



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

DEBORA BEZERRA DE SOUSA

ESTUDO DO POTENCIAL QUÍMICO DE *Fusarium udum*

FORTALEZA

2017

DEBORA BEZERRA DE SOUSA

ESTUDO DO POTENCIAL QUÍMICO DE *Fusarium udum*

Dissertação apresentada ao 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.

Orientador: Prof. Dr^a. Mary Anne Sousa Lima.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S696e Sousa, Debora Bezerra de.
Estudo do potencial químico de *Fusarium udum* / Debora Bezerra de Sousa. – 2017.
139 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.
1. *Fusarium udum*. 2. Fungo endofítico. 3. Metabólitos secundários. I. Título.

CDD 540

DEBORA BEZERRA DE SOUSA

ESTUDO DO POTENCIAL QUÍMICO DE *Fusarium udum*

Dissertação apresentada ao 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.

Aprovada em: 09/05/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Mary Anne Sousa Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Fátima Miranda Nunes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Aos meus pais, José Albino (*in memoriam*) e
Antonia Bezerra pelo carinho, incentivo, amor
e esforço. É tudo por vocês e para vocês!

AGRADECIMENTOS

À mãe Natureza pela incrível capacidade de fornecer tudo o que precisamos para a nossa existência. Pela sua generosidade e por tudo que ainda há de nos oferecer, pois há muito a ser descoberto.

Aos meus pais, José Albino (*in memoriam*) e Antonia Bezerra por todo amor, carinho, educação e por sempre acreditarem que o conhecimento é a chave para o crescimento tanto pessoal quanto profissional. Por cada palavra de incentivo e por acreditarem em mim mesmo nos momentos mais difíceis. Ofereço meu amor incondicional e cada conquista a vocês que são e sempre serão a razão do meu viver e pela qual eu luto e lutarei por dias melhores.

À professora Mary Anne Sousa Lima por ter aceito me orientar. Pelos ensinamentos, incentivo, conselhos e cobranças, pois estas são essenciais para o andamento do trabalho.

À professora Antônia Torres Ávila Pimenta que, desde o início me recebeu com enorme carinho e atenção sempre se dispondo a ajudar no que preciso fosse. Por todos os ensinamentos das técnicas de laboratório, pela sua paciência, otimismo e conselhos para a vida.

À CAPES pela concessão da bolsa e fomento à pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade.

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CE-NAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, em nome do seu coordenador Professor Edilberto Rocha Silveira e aos operadores Herbert Magalhães, Francisco das Chagas Silva Pinto, Henrique Machado César e Paula Karina Santos Uchôa pelos experimentos de RMN.

Ao Laboratório de Espectrometria em Massas do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará (UFC) na coordenação da Professora Dr. Otília Deusdênia Loiola Pessoa e à Karine Oliveira pelos espectros de infravermelho.

À Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC e ao operador Marcos Reinaldo da Silva pelos experimentos de espectrometria de massa.

À professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira que, durante o período de pós-doutorado da professora Mary Anne, forneceu valiosas orientações e sempre se dispôs a contribuir para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Micologia da UFC, em especial ao professor Cristiano Souza Lima que forneceu as cepas do micro-organismo além do espaço para cultivo, possibilitando a realização deste trabalho e ao Israel Lopes de Andrade que sempre se dispôs a verificar a pureza das culturas e forneceu grandes ensinamentos.

Ao Professor Dr. Raimundo Braz-Filho (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF), pela valorosa contribuição na determinação estrutural de algumas substâncias.

Aos professores Marcos Carlos de Mattos e Fátima Miranda Nunes que, juntamente com a professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, forneceram valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores da banca examinadora por aceitar o convite e pelas contribuições.

Aos amigos fiéis Bóris, Susy e Mel pelo carinho e amor com que sempre me recebem a cada volta para casa.

A todos os amigos da graduação, turma de Química 2009.1 da UECE, por sempre acreditaram em mim e me incentivaram, em especial à Adriana Virgílio, Carla Manoela, Rodrigo Bonfim e Juliana Alves. A Ambrosio Martins e Mayza França por todo apoio e companhia durante esta jornada.

Aos amigos de laboratório que ficarão para a vida: Hélio Oliveira, João Evangelista, Davi Dantas e Paula Karina pelos ensinamentos de técnicas, orientações e incentivo. À Letícia Holanda, Robert Bertoldo, Mariana Alencar, Nicaely Oliveira, Isabelle Bonfim, Henrique Cezar, Thaizy Martins e Matheus Areal pelo apoio, amizade, incentivo e por tornarem cada dia de trabalho no laboratório mais agradável. Este trabalho foi possível graças a vocês.

Aos companheiros de outros laboratórios pelo acesso a materiais e equipamentos, além dos ensinamentos, em especial Onassis Cardoso, Daniely Pinto, Leandro Lima, Caroline Lustosa, Sabrina Matias.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Obrigada!

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.” (Henry Poincaré)

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta." (Carl Sagan).

RESUMO

O presente trabalho objetiva a investigação do potencial químico de *Fusarium udum*, um fungo endofítico isolado de *Chrotalaria paulinea*, e responsável por causar danos a plantações de feijão e em espécies de *Chrotalaria*. O fungo foi cultivado em quatro meios de cultura distintos: BD (batata-dextrose), BDL (batata-dextrose-levedura), MPD (malte-peptona-dextrose) e Czapek, sendo o tempo de cultivo determinado pela taxa de glicose do meio. O extrato AcOEt do micro-organismo cultivado em meio MPD (25 dias) foi selecionado para o tratamento cromatográfico preliminar, levando ao isolamento do tirosol, ácido fusárico e monaspilosina. Em um outro experimento, e utilizando os meios de cultivo mencionados, *F. udum* teve a produção dos metabólitos secundários acompanhada através de diferentes dias de incubação (7, 14, 21, 28 dias). O fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt do micro-organismo cultivado em meio BDL (28 dias) forneceu a dicetopiperazina ciclo (L-Pro-L-Leu) e o triptofol. O extrato micelar obtido neste cultivo também foi estudado e forneceu a adenosina. Técnicas cromatográficas usuais, incluindo partição líquido-líquido, cromatografia em cartucho C-18 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 espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) com experimentos uni e bidimensionais, além de comparação com dados da literatura.

Palavras-chave: *Fusarium udum*. Fungo endofítico. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The present study aims to investigate the chemical potential of *Fusarium udum*, an endophytic fungus isolated from *Chrotalaria paulinea*, which is responsible for causing damage to bean planting and species of *Chrotalaria*. The fungus was cultivated in four distinct culture media: PD (potato-dextrose), PDY (potato-dextrose-yeast), MPD (malt-peptone-dextrose), and Czapek. The culture time was determined by the glucose rate of the culture medium. The ethyl acetate extract from the microorganism cultivated in MPD (25 days) was selected for the preliminary chromatographic treatment, and led to the isolation of tyrosol, fusaric acid, and monaspilosin. In another experiment that used the culture media mentioned above, *F. udum* produced secondary metabolites through different days of incubation (7, 14, 21, 28 days). The chromatographic fractionation of the ethyl acetate extract from the microorganism cultured in PDY (28 days) provided cycle (L-Pro-L-Leu) and triptophol. The micellar extract obtained in this culture was also studied and it supplied the substance adenosine. Usual chromatographic techniques, including liquid-liquid partition, C-18 cartridge chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC), were used to isolate the secondary metabolites. The structural characterization was conducted by using the spectrometric techniques mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) with one and two-dimensional experiments and comparison with literature data.

Keywords: *Fusarium udum*. Endophytic Fungus. Secondary Metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de um espécimen de bananeira apresentando sintomas do Mal do Panamá, com comprometimento das folhas.....	20
Figura 2 - Fotos de espécimens de <i>Cajanus cajan</i> com sintomas de fusariose: A) Perda da turgescência. B) Secagem das folhas. C) Escurecimento interno dos vasos do xilema. D) Faixa roxa no caule.....	21
Figura 3 - Imagens de macroconídios de espécies de <i>Fusarium</i> : A- <i>culmorum</i> , B- <i>solani</i> , C- <i>equiseti</i> , D- <i>graminearum</i> , E- <i>longipes</i> , F- <i>avenaceum</i> . G, H e M são microconídios de espécies de <i>Fusarium</i> G- <i>scirp</i> , H- <i>moniliforme</i> , M- <i>solani</i> . De I-L tem-se clamidósporos de espécies de <i>Fusarium</i> I- <i>oxysporum</i> , J- <i>equiseti</i> , L- <i>solani</i>	24
Figura 4 - Foto de uma cepa de <i>F. udum</i> cultivado em meio semissólido BDA.....	25
Figura 5 - Imagens de macroconídios (A-D) e microconídios (E-F) de <i>F. udum</i>	26
Figura 6 - Estruturas químicas das substâncias isoladas do gênero <i>Fusarium</i> de acordo com a Tabela 1.	30
Figura 7 – Estruturas das micotoxinas isoladas do gênero <i>Fusarium</i> e listadas na Tabela 2..	48
Figura 8 - Esqueleto base dos tricotecenos.....	52
Figura 9 – Estrutura da micotoxina desoxinivalenol (DON).....	53
Figura 10 – Estrutura da micotoxina T-2.	53
Figura 11 – Estrutura da micotoxina DAS.	54
Figura 12 - Estrutura química das fumonisinas FB1, FB2, FB3, FB4, FA1 e FA2.	55
Figura 13 – Estruturas químicas de: a) zearalenona; b) α -zearalenol; c) β -zearalenol; d) α -zearalanol; e) β -zearalanol.....	56
Figura 14 – Estrutura química do ácido fusárico.....	58
Figura 15 – Estrutura química da moniliformina.	59
Figura 16 – Foto do isolado UFCM0439 inoculado em meio BDA (a) tubo de ensaio e (b) placa de petri.	60
Figura 17 - Cromatograma da fração 2, mostrando pico correspondente à FU-1 (220-400 nm)..	69
Figura 18 - Cromatograma da fração 3, mostrando o pico correspondente à FU-2 (220-400 nm).....	69
Figura 19 - Cromatograma da fração 3 mostrando o pico correspondente à FU-4 (220-400 nm)..	70
Figura 20 - Análise por CCDA dos extratos segundo meios e períodos de cultivo.....	72

Figura 21 - Cromatograma Meio BDL controle 28 dias (220-400 nm).....	73
Figura 22 - Cromatograma Meio BDL extrato bruto 28 dias (220-400 nm).....	73
Figura 23 - Análise por CCDA comparando o controle (branco=bco) com as frações do extrato oriundo do cultivo de <i>F. udum</i> em grande escala meio BDL por 28 dias.	74
Figura 24 - Cromatograma da fração oriunda do agrupamento das frações F3 e F4, mostrando pico correspondente à FU - 3 (220-400 nm).....	75
Figura 25 - Cromatograma da subfração 4 mostrando pico correspondente à FU - 5 (220-400 nm).....	76
Figura 26 - Cromatograma da fase AcOEt mostrando os picos correspondentes a FU-6 e FU-7 (220-400 nm).....	77
Figura 27 – Metabólitos secundários isolados de <i>Fusarium udum</i>	78
Figura 28 - Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de FU-1.....	79
Figura 29 - Representação dos acoplamentos heteronucleares $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ a longa distância- HMBC de FU-1.	80
Figura 30 - Proposta para a formação do cátion com m/z 107.....	80
Figura 31 - Estrutura química do tirosol, FU-1 isolado de <i>F. udum</i>	81
Figura 32 - Espectro de RMN ^1H de FU-1 (500 MHz, CD_3OD).	83
Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de FU-1.	83
Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de FU-1.....	84
Figura 35 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-1.	84
Figura 36 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-1.	85
Figura 37 - Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CD_3OD) de FU-1.	85
Figura 38 - Espectro de massa de FU-1 (IE, 70 eV).....	86
Figura 39 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FU-1.....	86
Figura 40 - Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ observadas no espectro COSY.	88
Figura 41 - Representação dos acoplamentos heteronucleares $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ a longa distância- HMBC de FU-2.	89
Figura 42 - Estrutura química do ácido fusárico, FU-2 isolada de <i>F. udum</i>	90
Figura 43 - Espectro de RMN ^1H de FU-2 (500 MHz, CD_3OD).	91
Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de FU-2.	92

Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de FU-2.	93
Figura 46 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-2.	93
Figura 47 - Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H COSY (500 MHz, CD_3OD) de FU-2.	94
Figura 48 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-2.	94
Figura 49 - Espectro de massa de FU-2 (IE, 70 eV)	95
Figura 50 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FU-2.....	95
Figura 51 - Estrutura típica do esqueleto de uma dicetopiperazina.....	96
Figura 52 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H observadas no espectro COSY.	97
Figura 53 - Estrutura química dos aminoácidos leucina (a) e prolina (b).	97
Figura 54 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de FU-3.....	98
Figura 55 - Proposta para a formação do cátion com m/z 154.....	98
Figura 56 - Estrutura química dos aminoácidos ciclo (L-Pro-L-Leu), ciclo (D-Pro-D-Leu), ciclo (L-Pro-D-Leu) e ciclo (D-Pro-L-Leu), de a a d , respectivamente.....	99
Figura 57 - Estrutura química de ciclo (L-Pro-L-Leu), FU-3 isolada de <i>F. udum</i>	99
Figura 58 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de FU-3..	101
Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de FU-3.....	102
Figura 60 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de FU-3.....	102
Figura 61 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 3	103
Figura 62 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (300 MHz, CD_3OD) de FU – 3.....	103
Figura 63 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 MHz x 75MHz, CD_3OD) de FU – 3.....	104
Figura 64 - Espectro de massa de FU-3 (IE, 70 eV).....	104
Figura 65 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FU-3.....	105
Figura 66 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H observadas no espectro COSY..	106
Figura 67 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de FU-4.....	107

Figura 68 - Estrutura química da monaspilosina, FU-4 isolada de <i>F. udum</i>	108
Figura 69 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de FU-4.....	109
Figura 70 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (A) e (B) (500 x 125 MHz, CD_3OD) de FU – 4.....	110
Figura 71 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD) (A) e (B) de FU – 4.	111
Figura 72 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de FU – 4.....	112
Figura 73 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H observadas no espectro COSY	113
Figura 74 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de FU-5.....	114
Figura 75 - Proposta para a formação do cátion com m/z 130.....	115
Figura 76 - Estrutura química do triptofol, FU-5 isolado de <i>F. udum</i>	115
Figura 77 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de FU-5.....	118
Figura 78 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de FU-5.....	119
Figura 79 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (75MHz, CD_3OD) de FU-5.....	119
Figura 80 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 5.....	120
Figura 81 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (a) e (b) (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 5	120
Figura 82 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 5.....	121
Figura 83 - Espectro de massa de FU-5 (IE, 70 eV).	114
Figura 84 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H observadas no espectro COSY.....	124
Figura 85 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de FU-6.....	125
Figura 86 - Estrutura química da adenosina, FU-6 isolada de <i>F. udum</i>	125
Figura 87 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) de FU-6.....	128
Figura 88 - Espectro de RMN ^{13}C (75MHz, DMSO) de FU-6.....	128
Figura 89 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (75 MHz, DMSO) de FU-6.....	129
Figura 90 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (500 x 125 MHz, DMSO) de FU – 6.....	129

Figura 91 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (a) e (b) (500 x 125 MHz, DMSO) de FU – 6.....	130
Figura 92 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 75 MHz, DMSO) de FU – 6.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Fusarium</i> e espécies estudadas.	27
Tabela 2 - Exemplos de micotoxinas produzidas por algumas espécies de <i>Fusarium</i>	47
Tabela 3 - Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.....	63
Tabela 4 - Meios utilizados com respectivos períodos de incubação de acordo com a taxa de glicose e massas de extratos obtidas.....	67
Tabela 5 - Fracionamento do extrato bruto e rendimento das frações meio MPD 25 dias.	68
Tabela 6 - Massas de extrato obtidas no cultivo em pequena escala (200 mL de meio).....	71
Tabela 7 - Fracionamento cromatográfico do extrato bruto meio BDL 28 dias.....	74
Tabela 8 – Dados do fracionamento por partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto micelial de UFCM0439.	76
Tabela 9 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-1 com dados da literatura obtidos para o 4-(2-hidroxietil)fenol (tirosol) (PARK et al., 2011).	81
Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC e ^{13}C -HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-1 (CD_3OD , 125 x 500 MHz).	82
Tabela 11 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-2 com dados da literatura obtidos para o Ácido fusárico (LI et al., 2014).	90
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC e ^1H , ^{13}C -HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-2 (CD_3OD , 125 x 500MHz).....	90
Tabela 13 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-3 com dados da literatura obtidos para o ciclo (L-Pro-L-Leu) (FURTADO et al., 2005).....	100
Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC de FU-3 (CD_3OD , 125 x 300MHz).....	100
Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-4 com dados da literatura obtidos para a monaspilosina (CHENG et al., 2008).	108
Tabela 16 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC e ^1H , ^{13}C -HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-4 (CD_3OD , 125 x 500 MHz).....	109

Tabela 17 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-5 com dados da literatura obtidos para o triptofol (KÖHLING <i>et al.</i> , 2003).	116
Tabela 18 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HSQC e ^{13}C - HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-5 (CD_3OD , 75 x 300MHz).....	116
Tabela 19 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-6 com dados da literatura obtidos para a adenosina (ABOU-HUSSEIN <i>et al.</i> , 2007).....	126
Tabela 20 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HSQC e ^{13}C - HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-6 (DMSO-d_6 , 125 x 500MHz).	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BD - Meio de cultura batata- dextrose

BDA - Meio de cultura batata – dextrose - ágar

BDL - Meio de cultura batata - dextrose - extrato de levedura

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

CENAURENM – Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY – *Correlation Spectoscopy*

DAS - Diacetoxiscirpenol

DEPT 135° - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°*

δ – Deslocamento químico

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DON - Deoxinivalenol

FT-IR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

LEMANOR – Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste

MPD – Meio de cultura malte - peptona - dextrose

® - Marca registrada

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono - 13

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – 1

RNA – Ácido ribonucléico

ZEA – Zearalenona

ZOL - Zearalenol

ZAL - Zearalanol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Objetivos.....	22
1.1.1	Objetivo Geral.....	22
1.1.2	Objetivos Específicos	22
2	CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
2.1	Considerações taxonômicas sobre o gênero <i>Fusarium</i>	23
2.2	Levantamento bibliográfico sobre metabólitos secundários isolados do gênero <i>Fusarium</i>	26
2.3	Micotoxinas mais representativas de espécies de <i>Fusarium</i>	46
2.3.1	Tricotecenos	52
2.3.2	Fumonisinias	54
2.3.3	Zearalenona	56
2.3.4	Ácido fusárico	57
2.3.5	Moniliformina	58
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
3.1	Material de estudo.....	60
3.2	Cultivo, preservação e repicagem.....	60
3.3	Métodos Cromatográficos	61
3.3.1	Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).....	61
3.3.2	Cromatografia por adsorção em fase reversa	61
3.3.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	61
3.4	Métodos espectrométricos	62
3.4.1	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	62
3.4.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	62
3.4.3	Espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa (CG-EM)	63
3.5	Produção dos metabólitos secundários de UFCM0439	63
3.5.1	Estudo do crescimento do fungo segundo a taxa de glicose do meio	63
3.5.2	Estudo de otimização do crescimento de UFCM0439 em diferentes intervalos de tempo de cultivo.....	64
3.5.3	Cultivo de UFCM0439 em grande escala – Meio BDL (28 dias).....	65
3.5.4	Tratamento do micélio de UFCM0439 - Meio BDL (28 dias)	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	Produção dos metabólitos secundários de UFCM0439	67

4.1.1	Estudo do crescimento do fungo segundo a taxa de glicose do meio	67
4.1.2	Estudo de otimização do crescimento do fungo em diferentes intervalos de tempo do cultivo.....	70
4.1.3	Cultivo de UFCM0439 em grande escala – Meio BDL (28 dias).....	73
4.1.4	Tratamento do Micélio de UFCM0439 - Meio BDL (28 dias)	76
4.2	Determinação Estrutural	78
4.2.1	Determinação Estrutural de FU-1	78
4.2.2	Determinação Estrutural de FU-2	87
4.2.3	Determinação Estrutural de FU-3	96
4.2.4	Determinação Estrutural de FU-4	106
4.2.5	Determinação Estrutural de FU-5	113
4.2.6	Determinação Estrutural de FU-6	123
CONSIDERAÇÕES FINAIS		132
REFERÊNCIAS.....		133

1 INTRODUÇÃO

O ser humano sempre viu na natureza a fonte primária para atender às suas necessidades básicas, principalmente no que concerne à obtenção de substâncias com alguma atividade que possibilitem seu uso no tratamento das mais diversas enfermidades. Não obstante, datam de 2600 a.C. o uso de plantas por parte do homem objetivando o tratamento de doenças desde tosses a infecções e inflamações. A medicina egípcia traz registros de 2900 a.C., porém o registro mais conhecido é o chamado Papiro de Ebers que documenta o uso, na época, de mais de 700 drogas de origem vegetal. Gregos e romanos também contribuíram de modo substancial para o desenvolvimento da medicina pautada no uso de plantas medicinais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Quando a penicilina foi descoberta de forma acidental por Fleming¹ em 1928, passou-se a dar mais atenção a uma nova fonte de produtos naturais com elevado potencial bioativo: os fungos. Desta forma, estes micro-organismos passaram a ser estudados, e muito se tem descoberto a respeito de sua enorme capacidade de síntese de compostos com alta aplicabilidade tanto na medicina como na agricultura (CHAPLA *et al.*, 2013). Ademais, a investigação de metabólitos de micro-organismos pode levar à descoberta de novos produtos bioativos como alternativa ou adição aos compostos já obtidos através dos estudos com plantas.

Segundo Newman e Cragg (2016), até o ano de 2014, das 175 moléculas aprovadas no tratamento contra o câncer, 49% são de origem natural ou diretamente derivadas destas, sendo que há uma evolução considerável no que concerne aos estudos e produção de medicamentos que apresentam em sua constituição compostos biossintetizados por micro-organismos. Assim, os estudos para obtenção de produtos naturais oriundos destes seres vivos apresentam significativa relevância na descoberta de fármacos bem como no processo de desenvolvimento destes.

Uma importante fonte de novos metabólitos bioativos são os fungos endofíticos. Segundo De Bary (1866 *apud* KHARWAR *et al.*, 2011), são classificados como endofíticos os micro-organismos, incluindo fungos, bactérias, cianobactérias, que habitam o interior dos tecidos vegetais sem, contudo, causar-lhes quaisquer efeitos imediatos. Os endófitos constituem um grande grupo de micro-organismos variado, e se encontram nos mais diversos ambientes, seja nos oceanos, nas florestas tropicais ou em ambientes desérticos, ocupando desde as raízes às folhas das plantas.

¹ Alexander Fleming foi um médico escocês dedicado à pesquisa, sobretudo, com micro-organismos. Laureado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1945 graças a uma de suas mais importantes descobertas: a penicilina.

A partir da estimativa de que existem mais de trezentas mil espécies de plantas terrestres, e que cada uma destas espécies pode acomodar centenas de espécies de micro-organismos endófitos, através de uma relação mutualística ou parasita, o estudo de fungos mostra-se como uma fonte vasta e diversificada de metabólitos secundários (KHARWAR *et al.*, 2011; CHAPLA *et al.*, 2013).

De acordo com Ploetz (1990, *apud* MELO, 2014), espécies do gênero *Fusarium* possuem importância do ponto de vista patogênico, ocupando a terceira posição entre os gêneros de fungo com maior número de espécies que podem causar doenças em plantas, animais domésticos e humanos, devido a ação de algumas de suas micotoxinas.

Dentre os casos de responsabilidade deste fungo em doenças em plantas e grandes perdas na agricultura, pode-se citar o “Mal do Panamá”, ocorrido na década de 1960, onde cultivos de banana foram devastados na América Central pela ação do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Esta doença ainda atinge atualmente plantações de banana no mundo todo, inclusive no Brasil (CORDEIRO, 2016).

A forma de contágio do plantio ocorre através da disseminação dos esporos pelas plantas já infectadas ou, ainda, pelo uso de material contaminado durante o plantio. A sintomatologia envolve, em um primeiro estágio, o amarelamento das folhas infectadas, ocorrendo posterior murcha e ressecamento (FIGURA 1). Estima-se que esta doença chega a provocar perdas de 100% nas culturas de alguns tipos de banana, como a banana maçã, por exemplo (CORDEIRO, 2016).

Figura 1 – Foto de um espécimen de bananeira apresentando sintomas do Mal do Panamá, com comprometimento das folhas.



Fonte: Cordeiro (2016).

F. udum é responsável pela murcha do “feijão-guandu” (*Cajanus cajan*)², relatada pela primeira vez por Butler e colaboradores em 1906, na Índia. Porém, existem relatos da ocorrência da doença em outros países asiáticos, na América do Sul bem como no continente africano (KARIMI *et al.*, 2012).

A contaminação por *F. udum* se dá pela invasão do parasita que habita o solo e penetra na planta através das raízes ou de ferimentos no caule, colonizando, assim, o sistema vascular do hospedeiro. As folhas apresentam-se com perda da turgescência³ e tonalidade amarelada com conseqüente murchamento, e o caule apresenta-se com faixas roxeadas devido ao comprometimento do xilema (KARIMI *et al.*, 2012). Os sintomas descritos podem ser verificados na Figura 2.

Figura 2 – Fotos de espécimens de *Cajanus cajan* com sintomas de fusariose: A) Perda da turgescência. B) Secagem das folhas. C) Escurecimento interno dos vasos do xilema. D) Faixa roxa no caule.



Fonte: Sharma *et al.* (2016).

F. udum também causa a murcha em espécies do gênero *Chrotalaria*, porém não são descritos na literatura os sintomas específicos para esta relação de parasitismo, apenas relata-se que a planta, ao ser acometida pela murcha, apresenta porte reduzido (MELO, 2014).

A ocorrência de relatos na literatura acerca das grandes perdas na agricultura causadas por espécies do gênero *Fusarium*, bem como as doenças relacionadas à ingestão de metabólitos secundários tóxicos biossintetizados por estes micro-organismos, justifica o estudo do

² *Cajanus cajan* é uma leguminosa que cresce bem em climas úmidos e quentes, sendo utilizada como adubo verde por ser fixadora de nitrogênio além de ter seus grãos utilizados na alimentação humana. Apresenta-se com flores amarelas ou amarelo-avermelhadas e folhas trifoliadas sendo oriunda da África Tropical.

³ Processo que ocorre quando uma célula, tecido ou órgão, torna-se aumentada (com intumescimento) devido à elevação da pressão interna ao absorver água.

potencial químico de suas espécies. Destarte, o presente estudo químico utilizando-se uma cepa de *F. udum* caracteriza-se como inédito na literatura, haja vista que não há relatos de estudo químico desta espécie.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar quimicamente o fungo endofítico e fitopatogênico *Fusarium udum* (UFCM 0439), através de isolamento e caracterização dos metabólitos secundários produzidos em diferentes meios nutricionais.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Otimização das condições de cultivo em laboratório do fungo endofítico e fitopatogênico *Fusarium udum* em diferentes meios nutricionais;
2. Obtenção de extratos AcOEt oriundos do cultivo do micro-organismo em laboratório para análise por métodos cromatográficos;
3. Isolamento dos metabólitos secundários por métodos cromatográficos;
4. Caracterização dos metabólitos secundários isolados através do uso de métodos espectrométricos.

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

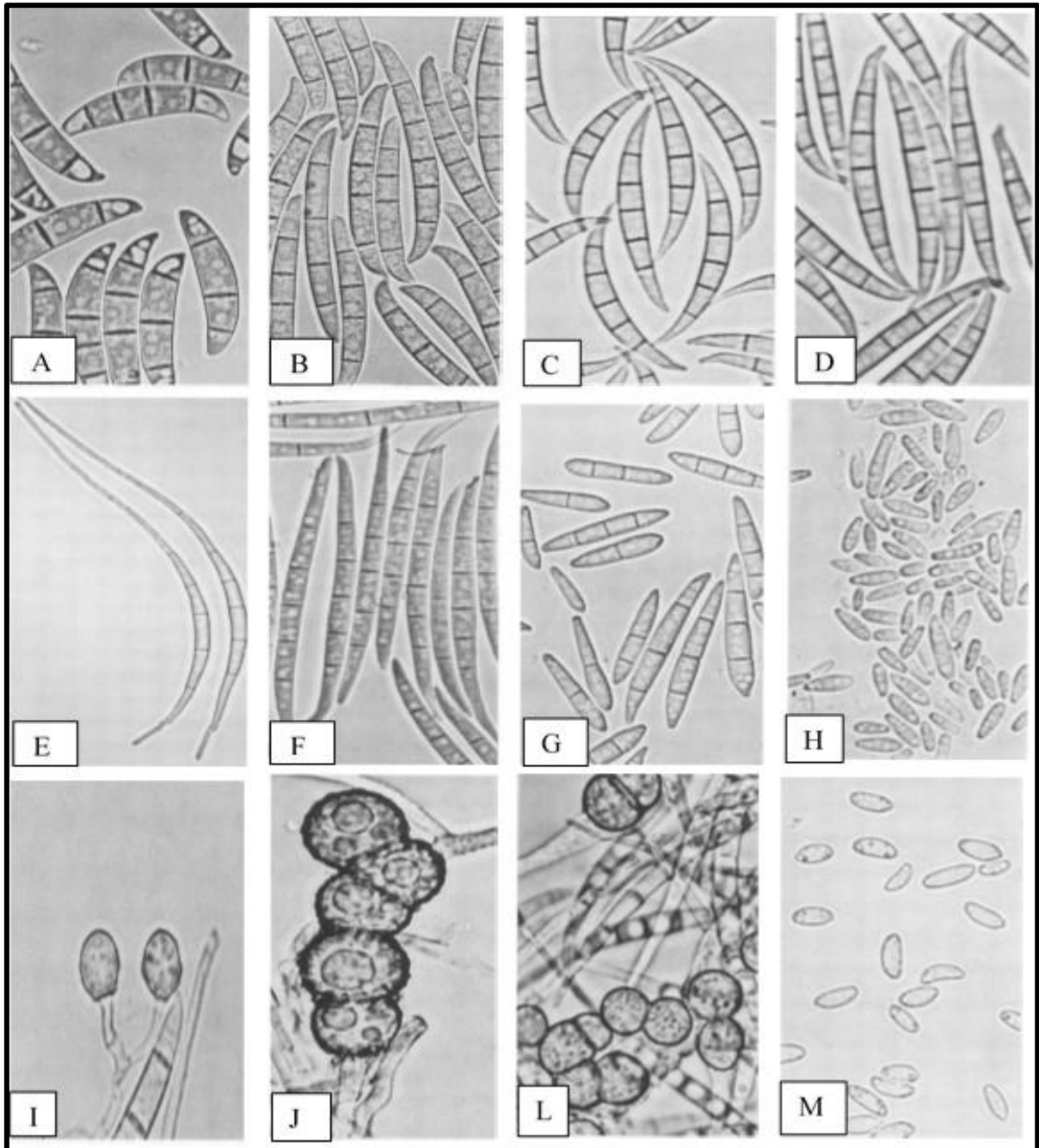
2.1 Considerações taxonômicas sobre o gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium*, de acordo com informações fornecidas pela base de dados Mycobank (2017), é pertencente ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, tendo como Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, pertencente à Sub-classe Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, sendo da Família Nectriaceae.

Este gênero apresenta mais de 100 espécies já descritas com características morfológicas, de cultivo e fisiológicas bem distintas, sendo dividido em seções que comportam espécies com maior grau de semelhança. Dentro dos aspectos morfológicos que são considerados para a caracterização do gênero, estão morfologia da colônia, especificidade em relação ao tipo de hospedeiros, taxa de crescimento, pigmentação da colônia, bem como perfil de metabólitos secundários produzidos. Porém, devido às grandes variações fenotípicas, verifica-se que apenas o uso de marcadores morfológicos não tem sido suficiente para a caracterização das espécies de *Fusarium* (DAMACENO, 2011). A descrição original do gênero revela que as principais características são a formação de conídios septados, fusiformes e alongados (MELO, 2014). As espécies podem produzir três tipos de esporos distintos: macroconídios (FIGURA 3, de A a F), microconídios (FIGURA 3, imagens G, H e M) e clamidósporos (FIGURA 3, imagens de I a L), sendo que uma mesma espécie pode chegar a produzir os três diferentes tipos de esporos mencionados (NELSON *et al.*, 1994).

De acordo com Leslie e Summerell (2007), devido à grande variedade encontrada nas diversas espécies e, inclusive dentro de uma mesma espécie do gênero em questão, tem-se observado a ocorrência de uma reclassificação levando à incorporação de espécies ou subespécies dentro de uma única.

Figura 3 – Imagens de macroconídios de espécies de *Fusarium*: A- *culmorum*, B- *solani*, C- *equiseti*, D- *graminearum*, E- *longipes*, F- *avenaceum*. G, H e M são microconídios de espécies de *Fusarium* G- *scirp*, H- *moniliforme*, M- *solani*. De I-L tem-se clamidósporos de espécies de *Fusarium* I- *oxysporum*, J- *equiseti*, L- *solani*.



Fonte: Nelson, *et al.* (1994).

Tem-se a presença das espécies do gênero *Fusarium* em praticamente todas as partes do mundo, sendo as maiores ocorrências registradas em ambientes tropicais e subtropicais. As espécies podem colonizar sobretudo o solo, e são resistentes graças a formação de estruturas morfológicas denominadas clamidósporos que garantem a sua sobrevivência nestes ambientes por longos períodos. Também tem sido cada vez mais comum o relato de espécies encontradas

parasitando sementes, folhas, flores além de frutos e tal colonização é favorecida pelo espalhamento de seus conídios pelo ar (LAZAROTTO, 2013).

Muitas espécies de *Fusarium* produzem toxinas que podem afetar humanos e animais, sendo elevados os índices de mortalidade entre pacientes imunocomprometidos. Das mais de 100 espécies descritas para o gênero até então, 12 delas são consideradas patógenas para os humanos, dentre as quais *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. verticilloides* (TAPIA; AMARO, 2014).

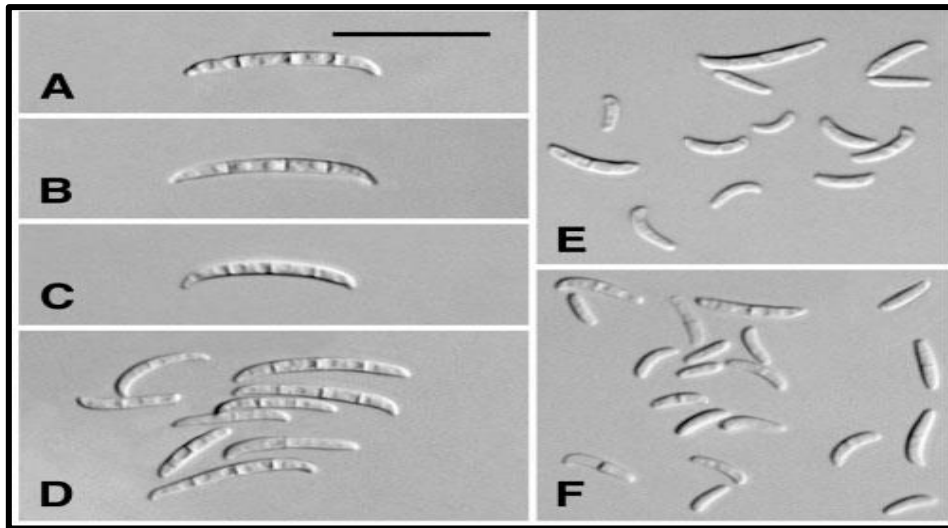
F. udum apresenta uma coloração branca do micélio quando cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar), podendo apresentar também um tom róseo à alaranjado, como pode ser visto na Figura 4. Algumas culturas podem apresentar pouco micélio aéreo por estarem cobertas por conídios. Os macroconídios são septados (de 1 a 5 septos) e apresentam abundância de esporodóquios com tonalidade salmon a rosa. Já os microconídios são ovais a fusiformes e podem não apresentar septos ou apresentar apenas um, sendo que as monofiálides são as células conidiogênicas e há ocorrência de micélio aéreo com falsas cabeças (FIGURA 5). Os clamidósporos de *F. udum* apresentam paredes lisas e não são pigmentados, sendo estes abundantes e encontrados entre as hifas ou no interior dos macroconídios (LESLIE; SUMMERELL, 2007).

Figura 4 – Foto de uma cepa de *F. udum* cultivado em meio semissólido BDA.



Fonte: Autora (2017).

Figura 5 – Imagens de macroconídios (A-D) e microconídios (E-F) de *F. udum*.



Fonte: Leslie e Summerell (2007).

2.2 Levantamento bibliográfico sobre metabólitos secundários isolados do gênero *Fusarium*

Os metabólitos secundários dos fungos endofíticos apresentam-se como substâncias de diversas classes estruturais, dentre as quais: terpenóides, fenóis, esteróides, peptídeos, alcaloides, lactonas, metabólitos alifáticos, entre outros. Dentre as substâncias já isoladas de *Fusarium*, podem se destacar os policetídeos, como a bicaverina (61), depsipeptídeos como a beauvericina (59), esteroides como o ergosterol (18), diterpenos como o ácido giberélico (60) além de outros compostos (SPECIAN *et al.*, 2014). Ainda segundo Specian *et al.* (2014), os compostos isolados de endófitos podem apresentar importantes atividades como imunossupressora (como o subglutinol A e B), antibiótica (como a brefeldina A), antitumorais (como o taxol), citotóxicas (citocalasinas), antifúngicas (como o tirosol).

Espécies de *Fusarium* são capazes de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários, sendo que estes podem apresentar função reguladora no crescimento de plantas, toxicidade para humanos e animais além de atividades biológicas. Também é relatado na literatura que a contaminação de alimentos por metabólitos secundários de *Fusarium* consiste em um grave problema, já que acarreta danos aos animais e às plantas e, conseqüentemente, grandes perdas na agricultura (BROWN; PROCTOR, 2013).

A partir destas informações e utilizando-se a base de dados *Scifinder*, foi realizada uma busca com as palavras chave “*Fusarium Secondary Metabolites*”, sem restrição de período.

Desta forma, a Tabela 1 mostra as informações concernentes aos metabólitos secundários relatados na literatura, obtidos através do cultivo de diversas espécies de *Fusarium* em diferentes tipos de meio de cultivo. Estas substâncias encontram-se identificadas por números, seguida da espécie da qual foi isolada e da referência. A Figura 6 (página 30) mostra as respectivas estruturas químicas citadas na Tabela 1.

Através do levantamento realizado, foi possível verificar que o gênero *Fusarium* apresenta vários relatos na literatura do ponto de vista químico para algumas espécies, porém, muitas delas ainda não foram estudadas, como é o caso de *F. udum*. Verificou-se também que é recorrente a obtenção de micotoxinas, que consistem de metabólitos secundários de elevada toxicidade tanto para animais quanto para humanos (NESIC *et al.*, 2014). As micotoxinas são abordadas na seção 2.3.

Observou-se que o perfil químico dos metabólitos secundários biossintetizados pelo gênero é bastante diversificado. Por esta razão e devido à ampla distribuição de suas espécies na natureza, estas constituem uma rica fonte de metabólitos secundários bioativos com perspectivas positivas de aplicabilidade em biotecnologia e na indústria farmacêutica (HIROOKA; YAMAGUCHI, 1994).

Tabela 1 – Metabólitos secundários isolados do gênero *Fusarium* e espécies estudadas.

METABÓLITO SECUNDÁRIO	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
2 α , 15-Diacetil-3-hidroxi-11-epiapotricotec-9-eno (1)	<i>F. sporotrichioides</i>	DAVID <i>et al.</i> , 1990
2,13-Diacetoxi-8-hidroxi-11-epiapotricotec-9-eno (2)		
2 α -Acetoxi-8,13-di-hidroxi-11-epiapotricotec-9-eno (3)		
2,8,13-Triacetil-11-epiapotricotec-9-eno (4)		
Diacetilsambucinol (5)		
3 α ,11-Epoxiapotricotec-9-eno (6)		
2,13-Di-hidroxi-3,11-epoxiapotricotec-9-eno (7)		
Fusapirona (8)	<i>F. semitectum</i>	ALTOMARE <i>et al.</i> , 2000
Desoxifusapirona (9)		

Continua...

Tabela 1 – Continuação

2,3-Di-hidro-5-hidroxi-8-metoxi-2,4-dimetil-nafto-[1,2-b]-furan-6,9-diona (10)	<i>F. solani</i>	TATUM <i>et al.</i> , 1989
5,10-Di-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1H-nafto-[2,3-c]-piran-1,6,9-triona (11)		
1,5,10-Tri-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1H-[2,3-c]-piran-6,9-diona (12)		
5,10-Di-hidroxi-1,7-dimetoxi-3-metil-1H-nafto-[2,3-c]-piran-6,9-diona (13)		
Sambucoína (14)	<i>Fusarium</i> sp	GREENHALGH <i>et al.</i> , 1989
Sambucinol (15)	<i>F. crookwellense</i> , <i>F.</i>	
3,13-Di-hidroxi-11-epiapotricotec-9-eno (16)	<i>culmorum</i> , <i>F. grami-</i>	
3,13-Di-hidroxi-11-epiapotricotec-9-eno (17)	<i>nearum</i> , <i>F. sporotri-</i> <i>chioides</i>	
Ergosterol (18)	<i>Fusarium</i> sp	LIU <i>et al.</i> , 2015
Cerevisterol (19)		
Peróxido de ergosterol (20)		
Alantoína (21)		
Fumitremorgina B (22)		
Verruculogena (23)		
Fumitremorgina C (24)		
Ciclotriprostatina B (25)		
Gliotoxina (26)		
Bis- <i>N</i> -norgliovietina (27)		
Bisdetiobis(metiltio)gliotoxina (28)		
Ciclo-(Phe-Ser) (29)		
T-2 (30)	<i>F. sporotrichioides</i>	CORLEY <i>et al.</i> , 1986
HT-2 (31)		
Esporotriquiol (32)		
NT-1 (33)		
Neosolaniol (34)		
8-Acetil-T2-tetraol (35)		

Continua...

Tabela 1 – Continuação

4-Deacetilneosolaniol (36)		
T2-Tetraol (37)		
DAS (38)		
Esporol (39)		
8 β -Hidroxisambucoína (40)	<i>F. sporotrichioides</i>	CORLEY <i>et al.</i> , 1987
8 α -Hidroxisambucoína (41)		
Sambucoína (42)		
8 β -Hidroxitricoteceno (43)	<i>F. sporotrichioides</i>	TRACY <i>et al.</i> , 1986
FS-1 (44)		
4-Propanoil HT-2 (45)		
T-2 (46)		
Fusarielina (47)	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. pseudograminearum</i>	SØRENSEN; SONDERGAARD, 2014
Clamidosporol (48)		
2-Amino-14,16-dimetiloctadecan-3-ol (49)		
Zearalenona (50)		
Enniatina B (51)		
Moniliformina (52)		
Antibiótico Y (53)		
Desoxinivalenol (54)		
Aurofusarina (55)		
Fusarina C (56)		
Ácido Fusárico (57)		
Fumonisina B1 (58)		
Beauvericina (59)		
Ácido Giberélico (60)		
Bicaverina (61)		
Culmorina (62)	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	LANGSETH <i>et al.</i> , 2001
Culmorona (63)		
3-Acetildesoxinivalenol (64)	<i>F. culmorum</i>	GREENHALGH <i>et al.</i> , 1986
Desoxinivalenol (65)		
Calonectrina (66)		

Continua...

Tabela 1 – Continuação

3-Deacetilcalonecrina (67)		
Isotricodermina (68)		
3,15-Diacetoxi- 12,13-epoxitricec-9-en-8-ona (69)		
3,15-Di-hidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno (70)		
15-Deacetil-8-cetocalonecrina (71)		
8-Hidroxicalonecrina (72)		
7,8-Di-hidroxicalonecrina (73)		
Sambucinol (74)		
Anguidina ou Diacetoxiscirpenol (DAS) (75)	<i>F. sambucinum</i>	NIEDERER <i>et al.</i> , 1992
Monoacetoxiscirpenol (76)		
Sambucinol (77)		
Sambucoína (78)		
Ácido Sambucínico (79)		
Apotricote-9-ene-3 α ,13-diol (80)		
Crisogina (81)		
2-Piruvilaminobenzamida (82)	<i>F. graminearum</i>	LAURIDS <i>et al.</i> , 2013
2-Quinazolin-4(3H)-ona (83)		
Fusarielina G (84)		
Fusarielina H (85)		
Fusarielina F (86)	<i>F. tricinctum</i>	
Fusarielina A (87)		

Fonte: Autora (2016).

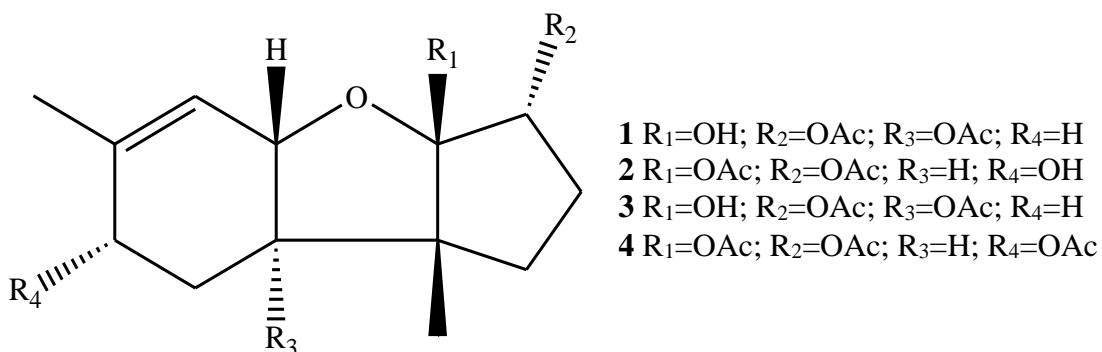
Figura 6 - Estruturas químicas das substâncias isoladas do gênero *Fusarium* de acordo com a Tabela 1.

