



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HÉLIO OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**ESTUDO DO POTENCIAL QUÍMICO E CITOTÓXICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Periconia hispidula***

FORTALEZA

2016

HÉLIO OLIVEIRA DO NASCIMENTO

ESTUDO DO POTENCIAL QUÍMICO E CITOTÓXICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Periconia hispidula*

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.
Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- N193e Nascimento, Hélio Oliveira do.
Estudo do potencial químico e citotóxico dos metabólitos secundários do fungo endofítico *Periconia hispidula*. / Hélio Oliveira do Nascimento. – 2016.
152 f. : il. ; color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.
Coorientação: Profa. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta.
1. Fungos. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Química. I. Título.

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

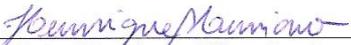

Hélio Oliveira do Nascimento

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 02/02/2016.

EXAMINADORES:


Prôfa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. João Henrique Silva Luciano
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

A Deus.
Minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e perseverança para enfrentar os obstáculos diários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade e infraestrutura.

A CAPES, CNPQ E FUNCAP, pela bolsa e patrocínio dos projetos.

A Professora Dra. Mary Anne Sousa Lima, pela orientação, conselhos, ensinamentos e empenho.

A Professora Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta, pelos ensinamentos das técnicas de laboratório, pela motivação e coorientação.

A Professora Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, pela cooperação, parceria e por ceder o laboratório de micro-organismos.

A Professora Dra. Letícia Costa Lotufo, ao Prof. Dr. Diego Veras Wilke, e ao Ms. Elthon Gois Ferreira do Laboratório de Oncologia Experimental da UFC, por contribuir com a realização dos bioensaios de atividade citotóxica.

A Professora Dra. Angélica Maria Lucchese da Universidade Estadual Feira de Santana (UEFS) – Bahia, pela identificação do fungo *Periconia hispidula*.

Ao Professor Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior do laboratório de bioprospecção e experimentação em leveduras da Universidade Federal do Ceará, pelos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, em nome do seu coordenador Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, a Profa. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil e aos operadores Paula Uchôa, Regivaldo Gomes, João Vito, Henrique e Hebbert, pelos espectros de RMN.

Ao Laboratório de Espectrometria em Massas do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará (UFC) na coordenação da Professora Dra. Otília Deusdênia e ao operador Fábio Ávila pela obtenção dos espectros de massa.

Ao Professor Dr. Raimundo Braz-Filho, ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e a Profa Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira pela contribuição na determinação estrutural de algumas substâncias.

Ao professor Luiz Gonzaga de França Lopes do laboratório de bioinorgânica e a operadora Elis pela obtenção dos espectros de infravermelho.

A amiga de iniciação científica Valdiana Fernandes pela contribuição no trabalho.

Aos amigos companheiros de Laboratório João Evangelista, Paula Uchôa, Regivaldo Gomes, pelas contribuições neste trabalho, conselhos, ensinamentos e amizade. Davi Dantas, Debora Sousa, Alisson, Robert, Letícia, Henrique Cezar e João Vito, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos companheiros de pós-graduação Carlos Oliveira e Marcos Reinaldo pelas orientações, ajudas, confiança, parceria e motivação em diversos momentos.

Aos companheiros de outros laboratórios especialmente Aiertá Cristina, Onassis, Bruna Rocha, Daniely e Carol pela amizade e parceria.

A minha família, pelo apoio, motivação, companheirismo, orações e amparo nos momentos difíceis.

Aos amigos do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Ceará por se fazerem presentes na minha vida mesmo após a conclusão da graduação.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

OBRIGADO!!!

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu...” [Eclesiastes 3:1](#)

RESUMO

Periconia hipidula é um fungo endofítico isolado de folhas secas provenientes de dunas do semiárido do estado da Bahia. O fungo foi submetido ao cultivo através da variação de fatores nutricionais em quatro meios diferentes: MPD (malte, peptona e dextrose), BD (batata, dextrose), BDL (batata, dextrose e levedura) e MntPL (manitol, peptona e levedura), e análise dos extratos em diferentes dias de incubação (7, 14, 21, 28 dias). A prospecção da atividade citotóxica preliminar foi realizada a partir dos extratos obtidos frente à linhagem de células tumorais de câncer de cólon (HCT-116). Os extratos MPD – 28 dias, BDL - 28 dias e BD - 21 dias apresentaram uma atividade citotóxica promissora e foram preliminarmente selecionados para o estudo químico. O fracionamento cromatográfico do extrato MPD-28 dias, resultou no isolamento de 11 metabólitos secundários caracterizados como {(R), 6-hidroxi-2-metil, 4-cromanona (**PS-1**)}, { (S), 6-hidroxi-2-metil, 4-cromanona (**PS-2**)}, {E, 1-(2,5 diidroxifenil) but-2-en-1-ona (**PS-3**)}, {1-(2, 5 diidroxifenil)-butan-1-ona (**PS-4**)}, Z-3-(3 hidroxifenil) propenoato de metila (**PS-5**), modiolido A (**PS-7**), fusanolido B (**PS-8**), estagonolido E (**PS-9**), {(3R,4R)-3,4diidro,3,4,8 triidroxinaftalen-1-(2H)-ona (PS-11)}, (4S)-isosclerona (**PS-12**), além de **PS-10** que se encontram em fase de caracterização estrutural. Os extratos BDL-28 dias e BD-21 dias apresentaram um perfil cromatográfico bastante semelhante ao extrato MPD-28 dias, desta forma, os fracionamentos cromatográficos de ambos os extratos foram direcionados para o isolamento de substâncias ausentes em MPD-28 dias. O ácido 3,4 diidroxibenzoico (**PS-6**) foi isolado apenas do extrato BD-21 dias, enquanto que o fracionamento do extrato BDL 28d forneceu PS-13 (em fase de caracterização estrutural) como diferente. Dentre os metabólitos isolados, os compostos (2S)-6-hidroxi-2-metil-4-cromanona, fusanolido B apresentaram caráter inédito na literatura. Os compostos isolados mostraram-se inativos em ensaios de atividade citotóxica frente a cepas de HCT-116 e MC-27 (adenocarcinoma de mama). No entanto, o composto 1-(2,5-diidroxifenil)-but-2-en-1-ona apresentou elevada inibição com CIM de 62,5 µg/mL ao ser submetido à ensaio antimicrobiano frente a cepas de fungos *Candida Krusei* (ATCC® 142432TM) e *Candida albicans* (ATCC® 10231TM) e 125 µg/mL frente à *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019TM), enquanto que o (2R)-6-hidroxi-2-metil-4-cromanona, Z-3-(3-hidroxifenil)-propenoato de metila, o modiolido A, o estagonolido E, o fusanolido B e a 3,4-diidro- 3,4,8-triidroxinaftalen-1-(2H)-naftalelona apresentaram moderada atividade com CIM de 500 µg/mL. Técnicas cromatográficas usuais, incluindo partição líquido-líquido, coluna de sílica *flash* e cromatografia de alta eficiência (CLAE) foram utilizadas para o isolamento dos metabólitos

secundários, enquanto que a caracterização estrutural foi possível através do uso de técnicas espectrométricas utilizando infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) com experimentos uni e bidimensionais, além de comparação com dados da literatura.

Palavras chave: fungo endofítico; *Periconia hispidula*; metabólitos secundários

ABSTRACT

Periconia hispidula is an endophytic fungus isolated from dried leaves from semi-arid dunes of Bahia. The fungus was subjected to cultivation by varying nutritional factors in four different culture mediums: MPD (malt, peptone and dextrose), BD (potato dextrose), BDL (potato, dextrose and yeast) and MntPL (mannitol, peptone and yeast), and analyzing the extracts on different incubation days (7, 14, 21, 28 days). A survey of primary cytotoxic activity was carried out from the extracts against tumor cell line of colon cancer (HCT-116). The MPD extracts - 28 days BDL - 28 days and BD - 21 days showed a promising cytotoxic activity and were preliminarily selected for the chemical study. The chromatographic fractionation of MPD-28 days extract resulted in the isolation of 11 secondary metabolites characterized as {4-chromanone, 6-hydroxy-(R) -methyl- (**PS-1**)}, {4-chromanone, 6-hydroxy-(S) -methyl- (**PS-2**)}, {*E*, 1-(2,5 dihydroxyphenyl) but-2-en-1-one (**PS-3**)}, {1-(2, 5 dihydroxyphenyl)-butan-1-one (**PS-4**)}, {*Z*-methyl-3-(3-hydroxyphenyl) propenoate (**PS-5**)}, modiolide A (**PS-7**), fusanolide B (**PS-8**), stagonolide E (**PS-9**), {(3R,4R)-3,4-dihydro, 3,4,8-trihydroxy, naphthalen-1(2H)-one (**PS-11**)}, {(4S) isosclerona (**PS-12**)}, furthermore **PS-10** without structural characterization yet. The BDL-BD-28 days and 21 days extracts presented a chromatographic profile very similar to MPD-28 days extract, thus, the chromatographic fractionations of both extracts were targeted for isolation of substances absent in MPD-28 days. The 3,4 dihydroxy-benzoic acid was isolated just from the BD-extract 21 days, while the fractionation of the extract BDL 28days gave (PS-13 without structural characterization yet) as different. Among the isolated metabolites, {4-chromanone, 6-hydroxy-(S) -methyl- (PS-2)}, fusanolide B and PS10 (probably) showed were new compounds. The isolated compounds were shown to be inactive in cytotoxicity assays against strains of HCT-116 and MC-27 (breast adenocarcinoma). However, the 1- (2,5-dihydroxyphenyl) but-2-en-1-one showed strong inhibition with a MIC of 62.5 µg/mL to be subjected to antimicrobial test against strains of fungi *Candida Krusei* (ATCC® 142432TM) and *Candida albicans* (ATCC® 10231TM) and CIM of 125 µg/mL against *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019TM), while {4-chromanone, 6-hydroxy-(S) -methyl-}, *Z*-3-(3-hydroxyphenyl) propenoate methyl, modiolide A, estagonolide E, fusanolide B and 3R,4R-dihydro-3,4,8-trihydroxy-1-(2H) -naftalelone showed moderate activity with MIC of 500 µg / mL. Usual chromatographic techniques including liquid-liquid partitioning, flash chromatography and high pressure liquid chromatography (HPLC) were used for the isolation of secondary

metabolites, while the structural characterization was possible through the use of spectrometric techniques using infrared (IR), mass spectrometry (MS), and uni and bidimensional techniques of nuclear magnetic resonance (NMR), and comparison with literature data.

Key words: endophytic fungus; *Periconia hispidula*; secondary metabolites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Drogas importantes na medicina atual, isoladas a partir de fungos endofíticos	24
Figura 2- Partes do fungo endofítico do gênero <i>Periconia</i>	26
Figura 3- Cultura do fungo <i>Periconia hispidula</i> (à direita) e suas estruturas (à esquerda).....	27
Figura 4- Gráfico com o percentual que representa a origem das substâncias isoladas de <i>Periconia</i>	28
Figura 5- esqueleto base dos metabólitos isolados de <i>P. byssoides</i>	29
Figura 6- Herbicina A.....	30
Figura 7 - Foto do fungo <i>Periconia hipidula</i> crescido em BDA/AD	40
Figura 8- Fluxograma do tratamento feito com FD MPD 28d.....	50
Figura 9- Cromatograma de isolamento da FHex MPD.....	51
Figura 10- Fluxograma de fracionamento para a FD BD 21d.....	53
Figura 11- cromatograma de isolamento de PS-6	53
Figura 12- Cromatograma de isolamento da FH BDL 28d em CLAE no modo isocrático ...	55
Figura 13- Cromatograma da FHex MPD 28d	56
Figura 14- Cromatograma da F dicloro MPD 28d	56
Figura 15- Cromatograma da F AcOEt MPD 28d	57
Figura 16 - Cromatograma da F Aquosa MPD 28d	57
Figura 17- Cromatograma da FH BDL 28d	57
Figura 18- Cromatograma da FD BDL 28d	58
Figura 19- Cromatograma da F AcOEt/Aq BDL 28 d	58
Figura 20- Cromatograma da FHex BD 21d.....	58
Figura 21- Cromatograma da FD BD 21d.....	59
Figura 22- Cromatograma FAcOEt/Aq BD 21d	59
Figura A- Metabólitos secundários isolados de <i>Periconia hispidula</i>	60
Figura 23- Subestrutura com correlações homonucleares ^1H , ^1H (COSY) de PS-1	62
Figura 24- Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de PS-1	62
Figura 25- Estrutura da molécula isolada como PS-1	63
Figura 26- Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) de PS-1	64
Figura 27- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-1	64
Figura 28- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de PS-1	65

Figura 29- Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de PS-1	65
Figura 30- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-1	66
Figura 31- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PS-1	66
Figura 32- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-1.....	67
Figura 33- Representação espacial das substâncias PS-2 e PS-1.....	68
Figura 34- Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$, COSY de PS-2	69
Figura 35- Representação dos acoplamentos heteronucleares $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ a longa distância- HMBC de PS-2	69
Figura 36- Estrutura química da molécula isolada como PS-2.....	70
Figura 37 - Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) de PS-2.....	71
Figura 38- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-2.....	71
Figura 39- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de PS-2	72
Figura 40- Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de PS-2	72
Figura 41- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (300 x75 MHz, CD_3OD) de PS-2.....	73
Figura 42- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PS-2 e expansão	73
Figura 43- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-2.....	74
Figura 44- Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY da substância PS-3	76
Figura 45- Representação das correlações heteronucleares $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - HMBC na molécula PS-3	76
Figura 46- Estrutura da substância isolada como PS-3.....	77
Figura 47- Mecanismo proposto para obtenção de PS-3	77
Figura 48- Espectro de massa (EM- ESI, 70 eV) de PS-3	79
Figura 49 – Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-3	79
Figura 50- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-3.....	80
Figura 51- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-3	80
Figura 52- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC e expansões [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-3	81

Figura 53 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-3.....	82
Figura 54 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-3	82
Figura 55 - Correlações homonucleares de PS-4	83
Figura 56 - Estrutura da substância denominada PS-4.....	84
Figura 57 - Espectro de massa de baixa resolução CG/EM de PS-4.....	85
Figura 58 - Espectro RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de PS-4.....	85
Figura 59 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [500 MHz, CD_3OD] de PS-4	59
Figura 60 - Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (COSY) de PS-5.....	88
Figura 61 - Representação das correlações a longa distância HMBC de PS-5	88
Figura 62 - Estrutura proposta para PS-5 de acordo com dados da literatura	89
Figura 63 - Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) apresentado por PS-5	90
Figura 64 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-5	90
Figura 65 - Espectro de RMN ^1H [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5	91
Figura 66 - Espectro RMN de ^{13}C [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5	91
Figura 67 - Espectro RMN de DEPT 135° [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5	92
Figura 68 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC e expansão [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5	93
Figura 69 - Ampliação do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5.....	94
Figura 70 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5	95
Figura 71 –Acoplamento homonuclear de PS-6	96
Figura 72 - Representação das correlações heteronucleares de PS-6.....	97
Figura 73 - Estrutura química do composto isolado como PS-6.....	98
Figura 74 Espectro de massa de baixa resolução obtido em CG/EM de PS-6 sililada.....	99
Figura 75 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-6.....	100
Figura 76 - Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-6.....	100
Figura 77 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC [500 x 125 MHz, (CD_3OD)] de PS-6.....	101
Figura 78 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [500 MHz, (CD_3OD)] de PS-6.....	101

Figura 79 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC [500 x 125 MHz, (CD_3OD)] de PS-6.....	102
Figura 80 - Subestruturas a, b, c mostrando as correlações homonucleares ^1H , ^1H presentes na PS-7.....	104
Figura 81 - Subestruturas a, b, c e correlações HMBC de PS-7.....	105
Figura 82 - Estrutura química de PS-7 (Modiolido A).....	105
Figura 83 - Espectro de massa (EM- ESI, 70 eV) de PS-7.....	106
Figura 84 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-7.....	107
Figura 85 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de PS-7.....	107
Figura 86 - Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de PS-7.....	108
Figura 87 - Espectro RMN de DEPT 135° (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-7.....	108
Figura 88 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-7.....	109
Figura 89 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PS-7.....	110
Figura 90 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-7.....	110
Figura 91 - Subestruturas a, e b mostrando as correlações homonucleares ^1H , ^1H presentes na PS-8.....	112
Figura 92 - Subestruturas a, b e correlações HMBC de PS-8.....	113
Figura 93 - Estereoquímica proposta para PS-8, e comparação com a de PS-7.....	113
Figura 94 -Estrutura proposta para PS-8.....	114
Figura 95 – Espectro de Massa de PS-8.....	116
Figura 96 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-8.....	117
Figura 97 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PS-8.....	117
Figura 98 - Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-8.....	118
Figura 99 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-8.....	119
Figura 100 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CD_3OD) de PS-8.....	120
Figura 101 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-8.....	121
Figura 102 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H COSY da substância PS-9.....	123
Figura 103 - Representação da Estereoquímica de PS-9.....	124
Figura 104 - Representação das correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HMBC na molécula PS-9.....	125
Figura 105 - Estrutura da substância isolada como PS-9, Estagonolido E.....	125

Figura 106- Espectro de massa de baixa resolução obtido em CG/EM de PS-9	127
Figura 107- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-9.....	127
Figura 108- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-9.....	128
Figura 109- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-9	129
Figura 110 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-9.....	129
Figura 111- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-9	130
Figura 112- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-9	131
Figura 113- Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H COSY da substância PS-11	133
Figura 114- Representação das correlações HMBC na molécula PS-11	133
Figura 115- Substância isolada como PS-11	134
Figura 116- Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) de PS-11	135
Figura 117- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-11	135
Figura 118- Espectro de RMN ^1H [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11.....	136
Figura 119- Espectro RMN de ^{13}C [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11	136
Figura 120- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansão [300 MHz x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11	137
Figura 121- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11.....	137
Figura 122- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC [300 x 75 MHz $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11	138
Figura 123 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H COSY da substância PS-12	140
Figura 124- Representação das correlações HMBC na molécula PS-12	141
Figura 125- Estrutura química de PS-12, isosclerona	141
Figura 126- Representação das conformações de PS-12 (isosclerona)	141
Figura 127- Espectro de massa de baixa resolução CG/EM de PS-12 CG/EM.....	143
Figura 128- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-12.....	143
Figura 129- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-12.....	144
Figura 130- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-12.....	144

Figura 131 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, CD_3OD) de PS-12.....	145
Figura 132 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-12.....	145

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Nome das substâncias isoladas do gênero <i>Periconia</i> , nº das estruturas e autores dos trabalhos	31
TABELA 2- Resultados do teste preliminar de citotoxicidade	46
TABELA 3- Volume de solvente e rendimento do fracionamento do extrato MPD-28 dias por partição líquido- líquido	48
TABELA 4- Resultado do 2º teste de atividade citotóxica	48
TABELA 5- Cromatografia <i>flash</i> da fração diclorometano oriunda da partição líquido-líquido extrato MPD 28d	49
TABELA 6- Volume de solvente e rendimento do fracionamento do extrato MPD-28 dias por partição líquido- líquido	52
TABELA 7- Cromatografia <i>flash</i> da fração diclorometano oriunda da partição líquido-líquido extrato MPD	52
TABELA 8- Coluna <i>flash</i> da AcOEt/Aq BD 21d	54
TABELA 9- Resultado da partição líquido-líquido do extrato BDL 28d	55
TABELA 10- Dados RMN ¹ H e ¹³ C apresentados por PS-1	63
TABELA 11- Correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C HSQC e HMBC de PS-1	64
TABELA 12- Apresentação dos dados RMN ¹ H e ¹³ C de PS-2 e comparação entre os dados RMN ¹ H, ¹³ C de PS-1	70
TABELA 13- Correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C HSQC e HMBC de PS-2	71
TABELA 14- Dados de ¹ H e ¹³ C de PS-3	78
Tabela 15 - Dados RMN ¹ H e ¹³ C e correlações heteronuclear ¹ H, ¹³ C-HSQC e ¹³ C-HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-9 [300 x 75 MHz, (CD ₃) ₂ CO]	78
TABELA 16- comparação dos dados ¹ H de PS-4 com os da literatura	84
Tabela 17- Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de PS-5 com dados RMN da literatura do composto Z-3-(3-hidroxifenil) propenoato de metila	89
TABELA 18- Dados RMN ¹ H e ¹³ C e correlações heteronuclear ¹ H, ¹³ C-HSQC e ¹³ C-HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-5 [300x 75 MHz (CD ₃) ₂ CO]	89

TABELA 19- Dados de ^1H e ^{13}C de PS-6 e comparação com a literatura	98
TABELA 20 - Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-6 [500 x 125 MHz, (CD_3OD)]	99
TABELA 21- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-7 com os dados relatados para o Modiolido A.....	106
TABELA 22- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC ^nJ (n=2 e n=3) de PS-7 (CD_3OD , 125 x 300 MHz)	106
TABELA 23- Comparação dos valores RMN de ^1H e ^{13}C para o PS-8, Modiolido A e Fusanolido B da literatura	115
TABELA 24 - Correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C HSQC e HMBC de PS-8 (CD_3OD , 500 x 125 MHz)	116
TABELA 25- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-9 com os do composto, estagonolido E da literatura	116
TABELA 26- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-9 [300x75 MHz, (CD_3) $_2\text{CO}$]	126
TABELA 27- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-11 com os do composto 3,4 diidro, 3,4,8triidroxi (2 <i>H</i>) naftalenona da literatura	134
TABELA 28- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-11 [125 x 300 MHz, (CD_3) $_2\text{CO}$]	135
TABELA 29- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-12 com os do composto, 4,8 driidroxi tetralonana da literatura	142
TABELA 30- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-12 [500x125 MHz, (CD_3OD)]	142
Tabela 31- Teste de atividade antifúngica	146

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AD- Água destilada
- BD - Meio de cultura batata- dextrose
- BDA - Meio de cultura batata- dextrose ágar
- BDL - Meio de cultura batata- dextrose e levedura
- CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica
- CENAURENM – Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- COSY – *Correlation Spectroscopy*
- DEPT 135° - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°*
- DMSO- Dimetilssulfóxido
- DPM- Desvio padrão médio
- EM – Espectrometria de massa
- EM-ESI – Espectrometria de massa com ionização por *Eletrospray*
- HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HPLC- *High Liquid Performance Chromatography*
- HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
- IC₅₀- Concentração inibitória em 50%
- IT-TOF- *Ion Trap- Time of Light*
- IV – Infravermelho
- J* – Constante de acoplamento
- LC-EM – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
- LEMANOR – Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste
- MntPL – Meio de cultura manitol, peptona e levedura
- MPD – Meio de cultura malte, peptona e dextrose
- MTT- Solução de sal de terazolin
- ODS- Octadecilsilano
- RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono-13
- RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
- (UV-vis)– Radiação na região do ultravioleta e visível
- δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Objetivos	25
<i>1.1.1 Objetivo geral</i>	25
<i>1.1.2 Objetivos específicos:</i>	25
2 CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS SOBRE O GÊNERO <i>PERICONIA</i>	26
3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>PERICONIA</i> E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	28
3.1 Compostos bioativos isolados do gênero <i>Periconia</i>	30
3.2 Estruturas químicas das substâncias isoladas do gênero <i>Periconia</i>	34
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1 Material de estudo	40
4.2 Cultivo, esterilização e repicagem	40
<i>4.3.2 Cromatografia em coluna de sílica flash</i>	40
4.4 Métodos espectrométricos	41
<i>4.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	41
<i>4.4.2 Espectrometria de massa</i>	42
<i>4.4.2.1 Espectrometria de alta resolução (EM)</i>	42
<i>4.4.2.1 Espectrometria de baixa resolução acoplada à cromatografia gasosa (CG/EM)</i>	42
<i>4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	42
4.5 Métodos Físicos	43
<i>4.5.2 Ponto de fusão</i>	43
4.6 Testes de atividade citotóxica	43
4.7 Testes de atividade antifúngica	43
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
5.1 Produção dos metabólitos secundários de <i>P. hispidula</i>	45
<i>5.1.1 Monitoramento do crescimento do fungo em pequena escala</i>	45

5.1.2 <i>Cultivo do fungo em grande escala</i>	47
5.2 Tratamento do extrato MPD 28 dias	47
5.2.1 <i>Partição líquido-líquido MPD 28d</i>	47
5.2.2 <i>Cromatografia em coluna flash da fração FD MPD 28d</i>	49
5.2.3 <i>Cromatografia de alta eficiência (CLAE) da FH MPD 28 d</i>	51
5.3 Tratamento do extrato BD 21 dias	51
5.3.1 <i>Partição líquido-líquido BD 21d</i>	51
5.3.2 <i>Coluna flash da FD BD 21d</i>	52
5.3.2.1 <i>Tratamento em CLAE BD-2 proveniente da FD BD21d</i>	53
5.3.3 <i>Coluna flash da FAcOEt/Aq BD 21d</i>	54
5.4 Tratamento cromatográfico do extrato BDL 28d	55
5.4.1 <i>Partição líquido-líquido BDL 28d</i>	55
5.4.2 <i>Tratamento em CLAE FHex BDL 28d</i>	55
5.5 Análise em CLAE das frações obtidas das partições líquido-líquido de todos os meios de cultivo	56
6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	61
6.1 Determinação Estrutural de PS-1	61
6.2 Determinação Estrutural de PS-2	68
6.3 Determinação Estrutural de PS-3	75
6.4 Determinação Estrutural de PS-4	83
6.5 Determinação Estrutural de PS-5	87
6.6 Determinação Estrutural de PS-6	96
6.7 Determinação Estrutural de PS-7	103
6.8 Determinação Estrutural de PS-8	111
6.9 Determinação Estrutural de PS-9	122
6.11 Determinação Estrutural de PS-11	132

6.12 Determinação Estrutural de PS-12	139
7- ATIVIDADES BIOLÓGICAS	146
7.1- Testes de citotoxicidade	146
7.2- Teste de atividade antifúngica	146
8-CONCLUSÕES E PESRPECTIVAS	147
REFERÊNCIAS	149

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são substâncias que geralmente apresentam baixo peso molecular, produzidos em decorrência do metabolismo primário de um organismo, e considerados como produtos de uma resposta às condições ambientais (VIEIRA, 2008; KELLER, TURNER, BENNETT, 2005). Essas substâncias são originárias de diversas fontes e vêm beneficiando a humanidade há milhares de anos no tratamento e cura de doenças, inicialmente através das plantas medicinais, e mais recentemente através dos micro-organismos de diferentes *habitats* (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

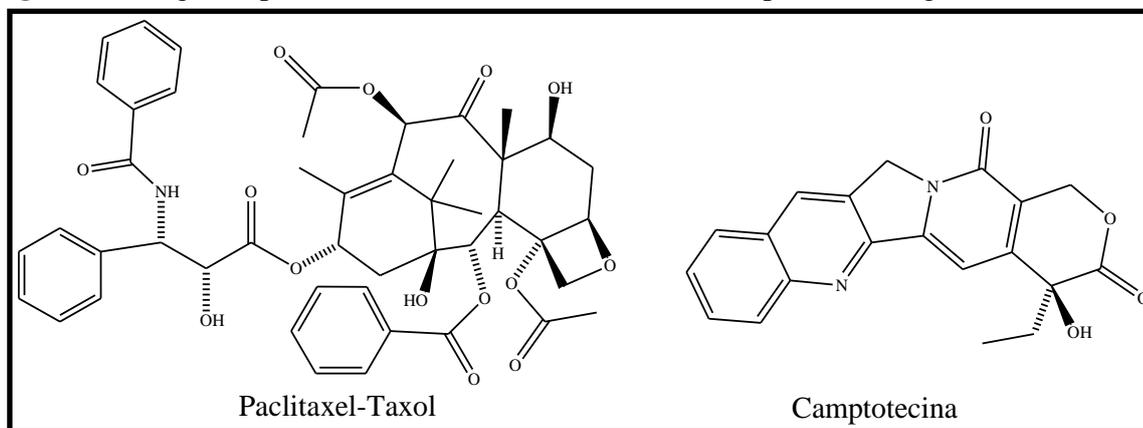
Os micro-organismos estão presentes em diversos ecossistemas como ar, água doce ou salgada e solo, inclusive associados a organismos invertebrados marinhos e plantas. Dentre os micro-organismos associados aos tecidos no interior das plantas, os fungos são os mais comumente isolados. Segundo Souza *et al.*, (2004) os fungos que estão associados ao reino vegetal podem ser classificados como: epífitos, aqueles que vivem na superfície de órgãos e tecidos das plantas; parasitas, que causam doenças; e endofíticos, que colonizam os tecidos interiores de diferentes partes da planta de forma assintomática.

Os fungos endofíticos têm sido encontrados em todas as espécies de plantas investigadas, e, baseados neste fato, estima-se que existem mais de 1 milhão de espécies de fungos endofíticos diferentes, no entanto, somente uma pequena parte desta imensa população tem sido relatada (GUO *et al.*, 2008). Estes fungos mantêm uma relação simbiótica com seus hospedeiros e atuam através de benefícios às espécies vegetais, seja na produção de substâncias tóxicas que combatem predadores, ou como fitorreguladores, aumentando o crescimento e resistência contra estresse (AZEVEDO, 1999; PEIXOTO NETO, AZEVEDO, ARAUJO, 2002). Esta relação é bastante diversa e os metabólitos secundários produzidos podem ser utilizados para fins biotecnológicos, através da introdução de genes que conferem à planta uma característica desejada, na agricultura como controles biológicos naturais, e na medicina com a produção de diversos compostos com atividade biológica (AZEVEDO, 1998; SILVA, 2009).

Uma das descobertas mais surpreendentes a partir dos estudos de endófitos é o isolamento do diterpenóide taxol, aprovado pela *Food and drug administration* (FDA) dos Estados Unidos como uma das mais potentes drogas anticâncer. A sua produção a partir de *Taxomyces andreanae* ofereceu outra alternativa para a produção da droga por fermentação de microorganismos (STIERLE; STIERLE; STROBEL, 1993). Em adição, a camptotecina e seus

derivados isolados a partir de um fungo da família dos ficomicetos mostram-se também como potentes agentes antineoplásicos (GUO *et al.*, 2008), como mostrado na Figura 1, abaixo.

Figura 1- Drogas importantes na medicina atual, isoladas a partir de fungos endofíticos



Fonte: Autor (2016).

O gênero *Periconia* possui 42 espécies reconhecidas (MARKOVSKAJA, KAČERGIUS, 2013) e amplamente distribuídas em diversos *habitats* e regiões como saprófitos terrestres, e como colonizadores endofíticos de herbáceas e plantas lenhosas. São consideradas patogênicas em função das toxinas seletivas que produzem (PASCHOLATE, 1995), com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, porém também registradas em lagos e oceanos de regiões temperadas em diversos países dos continentes Americano, Europeu, Asiático, Africano e Oceania.

Muitas espécies desse gênero são economicamente importantes e bem estudadas, como os fungos patogênicos de plantas que causam doenças em folhas e raízes *P. circinata* e *P. macrospinosa* (ODOVDY, DUNKLE, EDMUNDS, 1977; ROMERO, 2001). Outras são espécies consideradas ainda como saprófitas aquáticas, como no caso de *P. prolífica*, *P. abyssa* e *P. variicolor* (ALIAS E JONES, 2000; CANTRELL, HANLIN, EMILIANO, 2007; KOHLMAYER, 1977; PRASANNARAI E SRIDHAR, 2001; TUBAKI, ITO, 1973).

Apesar do gênero *Periconia* ainda ser considerado pouco investigado, os resultados preliminares embasam o potencial químico e farmacológico promissor abrigado por estas espécies de fungos. Por exemplo, a espécie mais investigada *P. byssoides*, apresentou substâncias contendo atividades anti-adesão de células tumorais leucêmicas a “células endoteliais de veias-umbilicais-humanas” (HUVEC) e atividade contra células de linfócitos leucêmicas (YAMADA *et al.*, 2007a). Por outro lado, algumas substâncias ativas isoladas de *P. sp* (isolada de *Annona muricata*), apresentaram diversos tipos de atividade

como anti-inflamatória neural, anticâncer e anti-HIV (imunodeficiência adquirida) (ZHANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016), enquanto que outros metabolitos isolados de *P. circinata* apresentaram atividades antimicrobiana e inibidora do crescimento de raízes de “sorghum” (MACKO *et al.*, 1992).

Em adição, a ação biocatalítica de *Periconia hispidula* em reações de redução de compostos carbonílicos aromáticos pró-quirais foi investigada, revelando este micro-organismo como biocatalisador estereosseletivo promissor em processos de redução de compostos carbonílicos (GONZALEZ, 2013). Estes resultados, aliado a ausência de relatos acerca de estudo químico desta espécie, nos estimularam ao seu estudo químico visando o isolamento de metabólitos secundários com possível atividade farmacológica.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral: Investigação química do fungo *Periconia hispidula*, e avaliação do potencial farmacológico dos metabólitos secundários isolados.

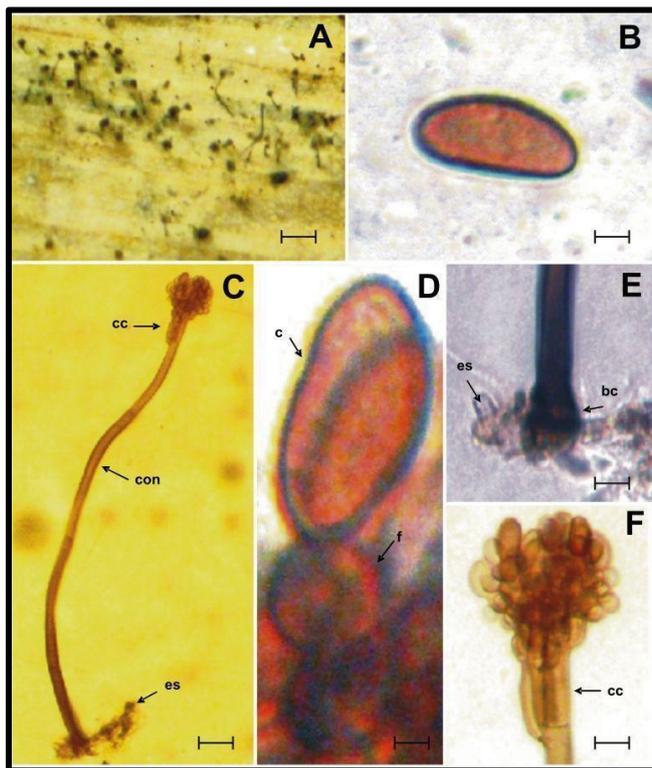
1.1.2 Objetivos específicos:

1. Otimização do cultivo do fungo *P. hispidula* em diferentes meios nutricionais.
2. Análise farmacológica dos extratos.
3. Fracionamento cromatográfico dos extratos ativos.
4. Caracterização estrutural dos metabólitos isolados.
5. Testes farmacológicos com os metabólitos secundários isolados.

2 CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS SOBRE O GÊNERO *PERICONIA*

Espécies de *Periconia* têm como principal característica a presença de colônias efusas (pequenos isolados, Fig. 2 A, abaixo), macronematosos pálidos ou marrons, liso ou raramente verruculos e micronematosos (indiferenciados) conidióforos. As células conidiogênicas (Fig. 2C, 2D e 2F, abaixo) são monoblásticas ou poliblasticas, discretas, elipsoidal a esféricas diretamente formadas na estipe ou nos ramos. Algumas vezes o ápice é estéril e as células conidiogênicas surgem na parte inferior e basal do estipe. Os conídios (Fig. 2B e 2D, a seguir) são catenuados, muitas vezes, produzidos em cadeia ao redor de uma célula conidiogênica ou apresentam muitos pontos na superfície curvada da célula conidiogênica (ELLIS, 1971; MARKOVSKAJA, KAČERGIUS, 2013).

Figura 2- Partes do fungo endofítico do gênero *Periconia*

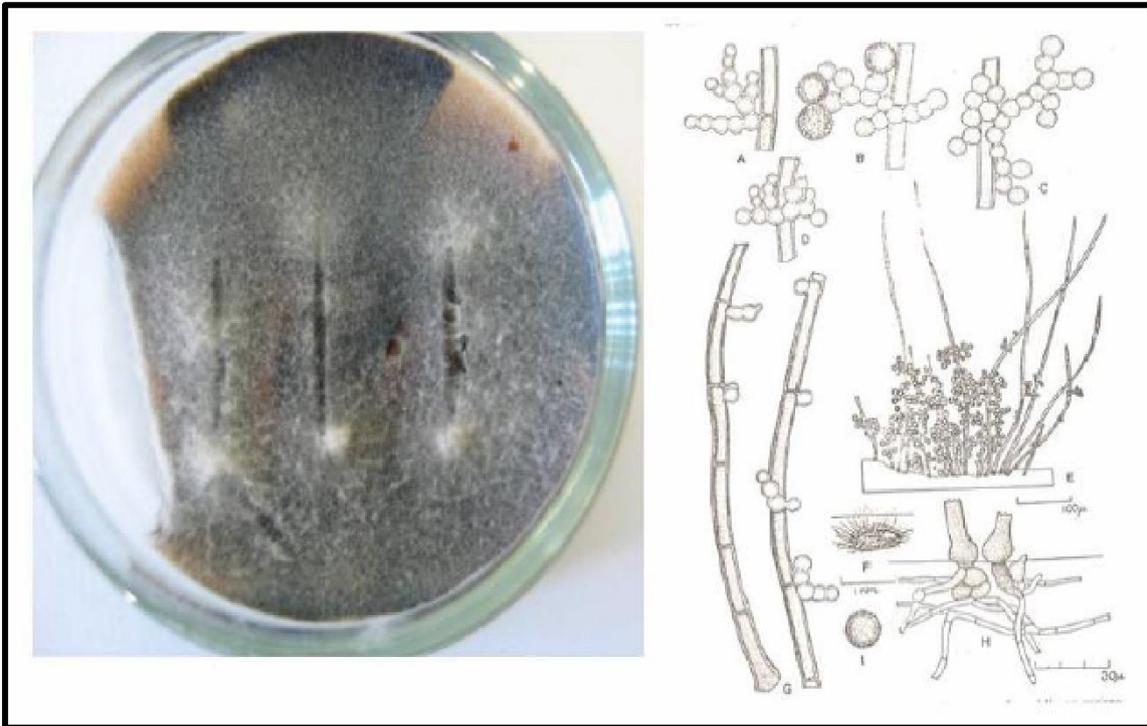


A. Frutificação na epiderme de uma folha de *Saccharum* sp., **B.** Conídio **C.** Estroma (es), conidióforo (con), e célula conidiogênica (cc) **D.** Detalhe de uma fiálide (f) e conídio(c) **E.** Detalhe da base do conidióforo (bc) e estroma (es) **F.** Célula conidiogênica (cc). Fonte: Oliveira (2010).

Gonzalez (2013), descreveu o fungo *P. hispidula* como um formador colônias com crescimento moderado, contendo uma coloração castanha

a castanha escura em alguns pontos. Além de apresentar micélio vegetativo superficial, com presença de hifas hialinas que esporulam em aproximadamente 7 dias.

Figura 3- Cultura do fungo *Periconia hispidula* (à direita) e suas estruturas (à esquerda)



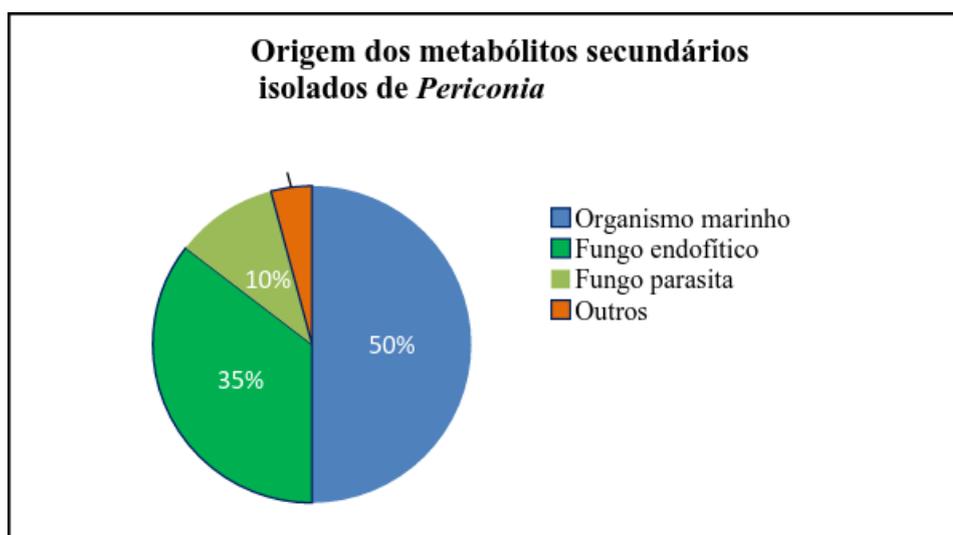
Fonte: Gusmão (2012) *apud* Gonzalez (2013).

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DO GÊNERO *PERICONIA* E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Uma pesquisa bibliográfica foi realizada acerca dos metabólitos secundários isolados a partir de espécies do gênero *Periconia* no período de 1969 a 2016, utilizando como banco de dados o *Chemical Abstracts* (*SciFinder®Scholar™*). Na Tabela 1, p. 31, encontram-se discriminados os nomes dos compostos contendo a numeração das respectivas estruturas químicas, e a indicação da espécie do microorganismo investigado.

As espécies relatadas representam diferentes *habitats*, sendo isolados a partir de fontes marinhas ou plantas terrestres. Por exemplo, a espécie *P. byssoides* foi isolada a partir do organismo marinho *Aplysia kurodai*, enquanto *P. circinata* é citada como um fungo patogênico de plantas de origem terrestre (Figura 4, a seguir).

Figura 4- Gráfico com o percentual que representa a origem das substâncias isoladas de *Periconia*



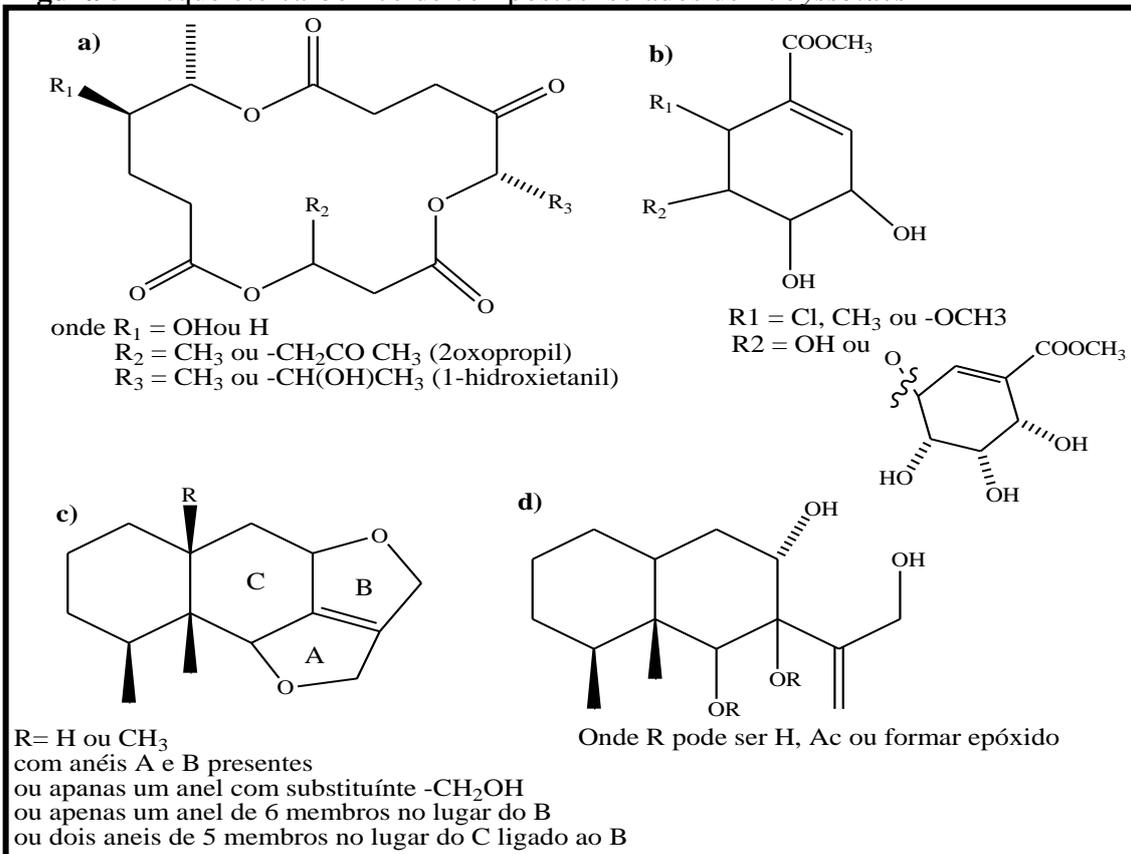
Fonte: Autor (2016).

Dentre os 21 relatos de estudos químicos do gênero, apenas os micro-organismos *P. byssoides*, *P. siamensis*, *P. macrospinosa*, *P. circinata* e *P. antopurpurea* foram identificados, e os demais trabalhos foram conduzidos com cepas identificadas apenas a nível de gênero. Destas, *P. byssoides* foi a espécie mais investigada e contendo um maior número de substâncias isoladas (24 substâncias) através da utilização de apenas um meio de cultivo.

Os dados apresentados revelaram que os estudos químicos realizados com espécies do gênero *Periconia* ainda são incipientes, apesar dos inúmeros relatos de estudos químicos utilizando fungos nos últimos anos.

O perfil químico do gênero é representado por diversas classes de metabólitos secundários. A espécie *P. byssoides* de origem marinha apresentou 3 diferentes classes de substâncias que não foram isoladas por espécies do mesmo gênero: as pericosinas (um tipo de carboáçucar), as peribisinas (a maioria sesquiterpenos eremofilanos) e macrosfelidos (macrolídeos de 16 membros)(Figura 5, abaixo). A maioria das substâncias isoladas do gênero são terpenóides, como exemplo disso a espécie *P. sp* (isolada de *Annona muricata*) apresentou diversos terpenóides, como as periconiasinas (citolchalsanas), periconianonas (sesquiterpenóides polioxigenados), periconicinas (diterpenos fusicocanos), a pericoanosina (com esqueleto hexa-hidro-*1H*-isochromen-5-isobutilpirrolidin-2-ona), a periconona (sesquiterpeno) e um monoterpene com nomenclatura usual. As demais espécies apresentaram classes, além de mais terpenóides, alcalóides, compostos aromáticos, isocumarinas, compostos cíclicos clorados, cromanonas, macrociclo de 10 membros, entre outros.

Figura 5- Esqueleto carbônico de compostos isolados de *P. byssoides*

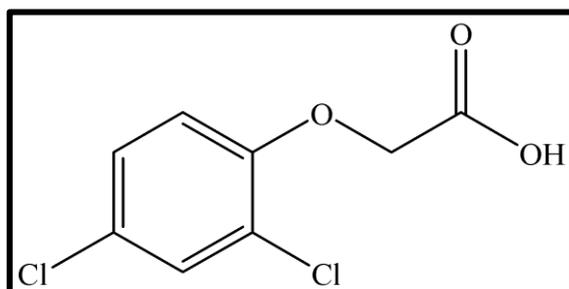


3.1 Compostos bioativos isolados do gênero *Periconia*

Uma abordagem a respeito das atividades biológicas apresentadas pelos metabólitos secundários isolados de *Periconia*, revelou as atividades anticâncer e antimicrobiana como as mais predominantes.

De acordo com o levantamento bibliográfico, o taxol (**32**) um diterpenóide utilizado no combate de vários tipos de câncer, foi isolado de *Periconia* sp de *Torreya granifolia* (LI *et al.*, 1998) e é o exemplo mais representativo dentre os compostos com atividade citotóxica. O estudo de *P. byssoides* forneceu os macrosfelidos e peribisinas como potentes agentes de anti-adesão de células tumorais leucêmicas a “células endoteliais de veias-umbilicais-humanas” (HUVEC). A atividade das peribisinas foi superior à dos macrosfelidos, em especial a da peribisina D (**4**), que mostrou-se 380 vezes mais potente que o padrão herbicina A (YAMADA *et al.*, 2007a)(Fig. 6, abaixo). Por outro lado, as pericosinas A (**20**), B (**21**) e D (**23**), isoladas desse mesmo fungo apresentaram inibição significativa do crescimento de células tumorais. A pericosina A (**20**) apresentou também atividade inibitória do crescimento de células tumorais leucêmicas *in vivo* e inibição do crescimento das proteínas quinase EGFR e topoisomerase II (YAMADA *et al.*, 2007b).

Figura 6-Herbicina A



Fonte: Autor (2016).

Peritoxinas A (**28**) e B (**29**) e a Periconina A (**30**) isolados do fungo patogênico *P. circinata* apresentaram atividade inibitória do crescimento de raízes de “*sorghum*”. (MACKO *et al.*, 1992).

Dentre os compostos do fungo endofítico *Periconia* sp. isolado de *Annona muricata*, as periconianonas A (**46**) e B (**47**) apresentaram significativa atividade anti-inflamatória neural (IC₅₀ 0,15 e 0,38 µM respectivamente); enquanto a periconiasina A (**43**)

apresentou atividade anticâncer frente a linhagens de células tumorais humanas de cólon e gástricas (IC₅₀ 0,9 e 2,1 µM respectivamente), e a periconiasina B (**44**) exibiu atividade significativa para esses dois tipos de células e também para as de hepatoma humano (IC₅₀ 0,8; 9,4 e 5,1 µM respectivamente). Além disso, a pericoannosina A (**50**) e a periconiasina F (**53**) apresentaram atividade anti-HIV (IC₅₀ 69,6 e 29,2 µM respectivamente) (ZHANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015).

A periconicina B (**35**), isolada de *P. antropurpurea* e *P. sp* (isolada de *Taxus cuspidata*) (KIM *et al.*, 2004; TELES *et al.*, 2006) apresentou atividade frente a linhagens de células tumorais de carcinoma cervical humano e ovário de hamster chinês (IC₅₀ 8,0 µM cada), além de moderada atividade antibacteriana. Em adição, a periconicina A (**34**) isolada apenas de *P. sp* (isolada de *Taxus cuspidata*) (KIM *et al.*, 2004), mostrou-se eficiente como antimicrobiana as cepas mais sensíveis foram as de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* seguidos de *Klebsiella pneumoniae*, e *Salmonella typhimurium* (CIM 3,12- 12,5 µg/mL).

As substâncias isoladas de *P. siamensis*, *P. sp* (isolada de *Piper L.*), *P. sp* (fungo endoliquínico) também apresentaram promissora atividade antimicrobiana. A piperina (**40**) foi ativa contra as bactérias *Mycobacterium tuberculosis* e *M. smegmetis* (CIM de 1,74 e 2,62 µg/mL cada) (VERMA *et al.*, 2011), o pericoterpenóide A (**49**) exibiu atividade moderada contra o fungo *Aspergillus niger* (WU *et al.*, 2016) e o modiolido A (**38**) apresentou CIM de 3,12 µg/mL quando testado em cepas de *Bacillus cereus* (BHILABUTRA *et al.*, 2007).

