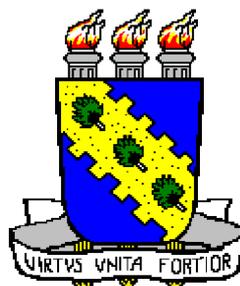


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA



Estudo Químico de *Ananas* (*A. comosus*, *A. bracteatus* e *A. lucidus*) e dos Fungos Endofíticos (*Acremonium curvulum* e *Fusarium oxysporum*) isolados de *Ananas lucidus*

ALEXANDRE CÉSAR PRAXEDES RODRIGUES

FORTALEZA - CEARÁ
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

**Estudo Químico de *Ananas* (*A. comosus*, *A. bracteatus* e
A. lucidus) e dos Fungos Endofíticos (*Acremonium*
curvulum e *Fusarium oxysporum*) isolados de *Ananas*
*lucidus***

ALEXANDRE CÉSAR PRAXEDES RODRIGUES

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação
em Química como requisito parcial para a obtenção do título de doutor

Trabalho realizado sob a orientação da Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e Coorientação do Prof. Dr. Jair Mafezoli da Universidade Federal do Ceará e do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho da Universidade Federal de São Carlos.

FORTALEZA - CEARÁ

2009

A Deus.

Aos meus Pais Raimundo e Lucinete,
aos meus Avos José Praxedes (*in
memorian*) e Francisca, José Rodrigues
e Alice (*in memorian*), à minha esposa
Jocelma, aos meus irmãos André e Ana
Paula.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, pela contribuição valorosa, atenção, compreensão, amizade e empenho em instituir um grupo de pesquisa em microrganismos, o que tornou possível à realização do trabalho.

À professora Ângela Martha, que me acolheu em seu laboratório no início do doutorado.

Aos professores da pós-graduação, os quais contribuíram na minha formação intelectual e pessoal e pelo empenho dedicado ao curso de pós-graduação.

Ao professor Edson Rodrigues Filho (Edinho) da UFScar, que me recebeu em seu laboratório e contribuiu de forma impar para o desenvolvimento deste trabalho, além da amizade.

Ao professor Raimundo Braz Filho, pela contribuição na elucidação das estruturas.

Aos funcionários da Pós-Graduação principalmente Sr. Paulo, Mundinha, Lana e Célia e Zeca pela colaboração e por tornarem o laboratório um local bastante agradável para se trabalhar.

Ao professor Jair Mafezoli, pela primordial contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais que sempre se fizeram presente na minha vida, e me deram sempre todas as oportunidades para que eu atingisse meus objetivos sempre de forma correta e digna.

À minha esposa Jocelma, que esteve sempre ao meu lado me apoiando em todos os passos ao longo do nosso caminho, e pela oportunidade de realizar sonhos ao meu lado.

À meus tios e tias que sempre me incentivaram a vencer com dignidade todos os obstáculos que a vida nos propõe.

À Luciana, operadora do laboratório de RMN da UFScar, pela grande ajuda na obtenção dos espectros.

Ao CENAUREMN e seus respectivos operadores pela obtenção dos espectros.

Aos amigos de laboratório e bancada, Gabriel, Nathalia, Ernani, Bartholomeu, Doquinha, Fátima, Gisele, Rosa, Chicão e Pontes que sempre fizeram do laboratório sempre um ambiente agradável e pelo incentivo e apoio durante este projeto.

Aos amigos que fiz durante a realização deste trabalho e que fizeram parte deste momento de alegria: Geraldo, Aluísio, Alana, Irineu, Ayla, Deda, João Samy, João Henrique, João Carlos, Glauber, Rudy, Délcio, Mozarina, Jefferson, Jackson, Diego, Max, Luciana Lucas, Luciana Bertini, Arthur, Lobinha, Cláudio.

Aos amigos de São Carlos-UFScar, Geizimar, Zé, Taícia, Luciana, Livia, Sabá, Cíntia, Amanda, Patrícia, Marilia, Mattiello, Ângelo, Diego, e em especial ao Joel, Bianca e Marcão, que além da amizade me apoiaram na minha chegada e estadia.

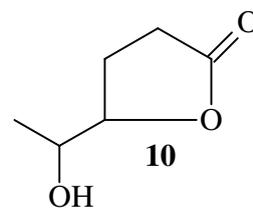
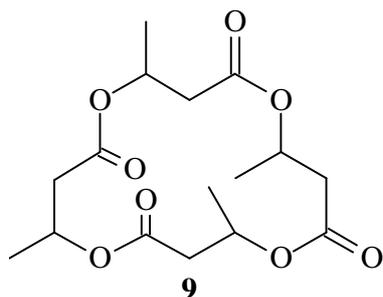
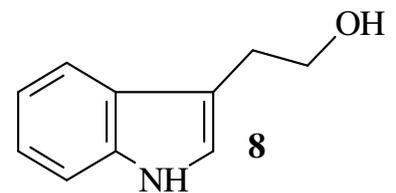
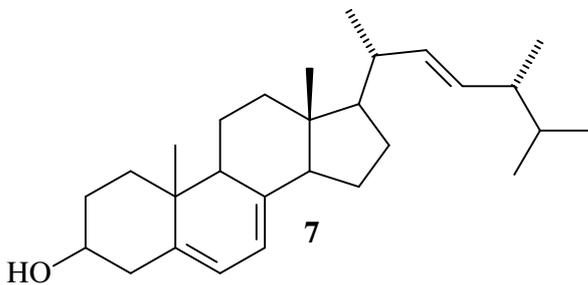
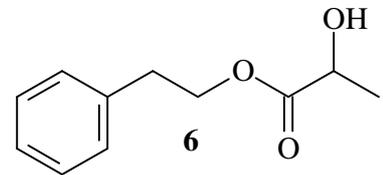
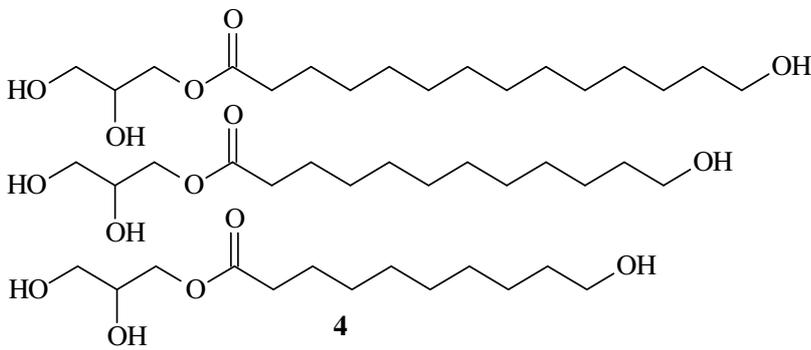
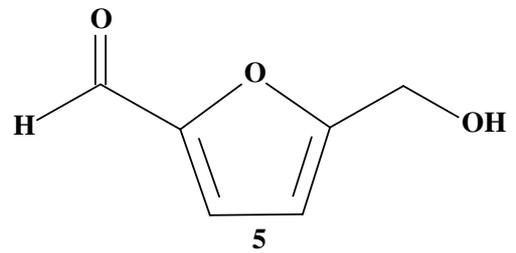
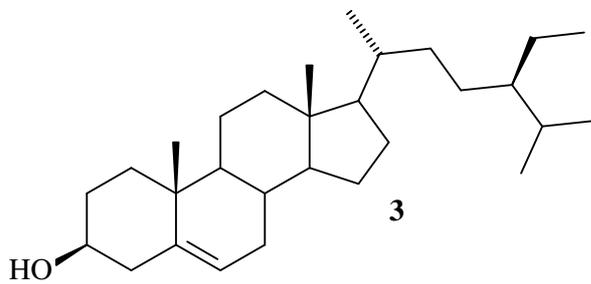
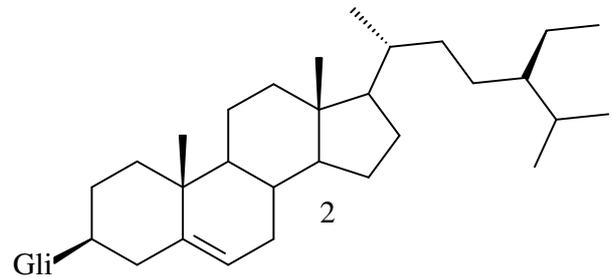
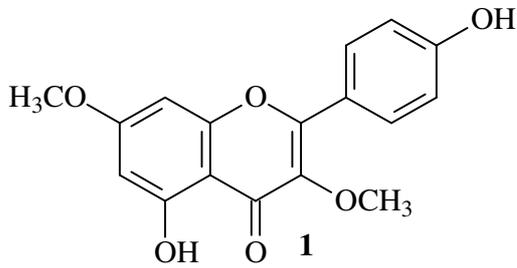
Ao CNPq, CAPES, FINEP, FUNCAP, PRONEX, pela concessão de bolsas e recursos financeiros.

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo químico de três espécies do gênero *Ananas* (*A. comosus*, *A. bracteatus* e *A. lucidus*) e dos fungos endofíticos *Acremonium curvulum* e *Fusarium oxysporum*, isolados de *A. lucidus*. A investigação fitoquímica das raízes, folhas e talos de *A. bracteatus* levou ao isolamento de três compostos micromoleculares: cumataquenina (**1**), glicosídeo do sitosterol (**2**) e sitosterol (**3**). Das folhas da espécie *A. lucidus* foram isolados a mistura de três monoacilglicerois (**4**) e o 5-(hidroximetil)-2-furaldeído (**5**). O estudo dos ácidos graxos das folhas e raízes de *A. bracteatus* e *A. lucidus*, bem como de *A. comosus*, *A. bracteatus* e *A. lucidus* cultivadas *in vitro* foi realizado. Vinte e um ácidos graxos, na forma de ésteres metílicos, foram identificados nas oito amostras analisadas, sendo 16 (76%) ácidos graxos saturados e 5 (24%) insaturados. A prospecção química do fungo *A. curvulum* levou ao isolamento dos compostos 2-hidroxiopropanoato de feniletila (**6**), ergosterol (**7**) e triptofol (**8**). A análise dos extratos de *F. oxysporum* levou ao isolamento do composto tetra(S)-butirolactona (**9**) e do (4*R**, 5*S**)-5-hidroxihexan-4-olida (71%) e (4*R**, 5*R**)-5-hidroxihexan-4-olida (29%) (**10**), estes na forma de uma mistura diastereoisomérica. A determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados foi realizada empregando-se as técnicas espectrométricas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, incluindo técnicas bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) e espectrometria de massa, além de comparação com dados descritos na literatura.

ABSTRACT

The chemical study of three *Ananas* species (*A. comosus*, *A. bracteatus* and *A. lucidus*) and the endophytic fungi *Acremonium curvulum* and *Fusarium oxysporum*, both isolated from *A. lucidus*, are described. The phytochemical investigations of roots, leaves and stems from *A. bracteatus* yielded the isolation of three micro molecular compounds: kumatekenin (**1**), glycosilated sitosterol (**2**) and sitosterol (**3**). From leaves of *A. lucidus* it was isolated a mixture of three monoacylglycerols (**4**) and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (**5**). The fatty acid composition of leaves and roots from *A. bracteatus* and *A. lucidus*, as well as *in vitro* *A. comosus*, *A. bracteatus* and *A. lucidus* was investigated. Twenty-one fatty acids, as methyl ester derivatives, were identified in eight studied samples, 16 (76%) of them saturated and 5 (24%) unsaturated acids. From the fungus *A. curvulum* three compounds were isolated: phenetyl 2-hydroxypropionate (**6**), ergosterol (**7**) and tryptophol (**8**). The chemical investigation of the organic extracts from *F. oxysporum* led to the isolation of tetra(*S*)-butirolactone (**9**) and the diastereoisomeric mixture of (4*R**,5*S**)-5-hydroxyhexan-4-olide (71%) and (4*R**,5*R**)-5-hydroxyhexan-4-olide (29%) (**10**). Structure elucidation of the isolated compounds was done by spectrometric analysis such as infrared, ¹H and ¹³C NMR, including bidimensional techniques (COSY, HMQC e HMBC), mass spectrometry as well as literature comparison.



Sumario

1- INTRODUÇÃO.....	1
2-Considerações Botânicas	4
2.1-Origem e distribuição das Bromélias	4
2.2-Hábito de Crescimento	4
2.3-Classificação Botânica	5
2.3.1-Família Bromeliaceae.....	5
2.3.2-Subfamília Pitcairnioideae	5
2.3.3-SubfamíliaTillandsioideae.....	6
2.3.4-Subfamília Bromelioideae.....	6
2.4-Gênero <i>Ananas</i>	7
2.4.1- <i>Ananas bracteatus</i>	7
2.4.2 <i>Ananas lucidus</i>	8
3-CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS.....	10
3.1- <i>Acremonium curvulum</i>	10
3.2-Gênero <i>Fusarium</i>	12
Classificação Taxonômica.....	12
3.2.1 - <i>Fusarium oxysporum</i>	15
4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃOS	40
5.1-Análise dos ácidos graxos de <i>Ananas spp</i>	40
Cultivadas <i>in vitro</i>	43
Cultivadas <i>in vitro</i>	43
5.2- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS	54
5.2.1- CONSTITUINTES ISOLADOS DE <i>ANANAS</i> spp	54
5.2.1.1- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AB1.....	54
5.2.1.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AB2.....	66
5.2.1.3 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AB3.....	71
5.2.1.4 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AL1	75
5.2.1.5 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AL2	86
5.2.1.6 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE FO1	93
5.2.1.7- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE FO2	103
5.2.1.8-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AC1	114
5.2.1.9- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AC2.....	125
5.2.1.10-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AC3	132
6-PARTE EXPERIMENTAL	143
6.1-MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	143
6.1.1-Cromatografia Líquida em Coluna Aberta (CC).....	143
6.1.2-Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	143
6.1.3-Cromatografia por Exclusão Molecular (Shephadex).....	143
6.2-MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISES	144
6.2.1-Ponto de fusão (p.f.)	144
6.2.2-Espectrometria de massa (EM)	144
6.2.3-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	145
6.2.4-Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	146
6.3-Material vegetal.....	146

6.4-Isolamento dos constituintes fixos de <i>A. comosus</i> , <i>A. bracteatus</i> e <i>A. lucidus</i>	146
6.4.1-Obtenção dos extratos metanólicos	146
<i>A. comosus</i>	147
<i>A. bracteatus</i>	147
6.4.2-Participação do extrato das folhas de <i>Ananas comosus</i> (ACFM)	147
6.4.3-Partição líquido-líquido do extrato dos talos de <i>A. comosus</i> (ACTM)	148
6.4.4-Partição líquido-líquido do extrato dos raízes de <i>A. comosus</i> (ACRM)	148
6.4.5-Partição do extrato das raízes de <i>A. bracteatus</i> (ABRM)	148
6.4.6-Partição do extrato das folhas de <i>A. Bracteatus</i> (ABFM)	149
6.4.7-Partição do extrato das folhas de <i>A. lucidus</i> (ALFM)	149
6.4.8-Partição do extrato das raízes de <i>A. lucidus</i> (ALRM)	150
6.4.9-Obtenção dos extratos hexânicos de <i>A. bracteatus</i> e <i>A. lucidus</i> cultivados <i>In vitro</i>	150
6.4.10-Obtenção dos ésteres metílicos de ALFM/H.....	150
6.4.11-Obtenção dos ésteres metílicos de <i>A. lucidus</i> (ALIV/H) e <i>A. bracteatus</i> (ABIV/H) cultivadas <i>in vitro</i>	151
6.4.12-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ALFM/H ..	151
6.4.13-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ACFM/H..	152
6.4.14-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ABFM/H..	152
6.4.15-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ACRM/H..	153
6.4.16-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ABRM/H..	153
6.4.17-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ALRM/H..	154
6.4.18-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ALiv/H....	154
6.4.19- Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ABiv/H....	155
6.4.20- Fracionamento cromatográfico de ABRM/C: Isolamento de AB1	155
6.4.21-Fracionamento cromatográfico de ABFM/C: Isolamento de AB2	156
6.4.22-Fracionamento cromatográfico de ABTM: isolamento de AB3	157
6.4.23-Fracionamento cromatográfico de ALFM/C: isolamento de AL1	158
6.4.24-Fracionamento cromatográfico de ALRM/A: isolamento de AL2.....	158
6.5-Isolamento de Fungos Endofíticos de <i>A. lucidus</i>	159
6.6 - Meios de Cultura Para Crescimento Fúngico.....	160
6.6.1 - Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	160
6.6.2-Meio Líquido Czapeck's	160
6.7- Inoculação dos fungos	162
6.8-Cultivo dos Microrganismos	162
6.8.1- <i>Acremonium curvulum</i>	162
6.8.2- <i>Fusarium oxysporium</i>	163
6.9 - Extrações dos fungos.....	164
6.9.1-Extração do <i>Acremonium curvulum</i> do meio Czapeck com extrato de levedura e caldo de batata	164
6.9.2-Extração do <i>Acremonium curvulum</i> do meio Czapeck com aminoácidos	165
6.9.3-Extração do <i>Fusarium oxysporium</i> do meio líquido de peptona.....	166
6.9.4-Extração do <i>Fusarium oxysporium</i> do meio sólido – arroz.....	167
6.10-Isolamento dos constituintes químicos de <i>Acremonium curvulum</i>	167
6.10.1-Isolamento de AC1	167
6.10.2-Isolamento de AC2	168

6.10.3–Isolamento de AC3	169
6.11–Isolamento dos constituintes de <i>Fusarium oxysporium</i>	169
6.11.1 – Isolamento de FO1.....	169
6.11.2–Isolamento de FO2	169
6.12-Preparo do éster do ácido nicotínico com o monoacilglicerol	171
6.12.1-Preparo do cloreto do ácido nicotínico.....	171
6.12.2-Reação de Esterificação do monoacilglicerol	171
7-CONCLUSÕES.....	172
8 - REFERÊNCIAS	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação taxonômica da espécie <i>Acremonium curvulum</i>	10
Tabela 2- Classificação Taxonômica da espécie <i>Fusarium oxysporium</i>	12
Tabela 3- Ocorrência de algumas espécies de <i>Fusarium</i> de acordo com a sua forma de adaptação a diferentes ambientes climáticos.	12
Tabela 4- Espécies de <i>Acremonium</i> e suas respectivas classes de metabólitos isolados.	18
Tabela 5- Diterpenos isolados do gênero <i>Acremonium</i>	21
Tabela 6- Lactonas isoladas do gênero <i>Acremonium</i>	24
Tabela 7- Peptídeos isolados do gênero <i>Acremonium</i>	27
Tabela 8- Policetideos e compostos fenólicos isolados do gênero <i>Acremonium</i>	31
Tabela 9- Terpenos – Triterpenos e Sesquiterpenos isolados do gênero <i>Acremonium</i>	37
Tabela 10- Chateoglobosinas e Pirrocidinas isoladas do gênero <i>Acremonium</i>	38
Tabela 11- Fosfoceramidas isoladas do gênero <i>Acremonium</i>	39
Tabela 12- Perfil comparativo de ácidos graxos das espécies <i>A. lucidus</i> , <i>A. bracteatus</i> e <i>A. comosus</i>	43
Tabela 13- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, C ₅ D ₅ N) para o composto AB1, incluindo os resultados das correlações heteronucleares dos espectros 2D HSQC e HMBC e comparação com dados da literatura (DONG <i>et al.</i> , 1999).	57
Tabela 14- Comparação dos dados de RMN ¹³ C de AB2 (125 MHz, CDCl ₃) com dados descritos na literatura para o β-sitosterol em CDCl ₃ (ARAGÃO, 1990).	67
Tabela 15- Dados RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de AB3 em comparação com dados do β-sitosterol glicosilado descritos na literatura (MACARI; EMERENCIANO e FERREIRA, 1990).	72
Tabela 16- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (500 MHz e 125 MHz, C ₅ D ₅ N) para o composto AL1 incluindo os resultados obtidos pelas correlações heteronucleares dos espectros 2D HSQC e HMBC.	78
Tabela 17- Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) em CDCl ₃ , para o composto AL2 incluindo os resultados obtidos por espectro 2D heteronuclear HMBC e o comparativo com dados da literatura para o HMF (TOMMERAAS <i>et al.</i> , 2001).	88
Tabela 18- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, CDCl ₃) para o composto FO1, incluindo os resultados obtidos pelas correlações heteronucleares dos espectros 2D HSQC e HMBC (ROELEN, 1992).	94
Tabela 19- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C em CDCl ₃ para o composto FO2, incluindo os resultados obtidos nos espectros 2D heteronucleares HSQC e HMBC (BUCHANAN <i>et al.</i> , 1995).	105
Tabela 20- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (125 MHz) 1D/2D, em CDCl ₃ , para o composto AC1.	116
Tabela 21- Dados comparativos de RMN ¹³ C de AC2 e do Ergosterol (PONCE <i>et al.</i> , 2002).	126
Tabela 22- Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) 1D/2D, em CDCl ₃ , para o composto AC3 (GUZMAN-LOPEZ <i>et al.</i> , 2007).	134

Tabela 23 -Rendimento dos extratos brutos das três espécies de <i>Ananas</i>	147
Tabela 24 -Rendimento obtido da partição do extrato das folhas de <i>A. comosus</i> (ACFM).....	147
Tabela 25 -Rendimentos obtidos da partição de ACTM	148
Tabela 26 -Rendimentos obtidos da partição de ACRM.....	148
Tabela 27 -Rendimentos obtidos da partição de ABRM.....	149
Tabela 28 -Rendimentos obtidos da partição de ABFM	149
Tabela 29 -Rendimentos obtidos da partição de ALFM.....	149
Tabela 30 -Rendimentos obtidos da partição de ALRM.	150
Tabela 31 -Rendimentos dos ésteres metílicos das espécies de <i>Ananas</i>	151
Tabela 32 -Rendimentos obtido do fracionamento cromatográfico de ALFM/H. ...	151
Tabela 33 -Rendimentos obtidos no fracionamento cromatográfico de ACFM/H .	152
Tabela 34 -Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ABFM/H....	153
Tabela 35 -Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ACRM/H...	153
Tabela 36 -Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ABRM/H. ..	154
Tabela 37 – Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ALRM/H..	154
Tabela 38 -Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ALiv/H.....	154
Tabela 39 -Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ABiv/H.	155
Tabela 40 -Rendimentos obtidos no fracionamento cromatográfico de ABRM/C .	155
Tabela 41 – Rendimento obtido no fracionamento cromatográfico de ABFM/C....	156
Tabela 42 -Rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico de ABTM.....	157
Tabela 43 -Rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico de ALFM/C. .	158
Tabela 44 -Rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico de ALRM/A. .	158
Tabela 45 -Rendimentos obtidos da extração do fungo <i>A. curvulum</i>	165
Tabela 46 -Rendimentos obtidos da extração do fungo <i>A. curvulum</i>	165
Tabela 47 -Massa de micélio do <i>Fusarium oxysporium</i>	166
Tabela 48 -Rendimentos obtidos das partições do meio e extração do micélio....	167
Tabela 49 -Rendimentos obtidos da coluna cromatográfica do extrato do micélio em Czapeck com aminoácidos.....	168
Tabela 50 -Rendimentos obtidos da coluna filtrante do extrato do micélio em Czapeck's com batata e levedura.	168
Tabela 51 -Rendimentos do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de <i>F. oxysporium</i>	170
Tabela 52 -Rendimentos do fracionamento cromatográfico fração hexano /acetato 70%.	170

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Foto de um espécime de <i>Ananas comosus</i>	7
Figura 2 – a- Foto de um espécime <i>Ananas bracteatus</i> , b – destaque das folhas, c- inflorescência, d- visão superior da inflorescência.....	8
Figura 3 – a – Foto de um espécime de <i>Ananas lucidus</i> , b - destaque das folhas e fruto, c - visão superior do fruto, d – infrutescência.....	9
Figura 4 -Fotos de placas de BDA de <i>Acremonium curvulum</i>	11
Figura 5 – a – Fotos de hifas do fungo <i>Acremonium</i> – b – conídios. (fonte: www.doctorfungus.com - acessado em 7/7/08).....	11
Figura 6 - Formas de macroconídios: a) delgado, com aspecto de agulha; b) com curvatura dorsal e ventral; c) curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral; d) macroconídio típico de <i>Fusarium</i> , com as células apicais (lado esquerdo) e basal (lado direito); e) grossa (sem corte); f) papilada; g) em forma de gancho; h) afilada; i) em forma de pé; j) pé alongado; l) distintamente entalhada (chanfrada) e m) escassamente entalhada (MENEZES e OLIVEIRA, 1993).....	14
Figura 7 -Formas dos microconídios: a) oval; b) reniforme ou alantoide; c) obovóide com a base truncada; d) piriforme; e) napiforme; f) globoso (MENEZES e OLIVEIRA, 1993).	14
Figura 8 -a- Fotos de placas de BDA de <i>Fusarium oxysporum</i> , b– destaque dos esporos (Fonte : www.doctorfungus.com - acessado em 07/07/08).....	15
Figura 9 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de <i>A. comosus</i>	44
Figura 10 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das raízes de <i>A. comosus</i>	44
Figura 11 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de <i>A. lucidus</i>	45
Figura 12 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de <i>A. lucidus</i>	45
Figura 13 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de <i>A. bracteatus</i>	46
Figura 14 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de <i>A. bracteatus</i>	46
Figura 15 -Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de <i>A. lucidus</i> cultivadas <i>in vitro</i>	47
Figura 16 - Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de <i>A. bracteatus</i> cultivadas <i>in vitro</i>	47
Figura 17 -Espectro de massa do ester metílico do ácido caprílico (8:0) (IE, 70eV).	48
Figura 18 - Espectro de massa do ester metílico do ácido cáprico (10:0) (IE, 70eV).	48
Figura 19 -Espectro de massa do ester metílico do ácido nonanodióico (11: 0) (IE, 70eV).	48
Figura 20 -Espectro de massa do ester metílico do ácido 10-undecenóico (10-11:1) (IE, 70eV).	48

