

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Lucas Magalhães de Abreu

**PERFILAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, PROSPECÇÃO
QUÍMICA E ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DE FUNGOS ENDÓFITOS**

Belo Horizonte

2010

UFMG/ICEX.DQ.814^a

T.343^a

Lucas Magalhães de Abreu

**PERFILAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, PROSPECÇÃO QUÍMICA
E ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DE FUNGOS ENDÓFITOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química

Belo Horizonte

2010

A162p Abreu, Lucas Magalhães,
2010 Perfilamento de metabólitos secundários, prospecção
T química e estudos quimiotaxonômicos de fungos
endófitos / Lucas Magalhães de Abreu. 2010.

xii, 172 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Coorientador: Ludwig Heinrich. Pfenning.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 156-172.

1.Química orgânica - Teses 2.Produutos naturais -
Teses 3.Fungos endófitos - Teses 4.Quimiotaxonomia -
Teses I.Takahashi, Jacqueline Aparecida, Orientadora
II.Pfenning, Ludwig Heinrich, Coorientador. III.
Título

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



**"Perfilamento de Metabólitos Secundários, Prospecção Química e Estudos
Quimiotaxonômicos de Fungos Endófitos"**

Lucas Magalhães de Abreu

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Prof. Ludwig Heinrich Pfenning - Co-Orientador
Universidade Federal de Lavras

Prof. Ângela Regina Araújo
UNESP

Prof. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Prof. Rossimiriam Pereira de Freitas
UFMG

Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Belo Horizonte, 15 de abril de 2010.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Jacqueline A. Takahashi, DQ, UFMG

Ao meu co-orientador professor Ludwig H. Pfenning, DFP, UFLA

Aos meus pais Antonio e Telma, meus irmãos Douglas e Karen e minha tia Mércia

Ao meu co-orientador no exterior professor Thomas O. Larsen, CMB, DTU, DK

À Gracielle

Aos colegas e ex-colegas do laboratório biotecnologia e bioensaios da UFMG Yuri, Adriana, Leonardo, Silmara, Giovanni, Esther, Alessandra, Mateus, Renata, Willian, Gabriela, Fabiana

Aos colegas e colaboradores Mirian Salgado, Edson Rezende e todo o pessoal do laboratório de sistemática e ecologia de fungos da UFLA

Aos colaboradores Richard K. Phipps, prof. Jens C. Frisvad, profa. Birgitte Andersen, prof. Kristian F. Nielsen, profa. Charlotte H. Gotfredsen, Christian Rank, Peter Knudsen

Aos demais colegas e colaboradores do CMB-DTU Marina, Tanja, Marie Louise, Anders, Maria, Jesper, Kir, Hanne, Lisette

Aos membros da banca examinadora da Tese professores Ângela R. Araújo, Edson R. Filho, Jarbas M. Resende, Rossimíriam P. Freitas

Aos bípedes Daniel, Rossano, Douglas Riff, Charlie, Maza, Alex, Lauro

À pós-graduação em Química da UFMG

Ao CNPq

Tak!

Sumário

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas	v
Abreviações, símbolos e siglas	vii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Introdução.....	1
1 Revisão Bibliográfica.....	4
1.1 Notas micológicas.....	4
1.1.1 Classificação dos fungos.....	4
1.1.2 Ciclo reprodutivo e nomenclatura de ascomicetos.....	5
1.1.3 Fungos endófitos	6
1.2 Metabólitos secundários produzidos por fungos.....	6
1.2.1 Metabólitos bioativos – micotoxinas.....	7
1.2.2 Metabólitos bioativos – fármacos e seus precursores	10
1.2.3 Metabólitos secundários de fungos endófitos	16
1.3 Perfilamento de extratos brutos e desreplicação de metabólitos secundários ...	21
2 Perfilamento de metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos dos gêneros <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i>.....	26
2.1 Introdução.....	26
2.2 Metodologia	30
2.2.1 Fungos utilizados.....	30
2.2.2 Solventes, ácidos orgânicos e substâncias puras.....	30
2.2.3 Procedimentos experimentais gerais	31
2.2.3.1 Cultivo dos fungos.....	31
2.2.3.2 Extração dos metabólitos secundários em micro-escala.....	31
2.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	31
2.2.3.4 CLAE-DAD acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM).....	32
2.2.4 Experimento 1: escolha do meio de cultura mais adequado à produção de metabólitos secundários.....	33
2.2.5 Experimento 2: Perfilamento de metabólitos secundários e desreplicação dos extratos brutos produzidos pelos fungos cultivados em meio MEA e agrupamento dos isolados em quimiotipos	34
2.3 Resultados e Discussão.....	35
2.3.1 Escolha do meio de cultura apropriado.....	35
2.3.2 Definição dos quimiotipos e desreplicação dos metabólitos majoritários	36
2.4 Conclusões	51
3 Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo endófito <i>Cytospora</i> sp. fel 302	52
3.1 Introdução.....	52
3.2 Materiais e métodos.....	52
3.2.1 Escolha do fungo, cultivo em grande escala e extração dos metabólitos secundários	52
3.2.2 Fracionamento inicial do extrato bruto por cromatografia <i>flash</i> em fase reversa (C18)	53
3.2.3 Fracionamento das frações CYT09, CYT10 e CYT11 por cromatografia <i>flash</i> em fase normal (diol)	53
3.2.4 Purificação final dos metabólitos por CLAE semipreparativa	54
3.2.5 Análises espectroscópicas, espectrométricas e físicas das subfrações purificadas	55
3.2.5.1 CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)	55
3.2.5.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)	55
3.2.5.3 Espectroscopia no infravermelho.....	56
3.2.5.4 Rotação específica.....	56
3.3 Resultados e discussão	56

3.3.1 Substâncias identificadas	56
3.3.1.1 Citosporona B (2-(3,5-diidroxi-2-octanoil-fenil)etanoato de etila, número CAS: 321661-62-5)	56
3.3.1.2 Dotiorelonas A, B e C	61
3.3.1.3 Citosporona C (1-heptil-6,8-diidroxi-isocroman-3-ona, número CAS: 321661-63-6)	67
3.3.1.4 Dotiorelona H (Citosporona J) (6,8-diidroxi-1-(6-hidroxiheptil)isocroman-3-ona, número CAS: 885109-77-3)	70
3.3.1.5 Citosporona O (6,8-diidroxi-1-(5-hidroxiheptil)isocroman-3-ona) – metabólito inédito	75
3.3.1.6 Citosporona D (1-heptil-1,4-diidro-6,7,8-triidroxi-2-benzopiran-3-ona, número CAS: 321661-59-0)	78
3.3.1.7 Citosporona E (3-heptil-4,5,6-triidroxi-1-isobenzofuranona, número CAS: 321661-60-3)	80
3.3.1.8 Citosporona P (3-(6-hidroxiheptil)-4,5,6-triidroxi-1-isobenzofuranona) – metabólito inédito	82
3.3.1.9 Citosporona Q (3-(7-hidroxiheptil)-4,5,6-triidroxi-1-isobenzofuranona) – metabólito inédito	84
3.3.2 Substâncias não identificadas	87
3.3.2.1 Subfração purificada CYT11_08_04_01	87
3.3.2.2 Subfração purificada CYT11_10-11_04	88
3.3.2.3 Subfrações purificadas CYT11_08_04_03 e CYT11_10-11_05	94
3.3.3 Padrões de absorção na região do UV exibidos pelos metabólitos isolados de <i>Cytospora</i> sp. fel 302	99
3.3.4 Ocorrência dos metabólitos isolados em diferentes quimiotipos de <i>Cytospora</i> e <i>Phomopsis</i>	103
3.4 Conclusões	105
4 Estudo quimiotaxonômico de fungos endófitos dos gêneros <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i>	106
4.1 Introdução	106
4.2 Materiais e métodos	108
4.2.1 Fungos estudados	108
4.2.2 Experimento 1: Classificação automatizada de 41 isolados de <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i> , com base em seus perfis metabólitos secundários, pelo programa <i>Chemical Image Analysis</i> (CIA)	108
4.2.3 Experimento 2: Classificação de 42 isolados de <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i> , com base em seus perfis de metabólitos secundários, por estatística multivariada de classificação	109
4.3 Resultados e discussão	111
4.3.1 Classificação dos isolados pelo programa <i>Chemical Image Analysis</i>	111
4.3.2 Classificação dos isolados por estatística multivariada de classificação	113
4.4 Conclusões	119
5 Avaliação da atividade citotóxica de extratos brutos de fungos endófitos contra linhagens de células de leucemia linfóide crônica e prospecção química do isolado <i>Libertella</i> sp. cml 1671	120
5.1 Introdução	120
5.2 Materiais e Métodos	123
5.2.1 Escolha dos isolados para a realização dos bioensaios	123
5.2.2 Bioensaios de citotoxicidade	125
5.2.2.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de fungos contra células de LLC co-cultivadas com células estromais HS-5	125
5.2.2.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de fungos contra células de LLC cultivadas em meio de cultura condicionado por células HS-5	125
5.2.2.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de fungos contra leucócitos sadios	126
5.2.3 Estudo químico do fungo endófito <i>Libertella</i> sp. cml 1671	126
5.2.3.1 Cultivo em maior escala e extração dos metabólitos	126
5.2.3.2 Microfracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671	127

5.2.3.3 Fracionamento do extrato bruto por cromatografia flash em fase normal (diol)	128
5.2.3.4 Purificação dos metabólitos da fração LIB04 por CLAE semipreparativa	128
5.2.4 Análises espectroscópicas, espectrométricas e físicas das subfrações purificadas	128
5.2.4.1 CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)	128
5.2.4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)	129
5.2.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	129
5.3 Resultados e discussão	129
5.3.1 Citotoxicidade dos extratos brutos contra células de leucemia linfóide crônica	129
5.3.2 Microfracionamento do extrato bruto do fungo <i>Libertella</i> sp. cml 1671	131
5.3.3 Substâncias purificadas a partir do extrato do isolado <i>Libertella</i> sp. cml 1671	136
5.3.3.1 Escoparasina A [(13E, 16S, 18R, 19E)-7,18-diidroxi-16,18-dimetil-10-(4-metoxifenil)-21,23-dioxa-[13]-citocalasa-5,13,19-trien-1,17,22-triona, número CAS: 488799-96-8]	137
5.3.3.2 Fenocalasina B [(7S, 13E, 16S, 18R, 19E)-6,7-epoxi-18-hidroxi-16,18-dimetil-10-(4-metoxifenil)-21,23-dioxa-[13]-citocalasa-13,19-dien-1,17,22-triona, número CAS: 253129-70-3]	142
5.3.3.3 Citocalasina LIB04_01 [(13E, 16S, 18R, 19E)-7,18-diidroxi-16,18-dimetil-10-(4-metoxifenil)-21,23-dioxa-[13]-citocalasa-6(12),13,19-trien-1,17,22-triona, número CAS: 488799-96-8]	149
5.4 Conclusões	155
Referências	156
Apêndices	
Artigo	

Lista de figuras

Figura 2.1: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado fel 89 representando o quimiotipo <i>Phomopsis</i> 1.....	37
Figura 2.2: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos identificados, comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 1: a - altenusina (01), b - alternariol (02), c - altenueno (03), d - AME (04), e - 4'-epialtenueno (05) (CLAE-DAD; H ₂ O-CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	38
Figura 2.3: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado fel 355 representando o quimiotipo <i>Phomopsis</i> 2.....	40
Figura 2.4: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 2: a - RI718, b - RI 778, e - RI 811, d - RI 883, e - RI 949, f - RI 981 (CLAE-DAD; H ₂ O-CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	41
Figura 2.5: Perfil químico obtido por CLAE-DAD do extrato do isolado fel 364 representando o quimiotipo <i>Phomopsis</i> 3.....	42
Figura 2.6: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 3: a - ácido 2,4-diidroxi-6-(2-oxopropil) benzóico (08), b - ácido 2,4-diidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil) benzóico (09), c - RI 611, d - RI 625, e - ortosporina (12), f - RI 792, g - RI 863 (CLAE-DAD; H ₂ O-CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	43
Figura 2.7: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado cml1530 representando o quimiotipo <i>Phomopsis</i> 4.....	45
Figura 2.8: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 4: a - RI 623 e RI 635, b - RI 749, C - fomol (CLAE-DAD; H ₂ O-CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	46
Figura 2.9: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado cml 1315.....	47
Figura 2.10: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos identificados, por tentativa, a partir do extrato do isolado cml 1315: a - dicerandrol B (15), b - dicerandrol A (16), c - dicerandrol C (17) (CLAE-DAD; H ₂ O-CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	48
Figura 2.11: Perfis químicos e espectros de absorção na região do UV dos metabólitos majoritários produzidos pelos isolados não classificados em quimiotipos: a - cml 1533, b - cml 1535, c - fel 356, d - fel 359. (CLAE-DAD; H ₂ O-CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	49
Figura 2.12: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado fel 302 representando o quimiotipo <i>Cytospora</i>	50
Figura 3.1: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_05_02 (18)	58
Figura 3.2: Espectro de absorção na região do IV de CYT11_05_02 (18) (ATR).....	58
Figura 3.3: Espectro de RMN de ¹ H [CD ₃ OD, 500 MHz] de CYT_05_02 (18)	59
Figura 3.4: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de CYT11_05_02 (18) evidenciando as correlações: a - H4 x C2; b - H6 x C7.	60
Figura 3.5: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT10_07_01_01 (19)	63
Figura 3.6: Espectro de RMN de ¹ H [(CD ₃) ₂ SO, 500 MHz] de CYT10_07_01_01 (19)	64
Figura 3.7: Espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ , 500 MHz] de CYT10_07_01_02 (20)	64

Figura 3.8: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de CYT10_07_01_03 (21)	65
Figura 3.9: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_06_02 (22)	68
Figura 3.10: Espectro de absorção na região do IV de CYT11_06_02 (22) (ATR).....	68
Figura 3.11: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de CYT11_06_02 (22)	69
Figura 3.12: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de CYT11_06_02 (22) evidenciando as correlações: a - H4 x C2; b - H6 x C7.....	69
Figura 3.13: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT09_09_1-2_01 (23)	72
Figura 3.14: Espectro de absorção na região do IV de CYT09_09_1-2_01 (23) (ATR).....	72
Figura 3.15: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de CYT09_09_1-2_01 (23)	73
Figura 3.16: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de CYT09_09_1-2_01 (23) evidenciando as correlações: a - H15 x C13; b - H16 x C14.....	74
Figura 3.17: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de CYT09_09_1-2_01 (23) evidenciando as correlações: a - H4 x C2; b - H6 x C7.....	74
Figura 3.18: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT09_09_1-2_02 (24)	76
Figura 3.19: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de CYT09_09_1-2_02 (24)	77
Figura 3.20: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_06_01 (25)	78
Figura 3.21: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de CYT11_06_01 (25)	79
Figura 3.22: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_08_03 (26)	80
Figura 3.23: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de CYT11_08_03 (26)	81
Figura 3.24: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT09_12_01 (27)	83
Figura 3.25: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de CYT09_12_01 (27)	83
Figura 3.26: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT09_12_02 (28)	85
Figura 3.27: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de CYT09_12_02 (28)	86
Figura 3.28: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_08_04_01	88
Figura 3.29: Espectro de RMN de ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz] de CYT11_08_04_01	88
Figura 3.30: Proposta de estrutura parcial de CYT11_10-11_04 obtida pela análise do mapa de contornos HMBC. Numeração de acordo com aquela descrita para a citosporacina (29) (He et al., 2003).....	90
Figura 3.31: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_10-11_04	92
Figura 3.32: Espectro de RMN de ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 800 MHz] de CYT11_10-11_04	92
Figura 3.33: Proposta de estrutura parcial de CYT11_10-11_05 obtida pela análise do mapa de contornos HMBC. Numeração de acordo com aquela descrita para a citosporacina (29) (He et al., 2003).....	95

Figura 3.34: Proposta de estrutura parcial de CYT11_10-11_05 obtida através da comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C com aqueles descritos para a citosporacina 29 (He et al., 2003).....	95
Figura 3.35: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de CYT11_10-11_05	96
Figura 3.36: Espectro de RMN de ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 800 MHz] de CYT11_10-11_05	97
Figura 3.37: Espectro de absorção no UV da citosporona B (18 , RI 1120) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	100
Figura 3.38: Espectros de absorção no UV: A citosporona C (22 RI 1000); B dotiorelona H (23 , RI 757) e citosporona O (24 , RI 764) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	101
Figura 3.39: Espectro de absorção no UV da citosporona D (25) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	101
Figura 3.40: Espectros de absorção no UV: A citosporona E (26); B citosporonas P (27 , RI 740) e Q (28 , RI 747) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	102
Figura 3.41: Espectros de absorção no UV dos metabólitos ‘amarelo 1’, ‘amarelo 2’ e ‘vermelho’ (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	103
Figura 4.1: Dendrograma gerado pelo programa CIA, baseado nos perfis de metabólitos secundários de 41 isolados de <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i> , através do método WARD de agrupamento.....	112
Figura 4.2: Dendrograma, gerado pela análise multivariada de classificação, baseado nos perfis de metabólitos secundários de 42 isolados de <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i> , através do método UPGMA de agrupamento.....	114
Figura 5.1: Cromatograma obtido do extrato do isolado cml 1671 durante o microfracionamento por CLAE semipreparativa ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	132
Figura 5.2: Atividade citotóxica das frações, obtidas a partir do microfracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671, contra células de LLC e células HS-5.....	133
Figura 5.3: Cromatograma da fração 54, oriunda do microfracionamento do extrato do isolado cml 1671, detectado por DAD (A) e ESI-TOF (B) ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	134
Figura 5.4: Cromatograma da fração LIB04 , oriunda do fracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671 ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	137
Figura 5.5: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de LIB04_02 (32)	138
Figura 5.6: Espectro de absorção na região do UV de LIB04_02 (32) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	139
Figura 5.7: Espectro de absorção na região do IV de LIB04_02 (32) (ATR).....	139
Figura 5.8: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de LIB04_02 (32)	140
Figura 5.9: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de LIB04_03 (33)	143
Figura 5.10: Espectro de absorção na região do UV de LIB04_03 (33) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA).....	143
Figura 5.11: Espectro de absorção na região do IV de LIB04_03 (33) (ATR).....	144
Figura 5.12: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de LIB04_03 (33)	144

Figura 5.13: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de LIB04_01 (37)	150
Figura 5.14: Espectro de absorção na região do UV de LIB04_01 (37) (CLAE-DAD; H ₂ O–CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	150
Figura 5.15: Espectro de RMN de ¹ H [CDCl ₃ , 500 MHz] de LIB04_01 (37)	151
Figura 5.16: Cromatograma do extrato bruto do isolado cml 1671 por CLAE-DAD-EM, detectado por DAD (A) e ESI-TOF, evidenciando a contagem total de íons (B) ou somente os picos contendo o íon <i>m/z</i> = 526 (C) (H ₂ O–CH ₃ CN + 50 ppm de TFA).....	153

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Número de metabólitos detectados por CLAE-DAD nos extratos brutos de sete fungos cultivados em onze meios de cultura diferentes.....	36
Tabela 2.2: Dados de espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF, modo positivo) dos metabólitos altenusina (01), alternariol (02), altenueno (03), AME (04) e 4'-epialtenueno (05).....	39
Tabela 2.3: Dados de espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF, modo positivo) dos metabólitos ácido 2,4-diidroxí-6-(2-oxopropil) benzóico (08), ácido 2,4-diidroxí-6-(1-hidroxí-2-oxopropil) benzóico (09) e ortosporina (12).....	44
Tabela 3.1: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT11_05_02 em comparação com aqueles descritos para o metabólito citosporona B (Brady et al., 2000).....	61
Tabela 3.2: Dados de RMN de ¹ H de CYT10_07_01_01, CYT10_07_01_02 e CYT10_07_01_03 comparados com aqueles descritos para os metabólitos dotiorelona A (19), dotiorelona C (20) e dotiorelona B (21) (Xu et al., 2004).....	66
Tabela 3.3: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT11_06_02 em comparação com aqueles descritos para o metabólito citosporona C (Brady et al., 2000).....	70
Tabela 3.4: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT09_09_1-2_01 comparados com aqueles descritos para o metabólito dotiorelona H (Shen et al., 2006).....	75
Tabela 3.5: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT09_09_1-2_02 (24).....	77
Tabela 3.6: Dados de RMN de ¹ H de CYT11_06_01 e aqueles da citosporona D (Brady et al., 2000).....	79
Tabela 3.7: Dados de RMN de ¹ H de CYT11_08_03 e aqueles da citosporona E (Brady et al., 2000).....	81
Tabela 3.8: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT09_12_01 (27).....	84
Tabela 3.9: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT09_12_02 (28).....	86
Tabela 3.10: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT11_10-11_04 comparados com aqueles descritos para o metabólito citosporacina (He et al., 2003).....	93
Tabela 3.11: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H, e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de CYT11_10-11_05 comparados com aqueles descritos para o metabólito citosporacina (He et al., 2003).....	98
Tabela 3.12: Ocorrência dos metabólitos isolados do fungo <i>Cytospora</i> sp. fel 302 nos perfis de metabólitos secundários de 42 isolados de <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i> pertencentes a diferentes quimiotipos.....	104
Tabela 4.1: Isolados de <i>Phomopsis</i> e <i>Cytospora</i> investigados no presente estudo.....	110

Tabela 5.1: Isolados de fungos endófitos cujos extratos foram submetidos aos bioensaios de citotoxicidade.....	124
Tabela 5.2: Atividade citotóxica dos extratos de fungos endófitos contra células de LLC.....	130
Tabela 5.3: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelos mapas de contornos HMBC e COSY, de LIB04_02 em comparação com aqueles descritos para o metabólito escoparasina A (Pongcharoen et al., 2006).....	141
Tabela 5.4: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelos mapas de contornos HMBC e COSY, de LIB04_03 em comparação com aqueles descritos para o metabólito fenocalasina B (Tomoda et al., 1999b).....	148
Tabela 5.5: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelos mapas de contornos HMBC e COSY, de LIB04_01 em comparação com aqueles descritos para o metabólito citocalasina 1.46 (Dettrakul, 2006).....	154

Abreviações, símbolos e siglas

δ	deslocamento químico
ν	número de onda
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro (s)
λ_{max}	comprimento de onda de absorção máxima
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	rotação específica
AcOEt	acetato de etila
ATR	attenuated total reflectance
Cap.	capítulo
CIA	<i>chemical image analysis</i>
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAE-DAD-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
cm	centímetro (s)
cml	coleção micológica de Lavras
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
d	dia(s)
d	duplete (em tabelas de RMN)
DCM	diclorometano
dd	duplete duplo
DMSO	dimetilsulfóxido
dt	tripleto duplo (<i>doubled triplet</i>)
ESI	<i>electrospray ionization</i>
fel	fungos endófitos Lucas
Fig.	figura
g	grama (s)
h	hora (s)
HMBC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento escalar spin-spin
L	litro (s)
LLC	leucemia linfóide crônica
m	multiplete
m/z	relação massa/carga
MEA	<i>malt extract agar</i>
MeOH	metanol
mg	miligrama
min	minuto (s)
mL	mililitro
ml	multiplete largo
mm	milímetro (s)
nm	nanômetro (s)
ppm	partes por milhão (concentração)
RI	índice de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
RT	tempo de retenção

s	segundo(s)
s	simpleto (em tabelas de RMN)
sl	simpleto largo (<i>broad singlet</i>)
t	tripeto
TFA	ácido trifluoroacético
TOF	<i>time of flight</i>
UV	ultravioleta
V	volts
YES	<i>yeast extract sucrose agar</i>

Resumo

A produção de metabólitos secundários por fungos endófitos de diferentes plantas foi investigada em dois conjuntos de experimentos. No primeiro, 56 fungos pertencentes aos gêneros morfológicamente semelhantes *Phomopsis* e *Cytospora* foram submetidos ao cultivo e extração dos metabólitos em micro-escala, seguida do perfilamento dos extratos por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM. Os metabólitos detectados foram caracterizados pelos respectivos índices de retenção e espectros de absorção na região do UV e os perfis obtidos foram usados para a classificação dos fungos em quimiotipos. Os dados de espectrometria de massas de alta resolução foram usados na desreplicação dos metabólitos majoritários característicos de cada quimiotipo definido. Trinta e sete fungos foram agrupados em cinco quimiotipos distintos, cinco exibiram perfis únicos e não foram agrupados em quimiotipos. Quatorze fungos não produziram quantidades detectáveis de metabólitos em seus extratos. O fungo *Cytospora* sp. fel 302, representante do quimiotipo 5, foi cultivado em maior escala e seu extrato submetido ao fracionamento cromatográfico visando à purificação de seus metabólitos secundários majoritários. No total quatorze metabólitos foram isolados, dentre os quais as citosporonas B, C, D, E, dotiorelonas A, B, C, H, e os metabólitos inéditos citosporonas O, P e Q. Três metabólitos coloridos não puderam ser identificados e foram denominados de 'amarelos 1 e 2' e 'vermelho'. A análise multivariada de classificação, realizada com os dados obtidos durante o perfilamento dos extratos, confirmou a classificação dos fungos em cinco quimiotipos. Em um segundo conjunto de experimentos, os extratos brutos de uma coleção de 36 fungos endófitos, pertencentes a diferentes espécies, foram submetidos a uma triagem por meio de bioensaios de citotoxicidade contra células de leucemia linfóide crônica. Vinte e um extratos foram tóxicos às células leucêmicas em concentrações inibitórias mínimas variando de 50 a 6,25 µg/200 µL de suspensão de células. O extrato do fungo *Libertella* sp. cml 1671 foi capaz de inibir as células leucêmicas em uma concentração de 24,4 ng/200 µL. O fungo *Libertella* sp. cml 1671 foi cultivado em maior escala e parte do extrato foi submetido ao microfracionamento por CLAE semipreparativa. As frações foram re-submetidas aos bioensaios de citotoxicidade contra células de leucemia e aquela de número 54 mostrou-se a mais ativa. A análise por CLAE-DAD-EM, e posterior desreplicação, da fração 54 indicou a presença de um metabólito majoritário, cuja fórmula molecular calculada correspondeu a duas citocalasinas isoméricas, escoparasina A e fenocalasina B. O restante do extrato bruto do fungo *Libertella* sp. cml 1671 foi submetido ao fracionamento cromatográfico e três

substâncias, contendo a mesma fórmula molecular do metabólito majoritário da fração bioativa 54, foram purificadas e identificadas: escoparasina A, fenocalasina B e o isômero $\Delta^{6,12}$ da escoparasina A. Novos bioensaios serão realizados para determinação de quais dos metabólitos isolados são os responsáveis pela citotoxicidade contra células de leucemia linfóide crônica.

Palavras chave: metabólitos secundários, desreplicação, quimiotaxonomia, espectrometria de massas, RMN, fungos endófitos

Abstract

Secondary metabolites production by fungal endophytes was investigated in two sets of experiments. In the first one, a collection of 56 strains belonging to two morphologically similar genera, *Phomopsis* and *Cytospora*, was cultivated and submitted to micro-scale extraction of metabolites followed by metabolite profiling using HPLC-DAD and LC-MS. Detected metabolites were defined by their retention index and UV spectra, and the profiles obtained were used to classify the fungal strains in chemotypes. High resolution mass spectrometry data were used for dereplication of the major metabolites characteristic of each chemotype. Thirty eight strains were grouped in five distinct chemotypes; five strains produced unique metabolite profiles and were not classified in chemotypes. Thirteen fungi did not produced detectable amounts of metabolites. The strain *Cytospora* sp. fel 302, from chemotype 5, was cultivated in larger scale and its crude extract was chromatographed followed by the purification of the major metabolites. Fourteen metabolites were purified, including the known compounds cytosporones B, C, D, E, dothiorelones A, B, C, H, and new compounds cytosporones O, P and Q. Three metabolites were not fully identified and received the trivial names 'yellow 1', 'yellow 2' and 'red'. Multivariate statistical analysis of classification was performed with data derived from the metabolite profiling, and the results confirmed the classification of the investigated strains into five chemotypes.

In a second group of experiments, the crude extracts of a collection of 36 fungal endophytes belonging to different species were screened for bioactivity against chronic lymphocytic leukemia cells. Twenty one extracts were toxic to leukemia cells in minimum inhibitory concentrations ranging from 50 to 6.25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ of cell suspension. The extract of strain *Libertella* sp. cml 1671 inhibited leukemia cells in a concentration of 24.4 $\text{ng}/200 \mu\text{L}$. This fungus was cultivated in larger scale and part of the crude extract was micro-fractionated by semipreparative HPLC. Ninety six fractions (1.25 mL each) were collected and submitted to cytotoxicity bioassays against leukemia cells, and fraction number 54 was detected as the most active one. LC-MS followed by metabolite dereplication identified one major compound in fraction 54, and its calculated molecular formula corresponded to those of the cytochalasins scoparasin A and phenochalasin B. The remaining extract was chromatographed and three metabolites containing the same molecular formula as the major compound of the bioactive fraction 54 were purified: scoparasin A, phenochalasin B, and the $\Delta^{6,12}$ isomer of scoparasin A. Further bioassays will be conducted to identify which compounds are responsible for the cytotoxic effect against leukemia cells.

Key words: secondary metabolites, dereplication, chemotaxonomy, mass spectrometry, NMR, fungal endophytes

Introdução

Os fungos formam um complexo grupo de organismos, presentes nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos. Esses organismos são exímios produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais bioativos (Bérdy, 2005). Várias espécies são patogênicas a plantas e produzem toxinas que auxiliam na infecção e colonização de suas hospedeiras. Já a contaminação de alimentos e forragens por fungos pode trazer riscos à saúde humana e animal, devido à capacidade desses de produzir micotoxinas (Bennett & Klich, 2003). Os fungos também são fonte de metabólitos secundários utilizados como fármacos, ou como precursores para síntese ou semi-síntese de medicamentos diversos, como antibióticos, antifúngicos, antitumorais, imunossupressores e antilipídêmicos (Larsen et al., 2005; Misiek & Hoffmeister, 2007).

O solo é o habitat tradicionalmente investigado como fonte de fungos e outros microrganismos empregados em programas de prospecção química, visando ao isolamento de novos metabólitos secundários bioativos (Bérdy, 2005). Mais recentemente, o interesse de vários químicos de produtos naturais tem-se voltado para outras fontes de organismos potencialmente produtores de substâncias bioativas, incluindo os fungos de ambientes aquáticos e aqueles que habitam o interior das plantas, os endófitos (Schulz et al., 2002). Centenas de novos metabólitos foram isoladas de fungos endófitos nos últimos quinze anos e a taxa de novas descobertas segue acelerada, visto que a diversidade, tanto biológica quanto química, desses organismos tem se mostrado imensa e relativamente pouco estudada (Schulz & Boyle, 2005).

Apesar da grande diversidade de metabólitos produzidos por fungos e do fato de que novidades taxonômicas são normalmente acompanhadas de substâncias inéditas, muitos metabólitos são co-produzidos por espécies distintas. Por outro lado, espécies muito semelhantes são capazes de produzir perfis diferentes de metabólitos secundários (Frisvad et al., 2008). Logo, o emprego de métodos analíticos para a caracterização prévia dos metabólitos presentes em extratos brutos originados de fungos pode auxiliar na escolha mais racional das espécies a serem investigadas em um programa de prospecção química. Métodos cromatográficos, como CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM, podem ser empregados no perfilamento de metabólitos secundários presentes em extratos brutos de fungos e os dados analíticos usados para a desreplicação dos metabólitos, estimativa da diversidade química dos extratos e comparação entre extratos (Smedsgaard & Nielsen, 2005). Como as amostras usadas

nas análises cromatográficas são diminutas, os extratos brutos podem ser obtidos em micro-escala, o que permite a triagem de dezenas a centenas de amostras em pouco tempo. As substâncias detectadas e caracterizadas durante o perfilamento de metabólitos secundários também podem ser usadas como marcadores em estudos quimiotaxonômicos (Frisvad et al., 2008).

O presente trabalho de Tese traz resultados de estudos envolvendo perfilamento de metabólitos secundários, prospecção química e quimiotaxonomia de fungos isolados como endófitos de diferentes plantas no Brasil. Em uma primeira parte, que abrange os **capítulos 2 a 4**, foram investigados 56 fungos pertencentes a dois gêneros semelhantes, *Phomopsis* e *Cytospora*. Nos experimentos descritos no **Cap. 2**, os fungos foram cultivados e submetidos à extração de seus metabólitos secundários em micro-escala, seguida do perfilamento de metabólitos por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM. Os objetivos dos ensaios foram: a definição do melhor meio de cultura para a produção de metabólitos; a comparação visual dos perfis de metabólitos presentes nos extratos brutos; o agrupamento dos perfis em quimiotipos e a desreplicação dos metabólitos majoritários representativos dos quimiotipos definidos.

No **Cap. 3** é descrito o estudo químico do fungo *Cytospora* sp. fel 302, representante de um dos quimiotipos definidos durante os experimentos anteriores. O fungo foi cultivado em maior escala e seu extrato submetido ao fracionamento cromatográfico, visando à purificação e elucidação estrutural dos metabólitos majoritários, e prováveis marcadores quimiotaxonômicos, presentes no extrato. Parte dos resultados obtidos nesse experimento foram publicados no artigo intitulado *Cytosporones O, P and Q from an endophytic Cytospora sp.*, pelo periódico *Tetrahedron Letters* (Abreu et al., 2010b).

A consistência da classificação dos fungos em quimiotipos foi testada por meio de métodos de estatística multivariada, descritos no **Cap. 4**. Os cromatogramas gerados durante o perfilamento dos extratos brutos por CLAE-DAD foram inicialmente classificados de forma automática por meio de um programa de computador (*Chemical Image Analysis*). Em um segundo experimento, uma matriz binária, contendo os dados de presença e ausência dos metabólitos detectados nos perfis dos fungos investigados, foi submetida à análise multivariada de classificação.

A segunda parte do trabalho, descrita no **Cap. 5**, envolveu a triagem de uma coleção diversificada de fungos endófitos na busca por metabólitos tóxicos a células de leucemia linfóide crônica. Após o perfilamento por CLAE-DAD, os extratos brutos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade contra células leucêmicas. O extrato do fungo *Libertella* sp. cml 1671 exibiu acentuada atividade citotóxica e foi submetido ao microfracionamento por CLAE semipreparativa. As frações obtidas foram re-

submetidas aos bioensaios e aquelas que se mostraram ativas foram caracterizadas por CLAE-DAD-EM e submetidas à desreplicação. O restante do extrato foi fracionado visando à purificação e elucidação estrutural dos prováveis metabólitos citotóxicos.

O presente trabalho de Tese foi desenvolvido sob a orientação da Professora Doutora Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, e co-orientação do Professor Doutor Ludwig Heinrich Pfenning, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Parte dos experimentos aqui descritos refere-se àqueles realizados sob a orientação do Professor Doutor Thomas Ostenfeld Larsen, do Centro de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Biologia de Sistemas da Universidade Tecnológica da Dinamarca (CMB, DTU-BIOSYS), no período entre novembro de 2008 e setembro de 2009, durante o estágio de doutorado sanduíche com apoio financeiro do CNPq.

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Notas micológicas

1.1.1 Classificação dos fungos

Os organismos conhecidos como fungos são atualmente classificados em três Reinos, Fungi, Chromista e Protozoa. Os fungos pertencentes ao Reino Fungi têm como principal característica a presença de quitina na parede celular e são classificados em cinco filos distintos: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (Kirk et. al, 2008; Rossman & Palm, 2006).

O Filo Chytridiomycota é composto por organismos comuns em ambientes aquáticos, onde se nutrem de matéria orgânica em decomposição. Tais fungos também podem ocorrer como parasitas de insetos, nematóides, animais, plantas e outros fungos, ou como endossimbiontes anaeróbios obrigatórios, presentes no sistema digestivo de herbívoros (Kirk et. al, 2008, Webster & Weber, 2007).

O filo Zygomycota é formado por um grupo heterogêneo de fungos, dentre os quais se destacam aqueles pertencentes ao subfilo Mucoromycotina (Hibbett et al., 2007). Esse subfilo é formado por gêneros como *Rhizopus* e *Mucor*, comumente associados à matéria orgânica, frutos danificados ou fezes de animais. Os zigomicetos são de ocorrência comum no solo (Domsch et al., 2007).

Os fungos que vivem associados a raízes de plantas e formam as chamadas micorrizas vesicular-arbusculares são atualmente classificados no filo Glomeromycota. Estima-se que cerca de 90% das plantas terrestres formam associações mutualísticas do tipo micorrizas com fungos desse filo (Stajich et al., 2009). A colonização do sistema radicular pelos fungos resulta no aumento da absorção de nutrientes do solo pelas plantas. Em troca, os fungos nutrem-se de fotoassimilados produzidos por suas hospedeiras (Alexopoulos et al., 1996; Rossman, 2006; Webster & Weber, 2007). Os fungos pertencentes aos filos Chytridiomycota, Glomeromycota e Zygomycota correspondem a cerca de 2% do total de espécies conhecidas do Reino Fungi (Stajich et al., 2009).

O Filo Ascomycota é o maior dentro do Reino Fungi, contendo 64% das espécies conhecidas (Stajich et al., 2009). Os ascomicetos compreendem leveduras e fungos filamentosos e são caracterizados pela formação de uma estrutura membranosa que contém os esporos derivados da reprodução sexuada (meiose), chamada asco (Carlile et al., 2001). Esses fungos estão presentes nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos, ocorrendo como sapróbios ou mutualistas, parasitas e

patógenos de animais, plantas e outros fungos (Schoch et al., 2009). Muitas espécies são importantes patógenos de plantas (Agrios, 2005), enquanto que um número reduzido de ascomicetos é patogênico ao homem ou a outros animais (Alexopoulos et al., 1996). Todos os fungos investigados na presente Tese pertencem ao Filo Ascomycota.

O quinto Filo pertencente ao Reino Fungi é conhecido como Basidiomycota. Esse grupo compreende fungos caracterizados pela produção de esporos, derivados da reprodução sexuada, sobre uma estrutura denominada de basídio. Os fungos macroscópicos como cogumelos e orelhas-de-pau são basidiomicetos, assim como aqueles causadores de ferrugens e carvões em plantas (Webster & Weber, 2007). Os basidiomicetos correspondem a 34% das espécies de fungos conhecidas (Stajich et al., 2009).

1.1.2 Ciclo reprodutivo e nomenclatura de ascomicetos

A maioria das espécies de fungos pertencentes ao Filo Ascomycota, bem como aquelas de outros Filos do Reino Fungi, pode-se reproduzir de forma sexuada ou assexuada. A fase sexuada é conhecida como teleomórfica e a assexuada como anamórfica (Shenoy et al., 2007). Muitas espécies se reproduzem predominantemente de forma assexuada e, em muitos casos, a fase teleomórfica não é conhecida. Essa situação gera certa confusão, pois cada fase recebe um nome distinto, embora se trate do mesmo organismo (Kirk et al., 2008).

Quando a conexão entre anamorfo e teleomorfo é estabelecida, o nome da fase sexuada prevalece. Porém, na ausência da fase sexuada, principalmente em estudos *in vitro*, a nomenclatura do anamorfo ainda é bastante utilizada (Shenoy et al., 2007). As relações de parentesco de fungos exclusivamente anamórficos com outras espécies que produzem a fase sexuada são investigadas por meio de análises filogenéticas, baseadas no sequenciamento de regiões específicas do DNA e comparação com bancos de dados especializados (Lima et al., 2009; Shenoy et al., 2007).

Os fungos investigados nos experimentos descritos nos **Cap. 2 a 4** da presente Tese pertencem aos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora*, os quais são anamorfos de ascomicetos pertencentes aos gêneros *Diaporthe* (*Phomopsis*), *Valsa* e *Leucostroma* (*Cytospora*). Os fungos submetidos aos ensaios de citotoxicidade contra células de leucemia, descritos no **Cap. 5**, são todos ascomicetos em sua fase anamórfica.

1.1.3 Fungos endófitos

Todos os fungos investigados no presente trabalho foram isolados como endófitos. O termo endófito compreende os organismos capazes de colonizar e se desenvolver no interior de tecidos vegetais. Os fungos endófitos são definidos como aqueles que, em pelo menos parte de seu ciclo de vida, são capazes de colonizar os tecidos internos de plantas sem causarem sintomas evidentes de enfermidades (Petrini et al., 1992). Praticamente todas as espécies de plantas investigadas até o momento mostraram-se colonizadas por fungos endófitos (Schulz & Boyle, 2005).

Um distinto grupo de ascomicetos, pertencentes à família *Clavicipitaceae*, ocorre como endófitos de gramíneas em regiões de clima temperado. Tais fungos colonizam suas hospedeiras de maneira sistêmica e são transmitidos através das sementes (Gundel et al., 2009; Schardl et al., 2004). Nessa simbiose, considerada mutualística, os fungos recebem proteção e nutrição de suas hospedeiras, produzindo, em troca, alcalóides tóxicos a mamíferos e insetos e protegendo-as contra herbivoria (Rodriguez et al., 2009).

O restante, e a maioria, dos fungos isolados como endófitos de plantas herbáceas e lenhosas formam um grupo taxonomicamente heterogêneo, composto em sua maioria por ascomicetos. Esses fungos ocupam porções restritas dos tecidos de suas plantas hospedeiras e seus esporos são transmitidos pelo ar, água da chuva ou por meio de insetos e pássaros (Rodriguez et al., 2009). A diversidade taxonômica desses fungos é enorme e centenas de espécies podem ocorrer em uma única planta hospedeira (Abreu et al., 2010a). Devido à sua diversidade taxonômica e ocorrência generalizada nos mais diversos habitats e hospedeiros, os fungos endófitos são considerados como um importante, e relativamente pouco estudado, componente da diversidade de fungos do planeta (Arnold, 2007; Arnold et al., 2000).

1.2 Metabólitos secundários produzidos por fungos

As plantas são fontes tradicionais de metabólitos secundários bioativos, com um longo histórico de uso de espécies medicinais por parte do homem. Milhares de produtos naturais foram e continuam sendo isolados de plantas espalhadas pelo planeta (Bérdy, 2005; Gurib-Fakim, 2006; Wolfender et al., 2003). Outra importante fonte de produtos naturais bioativos é constituída pelos microrganismos, os quais contam com uma história de uso bem mais recente, iniciada após a descoberta do antibiótico penicilina no início do século XX (Peláez, 2006). Bactérias, actinomicetos (bactérias formadoras de colônias filamentosas) e fungos são responsáveis pela maior parte dos metabólitos

secundários isolados de fontes microbianas. Desses três grupos, os actinomicetos, principalmente do gênero *Streptomyces*, destacam-se como exímios produtores de antibióticos. Entre as décadas de 1950 e 1960, cerca de 70% dos antibióticos descobertos originaram-se de actinomicetos (Bérdy, 2005).

Os fungos formam um grupo heterogêneo de organismos, capazes de colonizar diferentes ambientes terrestres e aquáticos, e são capazes de produzir uma enorme e diversa quantidade de metabólitos secundários, muitos dos quais bioativos (Bugni & Ireland, 2004; Gunatilaka, 2006). Vários metabólitos secundários produzidos por fungos são potentes micotoxinas, produzidas durante a contaminação de alimentos, capazes de causar danos a humanos e animais, por meio de intoxicações agudas ou de efeito acumulativo, induzindo a distúrbios fisiológicos, como o câncer (Bennett & Klich, 2003). Fungos patogênicos a plantas, como *Alternaria alternata* e *Bipolaris* spp., produzem fitotoxinas que destroem os tecidos de suas hospedeiras (Thomma, 2003).

A despeito de sua habilidade de produzir toxinas, os fungos também são responsáveis pela produção de diversas substâncias empregadas diretamente para o tratamento de enfermidades, ou utilizadas como base para a síntese de fármacos (Misiek & Hoffmeister, 2007; Wagenaar, 2009; Weber et al., 2007).

1.2.1 Metabólitos bioativos – micotoxinas

Os fungos são importantes patógenos de plantas e insetos, embora não sejam expoentes como patógenos de vertebrados, havendo poucas espécies de importância médica (Agrios, 2005; Alexopoulos et al., 1996). Os fungos patogênicos a humanos podem ser divididos em patógenos primários, como *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*, que infectam indivíduos até então saudáveis, e patógenos oportunistas, como *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, associados à infecção de pessoas imunossuprimidas (Bennett & Klich, 2003; d'Enfert, 2009). A maioria das micoses humanas é causada por patógenos oportunistas e estas podem variar de infecções de pele e unhas a micoses invasivas e sistêmicas, muitas vezes letais (Pfaller et al., 2006).

As micotoxicoses são enfermidades não infecciosas causadas pelo contato, ingestão ou inalação de metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos. Os sintomas e a severidade das micotoxicoses variam de acordo com o tipo, quantidade e tempo de exposição à micotoxina, com as condições gerais de nutrição e saúde dos indivíduos e com a espécie afetada (Bennett & Klich, 2003; Brase et al., 2007).

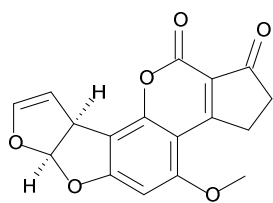
As micotoxinas compreendem substâncias de baixo peso molecular, produzidas como metabólitos secundários por fungos filamentosos e capazes de

produzir efeitos tóxicos em vertebrados (Bennett & Klich, 2003). Um grupo restrito de metabólitos representa riscos reais à saúde humana e animal e são alvos de investigações diversas. Por outro lado, dependendo da definição adotada, mais de 300 metabólitos secundários comumente produzidos por fungos podem ser considerados micotoxinas (Brase et al., 2007). Os metabólitos tóxicos produzidos por espécies de cogumelos são classificados como venenos e, já que não estão presentes em alimentos contaminados, mas são ingeridos intencionalmente, em casos de identificação errônea de espécies comestíveis (Patterson, 2006).

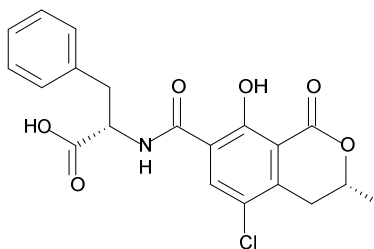
As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus*, com destaque a *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Esses metabólitos foram descobertos na década de 1960 e identificados como responsáveis pela intoxicação e morte de mais de cem mil perus, em granjas próximas a Londres. As aves haviam sido alimentadas com ração contendo farelo de amendoim contaminado com *A. flavus* (Hanson, 2008). A **aflatoxina B1** é a micotoxina majoritária produzida pelas espécies toxigênicas e considerada como um dos agentes carcinogênicos mais potentes conhecidos (Brase et al., 2007). Diversos tipos de cereais e outros alimentos, como óleos vegetais, castanhas e tabaco, estão sujeitos à contaminação por aflatoxinas. A intoxicação aguda por aflatoxinas pode levar à morte, enquanto que a exposição lenta e continuada está associada a câncer e supressão da imunidade (Probst et al., 2007).

A **ocratoxina A** é produzida por diversas espécies de *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus ochraceus*, e também por *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum* (Castella et al., 2002; Ringot et al., 2006; Larsen & Breinholt, 1999). É uma toxina comumente encontrada em amostras de cereais e outros grãos como aveia, centeio, cevada, trigo e café. A ocratoxina A tem efeito nefrotóxico a diversas espécies animais, incluindo o homem, sendo ainda considerada tóxica ao fígado, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica a animais (Ringot et al., 2006).

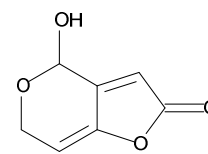
A **patulina**, produzida por espécies de *Penicillium*, como *Penicillium griseofulvum* e *P. expansum*, foi inicialmente descoberta e testada como antibiótico, devido à sua ação antibacteriana (Hanson, 2008). Estudos posteriores mostraram, no entanto, que a patulina era tóxica e carcinogênica a animais e seu *status* foi modificado na década de 1960, sendo classificada como uma micotoxina (Bennet & Klich, 2003; Saxena et al., 2009). Os fungos produtores de patulina estão normalmente associados a frutas, havendo casos de contaminações de polpas e sucos (Barreira et al., 2010; Ilha & Sabino, 2007).



aflatoxina B1



ocratoxina A

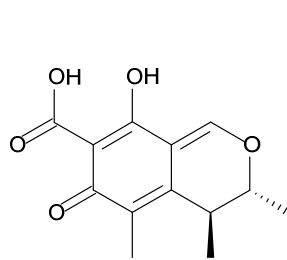


patulina

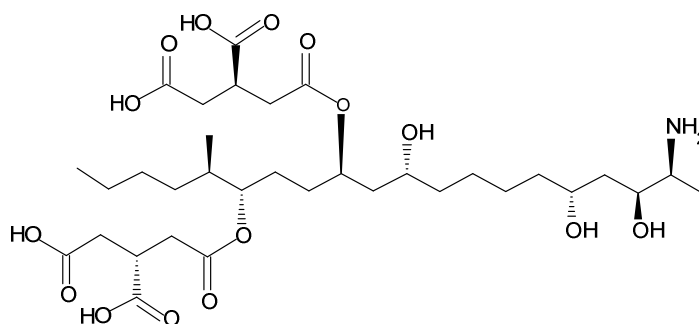
Isolada inicialmente do fungo *Penicillium citrinum*, a **citrinina** é uma micotoxina nefrotóxica, produzida por diversas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Monascus*, como *Monascus ruber*, empregado na produção de pigmentos vermelhos para a indústria de alimentos (Xu et al., 2009). A citrinina é comumente encontrada em amostras de grãos, farinhas, frutas e alimentos fermentados (Flajs & Peraica, 2009).

Descobertas no final da década de 1980, as fumonisinas são micotoxinas comumente produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, embora haja relatos de produção por *Aspergillus niger* (Marasas, 2001; Frisvad et al., 2007; Noonim et al., 2009). A fumonisina mais comumente encontrada é a **fumonisina B1** (Desjardins, 2006; Nelson et al., 1993). *Fusarium verticillioides* é a espécie produtora de fumonisinas mais importante, pois se encontra universalmente associada ao milho (Bennett & Klich, 2003). As fumonisinas interferem no metabolismo de esfingolipídios e causam diversos efeitos em animais como leucoencefalomalácia em equinos e coelhos, edemas pulmonares em suíno e efeitos tóxicos ao fígado de ratos (Câmara et al., 2008; Haschek et al., 2001; Noonim et al., 2009). Há indícios de que as fumonisinas estejam associadas à ocorrência de câncer de esôfago em populações humanas cuja base alimentar seja produtos derivados do milho (Marasas, 2001; Sydenham et al., 1990).

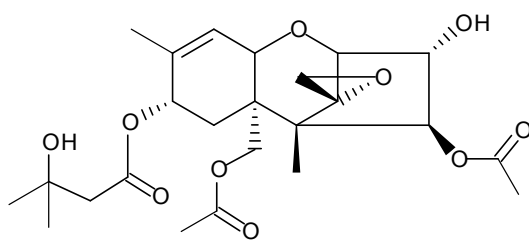
Os tricotecenos compreendem mais de 60 sesquiterpenóides produzidos por espécies de vários gêneros de fungos, como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* e *Trichothecium* (Nielsen et al., 2005; Thrane et al., 2004). Esses metabólitos são potentes inibidores da síntese de proteínas em eucariotos e ocorrem em alimentos e forragens, sendo associados a hemorragias, vômitos e diminuição da capacidade reprodutiva em animais (Cundliffe et al., 1974; Caloni et al., 2009, Desjardins, 2006.). A **toxina T2** e o **deoxinivalenol** estão entre as micotoxinas mais comuns, produzidas por espécies de *Fusarium* contaminantes de alimentos (Brase et al., 2007).



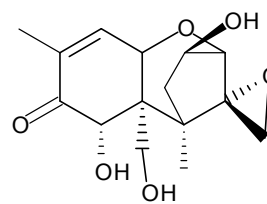
citrinina



fumonisina B1



toxina T2

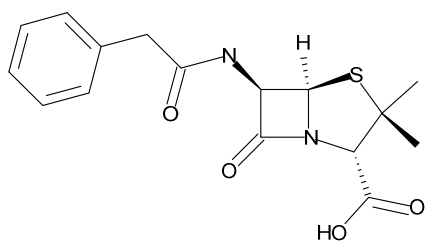


deoxinivalenol

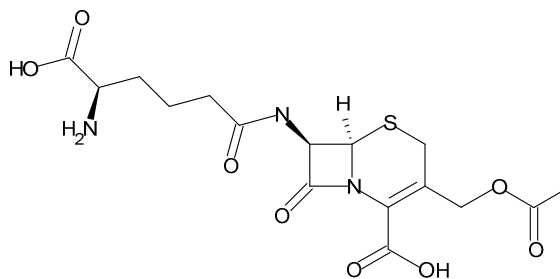
1.2.2 Metabólitos bioativos – fármacos e seus precursores

Centenas de substâncias com atividade antibacteriana foram isoladas de fungos desde a descoberta, e posterior desenvolvimento da **penicilina G**, na década de 1940 (Bérdy, 2005; Keller et al., 2005). Outros antibióticos produzidos por fungos, descobertos nesse período, foram as cefalosporinas, e.g. **cefalosporina C** (Newman et al., 2000). O **ácido fusídico** foi isolado do fungo *Fusidium coccineum*, na década de 1960, sendo empregado até os dias atuais no tratamento de infecções dermatológicas causadas, principalmente, por *Staphylococcus aureus* (Rigopoulos & Larios, 2008).

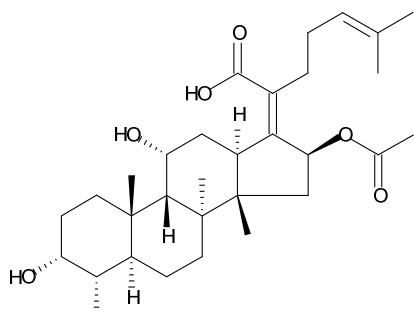
O antibiótico de amplo espectro **cefditoren pivoxil**, derivado sintético das cefalosporinas, foi aprovado em 2001 para uso no tratamento de bronquite crônica e infecções de pele (Chin et al., 2006). A **tiamulina** é um antibiótico utilizado em medicina veterinária. Esse fármaco é um derivado semi-sintético da **pleuromutilina**, isolada do fungo *Clitopilus scyphoides* (Misieki & Hoffmeister, 2007). A **retapamulina** é um novo derivado da pleuromutilina, desenvolvido para uso tópico em humanos, que possui potente atividade contra *Staphylococci* e *Streptococci* (Jones et al., 2006).



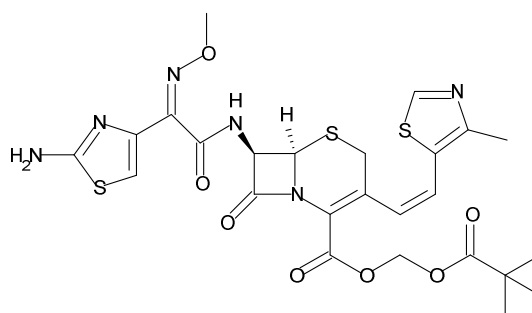
penicilina G



cefalosporina C



ácido fusídico

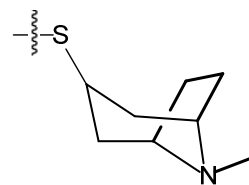


cefditoren pivoxil

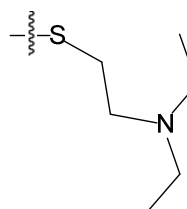


pleuromutilina: R= CH₂OH

tiamulina: R=



retapamulina: R=

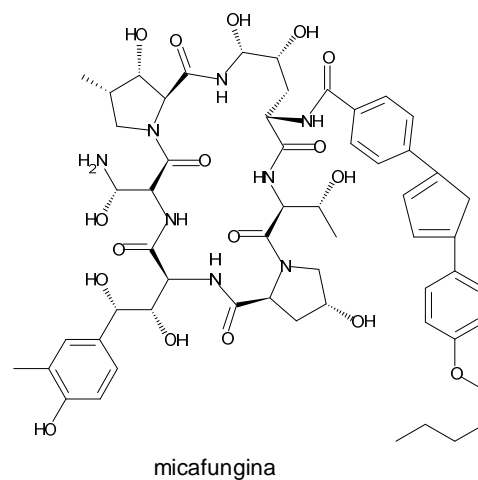
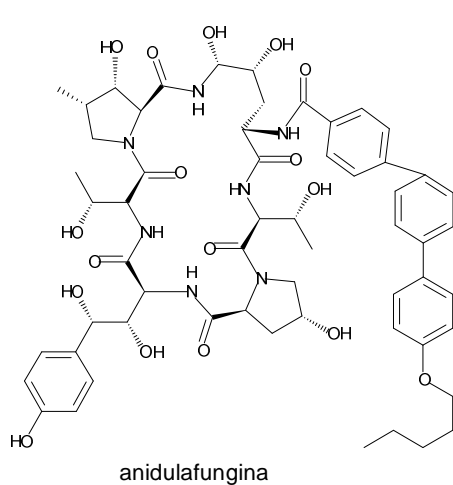
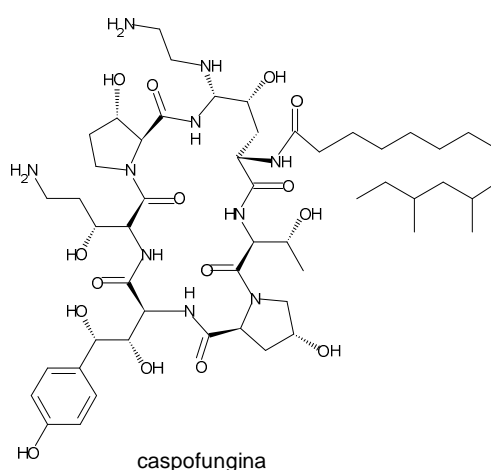
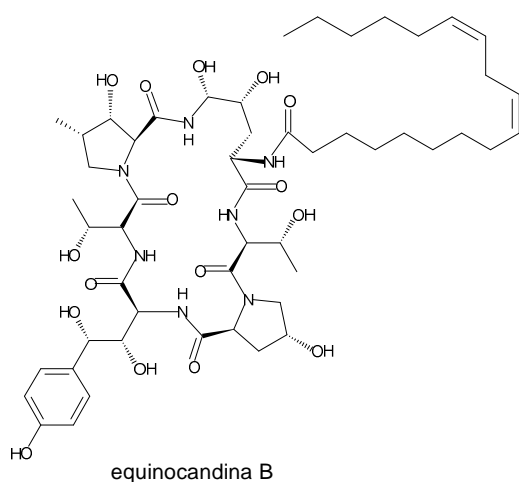


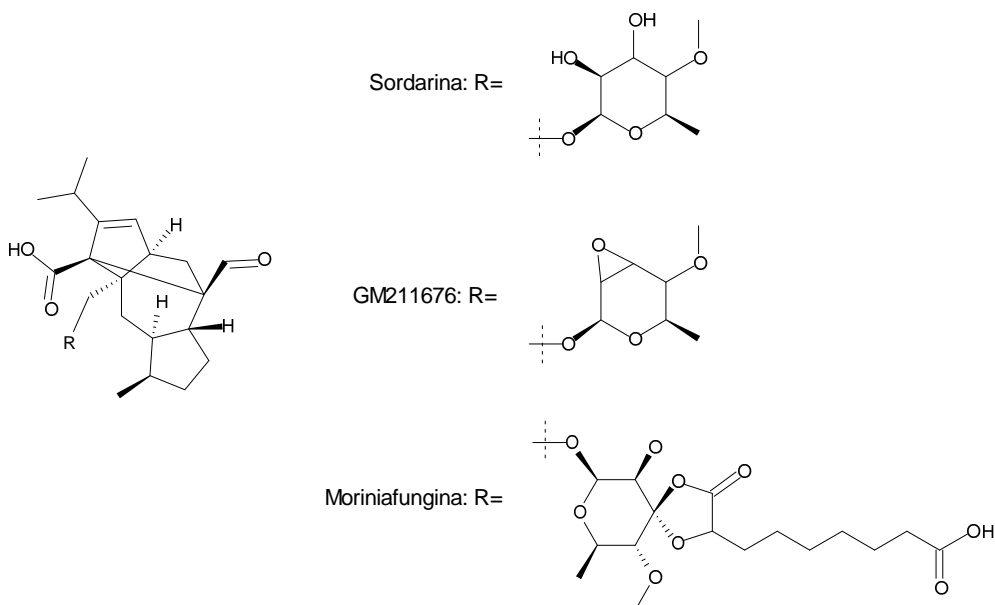
As infecções sistêmicas causadas por fungos têm aumentado nas últimas décadas devido, principalmente, à elevação do número casos de pessoas imunossuprimidas, como portadores do vírus HIV, pacientes com câncer ou que foram submetidos a transplantes de órgãos (Misiek & Hoffmeister, 2007). De forma semelhante, tem aumentado o número de fungos patogênicos resistentes aos fármacos disponíveis (Morschhäuser, 2009). As equinocandinas e as sordarinas estão entre os poucos agentes antifúngicos de origem natural promissores, descobertos nas últimas décadas (Misiek & Hoffmeister, 2007; Vicente et al., 2009).

A **equinocandina B** foi isolada do fungo *Apergillus nidulans* var. *echinulatus* como um antifúngico na década de 1970 (Misiek & Hoffmeister, 2007) e serviu de modelo para o desenvolvimento de derivados semi-sintéticos para o tratamento de

micoses sistêmicas, como a **caspofungina**, a **anidulafungina** e a **micafungina** (Chandrasekar & Strobel, 2006; Letscher-Bru & Herbrecht, 2003; Serena et al., 2005). As equinocandinas são lipopeptídeos que se ligam ao complexo enzimático β 1,3-glucanase e impedem a síntese de β glucanas, constituintes essenciais da parede celular dos fungos, ausentes em animais vertebrados (Chin et al., 2006; Denning, 1997).

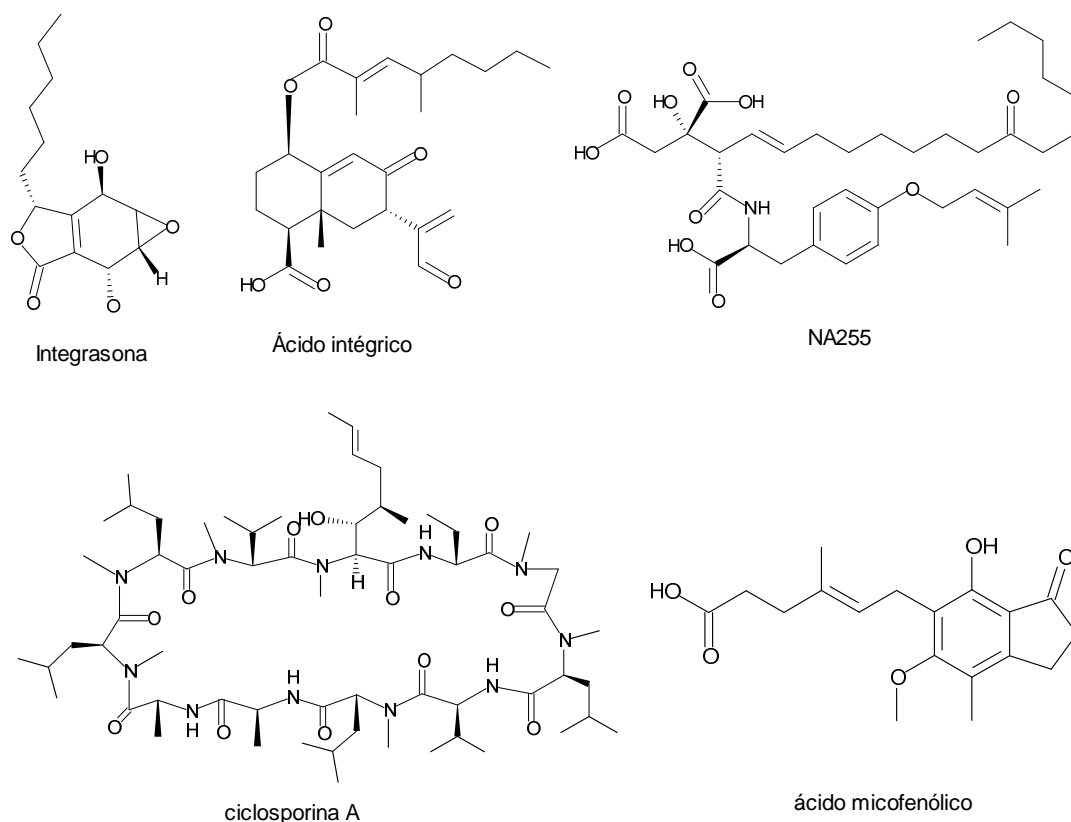
A **sordarina** é um glicosídeo diterpênico, isolada do fungo *Sordaria arenosa*, que possui ação antifúngica contra diversas espécies patogênicas (Misiek & Hoffmeister, 2007). Esse metabólito serviu de modelo para o desenvolvimento de derivados semi-sintéticos, como **GM211676**, e para descoberta de outras sordarinas naturais, como a **morinafungina**, isolada do fungo *Morinia pestalozzioides* (Clemons & Stevens, 2000; Basilio et al., 2006). As sordarinas interagem com o fator de enlogação EF2, inibindo a realização da síntese protéica em espécies suscetíveis (Dominguez et al., 1999).





Alguns metabólitos secundários de fungos possuem atividade antiviral. A **integrasona** e o **ácido intégrico** foram isolados de um fungo não identificado e mostraram-se potentes inibidores da enzima HIV integrase, crucial para o processo de integração do vírus HIV no genoma do hospedeiro (Kithsiri et al., 2004). O metabólito **NA255** foi isolado do fungo *Fusarium incarnatum* e mostrou-se ativo contra o vírus da hepatite C. Essa substância impede a síntese de esfingolipídios pelas células do fígado do hospedeiro, o que interfere diretamente na replicação do vírus, que depende da associação entre proteínas virais e esfingolipídios (Sakamoto et al., 2005).

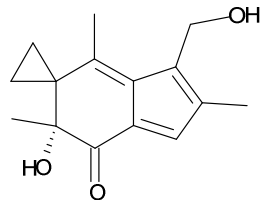
Como exemplificado no caso das micotoxinas, os metabólitos secundários produzidos por fungos possuem efeitos diversos sobre mamíferos e o homem. O oligopeptídeo **ciclosporina A** foi descoberto na década de 1960, a partir do extrato do fungo de solo *Tolypocladium inflatum*, e lançado no mercado como agente imunossupressor em 1983 (Stähelin, 1996). A ciclosporina A é um medicamento padrão usado para o tratamento de pessoas submetidas a transplantes de órgãos contra rejeição. Mais recentemente, o **ácido micofenólico**, comumente produzido por diversas espécies de *Penicillium*, foi lançado no mercado como agente imunossupressor (Butler, 2004).



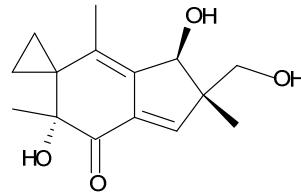
Os produtos naturais, oriundos de plantas e microrganismos, com atividades citotóxicas e antitumorais têm sido intensamente investigados (Cragg & Newman, 2009). O **irofulveno** é um derivado semi-sintético do metabólito **iludina S**, um sesquiterpeno altamente tóxico isolado do fungo *Omphalotus illudens* (Kelner et al., 2002). Essas substâncias são agentes alquilantes, ligando-se ao DNA e a diversas proteínas das células neoplásicas, induzindo-as à morte programada, i.e. apoptose (Misieki & Hoffmeister, 2007).

A **fumagilina** é um produto natural isolado da espécie *Aspergillus fumigatus* e que apresenta atividade anti-angiogênica, com potencial anticancerígeno (Hou et al., 2009). O derivado semi-sintético da fumagilina **TNP470** está em avaliação, em estágio pré-clínico, para o tratamento de diversos tipos de câncer (Zhang et al., 2006). O espectro de atividades biológicas da fumagilina e seus derivados é grande, incluindo efeitos tóxicos contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* e microsporídios (Arico-Muendel et al., 2009; Didier et al., 2006), e a diminuição de tecidos adiposos em ratos obesos (Lijnen et al., 2010). Outros metabólitos produzidos por *A. fumigatus*, contendo atividade antitumoral, são as triprostatinas. A **triprostatina A** interfere na organização dos microtúbulos celulares, impedindo a ocorrência de mitose em células cancerígenas (Usui et al., 1998). Já outra triprostatina, a **fumitremorgina C**, foi capaz de inibir células de câncer de mama multirresistentes a fármacos convencionais (Rabidran et al., 2000).

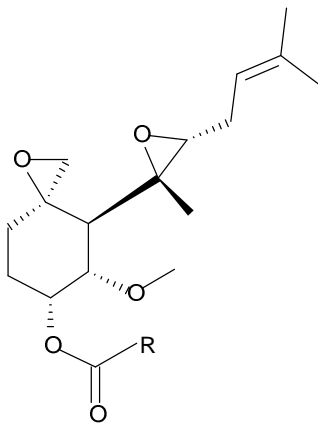
Estatinas são substâncias inibidoras da produção endógena de colesterol, usadas no tratamento de disfunções cardiovasculares. As estatinas sintéticas atualmente no mercado, e.g. **rosuvastatina**, responsáveis por vendas bilionárias em todo o mundo, originaram-se das estatinas naturais **mevastatina** e **lovastatina**, isoladas inicialmente dos fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus terreus*, respectivamente (Chin et al., 2006; Tober, 2006).



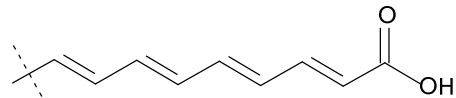
irofulveno



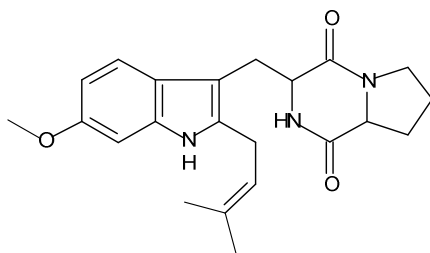
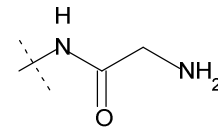
iludina S



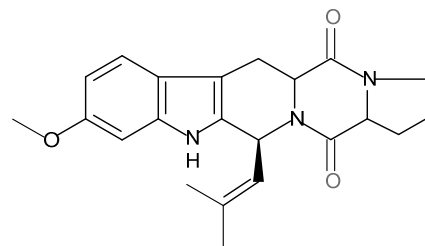
fumagilina: R=



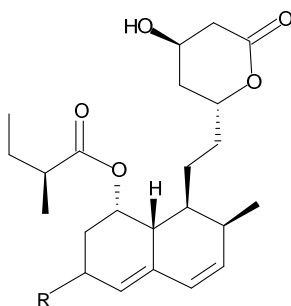
TNP470: R=



triprostatina A

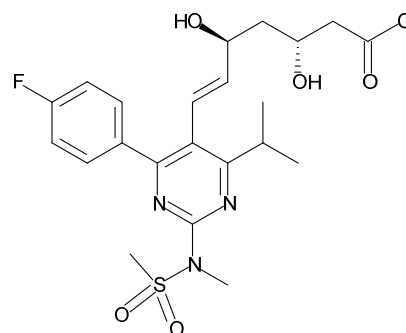


fumitremorgina C



lovastatina: R= CH₃

mevastatina: R= H



rosuvastatina

1.2.3 Metabólitos secundários de fungos endófitos

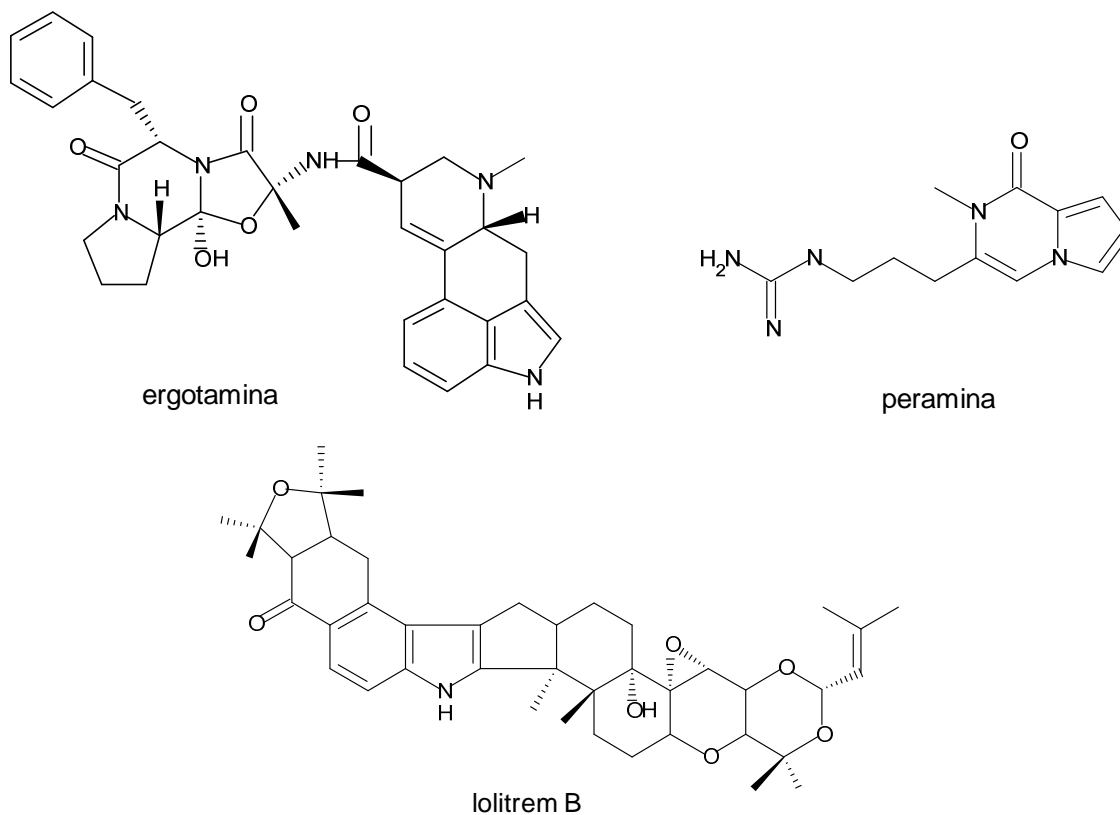
Na busca de novos metabólitos bioativos, muitos pesquisadores têm voltado a atenção para fungos que colonizam outros habitats que não o solo, tradicional fonte de microrganismos usados para a prospecção química (Bérdy, 2005). Os fungos endófitos e aqueles isolados de fontes marinhas têm se destacado como produtores de novos metabólitos (Bugni & Ireland, 2004; Gunatilaka, 2006; Schulz et al., 2002).

Desde a década de 1990, centenas de novos metabólitos, pertencentes a diferentes classes biossintéticas, foram isolados de fungos endófitos em várias partes do mundo (Gunatilaka, 2006; Tan & Zou, 2001). Vários desses metabólitos mostraram possuir atividades biológicas de interesse. Fármacos comerciais oriundos de metabólitos de fungos endófitos ainda não foram lançados, o que é razoável, já que a pesquisa nesse ramo é relativamente recente e o desenvolvimento de fármacos pode levar mais que uma década, podendo até chegar a quase 25 anos, como no caso da ciclosporina A (Cragg & Newman, 2005; Stähelin, 1996). Por outro lado, nos últimos 17 anos foram depositadas cerca de 40 patentes americanas, relacionadas ao desenvolvimento de fármacos e outros produtos de interesse a partir de metabólitos secundários de fungos endófitos (Priti et al., 2009).

Como discutido no item 1.1.3, um restrito grupo de fungos, pertencentes à família *Clavicipitaceae*, formam simbioses especializadas com gramíneas de clima temperado. A maioria desses fungos endófitos pertence ao gênero de ascomicetos anamorfos *Neotyphodium* e são responsáveis pela produção de alcalóides tóxicos a insetos e mamíferos (Tan & Zou, 2001). Muitos dos metabólitos produzidos por esses fungos são iguais ou similares àqueles isolados do fungo *Claviceps purpurea*, contaminante de grãos, como o centeio e a cevada, e responsável pelo ergotismo, doença que, nos séculos passados, era responsável por surtos de gangrena, perda de membros, insanidade e morte (Carlile et al., 2001). As técnicas modernas de colheita, armazenamento e inspeção de grãos eliminaram os riscos associados à contaminação de grãos por *C. purpurea*, razão pela qual os alcalóides do ergot não estão incluídos entre as micotoxinas de maior importância (Bennet & Klich, 2003).

A **ergotamina** e outros alcalóides do ergot foram isolados de fungos endófitos do gênero *Neotyphodium*, alguns dos quais possuindo atividade neurotóxica em insetos e mamíferos (Tan & Zou, 2001). A ergotamina tem efeito vaso-constritor, sendo empregada no tratamento de alguns tipos de enxaqueca na Europa (Tfelt-Hansen et al., 2000). A maioria das espécies de *Neotyphodium* produz o metabólito **peramina**, tóxico a insetos (Krauss et al., 2007). Alcalóides tremorgênicos chamados de lolitrens, e.g. **lolitrem B**, foram isolados tanto de culturas puras de fungos endófitos

do gênero *Neotyphodium* como de gramíneas colonizadas pelos endófitos. Esses metabólitos são os prováveis causadores de sintomas de tremores em animais que se alimentam de gramíneas colonizadas por endófitos (Hovermale & Craig, 2001).

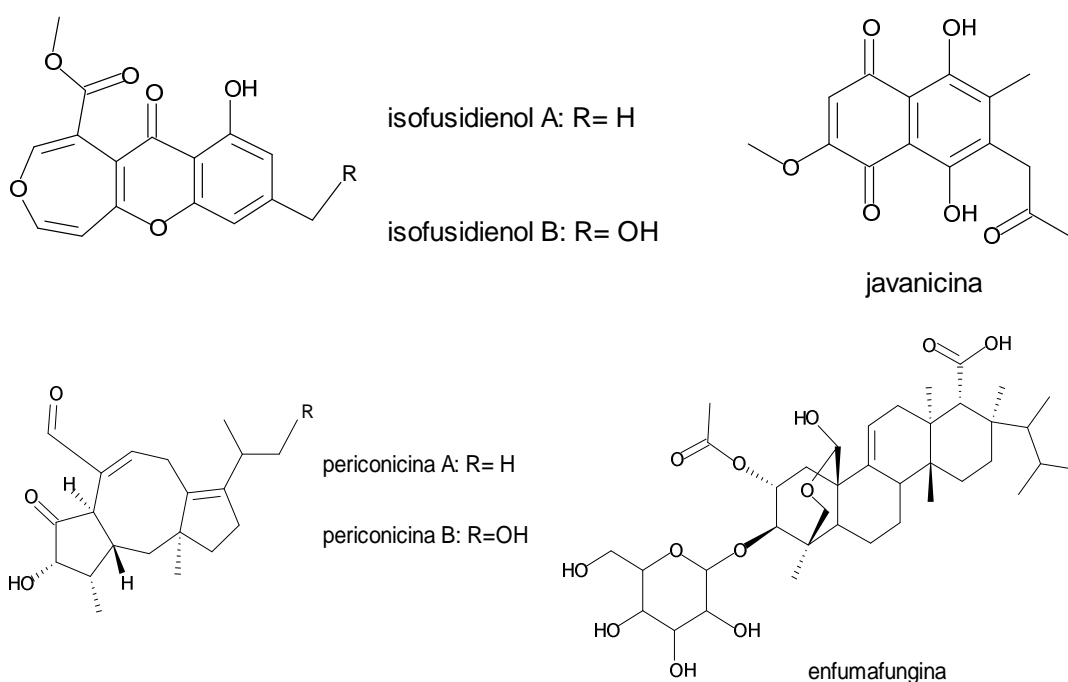


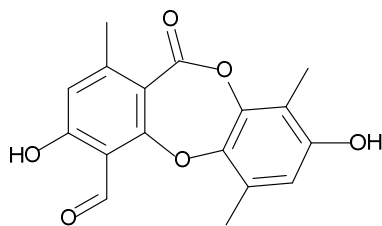
Milhares de fungos endófitos, não pertencentes à família *Clavicipitaceae*, foram investigados nos últimos quinze anos quanto à sua capacidade de produção de metabólitos secundários e centenas de metabólitos bioativos, muitos desses inéditos, foram isolados. Muitas dessas substâncias foram compiladas em várias revisões que tratam do tema, como aquelas publicadas por Borges et al. (2009), Firaková et al. (2007), Gunatilaka (2006), Strobel (2002), Strobel & Daisy (2003), Tan & Zhou (2001) e Yu et. al. (2010). Em sua revisão, Schulz et al. (2002) compilaram resultados de estudos de alguns anos com metabólitos de fungos, isolados de diversas fontes, e mostraram que 51% das substâncias isoladas de fungos endófitos eram inéditas, contra 38% de metabólitos inéditos isolados de fungos de solo.

Os **isofusidienóis A e B** foram isolados do fungo endófito *Chalara* sp. e exibiram potente atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, além de atividade moderada contra outras bactérias Gram positivas e negativas (Lösger et al., 2008). A naftoquinona **javanicina**, obtida do fungo endófito *Chloridium* sp., foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram negativas do gênero *Pseudomonas* (Kharwar et al., 2009).

As **periconicinas A e B** foram isoladas do fungo *Periconia* sp., endófito da planta *Taxus cuspidata*, e exibiram atividade antifúngica contra os patógenos humanos *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*, além de possuírem efeito fitotóxico (Kim et al., 2004). A substância **enfumafungina** foi isolada do fungo *Hormonema* sp., endófito da planta *Juniperus communis*. Esse metabólito mostrou ação antifúngica promissora, sendo capaz de inibir a ação da enzima β 1,3-glucanase, essencial para o crescimento dos fungos (Schwartz et al., 2000; Vicente et al., 2003). Quatro novos metabólitos, as botriorrodinas A–D, foram isolados do fungo *Botryosphaeria rhodina*, endófito de plantas de picão (*Bidens pilosa*). As **botriorrodinas A e B** exibiram atividade antifúngica contra patógenos de plantas e animais (Abdou et al., 2010).

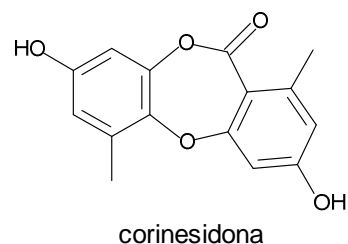
O metabólito **corinesidona** foi obtido do fungo endófito *Corynespora cassiicola* e mostrou-se capaz de inibir a enzima aromatase, associada ao desenvolvimento de câncer de mama estrógeno-dependente (Chomcheon et al., 2009). Os análogos de espiro bis naftalenos espiropreussionas A-C foram isolados do endófito *Preussia* sp. A **espiropreussiona A** exibiu citotoxicidade a duas linhagens de células cancerígenas e modesta atividade antibacteriana (Chen et al., 2009). O metabólito **tricodermamida C** foi isolado do fungo endófito *Eurotium* sp. e exibiu atividade citotóxica a duas linhagens de células cancerígenas (Davis et al., 2008). As **pirrospironas A e B**, isoladas do fungo endófito *Neonectria ramulariae*, foram capazes de induzir apoptose em células de leucemia (Shiono et al., 2008).



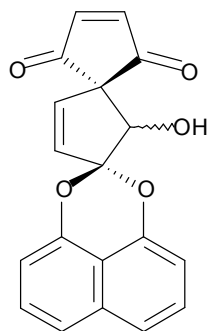


botriorrodina A: R= H

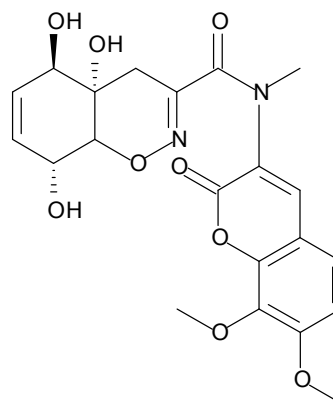
botriorrodina B: R= CH₃



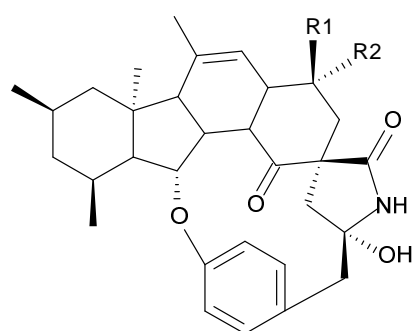
corinesidona



espiropreussiona A



tricolormamide C



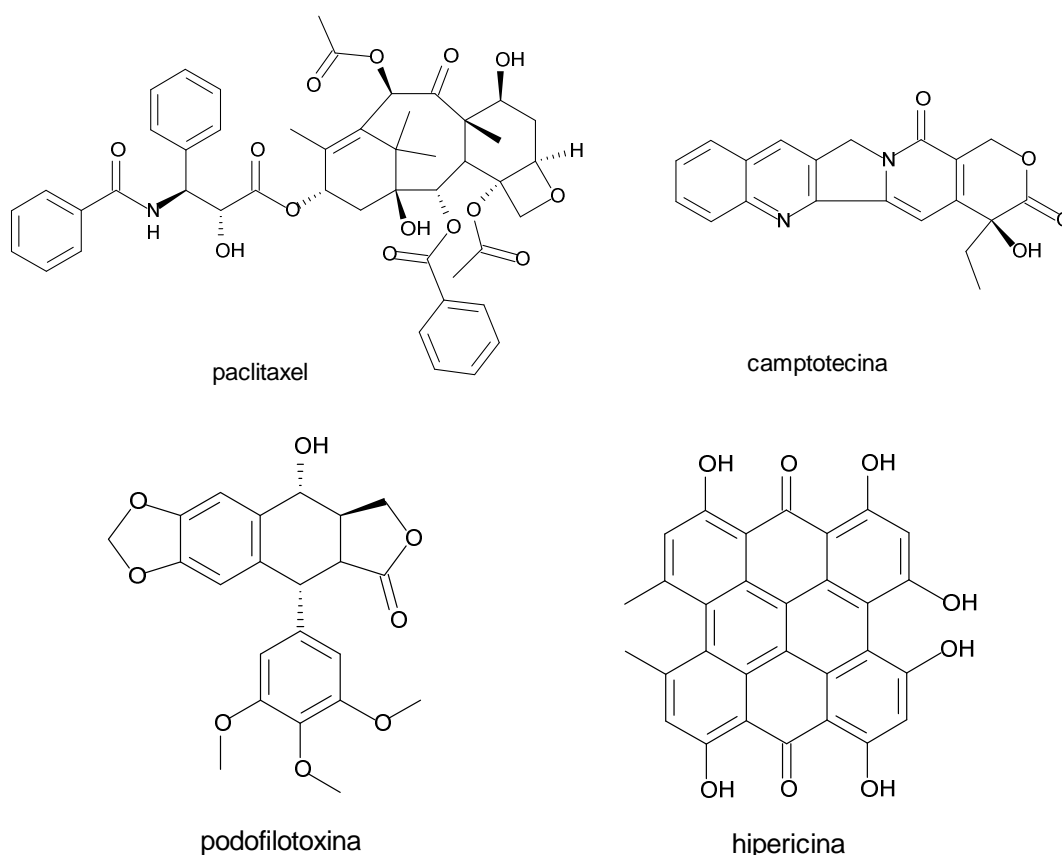
pirrospirona A: R1= H, R2= OH

pirrospirona B: R1= OH, R2= H

Um marco na pesquisa com produtos naturais de fungos endófitos foi a publicação, por Stierle et al. (1993), do relato da produção, *in vitro*, do anticancerígeno **paclitaxel** pelo fungo *Taxomyces andreanae*, isolado como endófito de plantas de teixo (*Taxus brevifolia*). A co-produção de metabólitos secundários pelo fungo endófito e sua planta hospedeira chamou a atenção da comunidade científica e a hipótese utilizada pelos autores, para tentar explicar esse fenômeno, foi a de uma possível transferência horizontal de genes entre planta e fungo endófito (Stierle et al., 1993). Posteriormente, o fungo *Pestalotiopsis microspora*, isolado como endófito de outra espécie de teixo (*Taxus wallachiana*), também se mostrou capaz de produzir paclitaxel (Strobel et al., 1996). Mais de 30 espécies de fungos não correlatas, isoladas como endófitos de diferentes plantas, produtoras e não produtoras de paclitaxel, já foram descritas como capazes de produzir paclitaxel *in vitro*, sempre em baixíssimas concentrações (Kumaran & Hur, 2009; Liu et al., 2009). Staniek et al. (2009) investigaram um isolado comercial de *Taxomyces andreanae*, mas não foram capazes

de detectar a presença do paclitaxel no extrato do fungo, embora tenham detectado alguns dos prováveis genes responsáveis pela produção do metabólito no genoma de *T. andreanae*.

Passados doze anos desde o primeiro relato da produção do paclitaxel por um fungo endófito, Puri et al. (2005) relataram o isolamento do anticancerígeno **camptotecina** a partir do extrato de um fungo endófito, identificado apenas como sendo um [sic] ficomiceto (i.e zigomiceto), isolado da planta *Nothapodytes foetida*, produtora de camptotecina. Da mesma espécie de planta, foi isolado o fungo *Neurospora* sp., o qual se mostrou capaz de produzir camptotecina *in vitro* (Rehmana et al., 2008). Um fungo não identificado, isolado com endófito da planta *Camptotheca acuminata*, também foi descrito como produtor de camptotecina (Kusari et al., 2009b). A produção do anticancerígeno **podofilotoxina**, originalmente isolada de plantas do gênero *Podophyllum*, por fungos endófitos como *Trametes hisurta* e *Phialocephala fortinii* também já foi descrita (Eyberger et al., 2006; Puri et al., 2006). Recentemente, foi descoberto que o fungo *Thielavia subthermophila*, endófito da planta *Hypericum perforatum*, é produtor do metabólito **hipericina**, conhecido como agente antidepressivo, antiinflamatório e antioxidante (Kusari et al., 2009a). A hipericina já havia sido isolada da espécie de cogumelo *Dermocybe austrovenata* (Gill et al., 1991).



1.3 Perfilamento de extratos brutos e desreplicação de metabólitos secundários

O número conhecido de espécies de fungos é de aproximadamente cem mil (Kirk et al., 2008), porém, apenas uma pequena parcela destas já foi submetida à prospecção química e caracterização de seus metabólitos secundários (Weber et al., 2007). O número estimado de metabólitos produzidos por microrganismos até o ano de 2002 era de mais de 50 mil, dos quais aproximadamente a metade era de substâncias isoladas de fungos (Bérdy, 2005).

Alguns gêneros de fungos, como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*, têm ocorrência generalizada nos mais diversos ambientes terrestres e aquáticos e produzem grandes quantidades de esporos, que se dispersam pelo ar (Domsch et al., 2007; Samson et al., 1995). Esses fungos também contaminam alimentos e têm bom crescimento quando em meio de cultura, além de serem produtores de uma gama metabólitos secundários, incluindo toxinas (item 1.2.1). Como consequência comum, muitas espécies de fungos são isoladas e investigadas repetidas vezes, e seus metabólitos típicos re-isolados da mesma forma. Ainda assim, o uso de técnicas apuradas de isolamento e caracterização de substâncias e o cultivo em condições diferenciadas têm propiciado a descoberta de novos metabólitos produzidos por espécies bastante investigadas como *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* (Rank et al., 2006; Maasson et al., 2010).

A redundância taxonômica está geralmente associada à redundância química e a diversificação das espécies de fungos investigadas em programas de prospecção é considerada como importante na busca por novos metabólitos (Monaghan et al., 1996; Smedsgaard & Nielsen, 2005). Por outro lado, a capacidade de produção de metabólitos secundários nem sempre é restrita, como nas definições clássicas (Dewick, 2002), e muitas substâncias são isoladas de diferentes espécies de fungos não correlatas, havendo, inclusive, casos de co-produção de metabólitos entre plantas e fungos (vide item 1.2.3). A alternativa, empregada para aumentar as chances de descoberta de novos metabólitos, baseia-se no uso de métodos de caracterização prévia dos extratos brutos, em pequena escala (Larsen et al., 2005).

As técnicas atuais de investigação de extratos brutos, oriundos de plantas, microrganismos e organismos aquáticos, lançam mão de estratégias desenvolvidas pela indústria farmacêutica e no meio acadêmico nas últimas décadas, representadas pela 'triagem de alta eficiência' (*high throughput screening*) (Mishra et al., 2007; Strege, 1999). Nesse processo, um elevado número de amostras, originadas de química sintética, combinatória ou de extratos brutos, é processado em sistemas

automatizados, com a realização de bioensaios apurados em escala reduzida (Eldridge et al., 2002; Zhang et al., 2007). As amostras contendo a atividade biológica desejada (*hits*) são investigadas em etapas seguintes do programa. Técnicas cromatográficas e espectroscópicas são empregadas para a investigação dos extratos bioativos e identificação das substâncias de interesse (Strege, 1999).

O perfilamento de metabólitos secundários presentes em extratos brutos visa à caracterização dos principais componentes do extrato e detecção de substâncias conhecidas, bem como de prováveis metabólitos inéditos, em um processo chamado de desreplicação (Larsen et al., 2005; VanMiddlesworth & Cannell, 1998). Por meio de tal estratégia, tenta-se evitar o re-isolamento de substâncias comuns e de pouco interesse e diminuir o tempo e o custo dos programas de prospecção química visando ao isolamento de metabólitos bioativos (Smedsgaard & Nielsen, 2005; Strege, 1999). A análise dos perfis de metabólitos também serve para a estimativa da diversidade química presente nos extratos (Higgs et al., 2001).

As amostras utilizadas para o perfilamento são geralmente reduzidas, como poucos gramas de material vegetal ou o conteúdo de uma cultura de fungo ou bactéria em uma placa de Petri (Smedsgaard, 1997; Mohn et al., 2009), sendo possível realizar a caracterização de dezenas a centenas de extratos em um curto espaço de tempo (Svendsen & Frisvad, 1994). Extratos de plantas, bastante complexos em sua constituição, podem ser extraídos em diferentes sistemas de solventes, e.g. CH_2Cl_2 e MeOH, e submetidos ao perfilamento separadamente (Mohn et al., 2009). Culturas de fungos em meio sólido podem ser submetidas à extração de metabólitos em micro-escala, onde alguns fragmentos de poucos milímetros são retirados das colônias e extraídos com uma quantidade reduzida de solvente, em banho de ultra-som (Andersen et al., 2008; Smedsgaard, 1997). O cultivo em meio líquido pode ser realizado em placas de microtitulação, contendo poços com volume reduzido, e.g. 1 mililitro de meio de cultura por poço, e as colônias submetidas à extração pela adição direta de solvente aos poços (Bills et al., 2008).

Os métodos de perfilamento de metabólitos secundários mais simples baseiam-se na cromatografia em camada delgada (CCD). Os extratos podem ser submetidos à CCD, sob condições padrão, e os perfis de metabólitos comparados. A aplicação de padrões de substâncias e o uso de sistemas diferenciados de revelação das placas podem ser usados para a detecção de metabólitos conhecidos e caracterização de grupos funcionais (VanMiddlesworth & Cannell, 1998). No caso de estudos biomonitorados, os extratos bioativos podem ser submetidos à CCD preparativa e os metabólitos separados extraídos da matriz, concentrados e submetidos aos bioensaios de interesse (Strege, 1999).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa é um método que permite a separação adequada de misturas complexas, contendo substâncias com diferentes tamanhos, polaridades e funcionalidades químicas, como no caso de extratos brutos obtidos de plantas e microrganismos (Larsen et al., 2005). O uso associado da CLAE com detectores por arranjo de diodos (CLAE-DAD) permite a obtenção dos espectros de absorção na região do UV para a maioria das substâncias separadas durante o processo cromatográfico (Smedsgaard & Nielsen, 2005).

Devido ao alto poder de resolução das colunas cromatográficas atuais e à reprodutibilidade obtida com os cromatógrafos, dezenas de metabólitos podem ser detectadas nos extratos brutos e os perfis gerados por CLAE-DAD podem ser comparados entre várias amostras (Frisvad & Thrane, 1987; Larsen et al., 2005). As informações sobre os tempos de retenção e os espectros de absorção no UV são empregadas para o reconhecimento de substâncias ou de prováveis análogos, por meio de comparações com amostras padrão (Nielsen & Smedsgaard, 2003). Bancos de dados contendo espectros de absorção no UV de substâncias puras podem ser montados, facilitando o processo de desreplicação dos extratos brutos (Frisvad & Thrane, 1987; Lang et al., 2008; VanMiddlesworth & Cannell, 1998).

O uso da CLAE acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-DAD-EM) ampliou as possibilidades de caracterização e identificação de metabólitos presentes em extratos brutos complexos (Espada et al., 2008; Smedsgaard & Nielsen, 2005). Nesse processo, o eluente contendo os metabólitos separados pela coluna, após a passagem pelo detector por arranjo de diodos, é direcionado à câmara de ionização do espectrômetro de massas. Métodos 'brandos' de ionização a pressão atmosférica são usados para a geração de íons estáveis e adutos, a partir dos metabólitos que adentram a câmara de ionização (Ardrey, 2003). O método de ionização a pressão atmosférica mais empregado é o *electrospray* (ESI) (Strege, 1999). Nesse método, o eluente vindo do cromatógrafo é borrifado através de uma fina agulha dentro da câmara de ionização, a qual é mantida aquecida e sob um potencial elétrico. As gotículas contendo moléculas carregadas passam através de um gás dessecante, ocorrendo a evaporação do solvente, e as moléculas ionizadas são direcionadas para o analisador de massas (Ardrey, 2003). Os íons são detectados por analisadores de massas como quadrupolo, tempo de voo e *ion trap* (Ardrey, 2003;). O emprego da ionização por *electrospray* e analisador de massas por tempo de voo (ESI-TOF) nos sistemas de CLAE-DAD-EM é bastante comum (Smedsgaard & Nielsen, 2005).

O uso de CLAE-DAD-EM permite agregar informações sobre a massa acurada dos metabólitos presentes nos extratos brutos. Os dados de massa de alta resolução e

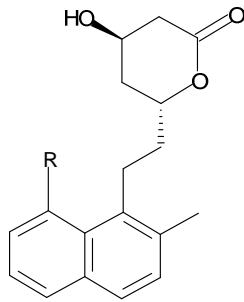
o padrão de adutos formados durante a análise, e.g. $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, são usados para calcular a provável fórmula molecular dos metabólitos de interesse. Os resultados obtidos são usados na busca por substâncias já conhecidas, contendo a mesma composição química dos metabólitos detectados, em bancos de dados especializados ou construídos pelos próprios pesquisadores (Nielsen & Smedsgaard, 2003). Os dados de espectroscopia na região do UV, tempo de retenção e a identidade do organismo produtor são comparados com aqueles dos possíveis candidatos presentes no banco de dados, permitindo a identificação, mesmo que por tentativa, de metabólitos conhecidos (Larsen et al., 2005; Strege et al., 1999).

Além do uso na desreplicação de extratos e detecção de prováveis metabólitos inéditos, o perfilamento de metabólitos secundários por CLAE-DAD-EM é empregado para a detecção de micotoxinas (Larsen et al., 2007; O'Brien et al., 2008), caracterização de frações bioativas (Lang et al., 2006) e comparação de espécies por meio de seus perfis de metabólitos secundários, i.e. quimiotaxonomia (Andersen et al., 2009; Sørensen et al., 2010).

O perfilamento do extrato bruto do fungo *Penicillium solitum* por CLAE-DAD-EM permitiu a detecção de dois metabólitos contendo espectros de absorção na região do UV semelhantes àqueles de estatinas, como a mevastatina. Os metabólitos foram purificados e identificados como os novos análogos de estatinas **solistatina** e **solistatinol** (Larsen et al., 2007; Sørensen et al., 1999). Os metabólitos **infectopirona** e **neozelandinas A e B** foram isolados de fungos da espécie *Alternaria infectoria*, os quais contêm perfis de metabólitos secundários bem diversos daqueles produzidos por outras espécies de *Alternaria* (Christensen et al., 2005; Larsen et al., 2003). A análise por CLAE-DAD-EM permitiu a detecção de um provável análogo de fumonisinas no extrato de fungos da espécie *Aspergillus niger*. Tal metabólito foi posteriormente isolado e identificado como uma nova fumonisina, nomeada de **fumonisina B6** (Maasson et al., 2010).

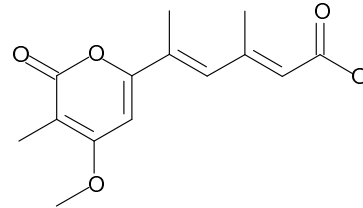
A desreplicação por CLAE-DAD-EM é geralmente associada ao fracionamento biomonitorado dos extratos. Por meio de métodos automatizados de fracionamento por CLAE e de coleta de frações (vide **Cap.5**), os extratos brutos são microfracionados e as frações geradas são submetidas a bioensaios diversos (Lang et al., 2006). As frações bioativas são submetidas à desreplicação e os prováveis metabólitos inéditos são purificados e identificados. Os metabólitos citotóxicos **4-cetoclonostaquidiol**, **crisoporídeo** e **crisaibol** foram isolados a partir de extratos de fungos submetidos ao microfracionamento associado ao perfilamento por CLAE-DAD-EM (Lang et al., 2006; Mitova et al., 2006, 2008).

A enorme diversidade de metabólitos produzidos pelos fungos pode ser usada como ferramenta quimiotaxonômica (Frisvad et al., 2008). Os perfis gerados durante o perfilamento de metabólitos secundários podem ser comparados e os fungos classificados em quimiotipos (vide **Cap. 2 e 4**). Em geral, a separação de espécies por meio de caracteres morfológicos, fisiológicos e/ou de sequenciamento do DNA coincide com os quimiotipos definidos pela análise quimiotaxonômica (Svendsen & Frisvad, 2004; Andersen et al., 2008; Sørensen et al., 2010).

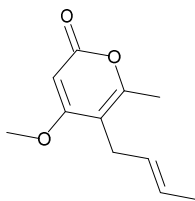


solistatina: R= H

solistatinol: R= OH

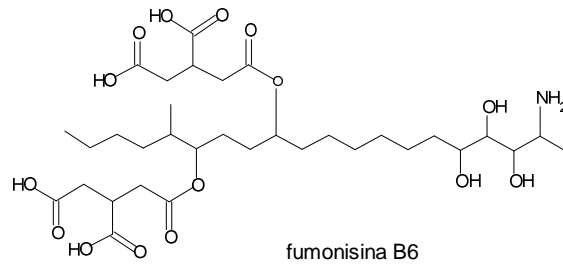


infectopirona

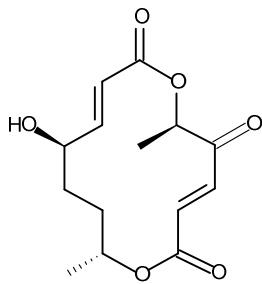


neozelandina A: R= CH₃

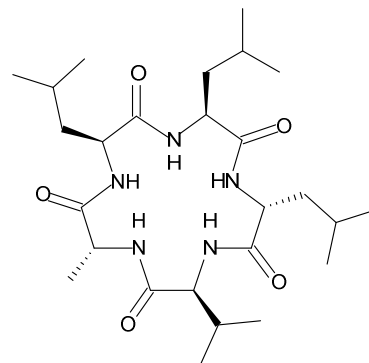
neozelandina B: R= COOH



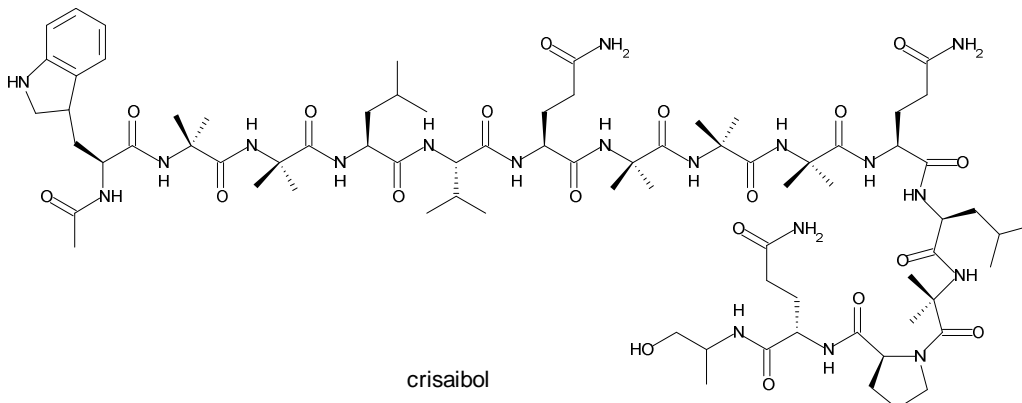
fumonisina B6



4-ceto-clonostaquidiol



crisosporídeo



crisaibol

2 Perfilamento de metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos dos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora*

2.1 Introdução

O gênero *Phomopsis* é composto de ascomicetos assexuados (anamorfos) cuja fase sexuada (teleomórfica) é conhecida como *Diaporthe* (família *Diaporthaceae*). Várias espécies de *Phomopsis* são patogênicas a plantas e causam doenças em diversas culturas, algumas das quais de importância econômica, como a escoriose da videira, o cancro da haste da soja, a mancha da haste do girassol e a melanose do citros (Agrios, 2005; Santos e Phillips, 2009). Espécies de *Phomopsis* também estão entre os endófitos dominantes de plantas tropicais e temperadas (Abreu et al., 2010a; Canon & Simmons, 2002; Rossman et al., 2007; Suryanarayanan et al., 2002).

Os fungos do gênero *Cytospora* são ascomicetos anamórficos cujas fases teleomórficas são conhecidas como *Valsa* e *Leucostroma*, gêneros correlatos pertencentes à família *Valsaceae*. Apesar de distintas, espécies de *Cytospora* e *Phomopsis* são morfológicamente semelhantes e intermediários entre os dois gêneros podem existir. Espécies de *Cytospora* estão geralmente associadas a caules de plantas lenhosas e podem causar doenças como cancrios e morte de troncos. Esses fungos também são isolados como endófitos em algumas ocasiões (Adams et al., 2005; Rossman et al., 2007).

A taxonomia desses dois gêneros é complicada, pois não há marcadores morfológicos suficientes para a discriminação de espécies e a nomenclatura destas é normalmente baseada na ocorrência em diferentes plantas hospedeiras, partindo-se do princípio de que cada espécie ocorre em uma determinada planta (Horn et al., 1996; Santos & Phillips, 2009). Estudos recentes, baseados em sequenciamento do DNA, mostraram a inconsistência desse sistema taxonômico, já que uma mesma espécie de *Phomopsis* ou *Cytospora* pode ocorrer em diferentes plantas hospedeiras e várias espécies podem colonizar uma mesma planta (Adams et al., 2005; Mostert et al., 2001; Niekerk et al., 2005).

Centenas de metabólitos secundários, muitos desses bioativos, já foram isolados de fungos dos gêneros *Phomopsis* e, em menor escala, *Cytospora*. Nas décadas de 1970 e 1980, muitos estudos eram realizados com fungos causadores de doenças e contaminações em plantas, com bioensaios voltados para a detecção de substâncias tóxicas a vegetais e animais. A partir de meados da década de 1990,

quando se intensificaram os estudos sobre metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos, a maioria das substâncias obtidas de fungos dos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora* se originou de endófitos. Visto que os fungos endófitos aparentemente não causam doenças em seus hospedeiros, os bioensaios sobre fitotoxicidade foram substituídos por ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana e citotóxica.

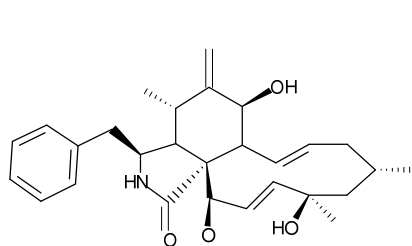
Os metabólitos tóxicos kodocitocalasinas 1 e 2 foram isolados de um fungo da espécie *Phomopsis paspalli*, principal contaminante de grãos do “mileto de Kodo” (*Paspalum scrobiculatum*) na Índia. Esses metabólitos foram considerados como prováveis causadores de envenenamentos de animais e humanos, ocorridos após a ingestão de grãos de mileto contaminados pelo fungo. As estruturas das kodocitocalasinas 1 e 2 foram posteriormente reconhecidas como idênticas àquelas da **citocalasina H** e **citocalasina J** (deacetilcitocalasina H), isoladas inicialmente de uma *Phomopsis* não identificada nos EUA, e descritas como tóxicas a aves e plantas (Patwardhan et al., 1974; Beno & Christof, 1976; Cole et al., 1981).

A **fomopsina A** é um hexapeptídeo tóxico produzido pela espécie *Phomopsis leptostomiformis* (= *Diaporthe toxica*), patógeno comum de plantas de tremoço. Este metabólito, junto a outros produzidos em menor quantidade, é o responsável pela lupinose, uma doença que afeta principalmente ovelhas, mas também bovinos e equinos, na África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. A enfermidade desenvolve-se após o consumo de pastagens de tremoço colonizadas por *P. leptostomiformis* e caracteriza-se pela ocorrência de lesões no fígado, diminuição do apetite, apatia e morte dos animais (Culvenor et al., 1989; Than et al., 2005).

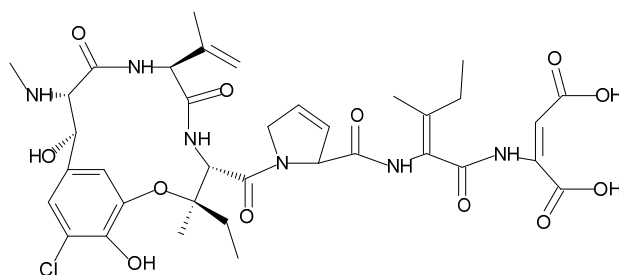
O metabólito **fomozina** foi isolado do fitopatógeno *Phomopsis helianthi* (= *Diaporthe helianthi*), causador da mancha da haste do girassol. Em testes *in vitro*, a fomozina foi capaz de causar necroses em folhas e ramos de girassol (Mazars et al., 1990). A **foeniculoxina** foi isolada do fungo *Phomopsis foeniculi*, patógeno do funcho, e mostrou-se tóxica a plantas de funcho, tomate e tabaco (Evidente et al., 1994).

Vários metabólitos secundários, com ações antibacteriana, antifúngica e/ou citotóxica moderadas, foram isolados de fungos endófitos do gênero *Phomopsis*, obtidos de plantas terrestres e marinhas em várias partes do globo, e.g.: **fomopsicalasina** – antibacteriano, anti-*Candida* (Horn et al., 1995); **fomopsidina** – antimetabólico (Kobayashi et al., 2003); **diaporteína B** – antibacteriano (*Mycobacterium tuberculosis*) e citotóxico (Dettrakul et al., 2003); **fomopsilactona** – antifúngico e citotóxico (Silva et al., 2005); **fomoenamida** – antibacteriano (*M. tuberculosis*) (Rukachaisirikul et al., 2008); **8 α -acetoximultipolídeo A** – antifúngico (Wu et al., 2008); **oblongolídeo Z** – citotóxico (Bunyapaiboonsri et al., 2010). A produção do

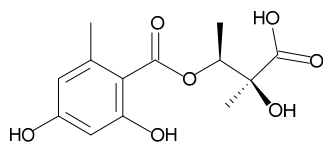
anticancerígeno paclitaxel por endófitos do gênero *Phomopsis* também já foi relatada (Liu et al., 2009; Kumaran & Hur, 2009).



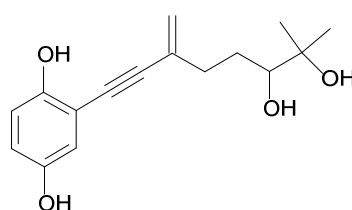
citocalasina J: R= H
citocalasina H: R= Ac



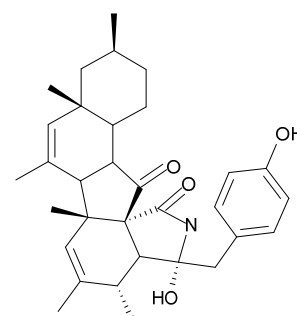
fomopsina A



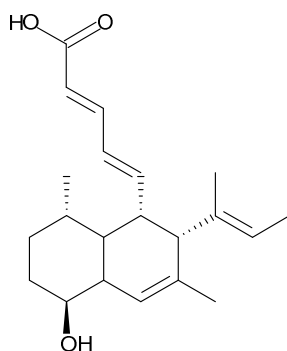
fomozina



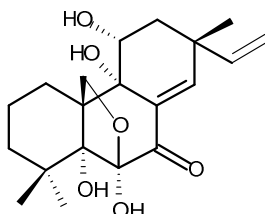
foeniculoxina



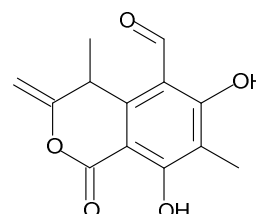
fomopsicalasina



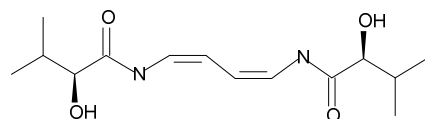
fomopsidina



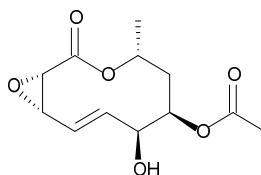
diaporteína B



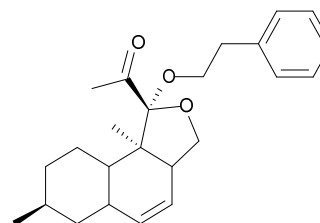
fomopsilactona



fomoenamida



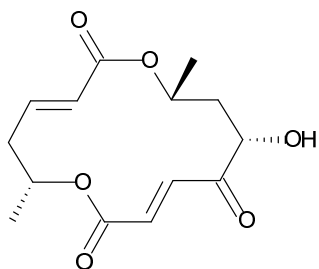
8α-acetoximultipólídeo A



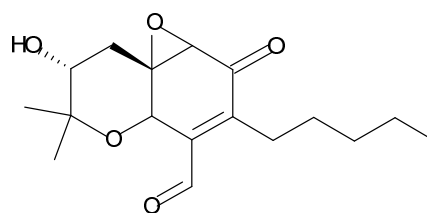
oblongólídeo Z

Metabólitos bioativos também foram isolados de espécimes de *Cytospora*, isolados como endófitos, e.g.: **grahamimicina A** – antibacteriano (Gurusiddaiah & Ronald, 1981), **citospolina A** – inibidor da síntese do hormônio vasoconstritor angiotensina II, o qual atua no controle da pressão arterial (Stevens-Miles et al., 1996);

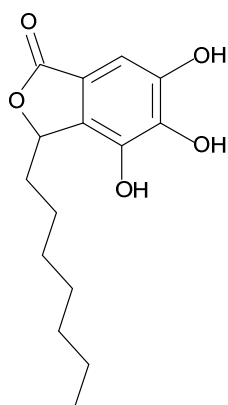
citosporona E – antibacteriano e anti-*Candida* (Brady et al., 2000); **ácido citospórico** – inibidor da enzima integrase produzida pelo vírus HIV (Jayasuriya et al., 2003).



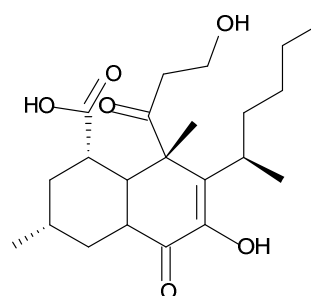
grahamimicina A



citosporina A



citosporona E



ácido citospórico

O perfilamento de metabólitos secundários presentes nos extratos brutos de fungos, por meio de CLAE-DAD(-EM), permite a separação de espécies morfológicamente semelhantes em quimiotipos e a identificação de marcadores químicos para delimitação de espécies (Frisvad et al., 2008). A análise de perfis químicos também pode ser empregada no processo de desreplicação e descoberta de novos metabólitos, os quais são geralmente produzidos por um restrito grupo de espécies em uma população (Larsen et al., 2005; Smedsgaard & Nielsen, 2005).

A capacidade de produção de metabólitos secundários por espécies de *Phomopsis* e *Cytospora*, isoladas como endófitos, justifica o seu estudo em programas de prospecção química. Diante da dificuldade de se diferenciar tais fungos com base em caracteres morfológicos, o uso de métodos de perfilamento de extratos brutos em pequena escala mostra-se viável, pois permite a rápida triagem de um elevado número de amostras, a definição de quimiotipos e a desreplicação dos extratos (Larsen et al., 2005).

Nesse capítulo, será descrito o estudo químico comparativo dos extratos brutos de 56 fungos endófitos pertencentes aos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora*, isolados de diferentes plantas. Os experimentos envolveram a definição do meio de cultura mais

adequado à produção de metabólitos; o cultivo em meio sólido e extração dos metabólitos secundários em micro-escala; o perfilamento dos extratos por CLAE-DAD; o agrupamento dos perfis (i.e. cromatogramas) em quimiotipos e a desreplicação dos extratos, com a caracterização dos metabólitos secundários majoritários por meio de seus espectros de absorção na região do UV, índices de retenção e espectros de massas de alta resolução, obtidos por CLAE-DAD-EM.

2.2 Metodologia

2.2.1 Fungos utilizados

Foram investigados 56 isolados* de fungos dos gêneros *Phomopsis* (48 isolados) e *Cytospora* (8 isolados) pertencentes à Coleção Micológica de Lavras (CML) do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, UFLA. Os isolados haviam sido previamente obtidos como endófitos de plantas nativas e cultivadas, coletadas nos estados de Minas Gerais, Bahia e Amazonas (Abreu et al., 2010a; Almeida, 2007; Costa, 2008; Rezende et al., 2007). Os fungos originados do projeto de mestrado do presente autor (Abreu et al., 2010a) foram identificados pela sigla “fel” (fungos endófitos Lucas) seguida de um número identificador. Os demais isolados estudados foram identificados pela sigla ‘cml’ seguida do número identificador.

* Os fungos podem se reproduzir assexuadamente por esporos ou fragmentos de hifa (i.e. seu corpo celular), gerando populações clonais. Logo, a definição de indivíduo não se aplica muito bem a tais organismos. O termo **isolado** (ou cepa, termo mais utilizado para bactérias) é então usado para definir uma cultura pura de um fungo obtido de um determinado local em um dado momento (Kirk et al., 2008).

2.2.2 Solventes, ácidos orgânicos e substâncias puras

Todos os solventes orgânicos, de grau CLAE, e o ácido trifluoroacético usados foram da marca Merck (Darmstadt, DE). O ácido fórmico adicionado aos solventes e as alquilfenonas utilizadas como padrões para os cálculos dos índices de retenção dos metabólitos (Frisvad & Thrane 1987) – acetofenona, propiofenona, butirofenona, valerofenona, hexanofenona, octanofenona, decanofenona – foram obtidos do fabricante Sigma (Steinheim, DE). A água purificada foi obtida em aparelho Milli-Q (Millipore, Billerica, US).

2.2.3 Procedimentos experimentais gerais

2.2.3.1 Cultivo dos fungos

Os isolados foram inoculados como três pontos em placas de Petri de poliestireno com 9 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura adequado. As placas foram acondicionadas em embalagens plásticas micro-perfuradas (5 placas por embalagem) e incubadas em uma câmara de crescimento mantida a 23 °C, com fotoperíodo de 12 h gerado por luzes fluorescentes brancas (TLD, 36W/950, Philips, DK). Alternativamente (quando indicado no texto), as placas foram incubadas em uma câmara de crescimento mantida a 25 °C, sem iluminação.

2.2.3.2 Extração dos metabólitos secundários em micro-escala

Colônias com 21 d de crescimento foram extraídas de acordo com método de extração de metabólitos em micro-escala, descrito por Smedsgaard (1997), com algumas adaptações: de cada colônia foram retirados, com auxílio de um furador cilíndrico metálico, 8 fragmentos de 6 mm de diâmetro e transferidos para frascos de 2 mL com tampa de rosca (Supelco, Deisenhofen, DE) junto a 900 µL do solvente de extração AcOEt–DCM–MeOH 3: 2: 1, contendo 1% de ácido fórmico. As amostras foram submetidas à extração em banho de ultra-som (Branson 3210, Ultrasonics Corporation, Danbury, US) por 1 h e os extratos obtidos foram transferidos para novos frascos de 2 mL e secados em capela de exaustão. Os extratos secos foram dissolvidos em 500µL de MeOH, em banho de ultra-som por 15 min, e filtrados através de filtros de 0,45 µm (National Scientific; Rockwood, US) para novos frascos de 2 mL, os quais foram armazenados a -20 °C até o momento da análise por CLAE-DAD.

2.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

A análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em um cromatógrafo da linha HP-1100 (Agilent, Waldbronn, DE) equipado com amostrador automático (*autosampler*) e detector de arranjo de diodos (DAD), o qual coleta dois espectros por segundo na região do ultravioleta e visível, na faixa entre 200 e 600 nm. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Luna II C18 (100 mm x 2 mm de diâmetro interno; tamanho de partícula 3 µm; Phenomenex, Torrance, US) com uma coluna de guarda C18 (4 mm x 2 mm de diâmetro interno, Phenomenex). O volume de amostra injetado foi de 3 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. O sistema cromatográfico foi operado pelo

programa *Chemstation for LC 3D* (Agilent Technologies, 2004). Métodos de eluição usados:

Método 1 (CH₃CN) – A fase móvel consistiu-se de uma mistura de H₂O e acetonitrila (CH₃CN), ambos contendo 50 ppm de ácido trifluoroacético. O gradiente linear de eluição usado foi: H₂O–CH₃CN 85: 15 a 0: 100 em 20 min, com mais 5 min mantidos na última concentração. O gradiente foi retornado ao valor inicial em 3 min e mantido por mais 5 min, para o equilíbrio do sistema, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do eluente foi de 0,4 mL/min. Os cromatogramas foram obtidos em dois comprimentos de onda, 210 e 280 nm. Uma série homóloga de alquilfenonas – acetofenona, propiofenona, butirofenona, valerofenona, hexanofenona, octanofenona, decanofenona – foi analisada inicialmente e empregada como referência externa de tempos de retenção para o cálculo do Índice de Retenção (RI) dos metabólitos detectados, através da seguinte fórmula (Frisvad & Thrane 1987):

$$RI = \frac{(T_{sm} - T_{p1}) \cdot \Delta z \cdot 100}{T_{p2} - T_{p1}} + z \cdot 100$$

Na qual T_{sm} é o tempo de retenção do metabólito detectado; T_{p1} é o tempo de retenção da alquilfenona que elui antes do metabólito; T_{p2} é o tempo de retenção da alquilfenona que elui depois do metabólito; z é o número de átomos de carbono da alquilfenona que elui antes do metabólito; e Δz é a diferença de números de átomos de carbono entre as alquilfenonas que eluem antes e depois do metabólito.

Método 2 (MeOH) – Na falta de CH₃CN, como ocorrido no primeiro semestre de 2009, esta foi substituída por MeOH nas análises por CLAE-DAD. O gradiente de eluição foi modificado, visto que o MeOH é mais polar do que a CH₃CN (Lloyd et al., 1988): H₂O–MeOH 85: 15 a 0: 100 em 15 min, mais 10 min nessa última concentração. O fluxo de eluição também foi alterado para 0,35 mL/min e os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm. As demais condições cromatográficas permaneceram inalteradas.

2.2.3.4 CLAE-DAD acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)

As análises por CLAE-DAD-EM foram realizadas em um cromatógrafo da linha HP-1100 (Agilent), equipado com amostrador automático e detector com arranjo de diodos (DAD), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com analisador de massas por tempo de voo (TOF) LCT (Micromass, Manchester, UK), contendo uma fonte de ionização a pressão atmosférica do tipo *electrospray* (ESI), com câmara de ionização em z (*Z-spray*) e uma sonda para aspersão de uma solução padrão

(*lockspray*). Uma coluna Luna II C18 (100 x 2 mm; 3 μ m; Phenomenex) foi usada nas separações cromatográficas e mantida à temperatura de 40° C. O sistema foi operado pelo programa *Masslynx* 4.1 (Waters Inc., 2005).

Foram injetados 3 μ L de cada amostra e o gradiente linear de eluição usado foi: H₂O–CH₃CN (ou, na falta desse, MeOH) 85: 15 a 0: 100 em 20 min, com mais 5 min nessa última concentração. O gradiente foi retornado ao valor inicial em 3 min e mantido por mais 5 min, para o equilíbrio do sistema antes da injeção da próxima amostra. O fluxo de eluição foi mantido a 0,30 mL/min e aos eluentes foram adicionados 20 mM de ácido fórmico.

Todas as análises foram realizadas com o espectrômetro de massas operando no modo positivo. O capilar da câmara de ionização foi mantido a 3000 V e o primeiro e segundo cones (*skimmers*) mantidos a 25 e 5 V, respectivamente. A temperatura de desolvatação foi de 400 °C e a fonte foi mantida a 120 °C. A sonda *lockspray* foi operada com cone a 25 V, borrifando uma solução de 0,2 μ g/mL de leucina-encefalina em CH₃CN–H₂O–HCOOH (50:50:1) sob um fluxo de 4 μ L/min. O íon em $m/z = 556,2771$ [M+H]⁺ da solução de leucina-encefalina foi usado como padrão de massa (*lockmass*). Os espectros de massa foram coletados como centróides, de $m/z = 100$ a 900, com tempo de coleta de dados (*scan*) de 1s e intervalo entre coleta de dados de 0,1 s. A cada três coletas de dados era feita uma leitura da solução de referência originada da sonda *lockspray* (Nielsen & Smedsgaard, 2003; Wolff et al., 2001).

2.2.4 Experimento 1: escolha do meio de cultura mais adequado à produção de metabólitos secundários

Um primeiro experimento foi realizado visando à escolha do meio de cultura mais adequado para a indução da produção de metabólitos secundários pelos fungos. Para tal, seis isolados de *Phomopsis* (códigos: cml 1503, cml 1538, fel 97, fel 104, fel 180 e fel 358) e um isolado de *Cytospora* (fel 302) foram escolhidos e cultivados em 11 meios de cultura, descritos a seguir*:

CYA (*Czapek yeast extract agar*) – caldo Czapek (35 g, Difco, Detroit, US), extrato de levedura (5 g, Biokar Diagnostics, Beuvais, Fr); **CYAS** (*Czapek yeast extract agar salt*) – meio CYA com a adição de NaCl (50 g, JT Baker, Deventer, NL); **DG18** (*Dichloran glycerol 18 % agar*) – ágar Dichloran glicerol (25,8 g, Oxoid, Basingstoke, UK), glicerol anidro (180,2 g, JT Baker), H₂O (0,82 L); **DRYES** (*Dichloran rose bengal yeast extract sucrose agar*) – extrato de levedura (20 g), sacarose (150 g), MgSO₄ · 7 H₂O (0,5 g, Merck), rosa de bengala (0,025 g, Merck), dichloran (0,002 g, Fluka Chemie, Buchs,

CH), cloranfenicol (0,05 g, Sigma), H₂O (0,9 L); **MEA** (*Malt extract agar*) – extrato de malte (20 g, Difco), peptona (1 g, Difco), glicose (20 g, BHD), ágar (20 g); **OAT** (*Oatmeal agar*) – farelo de aveia (30 g); **PCA** (*Potato carrot agar*) – batatas (10 g), cenouras(10 g); **PDA** (*Potato dextrose agar*) – PDA (39 g, Difco); **V8** (*V8 juice agar*) – suco V8 (175 mL, Campbell, US), CaCO₃ (3 g, Merck), ágar (20 g), H₂O (0,83 L); **YES** (*Yeast extract sucrose agar*) – extrato de levedura (20 g), sacarose (150 g), MgSO₄ · 7 H₂O (0,5 g), H₂O (0,88 L); **YES-OAT** – meio YES combinado com meio OAT. A todos os meios foi acrescido 1 mL de uma solução concentrada de sais: KCl (0,5 g/L, Merck), CuSO₄.5H₂O (0,005 g/L, Merck), FeSO₄.7H₂O (0,01 g/L, Merck), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0,01 g/L, Merck).

*Onde não são indicadas as quantidades de H₂O destilada e de ágar utilizados na preparação dos meios de cultura, consideram-se as quantidades padrão de 1 L de H₂O destilada e 15 g de ágar (Bie & Berntsen, Herlev, DK).

Após o cultivo por 21 d, extração dos metabólitos em micro-escala e análise por CLAE-DAD utilizando o método 1 (CH₃CN) de eluição, os cromatogramas foram impressos e avaliados visualmente, para a definição de qual ou quais meios de cultura induziram a produção do maior número de metabólitos (i.e. n° de picos no cromatograma) pelos isolados testados.

2.2.5 Experimento 2: Perfilamento de metabólitos secundários e desreplicação dos extratos brutos produzidos pelos fungos cultivados em meio MEA e agrupamento dos isolados em quimiotipos

Todos os 56 isolados foram cultivados em meio MEA, submetidos à extração em micro-escala de metabólitos e seus extratos foram avaliados por CLAE-DAD, utilizando o método 1 (CH₃CN) de eluição. Os cromatogramas e os espectros de absorção no UV das substâncias detectadas foram impressos e comparados visualmente, para o agrupamento inicial dos isolados com base em seus perfis de metabólitos, separando-os em quimiotipos diferentes. Os metabólitos (i.e. picos nos cromatogramas) foram caracterizados pelos seus índices de retenção (RI) e espectros de absorção na região do UV e avaliados visualmente, com o auxílio dos professores Jens Christian Frisvad e Birgitte Andersen, na tentativa de se fazer a desreplicação, com a identificação preliminar de metabólitos já conhecidos por meio de seus cromóforos (Frisvad & Thrane, 1987; Nielsen & Smedsgaard, 2003).

Extratos representativos de cada quimiotipo reconhecido na análise inicial dos cromatogramas foram submetidos à análise por CLAE-DAD-EM e posterior

desreplicação. Os dados de absorção na região do UV e de massa de alta resolução dos metabólitos majoritários de cada quimiotipo foram comparados com as informações contidas no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), o qual contém 34393 substâncias catalogadas, e na base de dados própria do Centro de Biotecnologia Microbiana da DTU (CMB) (799 substâncias, parte delas descritas em Nielsen & Smedsgaard, 2003).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Escolha do meio de cultura apropriado

Dentre os onze meios de cultura investigados, quatro – DRYES, MEA, YES e YES-OAT – induziram a uma produção média superior a 15 metabólitos pelos sete isolados testados (**Tabela 2.1**, pag. 36). Somente o isolado cml 1503 foi capaz de produzir mais de 10 metabólitos nos meios de cultura CYAS (14 metabólitos), DG18 (32) e PDA (20). O isolado Fel 358 produziu quantidades reduzidas de metabólitos (≤ 11) em todos os meios de cultura.

Os dois melhores meios de cultura, DRYES e MEA, permitiram uma produção média em torno de 28 metabólitos, porém, a produção foi mais homogênea (i.e. menor desvio padrão) no meio MEA. O meio DRYES contém em sua formulação dois inibidores do crescimento de fungos, o dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) e o rosa de bengala (4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína) (King Jr. et al., 1979) e é usado para a avaliação da produção de metabólitos em estudos quimiotaxonômicos de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Phoma* e *Ulocladium* (Andersen et al., 2002, 2008, 2009; Andersen & Hollensted, 2008; Sørensen et al., 2010). O crescimento dos fungos no meio DRYES foi lento quando comparado com aquele em MEA (dados não mostrados). Meios de cultura à base de extrato de malte foram usados nos processos de isolamento, identificação e preservação inicial dos fungos (Abreu et al., 2010a; Almeida, 2007; Costa, 2008) e como a produção de metabólitos no meio MEA foi satisfatória, esse foi escolhido como padrão para a realização dos experimentos posteriores.

O meio de cultura YES induziu a uma produção média em torno de 25 metabólitos e a adição de aveia à sua composição, meio YES-OAT, não provocou alterações significativas no número de metabólitos detectados. Junto ao meio CYA, o meio YES é usado como padrão no perfilamento de metabólitos secundários de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Frisvad et al., 2005; Samson et al., 2004). O meio de cultura PDA ou sua versão líquida, PDB (*Potato dextrose broth*), é

um meio micológico clássico muito utilizado para o cultivo de fungos visando ao isolamento de metabólitos secundários (Gunatilaka, 2006), inclusive em estudos com fungos endófitos dos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora* (Brady et al., 2000 a, b; Wagenaar & Clardy, 2001; Weber et al., 2004; Yu et al., 2008). A produção de metabólitos pelos fungos testados não foi satisfatória no meio PDA, com exceção do isolado cml 1533, indicando que talvez este não seja o meio de cultura 'geral' mais apropriado para o cultivo *Phomopsis* e *Cytospora* visando à extração de metabólitos secundários.

Tabela 2.1: Número de metabólitos detectados por CLAE-DAD nos extratos brutos de sete fungos cultivados em onze meios de cultura diferentes

Meios de cultura	Fungos							Média	Desvio Padrão
	fel 97	fel 104	fel 180	fel 302	fel 358	cml 1503	cml 1538		
CYA	3	5	2	2	3	5	2	3,14	1,35
CYAS	8	2	2	3	4	14	3	5,14	4,41
DG18	6	10	7	8	8	32	9	11,43	9,16
DRYES	44	60	22	24	4	18	23	27,86	18,41
MEA	35	32	29	38	3	26	27	27,14	11,48
OAT	7	3	6	3	3	5	3	4,29	1,70
PCA	3	4	4	1	1	1	6	2,86	1,95
PDA	4	2	2	2	2	20	3	5,00	6,66
V8	3	3	4	2	3	5	3	3,29	0,95
YES	26	34	13	64	10	16	10	24,71	19,48
YES-OAT	25	28	19	58	11	13	18	24,57	15,93

2.3.2 Definição dos quimiotipos e desreplicação dos metabólitos majoritários

Os perfis obtidos pela análise por CLAE-DAD, a partir dos extratos brutos dos 56 isolados cultivados em meio MEA, foram agrupados visualmente em cinco quimiotipos, sendo quatro grupos distintos de isolados de *Phomopsis* e um quimiotipo contendo os isolados do gênero *Cytospora*. Cinco isolados apresentaram perfis distintos e não foram agrupados em quimiotipos. Quatorze isolados de *Phomopsis* não produziram quantidades detectáveis de metabólitos nas condições testadas. O experimento foi repetido com esses isolados em cultivo a 23 °C com fotoperíodo e a 25 °C no escuro, porém, os resultados foram semelhantes. Tais fungos foram, então, deixados de lado e não inseridos nos estudos quimiotaxonômicos posteriores (**Cap. 4**).

Quimiotipo 1 (*Phomopsis* 1) – Dez isolados apresentaram perfis semelhantes de metabólitos secundários e foram agrupados no primeiro quimiotipo, cml 871, cml 1316, cml 1501, cml 1506, cml 1527, fel 89, fel 97, fel 104, fel 180 e fel 352. Todos os isolados deste grupo produziram o metabólito com índice de retenção (RI) 851 (RT 8,7 min, **Fig. 2.1**). Outros metabólitos majoritários comuns foram RI 815 (RT 7,9 min), RI 831 (RT 8,2 min), RI 837 (RT 8,4 min) e RI 1000 (RT 11,8 min).

Os metabólitos RI 815 e RI 851 foram reconhecidos pelos seus índices de retenção e espectros de absorção na região do UV (**Fig. 2.2 a, b**, pag. 38) como sendo as substâncias altenusina (**01**) e alternariol (**02**) (Andersen et al., 2002; Nielsen & Smedsgaard, 2003). Outros dois metabólitos minoritários, RI 796 (RT 7,39 min) e RI 992 (RT 11,65 min), foram identificados como altenueno (**03**) e alternariol monometil éter (AME, **04**). Os dados de espectrometria de massas de alta resolução permitiram a confirmação da fórmula molecular dos metabólitos identificados (**Tabela 2.2**, pag. 39). O metabólito RI 777 (RT 6,9 min) apresentou espectro de absorção no UV muito semelhante àquele do altenueno, além da mesma fórmula molecular, $C_{15}H_{16}O_6$. Esse foi identificado, por tentativa, como 4'-epialtenueno (**05**), isolado por Aly et al. (2008) de um fungo endófito do gênero *Alternaria*.