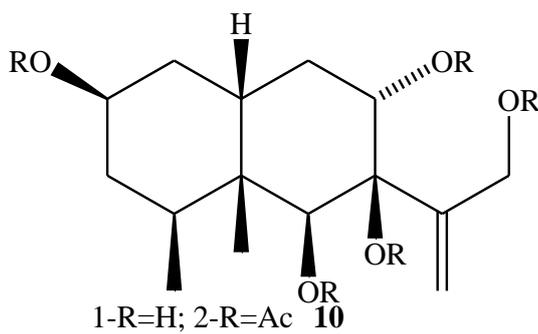
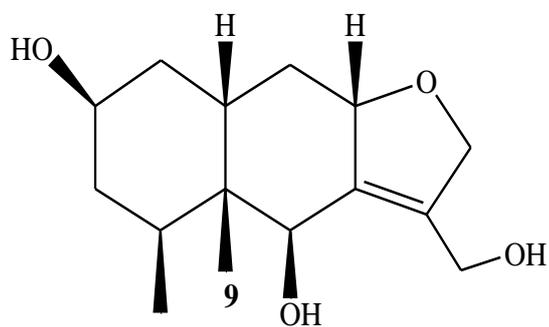
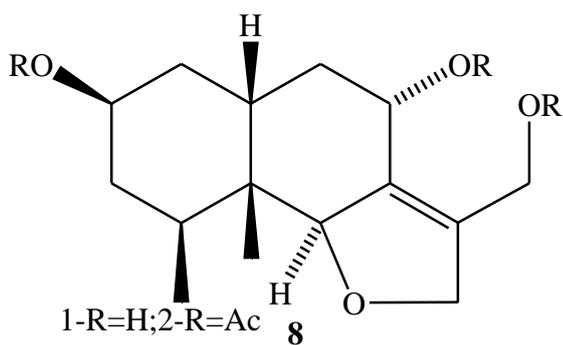
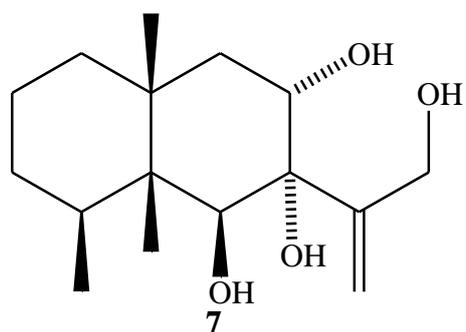
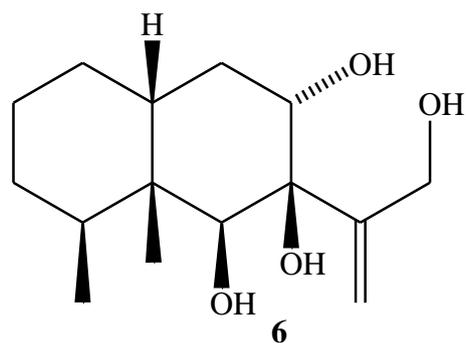
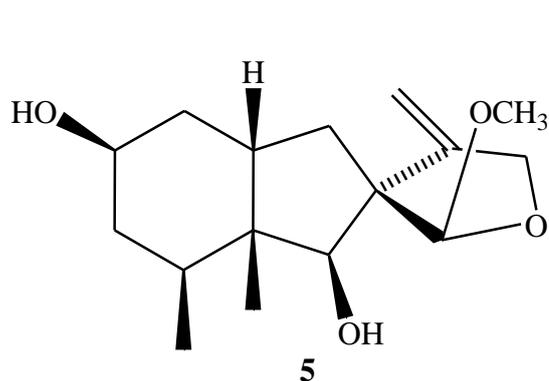
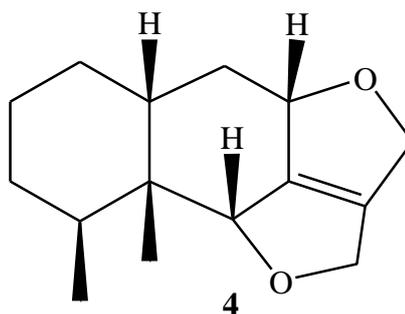
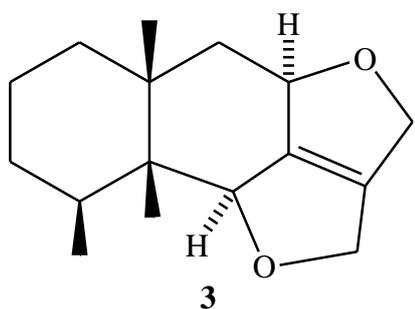
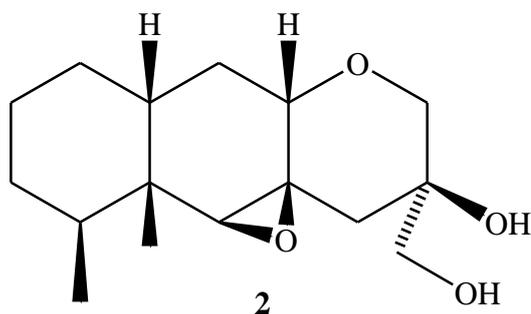
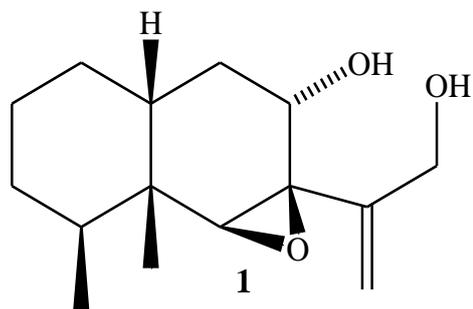
Tabela 1- Nome das substâncias isoladas do gênero *Periconia*, nº das estruturas e autores dos trabalhos

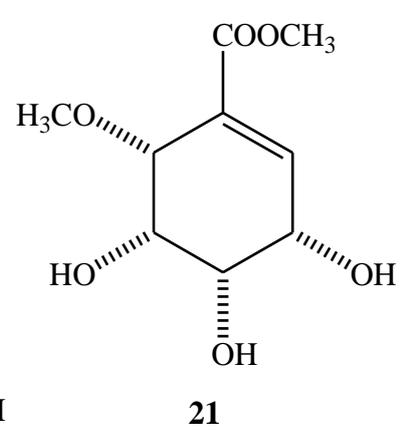
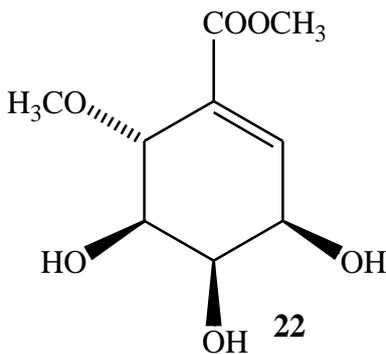
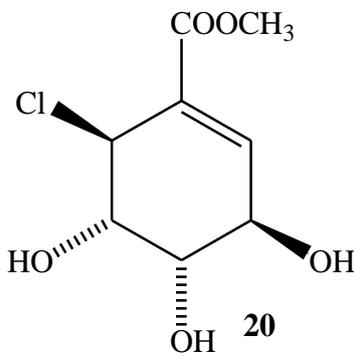
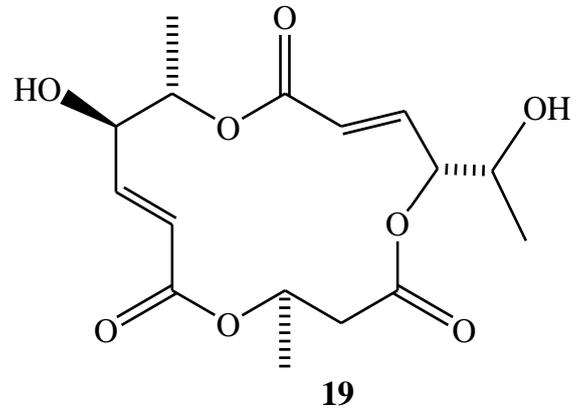
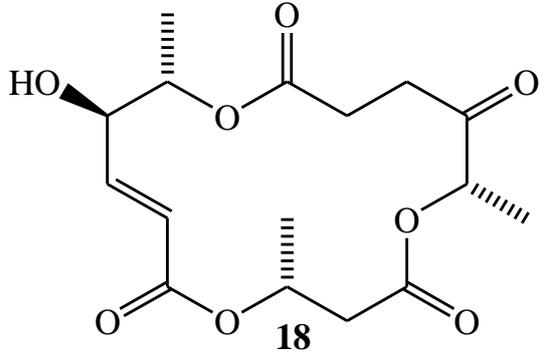
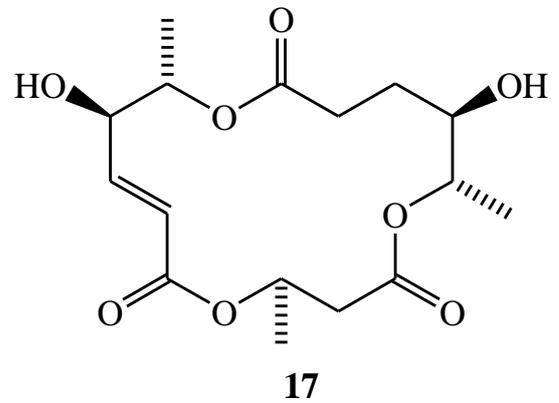
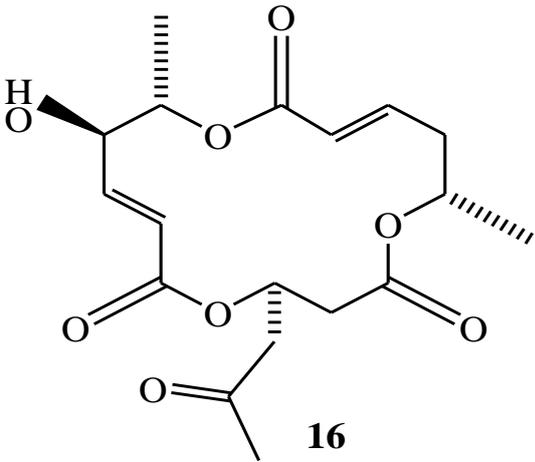
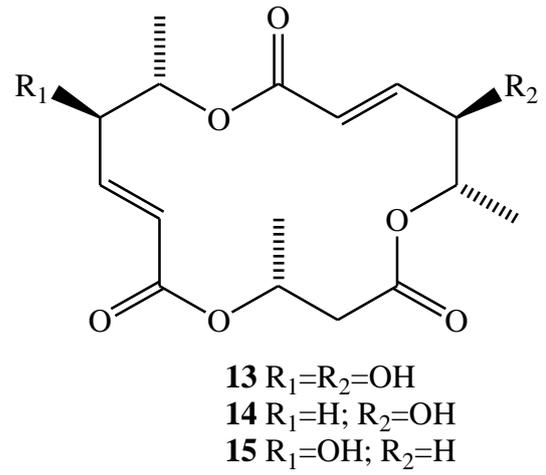
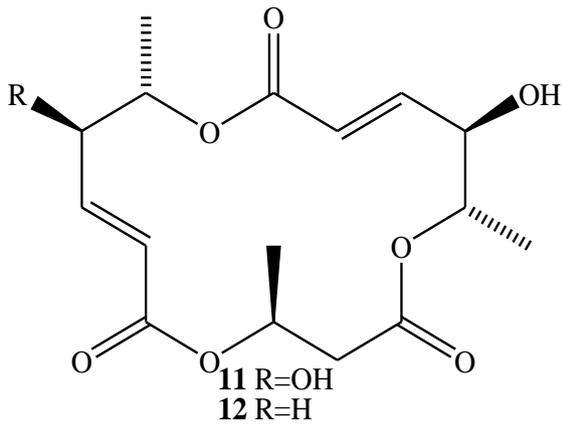
Metabólito secundário	Espécie	Referência
Peribisina A (1), Peribisina B (2), Peribisina C (3), Peribisina D (4)	<i>P. byssoides</i> de <i>Aplysia kurodai</i>	YAMADA <i>et al.</i> , 2004
Peribisina E (5), Peribisina F (6), Peribisina G (7)		YAMADA <i>et al.</i> , 2005
Peribisina H (8), Peribisina I (9), Peribisina J (10)		YAMADA <i>et al.</i> , 2006 e 2007a
Macrosfelido A (11), Macrosfelido C (12), Macrosfelido E (13), Macrosfelido F (14), Macrosfelido G (15), Macrosfelido H (16),	<i>P. byssoides</i> de <i>Aplysia kurodai</i>	YAMADA <i>et al.</i> , 2001

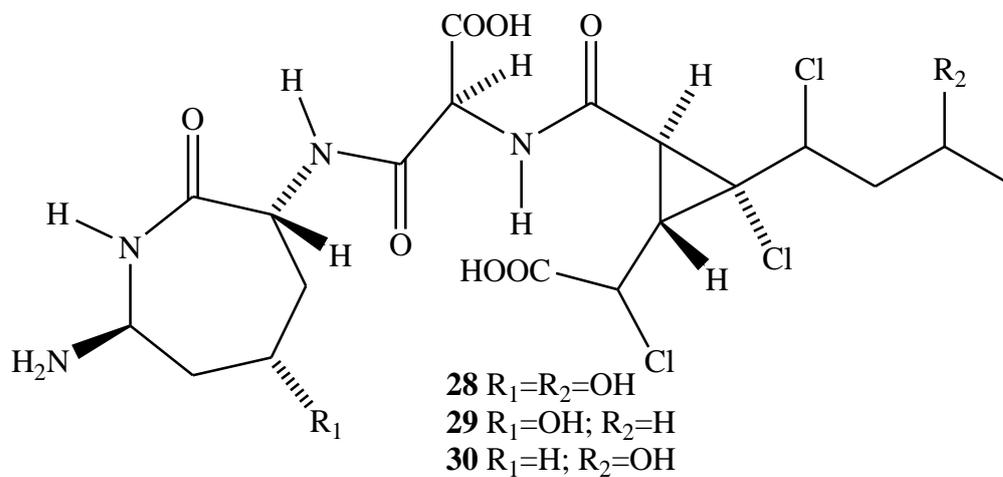
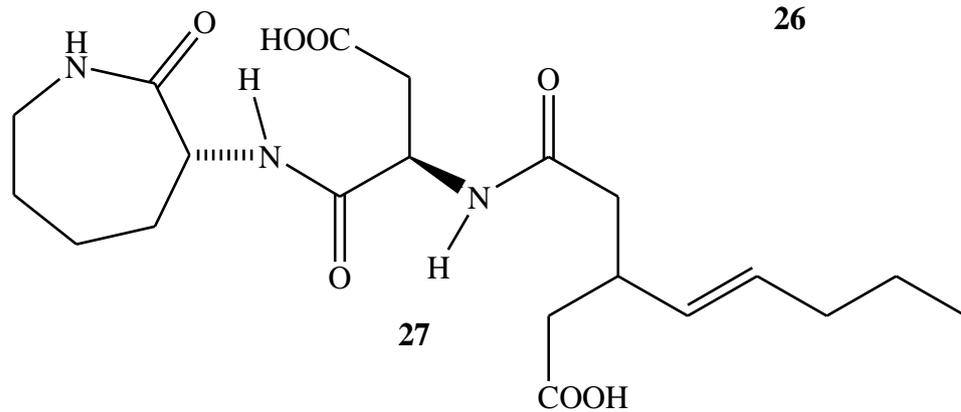
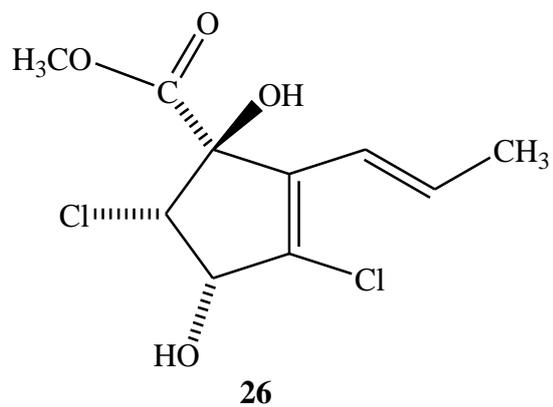
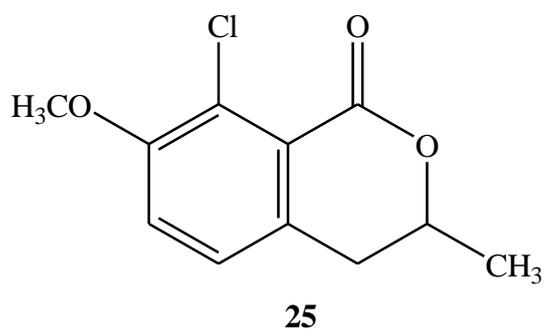
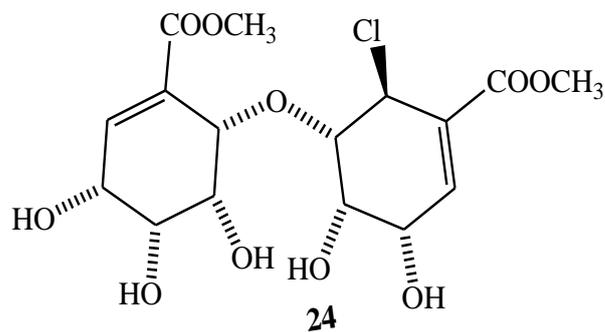
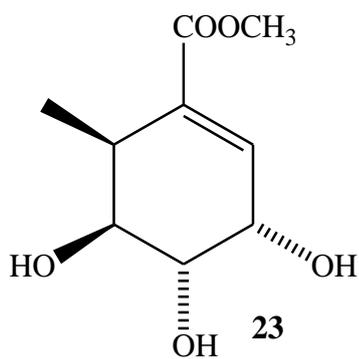
Macrosfelido I (17)		
Macrosfelido L (18)		YAMADA <i>et al.</i> , 2002
Macrosfelido M (19)		YAMADA <i>et al.</i> , 2007
Pericosina A (20), Pericosina B (21), Pericosina C (22), Pericosina D (23), Pericosina E (24)	<i>P. byssoides</i> de <i>Aplysia kurodai</i>	YAMADA <i>et al.</i> , 2007b
5-Cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi, metóxi-3-metilisocumarina (25)		
Metil-2-alil-3,5-dicloro-1,4-diidroxiciclopent- 2-enoato (26)	<i>P. macrospinosa</i>	GILES E TURNER, 1969
Circinatim (27)	<i>P. circinata</i> de	MACKO <i>et al.</i> , 1990
Peritoxina A (28), Peritoxina B (29) Periconina A (30), Periconina B (31)	<i>Sorghum bicolor</i>	MACKO <i>et al.</i> , 1992
Taxol (32)	<i>P. sp</i> de <i>Torreya</i> <i>granifolia</i>	LI <i>et al.</i> , 1998
Poliidroxilado (33)	<i>P. spp</i>	HAYATA <i>et al.</i> , 1998
Periconicina A (34), Periconicina B (35)	<i>P. sp</i> de <i>Taxus</i> <i>cuspidate</i>	KIM <i>et al.</i> , 2004
6,8-Dimetoxi-3- (2'-oxo-propil)cumarina (36)	<i>P. antropupurea</i>	
2,4-Diidroxi-6-(1'E,3'E-penta-1',3'-dienil)- benzaldeído (37)	de <i>Xylopi aromática</i>	TELES <i>et al.</i> , 2006
Periconicina B (35)		
Modiolido A (38) 6-Hidroxi-2-metil-4-cromanona (39)	<i>P. siamensis</i> de <i>Thysanoleana</i> <i>latifolia</i>	BHILABUTRA <i>et al.</i> , 2007
Piperina (40)	<i>P. sp</i> de <i>Piper</i> <i>longum L.</i>	VERMA <i>et al.</i> , 2011
(+)-Periconona A (41)	<i>P. sp</i> de	
(-)-(1R,4R,6S,7S)-2-Caren-4,8-olido (42)	<i>Annona muricata</i>	GE <i>et al.</i> , 2011

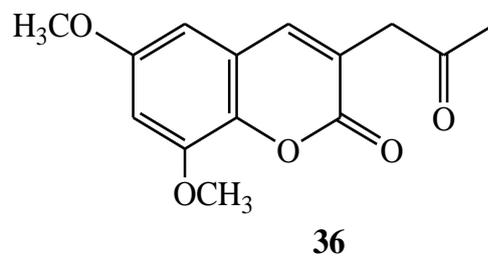
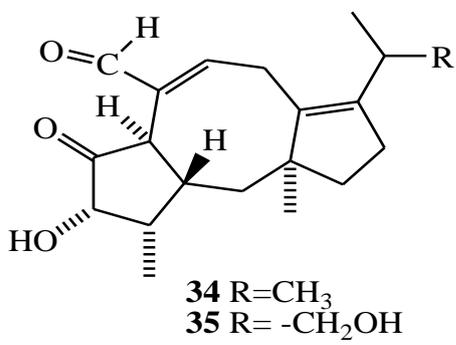
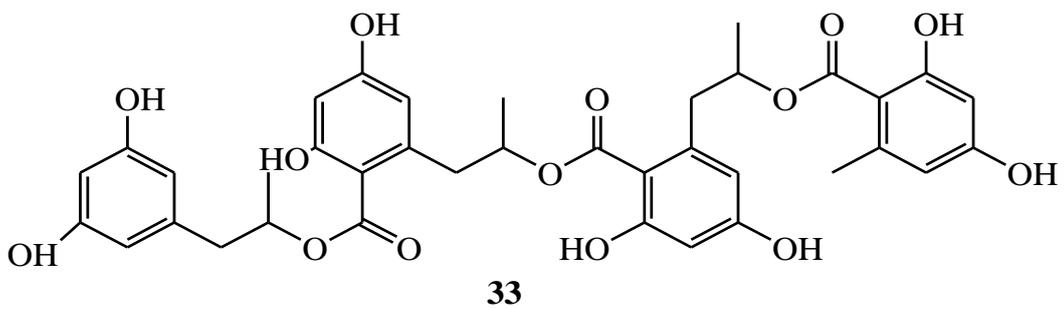
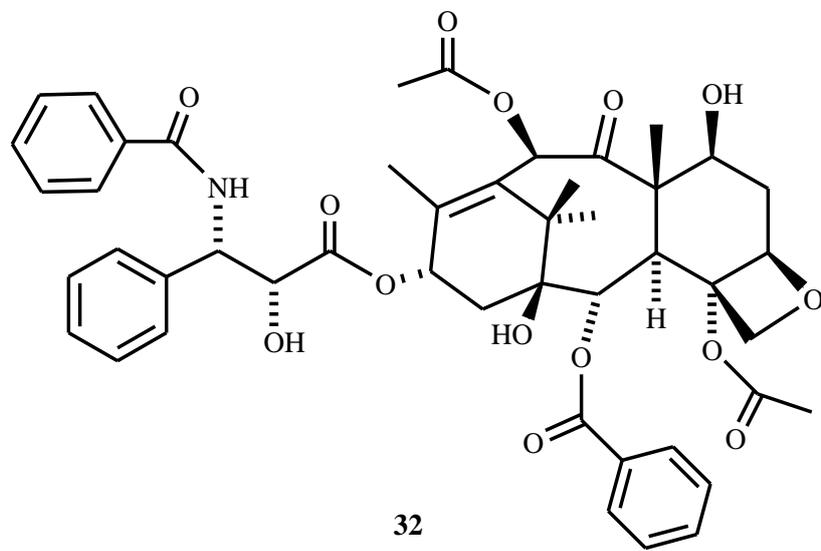
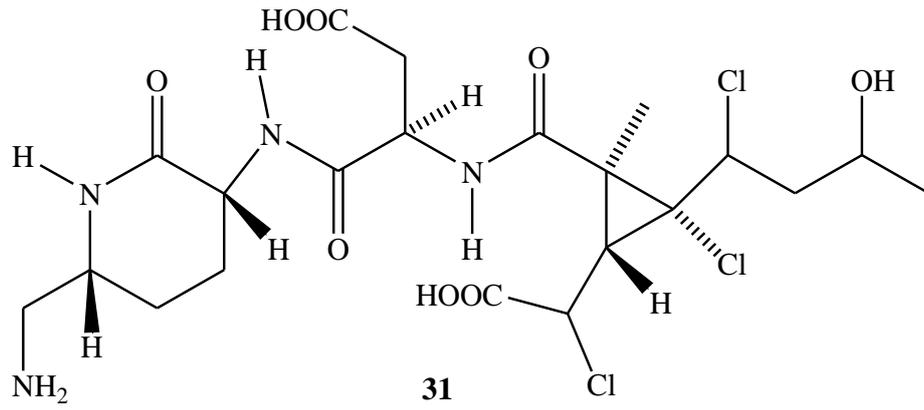
Periconiasina A (43), Periconiasina B (44), Periconiasina C (45)	<i>P. sp de Annona muricata</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2013
Periconianona A (46), Periconianona B (47), Diidronaftalenono-2,6-diona (48)	<i>P. sp de Annona muricata</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2014
Pericoterpenóide A (49)	<i>P. sp</i>	WU <i>et al.</i> , 2015
Pericoanosina A (50) Periconiasina D (51), Periconiasina E (52), Periconiasina F(53)	<i>P. sp de Annona muricata</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2015

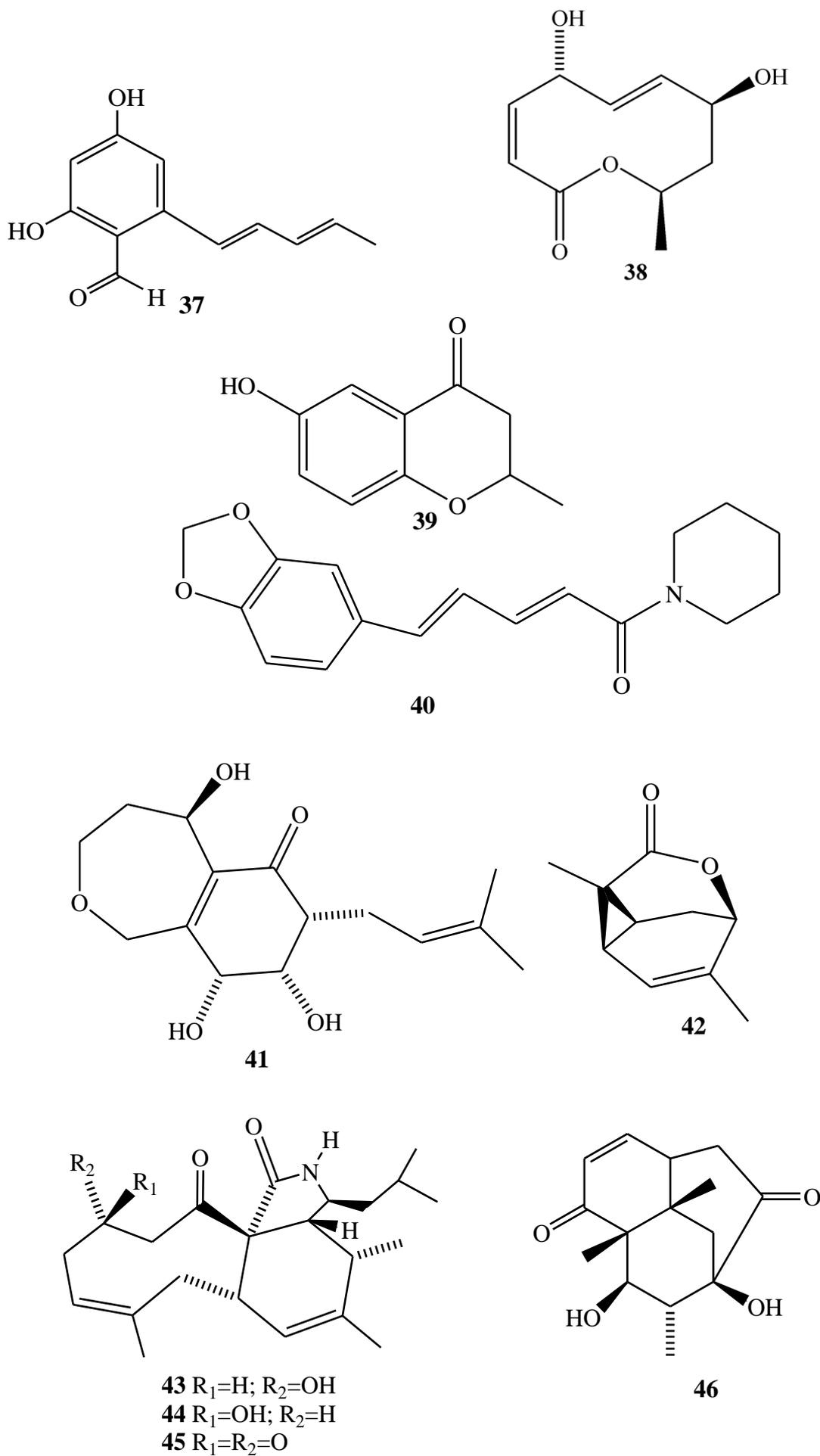
Fonte: Autor (2016).

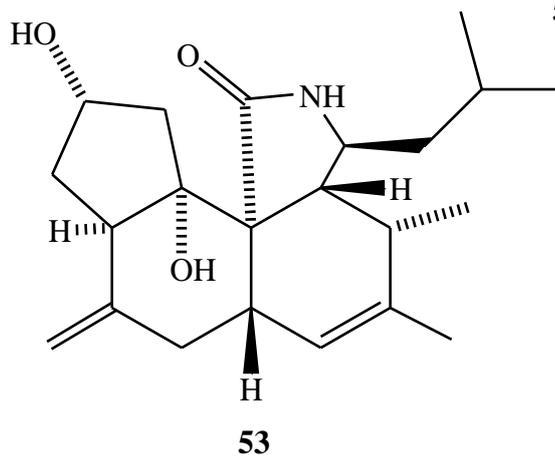
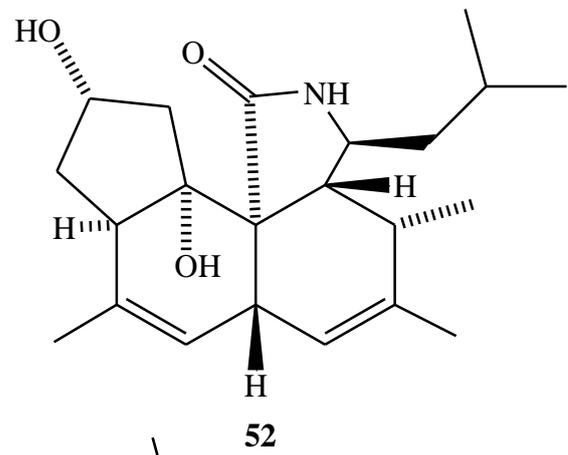
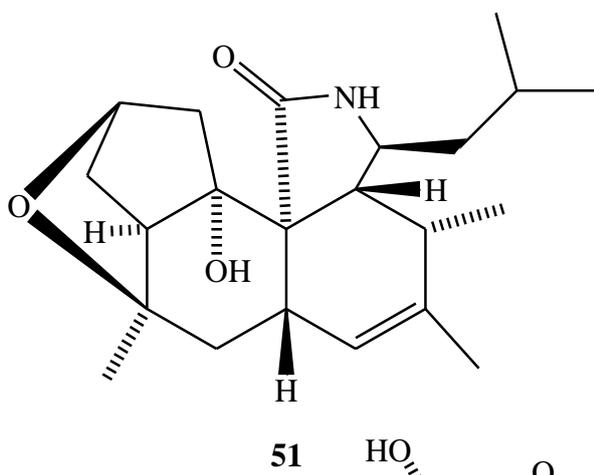
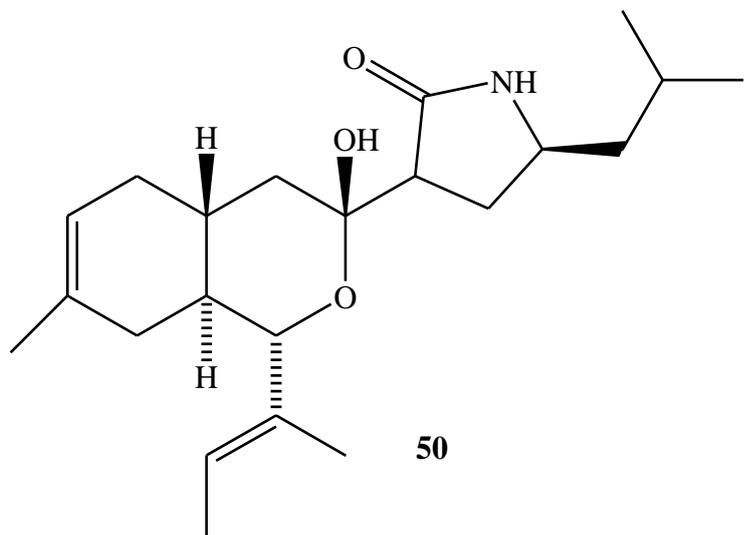
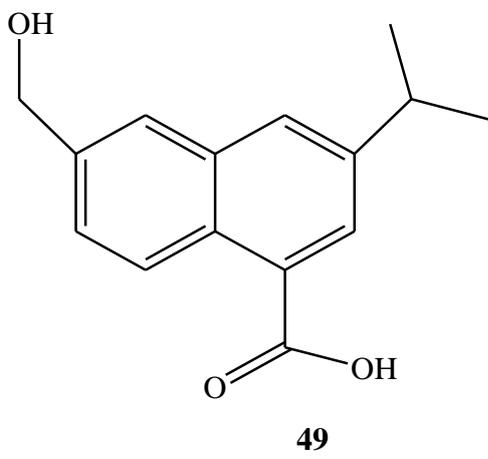
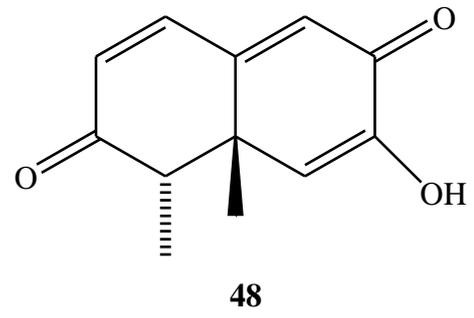
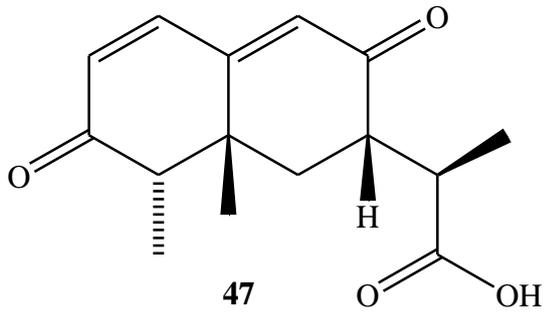
3.2 Estruturas químicas das substâncias isoladas do gênero *Periconia*











4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Material de estudo

O micro-organismo *Periconia hipidula* (Pers.) E. W. Mason e M. B. Ellis (1953) foi isolado de folhas secas dispersas em dunas do rio São Francisco, semiárido no estado da Bahia (GONZALEZ, 2013; MACHADO, 2012). A cepa isolada do micro-organismo (Fig. 7, a seguir) foi cedida pela Professora Dra. Angélica Maria Lucchese da Universidade Estadual Feira de Santana (UEFS) –Bahia.

Figura 7 - Foto do fungo *Periconia hipidula* crescido em BDA/AD



Fonte: Autor (2016).

4.2 Cultivo, esterilização e repicagem

O cultivo e preservação do fungo se deu através da incubação das cepas em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar e água destilada (BDA/AD). A cultura foi incubada à temperatura ambiente e após cada período de 20 dias o fungo foi repicado e transferido para outras placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultivo, e novamente estocado à temperatura ambiente. Esse procedimento, assim como os outros em que houve a manipulação do micro-organismo em estudo, foi realizado em câmara de fluxo laminar Labconco[®] MOD # 8089000. A esterilização do material usado no estudo foi feita em autoclave vertical da marca Phoenix[®] AV 75, com temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 15 min.

4.3 Métodos cromatográficos

4.3.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

A análise cromatográfica em CCDA foi feita em cromatoplasmas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ – Merk[®] (espessura de 0,2 mm). A revelação das substâncias nas placas foi realizada através de exposição à lâmpada ultravioleta da marca Spectroline[®] modelo CM-10 em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e pulverização

(ou imersão) com solução de vanilina em HClO_4 0,75 M/EtOH (1:1), seguido de aquecimento em chapa elétrica CIENTEC até sua completa revelação. Os solventes P. A. utilizados na eluição foram das marcas Vetec[®] e Synth[®]. Os extratos produzidos, assim como a maioria das frações analisadas em placas CCDA foram eluídos com misturas de acetato de etila e hexano de acordo com a polaridade das frações analisadas.

4.3.2 Cromatografia em coluna de sílica flash

As colunas cromatográficas em sílica foram realizadas utilizando sílica *flash* da marca Acros Organics em coluna de vidro. Os solventes utilizados na eluição foram de grau P. A. das marcas Vetec[®] e Synth[®].

4.3.3 Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O fracionamento por cromatografia de alta eficiência (CLAE) foi realizado em equipamento constituído de uma bomba ternária de alta pressão SHIMADZU LC-20AT, detector UV-Visível com arranjo de diodo SHIMADZU SPD-M20A e um forno termostático para acomodação da coluna.

As colunas de fase reversa utilizadas em CLAE eram constituídas de sílica C-18 (Phenomenex), sendo uma semipreparativa (250 x 10 mm e 5 μ) e uma analítica (250 x 4,6mm e 5 μ). As colunas de fase normal utilizadas eram constituídas de sílica normal (Phenomenex) semipreparativa (150 x 10 mm e 5 μ) e analítica (250 x 4,6mm e 5 μ).

As amostras foram dissolvidas com os solventes usados na fase móvel e filtradas num sistema manual de membrana de teflon com poros de 0,22 μm (Phenomenex). Os solventes usados na fase móvel eram das marcas Tedia e Panreac.

4.4 Métodos espectrométricos

4.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H (uni- e bidimensionais) foram realizados nos espectrômetros Bruker Avance DRX-500 (500 MHz) e Bruker Avance DPX-300 (300 MHz), utilizando como solvente metanol ($\text{CD}_3\text{-OD}$), acetona [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) deuterados (Cambridge Isotope Laboratories) no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) na UFC.

4.4.2 Espectrometria de massa

4.4.2.1 Espectrometria de alta resolução (EM)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria em Massas do Nordeste (LEMANOR), na UFC, que utiliza um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modelo SHIMADZU UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A, controlado pelo software LC-solution e acoplado ao espectrômetro de massas IT-TOF (Shimadzu, Japan) com ionização por eletrospray (ESI) operado no modo positivo e negativo. O espectro foi obtido numa faixa de m/z 100-1000 Da, usando um potencial do capilar de 4,0 kV, na desolvatação foi usado o nitrogênio e na colisão o gás hélio.

4.4.2.1 Espectrometria de baixa resolução acoplada à cromatografia gasosa (CG/EM)

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos em cromatógrafo gasoso do modelo QP 2010 da Simadzu, pertence à central analítica do departamento de química orgânica e inorgânica da UFC (DQOI/UFC) utilizando coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm id x 0,25 μ m filme) e o modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A temperatura do injetor foi de 280 °C e a do detector a 260 °C. Foi injetada 1 μ L de cada amostra solubilizada em AcOEt ou MeOH grau HPLC da marca Panreac[®] no modo split, tendo como gás de arraste o hélio e um fluxo de 1,7 mL/ min. Para a análise das amostras foi utilizada a seguinte programação de temperatura: 100 °C (1 min); 25 °C/ min até 280 °C, onde permaneceu por 2min; 20°C/ min até 300° C e permaneceu por 2 min.

4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos a partir da disposição das amostras solubilizadas em MeOH em pastilhas de brometo de potássio (KBr) utilizando um espectrofotômetro FTLA 2000-102, ABB-BOMEM, na região de 4000 a 400 cm^{-1} do Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

4.5 Métodos Físicos

4.5.1 Rotação

Os dados de rotação óptica foram obtidos a partir do polarímetro da marca Jasco polarimeter, modelo P-2000, utilizando lâmpadada de sódio a 589 nm, a 23 °C, situado no laboratório de espectrometria em massas do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.5.2 Ponto de fusão

Os dados de ponto de fusão foram obtidos em duplicata (e não foram corrigidos) no aparelho da Microquímica modelo MQAPF-302, no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) – UFC.

4.6 Testes de atividade citotóxica

Os testes farmacológicos de avaliação da atividade citotóxica foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) no Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto Ciências do Mar (LABOMAR- UFC), frente à linhagem células tumorais HCT-116 (côlon), as quais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantida em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPadPrism*. As substâncias isoladas também foram submetidas a teste citotóxico frente à células tumorais de MC-27 (adenocarcinoma de mama).

4.7 Testes de atividade antifúngica

A atividade antimicrobiana dos metabólitos isolados foi realizada no laboratório de bioprospecção e experimentação em leveduras da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

As cepas *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019TM), *Candida Krusei*(ATCC® 142432TM) e *Candida albicans* (ATCC® 10231TM) - (LABEL) foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37 °C por 24 h. As substâncias isoladas foram solubilizadas em DMSO, numa proporção de até 2%.

Foi usada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com

0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA). As substâncias, isoladas de *P. hispidula*, foram testadas no intervalo de concentração de 500 – 0,98 µg/mL. As placas foram preparadas no dia da realização do teste para evitar que a mesma fosse congelada.

A partir de um cultivo de 24 h das leveduras em ágar Sabouraud dextrose foi preparada uma suspensão de inóculo inicial, de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. As microplacas foram incubadas por um período de 24 horas a uma temperatura de 35°C (± 2°C). As leituras visuais foram realizadas após esse período.

Inicialmente as substâncias isoladas de *P. hispidula* foram testadas no intervalo de concentração de 500 – 0,98 µg/mL. Em seguida foi realizado um segundo teste (definitivo) com uma quantidade maior de células de inóculo com intervalo de concentração de 500 – 0,5 µg/mL para confirmação da atividade preliminar do primeiro.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Produção dos metabólitos secundários de *P. hispidula*

5.1.1 Monitoramento do crescimento do fungo em pequena escala

Inicialmente foi realizado um estudo para monitorar a produção de metabólitos secundários através do cultivo do fungo em pequena escala utilizando quatro meios de cultura líquidos diferentes: batata dextrose (BD), batata-dextrose-levedura (BDL), malte-peptona-dextrose (MPD) e manitol-peptona-levedura (MnTPL). Para o preparo dos meios foram utilizadas as seguintes quantidades de cada componente dissolvidos em água destilada: BD-24g/L; Levedura: 2 g/L; Malte: 20g/L; Manitol: 4g/L.

Os componentes de cada meio de cultura foram dissolvidos em 600 mL de água destilada, e a solução resultante foi dividida em 12 erlenmeyers de 250 mL. Os erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura foram devidamente fechados com tampão de algodão hidrófobo e posteriormente autoclavados a 121°C durante 15min. Após este procedimento, o resfriamento à temperatura ambiente foi realizado em câmara de fluxo laminar sob luz ultravioleta, e a inoculação foi realizada utilizando pequenos pedaços do micro-organismo.

O estudo foi realizado por um período de 28 dias. A cada intervalo de 7 dias foram retirados dois erlenmeyers de cada meio de cultivo, um contendo o fungo inoculado e outro sem o fungo e somente com meio de cultivo, para servir como controle (branco). Depois de filtração a vácuo para a retirada do micélio, foi realizada extração do meio líquido com 20 mL de acetato de etila (AcOEt) por 3 vezes. A fase orgânica foi posteriormente concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, para obtenção dos respectivos extratos.

Os extratos produzidos nessa etapa inicialmente foram analisados por CCDA (seção 4.3.1), e as réplicas reunidas de acordo com o padrão de semelhança, uma vez que o experimento foi realizado em duplicata. Uma alíquota de 1,0 mg de cada um dos 16 extratos, juntamente com o respectivo controle (branco) foram acondicionadas em tubos Eppendorf e submetidas ao teste de atividade citotóxica frente a células tumorais HCT-116, como mostrado a seguir na Tabela 2:

Tabela 2- Resultados do teste preliminar de citotoxicidade

Período (dias)	Meio	Massa produzida (mg)	Inibição da proliferação celular (%)			
			5 µg/mL		50 µg/mL	
			Média	SEM	Média	SEM
07	BD Bco	21,1	19,7	9,8	20,2	4,2
	BD	4,3; 5,5	20,4	3,0	39,0	13,5
14	BD Bco	30,4	21,7	4,3	19,7	2,3
	BD	14,5; 9,4	14,7	3,8	51,2	16,0
21	BD Bco	2,7	12,9	0,6	12,2	0,1
	BD	3,7; 3,3	22,0	3,0	72,8	10,1
28	BD Bco	2,2	22,5	2,5	41,8	0,5
	BD	4,5; 3,7	11,9	2,0	36,2	24,1
07	BDL Bco	26,5	12,5	0,8	28,2	6,4
	BDL	9,1; 3,7	19,9	0,9	36,9	1,6
14	BDL Bco	2,3	20,2	1,4	10,4	2,1
	BDL	3,4; 2,3	12,0	0,8	43,6	2,8
21	BDL Bco	2,1	0,6	5,9	18,8	9,2
	BDL	3,2; 1,4	19,5	7,1	34,2	5,7
28	BDL Bco	1,9	19,4	9,2	35,3	3,4
	BDL	1,1; 1,3	26,7	5,5	69,2	1,8
07	MPD Bco	20,9	-39,3	20,1	2,0	3,8
	MPD	4,9; 4,2	1,1	1,6	42,8	4,9
14	MPD Bco	3,2	3,6	0,3	10,7	0,1
	MPD	1,9; 1,2	-6,0	4,8	47,9	6,1
21	MPD Bco	6,3	21,2	4,6	29,2	6,8
	MPD	2,2; 2,8	25,6	4,8	51,1	10,9
28	MPD Bco	3,7	42,7	17,1	26,9	3,2
	MPD	2,7; 1,5	19,4	8,9	75,9	11,8
07	MNTPL Bco	2,8	3,7	11,1	10,2	12,4
	MNTPL	2,0; 2,0	25,3	0,7	24,5	6,1
14	MNTPL Bco	7,9	29,8	0,5	22,5	3,7
	MNTPL	1,7; 19,8	20,8	0,4	18,2	2,8
21	MNTPL Bco	11,2	-1,3	13,8	30,7	6,5
	MNTPL	1,6; 2,4	29,0	1,1	31,8	2,4

28	MNTPL Bco	1,2	30,0	1,0	30,9	1,5
	MNTPL	3,0; 1,1	21,2	1,2	15,9	2,6

Legenda: SEM = Erro padrão da média; Bco = branco; BD = batata dextrose; BDL= batata dextrose levedura; MPD= malte-peptona-dextrose; MntPL= manitol-peptona-levedura; d= dia. Fonte: Laboratório de Ecotoxicologia-LABOMAR / UFC (2016).

Dentre os extratos testados, o extrato MPD com incubação de 28 dias apresentou 75,9 % de inibição do crescimento celular na concentração de 50 µg/mL, seguido do BD que apresentou 72,8 % de inibição na mesma concentração com crescimento de 21 dias (Tabela 2, p. 46). Além desses, o extrato produzido com o meio de cultivo BDL apresentou um percentual de 69,2 % de inibição celular em um período de 28 dias de experimento, na mesma concentração dos anteriores. Com base nestes dados, estes extratos foram selecionados para o cultivo em grande escala, visando o estudo químico.

5.1.2 Cultivo do fungo em grande escala

O crescimento do fungo em grande escala ocorreu em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura. Para o cultivo do fungo em meio BD 21 dias foram utilizados 47 erlenmeyers. Para o meio BDL 28 dias foram utilizados 49 erlenmeyers e para o meio MPD 28 dias foram utilizados 80 erlenmeyers. As etapas de extração e obtenção dos extratos seguiu o mesmo protocolo utilizado anteriormente.

Apartir deste procedimento, foram obtidos 1,54 g do extrato BD 21 dias; 1,45 g do extrato BDL e 4,8 g do extrato MPD 28 dias.

5.2 Tratamento do extrato MPD 28 dias

5.2.1 Partição líquido-líquido MPD 28d

Uma alíquota de 3,0 g do extrato MPD-28 dias solubilizada em MeOH/ H₂O (3:10) foi submetida à partição líquido-líquido utilizando 360 mL dos solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, como mostrado na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3- Volume de solvente e rendimento do fracionamento do extrato MPD-28 dias por partição líquido- líquido

Solvente	Sigla da fração	Massa (g)	Rendimento
Hexano	FH MPD 28d	0,052	1,7
CH ₂ Cl ₂	FD MPD 28d	1,17	39
AcOEt	F AcOEt MPD 28d	0,97	32,3
MeOH-H ₂ O	F Aq MPD 28d	0,691	23,0
Emulsão	--	0,08	2,6
	TOTAL	2,96	98,6%

Fonte: Autor (2016).

Com o objetivo de fazer um estudo bioguiado, foram retiradas alíquotas de 1,0 mg de cada uma das frações descritas na Tabela 3 (acima) para avaliação de citotoxicidade com experimento feito em duplicata (n=2), conforme mostrado na Tabela 4, abaixo:

Tabela 4- Resultado do 2º teste de atividade citotóxica

Amostras	Inibição da proliferação celular (%)			
	5 µg/mL		50 µg/MI	
	Média	SEM	Média	SEM
FH MPD 28d	16,1	0,6	90,0	1,5
FD MPD 28d	21,9	1,6	68,7	5,7
F AcOEt MPD 28d	6,4	2,8	25,5	3,1
F Aq MPD 28d	19,5	12,6	2,0	3,6

Legenda: d= Dia; SEM: Desvio padrão da média. n= nº de réplicas do experimento.

F= Fração; H= Hexânica; Aq= Aquosa; AcOEt= Acetato; D=dicloro.

Fonte: Laboratório de Ecotoxicologia-LABOMAR/UFC (2015).

De acordo com a análise dos resultados obtidos, verificou-se que a fração hexânica apresentou um alto percentual de inibição celular, porém apresentou rendimento de 1,7% (0,05 g). Dessa forma, optou-se por trabalhar com a FD MPD 28d que apresentou 68,7% de inibição celular na concentração de 50 µg/mL e maior massa 1,168g (38,9 % do total).

5.2.2 Cromatografia em coluna flash da fração FD MPD 28d

A fração FD MPD-28 dias (1,16 g) foi submetida à cromatografia *flash*, utilizando 130,0 g de sílica com misturas dos solventes hexano e acetato de etila como eluente, em ordem crescente de polaridade como descrito a seguir: eluição com 100 mL de hexano, depois 500 mL de fase móvel com polaridade de 20% de AcOEt e 80% de hexano, depois eluição com 4400 mL de polaridade 30% AcOEt e 70% hexano. Após análise em CCDA decidiu-se aumentar a polaridade da fase móvel mudando o eluente para 100% de AcOEt adicionando 500 mL e depois para 100% metanol adicionando mais 300 mL.

As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com as semelhanças, resultando em 7 novas frações, como mostrado na Tabela 5 (abaixo) e Fluxograma (Fig. 8, p. 50):

Tabela 5- Cromatografia *flash* da fração diclorometano oriunda da partição líquido-líquido extrato MPD 28d

sigla	Eluente	Volume (mL)	Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
F1	Hex/AcOEt (8:2)	500	1	10,7	0,9
F2	Hex/AcOEt (7:3)	4400	2-321	673	57,6
F3	100% AcOEt 1	100	320	6,4	0,5
F4	100% AcOEt 2	300	321	10,5	0,9
F5	100% AcOEt 3	100	322	65,4	5,6
F6	100% MeOH 1	200	323	41,5	3,5
F7	100% MeOH 2	100	324	182	18,7
	Total	5800	326	993,7	85,7

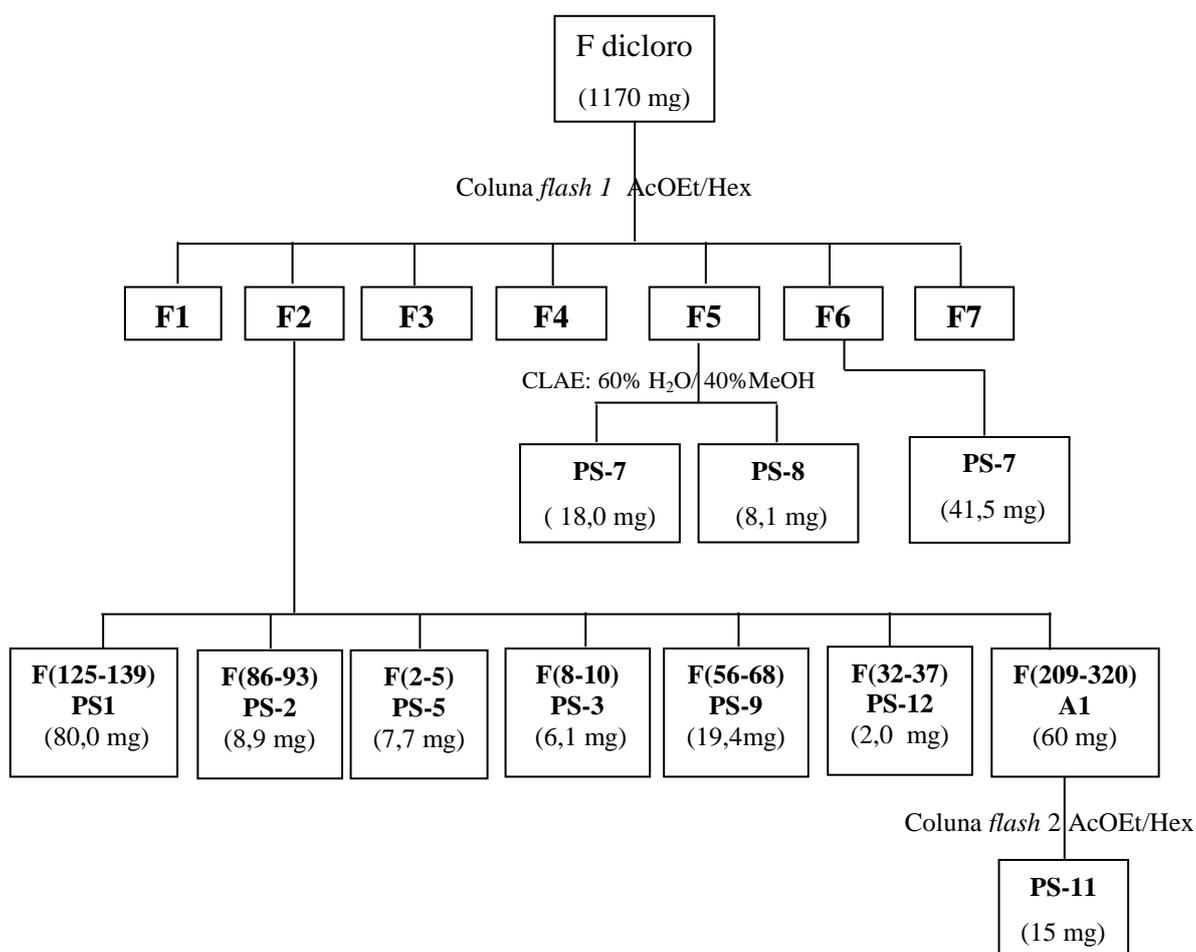
Fonte: Autor (2016).

O somatório das massas obtidas nas frações perfazem um total de 993,7 mg, com rendimento de 85,7 %.

A fração 2, foi reunida em 7 sub-frações, das quais 6 apresentaram aspecto homogêneo em CCDA e uma delas (A1) foi submetida a uma nova coluna *flash* para purificação utilizando eluente de 30% AcOEt e 70% Hex. Após essa purificação foi possível a obtenção 15,0 mg de um sólido cristalino claro em formato de agulha, denominado PS 11. A determinação estrutural dessas substâncias encontra-se nas p. 61 (PS-1), 68 (PS-2), 75 (PS-3), 87 (PS-5), 122 (PS-9), e 132 (PS-11).

A fração 5 (65,4 mg) foi submetida a CLAE usando fase móvel de 60% H₂O e 40% MeOH em modo isocrático. Nessa etapa foi possível à obtenção de duas substâncias com aspecto homogêneo em CCDA, ambas sólidas e com cristais em formato de agulha sendo que PS-7 (18,0 mg) apresentou coloração clara enquanto PS-8 (8,1 mg) apresentou-se marrom. A determinação estrutural dessas substâncias encontra-se nas p.inas 103 (PS-7) e 111 (PS-8).

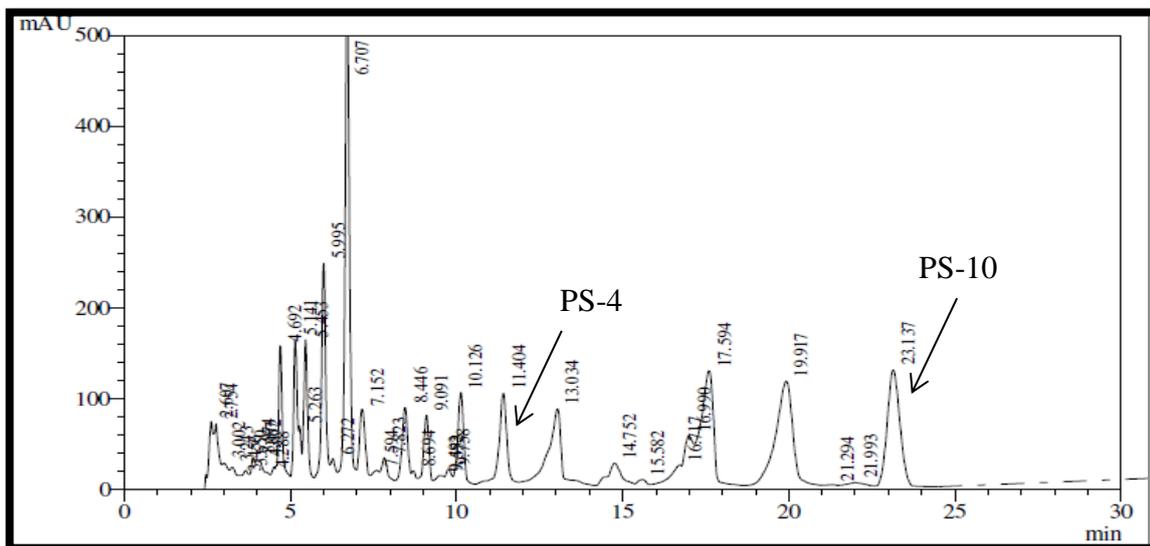
Figura 8- Fluxograma do tratamento feito com FD MPD 28d



5.2.3 Cromatografia de alta eficiência (CLAE) da FH MPD 28 d

Uma amostra com 52,0 mg fração hexânica foi fracionada em CLAE usando H₂O e MeOH como eluentes no modo isocrático começando com 50% H₂O e 50% MeOH até 100% MeOH em 50 minutos no modo gradiente e 42% H₂O e 58% MeOH em 30 minutos no modo isocrático. Por meio desta etapa de fracionamento foi possível o isolamento de duas substâncias denominadas PS-4 (determinação estrutural na p. 83) e PS-10 (em fase de caracterização estrutural). O cromatograma dessa fração é mostrado na Figura 9 (abaixo).

Figura 9- Cromatograma de isolamento da FH MPD



Fonte: Autor (2016).

5.3 Tratamento do extrato BD 21 dias

5.3.1 Partição líquido-líquido BD 21d

Uma alíquota de 1,5 g do extrato BD-21 dias foi submetida à partição líquido-líquido utilizando 125 mL dos solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, conforme mostrado na Tabela 6 a seguir (p. 52).

Tabela 6- Volume de solvente e rendimento do fracionamento do extrato BD-21 dias por partição líquido- líquido

Solvente	Sigla da fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	FH BD 21d	0,066	4,4
CH ₂ Cl ₂	FD BD 21d	0,8796	58,64
AcOEt/Aquosa	F AcOEt/Aq BD 21d	0,542	32,3
Total		1,48	95,3

5.3.2 Coluna flash da FD BD 21d

Uma massa de 879,0 mg da fração dicloro BD-21 dias foi submetida a cromatografia *flash*, utilizando 73,0 g de sílica com misturas dos solventes hexano e acetato de etila como eluente, em ordem crescente de polaridade, através da adição de 100 mL de hexano, seguido da mistura de Hexano/AcOEt 15% até a concentração de Hexano/AcOEt 60%, 100% AcOEt e lavagem da coluna com MeOH, como mostrado na Tabela 7 (abaixo).

As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com as semelhanças, resultando em 5 novas frações, após serem reunidas de acordo com semelhança em CCDA. Os resultados obtidos são mostrados no fluxograma a seguir (Fig.10, p. 53).

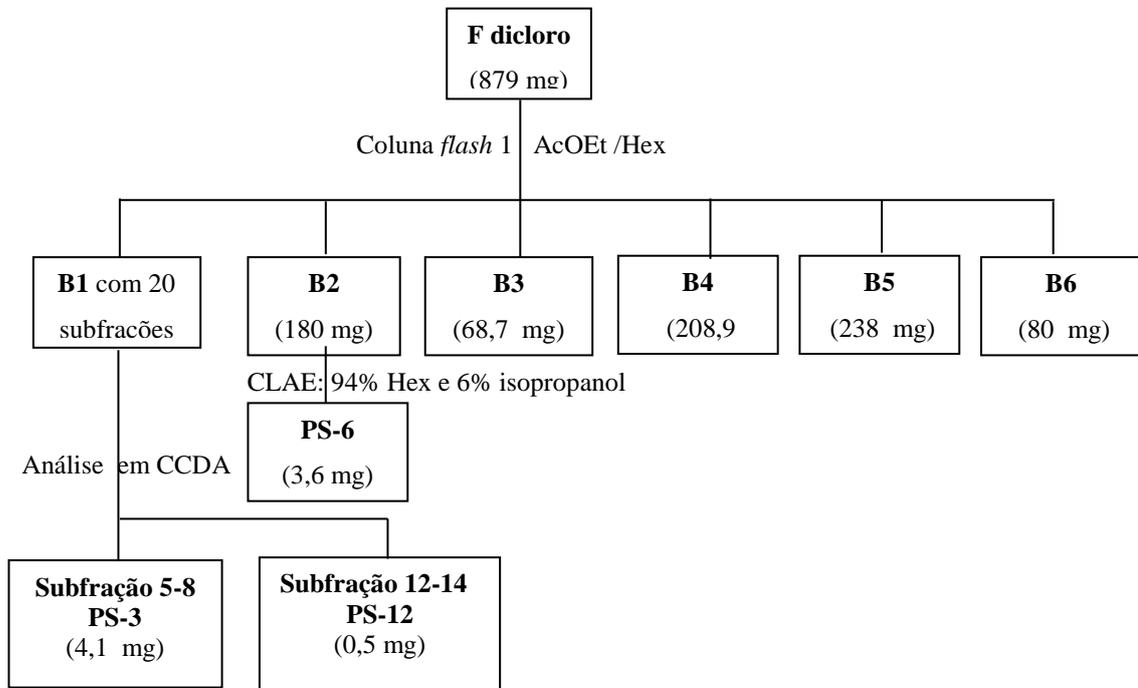
Tabela 7- Cromatografia *flash* da fração diclorometano oriunda da partição líquido-líquido extrato MPD

sigla	Eluente	Volume (mL)	Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
B1	Hex/AcOEt (85:15)	200	1 - 20	31,2	3,5
B2	Hex/AcOEt (75:25)	200	21	180,0	20,47
B3	Hex/AcOEt (65:35)	200	22	67,8	7,6
B4	Hex/AcOEt (60:40)	200	23	208,9	23,76
B5	100% AcOEt	300	24	238,0	27,0
B6	100% MeOH	300	25	50,0	5,68
Total		1400	25	875,9	88,0

As sub-frações 5-8 (4,1 mg) e 12-14 (0,5 mg) provenientes de B1 mostraram-se com aspecto homogêneo em CCDA, sendo a primeira uma resina amarela e a segunda uma resina marrom. Após análise em CCDA concluiu-se ambas já haviam sido isoladas do meio

de cultivo MPD 28 d e trava-se de PS-3 e PS-12 respectivamente, cujas determinações estruturais encontram-se nas p. 75 (PS-3) e p. 139 (PS-12).