Figura 21- Espectro de massa do ester metílico do ácido 12-metiltetradecanóico (14:0) (IE, 70eV).	49
Figura 22- Espectro de massa do ester metílico do ácido láurico (12:0) (IE, 70eV).	49
Figura 23- Espectro de massa do ester metílico do ácido 9-hexadecenóico (9-16:1) (IE, 70eV).	49
Figura 24- Espectro de massa do ester metílico do ácido mirístico (14:0) (IE, 70eV).	49
Figura 25- Espectro de massa do ester metílico do ácido pentadecanóico (15:0) (IE, 70eV).	50
Figura 26- Espectro de massa do ester metílico do ácido palmítico (16:0) (IE, 70eV).	50
Figura 27- Espectro de massa do ester metílico do ácido heptadecanóico (17:0) (IE, 70eV).	50
Figura 28- Espectro de massa do ester metílico do ácido elaídico (9-18:1) (IE, 70eV).	50
Figura 29- Espectro de massa do ester metílico do ácido linoléico (9,12-18:2) (IE, 70eV).	51
Figura 30- Espectro de massa do ester metílico do ácido oléico (9-18:1) (IE, 70eV).	51
Figura 31- Espectro de massa do ester metílico do ácido esteárico (18:0) (IE, 70eV).	51
Figura 32- Espectro de massa do ester metílico do ácido nonadecanóico (19:0) (IE, 70eV).	51
Figura 33- Espectro de massa do ester metílico do ácido araquídico (20:0) (IE, 70eV).	52
Figura 34- Espectro de massa do ester metílico do ácido heneicosanóico (21:0) (IE, 70eV).	52
Figura 35- Espectro de massa do ester metílico do ácido docosanóico (22:0) (IE, 70eV).	52
Figura 36- Espectro de massa do ester metílico do ácido tricosanóico (23:0) (IE, 70eV).	52
Figura 37- Espectro de massa do ester metílico do ácido tetracosanóico (24:0) (IE, 70eV).	53
Figura 38- Estrutura de AB1, com respectivos deslocamentos químicos de carbono-13 e hidrogênio.	56
Figura 39- Correlações de AB1 observadas no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC.	56
Figura 40- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.	58
Figura 41- Espectro de absorção na região do IV (NaCl) de AB1.	59
Figura 42- Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.	60
Figura 43- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.	61
Figura 44- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^1H COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.	62
Figura 45- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.	63

Figura 46- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.....	64
Figura 47- Espectro de Massa de AB1(IE 70 eV).	65
Figura 48-Estrutura de AB2 - β -sitosterol.	66
Figura 49- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AB2.....	68
Figura 50- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de AB2.	69
Figura 51- Espectro de massa de AB2 (IE 70 eV).	70
Figura 52- Estrutura de AB3 – β -sitosterol glicosilado.....	71
Figura 53- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB3.	73
Figura 54- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB3.	74
Figura 55- correlação homonuclear ^1H , ^1H COSY de AL1.	76
Figura 56- Principais correlações obtidas no espectro bidimensional HMBC para AL1.	77
Figura 57- Estrutura de AL1 – sendo a mistura de três monoacilglicerol com n igual a 5, 3 e 1 carbonos respectivamente.	77
Figura 58- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.	79
Figura 59- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.	80
Figura 60- Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.	81
Figura 61- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^1H COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.	82
Figura 62- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (500, 125 MHz, Pyr) de AL1.	83
Figura 63- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.	84
Figura 64- Espectro de Massa de AL1.	85
Figura 65- Estrutura de AL2: 5-(hidroximetil)-2-furaldeído.....	86
Figura 66- Principais correlações heteronuclear HMBC ^1H , ^{13}C de AL2.	87
Figura 67- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AL2.	89
Figura 68- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de AL2.....	90
Figura 69- Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de AL2.....	91
Figura 70- Espectro de RMN ^1H , ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3) HMBC de AL2.	92
Figura 71- Principais correlações do espectro de HMBC de FO1.....	94
Figura 72- Proposta para as principais fragmentações de massa da molécula FO1.	95
Figura 73- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de FO1.	96
Figura 74- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de FO1.....	97
Figura 75- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3).	98
Figura 76- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) de FO1.	99
Figura 77- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de FO1.....	100
Figura 78- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de FO1.....	101
Figura 79- Espectro de massa de FO1 (IE 70 eV).	102

Figura 80 -Estruturas de FO2 com respectivos deslocamentos químicos de carbono 13.	104
Figura 81 -Estrutura de FO2 – mistura dos estereoisômeros (4 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-5-hidroxihexan-4-olida e (4 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *)-5-hidroxi-hexano-4-olida – contendo os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono.	106
Figura 82 -Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de FO2.	107
Figura 83 -Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de FO2.	108
Figura 84 -Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl) de FO2.	109
Figura 85 -Espectro de RMN bidimensional ¹ H, ¹ H COSY (400 MHz,CDCl ₃) de FO2.	110
Figura 86 -Espectro de RMN bidimensional ¹ H, ¹³ C HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de FO2.	111
Figura 87 -Espectro de RMN bidimensional ¹ H, ¹³ C HMBC (400 e 100 MHz,CDCl ₃) de FO2.	112
Figura 88 -Cromatograma de FO2 obtido por CG.	113
Figura 89 - Espectro de massa de FO2(IE 70 eV).	113
Figura 90 - Proposta de fragmentação para FO2.	113
Figura 91 -estrutura de AC1 – 2'-hidroxipropanoato de feniletila.	115
Figura 92 -Principais correlações do espectro HMBC de AC1.	116
Figura 93 -Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de AC1.	117
Figura 94 -Espectro de IV (NaCl) de AC1.	118
Figura 95 -Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de AC1.	119
Figura 96 -Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de AC1.	120
Figura 97 -Espectro de RMN bidimensional ¹ H, ¹ H COSY (400 MHz, CDCl ₃) de AC1.	121
Figura 98 -Espectro de correlação bidimensional ¹ H, ¹³ C HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de AC1.	122
Figura 99 -Espectro de RMN bidimensional ¹ H, ¹³ C HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) de AC1.	123
Figura 100 - Espectro de massa de AC1 (IE 70 eV).	124
Figura 101 – Estrutura de AC2 – ergosterol.	126
Figura 102 -Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de AC2.	128
Figura 103 -Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de AC2.	129
Figura 104 -Espectro de IV (NaCl) de AC2.	130
Figura 105 -Espectro de massa de AC2 (IE 70 eV).	131
Figura 106 -Principais correlações obtidas no espectro de HMBC para AC3.	133
Figura 107 -Estrutura de AC3 – Triptofol.	134
Figura 108 -Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de AC3.	136
Figura 109 -Espectro de IV (NaCl) de AC3.	137
Figura 110 -Espectro de RMN bidimensional ¹ H, ¹³ C HSQC (400 e 100 MHz) de AC3.	138
Figura 111 -Espectro de RMN ¹ H, ¹ H COSY de AC3.	139
Figura 112 - Espectro de RMN bidimensional 1H, 13C HMBC (400 e 100 MHz) de AC3.	140
Figura 113 -Espectro de massa de AC3 (IE 70 eV).	141
Figura 114 -Proposta para as principais fragmentações de massa de AC3.	142

1- INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais é a área mais antiga dentre as que compõem a Química no Brasil. Isto se deve, certamente, ao fato do Brasil deter 22% dos recursos genéticos do planeta. Apesar disso, a exploração racional de sua biodiversidade, na busca por substâncias bioativas, ainda é muito modesta (MULLER e MACEDO 2005).

A maioria das pesquisas em Química de Produtos Naturais desenvolvidas no Brasil emprega as plantas como fonte de metabólitos secundários. Entretanto, nos últimos anos, observa-se um grande aumento no número de pesquisas envolvendo o estudo de plantas e seus microrganismos associados (PINTO *et al.*, 2002).

O Brasil apresentar uma grande diversidade botânica, assim, a fitoquímica continua em destaque nas pesquisas realizadas. Varias famílias de plantas continuam a serem exploradas quimicamente, apresentando-se como referencia na obtenção de novos metabolitos de interesse farmacológicos (PINTO *et al.*, 2002).

Espécies da família Bromeliaceae são, em sua maioria, originarias das Américas, com poucas espécies de zonas temperadas. São espécies que ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais com clima quente e seco ou com chuvas irregulares (QUEIROZ *et al.*, 2003).

As bromélias ornamentais do gênero *Ananas* são muito utilizadas no Brasil em projetos paisagísticos. No estado do Ceará, a produção de *A. lucidus* como flor de corte já está sendo exportada para Alemanha, Holanda e Estados Unidos com uma produção de 16.000 flor/mês (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Apesar disso, poucos estudos acerca do metabolismo secundários destas espécies encontram-se registrados na literatura (ROCHA e KAPLAN, 2000).

As plantas de modo geral apresentam associadas a elas microrganismos, os quais vivem em simbiose. Estes fungos crescem em suas plantas hospedeiras sem causar sintomas aparentes de doenças. O crescimento nesse *habitat* envolve uma interação metabólica contínua entre fungo e hospedeiro (ARONE, *et al.*, 2008).

O interesse por fungos endofíticos como produtores em potencial de substâncias novas e biologicamente ativas têm aumentado nas últimas décadas. Estudos recentes indicam que 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos não eram conhecidas (XU *et al.*, 2008)

Fungos do gênero *Acremonium* são considerados endofíticos e uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos, por exemplo, antibióticos β -lactâmicos, o imunossupressor ciclosporim, os tremogênicos diterpenos indólicos lolitremas e fenóis prenilados (ARNONE *et al.*, 2008, ASSANTE *et al.*, 2005).

No Brasil, as espécies de *Fusarium* identificadas entre 1993 e 1996 são de importância principalmente fitopatológica, causando doenças vasculares, também chamadas de murchas (MENEZES e OLIVEIRA, 1993). A maioria das espécies deste gênero habita a parte subterrânea e raízes das plantas, fragmentos vegetais e compostos orgânicos depositados até 100 cm de profundidade do solo (LEAL-BERTIOLE, 1998). Isolados de *Fusarium* podem produzir antibióticos Y, aurofusarina, butenolidas, crisogina, eniantinas e fusarina C (UHLIG *et al.*, 2005).

O objetivo geral desta tese foi à realização do estudo químico de espécies de *Ananas* e seus fungos associados.

Os objetivos específicos foram:

- Realização do estudo comparativo de ácidos graxos de três espécies de *Ananas ornamentais*: *A. comosus*, *A. bracteatus* e *A. lucidus*.
- Isolamento de metabólitos secundários de *A. lucidus* e *A. bracteatus*.

- Isolamento de fungos endofíticos de *A. lucidus* e realização do estudo químico dos mesmos.

Este trabalho encontra-se dividido em sete capítulos: 1-Introdução; 2- Considerações botânicas; 3- Considerações taxonômicas; 4- Levantamento bibliográfico; 5- Resultados e discussão; 6- Procedimento experimental; 7- Conclusão.

Este trabalho representa o primeiro estudo químico de fungos endofíticos desenvolvido pelo grupo, dentro do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, sendo o segundo trabalho de doutorado em Química de Microrganismos neste Programa.

O projeto que culminou na realização deste trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos – LABIOMMI – do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFScar), através do projeto de cooperação acadêmica CAPES/PROCAD – 2005 - “Nucleação e consolidação de grupos atuando em química de microrganismos na UFC e UFPA”.

2-Considerações Botânicas

O ananas, ou abacaxi como é popularmente conhecido, tem o nome originário do tupi-guarani, e significa fruta cheirosa. Esta é pertencente à família Bromeliaceae, subclasse das monocotiledôneas, a qual compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1.700 espécies de plantas herbáceas, sendo a maioria epífita (QUEIROZ *et al*, 2003).

2.1-Origem e distribuição das Bromélias

As bromélias são nativas de regiões tropicais e subtropicais das Américas, sendo que 40% encontram-se no Brasil (MERCIER e KERBAUY, 1997). As regiões mais ricas em Bromeliaceae são México, Antilhas, Costa Rica, Brasil, Andes da Colômbia, Peru e Chile (RAUH, 1990). No Brasil, a maior diversidade de bromélias é encontrada na Mata Atlântica (BEZERRA e PAIVA, 1997).

2.2-Hábito de Crescimento

As bromélias são encontradas do nível do mar à altitudes superiores a 4000 metros, nos Andes, desde regiões extremamente úmidas a regiões desérticas. Podem vegetar sobre a terra, sobre acúmulos orgânicos retidos nas fendas das rochas, ou mesmo diretamente sobre as pedras nuas, sendo respectivamente conhecidas como terrestres, saxícolas e rupícolas. Notabilizam-se, contudo pelo epifitismo, evoluindo do solo para o alto das árvores buscando mais luz, melhor drenagem e maior aeração (MERCIER e KERBAUY, 1997).

As plantas epífitas vivem apoiadas em outras plantas sem retirar nutrientes delas diretamente. As rupícolas vivem apoiadas em rochas, retirando nutrientes do solo existente entre suas fendas e as terrestres vivem no solo (MERCIER e KERBAUY, 1997).

Ao contrário da maioria das bromélias epífitas, as bromeliáceas terrestres crescem no solo em campo aberto, onde recebem o máximo de luz. Muitas são grandes e dotadas de espinhos afiados, não sendo muito apropriadas para o cultivo em interiores (MERCIER e KERBAUY, 1997).

A independência do solo foi acompanhada pela evolução das folhas para formar um copo central capaz de armazenar água e reter as mais diversas partículas sólidas e caldo nutriente que é absorvido através de um sistema único de estruturas celulares, os tricomas foliares. Por outro lado, as raízes passam a ter uma função mais de sustentação do que de nutrição. Os tricomas são de tal forma eficiente que absorvem, inclusive, aminoácidos quando em meio líquido e nas plantas desprovidas de copos, como as do gênero *Tillandsia*, absorvem nutrientes e água diretamente do ar (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

2.3-Classificação Botânica

2.3.1-Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae possui aproximadamente 50 gêneros e quase 4000 espécies (MERCIER e KERBAUY, 1997). Encontra-se atualmente dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae. Esta divisão é baseada em caracteres florais e na morfologia dos frutos e sementes.

2.3.2-Subfamília Pitcairnioideae

Quase todas espécies dessa subfamília são terrestres. O ovário em geral é súpero e os frutos usualmente secos, encerrados em cápsulas deiscente (que se abre espontaneamente). As sementes são nuas ou com apêndice, mas nunca são plumosas. As margens das folhas geralmente têm espinhos (BAKER e COLLINS, 1999). Dezesesseis gêneros são descritos: *Ayensua* (1 espécie), *Brocchinia* (17 espécies), *Connellia* (5 espécies), *Conttendorfia* (1 espécie), *Deuterocohnia* (14 espécies), *Brewacaria* (2 espécies), *Dyckia* (121 espécies), *Encholirium* (30 espécies), *Fosterella* (18 espécies), *Hechtia* (51 espécies), *Lindmania* (36 espécies), *Navia* (95 espécies), *Pepinia* (48 espécies), *Pitcairnia* (297 espécies), *Puya* (203 espécies) e *Steyerbromelia* (3 espécies).

2.3.3-Subfamília Tillandsioideae

A maioria das espécies de Tillandsioideae são epífitas, contudo as do gênero *Alcantarea* são todas terrestres, saxícolas. O ovário quase sempre é súpero e o fruto é seco com sementes plumosas em cápsula deiscente. As margens das folhas nunca têm espinhos (BAKER e COLLINS, 1999).

Os gêneros descritos para essa família são: *Tillandsia* (439 espécies), *Racinaea* (57 espécies), *Vriesea* (227 espécies), *Alcantarea* (15 espécies), *Werauhia* (63 espécies), *Guzmania* (175 espécies), *Catopsis* (21 espécies), *Mezobromelia* (9 espécies) e *Glomeropitcairnia* (2 espécies).

2.3.4-Subfamília Bromelioideae

Muitas espécies de Bromelioideae são epífitas. O ovário é ínfero e o fruto em forma de baga contém sementes sem apêndices. As margens das folhas em quase todas as espécies têm espinhos (BAKER e COLLINS, 1999). Esta família é a que apresenta maior número de gêneros (25): *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia* (62 espécies), *Bromelia* (49 espécies), *Canistrum* (11 espécies), *Cryptanthus* (42 espécies), *Deinacathon* (1 espécie), *Disteganthus* (3 espécies), *Fascicularia* (5 espécies), *Fernseea* (2 espécies), *Greigia* (28 espécies), *Hohenbergia* (47 espécies), *Hohenbergiopsis* (1 espécie), *Lymania* (6 espécies), *Neoglaziovia* (3 espécies), *Neoregelia* (95 espécies), *Nidularium* (54 espécies), *Ochagavia* (3 espécies), *Orthophytum* (26 espécies), *Portea* (9 espécies), *Pseudaechmea* (1 espécie), *Quesnelia* (15 espécies), *Ronnbergia* (11 espécies), *Ursulaea* (2 espécies) e *Wittrockia* (12 espécies).

2.4-Gênero *Ananas*

Plantas deste gênero (Fig. 1) apresentam desenvolvimento em média de 90 centímetros de diâmetro, com folhas muito duras de bordas providas de espinhos ou não, algumas variedades de tamanhos e formas diferentes, podendo produzir frutos após dois ou três anos. Possuem um hábito de crescimento semelhante ao de outras bromélias, dando bulbo a partir das axilas das folhas, as quais enraízam mais facilmente que as coroas dos frutos.



Figura1-Foto de um espécime de *Ananas comosus* (fonte: www.plantarum.com.br, acessado em 07/08/08).

2.4.1-*Ananas bracteatus*

O *Ananas bracteatus* (Fig. 2a) é encontrado desde as matas do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo. No sul do Brasil é muito cultivado para formação de cercas vivas. Possui roseta de porte em torno de um metro de altura, e folhas com muitos espinhos (Fig. 2b). Suas inflorescências são semelhantes a um pequeno abacaxi (Fig. 2c e d) medindo de 10 a 12 cm de comprimento e de coloração avermelhada. Possui hábito terrestre e se desenvolve bem a céu aberto (ALMEIDA e AKY, 1995).

As variedades *Ananas bracteatus* var. *porteanus* e *Ananas bracteatus* var. *variegatus* vem sendo demandadas por paisagísticos e cultivadas tanto para obtenção de plantas quanto para flor de corte. Entretanto, a disponibilidade de mudas de qualidade é um dos fatores limitantes da expansão destas espécies (ALMEIDA e AKY, 1995).

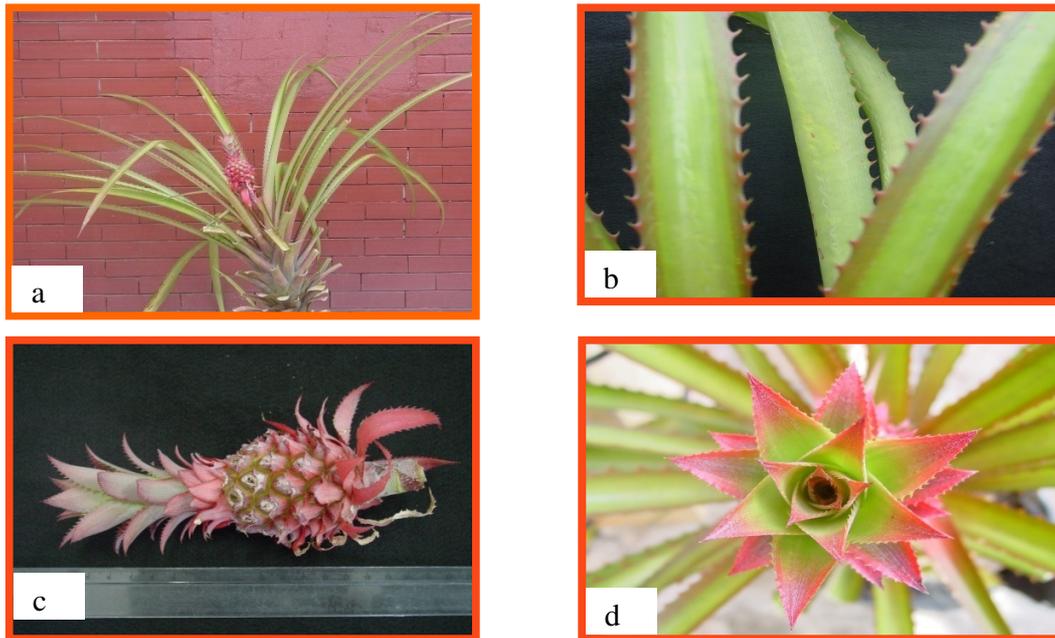


Figura 2– a- Foto de um espécime *Ananas bracteatus*, b – destaque das folhas, c- inflorescência, d- visão superior da inflorescência

2.4.2 *Ananas lucidus*

A espécie *Ananas lucidus* Miller (Fig. 3a) caracteriza-se por ser terrestre, geralmente se desenvolve em campo aberto sob alta luminosidade, em ambientes de solos arenosos e de clima tropical. Apresenta folhagem sem espinhos e de coloração púrpura (Fig. 3b), com infrutescência vermelha (Fig. 3c e d) medindo entre 8 a 10 cm de comprimento, dispostas na posição apical de haste de até 80 cm de comprimento (MERCIER e KERBAUY, 1997).

Esta espécie tem valor comercial tanto no mercado interno quanto externo de flores e plantas ornamentais. O Brasil é o único país que possui um plantio comercial desta espécie, com exportação mensal de 16 mil flores para Alemanha, Estados Unidos e Holanda (OLIVEIRA *et al.*, 2007).



Figura 3– **a** – Foto de um espécime de *Ananas lucidus*, **b** - destaque das folhas e fruto, **c** - visão superior do fruto, **d** – infrutescência.

3-CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS

3.1-*Acremonium curvulum*

Acremonium curvulum são fungos cosmopolitas, filamentosos comumente isolados de plantas e solo. O seu estado sexual não é bem definido, sendo classificado no grupo dos Deuteromicetos por alguns especialistas. Outros preferem incluí-lo no filo *Ascomycota*, devido as suas propriedades estruturais serem similares com a deste grupo (COLLIER, BALOWS e SUSSMAN, 1998). De forma geral a classificação deste gênero segue como descrito na Tabela 1.

O gênero *Acremonium* é bastante difundido como um fungo endófito (ARNONE *et al*, 2008), servindo como agente protetor de plantas contra insetos e outras pestes de lavouras, além de inibir a ação de fungos fitopagênicos (POLING, *et al*, 2008).

Tabela 1-Classificação taxonômica da espécie *Acremonium curvulum*.

Classificação taxonômica

Reino: Fungi.

Filo: Ascomycota.

Subfilo: Ascomycotina

Ordem: Hypocreales.

Família: Curculinoideae

Gênero: *Acremonium*

Espécie: *Acremonium curvulum*

A velocidade de crescimento das colônias (Fig. 4) de *Acremonium* é moderadamente rápida, estando madura após cinco dias de incubação. O diâmetro da colônia é de 1-3 cm quando incubado a 25° C por sete dias em BDA. A textura da colônia é compacta, plana e ocasionalmente elevada no centro. Quando velha, a superfície da colônia pode tornar-se algodoadada devido ao crescimento de hifas soltas. A cor da colônia é branca, pálida acinzentada ou rosa pálido na superfície (COLLIER, BALOWS e SUSSMAN, 1998).



Figura 4-Fotos de placas de BDA de *Acremonium curvulum*.

Microscopicamente, *Acremonium curvulum* possui hifa hialina e septada as quais são tipicamente finas (Fig. 5a). Sendo as hifas vegetativas muitas vezes formadas a partir de hifas de ligação. As fialides são formadas diretamente sobre as hifas, em seu ápice estão os conídios hialinos de 2-3 x 4-8 μm de tamanho (Fig 5b). Usualmente aparecem em ramos, bolas ou em cadeias frágeis de conídios, onde são ligados por materiais gelatinosos. Eles podem ser uni ou multicelulares fusiformes com uma pequena curvatura. Essas propriedades estruturais dos conídios variam dependendo da espécie (COLLIER, BALOWS e SUSSMAN, 1998).

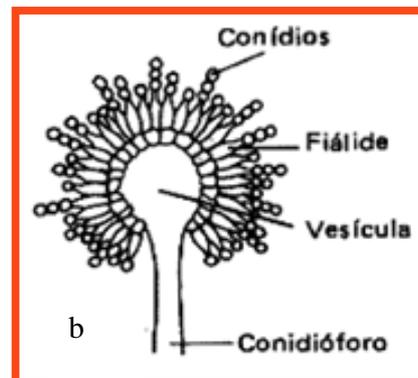
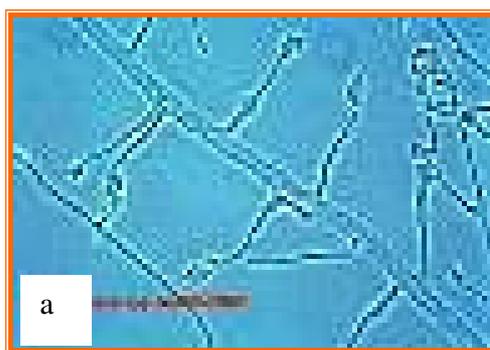


Figura 5– **a** – Fotos de hifas do fungo *Acremonium* – **b** – conídios. (fonte: www.doctorfungus.com - acessado em 7/7/08)

3.2-Gênero *Fusarium*.

Os fungos do gênero *Fusarium* Link ex Fr. têm uma ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes. Ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas (Tabela 3), embora algumas espécies tenham uma íntima associação com os hospedeiros (LEAL-BERTIOLE, 1998). De forma resumida a espécie pode ser classificada segundo a Tabela 2.

Tabela 2-Classificação Taxonômica da espécie *Fusarium oxysporum*.

Classificação Taxonômica
Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Ordem: Hypocreales
Família: Hypocreaceae
Gênero: <i>Fusarium</i>
Espécie: <i>Fusarium oxysporum</i>

Tabela 3-Ocorrência de algumas espécies de *Fusarium* de acordo com a sua forma de adaptação a diferentes ambientes climáticos.

Ocorrência Geral	Regiões de Clima Temperado	Regiões Subtropicais e Tropicais úmidas
<i>F. chlamydosporum</i>	<i>F. acuminatum</i>	<i>F. beomiforme</i>
<i>F. equiseti</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. compactum</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>F. crookwellense</i>	<i>F. decemcellulare</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. longipes</i>
<i>F. poae</i>	<i>F. graminearum</i>	
<i>F. semitectum</i>	<i>F. sambucinum</i>	
<i>F. solani</i>	<i>F. esporotrichioides</i>	
<i>F. subglutinans</i>		
<i>F. tricinctum</i>		

No Brasil, as espécies de *Fusarium* identificadas entre 1993 e 1996 são de importância, principalmente, fitopatológica, causando doenças vasculares, também chamadas de murchas (MENEZES e OLIVEIRA, 1993). A variabilidade da cultura é comum em algumas espécies, como *F. oxysporium*, *F. solani* e *F. equiseti*, estando possivelmente associada a sua ampla adaptação em diferentes ambientes, enquanto que outras de menor variabilidade, como *F. decemcellular*, *F. beomiforme* e *F. longipes*, teriam uma distribuição mais restrita a ambientes específicos (MENDES *et al*,1998). A maioria das espécies deste gênero habita a parte subterrânea e raízes das plantas, fragmentos vegetais e compostos orgânicos depositados até 1 m de profundidade do solo (LEAL-BERTIOLE, 1998).