Figura 6 – Continuação

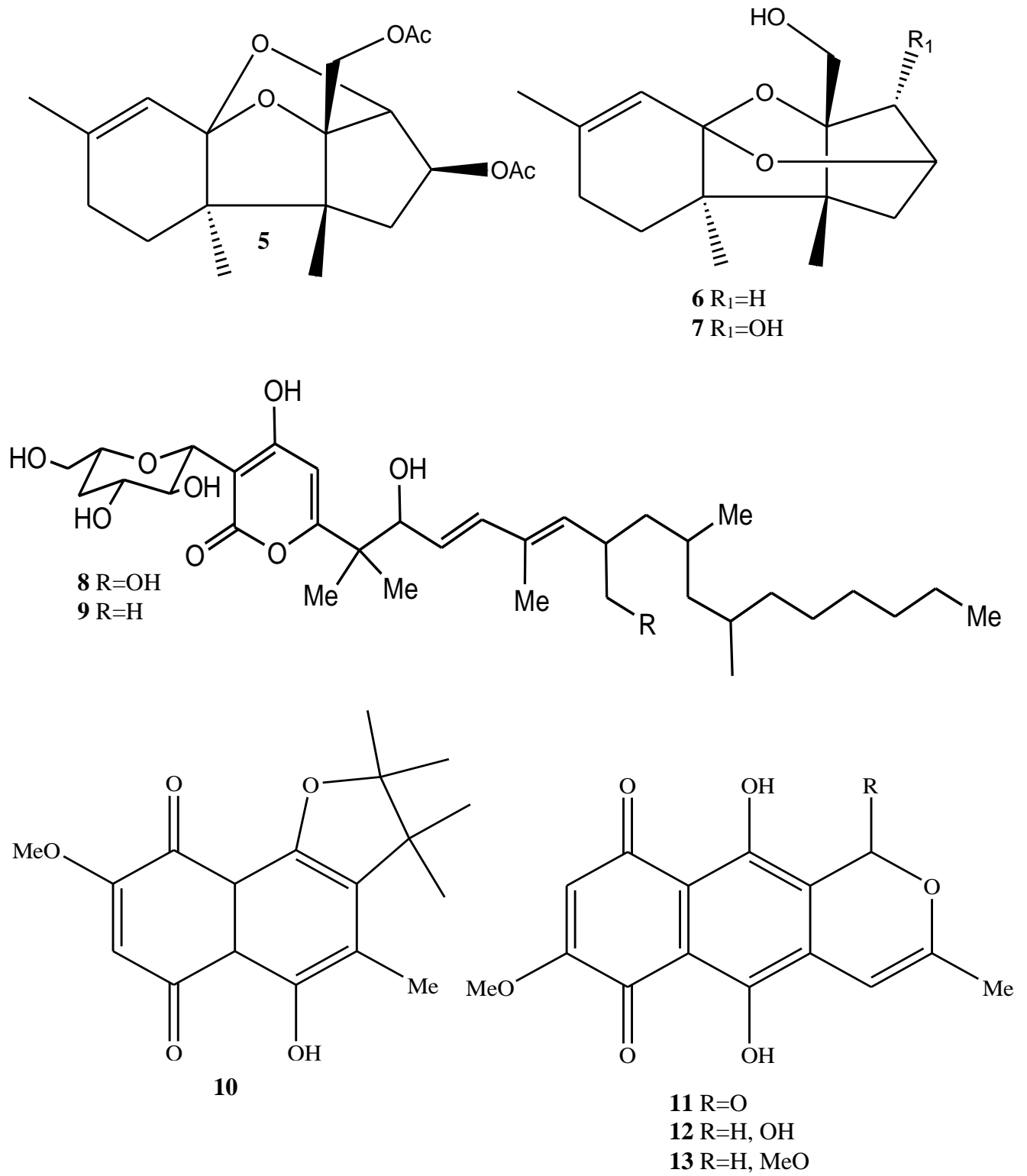
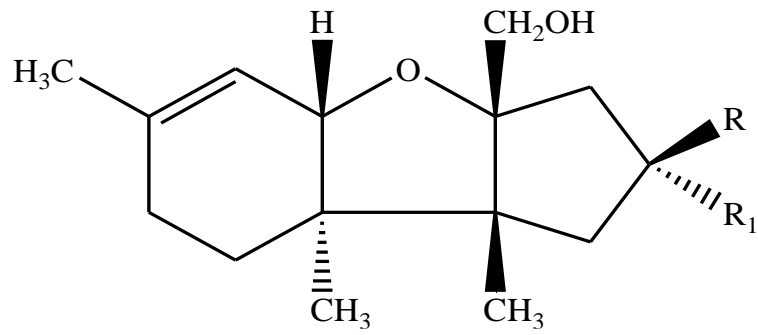
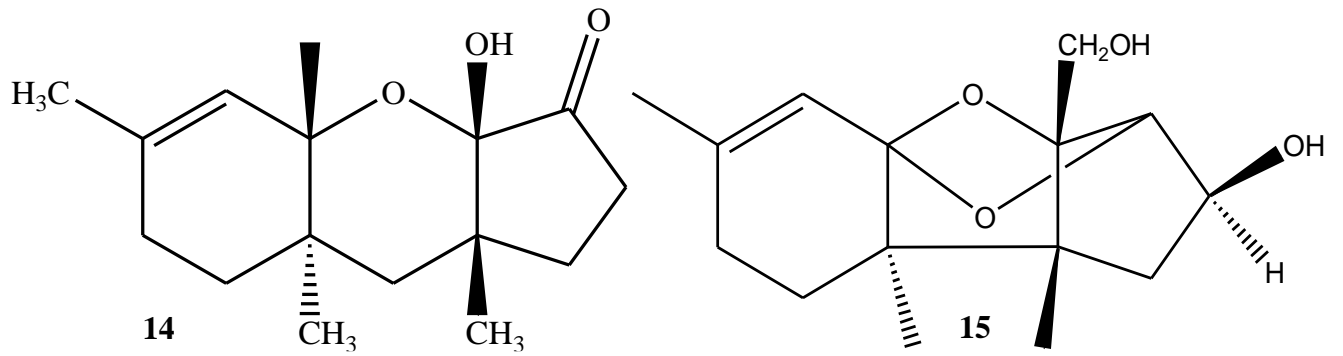


Figura 6 – Continuação



16 R=H; R₁=OH

17 R=OH; R₁=HH

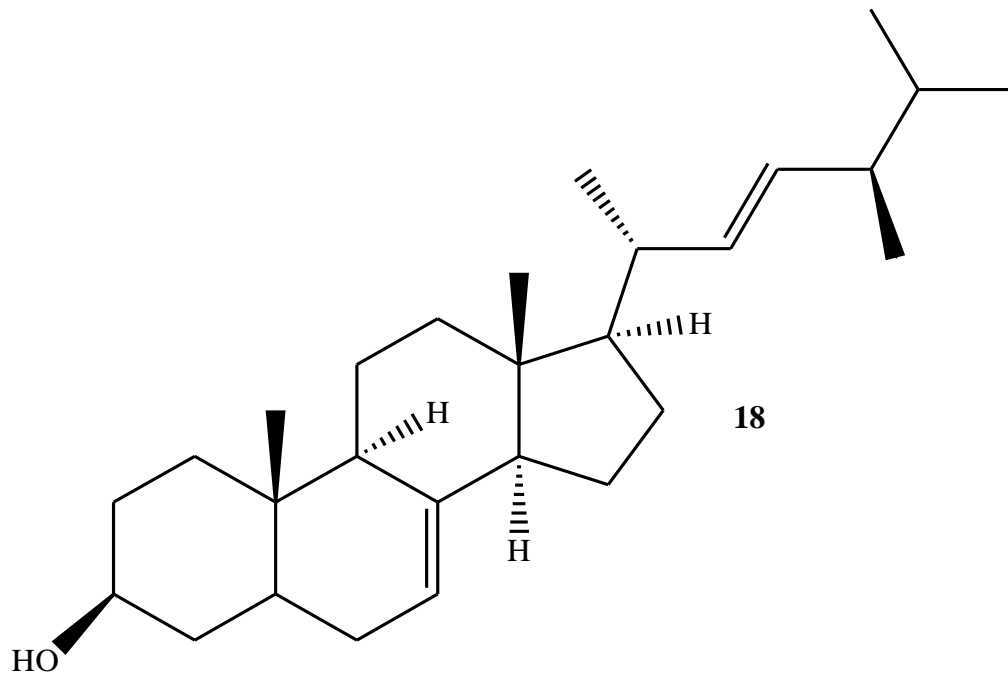


Figura 6 – Continuação

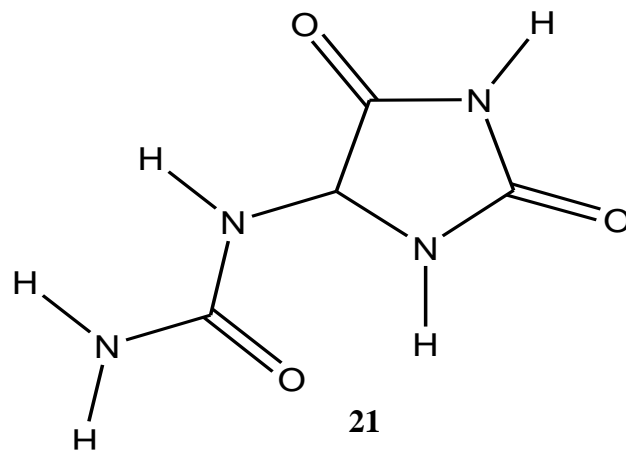
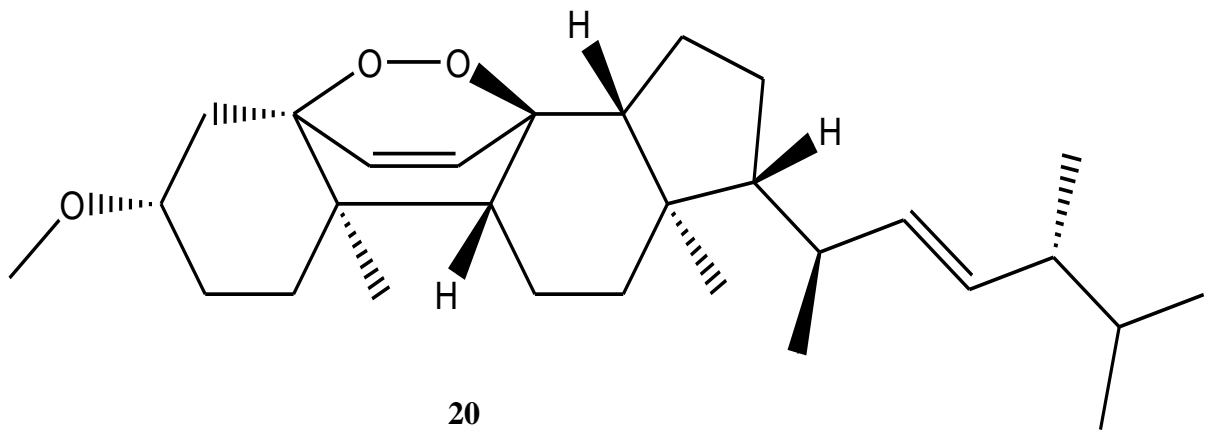
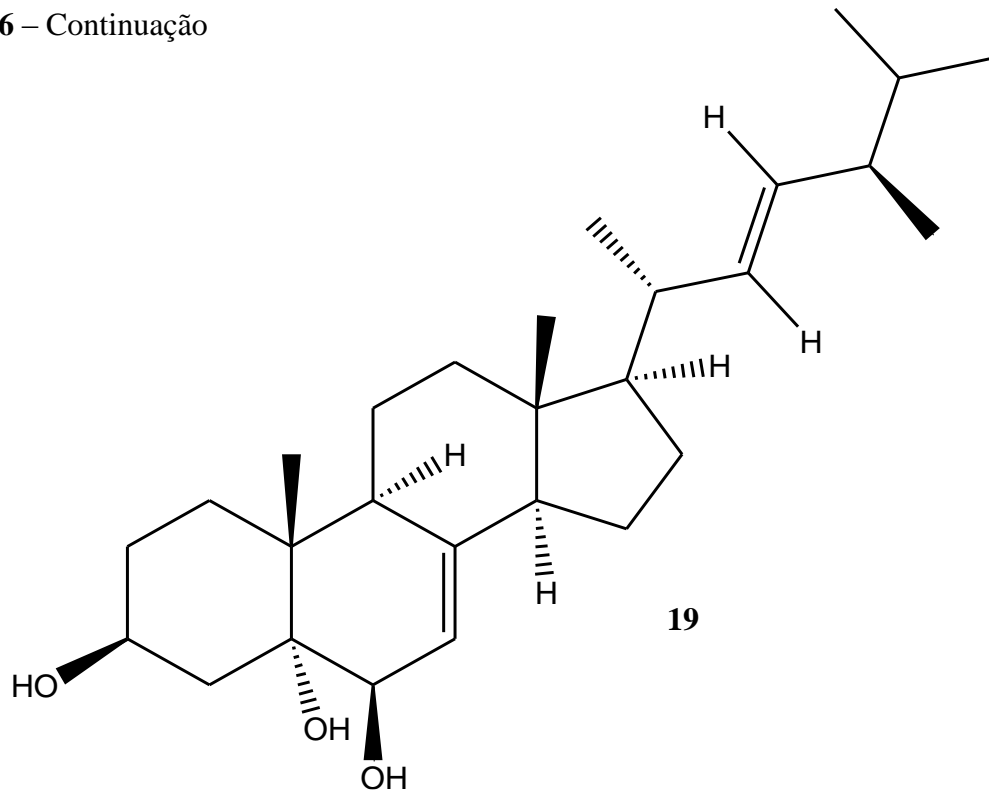


Figura 6 – Continuação

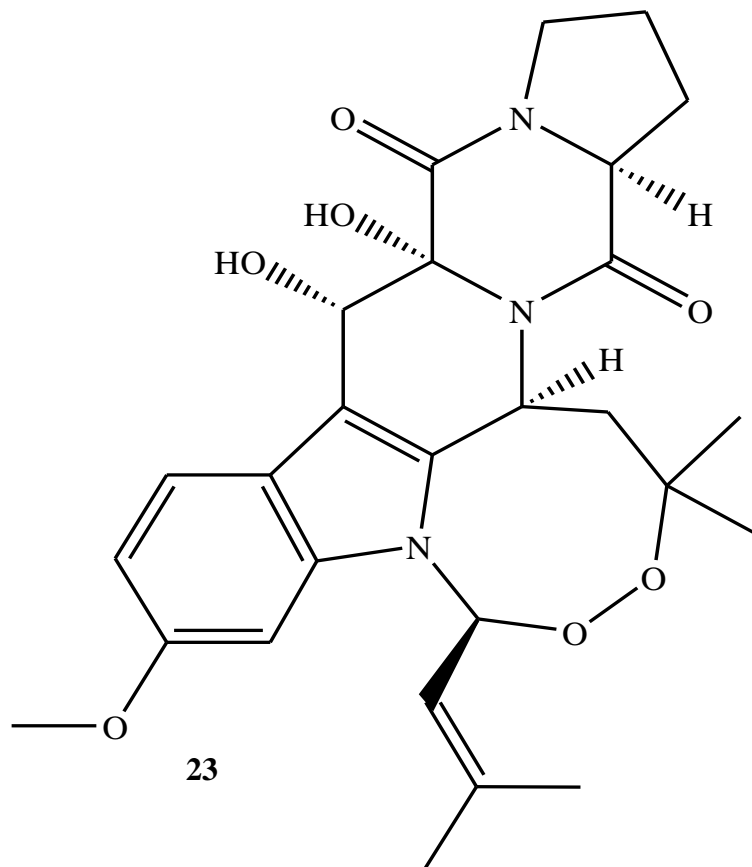
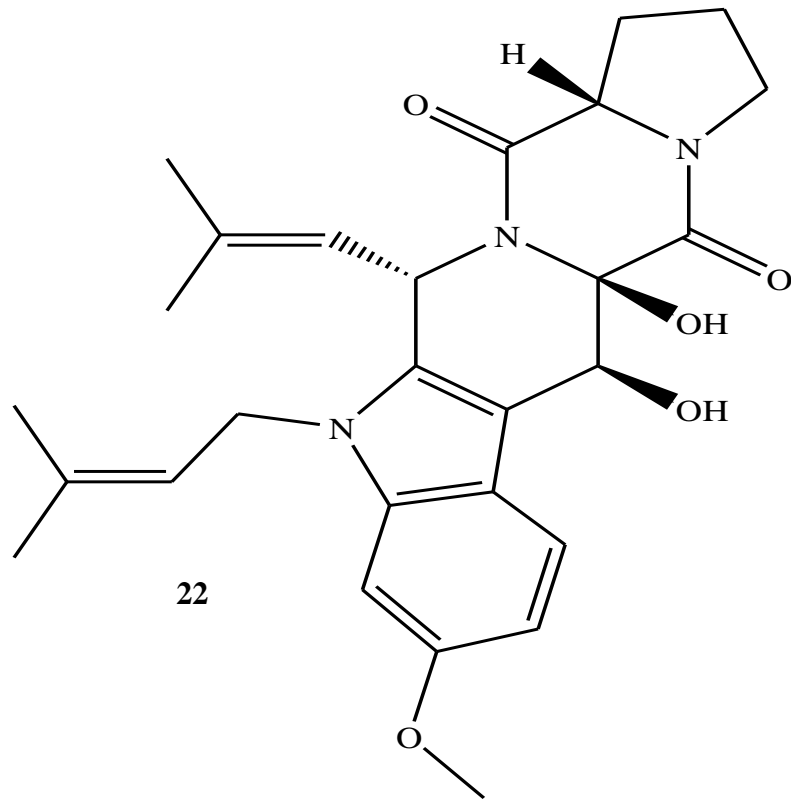


Figura 6 – Continuação

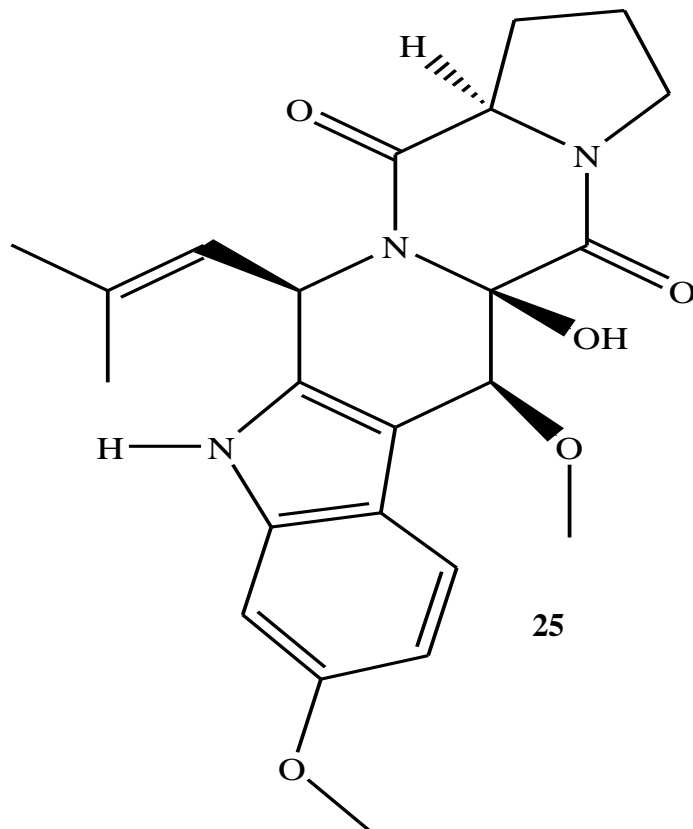
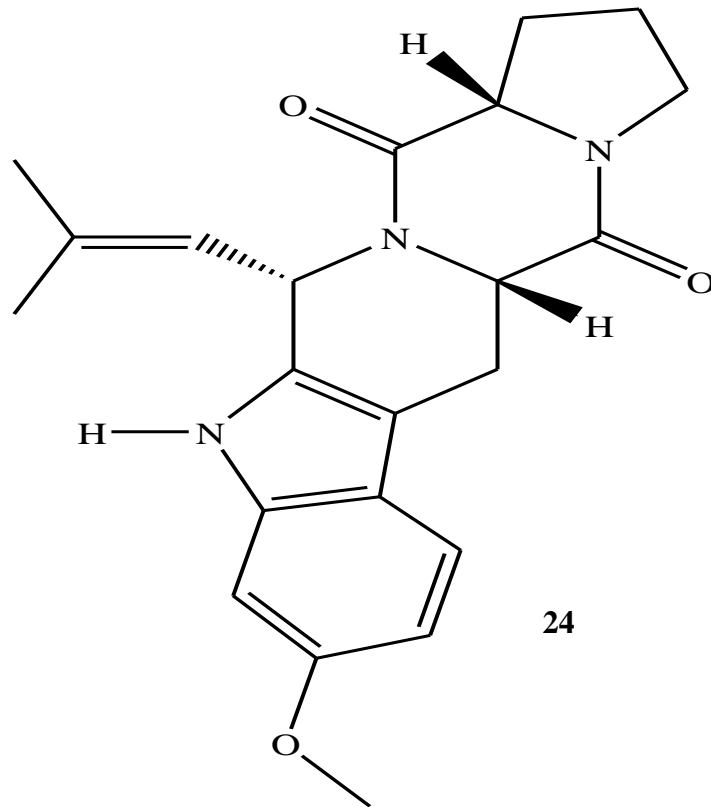
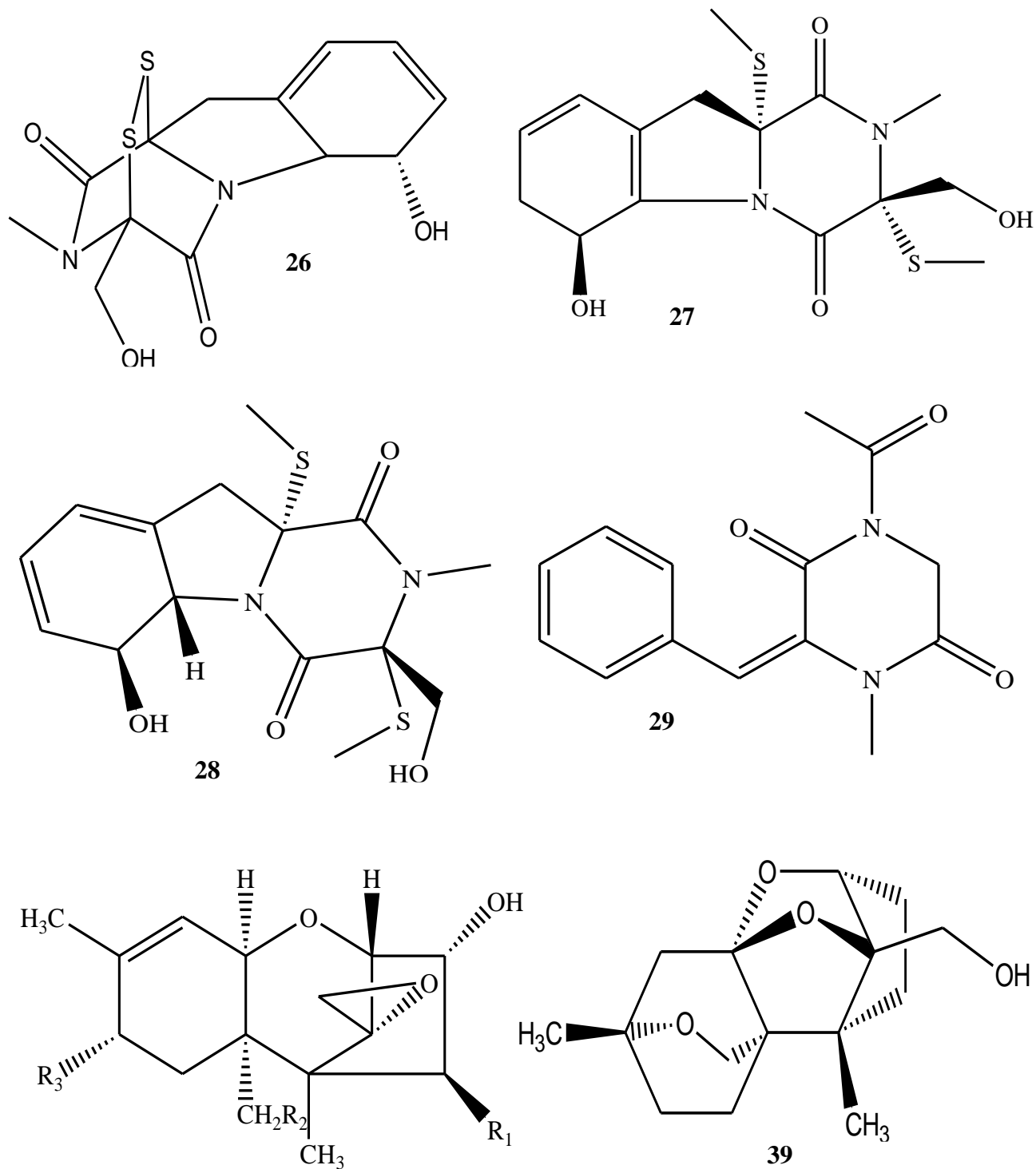


Figura 6 – Continuação



30 $R_1=OAc$; $R_2=OAc$; $R_3=OOCCH_2CH(CH_3)_2$

31 $R_1=OH$; $R_2=OAc$; $R_3=OOCCH_2CH(CH_3)_2$

32 $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OOCCH_2CH(CH_3)_2$

33 $R_1=OAc$; $R_2=OH$; $R_3=OAc$

34 $R_1=OAc$; $R_2=OAc$; $R_3=OH$

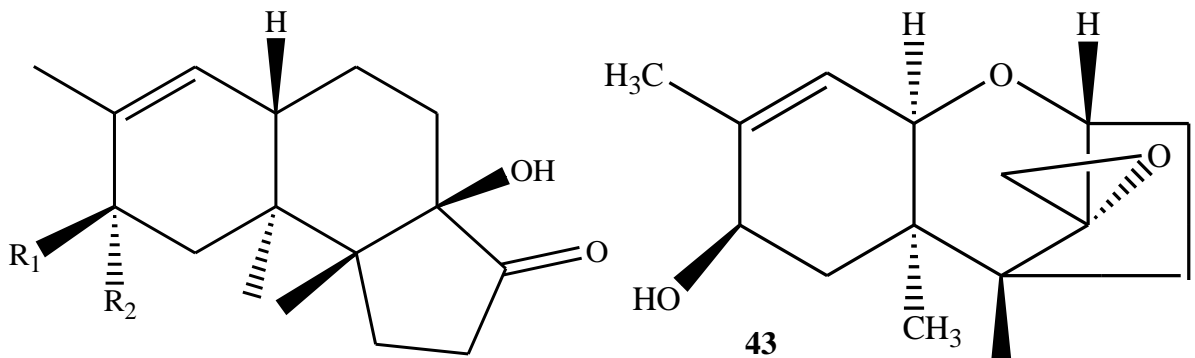
35 $R_1=OH$; $R_2=OH$; $R_3=OAc$

36 $R_1=OH$; $R_2=OAc$; $R_3=OH$

37 $R_1=OH$; $R_2=OH$; $R_3=OH$

38 $R_1=OAc$; $R_2=OAc$; $R_3=OH$

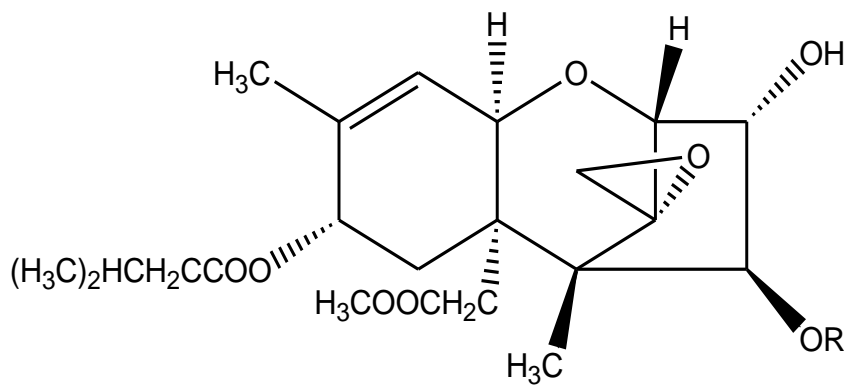
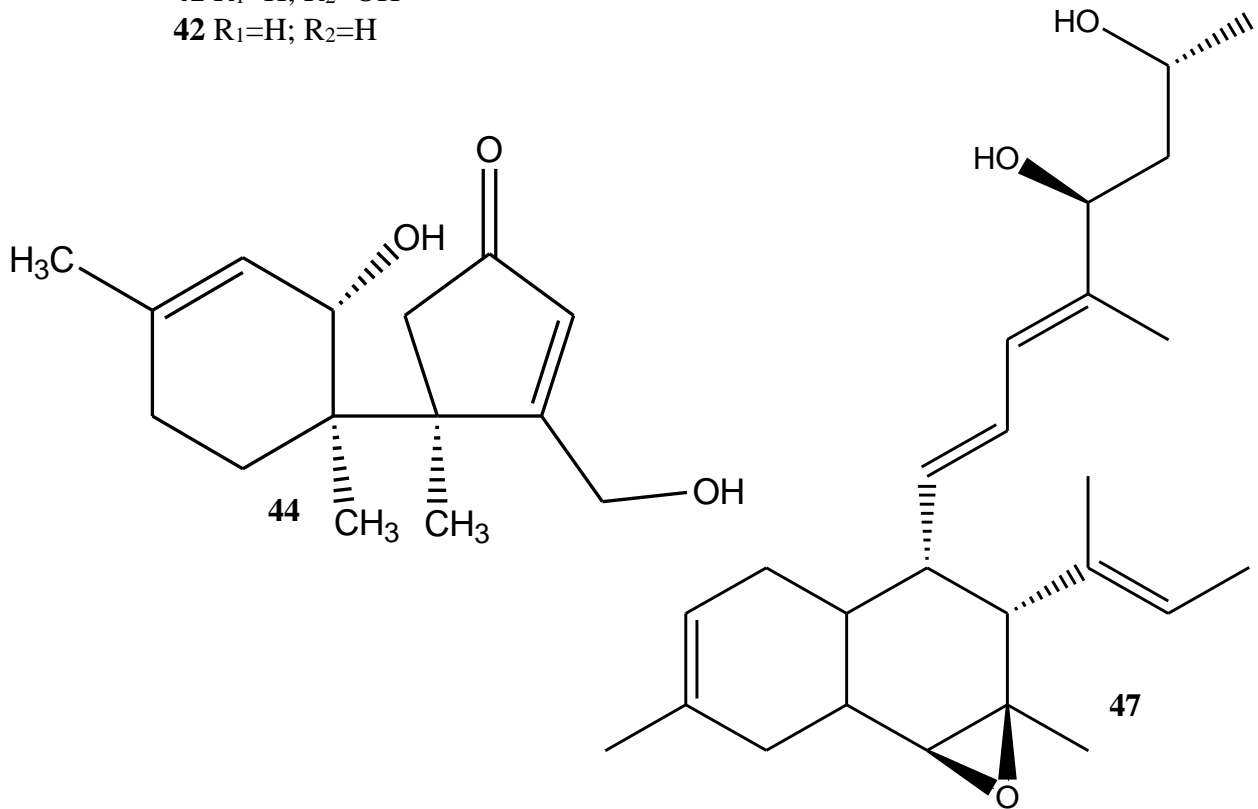
Figura 6 – Continuação



40 $R_1=OH$; $R_2=H$

41 $R_1=H$; $R_2=OH$

42 $R_1=H$; $R_2=H$



45 $R=COCH_2CH_3$

46 $R=COCH_3$

Figura 6 – Continuação

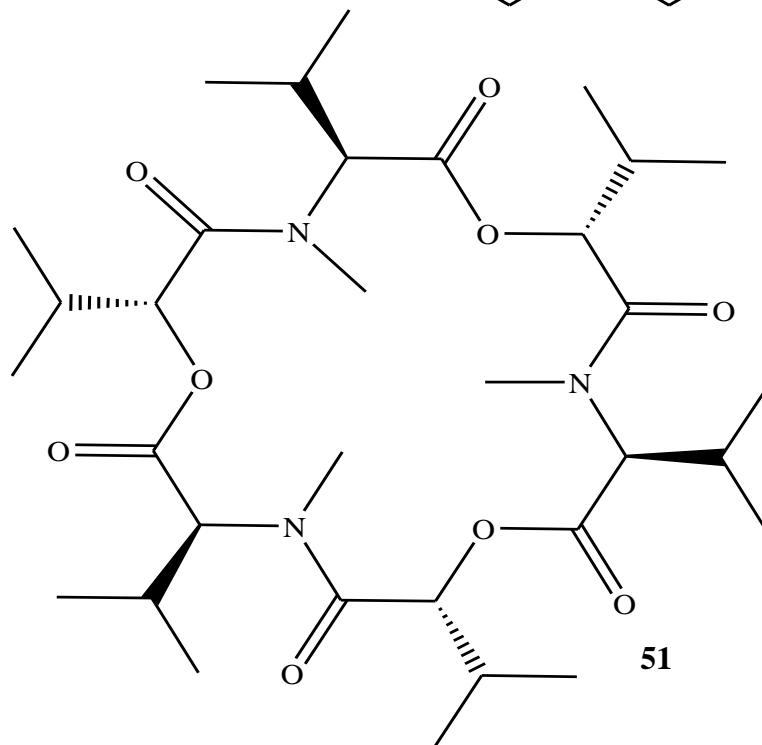
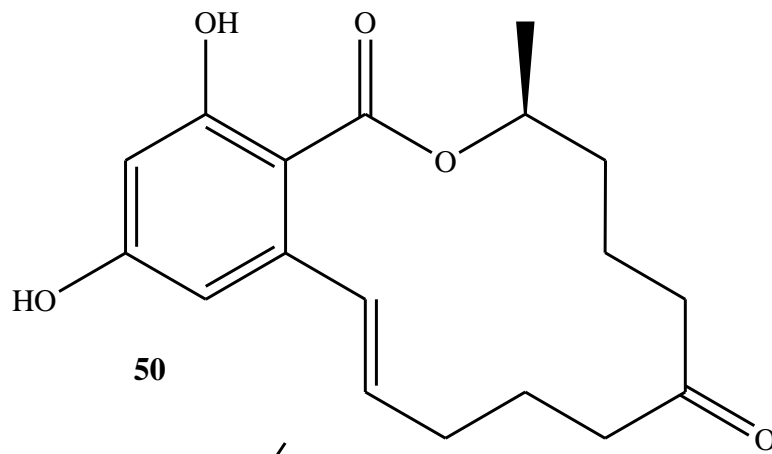
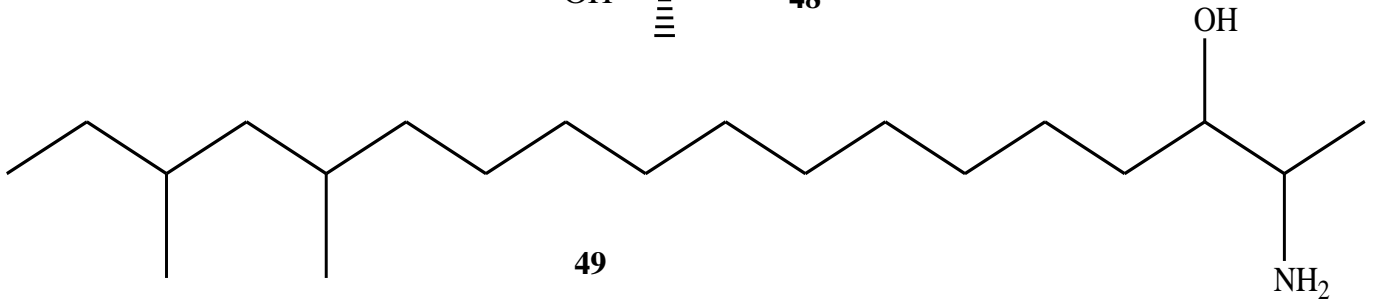
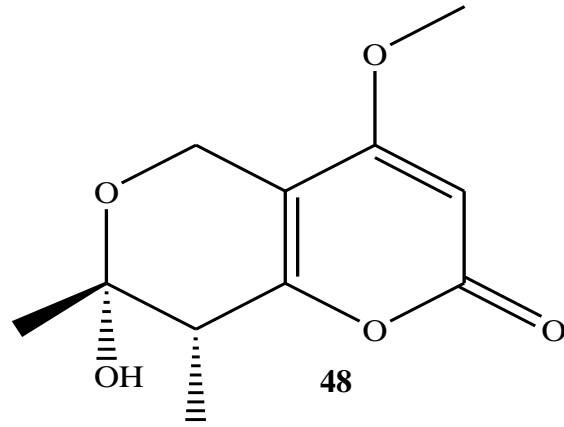


Figura 6 – Continuação

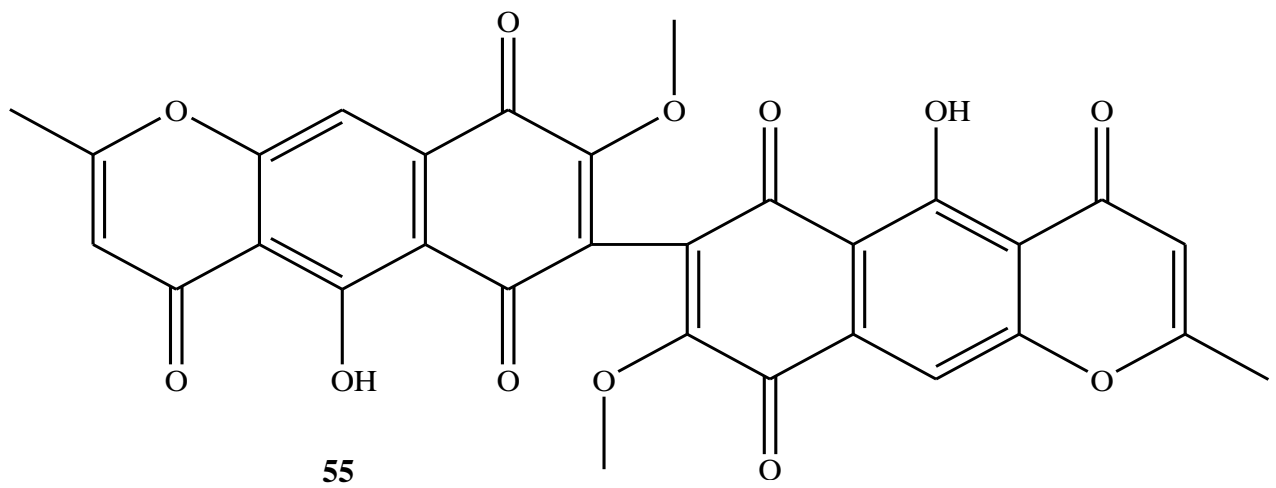
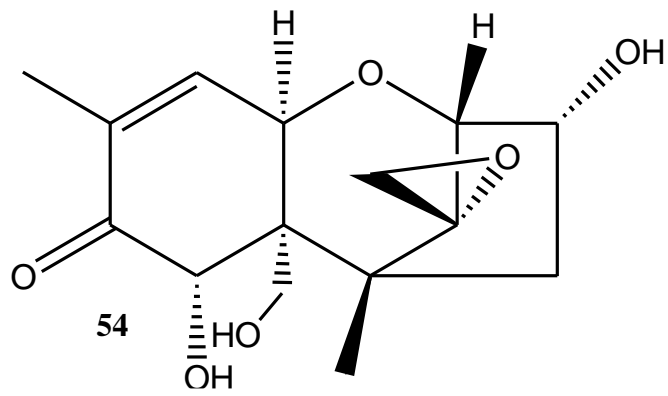
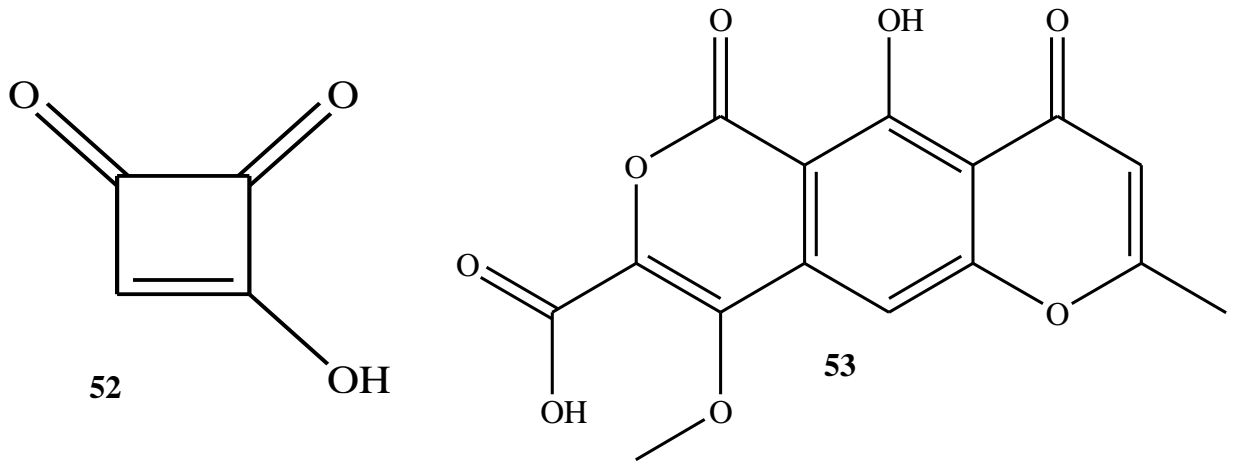


Figura 6 – Continuação

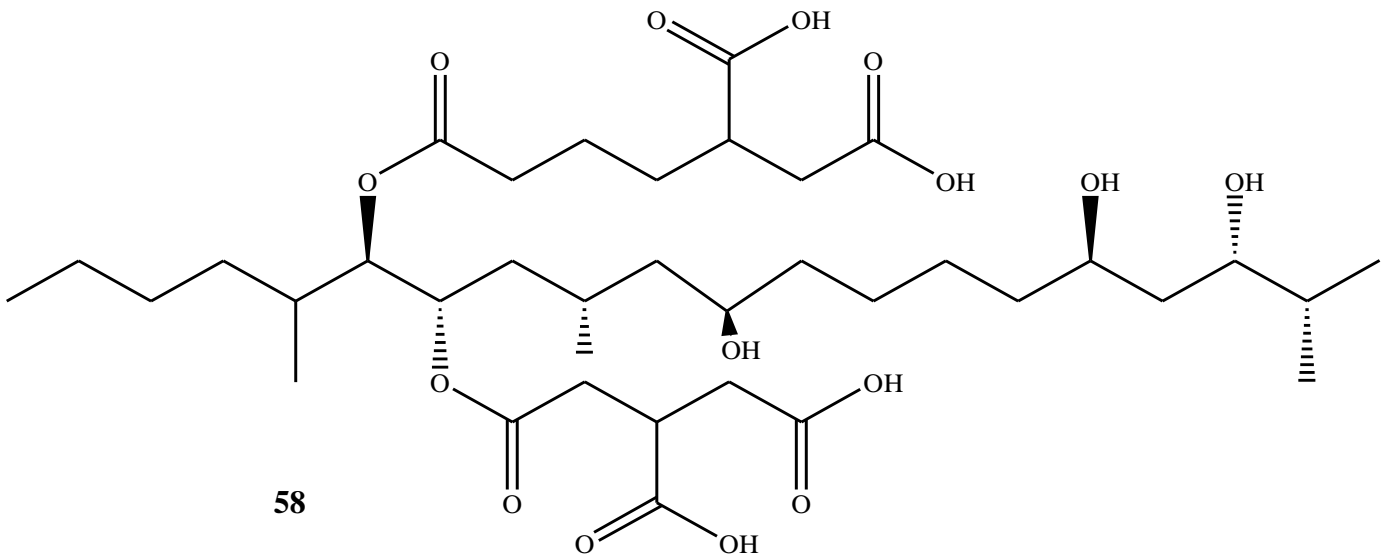
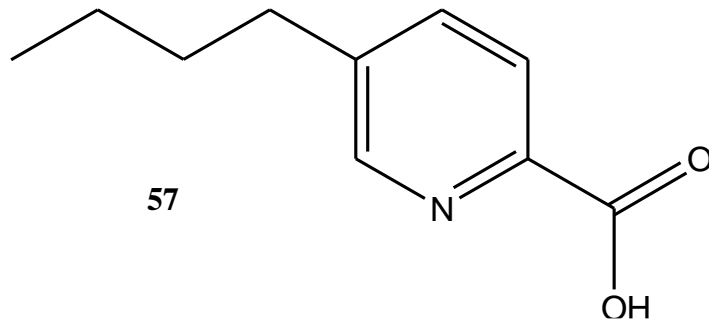
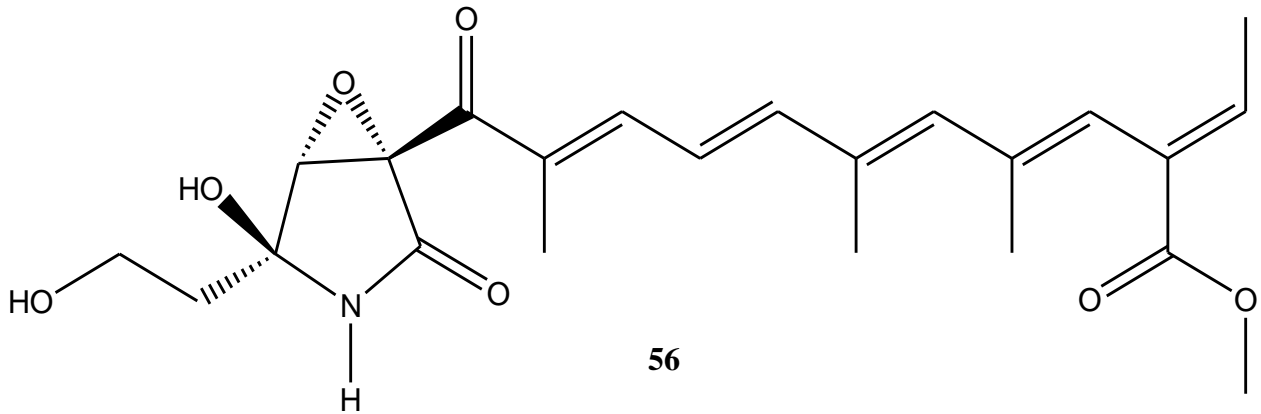


Figura 6 – Continuação

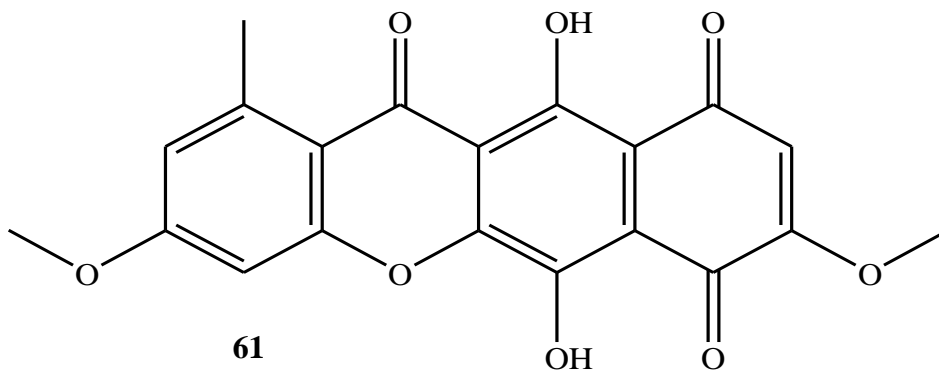
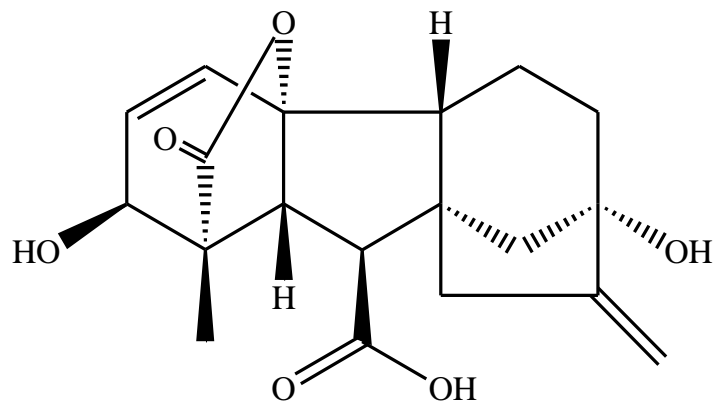
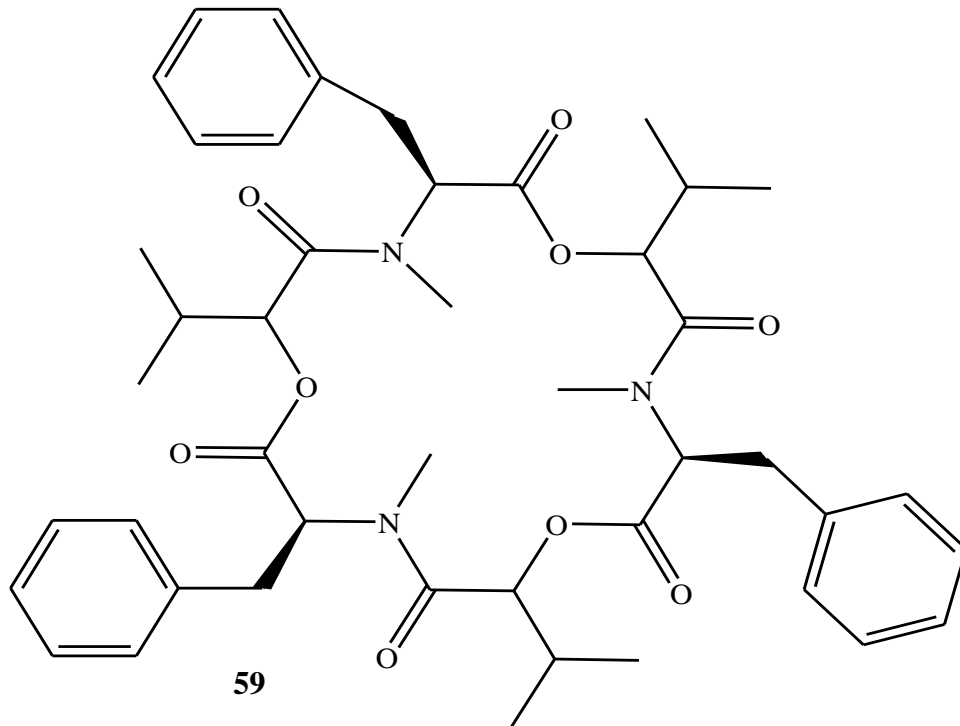


Figura 6 – Continuação

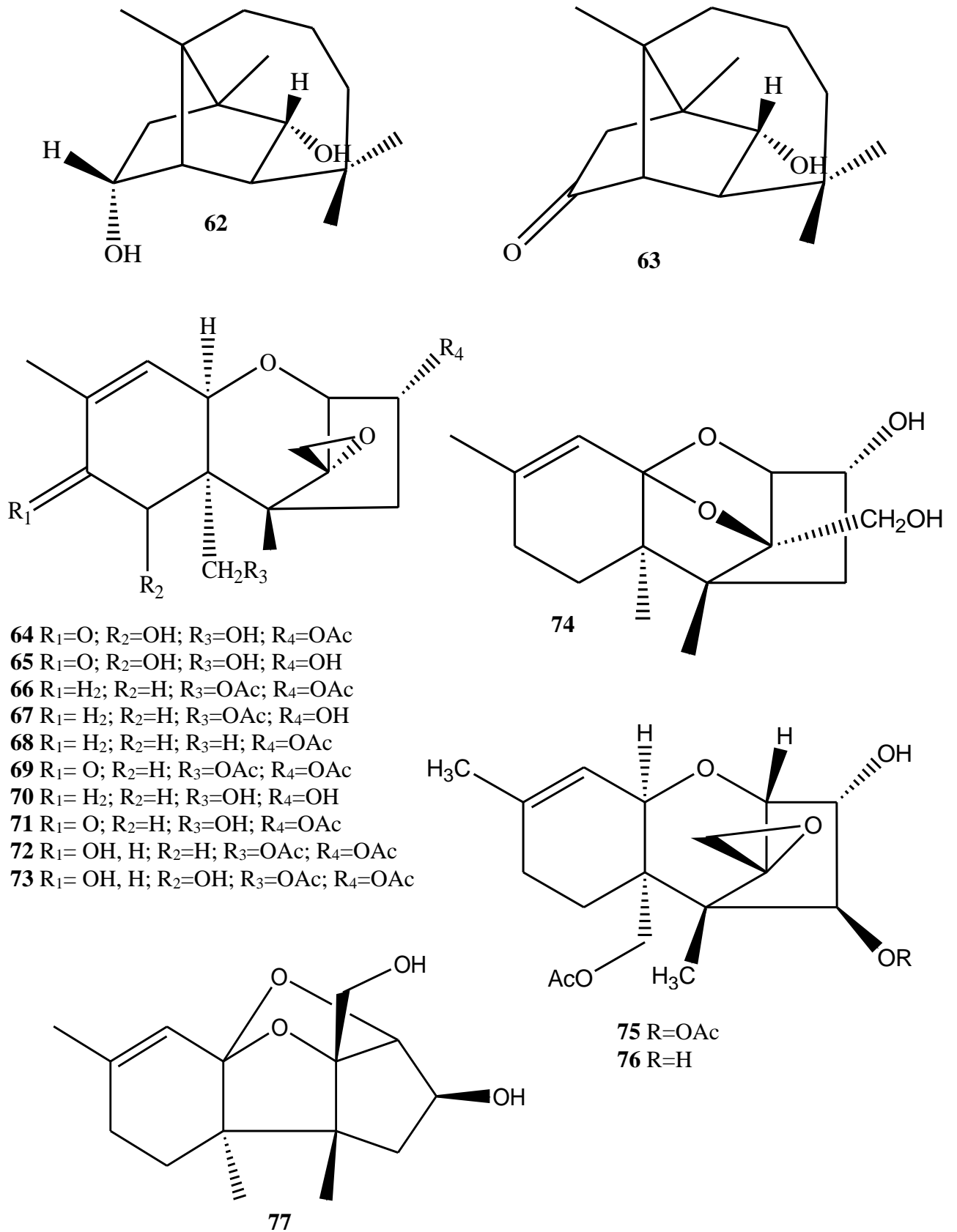


Figura 6 – Continuação

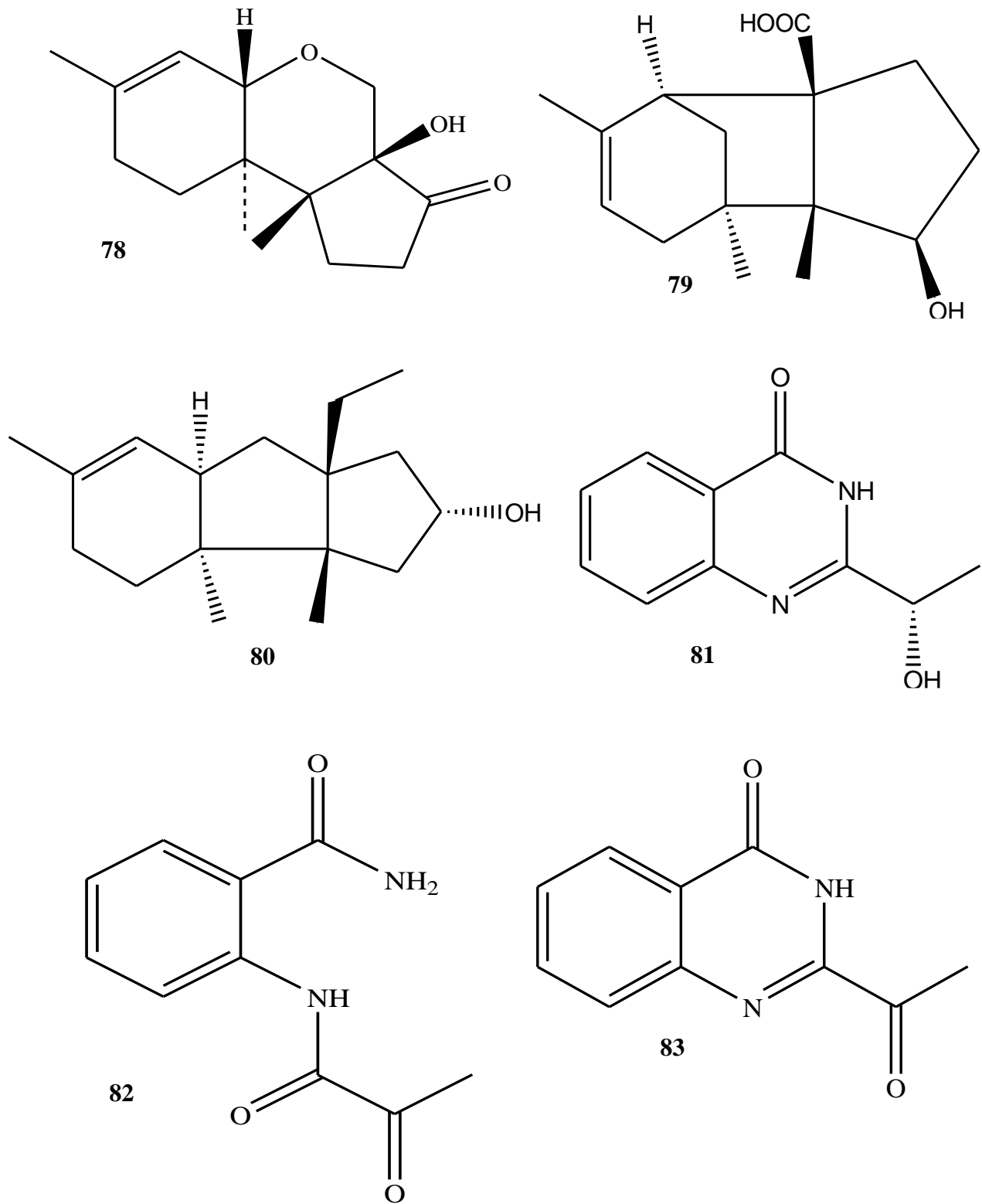


Figura 6 – Continuação

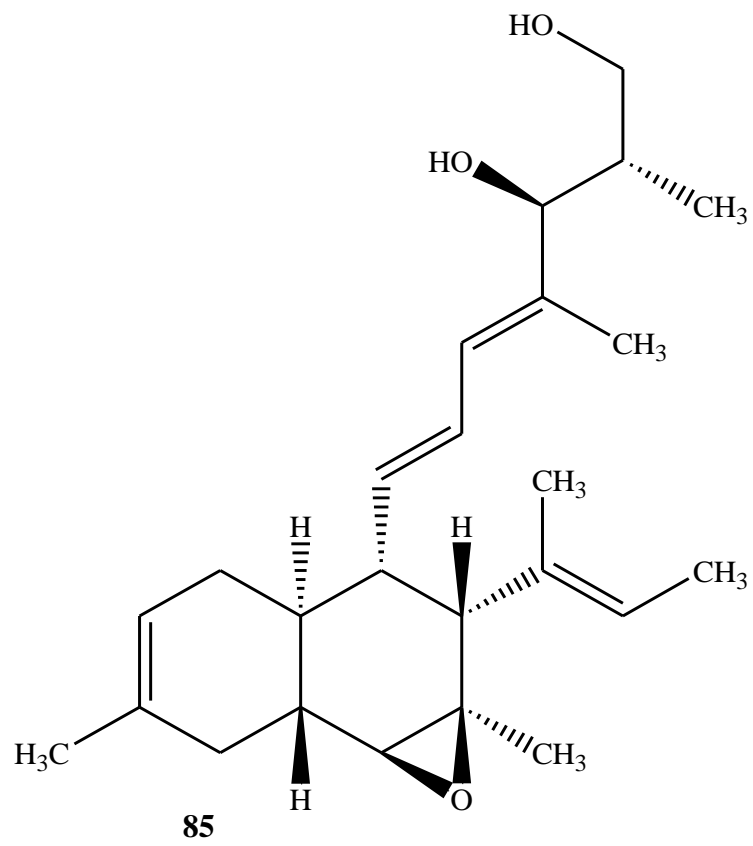
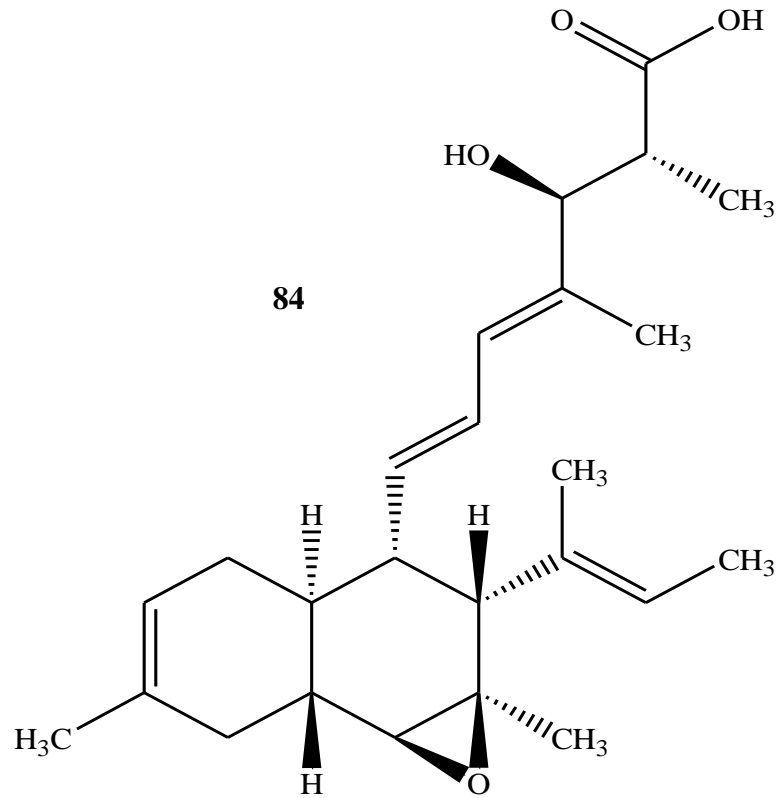
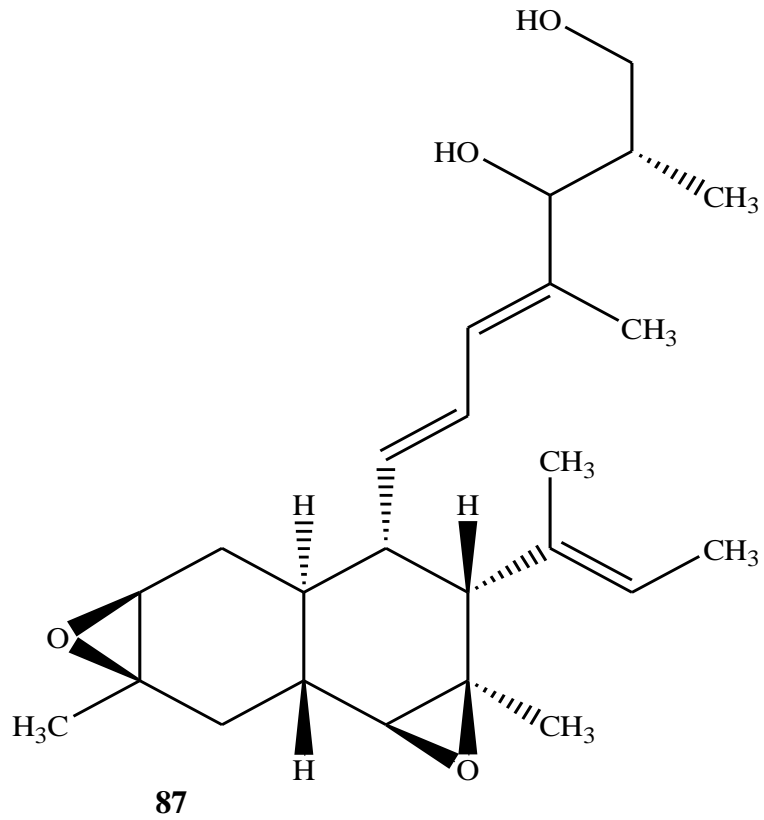
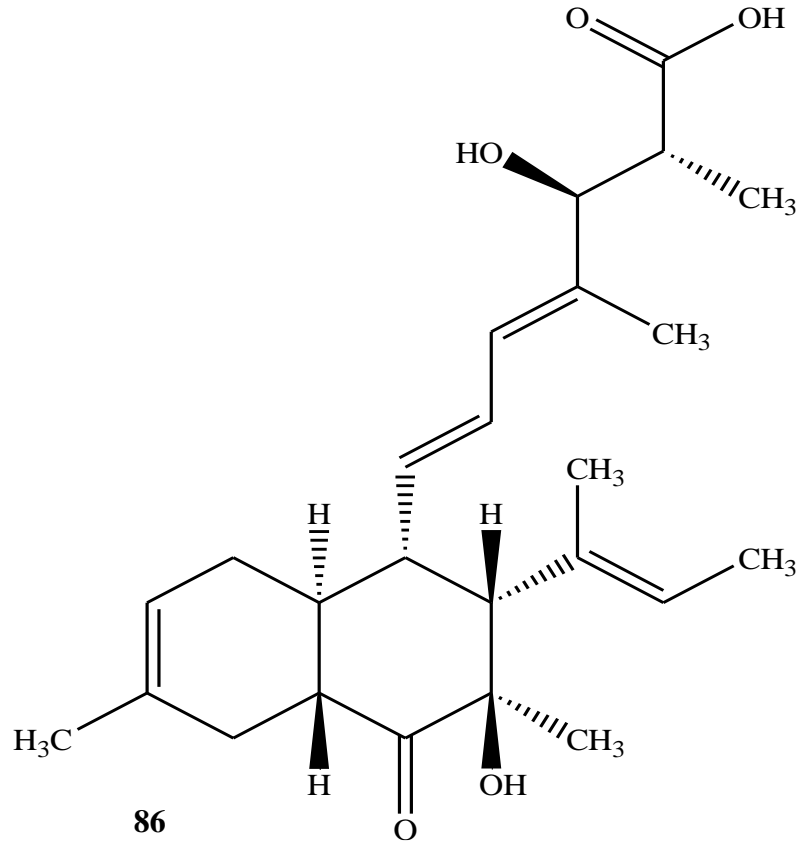


Figura 6 – Continuação



2.3 Micotoxinas mais representativas de espécies de *Fusarium*

Micotoxina [“*mykes*” (do grego, fungo) e “*toxicum*” (do latim, toxina)] é sinônimo de toxina fúngica, e este termo é utilizado para se referir aos vários metabólitos de elevada toxicidade produzidos por fungos ou leveduras diante de condições determinadas pelo ambiente em que estes micro-organismos estão inseridos. A ingestão de micotoxinas por humanos ou animais causa a micotoxicose, ou seja, a intoxicação adquirida através do consumo de metabólitos tóxicos (JOBIM *et al.*, 2001).