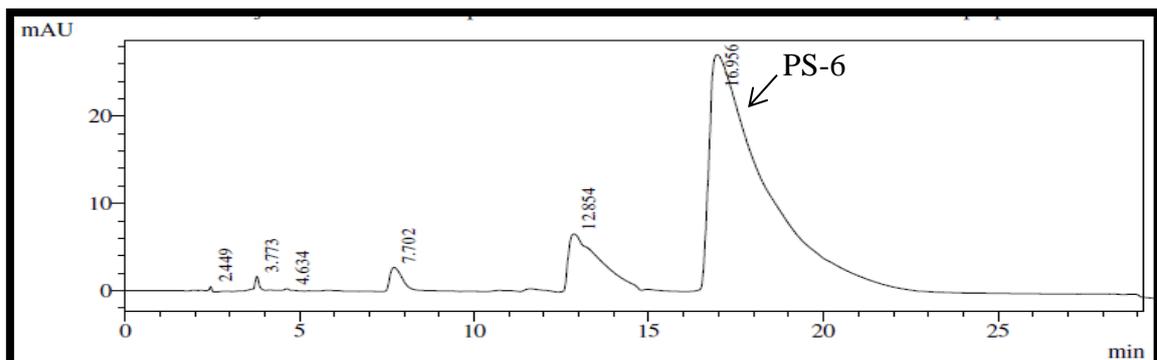
Figura 10- Fluxograma de fracionamento para a FD BD 21d



5.3.2.1 Tratamento em CLAE de B2 proveniente da FD BD21d

Uma massa de 18,5 mg da sub-fração proveniente da partição dicloro foi submetida a CLAE usando método gradiente de 90% hexano e 10% isopropanol e até 90% isopropanol e 10% hexano por 45 minutos, enquanto no modo isocrático foi usado eluente com 90% hexano e 10% isopropanol durante 30 min. Através dessa etapa foi possível o isolamento de PS-6, cromatograma encontra-se na Figura 11 (abaixo).

Figura 11- cromatograma de isolamento de PS-6



Fonte: Autor (2016).

5.3.3- Coluna flash da FAcOEt/Aq BD 21d

Para o fracionamento da FAcOEt/Aq BD 21d foi realizada uma coluna *flash* de 484,2 mg de material com 50 g de sílica. Inicialmente foram eluídos 100 mL de hexano, depois foram adicionados misturas de Hexano/ AcOEt em ordem crescente de polaridade: 500 mL de eluente na proporção 60% Hexano e 40% AcOEt, seguido de adição porções de 200 mL aumentando 10% de AcOEt cada uma até 80% AcOEt e 20% Hex. Depois 300 mL com 100% AcOEt e 300 mL com 100% MeOH. O resultado desta etapa de fracionamento é mostrado na Tabela 8, a seguir (p. 54).

Tabela 8- Coluna *flash* da AcOEt/Aq BD 21d

Sigla Frações	Eluente	Volume (mL)	subfrações	Massa (mg)	Rendimento (%)
C1	Hex/AcOEt (6:4)	500	1 – 134	240,4	49,7
C2	Hex/AcOEt (5:5)	200	135-155	5,1	1,05
C3	Hex/AcOEt (4:6)	200	156-175	5,3	1,09
C4	Hex/AcOEt (3:7)	200	176-195	3,6	0,7
C5	Hex/ AcOEt(2:8)	200	196-240	4,8	1,0
C6	100% AcOEt	300	241-243	112,7	23,3
C7	100% MeOH	300	244	65,2	13,5
	Total	1400	244	437,1	90,34

Nesta etapa de fracionamento, foi possível o isolamento de 3 substâncias, também isoladas do meio de cultivo MPD 28d: PS-3 (1,4 mg), PS-1 (20,8 mg) e PS-7 (5 mg), cujas determinações estruturais encontram-se nas p. 61 (PS-1), p. 75 (PS-3) e p.103 (PS-7). As demais substâncias diferentes que apareciam no cromatograma (Fig. 19, p. 58) não apresentaram massa suficiente para caracterização ou não apresentaram aspecto homogêneo em CCDA.

5.4 Tratamento cromatográfico do extrato BDL 28d

5.4.1 Partição líquido-líquido BDL 28d

Uma alíquota de 1,4 g do extrato BDL-28 dias solubilizado em MeOH/ H₂O (3:7) foi submetida à partição líquido-líquido utilizando 125 mL dos solventes hexano, diclorometano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, de acordo com a Tabela 9 (abaixo).

Tabela 9- Resultado da partição líquido-líquido do extrato BDL 28d

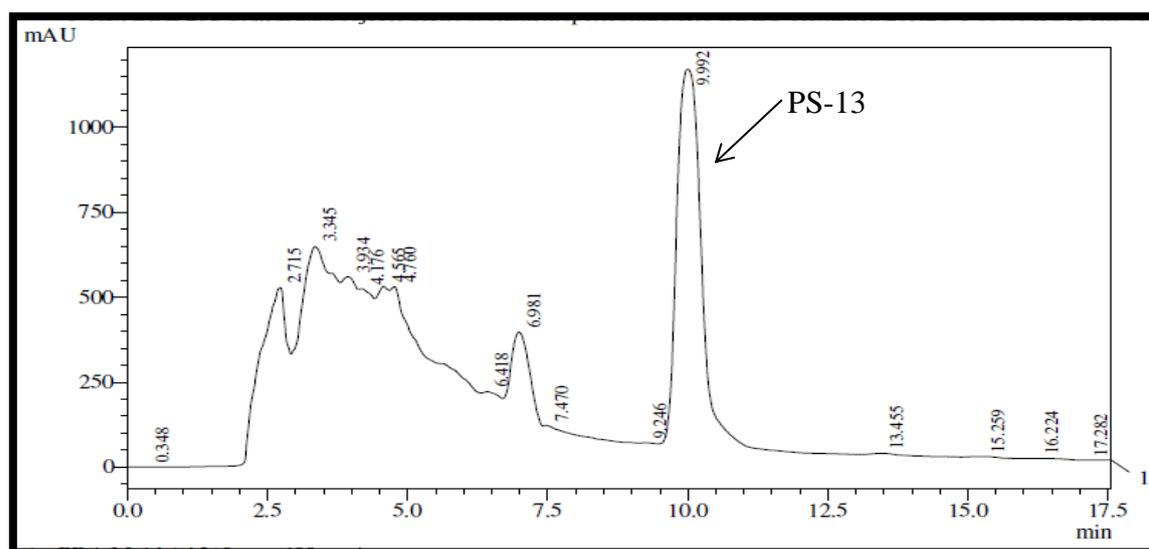
Solvente	Sigla da fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	FH BDL 28d	0,0614	4,38
CH ₂ Cl ₂	FD BDL 28d	0,7244	51,74
AcOEt/Aquosa	F AcOEt/Aq BDL 28d	0,530	37,86
Total		1,32	94,0

Fonte: Autor (2016).

5.4.2 Tratamento em CLAE FH BDL 28d

Uma amostra contendo 61,0 mg da fração hexânica BDL 28 dias foi analisada em CLAE no modo gradiente 50% H₂O e 50% MeOH até 100% MeOH em 50 min em seguida foi utilizado modo isocrático com 20% H₂O e 80% MeOH em 30 min. Essa etapa resultou no isolamento de PS-13. O cromatograma de isolamento dessa substância é mostrado na Figura 12.

Figura 12- Cromatograma de isolamento da FH BDL 28d em CLAE no modo isocrático

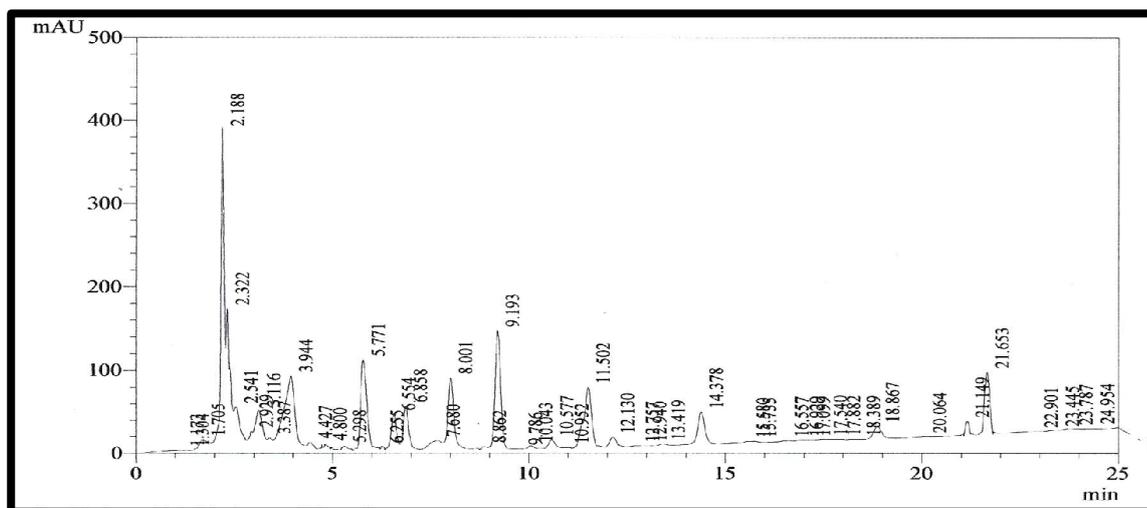


Fonte: Autor (2016).

5.5 Análise em CLAE das frações obtidas das partições líquido-líquido de todos os meios de cultivo

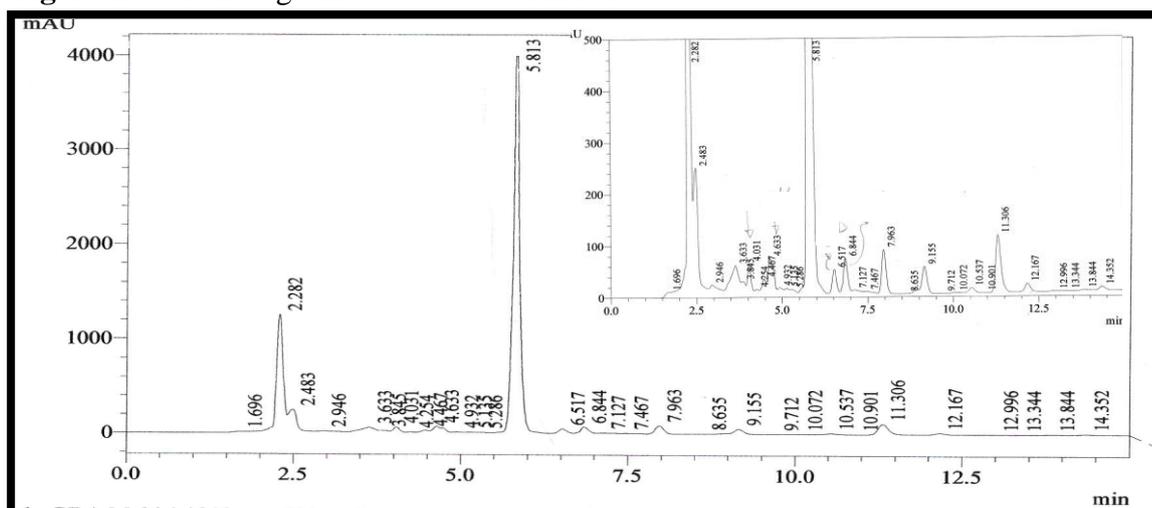
Com o objetivo de analisar as diferenças de produção de metabólitos secundários, todas as frações provenientes das partições líquido-líquido foram analisadas em CLAE no método gradiente 50% H₂O e 50% MeOH até 100% MeOH em 50min. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir:

Figura 13- Cromatograma da FHex MPD 28d



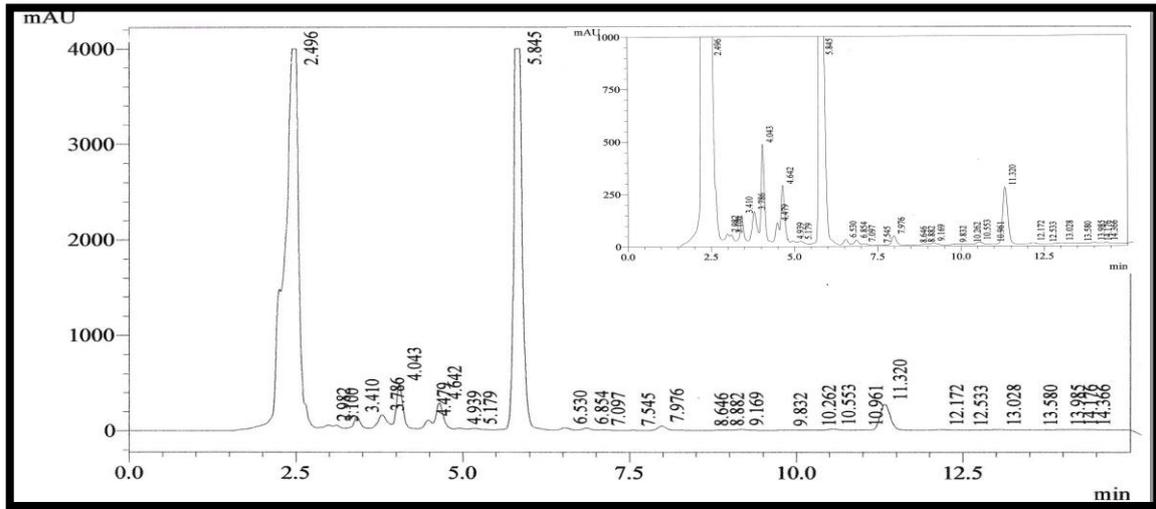
Fonte: Autor (2016).

Figura 14- Cromatograma da F dicloro MPD 28d



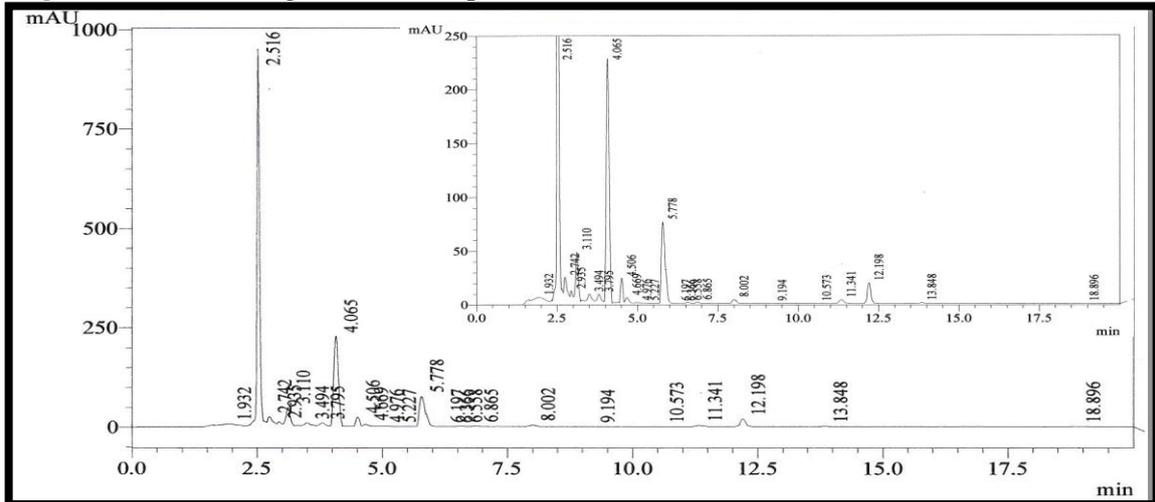
Fonte: Autor (2016).

Figura 15- Cromatograma da F AcOEt MPD 28d



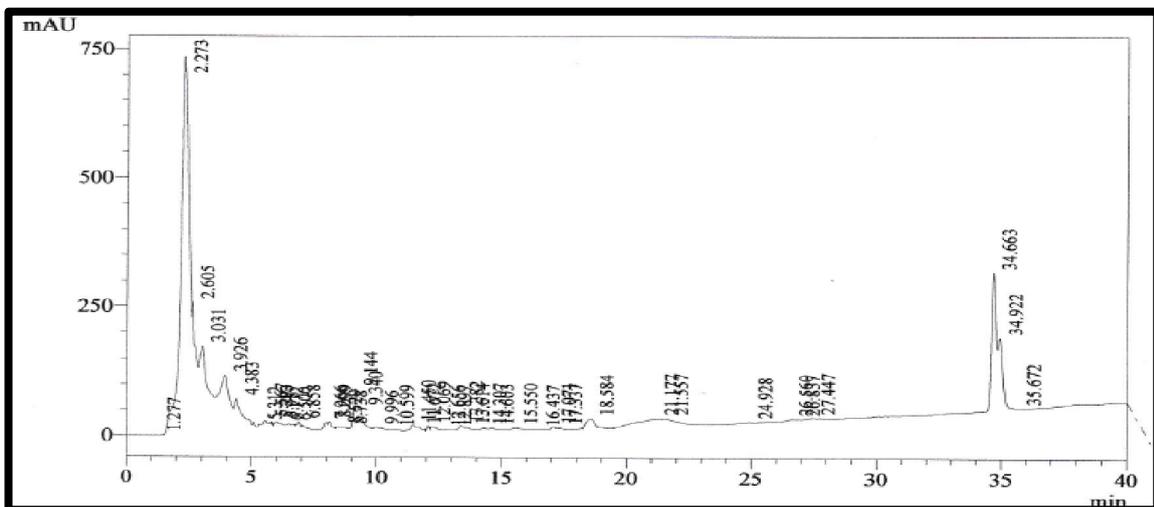
Fonte: Autor (2016).

Figura 16 - Cromatograma da F Aquosa MPD 28d



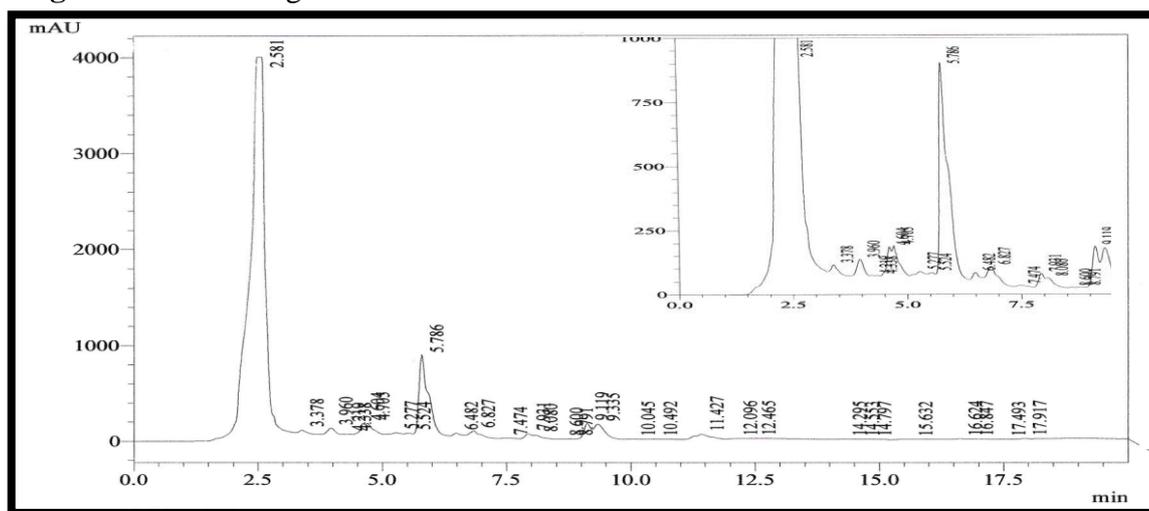
Fonte: Autor (2016).

Figura 17- Cromatograma da FH BDL 28d



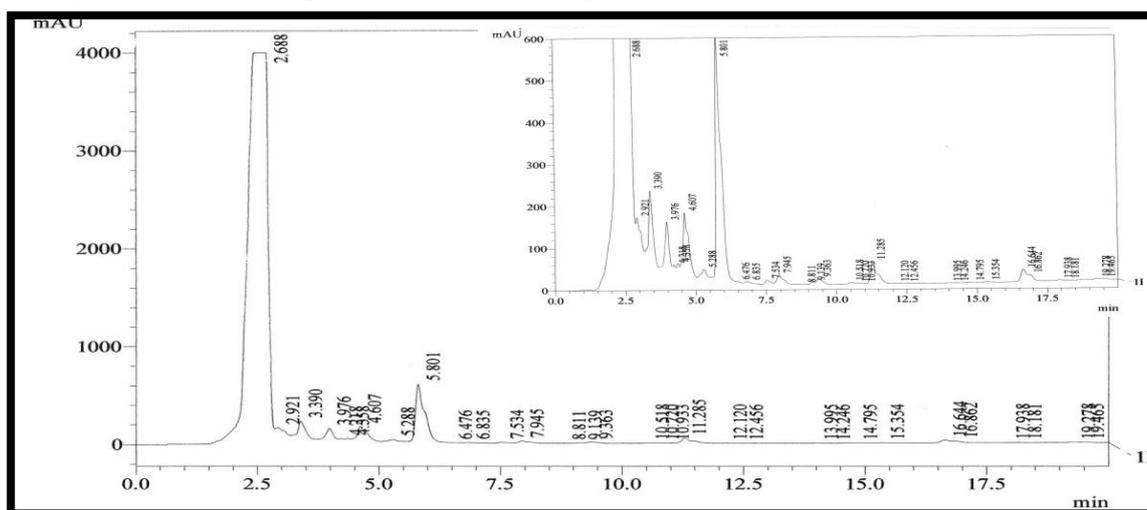
Fonte: Autor (2016).

Figura 18- Cromatograma da FD BDL 28d



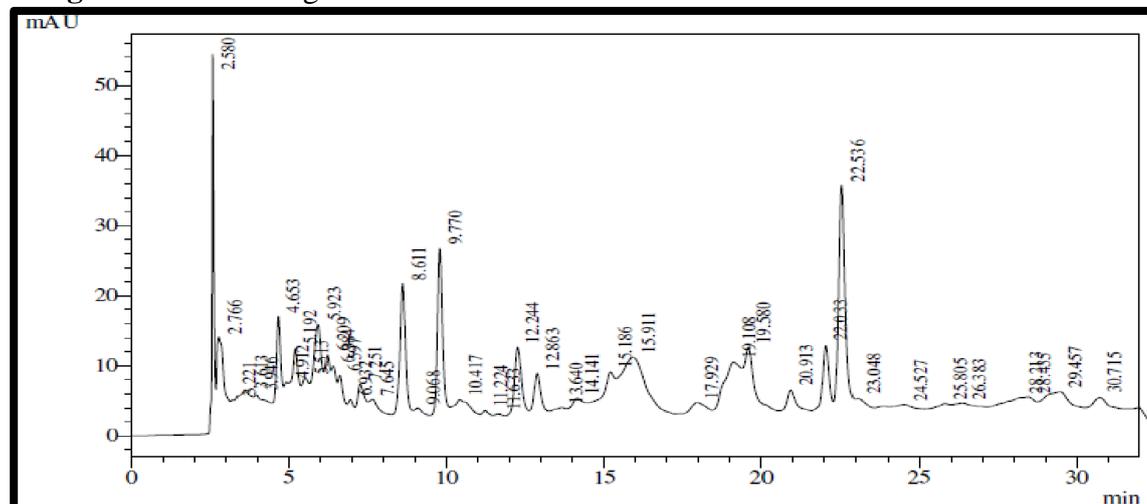
Fonte: Autor (2016).

Figura 19- Cromatograma da F AcOEt/Aq BDL 28 d

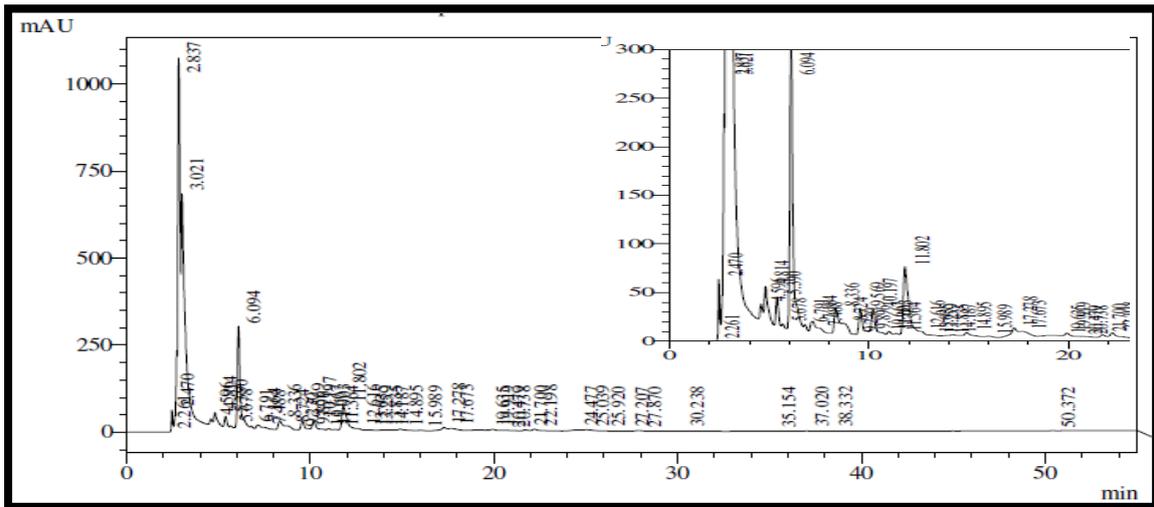


Fonte: Autor (2016).

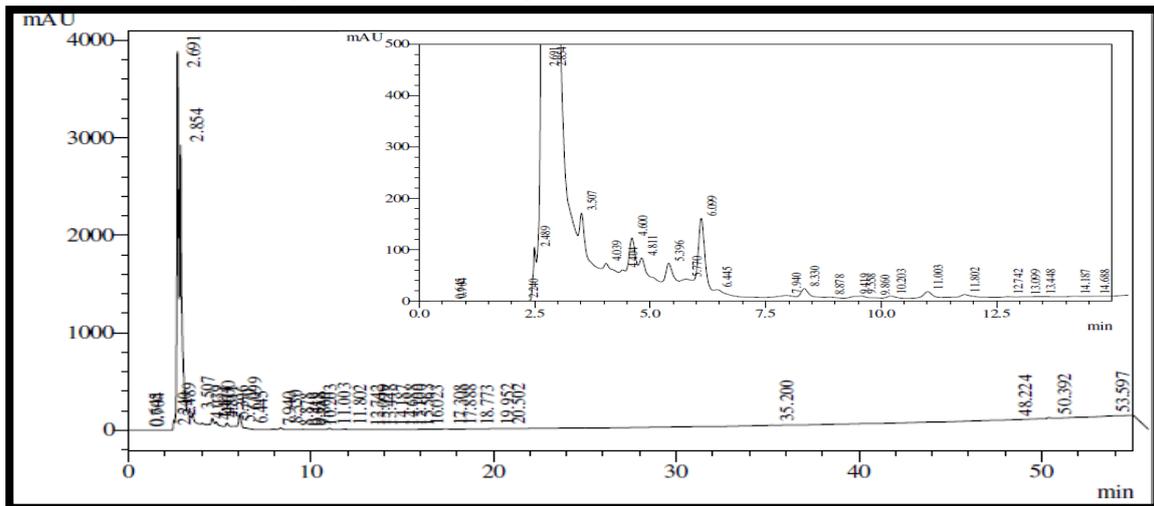
Figura 20- Cromatograma da FHex BD 21d



Fonte: Autor (2016).

Figura 21- Cromatograma da FD BD 21d

Fonte: Autor (2016).

Figura 22- Cromatograma FAcOEt/Aq BD 21d

Fonte: Autor (2016).

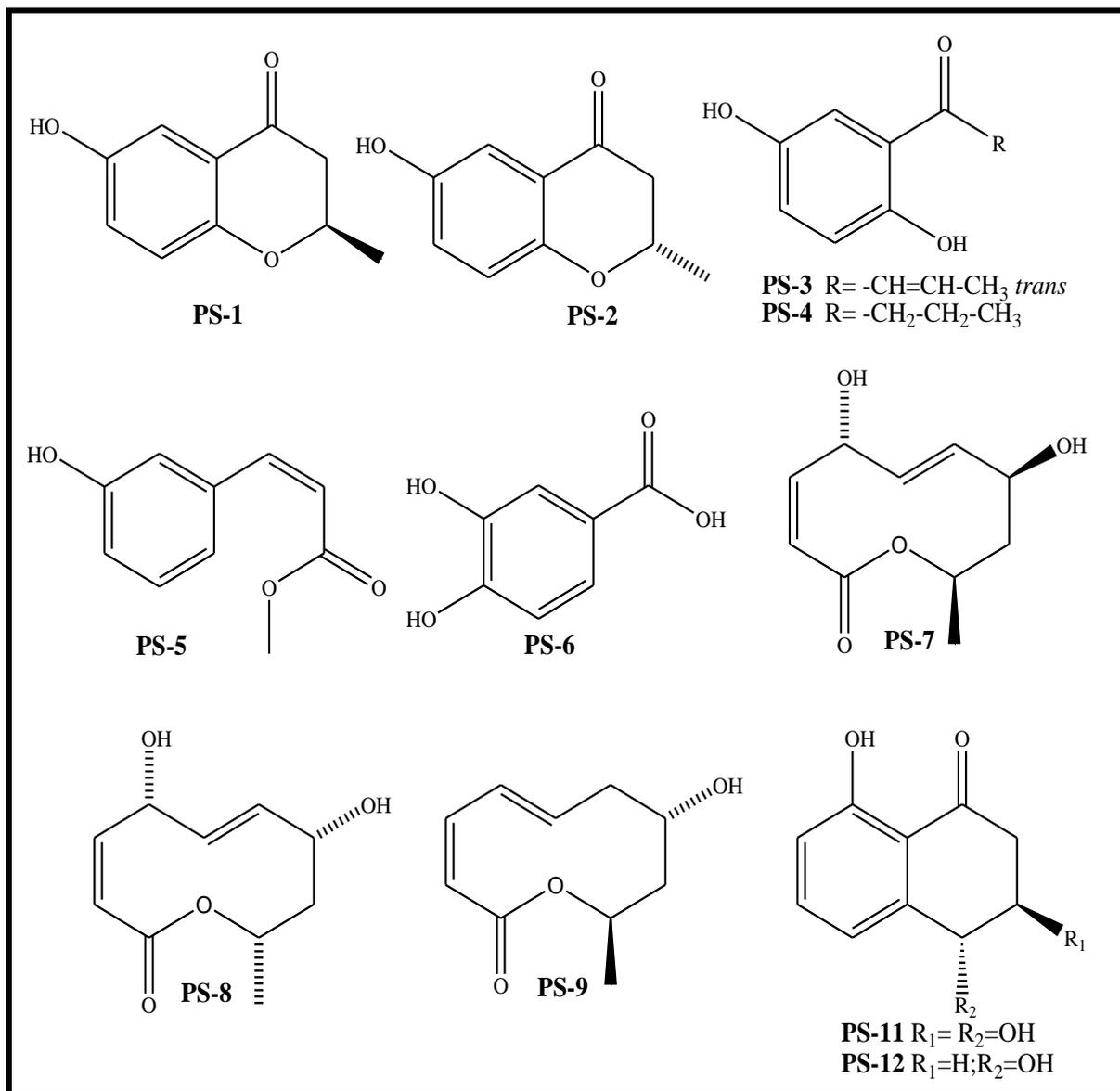
Após análise cromatográfica em CLAE, as frações do meio MPD 28 d foram selecionadas inicialmente para estudo por apresentarem maior massa e maior complexidade de substâncias, como mostrado nas Figuras 13 a 22 (p. 56-59).

A análise dos cromatogramas permitiu inferir que o meio de cultivo MPD 28d não mostrou diferenças significativas em relação ao meio de cultivo BDL 28d. Após o fracionamento, a FHex BDL 28d forneceu apenas uma substância com aspecto homogêneo em CCDA, não obtida a partir da FHex MPD 28d, denominada de PS-13.

A frações do meio de cultivo BD 21d (Fig. 20-22, p. 58-59) mostraram um perfil cromatográfico diferente e, com base nisso, todas as frações desse meio de cultivo foram

fracionadas levando a obtenção de PS-6. As demais substâncias isoladas desse meio de cultivo (PS-1, PS-3, PS-7 e PS-12) já haviam sido isoladas do MPD 28d.

Figura A- Metabólitos secundários isolados de *Periconia hispidula*



Fonte: Autor (2016).

6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

6.1 Determinação Estrutural de PS-1

Sucessivas cromatografias da fração do extrato MPD obtida por meio de partição líquido-líquido com diclorometano resultaram no isolamento de 550,0 mg de um sólido amarelo esverdeado denominado de PS-1. $\{[\alpha]_D^{22} (c 0,1 \text{ MeOH}) = -20,9^\circ$; ponto de fusão: degrada a $146,3^\circ\text{C}\}$.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 27, p. 64) de PS-1 apresentou absorções intensas em 3442 cm^{-1} relativo ao estiramento axial de ligações O-H, absorção em torno de 2900 cm^{-1} correspondente a estiramento axial de ligação H-C assimétrico, além de absorções em 1653 cm^{-1} e 1261 cm^{-1} relacionadas a estiramento axial de ligação C=O e C-O, respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de PS-1 (Fig. 28, p. 65) apresentou três absorções intensas em região de hidrogênios aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,23$ (1H, d, $J = 2,9 \text{ Hz}$, H-5), $\delta_{\text{H}} 7,0$ (1H, dd, $J = 8,9$ e $2,9 \text{ Hz}$, H-7) e $\delta_{\text{H}} 6,78$ (1H, d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, H-8). Além desses, foram também visualizados sinais de um duplete em $\delta_{\text{H}} 1,27$ (3H, d, $J = 6,3 \text{ Hz}$, H-11), sugerindo a presença de uma metila ligada a um carbono mono-hidrogenado, e uma absorção em $\delta_{\text{H}} 4,36$ (1H, m, H-2), relativo a hidrogênio ligado a carbono oximetínico. Em adição, as absorções em $\delta_{\text{H}} 3,17$ (1H, dd, $J = 16,1$; $7,5 \text{ Hz}$, H-3 α) e $\delta_{\text{H}} 3,02$ (1H, dd, $J = 16,1$; $5,0 \text{ Hz}$, H-3 β) revelaram a presença de hidrogênios diastereotópicos de um grupo metilênico.

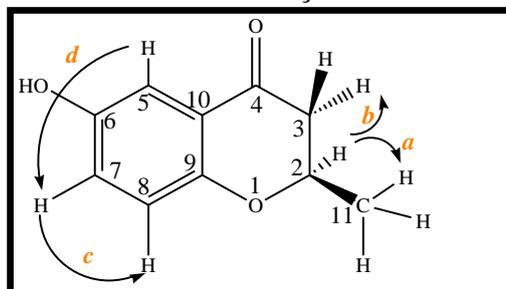
O espectro de RMN de ^{13}C CPD de PS-1 (Fig. 29, p. 65) apresentou 10 linhas espectrais, que após comparação com o espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC, Fig. 30, p. 66) revelou a presença de 1 carbono metílico, 1 carbono metilênico, 4 carbonos metínicos, e 4 carbonos não-hidrogenados. As absorções em $\delta_{\text{C}} 116,0$ (C-5), $126,1$ (C-7) e $119,8$ (C-8) foram atribuídas a carbonos metínicos insaturados, que, juntamente com os carbonos não-hidrogenados em $\delta_{\text{C}} 156,9$ (C-6), $150,7$ (C-9) e $\delta_{\text{C}} 121,0$ (C-10) sugeriram a presença de um anel aromático trissubstituído. A absorção em $\delta_{\text{C}} 206,4$ (C-4) foi relacionada à presença de carbono carbonílico de cetona (Tabela 10, p. 63 e Tabela 11, p. 64).

A análise do espectro de massa de alta resolução apresentou como íon molecular $[\text{M}+\text{H}^+]$ m/z 179, 0709, correspondente a fórmula molecular condensada $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6 (calc. 179,0703; erro = 3,35 ppm) (Fig. 26, p. 64).

O espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H (COSY, Fig. 23, p. 62) apresentou acoplamentos vicinais entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 4,36$ (H-2) e $\delta_{\text{H}} 1,46$ (H-11), e entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 3,17$ e $3,02$ (2H, H-3), além de acoplamento *orto* entre os hidrogênios

aromáticos em δ_H 7,0 (H-7) e δ_H 6,78 (H-8), e acoplamento *meta* entre os hidrogênios em δ_H 7,16 (H-5) e δ_H 7,0 (H-7) (Figura 23, abaixo).

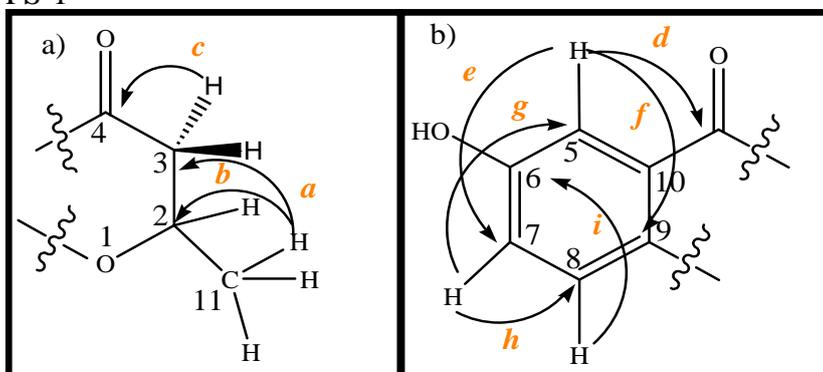
Figura 23- Subestrutura com correlações homonucleares $^1H, ^1H$ (COSY) de PS-1



Fonte: Autor (2016).

A análise do espectro RMN de correlação heteronuclear $^1H, ^{13}C$ a longa distância (HMBC, Fig. 32, p. 67) mostrou acoplamentos a duas ligações ($^2J_{CH}$) dos hidrogênios em δ_H 3,17 e 3,02 (2H, H-3) com o carbono em δ_C 65,4 (C-2) e dos hidrogênios do grupo metílico em δ_H 1,27 (H-11) com o carbono em δ_C 65,4 (C-2). As correlações a longa distância ($^3J_{CH}$) se deram entre o hidrogênio em δ_H 1,27 (H-11) e o carbono em δ_C 49,2 (C-3), como mostrado na subestrutura a (Fig. 21a, abaixo). Por outro lado, a subestrutura b (Fig. 24b, abaixo) apresenta um acoplamento $^2J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 7,0 (H-7) com o carbono em δ_C 119,8 (C-8), além dos acoplamentos $^3J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 7,23 (H-5) com os carbonos em δ_C 126,1 (C-7), δ_C 150,7 (C-9) e δ_C 206,4 (C-4), do hidrogênio em δ_H 7,0 (H-7) com o carbono em δ_C 116,0 (C-5), e do hidrogênio em δ_H 6,78 (H-8) com o carbono em δ_C 156,9 (C-6) (Tabela 11, p. 64).

Figura 24- Representação dos acoplamentos heteronucleares $^1H, ^{13}C$ a longa distância-HMBC de PS-1



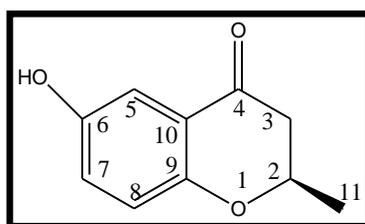
Fonte: Autor (2016).

A reunião de todos dados obtidos permitiu afirmar que PS-1 Possui esqueleto relativo à classe das cromanonas, mais precisamente a 6-hidroxi-2-metil- 4-cromanona (Fig.

25, abaixo), que foi isolada pela primeira vez de *Periconia siamensis* por Bilabutra *et al.*, (2007) e apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. No entanto, os dados de RMN ^1H e ^{13}C estão sendo citados pela primeira vez.

Uma análise nas constantes de acoplamento apresentadas pelos hidrogênios de PS-1 mostrou acoplamento compatíveis com acoplamentos axial-axial ($J= 7,5$ Hz) entre o hidrogênio vicinal com absorção em δ_{H} 4,36 (1H, m, H-2) com o hidrogênio em δ_{H} 3,17 (1H, dd, H-3 α) e acoplamento axial-equatorial ($J= 5,0$ Hz) com o hidrogênio em δ_{H} 3,02 (1H, dd, H-3 β). Isso sugere que a metila está para cima do plano e que o centro estereogênico C-2 possui configuração relativa R (Fig. 23 e 24, p. 62).

Figura 25- Estrutura da molécula isolada como PS-1



Fonte: Autor (2016).

Tabela 10- Dados RMN ^1H e ^{13}C apresentados por PS-1

Posição	PS-1 (CD ₃ OD, 300 MHz)	
	δ_{C} (padrão de hidrogenação)	δ_{H} , mult. e (J em Hz)
1	--	--
2	65,4 (CH)	4,36 m
3	49,2 (CH ₂)	3,17 (α) dd(16,1; 7,5) 3,02 (β) dd (16,1; 5,0)
4	206,4 (C)	--
5	116,0 (CH)	7,23 d (2,9)
6	156,9 (C)	--
7	126,1(CH)	7,0 dd (8,9; 2,9)
8	119,8 (CH)	6,78 d (8,9)
9	150,7 (C)	--
10	121,0 (C)	--
11	23,7 (CH ₃)	1,27 d (6,3)

Legenda: J=constante de acoplamento; multi= multiplicidade

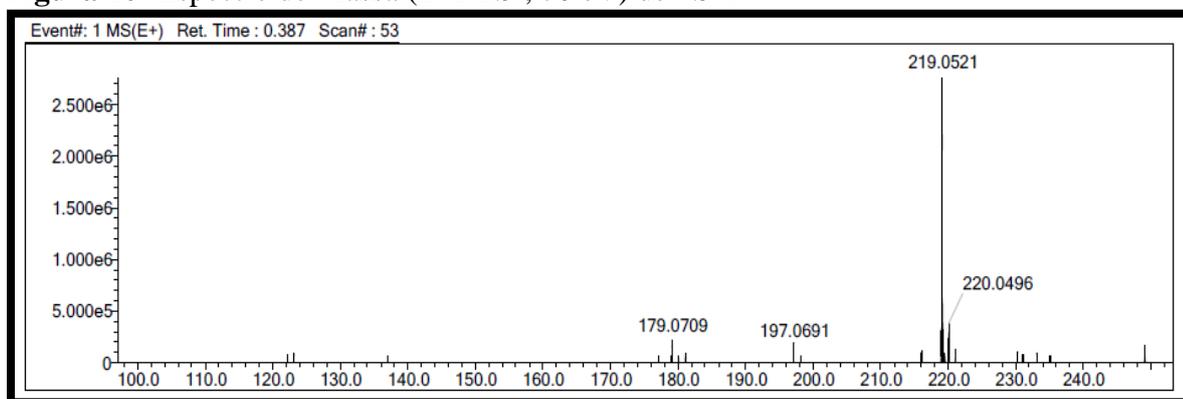
m= multipleteo; d= dubleteo; Fonte: Autor (2016).

Tabela 11- Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C HSQC e HMBC de PS-1

Posição	PS-1 HSQC		PS-1 HMBC	
	δ_C	δ_H , mult. e (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	--	--	--	--
2	65,4	4,36 m	H-11	--
3	49,2	3,17 (α) dd (16,1; 7,5) 3,02 (β) dd (16,1; 5,0)	--	H-11
4	206,4	--	H-3 e H-5	--
5	116,0	7,23 d (2,9)	--	H-7
6	156,9	--	--	H-8
7	126,1	7,0 dd (8,9; 2,9)	--	H-5
8	119,8	6,78 d (8,9)	H-7	--
9	150,7	--	--	--
10	121,0	--	--	--
11	23,7	1,27 d (6,3)	--	--

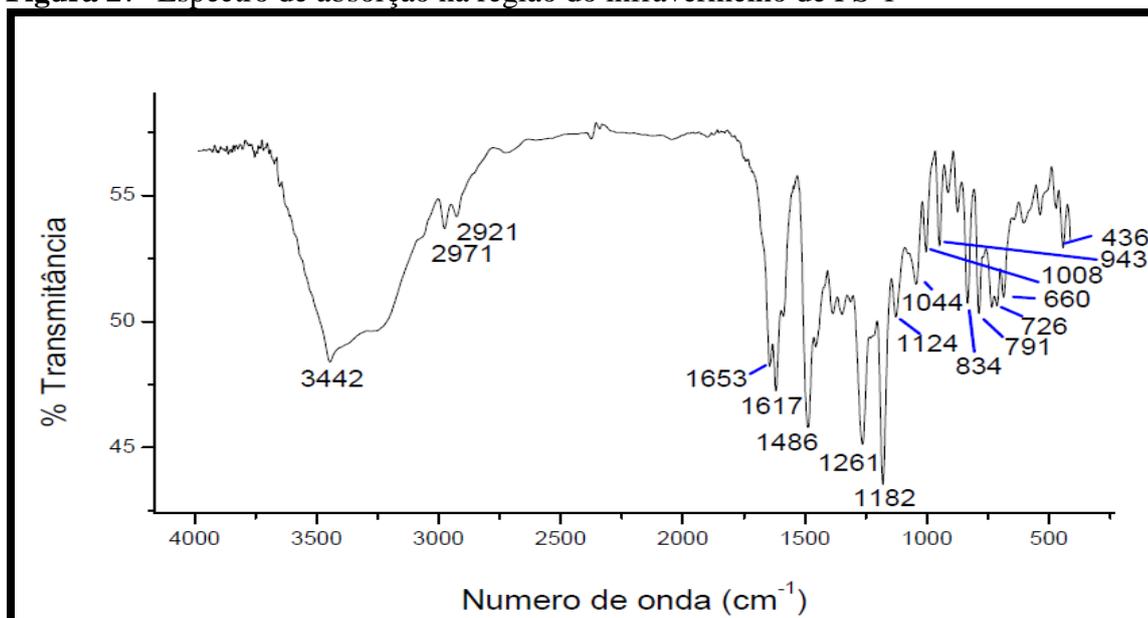
Fonte: Autor (2016).

Figura 26- Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) de PS-1



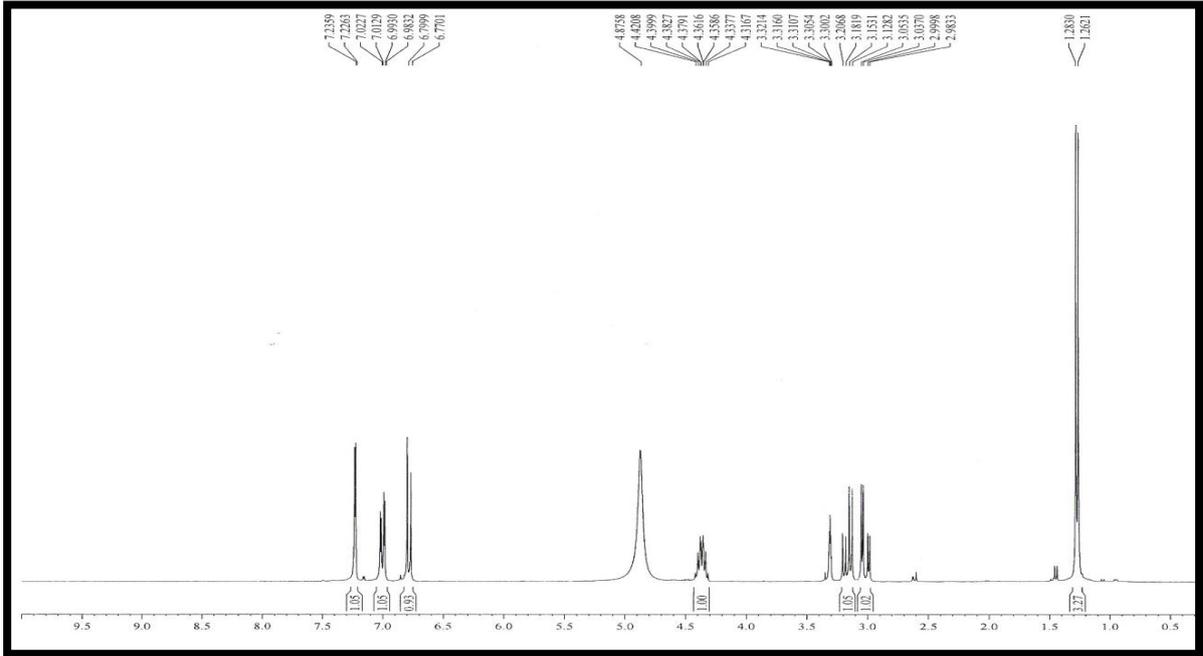
Fonte: LEMANOR-UFC (2015).

Figura 27- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-1



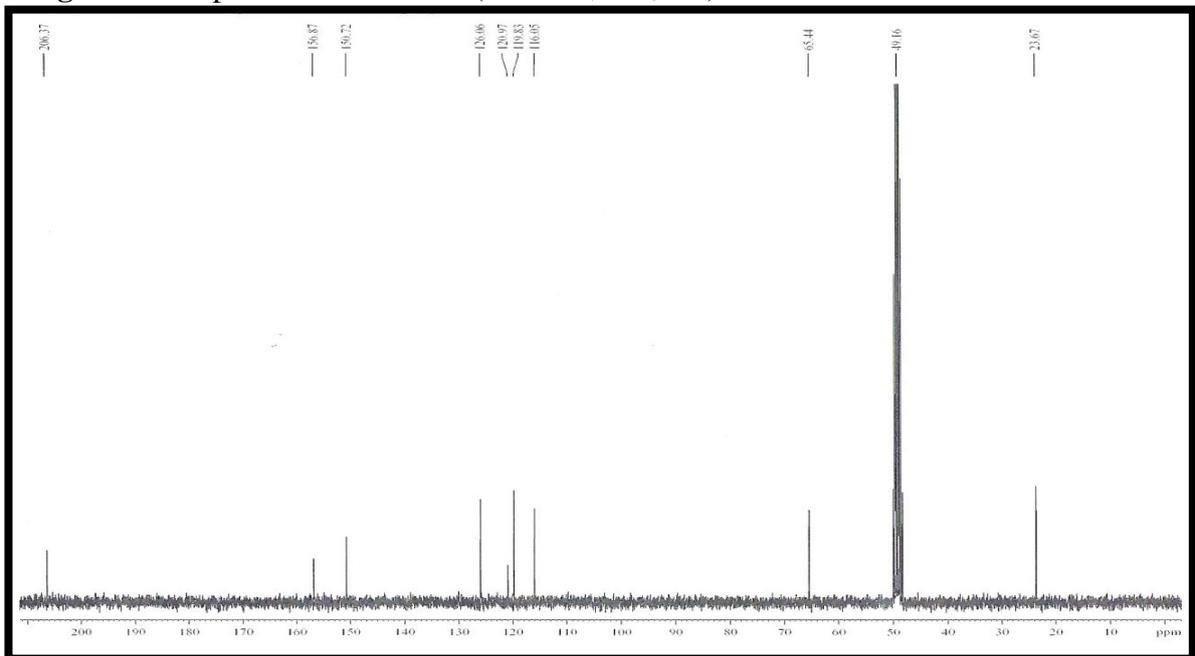
Fonte: LABIO-UFC (2015)

Figura 28- Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de PS-1



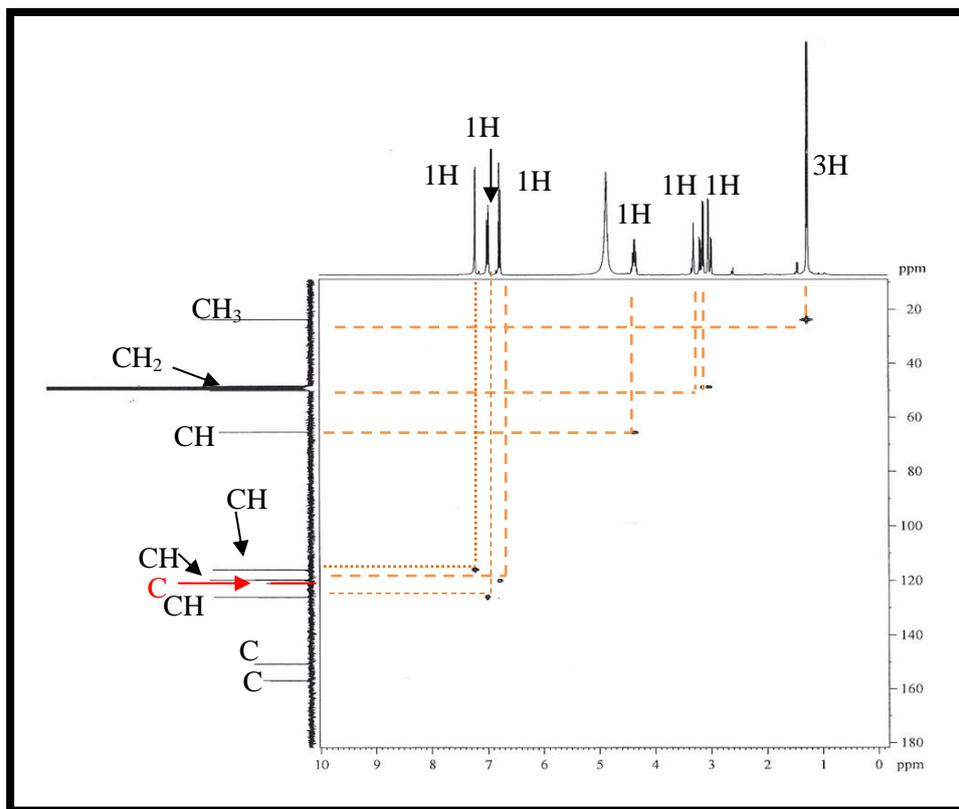
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 29- Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de PS-1



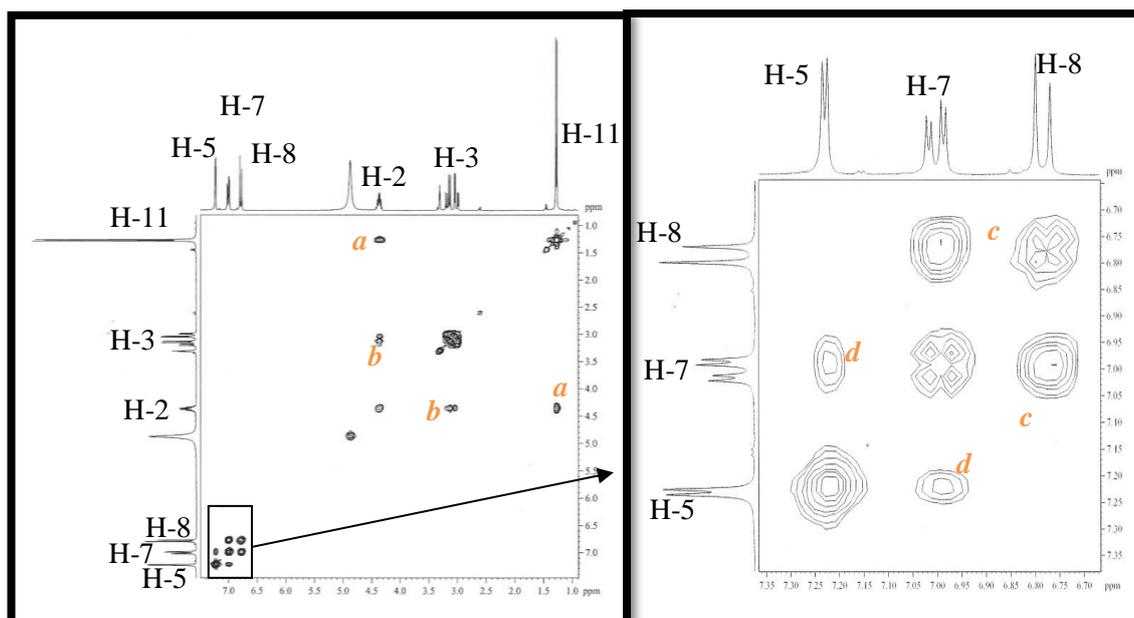
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 30- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-1



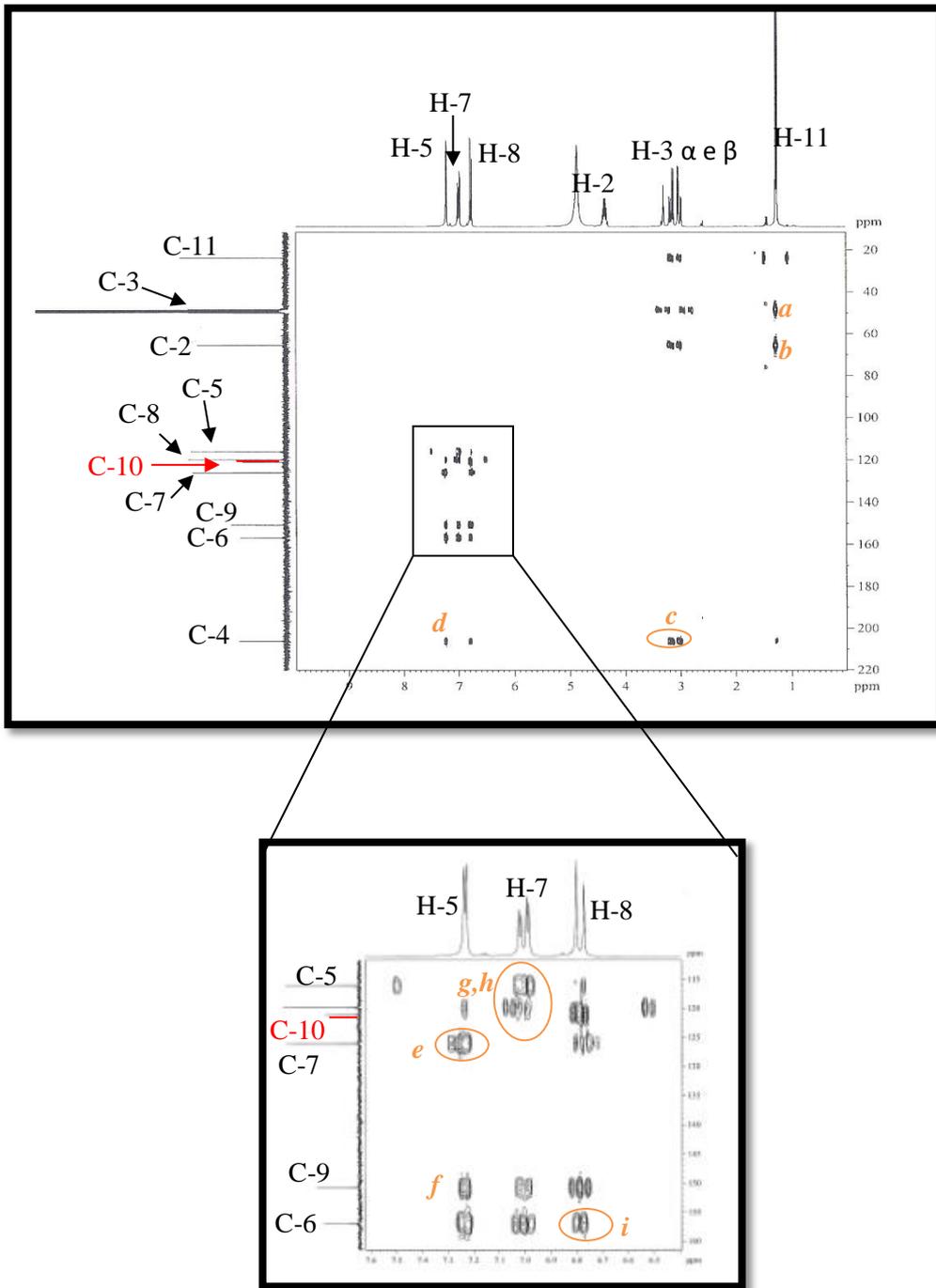
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 31- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PS-1



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 32- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H},^{13}\text{C}$ – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-1



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

1.2 Determinação Estrutural de PS-2

Sucessivas cromatografias da fração do extrato MPD-28 dias, obtida por meio de partição líquido-líquido com diclorometano, resultaram no isolamento de 8,9 mg de uma resina marrom denominada PS-2. $\{[\alpha]^{20,5}D (c 0,1 \text{ MeOH}) = + 25,6^\circ\}$.

