



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Dissertação de Mestrado**

**Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha*  
e *Rollinia* sp. (Annonaceae).**

**MAYANE PEREIRA DE SOUZA**

**Manaus, março de 2012.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA**

**MAYANE PEREIRA DE SOUZA\***

**Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha*  
e *Rollinia* sp. (Annonaceae).**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química  
da Universidade Federal do Amazonas,  
como requisito parcial para obtenção do  
Título de Mestre em Química. Área de  
atuação: Química Orgânica

**Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antonia Queiroz Lima de Souza**

**\*Bolsista CAPES**

**Manaus, março de 2012.**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Souza, Mayane Pereira de

S729e      Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp. / Mayane Pereira de Souza. - Manaus: UFAM, 2012.

120 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

1. Fungos endofíticos 2. Produtos naturais – Meios de cultura 3. Compostos biológicos I. Souza, Afonso Duarte Leão de (Orient.) II. Souza, Antonia Queiroz Lima de (co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 615.334(043.2)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e em cuja Biblioteca Central encontra-se disponível.

**MAYANE PEREIRA DE SOUZA**

Banca Examinadora:

  
.....  
*Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza – Presidente*

  
.....  
*Prof. Dr. Andersson Barison – membro UFPR*

  
.....  
*Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho – membro UFPA*

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Valdeci e Paula, minha irmã e grande  
amiga Maryane e meu irmão Valzinho  
pelo incentivo e pelo apoio, pois devo a vocês  
todas as minhas conquistas.*

*“Não é o que você faz, mas  
quanto amor você dedica no que  
faz que realmente importa.”*

*Madre Tereza de Calcutá*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que a cada dia nos dá uma nova oportunidade de crescermos e amadurecermos como humanos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida

Aos meus pais e especialmente minha mãe pelos ensinamentos, incentivo e o apoio.

Aos Professores Afonso Duarte Leão de Souza e Antonia Queiroz Lima de Souza pela orientação, paciência, pela oportunidade de crescimento profissional e pela amizade.

Aos Professores Quezia Bezerra Cass e Moacir Rossi Forim que gentilmente me receberam em seu laboratório na UFSCar, sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

Aos Professores Maria Lúcia Belém, Marcos Batista Machado e Rita Saraiva Nunomura pelos ensinamentos valiosos.

Aos grandes amigos Adriana Silva, Fabiana Greyce, Andréa Medeiros, Rita Cynnara, Paulo Renan, Priscila Aquino, Aimê Oliveira, Bruna Caroline Maciel, Orlando Amazonas, Mauro Galúcio e Felipe Thiago Lima que desde a graduação caminhamos juntos e nos apoiamos durante o mestrado.

Aos colegas de laboratório da UFAM: Laryssa Melo, Ednilze, Dominique, Júnior, Fátima, Eliana Bianco, Felipe Moura, Richardson, Elzalina, Renyer, Edson, Bruna Ribeiro, Liviane.

Aos colegas de laboratório da UFSCar: Eveline Costa, Bruno Perlatti, Israel Sá, Patrícia Bergo, Rodrigo, Barbara Sayure, Roberta Ávila, Fabiana Marques, Viviane, Tatiane Albarici, Tatiane Bondancia, Murilo Lima, Sergio e Lorena Mara.

Aos grandes amigos que fiz em São Carlos: Débora, Eveline, Patrícia e Israel.

As alunas de I.C. que ajudei a orientar Laís Meneses e Thais Nobre e que contribuíram em muitos dos trabalhos realizados.

As alunas de apoio técnico Auricélia Gama, pela coleta, isolamento dos fungos e preparação dos extratos dos fungos isolados de *Rollinia* sp, Socorro Teodoro pela coleta,

isolamento dos fungos endofíticos de *Duguetia stelechantha* e Fabiana Greyce de Oliveira, pela preparação dos extratos.

Ao mestre Hector Koolen e a aluna de IC Laís Menezes pela purificação e determinação estrutural de DgC12.

A professora Cláudia do Ó da UFC Pessoa pelos ensaios anticâncer.

Aos professores Antônio Gilberto Ferreira (Giba) da UFSCar, Tiago Venâncio e Andersson Barison da UFPR pelos experimentos em RMN.

A técnica Luciana Vizzoto do Lab. de RMN da UFSCar por realizar alguns experimentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



## Sumário

Lista de Abreviações .....	4
Lista de Figuras .....	6
Lista de Tabelas.....	10
Lista de Esquemas.....	11
Resumo.....	12
Abstract .....	13
<b>1.Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1 Produtos naturais .....	14
1.2 Potencial bioativo de produtos naturais de origem microbiana.....	15
1.3 Microrganismos endofíticos e suas interações com as plantas hospedeiras.....	18
1.4 Fungos endofíticos como agente anticâncer.....	21
1.5 A Família Annonaceae .....	23
1.5.1 A hospedeira <i>Duguetia stelechantha</i> .....	24
1.5.2 A hospedeira <i>Rollinia</i> sp. ....	26
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo geral .....	28
2.2- Objetivos específicos .....	28
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>29</b>
3.1 Materiais e Reagentes.....	29
3.1.1 Material para obtenção, cultivo e conservação dos fungos.....	29
3.1.2 Solventes .....	29
3.1.3 Fases estacionárias para cromatografia líquida.....	29
3.1.4 Equipamentos .....	29
3.2 Isolamento dos fungos.....	30
3.2.1 Coleta do material botânico.....	30

3.2.2	Material vegetal utilizado.....	30
3.2.3	Desinfecção do material vegetal .....	31
3.2.4	Isolamento dos fungos.....	31
3.2.5	Purificação, preservação e identificação. ....	31
3.3	Cultivo dos fungos em escala analítica .....	36
3.3.1	Preparo dos meios de cultura .....	36
3.3.2	Condições de cultivo .....	36
3.3.3	Obtenção dos extratos para os ensaios preliminares .....	39
3.4	Ensaio biológico .....	39
3.4.1	Ensaio antimicrobiano.....	39
3.4.2	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	41
3.5	Seleção, cultivo e obtenção de extratos de linhagens para estudo químico .....	42
3.5.1	Cultivo em larga escala da linhagem DgCr2 2.1b.....	42
3.5.2	Cultivo em larga escala da linhagem DgCr32.2 .....	42
3.5.3	Cultivo em larga escala da linhagem AnspCr1 1.1 .....	42
3.6	Estudos químicos.....	43
3.6.1	Estudo químico do fungo DgCr3 2.2.....	43
3.6.2	Estudo químico do fungo DgCr22.1b .....	48
3.6.3	Estudo químico do fungo AnspCr11.1 .....	51
4	Resultados e discussões.....	54
4.1	Fungos isolados de <i>Duguetia stelechantha</i> e <i>Rollinia</i> sp. ....	54
4.2	Testes biológicos .....	57
4.2.1	Ensaio antimicrobiano.....	57
4.2.2	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	61
4.3	Substâncias isoladas de AnspCr11.1 .....	64
4.3.1	Identificação da substância AnMb6 .....	64
4.3.2	Identificação da substância Nc5 .....	68
4.3.3	Identificação da substância Nc18 .....	76
4.4	Substâncias isoladas de DgCr22.1b.....	83
4.4.1	Identificação de DgA-9 .....	83
4.4.2	Identificação de DgD16 .....	86
4.5	Substâncias isoladas de DgCr32.2.....	89

4.5.1 Identificação da substância DgP14-2 .....	89
4.5.2 Identificação da substância DgP3-2 .....	98
4.5.3 Identificação da substância DgPa2.....	106
5. Considerações finais.....	108
6 Referências Bibliográficas .....	109

## Lista de Abreviações

AcOEt - Acetato de Etila

APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization

BDA - Batata Dextrose e Ágar

BDL - Batata Dextrose + Extrato de levedura

CCD - Cromatografia em camada delgada

CDCl<sub>3</sub> - Clorofórmio deuterado

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Diclorometano

CHCl<sub>3</sub> - Clorofórmio

CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória de 50% do crescimento da população (células ou microrganismos)

COSY - Correlation spectroscopy

DAD - Diode Array Detection

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMP – Desvio médio padrão

*d* - dubleto

*dd* - duplo dubleto

*ddd* - duplo duplo dubleto

*dt* - duplo tripleto

EtOH – Etanol

ESI-MS – Electrospray ionization- Mass Spectrometry

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz- Hertz

Hex- hexano

LC -MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

*J* - constante de acoplamento

*m* - multipleteo

m/z - razão massa carga

Me - Metila

MeOD- metanol deuterado

MeOH – Metanol

MHz - Mega-Hertz

M.F – Meio fermentado

MS - Mass Spectrometry

*q* - quarteto

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância magnética nuclear do núcleo de carbono 13

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância magnética nuclear do núcleo de hidrogênio 1

rpm - rotações por minuto

*s*- simplete

*sl*- simplete largo

*sp*.- espécie

*spp*. - Algumas espécies

*t* - tripleto

UV - Ultra Violeta

δ - deslocamento químico

Φ- largura da coluna cromatográfica

## Lista de Figuras

Figura 1: Penicilina G.....	14
Figura 2: Metabólitos secundários isolados de fungos.....	17
Figura 3: a) <i>Taxol</i> , b) <i>Taxosmyces andreanae</i> , c) <i>Taxus brevifolia</i> . ....	20
Figura 4: Metabólitos secundários de fungos comuns em plantas .....	21
Figura 5: Metabólitos secundários anti-oomicetos .....	23
Figura 6: a) <i>Annona muricata</i> b) <i>Rollinia mucosa</i> c) <i>Xylopiya peruviana</i> . ....	23
Figura 7: Alcalóides isolados de espécies da família Annonaceae .....	24
Figura 8: a) <i>Duguetia furfuracea</i> . b) <i>Duguetia lanceolata</i> .....	24
Figura 9: Alcalóides isolados de <i>Duguetia vallicola</i> . ....	25
Figura 10: a) <i>Rollinia sericea</i> . b) Fruto de <i>Rollinia mucosa</i> .....	26
Figura 11: Acetogeninas isoladas de <i>Rollinia laurifolia</i> .....	26
Figura 12: <i>Rollinia</i> sp. ....	27
Figura 13: Fungos endofíticos de AnspCr11.1 em tubos com meio inclinado agrupados de acordo com a morfologia.....	33
Figura 14: Preservação de fungo mitospóricos, a) Castellani (1939); b) Microtubos de 2,0 mL contendo água e 10% de glicerol; c) Tubo com meio inclinado e óleo mineral. ....	34
Figura 15: Culturas não mitospórica (Óleo mineral, placa pequena e microtubos). ....	34
Figura 16: Cultivo em pequena escala de endófitos isolados de <i>Duguetia stelechanta</i> . ....	37
Figura 17: Fermentação dos fungos endofíticos solados de <i>Rollinia</i> sp. sob agitação.....	38
Figura 18: Inoculação dos extratos testados contra <i>B. cereus</i> .....	40
Figura 19: Cultivo em larga escala de DgCr22.1b .....	42
Figura 20: a) Fração 3 (DgP3) da coluna filtrante, b) CCD do extrato em etanol e extrato em acetato/metanol 1:1.....	46
Figura 21: CCD das frações DgPa.....	47
Figura 22: Fração DgC12*, sólido amarelado.....	50
Figura 23: Grupos de microrganismos isolados de <i>D. stelechanta</i> por meio utilizado no isolamento.....	55

Figura 24: Grupos de microrganismos isolados de <i>Rollina</i> sp. por meio utilizado no isolamento.....	56
Figura 25: Halos de inibição dos extratos de fungos de <i>D.stelechantha</i> contra <i>P. avellani</i> . .....	58
Figura 26: Halos de inibição dos extratos de fungos endofíticos de <i>Rollina</i> sp.....	59
Figura 27: Halos de inibição dos extratos de fungos endofítico de <i>Rollina</i> sp. (Continuação). ....	60
Figura 28: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de AnMb6 a 400 MHz em MeOD.....	65
Figura 29: Espectro de <sup>13</sup> C de AnMb6 a 400 MHz em MeOD. ....	65
Figura 30: Destaques do mapa de correlações de HSQC de AnMb6.....	66
Figura 31: Destaque do mapa de correlação 1H-13C a longa distância de hidrogênios aromáticos – AnMb6. ....	67
Figura 32: Destaque do mapa de correlação <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a longa distância de hidrogênios aromáticos – AnMb6. ....	67
Figura 33: Espectros de massas APCI-ITMS a) modo positivo b) modo negativo.....	68
Figura 34: 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina.....	68
Figura 36: Destaque do espectro de RMN de <sup>1</sup> H - A .....	70
Figura 37: Destaque do espectro de RMN de <sup>1</sup> H – B.....	71
Figura 38: Destaque do espectro de RMN de <sup>1</sup> H - C.....	71
Figura 39: Destaque do mapa de correlações HMBC de Nc5 - A.....	72
Figura 40: Destaque do mapa de correlações HMBC de Nc5 – B .....	72
Figura 41: Correlações observadas no mapa de correlações de HMBC de Nc5 .....	72
Figura 42: Destaque do mapa de correlações de COSY e correlações de hidrogênios de Nc5 .....	73
Figura 43: Destaque do mapa de correlações de HMBC e correlações observadas para Nc5 .....	73
Figura 44: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc5 - A.....	74
Figura 45: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc5 - B.....	74
Figura 46: Correlações observadas no mapa de correlações de HMBC de Nc5. ....	74

Figura 47: Espectros de massas nos modos negativo e positivo de Nc5. ....	75
Figura 48: Paecilina B .....	76
Figura 49: Espectro de RMN <sup>1</sup> H de Nc18 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). ....	77
Figura 50: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Nc18 - região de olefínicos e aromáticos .....	77
Figura 51: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Nc18 - região dos metilênicos e metínicos.....	78
Figura 52: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Nc18 - região dos metílicos.....	78
Figura 53: Ampliações do COSY e correlações entre hidrogênios de Nc18 .....	79
Figura 54: Destaque do mapa de HMBC e correlações entre hidrogênios e carbonos de Nc18 .....	80
Figura 55: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc18 .....	80
Figura 56: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc18 .....	81
Figura 57. Correlações entre hidrogênios e carbonos de Nc18 .....	81
Figura 58: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc18 .....	81
Figura 59: Cordianidrido B .....	82
Figura 60: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da amostra Dg-A9, (DMSO-d, 500 MHz).....	84
Figura 61: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (DMSO-d, 125 MHz).....	84
Figura 62: Correlações de HMBC de Dg-A9 .....	85
Figura 63: Mapa de correlações de HSQC e correlações destacadas de Dg-A9 .....	85
Figura 64: Espectro de massas de Dg-A9 - íons filhos de 237 ([M+H] <sup>+</sup> ). ....	85
Figura 65: Austdiol.....	86
Figura 66: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da amostra DgD16, (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	87
Figura 67: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da amostra DgD16, (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	88
Figura 68: Mapa de correlações COSY da amostra DgD16,.....	88
Figura 69: Proposta estrutural para a substância DgD16 .....	89
Figura 70: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H em CCl <sub>3</sub> D, 400 MHz.....	91
Figura 71: Destaque da região de hidrogênios metílicos e metilênicos. ....	91
Figura 72: Destaque da região de hidrogênios olefínicos. ....	92



Figura 73: Destaque do mapa de COSY e correlações entre hidrogênios da cadeia lateral de DgP14-2.....	93
Figura 74: Destaque do mapa de HSQC e conexões entre H-14 e C-14 de DgP14-2.....	93
Figura 75: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas – A .....	94
Figura 76: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas - B. ....	94
Figura 77: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas - C. ....	95
Figura 78: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas - D .....	96
Figura 79: Isocromofilona VI.....	97
Figura 80: Espectros de massas ESI-ITMS a) modo negativo b) modo positivo.....	99
Figura 81: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DgP3-2, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	100
Figura 82: Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DgP3-2, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). .....	100
Figura 83: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de DgP3-2, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	101
Figura 84: Ampliações do mapa de contornos de COSY de Dgp3-2.....	101
Figura 85: Correlações de hidrogênios de DgP3-2 observadas no COSY .....	102
Figura 86: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas – A .....	102
Figura 87: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas - B. ....	103
Figura 88: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas - C. ....	103
Figura 89: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas - D .....	104
Figura 90: Proposta estrutural para DgP3-2 .....	105
Figura 91: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DgPa2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). .....	106
Figura 92: Região de alifáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DgPa2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	106

Figura 93: Ergosterol .....	107
-----------------------------	-----

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Exemplos de antibióticos comercializados de origem microbiana.....	15
Tabela 2: Fungos cultivados em pequena escala de fungos de <i>Duguetia stelechantha</i> .....	37
Tabela 3: Isolados de <i>Rollinia</i> sp. em seus respectivo meios cultivados em pequena escala .....	38
Tabela 4: Linhagens de fungos endofíticos com atividade contra <i>B. cereus</i> .....	57
Tabela 5: Extratos de linhagens de fungos endofíticos com atividades contra <i>P. avellani</i> .	58
Tabela 6: Linhagens com potenciais citotóxicos de acordo com os ensaios contra <i>P. avellani</i> .	61
Tabela 7: Percentual de inibição dos extratos de fungos ao crescimento celular de três linhagens tumorais.....	62
Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H de AnMb6 e do 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina.....	68
Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H de Nc5 com os da Paecilina B.....	75
Tabela 10: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de Nc18 e do cordyanidrido B...	82
Tabela 11: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de Dg-A9 e do austdiol.....	86
Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de DgP14-2 e da Isocromofilona VI .....	97
Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de DgP3-2 e da Sclerotioramina .....	105
Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H de DgPa2 e do Ergosterol .....	107

## Lista de Esquemas

Esquema 1: Diluição seriada para obtenção de cultura monospórica. ....	33
Esquema 2: Microcultivo dos fungos mitospóricos .....	35
Esquema 3: Lâmina a fresco.....	35
Esquema 4: Esquema geral para obtenção dos extratos dos fungos cultivados em pequena escala .....	39
Esquema 5: Obtenção dos extratos de meio fermentado e micélio do fungo DgC32.2 .....	43
Esquema 6: Obtenção das subfrações de Fa a partir de Fr1 .....	44
Esquema 7: Obtenção das subfrações Fb a partir de Fr2.....	44
Esquema 8: Obtenção dos extratos de micélio, fracionamento do extrato em etanólico e obtenção da substância DgP3-2.....	45
Esquema 9: Fracionamento do extrato em AcOEt/MeOH 1:1 e obtenção das substâncias DgPa1-c, DgPa2-c e DgP14 (2).....	47
Esquema 10: Obtenção da substância Dg-A9 do meio fermentado de DgCr22.1b.....	48
Esquema 11: Preparação dos extratos do meio fermentado e do micélio de DgCr22.1b....	49
Esquema 12: Fracionamento do extrato do micélio de DgCr22.1b.....	50
Esquema 13: Obtenção dos extratos de meio fermentado e de micélio. ....	51
Esquema 14: Frações obtidas do meio fermentado de AnM11-12.....	52

## Resumo

### Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp. (Annonaceae)

As plantas dos gêneros *Duguetia* e *Rollinia* pertencentes à família Annonaceae apresentam vários relatos sobre sua composição química principalmente pela presença de alcalóides e acetogeninas. Esses compostos têm atividades biológicas comprovadas como antiparasitários, antitumorais, inseticidas e antibacterianos. Porém, não há muitas informações quanto aos microorganismos endofíticos de plantas destes gêneros. No presente trabalho foi realizado o estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos de *Duguetia stelechantha*, e uma linhagem isolada de *Rollinia* sp. baseadas em resultados de ensaios antimicrobianos dos extratos obtidos em pequena escala contra *Cândida albicans*, *Penicillium avellani*, *Bacillus cereus* e ensaios citotóxicos contra três linhagens de células tumorais. Baseados nos resultados destes testes foram selecionadas as linhagens DgCr22.1b (resultado >90% contra linhagens tumorais) e DgC32.2 (melhor resultado contra *B. cereus*) (*Duguetia stelechantha*) e AnspCr11.1 (*Rollinia* sp.) para cultivo em larga escala e estudo químico. Foram obtidas duas substâncias isoladas da linhagem DgCr22.1b sendo um policetídeo e uma xantona dimérica. Da linhagem DgC32.2 cinco substâncias foram isoladas e três foram identificadas sendo dois corantes pertencentes a classe de azafilonas e um esteróide. Foram isoladas e identificadas três substâncias da linhagem AnspCr11.1 os quais são uma isocumarina, uma cromona e um ácido alcenoico conhecido como cordianidrido B.

**Palavras-chave:** *Duguetia stelechantha*, *Rollinia* sp. fungos endofíticos

## **Abstract**

### **Chemical studies of endophytic fungi associated with *Duguetia stelechantha* and *Rollinia* sp. (Annonaceae).**

The plants of the genera *Duguetia* and *Rollinia* belonging to the family Annonaceae have several reports on its composition mainly by the presence of alkaloids and acetogenins. These compounds have proven biological activity as antiparasitic, antitumor, insecticides and antibacterial. However, there is little information about the plant endophytic microorganisms of these genres. In the present work it was presented the chemical study of two strains of endophytic microorganisms from *Duguetia stelechantha*, and a strain isolated from *Rollinia* sp. based on results of antimicrobial assays of the extracts on a pilot scale against *Candida albicans*, *Penicillium avellani*, *Bacillus cereus* and cytotoxic assays against three tumor cell lines. Based on the results of these tests were selected strains DgCr22.1b (result > 90% against tumor cell lines) and DgC32.2 (best result against *B. cereus*) (*Duguetia stelechantha*) and AnspCr11.1 (*Rollinia* sp.) for large scale cultivation and chemical study. Were obtained two substances isolated from a strain DgCr22.1b being a polyketide and a xanthone. Strain DgC32.2 five substances have been isolated and identified two of three dyes belonging to class azaphilone and a steroid. Were isolated and identified three substances of lineage AnspCr11.1 which are an isocoumarin, a chromone and an alkenoic acid known as cordyanhydride B.

**Keywords:** *Duguetia stelechantha*, *Rollinia* sp. endophytic fungi

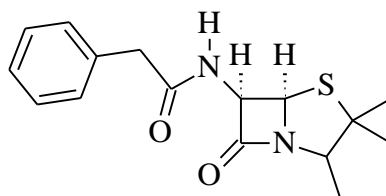
## 1.Introdução

### 1.1 Produtos naturais

A busca por novos compostos com diversas aplicações, com destaque os fármacos, é um processo que requer otimização contínua. Os produtos naturais representam uma alternativa de grande sucesso para a descoberta de novos fármacos (STROBEL, DAISY & CASTILHO, 2005). Em comparação com várias outras fontes de compostos de interesse farmacológico como as sínteses orgânicas, a maior diversidade química é proveniente de substâncias oriundas da natureza (HARVEY, 2000; KOEHN & CARTER, 2005). Segundo Harvey (2008) mais de 100 novos produtos estão em desenvolvimento clínico, principalmente como agentes anti-câncer e anti-infecciosos.

Historicamente, a mais importante fonte de produtos naturais tem sido as plantas, sendo que a pesquisa progrediu em duas grandes linhas: a etnofarmacologia e a toxicologia (HEINRICH & GIBBONS, 2001). A partir do século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana, foi uma das causas marcantes no declínio do uso de plantas medicinais (MONTANARI & BOLZANI, 2001). Após a descoberta acidental da penicilina G (Figura 1) por Flemming, a segunda fonte mais promissora de novas drogas são os fungos. A partir desses organismos, os avanços na área de antibióticos, imunossupressores e medicamentos antineoplásicos têm sido realizados (TULP & BOHLIN, 2004).

Mais recentemente, têm sido explorados os organismos marinhos no qual esta linha de pesquisa já resultou em vários medicamentos comercializados e mais atualmente em ensaios clínicos (KERR & KERR, 1999; HAEFNER, 2003).



**Figura 1: Penicilina G**

## 1.2 Potencial bioativo de produtos naturais de origem microbiana

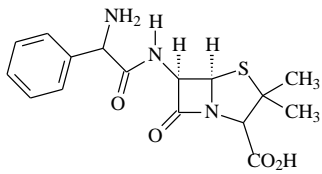
Os microorganismos apresentam grande habilidade de produzir metabólitos secundários de interesse a partir de vários substratos como uma consequência de sua evolução biológica e bioquímica (FERNANDES et al, 2009; FISHER, et al.,1992). Muitos antibióticos descobertos até o início dos anos 1970 chegaram ao mercado e sua química serviu como base para gerar novos antibióticos clinicamente úteis por modificação química como mostrado na Tabela1 (PELÀEZ, 2005).

**Tabela 1: Exemplos de antibióticos comercializados de origem microbiana**

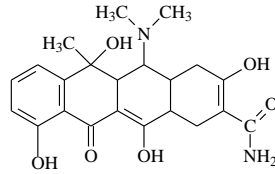
<b>Metabólito original</b>	<b>Produtos comerciais</b>	<b>Organismo produtor</b>
<b>Penicilinas</b>	Penicilina G, V, Ampicilina, Meticilina, Amoxicilina, Carbenicilina	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
<b>Cefalosporinas</b>	MEFOXIN (Cefoxitina), CECLOR (Cefaclor), CLAFORAN (Cefotaxima), ROCEPHIN (Ceftriaxona), CEFTIN (Cefuroxima)	<i>Acremonium</i> spp., <i>Emericellopsis</i> spp., <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> , <i>Streptomyces clavuligerus</i>
<b>Tienamicinas</b>	PRIMAXIN(Imipenem), INVANZ (Ertapenem)	<i>Streptomyces cattleya</i>
<b>Eritromicinas</b>	ERYTHROCIN, ZITHROMAX (Azithromycin), BIAXIN (Clarithromycin), KETEK (Telithromycin)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
<b>Vacomicina</b>	VANCOCIN	<i>Streptomyces orientalis</i>
<b>Fosfomicina</b>	MONURIL	<i>Streptomyces fradiae</i>
<b>Mupirocina</b>	BACTROBAN	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<b>Ácido fusídico</b>	FUSIDIN LEO	<i>Fusidium griseum</i>
<b>Estreptograminas</b>	SYNERCID (Dalfopristin/quinupristin)	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
<b>Daptomicina</b>	CUBICIN	<i>Streptomyces roseosporus</i>

Os microorganismos, particularmente os fungos, compreendem uma grande diversidade de espécies com inúmeras aplicações biológicas descritas na literatura dentre os quais a produção de substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários, incluindo, alcalóides, peptídeos, estereóides, terpenóides, compostos fenólicos, quinonas e flavonóides (SCHULZ et al., 2002; ADRIO & DEMAIN, 2003; BORGES, 2008; QIN et al., 2010). Entre os metabólitos secundários de interesse farmacológico (Figura 2) que os fungos são capazes de sintetizar podem ser destacados: antibióticos antibacterianos ( $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos e estreptograminas), antibióticos antitumorais (antraciclina, actinomicinas, bleomicinas e ácidos aureólicos), agentes redutores de colesterol humano (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A) e outros (NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2000).

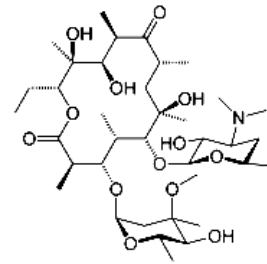




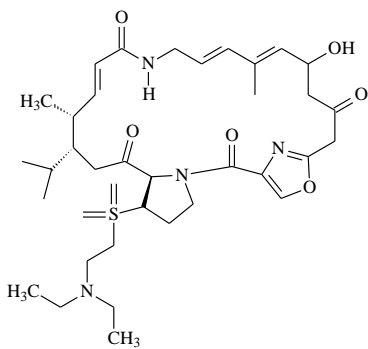
Penicilina G ( $\beta$ -lactâmico)  
(*Penicillium* sp.)



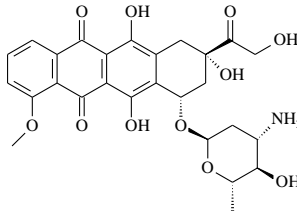
Clortetraciclina (tetraciclina)  
(*Streptomyces* sp.)



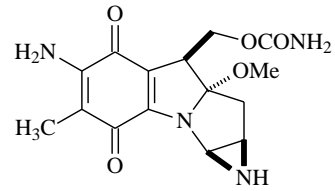
Eritromicina (macrolídeo)  
(*Streptomyces erythraeus*)



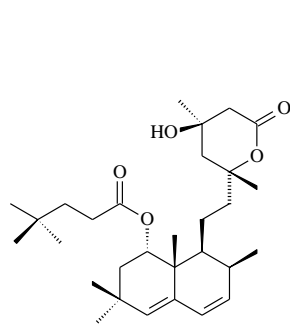
Dalfopristina (estreptogramina)  
(*Streptomyces pristinaespiralis*)



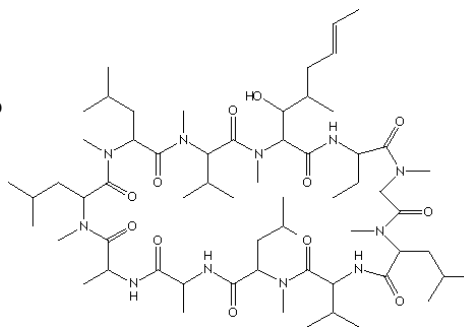
Doxorubicina (antraciclina)  
(*Streptomyces peucetius*)



Mitomicina C (actinomicina)  
(*Streptomyces caespitosus*)



Lovastatina (estatina)  
(*Aspergillus terreus*)



Ciclosporina A  
(*Tolypocladium inflatum*)

**Figura 2: Metabólitos secundários isolados de fungos**

Além da variedade de metabólitos que os microorganismos são capazes de produzir, outra vantagem do seu uso é a possibilidade de controlar os processos operacionais de maneira relativamente simples. Comparados às plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em termos de tempo e espaço, além de possibilitar o direcionamento da produção de metabólitos de interesse através das condições de cultivo (pH, substrato, temperatura e aeração) (BORGES, 2008).

### **1.3 Microrganismos endofíticos e suas interações com as plantas hospedeiras**

Normalmente as plantas encontram-se associadas a outros tipos de organismos e este fato tem despertado o interesse de biólogos, bioquímicos e químicos na tentativa de se entender os mecanismos dessas interações. Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que habitam o interior do tecido das plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas, como folhas e caules, sem lhe causar nenhum dano aparente (PETRINI, 1991). Eles distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais. Também são endofíticos microrganismos como os fungos micorrízicos e as bactérias que formam nódulos nas raízes de plantas; estes, entretanto, são muito mais bem estudados e, por esta razão, considerados separadamente dos que habitam preferencialmente as partes aéreas dos vegetais (PETRINI, 1991). A capacidade de adaptação dos microrganismos ao interior das plantas é total, pois têm sido isolados endófitos de folhas, espinhos, epiderme caulinar, xilema, sementes, pecíolo, enfim, de todos os tecidos vegetais estudados (REDLIN et al., 1996).

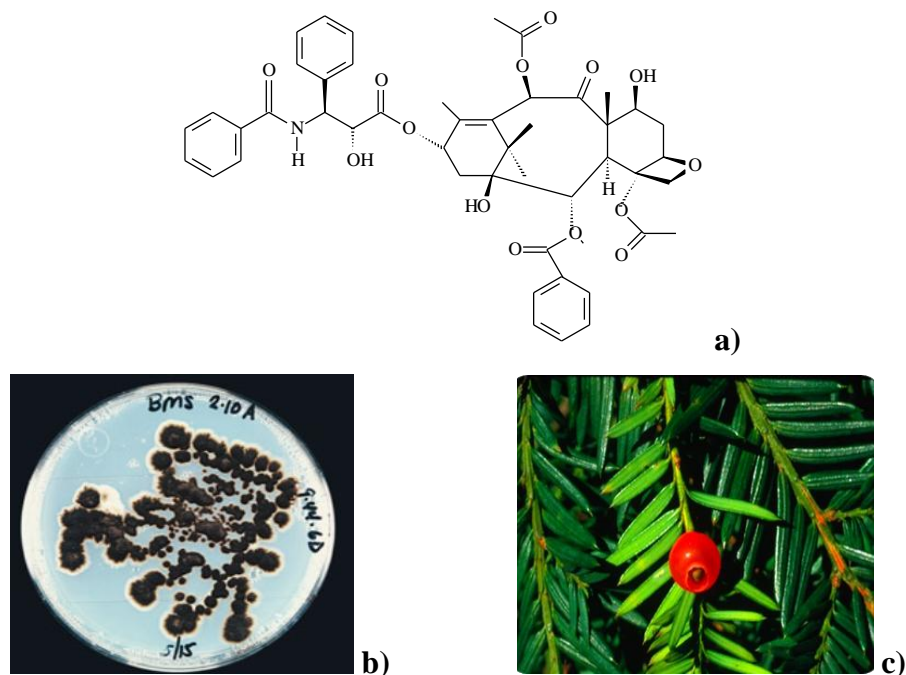
Entre os endófitos, os fungos são os mais frequentemente isolados (STROBEL; DAISY, 2003). Todos os vegetais superiores estudados até o momento apresentam microrganismos endofíticos, sendo possível o isolamento de um grande número de espécies a partir de um único hospedeiro. Entretanto, somente algumas, normalmente as espécies e/ou linhagens específicas do hospedeiro, estão presentes em quantidades significativas. As pesquisas desenvolvidas na área têm demonstrado que cada hospedeiro abriga um conjunto característico de endofíticos e que estes lhes são geralmente específicos. A composição e frequência, entretanto, podem ser significativamente afetadas por fatores tais como: grau de umidade ambiental, distribuição geográfica (têm

sido observadas diferenças bastante significativas na microbiota endofítica de espécies vegetais fora de seu habitat natural), posição relativa na planta (altura em relação ao solo), idade da planta, órgão da planta, entre outros (PETRINI et al., 1993).

A natureza das interações entre endofíticos e plantas, ainda não é muito bem compreendida, podendo ser simbiótica, neutra ou antagônica. Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (CARROL, 1988; AZEVEDO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2001; SOUZA et al., 2004). Em contrapartida, os endófitos podem receber proteção e nutrientes do hospedeiro (FISHER & PETRINI, 1992; STROBEL & DAISY, 2003; SELOSSE et al., 2004).

Pode-se ainda inferir que plantas medicinais contenham microrganismos que mimetizem a química da hospedeira e que sejam capazes de produzir o mesmo produto natural bioativo ou, até mesmo, derivados com maior bioatividade (STROBEL et al., 2002; LI, 1998). Esta possibilidade permitiria a obtenção destes compostos por processos fermentativos, em contraposição aos processos extrativos tradicionais, com vantagens relacionadas à regularidade e uniformidade de produção e aos ganhos ambientais.

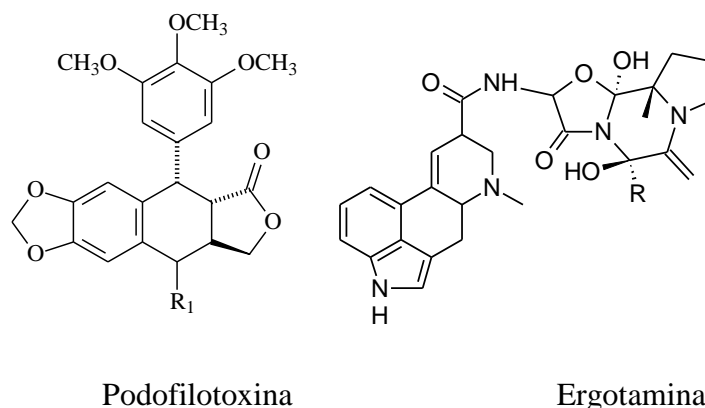
Um exemplo importante é o taxol (Figura 3), produzido também por plantas, um potente antitumoral é encontrado em quantidades extremamente pequenas na casca interna de espécies de *Taxus*, árvore de crescimento lento de regiões da costa oeste dos Estados Unidos. Foram isolados, a partir dessas espécies vegetais, fungos endofíticos capazes de produzir o taxol, por exemplo, o *Taxosmyces andreanae* (Figura 3b) isolado de *Taxus brevifolia* (Figura 3c), abrindo a possibilidade de sua obtenção por via fermentativa, com custos mais baixos e maior disponibilidade (WANG et al., 2000; LI et al., 1998; SU et al., 2001). Posteriormente, foram descobertos outros fungos endofíticos, isolados de plantas que não *Taxus* sp., capazes de produzir o taxol, sugerindo que esta substância, que é um fungicida, teria a função proteger a planta hospedeira de patógenos como os fungos aquáticos oomicetos (LI, SIDHU & STROBEL 1998; LI & STROBEL, 2001).



**Figura 3: a) *Taxol*, b) *Taxosmyces andreanae*, c) *Taxus brevifolia*.**  
 Fonte: b) Chris Muller, c) <http://www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/species/tabr2.htm>

Outra substância bioativa extraída de plantas e que pode ser obtida por cultivo de fungo endofítico é a podofilotoxina (Figura 4a), sintetizada pelas espécies vegetais em extinção *Podophyllum* spp. e com aplicação como anticâncer, antiviral, antibacteriano, imunoestimulador e antireumático. Recentemente, foi reportado o isolamento do fungo *Trametes hirsuta* a partir de *Podophyllum hexandrum*, espécie esta que produz podofilotoxina e além de lignanas biologicamente ativas, com propriedades antioxidantes, anticâncer e radioprotetora (PURI et al., 2006).

Outro exemplo de substâncias produzidas por fungos associados a plantas, são os alcalóides “ergot”, os quais tem analogia estrutural com aminas endógenas como a noradrenalina, dopamina e serotonina e quando usados em baixas doses tem efeito como vasoconstritor. Um exemplo é a ergotamina, (Figura 4) produzida pelo fungo *Claviceps purpurea*, que atua como estimulador da contração uterina (BACON & HINTON, 1988).



**Figura 4: Metabólitos secundários de fungos comuns em plantas**

#### 1.4 Fungos endofíticos como agente anticâncer

O câncer é o conjunto de mais de 100 doenças que invadem tecidos e órgãos e têm em comum o crescimento desordenado de células. Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis e podem formar tumores malignos que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2010). As causas de câncer são variadas e inter-relacionadas como por exemplo as causas externas ao organismo que referem-se ao meio ambiente e a hábitos ou costumes, enquanto que as causas internas, na maioria das vezes, são geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender de agressões externas. Os tumores que começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas e os que se iniciam nos tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. Entre os órgãos mais afetados no corpo estão pulmão, mama, colo do útero, próstata, cólon e reto (intestino grosso), pele, estômago, esôfago, medula óssea (leucemias) e cavidade oral (boca). Os tumores são de tipos diferenciados, menos ou mais agressivos. O tratamento do câncer requer uma ou mais modalidades combinadas, principalmente a cirurgia, que pode ser empregada em conjunto com radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. A quimioterapia, utilizada em tratamento sistêmico, é feita a base de fármacos que impedem a reprodução celular e consequentemente levam as células malignas à morte (SOUZA, 2004).

O combate ao câncer necessita cada vez mais soluções pensadas, com a participação de instituições governamentais e não-governamentais, universidades, centros de pesquisa e formadores de opinião. Em 2020 o número de casos novos anuais no mundo é estimado na ordem de 15 milhões, dos quais cerca de 60% em países em

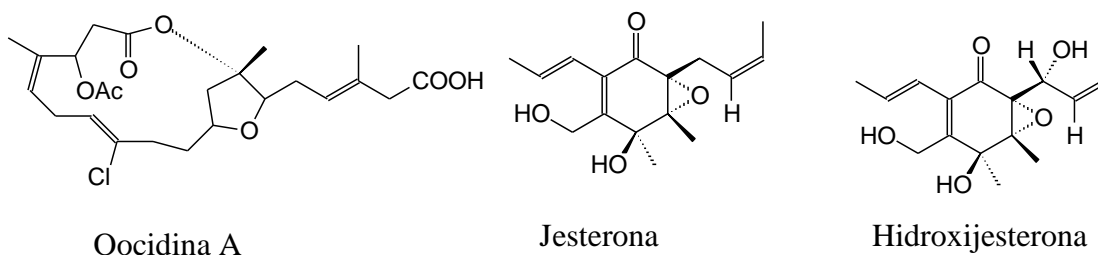
desenvolvimento. Sabe-se que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente poderiam ser prevenidos. No Brasil, estimou-se para 2008 e 2009 em torno de 500 mil casos novos sendo que o câncer é a segunda causa de morte em nosso país (INCA, 2010). Em fevereiro de 2007 no evento World Cancer Day, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou a estimativa de que cerca de 7,6 milhões de pessoas no mundo morreram de câncer em 2005 e que 84 milhões irão morrer entre 2005 e 2015 (WHO, 2006).

A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos produtos naturais. Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado. As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al, 2010).

Uma das maiores esperanças na solução de diversos problemas atuais, inclusive o câncer são os fungos endofíticos, cujo potencial no combate a este tipo de doença é amplamente ilustrado na literatura e pode ser avaliado pelos dados de uma prospecção na Tailândia em que foram obtidos 582 destes endófitos a partir de 81 plantas medicinais. Os extratos de 92 isolados inibiram a *Mycobacterium tuberculosis*, seis inibiram *Plasmodium falciparum*, 40 apresentaram atividade anti-virulenta contra herpes, 60 contra câncer oral e 48 contra câncer de fígado (WIYAKRUTTA et al., 2004).

Outro dado que ressalta a importância dos fungos endofíticos no combate ao câncer envolve a resistência de plantas aquáticas ou de áreas inundáveis, bem como plantas de regiões muito chuvosas a oomicetos, incluindo *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.* e *Aphanomyces spp.*, fungos extremamente fitopatogênicos. É muito provável que parte da defesa dessas plantas seja ocasionada por seus endófitos, como os produtores de paclitaxel (taxol) e a bactéria *Serratia marcescens* da planta aquática *Rhyncholacis penicillata*, cujo anti-oomiceto oocydina A, (Figura 5) também mata células cancerígenas (STROBEL & DAISY, 2003). O mecanismo de ação de metabólitos como jesterona e hidroxigesterona (Figura 5) contra os oomicetos seria o mesmo utilizado contra o câncer, o bloqueio da divisão celular. Uma consequência imediata, ratificada pela atividade anticancerígena de vários metabólitos anti-oomicetos, é a possibilidade de utilizar ensaios *in vitro* contra esses patógenos como uma metodologia prática, rápida e efetiva de prospecção de novos

anticancerígenos em produtos naturais (STROBEL, 2003). Através dela é possível eliminar abordagens randômicas, demoradas e caras nos passos iniciais de busca destes metabólitos.