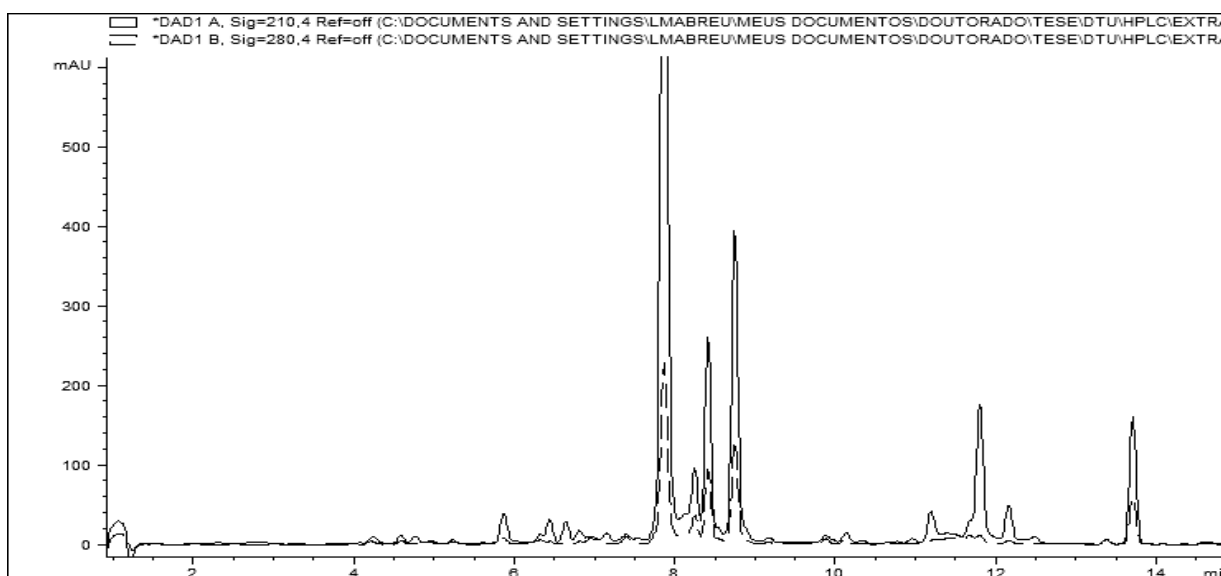


Figura 2.1: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado fel 89 representando o quimiotipo *Phomopsis* 1

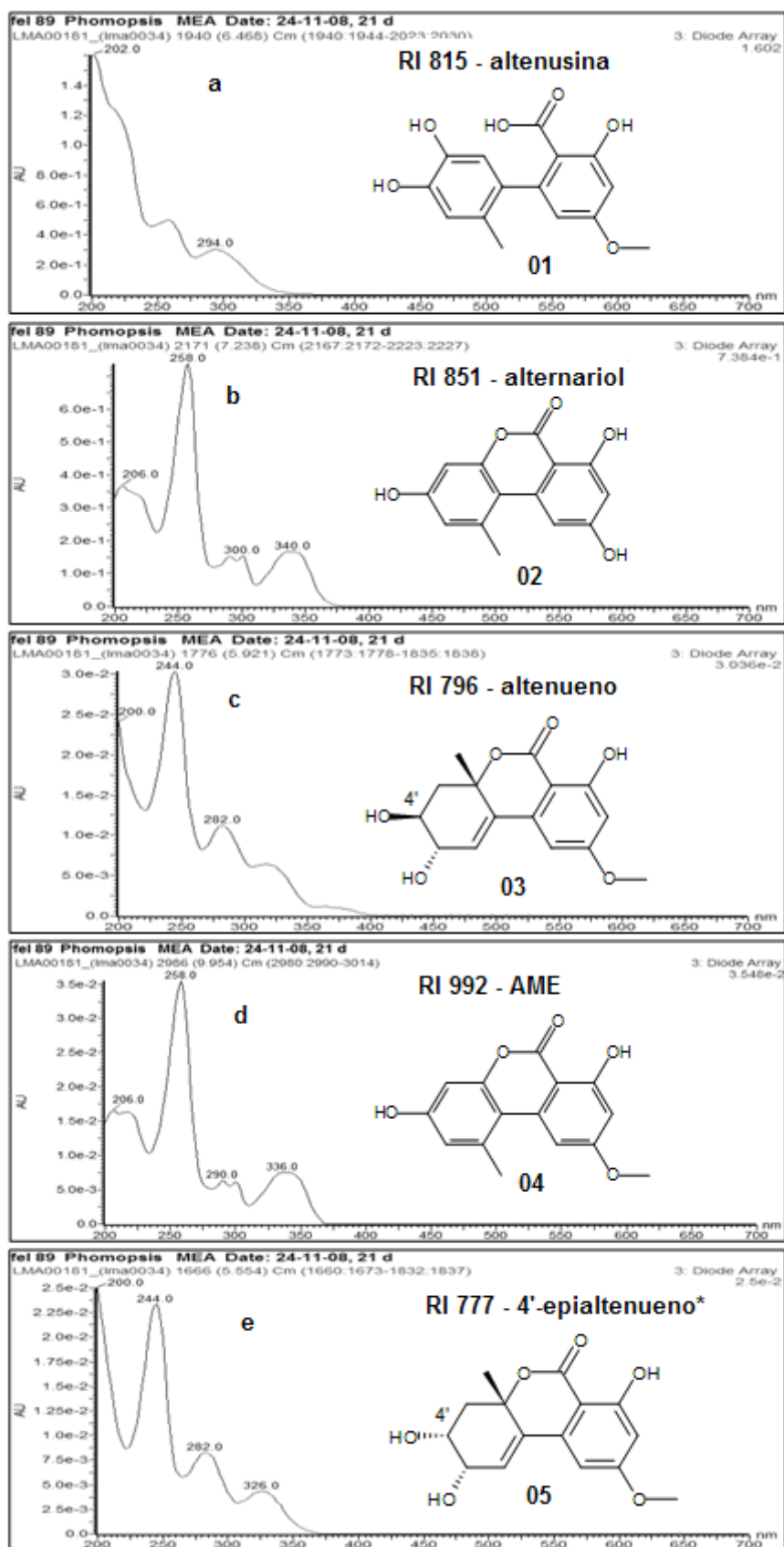


Figura 2.2: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos identificados, comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 1: **a** - altenusina (**01**), **b** - alternariol (**02**), **c** - altenueno (**03**), **d** - AME (**04**), **e** - 4'-epialtenueno (**05**) (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA). * metabólito identificado por tentativa

Tabela 2.2: Dados de espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF, modo positivo) dos metabólitos altenusina (**01**), alternariol (**02**), altenueno (**03**), AME (**04**) e 4'-epialtenueno (**05**)

Metabólito	RI	Fórmula molecular	[M+H] ⁺ calculado	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+CH ₃ CN+H] ⁺	[2M+NH ₄] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺
altenusina	815	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,0869	291,0880	308,1		332,1	598,2	273,1
alternariol	851	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	259,0606	259,0605			300,1	534,1	
altenueno	796	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	293,1025	293,1028			334,1		
AME	992	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,0763	273,0762		295,2	314,1	562,2	
4'-epialtenueno	777	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	293,1025	293,1002			334,1		

Os metabólitos **01** a **04** são comumente produzidos por espécies do gênero *Alternaria*, as quais ocorrem como contaminantes de grãos, frutas e hortaliças, causando doenças no campo ou infestações durante a pós-colheita (Andersen et al., 2002). Alternariol (**02**) e AME (**04**) são considerados micotoxinas, embora não produzam efeitos tóxicos agudos quando ingeridos. Esses dois metabólitos são capazes de induzir alterações na estrutura do DNA e podem estar ligados à ocorrência de câncer de esôfago em populações que se alimentam de produtos com altos índices de infestações por *Alternaria* (Ostry, 2008). A síntese de progesterona por células ovarianas de suínos foi inibida na presença de **2** e **4** *in vitro*, indicando que essas micotoxinas talvez influenciem negativamente na reprodução de suínos ou até outros mamíferos (Tieman et al., 2009). A altenusina (**01**), obtida de um isolado de *Alternaria* endófito da planta *Trixis vauthieri* no Brasil, exibiu efeito inibidor sobre a atividade da enzima tripanotiona redutase, a qual é essencial para a sobrevivência de protozoários dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, causadores de doenças infecciosas e de difícil tratamento em várias regiões do mundo (Cota et al., 2008).

Alternariol (**02**), AME (**04**) e o alternariol dimetil éter foram isolados de um fungo endófito do gênero *Phomopsis*, obtido da planta halotolerante *Melilotus dentata* na Alemanha (Dai et al. 2005b). Outro isolado de *Phomopsis*, obtido como endófito da planta halotolerante *Adenocarpus foliolosus*, também na Alemanha, mostrou-se capaz de produzir alternariol *in vitro* (Dai et al. 2005a).

Quimiotipo 2 (*Phomopsis* 2) – Todos os sete isolados agrupados no quimiotipo 2, cml 1500, cml 1502, cml 1503, cml 1507, fel 105, fel 355 e fel 357, produziram alternariol (**02**, RI 851, RT 8,7 min.) como metabólito majoritário (**Fig. 2.3**, pag. 40), além de vários outros prováveis análogos contendo espectros de absorção na região

do UV semelhantes a **02** (**Fig. 2.4 a - e**, pag. 41). Em nenhum isolado do quimiotipo 2 foram detectados os metabólitos altenusina, altenueno, AME, RI 831, RI 837 e RI 1000, característicos do quimiotipo 1.

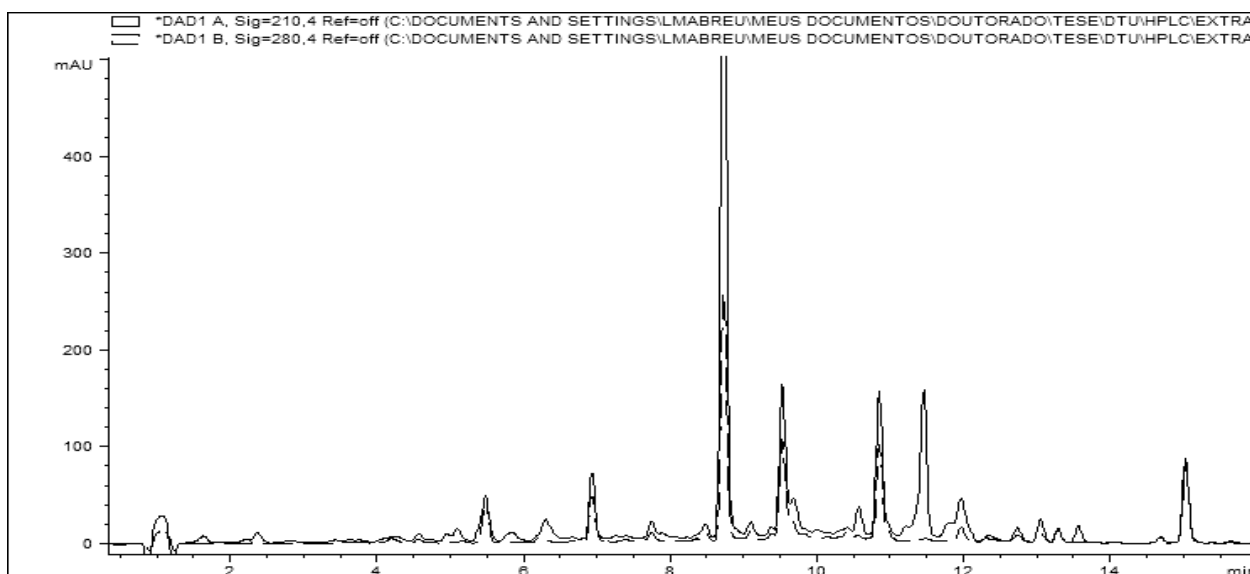
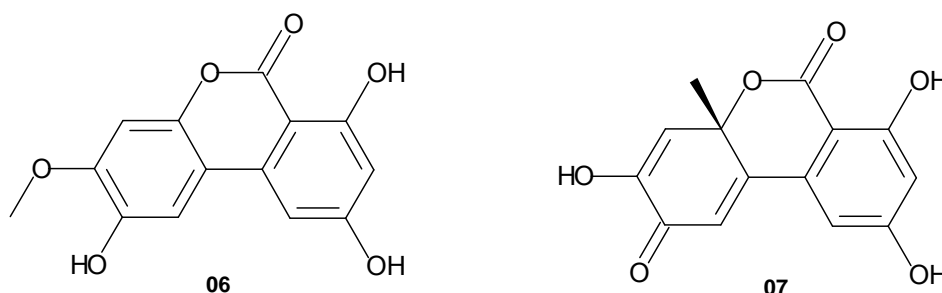


Figura 2.3: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado fel 355 representando o quimiotipo *Phomopsis* 2

O metabólito RI 811 (RT 7,8 min, **Fig. 2.3**) foi produzido por todos os isolados do quimiotipo 2 e sua fórmula molecular foi determinada como $C_{14}H_{10}O_6$ por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{14}H_{11}O_6 = 275,0556$ $[M+H]^+$; m/z encontrado = 275,0555; adutos: 316,1 $[M+CH_3CN+H]^+$, 549,1 $[2M+H]^+$, 566,1 $[2M+NH_4]^+$). A busca por metabólitos com a mesma fórmula molecular de RI 811 no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008) resultou em 13 substâncias, dentre as quais os análogos do alternariol altenuisol (**06**) e desmetilidroaltenusina (**07**). Na ausência de mais evidências, a identidade de RI 811 não pode ser determinada.



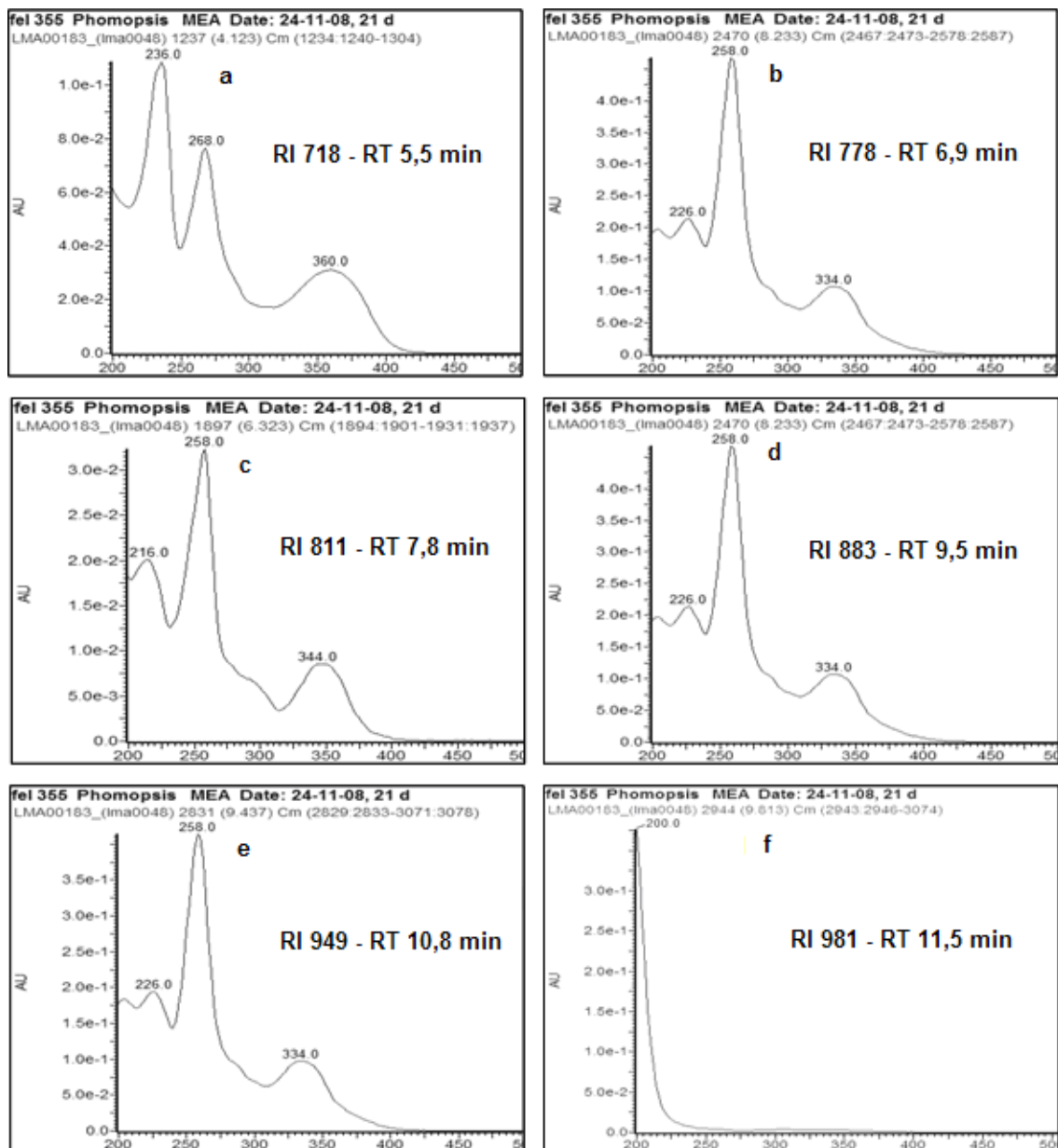


Figura 2.4: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 2: **a** - RI718, **b** - RI 778, **c** - RI 811, **d** - RI 883, **e** - RI 949, **f** - RI 981. (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Quimiotipo 3 (*Phomopsis* 3) – Os perfis de metabólitos secundários produzidos pelos sete isolados agrupados no quimiotipo 3, cml 1538, cml 1541, fel 101, fel 358, fel 360, fel 364 e fel 365, foram caracterizados pela presença de substâncias polares com tempo de retenção inferior a 5 min, RI 566 (RT 1,8 min, **Fig. 2.5**, pag. 42), RI 588 (RT 2,3 min), RI 611 (RT 2,9 min) e RI 625 (RT 3,2 min); além de outros quatro metabólitos mais apolares, RI 744 (RT 6,1 min), RI 772 (RT 6,8 min), RI 792 (RT 7,3 min) e RI 863 (RT 9,0 min).

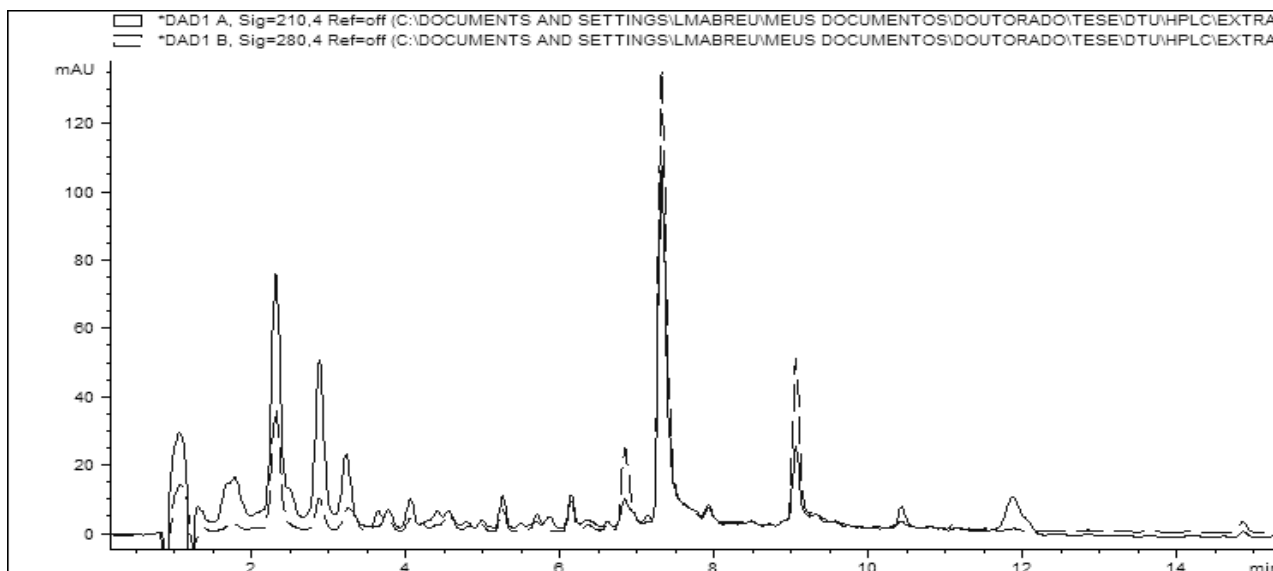


Figura 2.5: Perfil químico obtido por CLAE-DAD do extrato do isolado fel 364 representando o quimiótipo *Phomopsis* 3

Os metabólitos RI 566 e RI 588 foram reconhecidos, através da análise de seus espectros de absorção no UV (**Fig. 2.6 a, b**, pag. 43), como sendo os ‘fenóis de Raistrick’ ácido 2,4-dihidroxi-6-(2-oxopropil) benzóico (**08**) e ácido 2,4-dihidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil) benzóico (**09**) (Andersen, 1991) e tiveram suas fórmulas moleculares confirmadas por espectrometria de massas de alta resolução (**Tabela 2.3**, pag. 44). Os metabólitos **08** e **09** são produzidos por espécies pertencentes a gêneros diversos como *Penicillium brevicompactum*, *Alternaria kikuchiana*, *Pyricularia oryzae* e *Ophiostoma ulmi*, sendo as duas últimas espécies importantes patógenos do arroz (brusone do arroz) e do olmo (doença do olmo holandês) (Agris, 2005, Laatsch, 2008). Em testes realizados *in vitro* com folhas e ramos de olmo, **08** e **09** foram capazes de causar lesões e necrose de tecidos, porém, esses sintomas não foram reproduzidos em mudas saudáveis, o que não permitiu confirmar a hipótese de que esses metabólitos fossem fatores de virulência do patógeno *Ophiostoma ulmi* (Claydon et al., 1980).

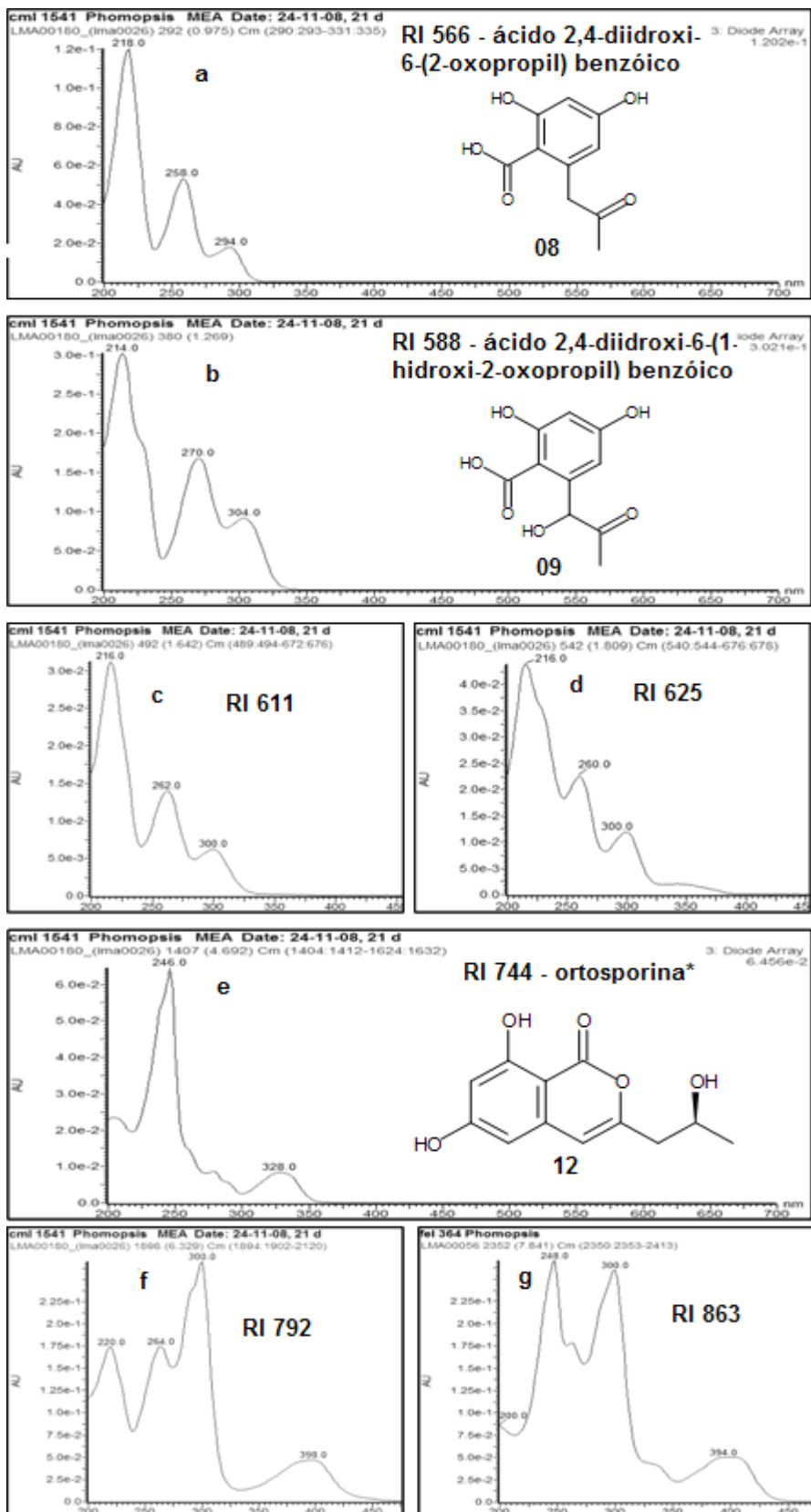


Figura 2.6: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 3: **a** - ácido 2,4-diidroxí-6-(2-oxopropil) benzóico (**08**), **b** - ácido 2,4-diidroxí-6-(1-hidroxí-2-oxopropil) benzóico (**09**), **c** - RI 611, **d** - RI 625, **e** - ortosporina (**12**), **f** - RI 792, **g** - RI 863 (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA). * metabólito identificado por tentativa

O espectro de absorção na região do UV de RI 744 (**Fig. 2.6 e**, pag. 43) foi reconhecido como semelhante àquele exibido por isocumarinas como citreoisocumarina (**10**) e diportina (**11**) (Larsen & Breinholt, 1999; Sørensen et al., 2010). A fórmula molecular de RI 744 foi determinada como C₁₂H₁₂O₅ (**Tabela 2.3**), contendo um carbono e dois hidrogênios a menos do que o metabólito diportina. Uma busca no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008) resultou em 18 substâncias com a fórmula molecular C₁₂H₁₂O₅, dentre as quais a ortosporina ou de-O-metildiportina (**12**). Essas evidências permitiram a identificação, por tentativa, de RI 744 como sendo **12**, a qual é considerada fitotóxica, capaz de causar lesões e necroses em folhas de plantas de aveia, milho, soja e ervas daninhas (Harris & Mantle, 2001). Como todos os fungos aqui estudados foram isolados de plantas aparentemente saudáveis (i.e. endófitos) e não foram submetidos a testes de patogenicidade, a hipótese de que a produção dos metabólitos fitotóxicos **08**, **09** e **12** pelos fungos do quimiotipo 3 possa estar relacionada à capacidade desses em causar doenças em seus hospedeiros não pode ser confirmada ou descartada.

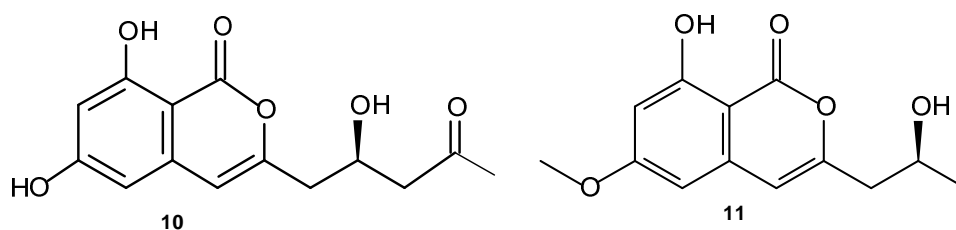


Tabela 2.3: Dados de espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF, modo positivo) dos metabólitos ácido 2,4-diidroxi-6-(2-oxopropil) benzóico (**08**), ácido 2,4-diidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil) benzóico (**09**) e ortosporina (**12**)

Metabólito	RI	Fórmula molecular	[M+H] ⁺ calculado	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+CH ₃ CN+H] ⁺	[2M+NH ₄] ⁺	[2M+Na] ⁺
ácido 2,4-diidroxi-6-(2-oxopropil) benzóico	566	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	211,0606	211,0610	228,1	252,1	438,1	443,1
ácido 2,4-diidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil) benzóico	588	C ₁₀ H ₁₀ O ₆	227,0556	227,0549	244,1	268,1	470,1	475,1
ortosporina	744	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	237,0763	237,0784	254,1			

Quimiotipo 4 (*Phomopsis* 4) – Cinco isolados produziram uma pequena quantidade de metabólitos em seus perfis e foram agrupados no quimiotipo 4, cml 1481, cml 1520, cml 1521, cml 1529 e cml 1530. Todos os isolados desse grupo produziram o

metabólito RI 1143 (RT 14 min, **Fig. 2.7**) como majoritário. Quatro isolados desse quimiotipo produziram os metabólitos RI 623 (RT 3,1 min) e RI 635 (RT 3,4 min), os quais exibiram o mesmo espectro de absorção no UV (**Fig. 2.8 a**, pag. 46). O metabólito RI 749 (RT 6,2 min) foi detectado nos perfis de três isolados.

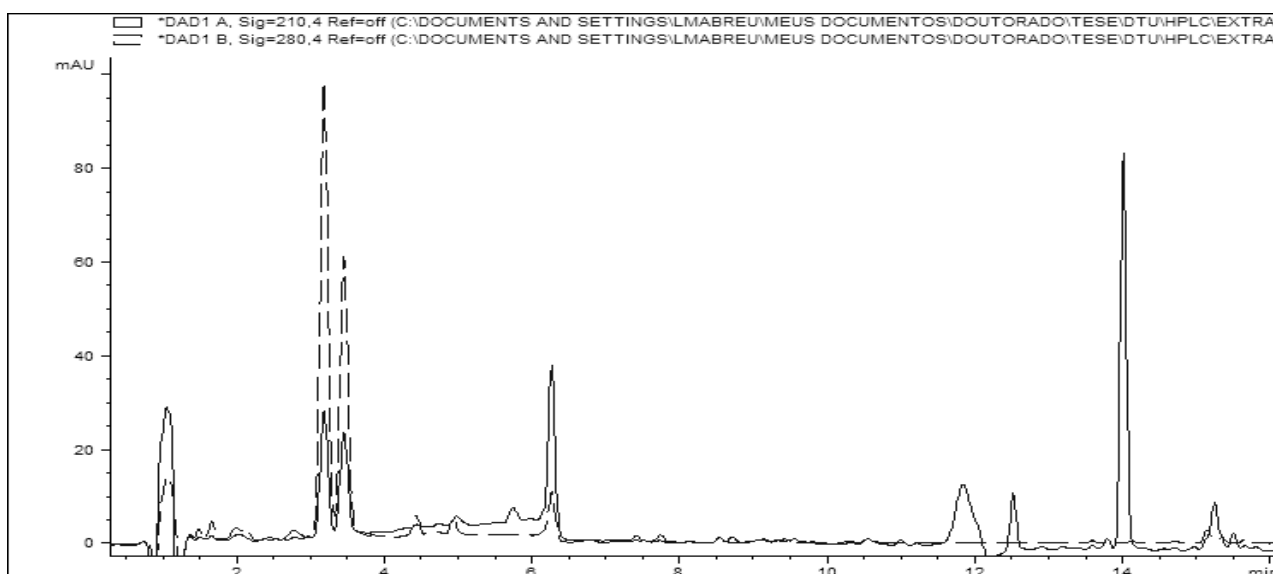


Figura 2.7: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado cml1530 representando o quimiotipo *Phomopsis* 4

A fórmula molecular de RI 1143 foi determinada como $C_{22}H_{36}O_7$ por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{22}H_{37}O_7 = 413,2539$ $[M+H]^+$; m/z encontrado = 413,2529; adutos: 430,3 $[M+NH_4]^+$, 842,5 $[2M+NH_4]^+$). O metabólito fomol (**13**), obtido de um fungo do gênero *Phomopsis*, endófito da planta medicinal *Erithrina crista-galli* na Argentina (Weber et al., 2004), foi o único encontrado no banco de dados Antibase (Laatsch, 2008) contendo a mesma fórmula molecular de RI 1143. O espectro de absorção no UV de RI 1143 exibiu apenas um máximo em 222 nm (**Fig. 2.8 c**, pag. 46), resultado condizente com a presença de um éster α,β insaturado contendo um grupo alquila ligado ao carbono α (λ_{max} calculado = 217 nm, Pavia et al., 2001). Essas evidências permitiram a identificação, por tentativa, de RI 1143 como sendo o metabólito fomol (**13**). Em ensaios realizados *in vitro* e *in vivo* com ratos, **13** demonstrou reduzida atividade citotóxica, além de ação antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica (Weber et al., 2004).

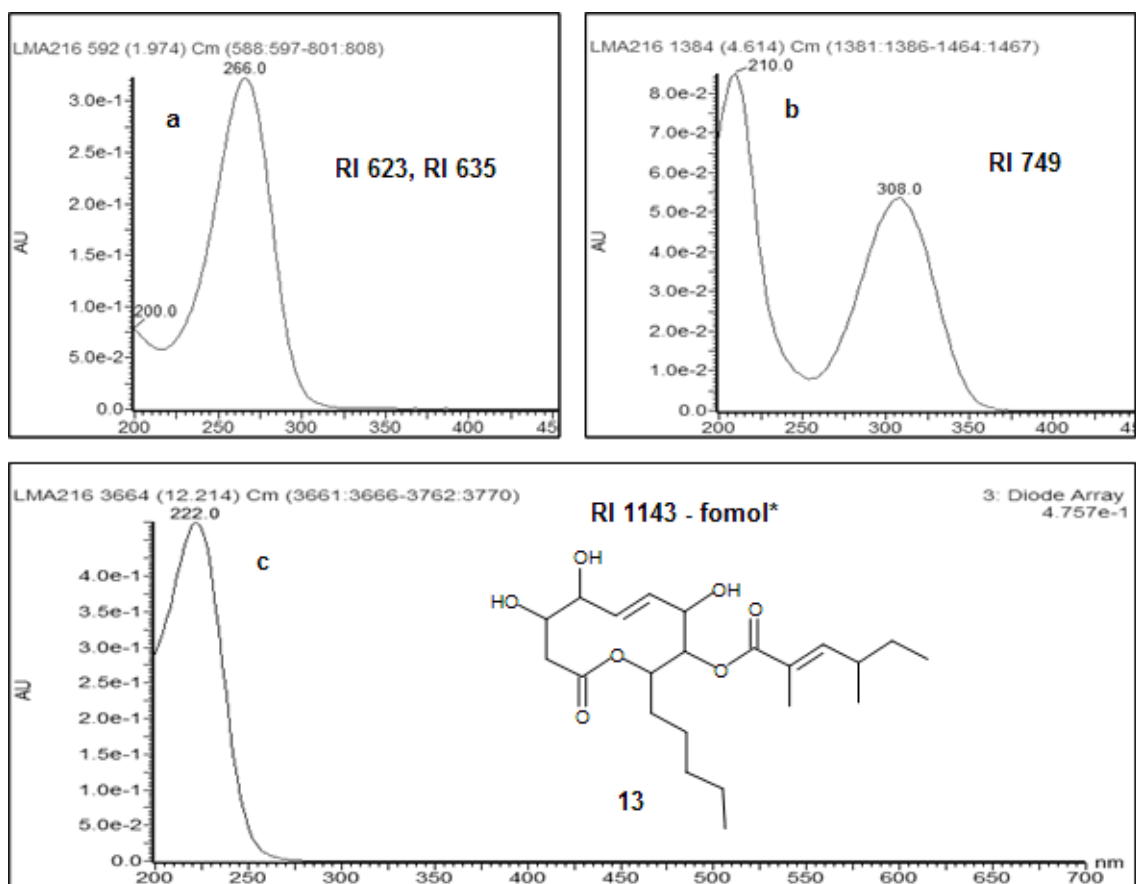


Figura 2.8: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos comumente produzidos pelos isolados do quimiotipo 4: **a** - RI 623 e RI 635, **b** - RI 749, **c** - fomol (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA). * metabólito identificado por tentativa

Isolados de *Phomopsis* não agrupados em quimiotipos

Isolado cml 1315 – o perfil de metabólitos secundários desse fungo apresentou um metabólito majoritário, RI 1244 (RT 15,4 min, **Fig. 2.9**, pag. 47). O espectro de absorção na região do UV de RI 1244 (**Fig. 2.10 a**, pag. 48) foi reconhecido como semelhante àqueles exibidos pelos metabólitos conhecidos como ácidos secalônicos, em especial o ácido secalônico D (**14**) (Nielsen & Smedsgaard, 2003). A fórmula molecular determinada para esse metabólito foi C₃₆H₃₆O₁₅ (m/z calculado para C₃₆H₃₇O₁₅ = 709,2132 [M+H]⁺; m/z encontrado = 709,2138; adutos: 726,2 [M+NH₄]⁺, 731,2 [M+Na]⁺). Apenas um metabólito com esta fórmula molecular foi encontrado no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), o dicerandrol B (**15**), isolado do fungo *Phomopsis longicolla*, endófito da espécie de menta silvestre *Dicerandra frutescens* nos EUA (Wagenaar et al., 2001). Dois outros metabólitos minoritários, RI 1137 (RT 13,9 min) e RI 1349 (RT 16,71 min), exibiram espectros de absorção no UV semelhantes ao de RI 1244 (**Fig. 2.10 b, c**, pag. 48). A análise do espectro de massas permitiu a definição da fórmula molecular de RI 1137 como C₃₄H₃₄O₁₄ (m/z calculado para C₃₄H₃₅O₁₄ = 667,2027 [M+H]⁺; m/z encontrado = 667,2024), idêntica àquela do

metabólito dicerandrol A (**16**). A fórmula molecular $C_{38}H_{38}O_{16}$ foi obtida para RI 1349 (m/z calculado para $C_{38}H_{39}O_{16} = 751,2238 [M+H]^+$; m/z encontrado = 751,2226; adutos 768,3 $[M+NH_4]^+$, 773,2 $[M+Na]^+$), sendo esta idêntica àquela do metabólito dicerandrol C (**17**). Esses resultados permitiram a identificação, por tentativa, dos metabólitos RI 1244, RI 1137 e RI 1349 como sendo os dicerandróis B (**15**), A (**16**) e C (**17**), respectivamente.

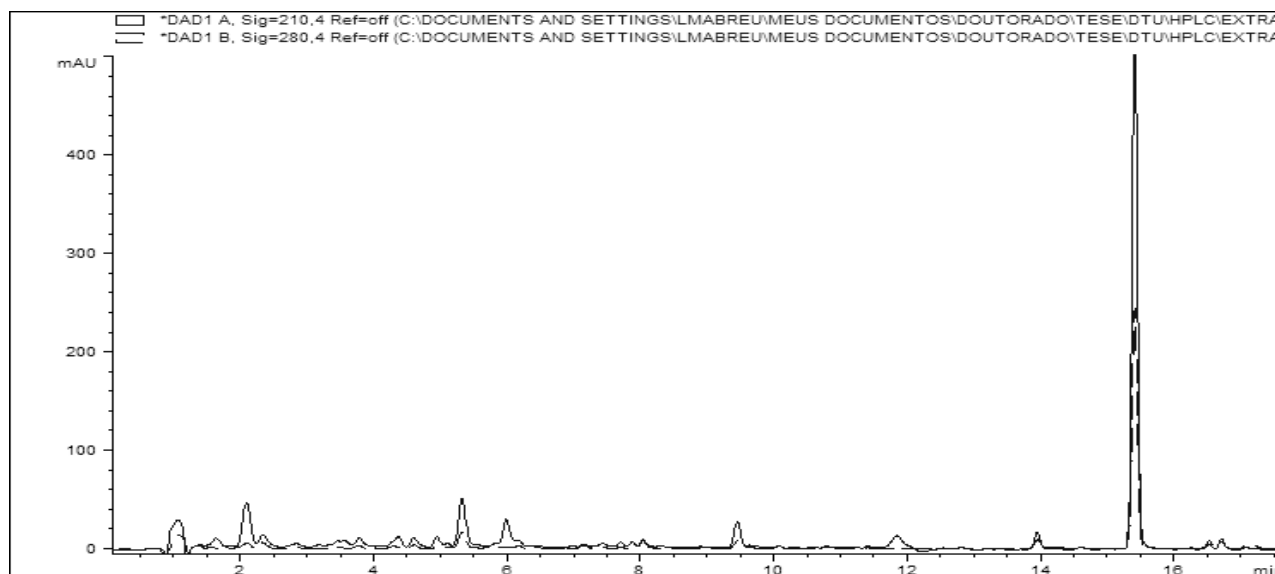
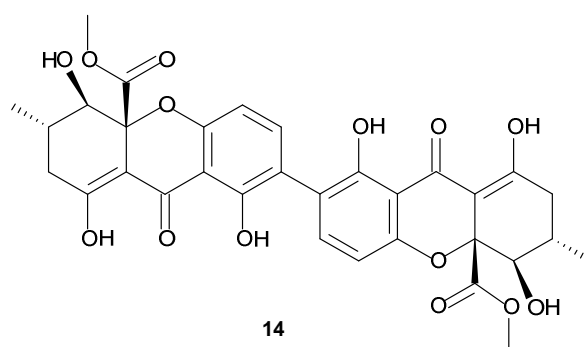


Figura 2.9: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado cml 1315

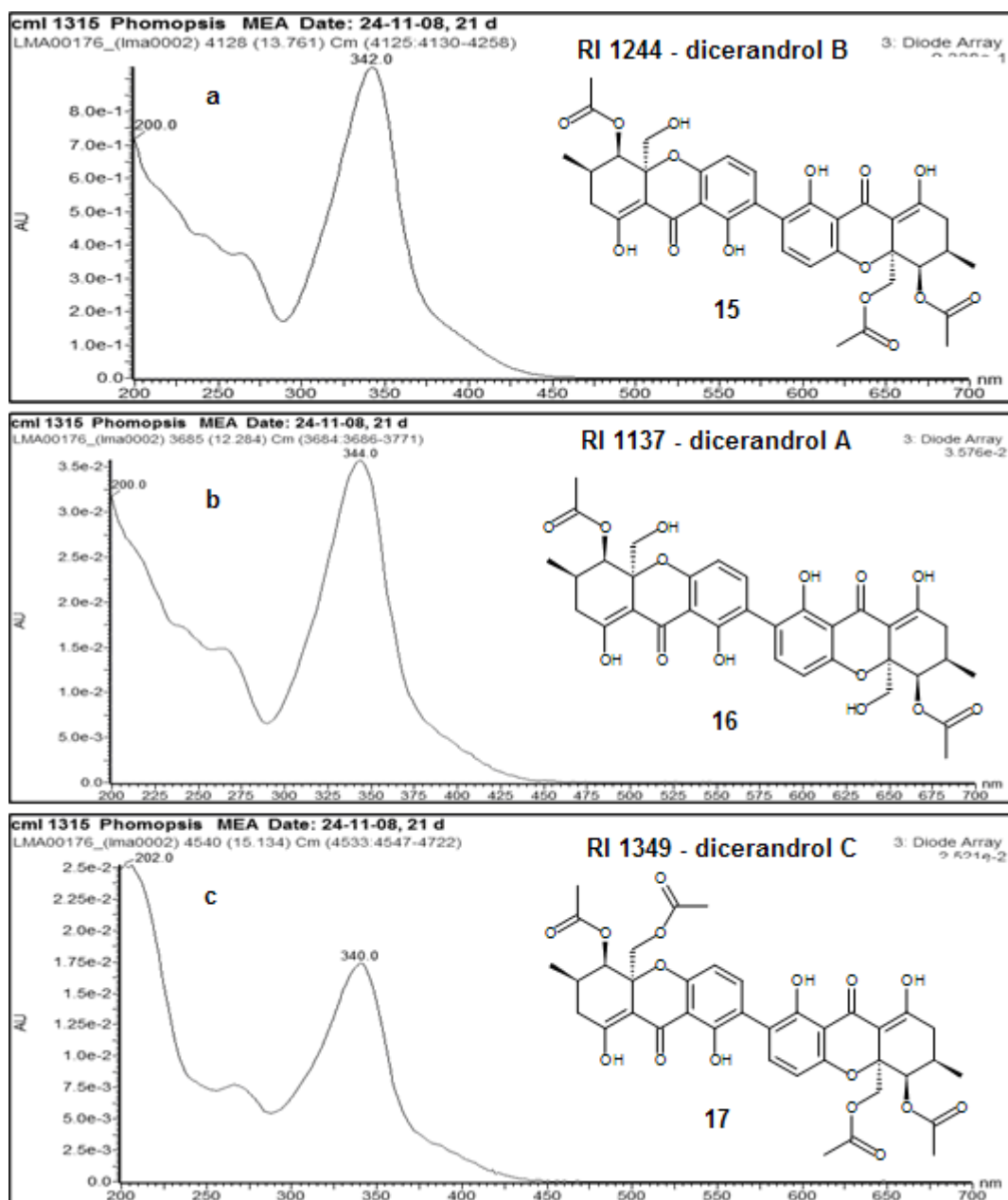


Figura 2.10: Espectros de absorção na região do UV dos metabólitos identificados, por tentativa, a partir do extrato do isolado cml 1315: **a** - dicerandrol B (**15**), **b** - dicerandrol A (**16**), **c** - dicerandrol C (**17**) (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Isolados cml 1533, cml 1535, fel 356, fel 359 – esses fungos produziram perfis distintos de metabólitos secundários, caracterizados pela presença de um ou dois metabólitos majoritários, os quais não foram reconhecidos por meio de seus espectros de absorção no UV (**Fig. 2.11**, pag. 49).

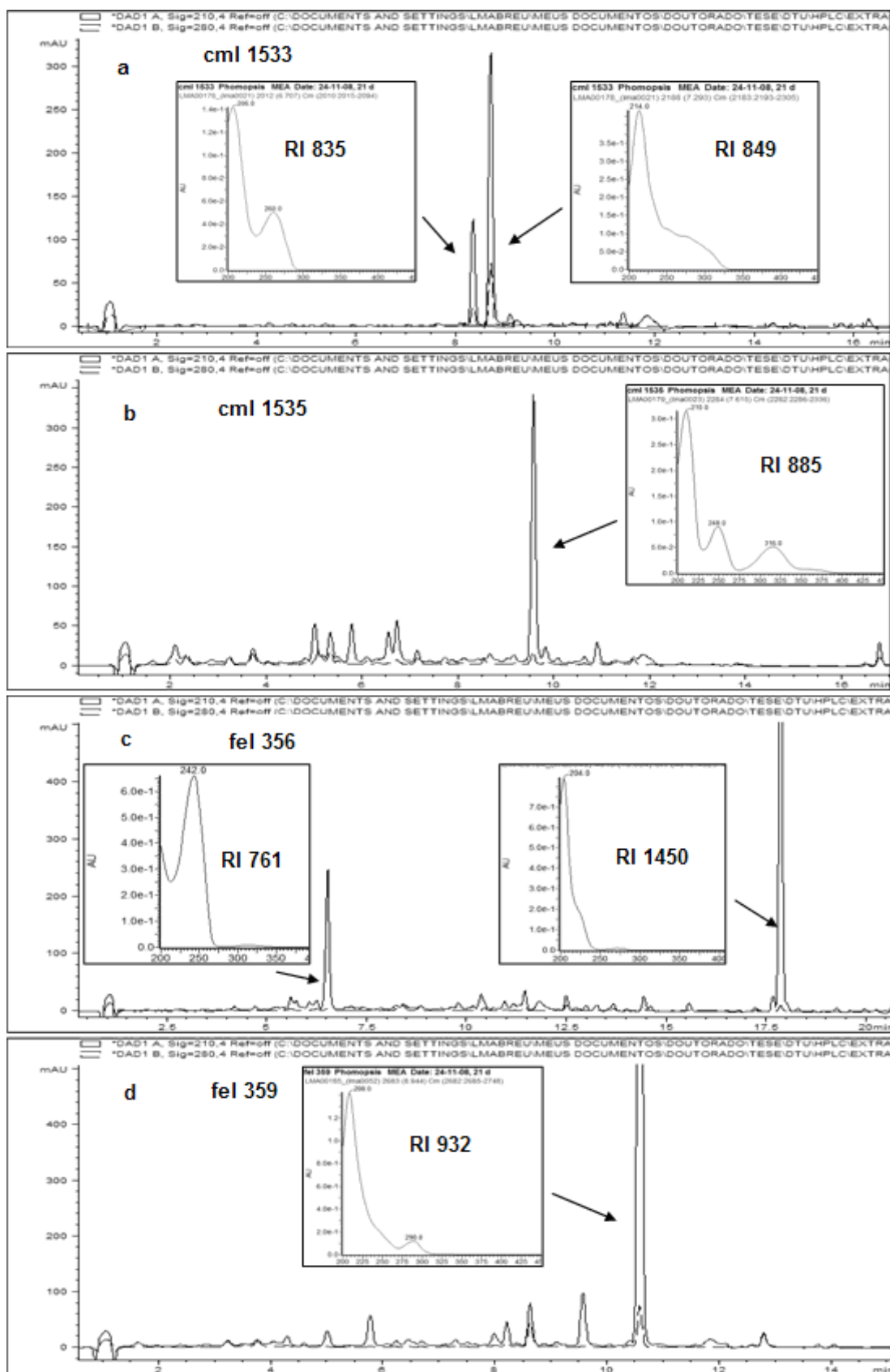


Figura 2.11: Perfis químicos e espectros de absorção na região do UV dos metabólitos majoritários produzidos pelos isolados não classificados em quimiotipos: **a** - cml 1533, **b** - cml 1535, **c** - fel 356, **d** - fel 359. (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Quimiotipo 5 (*Cytospora*) – Os oito isolados do gênero *Cytospora* estudados, fel 280, fel 281, fel 283, fel 302, fel 347, fel 353, fel 361 e fel 362, foram agrupados no quimiotipo 5. Os metabólitos majoritários produzidos pelos fungos desse grupo foram RI 757 (RT 6,4 min, **Fig. 2.12**), RT 764 (RT 6,6 min), RI 772 (RT 6,8 min), RI 965 (RT 11,2 min), RI 979 (RT 11,4 min) e RI 1000 (RT 11,8 min).

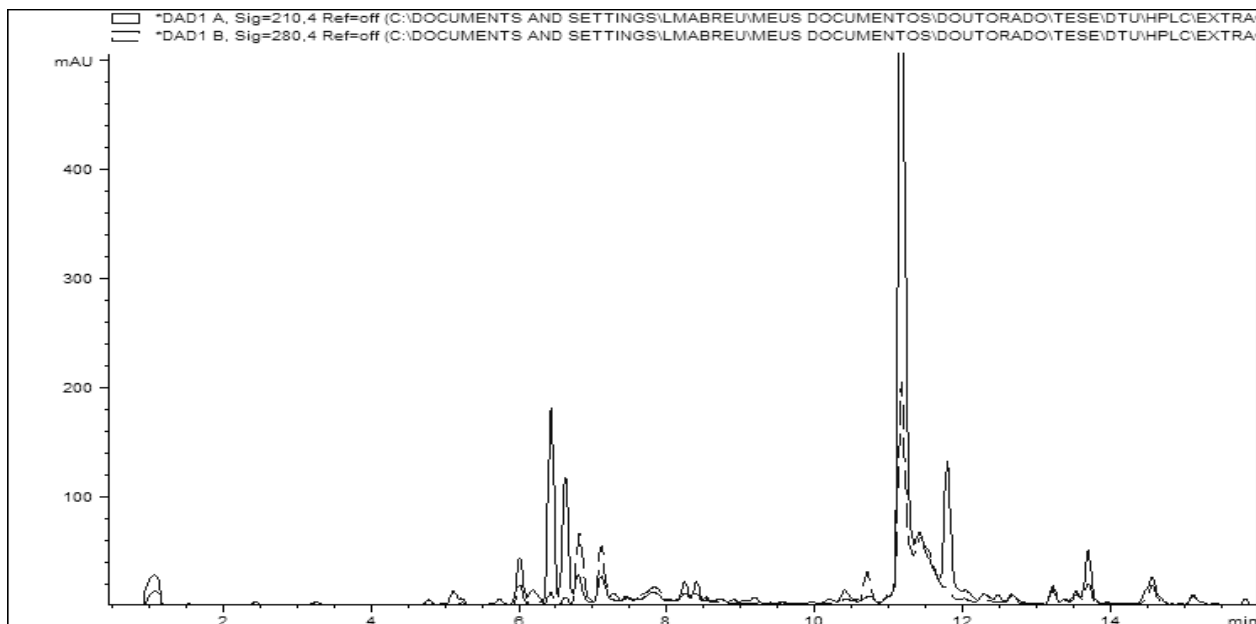


Figura 2.12: Perfil químico, obtido por CLAE-DAD, do extrato do isolado fel 302 representando o quimiotipo *Cytospora*

A análise comparativa dos perfis de metabólitos secundários mostrou que os fungos dos quimiotipos *Phomopsis* 1 e *Cytospora* produziram sete metabólitos em comum, (RI) 757, 764, 831 (RT 8,2 min, **Fig. 2.12**), 837 (RT 8,4 min), 979, 1000 e 1120, porém, os metabólitos típicos de *Alternaria* (i.e. alternariol e seus análogos) não foram detectados nos cromatogramas dos isolados do quimiotipo 5. Os isolados de *Cytospora* também produziram o metabólito RI 772 (RT 6,8 min) em comum com aqueles do quimiotipo *Phomopsis* 3.

Nenhum metabólito do quimiotipo 5 foi identificado diretamente pelo seu espectro de absorção no UV. Porém, a desreplcação dos metabólitos majoritários, por meio dos dados de espectrometria de massas de alta resolução (**Cap. 3**), indicou que alguns dos metabólitos se tratavam das citosporonas, isoladas por Brady et al. (2000) de um fungo do gênero *Cytospora*, endófito da planta *Conocarpus erecta* na Costa Rica. Com o intuito de identificar os possíveis marcadores quimiotaxonômicos do quimiotipo 5, a maioria dos quais também produzida pelos isolados do quimiotipo *Phomopsis* 1, o isolado de *Cytospora* fel 302 foi escolhido, cultivado em maior escala e submetido à extração e purificação dos metabólitos secundários majoritários, como descrito no **Cap. 3** dessa Tese.

2.4 Conclusões

O meio de cultura MEA foi escolhido como padrão para o perfilamento de metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos dos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora*, pois induziu a produção do maior número de metabólitos secundários, além de permitir o bom crescimento dos fungos investigados.

O perfilamento dos extratos brutos, obtidos em micro escala, por CLAE-DAD permitiu a caracterização e classificação dos isolados investigados em quimiotipos. A análise dos extratos por CLAE-DAD-EM permitiu a identificação, mesmo que por tentativa, de vários metabólitos detectados durante o perfilamento.

Os perfis obtidos pela análise por CLAE-DAD foram agrupados visualmente em cinco quimiotipos, sendo quatro grupos distintos de isolados de *Phomopsis* e um quimiotipo contendo os isolados do gênero *Cytospora*. Cinco isolados apresentaram perfis distintos e não foram agrupados em quimiotipos.

O quimiotipo *Phomopsis* 1 foi composto por 10 isolados e caracterizado pela produção dos metabólitos majoritários altenusina, alternariol, (RI) 831, 837 e 1000.

O quimiotipo *Phomopsis* 2 foi composto por sete isolados e caracterizado pela produção dos metabólitos majoritários alternariol, (RI) 718, 778, 811, 883, 949 e 981.

O quimiotipo *Phomopsis* 3 foi composto por sete isolados e caracterizado pela produção dos metabólitos majoritários ácido 2,4-diidroxi-6-(2-oxopropil) benzóico, ácido 2,4-diidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil) benzóico, ortosporina, (RI) 611, 625, 772, 792 e 863.

O quimiotipo *Phomopsis* 4 foi composto por cinco isolados e caracterizado pela produção dos metabólitos majoritários fomol, (RI) 623, 635 e 749.

O quimiotipo *Cytospora* (5) foi composto por oito isolados e caracterizado pela produção dos metabólitos majoritários (RI) 757, 764, 772, 965, 979 e 1000.

Os metabólitos (RI) 1244, 1137 e 1349, detectados no perfil de metabólitos do isolado cml 1315, foram identificados, por tentativa, como sendo os dicerandróis B, A e C, respectivamente.

3 Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo endófito *Cytospora* sp. fel 302

3.1 Introdução

O estudo químico comparativo dos perfis de metabólitos secundários permitiu a classificação de 37 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* em cinco quimiotipos diferentes, além de mais cinco isolados de *Phomopsis* cujos perfis não foram classificados (**Cap. 2**). Os principais marcadores químicos de cada quimiotipo foram caracterizados pelos seus índices de retenção em CLAE-DAD, espectro de absorção na região do UV e espectro de massas de alta resolução em CLAE-DAD-EM. Os dados obtidos foram submetidos à desreplicação, o que permitiu a identificação, mesmo que por tentativa, de vários desses metabólitos.

Os perfis classificados nos quimiotipos 1 (*Phomopsis* 1) e 5 (*Cytospora*) continham vários metabólitos em comum, dos quais nenhum foi identificado indubitavelmente através de seus espectros de absorção na região do UV e de massas de alta resolução. Com o intuito de se identificar os possíveis marcadores quimiotaxonômicos co-produzidos pelos isolados dos quimiotipos 1 e 5, o isolado de *Cytospora* fel 302 foi escolhido como representante desse último e cultivado em maior escala, visando à purificação e identificação de seus metabólitos secundários majoritários.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Escolha do fungo, cultivo em grande escala e extração dos metabólitos secundários

O fungo *Cytospora* sp. fel 302 (= cml 1841), previamente isolado da erva-de-passarinho *Phoradendron perrottettii* (Abreu et al., 2010a), foi escolhido como representante do quimiotipo 5, definido durante o perfilamento dos extratos de 56 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* por CLAE-DAD (**Cap. 2**). O isolado foi cultivado em 200 placas de Petri de 9 cm de poliestireno contendo o meio MEA [*Malt extract agar* – extrato de malte (20 g), peptona (1 g), glicose (20 g), ágar (20 g), água (1 L)] durante 20 d, a 25 °C no escuro. O conteúdo das placas foi macerado junto ao solvente de extração – 10 mL/placa de acetato de etila (AcOEt) (Merck, Darmstadt, DE) contendo 1 % de ácido fórmico (Merck) – em um aparelho *Stomacher* (Colworth 400, A. J. Seward, London, UK), transferido para um recipiente de vidro com

capacidade para 5 L, recoberto com solvente de extração (0,5 L) e deixado em repouso por 12 h. A fase orgânica obtida foi filtrada em filtro Whatman n° 4 (Whatman, Maidstone, UK) com o auxílio de uma bomba de vácuo (Millipore, Billerica, US), e o processo de extração da biomassa em repouso foi repetido. A fase orgânica combinada das duas extrações (5 L) foi concentrada em evaporador rotatório (Rotavapor R-210, Vacuum Controller V-850, Diaphragm Vacuum Pump V-710, Büchi Labortechnik, Flawil, CH) à temperatura de 30 °C e secada completamente sob fluxo de N₂, em capela de exaustão, originando 3,6 g de extrato bruto.

3.2.2 Fracionamento inicial do extrato bruto por cromatografia *flash* em fase reversa (C18)

O extrato bruto obtido (3,6 g, identificado pela sigla **CYT**, de *Cytospora*) foi dissolvido em 15 mL de AcOEt–MeOH (50: 50) e incorporado a 4 g de sílica funcionalizada com octadecilsilano (sílica C18) (Biotage, Uppsala, SE) em evaporador rotatório (Büchi). O extrato incorporado à sílica C18 foi transferido para um cartucho cilíndrico (8,1 cm de altura X 3,9 cm de diâmetro) contendo 60 g de sílica C18 (Snap Cartridge KP-C18-HS, Biotage) e submetido à cromatografia *flash* em um aparelho Isolera One (Biotage), utilizando como eluentes H₂O purificada em aparelho Milli-Q (Millipore, Billerica, US) e MeOH (Merck), de acordo com o gradiente de eluição: H₂O–MeOH 90: 10, 3 frações; 90: 10 a 0:100, 9 frações; 0: 100, 4 frações. O fluxo de eluente usado foi de 30 mL/min e o volume de cada fração coletada foi de 100 mL (entre as frações 4 e 12, houve variação de 10 % no gradiente a cada fração). Alíquotas de 200 µL das 16 frações coletadas (**CYT01** a **CYT16**) foram transferidas para frascos de vidro de 1 mL com tampa de rosca (Supelco) e submetidas à análise por CLAE-DAD, usando o método 2 (MeOH) (**Cap. 2**, item **2.2.3.3**, pag 31). As frações foram concentradas em evaporador rotatório e secadas completamente sob fluxo de N₂, em capela de exaustão.

3.2.3 Fracionamento das frações **CYT09, **CYT10** e **CYT11** por cromatografia *flash* em fase normal (diol)**

As frações **CYT09** (316 mg, H₂O–MeOH 40: 60 a 30: 70 no fracionamento inicial), **CYT10** (281 mg, H₂O–MeOH 30: 70 a 20: 80) e **CYT11** (438 mg, H₂O–MeOH 20: 80 a 10: 90) foram individualmente submetidas à cromatografia *flash* em cartuchos contendo 10 g de sílica funcionalizada com 1,1-dimetil-3-(2,3-diidroxipropoxi)-propil silano (diol) (Isolute Diol, Biotage), de acordo com a seguinte série de eluição: heptano, 1 subfração; heptano–diclorometano (DCM) 50: 50, 1 subfração; DCM, 1

subfração; DCM–AcOEt 90: 10 a 0: 100, 10 subfrações; AcOEt–MeOH 90: 10 a 80: 20, 2 subfrações; MeOH, 1 subfração. Foram coletadas 16 subfrações de 25 mL de cada fração (**CYT09_01** a **CYT09_16**; **CYT10_01** a **CYT10_16**; **CYT11_01** a **CYT11_16**), das quais foram retiradas alíquotas de 100 µL e enviadas para análise por CLAE-DAD, usando o método 2 (MeOH) (**Cap. 2**, item **2.2.3.3**, pag. 31). As subfrações foram concentradas em evaporador rotatório e secadas completamente sob fluxo de N₂, em capela de exaustão. Todos os solventes utilizados foram da marca Merck.

3.2.4 Purificação final dos metabólitos por CLAE semipreparativa

As subfrações **CYT11_05** (20 mg, DCM–AcOEt 80: 20 no segundo fracionamento), **CYT11_06** (26 mg, DCM–AcOEt 70: 30), **CYT11_08** (69 mg, DCM–AcOEt 50: 50) e **CYT11_10-11** (subfrações 10 e 11 combinadas, 41 mg, DCM–AcOEt 30: 70 e 20: 80) foram individualmente dissolvidas em MeOH (1,5 a 2 mL) e submetidas à CLAE semipreparativa em um cromatógrafo Waters 600 (Waters, Millford, US), com detector por arranjo de diodos (DAD) modelo 996 (Waters), utilizando uma coluna Luna II C18 (250 X 10 mm, 5 µm de tamanho de partícula, Phenomenex, Torrance, US). Os eluentes usados foram H₂O purificada em aparelho Milli-Q (Millipore) e MeOH (Merck), ambos contendo 100 ppm de ácido trifluoroacético (TFA) (Merck). O gradiente empregado para o fracionamento foi: H₂O–MeOH 30: 70 a 06: 94 em 20 min; MeOH por 5 min (lavagem do sistema); H₂O–MeOH 30: 70 por 5 min (re-equilíbrio do sistema antes de nova injeção). Foram realizadas entre 6 e 15 injeções de cada subfração e o volume de cada injeção foi de 200 µL. O fluxo do eluente foi mantido a 4 mL/min. Os metabólitos alvo foram identificados pelos seus respectivos espectros de absorção na região do UV, exibidos simultaneamente (*online*) pelo DAD, durante o processo cromatográfico.

Foram obtidas as seguintes subfrações purificadas: **CYT11_05_02** (12,6 mg), **CYT11_06_01** (0,6 mg), **CYT11_06_02** (13,7 mg), **CYT11_06_03** (1,5 mg), **CYT11_08_01** (0,5 mg), **CYT11_08_04** (17,2 mg), **CYT11_10-11_04** (18 mg) e **CYT11_10-11_05** (4,1 mg). A subfração **CYT11_08_04** foi novamente submetida à CLAE semipreparativa, nas mesmas condições acima descritas, originando as subfrações purificadas **CYT11_08_04_01** (4 mg) e **CYT11_08_04_03** (9,5 mg).

As subfrações **CYT09_09** (43 mg, DCM–AcOEt 40: 60) e **CYT09_12** (15,2 mg, DCM–AcOEt 10: 90) foram individualmente dissolvidas em 0,5 mL de CH₃CN (Merck) e submetidas à CLAE semipreparativa (cromatógrafo Waters 600, coluna Luna II C18), utilizando como eluentes H₂O e CH₃CN, ambos contendo 50 ppm de TFA. O fluxo do eluente foi mantido a 4 mL/min e o gradiente de eluição consistiu de: H₂O–CH₃CN 68:

32 a 62: 38 em 20 min; CH₃CN por 5 min; H₂O–CH₃CN 68: 32 por 5 min. Foram realizadas 10 injeções de 40 µL da subfração **CYT09_09** e 10 injeções de 25 µL da subfração **CYT09_12**, e obtidas as seguintes subfrações purificadas: CYT09_09_01 (2,1 mg), CYT09_09_02 (28,6 mg), **CYT09_12_01** (3 mg) e **CYT09_12_02** (1,5 mg). As subfrações purificadas CYT09_09_01 e CYT09_09_02 foram combinadas e submetidas a um novo fracionamento por CLAE semipreparativa, utilizando as mesmas condições acima descritas, originando as subfrações purificadas **CYT09_09_1-2_01** (22,1 mg) e **CYT09_09_1-2_02** (5,6 mg).

A subfração **CYT10_07** (50 mg, DCM–AcOEt 60: 40) foi dissolvida em 0,5 mL de CH₃CN e submetida à CLAE semipreparativa (cromatógrafo Waters 600, coluna Luna II C18, H₂O–CH₃CN + 50 ppm de TFA, fluxo de 4 mL/min), utilizando o gradiente de eluição: H₂O–CH₃CN 60: 40 a 54: 46 em 15 min; CH₃CN por 5 min; H₂O–CH₃CN 60: 40 por 5 min. Foram realizadas 15 injeções de 25 µL e obtida a subfração parcialmente purificada CYT10_07_01 (20,2 mg), a qual foi novamente submetida à CLAE semipreparativa, nas mesmas condições acima descritas, originando as subfrações purificadas **CYT10_07_01_01** (5,3 mg), **CYT10_07_01_02** (6,1 mg) e **CYT10_07_01_03** (3,4 mg).

3.2.5 Análises espectroscópicas, espectrométricas e físicas das subfrações purificadas

3.2.5.1 CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)

Alíquotas de 100 µL de todas as subfrações purificadas foram enviadas para análise por CLAE-DAD-EM, como descrito no **Cap. 2**, item **2.2.3.4** (pag. 32), para a verificação da pureza e obtenção do espectro de massas de alta resolução e do espectro de absorção na região do UV dos metabólitos purificados. Os dados de espectrometria de massas foram usados para a determinação da fórmula molecular das substâncias e posterior desreplicação, por meio de comparação com as informações contidas no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008).

3.2.5.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros unidimensionais de RMN de ¹H e os mapas de contorno bidimensionais ¹H–¹H COSY (*Correlation Spectroscopy*), ¹H–¹³C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e ¹H–¹³C HMBC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) foram obtidos em um aparelho Unity Inova 500 MHz, da fabricante Varian (Palo Alto,

US), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Tecnológica da Dinamarca. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e os experimentos bidimensionais ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC das amostras **CYT09_09_1-2_02**, **CYT09_12_01**, **CYT09_12_02**, **CYT11_10-11_04** e **CYT11_10-11_05** foram obtidos em um aparelho Avance III 800, da fabricante Bruker (Karlsruhe, DE), pertencente ao Centro Dinamarquês de Instrumentos para Espectroscopia de RMN de Macromoléculas Biológicas, do Laboratório da Cervejaria Carlsberg. Os espectros de RMN de ^{13}C das amostras **CYT09_09_1-2_01**, **CYT11_05_02** e **CYT11_06_02** foram obtidos em um aparelho Avance DRX 400, da fabricante Bruker (Karlsruhe, DE), pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Multi-usuário do Departamento de Química da UFMG. Todos os espectros de RMN foram processados pelo programa Mestre Nova 6.03 (Mestrelab Research, S. L., 2009).

3.2.5.3 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) das amostras **CYT09_09_1-2_01**, **CYT11_05_02** e **CYT11_06_02** foram obtidos em um espectrômetro FTS 3000, da série Excalibur (Digilab, Randolph, US), pertencente à Central de Análise e Prospecção Química da UFLA.

3.2.5.4 Rotação específica

Os dados de rotação específica das amostras **CYT09_09_1-2_02**, **CYT09_12_01** e **CYT09_12_02** foram obtidos em um polarímetro Perkin Elmer 341, do Departamento de Química da Universidade Tecnológica da Dinamarca.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Substâncias identificadas

3.3.1.1 Citosporona B (2-(3,5-diidroxi-2-octanoil-fenil)etanoato de etila, número CAS: 321661-62-5)

As subfrações purificadas **CYT11_05_02** (12,6 mg) e **CYT11_06_03** (1,5 mg) foram obtidas como uma goma branca leitosa e exibiram o mesmo espectro de absorção na região do UV e o mesmo tempo de retenção em análise por CLAE-DAD, além da mesma fórmula molecular, determinada como $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_5$ por meio de espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{O}_5 = 323,1858$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z

encontrado = 323,1857). Oito substâncias com a mesma fórmula molecular foram encontradas no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), dentre as quais a citosporona B, isolada inicialmente por Brady et al. (2000) de um isolado de *Cytospora* sp., endófito da planta *Conocarpus erecta*, na Costa Rica. A análise dos dados de RMN (**Tabela 3.1**, pag. 61, e **Apêndice 1**) permitiu a identificação de **CYT11_05_02** como sendo o metabólito citosporona B (**18**, **Fig. 3.1**, pag. 58 - numeração da estrutura de acordo com aquela descrita por Brady et al., 2000).

O espectro de RMN de ^1H de **CYT11_05_02** (**Fig. 3.3**, pag. 59) exibiu dois dupletos, referentes a hidrogênios aromáticos, em δ_{H} 6,20 (d, $J = 2,1$ Hz) e 6,26 (d, $J = 2,1$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H4 e H6, respectivamente. Também foram identificados dois sinais referentes aos hidrogênios de grupos metila em δ_{H} 0,90 (t, $J = 6,8$ Hz, CH_3 -16) e 1,24 (t, $J = 7,1$ Hz, CH_3 -18) e quatros sinais referentes a metilenos em δ_{H} 1,61 (m, CH_2 -11), 2,90 (t, $J = 7,5$ Hz, CH_2 -10), 3,57 (s, CH_2 -2) e 4,11 (q, $J = 7,1$ Hz, CH_2 -17), além de um multipletto largo, entre δ_{H} 1,30 e 1,32 (8H), atribuído aos metilenos das posições 12 a 15 (Brady et al., 2000). O espectro de RMN de ^{13}C de **CYT11_05_02** (**Apêndice 1.2**) exibiu 18 sinais, dentre os quais dois referentes aos grupos carbonila de cetona (δ_{C} 209,1, C9) e de éster (δ_{C} 173,6, C1) da citosporona B (**18**) (Brady et al., 2000). A elucidação da estrutura completa de **CYT11_05_02** foi realizada por meio das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC (**Tabela 3.1**, pag. 61, e **Apêndices 1.3, 1.4, 1.7**). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são descritos a seguir:

Tempo de retenção (RT) em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 15,96 min

RT em CLAE-DAD (CH_3CN), no extrato bruto: 13,69 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH_3CN), no extrato bruto: 1120

*Espectrometria de massas (CH_3CN) (**Fig. 3.1**, pag. 58):* $m/z = 323,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 386,2 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{N}+\text{Na}]^+$, 667,4 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$

Espectroscopia de absorção na região do UV (DAD) ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 200 (corte), 222, 270, 304

*Espectroscopia de absorção na região do IV (**Fig. 3.2**, pag. 58):* ν , $\text{cm}^{-1} = 3448, 2958, 2931, 2858, 1712, 1612, 1604, 1467, 1371, 1328, 1269, 1163, 1116, 1029, 848$

Ressonância magnética nuclear (RMN): Espectro de RMN de ^1H - **Fig. 3.3** (pag. 59), demais espectros - **Apêndice 1**, comparação de dados com a literatura **Tabela 3.1** (pag. 61)

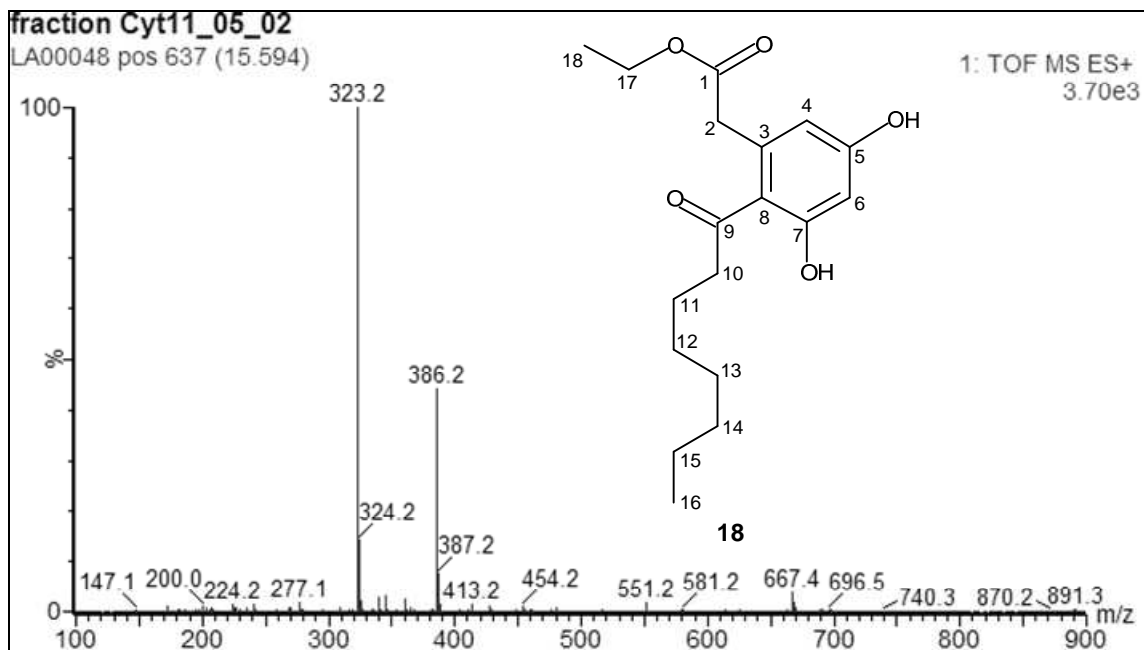


Figura 3.1: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_05_02 (18)**

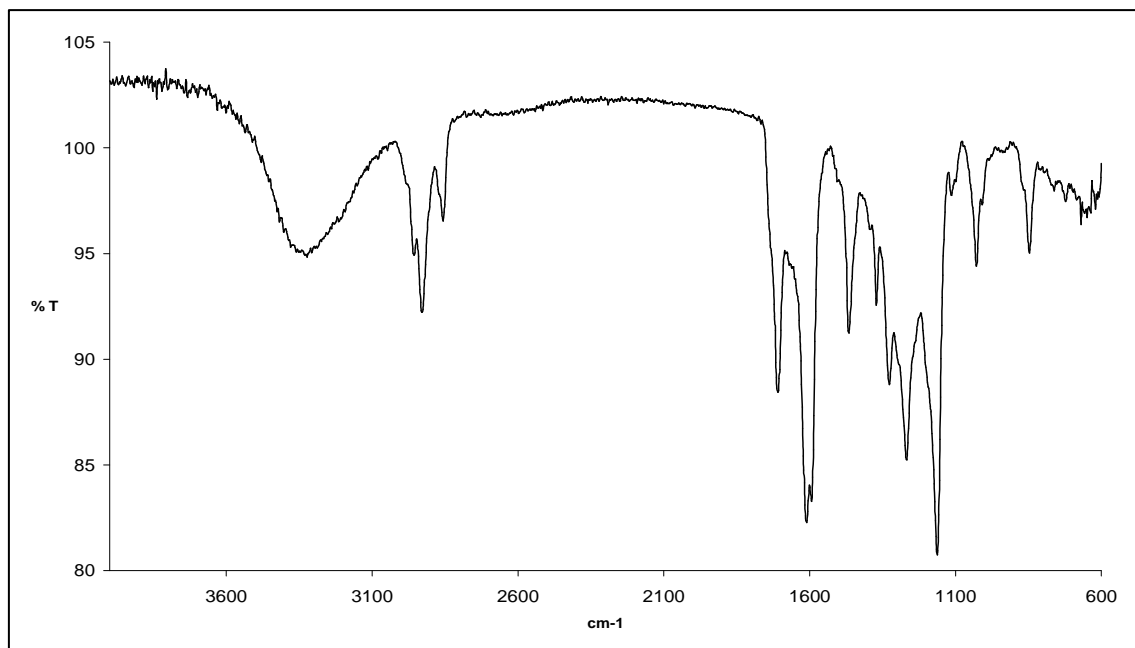


Figura 3.2: Espectro de absorção na região do IV de **CYT11_05_02 (18)** (ATR)

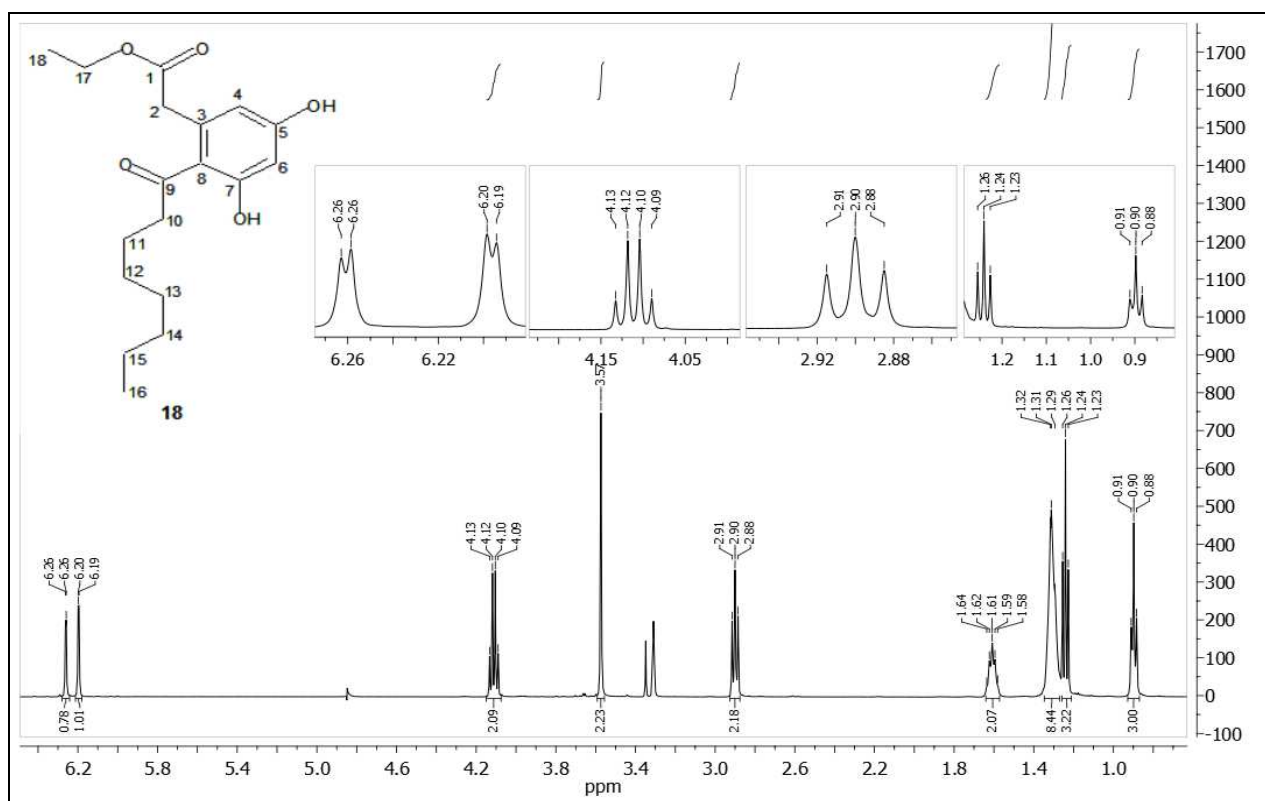


Figura 3.3: Espectro de RMN de ¹H [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)**

Quando os dados de RMN de ¹H e de ¹³C de **CYT11_05_02** foram comparados com aqueles descritos para a citosporona B (**18**) (Tabela 3.1, pag. 61), notou-se uma inversão na atribuição dos dados de deslocamentos químicos aos hidrogênios e carbonos das posições 4 e 6. Tal inversão foi comprovada, nesse trabalho, por meio das correlações, obtidas no mapa de contornos HMBC, entre os sinais atribuídos a H4 (δ_H 6,20, d, $J=2,1$ Hz) e C2 (δ_C 40,5), e entre aqueles referentes a H6 (δ_H 6,26, d, $J=2,1$ Hz) e C7 (δ_C 159,8) (Fig. 3.4, pag 60).

A descrição original das citosporonas foi feita a partir do extrato de um isolado de *Cytospora*, porém, os autores ressaltaram que todas as cinco citosporonas isoladas (citosporonas A-E) também haviam sido detectadas no extrato de um isolado de *Phomopsis*, endófito da planta *Forsteronia spicata*, também na Costa Rica (Brady et al., 2000). As citosporonas B (**18**) e C (**22**, item 3.3.1.3, pag. 67) foram posteriormente obtidas de dois isolados de *Phomopsis*, endófitos das plantas *Excoecaria agallocha* e *Annona squamosa*, na China (Huang et al., 2008; Lin et al., 2008). A produção de **18** por fungos endófitos pertencentes a outros gêneros, como *Dothiorella* e *Pestalotiopsis*, também foi relatada (Xu et al., 2004; Xu et al., 2009). Em testes *in vitro*, a citosporona B (**18**) exibiu atividades antifúngica e citotóxica (Huang et al., 2008; Xu et al., 2004),

além de atuar como ligante e ativador do receptor nuclear Nur77, o qual participa da regulação da função de diversos genes envolvidos nos processos de gliconeogênese e de apoptose de células tumorais. Alguns testes mostraram que a citosporona B (**18**) é capaz de induzir apoptose em tumores transplantados em cobaias e promover a elevação das taxas de gliconeogênese em células de fígado de ratos, indicando ser esse um bom modelo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer e hipoglicemia (Zhan et al., 2008).

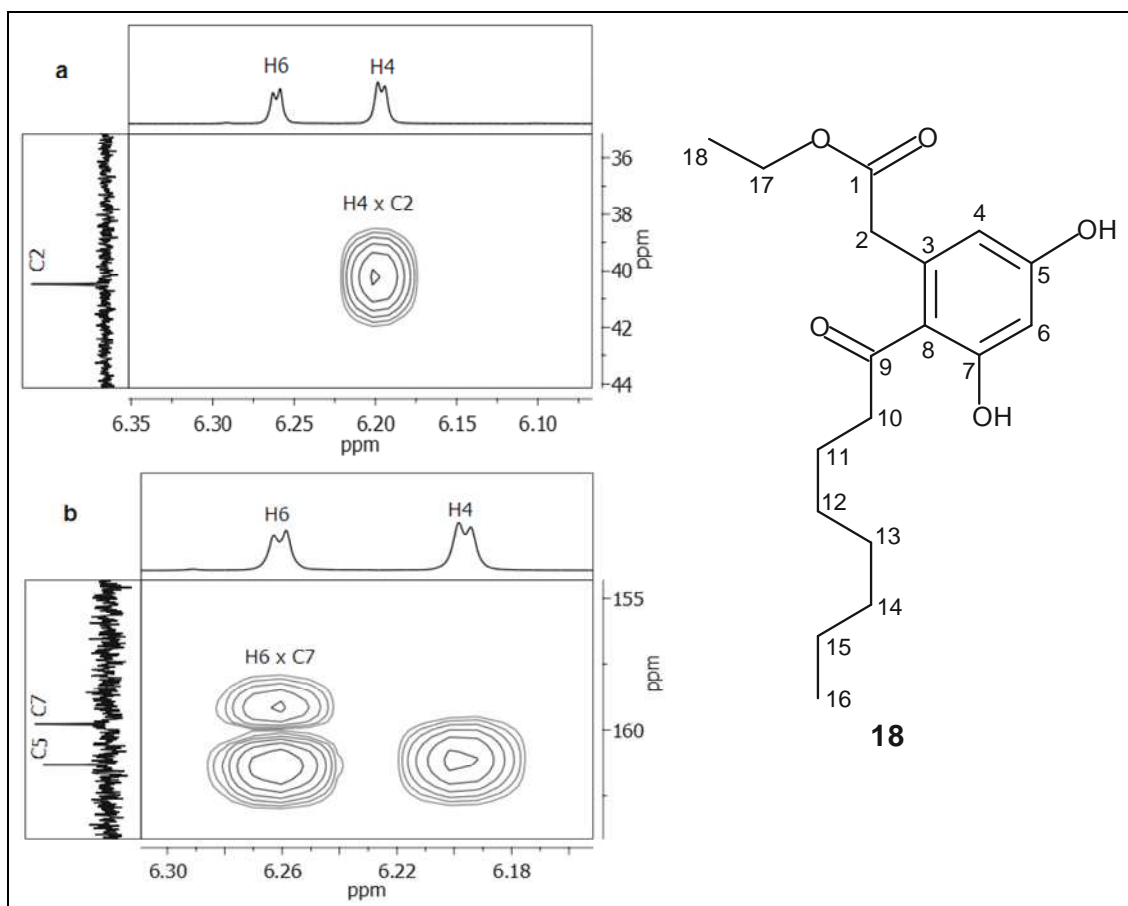


Figura 3.4: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de **CYT11_05_02 (18)** evidenciando as correlações: **a** - H4 x C2; **b** - H6 x C7. Espectro completo no **Apêndice 1.7**

Tabela 3.1: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC*, de **CYT11_05_02** em comparação com aqueles descritos para o metabólito citosporona B (Brady et al., 2000)

posição	CYT11_05_02 [δ (ppm), CD_3OD]			Citosporona B [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]	
	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	Correlações em HMBC	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
1	173,6			171,6	
2	40,5	3,57 (s, 2H)	C1, C3, C4, C8	40,1	3,67 (s, 2H)
3	137,0			137,0	
4	111,7	6,20 (d, $J=2,1\text{Hz}$)	C2, C5, C6, C8	102,5	6,37 (d, $J=2,0\text{Hz}$)
5	161,3			160,7	
6	102,8	6,26 (d, $J=2,1\text{Hz}$)	C4, C5, C7, C8, C9 (f) ^a	111,8	6,31 (d, $J=2,0\text{Hz}$)
7	159,8			159,7	
8	121,3			120,8	
9	209,1			206,3	
10	45,2	2,90 (t, $J=7,5\text{Hz}$, 2H)	C9, C11, C12	44,4	2,90 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 2H)
11	25,6	1,61 (m, 2H)	C9, C10, C12 ou C13	25,0	1,63 (p, 2H)
12	30,5 ^b	1,32 (m) (2H)	C13, C14	30,0 ^d	
13	30,3 ^c	1,32 (m) (2H)	C12, C14	29,9 ^e	1,26-1,32 (ml, H12-H15, 8H)
14	32,9	1,31 (m) (2H)		32,5	
15	23,7	1,30 (m) (2H)		23,3	
16	14,4	0,90 (t, $J=6,8\text{Hz}$, 3H)	C14, C15	14,3	0,88 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 3H)
17	61,8	4,11 (q, $J=7,1\text{Hz}$, 2H)	C1, C18	61,0	4,08 (q, $J=7,0\text{Hz}$, 2H)
18	14,5	1,24 (t, $J=7,1\text{Hz}$, 3H)	C17	14,5	1,21 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 3H)

^a (f) - correlação fraca; ^{b-e} - as atribuições aos carbonos adjacentes podem estar invertidas. * mapa de contornos HMBC - **Apêndice 1.7**

3.3.1.2 Dotiorelonas A, B e C

As subfrações purificadas **CYT10_07_01_01** (5,3 mg), **CYT10_07_01_02** (6,1 mg) e **CYT10_07_01_03** (3,4 mg) foram isoladas como gomas amarronzadas e exibiram espectros de absorção na região UV idênticos àquele da citosporona B (**18**, item **3.3.1.1**). A fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6$, contendo um oxigênio a mais do que aquela de **18**, foi determinada para as três subfrações por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 339,1808$; valores encontrados de $m/z = 339,1824$ para **CYT10_07_01_01**, 339,1805 para **CYT10_07_01_02** e 339,1825 para **CYT10_07_01_03**). Seis metabólitos com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6$ foram encontrados no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), incluindo as substâncias isoméricas dotiorelonas A, B e C, análogas da citosporona B (**18**),

isoladas por Xu et al. (2004) de um fungo do gênero *Dothiorella*, endófito da planta *Aegiceras corniculatum*, que ocorre em manguezais na China. O espectro de RMN de ^1H de **CYT10_07_01_01** (Fig. 3.6, pag. 64) exibiu um sinal referente a um hidrogênio ligado a carbono sp^3 oxigenado em δ_{H} 3,55 (m) e um duplete, referente a um grupo metila, em δ_{H} 1,01 (d, $J = 6,1$ Hz), resultados condizentes com a estrutura da dotiorelona A (**19**), a qual se diferencia da citosporona B (**18**) pela presença um grupo hidroxila ligado ao carbono C15 (Xu et al., 2004). A análise comparativa dos dados de RMN de ^1H permitiu a identificação de **CYT10_07_01_01** como sendo o metabólito dotiorelona A (**19**) (2-(3,5-diidroxio-2-(7-hidroxiocetanoil)fenil)etanoato de etila; número CAS: 849758-66-3) (Tabela 3.2, pag. 66).

Somente um sinal referente a um grupo metila foi detectado no espectro de RMN de ^1H de **CYT10_07_01_02** (Fig. 3.7, pag. 64) em δ_{H} 1,26 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_3 -18). Por outro lado, a ocorrência de um tripleto referente a um metileno oxigenado em δ_{H} 3,64 ($J = 6,5$ Hz) indicou a presença uma hidroxila ligada a um metileno terminal, como na estrutura da dotiorelona C (**20**) (Xu et al., 2004). A comparação do restante dos sinais de RMN de ^1H permitiu a confirmação da identidade **CYT10_07_01_02** com sendo a dotiorelona C (**20**) (2-(3,5-diidroxio-2-(8-hidroxiocetanoil)fenil)etanoato de etila; número CAS: 849758-68-5) (Tabela 3.2, pag. 66).

O espectro de RMN de ^1H de **CYT10_07_01_03** (Fig. 3.8, pag. 65) exibiu um sinal referente a um hidrogênio ligado a carbono sp^3 oxigenado em δ_{H} 3,55 (m). O duplete referente ao grupo CH_3 -16 da dotiorelona A (**19**) foi substituído por tripleto em δ_{H} 0,94 (t, $J = 7,6$ Hz), indicando a ocorrência de uma mudança na posição da hidroxila ligada à cadeia lateral, como observado na estrutura da dotiorelona B (**21**). A comparação dos dados de RMN de ^1H permitiu a identificação de **CYT10_07_01_03** como sendo o metabólito dotiorelona B (**21**) (2-(3,5-diidroxio-2-(6-hidroxiocetanoil)fenil)etanoato de etila; número CAS: 849758-67-4) (Tabela 3.2, pag. 66). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esses metabólitos são descritos a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (CH_3CN), substância pura: **CYT10_07_01_01** - 06,95 min; **CYT10_07_01_02** - 07,12 min; **CYT10_07_01_03** - 07,17 min

RT em CLAE-DAD (CH_3CN), no extrato bruto: **CYT10_07_01_01** - 08,23 min; **CYT10_07_01_02** - 08,39 min; **CYT10_07_01_03** - 08,52 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH_3CN), no extrato bruto: **CYT10_07_01_01** - 831; **CYT10_07_01_02** - 837; **CYT10_07_01_03** - 842

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig 3.5): $m/z = 339,2 [M+H]^+$, $356,2 [M+NH_4]^+$, $361,2 [M+Na]^+$, $694,4 [2M+ NH_4]^+$, $699,3 [2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção na região do UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 200 (corte), 222, 270, 306

Ressonância magnética nuclear: espectros de RMN de ¹H - **CYT10_07_01_01** - **Fig. 3.6** (pag. 64), **CYT10_07_01_02** - **Fig. 3.7** (pag. 64), **CYT10_07_01_03** - **Fig. 3.8** (pag. 65); comparação de dados com a literatura - **Tabela 3.2** (pag. 66)

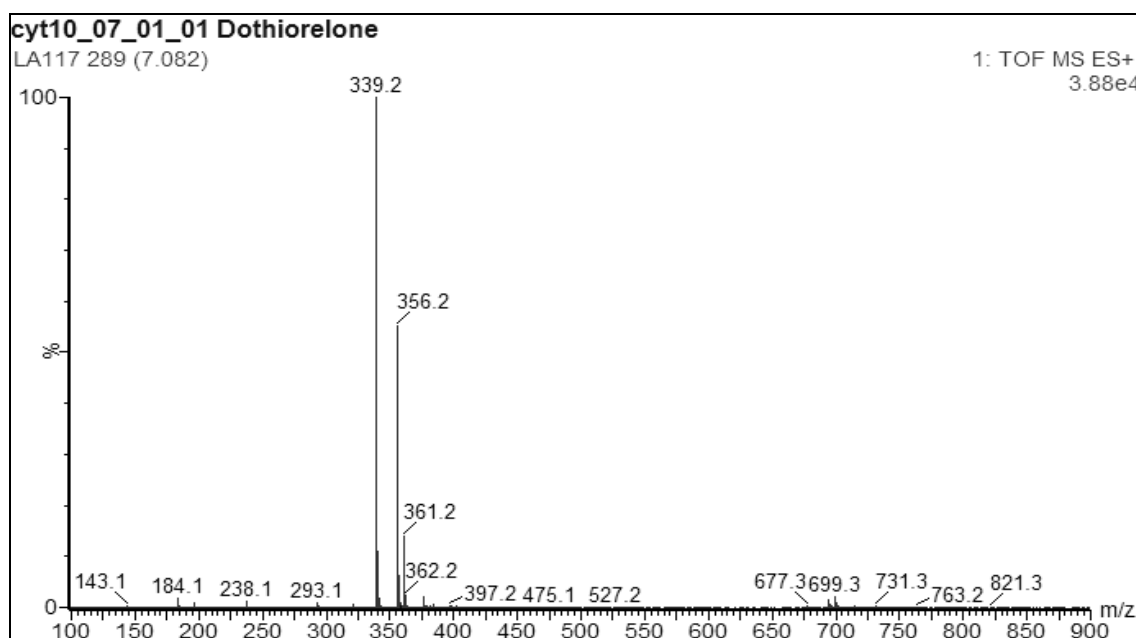
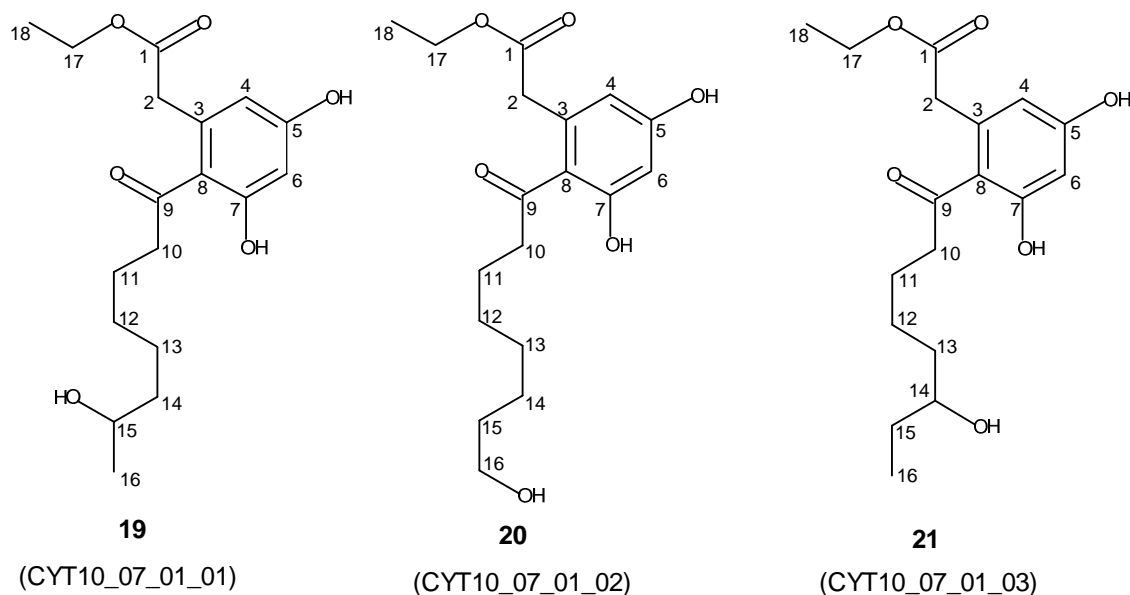


Figura 3.5: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT10_07_01_01 (19)**

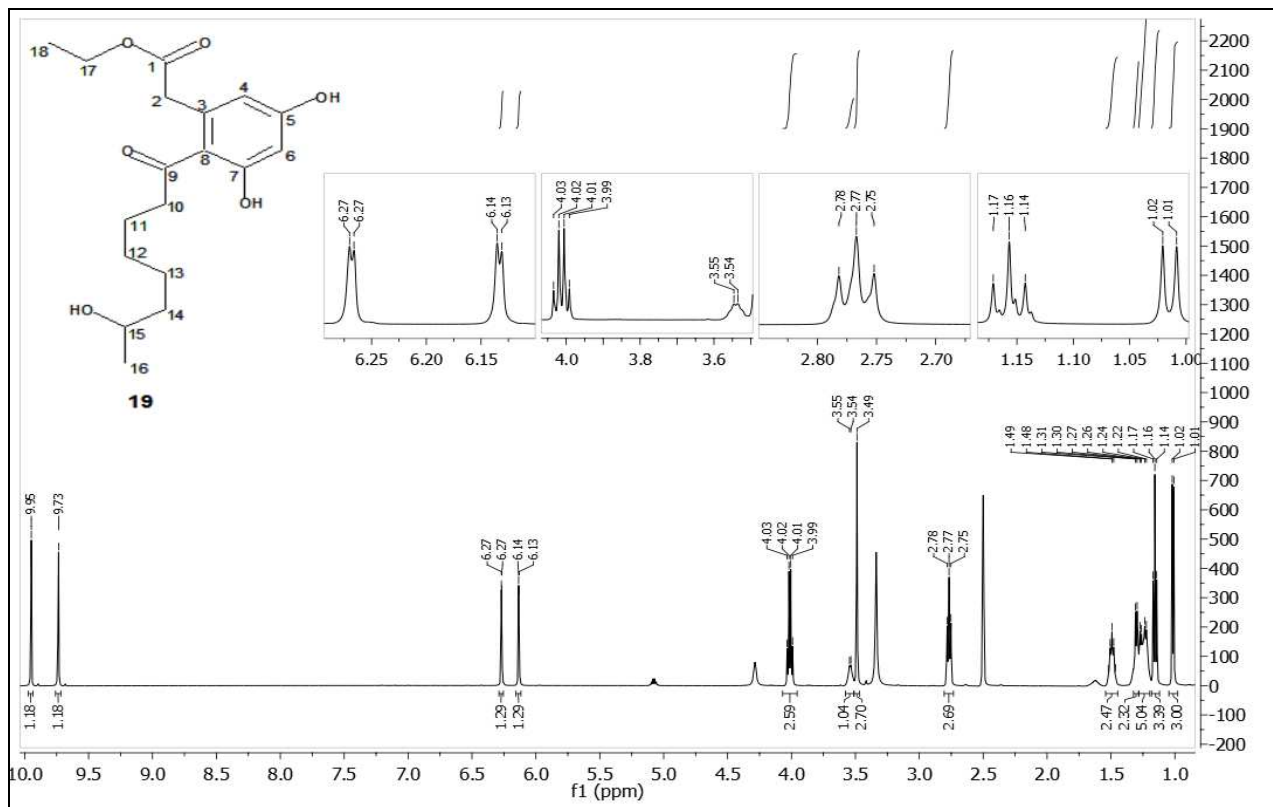


Figura 3.6: Espectro de RMN de ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz] de **CYT10_07_01_01 (19)**

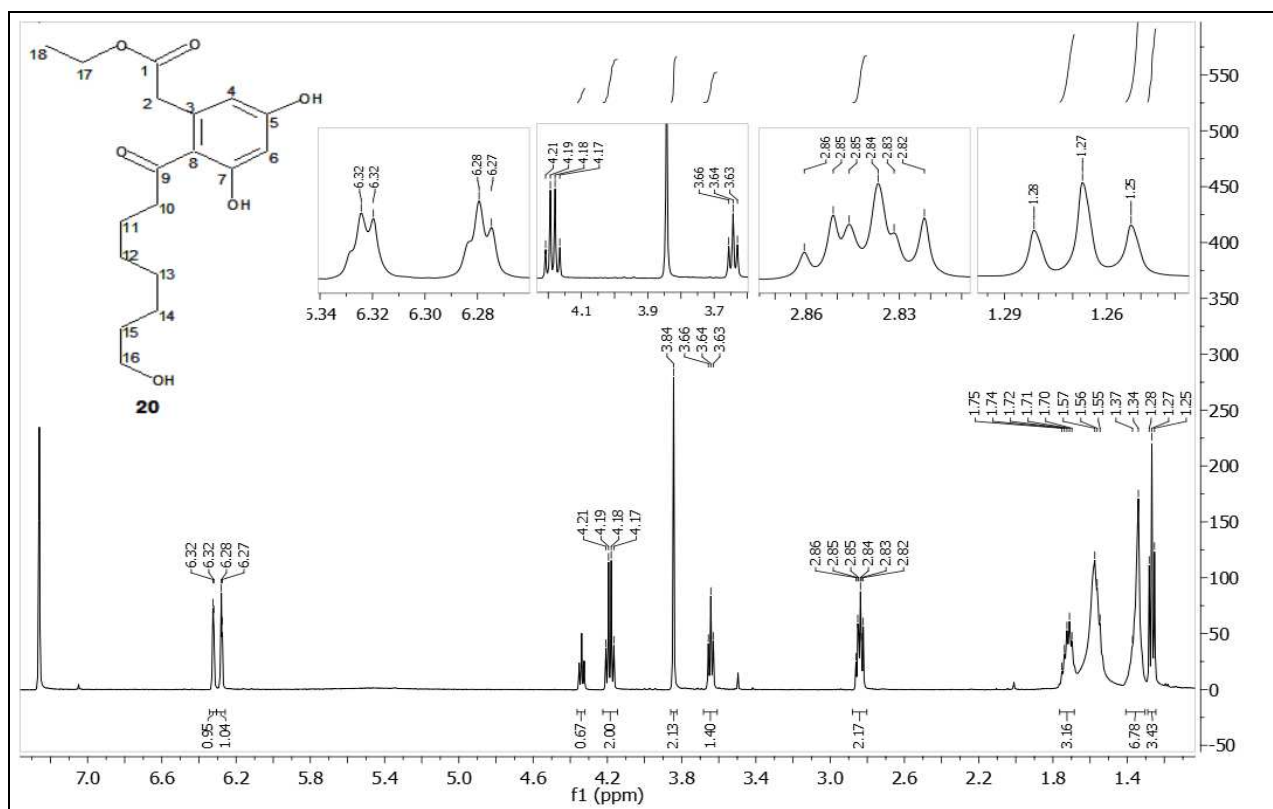


Figura 3.7: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de **CYT10_07_01_02 (20)**

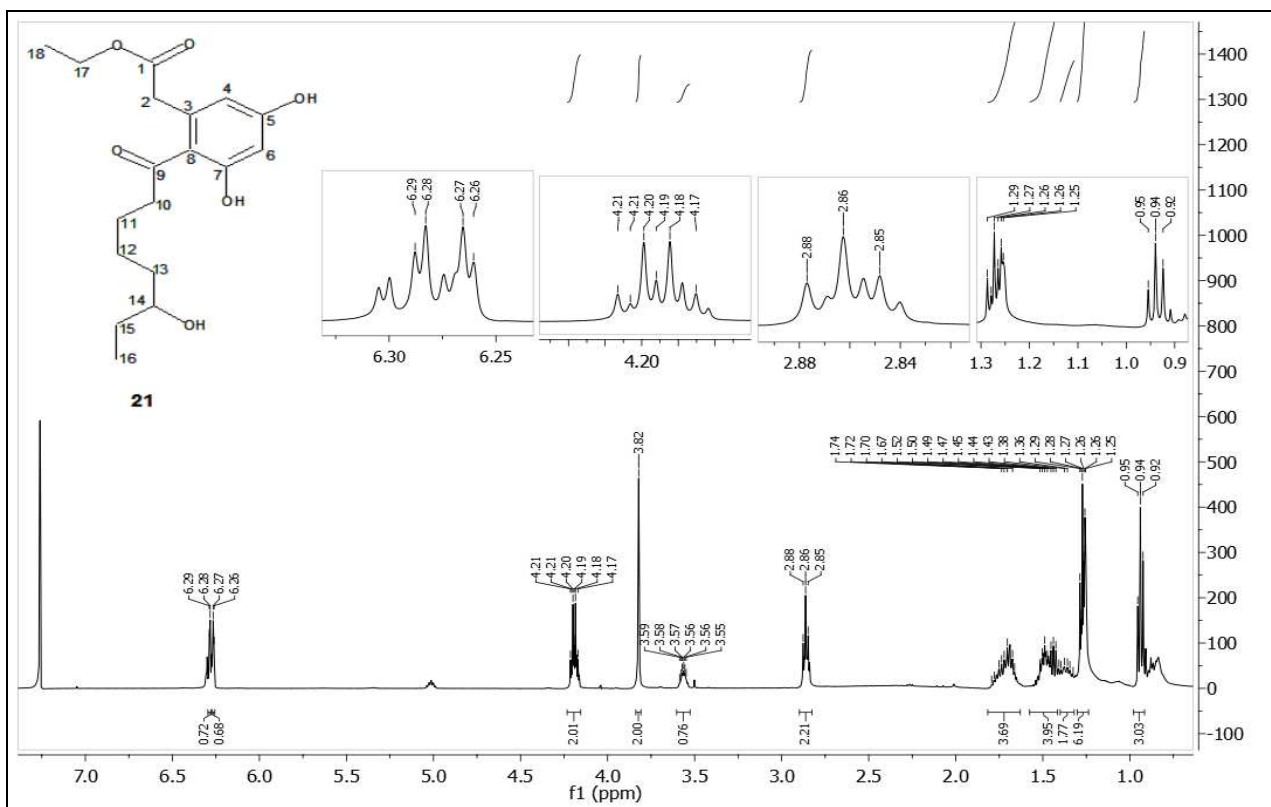


Figura 3.8: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de **CYT10_07_01_03 (21)**

As dotiorelonas A (**19**), B (**21**) e C (**20**) também foram isoladas de um fungo do gênero *Phomopsis*, endófito da planta halotolerante *Excoecaria agallocha*, na China (Huang et al., 2009). Outro isolado de *Phomopsis*, endófito da planta tailandesa *Garcinia hombroniana*, mostrou-se capaz de produzir **19** e **20** (Sommart et al., 2009). A dotiorelona B (**21**) também foi isolada de um fungo do gênero *Pestalotiopsis*, endófito da planta *Rhizophora mucronata*, proveniente de um manguezal chinês (Xu et al., 2009).

Tabela 3. 2: Dados de RMN de ^1H de **CYT10_07_01_01**, **CYT10_07_01_02** e **CYT10_07_01_03** comparados com aqueles descritos para os metabólitos dotiorelona A (**19**), dotiorelona C (**20**) e dotiorelona B (**21**) (Xu et al., 2004)

posição	CYT_10_07_01_01	dotiorelona A	CYT_10_07_01_02	dotiorelona C	CYT_10_07_01_03	dotiorelona B
	[δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]	[δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]	[δ (ppm), (CDCl_3)]	[δ (ppm), (CDCl_3)]	[δ (ppm), (CDCl_3)]	[δ (ppm), (CDCl_3)]
	RMN de ^1H (500 MHz)	RMN de ^1H (400 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	RMN de ^1H (400 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	RMN de ^1H (400 MHz)
2	3,49 (s, 2H)	3,47 (s, 2H)	3,84 (s, 2H)	3,81 (s, 2H)	3,82 (s, 2H)	3,77 (s, 2H)
4	6,13 (d, $J=2,1\text{Hz}$)	6,11 (d, $J=2,2\text{Hz}$)	6,32 (d, $J=2,3\text{ Hz}$)	6,30 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	6,26 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	6,25 (s)
6	6,27 (d, $J=2,0\text{Hz}$)	6,25 (d, $J=2,2\text{Hz}$)	6,28 (d, $J=2,4\text{ Hz}$)	6,27 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	6,29 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	6,26 (s)
10	2,77 (t, $J=7,4\text{Hz}$, 2H)	2,77 (t, $J=6,0\text{Hz}$, 2H)	2,84 (t, $J=7,3\text{Hz}$, 2H)	2,83 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 2H)	2,86 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 2H)	2,85 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 2H)
11	1,49 (m, 2H)	1,47 (m) (2H)	1,41-1,31 (m)	1,34 (m) (2H)	1,33-1,52 (m, 6H)	1,45 (m) (2H)
12	1,28 - 1,19 (m, 6H)	1,20 (m) (2H)	1,41-1,31 (m)	1,27 (m) (2H)	1,33-1,52 (m, 6H)	1,25 (m) (2H)
13	1,28 - 1,19 (m, 6H)	1,24 (m) (2H)	1,41-1,31 (m)	1,26 (m) (2H)	1,33-1,52 (m, 6H)	1,42 (m) (2H)
14	1,28 - 1,19 (m, 6H)	1,24 (m) (2H)	1,41-1,31 (m)	1,34 (m) (2H)	3,55 (m)	3,55 (m)
15	3,55 (m)	3,55 (m)	1,41-1,31 (m)	1,36 (m) (2H)	1,27 (m) (2H)	1,25 (m) (2H)
16	1,01 (d, $J=6,1\text{Hz}$, 3H)	1,01 (d, $J=5,3\text{Hz}$, 3H)	3,64 (t, $J=6,6\text{ Hz}$, 2H)	3,64 (t, $J=6,5\text{Hz}$, 2H)	0,94 (t, $J=7,6\text{Hz}$, 3H)	0,93 (t, $J=7,4\text{Hz}$, 3H)
17	4,01 (q, $J=7,1\text{Hz}$, 2H)	3,99 (q, $J=7,0\text{Hz}$, 2H)	4,19 (q, $J=7,1\text{ Hz}$, 2H)	4,18 (q, $J=7,2\text{Hz}$, 2H)	4,19 (q, $J=7,1\text{Hz}$, 2H)	4,18 (q, $J=7,2\text{Hz}$, 2H)
18	1,16 (t, $J=7,1\text{Hz}$, 3H)	1,14 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 3H)	1,27 (t, $J=7,1\text{ Hz}$, 3H)	1,26 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 3H)	1,27 (t, $J=7,1\text{Hz}$, 3H)	1,25 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 3H)
OH-5	9,73 (s)	9,74				
OH-7	9,95 (s)	9,96				

3.3.1.3 Citosporona C (1-heptil-6,8-diidroxi-isocroman-3-ona, número CAS: 321661-63-6)

O espectro de massas de alta resolução da subfração purificada **CYT11_06_02** (13,7 mg) permitiu a definição de sua fórmula molecular como $C_{16}H_{22}O_4$ (m/z calculado para $C_{16}H_{22}O_4 = 279,1596$ $[M+H]^+$; m/z encontrado = 279,1597). Foram encontradas 18 substâncias com a mesma fórmula molecular no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), incluindo a citosporona C, originalmente isolada de um fungo endófito do gênero *Cytospora* (Brady et al., 2000). A comparação dos dados de RMN permitiu a identificação de **CYT11_06_02** como sendo o metabólito citosporona C (**22**, **Fig. 3.9**, pag. 68).

O espectro de RMN de 1H de **CYT11_06_02** (**Fig. 3.11**, pag. 69) exibiu um sinal referente a um grupo metila em δ_H 0,89 (t, $J = 6,9$ Hz, CH_3 -16), dois sinais referentes a hidrogênios aromáticos em δ_H 6,13 (d, $J = 1,5$ Hz, H4) e 6,22 (d, $J = 2,0$ Hz, H6) e um sinal referente a um hidrogênio metínico ligado a carbono sp^3 oxigenado, em δ_H 5,60 (dd, $J = 8,6, 5,2$ Hz, H9). Também foram identificados os sinais referentes aos metilenos componentes da cadeia lateral alifática da citosporona C (**22**) (Brady et al., 2000). O espectro de RMN de ^{13}C de **CYT11_06_02** exibiu 16 sinais, em concordância com fórmula molecular calculada (**Apêndice 2.2**). A presença de apenas um sinal referente a uma carbonila de éster em δ_C 174,1 (C1) e a detecção de um sinal referente a um carbono sp^3 oxigenado em δ_C 80,1 foram condizentes com a ausência da carbonila de cetona da posição C9 da citosporona B (**18**) (Brady et al., 2000). A presença de uma lactona de seis membros ligando C1 a C9 foi confirmada pela correlação entre H9 (δ_H 5,60) e C1 (δ_C 174,1) no mapa de contornos HMBC (**Apêndice 2.7**). A elucidação da estrutura completa de **CYT11_06_02** foi realizada por meio das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC (**Tabela 3.3**, pag. 70, e **Apêndices 2.3, 2.4 e 2.7**). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 14,75 min

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 11,79 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 1000

Espectrometria de massas (MeOH) (Fig. 3.9, pag. 68): $m/z = 279,2$ $[M+H]^+$, 301,1 $[M+Na]^+$, 311,2 $[M+CH_3OH+H]^+$, 557,3 $[2M+H]^+$, 579,3 $[2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção na região do UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 206, 228 (ombro), 284.

Espectroscopia de absorção na região do IV (Fig. 3.10): ν , cm^{-1} = 3336, 2956, 2927, 2856, 1703, 1608, 1523, 1469, 1384, 1359, 1271, 1259, 1147, 1055, 1022, 1002, 947, 842, 725

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de ^1H - Fig. 3.11 (pag. 69), demais espectros - **Apêndice 2**, comparação de dados com a literatura - **Tabela 3.3** (pag. 70)

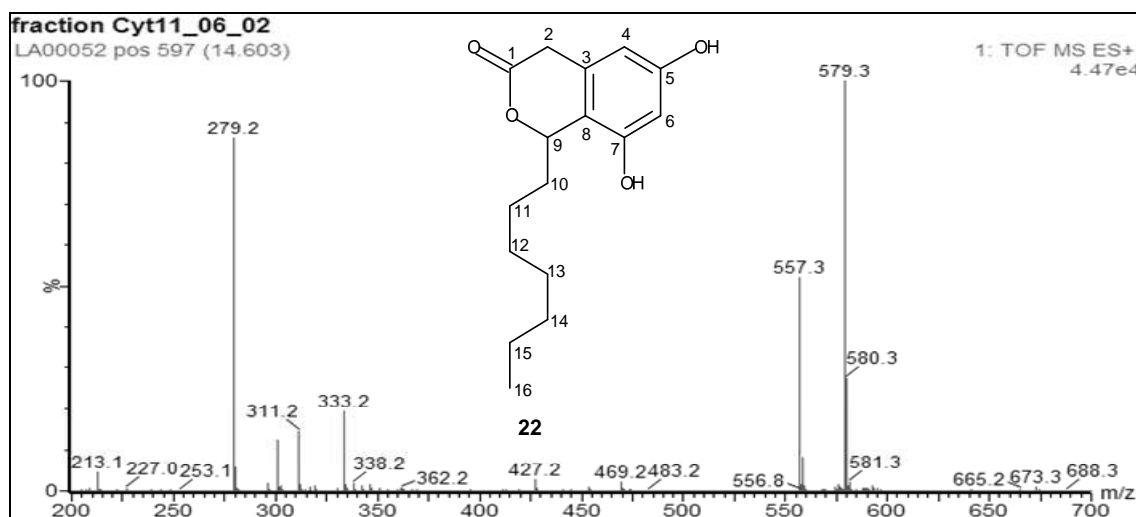


Figura 3.9: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_06_02 (22)**

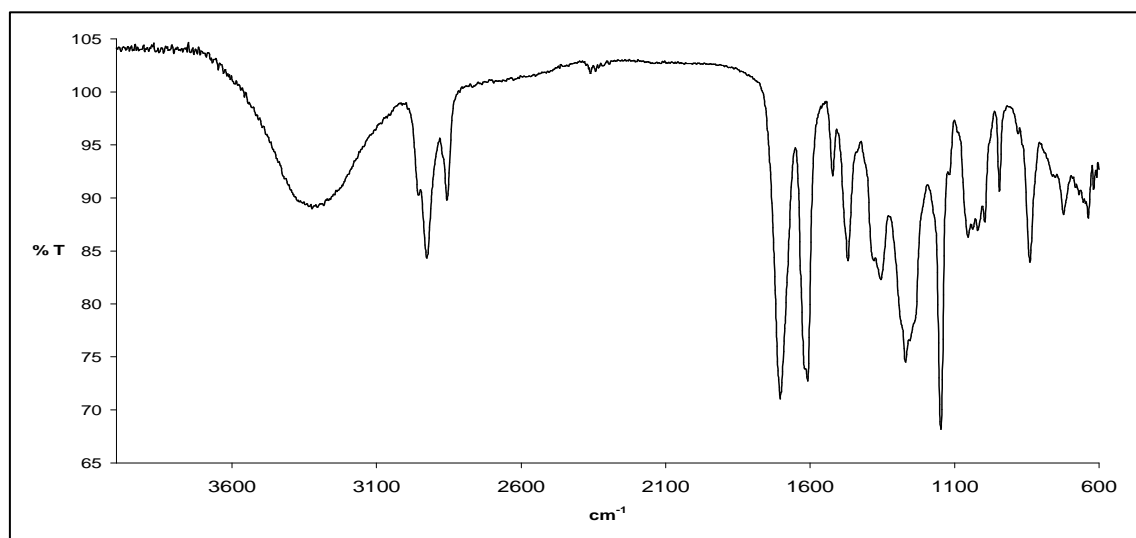


Figura 3.10: Espectro de absorção na região do IV de **CYT11_06_02 (22)** (ATR)

Os dados de RMN referentes aos hidrogênios e carbonos das posições 4 e 6 de **CYT11_06_02** ficaram invertidos, quando comparados com aqueles descritos para a citosporona C (Brady et al. 2000), como observado para a citosporona B (item 3.3.1.1, pag. 56). Essa inversão foi comprovada pelas correlações, obtidas no mapa de contornos HMBC, entre o sinal de H4 (δ_{H} 6,13, d, $J=1,5$ Hz) e aquele referente a C2 (δ_{C} 35,5), e entre o sinal de H6 (δ_{H} 6,22 d, $J=1,5$ Hz) e aquele referente a C7 (δ_{C} 155,2) (Fig. 3.12, pag. 69). Na descrição original das citosporonas, Brady et al. (2000)

realizaram a análise cristalográfica da citosporona C (**22**) e concluíram que essa, e provavelmente as outras citosporonas contendo um carbono assimétrico em sua estrutura, era produzida sob a forma de mistura racêmica.

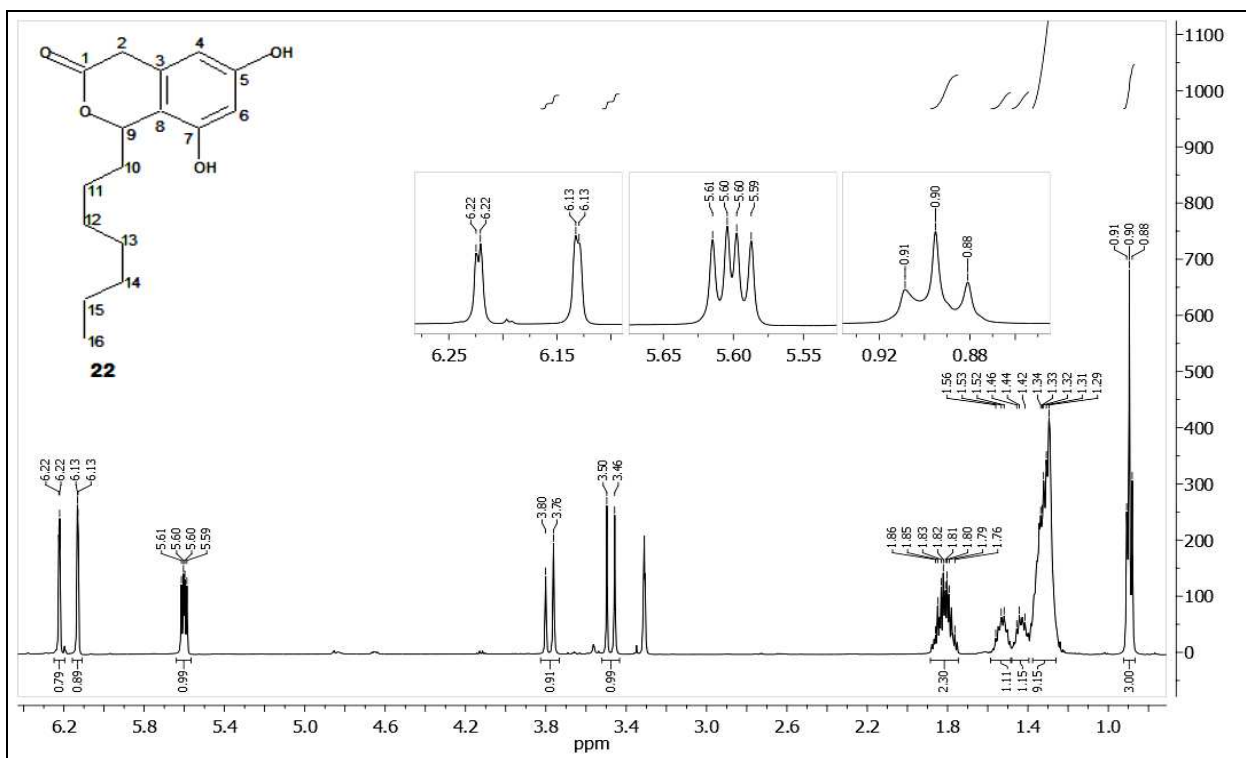


Figura 3.11: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de **CYT11_06_02** (**22**)

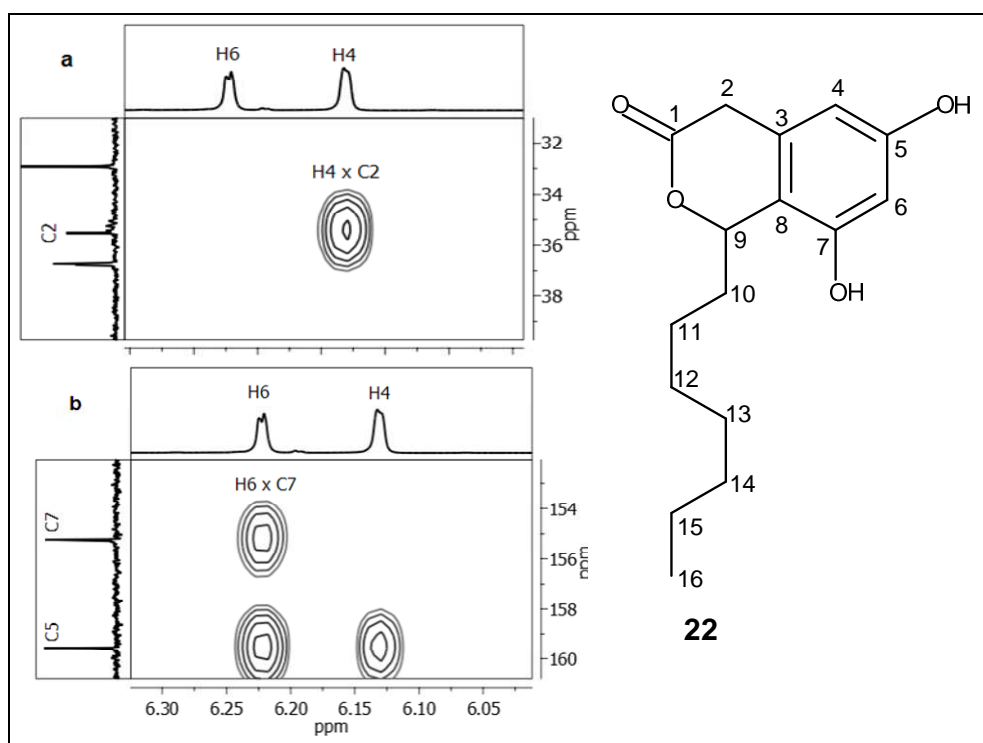


Figura 3.12: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de **CYT11_06_02** (**22**) evidenciando as correlações: **a** - H4 x C2; **b** - H6 x C7. Espectro completo no Apêndice 2.7

Em ensaios comparativos, a citosporona C (**22**) não foi capaz de se ligar ao receptor nuclear Nur77 ou induzir os processos de gliconeogênese em células de fígado de ratos e apoptose em células tumorais, como o observado para a citosporona B (**18**) (Zhan et al., 2008).

Tabela 3.3: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT11_06_02** em comparação com aqueles descritos para o metabólito citosporona C (Brady et al., 2000)

posição	CYT11_06_02 [δ (ppm), CD_3OD]			Citosporona C [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]	
	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	Correlações em HMBC	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
1	174,1			170,5	
2	35,5	a: 3,78 (d, $J=19,6\text{Hz}$); b: 3,48 (d, $J=19,6\text{Hz}$)	C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8	35,4	a: 3,79 (d, $J=24,0\text{Hz}$); b: 3,45 (d, $J=24,0\text{Hz}$)
3	132,8			133,5	
4	106,1	6,13 (d, $J=1,5\text{Hz}$)	C2, C5, C6, C8	101,8	6,34 (s)
5	159,6			159,0	
6	102,1	6,22 (d, $J=1,5\text{Hz}$)	C4, C5, C7, C8	106,3	6,23 (s)
7	155,2			154,5	
8	113,9			114,0	
9	80,1	5,60 (dd, $J=8,6, 5,2\text{Hz}$)	C1, C3, C7, C8, C10, C11	78,3	5,55 (dd, $J=11,5,$ $3,0\text{Hz}$)
10	36,7	1,81 (m, 2H)	C8, C9, C11, C12	36,4	a: 1,86 (m); b: 1,78 (m)
11	26,6	a: 1,53 (m); b: 1,43 (m)	C9, C10, C12 ou C13	26,4	a: 1,55 (m); b: 1,42 (m)
12	30,3 ^a	1,34 (m) (2H)	C13	29,9	
13	30,2 ^b	1,34 (m) (2H)	C12	29,9	1,27-1,30 (bm, H12- H15, 8H)
14	32,9	1,31 (m) (2H)		32,5	
15	23,7	1,30 (m) (2H)	C14	23,3	
16	14,4	0,89 (t, $J=6,9\text{Hz}, 3\text{H}$)	C14, C15	14,3	0,86 (t, $J=8,5\text{Hz}, 3\text{H}$)

^{a, b} - as atribuições aos carbonos adjacentes podem estar invertidas

3.3.1.4 Dotiorelona H (Citosporona J) (6,8-diidroxi-1-(6-hidroxiéptil)isocroman-3-ona, número CAS: 885109-77-3)

A subfração purificada **CYT09_09_1-2_01** (22,1 mg) foi isolada como uma goma branca e exibiu um espectro de absorção na região do UV muito similar àquele da citosporona C (**22**, item 3.3.1.3, pag. 67). A fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5$, contendo um átomo de oxigênio a mais do que aquela de **22**, foi determinada para essa subfração

por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{16}H_{23}O_5 = 295,1545 [M+H]^+$; m/z encontrado = 295,1520). Foram encontradas 13 substâncias contendo a fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_5$ no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), dentre as quais as citosporonas A e D, isoladas por Brady et al. (2000) do fungo endófito *Cytospora* sp. A análise dos dados de RMN de 1H de **CYT09_09_1-2_01** (Fig. 3.15, pag. 73) mostrou a presença de dois sinais referentes a hidrogênios aromáticos em δ_H 6,13 (sl) e 6,23 (d, $J = 1,5$ Hz), diferentemente do observado para o metabólito citosporona D (**25**, item 3.3.1.6, pag. 78), que possui apenas um sinal de hidrogênio ligado a carbono aromático. Também foi observado um sinal referente a um hidrogênio metínico ligado a carbono sp^3 oxigenado em δ_H 5,61 (dd, $J = 8,6, 5,2$ Hz), o qual inexistente no espectro da substância citosporona A (Brady et al., 2000).

O espectro de RMN de 1H de **CYT09_09_1-2_01** (Fig. 3.15, pag. 73) mostrou-se muito similar àquele da citosporona C (**22**, Fig. 3.11, pag. 69); com exceções de um sinal em δ_H 3,70 (m), referente a um hidrogênio ligado a carbono sp^3 oxigenado, inexistente no espectro de **22**, e da substituição do tripleto em δ_H 0,89, referente ao grupo CH_3 -16 em **22**, por um duplete em δ_H 1,14 (d, $J = 6,2$ Hz). Tais resultados, conjuntamente com a correlação entre o sinal em δ_H 3,70 e aquele em δ_H 1,14, no mapa de contornos COSY (Apêndice 3.3), indicaram que **CYT09_09_1-2_01** tratava-se da 15-hidroxicitosporona C. Uma busca por essa estrutura química, realizada no banco de dados *Chemical Abstracts*, através do programa *Scifinder Scholar* 2007 (American Chemical Society, 2007), resultou na dotiorelona H (**23**, Fig. 3.13, pag. 72), descrita e depositada em uma patente chinesa por Shen et al. (2006). A comparação dos dados de RMN (Tabela 3.4, pag. 75) permitiu a confirmação de **CYT09_09_1-2_01** como sendo **23**. Recentemente, Xu et al. (2009) descreveram o isolamento e a identificação de **23** do fungo endófito *Pestalotiopsis* sp. e, considerando-a inédita, nomearam-na citosporona J. Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (CH₃CN), substância pura: 05,21 min.

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 06,42 min.

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 757

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig. 3.13, pag. 72): $m/z = 295,2 [M+H]^+$, 312,2 $[M+NH_4]^+$, 317,1 $[M+Na]^+$, 333,1 $[M+K]^+$, 358,2 $[M+CH_3CN+Na]^+$, 589,3 $[2M+H]^+$, 606,3 $[2M+NH_4]^+$, 611,3 $[2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção na região do UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 204, 228 (ombro), 282

Espectroscopia de absorção na região do IV (Fig. 3.14): ν , cm^{-1} = 3325, 2968, 2935, 2862, 1708, 1620, 1525, 1469, 1381, 1357, 1274, 1203, 1147, 1087, 1056, 1022, 1002, 947, 842, 725, 638

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de ^1H - Fig. 3.15 (pag. 73), demais espectros - Apêndice 3, comparação de dados com a literatura - Tabela 3.4 (pag. 75)

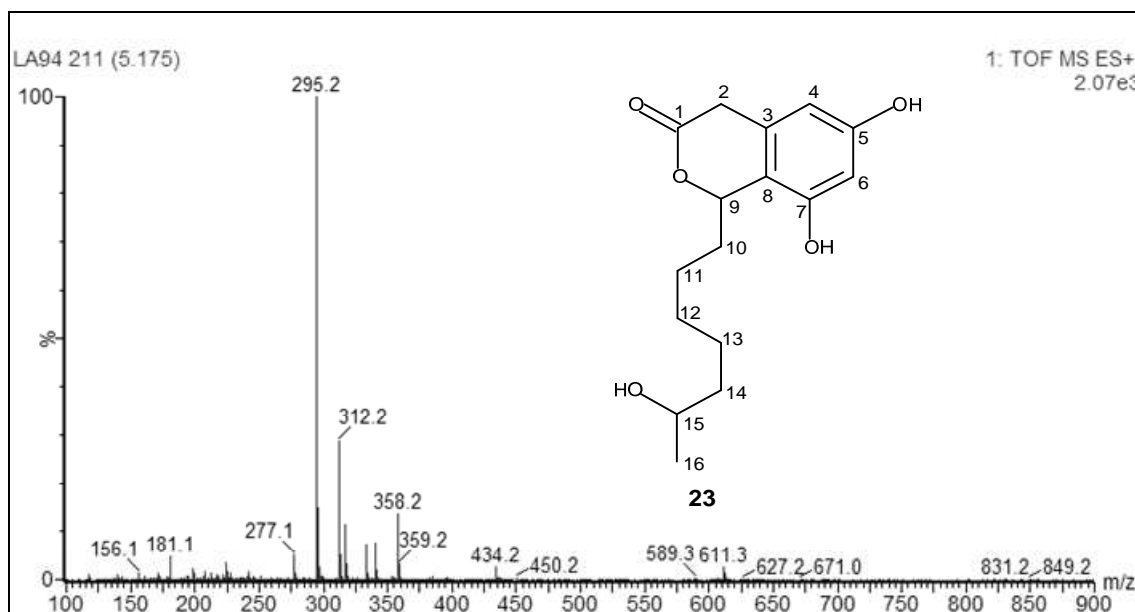


Figura 3.13: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT09_09_1-2_01 (23)**

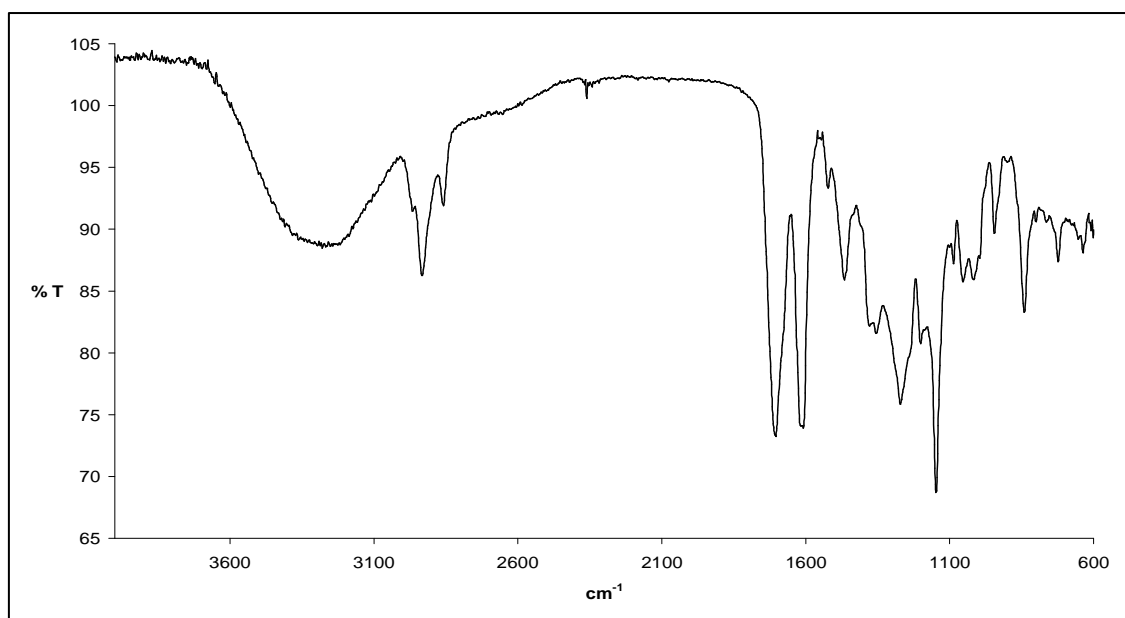


Figura 3.14: Espectro de absorção na região do IV de **CYT09_09_1-2_01 (23)** (ATR)

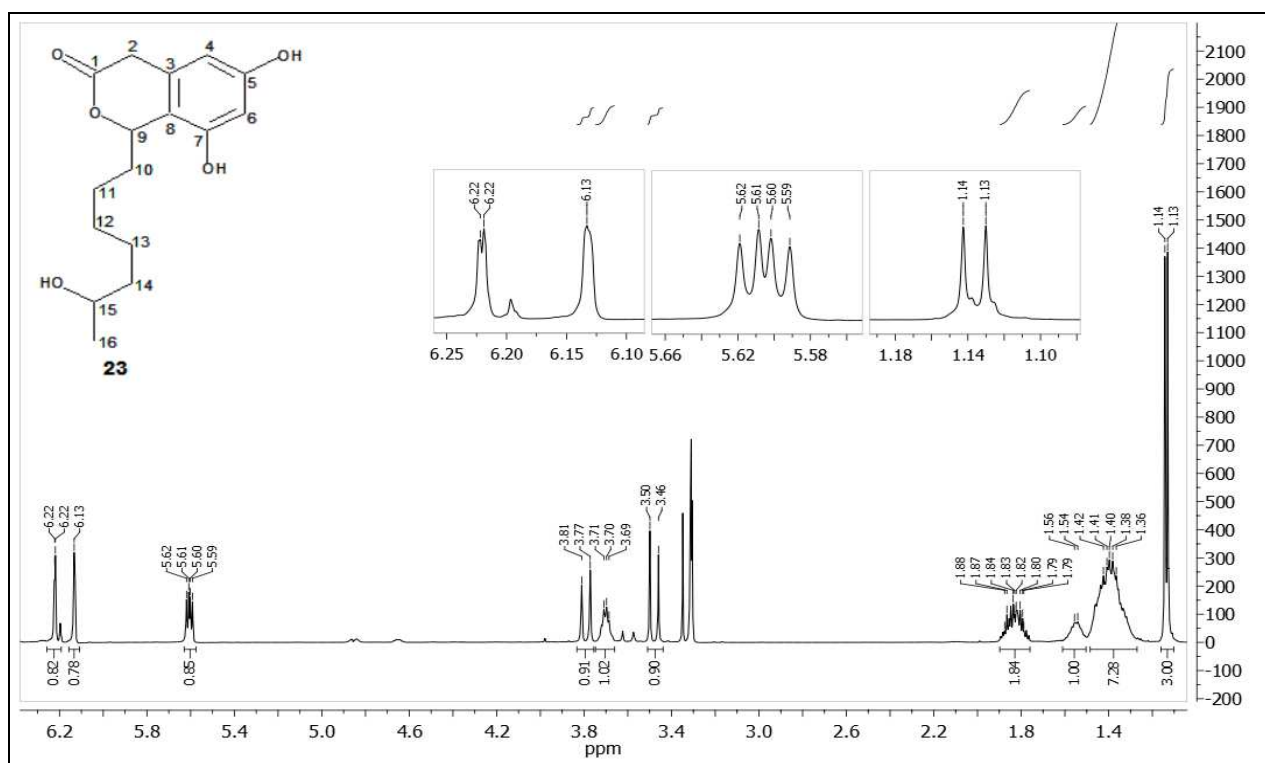


Figura 3.15: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)**

As correlações, obtidas no mapa de contornos HMBC, entre o sinal em δ_{H} 3,70 (H15) e outro em δ_{C} 26,7, e entre o sinal em δ_{H} 1,13 (CH_3 -16) e aquele em δ_{C} 40,1 (**Fig. 3.16**, pag. 74) permitiram a re-atribuição dos valores dos sinais de RMN de ^{13}C referentes aos carbonos C13 e C14 de **23** em δ_{C} 26,7 e δ_{C} 40,1 (Abreu et al. 2010b), ao invés de δ_{C} 30,3 e δ_{C} 31,0, inicialmente descritos por Shen et al (2006). Xu et al. (2009) não descreveram os dados de RMN de ^{13}C para o metabólito citosporona J.

Como já descrito para os metabólitos citosporona B e C, os sinais de RMN referentes aos carbonos e hidrogênios das posições 4 e 6 de **CYT09_09_1-2_01** mostraram-se invertidos quando comparados com aqueles descritos para a dotiorelona H (**23**) (Shen et al, 2006). Essa inversão foi comprovada pelas correlações, obtidas no mapa de contornos HMBC, entre o sinal de H4 (δ_{H} 6,13) e aquele de C2 (δ_{C} 35,5), e entre o sinal de H6 (δ_{H} 6,23) e aquele referente a C7 (δ_{C} 155,2) (**Fig. 3.17**, pag. 74).

