos de vida.
- Características morfológicas do micélio ou células.



Figura 1.1. Representação de algumas variedades de fungos e estruturas reprodutivas

Em uma grande variedade de fungos a produção dos esporos sexuais e corpos de frutificação, é dependente de determinadas condições ambientais. Os que possuem todos os estágios sexuais são denominados fungos perfeitos, enquanto que aqueles que não os possuem, são chamados de fungos imperfeitos.

Tanto a reprodução sexuada quanto a assexuada ocorre por meio de esporos. Estes esporos podem sobreviver a períodos extensos em condições drásticas de temperatura, radiação e também são resistentes a compostos tóxicos (PELCZAR, 1997, TORTORA et al., 2006, WAOLKEN et al., 2003).

Dentre os microrganismos, os fungos foram os primeiros habitantes do planeta e estão presentes nos diversos ambientes sendo mundialmente distribuídos.

Os fungos são capazes de decompor e utilizar uma grande variedade de substratos, sendo eficientes na conversão de nutrientes em material celular. Em condições de excesso de nutrientes, os diversos produtos de decomposição podem ser excretados ao meio ambiente, enquanto que substâncias de reserva como carboidratos e lipídios, acumulam-se no micélio (PELCZAR, 1997).

1.1.1 Fungos e sua importância econômica

A compreensão dos mecanismos de ação dos fungos é de extrema relevância para os diversos setores da sociedade, uma vez que estes estão envolvidos direta ou indiretamente em muitos processos industriais e farmacêuticos, no controle de pragas, decomposição de matéria orgânica, na produção de energia e também no desenvolvimento de patologias em plantas e animais.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente empregada em escala industrial na produção de vinhos, cervejas e pães. O ácido cítrico, metabólito do fungo *Aspergillus niger*, é produzido industrialmente utilizando melado como substrato. A maturação dos queijos blue, Roquefort e Camembert deve-se ao fungo *Penicillium roquefort* (PELCZAR, 1997).

Na indústria farmacêutica os fungos são de importância vital, pois a síntese de muitos medicamentos requer várias etapas reacionais, as quais inviabilizam economicamente a produção destes. A vitamina riboflavina é produzida por fermentação principalmente pelo fungo *Ashbya gossypii* (PELCZAR, 1997). O fungo *Tolypocladium niveum* foi fonte primária de Cyclosporin[®], de fundamental aplicabilidade em pacientes transplantados com a função de se evitar a rejeição de órgãos (ADRIO et al, 2003). Muitos outros fungos são fontes de produtos farmacêuticos, tais como a penicilina e o Mevacor[®] (SANTOS, 1999).

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* destacam-se na produção de enzimas de usos alimentícios e farmacêuticos (PELCZAR, 1997, ADRIO *et al.*, 2003).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada segura para produção de proteínas com finalidade farmacêutica, pois este microrganismo é largamente empregado na indústria alimentícia. A vantagem de se trabalhar com esta levedura está relacionada com seu rápido crescimento, alta densidade celular, secreção para o meio extracelular de proteínas heterólogas e também pelo conhecimento de sua genética, o qual é o mais avançado dentre os seres eucarióticos (ROMANOS, *et al.*, 1992). Genes humanos clonados são expressos em *S. cerevisiae* para a produção de interferon humano (HITZEMAN *et al.*, 1983), o fator de crescimento da epiderme humana, e na produção de hemoglobina humana (STROHL, 1997). A aplicação comercial, de maior importância, da levedura recombinante envolve a produção dos genes que são responsáveis pela codificação de antígenos contra o vírus da hepatite B, resultando na primeira forma segura de produção da vacina para o combate desta doença (ADRIO *et al.*, 2003).

1.2 Interações entre planta-microrganismos

Os microrganismos apresentam uma rede de complexas relações com outros microrganismos e com organismos maiores, como as plantas, as quais os servem como hospedeiros (BLACK, 2002). Eles participam de diversos tipos de associações, algumas neutras ou indiferentes, outras são benéficas ou positivas, ou ainda prejudiciais ou negativas. No neutralismo os organismos envolvidos desenvolvem-se sem qualquer efeito recíproco, pois as exigências de crescimento são completamente distintas (PELCZAR, 1997, AGRIOS, 1988).

O mutualismo é uma forma simbiótica de associação, no qual cada organismo recebe benefícios. A maneira pela qual se manifesta este benefício é variada. Um exemplo clássico desta interação ocorre entre fungos e algas, resultando nos líquens. O fungo obtém nutrientes, como glicose e álcoois poliídricos das algas, e estas beneficiam-se pelas propriedades das paredes celulares dos fungos, capazes de reter água. Nas interações comensalistas apenas um organismo é favorecido enquanto o outro não é afetado (PELCZAR, 1997).

As associações negativas são representadas por quatro interações. O antagonismo baseia-se na inibição de uma espécie por outra, atingindo de modo adverso o ambiente do outro organismo. Esta associação é de grande relevância, pois certos microrganismos podem produzir antibióticos. Uma relação negativa entre duas populações manifesta-se quando ambas são adversamente afetadas em relação à sobrevivência e ao crescimento, esta associação é caracterizada pela competição. O parasitismo é uma interação em que um organismo vive sobre ou dentro do outro organismo. A predação é uma associação na qual um organismo alimenta-se e digere outro organismo (PELCZAR, 1997, AGRIOS, 1988).

Uma interação planta-microrganismo não resulta necessariamente em patologia, portanto, o estudo das associações e interações envolvendo os microrganismos é de extrema importância para a manutenção do equilíbrio entre as espécies, bem como para a preservação do meio ambiente (CAMPOS, 2005). Entre os microrganismos (vírus, bactérias e fungos (Figura 1.2)), os fungos associam-se com maior frequência às plantas (ZOBERI, 1972).

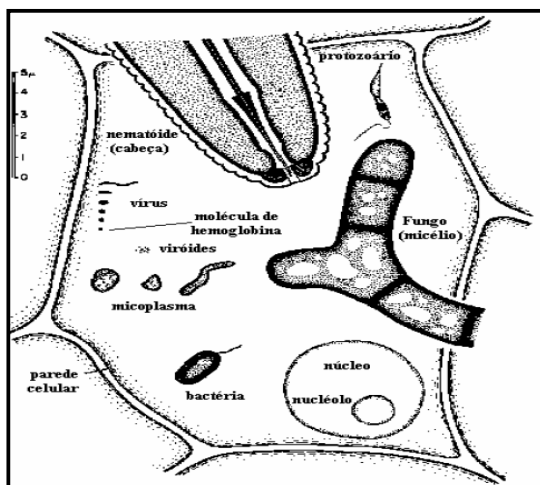


Figura 1.2. Microrganismos capazes de penetrar e associar-se a plantas (AGRIOS, 1988)

1.2.1 Associação planta-fungo endofítico

De forma literal a palavra endofítico significa “dentro da planta” (do grego *endon*, no interior de; *phyton*, planta). O uso deste termo é tão vasto quanto sua definição literal e aplica-se a bactérias (MORANDI, 1996, KOBAYASHI *et al.*, 2000), fungos (MORANDI, 1996, STONE *et al.*, 2000) algas (PETERS, 1991) e insetos (FELLER, 1995).

O termo endofítico foi mencionado pela primeira vez por De BARRY (1866), com a finalidade de distingui-los dos patógenos de plantas. Estudos mais detalhados mostraram que determinados patógenos vivem de forma latente no interior dos tecidos de seus hospedeiros e, esta observação, levou PETRINI (1991) a expandir a definição de endofíticos para incluir todos aqueles organismos que, durante determinado período de suas vidas, colonizam seus hospedeiros (plantas) sem causar sintomas visíveis de doenças.

KULDAU e YATES (2000) defendem a hipótese de que a infecção assintomática de um endofítico depende não somente de adaptações de um hospedeiro em particular e, sim da capacidade de virulência do endofítico, da resposta de defesa do hospedeiro e das condições ambientais. Por exemplo, o inóculo de um endofítico (o qual não causa sintomas de patogenicidade) em hospedeiro sob estresse ambiental, causará sintomas de doença. O grau de virulência não está associado ao gênero ou a espécie, porém se o fungo for isolado como endofítico, isso não exclui a possibilidade deste se tornar patogênico.

Os mecanismos de estabelecimento da associação são muito complexos e desconhecidos, no entanto, SCHULZ e BOYLE (2005) defendem a hipótese de que, a colonização assintomática é fruto de um balanço entre o hospedeiro e o endofítico (Figura 1.3). Endofíticos e patógenos possuem fatores de virulência idênticos. Os endofíticos produzem exoenzimas capazes de infectar e colonizar o hospedeiro e a maioria pode produzir micotoxinas. Do mesmo modo, a planta reage, induzindo a produção de metabólitos de defesa, resposta mecânica, enfim, respostas de defesa lentas e rápidas. O futuro da interação torna-se dependente da estratégia de sobrevivência de ambas as partes. Em muitos casos alguns endofíticos são especificamente adaptados aos seus hospedeiros, enquanto outros são oportunistas incidentais. As interações com o hospedeiro podem ser balanceadas ou antagonistas, refletindo a tolerância da coabitação.

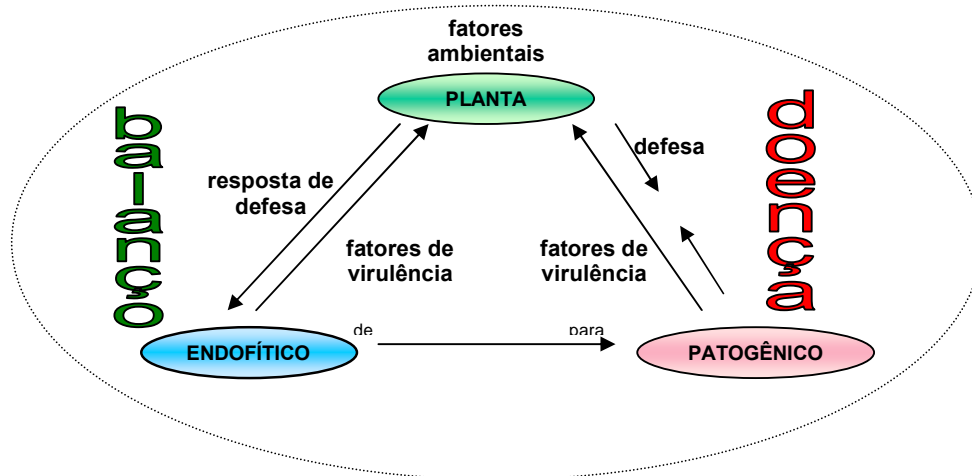


Figura 1.3. Hipótese: o equilíbrio entre a virulência do endófito e a resposta de defesa da planta resulta em uma colonização assintomática

Vários esforços estão sendo realizados com o intuito de distinguir infecções de plantas por microrganismos endofíticos e patógenos latentes (SCHULZ *et al.*, 1999). Essa distinção é dificultada pela ausência de sintomas no hospedeiro durante a fase de estabelecimento de colônias e por dificuldades de encontrar metodologias de isolamento que permita essa distinção. O possível papel de tais estágios “latente” ou “endofítico” na história da interação de plantas com fungos, recebeu pouca atenção com respeito aos seus potenciais relevantes para explicar as estratégias de colonização e desenvolvimento das várias espécies fúngicas (CHAPELA, 1989).

Fisiologicamente os fungos endofíticos utilizam as mesmas estratégias de penetração ao hospedeiro que os patógenos. A planta responde a esta invasão com suas “armas” de defesa e de reconhecimento, tornando as infecções endofíticas geralmente localizadas, ou seja, o fungo desenvolve-se no local da inoculação, atingindo raramente outras partes da planta (PETRINI *et al.*, 1992, PASCHOALATI, *et al.*, 1998). A Figura 1.4 representa, de forma esquematizada, o mecanismo de penetração. No entanto, existem poucos estudos realizados sobre a fisiologia das interações planta-endofíticos referentes a métodos de penetração, produção de enzimas e fitohormônios (CARROL e PETRINI, 1983, HOWARD *et al.*, 1991). Quanto à taxonomia, as espécies de endofíticos identificadas são pertencentes à classe dos *Ascomycetos*, *Deuteromicetos*, *Basidiomicetos* e poucos *Oomicetos* (PETRINI *et al.*, 1992).

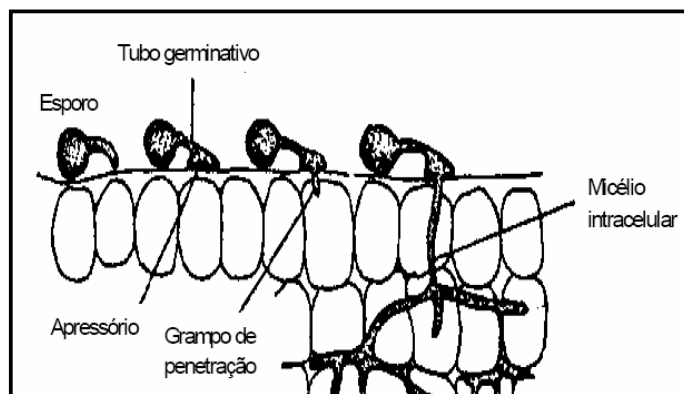


Figura 1.4. Método de penetração e invasão pelo fungo (AGRIOS, 1988)

1.2.1.1 Resposta da planta em virtude ao ataque de patógenos – ativação da enzima PAL (phenylalanine ammonia-lyase) e a conseqüente produção de compostos fenólicos

As plantas possuem um complexo e amplo mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos. A ativação desses mecanismos é iniciada pelo reconhecimento de sinais (moléculas) codificados pelo patógeno chamados de elicitores (ex.: proteínas microbianas, pequenos peptídeos, oligossacarídeos, etc.). Os elicitores primários do patógeno podem ativar uma série de genes de defesa na planta, cujos produtos incluem glutathione-S-transferase (GST), peroxidases, proteínas da parede celular, inibidores de proteinase, enzimas hidrolíticas (quinases e β -1,3-glucanases), e enzimas que biossintetizam fitoalexinas, tais como fenilalanina amônia-liase (PAL), e chalcona sintase (MAGNANI, 2002). As fitoalexinas possuem um importante papel mediante a invasão do patógeno, uma vez que, essas substâncias são capazes de restringir o crescimento intracelular ou até mesmo exterminar o invasor (SNYDER e NICHOLSON, 1990).

A enzima fenilalanina amônia-liase catalisa a conversão da fenilalanina ao ácido *trans* cinâmico, que é o primeiro passo na biossíntese de fenilpropanóides, os quais são precursores de um diverso grupo de metabólitos secundários de plantas como as ligninas, fitoalexinas e flavonóides (KERVINEN *et al.*, 1998).

Vários estudos demonstram que a enzima PAL está intimamente ligada ao sistema de defesa contra o ataque de microrganismos. NIELSEN *et al.* (2004), verificaram a produção dos compostos fenólicos, luteolinidina e apigeninidina, em

Sorghum bicolor L. após 22 h do inóculo de *Colletotrichum Graminicola* e *Cochiobolus heterostrophus*. Já MODAFAR *et al.* (2001) observaram um incremento na atividade da enzima PAL em resposta ao inóculo de *Fusarium oxysporum* em palmas de dois cultivares diferentes, ou seja, em cultivares resistente e suscetível ao microrganismo. O cultivar resistente apresentou um aumento na atividade da PAL sete vezes maior que o controle, após 96 horas da infecção pelo fungo, enquanto que, o cultivar suscetível teve um aumento três vezes menor que o resistente no mesmo intervalo de tempo.

1.2.2. Metabólitos secundários e sua relevância

Como fruto da interação mutualística, os fungos endofíticos podem conferir determinadas vantagens à planta hospedeira. Eles são reconhecidos como um armazém de novas substâncias, denominadas de metabólitos secundários, os quais podem apresentar atividades biológicas relevantes (SURYANARAYANAN *et al.*, 1998). A produção de metabólitos secundários deve desempenhar algum papel importante para o hospedeiro e (ou) uma função ecológica significativa (BOYLE, *et al.*, 2001). Às gramíneas, por exemplo, eles podem conferir crescimento vigoroso, resistência às intempéries, a nematóides, a herbivoria e a fitopatógenos (SOUZA, 2004), aumentar as defesas contra vertebrados e invertebrados (FAEH, 2002, CLAY, 1988; JARVIS & MILLER, 1996; D'MELLO & MACDONALD, 1997).

Para muitos micologistas a produção de metabólitos secundários *in vivo* é de grande importância na interação metabólica entre o fungo e a planta hospedeira, tais como; sinalização, defesa e regulação da simbiose (SCHULZ e BOYLE, 2005). TAN e ZOU (2001) demonstraram que a colonização endofítica melhora a adaptação ecológica do hospedeiro devido ao aumento da tolerância ao estresse e pela produção de metabólitos com atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e predadores.

DEMAIN (1980) sugeriu que, se um fungo pode produzir metabólitos *in vitro*, este metabólito deve também possuir alguma função na natureza.

Os metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos são pertencentes a diversas classes de substâncias, tais como, esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, furanodionas, terpenóides e citocalasinas (SCHULZ *et al.*, 2005).

Os alcalóides produzidos por endofíticos parecem ser a base da resistência aos insetos e toxicidade aos mamíferos. As evidências sugerem que os próprios fungos são os responsáveis pela produção destas substâncias, pois as plantas infectadas não as contêm. Todas as espécies de *Balanciaceae* examinadas produzem alcalóides de ergot. A ação desses alcalóides sobre os mamíferos é vasoconstritora e alguns deles possuem aplicação medicinal. A ergotamina (Fig. 1.5) é utilizada no tratamento da enxaqueca, e compostos similares possuem potentes efeitos alucinógenos (CLAY, 1988).

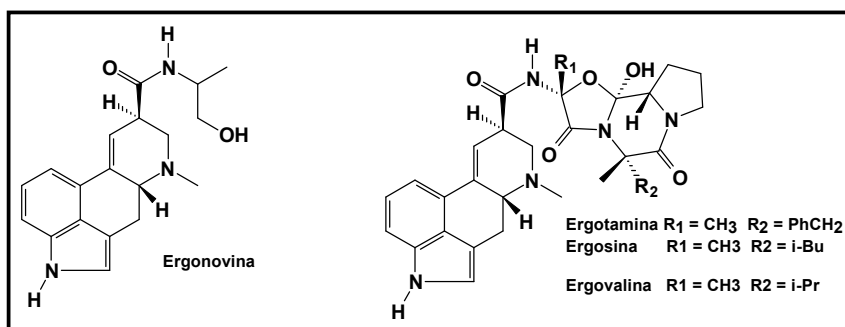


Figura 1.5. Exemplos de alcalóides do ergot

É extensa a busca por novos antibióticos, agentes quimioterapêuticos e produtos agroquímicos que sejam altamente eficientes, de baixa toxicidade, e que causem reduzido impacto ambiental. Essas pesquisas são conduzidas pela resistência adquirida de microrganismos (*Estafilococcus*, *Micobacteria* e *Streptococcus*), além da introdução, na população humana, de doenças como a Aids, problemas respiratórios severos e outras patologias devido à baixa imunidade, as quais requerem a descoberta e desenvolvimento de novas drogas para combatê-las (STROBEL e DAYSE, 2003). Devido à falta de segurança e problemas ambientais, muitos agentes agroquímicos sintéticos foram removidos do mercado; isto criou a necessidade de se encontrar mecanismos alternativos de controle do crescimento de pestes e patógenos na agricultura (DEMAIN, 2000). Novos produtos naturais provenientes de microrganismos oferecem oportunidade de inovação na descoberta de medicamentos e agroquímicos.

O número de fungos endofíticos é inestimável podendo existir algo em torno de um milhão de espécies distribuídas em pelo menos 80% das plantas vasculares. É relevante mencionar a hipótese de coevolução entre fungos e plantas,

a qual seria responsável pela diversidade de metabólitos secundários produzidos pelos endofíticos (STROBEL, 2004).

Os produtos naturais são fontes importantes de novos produtos farmacêuticos (PROUDFOOT, 2002) e considerando-se que 6 dos 20 medicamentos mais freqüentemente prescritos são de origem fúngica (ex: equinocandina, mevilonina, mutasteína, ciclosporina, cefalosporina), e que apenas 5% dos fungos foram descritos, estes organismos oferecem um enorme potencial para obtenção de novos fármacos (GLOER, 1997, HAWKSWORTH, 1991, 2001).

Outro aspecto interessante a respeito da interação fungo endofítico - planta também está relacionado à produção de metabólitos secundários, uma vez que, alguns endofíticos adquiriram a habilidade de produzir as mesmas substâncias produzidas pela planta. Este fenômeno é denominado “Transferência Genética Horizontal”, a qual consiste na troca de material genético entre células ou genomas não relacionados (BROWN, 2003).

O fungo *Giberela fugikuroi* associado à planta *Cucumbita máxima* produz, assim como ela, derivados do ácido giberélico, um diterpeno com atividade hormonal no crescimento de plantas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Foi descoberto que o fungo *Taxomyces andreanae*, isolado como endofítico em *Taxus brevifolia*, produz o paclitaxel (TaxolTM). Este fato causou grande impacto na comunidade científica devido às propriedades anticancerígenas diferenciadas desse diterpeno. O rendimento do taxol em *T. brevifolia* é muito pequeno, entre 0,0001% a 0,008% da planta seca, e devido a grande demanda dessa substância o fungo apresenta-se como uma mina de ouro para a obtenção do diterpeno (YUAN *et al.*, 2006). Muitas outras espécies de fungos produtores de taxol, em rendimentos relevantes, foram isolados de *T. brevifolia* (STIERLE e STROBEL, 1995) e também de outras espécies da *Taxus* (STROBEL, 1996, 1996a), além de outras plantas como a *Seimatoantlerium tepuiense* (STROBEL, *et al.*, 1999). Em 2000 a venda de taxol arrecadou montantes acima de um bilhão de dólares pela companhia Bristol-Mayer-Squibb (ADRIO *et al.*, 2003).

Outros exemplos mais recentes são a produção do inibidor da síntese de RNA, a camptotecina (PURI *et al.*, 2005), (Figura 1.6A) por um fungo (*Phycomyces*) associado à *Nothapodytes foetida*, do anticancerígeno podofilotoxina (Figura 1.6B) por *Phialocephala fortinii* e *P. hexandrum* (EYBERGER *et al.*, 2006) e também a produção de hipericina (KUSARI, *et al.*, 2008), com uma

extensa variedade de atividades biológicas, por um fungo endofítico isolado de *Hypericum perforatum* (Figura 1.6C).

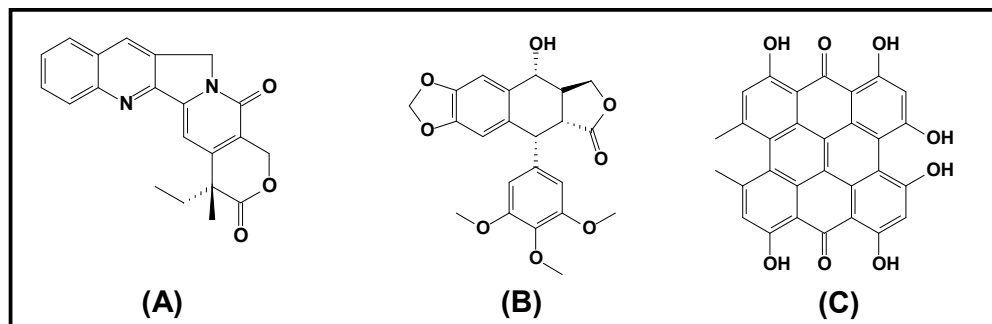


Figura 1.6. Fórmula estrutural (A) Camptotecina, (B) Podofilotoxina, (C) Hipericina

Substâncias de alta complexidade estrutural, inviáveis pela síntese orgânica *in vitro*, podem ser obtidas cultivando-se fungos endofíticos em meios artificiais. Além disso, a produção *in vitro* de enzimas codificadas por transferência genética da planta para o fungo, pode ser uma ferramenta útil para biotransformação de substratos levando à substâncias análogas e produtos naturais bioativos. Isso seria muito importante para estudos de relação estrutura-atividade biológica de substâncias de alta complexidade estrutural (SANTOS, 2003).

1.3 *Cupressus lusitanica*

A família *Cupressaceae* contém vários gêneros e diversas espécies, nas quais se inserem os Ciprestes, Cedros e árvores similares. Merece destaque a planta *Cupressus lusitanica*, objeto alvo deste estudo (Figura 1.7A).

Cupressus lusitanica é nativa da América Central e, é comumente conhecida como “Cedro de Goa”, “Cipreste do México” e “Cedro de Portugal”. A sua denominação como “Cedro de Portugal” deve-se ao fato da sua introdução neste país no século XVIII, na mata do antigo convento de Bugaço. Foram estes exemplares disseminados por toda a Europa e também para o Brasil (FARJON, 1993). Ela é uma árvore que alcança de 25-30 m de altura, apresenta muitas ramificações e suas folhas são pequenas e escamiformes (Figura 1.7B) (REITZ, 1989) e, é cultivada em muitos países, em jardins ornamentais e em plantações

comerciais para exploração de madeira (REITZ, 1989, VIDA KOVIC, 1991, FARJON, 1993).

Há vários relatos na literatura do uso de *Cupressus lusitanica* no tratamento de diversas enfermidades. As folhas desta planta são utilizadas em muitas práticas indígenas para o tratamento de catarro e dores de cabeça. O óleo essencial extraído das folhas é amplamente empregado contra reumatismo e tosse (DUKE, 2004). A infusão das folhas é usada, na cura de doenças dermatológicas (KUIATE *et al.*, 2006) e, as folhas secas são empregadas na proteção de grãos estocados contra infestação de insetos, uma vez que, estas emitem um forte e persistente odor por longos períodos de tempo, indicando, dessa forma, a presença de compostos voláteis (TAPONDJOU, *et al.*, 2005).

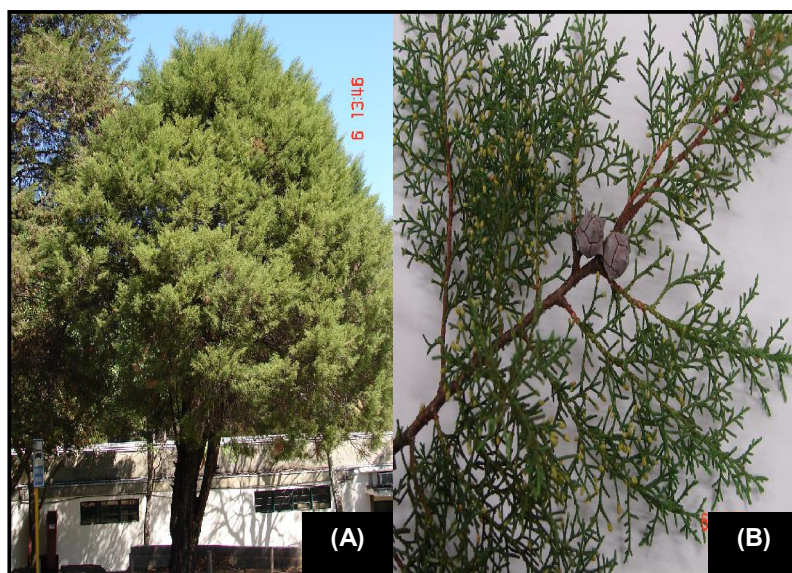


Figura 1.7. (A) *Cupressus lusitanica* localizada no campus da UFSCar, (B) ramo de *C. lusitanica* com cones masculinos e femininos

1.3.1 Constituintes químicos de *Cupressus lusitanica*

A família *Cupressaceae* é constituída por várias classes de substâncias, sendo o diterpenos os principais alvos de estudos relacionados à constituição química e atividades biológicas dos representantes desta família. Merecem destaque os diterpenos abietanos, labdanos e pimaranos (Figura 1.8).

A ampla utilização de *Cupressus lusitanica* no combate a diversas doenças promoveu o interesse de pesquisadores na investigação de sua constituição química. Análises químicas do óleo da planta proveniente de Portugal

mostraram que este contém monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, com o abietadieno como componente principal (ADAMS, 1997).

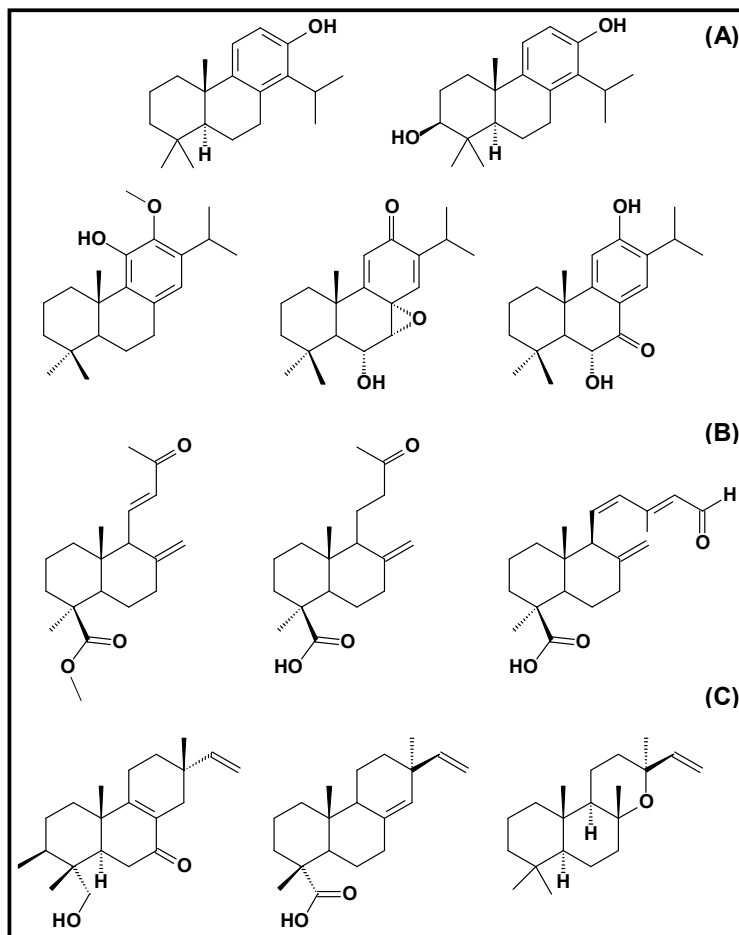


Figura 1.8. Diterpenos produzidos por *C. lusitana*; (A) abietanos (B) labdanos e (C) pimaranos

Com a finalidade de explicar o uso de *Cupressus lusitana* no tratamento de doenças de pele, como a dermatofitose, doença causada por infestação fúngica, caracterizada pela infecção dos tecidos queratinizados dos organismos humanos e de animais, KUIATE *et al.* (2006) investigaram, por CG/EM, a composição química de frações voláteis do extrato hexânico das folhas da planta. Foram detectados mais de 109 compostos, dentre os quais destacaram-se α -pineno, epi-zonareno, β -himachaleno, ácido pimárico, ácido caurenóico, cis e trans totarol, ferruginol, abietatrieno, entre outros. Foi verificado que as frações ricas em diterpenos são as responsáveis pela atividade antidermatofítica. No entanto, estudos

posteriores devem ser realizados com a finalidade de identificar quais substâncias desta classe promovem a referida atividade.

Pesquisadores como TANAKA *et al.* (2000), IWAMOTO *et al.*, (2001) dentre outros, conduzem pesquisas com os diterpenos do tipo labdano, extraídos de plantas pertencentes à família *Cupressaceae*, focando esta classe de compostos como agentes na prevenção de câncer.

Várias pesquisas apontam a família *Cupressaceae* como produtora de cicloheptatrienonas, que são fitoalexinas. A principal tropolona é a β -tujaplicina, Figura 1.9C, (YAMAGUCHI *et al.*, 1999, HARBORNE, 1999, ZHAO e SAKAE, 2003). Esta fitoalexina apresenta atividades biológicas muito interessantes, como antimicrobiana contra um vasto espectro de microrganismos desde bactérias a fungos (YAMADA *et al.*, 2002) e, é amplamente empregada como ingrediente em loções capilares, cremes dentais e cosméticos (YAMAGUCHI *et al.*, 1999). A β -tujaplicina também mostra atividade reguladora no fitocrescimento, efeitos citotóxicos em células de mamíferos, atividade antioxidante, e inibição de algumas enzimas incluindo tirosinase, catecol-O-metiltransferase e ATPase mitocondrial (YAMAGUCHI *et al.*, 1999).

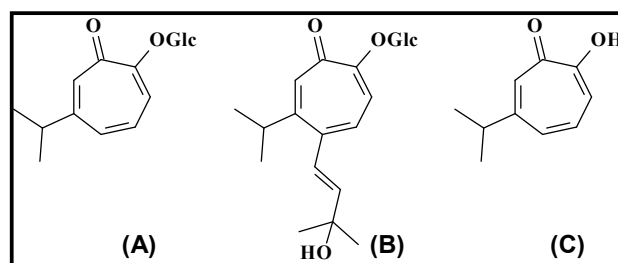


Figura 1.9. Estruturas moleculares das tropolonas glicosiladas (A) e (B) e a β -tujaplicina (C) produzidas por *C. lusitanica*

COWAN, *et al.* (2001) relatou, pela primeira vez, a ocorrência das lignanas arctigenina e matairesinol (Fig. 1.10) em *C. lusitanica*, porém os autores desconhecem a quimiotaxonomia e a importância ecológica destas substâncias para o gênero *Cupressus* ou para a família *Cupressaceae*.

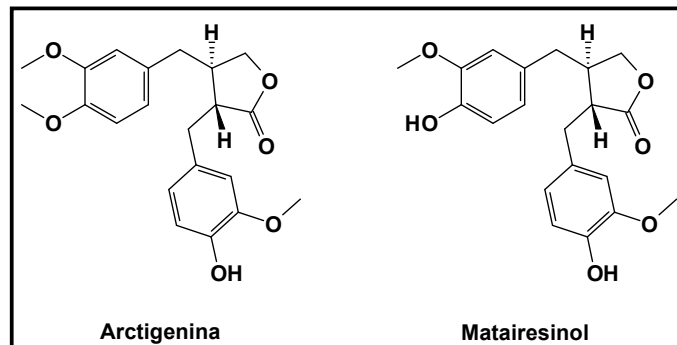


Figura 1.10. Fórmula estrutural das lignanas arctigenina e matairesinol isoladas de *C. lusitanica*

Muitas gimnospermas, em contraste com as espécies de angiospermas, são caracterizadas pela ocorrência de biflavonóides, juntamente com outros tipos de flavonóides (BARANOWSKA *et al.*, 2004). Os principais constituintes químicos relacionados a quimiotaxonomia do gênero *Cupressus* são os biflavonóides (ROMANI *et al.*, 2002). Desde o primeiro relato do isolamento da biflavona gingetin, mais de 100 biflavonóides, provenientes de plantas, foram identificados. Uma extensa variedade de atividades biológicas foi atribuída a essas moléculas, como, vasodilatadoras, hipoglicêmicas, antimicrobiana, dentre outras atividades de maior especificidade, destacando-se a atividade antiviral contra HIV e hepatite B (LIN, *et al.*, 1997). Embora os biflavonóides possuam um leque de propriedades importantes, esta classe de compostos fenólicos é pouco estudada. Alguns estudos foram realizados com biflavonóides das espécies *Ginkgo biloba* e *Hypericum perforatum*, devido à importância destes para a indústria farmacêutica, entretanto, a pesquisa no gênero *Cupressus* é limitada. GADECK e QUINN (1985) foram os primeiros a descrever a presença dos biflavonóides, derivados da apigenina, amentoflavona e cupressoflavona (Figura 1.11) nas folhas de *C. sempervirens*, *C. lusitanica* e *C. glabra*. Uma grande variedade de biflavonóides está presente nos tecidos dos ciprestes, porém a identificação destes compostos ainda é conflitante (ROMANI *et al.*, 2002).

HEIMLER e PIERONI (1991) iniciaram estudos com a finalidade de correlacionar à presença/ausência de biflavonóides a resistência ao cancro dos ciprestes causado pelo ataque de fungos.

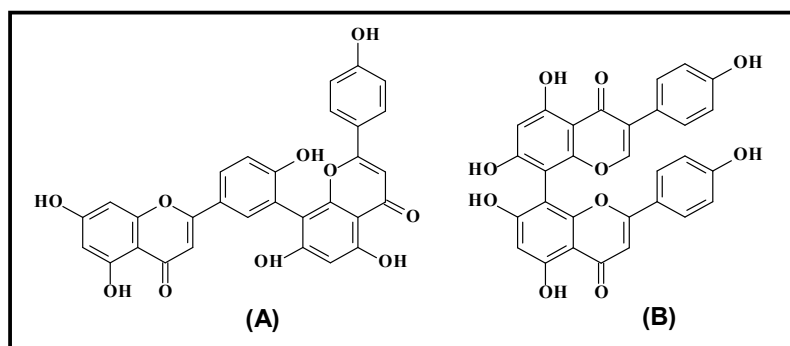


Figura 1.11. Fórmula estrutural dos biflavonóides isolados de *C. lusitanica* (A) Amentoflavona e (B) Cupressoflavona

1.3.2 *Cupressus* e o cancro

Há relatos na literatura de que os ciprestes são acometidos por cancro e, esta doença foi a responsável pela morte de muitos exemplares da família Cupressaceae (GRANITI, 1998). Os fungos *Seiridium cardinali* e *Seiridium unicorne* estão intimamente associados ao cancro (GRANITI, 1998, MUTHUCHELIAN *et al.*, 2005 e 2005a). As infecções causadas por fungos do gênero *Seiridium* ocorrem, geralmente, a partir de lesões existentes no tronco ou nos ramos, tornando a copa da árvore seca. Os ramos atacados tomam rapidamente uma coloração castanho-avermelhada, destacando-se sobre o verde da vegetação não afetada, como pode ser visto na Figura 1.12A. Observa-se também um grande fluxo de resina (Fig. 1.12B), que extravasa a partir de fissuras formadas pelo cancro. Anormalidades histológicas e necrose de células da planta são fenômenos interpretados como reações de defesa da planta, para limitar o avanço do patógeno (GRANITI, 1998).

Os sintomas aparentes, causados pela infecção de espécies de *Seiridium* aos seus hospedeiros, estão relacionados à produção local de toxinas pelo fungo, as quais são posteriormente difundidas aos tecidos adjacentes e às folhas (GRANITI, 1998). *S. cardinale* produz várias fitotoxinas, como seiridinas, seiricardinas, seiricuprolida e o ácido ciclopáldico dentre outros compostos (Figura 1.13). Os mecanismos de ação das fitotoxinas ainda não são claros, mas podem afetar o funcionamento do floema, a translocação de carboidratos, bem como induzir a inibição da fotossíntese (MUTHUCHELIAN *et al.*, 2005, 2005a).

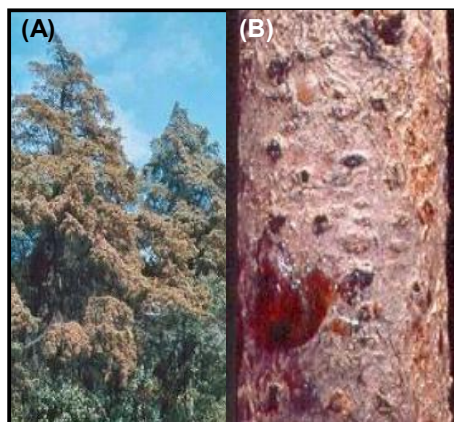


Figura 1.12. (A) Folhas secas de *C. lusitanica* devido ao ataque de *Seiridium unicorne*, (B) resina exsudada em decorrência da infecção

A incidência do cancro cortical e a disseminação de seus agentes causais são particularmente graves quando as condições climáticas são favoráveis, ou seja, em períodos chuvosos nos quais a umidade elevada propicia a reprodução e propagação fúngica.

O cancro dos ciprestes não é exclusivamente decorrente dos fungos *Seiridium cardinali* e *Seiridium unicorne*. Em estudos recentes, SPARAPANO *et al.* (2004) e EVIDENTE *et al.* (2006) também reportam o fungo *Sphaeropsis sapinea* como agente causador de cancras nos ciprestes.

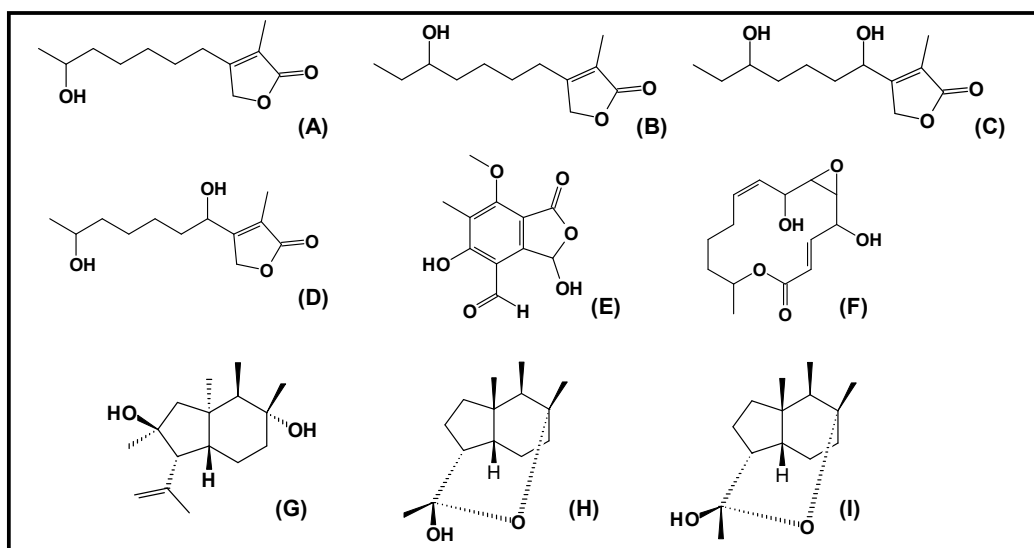


Figura 1.13. Estruturas das fitotoxinas produzidas por espécies de *Seiridium*: (A) Seiridina, (B) Isoseiridina, (C) 7-hidroxi seiridina, (D) 7-hidroxi isoseiridina, (E) Seiricuprolida, (F) Ácido ciclopáldico, (G) Seircardina A, (H) Seircardina B, (I) Seircardina C

O fungo *Shaeropsis sapinea* é um patógeno oportunista, de distribuição cosmopolita, que se associa extensivamente às coníferas, causando-lhes diversos danos, como cancro, ferrugem, doenças nas raízes, podridão, etc (EVIDENTE *et al.*, 2006).

A taxonomia de *S. sapinea* tem causado considerável confusão e conflito (SWART *et al.*, 1991). Inicialmente dois morfotipos, A e B, foram descritos para *S. sapinea* e, foram definidos de acordo com a textura das paredes celulares dos conídios e pela virulência (WANG *et al.*, 1985, PALMER *et al.*, 1987). A distinção também foi confirmada empregando-se seqüências de DNA e de rRNA (WET *et al.*, 2000). Recentemente foi designado o morfotipo C baseado nas diferenças de tamanho dos conídios (WET *et al.*, 2000).

O isolamento e estudo dos metabólitos secundários podem contribuir de modo significativo para melhor caracterizar a biologia, fisiologia e patogenicidade dos morfotipos de *S. sapinea*, além de explicar a possibilidade de interações específicas com os hospedeiros (EVIDENTE *et al.*, 2006).

O fungo *S. sapinea* é produtor de vários metabólitos secundários, dentre eles duas dimedonas metil éter (metabólitos fitotóxicos); sphaeropsidona e epishaeropsidona (EVIDENTE *et al.*, 1998) e dois metabólitos não tóxicos; clorosphaeropsidona e a epiclorosphaeropsidona (EVIDENTE *et al.*, 2000). Destaca-se ainda a produção de sphaeropsidinas A – F (FIGURA 1.14), diterpenos pimaranos tri e tetracíclicos (EVIDENTE *et al.*, 1996, 1997, 2002, 2003).

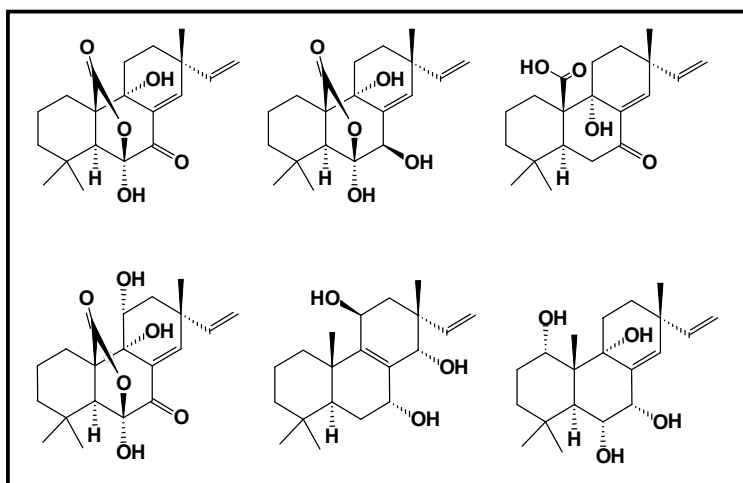


Figura 1.14. Estrutura das sphaeropsidinas A - F, respectivamente, produzidas por *S.sapinea*

Pesquisas atuais demonstraram que as sphaeropsidinas A – C são potentes fitotoxinas para seus hospedeiros (ciprestes) e não hospedeiros (tomate e grãos). A sphaeropsidina D apresenta fitotoxicidade apenas para *Cupressus macrocarpa*, enquanto a sphaeropsidina F é moderadamente fitotóxica somente para *C. sempervirens* (SPARAPANO *et al.*, 2003). Este estudo exibiu um fato de relevante curiosidade, a potente atividade antimicótica destas substâncias frente a *S. unicornis*, indicando-as como agentes preventivos de infecções de fungos da espécie *Seiridium*.

Observa-se um fato muito intrigante, dado que *Shaeropsis sapinea* produz diterpenos pimaranos polifuncionalizados, cujos esqueletos básicos são também produzidos por *Cupressus lusitanica*. Esta curiosa ocorrência pode estar relacionada à transferência genética horizontal, na qual o microrganismo “aprendeu” a produzir estas substâncias com a planta e, por um sistema enzimático oxidativo, ele funcionaliza o esqueleto destes diterpenos, tornando-os tóxicos. Uma outra hipótese relevante, que deve ser considerada, é que o fungo, estrategicamente, usa os diterpenos já produzidos pela planta e os toxifica através da ação enzimática. Esta observação foi a inspiração deste trabalho de mestrado.

2. OBJETIVOS

As principais metas do projeto foram relacionadas à descrição do perfil químico de microrganismos associados à *Cupressus lusitanica* e, a comparação desse perfil com aquele apresentado pela planta hospedeira, usando metodologias analíticas rápidas.

Também como objetivos destaca-se o isolamento e identificação de outros metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos.

Além dos objetivos já mencionados foi realizada a avaliação do potencial antibiótico dos extratos e substâncias obtidas usando metodologias já implementadas no LaBioMMi.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Isolar microrganismos associados à *Cupressus lusitanica*.
- Cultivar os microrganismos em diferentes meios de cultura com a finalidade de aperfeiçoar a produção dos diterpenos.
- Estabelecer condições ótimas de extração e pré-purificação dos diterpenos.
- Estabelecer condições ótimas de resolução cromatográfica em Cromatografia à Líquido.
- Estabelecer condições ótimas de análise por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas.
- Estudar a fragmentação dos diterpenos por *electrospray* (ESI) e decomposição induzida por colisão (CID). Escolher a partir desses dados, os melhores experimentos para a detecção seletiva dessas substâncias nos meios de cultura.
- Efetuar bioensaios visando à investigação do potencial antibiótico dos extratos e substâncias isoladas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

3.1.1 Materiais utilizados para o isolamento, cultivo e conservação dos fungos endofíticos

- Ágar bacteriológico SIGMA;
- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Alça de platina;
- Batata inglesa;
- Bico de Bunsen;
- Dextrose Mallinckrodt;
- Lâminas de bisturi;
- Papel de filtro qualitativo (80g Ø=12,5 cm) SATELIT;
- Placas de Petri;
- Vidros de penicilina e suas respectivas tampas

3.1.2 Equipamentos utilizados para o isolamento, cultivo e conservação dos fungos endofíticos

- Autoclave vertical Phoenix AV 75 e Soc. FABBE 103;
- Capela de fluxo laminar VECO VLFS -12M;
- Estufa de secagem e incubação FANEM 347 CD

3.1.3 Equipamentos utilizados

- Bomba LC10AD gradient pumps, SHIMADZU;
- Centrífuga Mobilispin VULCO TECHNOLOGIES
- CentriVap concentrador LABCONCO
- CentriVap cold trap LABCONCO
- Cromatógrafo a gás, GC 8000 series Fisons;

- Detector de arranjo de diodos WATERS 2696;
- Detector de UV (PDA) para HPLC SHIMADZU SPD-10A UV-Vis;
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo ESI, QuattroLC – Micromass;
- Espectrômetro de massas VG Platform;
- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear ARX-200 e APX-400;
- HPLC SHIMADZU analítico e preparativo
- Injetor para HPLC SHIMADZU Auto Injector SIL-10ADVp;
- Microondas LG Smart Dial modelo MS 158DDA;
- Módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-10A Communication BUS Module;
- Módulo de separação WATERS 2695;
- Moinho TEC 631 TECNAL;
- Rotavapor BÜCHI R-200 com banho de aquecimento BÜCHI B-490 e rotavapor BÜCHI R-114 com banho de aquecimento BÜCHI B-480;
- Sonicador BRANDSON 1510.

3.1.4 Material utilizado nos ensaios biológicos

- Ágar Mueller Hinton – Acumedia®;
- Agitador de tubos AP56 PHOENIX®
- BHI (Infuso Cérebro Coração) – Acumedia®;
- Caldo Mueller Hinton – Difco®;
- Dimetilsulfóxido – Synth®;
- Padrão de sulfato de bário (escala de McFarland: $1,0 \times 10^8$ cel/mL);
- Tetraciclina – Bristol-Mayer-Squibb®

3.1.5 Suportes cromatográficos

- Cromatografia em camada delgada analítica: Sílica gel em folhas sobre alumínio (ALUGRAM™ SIL G/UV₂₅₄ – MACHEREY-NAGEL);
- Cromatografia em coluna : ODS (h = 13,5 cm e ρ = 2,5 cm);
- Cromatografia em coluna : Sephadex LH 20 (h = 1,15 m e ρ = 3,5 cm);
- Cromatografia em coluna: Sílica gel 230-400 mesh;

- Coluna cromatográfica em CLAE analítica: Synergi 4 μ Fusion _RP 80A (part nº 00G-4424-E0), tamanho: 250 X 4.60 mm, Phenomenex e Gemini 10 μ C18 110A (part nº 00G-4436-E0), Phenomenex; Luna 5 μ Phenyl-Hexyl (part number 00G-4257-E0);
- Coluna cromatográfica em CLAE preparativa: coluna ODS Shim pack (250 x 21,20mm)
- Coluna cromatográfica em CG: DB1-MS J & W Scientific, 30 m e 0,25 μ m de filme de diâmetro interno.

3.1.6 Solventes empregados

- Solventes para cromatografia em bancada: destilados no DQ-UFSCar;
- Solventes grau HPLC: acetonitrila, isopropanol MALLINCKRODT[®], metanol J. T. Baker[®], ácido trifluoroacético TEDIA[®], H₂O purificada Milli-Q[®];
- Solventes deuterados: água, clorofórmio e metanol CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES[®], Inc.

3.2 Procedimento experimental

3.2.1 Isolamento dos fungos endofíticos de *Cupressus lusitanica*

3.2.1.1 Preparo do meio de cultura BDA

O meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar) foi preparado cozinhando-se 60 g de batata inglesa, descascada e cortada em cubos, por 15 minutos em forno de microondas (potência 60 W) com 150 mL de água destilada. Em seguida, filtrou-se, com o auxílio de uma gaze, transferindo o caldo para um Erlenmeyer. Acrescentou-se 6,0 g de dextrose e, após sua dissolução adicionou-se 4,5 g de ágar à mistura, homogeneizando-a e completando-se o volume para 300 mL de água destilada.

Após a esterilização do meio, em autoclave à 121 °C e 1 atm, adicionou-se uma suspensão do antibiótico terramicina, para evitar possíveis contaminações bacterianas. Em seguida o meio foi transferido para placas de Petri, previamente esterilizadas.

3.2.1.2 Isolamento dos endófitos de *Cupressus lusitanica*

Realizou-se, em setembro de 2006, um experimento preliminar, o qual consistia no isolamento dos endófitos de *Cupressus lusitanica*. Para isso, foram coletados galhos da planta localizada no campus da UFSCar.

O isolamento dos endófitos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por PETRINI *et al.* (1992). Após a lavagem das folhas em água corrente, toda a micro população epifítica foi eliminada por meio de imersão de fragmentos da planta em etanol 70% por 2 segundos, seguido da imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio 11% durante 1-5 minutos, etanol 70% por 2 segundos, e por último, a lavagem em água destilada para a remoção de resíduos dos agentes esterilizantes.

Os fragmentos do material vegetal foram depositados sob placa de Petri contendo meio BDA acrescido de antibiótico e incubados a 25°C e observados diariamente.

A fim de purificar as colônias fúngicas, promoveu-se repiques sucessivos nas placas em que houve crescimento de mais de uma colônia de microrganismo.

Em março de 2007 repetiu-se o processo de isolamento dos fungos endofíticos, a fim de se confirmar a presença dos microrganismos já isolados. Para isso, empregou-se procedimento idêntico ao mencionado anteriormente, porém, durante todo o experimento, manteve-se uma placa de Petri, com meio BDA, aberta, com o intuito de se verificar possíveis contaminações externas. Também para se certificar sobre a eficácia do procedimento de isolamento inoculou-se gotas da última água de lavagem.

Os microrganismos isolados foram catalogados na micoteca do LaBioMMI e cada um deles recebeu o código de NICL (não identificado de *Cupressus lusitanica*) seguido de um número para sua respectiva identificação .

3.2.1.3 Conservação dos fungos endofíticos isolados de *C. lusitanica*

Os fungos foram repicados em placas de Petri contendo o meio BDA e incubados a 25°C por um período de sete dias.

Decorrido o período de incubação dos fungos, realizou-se a esterilização do material necessário para conserva. Inicialmente, transferiu-se 5 mL de água destilada a vidros de penicilina, em seguida, estes foram vedados com

papel filme e papel alumínio. Os vidros de penicilina e suas respectivas tampas foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 15 minutos.

Em capela de fluxo laminar asséptica, pequenos cubos do meio BDA contendo o microrganismo foram cortados e transferidos aos vidros de penicilina, os quais foram vedados e armazenados no LaBioMMi. O mesmo procedimento foi realizado para os demais fungos isolados de *C. lusitanica*.

3.2.2 Cultivo dos microrganismos

3.2.2.1 Cultivo dos microrganismos em meio líquido e obtenção dos extratos

Em um estudo preliminar os fungos endofíticos isolados de *Cupressus lusitanica*, foram cultivados, em pequena escala, em meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, o qual é composto pelos seguintes nutrientes:

- 4,8 g de NaNO₃;
- 1,6 g de K₂HPO₄;
- 0,8 g de MgSO₄;
- 0,8 g de KCl;
- 0,016 g de FeSO₄·7H₂O;
- 48 g de glicose;
- 32,0 de extrato de levedura;
- 1,6 L de H₂O.

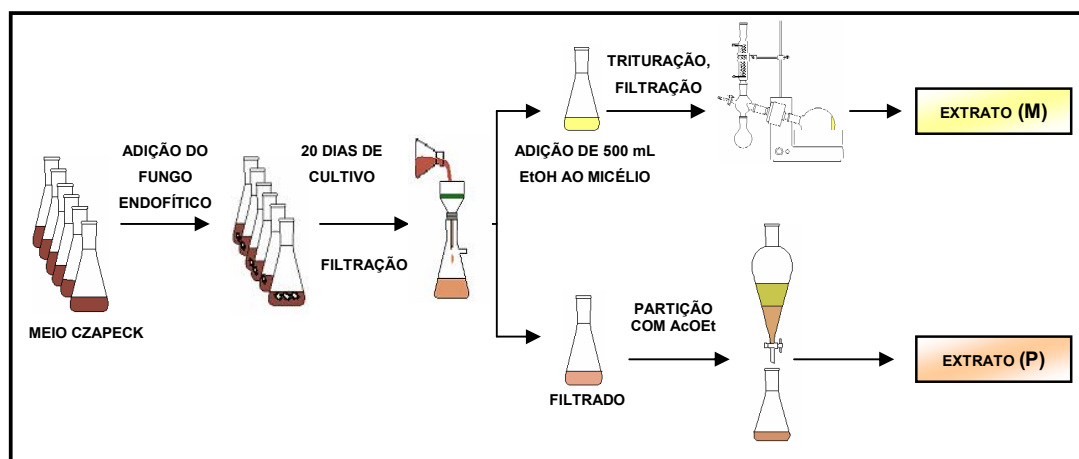
Dissolveram-se, sob agitação constante, os reagentes em água destilada. Em seguida, adicionaram-se, separadamente, 100 mL do meio de cultura em 16 Erlenmeyers de 250 mL, os quais foram autoclavados por 15 minutos, à 120°C e 1 atm de pressão.