**Figura 5: Metabólitos secundários anti-oomicetos**

### 1.5 A Família Annonaceae

Em meio à diversidade Amazônica, um grupo de plantas pertencentes à família Annonaceae destaca-se pelo crescimento considerável de sua importância econômica nas últimas décadas. A família Annonaceae compreende aproximadamente 130 gêneros e 2.300 espécies (MAAS, et al, 2001). Esta família é constituída por árvores, arbustos, e raramente por arbustos escandentes (PONTES, BARBOSA & MASS, 2004). Várias espécies (Figura 6) têm sido utilizadas na medicina tradicional apresentando uma ampla quantidade de metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas (CHATROU, RAINER & MAAS, 2004).

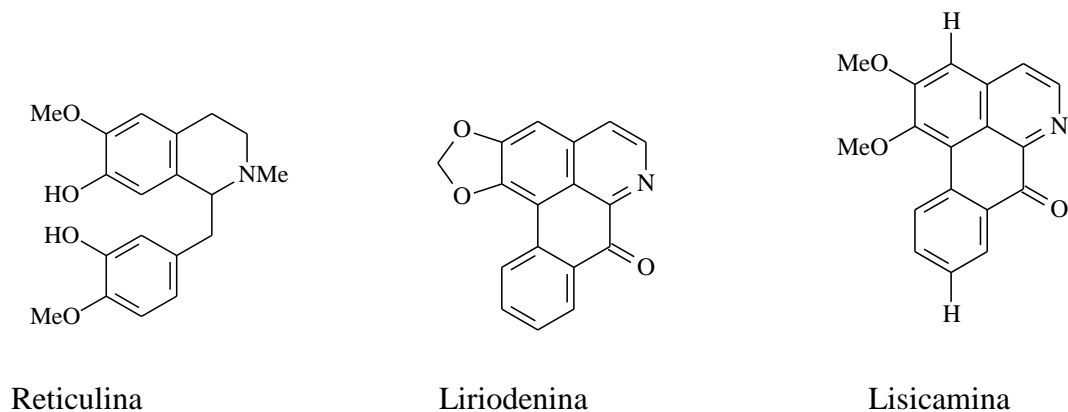


**Figura 6: a) *Annona muricata* b) *Rollinia mucosa* c) *Xylopia peruviana*.**

Fonte :a) <http://besthealtycare.com>, b) <http://www.kew.org>, c) [frutasraras.sites.uol.com.br](http://frutasraras.sites.uol.com.br)

Entre as classes de metabólitos secundários isolados de espécies de Annonaceae destacam-se alcalóides, acetogeninas, terpenóides e lactonas. Esses compostos apresentam atividades biológicas comprovadas como, por exemplo, os alcalóides benzilisoquinolínicos (reticulina) e isoquinolínicos (liriodenina e lisicamina) (Figura 7), que apresentam

inúmeras atividades biológicas como antiparasitária, antitumoral, inseticida e antibacteriana; acetogeninas com atividade antitumoral, antibacteriana, antiparasitária e inseticida (COSTA et al, 2006;).



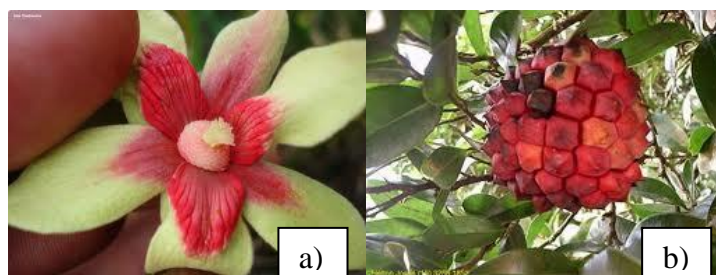
**Figura 7: Alcalóides isolados de espécies da família Annonaceae**

Apesar da importância dos membros dessa família na medicina popular, o número de espécies que têm sido investigadas é extremamente reduzido. Dentre as 2.300 espécies distribuídas em 130 gêneros, apenas 150 espécies (cerca de 7%) em 41 gêneros têm sido investigadas (CASTEDO et al., 1991; MAAS et al., 2001), mostrando que muitas ainda necessitam ser conhecidas e estudadas.

A escolha de plantas de *Annonaceae* para o estudo de seus microrganismos endofíticos, particularmente fungos, decorre da variedade de metabólitos das espécies dessa família, tendo sido escolhidos os gêneros *Rollinia* e *Duguetia*.

### 1.5.1 A hospedeira *Duguetia stelechantha*

O gênero *Duguetia* (Figura 8) compreende cerca de 80 espécies nativas na América tropical. O centro de distribuição é a Bacia Amazônica e Guiana, mas o gênero está representado também no sul da América do Sul de São Paulo ao Paraguai.

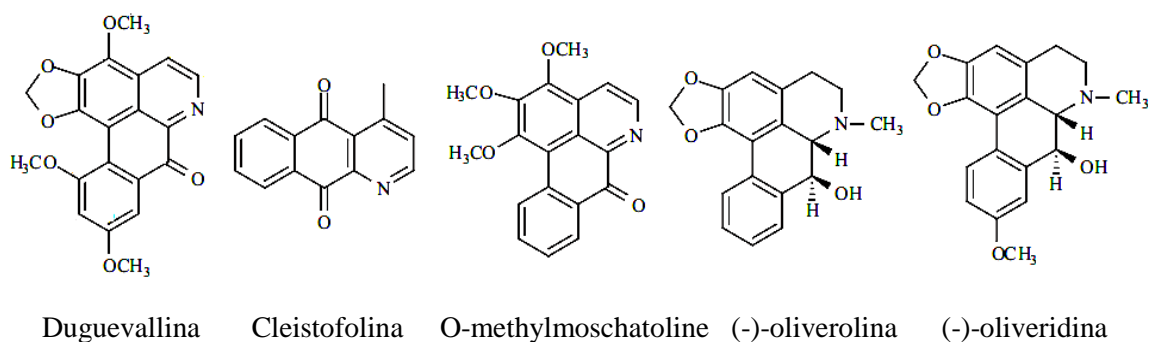


**Figura 8: a) *Duguetia furfuracea*. b) *Duguetia lanceolata*.**  
 Fonte: a) timblindim.wordpress. b) frutasararas.sites.uol.com.br



Diversos alcalóides têm sido isolados de várias espécies de *Duguetia* (CAVÉ; LEBOEUF; WATERMAN, 1987), alguns pelo estudo fitoquímico biomonitorado de *D. panamensis* por ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*, e outros alcalóides isoquinolínicos como a duguevalina (a), cleistofolina (b), O-metil-moschatolina (c), (-)-oliverolina (d) e (-)-oliveridina (e) de *Duguetia vallicola* (Figura 9) com atividade antiplasmódica (PÉREZ, et al., 2004).

As informações científicas de *D. stelechantha* são na sua maioria taxonômicas havendo ainda um grande vazio sobre a parte química e a microbiota associada. Com os primeiros passos dados anteriormente pela coleta e ensaios biológicos e químicos, este o primeiro estudo relacionado a química dos microrganismos endofíticos de *D. stelechantha*.



**Figura 9: Alcalóides isolados de *Duguetia vallicola*.**

### 1.5.2 A hospedeira *Rollinia* sp.

O gênero *Rollinia* (Figura 10) é constituído por 65 espécies, que ocorrem principalmente na América do Sul e com poucas espécies no México, Caribe e América Central (LEBOUF et al., 1982). Existem relativamente poucos relatos de investigações fitoquímicas sobre este gênero (KUO et al., 2001) quando comparado com outros gêneros da família (Annona, por exemplo), o que torna o seu estudo altamente relevante. Nascimento e colaboradores (2003) apresentaram resultados obtidos de estudo químico das folhas de *Rollinia laurifolia* que levou ao isolamento de três acetogeninas (Figura 11) já descritas em outros gêneros de Annonaceae, a uvariamicina-I (a), a solamina (b) e a gonionenina (c), mas relatadas pela primeira vez em *Rollinia*.



Figura 10: a) *Rollinia sericea*. b) Fruto de *Rollinia mucosa*

Fonte: a) sites.google.com b) fazendacitra.com.br

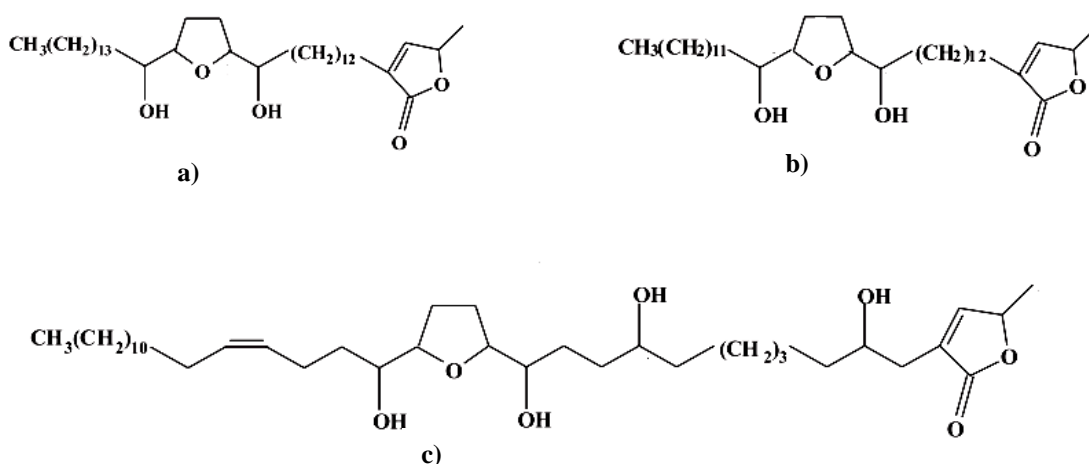


Figura 11: Acetogeninas isoladas de *Rollinia laurifolia*

A *Rollinia sp* conhecida popularmente como Araticum (Figura 12) está distribuída no Brasil e este nome é utilizado para designar a maioria das anonáceas, araticum de folha miúda, de terra fria. Os frutos não apresentam boas características comerciais, mas tem potencial farmacêutico, no melhoramento genético (SILVA, 2007).



**Figura 12: *Rollinia sp.***

**Fonte: [frutasraras.sites.uol.com.br](http://frutasraras.sites.uol.com.br)**

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Contribuir para o conhecimento do potencial químico e biológico de endófitos de *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp., com ênfase na busca de moléculas com ação anticancerígena e antimicrobiana.

### **2.2- Objetivos específicos**

- Realizar estudos químicos e biológicos de linhagens endofíticas de *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp., previamente selecionadas através de ensaios antimicrobianos e citotóxicos;
- Determinar atividades antimicrobianas e citotóxicas de extratos, frações e substâncias das linhagens selecionadas;
- Obter metabólitos secundários puros ou em misturas das linhagens selecionadas, através de técnicas de cromatografia e outras;
- Determinar as estruturas dos metabólitos secundários obtidos, através de técnicas espectrométricas;
- Identificar o(s) princípio(s) ativo(s) ou a(s) fração(ões) ativa(s) relacionada(s) as ações anticancerígenas e/ou antimicrobianas das linhagens selecionadas.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Materiais e Reagentes**

##### **3.1.1 Material para obtenção, cultivo e conservação dos fungos**

- Água destilada
- Glicerol P.A. - Nuclear<sup>®</sup>
- Dextrose – Nuclear<sup>®</sup>
- Extrato de levedura – Biosystems<sup>®</sup>
- Extrato de malte – Biosystems<sup>®</sup>
- Amido de milho - YOKI<sup>®</sup>
- Aveia - QUAKER<sup>®</sup>
- Batata
- Alcool 70%
- Hipoclorito de Sódio 3% - Nuclear<sup>®</sup>

##### **3.1.2 Solventes**

- Solventes de grau analítico Tedia, Merck e Sigma-Aldrich e de grau comercial destilados: acetato de etila, acetona, dimetilsufóxido, etanol, isopropanol, metanol e hexano;
- Solventes grau HPLC Tedia, metanol e isopropanol;
- Solventes deuterados Sigma-Aldrich para as análises de RMN.

##### **3.1.3 Fases estacionárias para cromatografia líquida**

- Placa cromatográfica de Sílica gel 60 Merck para cromatografia de camada delgada;
- Sílica gel (Flash) 70-230 Mesh e 230-400 Mesh para cromatografia em coluna;
- Sephadex LH 20 Sigma-aldrich.

##### **3.1.4 Equipamentos**

- Câmara de Fluxo Laminar – Tecnal<sup>®</sup>
- Estufa Incubadora – Tecnal<sup>®</sup>
- Autoclave Vertical – Stermax<sup>®</sup>
- Rotoevaporador – MA120, Marconi
- Lâmpada de U.V. 254 e 396 nm

- Estufa – TE-393/2, Tecnal
- Balança analítica –AUY 220, Shimadzu
- Bomba a vácuo – v-500, Buchi
- Cromatógrafo Thermo LC10, com detector DAD Thermo SPD-6AV acoplado ao espectrômetro de massas LCQ-*Fleet*-Thermo, analisador do tipo triplo-quadrupólo
- Cromatógrafo Shimadzu®, com detector de UV.
- Colunas para cromatografia líquida
  - Luna Phenyl Hexyl 10 μ, dimensões 150 x 200 mm– Phenomenex.
  - Luna Phenyl-hexyl 5μ, dimensões 250 x 10,00 mm – Phenomenex.
  - Luna C18 5μ, tamanho 150 x 4,60 mm – Phenomenex.
  - Luna C18 5μ dimensões 250 x 10,00 mm – Phenomenex.
- Espectrômetros de RMN
  - Bruker DXR 400;
  - Varian Inova 500;
  - Bruker AVANCE 400.
- Espectrômetro de massas TSQ-Thermo, com analisador do tipo triplo-quadrupólo;
- Espectrômetro de massas LCQ-*Fleet*-Thermo, com analisador do tipo *ion-trap*.

## 3.2 Isolamento dos fungos

### 3.2.1 Coleta do material botânico

A coleta da planta *Duguetia stelecantha* foi realizada no dia 11 de outubro de 2007 em uma área catalogada pelo professor de Botânica Antonio Carlos Webber, na Fazenda Experimental da UFAM, localizada no quilômetro 38 da BR-174 por volta das 10h. Foi realizada a coleta da planta *Rollinia* sp. na manhã do dia 14 de setembro de 2007 nas proximidades do Instituto de Ciências Humanas e Letras - ICHL do Campus Universitário da UFAM. A identificação desta planta como *Rollinia* sp. foi feita pelo mesmo botânico.

### 3.2.2 Material vegetal utilizado

Do espécime de *D. stelecantha* foram utilizados raiz, caule, folhas e fruto. Do material vegetal da espécie *Rollinia* sp. foram usados casca do caule, caule, casca da raiz, raiz, casca do galho, galho e folha.

### **3.2.3 Desinfecção do material vegetal**

Cada amostra vegetal foi lavada com detergente líquido e água de torneira. Em fluxo laminar foi feita a desinfecção superficial para a remoção dos microrganismos epifíticos, com etanol 70% durante 1 minuto, seguido por hipoclorito de sódio 4% por 3 minutos e novamente etanol 70% por 30 segundos. Por fim, o material vegetal foi lavado em água destilada autoclavada.

### **3.2.4 Isolamento dos fungos**

Após a assepsia superficial, cada tecido foi cortado em pedaços de aproximadamente 3 x 3 mm que foram colocados em placas de Petri contendo os meios de cultura com antibióticos descritos a seguir:

- BDA com 50 µL de Tetraciclina (50 µg/mL)– para o isolamento dos fungos.
- ISP<sub>2</sub> com 50 µL de Cetoconazol (20 µg/mL) – para o isolamento de bactérias e actinomicetos.
- Aveia com 50 µL de Cetoconazol (20 µg/mL) – para isolamento de bactérias e actinomicetos.

Cada tecido foi plaqueado em 3 placas com BDA (4 fragmentos), 2 placas com ISP<sub>2</sub> (9 fragmentos) e 2 placas com Aveia (9 fragmentos), além de 2 placas de cada meio para o caule não submetido a assepsia para epifíticos. Para cada tecido também foi feita uma placa controle para cada meio de cultura empregado no isolamento, em cuja superfície foi espalhada com alça de vidro (Drigalsky) uma alíquota de 50 µL da água destilada utilizada no último passo da assepsia superficial das amostras vegetais.

O material inoculado foi incubado a temperaturas aumentadas periodicamente de 18 para 26 e 30 °C. Após três dias pequenos pedaços de ágar contendo hifas dos fungos que originavam-se dos fragmentos foram transferidos para tubos de ensaio com meio de cultura inclinado, o mesmo meio do isolamento porém sem antibiótico.

### **3.2.5 Purificação, preservação e identificação.**

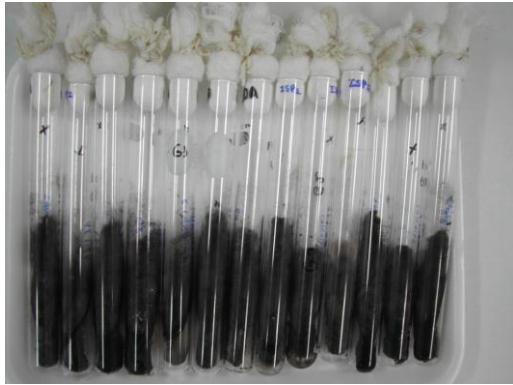
Após o crescimento dos microrganismos nos tubos, foi realizada a separação por grupos de acordo com suas morfologias, como ilustrado na Figura 13. Deu-se então o

procedimento de purificação das linhagens. Para as culturas mitospóricas foram realizadas diluições seriadas para o cultivo monospórico em duas placas de Petri (Esquema 1). Depois foi realizada a preservação das linhagens: pela metodologia de Castellani (1939) - cinco fragmentos contendo a cultura monospórica foram retirados da placa e colocados em vidros de penicilina contendo água destilada autoclavada; em óleo mineral – tubos de ensaio com o fungo crescido em meio de cultura inclinado e coberto com óleo mineral; e microtubos – suspensão dos esporos do fungo em 1 mL de solução de água e glicerol 90/10 (Figura 14).

As linhagens não mitospóricas foram repicadas dos tubos para placas de Petri com meios de cultura adequados a cada microrganismo e depois de incubadas a 26 °C foram preservadas em óleo mineral, solução de água/glicerol e placas de Petri pequenas (Figura 15).

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada pelas análises das estruturas macroscópicas, observando-se a consistência, a coloração e a forma das colônias e microscópicas, em que foram observados os tipos de micélios e corpos de frutificação. Para várias linhagens foram realizados micro-cultivos (Esquema 2) para a melhor verificação das hifas, micélio e estruturas de reprodução (sexuada e assexuada). As lamínulas com os fragmentos das linhagens foram coradas com lactofenol ou outro corante a fim de facilitar a visualização e a comparação com literatura de taxonomia específica para cada grupo. Os fungos dos grupos não mitospóricos (Esquema 3) foram analisados após fragmentos da cultura a fresco serem transferidos para lâminas e corados.

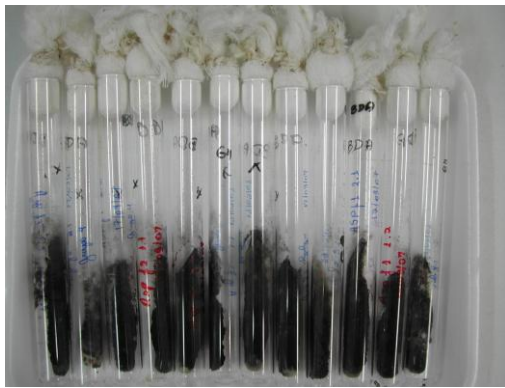




a)



b)

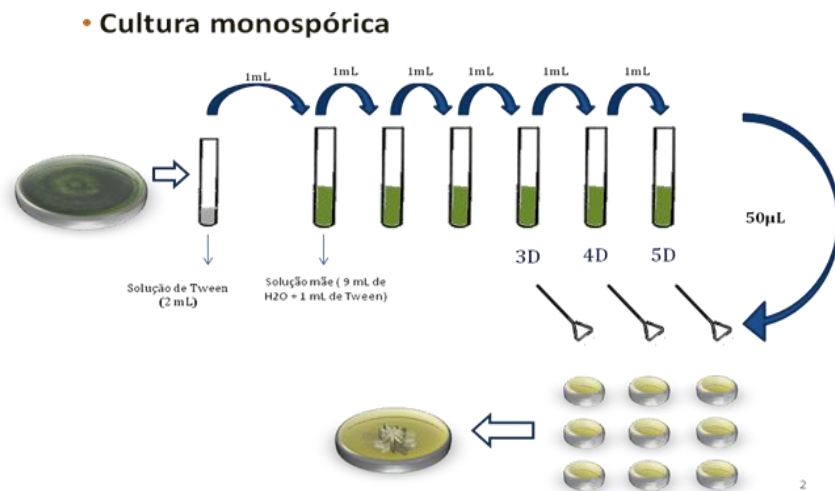


c)

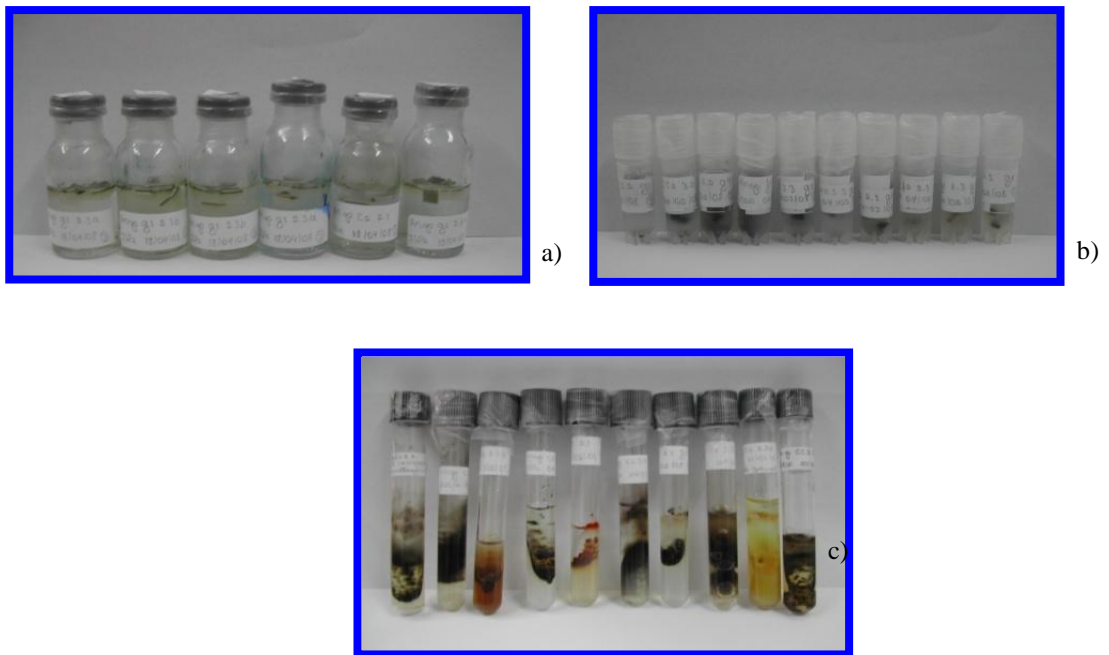


d)

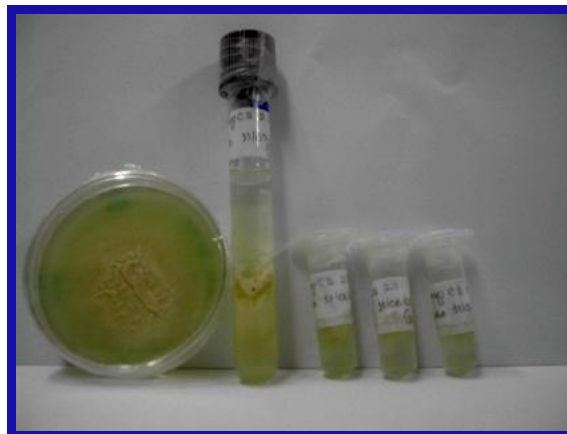
**Figura 13: Fungos endofíticos de AnspCr11.1 em tubos com meio inclinado agrupados de acordo com a morfologia.**



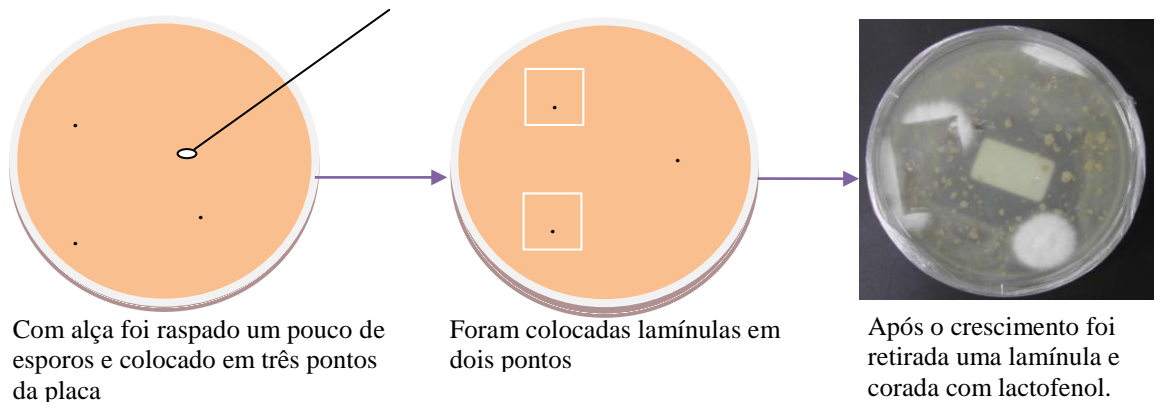
**Esquema 1: Diluição seriada para obtenção de cultura monopóica.**



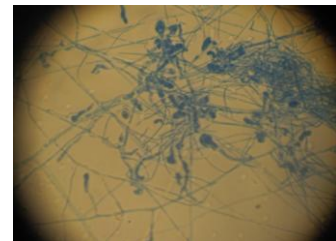
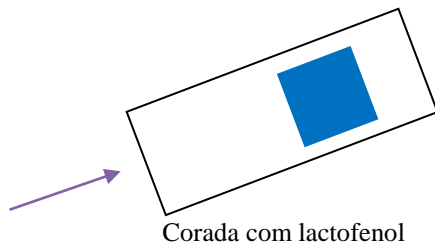
**Figura 14: Preservação de fungo mitospóricos, a) Castellani (1939); b) Microtubos de 2,0 mL contendo água e 10% de glicerol; c) Tubo com meio inclinado e óleo mineral.**



**Figura 15: Culturas não mitospórica (Óleo mineral, placa pequena e microtubos).**

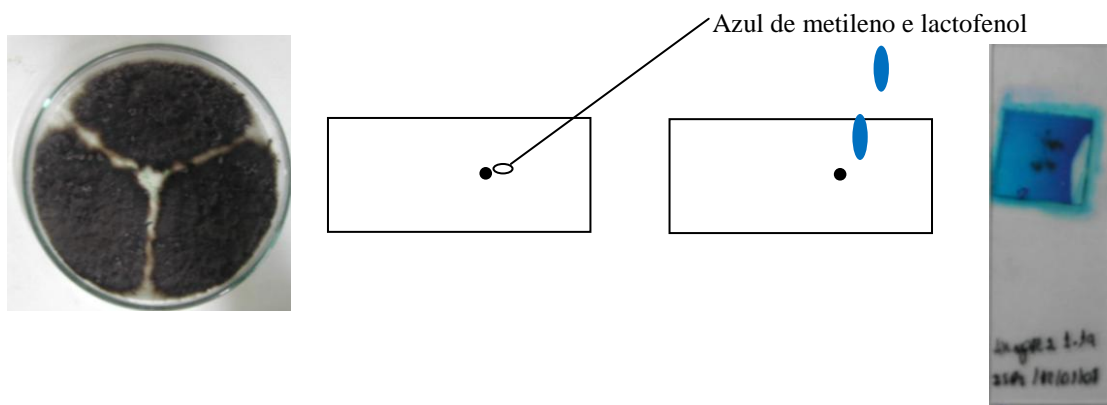


Após a esporulação retirou-se outra lamínula, e o terceiro ponto foi só para comparar o crescimento.



Identificação morfológica

### Esquema 2: Microcultivo dos fungos mitospóricos



### Esquema 3: Lâmina a fresco

### 3.3 Cultivo dos fungos em escala analítica

#### 3.3.1 Preparo dos meios de cultura

- **BD (Batata + dextrose)**

Foram cozidas 200g de batatas para cada litro de meio em microondas com água destilada por 20 minutos em potência alta. O caldo foi filtrado e o volume completado com água destilada. Foram acrescentados 20 g de dextrose seguido pela esterilização do meio em autoclave a 121 °C por 15 min. Para o cultivo dos fungos isolados de *Rollinia sp*, foram adicionados 2 g de extrato de levedura.

- **ISP2**

Foram pesados 10 g de amido de milho, 4 g de extrato de levedura, 10 g de malte e 15 g de dextrose para cada litro de meio de cultura. A mistura foi transferida para erlenmeyers de 500 mL e autoclavados a 121°C por 15 minutos para sua esterilização.

- **AVEIA**

Para cada litro de meio de aveia líquido, foram pesados 10 g de aveia, 4 g de extrato de levedura, 10 g de malte e 4 g de dextrose. Foi adicionada água destilada e o meio foi distribuído em erlenmeyers de 500 mL e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

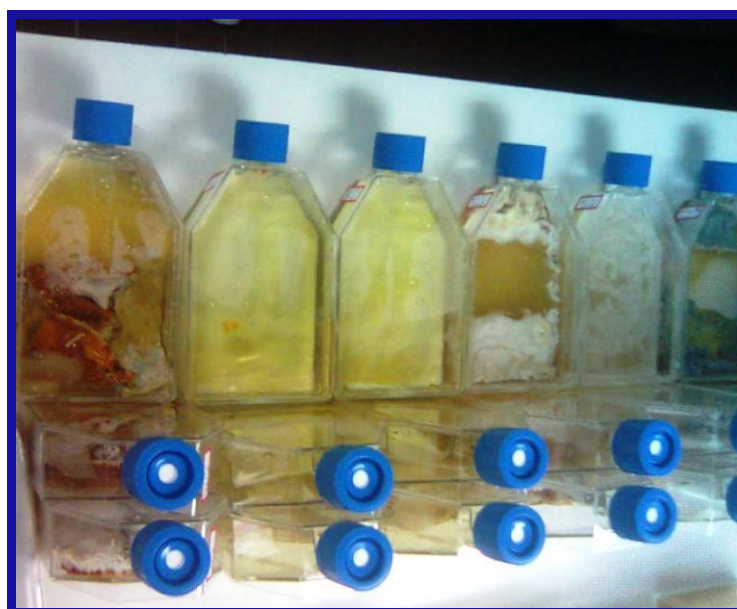
#### 3.3.2 Condições de cultivo

##### 3.3.2a Fungos isolados de *Duguetia stelechantha*

Foram selecionadas 15 linhagens de fungos isolados de *D. stelechantha* (Tabela 2) fermentados em meio líquido, estático, a temperatura ambiente, por 19 dias em garrafas de plástico (Figura 16). Cada linhagem foi cultivada em triplicata nos meios de cultura de composição semelhante aos das placas de isolamento em que foram obtidos.

**Tabela 2: Fungos cultivados em pequena escala de fungos de *Duguetia stelechanta***

<b>Meio BD</b>	<b>Meio ISP2</b>	<b>Meio Aveia</b>
DgC32.2	DgC21.2 s/assp*	DgR22.1
DgCr31.1	DgCC 12.1c	DgG23.2b
	DgCr22.1b	DgC11.1 s/assp
	DgC12.3	DgC12.3 s/assp
	DgG23.2 <sup>a</sup>	DgCr13.3
	DgC12.1 s/assp	DgC23.1
	DgC21.3	



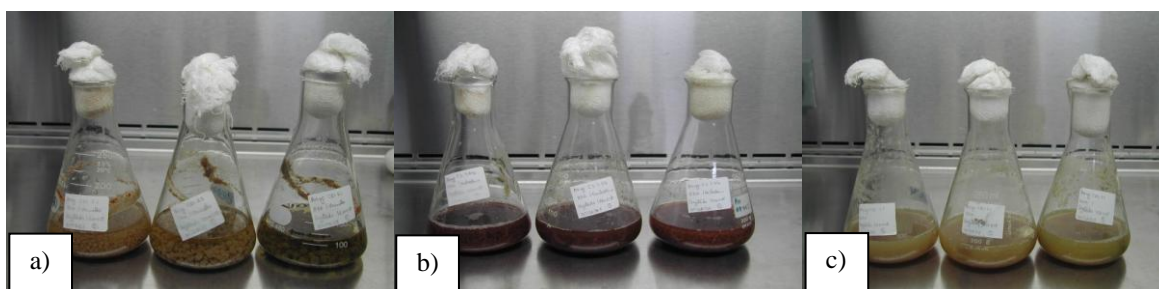
**Figura 16: Cultivo em pequena escala de endófitos isolados de *Duguetia stelechanta*.**

### **3.3.2b Fungos isolados de *Rollinia* sp.**

Após o isolamento, os fungos foram preservados em água glicerol 10% e 21 linhagens foram selecionadas e cultivadas nos respectivos meios de cultura como descrito na tabela 3. A fermentação (Figura 17) ocorreu sob agitação a 120 rpm, a 26°C, durante 15 dias. Após o período de incubação foi efetuada a filtração a vácuo para separação do meio fermentado e do micélio seguida pela obtenção dos extratos.

**Tabela 3: Isolados de *Rollinia* sp. em seus respectivo meios cultivados em pequena escala**

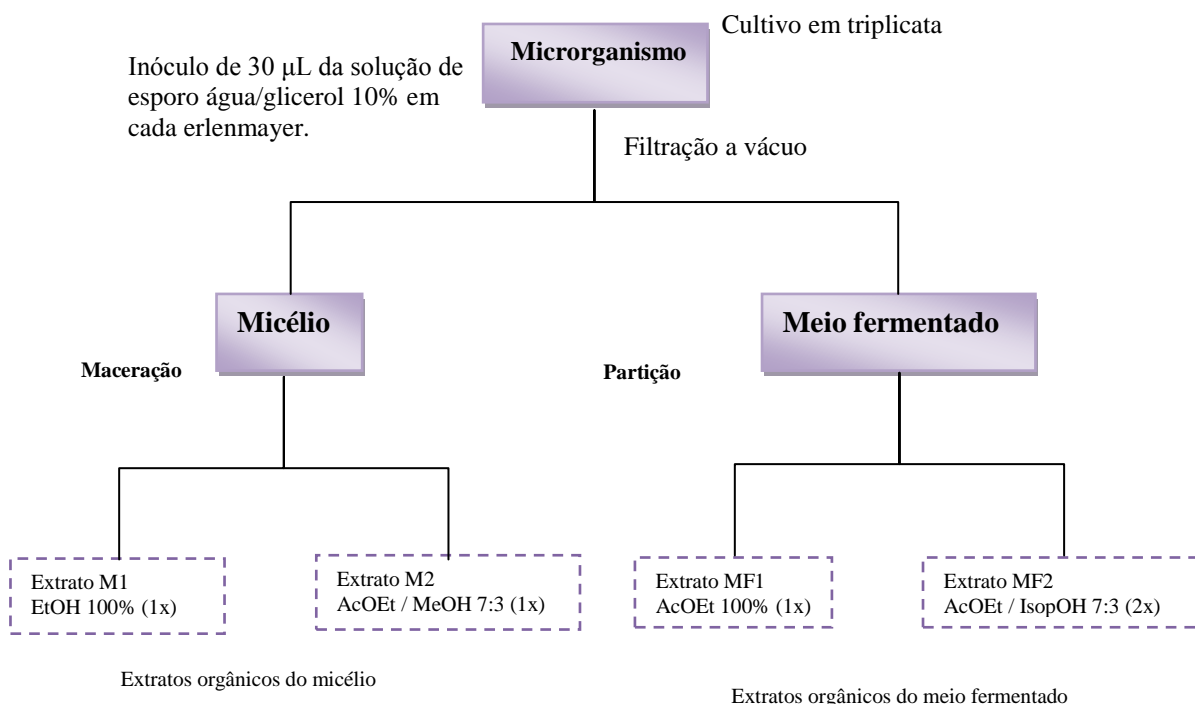
Meio BD + extrato de levedura	Meio ISP2	Meio Aveia
Ansp C31.2 c ( <i>Trichoderma</i> )	Ansp Cg 11.3a ( <i>Pestalotiopsis</i> )	Ansp R12.1( <i>Trichoderma</i> )
Ansp R21.1 (não identificado)	Ansp Cg12.1( <i>Pestalotiopsis</i> )	Ansp CC 21.2( <i>Trichoderma</i> )
AnspC22.1 ( <i>Penicillium</i> )	Ansp R12.1( <i>Trichoderma</i> )	Ansp R12.3b ( <i>Penicillium</i> )
AnspCr 12.1 (não identificado)	Ansp CC 21.2 ( <i>Trichoderma</i> )	Ansp R12.3b ( <i>Penicillium</i> )
AnspC31.1b ( <i>Trichoderma</i> )	Ansp CC 21.2 ( <i>Trichoderma</i> )	Ansp C23.1 ( <i>Penicillium</i> )
AnspCr11.1( não identificado)	Ansp C23.1 ( <i>Penicillium</i> )	Ansp cg22.1b (não identificado)
Ansp f32.2 ( <i>Colletotrichum</i> )	Ansp f11.3 g4 (não identificado)	Ansp CC12.1 g1 (não identificado)
Ansp Cg 11.3a( <i>Pestalotiopsis</i> )	Ansp cg21.2 <sup>a</sup> (não identificado)	Ansp cg13.2 (não identificado)
Ansp Cg12.1 ( <i>Pestalotiopsis</i> )	Ansp f11.2 (não identificado)	Ansp f32.2 ( <i>Colletotricum</i> )
Ansp C23.1 ( <i>Penicillium</i> )	Ansp f32.1b ( <i>Colletotricum</i> )	



**Figura 17: Fermentação dos fungos endofíticos solados de *Rollinia* sp. sob agitação**  
**a) An sp CR1 2.1 BD + Ext.(Vermelho - sob agitação) b) An sp C3 1.2b BD + Ext.(Trichoderma- sob agitação) c) An sp CR1 1.1 BD + Ext.(Amarelo - sob agitação).**

### 3.3.3 Obtenção dos extratos para os ensaios preliminares

Após os micélios e os meios fermentados serem separados por procedimentos de filtração, adaptado para cada caso, foram realizadas extrações líquido-líquido do meio fermentado de cada microrganismo e maceração do micélio conforme mostrado no modelo geral do Esquema 4.



**Esquema 4: Esquema geral para obtenção dos extratos dos fungos cultivados em pequena escala**

## 3.4 Ensaios biológicos

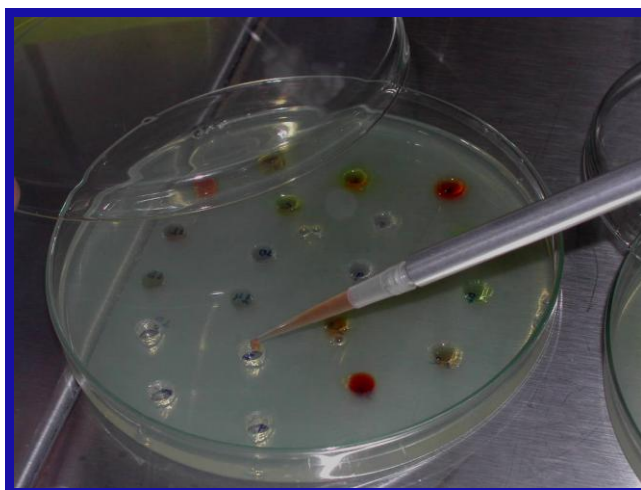
### 3.4.1 Ensaios antimicrobianos

Ao final das extrações líquido-líquido os extratos foram concentrados e pesados, posteriormente foram enviados para ensaios de citotoxicidade e ensaios antimicrobianos.

#### *Bacillus cereus*

O teste contra *Bacillus cereus* realizados na Universidade Federal do Amazonas, no laboratório do Grupo de Espectrometria de Massas Microorganismos da Amazônia - GEMMA, pela metodologia de difusão em ágar (Figura18), o qual 2 mg de cada amostra

foram dissolvidos em 1mL de DMSO ou etanol e água, na proporção de 1:9. A bactéria foi reativada em um tubo de ensaio com meio BHI líquido e após 24 horas do seu crescimento foi realizado o teste. Em uma placa de Petri com 14 cm de diâmetro contendo o meio foram adicionados 100 µL da suspensão com a bactéria. Com auxílio de uma alça de Drigasliki, a suspensão bacteriana foi espalhada na placa e posteriormente foram feitos poços no meio, nos quais as amostras foram aplicadas. A incubação ocorreu a 37 °C e foi acompanhada por 24 e 48 horas. Os resultados foram revelados com o corante cloreto tetrazólico 1% (1 g/100 mL de água). Os extratos de fungos isolados de *D. stelechantha* foram ensaiados contra *B.cereus* .



**Figura 18: Inoculação dos extratos testados contra *B. cereus* .**

### ***Candida albicans* e *Penicillium avellani***

As linhagens isoladas de *D. stelechantha* foram ensaiadas contra os dois fungos citados, porém as linhagens isoladas de *Rollinia sp* foram ensaiadas apenas contra *Penicillium avellani*. O teste antifúngico foi semelhante ao antibacteriano, porém a suspensão de esporos dos fungos foi misturada ao meio de cultura (BDA) e não apenas espalhada sobre a sua superfície. As soluções das amostras foram aplicadas em poços nas placas de Petri e após 24 e 48 horas os resultados foram analisados.



### 3.4.2 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados na Universidade Federal do Ceará em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental. As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e HL-60 (leucemia - 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 CO<sub>2</sub>. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Substâncias puras foram testadas na concentração única de 5µg/mL, os extratos na concentração de 50µg/mL e as frações na concentração de 25µg/mL.

Análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT, um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. 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. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10<sup>6</sup> cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,7 x 10<sup>5</sup> cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> 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 ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

Apenas as frações ou substâncias que apresentarem valores de inibição ≥ 90% a pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) foram escolhidas para avaliações subsequentes.

### 3.5 Seleção, cultivo e obtenção de extratos de linhagens para estudo químico

Entre as linhagens de microrganismos endofíticos de *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp., preservadas na coleção de microrganismos do LabGEMMA, foram selecionadas para o presente estudo as codificadas como DgCr22.1b, DgC32.2 (*Duguetia stelechantha*) e AnspCR1 1.1 (*Rollinia* sp.).

#### 3.5.1 Cultivo em larga escala da linhagem DgCr2 2.1b

Esta linhagem foi reativada e inoculada em 39 erlenmeyers contendo 300 mL de meio líquido ISP2 previamente esterilizado. O crescimento do fungo ocorreu em temperatura de 25°C em modo estático por 19 dias. Após o período de fermentação (Figura 19) foi realizada a filtração para separar o micélio do líquido fermentado.



Figura 19: Cultivo em larga escala de DgCr22.1b

#### 3.5.2 Cultivo em larga escala da linhagem DgC32.2

A linhagem foi reativada e inoculada em 60 erlenmeyers contendo 300 mL de meio líquido BD previamente esterilizado. O crescimento do fungo ocorreu em temperatura ambiente em modo estático por 21 dias. Após o período de fermentação o meio foi filtrado para separar o micélio do líquido fermentado.

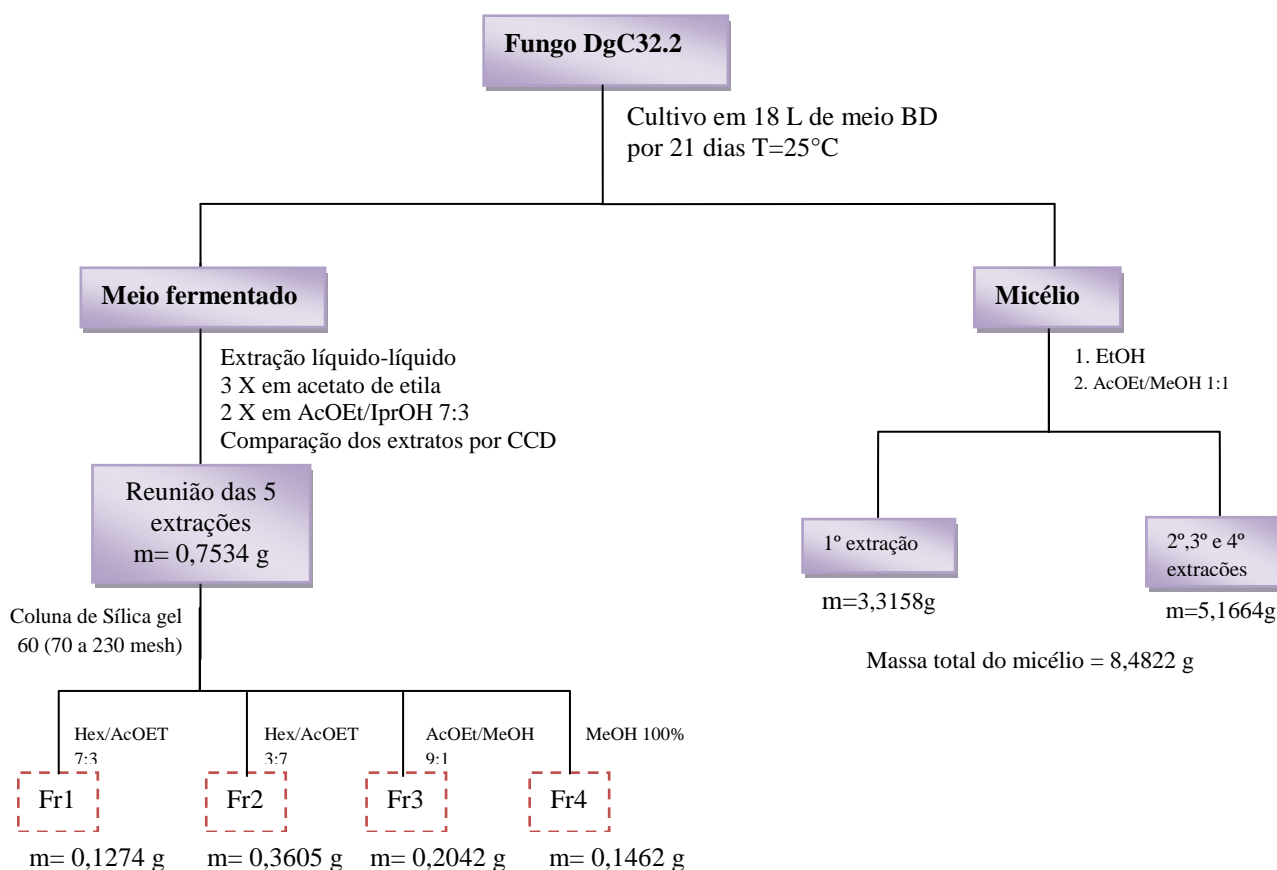
#### 3.5.3 Cultivo em larga escala da linhagem AnspCr1 1.1

A linhagem foi reativada e inoculada em 60 erlenmeyers contendo 300 mL de meio líquido BDL previamente esterilizado. O crescimento do fungo ocorreu em temperatura ambiente em modo estático por 23 dias. Após o período de fermentação foi realizada a filtração para separar o micélio do líquido fermentado.

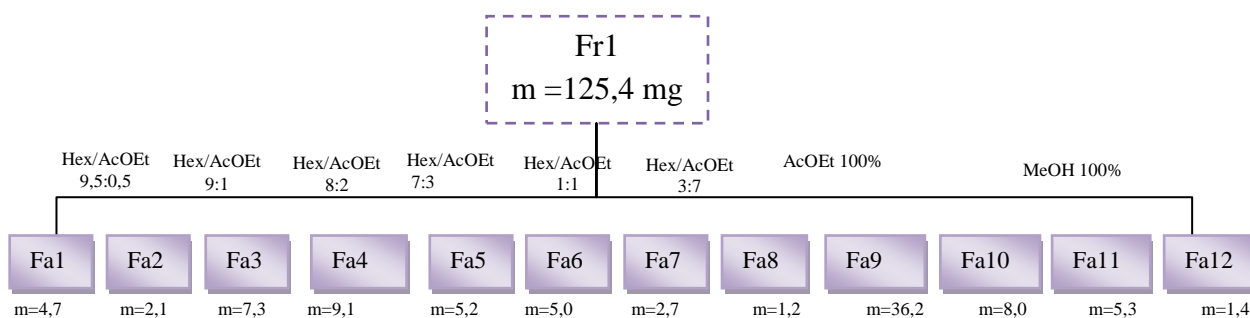
### 3.6 Estudos químicos

#### 3.6.1 Estudo químico do fungo DgC3 2.2

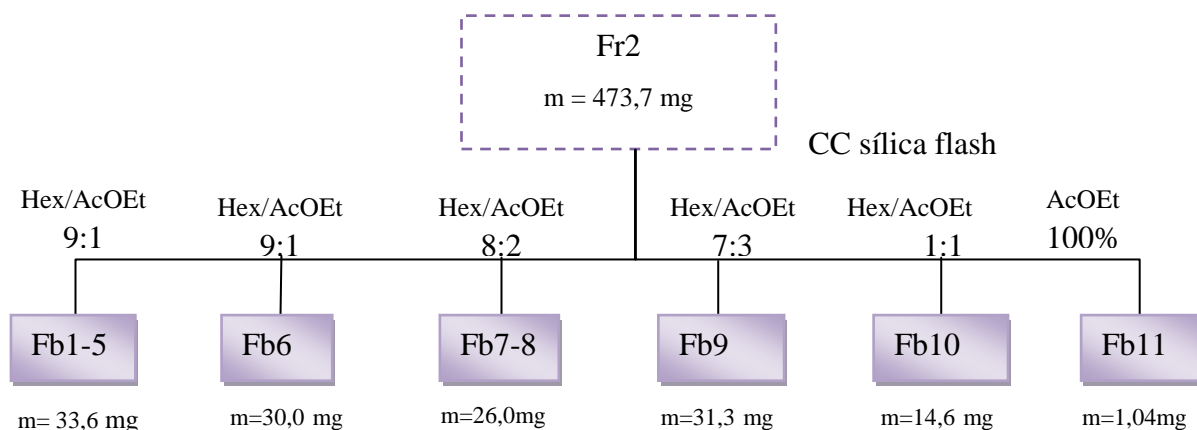
Após 21 dias de cultivo, foi realizada a filtração a vácuo para separação do meio fermentado e do micélio. O meio fermentado foi particionado três vezes com acetato de etila 100% e duas vezes com acetato de etila/*iso*-propanol na proporção de 7:3, fornecendo dois extratos. O micélio foi triturado e macerado com etanol 100% e três vezes com a mistura de acetato/metanol na proporção de 1:1 fornecendo também dois extratos. Os extratos do meio fermentado foram comparados através de análises em CCD, reunidos e submetido a cromatografia em coluna aberta filtrante sob pressão reduzida com gradiente de polaridade crescente (hexano/acetato de etila e metanol), fornecendo 4 frações de acordo com o Esquema 5.



Esquema 5: Obtenção dos extratos de meio fermentado e micélio do fungo Dg C32.2



**Esquema 6: Obtenção das subfrações de Fa a partir de Fr1**

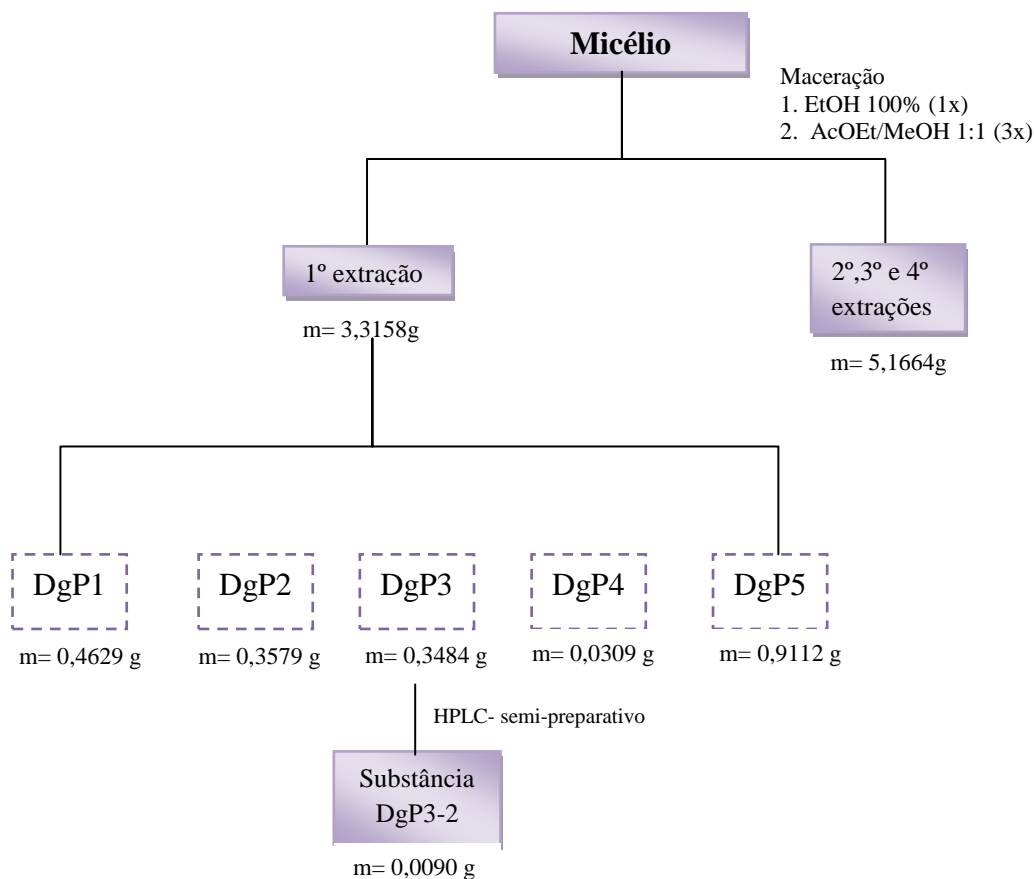


**Esquema 7: Obtenção das subfrações Fb a partir de Fr2**

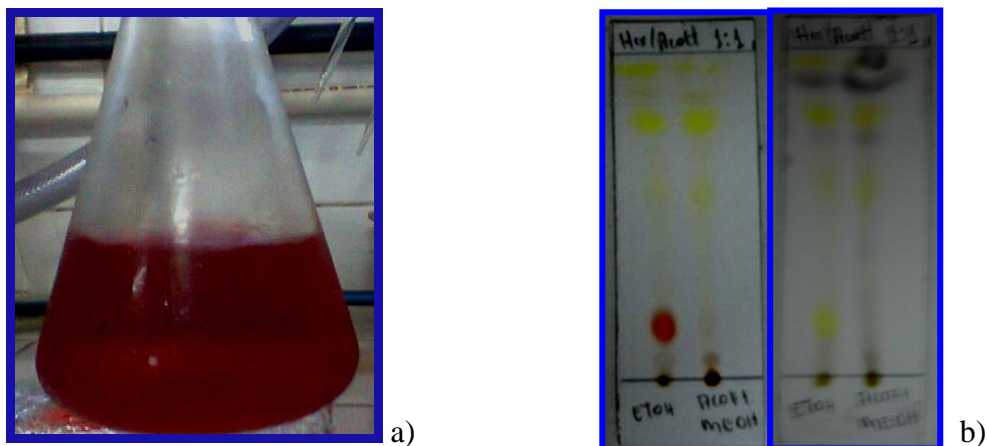
### Fracionamento do extrato do micélio de DgC32.2

O extrato etanólico do micélio foi submetido a um fracionamento em coluna filtrante com gel de sílica de 200 a 600 mesh eluído com hexano/acetato 1:1, acetato 100% e metanol 100% fornecendo 5 frações como mostrado no esquema 8. Antes do fracionamento o extrato etanólico apresentou um mancha vermelha intensa na placa de CCD, motivo pela qual foi selecionada. A fração 3 (DgP3) eluída em 100% de acetato de etila apresentou um cor vermelha intensa (Figura 20) e foi analisada por LC-UV. Em seguida esta foi purificada por HPLC semi-preparativo. Inicialmente foram feitas análises exploratórias em escala analítica utilizando-se um cromatógrafo Surveyor® (Thermo Scientific), com um detector PDA. No desenvolvimento do método foi usada uma coluna Luna C18 (fase reverso), 5 $\mu$ , tamanho 150 x 4,60 mm – Phenomenex. As fases móveis

utilizadas nesse modo de eluição foram metanol e água em modo gradiente de 70 a 100% de metanol com vazão de 0,7 ml/min. A purificação do pigmento em escala semi-preparativa procedeu-se através de um cromatógrafo Shimadzu®, operando com detector de UV utilizando o comprimento de onda de 480 nm. A fase estacionária utilizada foi uma Luna C18 (fase reverso)– Phenomenex. As fases móveis utilizadas nesse modo de eluição foram metanol e água na proporção de 7,5:2,5 com vazão de 12 ml/min. Foram obtidas 7 frações no qual a segunda fração forneceu a substância DgP3-2.



**Esquema 8: Obtenção dos extratos de micélio, fracionamento do extrato em etanólico e obtenção da substância DgP3-2**



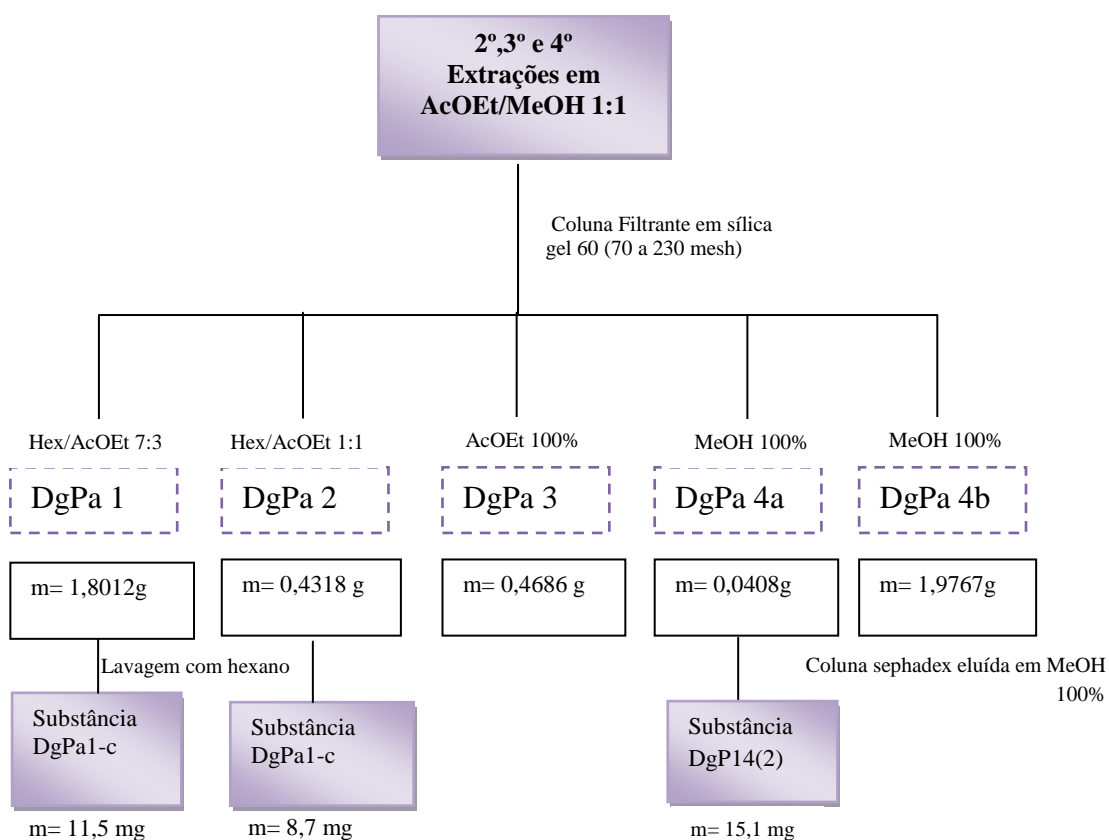
**Figura 20: a) Fração 3 (DgP3) da coluna filtrante, b) CCD do extrato em etanol e extrato em acetato/metanol 1:1.**

O extrato em acetato/metanol 1:1 foi fracionado em coluna filtrante de gel de sílica de 200 a 600 mesh eluído com Hex/AcOEt 7:3, Hex/AcOEt 1:1, AcOEt 100% e MeOH 100% fornecendo cinco frações (Esquema 9). As frações resultantes da coluna filtrante foram comparadas por CCD (Figura 21), observando-se uma mancha roxa nas duas primeiras frações. Observou-se também que havia formação de cristais na parede dos frascos destas frações. As mesmas foram lavadas com hexano o qual foram obtidas duas amostras DgPa1-c e DgPa2-c correspondentes a mesma substância.

A fração DgPa4b (m= 1,767 g) foi separada em duas aplicações em coluna aberta de sílica polimérica (h =80 cm e  $\phi$  = 3,0 cm, Sephadex LH-20) eluída em modo isocrático com 100% de metanol. As subfrações foram submetidas a CCD e análise por HPLC-UV, o qual foi selecionada a subfração DgP14-2 para análise de RMN de  $^1\text{H}$ . Posteriormente a amostra foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais além da análise por espectrometria de massas.



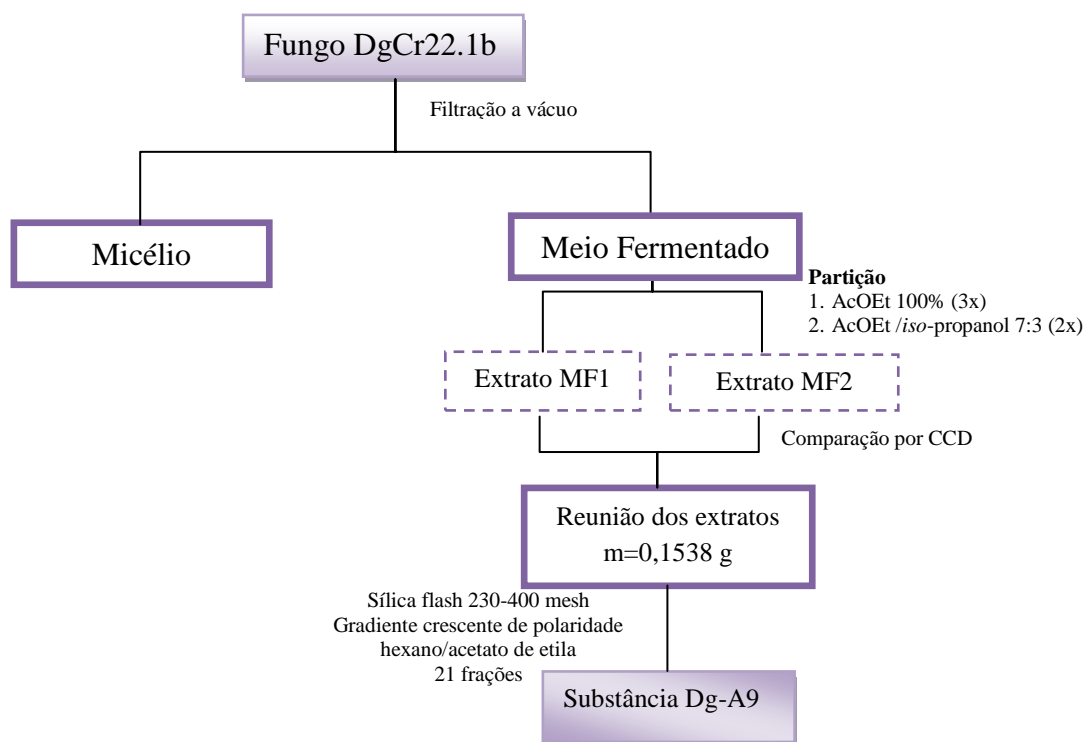
**Figura 21: CCD das frações DgPa**  
 a) revelador UV de 264 nm e b) revelador vanilina sulfúrica.



**Esquema 9: Fracionamento do extrato em AcOEt/MeOH 1:1 e obtenção das substâncias DgPa1-c, DgPa2-c e DgP14 (2)**

### 3.6.2 Estudo químico do fungo DgCr22.1b

O cultivo em escala analítica deste fungo forneceu um bom rendimento de massa de extrato de meio fermentado e de micélio do fungo DgCr22.1b. Baseado nos resultados de testes biológicos aliados ao bom rendimento, os extratos do meio fermentado foram reunidos e fracionados por cromatografia em coluna de bancada resultando em 21 frações, o qual foi obtida uma fração pré-purificada que foi enviada para análise em RMN e espectrometria de massas (Esquema 10).

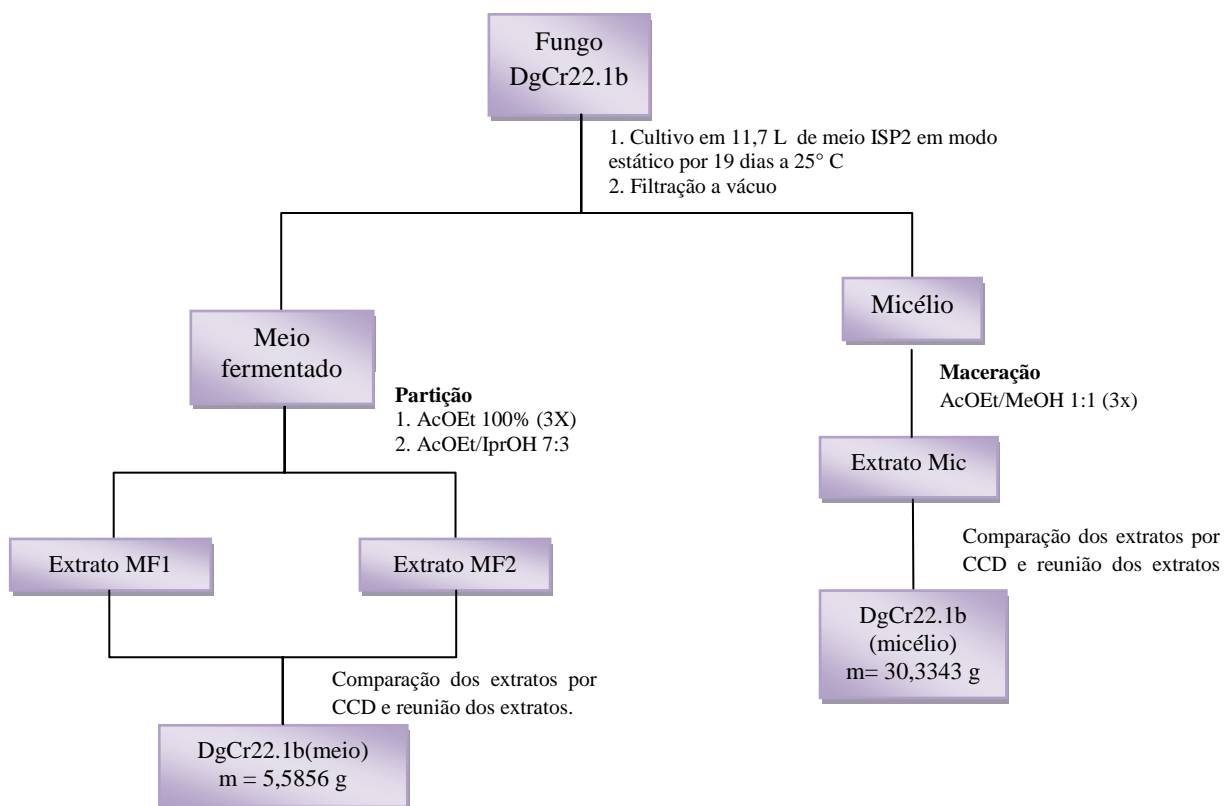


**Esquema 10: Obtenção da substância Dg-A9 do meio fermentado de DgCr22.1b**

Após 17 dias de cultivo em larga escala, foi realizada a filtração para separação do meio fermentado do micélio, seguido pela extração por solventes orgânicos como mostrado no esquema 11. O micélio foi triturado e macerado com a mistura de acetato/metanol 1:1 três vezes e em seguida o material foi concentrado para obtenção do extrato. O meio fermentado foi particionado três vezes com acetato de etila 100% e duas vezes com a

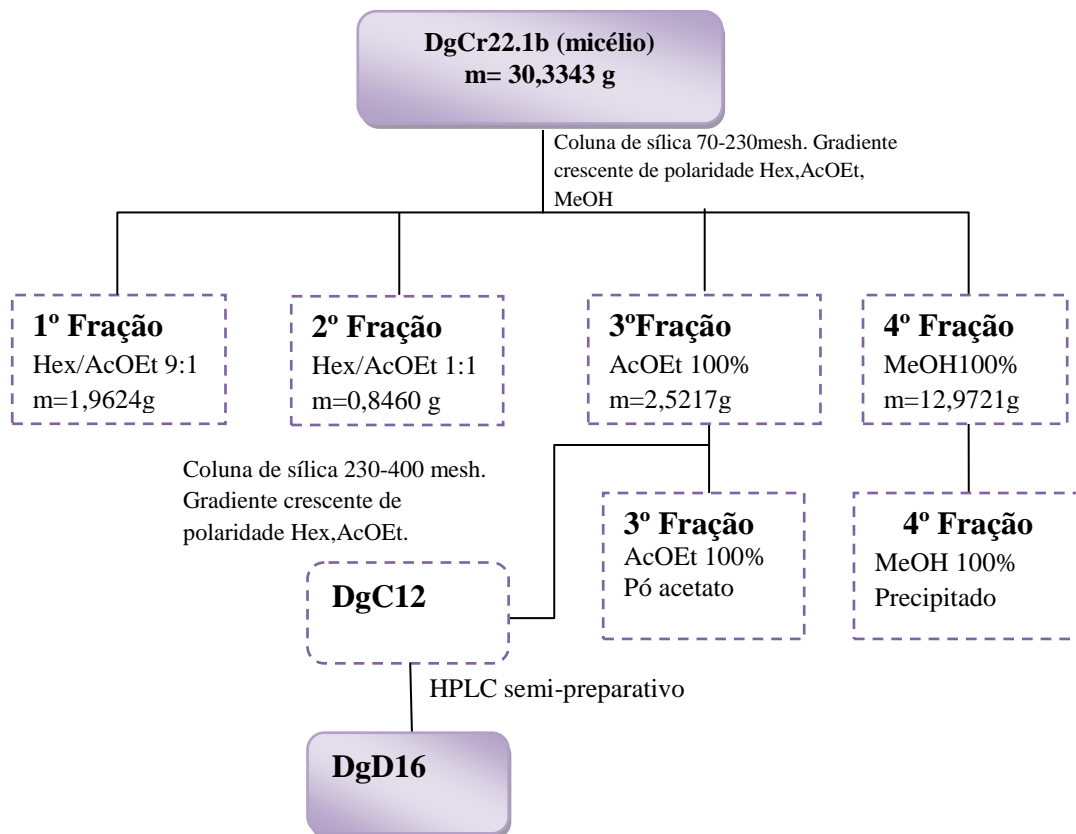


mistura de acetato/*iso*-propanol 7:3, mesma forma que o micélio o material foi concentrado para a obtenção dos extratos.



**Esquema 11: Preparação dos extratos do meio fermentado e do micélio de DgCr22.1b**

O extrato do micélio foi fracionado em coluna filtrante de gel de sílica de 200 a 600 mesh eluído com Hex/AcOEt 9:1, Hex/AcOEt 1:1, AcOEt 100% e MeOH 100% fornecendo cinco frações (Esquema 12). Baseado nos resultados de ensaios contra células tumorais, foram estudadas quimicamente a 2ª e a 3ª fração. O fracionamento da 3ª fração levou a obtenção de subfrações que apresentaram cristais amarelos (Figura 22). Estes foram comparados por CCD e submetidos a purificação por HPLC semi-preparativo. A substância isolada foi enviada para análises em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D e 2D.



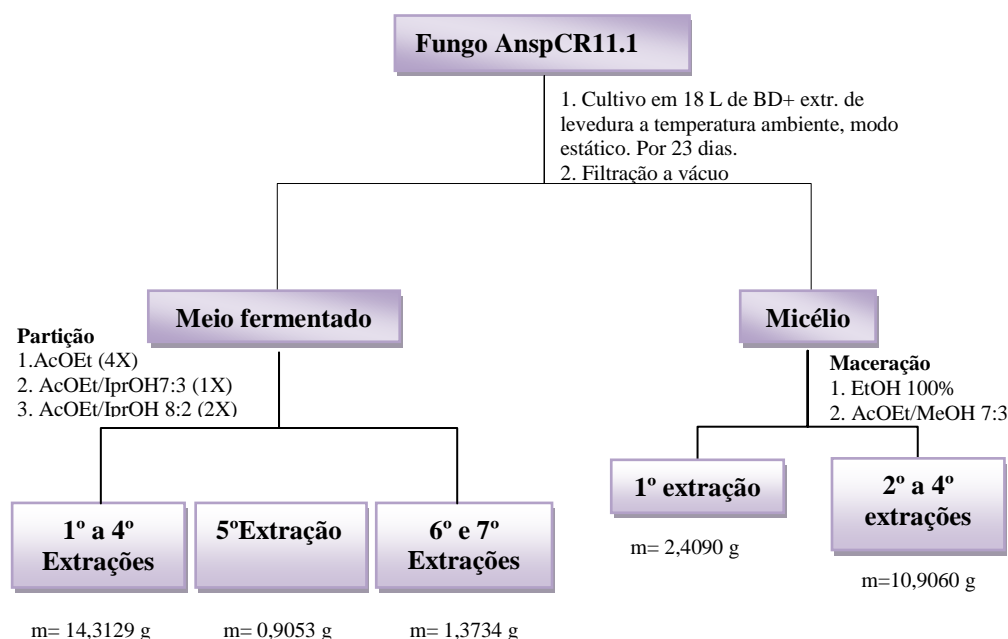
**Esquema 12: Fracionamento do extrato do micélio de DgCr22.1b**



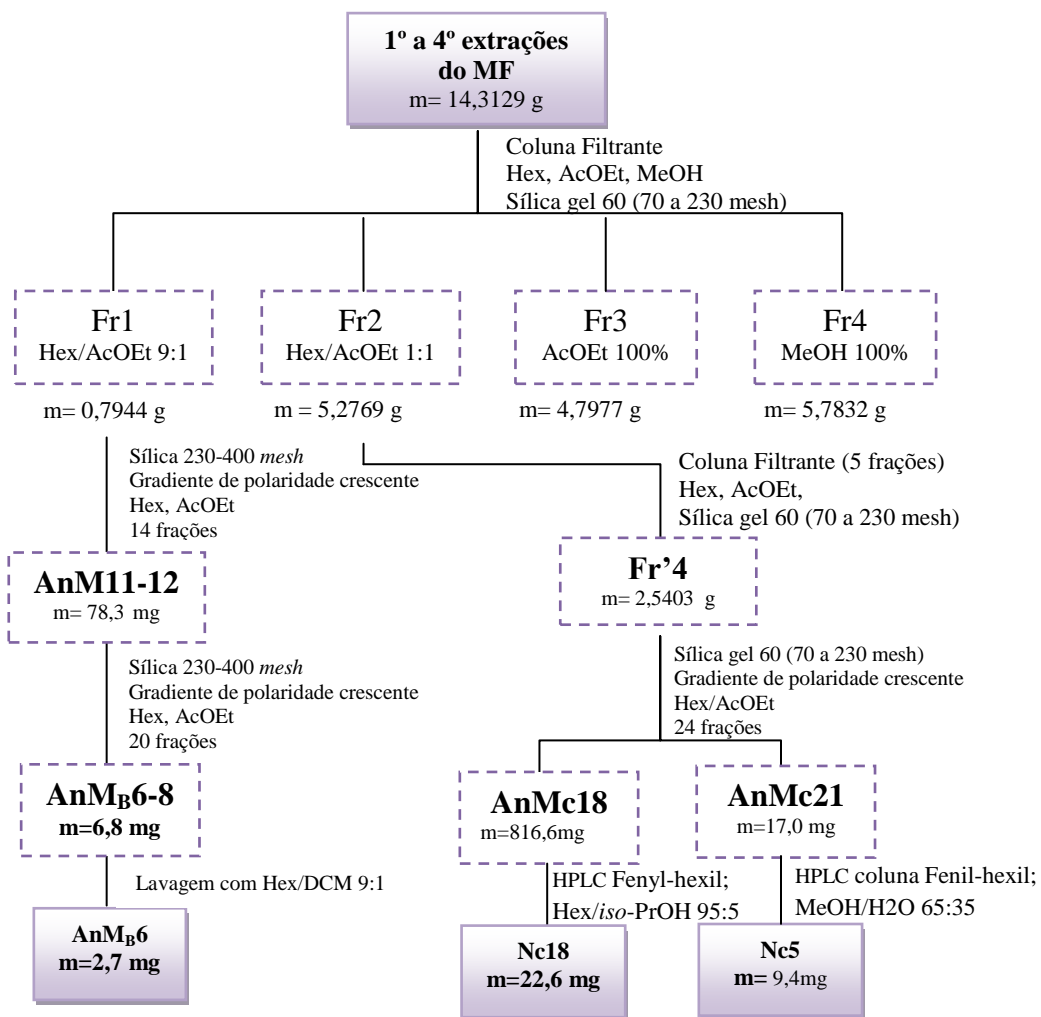
**Figura 22: Fração DgC12\*, sólido amarelado.**

### 3.6.3 Estudo químico do fungo AnspCr11.1

Após 23 dias de cultivo, o fungo AnspCr11.1 foi filtrado separando o meio fermentado do micélio. O meio fermentado foi particionado quatro vezes com acetato de etila e *iso*-propanol na proporção de 8:2 e três com acetato de etila e *iso*-propanol na proporção de 7:3 fornecendo dois extratos. O micélio foi macerado com etanol e particionado com uma mistura de acetato de etila e metanol na proporção de 7:3. Os extratos obtidos das partições do meio fermentado foram comparados por CCD e optou-se por reunir as extrações em acetato de etila e *iso*-propanol 7:3. Este extrato foi submetido a coluna filtrante com gradiente de polaridade crescente (hexano/Acetato de etila), fornecendo quatro frações conforme o esquema 13. A frações Fr 1 foi submetida a coluna de sílica flash com gradiente de polaridade crescente de hexano e acetato de etila fornecendo 14 subfrações (Esquema 14). Estas foram comparadas por CCD e decidiu-se reunir as frações AnM-12 e AnM13 para novo fracionamento por cromatografia de coluna. As novas subfrações foram rotuladas com o código AnMb observou que nas frações AnMb6 a AnMb8 houve a formação de cristais. Estes foram lavados com uma solução de Hex/DCM 9:1 o qual foi obtida a substância AnMb6. A mesma foi enviada para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D e 2D, além da espectrometria de massas.



Esquema 13: Obtenção dos extratos de meio fermentado e de micélio.



**Esquema 14: Frações obtidas do meio fermentado de AnM11-12**

Devido a grande quantidade de massa e o aspecto viscoso da fração Fr2, foi realizado uma nova coluna filtrante resultando em 5 frações. A fração Fr4' foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica 230-400 *mesh* fornecendo 24 frações. Estas frções foram comparadas por CCD e selecionadas para análise em LC-MS. As frações AnMc18 e AnMc21 foram purificadas por HPLC semi-preparativo. Uma quantidade de 80,0 mg da fração AnMc18 foi solubilizada em 5,0 mL da fase móvel usada. A fase estacionária usada foi uma coluna Luna Phenyl-Hexil (Phenomenex) em modo isocrático com a fase móvel Hex/IsoPrOH 9:0,5 com fluxo de 8 mL/min. Foram obtidas 4 frações na qual a terceira fração e a substância Nc18. Esta foi analisada por espectrometria de massas e enviada para análises de RMN <sup>1</sup>H.

A fração AnMc21 continha 17,0 mg que foi solubilizada em 1,6 mL da fase móvel usada. Foi usada neste procedimento uma coluna Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex) com a fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O 65:35 com vazão de 6,5 mL/min. Foram coletadas 7 frações no qual a banda de interesse forneceu a substância Nc5. Esta foi analisada por espectrometria de massas e enviada para análises de RMN.

## 4 Resultados e discussões

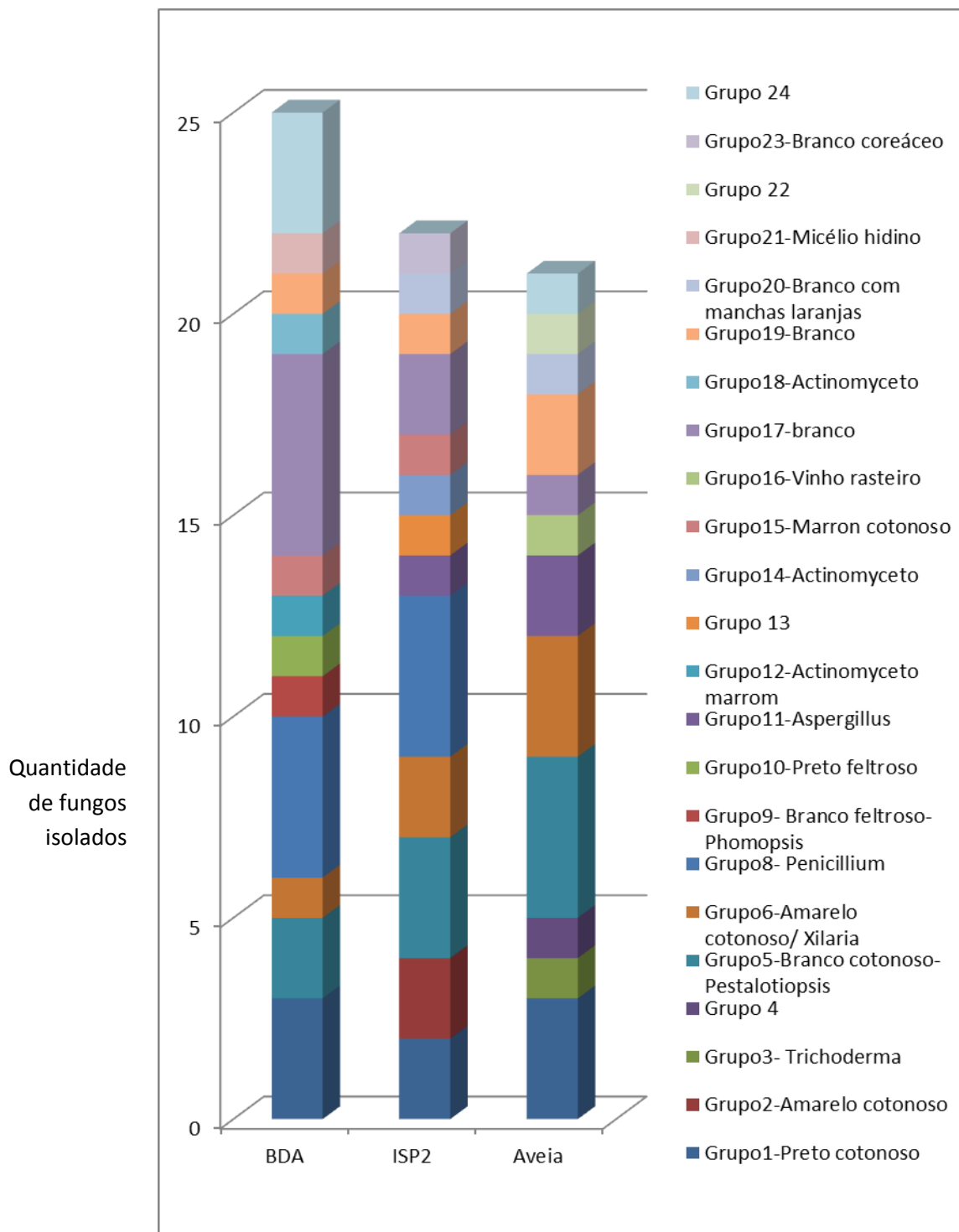
### 4.1 Fungos isolados de *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp.