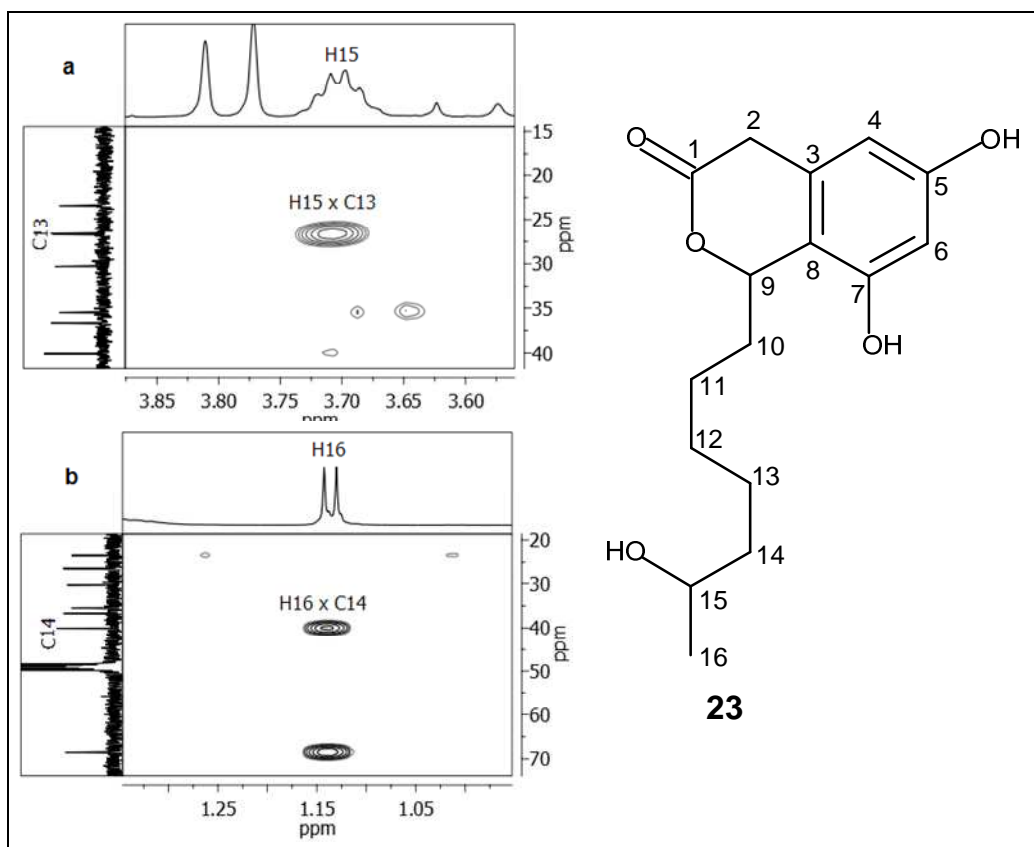


Figura 3.16: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de **CYT09_09_1-2_01** (**23**) evidenciando as correlações: **a** - H15 x C13; **b** - H16 x C14. Espectro completo no **Apêndice 3.7**

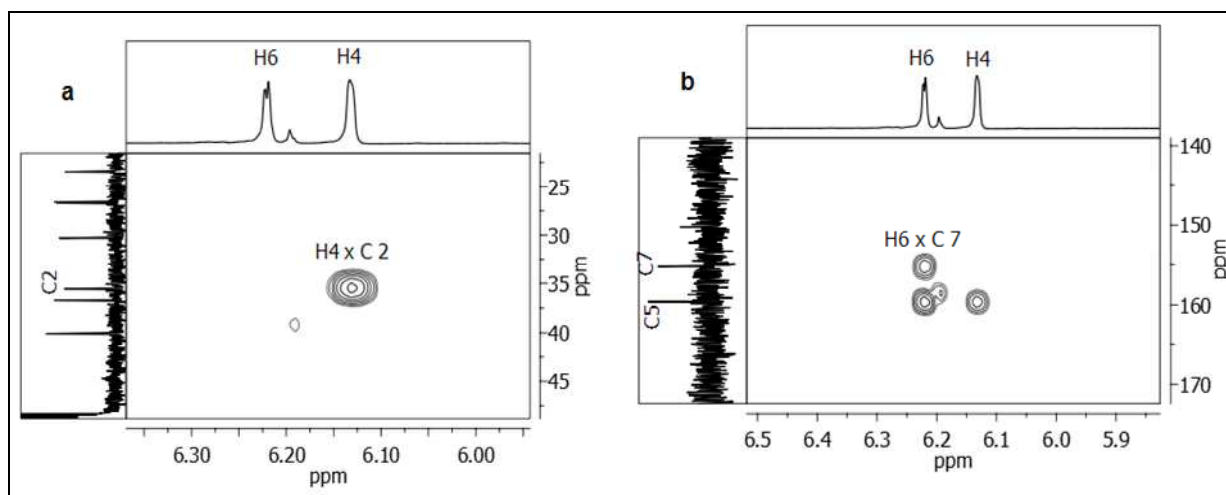


Figura 3.17: Seções expandidas do mapa de contornos HMBC de **CYT09_09_1-2_01** (**23**) evidenciando as correlações: **a** - H4 x C2; **b** - H6 x C7. Espectro completo no **Apêndice 3.7**

Tabela 3.4: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT09_09_1-2_01** comparados com aqueles descritos para o metabólito dotiorelona H (Shen et al., 2006)

posição	CYT09_09_01-02_01 [δ (ppm), CD_3OD]			dotiorelona H [δ (ppm), CD_3OD]	
	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	Correlações em HMBC	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
1	174,1			174,0	
2	35,5	a: 3,79 (d, $J=19,5\text{Hz}$); b: 3,48 (d, $J=19,6\text{Hz}$)	C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8	35,5	a: 3,80 (d, $J=19,5\text{Hz}$); b: 3,52 (d, $J=19,0\text{Hz}$)
3	132,9			132,8	
4	106,1	6,13 (sl)	C2, C5, C6, C8	102,0	6,21 (s)
5	159,6			159,5	
6	102,0	6,23 (d, $J=1,5\text{Hz}$)	C4, C5, C7, C8	106,1	6,12 (s)
7	155,2			155,2	
8	113,9			113,9	
9	80,1	5,61 (dd, $J=8,6, 5,2\text{Hz}$, 2H)	C1, C3, C7, C8, C10, C11	80,1	5,61 (dd, $J=9,1, 4,1\text{Hz}$, 2H)
10	36,7	1,84 (m, 2H)	C8, C9, C11, C12	36,7	1,83 (m, 2H)
11	26,6	a: 1,55 (m); b: 1,39 (m)		26,7	1,34 - 1,47 (m) (2H)
12	30,3	1,37 (m) (2H)	C13	30,7	1,34 - 1,47 (m) (2H)
13	26,7	1,39 (m) (2H)		30,3	1,34 - 1,47 (m) (2H)
14	40,1	1,41 (m) (2H)		31,0	1,34 - 1,47 (m) (2H)
15	68,5	3,70 (m)	C13	68,5	3,71 (m)
16	23,5	1,14 (d, $J=6,2\text{Hz}$, 3H)	C14, C15	23,5	1,13 (d, $J=6,2\text{Hz}$, 3H)

3.3.1.5 Citosporona O (6,8-diidroxi-1-(5-hidroxiethyl)isocroman-3-ona) – metabólito inédito

A subfração purificada **CYT09_09_1-2_02** (5,6 mg) foi obtida como uma goma esbranquiçada e exibiu um espectro de absorção no UV idêntico àquele da dotiorelona H (**23**, item **3.3.1.4**, pag. 70), além da mesma fórmula molecular, $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5$, determinada por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 295,1545$; m/z encontrado = 295,1523). O espectro de RMN de ^1H de **CYT09_09_1-2_02** (Fig. 3.19, pag. 77) mostrou-se muito semelhante ao de **23**, com exceção da substituição do duplete em δ_{H} 1,14, referente ao grupo CH_3 -16 de **23**, por um duplete triplo em δ_{H} 0,93 ($J = 7,4, 1,5 \text{ Hz}$), indicando uma mudança de posição da hidroxila ligada à cadeia alifática lateral.

O sinal em δ_{H} 0,93 (CH_3 -16) apresentou correlação com um sinal referente a um carbono alifático oxigenado em δ_{C} 73,9 no mapa de contornos HMBC (Tabela 3.5,

pag. 77 e **Apêndice 4.7**). Já um sinal em δ_H 3,43 (m), referente a um hidrogênio ligado a carbono oxigenado, exibiu correlação com o carbono metílico C16 (δ_C 10,5). Tais evidências indicaram a presença de uma hidroxila ligada ao carbono C14 da estrutura de **CYT09_09_1-2_02**, identificando-a como 14-hidroxicitosporona C (**24**). Nenhuma substância com a estrutura **24** foi encontrada no banco de dados *Chemical Abstracts*. Logo, essa foi considerada inédita e nomeada citosporona O (Abreu et al., 2010b), seguindo a ordem das citosporonas já descritas na literatura (Brady et al., 2000; Paranagama et al., 2007; Xu et al., 2009). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são descritos a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (CH₃CN), substância pura: 05,36 min

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 06,62 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 764

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig. 3.18): m/z = 295,2 [M+H]⁺, 312,2 [M+NH₄]⁺, 317,1 [M+Na]⁺, 333,1 [M+K]⁺, 358,2 [M+CH₃CN+Na]⁺, 611,3 [2M+Na]⁺

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 204, 228 (ombro), 282

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de ¹H - **Fig. 3.19** (pag. 77), demais espectros - **Apêndice 4**, compilação dos resultados - **Tabela 3.5** (pag. 77)

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} = -1.9^\circ$ (c 0,005, MeOH)

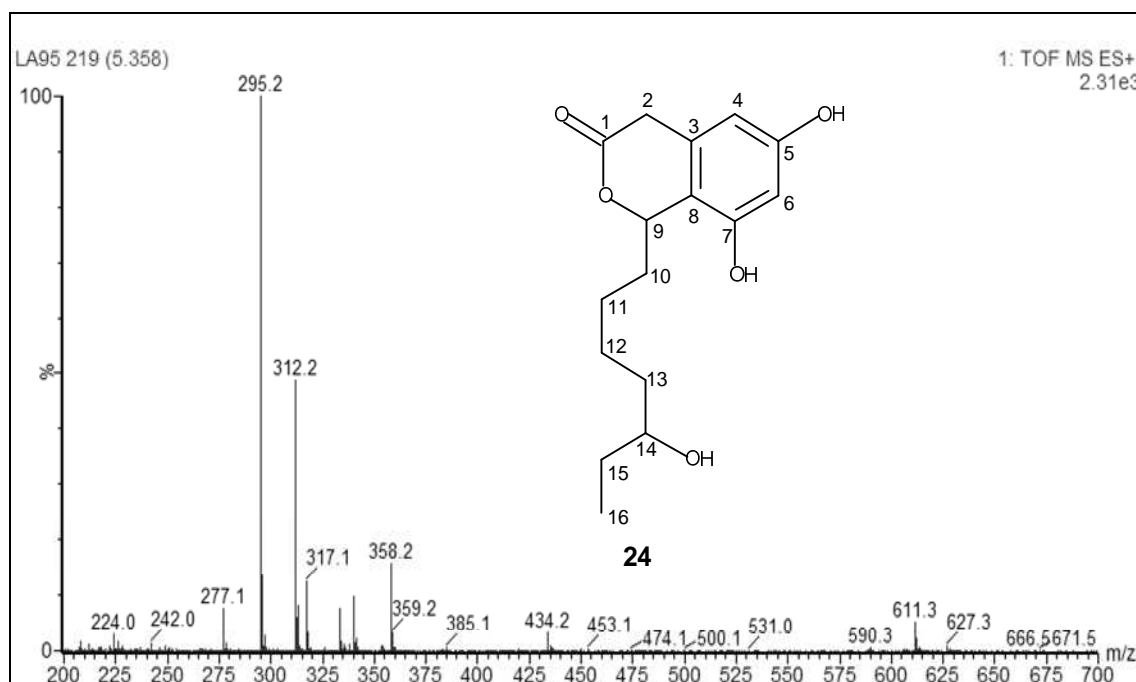


Figura 3.18: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT09_09_1-2_02** (**24**)

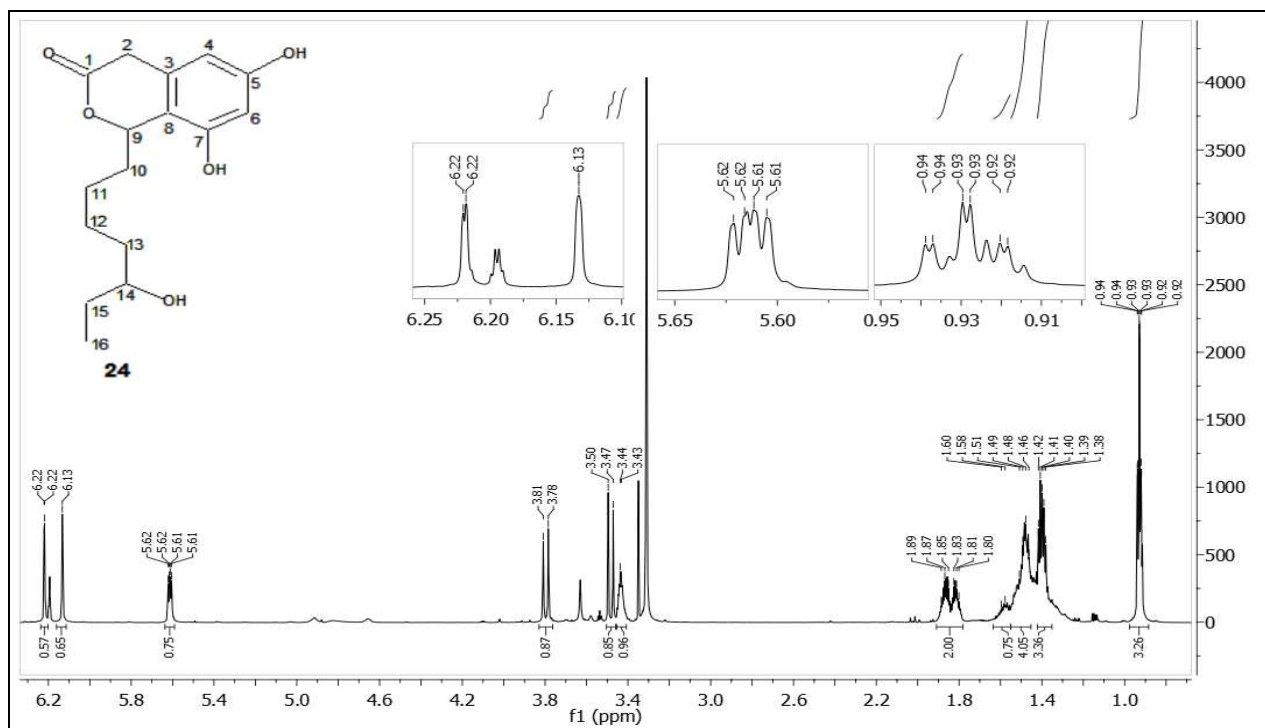


Figura 3.19: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)**

Tabela 3.5: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT09_09_1-2_02 (24)**

posição	CYT09_09_01-02_02 [δ (ppm), CD_3OD]		
	RMN de ^{13}C (200 MHz)	RMN de ^1H (800 MHz)	Correlações em HMBC
1	174,2		
2	35,7	a: 3,80 (d, $J=19,5\text{Hz}$); b: 3,48 (d, $J=19,6\text{Hz}$)	C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 (f) ^a
3	133,0		
4	106,3	6,13 (sl)	C2, C5, C6, C8
5	159,7		
6	102,1	6,22 (d, $J=1,63\text{Hz}$)	C4, C5, C7, C8
7	155,4		
8	114,0		
9	80,2	5,61 (dd, $J=8,6, 5,1\text{Hz}$)	C1, C3, C7, C8, C10, C11
10	36,9	a: 1,87 (m); b: 1,82 (m)	C8 (f), C9, C11, C12
11	26,9	a: 1,49 (m); b: 1,41 (m)	
12	26,5	a: 1,48 (m); b: 1,40 (m)	C13
13	37,9	a: 1,48 (m); b: 1,40 (m)	C14
14	73,9	3,43 (m)	C12 (f), C16 (f)
15	31,2	a: 1,48 (m); b: 1,40 (m)	C13, C14, C16
16	10,5	0,93 (dt, $J=7,4, 1,5\text{Hz}$, 3H)	C14, C15

^a f: correlação fraca

3.3.1.6 Citosporona D (1-heptil-1,4-diidro-6,7,8-triidroxi-2-benzopiran-3-ona, número CAS: 321661-59-0)

A subfração purificada **CYT11_06_01** (0,6 mg) exibiu espectro de absorção na região do UV semelhante, porém distinto, daquele apresentado pelos metabólitos **22**, **23** e **24**. O espectro de massas de alta resolução dessa subfração permitiu a definição de sua fórmula molecular como $C_{16}H_{22}O_5$ (m/z calculado para $C_{16}H_{23}O_5$ $[M+H]^+ = 295,1545$; m/z encontrado = 295,1538). O espectro de RMN de 1H de **CYT11_06_01** (**Fig. 3.21**) foi comparado com aqueles dos metabólitos citosporona A e D (Brady et al., 2000), os quais possuem a mesma fórmula molecular, permitindo a sua identificação como o metabólito citosporona D (**25**). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são descritos a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 14,14 min

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: não detectado

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: não determinado

Espectrometria de massas (MeOH) (Fig. 3.20): $m/z = 295,2$ $[M+H]^+$, 317,1 $[M+Na]^+$, 327,2 $[M+CH_3OH+H]^+$, 589,3 $[2M+H]^+$, 611,3 $[2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) (H₂O–MeOH + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 206, 272

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de 1H - **Fig. 3.21** (pag. 79), comparação de dados com a literatura - **Tabela 3.6** (pag. 79)

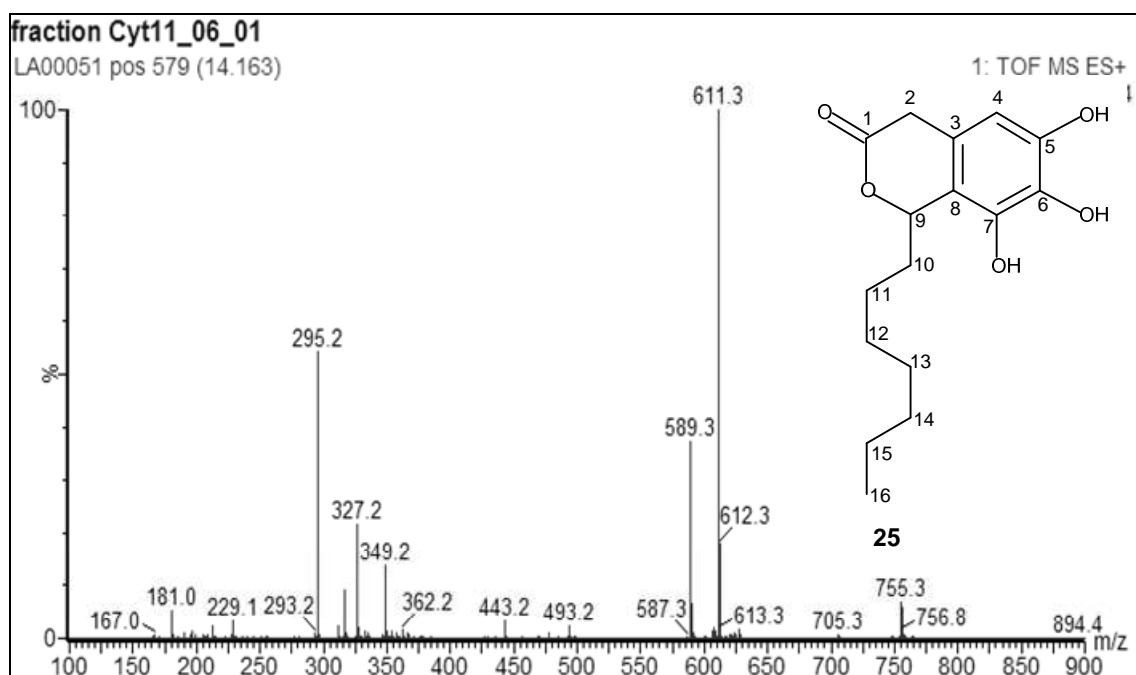


Figura 3.20: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_06_01** (**25**)

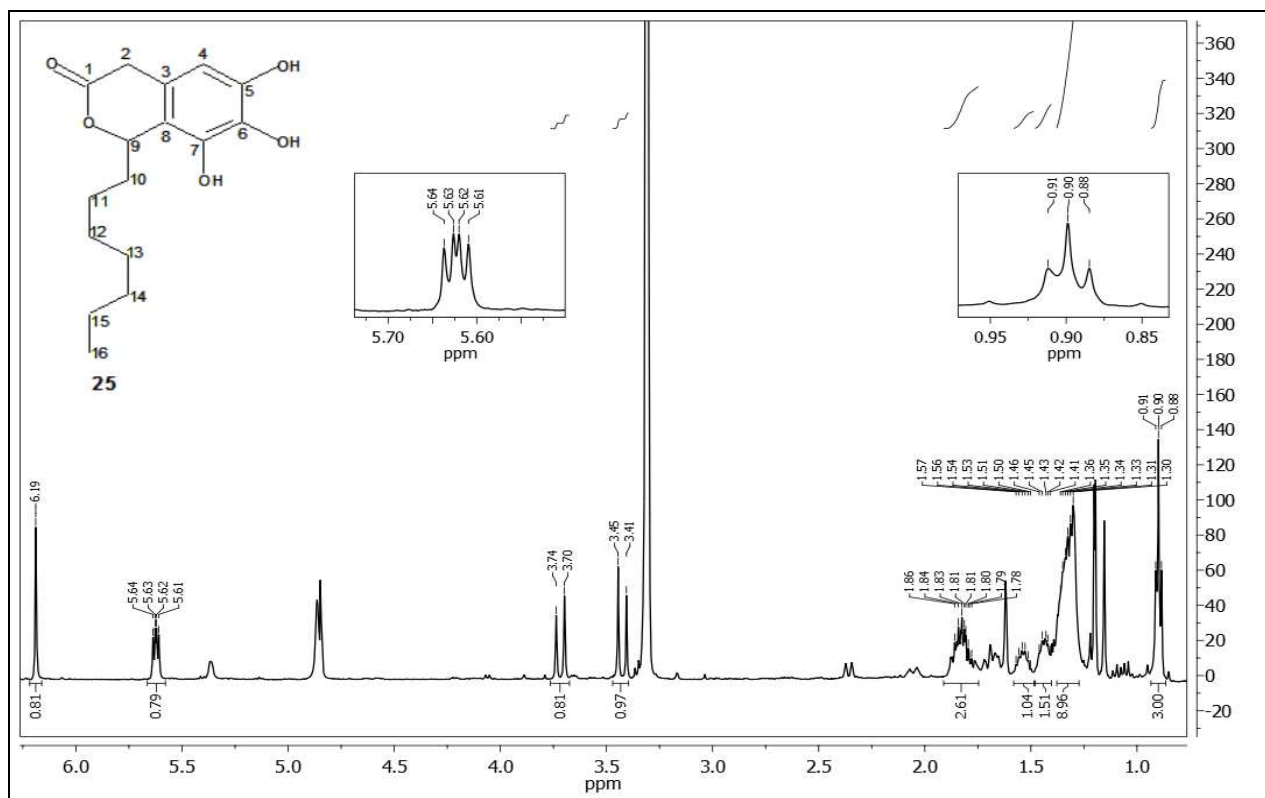


Figura 3.21: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de **CYT11_06_01** (25)

Tabela 3.6: Dados de RMN de ^1H de **CYT11_06_01** e aqueles da citosporona D (Brady et al., 2000)

posição	CYT11_06_01 [δ (ppm), CD_3OD]	Citosporona D [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]
	RMN de ^1H (500 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
2	a: 3,72 (d, $J=19,5\text{Hz}$); b: 3,43 (d, $J=19,5\text{Hz}$)	a: 3,71 (d, $J=19,0\text{Hz}$); b: 3,39 (d, $J=19,0\text{Hz}$)
4	6,19 (s)	6,29 (s)
9	5,62 (dd, $J=8,4, 5,3\text{Hz}$)	5,57 (dd, $J=9,0, 6,0\text{Hz}$)
10	1,83 (m) (2H)	a: 1,86 (m); b: 1,81 (m)
11	a: 1,54 (m); b: 1,44 (m)	a: 1,55 (m); b: 1,42 (m)
12 - 15	1,27-1,38 (ml, 8H)	1,26-1,33 (ml, H12-H15, 8H)
16	0,90 (t, $J=6,8\text{Hz}$, 3H)	0,88 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 3H)

3.3.1.7 Citosporona E (3-heptil-4,5,6-triidroxi-1-isobenzofuranona, número CAS: 321661-60-3)

A fórmula molecular da subfração purificada **CYT11_08_03** (0,5 mg) foi determinada como $C_{15}H_{20}O_5$ por espectroscopia de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{15}H_{21}O_5$ $[M+H]^+ = 281,1389$; m/z encontrado = 281,1367). Foram encontradas 23 substâncias contendo a fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_5$ no banco de dados Antibase (Laatsch, 2008), dentre as quais a citosporona E, isolada por Brady et al. (2000) do fungo endófito *Cytospora* sp. e a dotiorelona D, isolada a partir do fungo endófito *Dothiorella* sp. por Xu et al. (2004). A análise comparativa do espectro de RMN de 1H de **CYT11_08_03** (Fig. 3.23, Tabela 3.7, pag. 81) permitiu sua identificação como sendo o metabólito citosporona E (**26**). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 14,57 min.

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: não detectado

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: não determinado

Espectrometria de massas (MeOH) (Fig. 3.22): $m/z = 281,2$ $[M+H]^+$, $303,1$ $[M+Na]^+$, $313,1$ $[M+CH_3OH+H]^+$, $561,3$ $[2M+H]^+$, $583,3$ $[2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção na região do UV (DAD) (H₂O–MeOH + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 220, 278

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de 1H - Fig. 3.23 (pag. 81), comparação de dados com a literatura - Tabela 3.7 (pag. 81)

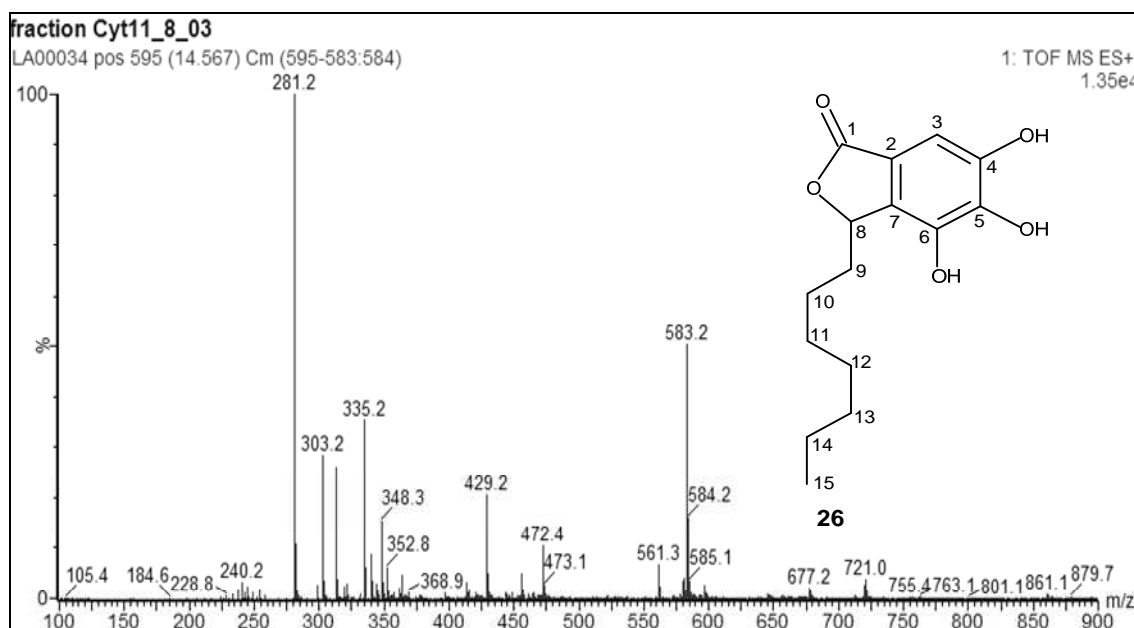


Figura 3.22: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_08_03** (**26**)

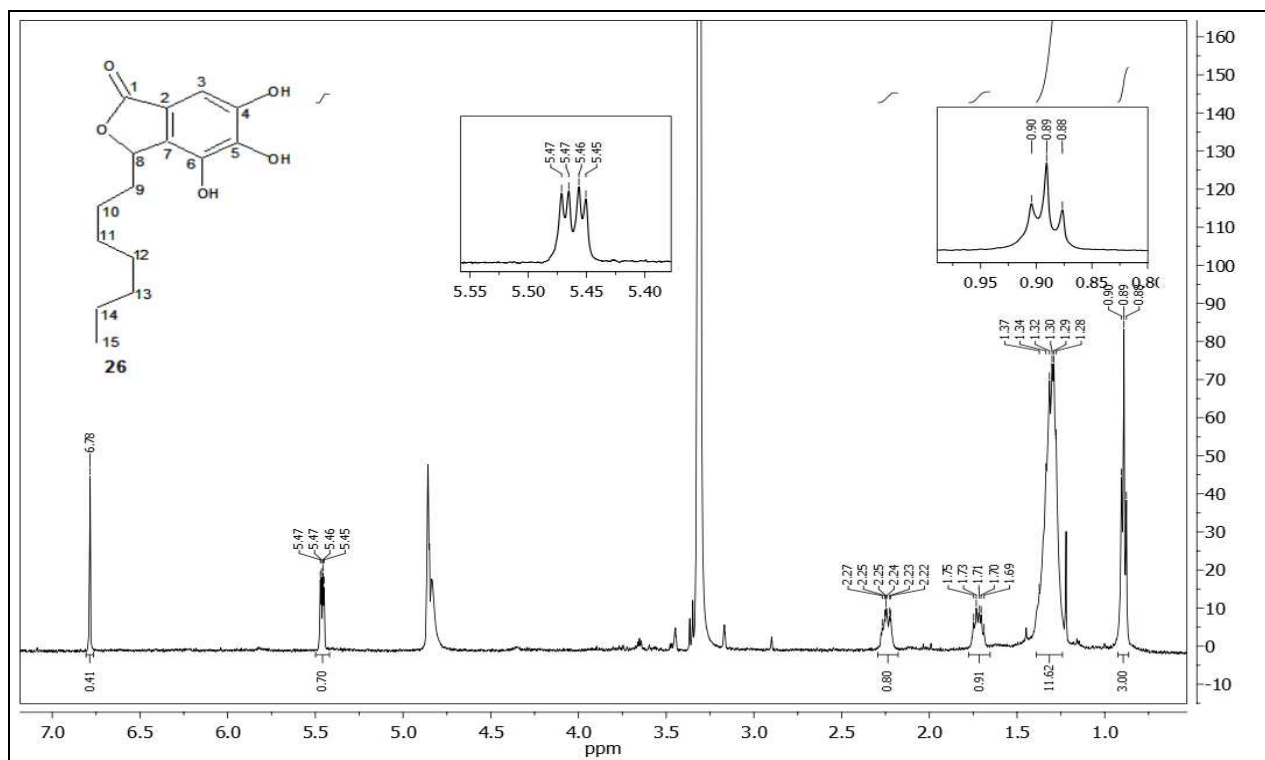


Figura 3.23: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 500 MHz] de **CYT11_08_03 (26)**

Tabela 3.7: Dados de RMN de ^1H de **CYT11_08_03** e aqueles da citosporona E (Brady et al., 2000)

posição	CYT11_08_03	Citosporona E
	$[\delta \text{ (ppm), } \text{CD}_3\text{OD}]$	$[\delta \text{ (ppm), } (\text{CD}_3)_2\text{CO}]$
	RMN de ^1H (500 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
3	6,78 (s)	6,83 (s)
8	5,46 (dd, $J=7,4, 3,0\text{Hz}$)	5,46 (dd, $J=7,0, 3,0\text{Hz}$)
9	a: 2,23 (m); b: 1,72 (m)	a: 2,24 (m); b: 1,72 (m)
10 - 14	1,25-1,38 (m, 10H)	1,23-1,44 (m, H10-H14, 10H)
15	0,89 (t, $J=6,9\text{Hz}$, 3H)	0,87 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 3H)

A atividade antimicrobiana das citosporonas D (**25**) e E (**26**), contra bactérias Gram positivas e negativas e contra *Candida albicans*, foi considerada promissora por Brady et al. (2000) quando da descoberta desses metabólitos. Posteriormente, **26** foi sintetizada sob a forma de mistura racêmica e como enantiômeros puros e submetida à avaliação de sua atividade antimicrobiana. Os resultados desses ensaios mostraram que, ao contrário do descrito inicialmente, a citosporona E (**26**) exibiu fraca atividade

contra bactérias Gram positivas e *Candida* spp. e não inibiu o crescimento de bactérias Gram negativas (Hall et al., 2005; Ohzeki & Mori, 2003).

3.3.1.8 Citosporona P (3-(6-hidroxiheptil)-4,5,6-triidroxi-1-isobenzofuranona) – metabólito inédito

A subfração purificada **CYT09_12_01** (3 mg) foi obtida como sólido amorfo esbranquiçado e exibiu um espectro de absorção na região do UV quase idêntico àquele da citosporona E (**26**, item 3.3.1.7, pag. 80). A fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_6$, contendo um átomo de oxigênio a mais do que a de **26**, foi determinada para essa subfração por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{15}H_{21}O_6$ $[M+H]^+ = 297,1338$; m/z encontrado = 297,1327). O espectro de RMN de 1H de **CYT09_12_01** (**Fig. 3.25**, pag. 83) mostrou-se semelhante àquele de **26** (**Fig. 3.23**, pag. 81), com exceção da presença de um sinal em δ_H 3,69 (m), referente a um hidrogênio metínico ligado a um carbono oxigenado, inexistente no espectro de **26**, e da substituição do tripleto em δ_H 0,89, referente ao grupo CH_3 -15 de **26**, por um duplete em δ_H 1,13 (d, $J = 6,2$ Hz). O sinal em δ_H 1,13 exibiu correlações com aquele em δ_H 3,69, no mapa de contornos COSY (**Apêndice 5.3**), e com um sinal referente a um carbono alifático oxigenado em δ_H 68,7, no mapa de contornos HMBC (**Tabela 3.8**, pag. 84, e **Apêndice 5.7**). Essas correlações indicaram a presença de uma hidroxila ligada ao carbono C14 da estrutura de **CYT09_12_01**, definindo-a como a 14-hidroxicitosporona E (**27**, **Fig. 3.24**, pag. 83). As demais correlações observadas no mapa de contornos HMBC permitiram a confirmação do restante da estrutura de **CYT09_12_01** como idêntico à citosporona E (**26**) (**Tabela 3.8**, pag. 84, e **Apêndice 5.7**). Nenhuma substância com estrutura química **27** foi encontrada no banco de dados *Chemical Abstracts*. Logo, essa foi considerada inédita e nomeada de citosporona P (Abreu et al., 2010b). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 4,84 min

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 6,00 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 740

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig. 3.24, pag. 83): $m/z = 297,1$ $[M+H]^+$, 314,2 $[M+NH_4]^+$, 319,1 $[M+Na]^+$, 360,1 $[M+CH_3CN+Na]^+$, 593,3 $[2M+H]^+$, 610,3 $[2M+NH_4]^+$, 615,2 $[2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção na região do UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 220, 276

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de ^1H - **Fig. 3.25** (pag. 83), demais espectros - **Apêndice 5**, compilação dos resultados - **Tabela 3.8** (pag. 84)

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} = -25,0^\circ$ (c 0,003, MeOH)

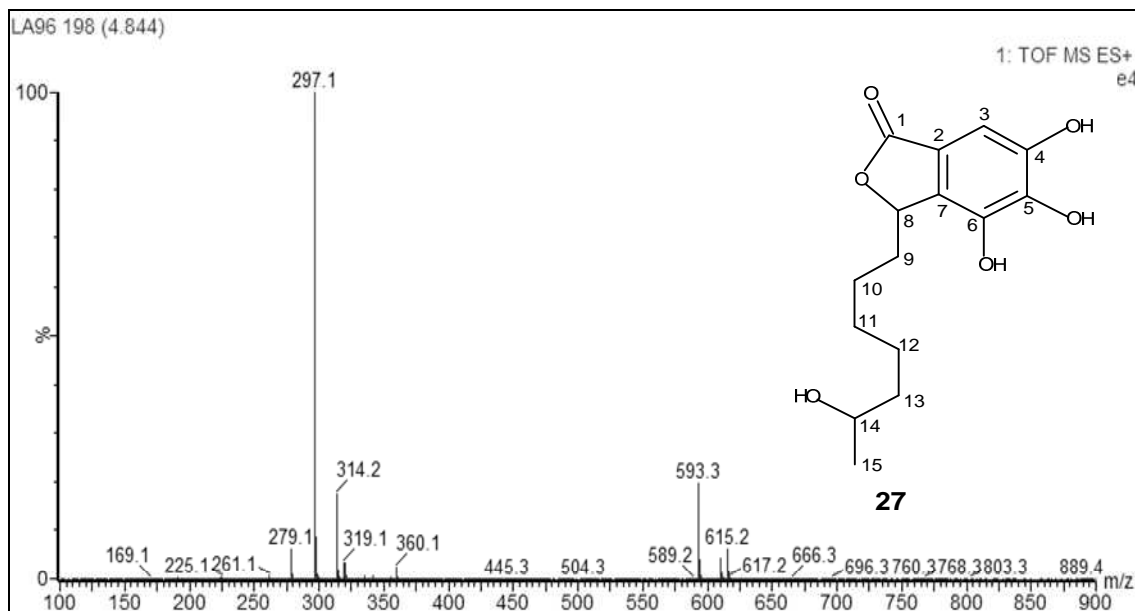


Figura 3.24: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT09_12_01 (27)**

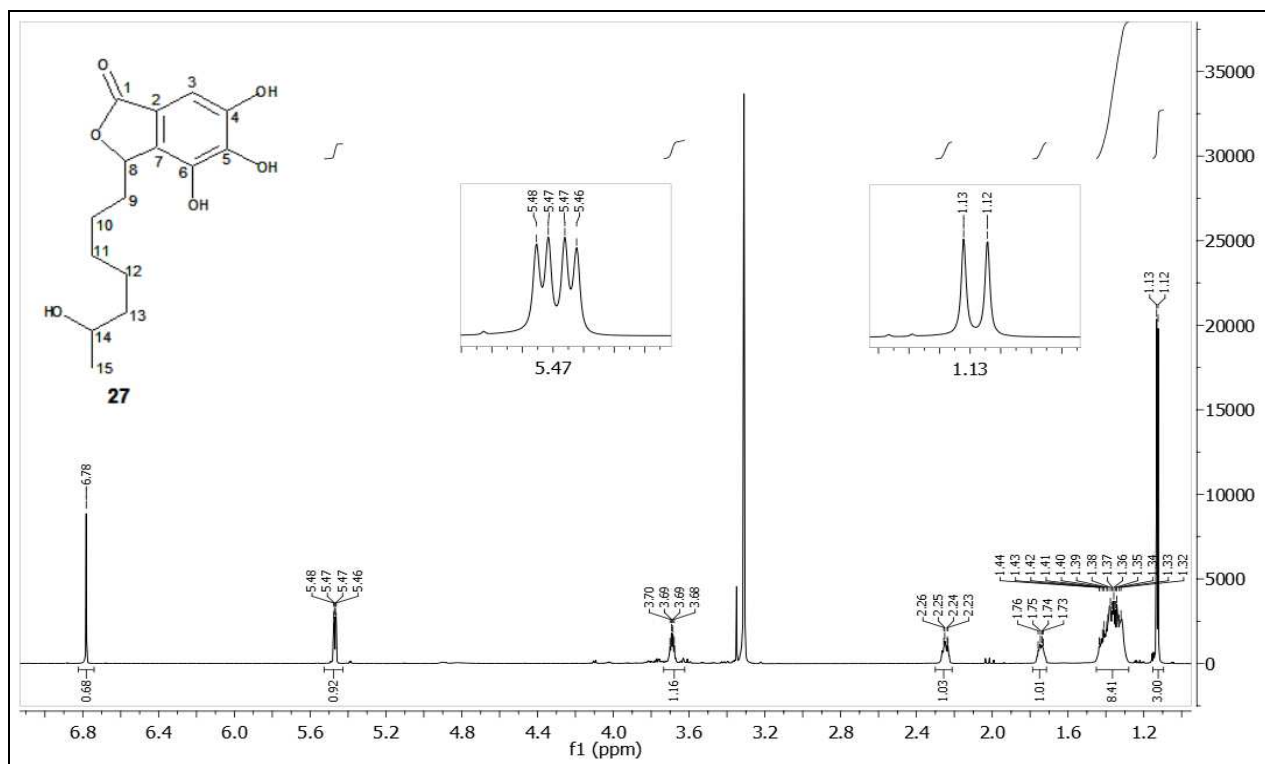


Figura 3.25: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)**

Tabela 3.8: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT09_12_01 (27)**

posição	CYT09_12_01 [δ (ppm), CD_3OD]		
	RMN de ^{13}C (200 MHz)	RMN de ^1H (800 MHz)	Correlações em HMBC
1	174,3		
2	131,2		
3	103,1	6,78 (s)	C1, C2, C4, C5, C7
4	148,8		
5	141,4 ^a		
6	141,2 ^b		
7	117,4		
8	82,0	5,47 (dd, $J=7,4, 3,1\text{Hz}$)	C1, C2, C6, C7, C9, C10
9	34,0	a: 2,25 (m); b: 1,74 (m)	C8, C10, C11
10	25,7	1,35 (m) (2H)	
11	30,6	1,35 (m) (2H)	
12	26,9	1,35 (m) (2H)	
13	40,2	1,39 (m) (2H)	C11, C12, C14
14	68,7	3,69 (m)	C12, C13, C15 (f) ^c
15	23,6	1,13 (d, $J=6,2\text{Hz}, 3\text{H}$)	C13, C14

^{a,b} - as atribuições aos carbonos podem estar invertidas; ^c f: correlação fraca

3.3.1.9 Citosporona Q (3-(7-hidroxiptil)-4,5,6-triidroxi-1-isobenzofuranona) – metabólito inédito

A subfração purificada **CYT09_12_02** (1,5 mg) foi obtida como um sólido amorfo esbranquiçado e exibiu um espectro de absorção na região do UV idêntico àquele da citosporona P (**27**, item **3.3.1.8**, pag. 82), além da mesma fórmula molecular, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$, determinada por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 297,1338$; m/z encontrado = 297,1334). O espectro de RMN de ^1H de **CYT09_12_02** (**Fig. 3.27**, pag. 86) mostrou-se muito semelhante àquele de **27** (**Fig. 3.25**, pag. 83), com exceção dos sinais relativos aos hidrogênios H14 e CH_3 -15. Nenhum sinal referente a um grupo metila foi detectado no espectro de RMN de ^1H de **CYT09_12_02**. A presença de um tripleto referente a um metileno ligado a carbono sp^3 oxigenado em δ_{H} 3,53 ($J = 6,7 \text{ Hz}$) indicou a existência de um álcool primário na estrutura de **CYT09_12_02**. O sinal em δ_{H} 3,53 apresentou correlações com aquele

em δ_H 1,51 (m, H14) no mapa de contornos COSY (**Apêndice 6.3**), e com aqueles em δ_C 33,7 (C14) e δ_C 26,9 (C13) no mapa de contornos HMBC (**Tabela 3.9**, pag. 86, e **Apêndice 6.7**), indicando a presença de uma hidroxila ligada ao carbono C15 da estrutura de **CYT09_12_02** e identificando-a como a 15-hidroxicitosporona E (**28**), isômero de posição de citosporona P (**27**). Nenhuma substância contendo a estrutura química **28** foi encontrada no banco de dados *Chemical Abstracts*. Logo, essa foi considerada inédita e nomeada de citosporona Q (Abreu et al., 2010b). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (CH₃CN), substância pura: 05,06 min

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 06,18 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 747

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig. 3.26): m/z = 297,1 [M+H]⁺, 314,2 [M+NH₄]⁺, 319,1 [M+Na]⁺, 360,1 [M+CH₃CN+Na]⁺, 593,3 [2M+H]⁺

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 220, 276

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de ¹H - **Fig. 3.27** (pag. 86), demais espectros - **Apêndice 6**, compilação dos resultados - **Tabela 3.9** (pag. 86)

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} = -52,1^\circ$ (c 0,001, MeOH)

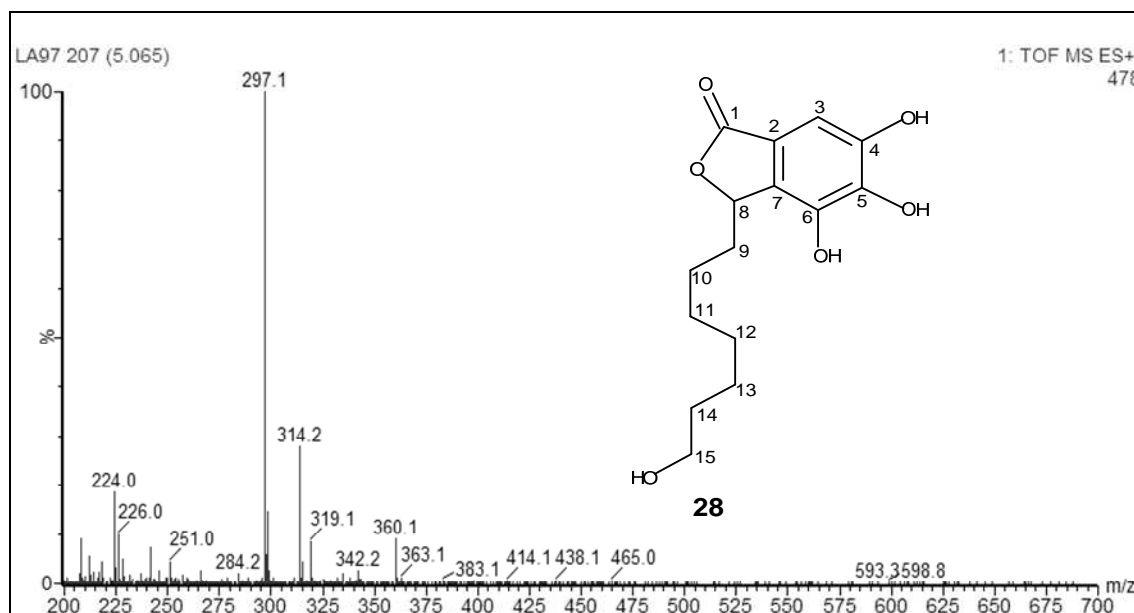


Figura 3.26: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT09_12_02** (**28**)

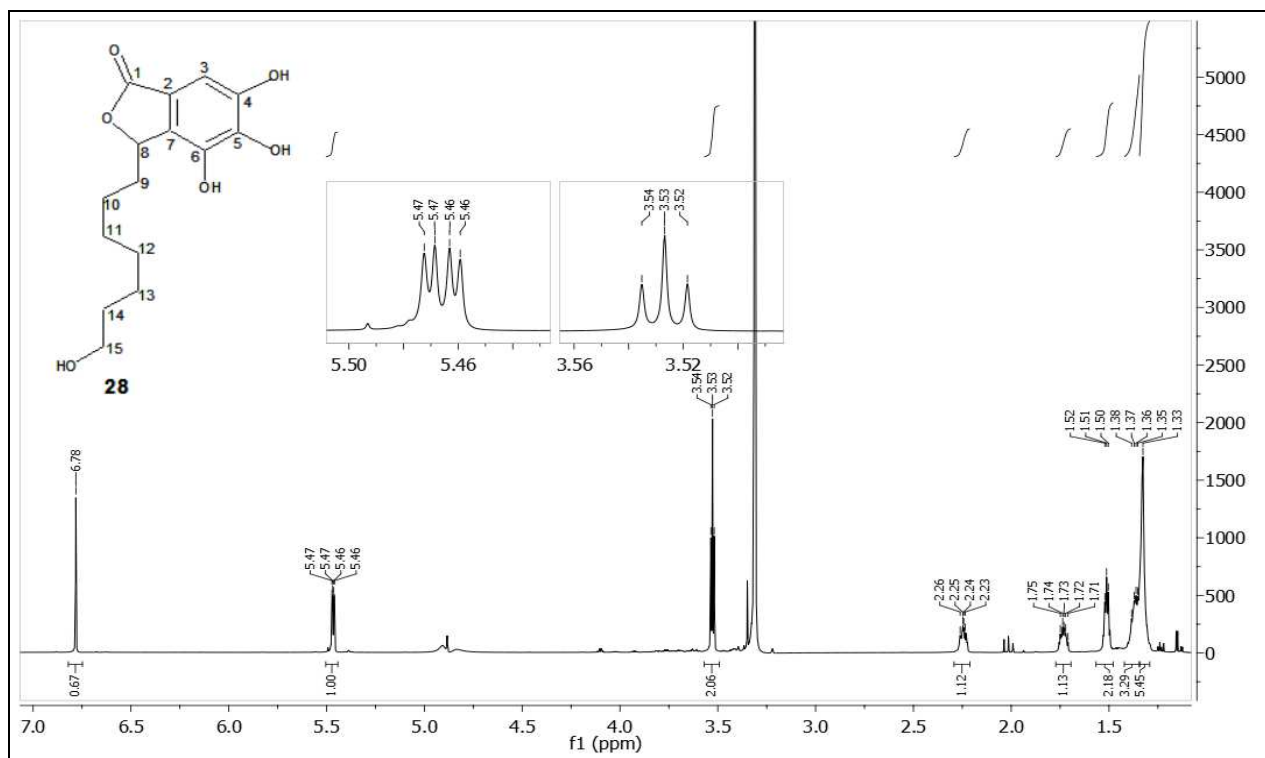


Figura 3.27: Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)**

Tabela 3.9: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT09_12_02 (28)**

posição	CYT09_12_02 [δ (ppm), CD_3OD]		
	RMN de ^{13}C (200 MHz)	RMN de ^1H (800 MHz)	Correlações em HMBC
1	174,3		
2	131,3		
3	103,1	6,78 (s)	C1, C2, C4, C5, C7 (f) ^a
4	148,8		
5	141,4 ^b		
6	141,2 ^c		
7	117,4		
8	82,0	5,47 (dd, $J=7,4, 3,1\text{Hz}$)	C1, C2, C6 (f), C7 (f), C9, C10
9	34,0	a: 2,23 (m); b: 1,74 (m)	C8, C10, C11
10	25,7	1,33 (m) (2H)	C8
11	30,5 ^d	1,33 (m) (2H)	
12	30,6 ^e	1,33 (m) (2H)	
13	26,9	1,33 (m) (2H)	C15
14	33,7	1,51 (m) (2H)	C12, C13, C15
15	63,1	3,53 (t, $J=6,7\text{Hz}$, 2H)	C13, C14

^a f: correlações fracas; ^{b-e} - as atribuições aos carbonos adjacentes podem estar invertidas

3.3.2 Substâncias não identificadas.

3.3.2.1 Subfração purificada CYT11_08_04_01

A subfração purificada **CYT11_08_04_01** (4 mg) foi isolada como um sólido amorfo amarelo e a sua provável fórmula molecular foi determinada como $C_{14}H_8O_7$ por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{14}H_8O_7 [M+H]^+ = 289,0348$; m/z encontrado = 289,0346). Nenhum metabólito de origem fúngica com a fórmula molecular $C_{14}H_8O_7$ foi encontrado no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008).

Essa subfração mostrou-se parcialmente solúvel em MeOH e solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO). O espectro de RMN de 1H de **CYT11_08_04_01**, obtido em CD_3OD , exibiu poucos sinais fracos e largos na região entre δ_H 6 e 8 (dados não mostrados). Quando analisada em DMSO- d_6 , **CYT11_08_04_01** exibiu três sinais melhor definidos em δ_H 7,05, 7,12 e 7,16, porém, com poucas informações adicionais no restante do espectro (**Fig. 3.29**, pag. 88). Não foi possível obter resultados satisfatórios com os experimentos de RMN em duas dimensões HSQC e HMBC para **CYT11_08_04_01**. Tendo sido isolado como um sólido amarelo, esse metabólito recebeu o nome de 'amarelo 1'. Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 11,21 min

RT em CLAE-DAD (CH_3CN), no extrato bruto: 6,79 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH_3CN), no extrato bruto: 772

Espectrometria de massas (MeOH) (Fig. 3.28, pag. 88): $m/z = 289,1 [M+H]^+$, 311,0 $[M+Na]^+$, 599,1 $[2M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) ($H_2O-CH_3CN + 50$ ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 200 (corte), 266, 296, 392

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de 1H - **Fig. 3.29** (pag. 88)

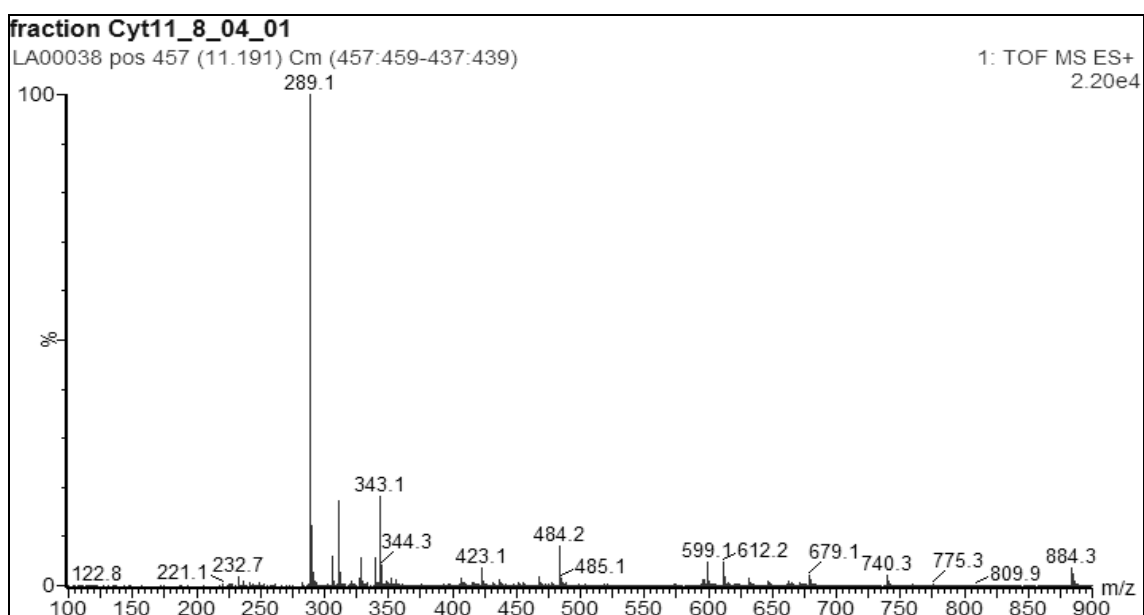


Figura 3.28: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_08_04_01**

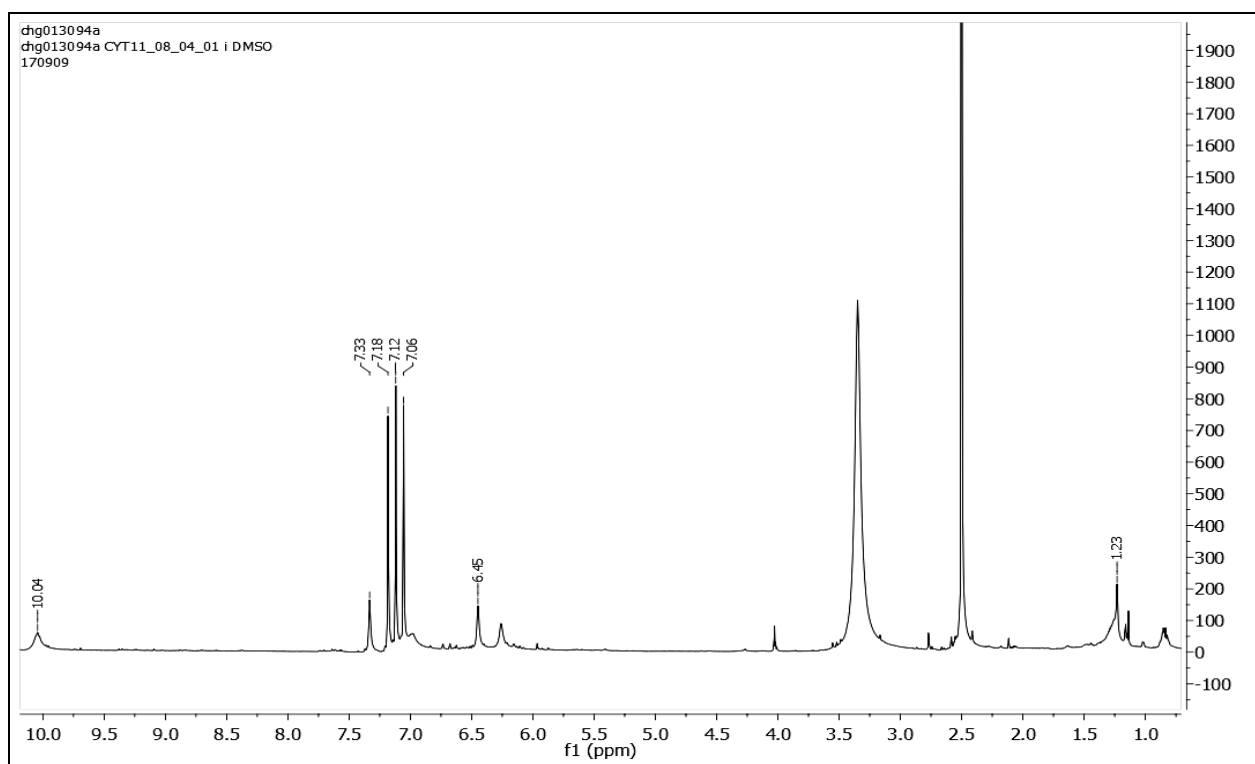
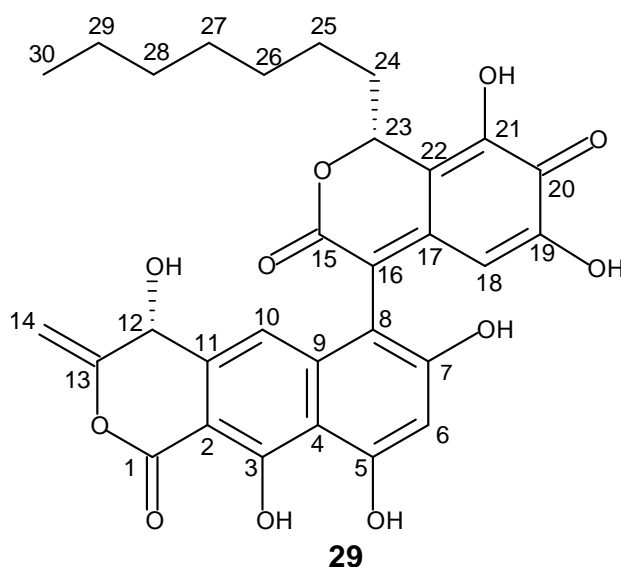


Figura 3.29: Espectro de RMN de ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 500 MHz] de **CYT11_08_04_01**

3.3.2.2 Subfração purificada CYT11_10-11_04

A subfração **CYT11_10-11_04** (18 mg) foi isolada como uma goma de cor amarela e seu espectro de absorção na região do UV mostrou-se semelhante àquele do

metabólito não identificado ‘amarelo 1’. A provável fórmula molecular de **CYT11_10-11_04** foi determinada como $C_{30}H_{28}O_{12}$ por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{30}H_{29}O_{12} [M+H]^+ = 581,1659$; m/z encontrado = 581,1654). Nenhum metabólito de origem fúngica com esta fórmula molecular foi encontrado no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008). Em uma procura por metabólitos com fórmulas moleculares semelhantes àquela de **CYT11_10-11_04**, feita em um banco de dados manual compilado a partir de informações existentes no *Chemical Abstracts* sobre metabólitos produzidos por espécies de *Phomopsis* e *Cytospora* (total 226 metabólitos), foi encontrada a citosporacina (**29**), obtida de um isolado de *Cytospora rhizosphorae*, por He et al. (2003). Esse metabólito foi isolado como um sólido vermelho e a sua fórmula molecular foi determinada como $C_{30}H_{28}O_{11}$, contendo um átomo de oxigênio a menos do que aquela de **CYT11_10-11_04**.



Devido à presença de uma ligação simples entre as duas metades da estrutura da citosporacina (**29**), essa ocorre naturalmente sob a forma de dois rotâmeros ortogonais, A e B. A existência desses rotâmeros foi demonstrada pela presença, no espectro de RMN de ^{13}C de **29**, de sinais duplicados referentes a quase todos os carbonos da molécula. Alguns sinais de RMN de 1H de **29** também se mostraram duplicados (He et al., 2003).

O espectro de RMN de 1H de **CYT11_10-11_04** (Fig. 3.32) exibiu certa semelhança com aquele de **29** (He et al., 2003). O espectro de RMN de ^{13}C de **CYT11_10-11_04** (Apêndice 7.2) exibiu 43 sinais, dos quais 36 se referiam, aparentemente, a 18 sinais duplicados, além de sete sinais não duplicados.

Os sinais em δ_H 7,07 (sl) e 7,51 (sl) do espectro de RMN de 1H de **CYT11_10-11_04** exibiram fracas manchas de correlação aqueles em δ_C 113,8 e 114,0, no mapa de contornos HSQC. Da mesma forma, os sinais em δ_H 6,48 (sl) e 6,60 (sl) exibiram fracas correlações com aqueles em δ_C 102,1 e 100,7 nesse mesmo experimento (**Apêndice 7.4**). A comparação desses resultados com aqueles descritos para a citosporacina (**29**) (**Tabela 3.10**, pag. 93) indicou que esses dois pares de sinais (δ_H 6,48, 6,60 e δ_H 7,07, 7,51) corresponderiam às posições 6 e 10 da estrutura de **29**, porém, nenhum desses exibiu correlações no mapa de contornos HMBC (**Apêndice 7.7**). A análise comparativa também demonstrou que os sinais correspondentes aos demais hidrogênios da metade inferior da estrutura de **29** (i.e. H12 e CH₂-14) não estavam presentes no espectro de RMN de 1H de **CYT11_10-11_04**.

A maior parte dos sinais de RMN de 1H e de ^{13}C de **CYT11_10-11_04** mostraram-se semelhantes àqueles descritos para a metade superior da estrutura de **29** (i.e. C15 - C30) (**Tabela 3.10**, pag. 93, e **Apêndices 7.1, 7.2**). Os resultados do experimento HMBC (**Apêndice 7.7**) permitiram a elucidação parcial da estrutura de **CYT11_10-11_04**, demonstrando as semelhanças, bem como algumas diferenças com aquela de **29** (**Fig. 3.30**). A inversão dos sinais de RMN de 1H e de ^{13}C relativos às posições 27 e 28 da estrutura de **CYT11_10-11_04** foi comprovada por meio das correlações entre o sinal referente aos hidrogênios do grupo metila CH₃-30 (δ_H 0,87, m) e aqueles em δ_C 31,2 e 31,3, equivalentes aos dois rotâmeros do carbono C27 na estrutura de **29** (**Tabela 3.10**, pag. 93).

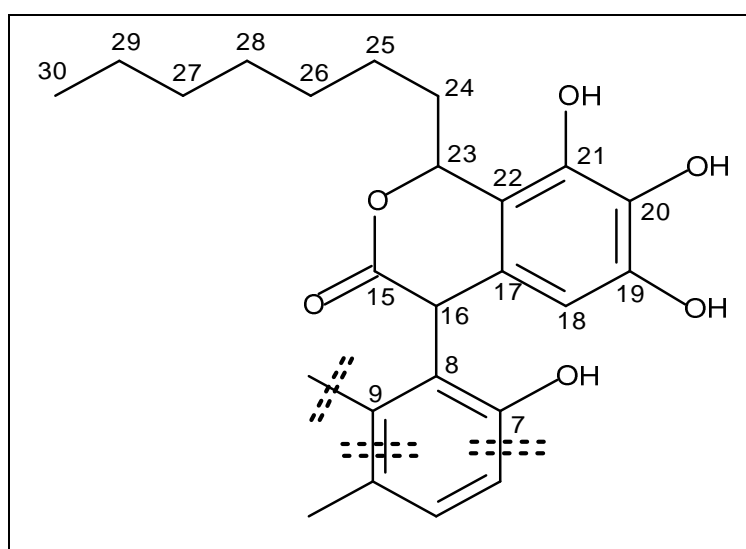


Figura 3.30: Proposta de estrutura parcial de **CYT11_10-11_04** obtida pela análise do mapa de contornos HMBC. Numeração de acordo com aquela descrita para a citosporacina (**29**) (He et al., 2003)

As correlações, obtidas pelo mapa de contornos HMBC, entre os sinais atribuídos aos dois rotâmeros do hidrogênio H18 da estrutura de **CYT11_10-11_04** (δ_H 5,40 e 5,44 para os rotâmeros A e B, respectivamente) e aqueles referentes a carbonos insaturados oxigenados em δ_C 131,2 e 131,4 (H18 x C20), indicaram a ausência da carbonila relativa à posição C20 da estrutura de **29**. As correlações entre os sinais referentes aos hidrogênios das hidroxilas 19-OH e 21-OH e aqueles referentes ao carbono C20 (δ_C 131,2 e 131,4) deram suporte a essa conclusão (**Tabela 3.10**, pag. 93, e **Apêndice 7.7**).

O sinal em δ_H 5,53 (s) do espectro de RMN de 1H de **CYT11_10-11_04** exibiu correlações, pelo mapa de contornos HMBC, com os sinais referentes aos carbonos C15, C17 e C18 (**Tabela 3.10**, pag. 93, e **Apêndice 7.7**), o que indicou a presença de um hidrogênio ligado ao carbono C16. A correlação entre o sinal em δ_H 5,40 (H18, rotâmero A) e aquele em δ_C 39,2 (C16) deu suporte a essa proposta estrutural. Os resultados permitiram a elucidação de parte da estrutura de **CYT11_10-11_04**, a qual se mostrou idêntica à citosporona D (**25**; item **3.3.1.6**, pag. 78).

As correlações, obtidas pelo mapa de contorno HMBC, entre o hidrogênio H16 (δ_H 5,53) e os sinais em δ_C 107, 6, 138,3 e 159,1 permitiram a atribuição desses aos carbonos das posições 8, 9 e 7, respectivamente (**Fig. 3.30**, pag. 90, e **Tabela 3.10**, pag. 93). Tal atribuição foi feita em comparação com os dados descritos para **29** (He et al., 2003).

Sem mais evidências que permitissem a completa elucidação estrutural de **CYT11_10-11_04** essa foi considerada como sendo um provável análogo da citosporacina (**29**) e nomeada de 'amarelo 2', à semelhança do metabólito 'amarelo 1'. A fórmula molecular $C_{30}H_{28}O_{12}$, determinada para o 'amarelo 2', corresponde exatamente à soma das fórmulas da citosporona D (**25**, item **3.3.1.6**, pag. 78), $C_{16}H_{22}O_{15}$, e do metabólito 'amarelo 1', $C_{14}H_8O_7$ (item **3.3.2.1**, pag. 87), após a subtração de dois hidrogênios referentes à formação da ligação covalente entre as duas moléculas. É, portanto, presumível que os metabólitos citosporona D e 'amarelo 1' sejam precursores do 'amarelo 2'. Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 15,78 min

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 11,16 min

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 965

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig. 3.31, pag. 92): m/z = 581,2 [M+H]⁺, 598,2 [M+NH₄]⁺, 603,2 [M+Na]⁺

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 208, 266, 300, 398

Ressonância magnética nuclear. Espectro de RMN de ¹H - Fig. 3.32, demais espectros - Apêndice 7, comparação de dados com a literatura - Tabela 3.10 (pag. 93)

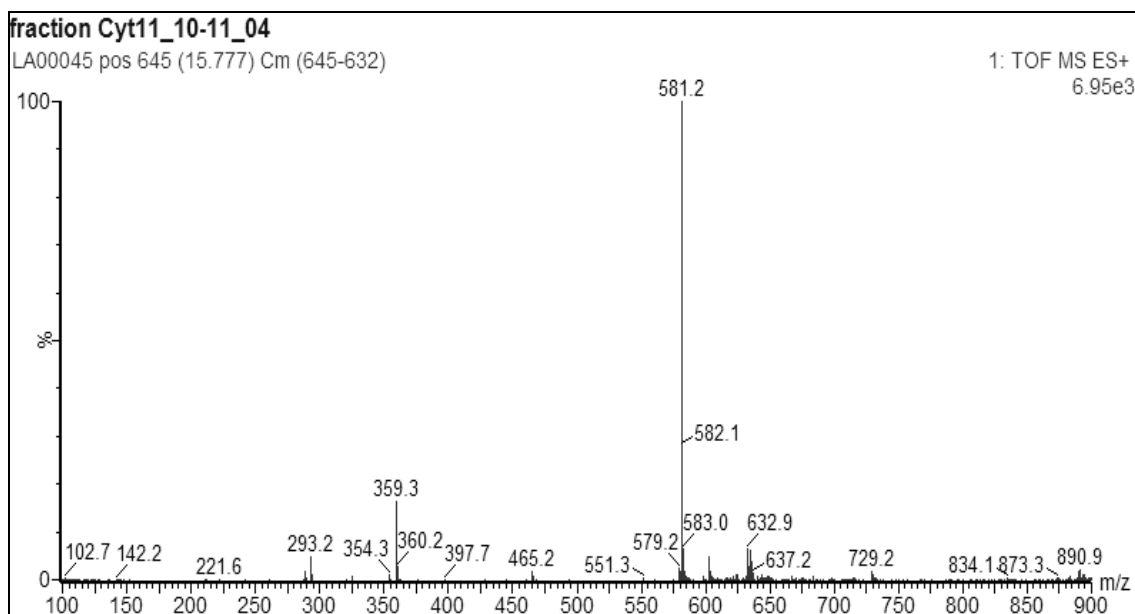


Figura 3.31: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_10-11_04**

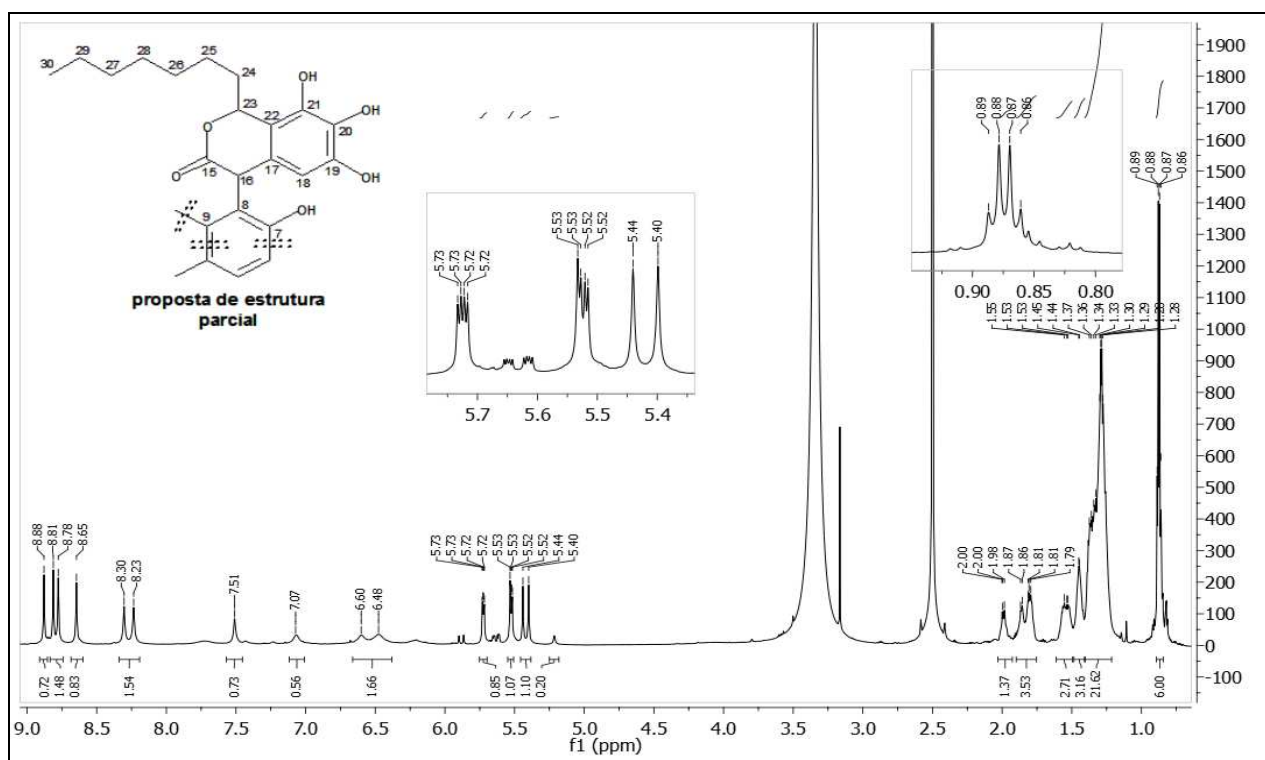


Figura 3.32: Espectro de RMN de ¹H [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_04**

Tabela 3.10: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT11_10-11_04** comparados com aqueles descritos para o metabólito citosporacina (He et al., 2003)

posição	CYT11_10-11_04 [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]				Correlações em HMBC	citosporacina [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]			
	RMN de ^{13}C (200 MHz)		RMN de ^1H (800 MHz)			RMN de ^{13}C (100 MHz)		RMN de ^1H (400 MHz)	
	rotâmero A	rotâmero B	rotâmero A	rotâmero B		rotâmero A	rotâmero B	rotâmero A	rotâmero B
1						164,90	164,75		
2	? 97,02 ^a	? 97,02				97,20	97,31		
3	? 161,45	? 161,24				162,41	162,13		
4						106,87	106,61		
5	? 158,4	? 158,4				158,56 ^b	158,59 ^c		
6	? 100,7	-	6,60 (sl)	6,48 (sl)	-	101,58	101,40	6,65 (s)	6,65 (s)
7	159,08	159,08				158,46	158,82		
8	? 107,55	? 107,55				107,41	107,57		
9	138,32	138,32				139,06	139,36		
10	? 113,77	? 113,95	7,07 (sl)	7,51 (sl)	-	111,24	110,19	6,81 (s)	6,70 (s)
11	-	-				136,97	136,60		
12	-	-				64,62	64,71	5,29 (sl)	5,29 (sl)
13	-	-				156,19	155,97		
14	-	-				95,11	94,53	4,85 (m, 2H)	4,85 (m, 2H)
15	171,63	171,53				162,02	162,05		
16	39,83	39,18	5,53 (s)	5,53 (s)	C7, C8, C9, C15, C17, C18	126,25	126,25		
17	123,25	124,49				139,47 ^d	139,46 ^e		
18	103,49	103,93	5,40 (sl)	5,44 (sl)	C16, C19, C20, C21, C22	107,28	107,28	5,89 (s)	5,89 (s)
19	145,41	145,67				151,33	151,42		
20	131,20	131,43				176,41	176,41		
21	141,28	141,71				144,59	144,59		
22	112,56	112,50				115,25 ^f	115,24 ^g		
23	77,31	76,98	5,52 (dd, J=9,6, 4,0Hz)	5,72 (dd, J=8,8, 4,3Hz)	C15, C17, C21, C22, C24, C25	75,17 ^h	75,18 ⁱ	5,65 (m)	5,65 (m)
24	35,61	36,10	1,86 (m), 1,80 (m)	1,99 (m), 1,80 (m)	C22, C23, C25, C26	36,18	36,59	1,95 (m, 2H)	1,90 (m, 2H)
25	25,18	25,53	1,53 (m), 1,44 (m)	1,53 (m), 1,44 (m)	C23, C24, C26	24,81	24,30	1,53 (m, 2H)	1,45 (m, 2H)
26	28,68 ^l	28,77 ^l	1,34 (m) (2H)	1,34 (m) (2H)	C25	28,67	28,81	1,30 (m, 2H)	1,30 (m, 2H)
27	31,33	31,25	1,27 (m) (2H)	1,27 (m) (2H)	C29	31,28	31,27	1,25	
28	28,62 ^m	28,82 ⁿ	1,34 (m) (2H)	1,34 (m) (2H)		28,58	28,56		
29	22,14	22,12	1,29 (m) (2H)	1,29 (m) (2H)	C27, C30	22,14	22,11		
30	14,01	14,01	0,87 (m) (3H)	0,87 (m) (3H)	C27, C29	14,04	14,02	0,82 (t, J=6,5Hz, 3H)	0,81 (t, J=6,5Hz, 3H)
19-OH			8,81	8,88	C18, C19, C20			10,50	10,50
20-OH			8,24	8,30	C21				
21-OH			8,65	8,78	C20, C21, C22				

^a ? - atribuições dos sinais feitas por comparação com aqueles descritos para a citosporacina. ^{b-n} as atribuições aos carbonos adjacentes podem estar invertidas

3.3.2.3 Subfrações purificadas CYT11_08_04_03 e CYT11_10-11_05

As subfrações purificadas **CYT11_08_04_03** (9,5 mg) e **CYT11_10-11_05** (4,1 mg) foram isoladas como sólidos amorfos de coloração vermelha escura e exibiram o mesmo tempo de retenção em CLAE-DAD e mesmo espectro de absorção na região do UV, o qual se mostrou semelhante àqueles exibidos pelos metabólitos amarelos 1 e 2 (itens **3.3.2.1**, pag. 87, e **3.3.2.2**, pag. 88). A provável fórmula molecular para essas subfrações purificadas foi determinada como $C_{30}H_{26}O_{12}$ por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{30}H_{27}O_{12} [M+H]^+ = 579,1503$; m/z encontrado = 579,1493), contendo dois átomos de hidrogênio a menos do que o metabólito 'amarelo 2'.

O espectro de RMN de 1H da subfração purificada **CYT11_10-11_05** (**Fig. 3.36**, pag. 97) mostrou-se semelhante àqueles dos metabólitos 'amarelo 2' e citosporacina (**29**, He et al., 2003). Foram detectados 48 sinais no espectro de RMN de ^{13}C dessa subfração, os quais se referem, provavelmente, a 22 sinais duplicados e 4 sinais não duplicados (**Tabela 3.11**, pag. 98, e **Apêndice 8.2**). A presença de sinais duplicados indicou a presença de dois rotâmeros da estrutura de **CYT11_10-11_05**, como o descrito para **29** (He et al., 2003).

À semelhança com o descrito para o metabólito 'amarelo 2', não foram observados, no espectro RMN de 1H de **CYT11_10-11_05**, os sinais referentes aos hidrogênios das posições 12 e 14 da estrutura da citosporacina (**29**). Da mesma forma, os prováveis sinais referentes às posições 10 (δ_H 6,63, sl e 6,59, sl, relativos aos dois rotâmeros) e 6 (δ_H 7,53, sl e 7,35, sl) não exibiram correlações no mapa de contornos HMBC (**Tabela 3.11**, pag. 98, e **Apêndice 8.7**).

Os demais sinais dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C de mostraram-se muito semelhantes àqueles de **29**. A análise das correlações obtidas pelo mapa de contornos HMBC permitiu a identificação parcial da estrutura de **CYT11_10-11_05** (**Fig. 3.33**, pag. 95), a qual se mostrou idêntica à metade superior da estrutura de **29**. A inversão dos sinais de RMN de 1H e de ^{13}C relativos às posições 27 e 28 da estrutura de **CYT11_10-11_05** foi comprovada pelas correlações entre os sinais dos hidrogênios do grupo metila CH_3 -30 (δ_H 0,85, t, $J = 7,1$ Hz e 0,82, t, $J = 7,1$ Hz) e aquele em δ_C 31,2, equivalente ao carbono C27 da estrutura de **29**.

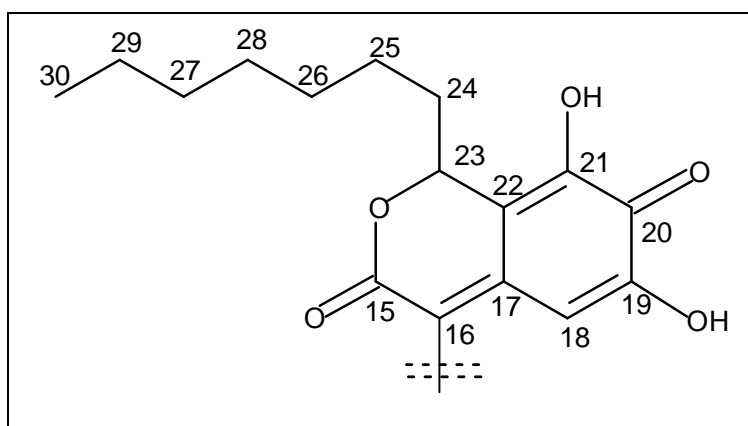


Figura 3.33: Proposta de estrutura parcial de **CYT11_10-11_05** obtida pela análise do mapa de contornos HMBC. Numeração de acordo com aquela descrita para a citosporacina (**29**) (He et al., 2003)

Parte da estrutura não elucidada de **CYT11_10-11_05** pôde ser inferida através da comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C com aqueles descritos para a citosporacina (**29**) (**Fig. 3.34**). Com exceção dos sinais propostos para as posições 10 e 11, os demais se mostram semelhantes àqueles descritos para **29**. Somente um sinal duplicado do espectro de RMN de ^{13}C de **CYT11_10-11_05**, em δ_{C} 130,6 e 130,9, não foi atribuído à estrutura inferida de **CYT11_10-11_05**. Não foram detectados os prováveis sinais referentes às posições 12, 13 e 14.

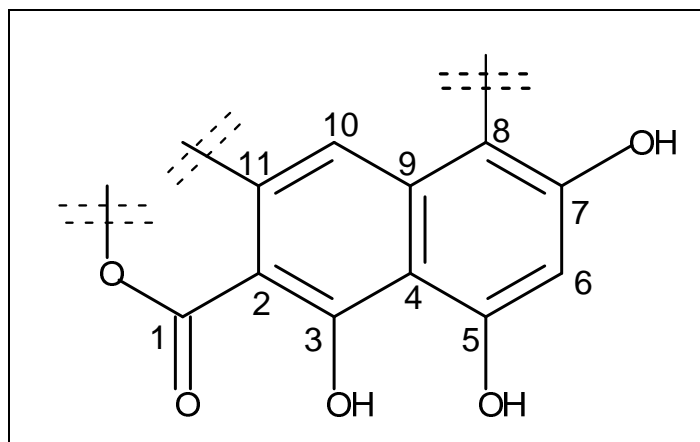


Figura 3.34: Proposta de estrutura parcial de **CYT11_10-11_05** obtida através da comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C com aqueles descritos para a citosporacina **29** (He et al., 2003)

É provável que a diferença de dois átomos de hidrogênio entre as fórmulas moleculares de **CYT11_10-11_05** e do 'amarelo 2' se deva à oxidação dos carbonos C20 e C16. Essas modificações na estrutura de **CYT11_10-11_05**, também

observadas na estrutura da citosporacina (**29**), promoveram a extensão da conjugação entre o anel benzênico e a carbonila em C15 (**Fig. 3.34**, pag. 95) e, provavelmente, entre as duas metades da molécula, o que explicaria a absorção de luz ultravioleta a até quase 600 nm (**Fig. 3.41**, item **3.3.3**, pag. 103) e a coloração vermelha desse metabólito. Na ausência de mais evidências que permitissem a elucidação completa da estrutura de **CYT11_10-11_05**, esta recebeu o nome trivial de metabólito 'vermelho'. Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são indicados a seguir:

RT em CLAE-DAD-EM (MeOH), substância pura: 15,78 min.

RT em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 11,16 min.

Índice de Retenção em CLAE-DAD (CH₃CN), no extrato bruto: 965

Espectrometria de massas (CH₃CN) (Fig. 3.35): $m/z = 579,2 [M+H]^+, 601,2 [M+Na]^+$

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) (H₂O-CH₃CN + 50 ppm de ácido trifluoroacético): λ_{max} nm = 204, 264, 300, 358, 413 (ombro)

Ressonância magnética nuclear: Espectro de RMN de ¹H - **Fig. 3.36** (pag. 97), demais espectros - **Apêndice 8**, comparação de dados com a literatura - **Tabela 3.11** (pag. 98)

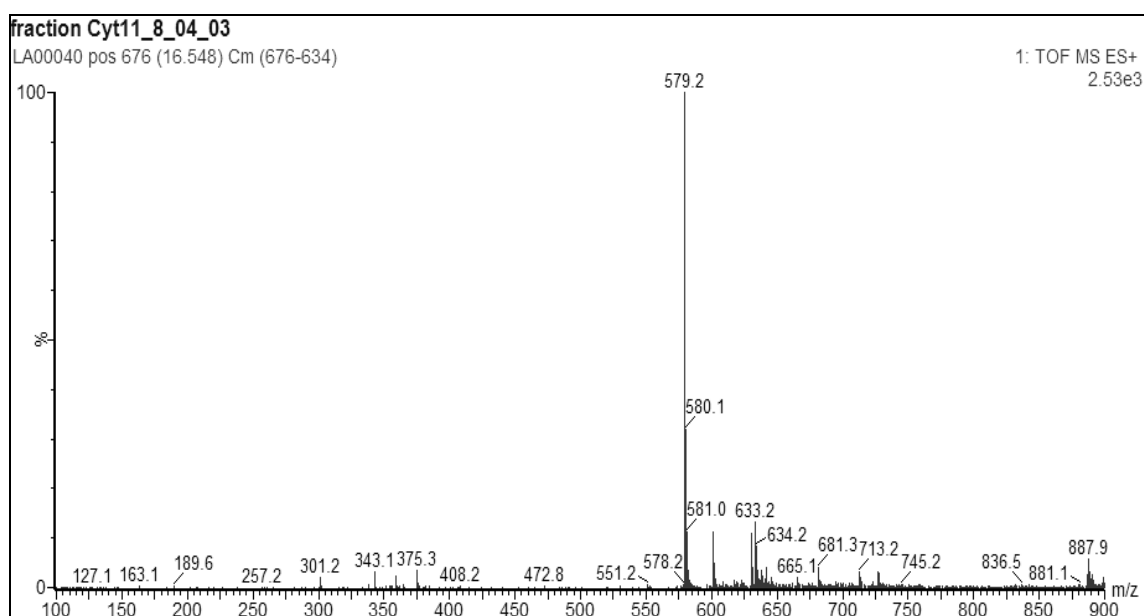


Figura 3.35: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **CYT11_10-11_05**

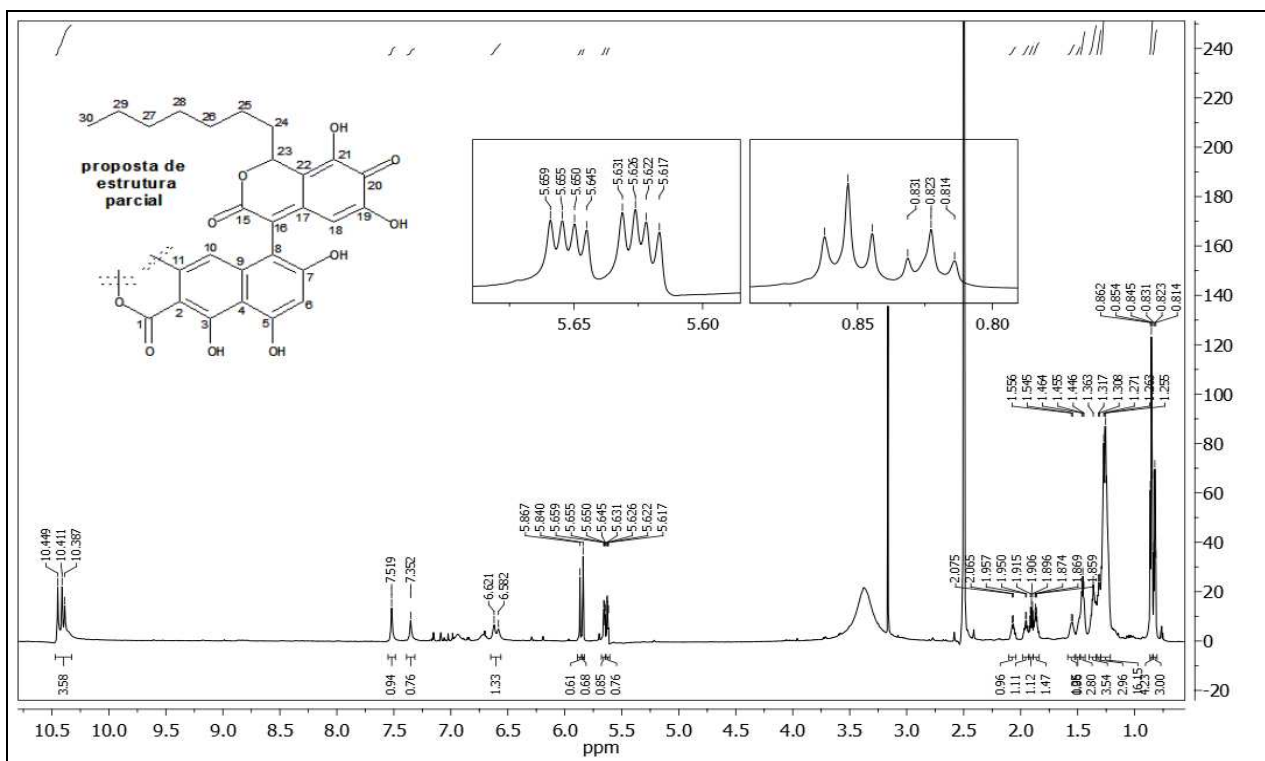


Figura 3.36: Espectro de RMN de ^1H [(CD_3) $_2\text{SO}$, 800 MHz] de CYT11_10-11_05

Tabela 3.11: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelo mapa de contornos HMBC, de **CYT11_10-11_05** comparados com aqueles descritos para o metabólito citosporacina (He et al., 2003)

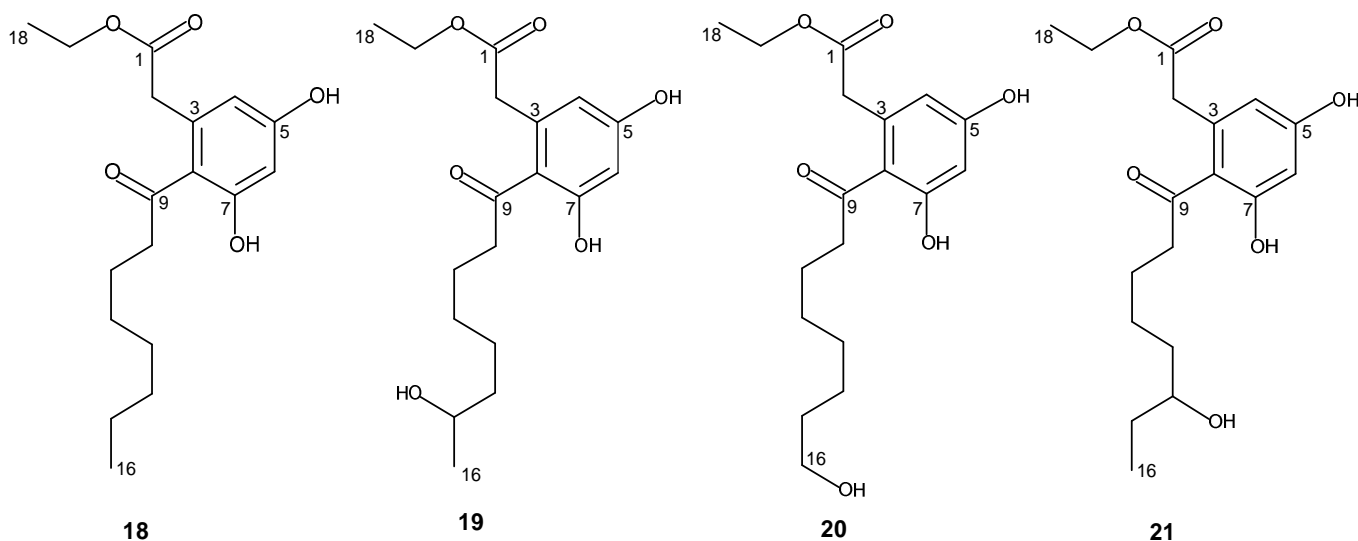
posição	CYT11_10-11_05 [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]				Correlações em HMBC	citosporacina [δ (ppm), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]			
	RMN de ^{13}C (200 MHz)		RMN de ^1H (800 MHz)			RMN de ^{13}C (100 MHz)		RMN de ^1H (400 MHz)	
	rotâmero A	rotâmero B	rotâmero A	rotâmero B		rotâmero A	rotâmero B	rotâmero A	rotâmero B
1	? 164,31 ^a	? 164,79				164,90	164,75		
2	? 97,51	? 97,62				97,20	97,31		
3	? 161,29	? 161,24				162,41	162,13		
4	? 106,23	? 105,73				106,87	106,61		
5	? 158,57	? 158,57				158,56 ^b	158,59 ^c		
6	? 101,59	-	6,62 (sl)	6,59 (sl)	-	101,58	101,40	6,65 (s)	6,65 (s)
7	? 159,01	? 159,01				158,46	158,82		
8	? 107,39	? 107,39				107,41	107,57		
9	? 139,37	? 139,86				139,06	139,36		
10	? 113,89	? 113,64	7,52 (sl)	7,36 (sl)	-	111,24	110,19	6,81 (s)	6,70 (s)
11	? 141,99	? 141,75				136,97	136,60		
12	-	-				64,62	64,71	5,29 (sl)	5,29 (sl)
13	-	-				156,19	155,97		
14	-	-				95,11	94,53	4,85 (m, 2H)	4,85 (m, 2H)
15	162,28	161,97				162,02	162,05		
16	126,48	126,22				126,25	126,25		
17	139,21	139,59				139,47 ^d	139,46 ^e		
18	107,38	107,35	5,84 (sl)	5,87 (sl)	C16, C19, C20, C22	107,28	107,28	5,89 (s)	5,89 (s)
19	151,19	151,30				151,33	151,42		
20	176,41	176,31				176,41	176,41		
21	144,33	144,48				144,59	144,59		
22	115,55	114,95				115,25 ^f	115,24 ^g		
23	75,06	75,30	5,62 (dd, $J=7,4, 4,1\text{Hz}$)	5,65 (dd, $J=7,5, 3,7\text{Hz}$)	C15, C17, C21, C22, C24, C25	75,17 ^h	75,18 ⁱ	5,65 (m)	5,65 (m)
24	35,82	36,11	2,06 (m), 1,95 (m)	1,90 (m), 1,87 (m)	C23, C25, C26	36,18	36,59	1,95 (m, 2H)	1,90 (m, 2H)
25	24,52	24,26	1,54 (m), 1,46 (m)	1,54 (m), 1,46 (m)	C23, C24, C26	24,81	24,30	1,53 (m, 2H)	1,45 (m, 2H)
26	28,74 ^j	28,55 ^l	1,36 (m) (2H)	1,27 (m) (2H)	C25	28,67	28,81	1,30 (m, 2H)	1,30 (m, 2H)
27	31,23	31,23	1,25 (m) (2H)	1,25 (m) (2H)	C29	31,28	31,27	1,25	
28	28,80 ^m	28,77 ⁿ	1,36 (m) (2H)	1,36 (m) (2H)		28,58	28,56		
29	22,06	21,99	1,26 (m) (2H)	1,26 (m) (2H)	C27, C30	22,14	22,11		
30	13,99	13,96	0,85 (t, $J=7,1\text{Hz}, 3\text{H}$)	0,82 (t, $J=6,9\text{Hz}, 3\text{H}$)	C27, C29	14,04	14,02	0,82 (t, $J=6,5\text{Hz}, 3\text{H}$)	0,81 (t, $J=6,5\text{Hz}, 3\text{H}$)
19-OH			10,45	10,38	C18, C19, C20			10,50	10,50
21-OH			10,45	10,43	C20, C21, C22				

^a ? - atribuições dos sinais feitas através da comparação com aqueles descritos para a citosporacina. ^{b-n} atribuições aos carbonos adjacentes podem estar invertidas

3.3.3 Padrões de absorção na região do UV exibidos pelos metabólitos isolados de *Cytospora* sp. fel 302

A semelhança entre os espectros de absorção na região do UV, exibidos pelos metabólitos contendo o mesmo cromóforo, facilitou o processo de desreplicação e a inferência sobre a estrutura de possíveis análogos de substâncias que já haviam sido isoladas e identificadas; como na desreplicação das dotiorelonas A, B e C, cujo espectro de absorção no UV é idêntico àquele da citosporona B e na inferência sobre a provável similaridade entre a citosporona E e os novos metabólitos citosporonas P e Q. Foram identificados quatro tipos ou padrões de espectros de absorção na região do UV dentre as citosporonas e dotiorelonas identificadas, além daqueles referentes aos metabólitos coloridos não identificados:

Padrão citosporona B: Os metabólitos com estruturas químicas análogas citosporona B (**18**, RI 1120) e dotiorelonas A (**19**, RI 831), B (**21**, RI 842) e C (**20**, RI 837) exibiram o mesmo espectro de absorção na região UV (**Fig. 3.37**, pag. 100). A existência de um átomo de oxigênio a mais na estrutura das dotiorelonas não alterou o espectro de absorção dessas, pois o grupo hidroxila excedente situa-se ao longo da cadeia lateral alifática e não interfere no cromóforo.



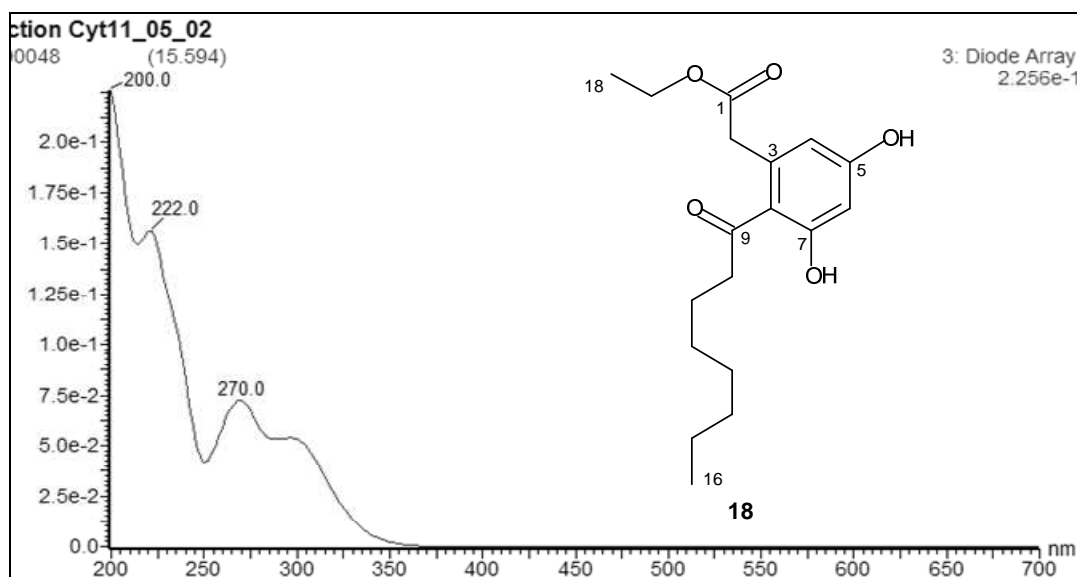
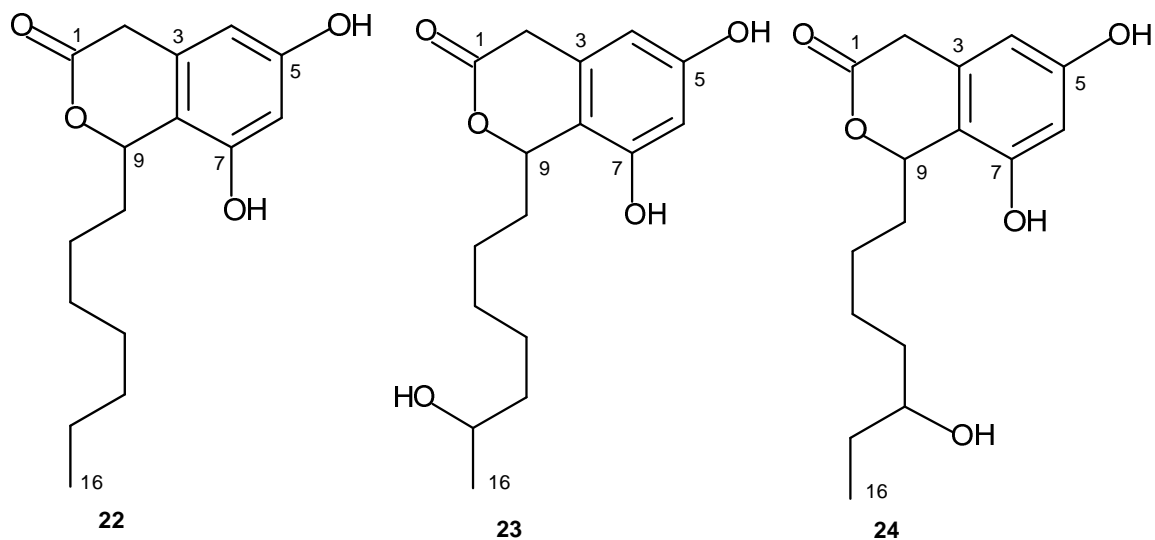


Figura 3.37: Espectro de absorção no UV da citosporona B (**18**, RI 1120) (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Padrão citosporona C: As diidroxibenzeno- δ -lactonas citosporonas C (**22**, RI 1000), O (**24**, RI 764) e a dotiorelona H (**23**, RI 757) exibiram espectros de absorção quase idênticos (**Figura 3.38**, pag. 101).



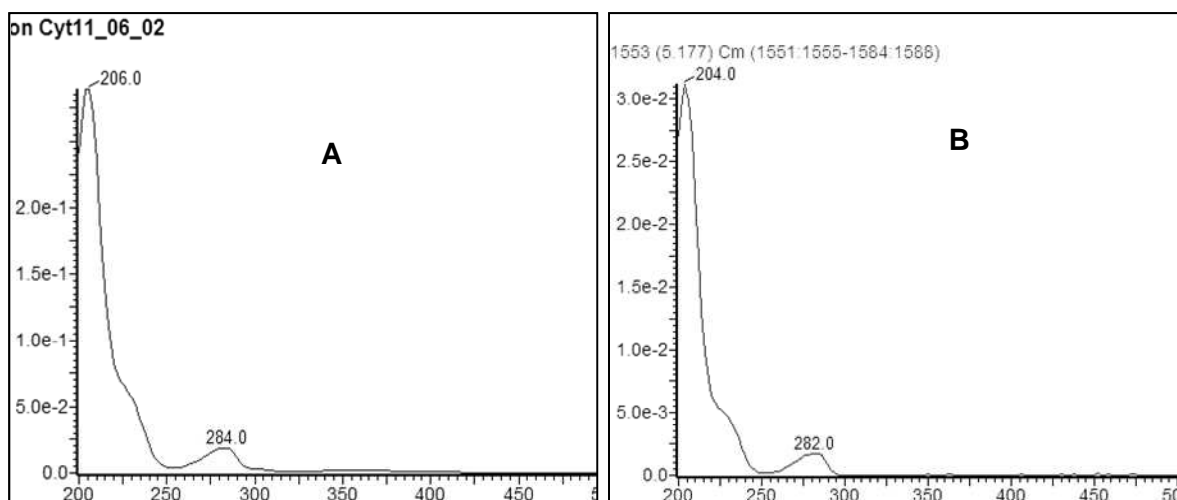


Figura 3.38: Espectros de absorção no UV: **A** citosporona C (**22**, RI 1000); **B** dotiorelona H (**23**, RI 757) e citosporona O (**24**, RI 764) (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Citosporona D: Esse metabólito (**25**) possui em sua estrutura três grupos hidroxila ligados ao anel benzeno, ao contrário de dois grupos hidroxila, como na estrutura da citosporona C (**22**) e seus análogos. O espectro de absorção no UV de **25** (**Fig. 3.39**) mostrou-se semelhante àquele de **22**.

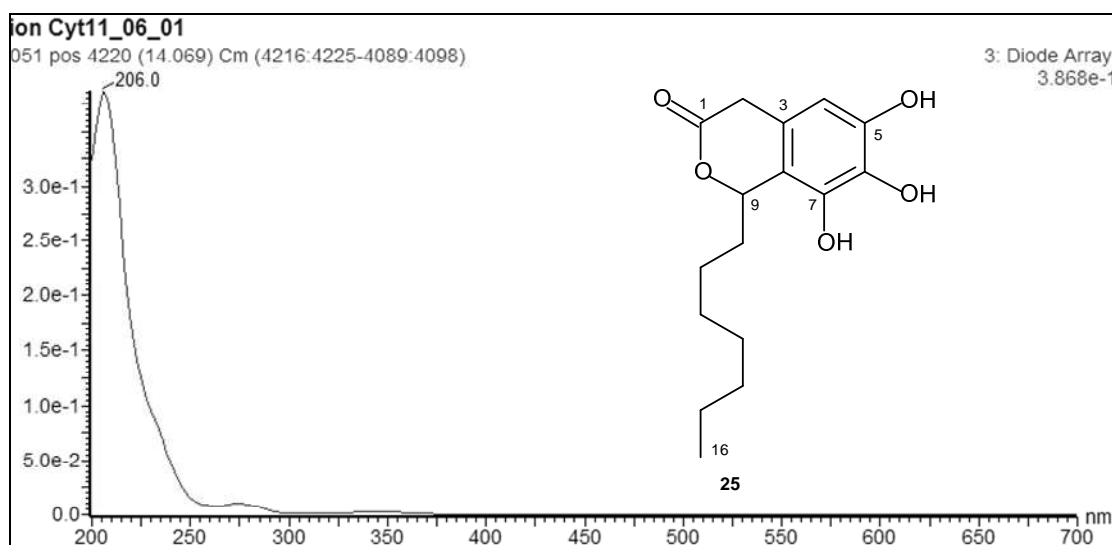


Figura 3.39: Espectro de absorção no UV da citosporona D (**25**) (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Padrão citosporona E: A citosporona E (**26**) e seus dois novos análogos, citosporonas P(**27**, RI 740) e Q (**28**, RI 747) exibiram espectros de absorção na região do UV muito semelhantes, caracterizados por dois máximos de absorção em 220 e 276/278 nm (**Fig. 3.40**, pag. 102).

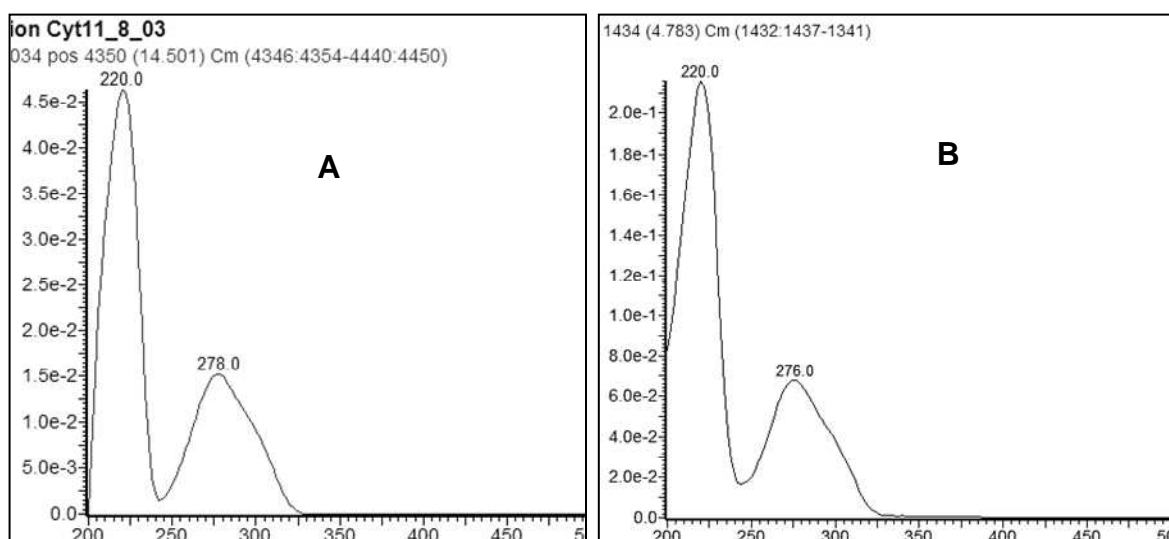
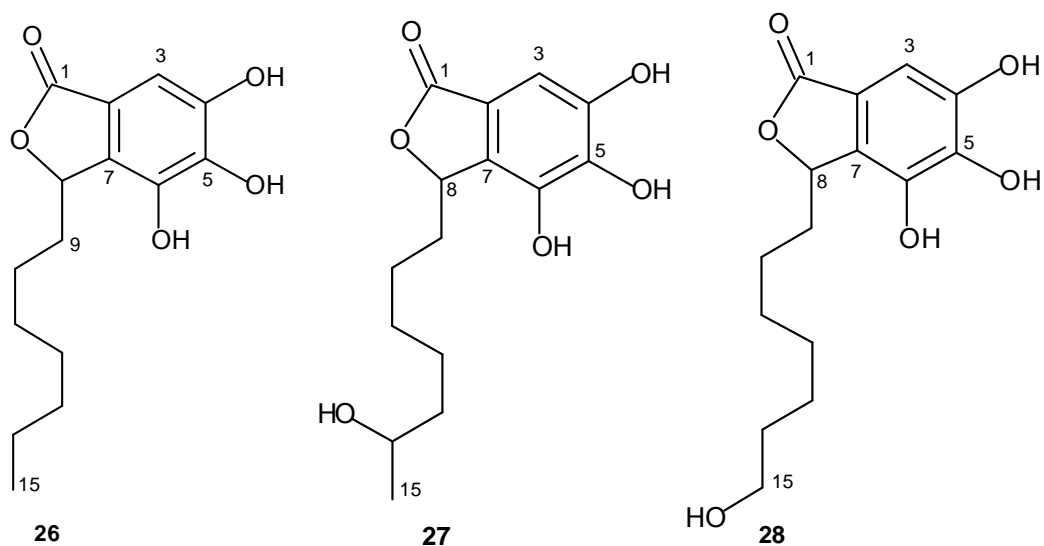


Figura 3.40: Espectros de absorção no UV: **A** citosporona E (**26**); **B** citosporonas P (**27**, RI 740) e Q (**28**, RI 747) (CLAE-DAD; H₂O–CH₃CN + 50 ppm de TFA)

Metabólitos coloridos: Os espectros de absorção na região do UV dos metabólitos ‘amarelo 1’ (RI 772) e ‘amarelo 2’ (RI 965) mostraram-se semelhantes (**Fig. 3.41**, pag. 103), com destaque à presença de um máximo de absorção em 208 nm no espectro do ‘amarelo 2’, provavelmente devido à presença da citosporona D em sua estrutura (vide item **3.3.2.2**, pag. 88). O metabólito ‘vermelho’ (RI 979) exibiu espectro de absorção na região do UV semelhante àqueles apresentados pelos amarelos 1 e 2 (**Fig. 3.41**), porém, com uma extensão da absorção a até quase 600 nm, o que explica a sua coloração vermelha (vide item **3.3.2.3**, pag. 94).

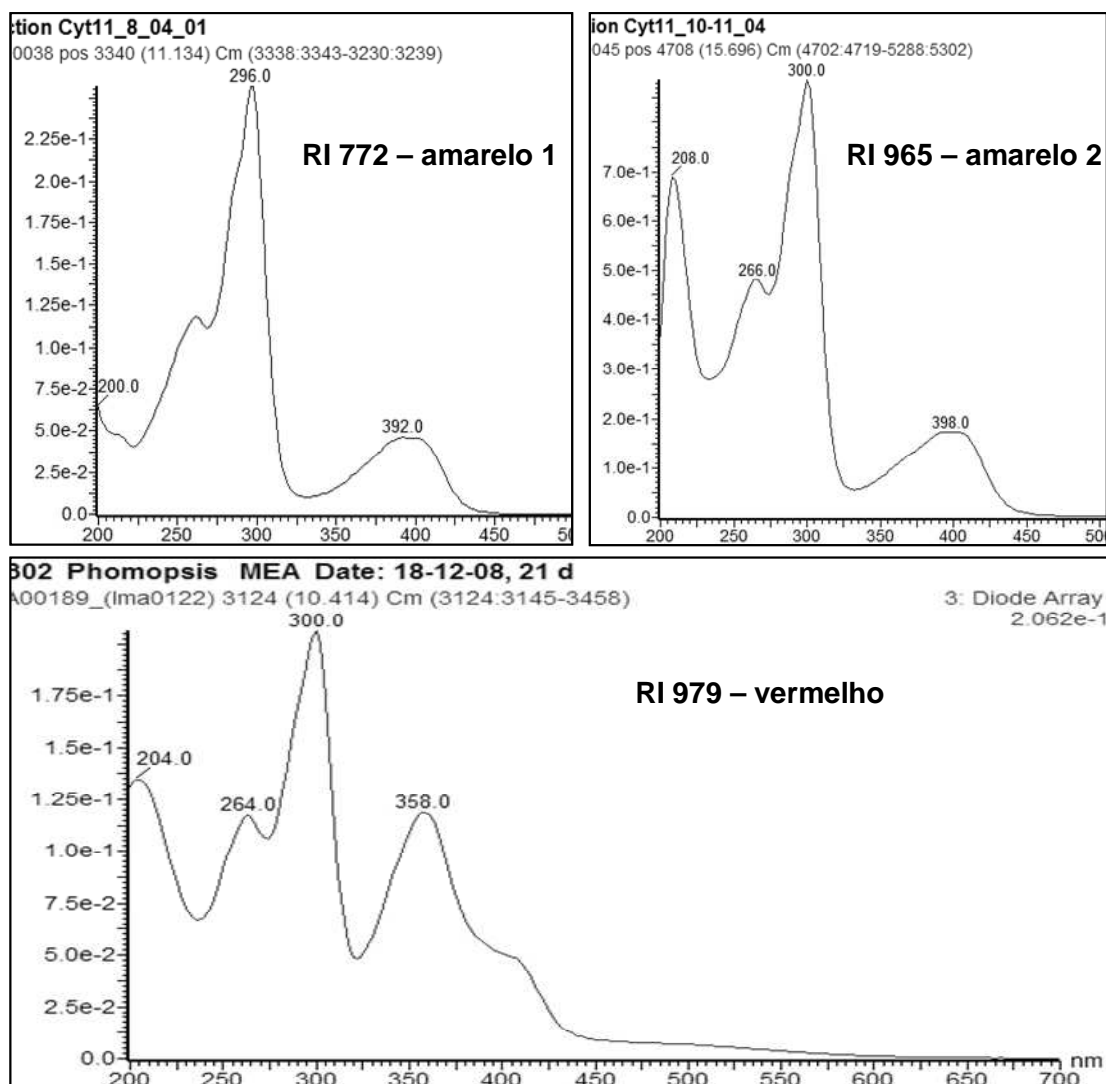


Figura 3.41: Espectros de absorção no UV dos metabólitos ‘amarelo 1’, ‘amarelo 2’ e ‘vermelho’ (CLAE-DAD; H₂O–CH₃CN + 50 ppm de TFA)

3.3.4 Ocorrência dos metabólitos isolados em diferentes quimiotipos de *Cytospora* e *Phomopsis*.

Os metabólitos citosporona D (**25**) e E (**26**) não foram detectados nos extratos brutos dos isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* submetidos à extração em micro escala e perfilamento por CLAE-DAD (**Cap. 2**). Como foram isolados em quantidades muito pequenas a partir de 3,6 g de extrato bruto, é possível que concentração de **25** e **26** nos extratos obtidos em micro escala esteja abaixo do limite de detecção do detector por arranjo de diodos.

Os demais metabólitos isolados do fungo *Cytospora* sp. fel 302 foram caracterizados pelos seus índices de retenção (RI) e espectros de absorção no UV e sua ocorrência nos perfis pertencentes aos diferentes quimiotipos foi verificada (**Tabela 3.12**, pag. 104).

O metabólito citosporona Q (**28**) foi detectado em apenas três perfis pertencentes ao quimiotipo 5. De forma semelhante, a dotiorelona B (**21**) ocorreu de forma errática em três perfis pertencentes a três quimiotipos distintos. Devido à sua ocorrência restrita e aleatória, esses metabólitos não foram considerados como marcadores quimiotaxonômicos úteis para a definição de quimiotipos.

Como indicado no **Cap. 2**, nenhum dos metabólitos compartilhados pelos quimiotipos 1 (*Phomopsis* 1) e 5 (*Cytospora*) foram detectados nos perfis do quimiotipo 2. Esses também não foram detectados nos perfis do quimiotipo 4 ou naqueles perfis de isolados não classificados em quimiotipos, com exceção da citosporona B, que ocorreu no perfil do Isolado fel 356 (**Tabela 3.12**). O isolado fel 360, classificado no quimiotipo 3, foi capaz de produzir quase todos os metabólitos isolados do fungo *Cytospora* sp. fel 302, com exceção da citosporona Q e do metabólito ‘amarelo 2’, restritos ao quimiotipo 5 (*Cytospora*). O metabólito ‘amarelo 1’ foi produzido pela maioria dos perfis dos quimiotipos 3 e 5; já o metabólito ‘vermelho’ foi regularmente detectado nos perfis dos quimiotipos 1, 5 e, em menor número, 3.

Tabela 3.12: Ocorrência dos metabólitos isolados do fungo *Cytospora* sp. fel 302 nos perfis de metabólitos secundários de 42 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* pertencentes a diferentes quimiotipos

metabólito	RT	RI	quimiotipo 1* (10 isolados)	quimiotipo 2 (7 isolados)	quimiotipo 3 (7 isolados)	quimiotipo 4 (5 isolados)	quimiotipo 5 (8 isolados)	demais isolados** (5 isolados)
citosporona P (27)	6,00	740	3	0	1	0	5	0
citosporona Q (28)	6,18	747	0	0	0	0	3	0
dotiorelona H (23)	6,42	757	9	0	1	0	7	0
citosporona O (24)	6,62	764	10	0	1	0	7	0
amarelo 1	6,79	772	1	0	5	0	7	0
dotiorelona A (19)	8,23	831	9	0	1	0	7	0
dotiorelona C (20)	8,39	837	9	0	1	0	7	0
dotiorelona B (21)	8,53	842	1	0	1	0	1	0
amarelo 2	11,16	965	0	0	0	0	7	0
vermelho	11,41	979	7	0	4	0	7	0
citosporona C (22)	11,78	1000	9	0	1	0	7	0
citosporona B (18)	13,69	1120	4	0	1	0	5	1 (fel 356)

* os quimiotipos foram definidos com base na análise dos perfis de metabólitos secundários obtidos por CLAE-DAD a partir dos extratos brutos de 42 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*; vide **Cap. 2**

** isolados cujos perfis de metabólitos secundários não foram classificados como pertencentes aos quimiotipos definidos; vide **Cap. 2**

Os metabólitos dotiorelonas A, C, H e citosporona O foram detectados em quase todos os perfis dos quimiotipos 1 e 5 e sempre ocorreram juntos. A citosporona

C também ocorreu na maioria dos perfis desses dois quimiotipos. Os resultados obtidos indicaram que a maioria dos metabólitos purificados a partir do extrato bruto do fungo *Cytospora* sp. fel 302 são possíveis marcadores quimiotaxonômicos para a definição dos quimiotipos 1, 5 e 3. Os dados de presença ou ausência dos metabólitos aqui isolados e daqueles detectados no **Cap. 2** foram tabulados em uma matriz binária e submetidos à análise estatística multivariada de classificação, com o objetivo de se confirmar, ou não, a separação dos isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* estudados em diferentes quimiotipos. Os resultados desse estudo quimiotaxonômico são descritos no **Cap. 4** dessa Tese.

3.4 Conclusões

Onze metabólitos foram purificados a partir do extrato bruto do isolado *Cytospora* sp. fel 302.

Foram identificados oito metabólitos conhecidos, citosporonas B, C, D, E e dotiorelonas A, B, C, H, e três metabólitos inéditos, nomeados de citosporonas O, P e Q.

Três metabólitos coloridos foram parcialmente caracterizados e nomeados de 'amarelo 1', 'amarelo 2' e 'vermelho'.

Os metabólitos citosporonas B, C, O, Q, dotiorelonas A, C, H, 'amarelo 2' e 'vermelho' foram produzidos pela maioria dos isolados classificados nos quimiotipos 1 (*Phomopsis* 1) e 5 (*Cytospora*).

O 'metabólito 'amarelo 1' foi produzido pela maioria dos isolados classificados nos quimiotipos 3 (*Phomopsis* 3) e 5 (*Cytospora*). Quatro isolados do quimiotipo 3 produziram o metabólito 'vermelho'.

Nenhum dos metabólitos purificados a partir do extrato do isolado *Cytospora* sp. fel 302 foi detectado nos perfis dos isolados classificados nos quimiotipos 2 e 4.

4 Estudo quimiotaxonômico de fungos endófitos dos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora*

4.1 Introdução

Os gêneros de ascomicetos anamórficos (assexuados) *Phomopsis* e *Cytospora* são compostos por espécies geralmente associadas a plantas lenhosas ou herbáceas, ocorrendo como patógenos ou endófitos (Rossman et al., 2007). Esses fungos são também versáteis produtores de metabólitos secundários (vide **Cap. 2 e 3**). Morfologicamente, *Phomopsis* e *Cytospora* são caracterizados pela produção de esporos assexuados no interior de estruturas ou corpos de frutificação e recebem o nome trivial de celomicetos (Rossman et al., 2007; Sutton, 1980).

A caracterização dos esporos e outras estruturas reprodutivas não são suficientes para a distinção inequívoca das espécies de *Phomopsis* e *Cytospora* e os conceitos de espécies nesses gêneros estão normalmente associados à ocorrência dessas em determinadas plantas hospedeiras (Adams et al., 2005; Niekerk et al., 2005; Rehner & Uecker, 1994). Não há sistemas padrão para o estudo taxonômico desses gêneros *in vitro*, como aqueles existentes para alguns gêneros mais bem estudados como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (Klich, 2002; Leslie & Summerell, 2006; Samson & Frisvad, 2004). Muitas das vezes, somente os métodos de biologia molecular, baseados no sequenciamento do DNA, são capazes de diferenciar, com certo grau de confiança, espécies morfolologicamente muito semelhantes de *Phomopsis* ou *Cytospora* (Adams et al., 2005; Niekerk et al., 2005; Rehner & Uecker, 1994).

A quimiotaxonomia de fungos filamentosos é definida como a identificação e classificação de espécies com base no perfilamento de metabólitos secundários (Frisvad et al., 2008). Um determinado metabólito pode ser produzido por diferentes espécies de fungos filogeneticamente distantes (i.e. que não possuem um ancestral próximo comum), porém, os perfis de metabólitos são geralmente específicos a cada espécie (Frisvad et al., 2008; Larsen et al., 2005).

A quimiotaxonomia é parte importante dos estudos taxonômicos de fungos que formam líquens e sua utilidade para a classificação de espécies de ascomicetos em gêneros como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, e *Trichoderma* já foi demonstrada (Andersen et al., 2002; Samson & Frisvad, 2004; Samson et al., 2004; Thrane et al., 2001, 2004).

O método preferido de perfilamento de metabólitos secundários é aquele baseado na análise de extratos brutos, obtidos em micro escala, através de CLAE-

DAD. Este método de análise permite a rápida separação e detecção de uma grande quantidade de metabólitos de diferentes origens biossintéticas e estruturas químicas. Os metabólitos detectados nos perfis são parcialmente caracterizados por meio de seus índices de retenção e espectros de absorção na região do UV e utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (Frisvad & Thrane, 1987; Svendsen & Frisvad, 1994; Stadler & Keller, 2008).

Os dados referentes aos marcadores quimiotaxonômicos, obtidos durante o perfilamento de metabólitos secundários, são tabulados em matrizes binárias e submetidos à análise estatística multivariada de classificação ou ordenação, visando ao agrupamento dos perfis em diferentes quimiotipos (Andersen & Hollensted, 2008; Andersen et al., 2002, 2008). Os perfis também podem ser analisados de forma automatizada. Os cromatogramas podem ser avaliados como figuras tridimensionais contendo os eixos tempo, comprimento de onda e intensidade de absorção. Após o alinhamento, esses podem ser comparados aos pares por um programa de análise de imagens e a matriz de similaridades obtida avaliada por métodos de estatística multivariada (Smedsgaard & Nielsen, 2005). O programa de computador *Chemical Image Analysis*, desenvolvido por pesquisadores do Centro de Biotecnologia Microbiana da Universidade Tecnológica da Dinamarca, tem sido usado satisfatoriamente para a classificação automatizada de espécies de *Alternaria*, *Penicillium*, *Phoma* e *Ulocladium*, com base em seus perfis de metabólitos secundários (Andersen & Hollensted, 2008; Andersen et al., 2008; Hansen et al., 2005, Sørensen et al., 2010).

Diante da grande capacidade de produção de metabólitos secundários pelos fungos dos gêneros *Phomopsis* e *Cytospora* e da complexidade taxonômica desse grupo, formulou-se a hipótese de que o perfilamento de metabólitos secundários produzidos por isolados endófitos desses dois gêneros, cultivados sob condições padrão, poderia ser usado na classificação desses em quimiotipos, os quais, talvez, representassem espécies distintas. A definição dos quimiotipos de *Phomopsis* e *Cytospora*, feita com base na análise visual dos perfis de metabólitos secundários obtidos por CLAE-DAD, foi descrita no **Cap. 2** dessa Tese. A detecção dos marcadores químicos de cada quimiotipo e a identificação de vários desses por meio de desreplicação ou da sua purificação e elucidação estrutural foram descritas no **Cap. 2 e 3**.

A consistência do modelo de classificação dos fungos em diferentes quimiotipos foi testada através de dois experimentos descritos nesse capítulo. No primeiro, os arquivos contendo os cromatogramas de 41 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* foram analisados pelo programa de computador *Chemical Image Analysis*

(Hansen et al., 2005). No segundo experimento, foi elaborada uma matriz binária contendo os dados de presença ou ausência de todos os marcadores químicos, identificados ou não, detectados nos perfis de 42 isolados. Essa matriz foi submetida à análise multivariada de classificação para a definição dos quimiotipos. Também foi avaliada a existência de possíveis correlações entre os quimiotipos identificados e as plantas hospedeiras e/ou as localidades de onde foram isolados os fungos.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Fungos estudados

Foram investigados 37 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* classificados nos quimiotipos 1 a 5 (**Cap. 2**, item **2.3.2**, pag. 36), além dos cinco isolados de *Phomopsis* não classificados em quimiotipos (**Tabela 4.1**, pag. 110). Nove isolados foram obtidos de plantas de cacauzeiro, coletadas em Manaus, AM, e Itabuna, BA, e três isolados de *Phomopsis* foram obtidos de cafeeiros, localizados em Machado e Santo Antonio do Amparo, MG. O restante dos isolados foi obtido no município de Lavras, MG, de plantas de mangueira (sete isolados) e das espécies nativas *Phoradendron perrottettii* (nove isolados) e *Tapirira guianensis* (14 isolados) (Abreu et al., 2010a; Almeida, 2007; Costa, 2008; Rezende et al., 2007).

4.2.2 Experimento 1: Classificação automatizada de 41 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*, com base em seus perfis metabólitos secundários, pelo programa *Chemical Image Analysis* (CIA)

Nesse experimento, foram utilizados os arquivos originais contendo os cromatogramas obtidos durante o perfilamento dos extratos brutos dos fungos por CLAE-DAD (**Cap. 2**). Somente o perfil do isolado cml 1521 não foi incluído nesse experimento, pois na primeira análise esse não havia produzido quantidades detectáveis de metabólitos em seu perfil. Não foram realizadas quaisquer manipulações ou seleções de picos antes da análise.

Os arquivos foram analisados pelo programa de computador *Chemical Image Analysis* (CIA), o qual avalia a semelhança entre os perfis de metabólitos presentes nos extratos brutos, investigados dois a dois, baseado em cada metabólito eluído e seu respectivo espectro de absorção no UV, obtidos durante o perfilamento por CLAE-DAD (Hansen et al., 2005).

Os arquivos foram submetidos a um processamento inicial pelo programa CIA, constituído de três passos: os dados de absorbância foram transformados por meio de uma operação logarítmica (\log_{10}), para a calibração das intensidades de absorção entre extratos contendo diferentes concentrações de metabólitos. Os cromatogramas foram, então, submetidos à correção das linhas de base e posterior alinhamento, por meio de modelos matemáticos. Esses últimos dois passos visaram a corrigir pequenas variações no tempo de retenção de um mesmo metabólito em diferentes análises (Andersen et al., 2005, 2008).

Os cromatogramas foram comparados, dois a dois, por meio de um algoritmo desenvolvido por Hansen (Hansen et al., 2005), gerando uma matriz com os valores de similaridade entre todos os perfis, a qual foi submetida à análise multivariada de classificação, utilizando o método WARD de agrupamento (Andersen et al., 2005, 2008).

4.2.3 Experimento 2: Classificação de 42 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*, com base em seus perfis de metabólitos secundários, por estatística multivariada de classificação

Uma matriz binária foi confeccionada contendo os dados de presença ou ausência de todos os metabólitos detectados nos cromatogramas impressos dos isolados investigados ($n = 156$ metabólitos), caracterizados pelos seus índices de retenção e espectros de absorção no UV (Frisvad & Thrane, 1987). Os metabólitos que foram detectados somente uma ou duas vezes nos perfis investigados, e que não foram considerados marcadores químicos majoritários, foram excluídos da planilha, gerando uma matriz reduzida contendo 97 metabólitos.

A matriz binária reduzida foi submetida à análise multivariada de classificação, utilizando o coeficiente de Yule para o cálculo de distâncias (dessemelhanças) entre os perfis e o método não ponderado de agrupamento por pares utilizando médias aritméticas (UPGMA) para a elaboração do dendrograma (Andersen et al., 2008; Svendsen & Frisvad, 1994). As análises foram realizadas no programa NTSYS-pc (Exeter Software, New York, US).

Tabela 4.1: Isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* investigados no presente estudo

Isolado	Código	Gênero	Hospedeiro	Órgão	Localidade	Quimiotipo *
1	cml1520	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	folha	Manaus_AM	4
2	cml1521	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	folha	Manaus_AM	4
3	cml1527	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	folha	Itabuna_BA	1
4	cml1529	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	caule	Itabuna_BA	4
5	cml1530	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	caule	Itabuna_BA	4
6	cml1533	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	caule	Itabuna_BA	-
7	cml1535	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	caule	Itabuna_BA	-
8	cml1538	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	folha	Manaus_AM	3
9	cml1541	<i>Phomopsis</i>	cacaueiro	caule	Itabuna_BA	3
10	cml871	<i>Phomopsis</i>	cafeeiro	caule	Machado_MG	1
11	cml1315	<i>Phomopsis</i>	cafeeiro	caule	S. A. Amparo_MG	-
12	cml1316	<i>Phomopsis</i>	cafeeiro	caule	S. A. Amparo_MG	1
13	cml1481	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	4
14	cml1500	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	2
15	cml1501	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	1
16	cml1502	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	2
17	cml1503	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	2
18	cml1506	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	1
19	cml1507	<i>Phomopsis</i>	mangueira	folha	Lavras_MG	2
20	fel89	<i>Phomopsis</i>	<i>Phoradendron perrottettii</i>	folha	Lavras_MG	1
21	fel97	<i>Phomopsis</i>	<i>P. perrottettii</i>	caule	Lavras_MG	1
22	fel302	<i>Cytospora</i>	<i>P. perrottettii</i>	folha	Lavras_MG	5
23	fel347	<i>Cytospora</i>	<i>P. perrottettii</i>	folha	Lavras_MG	5
24	fel355	<i>Phomopsis</i>	<i>P. perrottettii</i>	caule	Lavras_MG	2
25	fel356	<i>Phomopsis</i>	<i>P. perrottettii</i>	folha	Lavras_MG	-
26	fel357	<i>Phomopsis</i>	<i>P. perrottettii</i>	caule	Lavras_MG	2
27	fel359	<i>Phomopsis</i>	<i>P. perrottettii</i>	caule	Lavras_MG	-
28	fel364	<i>Phomopsis</i>	<i>P. perrottettii</i>	folha	Lavras_MG	3
29	fel101	<i>Phomopsis</i>	<i>Tapirira guianensis</i>	folha	Lavras_MG	3
30	fel104	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	folha	Lavras_MG	1
31	fel105	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	folha	Lavras_MG	2
32	fel180	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	1
33	fel280	<i>Cytospora</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	5
34	fel281	<i>Cytospora</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	5
35	fel283	<i>Cytospora</i>	<i>T. guianensis</i>	folha	Lavras_MG	5
36	fel352	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	folha	Lavras_MG	1
37	fel353	<i>Cytospora</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	5
38	fel358	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	3
39	fel360	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	3
40	fel361	<i>Cytospora</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	5
41	fel362	<i>Cytospora</i>	<i>T. guianensis</i>	caule	Lavras_MG	5
42	fel365	<i>Phomopsis</i>	<i>T. guianensis</i>	folha	Lavras_MG	3

* Os quimiotipos foram definidos através do perfilamento, por CLAE-DAD, dos extratos brutos dos isolados investigados, seguido da avaliação visual dos cromatogramas e metabólitos detectados (**Cap. 2**)

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Classificação dos isolados pelo programa *Chemical Image Analysis*

A análise pelo programa CIA foi realizada a partir dos cromatogramas 'brutos' obtidos por CLAE-DAD, contendo impurezas do meio de cultura, metabólitos constitutivos presentes nas paredes celulares dos fungos (e.g. ergosterol), metabólitos específicos de cada quimiotipo e aqueles específicos de cada isolado. Não houve, portanto, uma seleção prévia dos marcadores quimiotaxonômicos, razão pela qual essa análise é considerada não supervisionada e não tendenciosa (Andersen et al., 2005).

A maioria dos isolados originalmente classificados nos quimiotipos 1 e 5 foram separados em dois grupos homogêneos e distintos pelo programa CIA (**Fig. 4.1**, pag. 112). Os isolados classificados no quimiotipo 1 foram divididos em dois subgrupos homogêneos, contendo sete isolados, e mais um terceiro subgrupo distinto, composto pelos isolados cml 871 e cml 1527. O grupo contendo os isolados do quimiotipo 5 foi dividido em dois subgrupos semelhantes.

Um terceiro ramo do dendrograma originou um grupo distinto, contendo quatro isolados do quimiotipo 3, e um agrupamento maior e pouco definido, contendo 16 isolados pertencentes a quimiotipos diferentes (**Fig. 4.1**, pag. 112). Esse último grupo também foi dividido em subgrupos. Os isolados cml 1529 e 1530, pertencentes ao quimiotipo 4, formaram um subgrupo distinto. Quatro isolados do quimiotipo 2 (cml 1500, cml 1507, fel 105 e fel 357) formaram outro subgrupo, juntamente com os isolados cml 1501 (quimiotipo 1) e cml 1533. Um terceiro subgrupo foi formado por cinco isolados pertencentes aos quimiotipos 3, 4 e 5. O quarto ramo do dendrograma deu origem a dois grupos distintos, o primeiro contendo três isolados do quimiotipo 2 (cml 1500, cml 1503, fel 355) e o segundo composto pelos isolados cml 1535 e fel 359.

A classificação insatisfatória de 16 isolados em vários subgrupos semelhantes deve-se, provavelmente, ao fato de que esses fungos produziram pequenas quantidades de metabólitos em seus extratos. O modelo de análise do programa CIA considera os cromatogramas como arquivos tridimensionais com os eixos tempo, comprimento de onda e intensidade de absorção (Hansen et al., 2005). Logo, os isolados pertencentes a diferentes quimiotipos, mas que produziram perfis 'pobres' de metabólitos secundários foram classificados conjuntamente pelo programa CIA. Essa falha ou inadequação do programa CIA para a avaliação de cromatogramas oriundos de extratos pouco concentrados já foi observada em estudos com fungos dos gêneros *Alternaria*, *Phoma* e *Ulocladium* (Andersen & Hollensted, 2008, Andersen et al., 2008; Sørensen et al., 2010).