As micotoxinas são sintetizadas apenas diante de determinadas condições e estão relacionadas à capacidade de biossíntese do micro-organismo quando submetido a condições que favoreçam a produção dos metabólitos secundários tóxicos (OTTONI, 2008). Para Melo (2014), fatores químicos (uso de fungicidas), físicos (temperatura, armazenamento e umidade) e biológicos (susceptibilidade do hospedeiro e virulência do patógeno) afetam diretamente a síntese de micotoxinas por parte dos fungos.

Para animais e humanos, a principal fonte de micotoxinas são os cereais que constituem sua base alimentar (SANTIN *et al.*, 2000), desta forma, a presença das micotoxinas está geralmente associada a grãos como milho, sorgo, feijão, arroz, trigo, soja, cacau, café, cevada entre outros, além de frutas, ovos, leite e derivados, pimentas e chás (OTTONI, 2008).

O gênero *Fusarium* ocupa a terceira posição dentre os gêneros com maior número de espécies capazes de causar enfermidades em plantas (onde são observadas perdas globais na agricultura), animais e em seres humanos. Espécies do gênero possuem a incrível capacidade de produzir os mais variados tipos de micotoxinas, tais como fumonisinas, zearalenonas, ácido fusárico, moniliformina, além de tricotecenos, sendo os mais observados vomitoxina (também conhecida como desoxinivalenol - DON) e o T-2 (OTTONI, 2008).

Segundo Jobim *et al.* (2001), das cerca de 400 micotoxinas já conhecidas, algumas são mais preocupantes devido ao seu maior potencial tóxico e, em virtude disso, uma atenção especial é conferida às fumonisinas, aflatoxinas, zearalenona, desoxinivalenol, assim como aos tricotecenos.

O gênero *Fusarium* apresenta-se como grande produtor de micotoxinas, havendo relatos de que suas espécies são capazes de sintetizar mais de 70 destes compostos, além do fato de que uma única cepa dos micro-organismos pertencentes a este gênero é capaz de produzir 17 micotoxinas de forma concomitante (PINTO, 2005). Dentre as espécies de *Fusarium* produtoras de micotoxinas, destacam-se *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F.*

equiseti, *F. roseum*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (LESLIE; SUMMERELL, 2007; MELO, 2011).

A Tabela 2 ilustra algumas micotoxinas isoladas de espécies de *Fusarium* relatadas na literatura e a Figura 7 (página 48) ilustra as estruturas das mesmas.

Tabela 2 - Exemplos de micotoxinas produzidas por algumas espécies de *Fusarium*.

ESPÉCIE	MICOTOXINA
<i>F. culmorum</i>	Aurofusarina (1), butenolídeo (2), clamidosporol (3), culmorina (4), ciclonerodiol (5), ciclonerotriol (6), fusarinas (7), moniliformina (8), tricotecenos (9), zearalenona (10)
<i>F. graminearum</i>	Aurofusarina (1), butenolídeo (2), clamidosporol (3), culmorina (4), ciclonerodiol (5), fusarinas (7), tricotecenos (9), zearalenona (10)
<i>F. sporotrichioides</i>	Aurofusarina (1), beauvericina (11), butenolídeo (2), culmorina (4), enniatinas (12), moniliformina (8), tricotecenos (9)
<i>F. crookwellense</i>	Aurofusarina (1), butenolídeo (2), culmorina (4), ciclonerodiol (5), ácido fusárico (13), fusarinas (7), tricotecenos (9), zearalenona (10)
<i>F. acuminatum</i>	Acuminatum (14), aurofusarina (1), beauvericina (11), clamidosporol (3), enniatinas (12), fusarinas (7), moniliformina (8), tricotecenos (9)
<i>F. equiseti</i>	Beauvericina (11), equisetina (15), fusariocromanona (16), moniliformina (8), tricotecenos (9), zearalenona (10)
<i>F. proliferatum</i>	Beauvericina (11), enniatinas (12), fumonisinas (17), ácido fusárico (13), fusaproliferina (18), moniliformina (8)
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisin (17), ácido fusárico (13), fusarinas (7), naftoquinonas (19)
<i>F. armeniacum</i>	Beauvericina (11), fusarinas (7), tricotecenos (9)
<i>F. pseudograminearum</i>	Tricotecenos (9), Zearalenona (10)

Fonte: Nesic *et al.* (2014).

Figura 7 – Estruturas das micotoxinas isoladas do gênero *Fusarium* e listadas na Tabela 2.

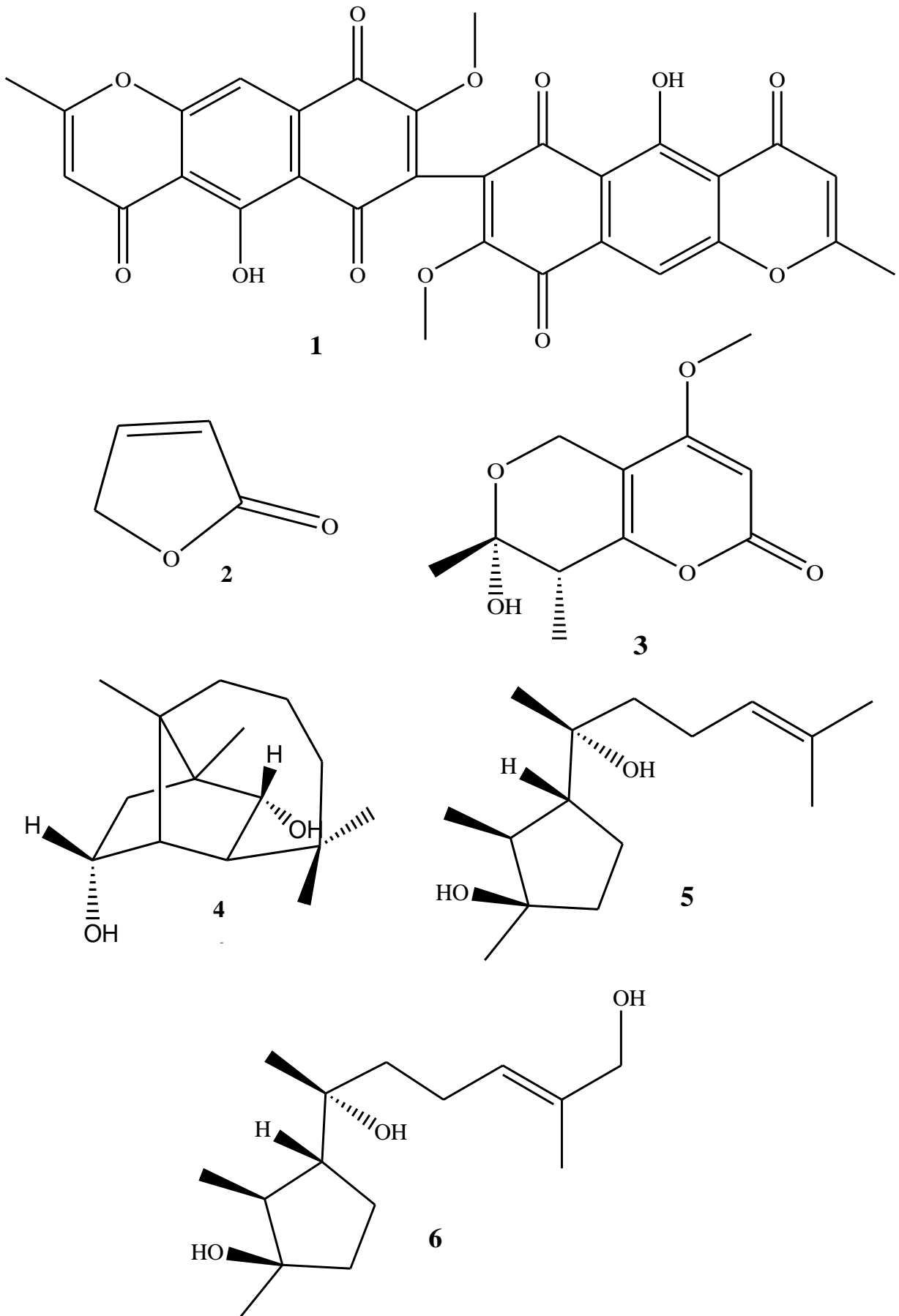


Figura 7 - Continuação

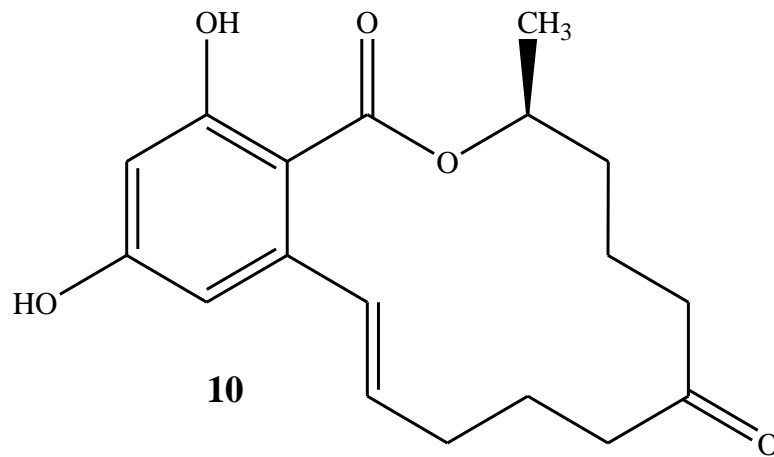
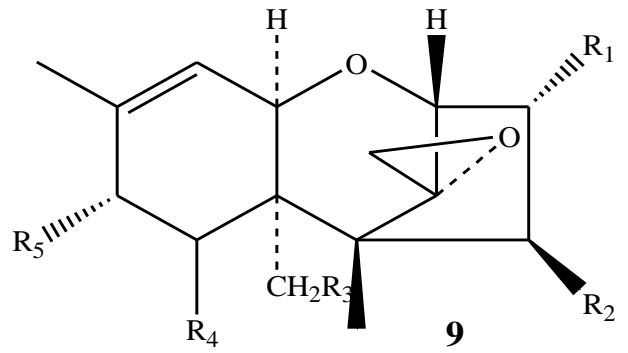
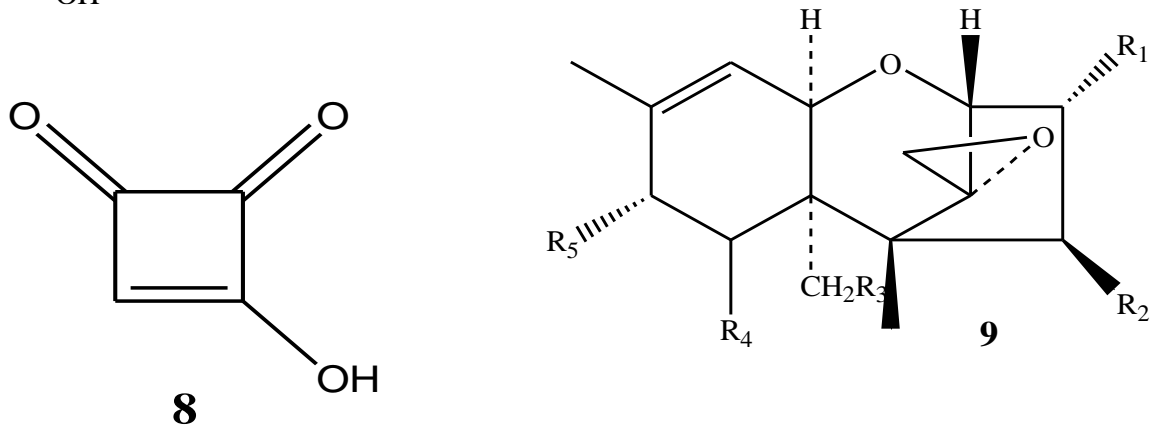
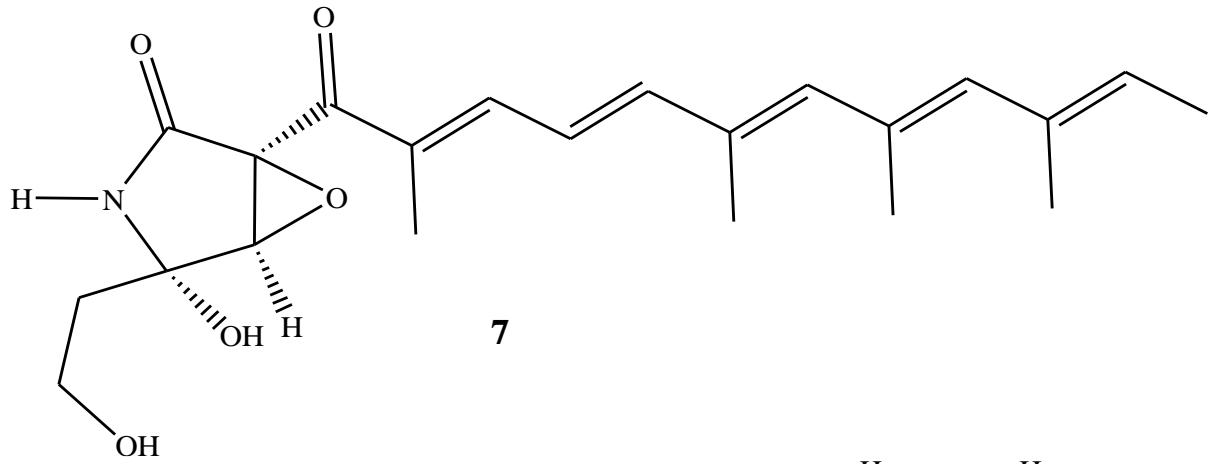


Figura 7 - Continuação

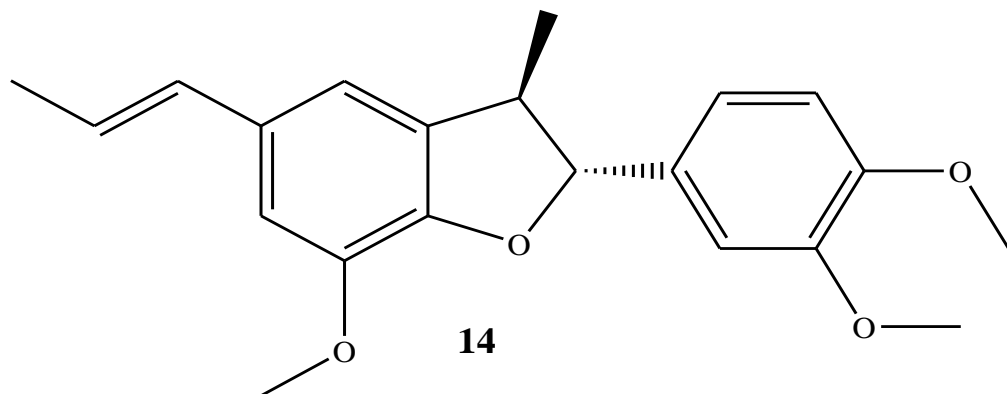
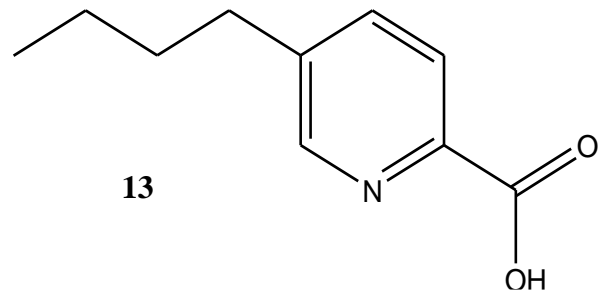
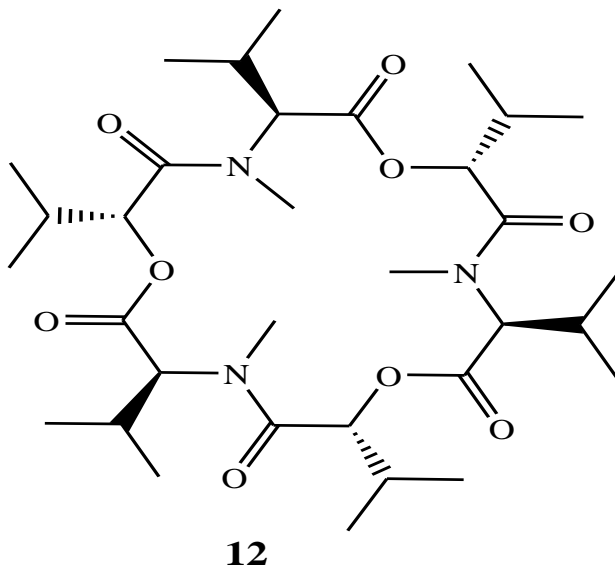
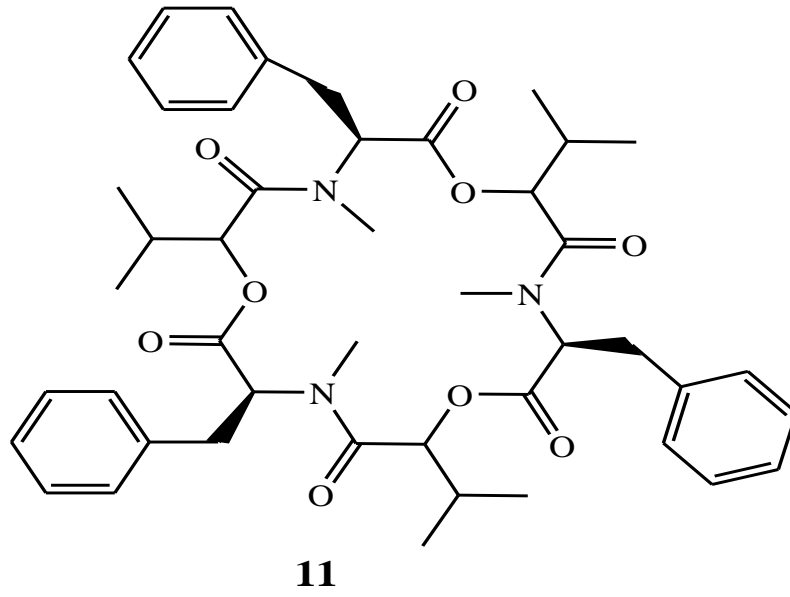
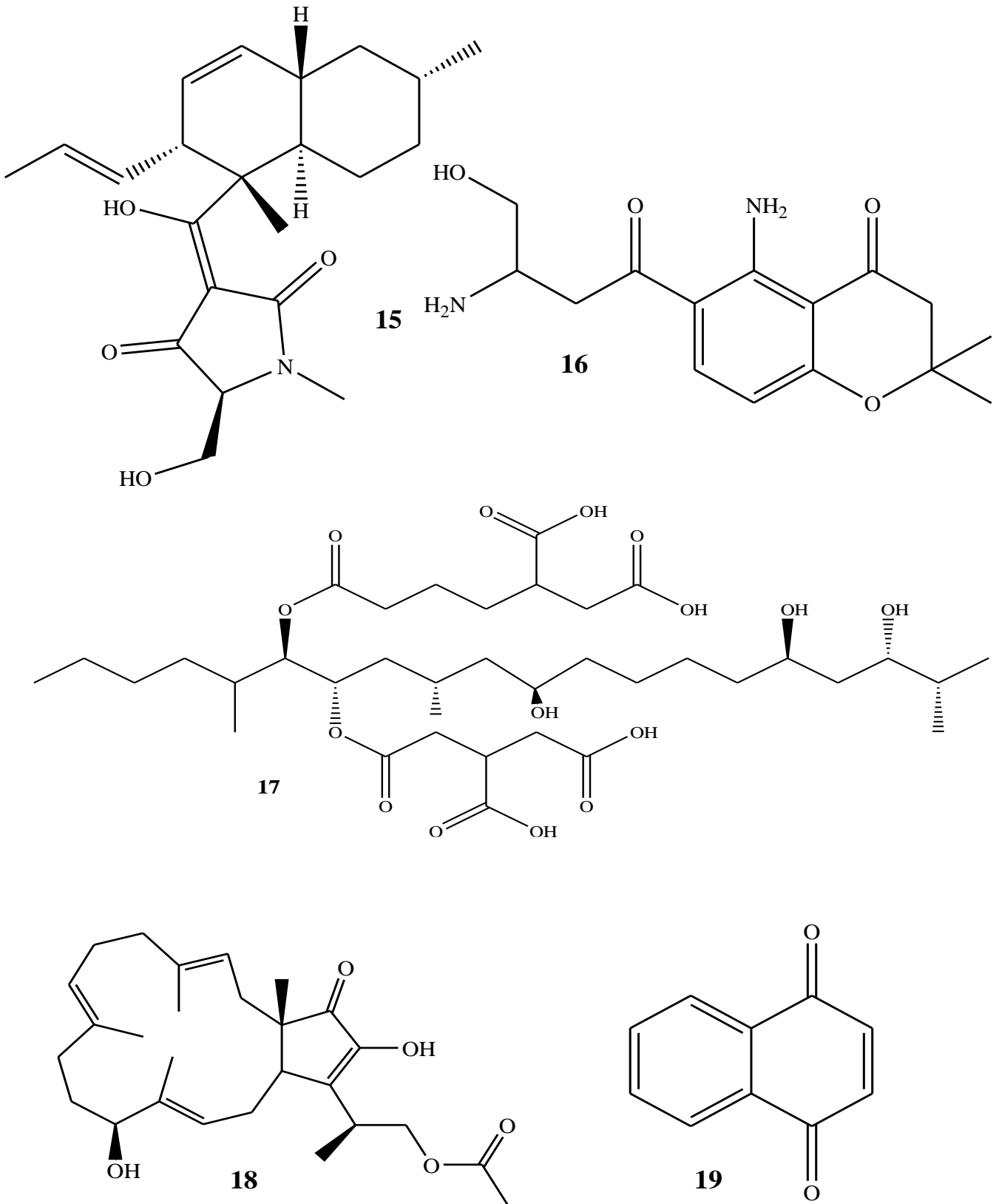


Figura 7 - Continuação

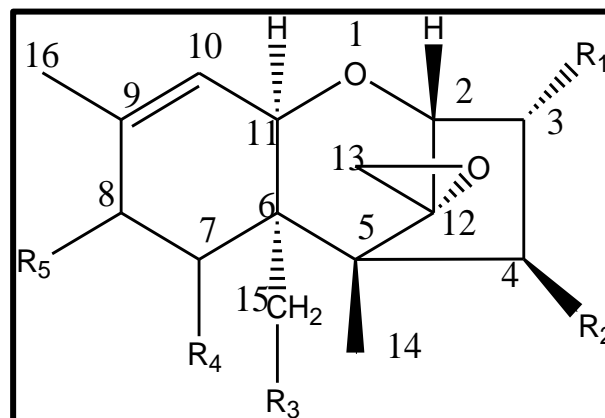


2.3.1 Tricotecenos

Tricotecenos (FIGURA 8) são micotoxinas produzidas sob condições de elevada umidade e em temperaturas que variam de 6 à 24° C, tendo ocorrência relatada em países da África, Europa, Américas do Norte e do Sul, Ásia e observados em culturas de milho, trigo, arroz, cevada, leguminosas entre outras (ZAIN, 2011). A toxicidade destes compostos está relacionada à inibição da síntese de DNA e RNA nas células (NESIC *et al.*, 2014), podendo causar necrose nos tecidos e mucosas que são a eles expostos. Os tricotecenos são sintetizados por vários gêneros de fungos, no entanto, mais abundantemente pelo gênero *Fusarium* (ZAIN, 2011).

Estes compostos são classificados estruturalmente na classe dos sesquiterpenóides, e contam com mais de 150 compostos diferentes e amplamente conhecidos pela sua elevada toxicidade (HIROOKA; YAMAGUCHI, 1994). A estrutura básica é formada por um núcleo tetracíclico chamado tricotecano, e possuem uma insaturação entre os carbonos 9 e 10 e um grupo epóxido nas posições 12 e 13, fato que confere a estas substâncias elevada toxicidade e reatividade (ZAIN, 2011). Os tricotecenos podem ser classificados como tipo A, apresentando um átomo de oxigênio na posição 8, e tipo B, que contém um grupo carbonila nesta posição. Tricotecenos do tipo A incluem a toxina HT-2 (FIGURA 6, estrutura 46), a T-2 (FIGURA 6, estrutura 31), diacetoxiscirpenol (DAS) (FIGURA 6, estrutura 75) e neosolaniol (FIGURA 6, estrutura 34). Já entre os tricotecenos do tipo B destaca-se a DON (FIGURA 6, estrutura 65). (NESIC *et al.*, 2014).

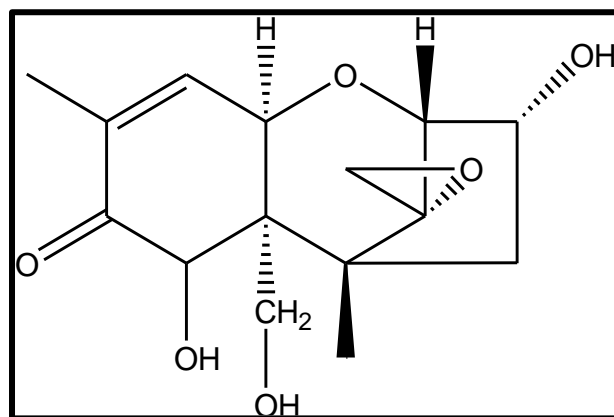
Figura 8 - Esqueleto base dos tricotecenos.



Fonte: Zain (2011).

Desoxinivalenol (DON) (FIGURA 9) foi isolada em 1972 no Japão sendo produzida por *Fusarium roseum*. Os animais mais sensíveis a este tricoteceno são os suínos que, quando contaminados, apresentam problemas respiratórios, necrose da epiderme, recusa alimentar, vômitos⁴, entre outros sintomas. Os principais micro-organismos associados à biossíntese de DON são *Fusarium roseum*, *F. tricinctum*, *F. equiseti*, *F. toxicum*, *F. moniliforme*, *Cephalosporium* ssp, *Myrothecium* ssp, *Trichoderma* ssp, *Sachybotrys* ssp, *Microdochium nivale* (DINIZ, 2010).

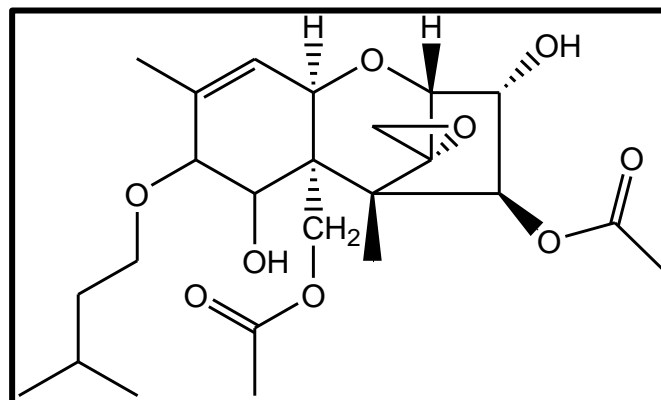
Figura 9 – Estrutura da micotoxina desoxinivalenol (DON).



Fonte: Zain (2011).

A micotoxina T-2 (FIGURA 10) é produzida principalmente por *F. langsethiae*. É tóxica tanto para animais como humanos e, alguns dos sintomas de intoxicação em humanos incluem hemorragias, inibição da síntese proteica além de pancitopenia⁵ (NESIC *et al.*, 2014).

Figura 10 – Estrutura da micotoxina T-2.



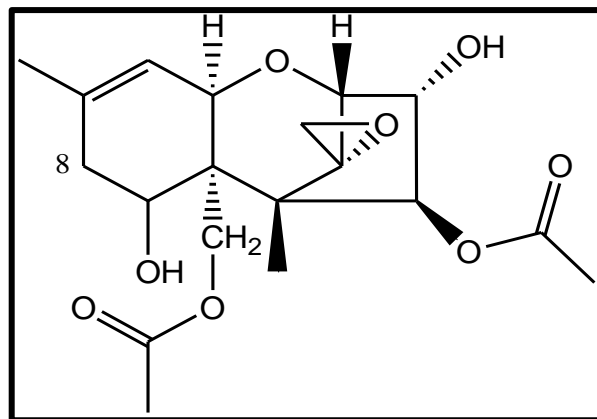
Fonte: Zain (2011).

⁴ Devido à estes sintomas, a DON também é conhecida como vomitoxina.

⁵ Redução no número de glóbulos brancos, vermelhos e de plaquetas no sangue.

Diacetoxiscirpenol (DAS), também conhecida como anguidina, é um dos tricotecenos mais tóxicos sendo produzido por várias espécies de *Fusarium*, incluindo *F. sambucinum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. acuminatum*, entre outros. Sua estrutura muito se assemelha com a da toxina T-2 (FIGURA 10), diferindo apenas na presença, em DAS, de átomos de hidrogênio no carbono 8 (FIGURA 11). Os sintomas causados pela ingestão e consequente intoxicação por este metabólito tóxico incluem vômitos, mielossupressão⁶, hipotensão e diarreia (ZAIN, 2011).

Figura 11 – Estrutura da micotoxina DAS.



Fonte: ZAIN, 2011.

2.3.2 Fumonisinias

As fumonisinias (FIGURA 12, página 55) são micotoxinas cancerígenas biossintetizadas por aproximadamente quinze espécies do gênero *Fusarium*. Dentre as espécies produtoras, encontram-se as do complexo *Gibberella fujikuroi*⁷, onde está inserido *F. udum*, porém, as maiores produtoras são as espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Apenas o fungo *Alternaria alternata*, não pertencente ao gênero *Fusarium*, foi relatado como passível de produzir fumonisinias (RHEEDER *et al.*, 2002).

O consumo de fumonisinias através da ingestão de grãos contaminados está associado a várias doenças tanto em humanos quanto em animais, tais como câncer no esôfago (TAMURA *et al.*, 2015), no fígado e má formação do sistema nervoso nos primeiros e leucoencefalomalácia⁸ em equinos e edema pulmonar em suínos (OTTONI, 2008).

⁶ Extinção na produção de células sanguíneas por parte da medula.

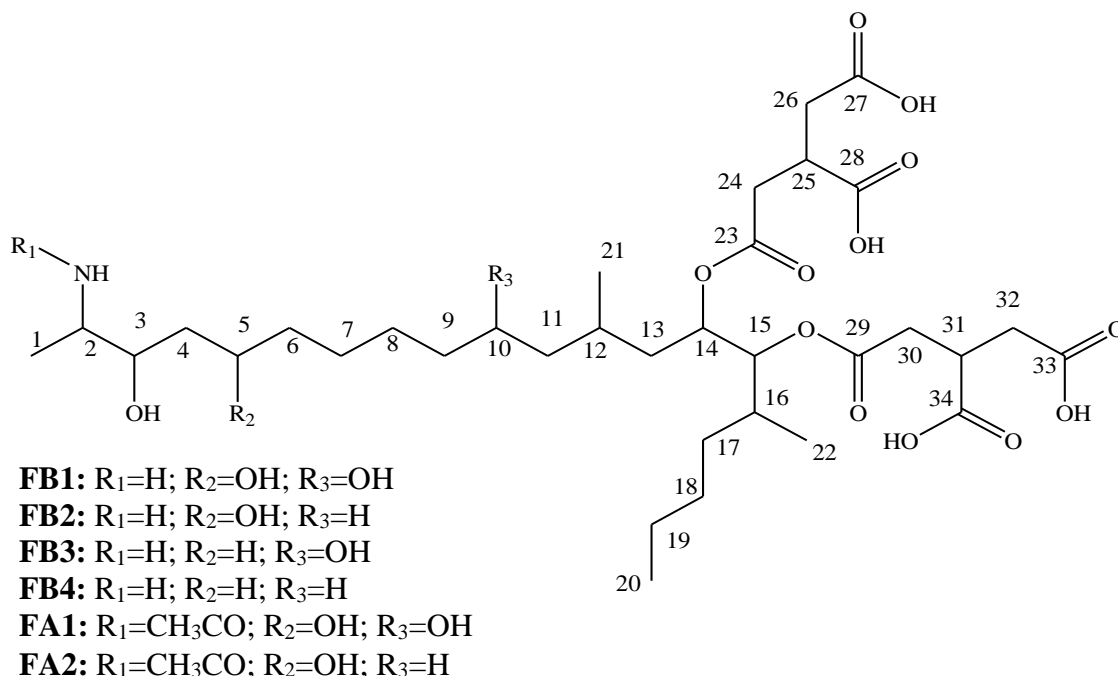
⁷ *Gibberella fujikuroi* trata-se de um grupo monofilético, ou seja, um grupo onde todos os elementos descendem de um ancestral comum, sendo que este complexo corresponde à antiga seção *Liseola*. Espécies originalmente classificadas em outras seções de *Fusarium* também estão inseridas neste complexo que, atualmente, é denominado *Fusarium fujikuroi species complex*.

⁸ Degeração do sistema nervoso central causado por alterações no metabolismo produzindo amolecimento e

Há relatos da identificação de seis tipos de fumonisinas, sendo estas classificadas como A1 e A2, apresentando o grupo funcional amida, além das do tipo B1, B2, B3 e B4, que apresentam o grupo funcional amina (NESIC *et al.*, 2014).

As fumonisinas do tipo A são pouco relatadas quanto ao seu isolamento, e sua ocorrência se dá em baixas concentrações. Acredita-se, inclusive, que elas sejam artefatos criados durante o processo de isolamento inicial das fumonisinas, de modo que não há informações de sua ocorrência natural (NELSON, 1993; LINO *et al.*, 2001). Segundo Lino *et al.* (2006), as do tipo B1 e B2 tiveram seu relato de isolamento e elucidação estrutural efetuado pela primeira vez em 1988, sendo sintetizadas, na ocasião, pela espécie *verticillioides*⁹.

Figura 12 - Estrutura química das fumonisinas FB1, FB2, FB3, FB4, FA1 e FA2.



Fonte: TAMURA *et al.*, 2015.

De acordo com Nesic *et al.* (2014), a fumonisina FB1 consiste no ácido 1,2,3-propanotricarboxílico, 1,1'-[1-(12-amino-4,9,11-tri-hidroxi-2-metiltridecil)-2-(1-metilpentil)-1,2-etanodiiil] éster, sendo a mais importante desta classe, devido a sua toxicidade e ocorrência natural (de 70 a 80% das fumonisinas encontradas são do tipo B1).

liquefação (malácia) da massa branca do encéfalo devido a ação de micotoxinas.

⁹ *Fusarium verticillioides* deve ser entendido como sinônimo de *Fusarium moniliforme*.

2.3.3 Zearalenona

Micotoxina isolada pela primeira vez em 1962 através do cultivo de *F. graminearum*, sendo que sua ocorrência natural passou a ser estudada a partir de 1968. Atualmente, sabe-se que este metabólito tóxico pode ser sintetizado por várias espécies do gênero, porém, as espécies *F. graminearum* e *F. culmorum* são relatadas como maiores produtoras (BOEIRA, 2012).

Esta classe de micotoxina caracteriza-se estruturalmente por ser uma macrolactona com um anel constituído por 13 átomos de carbono. Sua biossíntese está condicionada à presença do fungo em culturas de milho, cevada, trigo, arroz e sorgo em temperaturas entre 12-14°C e umidades relativamente elevadas. Já em laboratório, pode ser sintetizada pelo cultivo de espécies de *Fusarium* por 3 semanas em temperaturas entre 20-25°C e umidade acima de 20% (BOEIRA, 2012).

Alguns autores consideram inadequada a classificação da ZEA como micotoxina, pois sua toxicidade é muito baixa, apesar de ser biologicamente potente, causando problemas relacionados ao sistema reprodutor em suínos, ovinos e bovinos. Sendo assim, seria melhor classificada como estrógeno não esteroidal (FREIRE *et al.*, 2007).

A ZEA, após ingerida por humanos e alguns animais, é absorvida pelo trato intestinal e, nas células deste, sofre degradação em α - e β - zearalenol (α - e β -ZOL) e α - e β - zearalanol (α - e β -ZAL), sendo estes conjugados com ácido glicurônico, tendo o fígado a responsabilidade de reduzir ZEA em α -ZOL e β -ZOL (BOEIRA, 2012). A Figura 13 ilustra as estruturas químicas destes compostos.

Figura 13 – Estruturas químicas de: a) zearalenona; b) α -zearalenol; c) β -zearalenol; d) α -zearalanol; e) β -zearalanol.

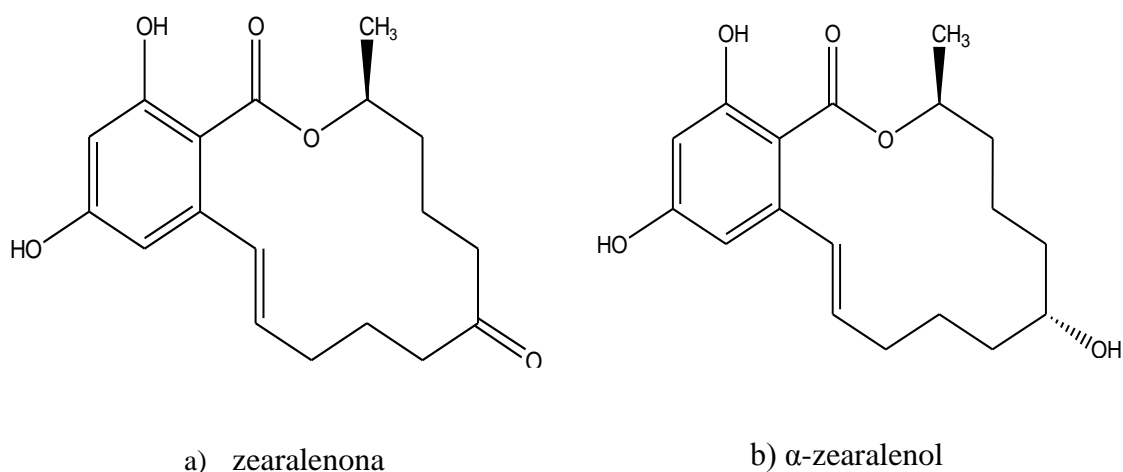
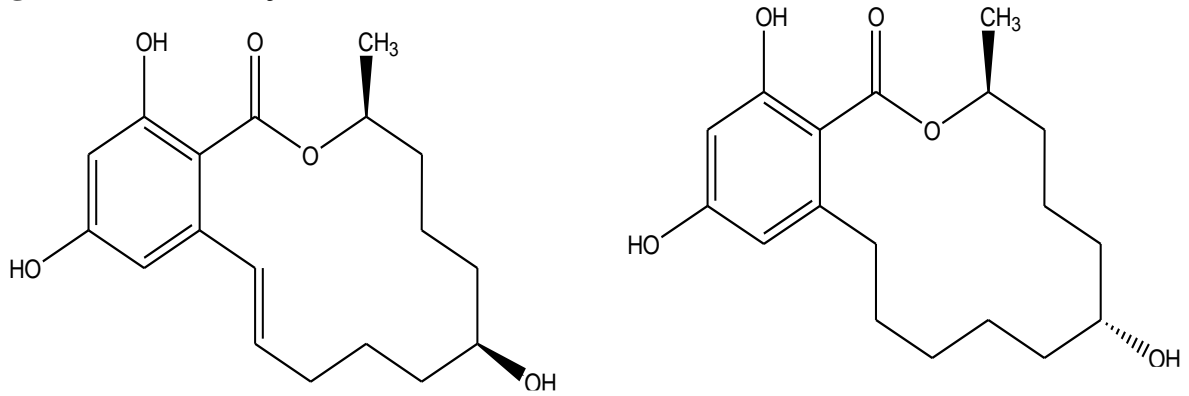
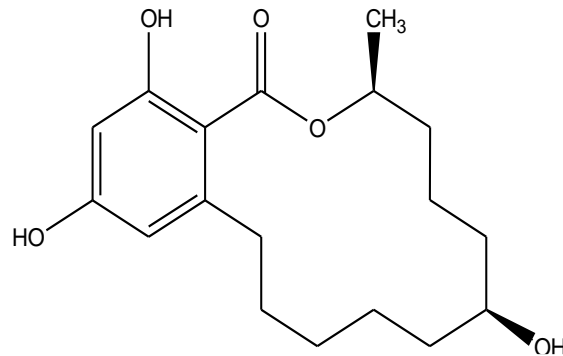


Figura 13 – Continuaçãoc) β -zearalenold) α -zearalenole) β -zearalenol

Fonte: Zinedine *et al.* (2007).

2.3.4 Ácido Fusárico

Também descrito como ácido 5-butilpicolínico (FIGURA 14), esta micotoxina foi isolada pela primeira vez por Yabuta em 1934 através do cultivo de *F. heterosporum* Ness¹⁰ em laboratório, tendo sido isolado de várias espécies de *Fusarium*, dentre elas: *F. moniliforme*, *F. crookwellense*, *F. subglutinans*, *F. sambucinum*, *F. nygama* e *F. semitectum* (DINIZ, 2010; TUNG *et al.*, 2016).

Devido à produção desta micotoxina ser efetuada pela grande maioria de espécies do gênero *Fusarium*, esta pode ser usada como indicador de contaminação por alguma espécie deste gênero em plantas e alimentos. Há ainda relatos de que a toxicidade de outras micotoxinas

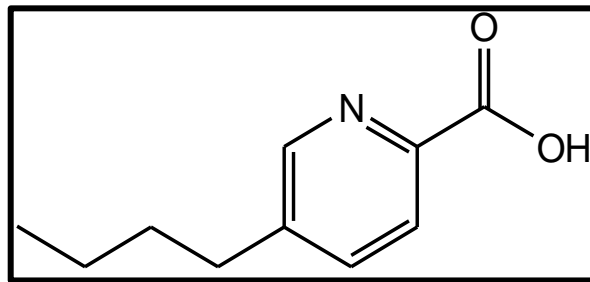
¹⁰ Este fungo foi posteriormente identificado como *F. moniliforme*.

podem ser potencializadas pela sua presença, devido às interações sinérgicas (BACON *et al.*, 1996).

O ácido fusárico é considerado tóxico tanto para plantas como para animais, já que seu baixo peso molecular favorece seu transporte até as células, e acredita-se que a toxicidade esteja relacionada à inibição da síntese de DNA. Este mecanismo é de significativa importância em doenças de plantas, estando associada aos males no tomate, pepino e banana (TUNG *et al.*, 2016).

Entretanto, também são relatadas várias atividades farmacológicas para este metabólito, através de um mecanismo de inibição da dopamina β -hidroxilase que, por sua vez, possui ação catalisadora na síntese da noradrenalina a partir da conversão da dopamina (BROWN; PROCTOR, 2013). Existem também relatos para a verificação da sua aplicabilidade no tratamento de doenças relacionadas à hipertensão, devido a sua capacidade de dilatação das artérias, além de estudos em fase inicial que investigam sua eficácia no tratamento contra o câncer de esôfago (TUNG *et al.*, 2016; DEVNARAIN *et al.*, 2017).

Figura 14 – Estrutura química do ácido fusárico.

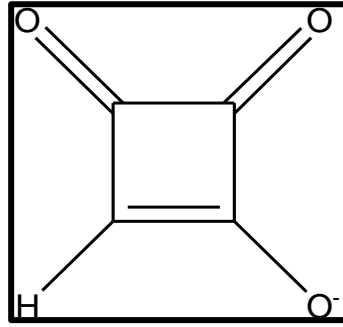


Fonte: Diniz (2010).

2.3.5 Moniliformina

Moliniformina ou 1-hidroxiciclobut-1-eno-3,4-diona (FIGURA 15, página 59) já foi relatada em mais de 30 espécies do gênero *Fusarium* (sobretudo *F. proliferatum*), e geralmente está associada à produção das fumonisinas, mesmo sem semelhanças estruturais entre as mesmas. É um metabólito caracterizado como um sal de potássio ou de sódio e altamente tóxico para aves, onde promove lesões cardíacas e inibição de algumas enzimas após prolongada exposição (NESIC *et al.*, 2014).

Figura 15 – Estrutura química da moniliformina.



Fonte: Zain (2011).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Material de estudo

O isolado UFCM-0439 de *Fusarium udum* foi obtido a partir da espécie *Crotalaria paulinea*, em Recife-PE, em 2010, e cedido a partir da Coleção de Culturas de Fungos de Plantas Tropicais - UFCM, do Laboratório de Micologia, do Departamento de Fitotecnia, Setor de Fitossanidade, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, sob a coordenação do professor Cristiano Souza Lima. A cepa isolada encontrava-se preservada segundo o método Castellani (CASTELLANI, 1963), e foi inoculada em meio semissólido BDA inclinado em tubo de ensaio devidamente protegido com tampão de algodão (FIGURA 16a).

Figura 16 – Foto do isolado UFCM0439 inoculado em meio BDA (a) tubo de ensaio e (b) placa de petri.



a)



b)

Fonte: Autora (2017).

3.2 Cultivo, preservação e repicagem

A cepa foi preservada segundo o método Castellani (CASTELLANI, 1963), em água estéril e à temperatura ambiente. O micro-organismo foi inicialmente cultivado por um período de 5 dias em meio semissólido BDA vertido em placa de petri (FIGURA 16b). Após este período, discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo UFCM0439 foram retirados com o auxílio de canudos de plástico previamente esterilizados. Os discos foram colocados no interior de tubos criogênicos de 5 mL, contendo 4 mL de água destilada estéril e lacrados com tampa e fita parafilme, para impedir a entrada de agentes contaminantes e a evaporação da

água. Os tubos contendo as cepas foram armazenados sob temperatura ambiente no Laboratório de Micologia da UFC.

A repicagem do fungo foi efetuada quinzenalmente através de sua transferência para tubos de ensaio e placas de petri contendo meio BDA, para assegurar o uso de culturas livres de agentes contaminantes (ácaros, bactérias ou outros gêneros e espécies de fungos) assim como a renovação da cultura fúngica. Os processos de repicagem, assim como todos os demais procedimentos que envolveram a manipulação de UFCM0439, foram efetuados em câmara de fluxo laminar Labconco® MOD # 8089000, e o material necessário aos processos foram submetidos à esterilização em autoclave vertical da marca Phoenix® A V 75, à 121°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

3.3 Métodos Cromatográficos

3.3.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Para a análise dos extratos por CCDA foram utilizadas placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ – Merk (espessura 0,2 mm). As placas foram submetidas à luz ultravioleta (lâmpada da marca spectroline® modelo CM-10) e a análise foi feita em dois comprimentos de onda, 254 e 365 nm. Após a análise em lâmpada UV, as placas foram imersas em solução de vanilina 5,0 g /HClO₄ 0,75 M/CH₃CH₂OH (1:1), e submetidas ao aquecimento em chapa elétrica CIENTEC até que fossem completamente reveladas. Para as referidas análises foram utilizados solventes grau P.A. das marcas Synth® e Vetec®. Os solventes utilizados como eluentes foram diclorometano, acetato de etila, metanol e hexano, combinados como misturas, em proporções adequadas às análises, ou utilizados individualmente.

3.3.2 Cromatografia por adsorção em fase reversa

O fracionamento dos extratos obtidos foi efetuado utilizando-se cromatografia de fase reversa, sendo realizado em cartuchos do tipo octadecilsilano (de sílica C18 - ODS) da marca Strata Phenomenex® de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro.

3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada utilizando um equipamento SHIMADZU LC-20AT, constituído por um sistema de bombeamento ternário de alta

pressão além de detector UV-Visível com arranjo de diodo SHIMADZU SPD-M20A e um forno termostático contendo a coluna metálica com recheio de sílica.

Para as análises feitas pelo sistema de CLAE, foram utilizadas colunas de fase reversa de sílica C-18 (Phenomenex) semipreparativa (de dimensões 250 x 10 mm e 5 μ) e analítica (250 x 4,6mm e 5 μ).

As análises foram feitas com as amostras dissolvidas com os solventes usados na fase móvel. Após a completa solubilização, as amostras eram filtradas num sistema manual de membrana de teflon com poros de 0,22 μ m (Phenomenex). Os solventes das marcas Tedia e Panreac grau HPLC utilizados na fase móvel foram previamente filtrados, enquanto que a água, quando utilizada na composição da fase móvel durante as análises, foi obtida de um equipamento de purificação e ultrapurificação Milli-Q.

3.4 Métodos espectrométricos

Os compostos obtidos e isolados com o auxílio de métodos cromatográficos foram submetidos a técnicas espectrométricas para a elucidação de suas estruturas. Deste modo, as técnicas, assim como a descrição dos equipamentos utilizados, encontram-se nas subseções abaixo.