Foram isolados, purificados e conservados 43 fungos endofíticos de *Duguetia stelechantha*. Estes foram distribuídos em 24 grupos (Figura 23) conforme os aspectos macro e micromorfológicos, dos quais 11 grupos não identificados foram denominados conforme as aparências macroscópicas como branco coráceo, micélio hidino, branco, branco com manchas laranja, vinho rasteiro, marrom cotonoso, preto feltroso, branco feltroso, amarelo cotonoso e preto cotonoso. Os demais grupos foram identificados como correspondentes aos gêneros *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Entre as bactérias destacaram-se por serem potenciais produtores de antibióticos dois grupos reunidos como actinomiceto marrom e actinomiceto.

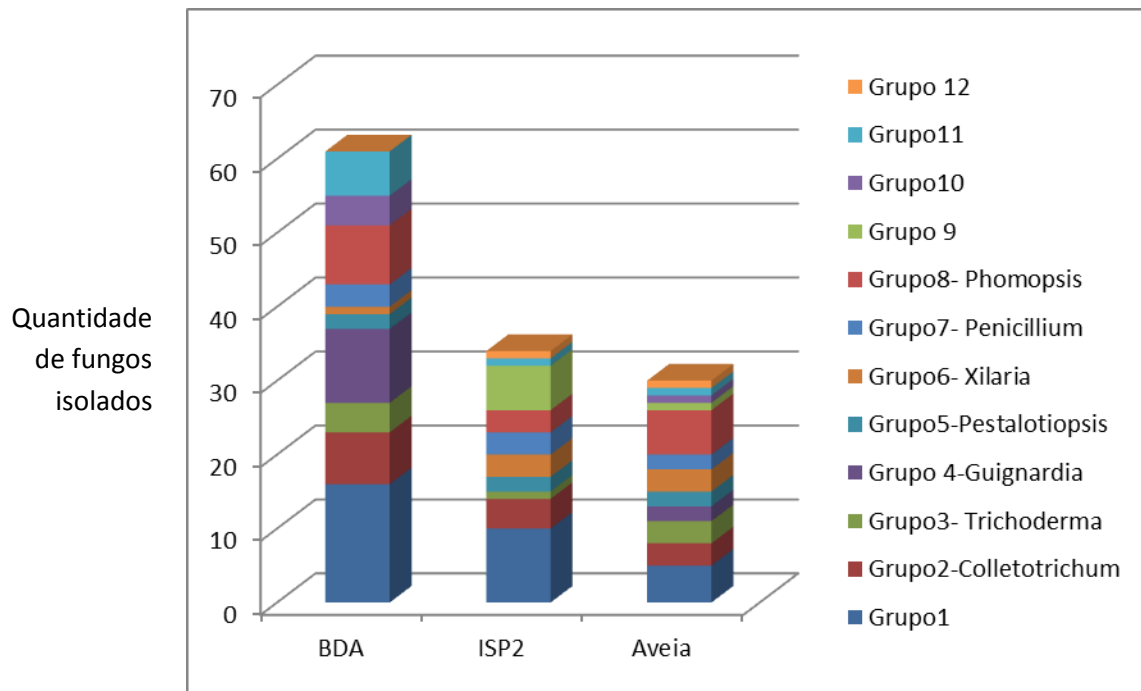
Quanto aos meios de cultura em que foram cultivados, com destaque os meios BDA e ISP2, todos utilizados foram adequados para o bom crescimento dos isolados. Observou-se que a variedade de fungos também foi bem distribuída entre os três meios de cultura utilizados na coleta.

Foram isolados 103 fungos de *Rollinia* sp, distribuídos em 12 grupos conforme a morfologia e o meio de cultura em que foram cultivados (Figura 24). Os grupos não identificados foram denominados pelo aspecto da mesma forma que os isolados de *D. stelechantha*. Os demais foram identificados como *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Penicillium* e *Phomopsis*. Observou-se que entre os fungos endofíticos cultivados em meio BDA, predominam os isolados que pertencem ao grupo 1, da mesma forma em meio ISP2.

Constatou-se uma grande variedade de microorganismos encontrados na hospedeira *D. stelechantha*, considerando que os isolados foram distribuídos em 24 grupos, como sinal de sua rica biodiversidade microbiana, o qual sendo explorada racionalmente contribuirá como uma fonte de produtos naturais bastante promissora.



**Figura 23: Grupos de microrganismos isolados de *D. stelechantha* por meio utilizado no isolamento.**



**Figura 24: Grupos de microrganismos isolados de *Rollina* sp. por meio utilizado no isolamento.**



## 4.2 Testes biológicos

### 4.2.1 Ensaios antimicrobianos

- *Bacillus cereus*

Entre as linhagens isoladas de *D. stelechantha* que foram ensaiadas contra a bactéria gram-positiva *B. cereus*, causadora de muitas doenças de histórico alimentar apresentando sintomas como vômito e diarreia, as codificadas como DgC32.2 e DgCr31.1 apresentaram os maiores halos de atividade antibacteriana (Tabela 4), sendo promissoras pelo menos para o combate desse patógeno.

**Tabela 4: Linhagens de fungos endofíticos com atividade contra *B. cereus***

Amostra	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)	MÉDIA
Dg C32.2	14	15	14	14
Dg G23.2 <sup>a</sup>	10	11	10	10
Dg Cr22.1b	11	12	12	12
Dg C32.2	12	11	12	12
Dg R22.1	10	9	11	10
Dg Cr31.1	15	14	16	15

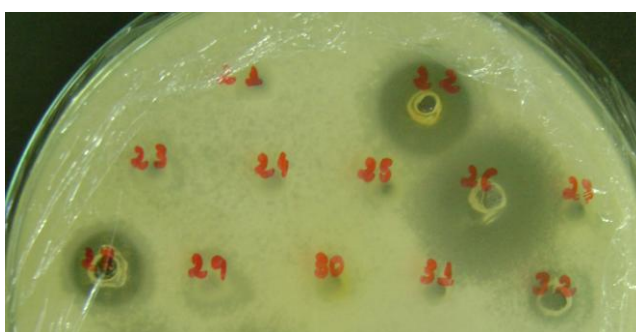
- *Penicillium avellani*

No teste de antibiose contra uma linhagem modificada do fungo *P. avellani* para servir como bioindicadora para atividade citotóxica, três linhagens isoladas de *D. stelechantha* apresentaram excelentes resultados (Tabela 5). O fungo DgC21.3 destacou-se com um halo de aproximadamente 30 mm (Figura 25). Os fungos DgCr22.1b e DgG23.2a se destacaram também, porém não foi possível medir os halos de inibição.

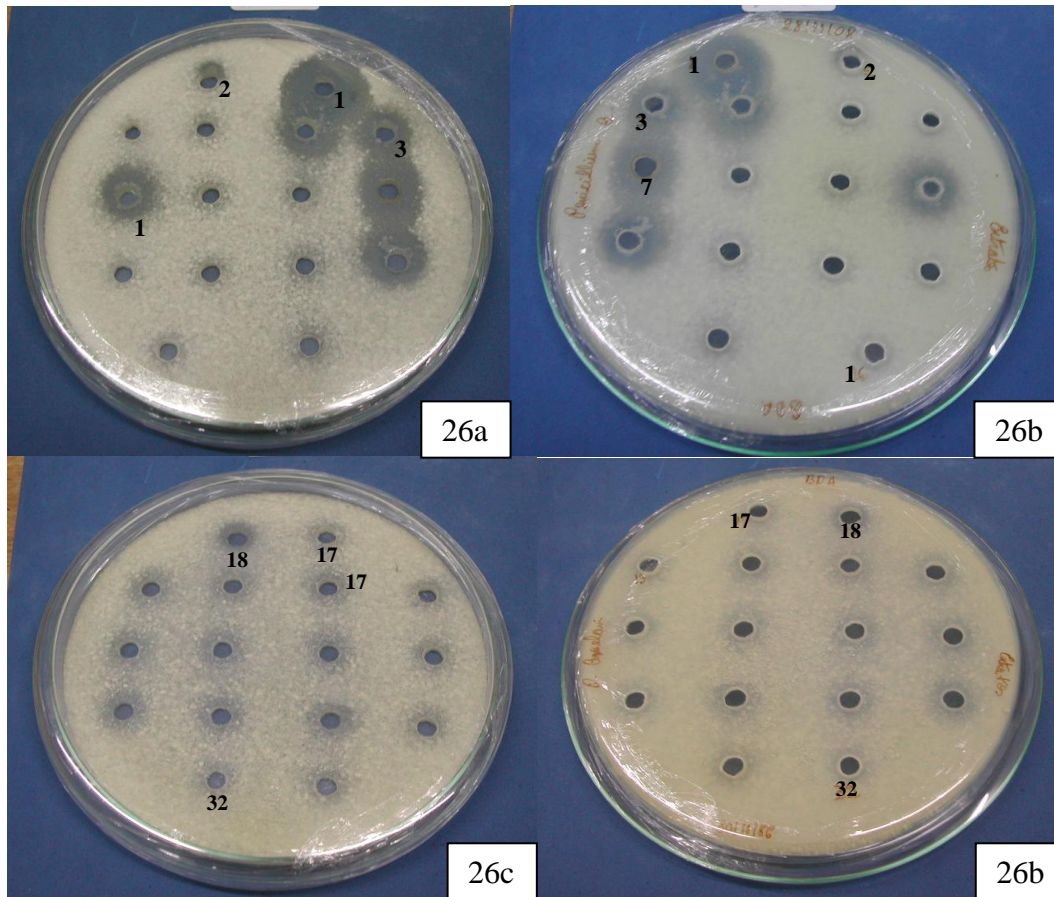
**Tabela 5: Extratos de linhagens de fungos endofíticos com atividades contra *P. avellani***

Fungo	Tipo de amostra	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo Média (mm)
DgC1 2.1b	Placa	20	19	19	<b>19</b>
DgC2 1.3	MF AcOet/ IPrOH	30	28	30	<b>29</b>
DgCr3 1.1	MF AcOet/ IPrOH	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>15</b>
DgCr2 2.1b	Micélio	*	*	*	*
DgG2 3.2a	Micélio	*	*	*	*
AnspCr1 1.1	micélio/shaker/ETO H	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
AnspR2 1.1	micélio/shaker/ETOH	-	-	-	-
AnspCr1 2.1	micélio/shaker/ETOH	-	-	-	-
AnspC3 1.2c	micélio/shaker/ETOH	-	-	-	-
AnspCr1 1.1	meio/shaker/AcOEt	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
AnspC2 2.1	micélio/shaker/ETOH	-	-	-	-
AnspC3 1.2b	micélio/shaker/ETOH	-	-	-	-
AnspG1 2.2	meio/shaker/AcOEt	12	11	11	<b>11,3</b>
AnspCg3 2.1	Aveia/Placa/ETOH	15	13	11	<b>13</b>
AnspCg1 2.2g	Aveia/Placa/ETOH	13	11	11	<b>11,6</b>
AnspCg2 2.2b	Aveia/Placa/ETOH	<b>34</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32,6</b>

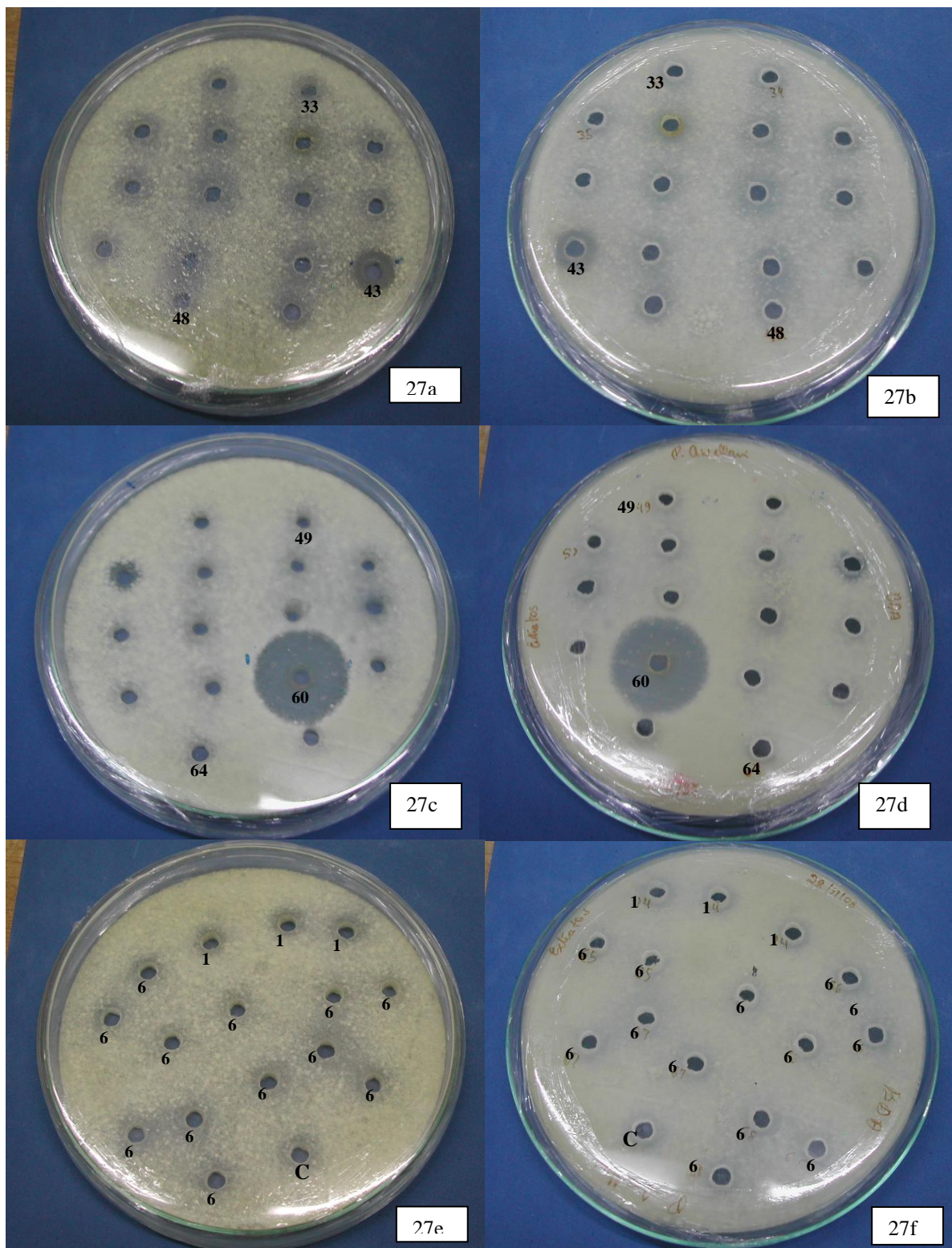
\*As amostras DgCr 2.1b mic e 9 DgG232a mic apresentaram atividade mas não foi possível medir os halos.



**Figura 25: Halos de inibição dos extratos de fungos de *D. stelechantha* contra *P. avellani*.**



**Figura 26: Halos de inibição dos extratos de fungos endofíticos de *Rollinia* sp. 26a) extratos de 1 a16 frente da placa; 26b) verso da placa; 26c) extratos de 17 a32 frente da placa; 26d) verso da placa.**



**Figura 27: Halos de inibição dos extratos de fungos endofítico de *Rollinia* sp. (Continuação). 27 a) extratos de 33 a 48, frente da placa; 27 b) verso da placa; 27 c) extratos de 49 a 64, frente da placa; 27 d) verso da placa. 27 e) extratos de 65 a 68 + Controle, frente da placa; 27 f) verso da placa. (A tabela 6 contém os extratos das linhagens endofíticas de acordo com a numeração mostrada na figura).**

Entre as linhagens que apresentaram resultados promissores no ensaio contra *P. avellani*, destacaram-se as linhagens mostradas na tabela 6. Estas linhagens foram consideradas boas candidatas para os ensaios contra linhagens de células tumorais, pois essa cepa do fungo *P. avellani* é bioindicadora de metabólitos citotóxicos. Com base neste resultado, a linhagem AnspCr11.1 (Figura 27a) foi selecionada para cultivo em larga escala para a obtenção de extratos para o estudo químico.

**Tabela 6: Linhagens com potenciais citotóxicos de acordo com os ensaios contra *P. avellani*.**

<b>1</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Tipo de extrato</b>	<b>Modo de cultivo</b>	<b>Solvente</b>
<b>1</b>	AnspCr1 1.1	Micélio	Agitado	EtOH
<b>2</b>	AnspR2 1.1	Micélio	Agitado	EtOH
<b>3</b>	AnspCr1 2.1	Micélio	Agitado	EtOH
<b>4</b>	AnspCr1 2.1	Micélio	Agitado	EtOH
<b>5</b>	AnspC3 1.2c	Micélio	Agitado	EtOH
<b>7</b>	AnspCr1 1.1	MF BDA	Agitado	AcOEt
<b>10</b>	AnspC2 2.1	Micélio	Agitado	EtOH
<b>11</b>	AnspC3 1.2b	Micélio	Agitado	EtOH
<b>18</b>	AnspG1 2.2	Meio	Agitado	AcOEt
<b>43</b>	AnspCg3 2.1	Meio de Aveia	Placa	EtOH
<b>54</b>	AnspCg1 2.g	Meio de Aveia	Placa	EtOH
<b>60</b>	AnspCg2 2.2b	Meio de Aveia	Placa	EtOH

- ***Candida albicans***

Entre as linhagens endofíticas ensaiadas contra *C. albicans*, fungo leveduriforme causador de infecções oral e vaginas conhecida como candidíase, duas, (DgG21.1 e DgC 2 1.3) apresentaram atividade inibitória com halos de inibição de 20,0 e 15 mm respectivamente. Essas linhagens podem ser consideradas para estudos futuros contra esse patógeno.

#### **4.2.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

Dos extratos de fungos endofíticos testados, duas linhagens apresentaram valores de inibição  $\geq 90\%$  a pelo menos duas linhagens tumorais, isto é, elevado potencial citotóxico, sendo escolhidas para as avaliações subseqüentes: DgCr22.1b (meio e micélio) e DgG23.2a (meio e micélio). Estes fungos também deram resultados positivos no teste contra *P. avellani*, o que reforça a validade deste teste como um bom bioindicador para substâncias citotóxicas.

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na Tabela 7, com seus respectivos percentuais de inibição. Considerando os resultados do teste de citotoxicidade feitos na UFC, entre os fungos isolados de *Duguetia stelechantha*, as duas linhagens que apresentaram valores de inibição  $\geq 90\%$  (DgG232a e DgCr22.1b) foram escolhidas para avaliações subsequentes. As linhagens mais promissoras, destacadas em negrito, foram reservadas para estudos posteriores de fracionamentos e ensaios citotóxicos das frações.

**Tabela 7: Percentual de inibição dos extratos de fungos ao crescimento celular de três linhagens tumorais.**

Fungos	SF295		HCT-8		MDA-MB435	
	Média	DMP	Média	DMP	Média	DMP
DgG2 3.2a	<b>91,68%</b>	<b>0,81%</b>	<b>95,64%</b>	<b>1,13%</b>	<b>65,63%</b>	<b>0,62%</b>
DgCr2 2.1b	<b>94,16%</b>	<b>1,08%</b>	<b>102,23%</b>	<b>0,88%</b>	<b>90,75%</b>	<b>8,90%</b>
DgC1 1.1 s/ assp	24,80%	0,54%	41,32%	0,88%	18,99%	2,17%
DgC1 2.3 s/ assp	29,82%	1,35%	44,43%	3,53%	24,08%	1,32%
DgC1 2.3	21,82%	2,25%	46,39%	0,25%	17,95%	2,71%
DgCr2 2.1b	<b>87,68%</b>	<b>0,18%</b>	<b>101,16%</b>	<b>0,38%</b>	<b>78,49%</b>	<b>0,85%</b>
DgC1 2.1s/assp	31,03%	2,51%	51,91%	5,54%	23,97%	5,65%
DgC1 2.1s/ass	5,87%	14,55%	29,56%	1,89%	3,50%	0,70%
DgG2 3.2a	9,43%	2,34%	25,02%	0,00%	2,63%	0,39%
DgCr3 1.1	<b>78,22%</b>	<b>6,20%</b>	<b>97,42%</b>	<b>2,90%</b>	<b>68,91%</b>	<b>0,15%</b>
DgC1 2.3	32,80%	9,70%	56,01%	0,00%	29,01%	11,38%
DgC2 3.1	19,59%	6,65%	33,04%	4,03%	19,81%	9,83%
DgC3 2.2	28,36%	11,68%	50,04%	1,64%	43,73%	15,17%
DgC1 1.1 s/ assp	16,97%	4,13%	41,87%	6,70%	13,85%	4,34%
DgR2 2.1	7,22%	2,63%	37,47%	1,84%	70,21%	3,19%
DgR2 2.1	72,55%	0,35%	90,87%	1,65%	54,19%	2,37%
DgC3 2.2	38,77%	6,50%	36,79%	1,46%	41,53%	2,10%
DgC1 2.3 s/assp	19,33%	6,59%	18,60%	2,52%	-9,75%	4,48%
DgC2 1.3	28,33%	1,93%	59,23%	1,75%	41,48%	6,78%
AnspCr1 1.1	1,07%	4,83%	30,82%	5,05%	9,29%	3,19%
AnspCr1 1.1	11,19%	4,39%	41,11%	5,24%	18,70%	12,28%
AnspC2 3.1	25,91%	0,44%	31,43%	2,04%	-39,25%	2,65%
AnspCg1 1.3a	-4,83%	0,18%	11,05%	7,57%	-41,31%	3,12%
AnspCr1 1.1	4,74%	1,23%	21,07%	6,21%	9,20%	0,07%

**Tabela 7: Percentual de inibição dos extratos de fungos ao crescimento celular de três linhagens tumorais (continuação).**

Fungos	SF295		HCT-8		MDA-MB435	
	Média	DMP	Média	DMP	Média	DMP
Ansp Cr1 1.1	-7,81%	0,70%	14,21%	0,00%	-4,52%	8,75%
Ansp C2 3.1	0,45%	1,84%	16,95%	7,18%	-5,38%	12,96%
Ansp R2 1.1	14,17%	11,24%	33,84%	9,12%	-25,63%	17,03%
Ansp Cc2 1.2	31,25%	0,44%	70,76%	4,46%	82,83%	4,88%
Ansp Cr1 1.1	48,77%	4,30%	66,99%	4,56%	82,16%	0,68%
Ansp Cg2 2.2b	<b>77,08%</b>	<b>17,13%</b>	<b>92,24%</b>	<b>3,01%</b>	<b>59,90%</b>	<b>0,95%</b>
Ansp Cr2 2.2b	-2,72%	18,79%	8,17%	4,66%	-29,75%	14,86%
Ansp Cr2 2.2b	<b>78,51%</b>	<b>9,84%</b>	<b>89,70%</b>	<b>0,97%</b>	<b>87,24%</b>	<b>2,04%</b>
Ansp Cc2 1.2	<b>86,52%</b>	<b>5,01%</b>	<b>90,73%</b>	<b>0,87%</b>	<b>96,74%</b>	<b>1,63%</b>
Ansp C2 3.1	<b>94,29%</b>	<b>0,35%</b>	<b>101,44%</b>	<b>1,07%</b>	<b>97,03%</b>	<b>2,98%</b>
Ansp C2 3.1	41,93%	1,14%	71,59%	0,97%	66,76%	19,06%
Ansp Cg2 2.2b	-8,99%	1,14%	28,69%	1,46%	6,56%	6,65%
Ansp C3 1.2b	3,56%	2,72%	46,53%	8,25%	30,88%	12,96%
Ansp F1 1.3 G4	28,83%	9,13%	32,94%	6,31%	15,63%	26,39%
Ansp Cg1 1.3a	-3,15%	0,97%	27,32%	2,23%	40,71%	11,94%
Ansp R2 1.1	16,97%	3,43%	48,73%	2,23%	45,13%	16,82%
Ansp Cg2 2.2b	17,96%	0,97%	43,65%	1,26%	83,79%	5,56%
Ansp Cg2 2.2b	<b>88,76%</b>	<b>0,79%</b>	<b>98,56%</b>	<b>0,10%</b>	<b>99,86%</b>	<b>0,34%</b>
Ansp Cg2 1.2 G6	<b>85,41%</b>	<b>2,02%</b>	<b>89,70%</b>	<b>0,00%</b>	<b>72,61%</b>	<b>0,34%</b>
Ansp Cc2 1.2	5,29%	6,41%	43,10%	10,58%	27,23%	27,07%
Ansp R1 2.1	7,83%	8,83%	29,52%	11,68%	18,76%	1,04%
Ansp Cc1 2.1 G1	29,41%	4,37%	39,59%	1,99%	17,45%	1,11%
Ansp C2 3.1	29,41%	2,27%	38,99%	1,14%	19,80%	0,74%
Ansp Cg2 2.1b G8	22,98%	4,37%	24,69%	5,13%	14,36%	2,96%
Ansp F1 1.3 G4	23,54%	5,16%	31,14%	4,84%	17,50%	0,89%
Ansp F1 1.2 G4	18,28%	5,77%	29,93%	5,70%	11,44%	1,63%
Ansp R1 2.3b 3.1	7,53%	11,01%	20,16%	1,28%	8,09%	4,88%
Ansp Cg2 1.2 a G6	70,45%	4,20%	84,90%	2,56%	44,06%	2,37%
Ansp Cr1 2.1	19,21%	3,76%	41,30%	14,67%	23,10%	5,10%
Ansp C3 1.2c	32,50%	3,32%	41,30%	1,00%	18,81%	2,44%
Ansp Cr1 2.1	32,68%	3,76%	41,81%	0,57%	16,82%	4,07%
Ansp C2 3.1	25,58%	6,29%	32,65%	0,43%	14,78%	1,63%
Ansp C3 1.2c	48,32%	5,25%	60,63%	36,02%	98,43%	3,55%
Ansp Cg1 2.1	28,11%	4,81%	34,46%	0,43%	14,47%	4,14%
Ansp Cc1 2.1 G1	<b>76,76%</b>	<b>3,85%</b>	<b>90,44%</b>	<b>3,84%</b>	<b>57,91%</b>	<b>6,43%</b>

### 4.3 Substâncias isoladas de AnspCr11.1

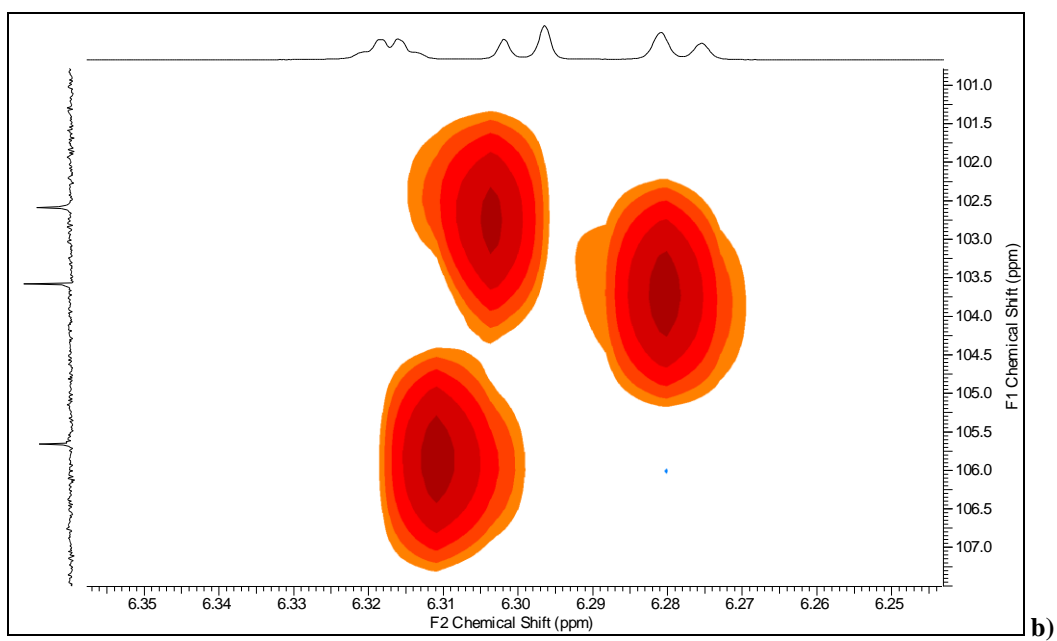
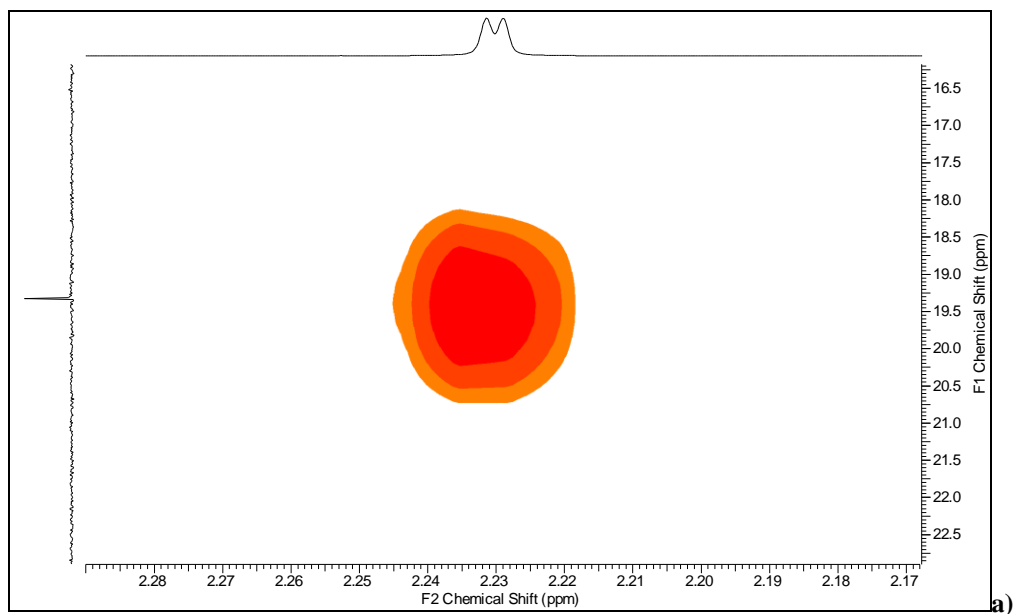
O estudo da linhagem AnspCr11.1 isolada da casca da raiz de *Rollinia* sp. resultou no isolamento de três substâncias as quais serão discutidas a seguir.

#### 4.3.1 Identificação da substância AnMb6

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 29) foram registrados 10 sinais, apenas um na região de carbonos alifáticos, sugerindo uma provável substância aromática. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AnMb6 foram registrados 4 sinais: um dubleto em  $\delta$  2,23 e três sinais na faixa de deslocamentos químicos de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$  entre  $\delta$  6,28 e 6,32 (Figura 28). Para o hidrogênio em  $\delta$  2,23, foi revelada pelo HSQC (Figura 30) a conexão com o carbono em  $\delta$  19,2 e pelo HMBC (Figura 31 e 32), correlações com os carbonos  $\delta$  105,6 e 155,3. O hidrogênio em  $\delta$  6,28 registrado como dubleto, está conectado ao carbono  $\delta$  103,5 (HSQC) e tem correlação com os carbonos  $\delta$  99,6, 102,5, 105,6 e 167,4 (HMBC). O hidrogênio em  $\delta$  6,30 está conectado ao carbono em  $\delta$  102,5 (HSQC) e correlaciona com os carbonos  $\delta$  164,9 e 167,4 (HMBC). Finalmente, o hidrogênio em  $\delta$  6,32, registrado como quarteto no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , está conectado com o carbono em  $\delta$  105,6 (HSQC) e tem correlações com os carbonos em  $\delta$  19,2, 103,5, 99,6, 155,6 e 141,5 (HMBC). Foram observados acoplamentos entre os hidrogênios em  $\delta$  2,23 e 6,32 ( $J = 1,0$  Hz) e entre os hidrogênios em  $\delta$  6,28 e 6,30 ( $J = 2,0$  Hz) indicando que estes se encontram em provável posição meta um do outro de um anel aromático. A integração dos sinais de AnMb6, bem como as correlações e os respectivos deslocamentos químicos são coerentes com a 6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina (Figura 34), que foi encontrada também como um metabólito de *Ceratocystis minor* por Ayer e colaboradores (1987) e *Streptoverticillium* sp. por Hegde e colaboradores (1988). O espectro de massas da substância AnMb6 por APCI-MS (Figura 33) registrou íons coerentes com essa identificação em  $m/z$  191 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) e 193 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), assim como a comparação com os dados da literatura (Tabela 8) que confirmou a estrutura da substância proposta. As diferenças observadas nessa tabela são causadas certamente pela diferença dos solventes deuterados utilizados nos experimentos de RMN.







**Figura 30: Destaques do mapa de correlações de HSQC de AnMb6.**

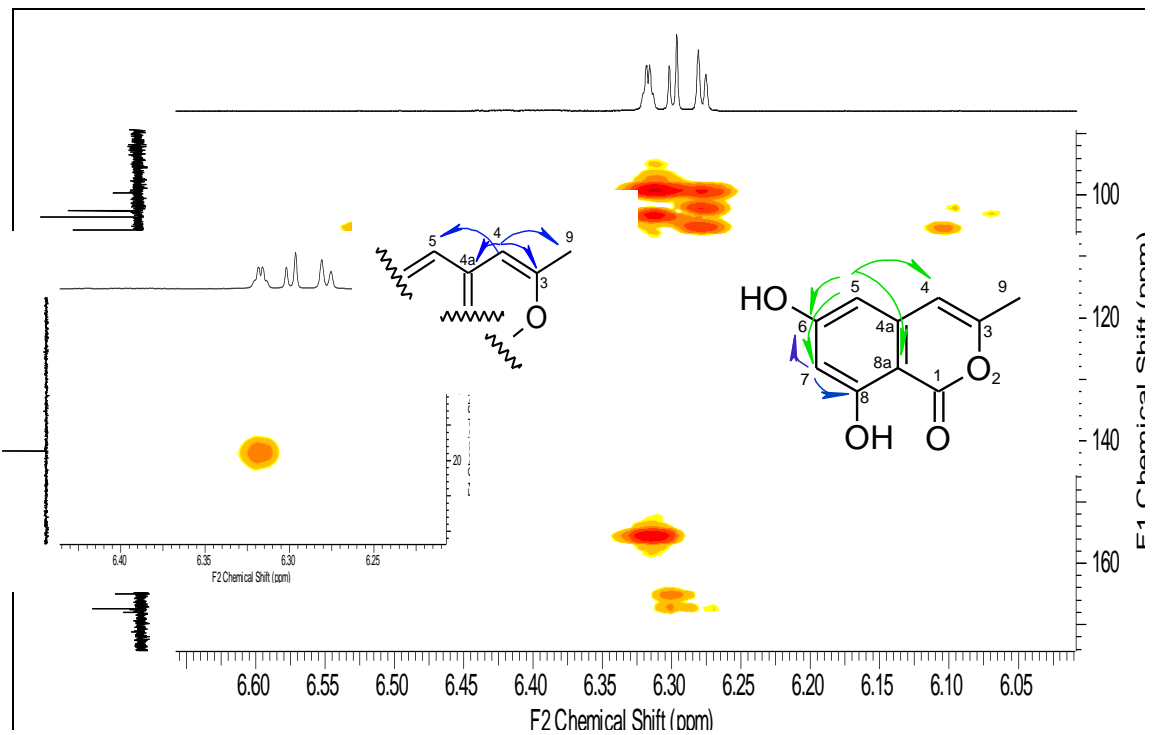


Figura 31: Destaque do mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de hidrogênios aromáticos – AnMb6.

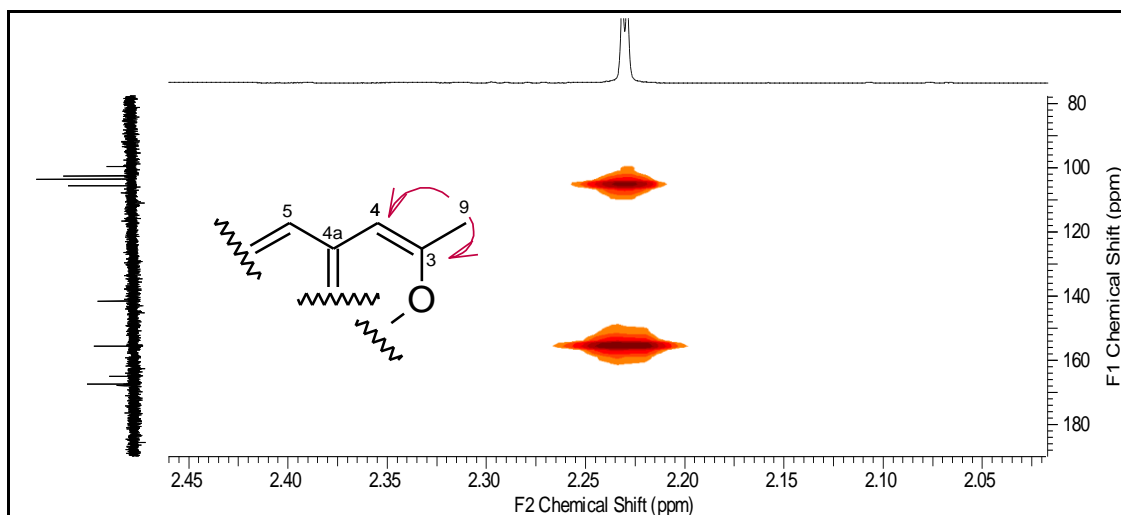


Figura 32: Destaque do mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de hidrogênios aromáticos – AnMb6.

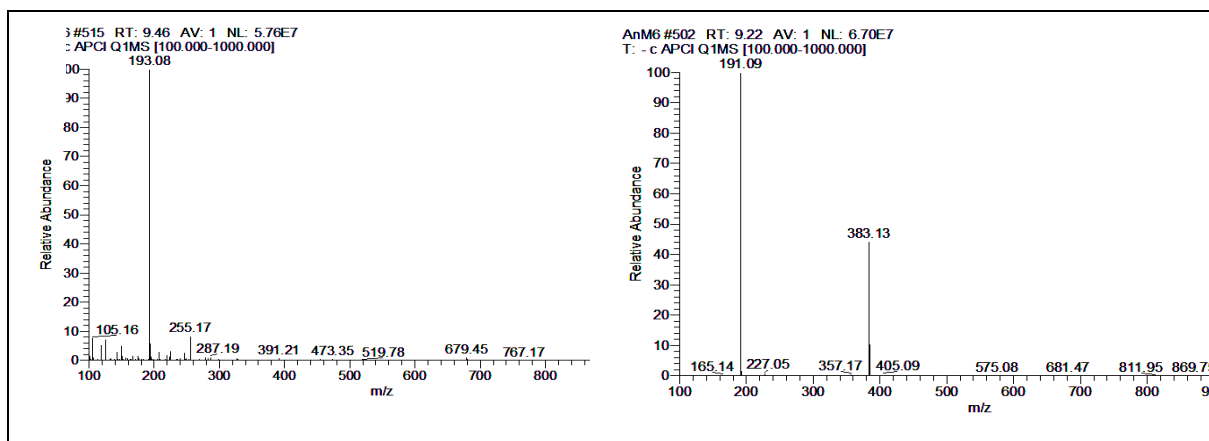


Figura 33: Espectros de massas APCI-ITMS a) modo positivo b) modo negativo

Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  de AnMb6 e do 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina.

Sinais $^1\text{H}$	$^a\delta_{\text{H}}$ 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina	$^b\delta_{\text{H}}$ Substância AnMb6
4	6,17 <i>s</i> 1H	6,32 <i>q</i> (1,0 Hz) 1H
5	6,45 <i>d</i> (2,0 Hz) 1H	6,28 <i>d</i> (2,0 Hz) 1H
7	6,30 <i>d</i> (2,0 Hz) 1H	6,30 <i>d</i> (2,0 Hz) 1H
9	2,25 <i>s</i> 3H	2,23 <i>d</i> (1,0 Hz) 3H

<sup>a</sup>Em aparelho de 200 MHz e  $\text{CDCl}_3$  (HEGDE et al, 1989). <sup>b</sup>Em aparelho 400 MHz e MeOD.

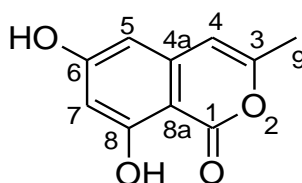


Figura 34: 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina

#### 4.3.2 Identificação da substância Nc5

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 35) apresentou 10 sinais, um dos quais em  $\delta$  11,46 sem conexão a carbono (HSQC) o que sugere a ligação a um heteroátomo, provavelmente uma hidroxila quelada, a considerar seu deslocamento químico. Pelo mapa de HMBC (Figura 39), este hidrogênio está correlacionado a carbonos em  $\delta$  107,8, 110,6 e 162,1. Um duplo dubleto detectado em  $\delta$  7,43 ( $J = 8,4$  e  $8,2$  Hz) está conectado a um carbono de deslocamento químico  $\delta$  139,3 e correlacionado com os carbonos em  $\delta$  159,1 e

162,1. Pelo COSY esse duplo dubleto tem correlações com os hidrogênios em  $\delta$  6,57 e 6,55 ambos com  $J = 4,0$  e  $0,8$ ; (Figura 42). O hidrogênio em  $\delta$  6,57 está conectado ao carbono em  $\delta$  107,9 que correlaciona com o carbono em  $\delta$  162,1 (HMBC). O hidrogênio em  $\delta$  6,55 está conectado ao carbono em  $\delta$  110,9 e correlaciona com o carbono em  $\delta$  159,2. Um sinal em  $\delta$  4,80 mostra um hidrogênio com conexão ao carbono em  $\delta$  83,2, deslocamento típico de carbono ligado a heteroátomo. No mapa de HMBC (Figura 46) este hidrogênio aparece correlacionado aos carbonos em  $\delta$  15,1, 33,7 e 37,0 (Figura 45). Um sinal característico de metoxila foi registrado em  $\delta$  3,74, correspondente a 3 hidrogênios em conexão com um carbono em  $\delta$  54,1 (HSQC). Dois hidrogênios em  $\delta$  3,27 estão conectados a um carbono em  $\delta$  40,1 e correlacionados a carbonos em  $\delta$  84,4, 169,3 e 194,1. Um multiplete em  $\delta$  2,98 revelou um hidrogênio conectado a um carbono em  $\delta$  33,7 e correlacionado com carbonos  $\delta$  15,1, 33,7, 83,2 e 175,1. Hidrogênios em  $\delta$  2,71 e 2,42 e conectados a um carbono em  $\delta$  37,0, também correlacionam com os carbonos em  $\delta$  15,1, 33,6, 83,0 e 175,1. Um dubleto em  $\delta$  1,33 foi identificado como sinal hidrogênios de metila ligados a um carbono de deslocamento químico de  $\delta$  15,3 (HSQC) e com correlações com os carbonos em  $\delta$  33,7, 37,0 e 83,0. Os espectros de massas (Figura 47) desta substância por APCI-ITMS registraram os íons em  $m/z$  319 ( $[M-H]^-$ ) e 321 ( $[M+H]^+$ ), confirmando a massa molecular da substância de 320 Da, coerente com a fórmula molecular  $C_{16}H_{16}O_7$ . Os dados de RMN e de espectrometria de massas foram comparados com dados da literatura (Tabela 9) e mostraram coerência com a substância paecilina B (Figura 48), exceto o deslocamento químico do C-4a que segundo Guo, 2007 e colaboradores corresponde a 130,4 ppm, o qual não é coerente com a estrutura pois devido ao sistema conjugado, o carbono nesta posição é mais blindado, desta forma o deslocamento químico esperado seria menor. Este fato é observado na forma dimérica (Paecilina A) da mesma publicação o qual o deslocamento químico tanto para o C-4a e C-4a' é em torno de 107 ppm, coerente com o deslocamento químico observado para a amostra Nc5.