O gênero *Fusarium* foi classificado por Link em 1809 e, até o momento, não existe um sistema completo que possibilite a identificação de suas espécies. Atualmente, todos os sistemas de taxonomia têm como base à publicação de Wollenweber & Reinking (1935), combinando as informações complementares de outros sistemas (TOUSSOUN e NELSON, 1975).

Em 1935, Wollenweber & Reinking, organizaram as espécies de *Fusarium* em 16 seções, que incluem 65 espécies, 55 variedades e 22 formas (VENTURA, 2000).

As espécies são classificadas na classe Hifomiceta, subdivisão Deuteromicotina, incluindo as que produzem macroconídios hialinos, septados, e caracterizados por possuírem as células basais e apicais diferenciadas, que são de grande importância na taxonomia das espécies (Fig. 6). Os microconídios também com diferentes formas (Fig. 7) podem estar presentes ou ausentes (VENTURA, 2000).

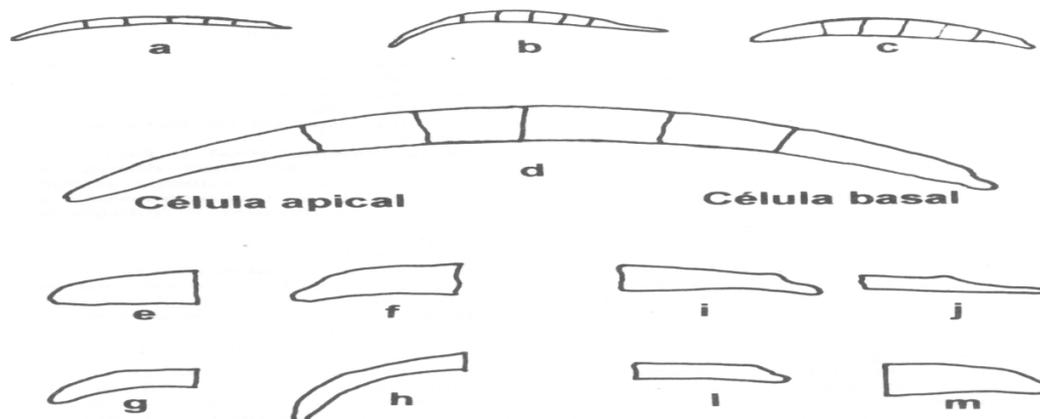


Figura 6- Formas de macroconídios: a) delgado, com aspecto de agulha; b) com curvatura dorsal e ventral; c) curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral; d) macroconídio típico de *Fusarium*, com as células apicais (lado esquerdo) e basal (lado direito); e) grossa (sem corte); f) papilada; g) em forma de gancho; h) afilada; i) em forma de pé; j) pé alongado; l) distintamente entalhada (chanfrada) e m) escassamente entalhada (MENEZES e OLIVEIRA, 1993).

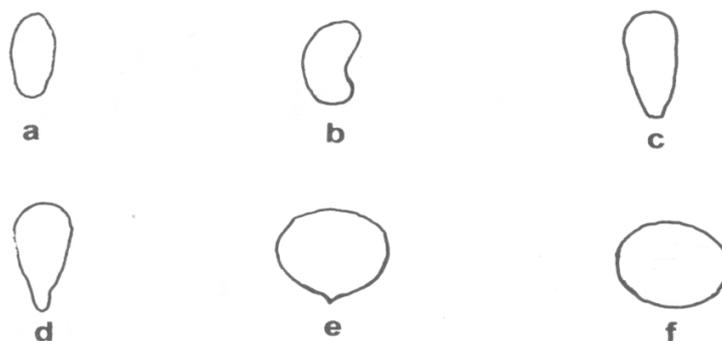


Figura 7- Formas dos microconídios: a) oval; b) reniforme ou alantoide; c) obovóide com a base truncada; d) piriforme; e) napiforme; f) globoso (MENEZES e OLIVEIRA, 1993).

3.2.1 -*Fusarium oxysporum*

A espécie *F. oxysporum* (Fig. 8a) apresenta macroconídeos, clamidósporos e microconídeos em “falsas cabeças” na extremidade de conidióforos curtos. Os clamidósporos esféricos podem ser formados isoladamente nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas ou nos macroconídeos. Os macroconídeos são hialinos, fusiformes, falcados, multicelulares (3-7 septos) (Fig. 8b) 27-60 μm x 3-5 μm . Os microconídios são geralmente unicelulares produzidos em conidióforos curtos, formados diretamente do micélio (MENEZES e OLIVEIRA, 1993).

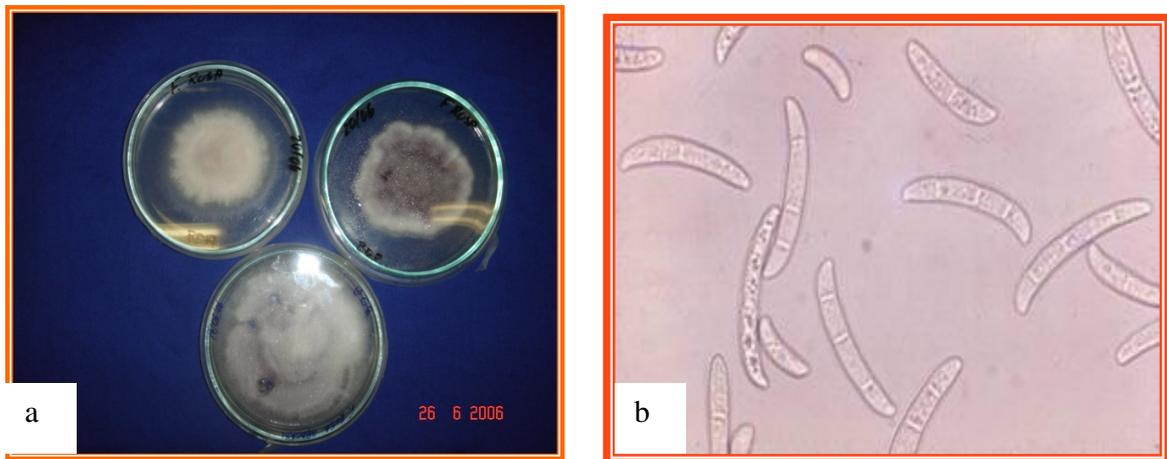


Figura 8 -a- Fotos de placas de BDA de *Fusarium oxysporum*, b– destaque dos esporos (Fonte : www.doctorfungus.com - acessado em 07/07/08).

4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

A busca por substâncias de uso prático para o homem na natureza é uma das mais antigas atividades da nossa civilização. No Brasil, as plantas têm sido os organismos vivos mais investigados como fonte de produtos naturais. No entanto, os microrganismos, organismos marinhos, pequenos insetos e animais têm se mostrado como uma rica fonte de substâncias para a humanidade. O Brasil ocupa lugar de destaque na biodiversidade de plantas e animais. Em virtude disso, é de se esperar que ocorra uma alta diversidade de bactérias e fungos a serem explorados (SANTOS, 1998).

A grande maioria das substâncias naturais é classificada como metabólitos secundários para diferenciá-las daquelas de função primária básica para os organismos vivos, os metabólitos primários. Estes últimos são em geral macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e alguns lipídeos), e são amplamente produzidos pelos seres vivos, independentemente da sua classificação taxonômica. Ao contrário, os metabólitos secundários, também denominados metabólitos especiais, geralmente são micromoléculas (esteróides, triterpenos, alcalóides, etc.), que não apresentam funções básicas aparentes, e sua produção depende do tipo de organismo e de sua espécie (THONSON, 1985; SANTOS, 1998).

Nos microrganismos, os metabólitos secundários são sintetizados no fim da fase de crescimento exponencial e sua produção é altamente influenciada pelas condições de crescimento, especialmente pela composição do meio de cultura (MARTIN, CASQUEIRO e LIRAS, 2005).

O entendimento da biossíntese de metabólitos secundários e a genética molecular de sua produção têm avançado consideravelmente nas últimas duas décadas. Os genes para biossíntese de metabólitos secundários são usualmente organizados em sistemas. Esses incluem as enzimas biossintéticas e proteínas regulatórias, genes para resistência a ação tóxica de metabólitos secundários e genes para secreção desses metabólitos. Muitos servem como sinais de comunicação (alelopatia) entre os organismos produtores e outros seres vivos, tais

como plantas, animais ou outros microrganismos, os quais dividem o mesmo ambiente. Desta forma, os metabólitos secundários são excretados para o meio extracelular para interagir com outros organismos (MARTIN, CASQUEIRO e LIRAS, 2005).

Microrganismos têm se destacado como fonte importante de metabólitos secundários biologicamente ativos, com estruturas variadas e com aplicação no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos (JANG *et al.*, 2006). Dentre esses microrganismos, destacam-se os fungos endofíticos, que são encontrados no interior das plantas, em associação simbiótica ou parasitária com as mesmas (JANG *et al.*, 2006).

Algumas espécies de *Acremonium* são descritas como endofíticos de plantas da família Gramineaceae, sendo responsáveis pelo aumento de resistência ao hospedeiro contra insetos e outras pragas de lavouras. Por outro lado, esses microrganismos são à base de muitas toxicoses em humanos e animais (ARNONE *et al.*, 2008, ASSANTE *et al.*, 2005).

Cerca de 100 espécies foram descritas para o gênero *Acremonium*, as quais são responsáveis pela produção de metabólitos biologicamente ativos, incluindo o antibiótico β -lactâmico Cefalosporina, o imunossupressor Ciclosporina, os diterpenos indólicos Lolitrems e fenóis prenilados (ASSANTE *et al.*, 2005).

Através de levantamento bibliográfico nas bases de dados *Chemical Abstract*, no período de 1994 a 2008, foi possível identificar um total de 91 metabólitos secundários isolados de 12 espécies de *Acremonium* (Tabela 4, p. 18). Estes metabólitos secundários encontram-se distribuídos nas classes dos diterpenos (20), lactonas (12), peptídeos (16), policetídeos e compostos fenólicos (33), terpenos (4) (triterpenos e sesquiterpenos), chateoglobosinas e pirrocininas (4) e fosfoceramidas (2).

Tabela 4-Espécies de *Acremonium* e suas respectivas classes de metabólitos isolados.

Espécies	Classe de metabólitos
<i>Acremonium sp</i>	Lactonas, Fosfoceramidas, Policetideos e Compostos Fenólicos, Terpenos (sesquiterpenos), Peptídeos, Chateoglobosinas.
<i>A. zeae</i>	Lactonas e Pirrocidinas
<i>A. butyri</i>	Lactonas
<i>A. strictum</i>	Lactonas, Terpenos (sesquiterpenos) e Peptídeos
<i>A. fusigerum</i>	Peptídeos
<i>A. lolli</i>	Diterpenos
<i>A. byssoides</i>	Policetideos e Compostos Fenólicos
<i>A. furcatum</i>	Peptídeos
<i>A. crocacinigenum</i>	Triterpenos
<i>A. roseum</i>	Lactonas
<i>A. striatiporum</i>	Diterpenos
<i>A. persicinum</i>	Peptídeos

O número de espécies exploradas quimicamente neste período representa apenas 12% do total de espécies relatadas para o gênero, o que representa uma parcela muito pequena em relação ao gênero. A maior parte dos metabólitos secundários isolados (48,3%) esta associada à espécies descritas somente no nível de gênero – *Acremonium sp* – isolado especificamente de fontes marinhas. (JANG *et al.*, 2006; BOOT *et al.*, 2007). As duas espécies identificadas, *A. striatiporum* (AFIYATULLOV *et al.*, 2000; 2002; 2004) E *A. lolli* (MILES *et al.*, 1994; MUNDAY-FINCH *et al.*, 1996; 1997), contribuíram com 14,2 e 8,7% dos metabólitos isolados, respectivamente, o restante (28,8%) esta distribuída nas demais espécies.

Dentre as atividades biológicas associadas aos metabólitos secundários de *Acremonium*, pode-se destacar a atividade herbicida das acremolactonas A (**25**), B (**26**) e C (**27**) (Tabela 6, p. 25), as quais apresentaram atividade contra o crescimento radicular de *Chinese cabbage* em concentrações (IC₅₀) de 1, 10 e 300 ppm, respectivamente (SASSA *et al.*, 1998; SASSA, OOI e KINOSSHITA, 2004). Acremolactona A (**25**) tem sua atividade relacionada à presença do núcleo epoxidiidropirano (SASSA *et al.*, 1998), apresentando também um núcleo epoxicicloexanol (SASSA, OOI e KINOSSHITA, 2004). Acremolactonas B (**26**) e C

(27) apresentam como diferenças estruturais um grupo toluila ligado ao anel piridínico e ao ciclopenteno, respectivamente (SASSA, OOI e KINOSSHITA, 2004).

As acreminas A–D (68-71), Tabela 8 (p. 34), foram testadas em sua capacidade de inibição da germinação do esporângio de *Plasmopara viticola*. A germinação foi inibida por todas as acreminas, em todas as concentrações testadas. Contudo, somente acremina C (70) superou 60% de inibição (ASSANTE *et al.*, 2005). Esses compostos possuem um núcleo cicloexânico ou aromático, possivelmente de origem policetídica, substituídos por uma unidade prenila. A partir das acreminas A (68) ou F (73) (Tabela 8 p.35), por diferentes reações de ciclização, é possível dar origem a anéis cromeno ou furânico, como nas acreminas C (70) e D (71) (ASSANTE *et al.*, 2005). A acremina G (74) (p.36), um derivado dimérico da mesma família, isolado de *A. byssoides*, também teve seu poder de inibição de *P. viticola* testado, apresentando 72,5% de inibição a uma concentração de 1µM (ARNONE *et al.*, 2008).

Em trabalho bioguiado com *Acremonium sp.*, um fungo isolado de organismo marinho, Ratnayake e colaboradores (2008) chegaram ao isolamento das acremolidas A (33), B (34), C (35) e D (36), classificadas como lipodepsipeptídeos (Tabela 7 p. 27), além de duas micotoxinas chaetoglobosinas, 19-O-acetilchaetoglobosina B (87) e 19-O-acetilchaetoglobosina D (86), e do composto aromático 49, conhecido por 2-(hidroximetil)-3-[(1E)-propenil] fenol. Este último, apesar de sua simplicidade estrutural, apresentou potente atividade antitumoral e no tratamento de diabetes, obesidade, neurose, além de Alzheimer e Parkinson, resultando em duas patentes (RATNAYAKE *et al.*, 2008).

A awajanomicina (24) (Tabela 6, p.24) teve sua atividade antitumoral testada, apresentando IC₅₀ de 27,5 µg/mL contra células de câncer de pulmão (JANG *et al.*, 2006). Uma estrutura bastante interessante é a da orbuticina (28) (Tabela 6 p.25), uma polilactona cíclica formada por duas unidades modificadas do ácido arselínico e três resíduos do ácido β-hidroxi-butírico. Este composto

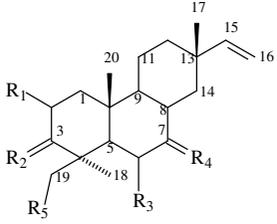
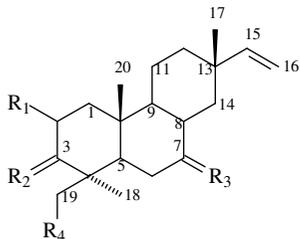
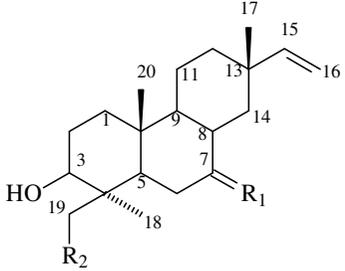
apresentou atividade contra alguns fitopatógenos, tais como *Phytophthora infestans*, *Pyricularia oryzae* e *Erysiphe graminis* (ROY *et al*, 1996).

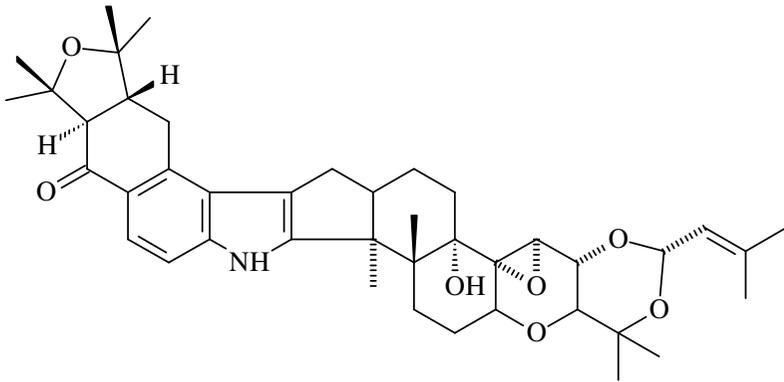
A classe das lolitremas (Tabela 5, p. 22) apresenta esqueletos carbônicos bastante diferenciados, como pode ser observado através das estruturas de lolitrem B (**13**), lolitrem E (**15**) e lolitrem F (**16**). Estes representantes da classe possuem em suas estruturas um núcleo diterpênico ligado a um núcleo indólico. O lolitriol (**17**) é considerado intermediário biossintético das lolitremas (MILES *et al*, 1994; MUNDAY-FINCH *et al*, 1996; MUNDAY-FINCH *et al*, 1997).

As acremodinas A-E (**63-67**) foram isoladas a partir de novos métodos de fermentação, os quais influenciam o crescimento e o metabolismo de microrganismos aumentando seu valor como fonte de metabólitos naturais. Estes fazem uso de suportes poliméricos para o ligamento do micélio e crescimento durante a fermentação, a qual é realizada com uso de substratos naturais como fonte de carbono e energia. Suportes sólidos aplicados à fermentação no estado sólido promovem novos caminhos para manipular variáveis que possam influenciar no crescimento e fisiologia, e assim explorar a diferenciação fúngica e processos que estão ligados a caminhos do metabolismo secundário e que produzam compostos mais complexos (BIGELIS *et al*, 2006).

Metabólitos secundários isolados do gênero *Acremonium*.

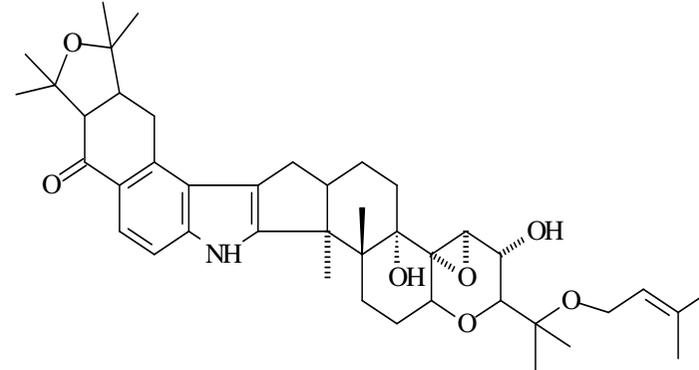
Tabela 5- Diterpenos isolados do gênero *Acremonium*.

 <p>R1=OH, R2=H,β-OH, R3=H, R4=H,H R5=β-D-altropiranosil $\Delta^{7,8}$ – Virescenosideo A (1) R1=H, R2=H,β-OH, R3=H, R4=H,H R5= β-D-altropiranosil $\Delta^{7,8}$ – Virescenosideo B (2) R1 =H, R2 = O, R3 = H, R4 = H,H R5 = β-D-altropiranosil $\Delta^{7,8}$ – Virescenosideo C (3) R1=OH, R2= H,β-OH, R3= H, R4= O R5= β-D-altropiranosil $\Delta^{8,9}$ – Virescenosideo M (4) R1=OH, R2=H,β-OH, R3=β-OH, R4=H,H R5=β-D-altropiranosil $\Delta^{7,8}$ – Virescenosideo N (5) AFIYATULLOV <i>et al</i>, 2000. e AFIYATULLOV <i>et al</i>, 2004.</p>	 <p>R1 = OH, R2= H, β-OH,R3= H,R4= α-D-glicopiranosil(1-6)-β-D-altropiranosil $\Delta^{7,8}$ – Virescenosideo R (6) R1 = H, R2 = O, R3 = H, α-OH, R4=β-D-altropiranosil $\Delta^{8,14}$ – Virescenosideo S (7) R1 = H, R2 = O, R3 = O, R4 = β-D-altropiranosil $\Delta^{8,9}$ – Virescenosideo T (8) R1 = H, R2 = O, R3 = O, R4 = β-D-altropiranosil $\Delta^{8,14}$ – Virescenosideo U (9) AFIYATULLOV <i>et al</i>, 2004.</p>
	<p>R1= H, α-OH; R2= β-D-altropiranosil $\Delta^{8,14}$ virescenoscide O (10) R1= O; R2= β-D-altropiranosil $\Delta^{8,9}$ virescenoscides P (11) R1= H; R2= β-D-mannopiranosil $\Delta^{7,8}$ virescenoscide Q (12) AFIYATULLOV <i>et al</i>, 2002. e AFIYATULLOV <i>et al</i>, 2004</p>



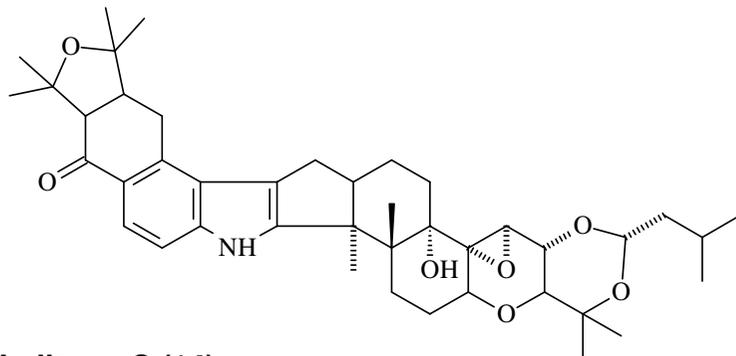
Lolitrem B (13)

MILES *et al.*, 1994; MUNDAY-FINCH *et al.*, 1996



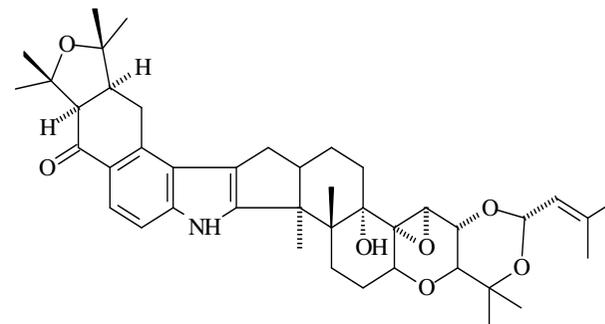
Lolitrem E (15)

MILES *et al.*, 1994.



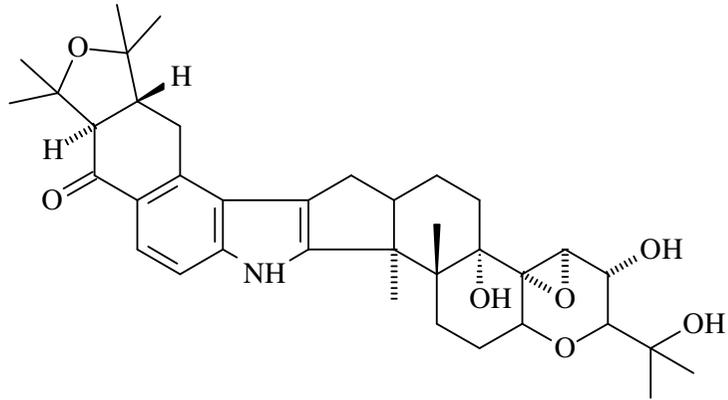
Lolitrem C (14)

MILES *et al.*, 1994.

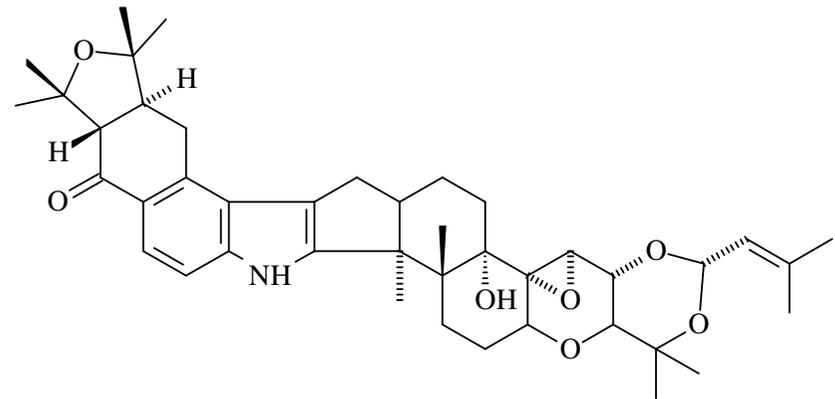


Lolitrem F (16)

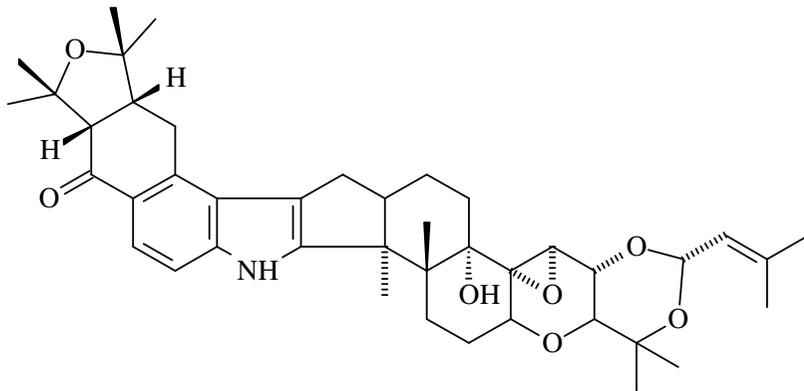
MUNDAY-FINCH *et al.*, 1996



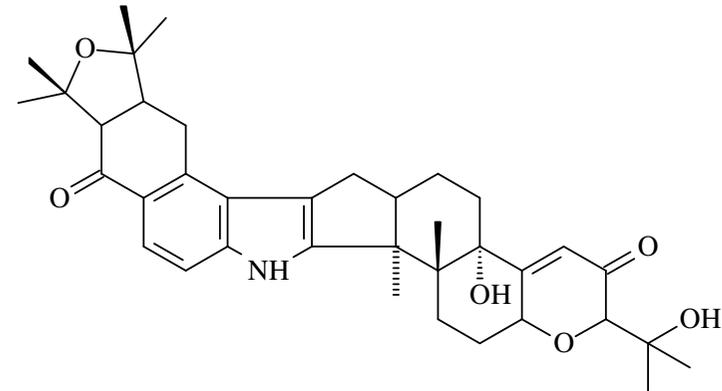
Lolitriol (17)
MILES *et al.*, 1994.