3.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em equipamento Bruker® DPX 300 e 500 MHz, no Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo utilizados como solventes CD_3OD (metanol) e DMSO-d_6 (dimetilsulfóxido) deuterados da Cambridge Isotope Laboratories.

3.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Para obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho (IV), foi utilizado espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 100, localizado no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As amostras resinosas foram solubilizadas em quantidades mínimas de solvente volátil (acetona ou diclorometano) e, na sequência, aplicadas no acessório UATR para serem analisadas. Já as

amostras sólidas, foram analisadas a partir da preparação de pastilhas de KBr (brometo de potássio).

3.4.3 Espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa (CG-EM)

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massas acoplado à cromatografia gasosa, de modelo QP 2010 da Shimadzu, 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 µm filme) com modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

3.5 Produção dos metabólitos secundários de UFCM0439

3.5.1 Estudo do crescimento do fungo segundo a taxa de glicose do meio

O estudo do crescimento de *F. udum* foi realizado em quatro meios de cultura distintos: BD (batata-dextrose), BDL (batata-dextrose-levedura), MPD (malte-peptona-dextrose) e Czapek. Para a inoculação do micro-organismo foram preparados quatro litros de cada um dos quatro meios de cultura distintos. A Tabela 3 traz informações concernentes aos meios utilizados e às proporções de cada componente destes. Os meios de cultura foram distribuídos em 16 erlenmeyers de 2 L, onde cada um continha 1L de meio, que foram devidamente lacrados com tampões de algodão hidrófobo, e submetidos ao processo de autoclavagem à 121°C por 15 minutos.

Tabela 3 - Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.

MEIO DE CULTURA	COMPOSIÇÃO
BD	Batata-dextrose 24g/L
BDL	Batata-dextrose 24g/L; Extrato de Levedura 2,5g/L
MPD	Extrato de malte 20g/L; Peptona 2g/L; Dextrose 20g/L
Czapek	Glicose 30g/L; NaNO ₃ 2g/L; K ₂ HPO ₄ 2g/L; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5g/L; KCl 0,5g/L; FeSO ₄ .7H ₂ O 0,01g/L.

Fonte: Autora (2015).

O micro-organismo permaneceu inoculado em 10 tubos de ensaio contendo meio semissólido BDA (batata-dextrose-água), por um período de 7 dias. A partir destas culturas,

foram produzidos 40 mL de suspensão de esporos cuja absorvância medida foi 0,13. Uma alíquota de 10 mL de suspensão de esporos foi inoculada para cada 1L de meio de cultura. Para cada um dos quatro meios de cultura distintos, 1L foi usado como “controle”, contendo apenas o meio não inoculado com o micro-organismo. O experimento foi conduzido no modo estático à temperatura de 28-33°C, fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, na sala de incubação de micro-organismos do Laboratório de Micologia da UFC.

A taxa de glicose foi acompanhada de dois em dois dias utilizando-se, para tal finalidade, fitas de medir glicose na urina da marca Confirme®. A partir do momento que era verificado que a taxa havia chegado a zero, os meios permaneciam inoculados por mais 48 horas. Na sequência, o micélio foi separado do seu respectivo meio de cultivo através de filtração a vácuo. A fase aquosa foi submetida à partição líquido-líquido, inclusive o controle, utilizando-se como solvente acetato de etila (3 vezes 350 mL) para cada litro de meio de cultura. Após este procedimento, foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e o solvente, após filtrado para a separação do sal, foi destilado sob pressão reduzida. Os extratos assim obtidos foram submetidos à análise por CCDA.

3.5.2 Estudo de otimização do crescimento de UFCM0439 em diferentes intervalos de tempo de cultivo

Foi realizado um estudo prévio, em pequena escala, objetivando encontrar o meio de cultura mais adequado, assim como o período de tempo mais favorável para a biossíntese de maior diversidade de metabólitos secundários.

Para este estudo foram selecionados os quatro meios de cultura líquidos batata-dextrose (BD), batata-dextrose-extrato de levedura (BDL), malte-peptona-dextrose (MPD) e Czapek. Os meios foram solubilizados em água destilada e preparados conforme as proporções dos nutrientes descritas na Tabela 3 (página 63).

Os componentes de cada meio de cultura foram dissolvidos em 1,2 L de água destilada para a preparação de um volume de 1,2 L de cada meio, o qual foi distribuído em porções iguais de 100 mL em 12 erlenmeyers de 250 mL. Os erlenmeyers foram lacrados com tampões de algodão hidrófobo e submetidos ao processo de autoclavagem à 121°C por 15 minutos. Após este tempo, os erlenmeyers foram retirados da autoclave para o resfriamento, seguido pela inoculação de *F. udum*.

O processo de inoculação foi realizado no Laboratório de Micologia da UFC em câmara de fluxo laminar Labconco®, cuja assepsia foi realizada previamente com álcool 70%.

Ao fungo que se encontrava crescido por 7 dias em tubos de ensaio contendo meio semissólido inclinado BDA (batata-dextrose-ágar), foi adicionado água destilada estéril para o desprendimento dos esporos. Foram preparados 45 mL de suspensão de esporos, que foi filtrada em filtros estéreis com membrana de nylon (100 µm, Falcon), e a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (Analítica WPA Biowave) obtendo-se um valor de 0,13. A partir deste procedimento, uma alíquota de 1 mL da solução de esporos foi adicionada a cada erlenmeyer contendo o respectivo meio de cultura. Para cada meio, foram preparados 12 erlenmeyers, dos quais 4 não foram inoculados, para servir como controle (branco) do experimento.

O estudo foi realizado por um período de 28 dias, sendo o experimento mantido na sala de incubação de micro-organismos, localizada no Laboratório de Micologia da UFC.

A cada intervalo de 7 dias, foram retirados 3 erlenmeyers de cada meio de cultivo, dois erlenmeyers contendo o fungo inoculado e um contendo apenas o meio de cultura (branco).

Para a obtenção da fase orgânica, os micélios foram separados dos meios de cultivo através de filtração a vácuo. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt) (3x 35,0 mL). Acrescentou-se Na₂SO₄ para remoção de água, filtrou-se e o solvente da fase orgânica foi evaporado em rotavapor sob pressão reduzida. O experimento foi conduzido em duplicata para prevenção de perdas oriundas de possíveis contaminações. Desta forma, as réplicas que se apresentavam idênticas, através da análise em CCDA e CLAE, foram reunidas.

3.5.3 Cultivo de UFCM0439 em grande escala – Meio BDL (28 dias)

O fungo foi cultivado em grande escala seguindo o mesmo procedimento e condições de cultivo do experimento em pequena escala. Desta forma, foram preparados 16 litros de meio de cultura BDL distribuídos em 80 erlenmeyers de 500 mL, onde cada erlenmeyer continha 200 mL de meio. Os erlenmeyers foram devidamente lacrados com tampões de algodão hidrófobo e submetidos à autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram realizadas as inoculações de UFCM0439 nos diversos erlenmeyers.

Para a inoculação, foram preparados 170 mL de suspensão de esporos com absorbância de 0,13. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de esporos foi inoculada para cada 100 mL de meio de cultura. Deixou-se 1 L de meio como controle, sem o micro-organismo. O experimento foi conduzido no modo estático, à temperatura de 28-33°C, e fotoperíodo de 12 horas no claro/12 horas no escuro.

Após os 28 dias de cultivo, foi possível constatar que 2 litros estavam contaminados por bactéria. Desta forma, foi efetuada a filtração de 13 L não contaminados, para separação do micélio do meio (o tratamento deste encontra-se descrito na seção 3.5.4). A fase aquosa foi submetida à partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 350 mL para cada litro de meio), sendo o solvente destilado em rotavapor sob pressão reduzida para a obtenção do extrato bruto.

3.5.4 Tratamento do micélio de UFCM0439 - Meio BDL (28 dias)

No experimento descrito na seção 3.5.3, o micélio foi separado do meio líquido através de filtração a vácuo e submetido à extração com MeOH por um período de 24 horas e, após este, foi levado ao banho ultrassônico por 30 minutos sendo seguido por filtração a vácuo. A fase orgânica foi submetida à destilação sob pressão reduzida em evaporador para remoção do solvente e obtenção do extrato micelial bruto. O extrato foi solubilizado em 90 mL de uma mistura binária H₂O/MeOH (1:1), e submetido à partição líquido-líquido com diferentes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção dos metabólitos secundários de UFCM0439

4.1.1 Estudo do crescimento do fungo segundo a taxa de glicose do meio

A partir do experimento realizado como descrito na seção 3.5.1, objetivou-se verificar através do acompanhamento constante da taxa de glicose em cada um dos quatro meios de cultivo distintos, o perfil dos metabólitos secundários produzidos por *F. udum*. Assim, após zerada a taxa de glicose em cada meio, foi possível verificar que o tempo de incubação variou de 15 a 25 dias, como ilustrado pela Tabela 4, exceto no meio Czapek, onde o fungo ficou inoculado por 70 dias, e, mesmo após este período, constatou-se que a glicose não fora completamente consumida, optando-se pela sua extração. Isso pode ser justificado pelo fato do meio ser pobre em nutrientes, quando comparado com os demais. Acredita-se que o micro-organismo tenha desenvolvido um mecanismo para poupar suas energias em virtude da baixa disponibilidade de nutrientes e, portanto, a glicose, principal fonte energética para o fungo, foi consumida lentamente a fim de que esta principal fonte de carbono não se esgotasse rapidamente e o micro-organismo não mais pudesse sobreviver neste meio. Assim, verifica-se que a composição química do meio nutricional é um dos fatores mais relevantes no que concerne ao comportamento e desenvolvimento do micro-organismo.

Tabela 4 - Meios utilizados com respectivos períodos de incubação de acordo com a taxa de glicose e massas de extratos obtidas.

MEIO DE CULTIVO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO ATÉ ZERADA A TAXA DE GLICOSE (DIAS)	MASSA (mg) DE EXTRATO BRUTO OBTIDA PARA 3 L DE MEIO	MASSA (mg) DO CONTROLE (1 L DE MEIO)
BD	20	183,0	69,7
BDL	15	69,8 *	118,1
MPD	25	285,2	44,3
Czapek	70	55,9	43,7

*Esta massa é para apenas 1 L de meio de cultivo inoculado, haja vista que, dos 3 L inoculados, 2 apresentaram contaminação por bactéria.

Fonte: Autora (2015).

O cultivo de UFCM0439 no meio MPD forneceu um maior rendimento de extrato, e foi selecionado para a análise preliminar de sua constituição química. 274,2 mg do extrato

bruto AcOEt foi submetido ao tratamento cromatográfico em cartucho octadesilsilano (C-18) (PHENOMENEX) por eluição com H₂O e MeOH, utilizando misturas binárias em diferentes concentrações, de acordo com os dados apresentados na Tabela 5, a seguir:

Tabela 5 - Fracionamento do extrato bruto e rendimento das frações meio MPD 25 dias.

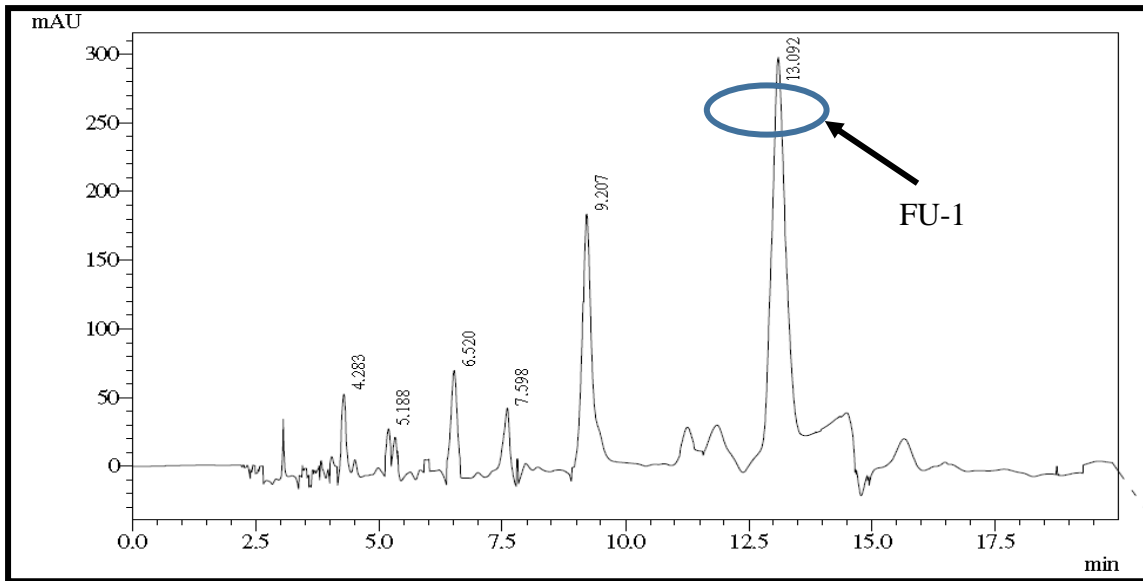
FRAÇÃO	ELUENTE	PROPORÇÃO	MASSA (mg)
1	H ₂ O	100%	63,2
2	H ₂ O/MeOH	4:1	71,4
3	H ₂ O/MeOH	3:2	48,7
4	H ₂ O/MeOH	1:1	13,8
5	MeOH/ H ₂ O	7:3	19,5
6	MeOH/ H ₂ O	4:1	15,6
7	MeOH/ H ₂ O	9:1	4,1
8	MeOH	100%	3,4
TOTAL	--	--	239,7

Fonte: Autora (2016).

Através da análise dos extratos por CCDA, as frações F-2 e F-3 foram selecionadas como as mais promissoras.

A fração F-2 foi submetida à cromatografia por CLAE utilizando como solvente a mistura de H₂O/ACN (90:10) em coluna C-18 (Phenomenex) semipreparativa e fluxo 4,72 mL/min, possibilitou o isolamento de 6,6 mg de uma substância com tempo de retenção de 13,0 minutos (FIGURA 17) denominada de FU-1, cuja caracterização estrutural encontra-se descrita na seção 4.2.1.

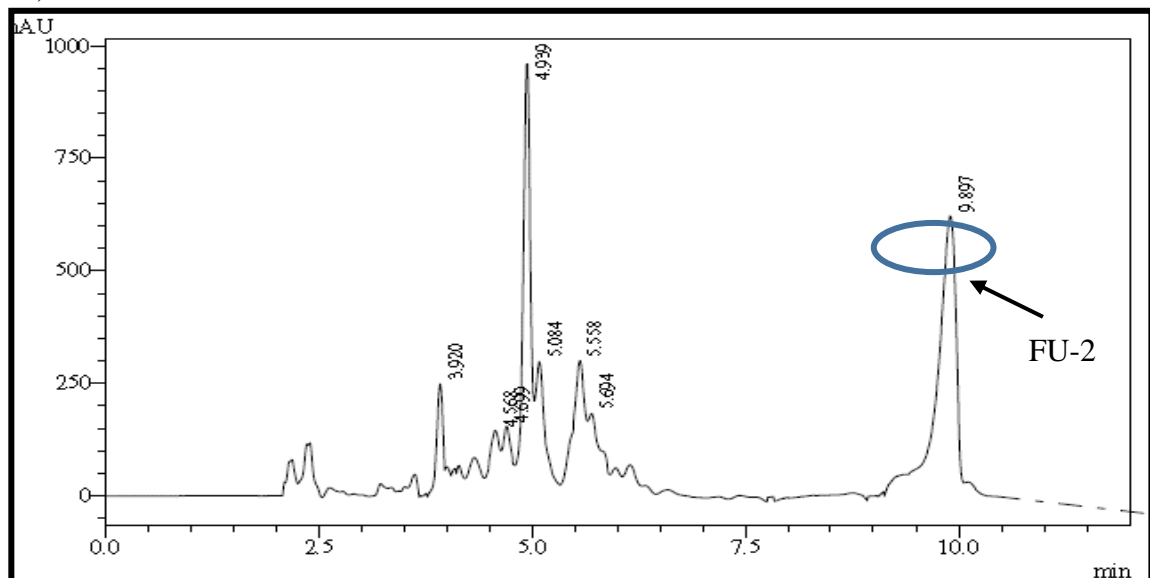
Figura 17 - Cromatograma da fração 2, mostrando pico correspondente à FU-1 (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

A partir do tratamento cromatográfico da fração F-3, utilizando um método isocrático composto pelos solventes ACN/H₂O (30:70) em coluna C-18 (Phenomenex) semipreparativa com fluxo 4,72 mL/min, foi possível o isolamento de FU-2, cuja coleta do pico, com tempo de retenção 9,8 minutos (FIGURA 18), resultou no isolamento de 8,0 mg de uma substância cuja determinação estrutural encontra-se descrita na seção 4.2.2.

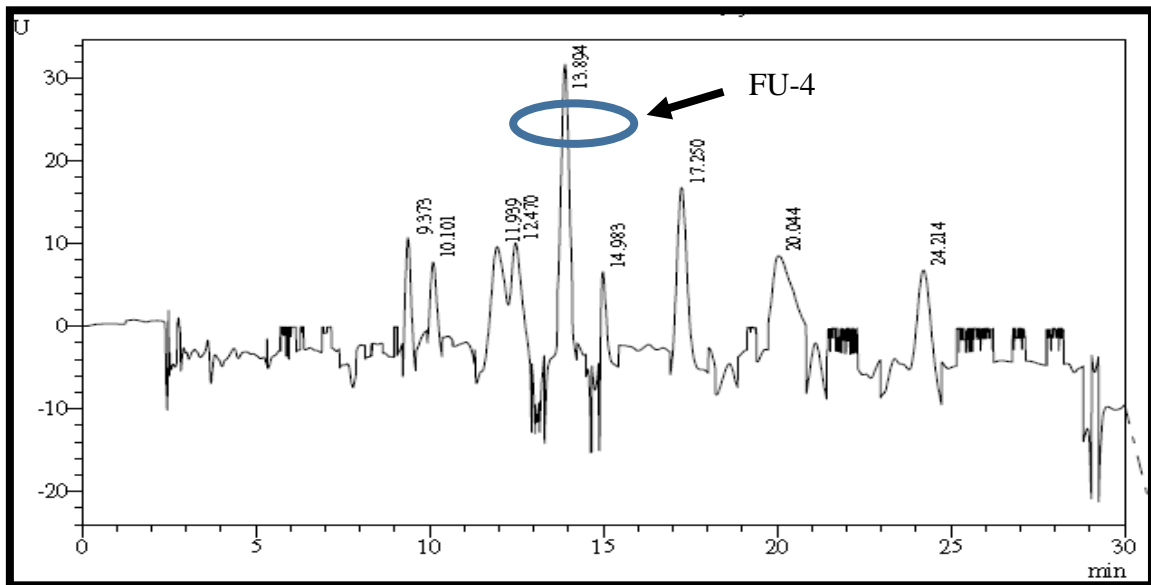
Figura 18 - Cromatograma da fração 3, mostrando o pico correspondente à FU-2 (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

Ainda através do tratamento cromatográfico por CLAE de F-3, porém agora utilizando a combinação de solventes MeOH/H₂O (25:75) em coluna C-18 (Phenomenex) semipreparativa com fluxo 4,72 mL/min, foi possível o isolamento do pico com tempo de retenção 13,9 minutos (FIGURA 19) correspondente à substância denominada FU-4, com uma massa de 1,2 mg que, ao ser analisada por CCDA, apresentou-se pura. A determinação estrutural encontra-se detalhada na seção 4.2.4.

Figura 19 - Cromatograma da fração 3, mostrando o pico correspondente à FU-4 (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

4.1.2 Estudo de otimização do crescimento do fungo em diferentes intervalos de tempo do cultivo

A partir do procedimento realizado como descrito na seção 3.5.2, foi possível verificar que UFCM0439 apresentou crescimento diferenciado. Nos meios BD, BDL e MPD havia grande quantidade de massa micelial com tom amarelo-laranja, onde o micro-organismo se desenvolveu com crescimento rápido na superfície central ou intermediária. No meio Czapek verificou-se que, mesmo ao final dos 28 dias de cultivo, o fungo apresentava pouco micélio desenvolvido, encontrando-se prioritariamente na parte inferior do meio, com uma coloração esbranquiçada. Esta análise corrobora o fato de que, de acordo com as fontes nutricionais fornecidas ao micro-organismo, este apresentará uma taxa distinta de desenvolvimento, com características tais como coloração e massa micelial bem diferentes em cada tipo de meio de cultivo.

As massas de extrato obtidas estão descritas na Tabela 6, onde é possível verificar que, em diferentes meios de cultura e períodos de incubação distintos, há significativa diferença de massas de extrato bruto obtida, bem como na quantidade de metabólitos produzidos, como é possível verificar através da análise em CCDA (FIGURA 20).

Tabela 6 - Massas de extrato obtidas no cultivo em pequena escala (200 mL de meio).

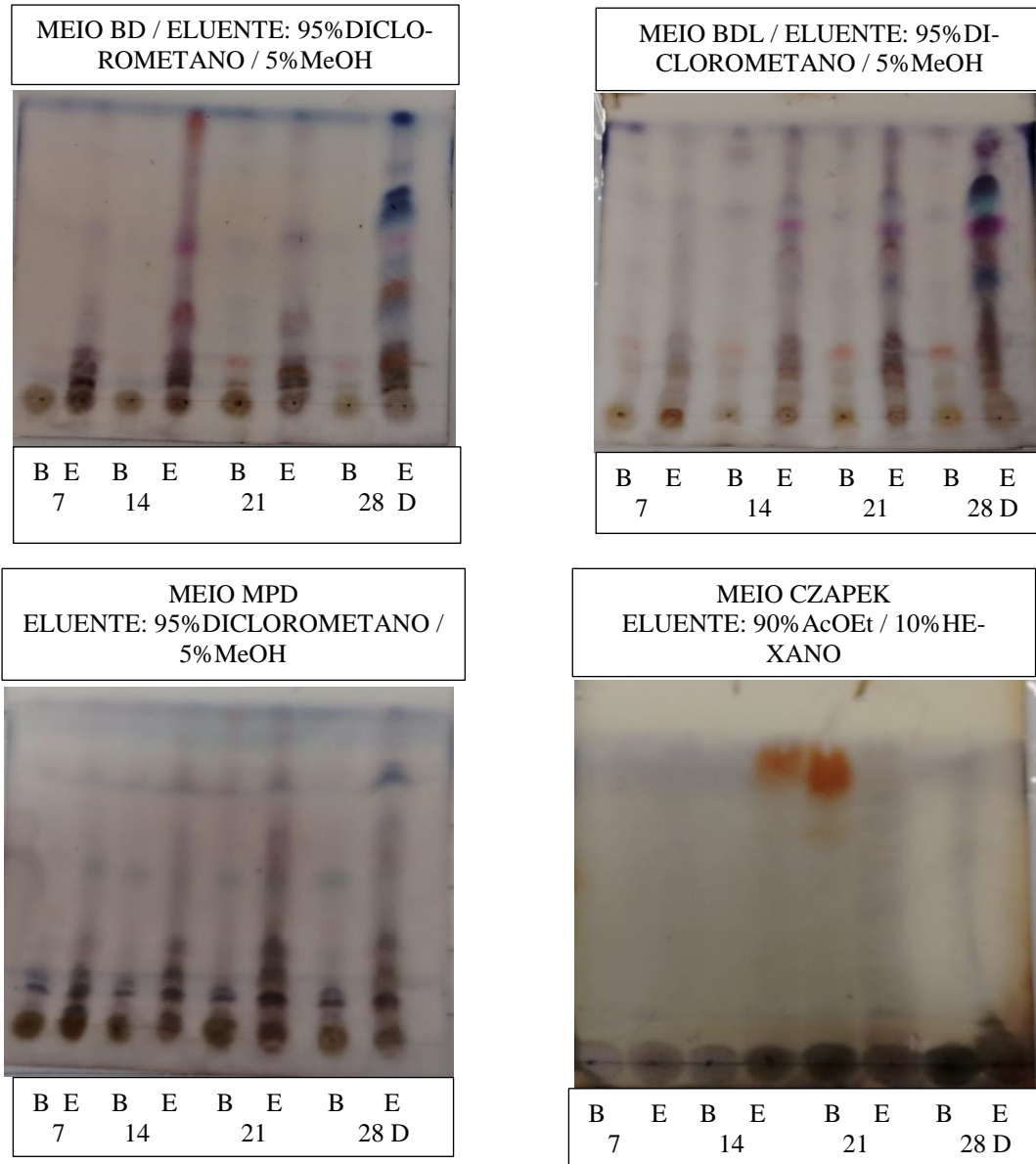
PERÍODO	CONDIÇÃO	MEIOS DE CULTURA E MASSAS (mg) PRODUZIDAS			
		MPD	BD	BDL	CZAPEK
7 DIAS	BCO	11,8	5,3	7,3	14,6
	BRUTO	43,8	11,8	18,1	12,1
14 DIAS	BCO	16,5	8,1	8,5	11,5
	BRUTO	26,6	8,1	17,0	9,1
21 DIAS	BCO	15,3	5,2	5,7	8,3
	BRUTO	19,1	6,9	11,3	10,2
28 DIAS	BCO	16,1	6,5	6,9	14,9
	BRUTO	19,1	11,2	8,9	8,8

Legenda: BCO = branco; MPD = malte-peptona-dextrose; BD = batata-dextrose; BDL = batata-dextrose-extrato de levedura.

Fonte: Autora (2016).

A partir da análise comparativa das placas cromatográficas e dos cromatogramas dos extratos relativos aos meios e os respectivos períodos de cultivo, foi possível observar que os meios BDL (28 dias) e BD (14 e 28 dias) apresentaram maior disparidade em relação aos seus respectivos controles (brancos), indicando uma maior quantidade e diversidade de metabólitos secundários nestas condições de cultivo (FIGURAS 20, 21 e 22). Assim, a condição BDL 28 dias foi preliminarmente escolhida para o cultivo do fungo em grande escala.

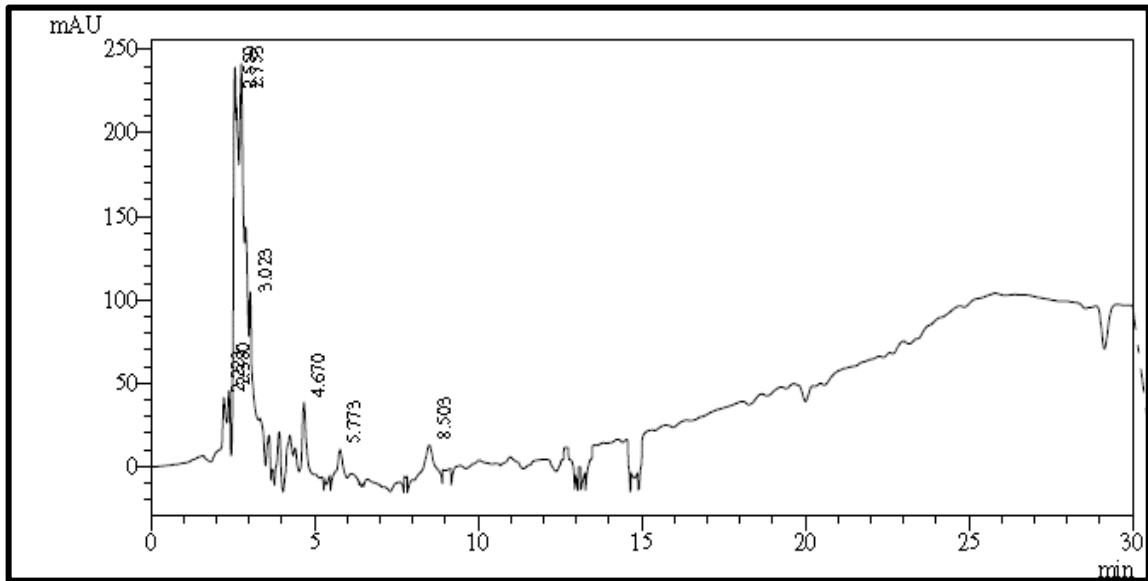
Figura 20 - Análise por CCDA dos extratos segundo meios e períodos de cultivo.



Legenda: B = branco (controle); E = extrato bruto (inoculado com UFCM0439); D = dias (indicando por quanto tempo o micro-organismo se manteve inoculado para o fornecimento do respectivo extrato).

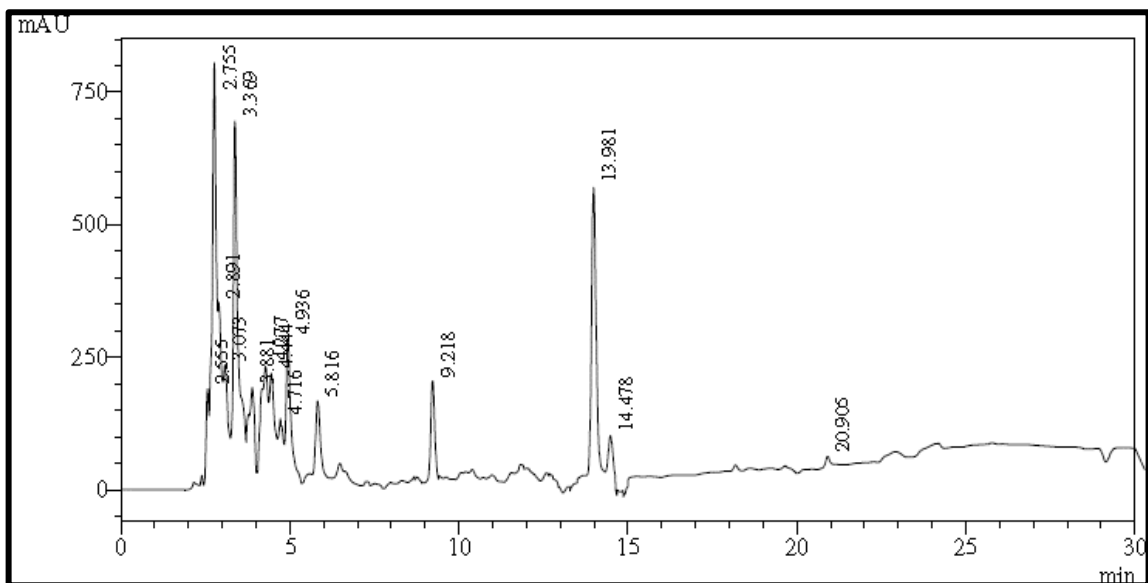
Fonte: Autora (2016).

Figura 21 - Cromatograma meio BDL controle 28 dias (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

Figura 22 - Cromatograma meio BDL extrato bruto 28 dias (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

4.1.3 Cultivo de UFCM0439 em grande escala – Meio BDL (28 dias)

A partir do experimento realizado como descrito na seção 3.5.3 foi possível a obtenção de 550,3 mg de extrato bruto, após um período de 28 dias de incubação em meio BDL.

Desta forma, 500 mg do extrato foram submetidos à cromatografia em cartucho C-18 (Phenomenex) por eluição com H₂O e MeOH, puros ou em misturas binárias, para a obtenção de 8 frações, como disposto na Tabela 7, abaixo:

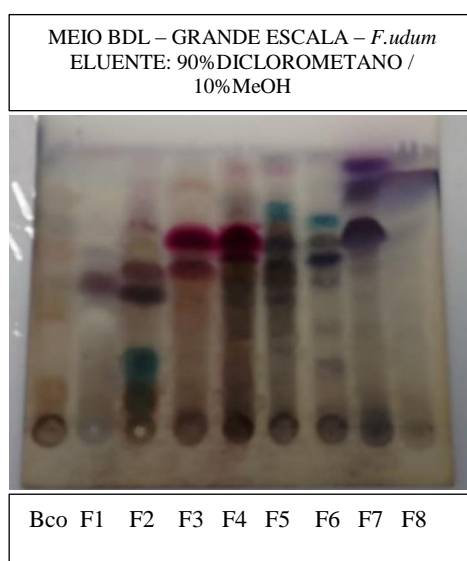
Tabela 7 - Fracionamento cromatográfico do extrato bruto meio BDL 28 dias.

FRAÇÃO	ELUENTE	PROPORÇÃO	MASSA (mg)
1	H ₂ O	100%	76,3
2	H ₂ O/MeOH	4:1	98,2
3	H ₂ O/MeOH	3:2	95,5
4	H ₂ O/MeOH	1:1	60,3
5	MeOH/ H ₂ O	7:3	43,4
6	MeOH/ H ₂ O	4:1	14,0
7	MeOH/ H ₂ O	9:1	28,2
8	MeOH	100%	29,3
TOTAL	--	--	445,2

Fonte: Autora (2016).

As frações obtidas foram submetidas à análise comparativa por CCDA (FIGURA 23) e CLAE com o extrato do controle (branco). A partir desta análise, a fração F-2 foi inicialmente selecionada para os estudos de isolamento de seus constituintes por CLAE.

Figura 23 - Análise por CCDA comparando o controle (branco=bco) com as frações do extrato oriundo do cultivo de *F. udum* em grande escala meio BDL por 28 dias.

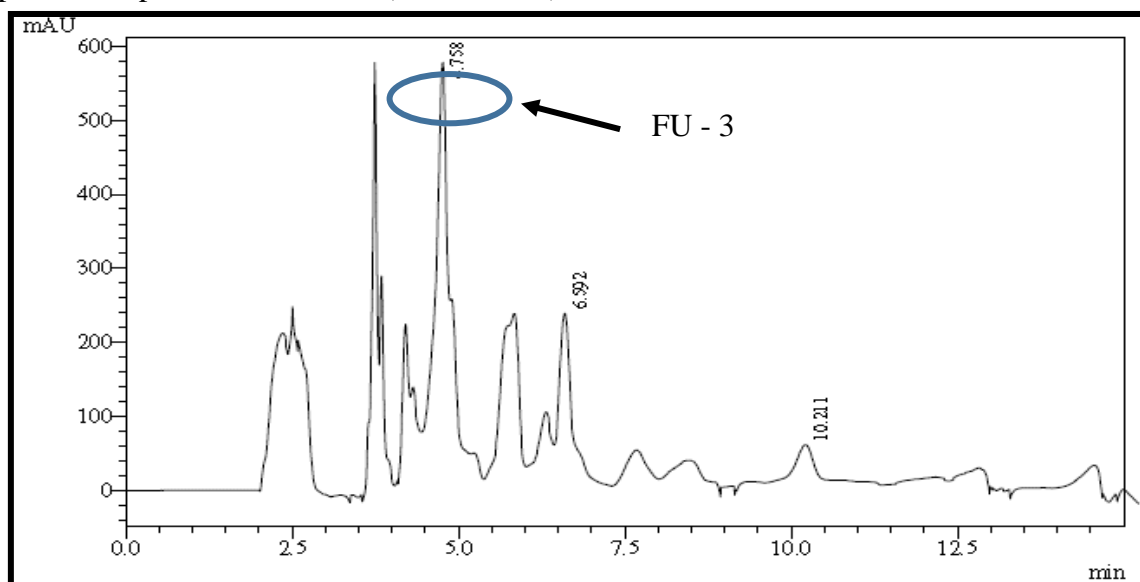


Fonte: Autora (2016).

Purificação da fração F-2 (98,2 mg) por CLAE, utilizando uma coluna C18 semi-preparativa (Phenomenex) e eluição isocrática com a mistura de solventes H₂O/MeOH (60:40), com fluxo de 4,72 mL/min, resultou no isolamento de 15,2 mg FU-1, já isolada anteriormente durante o primeiro cultivo de UFCM0439 utilizando o meio MPD, cuja determinação estrutural se encontra na seção 4.2.1.

Devido às semelhanças no perfil cromatográfico por CCDA (FIGURA 23), as frações F-3 e F-4 foram reunidas, resultando em 155,8 mg de extrato. A fração resultante foi cromatografada em cartucho C18, por eluição com H₂O e MeOH em diferentes concentrações, levando à obtenção de 6 frações. Verificou-se, através da análise por CCDA, que as subfrações 1, 2, 3, 5 e 6 eram semelhantes entre si e, assim, estas foram reunidas. O extrato assim obtido foi cromatografado em CLAE utilizando-se para tal uma coluna C18 semipreparativa (Phenomenex) e eluição isocrática com a mistura de solventes H₂O/ACN (75:25), com fluxo de 4,72 mL/min, resultando no isolamento de 5,0 mg de uma substância com tempo de retenção 4,7 minutos (FIGURA 24) denominada de FU-3, cuja determinação estrutural encontra-se descrita na seção 4.2.3.

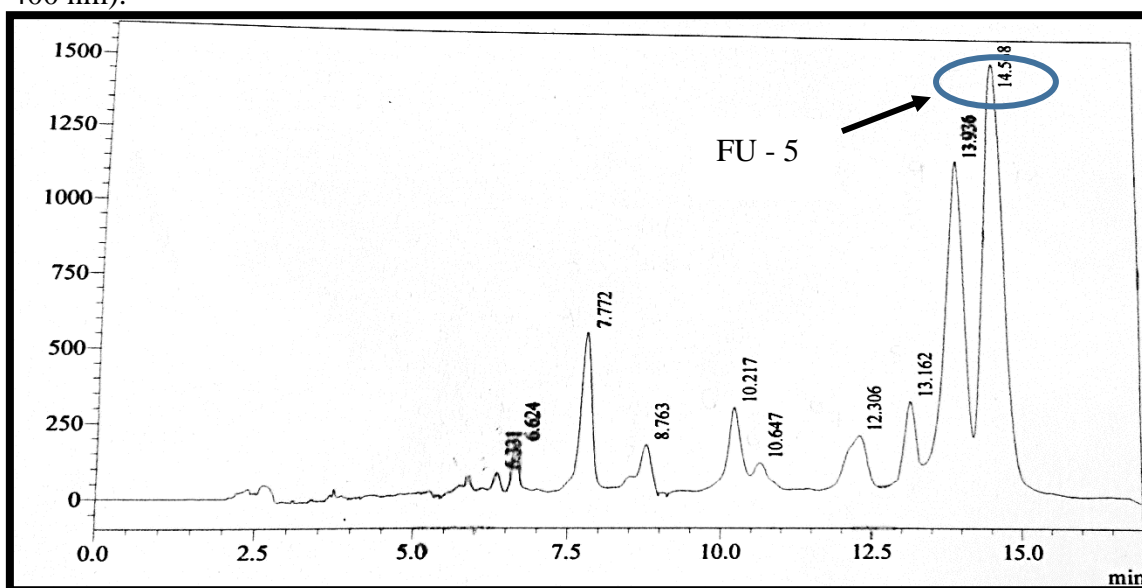
Figura 24 - Cromatograma da fração oriunda do agrupamento das frações F3 e F4, mostrando pico correspondente à FU - 3 (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

O tratamento cromatográfico da subfração 4, utilizando-se CLAE com os solventes H₂O/ACN (75:25), possibilitou o isolamento de 1,5 mg de uma substância com tempo de retenção 14,56 minutos que foi denominada de FU-5, cujo cromatograma encontra-se na Figura 25 e a determinação estrutural na seção 4.2.5.

Figura 25 - Cromatograma da subfração 4, mostrando pico correspondente à FU – 5 (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

4.1.4 Tratamento do Micélio de UFCM0439 - Meio BDL (28 dias)

Através do cultivo de UFCM0439 em meio BDL por um período de 28 dias foi possível efetuar a extração do micélio com metanol para a realização do estudo de seus constituintes químicos. Foi possível a obtenção de 11,2 g de extrato bruto, que foi submetido ao tratamento cromatográfico através da partição líquido-líquido com diferentes solventes, como descrito na Tabela 8, fornecendo cinco frações que se encontram descritas na referida tabela.

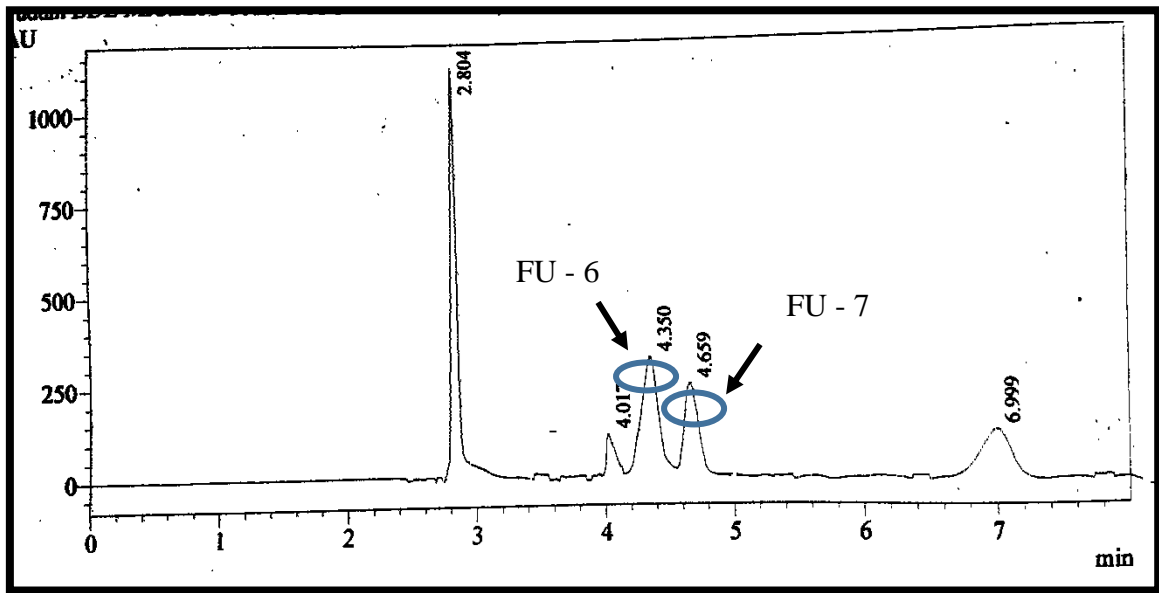
Tabela 8 – Dados do fracionamento por partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto micelial de UFCM0439.

SOLVENTE	VOLUME (mL)	MASSA (g)
Hexano	180	1,60
Diclorometano	180	0,10
Acetato de etila	180	0,44
n-butanol	180	2,70
Fase aquosa	90	5,30

Fonte: Autora (2016).

A fase AcOEt, quando submetida à CLAE com uma mistura de H₂O/ACN (90:10) com fluxo de 4,72 mL/min e utilizando-se uma coluna C18 semipreparativa (Phenomenex) forneceu duas substâncias denominadas FU-6 e FU-7, cujas massas foram, respectivamente, 4,3 mg e 6,6 mg (FIGURA 26). A caracterização estrutural da primeira se encontra descrita na seção 4.2.6. Já a de FU-7, ainda se encontra em andamento.

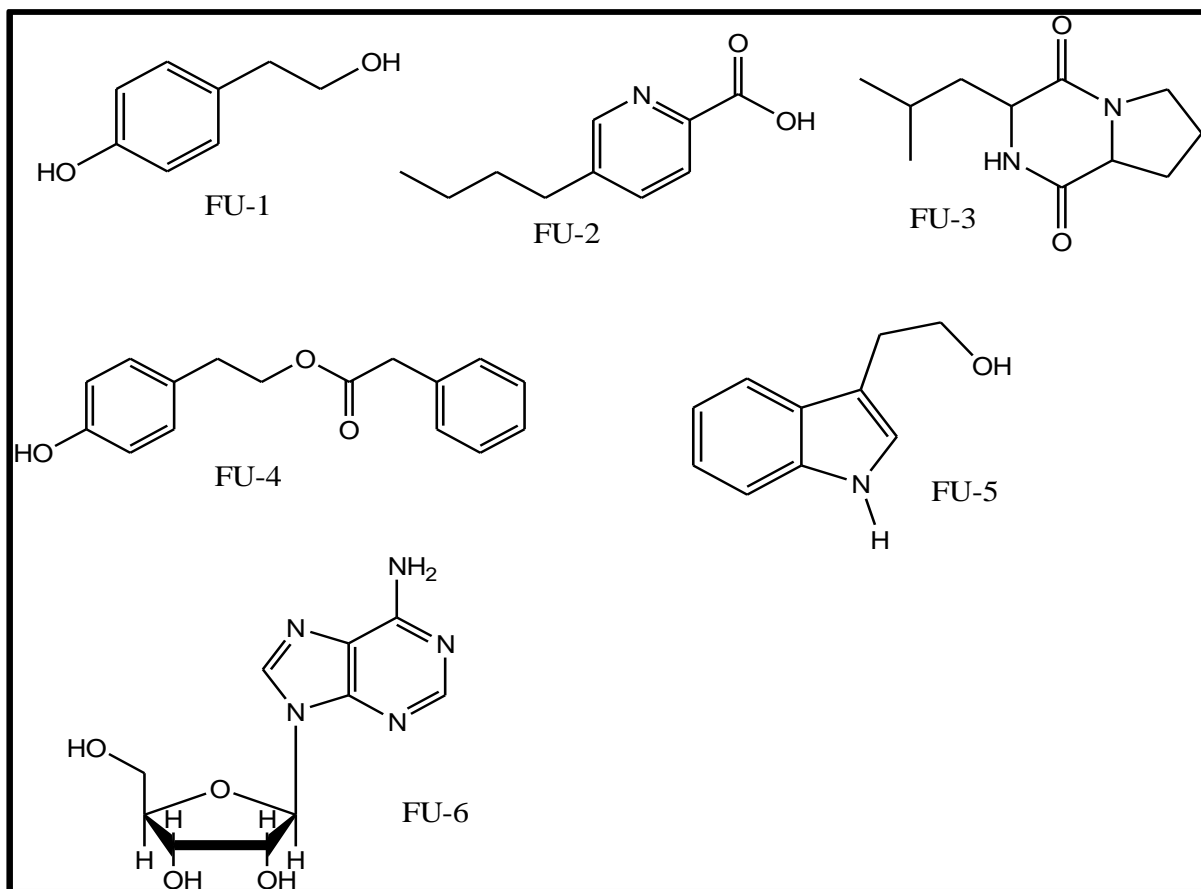
Figura 26 - Cromatograma da fase AcOEt mostrando os picos correspondentes a FU-6 e FU-7 (220-400 nm).



Fonte: Autora (2016).

Através do cultivo de UFCM0439 nos meios BDL e MPD, foi possível o isolamento das substâncias apresentadas na Figura 27 (página 78).

Figura 27 – Metabólitos secundários isolados de *Fusarium udum*.



Fonte: Autora (2017).

4.2 Determinação Estrutural

4.2.1 Determinação Estrutural de FU-1

FU-1 foi isolada através do cultivo de UFCM0439 nos meios MPD 25 dias (6,6 mg) e BDL 28 dias (15,2 mg), e apresentou-se como uma substância resinosa de coloração marrom e solúvel em metanol.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (FIGURA 32, página 83) apresentou absorções na região típica de hidrogênios aromáticos com um anel *para*-substituído, com sinais em δ_{H} 7,03 (2H, d, 8,4 Hz; H-2 e H-6) e δ_{H} 6,70 (2H, d, 8,4 Hz; H-3 e H-5), além de absorções relativas a hidrogênios de grupos metilênicos em δ_{H} 2,71 (2H, t, 7,2 Hz; H-1') e em δ_{H} 3,68 (2H, t, 7,2 Hz; H-2'), sendo este último típico de hidrogênios oximetilênicos.

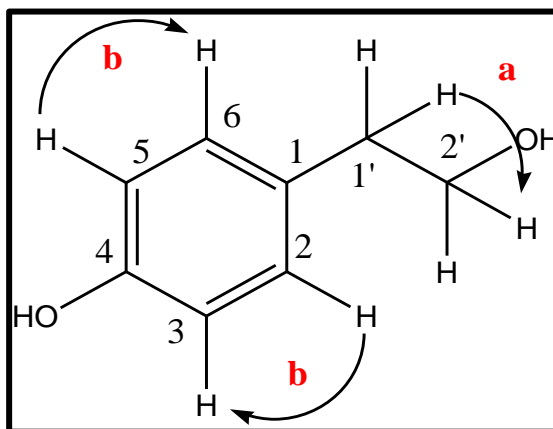
De acordo com a análise do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (FIGURA 33, página 83) e comparação com o espectro de DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) (FIGURA 34, página 84), foi possível comprovar a presença do anel aromático *para*-substituído, devido aos

sinais intensos em δ_C 116,3 (C-3/C-5) e δ_C 131,0 (C-2/C-6), para carbonos magneticamente equivalentes. Além destes, verificou-se a presença de sinais em δ_C 64,7 (C-2') e δ_C 39,5 (C-1'), sendo atribuídos a dois carbonos metilênicos, dos quais o primeiro é oxigenado. Foi possível ainda verificar a presença de dois carbonos não-hidrogenados em δ_C 131,2 (C-1) e δ_C 156,9 (C-1), sendo o último característico de carbono insaturado e oxigenado.

O espectro de correlação heteronuclear a uma ligação $^1H, ^{13}C$ HSQC (500MHz x 125MHz, CD_3OD) (FIGURA 35, página 84) permitiu atribuir o padrão de hidrogenação das linhas espectrais correspondentes aos átomos de carbono componentes da molécula. O carbono metilênico em δ_C 64,7 (C-2') mostrou correlação com os hidrogênios em δ_H 3,68 (2H-2'), assim como o átomo de carbono em δ_C 39,5 (C-1') apresentou correlação com os hidrogênios benzílicos em δ_H 2,71 (2H-1'). Os carbonos em δ_C 131,0 (C-2/C-6) e δ_C 116,3 (C-3/C-5), e mostraram correlações como os hidrogênios em δ_H 7,03 (H-2 e H-6) e 6,70 (H-3 e H-5), respectivamente.

No espectro de correlação homonuclear $^1H, ^1H$ COSY (FIGURA 37, página 85) verificaram-se acoplamentos vicinais entre os hidrogênios em δ_H 2,61 (2H-1') e δ_H 3,68 (2H-2'), além das correlações dos hidrogênios aromáticos em δ_H 6,70 (1H-3 e 1H-5) e δ_H 7,03 (1H-2 e 1H-6), como representado na Figura 28.

Figura 28 - Representação das correlações homonucleares $^1H, ^1H$ COSY de FU-1.

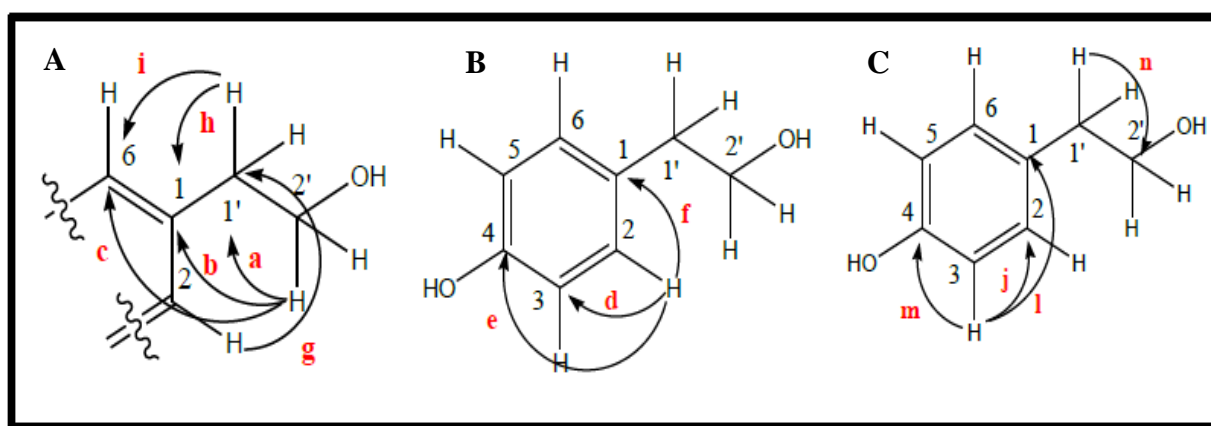


Fonte: Autora (2016).

Através da análise do espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1H, ^{13}C$ HMBC (500MHz x 125MHz, CD_3OD) (FIGURA 36, página 85) foi possível verificar acoplamentos entre os hidrogênios em δ_H 2,61 (2H-1') com o carbono em δ_C 64,7 (C-2') ($^2J_{CH}$) (FIGURA 29, subestrutura c) e com os carbonos em δ_C 131,2 (C-1) ($^2J_{CH}$) e δ_C 131,0 (C-2/C-6)

($^3J_{CH}$) (FIGURA 29, subestrutura a). Os hidrogênios em δ_H 3,68 (2H-2') mostraram acoplamento com os carbonos em δ_C 39,5 (C-1') ($^2J_{CH}$), δ_C 131,2 (C-1) ($^3J_{CH}$) e δ_C 131,0 (C-2/C-6) ($^4J_{CH}$), como ilustra a Figura 29, subestrutura A. O hidrogênio em δ_H 7,03 (1H-2 e 1H-6) apresentou correlação com os carbonos em δ_C 116,3 (C-3) ($^2J_{CH}$) e 156,9 (C-4) ($^3J_{CH}$) (FIGURA 29, subestrutura B), além do δ_C 39,5 (C-1') ($^3J_{CH}$) (FIGURA 29, subestrutura B), enquanto que o hidrogênio em δ_H 6,70 (1H-3 e 1H-5) apresentou correlações com os carbonos em δ_C 131,0 (C-2/C-6) ($^2J_{CH}$), δ_C 156,9 (C-4) ($^2J_{CH}$) e δ_C 131,2 (C-1) ($^3J_{CH}$) (FIGURA 29, subestrutura C).