A seguir, os frascos contendo o meio de cultura foram transferidos à capela de fluxo laminar, previamente limpa e, após o meio atingir a temperatura ambiente, transferiram-se 3 fragmentos, com cerca de 0,5 cm cada, de um dos microrganismos contido em placas de Petri com meio BDA para 3 Erlenmeyers, mantendo-se 1 deles como controle de assepsia. Procedimento idêntico foi adotado

para os demais endófitos. Os frascos foram incubados durante 20 dias, a temperatura de 25°C e sob repouso.

Finalizado o período de incubação, os frascos com meio de cultivo contendo o fungo, bem como o frasco contendo o branco, foram filtrados, a pressão reduzida, em capela de fluxo laminar, resultando, no micélio e no filtrado. Ao micélio adicionaram-se 250 mL de EtOH absoluto, triturando-o a seguir. Após 2 dias, este foi filtrado e adicionaram-se, novamente, 250 mL de EtOH à massa micelial. O filtrado etanólico foi concentrado em rotaevaporador, levando ao extrato micelial (M). Particionou-se o filtrado com AcOEt na proporção de 1:1, por 3 vezes, o qual produziu o extrato (P). Um resumo do procedimento descrito encontra-se no Esquema 3.1.

Em estágio posterior, todos os microrganismos isolados foram cultivados em larga escala, ou seja, em 6L de meio de cultura Czapeck com 2% de extrato de levedura, divididos em 20 erlenmeyers de 1000 mL.



Esquema 3.1. Procedimento de cultivo e extração dos fungos endofíticos

3.2.3 Obtenção do material botânico

3.2.3.1 Coleta de material vegetal para obtenção dos extratos

Foram coletados os galhos de *Cupressus lusitanica* de três árvores de diferente localização dentro da universidade, sendo uma situada próxima ao departamento de química (ÁRVORE 1) e as outras duas nas proximidades do departamento de estatística (ÁRVORE 2 e ÁRVORE 3).

Os ramos de *C. lusitanica* foram secos em estufa de circulação de ar à temperatura de 45°C durante 24 h. Em seguida, dividiu-se os ramos em 2 partes, sendo estas denominadas de ramos lenhosos (RL) e folhas (F), de acordo com a Figura 3.1. Após a separação do material vegetal, este foi moído.

A tabela a seguir apresenta as massas de folhas e dos ramos lenhosos das árvores 1, 2 e 3.

Tabela 3.1 Massa dos materiais vegetais das árvores em estudo

Material vegetal	Massa (g)	Massa (g)	Massa (g)
	ÁRVORE 1	ÁRVORE 2	ÁRVORE 3
Folhas	75,59	157,30	44,81
Ramos lenhosos	21,56	57,52	11,35

Após a moagem do material vegetal acrescentaram-se 400 mL de AcOEt aos frascos de Erlenmeyer contendo as folhas e 250 mL do mesmo solvente aos frascos contendo os ramos lenhosos.

O processo de extração foi realizado durante 5 dias em temperatura ambiente e em repouso. Decorrido este período, separou-se o material vegetal do extrato por meio de filtração a pressão reduzida. Os extratos de RL e F foram concentrados, separadamente, em rotaevaporador. Prosseguiu-se a extração com EtOH por mais 5 dias e realizou-se procedimento idêntico ao mencionado para a obtenção do extrato alcoólico.

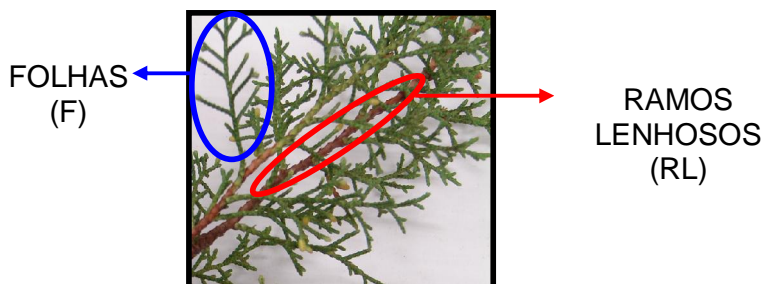


Figura 3.1. Partes nas quais os galhos de *Cupressus lusitanica* foram divididos

Analisaram-se, ambos os extratos (AcOEt e EtOH) RL e F das 3 árvores, por CCD e estes apresentaram perfis cromatográficos idênticos; decidiu-se, então, reunir todos os extratos, e realizou-se partição líquido-líquido com Hex:EtOH (1:1). A

fase hexânica forneceu o extrato denominado PHCL (particionado hexânico de *Cupressus lusitanica*) com 11,5459 g e a fase etanólica resultou no extrato PECL (particionado etanólico de *Cupressus lusitanica*) com 15,0063 g de massa.

A química do extrato hexânico de *C. lusitanica* foi explorada a partir de análises por CG/EM e comparada com os extratos fúngicos.

3.2.4 Estudo dos extratos fúngicos e botânico

3.2.4.1 Fracionamento dos extratos fúngicos “P” e “M” e botânico “PHCL”

Adotou-se o mesmo procedimento no pré-tratamento dos extratos fúngicos (P e M) e botânico (PHCL).

Inicialmente, os extratos fúngicos e botânico foram monitorados por CCD, com vários sistemas de eluição e, constatou-se uma satisfatória separação de substâncias por polaridade.

Com a finalidade de se promover uma pré-limpeza e diferenciação pela polaridade destes extratos, realizou-se, separadamente, cromatografia em coluna com placa sinterizada ($h = 4,5$ cm e $\Phi = 3,7$ cm), empregando-se o mesmo sistema de eluição da análise por CCD. A Tabela 3.2 apresenta a ordem de eluição utilizada.

As frações resultantes das colunas filtrantes foram monitoradas por CLAE/UV.

Tabela 3.2 Sistema de eluição para coluna filtrante

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (mL)	Código das frações
Hex : CH ₂ Cl ₂	1:1	200	A
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	1:1	200	B
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	1:4	200	C
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt : MeOH	1:4:10%	200	D
AcOEt : MeOH	1:1	200	E
MeOH	100%	200	F

3.2.5 Análise por CLAE/UV

3.2.5.1 Condições CLAE/UV para análise dos extratos fúngicos “P” e “M” e do extrato botânico “PHCL”

Utilizou-se metanol (Bomba B) o qual foi filtrado em membrana de nylon (45 μm) e água (Bomba A) purificada em sistema Millipore Milli-Q. Os eluentes foram sonicados por 30 minutos.

As análises foram realizadas utilizando-se coluna Phenomenex-Synergi 4 μ Fusion _RP 80A, com eluição gradiente e no modo reverso, de acordo com a Tabela 3.3. Empregou-se vazão de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 30 μL .

As frações monitoradas foram comparadas com frações ricas em diterpenos, previamente isolados pelo grupo, os quais foram submetidos às mesmas condições analíticas das amostras.

Tabela 3.3 Método cromatográfico terp_261007. Sistema de eluição dos extratos fúngicos e extrato botânico PHCL

Tempo (min)	%B
0.01	70
10.00	85
25.00	85
25.01	90
30.00	90
40.00	100
50.00	100
50.01	70
60.00	70

3.2.6 Análise por CG/EM

3.2.6.1 Tratamento da amostra utilizando extração em fase sólida

Antes da inserção dos extratos no sistema de CG/EM foram adotados procedimentos de pré-tratamento de amostra, os quais estão descritos nesta sessão.

Foram pesados, separadamente, 100 mg de extrato bruto de cada um dos fungos e também 100 mg de folhas de *C. lusitanica* seca e moída e, para a dissolução destes, foram adicionados, separadamente, 3 mL de clorofórmio.

Com a finalidade de se analisar as substâncias apolares presentes nos extratos, realizou-se extração em fase sólida (EFS), empregando cartuchos de sílica (STRATA SI-1 sílica).

Inicialmente ativou-se o cartucho com hexano, em seguida, este foi condicionado com clorofórmio. Então, aplicou-se a amostra, seguida da eluição com clorofórmio.

Após a secagem do material eluído, este foi re-suspendido em 1,0 mL de clorofórmio e injetado 2 μ L no CG/EM.

3.2.6.2 Tratamento da amostra utilizando derivação com diazometano

Adotou-se um segundo procedimento de tratamento de amostra, a metilação dos extratos com diazometano, uma vez que, não se conhecia a polaridade dos compostos constituintes dos extratos fúngicos e, também para impedir que os compostos mais polares ficassem aderidos à coluna cromatográfica.

Inicialmente, preparou-se o diazometano, dissolvendo-se 2,14 g de Diazald (N-metil-N-nitroso-4-toluosulfoamida) em 30 mL de éter etílico, em seguida, resfriou-se a mistura em banho de gelo por cinco minutos. Decorrido o tempo determinado, transferiu-se a mistura a um sistema próprio para esta reação (FIGURA 3.2) e, em seguida, acrescentou-se 0,4 g de KOH dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto. O sistema foi deixado em repouso por cinco minutos em banho de gelo. Iniciou-se a reação com o aquecimento do sistema a 60 °C. Coletou-se o produto da reação, sob resfriamento através de banho de gelo.

Transferiram-se 50 μL de diazometano a cada frasco contendo 5 mg de extrato fúngico. Os frascos foram vigorosamente agitados, e uma alíquota de 3 μL foi inserida no sistema de CG/EM.

As condições descritas, a seguir, foram empregadas na análise dos extratos não derivados e derivados com diazometano. Antes da injeção da amostra no equipamento, fixou-se a temperatura do injetor para 180 $^{\circ}\text{C}$ e ajustou-se a rampa de aquecimento, a qual variou da seguinte forma: temperatura fixa em 70 $^{\circ}\text{C}$ por seis minutos, elevação de 70 $^{\circ}\text{C}$ para 250 $^{\circ}\text{C}$ em uma velocidade de 6,0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; e então para 325 $^{\circ}\text{C}$ a uma velocidade de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

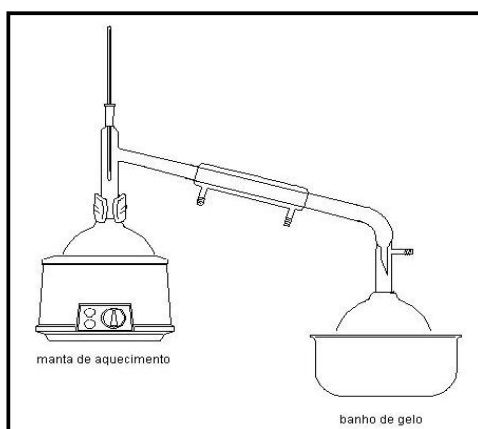
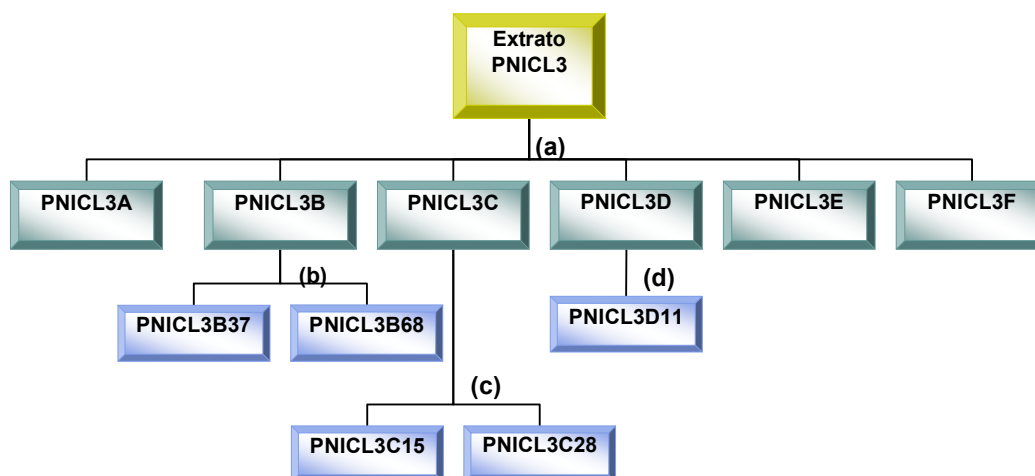


Figura 3.2. Ilustração do sistema reacional para obtenção de diazometano

3.2.7 Isolamento e identificação dos metabólitos secundários do microrganismo N1CL3

O pré-tratamento do extrato PN1CL3 em coluna cromatográfica com placa sinterizada resultou em 6 frações (A-F). As frações PN1CL3B, PN1CL3C e PN1CL3D foram submetidas, separadamente, a cromatografia clássica de bancada. O Fluxograma 3.1 ilustra os procedimentos cromatográficos aos quais a fração PN1CL3 foi submetida.

Fluxograma 3.1. Isolamento dos metabólitos secundários do extrato PNICL3



(a) coluna cromatográfica com placa sinterizada de dimensões $h = 4,5$ cm e $\Phi = 3,7$ cm. Fase estacionária: sílica comum. Fase móvel: eluição no modo gradiente conforme ilustra a tabela 3.2.

(b) cromatografia clássica de bancada empregando coluna de dimensões $h = 16$ cm e $\Phi = 2,5$ cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh. Fase móvel realizada no modo gradiente de eluição, iniciando com 100% de Hex até AcOEt/MeOH 1:1. Foram obtidas 119 frações recolhidas em vidros de 15 mL. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD.

(c) cromatografia clássica de bancada empregando coluna de dimensões $h = 9,0$ cm e $\Phi = 2,0$ cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh. Fase móvel realizada no modo gradiente de eluição, iniciando com 100% de Hex até AcOEt/MeOH 1:1. Foram obtidas 44 frações recolhidas em vidros de 15 mL. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD.

(d) cromatografia clássica de bancada empregando coluna de dimensões $h = 16$ cm e $\Phi = 2,0$ cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh. Fase móvel realizada no modo gradiente de eluição, iniciando com 100% de Hex até AcOEt/MeOH 1:1. Foram obtidas 90 frações recolhidas em vidros de 15 mL. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD.

As substâncias PNICL3C15, PNICL3B37 foram analisadas por ^1H RMN, PNICL3B68 por ^1H RMN, COSY e CG/EM. Para elucidação estrutural de PNICL3C28 foram empregadas análises de ^1H RMN uni e bidimensional, ^{13}C RMN, NOE, e Espectrometria de Massas utilizando *electrospray* no modo positivo de ionização. Já PNICL3D11 foi analisada por ^1H RMN uni e bidimensional.

3.2.8 Comparação do perfil metabólico de NICK3 em diferentes meios de cultura

3.2.8.1 Preparo dos diferentes meios de cultura

Para verificar o comportamento do microrganismo e, possíveis alterações na produção dos metabólitos, realizou-se o cultivo do fungo em quatro meios de cultura diferentes. Além do meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, foram preparados meios sólidos, arroz parboilizado e milho de canjica e também o meio baseado em extrato de soja.

O meio Czapeck com 2% de extrato de levedura foi preparado como descrito em 3.2.2.1. O preparo dos meios sólidos, arroz e milho, deu-se de forma idêntica. Utilizou-se quatro Erlenmeyers de 1000 mL, contendo, previamente, 100 g de arroz parboilizado Uncle bean's[®], aos quais foram adicionados, 84 mL de água destilada em cada frasco. Em seguida, os frascos foram autoclavados duas vezes (em dois dias consecutivos) por 40 minutos a temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão.

O meio contendo extrato de soja foi preparado de acordo com o descrito pelo fabricante do produto, ou seja, para cada 200 mL de água, 2 colheres de sopa do substrato. Foram utilizados 4 frascos de Erlenmeyer contendo um volume de 300 mL em cada frasco. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos, a temperatura de 121°C e 1 atm.

Para esse experimento foram utilizados um total de 16 Erlenmeyers de 1000 mL. Quatro frascos contendo 300 mL de meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura, quatro frascos com 300 mL de extrato de soja, quatro com 100 g de arroz parboilizado e quatro com 100 g de milho de canjica.

Após os meios atingirem a temperatura ambiente, 3 fragmentos do microrganismo, contido em placas de Petri com meio BDA, foram transferidos assepticamente para 3 frascos de cada meio de cultura. Um frasco de cada meio foi mantido como controle de esterilidade. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados, em ambiente sem luz e de forma estática e, cultivados por um período de 20 dias.

3.2.8.2 Obtenção dos extratos

O extrato proveniente do meio líquido Czapeck com 2% de extrato de levedura foi obtido de forma idêntica ao descrito no item 3.2.2.1.

O crescimento da massa fúngica nos meios de arroz, milho e extrato de soja foi interrompido mediante adição de 500 mL de EtOH em cada um dos frascos, os quais foram deixados em repouso por 24 horas. Em seguida, a massa fúngica foi triturada e, posteriormente separada por filtração a pressão reduzida. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se, dessa forma, o extrato etanólico. Após a filtração, foram adicionados 300 mL de AcOEt à massa fúngica e, o processo de extração, filtração e concentração foi idêntico ao mencionado anteriormente, resultando no extrato de acetato de etila.

3.2.8.3 Análise dos extratos por CLAE/UV

Os extratos referentes ao experimento de comparação de meios de cultura foram analisados por CLAE/UV, empregando-se uma coluna Luna 5 μ Phenyl Hexyl e como fase móvel foi utilizada água e acetonitrila, com vazão de 0,7 mL/min. Utilizou-se eluição gradiente como ilustra a Tabela 3.4. Os extratos foram preparados na concentração de 2,5 mg/mL e injetados em um volume de 30 μ L.

Tabela 3.4. Eluição gradiente utilizada nas análises do cultivo de N1CL3 em diferentes meios de cultura

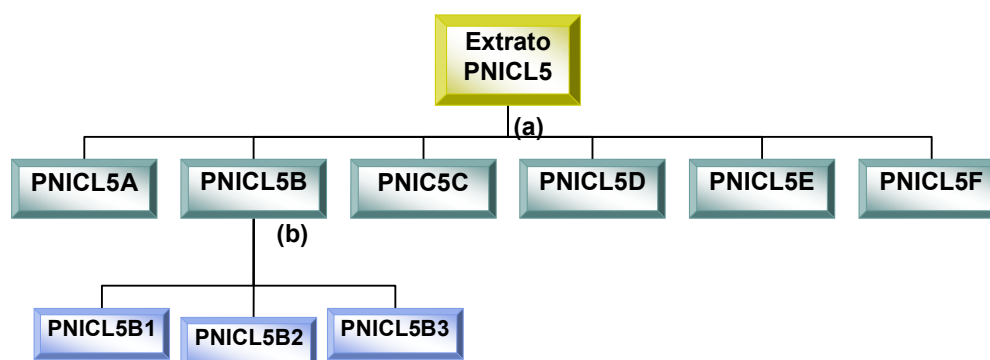
Tempo	Concentração de B% (acetonitrila)
0	20
40	100
45	100
47	15
60	15

3.2.9 Isolamento e identificação dos metabólitos secundários do microrganismo N1CL5

Os extratos PN1CL5 e MN1CL5 sofreram um pré-tratamento utilizando-se coluna cromatográfica com placa sinterizada, o qual resultou em 6 frações (A-F) de cada extrato. O sistema de eluição empregado foi descrito na tabela 3.2 do item 3.2.4.1.

A fração PN1CL5B foi analisada por CLAE/EM e posteriormente submetida a métodos cromatográficos, empregando o equipamento de CLAE preparativo. Para a separação dos compostos utilizou-se como fase estacionária coluna ODS e fase móvel constituída por água e metanol na proporção de 4:6, no modo isocrático de eluição. Foi utilizada vazão de 5 mL/min e monitorados os comprimentos de onda em 240 e 290 nm. Foram obtidas três frações, PN1CL5B1, PN1CL5B2 e PN1CL5B3, as quais foram analisadas por CLAE/EM e por RMN. O Fluxograma 3.2 mostra um resumo do procedimento descrito anteriormente.

Fluxograma 3.2. Isolamento dos metabólitos secundários do extrato PN1CL5

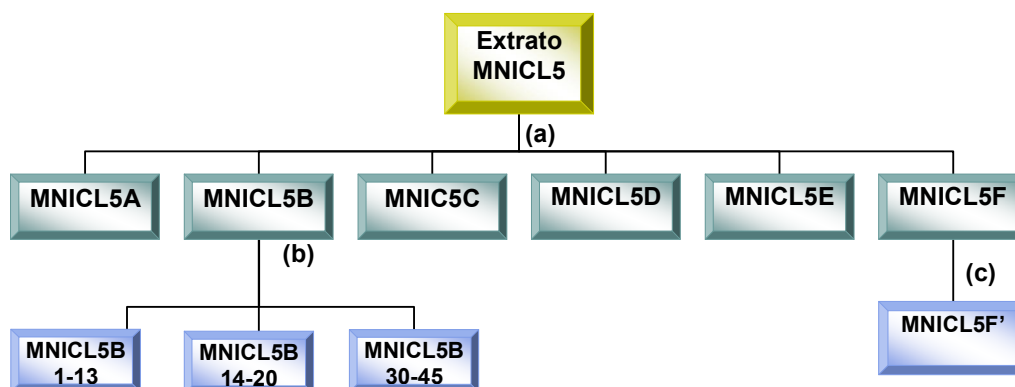


(a) coluna cromatográfica com placa sinterizada de dimensões $h = 4,5$ cm e $\Phi = 3,7$ cm. Fase estacionária: sílica comum. Fase móvel: eluição no modo gradiente conforme ilustra a tabela 3.2. A fração PN1CL3B foi analisada por CLAE/EM.

(b) CLAE preparativa: fase estacionária Shim Pack de 250 x 21,20 mm; eluição isocrática empregando a fase móvel $H_2O:MeOH$ (4:6); vazão de 5mL/min; λ monitorado em 240 e 290 nm

A fração MN1CL5B foi submetida à cromatografia líquida de bancada e, a fração MN1CL5F foi lavada com diferentes solventes. O Fluxograma 3.3. mostra os procedimentos adotados.

Fluxograma 3.3. Isolamento dos metabólitos secundários do extrato PNICL5



(a) coluna cromatográfica com placa sinterizada de dimensões $h = 4,5$ cm e $\Phi = 3,7$ cm. Fase estacionária: sílica comum. Fase móvel: eluição no modo gradiente conforme ilustra a tabela 3.2.

(b) cromatografia clássica de bancada empregando coluna de dimensões $h = 20$ cm e $\Phi = 3$ cm. Fase estacionária sílica gel 230-400 mesh. Fase móvel realizada no modo gradiente de eluição, Hex:CH₂Cl₂ (1:1) até AcOEt/MeOH (1:1). Foram obtidas 50 frações recolhidas em vidros de 15 mL. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD.

(c) lavagem da fração com os seguintes solventes: Hex, CH₂Cl₂, AcOEt.

As frações MNICL5B14-20 apresentaram o mesmo perfil cromatográfico e, dessa forma, foram reunidas e analisadas por RMN ¹H. Já dentre as frações MNICL5B21-50, destacaram-se as frações 30-45, pois apresentavam o mesmo perfil cromatográfico, no entanto, o espectro de RMN de ¹H mostrou-se muito parecido com os espectros das frações PNICL5B1-3 (Fluxograma 3.2) e não serão discutidos neste trabalho.

3.2.9.1 Análise por CLAE/EM

A fração PNICL5B e as subfrações PNICL5B1, PNICL5B2 e PNICL5B foram analisadas por EM empregando fonte de ionização *electrospray* (ESI) no modo positivo. A Tabela 3.5 ilustra as condições do equipamento para realização das análises.

As análises foram realizadas com coluna Luna 5 μ Phenyl Hexyl, eluição gradiente e no modo reverso, empregando água e acetonitrila como fase móvel. O gradiente utilizado encontra-se descrito na Tabela 3.6.

O volume de injeção de amostra foi de 50 μ L e, a vazão foi de 1,0 mL/min, porém, necessitou-se de um divisor de fluxo para introdução de 0,3 mL da amostra no espectrômetro de massas.

Tabela 3.5 Condições de análise do espectrômetro de massas

Experimento	Full Scan
Fonte de ionização	Electrospray positivo, (ESI(+))
Capilar	3,36 kV
Cone	20 V
Extrator	3 V
Lentes de Radiofrequência	0,68 V
Temperatura da fonte	50 °C
Temperatura do probe	300 °C

Tabela 3.6. Eluição gradiente empregada na análise de CLAE/EM

Tempo	Concentração de B% (acetonitrila)
0	30
10	50
30	80
31	100
35	100
36	20
45	20

3.2.10 Comparação do perfil metabólico de N1CL5 em diferentes meios de cultura

3.2.10.1 Preparo dos diferentes meios de cultura e obtenção dos extratos

Assim como N1CL3 foi cultivado em diferentes meios de cultura, para se verificar seu comportamento frente à composição do meio e à produção de metabólitos secundários, estudou-se também o efeito dessa alteração no metabolismo do fungo N1CL5.

Os procedimentos de preparo dos meios Czapeck enriquecido com 2% de levedura, arroz, milho e extrato de soja foram idênticos aos descritos no item 3.2.8.1, no entanto, N1CL5 foi, também, cultivado em meio BD (batata, dextrose). O preparo do meio foi semelhante ao do meio BDA, descrito no item 3.2.1.1, porém sem a adição do ágar.

Foram utilizados no total 20 Erlenmeyers, sendo o microrganismo inoculado em 3 frascos de cada meio de cultura. Um frasco de cada substrato foi mantido como controle de esterilidade.

O cultivo do microrganismo foi de 20 dias, de forma estática e ambiente sem luz.

Os extratos provenientes do meio líquido Czapeck com 2% de extrato de levedura e meio BD foram obtidos igualmente como descrito no item 3.2.2.1. Já a obtenção dos extratos de arroz, milho e soja, foi realizada de forma idêntica ao mencionado no item 3.2.8.2.

3.2.10.2 Análise dos extratos por CLAE/UV

Como fase estacionária foi empregada coluna Luna 5 μ Phenyl-Hexyl e fase móvel composta por água e acetonitrila, empregando modo gradiente de eluição, conforme descrito na Tabela 3.7. Foi utilizada vazão de 1 mL/min.

Os extratos foram preparados na concentração de 10 mg/mL.

Tabela 3.7. Método cromatográfico empregado na análise de comparação de meios de cultura

Tempo	Concentração de B% (acetonitrila)
0	15
15	40
30	80
31	0
35	0
36	30
45	30

3.2.11 Efeito da adição de aminoácidos no metabolismo do fungo N1CL5

3.2.11.1 Preparo dos meios de cultura e obtenção dos extratos de N1CL5

Os microrganismos têm um grande poder de multiplicação e são adaptáveis a variações nutricionais, dessa forma, investigou-se qual seria o comportamento do fungo N1CL5 mediante a adição de aminoácidos ao meio de cultura.

Comparou-se o metabolismo do microrganismo, cultivando-o em meio de cultura carente em aminoácidos (Czapeck), meio rico em diversos aminoácidos (Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura), meio enriquecido com alanina (Czapeck com alanina), meio enriquecido com fenilalanina (Czapeck com fenilalanina), meio enriquecido com tirosina (Czapeck com tirosina) e meio enriquecido com triptofano (Czapeck com triptofano).

Prepararam-se 2700 mL de meio Czapeck, o qual foi dividido em dezoito Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio. Como o experimento envolveu seis meios de cultura de diferente composição, o cultivo do microrganismo foi realizado em triplicata para cada meio. A quantidade de aminoácido livre adicionado foi baseada na composição do extrato de levedura e, encontra-se descrita na Tabela 3.8.

Os meios foram esterilizados e, após atingirem a temperatura ambiente, o microrganismo foi inoculado e cultivado por 20 dias na ausência de luz.

Tabela 3.8. Aminoácidos e suas respectivas massas adicionadas ao meio de cultura

Aminoácido	Massa (g)
Alanina	6,264
Fenilalanina	2,736
Tirosina	1,656
Triptofano	0,864

Decorrido esse período, o desenvolvimento do microrganismo foi interrompido por meio de filtração a pressão reduzida. O filtrado foi particionado com AcOEt (3x 100 mL) e a fase orgânica concentrada em rotaevaporador, obtendo-se, o extrato P. Ao micélio foram adicionados 150 mL de EtOH e deixado em repouso por 24 h. Após esse período, triturou-se o micélio. Em seguida, a massa fúngica foi filtrada e, o filtrado concentrado em rotaevaporador, obtendo-se o extrato M. Os extratos foram nomeados conforme os códigos apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Códigos dos extratos obtidos dos diferentes meios de cultura

Meio de Cultura	Código do extrato	Conteúdo do extrato
Czapeck	PCza	Fase orgânica do meio Czapeck
	MCza	Micélio do meio Czapeck
Czapeck + 2% de extrato de levedura	PLev	Fase orgânica do meio com extrato de levedura
	MLev	Micélio do meio com extrato de levedura
Czapeck + Alanina	PAla	Fase orgânica do meio com alanina
	MAla	Micélio do meio alanina
Czapeck + Fenilalanina	PFenil	Fase orgânica do meio com fenilalanina
	MFenil	Micélio do meio com fenilalanina
Czapeck + Tirosina	PTiro	Fase orgânica do meio com tirosina
	MTiro	Micélio do meio com tirosina
Czapeck + triptofano	PTrip	Fase orgânica do meio com triptofano
	MTrip	Micélio do meio com triptofano

3.2.11.2 Análise dos extratos por CLAE/EM

Para verificar o efeito da adição de aminoácidos ao meio de cultivo de NICL5 foram realizadas análises por CLAE/EM, empregando-se coluna Luna 5 μ Phenyl Hexyl, fase móvel composta por água e acetonitrila, ambos acidificados com 0,1% de TFA, utilizando-se eluição gradiente e no modo reverso e. O gradiente utilizado encontra-se descrito na Tabela 3.10.

Os extratos foram analisados na concentração de 10 μ g/mL, o volume de injeção de amostra foi de 50 μ L e, a vazão foi de 1,0 mL/min, porém, necessitou-se de um divisor de fluxo para introdução de 0,3 mL da amostra no espectrômetro de massas.

Tabela 3.10. Método cromatográfico utilizado nas análises para se verificar o efeito da adição de aminoácidos no metabolismo de NICL5

Tempo (min)	Concentração de B% (acetonitrila)
0	30
10	50
30	80
31	100
35	100
36	30
50	30

As análises dos extratos foram realizadas utilizando-se *electrospray* no modo positivo. A Tabela 3.11 ilustra as condições de sintonia do Espectrômetro de Massas.

Tabela 3.11. Condições do Espectrômetro de Massas para se verificar o efeito da adição de aminoácidos no metabolismo de NICL5

Experimento	Full Scan
Fonte de ionização	Electrospray positivo, (ESI(+))
Capilar	3,36 kV
Cone	19 V
Extrator	4 V
Lentes de Radiofrequência	0,7 V

3.2.12. Estudo da fração PECL

3.2.12.1 Tratamento do extrato botânico “PECL”

Para a pré-purificação do extrato PECL, foi utilizada coluna SEPHADEX LH – 20 ($h = 1,15$ m e $\rho = 3,5$ cm), a qual foi condicionada em H_2O : MeOH (2:8). Em seguida, dissolveu-se o extrato no sistema inicial de eluição, o qual foi posteriormente aplicado na fase estacionária. A Figura 3.3 representa o pré-tratamento do extrato PECL na coluna SEPHADEX-LH 20.



Figura 3.3. Coluna SEPHADEX LH-20 utilizada na pré-purificação do extrato PECL

Foram obtidas 240 frações as quais foram monitoradas por CCD. As frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL168 foram, também, analisadas por CLAE/UV.

3.2.12.2 Condições CLAE/UV para análise das frações PECL

As análises foram conduzidas utilizando-se a fase estacionária Gemini 10 μ C18, com eluição gradiente e no modo reverso, contendo como fase móvel água e metanol/acetonitrila 1:1, ambos acidificados com 0,1% de TFA. Nestas análises foram monitorados os comprimentos de onda de 190 a 370 nm.

Aplicou-se dois métodos cromatográficos distintos, denominados polares 21 e apolares 2 representados na Tabela 3.12

Tabela 3.12 Métodos cromatográficos empregados nas análises das frações PECL

Polares 21		Apolares 2	
Tempo (min)	%B	Tempo (min)	%B
0,01	15	0,01	60
10	40	30	100
35	40	40	100
36	100	40,01	60
40	100	60	60
41	15		
50	15		

3.2.12.3 Separação das substâncias da fração PECL170

A análise por CCD da fração PECL170 (11,65 mg) indicou a presença de duas substâncias. Para a separação dos constituintes químicos, foi realizada cromatografia clássica de bancada, empregando uma coluna ODS (h = 17 cm e Φ = 2,5 cm) e eluição gradiente no modo reverso, empregando-se água e metanol na proporção de 7:3 até 100% de metanol. Foram obtidas 20 subfrações, as quais foram monitoradas por CCD e, agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico. A

subfração denominada PECL170A (2,87 mg) foi analisada por ^1H RMN e por Espectrometria de Massas, utilizando *electrospray* como modo de ionização.

3.2.12.4 Análise por CLAE/EM

A análise de PECL170A foi executada empregando-se coluna Luna 5 μ C-18 e fase móvel composta por água, acetonitrila e metanol, com vazão de 0,7 mL/min. O método cromatográfico e as condições de sintonia do Espectrômetro de Massas estão apresentados nas Tabelas 3.13 e 3.14 respectivamente.

Tabela 3.13. Método cromatográfico para análise de PECL170A

Tempo (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	%C (AcCN)
0	80	20	-
8	80	20	-
15	60	20	-
25	40	30	-
40	30	30	-
41	-	-	100
48	-	-	100
48,01	60	-	40
49	85	15	-
60	85	15	-

Tabela 3.14. Condições de análise do espectrômetro de massas para análise de PECL170A

Experimento	Full Scan
Fonte de ionização	<i>Electrospray</i> negativo, (ESI(-))
Capilar	3,74 kV
Cone	38 V
Extrator	5 V
Lentes de Radiofrequência	0,80 V
Temperatura da fonte	50 °C
Temperatura do probe	350 °C

3.2.13 Detecção de biflavonóides nas folhas de *Cupressus lusitanica* e *Araucaria angustifolia*

Como relatado na introdução deste trabalho, a planta *C. lusitanica* e outras coníferas são produtoras de biflavonóides. Com a finalidade de se verificar a produção desta classe de compostos, coletaram-se ramos de *C. lusitanica* e de *A. angustifolia* localizadas no campus da UFSCar e, estes foram submetidos a três modos de extração diferentes e posterior análise por CLAE/UV, empregando-se três métodos cromatográficos distintos, a fim de se constatar o melhor modo de extração destes compostos fenólicos.

Após a coleta dos ramos de *C. lusitanica* e *A. angustifolia*, estes foram secos em estufa de circulação a 45 °C durante 24 horas e, em seguida, moídos em moinho de facas.

Para cada um dos três métodos de extração utilizou-se 100 mg de material vegetal proveniente de cada planta.

Os métodos de extração e análises por CLAE estão descritos a seguir.

❖ Método de extração A: Foram adicionados 2 mL de água e acetonitrila (1:1) aos 100 mg de material vegetal (de cada planta separadamente), os quais foram sonicados por 15 minutos. A mistura foi centrifugada durante 1 minuto, e posteriormente o sobrenadante foi removido e reservado. O procedimento foi repetido por mais uma vez.

Adicionaram-se 2 mL de CHCl_3 grau HPLC ao sobrenadante, em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente. Só então, esta foi centrifugada para separação da fase orgânica, a qual foi concentrada em Centrivap.

Na análise por CLAE empregou-se fase estacionária Gemini 10 μ C18. Utilizou-se modo reverso de eluição contendo como fase móvel metanol/acetonitrila 1:1 e H_2O , ambos acidificados com 0,1% de TFA. A amostra foi re-suspendida na fase móvel. O volume de injeção foi de 20 μL e, a vazão de 0,5 mL/min. Empregou-se o método cromatográfico, polares 21, descrito no item 3.2.12.2.

Monitoraram-se nestas análises os comprimentos de onda de 190 a 370 nm.

❖ Método de extração B: Foram adicionados 2 mL de acetonitrila grau HPLC aos 100 mg de material vegetal (de cada planta separadamente), os quais, em seguida, foram sonicados por 15 minutos. A mistura foi centrifugada por 1 minuto,

seguida da separação do sobrenadante. O procedimento foi repetido por mais uma vez.

A amostra antes de ser injetada no cromatógrafo passou por um processo de pré-purificação, o qual consistiu na retirada de uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e adição de 4 mL de H₂O milli-Q, seguida de agitação por 10 segundos em agitador de tubos. Logo após ativou-se um cartucho de C18 (1 mL) com 2 mL de acetonitrila, seguido de condicionamento com 2 mL de H₂O Milli-Q. Injetou-se a amostra no cartucho e, os compostos de polaridade intermediária foram eluídos com 2 mL de tetra hidrofurano. Empregaram-se as fases estacionária e móvel mencionadas no modo de extração anterior. As amostras foram resuspendidas no sistema de eluição. Injetou-se 20 µL de amostra e, utilizou-se vazão de 0,8 mL/min. O método cromatográfico apolares 21 foi utilizado nas análises destes extratos.

❖ Método de extração AB (extração ácido/base): Foram adicionados 2 mL de metanol, grau HPLC, aos 100 mg de material vegetal (de cada planta separadamente). Em seguida, a mistura foi sonicada durante 2 minutos. Transferiram-se 2 mL de solução de NH₄OH (1,0 mol/L) à mistura, a qual foi novamente sonicada por mais 5 minutos e, só então, centrifugada por 1 minuto, seguida da remoção do sobrenadante. Foram adicionados mais 2 mL de NH₄OH (1,0 mol/L) ao material vegetal residual, o qual foi novamente sonicado por mais 5 minutos. Após centrifugar a mistura, o sobrenadante foi removido.

Para a pré-purificação do extrato, adicionaram-se, ao sobrenadante, 2 mL de éter etílico, o qual foi agitado e, em seguida, retirou-se a fase orgânica com uma pipeta de Pasteur. Repetiu-se este procedimento mais uma vez. Adicionou-se ácido clorídrico concentrado à fase orgânica até a obtenção de pH entre 3-4. Extraiu-se os compostos fenólicos usando AcOEt (2 x 1 mL) e BuOH (2 x 1 mL). As amostras foram concentradas em centri vap.

Empregaram-se as fases estacionária e móvel mencionada no modo de extração A. Solubilizou-se as amostras no sistema de eluição. Injetou-se 20 µL de amostra e, vazão de 1,0 mL/min. O método cromatográfico, denominado bf_ab_250907, encontra-se na Tabela 3.15.

Tabela 3.15. Método cromatográfico bf_ab_250907 utilizado no modo de extração AB

Tempo (min)	% B (MeOH/AcCN 1:1 + 0,1% TFA)
0,01	25
35	100
40,0	100
40,01	25
45	25

3.2.14 Ensaios biológicos

3.2.14.1 Ensaio de inibição bacteriana pelo método de difusão em ágar

3.2.14.1.1 Preparo dos meios de cultura

❖ **Ágar Muller Hinton**

Em 250 mL de água destilada, dissolveu-se 9,5 g de ágar Mueller Hinton.

❖ **Caldo Mueller Hinton**

Dissolveu-se 10,5 g de caldo Mueller Hinton em 50 mL de água destilada.

❖ **BHI (Infuso Cérebro Coração)**

Preparou-se o meio dissolvendo-se 52,0 g de BHI para 1 L de água destilada.

3.2.14.1.2 Ativação das bactérias

As bactérias foram ativadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo incubadas por um período de 24 horas, a 33 °C. Após esse intervalo, transferiu-se cerca de uma colônia de bactéria para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller Hinton, com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada. Este tubo, após ser homogeneizado, foi incubado por um período de 24 a 30 horas, a uma temperatura de 33 °C.

3.2.14.1.3 Padronização das culturas

As bactérias submetidas aos ensaios antibacterianos foram padronizadas mediante comparação com os padrões da escala de McFarland de turbidez, tendo sido referida a concentração de 1×10^8 cel/mL.

Quando necessário, promoveu-se a diluição do tubo contendo a bactéria utilizando solução salina 0,9%.

3.2.14.1.4 Preparo das amostras

Os extratos a serem testados foram preparados na concentração 3 mg/mL e a substância pura na concentração de 1mg/mL em DMSO.

3.2.14.1.5 Preparo do antibiótico controle

Pesaram-se 1,25 mg de tetraciclina, as quais, foram dissolvidas em 25 mL de DMSO, obtendo-se, dessa forma, uma solução de concentração 0,05 mg/mL.

3.2.14.1.6 Ensaio antibacteriano contra as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*

Um volume de 25 μ L de cada bactéria a ser ensaiada foi transferido para uma placa de Petri contendo meio BHI. Esse volume de células bacterianas foi espalhado por toda a placa com o auxílio de uma alça. Após a secagem da placa foram feitos poços, os quais, posteriormente, foram preenchidos com as soluções, em DMSO, dos extratos e substância testados.

As placas de Petri foram incubadas por 24h em estufa a 33°C.

O resultado foi obtido mediante a medida do halo de inibição do crescimento bacteriano.

É importante ressaltar que para cada bactéria ensaiada o experimento foi realizado em triplicata.

3.2.14.2 Ensaio de inibição fúngica pelo método de difusão em ágar

O ensaio de inibição fúngica foi realizado mediante protocolos bem estabelecidos por nosso grupo de pesquisas.

Foram testadas as atividades dos extratos hexânico e etanólico de *C. lusitanica* e uma fração rica em biflavonóides produzidos pela planta, frente aos microrganismos NICL3, NICL4 e NICL5 isolados de *C. lusitanica*.

O meio de cultura utilizado no ensaio foi o BDA (batata, dextrose e ágar), o qual depois de preparado e esterilizado em autoclave, foi vertido em placas de Petri e, estas mantidas em capela de fluxo laminar até a solidificação.

Foram feitos quatro poços de 5 mm de diâmetro no meio de cultura circundando a região central, na qual se inoculou o fungo. Nestes poços foram adicionados 100 µL das soluções preparadas em DMSO nas concentrações de 5,00 mg/mL, 2,50 mg/mL e 1,25 mg/mL, para cada extrato testado e DMSO utilizado como controle (FIGURA 3.4). O desenvolvimento dos microrganismos foi observado dia a dia e, o potencial antifúngico dos extratos foi avaliado através da inibição do crescimento do microrganismo.

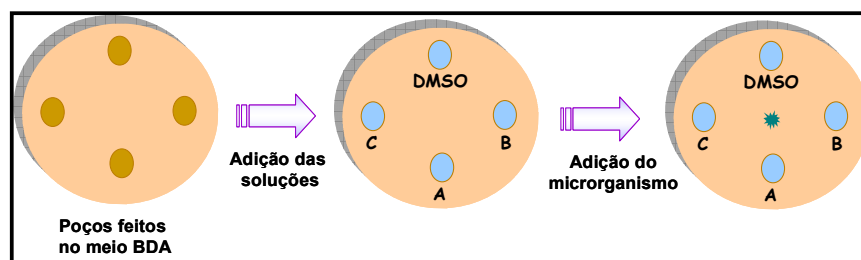


Figura 3.4. Representação do procedimento adotado para realização do ensaio antifúngico pelo método de dispersão em ágar. (A), (B) e (C) representam as concentrações das soluções em DMSO dos extratos testados. (A) 5 mg/mL, (B) 2,50 mg/mL e (C) 1,25 mg/mL

3.2.14.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (LOE UFC) com o objetivo de se verificar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos provenientes dos fungos endofíticos de *Cupressus lusitanica*, dos extratos hexânico e etanólico da planta e também de uma substância produzida pelo fungo N1CL5, em três linhagens de células tumorais humanas.

As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.2.14.3.1 Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. A substância pura foi testada na concentração única de 5µg/mL e os extratos na concentração de 50µg/mL.

3.2.14.3.2 Citotoxicidade *in vitro*

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT é um método rápido, sensível e barato. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad Prism.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de fungos endofíticos de *Cupressus lusitanica*

Após três dias do processo de isolamento dos microrganismos endofíticos de *C. lusitanica*, verificou-se o desenvolvimento dos primeiros isolados. A Figura 4.1.1 mostra o início do crescimento dos microrganismos a partir das extremidades do material botânico, depositado sobre o meio BDA na placa de Petri.

Notou-se também que a placa controle, a qual permaneceu aberta durante o processo de isolamento, e as placas inoculadas com a última água de esterilização da superfície das folhas da planta, não apresentavam sinais de contaminação, indicando, desse modo, a eficácia da metodologia aplicada, como apresentado na Figura 4.1.2.



Figura 4.1.1. Fungos endofíticos isolados das folhas de *Cupressus lusitanica*

Em setembro de 2006, em trabalho exploratório da micro população endofítica de *C. lusitanica*, observou-se o crescimento de quatro fungos. Em 2007, em trabalho incluso neste projeto de pesquisa, isolaram-se, das folhas de *C. lusitanica*, cinco fungos endofíticos, dentre os quais quatro eram, aparentemente, idênticos aos isolados em 2006. A identificação das espécies é de grande importância para os estudos de biodiversidade e relação com o hospedeiro. Toda forma de vida requer exigências nutritivas, em termos de substâncias químicas indispensáveis ao seu crescimento e ao seu funcionamento normal. Alguns fungos, embora cresçam bem em ágar, outros os fazem pobremente ou simplesmente não se desenvolvem,

exigindo nutrientes específicos como vitaminas e outras substâncias estimulantes (PELCZAR *et al.*, 1997).

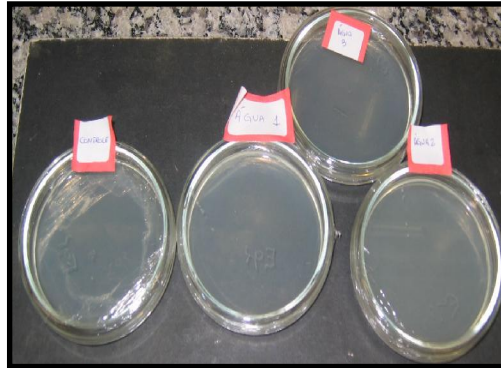


Figura 4.1.2. Placas de Petri que monitoraram a assepsia do processo de isolamento dos microrganismos de *C. lusitanica*

A Figura 4.1.3. ilustra os cinco fungos endofíticos isolados de *C. lusitanica* com seus respectivos códigos de identificação do LaBioMMI.

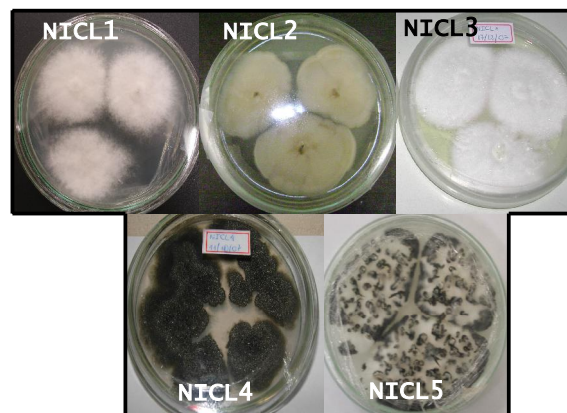


Figura 4.1.3. Fungos endofíticos isolados de *C. lusitanica* e seus respectivos códigos

Os microrganismos foram enviados para identificação na Universidade Federal da Amazônia (UFAM) e, em uma identificação prévia os fungos NICL3 e NICL5 foram relacionados ao gênero *Xylaria*, enquanto NICL4 foi identificado como *Guignardia mangifera*.

O fungo NICL5 destacou-se em meio aos demais, pois se constatou a formação de estruturas delgadas e alongadas que crescem a partir da massa micelial em direção a superfície. Esta observação impulsionou a busca de material

bibliográfico e, LEE, *et al.* (2003), reportaram que espécies de *Xylaria* possuem a característica de produzirem estroma alongado e ereto.

4.2 Extratos fúngicos

Ramos de *Cupressus lusitanica* com cones masculinos e femininos foram depositados no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCAR) sob o número de 7281.

No experimento em pequena escala houve a necessidade de se juntar os extratos P e M dos fungos NICL1 e NICL4 devido a pouca massa destes. A coluna filtrante resultou nas frações NICL1 A-F e NICL4 A-F.

Verificou-se no experimento em larga escala, em meio de cultura Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, que os microrganismos NICL1, NICL3 e NICL5 desenvolveram uma densa massa micelial, enquanto que o fungo NICL4 não apresentou um bom crescimento (Figura 4.2.1), já o fungo NICL2 cresceu submerso ao meio de cultura.

No experimento em larga escala, para todos os microrganismos cultivados, observou-se a baixa produção dos extratos P (partição AcOEt) em relação aos extratos M (micelial), esta fato deve estar relacionado a produção intracelular dos metabólitos, os quais podem ser excretados para o exterior. A Tabela 4.2.1 mostra as massas destes extratos.

Tabela 4.2.1 Massas dos extratos particionado e micelial

Extrato	Código do fungo	Massa (g)
PARTIÇÃO	NICL1	2,7300
	NICL2	0,6986
	NICL3	0,6301
	NICL4	0,8262
	NICL5	12,5224
MICÉLIO	NICL1	20,5687
	NICL2	3,4257
	NICL3	20,5687
	NICL4	22,0833
	NICL5	22,3825

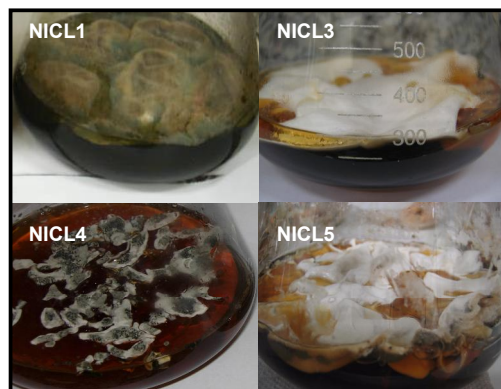


Figura 4.2.1 Crescimento micelial de NICL1, NICL3, NICL4 e NICL5 após 20 dias de cultivo

Durante o cultivo dos microrganismos alguns fatos interessantes foram observados, dentre eles, a marcante coloração verde escuro do meio de cultura Czapeck após 20 dias de cultivo do fungo NICL1. Mesmo após a partição com AcOEt, verificou-se que o extrato obtido, permanecia com a cor mencionada (Figura 4.5A), a qual também foi verificada no extrato micelial.

Notou-se grande diferença na aparência do fungo NICL4, quando cultivado em meios de cultura sólido (BDA) e líquido (Czapeck) (Figura 4.2.2B).

O fungo NICL5 mostrou-se bastante interessante de ser estudado não apenas por apresentar uma estrutura morfológica diferenciada (Figura 4.2.2C), mas também pelo fato de apresentar cristais bem definidos nos extratos brutos. Após a pré-purificação por meio da coluna filtrante pode-se verificar a presença de cristais nas frações PNICL5B, PNICL5C, MNICL5B, MNICL5C e MNICL5E.

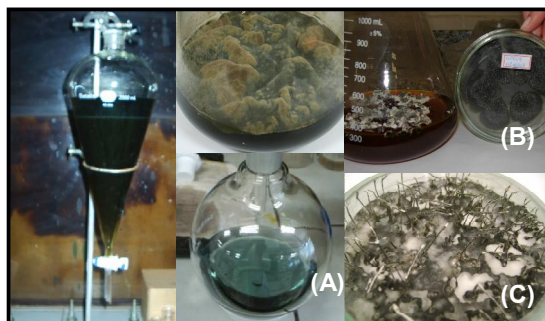


Figura 4.2.2. Características observadas: (A) NICL1 após 20 dias de cultivo e coloração esverdeada do extrato PNICL1, (B) modificação na aparência de NICL4 em meios diferentes e (C) estruturas delgadas e longas de NICL5

4.3 Monitoramento dos extratos fracionados (fúngicos e vegetal) por CLAE/UV

Como o estudo da associação planta-fungo endofítico de *Cupressus lusitanica* é pioneiro, não se conhecem os perfis dos metabólitos secundários fruto desta interação.

Inicialmente, explorou-se o comportamento cromatográfico de frações ricas em diterpenos, provenientes de trabalhos anteriores realizados no LaBioMMi. Esta iniciativa teve a finalidade de se comparar o perfil cromatográfico destas frações diterpênicas, com os extratos fúngicos e botânico, para verificar a presença desta classe nestes extratos.

Foram monitoradas as frações ricas nos diterpenos ácido abiético (AA), ácido diidroabiético (ADA) e ácido diidro-isoestévico (ADIE) no comprimento de onda 236 nm. A Figura 4.3.1 mostra os cromatogramas referentes às frações enriquecidas nos referidos diterpenos.

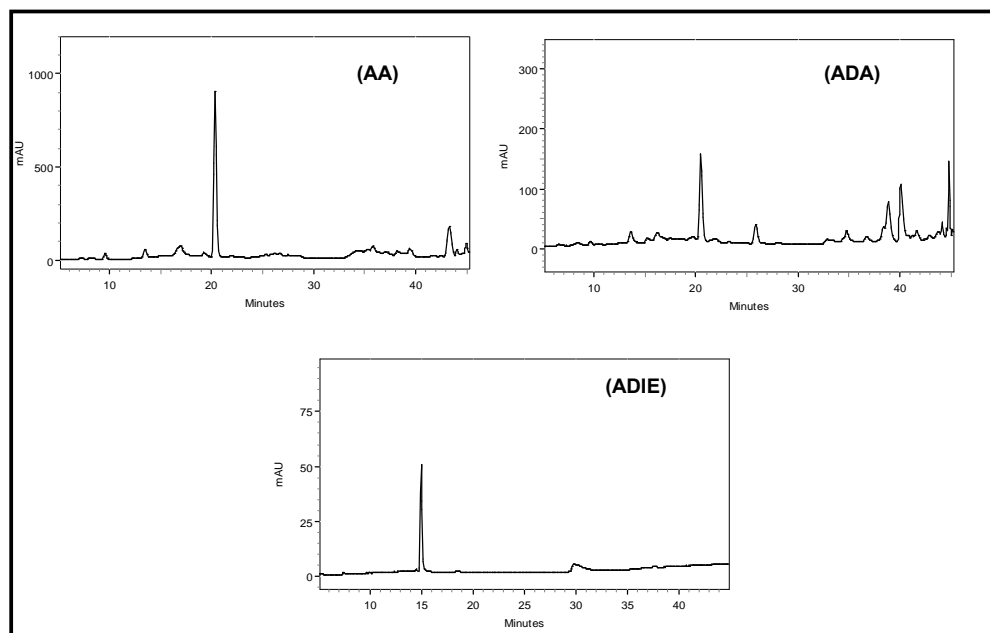


Figura 4.3.1. Cromatograma das frações ricas nos diterpenos ácido abiético (AA), ácido diidroabiético (ADA) e ácido diidro-isoestévico (ADIE) em 236 nm

O método cromatográfico (terp_261007, página 29) escolhido, foi aquele que concentrou as bandas dos diterpenos padrões entre 15 a 20 minutos de corrida. No entanto, como não se conhecia a constituição química dos extratos fúngicos,

sugeriu-se monitorar as bandas cromatográficas referente aos possíveis diterpenos no intervalo de 8 a 25 minutos, pois assim, substâncias com maior ou menor afinidade pela fase estacionária poderiam ser observadas no cromatograma.

A Figura 4.3.2 mostra os cromatogramas processados em 236 nm, adquiridos para as frações de PHCL de (A – F) provenientes dos material botânico. Pode-se observar a complexidade destas frações, uma vez que há compostos que eluem no início, no meio e final da corrida cromatográfica.

A fração PHCLA mostrou uma variedade considerável de compostos, com destaque para substâncias de menor polaridade, o que é justificável, pois esta foi obtida com solventes de baixa polaridade, Hex: CH₂Cl₂ (1:1). Entre 13 e 17 minutos verificou-se algumas bandas cromatográficas, as quais podem estar relacionadas à classe dos diterpenos.