A paecilina B é uma cromona ligada a grupo  $\beta$ -metil- $\gamma$ -lactona e um grupo éster obtida como uma goma amarela anteriormente isolada do fungo endofítico de mangue *Paecilomyces* sp. (Guo et al, 2007).

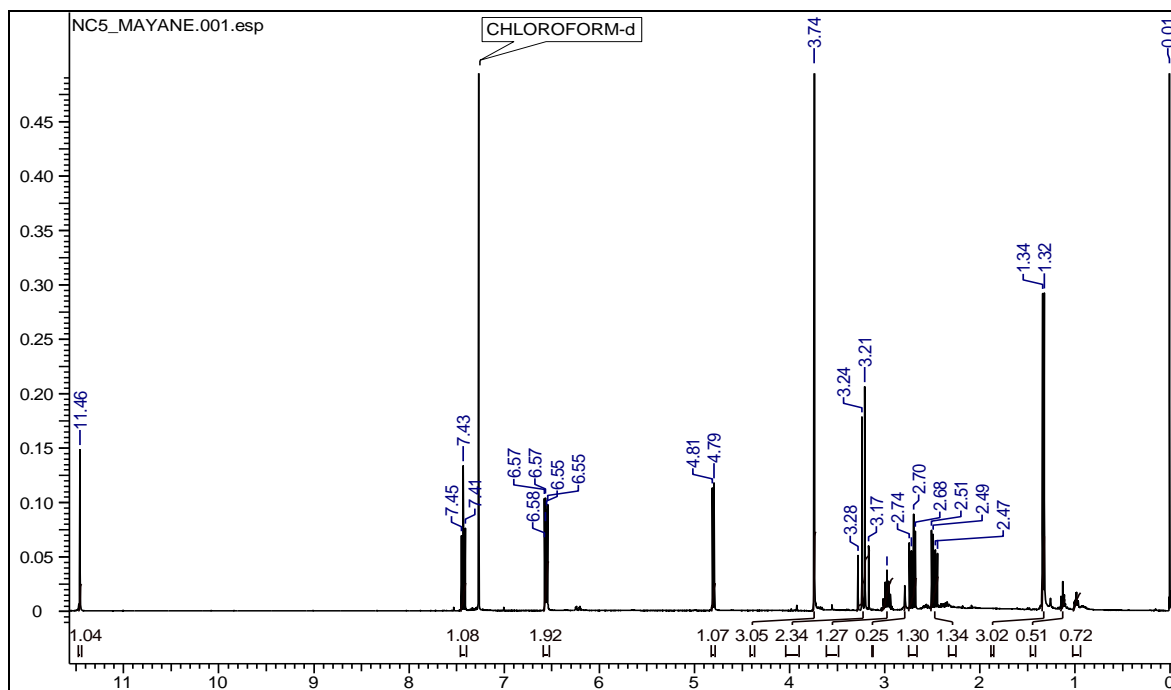


Figura 35: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Nc5 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

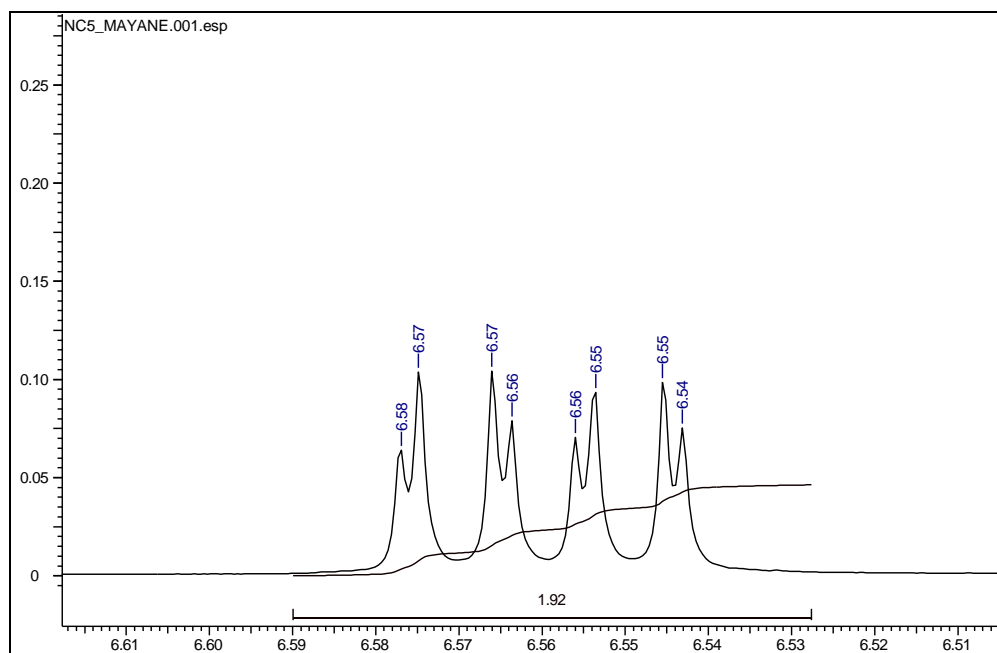
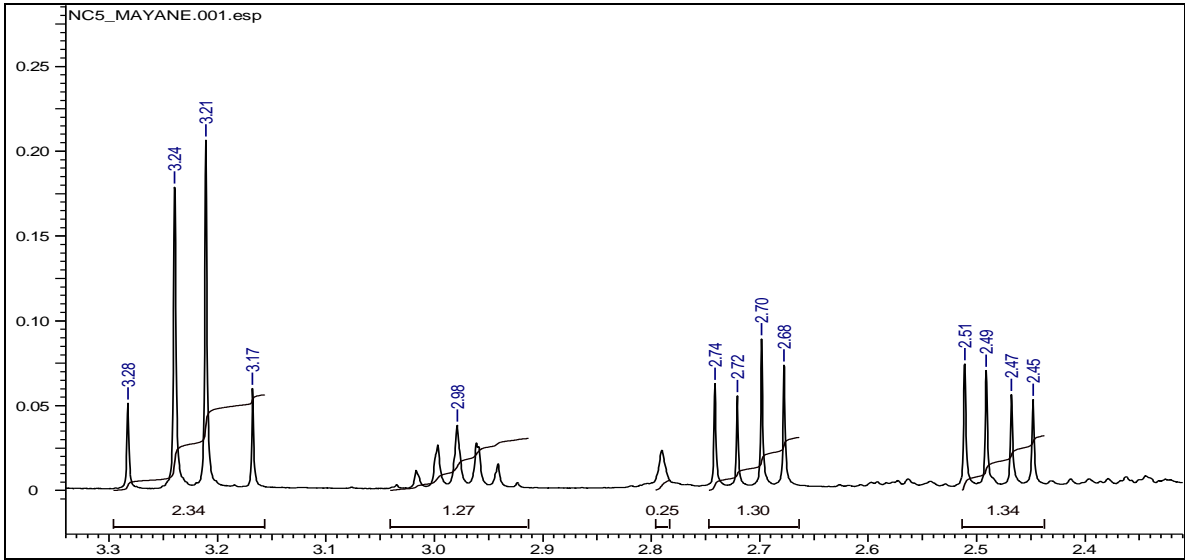
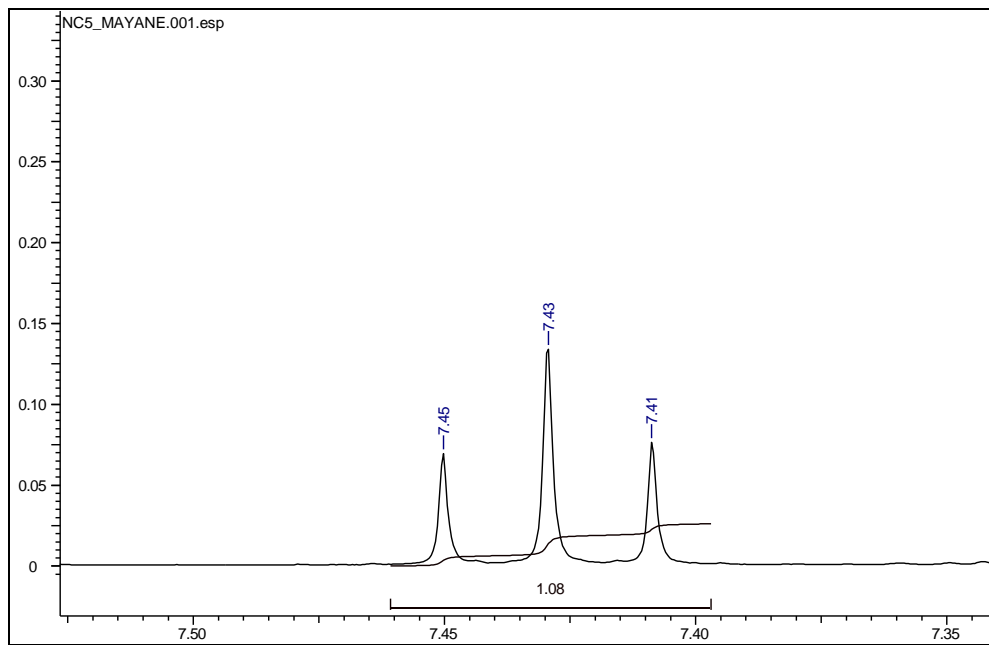


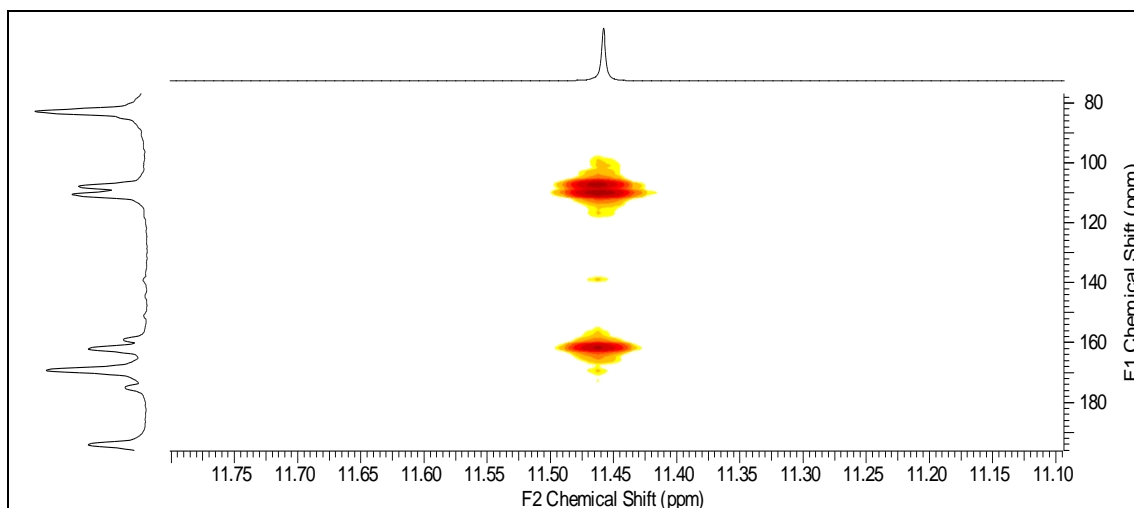
Figura 36: Destaque do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  - A



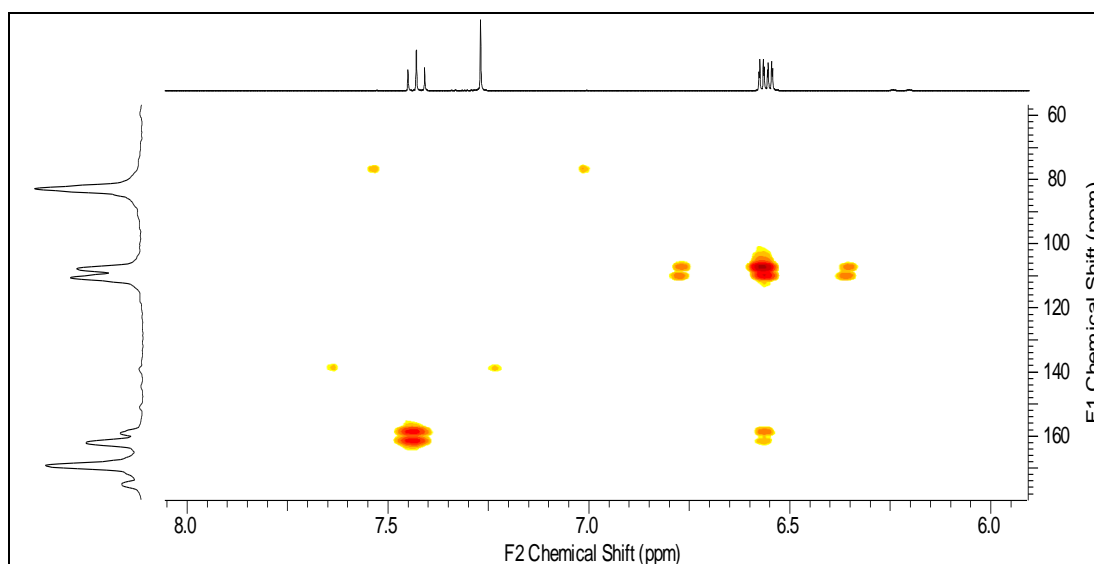
**Figura 37: Destaque do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  - B**



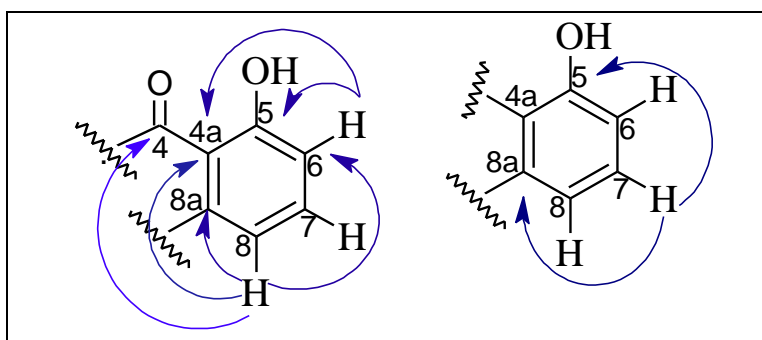
**Figura 38: Destaque do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  - C**



**Figura 39: Destaque do mapa de correlações HMBC de Nc5 - A**

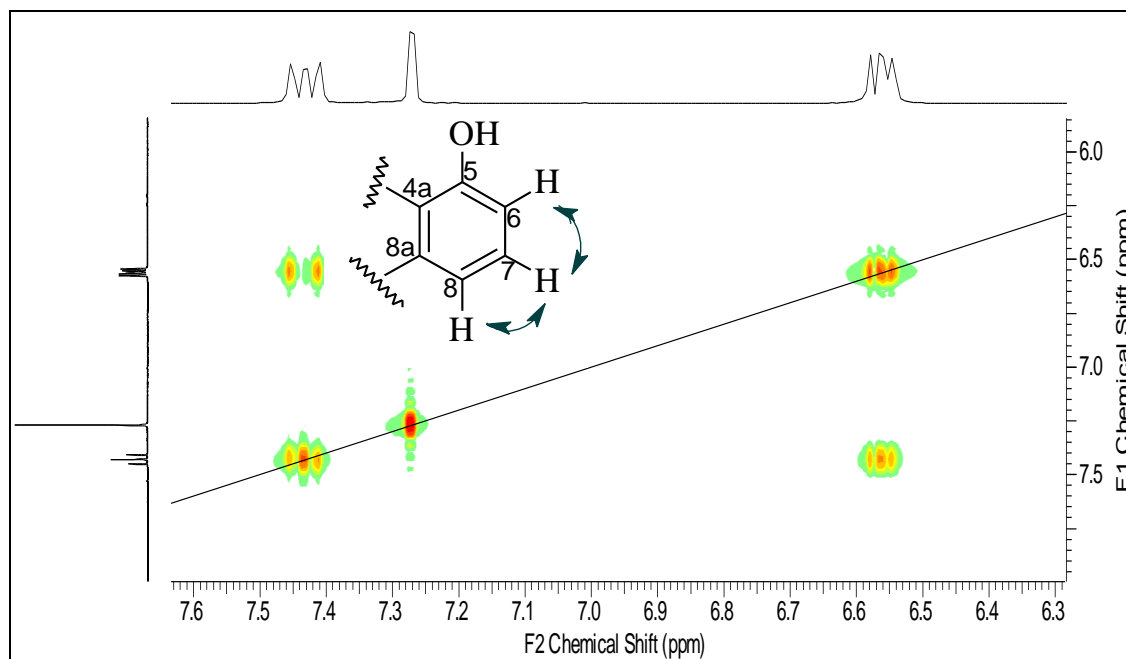


**Figura 40: Destaque do mapa de correlações HMBC de Nc5 - B**

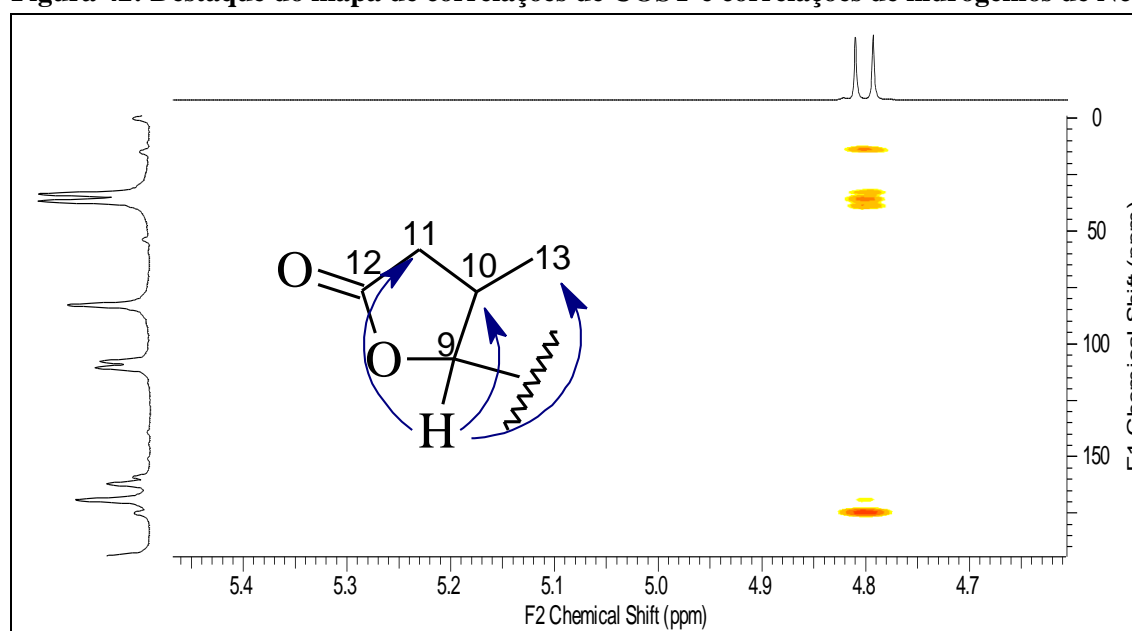


**Figura 41: Correlações observadas no mapa de correlações de HMBC de Nc5**

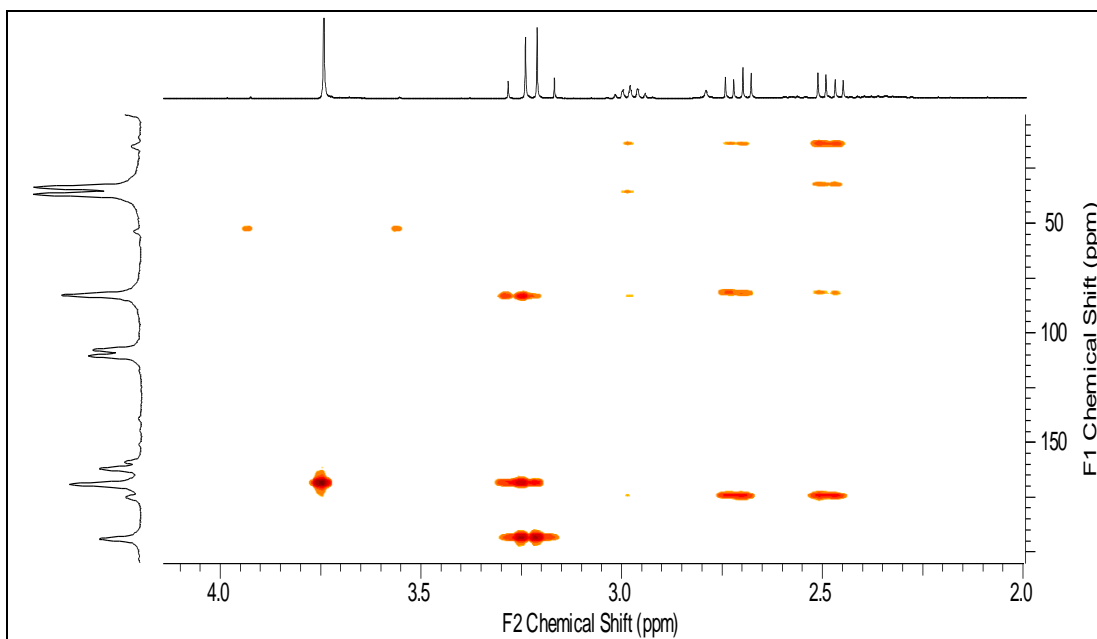




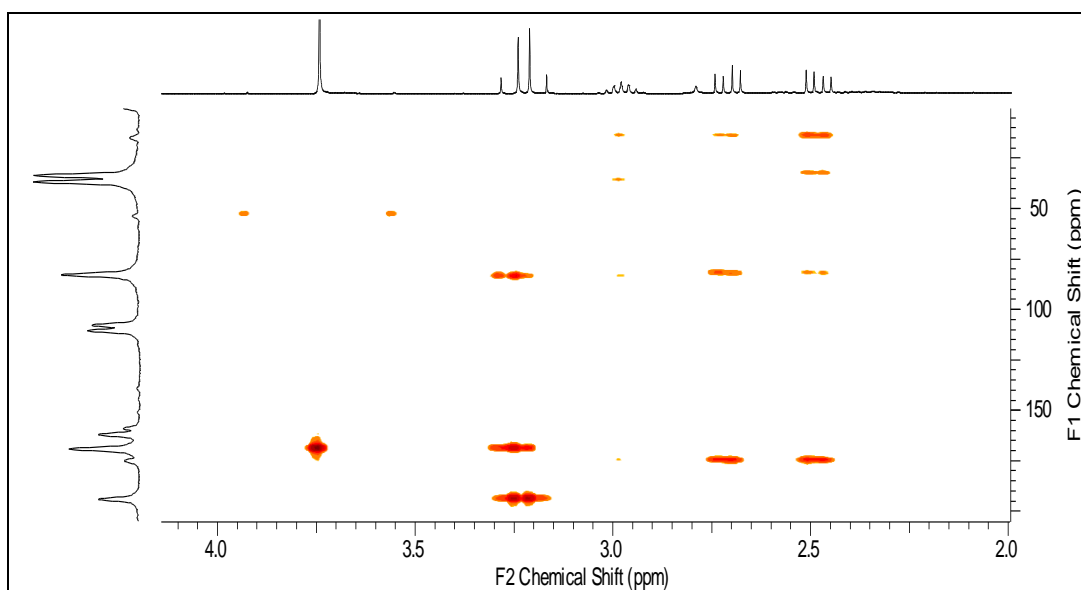
**Figura 42: Destaque do mapa de correlações de COSY e correlações de hidrogênios de Nc5**



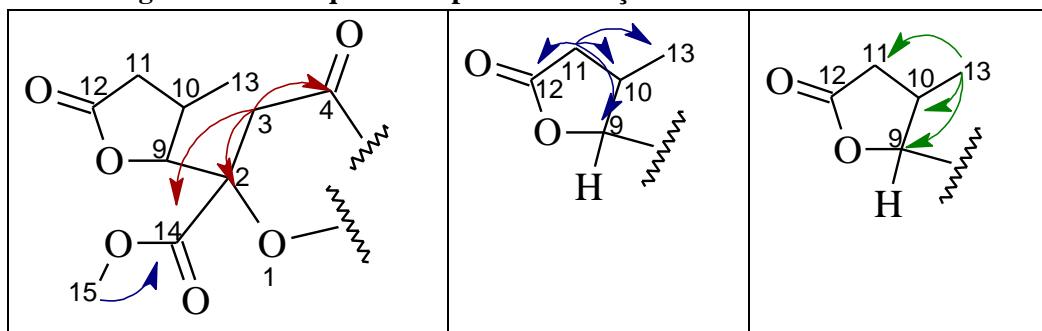
**Figura 43: Destaque do mapa de correlações de HMBC e correlações observadas para Nc5**



**Figura 44: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc5 - A.**



**Figura 45: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc5 - B.**



**Figura 46: Correlações observadas no mapa de correlações de HMBC de Nc5.**

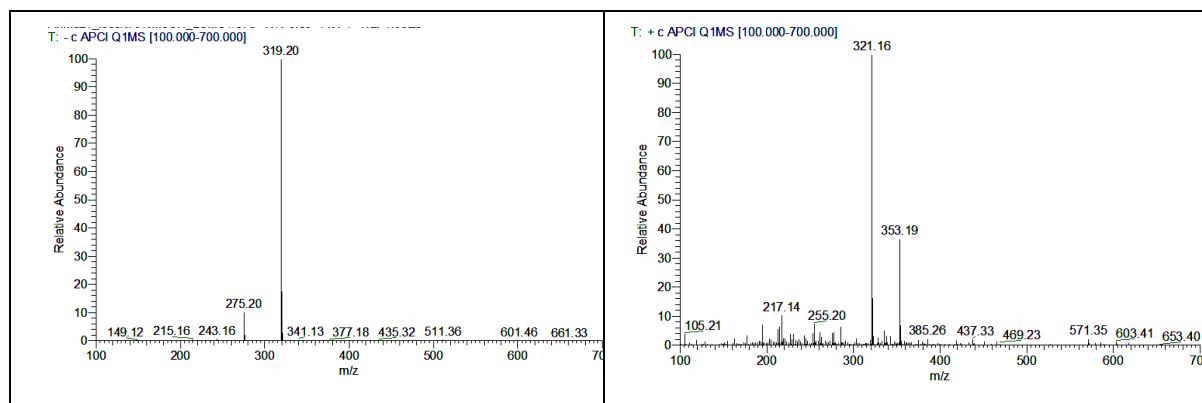
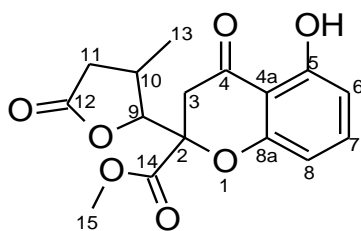


Figura 47: Espectros de massas nos modos negativo e positivo de Nc5.

Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  de Nc5 com os da Paecilina B

Sinais	Nc5		Paecilina B	
	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^{a'}$	$^1\text{H}^b$	$^{13}\text{C}^b$
2	-	84,4	-	84,9
3	3,27 <i>d</i> (17,3), 1H/Ha/ 3,21 <i>d</i> (17,3), 1H/Hb	40,1	3,53 <i>d</i> (17,4)/1H 3,16 <i>d</i> (17,4)1H	40,0
4	-	194,1	-	195,0
4a	-	107,1	-	130,4
5	-	162,1	-	161,9
6	6,57 <i>d</i> (8,5) 1H	110,6	6,61 <i>d</i> (8,1) 1H	109,8
7	7,43 <i>t</i> (8,3)1H	139,3	7,46 <i>t</i> (8,4, 8,1) 1H	139,0
8	6,55 <i>d</i> (8,5), 1H	107,9	6,51 <i>d</i> (7,8) 1H	107,8
8a	-	159,1	-	155,4
9	4,80 <i>d</i> (6,9), 1H	83,0	4,97 <i>d</i> (6,6) 1H	82,3
10	2,98 <i>m</i> , 1H	33,7	2,87 <i>m</i> 1H	33,6
11	2,71 <i>dd</i> (8,3, 17,3), 1H/Ha/ 2,48 <i>dd</i> (8,1, 17,3), 1H/Hb	37,0	2,73 <i>dd</i> (17,2)1H 2,41 <i>dd</i> (17,2) 1H	36,18
12	-	175,1	-	174,7
13	1,34 <i>d</i> (7,2), 3H	15,13	1,34 <i>d</i> (6,9) 3H	14,6
14	-	169,3	-	169,3
15	3,74 <i>s</i> , 3H	54,1	3,72 <i>s</i> 3H	53,1
OH	11,46 <i>s</i> 1H	-	11,49 <i>s</i> 1H	-

Deslocamentos químicos em  $\delta$ . <sup>a</sup>Dados obtidos em um aparelho de 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ . <sup>b</sup>Dados obtidos em um aparelho 500 MHz, em  $\text{CDCl}_3$  (Guo et al, 2007). <sup>a</sup>Baseado nos dados de correlações do HSQC.



**Figura 48: Paecilina B**

#### 4.3.3 Identificação da substância Nc18

No espectro de RNM de  $^1\text{H}$  de Nc18 (Figura 49) foram registrados 11 sinais dos quais dois correspondem a 2 hidrogênios na região de deslocamentos químicos de olefínicos, em  $\delta$  7,29 e 6,23, mostrados na ampliação da figura 50, os quais estão mutuamente correlacionados de acordo com as constantes de acoplamento e confirmado pelas correlações no COSY (Figura 53). Ambos são duplos tripletos acoplados por uma constante de acoplamento de 15,9 Hz, evidenciando que estão em posição *trans*. Quatro sinais foram registrados na faixa de deslocamento químico entre  $\delta$  2,78 e 2,34, destacando-se a presença de multipletos em  $\delta$  2,60-2,52, 2,44-2,30 e 2,29-2,20, correspondentes a hidrogênios metilênicos e metínicos (Figura 51). Um quinteto registrado em  $\delta$  1,34 e dois sinais em  $\delta$  1,12 e 0,97 correspondem a hidrogênios metílicos (figura 52). A figura 55 mostra as correlações dos H-16 e H-17 com os respectivos carbonos adjacentes comprovando parte da estrutura proposta. O mapa de correlações de HMBC da figura 55 e 57, mostra os H-6 e 8, H-11 e 13, H-2 e 3 e H-7 correlacionados aos carbonos adjacentes de acordo com a estrutura proposta (Figura 56).

Observou-se em alguns sinais como, por exemplo, em 0,97 uma sobreposição, que levou a hipótese de que os hidrogênios integrados estavam duplicados, desta forma com as correlações observadas no COSY, HSQC e HMBC e a comparação desses dados com os da literatura (Tabela 10), levaram a identificação da substância Nc18 com o anidrido ácido cordyanidrido B (Figura 59) de fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$ , confirmado pelo íon registrado no espectro de massas em  $m/z$  555 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) e um fragmento em  $m/z$  511 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) por APCI-ITMS com perda de um fragmento correspondente a  $\text{CO}_2$  (Figura 58). O cordyanidrido B foi isolado pela primeira vez por Isaka e colaboradores (2000), junto com o cordyanidrido A do fungo patogênico *Cordyceps pseudomilitaris* Hywel-Jones que infecta insetos da ordem Lepidoptera na fase imatura. Ambas as estruturas eram inéditas e

apresentavam de duas a três porções de anidrido maleico em cadeia linear. Quando a atividade biológica do cordyanidrido B não há relatos.

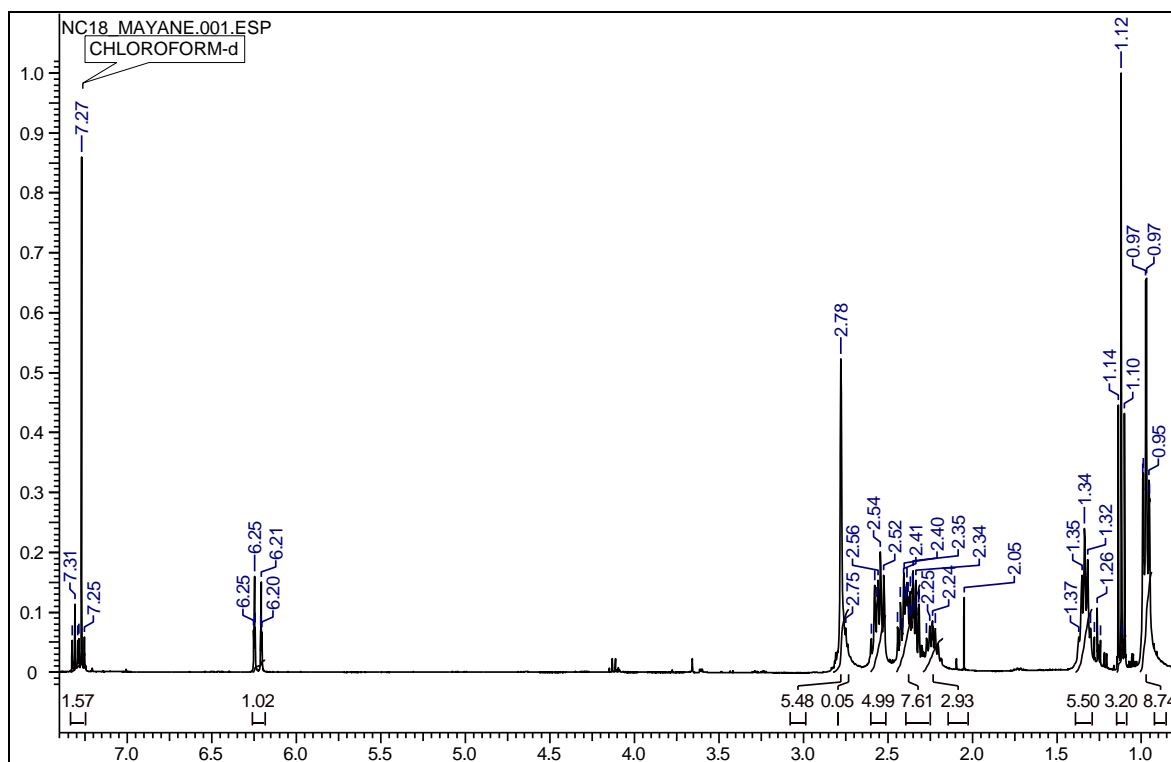


Figura 49: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Nc18 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

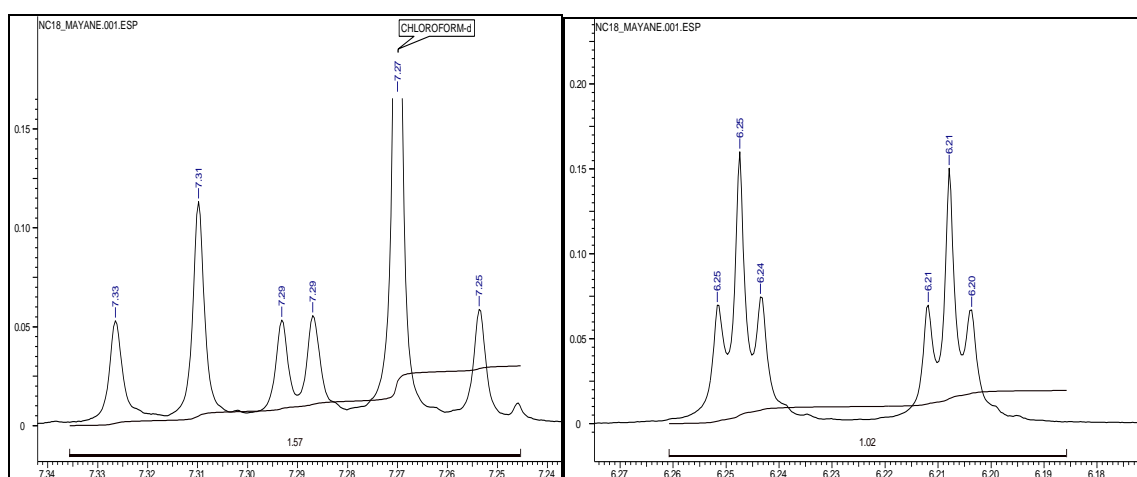
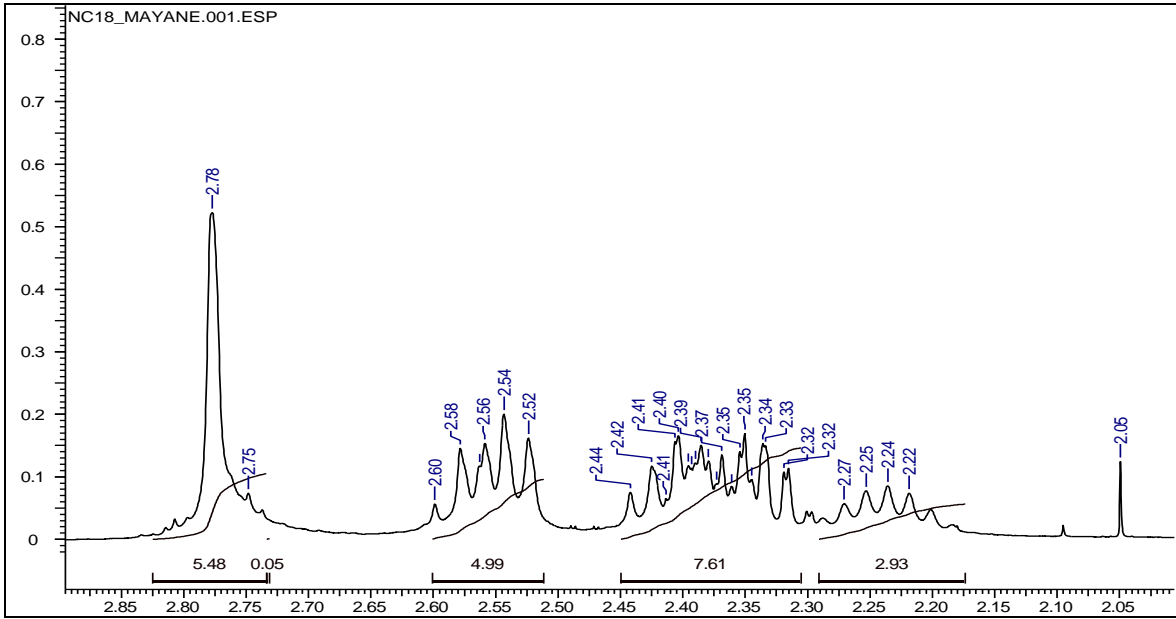
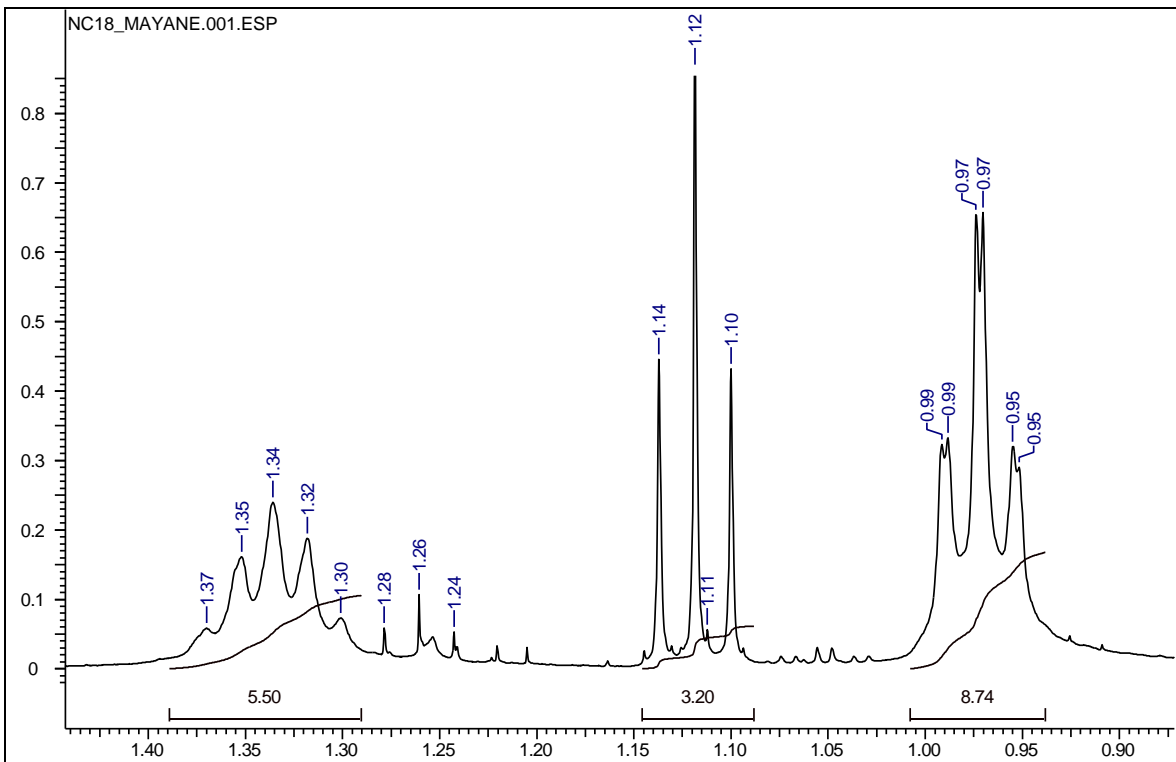