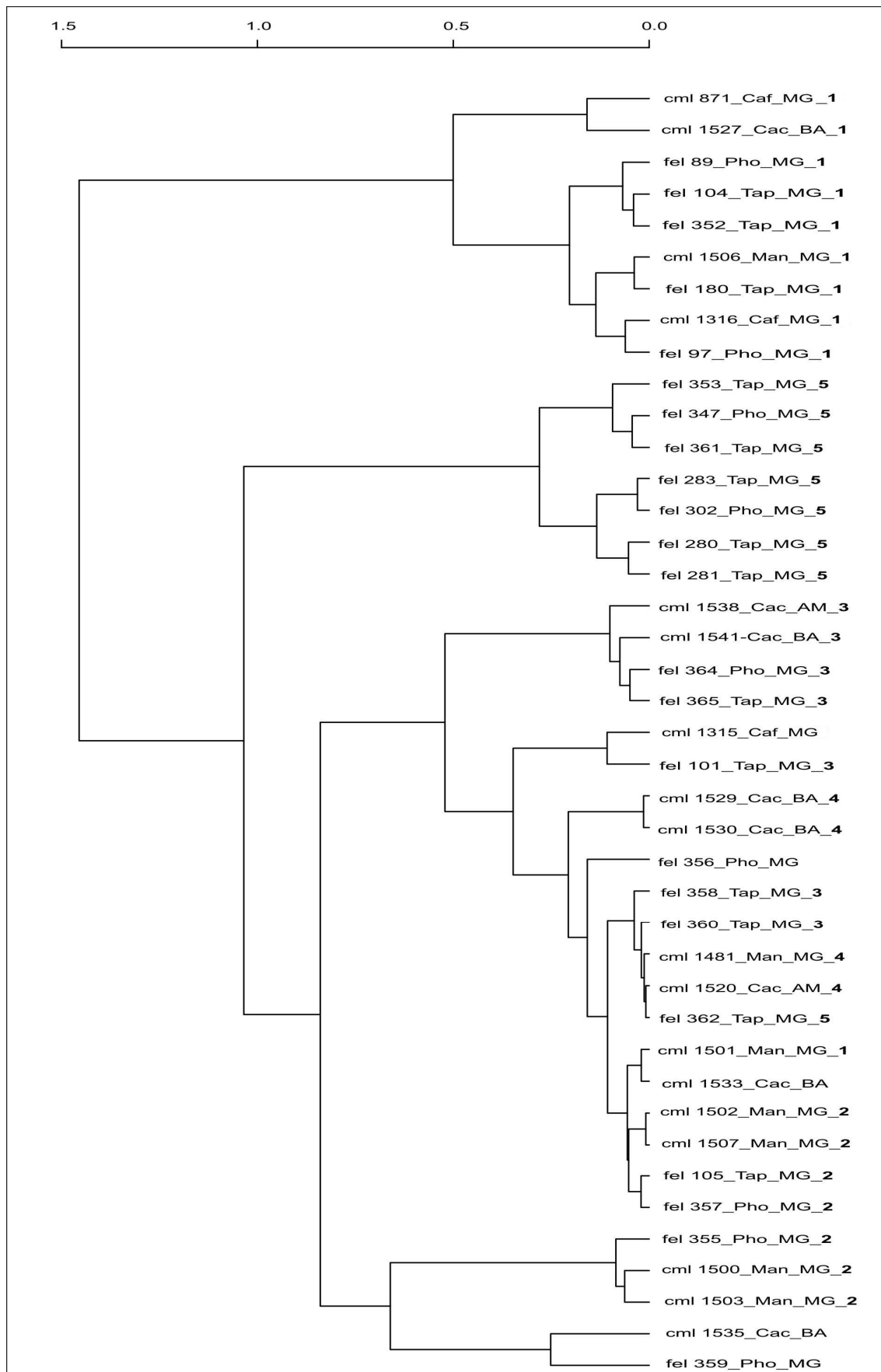


Figura 4.1: Dendrograma gerado pelo programa CIA, baseado nos perfis de metabólitos secundários de 41 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*, através do método WARD de agrupamento. Cada isolado foi identificado pelo seu código original, seguido da planta hospedeira (Cac: cacaueiro, Caf:cafeeiro, Man: mangueira, Pho: *P. perrottettii*, Tap: *T. guianensis*), da sigla do estado de origem e do número do quimiotipo ao qual pertence, destacado em negrito

Os demais 'bons' produtores de metabólitos secundários foram satisfatoriamente classificados em grupos distintos, os quais coincidiram com os quimiotipos definidos através da análise visual dos cromatogramas (**Cap. 2**). Em estudos quimiotaxonômicos com fungos dos gêneros *Alternaria*, *Phoma* e *Ulocladium*, os resultados do programa CIA permitiram a separação dos isolados de diferentes espécies em grupos distintos, com exceção daqueles isolados que eram 'maus' produtores de metabólitos (Andersen et al., 2008; Andersen & Hollensted, 2008; Sørensen et al., 2010).

4.3.2 Classificação dos isolados por estatística multivariada de classificação

A classificação dos isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*, obtida através da análise multivariada de classificação (**Fig. 4.2**, pag. 114), coincidiu com a separação desses em quimiotipos distintos, descrita no **Cap. 2** dessa Tese. O coeficiente de Yule, usado para o cálculo das distâncias entre os perfis de metabólitos dos fungos investigados, mostrou-se capaz de gerar grupos compactos e bem delimitados, resultado semelhante àqueles obtidos em outros estudos de quimiotaxonomia de ascomicetos (Overy et al., 2005; Svendsen & Frisvad, 1994; Thrane et al., 2001).

Em um estudo quimiotaxonômico realizado com 279 isolados de 45 espécies de *Penicillium*, Svendsen & Frisvad (1994) testaram a utilidade de 15 coeficientes para o cálculo de distâncias entre objetos e concluíram que o coeficiente de Yule era o mais adequado para a classificação de espécies com base em seus perfis de metabólitos secundários, obtidos por CLAE-DAD. O coeficiente de Yule somente registra uma diferença entre dois objetos (i.e. perfis) quando ambos possuem pelo menos uma variável (i.e. metabólito) ausente no outro objeto. Assim, mesmo que alguns metabólitos não sejam detectados no perfil de um isolado pertencente a um determinado quimiotipo, esse será classificado corretamente pelo coeficiente de Yule (Svendsen & Frisvad, 1994).

Seis grupos bem definidos foram obtidos através da análise multivariada de classificação, cinco referentes aos quimiotipos 1 a 5 e um sexto contendo os isolados cml 1481, cml 1535 e fel 359 (**Fig. 4.2**, pag. 114). Esses três isolados produziram três metabólitos em comum, RI (Índice de Retenção, vide **Cap. 2**, item **2.2.3.3**, pag. 31) 699, RI 730 e RI 885, os quais não foram detectados nos perfis de nenhum outro isolado investigado. Os isolados cml 1315 e fel 356 não se agruparam com outros isolados, confirmando os resultados obtidos no **Cap. 2**.

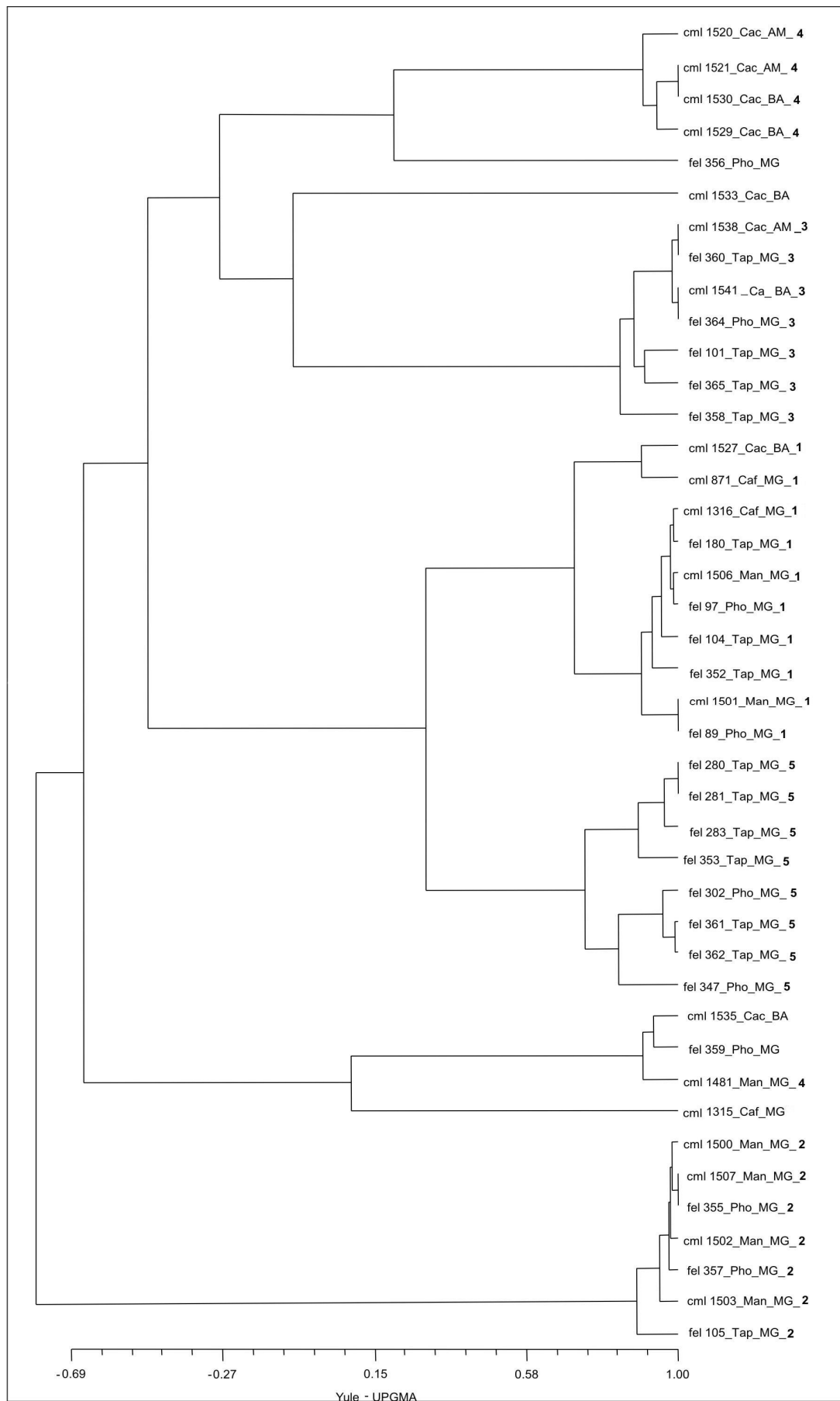


Figura 4.2: Dendrograma, gerado pela análise multivariada de classificação, baseado nos perfis de metabólitos secundários de 42 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*, através do método UPGMA de agrupamento. Cada isolado foi identificado pelo seu código original, seguido da planta hospedeira (Cac: cacaueteiro, Caf: cafeeiro, Man: mangueira, Phor: *P. perrottettii*, Tap: *T. guianensis*), da sigla do estado de origem e do número do quimiotipo ao qual pertence, destacado em negrito.

Os isolados cml 871 e cml 1527 formaram um subgrupo distinto dentro do grupo contendo os isolados do quimiotipo 1, resultado semelhante àquele obtido pela análise com o programa CIA. Esses isolados produziram os metabólitos RI 790 e RI 811, não encontrados nos perfis de outros isolados do mesmo quimiotipo. Já os metabólitos altenusina e 'vermelho', característicos do quimiotipo 1, não foram detectados nos perfis dos isolados cml 871 e cml 1527.

Os resultados obtidos confirmaram a classificação dos isolados em quimiotipos e permitiram definir os marcadores quimiotaxonômicos, identificados ou não, característicos de cada um. Os metabólitos produzidos por pelo menos metade dos isolados de um determinado quimiotipo foram considerados como marcadores característicos desse e são sumarizados a seguir:

Quimiotipo 1 (*Phomopsis* 1), total 10 isolados, marcadores quimiotaxonômicos: altenueno (03) [RI 796, produzido por 6 isolados], altenusina (01) [RI 815, 7], alternariol (02) [RI 851, 10], citosporona C (22) [RI 1000, 9], citosporona O (24) [RI 764, 10], dotiorelona A (19) [RI 831, 9], dotiorelona C (20) [RI 837, 9], dotiorelona H (23) [RI 757, 9], metabólito 'vermelho' [RI 979, 7], RI 667 (7), RI 681 (8), RI 733 (8), RI 786 (7). Os metabólitos alternariol monometil éter (04) [RI 992], 4'-epialtenueno (05) [RI 777] e citosporona B (18) [RI 1120] foram produzidos por quatro isolados pertencentes ao quimiotipo 1.

Quimiotipo 2 (*Phomopsis* 2), total 7 isolados, marcadores quimiotaxonômicos: alternariol (02) [RI 851, 7], RI 718 (5), RI 776 (7), RI 811 (7), RI 877 (6), RI 883 (7), RI 933 (5), RI 949 (6), RI 981 (6), RI 1011 (6), RI 1112 (6).

Quimiotipo 3 (*Phomopsis* 3), total 7 isolados, marcadores quimiotaxonômicos: ácido 2,4-diidroxi-6-(2-oxopropil) benzóico (08) [RI 566, 5], ácido 2,4-diidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil)benzóico (09) [RI 588, 7], ortosporina [RI 744, 6], 'amarelo 1' [RI 772, 5], RI 611 (6), RI 625 (4), RI 658 (4), RI 673 (4), RI 792 (6), RI 800 (4), RI 863 (6), RI 924 (4). Três isolados do quimiotipo 3 (cml 1538, fel 358 e fel 360) produziram o metabólito 'vermelho' [RI 979].

Quimiotipo 4 (*Phomopsis* 4), total 4 isolados, marcadores quimiotaxonômicos: fomol [RI 1143, 4], RI 623 (4), RI 635 (4), RI 749 (3), RI 696A (2), RI 792 (2).

Quimiotipo 5 (*Cytospora*), total 8 isolados, marcadores quimiotaxonômicos: citosporona B (18) [RI 1120, 5], citosporona C (22) [RI 1000, 7], citosporona O (24) [RI

764, 7], citosporona P (**27**) [RI 740, 5], dotiorelona A (**19**) [RI 831, 7], dotiorelona C (**20**) [RI 837, 7], dotiorelona H (**23**) [RI 757, 7], 'amarelo 1' [RI 772, 7], 'amarelo 2' [RI 965, 7], 'vermelho' [RI 979, 7], RI 625 (5), RI 703 (7), RI 728 (5), RI 784 (5), RI 813 (5), RI 924 (5), RI 1121 (6).

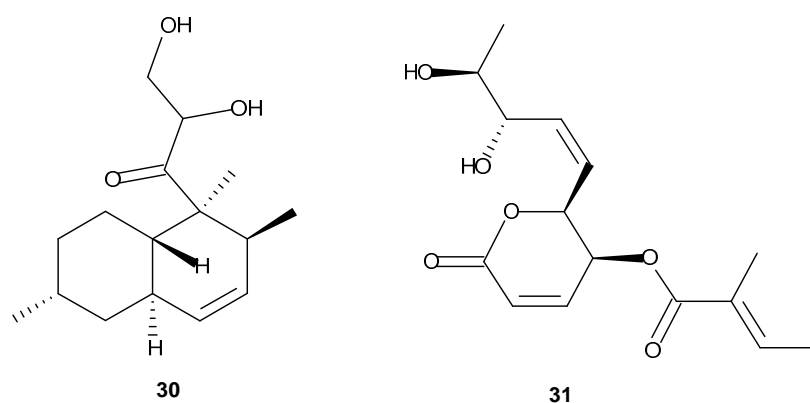
Todos os isolados pertencentes aos quimiotipos 1 e 2 produziram o metabólito alternariol como majoritário, porém, os demais metabólitos presentes nos perfis permitiram a clara distinção desses em dois grupos, seja pela análise visual dos cromatogramas (**Cap. 2**), pelo programa CIA, ou através dos resultados da análise multivariada de classificação. Esses resultados dão suporte à hipótese de que os quimiotipos 1 e 2 correspondam a duas espécies distintas, embora os isolados que os compõem sejam bastante similares morfológicamente (pesquisadora Mirian Salgado, Depto. de Fitopatologia, UFLA, informação pessoal).

Os quimiotipos 1 e 5, constituídos por isolados de dois gêneros distintos, *Phomopsis* e *Cytospora*, foram caracterizados pela produção de sete marcadores quimiotaxonômicos em comum, citosporonas B, C e O, dotiorelonas A, C e H e o metabólito 'vermelho'. Porém, os metabólitos alternariol, altenusina, altenueno, 4'-epialtenueno e alternariol monometil éter, característicos do quimiotipo *Phomopsis* 1, não foram detectados em nenhum dos perfis oriundos dos isolados de *Cytospora* classificados no quimiotipo 5. Já o metabólito 'amarelo 2', produzido como majoritário por sete dos oito isolados do quimiotipo 5, não foi detectado nos perfis daqueles pertencentes ao quimiotipo 1.

Os isolados cml 1481, cml 1535 e fel 359 produziram, exclusivamente, três metabólitos em comum (RI 699, RI 730 e RI 885) e foram classificados em um mesmo grupo no dendrograma gerado pela análise multivariada de classificação (**Fig. 4.2**, pag. 114). A possibilidade de que esses isolados pertençam a um sexto quimiotipo distinto não foi aventada, pois os três produziram metabólitos majoritários distintos em seus perfis (**Cap 2**, item **2.3.2**, pag. 36). Seria necessário um número maior de isolados e de marcadores quimiotaxonômicos para uma caracterização satisfatória desse provável quimiotipo. De forma semelhante, uma melhor caracterização do quimiotipo 4 seria obtida com o estudo de um número maior de isolados e de marcadores quimiotaxonômicos, talvez com o cultivo dos fungos em outros meios de cultura para a indução da produção de metabólitos (Overy et al., 2005).

Horn et al. (1996) avaliaram a utilidade do emprego dos metabólitos fomodiol (**30**) e fomopsolídeo B (**31**) como marcadores químicos para a classificação de isolados endófitos de *Phomopsis*, obtidos de plantas de salgueiro. Os extratos brutos de 52 isolados de *Phomopsis*, oriundos de plantas de salgueiro coletadas nos Estados

Unidos e na Inglaterra, e de mais oito isolados oriundos de plantas diversas, foram analisados por CLAE-DAD, visando à detecção e quantificação de **30** e **31**. A produção de **30** variou quali e quantitativamente entre todos os isolados investigados. Já o fomopsóldeo (**31**) foi produzido de forma consistente por quase todos os isolados obtidos de plantas de salgueiro. Os resultados não permitiram a classificação dos isolados de *Phomopsis* com base em apenas dois marcadores quimiotaxonômicos e a quantificação dos metabólitos mostrou-se bem menos informativa do que a presença ou ausência desses nos extratos.



Os quimiotipos 1, 2, 3 e 5 foram constituídos, em diferentes proporções, por isolados oriundos de mais de uma planta hospedeira, indicando a ausência de especificidade de colonização por parte dos fungos endófitos. A ocorrência de uma mesma espécie de *Phomopsis* como endófito dominante em diferentes plantas hospedeiras, coletadas em locais distintos, já foi demonstrada. Da mesma forma, várias espécies ou morfotipos (i.e. isolados contendo características morfológicas e culturais distintas, porém, insuficientes para defini-los como uma espécie) distintos de *Phomopsis* podem ocorrer como endófitos em uma única planta hospedeira (Abreu et al., 2010a; Cannon & Simmons, 2002; Murali et al., 2006).

O quimiotipo 1 foi constituído por isolados oriundos de todas as plantas hospedeiras investigadas, coletadas em três localidades de MG, além de Itabuna, BA. O quimiotipo 3 foi composto por endófitos do cacauero, coletados em Itabuna e Manaus, e das plantas nativas *P. perrottettii* e *T. guianensis*, coletadas em Lavras, MG. Os isolados incluídos no quimiotipo 2 formaram um grupo compacto e homogêneo no dendrograma gerado pela análise multivariada de classificação (**Fig. 4.2**, pag. 114). Esse grupo foi constituído pela maioria dos isolados obtidos de plantas de mangueira, além de endófitos das plantas *P. perrottettii* e *T. guianensis*, todas coletadas na cidade de Lavras.

O quimiotipo 4 foi constituído por isolados oriundos de plantas de uma mesma espécie, o cacaueteiro, coletadas em Itabuna e Manaus. Somente quatro isolados foram classificados nesse quimiotipo, sendo caracterizados pela produção de um número reduzido de metabólitos secundários em baixas concentrações (**Cap.2**, item **2.3.2**, pag. 36). Portanto, não foi possível inferir se o quimiotipo 4 corresponde a isolados de *Phomopsis* restritos a plantas de cacaueteiro ou se o resultado obtido é um artefato derivado da amostragem. Deve-se notar que o metabólito fomol (**Fig. 2.8**, pag. 46), detectado como majoritário nos cromatogramas dos isolados pertencentes ao quimiotipo 4, também foi detectado como majoritário no perfil do isolado cml 1481, endófito de uma planta de mangueira coletada em Lavras, fato que levou à classificação inicial desse isolado no quimiotipo 4.

Considerando que os quimiotipos, definidos através do perfilamento de extratos brutos de fungos obtidos por CLAE-DAD, geralmente correspondem a espécies distintas (Andersen et al., 2008; Boysen et al., 1996, Svendsen & Frisvad, 1994; Sørensen et al., 2010), quatro prováveis espécies de *Phomopsis* e uma espécie de *Cytospora* foram distinguidas no presente trabalho. A ocorrência de isolados oriundos de plantas e localidades diferentes na maioria dos quimiotipos indica que tais fungos não são restritos a determinada planta hospedeira ou circunscritas a uma determinada região geográfica. Obviamente, a amostragem restrita previne elaboração de hipóteses sobre a distribuição geográfica dos isolados pertencentes aos diferentes quimiotipos. Por outro lado, os resultados mostraram que a classificação quimiotaxonômica é viável como ferramenta para a separação de isolados morfologicamente semelhantes de *Phomopsis* e *Cytospora*, mas que possuam capacidades metabólicas distintas. Uma pesquisa mais ampla, feita com uma amostragem maior, poderia revelar melhor a distribuição dos quimiotipos em diferentes plantas hospedeiras e regiões geográficas, provavelmente com a descoberta de novos quimiotipos e seus respectivos metabólitos secundários.

Em colaboração com o Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia de UFLA, todos os 42 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora*, que foram objetos de investigação nesse trabalho de Tese, foram cultivados em meio líquido e submetidos à extração de DNA total. Os próximos passos serão a amplificação e o seqüenciamento das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 dos genes codificadores do RNA ribossômico (rDNA) (Mostert et al., 2001; Niekerk et al., 2005), seguidos da comparação das seqüências com aquelas de materiais de referência, depositadas em bancos de dados especializados, e da análise filogenética dos isolados. As espécies possivelmente delimitadas através da análise filogenética serão comparadas com os quimiotipos definidos no presente trabalho.

4.4 Conclusões

Vinte e cinco dos 41 isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* investigados pelo programa *Chemical Image Analysis* foram corretamente classificados em grupos distintos, os quais coincidiram com os quimiotipos previamente definidos por meio da análise visual dos cromatogramas.

Dezesseis isolados produziram baixas concentrações de metabólitos em seus extratos e não foram separados em grupos distintos pelo programa *Chemical Image Analysis*.

A classificação dos isolados por meio de estatística multivariada de classificação, com base nos dados de presença e ausência dos marcadores químicos definidos durante o perfilamento, confirmou a separação dos isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* em cinco quimiotipos distintos.

Os quimiotipos 1, 2, 3 e 5 foram constituídos por isolados de *Phomopsis* e *Cytospora* (quimiotipo 5) oriundos de diferentes plantas hospedeiras.

O quimiotipo 4 foi constituído por isolados de *Phomopsis* oriundos de plantas de cacaueteiro, coletadas nos estados da Bahia e Amazonas.

5 Avaliação da atividade citotóxica de extratos brutos de fungos endófitos contra linhagens de células de leucemia linfóide crônica e prospecção química do isolado *Libertella* sp. cml 1671

5.1 Introdução

A leucemia linfóide (ou linfocítica) crônica (LLC) é a forma de leucemia mais comum em adultos do hemisfério ocidental, sendo prevalente em pessoas com mais de 50 anos de idade (Dighiero & Hamblin, 2008). É uma doença adquirida e decorre de alterações não controladas no DNA dos linfócitos, em sua grande maioria linfócitos B, levando a alterações nos processos de maturação. Como resultado, há o acúmulo de linfócitos B maduros não funcionais (imuno-incompetentes) na medula óssea, nódulos linfáticos e outros órgãos, como o baço (Garicochea, 2005; Ghia et al., 2007). A doença leva ao comprometimento do sistema imunológico dos pacientes, aumentando a suscetibilidade a infecções variadas, além de induzir quadros de anemias, fadiga extrema e emagrecimento (Garnica & Nucci, 2005; Ghia et al., 2007).

A LLC é uma enfermidade heterogênea e de curso variável. As contagens de linfócitos B anormais podem manter-se estáveis durante anos, sem que haja alterações na qualidade de vida dos pacientes ou a necessidade de tratamento terapêutico. Já em outros casos, a evolução da doença é rápida e de difícil controle, exigindo um tratamento agressivo (Ghia et al., 2007). A gravidade da progressão da LLC parece estar ligada à presença ou ausência de mutações somáticas nos genes que codificam para a região variável das imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B (Caligaris-Capio & Ghia, 2008; Garicochea, 2005).

As células de LLC apresentam um perfil fenotípico semelhante ao de linfócitos B, porém, são capazes de expressar imunoglobulinas e outros marcadores típicos de linfócitos T (Garicochea, 2005). Essas células apresentam vida longa e há evidências de que possuam mecanismos intracelulares que retardam o processo espontâneo de apoptose (i.e morte programada das células). Há também a possibilidade de proliferação das células de LLC em centros de proliferação ou pseudofolículos, localizados no interior da medula óssea ou nódulos linfáticos (Caligaris-Capio 2000; Garicochea, 2005).

A sobrevivência das células de LLC é influenciada por outros tipos de células não leucêmicas, como linfócitos T, células dendríticas foliares e demais constituintes

presentes na medula óssea, nódulos linfáticos e outros órgãos. Embora resistentes à apoptose em seu micro-ambiente, as células de LLC sofrem rapidamente quando cultivadas isoladamente *in vitro* (Ghia et al., 2002). A taxa de apoptose das células de LLC *in vitro* é bem menor quando essas são co-cultivadas com outras células presentes no estroma constitutivo da medula óssea. Esse efeito protetor do microambiente gerado pelos constituintes da medula óssea confere maior resistência às células de LLC contra agentes quimioterápicos (Panayiotidis et al., 1996).

Os pacientes de LLC que se mantêm assintomáticos não são submetidos à terapia, pois esta não traz benefícios significativos quanto à sobrevivência desses. A progressão da doença é acompanhada por exames laboratoriais e o tratamento iniciado quando os sintomas e indícios da progressão da doença aparecem (Dighiero & Hamblin, 2008).

Não há tratamentos curativos para a LLC e a terapia aplicada visa ao prolongamento e melhoria da qualidade de vida dos pacientes (Ghia et al., 2007). O tratamento de primeira linha baseia-se no uso de agentes alquilantes, como clorambucil e ciclofosfamida e, mais recentemente, no uso de análogos de purinas, em especial a fludarabina (Rici et al., 2009). O mecanismo de ação desses agentes é similar, sendo o alvo terapêutico, o material genético das células de LLC. O clorambucil liga-se covalentemente a componentes celulares como DNA, RNA e até proteínas, interferindo nos processos celulares e induzindo a apoptose. Sendo um análogo de purinas, a fludarabina pode ser incorporada ao material genético celular, causando quebras no DNA e morte das células (Almeida et al., 2005; Rici et al., 2009).

Anticorpos monoclonais também têm sido empregados no tratamento da LLC. Os alvos terapêuticos de anticorpos são limitados às células que possuem marcadores específicos em suas membranas (i.e. antígenos), o que reduz os efeitos adversos induzidos pelos outros agentes quimioterápicos (Liu & O'Brien, 2004). Dois tipos de anticorpos monoclonais estão disponíveis atualmente no mercado para o tratamento da LLC, o rituximab e o alemtuzumab, os quais têm como alvos os marcadores celulares CD20 e CD52, respectivamente. O marcador CD20 é um antígeno presente na superfície de todos os linfócitos B e o CD52 está presente nas células do trato reprodutivo masculino e em todas as células hematopoiéticas, com exceção de eritrócitos, plaquetas e células tronco. As células reconhecidas pelos anticorpos são induzidas ao processo de apoptose (Dighiero & Hamblin, 2008; Keatin, 2006; Liu & O'Brien, 2004).

Embora a quimioterapia, realizada com os agentes terapêuticos disponíveis, seja geralmente capaz de eliminar as células de LLC do sangue periférico, a doença permanece incurável (Souza, 2005). Tal condição deve-se à resistência de células

leucêmicas, localizadas na medula óssea e nódulos linfáticos, que dificilmente são atingidas pelos agentes quimioterápicos. Essa reserva de células de LLC leva aos casos de reincidência da doença (Ghia et al., 2002). Há a necessidade, portanto, de descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que atuem sobre as células malignas de LLC protegidas em seu microambiente.

Os bioensaios são rotineiramente usados nos processos de triagem de extratos brutos, oriundos de plantas, animais ou microrganismos, em programas de prospecção química visando à descoberta de novos fármacos, agroquímicos ou outras substâncias de aplicação biotecnológica (Claeson & Bohlin, 1997). Um grande número de amostras (i.e. extratos) é submetido a bioensaios preliminares e somente aqueles extratos que se mostram ativos frente aos alvos biológicos de interesse são estudados com maior detalhe (Zhang et al., 2009). Os extratos brutos bioativos, detectados durante os bioensaios preliminares, são geralmente submetidos ao fracionamento cromatográfico biomonitorado (i.e. com a realização de novos bioensaios para se descobrir quais frações são bioativas) visando à purificação e identificação dos prováveis metabólitos responsáveis pela atividade biológica (Chen et al., 2009).

O número de metabólitos já descobertos e estudados quanto às suas propriedades biológicas é grande. Logo, faz-se necessário o uso de estratégias para a desrepliação dos extratos, evitando o re-isolamento de metabólitos conhecidos e priorizando a descoberta de novas substâncias bioativas (Claeson & Bohlin, 1997; Nielsen & Smedsgaard, 2003; VanMiddlesworth & Cannel, 1998).

O microfracionamento de extratos brutos é uma técnica que faz uso combinado do fracionamento biomonitorado dos extratos bioativos e do perfilamento desses por CLAE-DAD(-EM). Uma alíquota do extrato (e.g. 100 a 500 µg) é separada por CLAE-semipreparativa. Após a detecção por DAD, o eluente da coluna é coletado, sequencialmente, sob a forma de microfrações de alguns mililitros, em placas de microtitulação (Lang et al., 2006). Alternativamente, o fluxo do eluente pode ser dividido em dois, sendo, uma pequena fração deste direcionada para um espectrômetro de massas e o restante coletado (Cordell & Shin, 1999). As microfrações são coletadas em placas contendo, tipicamente, 96 poços, sendo a coleta automatizada por meio de braços mecânicos robotizados. A coleta também pode ser feita de forma manual, em frascos individuais de poucos mililitros (Vila et al., 2008). As microfrações são submetidas ao bioensaio de interesse, o que permite a obtenção do perfil de bioatividade do extrato investigado (Kim et al., 2008; Lang et al., 2006). Esse perfil é comparado com os resultados da análise cromatográfica, a fim de se identificar os prováveis metabólitos responsáveis pela bioatividade (Adams et al., 2009; Cordell & Shin, 1999).

Nesse capítulo, será descrita a triagem dos extratos brutos de diferentes espécies de fungos endófitos, por meio de bioensaios de citotoxicidade contra células de leucemia linfóide crônica (LLC). Os isolados investigados foram escolhidos após o perfilamento de metabólitos secundários de uma coleção de 50 extratos de fungos endófitos diversos por CLAE-DAD. O extrato do isolado *Libertella* sp. cml 1671 exibiu atividade citotóxica significativa nos bioensaios iniciais. Esse isolado foi cultivado em maior escala e seu extrato submetido ao microfracionamento, para obtenção do perfil de bioatividade, seguido da purificação e identificação dos prováveis metabólitos citotóxicos. Todos os bioensaios foram realizados no Centro Alemão de Pesquisas do Câncer, pelo colaborador Peter Boldsen Knudsen, na época, aluno de mestrado do Centro de Biotecnologia Microbiana da Universidade Tecnológica da Dinamarca (CMB-DTU). Os bioensaios foram realizados em uma nova plataforma experimental em desenvolvimento, baseada no co-cultivo das células de LLC com aquelas presentes no estroma da medula óssea e na avaliação da citotoxicidade diferenciada de extratos e metabólitos purificados contra as células leucêmicas.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Escolha dos isolados para a realização dos bioensaios

Inicialmente, foram investigados cinquenta isolados de diferentes espécies de fungos endófitos de plantas de cacaueteiro e das espécies nativas *Phoradendron perrottettii* e *Tapirira guianensis* (Abreu et al., 2010a; Costa, 2008). Os isolados foram inoculados, como três pontos, em placas de Petri de 9 cm contendo o meio YES (**Cap 2**, item **2.2.4**, pag. 33) e incubados por 15 d a 25 °C, no escuro. Após o cultivo, os isolados foram submetidos à extração em micro-escala e posterior perfilamento dos metabólitos secundários por CLAE-DAD, utilizando o método 2 (MeOH) (**Cap 2**, item **2.2.3.3**, pag. 31). Os cromatogramas foram impressos e avaliados visualmente, para a escolha dos extratos a serem submetidos aos bioensaios.

Trinta e um isolados produziram por volta de 10 metabólitos, ou pelo menos um metabólito majoritário, em seus perfis e foram escolhidos para a realização dos bioensaios (**Tabela 5.1**, pag. 124). Os fungos foram re-submetidos à extração dos metabólitos em micro-escala e os extratos brutos secos foram enviados ao Centro Alemão de Pesquisas do Câncer, em Heidelberg. Quatro isolados de *Phomopsis* e um de *Cytospora*, representantes dos quimiotipos 1 a 5, definidos nos **Cap. 2 e 4** dessa Tese, foram cultivados em meio MEA (**Cap 2**, item **2.2.4**, pag. 33) e seus extratos em micro-escala foram incluídos nos bioensaios (**Tabela 5.1**, pag. 124).

Tabela 5.1: Isolados de fungos endófitos cujos extratos foram submetidos aos bioensaios de citotoxicidade

Isolado	Código	Espécie	Hospedeiro
1	cml 832	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Cafeeiro
2	cml 1530	<i>Phomopsis</i> quimiotipo 4*	Cacaueiro
3	cml 1670	<i>Clonostachys solani</i>	Cacaueiro
4	cml 1671	<i>Libertella</i> sp.	Cacaueiro
5	cml 1681	<i>Curvularia prasadii</i>	Cacaueiro
6	cml 1690	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Cacaueiro
7	cml 1692	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Cacaueiro
8	cml 1693	<i>Spegazzinia deightonii</i>	Cacaueiro
9	cml 1695	<i>Virgatospora echinofibrosa</i>	Cacaueiro
10	cml 1702	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Cacaueiro
11	cml 1703	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Cacaueiro
12	cml 1707	<i>Nodulisporium</i> sp.	Cacaueiro
13	cml 1709	<i>Colletotrichum crassipes</i>	Cacaueiro
14	cml 1716	<i>Periconia</i> sp.	Cacaueiro
15	fel 01	<i>Acremonium strictum</i>	<i>Tapirira guianensis</i>
16	fel 05	<i>Periconia</i> sp.	<i>T. guianensis</i>
17	fel 06	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Phoradendron perrottettii</i>
18	fel 09	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	<i>P. perrottettii</i>
19	fel 17	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	<i>P. perrottettii</i>
20	fel 30	<i>Periconia</i> sp.	<i>P. perrottettii</i>
21	fel 42	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	<i>P. perrottettii</i>
22	fel 58	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	<i>P. perrottettii</i>
23	fel 64	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>P. perrottettii</i>
24	fel 89	<i>Phomopsis</i> quimiotipo 1*	<i>P. perrottettii</i>
25	fel 142	<i>Tubercularia</i> sp.	<i>P. perrottettii</i>
26	fel 159	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>T. guianensis</i>
27	fel 192	<i>Ascochyta</i> sp.	<i>T. guianensis</i>
28	fel 240	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	<i>P. perrottettii</i>
29	fel 248	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>P. perrottettii</i>
30	fel 299	<i>Curvularia</i> sp.	<i>P. perrottettii</i>
31	fel 302	<i>Cytospora</i> quimiotipo 5*	<i>P. perrottettii</i>
32	fel 307	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	<i>T. guianensis</i>
33	fel 308	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	<i>T. guianensis</i>
34	fel 315	<i>Verticillium leptobactrum</i>	<i>T. guianensis</i>
35	fel 355	<i>Phomopsis</i> quimiotipo 2*	<i>P. perrottettii</i>
36	fel 364	<i>Phomopsis</i> quimiotipo 3*	<i>P. perrottettii</i>

* Os quimiotipos 1 a 5 foram determinados nos **Cap. 2 e 4** dessa Tese.

5.2.2 Bioensaios de citotoxicidade

O método de co-cultivo de células de leucemia linfóide crônica (LLC) com células da linhagem HS-5, presentes no estroma constitutivo da medula óssea, e posterior avaliação da atividade citotóxica de extratos brutos ou metabólitos purificados sobre as células leucêmicas está em fase de testes e aprimoramento, não tendo sido publicado ainda. Dessa forma, a pedido dos colaboradores desse projeto, não será feita uma explanação detalhada dos procedimentos dos bioensaios, mas uma descrição geral desses, mesmo porque, os bioensaios não foram realizados pelo autor dessa Tese. Todos os bioensaios foram realizados pelo colaborador Peter Boldsen Knudsen durante seu projeto de mestrado (Knudsen, 2009). Os demais experimentos, envolvendo o cultivo dos fungos e obtenção dos extratos, o perfilamento de metabólitos, a desreplicação dos extratos, o microfracionamento desses e a purificação e elucidadação estrutural dos prováveis metabólitos citotóxicos, foram realizados pelo presente autor.

5.2.2.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de fungos contra células de LLC co-cultivadas com células estromais HS-5

Células de LLC criopreservadas foram co-cultivadas com células da linhagem HS-5, em meio de cultura adequado, e transferidas para placas de 96 poços (200 µL por poço). As células HS-5 fazem parte do estroma constitutivo da medula óssea e servem de suporte à sobrevivência das demais células hematopoiéticas (Graf et al., 2002).

Os extratos brutos foram diluídos, em várias concentrações, em dimetilsulfóxido (DMSO) e alíquotas de 2 µL de cada concentração definida foram adicionadas a 200 µL das suspensões de células. As placas de microtitulação foram incubadas por 24 h a 37 °C. A viabilidade das células de LLC e da linhagem HS-5 foi avaliada por citometria de fluxo com detecção por fluorescência, após o tratamento das suspensões de células com corantes específicos.

O bioensaio foi repetido com aqueles extratos que se mostraram ativos contra as células de LLC. Porém, a avaliação dos resultados foi realizada após 48 h de incubação, para verificação da especificidade da atividade citotóxica contra células de LLC, em detrimento àquelas da linhagem HS-5.

5.2.2.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de fungos contra células de LLC cultivadas em meio de cultura condicionado por células HS-5

Como as células HS-5 auxiliam na sobrevivência das células de LLC *in vitro*, há a possibilidade de que os extratos que se mostraram bioativos tenham afetado as células de LLC indiretamente, por meio de alterações não letais nas células HS-5.

Para avaliar essa hipótese, as células de LLC foram cultivadas em um meio contendo o sobrenadante derivado de uma suspensão de células HS-5. Esse meio de cultura condicionado é capaz de manter as células de LLC viáveis por um período superior a 24 h *in vitro*.

As suspensões de células de LLC em meio condicionado pelas células HS-5 foram transferidas para placas de 96 poços (200 µL por poço) e a essas foram adicionados 2 µL das diluições dos extratos brutos em DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C e a viabilidade das células foi avaliada, por citometria de fluxo, após 24 h.

5.2.2.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de fungos contra leucócitos sadios

Suspensões de leucócitos, oriundos de indivíduos sadios e cultivados em meio de cultura adequado, foram transferidas para placas de 96 poços (200 µL por poço). Às suspensões foram adicionados 2 µL das diluições dos extratos brutos em DMSO e essas foram incubadas a 37 °C. A viabilidade dos leucócitos foi avaliada por citometria de fluxo, após 24 h de incubação.

Em todos os bioensaios, o controle negativo usado foi o solvente DMSO (2 µL/200 µL de suspensão de células) e o agente antineoplásico etoposídeo foi usado como controle positivo (10 µg/200 µL de suspensão de células)

5.2.3 Estudo químico do fungo endófito *Libertella* sp. cml 1671

O isolado cml 1671, identificado como pertencente ao gênero *Libertella*, foi obtido como endófito do cacauzeiro (Costa, 2008). O extrato bruto desse isolado exibiu atividade citotóxica significativa contra células de LLC *in vitro* (item 5.3.1, pag. 129) e foi submetido a uma análise mais detalhada, na tentativa de se descobrir quais eram os metabólitos bioativos presentes em seu extrato bruto.

5.2.3.1 Cultivo em maior escala e extração dos metabólitos

O isolado cml 1671 foi inoculado, como três pontos, em 20 placas de Petri de 9 cm contendo o meio de cultura YES e incubado, por 15 d, em uma câmara de crescimento mantida a 25 °C, sem iluminação. O conteúdo das placas foi macerado junto ao solvente de extração – 10 mL / placa de acetato de etila (AcOEt) (Merck, Darmstadt, DE) contendo 1 % de ácido fórmico (Merck) – em um aparelho *Stomacher* (Colworth 400, A. J. Seward, London, UK), transferido para um recipiente de vidro com capacidade para 5 L, recoberto com solvente de extração (0,2 L) e deixado em repouso por 12 h. A fase orgânica obtida foi filtrada em filtro Whatman n° 4 (Whatman,

Maidstone, UK) com o auxílio de uma bomba de vácuo (Millipore, Billerica, US) e o processo de extração da biomassa em repouso foi repetido. A fase orgânica combinada das duas extrações (0,8 L) foi concentrada em evaporador rotatório (Rotavapor R-210, Vacuum Controller V-850, Diaphragm Vacuum Pump V-710, Büchi Labortechnik, Flawil, CH) à temperatura de 30 °C, originando 1,3 g de extrato bruto.

5.2.3.2 Microfracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671

Uma alíquota de 300 mg do extrato bruto obtido do isolado cml 1671 (massa total do extrato 1,3 g) foi dissolvida em CH₃CN (Merck) e a solução obtida (1,5 mL) foi filtrada através de um filtro de 0,45 µm (National Scientific; Rockwood, US). A amostra foi, então, submetida ao microfracionamento, utilizando um sistema GX-281 de CLAE analítica a semipreparativa (Gilson S.A.S., Villiers, Fr). O sistema foi operado pelo programa de computador Trilution LC (Gilson) e conectado a um módulo automatizado de injeção GX-Z (Gilson), para injeção de amostras e coleta de frações.

O extrato foi fracionado por CLAE em fase reversa, utilizando uma coluna Luna II C18 (250 X 10 mm, 5 µm de tamanho de partícula, Phenomenex, Torrance, US). Os eluentes usados foram H₂O purificada em aparelho Milli-Q (Millipore) e CH₃CN, ambos contendo 50 ppm de ácido trifluoroacético (TFA) (Merck). O gradiente empregado para o microfracionamento foi: H₂O–CH₃CN 90: 10 por 1 min; 90: 10 a 0: 100 em 20 min; CH₃CN por 5 min; H₂O–CH₃CN 0: 100 a 90: 10 em 2 min, mais 5 min nessa última concentração para o re-equilíbrio do sistema. O fluxo do eluente foi de 5 mL/min e o volume injetado foi de 200 µL (aproximadamente 50 mg de extrato).

As frações foram coletadas em uma placa de microtitulação de 96 poços e cada fração foi coletada durante um período de 15 s (correspondendo a 1,25 mL de eluente) entre 1 e 25 min de análise, totalizando 96 frações (4 frações/min X 24 min). A evaporação do solvente foi realizada sob fluxo N₂ a 40 °C (Microlab, Aarhus, DK), em uma capela de exaustão. O fracionamento foi realizado em duplicata e uma das placas de microtitulação foi mantida como reserva a -20 °C.

A placa, contendo 96 amostras, foi enviada ao Centro Alemão de Pesquisas do Câncer, para realização dos bioensaios de citotoxicidade contra células de LLC, co-cultivadas com células HS-5 ou cultivadas em meio de cultura condicionado, e contra leucócitos sadios, como descrito para os ensaios preliminares, realizados com os extratos brutos (itens **5.2.2.1** a **5.2.2.3**, pag. 125, 126).

5.2.3.3 Fracionamento do extrato bruto por cromatografia flash em fase normal (diol)

O restante do extrato bruto do isolado cml 1671, aproximadamente 1 g de extrato, foi submetido ao fracionamento por cromatografia *flash* em fase normal, utilizando um cartucho contendo 10 g de sílica funcionalizada com 1,1-dimetil-3-(2,3-diidroxipropoxi)-propil silano (diol) (Isolute Diol, Biotage, SE), de acordo com a seguinte série de eluição: heptano, 1 fração; heptano–diclorometano (DCM) 50: 50, 1 fração; DCM, 1 fração; DCM–AcOEt 90: 10 a 0: 100, 10 frações; AcOEt–MeOH 90: 10 a 80: 20, 2 frações; MeOH, 1 fração. Foram utilizados solventes da marca Merck. Foram coletadas 16 frações de 25 mL, as quais foram nomeadas de **LIB01** a **LIB16** (a sigla LIB foi usada em referência a *Libertella*). As frações foram concentradas em evaporador rotatório e secadas completamente sob fluxo de N₂, em capela de exaustão. Alíquotas de 100 µL das 16 frações coletadas (**LIB01** a **LIB16**) foram transferidas para frascos de vidro de 1 mL com tampa de rosca (Supelco) e submetidas à análise por CLAE-DAD, usando o método 2 (MeOH) (**Cap. 2**, item **2.2.3.3**, pag. 31).

5.2.3.4 Purificação dos metabólitos da fração LIB04 por CLAE semipreparativa

A fração **LIB04** (100,8 mg, DCM–AcOEt 90: 10 no fracionamento inicial) foi dissolvida em 1,5 mL de uma mistura H₂O–CH₃CN (40:60) e submetida ao fracionamento por CLAE semipreparativa em um cromatógrafo Waters 600 (Waters, Millford, US), com detector por arranjo de diodos (DAD) modelo 996 (Waters), utilizando uma coluna Luna II C18 (250 X 10 mm, 5 µm de tamanho de partícula, Phenomenex). Os eluentes usados foram H₂O purificada em aparelho Milli-Q (Millipore) e CH₃CN (Merck), ambos contendo 50 ppm de ácido trifluoroacético (TFA) (Merck). O gradiente empregado para o fracionamento foi: H₂O–CH₃CN 33: 67 a 29: 71 em 8 min; CH₃CN por 5 min (lavagem do sistema); H₂O–CH₃CN 33: 67 por 5 min (re-equilíbrio do sistema antes de nova injeção). Foram realizadas 13 injeções de 100 µL. Foram obtidas as seguintes subfrações purificadas: **LIB04_01** (6,5 mg), **LIB04_02** (18 mg) e **LIB04_03** (19,2 mg).

5.2.4 Análises espectroscópicas, espectrométricas e físicas das subfrações purificadas

5.2.4.1 CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)

Alíquotas de 100 µL das subfrações purificadas foram enviadas para análise por CLAE-DAD-EM, como descrito no **Cap. 2**, item **2.2.3.4** (pag. 32), para a verificação da

pureza e obtenção dos espectros de massas de alta resolução e de absorção na região do UV dos metabólitos purificados. Os dados de espectrometria de massas foram usados para a determinação da fórmula molecular das substâncias e posterior comparação com as informações contidas no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008).

5.2.4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e os mapas de contorno bidimensionais ^1H - ^1H COSY (*Correlation spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) das subfrações purificadas **LIB04_01**, **LIB04_02** e **LIB04_03** foram obtidos em um aparelho Unity Inova 500 MHz, da fabricante Varian (Palo Alto, US), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Tecnológica da Dinamarca. Os espectros de RMN de ^{13}C das amostras **LIB04_02** e **LIB04_03** foram obtidos em um aparelho Avance DRX-400, da fabricante Bruker (Karlsruhe, DE), pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Multi-usuário do Departamento de Química da UFMG.

5.2.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) das amostras **LIB04_02** e **LIB04_03** foram obtidos em um espectrômetro FTS 3000, da série Excalibur (Digilab, Randolph, US), pertencente à Central de Análise e Prospecção Química da UFLA.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Citotoxicidade dos extratos brutos contra células de leucemia linfóide crônica

Do total de 36 extratos submetidos ao bioensaio inicial (24 h de incubação), 22 exibiram atividade citotóxica contra células de LLC e foram submetidos a um novo bioensaio, com tempo de incubação das células de 48 h. Os resultados do segundo bioensaio mostraram que os 22 extratos foram capazes de causar a redução preferencial da viabilidade das células de LLC (**Tabela 5.2**, pag. 130), co-cultivadas com aquelas da linhagem HS-5, confirmando os resultados do ensaio preliminar. A redução da viabilidade das células HS-5, induzida pelos extratos brutos, variou entre 15 e 25% para maioria dos isolados, havendo alguns casos em que a maior

concentração usada dos extratos (100 µg/200 µL de suspensão de células) chegou a causar até 35% de redução (Knudsen, 2009).

Tabela 5.2: Atividade citotóxica dos extratos de fungos endófitos contra células de LLC.

Isolado	Código	Espécie	Concentração inibitória mínima* (µg/200µL de suspensão células)
1	cml 1671	<i>Libertella</i> sp.	0,0244
2	cml 1670	<i>Clonostachys solani</i>	6,25
3	cml 1695	<i>Virgatospora echinofibrosa</i>	6,25
4	cml 1707	<i>Nodulisporium</i> sp.	6,25
5	cml 1716	<i>Periconia</i> sp.	6,25
6	fel 142	<i>Tubercularia</i> sp.	6,25
7	fel 159	<i>Bipolaris</i> sp.	6,25
8	cml 1692	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	12,5
9	cml 1693	<i>Spegazzinia deightonii</i>	12,5
10	cml 1709	<i>Colletotrichum crassipes</i>	12,5
11	fel 248	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	12,5
12	fel 302	<i>Cytospora</i> quimiotipo 5	12,5
13	fel 240	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	25
14	cml 1690	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	50
15	cml 1703	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	50
16	fel 05	<i>Periconia</i> sp.	50
17	fel 17	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	50
18	fel 30	<i>Periconia</i> sp.	50
19	fel 64	<i>Arthrimum phaeospermum</i>	50
20	fel 299	<i>Curvularia</i> sp.	50
21	fel 308	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	50
22	fel 355	<i>Phomopsis</i> quimiotipo 2	50

* concentração do extrato capaz de induzir a, no mínimo, 40% de redução da viabilidade das células de LLC

O controle negativo dos experimentos, DMSO, causou, em média, entre 5 e 15% de inibição, tanto das células de LLC como das células HS-5. O etoposídeo, controle positivo dos experimentos (concentração padrão de 10 µg/200 µL de suspensão de células), causou, em média, redução de 40 a 60% da viabilidade das células de LLC e de 10 a 20% de redução da viabilidade das células HS-5. Nos ensaios com diferentes concentrações dos extratos brutos, a concentração inibitória mínima foi considerada aquela capaz de induzir a, no mínimo, 40% de redução da viabilidade das células de LLC (Knudsen, 2009). Tal concentração mínima é relevante, considerando que os extratos brutos possuem composição química complexa e que

seus metabólitos constituintes estão, geralmente, presentes em concentrações muito baixas.

A maioria dos extratos exibiu atividade citotóxica em uma concentração mínima de 50 µg/200 µL de suspensão de células. Cinco extratos foram ativos na concentração de 12,5 µg/200 µL e seis exibiram toxicidade às células de LLC na concentração de 6,25 µg/200 µL. O extrato do isolado cml 1671 (*Libertella* sp.) foi o mais citotóxico, tendo sido capaz de causar 42% de inibição das células de LLC na concentração de 24,4 ng/200 µL (**Tabela 5.2**, pag. 130, e Knudsen, 2009).

Os extratos que apresentaram atividade citotóxica em concentrações iguais ou inferiores a 12,5 µg/200 µL foram submetidos aos testes de citotoxicidade a células de LLC, cultivadas em meio condicionado por células HS-5, e de citotoxicidade a leucócitos sadios. Somente o extrato do isolado fel 248 (*Pestalotiopsis* sp.) não foi capaz de causar redução da viabilidade das células LLC em monocultivo no meio condicionado. Tal resultado indica que o extrato do isolado fel 248 induziu a modificações não letais nas células estromais HS-5, o que pode ter levado à diminuição da viabilidade das células de LLC indiretamente (Knudsen, 2009).

A redução da viabilidade dos leucócitos sadios variou, em média, entre 35 e 45% para os extratos brutos testados, em diferentes concentrações. Esses resultados são similares àqueles exibidos pelo controle negativo dos experimentos, DMSO, que exibiu uma redução média entre 30 e 40% da viabilidade de leucócitos sadios (Knudsen, 2009).

O extrato do isolado cml 1671 (*Libertella* sp.) exibiu efeito citotóxico proeminente contra células de LLC. Esse isolado foi escolhido para a fase subsequente do programa de prospecção de metabólitos com atividade citotóxica contra células leucêmicas, com o cultivo em maior escala e microfracionamento do extrato, seguido de desreplicação das frações bioativas por CLAE-DAD-EM.

A escolha de apenas um extrato promissor para a segunda fase do estudo foi justificada pela limitação de tempo disponível para a execução do projeto.

5.3.2 Microfracionamento do extrato bruto do fungo *Libertella* sp. cml

1671

O cromatograma, obtido durante o microfracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671, exibiu três picos majoritários com tempos de retenção (RT) de 13,2, 14,1 e 15,1 min (**Fig. 5.1**, pag. 132). O pico com RT 13,2 min correspondeu às frações 50 e 51, o

pico com RT 14,1 min correspondeu às frações 54 e 55 e aquele com RT 15,1 min correspondeu às frações 58 e 59.

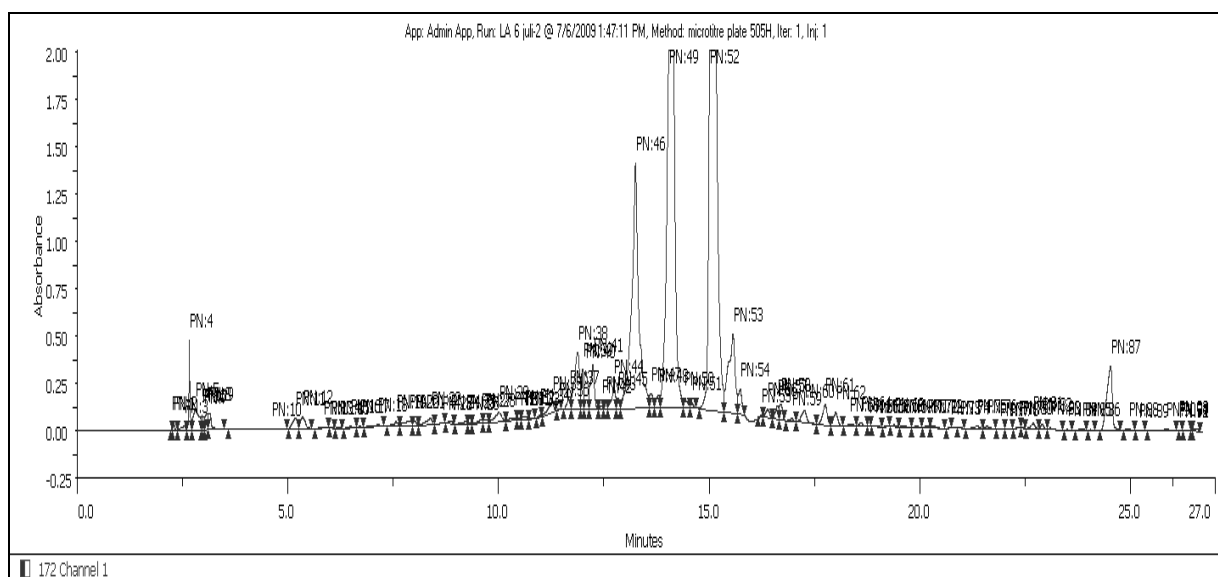


Figura 5.1: Cromatograma obtido do extrato do isolado cml 1671 durante o microfracionamento por CLAE semipreparativa ($H_2O-CH_3CN + 50$ ppm de TFA)

As 96 frações obtidas do extrato bruto do isolado cml 1671 foram dissolvidas em 25 μ L de DMSO e submetidas ao bioensaio de citotoxicidade contra células de LLC, co-cultivadas com células HS-5. Um total de 17 frações, entre a quinquagésima e a nonagésima sexta, causou a mortalidade de 100% das células de LLC (Knudsen, 2009). O bioensaio foi, então, repetido com as frações diluídas (fator de diluição 1: 10) em DMSO. Nesse segundo ensaio, a fração 54 mostrou-se a mais ativa contra as células de LLC, tendo exibido efeito citotóxico superior àquele do controle positivo do experimento (etoposídeo 10 μ g/200 μ L) (**Fig. 5.2**, pag. 133).

O efeito citotóxico das frações oriundas do microfracionamento sobre as células estromais HS-5 foi similar àqueles dos controles positivo e negativo do experimento (**Fig. 5.2**, pag. 133). Esses resultados confirmaram a atividade citotóxica 'preferencial' de constituintes do extrato bruto do isolado cml 1671 contra células leucêmicas, em detrimento às células estromais saudáveis.

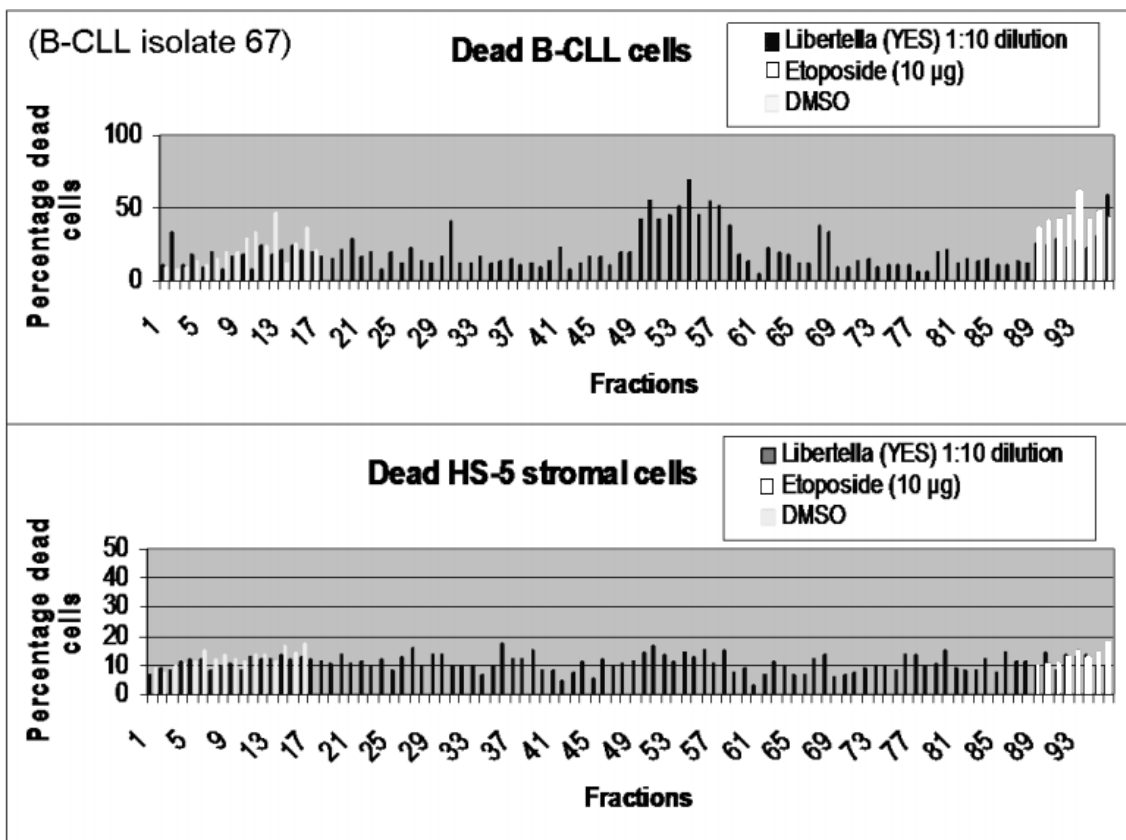


Figura 5.2: Atividade citotóxica das frações, obtidas a partir do microfracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671, contra células de LLC e células HS-5. Os resultados dos controles negativos são mostrados nas 15 primeiras frações e dos controles positivos, nas últimas oito frações. Figura adaptada, com permissão, de Knudsen (2009)

Como o microfracionamento do extrato do isolado cml 1671 foi realizado em duplicata e somente uma placa de microtitulação foi usada para realização dos bioensaios, alíquotas foram obtidas das frações da segunda placa, correspondentes às frações 54 e 55, e submetidas à análise por CLAE-DAD-EM. Os cromatogramas das frações 54 e 55 mostraram-se semelhantes, exceto pelo maior número de picos de pequena intensidade presentes no cromatograma da fração 55. O cromatograma da fração bioativa 54 evidenciou apenas um metabólito majoritário com RT 9,0 min, quando detectado pelo DAD. Já o cromatograma gerado pelo detector de massas de alta resolução (ESI-TOF) mostrou-se mais complexo, contendo, além do pico correspondente ao metabólito majoritário com RT 9,03 min, outros quatro picos proeminentes com RT de 7,34, 7,67, 7,85 e 8,26 min (**Fig. 5.3**, pag. 134).

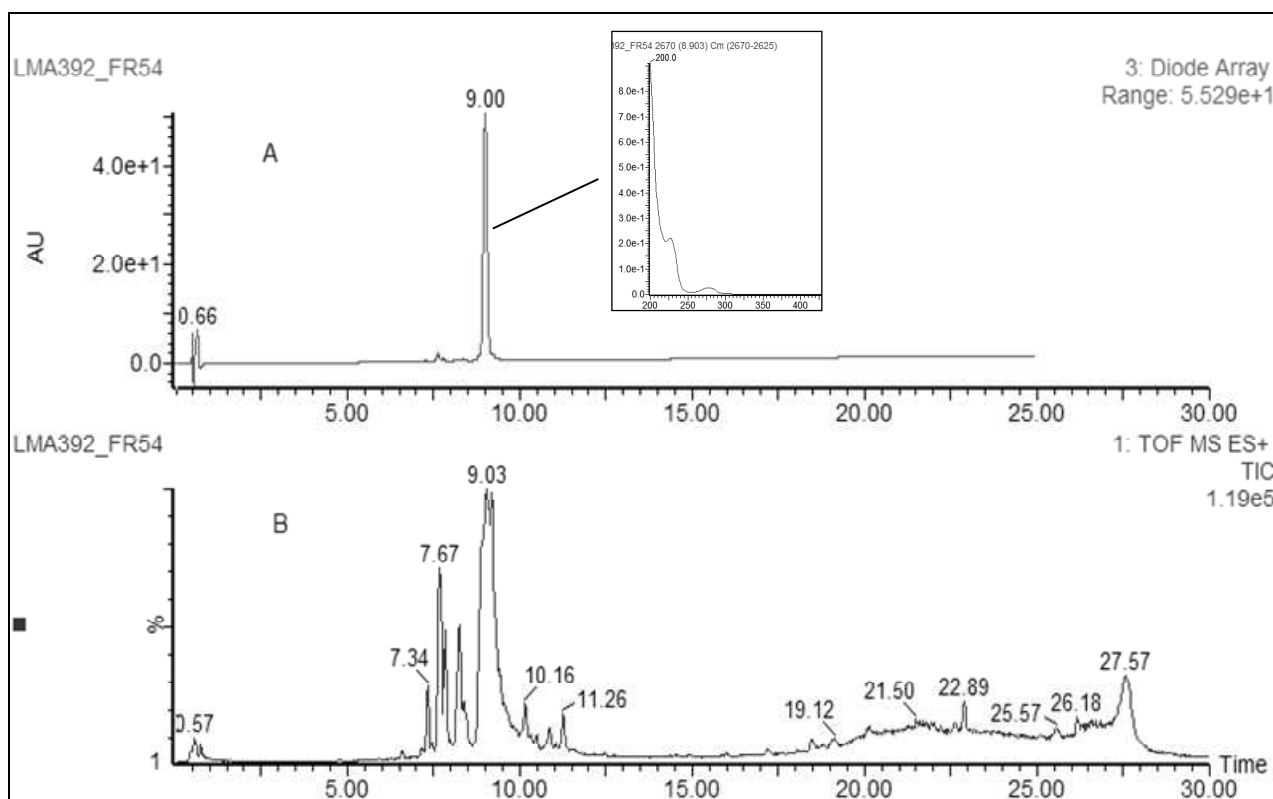
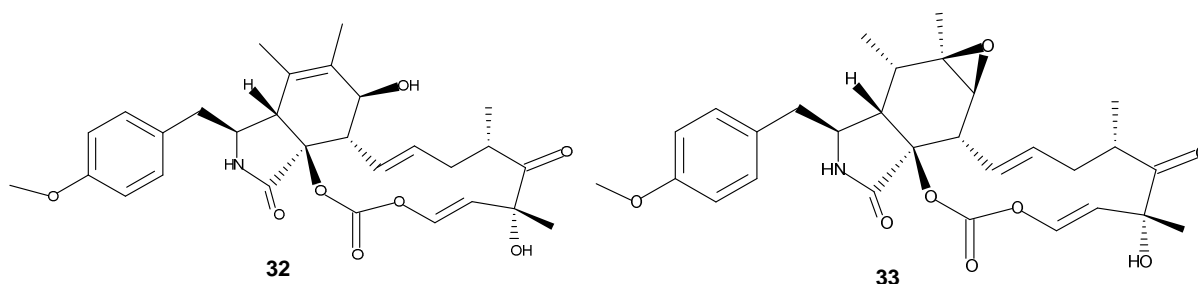


Figura 5.3: Cromatograma da fração 54, oriunda do microfracionamento do extrato do isolado cml 1671, detectado por DAD (A) e ESI-TOF (B) ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50 \text{ ppm de TFA}$)

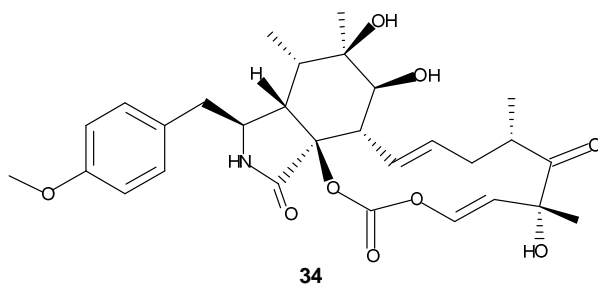
A fórmula molecular, calculada a partir do espectro de massas de alta resolução extraído do pico com RT de 9,03 min, foi determinada como $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ (m/z calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{NO}_8 = 526,2441$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z encontrado = 526,2433; aduto: 543,3 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). Dois metabólitos com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ foram encontrados no banco de Dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), os análogos de citocalasinas escoparasina A (**32**) e fenocalasina B (**33**). A escoparasina A (**32**) foi isolada do fungo *Eutypella scoparia*, endófito da planta *Garcinia dulcis*, coletada na Tailândia (Pongchaeroen et al., 2006) e a fenocalasina B (**33**) foi purificada a partir do extrato de um isolado de *Phomopsis*, oriundo de uma amostra de solo no Japão (Tomoda et al., 1999a, b). O espectro de absorção na região do UV do metabólito com RT 9,03 min apresentou máximos de absorção em 200 (corte), 228, 276 e 285 nm (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50 \text{ ppm de TFA}$), valores semelhantes àqueles descritos para a escoparasina A (**32**) ($\lambda_{\text{max}} = 224, 275, 284 \text{ nm}$; solvente MeOH) e fenocalasina B (**33**) ($\lambda_{\text{max}} = 200, 225, 275, 283 \text{ nm}$; solvente MeOH).

O gênero *Libertella* é composto por ascomicetos anamórficos (assexuados), cujas fases sexuadas correspondem aos gêneros *Eutypa* e *Eutypella*, família

Diatrypaceae (Kirk et al., 2008). É, portanto, possível que metabólito em RT 9,03 min seja a escoparasina A (**32**).



Os dados de espectrometria de massas de alta resolução permitiram o cálculo da provável fórmula molecular do metabólito com RT 7,67 min como $C_{29}H_{37}NO_9$ (m/z calculado para $C_{29}H_{38}NO_9 = 544,2547$ $[M+H]^+$; m/z encontrado = 544,2532; aduto: 561,3 $[M+NH_4]^+$). Somente um metabólito com essa fórmula molecular foi encontrado no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008), a escoparasina B (**34**), também isolada do fungo endófito *Eutypella scoparia* por Pongchaeroen et al. (2006).



Os metabólitos com RT 7,34 e 7,85 min exibiram, em seus espectros de massas, um sinal referente a um provável íon molecular protonado $[M+H]^+$ em $m/z = 480,2$ e um aduto de amônio $[M+NH_4]^+$ em $m/z = 497,3$. A fórmula molecular $C_{28}H_{33}NO_6$ foi calculada para esses metabólitos (m/z calculado para $C_{28}H_{34}NO_6 = 480,2386$ $[M+H]^+$; m/z encontrado = 480,2381 para RT 7,34 min e 480,2367 para RT 7,85 min), a qual não correspondeu a nenhuma substância presente no banco de dados Antibase 2008 (Laatsch, 2008).

A fórmula molecular $C_{30}H_{37}NO_{10}$ foi calculada para o metabólito com RT 8,26 min, por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{30}H_{38}NO_{10} = 572,2496$ $[M+H]^+$; m/z encontrado = 572,2501; aduto: 589,3 $[M+NH_4]^+$). Nenhum metabólito com essa fórmula molecular foi encontrado no banco de dados Antibase 2008. É provável que os metabólitos não identificados com RT 7,34, 7,85 e 8,26 min também sejam análogos de citocalasinas, pois as suas fórmulas moleculares são

semelhantes àquelas calculadas para as escoparasinas A (**32**), B (**34**) e fenocalasina B (**33**).

Os resultados da desreplicação da fração bioativa 54, obtida durante o microfracionamento do extrato bruto do isolado *Libertella* sp. cml 1671, sugeriram que o metabólito majoritário presente nessa fração fosse a escoparasina A (**32**). Um metabólito com a mesma fórmula molecular da escoparasina B (**34**) também foi detectado na fração 54. Os metabólitos **32** e **34** foram isolados de um fungo do gênero *Eutypella*, fase sexuada de *Libertella*, o que dá suporte à hipótese de que o metabólito majoritário, e responsável pela citotoxicidade da fração 54 contra células leucêmicas, seja a escoparasina A (**32**).

5.3.3 Substâncias purificadas a partir do extrato do isolado *Libertella* sp. cml 1671.

Com o objetivo de purificar e confirmar a identidade do metabólito majoritário detectado na fração 54, o restante do extrato bruto do isolado cml 1671 foi submetido ao fracionamento cromatográfico. O extrato foi inicialmente fracionado em 16 frações (**LIB01** a **LIB16**) por cromatografia *flash* em fase normal (diol). Alíquotas das frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD-EM e os resultados foram comparados com os dados referentes às citocalasinas possivelmente detectadas no cromatograma da fração bioativa 54.

No cromatograma da fração **LIB04** (100,8 mg) foram detectados três metabólitos majoritários (**Fig. 5.4**, pag. 137), os quais exibiram espectros de absorção na região do UV semelhantes àquele dos metabólito majoritário da fração 54, além da mesma fórmula molecular, $C_{29}H_{35}NO_8$, determinada por espectrometria de massas de alta resolução. A fração **LIB04** foi submetida à CLAE semipreparativa e os três metabólitos alvo (**LIB04_01**, **LIB04_02** e **LIB04_03**) foram purificados.

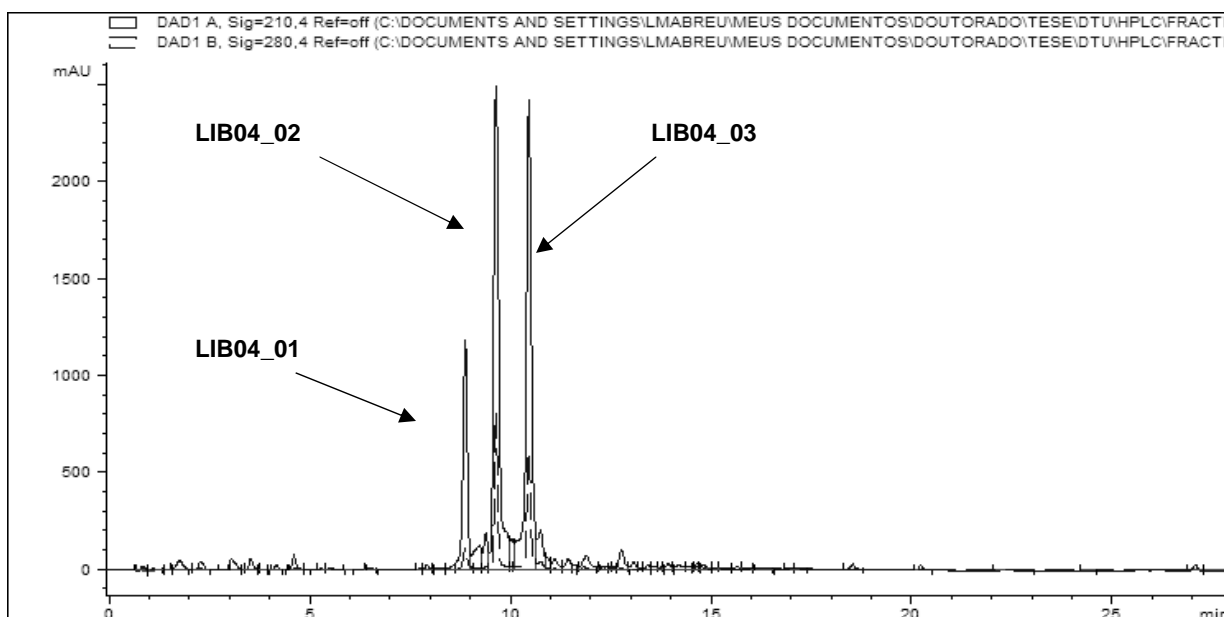


Figura 5.4: Cromatograma da fração **LIB04**, oriunda do fracionamento do extrato bruto do isolado cml 1671 (H₂O–CH₃CN + 50 ppm de TFA)

5.3.3.1 Escoparasina A [(13E, 16S, 18R, 19E)-7,18-diidroxi-16,18-dimetil-10-(4-metoxifenil)-21,23-dioxa-[13]-citocalasa-5,13,19-trien-1,17,22-triona, número CAS: 488799-96-8]

A subfração purificada **LIB04_02** (18 mg) foi isolada sob a forma de um sólido amorfo esbranquiçado e exibiu um espectro de absorção na região do UV (**Fig. 5.6**, pag. 139) idêntico àquele do metabólito majoritário da fração bioativa 54 (**Fig. 5.3**, item **5.3.2**, pag. 134). A fórmula molecular C₂₉H₃₅NO₈ foi calculada para **LIB04_02**, por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para C₂₉H₃₆NO₈ = 526,2441 [M+H]⁺; m/z encontrado = 526,2451).

A comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C com aqueles descritos na literatura permitiu a identificação de **LIB04_02** como sendo o metabólito escoparasina A (**32**) (**Tabela 5.3**, pag. 141). O espectro de RMN de ¹H (**Fig. 5.8**, pag. 140) exibiu dois sinais referentes a quatro hidrogênios aromáticos [δ_H 7,06 (d, $J=8,2$ Hz, 2H) e δ_H 6,85 (d, $J=8,2$ Hz, 2H)], indicando a presença de um anel aromático para-dissubstituído (Pavia et al., 2001). Também foram identificados sinais referentes a cinco grupos metila em δ_H 1,15 (d, $J=6,7$ Hz, CH₃-24), 1,47 (s, CH₃-11), 1,51 (s, CH₃-25), 1,66 (s, CH₃-12) e 3,78 (s, 29-OCH₃). A configuração E das duas duplas ligações entre as posições 13,14 e 19,20, foi indicada pelas constantes de acoplamento entre os hidrogênios metínicos H13, H14 ($J=14,2$ Hz) e H19, H20 ($J=11,5$ Hz) (Pavia et al., 2001).

Foram observados, no espectro de RMN de ^{13}C de **LIB04_02** (**Apêndice 9.2**), três sinais referentes aos grupos carbonila de cetona (δ_{C} 211,8, C17), lactama (δ_{C} 170,1, C1) e carbonato vinílico (δ_{C} 148,9, C22) da escoparasina A (**32**) (Pongcharoen et al., 2006). A presença dos grupos carbonila foi confirmada pela análise do espectro de absorção na região do IV de **LIB04_02** (**Fig. 5.7**, pag. 139), o qual exibiu uma forte banda de absorção em 1712 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=O do grupo carbonila das funções lactama e cetona, e outra banda em 1762 cm^{-1} , referente ao estiramento C=O do grupo carbonato vinílico (Pavia et al., 2001; Pongcharoen et al., 2006). A elucidação da estrutura completa de **LIB04_02** foi realizada por meio das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC (**Tabela 5.3**, pag. 141, e **Apêndices 9.3, 9.4, 9.5**). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são descritos a seguir:

Tempo de retenção em CLAE-DAD-EM (CH_3CN), substância pura: 09,06 min

*Espectrometria de massas (CH_3CN) (**Fig. 5.5**):* $m/z = 526,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $543,3$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

*Espectroscopia de absorção em UV (DAD) ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50\text{ ppm}$ de ácido trifluoroacético) (**Fig. 5.6**, pag. 139):* λ_{max} nm = 200 (corte), 228, 276 e 285

*Espectroscopia de absorção em IV (**Fig. 5.7**, pag. 139):* ν , $\text{cm}^{-1} = 3392, 3130, 2980, 2943, 2844, 1762, 1712, 1612, 1514, 1442, 1361, 1303, 1249, 1211, 1176, 1149, 1110, 1031, 1006, 974, 941, 821, 771$

Ressonância magnética nuclear (RMN): Espectro de RMN de ^1H - **Fig. 5.8** (pag. 140), demais espectros - **Apêndice 9**, comparação de dados com a literatura - **Tabela 5.3** (pag. 141)

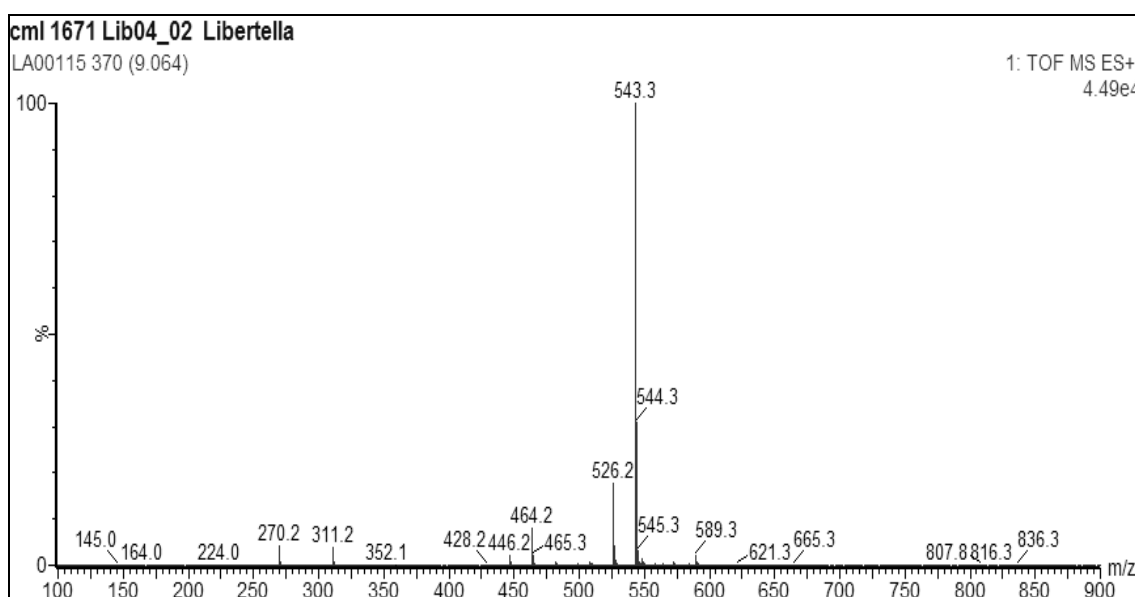


Figura 5.5: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **LIB04_02** (**32**)

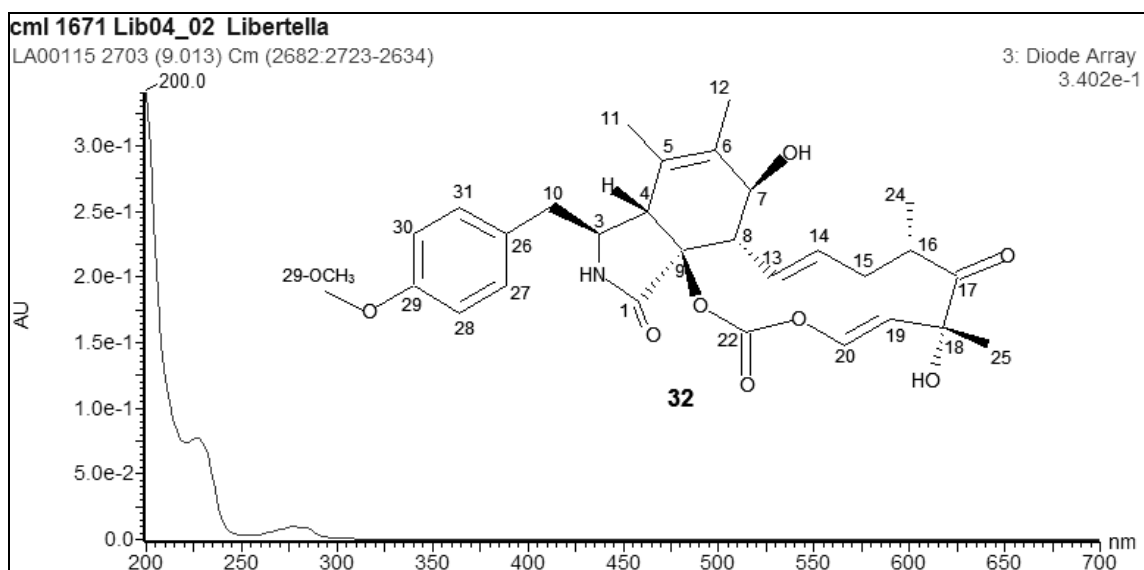


Figura 5.6: Espectro de absorção na região do UV de **LIB04_02 (32)** (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

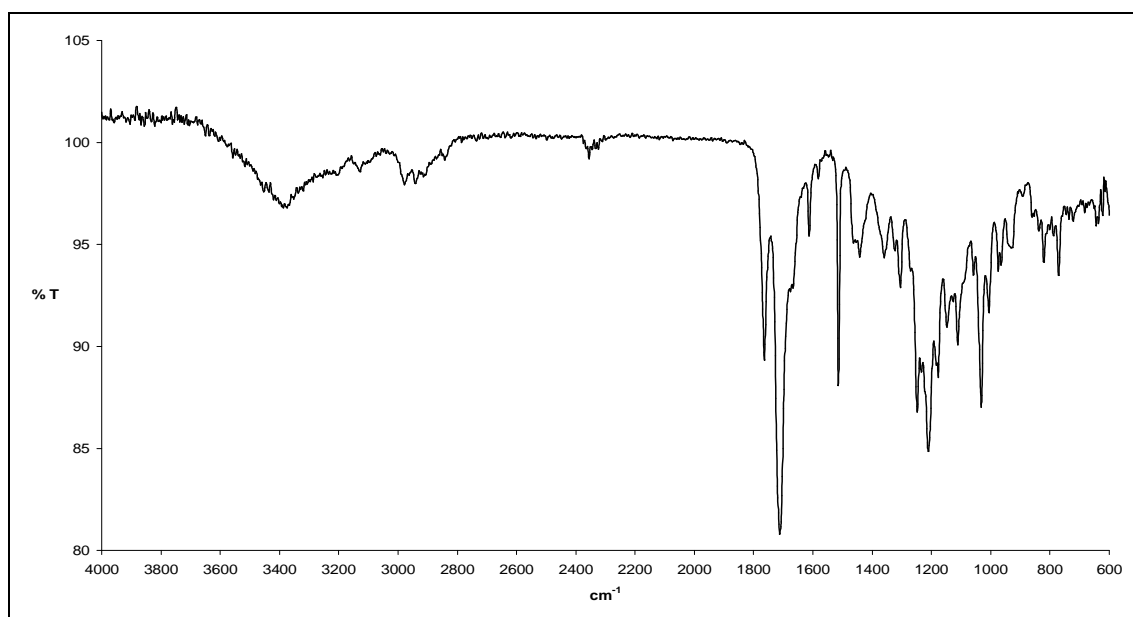


Figura 5.7: Espectro de absorção na região do IV de **LIB04_02 (32)** (ATR)

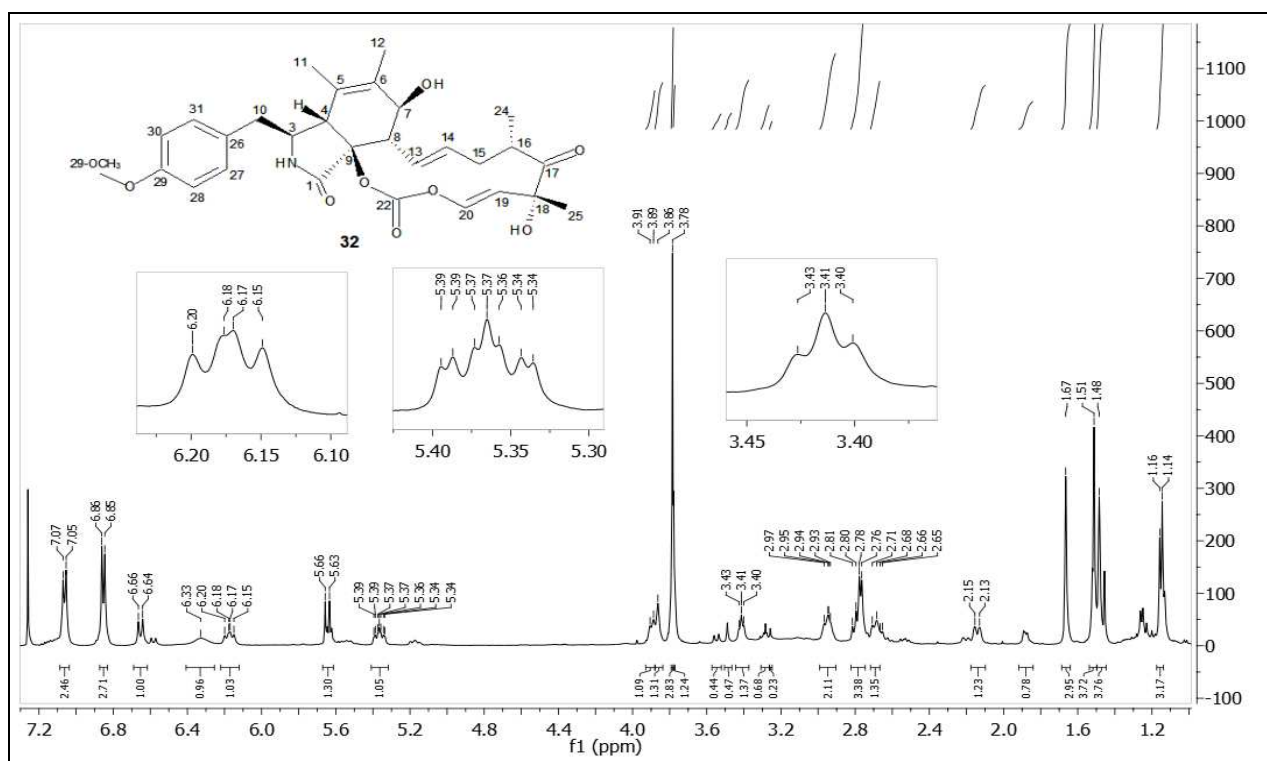


Figura 5.8: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de **LIB04_02 (32)**

Nenhum tipo de atividade biológica foi descrito para a escoparasina A (**32**) quando da sua descrição, embora esta tenha sido submetida a testes de atividade antimicrobiana. Somente a escoparasina B (**34**) mostrou-se ativa contra o fungo dermatófito *Microsporum gypseum* (Pongcharoen et al., 2006).

Tabela 5.3: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelos mapas de contornos HMBC e COSY, de **LIB04_02** em comparação com aqueles descritos para o metabólito escoparasina A (Pongcharoen et al., 2006)

posição	LIB04_02 [δ (ppm), CDCl_3]				escoparasina A [δ (ppm), (CDCl_3)]	
	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	Correlações em HMBC	Correlações em COSY	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
1	170,1				169,9	
2-NH		6,33 (sl)				5,81 (sl)
3	59,0	3,41 (t, $J=6,4$ Hz)	C1, C4, C5	H10	59,2	3,35 (t, $J=6,6$ Hz)
4	47,3	3,86 (sl)	C5 (f)*		48,2	3,81 (sl)
5	125,0				125,4	
6	132,0				131,7	
7	69,8	3,90 (m)		H8	70,0	4,15 (dd, $J=5,7, 3,6$ Hz)
8	49,6	2,79 (m)	C1 (f), C7 (f), C9 (f)		50,0	2,81 (m)
9	86,9				86,2	
10	42,7	2,77 (m) (2H)	C3, C4, C27 e C31		43,2	2,78 (m) (2H)
11	17,5	1,48 (sl, 3H)	C4, C5, C6		17,7	1,46 (sl, 3H)
12	14,0	1,67 (sl, 3H)	C5, C6, C7		13,9	1,61 (sl, 3H)
13	129,8	6,17 (dd, $J=14,2, 10,8$ Hz)		H8, H14	129,4	6,13 (dd, $J=15,0, 10,5$ Hz)
14	132,6	5,37 (ddd, $J=14,2, 10,8, 3,8$ Hz)		H15a, H15b	133,6	5,31 (ddd, $J=15,0, 11,1, 3,9$ Hz)
15	39,2	a: 2,68 (m); b: 2,14 (m)		H15a X H15b	39,0	a: 2,73 (m); b: 2,07 (m)
16	40,8	2,95 (m)	C24 (f)	CH_3 -24, H15a	40,9	2,87 (m)
17	211,8				211,5	
18	76,6				76,6	
19	120,1	5,64 (d, $J=11,6$ Hz)	C18, C20, C25		120,5	5,59 (d, $J=11,7$ Hz)
20	142,3	6,65 (d, $J=11,6$ Hz)	C18 (f), C19 (f)	H19	142,5	6,60 (d, $J=11,7$ Hz)
22	148,9				149,0	
24	20,1	1,16 (d, $J=6,7$ Hz, 3H)	C16, C17		20,2	1,11 (d, $J=6,6$ Hz, 3H)
25	24,6	1,51 (s, 3H)	C17, C18, C19		24,6	1,44 (s, 3H)
26	128,7				128,6	
27	130,5	7,06 (d, $J=8,2$ Hz)	C10, C28 e/ou C30, C29, C31		130,3	7,00 (d, $J=8,7$ Hz)
28	114,0	6,85 (d, $J=8,2$ Hz)	C26, C29, C30		114,3	6,80 (d, $J=8,7$ Hz)
29	158,4				158,7	
29-OCH ₃	55,1	3,78 (s, 3H)	C29		55,3	3,72 (s, 3H)
30	114,0	6,85 (d, $J=8,2$ Hz)	C26, C28, C29		114,3	6,80 (d, $J=8,7$ Hz)
31	130,5	7,06 (d, $J=8,2$ Hz)	C10, C27, C28 e/ou C30, C29		130,3	7,00 (d, $J=8,7$ Hz)

* f: correlação fraca

5.3.3.2 Fenocalasina B [(7S, 13E, 16S, 18R, 19E)-6,7-epoxi-18-hidroxi-16,18-dimetil-10-(4-metoxifenil)-21,23-dioxa-[13]-citocalasa-13,19-dien-1,17,22-triona, número CAS: 253129-70-3]

A subfração purificada **LIB04_03** (19,2 mg) foi isolada como um sólido branco. A fórmula molecular $C_{29}H_{35}NO_8$ foi calculada para **LIB04_03** por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{29}H_{36}NO_8 = 526,2441 [M+H]^+$; m/z encontrado = 526,2443). Essa subfração exibiu espectros de absorção nas regiões do UV (**Fig. 5.10**, pag. 145) e do IV (**Fig. 5.11**, pag. 145) muito semelhantes àqueles da escoparasina A (**32**) (**Fig. 5.6 e 5.7**, item 5.3.3.1, pag. 137).

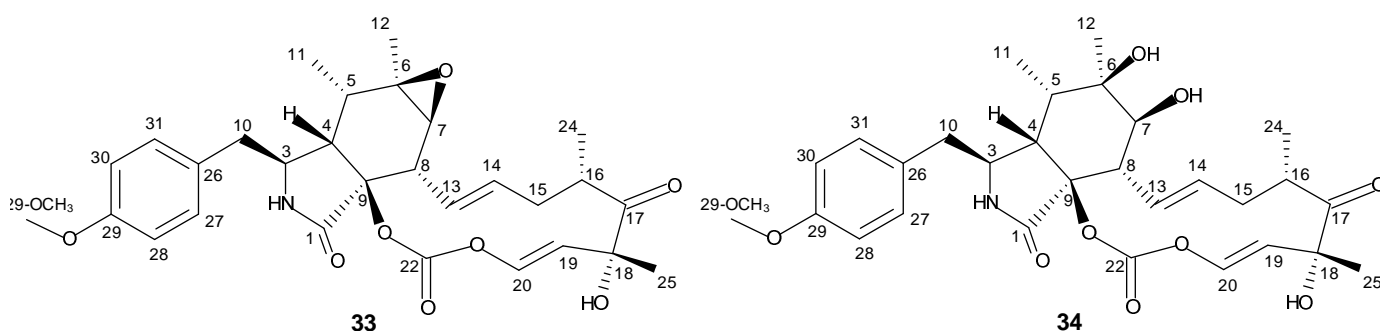
Os dados de RMN de 1H (**Fig. 5.12**, pag. 146) e de ^{13}C (**Apêndice 10.2**) de **LIB04_03** mostraram-se semelhantes àqueles determinados para a escoparasina A (**32**), com exceção dos sinais referentes às posições 5-7, 11 e 12. O sinal referente a um grupo metila em δ_H 1,10 (d, $J=7,2$ Hz, 3H) foi atribuído à posição 11, pois este apresentou correlação com o sinal do carbono C4 (δ_H 47,9) no mapa de contornos HMBC (**Tabela 5.4**, pag. 148, **Apêndice 10.7**). A multiplicidade do sinal de CH_3 -11 (duplete) indicou a presença de um hidrogênio metínico ligado ao carbono C5, qual foi confirmada pela correlação entre um sinal em δ_H 2,29 (m, H5) e aquele referente a H4 (δ_H 3,86, sl), no mapa de contornos COSY (**Apêndice 10.3**).

O sinal em δ_H 1,10 (CH_3 -11) também exibiu correlação, no mapa de contornos HMBC, com um sinal referente a um carbono sp^3 oxigenado em δ_C 57,4, o qual foi atribuído à posição 6. Essa atribuição foi confirmada pelas correlações, obtidas no mapa de contornos HMBC, entre os sinais referentes aos hidrogênios H5 (δ_H 2,29) e CH_3 -12 (δ_H 1,25, s, 3H) e aquele referente ao carbono C6.

O sinal referente ao grupo metila CH_3 -12 (δ_H 1,25) também exibiu correlações, no mapa de contornos HMBC, com C5 (δ_C 35,8) e com um sinal referente a um carbono sp^3 oxigenado em δ_C 60,6 o qual foi atribuído ao carbono C7. A existência de dois carbonos oxigenados adjacentes, nas posições C6 e C7, indicou a presença de um diol, como na escoparasina B (**34**) ou de um epóxido, como na estrutura da fenocalasina B (**33**). No entanto, a presença de um diol na estrutura de **LIB04_03** não seria condizente com a fórmula molecular calculada para essa substância. A comparação dos dados de RMN de 1H e de ^{13}C com aqueles descritos na literatura permitiu a confirmação da identidade de **LIB04_03** como sendo o metabólito fenocalasina B (**33**) (**Tabela 5.4**, pag. 148).

A fórmula molecular calculada para escoparasina B (**34**), $C_{29}H_{37}NO_9$, foi deduzida por Pongcharoen et al. (2006) a partir do pico de $m/z = 525,2350$, o qual

corresponderia ao íon molecular menos uma molécula de água $[M-H_2O]^+$, ou seja $C_{29}H_{35}NO_8$. Porém, nenhum outro aduto foi descrito para o espectro de massas de **34**. Já a fórmula molecular da escoparasina A (**32**), $C_{29}H_{35}NO_8$, foi deduzida a partir de um pico de $m/z = 525,2352$, correspondente ao íon molecular $[M]^+$. Tais resultados indicam que os dois metabólitos isolados por Pongcharoen et al. (2006) possuíam a mesma fórmula molecular, $C_{29}H_{35}NO_8$, porém, o íon molecular do segundo (descrito como escoparasina B) foi considerado como um fragmento $[M-H_2O]^+$. É, portanto, provável, que Pongcharoen et al. (2006) tenham isolado a fenocalasina B (**33**), mas consideraram que os sinais de RMN referentes aos carbonos oxigenados adjacentes C6 e C7 se referiam a um diol e não a um epóxido.



Uma comparação entre os dados de RMN descritos para a fenocalasina B (**33**, Tomoda et al., 1999b) e escoparasina B (**34**, Pongcharoen et al., 2006) (dados não mostrados), mostrou que os sinais de deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C das duas substâncias são quase idênticos. Logo, há indícios de que o metabólito escoparasina B (**34**) tenha sido descrito com base em uma interpretação equivocada dos dados de espectrometria de massas e, portanto, não exista como tal. Por outro lado, um metabólito com a provável fórmula molecular $C_{29}H_{37}NO_9$ (m/z calculado para $C_{29}H_{38}NO_9 = 544,2547 [M+H]^+$; m/z encontrado = 544,2532; aduto: 561,3 $[M+NH_4]^+$) foi detectado no cromatograma da fração biotiva 54 (item **5.3.2**, pag. 132).

O espectro de RMN de ^{13}C , obtido a partir de uma subamostra (4 mg) de **LIB04_03** (**Apêndice 10.2**), apresentou 42 sinais, muitos dos quais duplicados, indicando a presença de impurezas ou de produtos de decomposição da fenocalasina B (**33**), ocorrida entre o isolamento (Dinamarca, agosto de 2009) e a análise (Brasil, dezembro de 2009). Porém, os resultados obtidos com os mapas de contornos HSQC e HMBC permitiram a identificação correta dos sinais de RMN de ^{13}C de **LIB04_03** (**Tabela 5.4**; pag. 148, e **Apêndices 10.4, 10.7**). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são descritos a seguir:

Tempo de retenção em CLAE-DAD-EM (CH_3CN), substância pura: 09,89 min
Espectrometria de massas (CH_3CN) (**Fig. 5.9**): $m/z = 526,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $543,3$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$
Espectroscopia de absorção em UV (DAD) ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de ácido trifluoroacético) (**Fig. 5.10**, pag. 145): λ_{max} nm = 200 (corte), 228, 274 e 285
Espectroscopia de absorção no IV (**Fig. 5.11**, pag. 145): ν , $\text{cm}^{-1} = 3390, 2976, 2941, 2848, 1766, 1710, 1612, 1514, 1456, 1367, 1309, 1244, 1209, 1182, 1120, 1035, 972, 769$
Ressonância magnética nuclear (RMN): Espectro de RMN de ^1H - **Fig. 5.12** (pag. 146), demais espectros - **Apêndice 10**, comparação de dados com a literatura - **Tabela 5.4** (pag. 148)

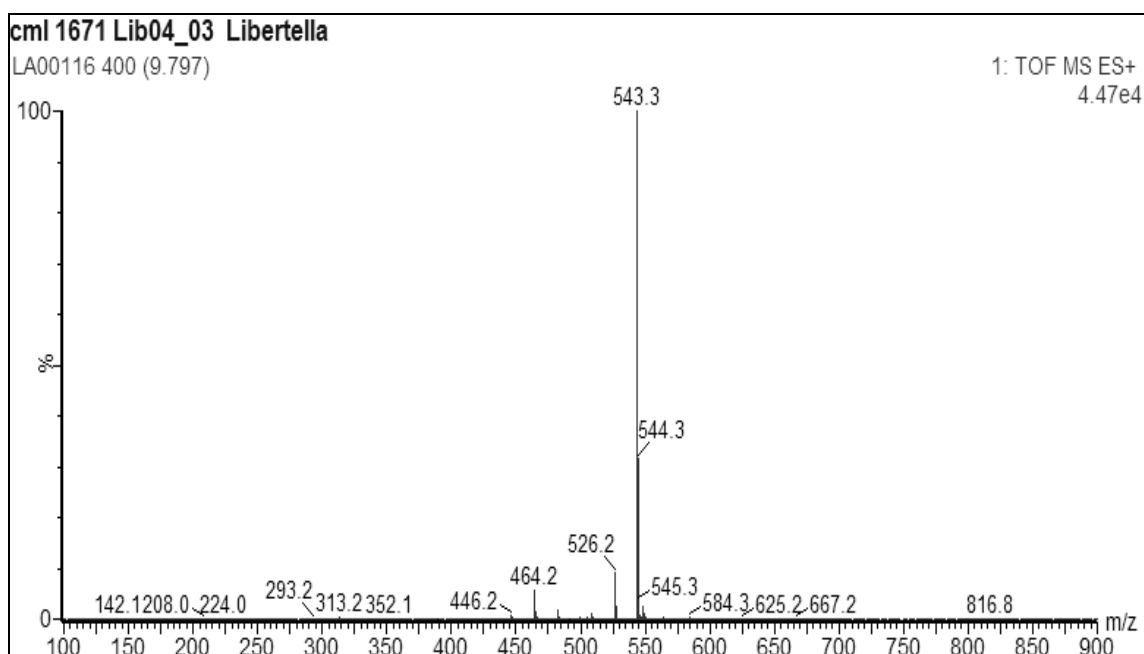


Figura 5.9: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de LIB04_03 (33)

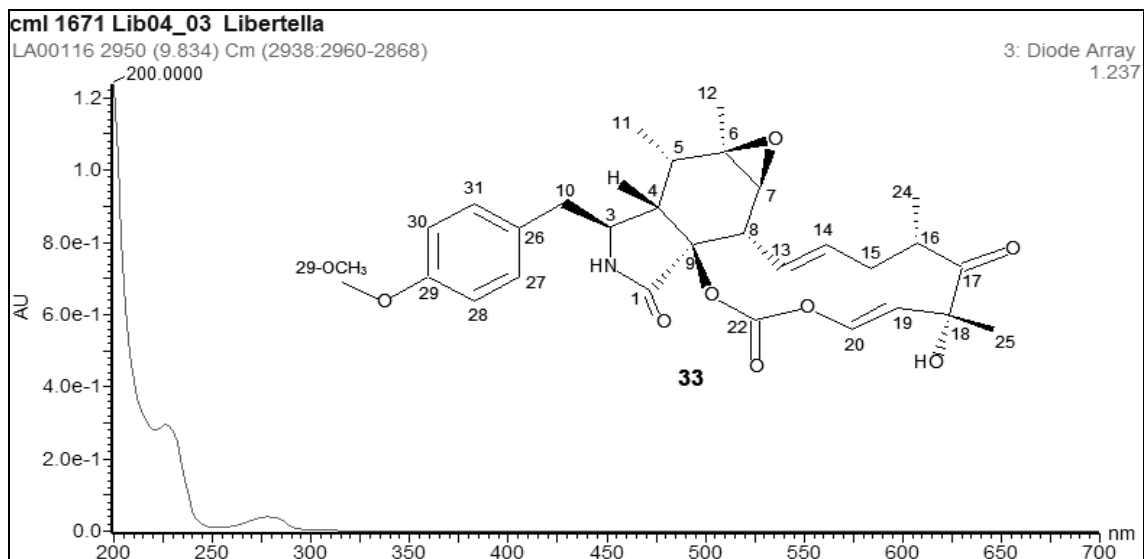


Figura 5.10: Espectro de absorção na região do UV de **LIB04_03 (33)** (CLAE-DAD; H₂O-CH₃CN + 50 ppm de TFA)

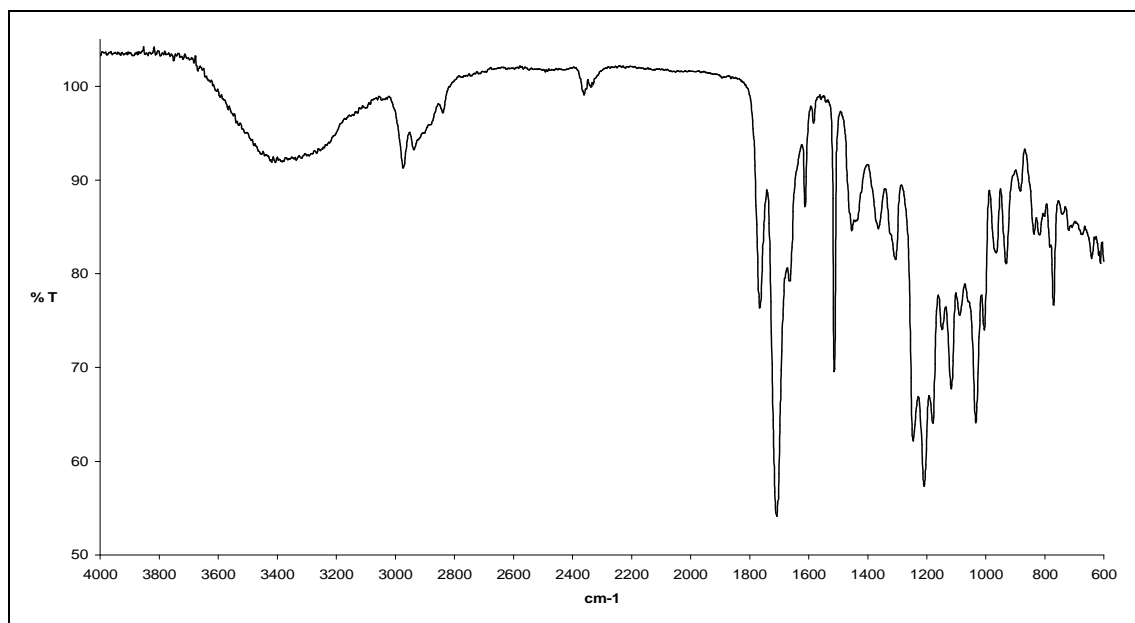


Figura 5.11: Espectro de absorção na região do IV de **LIB04_03 (33)** (ATR)

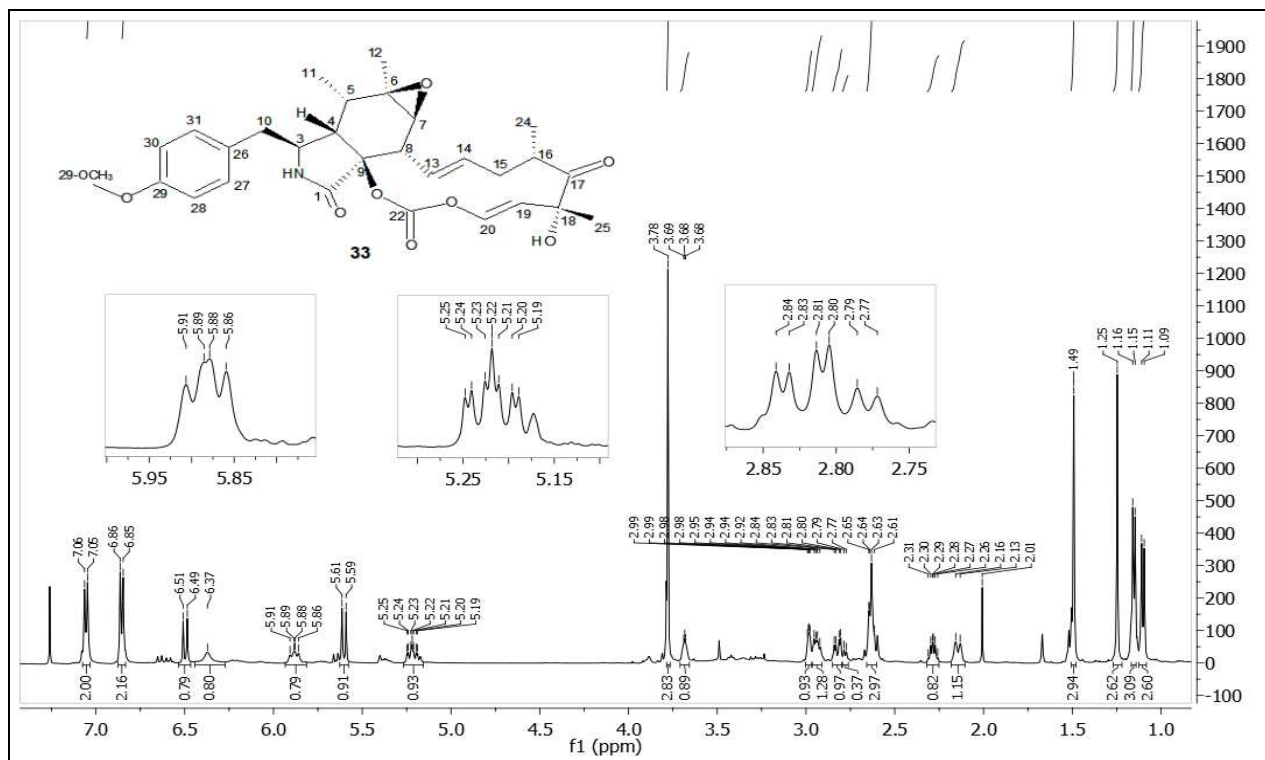


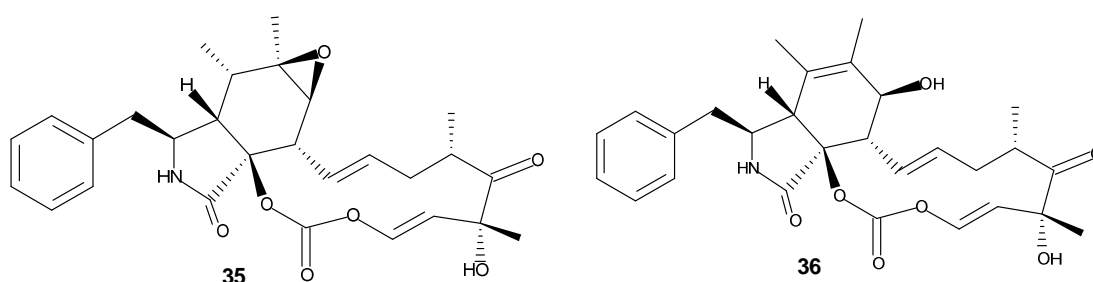
Figura 5.12: Espectro de RMN de ¹H [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_03 (**33**)

O metabólito fenocalasina B (**33**) foi isolado a partir do extrato de um isolado de *Phomopsis* sp., oriundo do solo, no Japão (Tomoda et al., 1999a, b). Em testes realizados *in vitro*, **33** foi capaz de inibir a formação de agregados de lipídios no interior de macrófagos de ratos. Os macrófagos têm papel importante na formação de placas de gordura e de tecido fibroso (ateromas) nas paredes internas das artérias, durante o desenvolvimento de aterosclerose. Essas células fagocitam lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e formam agregados de colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis em seu interior. Logo, substâncias como a fenocalasina B (**33**), capazes de inibir a formação de agregados lipídicos no interior dos macrófagos, têm potencial para o desenvolvimento de fármacos contra a aterosclerose (Tomoda et al., 1999a).

A fenocalasina B (**33**) também foi isolada das espécies de ascomicetos *Eutypella scoparia*, obtida de um cefalópode marinho na China (Ciavatta et al., 2008), e *Daldinia concentrica*, oriunda de uma floresta na Alemanha (Quang et al., 2002). De acordo com os últimos autores, **33** foi inicialmente isolada de um fungo do gênero *Libertella* e descrita em uma patente japonesa (JP 10114776), por Emiko et al. (1998), como potencial agente anticancerígeno (Quang et al., 2002). Não foi possível obter uma versão de tal patente em inglês, para comparações.

Os metabólitos isolados fenocalasina B (**33**) e escoparasina A (**32**) são análogos, respectivamente, das citocalasinas E (**35**) e K (**36**), há duas substâncias

descritas com o mesmo nome de citocalasina K, a com estrutura **36**, descrita por Steyn et al., 1982, e outra dissimilar descrita por Fex, 1981). As estruturas das citocalasinas se diferem daquelas de **32** e **33** pela ausência do grupo metóxido ligado ao carbono C29 do grupo fenila. As citocalasinas E (**35**) e K (**36**) foram isoladas da espécie de ascomiceto anamórfico *Aspergillus clavatus*, contaminante do malte derivado como subproduto da indústria de cervejaria e que é usado na alimentação animal (Steyn & Van Heerden, 1982). A ingestão do malte contaminado por *A. clavatus* está associada a intoxicações de bovinos e ovinos, com a ocorrência de tremores, problemas de locomoção e degeneração neurológica (Bezerra Jr. et al., 2009; McKenzie et al., 2004). Os metabólitos **35** e **36** mostraram-se tóxicos a ratos (Steyn & Van Heerden, 1982), mas não foram testados contra animais ruminantes, não sendo possível saber se estes são os responsáveis diretos pelas intoxicações de bovinos e ovinos (Bezerra Jr. et al., 2009).



As citocalasinas E (**35**) e K (**36**), isoladas do fungo *Spicaria elegans*, mostraram-se tóxicas a células de leucemia linfocítica e de adenocarcinoma pulmonar (Liu et al., 2006). Nesse artigo, os autores ressaltaram o fato de que a citocalasina K (**36**), análoga da escoparasina A (**32**), apresentou atividade citotóxica muito superior àquela da citocalasina E (**35**). Tal resultado dá mais indícios à hipótese de que a escoparasina A (**32**) seja o metabólito responsável pela citotoxicidade da fração bioativa 54, fato corroborado pelo tempo de retenção de **32** na análise por CLA-DAD-EM (9,06 min), muito semelhante àquela do metabólito majoritário da fração 54 (RT 9,02 min, item **5.3.2**, pag. 132).

Tabela 5.4: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelos mapas de contornos HMBC e COSY, de **LIB04_03** em comparação com aqueles descritos para o metabólito fenocalasina B (Tomoda et al., 1999b)

posição	LIB04_03 [δ (ppm), CDCl_3]				fenocalasina B [δ (ppm), (CDCl_3)]	
	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	Correlações em HMBC	Correlações em COSY	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
1	170,5				169,8	
2-NH		6,37 (sl)				
3	53,9	3,68 (t, $J=6,4$ Hz)	C1 (f)*, C4 (f), C5 (f), C26 (f)	H10a, H10b, H4	53,4	3,65 (ddd, $J=8,0, 4,0, 3,0$ Hz)
4	48,1	2,98 (sl)	C1 (f), C3, C5, C6, C9, C10	H5	48,2	2,99 (dd, $J=5,0, 3,0$ Hz)
5	35,8	2,29 (m)	C3, C4, C6, C11, C12	H4, CH_3 -11	35,9	2,30 (d, $J=5,0$ Hz)
6	57,4				57,3	
7	60,6	2,63 (m)	C8, C9		60,6	2,63 (s)
8	46,0	2,63 (m)	C1, C7, C9, C13		45,9	2,64 (d, $J=10$ Hz)
9	87,2				87,0	
10	43,7	a: 2,82 (dd, $J=13,7, 4,5$ Hz); b: 2,62 (m)	C3, C4, C26, C27 e/ou C31	H10a X H10b	44,3	a: 2,82 (dd, $J=14,0, 8,0$ Hz); b: 2,59 (dd, $J=14,0, 4,0$ Hz)
11	13,4	1,10 (d, $J=7,2$ Hz, 3H)	C4, C5, C6		13,2	1,12 (d, $J=7,5$ Hz, 3H)
12	20,2	1,25 (s, 3H)	C5, C6, C7		19,7	1,25 (s, 3H)
13	128,7	5,88 (dd, $J=13,3, 10,3$ Hz)		H8, H14	128,4	5,89 (ddd, $J=15,0, 10,5, 1,5$ Hz)
14	131,9	5,22 (ddd, $J=14,8, 11,0, 3,6$ Hz)	C8, C15	H15a, H15b	131,7	5,23 (ddd, $J=15,0, 11,0, 4,0$ Hz)
15	39,2	a: 2,64 (m); b: 2,14 (m)	C16, C17, C24	H15a X H15b	39,1	a: 2,65 (ddd, $J=14,0, 11,5, 11,0$ Hz); b: 2,14 (dddd, $J=14,0, 4,0, 2,5, 1,5$ Hz)
16	41,1	2,94 (m)	C15, C14, C17, C24	H15a, CH_3 -24	40,8	2,94 (ddd, $J=11,5, 7,0, 2,5$ Hz)
17	212,3				211,7	
18	77,0				76,7	
19	120,3	5,60 (d, $J=11,6$ Hz)	C17 (f), C18, C20, C22 (f), C25		120,4	5,62 (d, $J=12,0$ Hz)
20	142,4	6,50 (d, $J=11,6$ Hz)	C17, C18, C19, C22	H19	142,2	6,53 (d, $J=12,0$ Hz)
22	149,6				149,4	
24	20,3	1,15 (d, $J=6,6$ Hz, 3H)	C15, C16, C17		20,1	1,16 (d, $J=7,0$ Hz, 3H)
25	24,2	1,49 (s, 3H)	C17, C18, C19		24,4	1,50 (s, 3H)
26	128,5				128,0	
27	130,5	7,06 (d, $J=8,3$ Hz)	C10, C29, C28 e/ou C30, C31		130,5	7,05 (dd, $J=8,5, 2,0$ Hz)
28	114,5	6,86 (d, $J=8,3$ Hz)	C26, C29, C30		114,4	6,86 (dd, $J=8,5, 2,0$ Hz)
29	159,0				159,0	
29-OCH ₃	55,4	3,78 (s, 3H)	C29		55,3	3,79 (s, 3H)
30	114,5	6,86 (d, $J=8,3$ Hz)	C26, C28, C29		114,4	6,86 (dd, $J=8,5, 2,0$ Hz)
31	130,5	7,06 (d, $J=8,3$ Hz)	C10, C27, C29, C28 e/ou C30		130,5	7,05 (dd, $J=8,5, 2,0$ Hz)

* f: correlação fraca

5.3.3.3 Citocalasina LIB04_01 [(13E, 16S, 18R, 19E)-7,18-diidroxi-16,18-dimetil-10-(4-metoxifenil)-21,23-dioxa-[13]-citocalasa-6(12),13,19-trien-1,17,22-triona, número CAS: 488799-96-8]

A subfração purificada **LIB04_01** foi isolada como um sólido amorfo esbranquiçado e exibiu um espectro de absorção na região do UV (**Fig. 5.14**, pag. 150) similar àqueles da escoparasina A (**32**) (**Fig. 5.6**, item **5.3.3.1**, pag. 139) e da fenocalasina B (**33**) (**Fig. 5.10**, item **5.3.3.2**, pag. 145), além da mesma fórmula molecular, $C_{29}H_{35}NO_8$, determinada por espectrometria de massas de alta resolução (m/z calculado para $C_{29}H_{36}NO_8 = 526,2441 [M+H]^+$; m/z encontrado = 526,2449).

Os dados de RMN de **LIB04_01** (**Tabela 5.5**, pag. 154) mostraram-se semelhantes àqueles de **32** e **33**, com algumas exceções. Os sinais de deslocamentos químicos atribuídos ao carbono e ao hidrogênio da posição 7 [δ_C 69,3 e δ_H 3,82 (d, $J = 11,6$ Hz)], mostraram-se similares àqueles da escoparasina A (**32**), que possui um grupo hidroxila livre ligado a C7. Já os sinais atribuídos às posições 5 [δ_C 32,2 e δ_H 3,36 (sl)] e 11 [δ_C 14,6 e δ_H 1,15 (dl)] corresponderam àqueles determinados para a fenocalasina B (**33**), indicando a ausência de uma ligação dupla entre C5 e C6.

Dois sinais de simpletos largos, detectados no espectro de RMN de 1H de **LIB04_01** (**Fig. 5.15**, pag. 151) em δ_H 5,41 e 5,18, não foram detectados nos espectros de **32** e **33**. Esses sinais exibiram correlações com um carbono sp^2 em δ_C 114,4 no mapa de contornos HSQC (**Apêndice 11.4**), indicando a presença de um metileno terminal na estrutura de **LIB04_01**. Tal metileno foi atribuído à posição 12, com base nas correlações de seus hidrogênios com os sinais dos carbonos C5 e C7, no mapa de contornos HMBC (**Apêndice 11.7**), evidenciando a existência de uma dupla exocíclica entre C12 e C6. Esses resultados foram corroborados pelas correlações, obtidas no mapa contornos HMBC, entre H8 (δ_H 2,94, m) e CH_3 -11 (δ_H 1,15) e um sinal referente a um carbono sp^2 em δ_C 148,6, o qual foi atribuído a C6. Tais evidências indicaram que **LIB04_01** tratava-se do isômero $\Delta^{6,12}$ da escoparasina A (**37**).

Em uma busca pela estrutura **37**, realizada no banco de dados *Chemical Abstracts*, foi encontrada uma substância não nomeada, obtida como produto de reação da fenocalasina B (**33**) com o ácido para-tolueno sulfônico, descrita em uma patente por Sharma et al. (2005). A ocorrência de **37** como um provável produto natural, obtido de um isolado de *Diaporthe* sp. na Tailândia, foi descrita por Dettrakul em sua Tese de doutorado (Dettrakul, 2006), porém, os resultados não foram publicados. Como Sharma et al. (2005) não publicaram os dados de RMN de ^{13}C da

substância com a estrutura **37**, os dados de deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C de **LIB04_01** foram comparados com aqueles da “citocalasina 1.46” (**37**), descritos por Detrakul (2006) (**Tabela 5.5**, pag. 154). Os dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos para esse metabólito são descritos a seguir:

Tempo de retenção em CLAE-UV-EM (CH_3CN), substância pura: 08,29 min.

Espectrometria de massas (CH_3CN) (Fig. 5.13): $m/z = 526,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $543,3$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $589,3$ $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$

Espectroscopia de absorção em UV (DAD) ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de ácido trifluoroacético) (Fig. 5.14): λ_{max} nm = 200 (corte), 228, 275 e 284

Ressonância magnética nuclear (RMN): Espectro de RMN de ^1H - **Fig. 5.15** (pag. 151), demais espectros - **Apêndice 11**, comparação de dados com a literatura - **Tabela 5.5** (pag. 154)

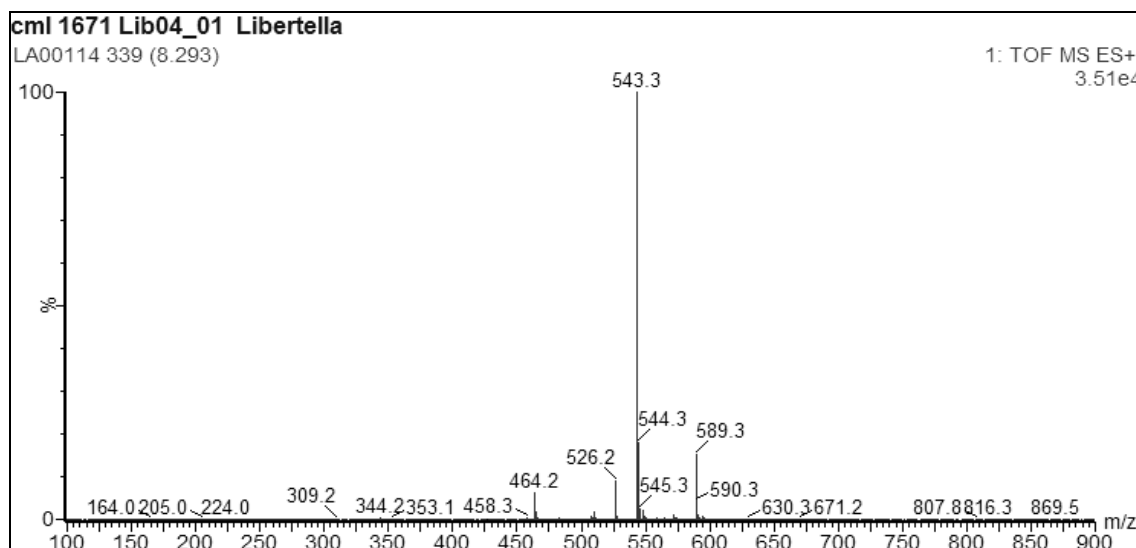


Figura 5.13: Espectro de massas (ESI-TOF, modo positivo) de **LIB04_01** (**37**)

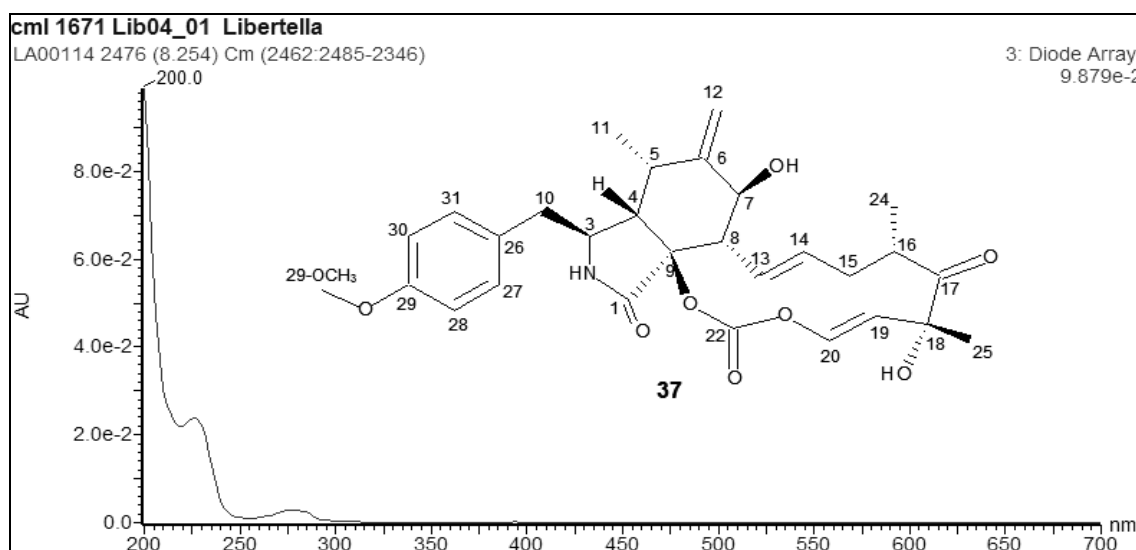


Figura 5.14: Espectro de absorção na região do UV de **LIB04_01** (**37**) (CLAE-DAD; $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} + 50$ ppm de TFA)

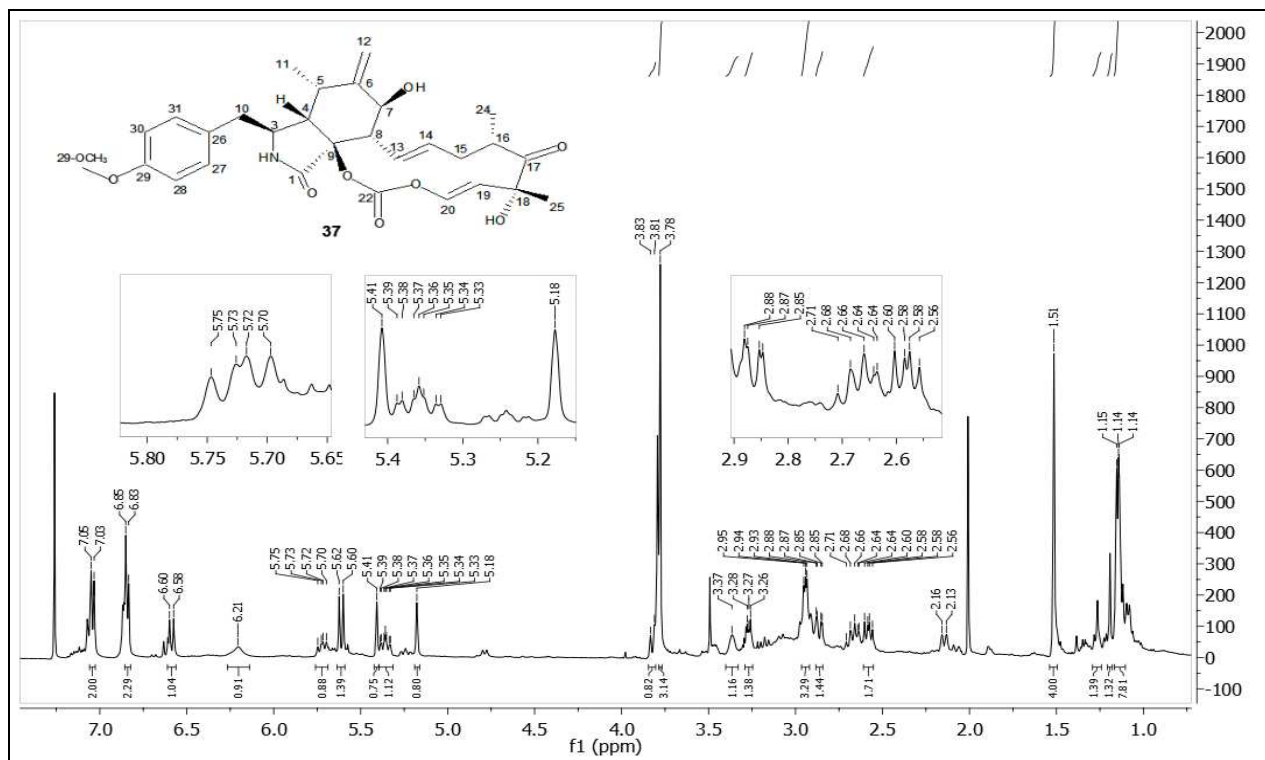
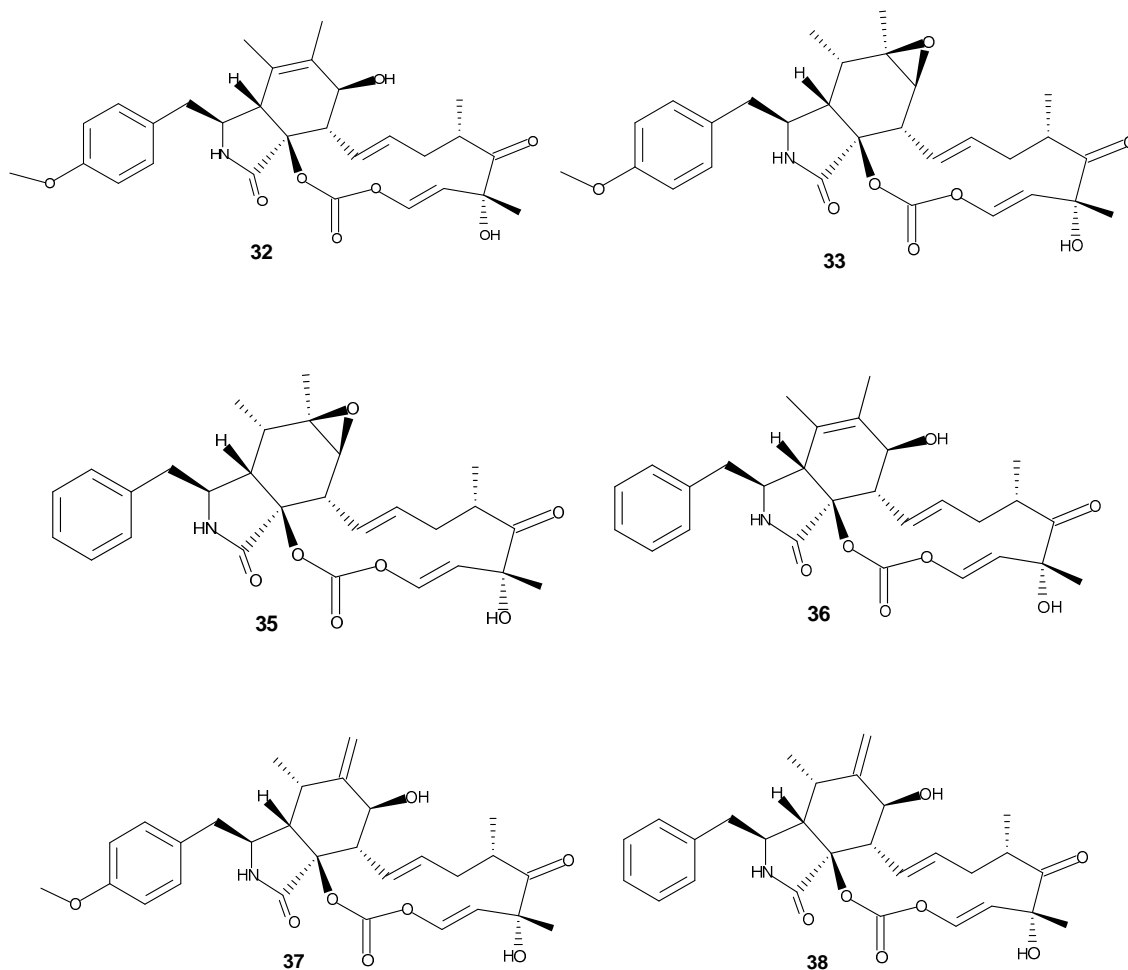


Figura 5.15: Espectro de RMN de ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de **LIB04_01** (**37**)

Sharma et al. (2005) obtiveram a citocalasina **37** após reagirem a fenocalasina B (**33**), dissolvida em CHCl_3 , com “uma pequena quantidade de ácido para-tolueno sulfônico”, por 5 h sob agitação. A reação resultou na conversão de 73% do material de partida em **37** e de 19 % em escoparasina A (**32**). Para testar a hipótese de que **LIB04_01** seja um produto de degradação da fenocalasina B (**33**), os sinais excedentes no espectro de ^{13}C de **33** (item 5.3.3.2, pag. 142, e Apêndice 10.2) foram comparados com aqueles obtidos para **LIB04_01** (Tabela 5.5, pag. 154). Com exceção do sinal referente ao carbono C1 (δ_{C} 169,6), todos os sinais referentes a **37** foram encontrados no espectro de ^{13}C de **33**, indicando que **LIB04_01** talvez seja um artefato do processo de purificação de **33**. Tal análise também permitiu a detecção do provável sinal referente ao carbono C22 (δ_{C} 149,1) de **LIB04_01**, o qual não foi detectado por correlações no mapa de contornos HMBC (Apêndice 11.7).

O metabólito citocalasina E (**35**), análogo da fenocalasina B (**33**), mostrou-se instável quando armazenado em CHCl_3 , tendo sido decomposto em um metabólito contendo uma dupla exocíclica entre C6 e C12 (**38**), semelhante à estrutura **37** (Kajimoto et al., 1989). Steyn & Van Heerden (1982) reagiram a citocalasina E (**35**) com H_2SO_4 e obtiveram como produtos a citocalasina K (**36**) e o metabólito **38**. Como a citocalasina K (**36**) havia sido isolada do extrato do fungo *Aspergillus clavatus*, esta foi considerada como um produto natural verdadeiro.



A escoparasina A (**32**) exibiu um tempo de retenção (9,06 min) muito similar àquele do metabólito majoritário presente na fração bioativa 54 (9,03 min), na análise por CLAE-DAD-EM. O metabólito **32** foi isolado em quantidade similar àquela da fenocalasina B (**33**) e sua descrição original foi feita a partir do extrato de um fungo do gênero *Eutypella*, fase teleomórfica de *Libertella* (Pongcharoen et al., 2006). Tais evidências sugeriram que **32** fosse um produto natural produzido pelo fungo *Libertella* sp. cml 1671 (item **5.3.3.1**, pag. 137). Porém, como a escoparasina A (**32**) e seu isômero $\Delta^{6,12}$ (**37**) podem ser produzidos a partir da abertura do epóxido presente na estrutura da fenocalasina B (**33**) (Sharma et al., 2005), há a possibilidade de que **32** e **37** sejam produtos de degradação de **33**.

O extrato bruto, em micro escala, do isolado *Libertella* sp. cml 1671, obtido durante a triagem de 50 isolados de fungos endófitos por CLAE-DAD (item **5.2.1**, pag. 123) foi submetido à análise por CLAE-DAD-EM e o cromatograma obtido (Fig. **5.16**, pag. 153) foi comparado com aqueles dos metabólitos escoparasina A (**32**, **LIB04_02**) e fenocalasina B (**33**, **LIB04_03**). Somente um pico majoritário contendo o íon $m/z = 526$ (massa nominal referente ao íon molecular protonado de **32** e **33**) foi detectado no

cromatograma do extrato bruto do isolado cml 1671 (**Fig. 5.16 c**). O tempo de retenção desse metabólito (9,83 min) correspondeu àquele da fenocalasina B (**33**) (9,89 min), indicando que somente o metabólito **33** estava presente como majoritário no extrato bruto obtido em micro escala. Outros três metabólitos minoritários, contendo o íon $m/z = 526$, foram detectados no cromatograma do extrato bruto do isolado cml 1671, nos tempos de retenção de 8,29, 9,06 e 10,33 min. Os tempos de retenção dois primeiros metabólitos corresponderam exatamente àqueles da citocalasina **37** e da escoparasina A (**32**) (item **5.3.3.1**, pag. 137). Tais resultados sugerem que tanto **32** quanto o seu isômero **37** sejam artefatos gerados durante o isolamento da fenocalasina B (**33**).

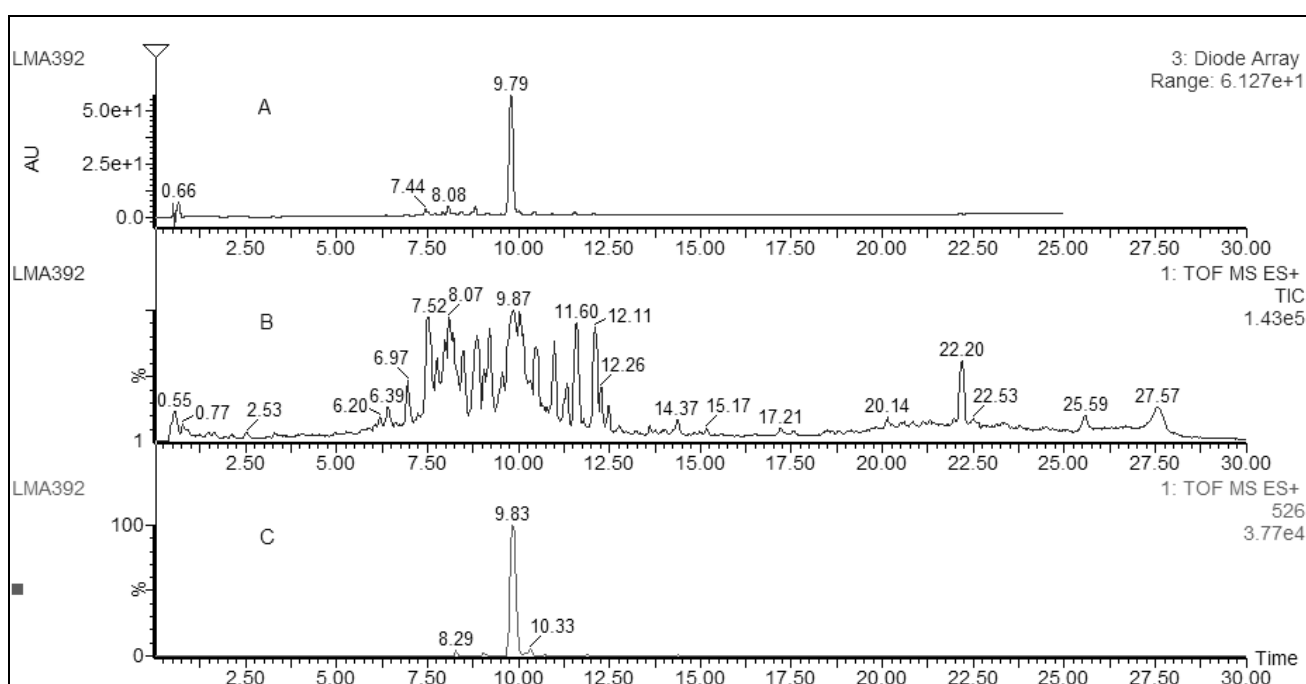


Figura 5.16: Cromatograma do extrato bruto do isolado cml 1671 por CLAE-DAD-EM, detectado por DAD (**a**) e ESI-TOF, evidenciando a contagem total de íons (**b**) ou somente os picos contendo o íon $m/z = 526$ (**c**) ($H_2O-CH_3CN + 50$ ppm de TFA)

Alíquotas das três frações purificadas **LIB04_01**, **LIB04_02** e **LIB04_03** foram enviadas ao Centro Alemão de Pesquisas do Câncer para realização dos bioensaios de citotoxicidade contra células de LLC, porém, até o momento da elaboração desse manuscrito, os bioensaios ainda não haviam sido realizados.