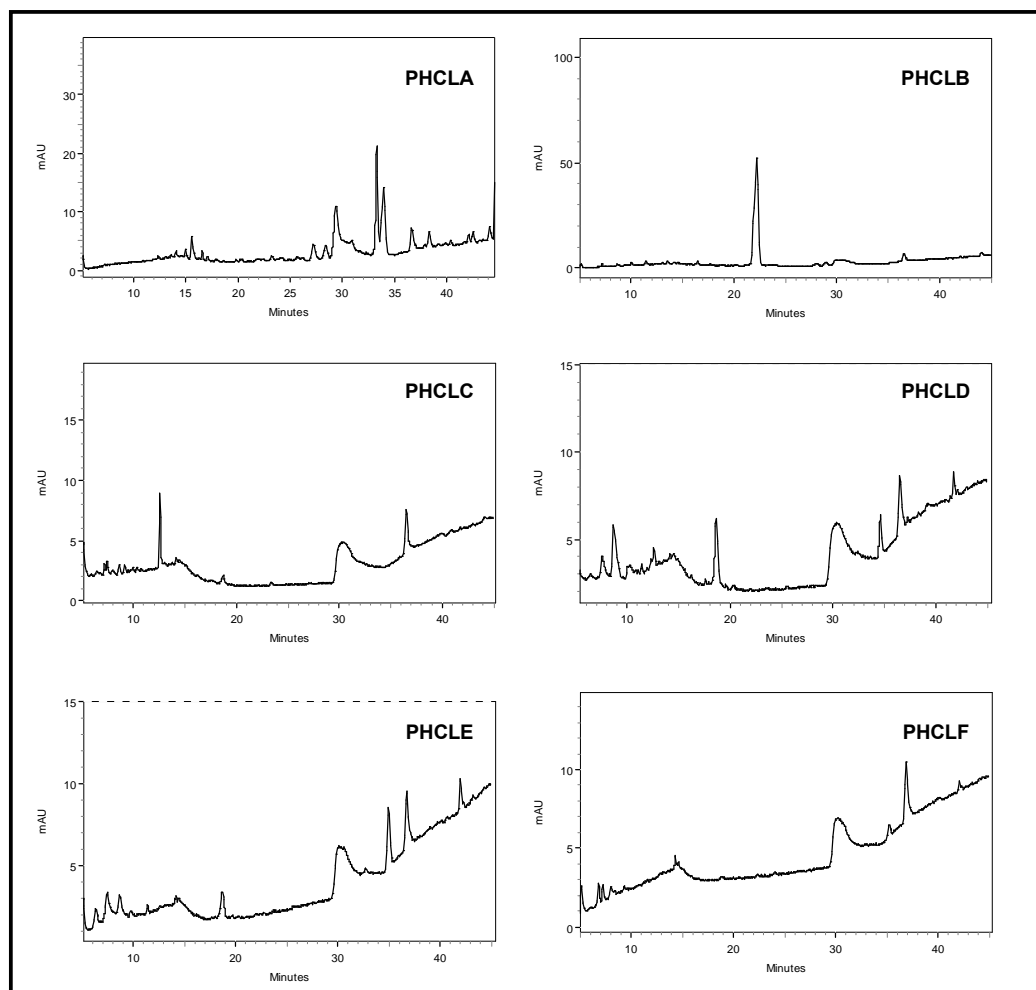


Figura 4.3.2. Cromatogramas das frações PHCL (A-F) $\lambda = 236$ nm

A fração PHCLB destacou-se em relação as demais, pois apresentou uma intensa banda cromatográfica com tempo de retenção próximo a 22,20 minutos, a qual enquadrou-se na faixa determinada para os diterpenos.

A fração PHCLC mostrou-se composta de substâncias de maior polaridade, no entanto, verificou-se uma banda com tempo de retenção próximo 13,00 minutos, a qual se enquadra no intervalo de retenção dos diterpenos. Os perfis cromatográficos ds frações PHCL (D-E) mostraram-se bastante semelhantes, podendo estas apresentarem a mesma constituição química. Na região de 8 a 20 minutos foram verificadas algumas bandas compreendidas na faixa de retenção determinada para os diterpenos.

As frações fúngicas apresentaram perfis cromatográfico distintos

Os cromatogramas referentes as frações NICL1 (A-F), mostram-se muito pobres em constiuintes químicos, uma vez que, apenas em NICL1D e NICL1E foram observadas poucas bandas cromatográficas, porém nos intervalos de retenção determinado para os ditepenos.

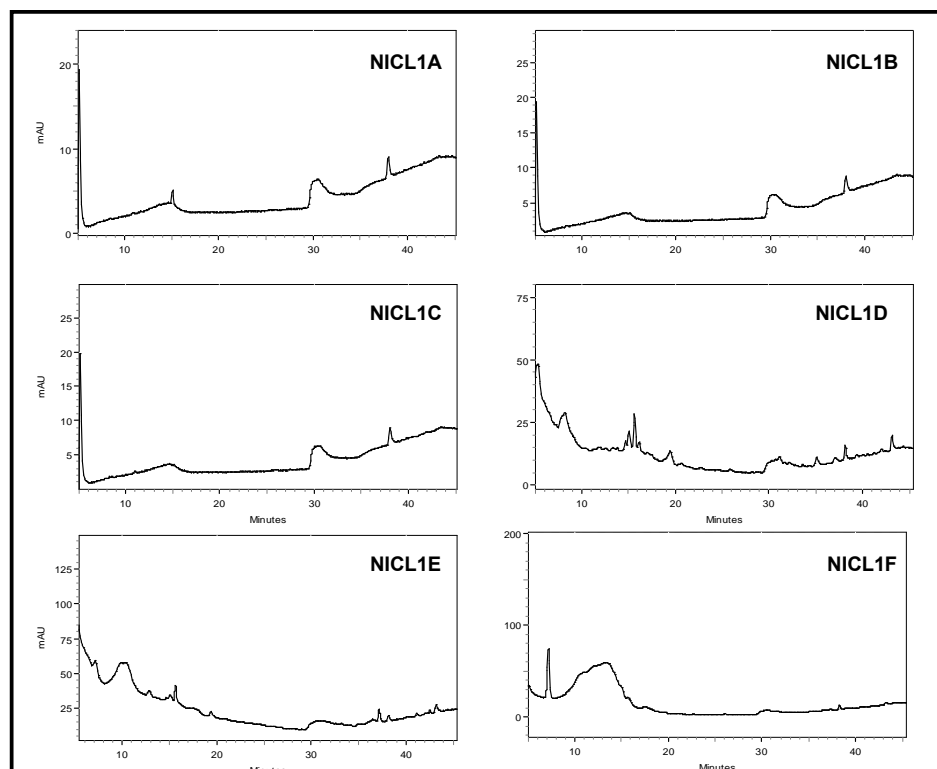


Figura 4.3.3. Cromatogramas das frações NICL1 (A-F), $\lambda = 236$ nm

As Figuras 4.3.4 e 4.3.5 ilustra os cromatogramas das frações provenientes de NACL2. Pôde-se constatar que somente as frações MNACL2 (B, D e E) e PNACL2C apresentaram compostos com tempo de retenção na faixa determinada para os diterpenos.

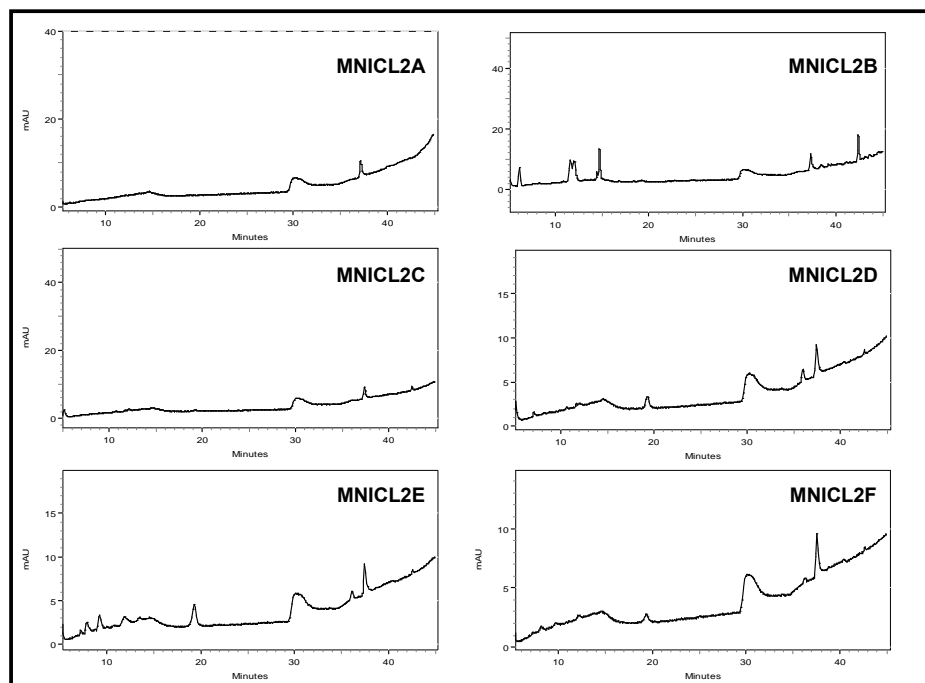


Figura 4.3.4. Cromatogramas das frações MNACL2 (A-F), $\lambda = 236$ nm

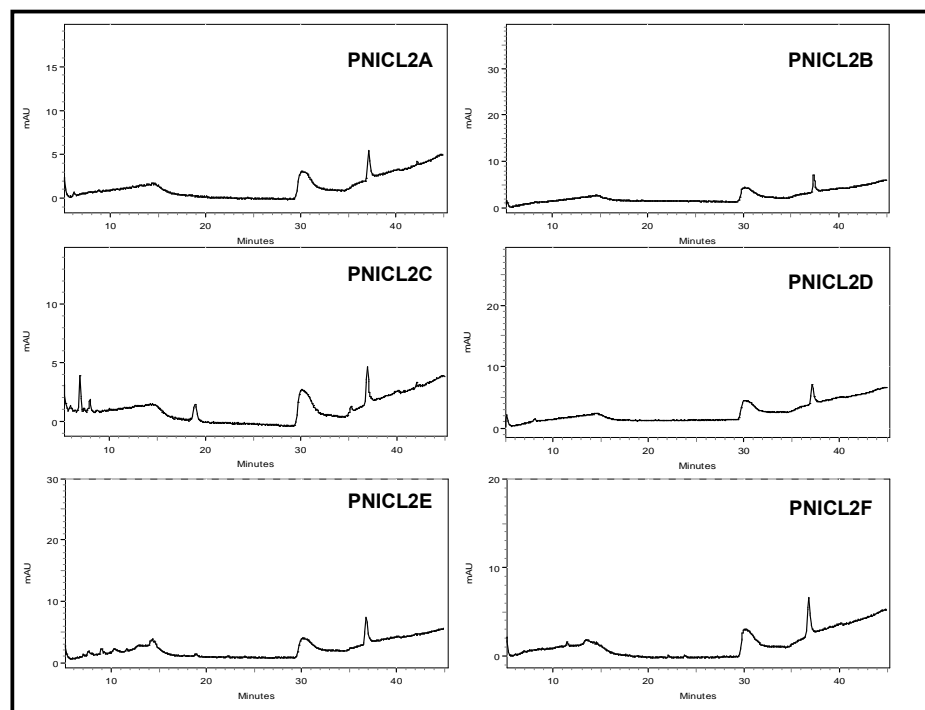


Figura 4.3.5. Cromatogramas das frações PNACL2 (A-F), $\lambda = 236$ nm

Diferentemente dos demais extratos analisados anteriormente, as frações de MNICL3 e PNICL3, apresentadas nas Figuras 4.3.6 e 4.3.7, mostraram maior riqueza de constituintes químicos, pois, foi possível observar nos cromatogramas bandas de baixa, média e alta polaridade. Foi notado também a presença de várias bandas no intervalo de retenção determinado para os diterpenos.

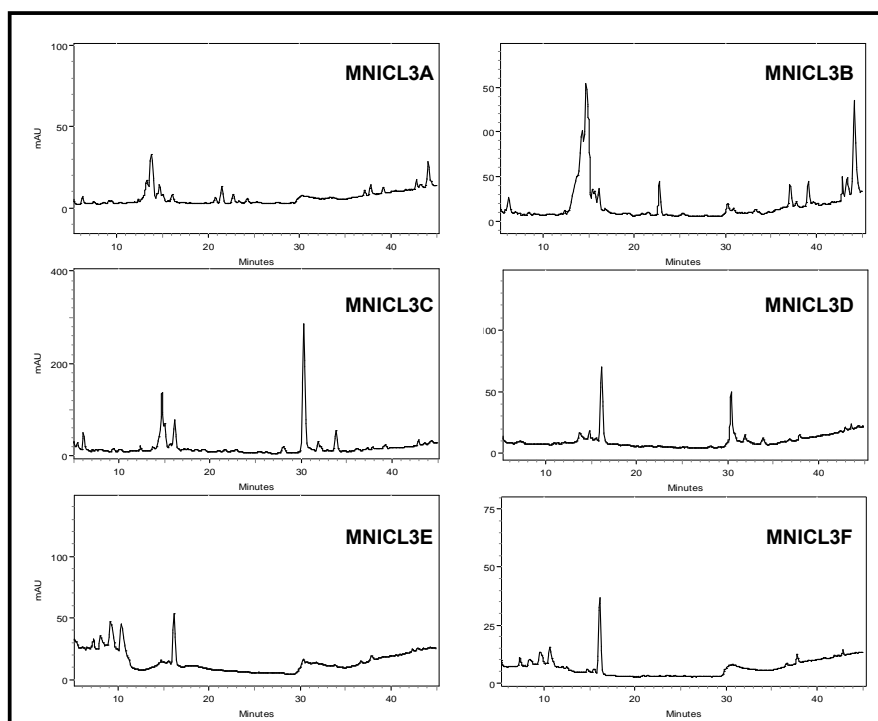


Figura 4.3.6. Cromatogramas das frações MNICL3 (A-F), $\lambda = 236$ nm

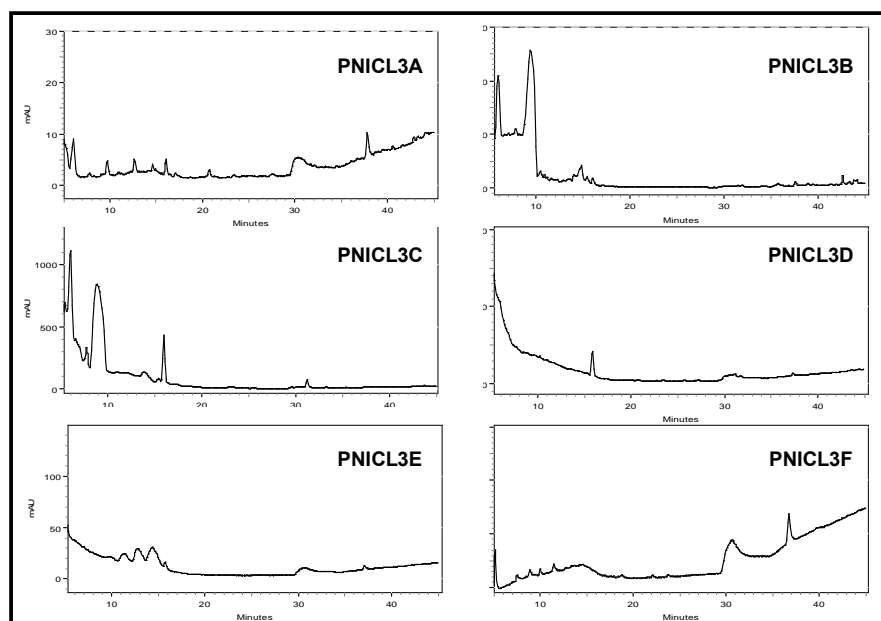


Figura 4.3.7 Cromatogramas das frações PNICL3 (A-F), $\lambda = 236$ nm

Assim como na maioria das frações dos extratos fúngicos, as frações NICL4 (A-F) apresentaram alguns constituintes químicos no intervalo de retenção dos diterpenos, destacando-se a fração NICL4B, por apresentar maior número de bandas no referido intervalo. A Figura 4.3.8 ilustra os cromatogramas das frações de NICL4.

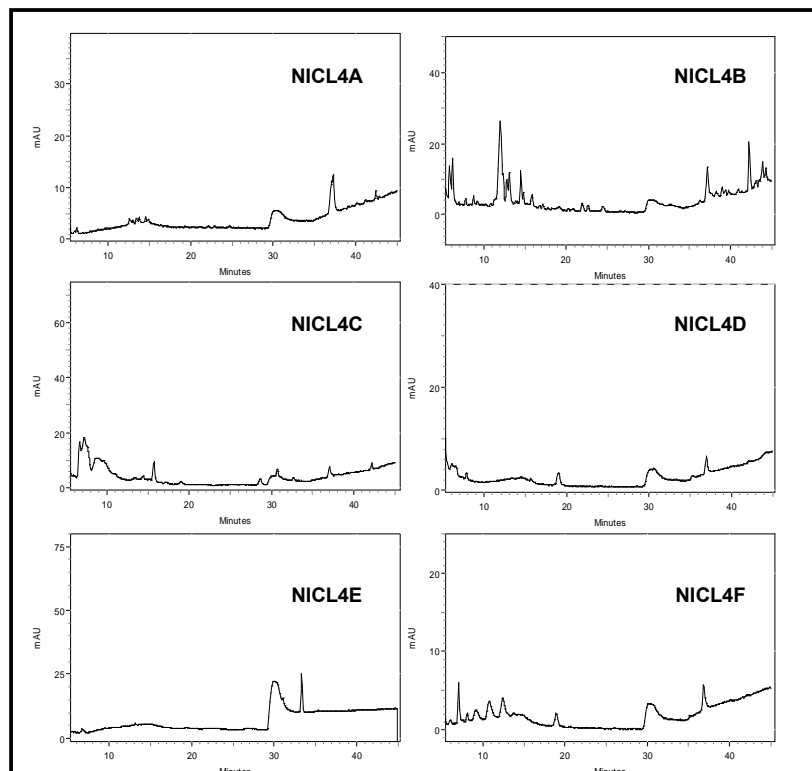


Figura 4.3.8 Cromatogramas das frações NICL4 (A-F), $\lambda = 236$ nm

As Figuras 4.3.9 e 4.3.10 representam os cromatogramas referentes às frações dos extratos de NICL5, nos quais constatou-se a possibilidade da produção de diterpenos pelo microrganismo. Notou-se no cromatograma de MNICL5A a presença de várias bandas de baixa intensidade na região proposta para os diterpenos. Já MNICL5B e MNICL5C apresentaram perfil cromatográfico muito semelhante, diferindo apenas na intensidade das bandas com tempos de retenção próximos a 7,5 e 9,5 minutos. Em MNICL5D observou-se um pequena banda em 18,5 minutos, a qual pode estar relacionada aos diterpenos.

As frações PNICL5B, PNICL5D, PNICL5E e PNICL5F (Figura 4.3.10) podem ser constituídas por diterpenos, uma vez que, algumas bandas, de fraca intensidade, foram observadas no intervalo sugerido para estes compostos.

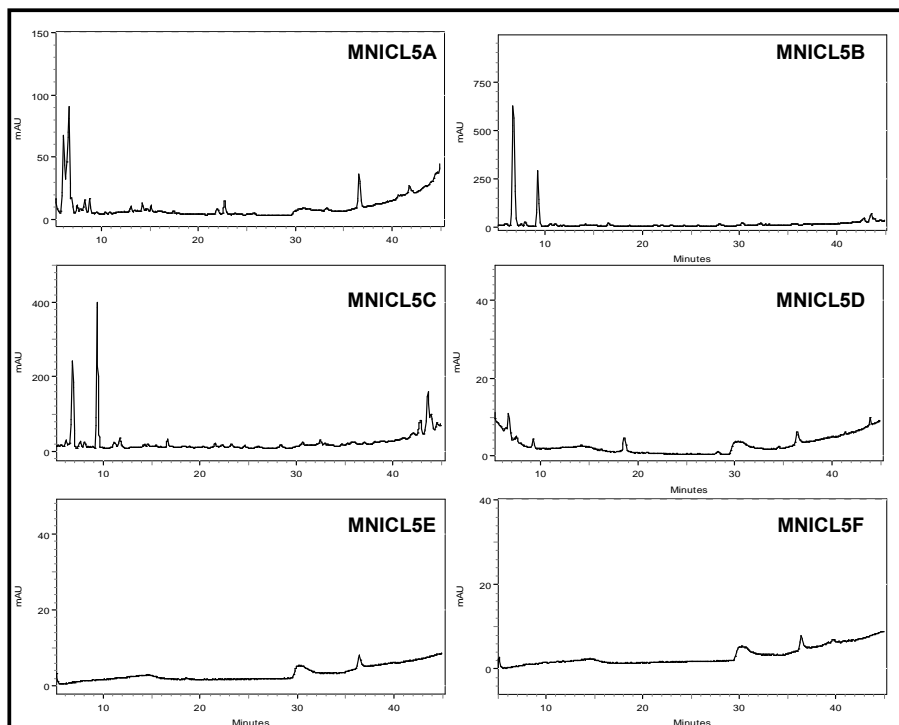


Figura 4.3.9. Cromatogramas das frações MNICL5 (A-F), $\lambda = 236$ nm

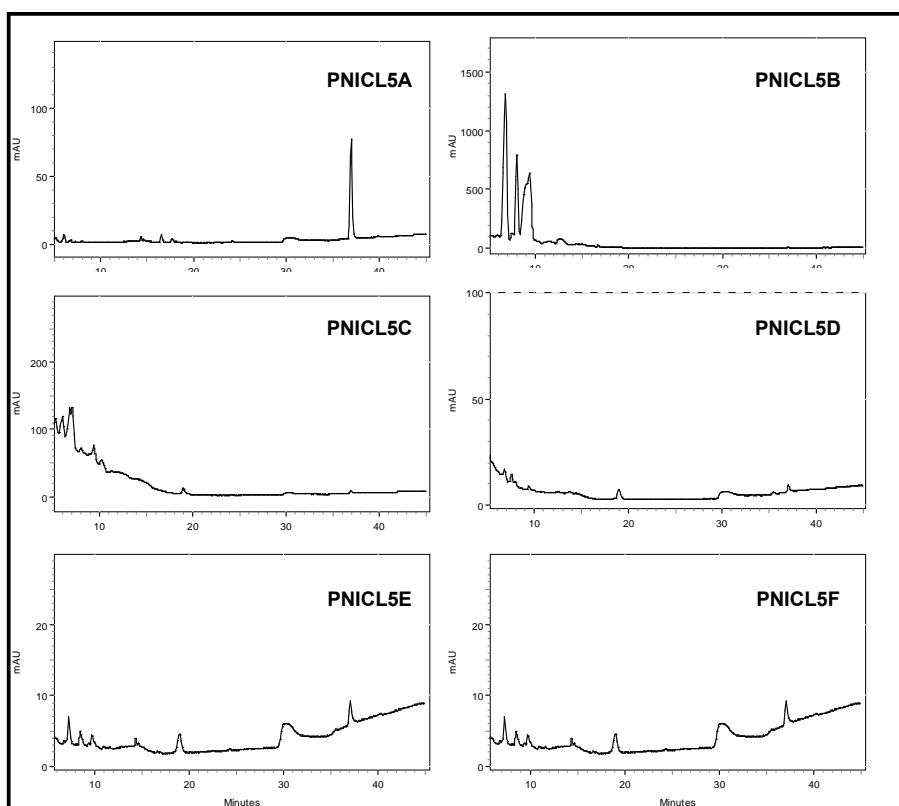


Figura 4.3.10. Cromatogramas das frações PNICL5 (A-F), $\lambda = 236$ nm

De acordo com as análises por CLAE/UV, todos os extratos apresentaram bandas no intervalo de retenção proposto para os diterpenos. Vale ressaltar que a maioria destas bandas apresentaram fraca intensidade, indicando a baixa concentração destes compostos. Destaram-se os extratos dos microrganismos N1CL3 e N1CL5, pois apresentaram maior riqueza de constituintes químicos, sugerindo, desse modo, que a química destes microrganismos deva ser estudada com mais ênfase.

4.4 Monitoramento dos extratos fúngicos e botânico por CG/EM

Também para se avaliar a constituição química dos extratos fúngicos e botânico em busca de diterpenos, foram realizadas análises por CG/EM.

O pré-tratamento dos extratos fúngicos e do material botânico foi realizado com a finalidade de extrair apenas os compostos de baixa polaridade, permitindo, desse modo, a execução das análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) com ionização por elétrons. Esta forma de ionização tem como característica principal a produção de vários íons fragmentos, conseqüentemente, fornecendo riqueza de informação estrutural.

As análises por CG/EM foram de extrema relevância para execução deste trabalho, pois houve a detecção de importantes metabólitos, como alguns diterpenos de *C. lusitânica*, bem como ésteres de cadeia longa e isocumarinas e um sesquiterpeno nos extratos fúngicos.

Também através destas análises pôde-se confirmar a maior riqueza de constituintes químicos dos extratos dos fungos N1CL3 e N1CL5, o que concordou com o observado nas análises por CLAE/UV. Estas constatações foram determinantes para a escolha dos microrganismos estudados.

4.4.1 Monitoramento do extrato das folhas de *C. lusitânica*

O cromatograma de íons totais do extrato da planta mostrou uma série de bandas, sugerindo uma mistura complexa de constituintes químicos, conforme mostra a Figura 4.4.1.

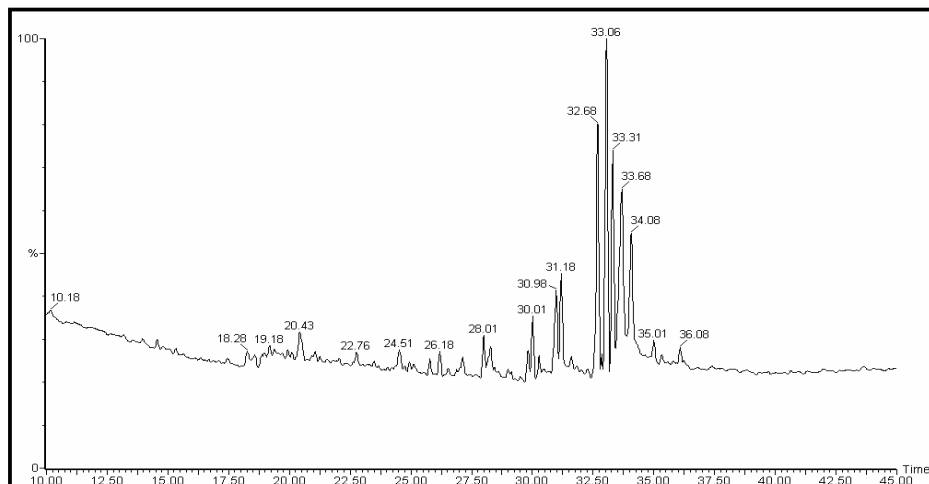


Figura 4.4.1. Cromatograma de íon totais do extrato botânico PHCL

Através da comparação do padrão de fragmentação com os espectros de massas fornecido pela biblioteca (NIST) do espectrômetro, alguns diterpenos foram detectados no extrato proveniente das folhas de *Cupressus lusitanica*. A Figura 4.4.2 mostra as estruturas dos diterpenos identificados pela biblioteca.

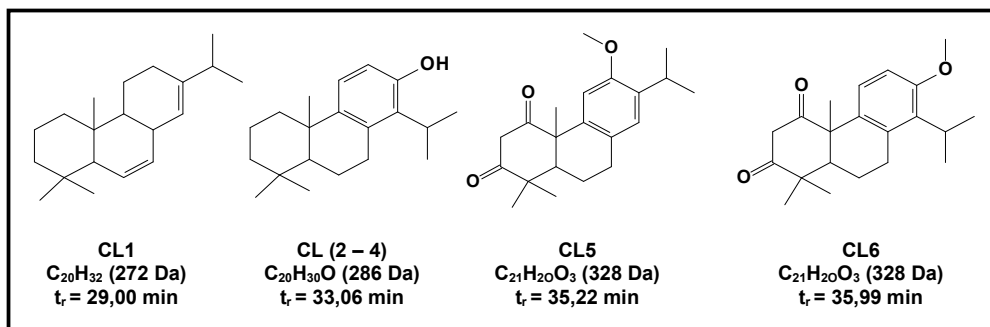


Figura 4.4.2. Diterpenos propostos pela biblioteca do espectrômetro de massas

O espectro de massas relacionado à banda cromatográfica com tempo de retenção em 29,00 minutos foi identificado por comparação com a biblioteca de massas do equipamento. A estrutura detectada foi o diterpeno abietato, devido à similaridade dos espectros. A Figura 4.4.3 mostra a comparação dos espectros de massas e a estrutura do diterpeno.

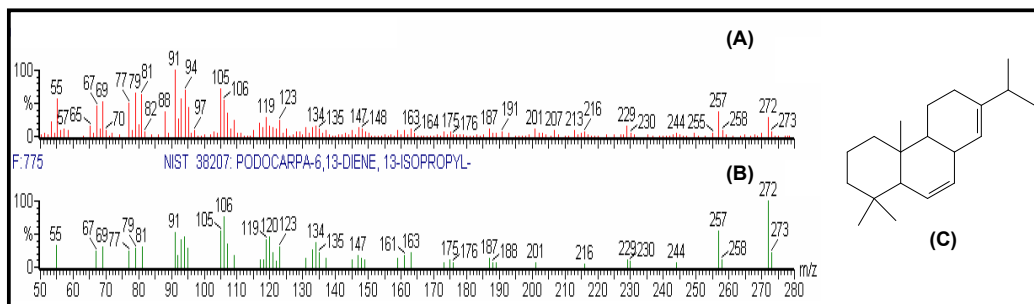


Figura 4.4.3. (A) espectros de massas referente à banda com $t_r = 29,00$ min e (B) espectro da de massas da biblioteca e (C) diterpeno abietato

O cromatograma de íons selecionados a m/z 286 mostrou três bandas intensas com tempos de retenção 32,38 min, 33,06 min e 33,28 min. Os espectros de massas destas bandas mostraram-se muito semelhantes, diferindo apenas nas intensidades dos íons. A comparação destes espectros com os dados da biblioteca, relacionou-os com a mesma estrutura (CL2 Figura 4.4.2), indicando, desse modo, a presença de isômeros, os quais podem possuir espectros de massas idênticos. A Figura 4.4.4 mostra o cromatograma de íons selecionados a m/z 286 e seus respectivos espectros de massas.

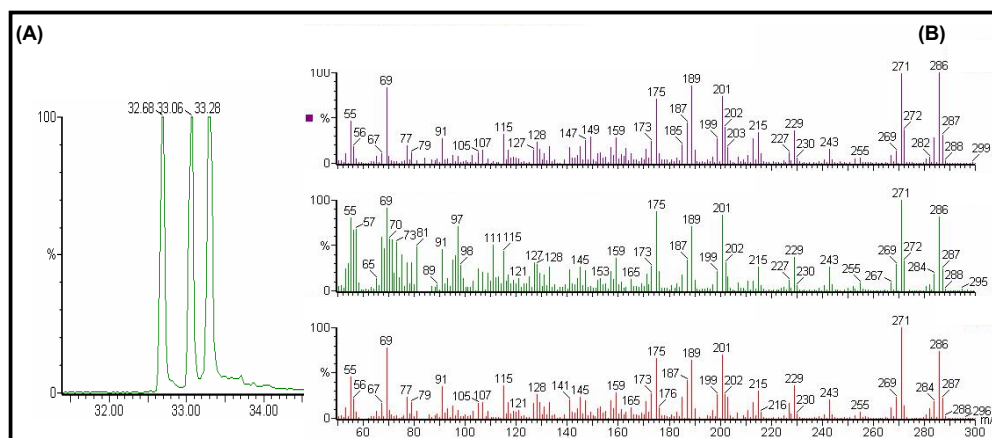


Figura 4.4.4. (A) Cromatograma de íons selecionados a m/z 286 e seus respectivos espectros de massas

Conforme mostra a Figura 4.4.5A, o cromatograma de íons selecionados a m/z 328 apresentou duas bandas (35,22 min e 35,99 min), as quais possuem espectros de massas muito semelhantes (Figura 4.4.5B/C), indicando a

presença de isômeros. Verificou-se a diferenciação destes compostos pela biblioteca, os quais foram identificados como CL5 e CL6 (Figura 4.4.2).

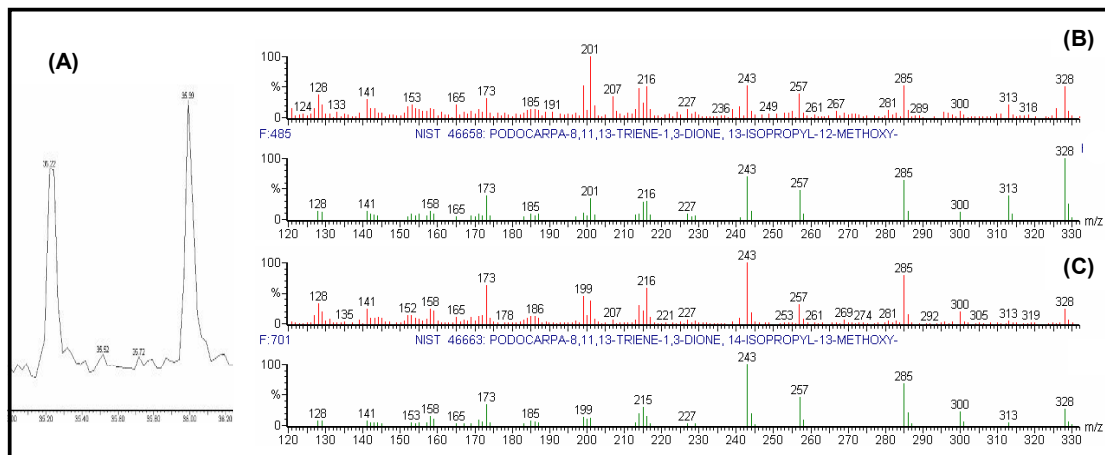


Figura 4.4.5. (A) Cromatograma de íons selecionados a m/z 328 (B) Espectros de massas de CL5 e comparação com a biblioteca e (C) espectros de massas de CL6 e comparação com a biblioteca

Vários outros metabólitos não tiveram suas estruturas estabelecidas. Porém, conforme o perfil cromatográfico, o perfil do espectro de massas e alguns dados da literatura, houve indícios da ocorrência de outros diterpenos. Dessa forma, foi proposto que o espectro de massas relacionado a banda cromatográfica com tempo de retenção 34,08 minutos pertence ao diterpeno ácido abiético, uma vez que, a proposta de fragmentação deste, apresentada no esquema 4.4.1, justifica alguns íons observados no espectro de massas da Figura 4.4.6.

No esquema 4.4.1 a ionização ocorreu na ligação dupla formando o íon molecular de m/z 302, o qual sofreu a perda de uma metila radicalar, levando ao íon de m/z 287. A saída de CO_2H_2 , a partir do íon molecular, levou ao íon de m/z 256 e, a perda metila radicalar conduziu ao íon de m/z 241. Através de mecanismos de retro Diels Alder de m/z 241 foram formados os íons de m/z 173 e 133. O mecanismo proposto apresentou alguns íons de relação massa carga idênticos aqueles pertencentes ao espectro de massas da Figura 4.4.6. A partir destes dados pode-se sugerir que, a estrutura proposta possui grandes chances de pertencer ao extrato das folhas de *C. lusitanica*.

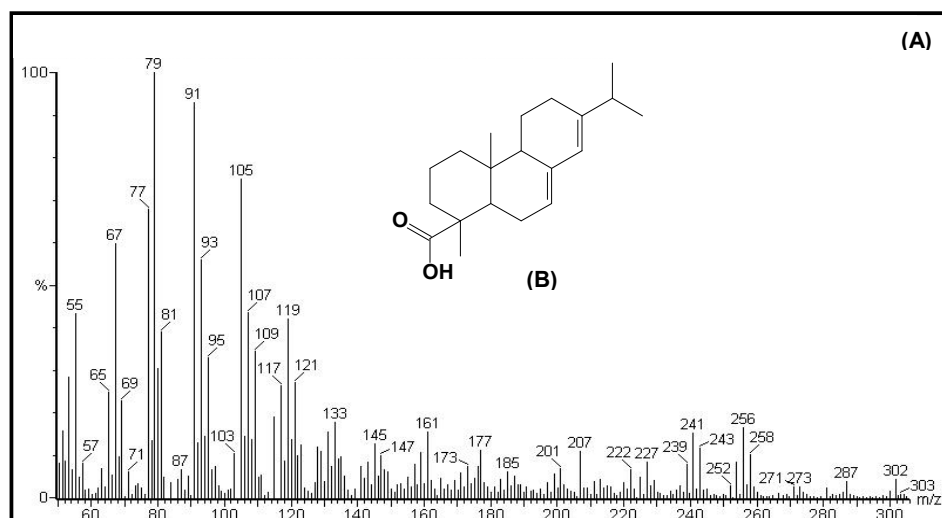
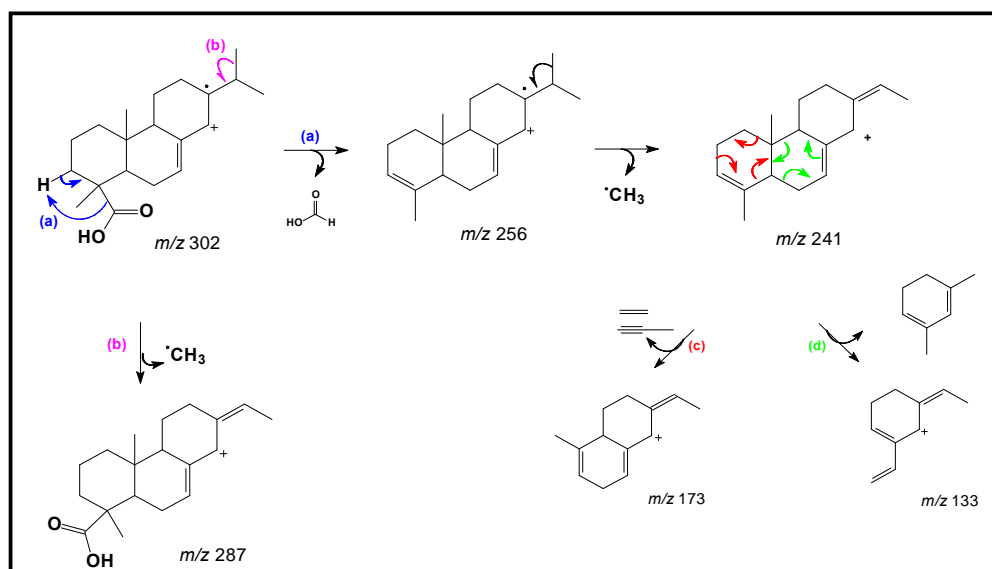


Figura 4.4.6. Espectro de massas com tempo de retenção 34,08 min e (B) ácido abiético



Esquema 4.4.1. Proposta de fragmentação do diterpeno ácido abiético

A derivação com diazometano possibilitou uma boa limpeza no extrato das folhas de *C. lusitanica*, pois além dos compostos já mencionados, houve a detecção de um monoterpene, dois sesquiterpenos, dois diterpenos e também quatro ésteres metílicos. A Figura 4.4.7 ilustra o cromatograma do extrato derivado.

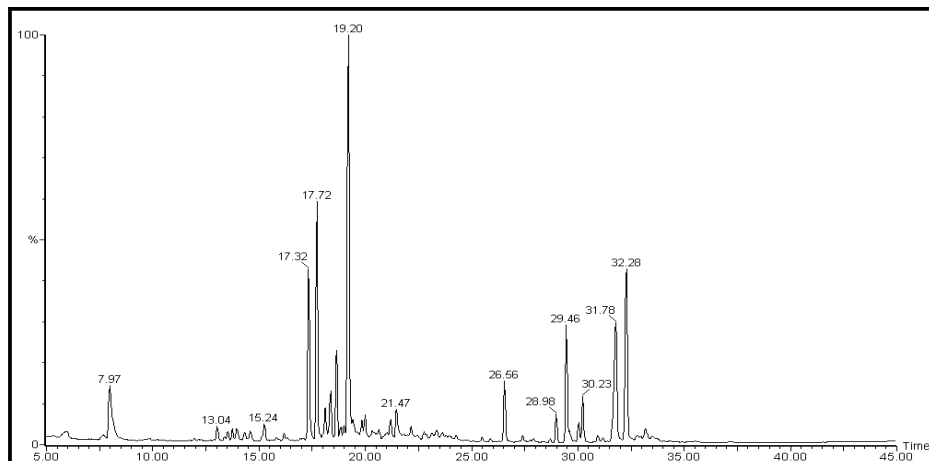


Figura 4.4.7. Cromatograma de íons totais do extrato hexânico da folhas de *Cupressus lusitanica*

A Figura 4.4.8 mostra os compostos detectados com seus respectivos tempos de retenção, fórmula molecular, massa molecular e também os códigos.

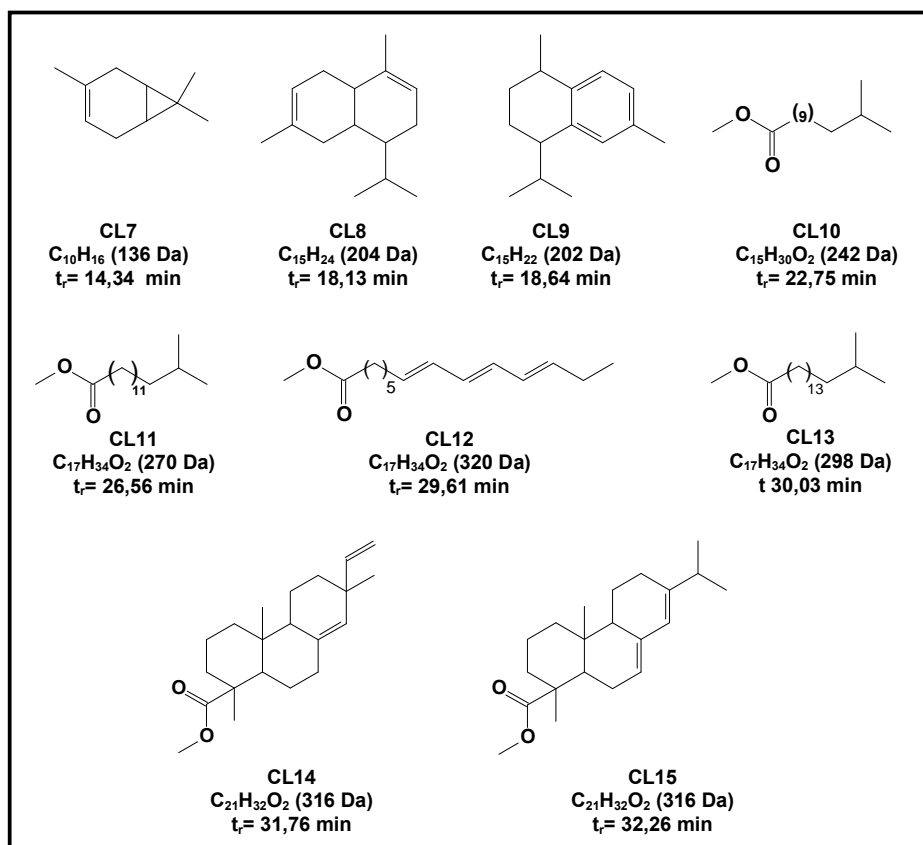


Figura 4.4.8. Substâncias detectadas por CG/EM no extrato de *C. lusitanica*

Na Figura 4.4.9A pôde-se verificar o espectro de massas de CL7 (banda cromatográfica em 14,34 min) e, também a comparação deste com os dados da biblioteca (Figura 4.4.9B). Notou-se, claramente, uma boa similaridade entre ambos, o que permitiu identificar CL7 como o monoterpene 3-careno (Figura 4.4.9 C).

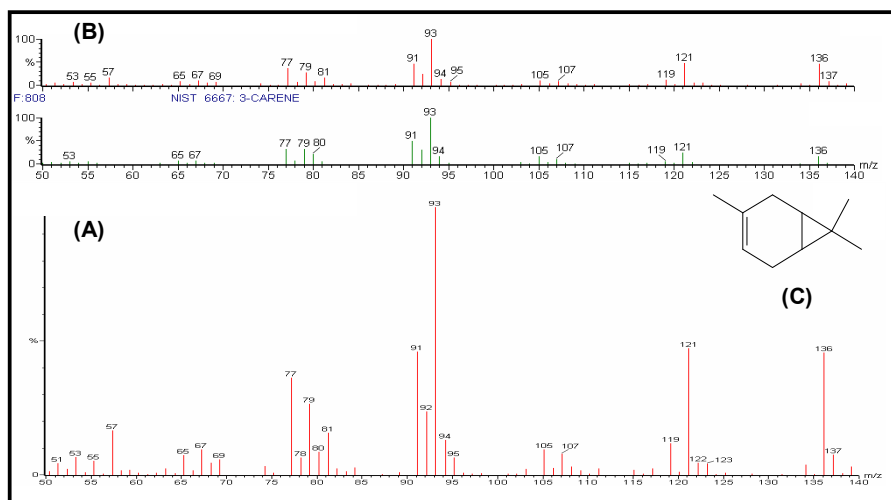


Figura 4.4.9. (A) Espectro de massas de CL7, (B) comparação do espectro de CL7 com os dados da biblioteca e (C) 3-careno

As bandas cromatográficas com tempos de retenção 18,13 e 18,64 min são referentes à CL8 e CL9 respectivamente. Estas duas substâncias foram identificadas através da comparação dos seus espectros de massas com os dados da biblioteca e estão representadas nas Figuras 4.4.10 e 4.4.11.

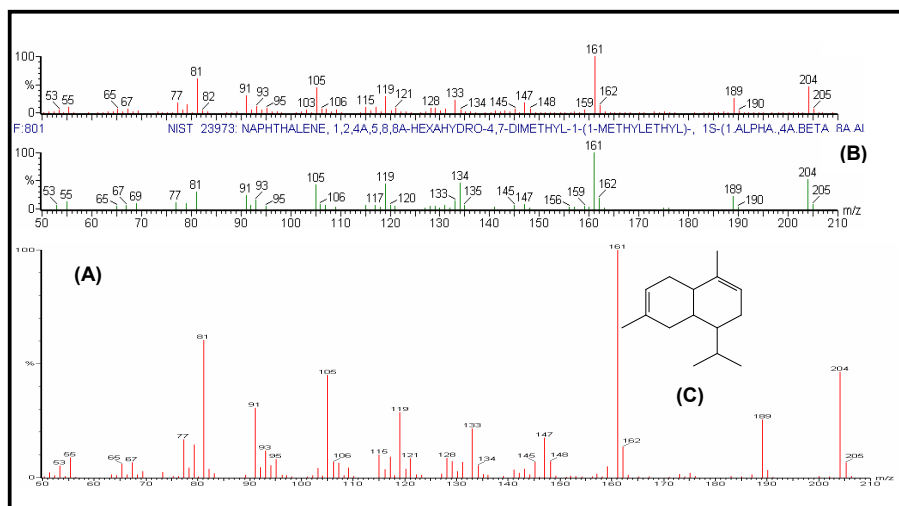


Figura 4.4.10. Espectro de massas de CL8, (B) Comparação com biblioteca e (C) naftaleno

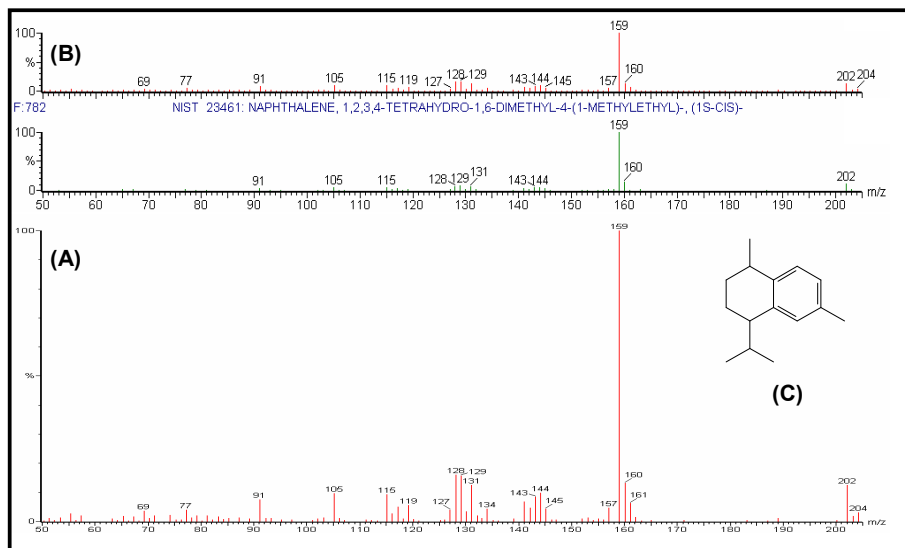


Figura 4.4.11. (A) Espectro de massas de CL9, (B) comparação do espectro de CL9 com os dados da biblioteca e (C) calameneno

Os espectros de massas de CL10, CL11 e CL13 apresentam características espectrais muito semelhantes e, através da presença dos íons de m/z 74 e 87 estes foram identificados como ésteres metílicos.

O cromatograma de íons selecionados a m/z 316, ilustrado na Figura 4.4.12, apresentou duas bandas cromatográficas, as quais foram correlacionadas as estruturas apresentadas na Figura 4.4.13A/B.

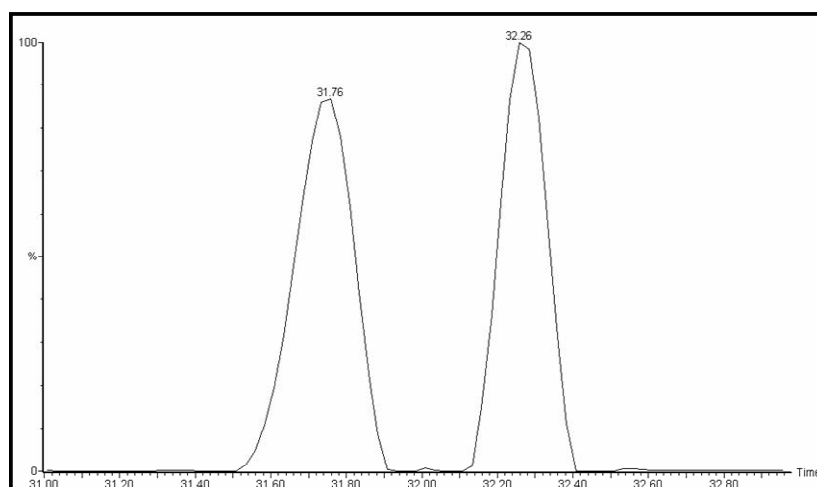


Figura 4.4.12. Cromatograma de íons selecionados a m/z 316

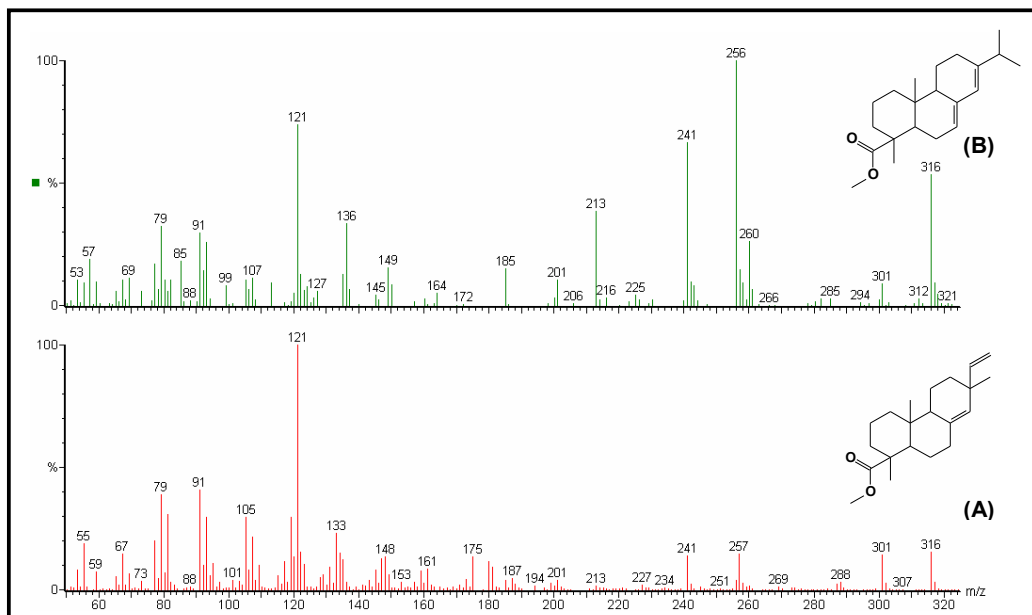


Figura 4.4.13. Espectros de massas de: (A) CL14 éster metílico do ácido pimárico e (B) CL5 éster metílico do ácido abiético

A detecção do éster metílico do ácido abiético confirmou a presença da do ácido abiético nas folhas de *Cupressus lusitanica*, conforme proposto anteriormente.

4.4.2 Monitoramento dos extratos fúngicos

4.4.2.1 Análise dos extratos PNICL1 e MNICL1

Não foram observadas semelhanças nos perfis cromatográficos dos extratos MNICL1 e PNICL1. Além disso, a maioria das bandas não foi identificada, pois a comparação com dados da biblioteca não forneceu similaridade entre os espectros.

No extrato PNICL1 apenas três compostos foram identificados, conforme pode ser visto nas Figuras 4.4.14 a 4.4.16.

A substância com tempo de retenção em 31,39 minutos foi identificada, através da comparação dos espectros de massas, como sendo o ácido octadecanóico.

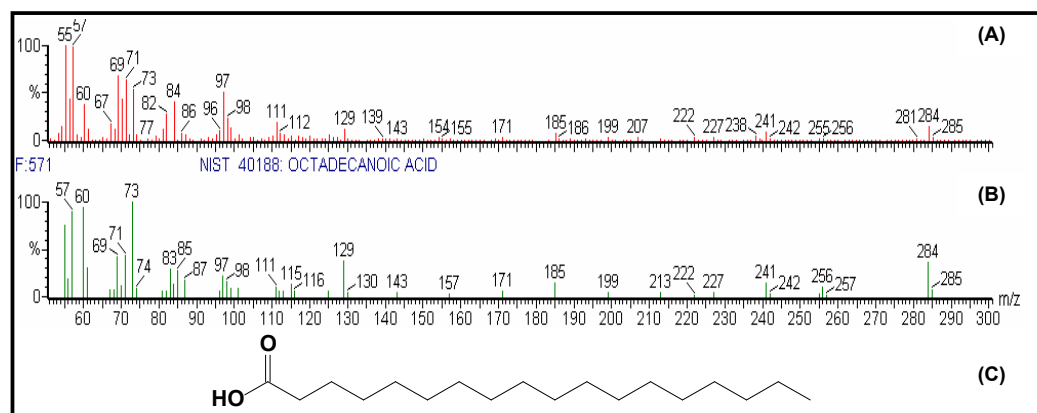


Figura 4.4.14. (A) Espectro de massas da substância com tr = 31,39 min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) ácido octadecanóico

Foi possível detectar um éster derivado de um ácido dicarboxílico com tempo de retenção 34,34 minutos, pois a comparação dos espectros de massas apresentou grande similaridade, como pode ser visto na Figura 4.4.15.

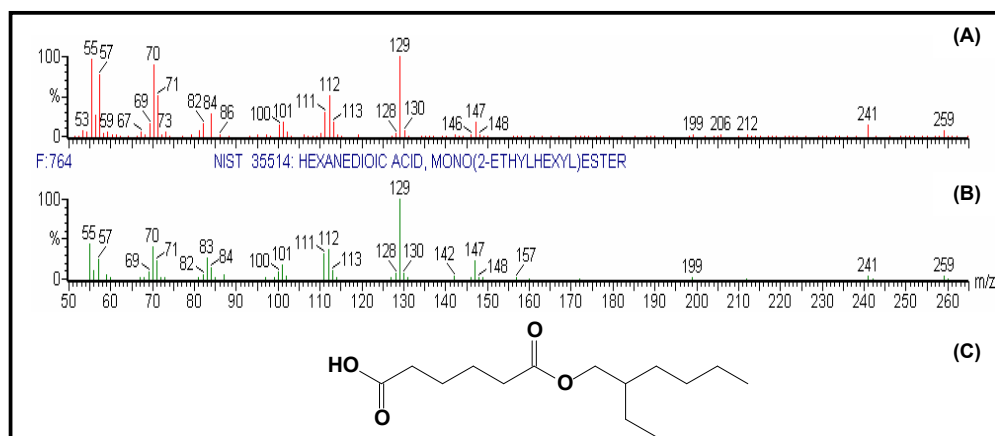


Figura 4.4.15. (A) Espectro de massas da substância com tr = 34,34 min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) estrutura do ácido dicarboxílico

Embora não se tenha detectado o íon molecular, a comparação do espectro de massas da substância com tempo de retenção em 34,59 minutos com as informações da biblioteca do espectrômetro, indicou a presença de um hidrocarboneto linear, saturado e de cadeia longa, conforme pode ser visto na Figura 4.4.16.

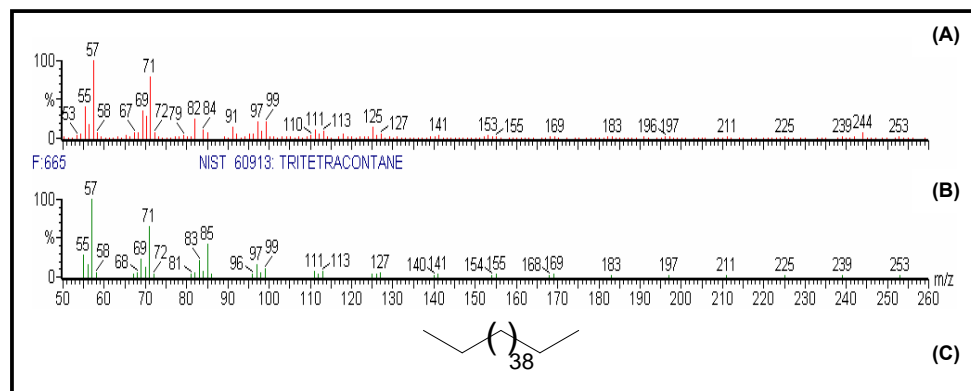


Figura 4.4.16. (A) Espectro de massas da substância com $t_r = 29,97$ min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) hidrocarboneto tritetracontano

As análises dos compostos provenientes do extrato micelial (MNICL1), permitiram a identificação de somente um composto, com tempo de retenção de 29,97 minutos, pela comparação dos dados com a biblioteca de massas. A Figura 4.4.17 ilustra os espectros de massas que foram comparados e a estrutura identificada como o z-9-octadecenoato de metila.