Epi-lolitrem F (19)
MUNDAY-FINCH *et al.*, 1996

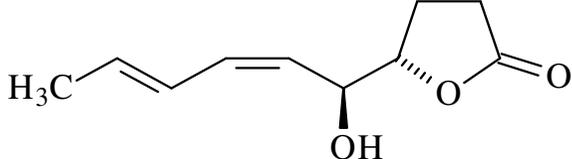
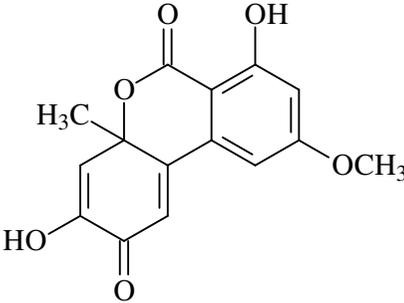
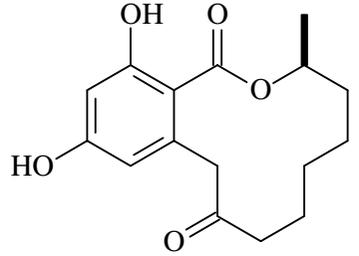
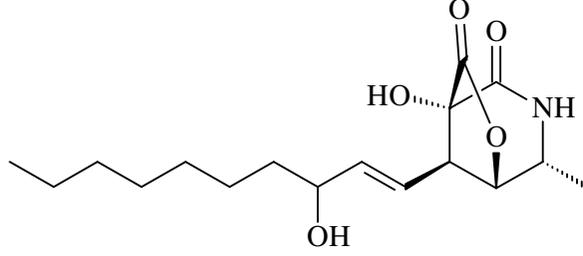


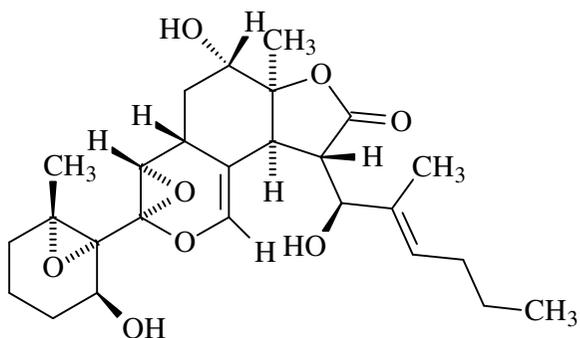
Epi-lolitrem B (18)
MUNDAY-FINCH *et al.*, 1996



Lolilina (20)
MUNDAY-FINCH *et al.*, 1997.

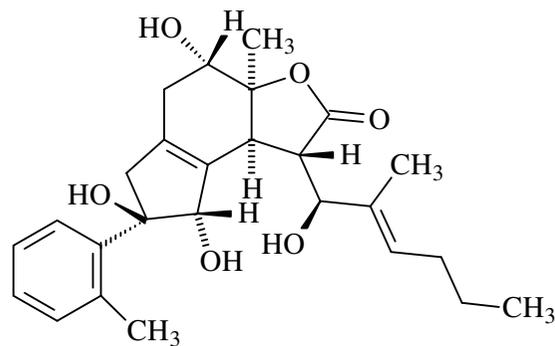
Tabela 6-Lactonas isoladas do gênero *Acremonium*.

 <p>(4S,5S,6Z,8E)-5-hydroxideca-6,8-dien-4-olida (21) CLOUGH <i>et al.</i>, 2000.</p>	 <p>Dehidroalternusina (23) MURAKAMI-NAKAI <i>et al.</i>, 2004.</p>
 <p>7-Hidroxi dihidroresorcilida (22) POLING <i>et al.</i>, 2008.</p>	 <p>Awajanomicina (24) JANG <i>et al.</i>, 2006.</p>



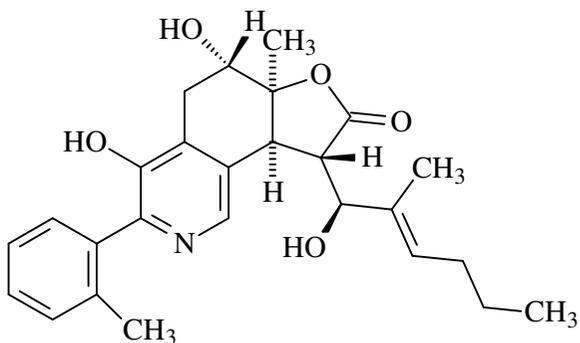
Acremolactona A (25)

SASSA *et al.*, 1998, SASSA, OOI, e KINOSHITA, 2004



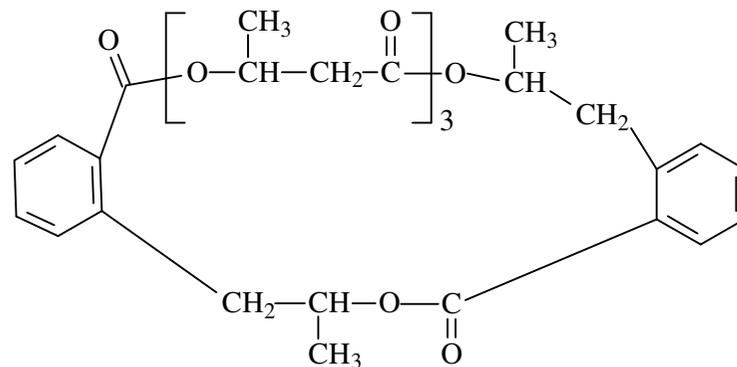
Acremolactona C (27)

SASSA, OOI, e KINOSHITA, 2004.



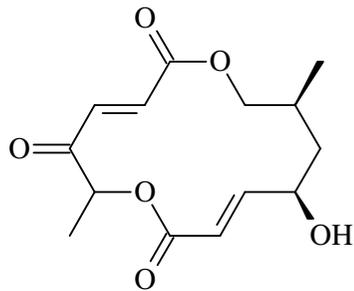
Acremolactona B (26)

SASSA, OOI, e KINOSHITA, 2004



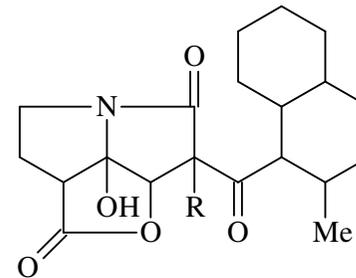
Orbuticina (28)

ROY *et al.*, 1996.



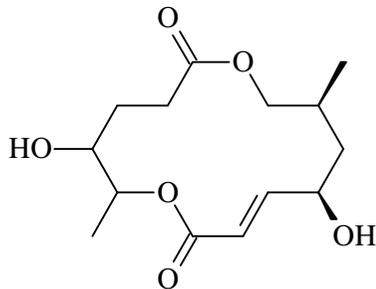
Acremolol (29)

BERG *et al.*, 2002



R= H - **UCS 1025 A (31)**

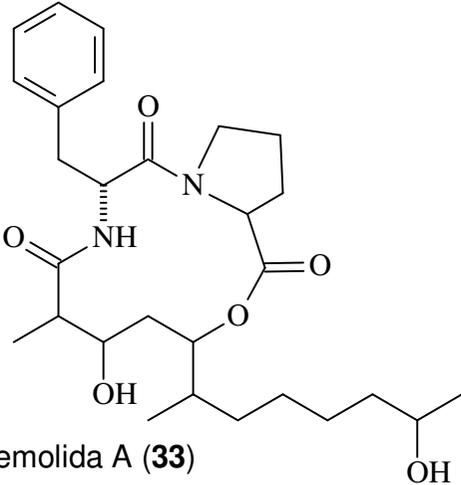
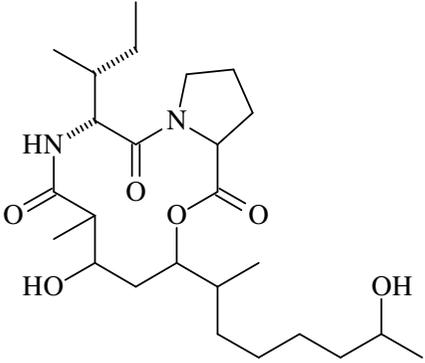
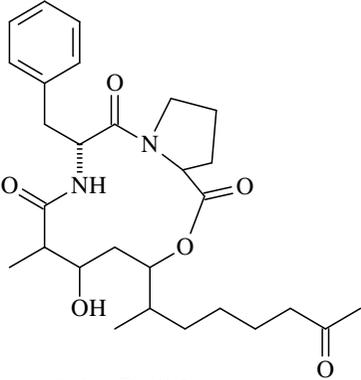
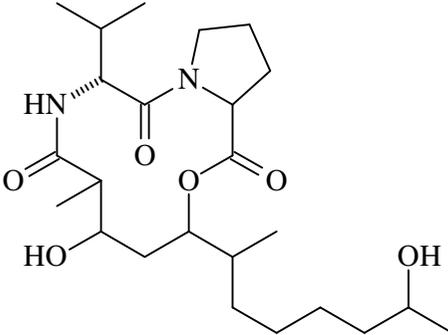
R= OH - **UCS 1025 B (32)**
NAKAI *et al.*, 2000.

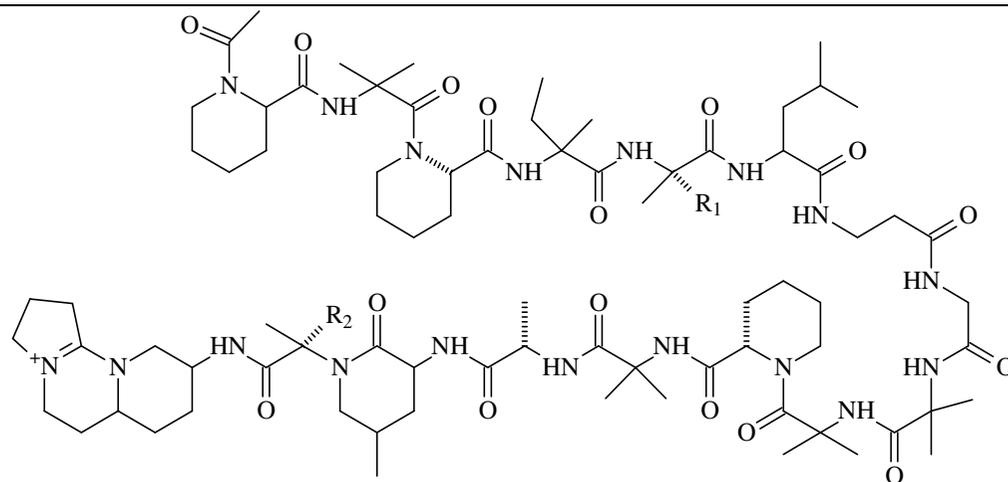


Acremodiol (30)

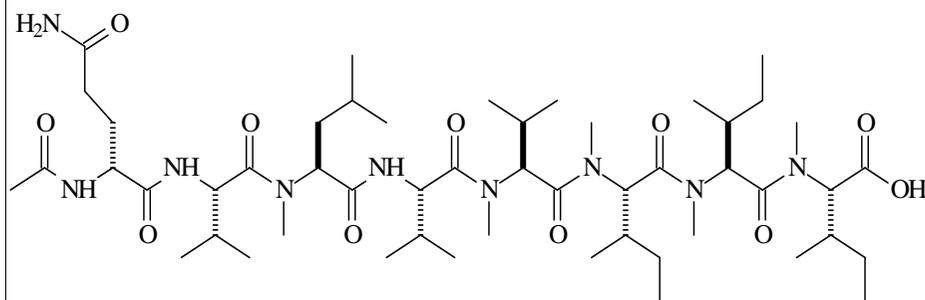
BERG *et al.*, 2002

Tabela 7-Peptídeos isolados do gênero *Acremonium*.

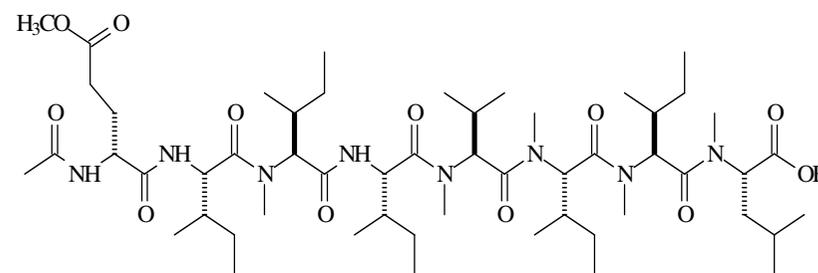
 <p>Acremolida A (33) RATNAYAKE <i>et al.</i>, 2008.</p>	 <p>Acremolida C (35) RATNAYAKE <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>Acremolida B (34) RATNAYAKE <i>et al.</i>, 2008</p>	 <p>Acremolida D (36) RATNAYAKE <i>et al.</i>, 2008</p>



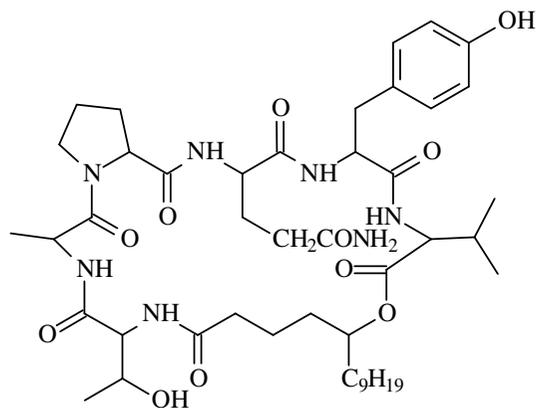
R1=R2= CH₃ **Efraeptina Eα (37)**
 R1=R2=CH₂ CH₃ **Efraeptina H(38)**
 BOOT *et al.*, 2007



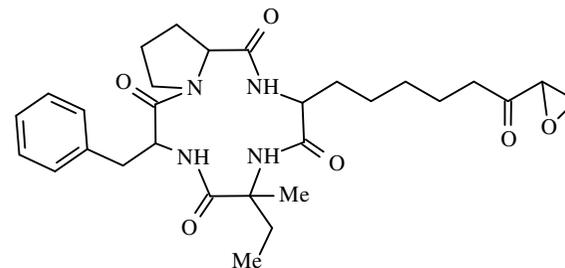
RHM3 (39)
 BOOT *et al.*, 2007



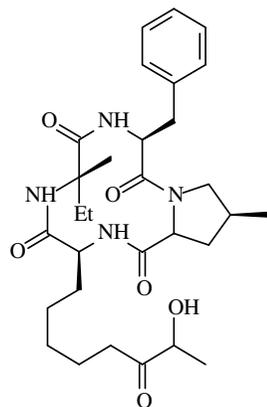
RHM4 (40)
 BOOT *et al.*, 2007.



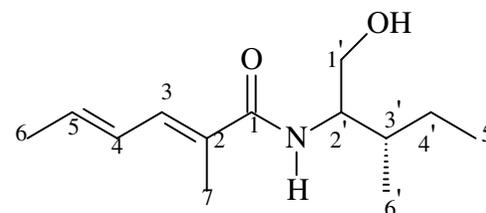
Verlamelina (41)
KIM *et al.*, 2002.



Foenistatina (43)
MASSUOKA *et al.*, 2001.

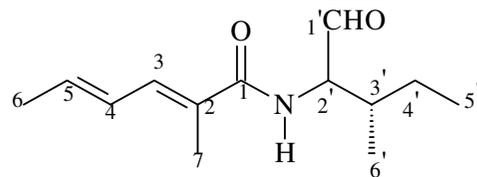


FR235222 (42)
MORI *et al.*, 2003.



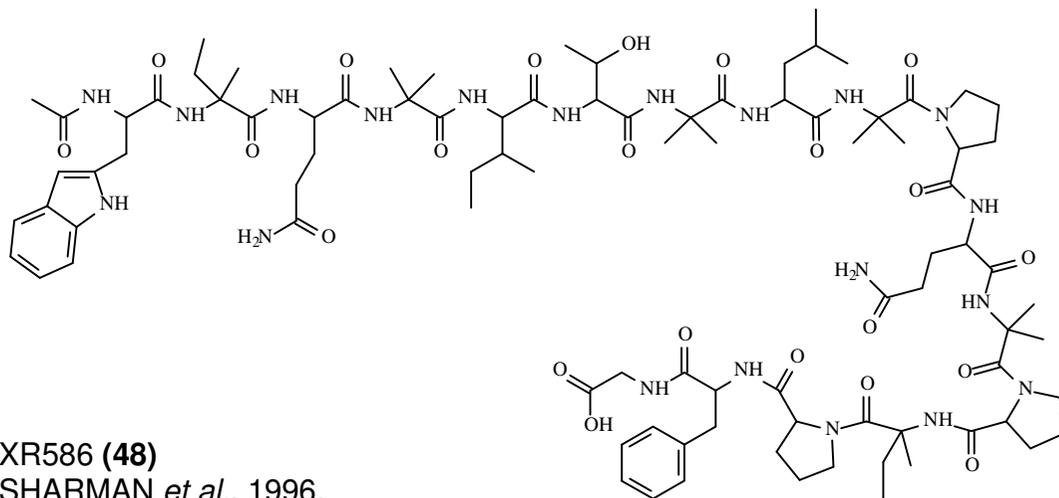
(2E,4E)-2-metil-hexa-2,4-dienoic acido(2'*R*,3'*S*)-isoleucinol
amida (**44**)

(2E,4E)-2-metil-hexa-2,4-dienoic acido(2'*S*,3'*S*)-isoleucinol
amida (**45**)
GALLARDO *et al.*, 2006.



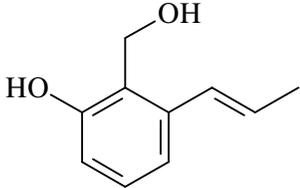
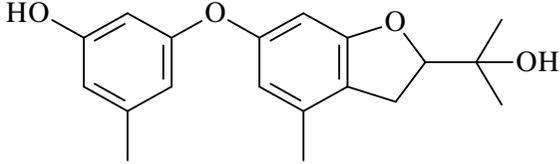
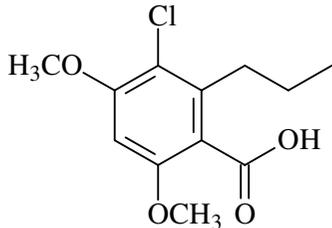
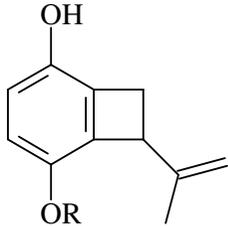
(2'R,3'S) e (2'S,3'S)[2E,4E]-2-metil-hexa-2,4-dienoico ácido isoleucinaldeído (46) e (47)

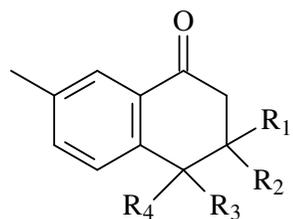
GALLARDO *et al.*, 2006.



XR586 (48)
SHARMAN *et al.*, 1996.

Tabela 8-Polictetideos e compostos fenólicos isolados do gênero *Acremonium*.

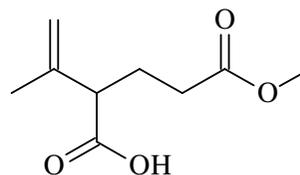
 <p>2-(hidroximetil)-3-[(1E)-propenil] fenol (49)</p> <p>RATNAYAKE <i>et al.</i>, 2008.</p>	 <p>Awajanoran (51)</p> <p>JANG <i>et al.</i>, 2006.</p>
 <p>Acremonisol A (50)</p> <p>PONTIUS <i>et al.</i>, 2008.</p>	 <p>R=H, 7-isopropenilbicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene-2,5-diol (52)</p> <p>R=β-D-glicopiranosideo, 7-isopropenilbicyclo-[4.2.0]octa-1,3,5-triene-2,5-diol-5-β-D-glicopiranosideo (53)</p> <p>ABDEL-LATEFF <i>et al.</i>, 2002.</p>



R1=R3=H, R2=R4= OH, (3*R*^{*},4*S*^{*})-3,4-dihidroxy-7-metil-3,4-dihidro-1(2H)-naftalenona (**54**)

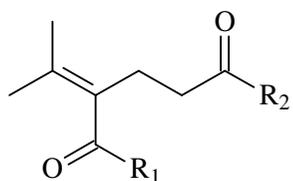
R2=R3=H, R1=R4= OH, (3*S*^{*},4*S*^{*})-3,4-dihidroxy-7-metil-3,4-dihidro-1(2H)-naftalenona (**55**)

ABDEL-LATEFF *et al.*, 2002



Acido pentanedioico 2-(1-metiletenil)-5-metil ester (**59**)

ABDEL-LATEFF *et al.*, 2002

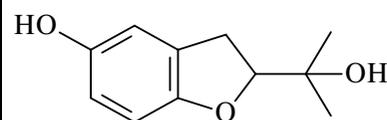


R1=R2=OH acido 2-(1-Metiletilidene)pentanedioico (**56**)

R1=OH, R2= OCH₃ acido pentanedioico 2-(1-etiletilidene)-5-metil éster (**57**)

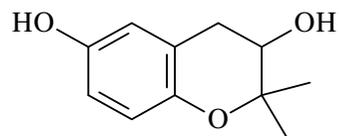
R1=OCH₃, R2=OH acido pentanedioico 2-(1-etiletilidene)-1-metil éster (**58**)

ABDEL-LATEFF *et al.*, 2002



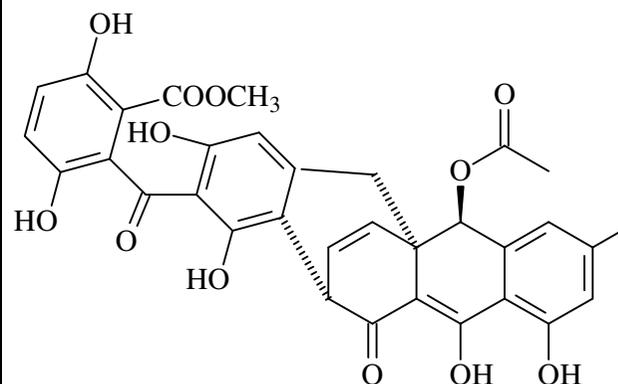
2-(1-Hidroxi-1-metil)-2,3-dihidrobenzofuran-5-ol (**60**)

ABDEL-LATEFF *et al.*, 2002.



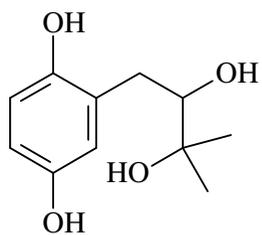
2, 2-Dimetilcroman-3, 6-diol (**61**)

ABDEL-LATEFF *et al.*, 2002.



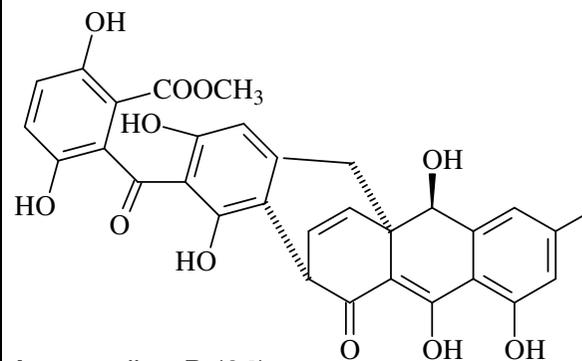
Acremodina A (**63**)

ASSANTE *et al.*, 2005.



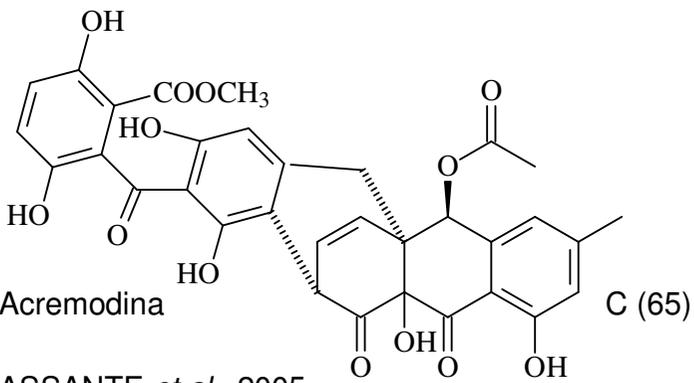
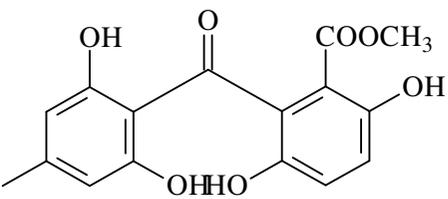
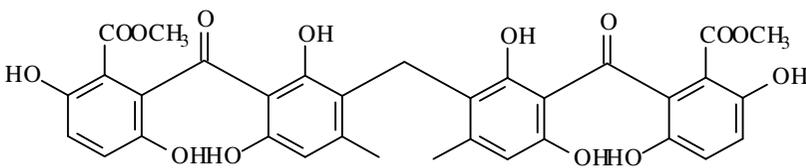
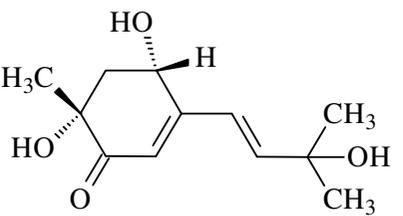
2-(3-Dihidroxi-3-metilbutil)benzene-1,4-diol (**62**)

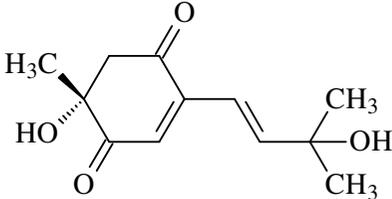
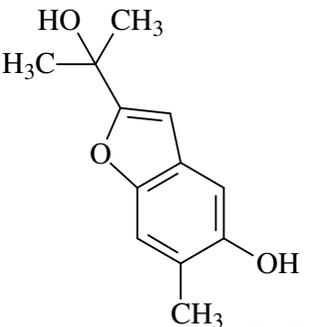
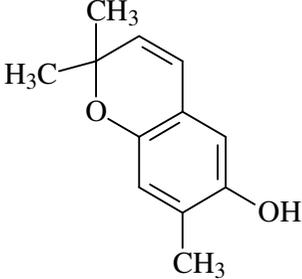
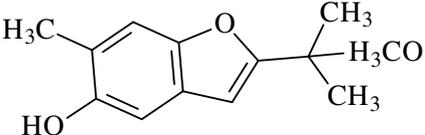
ABDEL-LATEFF *et al.*, 2002.