Tabela 5.5: Dados de RMN de ^{13}C e de ^1H , e correlações pelos mapas de contornos HMBC e COSY, de **LIB04_01** em comparação com aqueles descritos para o metabólito citocalasina 1.46 (Dettrakul, 2006)

posição	LIB04_01 [δ (ppm), CDCl_3]				citocalasina 1.46 [δ (ppm), (CDCl_3)]	
	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)	Correlações em HMBC	Correlações em COSY	RMN de ^{13}C (125 MHz)	RMN de ^1H (500 MHz)
1	169,8				168,9	
2-NH		6,21 (sl)				5,70 (sl)
3	54,0	3,27 (m)	C26 (f)*	H4, H10a, H10b	53,5	3,25 (td, $J=9,4, 3,6$ Hz)
4	48,2	2,94 (m)	C3 (f), C5 (f)		48,0	2,99 (m)
5	32,2	3,37 (sl)		H4, CH_3 -11	32,0	3,37 (sl)
6	148,7				148,4	
7	69,4	3,82 (d, $J=11,6$ Hz)		H8	69,3	3,83 (d, $J=10,8$ Hz)
8	48,9	2,96 (m)	C1 (f), C6 (f), C7 (f), C9 (f)		48,8	2,96 (m)
9	86,5				86,1	
10	43,3	a: 2,86 (dd, $J=13,7, 3,2$ Hz); b: 2,58 (dd, $J=13,7, 9,1$ Hz)	C3, C27 e/ou C31		43,7	a: 2,97 (m); b: 2,87 (dd, $J=13,8, 3,6$ Hz)
11	14,8	1,15 (dl) (3H)	C4, C5, C6		14,6	1,18 (d, $J=6,8$ Hz 3H)
12	114,3	a: 5,41 (sl); b: 5,18 (sl)	C5, C7		114,4	a: 5,41 (sl); b: 5,2 (sl)
13	128,7	5,72 (dd, $J=14,5, 9,9$ Hz)		H8, H14	128,2	5,71 (dd, $J=15,0, 9,8$ Hz)
14	133,9	5,36 (ddd, $J=14,7, 11,1, 3,6$ Hz)		H15a, H15b	133,8	5,39 (ddd, $J=15,0, 10,9, 3,8$ Hz)
15	38,9	a: 2,65 (m); b: 2,14 (m)		H15a X H15b	38,7	a: 2,72 (dd, $J=13,0, 10,9$ Hz); b: 2,17 (m)
16	41,0	2,94 (m)	C14 (f)	H15a, CH_3 -24	40,8	2,60 (dd, $J=13,7, 9,4$ Hz)
17	212,8				211,7	
18	76,8				77,0	
19	120,5	5,61 (d, $J=11,8$ Hz)	C17 (f), C18, C20, C25		120,2	5,65 (d, $J=11,8$ Hz)
20	142,6	6,59 (d, $J=11,7$ Hz)	C18, C19	H19	142,2	6,62 (d, $J=11,8$ Hz)
22	149,1				149,5	
24	20,1	1,14 (dl) (3H)	C15, C16, C17		20,2	1,16 (d, $J=6,7$ Hz, 3H)
25	24,0	1,52 (s, 3H)	C17, C18, C19, 20		24,2	1,53 (s, 3H)
26	128,7				128,6	
27	130,2	7,04 (d, $J=8,4$ Hz)	C10, C29, C31		130,2	7,06 (d, $J=8,5$ Hz)
28	114,3	6,84 (d, $J=8,5$ Hz)	C26, C29, C30		114,3	6,87 (d, $J=8,5$ Hz)
29	158,9				158,8	
29-O CH_3	55,2	3,78 (s, 3H)	C29		55,3	3,80 (s, 3H)
30	114,3	6,84 (d, $J=8,5$ Hz)	C26, C28, C29		114,3	6,87 (d, $J=8,5$ Hz)
31	130,2	7,04 (d, $J=8,4$ Hz)	C10, C27, C29		130,2	7,06 (d, $J=8,5$ Hz)

* f: correlação fraca

5.4 Conclusões

Os extratos brutos de 22 fungos endófitos exibiram atividade citotóxica contra células de leucemia linfóide crônica (LLC), co-cultivadas com células estromais sadias da linhagem HS-5, com concentrações inibitórias mínimas variando de 50 a 0,02 µg/200 µL de suspensão de células.

O extrato bruto do isolado *Libertella* sp. cml 1671 foi o mais citotóxico frente às células de LLC, tendo exibido atividade na concentração de 24 ng/200 µL de suspensão de células.

A fração 54 foi a mais ativa dentre as 96 frações obtidas durante o microfracionamento do extrato bruto do isolado *Libertella* sp. cml 1671 e submetidas ao bioensaio de citotoxicidade contra células de LLC.

A fórmula molecular $C_{29}H_{35}NO_8$, correspondente àquelas dos metabólitos escoparasina A e fenocalasina B, foi determinada, por espectrometria de massas de alta resolução, para o metabólito majoritário detectado no cromatograma da fração bioativa 54

Três subfrações purificadas foram obtidas a partir do extrato bruto do fungo *Libertella* sp. cml 1671 (**LIB04_01**, **LIB04_02**, **LIB04_03**), contendo a mesma fórmula molecular e espectros de absorção na região do UV muito similares àquele do metabólito majoritário da fração bioativa 54.

A subfração purificada **LIB04_02** foi identificada como sendo o metabólito escoparasina A, **LIB04_03** foi identificada como o metabólito fenocalasina B e **LIB04_01** foi identificada como sendo o isômero $\Delta^{6,12}$ da escoparasina A.

O tempo de retenção da escoparasina A (**LIB01_02**), na análise por CLAE-DAD-EM (9,06 min), foi muito similar àquele do metabólito majoritário presente na fração bioativa 54 (RT 9,03 min).

Referências

- Abdou, R.; Scherlach, K.; Dase, H.-M.; Sattler, I.; Hertweck, C. **Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*.** *Phytochemistry*, 71, 110 - 116, 2010.
- Abreu, L. M. de; Almeida A.R.; Salgado M.; Pfenning, L. H. **Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottettii* and its host tree *Tapirira guianensis*.** *Mycological Progress*, DOI: 10.1007/s11557-010-0663-8, 2010 a.
- Abreu, L. M.; Phipps, R. K.; Pfenning, L. H.; Gottfredsen, C. H.; Takahashi, J. A.; Larsen, T.O. **Cytosporones O, P and Q from an endophytic *Cytospora* sp.** *Tetrahedron Letters*, 51, 1803 - 1805, 2010 b.
- Adams, G.C.; Wingfield, M.J.; Common, R.; Roux, J. **Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) from *Eucalyptus*.** *Studies in Mycology*, 52, 1 - 144, 2005.
- Adams, M.; Plitzko, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Hamburger, M. **HPLC-profiling for antiplasmodial compound 3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*.** *Phytochemistry Letters*, 2, 159 - 162, 2009.
- Agrios, George N. **Plant Pathology**. 5th ed. Burlington, Elsevier Academic Press, 952p. 2005.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York, John Wiley & Sons. 869 p, 1996.
- Almeida, A.R. **Fungos endófitos e espécies de *Phoma* associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Tese (Doutorado em Agronomia (Fitopatologia)) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 84p. 2007.
- Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L. **Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction.** *Química Nova*, 28 (1), 118 - 129, 2005.
- Aly, A.H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I.D.; Wray, V.; Muller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schachtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R. **Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*.** *Journal of Natural Products*, 71 (6), 972 - 980, 2008.
- Andersen, A.; Sørensen, J.L.; Nielsen, K.F.; Ende, B.G.; Hoog, S. **A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group.** *Fungal Genetics and Biology*, 46, 642 - 656, 2009.
- Andersen, B. **Consistent production of phenolic compounds by *Penicillium brevicompactum* for chemotaxonomic characterization.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 60, 115 - 123, 1991.
- Andersen, B.; Dongo, A.; Pryor, B.M. **Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. Tomatophila*.** *Mycological Research*, 112, 241 - 250, 2008.
- Andersen, B.; Hollensted, M. **Metabolite production by different *Ulocladium* species.** *International Journal of Food Microbiology*, 126, 172 - 179, 2008.
- Andersen, B.; Kréger, E.; Roberts, R.G. **Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups.** *Mycological Research*, 106 (2), 170 - 180, 2002.

Andersen,B.; Hansen, M. E.; Smedsgaard, J. **Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp.** *Phytopathology*, 95(9), 1021 - 1029, **2005**.

Ardrey, R.A. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction.** John Wiley & Sons, Ltd., **2003**.

Arico-Muendel, C.; Centrella, P.A.; Contonio, B. D.; Morgan, B.A.; O'Donovan, G.; Paradise, C.L.; Skinner, S. R.; Sluboski, B.; Svendsen, J.L.; White, K.F.; Debnath, A.; Gut, J.; Wilson, N.; McKerrow, J. H.; DeRisi, J.L.; Rosenthal, P.J.; Chiang, P.K. **Antiparasitic activities of novel, orally available fumagillin analogs.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 5128 – 5131, **2009**.

Arnold, A.E. **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers.** *Fungal Biology Reviews*, 21, 51 - 66, **2007**.

Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S.; Coley, F.D.; Kursar, T.A. **Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?** *Ecology Letters*, 3, 267 - 274, **2000**.

Barreira, M.J.; Alvito, P.C.; Almeida, C.M.M. **Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal.** *Food chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.085, **2010**.

Basilio,A.; Justice,M.; Harris,G.; Bills, G.; Collado, J.; de la Cruz, M.; Diez, M.T.; Hernandez, P.; Liberator,P.; Kahn, J.N.; Peláez, F.; Platas, G.; Schmatz,D.; Shastry, M.; Tormo, J. R.; Andersen, G. R.; Vicente, F. **The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 560 - 566, **2006**.

Bennett, J.W.; Klich, M. **Mycotoxins.** *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 497 - 516, **2003**.

Beno, M. A.; Christoph, G.G. **X-Ray crystal structure of cytochalasin H, a potent new [III] cytochalasan toxin.** *Journal.of the Chemical. Society, Chemical. Communications* , 344 - 345, **1976**.

Bérdy, J. **Bioactive microbial metabolites.** *The journal of antibiotics*, 58 (1), 1 - 26, **2005**.

Bezerra Júnior, P. S.; Santos, A. S.; Bandarra, P.M.; Pedroso, p. M. O. C.; Pavarini, S.P.; Spanemberg, A.; Ferreiro, L.; Driemeier, D. **Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos.** *Pesquisa veterinária brasileira*, 29 (3), 205 – 210, **2009**.

Bills, G.F.; Platas, G.; Fillola, A.; Jiménez, M.R. ; Collado, J ; Vicente, F.; Martín1, J.; González, A.; Bur-Zimmermann, J.; Tormo, J.R.; Peláez, F. **Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays.** *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1644 - 1658, **2008**.

Borges, W. S.; Keyller, B. B.; Bonato, P. S.; Said, S.; Pupo, M.T. **Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions.** *Current Organic Chemistry*, 113(12), 1137 - 1163(27), **2009**.

Boysen, M.; Skouboe, P.; Frisvad, J.C.; Rossen, L. **Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles.** *Microbiology*, 142, 541 - 549, **1996**.

Brady,S.F.; Wagenaar, M.M.; Singh, M. P.; Janso, J. E.; Clardy, J. **The Cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus.** *Organic Letters*, 2 (25), 4043-4046, **2000**.

Brase, S.; Encinas, A.; Keck, J.; Nising, C.F. **Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites.** *Chemical Reviews*, 109 (9), 3903 – 3990, **2007**.

- Bugni, T.S.; Ireland, C. M. **Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms.** *Natural Products Reports*, 21, 143 - 163, **2004**.
- Bunyapaiboonsri, T.; Yoiprommarat, S.; Srikitikulchai, P.; Srichomthong, K.; Lumyong, S. **Oblongolides from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789.** *Journal of Natural Products*, 73 (1), 55 - 59, **2010**.
- Butler, M.S. **The role of natural product chemistry in drug discovery.** *Journal of Natural Products*, 67, 2141 - 2153, **2004**.
- Caligaris-Cappio, F. **Biology of chronic lymphocytic leukemia.** *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 4 (1), 5 - 21, **2000**.
- Caligaris-Cappio, F.; Ghia, P. **Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease?** *Journal of Clinical Oncology*, 26 (27), 4497 - 4503, **2008**.
- Caloni, F.; Ranzenigo, G.; Cremonesi, F.; Spicer, L.J. **Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells.** *Toxicol*, 54, 337 - 344, **2009**.
- Câmara, A.C.L.; Afonso, J.A.B.; Correa, F.R.; Dantas, A.F.M.; Mendonça, C.L.; Costa, N. A.; Dantas, A.C.; Neto, H.A.C.; Campos, A.G.S.S.; Souza, M.I. **Leucoencefalomalácia em equídeos no estado de Pernambuco.** *Ciência Animal Brasileira*, 9 (2), 470 - 479, **2008**.
- Cannon, P. F.; Simmons, C. M. **Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana.** *Mycologia*, 94 (2), 210 - 220, **2002**.
- Carlile, M.J.; Watkinson, S.C.; Gooday, G.W. **The Fungi.** 2nd. ed. London, Academic Press, 578 p, **2001**.
- Castella, G.; Larsen, T.O.; Cabanes, J.; Schmidt, H.; Albores, A.; Niessen, L.; Farber, P.; Geisen, R. **Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*.** *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 74 - 83, **2002**.
- Chandrasekar, P. H.; Sobel, J. D. **Micafungin: a new echinocandin.** *Reviews of Anti-Infective Agents*, 42, 1171 - 1178, **2006**.
- Chen, Y; Guo, H.; Du, Z.; Liu, Z.,; Che, Y.; Ye, X. **Ecology-based screen identifies new metabolites from a cordyceps-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers.** *Cell Proliferation*, 1 - 10, doi: 10.1111/j.1365-2184.2009.00636.x, **2009**.
- Chin, Y- W.; Balunas, M.J.; Chai, H.B.; Kinghorn, A.D. **Drug discovery from natural sources.** *The AAPS Journal*, 8 (2), Article 28, **2006**.
- Chomcheon, P.; Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Ngamrojanavanich, N.; Kengtong, S.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. **Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36.** *Phytochemistry*, 70, 407 - 413, **2009**.
- Christensen, K.B.; Van Klink, J.W.; Weavers, R.T.; Larsen, T.O.; Andersen, B.; Phipps, R.K. **Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24), 9431 - 9435, **2005**.
- Ciavatta, M. L.; Lopez-Gresa, M. P.; Gavagnin, M.; Nicoletti, R.; Manzo, E.; Mollo, E.; Guo, Y.; Cimino, G. **Cytosporin-related compounds from the marine-derived fungus *Eutypella scoparia*.** *Tetrahedron*, 64, 5365 - 5369, **2008**.

Claeson, P.; Bohlin, L. **Some aspects of bioassay methods in natural-product research aimed at drug lead discovery.** *Trends in Biotechnology*, 15, 245 - 248, 1997.

Claydon, N.; Elgersma, D. M.; Grove, J.F. **The phytotoxicity of some phenolic metabolic products of *Ophiostoma ulmi* to *Ulmus* spp.** *European Journal of Plant Pathology*, 86 (5), 229 - 237, 1980.

Clemons, K.V.; Stevens, D.A. **Efficacies of sordarin derivatives GM193663, GM211676, and GM237354 in a murine model of systemic coccidioidomycosis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1874 - 1877, 2000.

Cole, R.J.; Wells J.M.; Cox, R.H.; Cutler, H. G. **Isolation and Biological Properties of Deacetylcytochalasin H from *Phomopsis* sp.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29, 205 - 206, 1981.

Cordell, G.A.; Shin, Y.G. **Finding the needle in the haystack.** The dereplication of natural product extracts. *Pure Application Chemistry*, 71 (6), 1089 - 1094, 1999.

Costa, L.A. **Fungos endófitos associados ao cacauzeiro.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 61 p, 2008.

Cota, B. B.; Rosa, L. H.; Caligiorne, R. B.; Rabello, A. L. T.; Alves, T. M. A.; Rosa, C. A.; Zani, C.L. **Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*.** *FEMS Microbiology Letters*, 285, 177 - 182, 2008.

Cragg, G. M.; Newman, D. J. **Nature: a vital source of leads for anticancer drug Development.** *Phytochemistry Reviews*, 8, 313 - 331, 2009.

Culvenor, C.J.C.; Edgar, J.A.; Mackay, M.F. **Structure elucidation and absolute configuration of phomopsina, a hexapeptide mycotoxin produced by *Phomopsis leptostromiformis*.** *Tetrahedron*, 45 (8), 2351 - 2372, 1989.

Cundliffe, E.; Cannon, M.; Davies, J. **Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(1), 30 - 34, 1974.

d'Enfert, C. **Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host.** *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 358 - 364, 2009.

Dai, J.; Krohn, K.; Flörke, U.; Gehle, D.; Aust, H.; Draeger, S.; Schulz, B.; Rheinheimer, J. **Novel highly substituted biraryl ethers, phomosines D–G, Isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*.** *European Journal of Organic Chemistry*, 23, 5100 - 5105, 2005a.

Dai, J.; Krohn, K.; Gehle, D.; Kock, I.; Flörke, U.; Aust, H.; Draeger, S.; Schulz, B.; Rheinheimer, J. **New oblongolides isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Melilotus dentata* from the shores of the Baltic Sea.** *European Journal of Organic Chemistry*, 18, 4009 - 4016, 2005b.

Davis, R.A.; Longden, J.; Avery, V.M.; Healy, P.C. **The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 2836 - 2839, 2008.

Denning, D.W. **Echinocandins and pneumocandins – a new antifungal class with a novel mode of action.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 611 - 614, 1997.

Desjardins, A.E. ***Fusarium* mycotoxins – Chemistry, genetics, and biology.** St. Paul, Minnesota, APS Press, 260 p. 2006.

Dettrakul, S. **Characterization of biologically active compounds from the fungus *Diaporthe* sp. BCC 6140, and from higher plant *Cordia globifera***. Thesis, (Organic chemistry, Faculty of graduate studies, Mahidol University, Thailand), 230p., **2006**.

Dettrakul, S.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Nopichai, S.; Suyarnsestakorn, C.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. **Antimycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 1253 - 1255, **2003**.

Dewick, P.M. **Medicinal natural products. A biosynthetic approach**, 2nd ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK, 507 p, **2002**.

Didier, P.J.; Phillips, J.N.; Kuebler, D.J.; Nasr, M.; Brindley, P.J.; Stovall, M.E.; Bowers, L.C.; Didier, E.S. **Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives *in vitro* and *in vivo***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (6), 2146 - 2155, **2006**.

Dighiero, G.; Hamblin, T.J. **Chronic lymphocytic leukaemia**. *Lancet*, 371, 1017 - 1029, **2008**.

Domínguez, J.M.; Lorenzo, M.G.G.; Martín, J.J. **Sordarin inhibits fungal protein synthesis by blocking translocation differently to fusidic acid**. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22423 - 22427, **1999**.

Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson T.H. **Compendium of soil fungi**. IHW Verlag, Eching, Germany, 672 p. **2007**.

Eldridge, G.R.; Vervoort, H.C.; Lee, C.M.; Cremin, P.A.; Williams, C.T.; Hart, S.M.; Goering, M.G.; O'Neil-Johnson, M.; Zeng, L. **High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery**. *Analytical Chemistry*, 74 (16), 3963 - 3971, **2002**.

Espada, A.; Martin, M.M.; Dage, J.; Kuo, M-S. **LC/MS and related techniques to high throughput drug discovery**. *Drug Discovery Today*, 13 (9/10), 417 - 423, **2008**.

Evidente, A.; Lanzetta, R.; Abouzeid, M.A.; Corsaro, M. M.; Mugnai, L.; Surico, G. **Foeniculoxin, a new phytotoxic geranylhydroquinone from *Phomopsis foeniculi***. *Tetrahedron*, 50 (34), 10371 - 10378, **1994**.

Eyberger, A.L.; Dondapati, R.; Porter, J.R. **Endophyte Fungal Isolates from *Podophyllum peltatum* Produce Podophyllotoxin**. *Journal of Natural Products*, 69 (8), 1121 - 1124, **2006**.

Fex, T. **Structures of cytochalasin k, l and m, isolated from *Chalara microspora***. *Tetrahedron*, 22 (28), 2703 - 2706, **1981**.

Firáková, S.; Šturdíková, M.; Múčková, M. **Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants**. *Biologia*, 62 (3), 251 - 257, **2007**.

Flajs, D.; Peraica, M. **Toxicological properties of citrinin**. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60, 457 - 464, **2009**.

Frisvad, J. C.; Thrane, U. **Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection)**. *Journal of Chromatography*, 404, 195 - 214, **1987**.

Frisvad, J. C.; Andersen, B.; Thrane, U. **The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi**. *Mycological Research*, 112, 231 - 240, **2008**.

Frisvad, J.C.; Smedsgaard, J.; Samson, R.A.; Larsen, T.O.; Thrane, U. **Fumonisin B production by *Aspergillus niger***. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 55, 9727 - 9732, **2007**.

- Garicochea, B. **Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 27 (4), 241 – 246, **2005**.
- Garnica, M.; Nucci, M. **Epidemiology, treatment and prophylaxis of infections in chronic lymphocytic leukemia.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 27 (4), 290 - 300, **2005**.
- Ghia, P.; Ferreri, A. J. M.; Caligaris-Cappio, F. **Chronic lymphocytic leukemia.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64, 234 - 246, **2007**.
- Ghia, P.; Granziero, L.; Chilosi, M.; Caligaris-Cappio, F. **Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment.** *Seminars in Cancer Biology*, 12, 149 - 155, **2002**.
- Gill, M.; Giménez, A. **Austrovenetin, the principal pigment of the toadstool *Dermocybe austroveneta*.** *Phytochemistry*, 30 (3), 951 - 955, **1991**.
- Graf, L.; Iwata, M.; Torok-Storb, B. **Gene expression profiling of the functionally distinct human bone marrow stromal cell lines HS-5 and HS-27a.** *Blood*, 100, 1509 - 1511, **2002**.
- Gunatilaka, A. A. L. **Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence.** *Journal of Natural Products*, 69(3), 509 - 526, **2006**.
- Gundel, P.E.; Garibaldi, L.A.; Tognetti, P.M.; Aragón, R.; Ghersa, C. M.; Omacini, M. **Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa.** *Microbial Ecology*, 57 (4), 740 - 748, **2009**.
- Gurib-Fakim, A. **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.** *Molecular aspects of medicine*, 27 (1), 1 - 93, **2006**.
- Gurusiddaiah, S.; Ronald, R.C. **Grahamimycins: antibiotics from *Cytospora* sp. Ehrenb. W.F.P.L. 13^a.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19 (1), 153 - 165, **1981**.
- Hall, J. D.; Duncan-Gould, N. W.; Siddiqi, N. A.; Kelly, J. N.; Hoferlin, L. A.; Morrison, S. J.; Wyatt, J. K. **Cytosporone E: racemic synthesis and preliminary antibacterial testing.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 1409 - 1413, **2005**.
- Hansen, M.E.; Andersen, B.; Smedsgaard, J. **Automated and unbiased classification of chemical profiles from fungi using high performance liquid chromatography.** *Journal of Microbiological Methods*, 61, 295 - 304, **2005**.
- Hanson, J.R. **The chemistry of fungi.** Cambridge, RCS publishing, 220p. **2008**.
- Harris, J. P.; Mantle, P. G. **Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*.** *Phytochemistry*, 57, 165 - 169, **2001**.
- Haschek, W.M.; Gumprecht, L.A.; Smith, G.; Tumbleson, M.E.; Constable, P.D. **Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives.** *Environmental Health Perspectives*, 109 (S2), 251 - 257, **2001**.
- He, H.; Janso, J. E.; Williamson, R. T.; Yang, H. Y.; Carter, G. T. **Cytosporacin, a highly unsaturated polyketide: application of the accordadequate experiment to the structural determination of natural products.** *The Journal of Organic Chemistry*, 68 (16), 6079 - 6082, **2003**.
- Hibbett, D. S.; Binder, M.; Bischoff, J. F.; Blackwell, M.; Cannon, P.F.; Eriksson, O.E.; Huhndorf, S.; James, T.; Kirk, P.M.; Lücking, R.; Lumbsch, H. T.; Lutzoni, F.; Matheny, P. B.; Mclaughlin, D. J.; Powell, M. J.; Redhead, S.; Schoch, C. I.; Spatafora, J. W.; Stalpers, J. A.; Vilgalys, R.; Aime, M. C.; Aptroot, A.; Bauer, R.; Begerow, D.; Benny, G. L.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W.; Dai, Y.; Gams, W.; Geiser, D. M.; Griffith, G. W.; Gueidan, C.; Hawksworth, D.L.;

Hestmark, G.; Hosaka, K.; Humber, R. A.; Hyde, K. D.; Ironside, J.E.; Koljalg, U.; Kurtzman, C. P.; Larsson, K.; Lichtwardt, R.; Longcore, J.; Miadlikowska, J.; Miller, A.; Moncalvo, J.; Mozley-standridge, S.; Oberwinkler, F.; Parmasto, E.; Reeb, V.; Rogers, J. D.; Roux, C.; Ryvarden, L.; Sampaio, J.P.; Schuñler, A.; Sugiyama, J.; Thorn, R.G.; Tibell, L.; Untereiner, W.A.; Walker, C.; Wang, Z.; Weir, A.; Weiss, M.; White, M. M.; Winka, K.; Yao, V.; Zhang, N. **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.** *Mycological Research*, 111, 509 - 547, **2007**.

Higgs, R.E.; Zahn, J.A.; Gygi, J.D.; Hilton, M.D.; **Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts.** *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), 371 - 376, **2001**.

Horn, W.S.; Simmonds, M.S.J. ; Schwartz, R.E. ; Blaney,W.M. ; **Variation in production of phomodiol and phomopsolide B by *Phomopsis* spp.** *Mycologia*, 88 (4), 588 - 595, **1996**.

Horn, W.S.; Simmonds, M. S. J., Shwartz, R. E.;Blaney, W.M. **Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp.** *Tetrahedron*, 51 (14), 3969 - 3978, **1995**.

Hou, L.; Mori,D.; Takase,Y.; Meihua, P.; Kai, K.; Tokunaga, O. **Fumagillin inhibits colorectal cancer growth and metastasis in mice: *In vivo* and *in vitro* study of anti-angiogenesispin_2393 448.461.** *Pathology International*, 59, 448 - 461, **2009**.

Hovermale, J.T.; Craig, A.M. **Correlation of ergovaline and lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass (*Lolium perenne*).** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13 (4), 323 - 327, **2001**.

Huang, Z.; Cai, X; Shao, C; She, Z; Xia, X; Chen, Y; Yang, J; Zhou, S; Lin, Y. **Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76.** *Phytochemistry*, 69, 1604 - 1608, **2008**.

I

Iha, M.H.; Sabino, M. **Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks.** *Food Control*, 19, 417 - 422, **2008**.

Jayasuriya, H.; Guan,Z.; Polishook,J.D.; Dombrowski, A. W.; Felock, P.J.; Hazuda,D.J.;Singh, S.B. **Isolation, Structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of cytosporic acid, a fungal metabolite produced by a *Cytospora* sp.** *Journal of Natural Products*, 66 (4),551 - 553, **2003**.

Jones, R.N.; Fritsche, T.R.; Sader, H.S.; Ross, J.E. **Activity of retapamulin (sb-275833), a novel pleuromutilin, against selected resistant gram-positive cocci.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (7), 2583 - 2586, **2006**.

Kajimoto, T.; Imamura, Y.; Yamashita, M.; Takahashi, K.; Shibata, M.; Nohara, T. **Nuclear magnetic resonance studies of cytochalasin E and its decomposition product.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37 (8), 2212 - 2213, **1989**.

Keating, M.J. **Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia.** *Haematologica Reports*, 2 (7), 30 - 34, **2006**.

Keller, N.P.; Turner, G.; Bennett, J.W. **Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics.** *Nature Reviews Microbiology* , 3, 937 - 947, **2005**.

Kelner, M.J.; McMorris, T.C.; Rojas, R.J.; Trani , N.A.; Estes, L. **Enhanced antitumor activity of irifolven in combination with thiotepa or mitomycin C.** *Cancer Chemoterapy and Pharmacology*, 49 (5), 412 - 418, **2002**.

Kharwar, R.N.; Verma, V.C.; Kumar, A.; Gond, S.K.; Harper, J.K.; Hess, W.M.; Lobkovosky, E.; Ma, C.; Ren, Y.; Strobel, G.A. **Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp.** *Current Microbiology*, 58, 233 - 238, **2009**.

Kim, H. J.; Baburin, I.; Khom, S.; Hering, S.; Hamburger, M. **HPLC-based activity profiling approach for the discovery of GABA_A receptor ligands using an automated two microelectrode voltage clamp assay on *Xenopus* Oocytes.** *Planta Medica*, 74 (5), 521 - 526, **2008**.

Kim, S.; Shin, D-S.; Lee, T.; Oh, K-B. **Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity.** *Journal of Natural Products*, 67 (3), 448 - 450, **2004**.

King Jr., D. A.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I. **Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods.** *Applied and Environmental Microbiology*, 37 (5), 959-964, **1979**.

Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W. **Dictionary of the fungi**, 10th ed. Wallingford, CABI Publishing, 771p. **2008**.

Kithsir, B.H.; Jayasuriya, H.; Bills, G.F.; Polishook, J.D.; Dombrowski, A.W.; Guan, Z.; Felock, P.J.; Hazuda, D.J.; Singh, S.B. **Isolation, structure, absolute stereochemistry, and HIV-1 integrase inhibitory activity of integrasone, a novel fungal polyketide.** *Journal of Natural Products*, 67 (5), 872 - 874, **2004**.

Klich MA. **Identification of Common *Aspergillus* Species.** Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116 p. **2002**.

Knudsen, P.B. **Apoptosis inducing natural products against B-cell chronic lymphocytic leukemia.** Dissertation, (Biotechnology Microbial Center, Technical University of Denmark), 158p. **2009**.

Kobayashi, H.; Meguro, S.; Yoshimoto, T.; Namikoshi, M. **Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine-derived fungus *Phomopsis* sp.** *Tetrahedron*, 59, 455 - 459, **2003**.

Krauss, J.; Härrä, S.A.; Bush, L.; Husi, R.; Bigler, L.; Power, S.A.; Müller, C.B. **Effects of fertilizer, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies.** *Functional Ecology*, 21, 107 - 116, **2007**.

Kumaran, R.S.; Hur, B-K. **Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 54, 21 - 30, **2009**.

Kusari, S.; Zuhlke, S.; Kosuth, J.; Cellarova, E.; Spiteller, M. **Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis.** *Journal of Natural Products*, 72(10), 1825 - 1835, **2009a**.

Kusari, S.; Zuhlke, S.; Spiteller, M. **An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues** *Journal of Natural Products*, 72 (1), 2 - 7, **2009b**.

Laatsch, H. **AntiBase 2008, A data base for rapid dereplication and structure determination of microbial natural products.** Weinheim, Wiley-VCH, **2008**.

Lang,G.; Mayhudin,N.A.; Mitova,M.I.; Sun,L.; Van der Sar,S.; Blunt,J.W.; Cole,A.L.J.; Ellis,G.; Laatsch, H.; Munro, M.H.G. **Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts.** *Journal of Natural Products*, 71 (9), 1595 - 1599, **2008**.

Lang,G.; Mitova, M. I.; Ellis, G.; van der Sar, S.; Phipps,R.K.; Blunt,J.W.; Cummings, N.J.; Cole, A.L.J.; Munro, M.H.G. **Bioactivity profiling using HPLC/Microtiter-plate analysis: application to a New Zealand marine alga-derived fungus, *Gliocladium* sp.** *Journal of Natural Products* 69 (4), 621 - 624, **2006**.

- Larsen, T. O.; Breinholt, J. **Dichlorodiaportin, diaportinol, and diaportinic acid: three novel isocoumarins from *Penicillium nalgioense***. *Journal of Natural Products*, 62 (8), 1182 - 1184, **1999**.
- Larsen, T.O.; Lange, L.; Schnorr, K.; Stender, S.; Frisvad, J.C. **Solistatinol, a novel phenolic compactin analogue from *Penicillium solitum***. *Tetrahedron Letters*, 48, 1261 - 1264, **2007**.
- Larsen, T.O.; Perry, N.B.; Andersen, B. **Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria***. *Tetrahedron Letters*, 44, 4511 - 4513, **2003**.
- Larsen, T.O.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K. F.; Hansen, M. E.; Frisvad, J. C. **Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery**. *Natural Products Report*, 22, 672 - 695, **2005**.
- Leslie, J.F.; Summerell, B.A.. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames, Blackwell Professional. 388 p. **2006**
- Letscher-Bru, V.; Herbrecht, R. **Caspofungin: the first representative of a new antifungal class**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 513 - 521, **2003**.
- Lijnen, H.R.; Frederix, L.; Van Hoef, B. **Fumagillin reduces adipose tissue formation in murine models of nutritionally induced obesity**. *Obesity*, doi:10.1038/oby.2009.503, **2010**.
- Lima, C.S.; Pfenning, L. H.; Costa, S.S.; Campos, M.A.; Leslie, J.F. **A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil**. *Plant Pathology*, 58 (1), 33 - 42, **2009**.
- Lin, X; Lu, C; Shen, Y. **One new ten-membered lactone from *Phomopsis* sp. B27, an Endophytic Fungus of *Annona squamosa* L.** *Chinese Journal of Natural Medicines*, 6(5), 391 - 394, **2008**.
- Liu, K.; Ding, X.; Deng, B.; Chen, W. **Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis***. *Journal of industrial Microbiology Biotechnology*. 36, 1171 - 1177, **2009**.
- Liu, N. S.; O'Brien, S. **Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia**. *Medical Oncology*, 21(4), 297 - 304, **2004**.
- Liu, R.; Gu, Q.; Zhu, W.; Cui, C.; Fan, G.; Fang, Y.; Zhu, T.; Liu, H. **10-Phenyl-[12]-cytochalasins Z7, Z8, and Z9 from the marine-derived fungus *Spicaria elegans***. *Journal of natural products*, 69 (6), 871 - 875, **2006**.
- Lösgen, S.; Magull, J.; Schulz, B.; Draeger, S.; Zeeck, A. **Isofusidienols: novel chromone-3-oxepines produced by the endophytic fungus *Chalara* sp.** *European Journal of Organic Chemistry*, 4, 698 - 703, **2008**.
- Maansson, M.; Klejnstrup, M.L.; Phipps, R.K.; Nielsen, K.F.; Frisvad, J.C.; Gotfredsen, C.H.; Larsen, T.O. **Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger***. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2), 949 - 953, **2010**.
- Marasas, W.F.O. **Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective**. *Environmental Health Perspectives*, 109, (S2), 239 - 243, **2001**.
- Mazars, C.; Rossignol, M.; Auriol, P.; Kläebe, A. **Phomozin, a phytotoxin from *Phomopsis helianthi*, the causal agent of stem canker of sunflower**. *Phytochemistry*, 29 (11), 344 - 3444, **1990**.
- Mckenzie, R.A.; Kelly, M.A.; Shivas, R.G.; Gibson, J.A.; Cook, P. J.; Widderick, K.; Guilfoyle, A.F. ***Aspergillus clavatus* tremorgenic neurotoxicosis in cattle fed sprouted grains**. *Australian Veterinary Journal*, 82 (10), 635 - 638, **2004**.

Mishra, K. P.; Ganju, L.; Sairam, M.; Banerjee, P.K.; Sawhney, R.C. **A review of high throughput technology for the screening of natural products.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62 (2), 94 - 98, **2007**.

Misieki, M.; Hoffmeister, D. **Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences.** *Planta Medica*, 73 (2), 103 - 115, **2007**.

Mitova, M.I.; Murphy, A.C.; Lang, G.; Blunt, J.W.; Cole, A.L.J.; Ellis, G.; Munro, M.H.G. **Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. 2. The isolation of chrysaibol, an antibiotic heptaibol from a New Zealand sample of the mycoparasitic fungus *Sepedonium chrysospermum*.** *Journal of Natural Products*, 71 (9), 1600 - 1603, **2008**.

Mitova, M.I.; Stuart, B.G.; Cao, G.H.; Blunt, J.W.; Cole, A.L.J.; Munro, M.H.G. **Chrysosporide, a cyclic pentapeptide from a New Zealand sample of the fungus *Sepedonium chrysospermum*.** *Journal of Natural Products*, 69 (10), 1481 - 1484, **2006**.

Mohn, T.; Plitzko, I.; Hamburger, M. **A comprehensive metabolite profiling of *Isatis tinctoria* leaf extracts.** *Phytochemistry*, 70, 924 - 934, **2009**.

Monaghan, R.L.; Polishook, J.D.; Pecore, V.J.; Bills, G.F.; Nallin-Omstead, M.; Streicher, S.L. **Discovery of novel secondary metabolites from fungi - is it really a random walk through a random forest?** *Canadian Journal of Botany*, 73, 925 - 931, **1996**.

Morschhäuser, J. **Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi.** *Fungal Genetics and Biology*, 47 (2010), 94 - 106, **2009**.

Mostert, L.; Crous, P.W.; Kang, J. C.; Phillips, A.J.L. **Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization.** *Mycologia*, 93 (1), 146 - 167, **2001**.

Motti, C. A.; Freckleton, M. L.; Tapiolas, D. M.; Willis, R. H. **FTICR-MS and LC-UV/MS-SPE-NMR applications for the rapid dereplication of a crude extract from the sponge *Ianthella flabelliformis*.** *Journal of Natural Products*, 72 (2), 290 - 294, **2009**.

Murali, T. S.; Suryanarayanan, T. S.; Geeta, R. **Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates.** *Canadian Journal of Microbiology*, 52 (7), 673 - 680, **2006**.

Nelson, P.E.; Desjardins, A.E.; Plattner, R.D. **Fumonisin, mycotoxins produced by fusarium species: biology, chemistry, and significance.** *Annual Review of Phytopathology*, 31, 233 - 252, **1993**.

Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. **The influence of natural products upon drug discovery.** *Natural Products Reports*, 17, 215 - 234, **2000**.

Niekerk, J. M. van; Groenewald, J. Z. Farr, D.F.; Fourie, P. H.; Halleen, F.; Crous, P. W. **Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines.** *Australasian Plant Pathology*, 34, 27 - 39, **2005**.

Nielsen, K. F.; Smedsgaard, J. **Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology.** *Journal of Chromatography A*, 1002, 111 - 136, **2003**.

Nielsen, K.F.; Dalsgaard, P.W.; Smedsgaard, J.; Larsen, T.O. **Andrastins A–D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (8), 2908 - 2913, **2005**.

Noonim, P.; Mahakarnchanakul, W.; Nielsen, K.F.; Frisvad, J. C.; Samson, R.A. **Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans.** *Food Additives & Contaminants, Part A*, 26 (1), 94 - 100, **2009**.

O'Brien, S. **New agents in the treatment of CLL.** *Hematology*, 457 - 464, **2008**.

Ohzeki, T; Mori, K. **Synthetic racemate and enantiomers of cytosporone E, a metabolite of an endophytic fungus, show indistinguishably weak antimicrobial activity.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (12), 2584 - 2590, **2003**.

Ostry, V. ***Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs.** *World Mycotoxin Journal*, 1 (2), 175 - 188, **2008**.

Overy, D.P.; Valdez, J.G.; Frisvad, J.C. **Revisions to *Penicillium* ser. *Corymbifera*: agents responsible for blue mould storage rot of various flower and vegetable bulbs.** *Canadian Journal of Botany*, 83 (11), 1422 - 1433, **2005**.

Panayiotidis, P.; Jones, D.; Ganeshaguru, K.; Foroni, L.; Hoffbrand, A.V. **Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*.** *British Journal of Hematology*, 92, 97 - 103, **1996**.

Paranagama, P. A; Wijeratne, E. M. K; Gunatilaka, A. A. L. **Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*.** *Journal of Natural Products*, 70 (12), 1939 - 1945, **2007**.

Patterson, R.R.M. **Fungi and fungal toxins as weapons.** *Mycological Research*, 110(9), 1003 - 1010, **2006**.

Patwardhan, S. A.; Pandey, R.C.; Dev, S. **Toxic cytochalasins of *Phomopsis paspalli*, a pathogen of kodo millet.** *Phytochemistry*, 13, 1985 - 1988, **1974**.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; **Introduction to Spectroscopy**, 3 rd ed., Australia, Brooks/Cole, **2001**.

Pelaéz, F. **The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat?** *Biochemical Pharmacology*, 71 (7), 981 - 990, **2006**.

Petrini O.; Sieber, T.N.; Toti, L.; Viret, O. **Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi.** *Natural Toxins*, 1 (3), 185 - 196, **1992**.

Pfaller, M.A.; Pappas, P.G.; Wingard, J. R. **Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends.** *Clinical Infectious Diseases*, 43, S3 - S14, **2006**.

Pongcharoen, W.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J. **Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44.** *Journal of Natural Products*, 69 (5), 856 - 858, **2006**.

Priti, V.; Ramesha, B. T.; Singh, S.; Ravikanth, G.; Ganeshaiyah, K. N.; Suryanarayanan, T. S.; Shaanker, R.U. **How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites?** *Current Science*, 97 (4), 477 - 478, **2009**.

Probst, C.; Njapau, H.; Cotty, P.J. **Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent.** *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (8), 2762 - 2764, **2007**.

Puri, S.C.; Nazir, A.; Chawla, R.; Arora, R.; Riyaz-ul-Hasan, S.; Amna, T.; Ahmed, B.; Verma, V.; Singh, S.; Sagar, R.; Sharma, A.; Kumar, R.; Sharma, R.K.; Qazi, G.N. **The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans.** *Journal of Biotechnology*, 122, 494 - 510, **2006**.

- Puri, S.C.; Verma, V.; Amna, T.; Qazi, G.N.; Spiteller, M. **An Endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin.** *Journal of Natural Products*, 68(12), 1717 - 1719, **2005**.
- Quang, D. N.; Hashimoto, T.; Tanaka, M.; Baumgartner, M.; Stadler, M.; Asakawa, Y. **Chemical constituents of the ascomycete *Daldinia concentrica*.** *Journal of Natural Products*, 65 (12), 1869 - 1874, **2002**.
- Rabindran, S.K.; Ross, D.D.; Doyle, L.A.; Yang, W.; Greenberger, L.M. **Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein1.** *Cancer Research*, 60, 47 - 50, **2000**.
- Rank, C.; Phipps, R.K.; Harris, P.; Frisvad, J.C.; Gottfredsen, C.H.; Larsen, T.O. **Epiazonalenins A, B, and C from *Aspergillus novofumigatus*.** *Tetrahedron Letters*, 47, 6099 - 6102, **2006**.
- Rehmana, S.; Shawl, A. S.; Koura, A.; Andrabi, R.; Sudan, P.; Sultana, P. ; Verma, V.; Qazi, G. N. **An endophytic *Neurospora sp.* from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44 (2), 203 - 209, **2008**.
- Rehner, S. A.; Uecker, F.A. **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*.** *Canadian Journal of Botany*, 72 (11), 1666 - 1674, **1994**.
- Rezende, E. L.; Lima, C. S.; Costa, S.S.; Pfenning, L.H. **Fungos associados a inflorescências de mangueira assintomáticas e com malformação.** In: *Congresso Brasileiro de Micologia*, Recife. Anais. Recife : Sociedade Brasileira de Micologia, p. 111-111, **2007**.
- Ricci, F.; Tedeschi, A.; Morra, E.; Montillo, M. **Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review.** *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5, 187 - 207, **2009**.
- Rigopoulos, D.; Larios, G. **Fusidic acid: a valuable agent for controlling *Staphylococcus aureus* skin infections.** *Acta dermato - Venereologica*, S 216, 7 - 13, **2008**.
- Ringot, D.; Chango, A.; Schneider, Y-J.; Larondelle, Y. **Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update.** *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18 - 46, **2006**.
- Rodriguez, R. J.; White Jr, J. F.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. **Fungal endophytes: diversity and functional roles.** *New Phytologist*, 182 (2), 314 - 330, **2009**.
- Rossmann, A.Y.; Farr, D.F.; Castlebury, L. A. **A review of the phylogeny and biology of the *Diaporthales*.** *Mycoscience*, 48, 135 - 144, **2007**.
- Rossmann, A.Y.; Palm, M. E. **Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true fungi?** *Outlooks on Pest Management*, 17 (5), 217 - 219, **2006**.
- Rukachaisirikul, V.; Sommart, U.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. **Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis sp.* PSU-D15.** *Phytochemistry*, 69, 783 - 787, **2008**.
- Sakamoto, H.; Okamoto, K.; Aoki, M.; Kato, H.; Katsume, A.; Ohta, A.; Tsukuda, T.; Shimma, N.; Aoki, Y.; Arisawa, M.; Kohara, M.; Sudoh, M. **Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy.** *Nature Chemical Biology*, 1, 333 - 337, **2005**.
- Samson, R. A.; Frisvad J.C. ***Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites.** *Studies in Mycology*, 49, 1 - 251, **2004**.
- Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Oorschot, C. A. N. Van. **Introduction to food-borne fungi.** 4th ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands, 322p. **1995**.

Samson, R. A.; Houbraken, J. A.M.P.; Kuijpers, A. F. A.; Frank, J.M.; Frisvad, J.C. **New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri***. *Studies in Mycology*, 50, 45 - 61, 2004.

Santos, J.M.; Phillips, A.J.L. **Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal**. *Fungal Diversity*, 34, 111 - 125, 2009.

Saxena, N.; Ansari, K. M.; Kumar, R.; Dhawan, A.; Dwivedi, P.D.; Das, M. **Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p53 and p21/WAF1 proteins in skin of mice**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234, 192 - 201, 2009.

Schardl, C.L.; Leuchtman, A.; Spiering, M.J. **Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes**. *Annual Review of Plant Pathology*, 55, 315 - 340, 2004.

Schoch, C.L.; Sung, G.; Giráldez, F.L.; Townsend, J.P.; Miadlikowska, J.; Hofstetter, V.; Robbertse, B.; Matheny, P.B.; Kauff, F.; Wang, Z.; Gueidan, C.; Andrie, R. M.; Trippe, K.; Ciufetti, L.M.; Wynns, A.; Fraker, E.; Hodkinson, B.P.; Bonito, G.; Groenewald, J. Z.; Arzanlou, M.; De Hoog, G. S.; Crous, P.W.; Hewitt, D.; Pfister, D.H.; Peterson, K.; Gryzenhout, M.; Wingfield, M.J.; Aptroot, A.; Suh, S.; Blackwell, M.; Hillis, D.M.; Griffith, G.W.; Castlebury, L.A.; Rossman, A. Y.; Lumbsch, H.T.; Lucking, R.; Budel, B.; Rauhut, A.; Diederich, P.; Ertz, D.; Geiser, D.M.; Hosaka, K.; Inderbitzin, P.; Kohlmeyer, J.; Volkmann-kohlmeyer, B.; Mostert, L.; O'donnell, K.; Sipman, H.; Rogers, J.D.; Shoemaker, R.A.; Sugiyama, J.; Summerbell, R.C.; Untereiner, W.; Johnston, P.R.; Stenroos, S.; Zuccaro, A.; Dyer, P.S.; Crittenden, P.D.; Cole, M.S.; Hansen, K.; Trappe, J.M.; Yahr, R.; Lutzoni, F.; Spatafora, J.W. **The Ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits**. *Systematic Biology*, 58 (2), 224 - 239, 2009.

Schulz, B.; Boyle, C. **The endophytic continuum**. *Mycological Research*, 109 (6), 661 - 686, 2005.

Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A-K.; Krohn, K. **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites**. *Mycological Research*, 106 (9), 996 - 1004, 2002.

Schwartz, R.E.; Smith, S.K.; Onishi, J.C.; Mainz, M.; Kurtz, M.; Giacobbe, R.A.; Wilson, K.E.; Liesch, J.; Zink, D.; Horn, W.; Morris, S.; Cabello, A.; Vicente, F. **Isolation and structural determination of enfumafungin, a triterpene glycoside antifungal agent that is a specific inhibitor of glucan synthesis**. *Journal of American Chemical Society*, 122 (20), 4882 - 4886, 2000.

Serena, C.; Mariné, M.; Pastor, F.J.; Nolard, N.; Guarro, J. **In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 1020 - 1023, 2005.

Sharma, S. V.; Matsuhita, N.; Ando, K.; Osaka, Y.; Tokyo, N.; Tokyo, A.; Kanda, Y. **Sh3 domain binding inhibitors**. *United States Patent Application 20050069999*, 38 p. 2005.

Shen, Y.; Du, X. Z. Z. H. Y. S. S. S. W. **Polyketones manufactured and extracted from *Dothiorella*, their preparation and application in preparation of anti-tumor drugs**. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 11 p. 2006.

Shenoy, B.D.; Jeewon, R.; Hyde, K.D. **Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi**. *Fungal Diversity*, 26, 1 - 54, 2007.

Shiono, Y.; Shimanuki, K.; Hiramatsu, F.; Koseki, T.; Tetsuya, M.; Fujisawa, N.; Kimura, K-i. **Pyrospirones A and B, apoptosis inducers in HL-60 cells, from an endophytic fungus**,

Neonectria ramulariae Wollenw **KS-246**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 6050 - 6053, **2008**.

Silva, G. H.; Telesa, H.L.; Trevisana, H. C.; Bolzani, V. S.; Young, M. C. M.; Pfenning, L.H.; Eberlind, M.N.; Haddad, R.; Neto, C. M.C.; Araújo, A.R. **New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis***. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 16 (6B), 1463 - 1466, **2005**.

Smedsgaard, J. **Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures**. *Journal of Chromatography A*, 760, 264 - 270, **1997**.

Smedsgaard, J.; Nielsen, J. **Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics**. *Journal of Experimental Botany*, 56 (410), 273 - 286, **2005**.

Sommart, U; Rukachaisirikul, V; Sukpondma, Y; Phongpaichit, S; Towatana, N. H; Graidist, P; Hajiwangoh, Z; Sakayaroj, J. **A cyclohexenone derivative from *Diaporthaceous* fungus PSU-H2**. *Archives of Pharmacological Research*, 32 (9), 1227 - 1231, **2009**.

Sørensen, D.; Larsen, T.O.; Christophersen, C.; Nielsen, P.H.; Anthoni, U. **Solistatin, an aromatic compactin analogue from *Penicillium solitum***. *Phytochemistry*, 51 (8), 1027 - 1029, **1999**.

Sørensen, J.L.; Aveskamp, M.M.; Thrane, U.; Andersen, B. **Chemical characterization of *Phoma pomorum* isolated from Danish maize**. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 310 - 317, **2010**.

Souza, C. A. **Strategies of treatment for relapsed or resistant chronic lymphocytic leukemia including to hematopoietic progenitor cell transplantation**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 27 (4), 283 - 286, **2005**.

Stadler, M.; Keller, N.P. **Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research**. *Mycological Research*, 112 (2), 127 - 130, **2008**.

Stahelin, H.F. **The history of cyclosporin A (Sandimmune) revisited: another point of view**. *Experientia*, 52, 5 - 13, **1996**.

Stajich, J.E.; Berbee, M.L.; Blackwell, M.; Hibbett, D.S.; James, T.Y.; Spatafora, J.W.; Taylor, J.W. **The Fungi**. *Current Biology*, 19 (18), 840 - 845, **2009**.

Staniek, A.; Woerdenbag, H.J.; Kayser, O. ***Taxomyces andreanae*: a presumed paclitaxel producer demystified?** *Planta Medica*, 75 (15), 1561 - 1566, **2009**.

Stevens-Miles, S.; Goetz, M.A.; Bills, G.F.; Giacobbe, R.A.; Tkacz, J.S.; Chang, R.S.L.; Mojena, M.; Martin, I.; Diez, M. T.; Pelaez, F.; Hensens, O.D.; Jones, T.; Burg, R.W.; Kong, Y.L.; Huang, L. **Discovery of an angiotensin II binding inhibitor from a *Cytospora* sp. using semi-automated screening procedures**. *The Journal of Antibiotics*, 49 (2), 119 - 123, **1996**.

Steyn, P. S.; Van Heerden, F. **Cytochalasins E and K, toxic metabolites from *Aspergillus clavatus***. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 2, 541 - 544, **1982**.

Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. **Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew**. *Science*, 260 (5105), 214 - 216, **1993**.

Strege, M.A. **High-performance liquid chromatographic–electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening**. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 725 (1), 67 - 78, **1999**.

Strobel, G. **Rainforest endophytes and bioactive products.** *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (4):315 - 333, **2002**.

Strobel, G.; Daisy, B. **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 491 - 502, **2003**.

Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R.S.; Hess, W.M. **Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*.** *Microbiology*, 142, 435 - 440, **1996**.

Suryanarayanan, T. S.; Murali, T. S.; Venkatesan, G. **Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient.** *Canadian Journal of Botany*, 80 (8), 818 - 826, **2002**.

Sutton, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata.** Kew, London, Commonwealth Mycological Institute, 696 p. **1980**.

Svendsen, A.; Frisvad, J.C. **A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites.** *Mycological Research*, 98 (11), 1317 - 1328, **1994**.

Sydenham, W. R.; Thiel, P.G.; Marasas, W.F.O.; Shephard, G.S.; Van Schalkwyk, D.J.; Koch, K.R. **Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (10), 1900 - 1903, **1990**.

Tan, R.X.; Zou, W.X. **Endophytes: a rich source of functional metabolites.** *Natural Products Reports*, 18, 448 - 459, **2001**.

Tfelt-Hansen, P.; Saxena, P.R.; Dahlof, C.; Pascual, J.; Láinez, M.; Henry, P.; Diener, H.C.; Schoenen, J.; Ferrari, M.D.; Goadsby, P.J. **Ergotamine in the acute treatment of migraine: a review and European consensus.** *Brain*, 123, 9 - 18, **2000**.

Than, K. A.; Stevens, V.; Knill, A.; Gallagher, P. F.; Gaul, K. L.; Edgar, J. A.; Colegate, S. M. **Plant-associated toxins in animal feed: screening and confirmation assay development.** *Animal Feed Science and Technology*, 121, 5 - 21, **2005**.

Thomma, B. P. H. J. ***Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite.** *Molecular Plant Pathology*, 4 (4), 225 - 236, **2003**.

Thrane, U.; Adler, A.; Clasen, P.E.; Galvano, F.; Langseth, W.; Lew, H.; Logrieco, A.; Nielsen, K. F.; Ritieni, A. **Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*.** *International Journal of Food Microbiology*, 95, 257 - 266, **2004**.

Thrane, U.; Poulsen, S.B.; Nirenberg, H.I.; Lieckfeldt, E. **Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms.** *FEMS Microbiology Letters*, 203, 249 - 255, **2001**.

Tiemann, U.; Tomeka, W.; Schneidera, F.; Müller, M.; Pöhlanda, R.; Vanselowb, J. **The mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether negatively affect progesterone synthesis in porcine granulosa cells *in vitro*.** *Toxicology Letters*, 186, 139 - 145, **2009**.

Tobert, J.A. **Lovastatin and beyond: the history of the hmg-coa reductase inhibitors.** *Nature Reviews*, 2, 517 - 526, **2006**.

Tomoda, H.; Namatame, I.; Si, S.; Kawaguchi, K.; Masuma, R.; Namikoshi, M.; Omura, S. **Phenochalasin, inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Phomopsis* sp. FT-0211.** *The Journal of Antibiotics*, 52 (10), 851 - 856, **1999 a**.

Tomoda, H.; Namatame, I.; Tabata, N.; Kawaguchi, K.; Si, S.; Omura, S. **Structure elucidation of fungal phenochalasin, novel inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages.** *The Journal of Antibiotics*, 52 (10), 857 - 861, 1999 b.

Usui, T.; Kondoh, M.; Cui, C-B.; Mayumi, T.; Osada, H. **Tryprostatin A, a specific and novel inhibitor of microtubule assembly.** *Biochemical Journal*, 333, 543 - 548, 1998.

VanMiddlesworth, F.; Cannell, R. J. P. Dereplication and partial identification of natural products. In: **Methods in biotechnology Vol. 4- Natural Products Isolation.** Totowa, NJ. Humana Press, 279 - 327, 1998.

Vicente, F.; Basilio, A.; Platas, G.; Collado, J.; Billsa, G.F.; Del Vala, A.G.; Martín, J.; Tormo, J.R.; Harris, G.H.; Zink, D.L.; Justice, M.; Kahn, J.N.; Peláez, F. **Distribution of the antifungal agents sordarins across filamentous fungi.** *Mycological Research*, 113, 754 - 770, 2009.

Vicente, F.; Basilio, A.; Cabello, A.; Peláez, F. **Microbial natural products as a source of antifungals.** *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 15 - 32, 2003.

Vila, F. C.; Colombo, R.; Lira, T. O.; Yariwake, J. H. **HPLC Microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L.** *Journal of Brazilian Chemical Society*, 19 (5), 903 - 908, 2008.

Wagenaar, M.M. **Pre-fractionated microbial samples – the second generation natural products library at Wyeth.** *Molecules*, 13, 1406 - 1426, 2009.

Wagenaar, M.M.; Clardy, J. **Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint.** *Journal of Natural Products*, 64 (8), 1006 - 1009, 2001.

Weber, D.; Sterner, O.; Anke, T.; Gorzalczancy, S.; Martino, V.; Acevedo, C. **Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*.** *The journal of Antibiotics*, 57 (9), 559 - 563, 2004.

Weber, R.W.S.; Kappe, R.; Paululat, T.; Mösker, E.; Anke, H. **Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi.** *Phytochemistry*, 68 (6), 886 - 892, 2007.

Webster J.; Weber R.W.S. **Introduction to Fungi.** 3rd. ed. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 841 p, 2007.

Wolfender, J.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. **Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites.** *Journal of Chromatography A*, 1000, 437 - 455, 2003.

Wolff, J-C.; Eckers, C.; Sage, A.B.; Giles, K.; Bateman, R. **Accurate mass liquid chromatography/mass spectrometry on quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass analyzers using switching between separate sample and reference sprays. 2. applications using the dual-electrospray ion source.** *Analytical Chemistry*, 73 (11), 2605 - 2612, 2001.

World Health Organization International Agency for Research on Cancer. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, v.56, 33p., 1997.

Wu, S.; Chen, Y.; Shao, S.; Wang, L.; Li, Z.; Yang, L.; Li, S.; Huang, R. **Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*.** *Journal of Natural Products*. 71 (4), 731 - 734, 2008.

Xu, J; Kjer, J; Sendker, J; Wray, V; Guan, H; Edrada, R; Müller, W. E. G; Bayer, M; Lin, W; Wud, J; Proksch, P. **Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 7362 - 7367, **2009**.

Xu, Q; Wang, J; Huang, Y; Zheng, Z; Song, S; Zhang, Y; Su, W. **Metabolites from mangrove endophytic fungus *Dothiorella* sp.** *Acta Oceanologica Sinica*, 23(3), 541 – 547, **2004**.

Yu, B.; Zhang, G.; Du, Z.; Zheng, Y.; Xu, J.; Luo, X. **Phomoeuphorbins A–D, azaphilones from the fungus *Phomopsis euphorbiae*.** *Phytochemistry*, 69, 2523 - 2526, **2008**.

Yu, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zheng, C.; Guo, L.; Li, W.; Sun, P.; Qin, L. **Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes.** *Microbiological Research*, doi:10.1016/j.micres.2009.11.009, **2010**.

Zhan, Y.; Du, X.; Chen, H.; Liu, J.; Zhao, B.; Huang, D.; Li, G.; Xu, Q.; Zhang, M.; Weimer, B. C.; Chen, D.; Cheng, Z.; Zhang, L.; Li, Q.; Li, S.; Zheng, Z.; Song, S.; Huang, Y.; Ye, Z.; Su, W.; Lin, S.; Shen, Y.; Wu, Q. **Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77.** *Nature Chemical Biology*, 4 (9), 549 - 556, **2008**.

Zhang, Y.; Yeh, J.R.; Mara, A.; Ju, R.; Hines, J.F.; Cirone, P.; Griesbach, H.L.; Schneider, I.; Slusarski, D.C.; Holley, S.A.; Crews, C.M. **A chemical and genetic approach to the mode of action of fumagillin.** *Chemistry & Biology*, 13, 1001 - 1009, **2006**.

Zhang, Yi.; Mu, J.; Feng, Y.; Kang, Y.; Zhang, J.; Gu, P.; Wang, Y.; Ma, L.; Zhu, Y. **Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy.** *Marine Drugs*, 7, 97 - 112, **2009**.

Zhang, L.; Yan, K.; Zhang, Y.; Huang, R.; Bian, J.; Zheng, C.; Sun, H.; Chen, Z.; Sun, N.; An, R.; Min, F.; Zhao, W.; Zhuo, Y.; You, J.; Song, Y.; Yu, Z.; Liu, Z.; Yang, K.; Gao, H.; Dai, H.; Zhang, X.; Wang, J.; Fu, C.; Pei, G.; Liu, J.; Zhang, S.; Goodfellow, M.; Jiang, Y.; Kuai, J.; Zhou, G.; Chen, X. **High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (11), 4606 - 4611, **2007**.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

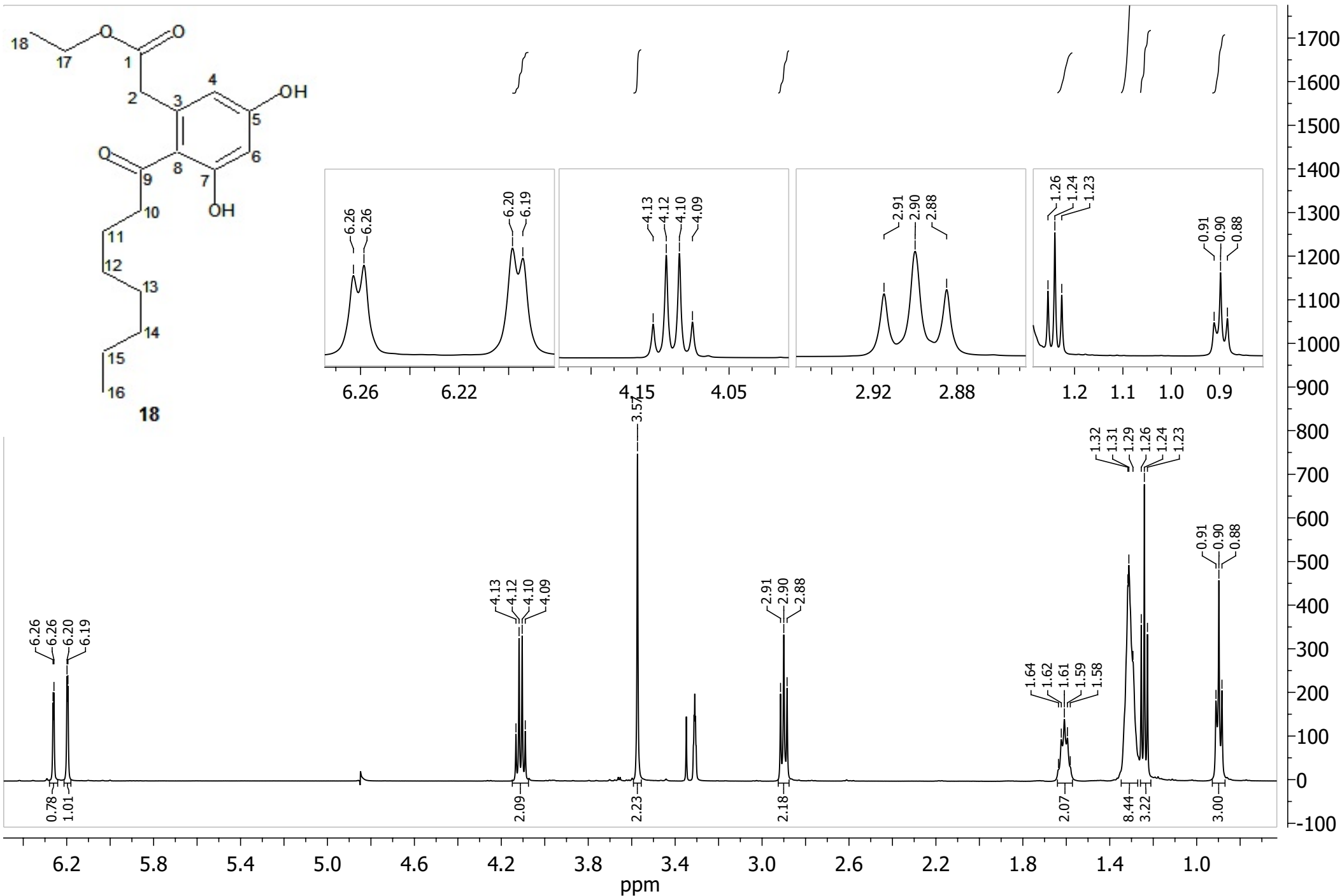
Lucas Magalhães de Abreu

**PERFILAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, PROSPECÇÃO
QUÍMICA E ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DE FUNGOS ENDÓFITOS**

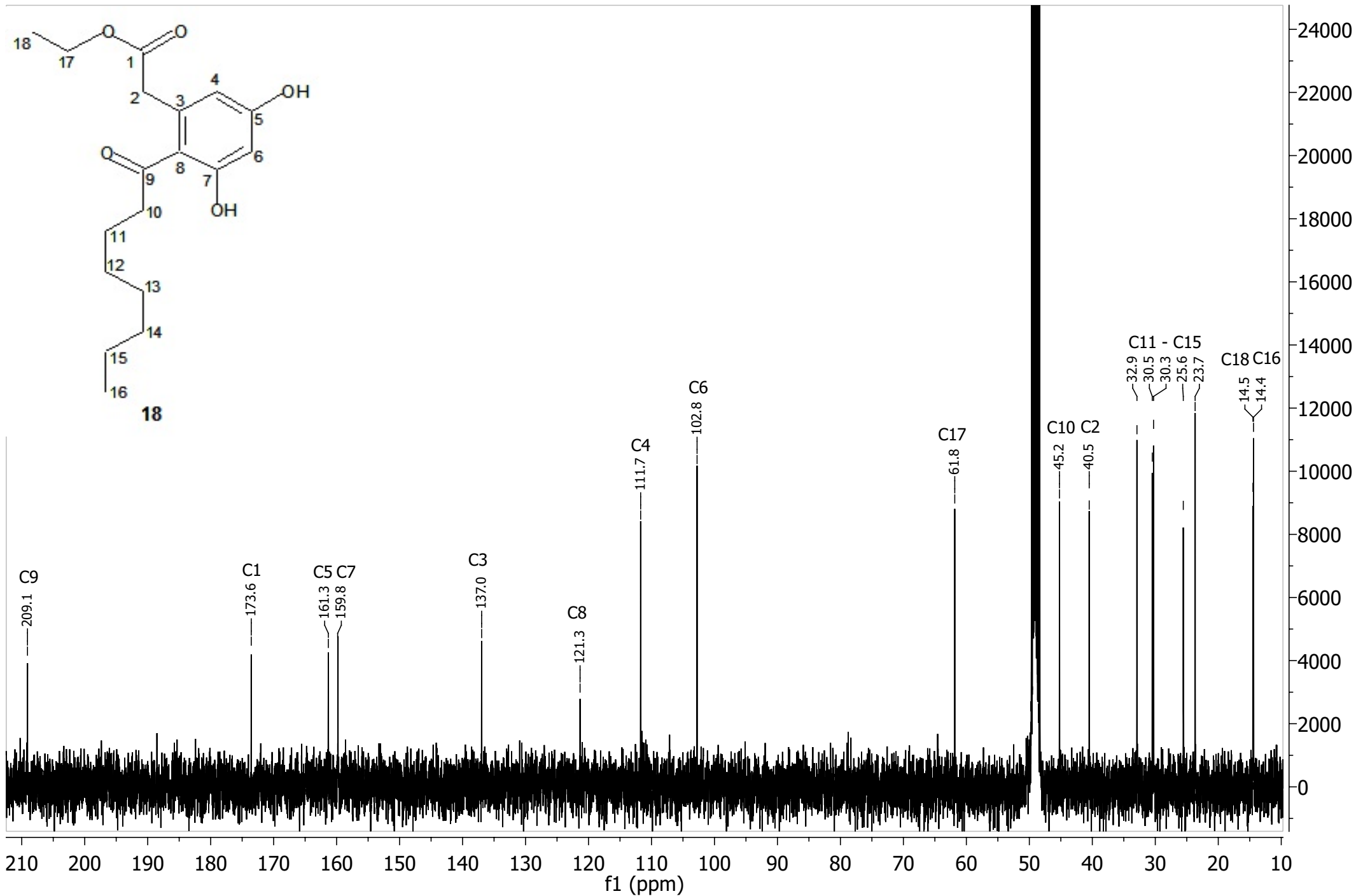
- 1. Apêndices – dados de RMN das substâncias isoladas**
- 2. Artigo publicado**

Belo Horizonte

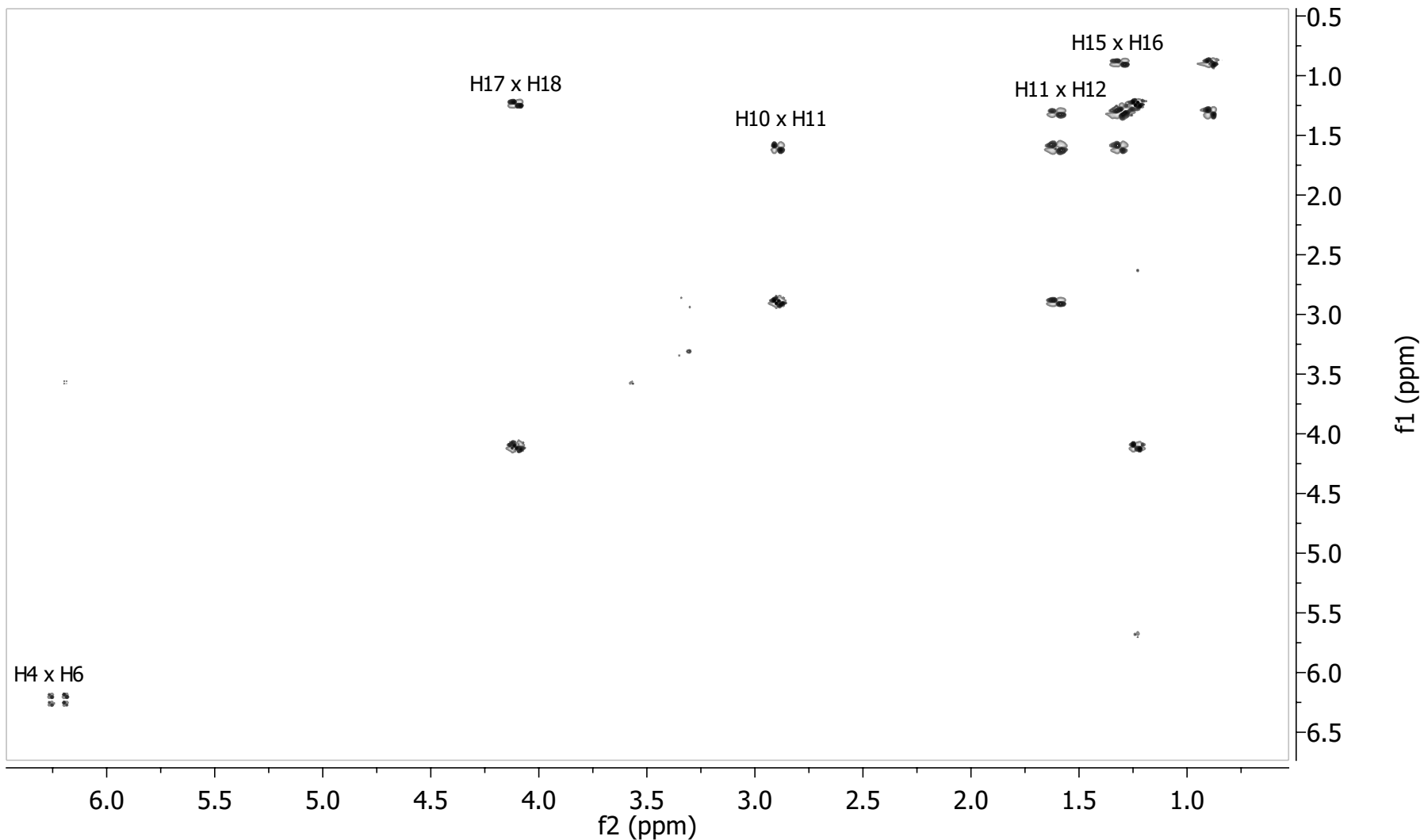
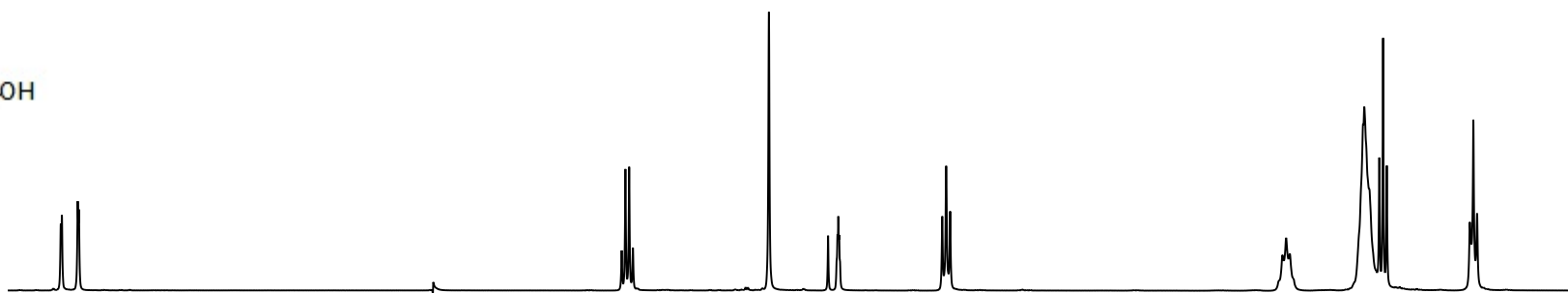
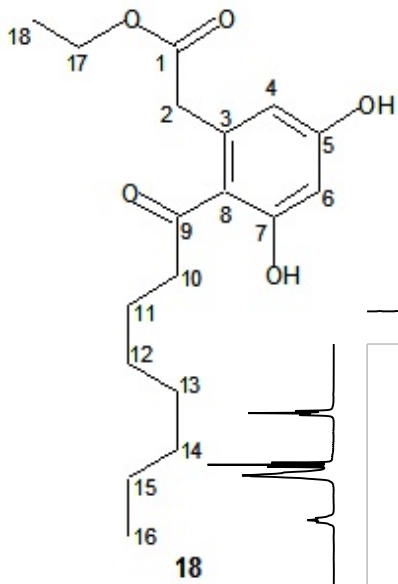
2010



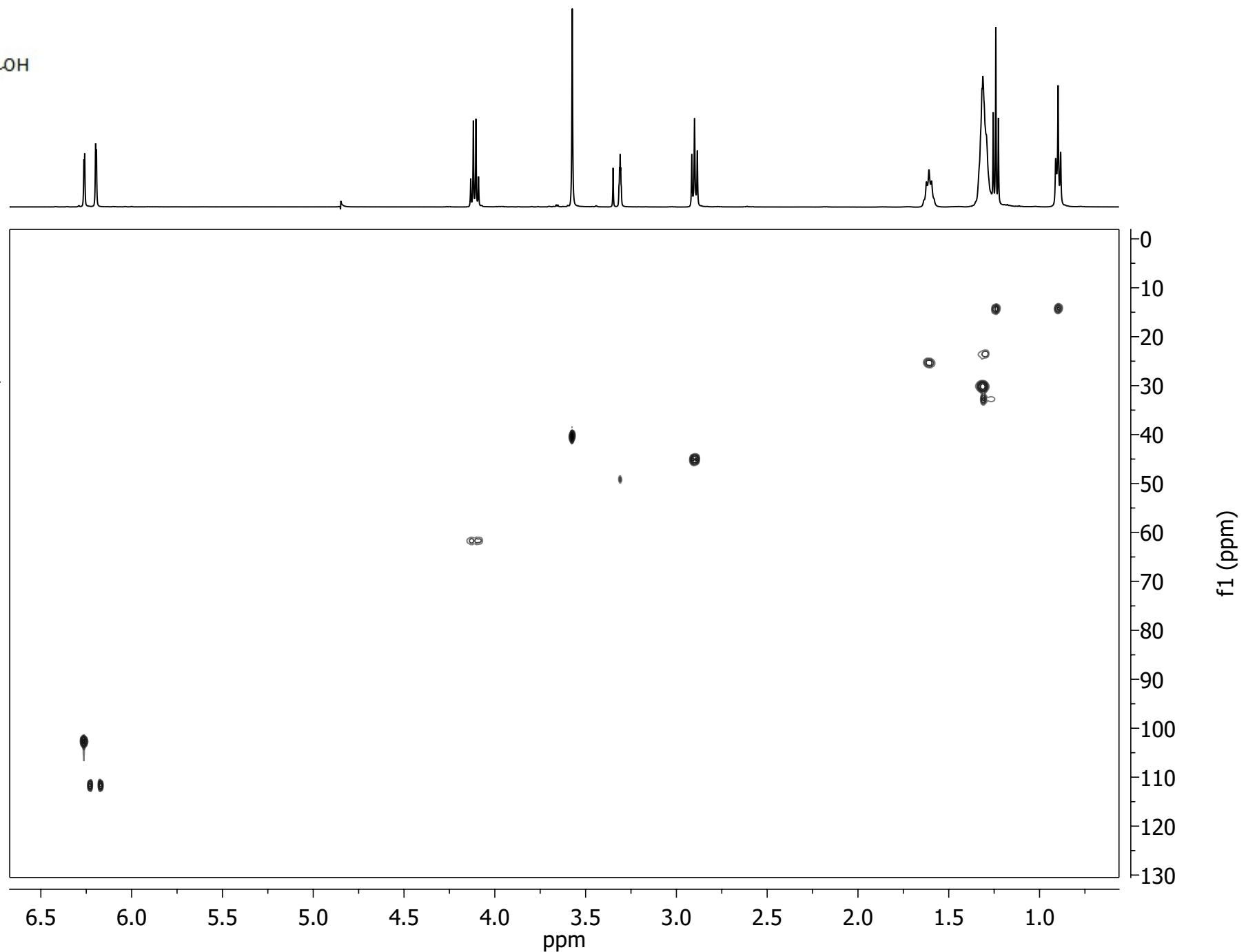
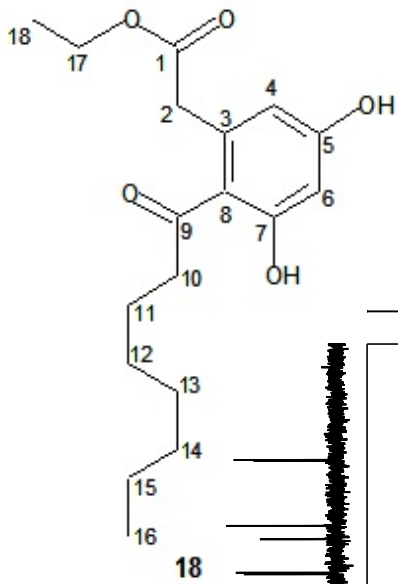
Apêndice 1.1: Espectro de RMN de ^1H [CD $_3$ OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)**



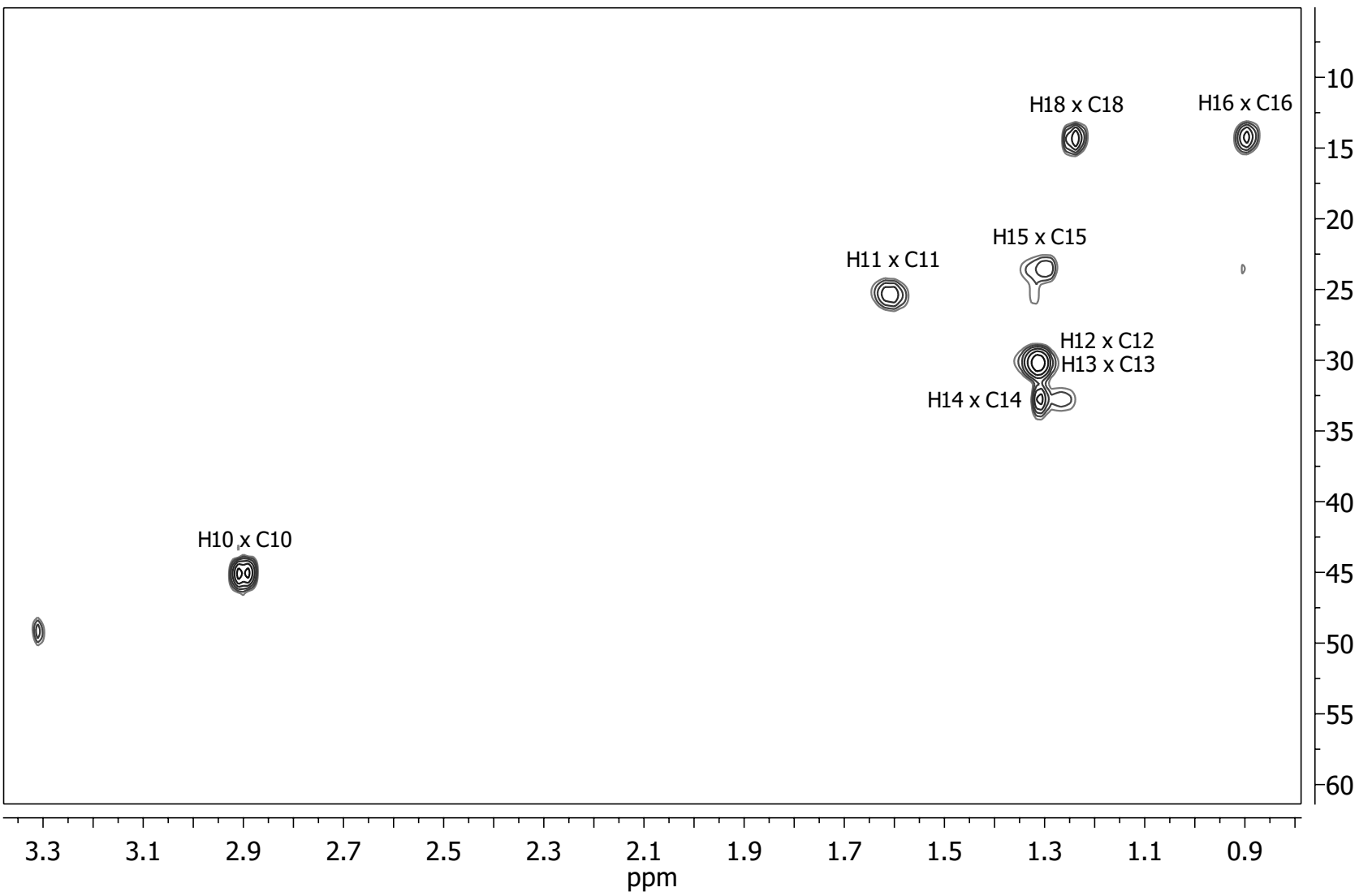
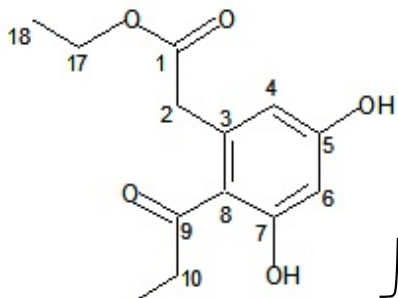
Apêndice 1.2: Espectro de RMN de ¹³C [CD₃OD, 100 MHz] de **CYT_05_02 (18)**



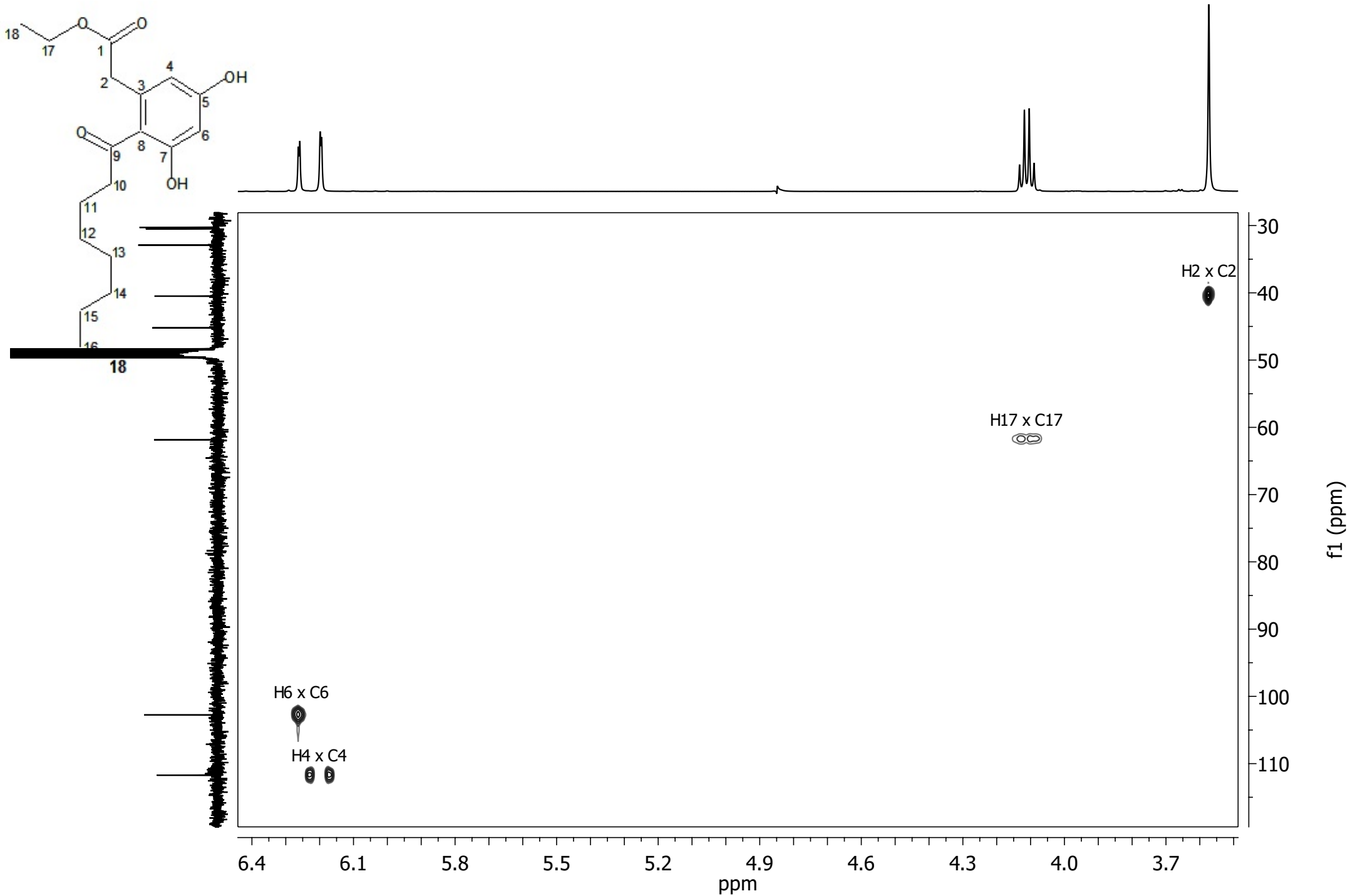
Apêndice 1.3 - Mapa de contornos COSY [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT05_02 (18)**



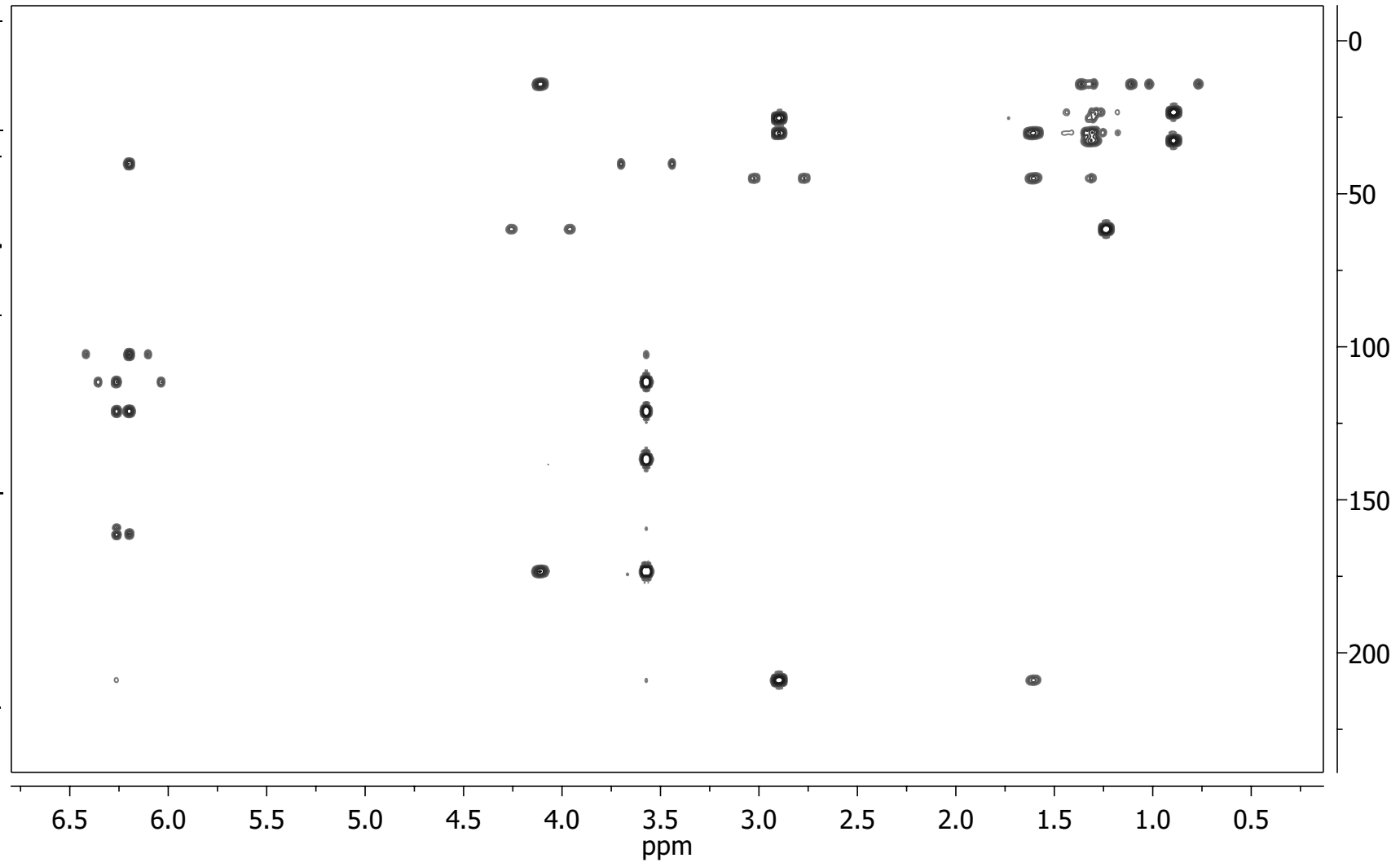
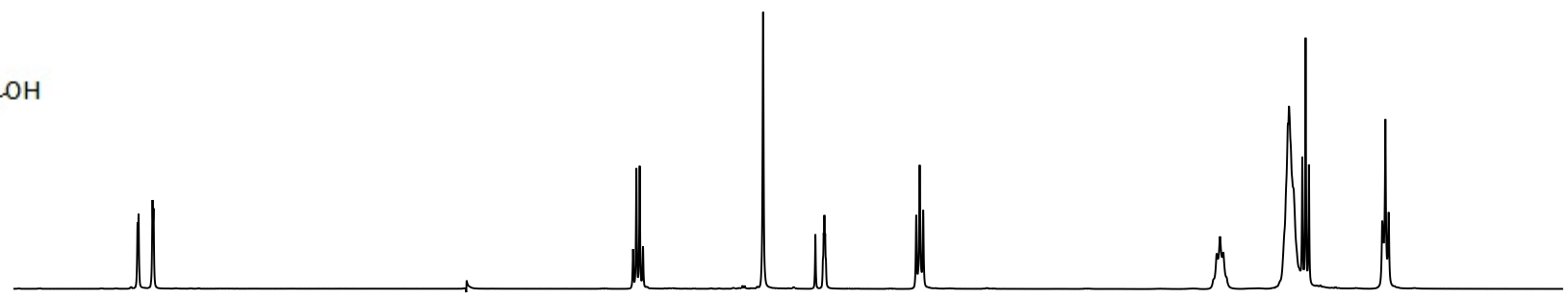
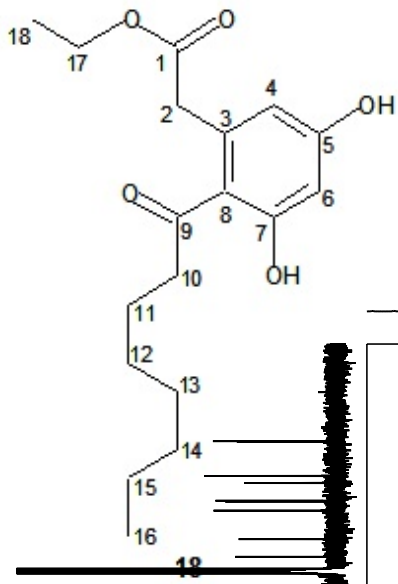
Apêndice 1.4 - Mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)**



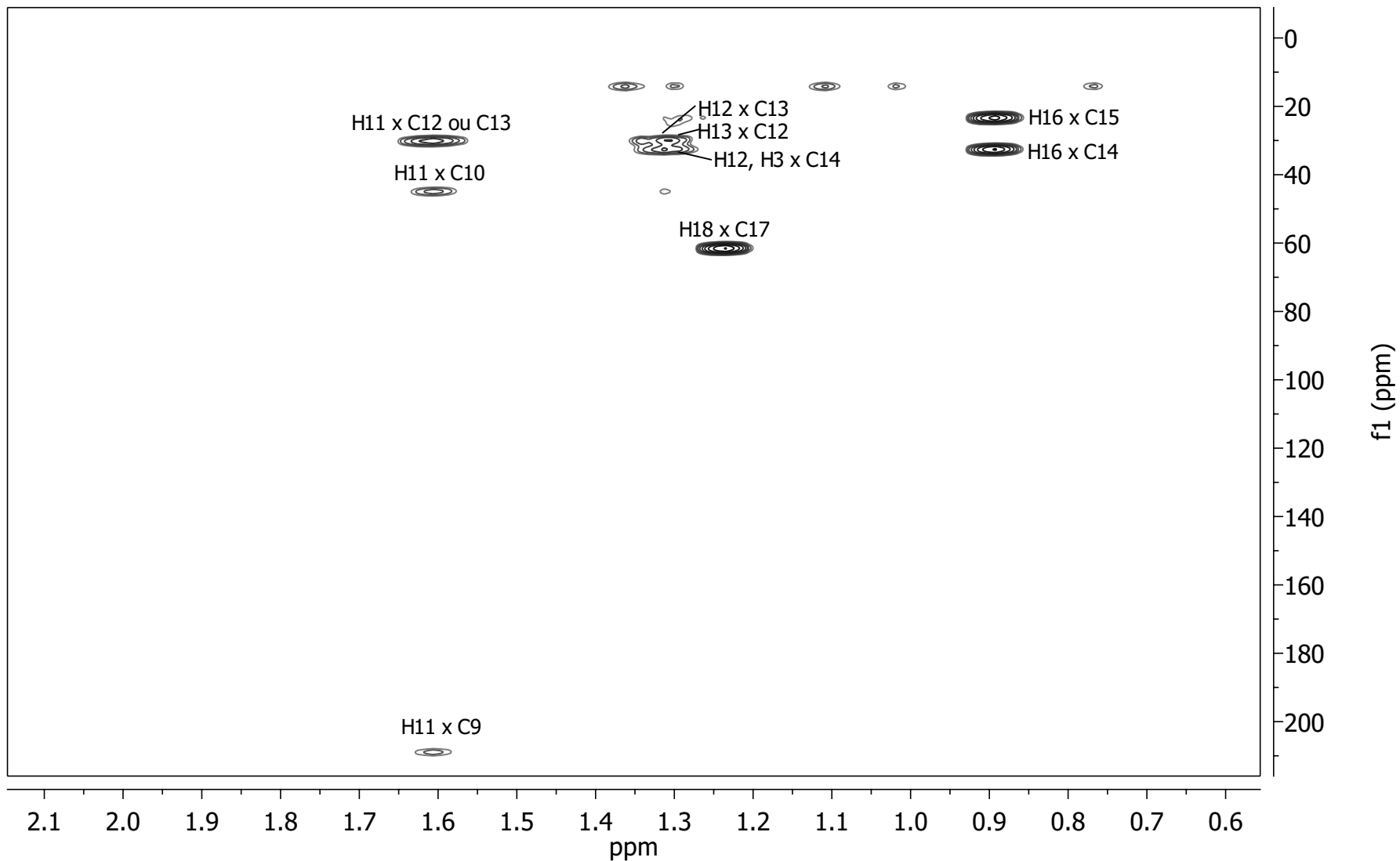
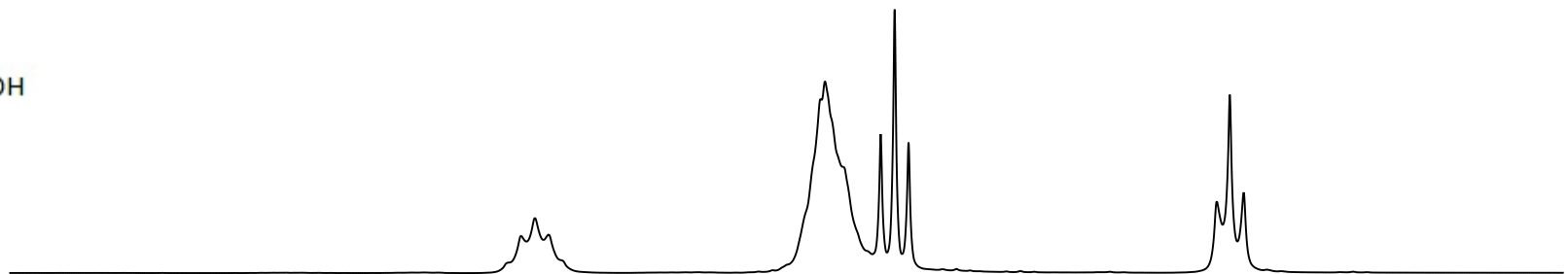
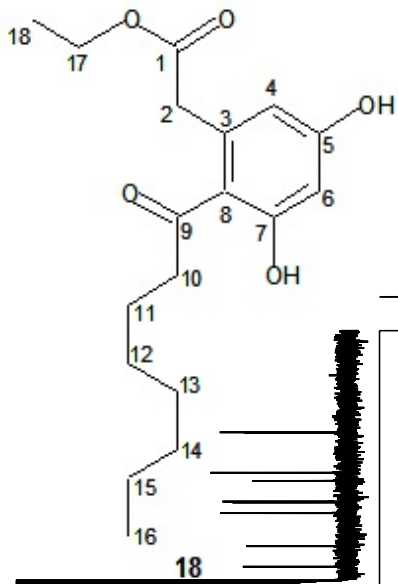
Apêndice 1.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)** entre δ_H 0,80 e 3,35



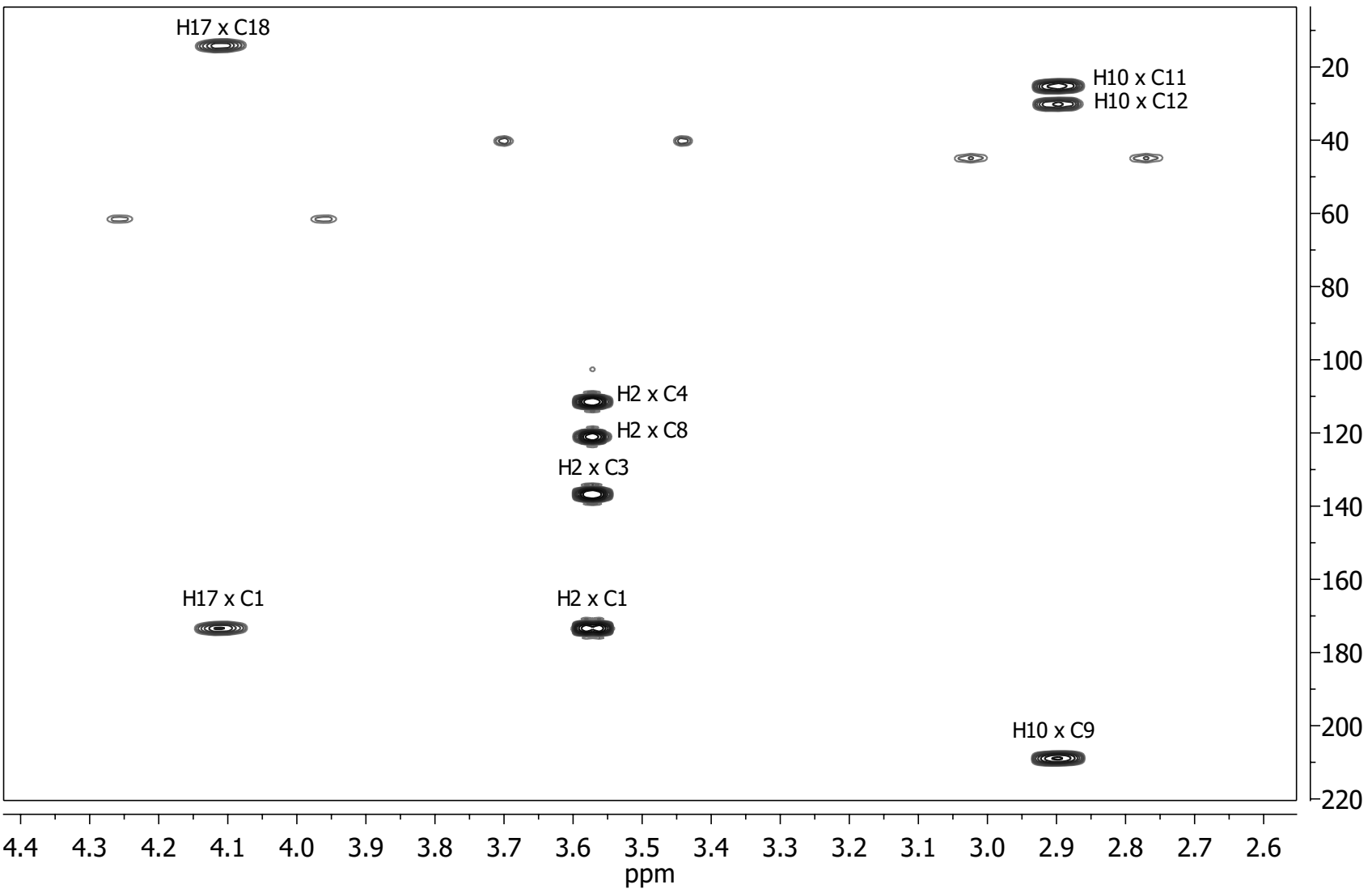
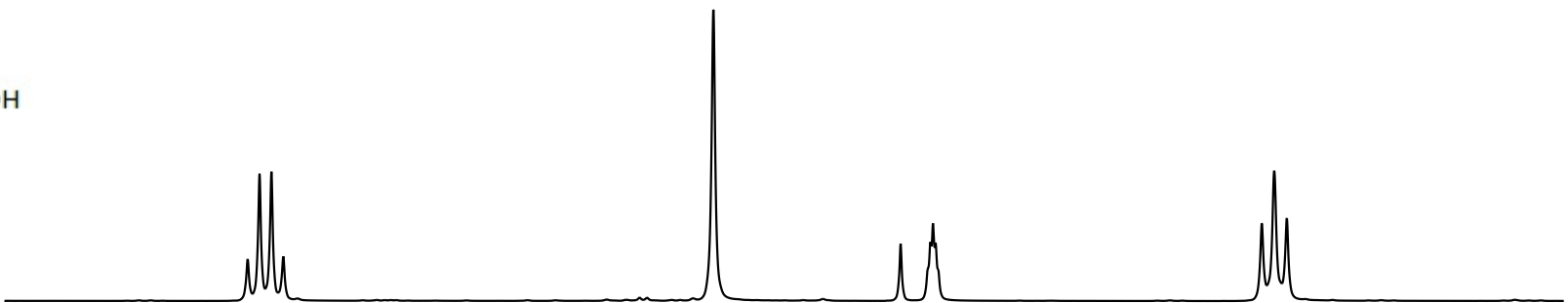
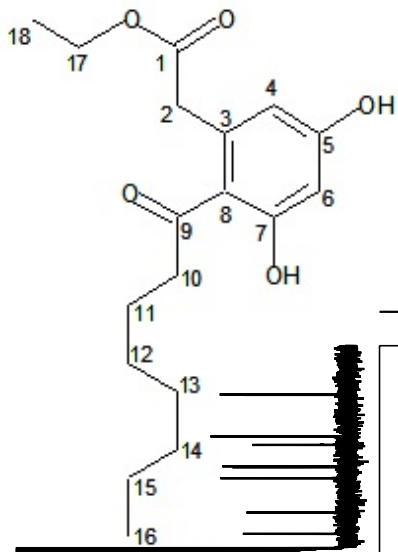
Apêndice 1.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)** entre δ_H 3,50 e 6,40



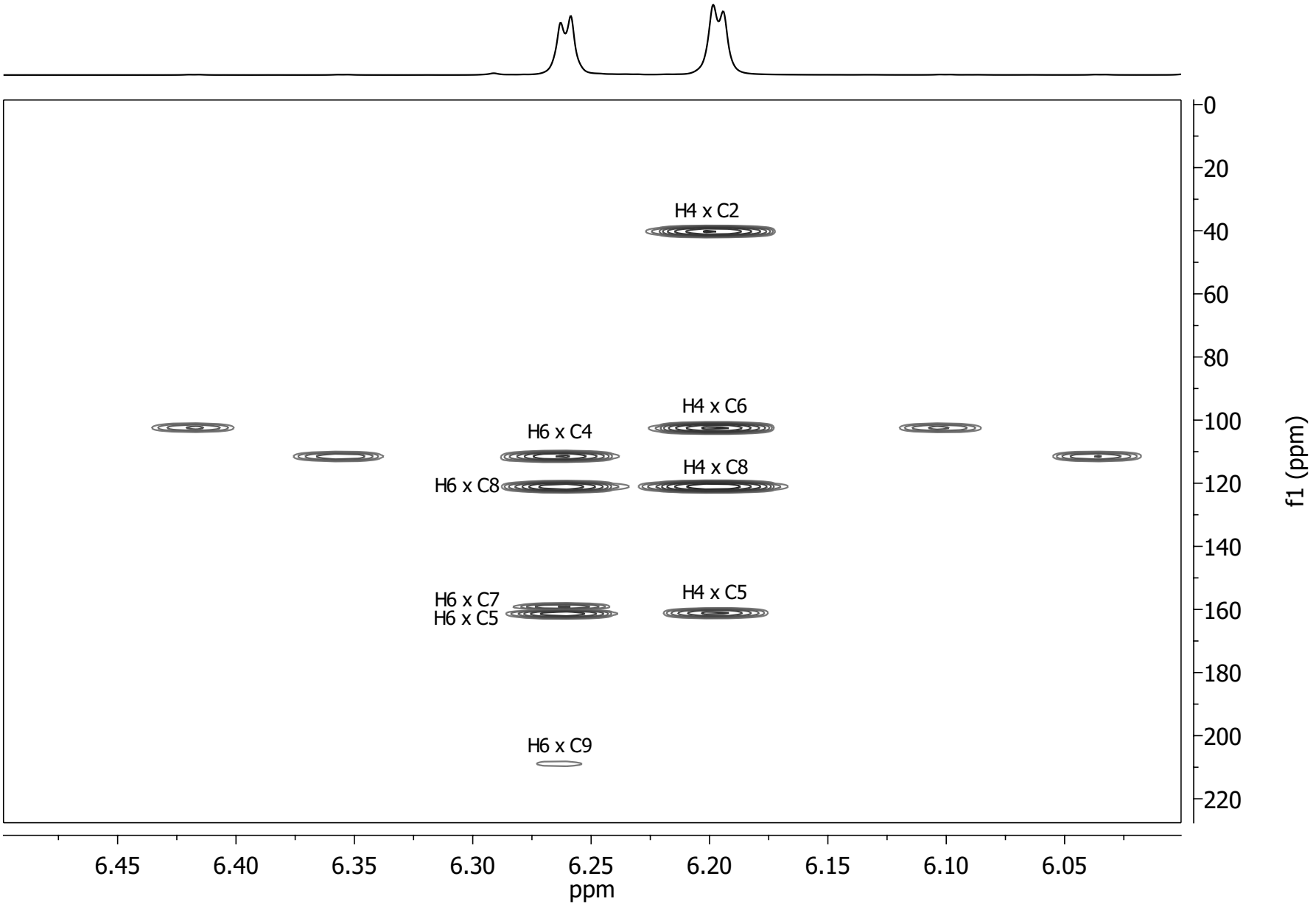
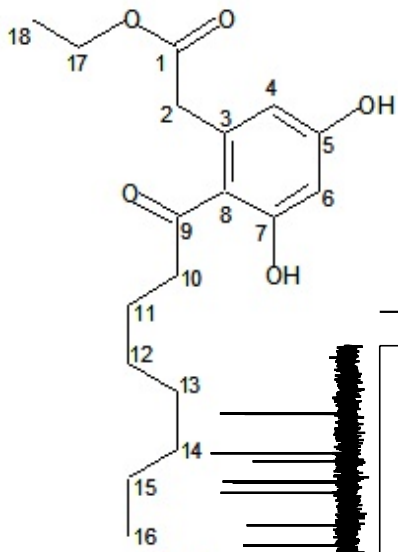
Apêndice 1.7 - Mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)**



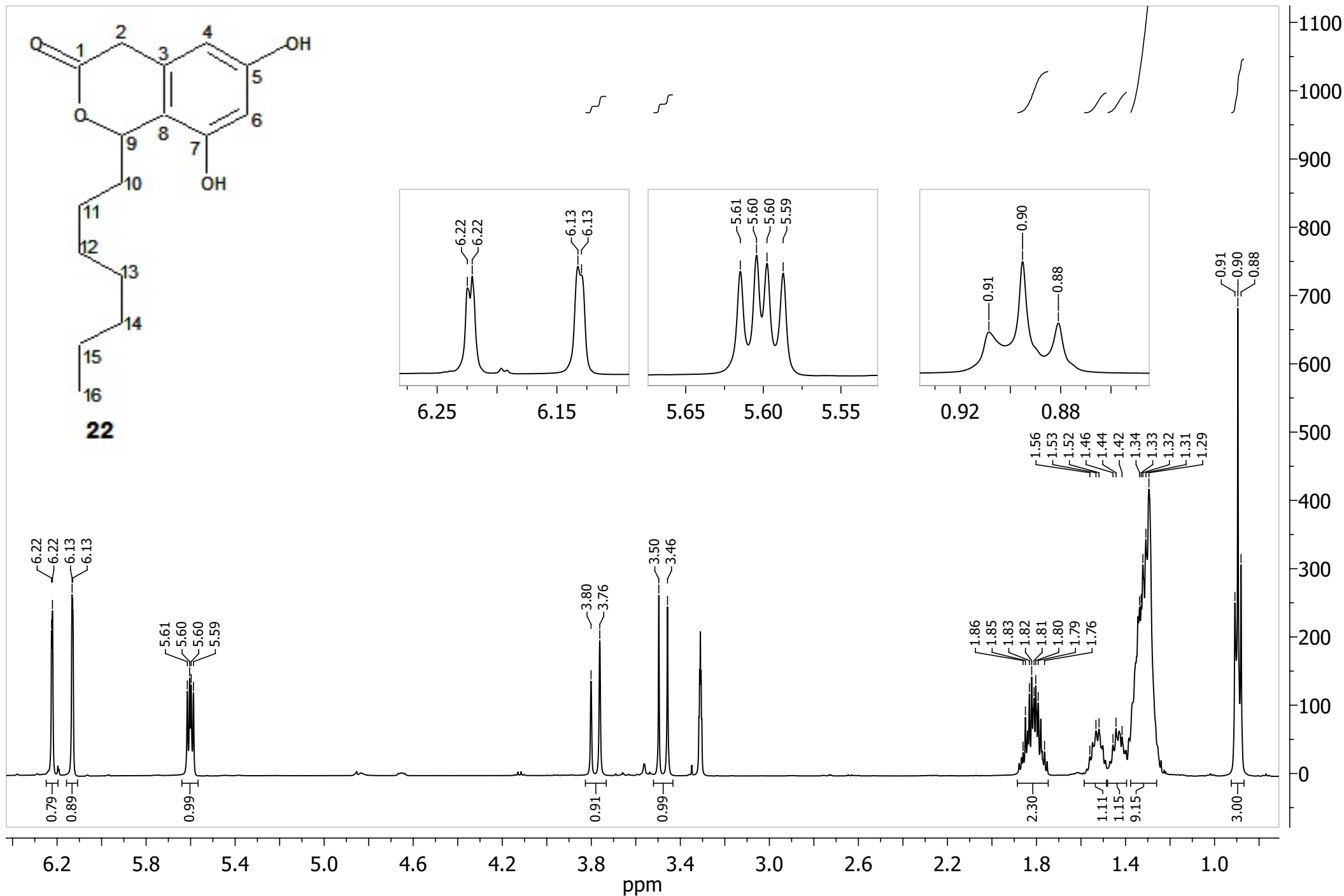
Apêndice 1.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD_3OD , 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)** entre δ_{H} 0,60 e 2,10



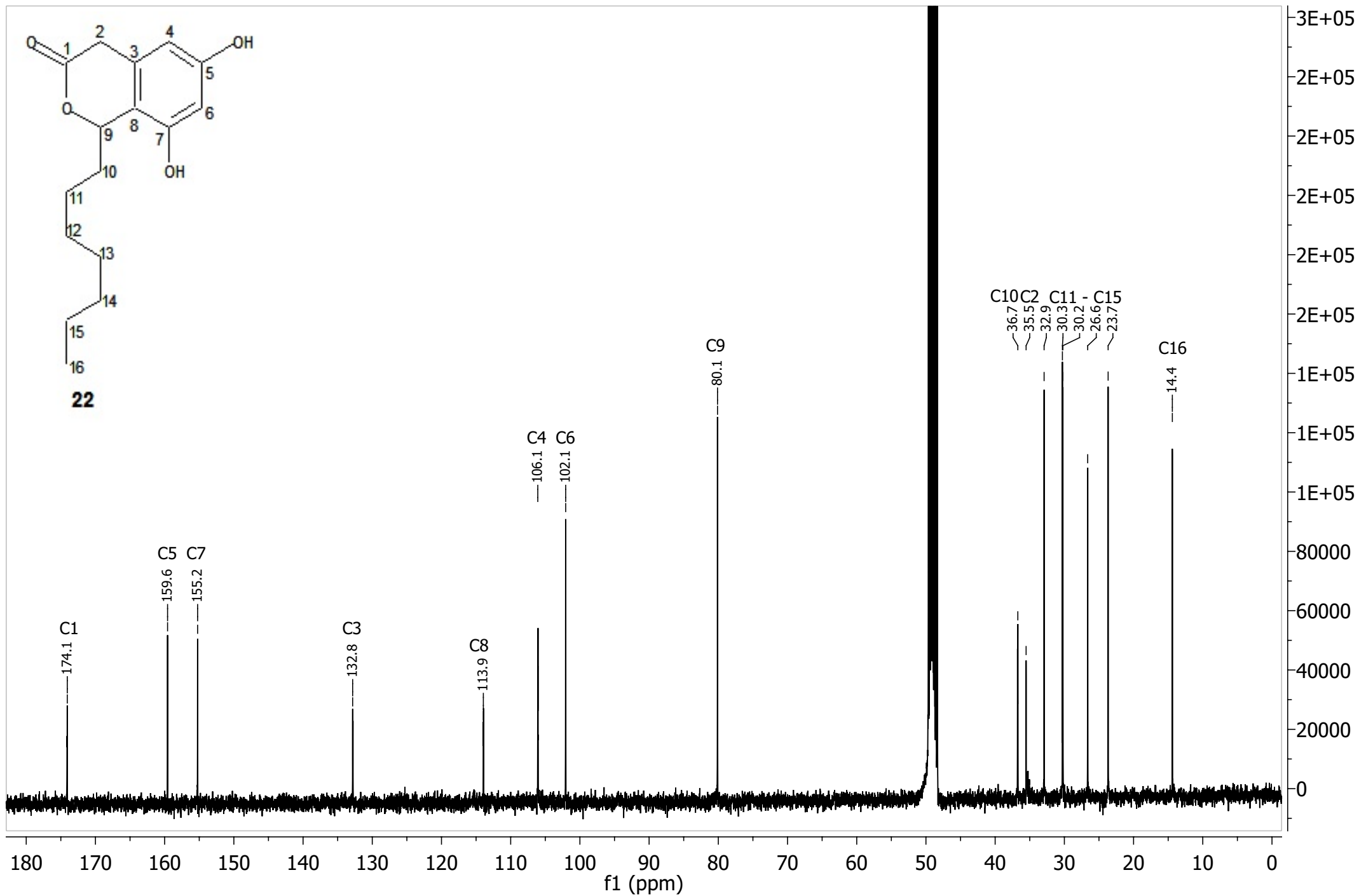
Apêndice 1.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)** entre δ_H 2,60 e 4,40



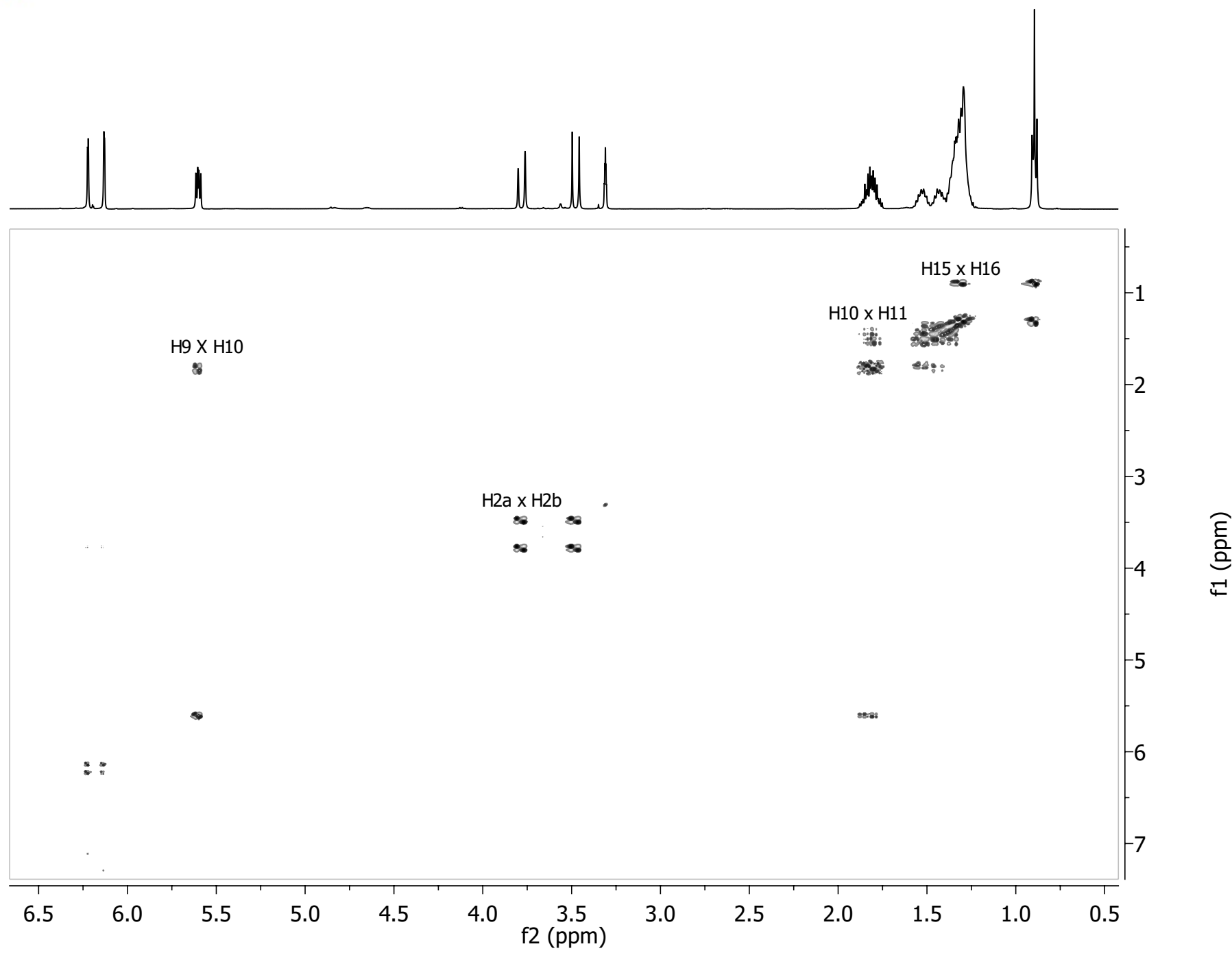
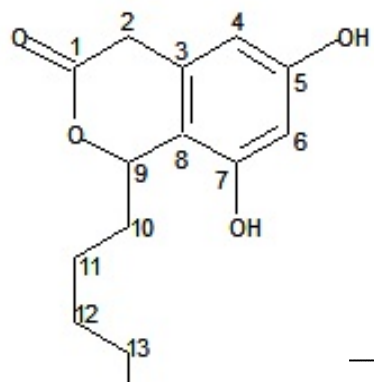
Apêndice 1.10 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_05_02 (18)** entre δ_H 6,07 e 6,40



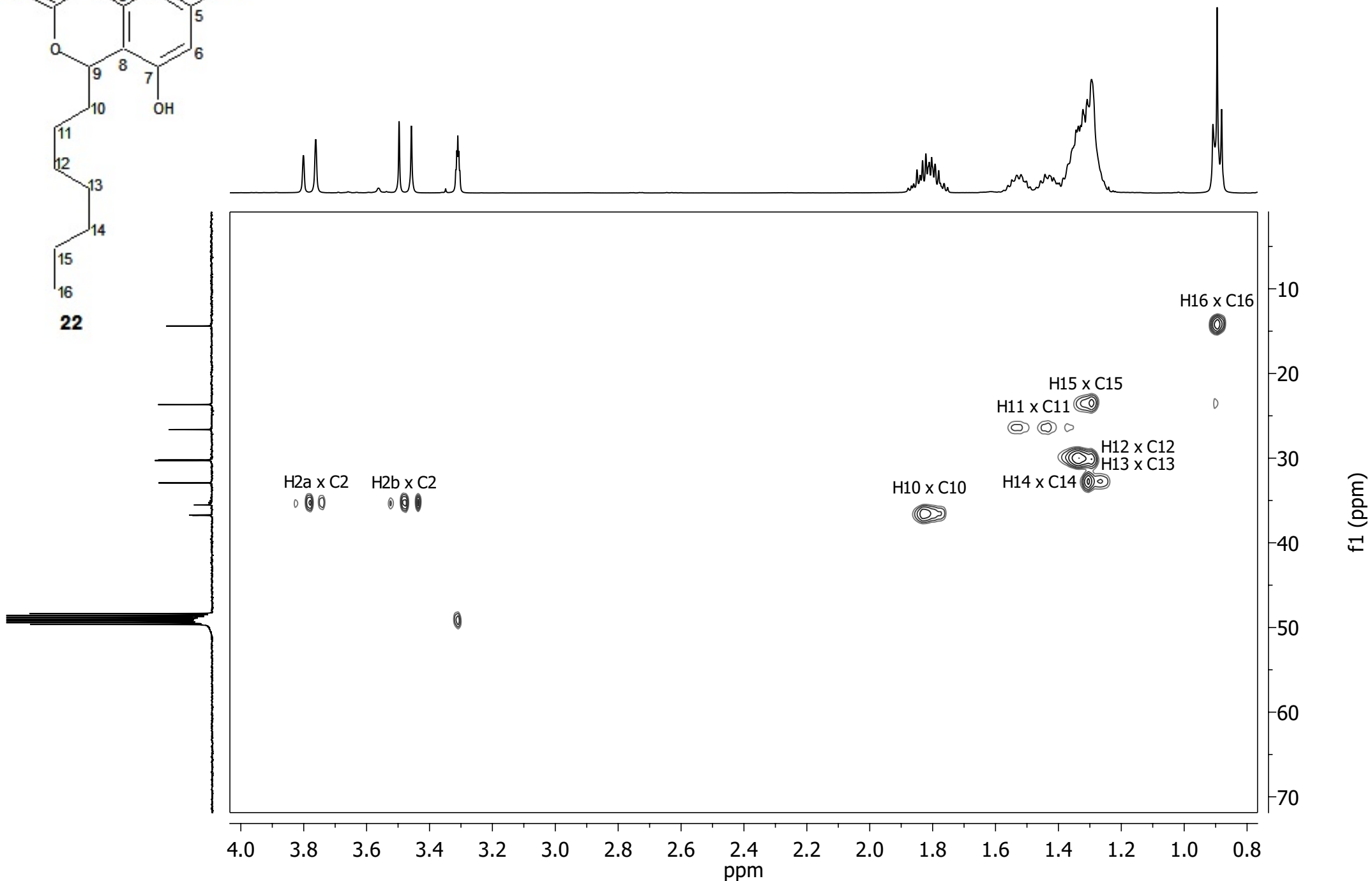
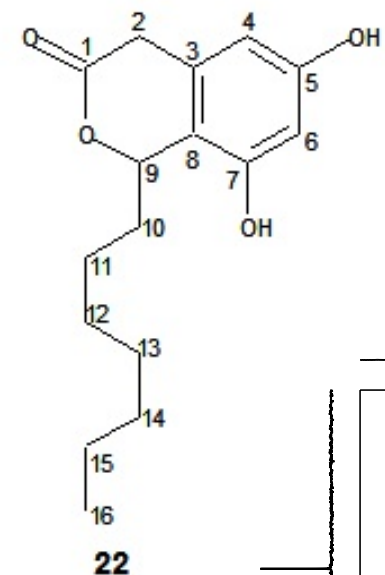
Apêndice 2.1: Espectro de RMN de ¹H [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_06_02 (22)**



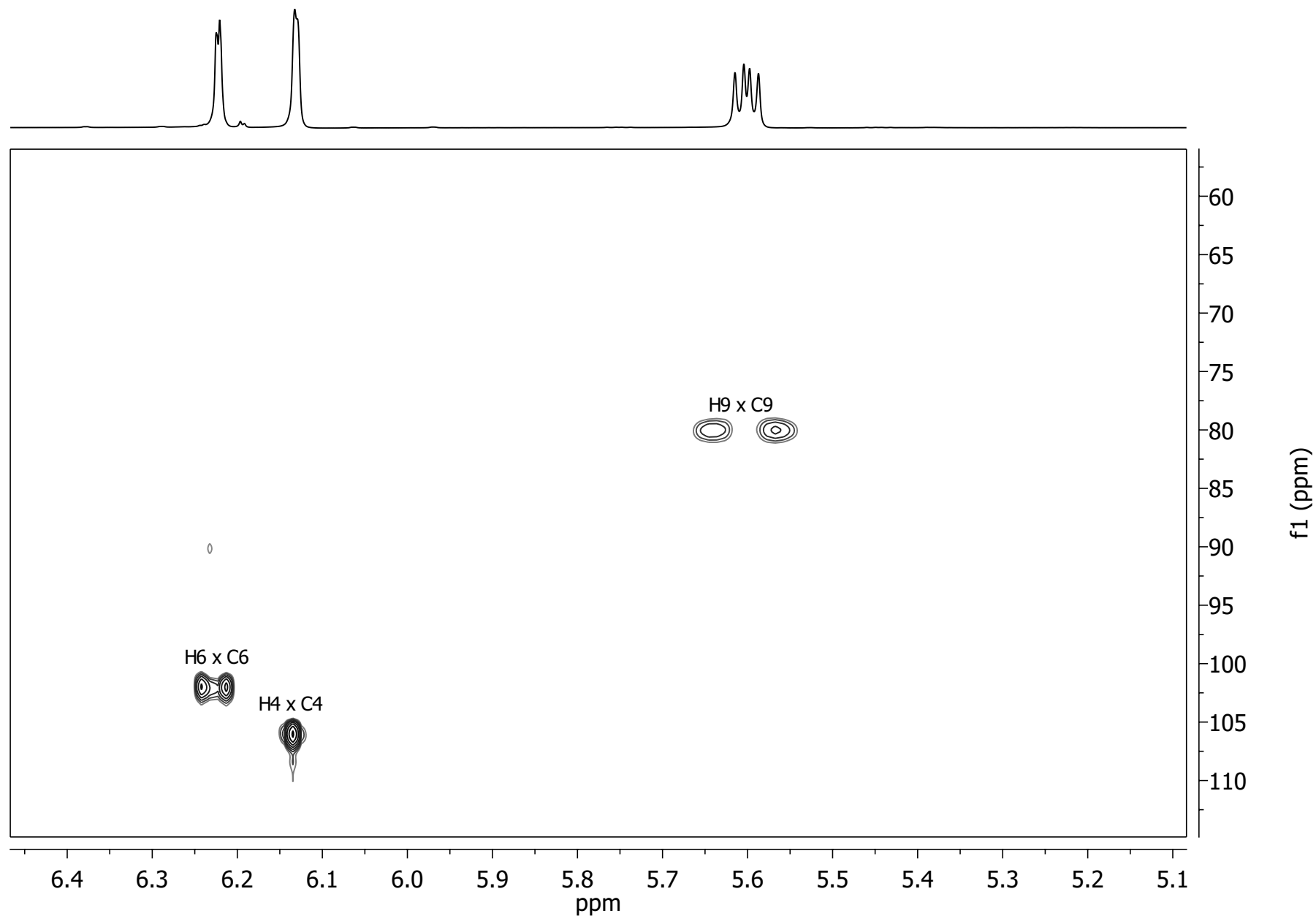
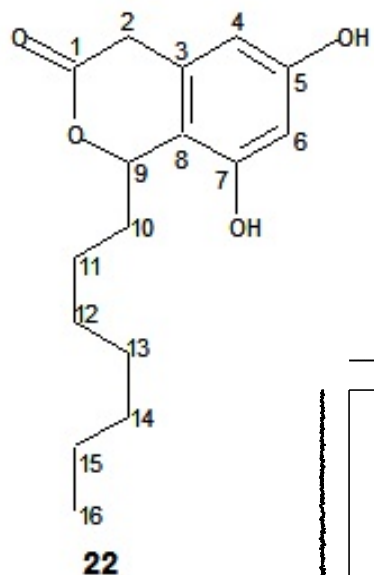
Apêndice 2.2: Espectro de RMN de ^{13}C [CD₃OD, 100 MHz] de **CYT_06_02 (22)**



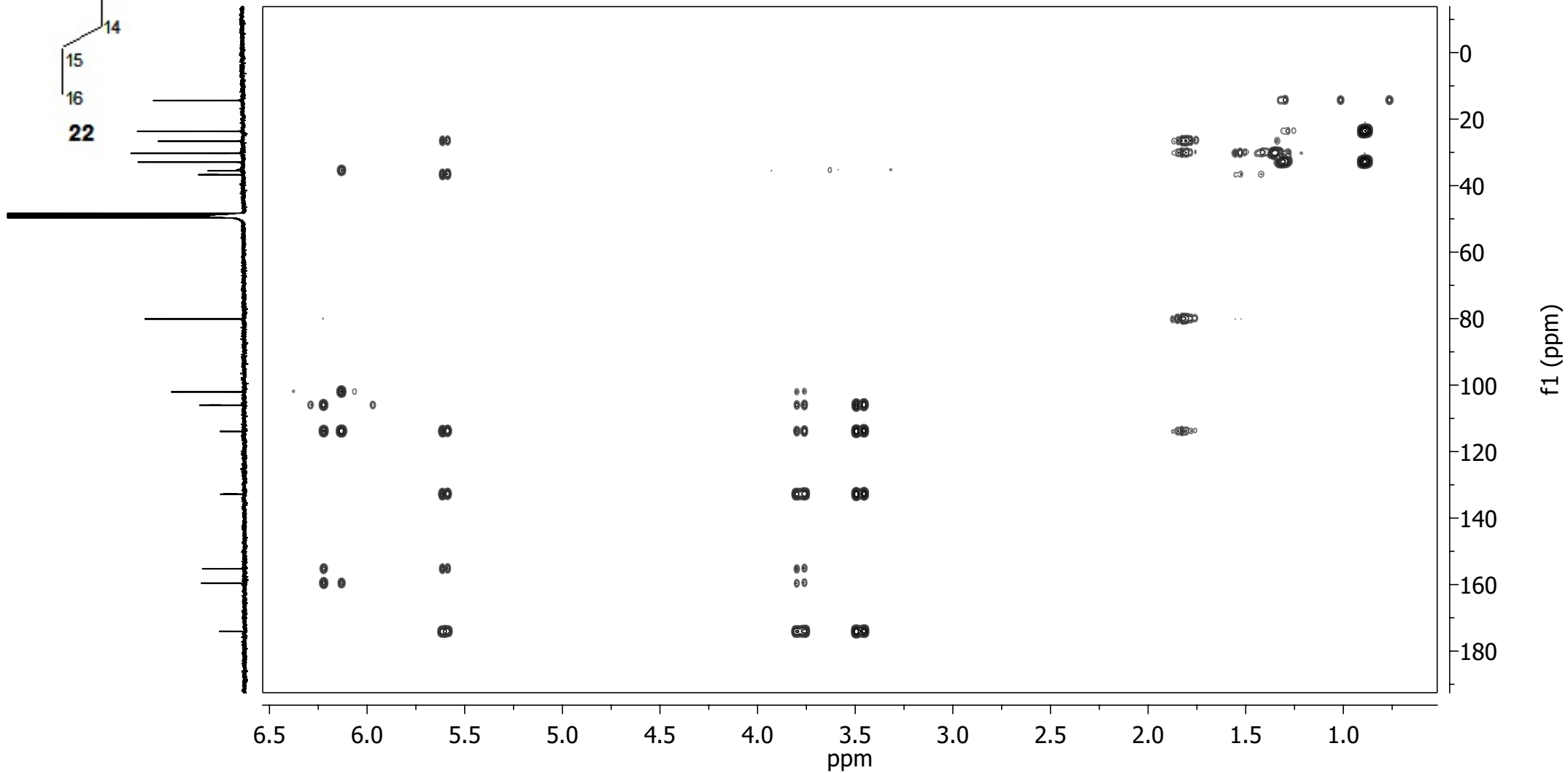
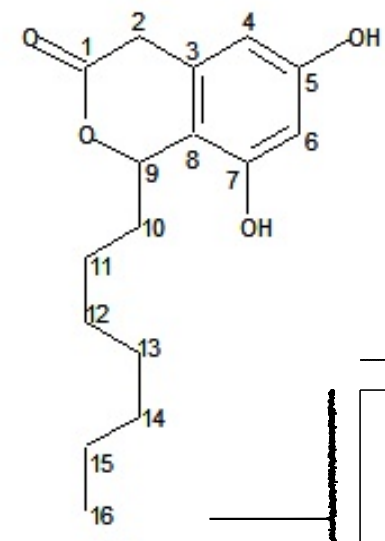
Apêndice 2.3 - Mapa de contornos COSY [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT06_02 (22)**