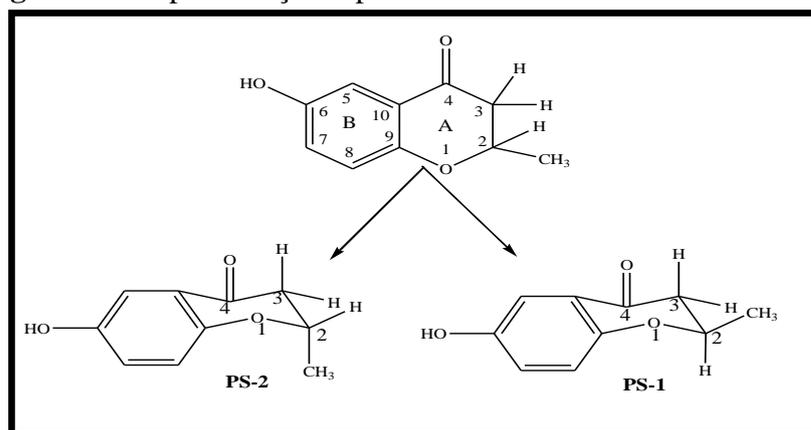
O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 38, p. 71) de PS-2 mostrou-se muito semelhante com o espectro de PS-1 (Fig. 27, p. 64), com absorções em 3422 cm^{-1} de estiramento axial de ligações O-H, carbonila conjugada em 1674 cm^{-1} , além de estiramento axial C-O em 1246 cm^{-1} .

A análise do espectro de massa de alta resolução de PS-2 (Fig. 37, p.71) revelou íon molecular $[M+H^+]$ m/z 179,0704 semelhante a PS-1 (Fig. 26, p. 64), correspondente a fórmula molecular condensada $C_{10}H_{10}O_3$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6, indicando que PS-2 trata-se de um isômero de PS-1.

De forma análoga, o espectro de espectro RMN 1H (CD_3OD , 300 MHz) de PS-2 (Fig. 39, p. 72) apresentou semelhanças entre as duas substâncias, onde a única diferença foi a ausência das absorções em δ_H 3,17 (1H, dd, $J= 16,1$ e $7,5$ Hz, H-3 α) e δ_H 3,02 (1H, dd, $J=16,1$ e $5,0$ Hz, H-3 β) no espectro de PS-1 (Fig. 28, p. 65), que apresentou-se como um tripleto em δ_H 2,64 (2H, t, $J=6,8$ e $2,0$ Hz, H-3) em PS-2.

O espectro RMN de ^{13}C de PS-2 também mostrou uma estreita semelhança com os dados observados para PS-1 (Fig. 40, p. 72), conforme mostrado na Tabela 12 (p. 70). As principais diferenças observadas foram relacionadas a absorção em região de maior desproteção em δ_C 75,8 para o carbono C-2, e em região de maior proteção em δ_C 45,6 para o carbono C-3 e em δ_C 195,2 para a carbonila em C-4, quando comparadas a PS-1 em δ_C 65,4 (C-2), 49,2 (C-3) e em δ_C 206,4 (C-4), respectivamente. Com base nisso, o arranjo espacial adotado pelas moléculas é o fator mais conveniente para explicar esse fenômeno (Fig. 33, abaixo).

Figura 33- Representação espacial das substâncias PS-2 e PS-1

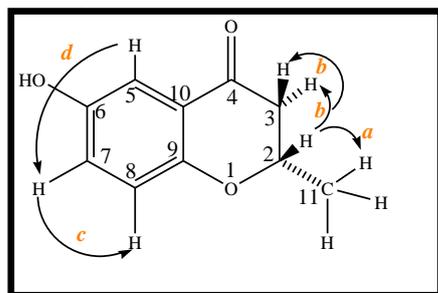


Fonte: Autor (2016).

De acordo com a Figura anterior (Fig. 33) os hidrogênios em δ_H 2,64 (2 H, t, $J=6,8$; 2,0 Hz, H-3) de PS-2 apresentam acoplamento axial-equatorial ($J = 6,8$ Hz) e equatorial-equatorial ($J= 2,0$ Hz) (Tabela 12, p.70) com o hidrogênio em δ_H 4,51(1H, m, H-2), enquanto que em PS-1 acontece acoplamento axial-axial ($J= 7,5$ Hz) entre o hidrogênio em δ_H 4,36 (1H, m, H-2) com o hidrogênio em δ_H 3,17 (1H, dd, H-3 α), e acoplamento axial-equatorial ($J= 5,0$ Hz) com o hidrogênio em δ_H 3,02 (1H, dd, H-3 β).

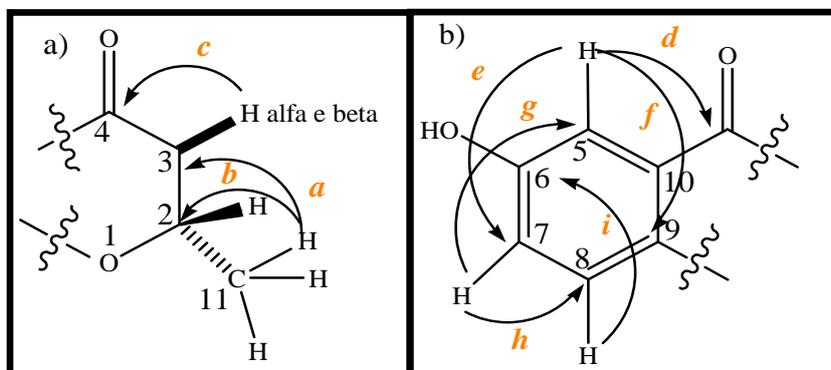
O espectro de correlação homonuclear $^1H, ^1H$ (COSY, Fig. 42, p. 73) de PS-2 apresentou mesmos acoplamentos que PS-1 (Fig. 34, p. 69), e confirmou o anel aromático trissubstituído. Assim como o espectro de correlação heteronuclear a longa distância $^1H, ^{13}C$ (HMBC), como mostrado nas Figura 34 e 35 (abaixo) e na Tabela 13 (p. 71).

Figura 34- Representação das correlações homonucleares $^1H, ^1H$, COSY de PS-2



Fonte: Autor (2016).

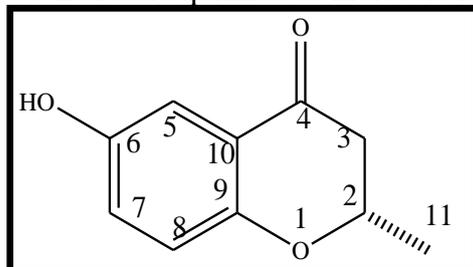
Figura 35- Representação dos acoplamentos heteronucleares $^1H, ^{13}C$ a longa distância-HMBC de PS-2



Fonte: Autor (2016).

Com base nos dados anteriormente citados, foi possível afirmar que PS-2 trata-se do composto inédito na literatura 6-hidroxi-2-metil-4-cromanona, com C-2 apresentando configuração relativa S (Fig. 36, abaixo).

Figura 36-Estrutura química da molécula isolada como PS-2



Fonte: Autor (2016)

Tabela 12- Apresentação dos dados RMN ^1H e ^{13}C de PS-2 e comparação entre os dados RMN ^1H , ^{13}C de PS-1

Posição	PS-2 (CD_3OD , 300 MHz)		PS-1 (CD_3OD , 300 MHz)	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , multi. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , multi. e (J em Hz)
1	--	--	--	--
2	75,8 (CH)	4,52 m	65,4 (CH)	4,36 m
3	45,6 (CH_2)	2,64 t (6,8; 2,0)	49,2 (CH_2)	3,17 (α) dd (16,1; 7,5) 3,02 (β) dd (16,1; 5,0)
4	195,2 (C)	--	206,4 (C)	--
5	111,4 (CH)	7,16 d (3,1)	116,0 (CH)	7,23 d (2,9)
6	157,2 (C)	--	156,9 (C)	--
7	126,0 (CH)	7,0 dd (3,1; 8,9)	126,1 (CH)	7,0 dd (8,9; 2,9)
8	120,1 (CH)	6,85 d (8,9)	119,8 (CH)	6,78 d (8,9)
9	152,9 (C)	--	150,7 (C)	--
10	122,2 (C)	--	121,0 (C)	--
11	21,3 (CH_3)	1,46 d (6,2)	23,7 (CH_3)	1,27 d (6,3)

Legenda: J=constante de acoplamento; multi= multiplicidade m= multipleteo; t= tripleteo; d= dubleteo;

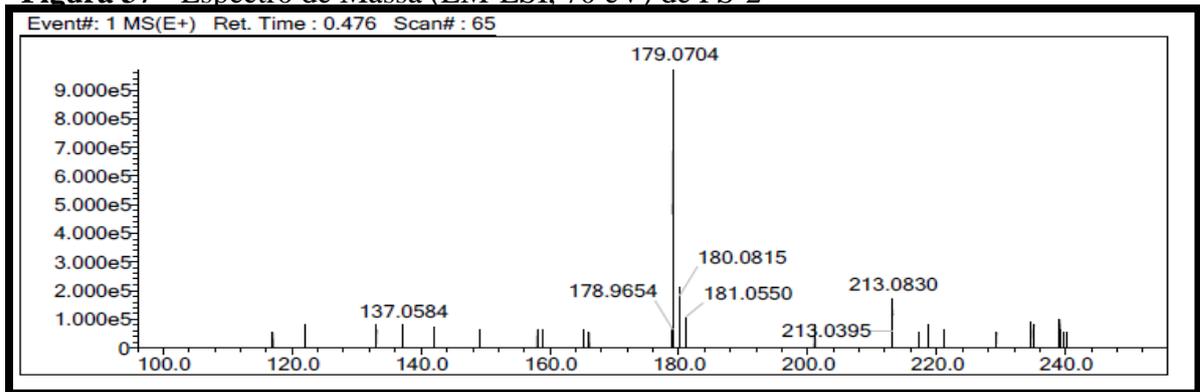
Fonte: Autor (2016).

Tabela 13- Correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C HSQC e HMBC de PS-2

Posição	PS-2 HSQC		PS-2 HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} , m e (J em Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	--	--	--	--
2	75,8	4,52 m	H-11	--
3	45,6	2,64 t (6,8; 2,0)	--	H-11
4	195,2	--	H-3 e H-5	--
5	111,4	7,16 d (3,1)	--	H-7
6	157,2	--	--	H-8
7	126,0	7,0 dd (3,1; 8,9)	--	H-5
8	120,1	6,85 d (8,9)	H-7	--
9	152,9	--	--	--
10	122,2	--	--	--
11	21,3	1,46 d (6,2)	--	--

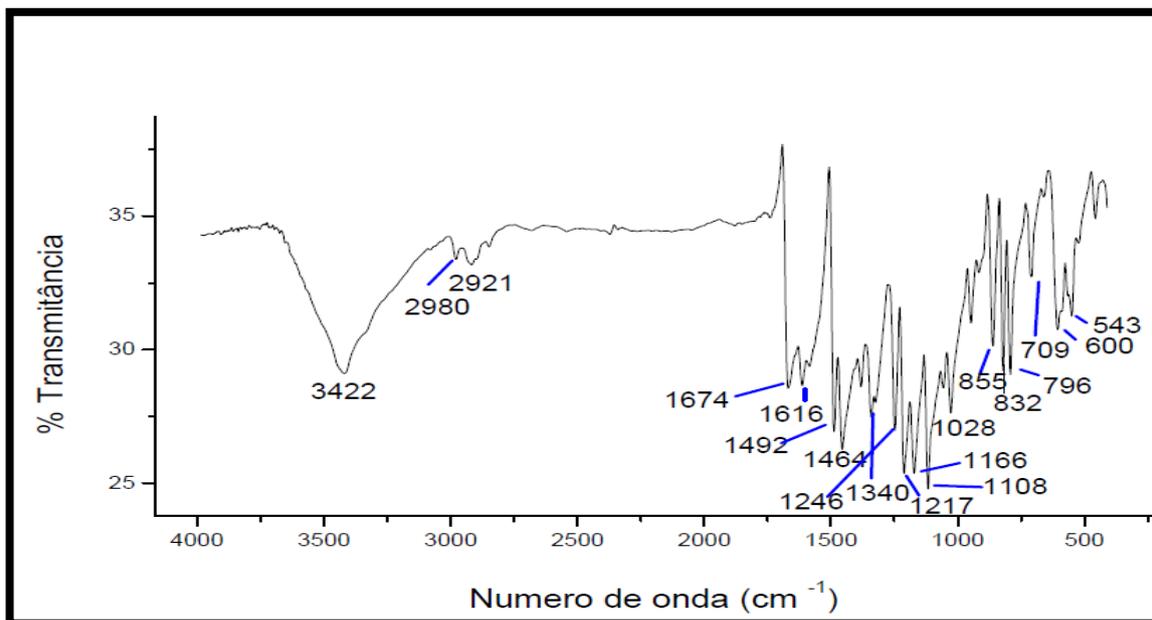
Fonte: Autor (2016).

Figura 37 - Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) de PS-2



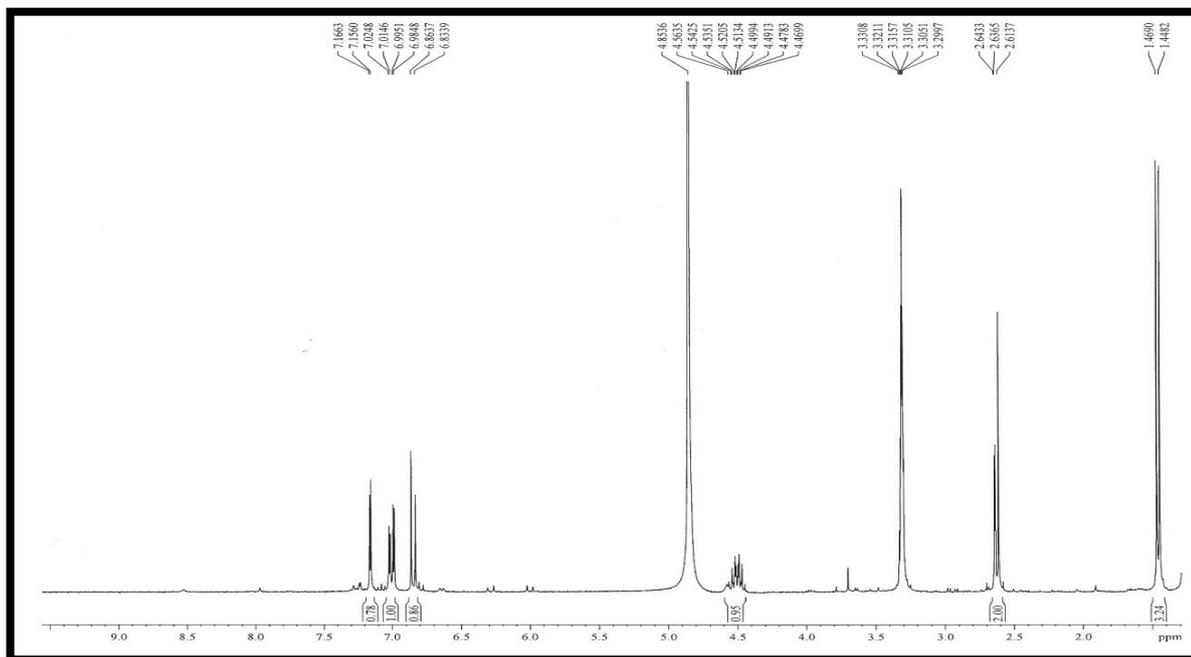
Fonte: LEMANOR-UFC (2015).

Figura 38- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-2



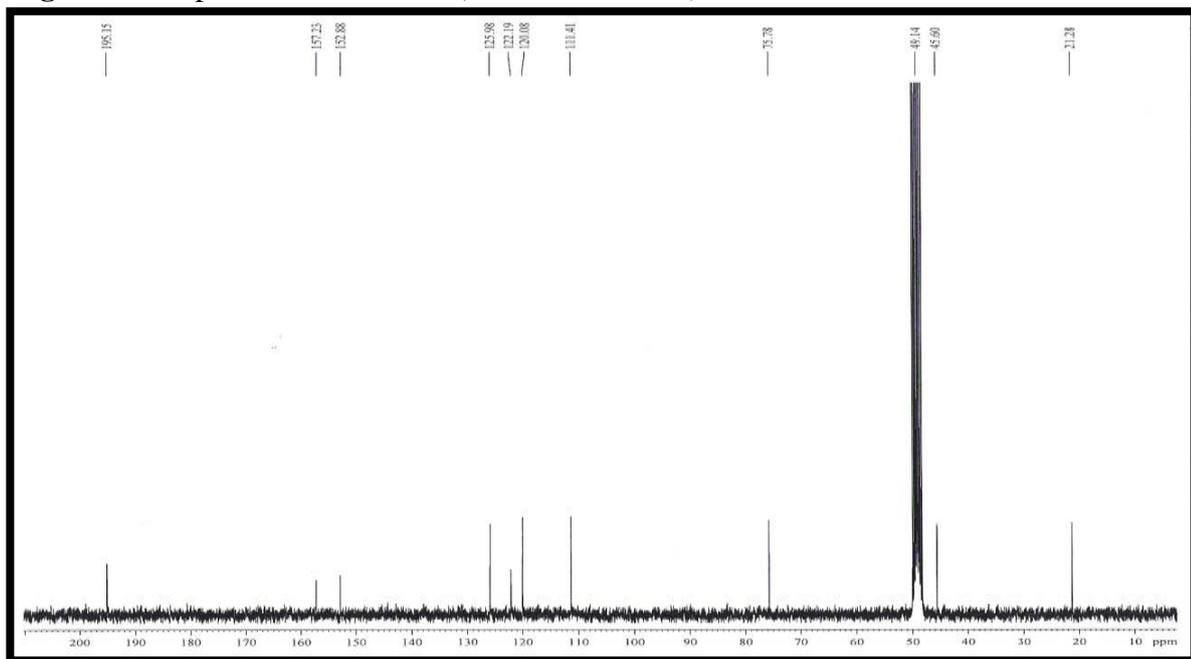
Fonte: LABIO-UFC (2015).

Figura 39- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de PS-2



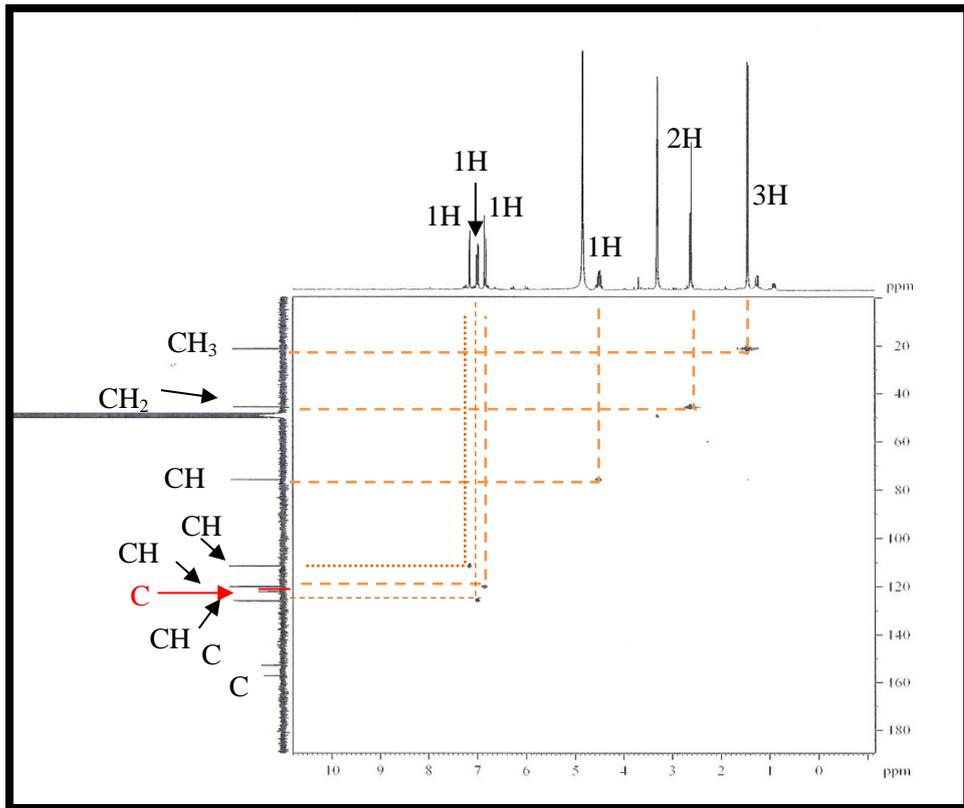
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 40- Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de PS-2



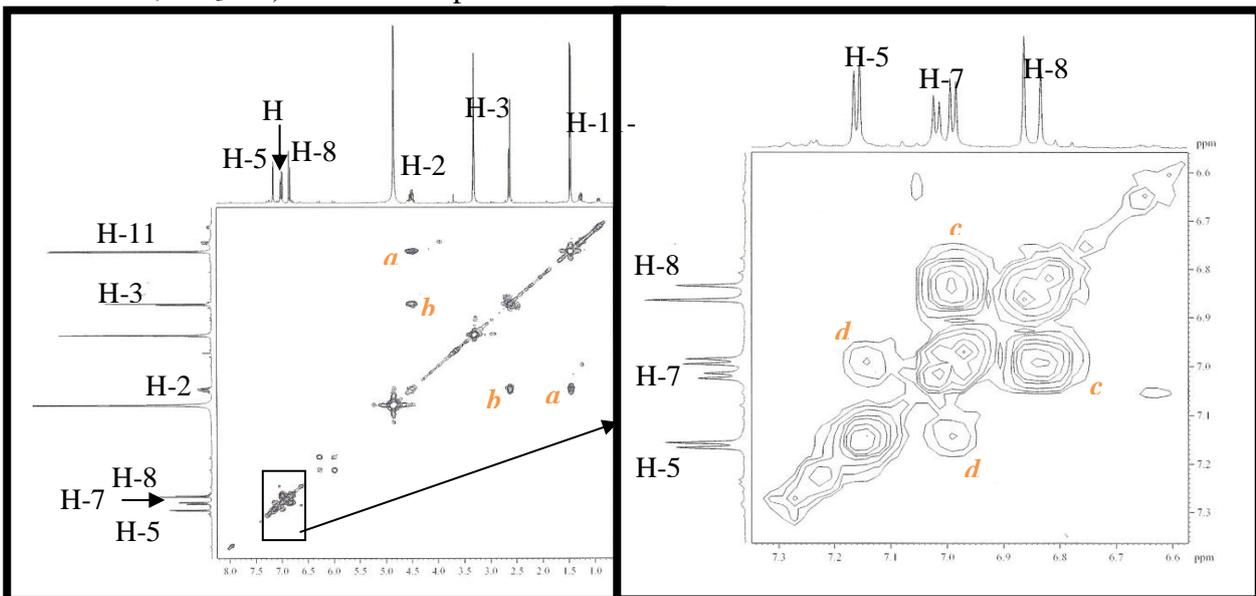
Fonte: CENAUREMN (2015).

Figura 41- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (300 x75 MHz, CD_3OD) de PS-2



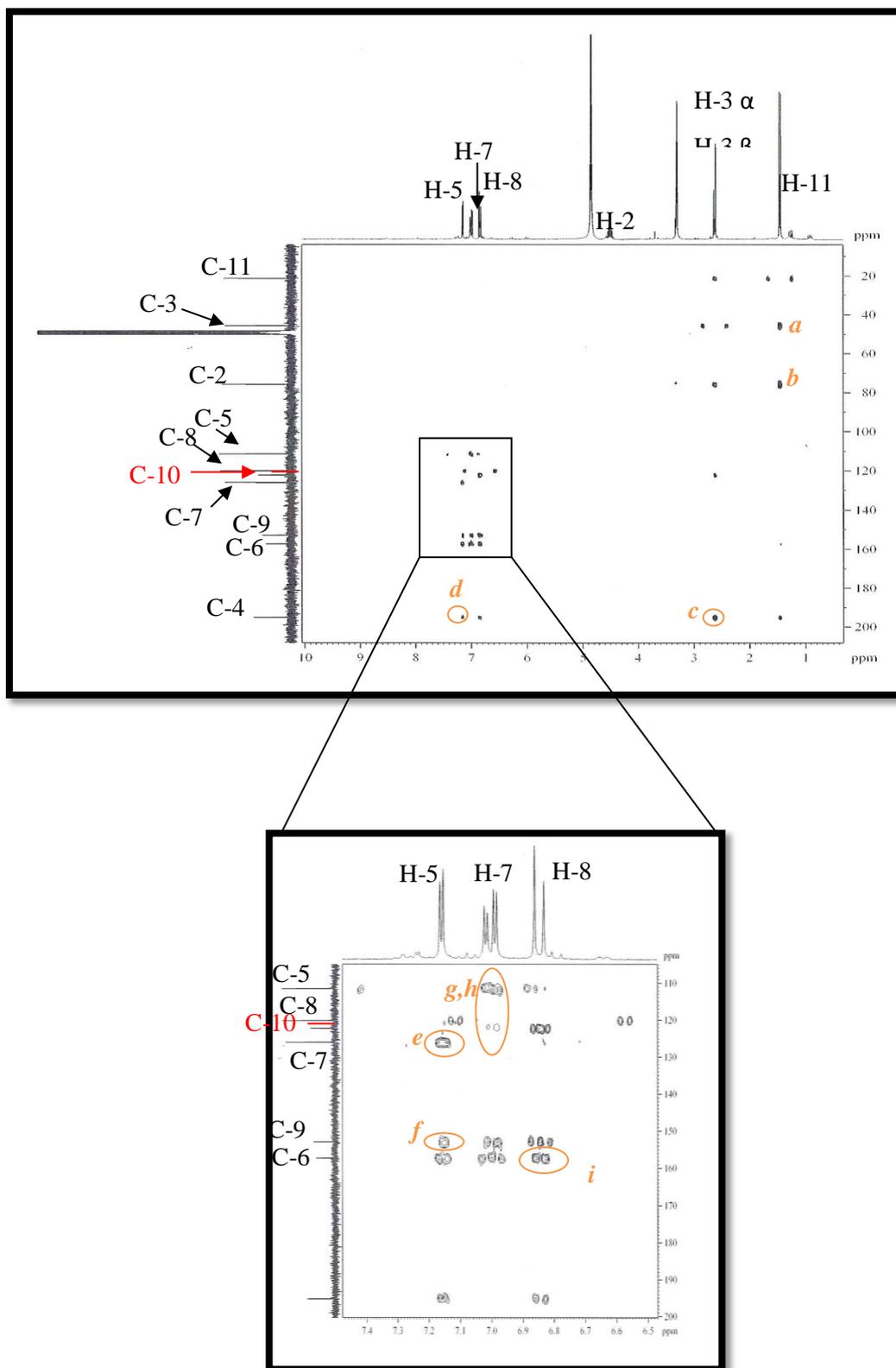
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 42- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PS-2 e expansão



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 43- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-2



Fonte: Autor (2016).

6.3 Determinação estrutural PS-3

Sucessivas cromatografias da fração obtida por meio de partição líquido-líquido e extração com diclorometano do extrato MPD, resultaram na purificação de 6,1 mg de uma resina amarela, denominada de PS-3.

O espectro de absorção na região do infravermelho de PS-3 (Fig. 49, p. 79) mostrou absorções intensas típicas de estiramento axial de ligação O-H em 3336 cm^{-1} , estiramento axial de ligação H-C assimétrico em 2976 , 2951 e 2928 cm^{-1} , além de estiramento axial de carbonila C=O conjugada de éster em 1654 cm^{-1} , e de ligação C=C em 1654 e 1603 cm^{-1} .

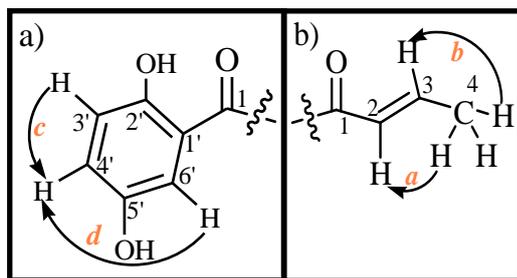
O espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-3 (Fig. 50, p. 80) mostrou-se muito semelhante aos de PS-1 e PS-2 (Figuras 28 e 39, p. 65 e 72 respectivamente), particularmente devido a presença de três absorções relativas a hidrogênios aromáticos contendo um sistema 1,2,5-trissubstituído. Além disso, observou-se a presença de um sinal em $\delta_{\text{H}} 2,03$ (3H, dd, $J = 6,4; 0,9\text{ Hz}$, H-4), além de duas absorções intensas em $\delta_{\text{H}} 7,11$ (1H, dd, $J = 15,0; 0,9\text{ Hz}$, H-2) e $\delta_{\text{H}} 7,17$ (1H, dqua, $J = 15,0; 6,4\text{ Hz}$, H-3) sugerindo a presença de hidrogênios olefínicos em uma ligação dupla com estereoquímica *trans*.

Os espectros RMN ^{13}C – CPD (125 MHz, CD_3OD) e de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC (300x75 MHz, $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$) (Fig. 51e 52, p. 80 e 81 respectivamente) permitiram atribuir o padrão de hidrogenação a 10 linhas espectrais, distribuídas em 1 carbono metílico, 5 carbonos metínicos e 4 carbonos não-hidrogenados. Os carbonos metínicos sp^2 em $\delta_{\text{C}} 119,8$ (C-3'), em $\delta_{\text{C}} 125,9$ (C-4') e em $\delta_{\text{C}} 115,7$ (C-6') foram correlacionados ao sistema aromático, enquanto que os carbonos em $\delta_{\text{C}} 127,0$ (C-2) e em $\delta_{\text{C}} 147,2$ (C-3) foram atribuídos a dupla olefínica dissubstituída. Em adição, foram observados os carbonos não-hidrogenados oxigenados em $\delta_{\text{C}} 157,8$ (C-2') e $\delta_{\text{C}} 150,8$ (C-5') e uma absorção típica de carbono carbonílico em $\delta_{\text{C}} 195,5$ (C-1) (Tabela 14, p.78)

O espectro de massa de baixa resolução (Fig. 48, p. 79) revelou um pico íon molecular com m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$ igual a 178, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6.

A análise do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H , (COSY, Fig. 53, p. 82) revelou os acoplamentos vicinais entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 7,17$ (H-3') e em $\delta_{\text{H}} 7,27$ (H-6') com o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 2,03$ (H-4') (Fig. 44a, p. 77), além dos acoplamentos vicinais entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 2,03$ (H-4) com os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 7,11$ (H-2) e em $\delta_{\text{H}} 7,17$ (H-3) (Fig. 44b, p. 76).

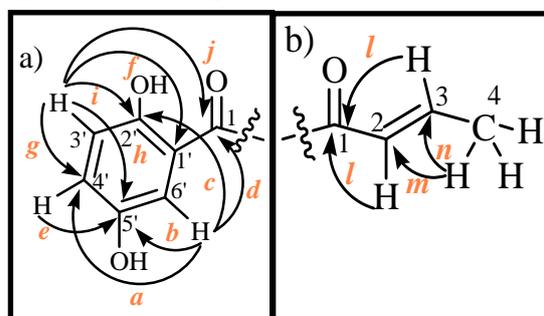
Figura 44- Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H COSY da substância PS-3



Fonte: Autor (2016).

A análise do espectro de correlação heteronuclear a longa distância- HMBC (Fig. 54, p. 82) permitiu a visualização de acoplamentos a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ_{H} 6,80 (H-3') com os carbonos em δ_{C} 125,9 (C-4') e em δ_{C} 157,8 (C-2'), e dos hidrogênios em δ_{H} 7,01 (H-4') e em δ_{H} 7,27 (H-6') com o carbono em δ_{C} 150,8 (C-5'). Foi possível também visualizar acoplamentos ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio em δ_{H} 6,80 (H-3') com os carbonos em δ_{C} 150,8 (C-5') e em δ_{C} 120,8 (C-1'), e do hidrogênio em δ_{H} 7,27 (H-6') com os carbonos em δ_{C} 125,9 (C-4'), em δ_{C} 157,8 (C-2') e em δ_{C} 195,4 (C-1), também foi visualizado acoplamento ($^4J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ_{H} 6,80 (H-3') com o carbono em δ_{C} 195,4 (C-1) como mostrado na subestrutura a (Fig. 45a, abaixo). Por outro lado, na subestrutura b (Fig. 45b, abaixo), são mostrados acoplamentos ($^2J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ_{H} 7,11 (H-2) com o carbono em δ_{C} 195,4 (C-1) e dos hidrogênios do grupo metílico com o carbono em δ_{C} 147,2 (C-3). Além disso, foi possível visualizar acoplamentos entre os hidrogênios do grupo metílico em 2,03 (3H-4) com o carbono em δ_{C} 127,0 (C-2), e do hidrogênio em 7,17 (H-3) com o carbono em δ_{C} 195,4 (C-1) (Tabela 15, p.78)

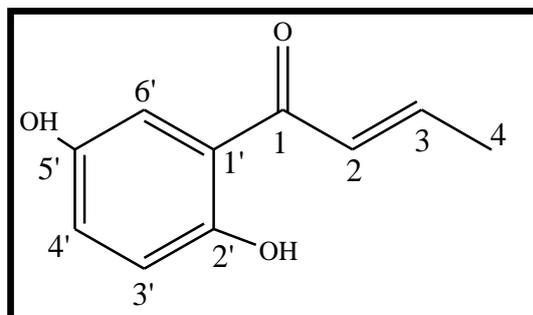
Figura 45- Representação das correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HMBC na molécula PS-3



Fonte: Autor (2016).

A análise dos dados apresentados permitiu afirmar que PS-3 trata-se da *E*, 1-(2,5 diidroxifenil) but-2-en-1-ona (Fig. 46, abaixo), com caráter inédito no gênero *Periconia* e cujos dados RMN de ^{13}C estão sendo reportados pela primeira vez.

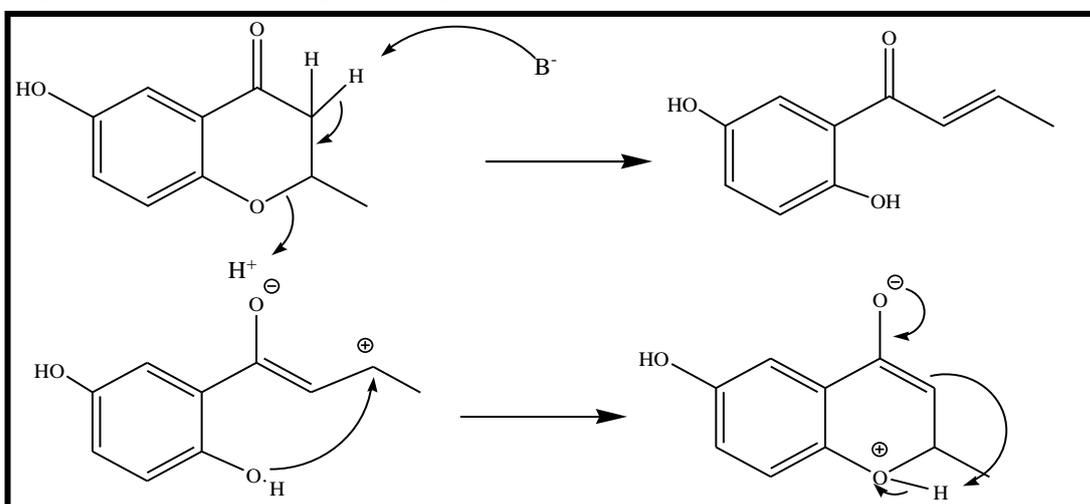
Figura 46- Estrutura da substância isolada como PS-3



Fonte: Autor (2016).

A estrutura desse composto sugere que o mesmo pode ser um derivado da PS-1 e/ou PS-2, gerado a partir do mecanismo proposto na Figura 47, abaixo. Existe também a possibilidade de PS-3 ser um precursor de PS-1 e/ou PS-2 através de uma reação de ciclização.

Figura 47- Mecanismo proposto para obtenção de PS-3



Fonte: Autor (2016).

Este composto foi isolado do fungo endofítico *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18 e apresentou significativa atividade antimicrobiana contra os fungos *Microsporium gypseum* SH-MU-4 (8, 32 $\mu\text{g/mL}$), *Candida albicans* e *C. neoformans* (32 $\mu\text{g/mL}$), alto potencial de eliminação de radicais com IC_{50} de 0, 018 $\mu\text{g/mL}$ e moderada atividade antimalárica com IC_{50} de 9, 63 $\mu\text{g/mL}$ (SOMMART *et al.*, 2012).

Tabela 14- Dados de ^1H e ^{13}C de PS-3

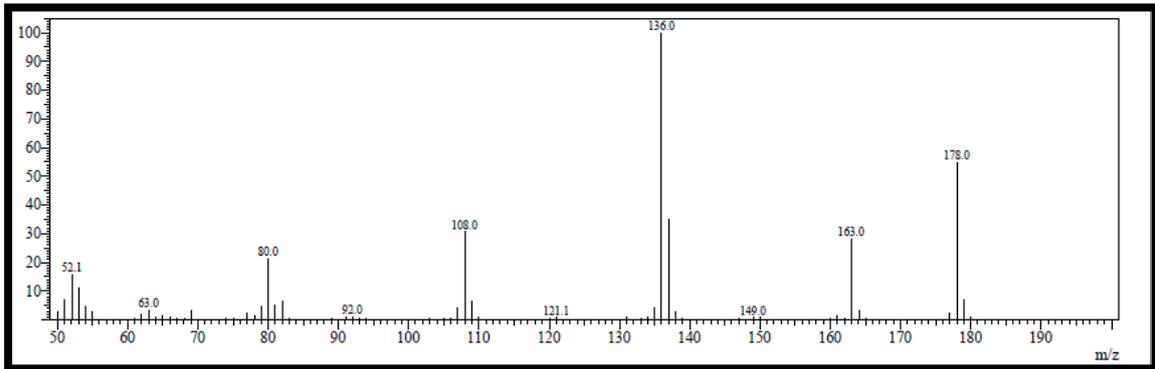
PS-3(CD ₃ OD, 500 MHz)		
Posi- Cão	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)
1	195,4 (C)	--
2	127,0 (CH)	7,11dd (15,0; 0,9)
3	147,2 (CH)	7,17 dqua (15,0; 6,4)
4	18,8 (CH ₃)	2,03 dd (6,4; 0,9)
1'	120,8 (C)	--
2'	157,8 (C)	--
3'	119,8 (CH)	6,80 d (8,9)
4'	125,9 (CH)	7,01 dd (8,9; 2,9)
5'	150,8 (C)	--
6'	115,7 (CH)	7,27 d (2,9)

Legenda: mult.=multiplicidade; d=dubleto; qua=quarteto; J= constante de acoplamento

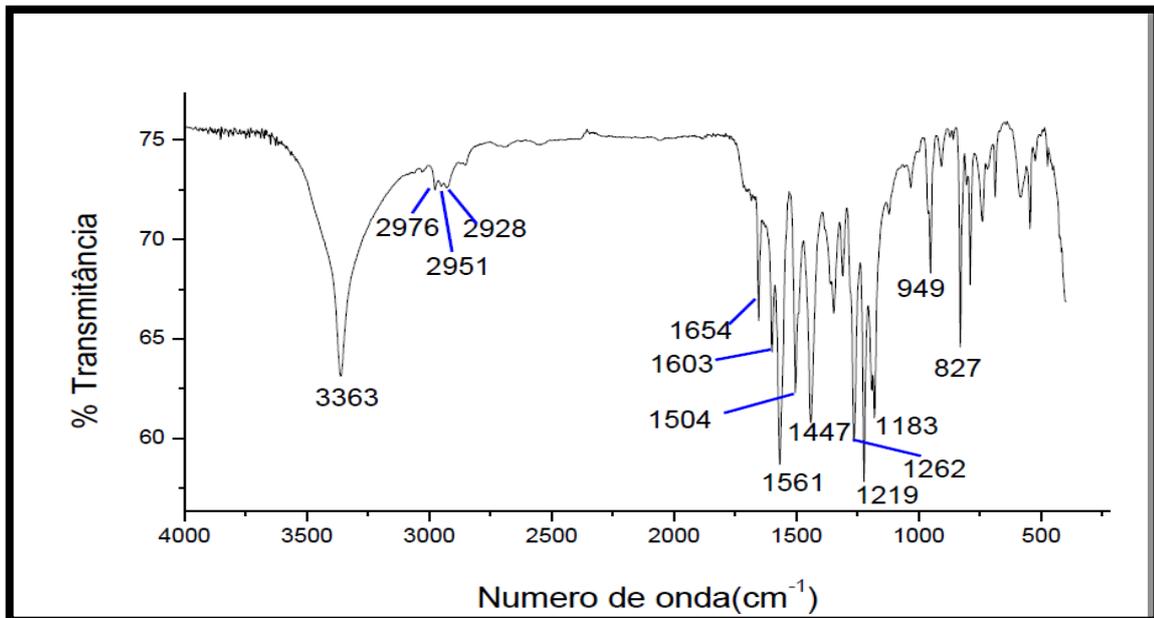
Tabela 15 - Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-9 [300 x 75 MHz, (CD₃)₂CO]

Posição	δC	δH , mult. e (J em Hz)	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$	$^4\text{J CH}$
1	195,4	--	H-2	H-3, H-6'	H-3', H-4
2	127,0	7,11dd (15,0; 0,9)	--	H-4	--
3	147,2	7,17 dqua (15,0; 6,4)	H-4	--	--
4	18,8	2,03 dd (6,4; 0,9)	--	--	--
1'	120,8	--	--	H-3'	--
2'	157,8	--	H-3'	H-6', H-4'	--
3'	119,8	6,80 d (8,9)	--	--	--
4'	125,9	7,01 dd (8,9; 2,9)	H-3'	H-6'	--
5'	150,8	--	H-6', H-4'	H-3'	--
6'	115,7	7,27 d (2,9)	--	--	--

Legenda: mult.=multiplicidade; d=dubleto; qua=quarteto; J= constante de acoplamento

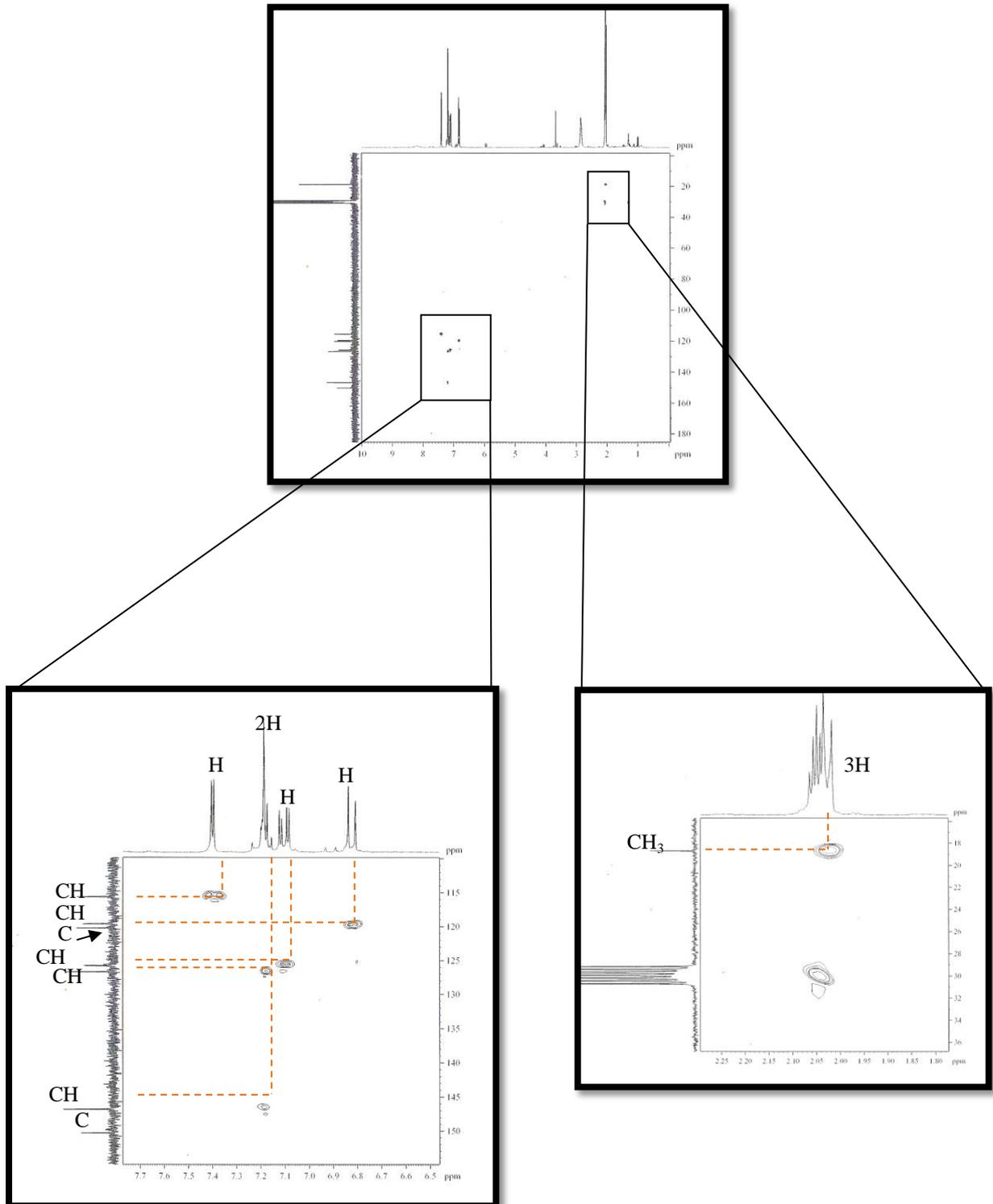
Figura 48 - Espectro de massa de PS-3 obtido em CG/EM

Fonte: Central analítica- UFC (2015).

Figura 49 – Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-3

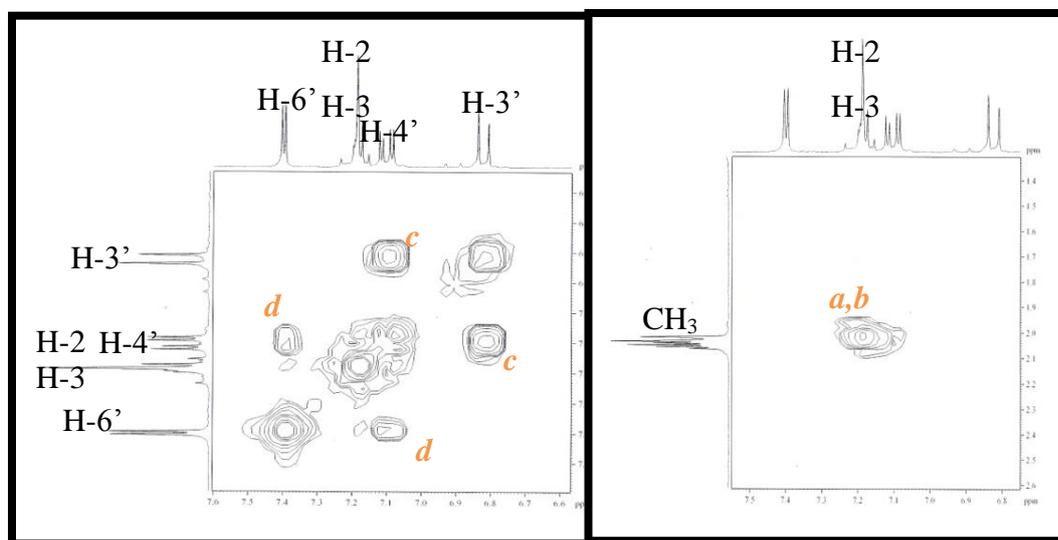
Fonte: LABIO-UFC (2015).

Figura 52- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC e expansões [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-3



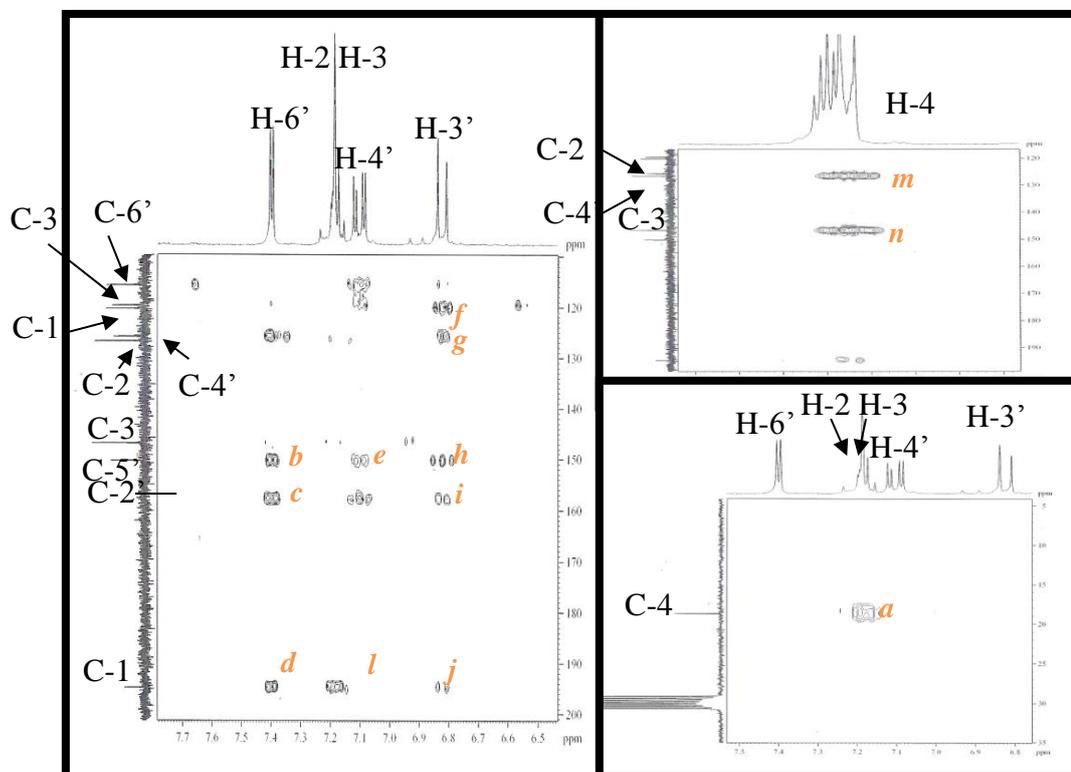
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 53 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-3



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 54- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-3



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

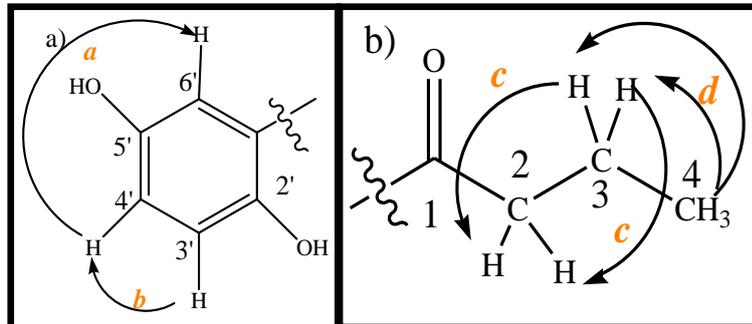
6.4 Determinação estrutural de PS-4

Sucessivas cromatografias do extrato MPD 28 dias levaram ao isolamento de 1,8 mg de um composto resinoso transparente denominado de PS-4.

O espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-4 (Fig. 58, p. 85) mostrou-se muito semelhante ao de PS-3 (Fig. 50, p. 80), através da presença dos sinais em δ_{H} 6,79 (1H, d, $J=2,9$ Hz, H-3'), δ_{H} 6,99 (1H, dd, $J=8,9; 2,9$ Hz, H-4') e 7,25 (1H, d, $J=8,9$ Hz, H-6') relativas ao sistema aromático 1,2,5-trissubstituído. Em adição, foi possível notar a existência de absorções relativas a um grupo metila em δ_{H} 1,01 (3H, t, $J=7,4$ Hz, H-4), e dois grupos metilênicos em δ_{H} 2,97 (2H, t, $J=7,3$ Hz, H-2) e em δ_{H} 1,75 (1H, sexteto, $J=7,4$ Hz, H-3), sugerindo a ausência da dupla ligação C-2/C-3 em PS-3 (Tabela 16, p. 84).

O espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - COSY de PS-4 (Fig.56, p.) mostrou acoplamentos vicinais entre os hidrogenios em δ_{H} 6,99 (H-4') com hidrogênios em δ_{H} 6,79 (H-3') e em δ_{H} 7,25 (H-6'), além dos acoplamentos dos hidrogênios em δ_{H} 1,75 (2H-2) com os hidrogênios em δ_{H} 2,97 (2H-3) e em δ_{H} 1,01 (3H-4), como mostrado abaixo (Fig. 55).

Figura 55- Correlações homonucleares de PS-4

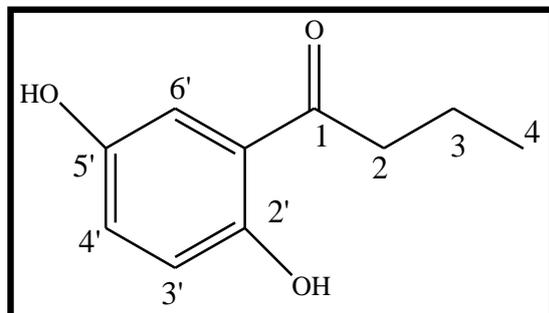


Fonte: Autor (2016).

O espectro de massa de PS-4 apresentou íon molecular de baixa resolução (Fig. 57, p. 85) revelou um pico íon molecular com m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$ igual a 180, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a 5.

Com base na análise dos dados anteriormente mencionados, foi possível afirmar que PS-4 trata-se da 1(2', 5' diidroxifenil)-butan-1-ona (Fig. 56, p. 84), que está sendo relatada pela primeira vez como produto natural. Relatos anteriores mencionam este composto com um intermediário reacional, tendo sido inativa quando testada contra cepas de *Leishmania tropica* e *L. infantum* (HERMOSO *et al.*, 2003).

Figura 56- Estrutura da substância denominada PS-4



Fonte: Autor (2016).

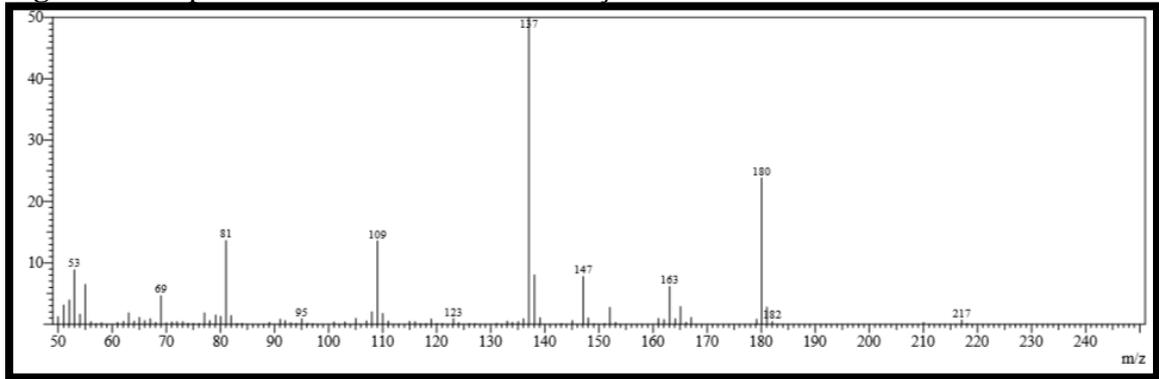
Tabela 16 -Comparação dos dados ^1H de PS-4 com os da literatura

Posi- Cão	Padrão de hidrogenação dos carbonos	PS-4 (CD_3OD , 500 MHz) δH , mult. e (J em Hz)	1-(2', 5'diidroxifenil)- butan-1-ona (CDCl_3 , 400 MHz) ¹ δH , mult. e (J em Hz)
1	C	--	--
2	CH_2	2,97 t (2H, J= 7,3)	2,5 m (2H)
3	CH_2	1,75 sex (1H, J=7,4)	1,8 m (2H)
4	CH_3	1,01 t (3H, J=7,4)	1,1 (3H, J=5,5)
1'		--	--
2'		--	--
3'	CH	6,79 d (1H, 2,9)	6,8 m (1H)
4'	CH	6,99 dd (1H, J=8,9; 2,9)	6,9 m (1H)
5'		--	--
6'	CH	7,25 d (1H, J= 8,9)	7,1 s (1H)

Legenda: mult.=multiplicidade; d=dublete; qua=quarteto; J= constante de acoplamento.