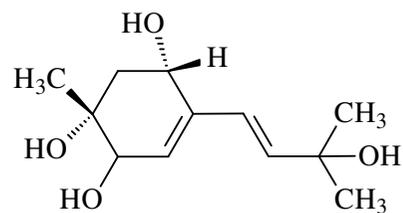


Acremodina B (**64**)

ASSANTE *et al.*, 2005.

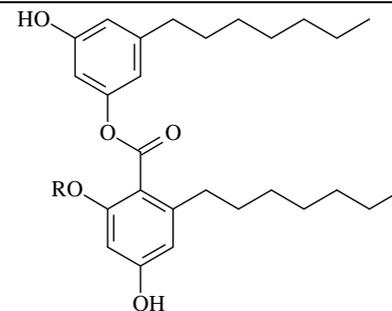
 <p>Acremodina C (65)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>	 <p>Acremodina E (67)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>
 <p>Acremodina D (66)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>	 <p>Acremina A (68)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>

 <p>Acremina B (69)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>	 <p>Acremina D (71)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>
 <p>Acremina C (70)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>	 <p>Acremina E (72)</p> <p>ASSANTE <i>et al.</i>, 2005.</p>



Acremina F (73)

ASSANTE *et al*, 2005.

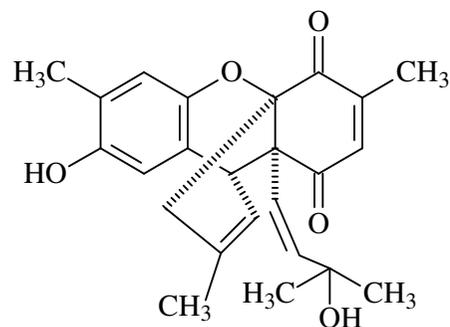


R=D-galatopiranoside, 3-heptil-5-hidroxifenil 2-heptil-4,6-dihidroxibenzoato- D-galatopiranoside (75)

R=D-digalatopiranoside, 3-heptil-5-hidroxifenil 2-heptil-4,6-dihidroxibenzoato- D-digalatopiranoside (76)

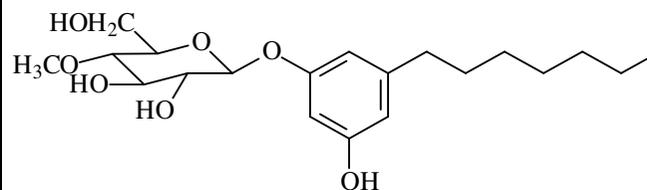
R=H, 3-heptil-5-hidroxifenil 2-heptil-4,6-dihidroxibenzoato- (77)

BUNYAPAIBOONSRI *et al*, 2007



Acremina G (74)

ARNONE *et al.*, 2008.



5-heptilresorcinol- 4-O-metil—glucopiranoside (78)

BUNYAPAIBOONSRI *et al.*, 2007

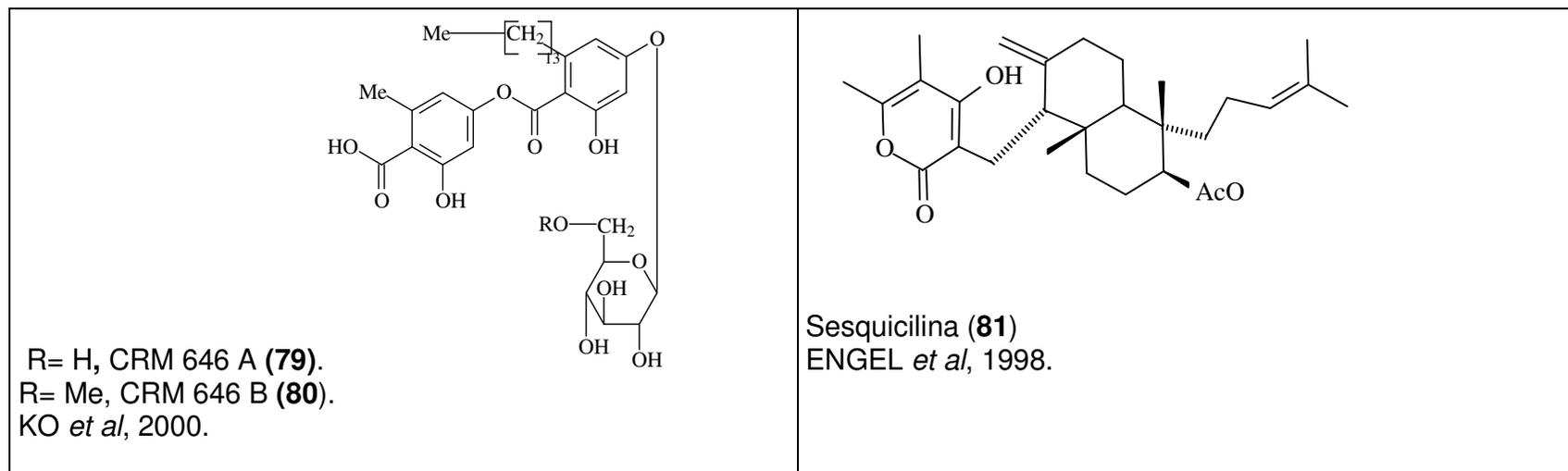
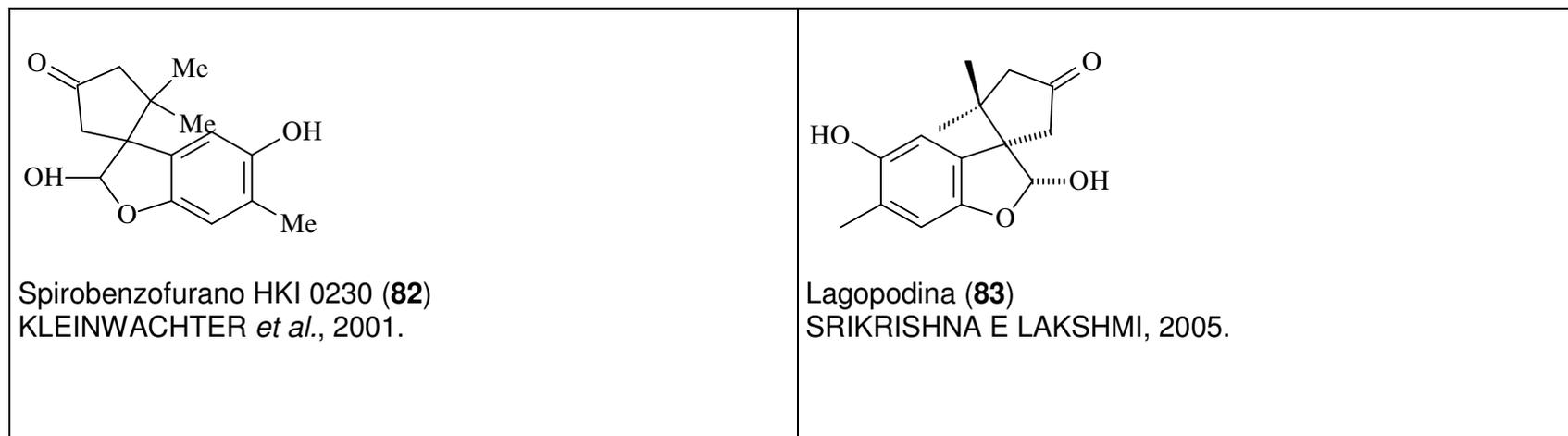
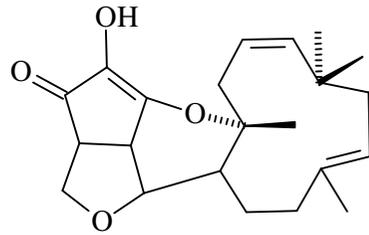
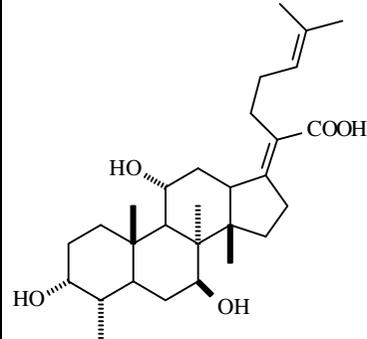


Tabela 9-Terpenos – Triterpenos e Sesquiterpenos isolados do gênero *Acremonium*.



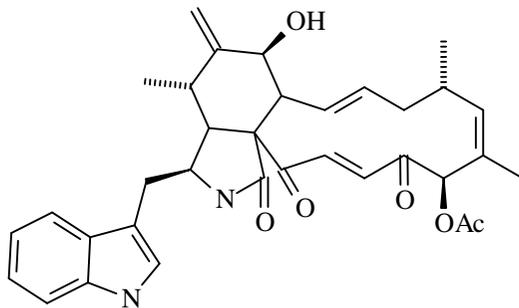


Xenovuleno A (**84**)
CLOUGH *et al.*, 2000.

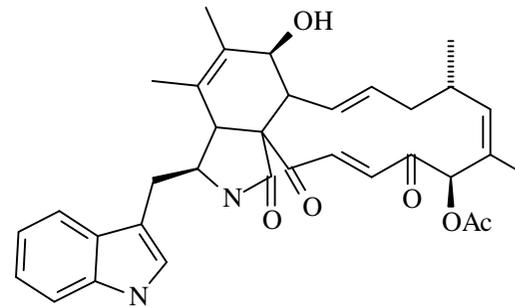


Ácido hidroxifusídico (**85**)
EVANS *et al.*, 2006.

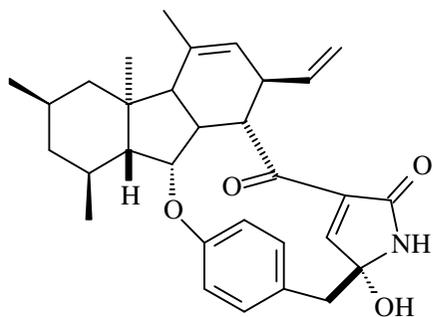
Tabela 10-Chateoglobosinas e Pirrocidinas isoladas do gênero *Acremonium*.



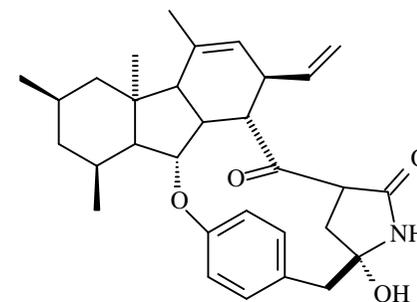
19-O-acetilchaetoglobosina D (**86**)
RATNAYAKE *et al.*, 2008



19-O-acetilchaetoglobosina B (**87**)
RATNAYAKE *et al.*, 2008

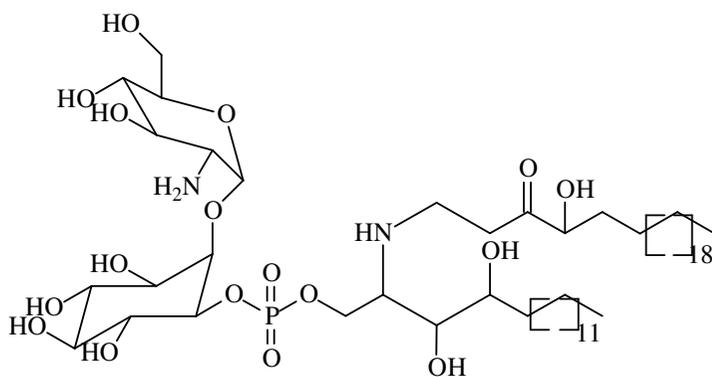


Pirrocidina A (**88**)
WICKLOW *et al.*, 2005; BIGELIS, 2006

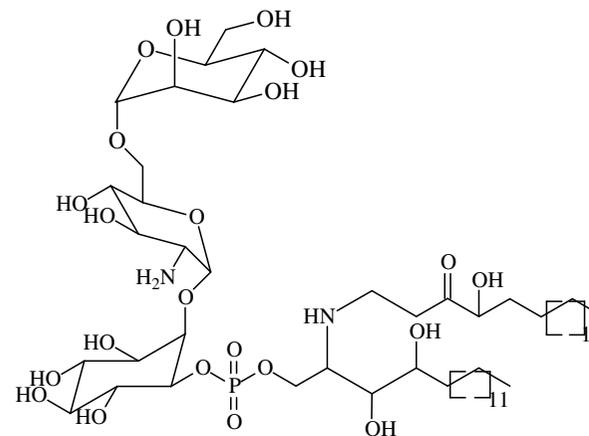


Pirrocidina B (**89**)
WICKLOW *et al.*, 2005; BIGELIS, 2006

Tabela 11-Fosfoceramidas isoladas do gênero *Acremonium*.



ZGL 1 (**90**)
YAMADA-HADA *et al.*, 2004



ZGL 2 (**91**)
YAMADA-HADA *et al.*, 2004

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃOS

5.1-Análise dos ácidos graxos de *Ananas spp*

O estudo comparativo dos ácidos graxos das espécies de *Ananas* foi realizado com as folhas e raízes de *A. comosus*, *A. lucidus* e *A. bracteatus* cultivadas no campo, além de plântulas de *A. lucidus* e *A. bracteatus* cultivadas *in vitro*. Após extração da fração lipídica por saponificação dos ácidos graxos de cada espécie e obtenção dos ésteres metílicos (Item 6.4.10, p. 150), estes foram analisados por CG/EM (Item 6.2.2, p. 144) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2001). Um total de vinte e um ácidos graxos, na forma de ésteres metílicos, foi identificado nas oito amostras analisadas (Tabela 12, p. 43), sendo dezesseis (76%) ácidos graxos saturados e cinco (24%) insaturados.

Dentre os ácidos graxos saturados identificados (Tabela 12, p. 43), observou-se que a maioria encontrava-se na composição de *A. bracteatus* (13 constituintes) e *A. comosus* (9 constituintes) cultivados no campo. Somente três ácidos graxos saturados foram identificados em *A. lucidus*. Nas espécies cultivadas *in vitro*, *A. bracteatus* e *A. lucidus* apresentaram em suas composições, um e três ácidos graxos saturados, respectivamente.

O ácido palmítico (16:0) foi identificado em sete, das oito amostras analisadas. Esse ácido graxo mostrou-se como constituinte presente em quatro amostras, estando ausente nas folhas de *A. lucidus* e em baixa concentração nas raízes dessa espécie. Vale ressaltar que nas espécies cultivadas *in vitro*, este ácido graxo foi identificado em altas concentrações (>60%), sendo o único ácido graxo saturado em *A. bracteatus*. Segundo VIANNI e BRAZ-FILHO (1995), o ácido palmítico é o ácido graxo mais amplamente distribuído na natureza, funcionando como precursor de ácidos graxos naturais saturados e insaturados de cadeia longa.

O ácido esteárico (18:0) foi o segundo ácido graxo saturado presente no maior número de amostras analisadas, estando ausente apenas em *A. bracteatus*

cultivada *in vitro* e em *A. lucidus* (folhas e raízes) cultivada no campo. Ainda segundo VIANNI e BRAZ-FILHO (1995), a maioria dos óleos vegetais contém de 1 a 5% de ácido esteárico.

Os ácidos nonanedióico (11:0) e 12-metiltetradecanóico (12-Me, 14:0) foram os únicos ácidos graxos dicarboxilados e ramificado, respectivamente, identificados nas amostras analisadas. Ambos foram detectados em *A. lucidus*. Os ácidos graxos saturados de cadeia com mais de vinte carbonos foram identificados somente nas folhas de *A. bracteatus* e raízes de *A. comosus*.

Foram identificados cinco ácidos insaturados, sendo os ácidos linoléico (ω -6; 9(Z), 12(Z) octadecadienóico) e oléico (ω -9; 9(Z)-octadecenóico) os dois ácidos graxos mais frequentes. Estes foram identificados nas três espécies cultivadas no campo, mas mostraram-se ausentes nas espécies *in vitro*. O ácido linoléico (9(Z),12(Z) octadecadienóico) foi identificado em 73,4% nas raízes de *A. lucidus* cultivada no campo, embora ausente na mesma espécie cultivada *in vitro*. Este resultado sugere *A. lucidus* como uma boa fonte de ω -6, um ácido graxo essencial à dieta humana e de animais (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1995). O ácido elaídico (9(E)-octadecenóico), um ácido da família ω -9 com configuração *E*, embora pouco comum em óleos vegetais (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1995), foi identificado em 24,3% em *A. bracteatus* cultivado *in vitro* e em baixas concentrações em todas as espécies cultivadas no campo. O ácido 10-undecenóico (10-11:1) foi identificado apenas nas folhas de *A. lucidus* cultivado no campo.

Em suma, o estudo da composição de ácidos graxos de *A. comosus*, *A. lucidus* e *A. bracteatus* permitiu a identificação de um perfil diferenciado entre as espécies. Dentre as espécies provenientes do cultivo no campo, *A. lucidus* se diferenciou das demais pelo alto teor de ácidos graxos insaturados. *A. lucidus* e *A. bracteatus* apresentaram um perfil de ácido graxo muito semelhante, diferenciando-se, principalmente, no teor de ácido linoléico (9,12 -18:2) nas folhas das duas espécies. As espécies *A. lucidus* e *A. bracteatus* cultivadas *in vitro*

apresentaram um alto teor de ácido graxo saturado, sendo o ácido palmítico (16:0) o principal constituinte.

O estudo não nos permitiu utilizar o perfil de ácidos graxos presentes nas espécies como marcadores taxonômicos, para isto seria um necessário a continuidade do estudo em relação ao ciclo de variação circadiana e de sazonalidade, a fim de se chegar a um perfil que englobe todas estes parâmetros.

As Figuras 9-16 (p. 44-47) apresentam os cromatogramas obtidos nas análises por CG das amostras analisadas. Os espectros de massa de todos os ésteres metílicos dos ácidos graxos identificados encontram-se apresentados nas Figuras 17-37 (p. 48-53).

Tabela 12-Perfil comparativo de ácidos graxos das espécies *A. lucidus*, *A. bracteatus* e *A. comosus*.

Ácidos graxos saturados	Cultivadas no campo						Cultivadas <i>in vitro</i>	
	<i>A. bracteatus</i>		<i>A. comosus</i>		<i>A. lucidus</i>		<i>A. bracteatus</i>	<i>A. lucidus</i>
	Folhas (%)	Raíz (%)	Folhas (%)	Raíz (%)	Folhas (%)	Raíz (%)	(%)	(%)
Ácido caprílico (8:0)						7.5		
Ácido cáprico (10:0)		1.5						
Ácido nonanedióico (11:0)						5.2		
Ácido 12-metiltetradecanóico (12Me-14:0)								14.6
Ácido laurico (12:0)	2.3	3.3	0.5					
Ácido mirístico (14:0)	4.8		0.9	1.0				
Ácido pentadecanóico (15:0)	1.9	1.8	0.5					
Ácido palmítico (16:0)	25.4	33.3	17.1	22.2		7.6	68.6	63.7
Ácido heptadecanóico (17:0)	4.1		1.3	1.7				
Ácido esteárico (18:0)	18.3	8.2	6.8	11.6				6.6
Ácido nonadecanóico (19:0)	1.2							
Ácido araquídico (20:0)	9.6			3.1				
Ácido heneicosanóico (21:0)		1.3						
Ácido dodecosanóico (22:0)	4.0			1.6				
Ácido tricosanóico (23:0)	1.0							
Ácido tetracosanóico (24:0)	6.2			2.2				
Ácidos graxos insaturados	Cultivadas no campo						Cultivadas <i>in vitro</i>	
	<i>A. bracteatus</i>		<i>A. comosus</i>		<i>A. lucidus</i>		<i>A. bracteatus</i>	<i>A. lucidus</i>
	Folhas (%)	Raíz (%)	Folhas (%)	Raíz (%)	Folhas (%)	Raíz (%)	(%)	(%)
Ácido 10-undecenóico (10-11:1)						35.4		
Ácido 9-hexadecenóico (9-16:1)			1.1			2.2		15.1
Ácido eláidico (9-18:1)		1.9	1.9			5.4	24.3	
Ácido linoléico (9,12 -18:2)	2.2	18.6	26.3	38.4		73.7		
Ácido oléico (9-18:1)	16.5	17.8	39.4	15.5	26.7	18.7		
TOTAL	96.5	87.7	95.8	97.3	82.4	100	92.9	100

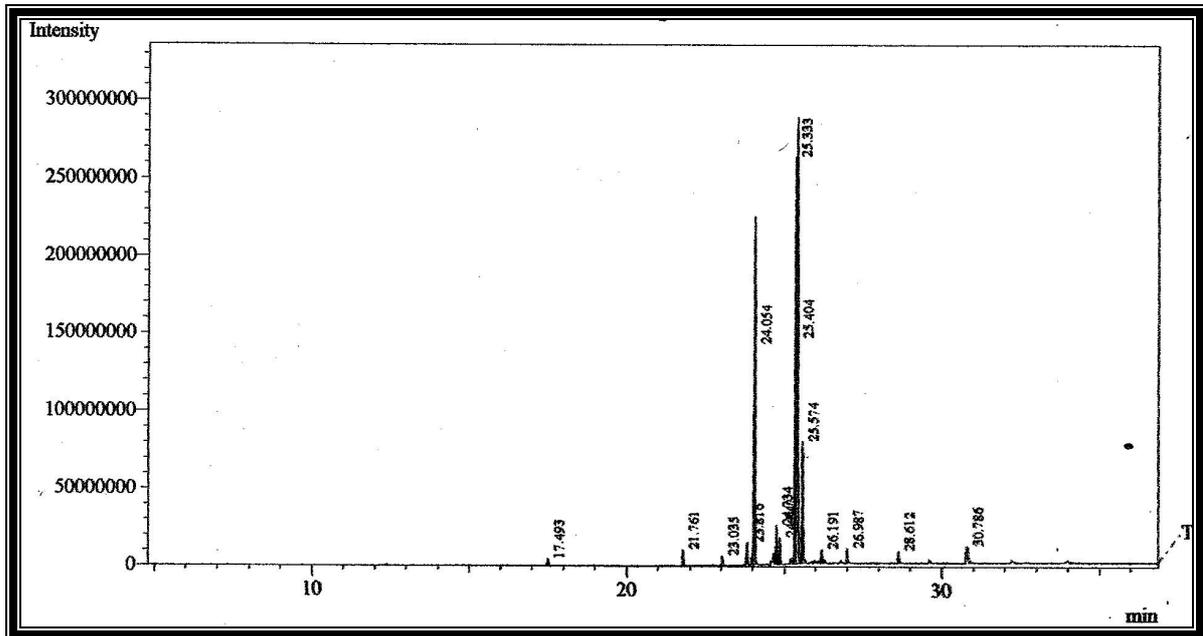


Figura 9-Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de *A. comosus*.

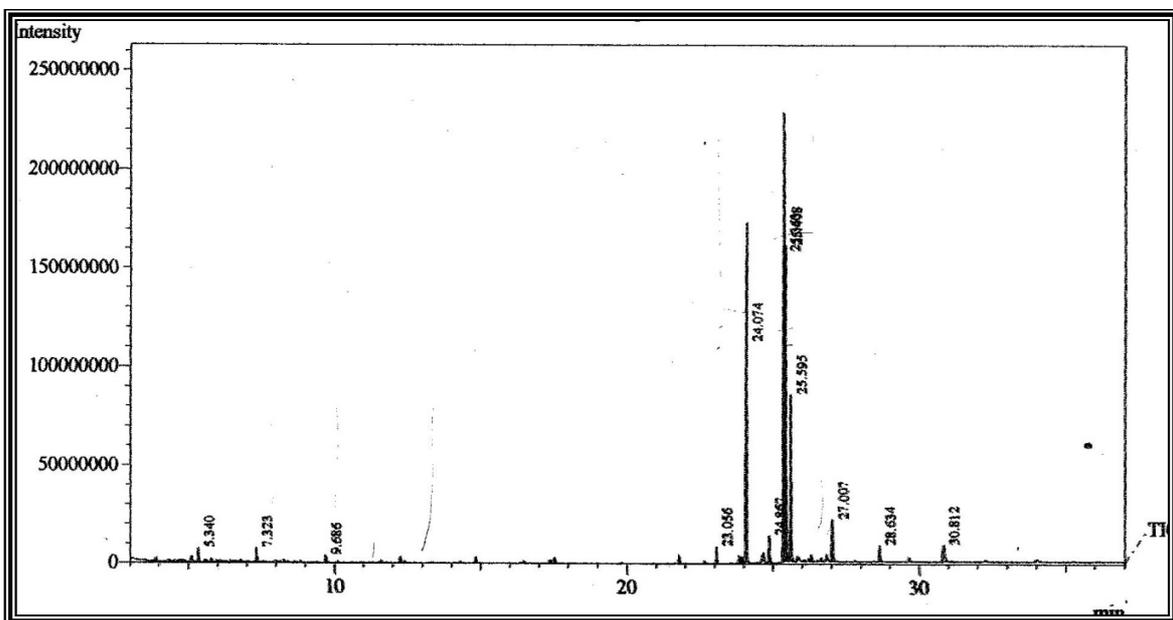


Figura 10-Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das raízes de *A. comosus*.