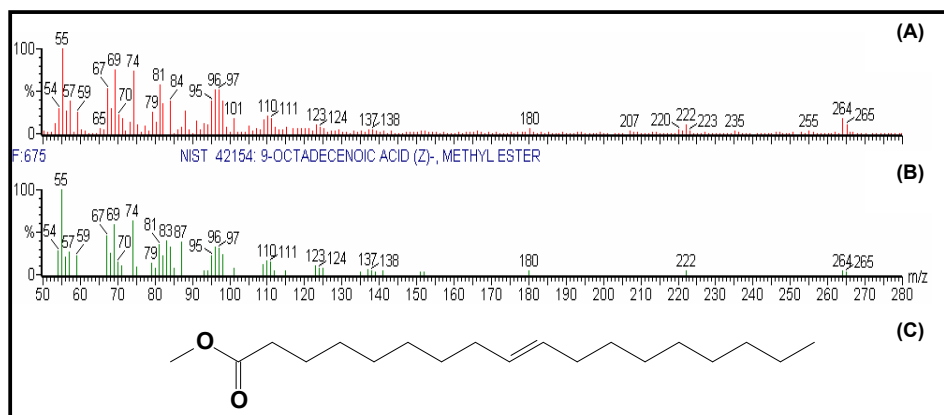


Figura 4.4.17. (A) Espectro de massas da substância com $t_r = 34,59$ min, (B) comparação com o espectro de massas da biblioteca, (C) z-9-octadecenoato de metila

As análises dos extratos derivados com diazometano, não se mostraram eficientes, visto que, foi possível identificar apenas um composto do extrato PNICL1, o qual foi caracterizado como um éster metílico. A Figura 4.4.18 mostra a comparação dos espectros de massas e a estrutura deste éster.

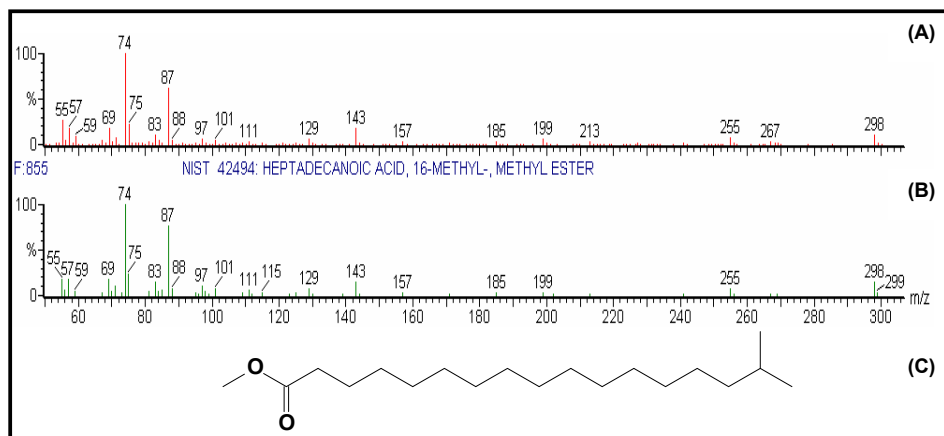


Figura 4.4.18. (A) Espectro de massas da substância com tempo de retenção = 30,05 min, (B) espectro de massas da biblioteca do espectrômetro e (C) 16-metil, heptadecanoato de metila

4.4.2.2 Análises dos extratos PNICL2 e MNICL2

Não foi verificada similaridade espectral entre as bandas dos extratos PNICL2 e MNICL2 com as informações da biblioteca do equipamento, dessa forma, nenhum composto foi identificado.

Os extratos derivados com diazometano apresentaram um grande número de bandas cromatográficas, conforme mostra a Figura 4.4.19. No entanto, foi possível detectar quatro compostos no extrato MNICL2, sendo que dois deles também faziam parte da constituição do extrato PNICL2. As Figuras 4.4.20 a 4.4.23 apresentam os espectros de massas das substâncias identificadas e as suas respectivas estruturas.

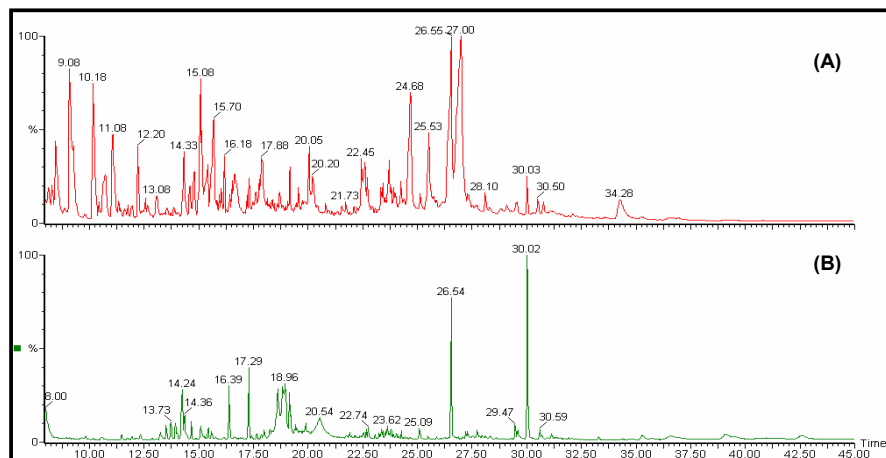


Figura 4.4.19. Cromatograma de íons totais dos extratos derivados com diazometano: (A) PNICL2 e (B) MNICL2

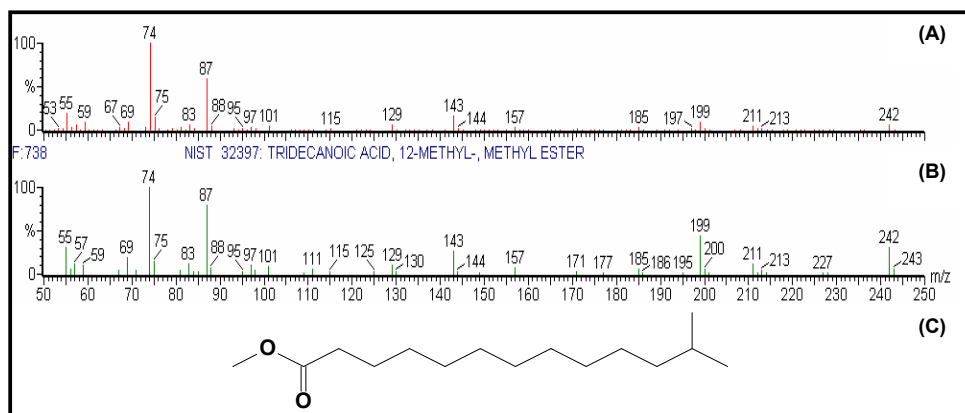


Figura 4.4.20. (A) Espectro de massas da substância eluída em 22,74 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) 12-metil, tridecanoato de metila

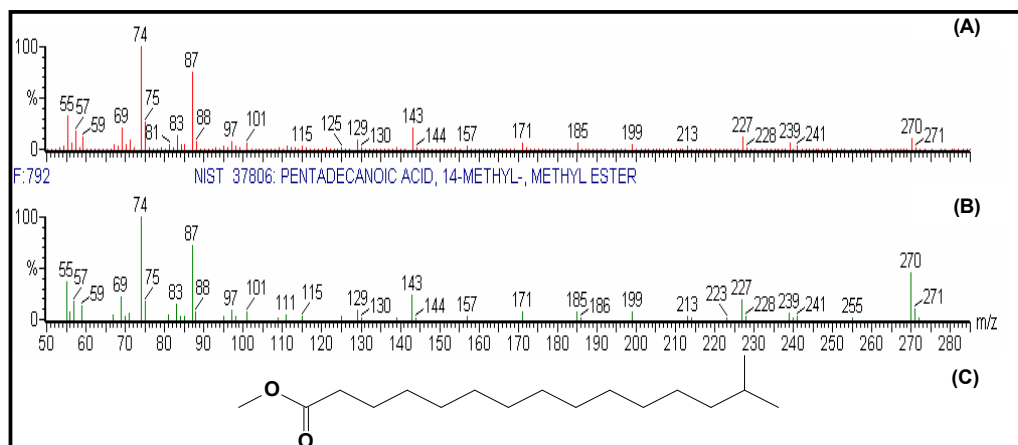


Figura 4.4.21. (A) Espectro de massas da substância eluída em 26,54 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) 14-metil, pentadecanoato de metila

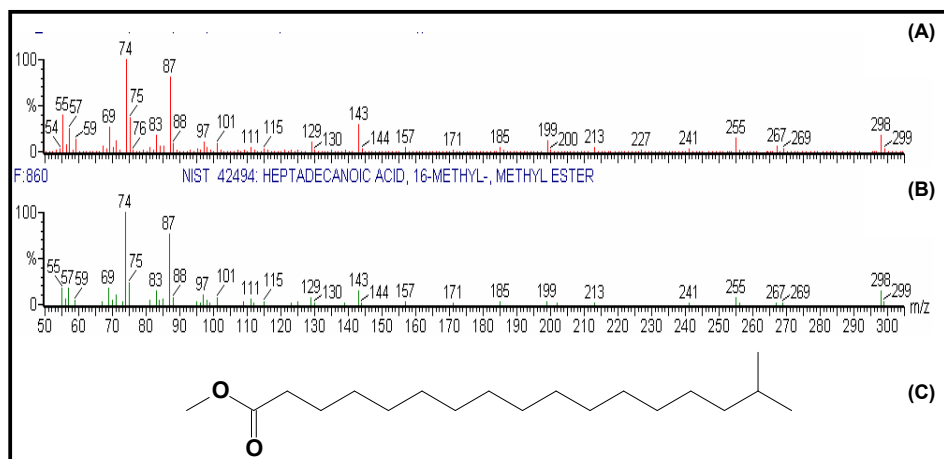


Figura 4.4.22. (A) Espectro de massas da substância eluída em 30,03 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) 16-metil, heptadecanoato de metila

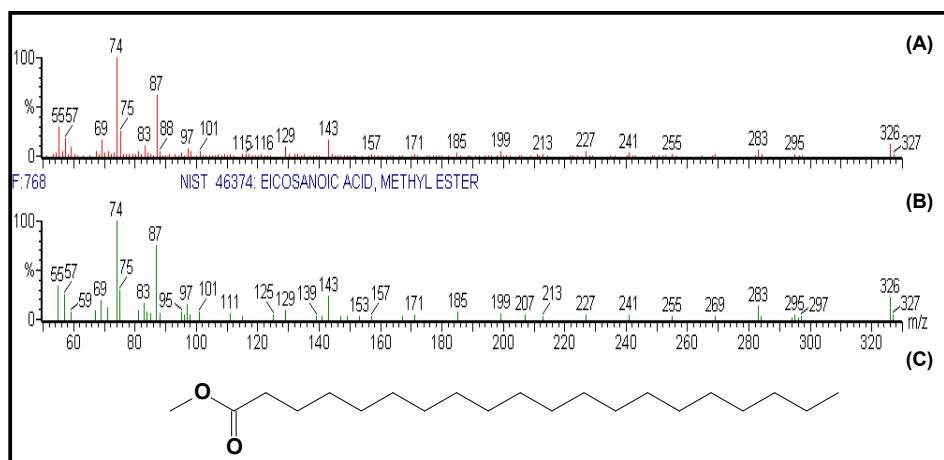


Figura 4.4.23. (A) Espectro de massas da substância eluída em 33,27 minutos, (B) espectro de massas da biblioteca, (C) eicosanoato de metila

As estruturas apresentadas nas Figuras 4.4.22 e 4.4.23 foram também detectadas no extrato PNICL2.

4.4.2.3 Análise dos extratos PNICL3 e MNICL3

Assim como nos demais extratos, os cromatogramas de íons totais dos extratos de NICL3 apresentaram uma grande diversidade de bandas cromatográficas.

O espectro de massas da substância eluída em 17,58 min (Figura 4.4.24A) apresentou íons característicos de aromáticos, devido à presença de m/z 77 e 91. Houve uma grande compatibilidade entre os espectros de massas da substância e da biblioteca (Figura 4.4.24B), a qual permitiu identificá-lo como 2-hidroxi fenil etanol (Figura 4.4.24C).

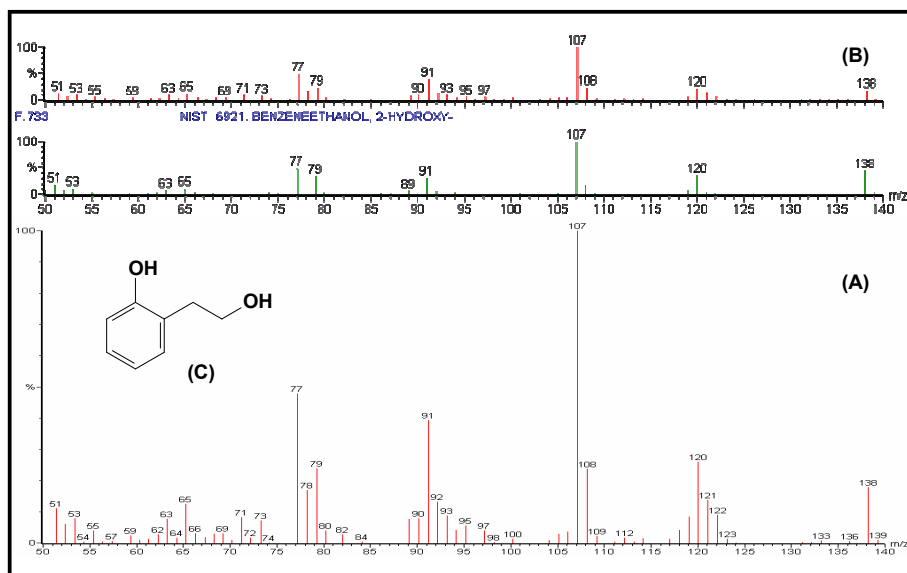


Figura 4.4.24. (A) Espectro de massas, (B) comparação com a biblioteca e (C) 2-hidroxi fenil etanol

A biblioteca de massas identificou no extrato MNICL3 um sesquiterpeno eremofilano, de fórmula molecular $C_{15}H_{24}$, cujo espectro de massas e fórmula estrutural apresentam-se na Figura 4.4.25.

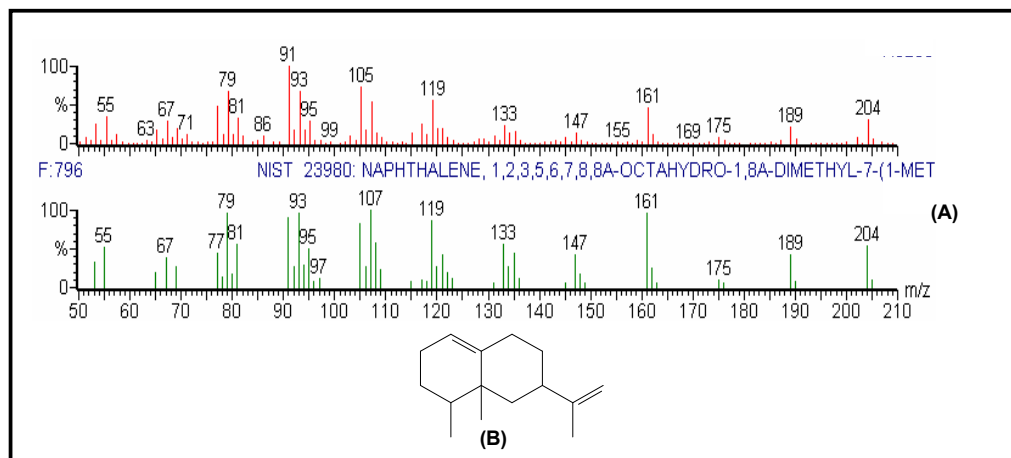


Figura 4.4.25. (A) Comparação dos espectros obtido do extrato MNICL3 e da biblioteca do espectrômetro e (B) diterpeno eremofilano valenceno

A detecção deste sesquiterpeno motivou a continuidade do estudo químico do metabolismo do fungo N1CL3, pois o microrganismo pode ser um hábil produtor de terpenóides, inclusive aqueles apresentados na introdução deste trabalho.

A banda em 19,35 minutos no cromatograma de íons selecionados a m/z 178 (Figura 4.4.26A) foi identificada, pela comparação do seu espectro de massas com os dados da biblioteca, como a substância de fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_3$, a isocumarina meleína. A Figura 4.4.26 mostra a comparação do espectro de massas da meleína com o espectro da biblioteca e, também, a estrutura da isocumarina.

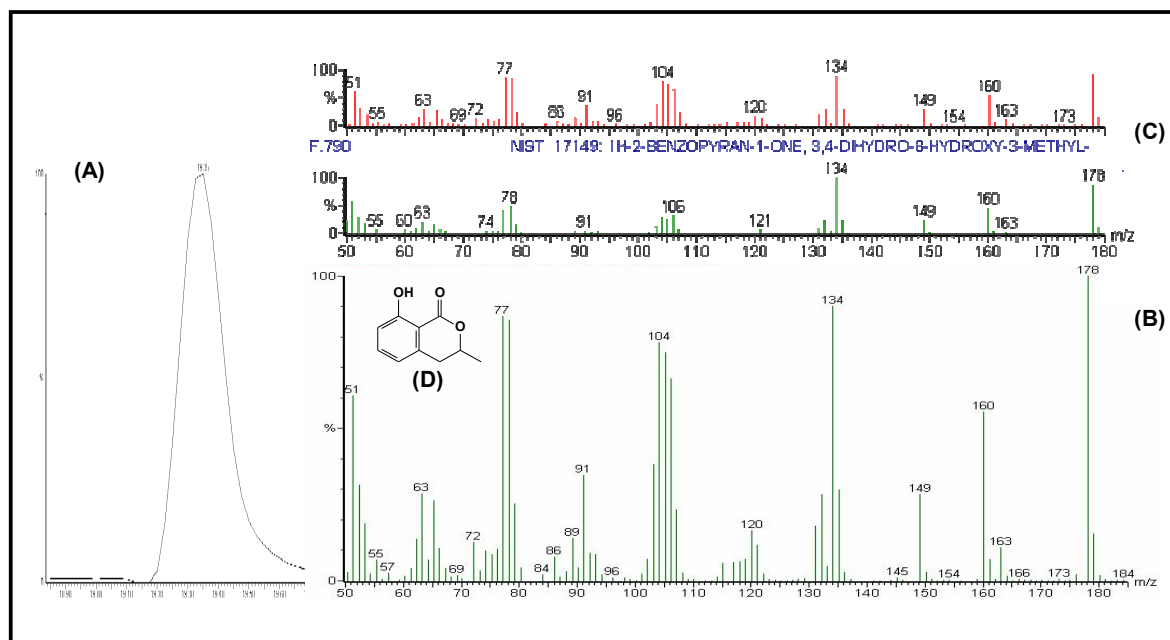
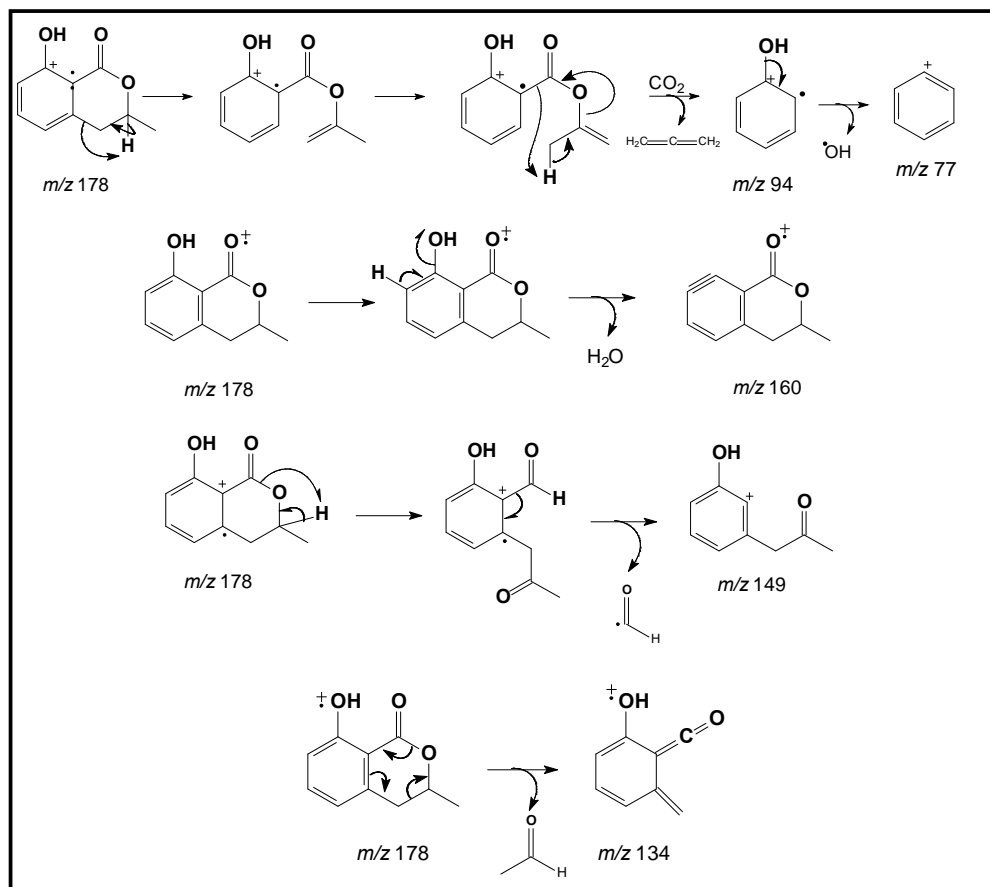


Figura 4.4.26. (A) Banda com tempo de retenção = 19,35 min do cromatograma de íons selecionados a m/z 178 e seu respectivo espectro de massas (B). (C) comparação dos espectros de massas e (D) estrutura molecular da meleína

Foi proposto um mecanismo de fragmentação, apresentado no Esquema 4.4.2, com a finalidade de se justificar os principais íons observados.

O íon molecular de m/z 178 sofre um rearranjo de hidrogênio e conseqüente abertura do anel, em seguida, é observado, novamente, um outro rearranjo de hidrogênio resultando na perda de CO_2 e de C_3H_4 , conduzindo ao íon de m/z 94, o qual pela perda de $\cdot OH$ leva ao íon de m/z 77. O íon de m/z 160 é formado a partir da desidratação do íon molecular.

A formação do íon de m/z 149 envolve um rearranjo de hidrogênio resultando na abertura do anel da lactona, seguida da perda de $\cdot\text{COH}$. Já o íon de m/z 134, pico base do espectro, é obtido por uma retro Diels Alder.



Esquema 4.4.2. Proposta de fragmentação para a meleína

O cromatograma de íons selecionados a m/z 192 apresentou uma banda cromatográfica tanto em PNICL3 quanto em MNICL3, com tempos de retenção muito próximos (22,32 min e 22,23 min, respectivamente) e espectros de massas semelhantes (Figura 4.4.27), sugerindo, dessa forma, a presença da mesma substância em ambos os extratos. Entretanto, a biblioteca de massas não os identificou.

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, SANTOS (2006) isolou diversas isocumarinas produzidas pelo fungo endofítico *Xylaria* sp, isolado de *Sapindus saponaria*. Dentre as isocumarinas isoladas mereceu destaque o éter metílico da meleína (Figura 4.4.27C), cujo espectro de massas é parecido com os espectros representados na Figura 4.4.27A-B, indicando, dessa forma, a presença

desta substância nos extratos de N1CL3. O mecanismo de fragmentação deste composto não foi proposto, uma vez que, é muito parecido com o da meleína.

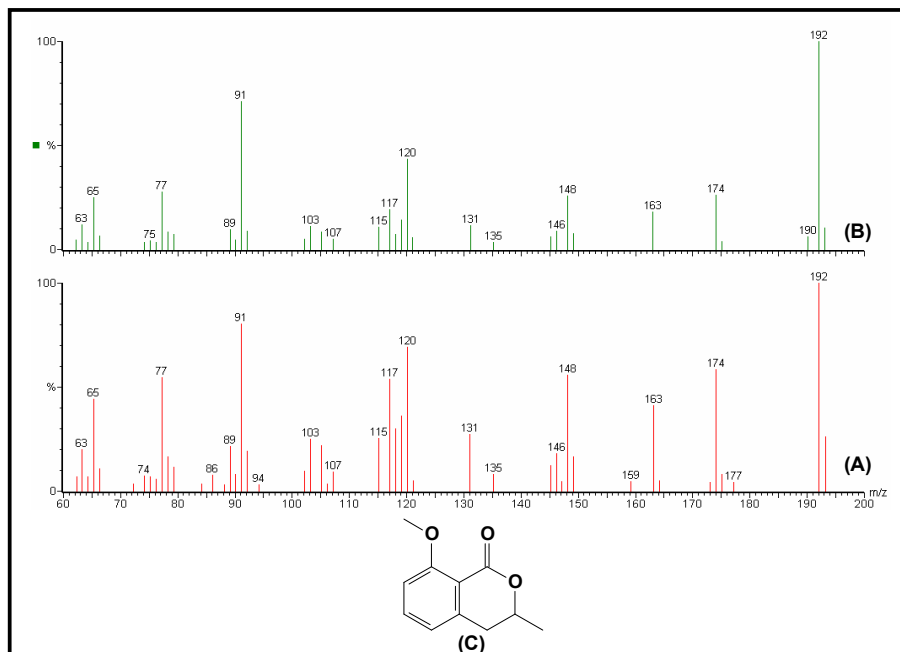


Figura 4.4.27. Espectros de massas com íon molecular m/z 192 (A) de PN1CL3 com $t_r = 22,32$ min e (B) MN1CL3 22,23 min e (C) éter metílico da meleína

Foi possível observar no extrato PN1CL3 uma substância com $t_r = 23,83$ min, cujo íon molecular correspondeu a m/z 206 (Figura 4.4.28). Mesmo a substância apresentando características espectrais das isocumarinas, esta não foi identificada pela biblioteca do espectrômetro. O estudo de SANTOS (2006) foi de valiosa importância e contribuição para a caracterização dos compostos deste trabalho, pois a comparação deste espectro com o espectro da 5-formil meleína (Figura 4.4.28B) revelou considerável similaridade entre ambos.

Para se confirmar a presença da 5-formil meleína no extrato PN1CL3, foi proposto um mecanismo de fragmentação, conforme ilustra o Esquema 4.4.3. Os íons fragmentos apresentados no esquema, estão de acordo com os íons observados na Figura 4.4.28A, confirmando a produção da 5-formil meleína pelo fungo N1CL3.

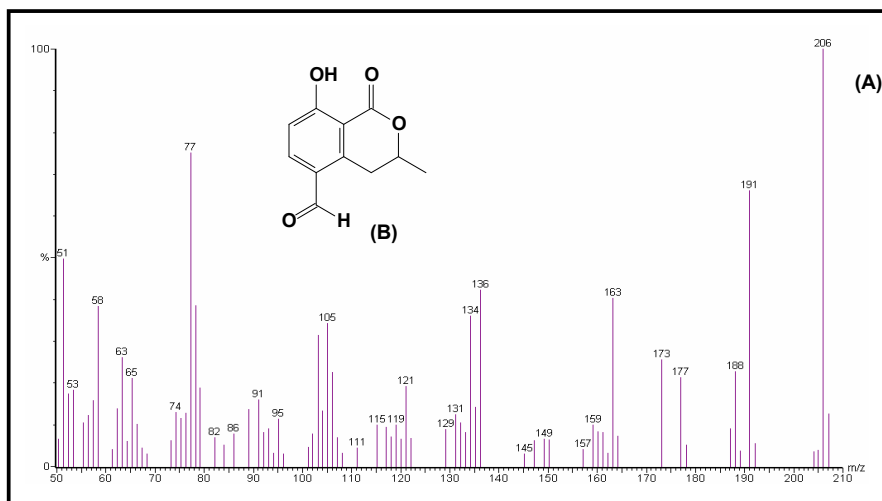
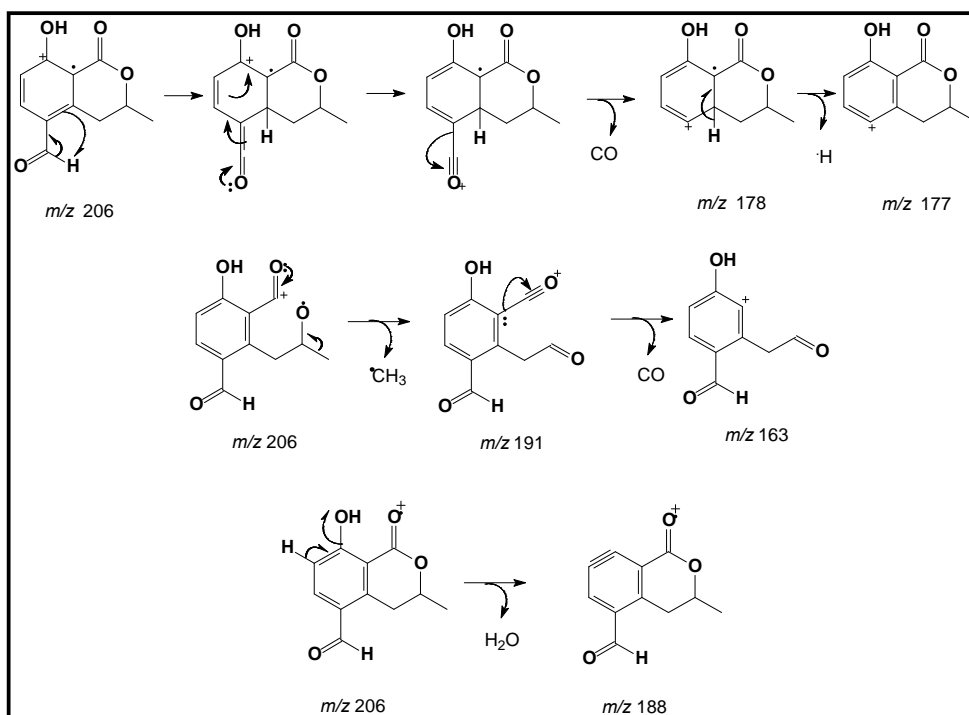


Figura 4.4.28. (A) Espectros de massas com íon molecular m/z 206 em PNICL3 ($t_r = 23,83$ min) e (B) 5-formil meleína



Esquema 4.4.3. Proposta de fragmentação para a 5-formil meleína

O íon molecular de m/z 206 foi formado mediante a abstração de um elétron do sistema aromático. Posteriormente verificou-se um rearranjo de hidrogênio levando a uma espécie intermediária, a qual pela conjugação do par de elétrons não ligante do oxigênio estabiliza a carga positiva do carbono do anel, em seguida, verifica-se a perda de uma molécula de CO, levando ao íon de m/z 178 e,

este pela perda de hidrogênio radicalar leva ao íon de m/z 177, de maior estabilidade devido ao retorno da aromaticidade.

O íon de m/z 206 através da perda de uma metila radicalar, levou a formação do íon de m/z 191, o qual pela perda de CO produziu o íon de m/z 163. Já a formação de m/z 188 foi decorrente da desidratação do íon molecular.

Constatou-se também a presença de um éster etílico e um éster metílico no extrato micelial, conforme pode ser visto nas Figuras 4.4.29 e 4.4.30.

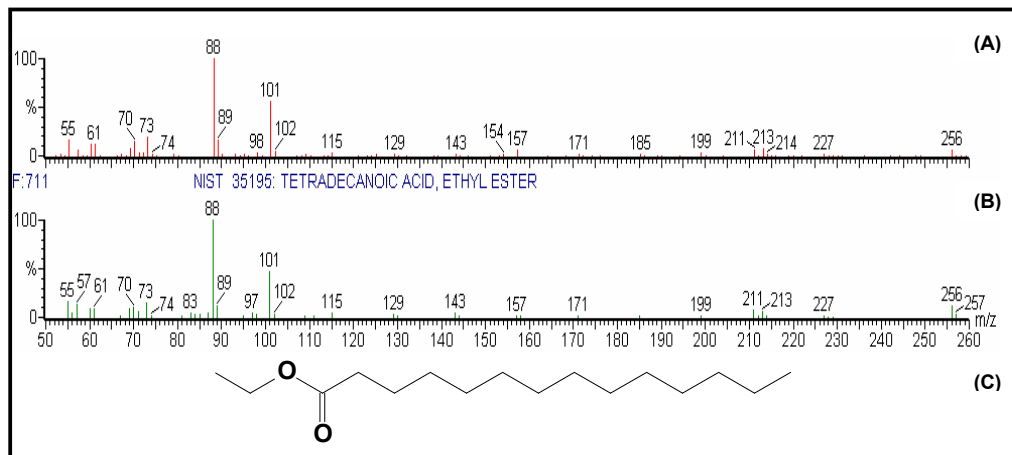


Figura 4.4.29. (A) Espectro de massas da substância com $t_r= 24,78$ min, (B) espectro relacionado à biblioteca e (C) tetradecanoato de etila

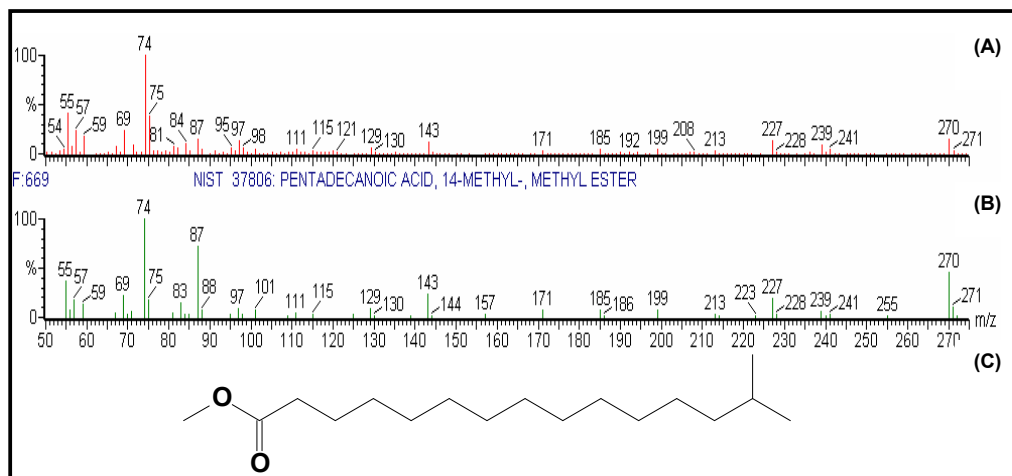


Figura 4.4.30. (A) Espectro de massas da substância com $t_r= 27,13$ min, (B) espectro relacionado à biblioteca e (C) 14-metil, pentadecanoato de metila

Nos extratos de NICK3 derivados com diazometano foram detectados os mesmos compostos apresentados anteriormente.

4.4.2.4 Análises dos extratos PNICL4 e MNICL4

Foram detectados nos extratos PNICL4 e MNICL4 ésteres metílicos e etílicos devido à presença, nos espectros de massas, dos íons de m/z 74 e 88, respectivamente. Entretanto, estes não apresentaram compatibilidade com as informações da biblioteca do equipamento e, conseqüentemente não foram identificados.

Os perfis cromatográficos dos extratos de NICL4 derivados com diazometano apresentaram uma diferença considerável, uma vez que, o cromatograma de PNICL4 mostrou um número maior de bandas, quando comparado ao cromatograma de MNICL4, conforme pode ser visto na Figura 4.4.31.

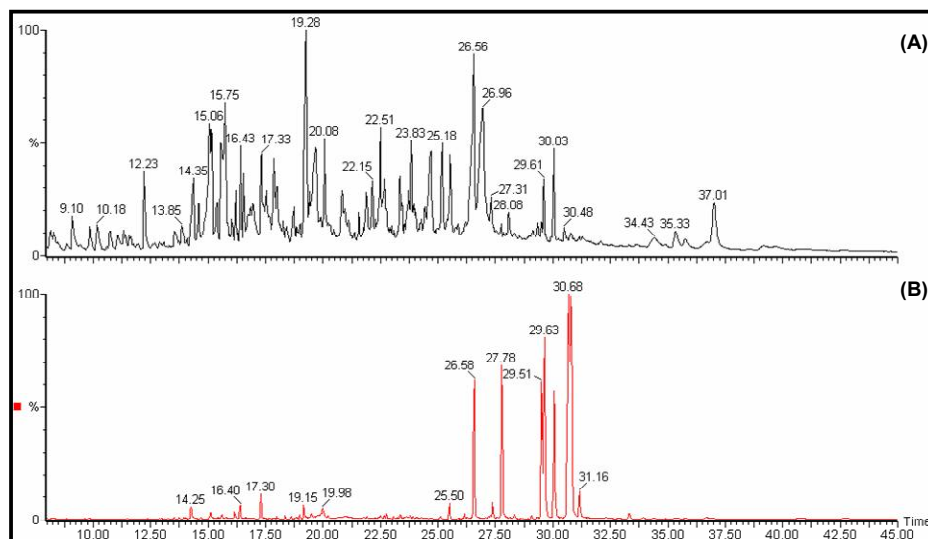


Figura 4.4.31. (A) Cromatogramas de íons totais de (A) PNICL4 e (B) MNICL4

Apesar dos diferentes perfis cromatográficos dos extratos, as substâncias identificadas fazem parte da constituição de ambos. A comparação com os dados da biblioteca do espectrômetro, permitiu a identificação de três ésteres metílicos, os quais estão representados nas Figuras 4.4.32 a 4.4.34.

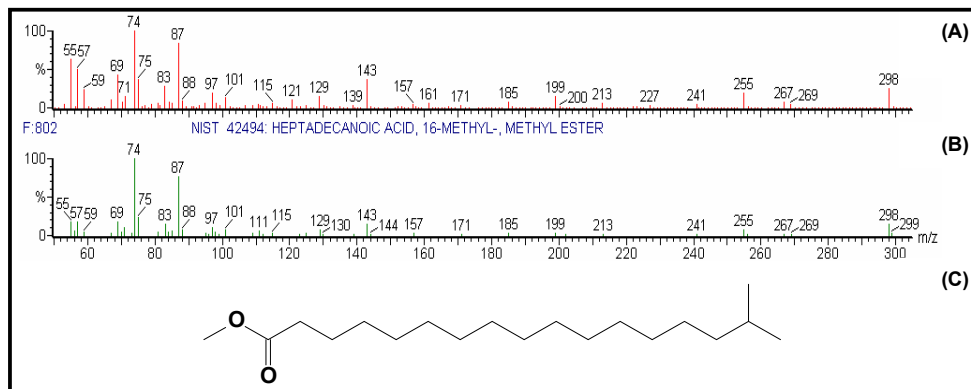


Figura 4.4.32. (A) Espectro de massas da substância com tr = 30,03 min, (B) espectro da biblioteca, (C) 16-metil, heptadecanoato de metila

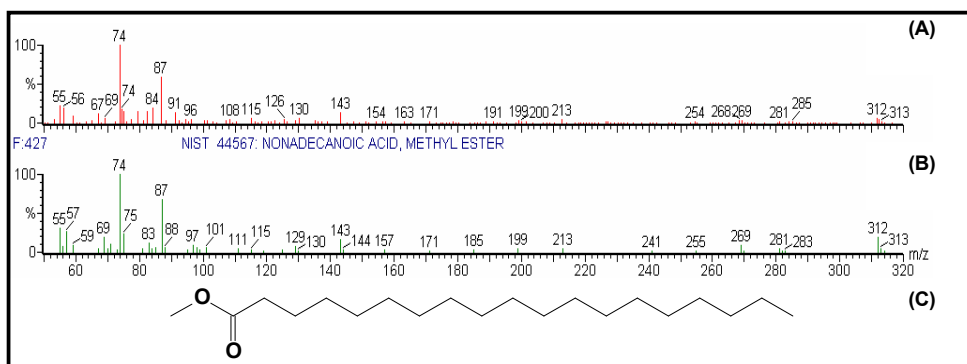


Figura 4.4.33. (A) Espectro de massas da substância com tr = 31,66 min, (B) espectro da biblioteca, (C) nonadecanoato de metila

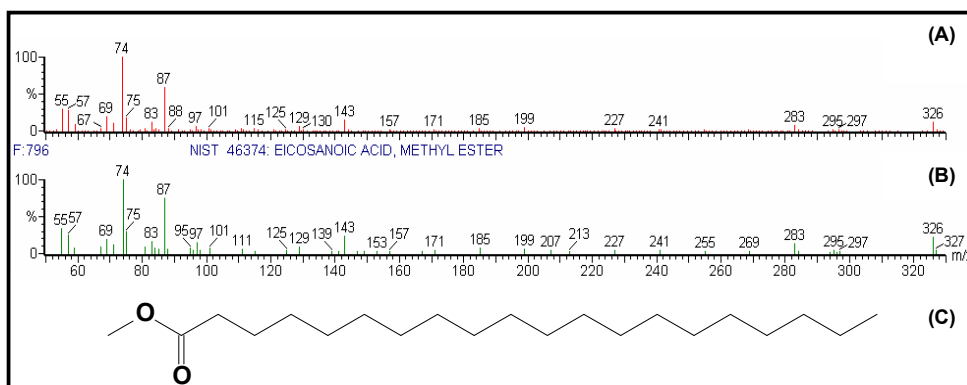


Figura 4.4.34. (A) Espectro de massas da substância com tr = 33,31 min, (B) espectro da biblioteca, (C) eicosanoato de metila

4.4.2.5 Análise dos extratos PNICL5 e MNICL5

Verificou-se, no extrato PNICL5, que o espectro de massas da banda com tempo de retenção de 22,25 minutos, mostrou grande semelhança com aquele observado para o éter metílico da meleína, apresentado no item 4.4.2.3, sugerindo que o fungo NICL5 também seja produtor de isocumarinas. A Figura 4.4.35 ilustra o espectro de massas da substância eluída em 22,25 min e o espectro do éter metílico da meleína.

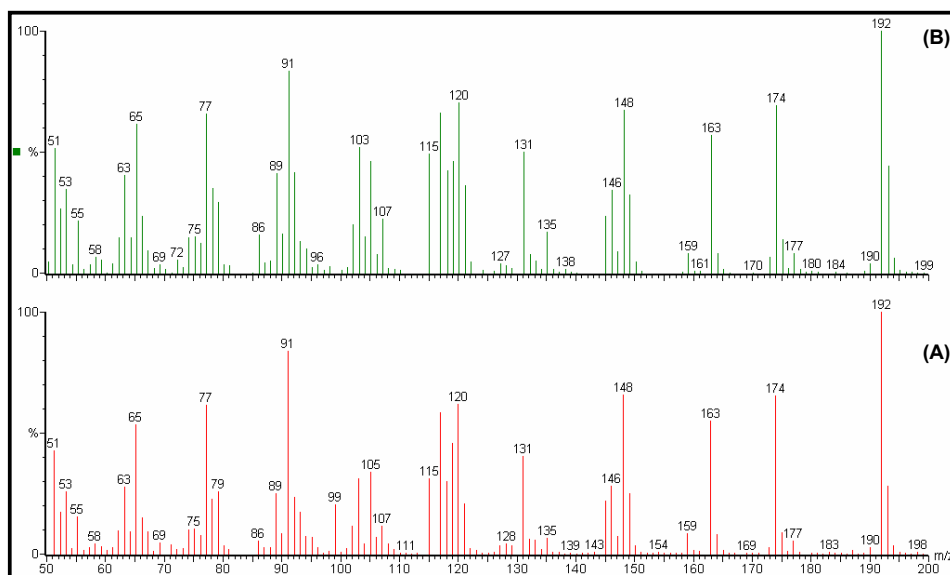


Figura 4.4.35. (A) espectro de massas da substância eluída em 22,25 min do extrato PNICL5 e (B) espectro de massas do éter metílico da meleína detectada no extrato PNICL3

Os espectros de massas das demais bandas cromatográficas não apresentaram similaridade com as informações da biblioteca e, conseqüentemente, não foram identificados.

Os extratos de NICL5 derivados com diazometano não tiveram substâncias identificadas pela biblioteca do espectrômetro de massas.

Segundo MAGALESWARAM *et al.*(2000) o ácido pilifórmico é um metabólito secundário comum de fungos endofíticos pertencentes a família Xylariaceae.

Em seu estudo SANTOS (2006) isolou o ácido pilifórmico (Figura 4.4.36), dado que, o microrganismo pesquisado pertencia a referida família.

Uma alíquota do ácido, isolado por SANTOS, foi metilada com diazometano e analisada por CG/EM. Dessa forma, foi possível fazer uma triagem em busca desta substância nos extratos de N1CL5, através de comparações dos tempos de retenção e, também, dos espectros de massas. Foi verificado que no extrato PN1CL5 havia uma banda com tempo de retenção em 20,25 min, idêntico ao do ácido metilado (Figura 4.4.37A-B). Foi constatada a produção do ácido pilifórmico pelo fungo, uma vez que, os espectros de massas do ácido metilado e da referida banda mostraram-se iguais, conforme mostra a Figura 4.4.37C-D.

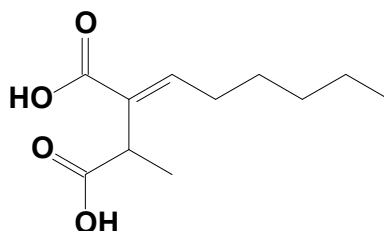


Figura 4.4.36. Ácido Pilifórmico

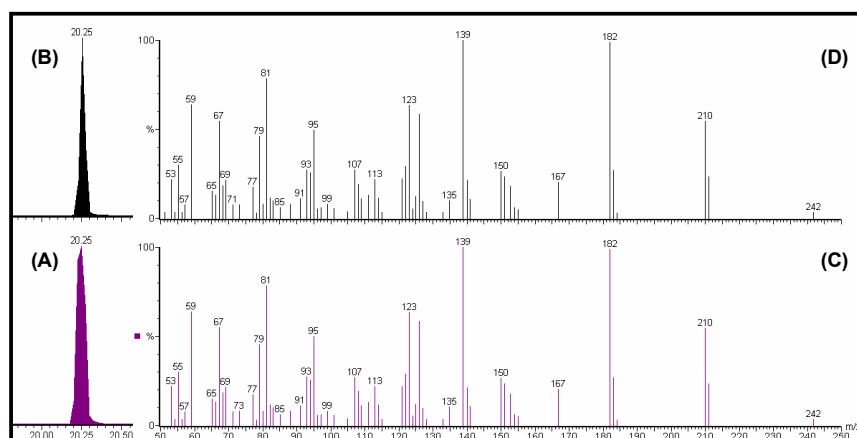
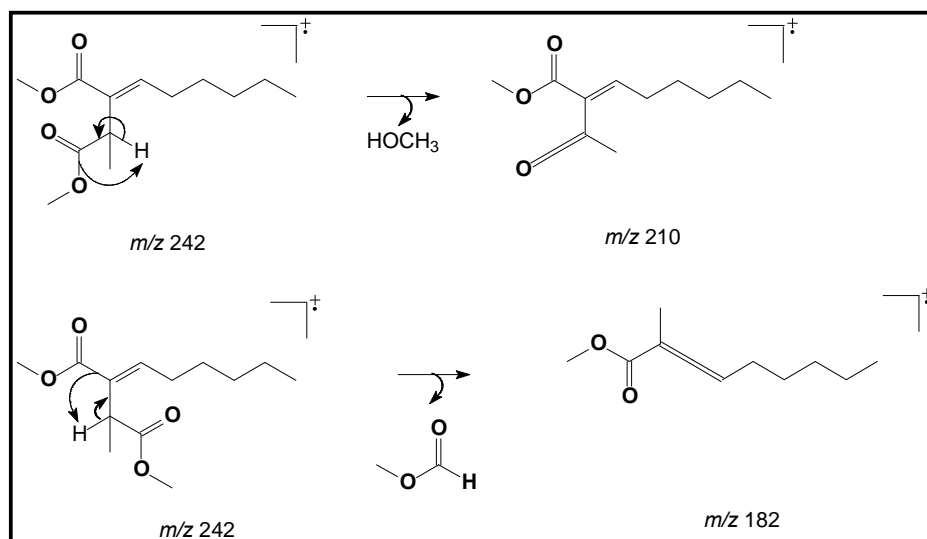


Figura 4.4.37. (A) e (C) banda cromatográfica e espectro de massas do éster metílico do ácido pilifórmico, (B) e (D) detecção do referido éster no extrato PN1CL5

O Esquema 4.4.4 ilustra uma proposta de fragmentação para o ácido pilifórmico metilado, justificando alguns íons observados no espectro de massas. A partir do íon molecular de m/z 242 ocorreu a abstração do hidrogênio α a carboxila e conseqüente eliminação de metanol, levando ao íon de m/z 210. Já a formação de m/z 182 também ocorreu a partir do íon molecular, porém com a eliminação do grupo $C_2O_2H_4$.



Esquema 4.4.4. Proposta de fragmentação do éster metílico do ácido pilifórmico

4.5 Isolamento de metabólitos secundários produzido pelo microrganismo N1CL3

4.5.1. Identificação da fração PN1CL3B68

A fração PN1CL3B68 mostrou-se como uma mistura de substâncias, pois foram observadas duas bandas em CCD. Devido à baixa massa da fração, esta não foi submetida a novos procedimentos de purificação. No entanto, foi possível identificar, através de experimentos de RMN e Espectrometria de Massas, a substância majoritária da mistura.

No espectro de ^1H RMN, mostrado na Figura 4.5.1, verificou-se na região dos aromáticos a presença de dois sinais, um dubleto em 7,09 ppm, com integração para dois hidrogênios e outro dubleto em 6,78 ppm, também com integração para dois hidrogênios. Com base no espectro de COSY (Figura 4.5.2A) os hidrogênios aromáticos correlacionam-se somente entre si, podendo-se concluir que o anel é para dissubstituído. Verificou-se em 3,83 ppm um tripleto integrando para dois hidrogênios, ou seja, um metileno fortemente desblindado, o qual deve estar ligado diretamente a um centro retirador de elétrons. Em 2,80 ppm têm-se um tripleto com integração para dois hidrogênios e pelo COSY (Figura 4.5.2B) observou-se a correlação deste com o outro tripleto mencionado. A reunião das informações descritas sugeriu a estrutura mostrada na Figura 4.5.3.

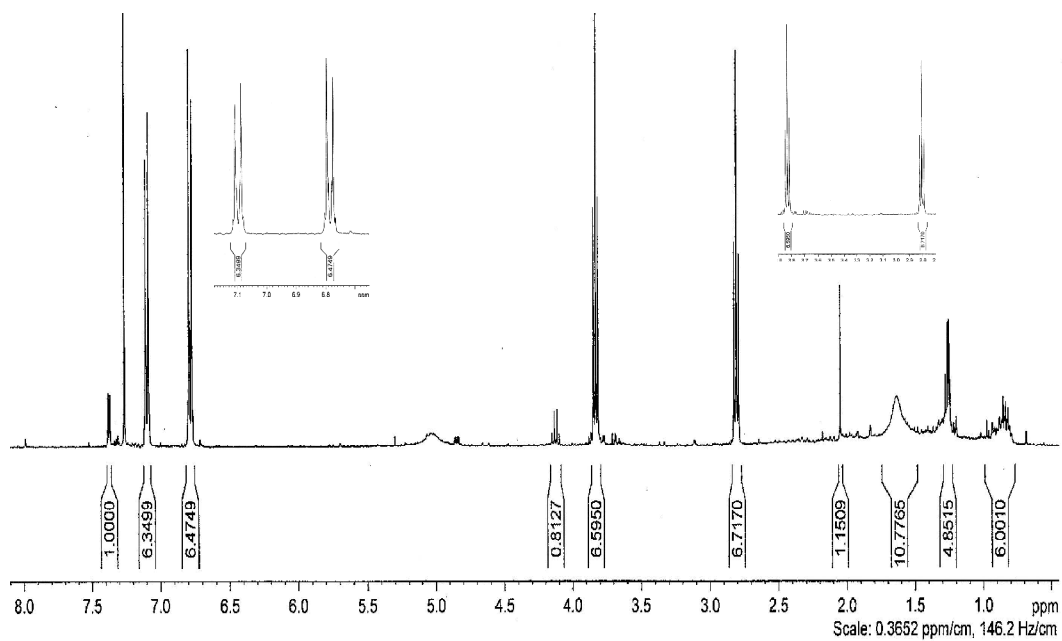


Figura 4.5.1. Espectro de ^1H RMN em 400 MHz da fração PNICL3B68 em CDCl_3

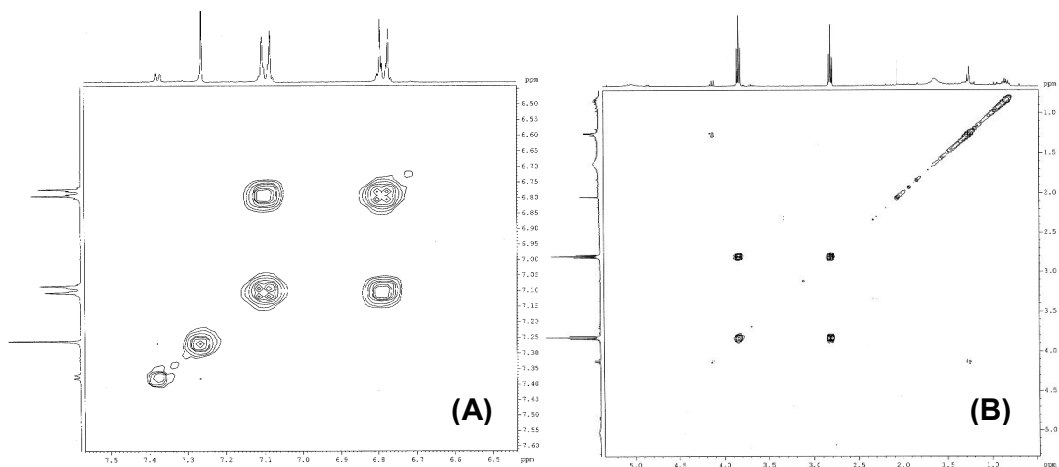


Figura 4.5.2. Espectro de COSY em 400 MHz da fração PNICL3B68 em CDCl_3 (A) região de aromáticos e (B) correlação dos hidrogênios na região mais blindada do espectro

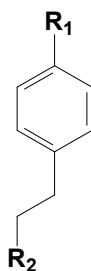


Figura 4.5.3. Estrutura presente na fração PNICL3B68

Para determinação de R1 e R2 a fração PNICL3B68 foi analisada pela técnica de CG/EM. Na Figura 4.5.4 pôde-se observar o íon molecular com m/z 138, indicando, dessa forma, que R1 e R2 são iguais e correspondem ao grupo OH. A substância caracterizada é conhecida como tirosol (4-hidroxi fenil etanol), é muito encontrada em vinhos e azeite de oliva e exibe uma marcante propriedade antioxidante (PUERTA *et al.*,1991 e GIOVANNINI, *et al.*,1999).

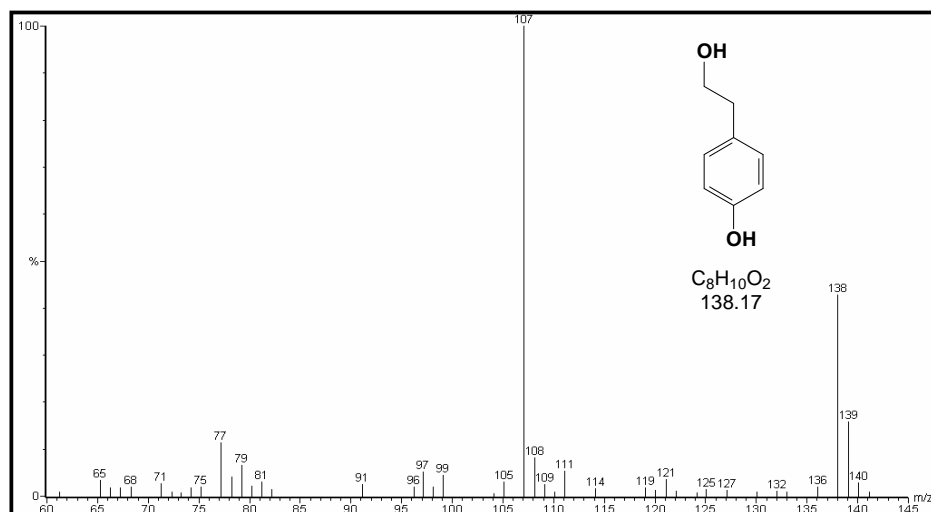
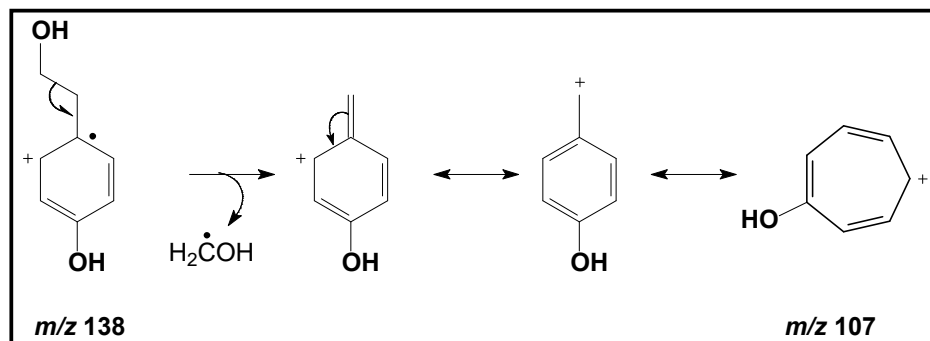


Figura 4.5.4. Espectro de massas da fração PNICL3B68

O Esquema 4.5.1 apresenta uma proposta de fragmentação para o tirosol, na qual a formação do pico base decorre da clivagem homolítica β ao anel aromático levando ao íon de m/z 107, altamente estável devido ao retorno da aromaticidade.