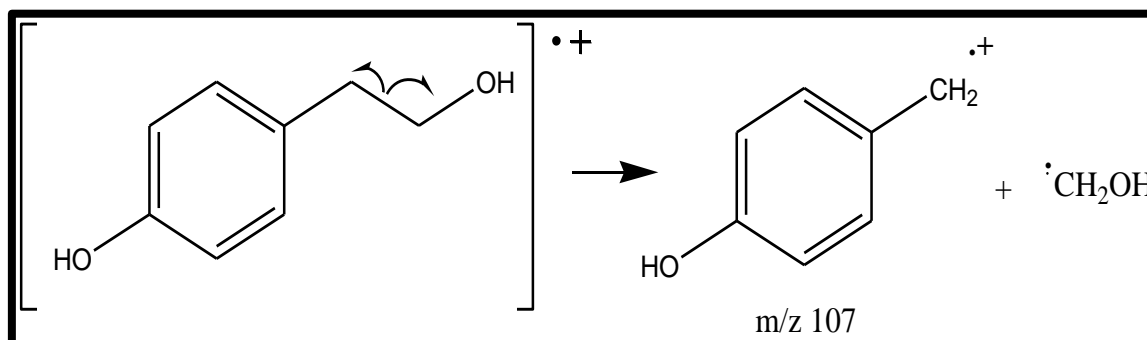
Figura 29 - Representação dos acoplamentos heteronucleares 1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de FU-1.



Fonte: Autora (2016).

O espectro de massa de baixa resolução (FIGURA 38, página 86) forneceu um pico de íon molecular m/z 138, conciliável com a fórmula molecular $C_8H_{10}O_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a 4. Um pico base com m/z 107 foi verificado e pode ser justificado por uma quebra heterolítica com a liberação de um cátion benzílico, como ilustrado na Figura 30.

Figura 30 - Proposta para a formação do cátion com m/z 107.

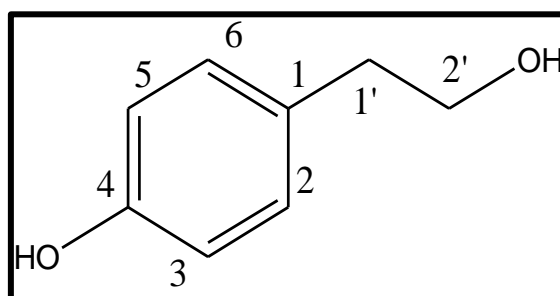


Fonte: Autora (2016).

O espectro de absorção na região do infravermelho de FU-1 mostrou uma banda larga e intensa em 3274 cm^{-1} característica do estiramento axial da ligação O-H, além de bandas em 2922 e 2880 cm^{-1} relativas ao estiramento de ligações C-H (FIGURA 39, página 86).

A reunião de todos os dados discutidos e posterior comparação com dados de RMN descritos na literatura (PARK *et al.*, 2011), permitiram inferir para FU-1 a estrutura do 4-(2-hidroxiethyl)fenol, também conhecida como tirosol (FIGURA 31). Esta substância pode ser encontrada no vinho e no azeite de oliva, porém, também comumente isolada de fungos endofíticos, tendo relatos de isolamento de *Fusarium solani*. Acredita-se que o tirosol possa ter uma função sinalizadora para a síntese de outros compostos, além de possuir atividades antioxidante, antifúngica, e aplicabilidade no tratamento de doenças cardiovasculares e trombose (VIEIRA, 2016). Estudos ainda indicam a viabilidade do uso do tirosol no tratamento de acidente vascular cerebral, devido ao efeito neuroprotetor em ratos (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Figura 31 - Estrutura química do tirosol, FU-1 isolado de *F. udum*.



Fonte: Autora (2016).

Tabela 9 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-1 com dados da literatura obtidos para o 4-(2-hidroxiethyl)fenol (tirosol) (PARK *et al.*, 2011).

Carbono	FU-1 (CD ₃ OD, 500MHz)		4-(2-hidroxiethyl)fenol (CD ₃ OD, 500 MHz) (PARK <i>et al.</i> , 2011).	
	δ_{H} , m e J em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)	δ_{H} , m e J em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)
1	----	131,2 (C)	----	130,7 (C)
2	7,03 dL (8,4)	131,0 (CH)	7,02 dd (8,0; 2.1)	129,7 (CH)
3	6,70 dL (8,4)	116,3 (CH)	6,70 d (8,0)	114,9 (CH)
4	----	156,9 (C)	----	155,6 (C)

Continua...

Tabela 9 – Continuação

5	6,70 dL (8,5)	116,3 (CH)	6,70 dd (8,0; 2,1)	114,9 (CH)
6	7,03 dL (8,4)	131,0 (CH)	7,02 dd (8,0; 2,1)	129,7 (CH)
1'	2,71 t (7,2)	39,5 (CH ₂)	2,71 t (7,0)	38,2 (CH ₂)
2'	3,68 t (7,2)	64,7 (CH ₂)	3,67 t (7,3)	63,4 (CH ₂)

Legenda: J=constante de acoplamento; m=multiplicidade; d=dubleteo; dL=dubleteo largo; dd=dubleteo de dubleteo; t=tripleto; s=singleto.

Fonte: Autora (2016); Park *et al* (2011).

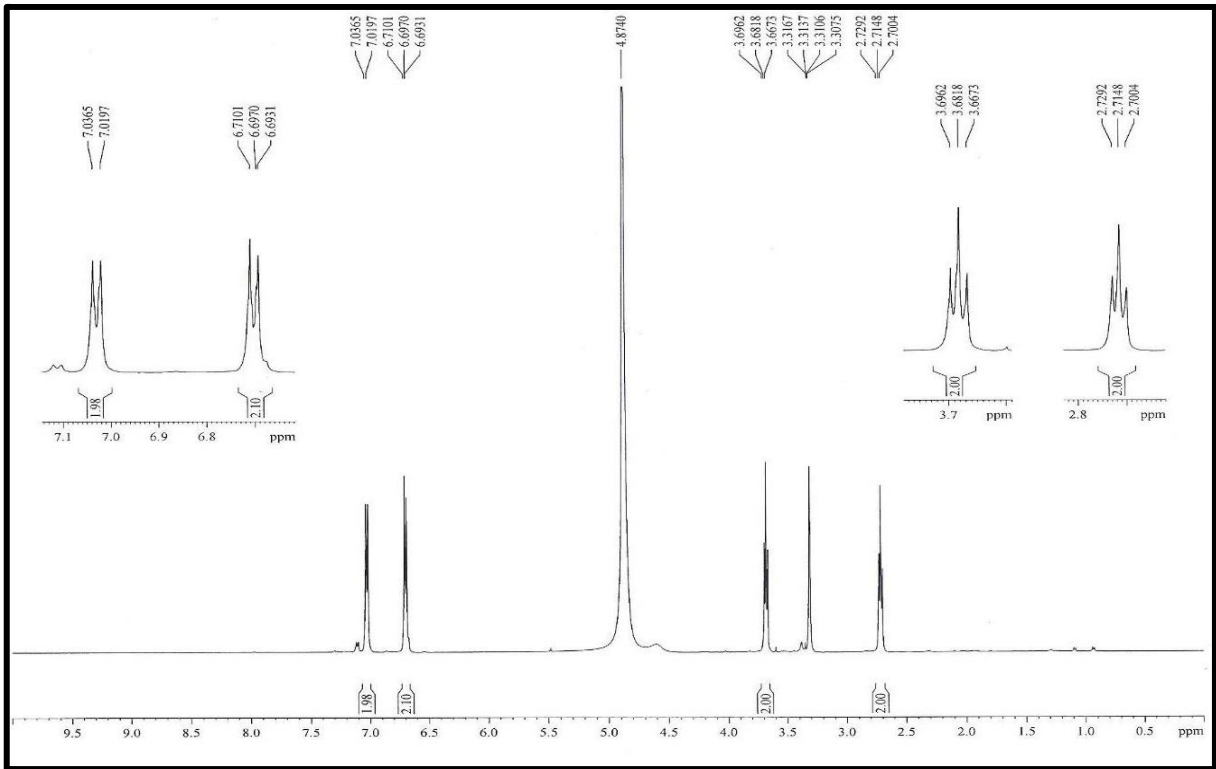
Tabela 10 - Dados de RMN ¹H e ¹³C e correlações heteronucleares ¹H, ¹³C-HSQC e ¹³C-HMBC ⁿJ (n=2; 3 ou 4) de FU-1 (CD₃OD, 125 x 500 MHz).

Posição	FU-1 HSQC		FU-1 HMBC		
	δ_c	δ_H , mult. e J em Hz	² J CH	³ J CH	⁴ J CH
1	131,2 (C)	----	----	----	---
2	131,0 (CH)	7,03 dL (8,4)	H-3; H-5; H-1	H-1'; H-4	---
3	116,3 (CH)	6,70 dL (8,5)	H-2; H-6; H-4	H-1	---
4	156,9 (C)	----	----	----	---
5	116,3 (CH)	6,70 dL (8,5)	----	----	---
6	131,0 (CH)	7,03 dL (8,4)	----	----	---
1'	39,5 (CH ₂)	2,71 t (7,2; 7,2)	H-2'; H-1	H-2; H-6	---
2'	64,7 (CH ₂)	3,68 t (7,2; 7,2)	H-1'	H-1	H-2; H-6

Legenda: J=constante de acoplamento; m=multiplicidade; d=dubleteo; dL=dubleteo largo; t=tripleto.

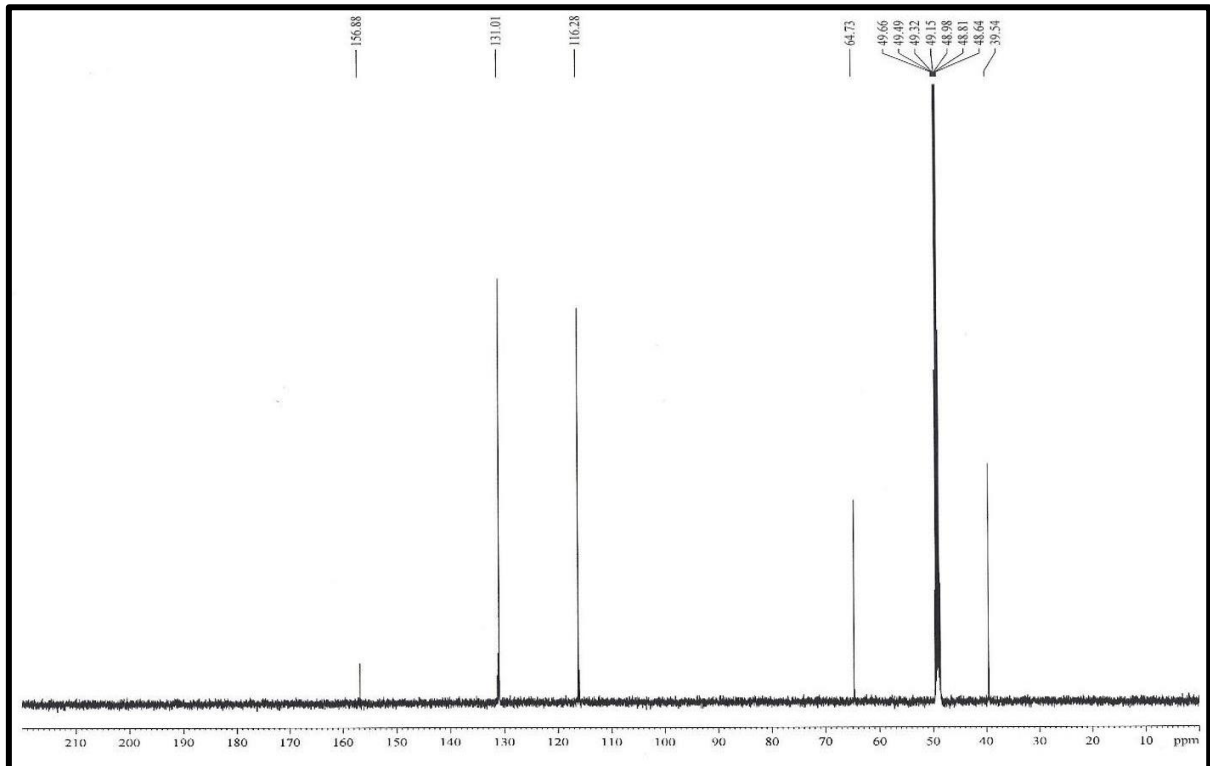
Fonte: Autora (2016).

Figura 32 - Espectro de RMN ^1H de FU-1 (500 MHz, CD_3OD).



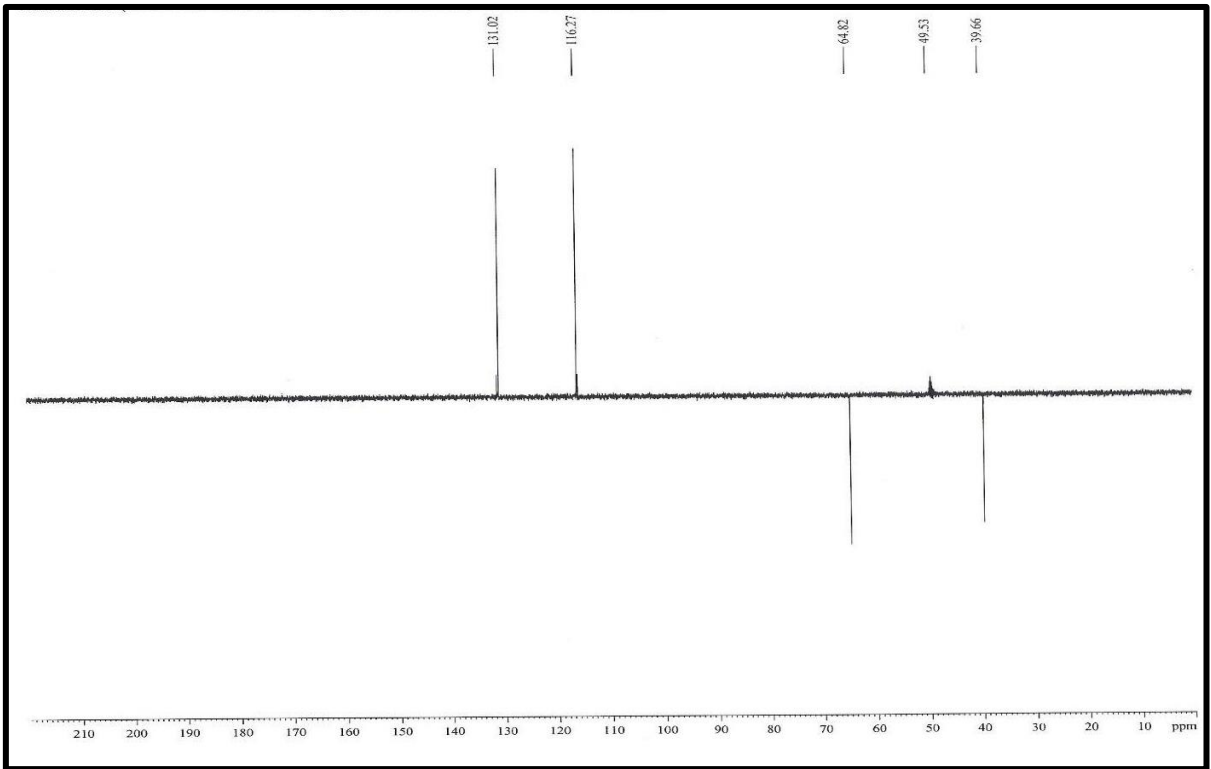
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de FU-1.



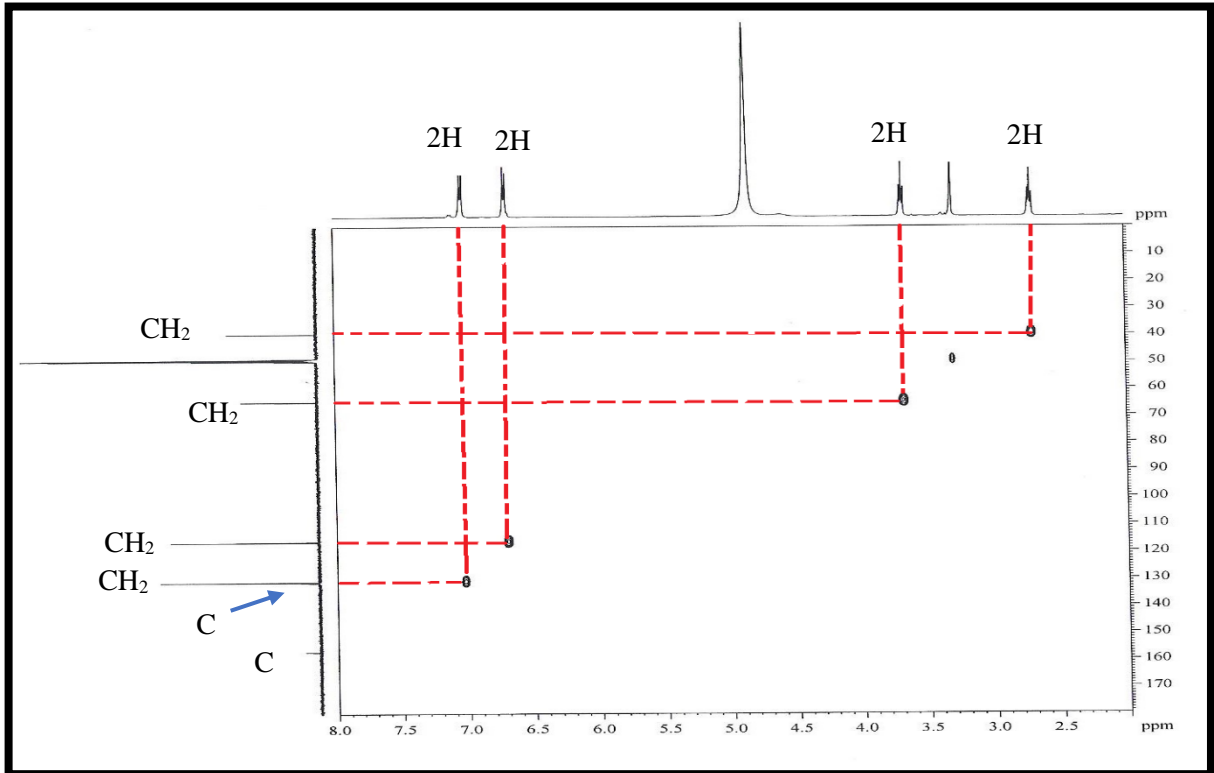
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de FU-1.



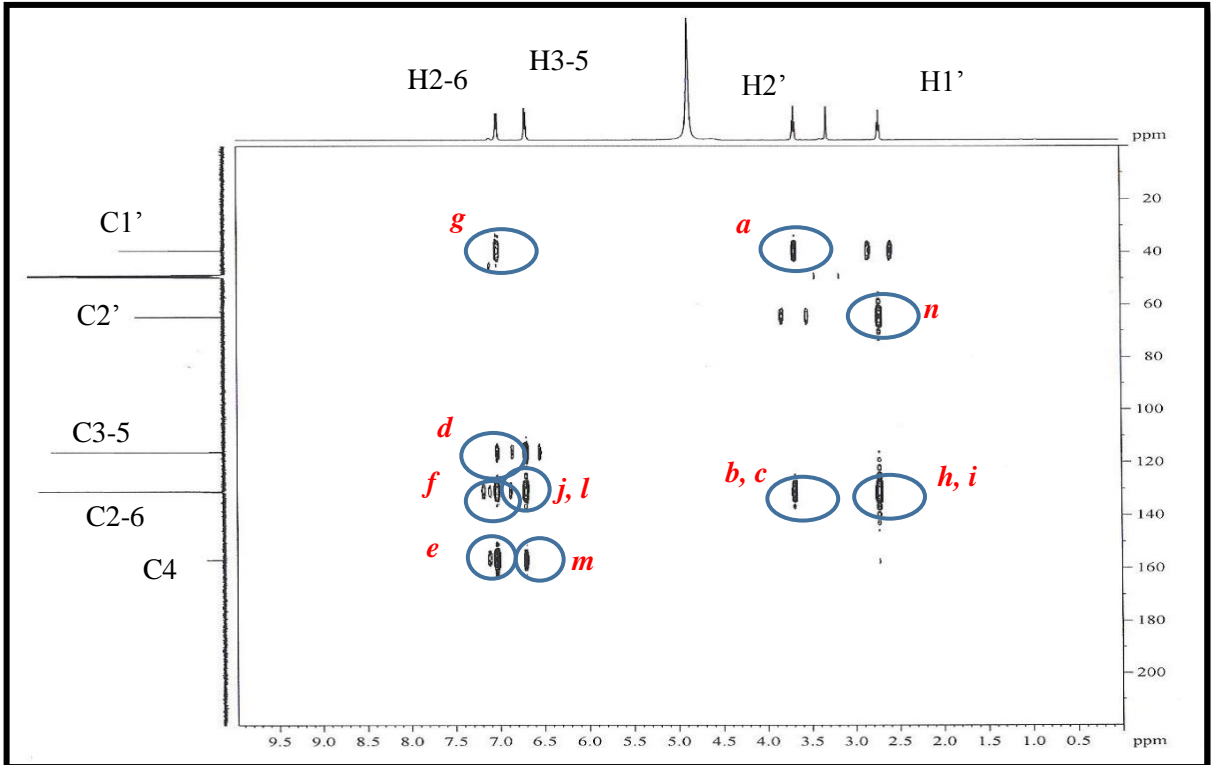
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 35 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-1.



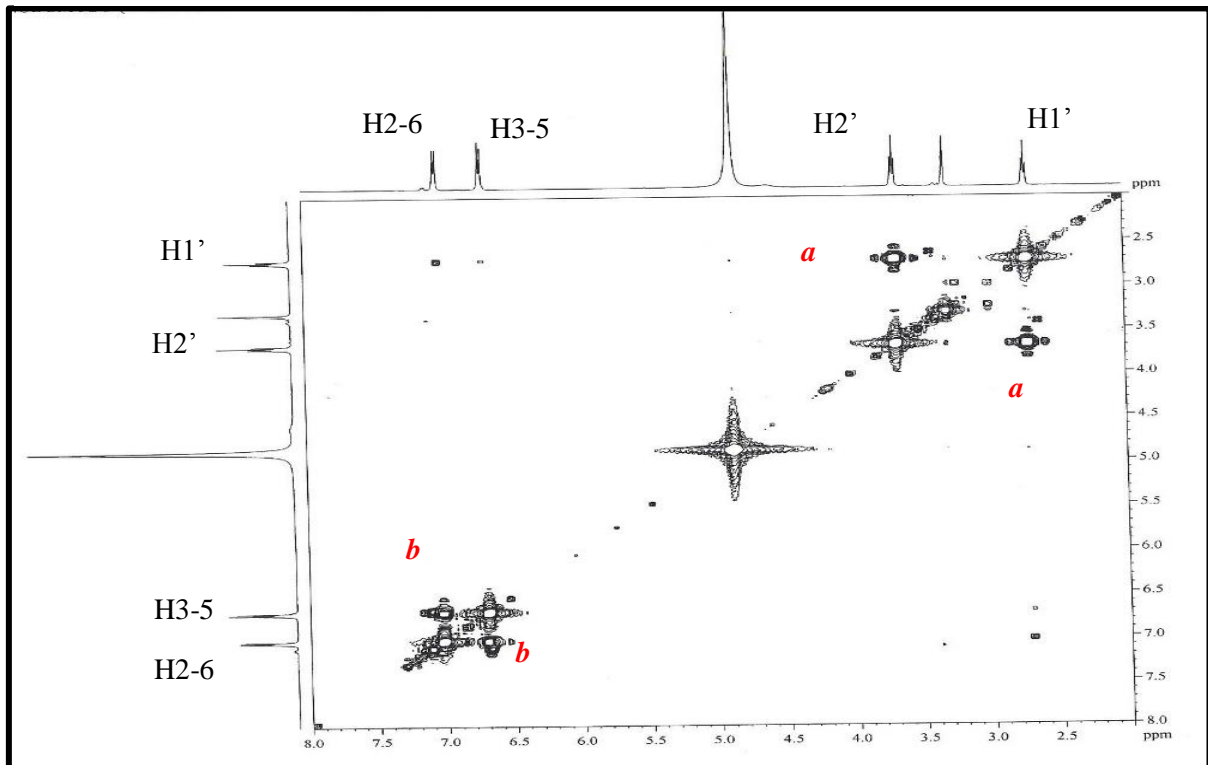
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 36 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-1.



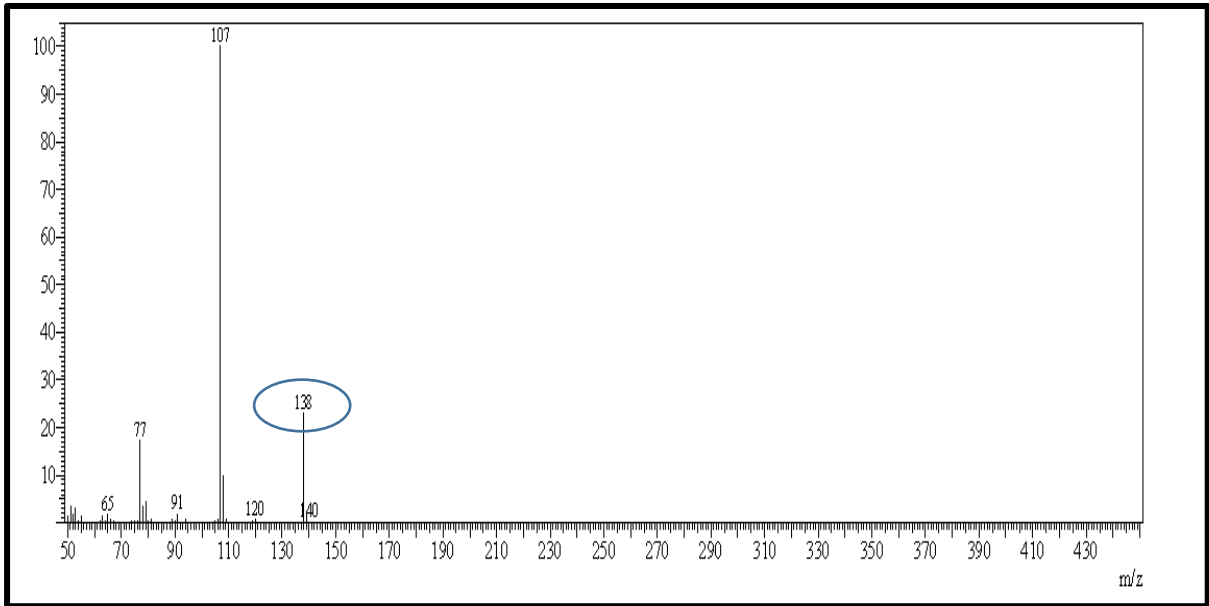
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 37 - Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CD_3OD) de FU-1.



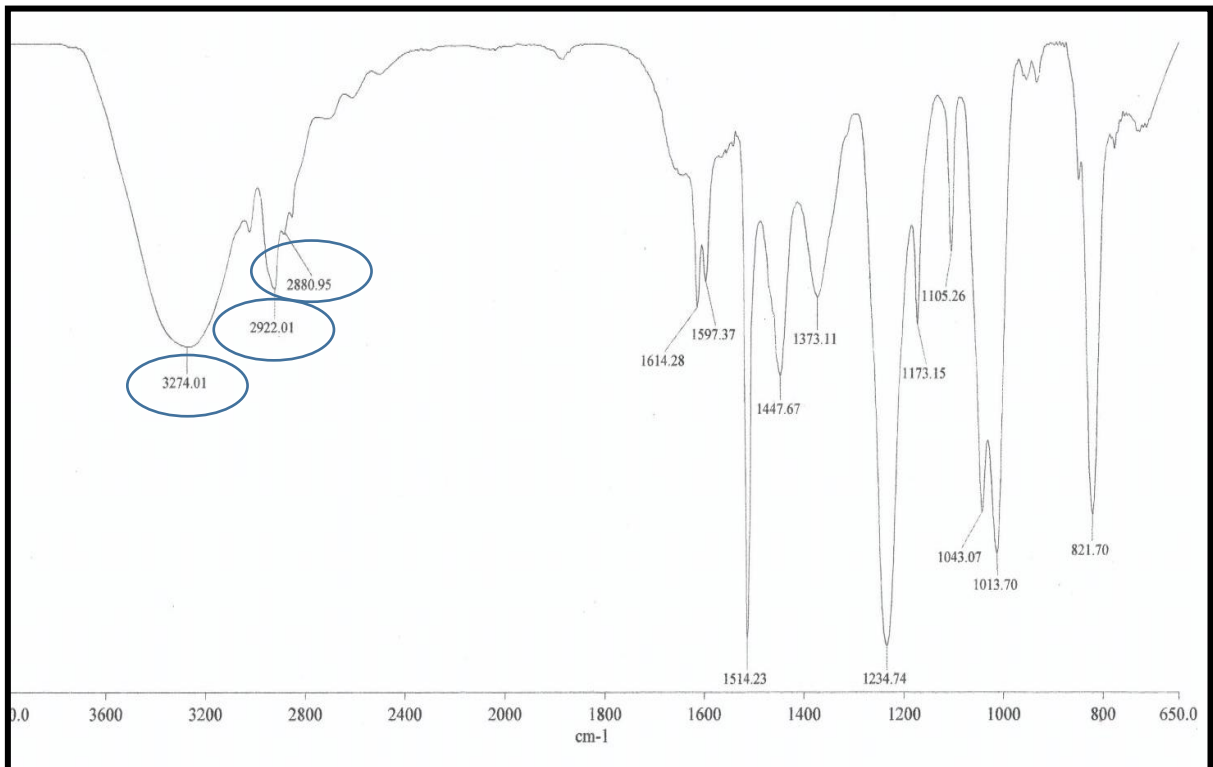
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 38 - Espectro de massa de FU-1 (IE, 70 eV).



Fonte: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC (DQOI/UFC).

Figura 39 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FU-1.



Fonte: Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) – UFC.

4.2.2 Determinação Estrutural de FU-2

Sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato bruto obtido através do cultivo de UFCM0439 em meio MPD por um período de incubação de 25 dias, levaram ao isolamento de 8,0 mg de um composto com aspecto resinoso de coloração marrom-amarelado denominado de FU-2.

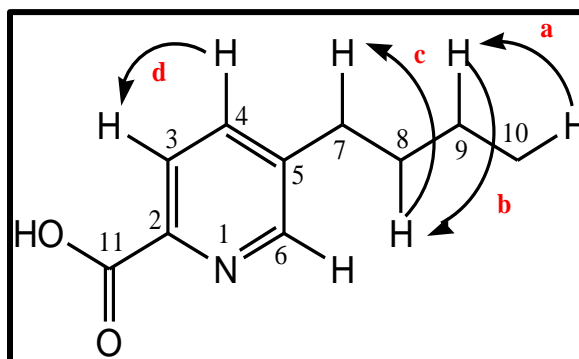
A análise espectral dos experimentos de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (FIGURA 43, página 91) mostrou multipletos intensos em δ_{H} 1,37 (2H, m; H-9) e δ_{H} 1,65 (2H, m; H-8), além da presença de um tripleto de significativa intensidade em δ_{H} 0,95 (3H, t, 7,2 Hz; H-10), caracterizando a presença de hidrogênios de um grupo metila. Ainda nesta região de maior proteção, observou-se um singleto em δ_{H} 2,76 (2H, s; H-7), que foi correlacionado a hidrogênios metilênicos. Foram observados ainda sinais em δ_{H} 7,90 (1H, d; H-4), δ_{H} 8,11 (1H, sL; H-3) e δ_{H} 8,50 (1H, sL; H-6), característicos de hidrogênios de anel heteroaromático.

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C (FIGURA 44, página 92) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) (FIGURA 45, página 93) permitiram verificar a existência de 10 átomos de carbono na molécula. Foi revelada a existência de 3 carbonos metilênicos em δ_{C} 23,4 (C-9), δ_{C} 34,3 (C-8) e δ_{C} 33,6 (C-7), um carbono metílico em δ_{C} 14,3 (C-10), além de carbonos insaturados em δ_{C} 126,2 (C-3), δ_{C} 140,2 (C-4), δ_{C} 144,4 (C-5), δ_{C} 147,1 (C-2) e δ_{C} 149,2 (C-6), e uma carbonila conjugada em δ_{C} 167,5 (C-11).

Os dados do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ^1H , ^{13}C – HSQC (FIGURA 46, página 93) possibilitaram inferir o padrão de hidrogenação de cada átomo de carbono constituinte da molécula, confirmando a presença de carbonos metilênicos através das correlações dos carbonos em δ_{C} 33,6 (C-7) com os hidrogênios em δ_{H} 2,76 (H-7), dos carbonos em δ_{C} 34,3 (C-8) com δ_{H} 1,65 (H-8) e δ_{C} 23,4 (C-9) com hidrogênios em δ_{H} 1,37 (H-9), além da existência de átomos de carbono insaturados e não hidrogenados em δ_{C} 140,2 (C-5) e δ_{C} 144,2 (C-2).

As análises feitas com os dados fornecidos pelo espectro de RMN de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY (FIGURA 47, página 94) permitiram verificar a ocorrência de acoplamentos entre os hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,95 (3H-10) com hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,37 (2H-9, m) e destes com o outro grupo metilênico em δ_{H} 1,65 (2H-8, m). Estes últimos hidrogênios metilênicos, por sua vez, apresentaram correlação com os hidrogênios em δ_{H} 2,76 (2H-7, sL). Os hidrogênios aromáticos mostraram correlações entre δ_{H} 7,90 (1H-4, d) e δ_{H} 8,11 (1H-3, sL), como pode ser visto na Figura 40.

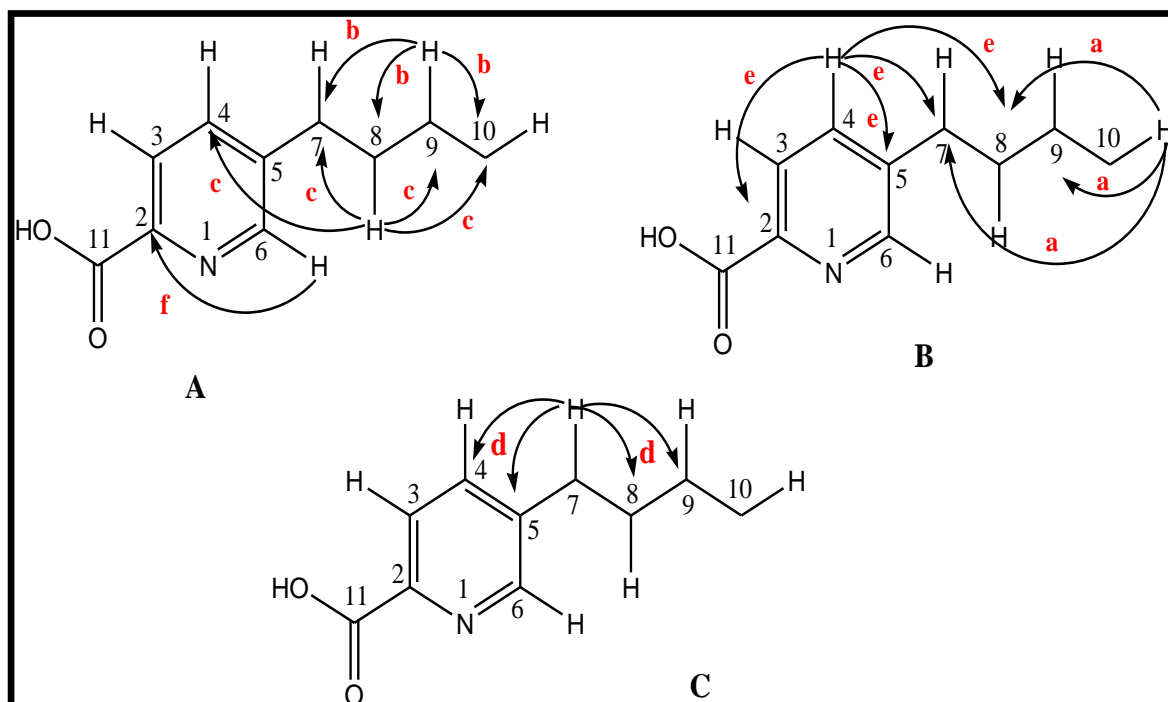
Figura 40 - Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ observadas no espectro COSY.



Fonte: Autora (2016).

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância HMBC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) (FIGURA 48, página 94) possibilitou que fossem verificados acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 0,95 (3H-10) com os carbonos em δ_{C} 33,6 (C-7) ($^4\text{J}_{\text{CH}}$), δ_{C} 34,3 (C-8) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 23,4 (C-9) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), respectivamente (FIGURA 41, subestrutura B). Além destas, as correlações entre os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,37 (2H-9) com o carbono em δ_{C} 33,6 (C-7) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e com os carbonos em δ_{C} 34,3 (C-8) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 14,3 (C-10) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) (FIGURA 41, subestrutura A) também foram observadas. Verificou-se, ainda, a correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 1,65 (2H-8) com os carbonos em δ_{C} 33,6 (C-7) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 23,4 (C-9) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e com o carbono em δ_{C} 14,3 (C-10) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) (FIGURA 41, subestrutura A). O hidrogênio em δ_{H} 2,76 (2H-7) mostrou acoplamento com os carbonos em δ_{C} 34,3 (C-8) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), δ_{C} 23,4 (C-9) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 140,2 (C-4) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) (FIGURA 41, subestrutura C). Apenas dois dos hidrogênios do anel aromático tiveram suas correlações determinadas. O hidrogênio metínico em δ_{H} 7,90 (1H-4) com os carbonos δ_{C} 33,6 (C-7) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$), δ_{C} 144,2 (C-2) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 34,3 (C-8) ($^4\text{J}_{\text{CH}}$) (FIGURA 41, subestrutura B), e o hidrogênio em δ_{H} 8,50 (1H-6), se correlacionou com o carbono em δ_{C} 144,2 (C-2) (FIGURA 41, subestrutura A).

Figura 41 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância-HMBC de FU-2.

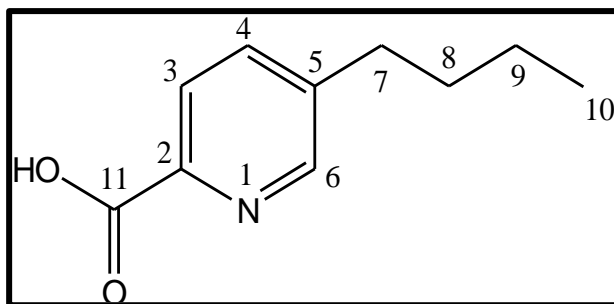


Fonte: Autora (2016).

O espectro de massa de FU-2 (FIGURA 49, página 95) mostrou um pico com m/z 180, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ ($M + 1$), com índice de deficiência de hidrogênio igual a 5.

O espectro de absorção na região do infravermelho (FIGURA 50, página 95) mostrou bandas entre 2861 cm^{-1} e 2956 cm^{-1} características de estiramento da ligação entre C-H sp^3 , além de bandas na região de $1710,2\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento de ligação $\text{sp}^2\text{ C=O}$ de ácido carboxílico.

A reunião dos dados espectrométricos permitiu inferir que FU-2 trata-se do ácido fusárico (FIGURA 42), uma substância biossintetizada por uma grande variedade de espécies do gênero *Fusarium* (TUNG *et al.*, 2016). Há relatos na literatura de estudos para a utilização do ácido fusárico como um potencial microbicida, haja vista sua atividade antivirulência para alguns patógenos, além de sua atividade antibacteriana (LI *et al.*, 2014). Há, ainda, estudos envolvendo investigações da ação antitumoral do ácido fusárico (GHANNAM *et al.*, 2014).

Figura 42 - Estrutura química do ácido fusárico, FU-2 isolada de *F. udum*.

Fonte: Autora (2016).

Tabela 11 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-2 com dados da literatura obtidos para o Ácido fusárico (LI *et al.*, 2014).

Carbono	FU-2 (CD ₃ OD, 500 MHz)		Ácido fusárico (CD ₃ OD) (LI <i>et al.</i> , 2014)	
	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)
2	----	147,1 (C)	----	145,6 (C)
3	8,11 s	126,2 (CH)	8,11 d (8,0)	124,7 (CH)
4	7,91 d (7,2)	140,2 (CH)	7,90, dd (2,0; 8,0)	138,4 (CH)
5	----	144,4 (C)	----	142,8 (C)
6	8,50 s	149,2 (CH)	8,51 s	147,9 (CH)
7	2,76 sL	33,6 (CH ₂)	2,75 t (7,8)	32,7 (CH ₂)
8	1,65 m	34,3 (CH ₂)	1,65 m	32,1 (CH ₂)
9	1,37 t	23,4 (CH ₂)	1,39 m	21,9 (CH ₂)
10	0,95 t (7,2)	14,3 (CH ₃)	0,96 t (7,4)	12,7 (CH ₃)
11	----	167,5(C)	----	165,9 (C)

Legenda: s=singleteo; t=tripleteo; sL=singleteo largo; m=multiploteo; d=dubleteo; dd=dubleteo de dubleteo.

Fonte: Autora (2016); Li *et al.* (2014).**Tabela 12** - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC e ^1H , ^{13}C -HMBC nJ ($n=2$; 3 ou 4) de FU-2 (CD₃OD, 125 x 500MHz).

Posição	FU-2 HSQC		FU-2 HMBC		
	δ_{C}	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	2J CH	3J CH	4J CH
2	144,2 (C)	----	----	H-6; H-4	----

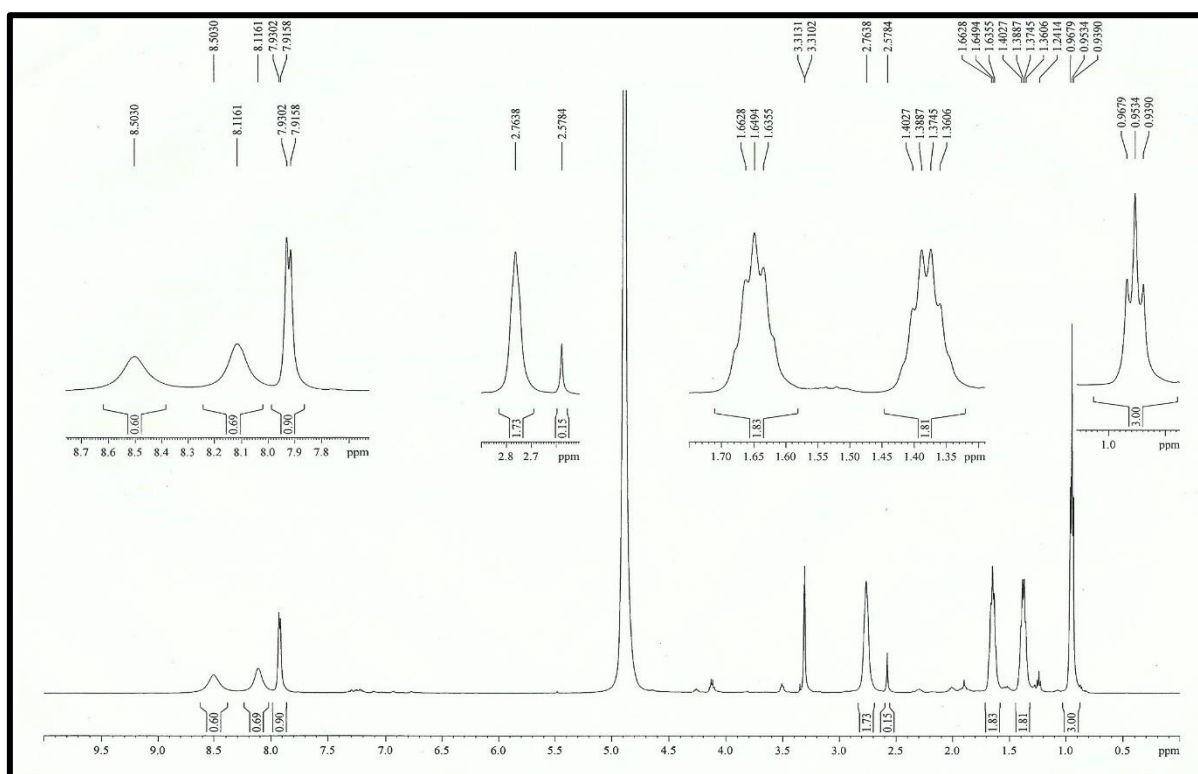
Continua...

Tabela 12 – Continuação

3	126,2 (CH)	8,11 s	----	----	----
4	140,2 (CH)	7,9 d (7,2)	----	H-7	H-8
5	144,4 (C)	----	H-4; H-7	H-8	----
6	149,2 (CH)	8,50 s	----	----	----
7	33,6 (CH ₂)	2,76 sL	H-8	H-9; H-4	H-10
8	34,3 (CH ₂)	1,65 m	H-9	H-10	H-4
9	23,4 (CH ₂)	1,37 t	H-8; H-10	H-7	----
10	14,3 (CH ₃)	0,95 t (7,2)	H-9	H-8	----
11	167,5 (C)	----	----	----	----

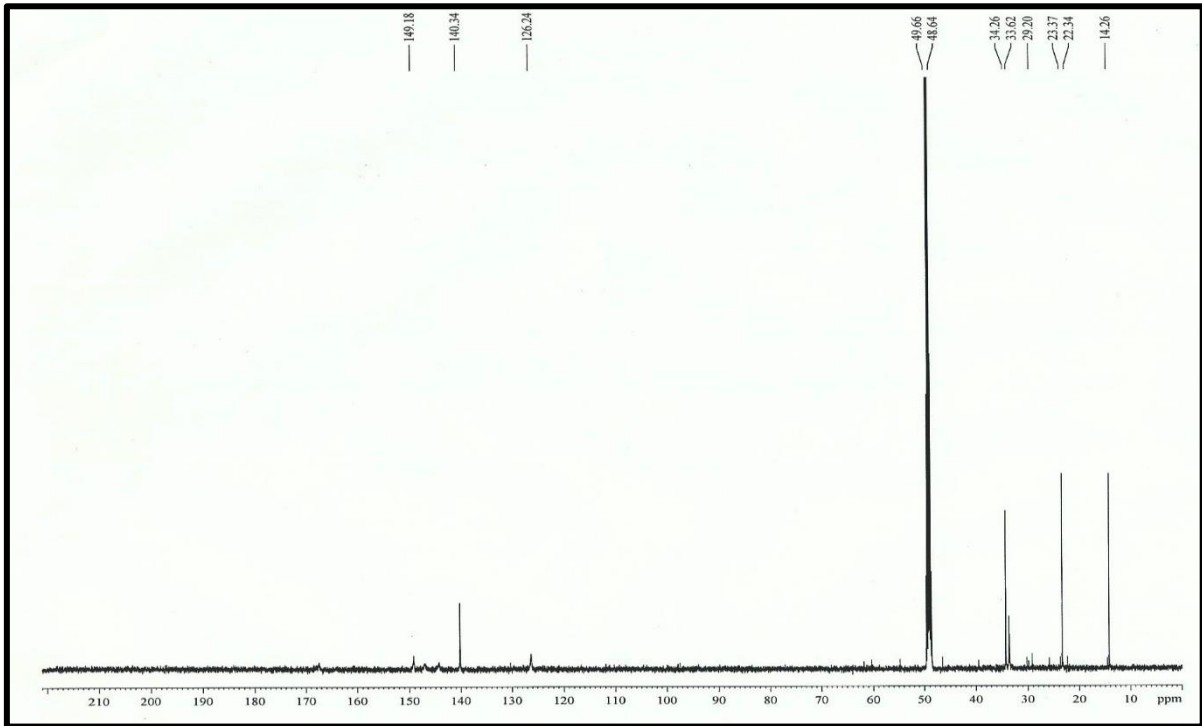
Legenda: s=singleteo; t=tripleteo; sL=singleteo largo; m=multiploteo; d=dubleteo.

Fonte: Autora (2016).

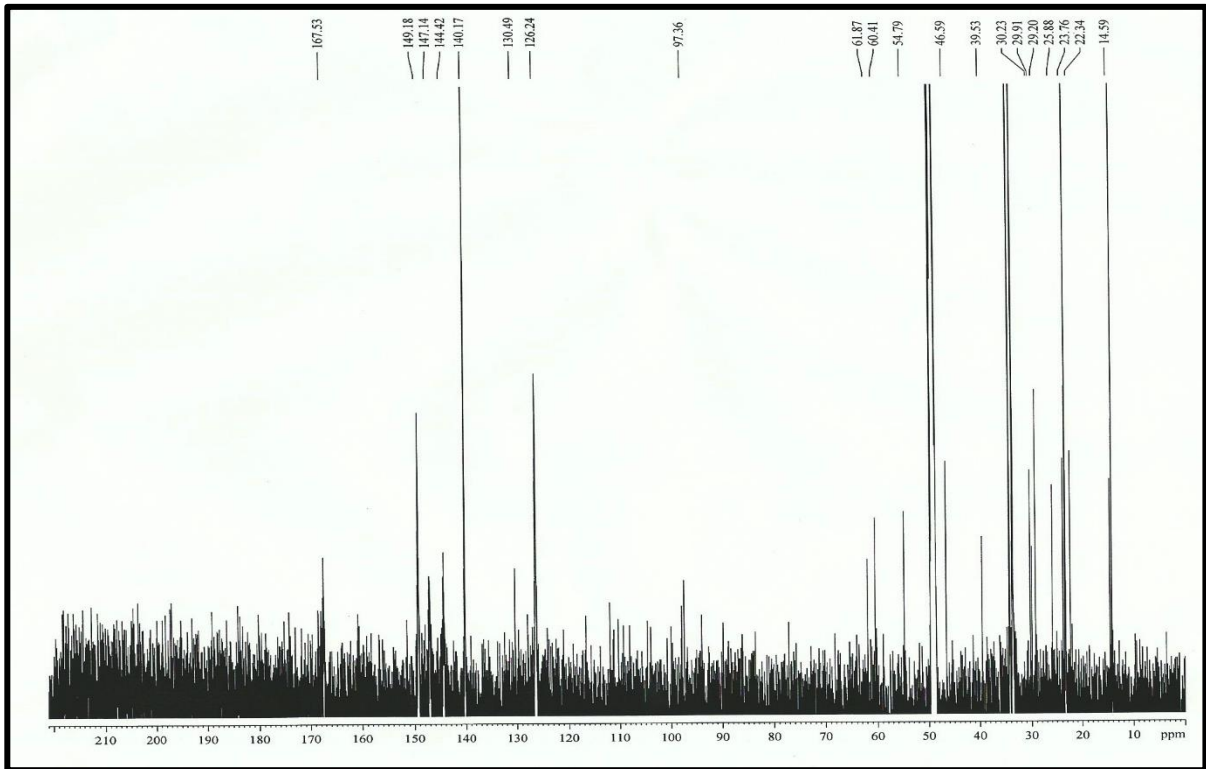
Figura 43 - Espectro de RMN ¹H de FU-2 (500 MHz, CD₃OD).

Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de FU-2.

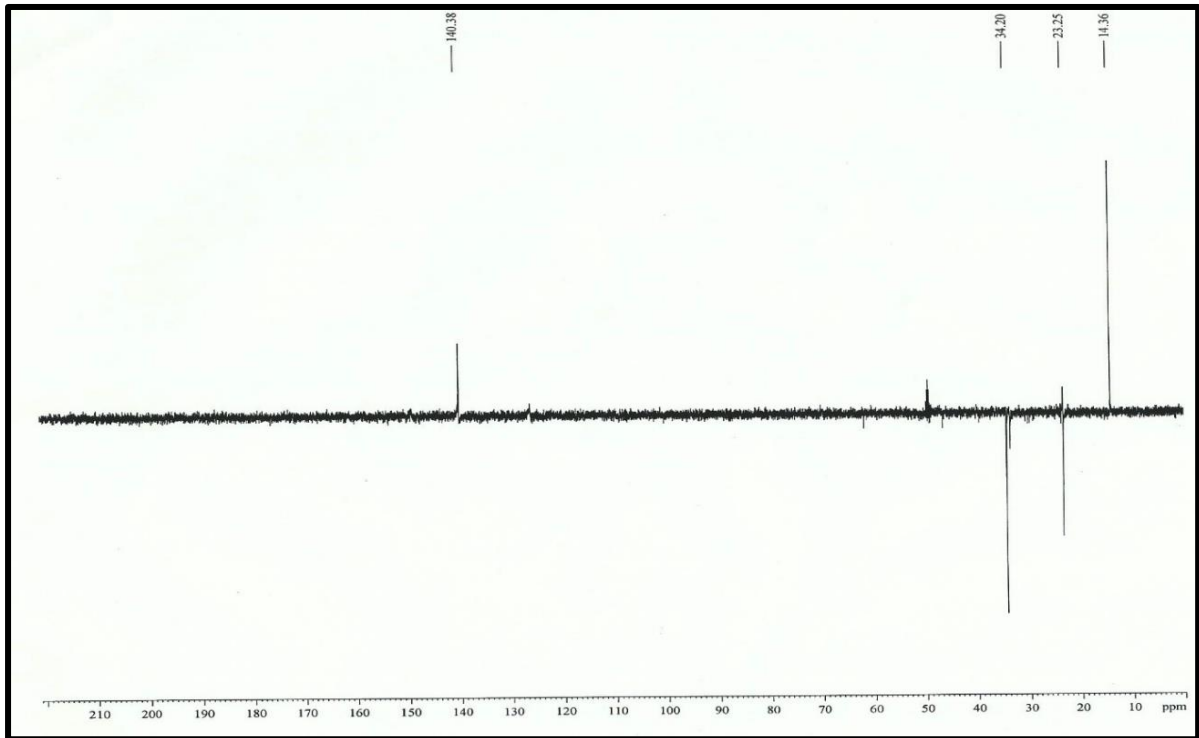


Fonte: CENAUREMN - UFC (2016). **A**



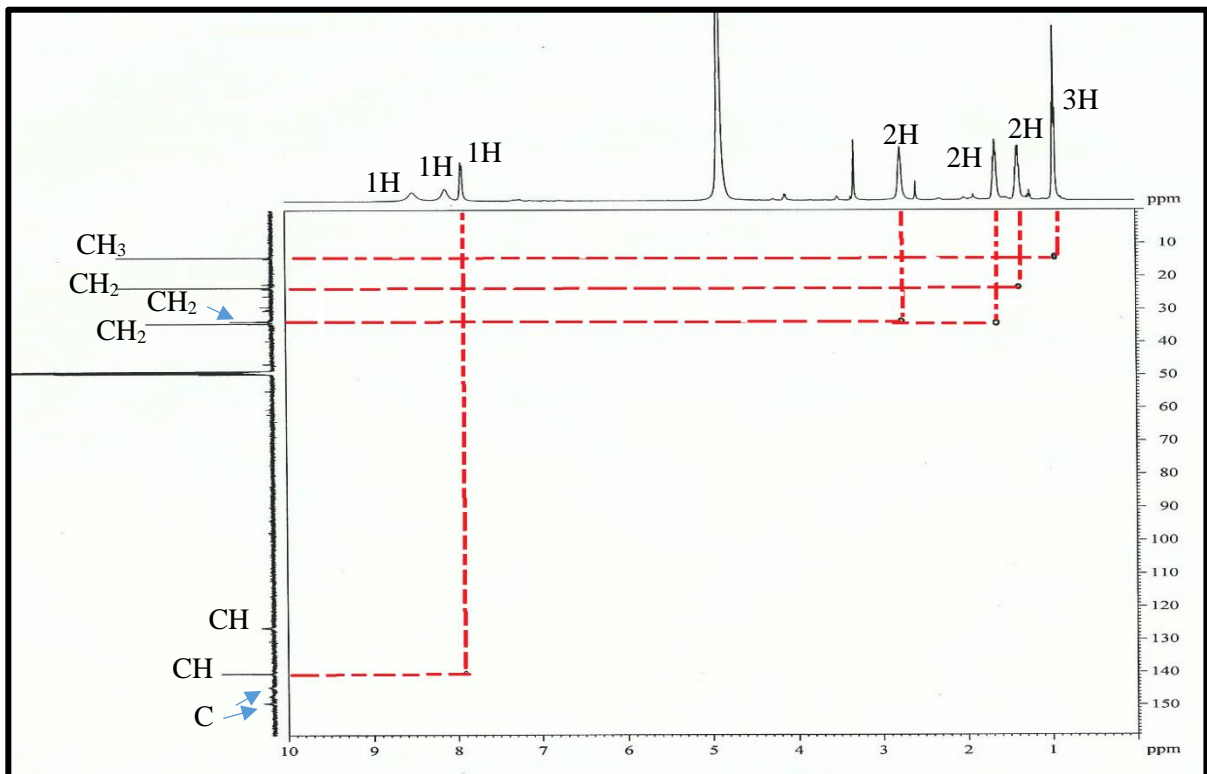
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016). **B**

Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de FU-2.