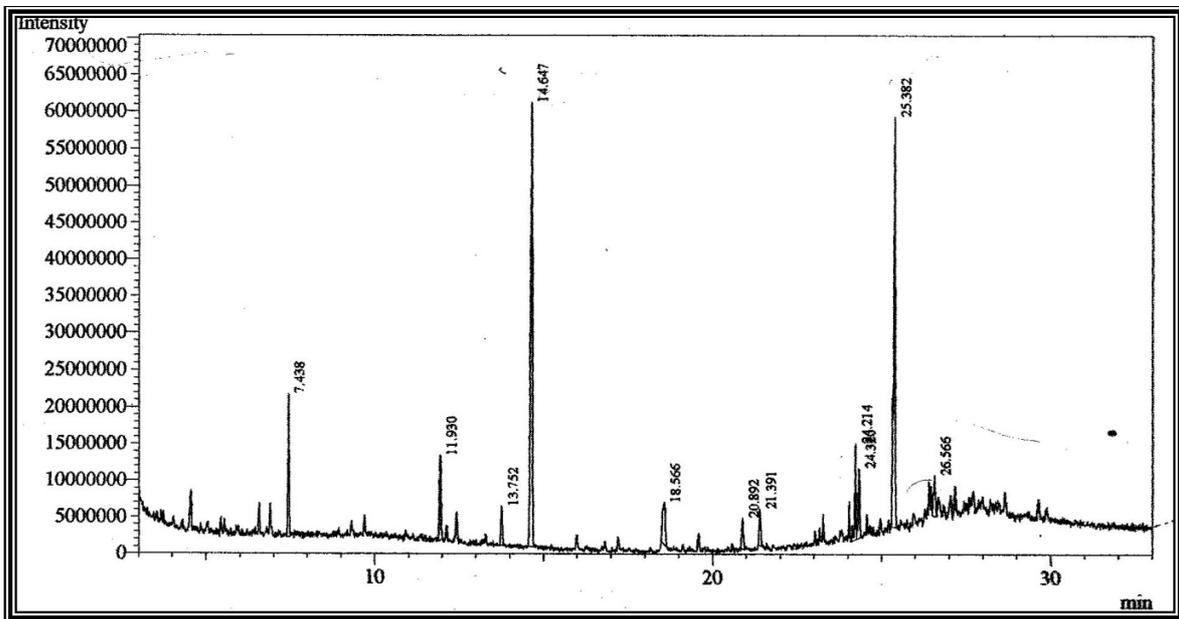


Figura 11-Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de *A. lucidus*.

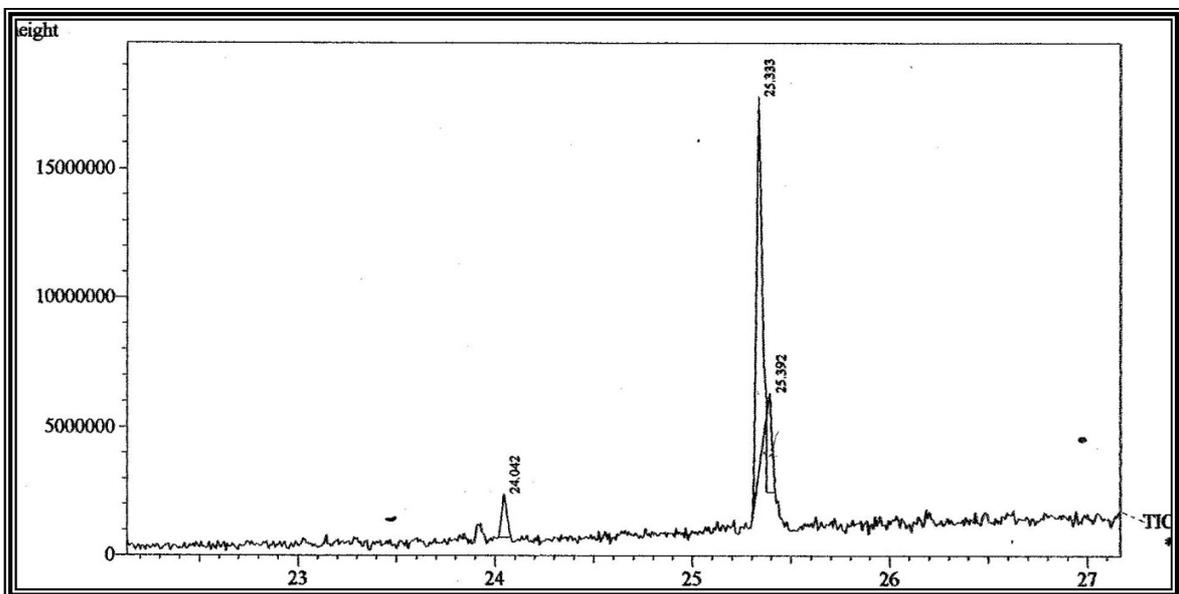


Figura 12-Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de *A. lucidus*.

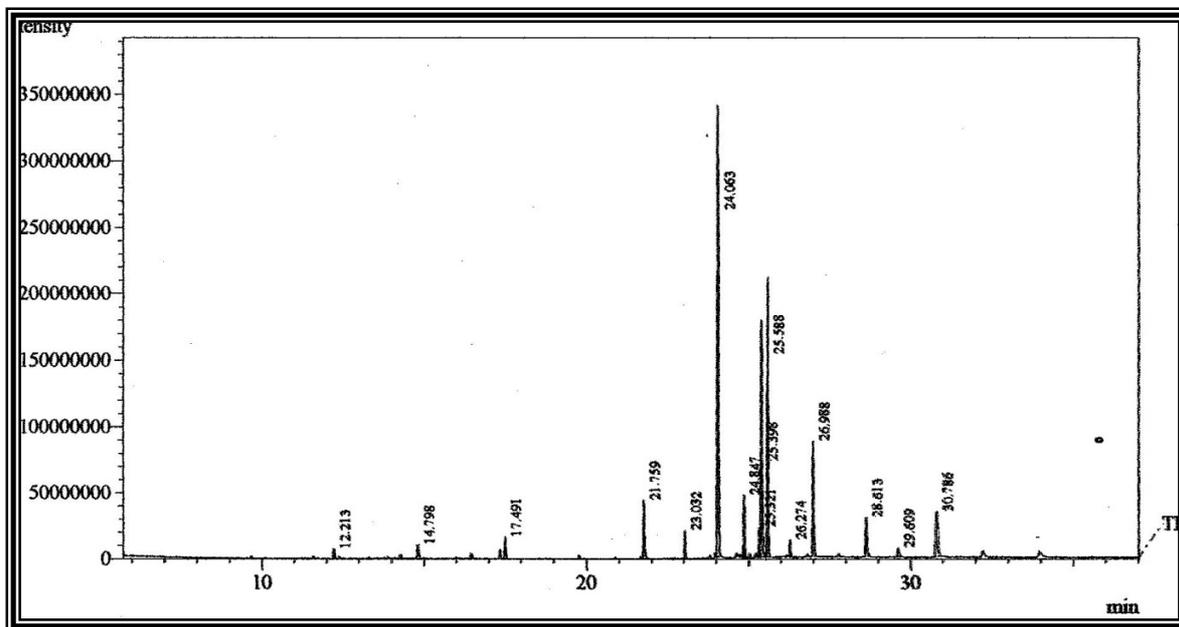


Figura 13-Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de *A. bracteatus*.

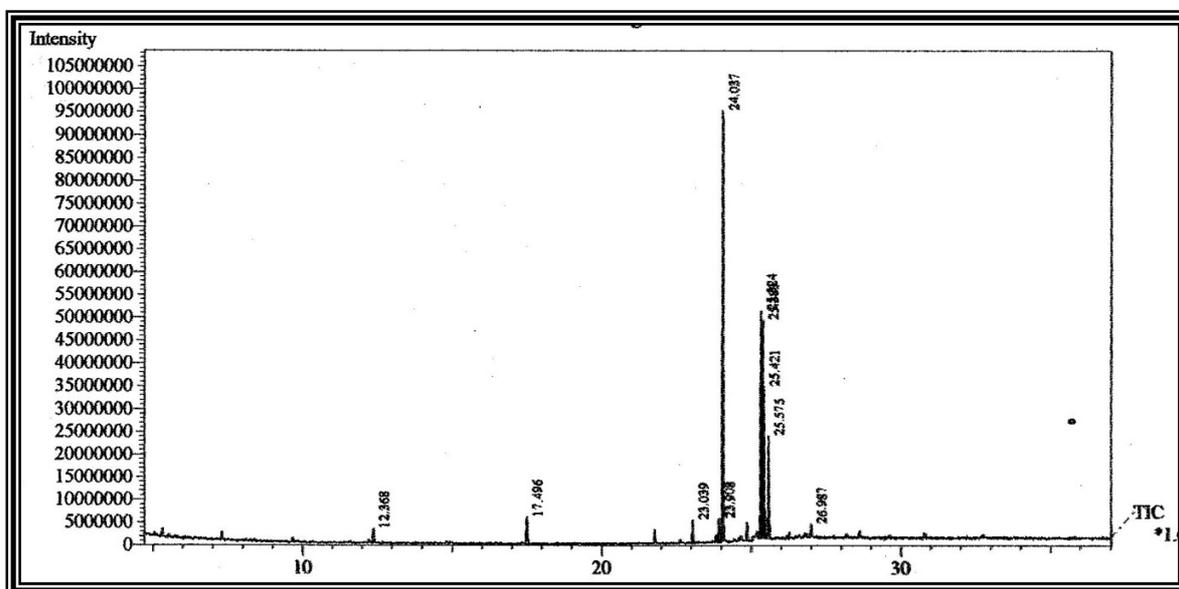


Figura 14-Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das folhas de *A. bracteatus*.

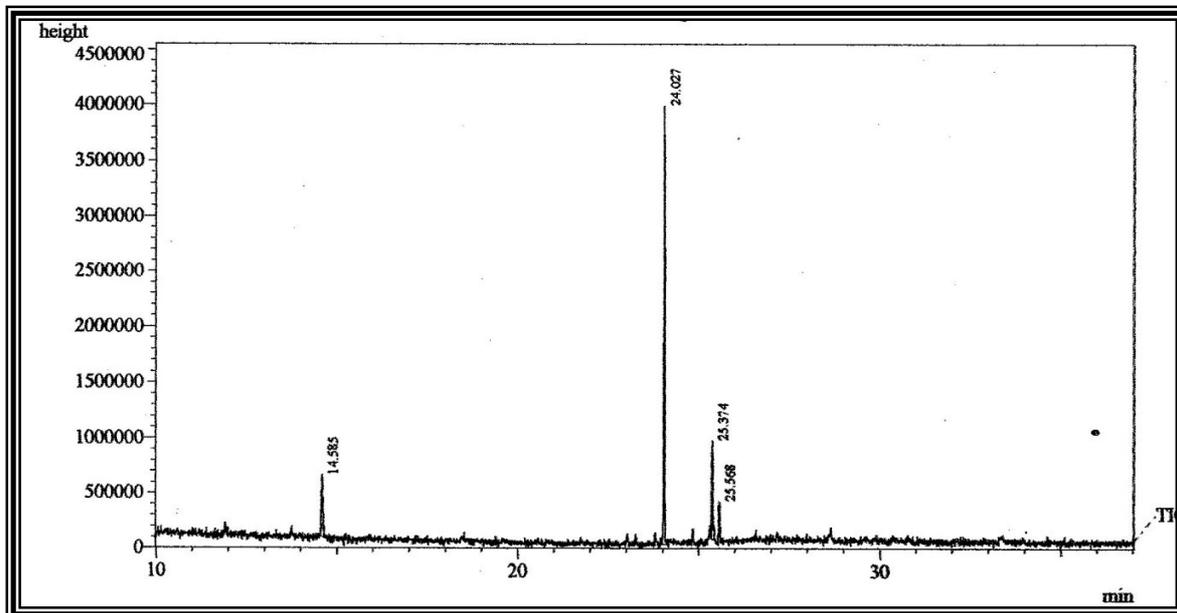


Figura 15- Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de *A. lucidus* cultivadas *in vitro*.

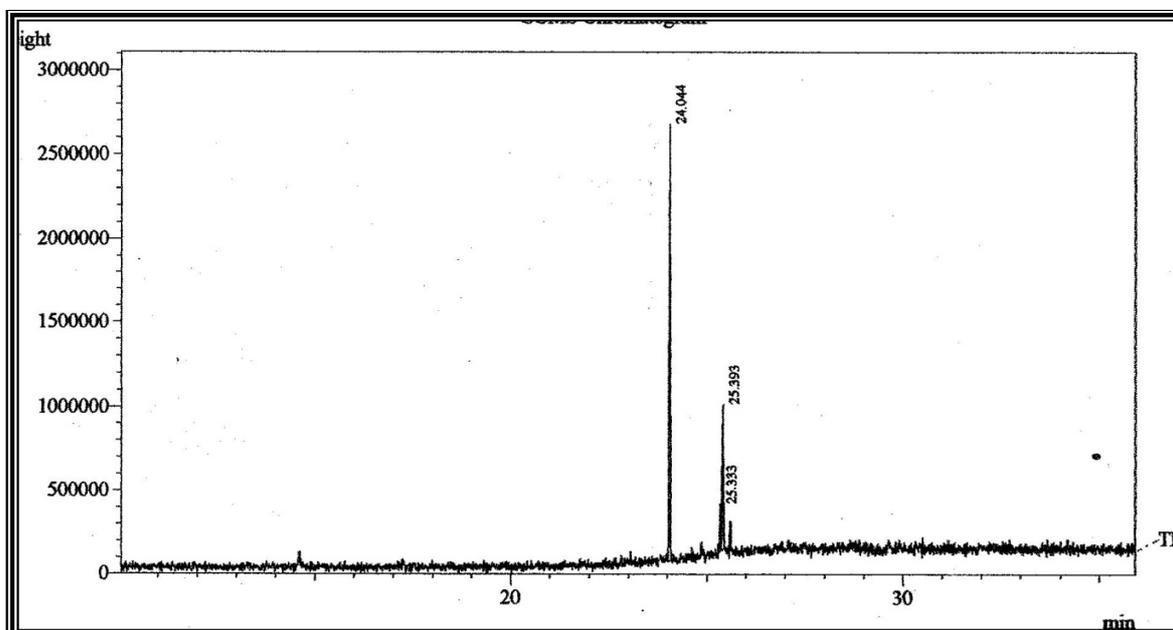


Figura 16- Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de *A. bracteatus* cultivadas *in vitro*.

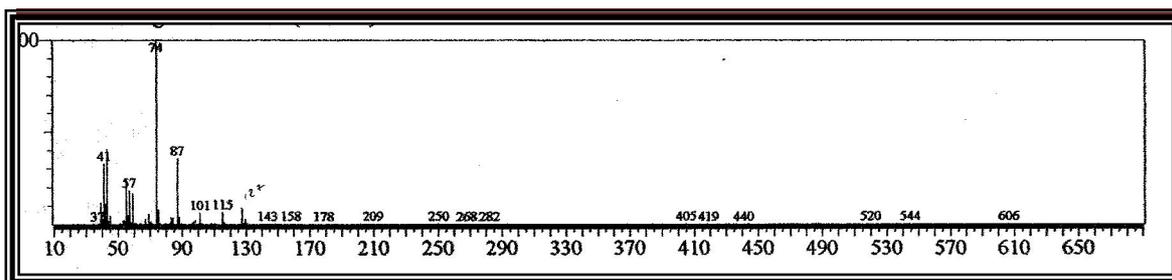


Figura 17-Espectro de massa do ester metílico do ácido caprílico (8:0) (IE, 70eV).

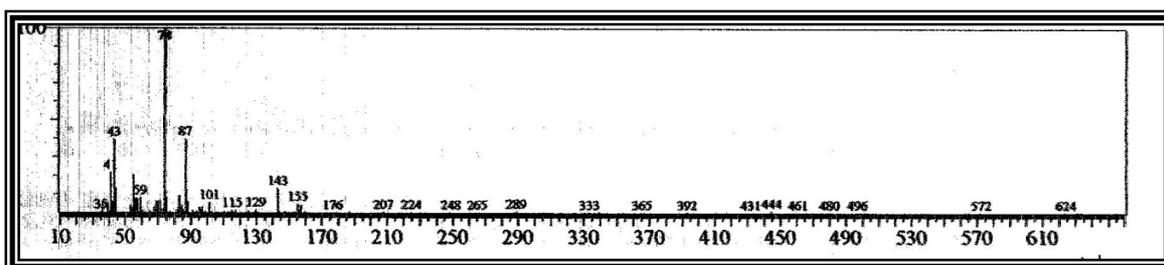


Figura 18- Espectro de massa do ester metílico do ácido cáprico (10:0) (IE, 70eV).

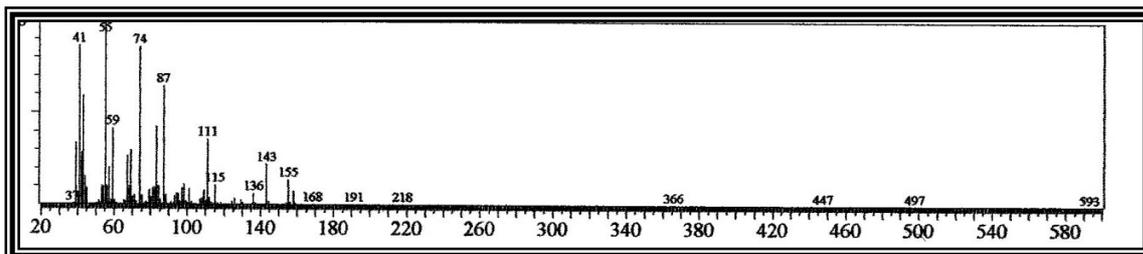


Figura 19-Espectro de massa do ester metílico do ácido nonanodióico (11: 0) (IE, 70eV).

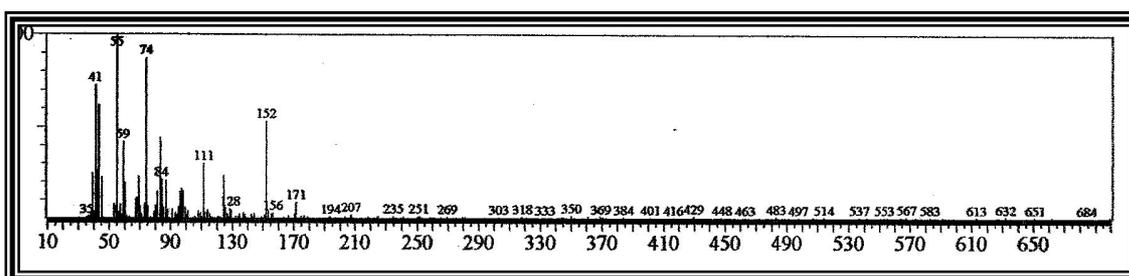


Figura 20-Espectro de massa do ester metílico do ácido 10-undecenóico (10-11:1) (IE, 70eV).

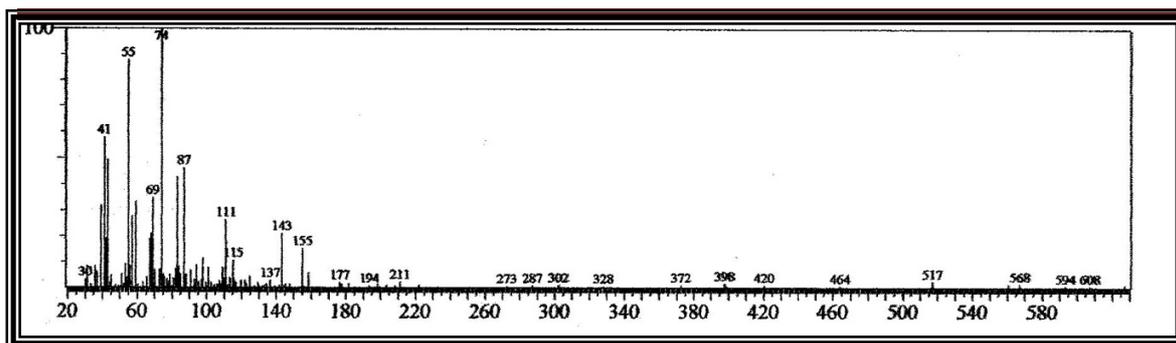


Figura 21- Espectro de massa do ester metílico do ácido 12-metiltetradecanóico (14:0) (IE, 70eV).

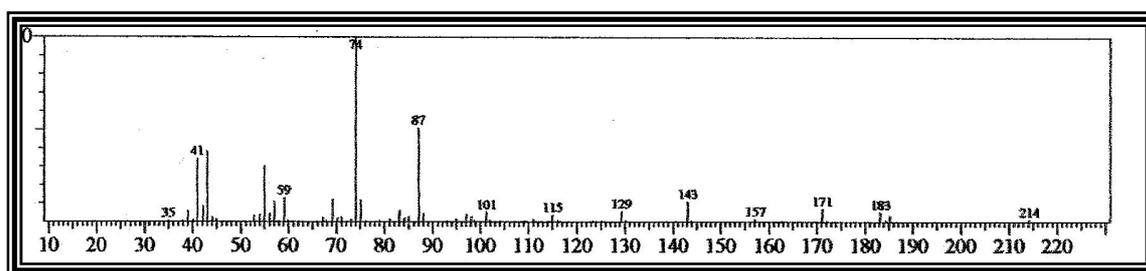


Figura 22- Espectro de massa do ester metílico do ácido láurico (12:0) (IE, 70eV).

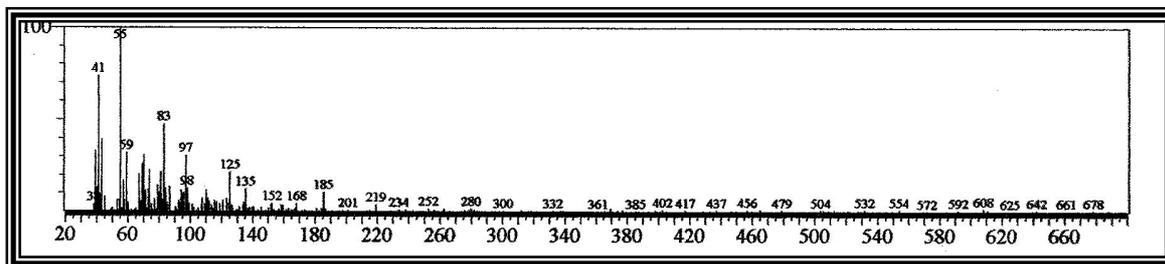


Figura 23- Espectro de massa do ester metílico do ácido 9-hexadecenóico (9-16:1) (IE, 70eV).

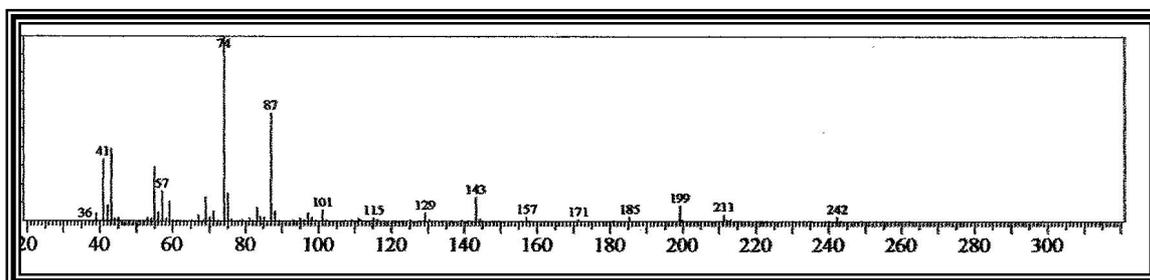


Figura 24- Espectro de massa do ester metílico do ácido mirístico (14:0) (IE, 70eV).

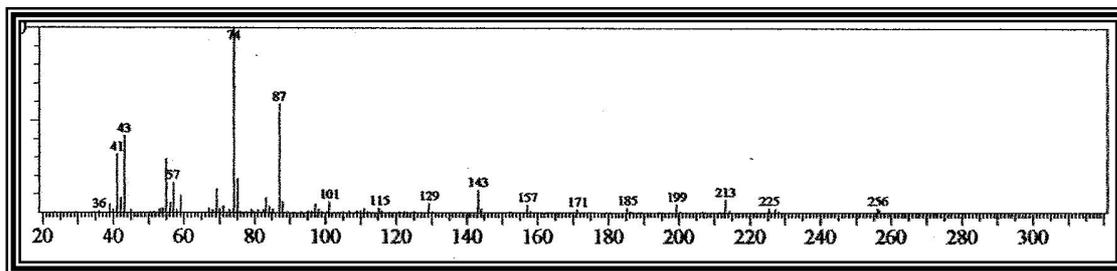


Figura 25-Espectro de massa do ester metílico do ácido pentadecanóico (15:0) (IE, 70eV).

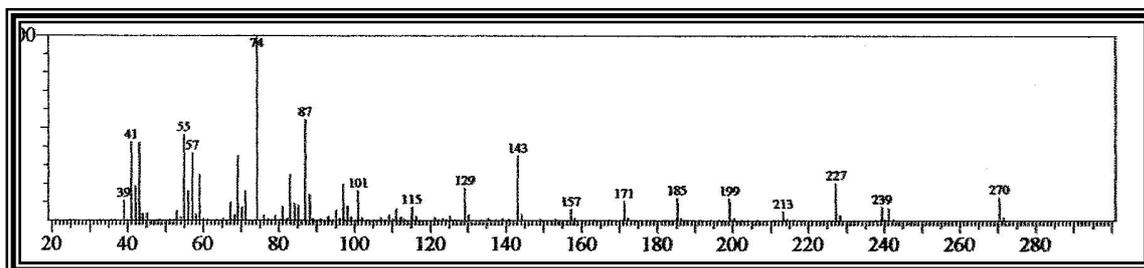


Figura 26-Espectro de massa do ester metílico do ácido palmítico (16:0) (IE, 70eV).

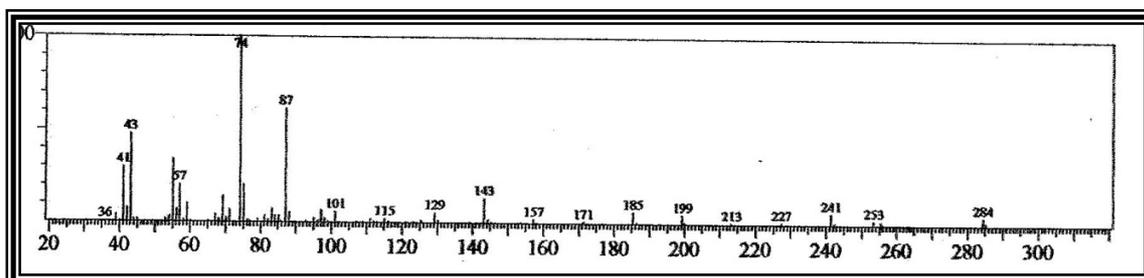


Figura 27-Espectro de massa do ester metílico do ácido heptadecanóico (17:0) (IE, 70eV).