Esquema 4.5.1. Proposta de fragmentação da substância majoritária na fração PNICL3B68

4.5.2 Identificação da fração PNICL3C15

Notou-se no espectro de ^1H RMN de PNICL3C15, apresentado na Figura 4.5.5, um singlete bastante desblindado em 11,92 ppm, com deslocamento químico característico de hidrogênio quelado ou de grupo aldeído. Na região de aromáticos foram observados dois dubletos, em 8,21 ppm (d, $J = 8,4$ Hz, 1H) e 6,97 ppm (d, $J = 9,2$ Hz, 1H) e, pela constante de acoplamento estes devem estar em posição orto entre si. Um grupo retirador de elétrons deve estar ligado ao anel aromático, justificando, assim, o deslocamento químico do hidrogênio em 8,21 ppm. A análise do espectro indicou a presença de um hidrogênio carbinólico em 4,69 ppm (m, 1H) e uma metila em 1,57 ppm (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), a qual deve estar ligada ao carbono carbinólico, devido ao valor do deslocamento químico. Foram observados ainda dois duplos dubletos, cada um integrando para um hidrogênio, em 3,93 ppm (dd, $J = 4,4$ e $18,4$ Hz, 1H) e 3,06 ppm (dd, $J = 10,8$ e $18,4$ Hz, 1H) e, de acordo com as constantes de acoplamento de $18,4$ Hz, estes devem ser hidrogênios geminais.

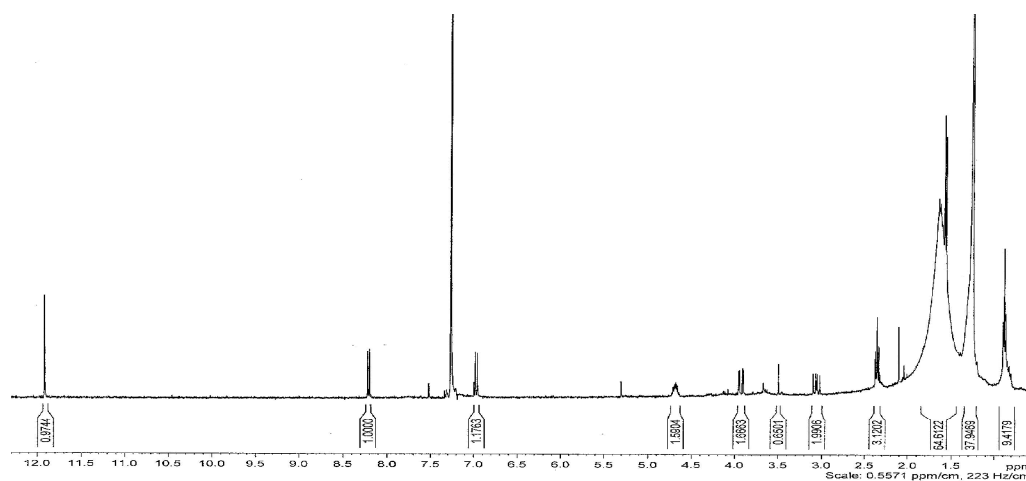


Figura 4.5.5. Espectro de ^1H RMN de PNICL3C15 em CDCl_3 (400MHz)

A junção dos dados espectrais mencionados no parágrafo anterior e a ocorrência da detecção de isocumarinas nos extratos de NICL3, permitiu identificar a substância PNICL3C15 com a estrutura ilustrada na Figura 4.5.6.

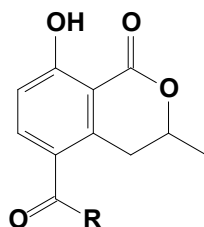


Figura 4.5.6. Estrutura parcial proposta para PNICL3C15

O grupo R, possivelmente, deve ser uma cadeia alquílica longa, pois verificou-se um acúmulo de sinais na região compreendida entre 1,8 a 1,5 ppm. No entanto, a análise do espectro de ^1H RMN indicou a presença de dois tripletos, sendo que um deles deve ser um grupo metilênico adjacente a carbonila devido ao valor do deslocamento químico em 2,36 ppm e o segundo referente a metila terminal com deslocamento de 0,88 ppm.

Novos experimentos serão realizados para determinação do grupo R e confirmação da estrutura proposta.

4.5.3 Elucidação estrutural da fração PNICL3C28

A substância, pertencente à fração PNICL3C28, foi isolada como um sólido branco amorfo, com 5,2 mg de massa e, para sua elucidação estrutural foram utilizados os experimentos de ^1H RMN uni e bidimensionais, ^{13}C RMN e Espectrometria de Massas.

A integração no espectro de ^1H RMN (Figura 4.5.7) apresentou vinte hidrogênios, enquanto que, no espectro de ^{13}C RMN (Figura 4.5.8) foram observados quinze carbonos. No espectro de DEPT 135 (Figura 4.5.9) foi possível verificar a presença de três metilas, três grupos metilenos e quatro grupos metínicos.

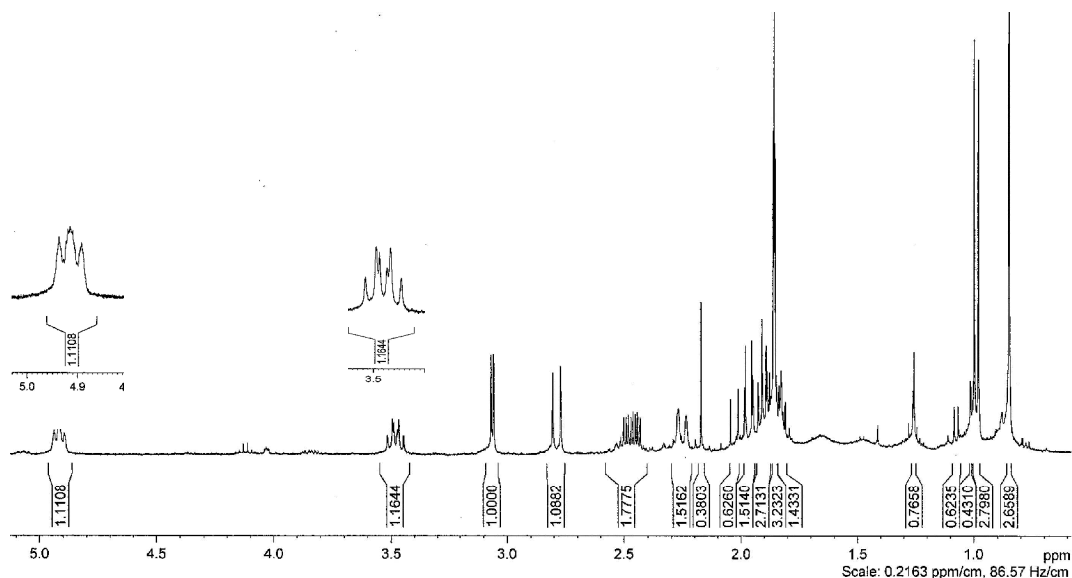


Figura 4.5.7. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 400MHz de PNICL3C28

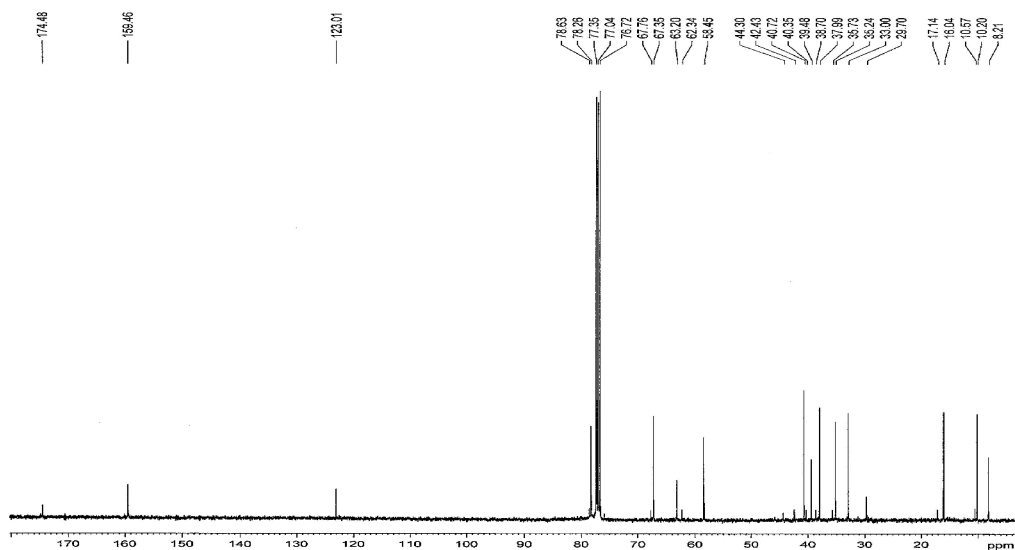


Figura 4.5.8. Espectro de ^{13}C RMN em CDCl_3 de PNICL3C28

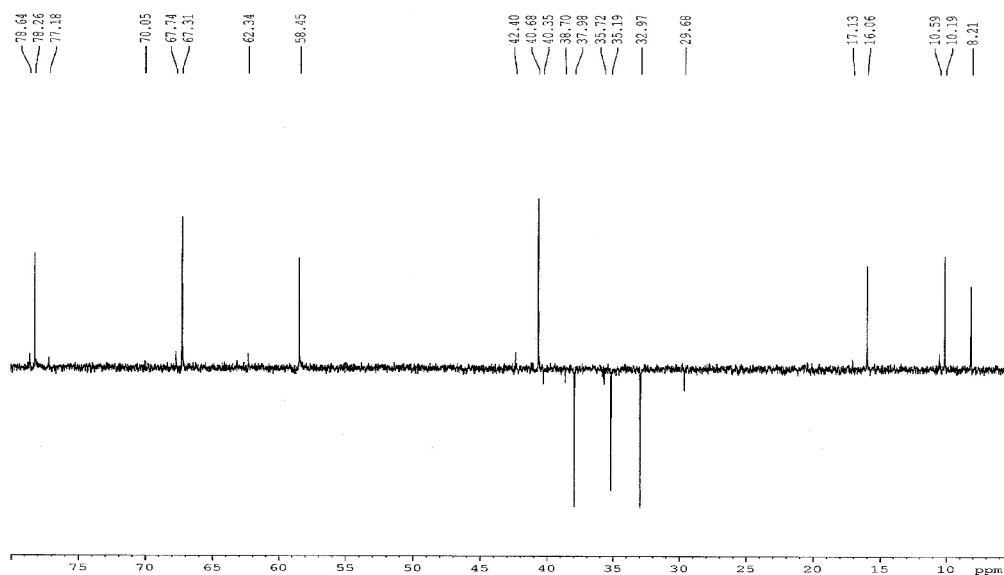


Figura 4.5.9. Espectro de DEPT 135 em CDCl_3 de PNICL3C28

Notou-se na Figura 4.5.7 um duplo duplo dubleto em 3,48 ppm (ddd, 1H), o qual é característico de hidrogênio carbinólico. Este, no espectro de COSY (Figura 4.5.10), apresentou correlações com o sinal 2,44 ppm (ddd, $J = 5; 10; 20$ Hz, 1H) e com os multipletos em 1,81 ppm (m, 1H) e 1,89 ppm (m, 1H). Com base nos espectros de ^1H e COSY, o sinal em 2,44 ppm acopla-se com o multipletto em 1,89 ppm (m, 1H) e com o dubleto em 3,06 ppm (d, $J = 4$ Hz, 1H). O multipletto em 1,81 ppm mostrou acoplamento com a metila em 0,96 ppm. O sinal em 3,06 ppm está ligado a um carbono em 58,5 ppm (HSQC, Figura 4.4.11), deslocamento químico

característico de epóxido. Pelo HMBC (Figura 4.5.12) observou-se a correlação deste hidrogênio com o carbono em 63,2 ppm, confirmando a presença do epóxido. A junção de todos estes dados permitiu sugerir a estrutura parcial representada na Figura 4.5.13.

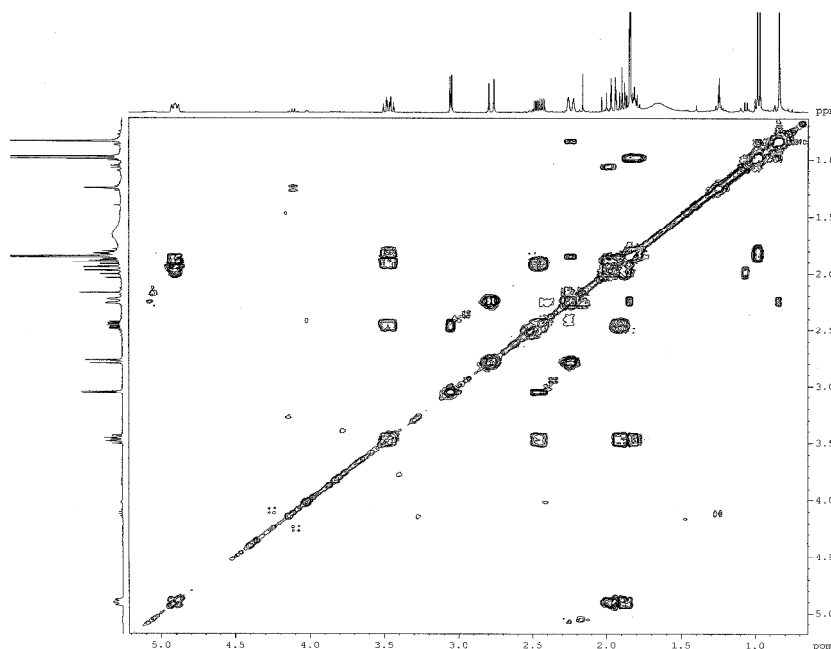


Figura 4.5.10. Espectro de COSY em CDCl_3 de PNICL3C28

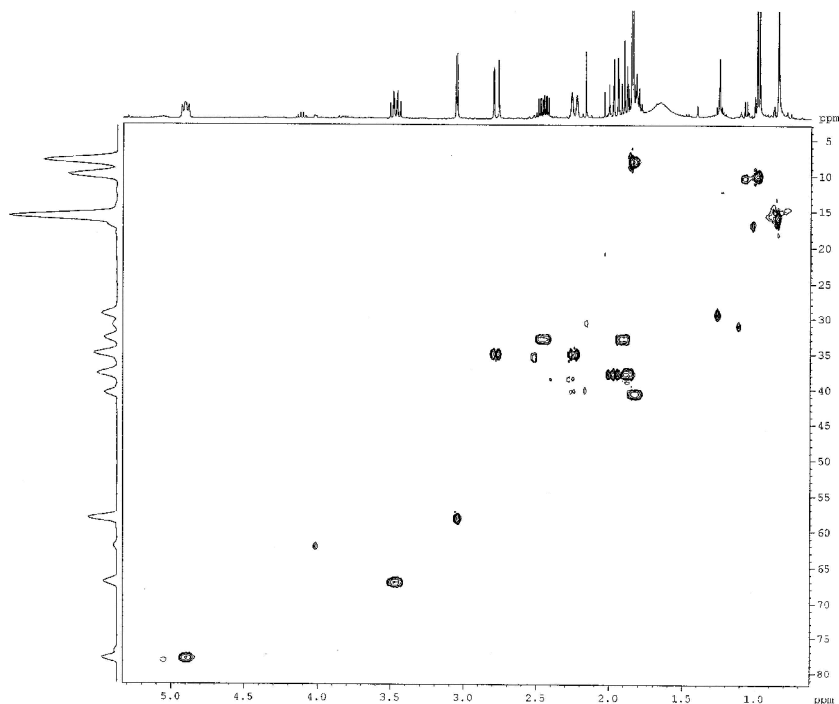


Figura 4.5.11. Espectro de HSQC de PNICL3C28

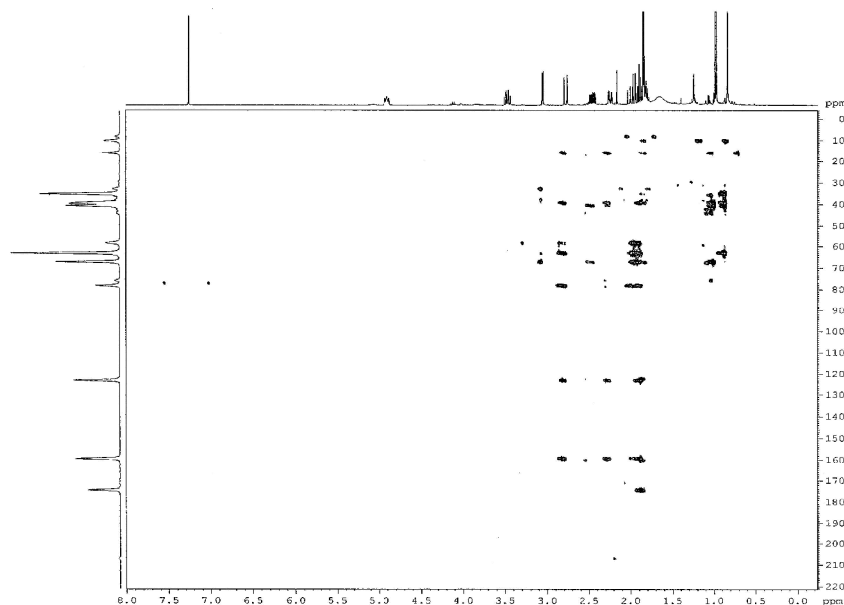


Figura 4.5.12. Espectro de HMBC de PNICL3C28

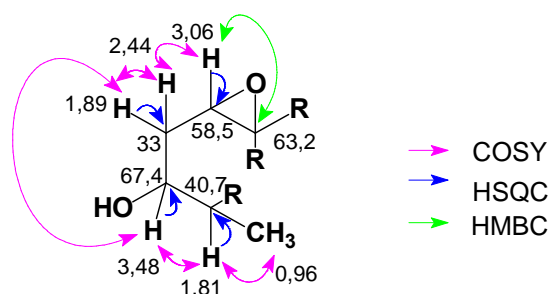


Figura 4.5.13. Estrutura parcial da substância PNICL3C28 e as correlações observadas no COSY, HSQC e HMBC

No experimento de HSQC foram observadas todas as correlações para cada hidrogênio presente na molécula. A Tabela 4.5.1 apresenta estas correlações.

O multiplete em 4,9 ppm, integrando para um hidrogênio, deve estar adjacente a um oxigênio, devido ao deslocamento químico. Este hidrogênio está diretamente ligado ao carbono em 78,3 ppm e correlaciona-se com os hidrogênios em 1,82 ppm e 2,05 ppm.

No espectro de ^{13}C RMN pôde-se observar sinais característicos de carboxila de éster em 174,6 ppm, e de dois carbonos sp^2 (159,5 e 122,3 ppm), sendo que o mais blindado deve ser ligado ao carbono da carboxila. Com base nestes dados propôs-se o grupo mostrado na Figura 4.5.14.

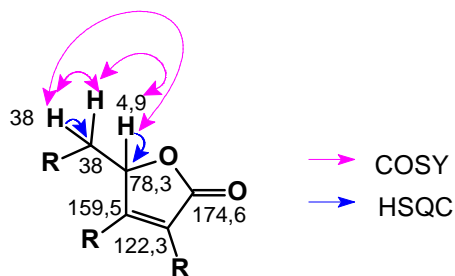


Figura 4.5.14. Grupo pertencente à fração PNICL3C28 e as correlações observadas no COSY e HSQC

O tripleto em 1,85 ppm, com integração para três hidrogênios, deve estar ligado a um carbono sp^2 , por estar mais desblindado, o que foi confirmado pelo HMBC. Pelo COSY observou-se o acoplamento homoalílico desta metila com o dubleto em 2,23 ppm (d, $J = 14$ Hz, 1H) e com o multiplete em 4,9 ppm. O hidrogênio em 2,76 ppm mostrou correlação com o dubleto em 0,83 ppm (d, $J = 1$ Hz). Já o dubleto (3H) em 0,83 ppm mostrou correlação com o carbono em 40,7 ppm. Através das correlações observadas anteriormente, dos grupos já elucidados, dos dados da literatura (PÉREZ-CASTORENA, *et al.*, 2007) e também a estrutura do sesquiterpeno eremofilano detectada por CG/EM no extrato de NICL3, foi proposta a estrutura da Figura 4.5.15 para a molécula pertencente à fração PNICL3C28.

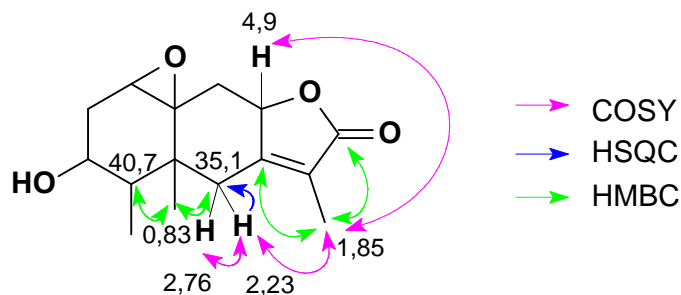


Figura 4.5.15. Estrutura proposta para a substância da fração PNICL3C28 e as correlações observadas no COSY, HSQC e HMBC

A estereoquímica relativa foi determinada através do NOE (Figura 4.5.17) e do COSY. A irradiação do multiplete em 3,48 ppm causou o efeito NOE nos hidrogênios em 0,83 e 0,96 ppm. Já o espectro de COSY mostrou a correlação dos hidrogênios da metila (H13) com os sinais em 2,23 ppm (H6b) e com o multiplete em 4,90 ppm (H8), sugerindo um ângulo diedro de 90° entre H6b e H8 com o carbono da dupla ligação em C11, indicando uma orientação α para H8. A Figura 4.5.16 apresenta a estrutura com a respectiva estereoquímica relativa.

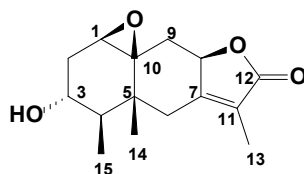


Figura 4.5.16. Estereoquímica proposta para a substância da fração PNICL3C28

Tabela 4.5.1. Dados espectroscópicos de PNICL3C28

Posição	¹ H	HSQC	COSY	HMBC
1	3,06 (d, 4 Hz)	58,5	H2a	C2, C10
2a	2,44 (ddd, 20/10/5 Hz)	33,0	H1, H2b, H3	C3, C14
2b	1,89 (m)		H2a, H3	C1, C10, C3
3	3,48 (m)	67,4	H2a, H2b, H4	C4, C15
4	1,81 (m)	40,7	H15, H3	C2, C3
5	-	39,1	-	-
6a	2,76 (d, 14 Hz)	35,1	H6b	C5, C7, C8, C10, C11, C14
6b	2,23 (dl, 14 Hz)		H6a, H13, H14	C5, C7, C8, C10, C11, C14
7	-	159,5		n.d
8	4,90 (m)	78,3	H9a, H9b, H13	n.d.
9a	2,05 (m)	38,0	H9b, H8	C7, C8, C13
9b	1,82 (m)		H9a, H8	C3, C5, C14, C15
10	-	63,2	-	-
11	-	122,3	-	-
12	-	174,6	-	-
13	1,85 (t, 2 Hz)	8,1	H6b, H8, H15	C7, C11, C12, C15
14	0,83 (d, 1 Hz)	15,8	H6b	C4, C5, C6, C10, C15
15	0,96 (d, 7 Hz)	10,1	H4	C3, C4, C5

* deslocamento químico em ppm

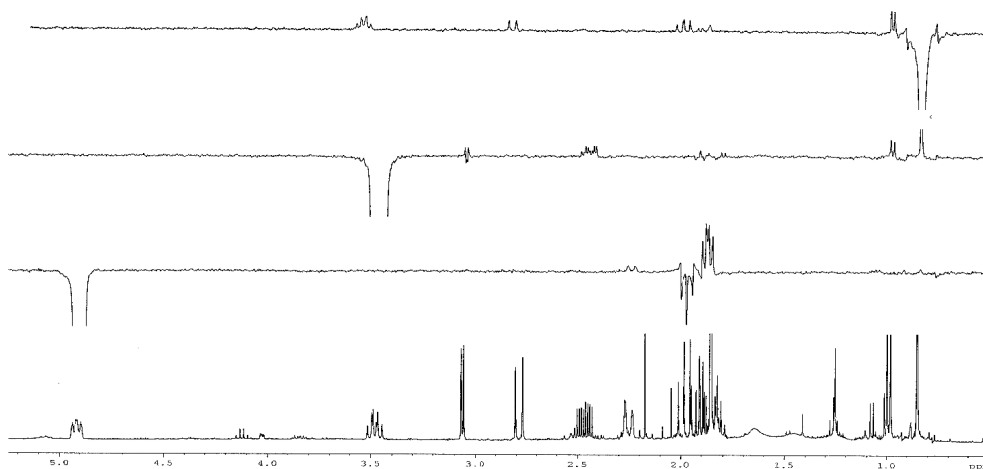


Figura 4.5.17. Espectro de NOE de PNICL3C28

Para confirmação da estrutura proposta foram realizados experimentos de Espectrometria de Massas no modo *full scan* e íons produtos. No espectro de massas, com ionização por ESI(+) no modo *full scan* foi possível observar o íon molecular protonado $[M+H]^+$ com m/z 265, confirmando a massa molecular da estrutura proposta, conforme ilustra a Figura 4.5.18.

No espectro de íons produtos (Figura 4.5.19), obtido com energia de colisão de 20 eV, pôde-se observar muitos fragmentos, dos quais os íons de m/z 265, 247, 229 e 201 foram justificados, conforme mostra o Esquema 4.5.2.

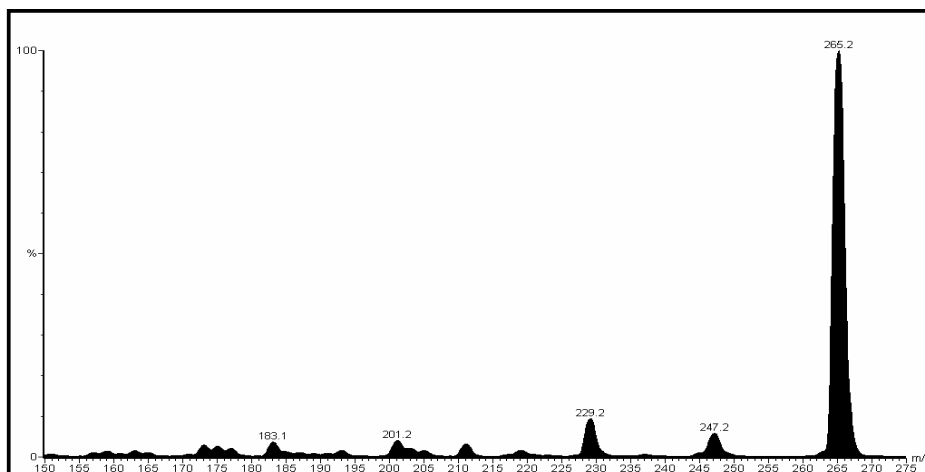


Figura 4.5.18. Espectro de Massas da molécula presente na fração PNICL3C28

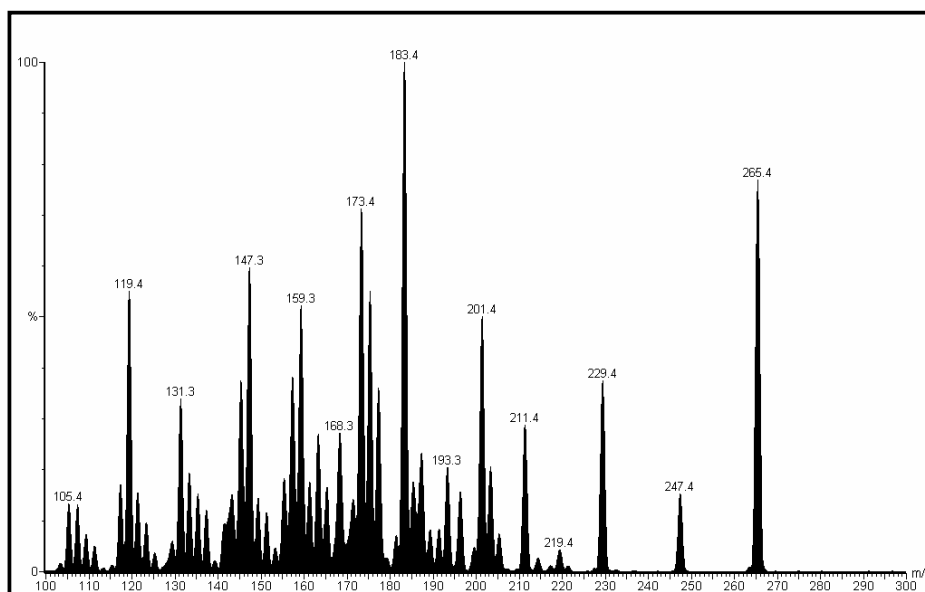
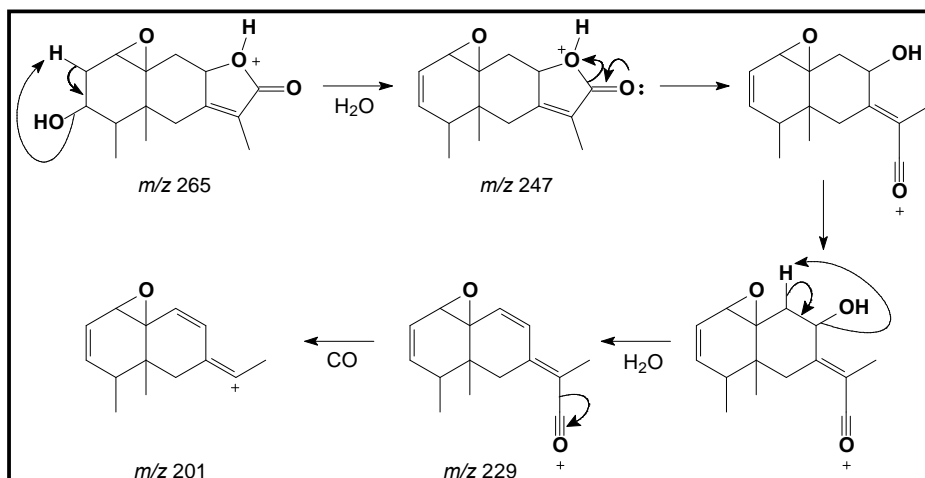


Figura 4.5.19. Espectro de íons produtos de m/z 265



Esquema 4.5.2. Proposta de fragmentação do sesquiterpeno elucidado

Através do esquema proposto, verificou-se a protonação do oxigênio do éster levando ao íon molecular protonado de m/z 265, este sofreu uma desidratação, a qual levou ao íon de m/z 247. Em seguida, ocorreu a abertura da lactona, assistida pelo par de elétrons não ligante do oxigênio da carboxila e, uma segunda desidratação conduzindo ao íon de m/z 229, o qual pela perda de uma molécula de CO , produziu o íon de m/z 201.

De acordo com pesquisa bibliográfica na base de dados Science Finder a estrutura apresentada para PNICL3C28 é inédita na literatura.

4.5.4 Elucidação estrutural da fração PNICL3B37

O espectro de 1H RMN de PNICL3B37 (Figura 4.5.20) apresentou uma grande similaridade com o espectro de hidrogênio do sesquiterpeno eremofilano elucidado no item anterior (Figura 4.5.7). No entanto, não foram observados os sinais referentes ao hidrogênio carbinólico em 3,48 ppm (H3) e ao hidrogênio diastereotópico em 2,44 ppm (H2a), evidenciando, dessa forma, a ausência da hidroxila em C3. A falta deste grupo em C3 deve deslocar o sinal de H3 para a região mais blindada do espectro, o que está de acordo com o observado na Figura 4.5.17, uma vez que, pôde-se verificar um multipletto em 1,27 ppm, o qual concorda com os dados da literatura (PÉREZ-CASTORENA, *et al.*, 2007). A estereoquímica relativa da molécula foi determinada com base na estereoquímica proposta para

PNICL3C28. A Figura 4.5.21 ilustra a estrutura de PNICL3B37 e, a comparação dos dados de ^1H RMN que permitiram a identificação desta encontra-se na Tabela 4.5.2.

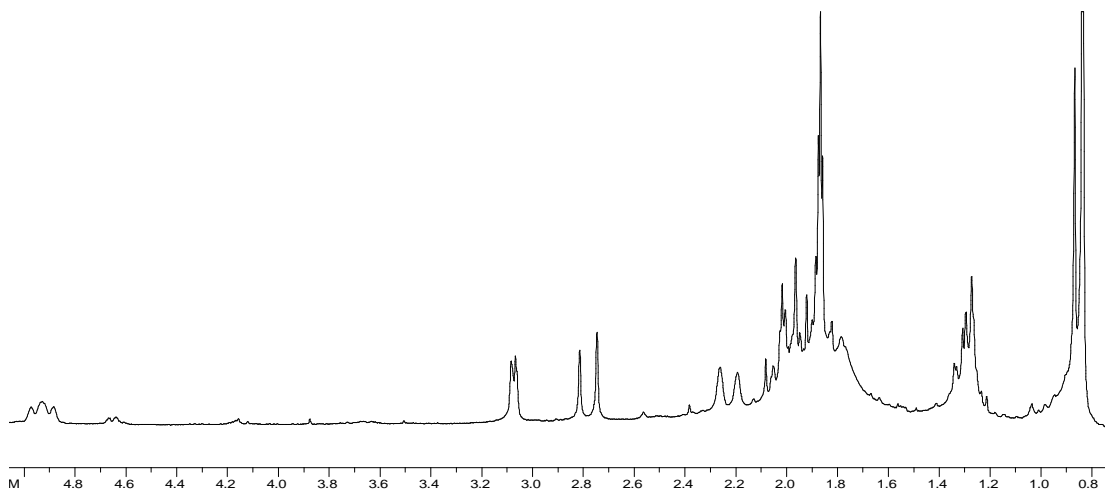


Figura 4.5.20. Espectro de ^1H RMN de PNICL3B37 em CDCl_3 (200 MHz)

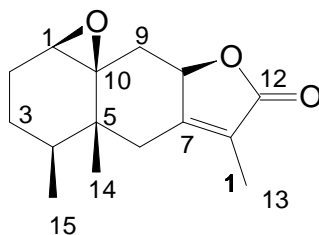


Figura 4.5.21. Estrutura de PNICL3B37

Tabela 4.5.2 Comparação dos dados de ^1H RMN de PNICL3B37 com os dados da literatura (PÉREZ-CASTORENA, *et al.*, 2007)

Posição	^1H RMN PNICL3B37 (*)	^1H RMN literatura (*)
H1	3,07 (d, J = 3,4 Hz)	3,06 (d, J = 3,5Hz)
H3	1,27 (m)	1,26 (m)
H6a	2,78 (dl, J = 13,2 Hz)	2,76 (dl, J = 13,5 Hz)
H6b	2,23 (d, J = 13,2 Hz)	2,21 (d, J = 13,5 Hz)
H8	4,92 (m)	4,91 (ddl, J = 9; 9 Hz)
H13	1,86 (dd, J = 1,2; 1,2 Hz)	1,85 (dd, J = 1,8; 1,2 Hz)
H14	0,83 (s)	0,82 (s)
H15	0,85 (d, J = 6,2 Hz)	0,83 (d, J = 7 Hz)

* deslocamento químico em ppm

4.5.5 Elucidação estrutural da fração PNICL3D11

A elucidação estrutural de PNICL3D11 baseou-se na análise das informações obtidas por RMN. Foi possível observar características semelhantes aos sesquiterpenos eremofilanos anteriormente elucidados, pois pelo espectro de ^1H RMN (Figura 4.5.22) verificou-se dois sinais de hidrogênios olefínicos, três sinais de hidrogênios carbinólicos e, pela integração foi possível atribuir à molécula duas metilas.

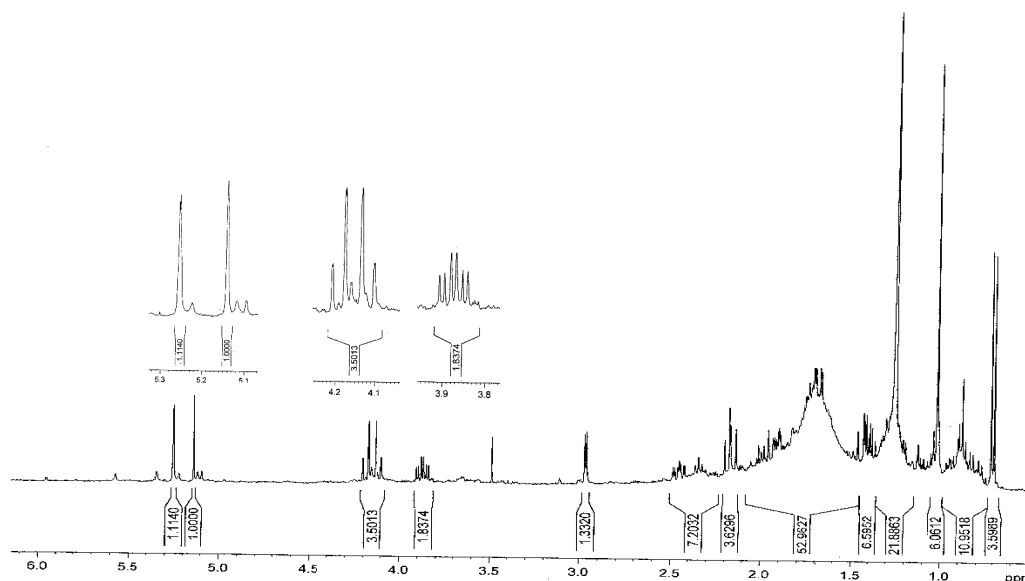


Figura 4.5.22. Espectro de ^1H RMN em 400MHz de PNICL3D11 em CDCl_3

Os sinais dos hidrogênios olefínicos em 5,26 ppm (d, $J = 1\text{ Hz}$, 1H) e 5,12 ppm (sl, 1H) apresentaram correlação entre si pelo COSY (Figura 4.5.23), e através do HSQC (Figura 4.5.24) verificou-se que estes são hidrogênios geminais. Ainda pelo COSY notou-se que o dubleto em 5,26 ppm acopla com os hidrogênios carbinólicos em 4,19 ppm (dd; $J = 11$; 1 Hz; 1H) e 4,16 ppm (dd; $J = 11$; 1 Hz). A partir destas informações foi possível propor a estrutura parcial apresentada na Figura 4.5.25

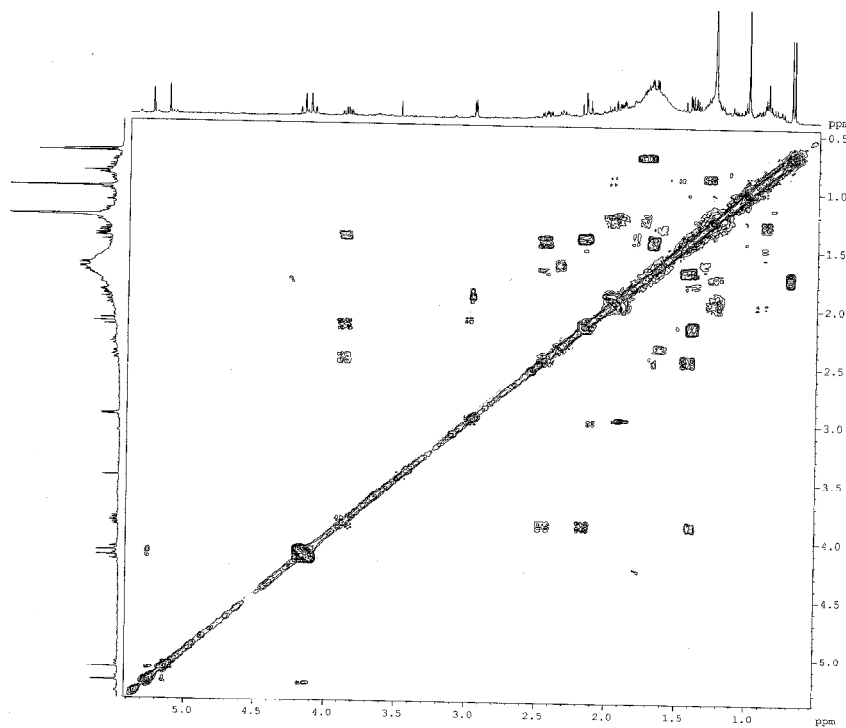


Figura 4.5.23. Espectro de COSY de PNICL3D11 em CDCl_3

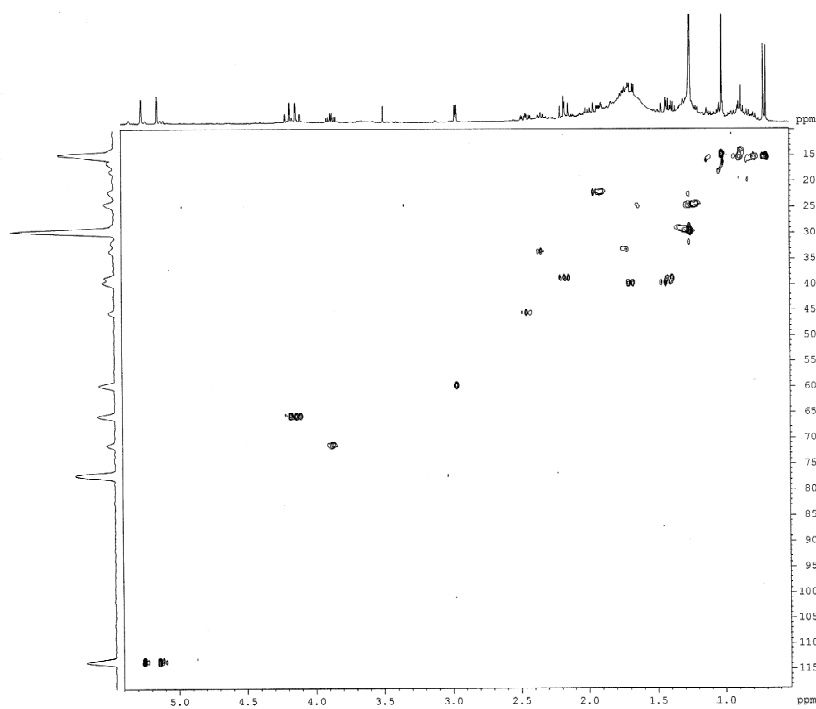


Figura 4.5.24. Espectro de HSQC de PNICL3D11 em CDCl_3

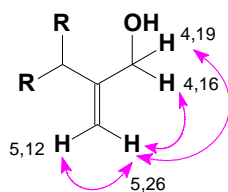


Figura 4.5.25. Estrutura parcial proposta para a molécula PNICL3C11 através das correlações de COSY

Pelo deslocamento químico do multipeto em 2,43 ppm pôde-se inferir que este deve estar nas vizinhanças de um centro retirador de elétrons. Esta proposição foi confirmada, uma vez que, constatou-se, pelo COSY, a correlação deste sinal com o hidrogênio carbinólico em 3,88 ppm (dt, $J = 10; 4$ Hz, 1H). Foi possível notar também a correlação do multipeto com os sinais em 1,68 ppm (m; 1H) e 1,41 ppm (m, 1H), os quais pelo HSQC estão ligados ao carbono em 39,6 ppm e pelo HMBC (Figura 4.5.26) apresentam acoplamento com uma metila em 1,02 ppm (s, 3H). Já o hidrogênio carbinólico em 3,88 ppm apresentou correlação com os hidrogênios diasterotópicos em 2,18 ppm (dd, $J = 12,4; 9,6$ Hz, 1H) e 1,38 ppm (m, 1H). A Figura 4.5.27 apresenta a estrutura parcial proposta de acordo com as correlações mencionadas anteriormente.

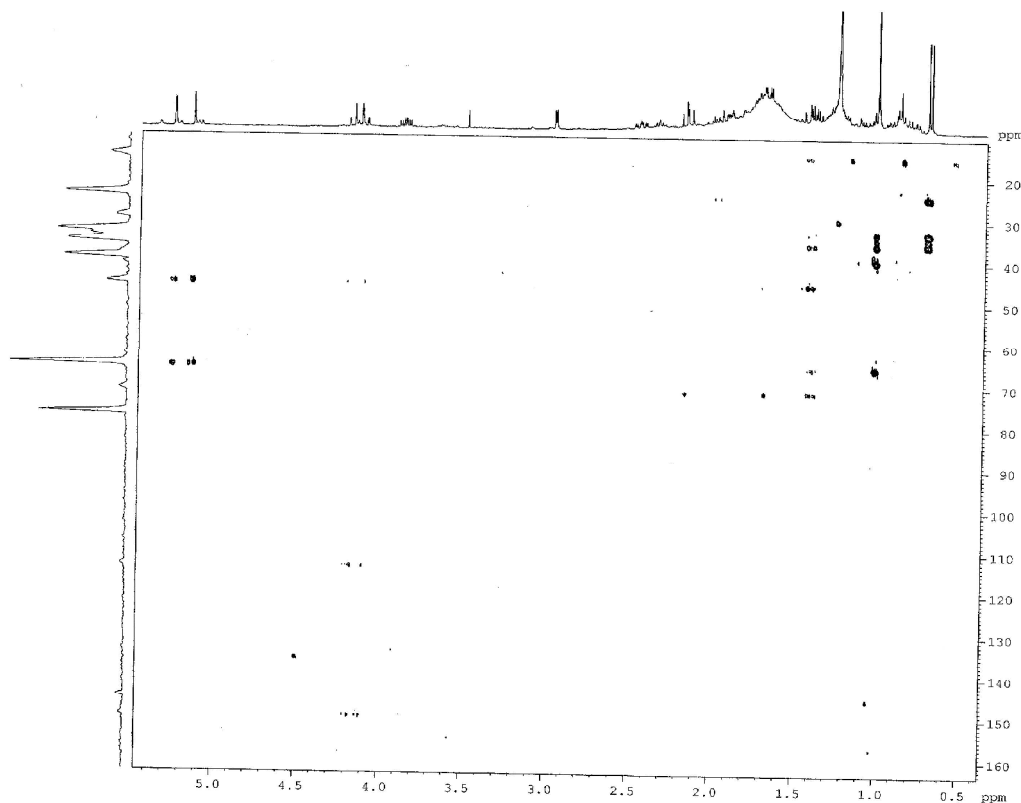


Figura 4.5.26. Espectro de HMBC de PNICL3D11 em CDCl_3

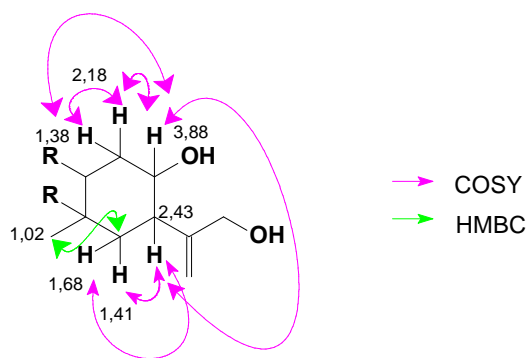


Figura 4.5.27. Estrutura parcial proposta para a molécula PNICL3C11 através das correlações de COSY e HMBC

A análise do espectro de HSQC indicou que o duplete em 2,96 ppm (d, $J = 7$ Hz) apresenta correlação com carbono característico de epóxido em 59,7 ppm e, através do COSY, observou-se o acoplamento em W com o duplo duplete 2,18 ppm (dd, $J = 9,6; 12,4$ Hz, 1H) e com o hidrogênio em 1,91 ppm (m, 2H). As análises do HSQC e do COSY indicaram que os hidrogênios do multiplete estão ligados ao carbono em 22,1 ppm e aos hidrogênios em 1,21 ppm (m, 2H), respectivamente.

Pôde-se inferir, através dos dados de COSY e HMBC, que os hidrogênios em 1,21 ppm estão acoplados a um grupo metínico com hidrogênio em 1,71 ppm (m, 1H) e a metila em 0,71 ppm (dl, $J = 5,6$ Hz, 3H). A Tabela 4.5.3 apresenta todos os dados espectroscópicos de RMN da substância PNICL3D11.

Pela junção de todos dados mencionados anteriormente, foi possível propor a estrutura da molécula em estudo, conforme ilustra a Figura 4.5.28.

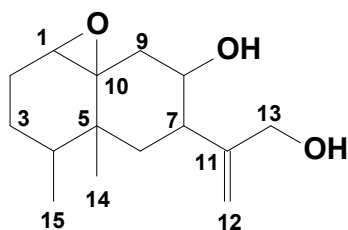


Figura 4.5.28. Estrutura proposta para a substância PNICL3D11

A estrutura proposta está de acordo com todos os dados de RMN e também concorda com o fato de o microrganismo NICK3 ser um hábil produtor de sesquiterpenos eremofilanos, uma vez que, esta classe foi detectada por CG/EM e também isolada em outras frações do extrato fúngico. No entanto, não foi possível realizar experimentos a fim de se verificar a estereoquímica relativa, uma vez que, a

amostra degradou, dessa forma, foi sugerida a mesma estereoquímica observada para o sesquiterpeno PNICL3C28 (Figura 4.5.16). A Figura 4.5.29 apresenta a estrutura do sesquiterpeno elucidado e a estereoquímica relativa proposta. Não há relatos deste sesquiterpeno na literatura, o que o caracteriza como uma substância inédita.

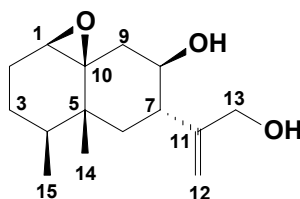


Figura 4.5.29. Estereoquímica relativa proposta para a substância PNICL3D11

Tabela 4.5.3. Dados espectroscópicos de RMN

Posição	^1H (*)	HSQC (*)	COSY	HMBC
1	2,97 (d, J = 7 Hz, 1H)	59,7	H2a/b, H9a	n.d.
2a/2b	1,91 (m, 2H)	22,1	H1, H3a/b	n.d.
3a/3b	1,21 (m, 2H)	24,3	H2a/b, H4	C15
4	1,71 (m, 1H)	33,1	H3a/b, H15	n.d.
5	-	35,8	-	C4, C15
6a	1,68 (m, 1H)	39,6	H6b, H7	C7, C8
6b	1,41 (m, 1H)	39,6	H6a, H7, H8	C7, C8, C10
7	2,43 (ddd, J = 9,2; 20; 23,6 Hz, 1H)	45,4	H6a, H6b, H8,	n.d.
8	3,88 (dt, J = 10; 4 Hz, 1H)	71,6	H6b, H7, H9a/b	n.d.
9a	2,18 (dd, J = 9,6; 12,4 Hz, 1H)	38,5	H1, H8, H9b	C8
9b	1,38 (m, 1H)	38,5	H9a,	C7, C8, C10
10	-	65,8	-	-
11	-	150,1	-	-
12a	5,26 (d, J = 1 Hz, 1H)	113,2	12b, H13a, H13b	C7, C13
12b	5,12 (d, J = 1 Hz, 1H)	113,2	H12a	C7, C13
13a	4,19 (dd, J = 11; 1 Hz, 1H)	65,8	H12a	C7, C11, C12
13b	4,16 (dd, J = 11; 1 Hz, 1H)	65,8	H12a	C7, C11, C12
14	1,02 (s, 3H)	15,9	n.d.	C4, C5, C6, 10
15	0,71 (d, J = 6 Hz, 3H)	14,8	H4	C3, C4, C5

* deslocamento químico em ppm

4.6 Comparação do perfil metabólico de N1CL3 em diferentes meios de cultura

Muitas pesquisas relatam que os microrganismos possuem um poder muito grande de adaptação mediante o suprimento ou carência de nutrientes, desse modo, o meio de cultura é um fator determinante na produção de metabólitos secundários. Diante disso, o fungo N1CL3 foi cultivado em diferentes meios de cultura e os extratos analisados por CLAE/UV. De cada meio de cultivo foram obtidos dois extratos, um extrato etanólico e um de acetato de etila.

Em uma análise puramente visual observou-se que, após vinte dias de cultivo, o fungo N1CL3 desenvolveu-se muito bem em todos os meios de cultura, como pode ser observado na Figura 4.6.1.

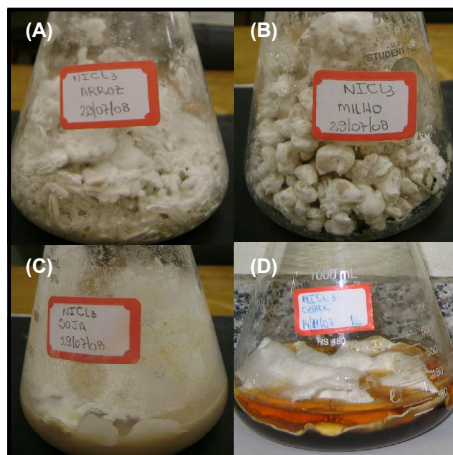


Figura 4.6.1 Desenvolvimento do fungo N1CL3 em diferentes meios de cultura; (A) arroz, (B) milho, (C) extrato de soja e (D) Czapeck + 2% de extrato de levedura

Primeiramente, monitoraram-se os meios de cultura (BRANCOS) em comprimentos de onda que apresentassem maior número de bandas cromatográficas (Figura 4.6.2). Constatou-se que todos os meios apresentaram uma boa quantidade de constituintes, uma vez que, são substratos compostos basicamente por carboidratos, aminoácidos, dentre outros.

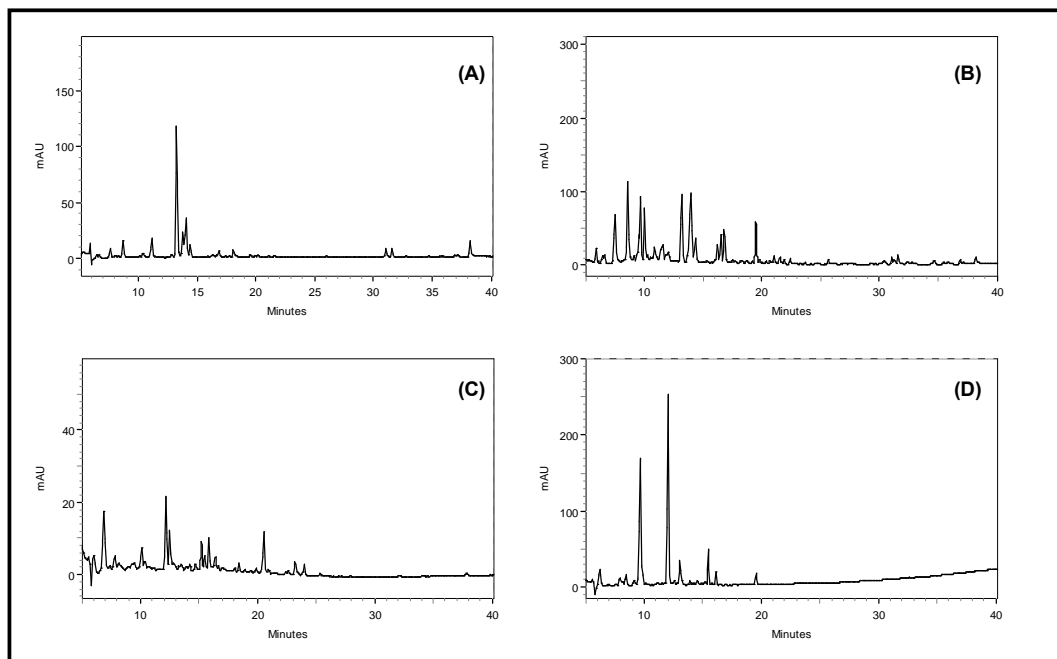


Figura 4.6.2. Cromatogramas dos meios de cultura sem crescimento fúngico; (A) Arroz ($\lambda = 225$ nm), (B) Milho ($\lambda = 285$ nm), (C) Czapeck com 2% de extrato de levedura ($\lambda = 287$ nm) e (D) Extrato de Soja ($\lambda = 248$ nm)

Verificou-se que o microrganismo modificou consideravelmente o meio de cultura, uma vez que, os extratos de cada meio apresentaram perfis cromatográficos (Figura 4.6.3) distintos daqueles mostrados na Figura 4.6.2. Também foi possível notar a diferença de um cromatograma para o outro, confirmando a proposição de que o meio de cultura influencia significativamente na produção de metabólitos secundários. Este resultado mostra a potencialidade e importância do estudo da química de microrganismos, pois através de alterações no meio de cultivo, os microrganismos podem produzir uma variedade de substâncias diferentes e com diversas atividades biológicas. Este fato relaciona-se diretamente com o interesse pela busca de novas substâncias com ações farmacológicas, agroquímicas, dentre outras.