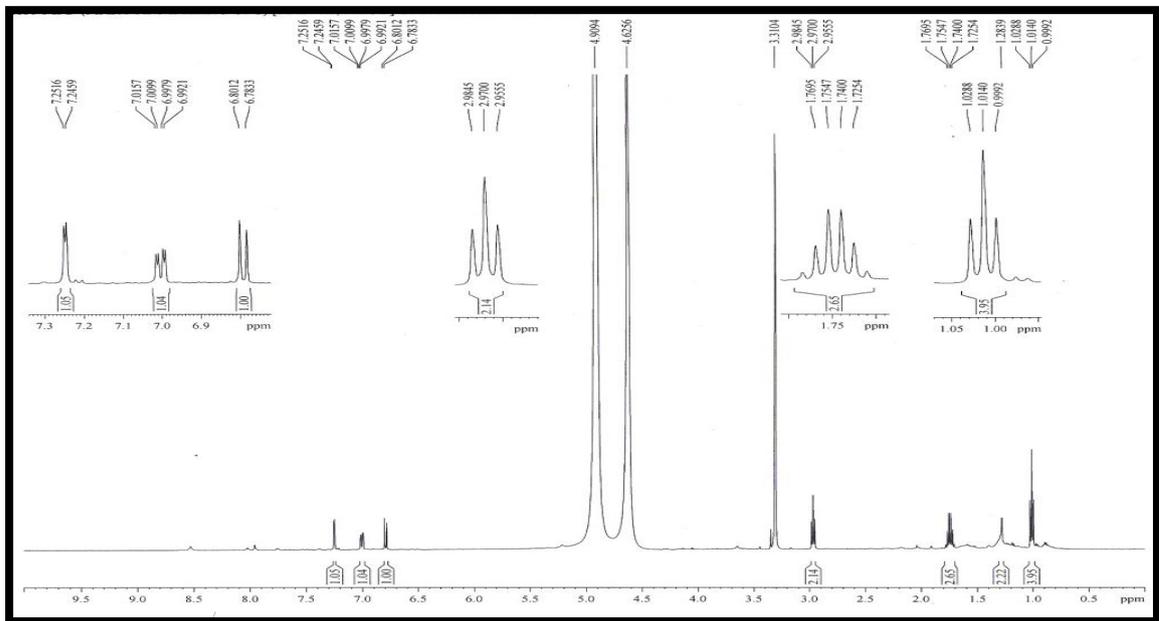
Fonte: ¹Naeimi, Amini e Moradian (2016).

Figura 57- Espectro de massa de baixa resolução CG/EM de PS-4



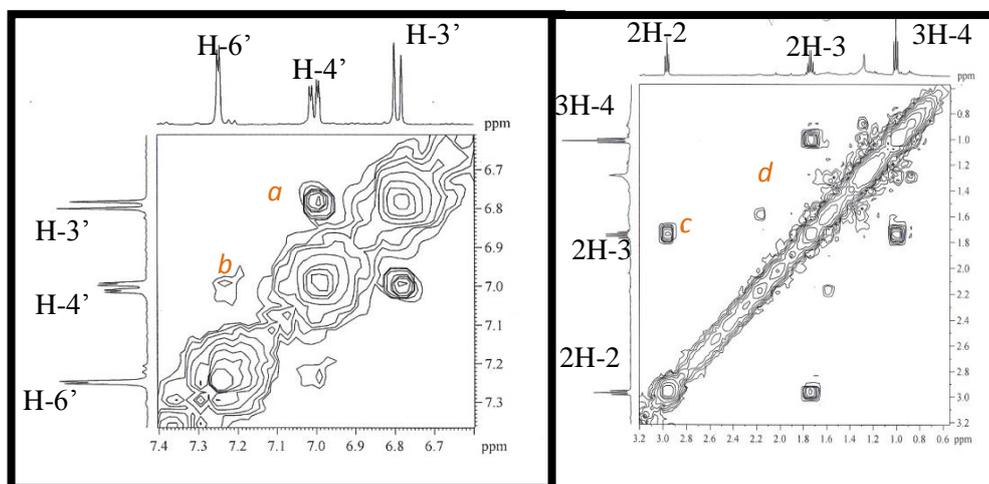
Fonte: Central analítica- UFC (2015).

Figura 58- Espectro RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de PS-4



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 59- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [500 MHz, CD_3OD] de PS-4



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

6.5 Determinação estrutural de PS-5

A fração diclorometano, obtida a partir de partição líquido-líquido do extrato bruto MPD-28 dias, seguida de fracionamento cromatográfico forneceu uma substância líquida escura (7,7 mg) denominada de PS-5.

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho apresentou bandas intensas típicas de estiramento axial das ligações O-H em 3400 cm^{-1} , estiramento de ligação C-H assimétrico em 2945 cm^{-1} , além de uma absorção em 1700 cm^{-1} referente ao estiramento axial de ligação C=O, e outra em 1647 cm^{-1} relacionada a estiramento axial de ligação C=C (Fig. 64, p. 90).

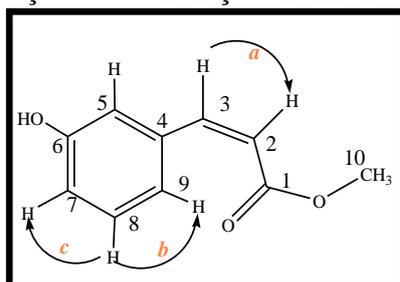
A análise do espectro RMN ^1H [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] revelou um singlete intenso referente a um grupo metoxila em $\delta_{\text{H}} 3,68$ (3H, H-10)(Fig. 65, p. 91), além de duas absorções em $\delta_{\text{H}} 5,94$ (1H, d, $J=12,8$ Hz, H-2) e $\delta_{\text{H}} 6,91$ (1H, d, $J=12,8$ Hz, H-3) atribuídas a hidrogênios olefínicos em uma dupla ligação dissubstituída com estereoquímica *cis*. As demais absorções em $\delta_{\text{H}} 7,22$ (1H, t, $J=1,6$, H-5), $\delta_{\text{H}} 6,84$ (1H, dt, $J=7,2; 1,6$ Hz, H-7), $\delta_{\text{H}} 7,18$ (1H, t, $J=7,9$ Hz, H-8), e $\delta_{\text{H}} 7,07$ (1H, d, $J=7,9$ Hz, H-9), foram relacionadas a presença de um sistema aromático 1,3-dissubstituído.

Através de análise no espectro RMN ^{13}C – CPD (75 MHz, CD_3OD), DEPT 135° e do espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (Figuras 66-68, p. 91-93), foi possível observar a presença de 10 linhas espectrais relacionadas a 1 carbono metílico, 3 carbonos não-hidrogenados e 6 carbonos metínicos (Tabela 17, p. 89). Neste espectro foi possível a observação do sinal relacionado a metoxila em $\delta_{\text{C}} 51,6$ (C-10), além da carbonila em $\delta_{\text{C}} 167,2$ (C-1), e de um carbono insaturado oxigenado em $\delta_{\text{C}} 159,0$ (C-6). Além disso, a existência de 6 carbonos metínicos insaturados com $\delta_{\text{C}} 143,1$ (C-3), $120,1$ (C-2), $117,7$ (C-5), $122,4$ (C-9), $130,0$ (C-8) e $117,3$ (C-7), corroboram a existência de um anel aromático 1,3-dissubstituído e da dupla ligação.

A análise do espectro de massa de PS-5 (Fig. 63, p. 90) mostrou um íon molecular com m/z igual a $179,0696$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $179,0703$; erro= $3,91$ ppm), equivalente a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6.

A análise do espectro RMN de correlação homonuclear ^1H , ^1H COSY (Fig. 69, p. 94) possibilitou a visualização de acoplamentos vicinais do hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,18$ (H-8) com os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 6,84$ (H-7) e em $\delta_{\text{H}} 7,07$ (H-9), bem como dos hidrogênios olefínicos em $\delta_{\text{H}} 6,91$ (H-3) e $\delta_{\text{H}} 5,94$ (H-2)(Fig. 60, a seguir).

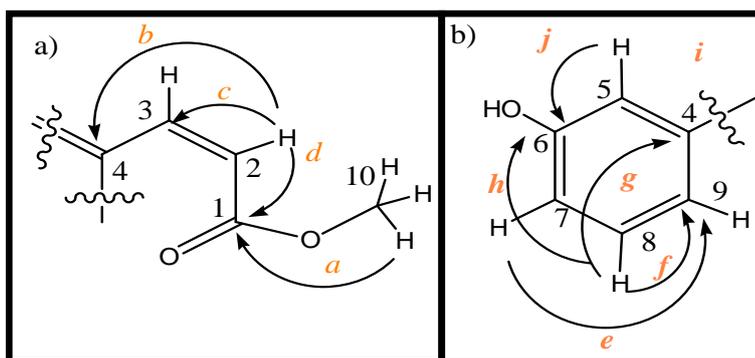
Figura 60- Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H (COSY) de PS-5



Fonte: Autor (2016).

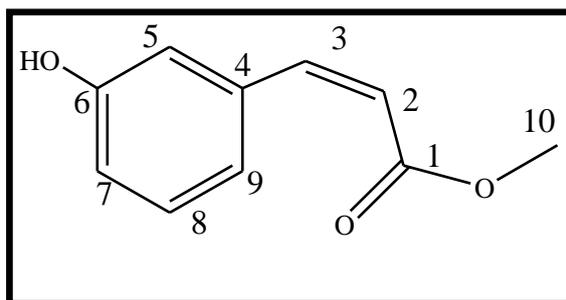
O espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HBMC (Fig. 70, p. 95) mostrou acoplamentos a duas ligações $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 3,68 (H-10) com o carbono em δ_{C} 167,2 (C-1), e do hidrogênio em δ_{H} 5,94 (H-2) com o carbono em δ_{C} 137,3 (C-4). Além disso, foi possível visualizar acoplamentos $^2J_{\text{H}}$ do hidrogênio em δ_{H} 5,94 (H-2) com os carbonos em δ_{C} 167,2 (C-1) e δ_{C} 137,3 (C-4), como mostrado na subestrutura a (Fig. 61a, abaixo). Ademais, foi possível visualizar $^2J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 7,22 (H-5) com o carbono em δ_{C} 158,0 (C-6), do hidrogênio em δ_{H} 7,18 (H-8) com o carbono em δ_{C} 122,4 (C-9), acoplamentos $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 7,18 (H-8) com os carbonos em δ_{C} 137,3 (C4) e em δ_{C} 158,0 (C-6), e do hidrogênio em δ_{H} 6,84 (H-7) com o carbono em δ_{C} 122,4 (C-9), como mostrado na subestrutura b (Fig. 61b, abaixo)(Tabela 18, p. 89).

Figura 61- Representação das correlações a longa distância HMBC de PS-5



Fonte: Autor (2016).

A reunião de todos os dados expostos permitiu caracterizar PS-5 como Z-3-(3-hidroxifenil) propenoato de metila (Fig. 62, p. 89). A literatura cita os dados de RMN somente para o isômero *trans*, sintetizado por Murray *et al.*, (2013), porém não existe nenhum relato do isolamento do isômero Z como produto natural.

Figura 62- Estrutura proposta para PS-5 de acordo com dados da literatura

Fonte: Autor (2016).

Tabela 17- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-5 com dados RMN da literatura do composto Z-3-(3-hidroxifenil) propenoato de metila

Posição	PS-5 [(CD ₃) ₂ CO, 300 MHz]		Metil- <i>trans</i> -3-(3-hidroxifenil) propenoato (CDCl ₃ , 400 MHz) ¹	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , m e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , m e (J em Hz)
1	167,2 (C)	--	168,1 (C)	--
2	120,1 (CH)	5,94 d (12,8)	114,6 (CH)	6,4 d (16,0)
3	143,1 (CH)	6,91 d (12,8)	145,3 (CH)	7,65 d (16,0)
4	137,3 (C)	--	135,7 (C)	--
5	117,7 (CH)	7,22 t (1,6)	117,8 (CH)	--
6	158,0 (C)	--	156,3 (C)	--
7	117,3 (CH)	6,84 dt (1,6; 7,9)	117,7(CH)	6,91 ddd (8,0; 2,5; 1,0)
8	130,0 (CH)	7,18 t (7,9)	130,1(CH)	7,21-7,27 m
9	122,4 (CH)	7,07 d (7,9)	120,7(CH)	7,02-7,09 m (2H)
10	51,6 (CH ₃)	3,68 s	52,0 (CH ₃)	3,82 s (3H)

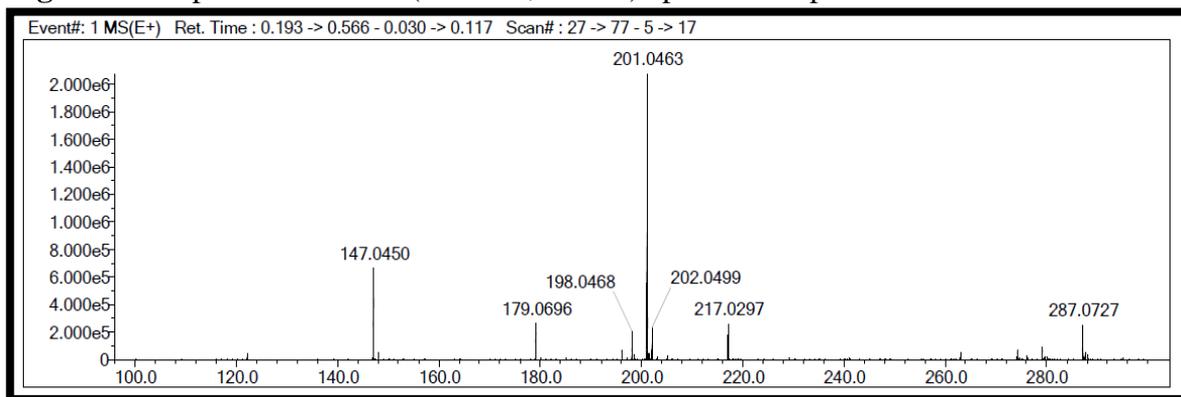
Legenda: J=constante de acoplamento; m= multiplicidade; d= dubleto; t= tripleto; s= singleto.

Fonte: ¹ Murray *et al.*, (2013).

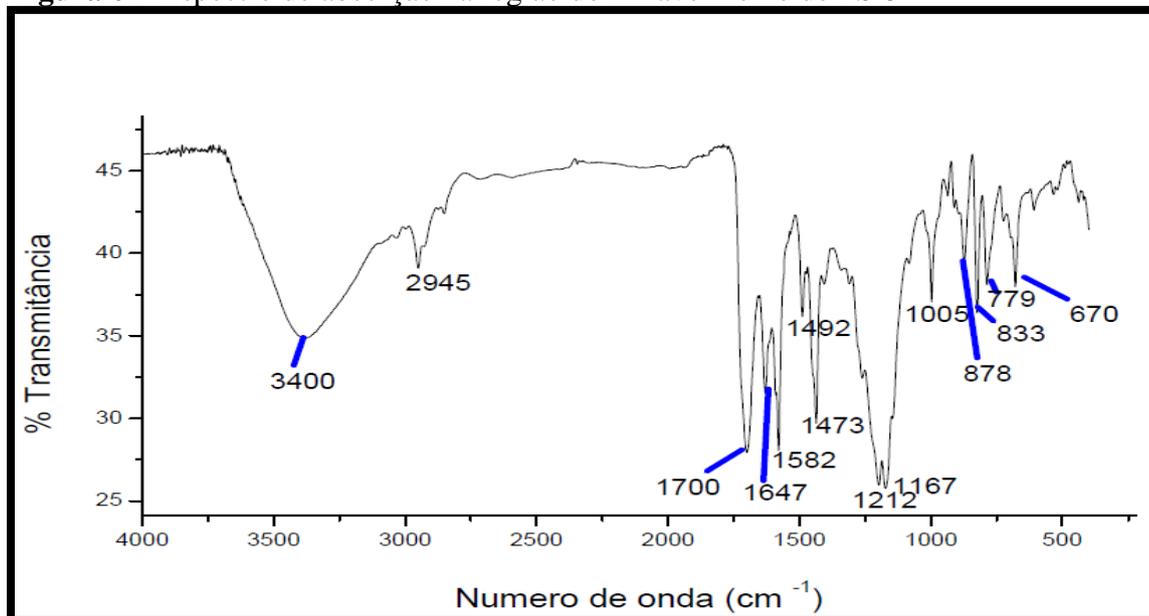
Tabela 18- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-5 [300x 75 MHz (CD₃)₂CO]

Posição	PS-5 HSQC		PS-5 HMBC	
	δC	δH , m e (J em Hz)	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$
1	167,2	--	--	H-10; H-3
2	143,1	5,94 d (12,8)	H-3	--
3	120,1	6,91 d (12,8)	--	--
4	137,3	--	H-3; H-5	H-8
5	117,2	7,22 t (1,6)	--	H-7
6	158,0	--	H-5	H-8
7	122,4	6,84 dt (1,6; 7,9)	--	--
8	130,0	7,18 t (7,9)	--	--
9	117,3	7,07 d (7,9)	H-8	--
10	51,6	3,68 s	--	--

Fonte: Autor (2016).

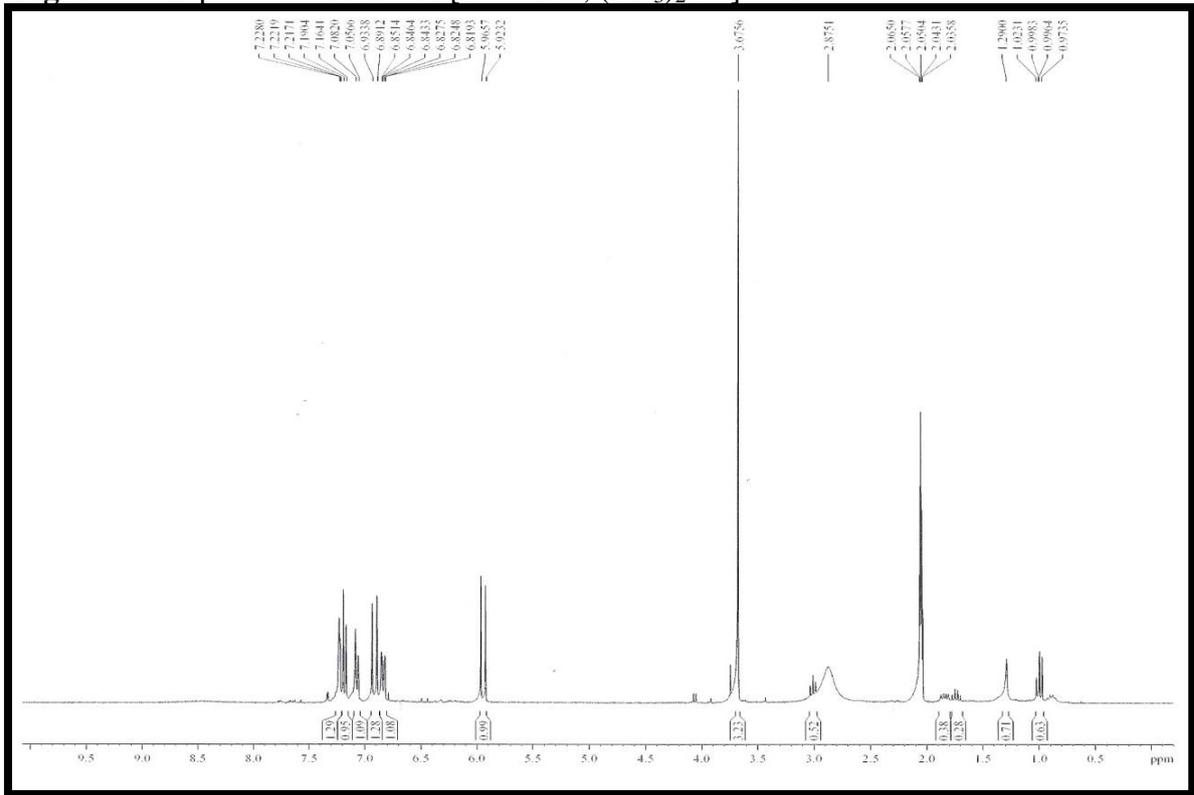
Figura 63- Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) apresentado por PS-5

Fonte: LEMANOR- UFC (2015).

Figura 64- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-5

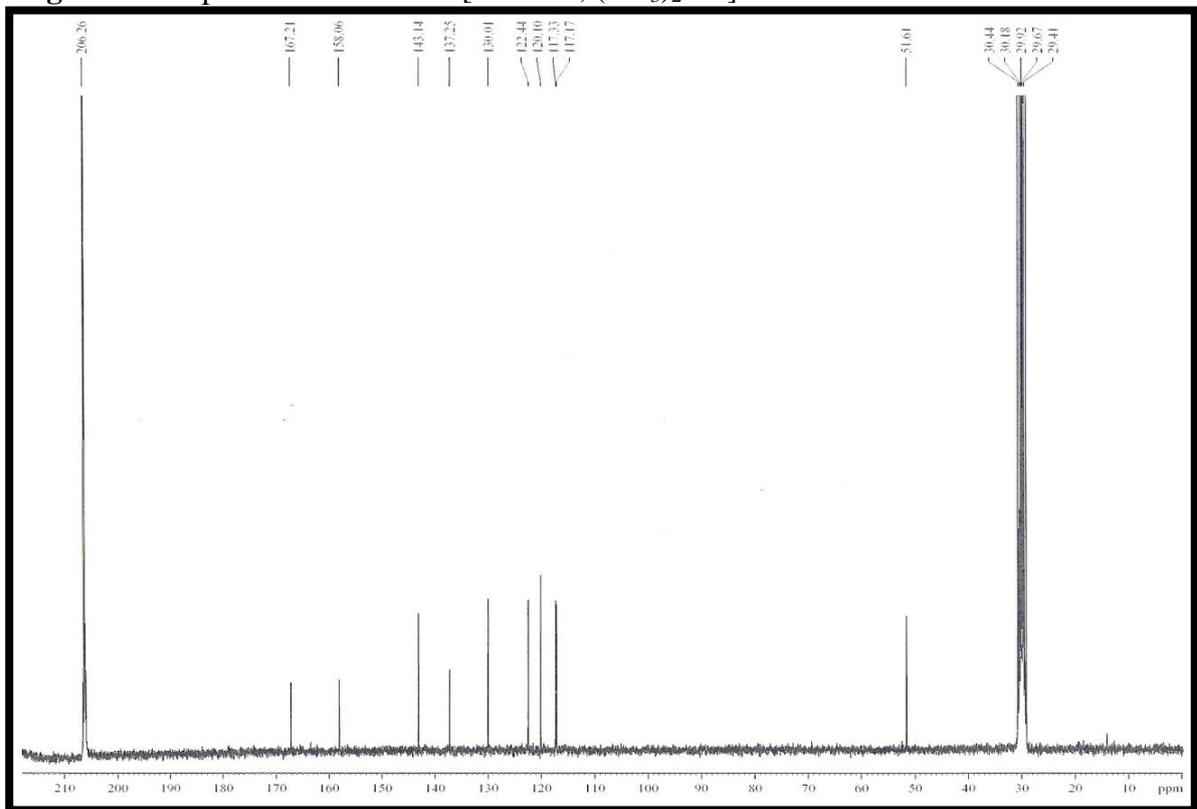
Fonte: LABIO-UFC (2015).

Figura 65- Espectro de RMN ¹H [300 MHz, (CD₃)₂CO] de PS-5



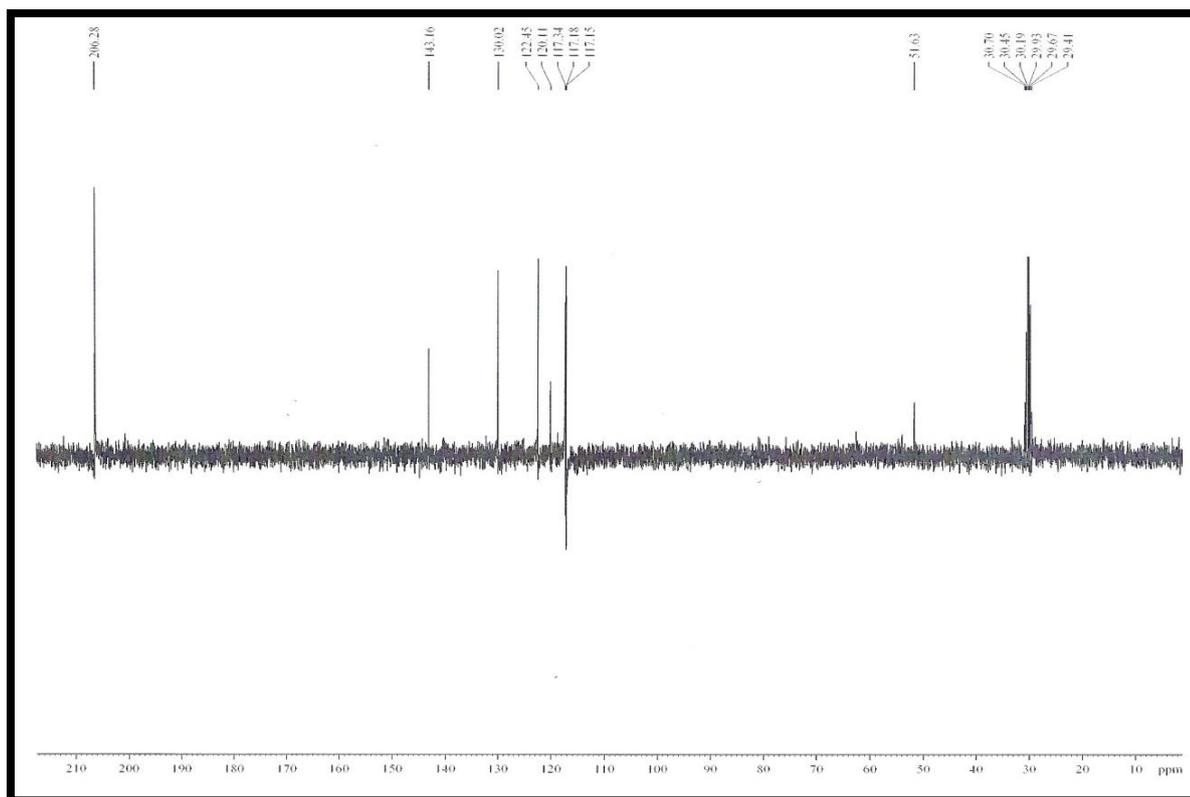
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 66- Espectro RMN de ¹³C [75 MHz, (CD₃)₂CO] de PS-5



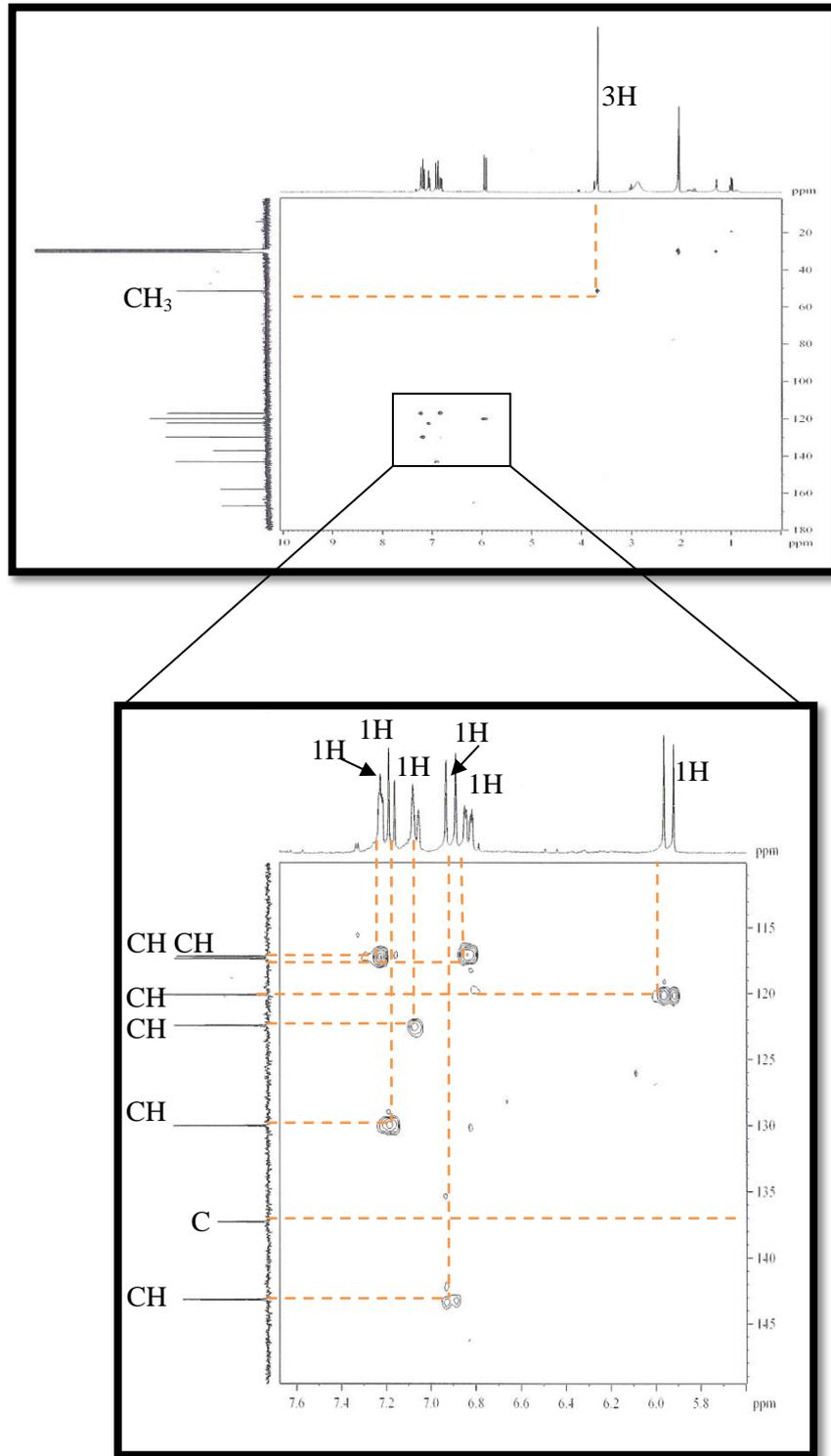
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 67- Espectro RMN de DEPT 135° [75 MHz, (CD₃)₂CO] de PS-5



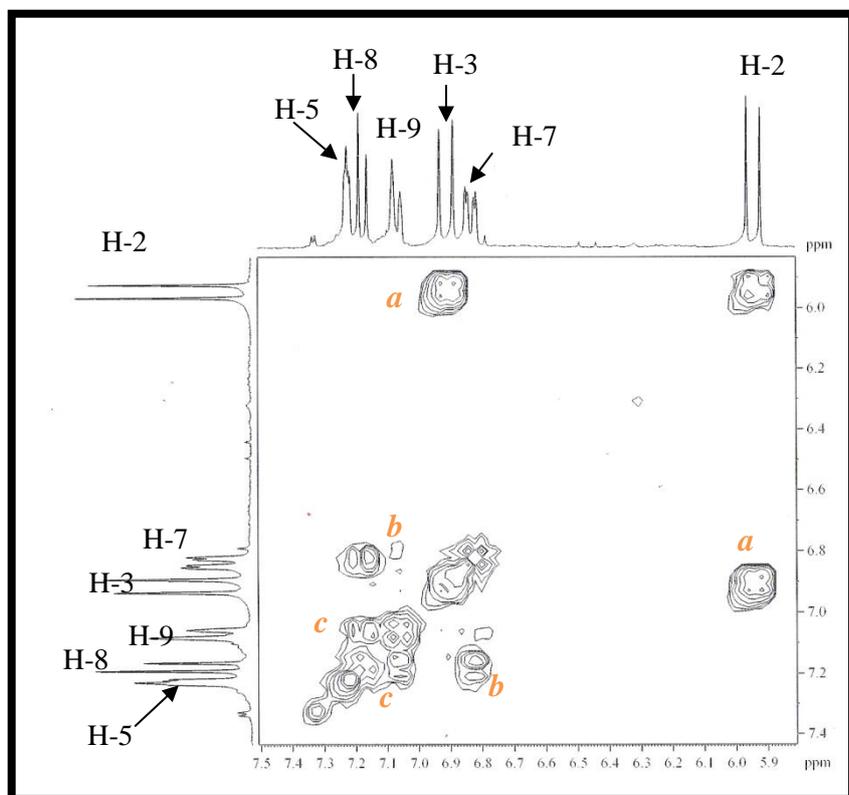
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 68- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC e expansão [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5



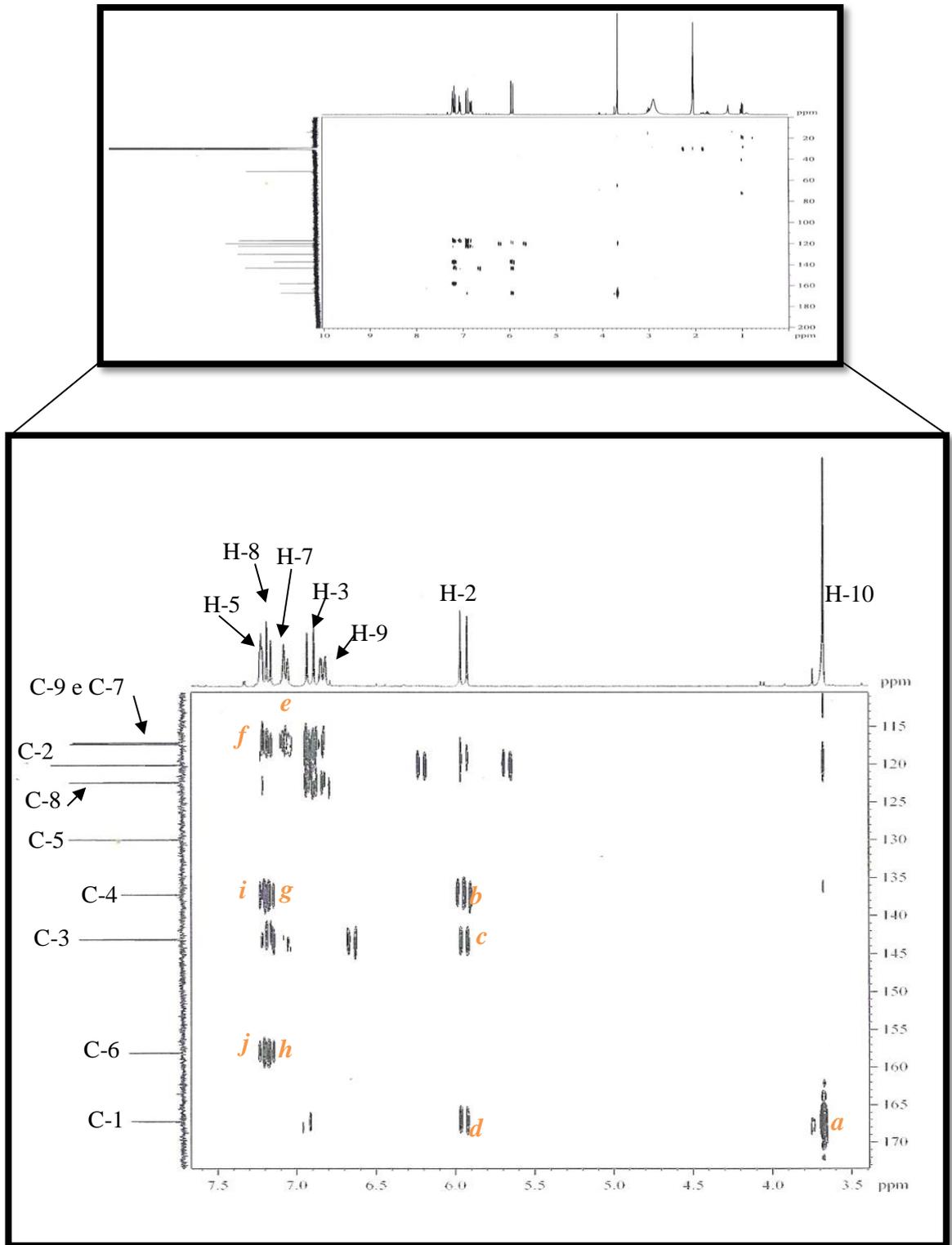
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 69- Ampliação do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 70- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-5



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

6.6 Determinação estrutural de PS-6

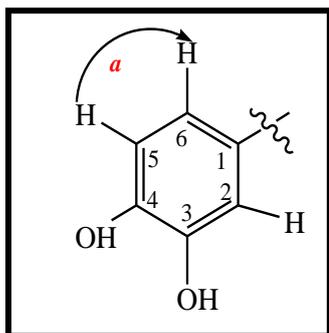
Sucessivas cromatografias da fração dicloro do extrato bruto BD-21d levou ao isolamento de um sólido marrom (3,6 mg) denominado de PS-6.

O espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-6 (Fig. 75, p. 100) mostrou semelhança com o de PS-3 (Fig. 50, p. 80), especialmente em relação a três absorções na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,77 (1H, dd, $J=8,2$ Hz, H-5), δ_{H} 7,40 (1H, dd, $J=8,2$; 1,9 Hz, H-6) e em δ_{H} 7,43 (1H, d, $J=1,9$ Hz, H-2), sugerindo a presença do sistema 1,2,5-trissubstituído.

Através de análise no espectro RMN ^{13}C – CPD (125 MHz, CD_3OD) e do espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (Figuras 76 e 77, p. 100 e 101 respectivamente), foi possível observar a presença de 7 linhas espectrais relacionadas a três carbonos não-hidrogenados em δ_{C} 151, 0 (C-4), em δ_{C} 145,9 (C-3) e em δ_{C} 125,5 (C-1), 3 carbonos metínicos em δ_{C} 123,8 (C-6), em δ_{C} 118,0 (C-2) e em 115,8 (C-5), além de um carbono carbonílico em δ_{C} 172,1 (C-1') (Tabela 19, p. 98).

A análise do espectro RMN de correlação homonuclear ^1H , ^1H COSY (Fig. 78, p. 101) possibilitou a visualização de acoplamento vicinal do hidrogênio em δ_{H} 6,77 (H-5) com o hidrogênio em δ_{H} 7,40 (H-6), como mostrado na subestrutura abaixo (Fig. 71).

Figura 71–Acoplamento homonucleares de PS-6

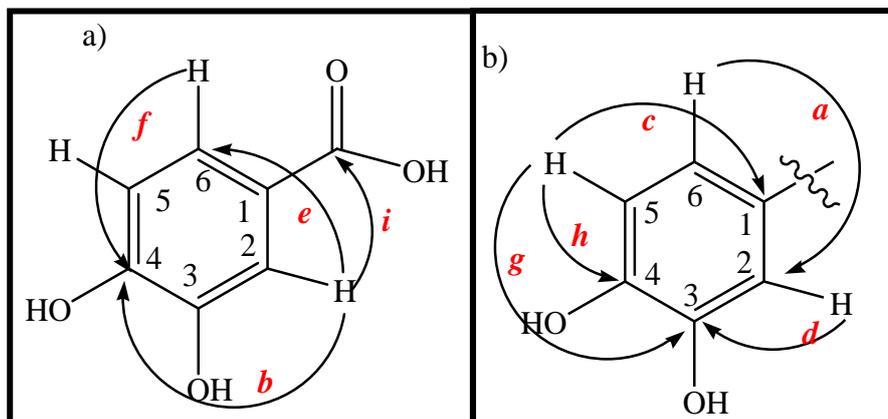


Fonte: Autor (2016).

O espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C -HBMC (Fig. 79, p. 102) mostrou acoplamentos $^3\text{J}_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 7,43 (H-2) com os carbonos em δ_{C} 172,1 (C-1'), em δ_{C} 151, 0 (C-4) e em δ_{C} 123,8 (C-6), e também do hidrogênio em δ_{H} 7,40 (H-6) com o carbono em δ_{C} 151,0 (C-4), como mostrado na subestrutura a (Fig. 72a, p. 97). Este espectro ainda mostrou correlações $^2\text{J}_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 6,77 (H-5) com o carbono em δ_{C} 151,0 (C-4) e do hidrogênio em δ_{H} 7,43 (H-2) com o carbono em δ_{C} 145,9 (C-3). Em adição,

também foram visualizados acoplamentos $^3J_{CH}$ do hidrogênio δ_H 6,77 (H-5) com os carbonos em δ_C 125,5 (C-1) e em δ_C 145,9 (C-3), e do hidrogênio em δ_H 7,40 (H-6) com o carbono em δ_C 118,0 (C-2), como mostrado na subestrutura b (Fig. 72, abaixo)(Tabela 20, p. 99).

Figura 72- Representação das correlações heteronucleares de PS-6

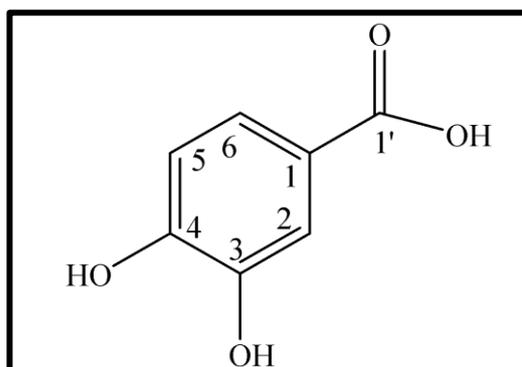


Fonte: Autor (2016).

O espectro de massa de baixa resolução (Fig. 74, p. 99) revelou um pico íon molecular com m/z sililada igual a 370, correspondente à fórmula molecular $C_7H_6O_4$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 5.

A análise dos dados apresentados permitiu confirmar que PS-6 trata-se do ácido 3,4-diidroxi-benzóico (Fig.73, p. 98), de caráter inédito no gênero *Periconia*.

Esse composto já foi isolado da planta *Trichomanes chinense* L. (*Hymenophyllaceae*) por Syafini, Putra e Arbain (2012), onde apresentou significativa atividade antimicrobiana frente a cepas de *Salmonella thypimurium* ATCC 14028 NCTCC 12023, e mostrou potencial antioxidante 1,8 vezes mais eficiente que o ácido ascórbico e igual ao ácido gálico. Em um outro estudo este composto mostrou atividade contra produtos de glicação avançada (AGEs) com valores de IC50 1, 2 vezes maior que a quercetina e 20 vezes que a aminoguanidina (FERCHINI *et al.*, 2012).

Figura 73- Estrutura química do composto isolado como PS-6

Fonte: Autor (2016).

Tabela 19- Dados de ^1H e ^{13}C de PS-6 e comparação com a literatura

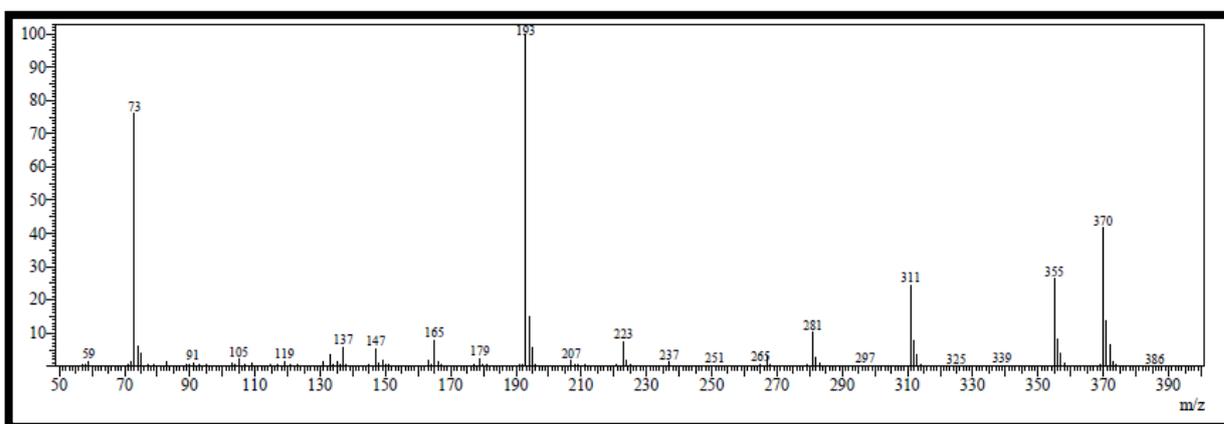
Po- Sição	PS-6 (CD_3OD , 500 MHz)		Ácido 3,4 diidroxibenzoico ¹ (DMSO, 500 MHz)		Ácido 3,4 diidroxibenzoico ² (Acetona, 25 MHz)
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. E (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)
1'	172,1 (C)	--	170,4	--	169,4
1	125,5 (C)	--	123,3	--	122,4
2	118,0 (CH)	7,43 d (1,9)	117,9	7,44 d (2,0)	117,5
3	145,9 (C)	--	146,2	--	145,3
4	151,0 (C)	--	151,6	--	150,8
5	115,8 (CH)	6,77 d (8,2)	124,0*	6,79 d (6,0)	115,9
6	123,8 (CH)	7,40 dd (8,2; 1,9)	115,9*	7,42 dd (6,0; 2,0)	124,0

Fonte:¹ Syafini, Putra e Arbain (2012); ² Scott (1972). *trocou. Legenda: d=dubleto; multi=multiplicidade.

Tabela 20 - Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-6 [500 x 125 MHz, (CD_3OD)]

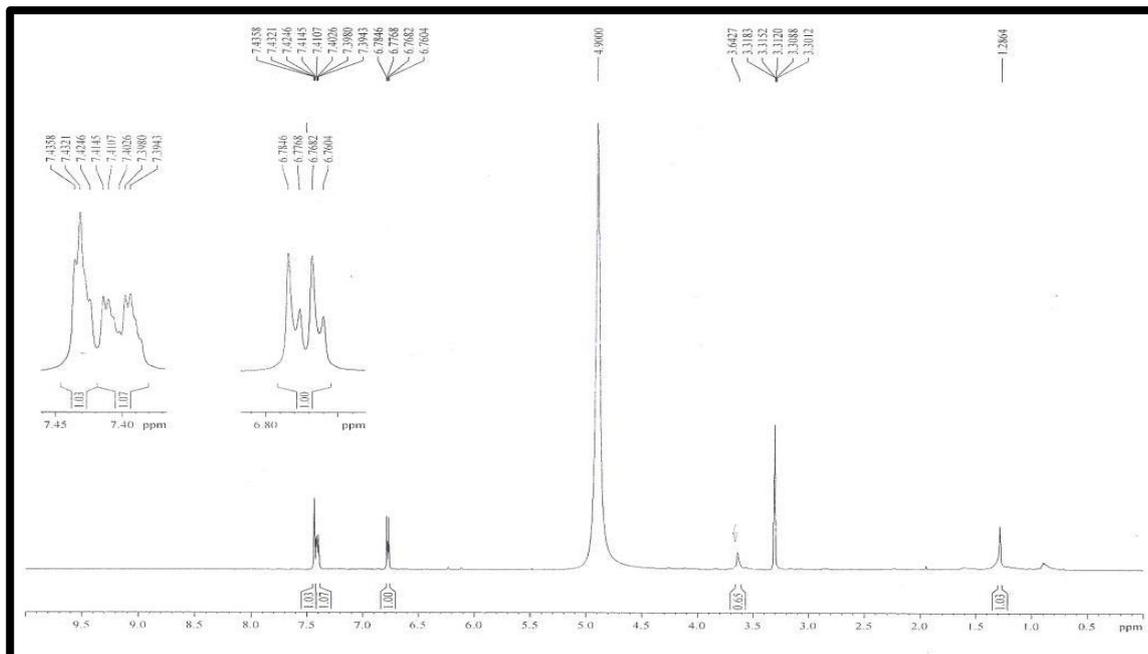
Posição	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	^2J CH	^3J CH
1'	172,1 (C)	--	--	H-2
1	125,5 (C)	--	--	H-5
2	118,0 (CH)	7,43 d (1,9)	--	H-6
3	145,9 (C)	--	H-2	H-6
4	151,0 (C)	--	H-5	H-6
5	115,8 (CH)	6,77 d (8,2)	--	--
6	123,8 (CH)	7,40 dd (8,2; 1,9)	--	H-2

Figura 74 - Espectro de massa de baixa resolução obtido em CG/EM de PS-6 sililada



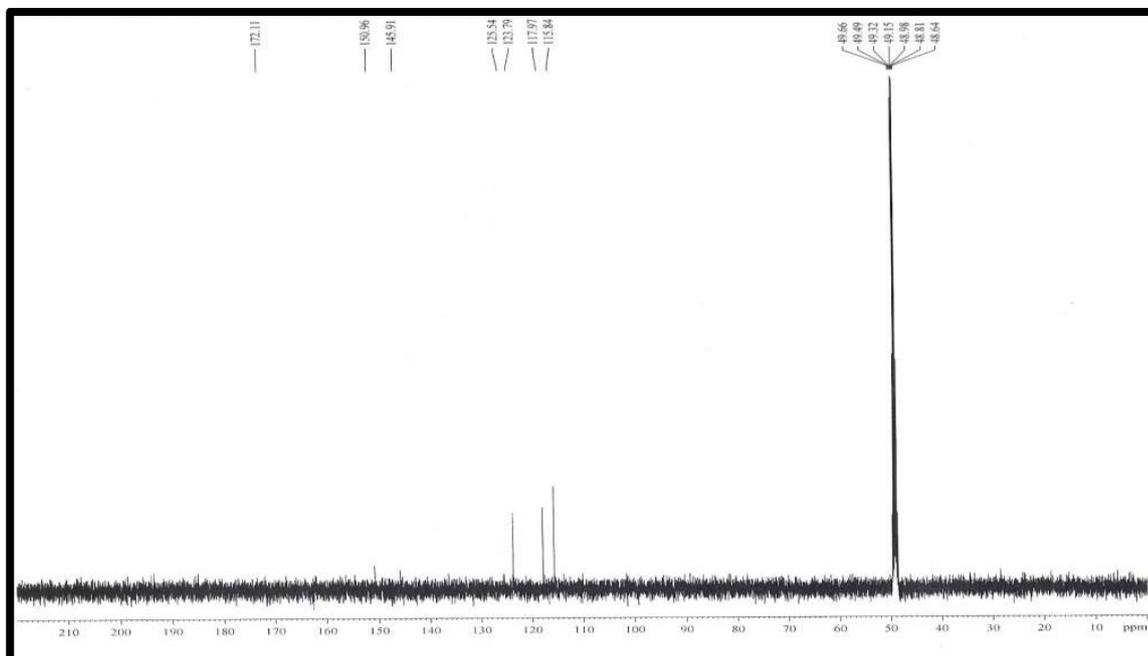
Fonte: Central analítica-UFC (2015).

Figura 75- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-6



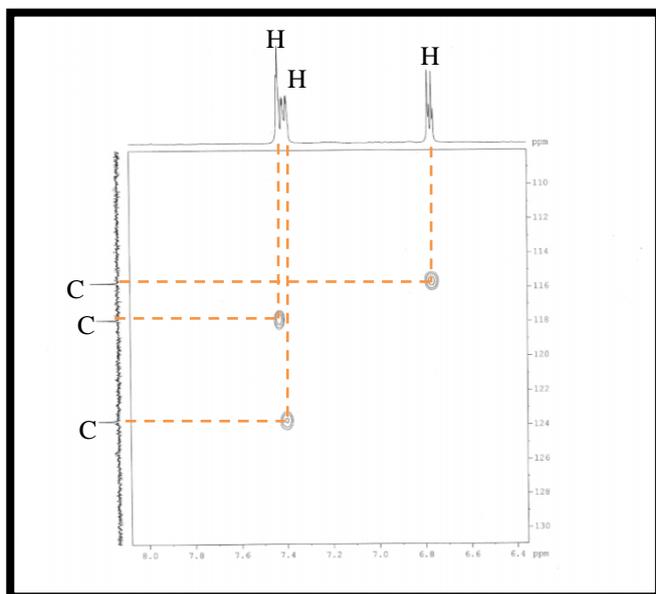
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 76- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-6



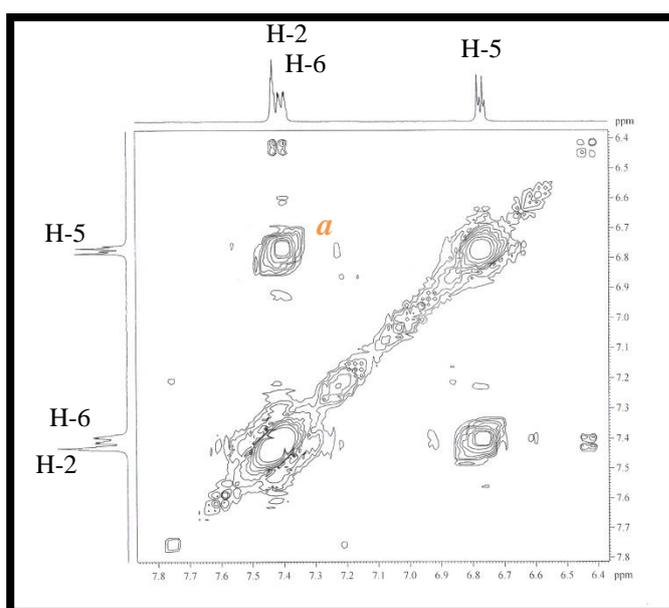
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 77- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC [500 x 125 MHz, (CD_3OD)] de PS-6



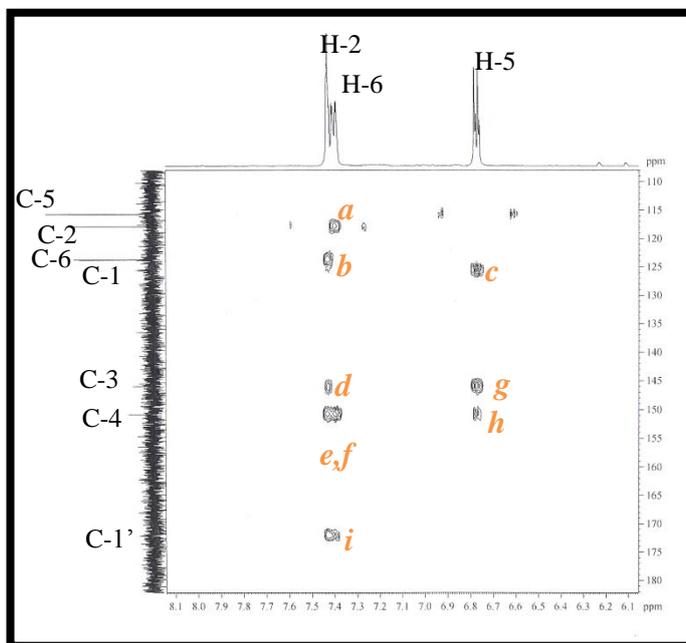
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 78- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [500 MHz, (CD_3OD)] de PS-6



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 79 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC [500 x 125 MHz, (CD_3OD)] de PS-6



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

6.7 Determinação estrutural de PS-7

Sucessivas cromatografias da fração diclorometano, obtida após partição líquido-líquido do extrato bruto de *P. hipidula*, resultou na obtenção de 170,0 mg de um sólido cristalino em forma de agulha de cor clara, denominado de PS-7.

O espectro de absorção na região do infravermelho de PS-7 (Fig. 84, p. 107) mostrou absorções intensas típicas de estiramento axial de ligação O-H em 3262 cm^{-1} , estiramento axial de ligação H-C assimétrico em 2969 cm^{-1} , além de estiramento axial de carbonila C=O conjugada de éster em 1712 cm^{-1} , e de ligação C=C em 1670 e 1636 cm^{-1} , e de ligação C-O em 1117 cm^{-1} .

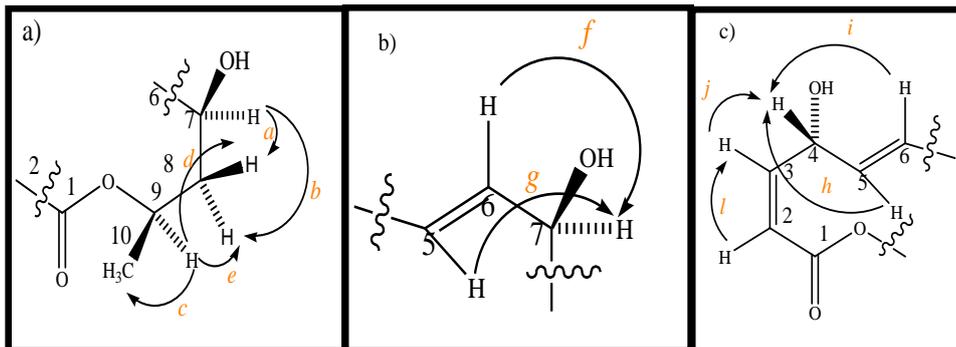
A análise no espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) (Fig 85, p. 107) revelou um sinal intenso de um grupo metila em $\delta_{\text{H}} 1,23$ (3H, d, $J= 6,4$ Hz, H-10) além de quatro absorções relativas a hidrogênios olefínicos em $\delta_{\text{H}} 5,88$ (1H, dd, $J= 0,93; 12,6$ Hz, H-2), $\delta_{\text{H}} 5,82$ (1H, dd, $J= 2,6; 12,6$ Hz, H-3), $\delta_{\text{H}} 5,63$ (1H, dd, $J= 7,0; 15,9$ Hz, H-5) e $\delta_{\text{H}} 5,56$ (1H, $J= 7,6; 15,9$ Hz, H-6). Em adição, foram observadas absorções em $\delta_{\text{H}} 4,13$ (1H, ddd, $J= 3,4; 7,6; 11,6$ Hz, H-7), $\delta_{\text{H}} 4,69$ (dd $J= 2,6$ e $7,0$ Hz, H-4) e $\delta_{\text{H}} 5,26$ (1H, ddqua, $J= 3,4; 11,6; 6,4$ Hz, H-9), que foram atribuídas a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – CPD (75 MHz, CD_3OD) com o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ^1H , ^{13}C – HSQC e DEPT 135° (Figuras 86-88, p.108 e 109), possibilitou atribuir o padrão de hidrogenação a todos os carbonos presentes na molécula. Após a análise destes dados, foi possível determinar a presença de 1 carbono metílico, 1 metilênico, 7 metínicos e 1 carbono carbonílico, possivelmente de função éster em $\delta 170,4$ (C-1) (Tabela 21, p. 106). Os carbonos metínicos insaturados em $\delta_{\text{C}} 138,8, 138,0, 131,2$ e $123,0$ foram correlacionados aos hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 5,88$ (1H, dd, $J= 0,93; 12,6$ Hz, H-2), $5,82$ (1H, dd, $J= 2,6; 12,6$ Hz, H-3), $5,63$ (1H, dd, $J=7,0; 15,9$ Hz, H-5) e $5,56$ (1H, dd, $J=7,6; 15,9$ Hz, H-6), respectivamente, confirmando a existência de duas ligações duplas dissubstituídas. As outras absorções em $\delta_{\text{C}} 73,0, 72,3, 70,3$ foram atribuídas a carbonos metínicos oxigenados.