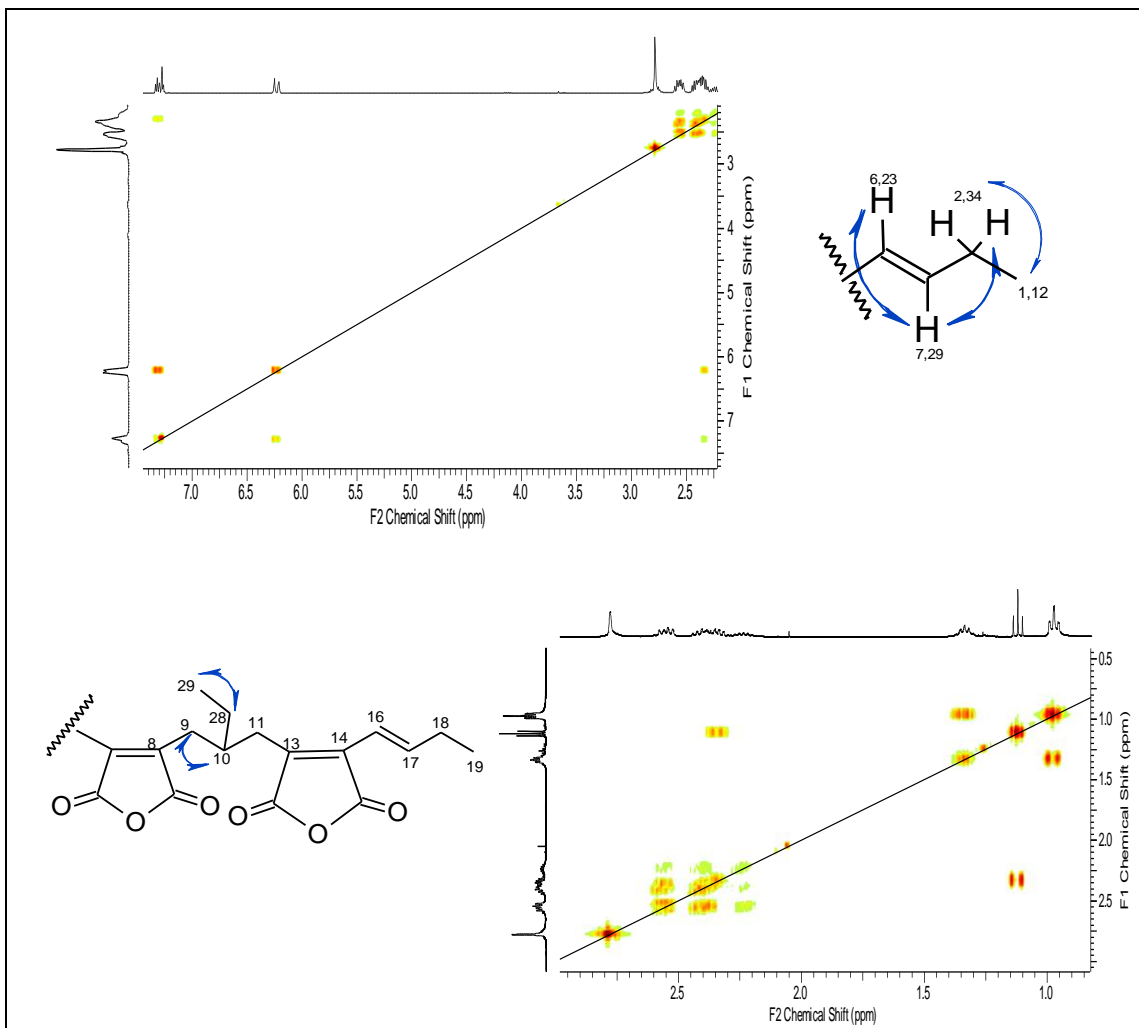
Figura 50: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Nc18 - região de olefínicos e aromáticos



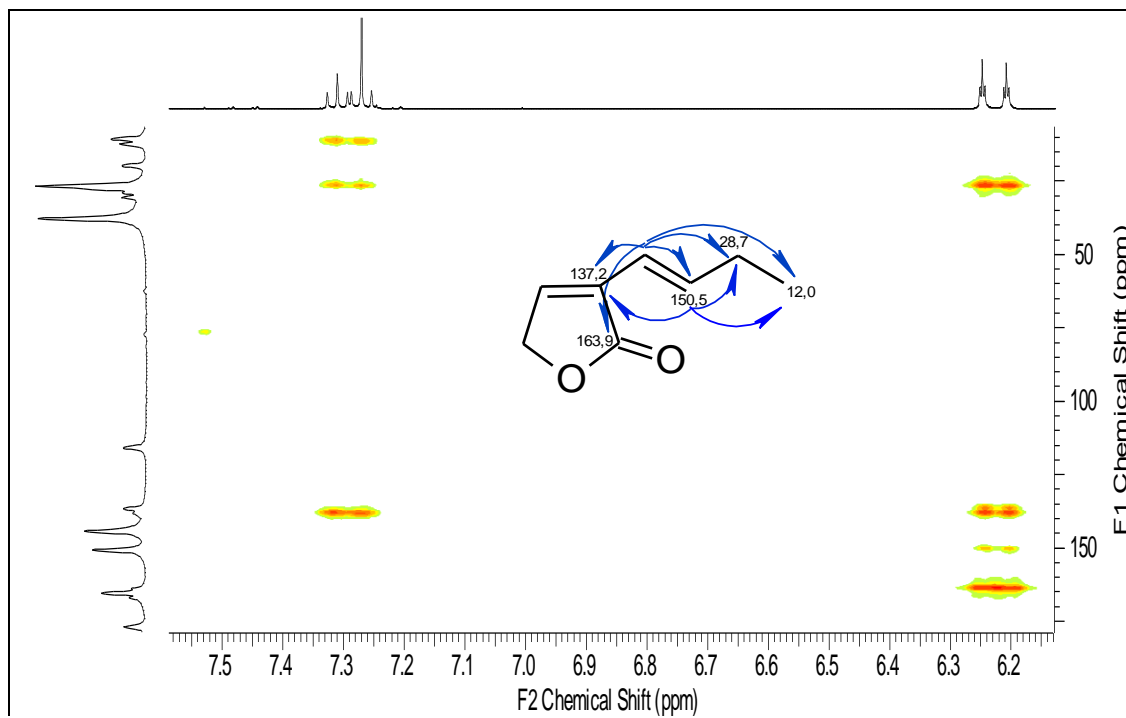
**Figura 51: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Nc18 - região dos metilênicos e metínicos**



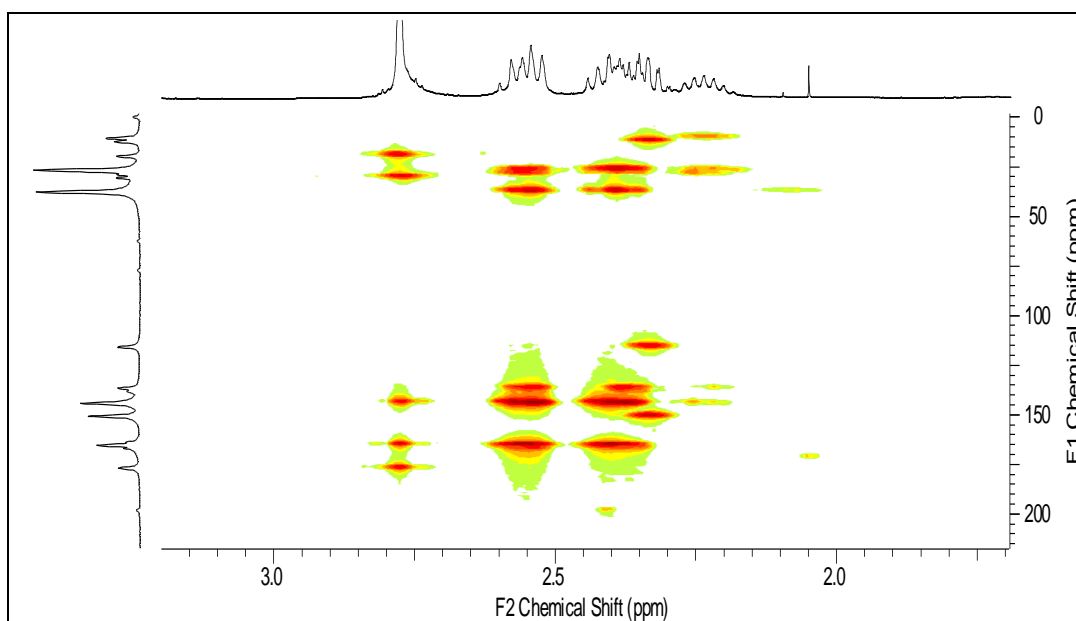
**Figura 52: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Nc18 - região dos metílicos**



**Figura 53: Ampliações do COSY e correlações entre hidrogênios de Nc18**

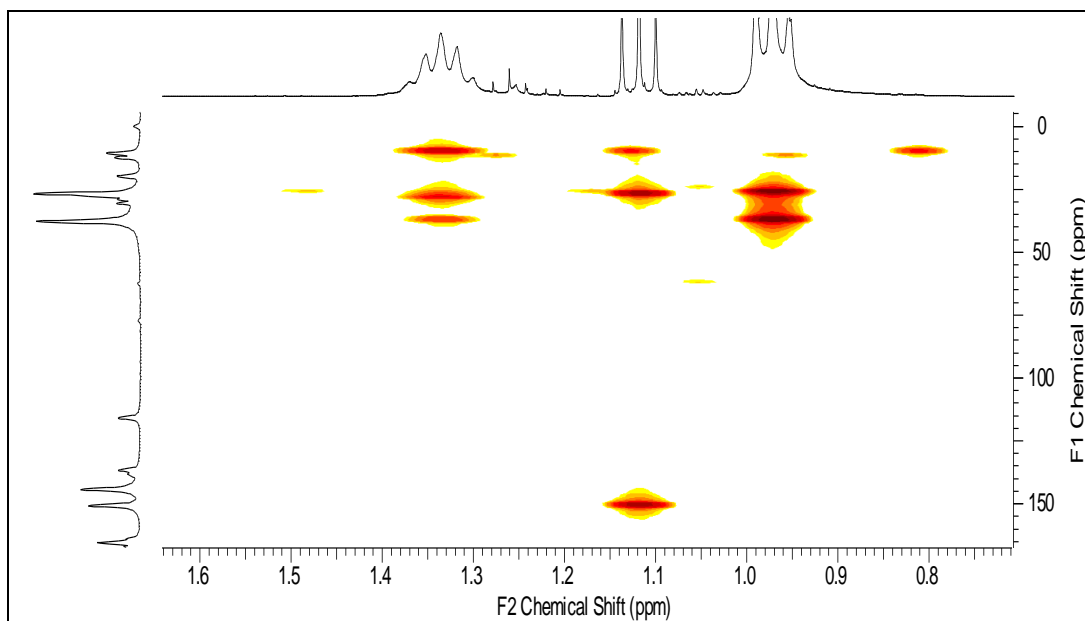


**Figura 54: Destaque do mapa de HMBC e correlações entre hidrogênios e carbonos de Nc18**

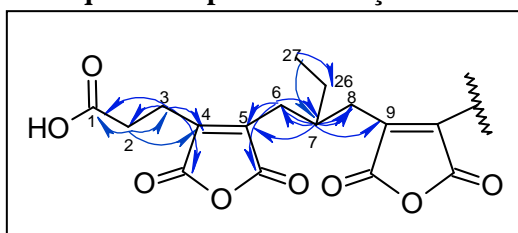


**Figura 55: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc18**

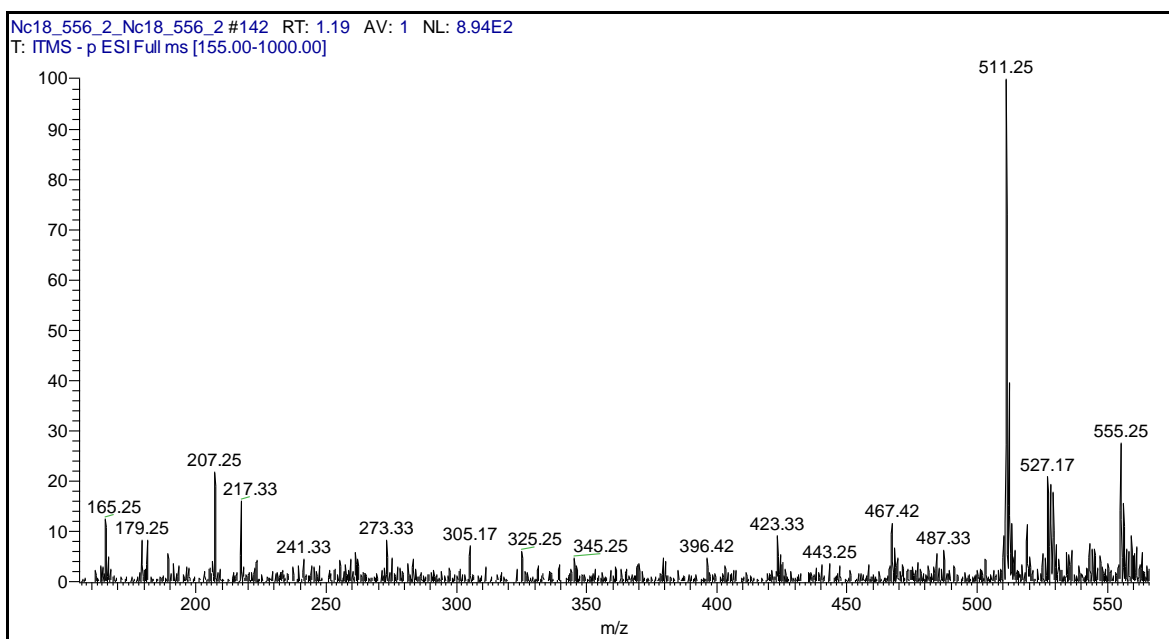




**Figura 56: Destaque do mapa de correlações de HMBC de Nc18**



**Figura 57. Correlações entre hidrogênios e carbonos de Nc18**

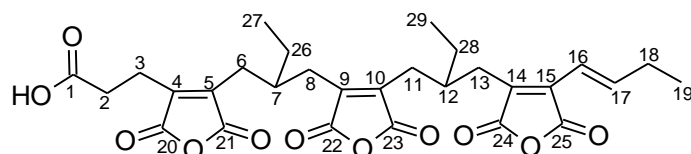


**Figura 58: Espectro de massas ITMS-APCI modo negativo de Nc18**

**Tabela 10: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Nc18 e do cordyanidrido B**

	Nc18		Cordyanidrido B <sup>b</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	176,9	-	176,8
2	2,78 <i>m</i> 2H	30,4	2,77 <i>m</i> 2H,	30,6
3	2,78 <i>m</i> 2H	19,7	2,77 <i>m</i> 2H	19,7
4	-	144,0	-	144,3
5	-	143,3	-	143,6
6	2,56 <i>m</i> 1H H-6a 2,40 <i>m</i> 1H H-6b	29,0	2,58–2,53 <i>m</i> 1H H-6a, 2,42–2,39 <i>m</i> 1H H-6b	28,9
7	2,25 <i>m</i> 1H	37,7	2,24 <i>m</i> 1H	37,7
8	2,56 <i>m</i> 1H H-8a 2,40 <i>m</i> 1H H-8b	28,2	2,58–2,53 <i>m</i> 1H H-8a 2,42–2,39 <i>m</i> 1H H-8b	28,8
9	-	144,2	-	144,0
10	-	144,4	-	143,0
11	2,56 <i>m</i> 1H H-11a 2,40 <i>m</i> 1H H-11b	29,7	2,58–2,53 <i>m</i> 1H H-11a 2,42–2,39 <i>m</i> 1H H-11b	28,6
12	2,25 <i>m</i> 1H	37,9	2,24 <i>m</i> 1H	37,9
13	2,56 <i>m</i> 1H H-13a 2,40 <i>m</i> 1H H-13b	28,9	2,58–2,53 <i>m</i> 1H H-13a 2,42–2,39 <i>m</i> 1H H-13b	28,1
14	-	136,7	-	136,6
15	-	138,5	-	138,5
16	6,23 <i>dt</i> (15,8 ; 1,6Hz) 1H	115,9	6,23 <i>d</i> (15,8 Hz) 1H	115,9
17	7,29 <i>dt</i> (15,8, 6,7 Hz) 1H	150,6	7,28 <i>dt</i> (15,8, 6,7 Hz) 1H	150,6
18	2,34 <i>m</i> 1H	28,5	2,35 <i>m</i> 1H	27,4
19	1,12 <i>t</i> (6,6 Hz) 3H	12,4	1,12 <i>t</i> (7,4 Hz) 3H	12,3
20	-	165,6	-	165,6
21	-	165,6	-	165,5
22	-	165,1	-	165,5
23	-	165,5	-	165,0
24	-	166,4	-	166,3
25	-	164,0	-	164,0
26	1,35 <i>m</i> 2H	26,5	1,34 <i>m</i> 2H	28,6
27	0,97 <i>t</i> (7,3; 1,3 Hz) 3H	10,7	0,97 <i>t</i> (7,3 Hz) 3H	10,6
28	1,35 <i>m</i> 2H	27,5	1,34 <i>m</i> 2H	28,9
29	0,97 <i>t</i> (7,3; 1,3 Hz) 3H	10,7	0,97 <i>t</i> (7,3 Hz) 3H	10,6
CO <sub>2</sub> H	-	-	7,9 1H, brs,	-

<sup>a</sup>Baseado nos dados de correlações do HSQC e HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz). <sup>b</sup>Isaka et al. (2000): RMN de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); ): RMN de  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).



**Figura 59: Cordianidrido B**

#### 4.4 Substâncias isoladas de DgCr22.1b

A linhagem DgCr22.1b isolada da casca da raiz de *Duguetia stelechantha* foi estudada quimicamente, tendo sido isoladas duas substâncias. O gênero e a espécie desta linhagem esta em fase de determinação por biologia molecular.

##### 4.4.1 Identificação de DgA-9

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 60 e 61) da amostra DgA-9 em DMSO-*d*, observou-se uma substância em mistura, a qual foi identificada como austdiol (VLEGGGAAR, et al 1974). por análise dos seus sinais de hidrogênios e carbonos e das respectivas correlações no COSY, HSQC e HMBC, por espectrometria de massas, e pela comparação com dados da literatura. Foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sete sinais de hidrogênios, correspondentes a quatro grupos CH e dois  $\text{CH}_3$ . Foram identificados um singlete em  $\delta$  1,14 e um dubleto em  $\delta$  2,41, característicos de grupos metílicos; quatro sinais na região de hidrogênios olefínicos e um hidrogênio ligado a um carbono carbonílico com deslocamento químico em  $\delta$  9,98 evidenciando a presença de um grupo aldeído. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  realizado com o mesmo solvente (Figura 61), foram observados 12 sinais, dois de carbonos carbonílicos, em  $\delta$  198,0 (cetona) e  $\delta$  189,1 (aldeído), dois de carbonos carbinólicos ( $\delta$  71,4 e 74,4), diversos na região de carbonos  $\text{sp}^2$  e dois de carbonos metílicos em  $\delta$  21,8 e 19,9. No mapa de correlação HMBC foram observadas as correlações entre hidrogênios e carbonos, confirmando a estrutura da molécula (Figura 62). Na análise por espectrometria de massas (Figura 64), foi registrado um pico em  $m/z$  237 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) coerente com a fórmula molecular do composto  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , além de ter sido observado um padrão de fragmentação coerente com a estrutura proposta, o qual apresenta uma perda de 18 correspondentes a molécula de água e duas perdas de 28 correspondentes a unidades de monóxido de carbono. Foi observada muita semelhança entre os dados de RMN da literatura e os de DgA-9 (Tabela 11), apesar de terem sido obtidos em solventes diferentes, revelando que realmente uma das substancias em mistura é o policetídeo denominado austdiol (7*R*,8*S* - 7,8-dihidro-7.8-dihidroxi-3,7-dimetil-6-oxo-6-2-benzopiran-5-carbaldeído), isolado por Vleggaar e colaboradores (1974) de *Aspergillus ustus*, um contaminante encontrado em gêneros alimentícios. O austdiol (Figura 65) é uma toxina gastro-intestinal geralmente obtida como agulhas amarelas opticamente ativas (VLEGGGAAR, et al 1974).

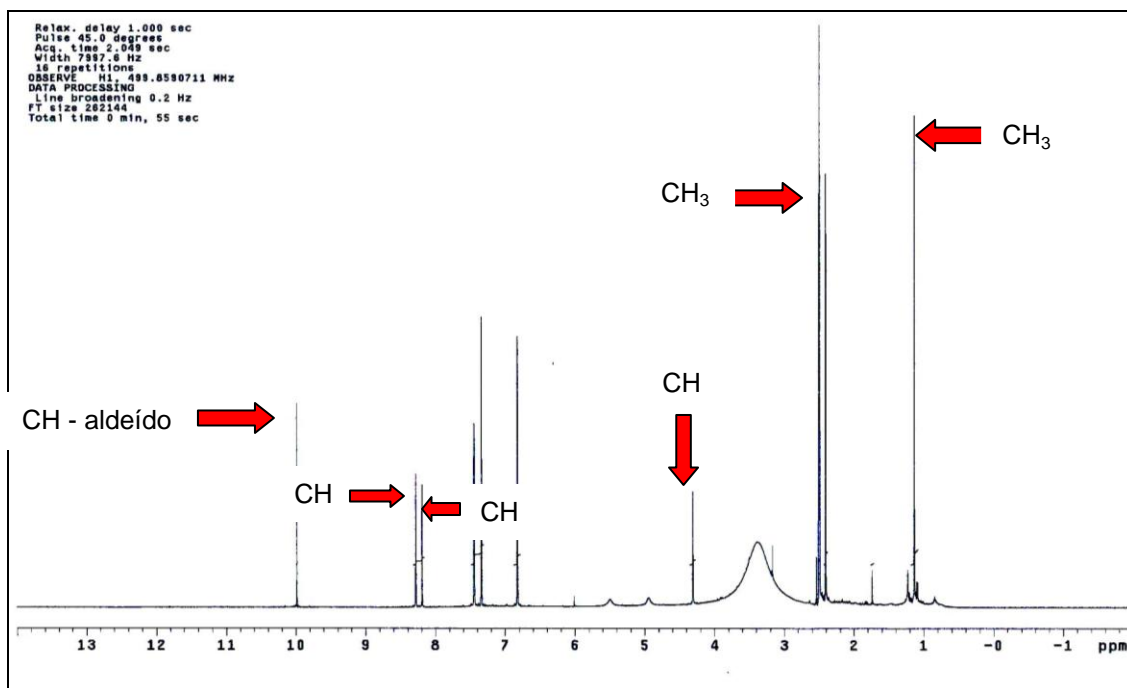


Figura 60: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra Dg-A9, (DMSO-*d*, 500 MHz).

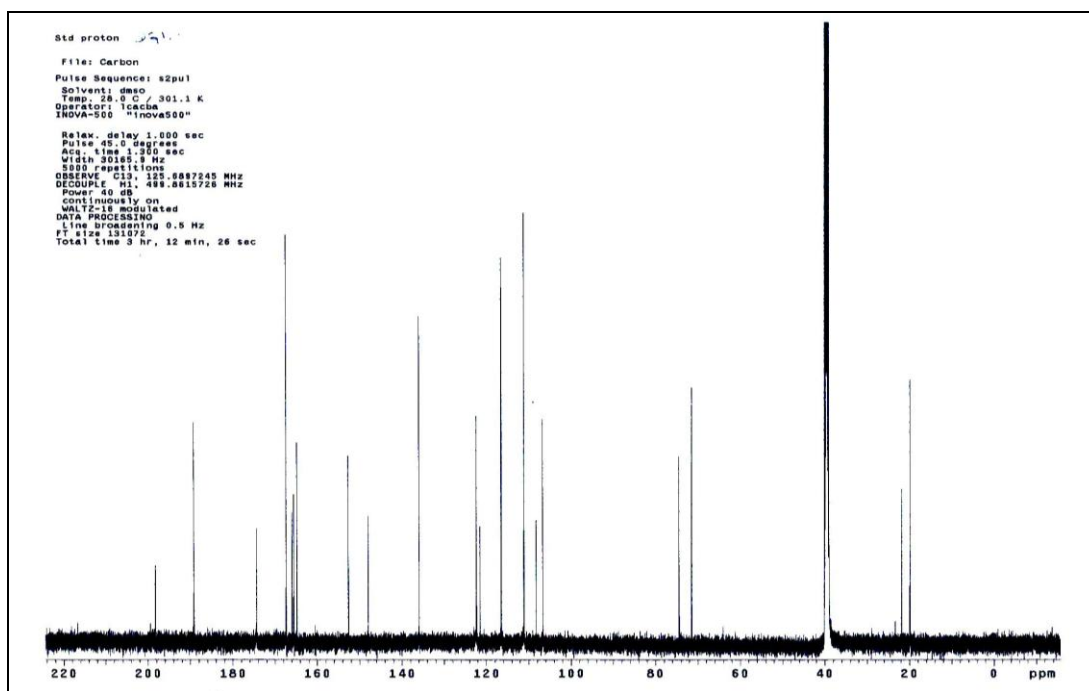


Figura 61: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO-*d*, 125 MHz).

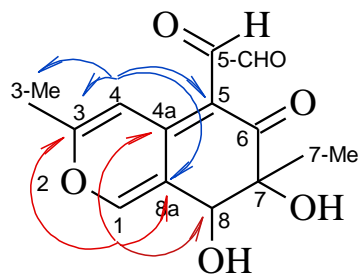


Figura 62: Correlações de HMBC de Dg-A9

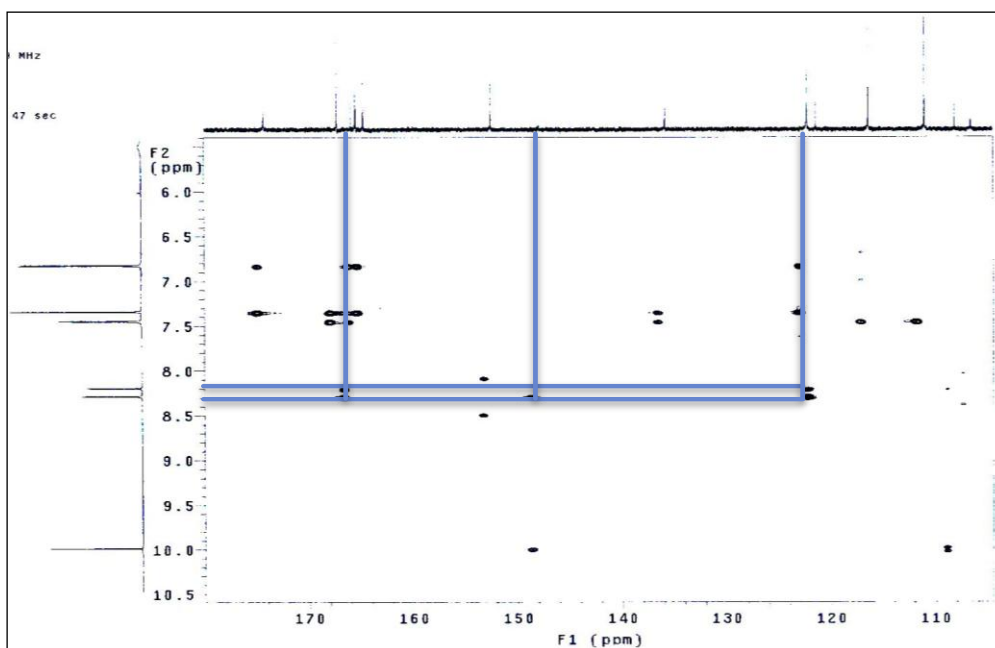


Figura 63: Mapa de correlações de HSQC e correlações destacadas de Dg-A9

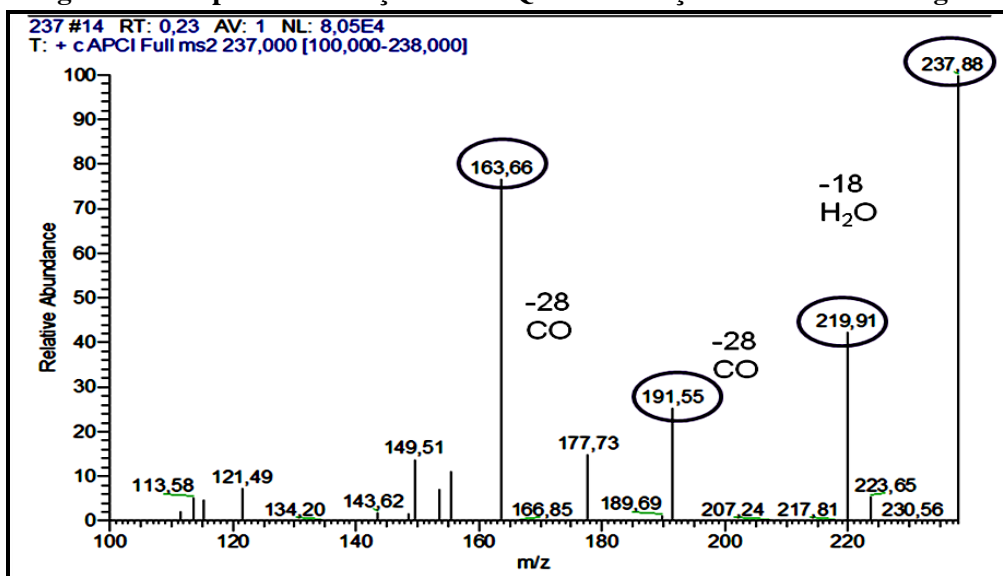
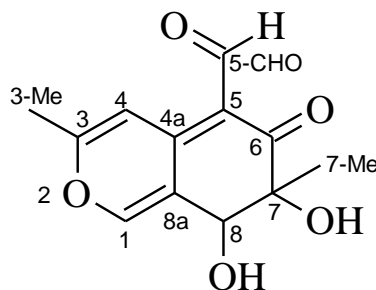


Figura 64: Espectro de massas de Dg-A9 - íons filhos de 237 ([M+H]<sup>+</sup>).

**Tabela 11: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Dg-A9 e do austdiol**

Sinais	<sup>a</sup> Dg-A9		<sup>b</sup> Austdiol	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	8,28 <i>s</i> 1H	152,6	8,30 <i>s</i> 1H	152,6
3	-	165,9	-	165,9
3-Me	2,50 <i>d</i> 3H	19,9	2,41 <i>d</i> 3H	19,9
4	8,19 <i>s</i> 1H	106,6	8,20 <i>q</i> 1H	106,5
4a	-	148,0	-	148,0
5	-	108,2	-	108,1
5- CHO	9,98 <i>s</i> 1H	189,2	9,98 <i>s</i> 1H	189,1
6	-	198,3	-	198,3
7-	-	71,4	-	71,4
7-OH	4,30	71,4	4,31 <i>d</i>	71,4
7-Me	1,13 <i>s</i> 3H	21,8	1,14 <i>s</i> 3H	21,8
8	4,99 <i>s</i> 3H	74,4	5,00 <i>s</i> 3H	74,4
8a	-	121,5	-	121,5

<sup>a</sup>DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz; <sup>b</sup>Piridina-*d*<sub>5</sub>, 250 MHz (Vleggaar et al, 1974).

**Figura 65: Austdiol.**

#### 4.4.2 Identificação de DgD16

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgD16 (Figura 66) foram observados sinais em  $\delta$  13,66 e 11,41, ambos singletos e integrando para 1H, coerentes com hidrogênios de hidroxila quelados; dois dubletos em  $\delta$  8,04 e 6,60 com constantes de acoplamento de 8,7 Hz, indicando corresponderem a hidrogênios em orientação orto entre si. Foram observados dois duplo dubletos de hidrogênios alquílicos em  $\delta$  2,71 e 2,27 e um multipletto em 2,42. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 67) são observados sinais de carbonos carbonílicos em  $\delta$  177,1, e 169,9; aromáticos e olefínicos em  $\delta$  161,8, 155,6, 141,3, 115,2, 110,1, 106,9 e 101,1, bem como sinais de carbonos carbinólicos em  $\delta$  84,2 e 76,4 e sinais metilênicos e

metflicos em  $\delta$  36,1, 29,0 e 17,9. No HMBC (Figura 68) são observadas as seguintes correlações: do hidrogênio quelado de hidroxila em  $\delta$  13,66 com os carbonos em  $\delta$  36,1, 177,1 e 101,3; do outro hidrogênio quelado em  $\delta$  11,41 com os carbonos em  $\delta$  107,0, 110,1 e 161,8; dos sinais em  $\delta$  2,71 e 2,27, revelados pelo mapa de HSQC como sendo de hidrogênios geminados magneticamente diferentes, correlacionados aos carbonos em  $\delta$  101,3, 177,1, 29,0, 17,9 e 76,4. O hidrogênio carbinólico em  $\delta$  3,74 correlaciona com os carbonos em  $\delta$  17,9, 29,0 e 84,8; e dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,04 e 6,60 com os carbonos em  $\delta$  155,6 e em  $\delta$  107,0, respectivamente, ao passo que ambos correlacionam com os carbonos  $\delta$  115,2 e 161,8. Esses dados de RMN e o espectro de massas que indicou um pico em  $m/z$  637 ( $[M-H]^-$ ) são coerentes com um dímero simétrico inédito na literatura.

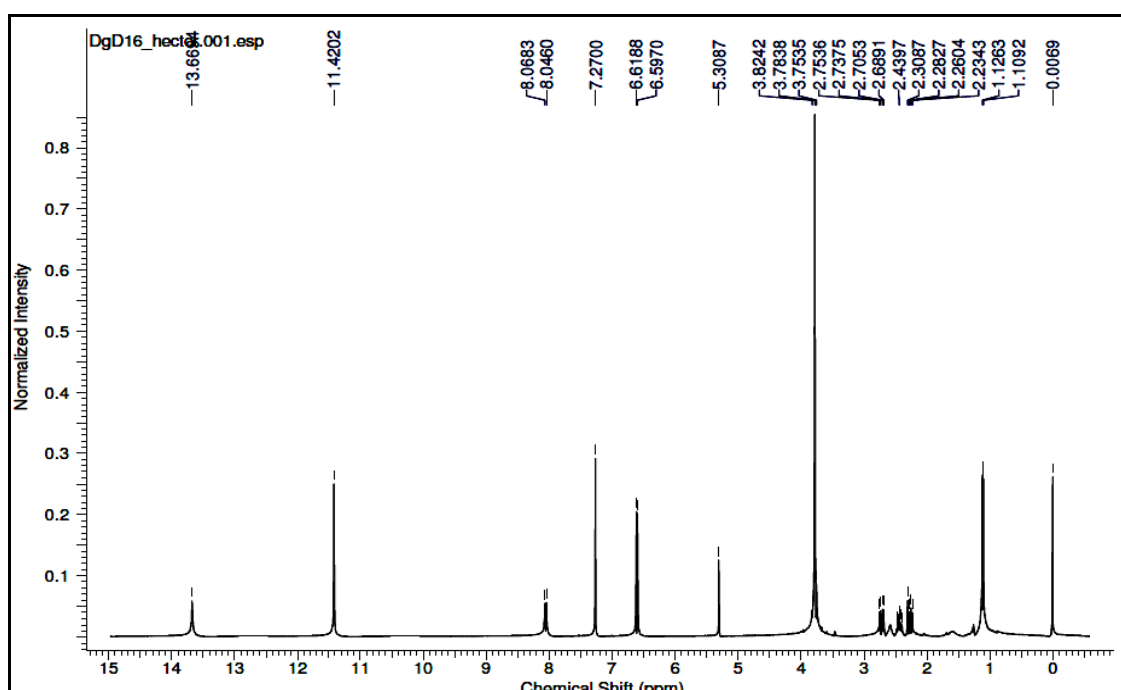


Figura 66: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra DgD16, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

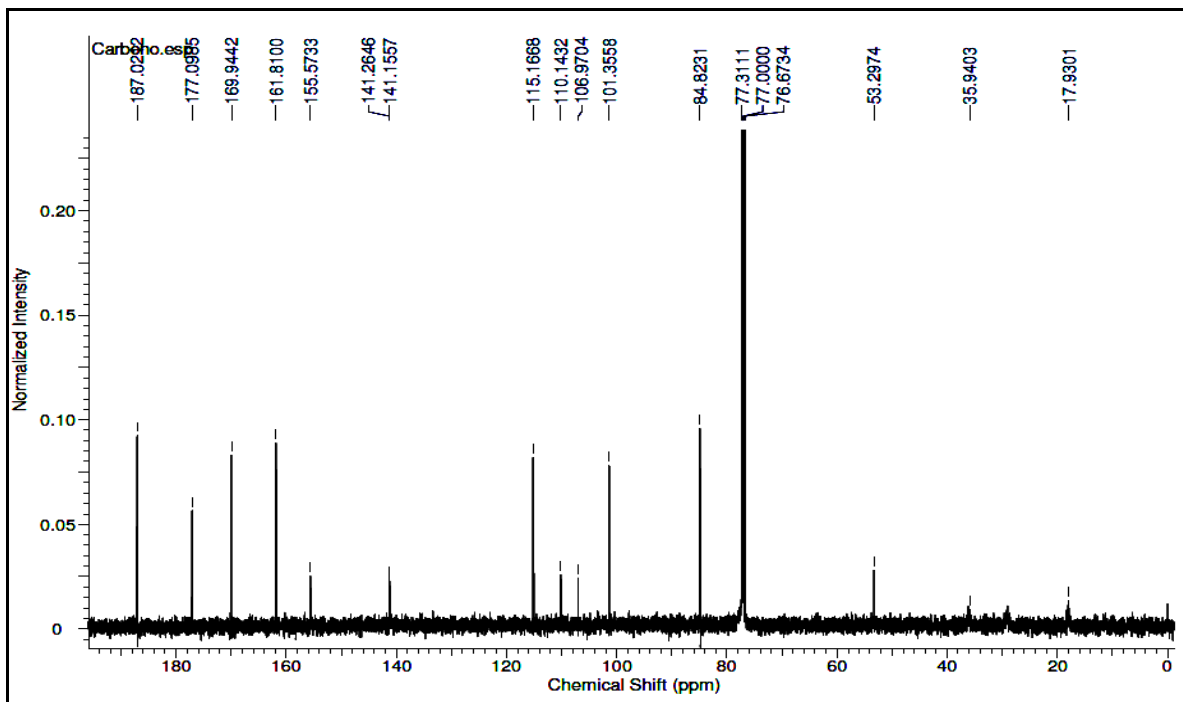


Figura 67: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra DgD16, ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

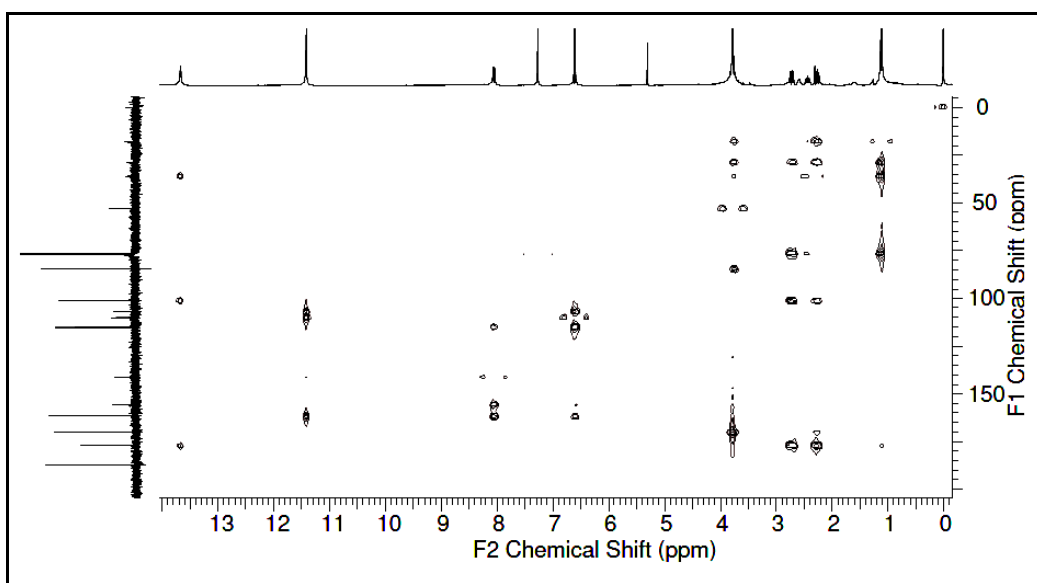
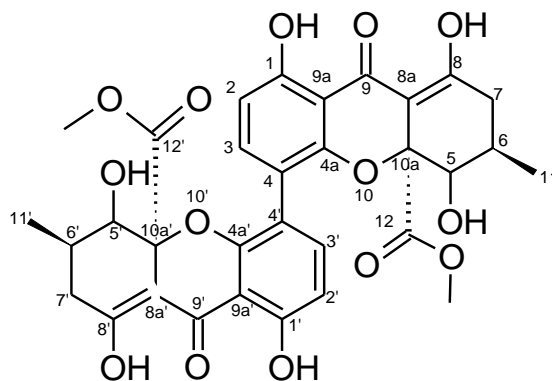


Figura 68: Mapa de correlações COSY da amostra DgD16,





**Figura 69: Proposta estrutural para a substância DgD16**

#### 4.5 Substâncias isoladas de DgCr32.2

O fungo DgCr32.2 foi identificado pela macromorfologia como pertencente ao gênero *Penicillium*. O estudo químico deste fungo forneceu três substâncias, as quais são dois corantes e um esteróide.