Observando-se as Figuras 4.6.3 e 4.6.4, foram constatadas pequenas diferenças nos perfis cromatográficos dos extratos obtidos com EtOH e AcOEt. O extrato proveniente do meio Czapeck com 2% de extrato de levedura particionado com AcOEt, mostrou maior constituição química do que aquele obtido pela extração com EtOH.

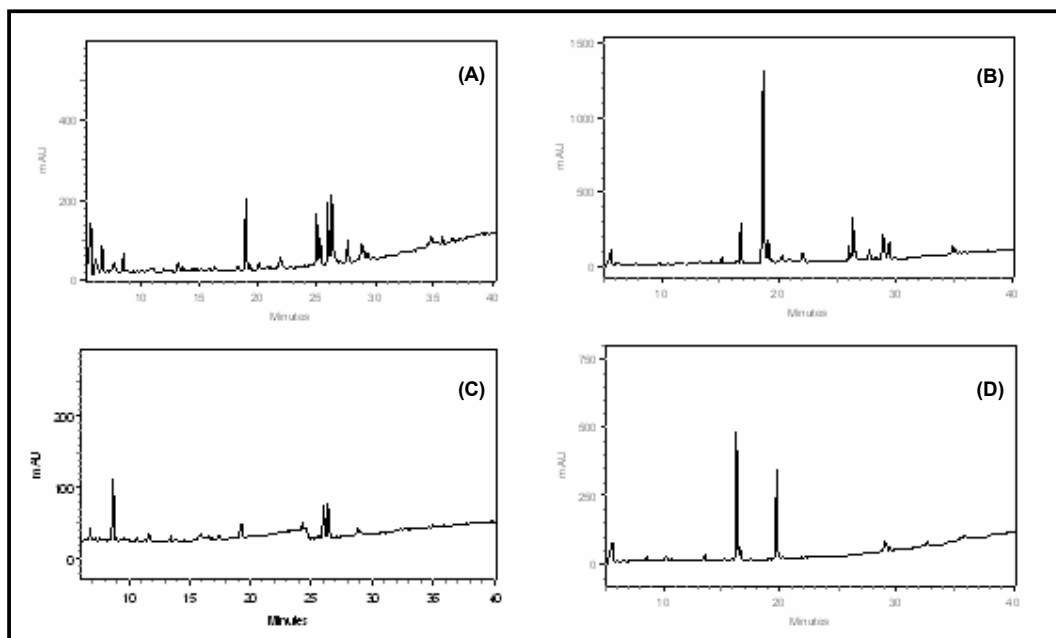


Figura 4.6.3. Cromatogramas ($\lambda = 225$ nm) dos extratos obtidos a partir de EtOH dos diferentes meios de cultivo de NiCl₃: (A) Arroz, (B) Milho, (C) Czapeck com 2% extrato de levedura e (D) Extrato de soja

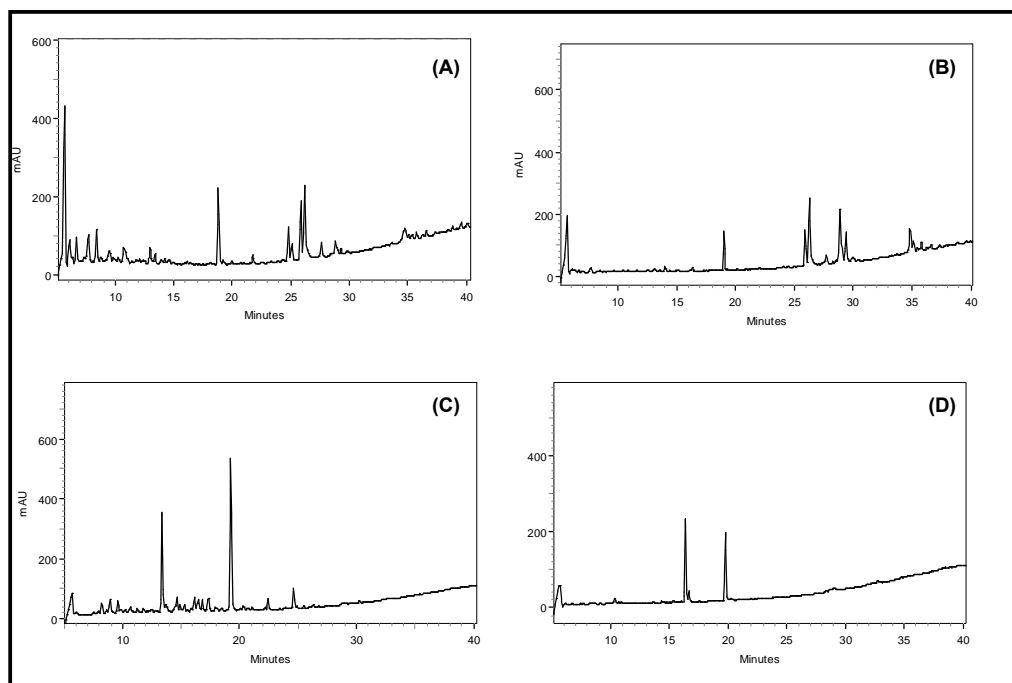


Figura 4.6.4. Cromatogramas ($\lambda = 225$ nm) dos extratos obtidos a partir de AcOEt dos diferentes meios de cultivo de NiCl₃: (A) Arroz, (B) Milho, (C) Czapeck com 2% extrato de levedura e (D) Extrato de soja

4.7 Isolamento de metabólitos secundários produzidos pelo fungo N1CL5

4.7.1. Isolamento das substâncias na fração PN1CL5B

Após o pré-tratamento dos extratos brutos PN1CL5 e MN1CL5 por cromatografia usando coluna com placa sinterizada, foram obtidas seis frações referentes a cada extrato. As frações B e C de cada extrato apresentaram pequenos cristais solúveis em solventes de média polaridade, enquanto que as frações F continham cristais maiores, que eram solúveis somente em água.

Em um primeiro instante a fração PN1CL5B foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE/EM), utilizando as condições descritas no item 3.2.9.1.

Surpreendentemente verificou-se, no cromatograma de íons totais (TIC), que a fração PN1CL5B era composta basicamente por três substâncias (Figura 4.7.1A), as quais poderiam apresentar íons moleculares protonados ($[M+H]^+$) iguais a m/z 508, o que foi confirmado pela presença do aduto de sódio, $[M+Na]^+$, em m/z 530 (Figura 4.7.2) e também pelo cromatograma de íons selecionados a m/z 508 (Figura 4.7.1B). Na Figura 4.7.2 pôde-se observar nos espectros em *full scan* a presença dos íons de m/z 490, 448 e 430, que foram gerados na fonte de ionização.

A fim de se obter maiores informações estruturais, foram realizados experimentos de íons produtos de m/z 508, os quais pelos espectros de massas (Figura 4.7.3) foram praticamente idênticos, diferindo na intensidade dos íons.

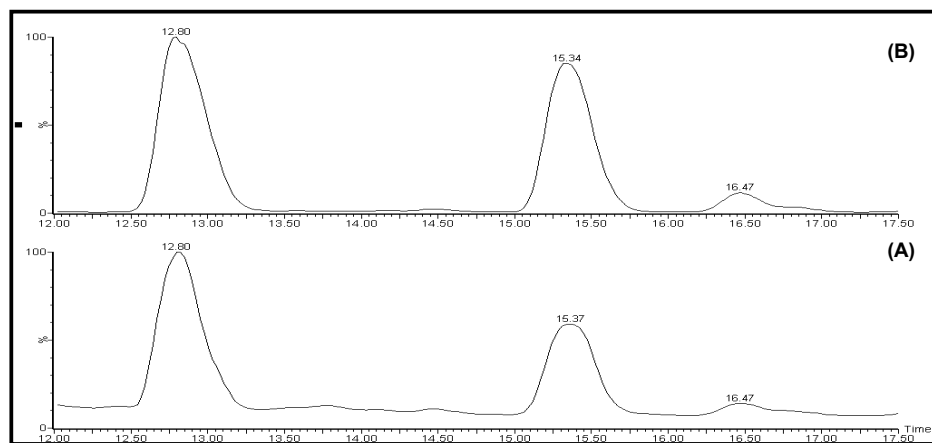


Figura 4.7.1. (A) Cromatograma de íons totais (TIC) da fração PN1CL5B e (B) Cromatogramas de íons selecionados a m/z 508

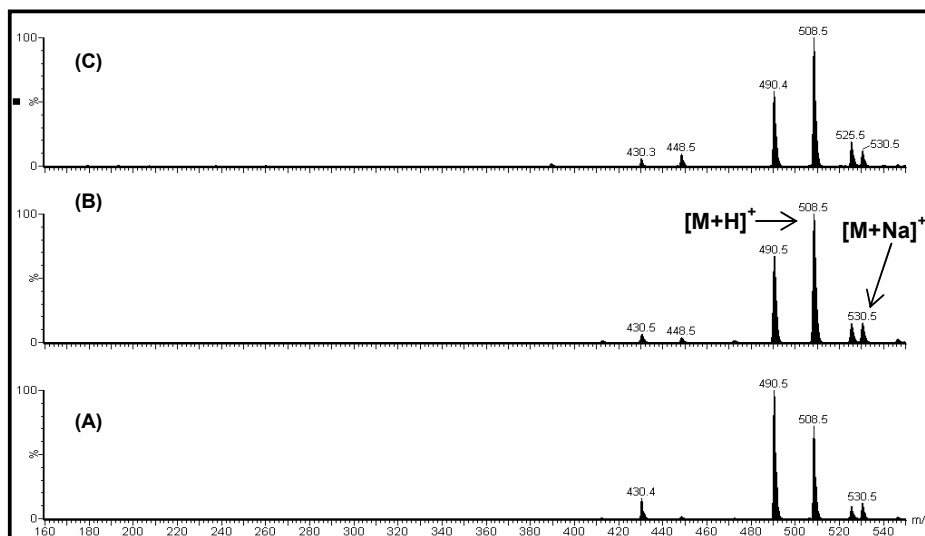


Figura 4.7.2. Espectros de massas *full scan* das substâncias presentes na fração PNICL5B: (A) 12,80 min, (B) 15,34 min e (C) 16,42 min

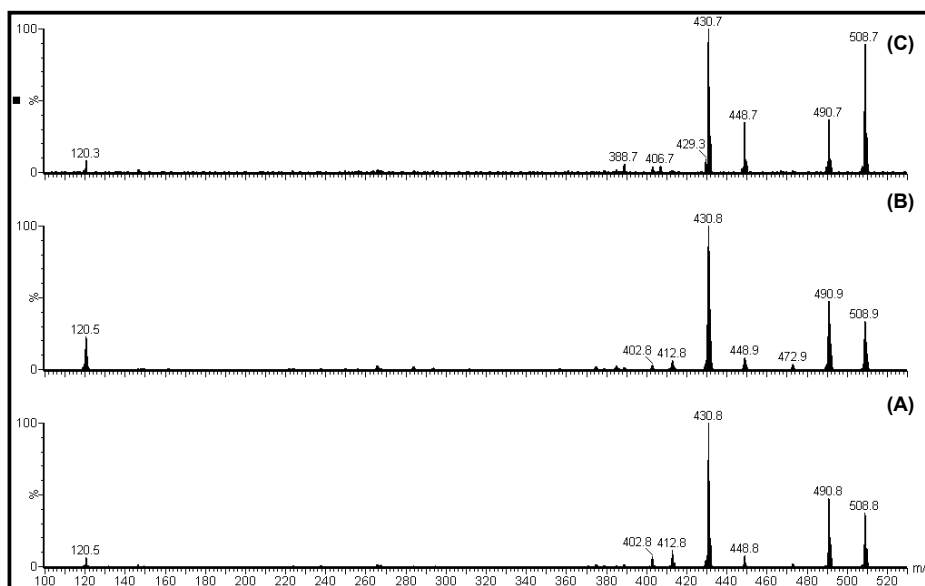


Figura 4.7.3. Espectros de íons produtos de m/z 508 das substâncias presentes na fração PNICL5B: (A) 12,80 min, (B) 15,34 min e (C) 16,42 min

Para a separação destas substâncias foi empregada CLAE preparativa, conforme as condições descritas no item 3.2.9. A Figura 4.7.4 mostra o cromatograma, monitorado a 240 e 290 nm, no qual foi possível observar uma boa separação dos constituintes da fração PNICL5B.

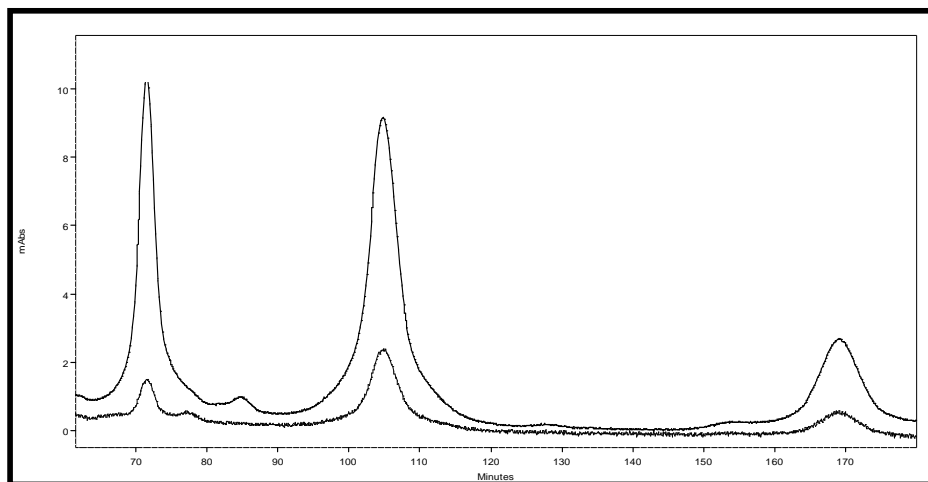


Figura 4.7.4. Cromatograma da fração PNICL5B

As substâncias eluídas apresentaram pequenos cristais de coloração branca e aciculiformes e, receberam a denominação de PNICL5B1, PNICL5B2 e PNICL5B3. Estas substâncias foram analisadas por ^1H RMN e novamente por CLAE/EM. Apesar da boa separação cromatográfica visualizada na Figura 4.7.4 as análises por RMN mostraram que frações PNICL5B2 e PNICL5B3 estavam em mistura.

4.7.1.1 Identificação estrutural de PNICL5B1

A comparação dos dados espectroscópicos de RMN e Espectrometria de Massas e os dados da literatura (FUJI, *et al.*, 2000) permitiram a identificação da substância PNICL5B1 como sendo a Citocalasina D.

A análise do espectro de ^1H RMN de PNICL5B1, mostrado na Figura 4.7.5, indicou a presença de um anel aromático monossustituído, seis sinais de hidrogênios olefínicos e dois sinais de hidrogênios carbinólicos.

Pelo COSY (Figura 4.7.6) o sinal (hidrogênio carbinólico) em 3,81 ppm (d, $J = 10,4$ Hz) com integração para um hidrogênio, mostrou correlação apenas com o multipeto em 2,83 ppm, indicando a possibilidade de estar ligado a um carbono quaternário. Já o multipeto em 2,83 ppm correlacionou-se com o sinal característico de hidrogênio olefínico, com integração para um hidrogênio, em 5,70 ppm (dd, $J = 10$ e 16 Hz). O hidrogênio em 5,70 ppm correlacionou-se com o duplo duplo dubleto em 5,34 ppm (ddd, $J = 5,6; 10,4$ e 16 Hz) e, a geometria da dupla ligação, através do valor da constante de acoplamento, de 16 Hz, foi determinada como E. Com base no

COSY o sinal em 5,34 ppm indicou acoplamento com os hidrogênios em 2,02 ppm e 2,51 ppm, ambos multipletos integrando para um hidrogênio, os quais pelo HSQC (Figura 4.7.7) estão ligados ao carbono em 37,8 ppm.

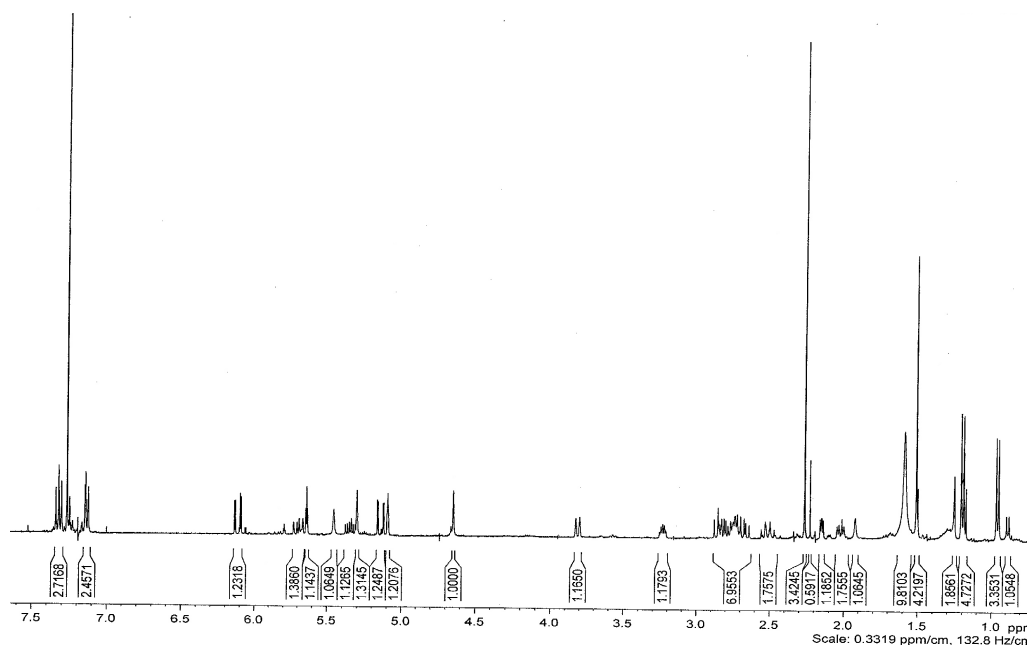


Figura 4.7.5. Espectro de ^1H RMN em 400MHz de PNICL5B1 em CDCl_3

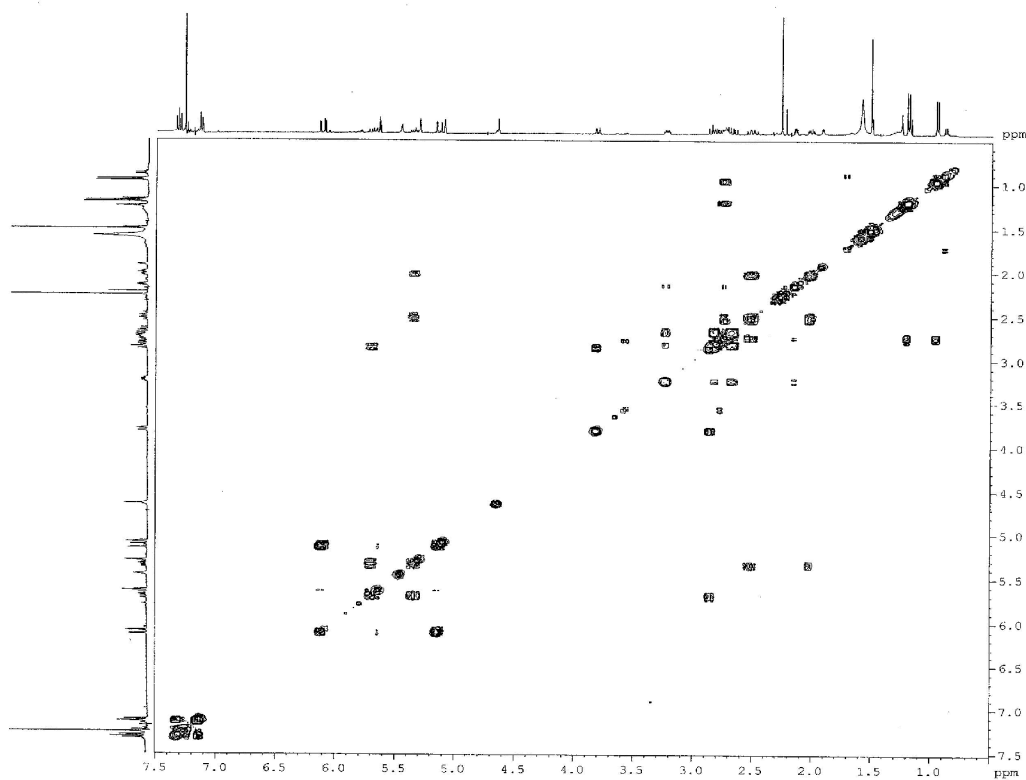


Figura 4.7.6. Espectro de COSY de PNICL5B1 em CDCl_3

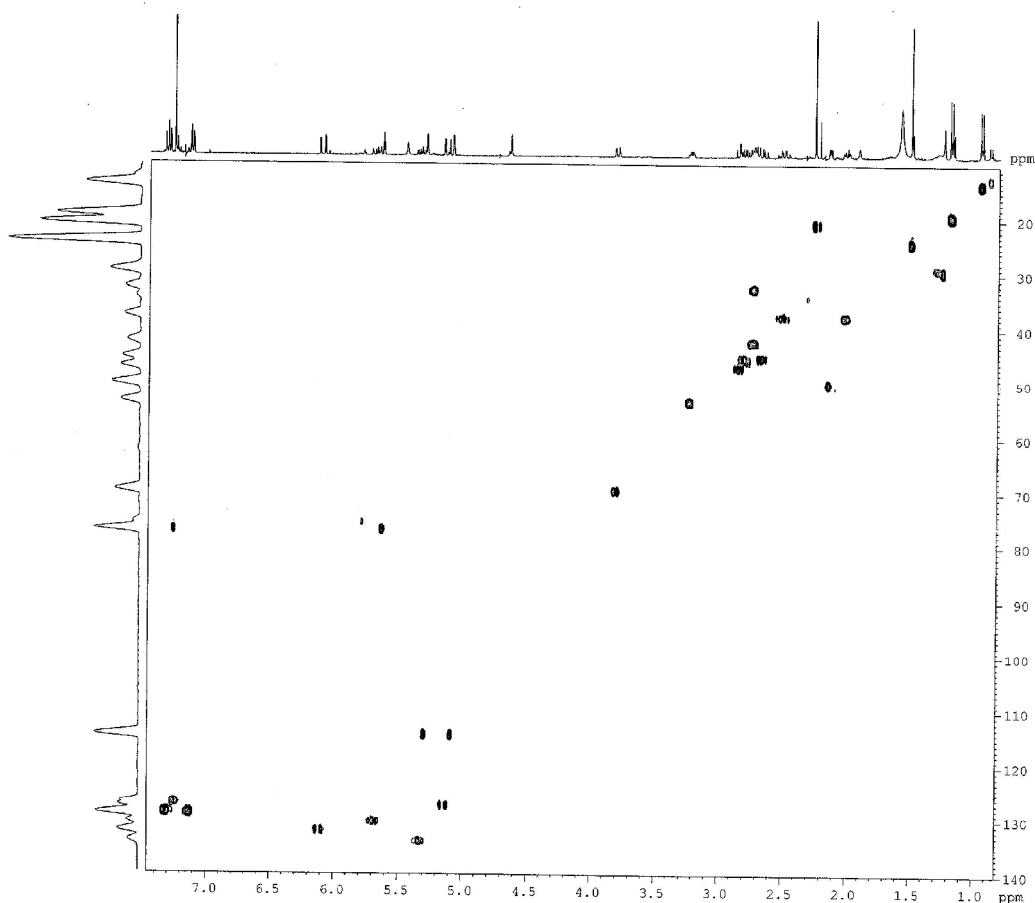


Figura 4.7.7. Espectro de HSQC de PNICL5B1 em CDCl_3

No HMBC (Figura 4.7.8) foi observado o acoplamento do multipeto em 2,75 ppm com o carbono sp^2 em 130,9 ppm e pelo COSY foi verificada a correlação com o hidrogênio em 2,51 ppm e com a metila em 1,20 ppm (d, $J=6,8$ Hz). Pelo HMBC, foi possível notar os acoplamentos da metila com um carbono com deslocamento químico característico de carbonila de cetona, em 210,2 ppm e, também com o carbono quaternário em 19,5 ppm. Através da comparação com os dados da literatura (FUJI, *et al.*, 2000) e da reunião de todos os dados descritos, sugeriu-se a estrutura parcial representada na Figura 4.7.9.

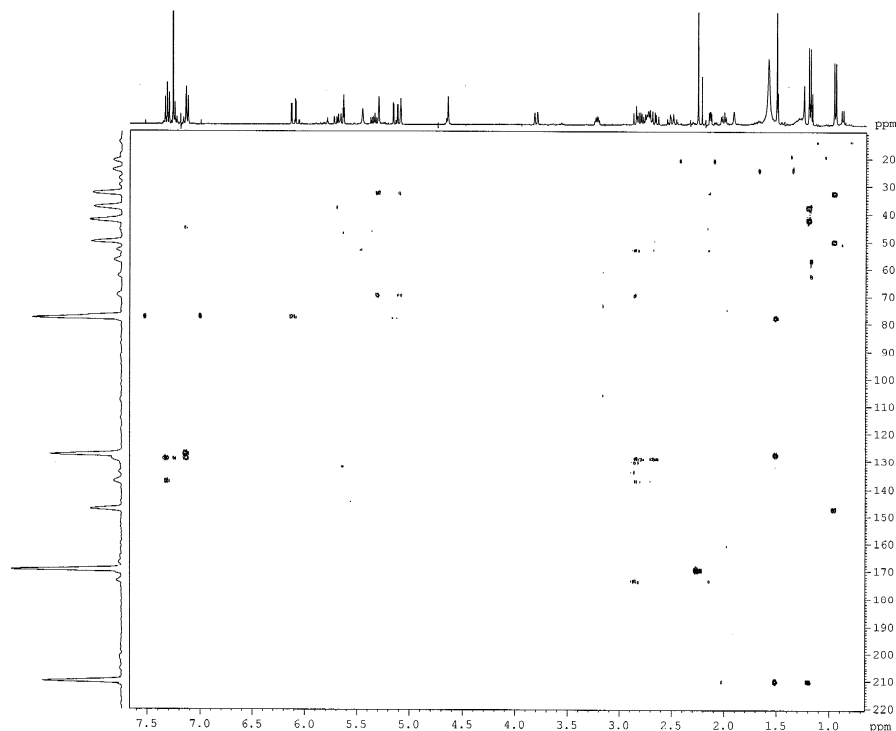


Figura 4.7.8. Espectro de HMBC de PNICL5B1 em CDCl_3

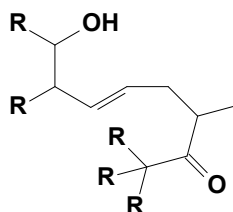


Figura 4.7.9. Estrutura parcial da substância PNICL5B1

O singlete, com integração para três hidrogênios, em 1,51 ppm não apresentou correlação no COSY, indicando, dessa forma, que deve estar ligado a um carbono quaternário. No entanto, por HMBC foi possível observar o acoplamento do carbono deste sinal com o hidrogênio olefínico em 5,14 ppm (dd, $J = 2,4; 15,6$ Hz).

A presença da dupla ligação foi confirmada através do COSY, uma vez que, o dd em 5,14 ppm mostrou correlação com o sinal em 6,11 ppm (dd, $J = 2,8$ e 15,6 Hz) e, pela constante de acoplamento, pode-se inferir que a geometria da dupla

ligação foi E. Pelo HMBC verificou-se o acoplamento do carbono sp^2 ligado ao hidrogênio olefínico em 5,14 ppm com o carbono carbinólico em 77 ppm. Ainda pelo HMBC foi possível notar o acoplamento do hidrogênio carbinólico em 5,64 ppm (dd, $J = 2,4; 2,7$ Hz) com o carbono em 171 ppm, que pelo deslocamento químico deve ser uma carboxila de éster. O singlete (3H) em 2,27 ppm foi relacionado à metila de um grupo acetato.

Outros dois carbonos olefínicos foram observados, sendo um deles carbono quaternário enquanto que o outro, pelo HSQC, apresentou correlações com os hidrogênios em 5,09 ppm (s) e 5,30 ppm (s). Através do HMBC foi possível verificar acoplamentos dos hidrogênios olefínicos com o carbono carbinólico em 70 ppm e com o carbono em 32,9 ppm. Pelo HSQC notou-se o acoplamento do carbono em 32,9 ppm com o multiplete em 2,75 ppm e, com base no COSY este multiplete correlacionou-se com a metila em 0,96 ppm (d, $J=8$ Hz) e com o duplo dubleto em 2,15 ppm (dd, $J=2,8$ e 4,8 Hz). Já o dd em 2,15 ppm, pelo COSY, apresentou também correlação com o multiplete, com integração para um hidrogênio, em 3,23 ppm.

Foi possível observar pelo HMBC e pelo COSY o acoplamento do multiplete em 3,23 ppm com o carbono em 32,9 ppm, com o carbono quaternário em 53,1 ppm e o hidrogênio em 2,69 ppm (m, 1H). A análise do COSY indicou a correlação do multiplete em 2,69 ppm com o sinal em 2,80 ppm (m, 1H), os quais se correlacionam com o carbono em 45,8 ppm (HSQC). Estes no HMBC acoplam com um carbono característico de sistema aromático em 128,8 ppm.

Através da integração verificou-se a presença de cinco hidrogênios aromáticos, constituindo um sistema monossustituído.

Foi possível verificar no HMBC a presença de uma carboxila de amida, a qual mostrou acoplamento com o hidrogênio em 2,86 ppm.

A partir da união das informações descritas e também pelos dados espectrais de RMN da literatura pôde-a atribuir a substância PNICL5B1 como sendo a citocalasina D, apresentada na Figura 4.7.10. A Tabela 4.7.1 ilustra os dados espectroscópicos de RMN da substância PNICL5B1.

Não há relatos na literatura dos dados Ressonância Magnética Nuclear da citocalasina D em clorofórmio deuterado. Por isso, a comparação dos dados espectrais da substância identificada foi realizada com os dados espectroscópicos

da zigosporina D (com grupo OH em C21) e de um derivado da zitocalasina D, com grupo acetato em C7 e C21.

Tabela 4.7.1 Dados espectroscópicos de PNICL5B1

Posição	¹ H (*)	HSQC (*)	COSY	HMBC
1	-	174	-	-
2	5,46 (s, 1H)	-	-	-
3	3,23 (m, 1H)	53	H10a, H4	C5, C4, C9
4	2,15 (dd, 2,8; 4,8 Hz, 1H)	50	H3, H5	C5, C9
5	2,75 (m)	32,9	H4, H11	C9
6	-	147,4	-	-
7	3,81 (d, 10,4 Hz, 1H)	70	H8	n.d.
8	2,86 (m)	46	H7, H13	C1, C14, C21
9	-	53,1	-	-
10a	2,69 (m, 1H)	45,8	H10a/b, H3	C3', C5
10b	2,80 (m, 1H)			C3', C5'
11	0,96 (d, 6,8 Hz, 3H)	13,9	H5	C4, C5, C6
12a	5,09 (s, 1H)	114,5	n.d.	C5, C7
12b	5,30 (s, 1H)		n.d.	C5, C7
13	5,70 (dd, 10; 16 Hz, 1H)	130,9	H14, H8	C15
14	5,34 (ddd, 5,6; 10,4; 16 Hz, 1H)	134,2	H13, H15a/b	C8
15a	2,51 (m, 1H)	37,8	H15b, H16	C13, C21, C22
15b	2,02 (m, 1H)		H15a	-
16	2,75 (m, 1H)	42,3	H22, H15a	
17	-	210,2	-	-
18	-	78	-	-
19	5,14 (dd, 2,4; 15,6 Hz, 1H)	127,6	H20, H23	C21
20	6,11 (dd, 2,8; 15,6 Hz, 1H)	132,5	H19, H21	C18
21	5,64 (dd, 2,4; 2,8 Hz, 1H)	77	H19, H20	C15, 21-OAc
22	1,20 (d, 6,8 Hz, 1H)	19,5	H16	C15, C16, C17, C18
23	1,51 (s, 3H)	24,5	-	C17, C19
21 OC	-	170	-	-
21-OAc	2,27 (s, 3H)	21,8	n.d.	21OC, C18
1'	-	140	-	C2'
2' e 6'	7,31 (m, 2H)	128,5	H3', H4, H5'	C1'
3' e 5'	7,13 (dd, 1,6; 6,8 Hz, 2H)	128,8	H2', H4', H6'	C2', C4'
4'	7,24 (m, 1H)	126		C3'

* deslocamento químico em ppm

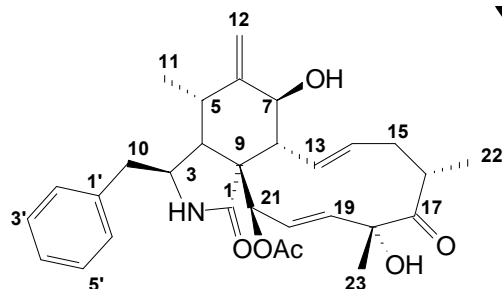


Figura 4.7.10. Estrutura molecular da citocalasina D

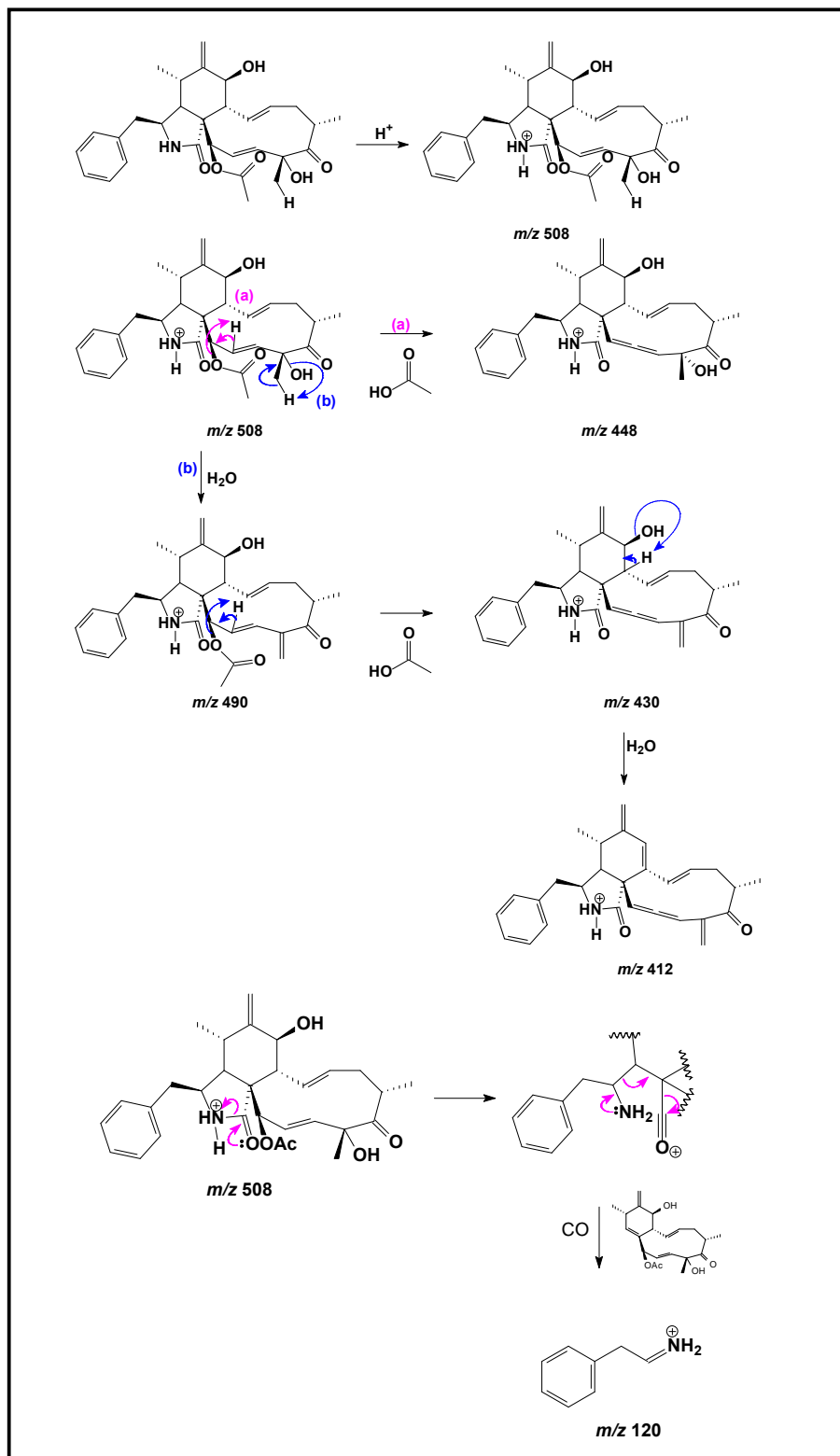
Para a confirmação da estrutura proposta foram realizados experimentos de Espectrometria de Massas no modo *full scan* para a determinação da massa molecular, e íons produtos para informação estrutural.

Conforme visto na Figura 4.7.2A, a substância PNICL5B1 ($t_r = 12,80$ min) apresentou como pico base o íon molecular protonado ($[M+H]^+$) com m/z 508, o qual foi confirmado pela presença do aduto de sódio, $[M+Na]^+$, com m/z 530, dessa forma, o composto deve apresentar massa molecular de 507 Da.

O espectro de íons produtos obtido com energia de colisão de 20 eV ilustrado na Figura 4.7.3A apresentou pico base o íon de m/z 430. O Esquema 4.7.1 mostra uma proposta de fragmentação que justifica a maioria dos íons observados.

A proposta de fragmentação para a citocalasina D, no modo positivo de ionização, baseou-se na protonação do nitrogênio da amida. Em seguida, ocorreu uma desidratação levando ao íon de m/z 490. O pico base do espectro de íons produtos foi formado pela perda de ácido acético.

As citocalasinas são substâncias de origem biossintética mista, a qual envolve um aminoácido e uma cadeia policetílica. O íon de m/z 120 caracteriza as citocalasinas provenientes do aminoácido fenilalanina. A formação desse íon, segundo o Esquema 4.7.1, envolve a abertura do anel de cinco membros assistida pelo par de elétrons não ligante do oxigênio da carboxila e conseqüente estabilização da carga positiva no átomo de nitrogênio. Em seguida, através da conjugação do par de elétrons não ligante do nitrogênio ocorreram as perdas simultâneas de uma molécula de CO e da porção policetílica, levando ao íon de m/z 120.



Esquema 4.7.1 Proposta de fragmentação da Citocalasina D

4.7.1.2 Identificação estrutural de PNICL5B2 e PNICL5B3

Como dito no item 4.7.1 a fração PNICL5B apresentou, no experimento de CLAE/EM, três bandas cromatográficas, as quais possuíam o íon molecular protonado de m/z 508 e espectros de íons produtos praticamente idênticos, indicando a presença de isômeros. Um desses isômeros foi identificado como sendo a citocalasina D.

Através de pesquisa bibliográfica na base de dados Science Finder, foi possível verificar que somente as citocalasinas C e Q são isômeros da citocalasina D. Conforme mostrado na Figura 4.7.11, estas apresentam uma grande similaridade estrutural, sendo que a diferença entre elas reside nas posições 5, 6 e 7. A Citocalasina C apresenta uma dupla ligação entre C5 e C6 enquanto a citocalasina D apresenta dupla ligação entre C6 e C12. Já a citocalasina Q possui um epóxido entre C6 e C7.

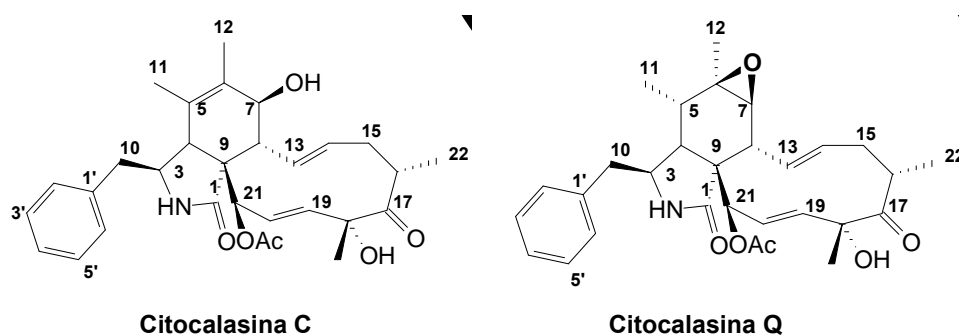


Figura 4.7.11 Estruturas químicas das citocalasinas C e Q

As análises dos espectros de ^1H RMN da fração PNICL5B2 e PNICL5B3 (Figuras 4.7.12 e 4.7.13) mostraram uma grande complexidade de sinais, indicando a presença de mistura. No espectro de ^1H RMN de PNICL5B2 foi possível notar além dos sinais da Citocalasina D, um singlete em 1,25 ppm, com deslocamento químico característico de metila. Este singlete forneceu indícios da presença da Citocalasina C, pois esta possui uma metila ligada a C6. Já o espectro de HSQC (Figura 4.7.14) de PNICL5B3 mostrou correlação do hidrogênio H7 com o carbono com deslocamento químico característico de epóxido em 60 ppm.

Com base nos dados experimentais observados anteriormente, os experimentos de Espectrometria de Massas e a busca bibliográfica realizada, pôde-

se inferir que as frações PNICL5B2 e PNICL5B3 correspondem às citocalasinas C e Q, respectivamente.

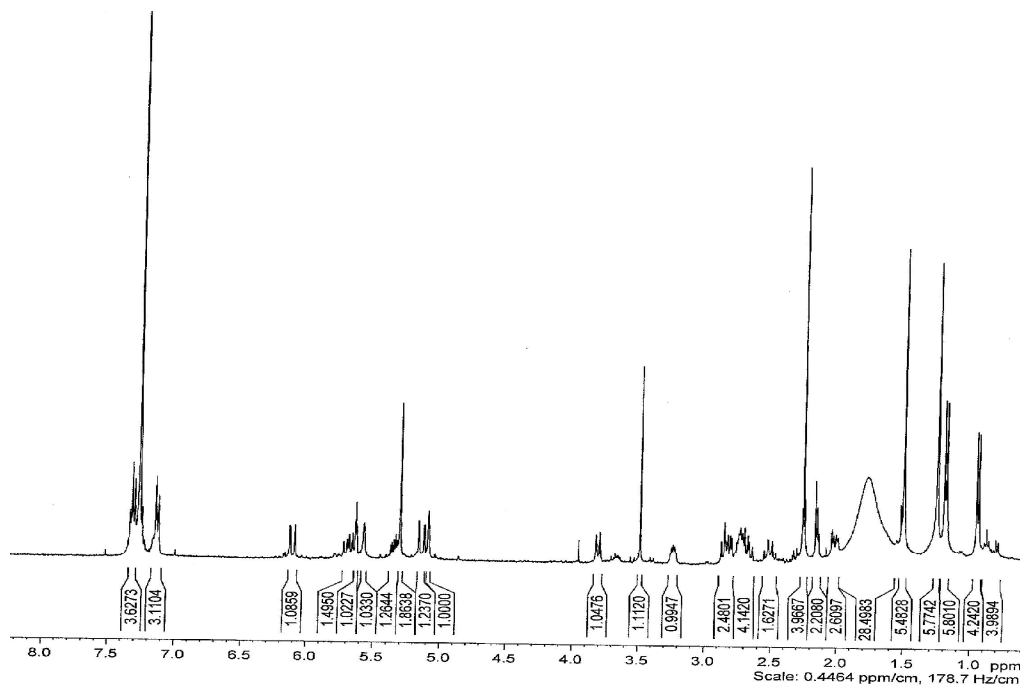


Figura 4.7.12. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (400 MHz) da fração PNICL5B2

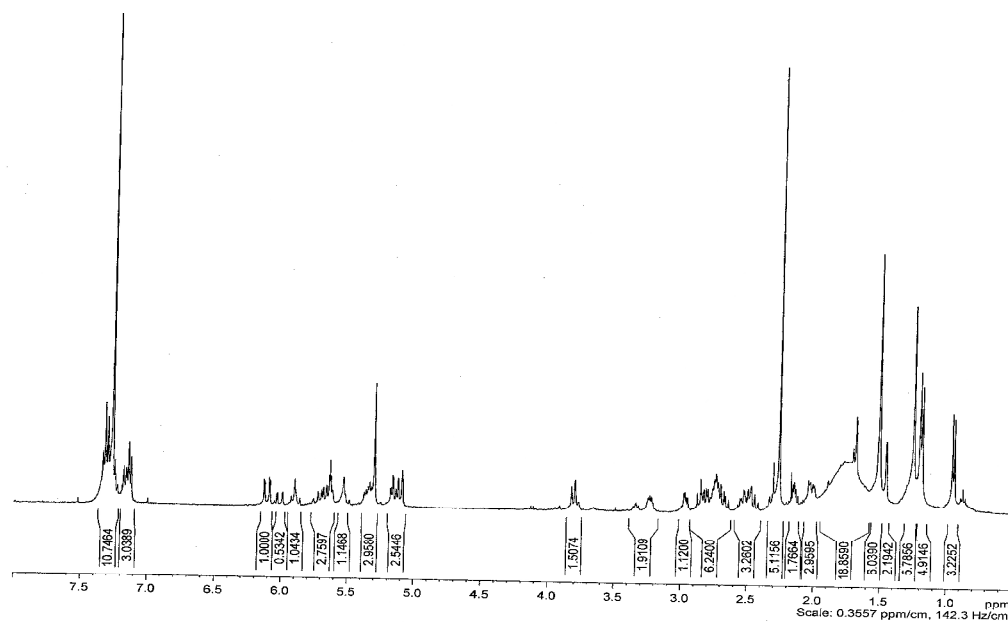


Figura 4.7.13. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (400 MHz) da fração PNICL5B3

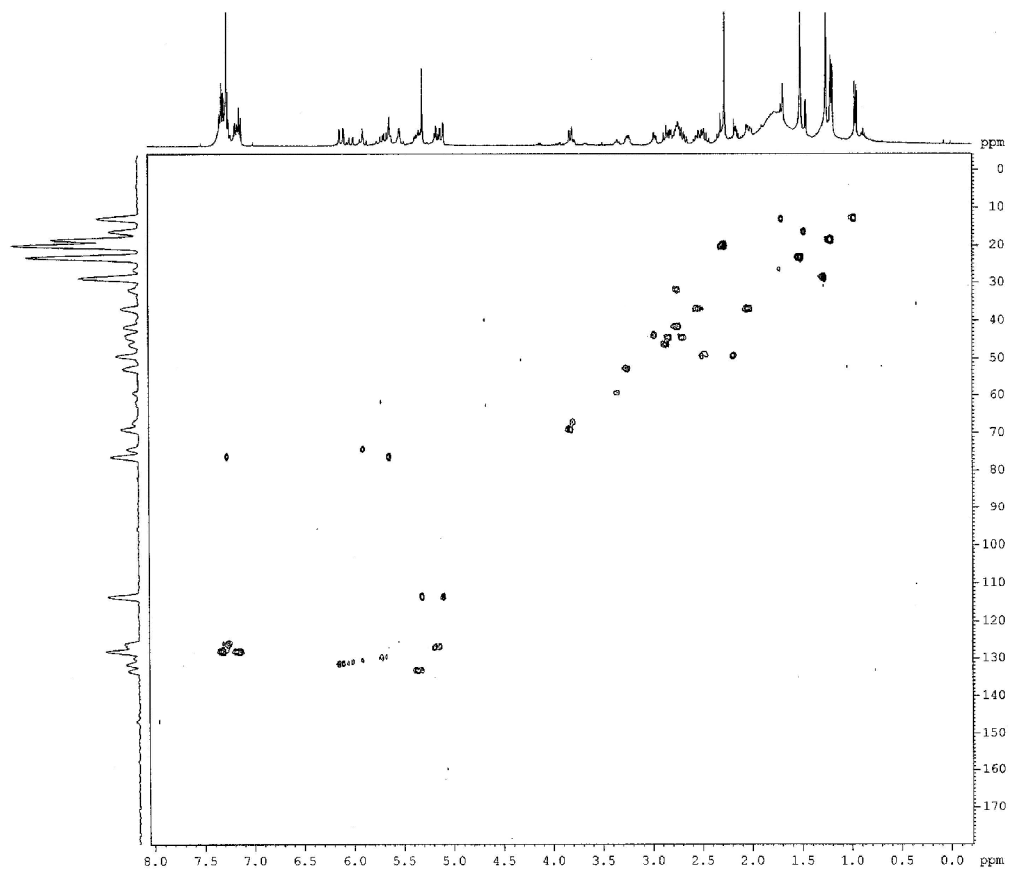


Figura 4.7.14. Espectro de HSQC de PNICL5B3

4.7.2 Identificação estrutural da fração MNICL5B16

A fração MNICL5B16 de massa 3,2 mg apresentou cristais brancos que foram analisados por ^1H RMN em clorofórmio deuterado.

A Figura 4.7.15 representa o espectro de ^1H RMN da substância isolada, na qual se observou um multiplete com deslocamento químico de hidrogênio carbinólico em 3,66 ppm, e três sinais característicos de hidrogênios olefínicos entre 5,7 e 5,2 ppm. Pela integração pôde-se verificar a presença de 6 metilas. Estes sinais caracterizam uma substância com esqueleto esteroidal.

O esteróide mais frequentemente isolado de fungos, é o Ergosterol e, para se confirmar que MNICL5B16 era o referido esteróide, realizou-se CCD de ponto misto. Foi aplicado o padrão de Ergosterol juntamente com a substância a ser identificada em um mesmo ponto da placa. Verificou-se que ambos apresentavam o

mesmo fator de retenção, o que caracterizou a substância MNICL5B16 como o Ergosterol. A Figura 4.7.16 apresenta a estrutura molecular do ergosterol.

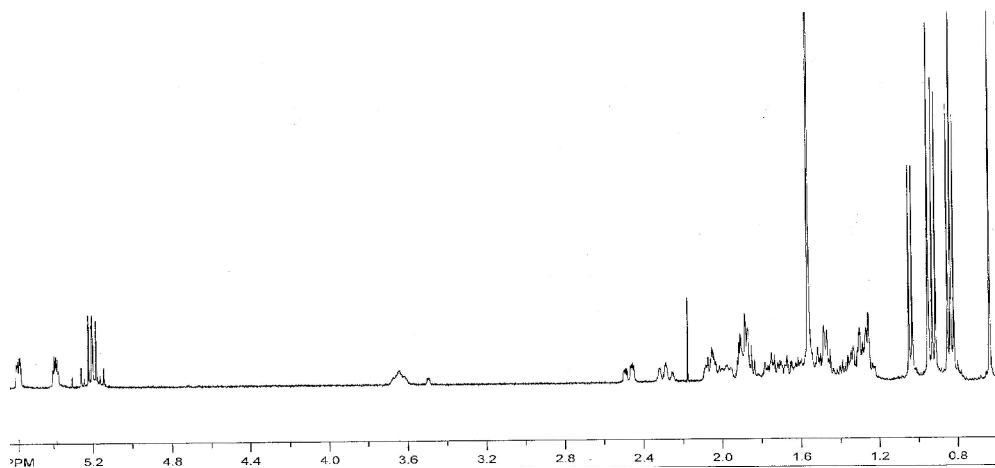


Figura 4.7.15. Espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (400 MHz) de MNICL5B16

Os sinais que caracterizam o Ergosterol são os multipletos em 5,57 ppm e 5,38 ppm atribuídos aos hidrogênios olefínicos H6 e H7, além dos sinais dos hidrogênios da dupla ligação da cadeia lateral, H22 e H23 em 5,2 ppm, do hidrogênio carbinólico em 3,66 ppm (m) atribuído a H7. Já os sinais das metilas encontram-se na região mais desblindada do espectro. As metilas 18 e 19 são caracterizadas pelos singletos em 0,63 ppm (s, 3H) e 0,95 ppm s, 3H). Os dubletos em 1,02 ppm (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,92 ppm (d, 6,8 Hz, 3H), 0,85 ppm (d, $J = 3,0$ Hz, 3H) e 0,82 ppm (d, $J = 3,0$ Hz, 3H) foram atribuídos aos hidrogênios H21, H26, H27 e H28.

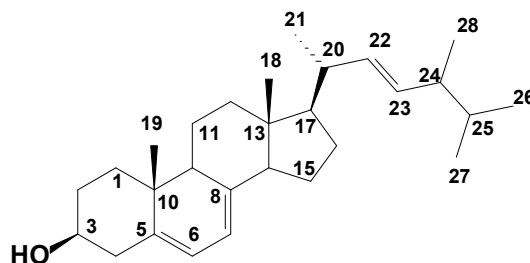


Figura 4.7.16. Estrutura molecular do ergosterol

4.7.3 Identificação estrutural da fração MNICL5F'

A substância MNICL5F' apresentou grandes cristais incolores, de alta polaridade, sendo solúveis somente em água. Esta substância foi analisada por ^1H RMN e ^{13}C RMN, e baseados nos dados espectroscópicos pôde-se identificá-la com o poliol sorbitol. A Figura 4.7.17 representa o espectro de ^1H RMN da substância isolada.

Observou-se no espectro de ^1H RMN sinais característicos do sorbitol (Figura 4.7.19) os multipletos na região entre 3.68 ppm e 3.90 ppm são atribuídos aos hidrogênios carbinólicos. Já o espectro de ^{13}C RMN (Figura 4.7.18) apresentou somente três sinais de carbonos em 63,1; 69,4 e 71 ppm, referentes aos carbonos carbinólicos. A existência de apenas três sinais de ^{13}C decorre da existência de um centro de simetria.

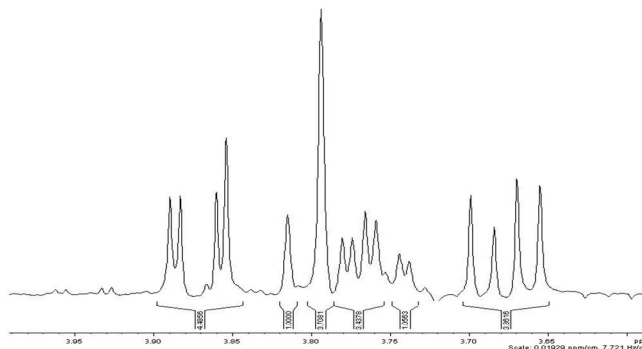


Figura 4.7.17. Espectro de ^1H RMN de MNICL5F' (D_2O) em 400 MHz

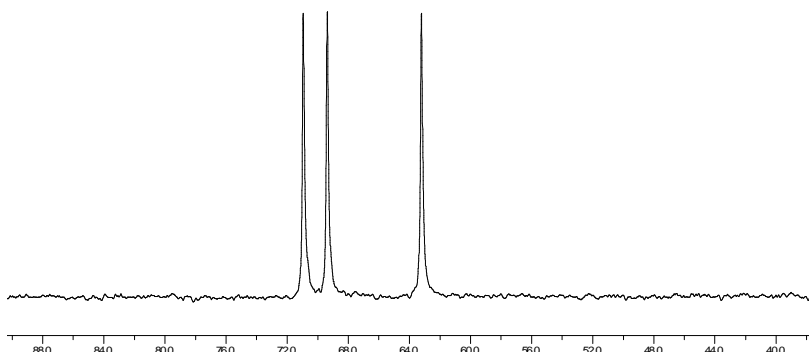


Figura 4.7.18. Espectro de ^{13}C RMN de MNICL5F' (D_2O) em 200 MHz

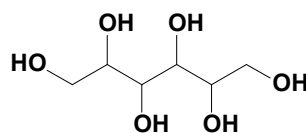


Figura 4.7.19. Estrutura química do sorbitol

4.8 Comparação do perfil metabólico de N1CL5 em diferentes meios de cultura

Desde a descoberta das citocalasinas na década de 70, verificou-se um crescimento extraordinário no estudo desta classe de substâncias, pois elas se tornaram um potente instrumento na biologia molecular e na medicina, devido ao grande número de atividades biológicas que lhes são pertinentes (SCHÜMANN e HERTWECK, 2007, EVIDENTE *et al.*, 2003). Podem-se enumerar as atividades: no transporte de glicose, na secreção dos hormônios da paratireóide, imunossupressora, inibição da polimerização da actina, antibiótica, antiviral, antifúngica, herbicida (PRASAIN *et al.*, 2002, OVERY *et al.*, 2003, MATESIC *et al.*, 2006, MILLS *et al.*, 2000, FOISSNER *et al.*, 2007). Algumas citocalasinas são conhecidas pela intrínseca capacidade de interromper o crescimento celular, sendo, por tanto, uma poderosa ferramenta contra o desenvolvimento de tumores (VEDERAS, *et al.*, 1975, YWANAMOTO, *et al.*, LIU, *et al.*, 2006, SCHÜMANN e HERTWECK, 2007).