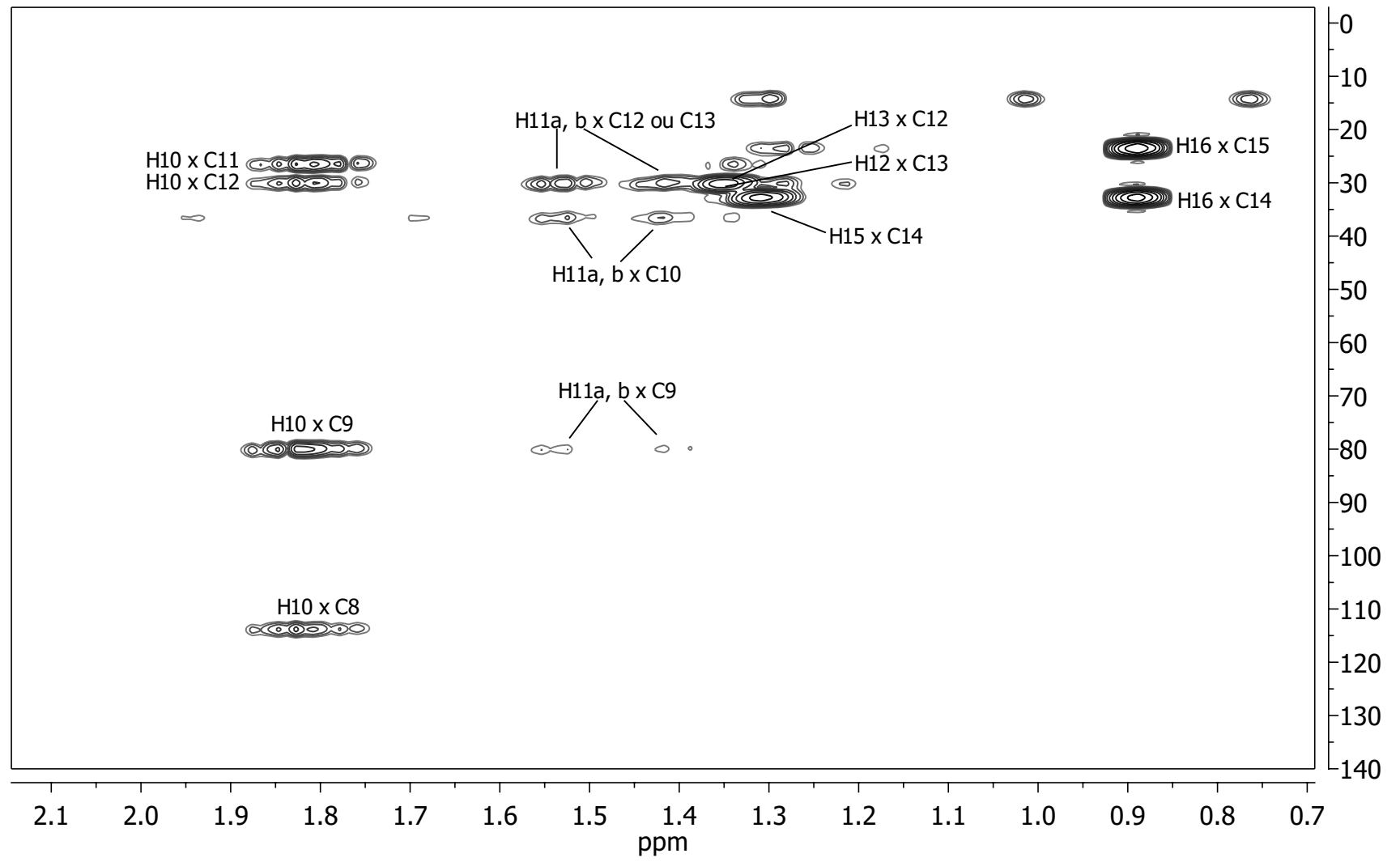
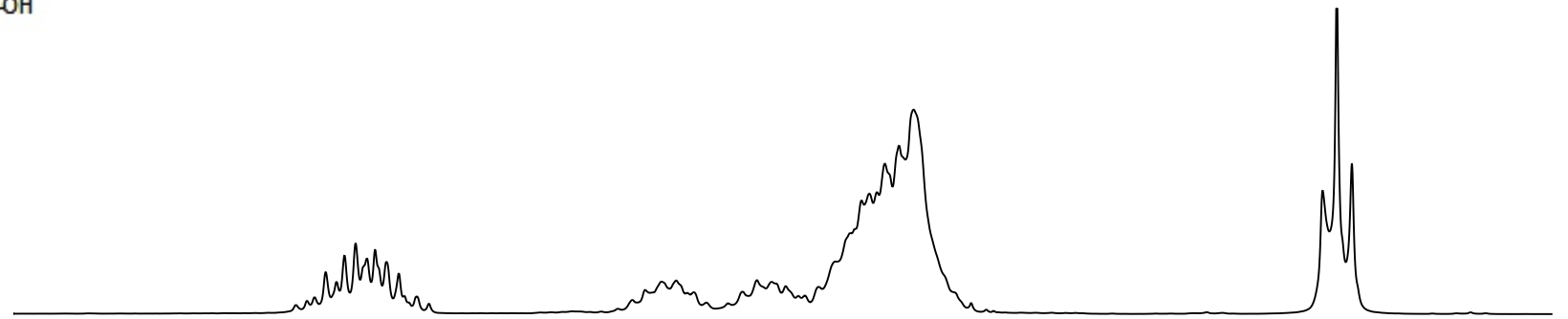
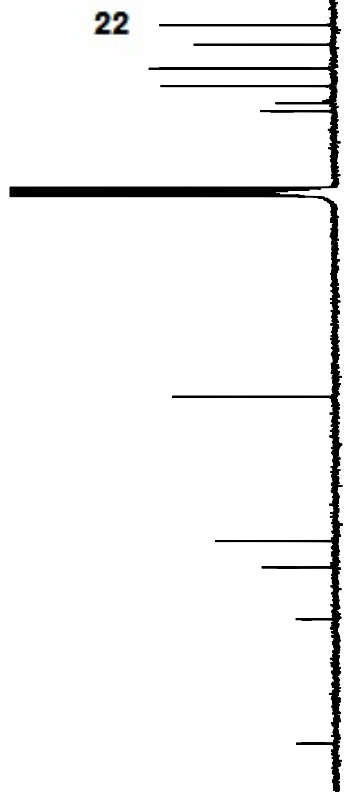
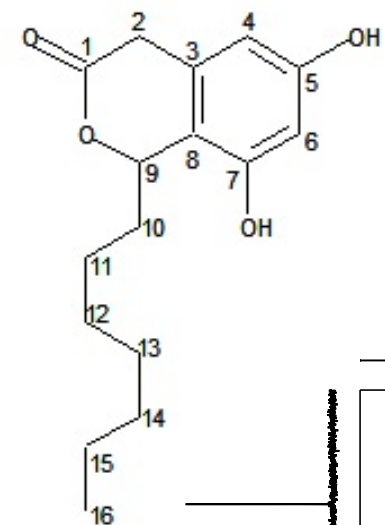
Apêndice 2.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD_3OD , 500 MHz] de **CYT_06_02 (22)** entre δ_{H} 0,80 e 4,00



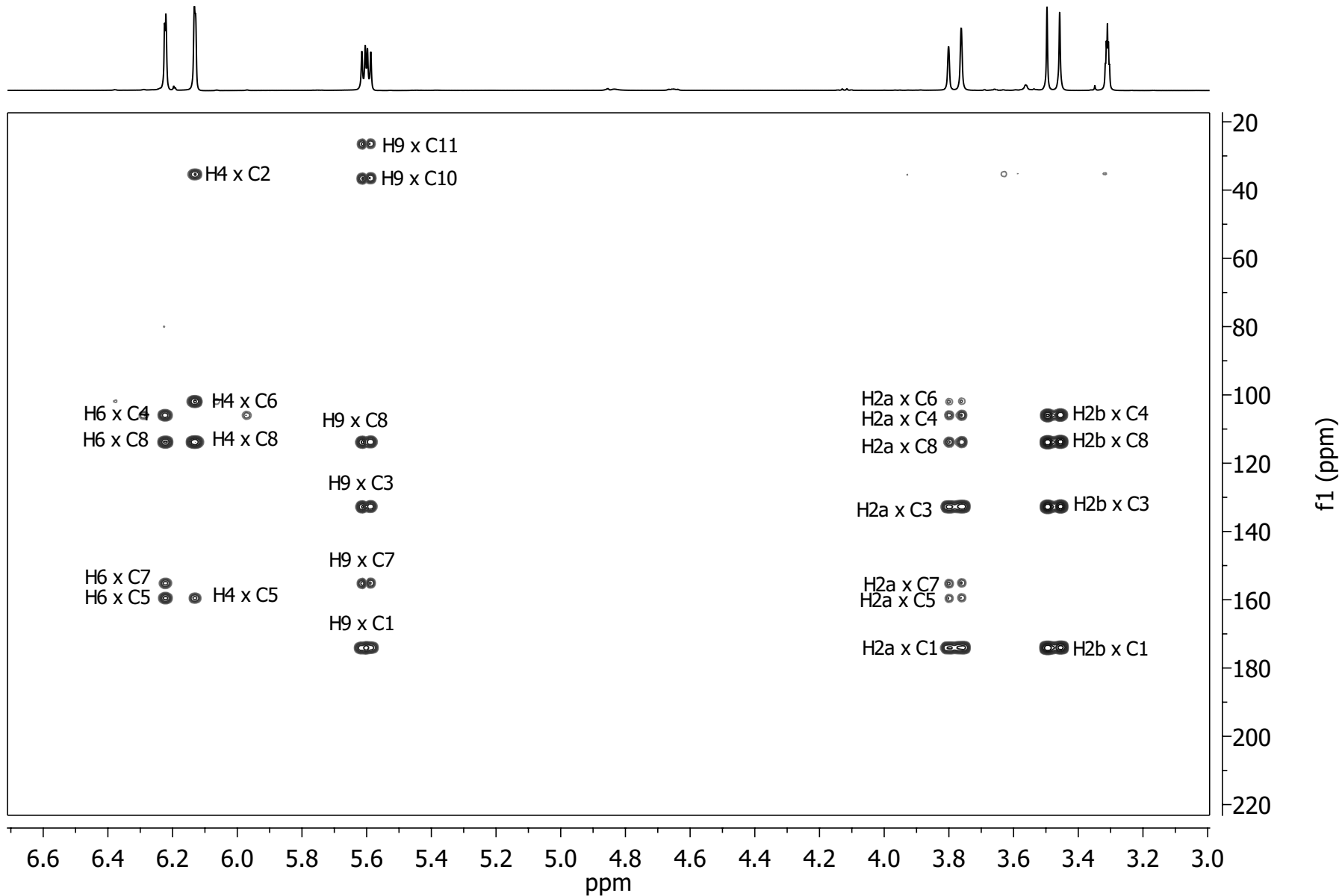
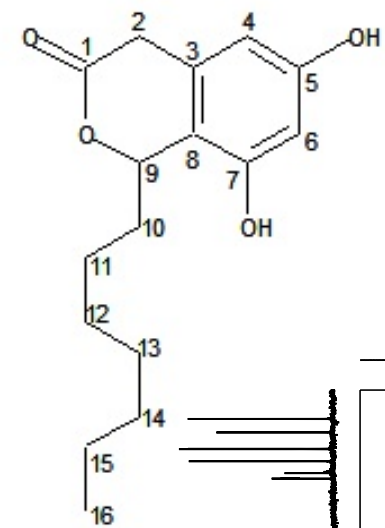
Apêndice 2.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_06_02 (22)** entre δ_{H} 5,10 e 6,45



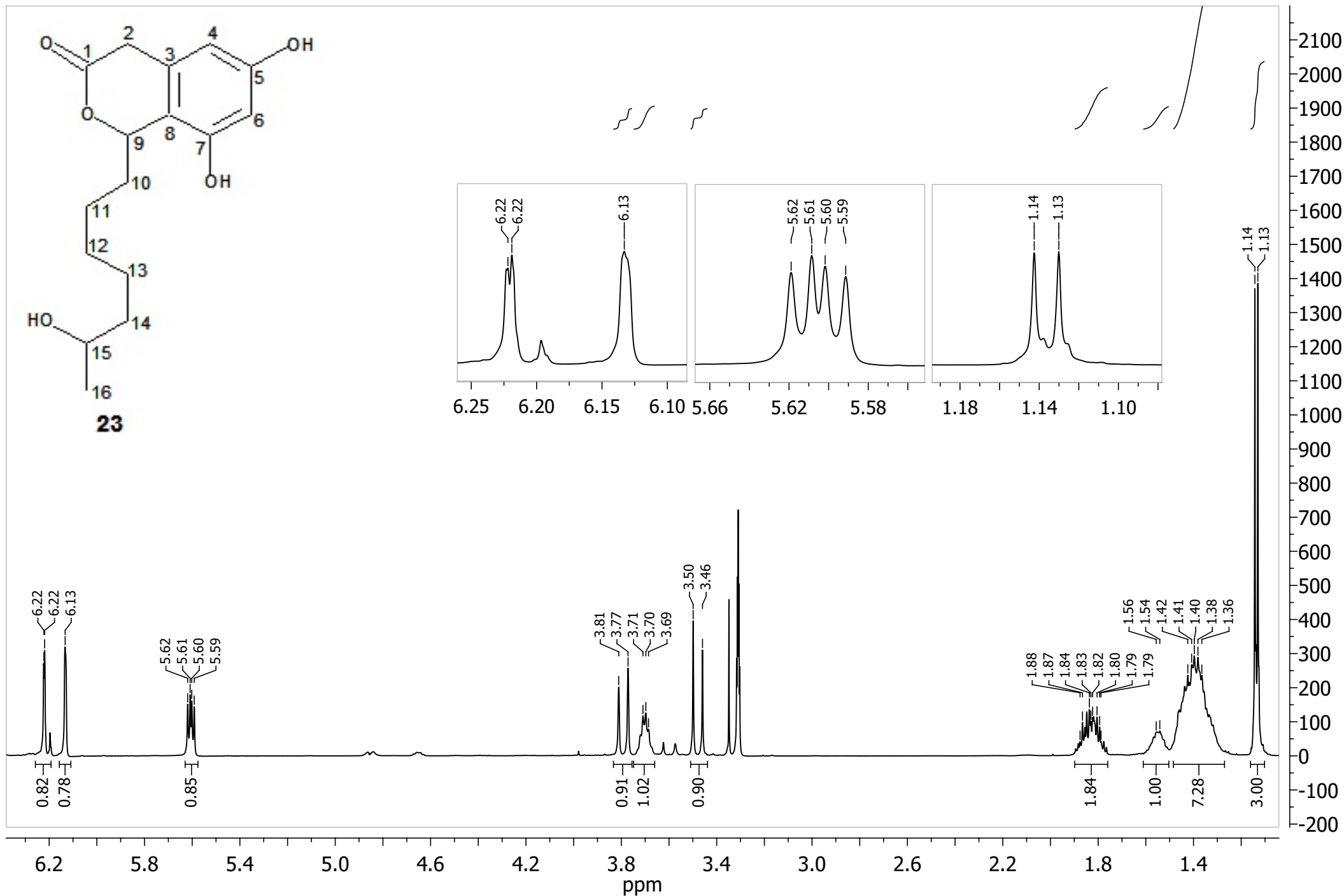
Apêndice 2.7 - Mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_06_02 (22)**



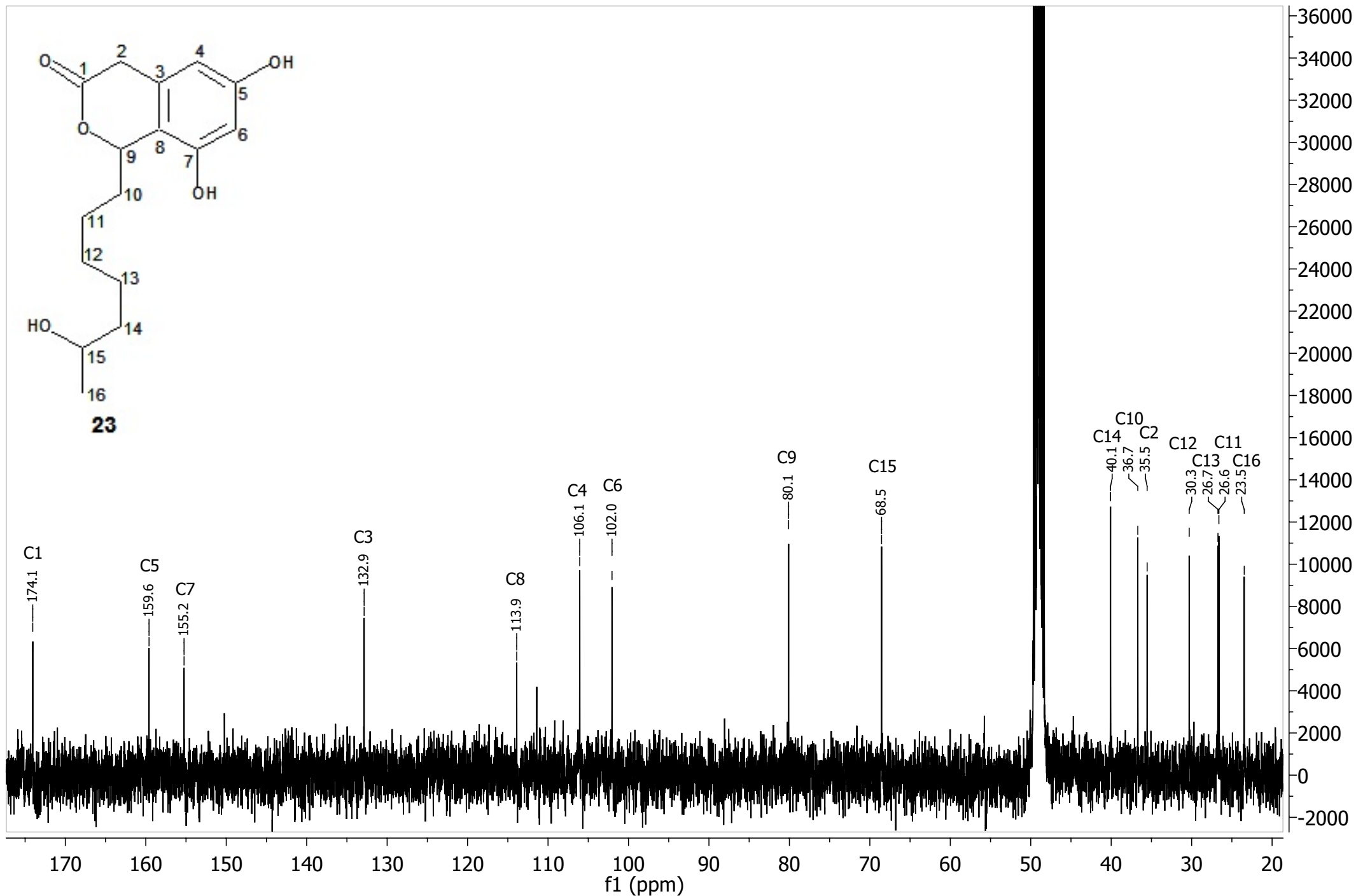
Apêndice 2.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_06_02 (22)** entre δ_H 0,80 e 2,10



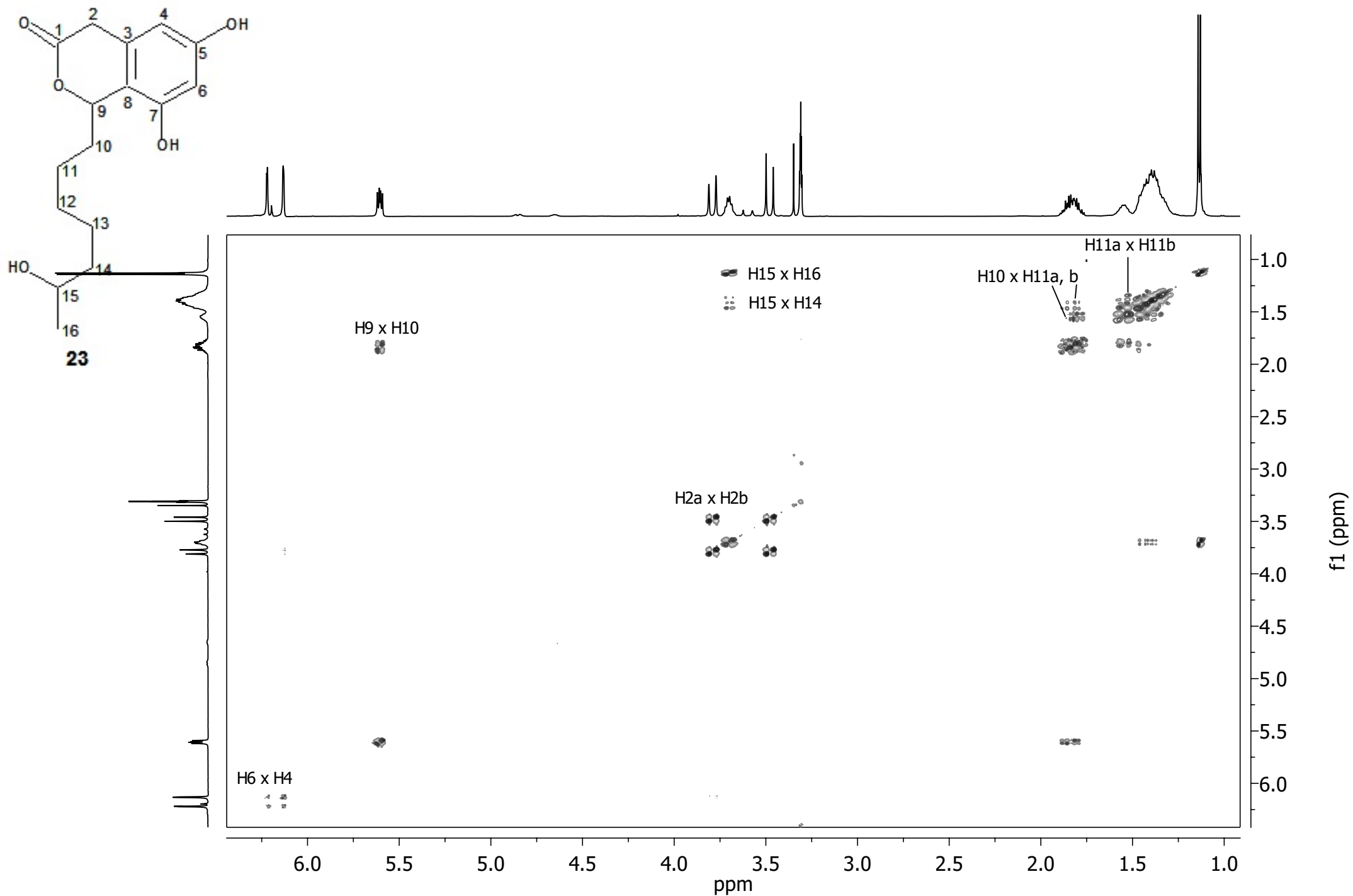
Apêndice 2.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT_06_02 (22)** entre δ_H 3,20 e 6,70



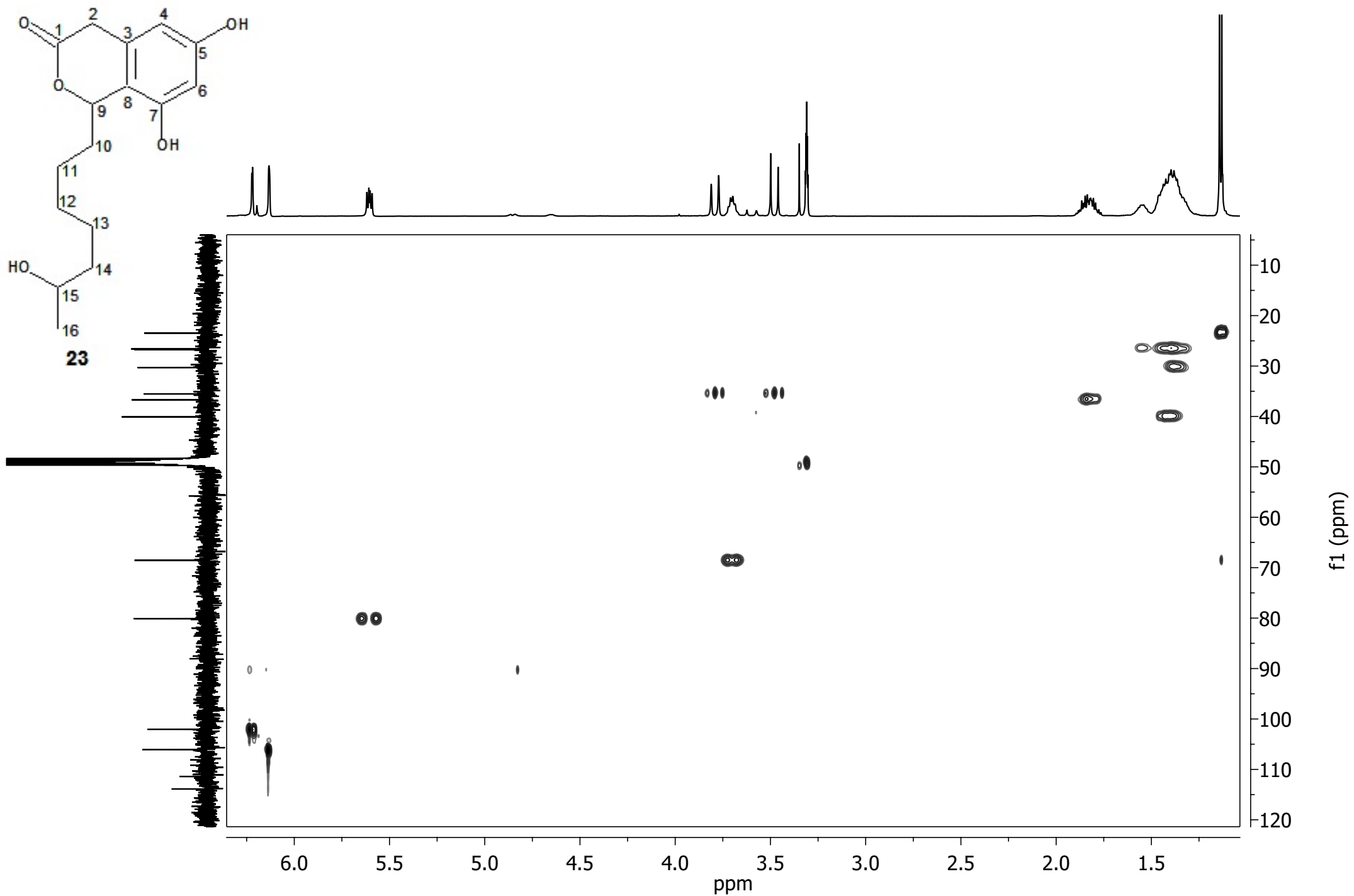
Apêndice 3.1: Espectro de RMN de ¹H [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)**



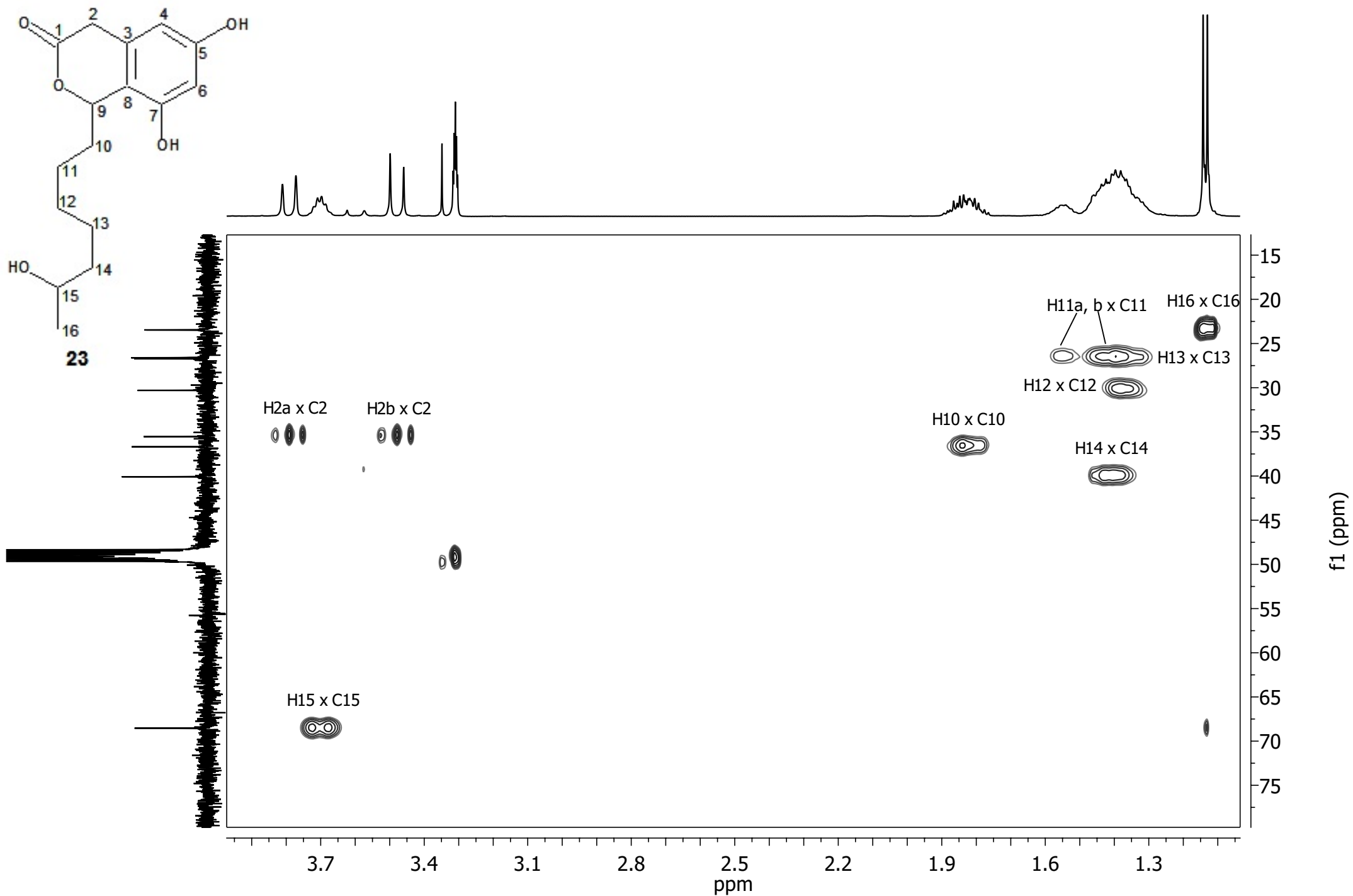
Apêndice 3.2: Espectro de RMN de ^{13}C [CD_3OD , 100 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)**



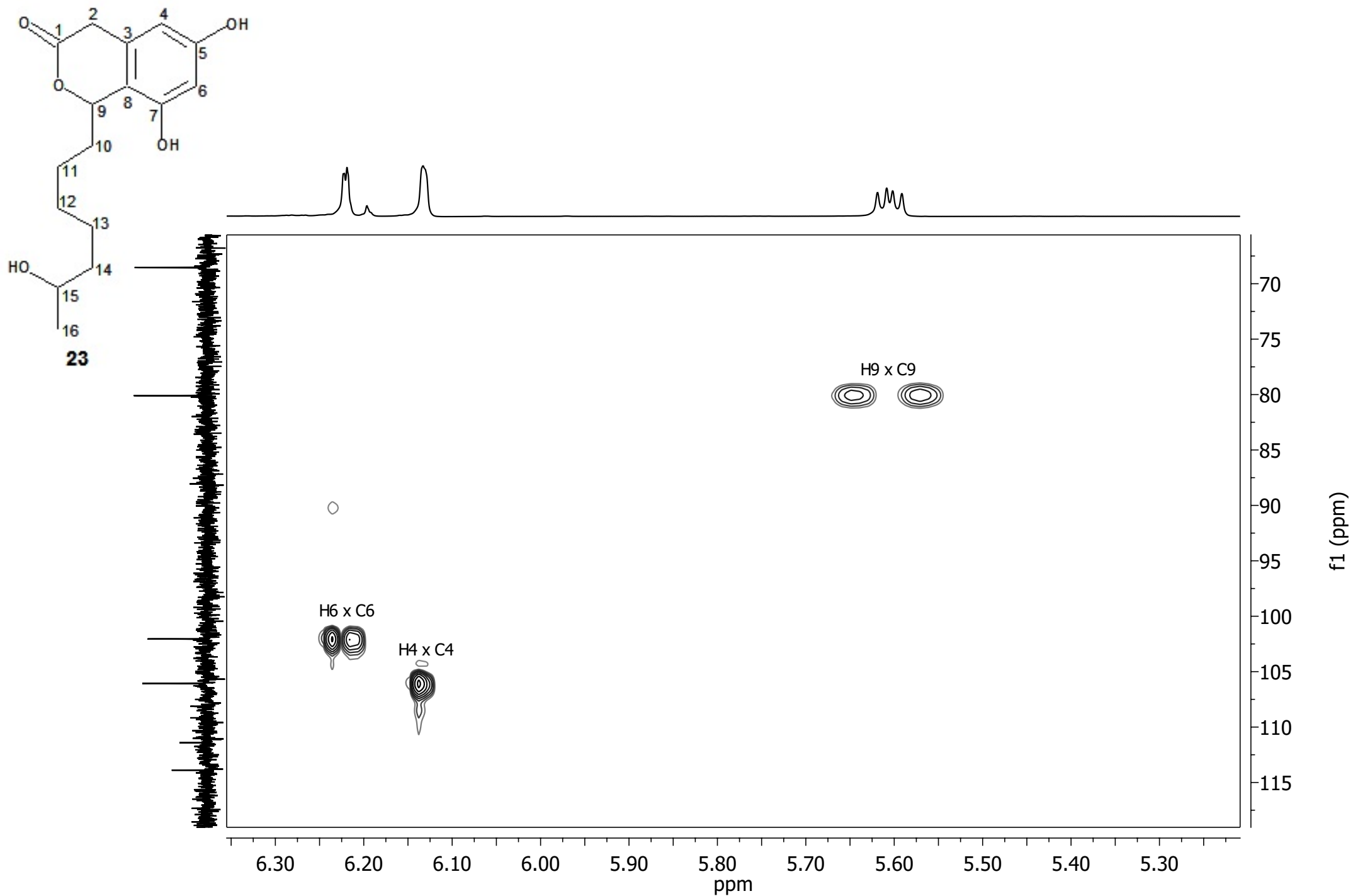
Apêndice 3.3 - Mapa de contornos COSY [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)**



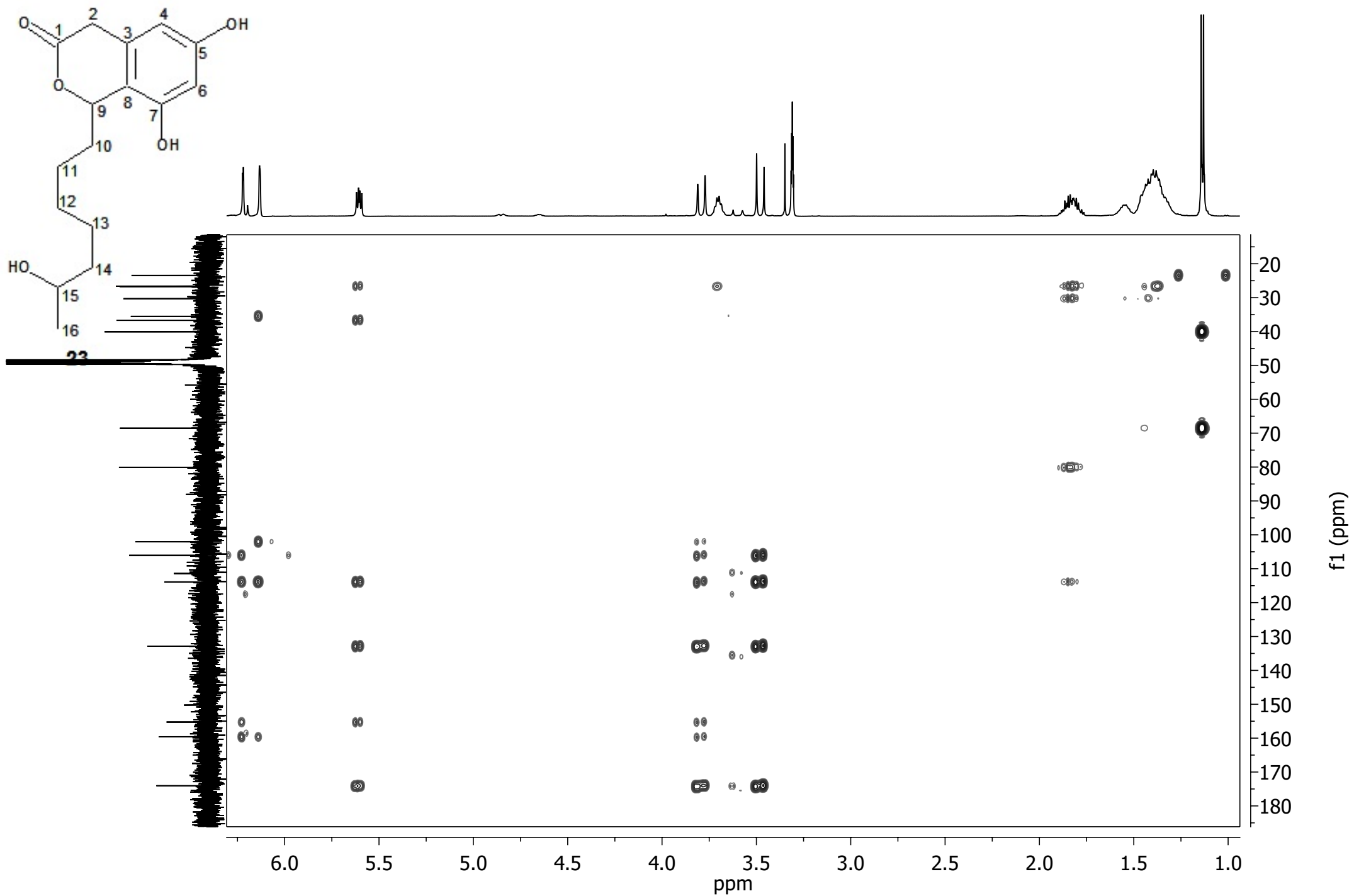
Apêndice 3.4 - Mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)**



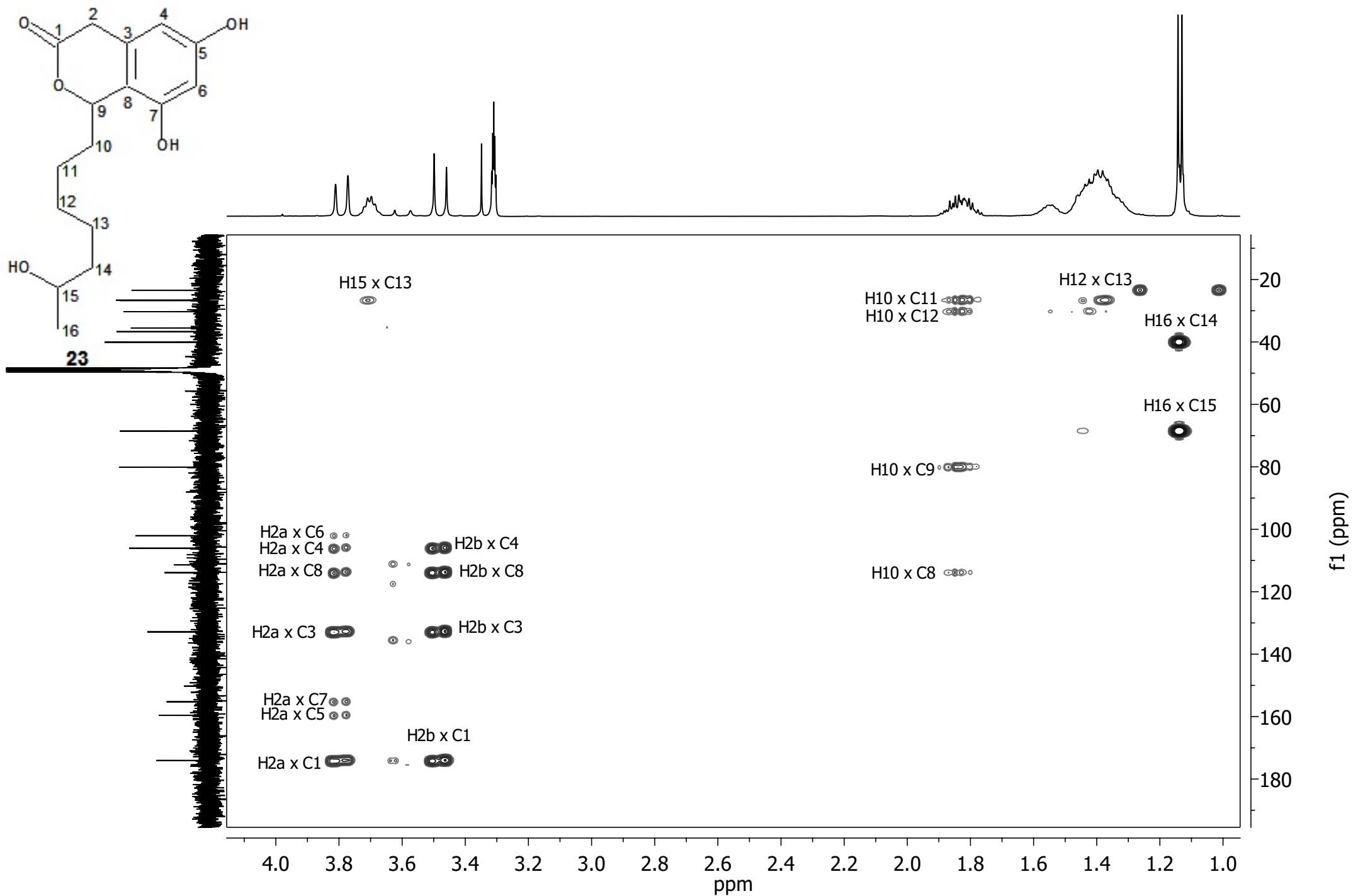
Apêndice 3.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)** entre δ_H 1,10 e 3,90



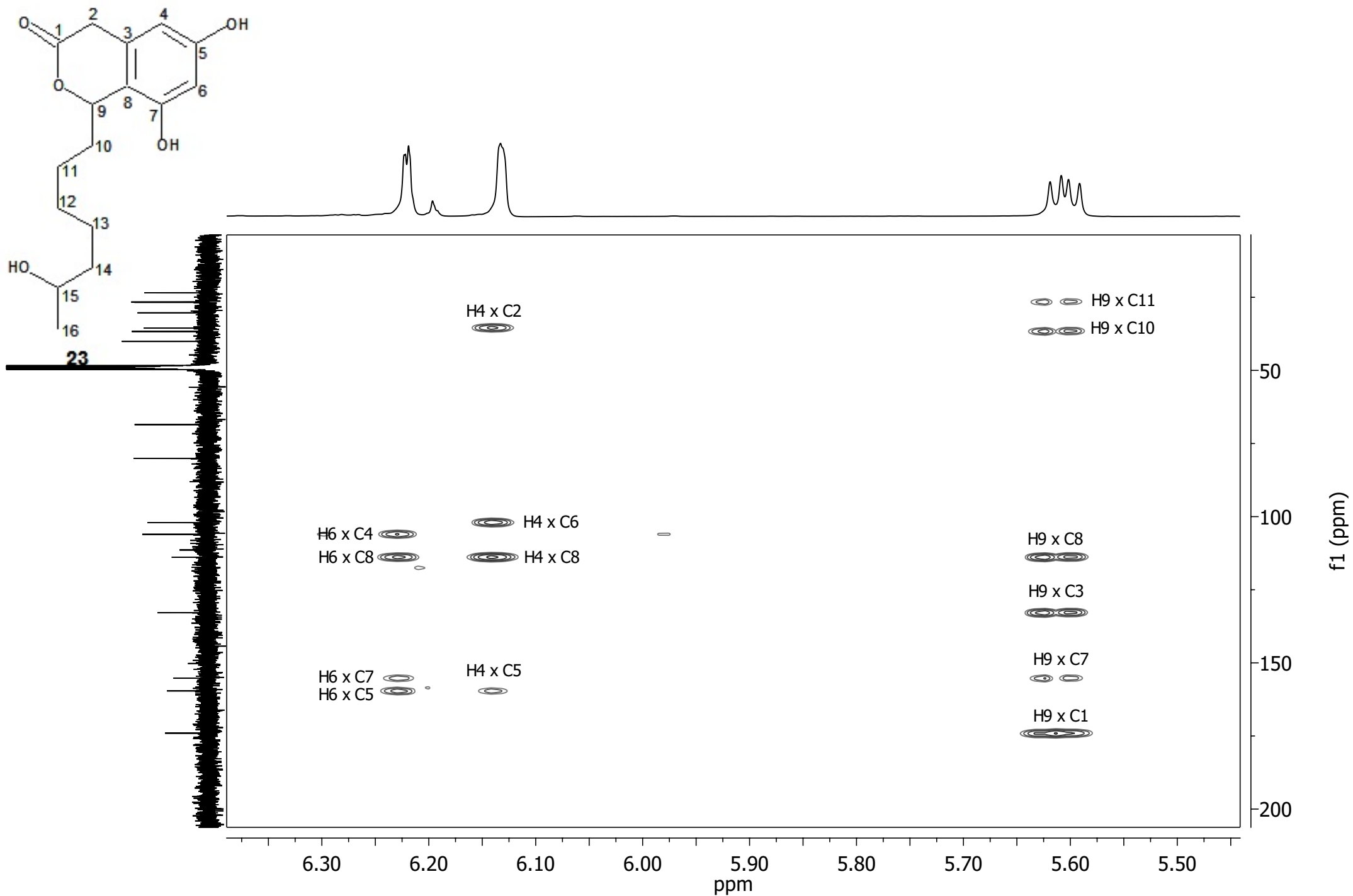
Apêndice 3.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)** entre δ_H 5,20 e 6,30



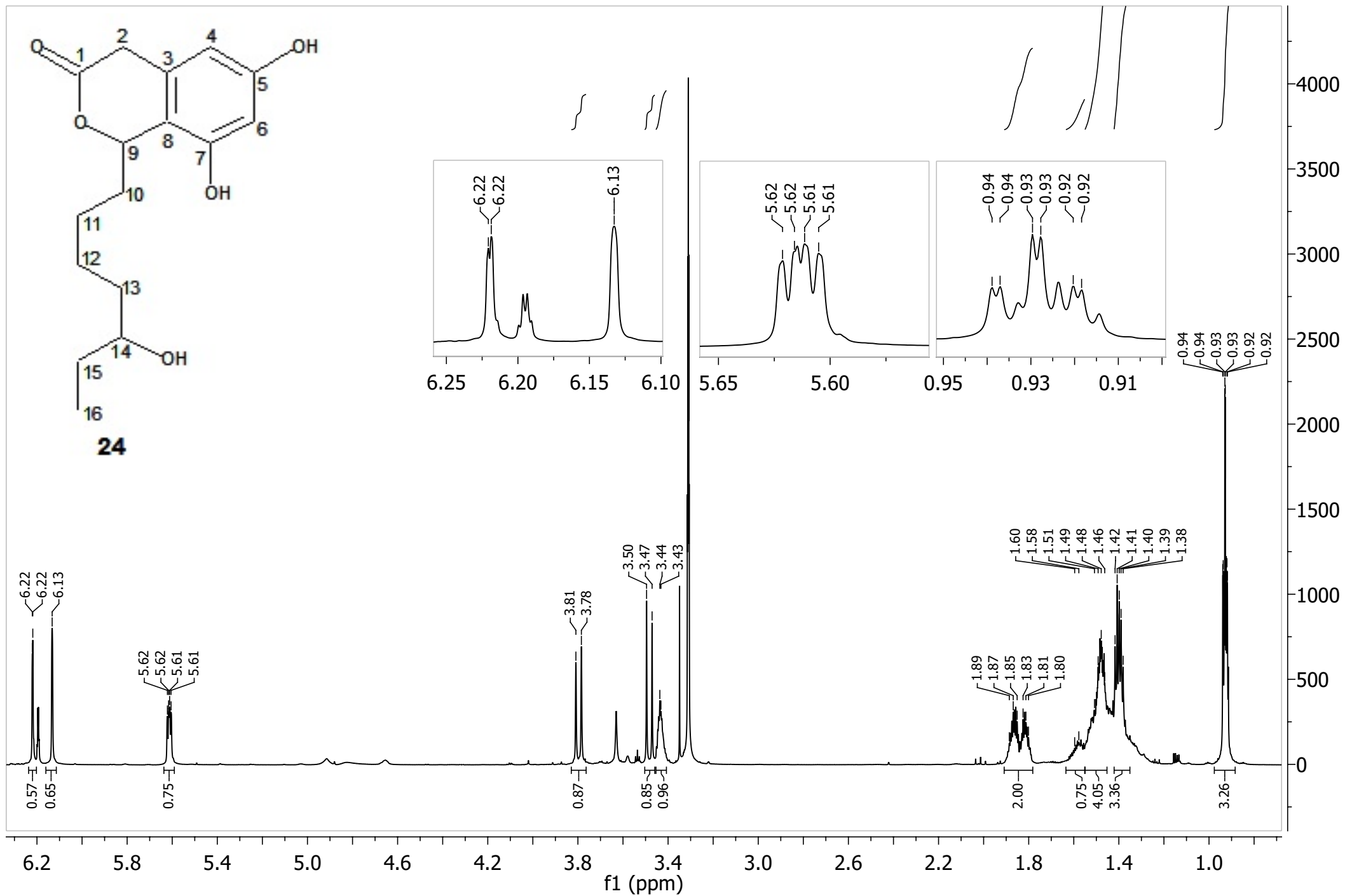
Apêndice 3.7 - Mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)**



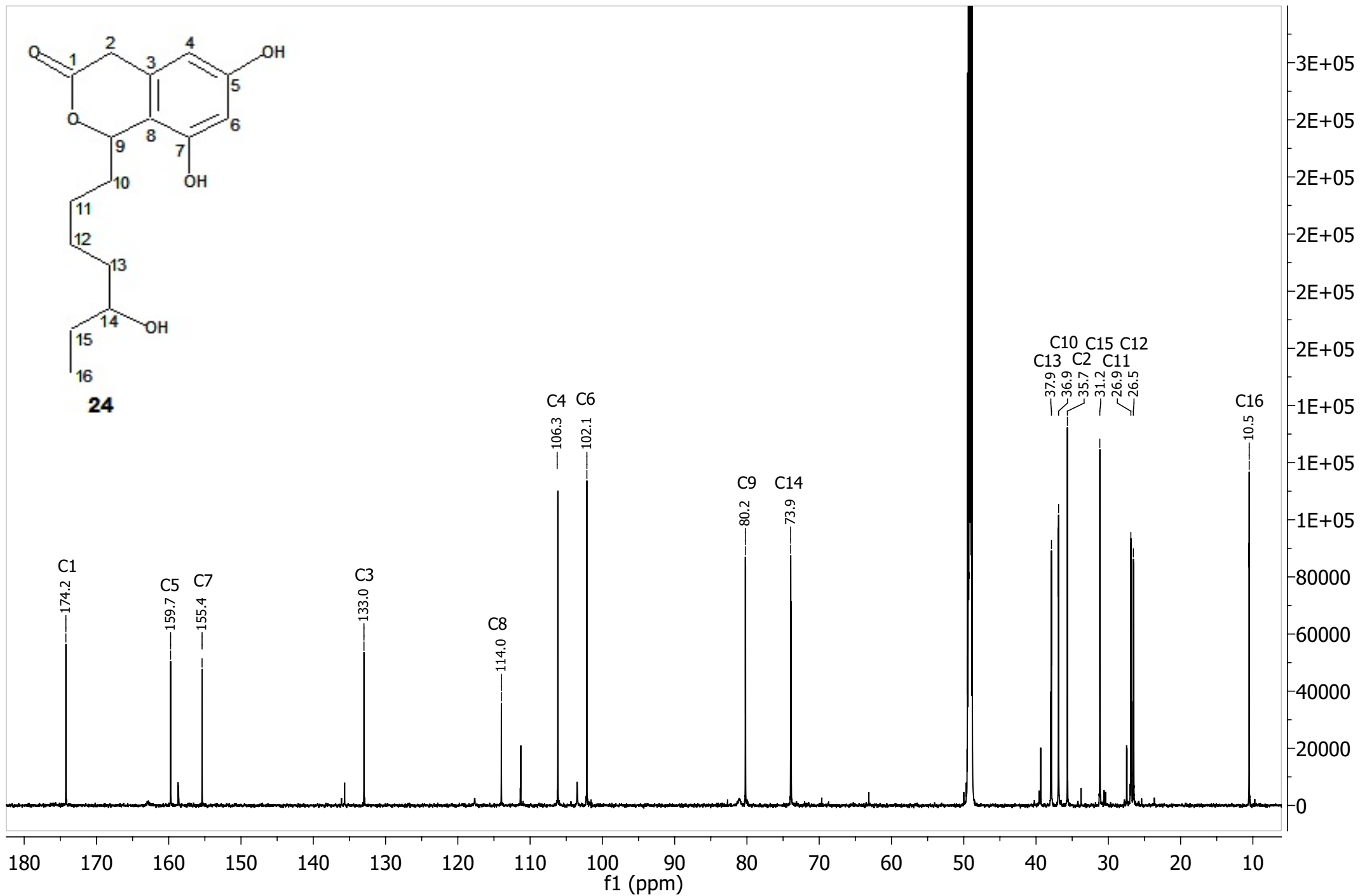
Apêndice 3.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)** entre δ_H 1,00 e 3,90



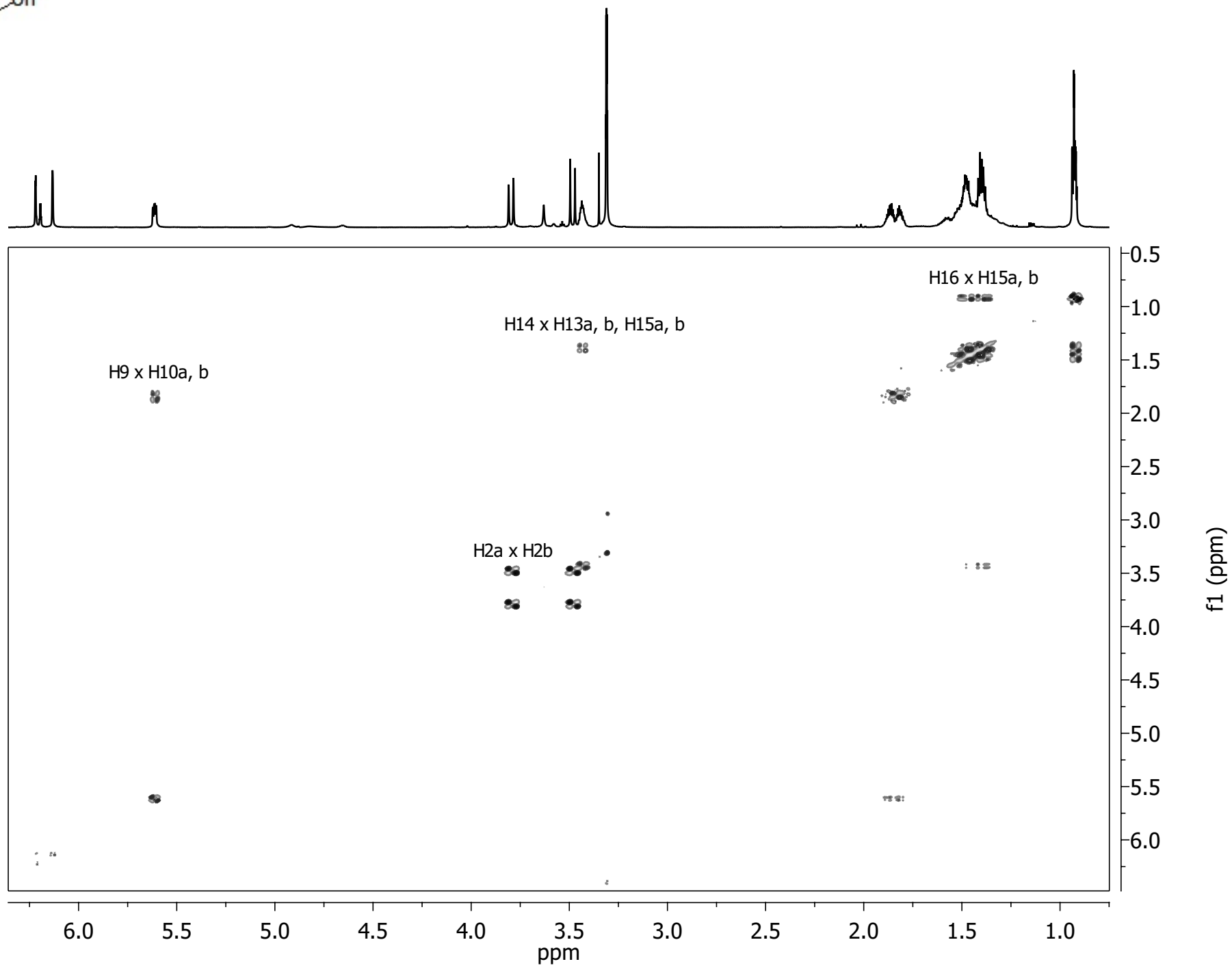
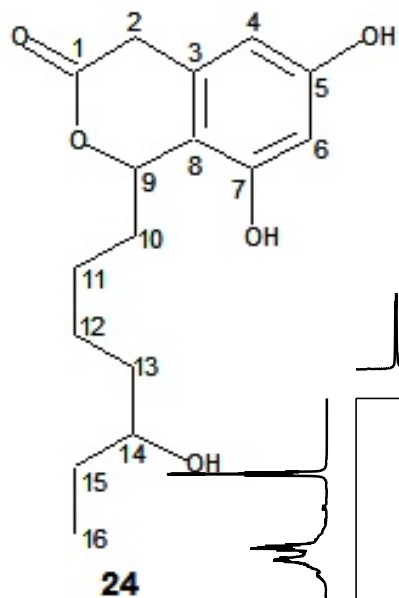
Apêndice 3.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 500 MHz] de **CYT09_09_1-2_01 (23)** entre δ_H 5,40 e 6,40



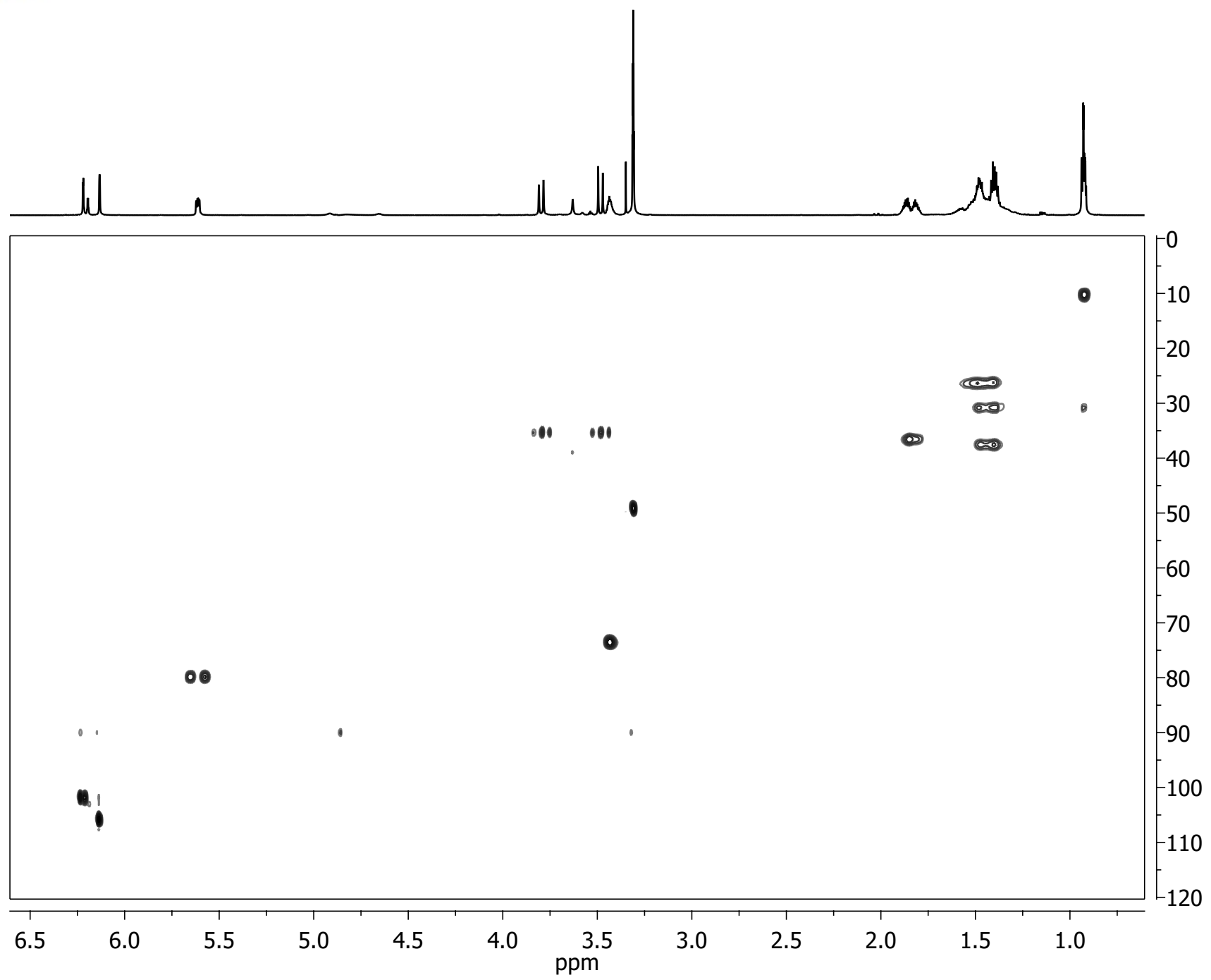
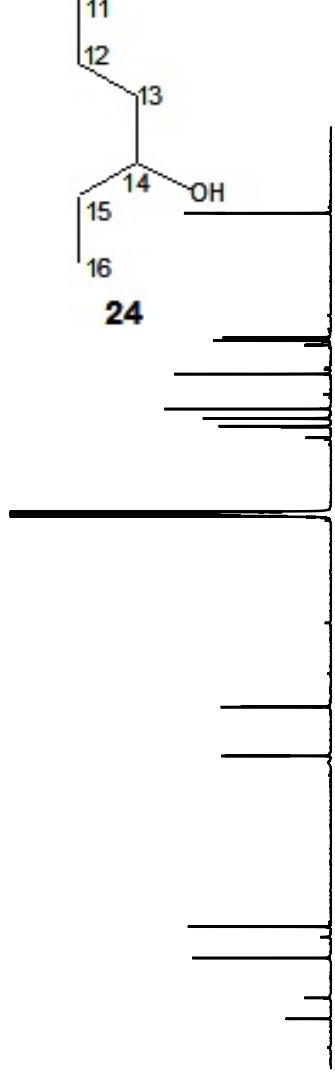
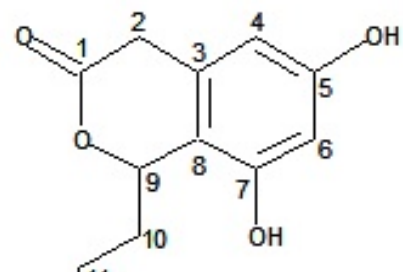
Apêndice 4.1 - Espectro de RMN de ^1H [CD_3OD , 800 MHz] de CYT09_09_1-2_02



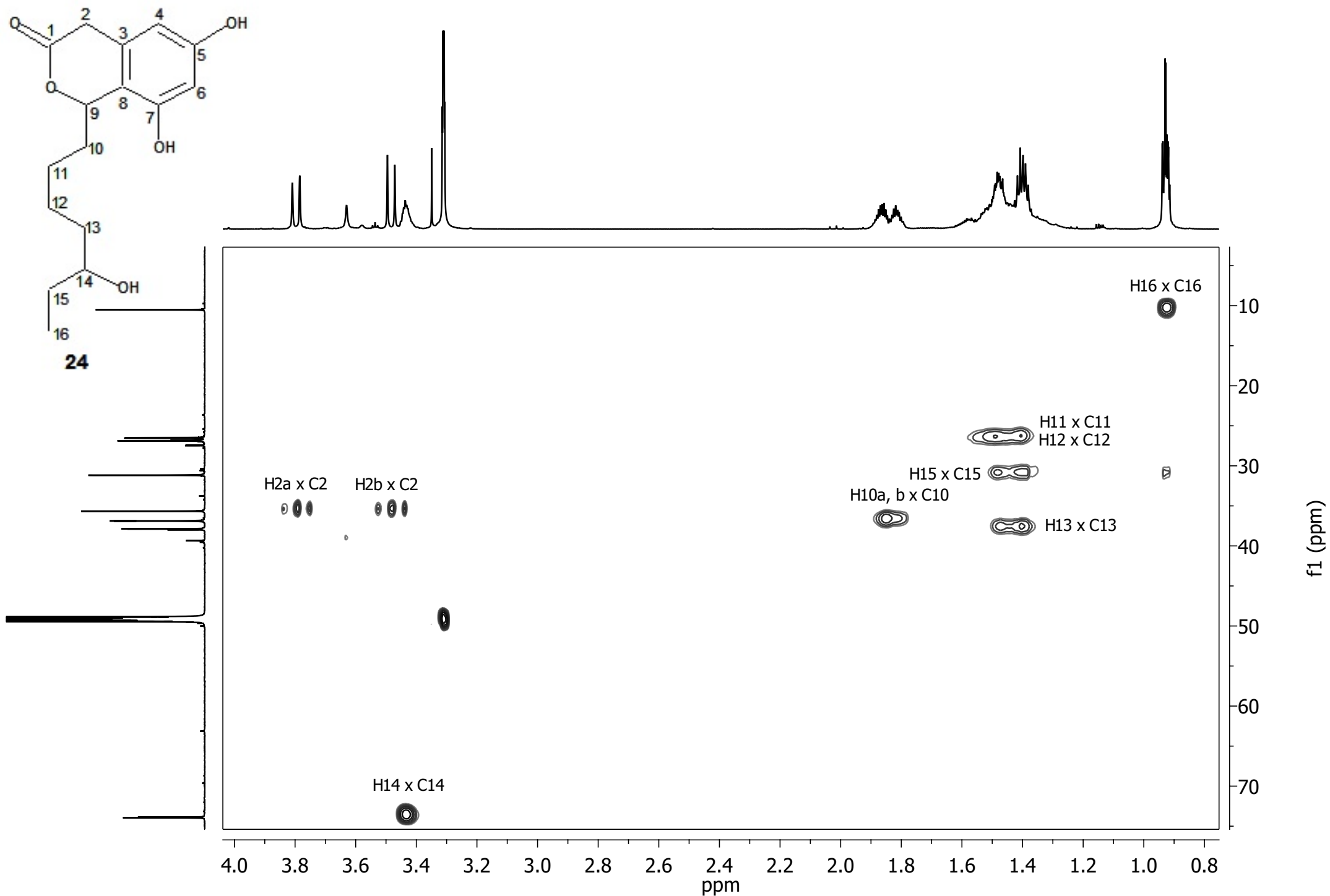
Apêndice 4.2 - Espectro de RMN de ^{13}C [CD_3OD , 200 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)**



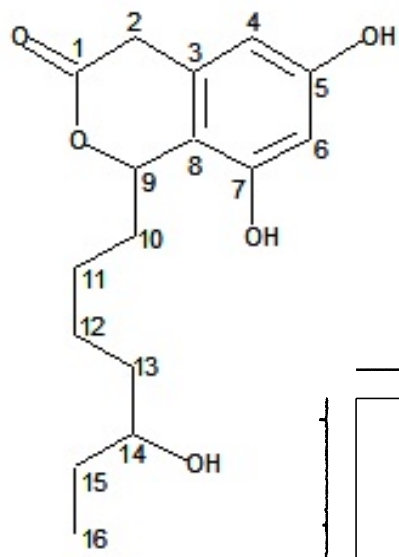
Apêndice 4.3 - Mapa de contornos COSY [CD₃OD, 800 MHz] de CYT09_09_1-2_02 (24)



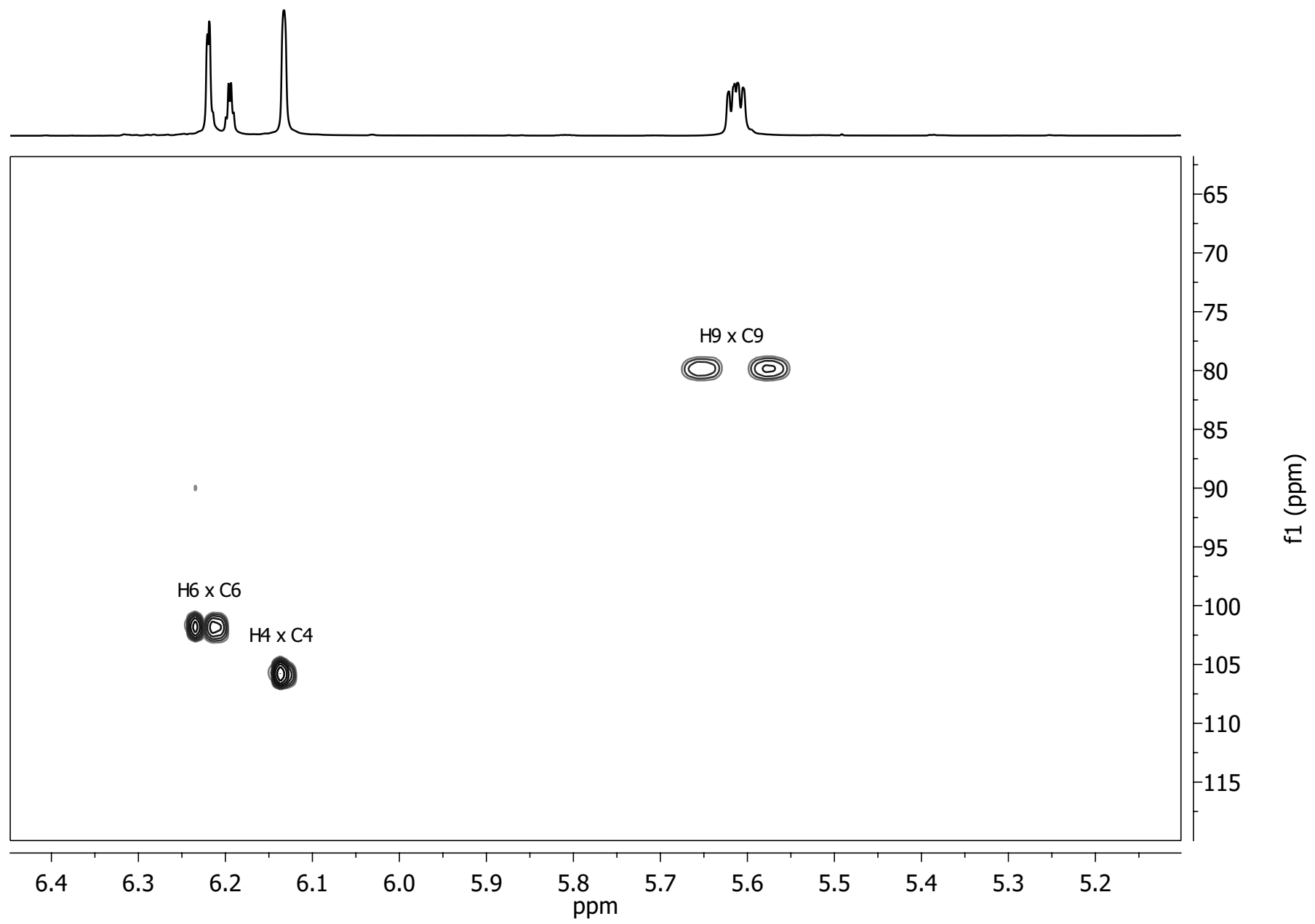
Apêndice 4.4 - Mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)**



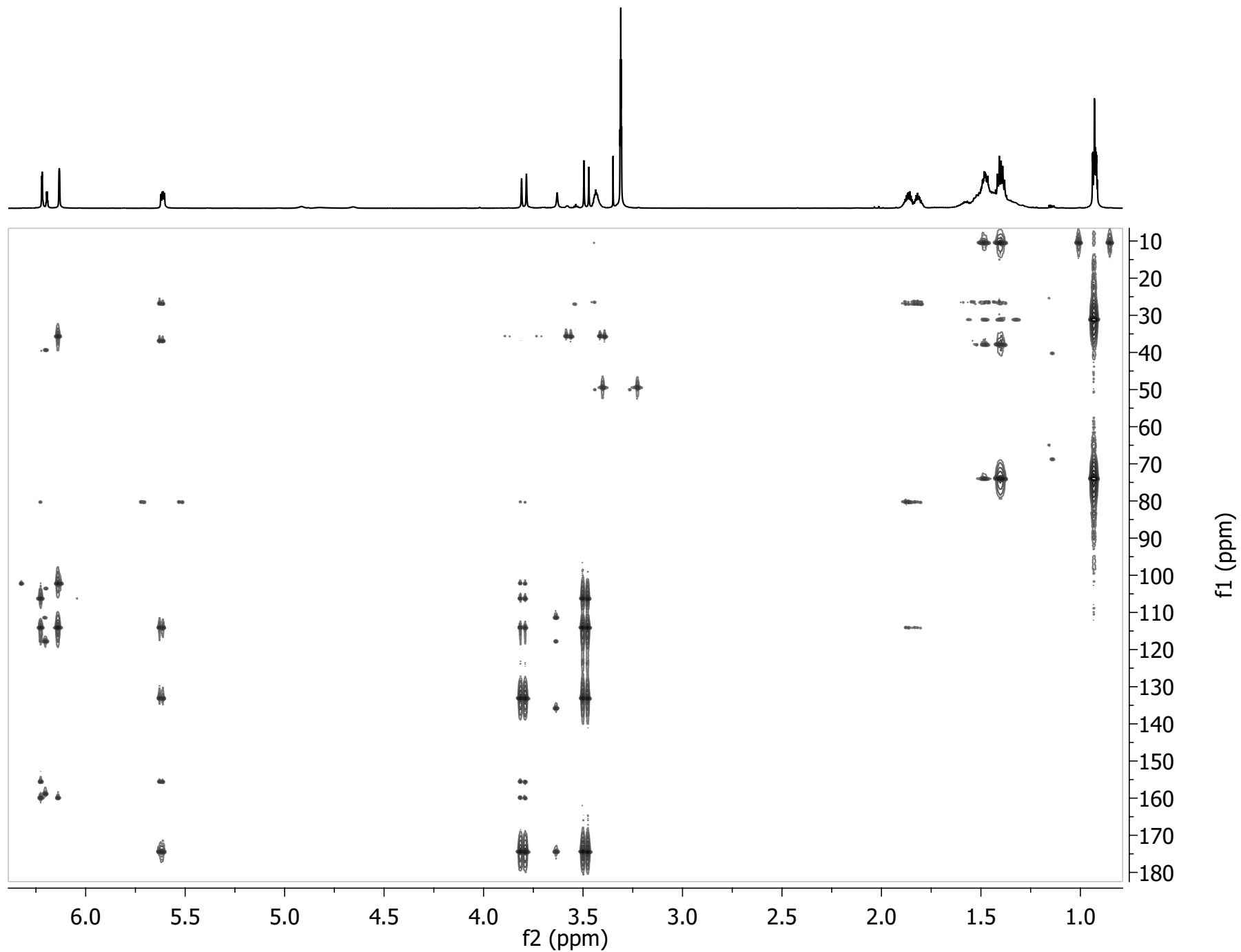
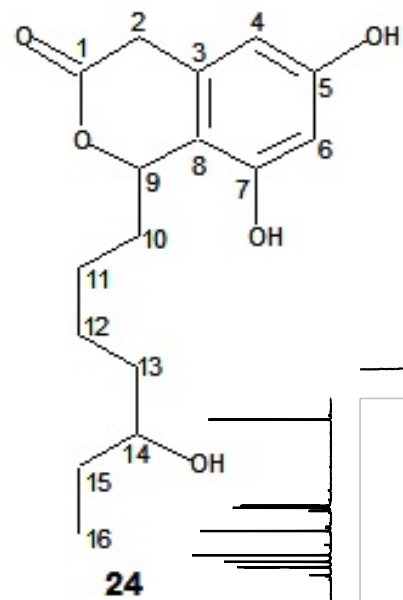
Apêndice 4.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)** entre δ_H 0,8 e 4,0



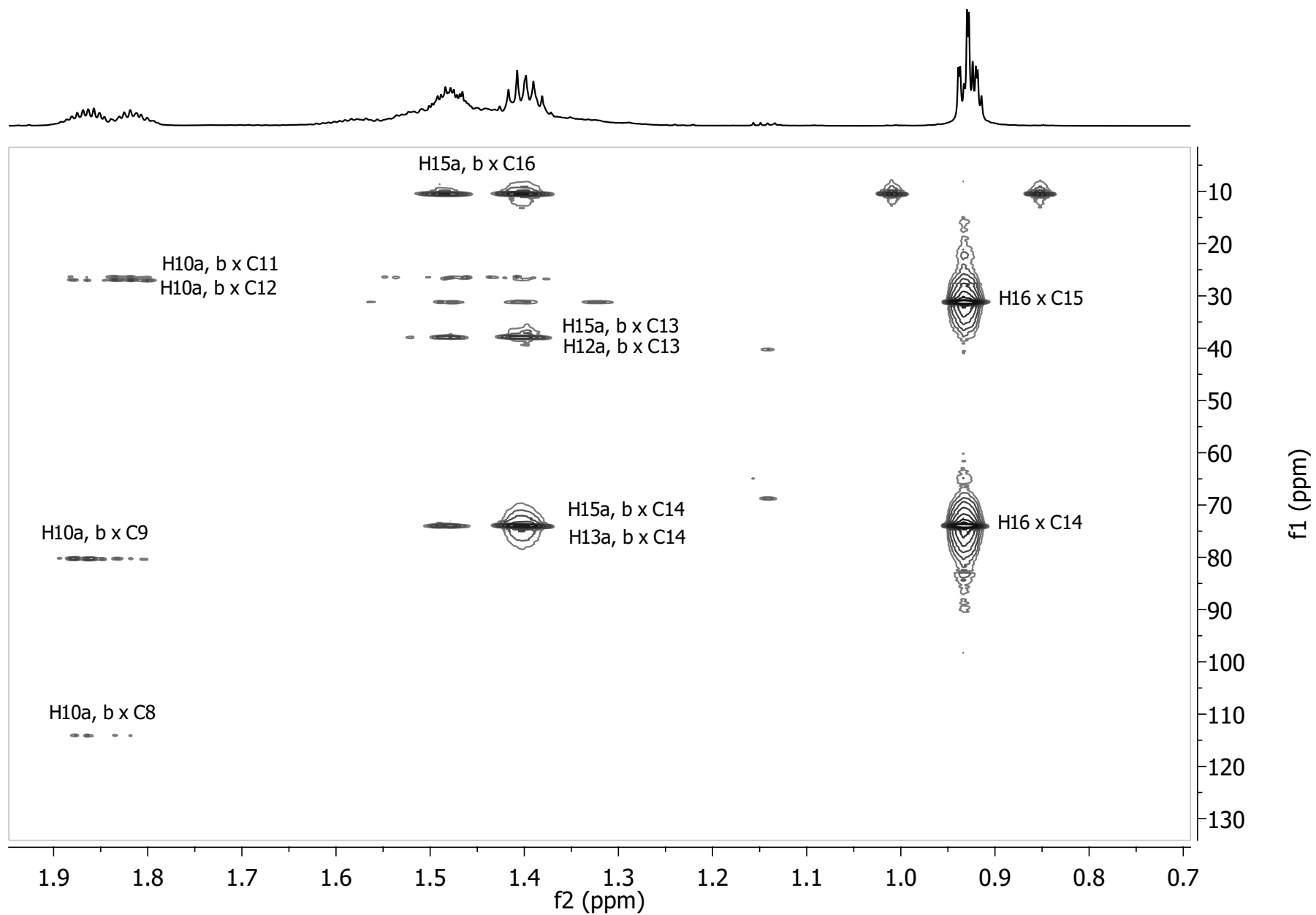
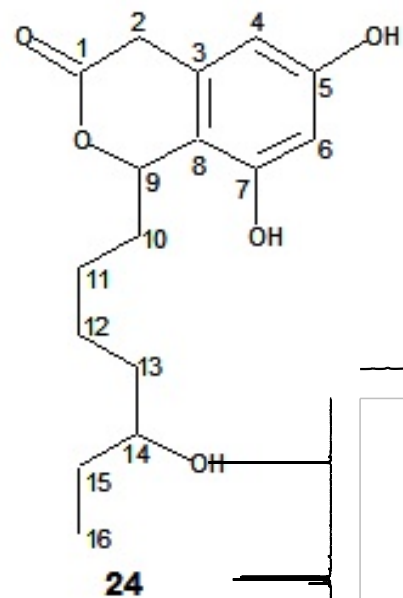
24



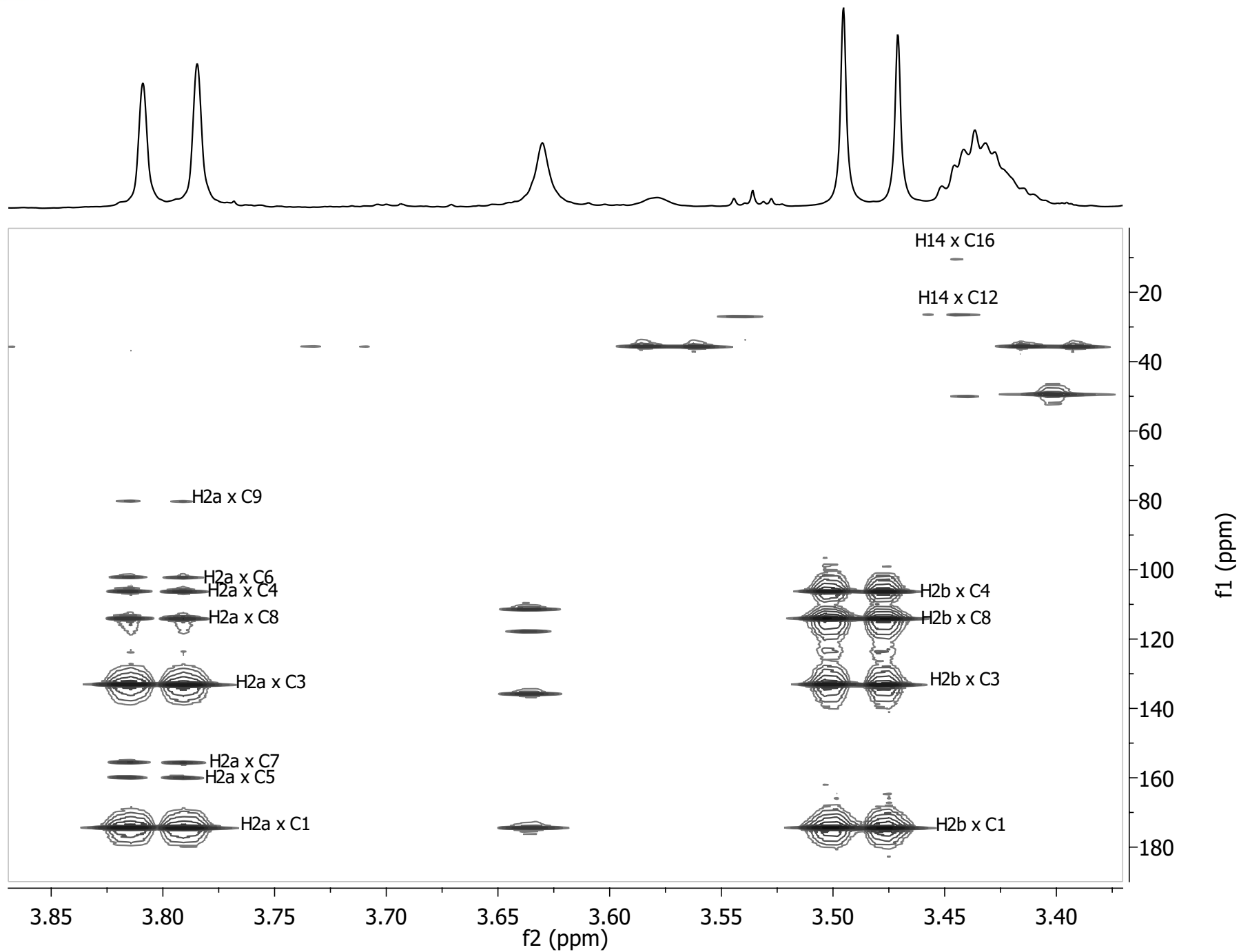
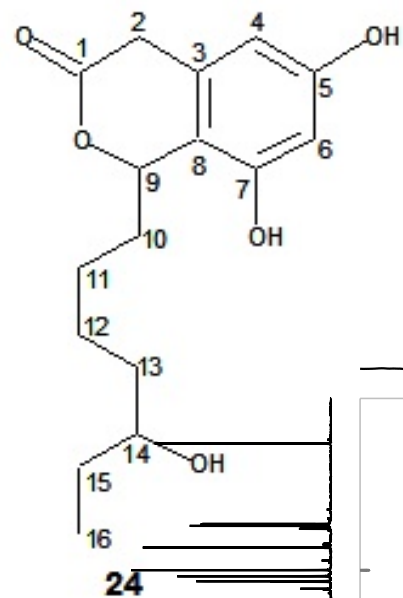
Apêndice 4.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD_3OD , 800 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)** entre δ_{H} 5,1 e 6,4



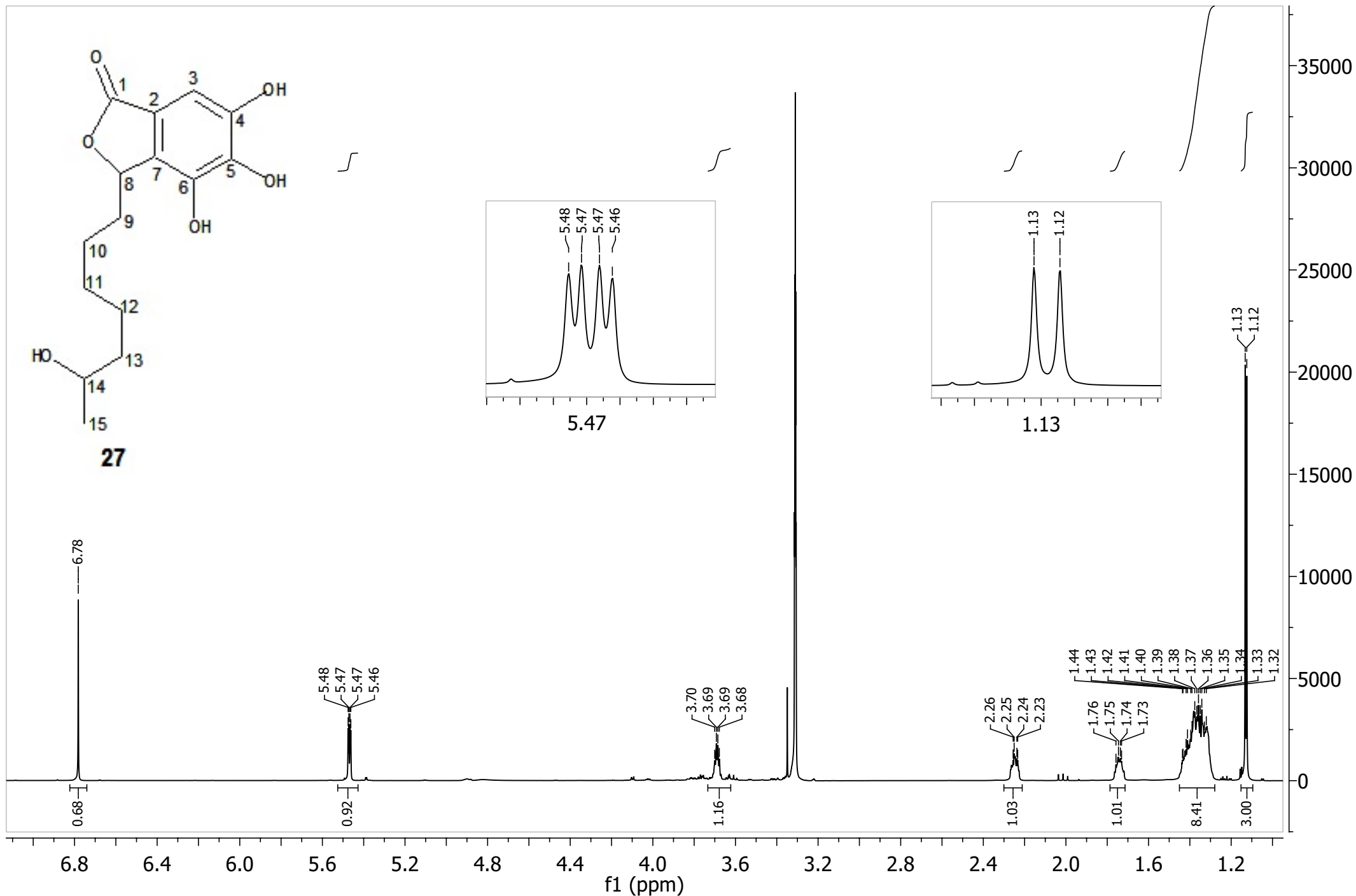
Apêndice 4.7 - Mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de CYT09_09_1-2_02 (24)



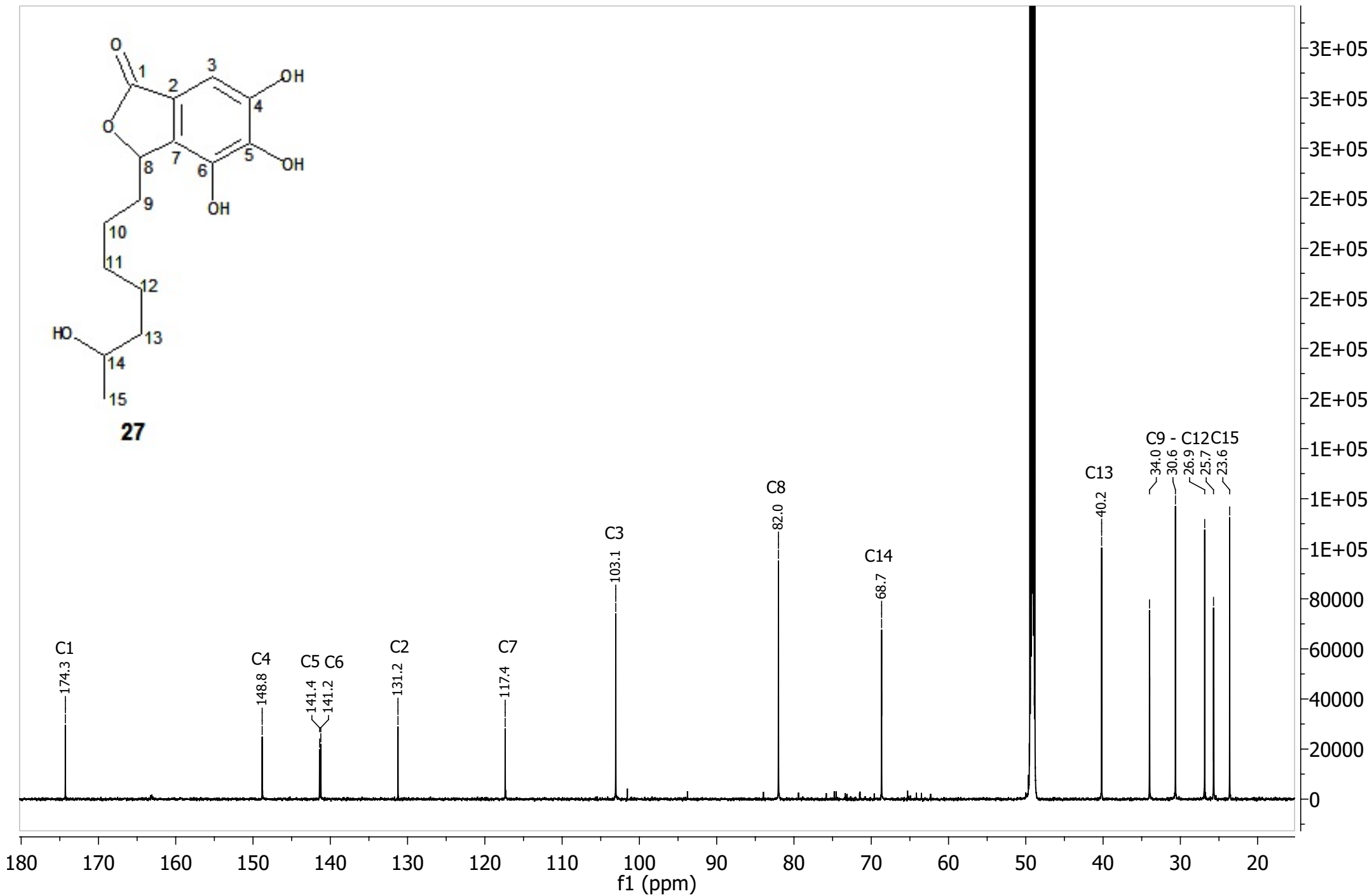
Apêndice 4.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)** entre δ_H 0,8 e 2,00



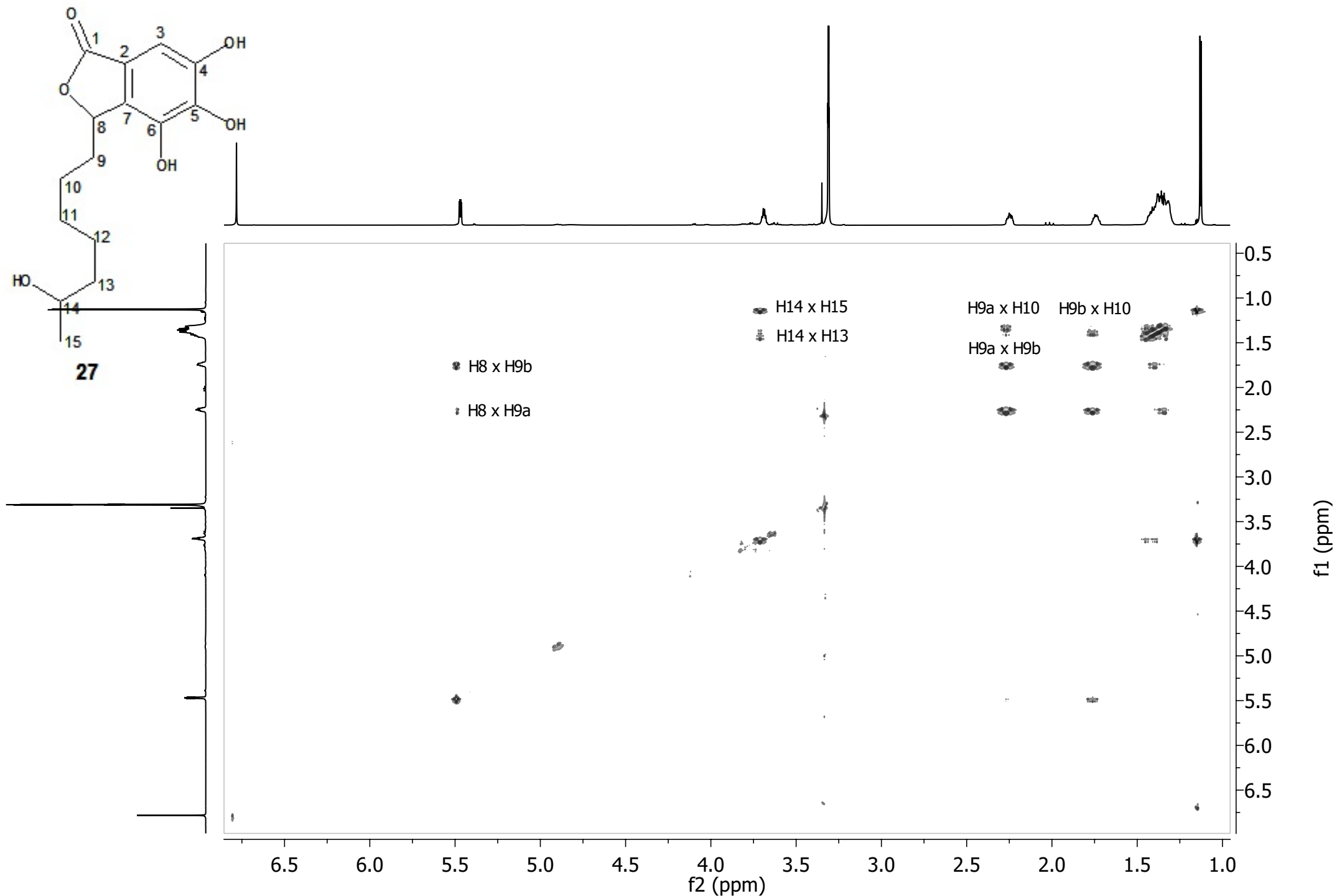
Apêndice 4.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_09_1-2_02 (24)** entre δ_H 3,41 e 3,88



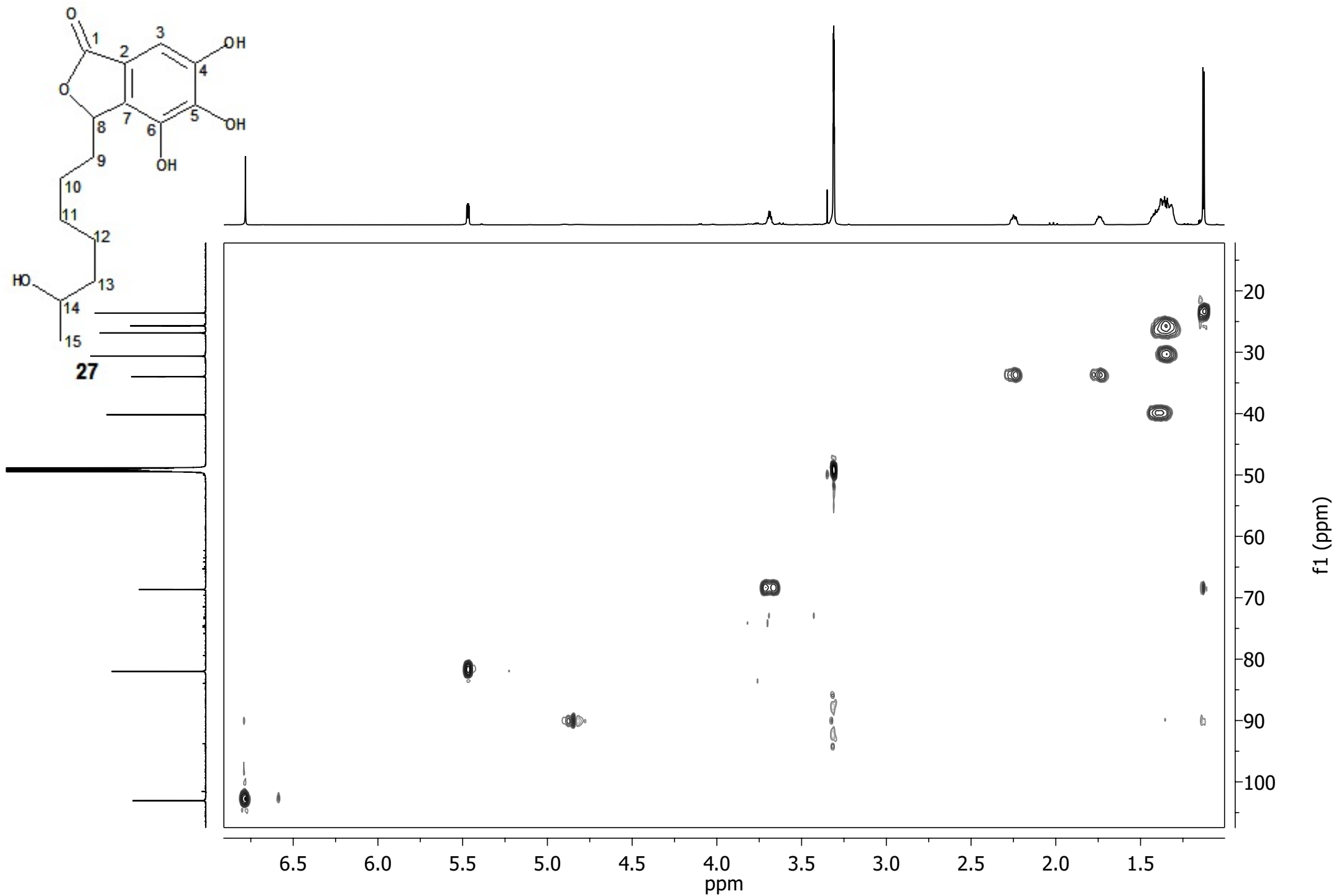
Apêndice 5.1 - Espectro de RMN de ¹H [CD₃OD, 800 MHz] de CYT09_12_01 (27)



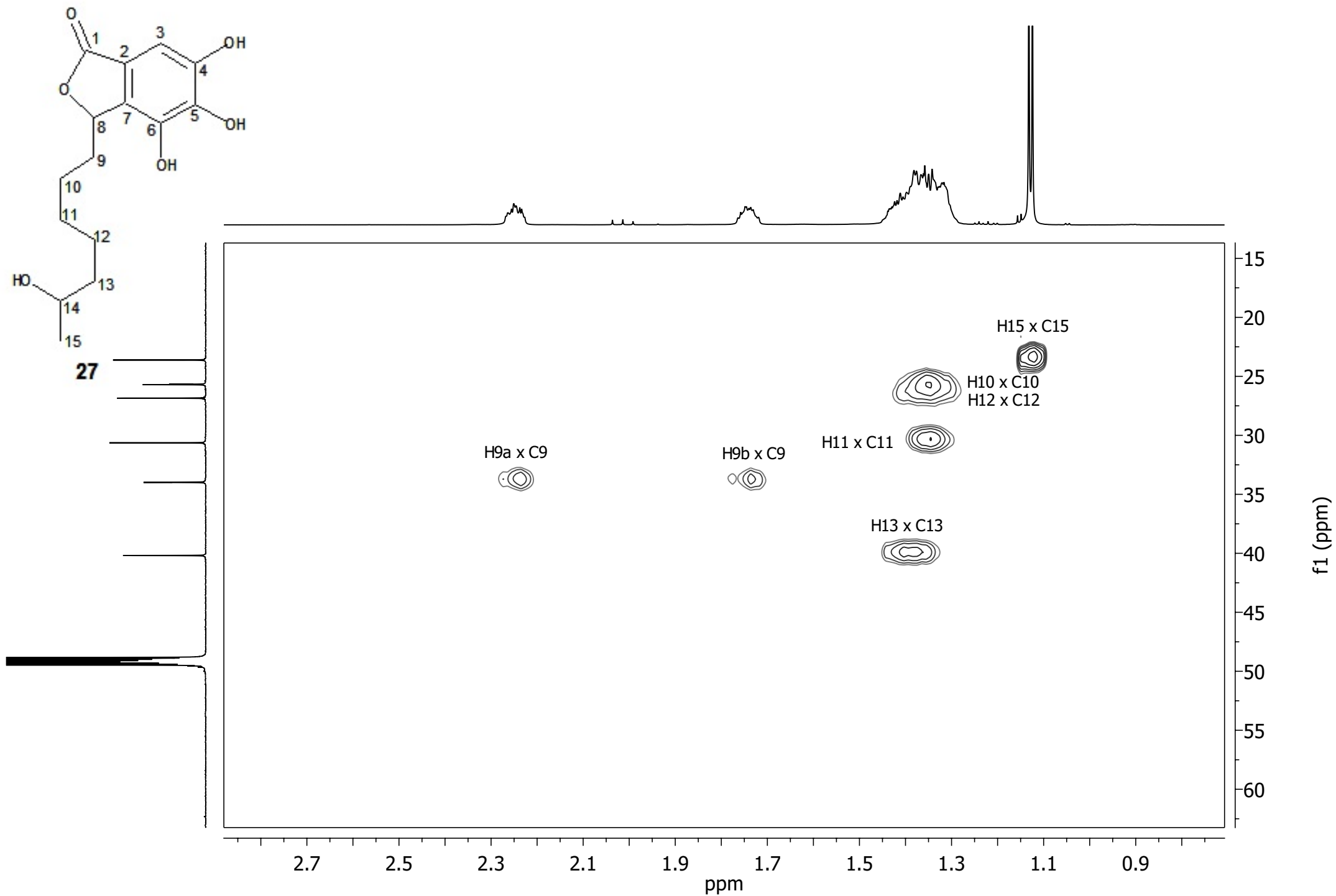
Apêndice 5.2 - Espectro de RMN de ^{13}C [CD₃OD, 200 MHz] de **CYT09_12_01 (27)**



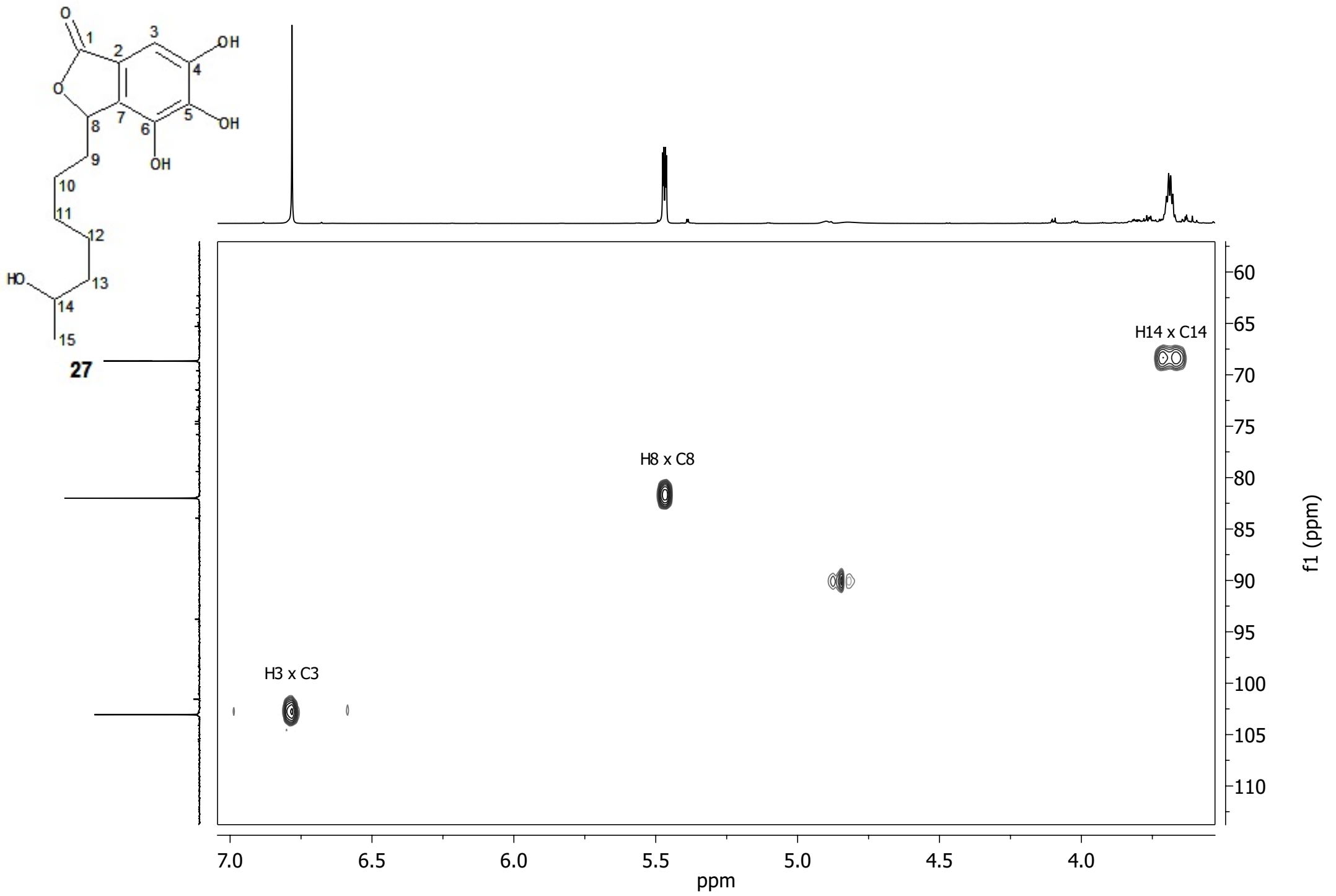
Apêndice 5.3 - Mapa de contornos COSY [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)**



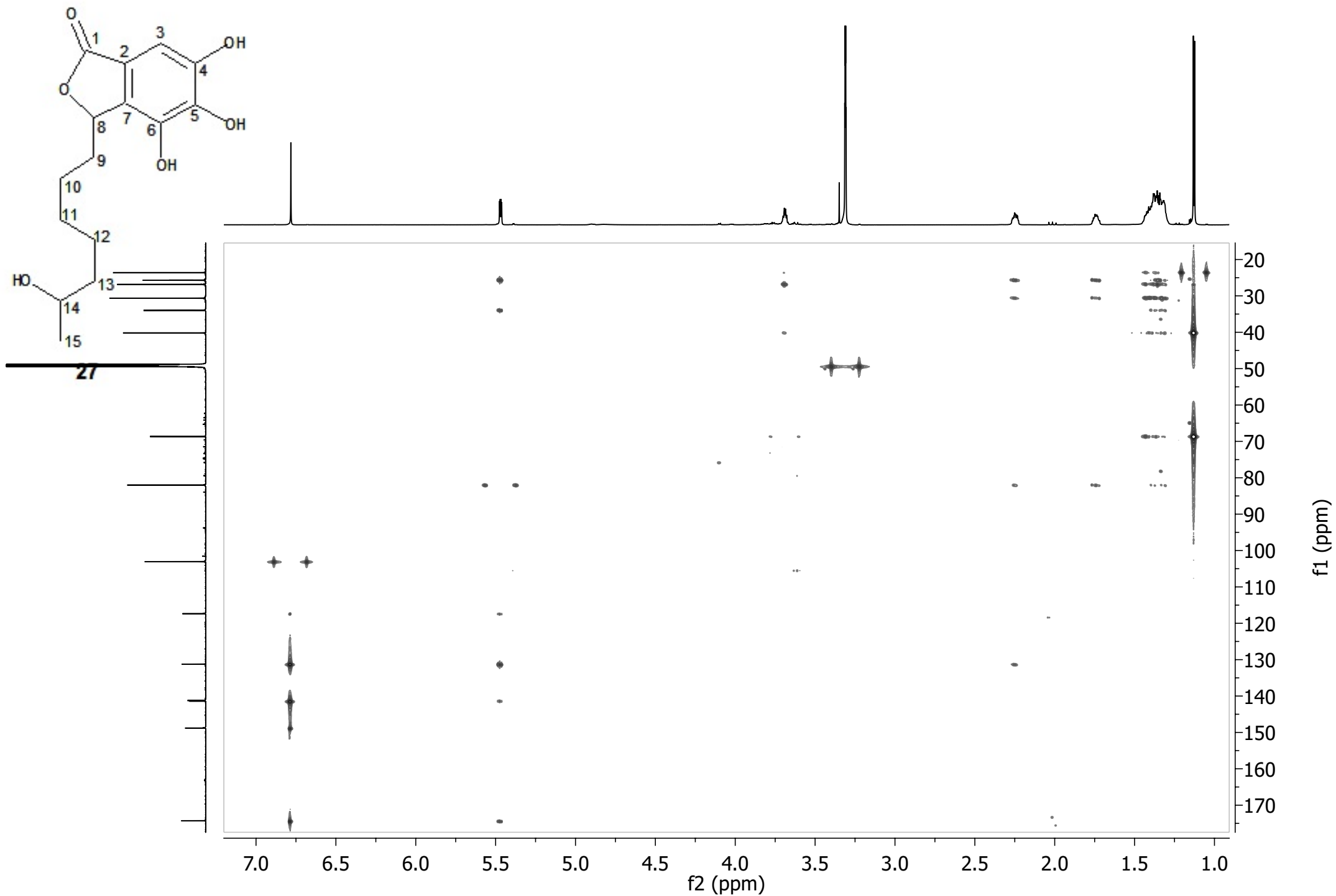
Apêndice 5.4 - Mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)**



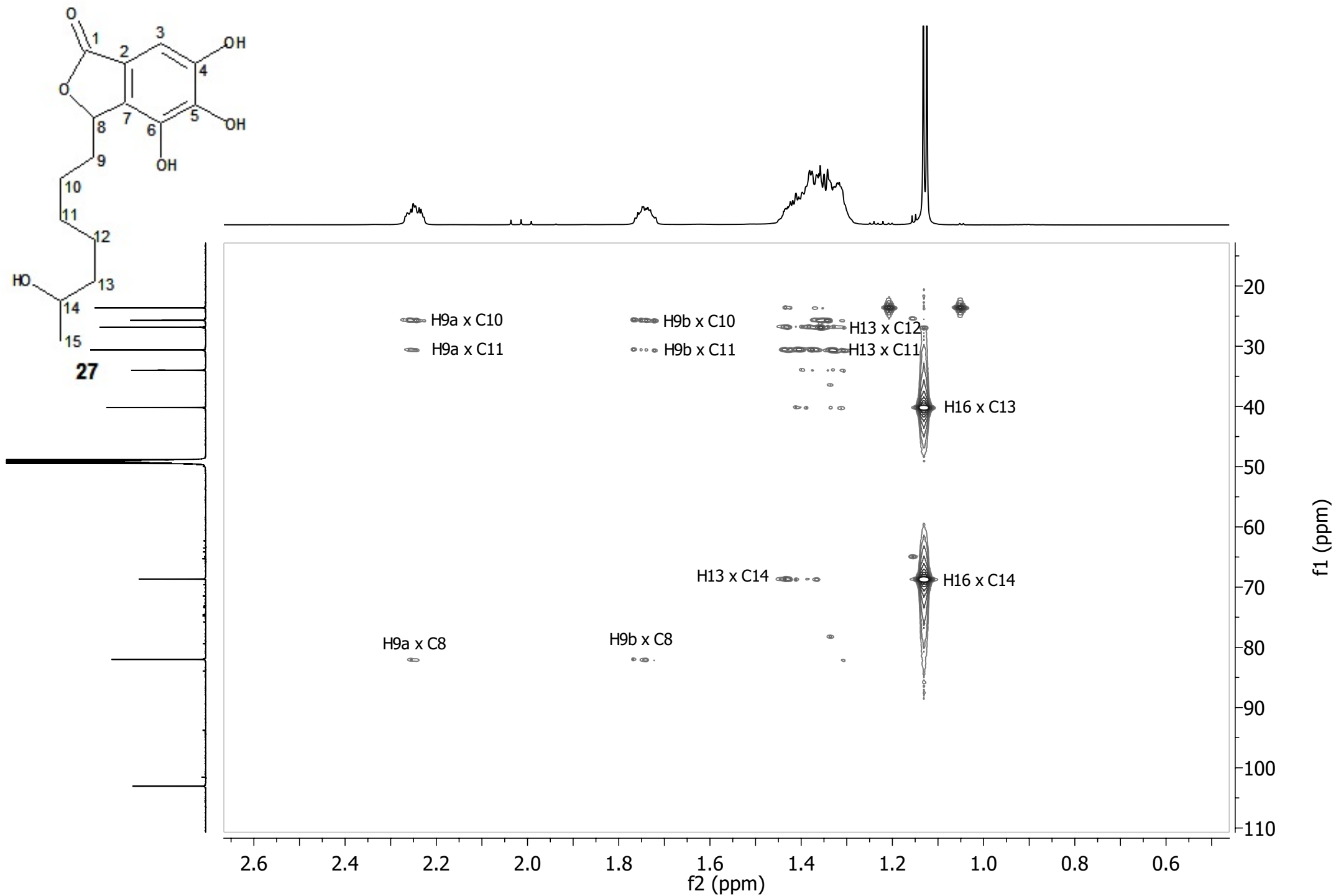
Apêndice 5.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)** entre δ_H 0,8 e 2,8



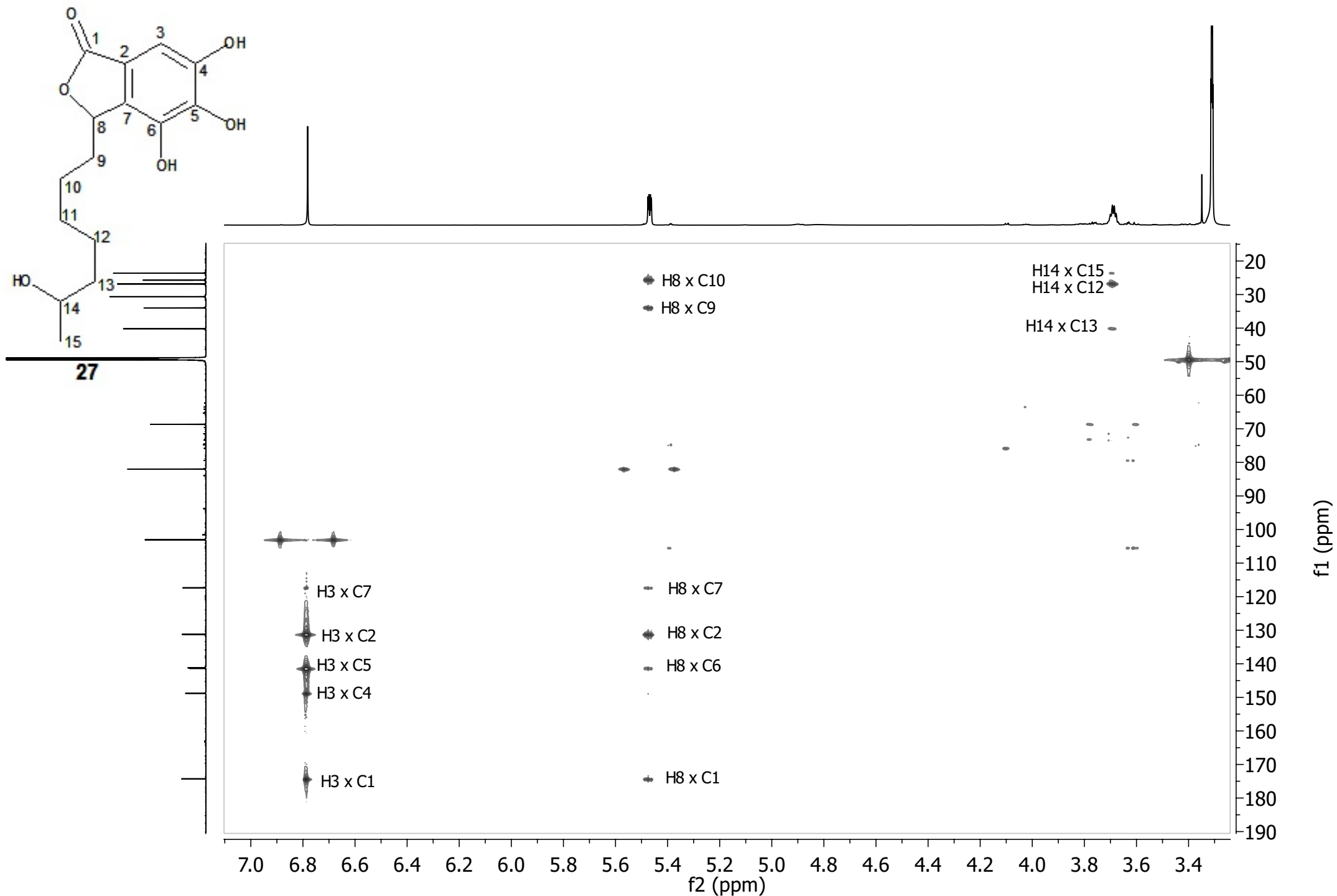
Apêndice 5.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)** entre δ_H 3,0 e 7,0



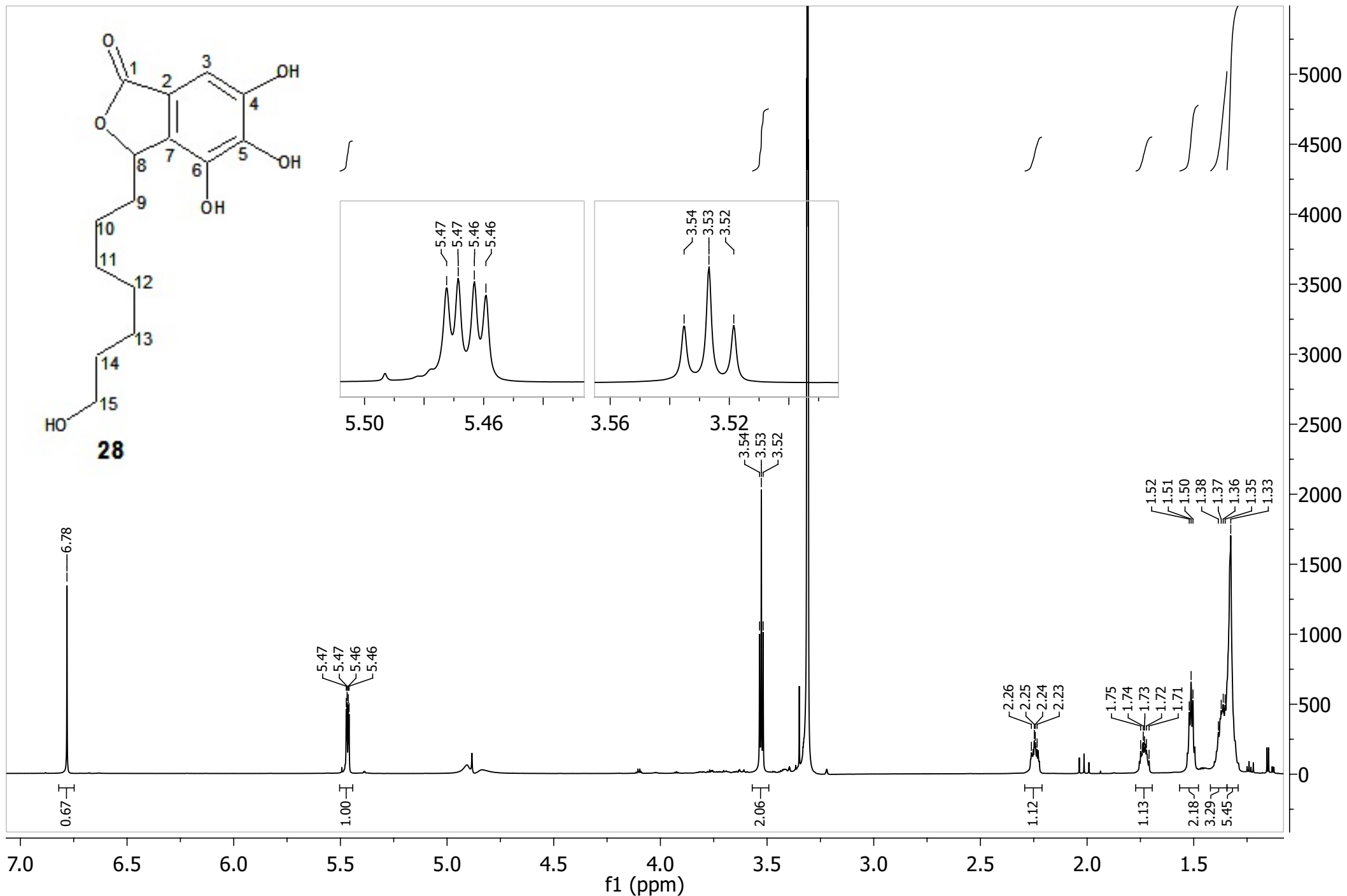
Apêndice 5.7 - Mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)**



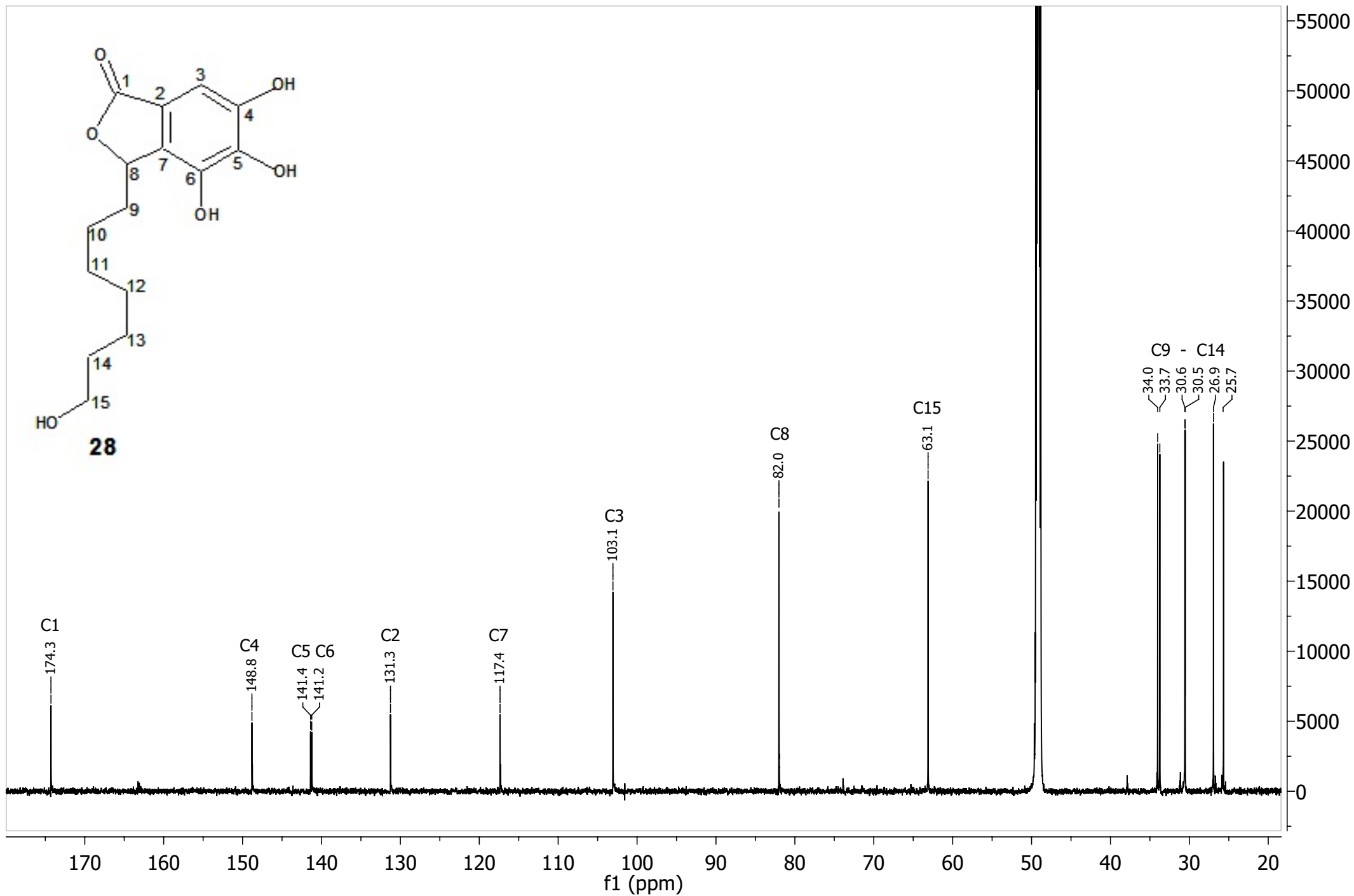
Apêndice 5.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)** entre δ_H 0,6 e 2,60



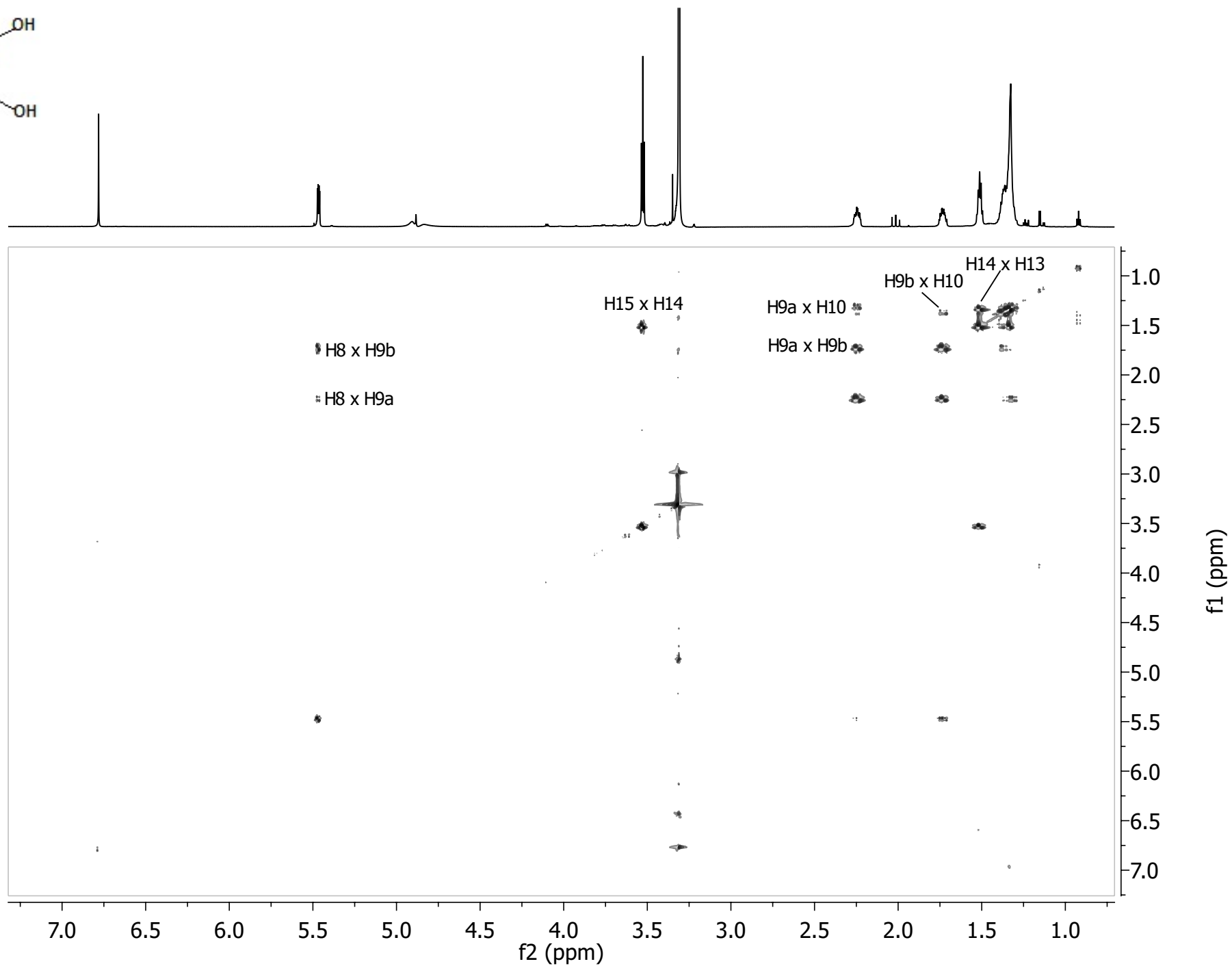
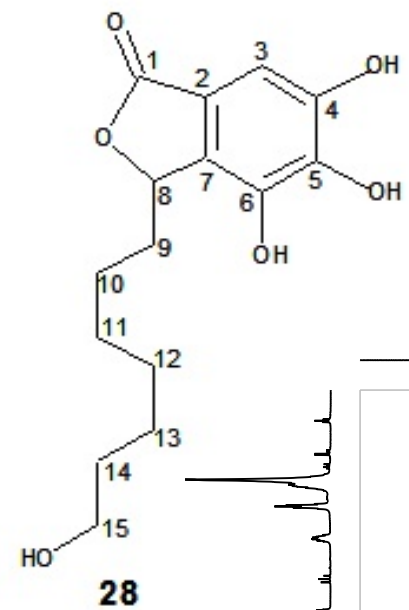
Apêndice 5.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_01 (27)** entre δ_H 3,4 e 7,00



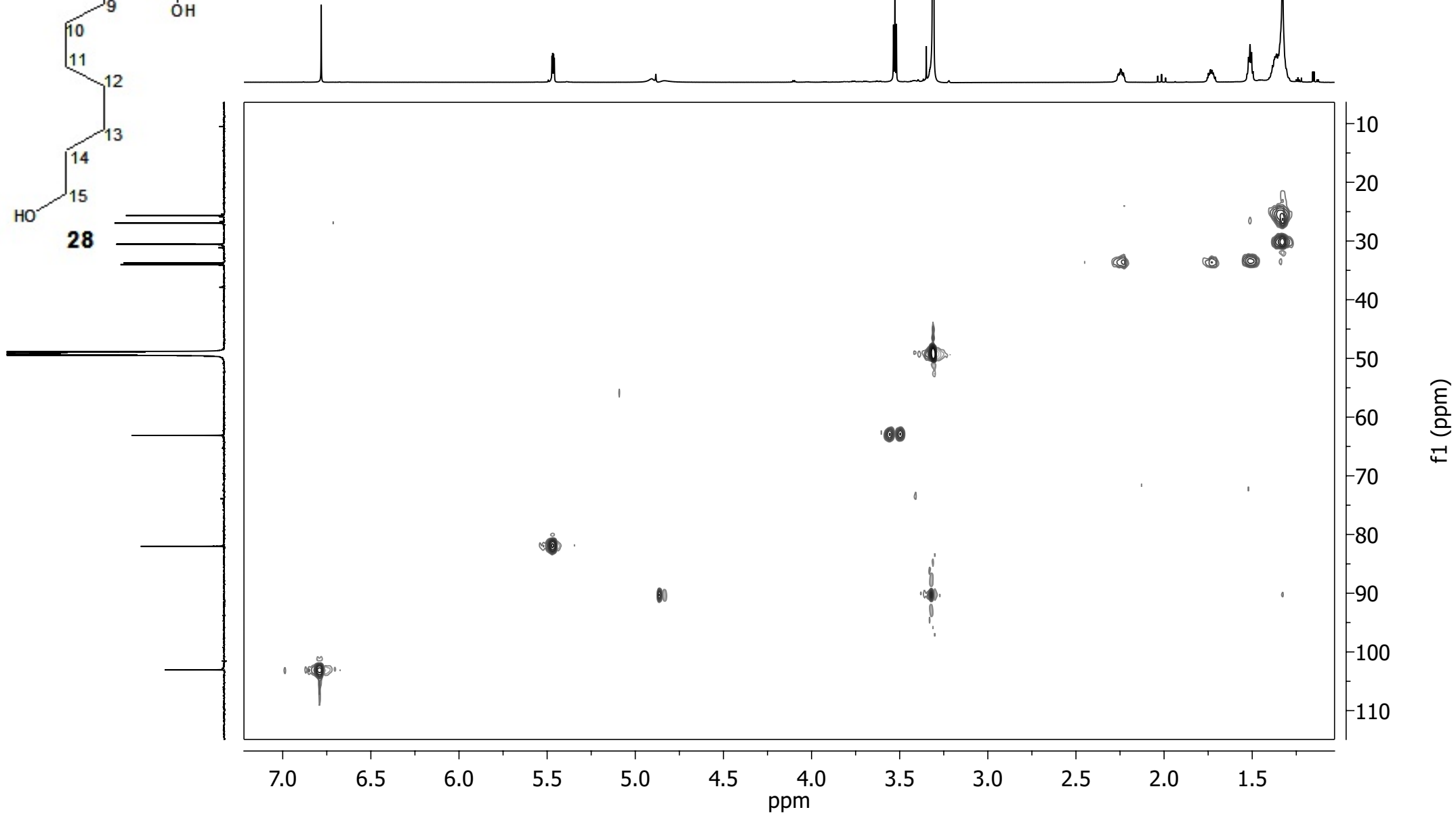
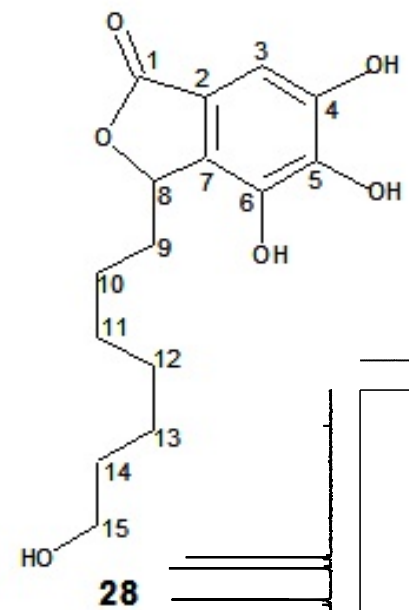
Apêndice 6.1 - Espectro de RMN de ¹H [CD₃OD, 800 MHz] de CYT09_12_02 (28)



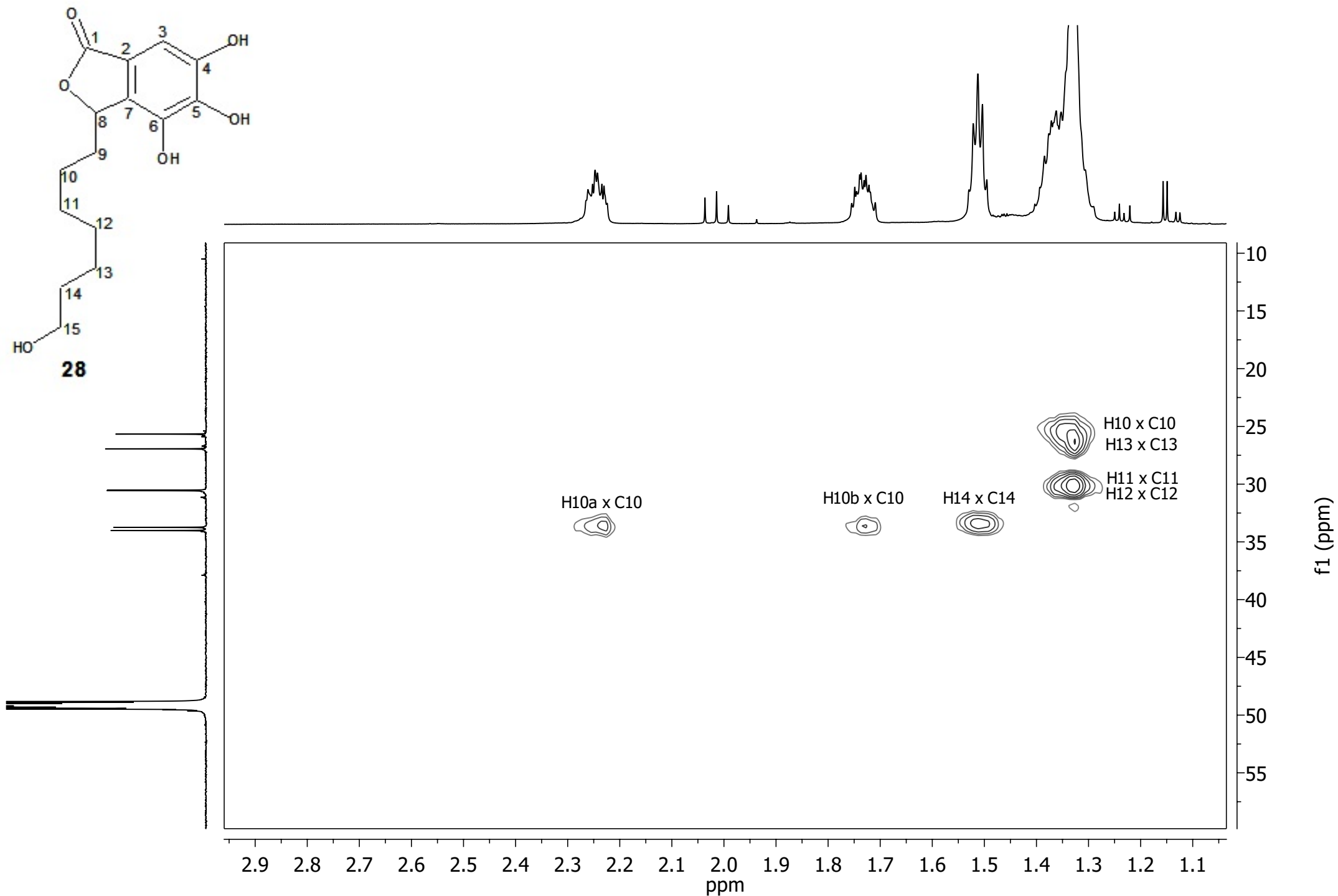
Apêndice 6.2 - Espectro de RMN de ^{13}C [CD_3OD , 200 MHz] de **CYT09_12_02 (28)**