##### 4.5.1 Identificação da substância DgP14-2

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgP14-2 em  $\text{CDCl}_3$  (Figura 70) foram registrados 14 sinais de hidrogênio (alguns deles duplicados), entre os quais cinco de metilas em  $\delta$  0,89, 1,03, 1,55, 1,85 e 2,16 (Figura 71), sendo este coerente com uma metila acíclica de um grupo éster. Foi registrado um multipletto em  $\delta$  1,30-1,49 de hidrogênio conectado a um carbono em  $\delta$  30,0 (HSQC; Figura 74), e em correlação com carbonos em  $\delta$  12,0, 20,2, 35,1 e 148,5 (HMBC; Figura 75). Dois duplos dubletos foram observados na região de olefínicos (Figura 72), em  $\delta$  6,15 e 6,95, acoplados entre si por um valor de  $J = 15,0$  Hz, indicando hidrogênios em *trans*. Este acoplamento foi confirmado no mapa de COSY (Figura 73) e pelo mapa de HSQC foi verificado que os hidrogênios estão conectados respectivamente aos carbonos em  $\delta$  114,7 e 145,0. Um hidrogênio detectado em  $\delta$  5,71 foi registrado como um dubleto e acopla com outro em  $\delta$  2,52-2,45 e com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,85. Através desses dados e das correlações observadas no COSY e HMBC foi possível propor parte da estrutura (Figuras 73 e 75). Um singleto em  $\delta$  7,84 de um hidrogênio conectado a um carbono em  $\delta$  142,1 correlaciona segundo o mapa de HMBC (Figura 76 e 77) com os carbonos em  $\delta$  144,5; 148,5 e 194,0. Outro singleto em  $\delta$  7,03 de hidrogênio conectado a um carbono em  $\delta$  111,8 correlaciona com os carbonos em  $\delta$  101,9; 114,7; 148,5 e fracamente em  $\delta$  194,0

(Figura 76). Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,55 estão ligados a um carbono em  $\delta$  23,2 e correlacionam com os carbonos em  $\delta$  85,0; 184,2 e 194,0 (Figura 78). O carbono em  $\delta$  85,0 apresenta deslocamento químico coerente com oxigênio de éster, o que é confirmado por um carbono acílico de éster em  $\delta$  170,1, ao qual está ligada uma metila em  $\delta$  2,17. Esses e os demais dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e suas respectivas correlações foram comparados aos dados da literatura (Tabela 12) e chegou-se a conclusão de que DgP14-2 contém a isocromofilona VI, uma molécula com um átomo de cloro e uma cadeia lateral 3,5-dimetil-1,3-heptadieno no C-3 (Figura 79; ARAY, et al 1995). Os hidrogênios metilênicos do grupo  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  ligado ao nitrogênio da isocromofilona VI foram observados como multipletos em  $\delta$  4,10-3,99 e 3,98-3,85. Em relação a essa fonte bibliográfica observou-se uma inversão dos carbonos 4a e 5, o que é justificado tanto pelo sistema conjugado com a carbonila C-6 quanto pelas correlações do C-1.

Em um comportamento típico de misturas epiméricas, foram observados vários sinais da isocromofilona VI duplicados. Considerando que os únicos carbonos estereogênicos da molécula estão em posições que não justificariam tais duplicações como um todo, será trabalhada a hipótese de uma epimeria conformacional sobre o nitrogênio. Ensaio de RMN em diferentes temperaturas serão feitos a fim de comprovar esta hipótese.

A isocromofilona VI pertence a subclasse das azafilonas, constituída por corantes muito interessantes isolados de algumas espécies do gênero *Penicillium* e denominados isocromofilonas, para os quais foram reportadas na literatura atividades em ensaios enzimáticos relacionados ao tratamento de arterosclerose e hipercolesterolemia (Aray et al, 1995). A coloração destes compostos depende da estrutura química, em geral as estruturas amarelas são mais hidrogenadas do que as alaranjadas e vermelhas. A presença do grupo amino geralmente aumenta o comprimento de onda no espectro de absorção. O sistema de dois anéis fundidos é altamente conjugado contribuindo na propriedade cromófora da substância.

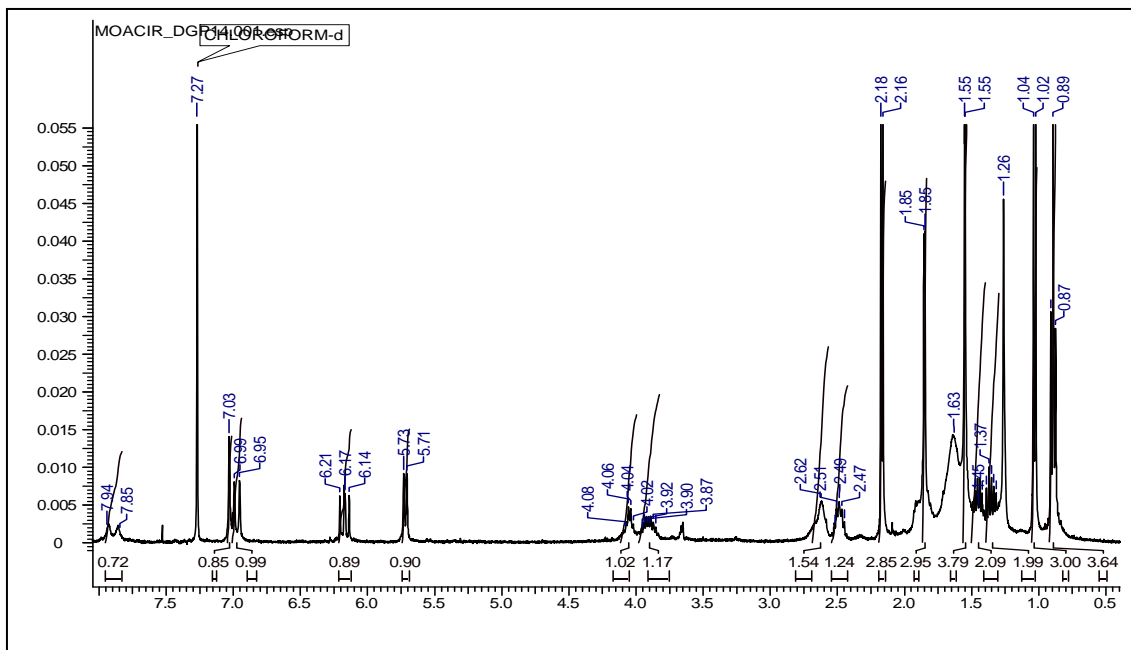


Figura 70: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{CCl}_3\text{D}$ , 400 MHz

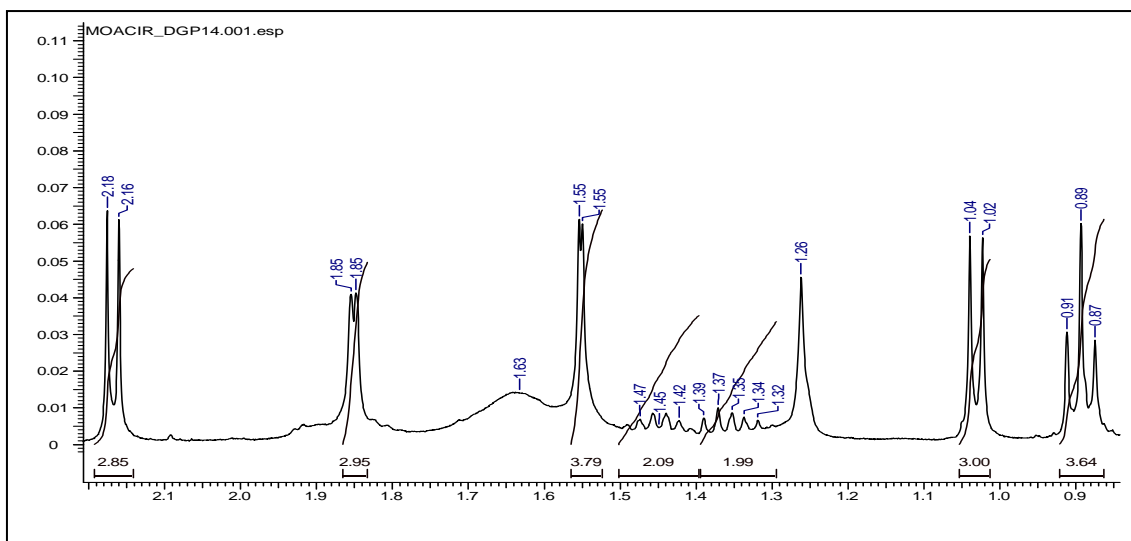
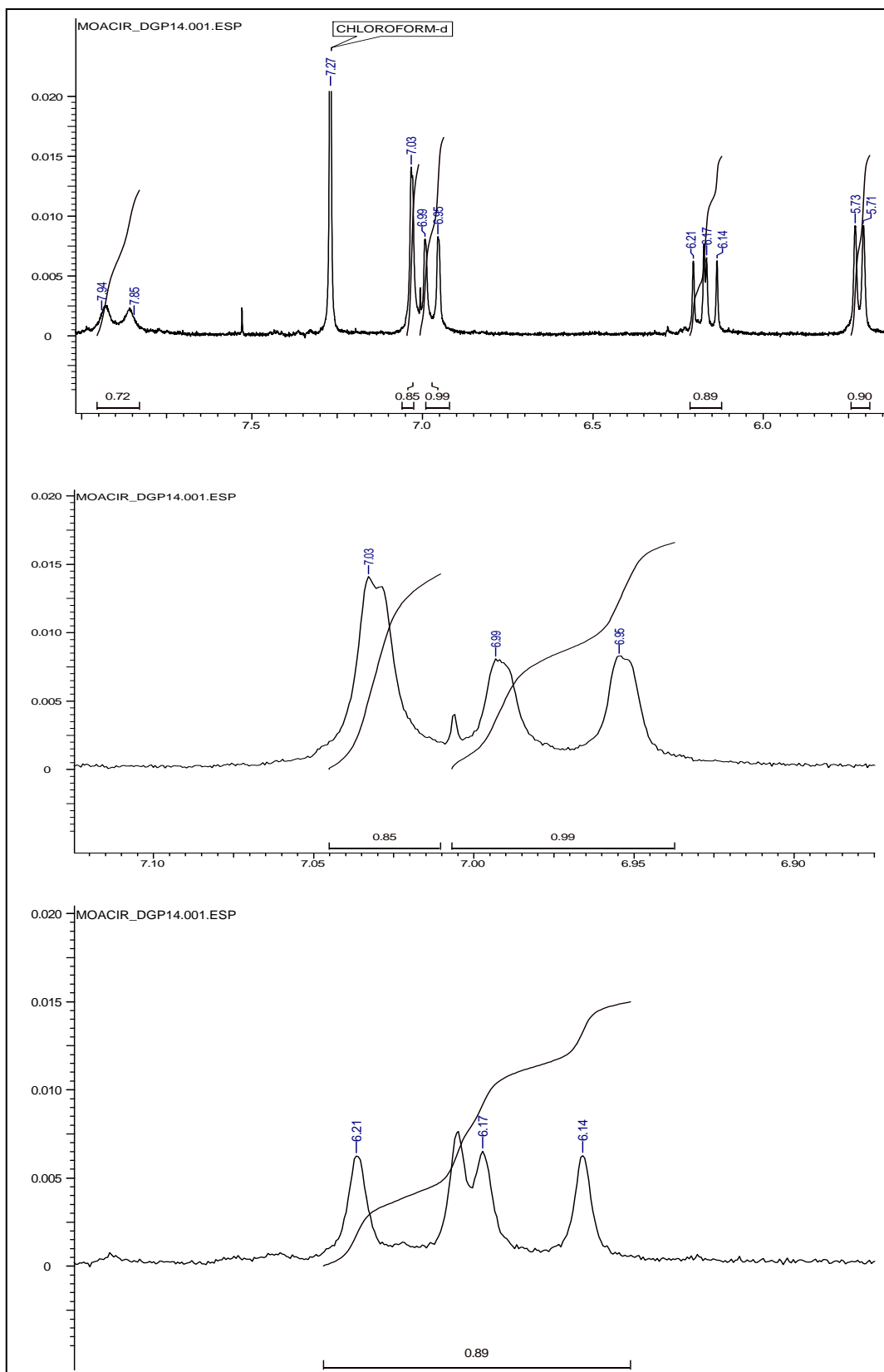
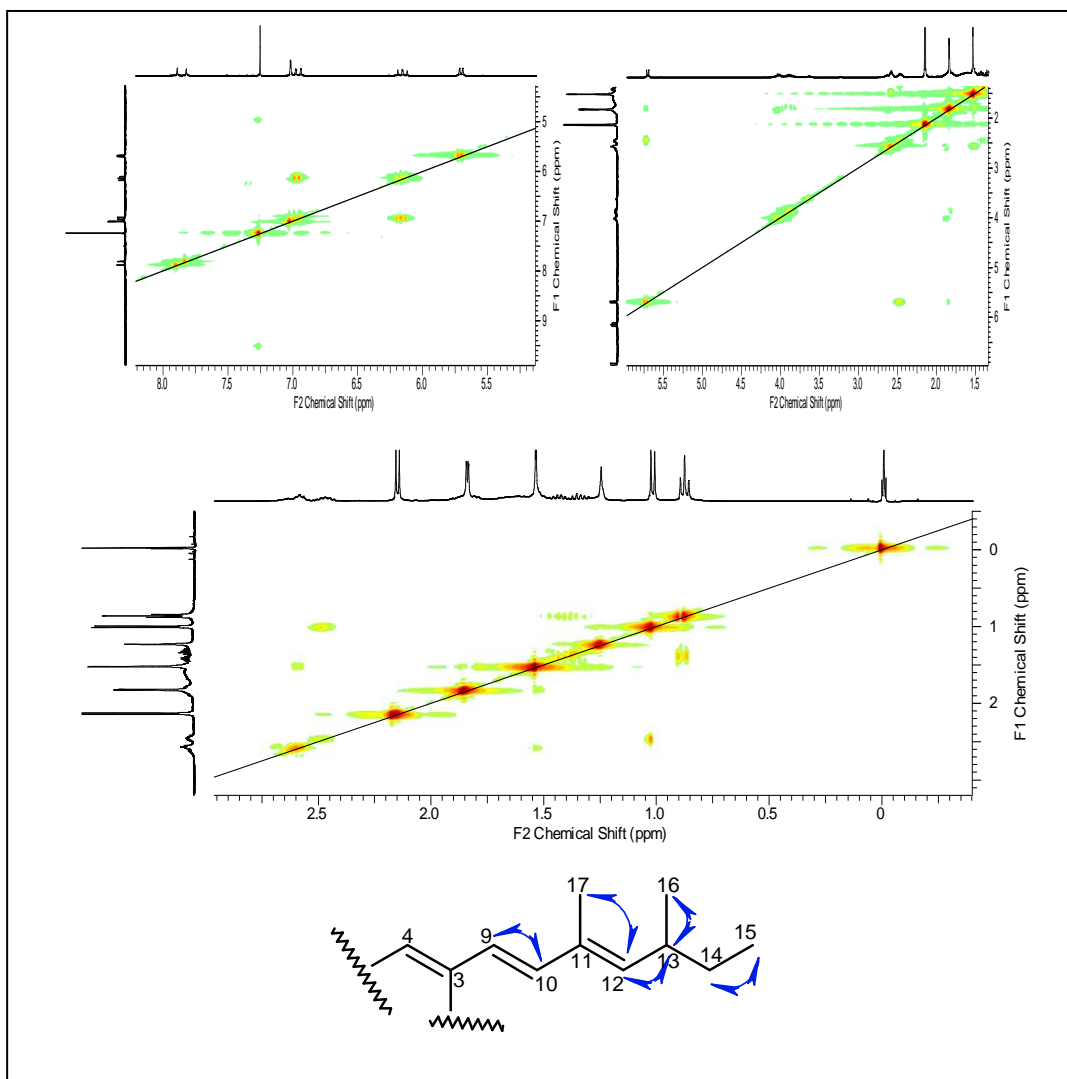


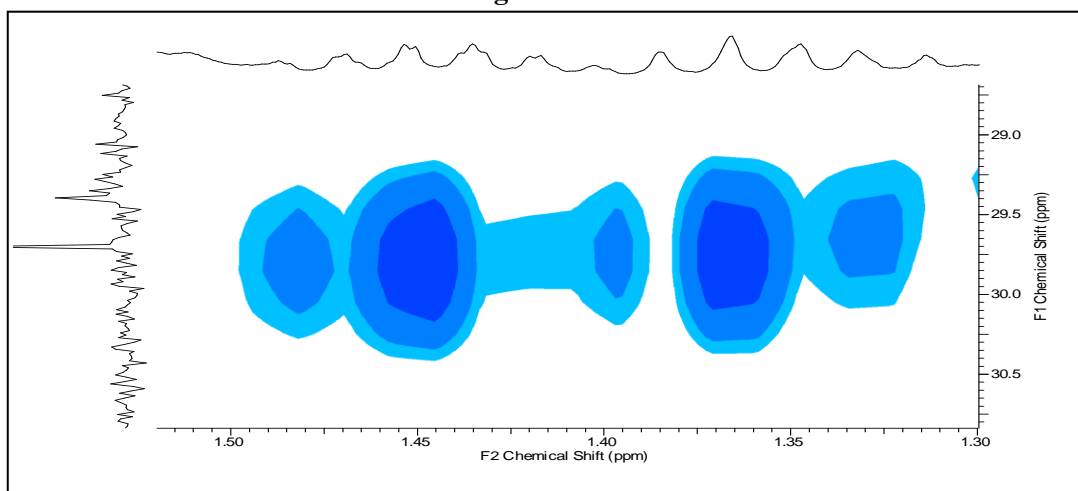
Figura 71: Destaque da região de hidrogênios metílicos e metilênicos.



**Figura 72: Destaque da região de hidrogênios olefínicos.**



**Figura 73: Destaque do mapa de COSY e correlações entre hidrogênios da cadeia lateral de DgP14-2**



**Figura 74: Destaque do mapa de HSQC e conexões entre H-14 e C-14 de DgP14-2**

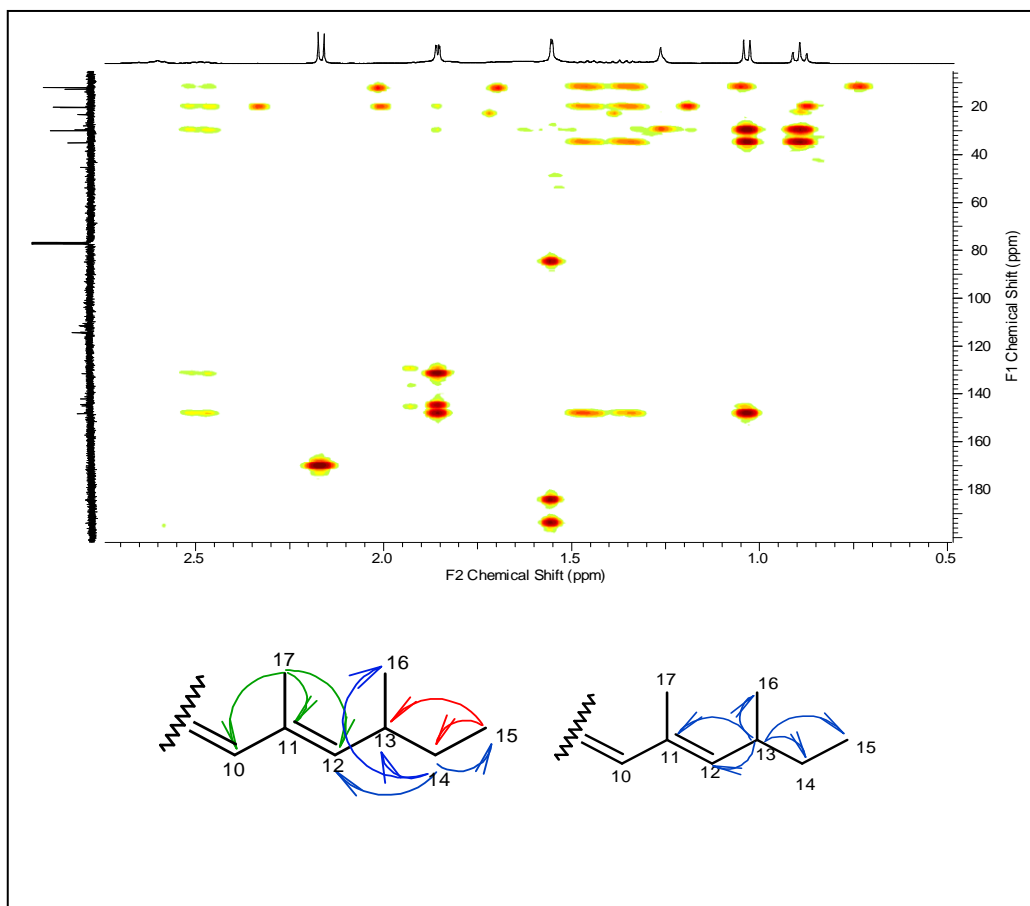


Figura 75: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas – A

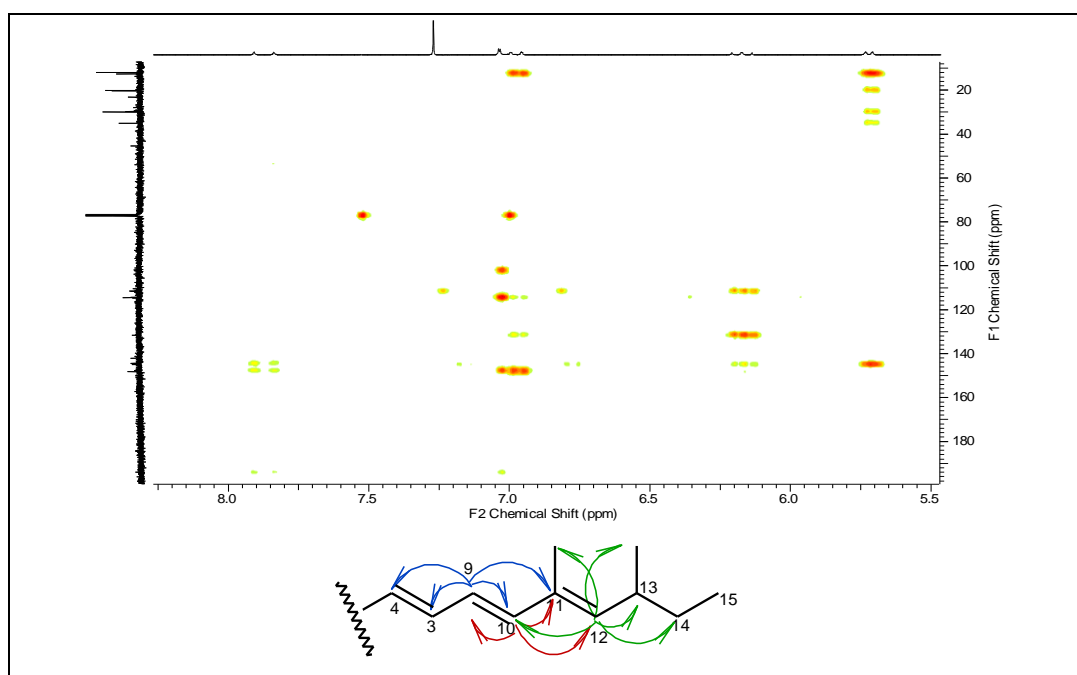


Figura 76: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas - B.

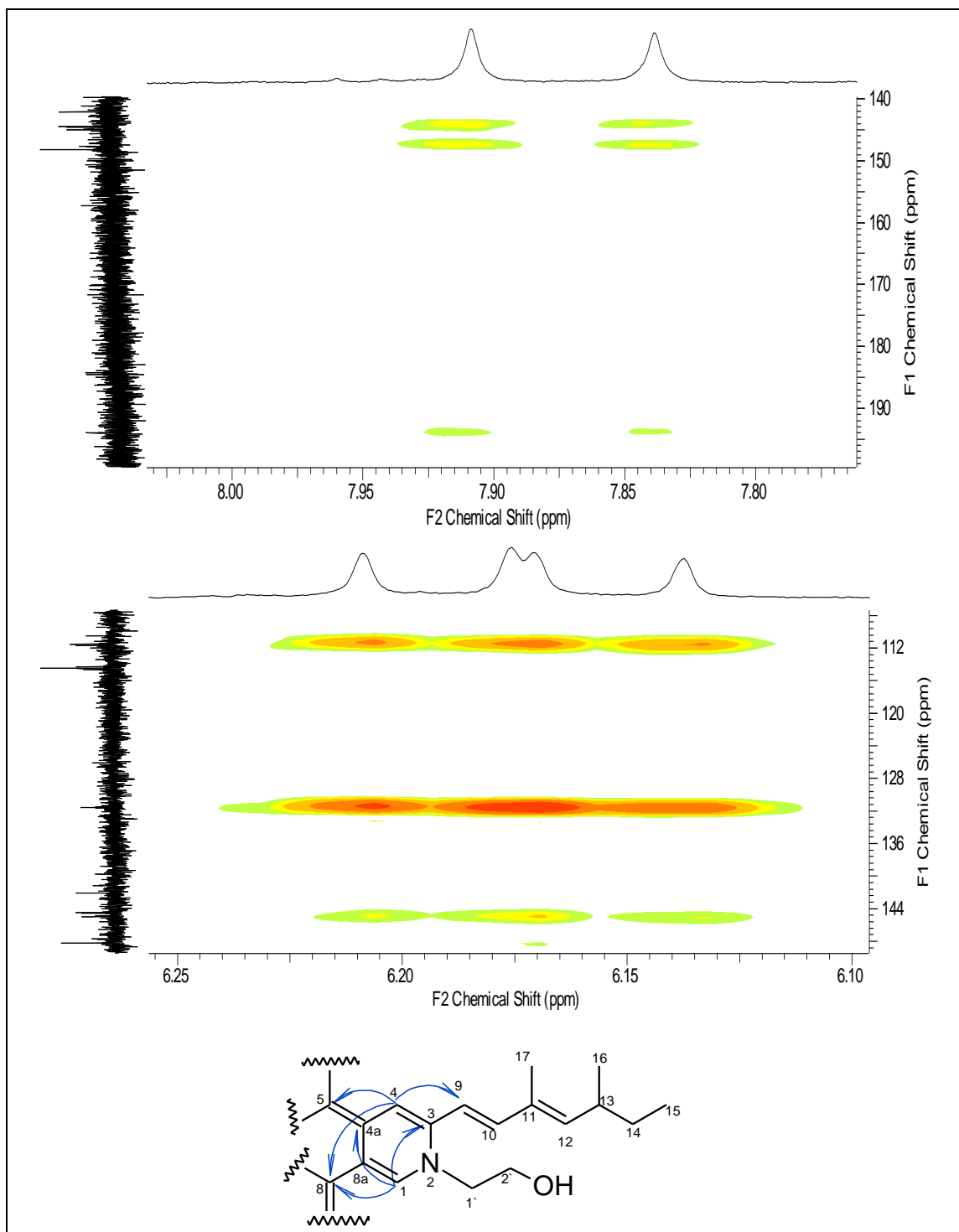


Figura 77: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas - C.

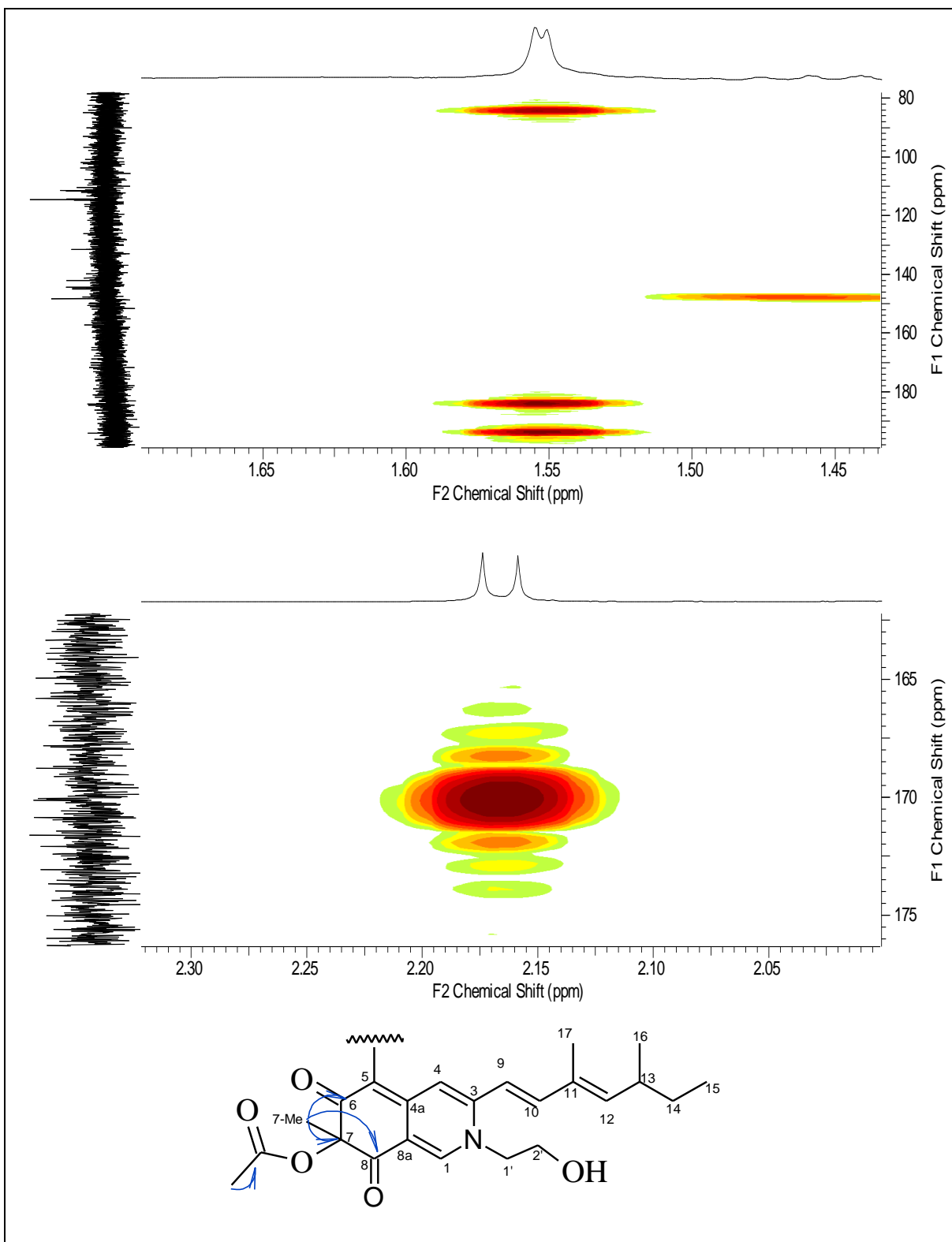


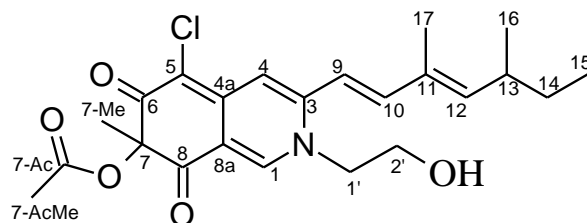
Figura 78: Destaque do HMBC de DgP14-2 e interpretação das correlações observadas - D



**Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de DgP14-2 e da Isocromofilona VI**

Sinais	DgP14-2		Isocromofilona VI	
	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^b$	$^{13}\text{C}^b$
1	7,84 <i>s</i> 1H <b>7,91 <i>s</i> 1H</b>	142,1 <b>141,2</b>	7,86 <i>s</i> 1H	141,9
3	-	144,5	-	144,8
4	7,03 <i>s</i> 1H <b>7,04 <i>s</i> 1H</b>	111,8 <b>111,5</b>	7,02 <i>s</i> 1H	111,8
4 <sup>a</sup>	-	101,9	-	100,6
5	-	148,5	-	148,5
6	-	184,2	-	184,4
7	-	85,0	-	84,9
8	-	194,0	-	193,9
8 <sup>a</sup>	-	114,5	-	114,6
9	6,15 <i>d</i> (15,0 Hz) 1H <b>6,19 <i>d</i> (15,0 Hz) 1H</b>	114,7	6,25 <i>d</i> (16,0 Hz) 1H	115,0
10	6,95 <i>d</i> (15,0 Hz) 1H <b>7,00 <i>d</i> (15,0 Hz) 1H</b>	145,0	6,93 <i>d</i> (16,0 Hz) 1H	145,1
11	-	131,6	-	131,7
12	5,71 <i>d</i> (10,0 Hz) 1H <b>5,73 <i>d</i> (10,0 Hz) 1H</b>	148,5	5,70 <i>d</i> (10,0 Hz) 1H	148,0
13	2,52-2,45 <i>m</i> 1H <b>2,62-2,58 <i>m</i> 1H</b>	35,1	2,47 <i>m</i> 1H	35,0
14	1,30-1,49 <i>m</i> 2H	30,0	1,20-1,40 <i>m</i> 2H	29,7
15	0,89 <i>t</i> (7,4 Hz) 3H <b>0,89 <i>t</i> (7,4 Hz) 3H</b>	12,0	0,88 <i>t</i> (10,0 Hz) 3H	12,0
16	1,03 <i>d</i> (6,5 Hz) 3H <b>1,04 <i>d</i> (6,5 Hz) 3H</b>	20,2	1,02 <i>d</i> (7,0 Hz) 3H	20,2
17	1,85 <i>d</i> (1,1 Hz) 3H <b>1,86 <i>d</i> (1,1 Hz) 3H</b>	12,6	1,84 <i>d</i> (1,0 Hz) 3H	12,6
7-Me	1,55 <i>s</i> 3H <b>1,56 <i>s</i> 3H</b>	23,2	1,55 <i>s</i> 3H	23,2
7-Ac C=O	-	170,1	-	170,3
7-Ac Me	2,16 <i>s</i> 3H <b>2,17 <i>s</i> 3H</b>	20,3	2,16 <i>s</i> 3H	20,3
1'	4,10 -3,99 <i>m</i> 2H	51,5	4,02 <i>dd</i> (5,0, 5,0 Hz) 2H	55,4
2'	3,98 -3,85 <i>m</i> 2H	54,0	3,92 <i>dd</i> (5,0, 5,0 Hz) 2H	60,9

Deslocamentos químicos em  $\delta$ . <sup>a</sup>Dados obtidos em um aparelho 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ; <sup>b</sup>Dados obtidos em um aparelho de 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$  (ARAI et al, 1995). \* Sinais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DgP14-2 duplicados.



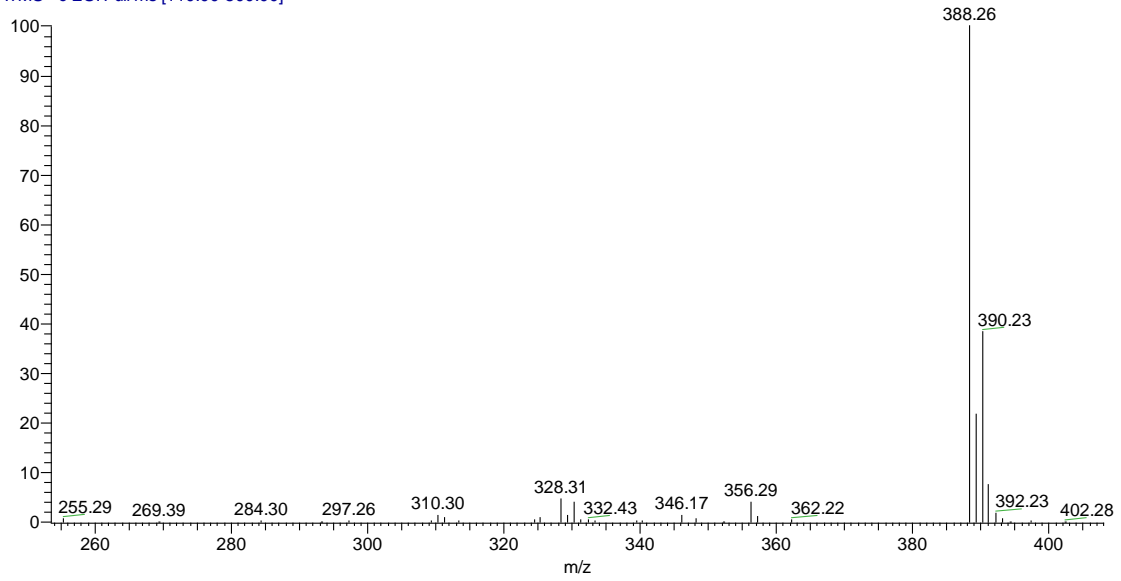
**Figura 79: Isocromofilona VI**

#### 4.5.2 Identificação da substância DgP3-2

Na análise de DgP3-2 através de LC-UV foi observada uma banda em 490 nm coerente com a cor vermelha da amostra. Foi observado que a maioria dos sinais registrados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgP3-2 (Figura 81-82) e de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 83) coincidem com os sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgP14-2, apresentados anteriormente, exceto pela ausência dos multipletos em  $\delta$  3,98 e 4,10, que caracterizam o grupo ligado ao nitrogênio da isocromofilona VI (ARAI et al, 1995). A aparente diferença entre DgP3-2 e esta substância está no grupo ligado ao nitrogênio (Tabela 13).

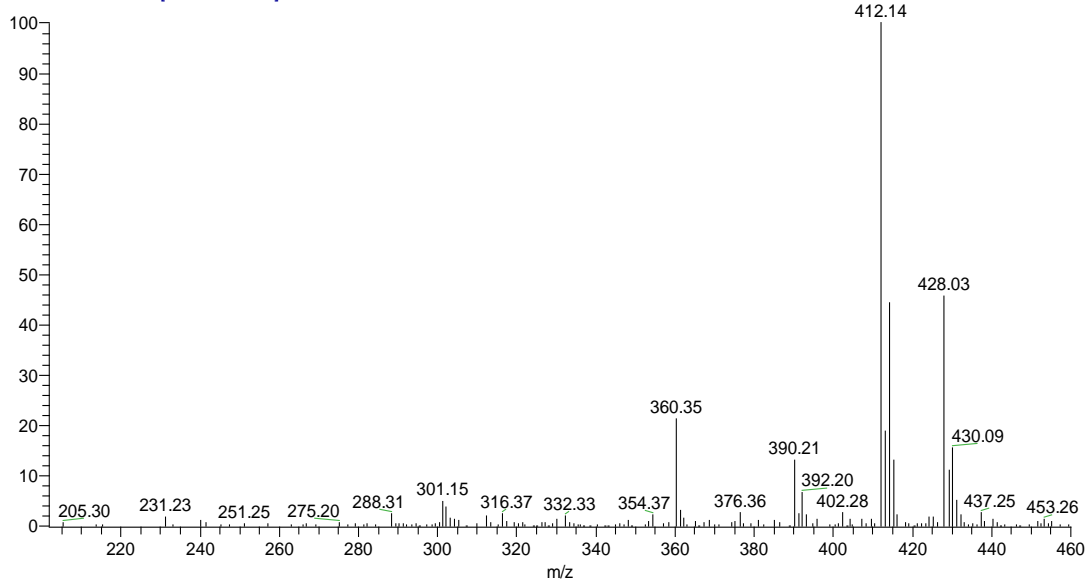
Na estrutura da isocromofilona VI, o nitrogênio da molécula está ligado ao um grupo  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  enquanto que em DgP3-2 o nitrogênio correspondente está possivelmente ligado a um hidrogênio conforme foi mostrado o acoplamento com o H-1 pelo mapa de COSY (Figura 84 e 85) confirmado pela análise por espectrometria de massas (Figura 80). No modo negativo foi observado registrou o pico em  $m/z$  388 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ), correspondente a substância com o isótopo de cloro 35 e o pico em  $m/z$  390 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ), relativo ao respectivo isótopo 37. No modo positivo foram registrados os íons em  $m/z$  390/392 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 412/414 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) e 428/430 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ). Estes dados também foram comparados aos dados da sclerotioramina mostrada na Figura 90 (WANG, et al, 2010) e observou-se que são coerentes com a amostra DgP3-2. Esta estrutura corresponde a sclerotioramina, também pertencente a classe das azafilonas.