Nesse contexto a compreensão da química de microrganismos e a otimização da produção de metabólitos secundários se mostram mais uma vez indispensáveis. No sentido de contribuir para o entendimento da química de microrganismos e a conseqüente produção de metabólitos secundários, avaliou-se, por CLAE/UV, a produção da Citocalasina D em diferentes meios de cultura, como arroz, milho de canjica, Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, extrato de soja e BD.

Após o inóculo do microrganismo N1CL5 acompanhou-se, dia a dia, o crescimento fúngico. O microrganismo apresentou um bom crescimento da massa micelial em todos os meios de cultivo destacando-se o meio BD, pois houve o crescimento de corpos de frutificação, como pode ser visto na Figura 4.8.1.

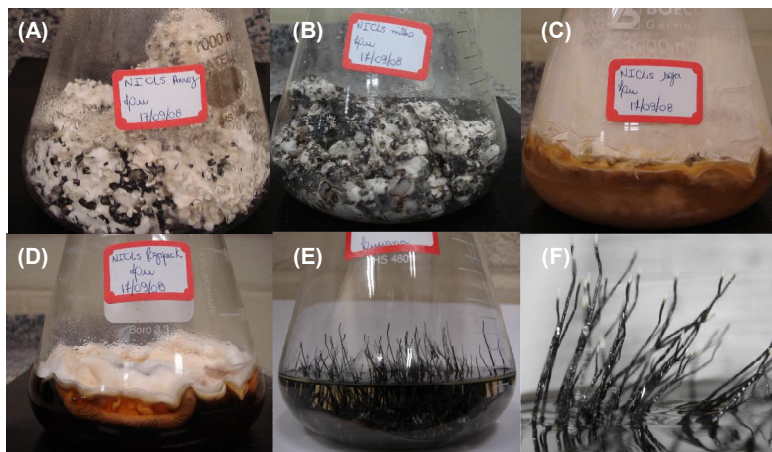


Figura 4.8.1. Crescimento do fungo endofítico NICK5 em diferentes meios de cultura: (A) Arroz, (B) Milho, (C) Extrato de Soja, (D) Czapeck + 2% extrato de levedura, (E) BD e (F) corpos de frutificação produzidos no meio BD

Inicialmente foi estudado o perfil cromatográfico da Citocalasina D e, em seguida, compararam-se os perfis cromatográficos dos extratos com a substância de interesse. Através da Figura 4.8.2A pôde-se verificar que a Citocalasina D apresentou tempo de retenção de 22,26 min e, o espectro de absorção no ultravioleta mostrou o máximo de absorção em 221 e 285 nm.

A comparação dos cromatogramas da Citocalasina D e dos extratos obtidos a partir de EtOH dos diferentes meios de cultivo, indicou a presença da desta substância somente nos meios arroz, milho e Czapeck. Embora não se tenha constatado a presença da Citocalasina D nos meios de soja e BD, não se pode afirmar, que o fungo NICK5 não a produziu, uma vez que, em baixíssimas concentrações esta não seria detectada pelo detector de ultravioleta.

Já os extratos obtidos a partir de AcOEt apresentaram o mesmo comportamento dos extratos obtidos com EtOH, ou seja, a detecção da Citocalasina D ocorreu somente nos meios de cultivo arroz, milho e Czapeck enriquecido com extrato de levedura, conforme ilustra a Figura 4.8.3.

Infelizmente não foi possível verificar quantitativamente qual dos meios de cultivo estudados seria o melhor produtor de Citocalasina D. Este fato deverá ser analisado em trabalho posterior.

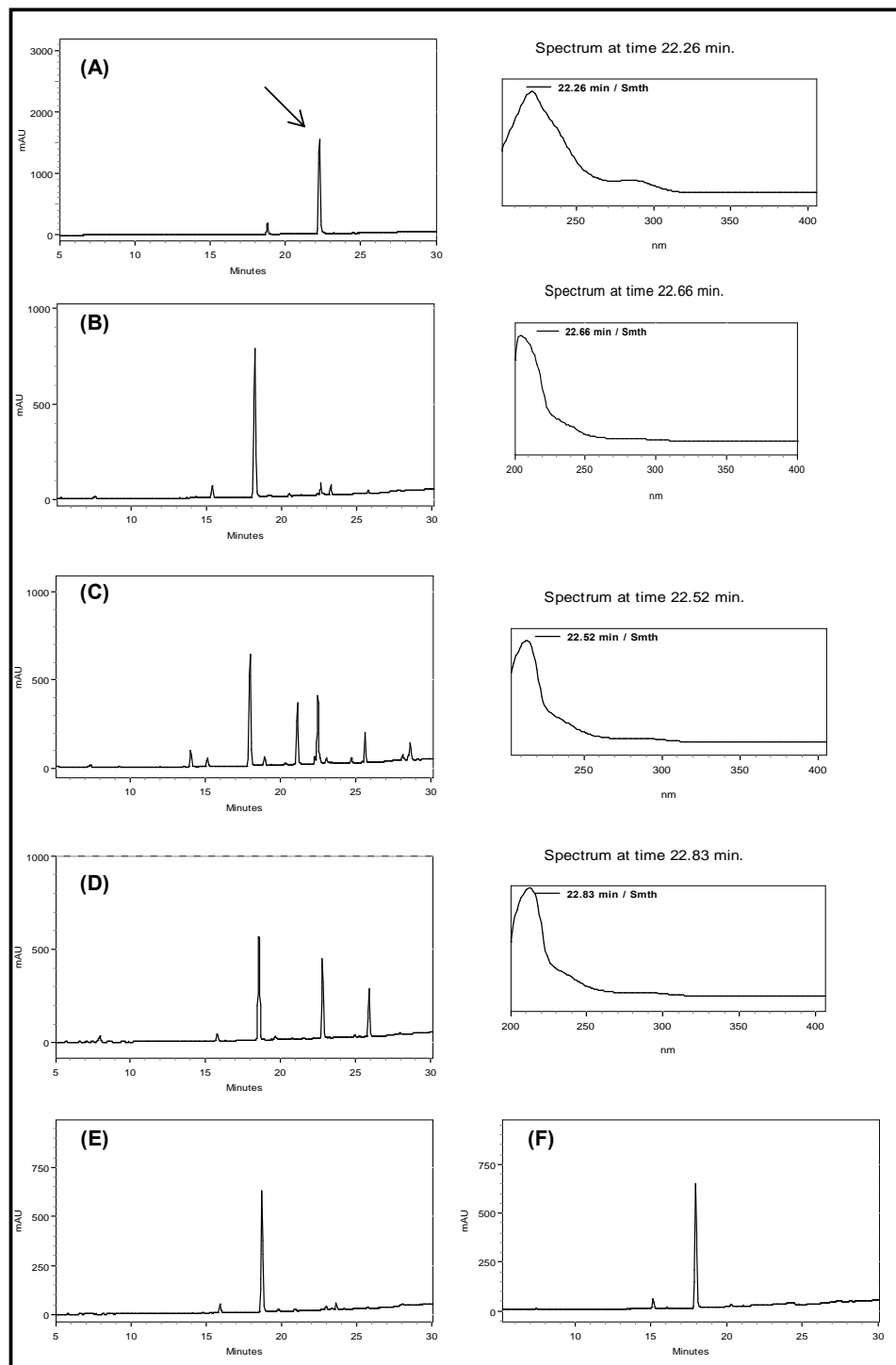


Figura 4.8.2. Perfil da produção de Citocalasina D em diferentes meios de cultura dos extratos obtidos a partir de EtOH (cromatogramas monitorados em $\lambda = 221$ nm): (A) Citocalasina D em 22,26 min, (B) Arroz, (C) Milho, (D) Czapeck + 2% de extrato de levedura, (E) BD e (F) extrato de soja

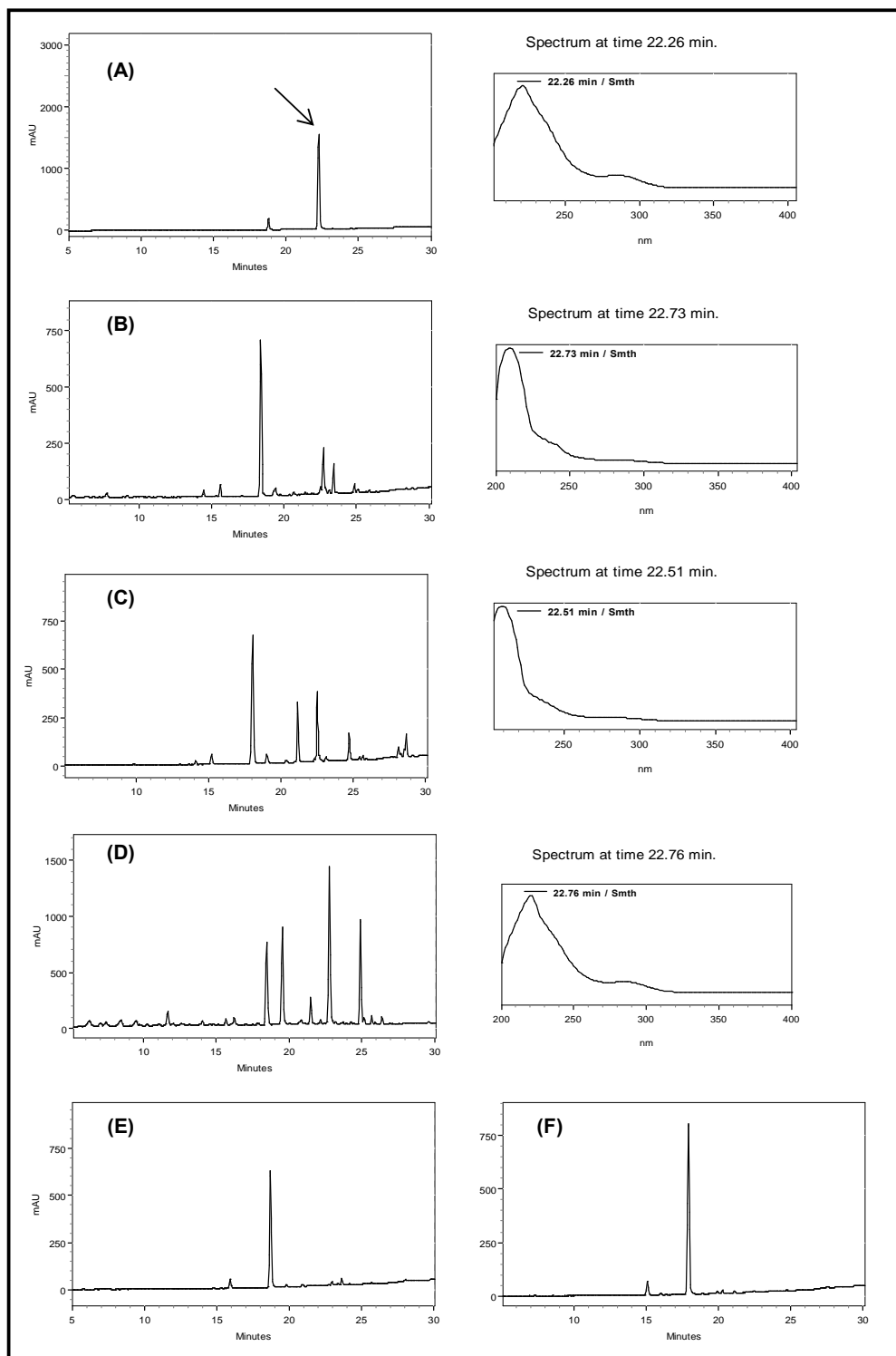


Figura 4.8.3 Perfil da produção de Citocalasina D em diferentes meios de cultura dos extratos obtidos a partir de AcOEt (cromatogramas monitorados em $\lambda = 221$ nm): (A) Citocalasina D em 22,26 min, (B) Arroz, (C) Milho, (D) Czapeck + 2% extrato de levedura, (E) BD e (F) Extrato de Soja

4.9 Efeito da adição de aminoácidos no metabolismo do fungo N1CL5

As citocalasinas são substâncias de origem biossintética mista, a qual envolve uma unidade de aminoácido (fenilalanina, ou triptofano, ou leucina) e uma cadeia policetídica. As substâncias provenientes do aminoácido fenilalanina são denominadas citocalasinas e zigosporinas, já aquelas que envolvem o aminoácido triptofano são conhecidas como citocalasinas e caetoglobosinas e as oriundas do aminoácido leucina são as aspocalasinas. A Figura 4.9.1 ilustra algumas citocalasinas de origem biossintética diferentes.

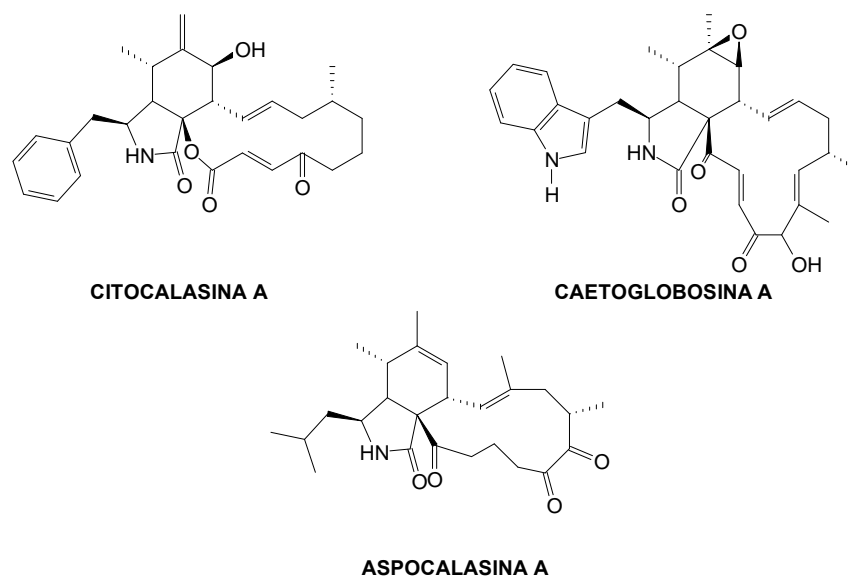


Figura 4.9.1. Citocalasinas provenientes dos aminoácidos fenilalanina, triptofano e leucina, respectivamente

Como já mencionado neste trabalho, a composição do meio de cultura afeta diretamente a produção de metabólitos secundários. Poucos estudos relatam o efeito da adição de aminoácidos livres ao meio de cultura. No entanto, FILL (2007) verificou a indução da biossíntese de metabólitos secundários através da suplementação de aminoácidos ao meio de cultivo. De acordo com GRAF *et al.*, e VEDERAS *et al.* (1974, 1975, 1976, respectivamente) as citocalasinas (Citocalasinas D, C e Q), isoladas nesse trabalho, possuem origem biossintética baseada no aminoácido fenilalanina.

O primeiro experimento envolvendo o microrganismo N1CL5 e a conseqüente produção de citocalasinas consistiu no cultivo do fungo em meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura. Com base em informações do fabricante desse suplemento, constatou-se que, este é composto basicamente por aminoácidos, inclusive os aminoácidos precursores das citocalasinas.

Com a finalidade de se investigar o comportamento do metabolismo do microrganismo frente à adição de aminoácidos, foi realizado um estudo empregando o meio Czapeck como base e variando-se o aminoácido. Dessa forma, o fungo foi cultivado em seis diferentes meios de cultura, os quais foram:

- Czapeck;
- Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura;
- Czapeck com alanina;
- Czapeck com fenilalanina;
- Czapeck com tirosina;
- Czapeck com triptofano.

O primeiro resultado desse estudo foi o intrigante desenvolvimento do microrganismo, pois, somente no meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura o microrganismo apresentou um bom crescimento micelial. Nos demais meios o desenvolvimento da massa fúngica foi muito restrito, conforme pode ser visualizado na Figura 4.9.2.

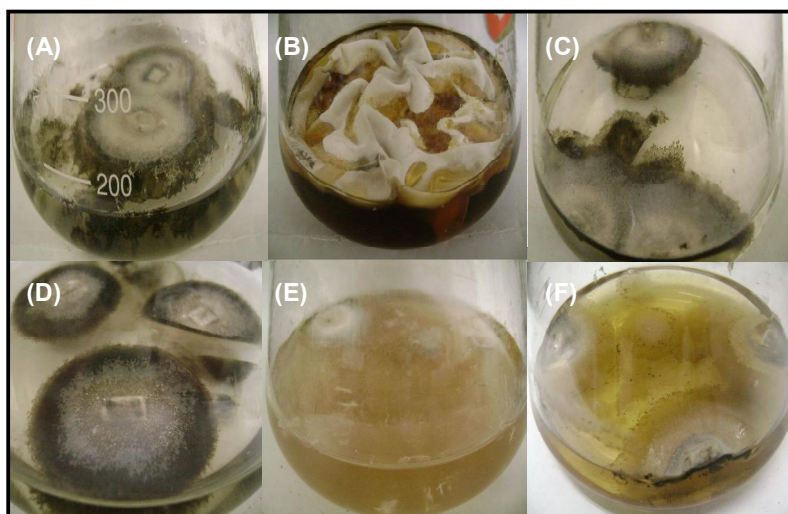


Figura 4.9.2. Crescimento do fungo N1CL5 em diferentes meios de cultivo: (A) Czapeck, (B) Czapeck com 2% de extrato de levedura, (C) Czapeck com alanina, (D) Czapeck com fenilalanina, (E) Czapeck com tirosina e (F) Czapeck com triptofano

Após 20 dias de cultivo foram obtidos os extratos, os quais foram analisados por CLAE/EM. Surpreendentemente, a análise dos cromatogramas de íons totais apresentou uma série de bandas cromatográficas em todos os extratos provenientes dos diferentes meios de cultura, como pode ser observado na Figura 4.9.3.

O extrato obtido a partir do meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura foi considerado como experimento padrão, dado que foi através dele que as Citocalasinas C, D e Q foram isoladas.

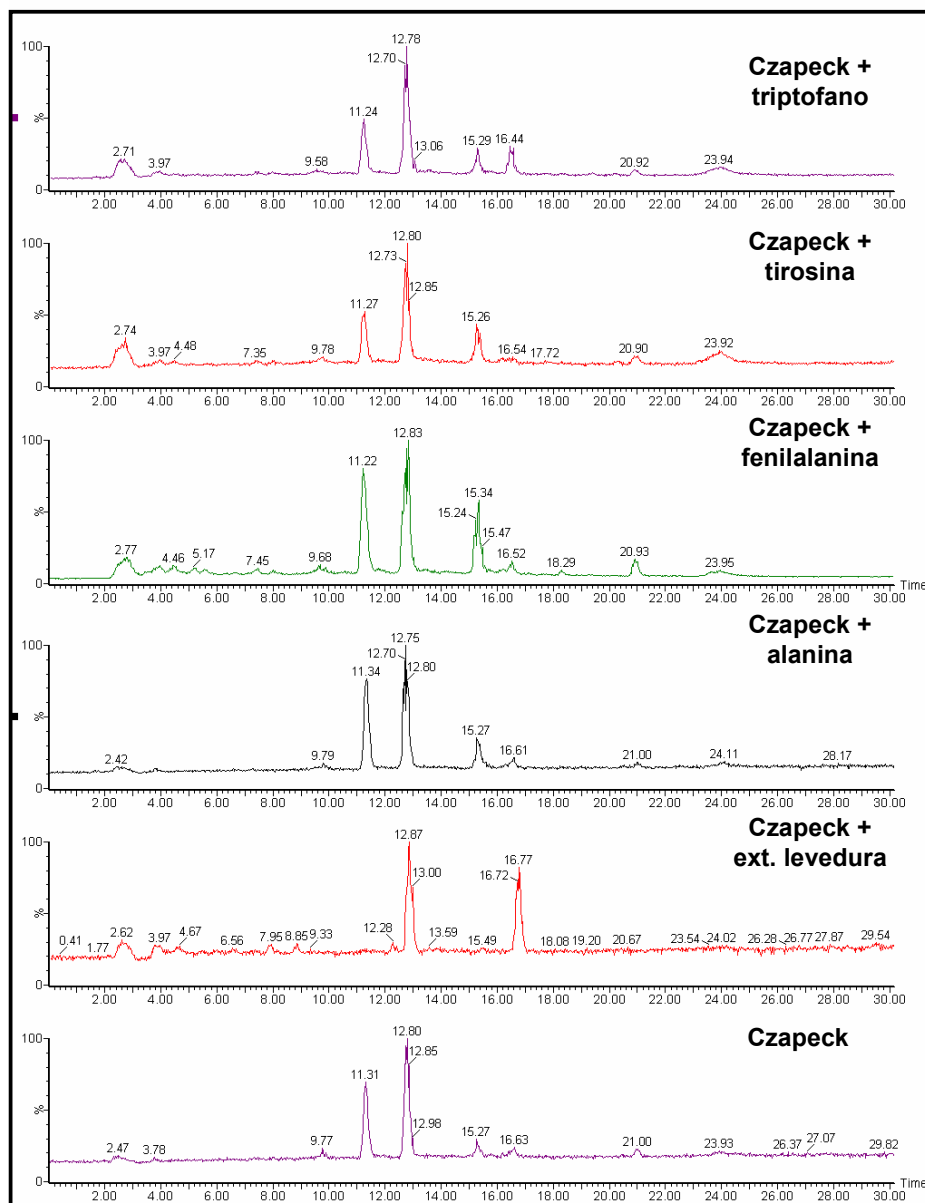


Figura 4.9.3. Cromatograma de íons totais dos extratos provenientes dos diversos meios de cultura

Primeiramente foi analisada a capacidade de o microrganismo produzir as Citocalasinas de m/z 508 (Citocalasinas C, D, E) nos meios de cultura estudados. Através do cromatograma de íons selecionados a m/z 508, Figura 4.9.4, pôde-se constatar a produção da Citocalasina D ($t_r = 12,83$ min) em todos os extratos. O mesmo não foi observado para a Citocalasina com tempo de retenção em 16,73 min no extrato suplementado com o aminoácido tirosina, indicando uma provável inibição da biossíntese desta substância.

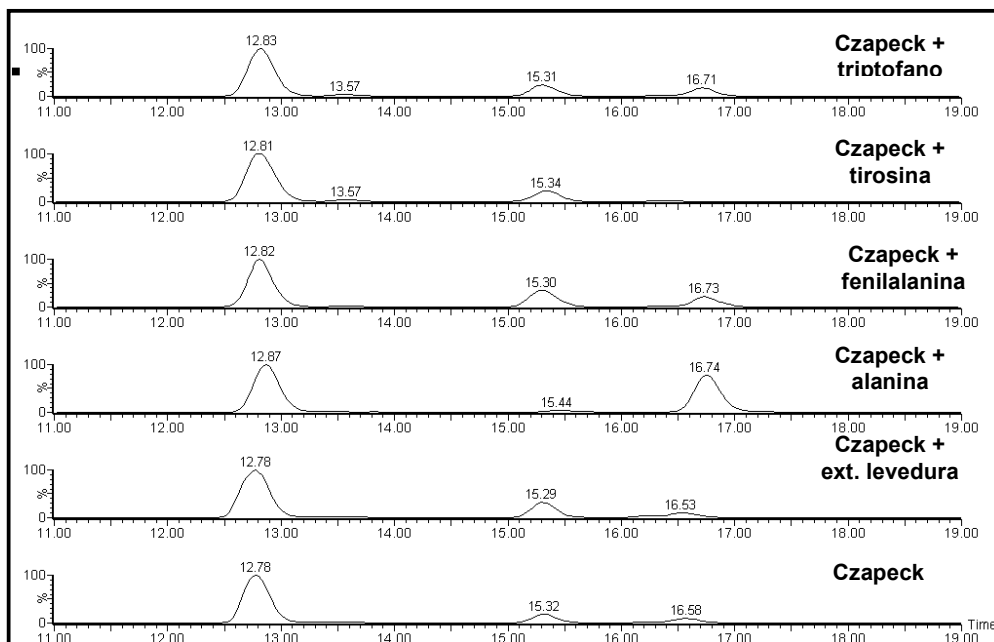


Figura 4.9.4. Cromatograma de íons selecionados a m/z 508

O estudo da fragmentação da Citocalasina D, realizado no item 4.7.1.1 mostrou que a porção referente ao aminoácido fenilalanina possuía íon característico de m/z 120. Aplicando o mesmo raciocínio para as demais citocalasinas provenientes de outros aminoácidos e com base no trabalho de PRASAIN *et al.*, foram monitorados os íons de m/z 44, 86, 120, 150, 185; para verificar se ocorreu a produção de citocalasinas originada da alanina, leucina, fenilalanina, tirosina e triptofano, respectivamente. A Figura 4.9.5 mostra as estruturas dos íons monitorados.

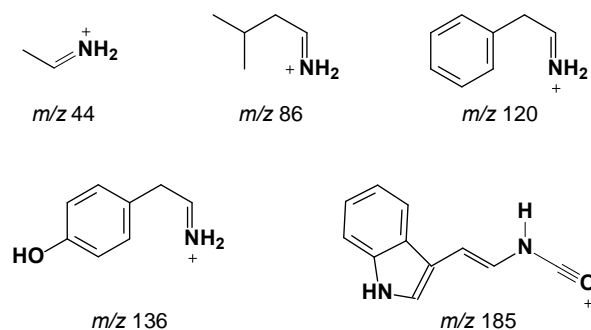


Figura 4.9.5. Estruturas dos íons monitorados no experimento de íons precursores

As citocalasinas isoladas, neste trabalho, foram provenientes do cultivo do microrganismo N1CL5 em meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura. Dessa forma, foi verificado se houve a produção de outras citocalasinas biossintetizadas a partir do aminoácido fenilalanina no referido meio. Para isso, foram processadas, uma a uma, as bandas cromatográficas do TIC (do extrato Czapeck com extrato de levedura) e, através deste monitoramento foram detectadas outras seis substâncias. Estas foram correlacionadas à classe das citocalasinas uma vez que apresentaram o íon de m/z 120 nos respectivos espectros de íons produtos, e confirmadas através do experimento de íons precursores de m/z 120. A Tabela 4.9.1 apresenta informações das substâncias detectadas.

Tabela 4.9.1 Citocalasinas detectadas no meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura

<i>Tempo de retenção (min)</i>	<i>m/z [M+H]⁺</i>	<i>m/z [M+Na]⁺</i>
7,95	482	504
8,84	524	546
9,61	482	504
11,56	466	488
12,20	524	546
13,82	466	488

De acordo com pesquisa realizada na base de dados Science Finder foram encontradas cinco citocalasinas com massa molecular de 465 Da (desacetil Citocalasina C, Citocalasina Z7, Citocalasina Z8, Citocalasina Z9 e Zigosporina D), uma citocalasina de massa molecular 481 Da (desatil 19,20 Citocalasina D) e três com massa molecular 523 Da (19,20 Epoxicitocalasina C, Citocalasina N e Citocalasina R).

Pelo experimento de íons precursores de m/z 120, monitoraram-se, nos demais extratos, a produção das citocalasinas originadas a partir da fenilalanina, conforme representa a Figura 4.9.6. A análise do cromatograma indicou que os meios Czapeck com extrato de levedura e Czapeck com fenilalanina foram os meios mais ricos em citocalasinas, pois houve maior detecção de precursores do íon de m/z 120.

Um fato interessante que merece ser destacado foi a produção de uma substância com tempo de retenção 21,04 minutos, que não havia sido detectada no meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura. Através do espectro de *full scan* (Figura 4.9.7A) constatou-se que o pico base deve ser o íon molecular protonado, $[M+H]^+$, de m/z 492, devido a presença de $[M+Na]^+$ de m/z 514, desse modo, o composto em questão deve apresentar massa molecular de 491 Da. Já no espectro de íons produtos (Figura 4.9.7B), notou-se o fragmento característico da fenilalanina de m/z 120. Pelo experimento de íons precursores ficou confirmado que o fragmento pertence à substância estudada. Esta substância pode ser uma citocalasina inédita, dado que, em pesquisa bibliográfica não se encontrou membros desta classe com a massa molecular observada.

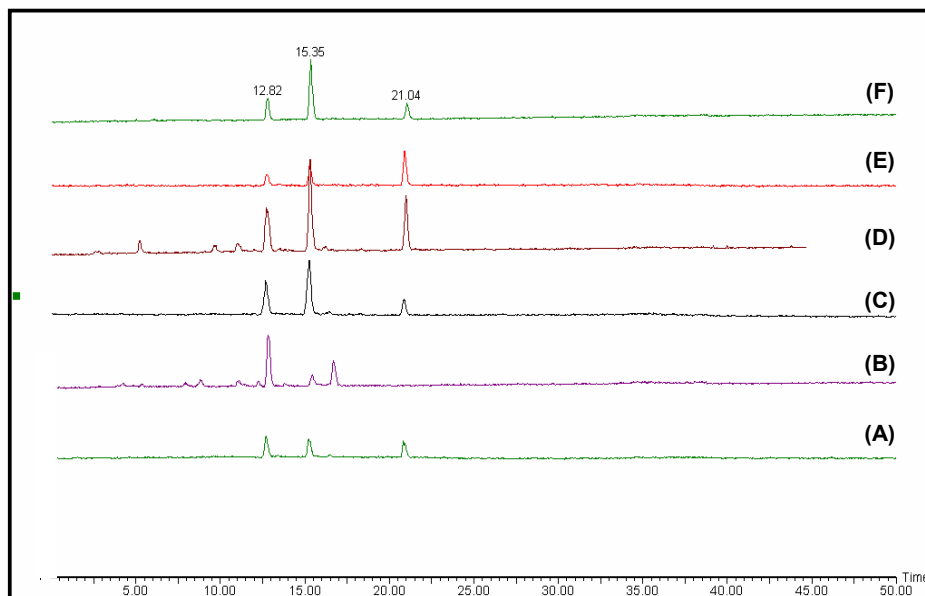


Figura 4.9.6. Cromatograma do experimento de íons precursores de m/z 120 em diferentes meios de cultura: (A) Czapeck, (B) Czapeck com extrato de levedura, (C) Czapeck com alanina, (D) Czapeck com fenilalanina, (E) Czapeck com tirosina e (F) Czapeck com triptofano

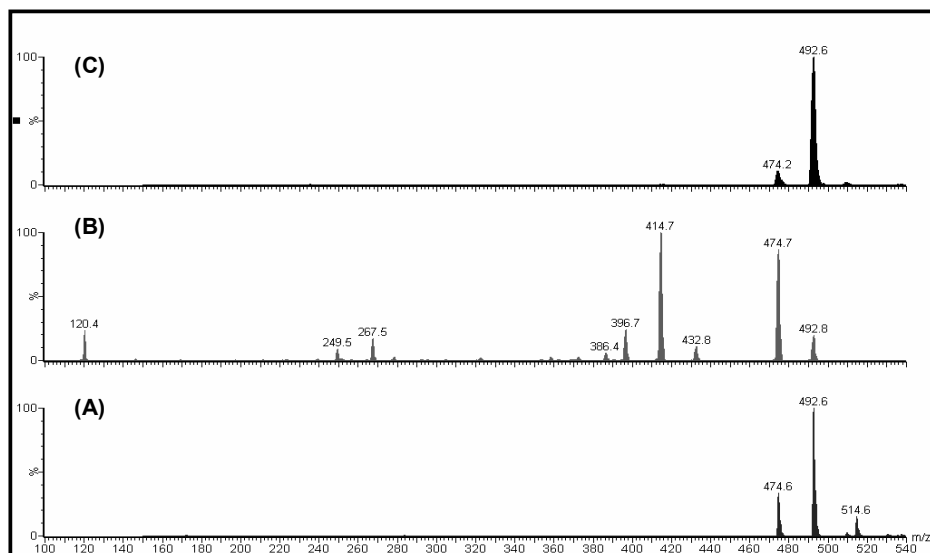


Figura 4.9.7. Espectros de massas da substância em 21,01 min: (A) *full scan*, (B) íons produtos de m/z 492 e (C) íons precursores de m/z 120

Observou-se a possível indução da biossíntese de uma citocalasina formada pelo triptofano, pois, através do experimento de íons precursores de m/z 185, íon característico da porção deste aminoácido, foi constatada uma banda em 27,20 minutos no meio de cultivo Czapeck enriquecido com triptofano, conforme pode ser visto na Figura 4.9.8F.

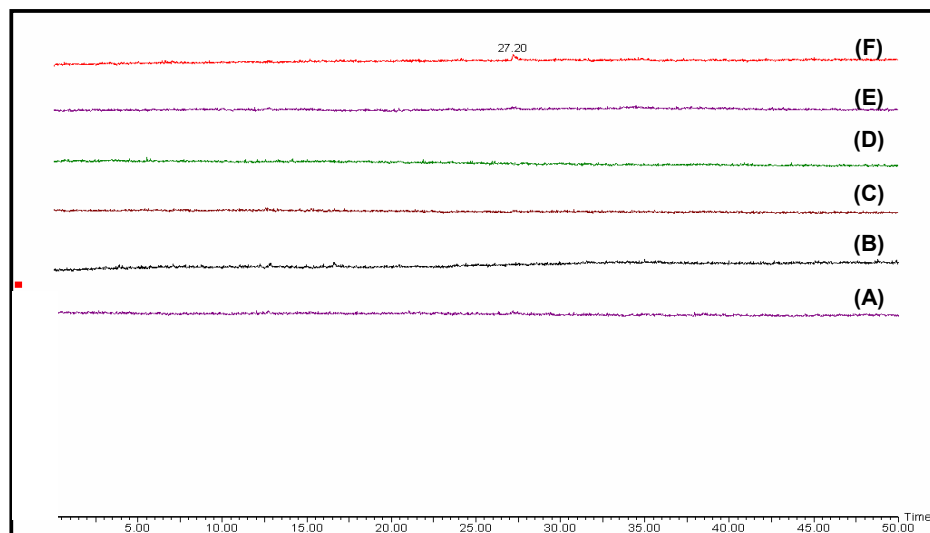


Figura 4.9.8. Cromatograma do experimento de íons precursores de m/z 185 em diferentes meios de cultura: (A) Czapeck, (B) Czapeck com extrato de levedura, (C) Czapeck com alanina, (D) Czapeck com fenilalanina, (E) Czapeck com tirosina e (F) Czapeck com triptofano

O espectro de massas, (Figura 4.9.9A) referente à banda em 27,20 min, apresentou pico base de m/z 403 e, devido à presença dos adutos de sódio e potássio de m/z 425 e 441 respectivamente, pode-se atribuir o pico base como sendo o íon molecular protonado. O espectro de íons produtos de m/z 403 e íons precursores de m/z 185 (Figura 4.9.9B/C) mostraram claramente o íon característico da porção do triptofano nas citocalasinas, indicando a possível incorporação do deste aminoácido.

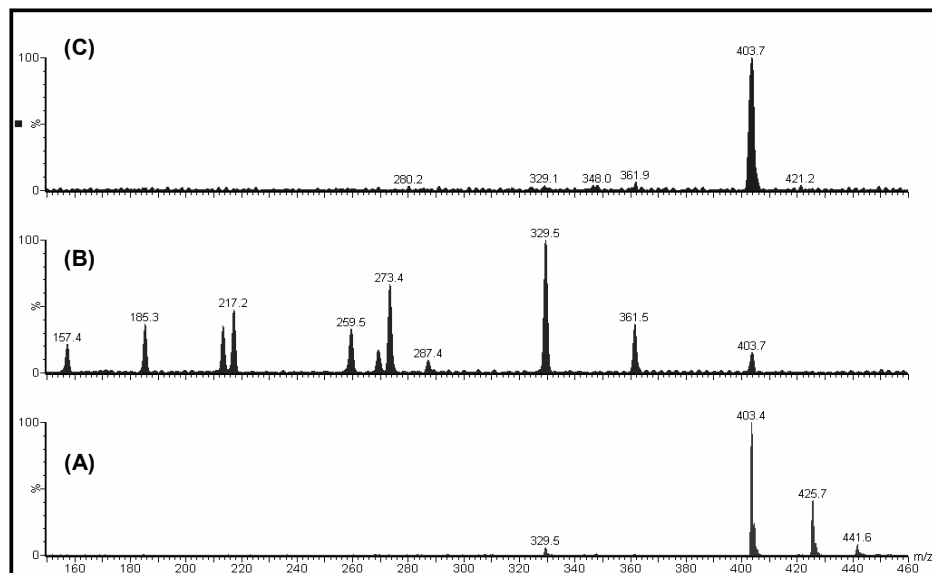


Figura 4.9.9. Espectros de massas da substância em 27,20 min do extrato Czapeck enriquecido com triptofano: (A) *full scan*, (B) íons produtos de m/z 403 e (C) íons precursores de m/z 185

Com exceção do cromatograma de íons totais do extrato proveniente do meio Czapeck enriquecido com extrato de levedura, foi observado, nos demais cromatogramas, a presença de uma banda com tempo de retenção entre 11,22 min, a qual não foi relacionada com a classe da citocalasina, dado que o seu espectro de massas no *full scan* apresentou íon molecular protonado de m/z 256 (FIGURA 4.9.10A), uma relação massa carga muito inferior àquelas observadas para as citocalasinas. Esta observação foi comprovada pelo experimento de íons produtos de m/z 256, pois nenhum dos íons característicos da referida classe foi observado (FIGURA 4.9.10B).

Para os demais extratos não foram observados indícios da incorporação dos aminoácidos alanina, tirosina.

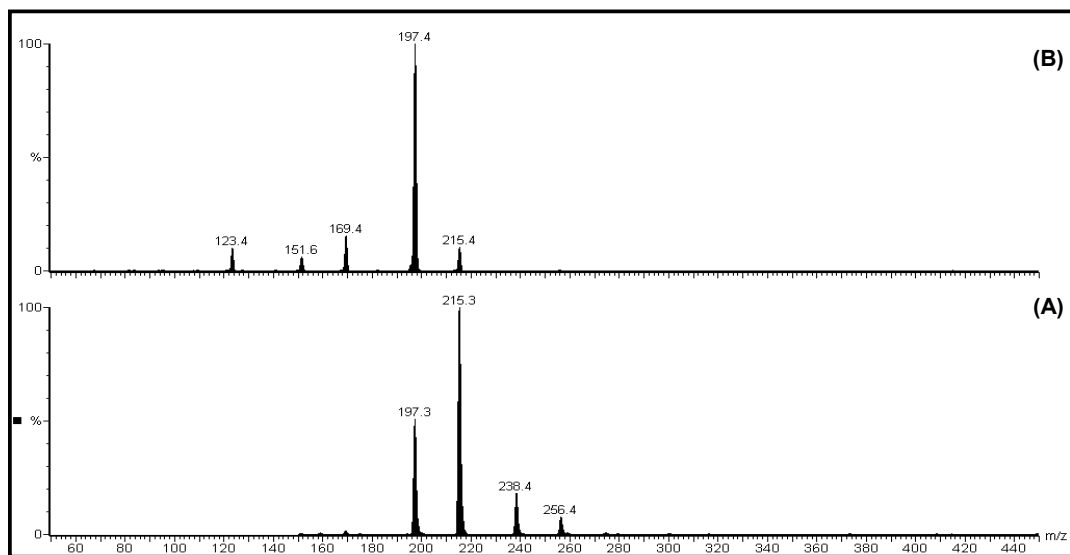


Figura 4.9.10. (A) espectro de massas no *full scan* da banda cromatográfica com tr de 11,22 min e, (B) espectro de íons produtos de m/z 256 obtidos com 10 eV

A espectrometria de massas se mostrou uma ferramenta fantástica na detecção de citocalasinas em extratos sem nenhum tratamento prévio, permitiu a observação da possível indução da biossíntese de outras citocalasinas de m/z 492, derivada da fenilalanina e de m/z 403 originada a partir do triptofano.

4.10 Caracterização e isolamento de biflavonóides de *Cupressus lusitanica*

No sentido de se contribuir com o estudo da química de *C. lusitanica*, foi explorado o extrato etanólico de suas folhas. Inicialmente foi realizada cromatografia clássica de bancada empregando coluna SEPHADEX LH-20.

Durante o monitoramento por CCD das frações provenientes da coluna SEPHADEX LH-20, constatou-se que diversas frações apresentavam uma característica interessante, uma banda de cor amarela.

As análises por CLAE/UV das frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL 68 sugeriram a presença de biflavonóides, devido à absorção característica no espectro no ultravioleta.

O método apolares 2 apresentou melhores resultados analíticos, uma vez que os compostos foram eluídos entre 8 e 20 minutos de corrida, já no método

polares 21 os compostos foram detectados no fim da análise, como pode ser observado na Figura 4.10.1. Verificou-se para as frações PECL150 e PECL168 a má separação das bandas cromatográficas, resultado este diretamente relacionado à força da fase móvel. Salieta-se que o método apolares 2 apresentou melhor resolução, pois observou-se bandas bem separadas e simétricas (Figura 4.10.1).

Deve-se ressaltar que, embora na placa de CCD tenha se observado apenas uma banda de cor amarela, a ocorrência de mais de um biflavonóide, nas folhas de *C. lusitanica*, foi confirmada, uma vez que, os cromatogramas das frações PECL132, PECL150 e PECL168 apresentaram bandas com espectro de absorção no ultravioleta idênticos, nos tempos de retenção 8,70 min, 11,17 min, 16,30 e 20,04 min.

Para confirmação da presença de biflavonóides nas frações PECL, submeteu-se a fração PECL170, por ter apresentado em CCD somente duas bandas, a novo processo cromatográfico, utilizando-se cromatografia clássica de bancada com fase estacionária ODS, na qual foi obtida uma substância de cor amarela, denominada de PECL170A. Por CCD verificou-se a presença de uma única banda indicando, dessa forma, uma boa separação. As análises por ^1H RMN e por Espectrometria de Massas relacionaram a substância a classe dos biflavonóides.

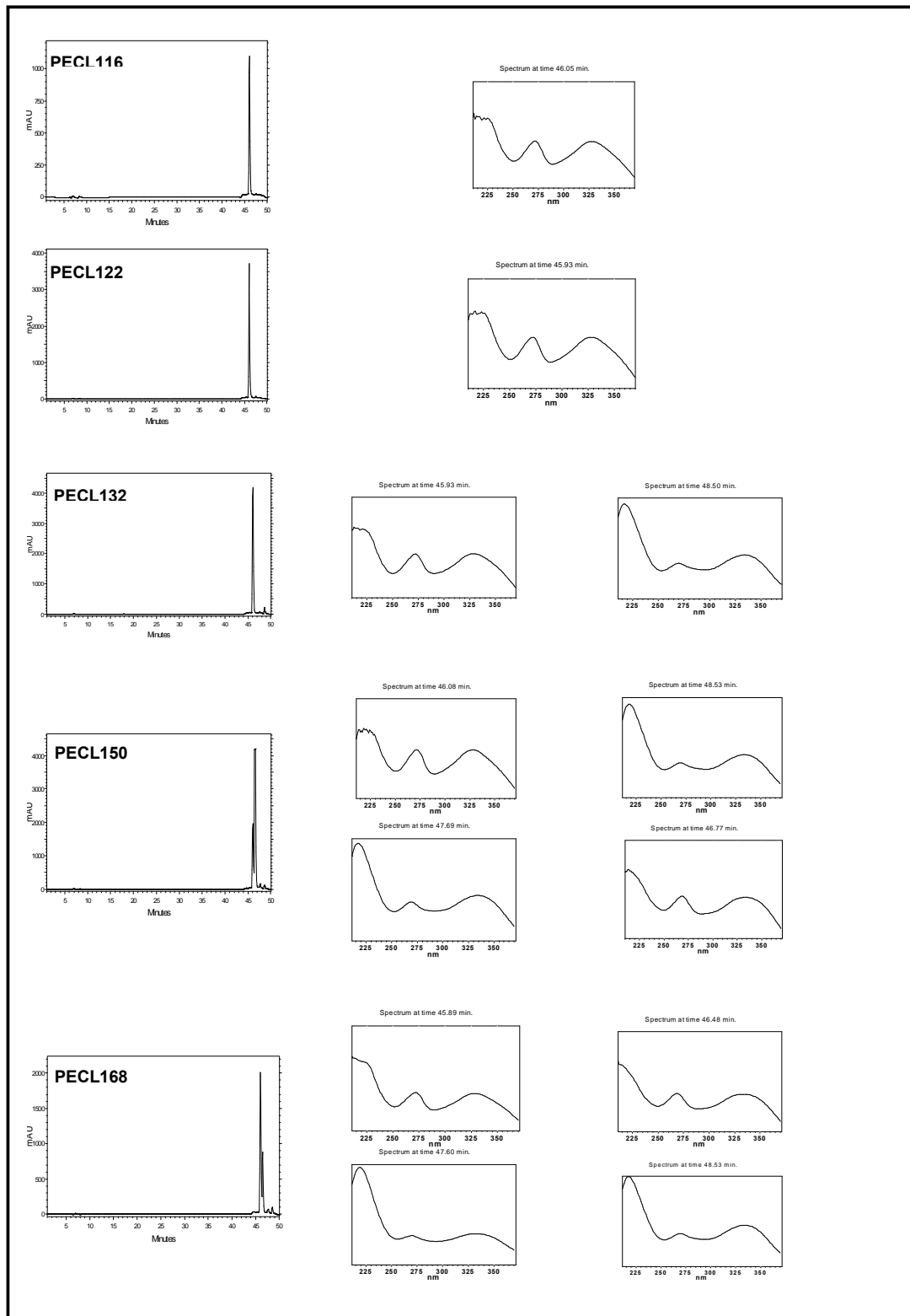


Figura 4.10.1. Cromatogramas das frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL168 obtidos no método polares 21, com detector a 320 nm

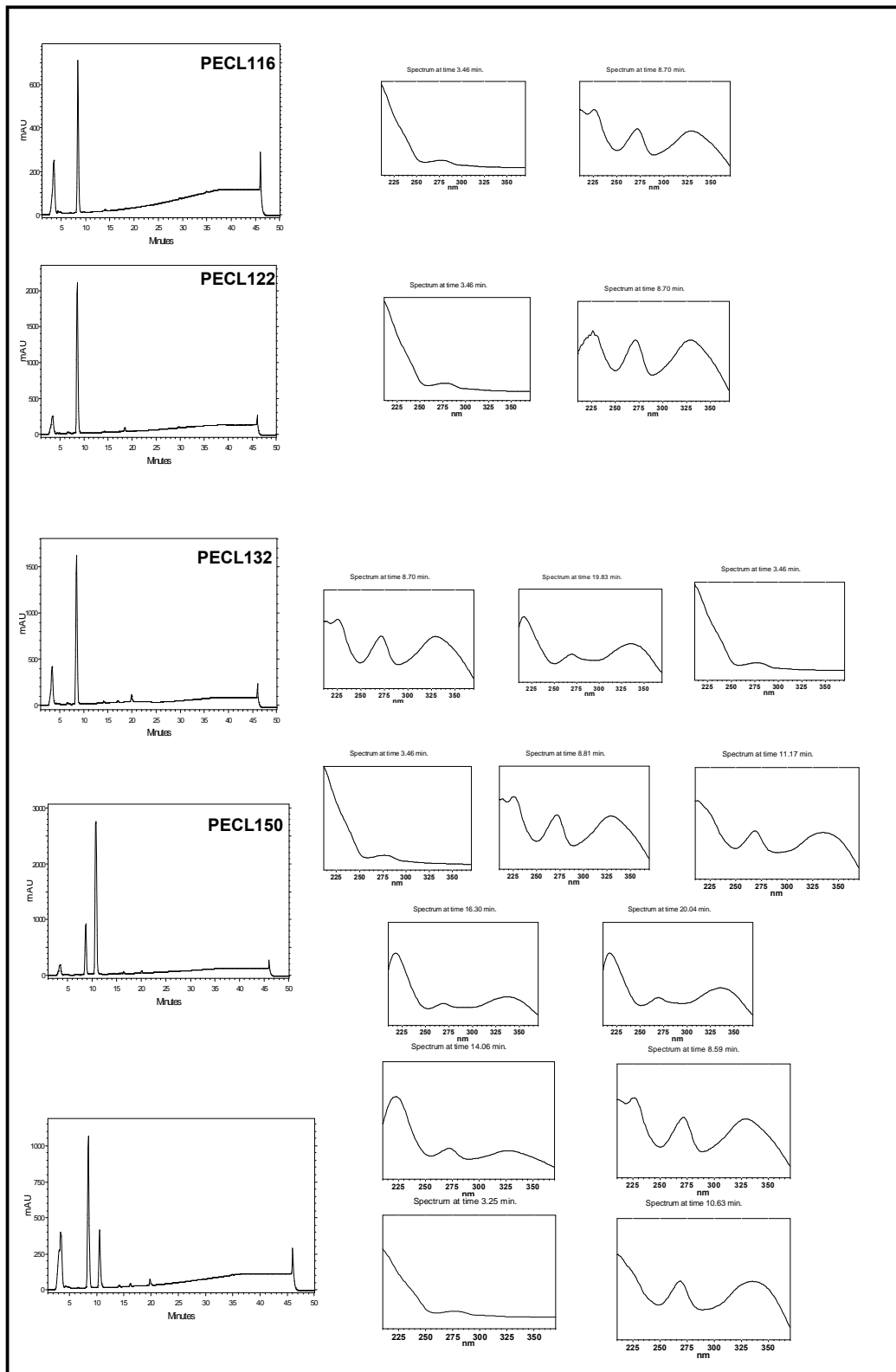


Figura 4.10.2. Cromatogramas das frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL168 obtidos no método apolares 2, com detector a 320 nm

O espectro de ^1H RMN, apresentado na Figura 4.10.3, forneceu deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos em 7,14 ppm (2H, $J = 8,8$ Hz), 7,55 ppm (2H $J = 8,8$ Hz), 7,48 ppm (2H $J = 9,2$ Hz) e também deslocamentos de hidrogênios ligados a carbono com hidridização sp^2 em 6,38 ppm (s) e 6,47 ppm (s). Verificou-se também um singlete largo em 8,46 ppm. Embora tenha se observado a existência de uma única banda em CCD, observou-se no espectro de ^1H RMN uma mistura de substâncias.

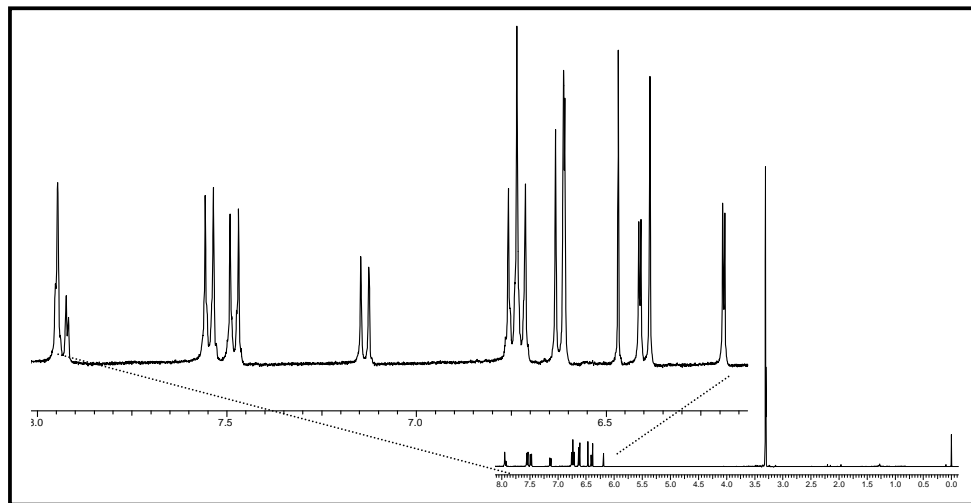


Figura 4.10.3. Espectro de RMN ^1H de PECL170A (400 MHz-MeOD)

A análise por CL/EM empregando fonte ionização por *eletrospray* no modo negativo foi de grande importância na identificação dos biflavonóides, dado que, o cromatograma de íons selecionados (m/z 537) da substância PECL170A, apresentou duas bandas cromatográficas com tempos de retenção próximos a 30,0 e 33,0 minutos (Figura 4.10.4), indicando a presença dos isômeros Amentoflavona e Cupressoflavona de massa molecular 538 Da.

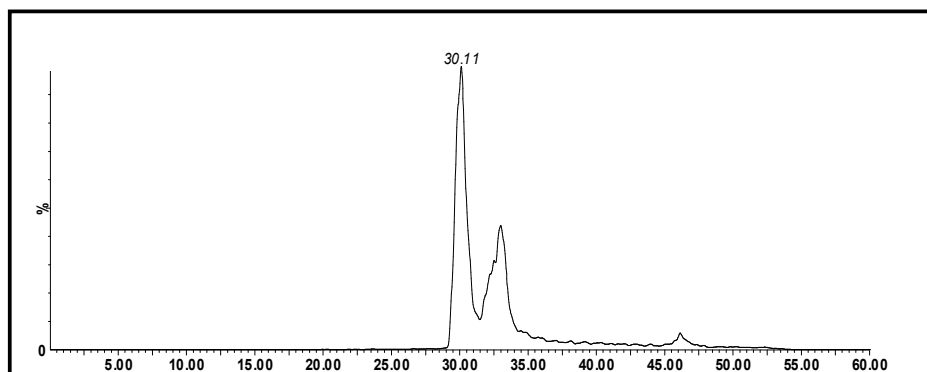


Figura 4.10.4. Cromatograma de íons selecionados m/z 537

Notou-se, pelos espectros de *full scan* dos isômeros, que o método analítico adotado foi de grande eficiência, uma vez, que foram detectados somente os íons moleculares protonados, como observado na Figura 4.10.5.

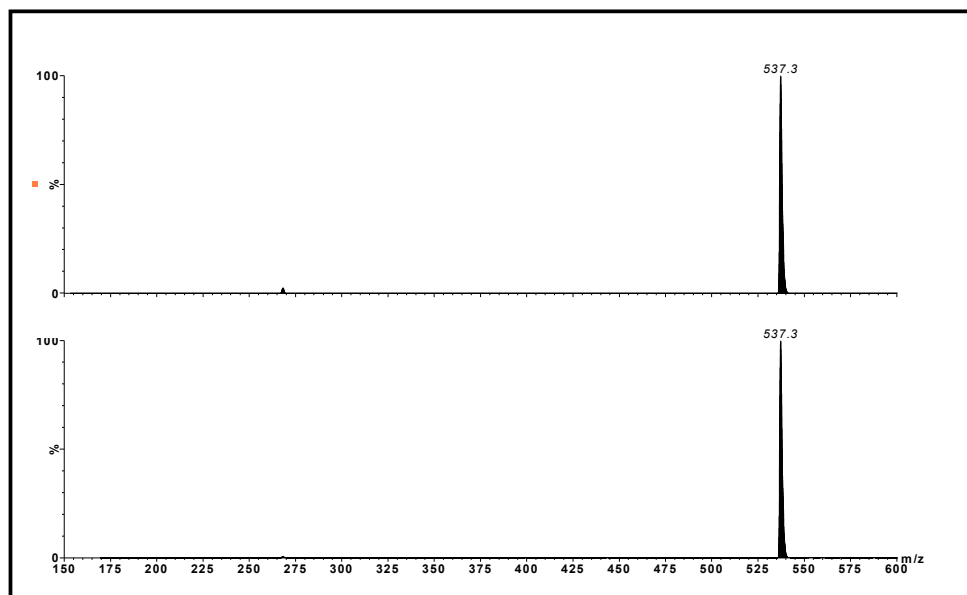


Figura 4.10.5. Espectros de *full scan* no modo negativo de PECL170A

Moléculas de mesma massa molecular podem exibir o mesmo espectro de massas no *full scan*, contudo a diferenciação destas pode ser realizada com o experimento de íons produtos, uma vez que, este fornece maiores informações estruturais.

Os espectros de íons produtos foram obtidos empregando-se energia de colisão de 25 eV.

O simples estudo dos espectros de íons produtos não foi suficiente para identificar os compostos fenólicos, amentoflavona e cupressoflavona, devido a grande semelhança dos íons fragmentos produzidos. No entanto, quando ampliou-se os espectros, constatou-se, claramente, diferenças relevantes, as quais forneceram informações estruturais capazes de identificar estes biflavonóides. A Figura 4.10.6 mostra os espectros de íons produtos ampliados 8 e 10 vezes nos intervalos de 90 a 360 e 440 a 520 respectivamente.