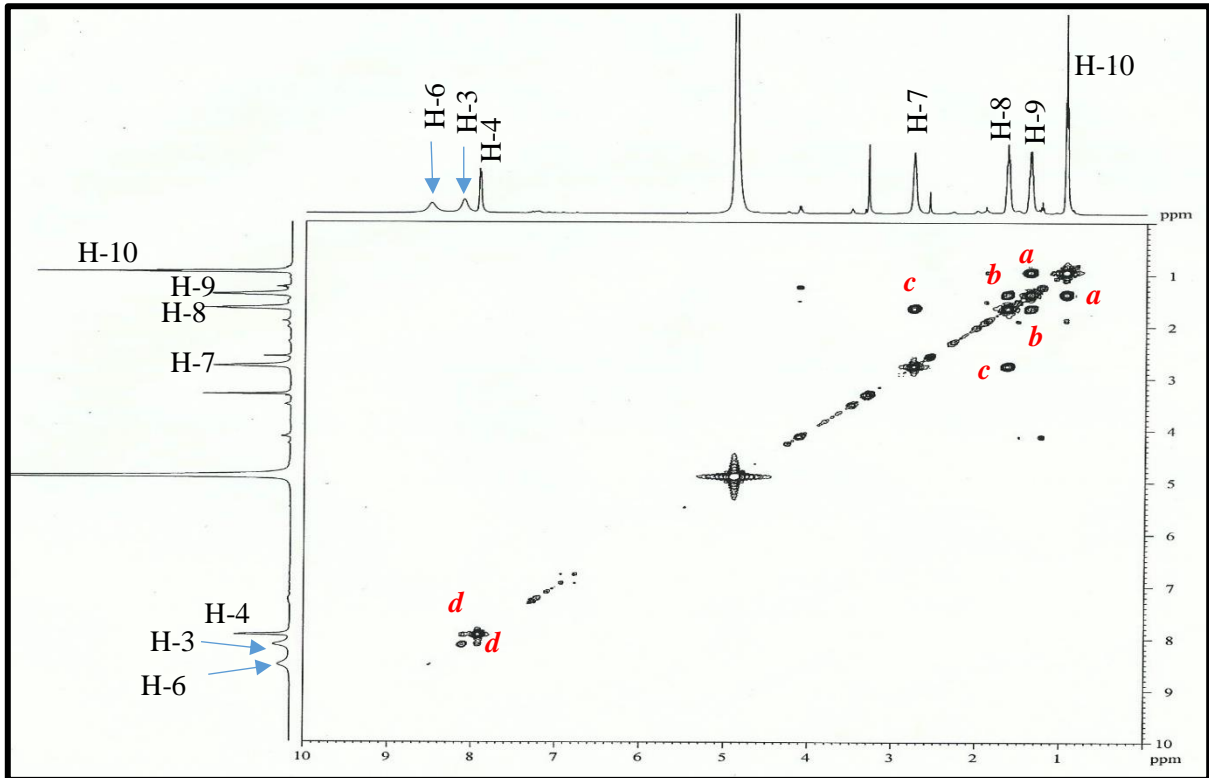
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 46 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HSQC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-2.



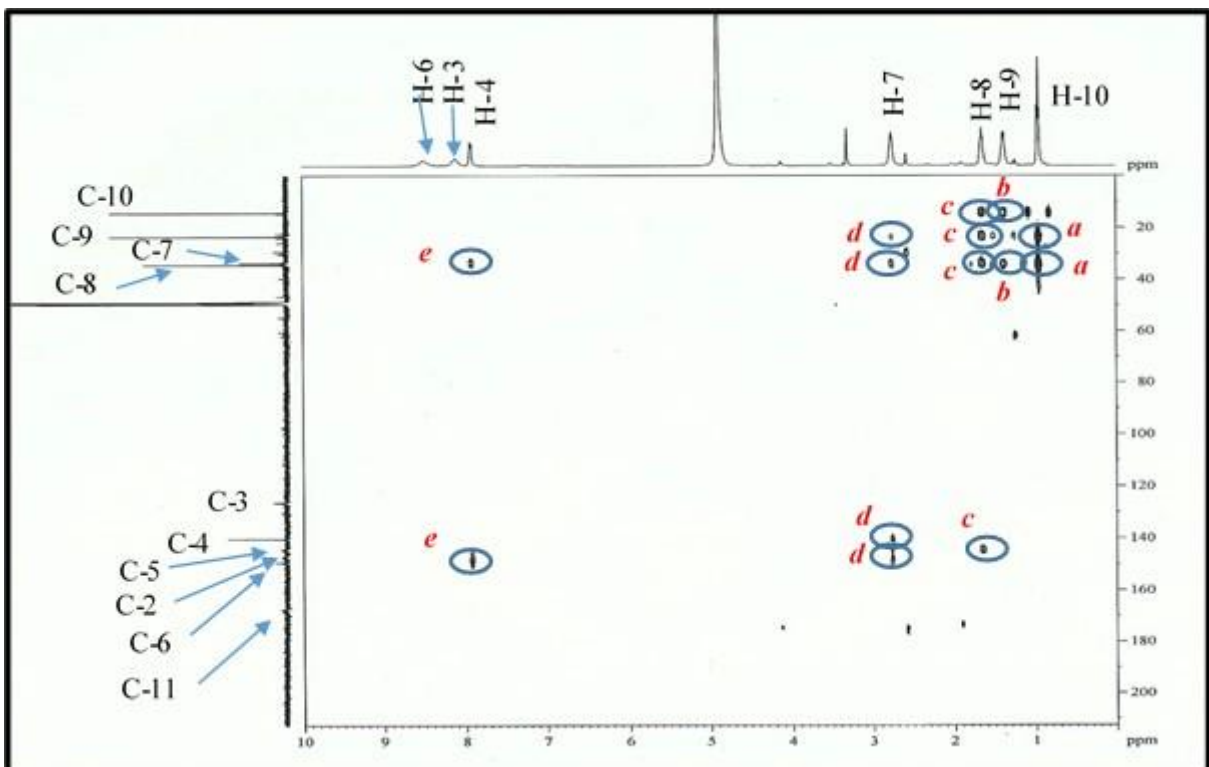
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 47 - Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz, CD_3OD) de FU-2.



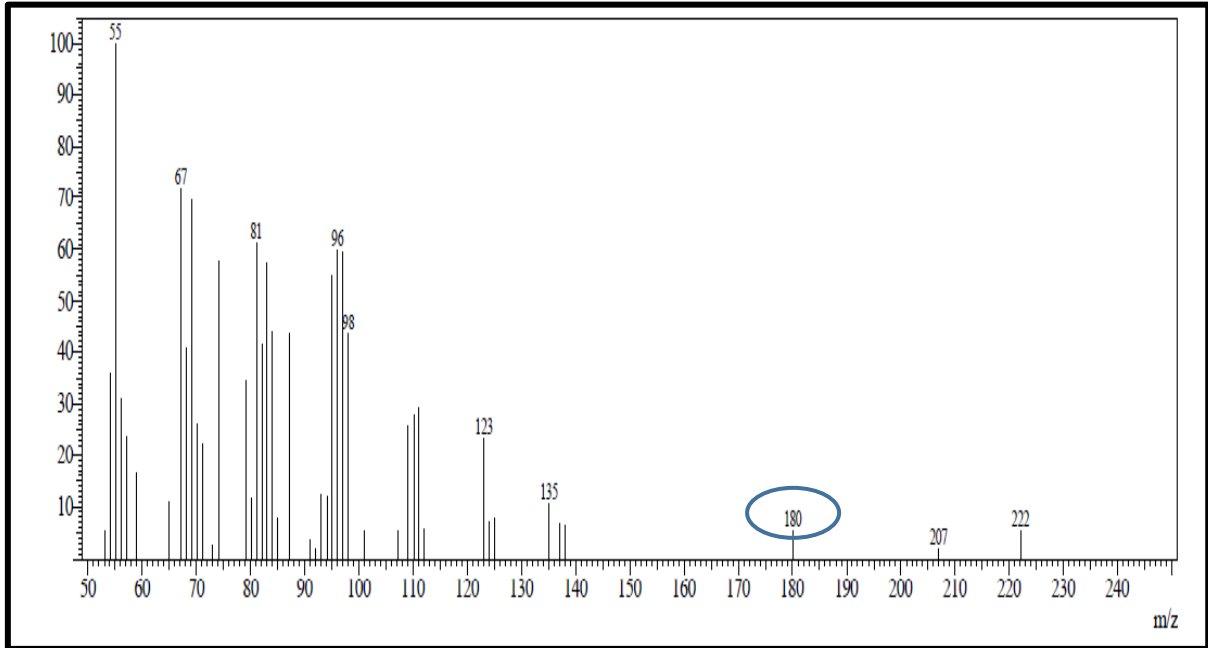
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 48 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD) de FU-2.



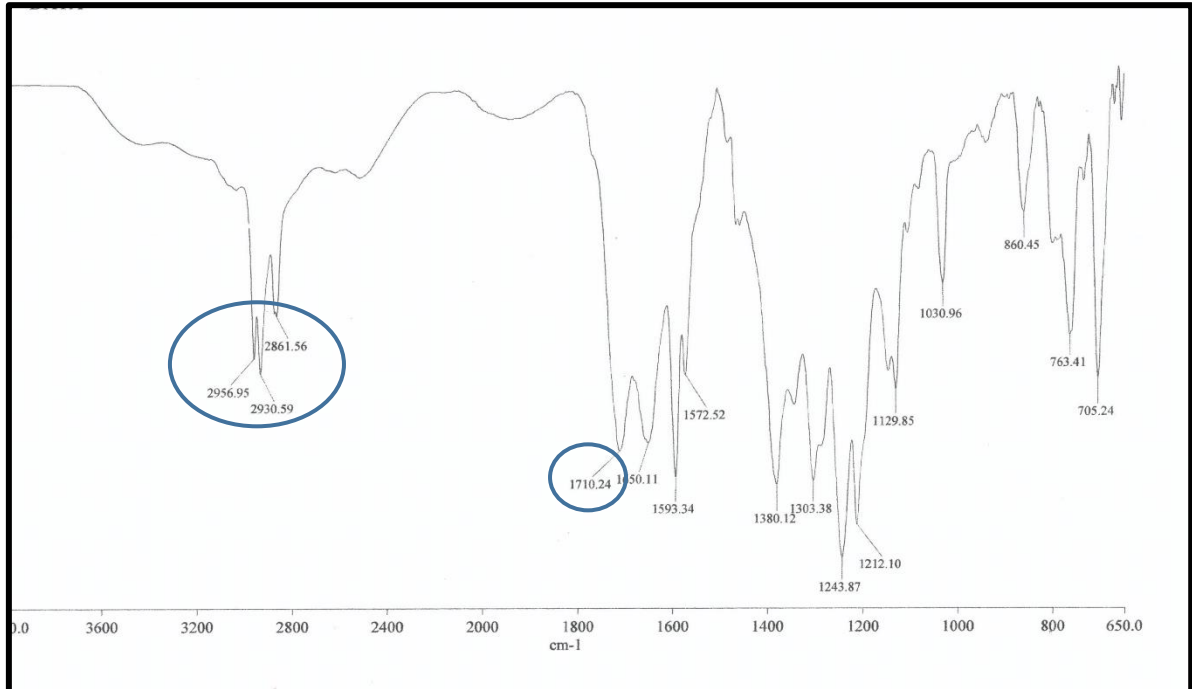
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 49 - Espectro de massa de FU-2 (IE, 70 eV).



Fonte: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC (DQOI/UFC).

Figura 50 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FU-2.



Fonte: Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) – UFC.

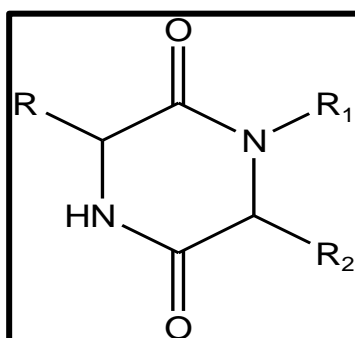
4.2.3 Determinação Estrutural de FU-3

Através do tratamento cromatográfico do extrato obtido do cultivo de UFCM0439 em meio BDL por um período de 28 dias, foi possível a obtenção de 5,0 mg de FU-3, uma substância sólida de coloração branca.

A análise do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) (FIGURA 58, página 101) revelou um multipletto intenso em δ_{H} 0,94-0,97 (6H, m; H-12 e H-13) compatíveis com grupos metilas, além de multipletos em δ_{H} 1,87 – 1,93 (1H, m; H-11), δ_{H} 1,95 - 2,03 (2H, m; H-4), δ_{H} 1,49 – 1,55 (2H, m; H-10), e absorções em região de desproteção em δ_{H} 4,12 – 4,15 (1H, m; H-9), δ_{H} 4,24 - 4,29 (1H, m; H-6) e δ_{H} 3,48 – 3,53 (2H, m; H-3), que foram correlacionadas a hidrogênios típicos do esqueleto da classe dos ciclodipeptídeos denominados de dicetopiperazinas (FIGURA 51) (KOZLOVSKY *et al.*, 2000).

A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) (FIGURA 59, página 102) e de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ^1H , ^{13}C – HSQC (FIGURA 61, página 103) permitiu atribuir o padrão de hidrogenação de todos os átomos de carbono, e revelou a presença de 2 carbonos metílicos em δ_{C} 22,3 (C-12) e δ_{C} 23,4 (C-13), 4 carbonos metilênicos em δ_{C} 23,7 (C-4), δ_{C} 29,2 (C-5), δ_{C} 39,5 (C-10), δ_{C} 46,7 (C-3), 3 carbonos metínicos em δ_{C} 25,8 (C-11), δ_{C} 54,8 (C-9), δ_{C} 60,4 (C-6) e 2 carbonos não-hidrogenados em δ_{C} 169,0 (C-1) e δ_{C} 172,9 (C-7), que foram atribuídos à carbonos carbonílicos. As absorções em δ_{C} 60,4 (C-6) e 54,8 (C-9) foram atribuídas a carbonos possivelmente nitrogenados, confirmando a sugestão do núcleo dicetopiperazínico (FIGURA 51) observado anteriormente no espectro de RMN ^1H .

Figura 51 - Estrutura típica do esqueleto de uma dicetopiperazina.

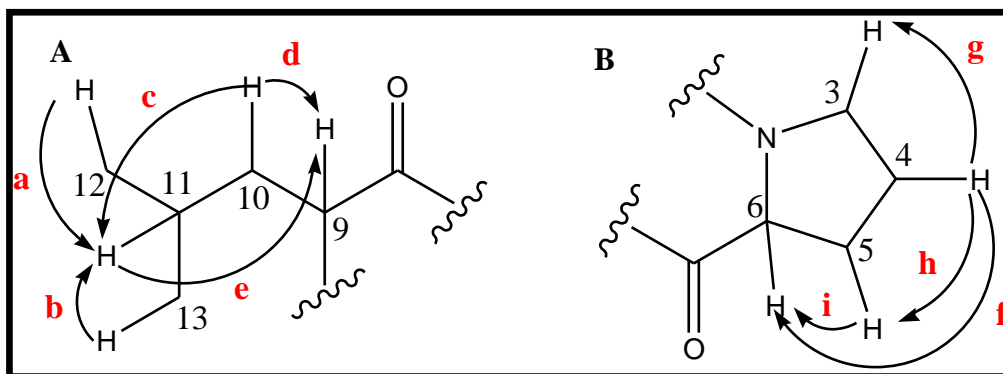


Fonte: Autora (2016).

O espectro de RMN de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY (FIGURA 62, página 103) revelou os acoplamentos dos grupos metílicos em δ_{H} 0,94 - 0,97 (6H, H-12 e H-13) com o hidrogênio metínico em δ_{H} 1,87 (H-11), e deste último com os hidrogênios metilênicos

em δ_H 1,52 e 1,90 (H-10), que, por sua vez, mostram correlações com o hidrogênio metínico em δ_H 4,11 (H-9), conforme ilustrado pela Figura 52, subestrutura A. Observaram-se, ainda, os acoplamentos dos hidrogênios metilênicos em δ_H 1,95 - 2,03 (2H-4) com grupos também metilênicos em δ_H 3,48 (2H-3) e δ_H 2,29 (H-5) e a correlação destes hidrogênios metilênicos com o hidrogênio metínico em δ_H 4,24 (H-6) (FIGURA 52, subestrutura B).

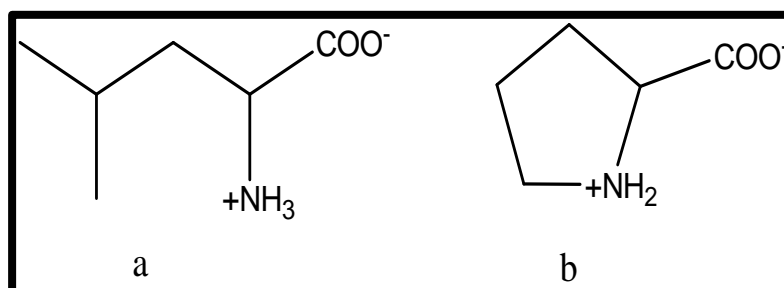
Figura 52 - Representação das correlações homonucleares $^1H, ^1H$ observadas no espectro COSY.



Fonte: Autora (2016).

A reunião destes dados possibilitou inferir a presença de fragmentos dos aminoácidos prolina e leucina, cujas estruturas podem ser vistas na Figura 53.

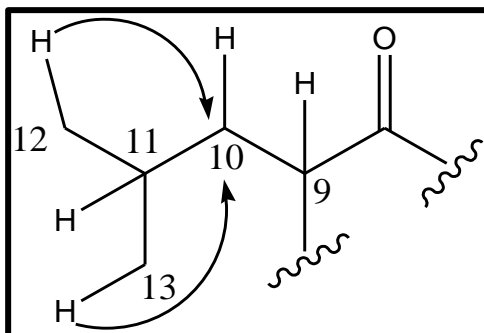
Figura 53 - Estrutura química dos aminoácidos leucina (a) e prolina (b).



Fonte: Autora (2016).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância $^1H, ^{13}C$ -HMBC (FIGURA 63, página 104), possibilitou inferir a correlação entre os hidrogênios δ_H 0,94 - 0,97 (6H-12 e 13) e o carbono δ_C 39,5 (C-10) ($^3J_{CH}$) (FIGURA 54).

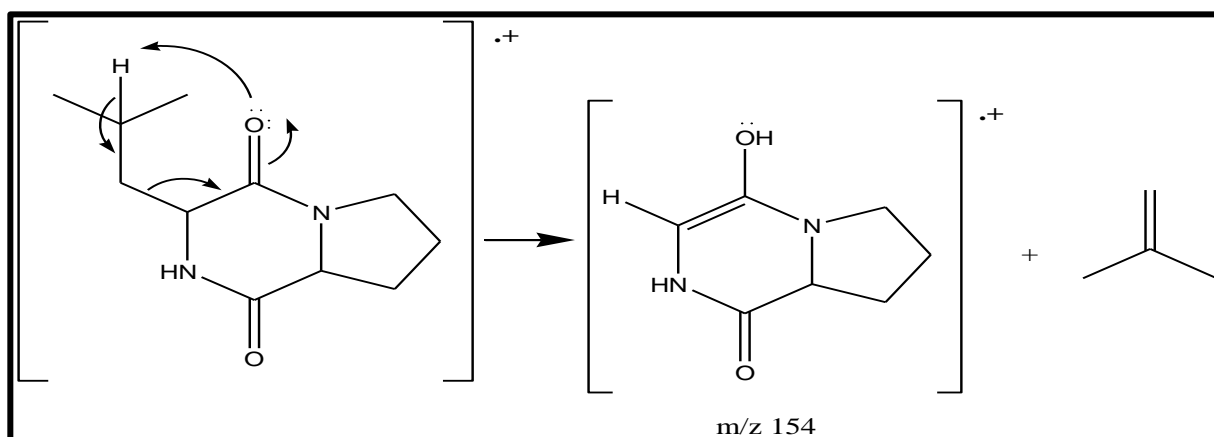
Figura 54 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância- HMBC de FU-3.



Fonte: Autora (2016).

O espectro de massas de baixa resolução (70 eV) (FIGURA 64, página 104) mostrou o pico do íon molecular com razão massa/carga (m/z) 209, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$, com grau de insaturação igual a quatro. Um pico base com m/z 154 foi verificado e pode ser justificado segundo o esquema da Figura 55.

Figura 55 - Proposta para a formação do cátion com m/z 154.



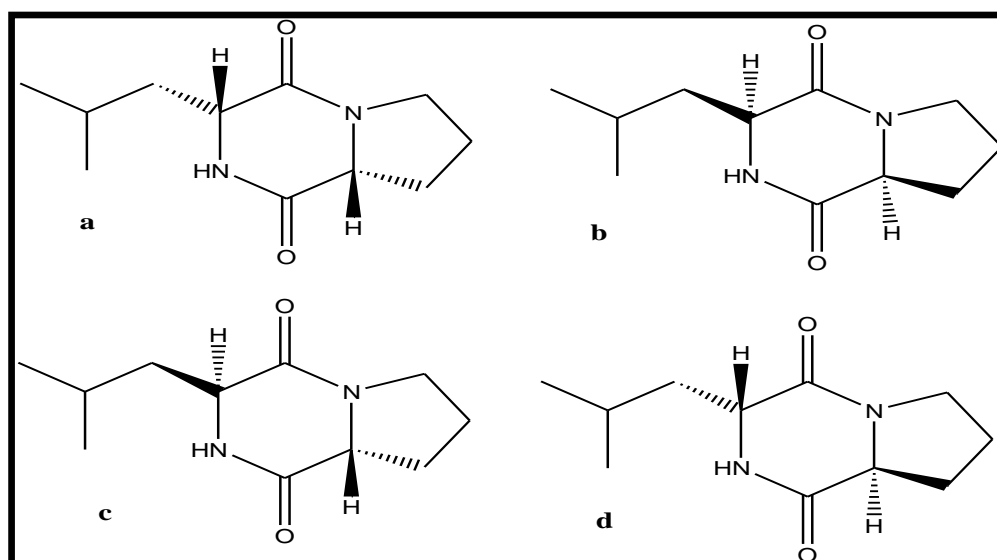
Fonte: Autora (2016).

O espectro de absorção na região do infravermelho de FU-3 (FIGURA 65, página 105) apresentou absorções em 1631 cm^{-1} e 1669 cm^{-1} atribuídos à deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$, além de absorções em 3254 cm^{-1} referente a estiramento de ligação $\text{N}-\text{H}$ e em 2876 cm^{-1} e 2949 cm^{-1} característicos de estiramento de ligação $\text{C}-\text{H}$ sp^3 .

A comparação dos dados de RMN ^{13}C e ^1H de FU-3 foram compatíveis com os dados de RMN ^{13}C e ^1H descritos para a ciclo (L-Pro-L-Leu) (FIGURA 57, página 99), uma dicetopiperazina já isolada da espécie *Aspergillus fumigatus* (FURTADO *et al.*, 2005). Entretanto, é necessária a obtenção de dados de rotação óptica para a confirmação deste isômero, haja

vista a possibilidade de 4 isômeros distintos devido à presença de dois centros estereogênicos na molécula (C-6 e C-9): ciclo (L-Pro-L-Leu), ciclo (D-Pro-D-Leu), ciclo (D-Pro-L-Leu) e ciclo (L-Pro-D-Leu) (FIGURA 56). De forma natural os aminoácidos são essencialmente sintetizados como L-isômeros (ANDRADE, 2011). Porém, há relatos na literatura que discorrem acerca do isolamento de D-aminoácidos a partir de bactérias (FDHILA *et al.*, 2003).

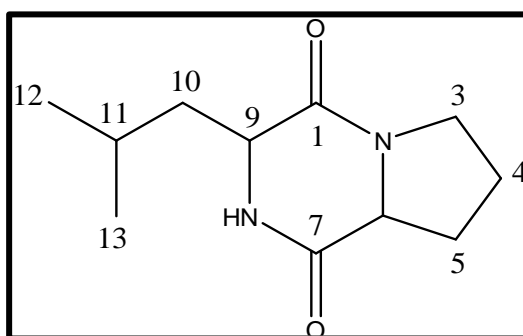
Figura 56 - Estrutura química dos aminoácidos ciclo (L-Pro-L-Leu), ciclo (D-Pro-D-Leu), ciclo (L-Pro-D-Leu) e ciclo (D-Pro-L-Leu), de **a** a **d**, respectivamente.



Fonte: Andrade (2011).

Há relatos de isolamento de ciclo (L-Pro-L-Leu) de fungos além de uma bactéria associada ao molusco *Pecten maximus*. Esta substância apresentou atividade antifúngica considerável contra *Cladosporium phlei* e potente atividade antibiótica contra a bactéria *Vibrio anguillarum* (CHAPLA, 2010).

Figura 57 - Estrutura química de ciclo (L-Pro-L-Leu), FU-3 isolada de *F. udum*.



Fonte: Autora (2016).

Tabela 13 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-3 com dados da literatura obtidos para o ciclo (L-Pro-L-Leu) (FURTADO *et al.*, 2005).

Carbono	FU-3 (CD ₃ OD, 300 MHz)		Ciclo (L-Pro-L-Leu) (CD ₃ OD, 400 MHz) (FURTADO <i>et al.</i> , 2005)	
	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)
1	----	169,0 (C)	----	168,5 (C)
2	----	----	----	----
3	3,48 - 3,53 m	46,6 (CH ₂)	3,47 - 3,51 m	46,0 (CH ₂)
4	1,95 - 2,03 m	23,7 (CH ₂)	4a: 1,96 - 2,05 m 4b: 1,81 - 1,94 m	23,2 (CH ₂)
5	2,29 - 2,32 m	29,2 (CH ₂)	5a: 2,24 - 2,34 m 5b: 1,96 - 2,05 m	28,8 (CH ₂)
6	4,24 - 4,29 m	60,4 (CH)	4,25 ddd (1,7; 6,3; 11,1 Hz)	60,1 (CH)
7	----	172,9 (C)	----	172,6 (C)
8	----	----	4,56 s	----
9	4,12 - 4,15 m	54,8 (CH)	4,09 - 4,15 m	54,0 (CH)
10	1,49 - 1,55 m	39,5 (CH ₂)	10a: 1,81 - 1,94 m 10b: 1,47 - 1,56 m	38,2 (CH ₂)
11	1,87 - 1,93 m	25,9 (CH)	1,81 - 1,94 m	25,0 (CH)
12	0,94 - 0,97 m	22,3 (CH ₃)	0,94 d (6,5)	21,4 (CH ₃)
13	0,94 - 0,97 m	23,4 (CH ₃)	0,95 d (6,5)	22,8 (CH ₃)

Legenda: J=constante de acoplamento; m=multipleteo; d=dubleteo.

Fonte: Autora (2016); Furtado *et al.* (2005).

Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC de FU-3 (CD₃OD, 125 x 300MHz).

Posição	FU - 3 HSQC	
	δ_{C}	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz
1	169,0 (C)	----

Continua...

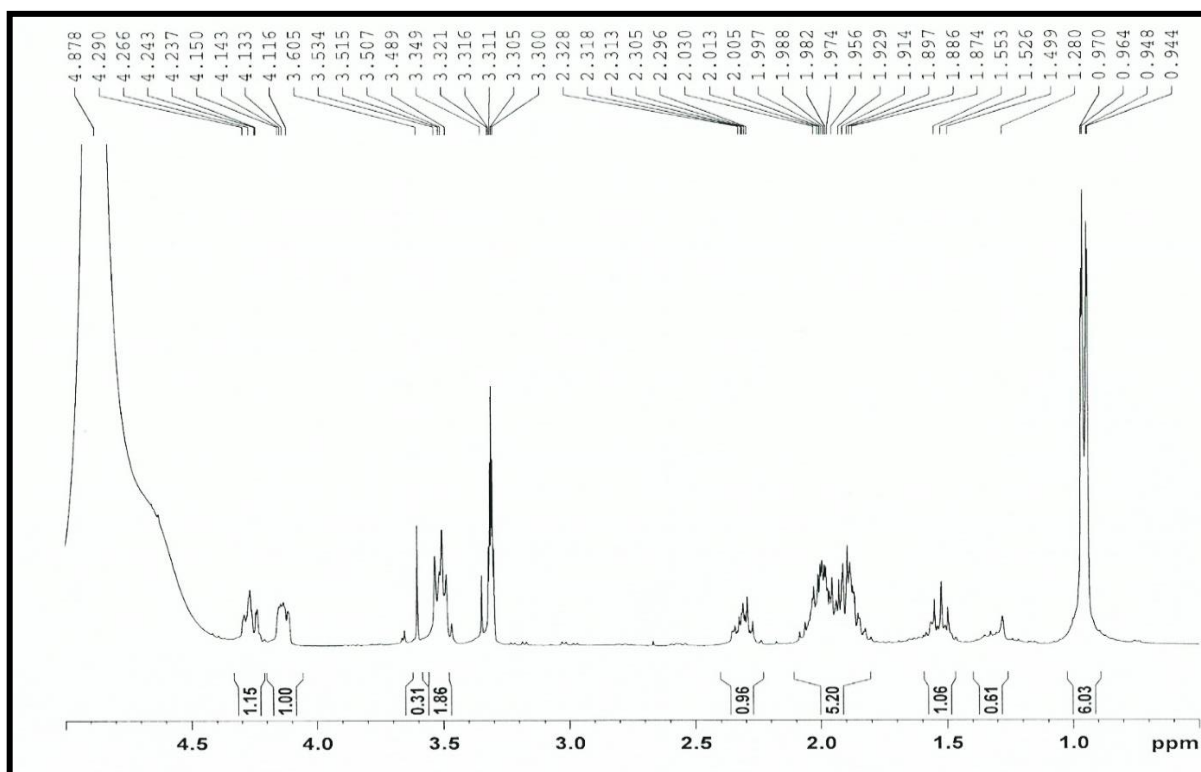
Tabela 14 – Continuação

2	----	----
3	46,6 (CH ₂)	3,48 - 3,53 (2H, m)
4	23,7 (CH ₂)	1,95 - 2,03 (2H, m)
5	29,2 (CH ₂)	2,29 - 2,32 (2H, m)
6	60,4 (CH)	4,24 - 4,29 (1H, m)
7	172,9 (C)	----
8	----	----
9	54,8 (CH)	4,12 - 4,15 (1H, m)
10	39,5 (CH ₂)	1,49 - 1,55 (2H, m)
11	25,9 (CH)	1,87 - 1,93 (1H, m)
12	22,3 (CH ₃)	0,94 - 0,97 (3H, m)
13	23,4 (CH ₃)	0,94 - 0,97 (3H, m)

Legenda: J=constante de acoplamento; m=multiplete.

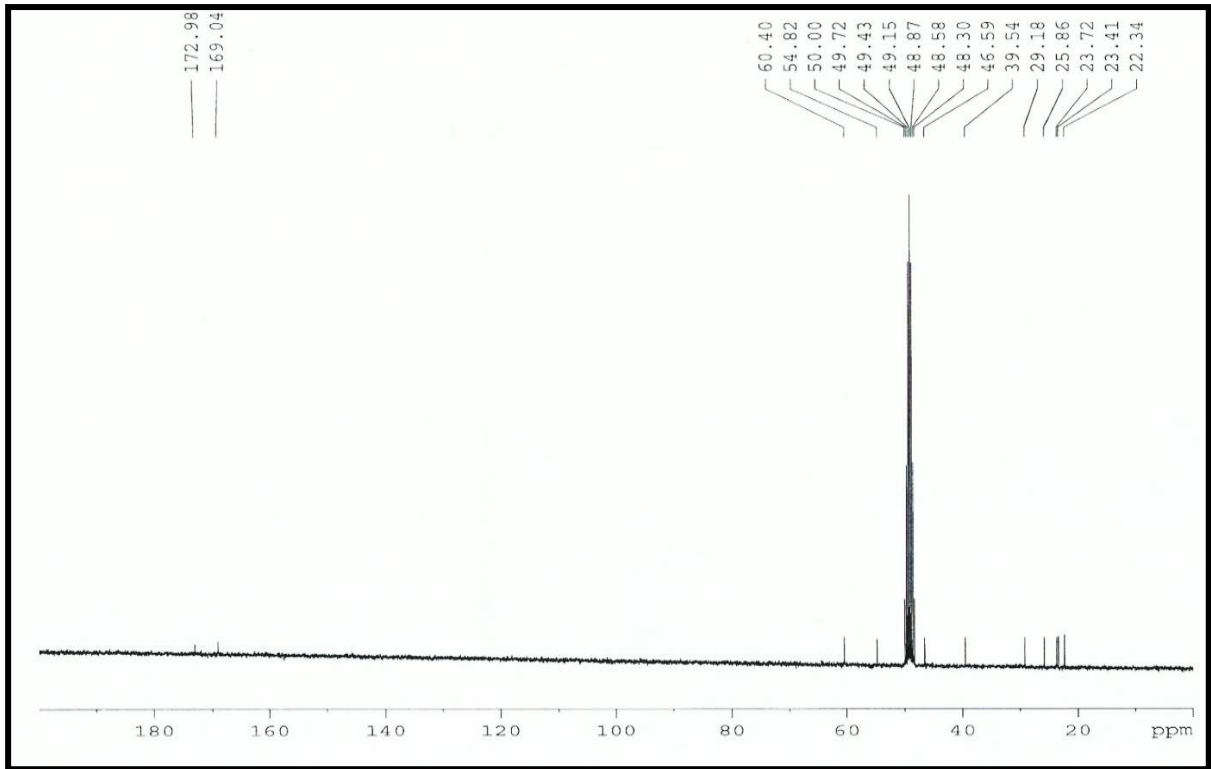
Fonte: Autora (2016).

Figura 58 - Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) de FU-3.



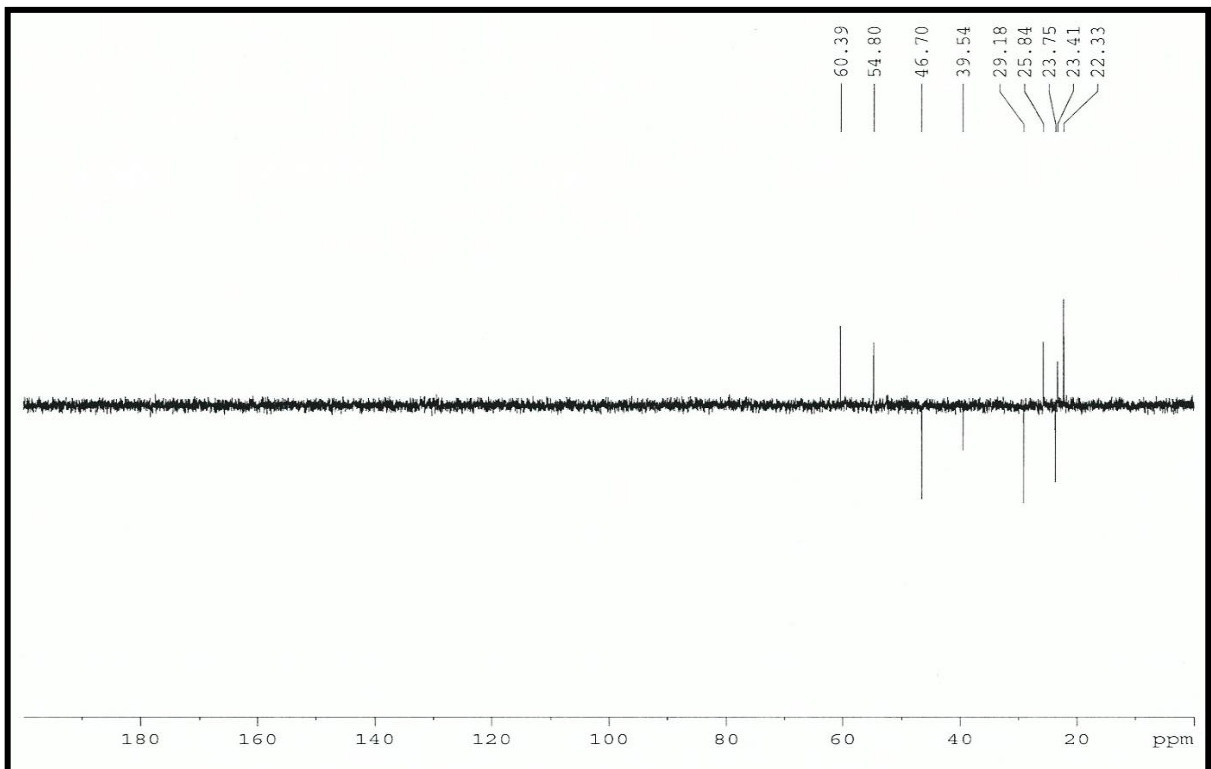
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de FU-3.



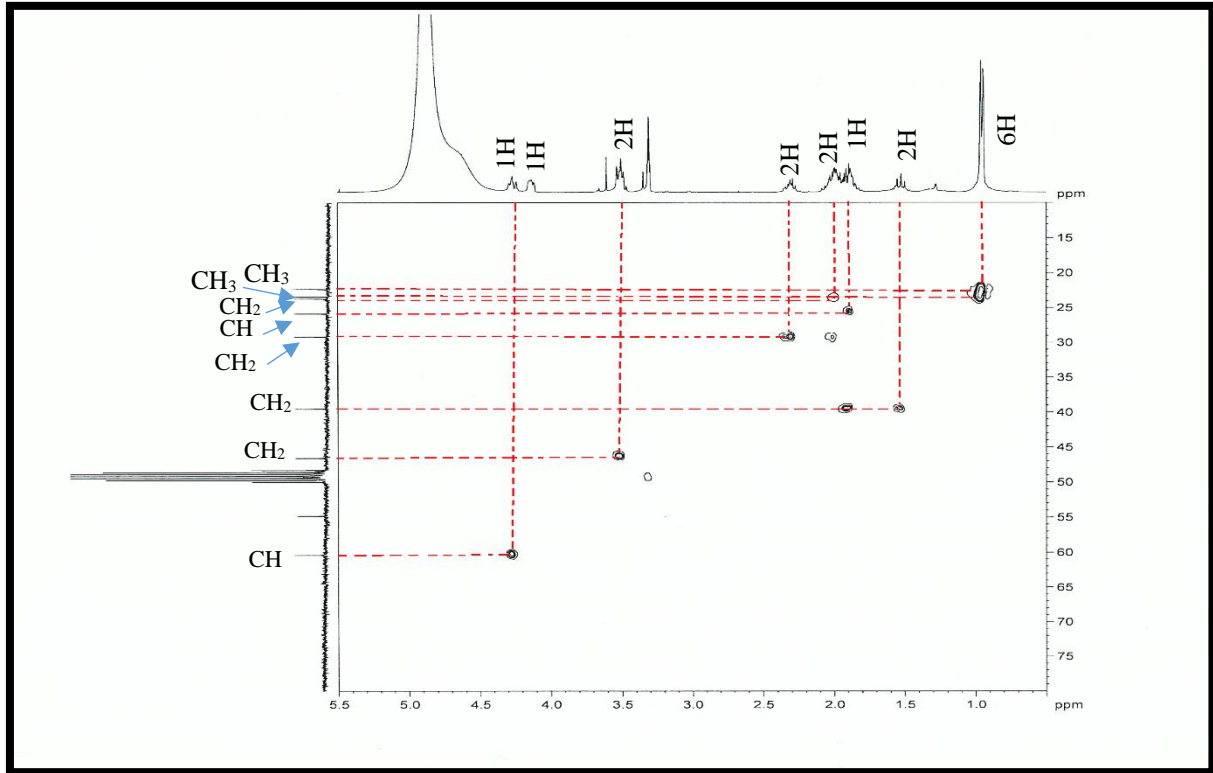
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 60 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de FU-3.



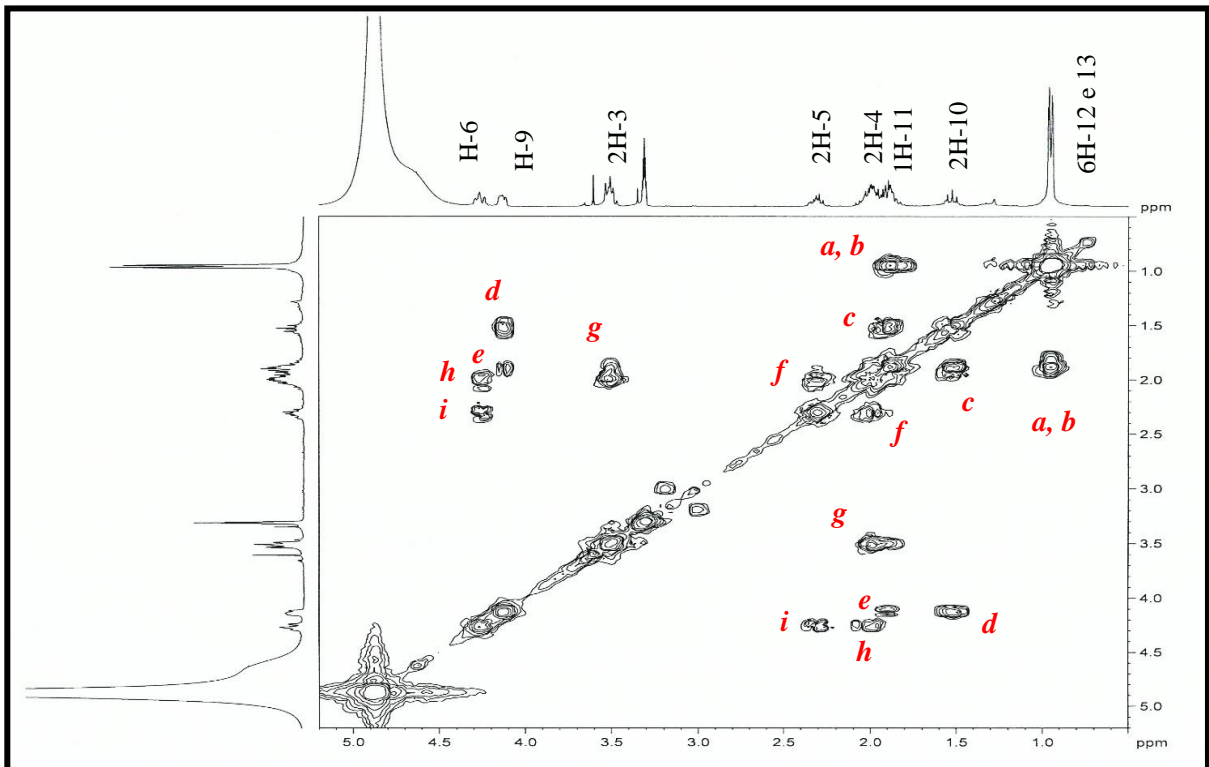
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 61 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 3.



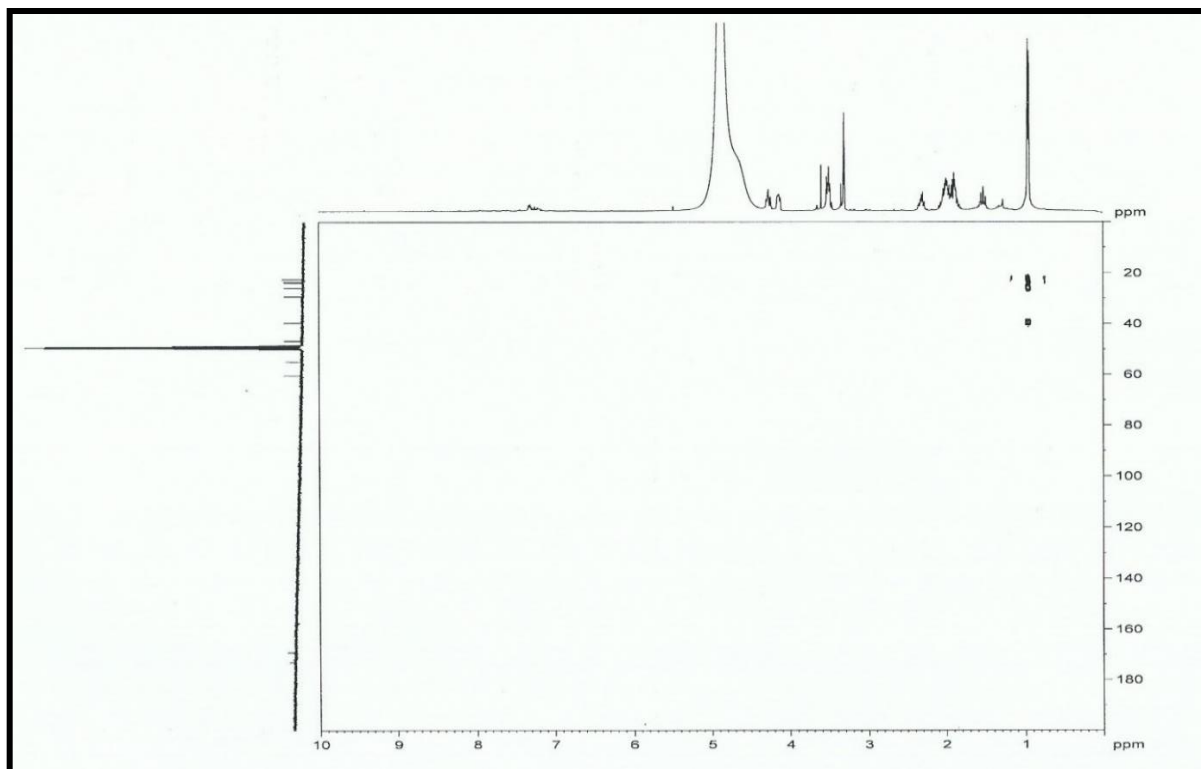
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 62 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (300 MHz, CD_3OD) de FU – 3.



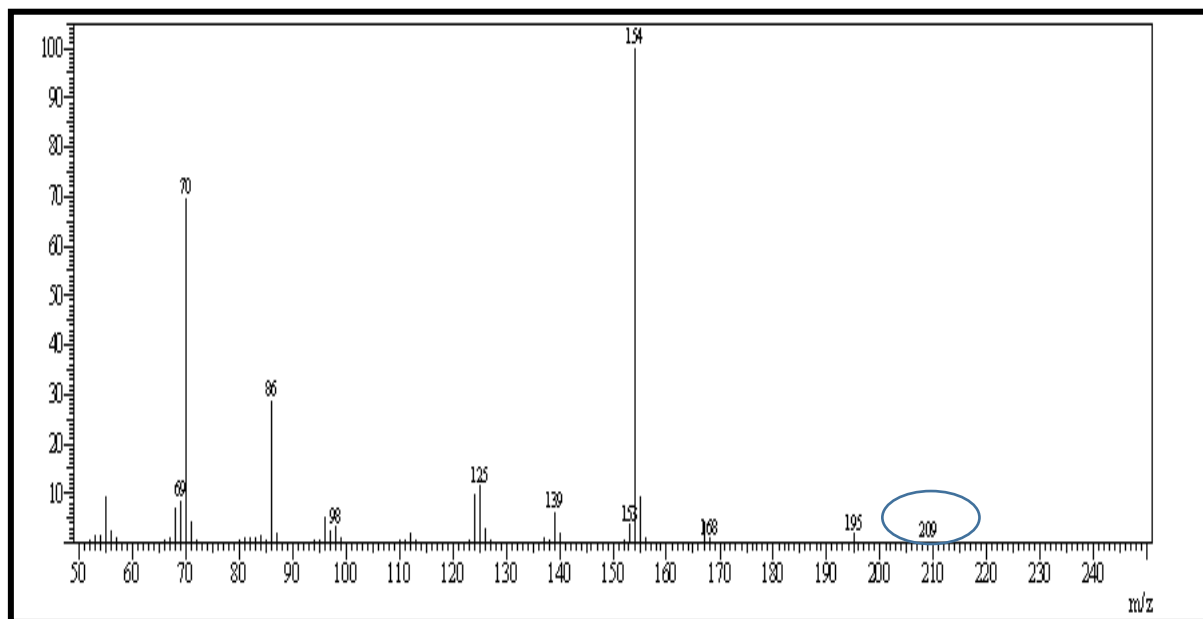
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 63 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H},^{13}\text{C}$ – HMBC (300 MHz x 75MHz, CD_3OD) de FU – 3.



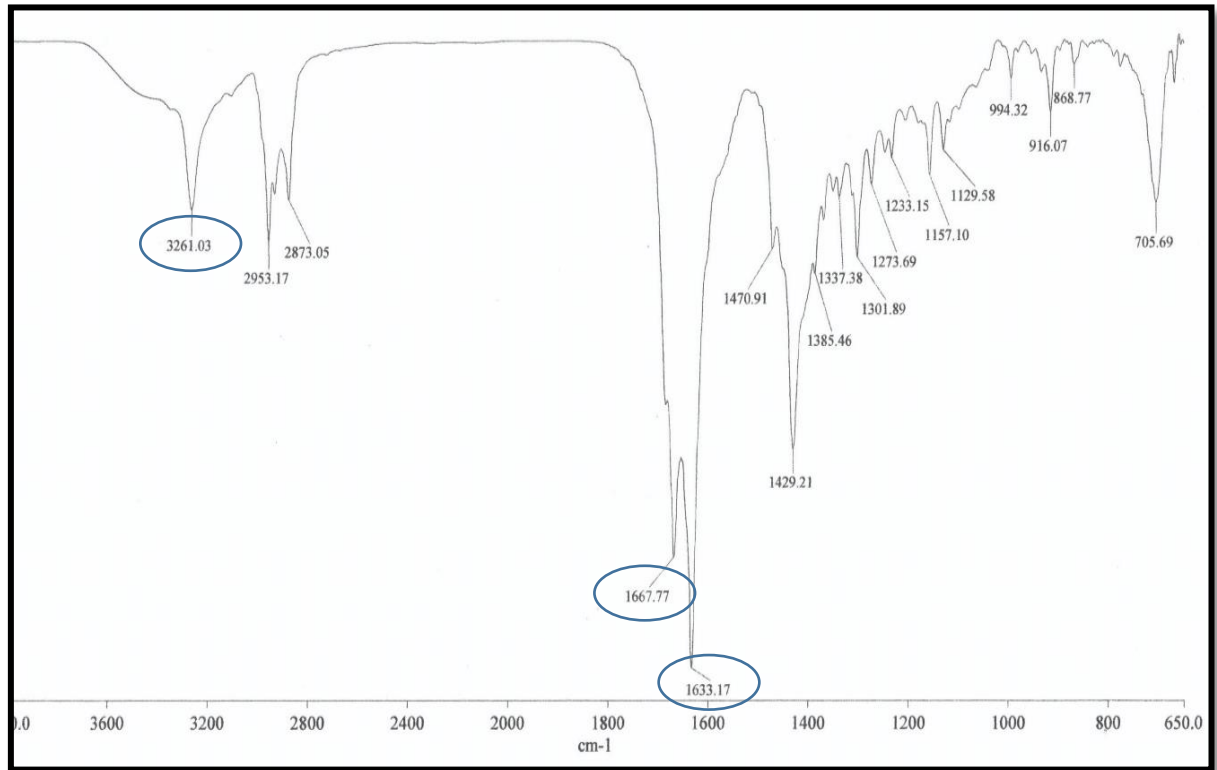
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 64 - Espectro de massa de FU-3 (IE, 70 eV).



Fonte: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC (DQOI/UFC).

Figura 65 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FU-3.



Fonte: Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) – UFC.