Corante1\_111117154908 #754 RT: 8.79 AV: 1 NL: 7.31E3  
T: ITMS - c ESI Full ms [110.00-500.00]



a)

Corante1\_111117154908 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 8.85E3  
T: ITMS + c ESI Full ms [110.00-500.00]



b)

**Figura 80: Espectros de massas ESI-ITMS a) modo negativo b) modo positivo de DgP3-2**

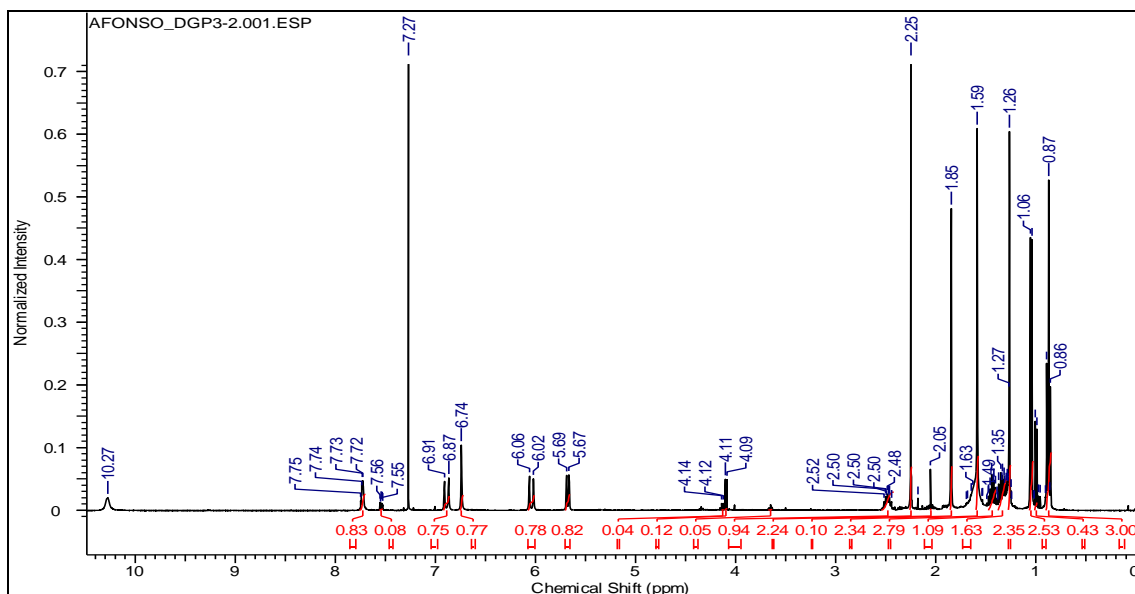


Figura 81: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgP3-2, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

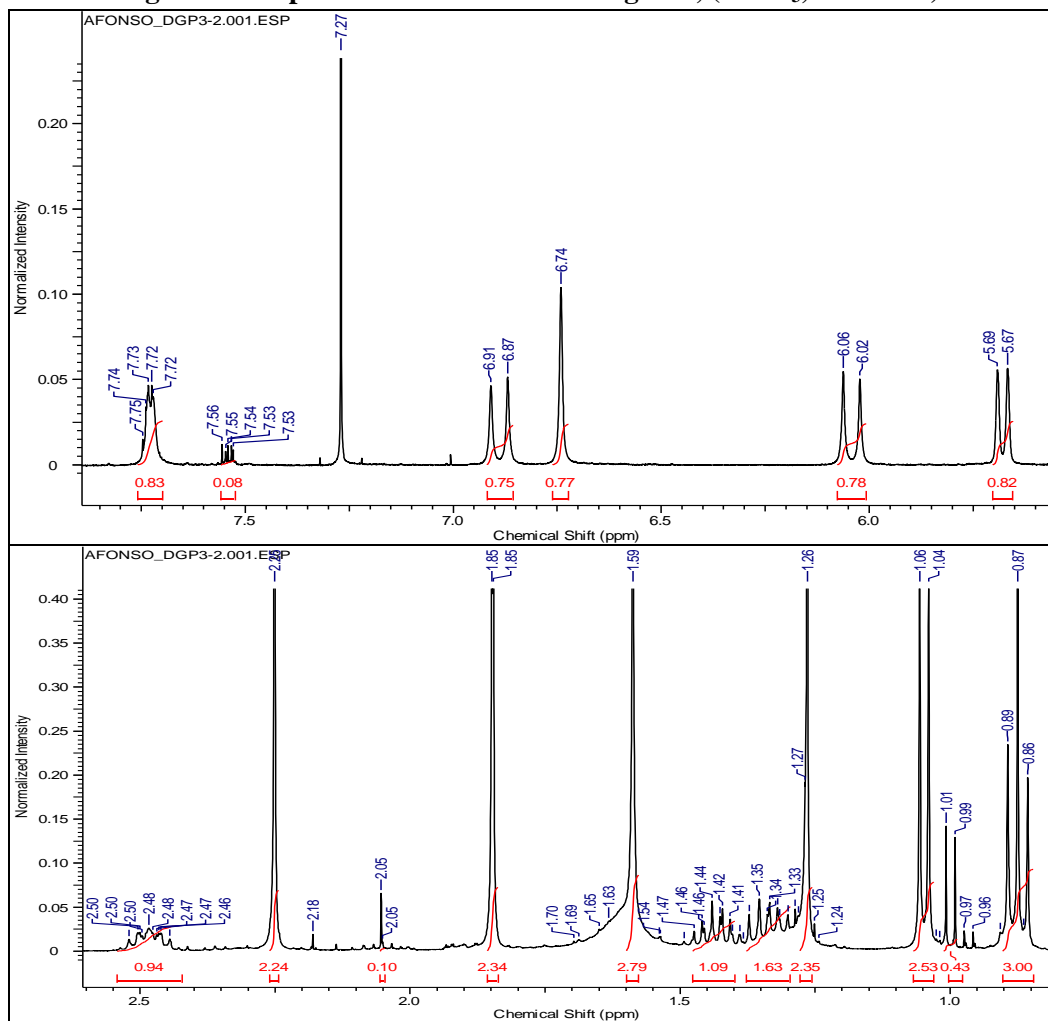


Figura 82: Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgP3-2, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

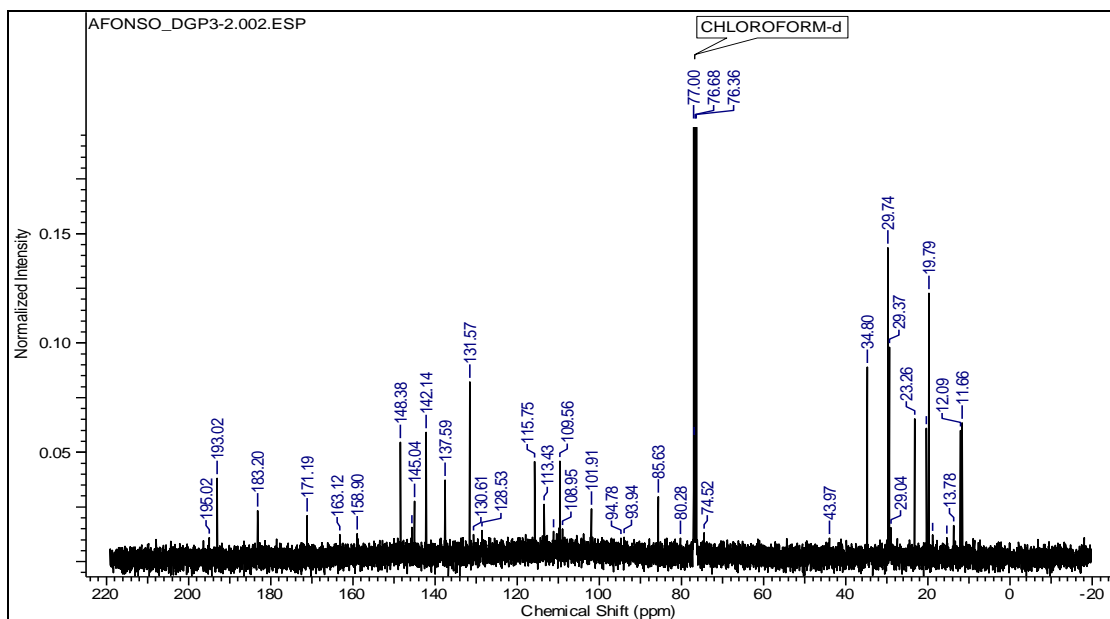


Figura 83: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DgP3-2, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

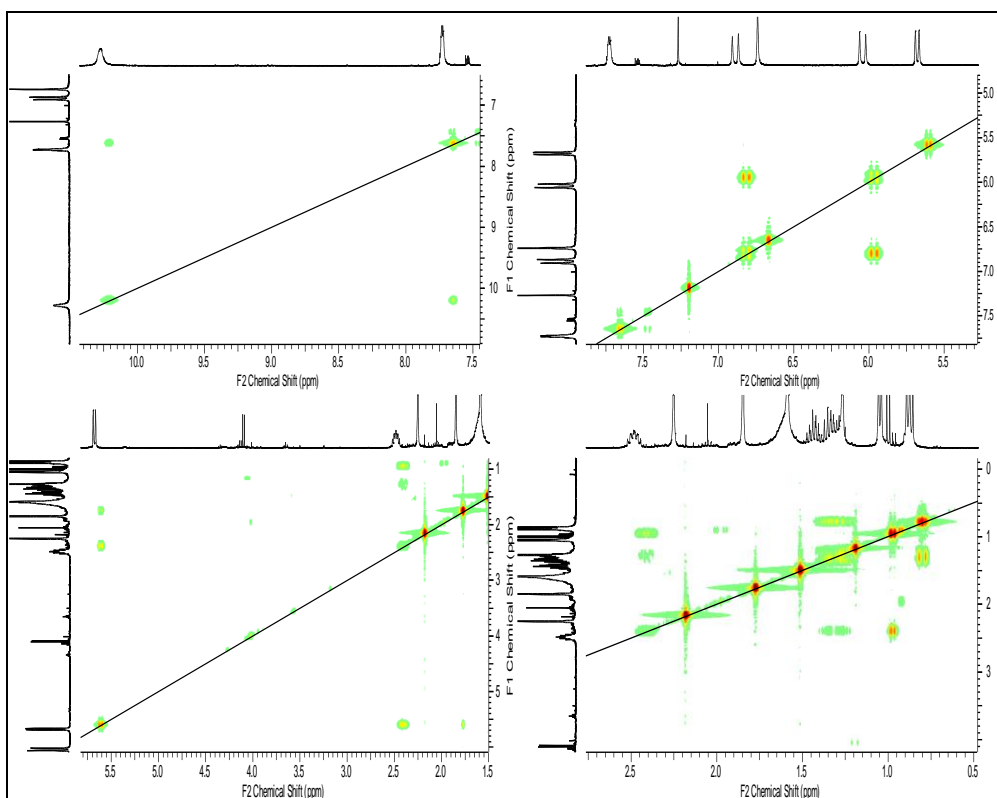


Figura 84: Ampliações do mapa de contornos de COSY de Dgp3-2

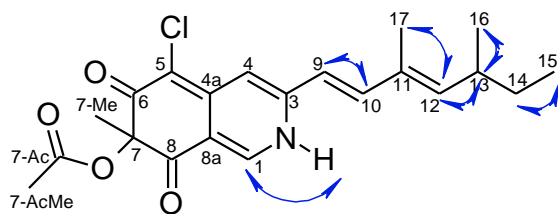


Figura 85: Correlações de hidrogênios de DgP3-2 observadas no COSY

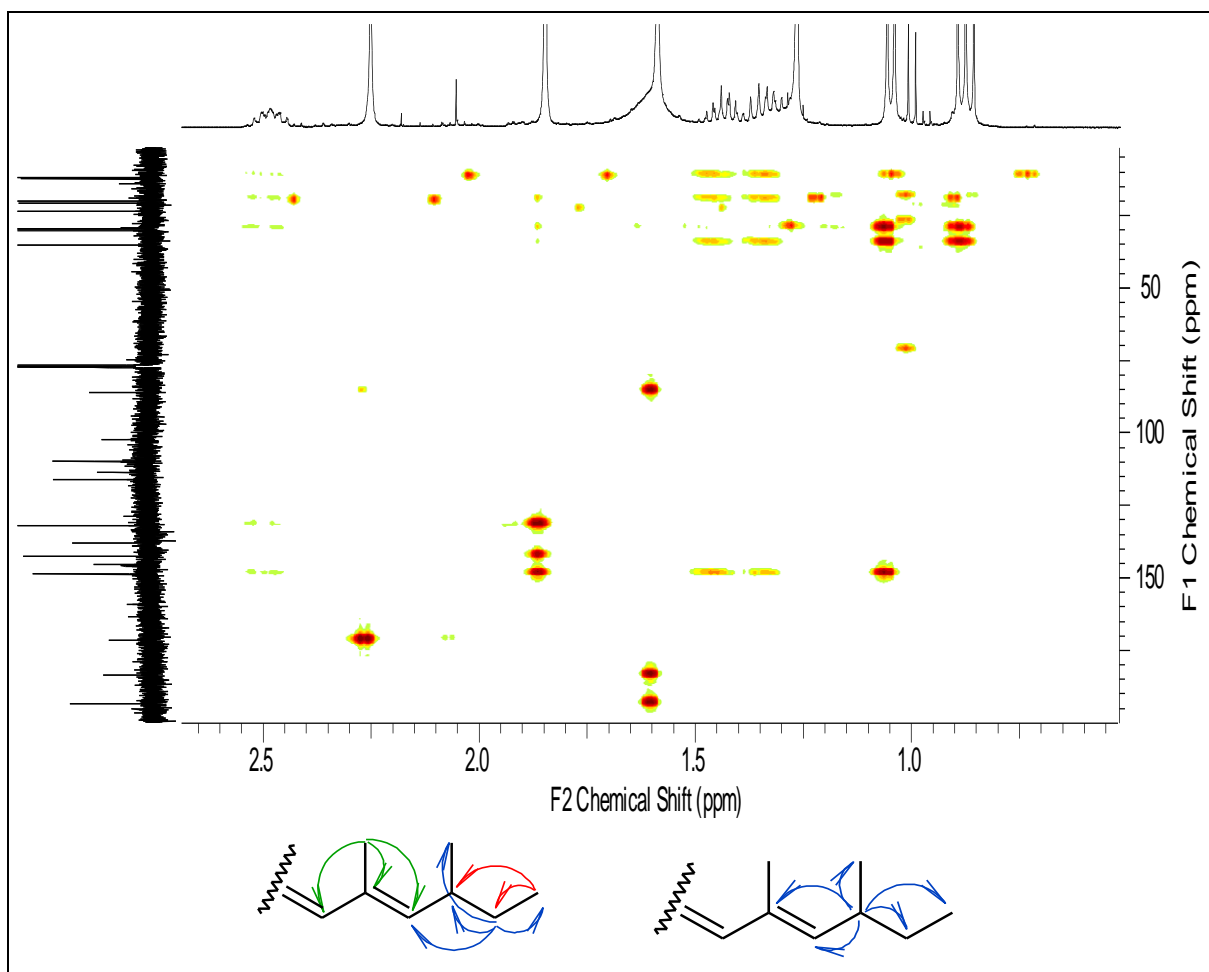


Figura 86: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas – A

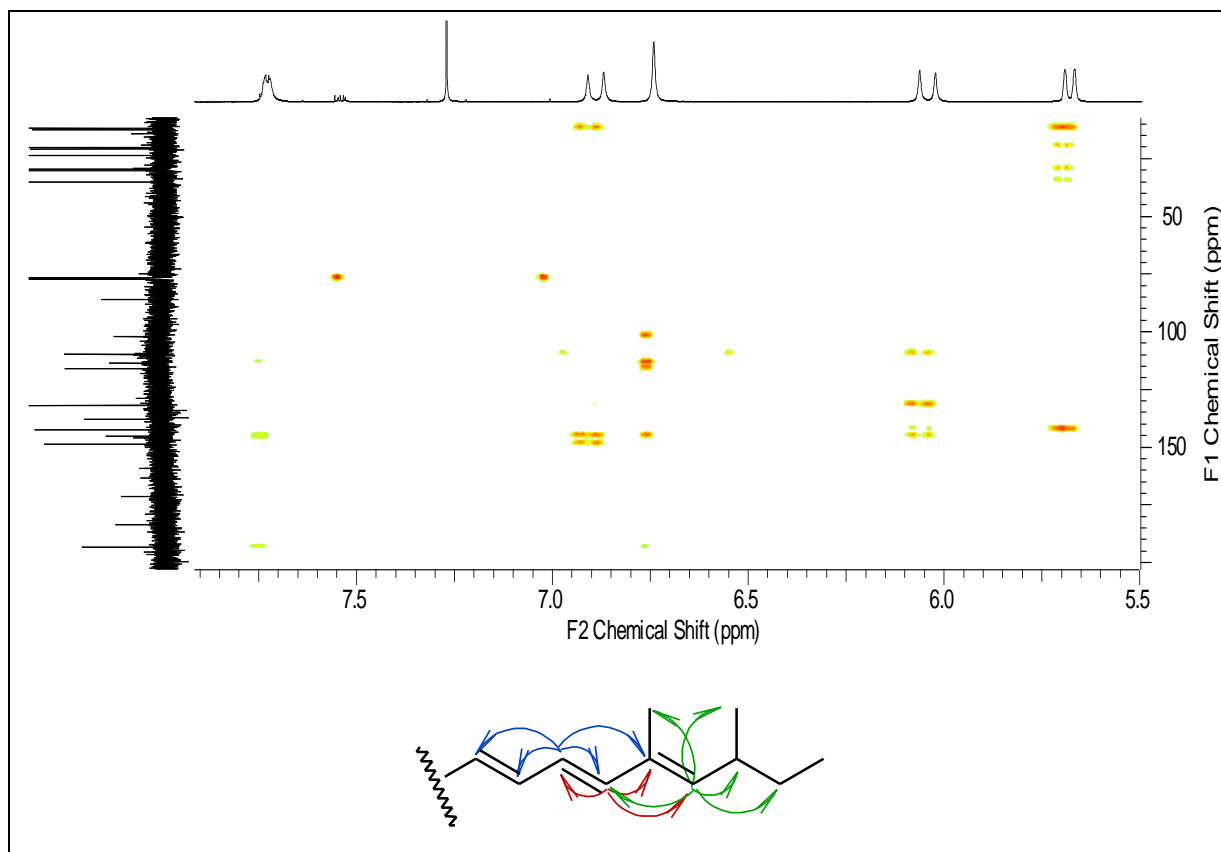


Figura 87: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas - B.

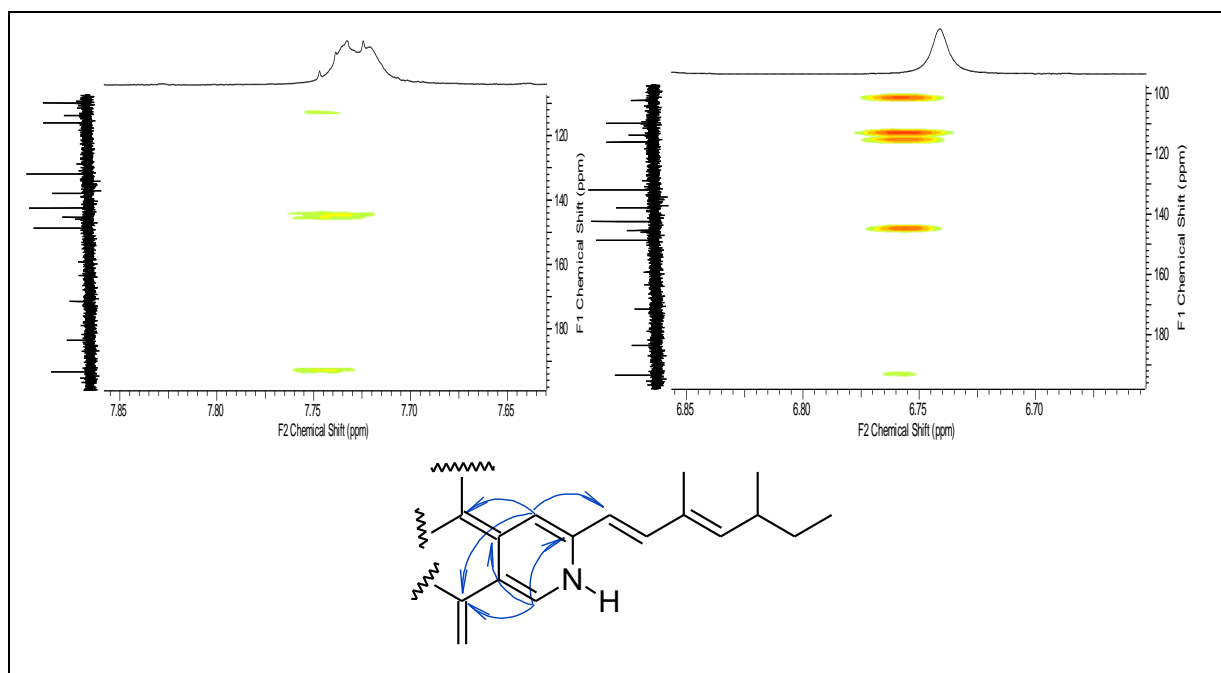
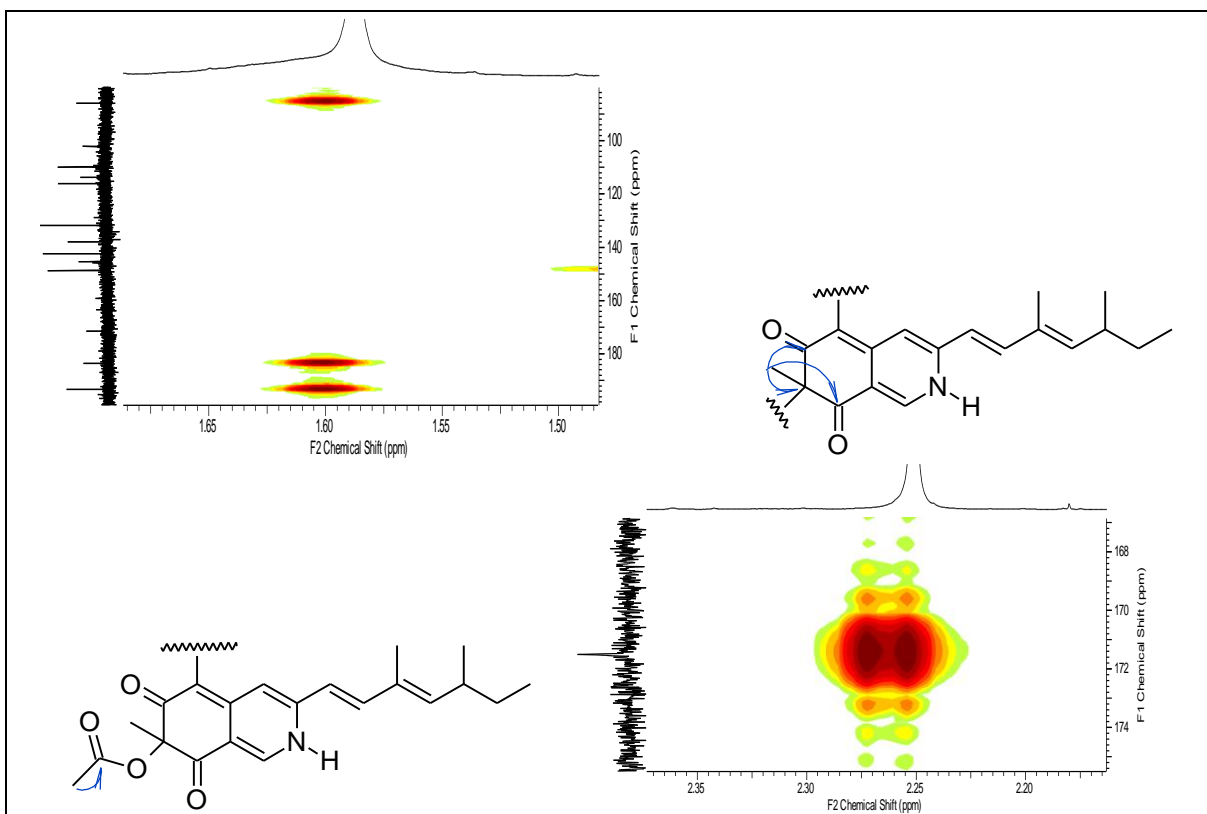


Figura 88: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas - C.



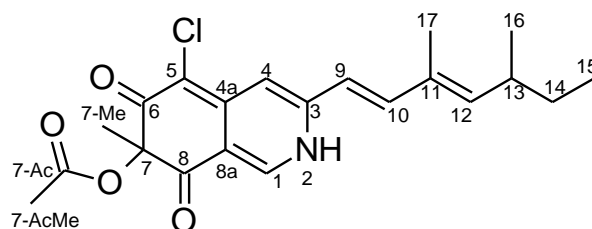
**Figura 89: Destaque do HMBC de DgP3-2 e interpretação das correlações observadas - D**



**Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DgP3-2 e da Sclerotioramina**

	DgP3-2		Sclerotioramina	
	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^b$	$^{13}\text{C}^b$
1	7,73 <i>s</i> 1H	142,1	7,86 <i>s</i> 1H	141,9
3	-	145,0	-	146,1
4	6,74 <i>s</i> 1H	109,5	7,02 <i>s</i> 1H	110,5
4a	-	101,9	-	100,6
5	-	148,4	-	148,5
6	-	183,2	-	183,4
7	-	85,6	-	85,6
8	-	193,2	-	193,9
8a	-	113,4	-	114,2
9	6,04 <i>d</i> (16,0 Hz) 1H	115,7	6,25 <i>d</i> (16,0 Hz) 1H	116,3
10	6,89 <i>d</i> (16,0 Hz) 1H	145,6	6,93 <i>d</i> (16,0 Hz) 1H	143,0
11	-	131,6	-	132,1
12	5,68 <i>d</i> (10,0 Hz) 1H	148,4	5,70 <i>d</i> (10,0 Hz) 1H	149,1
13	2,48 <i>m</i> 1H	34,8	2,47 <i>m</i> 1H	35,3
14	1,30-1,40 <i>m</i> 2H	29,7	1,20-1,40 <i>m</i> 2H	30,2
15	0,87 <i>t</i> (7,4 Hz) 3H	11,6	0,88 <i>t</i> (10,0 Hz) 3H	12,2
16	1,05 <i>d</i> (6,5 Hz) 3H	19,7	1,02 <i>d</i> (7,0 Hz) 3H	20,3
17	1,85 <i>d</i> (1,1 Hz) 3H	12,1	1,84 <i>d</i> (1,0 Hz) 3H	12,6
7-Me	1,59 <i>s</i> 3H	23,3	1,55 <i>s</i> 3H	23,7
7-AcC=O	-	171,2	-	171,4
7-Me-Ac	2,25 2,16 <i>s</i> 3H	20,4	2,16 <i>s</i> 3H	20,8
1'	-	-	4,02 <i>dd</i> (5,0, 5,0 Hz) 2H	55,4
2'	-	-	3,92 <i>dd</i> (5,0, 5,0 Hz) 2H	60,9
2-NH	10,3 <i>s</i> 1H	-	-	-

Deslocamentos químicos em  $\delta$ . <sup>a</sup>Dados obtidos em um aparelho 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ . <sup>b</sup>Dados obtidos em um aparelho de 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$  (WANG et al, 2010).



**Figura 90: Sclerotioramina**

### 4.5.3 Identificação da substância DgPa2

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **DgPa2** (Figuras 91 e 92) apresenta sinais de hidrogênios alifáticos metílicos e metilênicos/metínicos, carbinólicos e olefínicos. A amostra DgPa2 foi identificada como ergosterol por comparação desses sinais com dados da literatura (SHIRANE et al., 1996; Tabela 14) e por co-eluição em CCD com padrão deste esteroide, comumente encontrado em micélios por ser um componente da parede celular dos fungos (Figura 93).

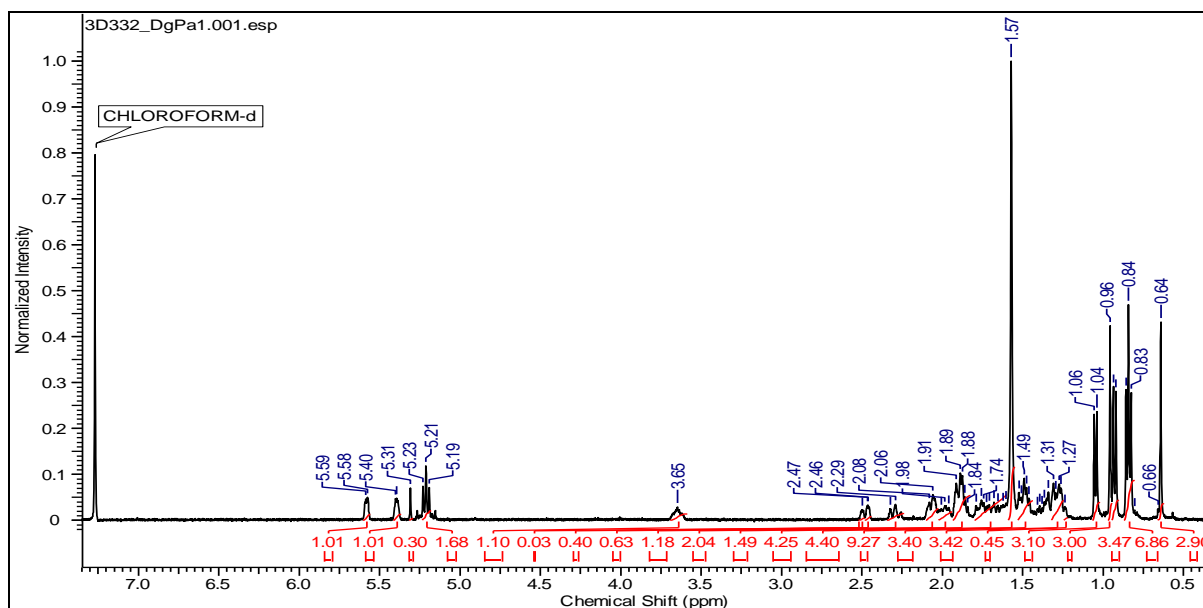


Figura 91: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgPa2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

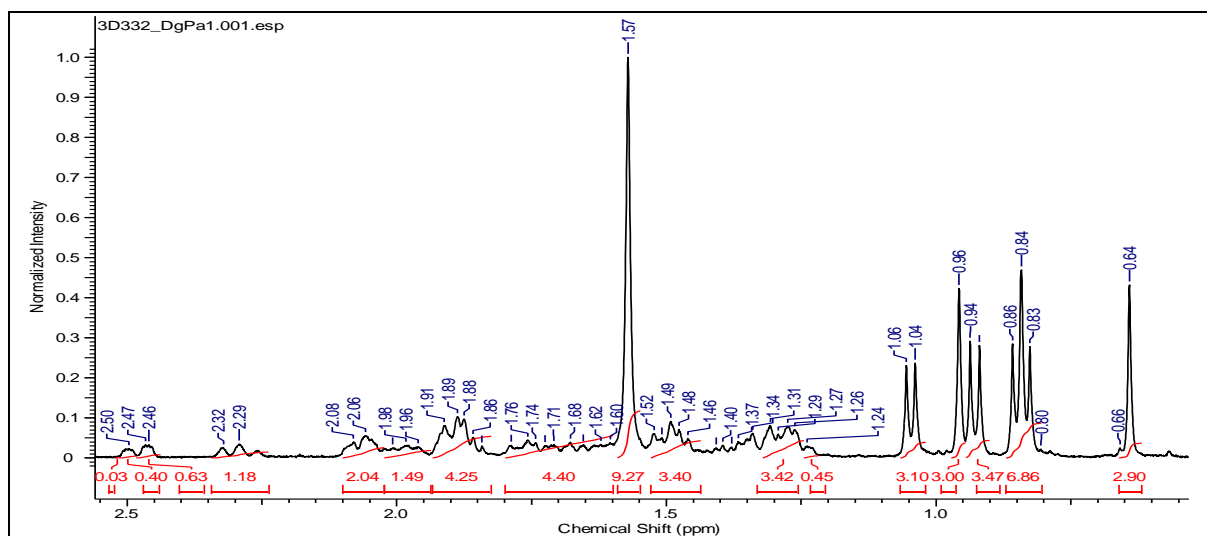
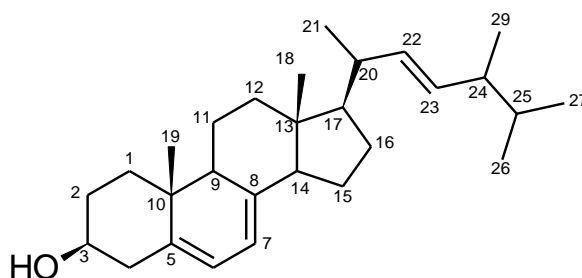


Figura 92: Região de alifáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DgPa2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

**Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  de DgPa2 e do Ergosterol**

Sinais	DgPa2 $^a\delta \text{ } ^1\text{H}$	Ergosterol $^b\delta \text{ } ^1\text{H}$
<b>3</b>	3,64 m	3,65 m
<b>4</b>	2,47 ddd, (14,2; 4,5; 2,2 Hz)	2,49 m
<b>6</b>	5,57 dd ( 5,7; 2,5 Hz)	3,62 d (4,8 Hz)
<b>7</b>	5,37 (m)	5,32 dd, ( 4,8; 2,4 Hz)
<b>18</b>	0,64 s	0,64 s
<b>19</b>	0,95 s	1,09 s
<b>21</b>	1,05 d (6,6 Hz)	1,03 s
<b>22</b>	5,15 – 5,25 m	5,16 dd, ( 8,1; 15,4 Hz)
<b>23</b>	5,15 – 5,25 m	5,23 dd (7,0; 15,4 Hz)
<b>26</b>	0,83 d (6,6 Hz)	0,82 d (6,3 Hz)
<b>27</b>	0,84 d (6,6 Hz)	0,84 d (6,9 Hz)
<b>28</b>	0,92 d (6,8 Hz)	0,92 d (6,6 Hz)

Deslocamentos químicos em  $\delta$ . <sup>a</sup>Dados obtidos em um aparelho 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ . <sup>b</sup>Dados obtidos em um aparelho de 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$  (SHIRANE et al., 1996).



**Figura 93: Ergosterol**

## 5. Considerações finais

Os microrganismos endofíticos isolados de *Duguetia stelechantha* (total de 43) e de *Rollinia* sp. (total de 103) foram armazenados e catalogados e fazem parte da coleção de microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia do Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia.

Extratos obtidos de vários desses microrganismos apresentaram potencial biológico promissor contra patógenos e células cancerígenas, em ensaios antimicrobianos e citotóxicos. Dos extratos de fungo endofíticos isoladas de *D. stelechantha* ensaiados contra linhagens patogênicas, destacaram-se as linhagens DgCr22.1b contra *Penicillium avelani* e DgC322 contra *Bacillus cereus*. Entre os endófitos isolados de *Rollinia* sp. a linhagem AnspCr11.1 apresentou potencial inibitório contra *P. avellani*. Nos ensaios contra linhagens de células tumorais, o fungo DgCr22.1b obteve destaque tanto para o extrato de meio fermentado como o de micélio, confirmando o ensaio contra a linhagem de *P. avellani*, modificada geneticamente para servir como bio-indicadora de atividade anticâncer.

O estudo químico dos metabólitos dessas três linhagens de fungos endofíticos levou ao isolamento e identificação de 6,8-dihidroxi-metil-isocumarina, paecilina B e cordianidrido B de AnspCr 11.1; austdiol e um dímero inédito derivado do ácido secalônico, de DgCr 22.1b; ergosterol, isocromofilona VI e sclerotioramina, isolados do fungo DgC32.2 identificado como *Penicillium* sp. A rica variedade e a complexidade das substâncias isoladas, além das atividades biológicas dos seus extratos, justificam a continuidade dos estudos desses e de outros microrganismos endofíticos, fontes potenciais de produtos naturais para as mais diversas aplicações.

Substâncias puras como a paecilina B e cordyanidrido B ainda devem ser ensaiadas biologicamente para determinar se possuem potencial antimicrobiano e citotóxico.

## 6 Referências Bibliográficas

- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. 2003. Fungal Biotechnology. *International Microbiology*. 6: 191-199.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR, C.I. V.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 229-236.
- ARAI, N.; SHIOMI, K.; TOMODA, H.; TABATA, N.; YANG, D. J. MASUMA, R.; KAWAKUBO, T.; OMURA, S. 1995. Isochromophilones III ~ VI, Inhibitors of Acyl-CoA : Cholesterol Acyltransferase Produced by *Penicillium multicolor* FO-3216. *The Journal of antibiotics*. 48(7):696-702.
- AYER, W.A.; KRATOCHVIL, B.; ALLEN, E.; BROWNE, L.M.; DUFRESNE, C.; FIGUEROA, D.; SZENTHE, A. 1987. The chemistry of the blue stain fungi, Part 3. Some metabolites of *Ceratocystis minor* (Hedgcock) Hunt. *Canadian Journal of Chemistry*, 65:765-769.
- AZEVEDO, J. L. 1998. Microrganismos endofíticos. In : *Ecologia Microbiana* (I.S Melo, J. L. Azevedo, Edts.) Jaguariuna, Editora Embrapa. 117-137
- AZEVEDO, J. L. 1999. Botânica: uma ciência básica ou aplicada *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo. 22: 225-229.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3 Disponível em: <<http://ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/index.html>>. Acesso em: novembro. 2010.
- BACON C. W. AND HINTON D. M. 1988. Ascosporic iterative germination in *Epichloe typhina*. *British Mycological Society* 90: 563-569
- BORGES, W.S. 2008. Estudos de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fonte de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- CASTEDO, L.; GRANJA, J.A.; DE LERA, A.R.; VILLAVERDE, M.C. 1991. Alkaloids from *Gutteria Goudotiana*. *Phytochemistry*, 30: 2781-2783.
- CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. 1987. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Ed. S. William Pelleiter (John Wiley & Sons) 5:133-627.
- CARROL, George. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* 69 (1): 2-9.
- CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (Soursop Family). Em *Flowering Plants of the Neotropics*; SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. Princeton University Press: Princeton, NJ, 2004; pp 18-20.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. J. 2006. A Pyrimidine- $\hat{a}$ -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. *Journal of Natural Products* 69: 292-294.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. 2010. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará *Revista Virtual Química* 2 (1): 47-58.

FERNANDES, M.R.V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H.; COSTA, C. M. N.; HEINRICH, T.A.; ALENCAR, S. M. ; LIMA, M.A.; IKEGAKI, M. 2009. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45: 677-685

FISHER, P.J.; PETRINI, O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol.* 120, 137-143.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H.M. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist.* 122, 299-305.

GUO, Z.; SHE, Z.; SHAO, C.; WEN, L.; LIU, F.; ZHENG, Z.; LIN, Y. 2007.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of Paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). *Magnetic Resonance in Chemistry.* 45: 777-780.

HAEFNER, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* 8, 536-544.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 895-914.

HARVEY, A. L. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* 5: 294-300

HARVEY, A. L. 2008. Natural products in drug discovery *Drug Discovery Today* 13: 894-901.

HEGDE, V.R.; WITTEICH, H.; PATEL, M.G.; HORAN, A.C.; HART, R.F.; TROYANOVICH, J.J.; PUAR, M.S.; GULLO, V.P. 1989. Naturally produced isocoumarins: inhibitors of calmodulinsensitive cyclic guanosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *Journal of Industrial Microbiology*, 4: 209-214.

HEINRICH, M.; GIBBONS, S. 2001. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journa of. Pharmacy and. Pharmacology.* 53: 425-432.

INCA–INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER: Câncer. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acesso em: julho de 2010.

ISAKA, M.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. 2000. Cordyanydrides A and B. two unique anhydrids from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. *Tetrahedron letters*, 41: 1657-1667.

KERR, R.G.; KERR, S.S. 1999. Marine natural products as therapeutic agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 9, 1207–1222.

KOEHN, F.E.; CARTER, G. T.2005. The evolving role for natural rroducts in drug discovery *Nature*. 4 206-220.

KUO, R.Y.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; TENG, C.M.; YEN, H.F.; WU, Y.C. 2001. Antiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry* 57: 421-425.

LI, J.Y.; SIDHU, R.S.; FORD E.J.; LONG, D.M.; HESS, W.M. AND STROBEL, G.A. 1998. The induction of taxol production in the endophytic fungus— *Periconia* sp from *Torreya grandifolia* *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 20: 259–264.

LI, J.Y.;SIDHU, R.S.; STROBEL, G.A. 1998. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycological Research* 102: 4461-464

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jester*. *Phytochemistry* 57: 261–265.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. D.; RAINER, H. 2001. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia* 52: 65-98.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química. Nova* 24: 105-111.

MOSSMAN, T. 1983.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65: 55-63.

NASCIMENTO, F.C.; BOAVENTURA, M.A.D.; ASSUNÇÃO, A.C.S; PIMENTA, L.C.S. 2003 Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifólia*. *Química. Nova* 26:319-322.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*. 17:215-23.

PELÀEZ, FERNANDO. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? *Biochemical pharmacology*. 71: 981– 990.

PÉREZ, E.; SÁEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X.; FIGADÈRE B. 2004. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia Vallicola* Stem Bark with antiplasmodial activity. *Letters in Organic Chemistry* 1: 102-104.

PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. 1993. Ecology, metabolit production, and substract utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1:185-196.

PETRINI, O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial Ecology of Leaves* (J. Andrews & S. Hirano) 179-197.

PONTES, A.F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J.M. 2004. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. *Acta Botânica Brasileira* 18(2): 281-293.

PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA R.; S. R. H.; AMNA, T. ; AHMED, B.; VERMA, V.; , SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G.N. 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans *Journal of Biotechnology* 122: 494-510.

QIN,L.; YU, H.; ZHANG, L.; LIL.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN,P. 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes *Microbiological Research* 165: 437-444.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. 1996, "Endophytic fungi in grasses and woody plants". St. Paul, *The American Phytopathological Society*.

SAYKKONEN, K.; FAETH,S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343.

SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., ROMMERT, A.K., KROHN, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycology Research*. 106: 996-1004.

SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. 2004. Symbiotic microorganism, a key for ecological success and protection of plants *Comptes Rendus Biologies* 327: 369-348.

SILVA, J.A.A. 2007. Quem é quem na família das anonáceas. Artigo em Hypertexto.Disponível em:[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_2/anonaceas/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/anonaceas/index.htm). Acesso em: 27/10/2010.

SHIRANE, N.; TAKENAKA, H.; UEDA, K.; HASHIMOTO, Y.; KATOH, K.; ISHII, H. Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* 41: 1301-1308. 1996.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* 34: 185 - 195

STROBEL, G.; DAISY, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products *Microbiology and molecular biology reviews* 67: 491–502.

STROBEL, G.; DAISY, B.; & CASTILHO, U. 2005. The biological promise of microbial endophytes and their natural products *Plant Pathology Journal* 4(2): 161-176.

SU, W.; HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*,



*Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *Immunology and Medical Microbiology* 31: 163-167.

TULP, M.; BOHLIN, L. 2004. Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discovery Today* 9: 450-458.

VLEGGAR, R.; STEYN, P. S.; NAGEL, D. W. 1974. Constitution and Absolute Configuration of Austdiol, the Main Toxic Metabolite from *Aspergillus ustus*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 45-49.

WANG J., LI G., LU H., ZHENG Z., HUANG Y., SU W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *Microbiology Letters* 193: 249-253.

WANG, XIAORU.; FILHO, J. G. S.; HOOVER, A. R.; KING, J. B.; ELLIS, T. K.; POWELL, D. R.; CICHEWICZ, R. H. 2010. Chemical Epigenetics Alters the Secondary Metabolite Composition of Guttate Excreted by an Atlantic-Forest-Soil-Derived *Penicillium citreonigrum*. *Journal of Natural Products* 73: 942-948.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION: World Cancer Day. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr06/en/index.html>. Acesso em: 05 de novembro de 2010.

WIYAKRUTTA, S.; RIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from the medicinal plants. *World J Microb Biot* 20: 265-272.