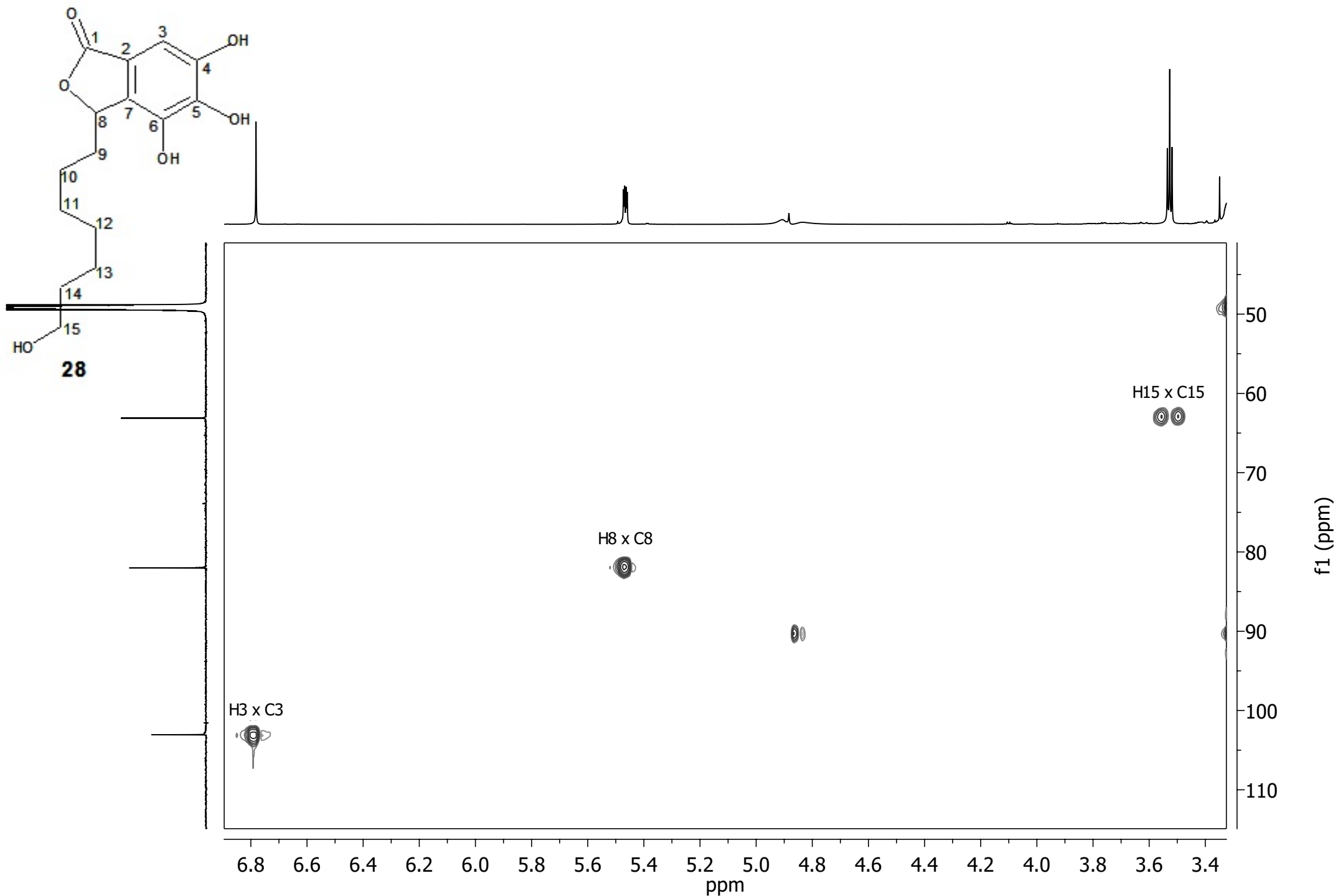
Apêndice 6.3 - Mapa de contornos COSY [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)**



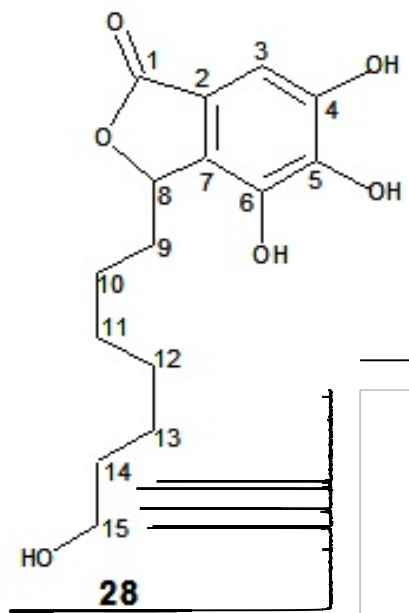
Apêndice 6.4 - Mapa de contornos HSQC [CD_3OD , 800 MHz] de CYT09_12_02 (28)



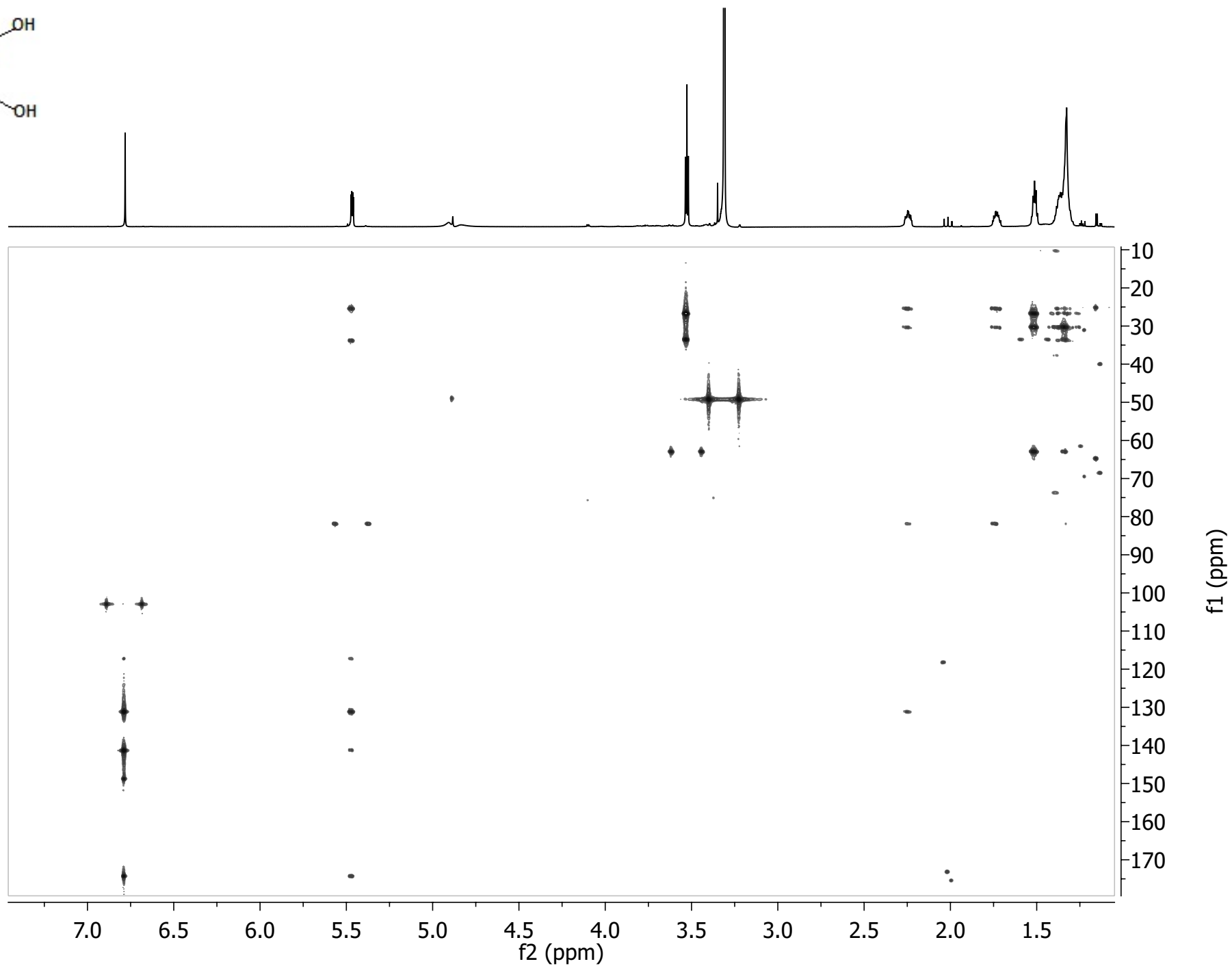
Apêndice 6.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)** entre δ_H 1,1 e 2,9



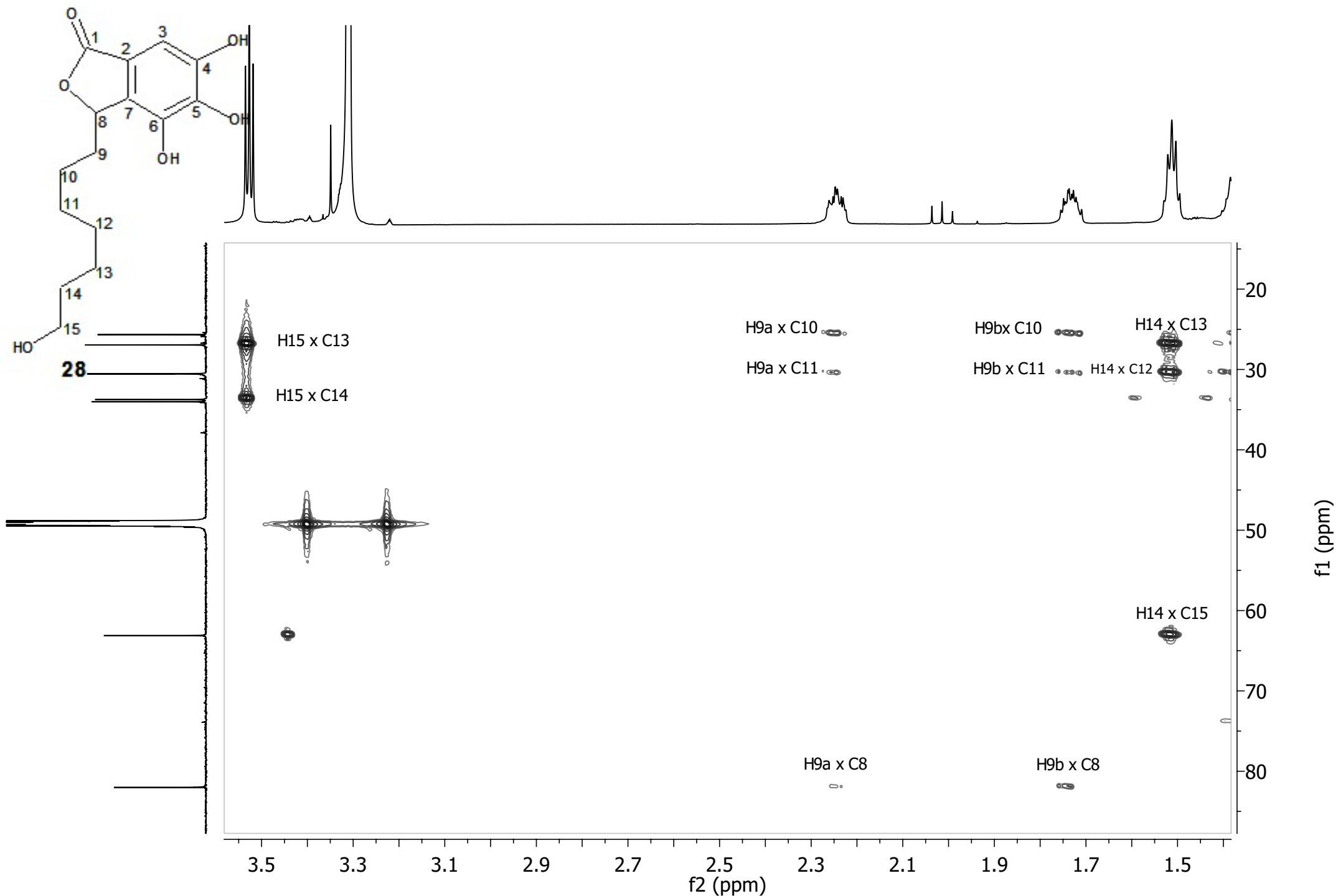
Apêndice 6.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)** entre δ_H 3,4 e 6,9



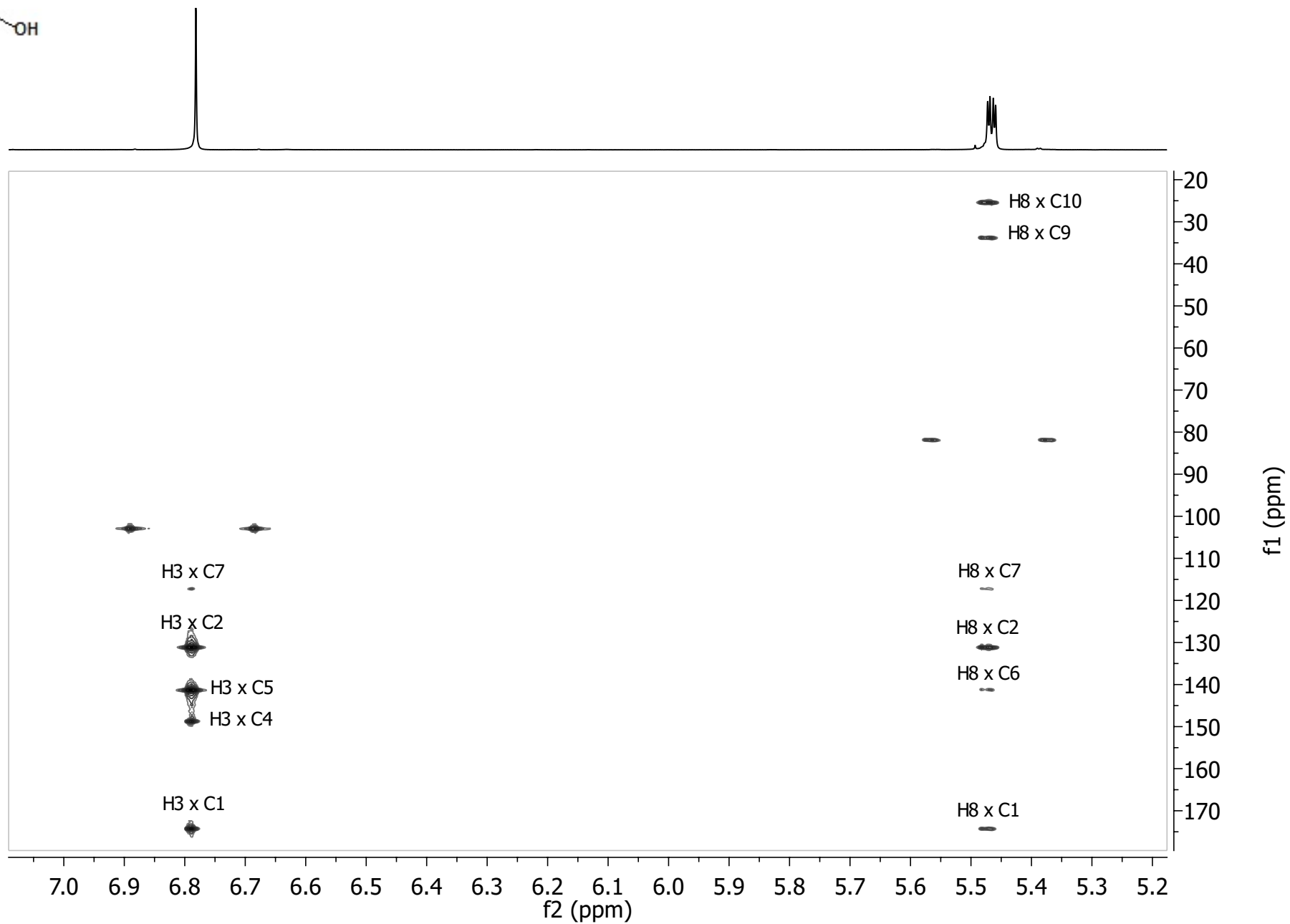
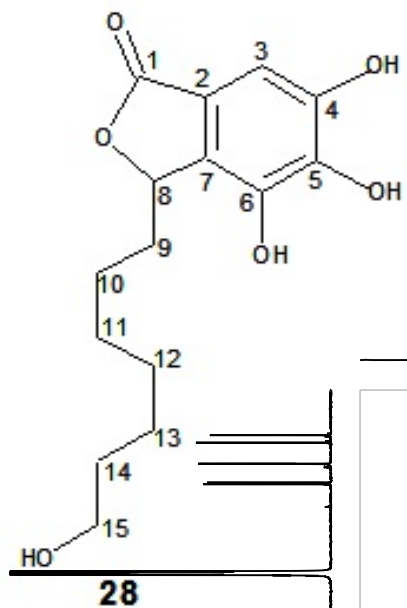
28



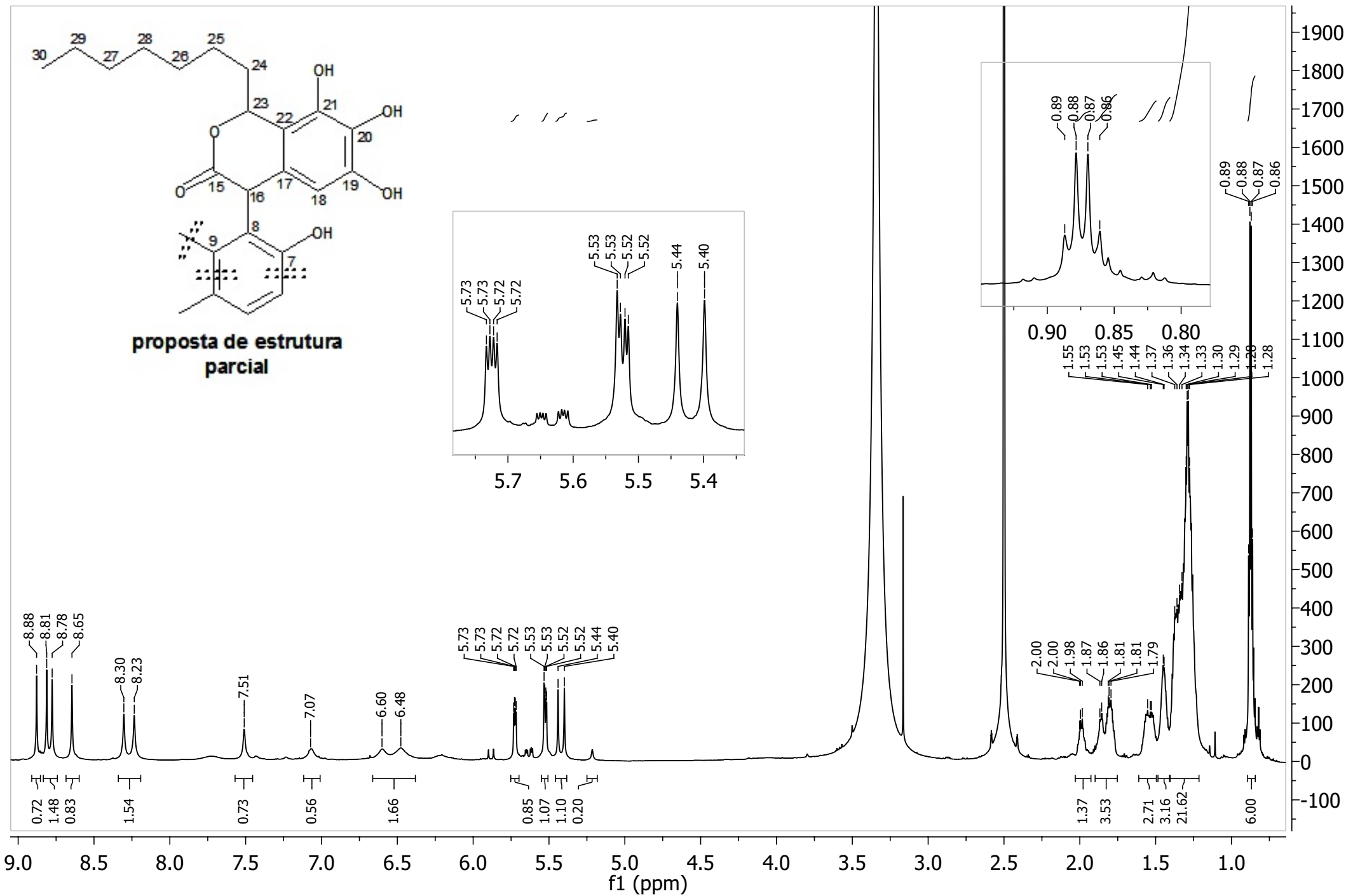
Apêndice 6.7 - Mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)**



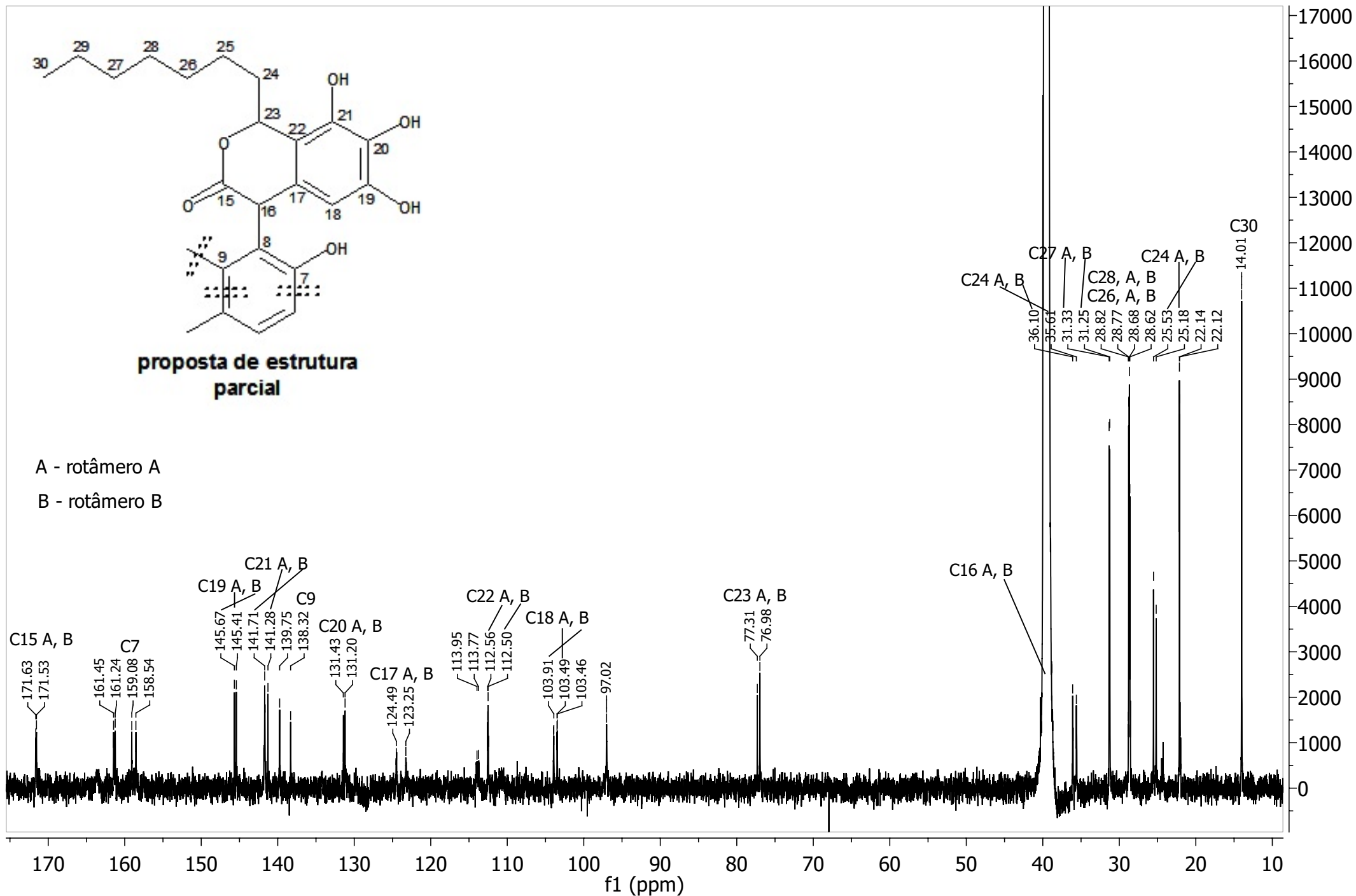
Apêndice 6.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)** entre δ_H 1,0 e 3,90



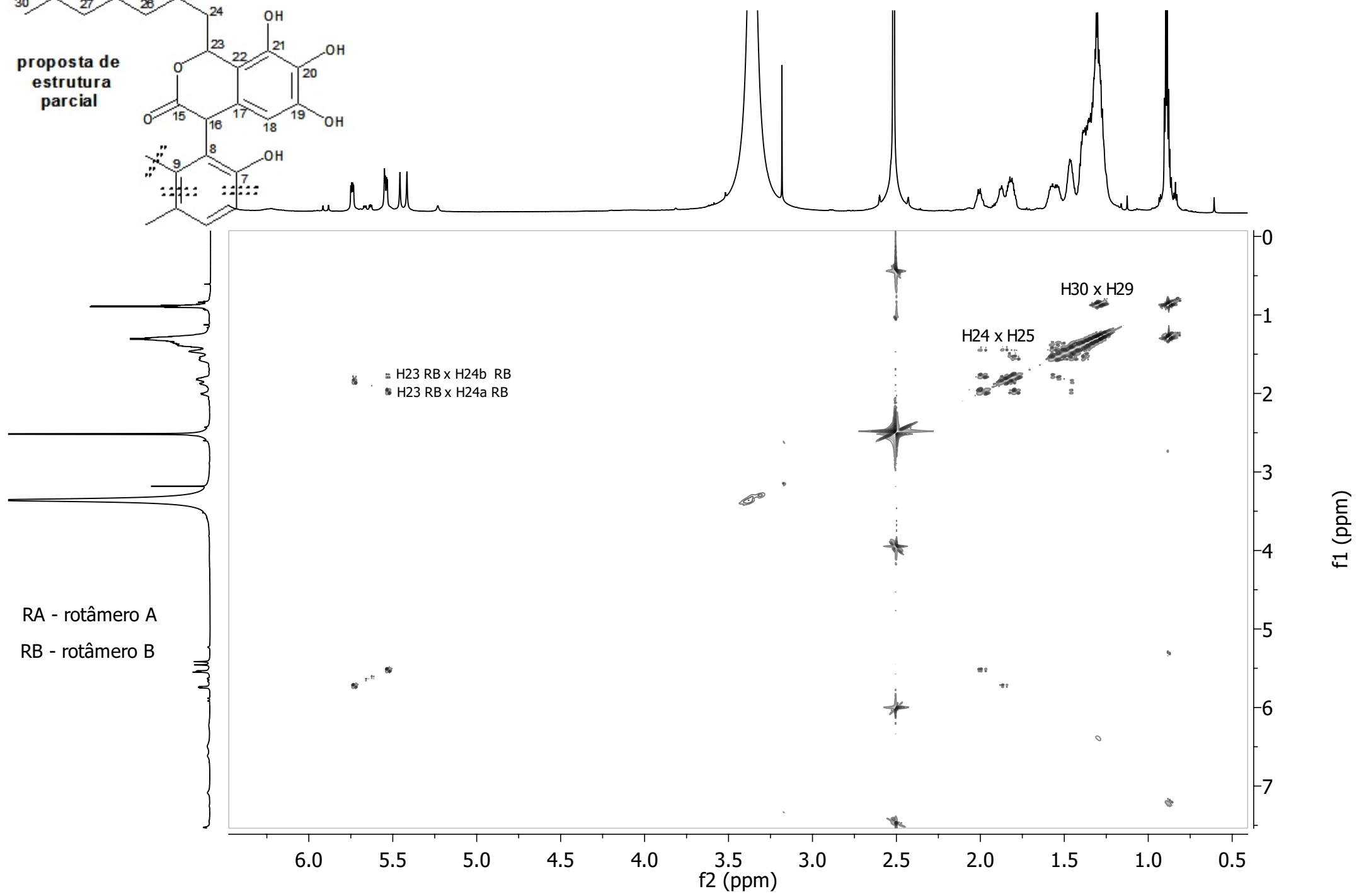
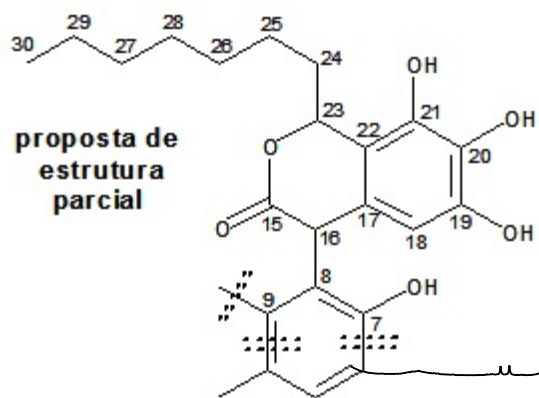
Apêndice 6.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃OD, 800 MHz] de **CYT09_12_02 (28)** entre δ_H 5,2 e 7,00



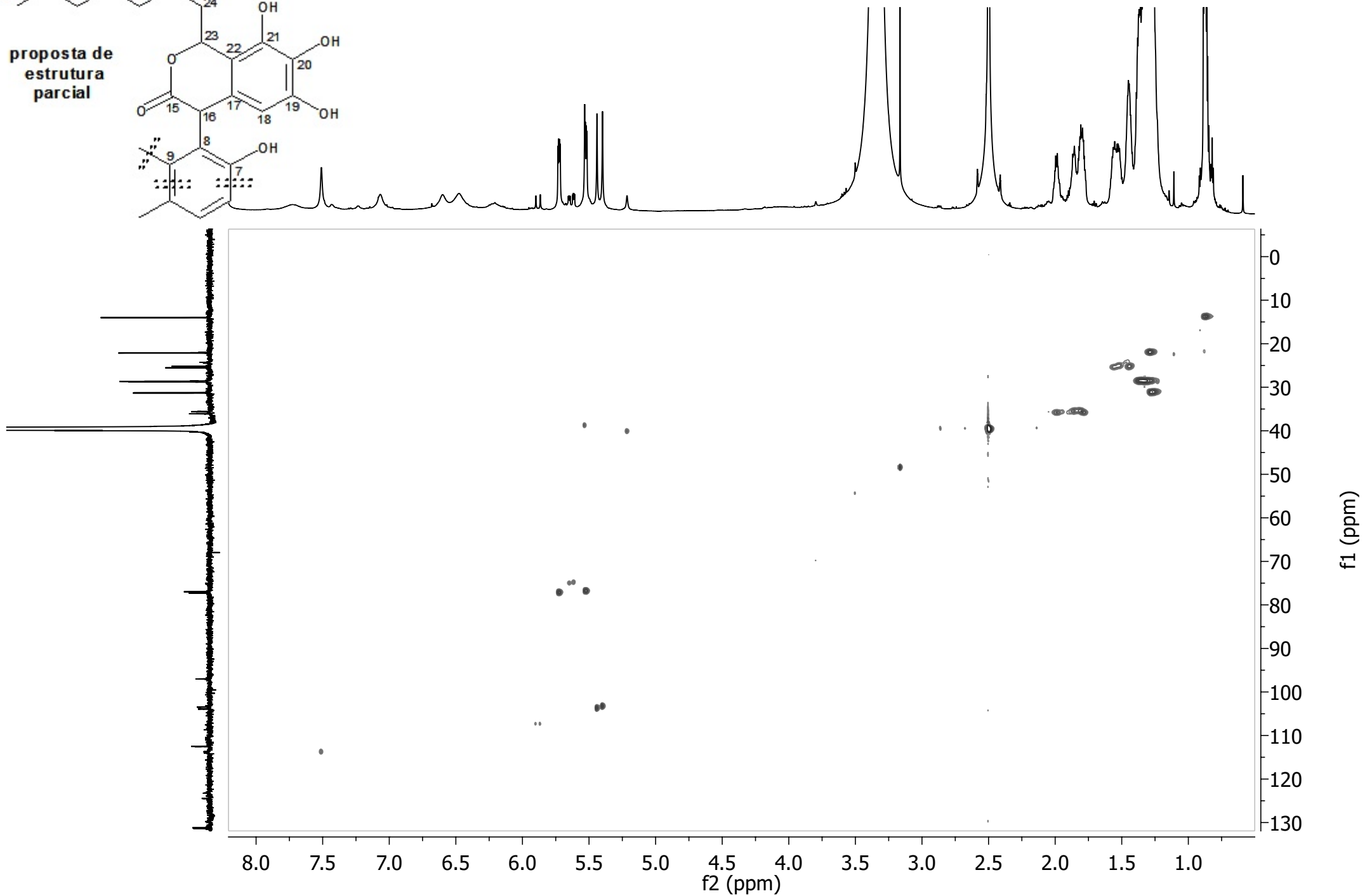
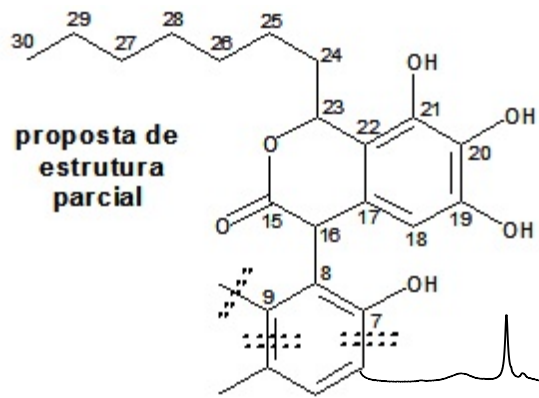
Apêndice 7.1 - Espectro de RMN de ^1H [(CD_3) $_2\text{SO}$, 800 MHz] de CYT11_10-11_04



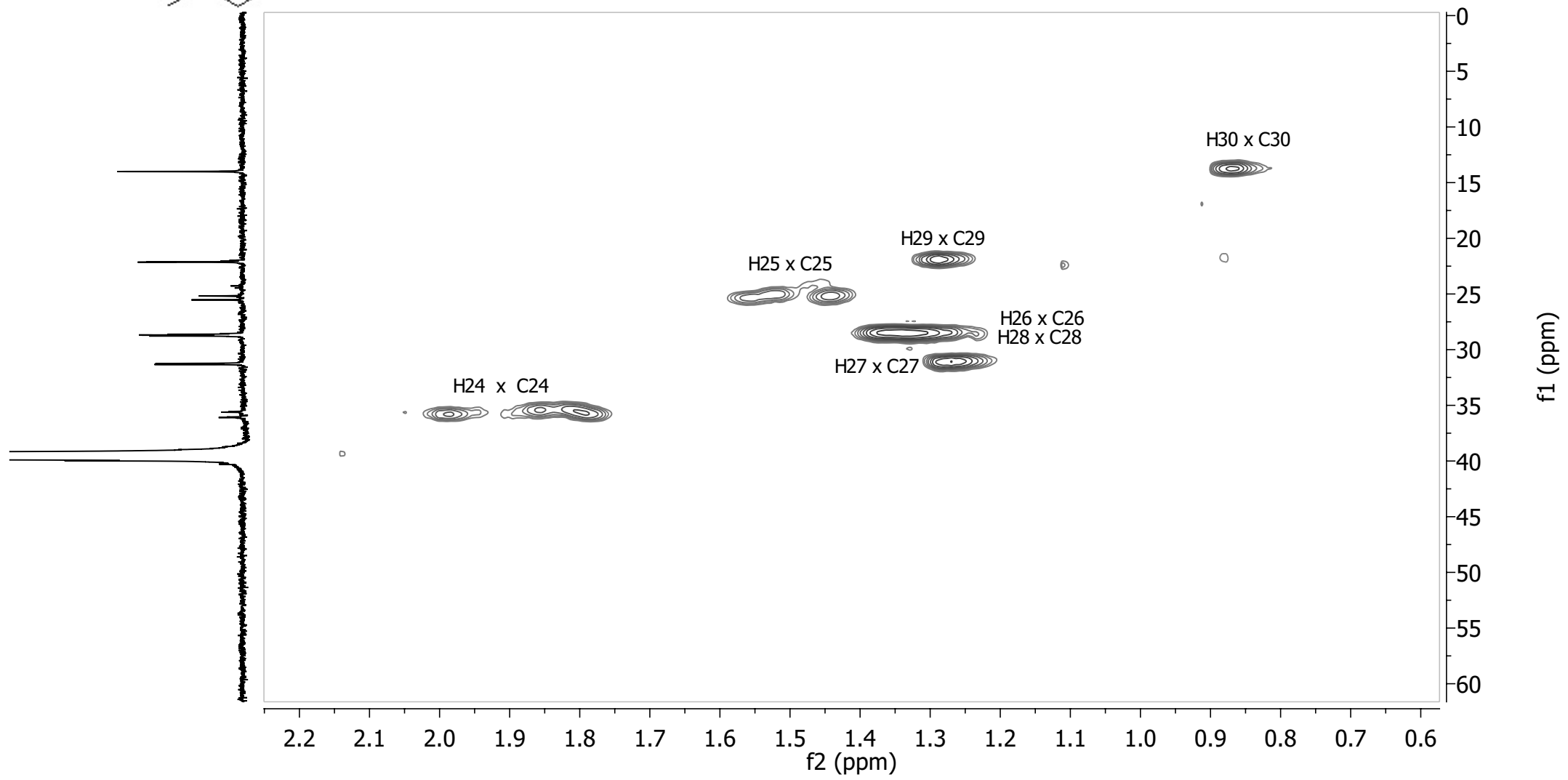
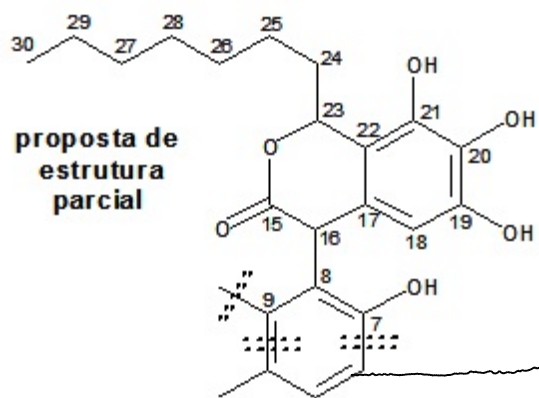
Apêndice 7.2 - Espectro de RMN de ¹³C [(CD₃)₂SO, 200 MHz] de CYT11_10-11_04



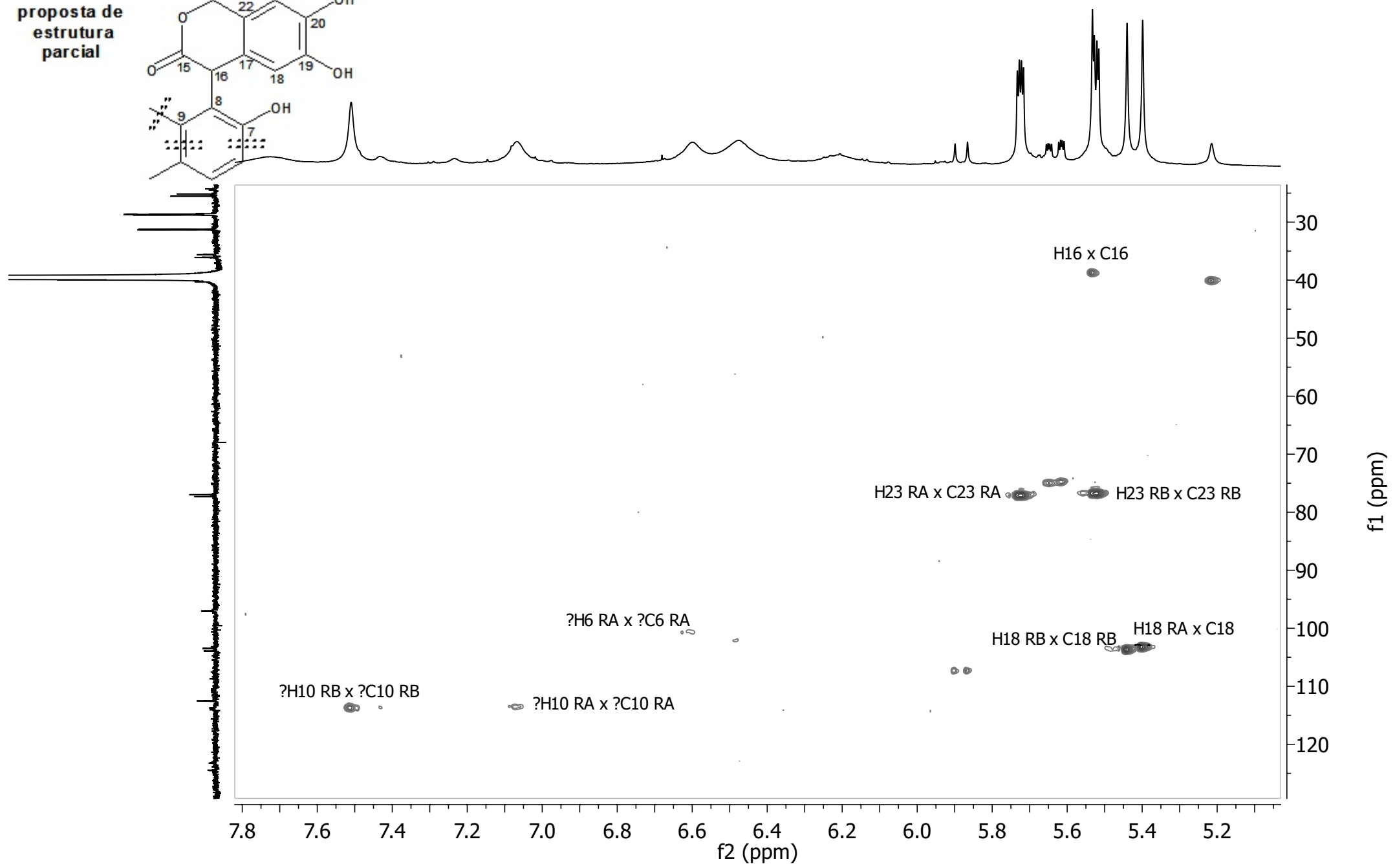
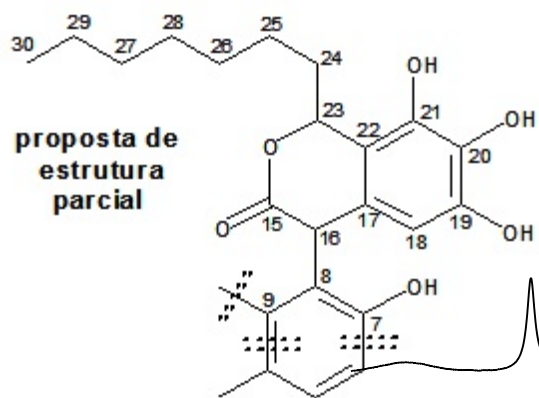
Apêndice 7.3 - Mapa de contornos COSY [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de CYT11_10-11_04



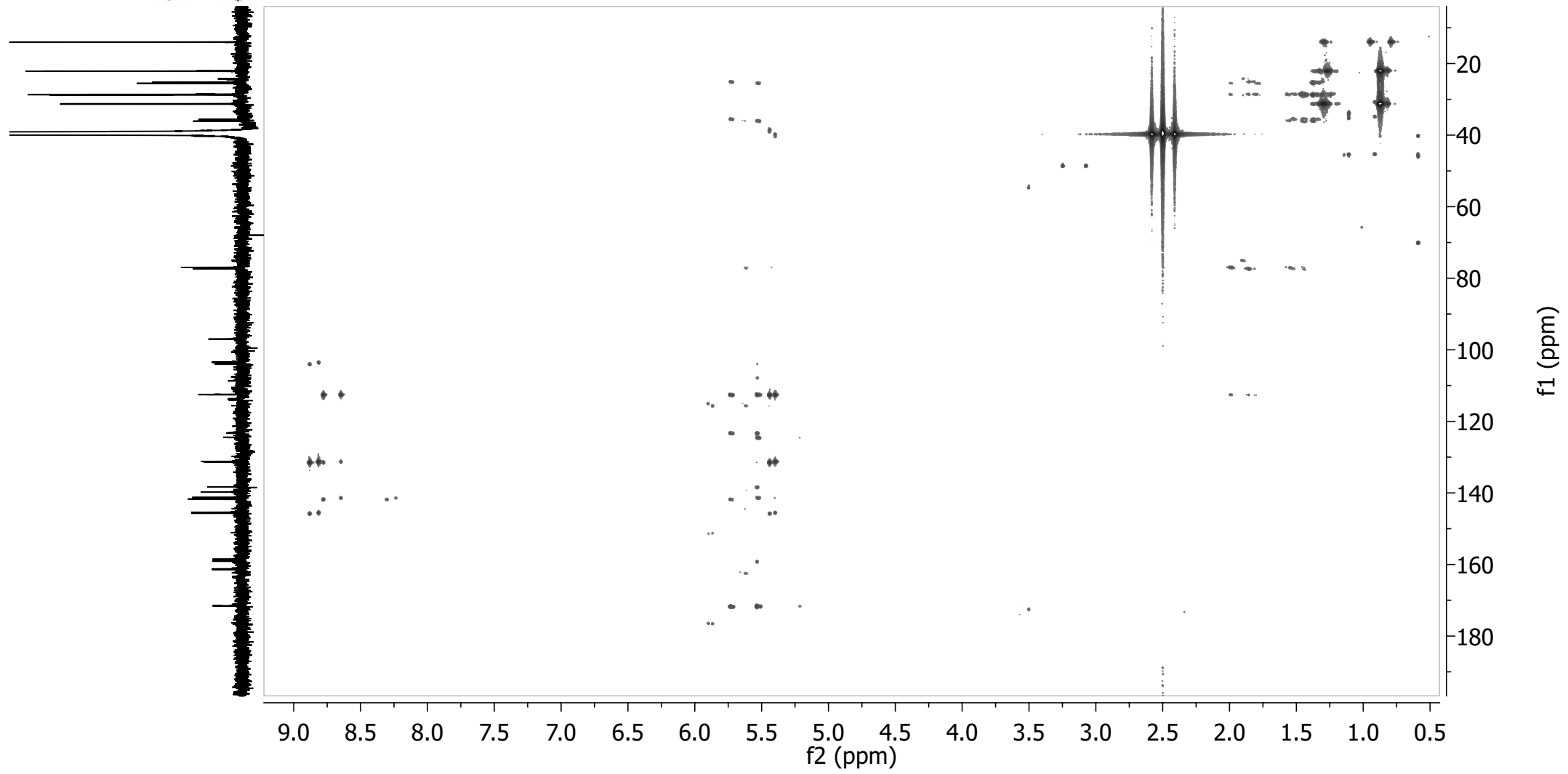
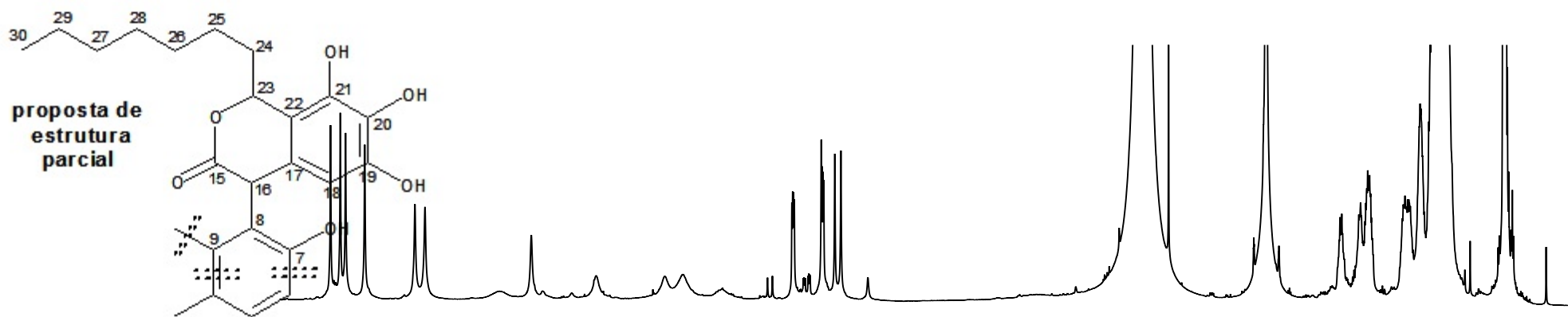
Apêndice 7.4 - Mapa de contornos HSQC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de CYT11_10-11_04



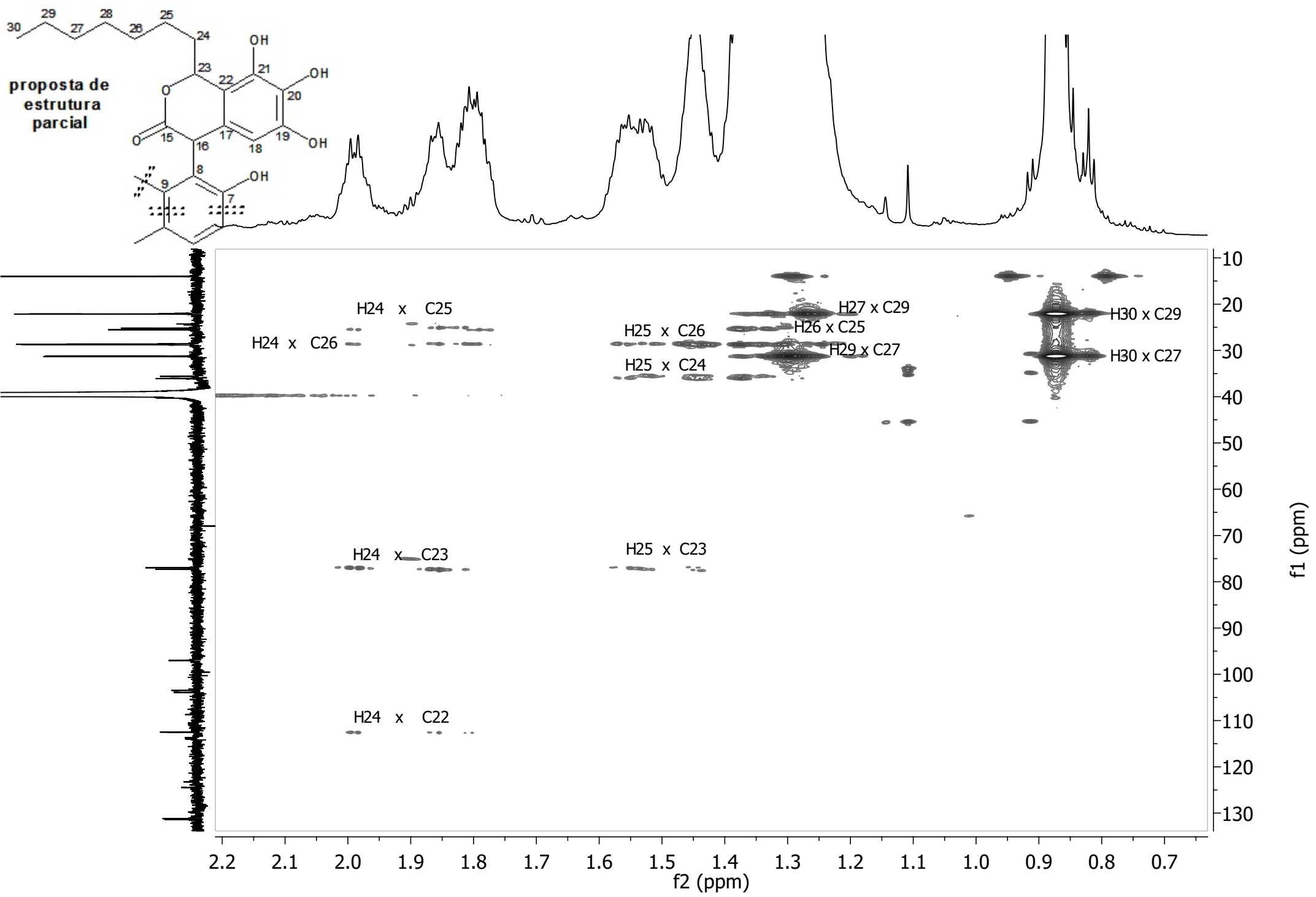
Apêndice 7.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_04** entre δ_{H} 0,60 e 2,20



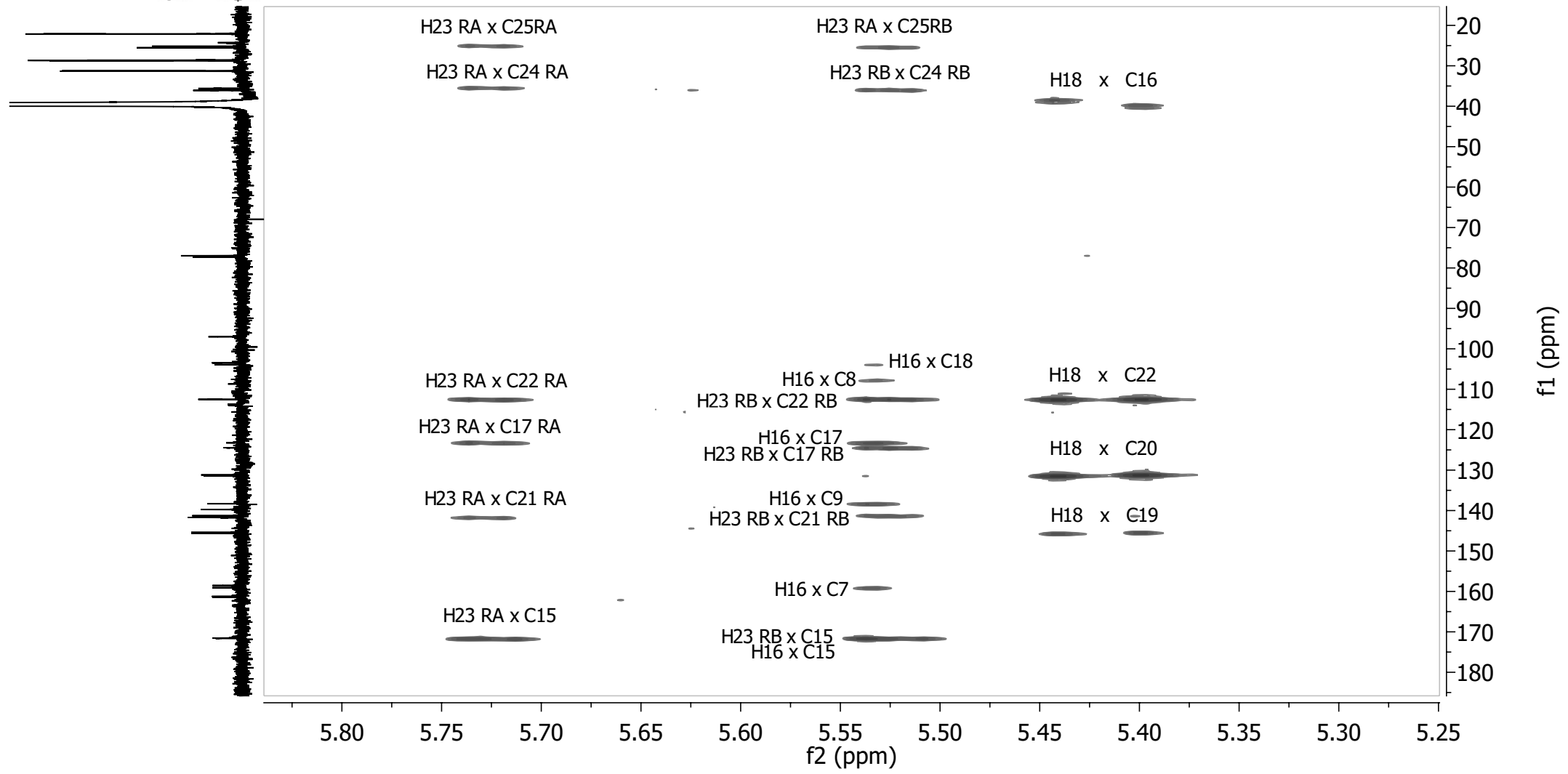
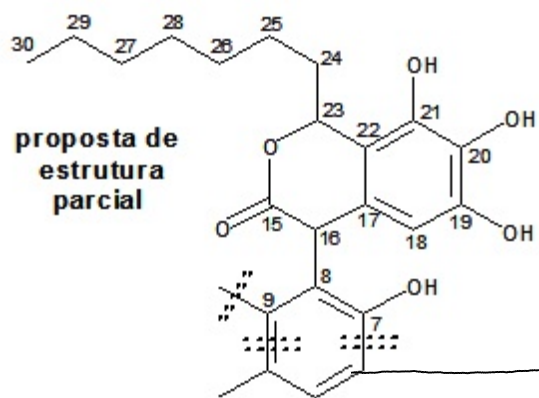
Apêndice 7.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_04** entre δ_H 5,10 e 7,80



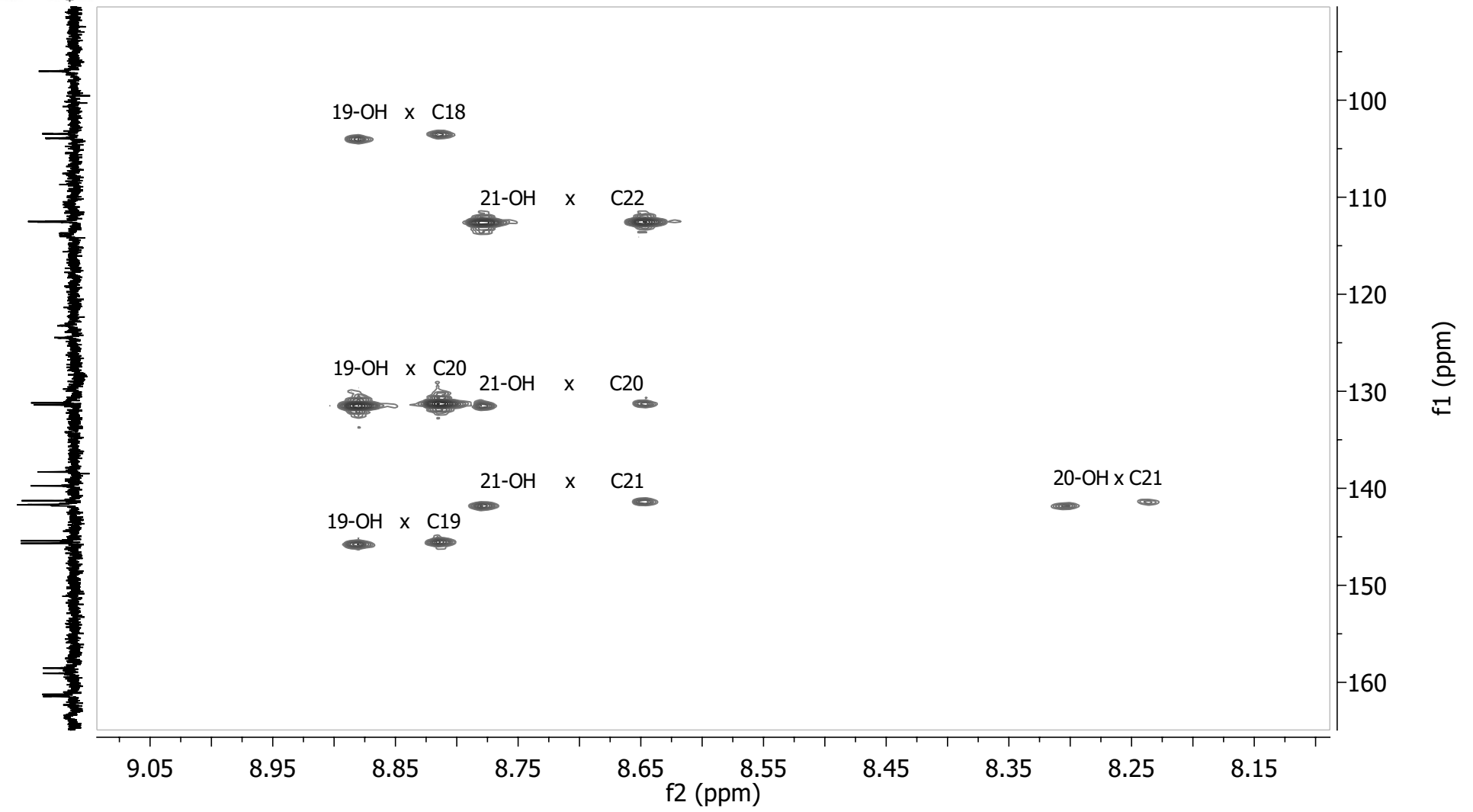
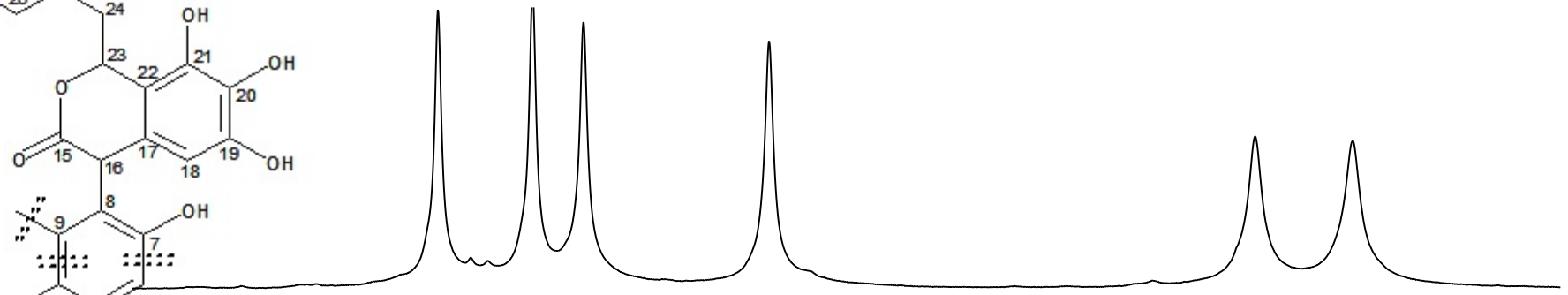
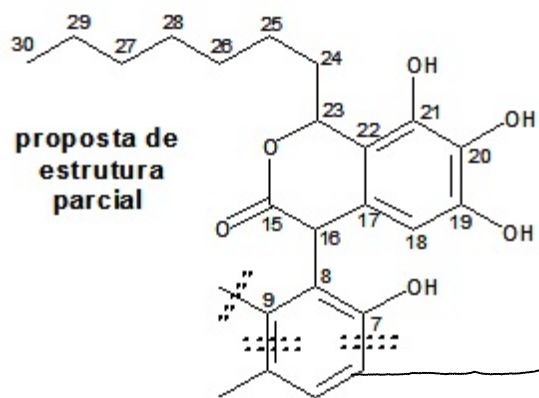
Apêndice 7.7 - Mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de CYT11_10-11_04



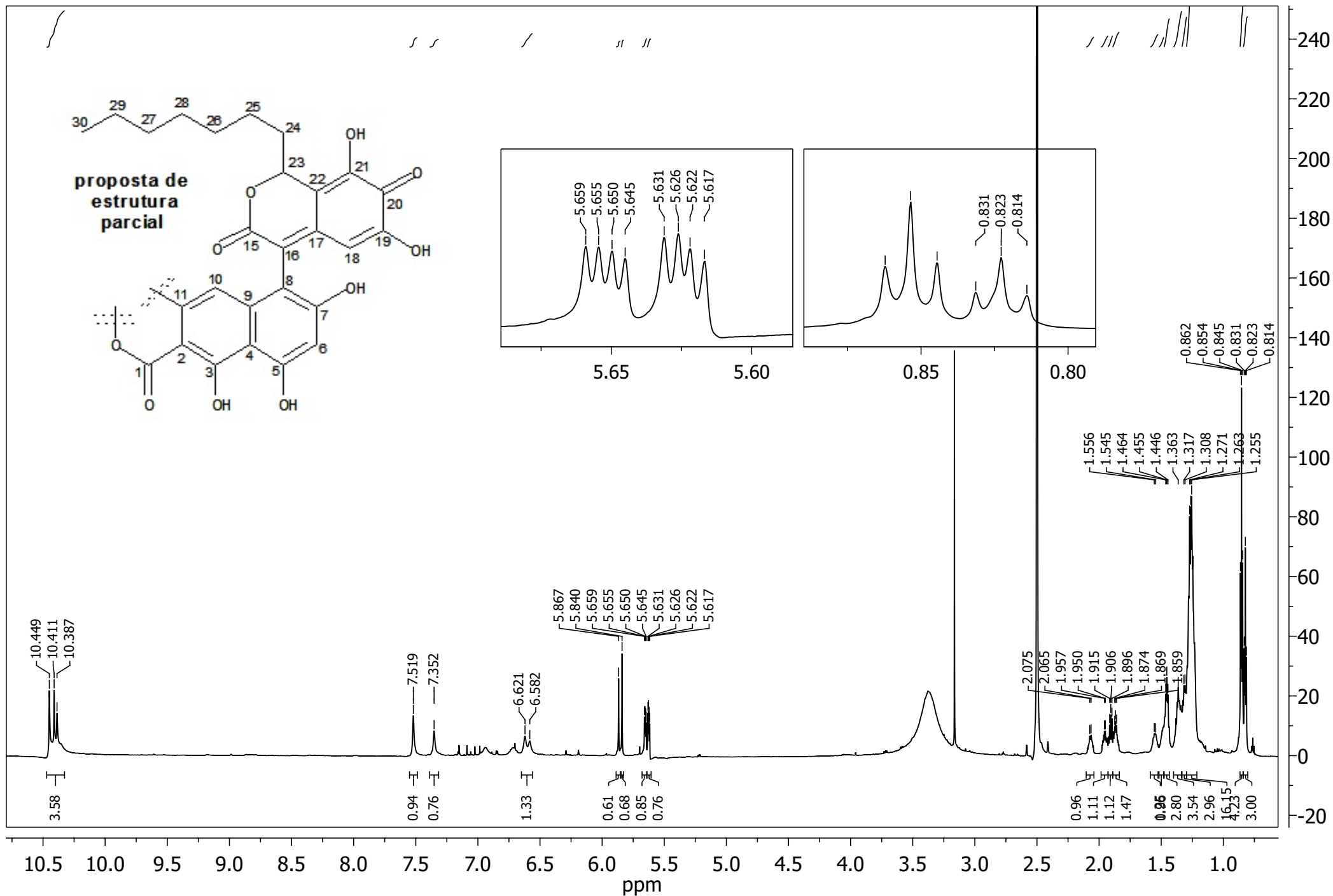
Apêndice 7.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_04** entre δ_{H} 0,70 e 2,20



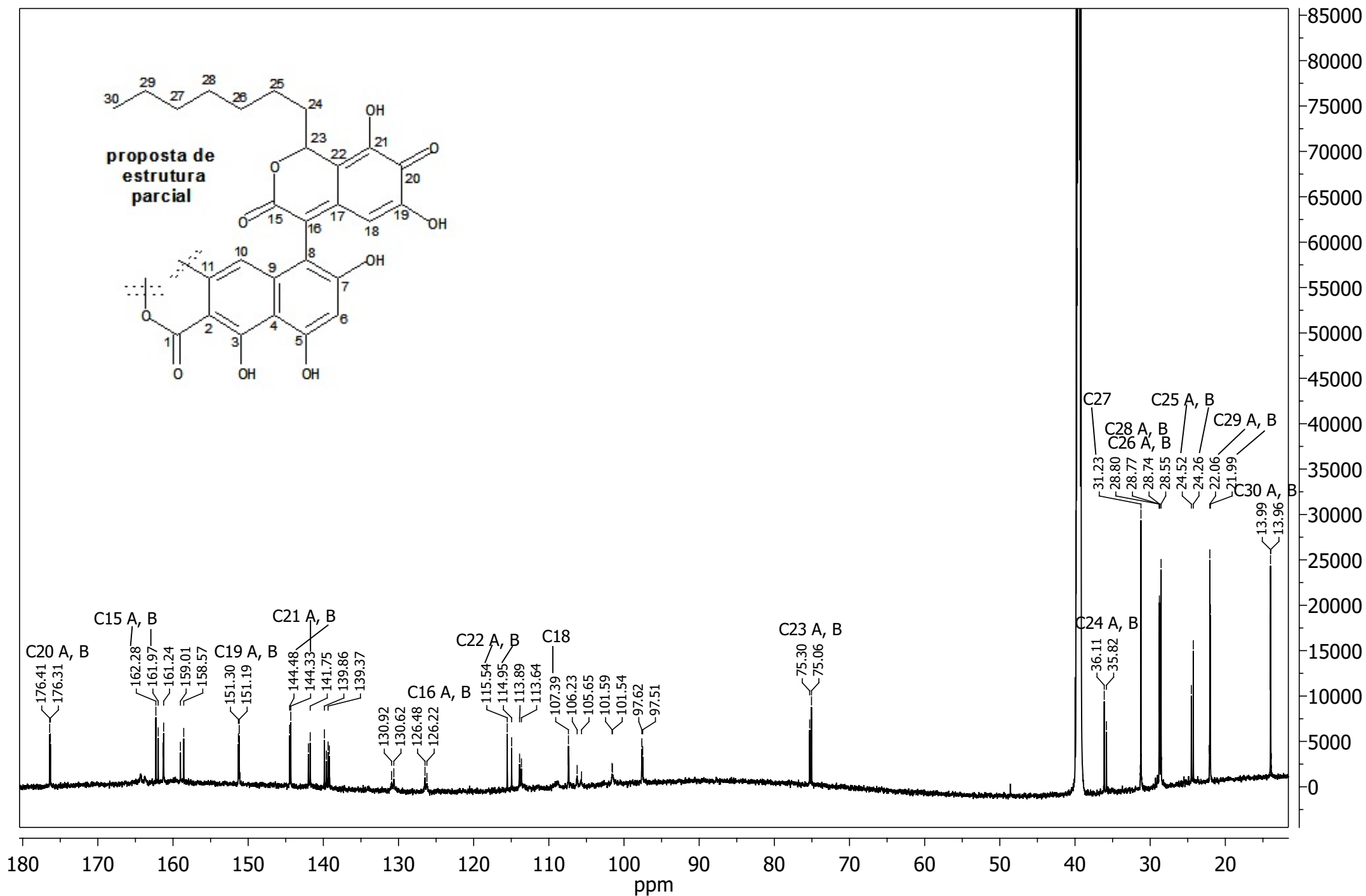
Apêndice 7.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_04** entre δ_H 5,25 e 5,90



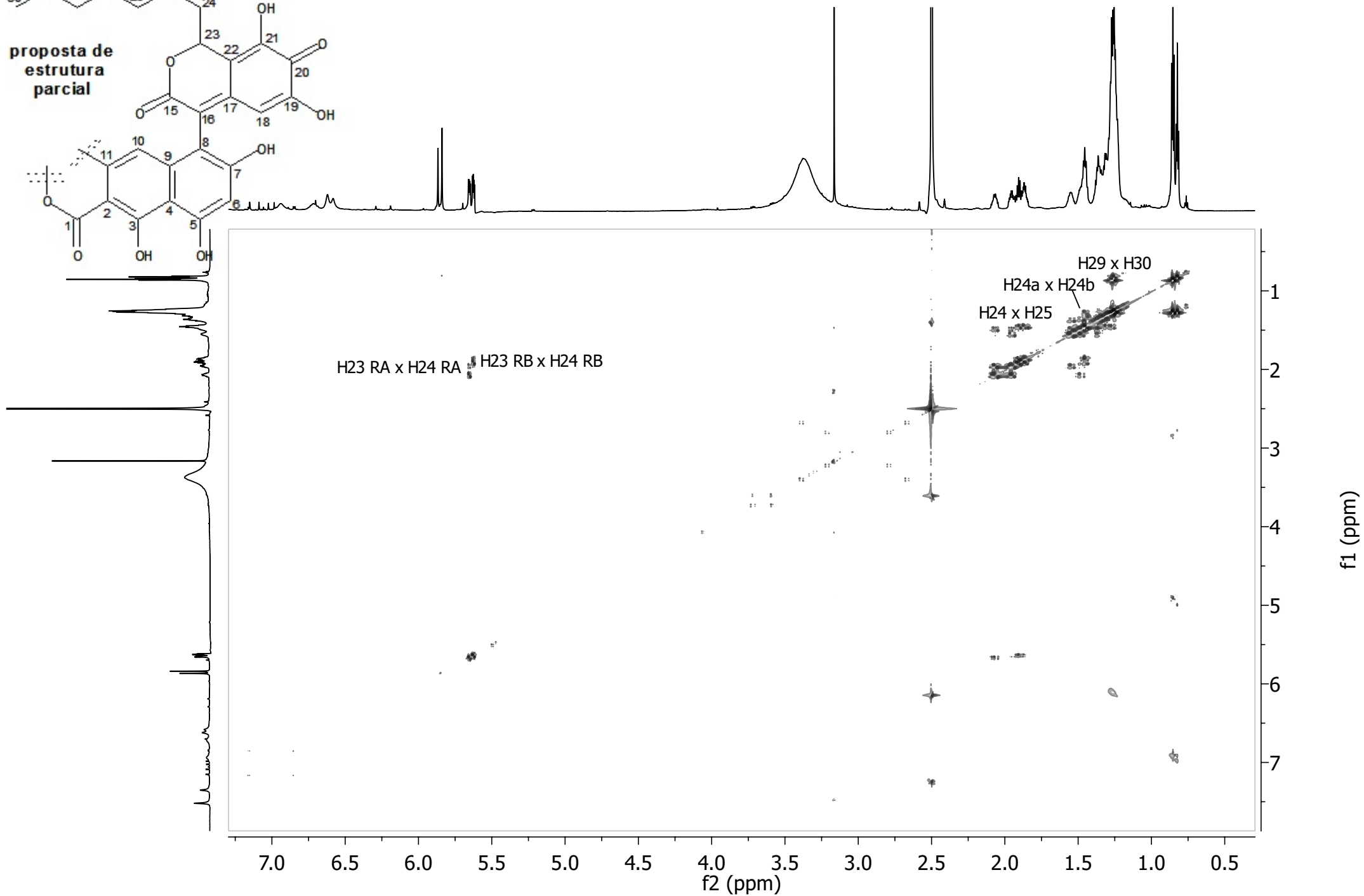
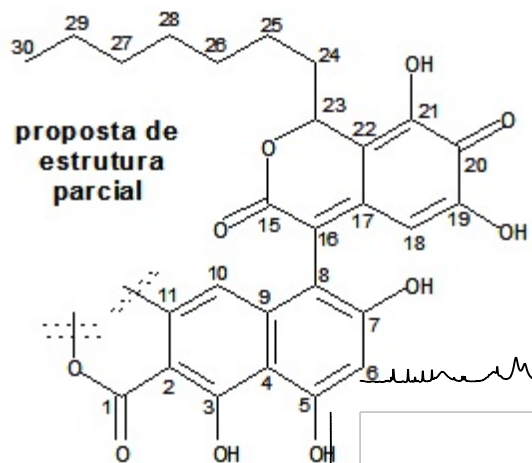
Apêndice 7.10 - Expansão do mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_04** entre δ_H 8,14 e 9,05



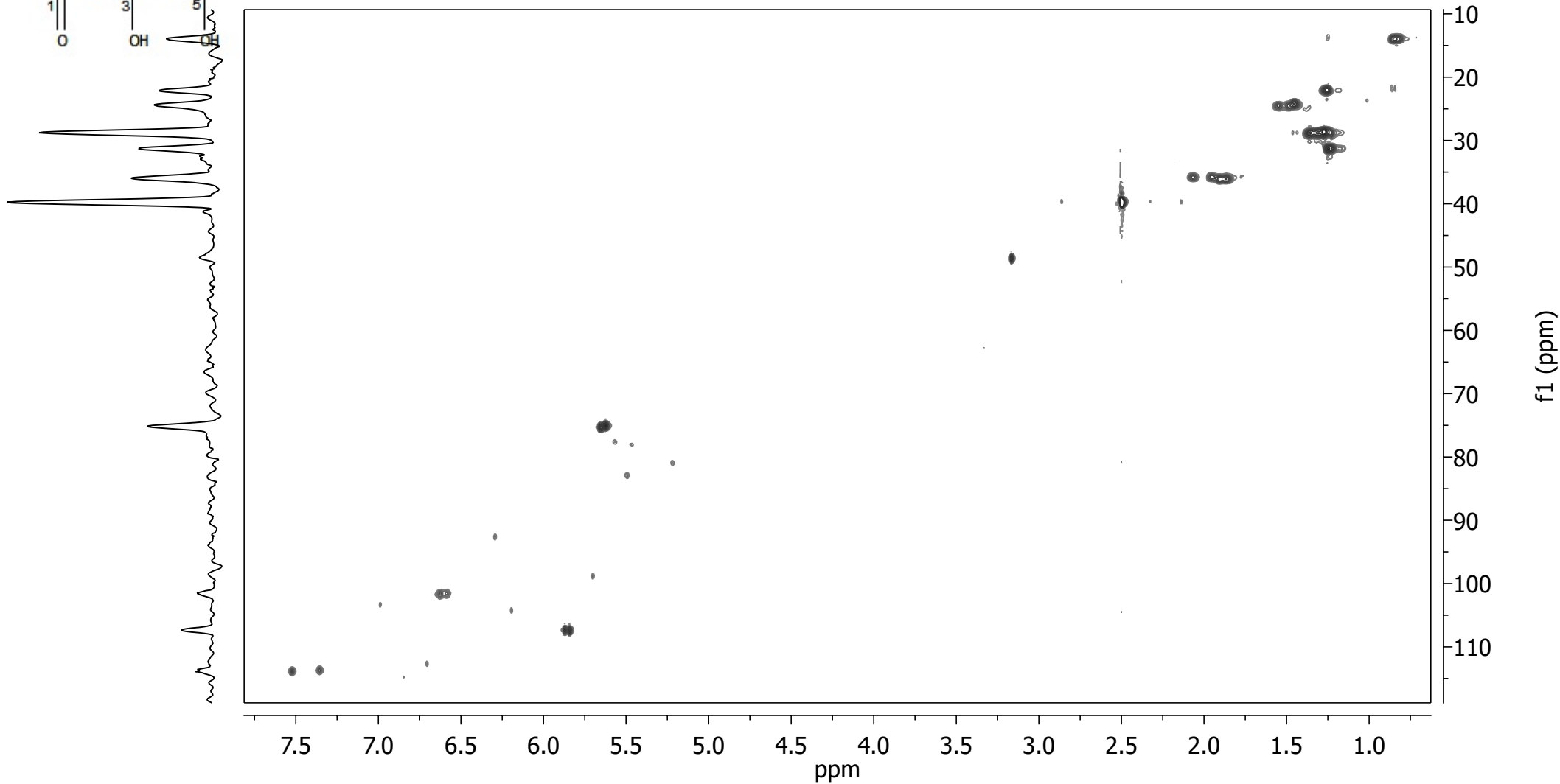
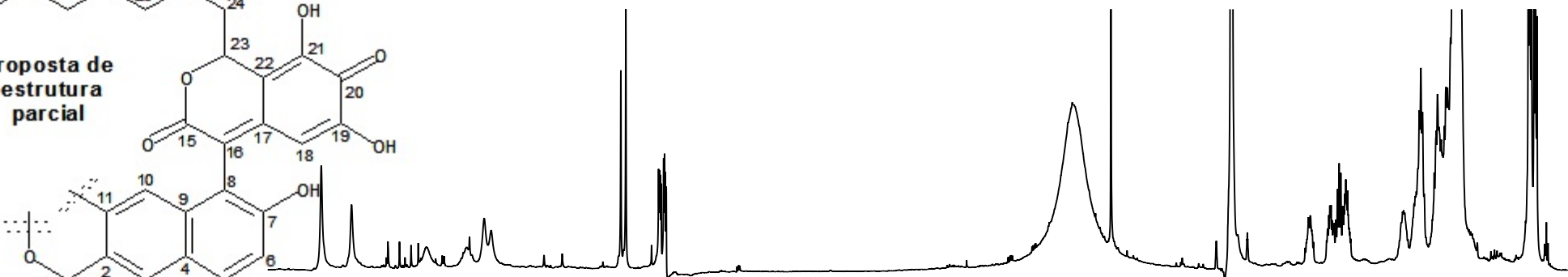
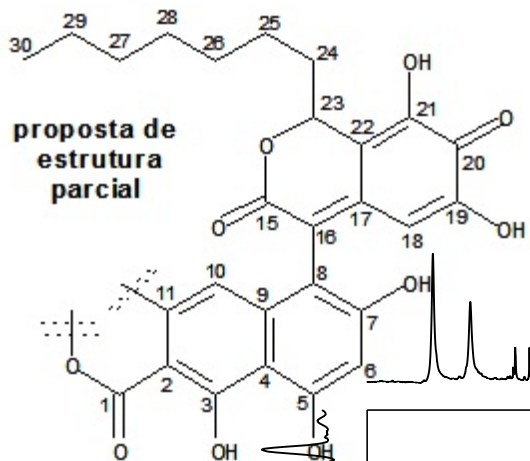
Apêndice 8.1 - Espectro de RMN de ^1H [(CD_3) $_2\text{SO}$, 800 MHz] de CYT11_10-11_05



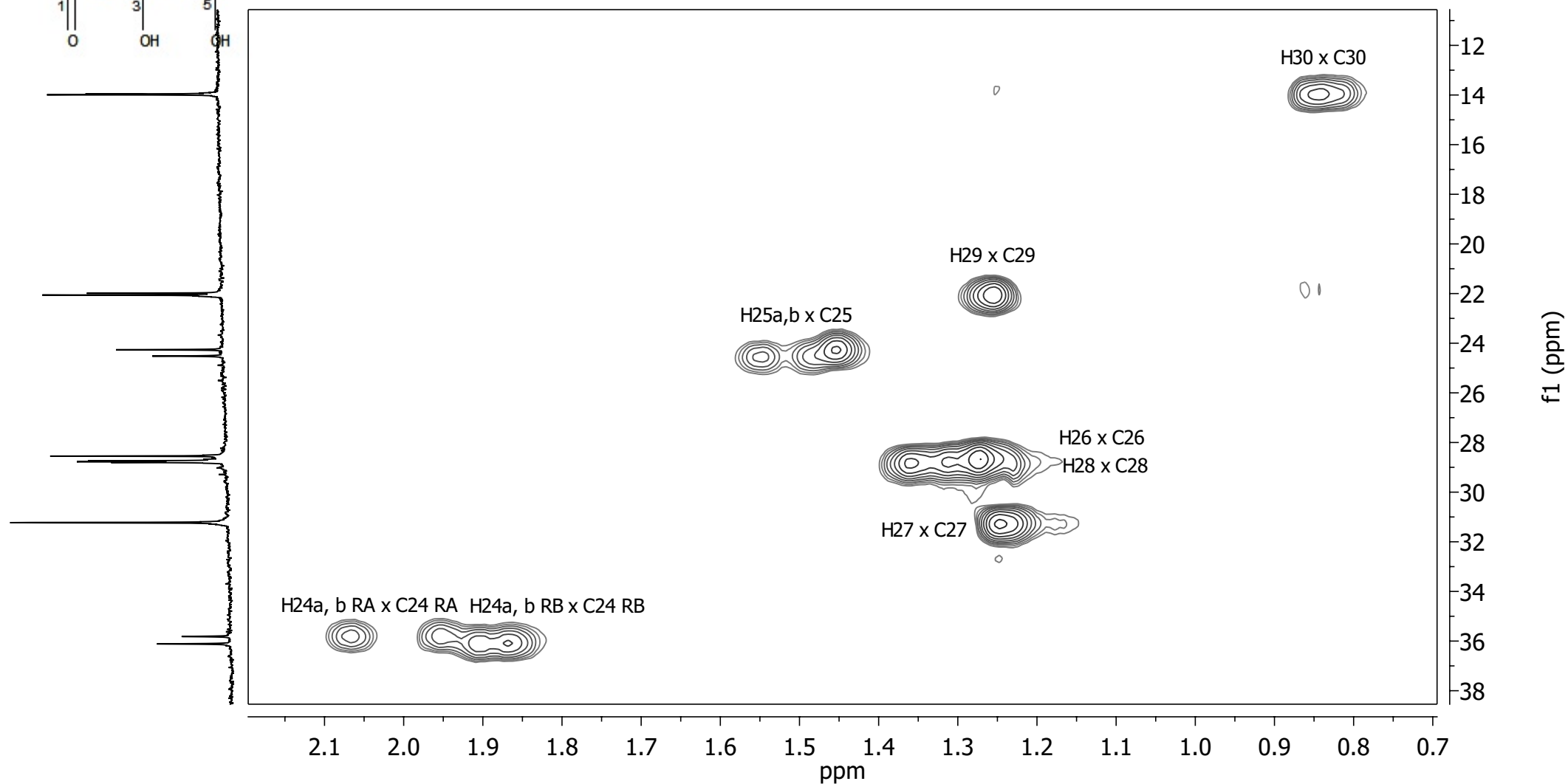
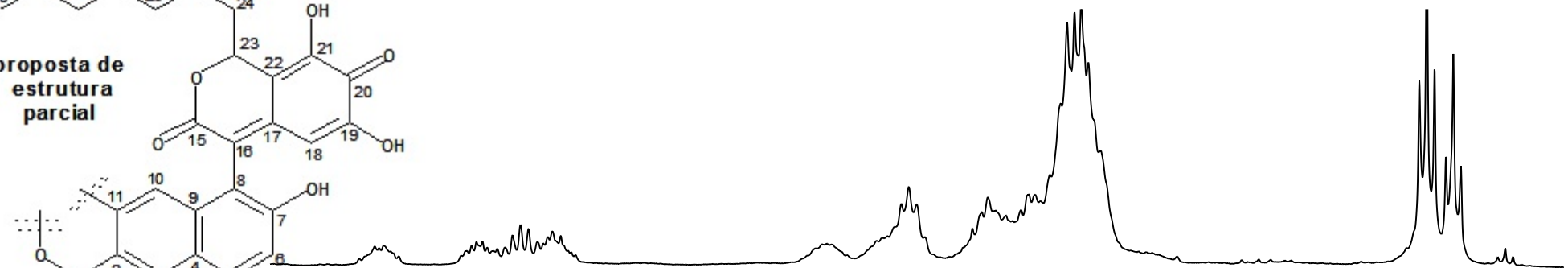
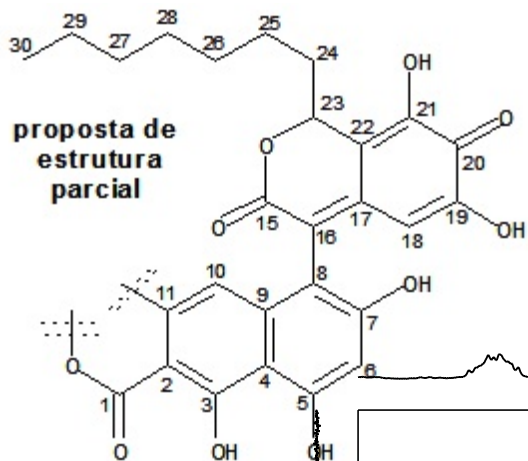
Apêndice 8.2 - Espectro de RMN de ¹³C [(CD₃)₂SO, 200 MHz] de CYT11_10-11_05



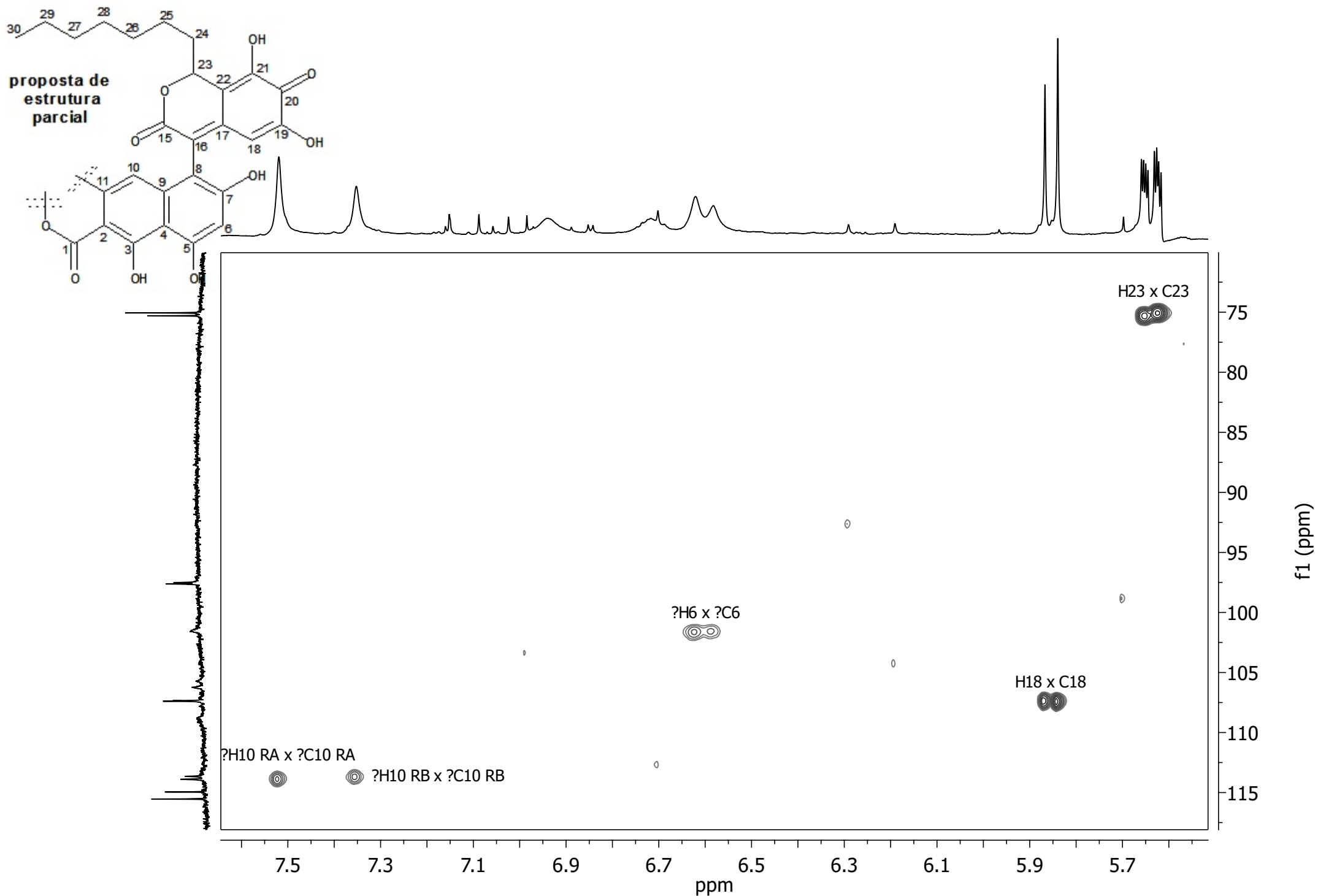
Apêndice 8.3 - Mapa de contornos COSY [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de CYT11_10-11_05



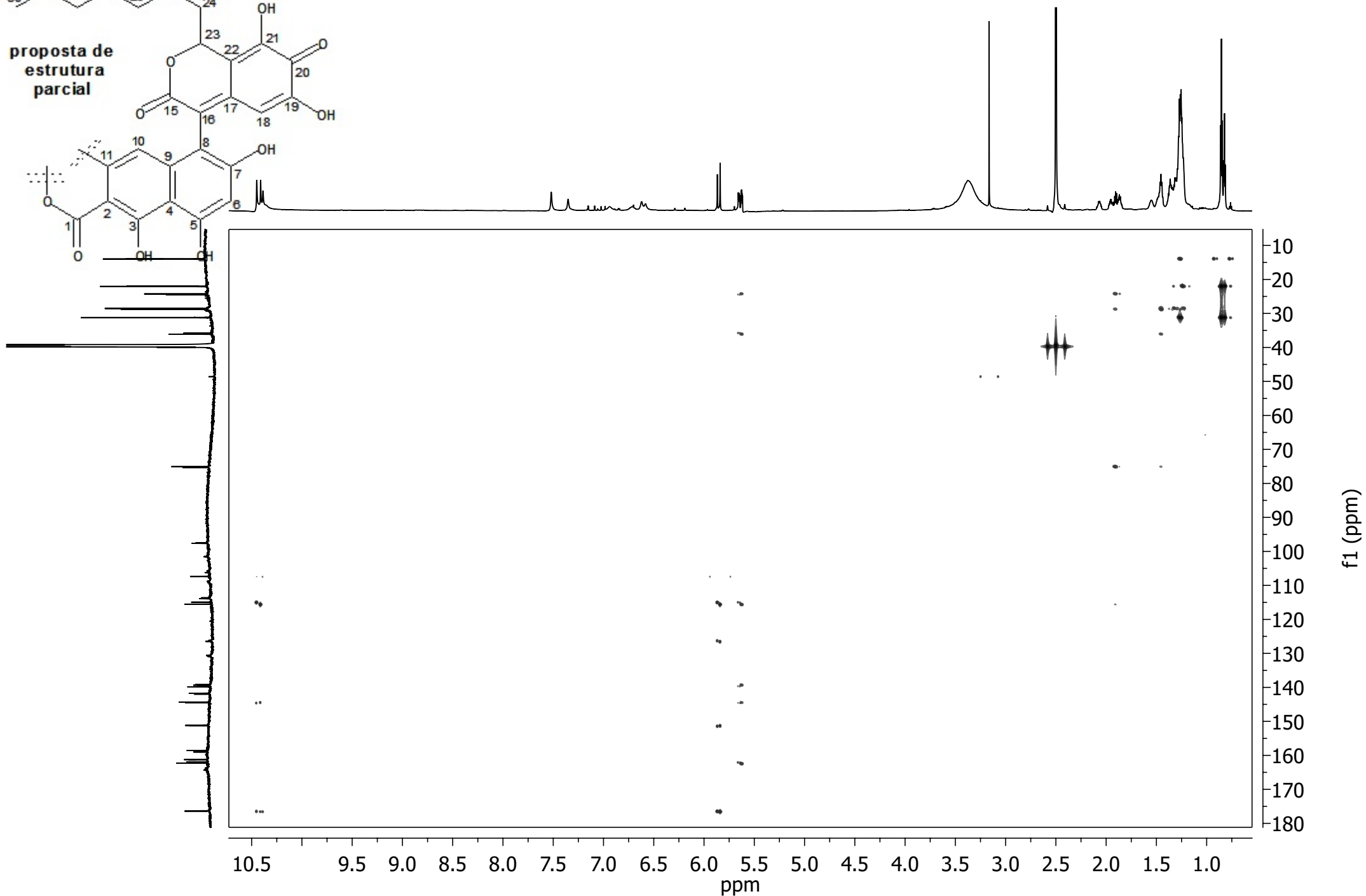
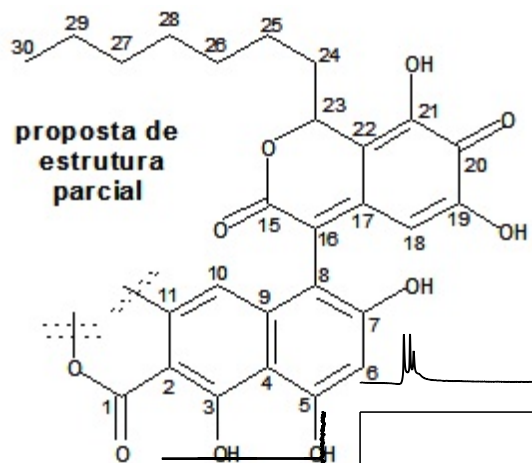
Apêndice 8.4 - Mapa de contornos HSQC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de CYT11_10-11_05



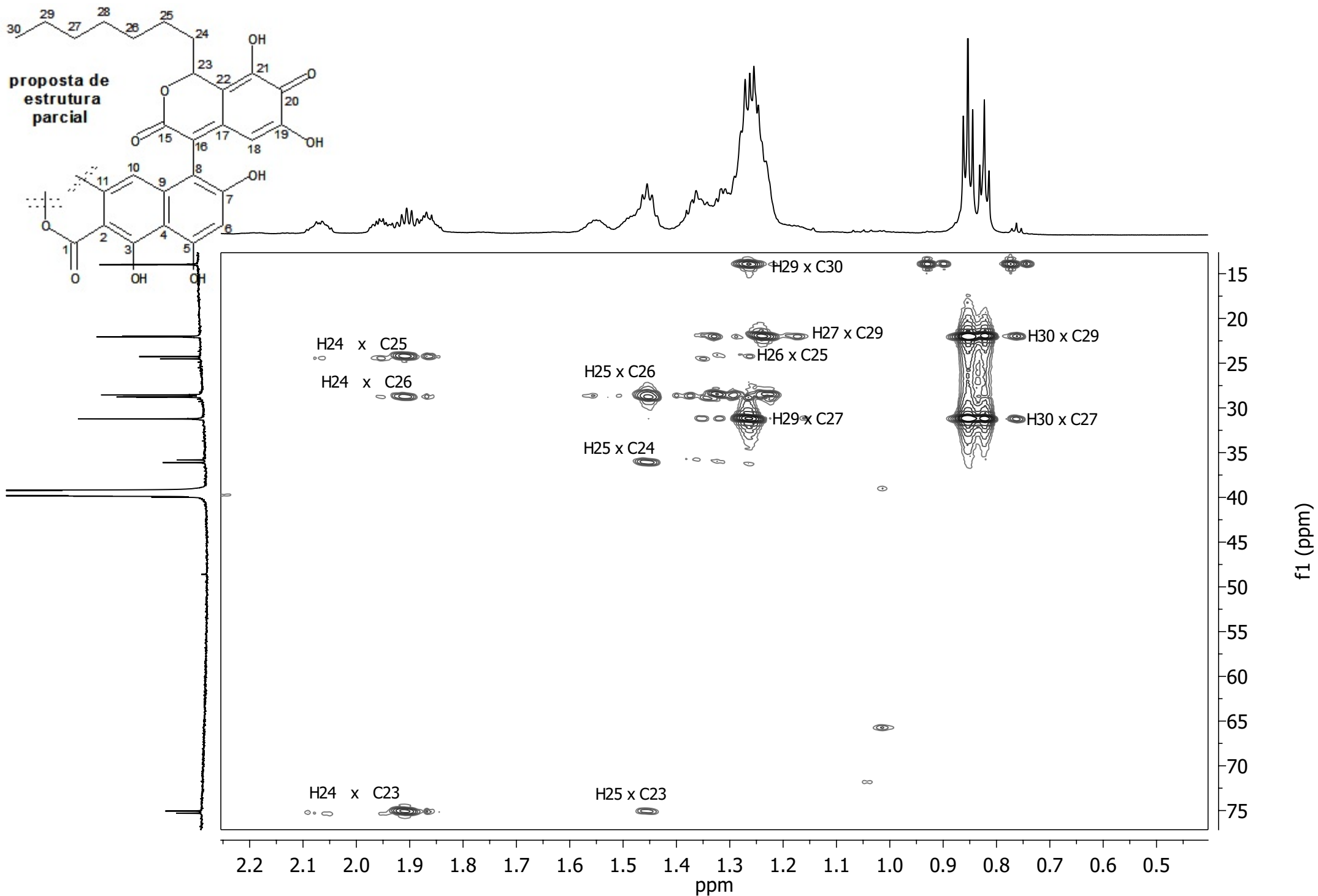
Apêndice 8.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_05** entre δ_H 0,70 e 2,10



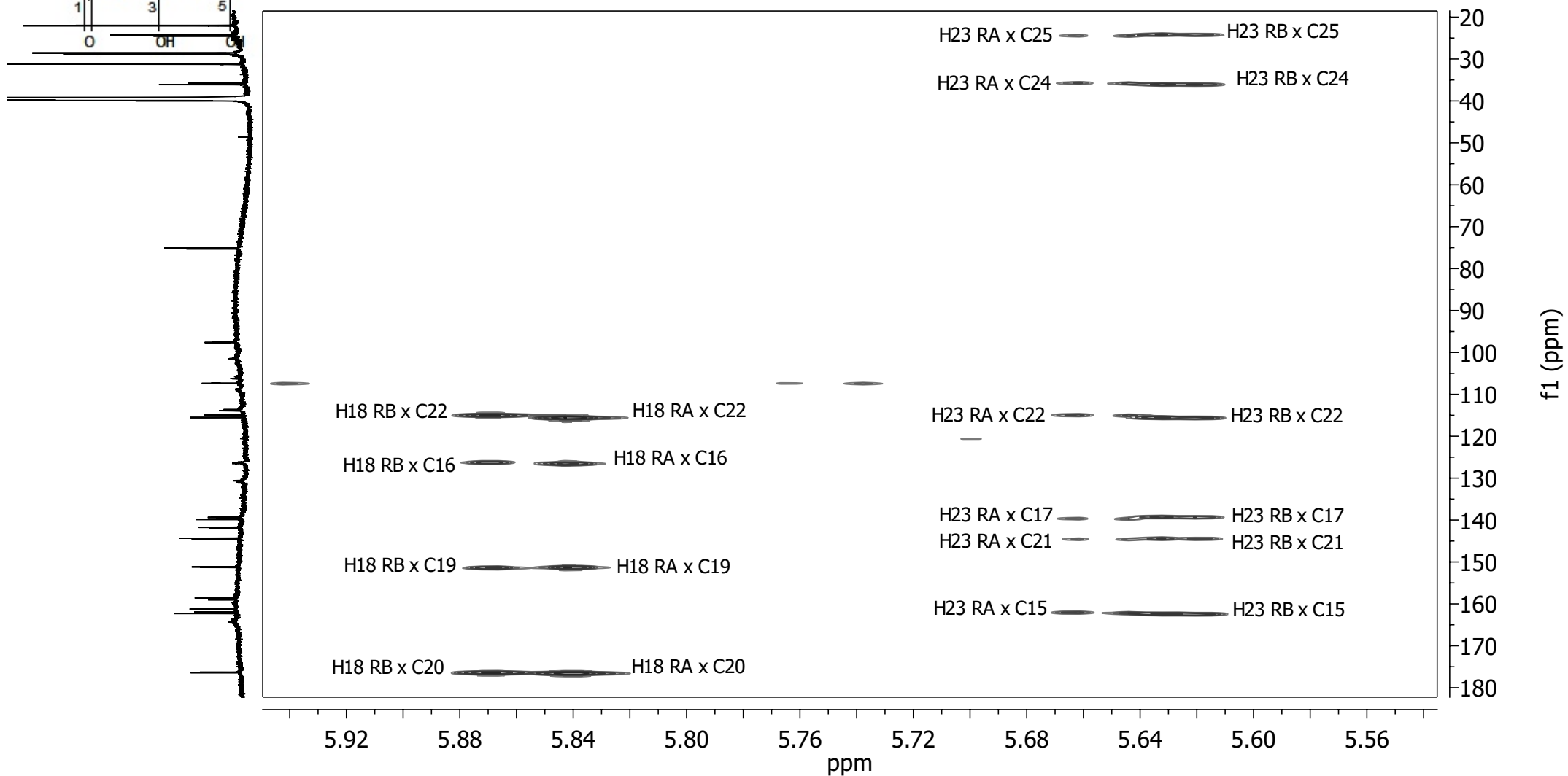
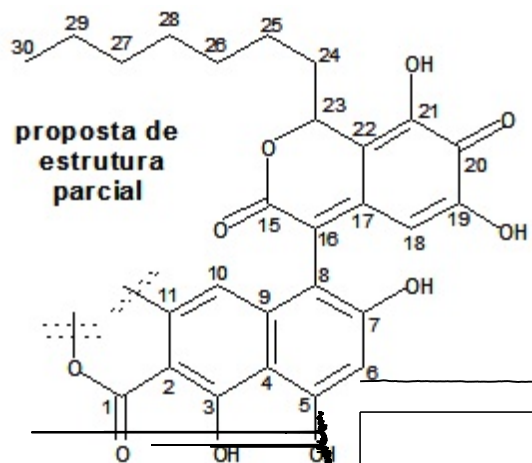
Apêndice 8.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_05** entre δ_H 5,60 e 7,60



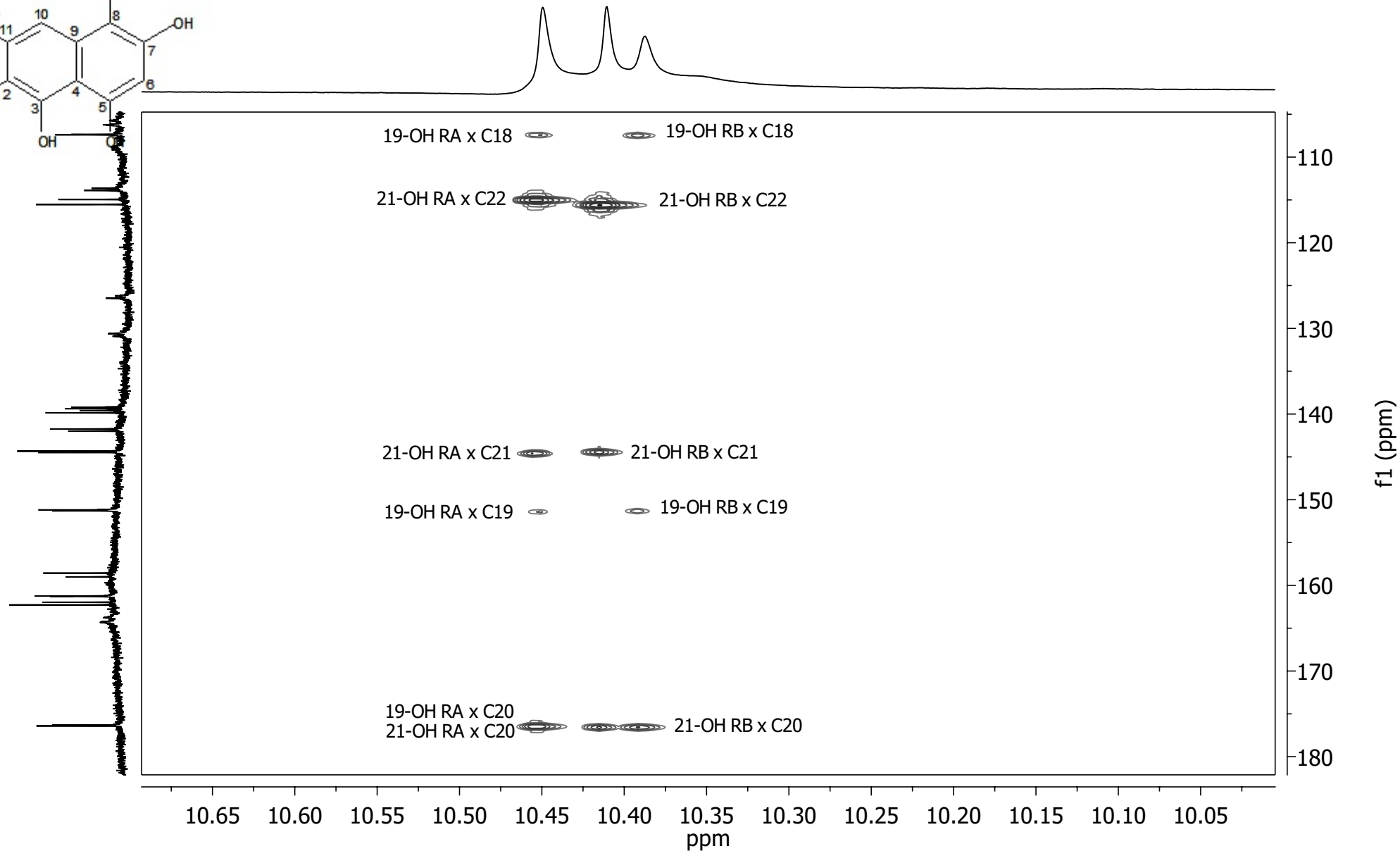
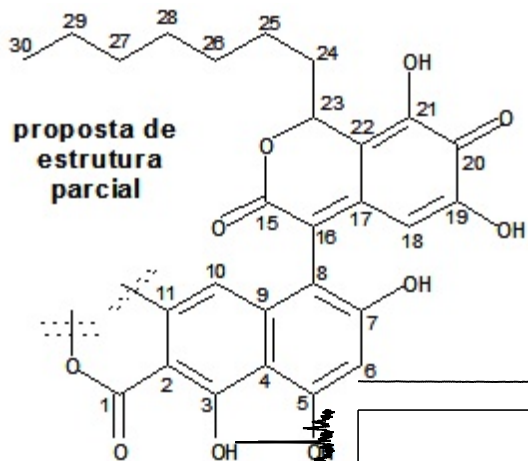
Apêndice 8.7 - Mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de CYT11_10-11_05



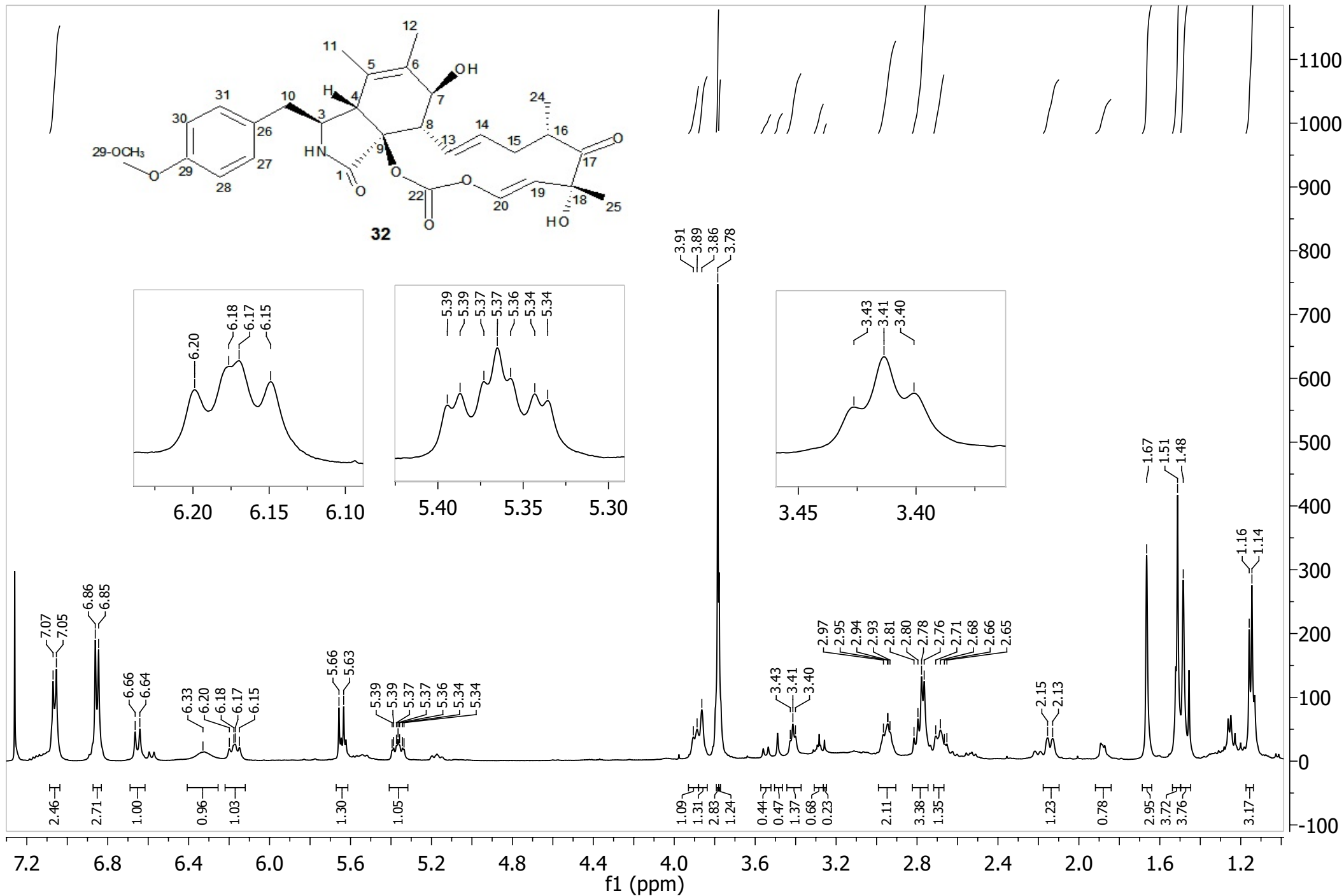
Apêndice 8.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_05** entre δ_H 0,50 e 2,20



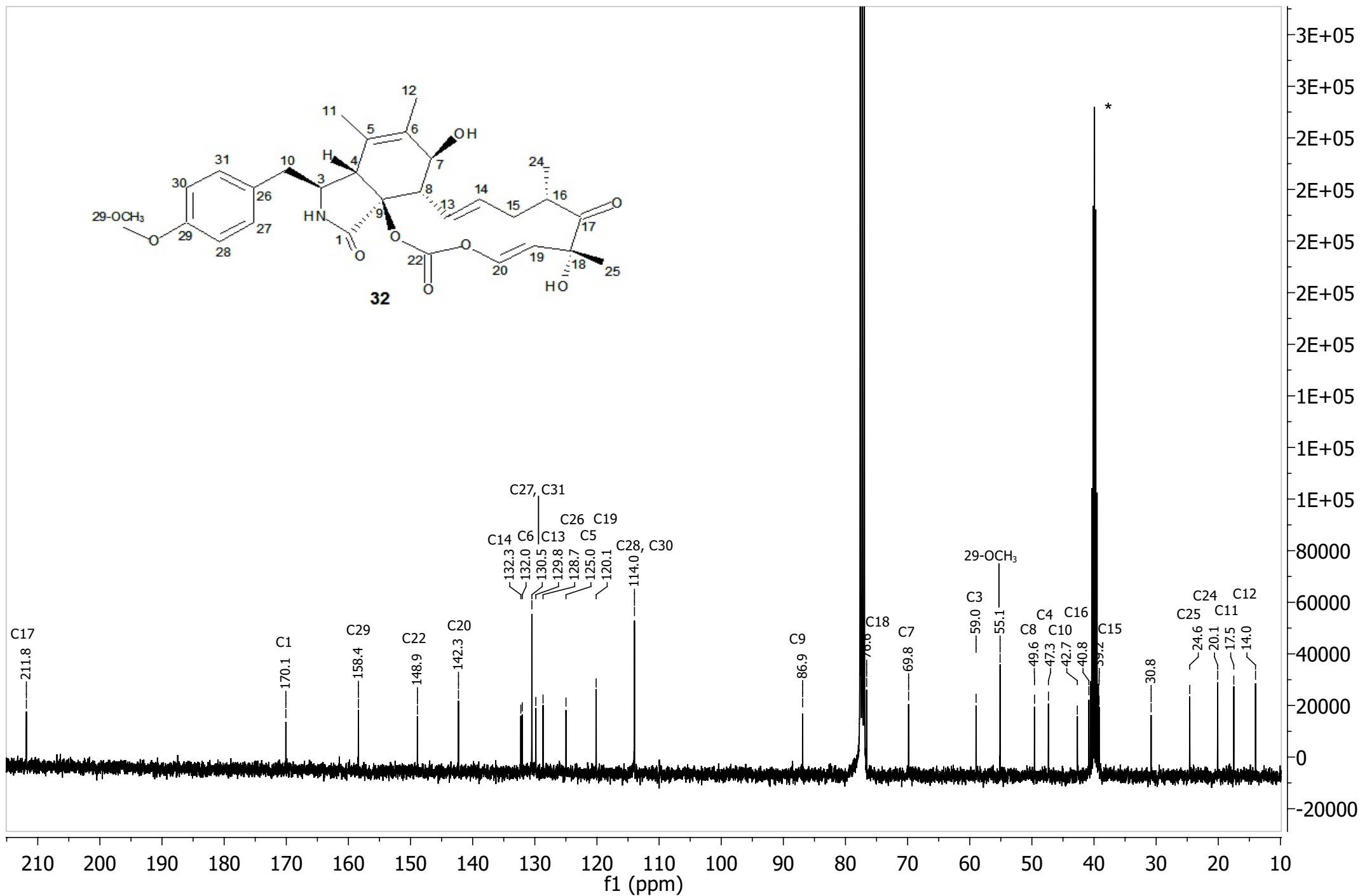
Apêndice 8.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_05** entre δ_H 5,50 e 10,50



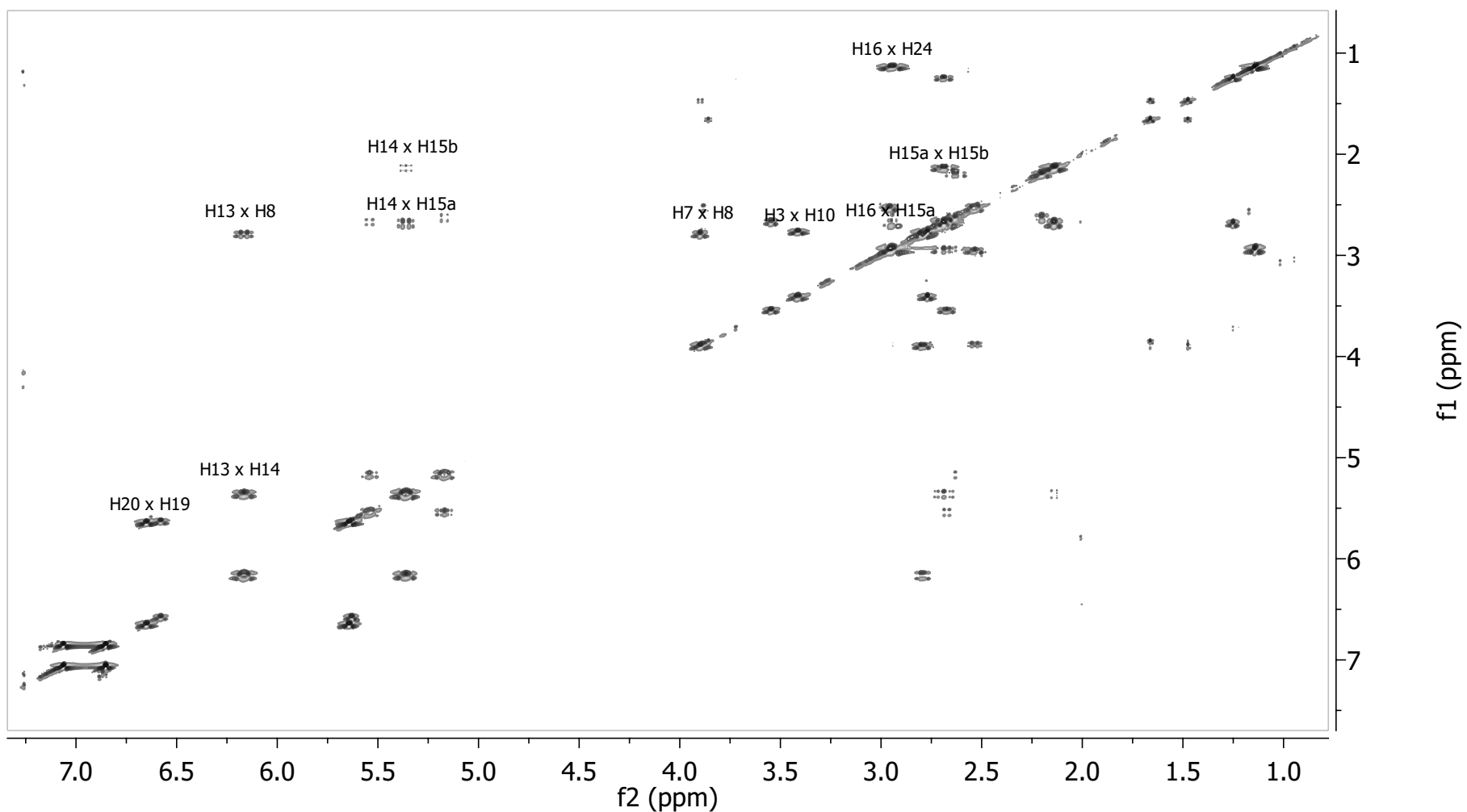
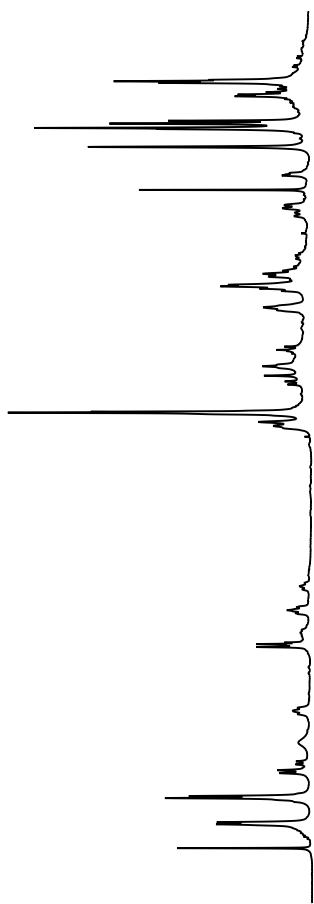
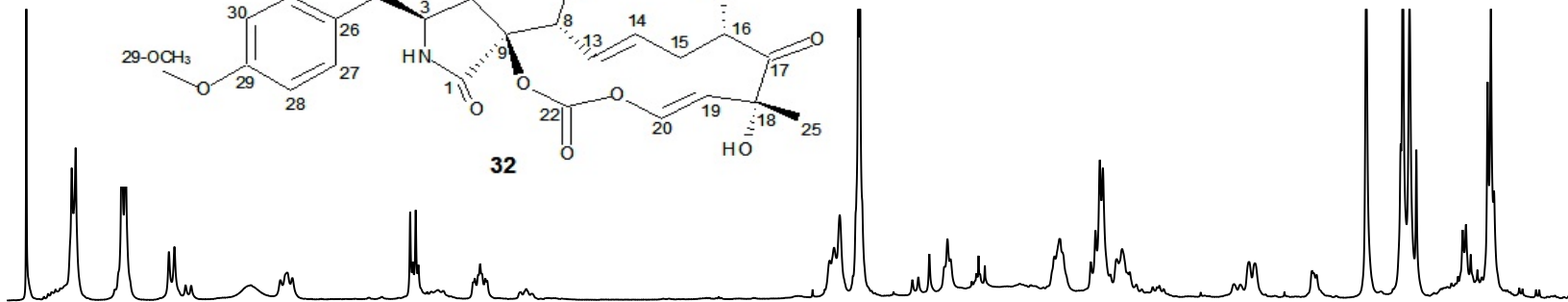
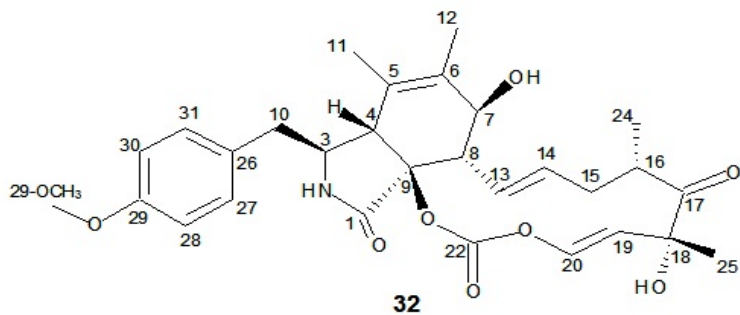
Apêndice 8.10 - Expansão do mapa de contornos HMBC [(CD₃)₂SO, 800 MHz] de **CYT11_10-11_05** entre δ_H 10,00 e 10,65



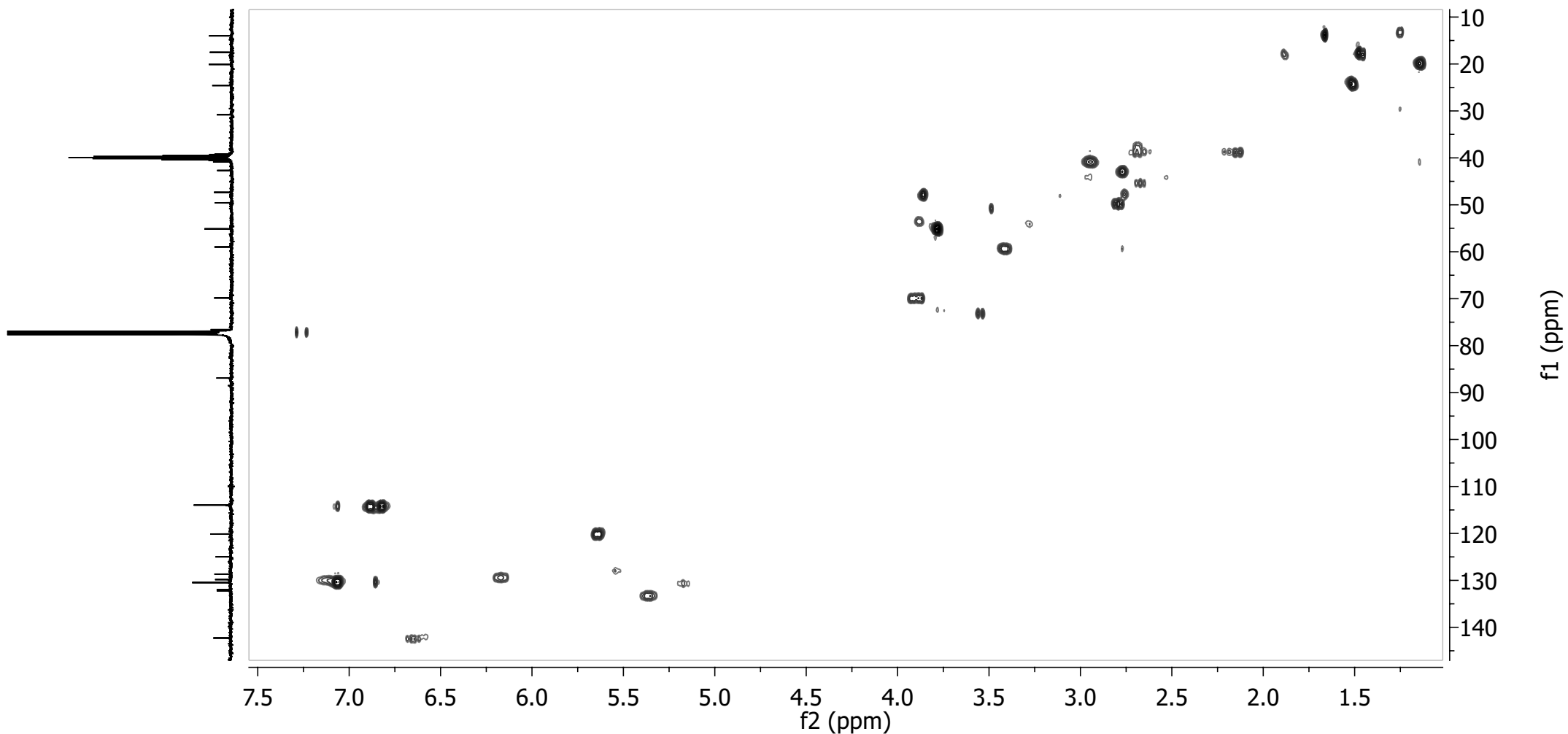
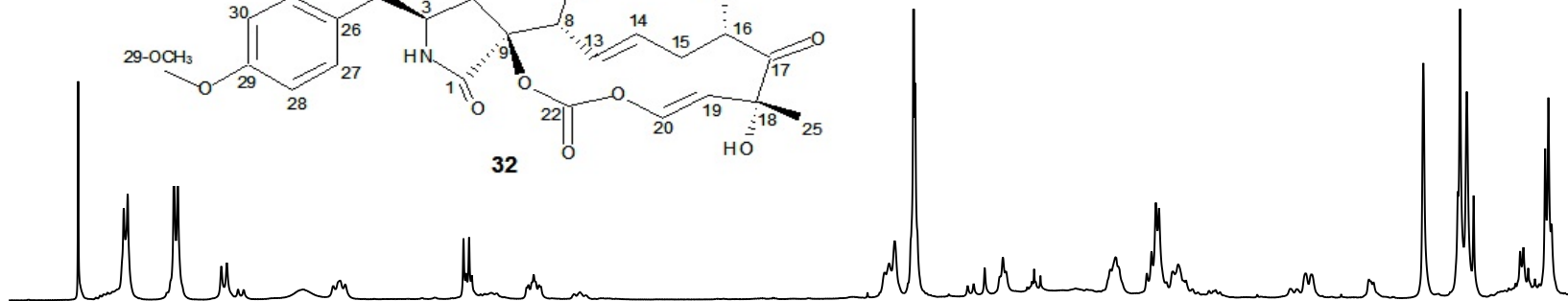
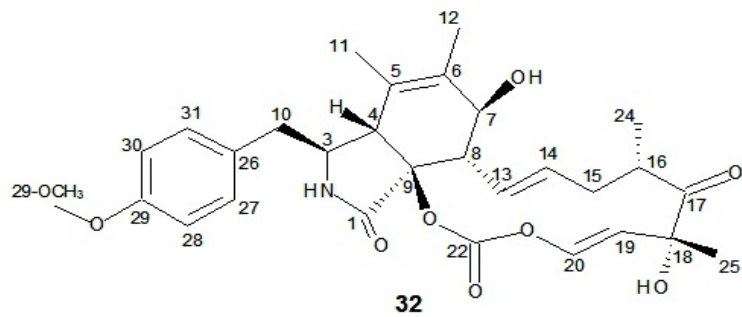
Apêndice 9.1: Espectro de RMN de ¹H [CDCl₃, 500 MHz] de LIB_04_02 (32)



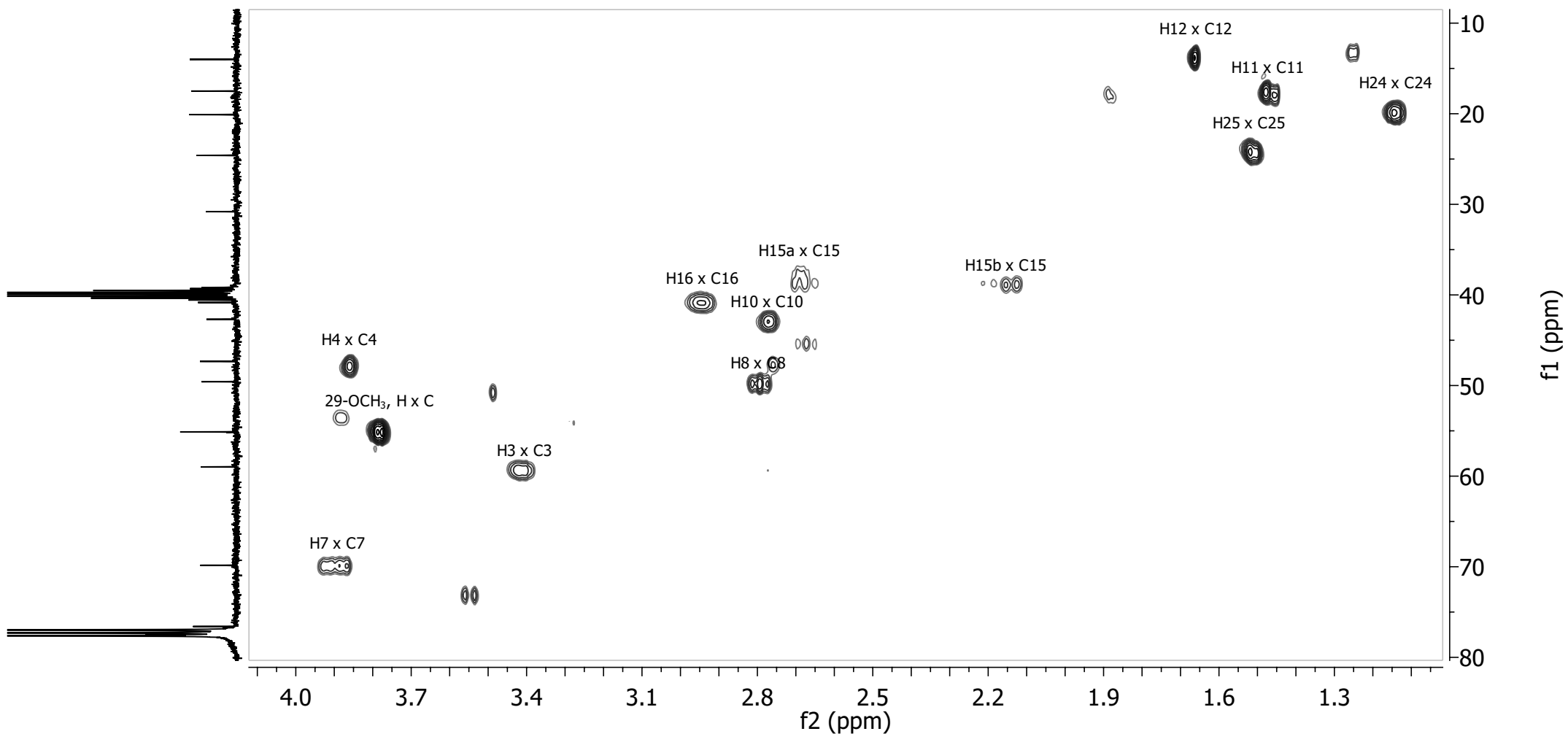
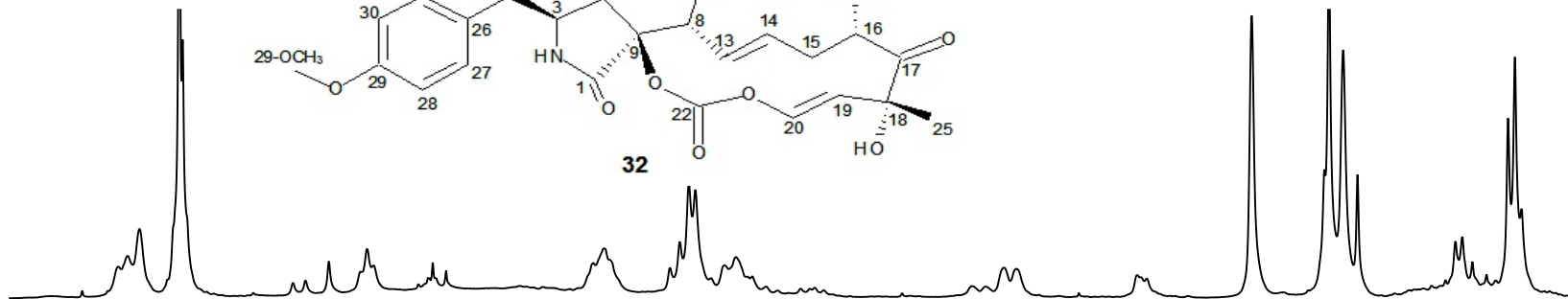
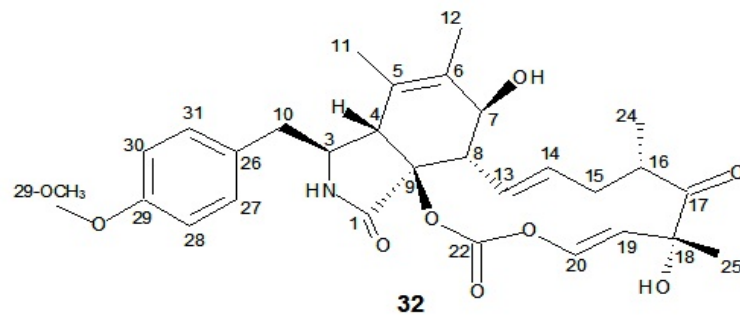
Apêndice 9.2: Espectro de RMN de ¹³C [CDCl₃, 100 MHz] de **LIB_04_02 (32)** * DMSO-*d*₆ adicionado para aumentar solubilidade



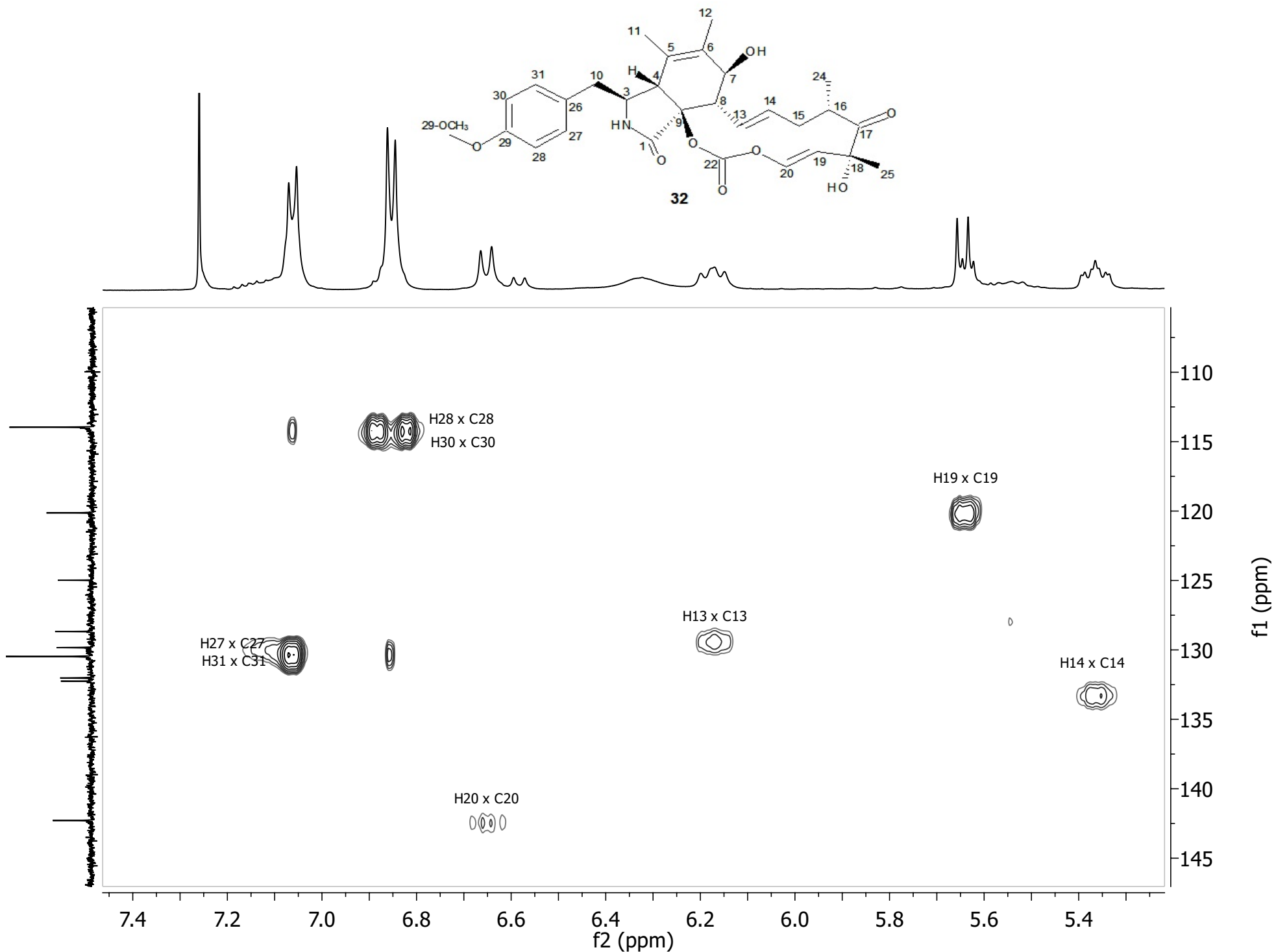
Apêndice 9.3 - Mapa de contornos COSY [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_02 (32)