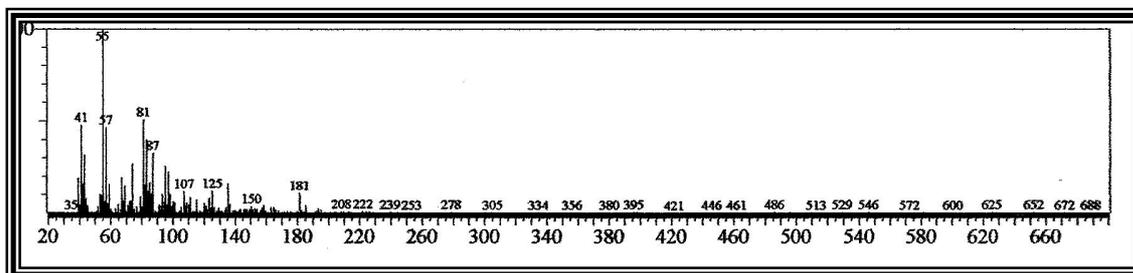


Figura 28-Espectro de massa do ester metílico do ácido elaídico (9-18:1) (IE, 70eV).

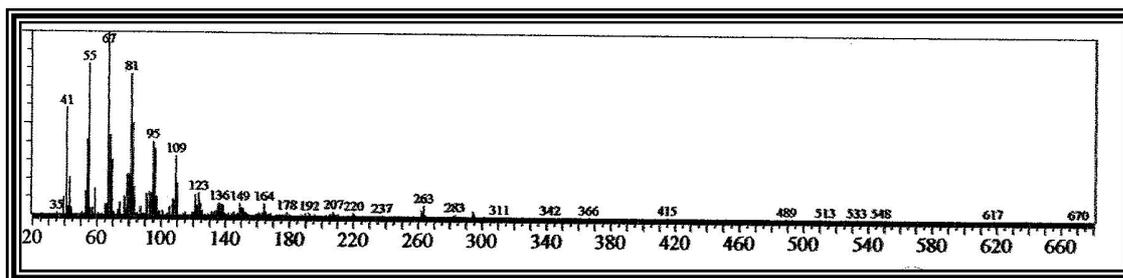


Figura 29-Espectro de massa do ester metílico do ácido linoléico (9,12-18:2) (IE, 70eV).

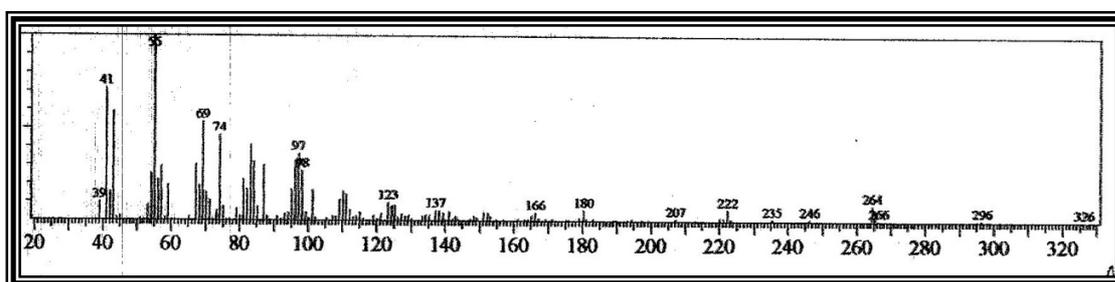


Figura 30-Espectro de massa do ester metílico do ácido oléico (9-18:1) (IE, 70eV).

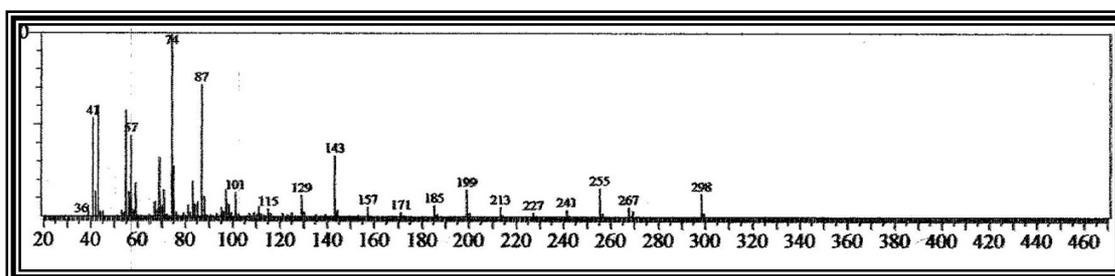


Figura 31-Espectro de massa do ester metílico do ácido esteárico (18:0) (IE, 70eV).

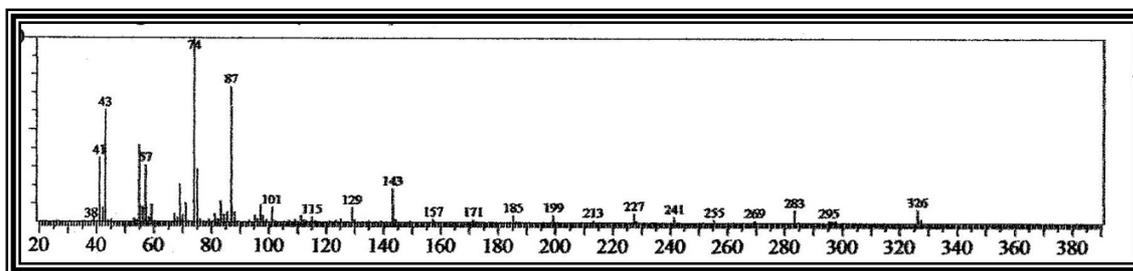


Figura 32-Espectro de massa do ester metílico do ácido nonadecanóico (19:0) (IE, 70eV).

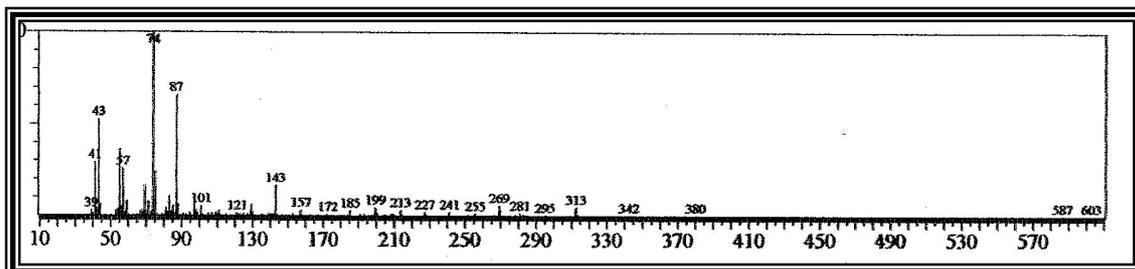


Figura 33- Espectro de massa do ester metílico do ácido araquídico (20:0) (IE, 70eV).

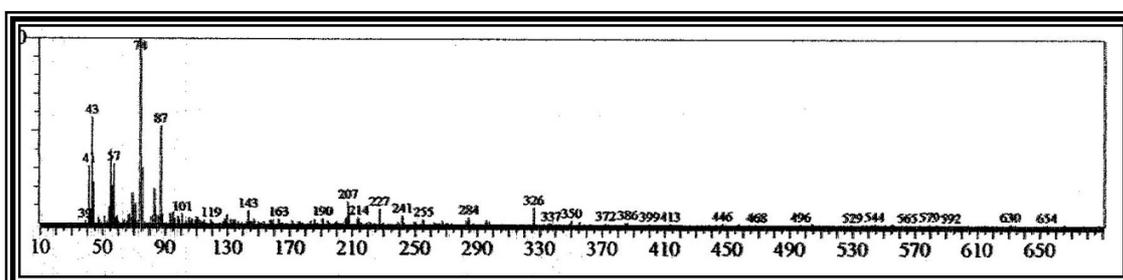


Figura 34- Espectro de massa do ester metílico do ácido heneicosanoico (21:0) (IE, 70eV).

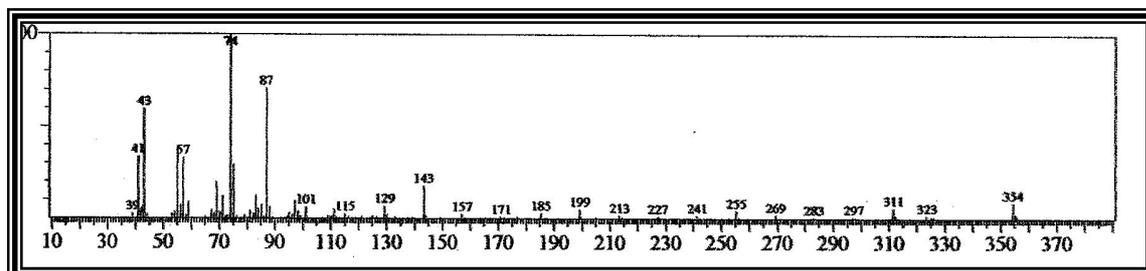


Figura 35- Espectro de massa do ester metílico do ácido docosanoico (22:0) (IE, 70eV).

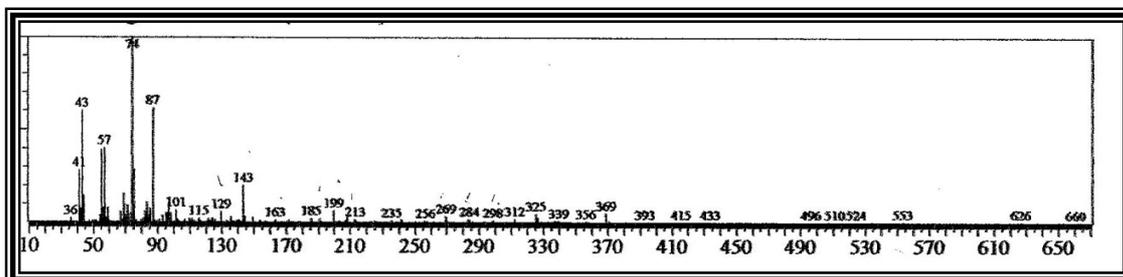


Figura 36- Espectro de massa do ester metílico do ácido tricosanoico (23:0) (IE, 70eV).

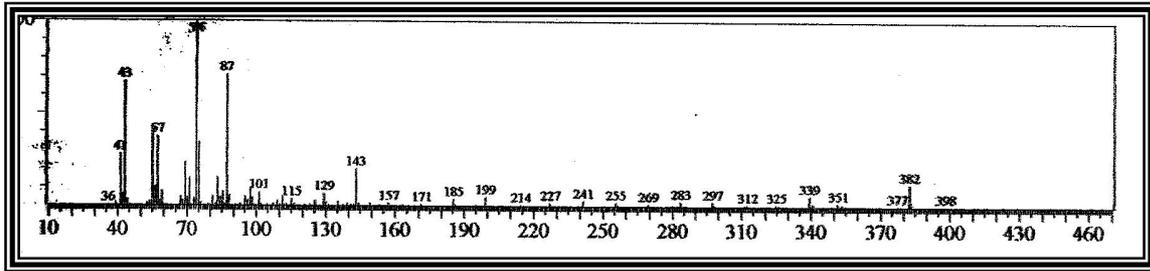


Figura 37-Espectro de massa do ester metílico do ácido tetracosanóico (24:0) (IE, 70eV).

5.2- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS

5.2.1- CONSTITUINTES ISOLADOS DE *ANANAS spp*

5.2.1.1- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **AB1**.

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica das raízes de *A. bracteatus* (ABRMC), resultou no isolamento de 15 mg de um sólido amorfo esverdeado (Item 6.4.20, p 155), sóluvel em piridina, com ponto de fusão na faixa de 253,6-253,9 °C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 41, p. 59), revelou a deformação axial $\nu_{C=C}$ de anel aromático na região de 1600-1499 cm^{-1} . As absorções em 1661 e 1171 cm^{-1} foram associadas a deformações axiais $\nu_{C=O}$ e angulares ν_{C-O} de carbonila α,β insaturada, respectivamente.

O espectro de RMN ^1H de **AB1** (Fig. 40, p. 58) revelou a presença de dois sistemas aromáticos. Um sistema *para* substituído foi observado através das absorções dos hidrogênios em δ 7,33 (2H, d, $J = 8,8$ Hz) e δ 8,22 (2H, d, $J = 8,8$ Hz). A presença de dois hidrogênios *meta* acoplados foi observada através dos sinais em δ 6,63 (1H, d, $J = 2,1$ Hz) e δ 6,71 (1H, d, $J = 2,1$ Hz). O espectro também mostrou a presença de duas hidroxilas em δ 12,6 (1H, s) e δ 13,3 (1H, s), sendo a última quelada, e dois grupos metoxilas em δ 3,80 (3H, s) e δ 3,90 (3H, s). O espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H COSY de **AB1** (Fig. 44, p. 62) confirmou o acoplamento dos hidrogênios ligados a anel aromático observados no espectro de RMN ^1H .

O espectro de RMN ^{13}C de **AB1** (Fig. 42, p. 60) apresentou 15 sinais, sendo o padrão de hidrogenação dos carbonos obtido através da comparação deste com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 43, p. 61). O espectro revelou a presença de uma carbonila em δ 179,6; 8 carbonos insaturados não hidrogenados, sendo seis oxigenados (δ 166,3, 162,9, 162,4, 157,6,157,1 e 139,3) e dois não oxigenados (δ 122,0 e 106,9); quatro carbonos metínicos (CH) sp^2 em δ 131,5, 117,0, 98,88 e 93,00, e dois carbonos metílicos (CH₃) em δ 60,4 e 56,4. Estes dois

últimos sinais foram associados à duas metoxilas, corroborando a informação obtida no espectro de RMN ^1H . A observação de um sistema *para* substituído no espectro de RMN ^1H , bem como a maior intensidade dos sinais em δ 131,5 e 117,0 em relação aos demais sinais metínicos, permitiu associar estes dois sinais a quatro carbonos. Com os dados obtidos foi possível sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, a qual foi confirmada pela presença do pico ion-molecular com razão massa/carga igual a 314 daltons no espectro de massa (Fig. 47, p. 65).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC), (Fig. 45 p. 63), permitiu associar os hidrogênios a seus respectivos carbonos. A correlação dos sinais de hidrogênio em δ 7,33 (2H, d, $J=8,8$ Hz) e δ 8,22 (2H, d, $J=8,8$ Hz) com os sinais de carbono em δ 117,0 e 131,5, respectivamente, confirmou a correspondência de dois carbonos metínicos (CH) para cada sinal de carbono.

A análise dos dados permitiram sugerir o esqueleto de um flavonóide apresentando duas metoxilas e duas hidroxilas, sendo uma destas quelada a carbonila.

A análise do espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a mais de uma ligação (HMBC) (Fig. 46, p. 64) permitiu assinalar os deslocamentos químicos para a estrutura do anel A. Através do acoplamento do hidrogênio do anel aromático tetrassubstituído em δ 6,63 com os carbonos em δ 93,0 (J^3), 106,9 (J^3), 157,1 (J^2) e 166,3 (J^2); do hidrogênio em δ 6,71 com os carbonos δ 106,9 (J^3) e 162,4 (J^2) e dos hidrogênios da metoxila em δ 3,08 com o carbono em δ 166,3 (J^3) pode-se atribuir a posição C-8 para a metoxila, sendo a posição C-5 atribuída a hidroxila quelada (Fig. 39, p. 56).

O assinalamento do anel B (*p*-substituído), bem como do anel C, foi obtido através da correlação entre os hidrogênios em δ 7,33 com o carbono em δ 122,0 (J^3); os hidrogênios em δ 8,22 com os carbonos em δ 157,6 (J^3) e 162,9 (J^3). O acoplamento do sinal de metoxila em δ 3,98 com o carbono em δ 139,3 permitiu

assinalar a posição C-3 para esta. Esse assinalamento é corroborado pela deslocamento químico em δ 60,4 para o carbono da metoxila (estericamente impedida). Desta forma, a posição da hidroxila estaria em C-4'. Com estes dados pode-se sugerir a estrutura do cumataquenina para **AB1** (Fig. 38). A confirmação da estrutura foi realizada pela comparação com os dados da literatura (DONG *et al.*, 1999). A Tabela 13 apresenta todos os assinalamentos de RMN ^1H e ^{13}C 1D/2D, bem como comparação dos dados RMN ^{13}C com dados da literatura.

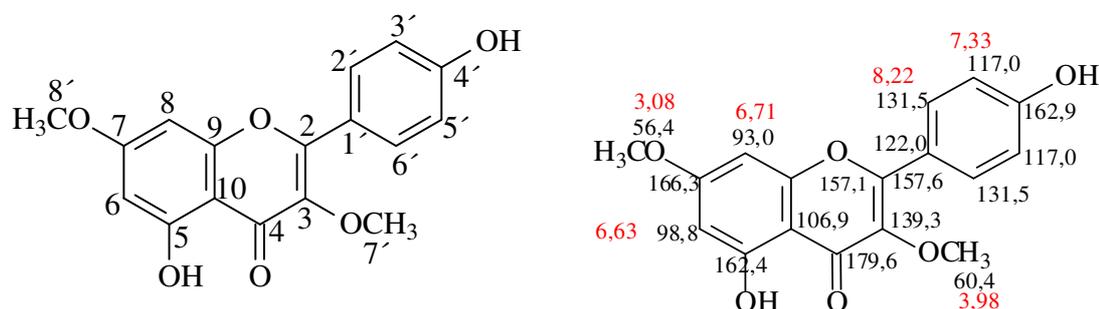


Figura 38- Estrutura de **AB1**, com respectivos deslocamentos químicos de carbono-13 e hidrogênio.

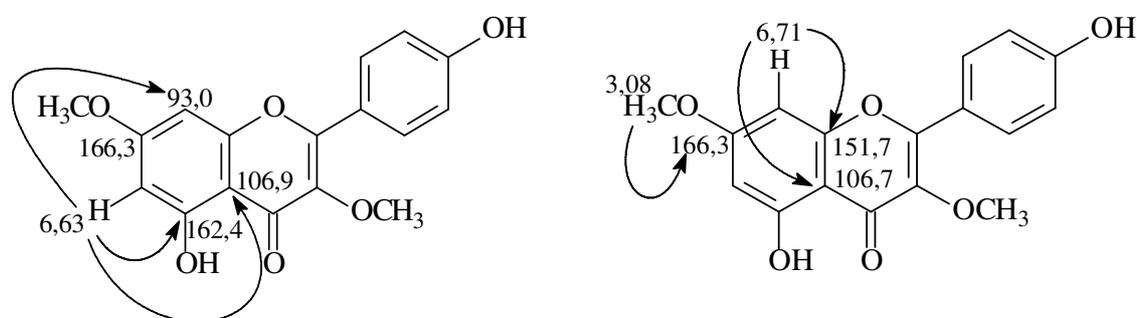


Figura 39- Correlações de **AB1** observadas no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C - HMBC.

AB1, caracterizada como a cumataquenina, esta sendo isolada pela primeira vez para o gênero, tendo sido isolada anteriormente dos frutos de *Amomum koenigii* (DONG *et al.*, 1999).

Tabela 13-Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) para o composto **AB1**, incluindo os resultados das correlações heteronucleares dos espectros 2D HSQC e HMBC e comparação com dados da literatura (DONG *et al.*, 1999).

Carbono	HSQC		HMBC		cumataquenina CDCl ₃
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
2	-	157,6			156,0
3	-	139,3		3H-7'	137,9
4	-	179,6			178,1
5	-	162,4	H-6		160,9
6	6,63 (d, J=2,1 Hz)	98,8			97,8
7	-	166,3	H-6	3H-8'	165,2
8	6,71(d, J=2,1 Hz)	93,0		H-6	92,4
9	-	157,1	H-8		156,4
10	-	106,9		H-6, H-8	105,3
1'	-	122,0		2H-3',5'	120,6
2'e 6'	8,22 (d, J = 8,8 Hz)	131,5			130,3
3' e 5'	7,33 (d, J = 8,8 Hz)	117,0			115,8
4'		162,9		2H-2',6'	160,3
7'	3,98(s)	60,4			59,8
8'	3,08(s)	56,4			56,1

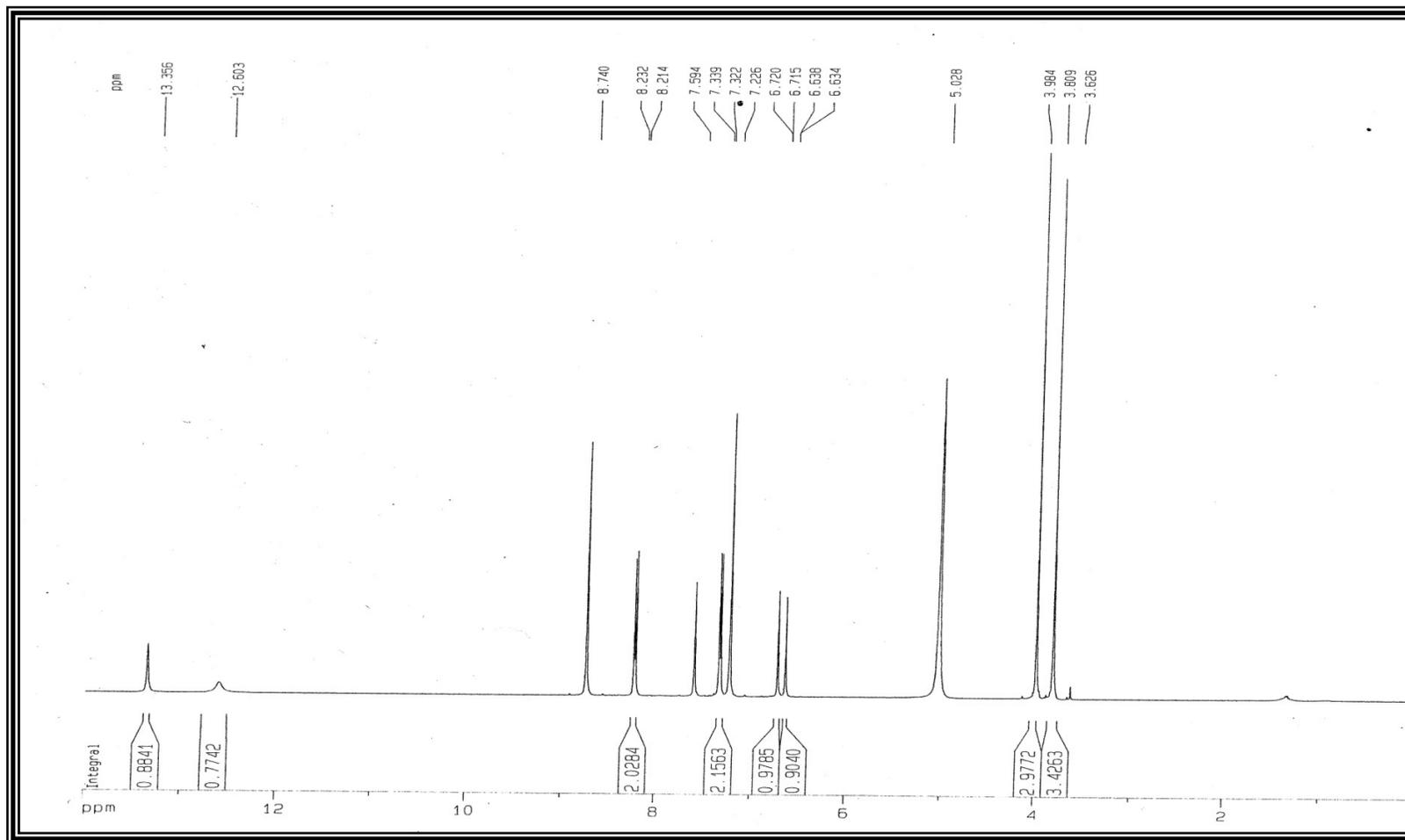


Figura 40-Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **AB1**.

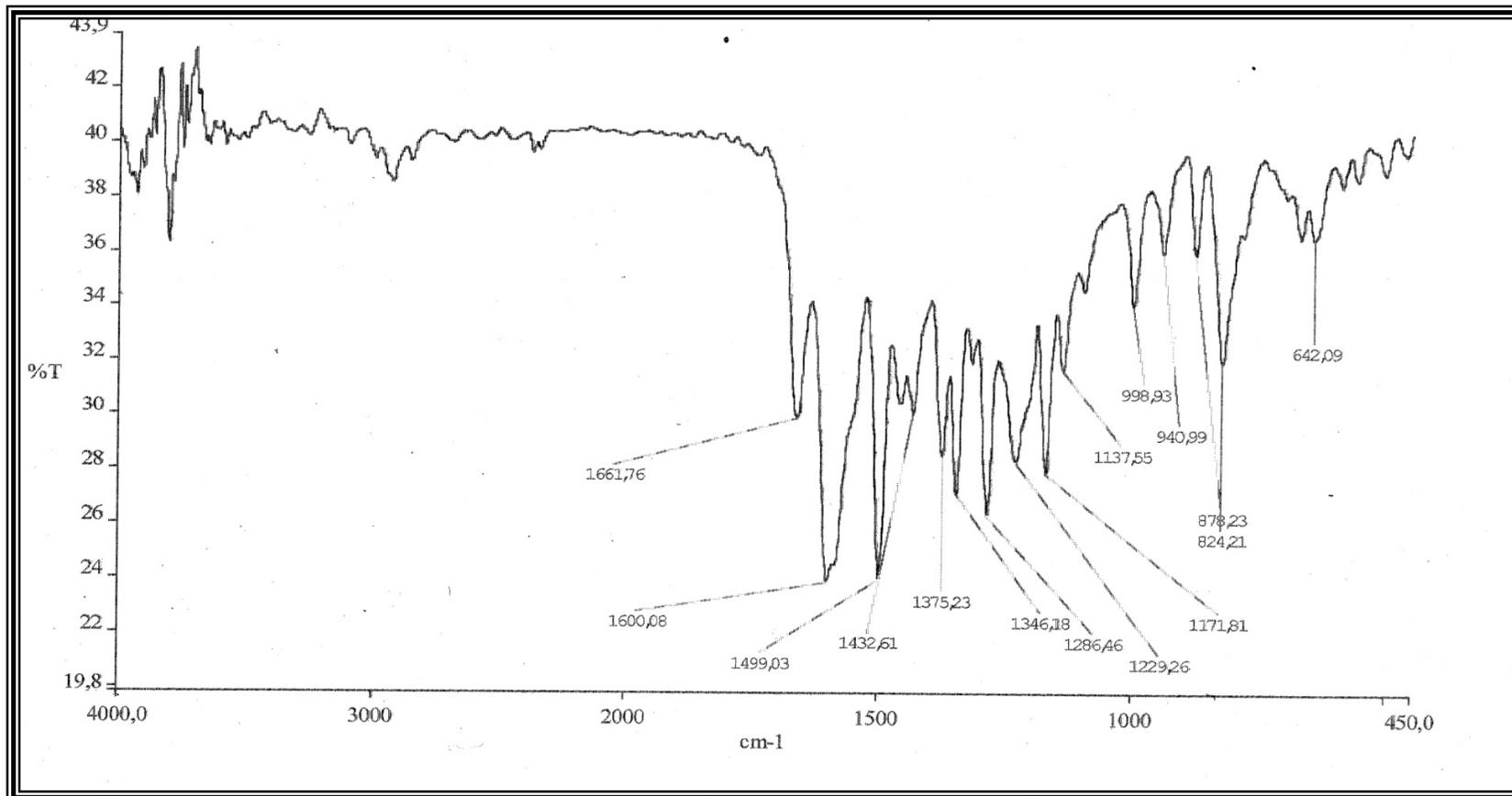


Figura 41-Espectro de absorção na região do IV (NaCl) de AB1.