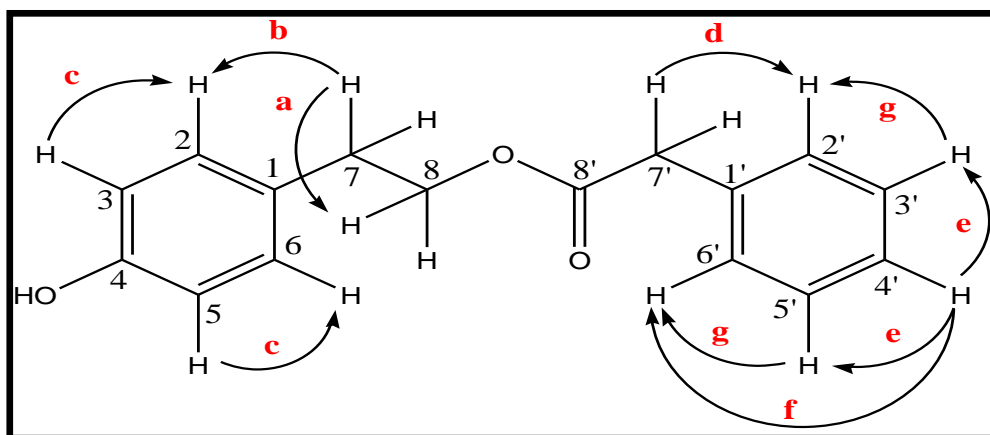
4.2.4 Determinação Estrutural de FU-4

Sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato bruto oriundo do cultivo de UFCM0439 em meio MPD por 25 dias resultaram em 1,2 mg de uma substância resinosa de coloração marrom, denominada FU-4.

Os dados no espectro de RMN ^1H (500 MHz, em CD_3OD , FIGURA 69, página 109) de FU-4 mostraram algumas semelhanças com o espectro de FU-1, particularmente nos sinais relacionados aos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,71 (2H, t, 7,3 Hz, H-7) e δ_{H} 3,68 (2H, t, 7,3 Hz, H-8), aos hidrogênios aromáticos em anel *para*-substituído com δ_{H} 7,02 (2H, d, 8,4 Hz, H-2 e H-6) e δ_{H} 6,70 (2H, d, 8,4 Hz, H-3 e H-5), o que possibilitou inferir a possibilidade de FU-4 ser um derivado do tirosol. Em adição, observou-se ainda neste espectro a presença de um singleto em δ_{H} 3,47 (2H, s, H-7'), além de hidrogênios de um outro sistema aromático monossustituído em δ_{H} 7,30 (2H, d, 7,5 Hz, H-2' e H-6'), δ_{H} 7,24 (2H, t, 7,5 Hz, H-3' e H-5') e δ_{H} 7,15 (1H, t, 7,5 Hz, H-4').

Através da análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (FIGURA 70, página 110) foi possível verificar as correlações vicinais entre os hidrogênios em δ_{H} 2,71 (H-7) com os hidrogênios em δ_{H} 3,68 (H-8), e dos hidrogênios em δ_{H} 6,70 (H-3 e H-5) com os hidrogênios δ_{H} 7,02 (H-2 e H-6) que caracterizou a presença de anel *para*-substituído, além do acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,71 (2H-7) com o hidrogênio em δ_{H} 7,02 (2H - 2 e 6). A correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 7,30 (2H - 2' e 6') e δ_{H} 7,21 (H-3' e H-5') com o hidrogênio δ_{H} 7,15 (H-4') também foi observada. Além destas, também há correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 3,47 (2H-7') e δ_{H} 7,30 (2H- 2' e 6') caracterizando o segundo anel aromático como mostrado na estrutura abaixo (FIGURA 66):

Figura 66 - Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ observadas no espectro COSY.

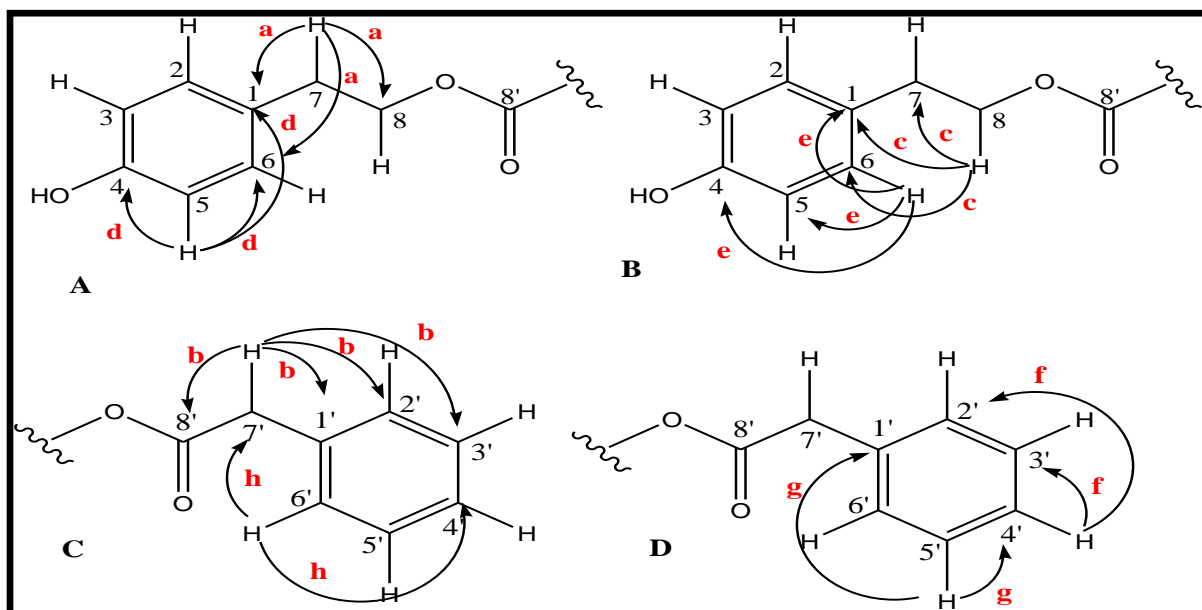


Fonte: Autora (2016).

Os espectros RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ^1H , ^{13}C – HSQC (FIGURA 71, página 111) e RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC (FIGURA 72, página 112) possibilitaram inferir os deslocamentos químicos dos átomos de carbono de acordo com seus respectivos hidrogênios. Assim, inferiu-se a presença de quinze carbonos distribuídos entre carbonos não-hidrogenados em δ_{C} 130,7 (C-1), δ_{C} 156,9 (C-4), δ_{C} 139,4 (C-1'), um carbono carbonílico em δ_{C} 180,3 (C-8'), carbonos metínicos em δ_{C} 131,0 (C-2 e C-6), δ_{C} 116,3 (C-3 e C-5), δ_{C} 130,3 (C-2' e C-6'), δ_{C} 129,4 (C-3' e C-5'), δ_{C} 127,0 (C-4'), além dos carbonos metilênicos em δ_{C} 39,6 (C-7), δ_{C} 64,7 (C-8) e δ_{C} 46,1 (C-7').

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC (FIGURA 72, página 112) permitiu verificar acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,68 (H-8) com o carbono em δ_{C} 131,0 (C-2 e C-6) ($^4\text{J}_{\text{CH}}$) e dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,02 (2H, d, 8,4 Hz, H-2 e H-6) com o carbono não hidrogenado em δ_{C} 130,7 (C-1) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$). Por sua vez, os hidrogênios em δ_{H} 6,70 (2H, d, 8,4 Hz, H-3 e H-5) mostraram correlações com os carbonos em δ_{C} 131,0 (C-2 e C-6) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), δ_{C} 130,7 (C-1) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e com o carbono com deslocamento em δ_{C} 156,9 (C-4) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), respectivamente. Em adição, observou-se ainda a correlação importante entre os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,47 (2H, s, H-7') com a carbonila em δ_{C} 180,3 (C-8') ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) além deste hidrogênio também mostrar correlações com os carbonos em δ_{C} 139,4 (C-1') ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), δ_{C} 130,7 (C-2' e C-6') ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 129,4 (C-3' e C-5') ($^4\text{J}_{\text{CH}}$), respectivamente. Estas e outras correlações observadas estão representadas nas subestruturas da Figura 67.

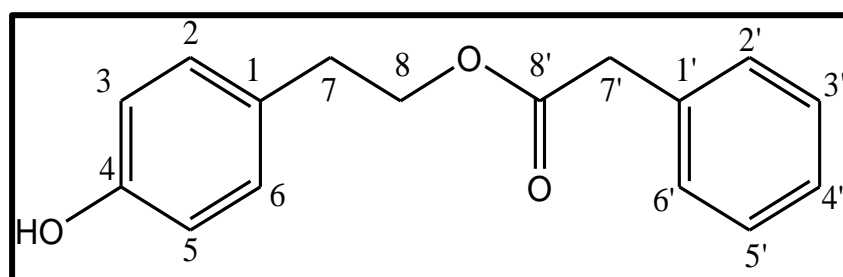
Figura 67- Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância-HMBC de FU-4.



Fonte: Autora (2016).

A reunião dos dados discutidos acima, possibilitou atribuir para FU-4 a estrutura da monaspilosina ($C_{16}H_{16}O_3$) (FIGURA 68), um derivado do ácido fenilacético com importante atividade antioxidante cujo isolamento já foi relatado a partir de culturas do fungo filamentososo *Monascus spp.* (CHENG *et al.*, 2008) e de *Fusarium solani* (TADPETCH *et al.*, 2015).

Figura 68 - Estrutura química da monaspilosina, FU-4 isolada de *F. udum*.



Fonte: Autora (2016).

Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C de FU-4 com dados da literatura obtidos para a monaspilosina (CHENG *et al.*, 2008).

Carbono	FU-4 (CD_3OD , 300 MHz)		Monaspilosina ($CDCl_3$, 400 MHz) (CHENG <i>et al.</i> , 2008).	
	δ_H , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_C (padrão de hidrogenação)	δ_H , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_C (padrão de hidrogenação)
1	----	130,7 (C)	----	129,6
2/6	7,02 d (8,4)	131,0 (CH)	7,00 d (8,8)	130,0
3/5	6,70 d (8,4)	116,3 (CH)	6,72 d (8,8)	115,3
4	----	156,9 (C)	----	154,2
7	2,71 t (7,3)	39,6 (CH_2)	2,84 t (7,0)	34,1
8	3,68 t (7,3)	64,7 (CH_2)	4,26 t (7,0)	65,6
1'	----	139,4 (C)	----	133,9
2'/6'	7,30 d (7,5)	130,3 (CH)	7,09 m	129,3
3'/5'	7,21 t (7,5)	129,4 (CH)	7,09 m	127,1
4'	7,15 t (7,5)	127,0 (CH)	7,09 m	128,5
7'	3,47 s	46,1 (CH_2)	3,60 s	41,4
8'	----	180,3 (C)	----	171,6

Legenda: J=constante de acoplamento; m=multiplato; d=dublete; t=triplete; s=singlete.

Fonte: Autora (2016); Cheng *et al.* (2008).

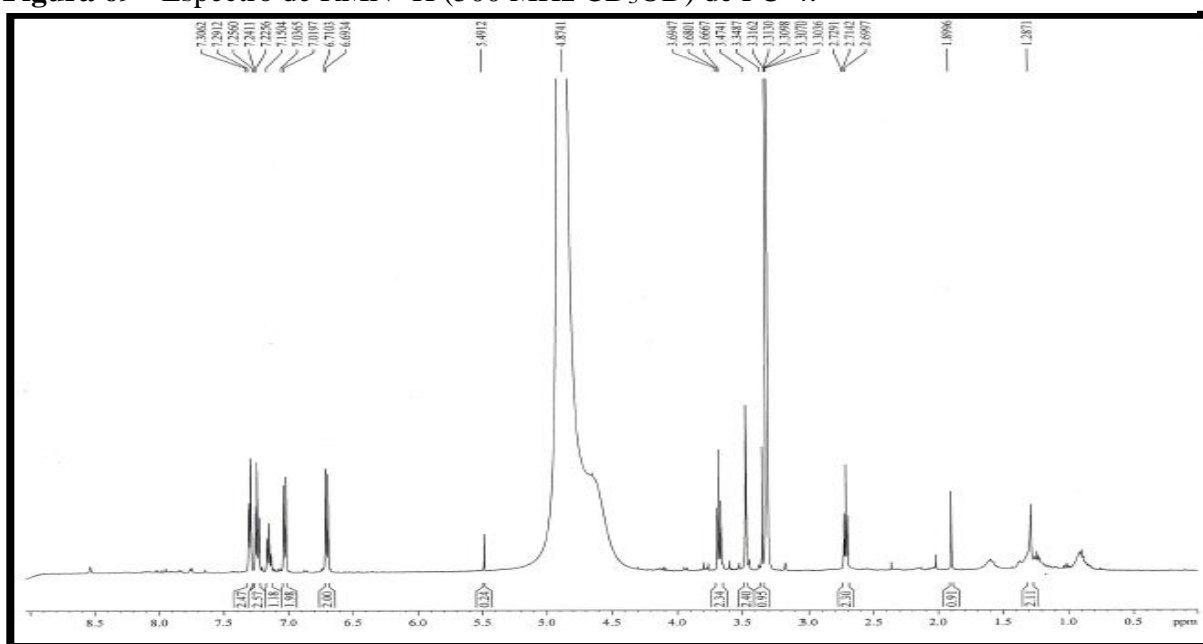
Tabela 16 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C -HSQC e ^1H , ^{13}C -HMBC nJ ($n=2$; 3 ou 4) de FU-4 (CD_3OD , 125 x 500 MHz).

Posição	FU-4 HSQC		FU-4 HMBC		
	δ_{C}	δ_{H} , mult. e J em Hz	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$
1	130,7	----	2H-7; H-2/H-6	H-3/H-5; 2H-8	----
2/6	131,0	7,02 d (8,4)	H-3/H-5	2H-7	2H-8
3/5	116,3	6,70 d (8,4)	H-2/H-6	----	----
4	156,9	----	H-3/H-5	H-2/H-6	----
7	39,6	2,71 t (7,3)	2H-8	----	----
8	64,7	3,68 t (7,3)	2H-7	----	----
1'	139,4	----	2H-7'	H-3'/H-5'	----
2'/6'	130,3	7,30 d (7,5)	----	2H-7'; H-4'	----
3'/5'	129,4	7,21 t (7,5)	H-4'	----	2H-7'
4'	127,0	7,15 t (7,5)	H-3/H-5'	H-2/H-6'	----
7'	46,1	3,47 s	----	H-2'/H-6'	----
8'	180,3	----	2H-7'	----	----

Legenda: J=constante de acoplamento; m=multipeto; d=dubleteo; t=tripleto; s=singleteo.

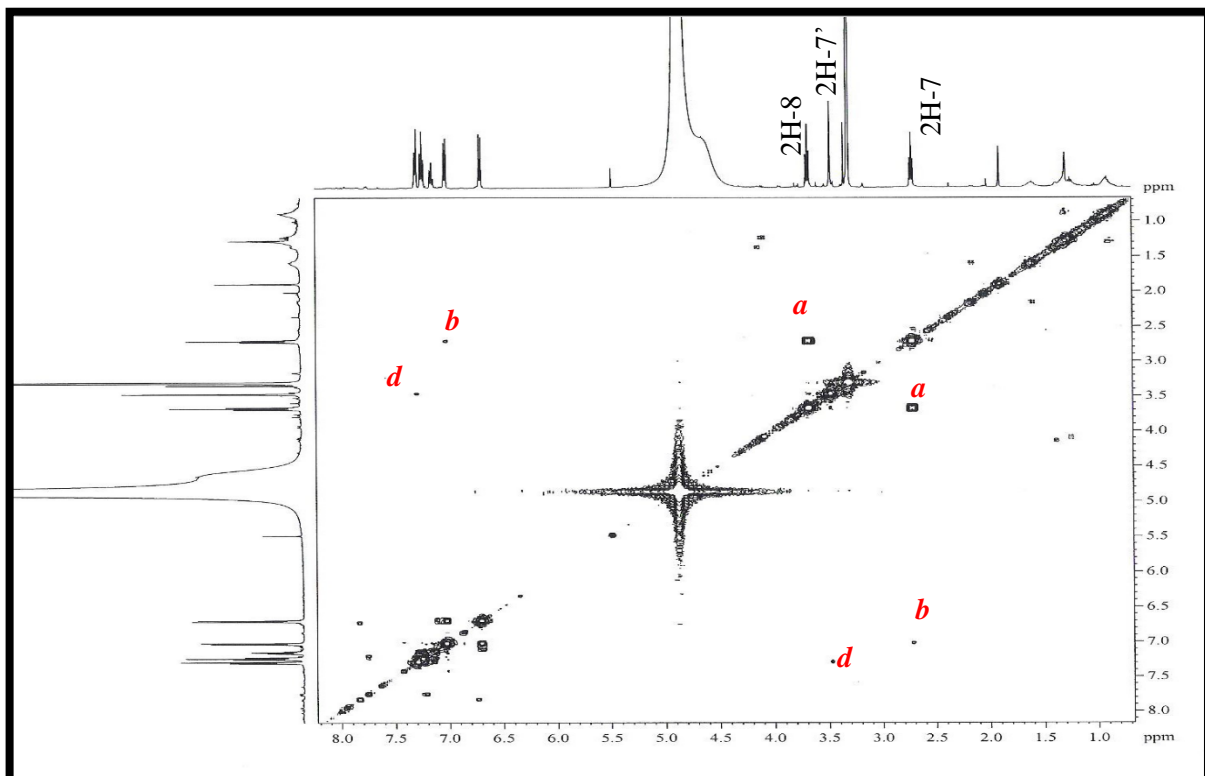
Fonte: Autora (2016).

Figura 69 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz CD_3OD) de FU-4.



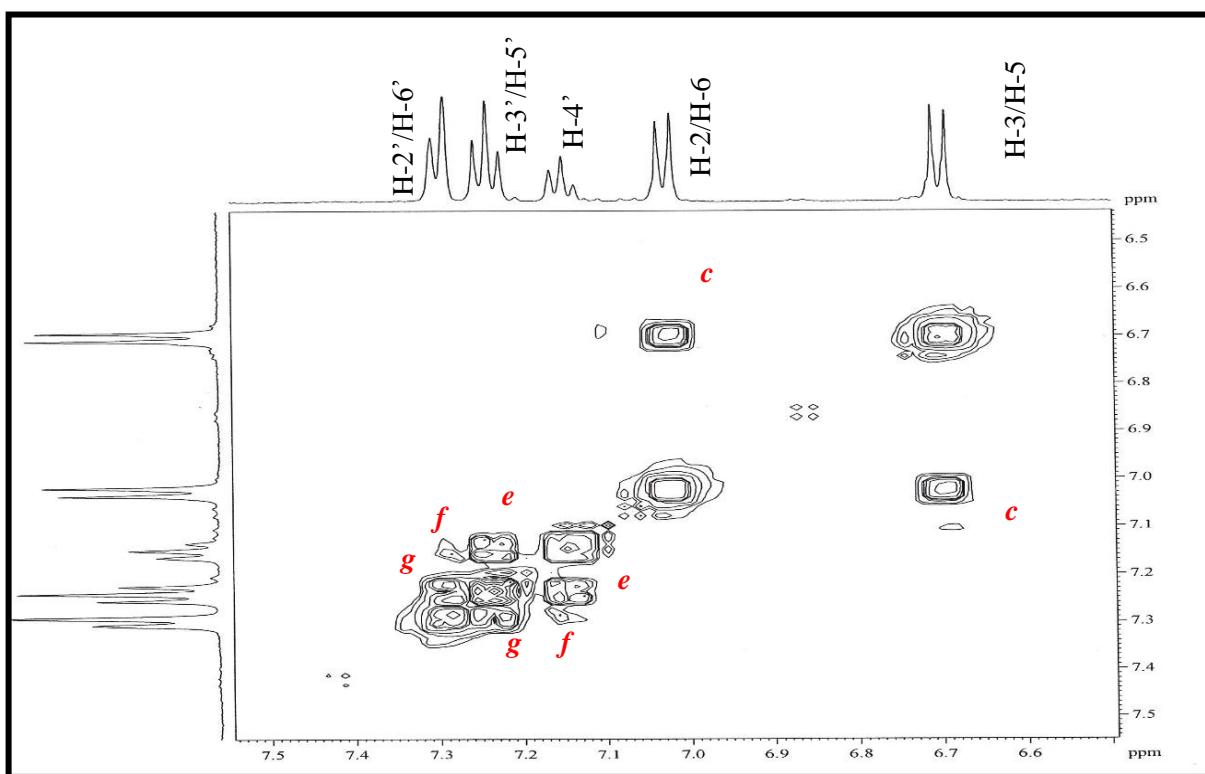
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

Figura 70 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY (A) e (B) (500 x 125 MHz, CD_3OD) de FU - 4.



Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

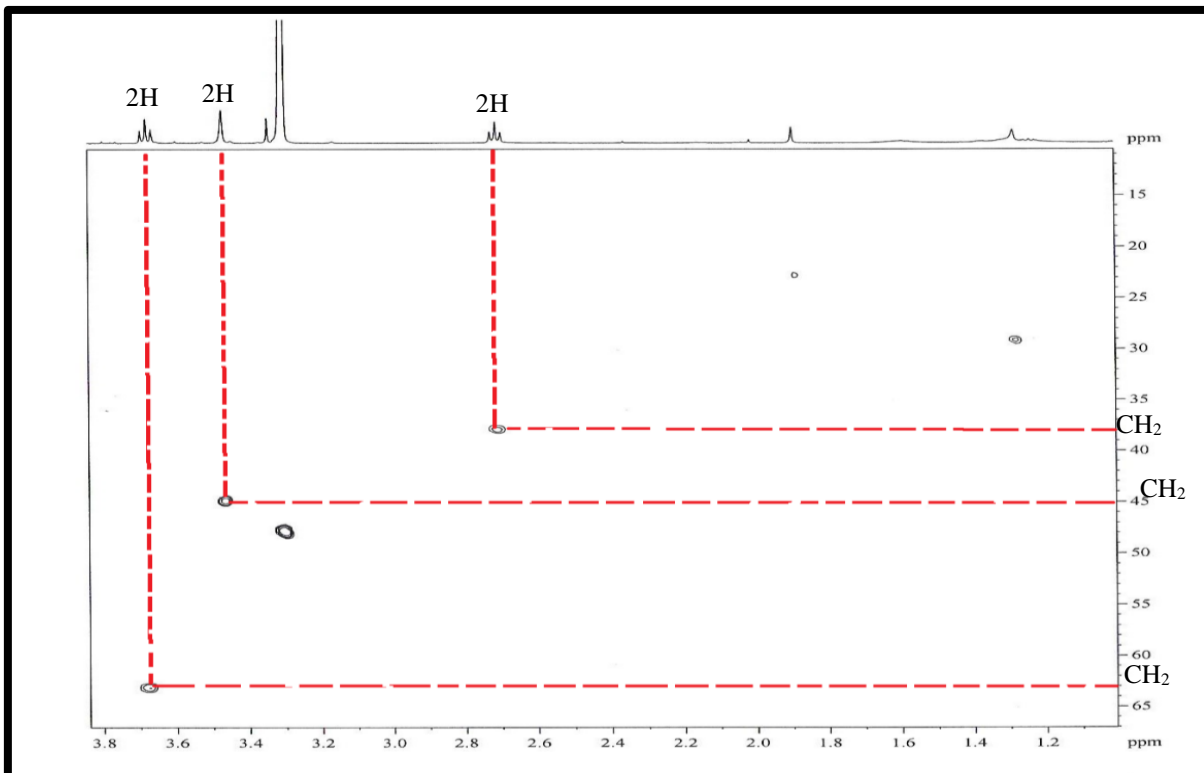
A



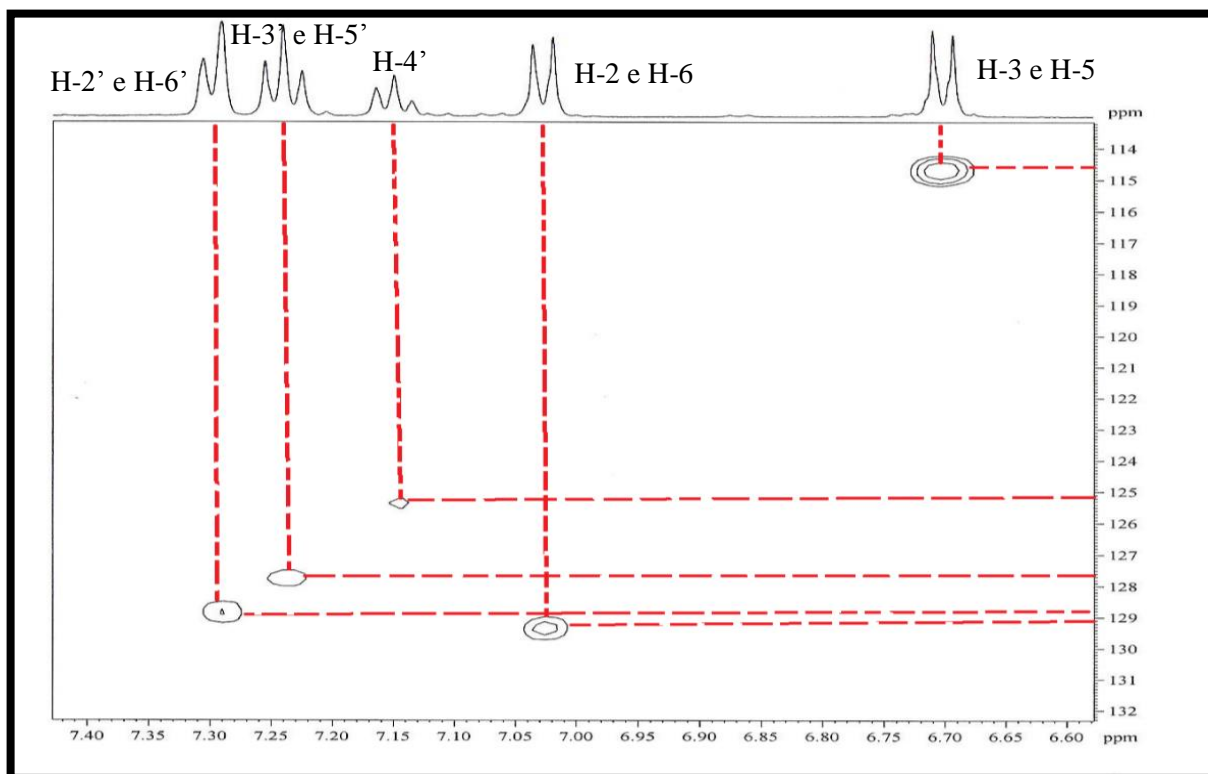
Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

B

Figura 71 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD) (A) e (B) de FU – 4.

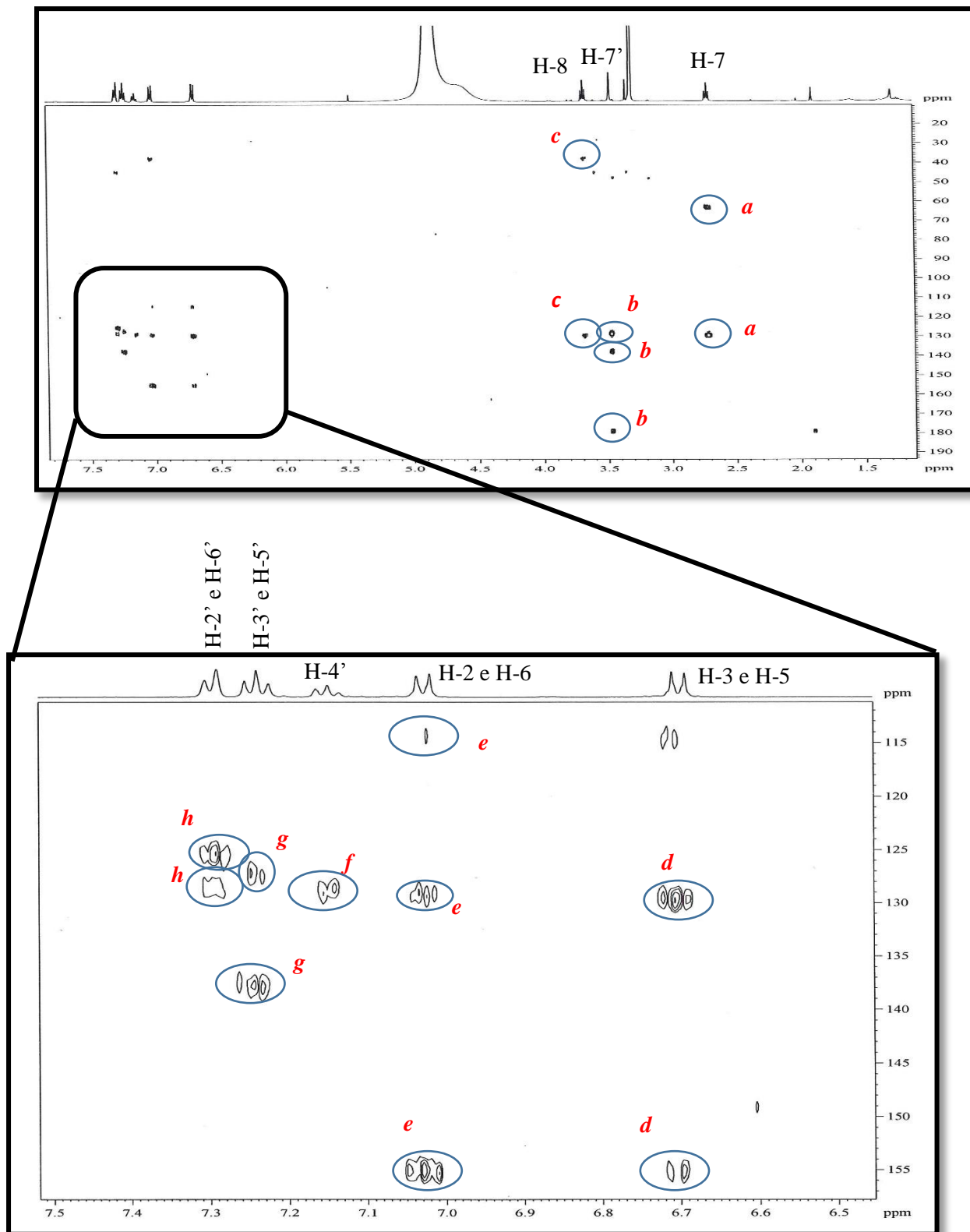


Fonte: CENAUREMN - UFC (2016). **A**



Fonte: CENAUREMN - UFC (2016). **B**

Figura 72 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de FU – 4.



Fonte: CENAUREMN - UFC (2016).

4.2.5 Determinação Estrutural de FU – 5

Sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato bruto obtido através do cultivo de UFCM0439 em meio BDL por 28 dias resultaram em 1,5 mg de uma substância resinosa de coloração marrom clara, denominada de FU-5.

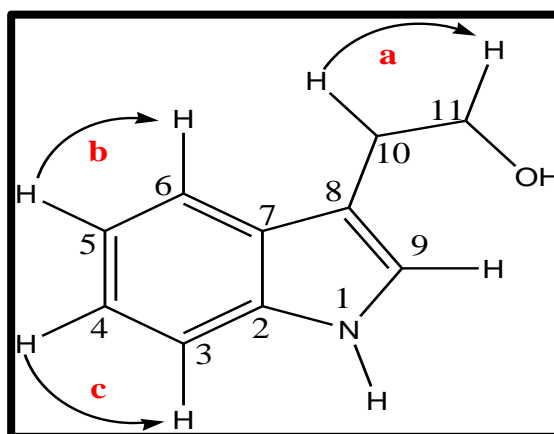
Os espectros de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) (FIGURA 77, página 118) de FU-5 permitiram verificar a presença de dois grupos metilênicos, um dos quais oxigenado em δ_{H} 3,81 (2H, t, 7,3 Hz; H-11), e um outro em δ_{H} 2,97 (2H, t, 7,3 Hz; H-10). Em adição, foram ainda observados hidrogênios de um sistema aromático 1,2-dissubstituído em δ_{H} 7,32 (1H, d, 7,7 Hz; H-3), δ_{H} 7,07 (1H, t, 7,7 Hz; H-4) em δ_{H} 6,99 (1H, t, 7,7 Hz; H-5), δ_{H} 7,53 (1H, d, 7,7 Hz; H-6), além de um hidrogênio olefínico em δ_{H} 7,07 (1H, s; H-9).

Através do espectro RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD), Figura 78 (página 119) e do DEPT 135° (FIGURA 79, página 119), foi possível inferir a presença de átomos de carbono sp^2 não-hidrogenados em δ_{C} 112,8 (C-8), δ_{C} 138,2 (C-2), e δ_{C} 129,0 (C-7), além da presença de carbonos sp^2 metínicos em δ_{C} 123,7 (C-9), δ_{C} 112,3 (C-3), δ_{C} 122,3 (C-4), δ_{C} 119,6 (C-5) e δ_{C} 119,3 (C-6). Soma-se ainda, a presença de carbonos sp^3 em δ_{C} 63,7 (C-11) e δ_{C} 29,8 (C-10).

O espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (FIGURA 80, página 120) permitiu atribuir as correlações dos carbonos a seus respectivos hidrogênios, de acordo com a Tabela 18, página 116.

A análise do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (FIGURA 81, página 120) mostrou acoplamentos vicinais entre os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,97 (H-10) e δ_{H} 3,81 (H-11), entre o hidrogênio em δ_{H} 6,99 (H-5) com os hidrogênios em δ_{H} 7,53 (H-6), e entre os hidrogênios em δ_{H} 7,32 (H-3) e δ_{H} 7,07 (H-4), como ilustra a Figura 73.

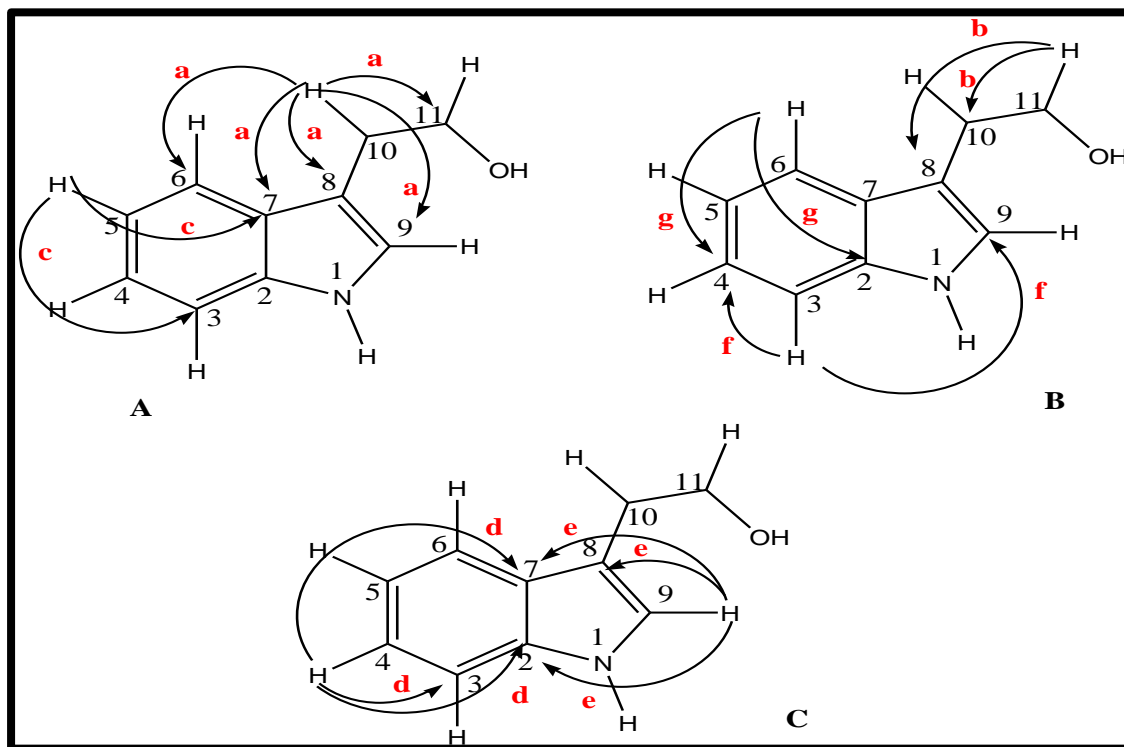
Figura 73 - Representação das correlações homonucleares ^1H , ^1H observadas no espectro COSY.



Fonte: Autora (2016).

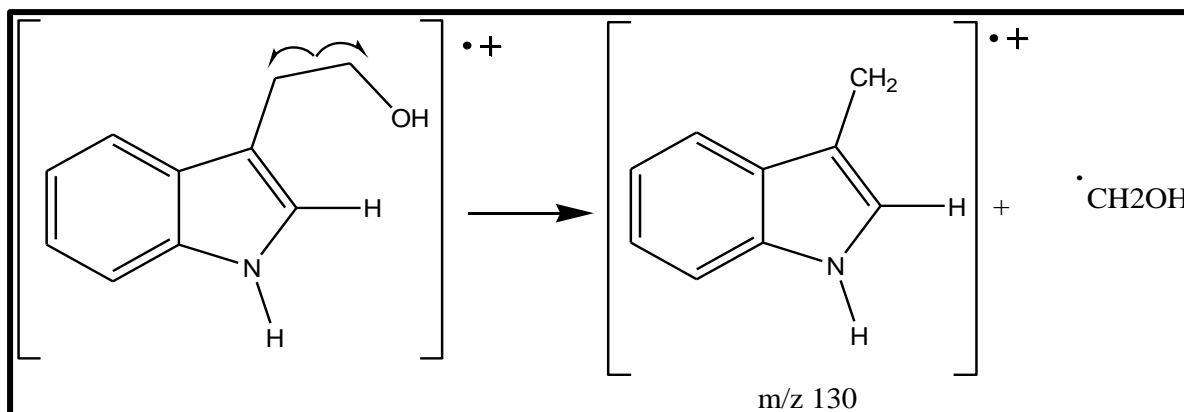
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear à longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC (FIGURA 82, página 121) permitiu inferir os acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 3,81 (H-11) com o carbono em δ_{C} 112,8 (C-8) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e com δ_{C} 29,8 (C-10) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$). Também se verifica a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 7,07 (H-9) com o carbono em δ_{C} 112,8 (C-8) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e com os carbonos em δ_{C} 138,2 (C-2) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 129,0 (C-7) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$). O hidrogênio em δ_{H} 7,32 (H-3) mostrou correlação com o carbono em δ_{C} 122,3 (C-4) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e com o carbono em δ_{C} 123,7 (C-9) ($^4\text{J}_{\text{CH}}$). Já o hidrogênio em δ_{H} 6,99 (H-5) mostrou correlações com os carbonos em δ_{C} 129,0 (C-7) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e δ_{C} 112,3 (C-3) ($^3\text{J}_{\text{CH}}$). Ainda se verifica a correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 7,07 (H-4) e 7,53 (H-6) com o carbono em δ_{C} 138,2 (C-2) ($^2\text{J}_{\text{CH}}$). A Figura 74 ilustra estas e outras correlações.

Figura 74 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância-HMBC de FU-5.



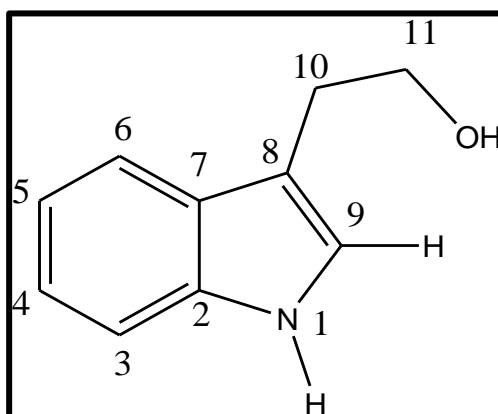
Fonte: Autora (2016).

A análise do espectro de massa de FU-5 (FIGURA 83, página 122) revelou um pico com m/z 161, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$, tendo o índice de deficiência de hidrogênio igual a 6. Um pico base com m/z 130 foi justificado de acordo com o esquema abaixo (FIGURA 75).

Figura 75 - Proposta para a formação do cátion com m/z 130.

Fonte: Autora (2016).

A reunião dos dados discutidos permitiu inferir que FU-5 trata-se do triptofol (FIGURA 76). Há relatos do isolamento deste composto através do cultivo dos fungos *Aspergillus niger*, *Balansia epichloe*, *Dreschlera nodulosum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ceratocystis spp.*, *Rhizobium spp.*, bem como de esponja marinha *Ircinia spinulosa*. A literatura reporta que o triptofol apresenta atividade antibacteriana contra *Candida albicans* e bactérias gram-positivas (ELLEUCH *et al.*, 2010).

Figura 76 - Estrutura química do triptofol, FU-5 isolado de *F. udum*.

Fonte: Autora (2016).

Tabela 17 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-5 com dados da literatura obtidos para o triptofol (KÖHLING *et al.*, 2003).

Carbono	FU-5 (CD ₃ OD, 300 MHz)		Triptofol (CDCl ₃ , 500 MHz) (KÖHLING <i>et al.</i> , 2003)	
	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)
1	----	-	8,19 (NH)	---
2	----	138,2 (C)	-	136,4 (C)
3	7,32 d (7,7)	112,3 (CH)	7,34 d (8,0)	111,2 (CH)
4	7,07 t (7,7)	122,3 (CH)	7,03 s	122,1 (CH)
5	6,99 t (7,7)	119,6 (CH)	7,15 dd (7,5; 8,0)	119,4 (CH)
6	7,53 d (7,7)	119,3 (CH)	7,21 dd (7,5; 8,0)	118,7 (CH)
7	----	129,0 (C)	----	127,4 (C)
8	----	112,8 (C)	----	112,1 (C)
9	7,07 s	123,7 (CH)	7,03 s	122,5 (CH)
10	2,97 t (7,3)	29,8 (CH ₂)	3,04 dd (6,5)	28,7 (CH ₂)
11	3,81 t (7,3)	63,8 (CH ₂)	3,90 dd (6,5)	62,5 (CH ₂)
12	---	---	1,77 bs	---

Legenda: d=dubleteo; t=tripleto; s=singleteo; dd=dubleteo de dubleteo.

Fonte: Autora (2016); Köhling *et al.* (2003).

Tabela 18 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HSQC e ^{13}C - HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-5 (CD₃OD, 75 x 300MHz).

Posição	FU-5 HSQC		FU-5 HMBC		
	δ_{C}	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$	$^4\text{J CH}$
2	138,2 (C)	-	H-9; 2H-10	H-4; H-9;H-6	-
3	112,3 (CH)	7,32 d (7,7)	H-4	H-5	-
4	122,3 (CH)	7,07 t (7,7)	H-3	H-6	-
5	119,6 (CH)	6,99 t (7,7)	-	-	-
6	119,3 (CH)	7,5 d (7,7)	-	-	H-10
7	129,0 (C)	-	-	H-5; H-9; H-10	H-4

Continua...

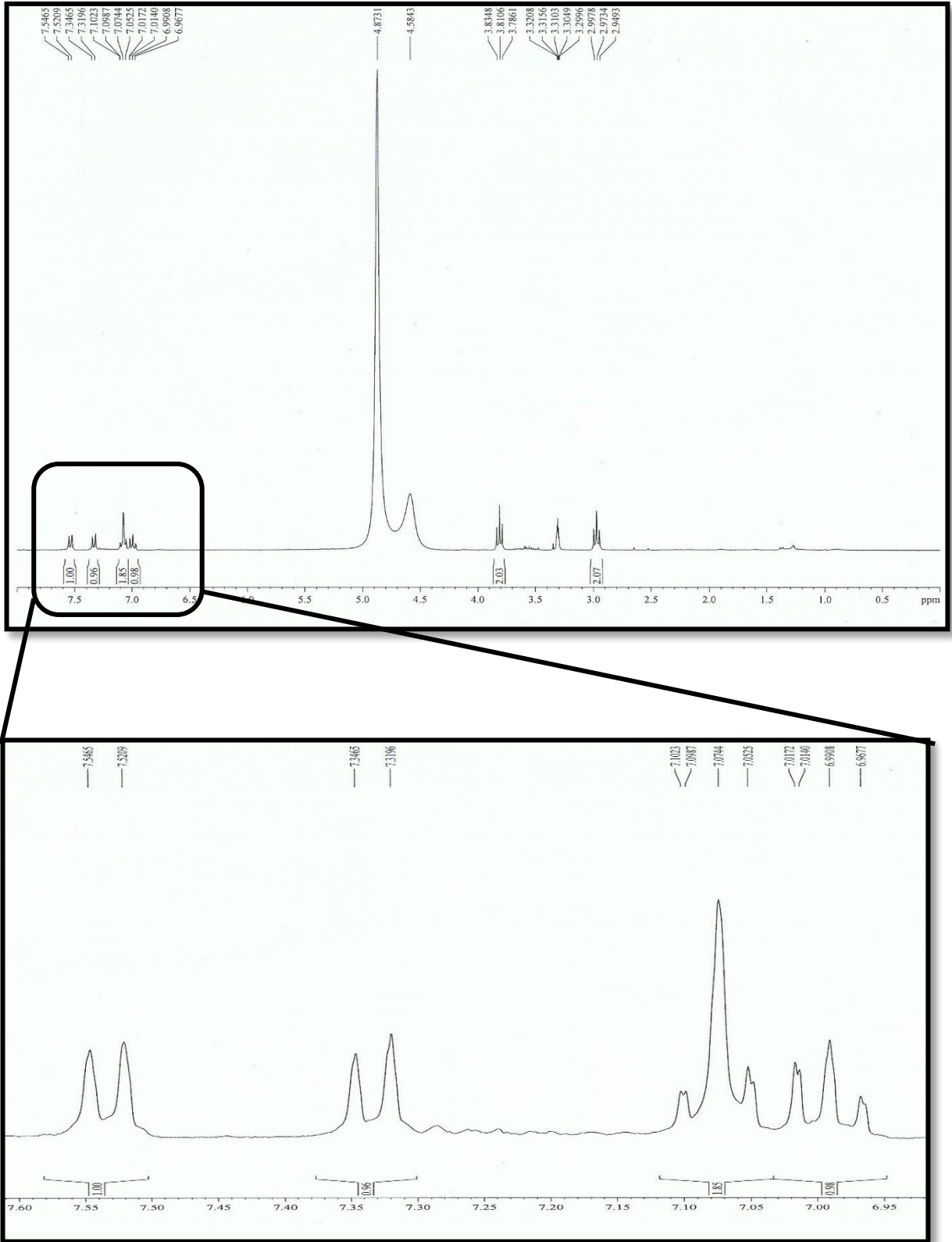
Tabela 18 – Continuação

8	112,8 (C)	-	H-9; H-10	H-11	-
9	123,7 (CH)	7,07 s	-	H-10	H-3
10	29,8 (CH ₂)	2,97 t (7,3)	2H-11	-	-
11	63,8 (CH ₂)	3,81 t (7,3)	2H-10	-	-

Legenda: d=dubleteo; t=tripleteo; s=singleteo.

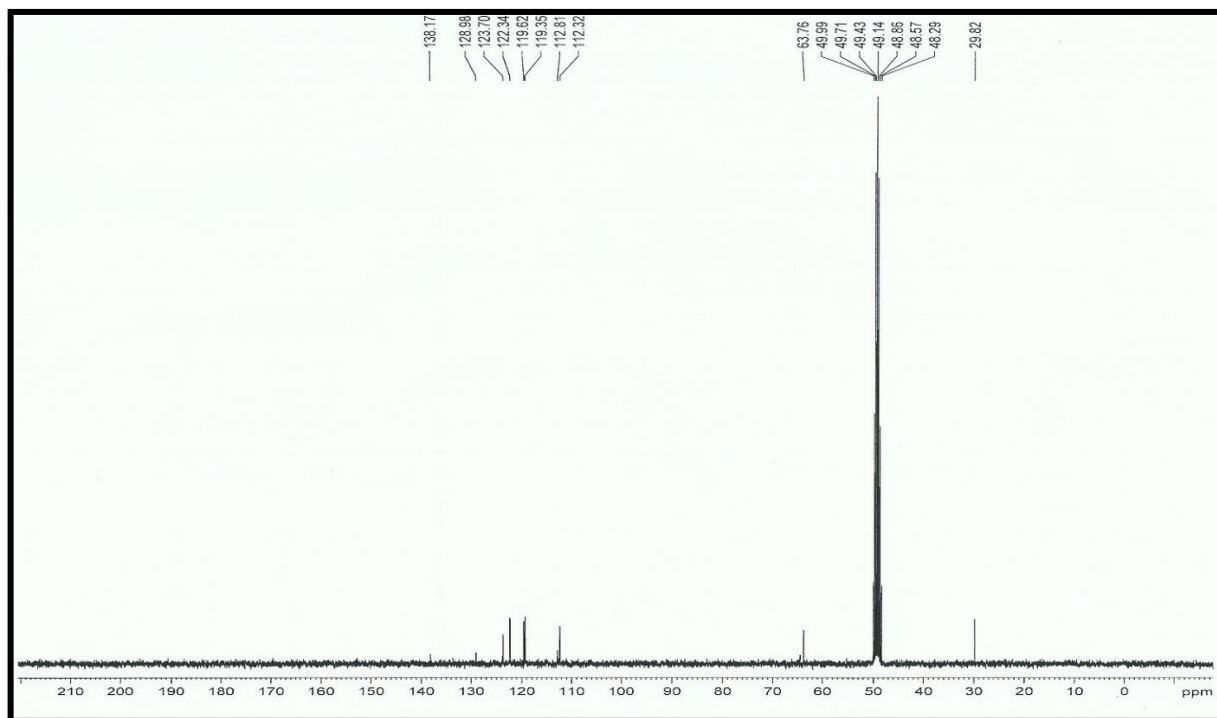
Fonte: Autora (2016).

Figura 77 - Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) de FU-5.



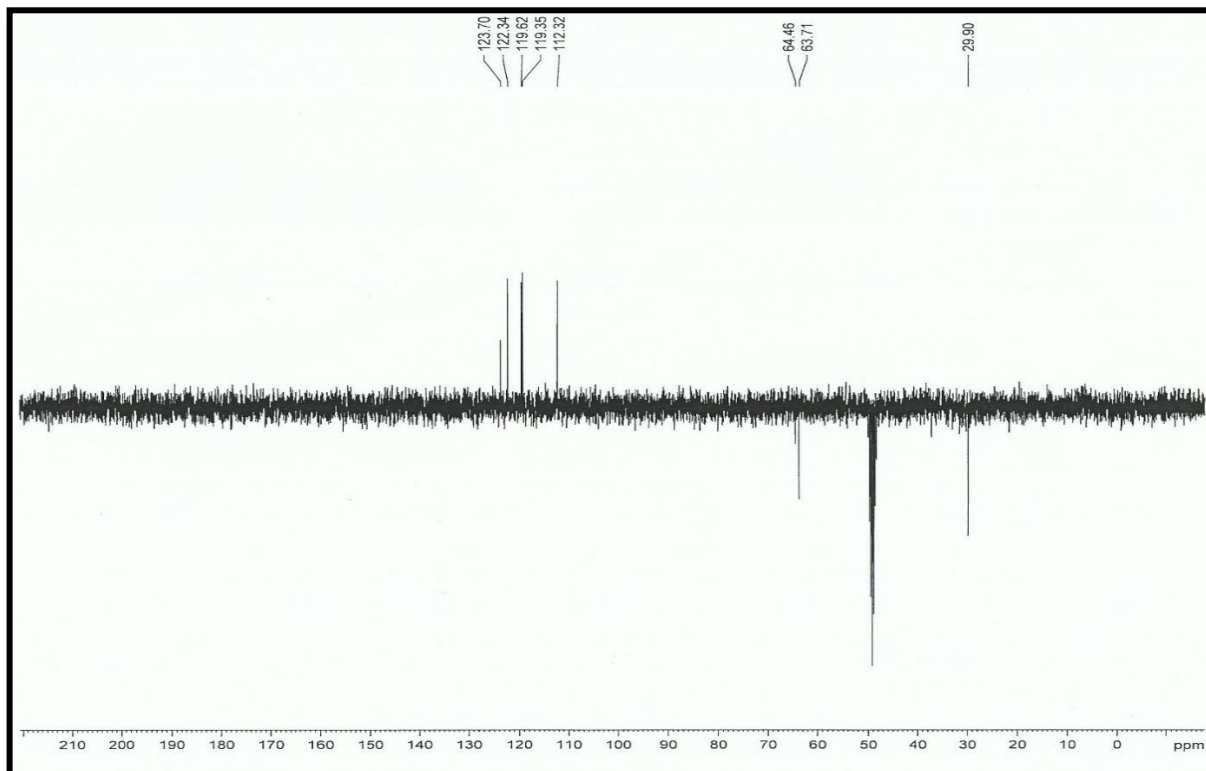
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 78 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de FU-5.