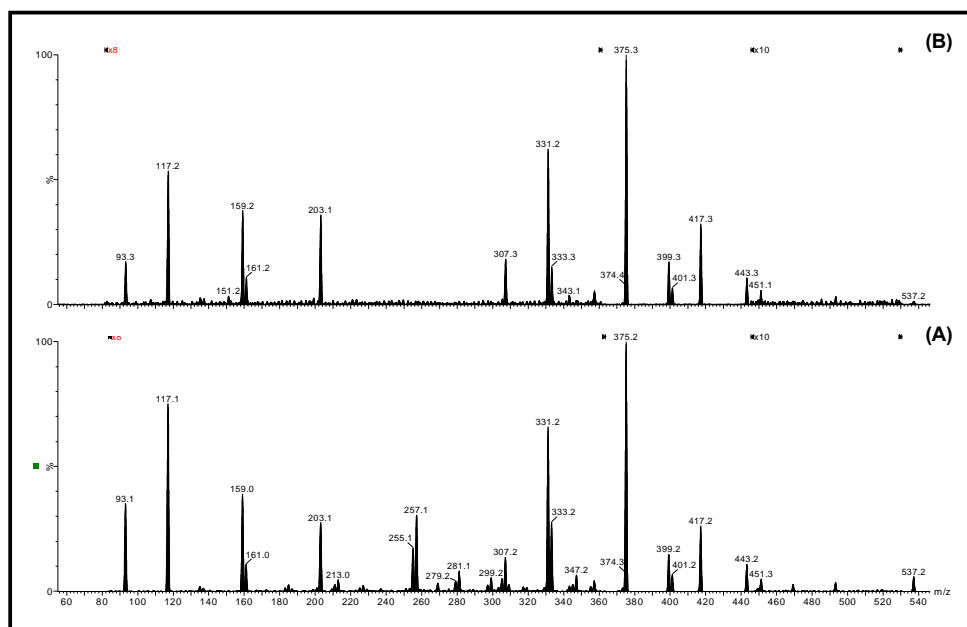
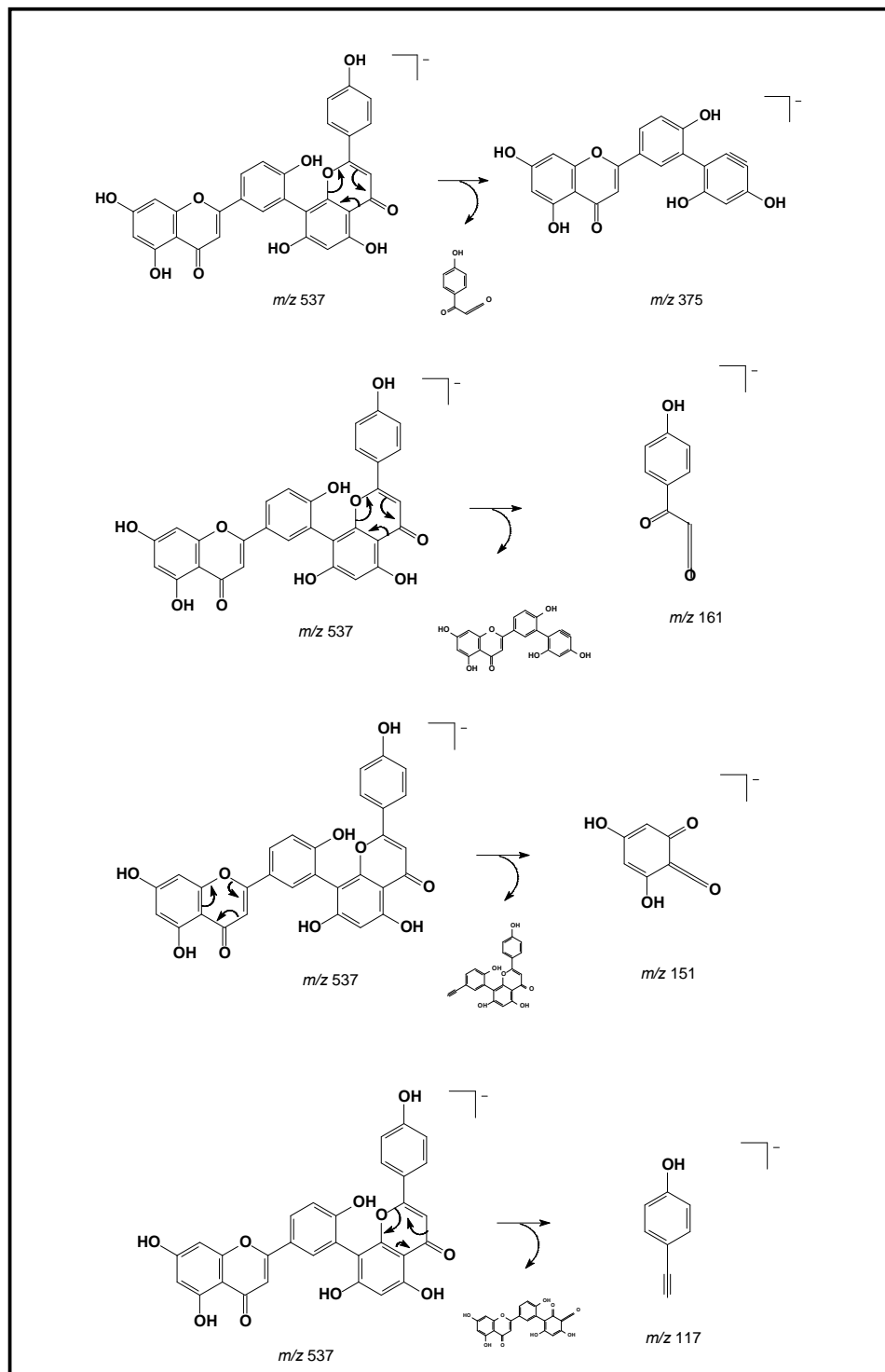


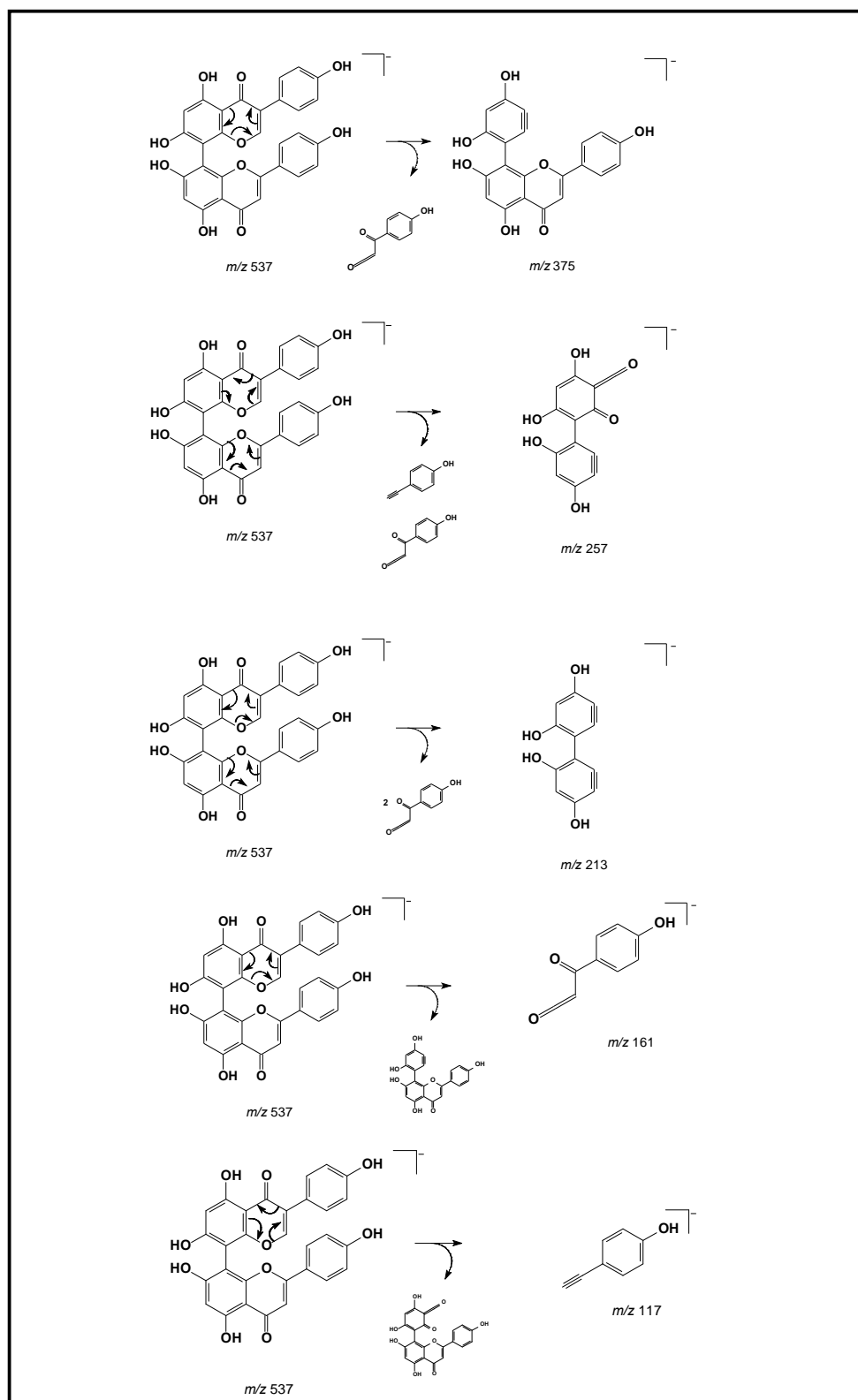
Figura 4.10.6. Espectros de íons produtos ampliados 8 e 10 vezes nos intervalos de massas de 90 a 360 e 440 a 520 respectivamente

Ambos os espectros de íons produtos apresentaram o mesmo pico base com m/z 375 e muitos outros fragmentos idênticos, no entanto, no espectro (A) verificou-se a presença de íons de relação massa/carga que não foram observados em (B).

Com base nos espectros de íons produtos e do conhecimento das estruturas dos biflavonóides, foram propostos esquemas de fragmentações (Esquema 4.10.1 e Esquema 4.10.2). A partir de reações de retro Diels-Alder dos íons moleculares deprotonados dos compostos fenólicos, justificou-se alguns fragmentos que permitiram, em um primeiro momento, relacionar os espectros (A) e (B) aos biflavonóides cupressoflavona e amentoflavona respectivamente. Ressalta-se, porém, que o estudo ainda não foi concluído e, que outros experimentos devem ser implementados a fim de se conhecer o mecanismo de fragmentação destes compostos.



Esquema 4.10.1. Proposta de fragmentação para a Amentoflavona



Esquema 4.10.2. Proposta de fragmentação para a Cupressoflavona

A espectrometria de massas mostrou-se uma ferramenta fundamental neste trabalho, pois esta detectou não apenas os biflavonóides amentoflavona e cupressoflavona, mas também seus derivados metilados observados no cromatograma de íons selecionados a m/z 551 e nos espectros de massas processados para este íon (Figura 4.10.7). A detecção destes compostos corrobora com o verificado nos espectros de UV dos cromatogramas das frações PECL 132, PECL150 e PECL 168.

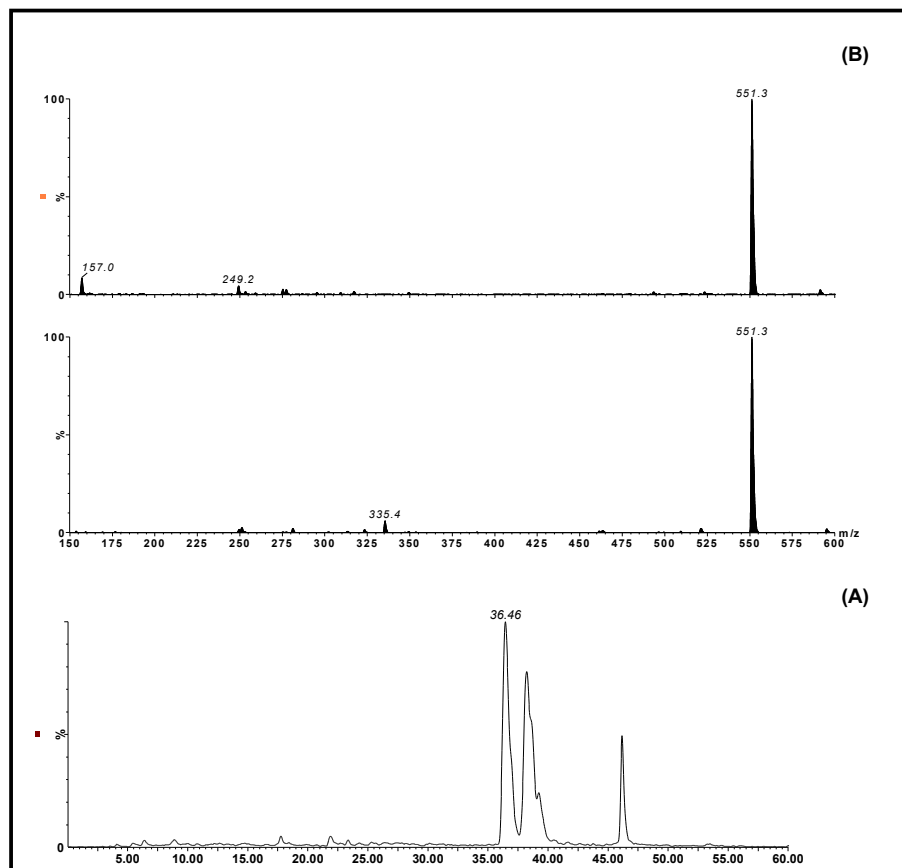


Figura 4.10.7. (A) Cromatograma de íons selecionados a m/z 551 e (B) seus respectivos espectros de massas.

4.11 Monitoramento de biflavonóides nos extratos de *Cupressus lusitanica* e *Araucaria angustifolia* por CLAE/UV

É muito bem estabelecida a função protetora dos flavonóides e biflavonóides nas interações entre plantas e insetos, no entanto, nas interações

planta e fungos alguns estudos apontam os biflavonóides e flavonóides como sendo fungicidas naturais (PIRRONI e HEIMLER, 1991), o que vem de encontro com a produção de composto fenólicos através do caminho biossintético que usa a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL, do inglês “phenylalanine ammonia-lyase”), cuja estimulação é frequentemente apontada como consequência da interação com fitopatógenos (GUNATILAKA, 2006).

Assim como observado em *Cupressus lusitanica*, há relatos da amarelidão e ressecamento das folhas de *Araucaria angustifolia* e, estes sintomas podem estar relacionados com a infestação de microrganismos. Em trabalho iniciado em nosso grupo de pesquisas, foram isolados fungos desta conífera e estes aparentemente são semelhantes com aqueles isolados de *Cupressus lusitanica*.

Os extratos botânicos de *Cupressus lusitanica* e *Araucaria angustifolia* obtidos pelos modos de extração A, B e AB foram denominados CLA, CLB e CLAB e AA, AB e AAB, respectivamente. A partir das análises dos extratos pôde-se constatar a presença de biflavonóides tanto nos extratos de *Cupressus lusitanica* como nos extratos de *Araucaria angustifolia* e, também, escolher o melhor método de extração e monitoramento dos biflavonóides.

Baseando-se nos dados da literatura (INNOCENTI *et. al.*, 2007), de que os biflavonóides possuem absorção característica no ultravioleta entre 330 nm, foi possível constatar a presença desta classe de compostos nos extratos das folhas de *Cupressus lusitanica* e de *Araucaria angustifolia*, pois mais de uma banda cromatográfica apresentou absorção neste comprimento de onda. As Figuras 4.11.1 e 4.11.2 mostram os cromatogramas referentes aos extratos foliares de ambas as plantas.

A Figura 4.11.1 mostra os cromatogramas obtidos para os três métodos de extração. O método B mostrou-se eficaz na extração dos compostos fenólicos da Araucária, uma vez que, o cromatograma a 323 nm apresentou diversas bandas com espectros no UV muito semelhante aos dos biflavonóides amentoflavona e cupressoflavona ($\lambda_{\text{máx}}$ 272, 328 nm e 269, 338 nm respectivamente (INNOCENTI *et. al.*, 2007)). O método AB mostrou-se satisfatório, embora a quantidade de bandas cromatográficas relacionadas aos biflavonóides seja menor quando comparadas àquelas do método B. Já o método A não foi adequado, uma vez que, apenas um espectro no UV mostrou-se similar ao dos biflavonóides de referência.

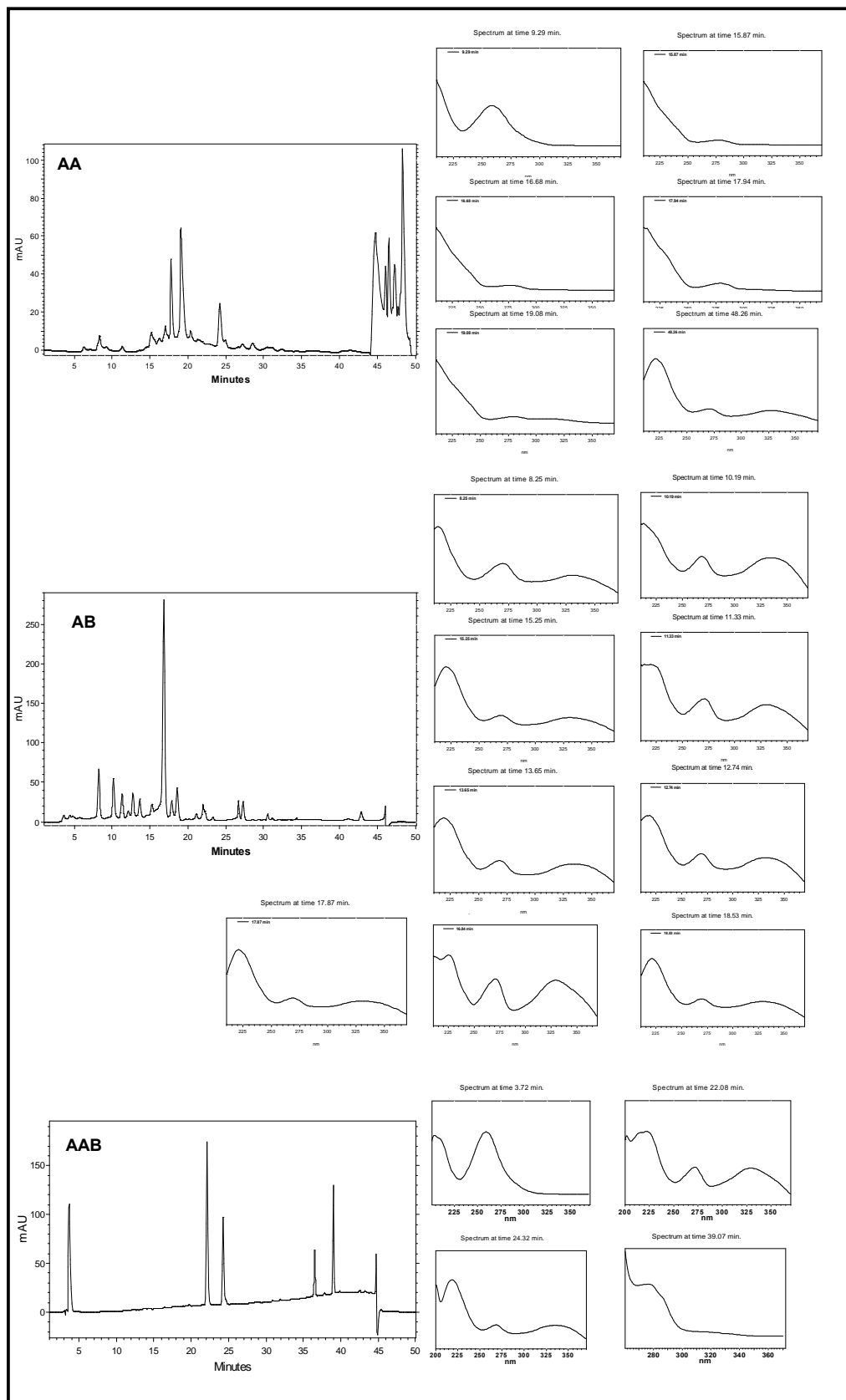


Figura 4.11.1. Cromatogramas a 323 nm e espectros no UV dos extratos de *Araucaria angustifolia*

Observou-se na Figura 4.11.2, para o extrato das folhas de *C. lusitanica*, que o cromatograma referente ao método de extração B, apresentou apenas 2 bandas cromatográficas com tempos de retenção e espectro de absorção no ultravioleta semelhante aos biflavonóides cupressoflavona e amentoflavona. Já o cromatograma referente ao método AB mostrou maior quantidade de bandas cromatográficas e espectros no UV característicos dos biflavonóides, indicando a possibilidade da presença de outros constituintes fenólicos. Apesar da existência de várias bandas cromatográficas no cromatograma relacionado ao método A, os seus respectivos espectros no UV não correspondem às absorções características dos biflavonóides.

A fim de se verificar a existência de novos biflavonóides e suas respectivas elucidaciones estruturais, foram enviados ao Instituto Max Plank, na Alemanha, extratos das folhas de *C. lusitanica* e de *Araucária angustifolia*, bem como alíquotas das frações PECL116, PECL122, PECL132, PECL150 e PECL168, os quais deveriam ser analisados por CLAE/RMN. Até o presente momento nenhuma informação a respeito destas análises foi obtida.

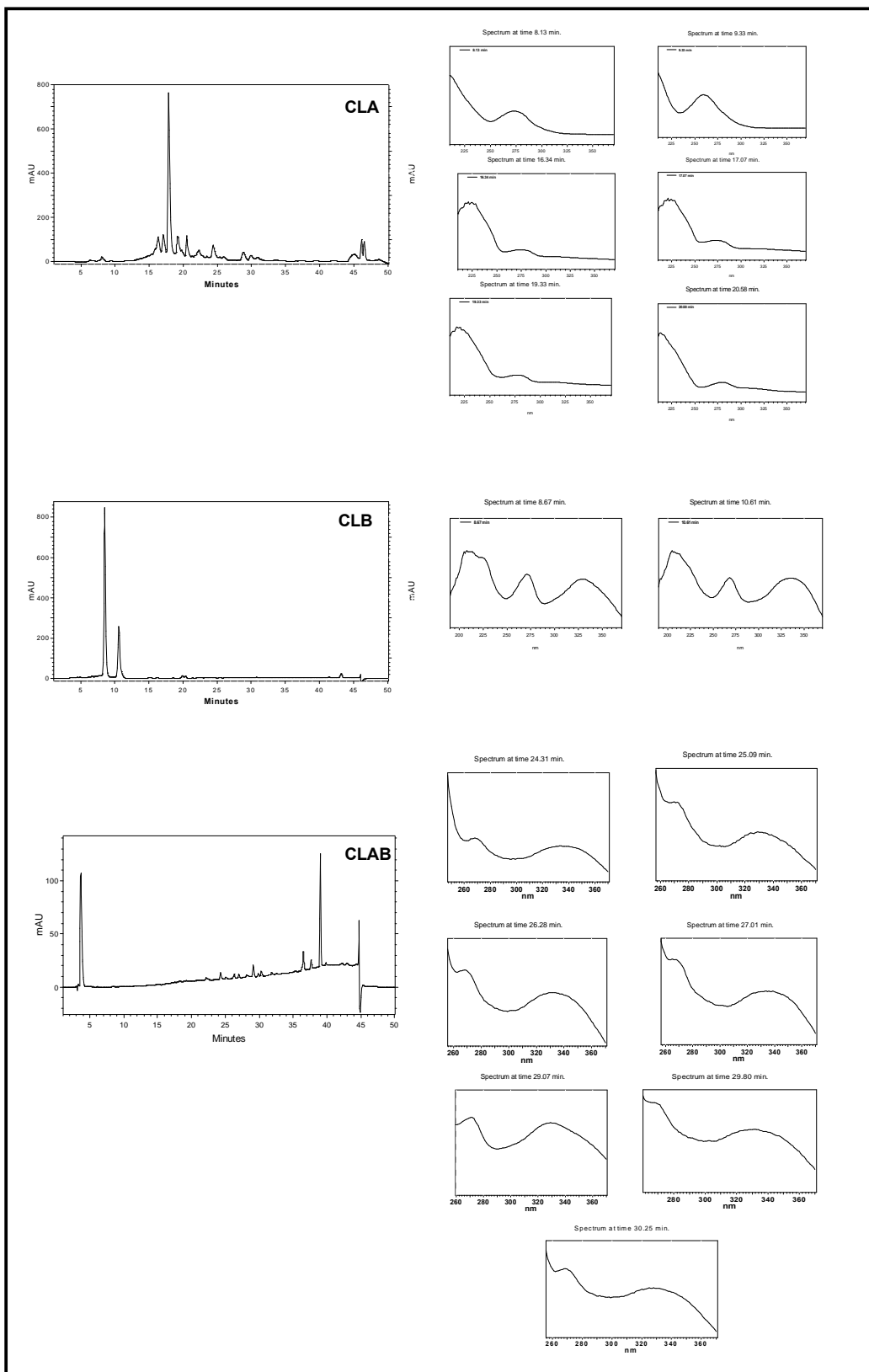


Figura 4.11.2. Cromatogramas a 323 nm e espectros no UV dos extratos de *C. lusitânica*

4.12 Ensaios Biológicos

4.12.1 Ensaio de inibição fúngica

De acordo com as pesquisas reportadas na literatura, as interações entre plantas e fungos endofíticos nem sempre são simbióticas, pois estes podem ser patógenos em estado de latência (referência na introdução).

Baseando no fato de que os compostos fenólicos muitas vezes são produzidos para atuarem no mecanismo de defesa das plantas, estudou-se o efeito dos extratos hexânico, etanólico e de uma fração rica em biflavonóides, todos provenientes de *Cupressus lusitanica* contra os fungos endofíticos N1CL3, N1CL4 e N1CL5, também isolados de *C. lusitanica*.

O experimento foi acompanhado dia a dia. Contudo, não se observou inibição do crescimento fúngico frente aos constituintes químicos de *C. lusitanica*, como pode ser observado na Figura 4.12.1.

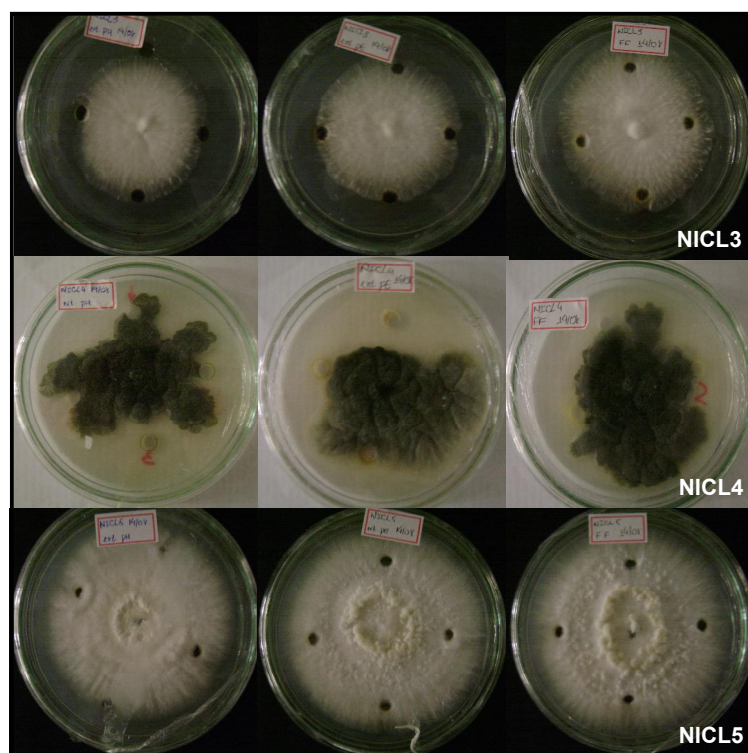


Figura 4.12.1. Ensaio antifúngico. Da esquerda para a direita: PHCL, PECL e Bifl

4.12.2 Ensaio para detecção de metabólitos secundários bioativos

Como os fungos endofíticos são potentes fontes de metabólitos bioativos, foram realizados ensaios biológicos, visando a inibição do desenvolvimento bacteriano.

As bactérias ensaiadas foram *Bacillus subtilis*, bactéria gram positiva que não patogênica, porém, similar a *Bacillus cereus*, que é responsável por diarreias, náuseas e vômitos e, contra às bactérias gram negativas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*.

Os extratos etanólico (extratos M) e particionado com acetato de etila (extratos P) de todos os microrganismos endofíticos, isolados de *Cupressus lusitanica*, bem como uma fração rica em Citocalasina D foram ensaiados, contudo, estes não tiveram nenhum efeito antagônico contras as bactérias, como pode ser observado na Figura 4.12.2.

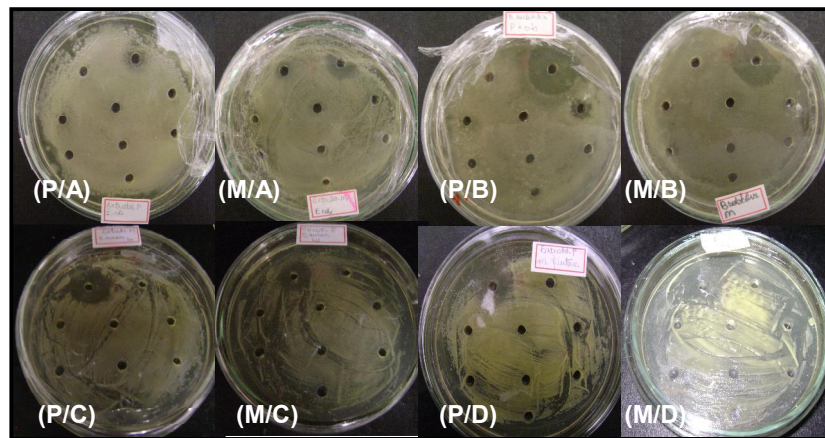


Figura 4.12.2. Ensaio de inibição bacteriana; (A) *E. coli*, (B) *B. subtilis*, (C) *S. aureus*, (D) *M. luteus*

4.12.3 Ensaio Citotóxico

As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

A Tabela 4.12.1 apresenta a atividade citotóxica das amostras com seus respectivos percentuais de inibição. Apenas as substâncias que apresentarem valores de inibição $\geq 90\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são escolhidas para avaliações subseqüentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 4.12.1. - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média \pm DPM.

Amostras	SF-295		HCT-8		MDA/MB-435	
	Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
PNICL1	33,42	6,68	12,94	3,94	17,29	4,44
PNICL2	33,12	1,32	11,65	0,68	9,67	15,65
PNICL3	23,00	0,24	25,45	4,32	9,46	0,84
PNICL4	35,65	0,00	20,75	3,71	7,21	10,99
PNICL5	76,68	1,26	88,92	0,15	9,46	0,84
PECL	41,73	0,18	52,45	12,96	19,51	0,52
PHCL	13,23	4,94	13,85	2,72	18,87	21,36
MNICL5B45	70,23	0,36	75,37	0,07	24,69	19,03
Doxorubicina	88,13	1,74	93,09	0,37	87,41	0,31

Pela Tabela 4.12.1 somente o extrato PNICL5 e a fração MNICL5B45, rica em Citocalasina D, apresentaram atividade citotóxica, no entanto, os valores das respectivas atividades mostraram-se inferiores ao do controle. Este fato não foi bem compreendido, dado que as citocalasinas, inclusive a Citocalasina D, são providas de uma marcante atividade citotóxica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados cinco microrganismos endofíticos das folhas de *Cupressus lusitanica*, sendo que os dois microrganismos estudados são pertencentes ao gênero *Xylaria* (NICL3 e NICL5).

A técnica de CG/EM mostrou-se relevante, pois permitiu a detecção de isocumarinas e de um sesquiterpeno eremofilano nos extratos de NICL3 e também do ácido pilifórmico nos extratos de NICL5. A detecção destes compostos está de acordo com o descrito na literatura, pois estes metabólitos são característicos de microrganismos do gênero *Xylaria*.

O fungo endofítico NICL3 mostrou-se um hábil produtor de sesquiterpenos eremofilanos. Destacando-se duas estruturas inéditas na literatura.

O microrganismo NICL5 apresentou peculiaridades morfológicas muito interessantes, o desenvolvimento de corpos de frutificação. Além desta peculiaridade, foi constatada uma inerente capacidade de produção de citocalasinas, dentre as quais as Citocalasinas C, D e Q, que foram isoladas por CLAE preparativa e identificadas por RMN e EM.

A técnica de CLAE/UV foi responsável pela detecção da Citocalasina D nos meios de cultivo Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, Arroz e Milho, porém a determinação do melhor meio produtor desta substância deverá ser implementada em trabalhos futuros.

O emprego da técnica de CLAE/EM foi de fundamental importância no desenvolvimento deste trabalho, pois permitiu a detecção de outras citocalasinas nos extratos provenientes do meio Czapeck com extrato de levedura, além de detectar uma possível indução da biossíntese de uma citocalasina originada a partir do aminoácido triptofano.

Os microrganismos estudados não apresentaram, segundo a identificação preliminar, correlação com aqueles que são patógenos a *Cupressus lusitanica*. Embora nenhum deles tenha produzido, em meio artificial, os diterpenos que são tóxicos à planta, não se exclui a possibilidade de o microrganismo utilizar estrategicamente os diterpenos produzidos pela planta e toxicá-los através de um sistema enzimático oxidativo, dado que o fungo NICL3 produziu metabólitos bastante oxigenados.

Foram obtidos extratos hexânico e etanólico das folhas de *C. lusitanica*. Através de análises por CG/EM foram detectados vários diterpenos no extrato hexânico. Já o extrato etanólico, em análises preliminares, mostrou-se rico em compostos fenólicos, destacando-se as biflavonas amentoflavona e cupressoflavona e seus respectivos análogos metilados. A presença destes compostos possivelmente é uma resposta da planta contra a infestação de fitopatógenos, pois estes são produzidos pelo caminho biossintético que usa a enzima fenilalanina amonialiase (PAL) cuja estimulação é freqüentemente apontada como conseqüência da interação com fitopatógenos.

Assim como em *C. lusitanica*, observou-se que *Araucaria angustifolia* também apresenta amarelidão e ressecamento das folhas e, as análises por CLAE/UV mostraram a presença de biflavanóides, indicando, desse modo, a possibilidade de ambas as plantas serem infectadas por fitopatógenos semelhantes.

Neste primeiro trabalho envolvendo os microrganismos endofíticos de *C. lusitanica*, não foram constatadas atividades biológicas relevantes nos extratos fúngicos, porém tal fato não desmerece o estudo da química destes microrganismos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P., ZANONI, T. A., LARA, A., BARRETO, A. F., COLL, L. G. "Comparisons among *Cupressus arizonica* Greene, *C. benthamii* Endl., *C. lindleyi*, Klotz. ex Endl. and *Cupressus lusitanica* Mill using leaf essential oils and DNA fingerprint". *Journal of Essential Oil Research*, **9**, 303-309, 1997.
- ADRIO, J. L., DEMAÏN, A. L. "Fungal biotechnology". *Int. Microbiology*, **6**, 191-199, 2003
- AGRIOS, G. N. "Plant pathology". 3ª edição, New York, Academic Press, 1988
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. "Introductory mycology", 4th ed. USA, John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- ARCINIEGAS A., PÉREZ-CASTORENA, A. L., MALDONADO, J., AVILA, G., VILLASEÑOR, VIVAR, A. R. "Chemical constituents of *Roldana lineolata*". *Fitoterapia*, **79**, 47-52, 2008.
- BALL, O. J. P., MILES, C. O., PRESTIDGE, R. A. "Ergopeptine alkaloids and *Neotyphodium lolii* – mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae)". *Plant Resistance*, **90**(5), 1382-1391, 1997.
- BARAWSKA, M. K., BACZEK, T., GLÓD, D., KALISSON, R., WOLLENWEBER, E. "HPLC separation of O-acylated flavonoids and biflavonoids from some species of gymnospermae". *Chromatographia*, **60**, 9-15, 2004.
- BARRY, A. "Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Mycomycetum: II", Leipzig, Engelmann, 1966.
- BOYLE, C., GOTZ, M., DAMMANN-TUGEND, U., SCHULZ, B. "Endophyte-host interactions III. Local vs systemic colonization". *Symbiosis*, **31**, 259-281, 2001
- BLACK, J. C. "Microbiologia: fundamentos e perspectivas". Trad. Eiler Fritsch Toros. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002
- BROWN, J. R. "Ancient horizontal gene transfer". *Nature Reviews Genetics*, **4**, 121-132, 2003.
- CAMPOS, F. R. "Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microspora* sp. Isoalóidos como microrganismos endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2005. Tese de doutorado, p 282.
- CARROL, G. C., PETRINI, O. "Patterns of substrate utilization by some endophytes from coniferous foliage". *Micologia*, **75**, 53-63, 1983.

- CHAPELA, I. H. "fungi in health in stems and branches of american beech and aspen: a comparative study". *New Phytologist*, **113** 65-75, 1989.
- CLAY, K., HOLAH, J. "Fungal endophyte grasses: a defensive mutualism between plants and fungi". *Ecology*, **69**: (1), 10 -16, 1988.
- CORDEIRO NETO, F., DIETRICH, S. M. C. "Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae". *Ciência e Cultura*, **44**: (45), 342-344, 1992.
- COWAN, S., BARTHOLOMEW, B.; WATSON, A. A., BRIGHT, C., LATIF, Z., SARKER, S. D., NASH, R. J. "Lignans from *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae)". *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**, 109-111, 2001
- DEMAIN, A. L. "Do antibiotics function in nature?". *Search*, **11**, 148-151, 1980
- DEMAIN, A. L. "Microbial natural products: a past with a future". 2000, p. 3–16. In S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
- D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. "Mycotoxins". *Animal Feed Science and Technology*, **69**: (1/3), 155-166, 1997.
- DUKE, J. "Phytochemical Database [on line]". USDA-ARS NGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, 2004.
- EVIDENTE, A., SPARAPANO, L., MOTTA, A., GIORDANO, F., FIERRO, O., FRISULLO, S. "A phytotoxic pimarane diterpene of *Sphaeropsis sapinea* f. sp. cupressi, the pathogen of a canker disease of cypress". *Phytochemistry*, **42**, 1541–1546, 1996.
- EVIDENTE, A., SPARAPANO, L., FIERRO, O., BRUNO, G., GIORDANO, F., MOTTA, A. "Sphaeropsidins B and C, phytotoxic pimarane diterpenes from *Sphaeropsis sapinea* f. sp. cupressi and *Diplodia mutila*". *Phytochemistry*, **45**, 705–713, 1997
- EVIDENTE, A., SPARAPANO, L., FIERRO, O., BRUNO, G., GIORDANO, F., MOTTA, A. "Sphaeropsidone and episphaeropsidone, phytotoxic dimedone methyl ethers produced by *Sphaeropsis sapinea* f.sp. cupressi grown in liquid culture". *Phytochemistry*, **48**, 1139–1143, 1998.
- EVIDENTE, A., SPARAPANO, L., ANDOLFI, A., BRUNO, G., GIORDANO, F., MOTTA, A. "Chlorosphaeropsidone and epichlorosphaeropsidone, two new chlorinated dimedone methyl ethers isolated from liquid cultures of *Sphaeropsis sapinea* f. sp. Cupressi". *Phytopathologia Mediterranea*, **39**, 299–309, 2000.
- EVIDENTE, A., SPARAPANO, L., BRUNO, G., MOTTA, A. "Sphaeropsidins D and E, two other pimarane diterpenes produced in vitro by the plant pathogenic fungus *Sphaeropsis sapinea* f. sp. Cupressi". *Phytochemistry*, **59**, 817–823, 2002.

EVIDENTE, A., ANDOLFI, A., VURRO, M., ZONNO, M. C., MOTTA, A.
“Citochalasins Z4, Z5 and Z6, three new 24-oxa[14]cytochalasans produced by *Phoma exigua* var. *heteromorpha*”. *Journal of Natural Products*, **66**, 1540-1544, 2003.

EVIDENTE, A., SPARAPANO, L., ANDOLFI, A., BRUNO, G., MOTTA, A.
“Sphaeropsidin F, a new pimarane diterpene produced in vitro by the cypress pathogen *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *Cupressi*”. *Australian Journal of Chemistry* **56**, 615–619, 2003.

EVIDENTE, A., FIORE, M., BRUNO, G., SPARAPANO, L., MOTTA, A.
“Chemical and biological characterizations of sapinopyridione, a phytotoxic 3,3,6-trisubstituted-2,4-pyridione produced by *Sphaeropsis sapinea*, a toxigenic pathogen of native and exotic conifers, and its derivatives”. *Phytochemistry*, **67**, 1019-1028, 2006.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. “Endophyte fungal from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin”. *Journal of Natural Products*, **69** (8), 1121-1124, 2006

FAETH, S. H. “Are endophytic fungi defensive plant mutualists?”, *Oikos*, **98**, 2002, 25-36

FARJON, A. “Nomenclature the Mexican cypress or “cedar of Goa”, *Cupressus lusitanica* Mill. (*Cupressaceae*)”. *Taxon*, **42**, 81-84, 1993

FELLER, I. C. “Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove(*Rhizophora mangle*)”. *Ecological Monographs*, **65**, 477-505, 1995.

FILL, T. P. RODRIGUES FILHO, E. “The effect of phenylalanine addition on the biosynthesis of bis-phenylpropanoids amides in the fungus *Penicillium* sp. Isolated as endophyte from *Melia Azedarach*”. First Brazilian Conference on Natural Products. Águas de São Pedro-S.P, 2007.

FOGLE, M. R., DOUGLAS, D. R., JUMPER, C. A., STRAUS, D. C. “Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*”. *Mycopathologia*, **164**, 49-56, 2007.

FOISSNER, I., WASTENEYS, G. O. “Wide-ranging effects of eight cytochalasins and latrunculin A and B on intracellular motility and actin filament reorganization in characean internodal cells”. *Plant Cell Physiology*, **48**(4), 585-597, 2007

FUJI, Y., TANI, H., ICHINOE, M., NAKAJIMA, H. “Zigosporin D and two newcytochalasins produced by the fungus *Metarrhizium anisopliae*”. *Journal of Natural Products*, **63**, 132-135, 2000.

GIOVANNINE, C., STRAFACE, C., MODESTI, D., CONI, E., CANTAFORA, A., DE VICENZI, M. “Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against

- oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 Cells". *The Journal of Nutrition*, **129**, 1269–1277, 1999.
- GLOWE, J. B. "Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products". *The Mycota*, vol. IV, Springer Verlag, New York, 249-268, 1997.
- GRAF, W., ROBERT, J., VEDERAS, J. C., TAMM, C., SOLOMON, P. H., MIURA, I., NAKANISHI, K. "Biosynthesis of the Cytochalasans. Part III. ¹³C-NMR of cytochalasin B (Phomin) and Cytochalasin D. Incorporation of [¹⁻¹³C] and [²⁻¹³C] sodium acetate". *Helvetica Chimica Acta*, **57**, 1801-1815, 1974.
- GRANITI, A. "Cypress canker: a Pandemick in progress". *Annual Review of Phytopatology*, **36**, 91-114, 1998.
- GUNATILAKA, A. A. L. "Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence". *Journal of Natural Products*, **69**, 509- 526, 2006.
- HARBONE, J. B. "The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants". *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**, 335-367, 1999
- HAWKSWORTH, D. L. "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation". *Mycological Research*, **95**, 641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D. L. "The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited". *Mycological Research*, **105**, 1422-1431, 2001.
- HEIMLER, D., PIERONI, A. "High performance quantitative thin-layer chromatography of flavonoid glycosides and biflavonóides of *Cupressus sempervirens* in relation to cypress canker". *Chromatographia*, **31** (5/6), 247-250, 1991.
- HEYNEKAMP, J. J., HUNSAKER, L. A., JAGT, T. A. V., DECK, L. M., JAGT, D. L. V. "Uncharged isocoumarin-based inhibitors of urokinase-type plasminogen activator". *BMC Chemical Biology*, in press, 2006
- HITZEMAN, R. A., LEUNG, D. W., PERRY, L.J., KOHR, W.J., LEVINE, H.L., GOEDDEL, D.W. "Secretion of human interferons by yeast". *Science*. **219**, 620–625, 1983.
- HOWARD. R. J., FERRARI, M. A., ROACH, D. H., MONEY, N. P. "Penetration of hard substrate by a fungus employing enormous turgor pressures". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **88**, 11281-11284, 1991.
- INOCENTI, M., MICHELOZZI, M., GIACCHERINI, C., IERI, F., VINCIERI, F., F., MULINACCI, N. "Flavonoids and biflavonóides in Tuscan Berries of *Juniperus communis* L.: detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6596-6602, 2007.

- IWAMOTO, C., YAMADA, T., ITO, Y., MINOURA K., NUMATA, A. "Citotoxic cytochalasins from a *Penicillium* species separated from a marine alga". *Tetrahedron*, **57**, 2997-3004, 2001.
- IWAMOTO, M., OHTSU, H., TOKUDA, H., NISHINO, H., MATSUNAGA, S., TANAKA, R., "anti-tumor promoting diterpines from the stem bark of *Thuja standishii* (Cupressaceae)". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**, 1911-1921, 2001.
- JARVIS, B. B., MILLER, J. D. "Natural products, complexity and Evolution" IN: *Phytochemical Diversity na Redundancy in Ecological Interactions*. ROMEO et al. (Eds.) Nova Iorque, Plenum Press, 265-293, 1996.
- KERVINEN, T., PELTONEN, S., TEERI, T. H. "Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitor". *New Phytology*, **139**, 293-300, 1998.
- KOBAYASHI, D. Y., PALUMBO, J. D. "Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture" In *Microbiol Endophyte* (C. W. Bacon, J. F. White), Marcel Dekker, New York, 2000.
- KUIATE, J., BESSIÈRE J. M., ZOLLO, P. H. A., KUATE, S. P. "Chemical composition and antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon". *Journal of Ethnopharmacology*, **103**, 160-165, 2006.
- KUIATE, J., BESSIÈRE J. M., VILAREM, G., ZOLLO, P. H. A. "Chemical composition and antidermatophytic properties of essential oils from leaves, flowers and fruits of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon". *Journal of Ethnopharmacology*, **103**, 160-165, 2006.
- KULDAU, G. A., YATES, I. E. "Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants". *Microbial Endophytes*, New York and Basel, 85-120, 2000.
- KUZARI, S., LAMSHOFT M., ZÜHLKE, SPITELLER, M. "An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin". *Journal of Natural products*, in press, 2008
- LIN, Y., ANDERSON, H., FLAVIN, M. T., PAI, Y., GREENWOOD, E. M., PERGSUPARP, T., PEZZUTO, J. M., SCHINAZI, R. F., HUGHES, S. H., CHEN, F. "In vitro anti HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinea multiflora*" *Journal of Natural Products*, **60**, 884-888, 1997.
- LIU, R., GU, Q., ZHU, W., CUI C., FAN, G., FANG, Y., ZHU, T., LIU, H. "10-phenyl-[12]-cytochalasin Z7, Z8 and Z9 from the Marine Derived Fungus *Spicaria elegans*". *Journal of Natural Products*, **69**, 871-875, 2006.
- MCDONALD, L. A., BARBIERI, R. L., BERNAN, B. S., JANSO, J., LASSOTA, P., CARTER, G.T. "07H239-A, a new cytotoxic remophilane sesquiterpene

from the marine-derived xylariaceous fungus LL-07H239". *The Journal of Organic Chemistry*, **69** (22), 7428-7435, 2004.

MATESIC, D. F., VILLIO, K. N., FOLCE, S. L., GARCIA, E. L., CUTLER, S. J., CUTLER, G. H. "Inhibition of cytokinesis and akt phosphorylation y chaetolobosin K in ras-transformed epithelial cells". *Cancer Chemother Pharmacol*, **57**, 741-754, 2006.

MILLS, J. W., PEDERSEN S. F., WALMOD, P. S., HOFFMANN, E.K. "Effect of cytochalasin on F actin and morphology of Ehrlich Ascites Tumor Cells". *Experimental Cell Research*, 261, 209-219, 2000.

MOLDAFAR, C., TANTAQUI, A., BOUSTANI, E. "Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* and to elicitation with fungal wall elicitor". *Journal of Plant Physiology*, **158**, 715-722, 2001.

MORANDI, D. "Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control". *Plant and Soil*, **185** 241-251, 1996.

MUTHUCHELIAN, K., BERTAMINI, M., PORTA, N., NEDUNCHEZHIAN, N. "Photoinhibition and recovery of photosynthesis in canker-susceptible and resistant needles of cypress (*Cupressus sempervirens* L.)". *Journal of Phytopathology*, **153**, 337-343, 2005.

MUTHUCHELIAN, K., PORTA, N., BERTAMINI, M., NEDUNCHEZHIAN, N. "Cypress canker induced inhibition of photosynthesis in field grown cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **67**, 33-39, 2005.

NIELSEN, K. A., GOTFREDSEN, C. H., BUCH-PEDERSEN, M. J., AMMIZBØLL, H., MATTSSON, O., DUUS, J. Ø., NICHOLSON, R. L. "Inclusions of flavonoid 3-deoxyanthocyanidins in *Sorghum bicolor* self-organize into spherical structures". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**, 187-186, 2004.

OVERY, P. D., SEIFERT, K. A., SAVARD M. E., FRISVAD, J. C. "spoilage fungi in their mycotoxins commercialy marketrd chestnuts". *International Journal of Food Microbiology*, 88, 69-77, 2003.

PASCHOALATI, S. F., STANGARLIN, J. R., LEITE, B., SCHAN-ESTRADA, K. R. F. "Mecanismos de patogenicidade em fungos". *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, **6**, 1-47, 1998.

PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. "Microbiologia". Vol 1 e 2. 2ª edição, São Paulo, Makron Books, 1997.

PÉREZ-CASTORENA, A., ARCINIEGAS, A., GUZMÁN, S. L., VELLASEÑOR, J. L., VIVAR, A. R. "Eremophylanes from *Senecio mairtinnus* and some reaction products". *Journal of Natural Products*, **69**, 1471-1475, 2006.

PETERS, A. F. "Field and culture studies of *Streblonema Macrocystis* new species Ectocarpales Phaephyceae from Chile, a sexual endophyte of giant kelp". *Phycologia*, **30**, 365-377, 1991.

PETRINI, O. "Fungal endophytes of tree leaves". *Microbial Ecology of leaves*, Springer Verlag, New York, 179-197, 1991

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

PRASAIN, J. K., UEKI, M. STEFANOWICZ, P. OSADA, H. "Rapid screening and identification of cytochalasins by electrospray tandem mass spectrometry". *Journal of Mass Spectrometry*, **37**, 238-291, 2002.

PROUDFOOT, J. R. "Drugs, leads and drug-likeness: an analyses of some recently launched drugs". *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, **12**, 1647-1650, 2002.

PUERTA, R., GUTIERREZ, V. R., HOULT, J. R.S. "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil". *Biochemical Pharmacology*, **57**, 445-449, 1999.

PURI, S. C., VERMA, V., AMNA, T., QAZI, G. N., SPITELLER, M. "An endophytes fungus from *Nathapodytes foetida* that produces camptotecin". *Journal of Natural Products*, **68**, (12), 1717-1719, 2005.

REITZ, R. "Flora Ilustrada Catarinense-Cupressáceas". *Herbário Barbosa Rodrigues*, Itajaí, Santa Catarina, 3,15-17, 1989.

ROHY, J. A. "*Chem. Int. Ed. Engli*", **36** (20), 2190-2194, 1997.

ROMANE, A., GALARDI, C., PINELLI, P., MULINACCI, N., HEIMLER, D. "HPLC quantification of flavonoids and biflavonoids in Cupressaceae leaves". *Chromatographia*, **56**, 465-474, 2002.

ROMANOS, M. A., SCORER, C. A., CLARE, J.J. "Foreign gene expression in yeast: a review". *Yeast* (8), 423-488.

RUANGRUNGSI, N., SEKINE, T., PHADUNGCHAROEN, T., SURIYAGAN, S., MURAKOSKI, I. "Isocumarins from *Xyris indica*". *Phytochemistry*, **38** (2), 481-483, 1995.

SANTOS, L. F. A. "Contribuição ao estudo do metabolismo micromolecular de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Sapindus saponaria*". São Carlos,

- Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2006. Dissertação de mestrado
- SANTOS, R. M. G. "Interação planta-microrganismos: o papel de metabólitos secundários na interação de *Melia azedarach* com fungos filamentosos". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 1999. Dissertação de mestrado.
- SANTOS, R. M. G. "Metabolismo secundário de fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2003. Tese de doutorado
- SCHULZ, B., ROMMERT, A. K., DAMMANN, U., AUST, H.J., STRACK, D." The endophyte-host interaction: A balanced antagonism?". *Micological Research*, **103**, 1275-1283, 1999.
- SCHÜMAN, J., HERTWECK, C. "Molecular basis of cytochalasin synthesis in fungi: gene cluster analysis and evidence for the involvement of a PKS-NRPS hybrid synthase by RNA silencing". *Journal of American Chemical Society*, **129**, 9564-9565, 2007.
- SCHULZ, B., BOYLE, C. "The endophytic continuum". *Micological Research*, **109**:(6), 661-686, 2005.
- SNYDER, B., NICHOLSON R.L. "Synthesis of phytoalexins in Sorghum as a site-specific response to fungal ingress". *Science*, **248**, 1637-1637, 1990.
- SOUZA, A. Q. L., SOUZA, A. L. A. Q., ASTOLFI FILHO, S., PINHEIRO, M. L. B., SARQUIS, M. I., PEREIRA, J. O. "Atividade antimicrobiana de fungos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bethan". *Acta Amazônia*, **34**:(2), 185-186, 2004.
- SPARAPANO. L., BRUNO, G., FIERRO O., EVIDENTE, A. "Studies on structure –activity relationship of sphaeropsidins A – F, phytotoxins produced by *Sphaeropsis sapinea* f. sp. Cupressi". *Phytochemistry*, **65**, 189-198, 2004.
- STIERLE, A., STROBEL, G. "The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*". *Journal of Natural Products*, **62** 9, 1315-1324, 1995
- STONE, J. K., BACON, C. W., WHITE, J. F. "An overview of endophytic microbes: endophytism defined". In *Microbial Endophytes* (C. W. Bacon & J. F. White, eds): 3–30. Marcel Dekker, New York, 2000.
- STROBEL, G., YANG, X. S., SEARS, J., KRAMER, R., SIDHU, R. S., HESS, W. M. "Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*". *Microbiology-UK*, **142**, 435, 1996.

STROBEL, G., HESS, W. M., FORD, E., SIDHU, R. S., YANG, X. "Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **17**:(5-6), 417-423, 1996a.

STROBEL, G., FORD, E., LI, J., SEARS, J., SIDHU, R. S., HESS, W. M. "Seimatoantlerium tepuiense gen, nov., a unique epiphytic fungus producing taxol from the Venezuelan Guyana". *Sistematic and applied Microbiology*, **220**, 426-427, 1999.

STROBEL, G. DAISE, B. "Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67** (4), 491-502, 2003

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

STROHL, W. R. "Industrial antibiotics: today and the future" In: Strohl WR (ed) *Biotechnology of antibiotics*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp 1-47

SURYANARAYANAN, T. S., KUMARESAN, V. HOHNSON, J. A. "Foliar fungal endophytes from two species of the *Mangrove Rhizophora*". *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 1003-1006, 1998.

SWART, W. J., WINGFIELD, M. "Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on Pinus species in south Africa". *Plant Disease*, **75**, 761-766, 1991.

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

TANAKA, R., OHTSU, H., IWAMOTO, M. MINAMI, T., TOKUDA, H., NISHINO, H., MATSUNAGA, S., YOSHITAKE, A. "Câncer chemopreventive agents, labdane diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii* (Gord.) Carr". *Cancer Letters*, **161**, 165-170, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. "Microbiologia". 8ª edição, São Paulo, Artmed, 2006.

VEDERAS, J. C., GRAF, W., DAVID, L., TAMM, C. "Biosynthesis of cytochalasans. Part 4. The mode of incorporation of common naturally-occurring carboxylic acids into cytochalasin D". *Helvetica Chimica Acta*, **58**: (7), 1887-1898, 1975.

VEDERAS, J. C., TAMM, C. "Biosynthesis of cytochalasans. Part 6. The mode of incorporation of phenylalanine into cytochalasin D". *Helvetica Chimica Acta*, **59**: (2), 558-566, 1976.

VIDAKOVIC, M., "Conifers: Morphology and Variations". Graficki Zavod, Hrvatske, Croatia (Translated from Croatian by Maja Soljan), 1991

WEBSTER, J. "Introduction to fungi". 2nd edition. Oxford, Cambridge University Press, 1989

- WET, J., WINGFIELD, M.J., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D. "Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico and Indonesia". *Plant Disease*, **84**, 151–156, 2000.
- WOLKEN, W. A. M.; TRAMPER J.; WERF, M. J. "What can spores do for us?". *TRENDS in Biotechnology*, **21**(8), 2003, 338-46
- YAMADA, J., FUJITA, K., SAKAI, K. "Feedback regulation of β -thujaplicin production and formation of methyl ether in a suspension culture of *Cupressus lusitanica*". *Phytochemistry*, **60**, 447-450, 2002.
- YAMADA, J., FUJITA, K., SAKAI, K. "Effect of major inorganic nutrients on β -thujaplicin production in a suspension culture of *Cupressus lusitanica*". *Journal of Wood Science*, **49**, 172-175, 2003.
- YAMAGUCHI, T., FUJITA, K., SAKAI, K. "Biological activity of extracts from *Cupressus lusitanica* cell culture". *Journal of Wood Science*, **45**, 170-173, 1999.
- YUAN, J., JIAN-NAN, B., BING, Y., XU-DONG, Z. "Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of Taxol". *Chinese Journal of Biotechnology*, **22**:(1), 1-6, 2006
- ZHAO, J., SAKAI, K. "Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures". *Journal of Experimental Botany*, **54**, 647-656, 2003.
- ZOBERI, M. H. "Tropical Macrofungi". 1st ed, London, The MacMillan Press, 1972