A análise do espectro de correlação homonuclear COSY (Fig. 89, p. 110), possibilitou a visualização das correlações entre o hidrogênio metínico em $\delta_{\text{H}} 4,13$ (H-7) e os hidrogênios metilênicos diastereotópicos em $\delta_{\text{H}} 1,88$ e $1,72$ (2H-8), além das correlações entre o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 5,26$ (H-9) com os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 1,88$ e $1,72$ (2H-8) e $\delta_{\text{H}} 1,23$ (H-10), como mostrado na subestrutura abaixo (Fig. 80a, p. 104). Outras correlações foram observadas entre o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,13$ (H-7) com os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 5,63$ (H-5) e δ_{H}

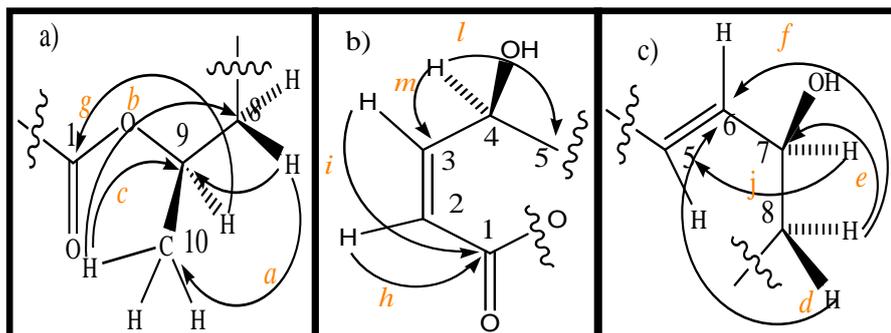
1,88 e 1,72 (2H-8) na Fig. 80b (abaixo), além das correlações dos hidrogênios em δ_H 5,82 (H-3) com os hidrogênios em δ_H 4,69 (H-4) e δ_H 5,88 (H-2), e do hidrogênio em δ_H 4,69 (H-4) com os hidrogênios em δ_H 5,63 (H-5) e δ_H 5,56 (H-6) (Fig. 80c, abaixo).

Figura 80- Subestruturas a, b, c mostrando as correlações homonucleares 1H , 1H presentes na PS-7



Fonte: Autor (2016).

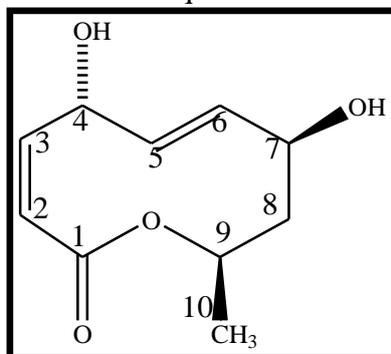
A análise do espectro de correlação heteronuclear a longa distância- HMBC (Fig. 90, p. 110) permitiu a visualização de acoplamentos a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre os hidrogênios do grupo metila em δ_C 21,7 (C- 10) e do grupo metilênico em δ_H 1,88 e 1,72 (2H-8) com o carbono em δ_C 70,3 (C-9), além dos acoplamentos ($^3J_{CH}$) do hidrogênio em δ_H 5,26 (H -9) com o carbono em δ_C 170,4 (C-1), e do hidrogênio em δ_H 1,23 (H-10) com o carbono em δ_C 44,1 (C-8) (Fig. 81a, p. 105). Em adição, este espectro ainda mostrou correlações $^2J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 4,69 (H-4) com os carbonos δ_C 138,0 (C-3) e 131,2 (C-5), e do hidrogênio em δ_H 5,88 (H-2) com o carbono em δ_C 170,4 (C-1), além de correlações ($^3J_{CH}$) do hidrogênio em δ_H 5,82 (H-3) com o carbono em δ_C 170,4 (C-1)(Fig. 81b, p. 105). Foi possível ainda visualizar os acoplamentos $^3J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 4,13 (H-7) com o carbono em δ_C 131,2 (C-5), e dos hidrogênios em δ_H 1,88 e 1,72 (2H-8) com o carbono em δ_C 73,0 (C-7), além de um acoplamento $^4J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 1,88 e 1,72 (2H-8) com o carbono em δ_C 138,8 (C-6) (Fig. 81c, abaixo)(Tabela 22, p. 106).

Figura 81- Subestruturas a, b, c e correlações HMBC de PS-7

Fonte: Autor (2016).

O espectro de massa revelou para PS-7 um pico íon molecular $m/z = 221, 0795$ $[M+23]^+$ com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O_4$ (calc. 221,0784; erro= 4,98 ppm) e índice de deficiência de hidrogênio igual a 4 (Fig. 83, p. 106).

A partir da análise dos dados descritos foi possível inferir que PS-7 tratava-se de um composto cíclico da classe dos nonelidos, mais especificamente o modiolido A {lit. $[\alpha]_D^{18} = +42^\circ$ (c 0,25, MeOH), 188,85- 190,85 $^\circ C$ } (Fig. 82, abaixo).

Figura 82- Estrutura química de PS-7 (modiolido A)

Fonte: Autor (2016).

Essa substância já foi isolada a partir dos fungos *Paraphaeosphaeria* sp (TSUDA *et al.*, 2003), *Stagonospora cirsii* (EVIDENTE *et al.*, 2008), *curvularia* sp. (GREVE *et al.*, 2008 e TRISUWAN *et al.*, 2011) e *Periconia siamensis* (BHILABUTRA *et al.*, 2007), e apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus aureus*, *Microsporium gypseum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 21- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-7 com os dados relatados para o Modiolido A

Posição	PS-7 (CD_3OD , 300 MHz)		Modiolido A (CD_3OD , 600 MHz) ¹	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)
1	170,4	---	170,9	---
2	123,0	5,88 dd (0,93; 12,6)	123,7	5,85 dd (1,5; 12,3)
3	138,0	5,82 dd (2,6; 12,6)	138,7	5,83 dd (3,5; 12,3)
4	72,3	4,69 dqua (2,6; 7,0)	73,0	4,68 br dd (3,5; 7,3)
5	131,2	5,63 dd (7,0; 15,9)	131,8	5,61 dd (7,3; 15,8)
6	138,8	5,56 dd (7,6; 15,9)	139,4	5,56 dd (7,5; 15,8)
7	73,0	4,13 ddd (3,4; 7,6; 11,6)	73,6	4,12 ddd (2,5; 7,5; 11,4)
8	44,1	(α)1,72 dt (14,0; 11,6) (β) 1,88 dt (14,0; 3,4)	44,7	(α)1,71 dt (14,0; 11,4) (β)1,87 dt (14,0 2,5)
9	70,3	5,26 ddqua (3,4; 11,6; 6,4)	70,9	5,25 ddqua (2,5; 11,4; 6,7)
10	21,7	1,23 d (6,4)	22,4	1,22 d (6,7)

Legenda: J=constante de acoplamento; m= multiplicidade; d= duplete; qua= quarteto; t=tripleto.

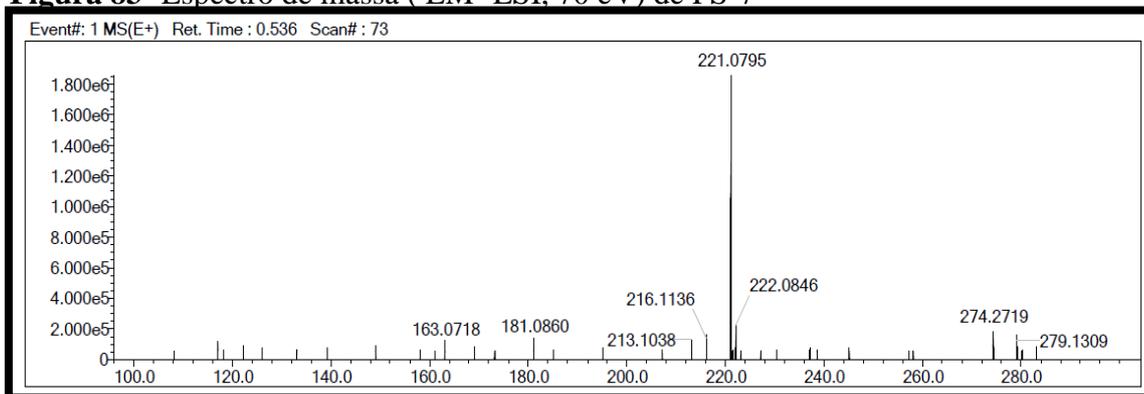
Fonte: ¹ (TSUDA *et al.*, 2003).

Tabela 22- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC ^nJ (n=2 e n=3) de PS-7 (CD_3OD , 125 x 300 MHz)

Posição	PS-7 HSQC		PS-7 HMBC	
	δC	δH , m e (J em Hz)	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$
1	170,4	---	H-2	H-3, H-9
2	123,0	5,88 dd (0,93; 12,6)	H-3	H-4
3	138,0	5,82 dd (2,6; 12,6)	H-2, H-4	H-5
4	72,3	4,69 dqua (2,6; 7,0)	H-3, H-5	H-2, H-6
5	131,2	5,63 dd (7,0; 15,9)	H-4, H-6	H-3, H-7
6	138,8	5,56 dd (7,6; 15,9)	H-5	H-4, H-8 (α , β)
7	73,0	4,13 ddd (3,4; 7,6; 11,6)	H-6, H-8 (α , β)	---
8	44,1	(α)1,72 dt (14,0; 11,6) (β) 1,88 dt (14,0; 3,4)	H-7, H-9	H-10
9	70,3	5.26 ddqua (3,4; 11,6; 6,4)	H-8 (α , β), H10	---
10	21,7	1,23 d (6,4)	---	H-8 (α , β)

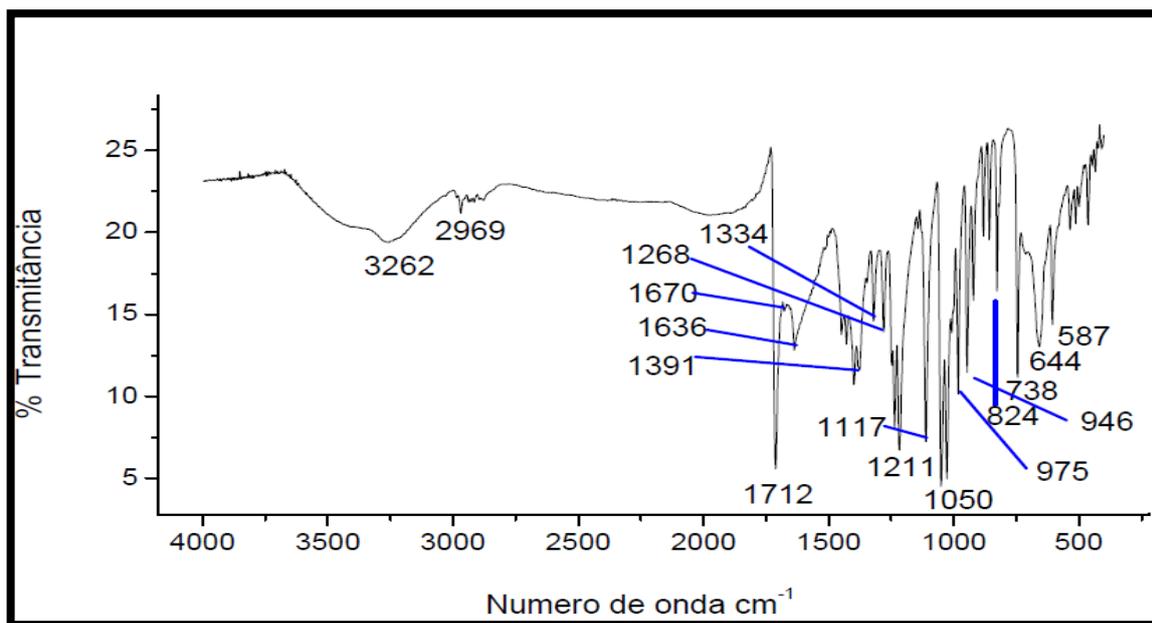
Fonte: Autor (2016).

Figura 83- Espectro de massa (EM- ESI, 70 eV) de PS-7



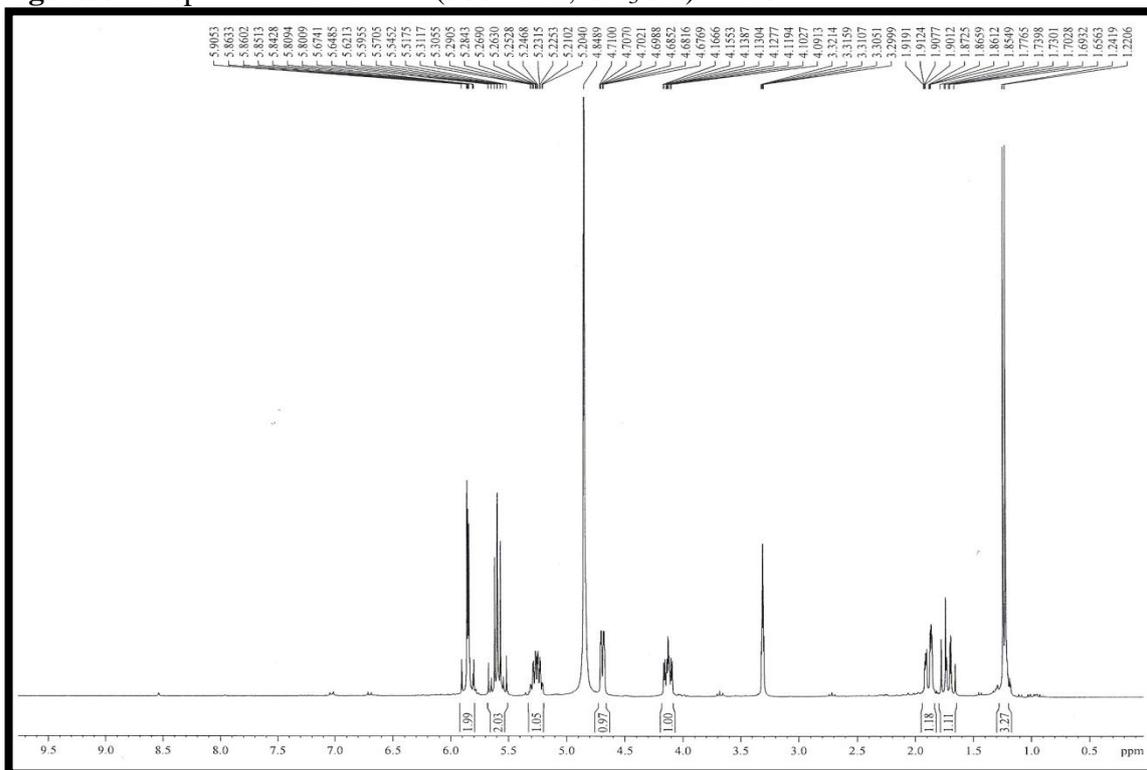
Fonte: LEMANOR-UFC (2015).

Figura 84- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-7

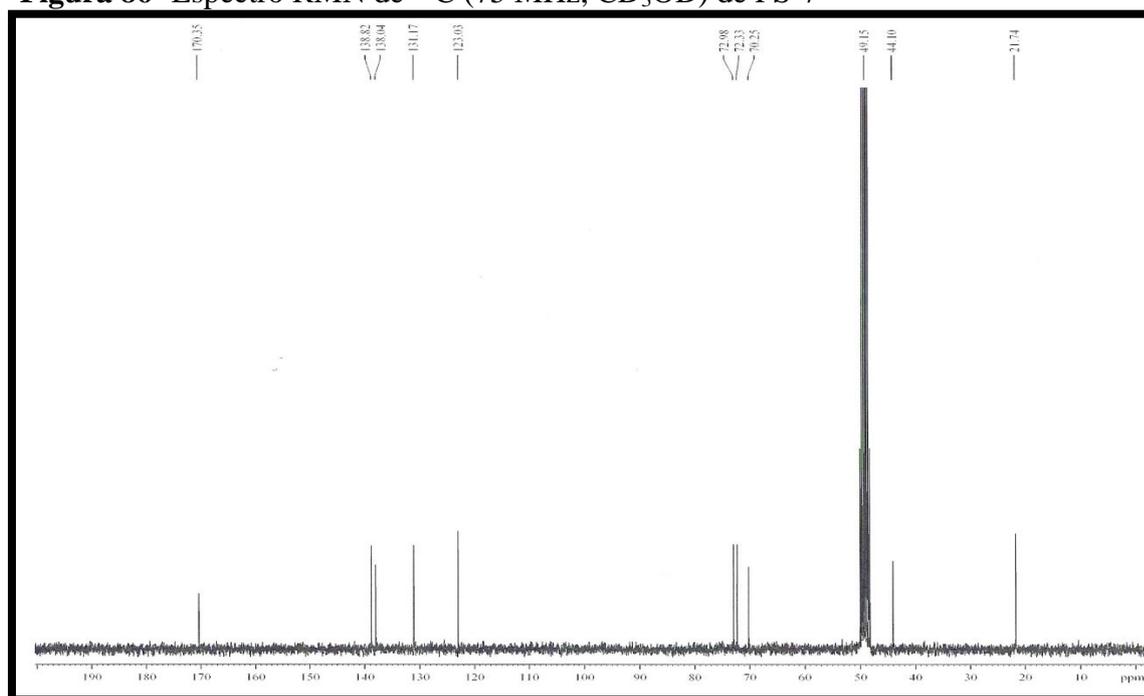


Fonte: LABIO-UFC (2015).

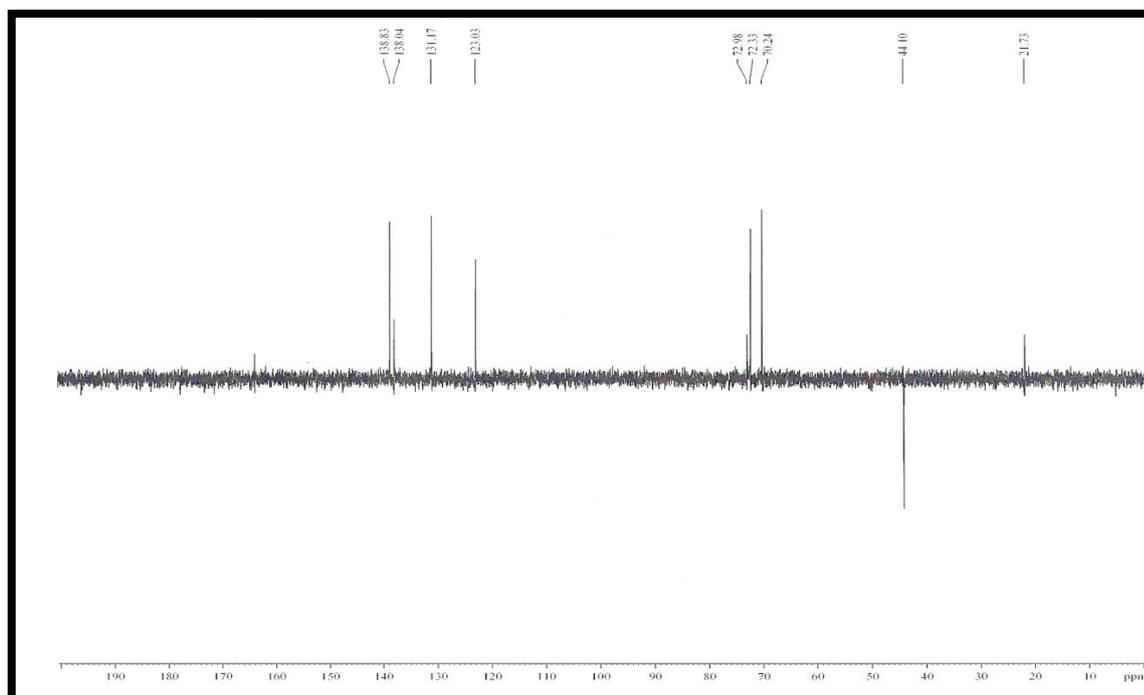
Figura 85- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de PS-7



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

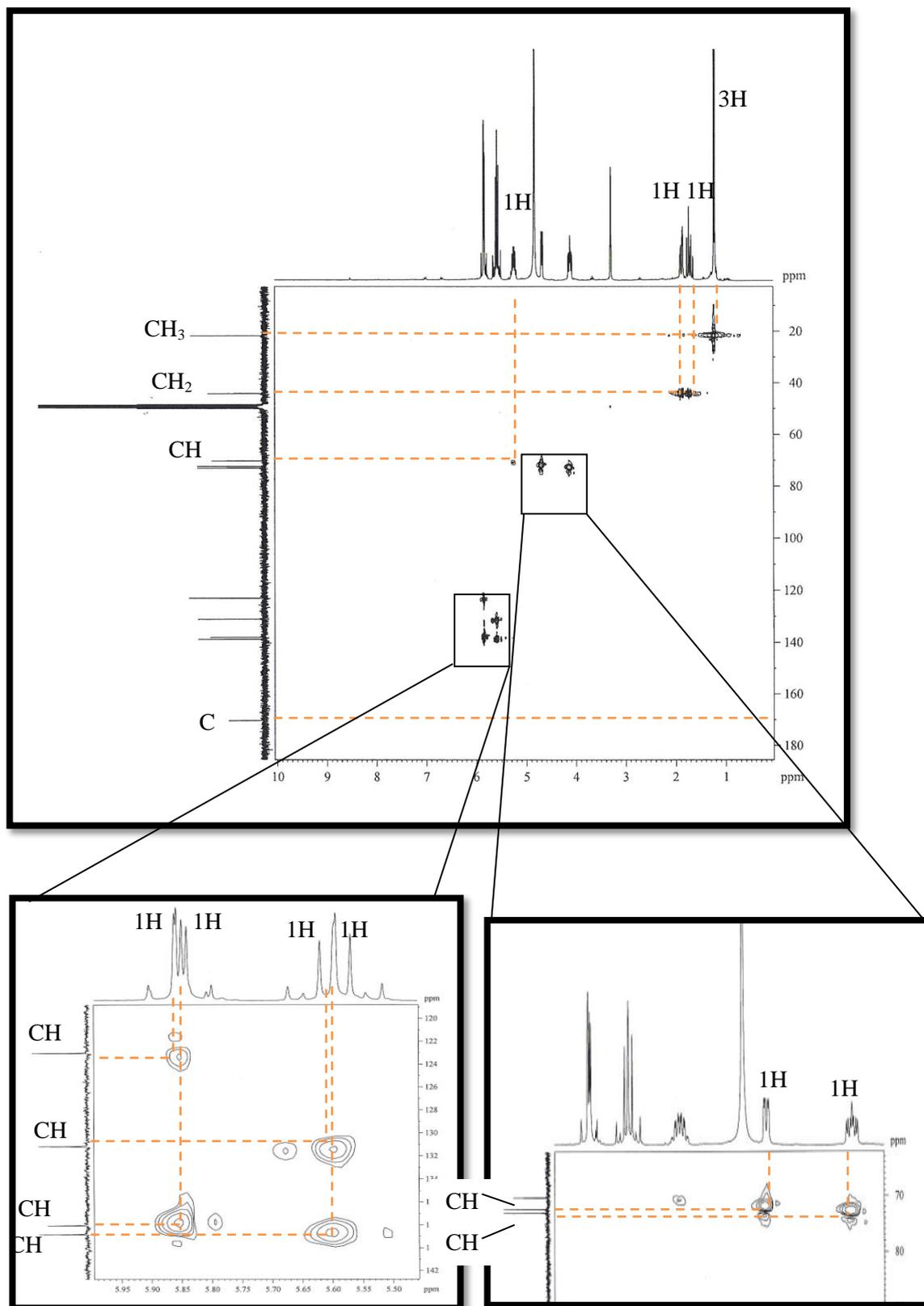
Figura 86- Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de PS-7

Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 87- Espectro RMN de DEPT 135° (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-7

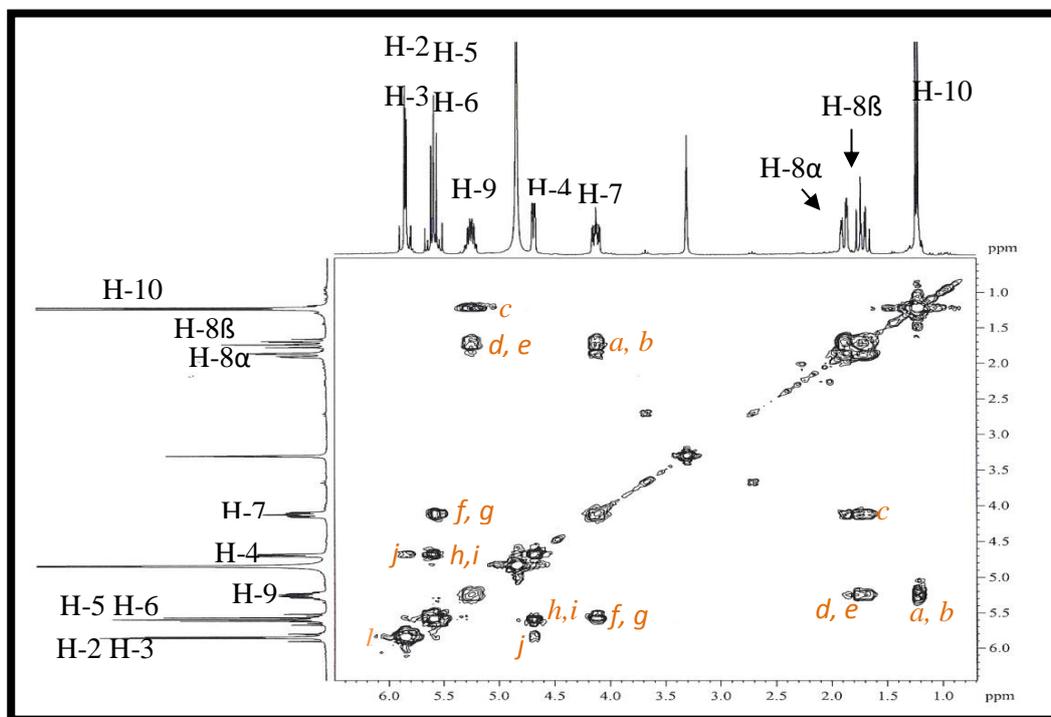
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 88- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-7



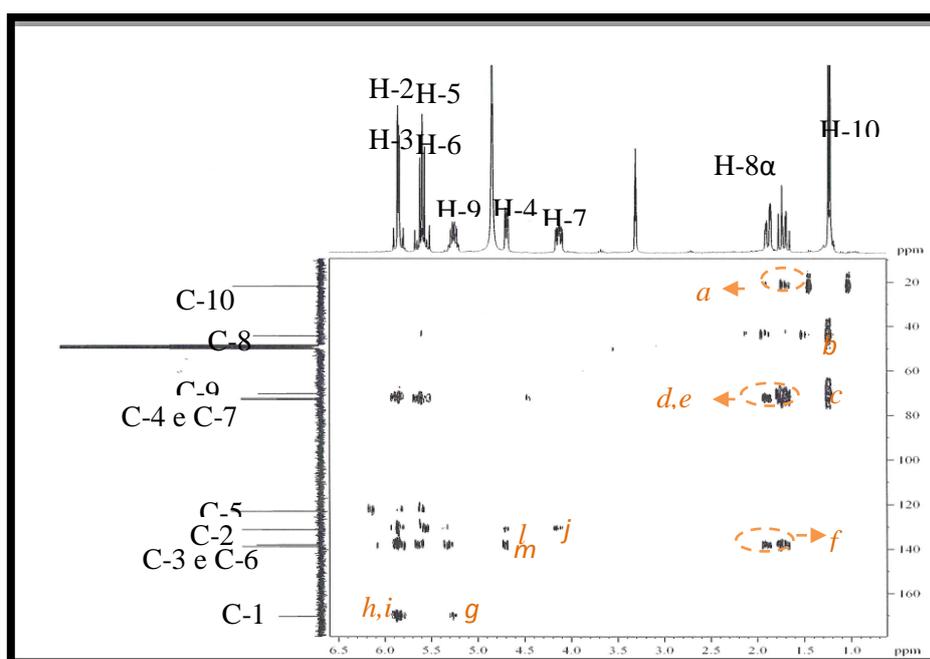
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 89- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PS-7



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 90- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de PS-7



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015)

3.8- Determinação estrutural de PS-8

Sucessivas cromatografias da fração diclorometano, obtida após partição líquido-líquido do extrato bruto de *P. hipidula*, resultou na obtenção de 17,0 mg de um sólido cristalino em forma de agulhas de cor marrom clara, denominado de PS-8.

O espectro de absorção na região do infravermelho de PS-8 (Fig. 96, p. 117) mostrou absorções intensas típicas de estiramento axial de ligação O-H em 3391 cm^{-1} , estiramento axial de ligação H-C assimétrico em 2974 e 2922 cm^{-1} e de H-C simétrico em 2870 cm^{-1} , além de estiramento axial de carbonila C=O conjugada de éster em 1700 cm^{-1} , e de ligação C=C em 1632 cm^{-1} , e de ligação C-O em 1110 cm^{-1} .

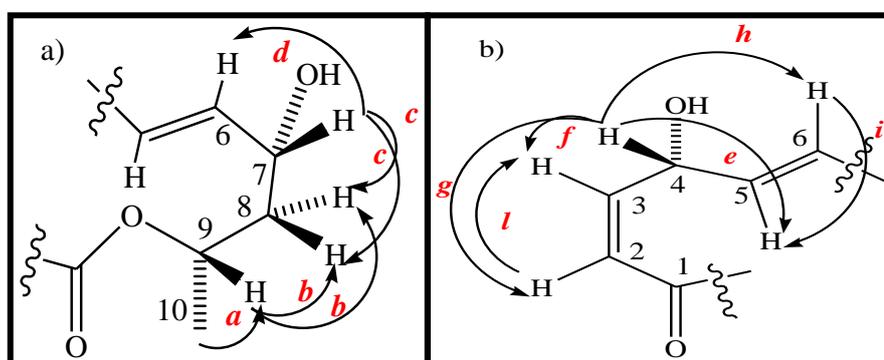
O espectro RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PS-8 (Fig. 97, p. 117) mostrou-se muito semelhante a PS-7 (Fig. 85, p. 107) e permitiu sugerir o mesmo esqueleto para ambas as substâncias devido à existência de 4 absorções relativas a hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,10 (1H, dd, $J=12,6, 1,9$ Hz, H-2), δ_{H} 6,27 (1H, dd $J=12,6; 3,2$ Hz, H-3), δ_{H} 6,66 (1H, dd, $J=15,9, 1,5$ Hz, H-5) e em δ_{H} 6,02 (1H, dm, $J=15,9$; Hz, H-6), três absorções relacionadas a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ_{H} 5,24 (1H, dm, $J= 7,8$ Hz, H-4), em δ_{H} 4,76 (1H, s largo, H-4) e em δ_{H} 6,14 (1H, m, H-9), além da presença de uma metila em δ_{H} 1,19 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-10).

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C – CPD (125 MHz, CD_3OD) com o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ^1H , ^{13}C – HSQC (Figuras 98 e 99, p. 118 e 119, respectivamente), possibilitou atribuir a existência de 10 linhas espectrais contendo o mesmo padrão de hidrogenação de PS-7. Os carbonos metínicos em δ_{C} 123,0 (C-2) e δ_{C} 138,3 (C-3) foram relacionados aos hidrogênios em δ_{H} 6,10 (H-2) e 6,27 (H-3), respectivamente, e determinaram a presença de uma ligação dupla dissubstituída com estereoquímica *cis*. Por outro lado, os carbonos em δ_{C} 126,0 (C-5) e 138,5 (C-6) mostraram correlação com os hidrogênios em δ_{H} 6,66 (H-5) e 6,02 (H-6), e determinaram a outra ligação dupla como sendo *trans*-dissubstituída. Além disso, foi ainda visualizar uma absorção em δ_{C} 170,4 (C-1), típica de carbono carbonílico possivelmente de éster (Tabela 23, p. 115).

A análise do espectro de correlação homonuclear COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) (Fig. 100, p. 120), possibilitou a visualização das correlações vicinais entre os hidrogênios do grupo metílico em δ_{H} 1,19 (H-10) com o hidrogênio em δ_{H} 6,14 (H-9) e com os do grupo metilênico em δ_{H} 1,94 e 1,88 (2H-8), além da correlação do hidrogênio em δ_{H} 4,76 (H-7) com o hidrogênio olefínico em 6,02 (H-6) e com o grupo metilênico em em δ_{H} 1,94 e 1,88 (2H-8),

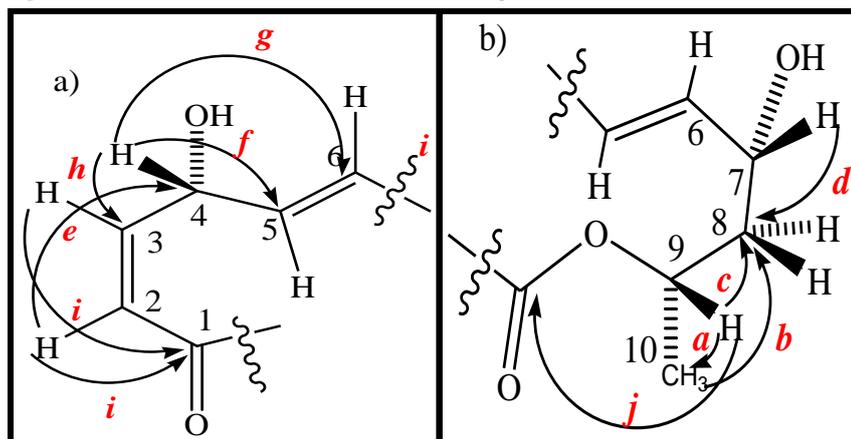
como mostrado na subestrutura a (Fig. 91a, abaixo). Outras correlações foram observadas entre o hidrogênio em δ_H 5,24 (H-4) com os hidrogênios em δ_H 6,66 (H-5) e 6,27 (H-3), entre os hidrogênios em δ_H 6,10 (H-2) e δ_H 6,27 (H-3), e entre o hidrogênio em δ_H 6,02 (H-6) com o hidrogênio em δ_H 6,66 (H-5) e δ_H 4,76 (H-7). Além destes, foram ainda observados acoplamentos alílicos entre o hidrogênio em δ_H 5,24 (H-4) com os hidrogênios em δ_H 6,02 (H-6) e δ_H 6,10 (H-2), como mostrado na subestrutura b (Fig. 91b, abaixo).

Figura 91- Subestruturas a, e b mostrando as correlações homonucleares 1H , 1H presentes na PS-8



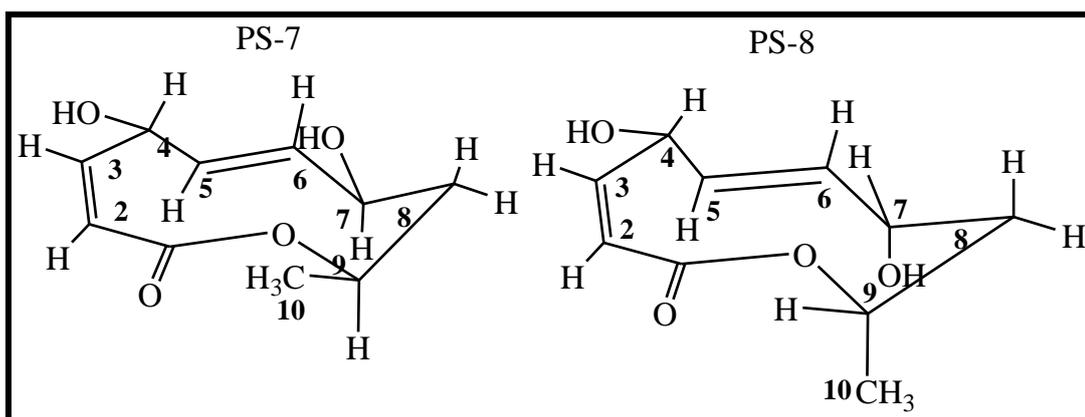
Fonte: Autor (2016).

A análise do espectro de correlação heteronuclear a longa distância- HMBC (500 x 125, CD₃OD) (Fig. 101, p. 121) permitiu a visualização de acoplamentos ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio em 5,78-5,76 (H-3) com o carbono carbonílico em δ_C 170,4 (C-1), do hidrogênio em δ_H 4,7 (H-4) com o carbono em δ_C 138,5 (C-6), e do hidrogênio em δ_H 5,78-5,76 (H-2) com o carbono em δ_C 73,0 (C-4), como mostrado na subestrutura a (Fig. 92a, p. 113). Em adição, este espectro ainda mostrou acoplamentos ($^3J_{CH}$) dos hidrogênios do grupo metílico em δ_H 1,19 (H-10) com o carbono metilênico em δ_C 41,4 (C-8), e do hidrogênio em δ_H 5,55 (H-9) com o carbono carbonílico em δ_C 170,4 (C-1), como mostrado na subestrutura b (Fig. 92b, p. 113). A partir desta análise, foi possível determinar a posição relativa dos dois grupos hidroxilas em C-7 e C-4, e as duplas ligações am C5-C6 e C-2-C3 (Tabela 24, p. 116).

Figura 92- Subestruturas a, b e correlações HMBC de PS-8

Fonte: Autor (2016).

A partir da análise destes dados foi possível inferir que PS-8 também se tratava de um composto cíclico da classe dos nonelidos, com estereoquímica relativa apresentada na Figura abaixo (Fig. 93, abaixo). Levando-se em consideração os deslocamentos químicos dos carbonos em δ_C 126,0 (C-5), δ_C 68,1 (C-7), δ_C 41,4 (C-8) e δ_C 67,7 (C-9), que se encontram em região de proteção quando comparadas às absorções em δ_C 131,2 (C-5), δ_C 73,0 (C-7), δ_C 44,1 (C-8) e em δ_C 70,3 (C-9) de PS-7, pôde-se inferir que o grupo metila em C-10 e a hidroxila em C-7 deveriam estar axialmente orientados causando um “efeito gama gauche” de proteção.

Figura 93- Estereoquímica proposta para PS-8, e comparação com a de PS-7

Fonte: Autor (2016).

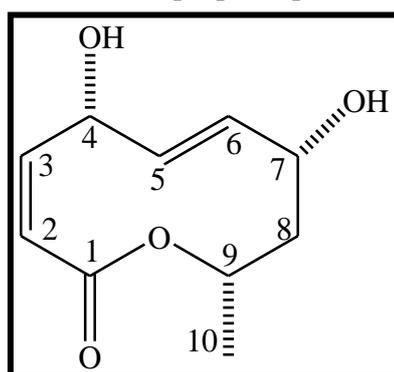
O espectro de massa de baixa resolução confirmou a estrutura proposta através do pico íon molecular $m/z = 198$ compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{14}O_4$ e índice de deficiência de hidrogênio igual a 4 (Fig. 95, p. 116).

A estrutura apresentada para PS-8 é idêntica à proposta por Shimada *et al.*, (2002) para o fusanolido B. No entanto, uma análise detalhada nos dados RMN de ^1H e ^{13}C de ambos os compostos, revelou que os dados sugeridos para o fusanolido B são mais compatíveis com o dados encontrados para o modiolido A (PS-7), conforme mostrado na Tabela 23 (p. 115).

Embora tenham sido realizados experimentos de NOESY e NOE diferencial, as correlações visualizadas não nos permitiram afirmar que são unicamente geradas pela aproximação espacial ou entre hidrogênios do mesmo lado do plano. Desse modo, a estereoquímica proposta só poderá ser definitivamente confirmada através de reação de esterificação de Mosher, ou ainda experimentos de raios-X.

Com base na discussão anterior foi possível sugerir que PS-8 possui caráter inédito na literatura, apresentou $\{[\alpha]^{23}\text{D} (\text{c } 0,2 \text{ MeOH}) = + 71,8^\circ; \text{p.f.: } 188,85\text{-}190,85 \text{ }^\circ\text{C} \}$ (Fig. 94, abaixo).

Figura 94-Estrutura proposta para PS-8



Fonte: Autor (2016).

Testes de atividade antimicrobiana utilizando PS-8 contra cepas de fungos patogênicos *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™) e *Candida krusei* (ATCC® 14243™), revelou uma redução do crescimento de células fúngicas na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A atividade citotóxica realizada frente a linhagem de células cancerígenas de cólon (HCT-116) e mama (MCF-7) não apresentou inibição significativa em relação ao padrão testado.

Tabela 23- Comparação dos valores RMN de ^1H e ^{13}C para o PS-8, Modiolido A e Fusanolido B da literatura

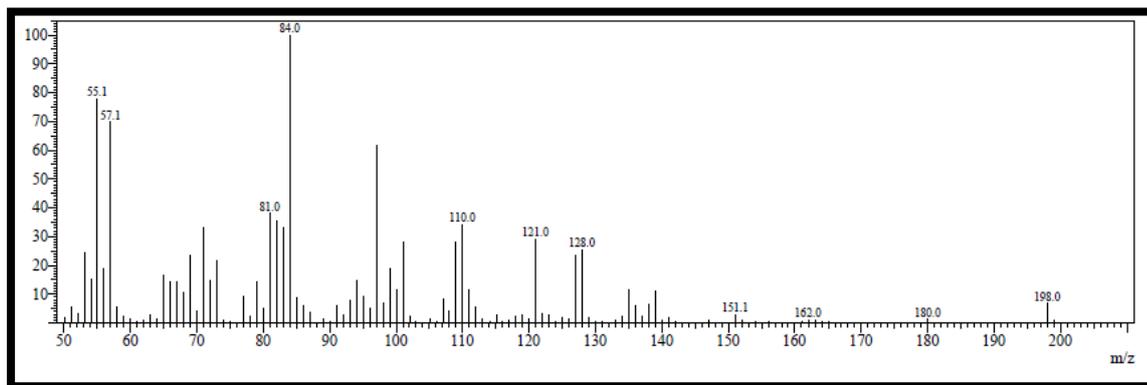
Po si- ção	PS-8 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)		PS-8 (CD_3OD , 500 MHz)		Fusanolido B (CD_3OD , 500 MHz) ¹		Modiolido A (CD_3OD , 600 MHz) ²	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. E (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz) ¹
1	169,1 (C)	--	170,4 (C)	--	171,0 (C)	--	170,9 (C)	---
2	122,3 (CH)	6,10 dd (12,6;1,9)	123,0 (CH)	5,78-5,76	123,7 (CH)	5,9 dd (12,2; 1,0)	123,7 (CH)	5,85 dd (12,3; 1,5)
3	138,3 (CH)	6,27 dd (12,6; 3,2)	138,3 (CH)	5,78-5,76	138,8 (CH)	5,83 dd (12,2; 2,4)	138,7 (CH)	5,83 dd (12,3; 3,5)
4	72,6 (CH)	5,24 dm (7,8)	73,0 (CH)	4,7dd (7,0; 1,2)	73,0 (CH)	4,65 ddd (7,8; 2,4; 1,0)	73,0 (CH)	4,68 br dd (3,5; 7,3)
5	127,2 (CH)	6,66 dd (15,9;1,5)	126,0 (CH)	5,84-5,83	131,8 (CH)	5,65 dd (15,7; 7,2)	131,8 (CH)	5,61 dd (15,8; 7,3)
6	139,4 (CH)	6,02 dm (15,9)	138,5 (CH)	5,84-5,83	139,5 (CH)	5,55 dd (15,7; 8,3)	139,4 (CH)	5,56 dd (15,8; 7,5)
7	67,3 (CH)	4,76 s	68,1 (CH)	4,49 dd	73,7 (CH)	4,12 ddd (3,4; 8,3; 11,2)	73,6 (CH)	4,12 ddd (2,5; 7,5; 11,4)
8	41,7 (CH_2)	(α) 1,94 d (14,4) (β) 1,88dm (14,4)	41,4 (CH_2)	1,86- 1,77 (m)	44,8 (CH_2)	(α) 1,73 ddd (13,7; 11,2; 11,2) (β) 1,90 ddd (13,7; 3,4; 1,9)	44,7 (CH_2)	(α) 1,71dt (14,0;11,4) (β) 1,87 dt (14,02,5)
9	66,9 (CH)	6,14 m	67,7 (CH)	5,55 m	71,0 (CH)	5,25 ddqua(1,9; 11,2; 6,4)	70,9 (CH)	5,25 ddqua (2,5; 11,4; 6,7)
10	21,9 (CH_3)	1,19 d (6,5)	21,7 (CH_3)	1,19d (6,6)	22,4 (CH_3)	1,21 d (6,4)	22,4 (CH_3)	1,22 d (6,7)
OH	--	7,16 sL (OH-4)	--	--	--	--	--	--
OH	--	6,57 sL (OH-7)	--	--	--	--	--	--

Fonte: ¹Shimada *et al.*, (2002). ²Tsuda *et al.*, (2003).

Tabela 24 - Correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C HSQC e HMBC de PS-8 (CD_3OD , 500 x 125 MHz)

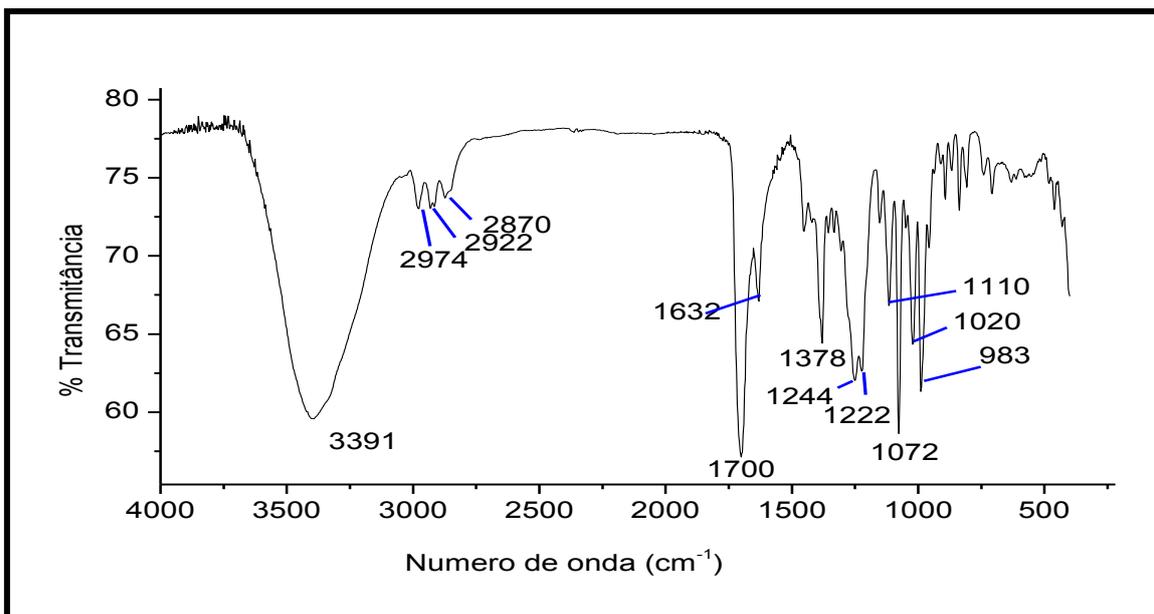
Posição	PS-8 HSQC		PS-8 HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} , m e (J em Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	170,4	--	H-2	H-3, H-9
2	123,0	5,78-5,76	--	--
3	138,3	5,78-5,76	--	H-11
4	73,0	4,7 dd (7,0; 1,2)	H-4	--
5	126,0	5,84-5,83	H-4	--
6	138,5	5,84-5,83	H-4	--
7	68,1	4,49 dd	--	--
8	41,4	1,86-1,77 (m)	H-7, H-9	H-10
9	67,7	5,55 m	--	--
10	21,7	1,19 d (6,6)	--	--

Figura 95– Espectro de massa de baixa resolução CG/EM PS-8



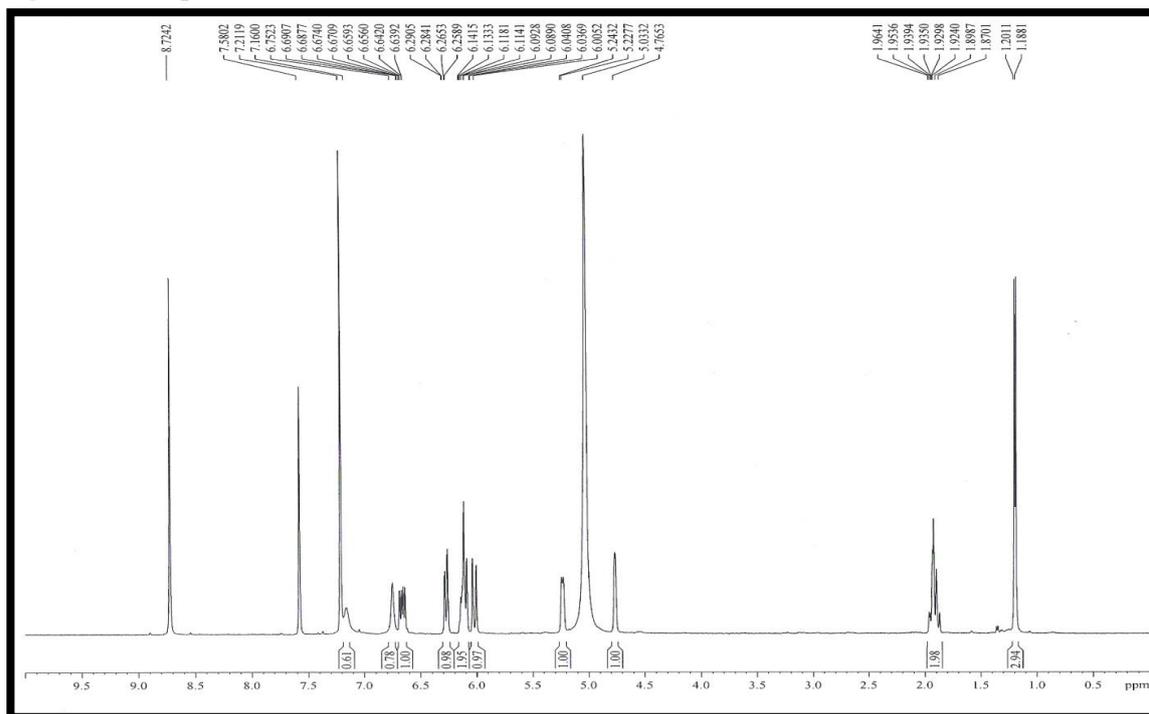
Fonte: Central analítica- UFC (2015).

Figura 96- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-8

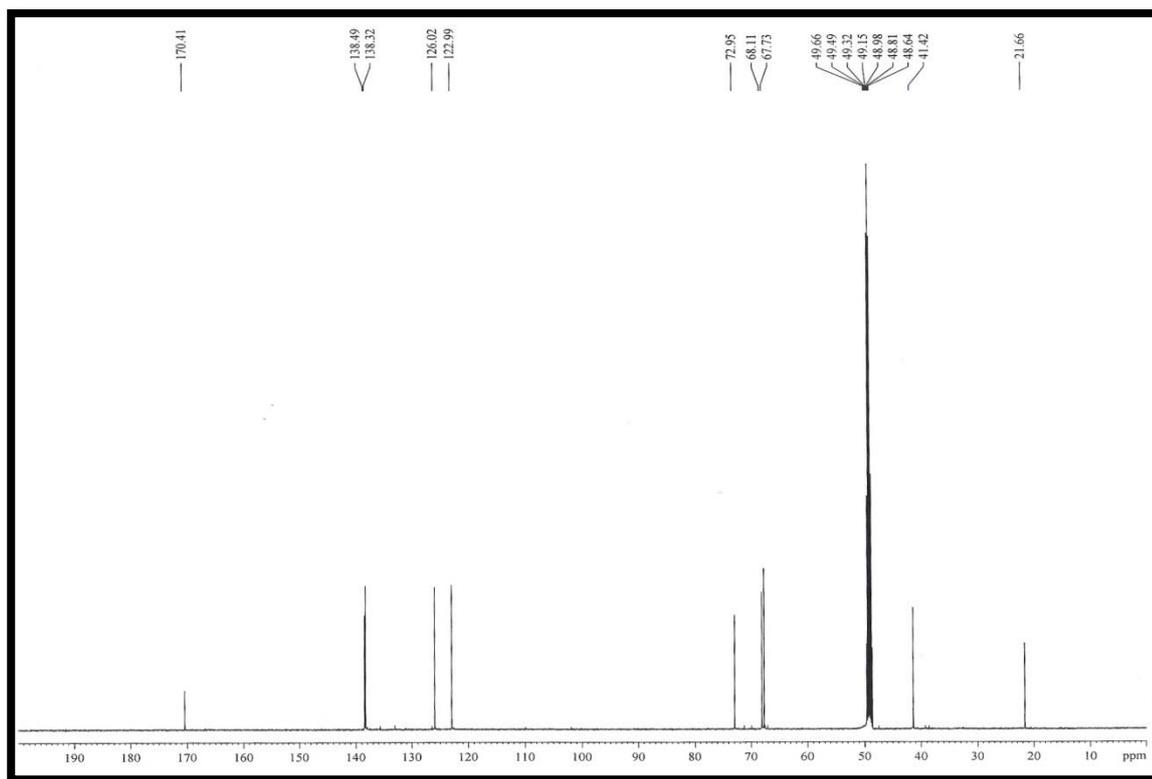


Fonte: LABIO-UFC (2015).