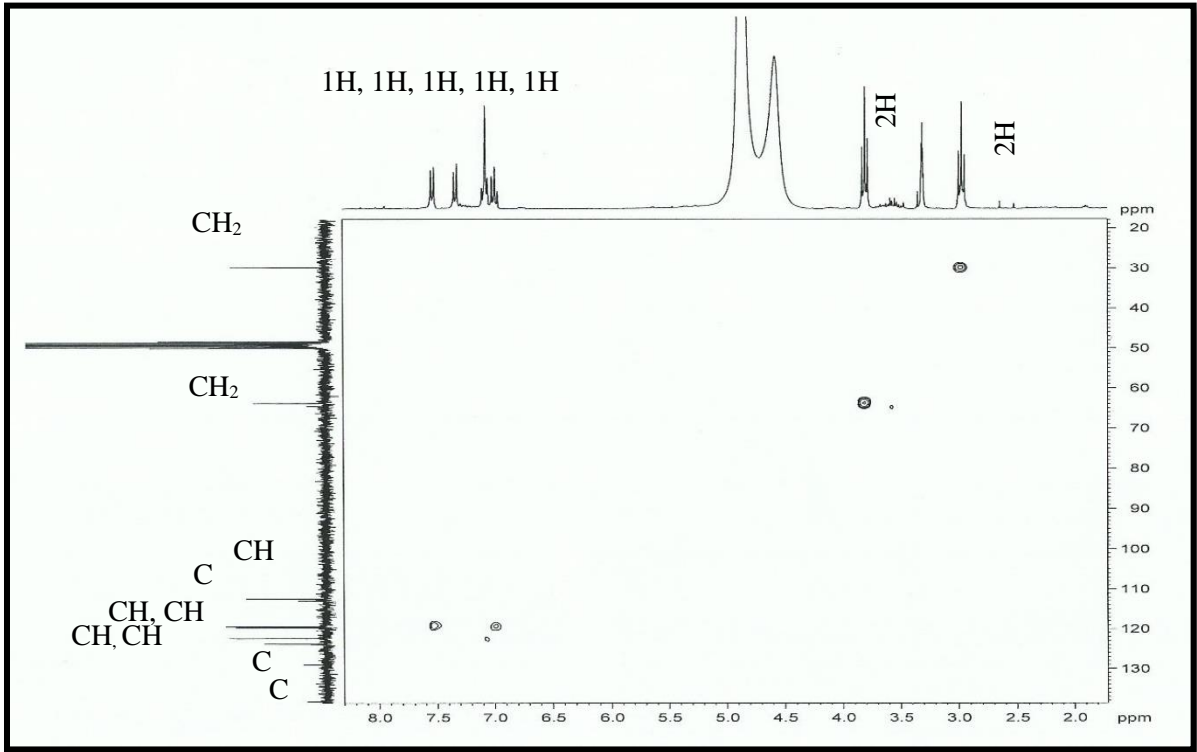
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 79 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (75MHz, CD_3OD) de FU-5.



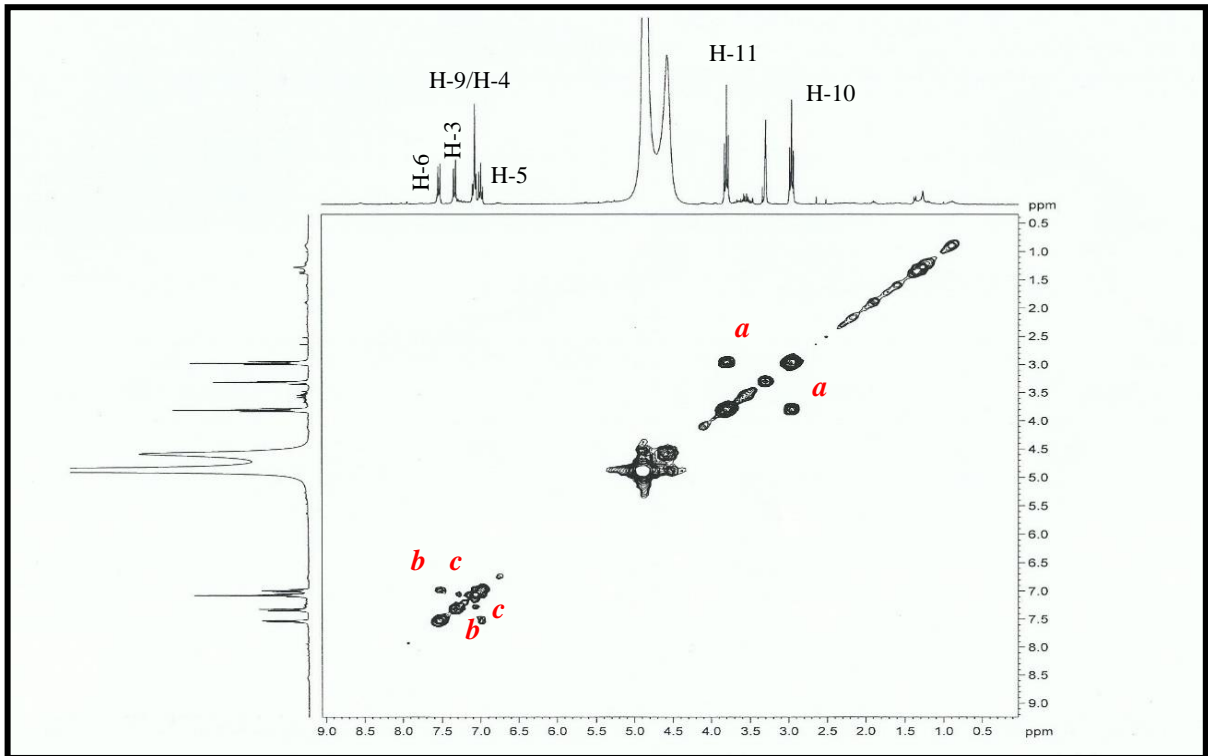
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 80 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 5.



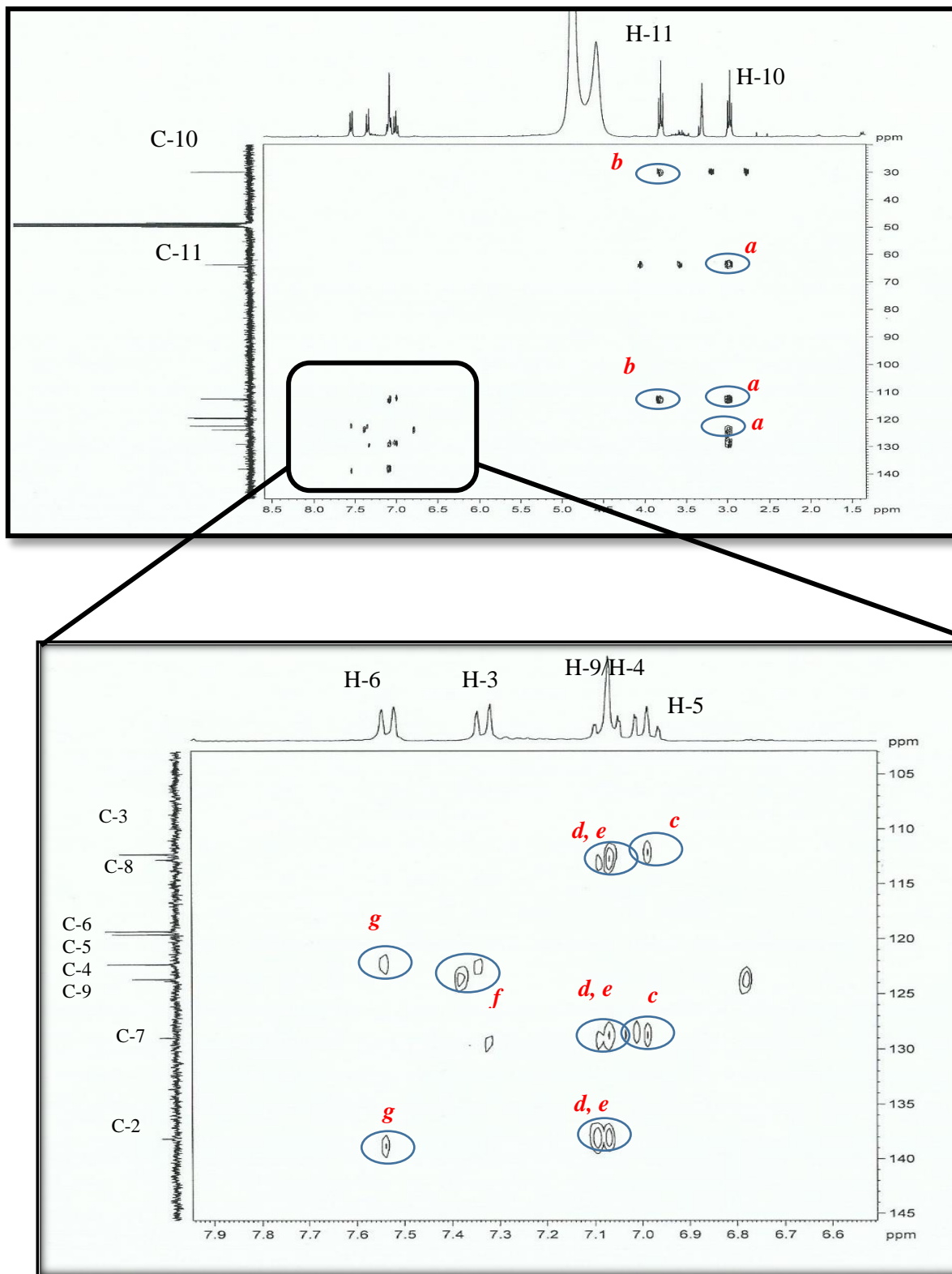
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 81 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (a) e (b) (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 5.

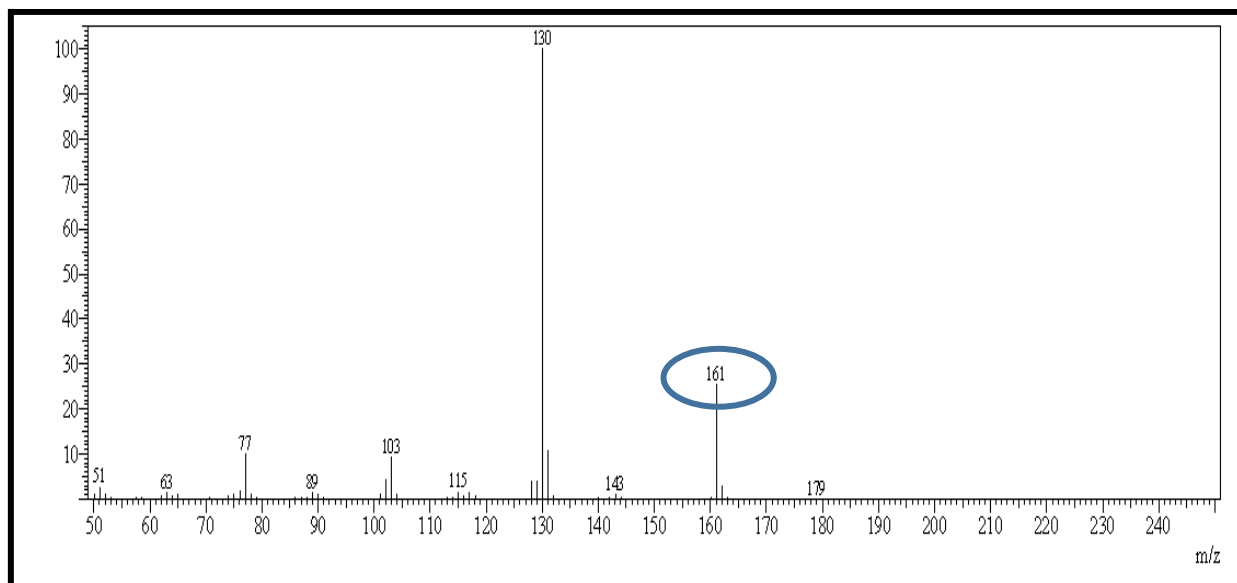


Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 82 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de FU – 5.



Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 83 - Espectro de massa de FU-5 (IE, 70 eV).

Fonte: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC (DQOI/UFC).

4.2.6 Determinação Estrutural de FU-6

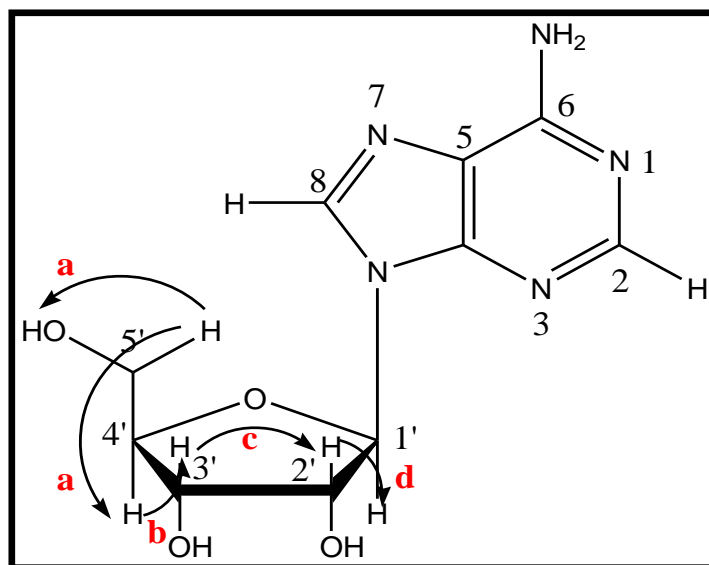
Através do estudo do extrato micelial oriundo do cultivo de UFCM0439 em meio BDL por um período de incubação de 28 dias e de sucessivos tratamentos cromatográficos, foi possível a obtenção de 4,3 mg de uma substância sólida de coloração branca, denominada de FU-6.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (FIGURA 87, página 128) de FU-6 permitiu a observação das absorções em δ_{H} 8,34 (1H, s; H-8) e δ_{H} 8,13 (1H, s; H-2), além de sinais intensos em δ_{H} 7,32 (2H, s; H), δ_{H} 5,90 (1H, d, 6,15 Hz; H-1') e hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 5,50 (1H, sL; H-5' OH) e δ_{H} 5,45 (1H, sL; H-2' OH). Um singleto largo e de baixa intensidade foi observado na região de δ_{H} 5,25 (1H, sL; H-3' OH), provavelmente pertencente a uma hidroxila. Em adição, absorções relativas a grupos metínicos foram observadas em δ_{H} 4,60 (1H, t, 5,5 Hz; H-2'), δ_{H} 4,14 (1H, t, 3,3 Hz; H-3') e δ_{H} 3,96 (1H, t, 3,2 Hz; H-4'), além de absorções referentes a hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,67 (1H, d, 10,6 Hz; H-5') e δ_{H} 3,56 (1H, d, 12,4 Hz; H-5').

De acordo com as informações obtidas através da análise do espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 88, página 128) e DEPT 135° (125 MHz, DMSO- d_6) (FIGURA 89, página 129), foram observadas dez linhas espectrais, sendo 5 delas atribuídas a carbonos do tipo sp^3 em δ_{C} 61,6 (C-5') atribuído a carbono metilênico oxigenado, δ_{C} 70,6 (C-3') e δ_{C} 73,5 (C-2') atribuídos a carbonos metínicos oxigenados, δ_{C} 85,8 (C-4') e δ_{C} 87,9 (C-1') relativos a carbonos metínicos, além de 5 sinais observados em região de carbono sp^2 em δ_{C} 119,3 (C-5), δ_{C} 139,8 (C-8), δ_{C} 149,1 (C-4), δ_{C} 152,3 (C-2) e δ_{C} 156,1 (C-6). Estes dados, em adição às informações fornecidas pelo espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - HSQC (500 MHz x 125 MHz, DMSO- d_6) permitiram atribuir inequivocamente o padrão de hidrogenação de todos os átomos de carbono.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (FIGURA 91, página 130) mostrou acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,56 (H-5') com o hidrogênio da hidroxila δ_{H} 5,45 (OH-5'). Também foi possível verificar a correlação vicinal entre os hidrogênios δ_{H} 4,60 (H-2') e δ_{H} 5,90 (H-1'), além da correlação δ_{H} 3,67 (H-5') e δ_{H} 3,96 (H-4'), sendo que este último também mostrou correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 4,14 (H-3') que, por sua vez, também acopla com o δ_{H} 4,60 (H-2') (FIGURA 84).

Figura 84 - Representação das correlações homonucleares $^1\text{H}, ^1\text{H}$ observadas no espectro COSY.

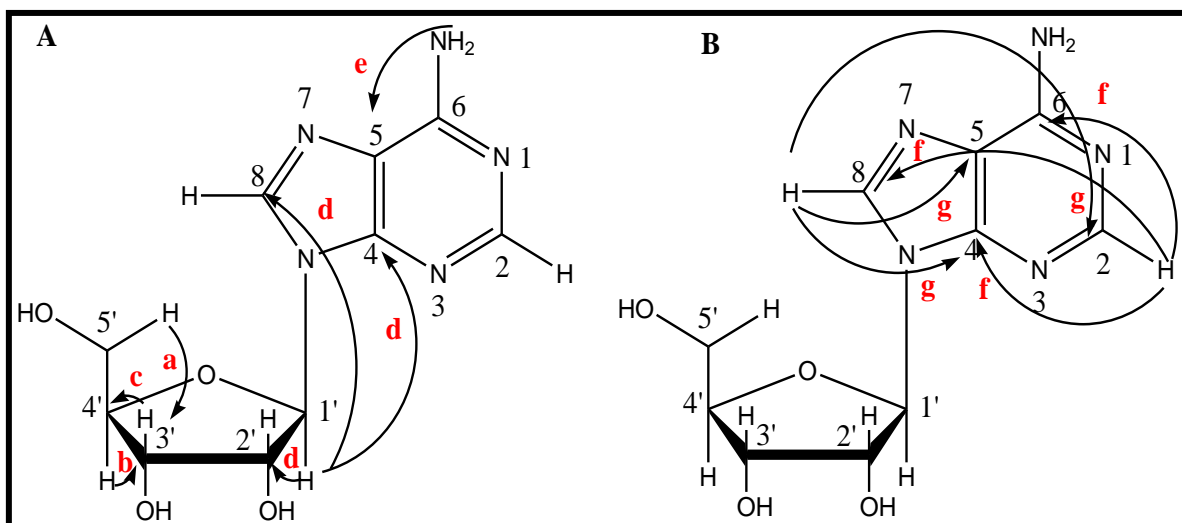


Fonte: Autora (2017).

As análises do espectro bidimensional de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - HMBC (500 MHz x 125 MHz, DMSO- d_6) (FIGURA 92, página 131) possibilitou inferir acoplamentos entre os hidrogênios δ_{H} 3,67 (H-5') e δ_{H} 3,56 (H-5') com o carbono em δ_{C} 70,6 (C-3') ($^3J_{\text{CH}}$). Também foram observados acoplamentos entre o hidrogênio δ_{H} 4,14 (H-3') com o carbono em δ_{C} 85,8 (C-4') ($^2J_{\text{CH}}$) além da recíproca correlação do hidrogênio deste carbono em δ_{H} 3,96 (H-4') com o carbono em δ_{C} 70,6 (C-3') ($^2J_{\text{CH}}$). Verificou-se ainda, a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 5,90 (H-1') e o carbono em δ_{C} 73,5 (C-2') ($^2J_{\text{CH}}$). Este hidrogênio mostrou, ainda, correlações com os carbonos em δ_{C} 139,8 (C-8) ($^3J_{\text{CH}}$) e δ_{C} 149,1 (C-4) ($^3J_{\text{CH}}$). O par de hidrogênios da porção amina em δ_{H} 7,32 (H-6') mostrou correlação com o carbono em δ_{C} 119,3 (C-5) ($^3J_{\text{CH}}$), como pode ser verificado na Figura 85, estrutura A.

Outras correlações também foram observadas na porção nucleotídica da molécula, como acoplamentos entre o hidrogênio em δ_{H} 8,34 (H-8) e os carbonos em δ_{C} 119,3 (C-5) ($^3J_{\text{CH}}$) e δ_{C} 149,1 (C-4) ($^3J_{\text{CH}}$). O hidrogênio em δ_{H} 8,13 (H-2) apresentou correlações com os carbonos em δ_{C} 156,1 (C-6) e δ_{C} 149,1 (C-4) ($^2J_{\text{CH}}$). Outras correlações foram observadas e podem ser verificadas na Figura 85, estrutura B.

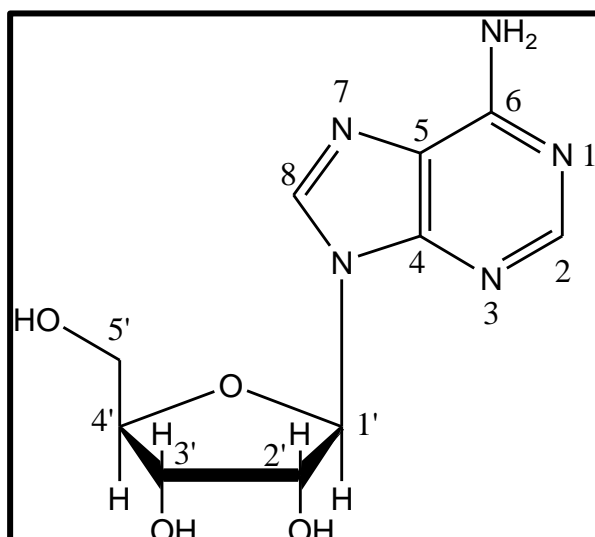
Figura 85 - Representação dos acoplamentos heteronucleares ^1H , ^{13}C a longa distância-HMBC de FU-6.



Fonte: Autora (2017).

A reunião dos dados espectroscópicos obtidos permitiu inferir, inequivocamente, a estrutura para FU-6 e corroborar que se trata do nucleosídeo adenosina (FIGURA 86). Há relatos na literatura de seu isolamento do cordado marinho *Eudistoma laysani* (ABOU-HUSSEIN *et al.*, 2007).

Figura 86 - Estrutura química da adenosina, FU-6 isolada de *F. udum*.



Fonte: Autora (2017).

Tabela 19 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de FU-6 com dados da literatura obtidos para a adenosina (ABOU-HUSSEIN *et al.*, 2007).

Posição	FU-6 (DMSO-d ₆ , 500 MHz)		Adenosina (DMSO-d ₆ , 400 MHz) (ABOU-HUSSEIN <i>et al.</i> , 2007).	
	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)	δ_{H} , mult. e <i>J</i> em Hz	δ_{C} (padrão de hidrogenação)
1 – N	----	----	----	----
2	8,13 s	152,3 (CH)	8,12 s	152,3 (CH)
3	----	----	----	----
4	----	149,1 (C)	----	149,0 (C)
5	----	119,3 (C)	----	119,2 (C)
6-NH ₂	7,32 s	156,1 (C)	7,31 s	156,1 (C)
8	8,34 s	139,8 (CH)	8,33 s	139,8 (CH)
1'	5,90 d (6,15)	87,9 (CH)	5,88 d (7,2)	87,8 (CH)
2'	4,60 t (5,5)	73,5 (CH)	4,60 q (5,3)	73,4 (CH)
2' -OH	5,45 sL	----	5,46 d (7,0)	----
3'	4,14 t (3,3)	70,6 (CH)	4,13 br d (3,1)	70,5 (CH)
3' -OH	5,25 sL	----	5,20 br d (3,9)	----
4'	3,96 t (3,2)	85,8 (CH)	3,94 q (3,1)	85,8 (CH)
5'	3,67 d (10,6)	61,6 (CH ₂)	3,58 m	61,6 (CH ₂)
	3,56 d (12,4)		3,67 m	
5' -OH	5,50 sL	----	5,42 t (4,5)	---

Legenda: s=singleteo; d=dubleteo; sL=singleteo largo; m=multipleteo; t=tripleto; q=quarteto.

Fonte: Autora (2017); Abou-Hussein *et al.* (2007).

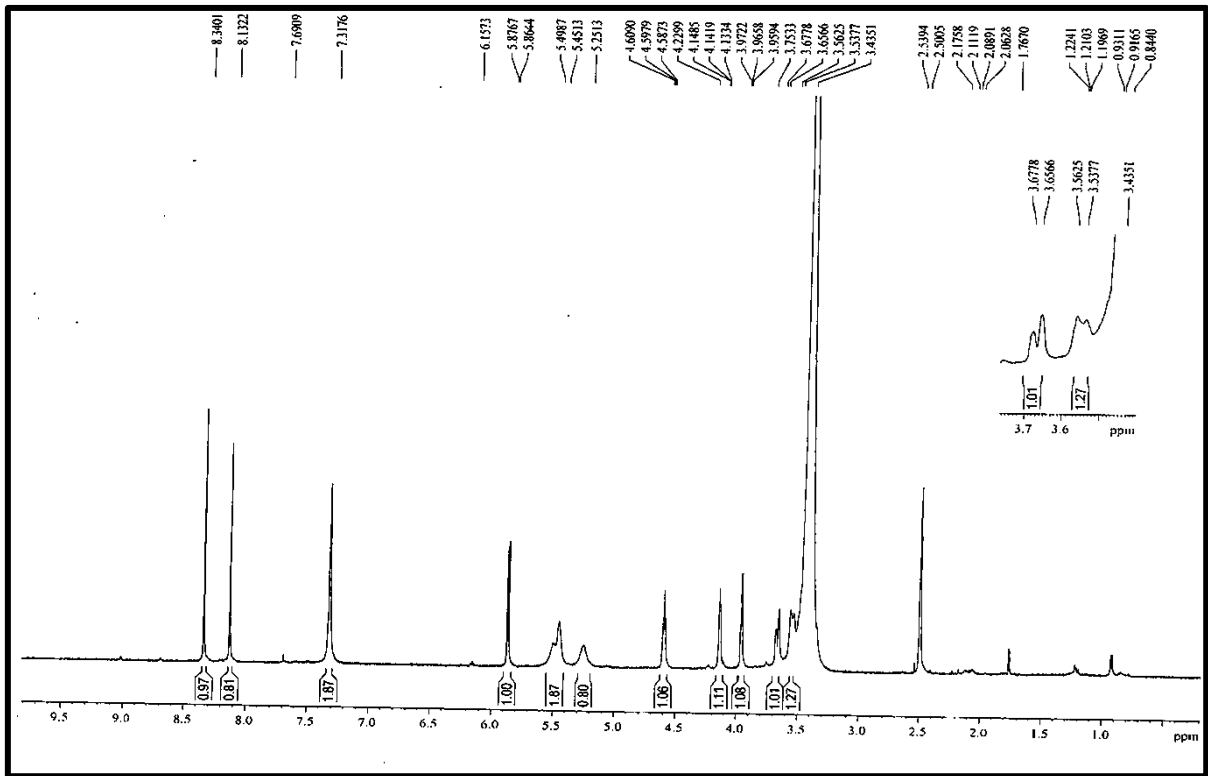
Tabela 20 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações heteronucleares ^1H , ^{13}C - HSQC e ^{13}C - HMBC ^nJ (n=2; 3 ou 4) de FU-6 (DMSO-d₆, 125 x 500MHz).

Posição	FU-6 HSQC		FU-6 HMBC		
	δ_{C}	δ_{H} , mult. e J em Hz	$^2\text{J CH}$	$^3\text{J CH}$	$^4\text{J CH}$
1 – N	----	----	----	----	----
2	152,3 (CH)	8,13 s	----	----	----
3	----	----	----	----	----
4	149,1 (C)	----	----	H-1'; H-2; H-8	----
5	119,3 (C)	----	----	H-6 (NH ₂); H-8	----
6-NH ₂	156,1 (C)	7,32 s	----	H-2	----
8	139,8 (CH)	8,34 s	----	H-1'	----
1'	87,9 (CH)	5,90 d (6,15)	----	----	----
2'	73,5 (CH)	4,60 t (5,5)	H-1'	----	----
2' -OH	----	5,45 sL	----	----	----
3'	70,6 (CH)	4,14 t (3,3)	H-4'	H-5'	----
3' -OH	----	5,25 sL	----	----	----
4'	85,8 (CH)	3,96 t (3,2)	H-3	----	----
5'	61,6 (CH ₂)	3,67 d (10,6) 3,56 d (12,4)	----	----	----
5' -OH	----	5,50 sL	----	----	----

Legenda: s=singleteo; d=dupleteo; sL=singleteo largo; t=tripleto.

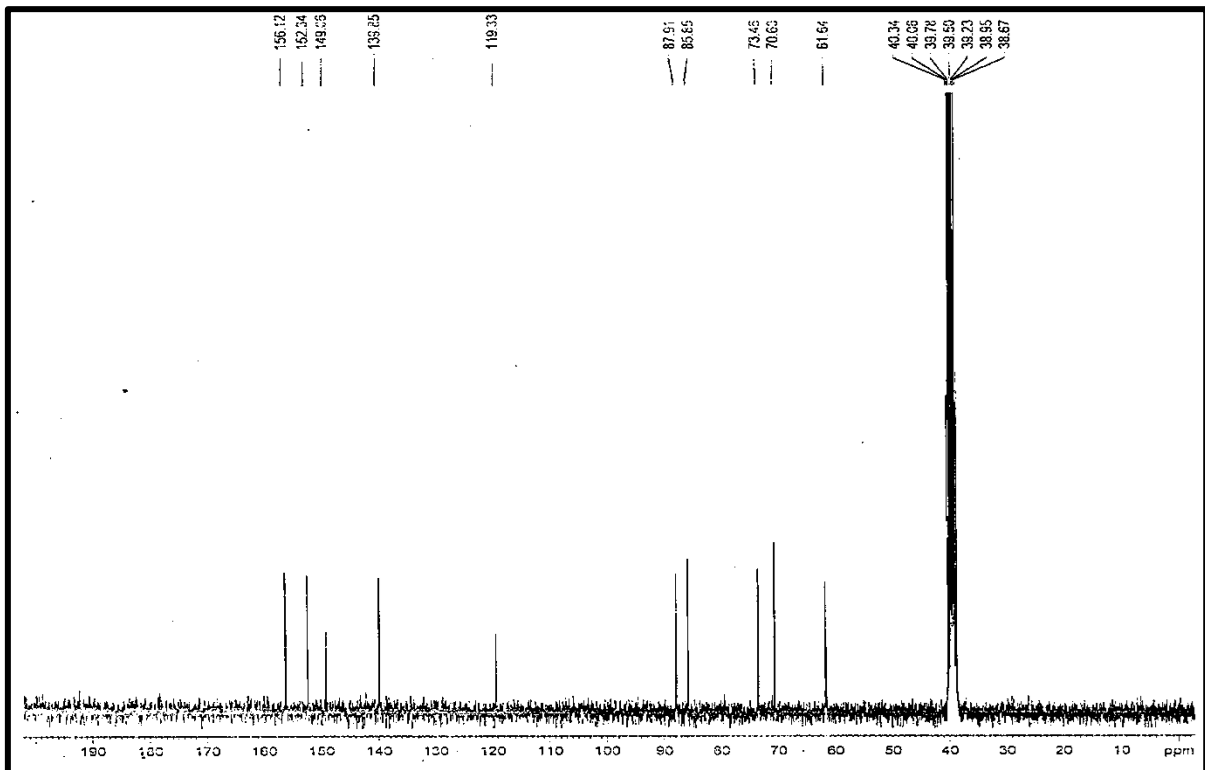
Fonte: Autora (2017).

Figura 87 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO) de FU-6.



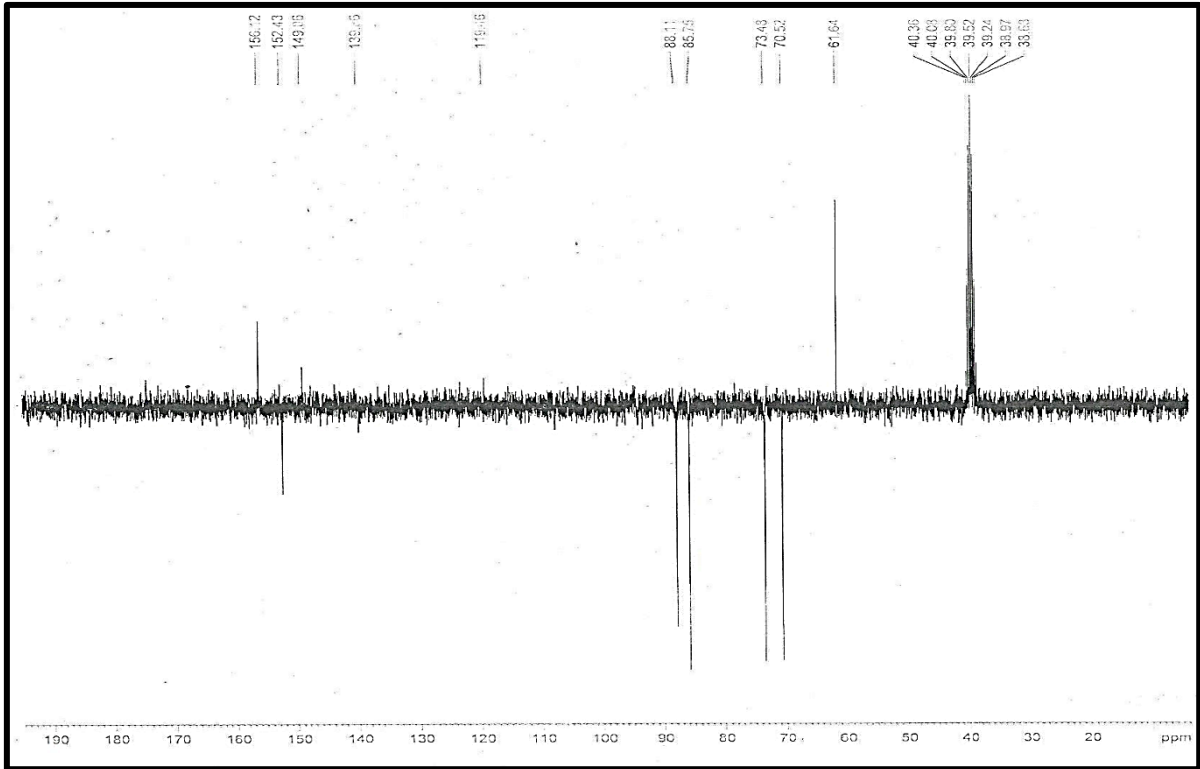
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 88 - Espectro de RMN ¹³C (125MHz, DMSO) de FU-6.



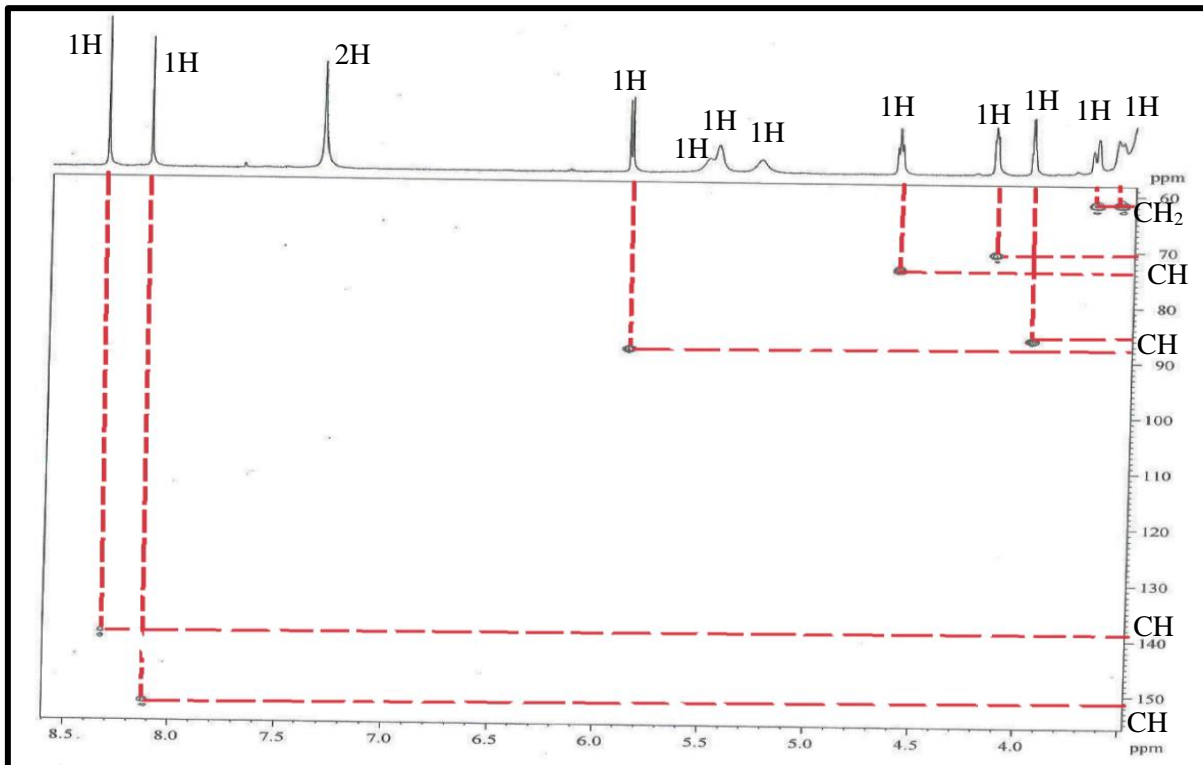
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 89 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125MHz, DMSO) de FU-6.



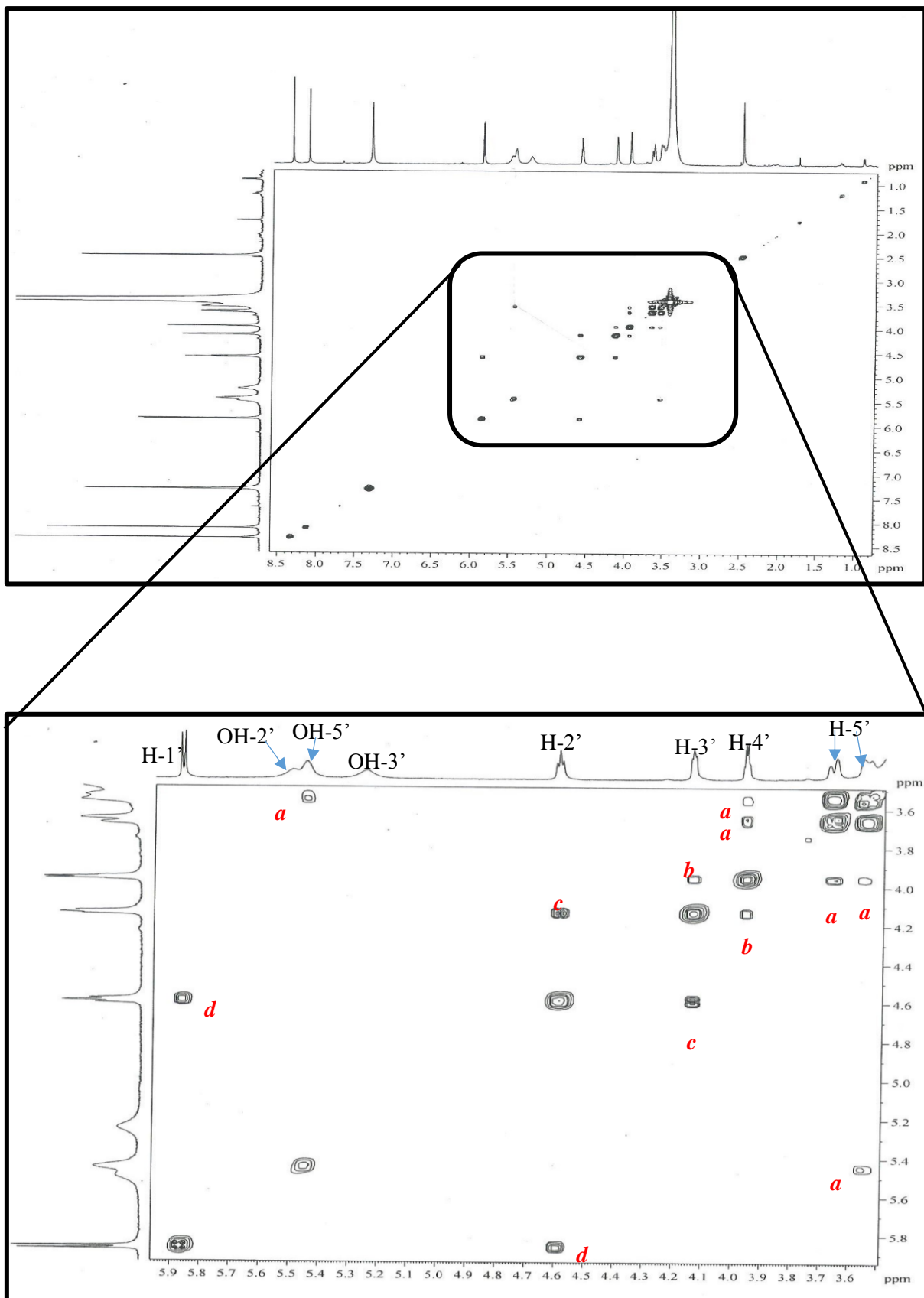
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 90 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (500 x 125 MHz, DMSO) de FU – 6.



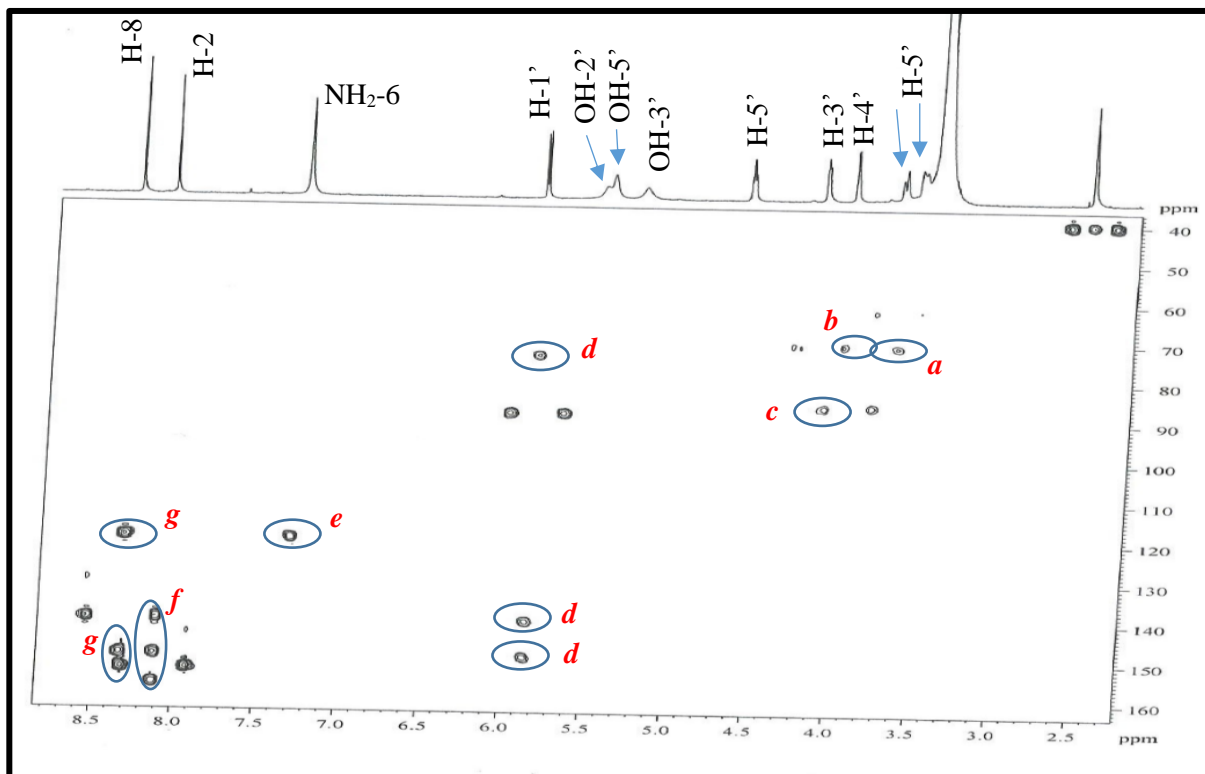
Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 91 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (a) e (b) (500 x 125 MHz, DMSO) de FU – 6.



Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

Figura 92 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 125 MHz, DMSO) de FU – 6.



Fonte: CENAUREMN – UFC (2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção química de *F. udum* foi realizada através de dois estudos objetivando-se verificar qual meio de cultivo e período de incubação mais promissores para a obtenção de maior diversidade de metabólitos secundários através da análise por CCDA e CLAE.

Foram utilizados os meios MPD (malte, peptona e dextrose), BD (batata, dextrose), BDL (batata, dextrose e extrato de levedura) e Czapek (Glicose, NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, KCl, FeSO₄.7H₂O), onde o fungo foi mantido inoculado até zerada a taxa de glicose do meio. Verificou-se inicialmente um maior rendimento para o cultivo em meio MPD por 25 dias (285,2 mg) sendo o seu extrato AcOEt selecionado preliminarmente para estudo.

No outro estudo, o micro-organismo permaneceu inoculado por 7, 14, 21 e 28 dias nos quatros diferentes meios de cultivo, sendo verificada, a cada período, a diversidade de metabólitos presentes. Através deste estudo, verificou-se que o extrato AcOEt oriundo do cultivo em BDL por 28 dias foi o mais promissor sendo, então, selecionado para o estudo de seus constituintes químicos. O micélio obtido através deste cultivo foi extraído com MeOH e a fase AcOEt foi analisada.

Sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato AcOEt oriundo do cultivo de *F. udum* em meio MPD-25 dias forneceu três compostos: tirosol (FU-1), ácido fusárico (FU-2) e monaspilosina (FU-4). Por outro lado, o tratamento cromatográfico do extrato AcOEt do meio BDL-28 dias forneceu os compostos ciclo (L-Pro-L-Leu) (FU-3) e triptofol (FU-5). A partir do estudo do extrato AcOEt do respectivo micélio, foi obtido o composto adenosina (FU-6).

O potencial químico de fungos endofíticos apresenta-se como uma fonte ainda pouco explorada, o que justifica os estudos realizados, assim como a sua continuidade. O estudo com cepas de *F. udum* caracteriza-se como inédito na literatura, desta forma, todos os compostos obtidos contribuem para o conhecimento químico do gênero *Fusarium*.

REFERÊNCIAS

- ABOU-HUSSEIN, D. R.; BADR, J.; YOUSSEF, D. Nucleoside constituents of the egyptian tunicate *Eudistoma laysani*. **Natural Product Sciences**, v. 13, n. 3, p. 229–233, 2007.
- ALTOMARE, C.; PERRONE, G.; ZONNO, M. C.; et al. Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. **Journal Natural Products**, p. 1131–1135, 2000.
- ANDRADE, M. DOS S. **Estudo químico em patógenos e vetores de doenças de citros: *Xylella fastidiosa* e *Diaphorina citri***. 2011. 265 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039–4043, 1996.
- BOEIRA, S. P. **Caracterização de Efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Itaqui, 2012.
- BROWN, D. W.; PROCTOR, R. H. ***Fusarium*. Genomics, molecular and cellular biology**. 2013.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 20, n. 1–2, p. 1–6, 1963.
- CORDEIRO, Z. J. M. **Cultivo da Banana para o Pólo Petrolina Juazeiro**. Brasília, 2003. Circular Técnica. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/doencas.htm#fungica>>. Acesso em: 05 jun. 2016.
- CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 176 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013.
- CHENG, M.-J.; WU, M.-D.; CHEN, I.-S.; YUAN, G.-F. Secondary metabolites from the mycelia of the fungus *Monascus pilosus* BCRC 38072. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 1205–1210, 2008.
- CORLEY, D. G.; ROTTINGHAUS, G. E.; TEMPESTA, M. S. Novel trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides*. **Tetrahedron Letters**, , n. 4, p. 427–430, 1986.
- CORLEY, D. G.; ROTTINGHAUS, G. E.; TEMPESTA, M. S. Secondary metabolites from *Fusarium*. Two new modified trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides* MC-72083.

Journal of Natural Products, v. 50, n. 5, p. 897–902, 1987.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DAMACENO, Lucas Vieira. **Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Fusarium verticillioides***. 2011. Disponível em: <<http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2011/12/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo.html>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

DAVID, A.; GREENHALGH, R.; BLACKWELL, B. A.; et al. Some Minor secondary metabolites of *Fusarium sporotrichioides* DAOM. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, p. 1978–1984, 1990.

DEVNARAIN, N.; TILOKE, C.; NAGIAH, S.; CHUTURGOON, A. A. Fusaric acid induces oxidative stress and apoptosis in human cancerous oesophageal SNO cells. **Toxicon**, v. 126, p. 4–11, 2017.

DINIZ, S. P. S. DE S. **Micotoxinas**, 2010. Maringá. Slides.

ELLEUCH, L.; SHAABAN, M.; SMAOUI, S.; et al. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 579–593, 2010.

FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SÁNCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against vibrio anguillarum isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299–1301, 2003.

FREIRE, F. DAS C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. 2007. 48 f. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110), Fortaleza, 2007.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; et al. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* brazilian strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1448–1453, 2005.

GHANNAM, I. A. Y.; ROAIAH, H. F.; HANNA, M. M.; EL-NAKKADY, S. S.; COX, R. J. identification, crystal structure and antitumor activity of fusaric acid from the sugarcane fungal pathogen, *Fusarium sacchari*. **International Journal Of Pharmacy & Technology**, v. 6, n. 2, p. 6528–6535, 2014.

GREENHALGH, R.; LEVANDIER, D.; ADAMS, W.; et al. Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum* (CMI 14764, HLX 1503). **Journal of agricultural and food chemistry**, n. 34, p. 98–102, 1986.

GREENHALGH, R.; FIELDER, D. A.; MORRISON, L. A.; et al. Secondary metabolites of *Fusarium* Species : apotrichothecene derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 699–705, 1989.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid czapek cultures from endophytic fungi.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 20, n. 1, p. 188–194, 2009.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M. Micotoxinas e metabólitos bioativos de *Fusarium*: perspectiva de sua importância para o Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 74–79, Mar. 1994. Londrina.

JOBIM, C. C.; GOLÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. DOS. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “ versus ” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. p. 242-261.

KARIMI, R.; OWUOCHE, J. O.; SILIM, S. N. Importance and management of *Fusarium wilt* (*Fusarium udum* Butler) of pigeonpea. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2012.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural product reports**, v. 28, p. 1208–1228, 2011.

KÖHLING, P.; SCHMIDT, A. M.; EILBRACHT, P. Tandem hydroformylation/Fischer indole synthesis: a novel and convenient approach to indoles from olefins. **Organic Letters**, v. 5, n. 18, p. 3213–3216, 2003.

KOZLOVSKY, A.; VINOKUROVA, N.; ADANIN, V. Diketopiperazine alkaloids from the fungus *Penicillium piscarium* westling. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 271–275, 2000.

LANGSETH, W.; GHEBREMESKEL, M.; KOSIAK, B.; KOLSAKER, P.; MILLER, D. Production of culmorin compounds and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* strains isolated from Norwegian., p. 23–34, 2001.

LAURIDS, J.; AKK, E.; THRANE, U.; GIESE, H.; ESBEN, T. Production of fusarielins by *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 206–211, 2013.

LAZAROTTO, M. **Identificacao e caracterizacao de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp . associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul**. 2013. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 2007.

LI, J.; SUN, W.; GUO, Z.; LU, C.; SHEN, Y. Fusaric acid modulates type three secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, n. 4, p. 455–459, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.044>>.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisinás : presença em alimentos , implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 1988, p. 181–192, 2001.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das

fumonisininas em milho e alimentos à base de milho. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 293–299, 2006.

LIU, X.; LI, H.; ZHOU, F.; WANG, R. Secondary metabolites of *Fusarium* sp., AN endophytic fungus in *Astragalus membranaceus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 6, p. 1030–1031, 2015.

MELO, M. P. D. E. **Detecção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas em grãos de milho no Nordeste do Brasil**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

MELO, M. P. D. E. **Espécies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi***, 2014. 132 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MYCOBANK DATABASE. *Fusarium*. Disponível em:
<<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=41506&Fields=All>>.

NELSON, P. E. Fumonisinins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. **Annual Review of Phytopathology**, n. 31, p. 233–252, 1993.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAÏSSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 479–504, 1994.

NESIC, K.; IVANOVIC, S.; NESIC, V. Fusarial Toxins : Secondary metabolites of *Fusarium* fungi. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 228, p. 101–120, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIEDERER, D.; TAMM, C.; ZIJRCHER, W. Nitrogen containing of *Fusarium sambucinum*. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 28, p. 3997–4000, 1992.

OTTONI, J. R. **Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e de níveis de fumonisininas em grãos ardidos de milho híbrido**. 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PARK, C. H.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; et al. Phenolic constituents of *Acorus gramineus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 8, p. 1289–1296, 2011.

PINTO, N. F. J. DE A. **Grãos Ardidos em Milho**. 2005. 6 f. Circular técnica. Embrapa, Sete Lagoas, 2005.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101–2105, 2002.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 185–190, 2000.

- SHARMA, M.; GHOSH, R.; TELANGRE, R.; et al. Environmental influences on pigeonpea-*Fusarium udum* interactions and stability of genotypes to *Fusarium wilt*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2016.
- SØRENSEN, J. L.; SONDERGAARD, T. E. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 55–60, 2014.
- SPECIAN, V.; CASAROTTI, R.; CRISTINA, A.; LÚCIO, J.; ALENCAR, J. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, n. 345, p. 345–352, 2014.
- TADPETCH, K.; CHUKONG, C.; JEANMARD, L.; et al. Cytotoxic naphthoquinone and a new succinate ester from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG227. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 106–110, 2015. Phytochemical Society of Europe.
- TAMURA, M.; MOCHIZUKI, N.; NAGATOMI, Y.; et al. Identification and quantification of fumonisin A1, A2, and A3 in corn by high-resolution liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry. **Toxins**, v. 7, n. 2, p. 582–592, 2015.
- TAPIA, C.; AMARO, J. Retrato microbiológico. **Revista chilena infectol**, v. 31, n. 1, p. 85–86, 2014.
- TATUM, J. H.; CITRUS, S.; BAKER, R. A.; BERRY, R. E.; WINTER, P. O. B. Metabolites of *Fusarium solani*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 1, p. 283–284, 1989.
- TRACY, J. K.; TEMPESTA, M. S.; CORLEY, D. G.; ROTTINGHAUS, G. E. New trichothecene mycotoxins of *Fusarium sporotrichioides*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 35, p. 4133–4136, 1986.
- TUNG, T. T.; JAKOBSEN, T. H.; DAO, T. T.; et al. Fusaric acid and analogues as gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 1011–1020, 2016.
- VIEIRA, N. C. **Estudos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*: uma exploração racional da biodiversidade molecular com potencial citotóxico e anticolinesterásico**. 2016. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011.
- ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1–18, 2007.