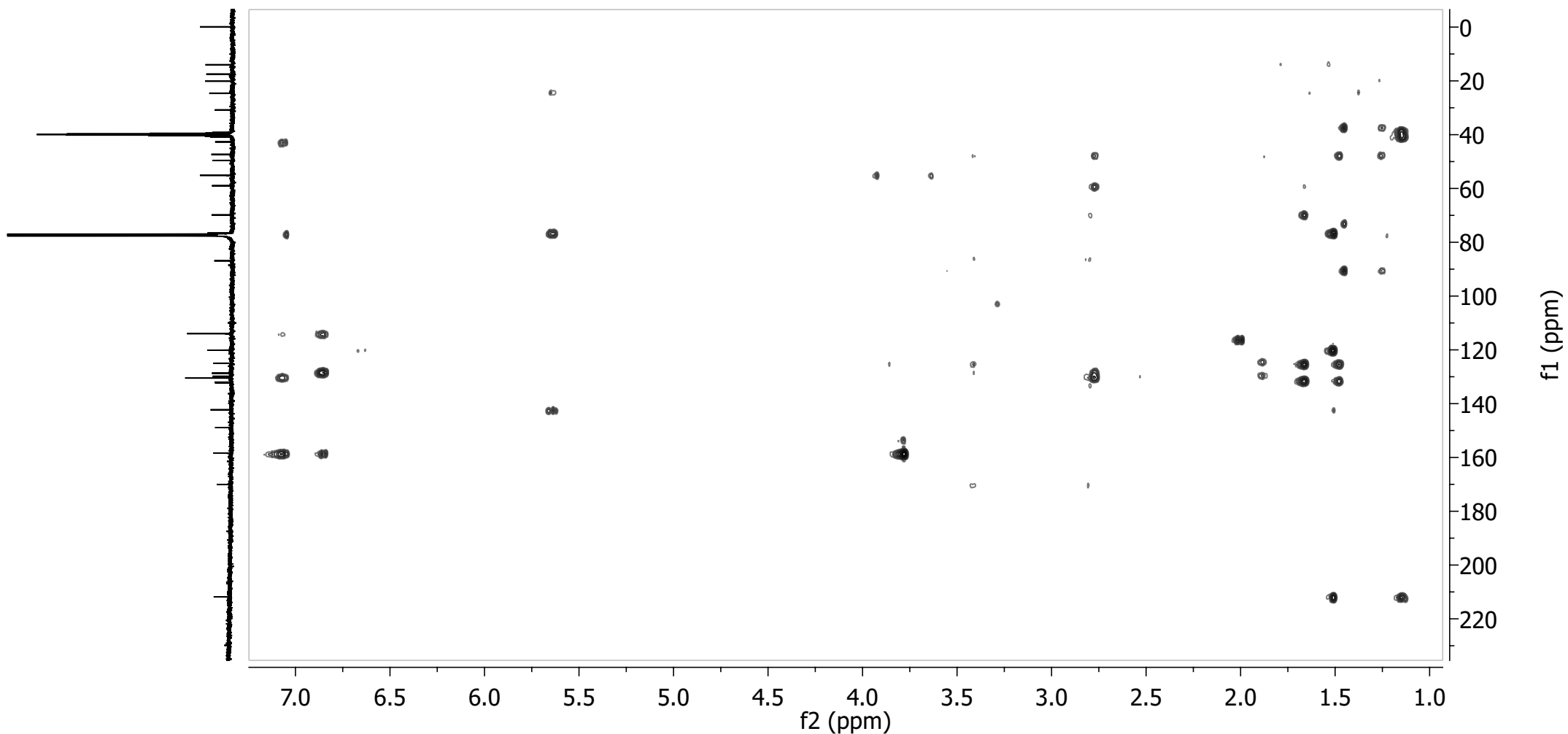
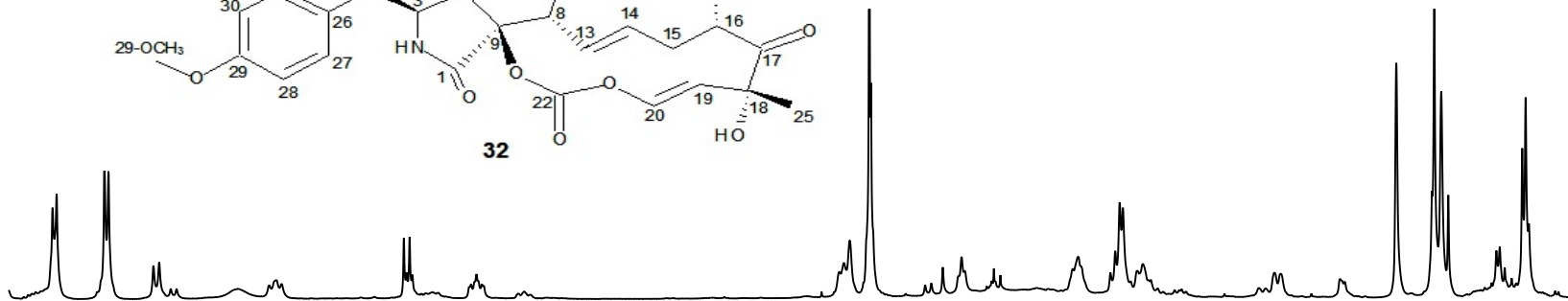
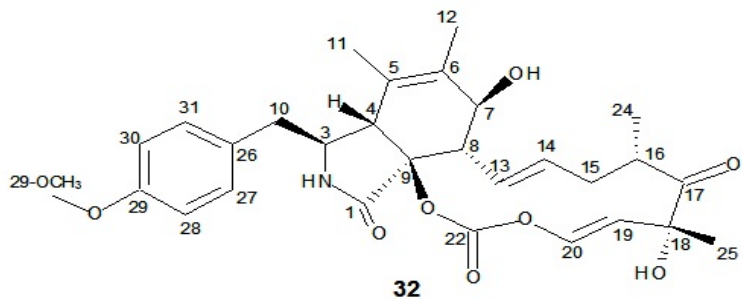
Apêndice 9.4 - Mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_02 (32)



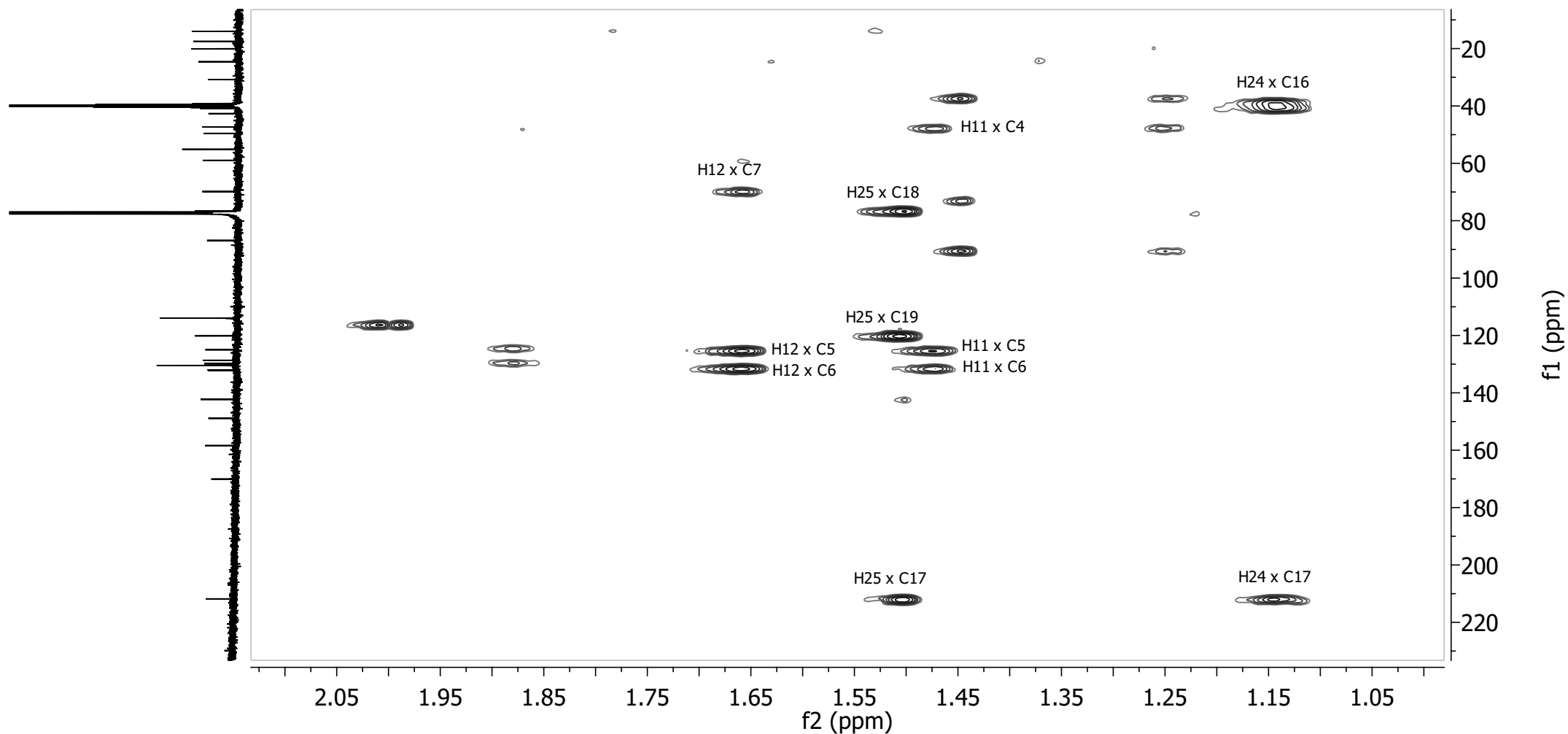
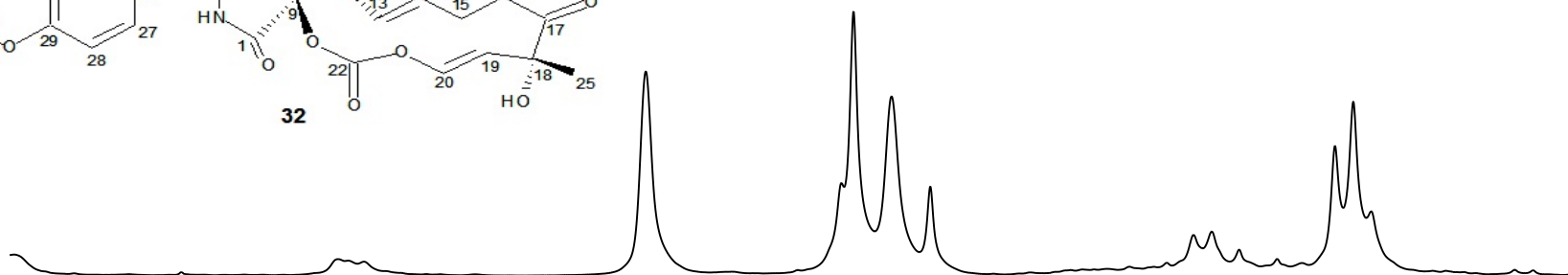
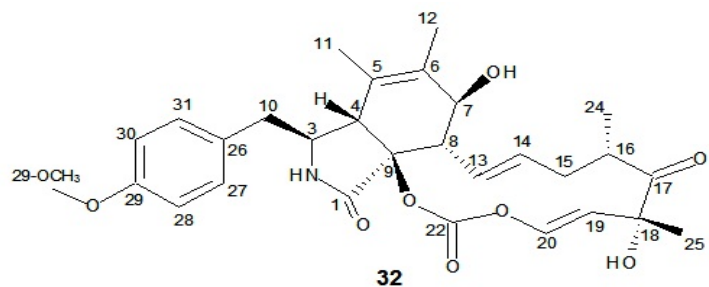
Apêndice 9.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_02 (**32**) entre δ_H 1,00 e 4,10



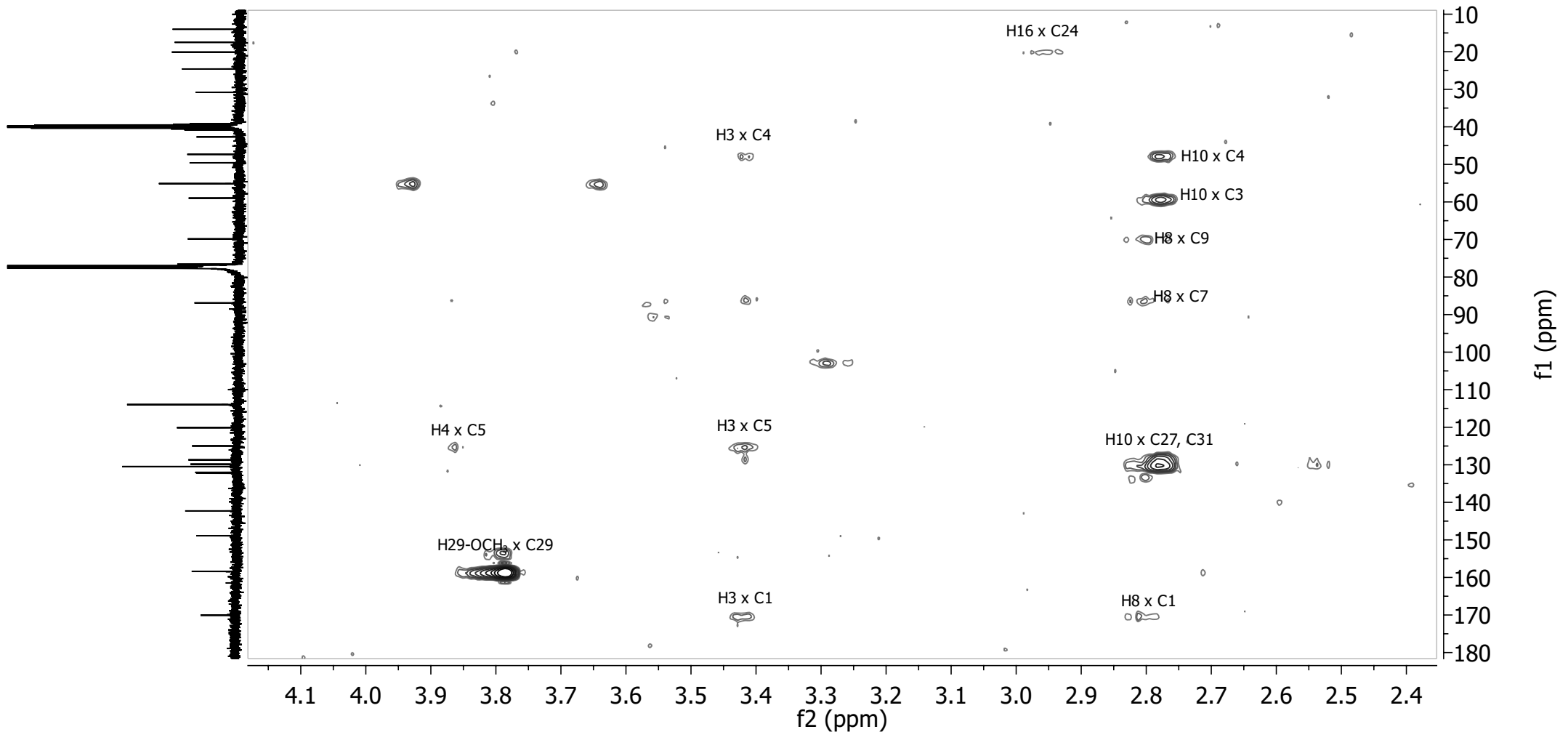
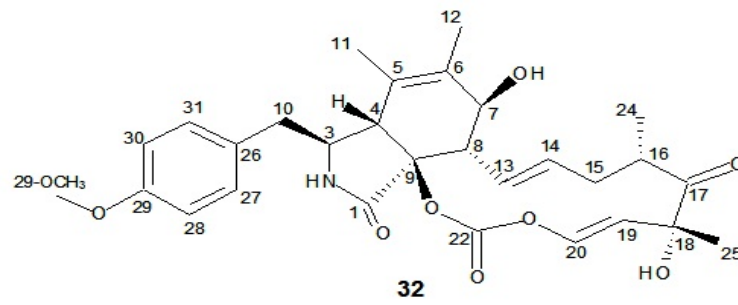
Apêndice 9.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB04_02 (32)** entre δ_H 5,30 e 7,40



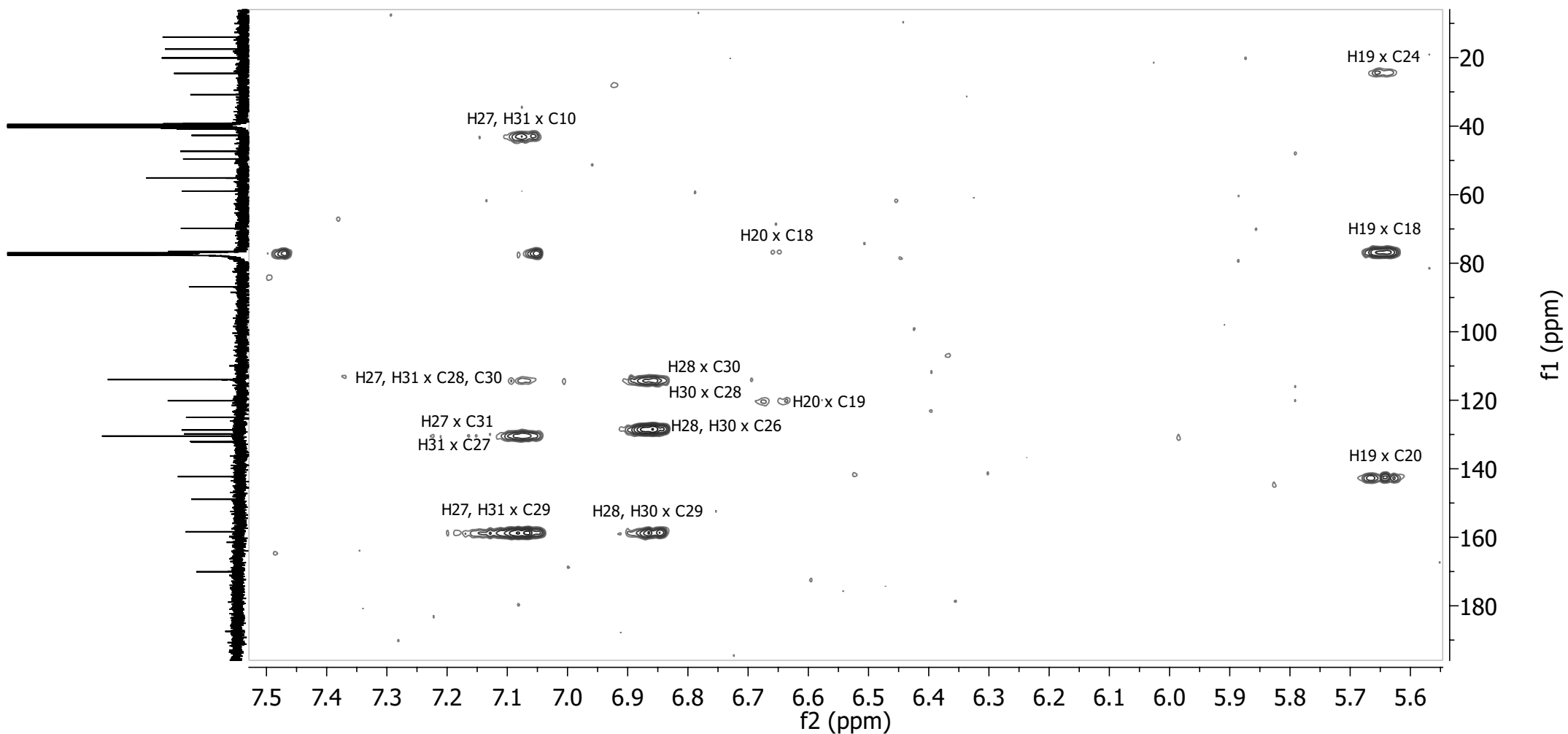
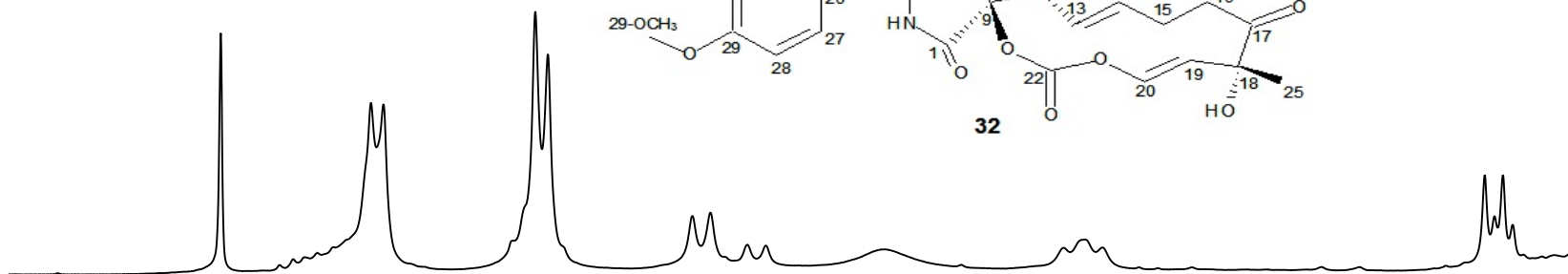
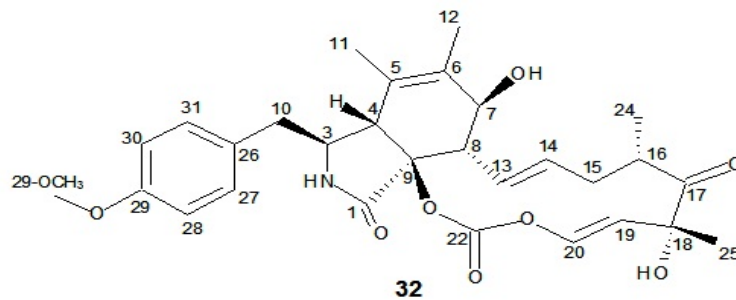
Apêndice 9.7 - Mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_02 (32)



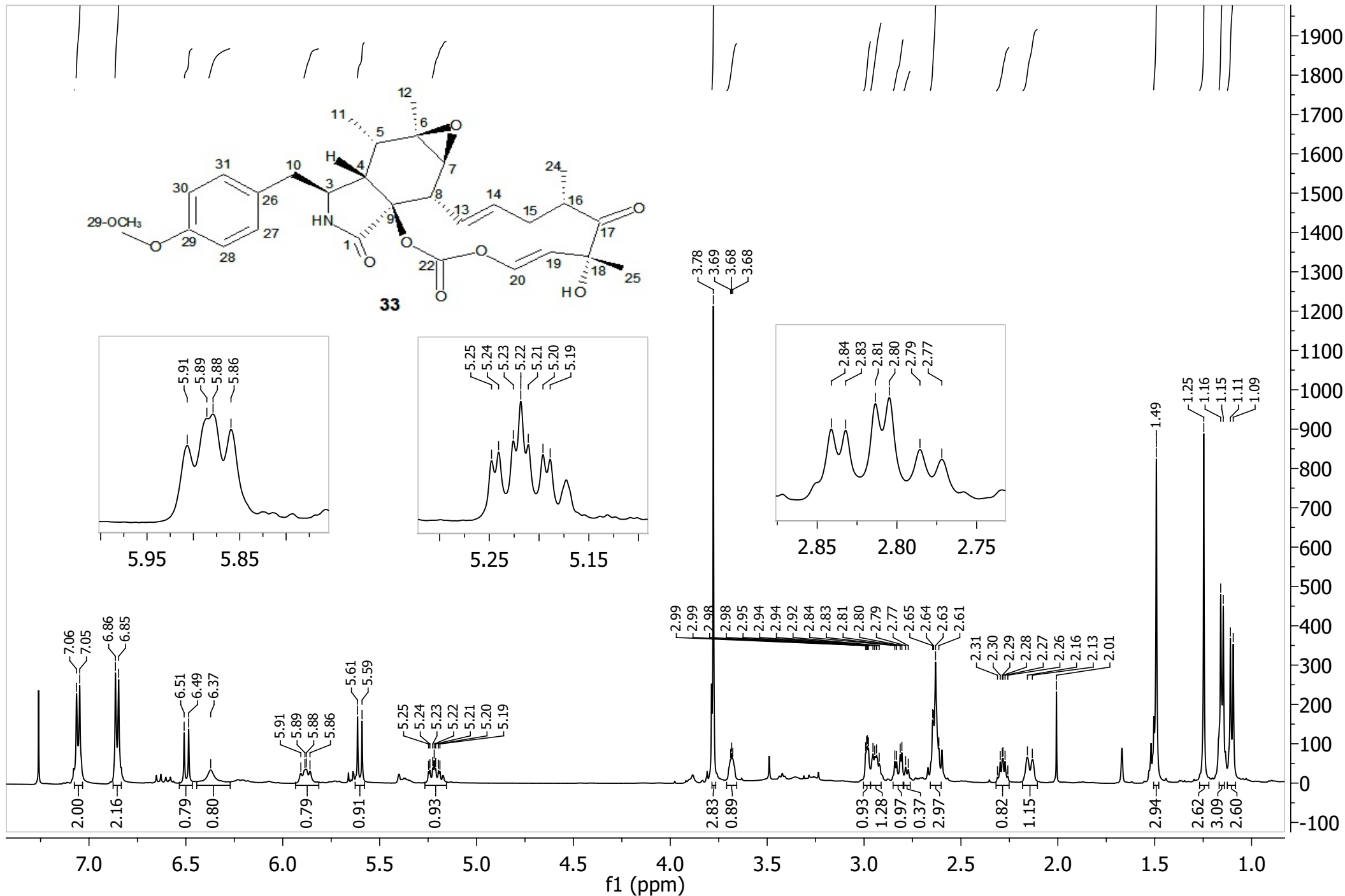
Apêndice 9.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB_04_02 (32)** entre δ_H 1,00 e 2,10



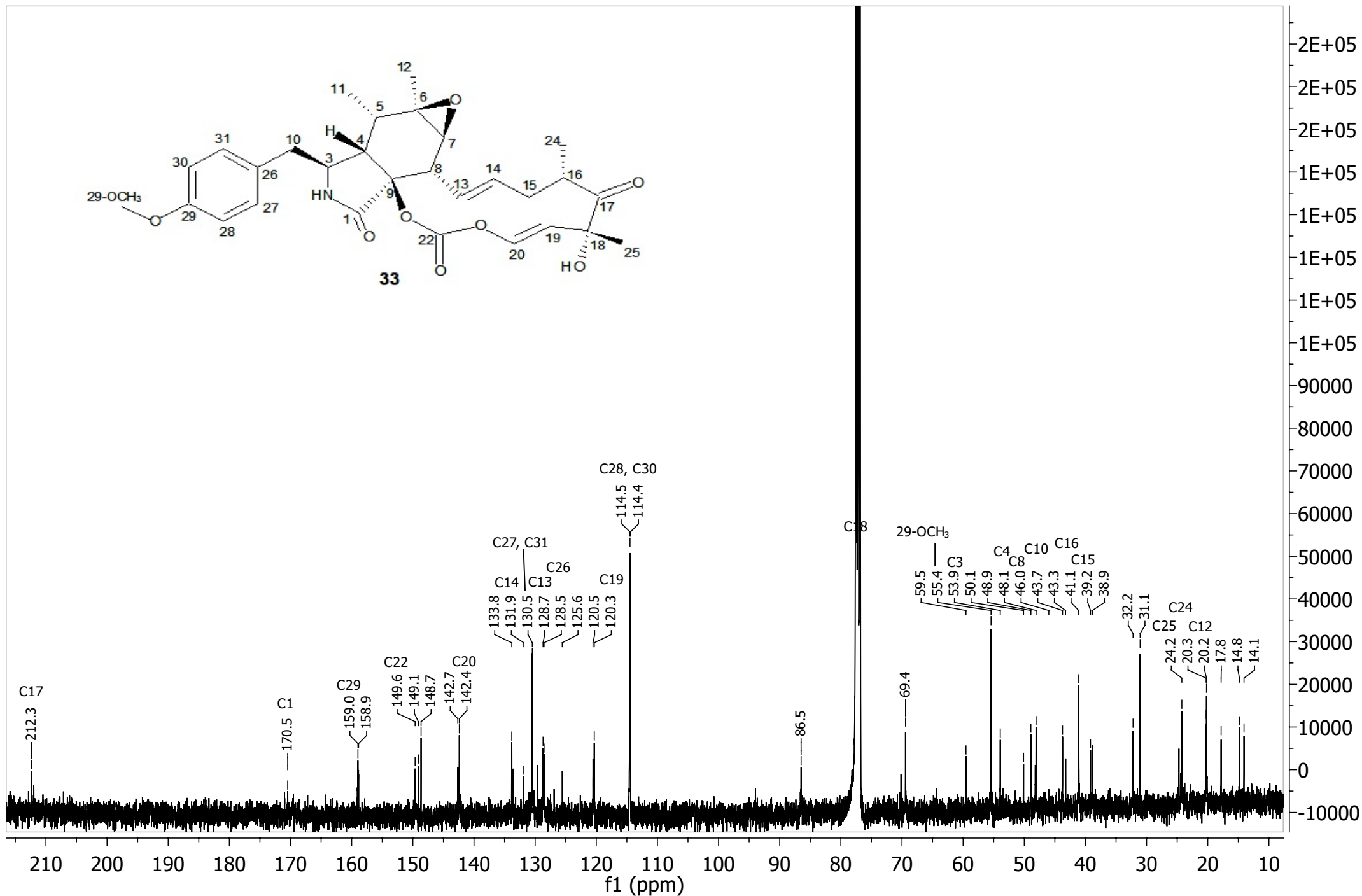
Apêndice 9.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB_04_02 (32)** entre δ_H 2,40 e 4,20



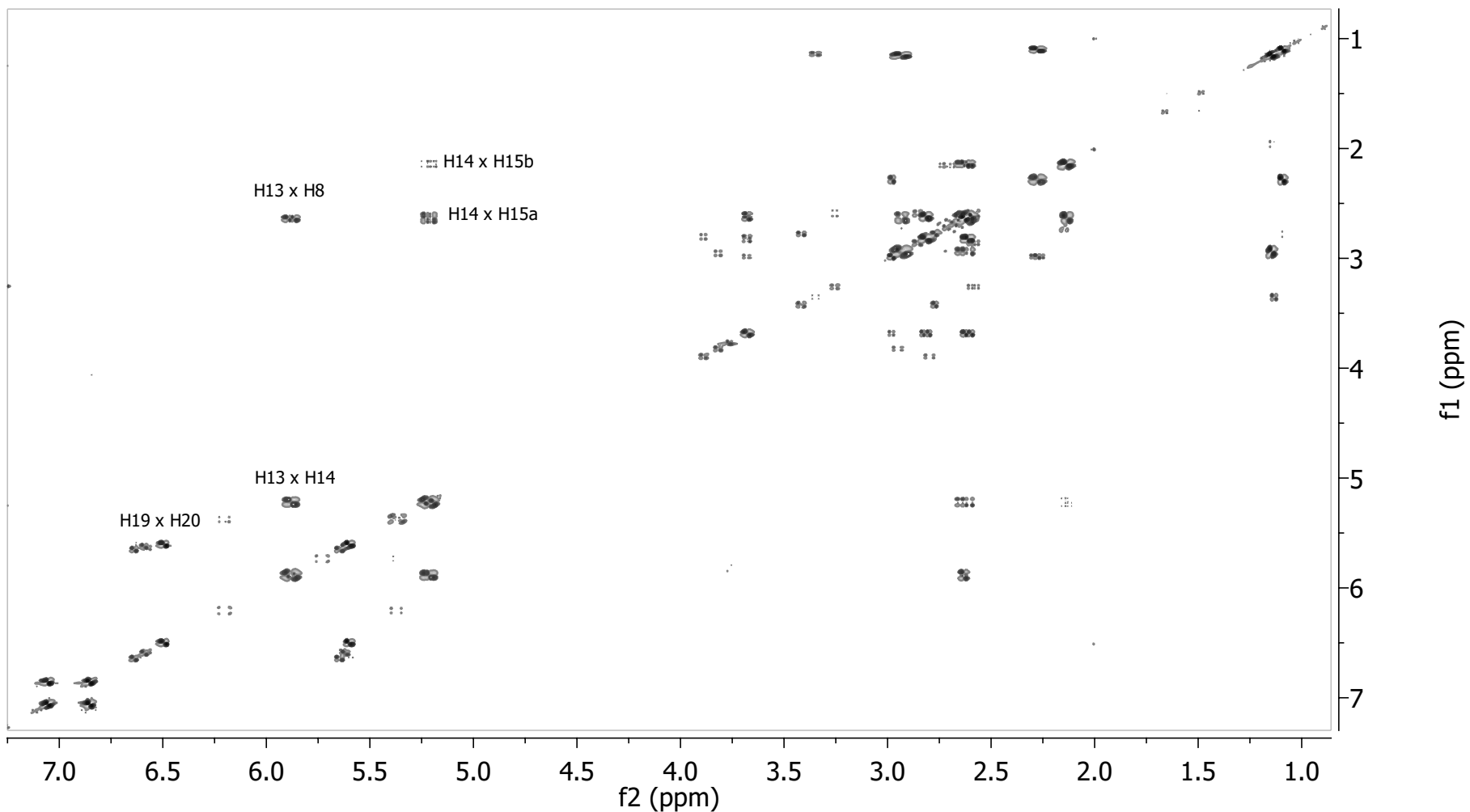
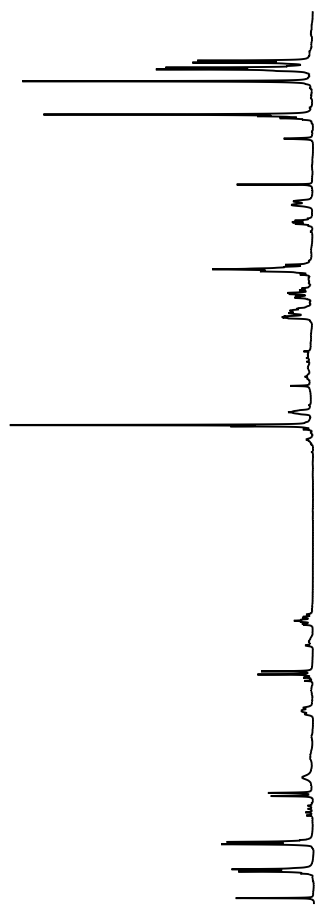
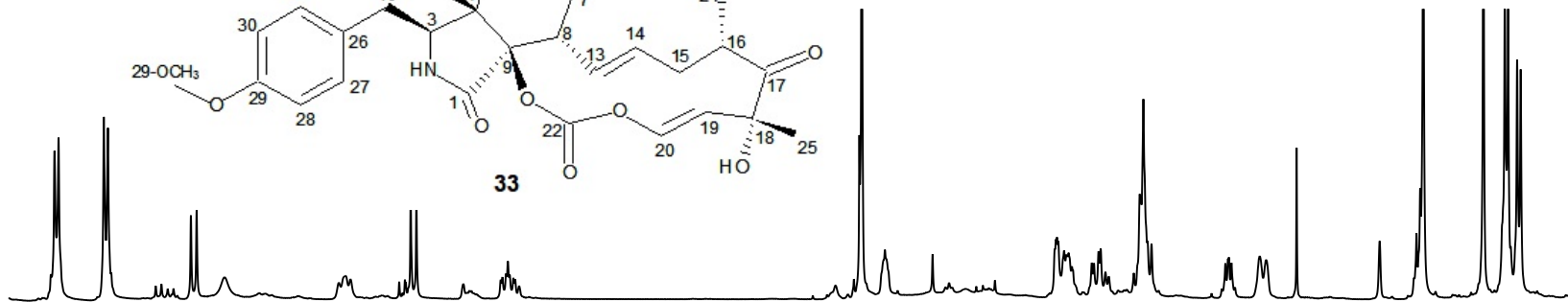
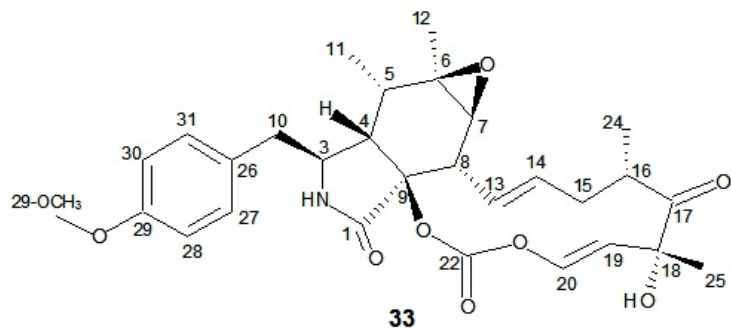
Apêndice 9.10 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CD₃Cl, 500 MHz] de LIB_04_02 (32) entre δ_H 5,60 e 7,50



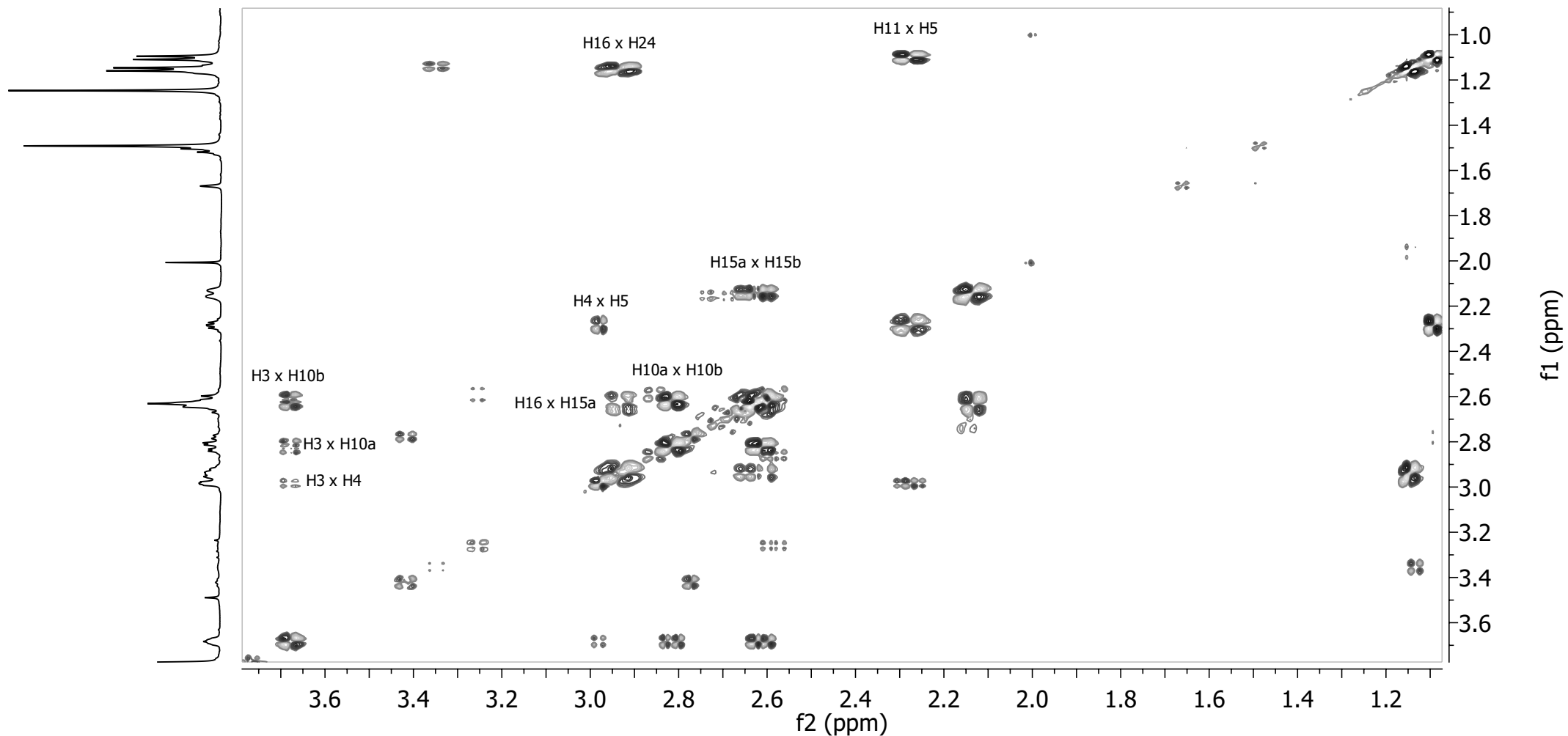
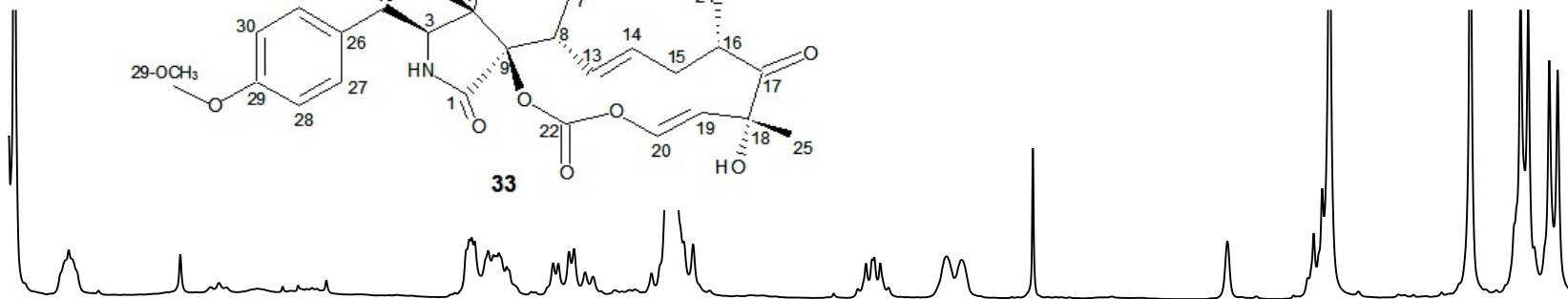
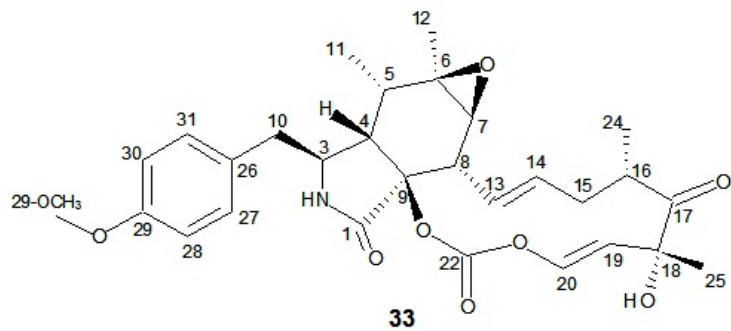
Apêndice 10.1: Espectro de RMN de ¹H [CDCl₃, 500 MHz] de LIB_04_03 (33)



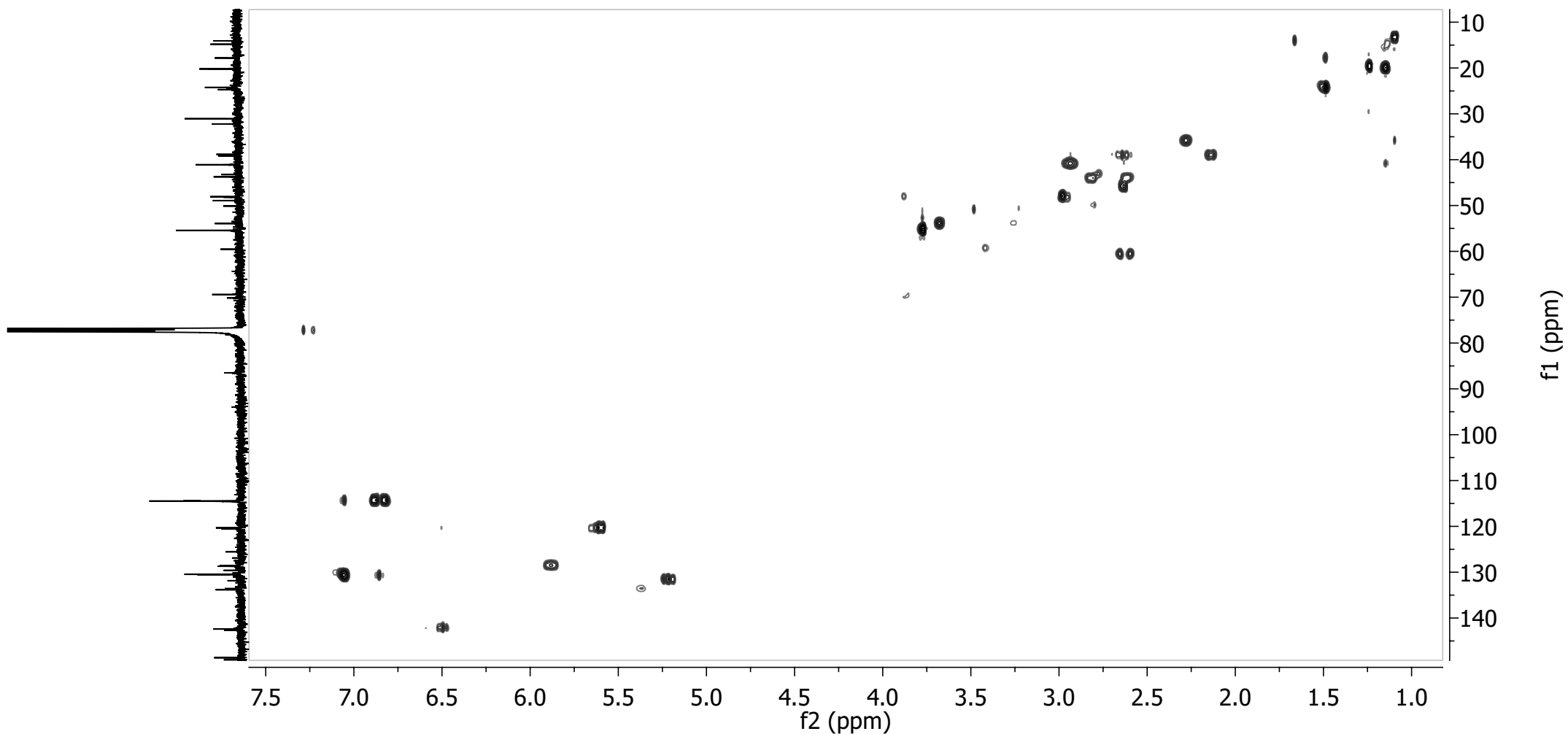
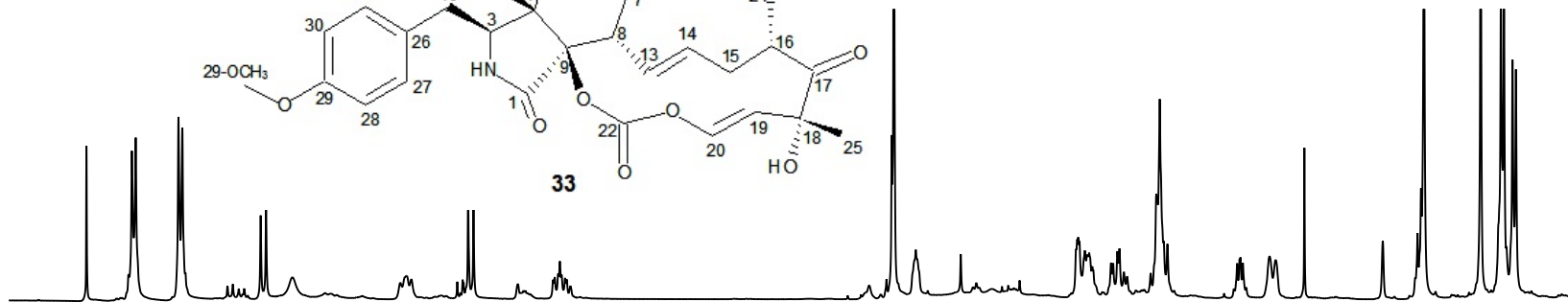
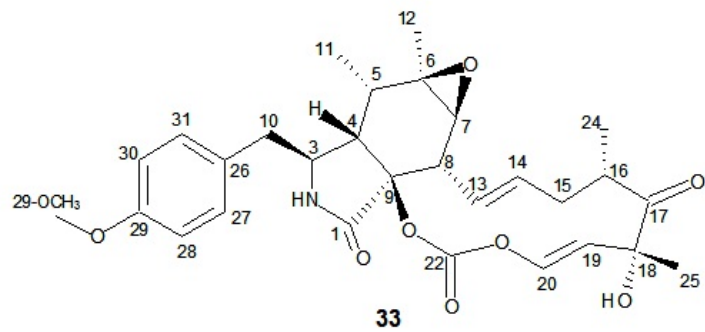
Apêndice 10.2: Espectro de RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] de LIB_04_03 (33)



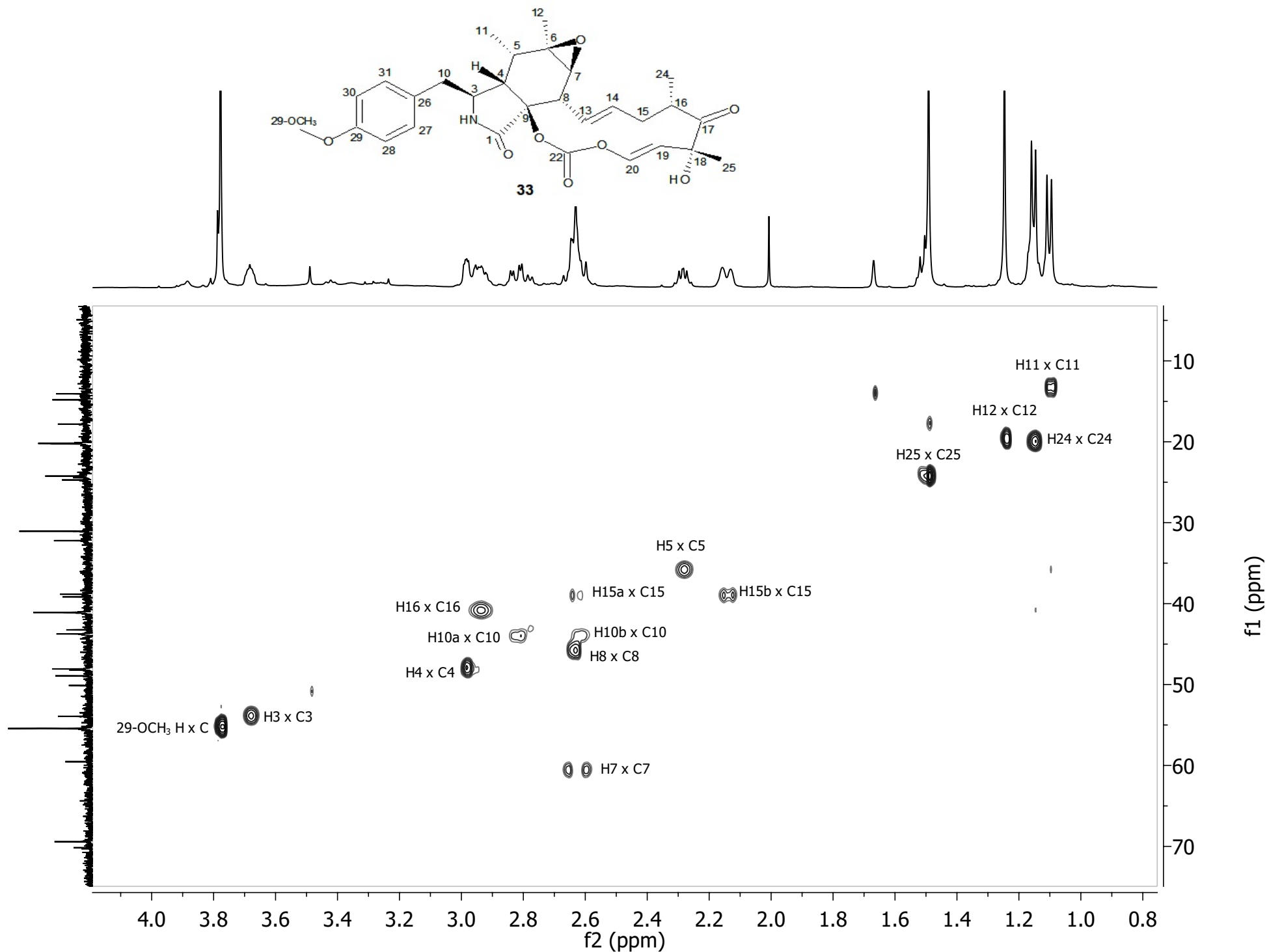
Apêndice 10.3 - Mapa de contornos COSY [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_03 (33)



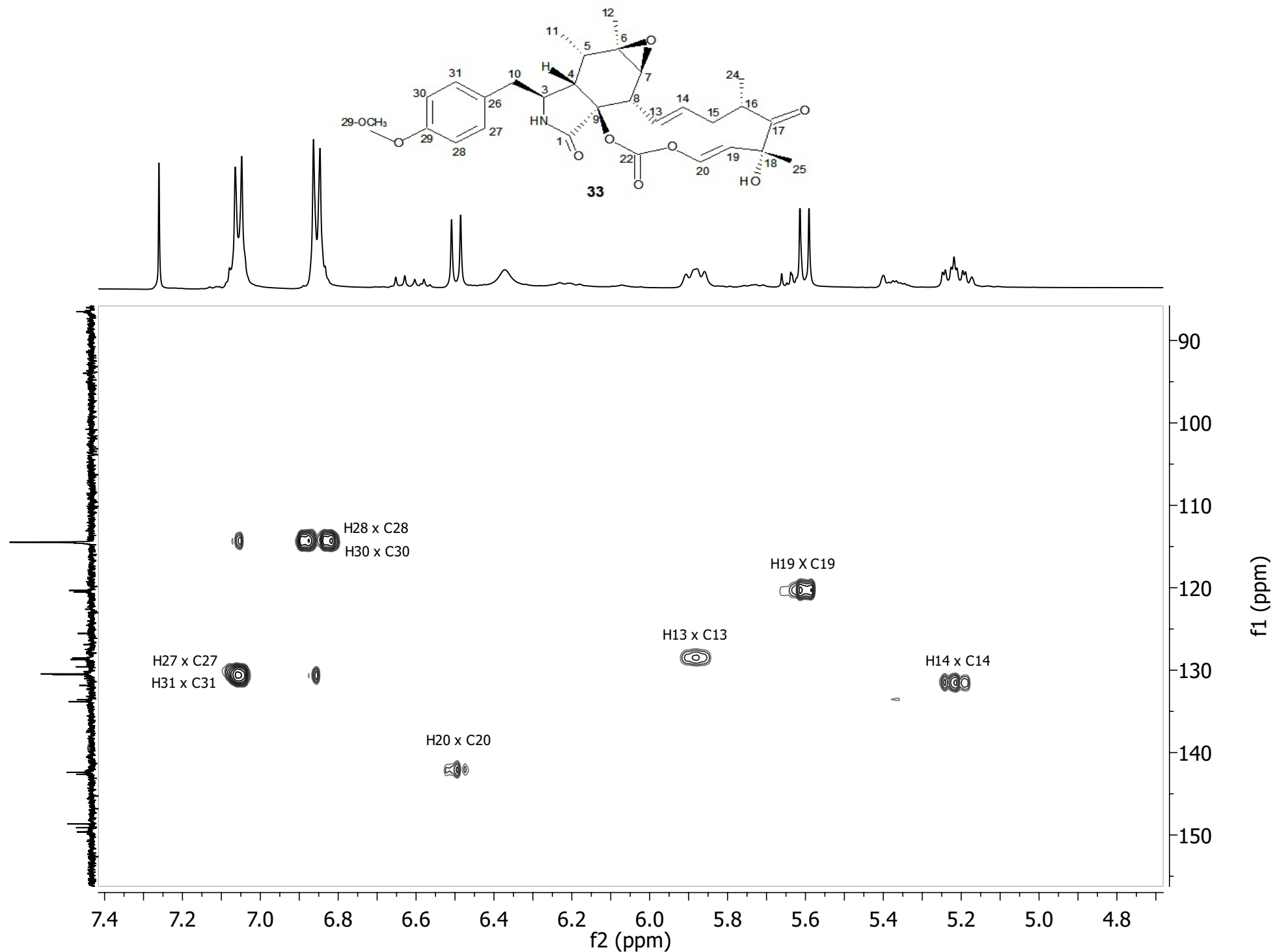
Apêndice 10.4 - Expansão do mapa de contornos COSY [CDCl_3 , 500 MHz] de **LIB04_03 (33)** entre δ_{H} 1,10 e 3,70



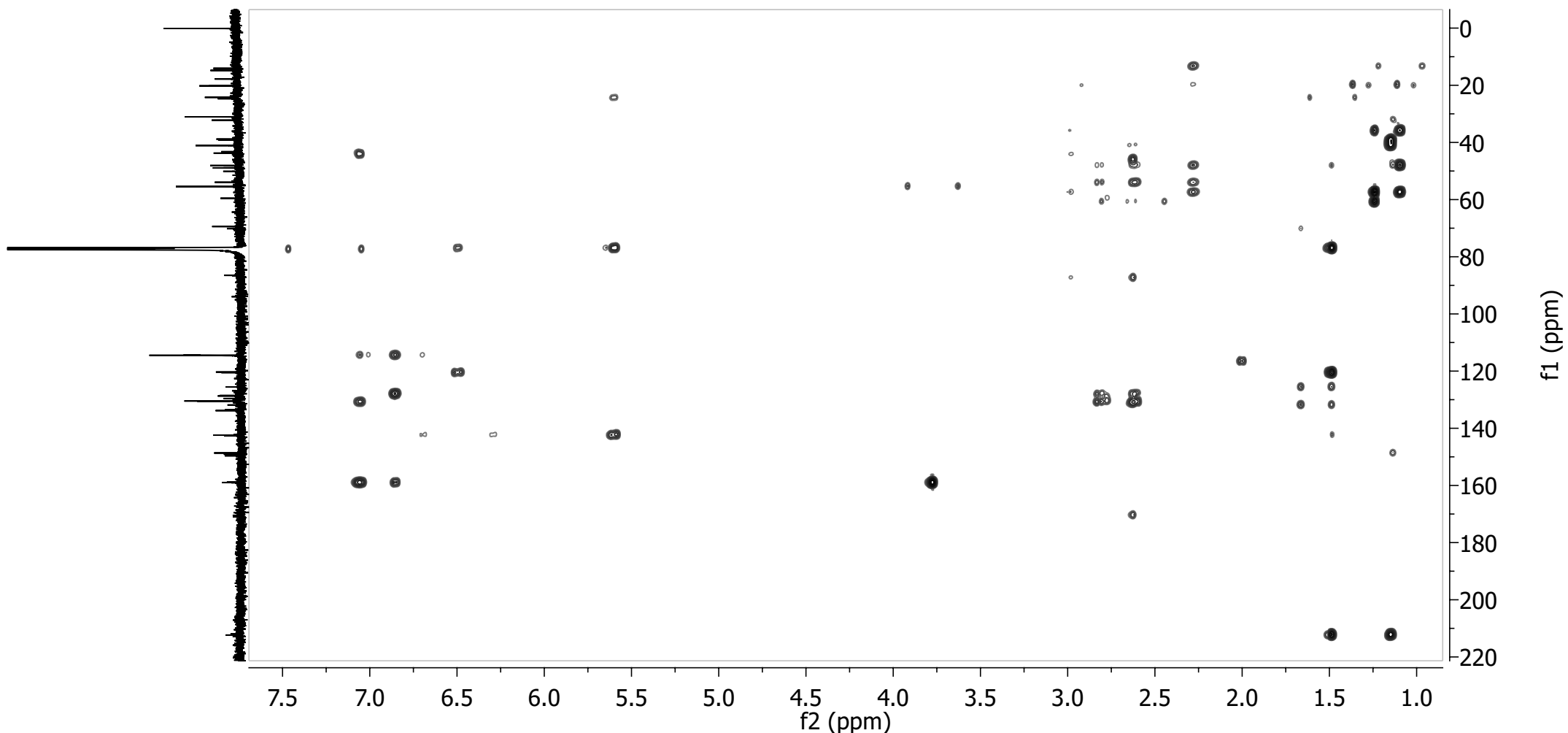
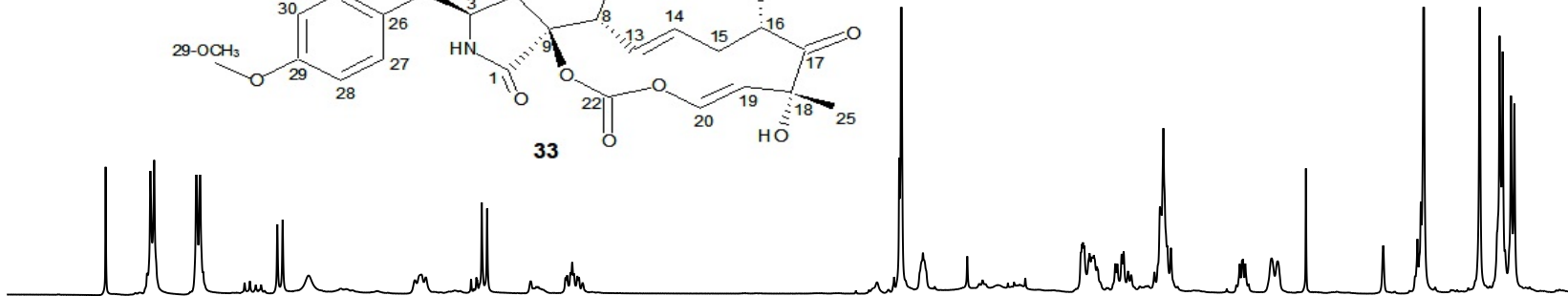
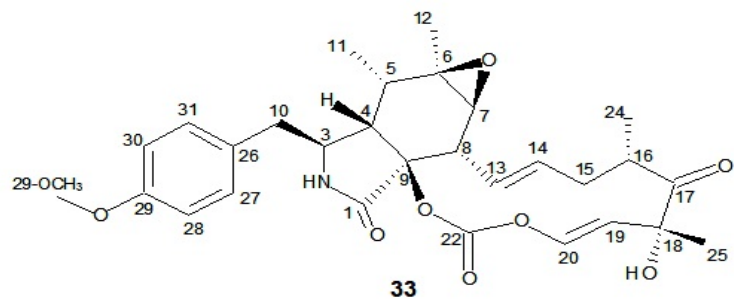
Apêndice 10.5 - Mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_03 (33)



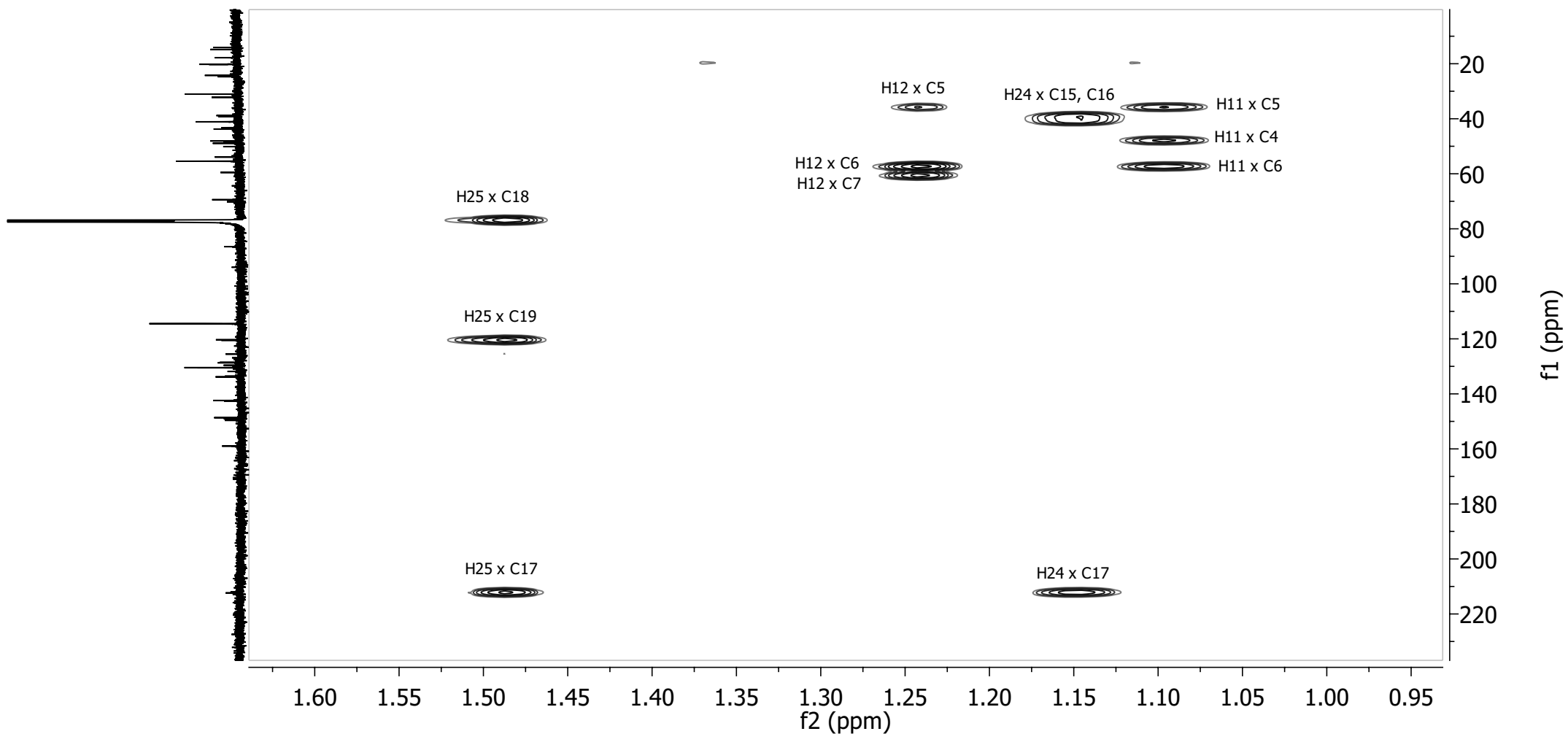
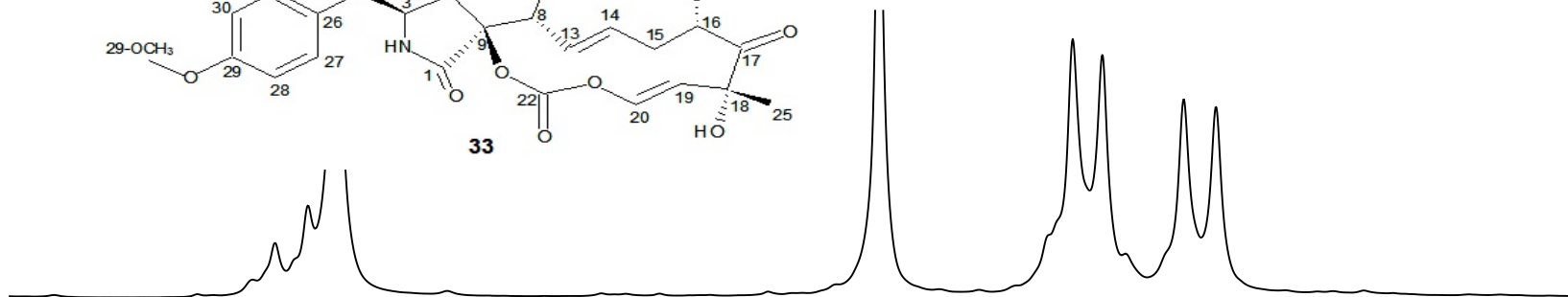
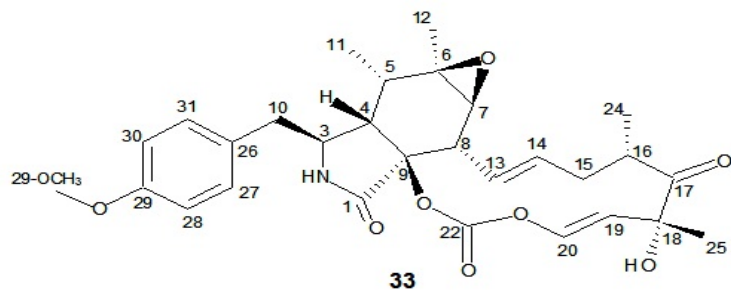
Apêndice 10.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB04_03 (33)** entre δ_H 0,80 e 4,10



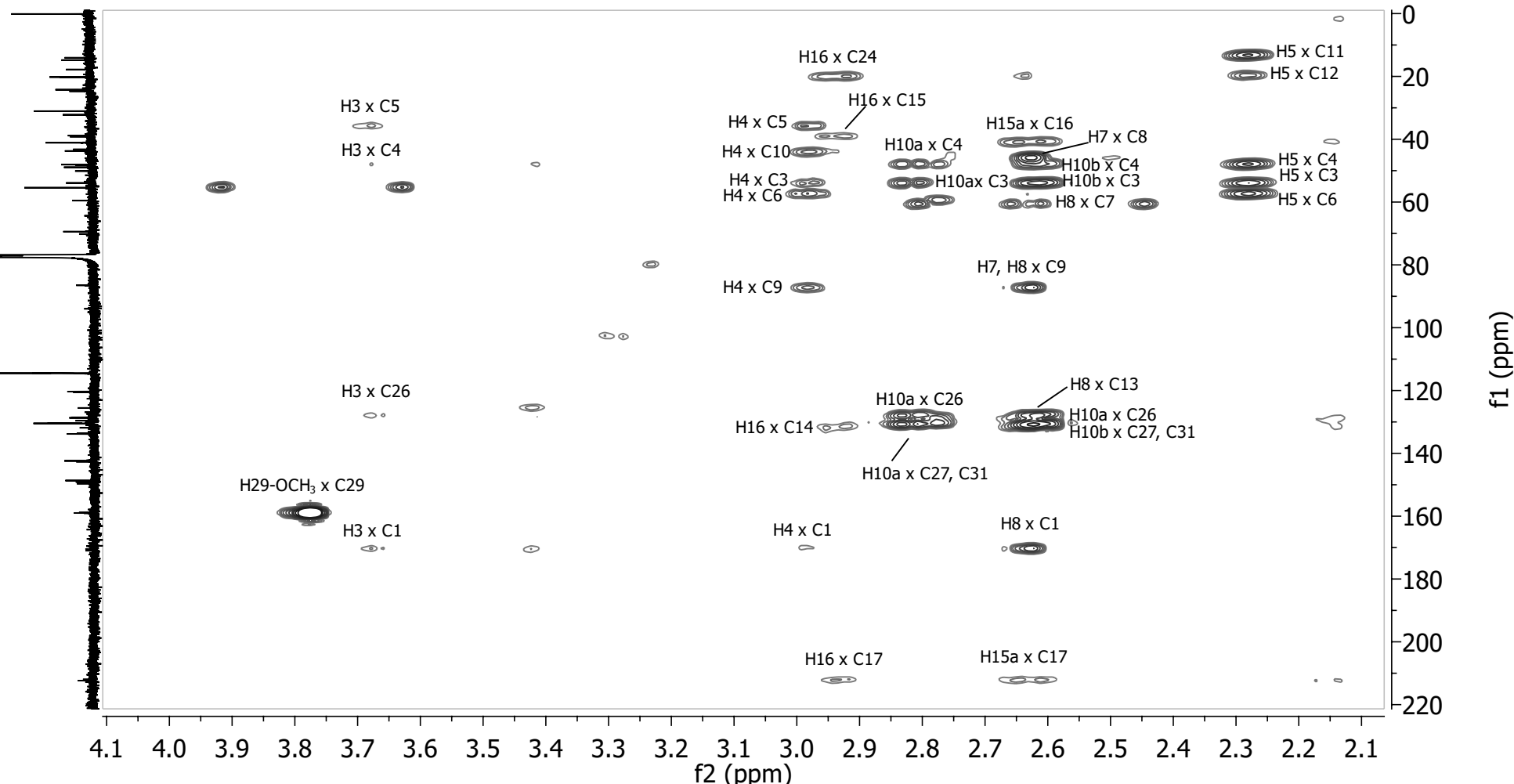
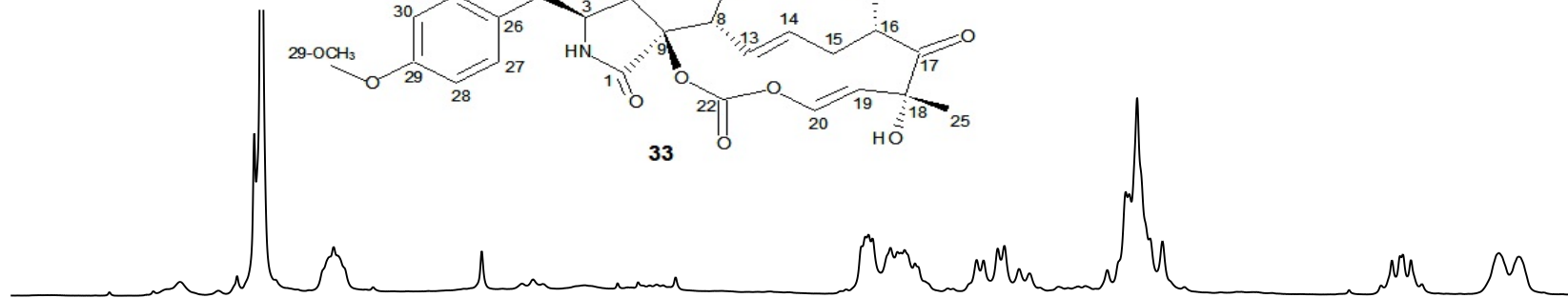
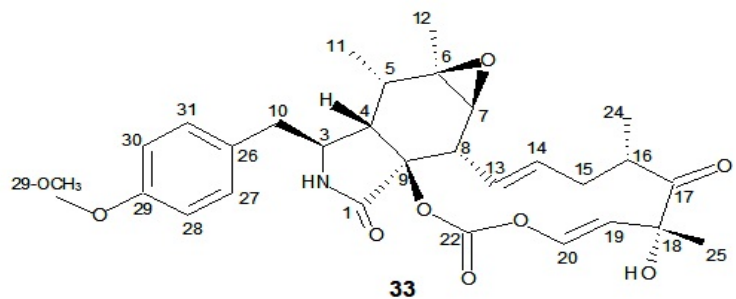
Apêndice 10.7 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB04_03 (33)** entre δ_H 4,70 e 7,40



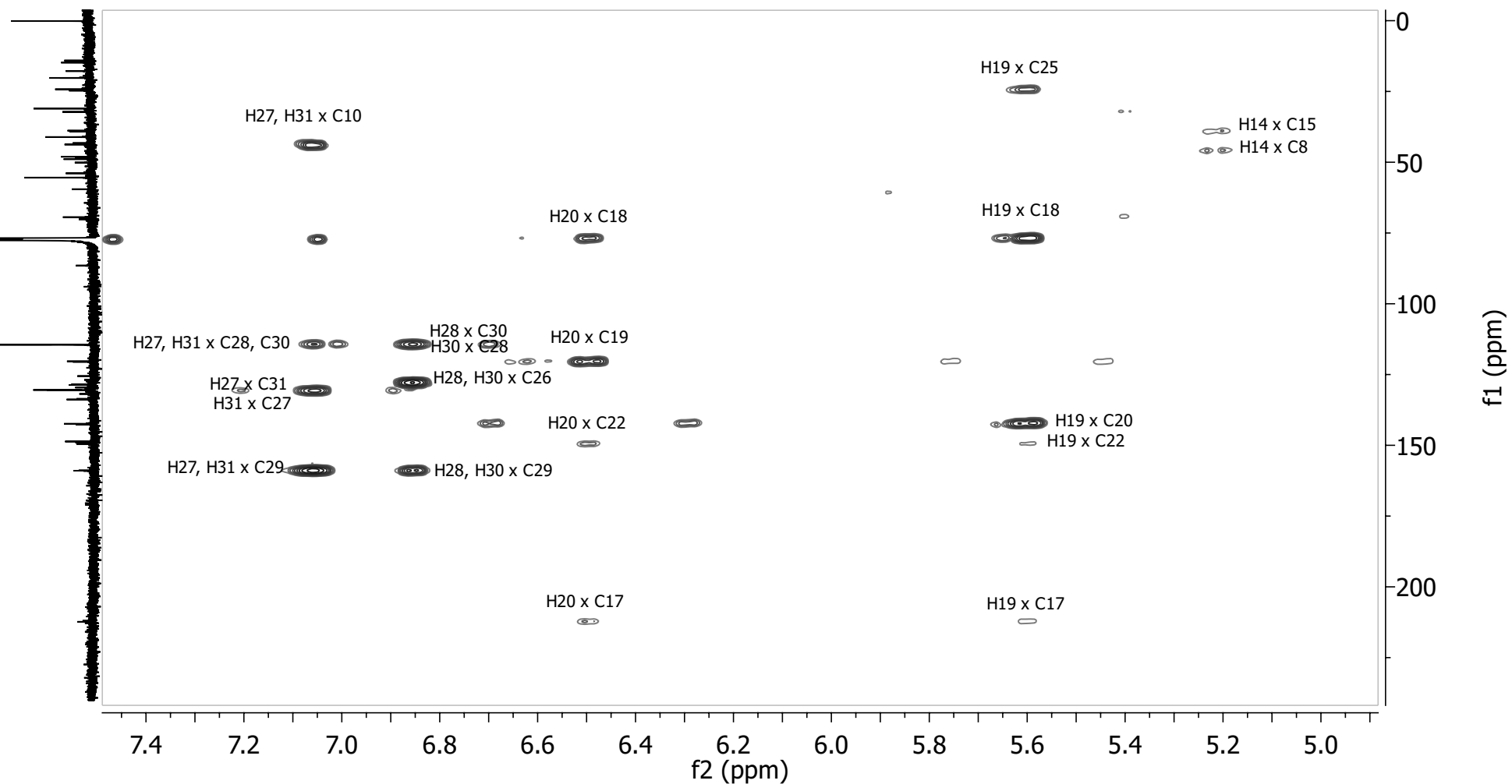
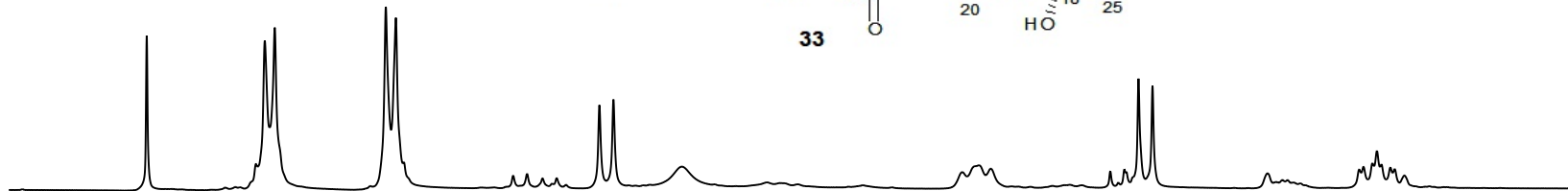
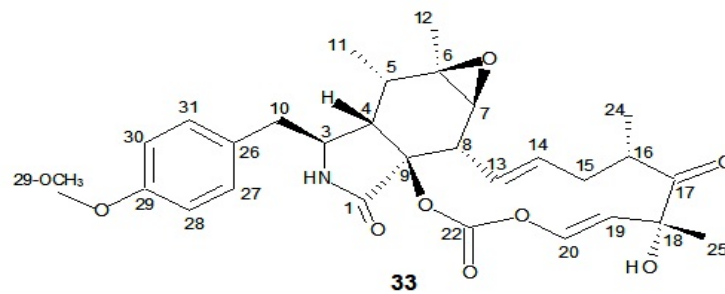
Apêndice 10.8 - Mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_03 (33)



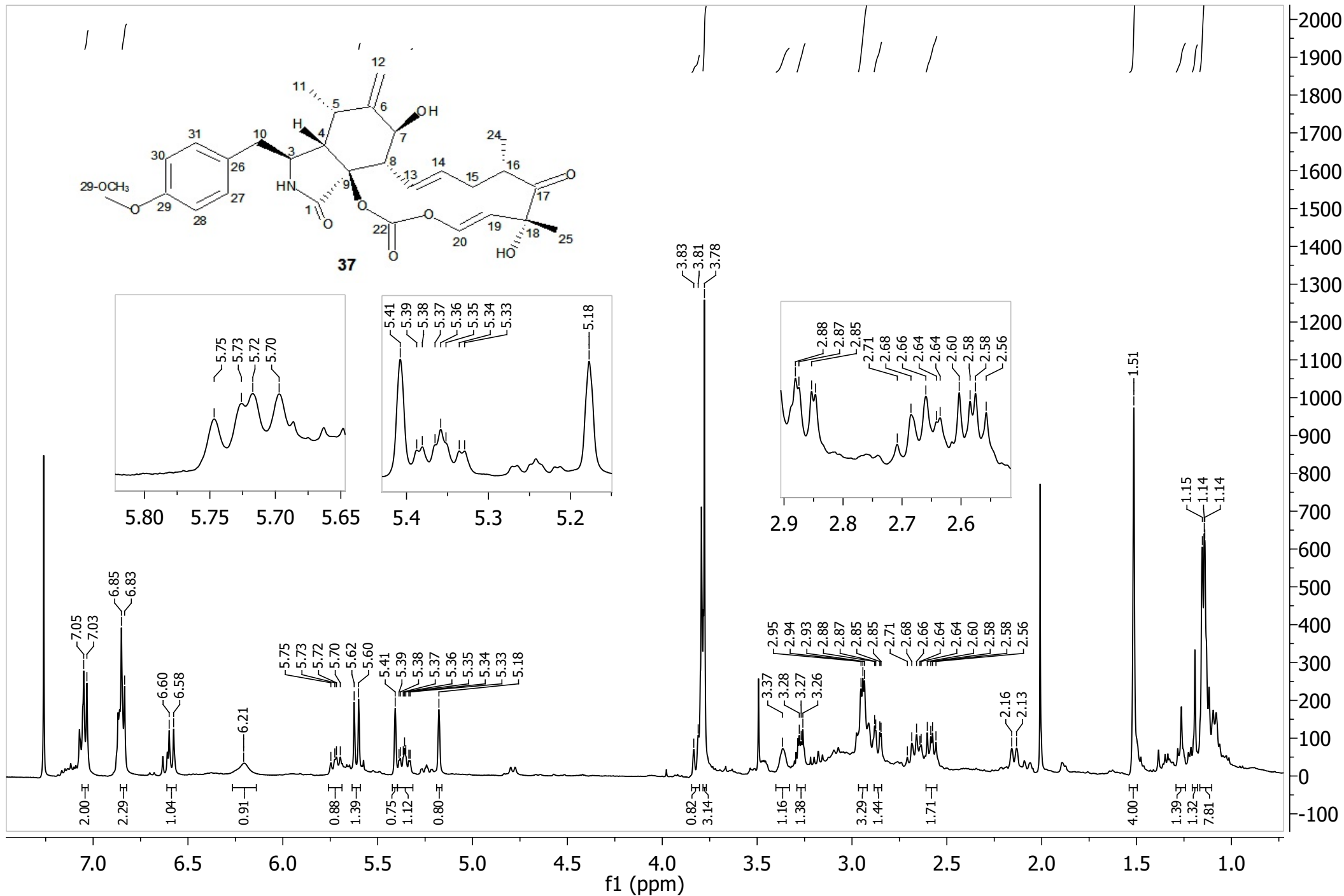
Apêndice 10.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB_04_03 (33)** entre δ_H 0,95 e 1,65



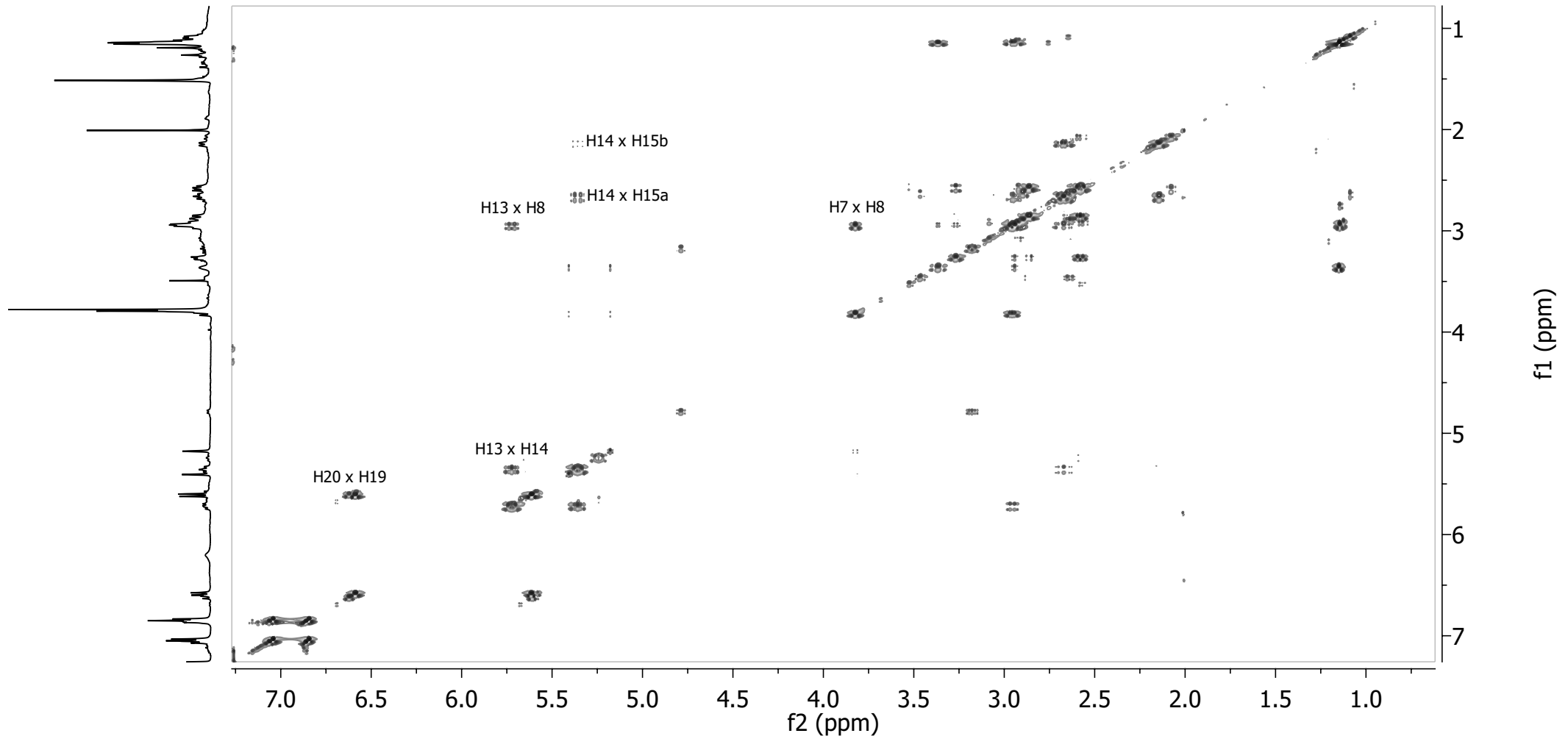
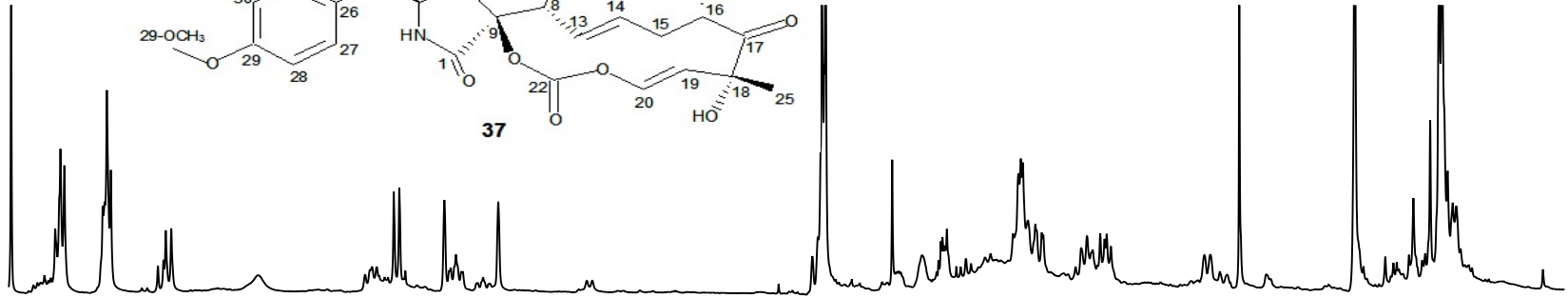
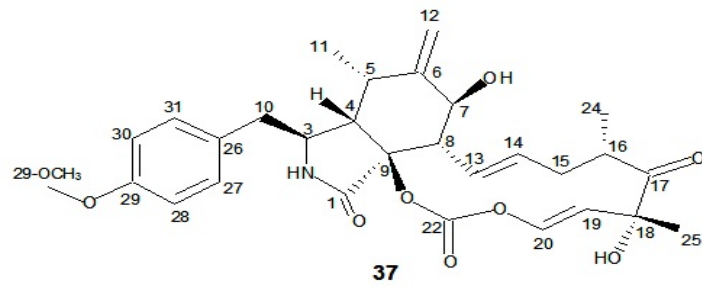
Apêndice 10.10 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB_04_03 (**33**) entre δ_H 2,10 e 4,10



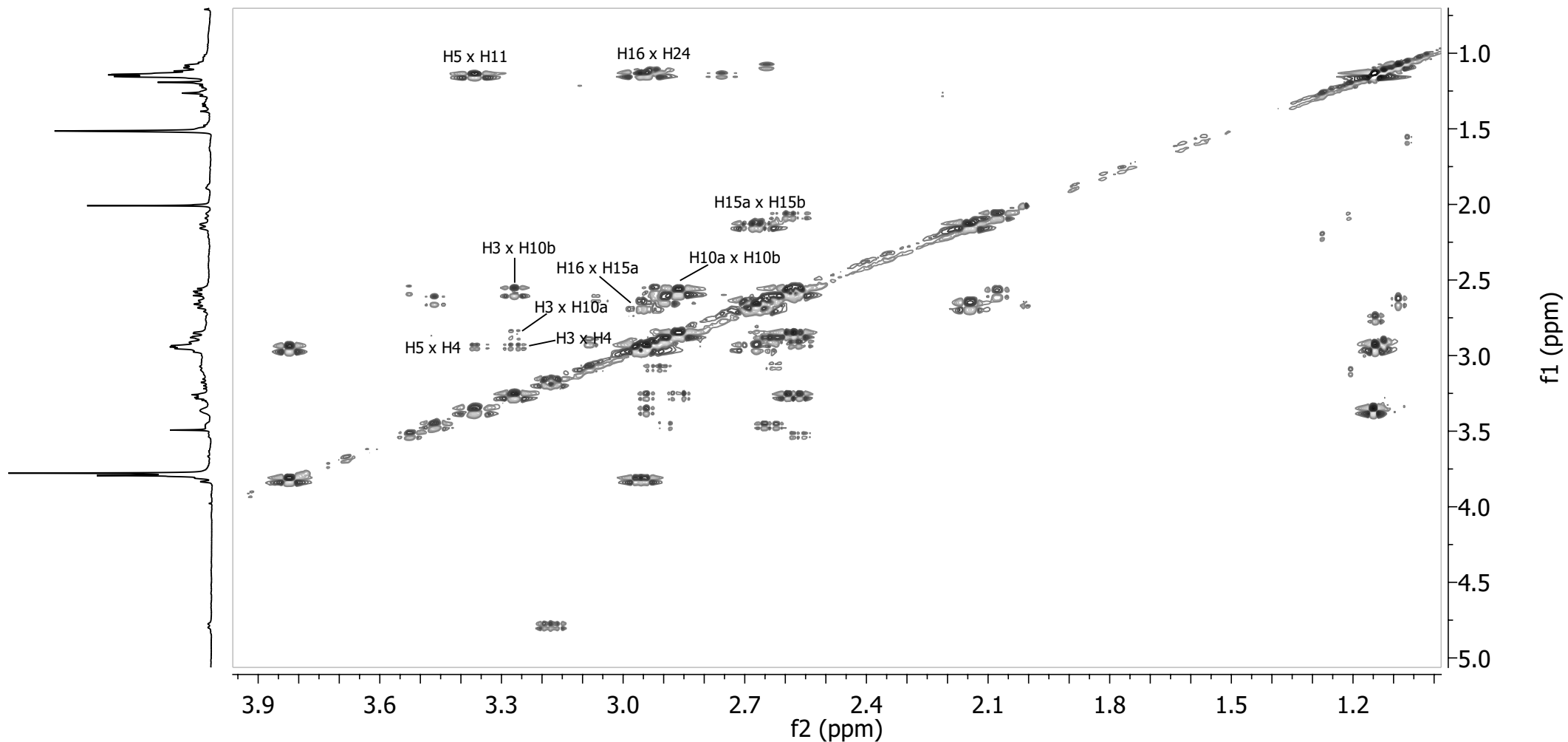
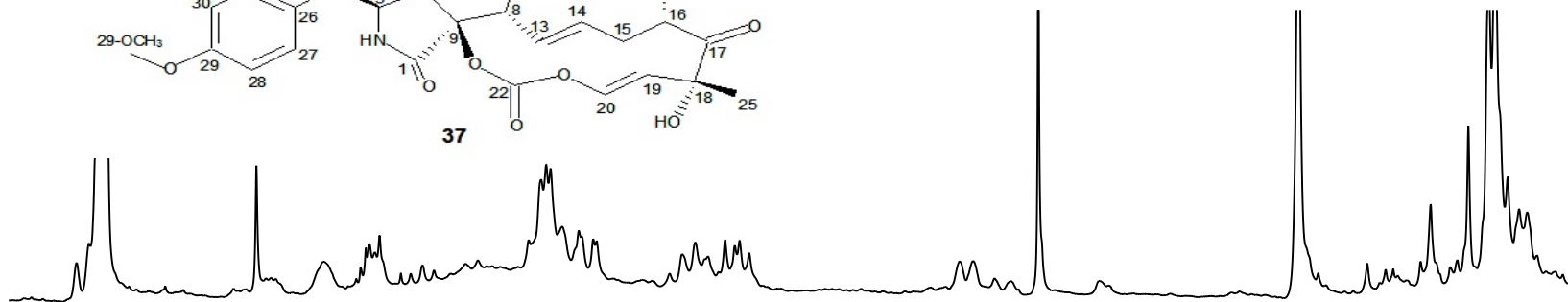
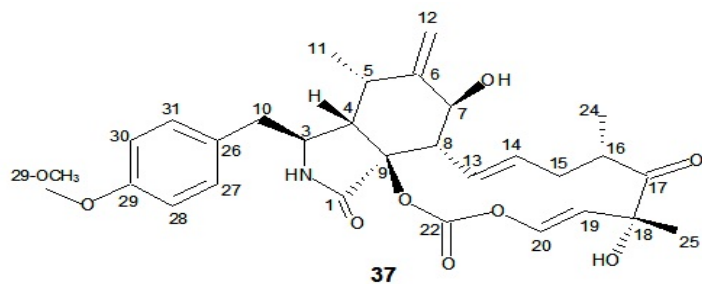
Apêndice 10.11 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB_04_03 (**33**) entre δ_H 5,00 e 7,15



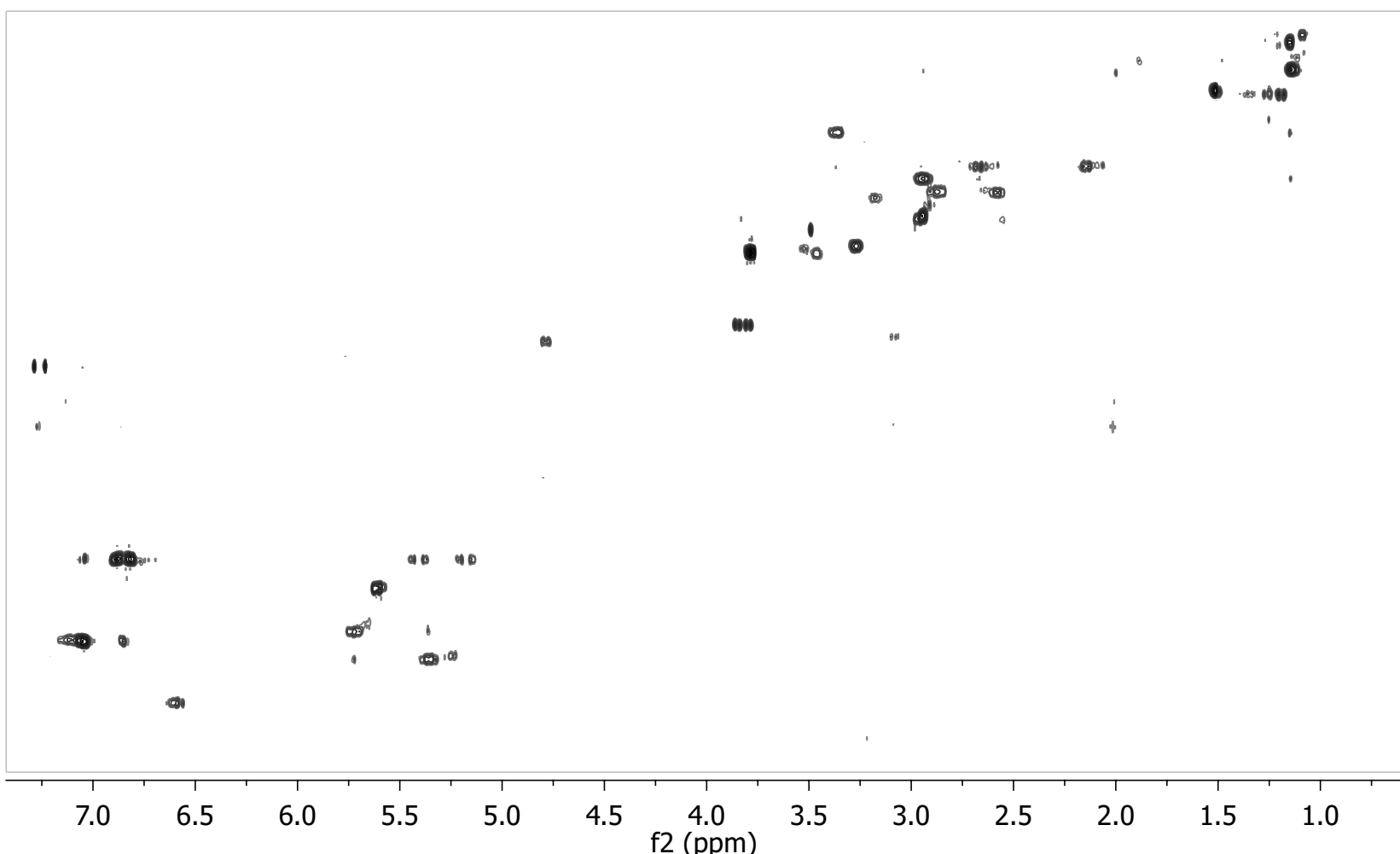
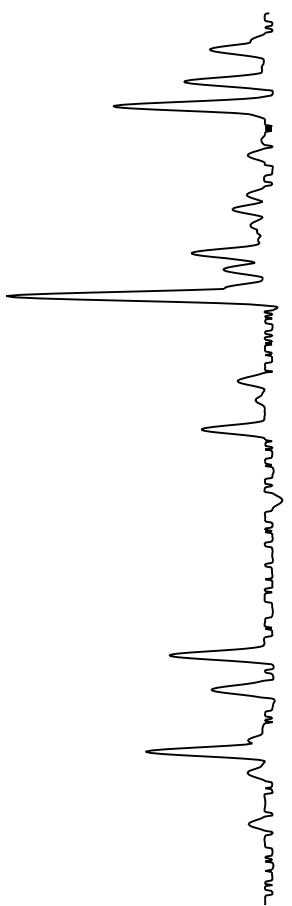
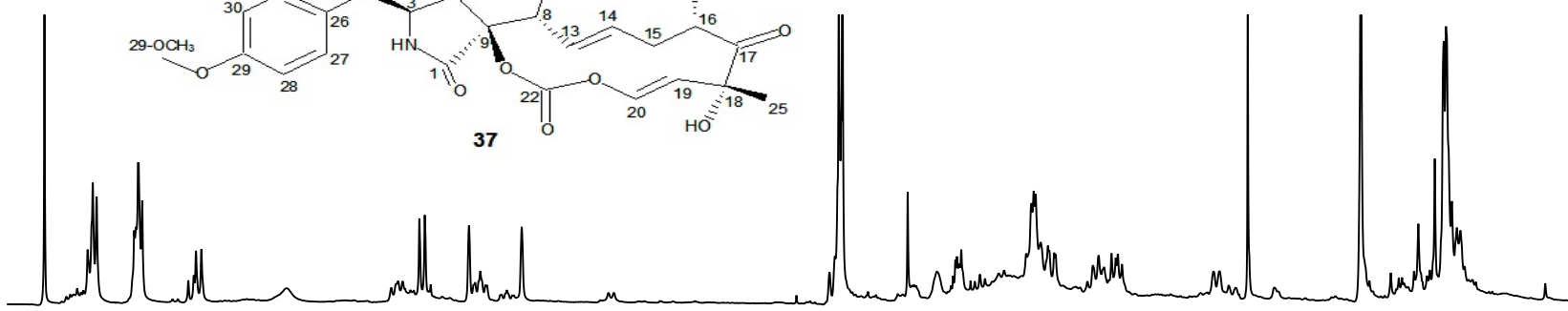
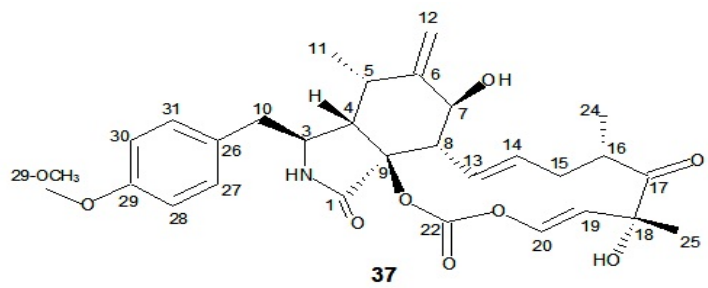
Apêndice 11.1: Espectro de RMN de ¹H [CDCl₃, 500 MHz] de LIB_04_01 (37)



Apêndice 11.2 - Mapa de contornos COSY [CD₃Cl, 500 MHz] de LIB04_01 (37)

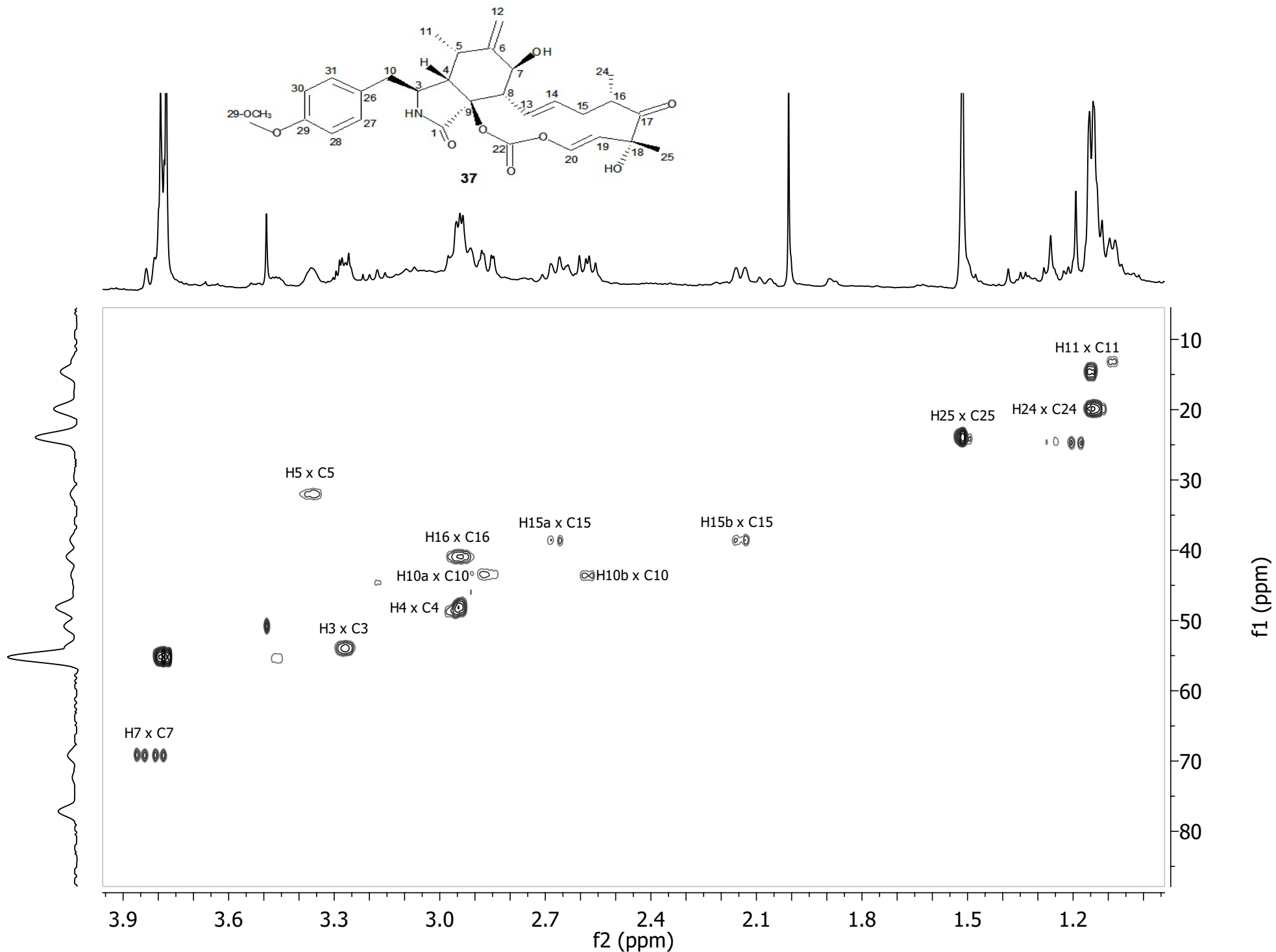


Apêndice 11.3 - Expansão do mapa de contornos COSY [CD₃Cl, 500 MHz] de **LIB04_01 (37)** entre δ_H 1,00 e 3,90

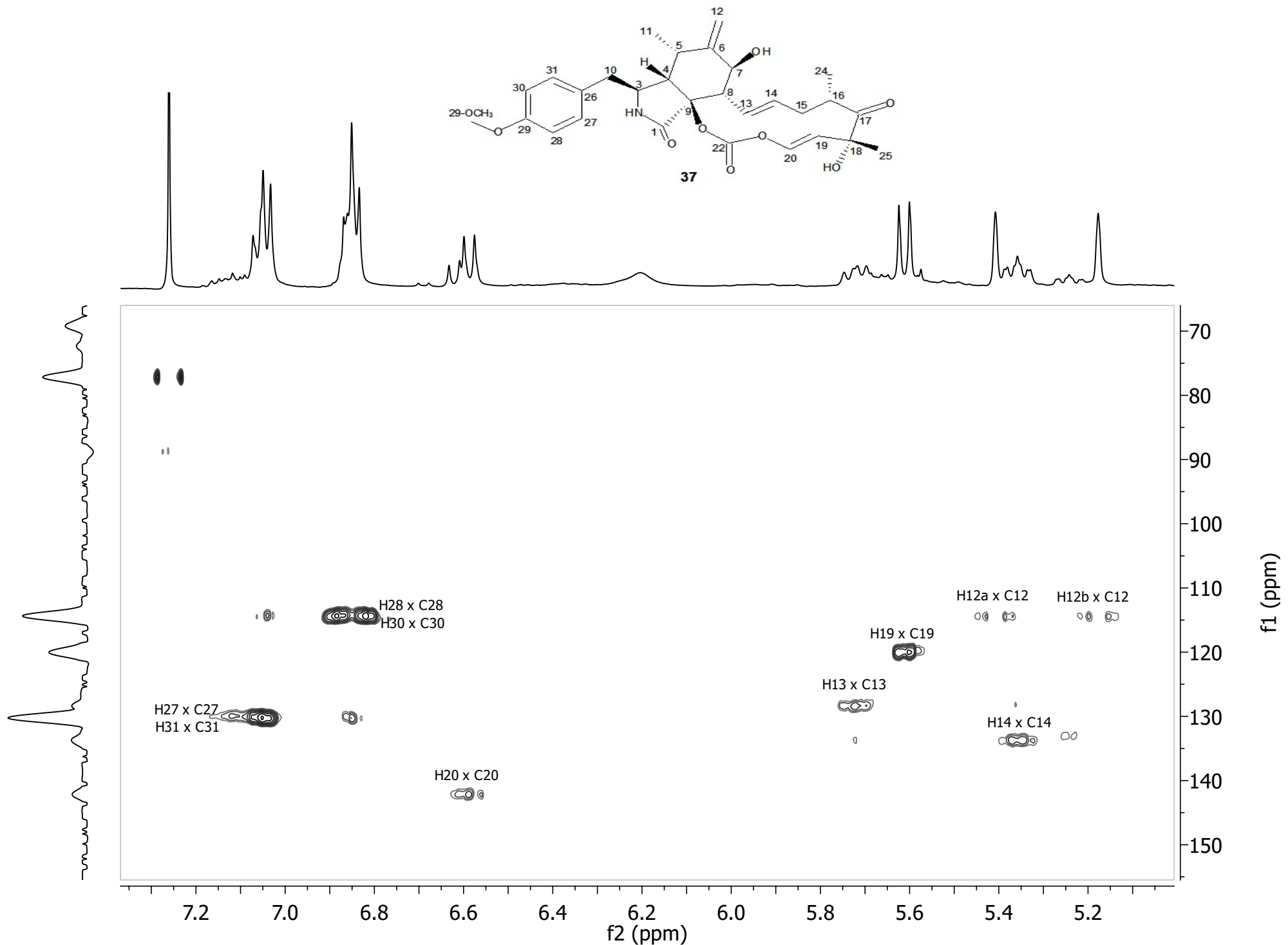


f1 (ppm)

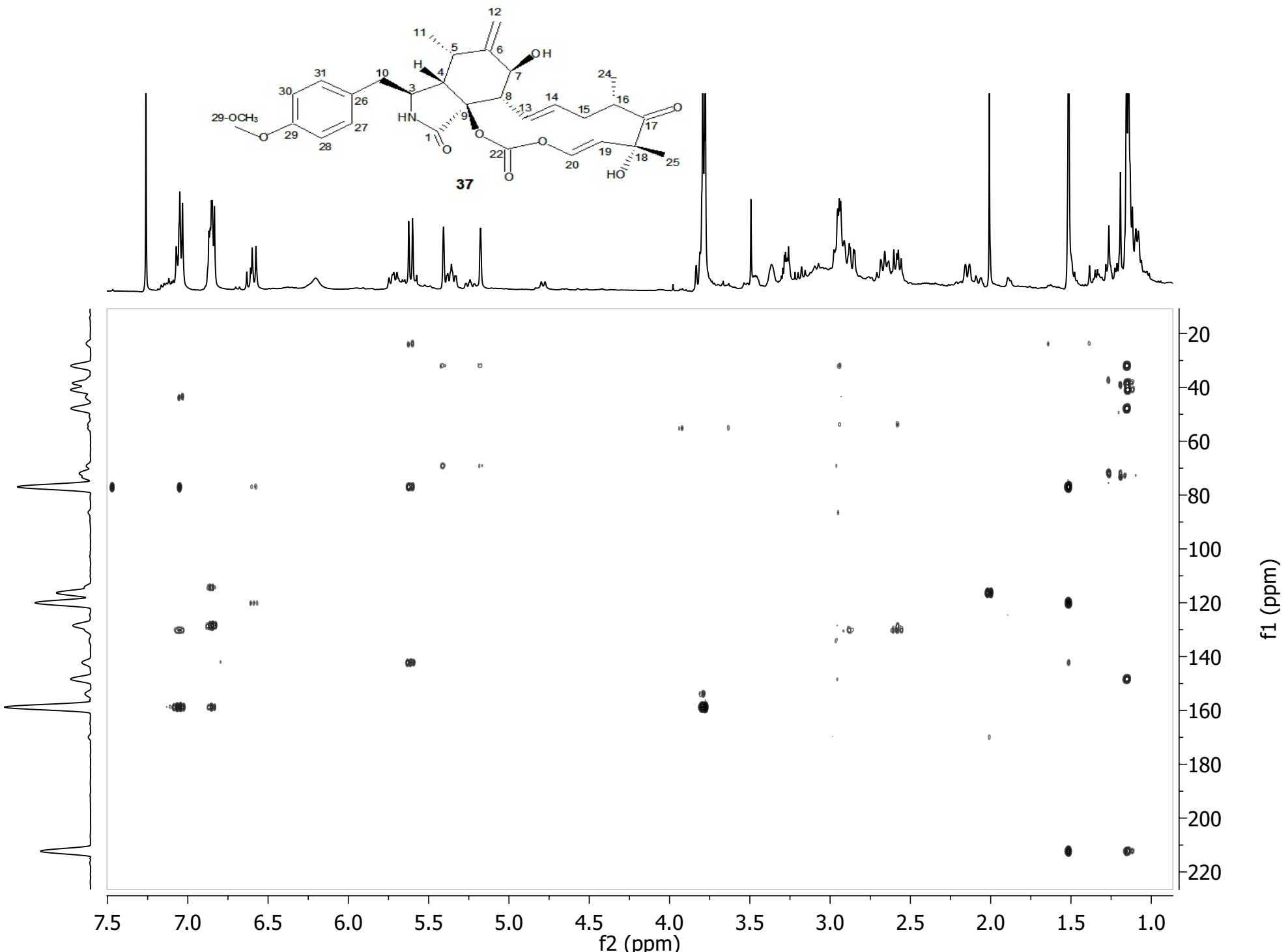
Apêndice 11.4 - Mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_01 (37)



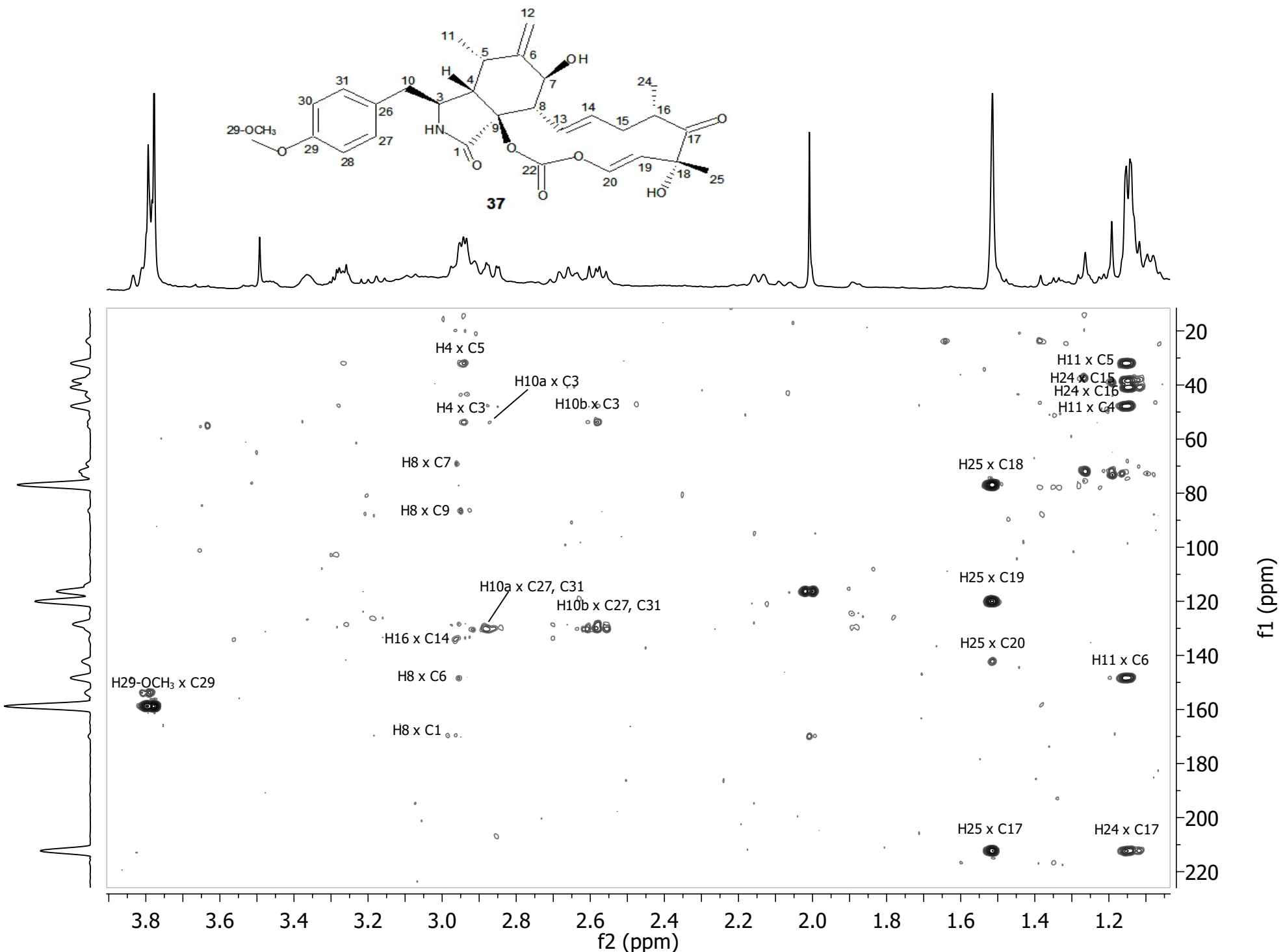
Apêndice 11.5 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_01 (37) entre δ_H 1,00 e 3,90



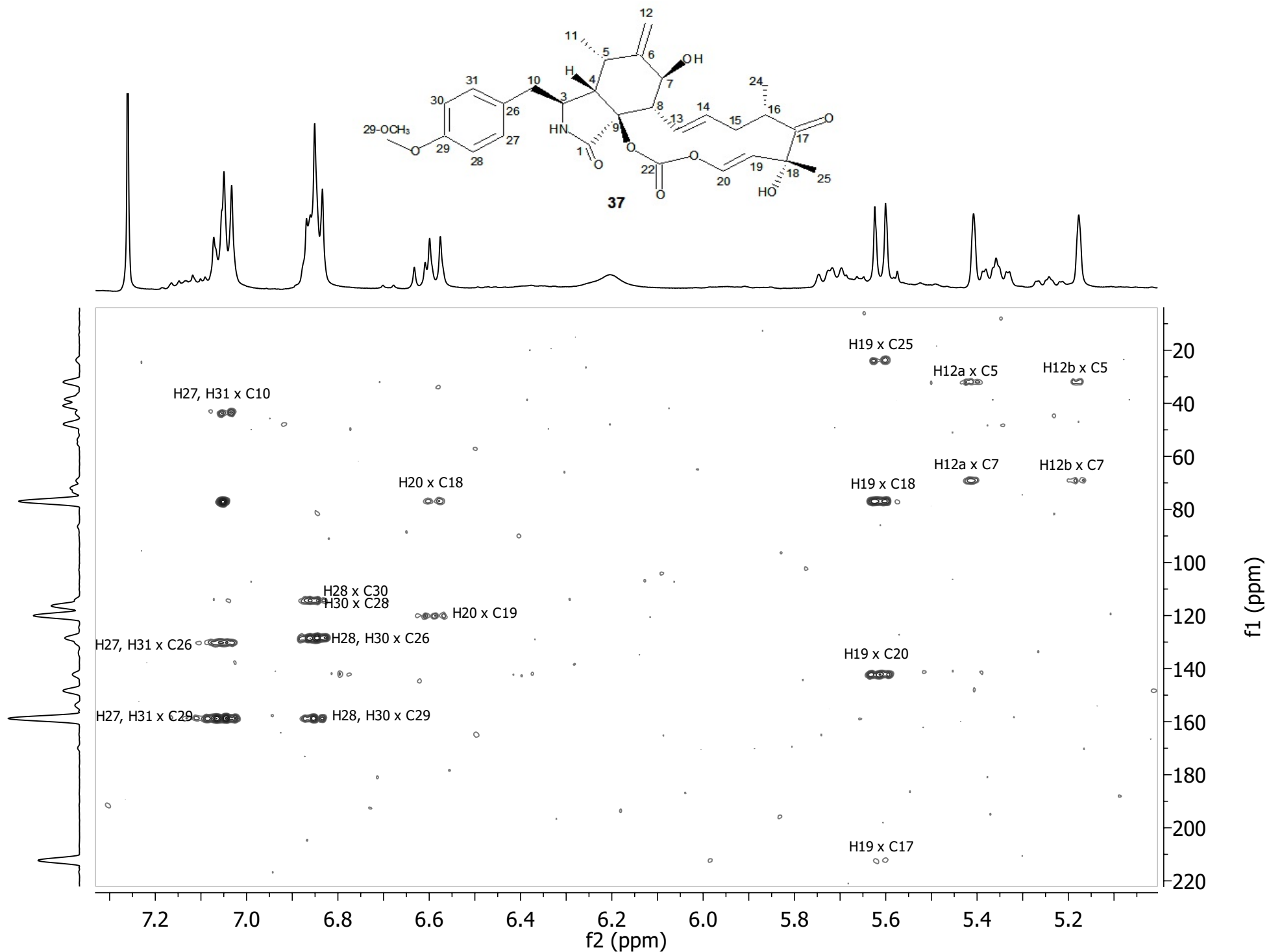
Apêndice 11.6 - Expansão do mapa de contornos HSQC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_01 (37) entre δ_H 5,00 e 7,35



Apêndice 11.7 - Mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB04_01 (37)



Apêndice 11.8 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de **LIB_04_01 (37)** entre δ_H 1,00 e 3,90



Apêndice 11.9 - Expansão do mapa de contornos HMBC [CDCl₃, 500 MHz] de LIB_04_01 (37) entre δ_H 5,00 e 7,20



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetletCytosporones O, P and Q from an endophytic *Cytospora* sp.Lucas M. Abreu^{a,*}, Richard K. Phipps^b, Ludwig H. Pfenning^c, Charlotte H. Gotfredsen^d,
Jacqueline A. Takahashi^a, Thomas O. Larsen^b^a Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil^b Department of Systems Biology, Center for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark, Søtofts Plads Building 221, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark^c Department of Phytopathology, Federal University of Lavras, PO Box 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil^d Department of Chemistry, Technical University of Denmark, Kemitorvet Building 201, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2009

Revised 28 January 2010

Accepted 29 January 2010

Available online 2 February 2010

Keywords:

Cytosporones

Dothiorelones

*Cytospora**Phomopsis*

Fungal endophytes

ABSTRACT

Cytosporones O, P and Q, together with the known compounds cytosporones B, C, D, E and dothiorelones A, B, C, and H were isolated from the ascomycete fungus *Cytospora* sp. during a chemotaxonomic study of fungal endophytes belonging to the related genera *Cytospora* and *Phomopsis* from Brazil. The structures were determined by NMR spectroscopy and mass spectrometry. With exception of cytosporones D, E, Q, and dothiorelone B, all compounds were consistently detected in the metabolite profiles of eight *Cytospora* isolates investigated; and were also produced by a distinct chemotype of *Phomopsis*.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Fungal endophytes comprise a heterogeneous and diverse group of species capable of colonizing asymptotically the interior of plants and are considered as an important part of global fungal diversity.¹ The taxonomy of several genera of fungi occurring as common endophytes (e.g., *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Xylaria*) is quite complex due to the lack of good morphological markers for in vitro species recognition and differentiation among isolates in the same genus are generally indicated by distinct morphotypes.²

Endophytes are also recognized as producers of a vast array of secondary metabolites, many of them with promising bioactivities.³ Chemotaxonomic studies of morphologically related endophytes using secondary metabolite profiling of fungal cultures by LC–UV–MS can be used as support for species delimitation as well as for compound dereplication and discovery of new metabolites.⁴

During a chemotaxonomic study of fungal endophytes belonging to the related ascomycete genera *Cytospora* and *Phomopsis* isolated from native and cultivated plants in Brazil, we have cultivated one isolate of *Cytospora* sp. in large scale and purified the known natural products cytosporones B, C, D, E and the structurally related dothiorelones A, B, C, and H, together with three new cytosporone analogues described herein this Letter.

The fungus *Cytospora* sp. CML 1841 (=IBT 41593)⁵ isolated as an endophyte of the mistletoe *Phoradendron perrottetii* in Brazil⁶ was three-point inoculated in 200 plates containing MEA medium⁷

and cultivated for 20 days at 25 °C. The contents of the plates were extracted twice with ethyl acetate (5 L) and the dried extract (3.6 g) was subjected to reversed phase (C18) followed by stepwise normal phase (Diol) flash chromatography.⁸ Target compounds were identified based on their retention times and UV spectra under standard analytical HPLC conditions⁹ in comparison to data of the compounds most commonly found in the metabolite profiles of eight *Cytospora* isolates cultivated under the same growth conditions on MEA plates and subjected to micro-scale extraction of metabolites¹⁰ followed by analytical HPLC profiling. Final purification of compounds was accomplished by semi-preparative HPLC.¹¹

Eleven compounds were purified and eight were identified as the known compounds cytosporones B, C, D, E and the dothiorelones A, B, C, and H after comparison of their HRESIMS and NMR data¹² to those reported in the literature.^{13–15}

Compound **1** was purified from the same fraction containing dothiorelone H (**2**) and HRESIMS data indicated that both compounds have the same molecular formula C₁₆H₂₂O₅ (*m/z* calcd for C₁₆H₂₃O₅ 295.1545; found 295.1523 for **1** and 295.1520 for **2**) as well as identical UV spectra (λ_{\max} 204, 282 nm; CH₃CN–H₂O plus 50 ppm TFA). ¹H and ¹³C NMR data confirmed the structural similarity of **1** and **2** (Table 1) and also indicated a shift in the position of the hydroxyl group attached to the saturated side chain in **1**, as revealed with the replacement of a methyl doublet at δ_{H} 1.14, in the ¹H NMR of **2** (H-16), by a triple doublet at δ_{H} 0.93 in **1**. HMBCs from this methyl triple doublet to an oxygenated carbon signal at δ_{C} 73.9, in ¹³C NMR, supported the attachment of a hydroxyl at

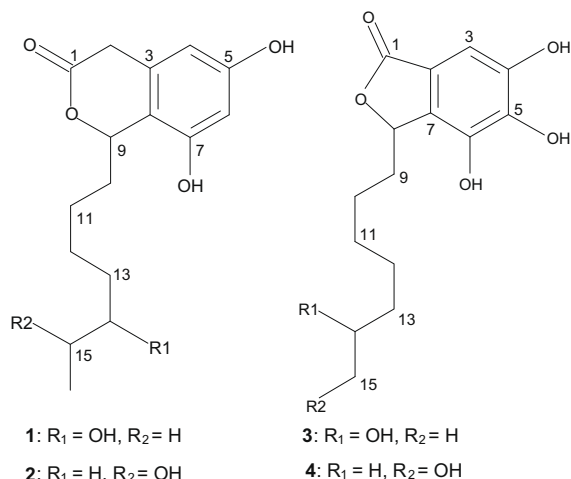
* Corresponding author. Tel.: +55 3134095754; fax: +55 3134095700.
E-mail address: lmabreu@ufmg.br (L.M. Abreu).

Table 1
NMR data for **1** (^1H at 800 MHz, ^{13}C at 200 MHz; CD_3OD) and **2** (^1H at 500 MHz, ^{13}C at 125 MHz; CD_3OD)

Position	1			2		
	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	HMBC
1	174.2			174.1		
2	35.7	3.80 d (19.5), 3.48 d (19.6)	C1, C3, C4, C8	35.4	3.79 d (19.5), 3.48 d (19.6)	C1, C3, C4, C5, C7
3	132.9			132.8		
4	106.3	6.13 br s	C2, C5, C6, C8	106.2	6.13 br s	C2, C5, C6, C8
5	159.7			159.7		
6	102.1	6.22 d (1.6)	C4, C5, C7, C8	102.2	6.23 d (1.5)	C4, C5, C7, C8
7	155.4			155.3		
8	114.0			113.9		
9	80.2	5.61 dd (8.6, 5.1)	C1, C3, C7, C8, C10, C11	80.2	5.61 dd (8.6, 5.2)	C1, C3, C7, C8, C10, C11
10	36.9	1.87 m, 1.82 m	C8, C9, C11	36.6	1.84 m	C8, C9, C11, C12
11	26.9	1.49 m, 1.41 m		26.6	1.55 m, 1.39 m	
12	26.5	1.48 m, 1.40 m		30.3	1.37 m	C13
13	37.9	1.48 m, 1.40 m		26.7	1.39 m	
14	73.9	3.43 m	C12, C16	40.0	1.41 m	
15	31.2	1.48 m, 1.40 m	C13, C14, C16	68.6	3.70 m	C13
16	10.5	0.93 td (7.4, 1.5)	C14, C15	23.4	1.14 d (6.2)	C14, C15

C-14, thus defining the structure of a new cytosporone analogue, cytosporone O. Detailed analysis of NMR data for **2** also supported the reassignment of ^{13}C signals for C-13 at δ_{C} 26.7 and C-14 at δ_{C} 40.0, instead of δ_{C} 30.3 and δ_{C} 31.1 originally described.¹⁵ Dothiorelone H has recently been isolated from an endophytic *Pestalotiopsis* fungus and named as cytosporone J,¹⁶ but no ^{13}C NMR data were provided by the authors for this compound.

Two compounds, **3** and **4**, were purified and exhibited UV spectra (λ_{max} 220, 276 nm; $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ plus 50 ppm TFA) almost identical to that of cytosporone E. Comparative analysis of ^1H and ^{13}C NMR data for **3**, **4** (Table 2), and cytosporone E¹³ confirmed their core structure as trihydroxy benzene γ -lactones attached to a heptane side chain, except for the presence of one extra oxygen in the structures of **3** and **4**, as indicated by their molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ derived from HRESIMS (m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_6$ 297.1338; found 297.1327 for **3** and 297.1334 for **4**).



Correlation of a methyl doublet at δ_{H} 1.13 (H-15) in the ^1H NMR of **3** to a carbinolic proton at δ_{H} 3.69 (m) in $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and to an oxygenated carbon signal at δ_{C} 68.7 in HMBC indicated the attachment of a hydroxyl group at C-14, thus identifying **3** as a new compound, cytosporone P.

No methyl signal was observed in the ^1H NMR spectrum of **4**, instead a downfield methylene triplet at δ_{H} 3.53 indicated the presence of a primary alcohol moiety. Further correlations from this methylene signal to another methylene at δ_{H} 1.51 (H-14) in $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and to C-13 and C-14 in HMBC supported the attachment of a hydroxyl group at C-15. This new compound was named cytosporone Q.¹⁷

Table 2
NMR data for **3** and **4** (^1H at 800 MHz, ^{13}C at 200 MHz; CD_3OD)

Position	3			4		
	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	HMBC
1	174.3			174.3		
2	131.2			131.3		
3	103.1	6.78 s	C1, C2, C4, C5, C7	103.1	6.78 s	C1, C2, C4, C5
4	148.8			148.8		
5	141.4 ^a			141.4 ^c		
6	141.2 ^b			141.2 ^d		
7	117.4			117.4		
8	82.0	5.47 dd (7.4, 3.1)	C1, C2, C6, C7, C9, C10	82.0	5.47 dd (7.4, 3.1)	C1, C2, C9, C10
9	34.0	2.25 m, 1.74 m	C8, C10, C11	34.0	2.23 m, 1.74 m	C8, C10, C11
10	25.7	1.35 m		25.7	1.33 m	
11	30.6	1.35 m		30.5 ^e	1.33 m	
12	26.9	1.35 m		30.6 ^f	1.33 m	
13	40.2	1.39 m	C11, C12, C14	26.9	1.33 m	
14	68.7	3.69 m	C12, C13	33.7	1.51 m	C12, C13, C15
15	23.6	1.13 d (6.2)	C13, C14	63.1	3.53 t (6.7)	C13, C14

^{a-f} Assignment of carbons can be interchanged.

Cytosporone O (**1**) and the dothiorelones A, C and H (**2**) were detected in the metabolite profiles of seven out of eight *Cytospora* isolates investigated by HPLC-DAD and always occurred together. Cytosporone C was produced by seven isolates; cytosporone P (**3**) and cytosporone B were produced by five isolates. These seven compounds were also consistently detected in the metabolite profiles of a distinct group of *Phomopsis* isolates in agreement with findings of Brady et al.¹³ that cytosporones were produced by fungi of both genera. Cytosporone Q was detected in the metabolite profiles of three *Cytospora* isolates only. Investigations are underway to determine the chemotaxonomic relationships of a group of endophytic *Cytospora* and *Phomopsis* isolated from tropical plants in Brazil and to assess the possible role of the isolated cytosporones and dothiorelones as chemotaxonomic markers.

Acknowledgments

This work is part of the Ph.D. project of the first author and the fellowship given by Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientí-

fico eTecnológico—CNPq is gratefully acknowledged. Part of this research was supported through funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais—FAPEMIG. The work was performed in Denmark and the authors thank the Danish Research Council for Technology and Production Sciences (247-07-0513) for support.

References and notes

- Rodriguez, R. J.; White, J. F., Jr.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. *New Phytol.* **2009**. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- Cannon, P. F.; Simmons, C. M. *Mycologia* **2002**, *94*, 210.
- Gunatilaka, A. A. L. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 509.
- Larsen, T. O.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K. F.; Hansen, M. E.; Frisvad, J. C. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 672.
- CML—Mycological Collection of Lavras, Federal University of Lavras, Brazil; IBT—IBT Culture Collection, Center for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark.
- Abreu, L. M.; Almeida, A. R.; Salgado, M.; Pfenning, L. H. *Mycol. Prog.*, in press. doi:10.1007/s11557-010-0663-8.
- Malt Extract Agar (MEA)—malt extract (Difco) 20 g, peptone (Difco) 1 g, glucose (BHD) 20 g, distilled water 750 mL.
- The crude extract was loaded onto a C18 Snap cartridge (60 g, Biotage) and subjected to reversed phase flash chromatography on an Isolera One system (Biotage) using a water–methanol gradient (H₂O–MeOH 90:10, 3 fractions; 90:10–0:100, 9 fractions; 0:100, 4 fractions) to give 16 fractions. Fractions 09 (316 mg), 10 (281 mg), and 11 (440 mg) were individually submitted to step-wise normal phase flash chromatography over 10 g diol cartridges (Biotage) eluting from 100% heptane to 100% dichloromethane in 50% steps, and from dichloromethane to 100% ethyl acetate in 10% steps, with two additional elutions with ethyl acetate–methanol (90:10 and 80:20) and a final wash with 100% methanol to afford another 16 sub fractions each (09_01 to 09_16, 10_01 to 10_16, and 11_01 to 11_16). All solvents were HPLC grade and were purchased from Merck.
- Analytical HPLC was performed on a HP 1100 system equipped with a diode array detector (Agilent) using a Luna II C18 column (100 × 2 mm, 3 μm; Phenomenex) and an elution gradient of water–acetonitrile from 85:15 to 0:100 in 20 min plus 5 min of pure acetonitrile; both solvents containing 50 ppm of trifluoroacetic acid.
- Smedsgaard, J. *J. Chromatogr.* **1997**, *760*, 264.
- Semi-preparative purification of target compounds was performed on a Waters 600 HPLC system with a 996 PDA detector using a Luna II C18 (250 × 10 mm, 5 μm) column (Phenomenex). Fractions 11_05, 11_06, 11_08, and 11_10 were chromatographed using water–methanol containing 100 ppm of trifluoroacetic acid as eluents (H₂O–MeOH 30:70–06:94 in 20 min, plus 5 min of 100% MeOH) to afford cytosporone B (12.8 mg), cytosporone D (0.6 mg), cytosporone C (13.7 mg), and cytosporone E (0.5 mg). Fractions 09_09, 09_12 and 10_07 were submitted to semi preparative HPLC using water–acetonitrile containing 50 ppm of TFA as eluents (H₂O–ACN 68:32–66:34 in 12 min, plus 5 min of 100% ACN) to afford dothiorelones A–C and H (**2**), and compounds **1**, **3**, and **4**.
- HRESIMS was obtained on a LCT orthogonal time-of-flight mass spectrometer (Waters–Micromass) with a Z-spray ESI source. ¹H and 2D NMR spectra for known cytosporones and dothiorelones were acquired in Varian Unity Inova 500 MHz spectrometer using standard pulse sequences. ¹H, ¹³C and 2D NMR spectra for compounds **1**, **3**, and **4** were acquired in Bruker Avance 800 MHz using standard pulse sequences.
- Brady, S. F.; Wagenaar, M. M.; Singh, M. P.; Janso, J. E.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4043.
- Xu, Q.; Wang, J.; Huang, Y.; Zheng, Z.; Song, S.; Zhang, Y.; Su, W. *Acta Oceanol. Sin.* **2004**, *23*, 541.
- Shen, Y.; Du, X.; Zheng, Z.; Huang, Y.; Song, S.; Su, W. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* **2006**, 11.
- Xu, J.; Kjer, J.; Sendker, J.; Wray, V.; Guan, H.; Edrada, R.; Müller, W. E. G.; Bayer, M.; Lin, W.; Wu, J.; Proksch, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7362.
- Optical rotations were measured on a Perkin Elmer 341 polarimeter; **1**: [α]_D²⁰ –1.9 (c 0.005, MeOH), **3**: [α]_D²⁰ –25.0 (c 0.003, MeOH), **4**: [α]_D²⁰ –52.1 (c 0.001, MeOH).