Figura 97- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de PS-8

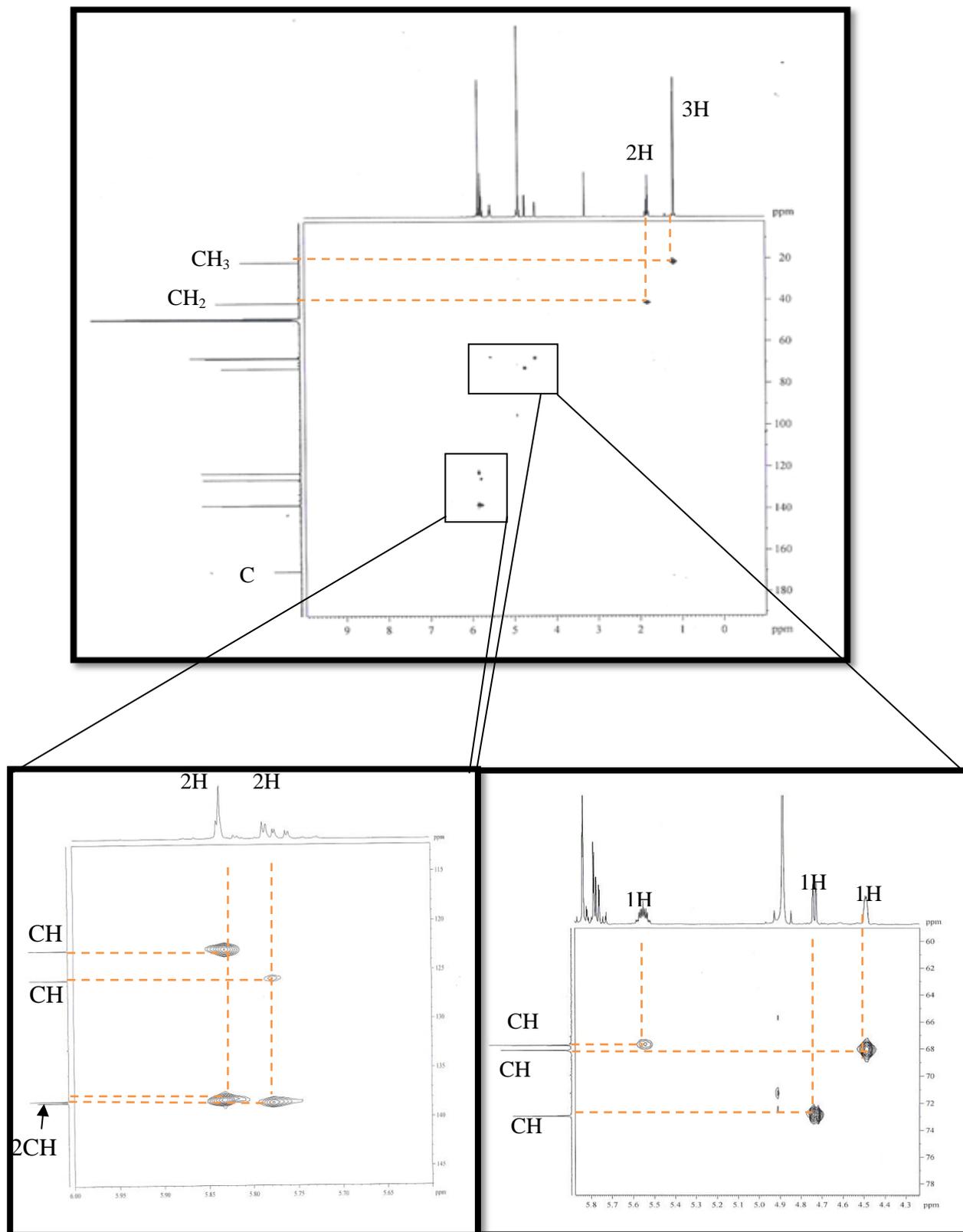


Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 98- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-8

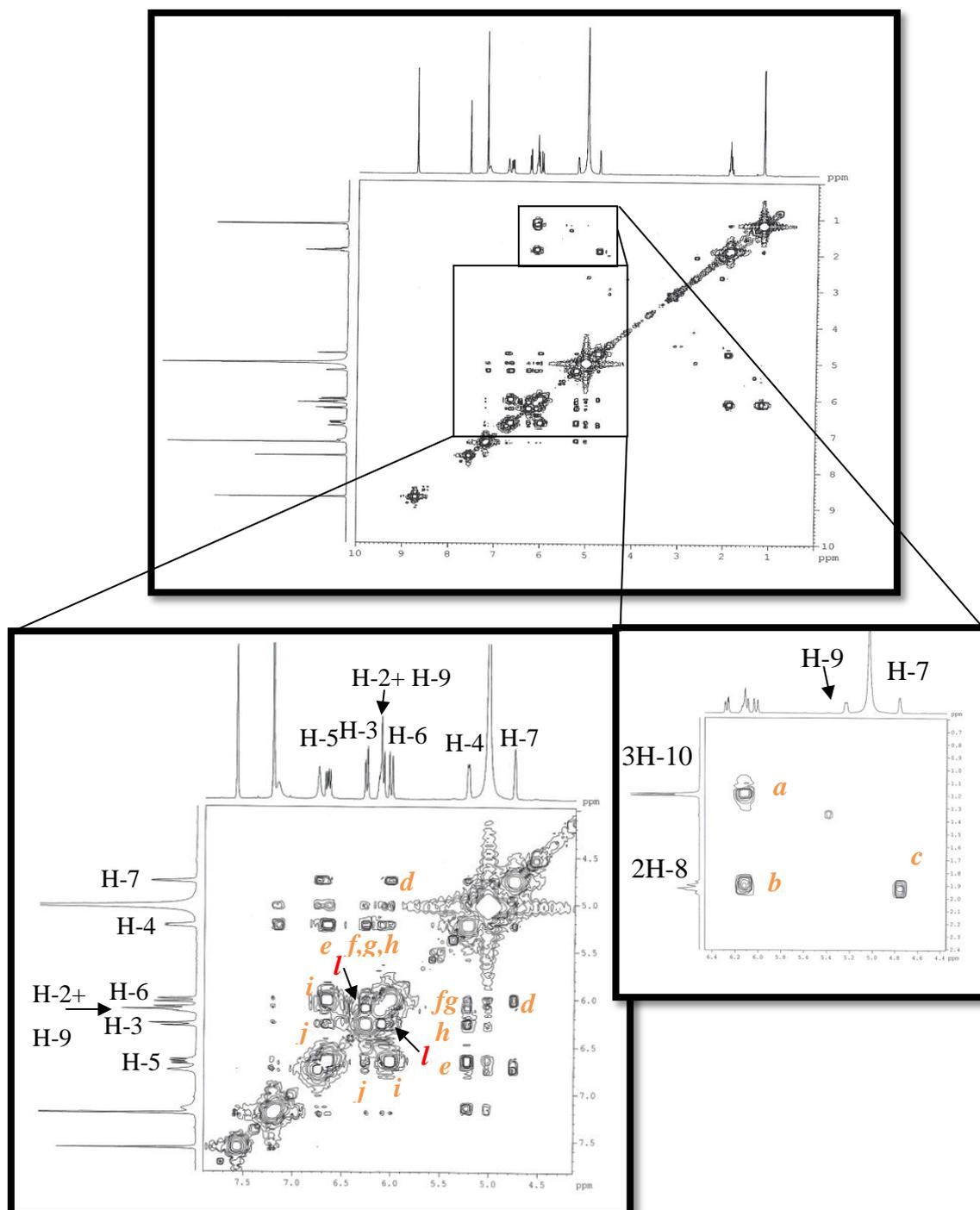
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 99- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-8



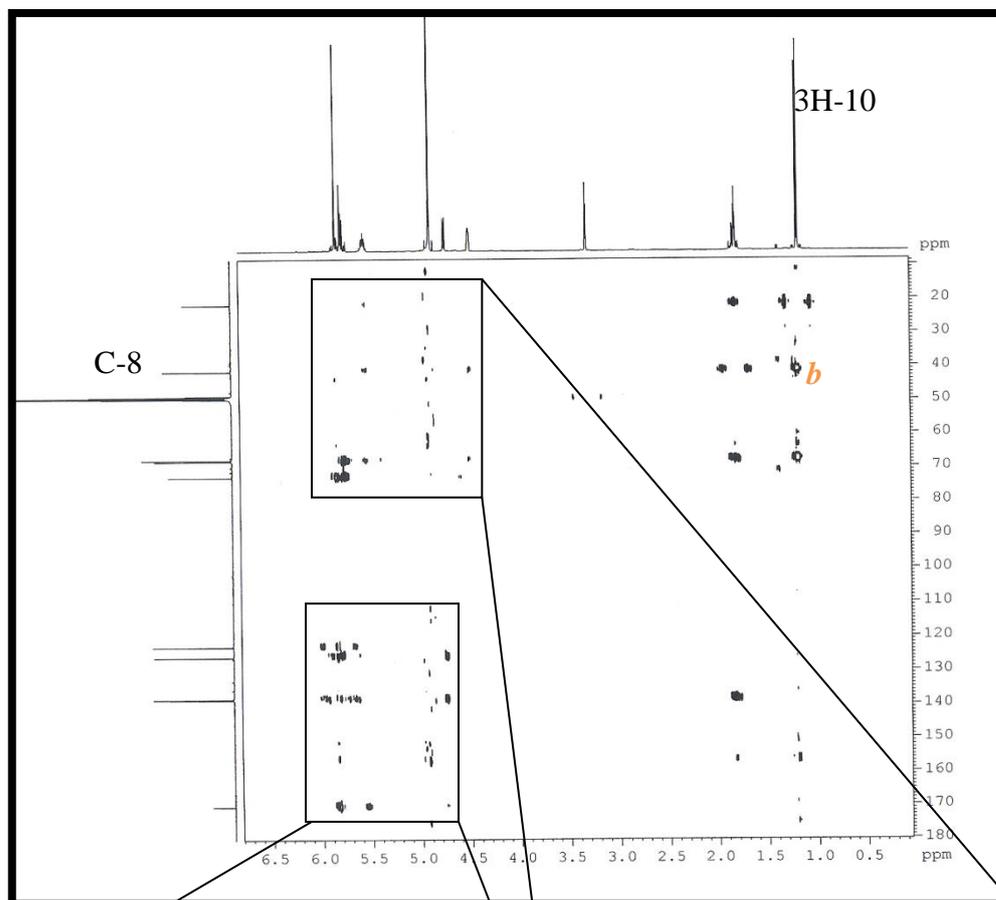
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 100- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, CD_3OD) de PS-8

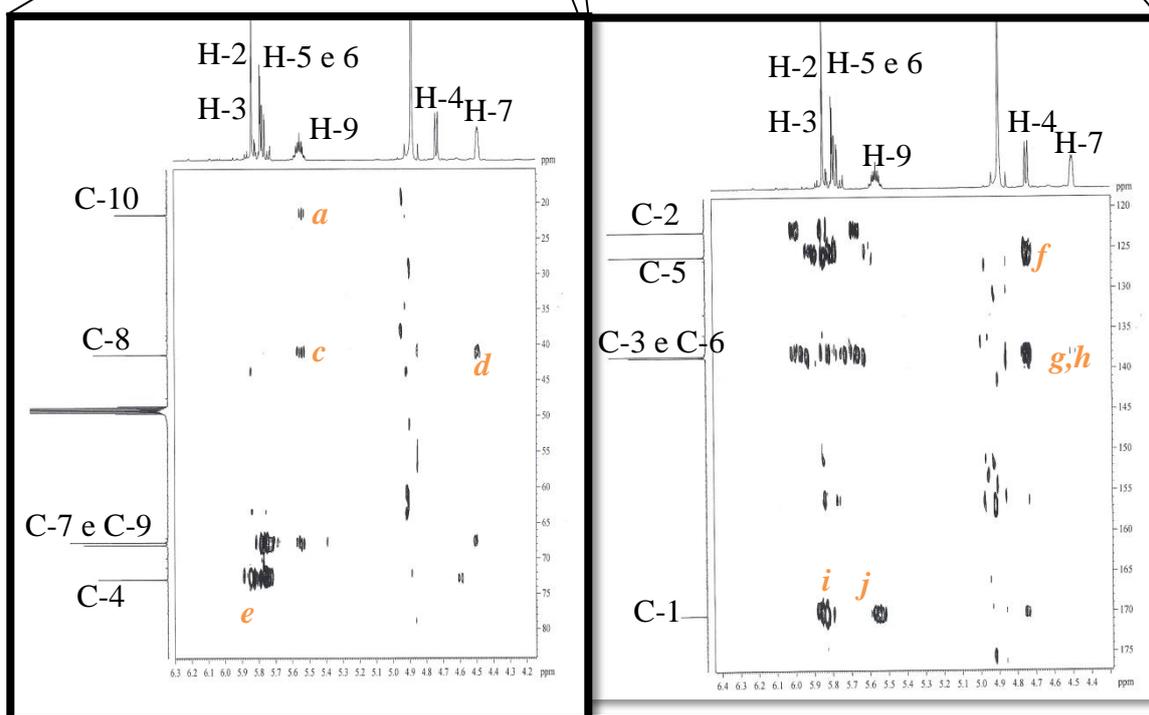


Fonte CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 101- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-8



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).



6.9- Determinação estrutural de PS-9

Sucessivas cromatografias da fração obtida por meio de partição líquido-líquido com diclorometano do extrato MPD, resultaram na purificação de 25,0 mg de uma resina marrom denominada de PS-9.

O espectro de absorção na região do infravermelho de PS-9 (Fig. 107, p. 127) mostrou absorções intensas típicas de estiramento axial de ligação O-H em 3412 cm^{-1} , de estiramento axial de ligação H-C assimétrico em 2978 e 2928 cm^{-1} , além de estiramento axial de carbonila C=O conjugada de éster em 1711 cm^{-1} , de ligação C=C em 1654 e 1557 cm^{-1} , e de ligação C-O em 1163 cm^{-1} .

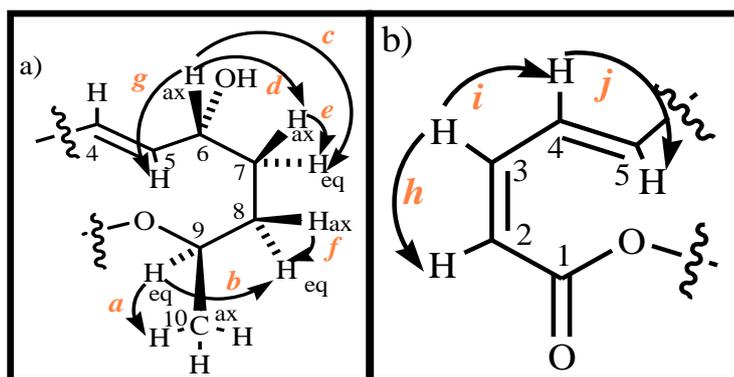
O espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-9 (Fig.108, p.128) mostrou-se muito semelhante ao de PS-7(Fig. 85, p.107), particularmente pela presença dos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,82 (1H, d, $J=10,6$ Hz, H-2), δ_{H} 6,67 (1H, dd, $J=10,6$; 1,4 Hz, H-3), δ_{H} 6,11 (1H, d largo $J=15,3$ Hz, H-4) e δ_{H} 5,64 (1H, dd, $J=15,3$; 9,5 Hz, H-5), além das absorções relativas a dois grupos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos em δ_{H} 2,05 (1H, ddd, $J=13,9$; 9,2; 3,8 Hz, H-7a), em δ_{H} 1,68 (1H, m, H-7b), em δ_{H} 1,86 (1H, dd largo $J=15,3$; 9,3 Hz, H-8a) e em δ_{H} 1,59 (1H, m, H-8b). A principal diferença deveu-se a apenas duas absorções intensas em δ_{H} 4,16 (1H, dt, $J=9,5$; 3,8 Hz, H-4) e em δ_{H} 4,94 (1H, t, $J=6,5$, H-9) em região típica de hidrogênios oxigenados.

Os espectros RMN ^{13}C – CPD (125 MHz, CD_3OD) e de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC (300x75 MHz, $[\text{CD}_3]_2\text{CO}$) (Figuras 109 e 110 p. 129) permitiram atribuir o padrão de hidrogenação a 10 linhas espectrais presentes no espectro RMN ^{13}C , distribuídas em 2 carbonos metilênicos, 7 carbonos metínicos e 1 carbono não-hidrogenado (Tabela 25, p. 126). O carbono em δ_{C} 38,5 (C-7) exibiu correlação com os hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,05 e 1,68 (2H-7) e o carbono em δ_{C} 31,4 (C-8) exibiu correlação com os hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 1,86 e 1,59 (2H-8). As absorções intensas em δ_{C} 74,8 (C-6) e δ_{C} 74,3 (C-9) foram atribuídas a carbonos oximetínicos, que exibiram correlações com os hidrogênios com absorções em δ_{H} 4,16 (H-6) e em δ_{H} 4,94 (H-9), respectivamente. Os outros três carbonos metínicos tiveram absorções em região de carbonos insaturados em δ_{C} 126,3 (C-2), 141,6 (C-3), 127,5 (C-4) e 141,8 (C-5). O carbono-hidrogenado em δ_{C} 170,5 (C-1) confirmou a presença de uma carbonila, possivelmente de éster.

O espectro de massa de baixa resolução (Fig. 106, p. 127) revelou um pico íon molecular com m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$ igual a 182, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 4.

A análise do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H , (COSY, Fig.111, p. 130) mostrou acoplamentos geminais entre o hidrogênio em δ_{H} 2,05 (H-7eq) com o hidrogênio em δ_{H} 1,68 (H-7ax), e do hidrogênio em δ_{H} 1,86 (H-8eq) com o hidrogênio em δ_{H} 1,59 (H-8ax). Também foi possível a visualização de acoplamentos vicinais entre o hidrogênio em δ_{H} 4,94 (H-9) com os hidrogênios do grupo metilênico em δ_{H} 1,19 (3H-10) e com o hidrogênio com absorção em δ_{H} 1,59 (H-8ax), e entre o hidrogênio em δ_{H} 4,16 (H-6) com os hidrogênios do grupo metilênico em δ_{H} 2,0 e δ_{H} 1,68 (2H-7) e entre o hidrogênio em δ_{H} 5,64 (H-5) com o hidrogênio em δ_{H} 4,16 (H-6), como mostrado na subestrutura a (Fig. 102a, abaixo). Em adição, na subestrutura b (Fig. 102b, abaixo) são representados acoplamentos entre o hidrogênio em δ_{H} 6,67 (H-3) com os hidrogênios em δ_{H} 5,82 (H-2) e 6,11 (H-4), e também entre o hidrogênio em δ_{H} 6,11 (H-4) com os hidrogênios em δ_{H} 5,64 (H-5).

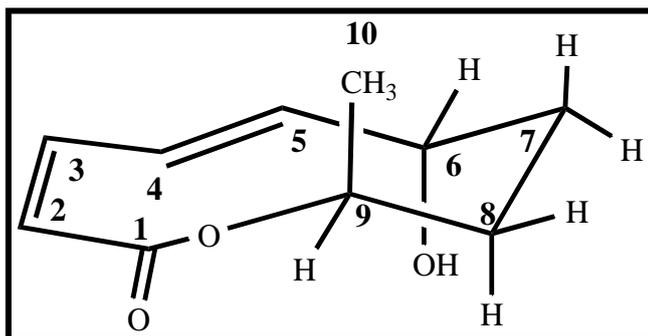
Figura 102 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H COSY da substância PS-9



Fonte Autor (2016).

A estereoquímica relativa da hidroxila equatorialmente orientada no carbono C-6 pôde ser determinada através do valor da constante de acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 4,16 (H-6), que exibiu acoplamento axial-axial com o hidrogênio em δ_{H} 1,68 (H-7ax, $J=8,7$ Hz) e axial-equatorial com o hidrogênio em δ_{H} 2,05 (H-7eq, $J=3,8$ Hz). Por outro lado, a metila do centro estereogênico em C-9 encontra-se axialmente orientada devido ao valor da constante de acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 4,94 (H-9) que exibiu acoplamento axial-axial com o hidrogênio δ_{H} 1,59 (H8 ax, $J=9,3$) e equatorial-equatorial com o hidrogênio em 1,86 (H-8eq, J muito pequeno), como mostrado na Figura a seguir (Fig. 103).

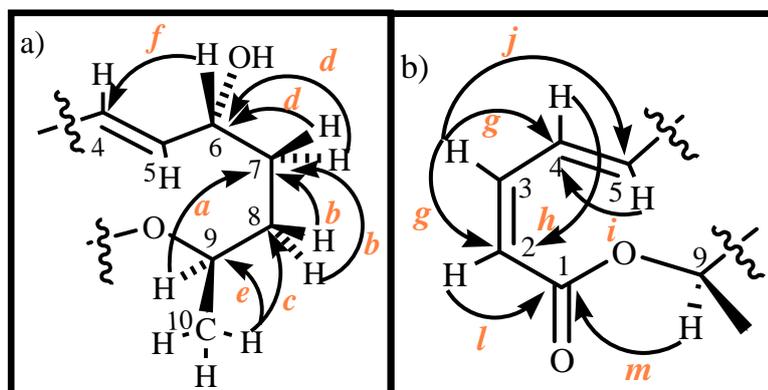
Figura 103- Representação da Estereoquímica de PS-9



Fonte: Autor (2016).

A análise do espectro de correlação heteronuclear a longa distância- HMBC (Fig. 112, p.131) permitiu a visualização de acoplamentos a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre os hidrogênios do grupo metilênico em δ_H 1,86 e 1,59 (2H-8) com o carbono em δ_C 38,5 (C-7), do grupo metilênico em δ_H 2,05 e 1,68 (2H-7) com o carbono em δ_C 74,8 (C-6), e do grupo metílico em δ_H 1,19 (3H-10) com o carbono em δ_C 74,3 (C-9), além dos acoplamentos ($^3J_{CH}$) do hidrogênio em δ_H 4,94 (H-9) com o carbono em δ_C 38,5 (C-7), dos hidrogênios do grupo metílico em δ_H 1,19 (3H-10) com o carbono em δ_C 31,4 (C-8) e do hidrogênio em δ_H 4,16 (H-6) com o carbono em δ_C 127,5 (C-4)(Fig. 104a, p. 125). Em adição, este espectro ainda mostrou correlações $^2J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 6,67 (H-3) com os carbonos em δ_C 126,3 (C-2) e δ_C 127,5 (C-4), do hidrogênio em δ_H 5,64 (H-5) com o carbono em δ_C 127,5 (C-4), e do hidrogênio em δ_H 5,82 (H-2) com o carbono em δ_C 170,5 (C-1). Foram ainda visualizadas correlações ($^3J_{CH}$) do hidrogênio em δ_H 6,11 (H-4) com o carbono em δ_C 126,3 (C-2), do hidrogênio em δ_H 6,67 (H-3) com o carbono em δ_C 141,8 (C-5), e do hidrogênio em δ_H 4,94 (H-9) com o carbono em δ_C 170,5 (C-1), como mostrado na Fig.104b (abaixo)(Tabela 26, p. 126).

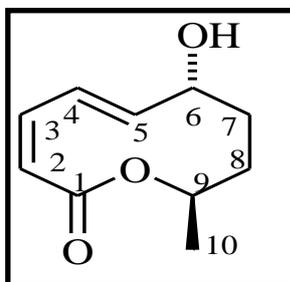
Figura 104- Representação das correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HMBC na molécula PS-9



Fonte: Autor (2016).

Com base nas informações anteriormente apresentadas foi possível afirmar que o composto denominado de PS-9 possui estrutura semelhante à do modiolido A (PS-7), e trata-se do estagonolido E, representada na Figura abaixo (Fig. 105). Os dados de rotação óptica observados foram $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -137,9$ (c 0,25; MeOH), {lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -180$ (c 0,2 CHCl_3)}.

Figura 105- Estrutura da substância isolada como PS-9, Estagonolido E



Fonte: Autor (2016).

Esse composto está sendo isolado pela primeira vez no gênero *Periconia*, porém já foi anteriormente isolado do fungo endofítico *Stagonospora cirsii* (EVIDENTE *et al.*, 2008) e do fungo marinho *Curvularia* sp. PSUF22 (TRISUWAN, *et al.*, 2011).

Tabela 25- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-9 com os do composto, estagonolido E da literatura

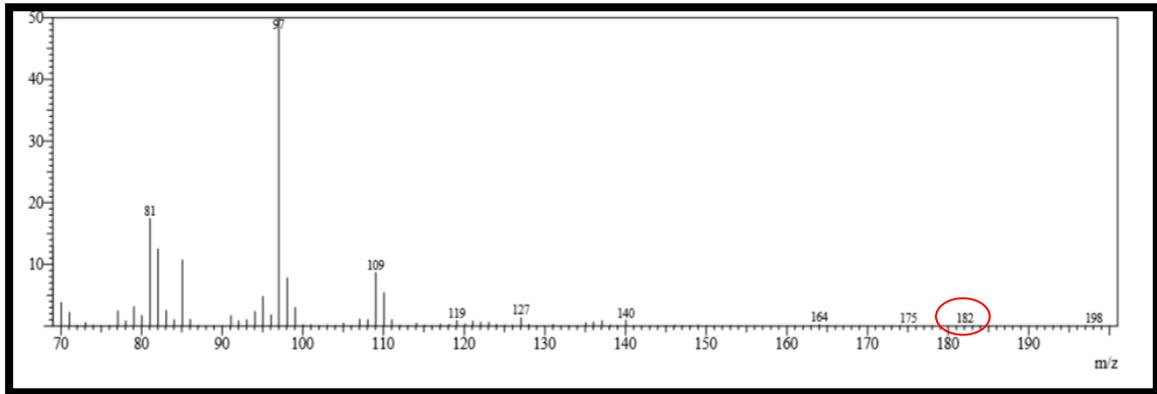
Posi- Cão	PS-9 (CD_3OD , 500 MHz)		Estagonolido E (CDCl_3 , 600 MHz) ¹	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação) ¹	δH , mult. e (J em Hz) ¹
1	170,5 (C)	--	168,2 (C)	--
2	126,3 (CH)	5,82 d (10,6)	125,6 (CH)	5,84 d (11,6)
3	141,6 (CH)	6,67 dd (10,6; 1,4)	139,6 (CH)	6,60 dL (11,6)
4	127,5 (CH)	6,11 dL (15,3)	126,6 (CH)	6,12 dL (15,4)
5	141,8 (CH)	5,64 dd (15,3; 9,5)	140,2 (CH)	5,73 dd (15,4; 9,6)
6	74,8 (CH)	4,16 dt (9,5; 3,8)	73,7 (CH)	4,24 ddd (9,6; 9,0; 3,8)
7	38,5 (CH_2)	eq 2,05 ddd (13,9; 9,2; 3,8) ax 1,68 m	37,4 (CH_2)	eq 2,08 ddd (14,2; 9,0; 3,8) ax 1,73 ddd (14,2; 9,5; 9,0)
8	31,4 (CH_2)	eq 1,86 ddL (15,3; 9,3) ax 1,59 m	30,4 (CH_2)	eq 1,85 dd (15,8; 9,0) ax 1,6 m
9	74,3 (CH)	4,94 t (6,5)	73,2 (CH)	4,98 dq (11,7; 6,5)
10	21,6 (CH_3)	1,19 d (6,5)	21,1 (CH_3)	1,21 d (6,5)

Legenda: J=constante de acoplamento; d= dubleto; t=tripleto; L= sinal largo; t= tripleto; m=multipleto. Fonte: ¹ Evidente *et al.*, (2008).

Tabela 26 - Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-9 [300x75 MHz, (CD_3)₂CO]

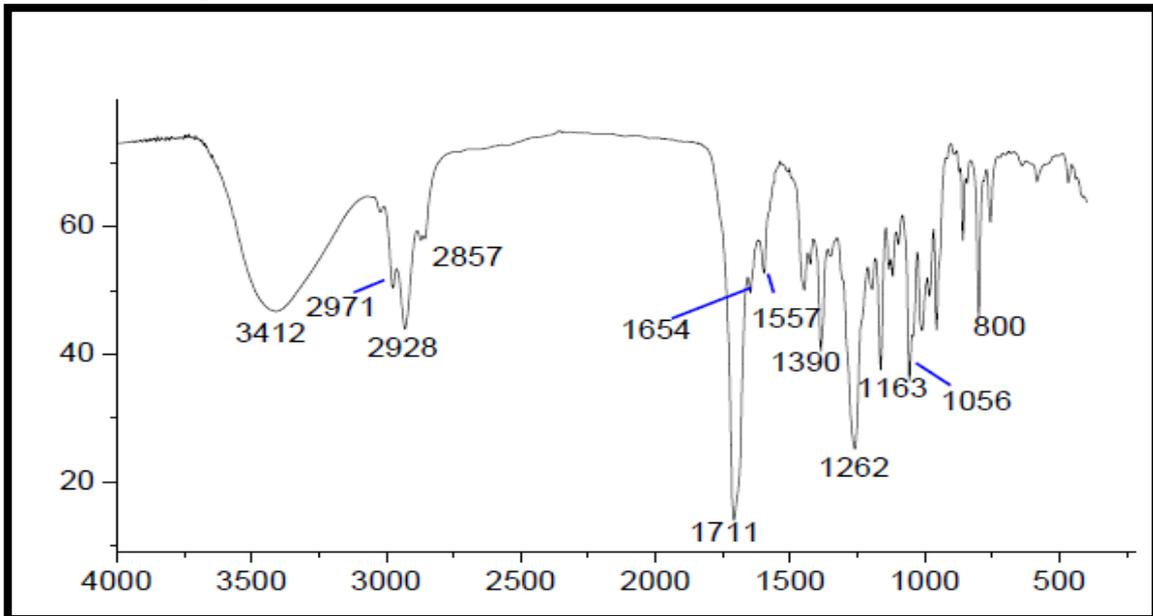
Posição	PS-9 HSQC		PS-9 HMBC		
	δC	δH , mult. e (J em Hz)	² J CH	³ J CH	⁴ J CH
1	170,5	--	H-2	H-9	--
2	126,3	5,82 d (10,6)	H-3	H-4	--
3	141,6	6,67 dd (10,6; 1,4)	H-2	H-5	--
4	127,5	6,11 dL (15,3)	H-5	H-6, H-3	--
5	141,8	5,64 dd (15,3; 9,5)	--	H-3	2H-8
6	74,8	4,16 dt (8,7; 3,8)	2H-7	--	--
7	38,5	eq 2,05 ddd (13,9; 9,2; 3,7) ax 1,68 m	2H-8	--	--
8	31,4	eq 1,86 ddL (15,3; 9,3) ax 1,59 m	2H-7	--	--
9	74,3	4,94 tL (6,0)	H-10	--	--
10	21,6	1,19 d (6,5)	--	--	--

Figura 106- Espectro de massa de baixa resolução obtido em CG/EM de PS-9

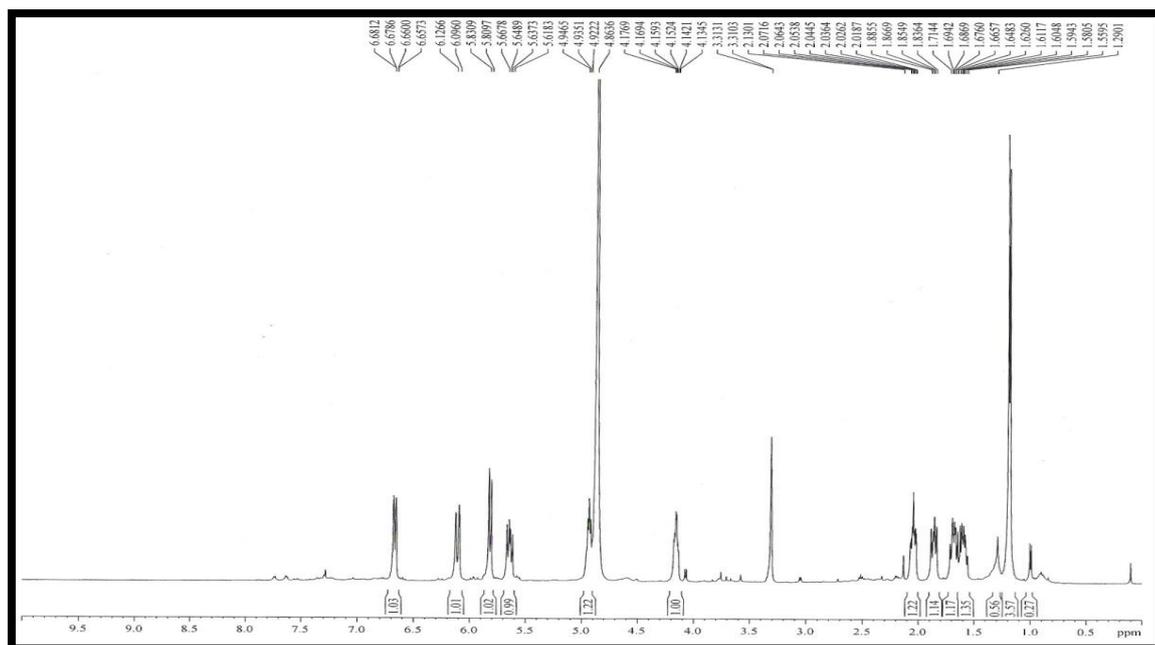


Fonte: Central analítica-UFC (2015).

Figura 107- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-9

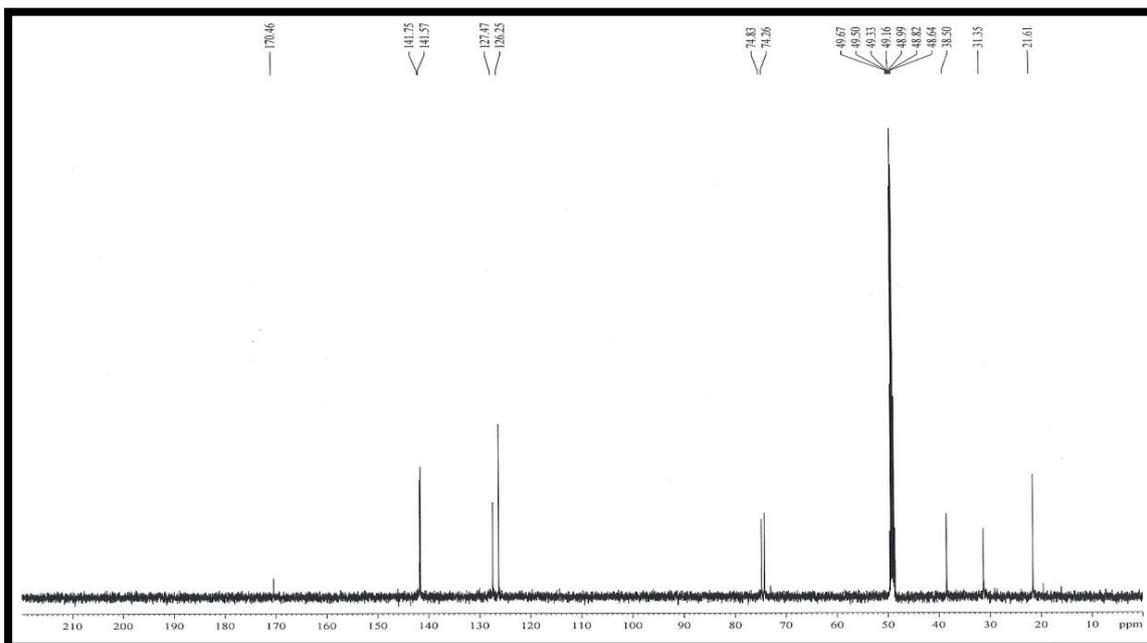


Fonte: LABIO-UFC (2015).

Figura 108- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-9

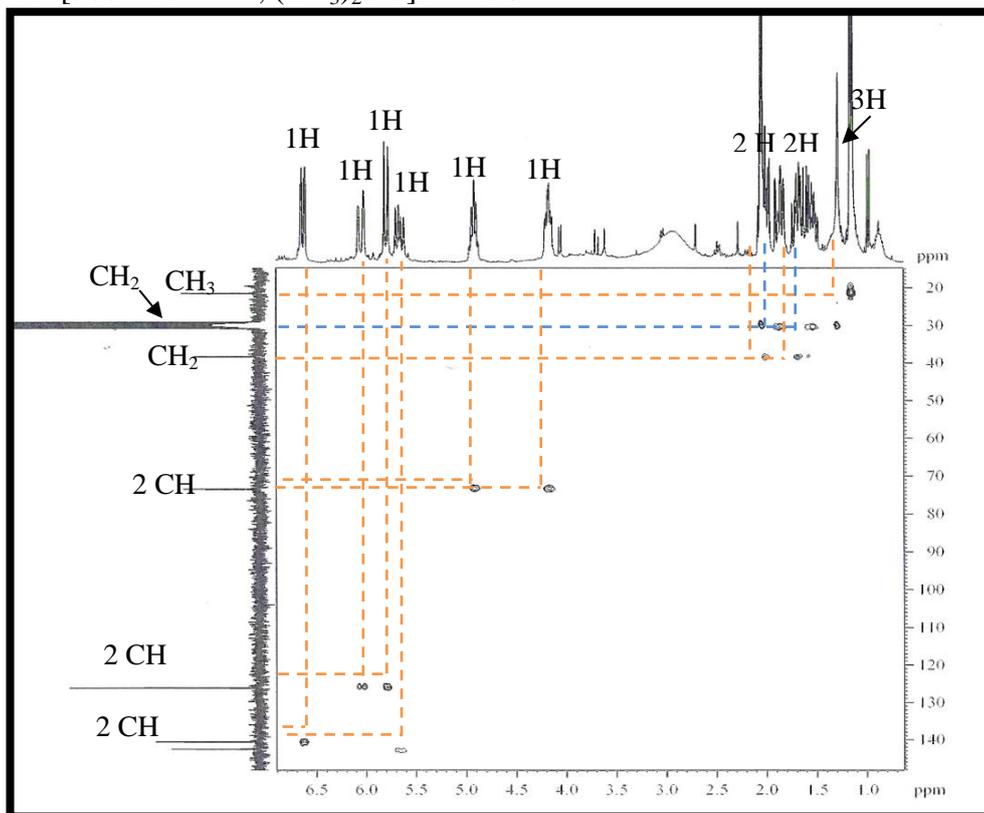
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 109- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-9



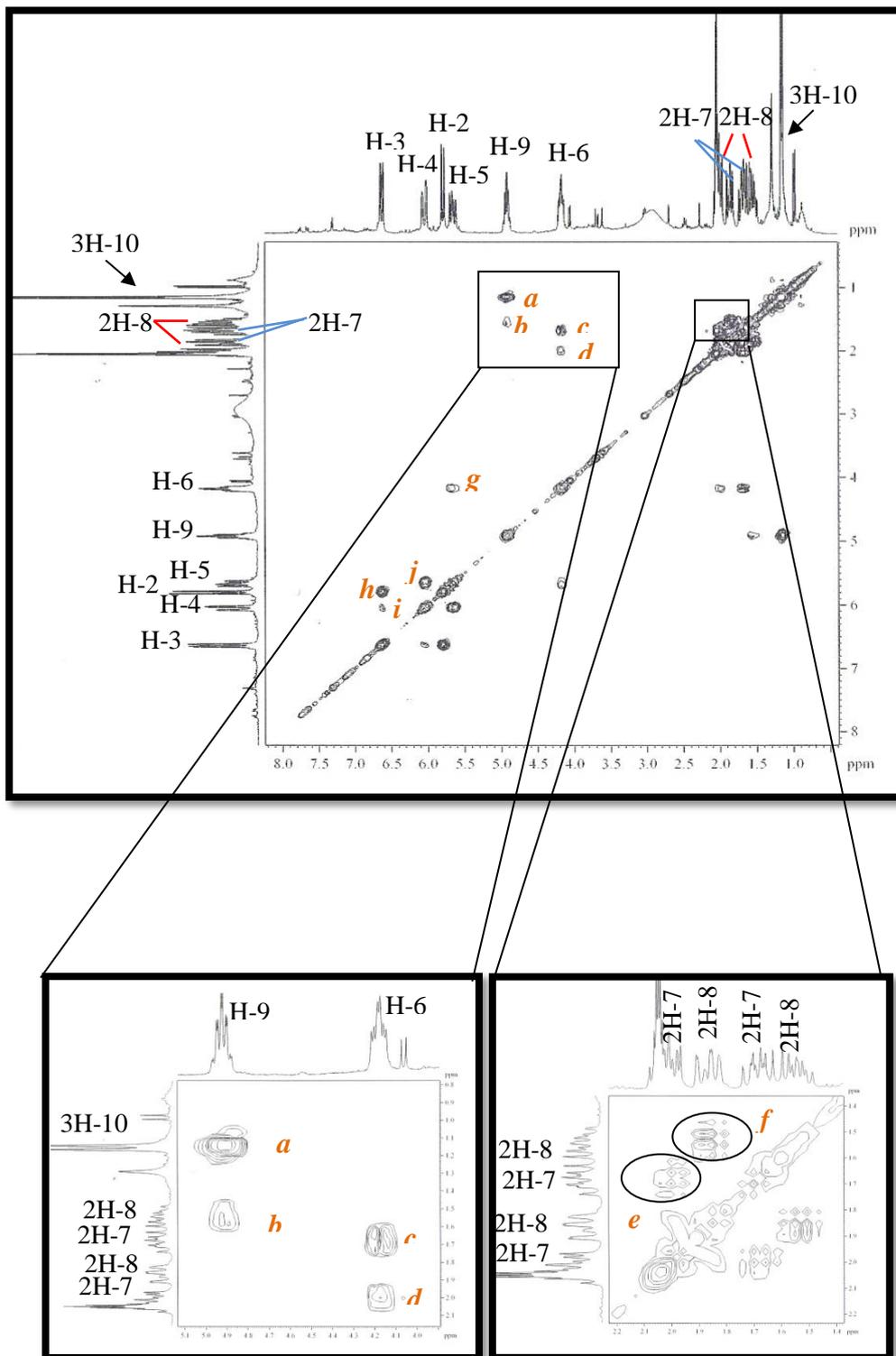
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 110 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões [300 x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-9



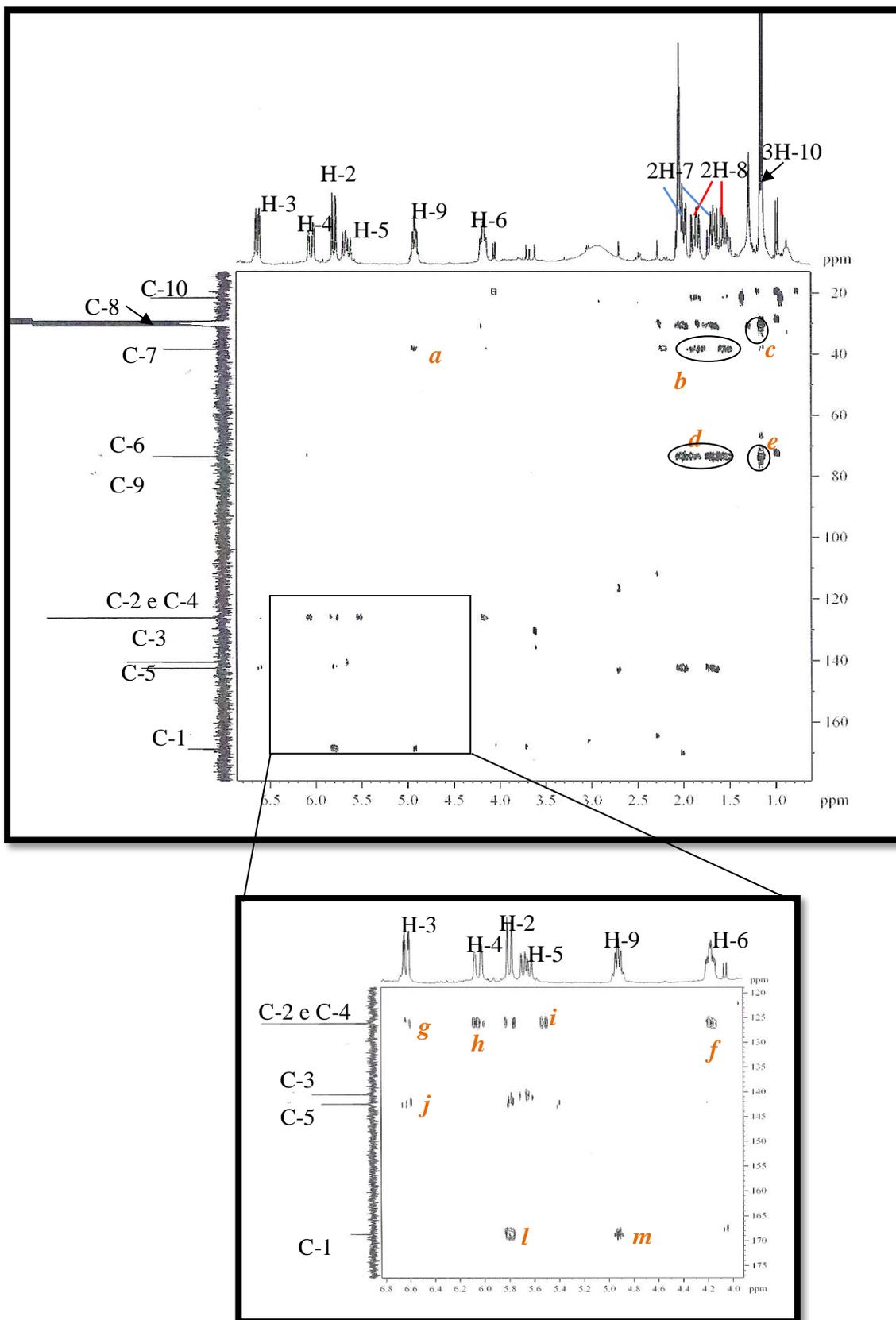
Obs.: o Carbono com δC 168,7 neste experimento (feito em acetona) não apresentou correlação $^2\text{J}_{\text{CH}}$ com nenhum hidrogênio. Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 111- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-9



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 112- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-9



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

6.11 Determinação estrutural de PS-11

Sucessivas cromatografias da fração diclorometano, obtida por meio de partição líquido-líquido do extrato MPD, resultaram na purificação de 15,0 mg de um sólido claro em formato de agulha, denominado de PS-11.

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou bandas intensas resultantes de deformação axial em ligações O-H (3478 e 3360 cm^{-1}), de ligação C=O conjugada (1640 cm^{-1}), além de uma absorção em 2924 cm^{-1} devido ao estiramento de ligação C-H assimétrico (Fig. 117, p. 135).

O espectro de RMN ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 300 MHz] mostrou absorções na região de hidrogênios pertencentes a anel aromático em δ_{H} 7,17 (1H, d, $J=7,7$ Hz; H-5), 7,55 (1H, t, $J=8,4$; 7,7 Hz, H-6) e 6,84 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-7), sugerindo a existência de um sistema 1,2,3-trissubstituído, além de um singlete largo em δ_{H} 12,3 (1H, singlete largo, OH-8), evidenciando a presença de uma hidroxila quelada com um grupo carbonila (Fig. 118, p. 136), e de hidrogênios de um grupo metilênico em δ_{H} 2,74 (1H, dd, $J=17,2$, 8,7 Hz, H-2 axial) e δ_{H} 3,07 (1H, dd, $J=17,2$; 4,1 Hz; H-2 equatorial).

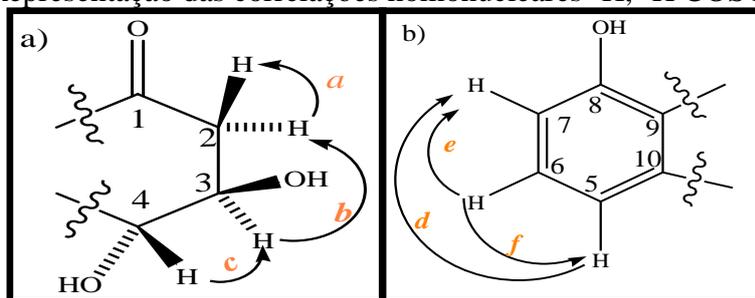
Os espectros RMN ^{13}C e de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC (Figuras 119 e 120, p. 136 e 137, respectivamente) permitiram atribuir o padrão de hidrogenação a todas as 10 linhas espectrais presentes no espectro RMN ^{13}C , distribuídas em 1 carbono metilênico, 5 carbonos metínicos e 4 carbonos não-hidrogenados (Tabela 27, p. 134). O carbono metilênico em δ_{C} 44,6 (C-2) exibiu correlação com os hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,74 e 3,07 (2H-2), enquanto que as absorções em δ_{C} 71,6 (C-3) e 73,3 (C-4) foram atribuídas a carbonos oximetínicos, através da correlação com os hidrogênios em δ_{H} 4,12 (1H, ddd, $J=8,7$; 7,2; 4,0 Hz, H-3 axial) e 4,68 (1H, dd, $J=7,2$ Hz; H-4). Além destes, foram observados outros três carbonos metínicos em δ_{C} 119,4 (C-5), 137,7 (C-6), 117,2 (C-7), e os carbonos não-hidrogenados em região de carbonos sp^2 oxigenado em δ_{C} 163,0 (C-8) e uma carbonila em δ_{C} 204,5 (C-1).

O espectro de massa de alta resolução (Fig. 116, p. 135) revelou um pico íon molecular com m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$ igual a 195,0655, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6 (calc. 195,0652; erro = 1,54 ppm).

A análise do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H , (COSY, Fig. 121, p. 137) mostrou acoplamentos geminais entre os hidrogênios em δ_{H} 2,74 (H-2 axial) e δ_{H} 3,07 (H-2 equatorial), além dos acoplamentos do hidrogênio em δ_{H} 4,12 (H-2 axial) com o hidrogênio em δ_{H} 4,12 H-3 (axial), e do hidrogênio em δ_{H} 4,12 (H-3 axial) com o hidrogênio em δ_{H} 4,68 (H-4), como mostrado na subestrutura a (Fig. 113a, abaixo). Em adição, na

subestrutura b (Fig.113b, abaixo), são representados os acoplamentos vicinais entre o hidrogênio em δ_H 7,55 (H-6) com os hidrogênios em δ_H 7,17 (H-5) e δ_H 6,84 (H-7).

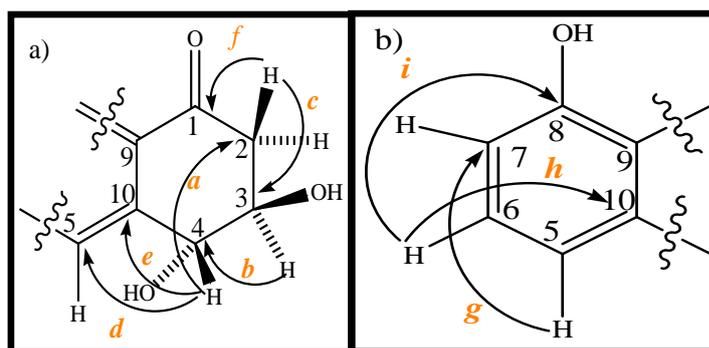
Figura 113- Representação das correlações homonucleares 1H , 1H COSY da substância PS-11



Fonte: Autor (2016).

O espectro de correlação heteronuclear a longa distância –HMBC (Fig. 122, p. 138) apresentou acoplamentos a duas ligações ($^2J_{CH}$) dos hidrogênios em δ_H 2,74 e 3,07 (2H-2) com os carbonos em δ_C 204,5 (C-1) e δ_C 71,6 (C-3), do hidrogênio em δ_H 4,12 (H-3) com o carbono em δ_C 73,3 (C-4), e do hidrogênio em δ_H 4,68 (H-4) com o carbono em δ_C 146,4 (C-10). Além disso, foram observados os acoplamentos $^3J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 4,68 (H-4) com os carbonos em δ_C 119,4 (C-5) e δ_C 44,6 (C-2), como mostrado na subestrutura a (Fig. 114a, abaixo). Na subestrutura b (Fig. 114b, abaixo), são mostrados os acoplamentos $^3J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 7,55 (H-6) com os carbonos em δ_C 163,0 (C-8) e em δ_C 146,4 (C-10), bem como o acoplamento do hidrogênio em δ_H 7,17 (H-5) com o carbono em δ_C 117,2 (C-7)(Tabela 28, p. 135).

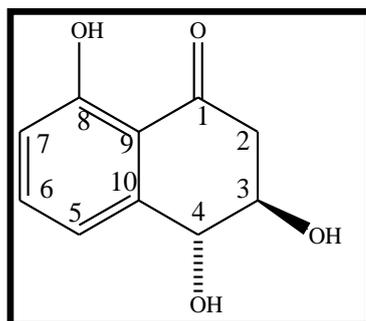
Figura 114- Representação das correlações HMBC na molécula PS-11



Fonte: Autor (2016).

A reunião dos dados anteriormente citados permitiu inferir que PS-11 trata-se da 3,4-diidro, 3,4,8-triidroxi, 1(2H) naftalelona (Fig.115, abaixo), uma toxina isolada de fungos patogênicos das espécies *Hypoxyylon mammatum* e *Phaeoacremonium aleophilum*, possuidora de atividade fitopatogênica contra *Arabidopsis thaliana* (BORGSCULTE, *et al.*, 1991; MANSOUR, COUCHÉL; TABACCHI, 2004). $\{[\alpha]^{21}D$ (c 0,1 MeOH)= -3,8 °} lit $\alpha]^{21}D$ (c 0,12 MeOH)= -40° ; ponto de fusão lit 177-178 °C}.

Figura 115- Substância isolada como PS-11



Fonte: Autor (2016).

Tabela 27- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-11 com os do composto 3,4 diidro, 3,4,8triidroxi (2*H*) naftalenona da literatura

Posi- Cão	PS-11 [(CD_3) $_2$ CO, 300 MHz]		3,4 diidro,3,4,8triidroxi1(2 <i>H</i>)naftalenona (CD_3OD , 300 MHz) ¹	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação) ¹	δH , mult. e (J em Hz) ¹
1	204,5 (C)	--	204,3(C)	--
2	44,6 (CH_2)	ax 2,74 dd (17, 2; 8,7) eq 3,07 dd (17, 2; 4,0)	44,4 (CH_2)	ax 2,74 dd (17,2; 8,1) eq 3,12 dd (17,2; 4,0)
3	71,6 (CH)	4,12 ddd (8,7; 7,2; 4,0)	71,7 (CH)	4,12 ddd (8,1; 6,8; 4,0)
4	73,3 (CH)	4,68 d (7,2)	73,3 (CH)	4,65 d (6,8)
5	119,4 (CH)	7,17 d (7,7)	120,0 (CH)	7,17 d (7,6)
6	137,7 (CH)	7,55 t (8,4; 7,7)	137,7 (CH)	7,58 dd (8,4; 7,6)
7	117,2 (CH)	6,84 d (8,4)	117,7 (CH)	6,9 d (8,4)
8	163,0 (C)	12,3 sL (OH)	163,2 (C)	--
9	129,9 (C)	--	145,9 (C)	--
10	146,4 (C)	--	140,0 (C)	--

Legenda: J=constante de acoplamento; d= dubleto; t=tripleto; sL= singleto largo.

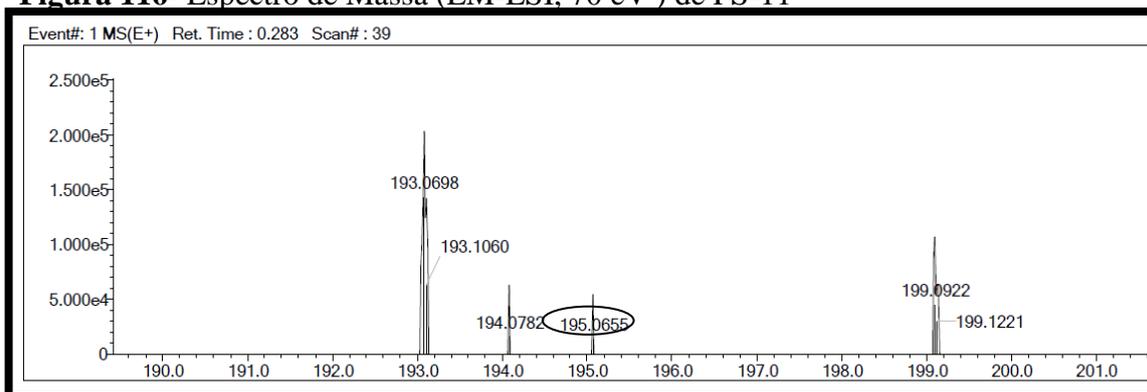
Fonte: ¹ Borgschulte *et al.*, (1991).

Tabela 28- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-11 [125 x 300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]

Posição	Δc	PS-11 HSQC	PS-11 HMBC	
		δH , mult. e (J em Hz)	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$
1	204.5	--	H-2	--
2	44.6	ax 2,74 dd (17, 2; 8,7) eq 3,07 dd (17, 2; 4,0)	--	H-4
3	71.6	4,12 ddd (8,7; 7,2; 4,0)	H-2	--
4	73.3	4,68 d (7,2)	H-3	--
5	119.4	7,17 d (7,7)	--	H-4
6	137.7	7,55 t (8,4; 7,7)	--	--
7	117.2	6,84 d (1, 8,4)	--	H-5
8	163.0	12,3 sL (OH)	--	H-6
9	129.9	--	--	--
10	146.4	--	H-4	H-6

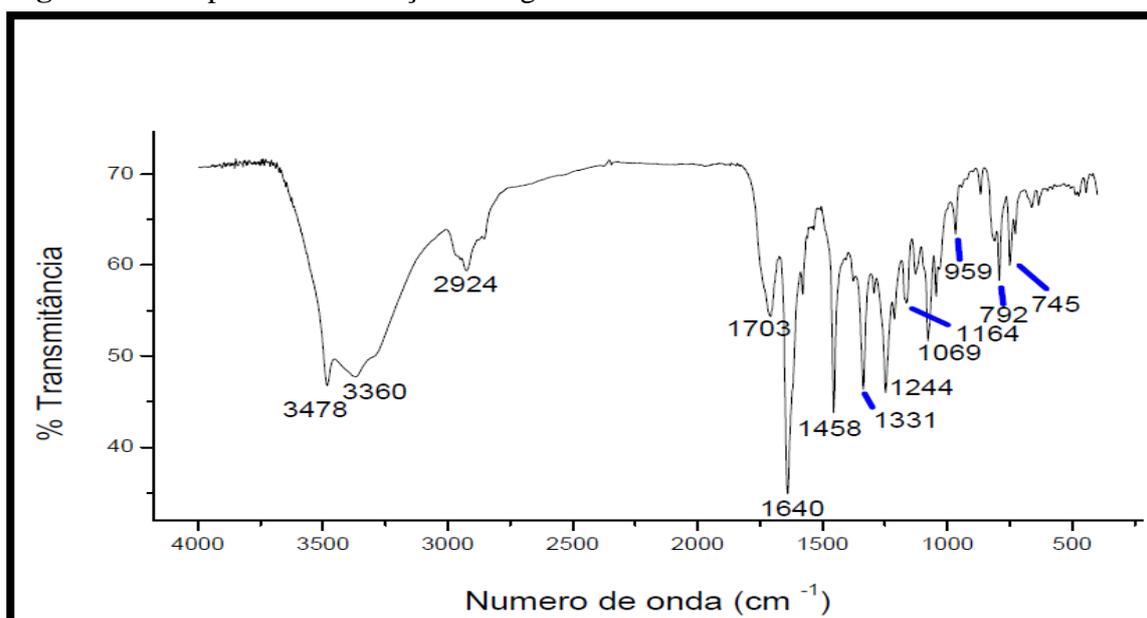
Legenda: d= duplete; t= tripleto; sL= singleto largo. Fonte: Autor (2016)

Figura 116- Espectro de Massa (EM-ESI, 70 eV) de PS-11



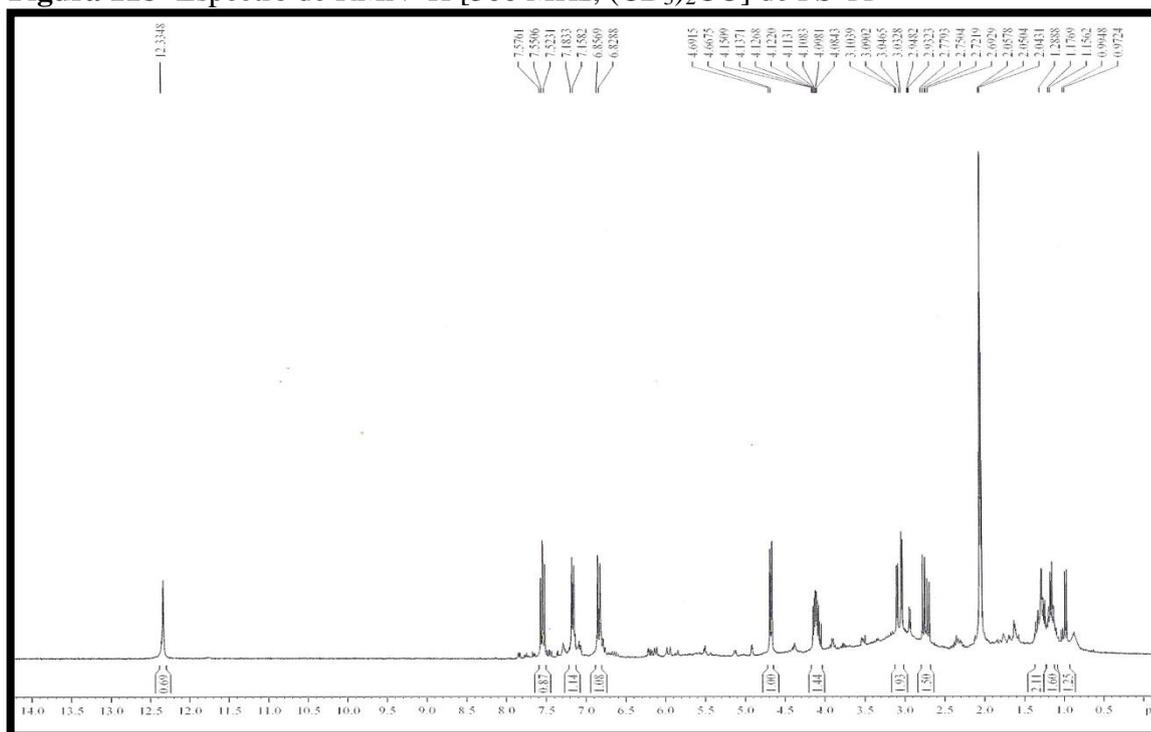
Fonte: LEMANOR- UFC (2015).

Figura 117- Espectro de absorção na região do infravermelho de PS-11



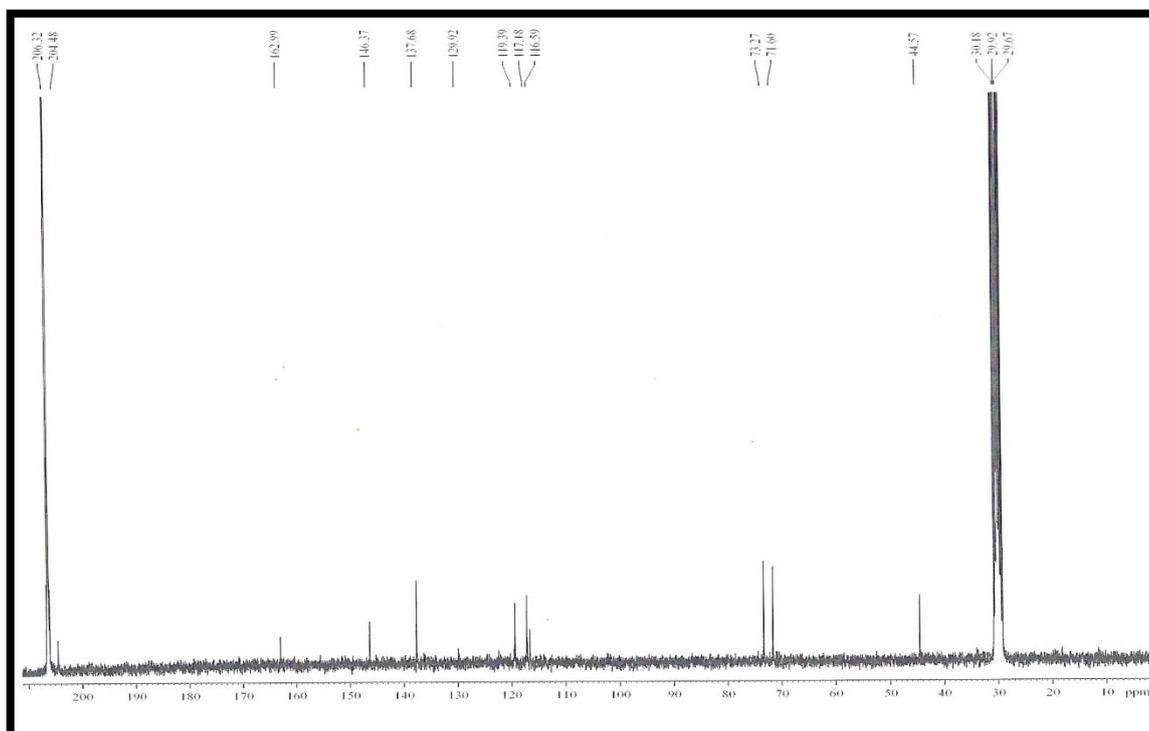
Fonte: LABIO-UFC (2015).

Figura 118- Espectro de RMN ^1H [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11



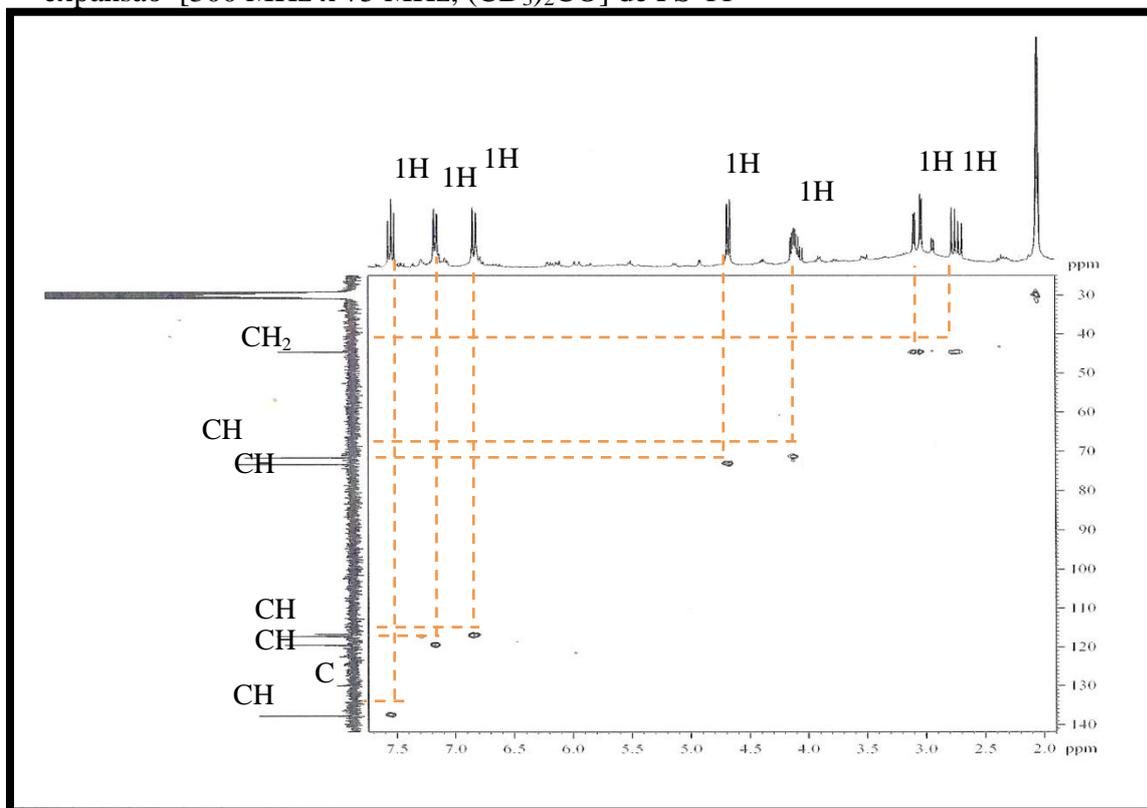
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 119- Espectro RMN de ^{13}C [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11



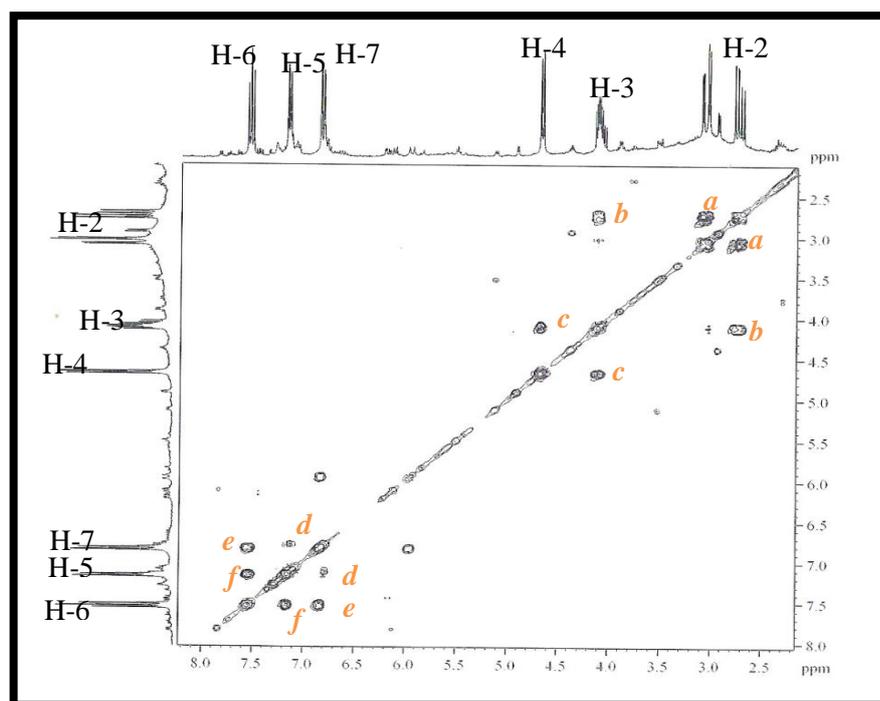
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 120- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC e expansão [300 MHz x 75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11



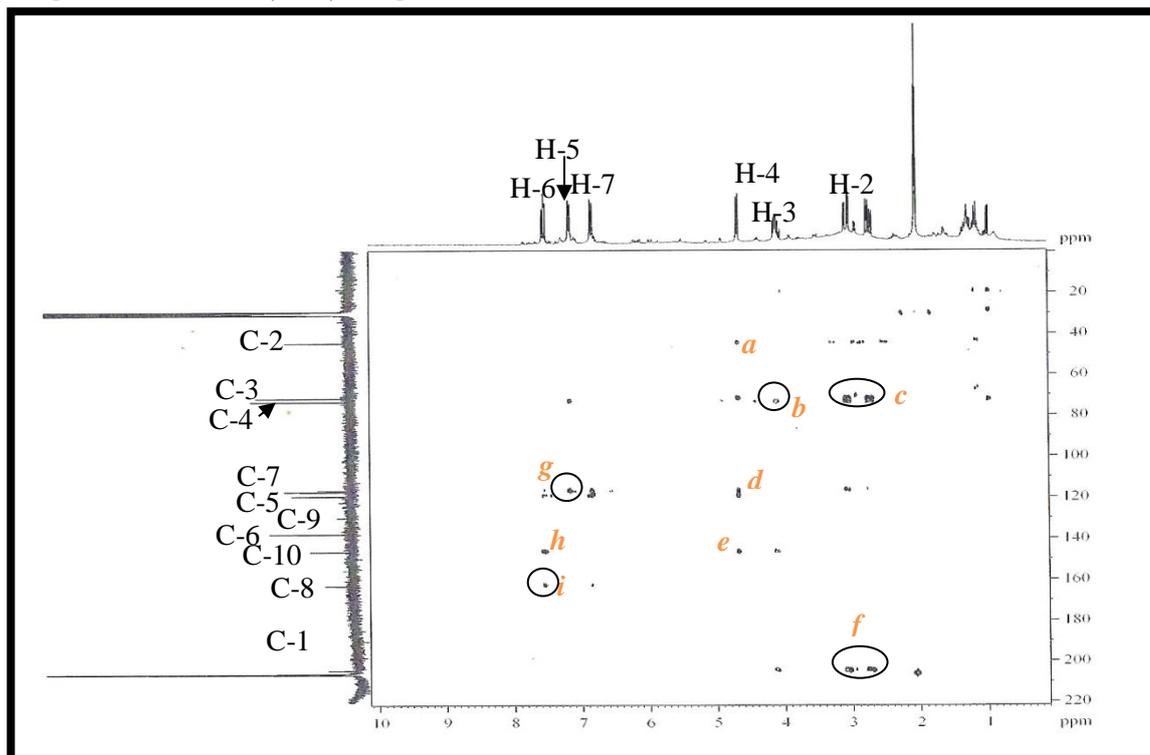
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 121- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 122- Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC [300 x 75 MHz $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de PS-11



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

6.12 Determinação estrutural de PS-12

Sucessivas cromatografias da fração diclorometano obtida por meio de partição líquido-líquido do extrato MPD, resultaram na purificação de 2,0 mg de uma resina marrom em formato de escamas e denominado de PS-12.

O espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-12 (Fig. 128, p. 143) mostrou-se muito semelhante ao de PS-11 (Fig. 118, p. 136), especialmente quanto a existência do anel aromático 1, 2, 3 trissubstituído contendo uma hidroxila quelada em C-8, através das absorções em δ_{H} 7,07 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-5), em δ_{H} 7,51 (1H, dd, 8,3; 7,5 Hz, H-6) e em δ_{H} 6,85 (1H, d, $J=8,3$ Hz, H-7). A diferença observada deve-se a presença de um grupo metilênico adicional através das absorções em δ_{H} 2,3 (2H, m, H-3) e δ_{H} 2,11 (2H, m, H-3), e apenas uma absorção relativa a um hidrogênio ligado a carbono oxigenado em δ_{H} 4,84 (1H, dd, $J=8,5; 3,8$ Hz, H-4). Em adição, foi ainda observado absorções intensas em δ_{H} 2,9 (1H, ddd, $J=17,8; 7,5; 4,6$ Hz, H-2 equatorial) e em δ_{H} 2,67 (1H, ddd, $J=17,8; 9,2; 4,8$ Hz, H-2 axial) referente a hidrogênios diastereotópicos de um grupo metilênico.

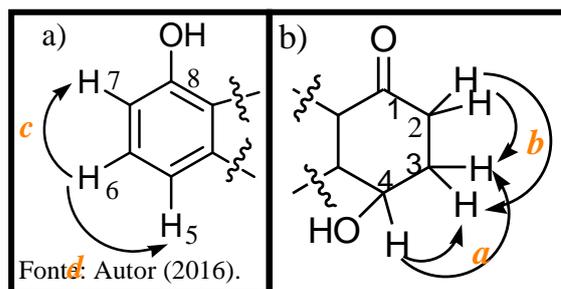
Os espectros RMN ^{13}C e de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC (Figuras 129 e 130, p. 144) permitiram atribuir o padrão de hidrogenação a todas as 10 linhas espectrais presentes no espectro RMN ^{13}C , distribuídas em 2 carbonos metilênicos, 4 carbonos metínicos e 4 carbonos não-hidrogenados (Tabela 29, p. 142). O carbono metilênico em δ_{C} 36,1 (C-2) exibiu correlação com os hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,9 e 2,67 (2H-2), e o carbono em δ_{C} 32,7 exibiu correlação com os hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,3 e 2,11 (2H-3). A absorção intensa em δ_{C} 68,4 (C-4) foi atribuída a um carbono oximetínico, que exibiu correlação com o hidrogênio com absorção em δ_{H} 4,84 (H-4). Os outros três carbonos metínicos tiveram absorções em região de carbonos insaturados em δ_{C} 118,9 (C-5), 138,2 (C-6), 118,0 (C-7). Dentre os carbonos não-hidrogenados, um deles apresentou absorção em região de carbonos sp^2 oxigenado em δ_{C} 163,3 (C-8), e o outro em δ_{C} 206,6 (C-1) confirmou a presença de uma carbonila, possivelmente de cetona conjugada, como já observado para PS-11.

O espectro de massa de baixa resolução (Fig. 127, p. 143) revelou um pico íon molecular com m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$ igual a 178, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6.

A análise do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H , (COSY, Fig. 131, p. 145) mostrou acoplamentos vicinais entre o hidrogênio em δ_{H} 7,51 (H-6) com os hidrogênios em δ_{H} 7,07 (H-5) e em δ_{H} 6,85 (H-7), como mostrado na subestrutura a (Fig. 123a, abaixo).

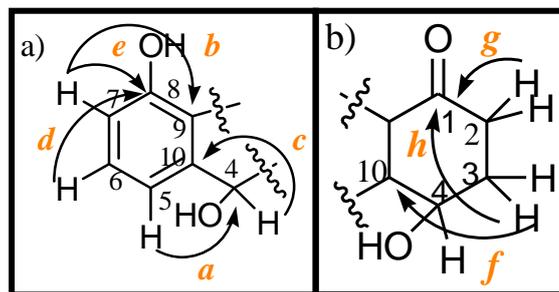
Em adição, na subestrutura b (Fig. 123b, abaixo), são representados dois acoplamentos vicinais entre os hidrogênios em δ_H 2,9 e 2,67 (2H-2) com os hidrogênios em δ_H 2,3 e 2,11(2H-3), além de um acoplamento entre o hidrogênio em δ_H 4,84 (H-4) com os hidrogênios em δ_H 2,9 e 2,67 (2H-2).

Figura 123 - Representação das correlações homonucleares 1H , 1H COSY da substância PS-12



O espectro de correlação heteronuclear a longa distância –HMBC (Fig. 132, p. 145) apresentou acoplamentos a duas ligações ($^2J_{CH}$) do hidrogênio em δ_H 6,85 (H-7) com o carbono em δ_C 163,3 (C-8), e do hidrogênio em δ_H 4,84 (H-4) com o carbono em δ_C 148,8 (C-10). Além disso, foram observados os acoplamentos $^3J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 7,07 (H-5) com o carbono em δ_C 68,4 (C-4), do hidrogênio em δ_H 7,51(H-6) com o carbono em δ_C 163,3 (C-8), e do hidrogênio em δ_H 6,85 (H-7) com o carbono em δ_C 116,7 (C-9), como mostrado na subestrutura a (Fig.124a, p. 141). Na subestrutura b (Fig. 124b, p. 141), são mostrados os acoplamentos $^3J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 2,3 e 2,11 (2H-3) com os carbonos em δ_C 206,6 (C-1) e em δ_C 148,8 (C-10), bem como o acoplamento $^2J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 2,9 e 2,67 (2H-2) com o carbono em δ_C 206,6 (C-1)(Tabela 30, p. 142).

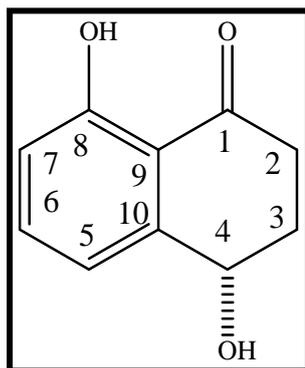
Figura 124- Representação das correlações HMBC na molécula PS-12



Fonte: Autor (2016).

A reunião dos dados anteriormente citados permitiu inferir que PS-12 trata-se da 4,8 diidroxil-1-tetralona (isosclerona)(Fig. 125, abaixo). Esse composto apresentou $[\alpha]_D^{19} = + 14,36$ (c 0,175 MeOH), lit $\{[\alpha]_D^{22} = + 18,5$ (c 3,25 CHCl₃) PRADO *et al.*, 2013}.

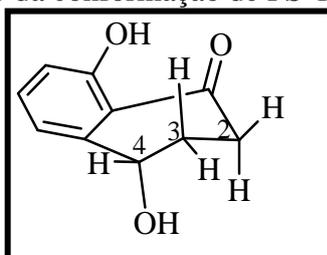
Figura 125- Estrutura química de PS-12, isosclerona



Fonte: Autor (2016).

A configuração relativa do grupo hidroxila axialmente orientada em C-4 pôde ser determinada através dos valores das constantes de acoplamento $J=8,5$ Hz (axial, equatorial) e $J= 3,8$ Hz (equatorial, equatorial), como mostrado na Figura 126, a seguir:

Figura 126- Representação da conformação de PS-12 (isosclerona)



Fonte: Autor (2016).

Esse composto já foi isolado do fungo *Cytospora eucalypticola*, e apresentou atividade antifúngica e antibacteriana contra as espécies *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Pseudomonas syringae*, *Bacillus subtilis* (KOKUBUN, *et al.*, 2003), *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (RUSMAN, *et al.*, 2016).

Tabela 29- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de PS-12 com os do composto, 4,8 dihidroxi tetralonana da literatura

Posi- Cão	PS-12 (CD_3OD , 500 MHz)		4,8 dihidroxi-teralona (CD_3OD , 400 MHz) ¹	
	δC (padrão de hidrogenação)	δH , mult. e (J em Hz)	δC (padrão de hidrogenação) ¹	δH , mult. e (J em Hz) ¹
1	206,6 (C)	--	206,3 (C)	--
2	36,1 (CH_2)	ax 2,67 ddd (17, 8; 9,2; 4,8) eq 2,9 ddd (17, 8; 7,5; 4,6)	36,1 (CH_2)	ax 2,74 ddd (17,8; 9,1; 4,8) eq 3,12 ddd (17,8; 7,6; 4,7)
3	32,7 (CH_2)	2,3(m) e 2,11(m)	32,6 (CH_2)	2,3 (m) e 2,1 (m)
4	68,4 (CH)	4,86 dd (8,5*; 3,8)	68,6 (CH)	4,84 dd (8,0; 3,8)
5	118,9 (CH)	7,07 d (7,5)	118,8 (CH)	7,07 dm (7,6)
6	138,2 (CH)	7,51 dd (8,3; 7,5)	137,9 (CH)	7,5 dd (8,3; 7,6)
7	118,0 (CH)	6,85 d (8,3)	117,6 (CH)	6,84 dm (8,3)
8	163,3 (C)	12,4 sL (OH)	163,7 (C)	--
9	116,7 (C)	--	116,5 (C)	--
10	148,8 (C)	--	148,6 (C)	--

Legenda: J=constante de acoplamento; d= dubleto; t=tripleto; sL= singleto largo. Fonte: ¹ Kokubun *et al.*, 2003.

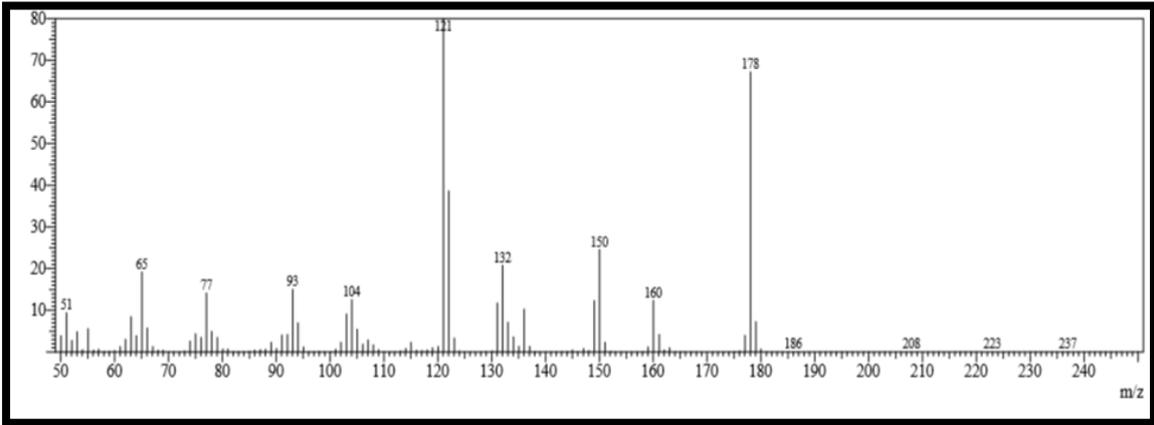
* constante calculada em outro espectro obtido com $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ da substância com algumas impurezas

Tabela 30- Dados RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronuclear ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC n J (n= 2 e n= 3) de PS-12 [500x125 MHz, (CD_3OD)]

Posição	PS-12 HSQC		PS-12 HMBC	
	Δc	δH , mult. e (J em Hz)	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$
1	206,6	--	H-2	H-3
2	36,1	ax 2,67 ddd (17, 8; 9,2; 4,8) eq 2,9 ddd (17, 8; 7,5; 4,6)	H-3	--
3	32,7	2,3(m) e 2,11(m)	H-2	--
4	68,4	4,86 dd (8,5; 3,8)	--	H-5
5	118,9	7,07 d (7,5)	--	--
6	138,2	7,51 dd (8,3; 7,5)	--	--
7	118,0	6,85 d (8,3)	--	--
8	163,3	12,4 sL (OH)	H-7	H-6
9	116,7	--	--	H-7
10	148,8	--	--	H-3

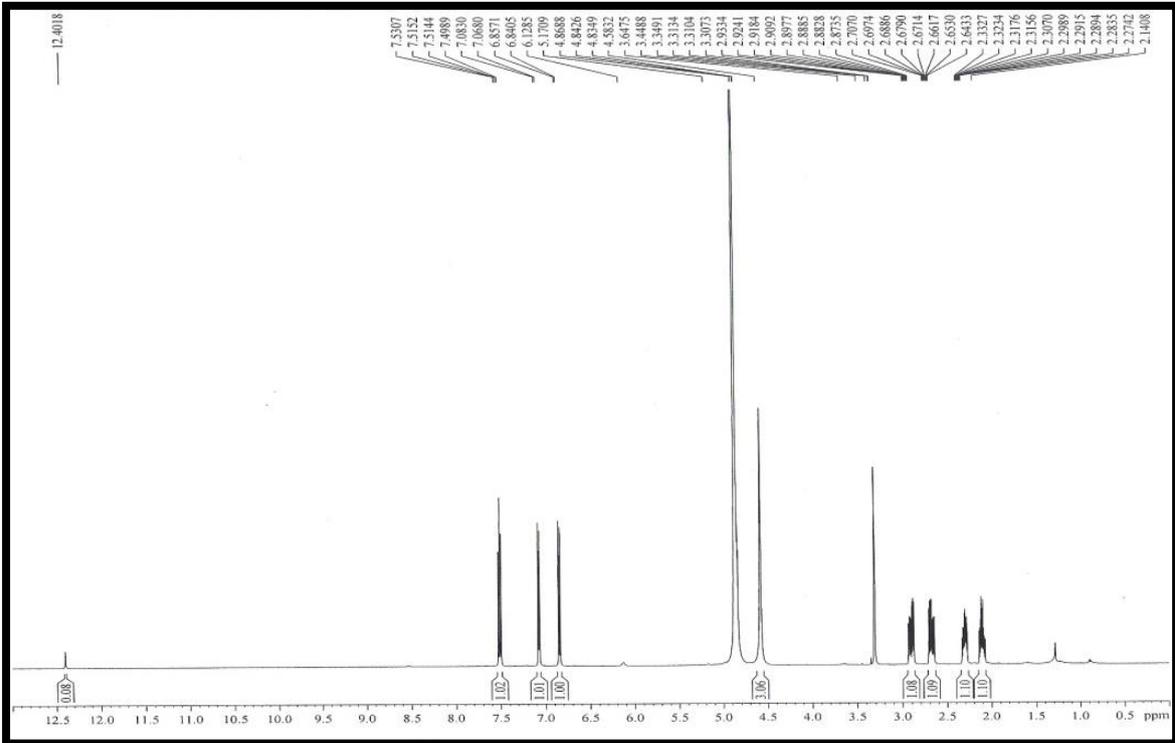
Legenda: d= dubleto; t= tripleto; sL= singleto largo. Fonte: Autor (2016)

Figura 127- Espectro de massa de baixa resolução CG/EM de PS-12 CG/EM



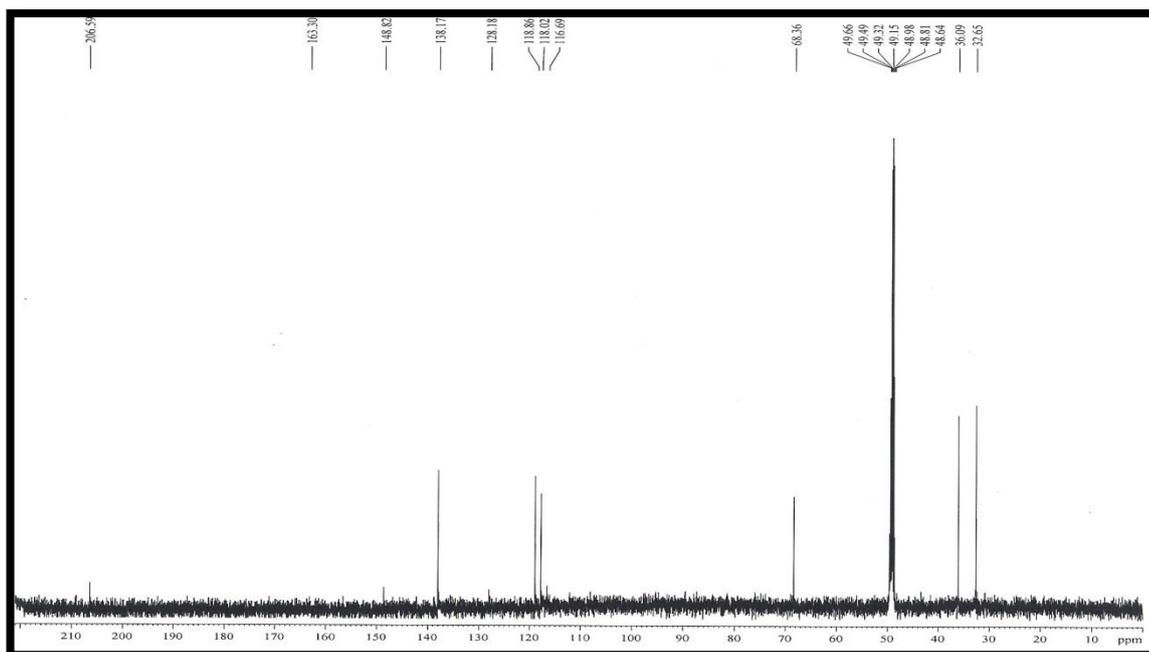
Fonte: Central analítica-UFC (2015).

Figura 128- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PS-12



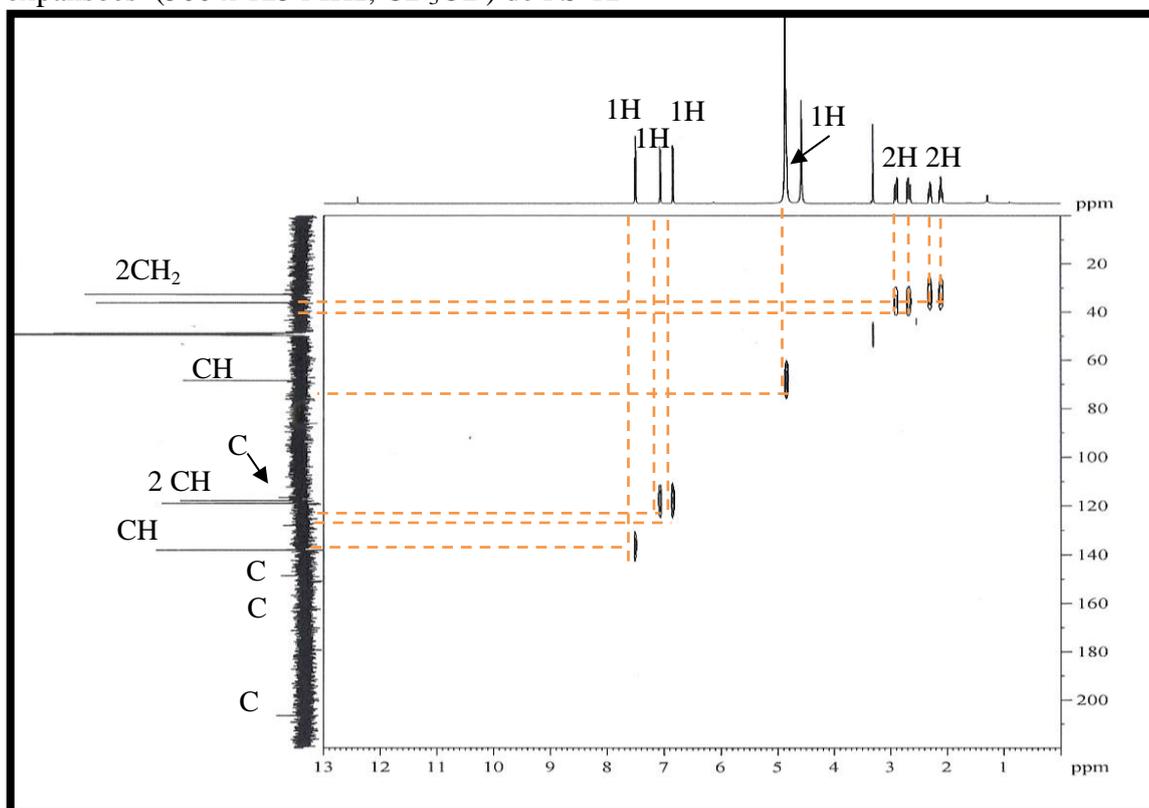
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 129- Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de PS-12



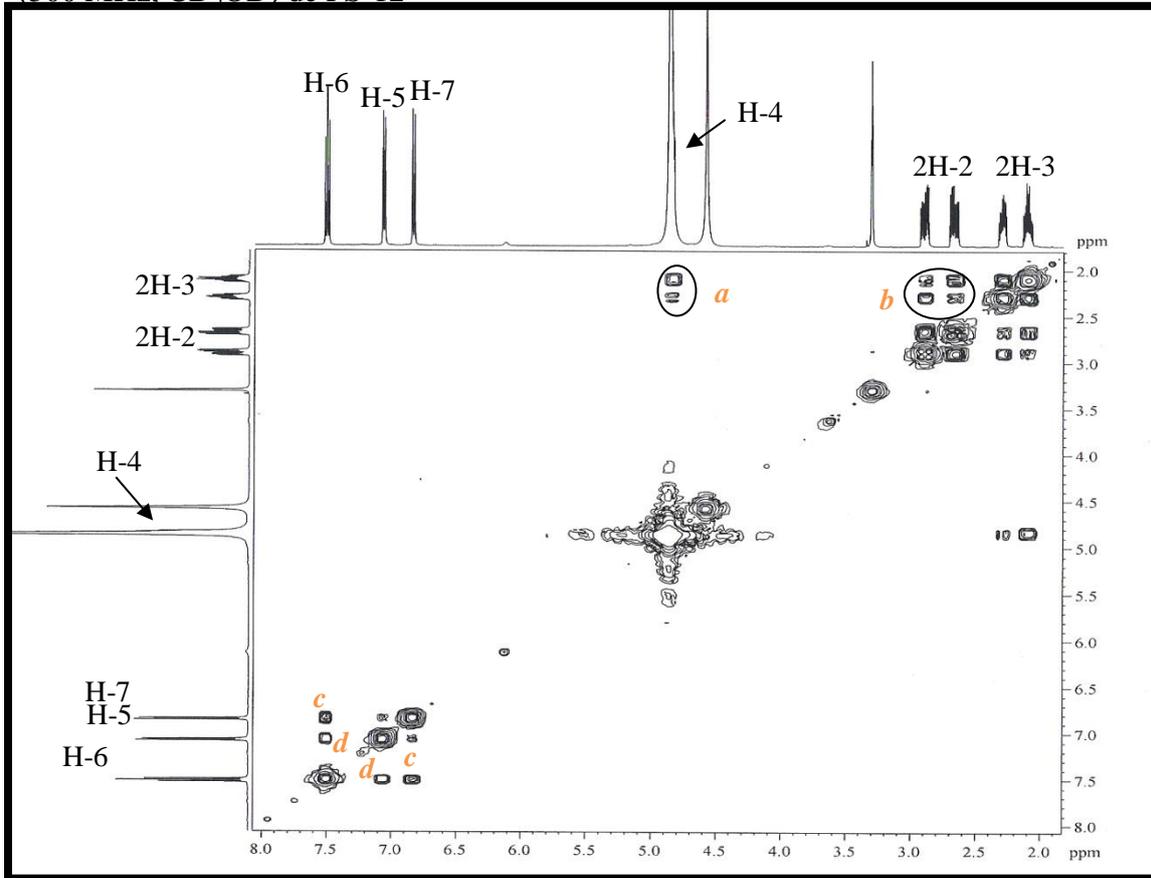
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 130 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e expansões (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-12



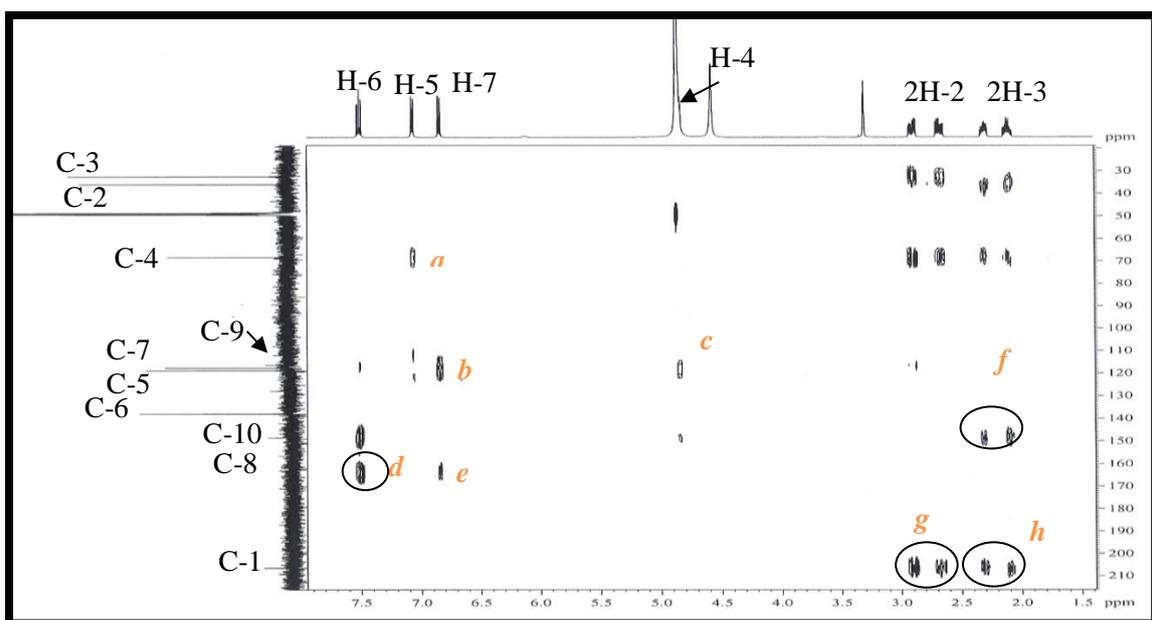
Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 131- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, CD_3OD) de PS-12



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

Figura 132 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de PS-12



Fonte: CENAUREMN-UFC (2015).

7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

7.1- Testes de Citotoxicidade

Embora os extratos e as frações testadas tenham apresentado atividade citotóxica, o mesmo não foi observado para as substâncias isoladas como PS-1 (R-6-hidroxi-2-metil, 4-cromanona), PS-3{*E*, 1-(2,5 diidroxifenil) but-2-en-1-ona}, PS-5{*Z*-3-(3-hidroxifenil) propenoato de metila}, PS-7(modiolido A), PS-8 (fusanolido B), PS-9 (estagonolido E) e PS-11{3,4-diidro, 3,4,8-triidroxi, 1(2*H*) naftalelona} quando testadas frente a linhagem de células tumorais humanas HCT-116 e MCF7.

7.2- Testes de atividade antifúngica

No teste preliminar a substância PS-3{*E*, 1-(2,5 diidroxifenil) but-2-en-1-ona} mostrou MIC de 125 µg/ mL, enquanto as substâncias PS-1 (R-6-hidroxi-2-metil, 4-cromanona), PS-5{*Z*-3-(3-hidroxifenil) propenoato de metila}, PS-7(modiolido A), PS-8 (fusanolido B), PS-9 (estagonolido E) e PS-11{3,4-diidro, 3,4,8-triidroxi, 1(2*H*) naftalelona} apresentou MIC de 500 µg/ mL.

No teste definitivo PS-3{*E*, 1-(2,5 diidroxifenil) but-2-en-1-ona} mostrou MIC de 125 µg/ mL para o fungo *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e de 62,5 µg/ mL para as cepas de *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 10522. Enquanto as substâncias PS-1 (R-6-hidroxi-2-metil, 4-cromanona), PS-7(modiolido A), PS-8 (fusanolido B), PS-9 (estagonolido E) apresentaram MIC >500 µg/ mL. As substâncias PS-5{*Z*-3-(3-hidroxifenil) propenoato de metila} e PS-11{3,4-diidro, 3,4,8-triidroxi, 1(2*H*) naftalelona} não foram submetidas a este segundo teste por falta de massa.

Tabela 31- Teste de atividade antifúngica

Substâncias	CIM (concentração inibitória mínima)		
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. albicans</i> ATCC 10522
	Teste preliminar		
PS-3		125 µg/ mL	
PS-1, 5, 7, 8, 9 e 11		500 µg/ mL	
	Teste definitivo		
PS-3	125 µg/ mL		62,5 µg/ mL
PS-1, 7, 8 e 9		> 500 µg/ mL	

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A prospecção preliminar de *P. hipidula* foi iniciada através do acompanhamento do crescimento do micro-organismo empregando quatro diferentes meios de cultivo: BD (batata e dextrose), BDL (batata, dextrose e levedura), MPD (malte, peptona e dextrose), MntPL (manitol, peptona e levedura) em períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. A avaliação da atividade citotóxica dos extratos obtidos revelou as frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato MPD 28d com hexano (FH MPD-28 dias) e diclorometano (FD MPD 28 d), como as mais promissoras.

A investigação química do extrato MPD 28d por meio da fração FD MPD 28d resultou no isolamento 11 metabólitos secundários, dos quais duas apresentaram-se inéditas na literatura: S-6-hidroxi-2-metil-4-cromanona (PS-2) e Fusanolido B (PS-8). Além disso, o composto 1-(2,5-diidroxifenil) but-2-en-1-ona (PS-3) apresentou atividade antimicrobiana com CIM de 125 µg/mL frente a cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e de 62,5 µg/mL frente às cepas de *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 10522 de *Candida* e 62,5 frente a *C. krusei* e *C. albicans*. O fracionamento da fração hexânica desse mesmo extrato (FH MPD 28d) levou ao isolamento de duas substâncias: um derivado de PS-1, o composto 1-(2',5'-diidroxifenil) butan-1-ona (PS-4), com dados RMN inéditos na literatura, além de PS-10 (em fase de caracterização estrutural).

O fracionamento da fração FH BDL 28d forneceu apenas uma substância diferente dos demais meios (PS-13, que se encontra em fase de caracterização estrutural), assim como o fracionamento do meio de cultivo BD 21d que forneceu de diferente o ácido 3,4 diidroxibenzóico que possui atividade antioxidante segundo a literatura.

Apesar da atividade preliminar dos extratos, nenhuma das substâncias testadas apresentou atividade citotóxica e apenas PS-3 apresentou atividade antifúngica elevada, enquanto PS-1, PS-5, PS-7, PS-8, PS-9 e PS-11 apresentaram atividade antimicrobiana moderada com CIM de 500 µg/mL. As substâncias isoladas não apresentaram atividade antibacteriana.

Das 13 substâncias isoladas, apenas duas: (R)-6-hidroxi-2-metil-4-cromanona e o macrociclo modiolido A já foram isoladas de espécies do gênero *Periconia*. No entanto, por meio do extrato MPD 28d foi possível a obtenção de 550 mg da primeira (18,3 % do extrato) e 160 mg da segunda (5,3 % do extrato), o que as tornam uma fonte promissora para gerar novas moléculas por meio de reações para a obtenção de derivados sintéticos.

Estes resultados confirmam o potencial químico e farmacológico dos fungos na produção de uma diversidade estrutural de metabólitos secundários a partir de uma única cepa através da manipulação de fatores nutricionais e períodos de cultivo que poderão ser utilizados para direcionar estudos posteriores utilizando outros fungos dentro dos grupos de pesquisa.

REFERENCIAS

- ALIAS, S. A; JONES, B. **Colonization of mangrove wood by marine fungi at Kuala Selangor Mangrove Stand, Malasya.** In: Hyde KD, Ho WH, Pointing SB (eds) Aquatic Mycology across the Millennium. Fungal Divers, 2000.
- AZEVEDO, J.L. **Botânica: uma ciência básica ou aplicada?** Revista Brasileira de Botânica, v. 22, p. 225-229, 1999.
- AZEVEDO, J.L. **Microorganismos endofíticos.** In: Ecologia Microbiana. Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (edts.). Editora EMBRAPA, Jaguariuna, São Paulo, Brasil, p. 117-137, 1998.
- BHILABUTRA, W.; TECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; Lumyong, S. **Antimicrobial Activity of Bioactive Compounds from *Periconia Siamensis* CMUGE 015.** Research Journal of Microbiology, v.10, p.749-755, 2007.
- BORGSCHULTE, K.; REBUFFAT, S. K.; WOLFRAM, T; SCHOMBURG, D.; PINON, J.; BODO, B. **Isolation and structure elucidation of hymatoxins b – e and other phytotoxins from *Hypoxylon mammatum* fungal pathogen of leuce poplars.** Tetrahedron, v. 41. no. 39, 1991.
- CANTRELL S. A., HANLIN, R.T.; EMILIANO, A. ***Periconia variicolor* sp. nov., a new species from Puerto Rico.** Mycologia, v. 99(3), p. 482–487, 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3, 3rd ed Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes.** Ed. CAB- Commonwealth Mycological Institute Kew, SURRE, England. 1971.
- EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; BERESTETSKIY, A.; MITINA, G.; ANDOLFI, A. E MOTTA, A. **Stagonolides B-F, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsii*, a Potential Mycoherbicide of *Cirsium arvense*.** Journal of Natural Products, v. 71, p. 31-34, 2008.
- FERCHICHI, L.; DERBRÉ, S.; MAHMOOD, K.; TOURÉ, K.; GUILLET, D.; LITAUDON, M.; AWANG, K.; HADI, H.A.; RAY, A-M.; RICHOMME, P. **Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*.** Phytochemistry, v.78, p. 98-106, 2012.
- GE, Han-lin; ZHANG, De-Wu; LI, Li; XIE, Dan; ZOU, Jian-Hua; SI, Yi- Kang; DAI, Jungui. **Two New Terpenoids from Endophytic Fungus *Periconia* sp F-31.** Chemical Pharmaceutical Bulletin, v. 59(12), p. 1541-1544, 2011.
- GILES, D e Turner, W. B. **Chlorine-containing Metabolites of *Periconia macrospinosa*.** J. Chem. SOC. (C), 1969.
- GONZALEZ, I. S. C. ***Periconia hipidula*: Um novo biocatalisador do semiárido para a redução de cetonas aromáticas pró-quirais.** 2013, 77 p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana (UEFS), 2013.

GREVE, H.; SCHUPP, P. J.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS, S.; KOENIG, G. M. **Ten-Membered Lactones from the Marine-Derived Fungus *Curvularia* sp.** Journal of Natural Products, v. 71(9), 2008.

GUO *et al.*, 2008 B., Wang Y., Su X., Tang K. **Bioactive Natural Products from Endophytes: A review.** Applied Biochemistry and Microbiology, v. 44, p.136-139, 2008.

HAYATA, K.; TANIGUCHI, M.; NAGAI, K.; YAMAJI, K.; NIIMURA, N. **Manufacture of polyhydroxy compound as cathepsin L inhibitor with *Periconia* and its pharmaceutical use.** Kokay Tokkyo Koho, 1998.

HERMOSO, A.; JIMÉNEZ, I.A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I.L.; PINERO, J.E.; RAVELO, A. G.; e VALLADARES, B. **Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 11, p. 3975-3980, 2003.

KELLER, N.P; TURNER,G.; BENNETT, J.W.; **Fungal secondary metabolismo-from biochemistry to genomics.** Nature Reviews/Microbiology, v.3, p. 937-947, 2005.

KIM, S.; SHIN, D. LEE, T.; OH, K. **Periconicins, Two New Fusicoccane Diterpenes Produced by an Endophytic Fungus *Periconia* sp. with Antibacterial Activity.** Journal of Natural Products, v. 67, p. 448-450, 2004.

KOHLMEYER, J. **New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615–5315 m).** Revue Mycol, v. 41, p.189–206, 1977.

KOKUBUN, T.; VEITCH, N.C.; BRIDGE, P. D.; SIMMONDS, M.S.J. **Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*.** Phytochemistry, v. 62, p. 779–782, 2003.

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

MACHADO, S. S. **Biorredução de cetonas por fungos conidiais do semiárido brasileiro.** 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana (UEFS), 2012.

MACKO ,V; STIMMEL, M. B.; PEETERS, H.; WOLPERT ,T.J.; DUNKLE, L.D.; ACKLIN, W.; R. Banteli, R.; JAUN, B; e ARIGONI, D. **The structure of circinatin, a non-toxic metabolite from the plant pathogenic fungus *Periconia circinata*.** Birkhauser Verlag Basel, 1990.

MACKO,V.; STIMMEL, M. B.; WOLPERT, T. J.; DUNKLEO, L. D.; ACKLIN,W.; BANTELI, R.; JAUN, B.; e ARIGONI, D.; **Structure of the host-specific toxins produced by the fungal pathogen *Periconia circinata*.** Proceedings of the National Academy of sciences, USA, v. 89,1992.

MANSOUR, E. A.; COUCHÉ, E.; TABACCHI, R. **Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms?** Phytopathologia Mediterranea, v. 43, p. 75-82, 2004.

MARKOVSKAJA, S.; KAČERGIUS, A. **Morphological and molecular characterisation of *Periconia pseudobyssoides* sp. nov. and closely related *P. byssoides*.** German Mycological Society and Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.

MASON, E.W.; ELLIS, M.B.; *Periconia curta*; Mycological Papers, v. 56, 1953.

MOSMANN, T.J. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURRAY, P. M.; BOWER, J. F. B.; COX, D. K.; GALBRAITH, E. K.; PARKER, J. S.; SWEENEY, J. B. **A Robust First-Pass Protocol for the Heck–Mizoroki Reaction.** Organic Process Research & Development, v. 17, p. 397–405, 2013.

NAEIMI, H.; AMINI, A.; AND MORADIAN, M. **Regioselective direct ortho C-acylation of phenol and naphthol derivatives catalyzed by modified ZnCl₂ on Al₂O₃ as catalyst under solvent-free and microwave conditions.** Organic chemistry frontier, v. 1, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M., SNADER, K. M. **The influence of natural products upon drug discovery.** Natural Product Reports, v. 17, p. 215 – 234, 2000.

ODVODY S.N.; DUNKLE, L.D.; EDMUNDS, L.K. **Characterization of the *Periconia circinata* population in a milo disease nursery on roots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench.** Phytopathology, v.67, p.1485–1489, 1977.

OLIVEIRA, F. C. **Aspectos gerais e morfológicos do fungo "*Periconia* sp."**, 2010. disponível em http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/07/aspectos-gerais-e-morfolgicos-do-fungo_9126.html. Acesso em 21.10.2014 às 17:44 h.

PASCHOLATE, S. F. **Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios.** In. BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIN, L.: Manual de fitopatologia. 3^a ed. São Paulo: Ceres, v.1, p.365-392, 1995.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W.L. **Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico.** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 29, p.62-76, 2002.

PRADO, S.; BUISSON, D.; NDOYE, I.; VALLET, M.; NAY, B.; **One-step enantioselective synthesis of (4S)-Isosclerone through biotransformation of juglone by an endophytic fungus.** Tetrahedron Letters, vol. 53, p. 1189-1191, 2013.

PRASANNARAI, K.; SRIDHAR, K.R. **Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India.** Current Science, v. 81(3):304–311, 2001.

ROMERO, A.; CARRIÓN, G.; RICO-GARY, V. **Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Aparthenium hysterophorus* (Asteraceae).** Fungal Divers, v.7, p.81–87, 2001.

RUSMAN, Y.; HELD, B.W.; BLANCHETTE, R. A. WITTLIN, S. e SALOMON, C. E. **Soudanones A–G: Antifungal Isochromanones from the Ascomycetous Fungus *Cadophora* sp. Isolated from an Iron Mine.** Journal of Natural Products, v. 78, p. 1456–1460, 2015.

SCOTT, K. N. **Carbon- 13 Nuclear Magnetic Resonance of Biologically Important Aromatic Acids. I. Chemical Shifts of Benzoic Acid and Derivatives.** Journal of the American Chemical Society. 1972.

SHIMADA, A.; KUSANO, M.; MATSUMOTO, K.; NISHIBE, M.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. **Pollen growth regulator, Fusanolide A, and related metabolite from *Fusarium* sp.** Verlag der zeitschrift fur naturforschung tubingen, 2001.

SILVA, M. S. **Fungos endofíticos: fontes promissoras de novas substâncias com atividades antioxidante e antiviral.** 2009, 61 p. Monografia de Curso de Especialização em Microbiologia - Universidade federal de minas gerais (UFMG). Belo Horizonte, 2009.

SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TADPETCH, K.; SUKPODMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; SAKAYAROJ, J. **Modiolin and phthalide derivatives from the endophytic fungus *Microspheeropsis arundinis* PSU-G18.** Tetrahedron Letters, v. 68 p. 10005-10010, 2012.

SOUZA, A. Q. L. A.; SOUZA, D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham.** Acta Amazônica, v. 32(2), p. 185-195, 2004.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE D. **Taxol and Taxane production by *Taxomyces andereanae*, na endophytic fungus of pacific Yew.** Science, v. 260, p.214–216, 1993.

SYAFNI, N.; PUTRA, D.P. e ARBAIN, D. **3,4-Dihydroxybenzoic Acid and 3,4-Dihydroxybenzaldehyde from the Fern *Trichomanes Chinense* L.; Isolation, Antimicrobial and Antioxidant Properties.** Indonesian Journal of Chemistry, v. 12, p. 273-278, 2012.

TELES, H. L.; SORDI, R.; SILVA, G. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; PFENNING, L. H.; ABREU, L. M.; COSTA-NETO, C. M.; YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, Â. R. **Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopi*.** Phytochemistry, v. 67, p. 2686–2690, 2006.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. **Modiolide and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-derived Fungus *Curvularia* sp. PSU-F22.** Archives of Pharmacal Research, v. 34, no 5, p.709-714, 2011.

TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. **Modiolides A and B, Two New 10-Membered Macrolides from a Marine-Derived Fungus.** Journal of Natural Products, v. 66, p.412-415, 2003.

TUBAKI, K.; ITO, T. **Fungi inhabiting in brackish water.** Rep. Tottori Mycol. Inst. (Jpn), v. 10, p. 523–539, 1973.

VERMA, V. C.; LOBKOVSKY, E.; GANGE, A. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. **Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L.** Journal of Antibiotics, v. 64, p.427–431, 2011.

VIEIRA, M.L.A. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* vell. (*solanaceae*).** 2008, 117 p. Dissertação de mestrado. Universidade federal de Minas Gerais (UFMG), 2008.

WU, Y-h.; CHEN, G-d.; WANG, C-X.; HU, D.; LI, X-X.; LIAN, Y-Y.; LIN, F. L.; GUO, L-d.; GAO, H. **Pericoterpenoid A, a new bioactive cadinane-type sesquiterpene from *Periconia* sp.** Journal of Asian Natural Product Research. 2015.

YAMADA, T.; DOI, M.; MIURA, A.; HARADA, W.; HIRAMURA, M.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A. **Absolute Stereostructures of Cell-adhesion Inhibitors, Peribysins A, E, F and G, Produced by a Sea Hare-derived *Periconia* sp.** The Journal of the antibiotics, v. 58(3), p.185–191, 2005.

YAMADA, T.; IRITANI, M.; MINOURA, K.; KAWAI, K.; NUMATA, A. **Peribysins A–D, potent cell-adhesion inhibitors from a sea hare-derived culture of *Periconia* species.** Organic & Biomolecular Chemistry, v. 2, p. 2131-2135, 2004.

YAMADA, T.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A. **Absolute stereostructures of cell-adhesion inhibitors, macrosphelides C, E–G and I, produced by a *Periconia* species separated from an aplusia sea hare.** The Royal Society of Chemistry, 2001.

YAMADA, T.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A. **Absolute Stereostructures of Cell Adhesion Inhibitors, Macrosphelides H and L, from *Periconia byssoides* OUPS-N133.** The Journal of the antibiotics, v. 55, no 2, 2002.

YAMADA, T.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A.; **Cell-adhesion Inhibitors Produced by a Sea Hare-derived *Periconia* sp. III Absolute Stereostructures of Peribysin J and Macrosphelide M.** The Journal of the antibiotics, v. 60, p. 370–375, 2007a.

YAMADA, T.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A. **Cell-adhesion Inhibitors Produced by a Sea Hare-derived *Periconia* sp. II Absolute Stereostructures of Peribysins H and I.** The Journal of the antibiotics, v. 59(6), p. 345–350, 2006.

YAMADA, T.; IRITANI, M.; OHISHI, H.; TANAKA, M.; DOI, M.; NUMATA, A. **Pericosines, antitumor metabolites from the sea hare-derived fungus *Periconia byssoides*. Structures and biological activities.** Organic and biomolecular chemistry, v.5, p. 3979-3986, 2007b.

ZHANG, D.; TAO, X.; CHEN, R.; LIU, J.; XIAOMEI, L-L.; FANG, LIYAN, F.; YU, L.; DAI, J.; **Pericoannosin A, a Polyketide Synthase-Nonribosomal Peptide Synthetase Hybrid Metabolite with New Carbon Skeleton from the Endophytic Fungus *Periconia* sp.** Organic Letters, v. 17, p. 4304–4307, 2015.

ZHANG, D.; GE, H.; XIE, D.; CHEN, R.; ZOU, J-H.; TAO, X.; e DAI, J. **Periconiasins A-C, New Cytotoxic Cytochalasans with an Unprecedented 9/6/5 Tricyclic Ring System from Endophytic Fungus *Periconia* sp.** *Organic Letters*, v.15, p. 1674–1677, 2013.

ZHANG, D.; GE, H.; ZOU, J.H.; TAO, X.; CHEN, R.; e DAI, J. **Periconianone A, a New 6/6/6 Carbocyclic Sesquiterpenoid from Endophytic Fungus *Periconia* sp. with Neural Anti inflammatory Activity.** *Organic Letters*, v. 16, p. 1410–1413, 2014.