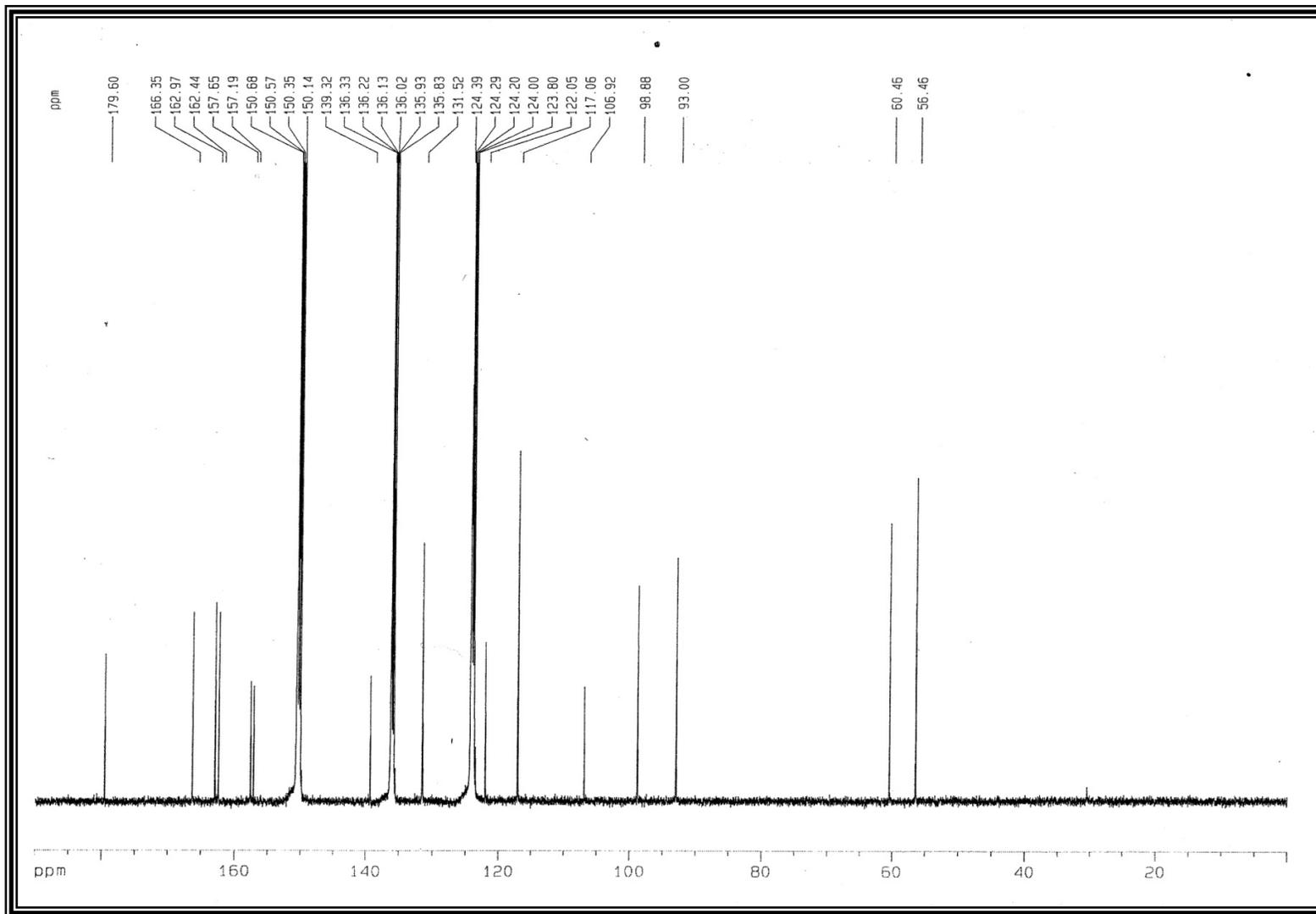


Figura 42-Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.

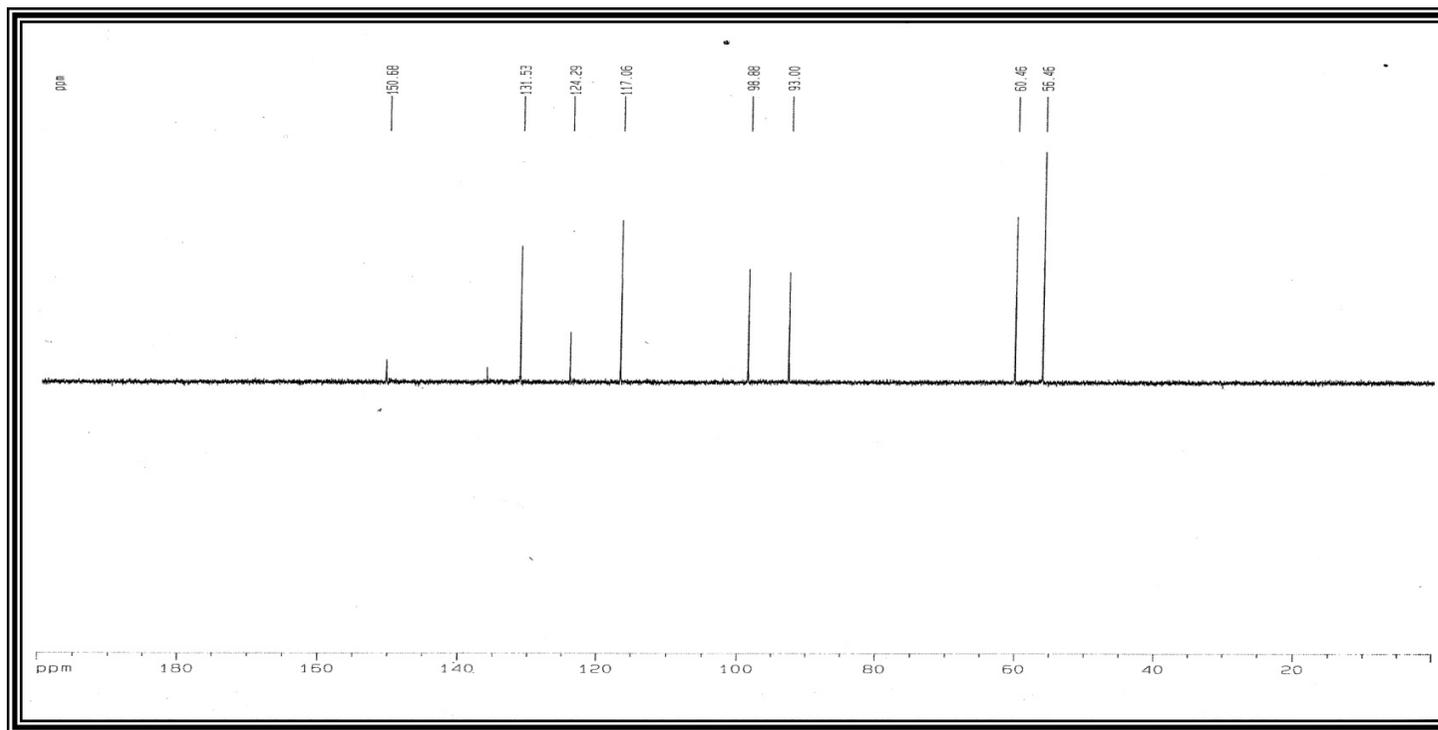


Figura 43-Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (125 MHz, C₅D₅N.) de AB1.

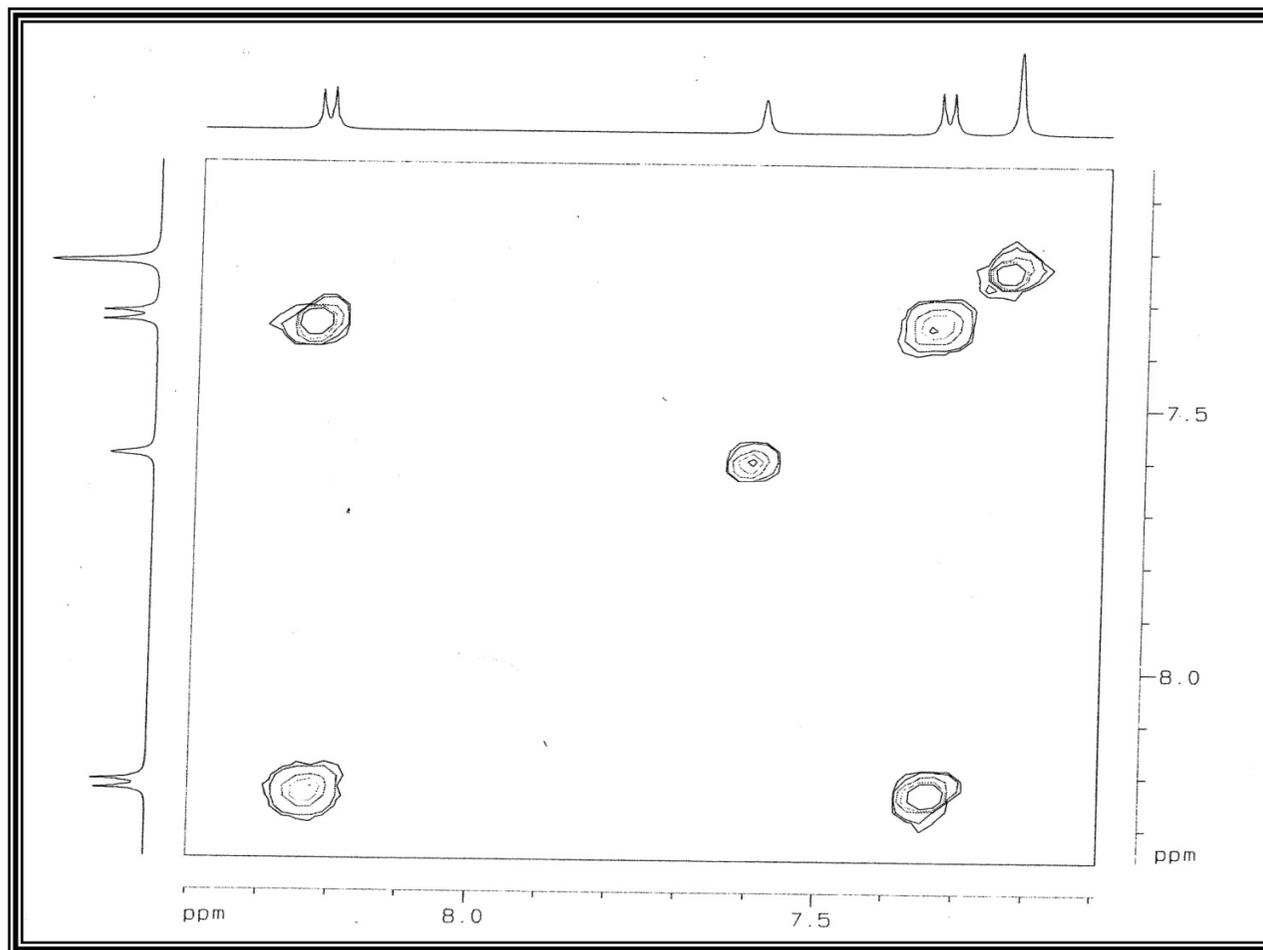


Figura 44-Espectro de RMN bidimensional ¹H, ¹H COSY (500 MHz, C₅D₅N) de AB1.

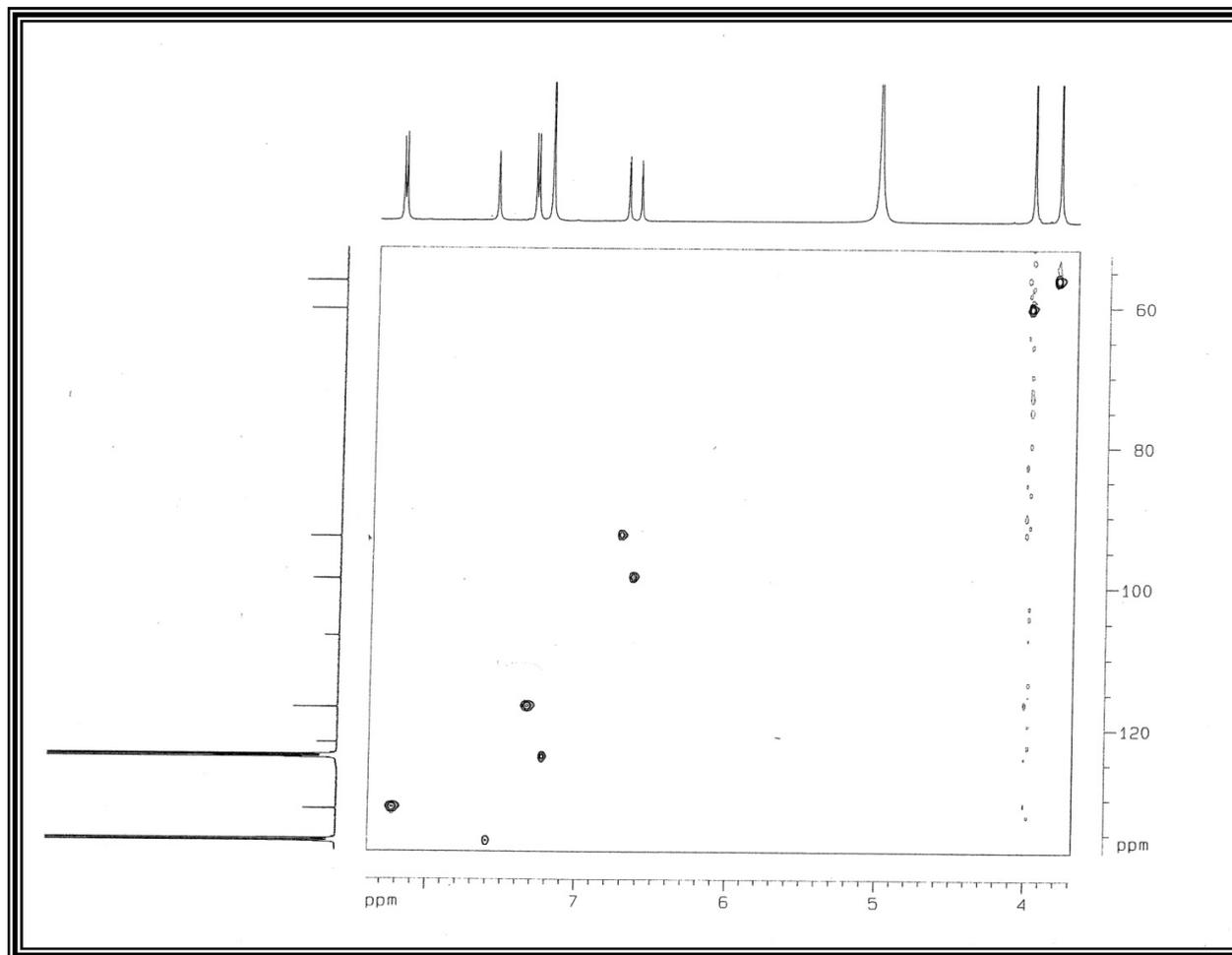


Figura 45-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.

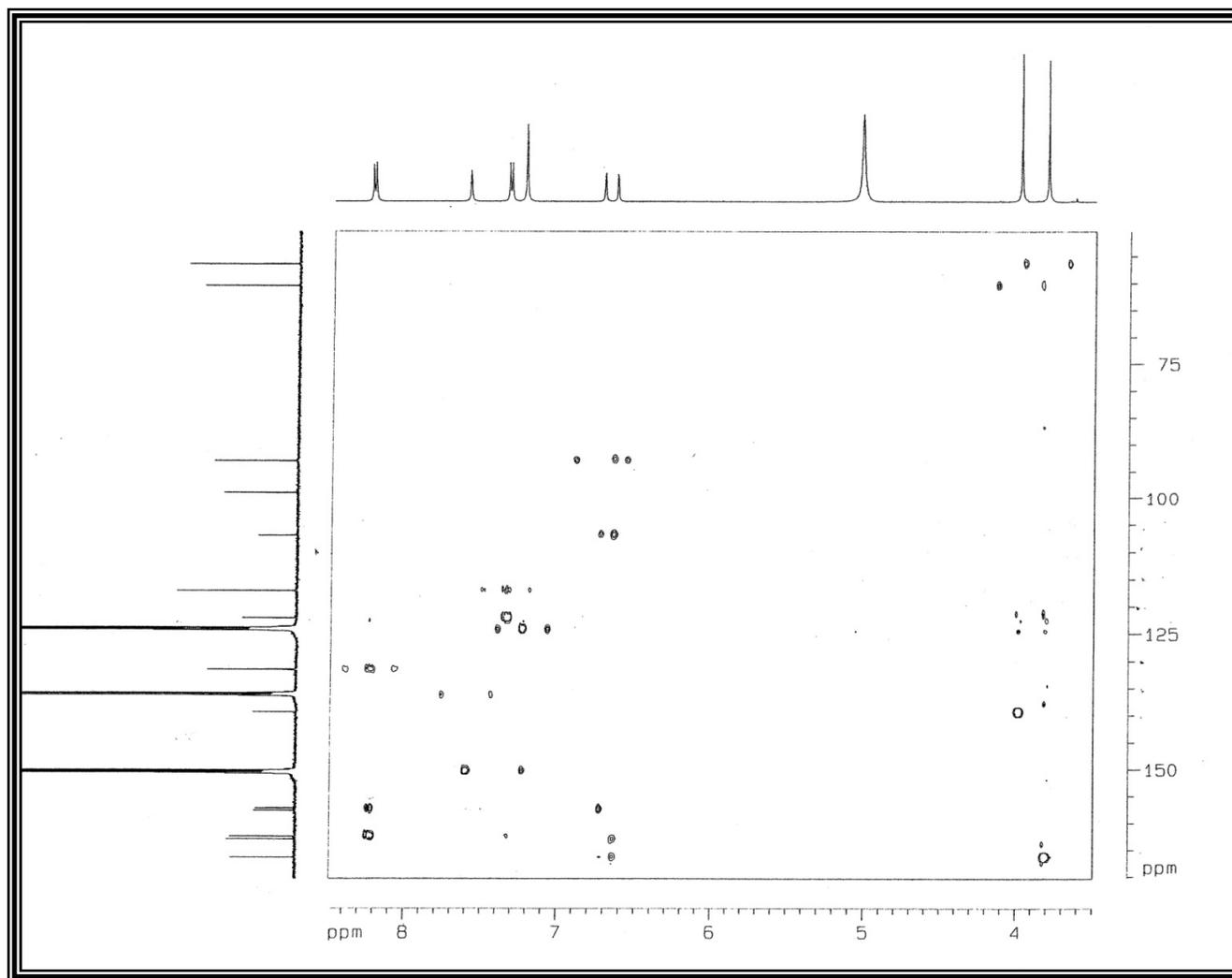


Figura 46- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB1.

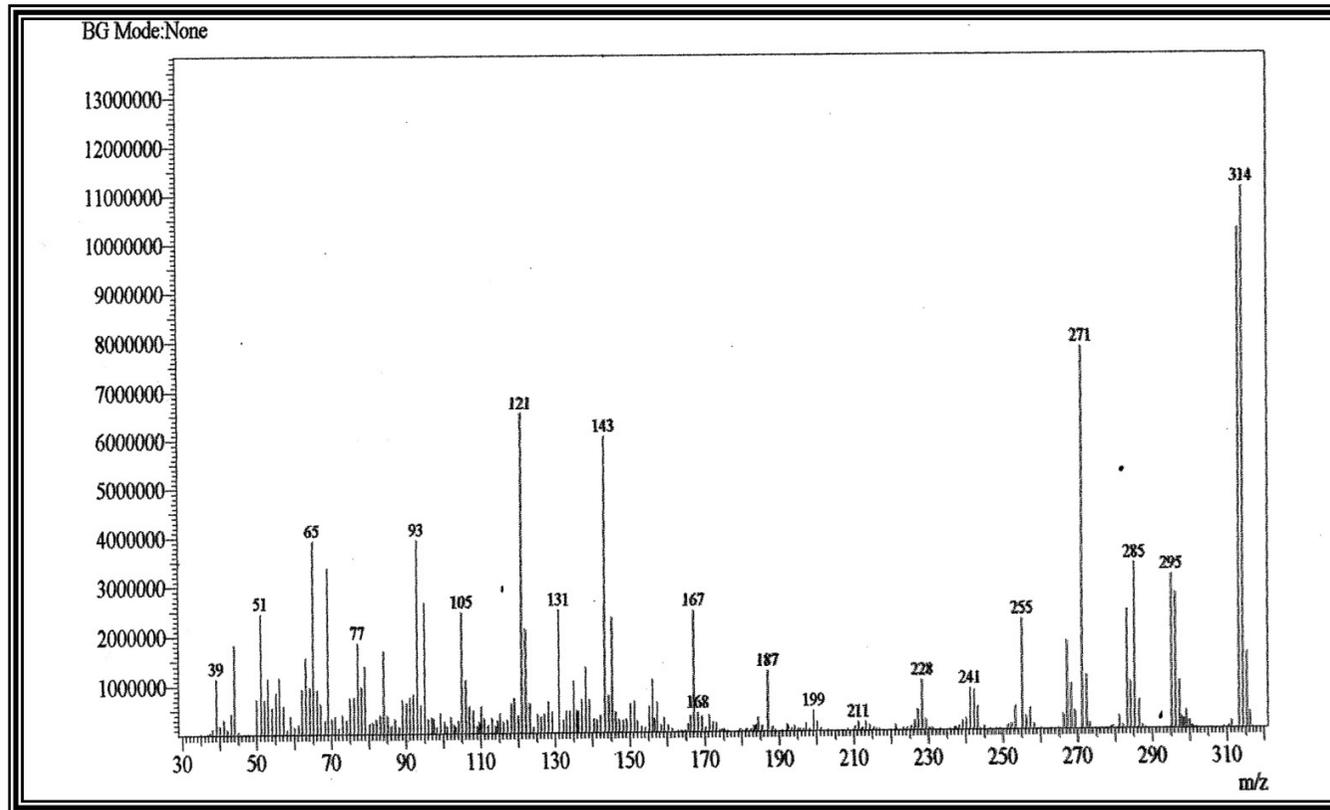


Figura 47-Espectro de Massa de AB1(IE 70 eV).

5.2.1.2 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AB2

O tratamento cromatográfico do extrato etanólico dos talos de *Ananas bractestus* (ABTE) forneceu um sólido cristalino incolor com faixa de fusão entre 123,4 – 127,0 °C, sóluvel em clorofórmio, o qual foi denominado de AB2 (Item 6.4.21, p.156).

O espectro de RMN ^1H de AB2 (Fig.49, p.68) apresentou sinais em δ 5,35 (1H, d, $J= 4,9$ Hz) e δ 3,51 (1H, m) característicos dos hidrogênios H-6 e H-3 do β -sitosterol, respectivamente. Os sinais intensos em δ 0,68 (3H, s), 0,81 (3H, s), 1,01 (3H, s), δ 0,92 (3H, d, $J= 6,5$ Hz), 0,84 (3H, d, $J= 7,0$ Hz) e δ 0,86 (3H, t) foram associados a seis grupos metilas característicos de esteróides.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig.50, p.69) de AB2 apresentou 29 linhas espectrais, sendo os sinais em δ 141,0 e 121,9, característicos da ligação dupla entre C-5 e C-6 do β -sitosterol, bem como o sinal em δ 72,0 associado a carbono carbinólico C-3.

O espectro de massa de AB2 (Fig. 51, p.70) apresentou pico íon molecular com razão massa/carga igual a 414 Daltons, estando de acordo com a massa molar do esteróide β -sitosterol.

A comparação dos dados de RMN ^{13}C de AB2 com os do esteróide β -sitosterol (ARAGÃO, 1990) confirmou a identidade entre os mesmos, conforme Tabela 14 e Figura 48.

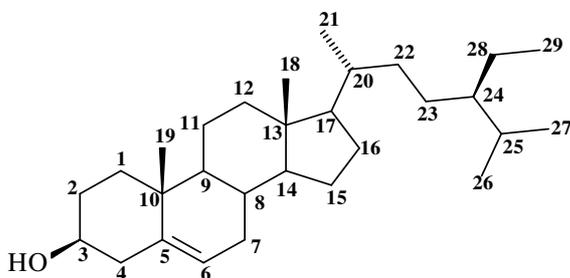


Figura 48-Estrutura de AB2 (β -sitosterol).

Tabela 14- Comparação dos dados de RMN ^{13}C de AB2 (125 MHz, CDCl_3) com dados descritos na literatura para o β -sitosterol em CDCl_3 (ARAGÃO, 1990).

C	Sitosterol	AB2
1	37,2	36,8
2	31,6	29,5
3	71,7	72,0
4	38,9	37,5
5	140,7	141,0
6	121,6	121,9
7	31,8	32,1
8	31,8	31,9
9	50,1	50,4
10	36,4	36,4
11	21,1	21,3
12	39,7	40,1
13	42,3	42,6
14	56,7	57,0
15	24,2	24,5
16	28,1	28,4
17	56,1	56,4
18	11,9	12,2
19	19,3	19,3
20	36,0	34,2
21	21,1	20,0
22	33,9	32,2
23	26,1	26,5
24	45,8	46,1
25	29,1	29,3
26	19,6	19,6
27	18,9	19,0
28	23,0	23,4
29	11,9	12,1

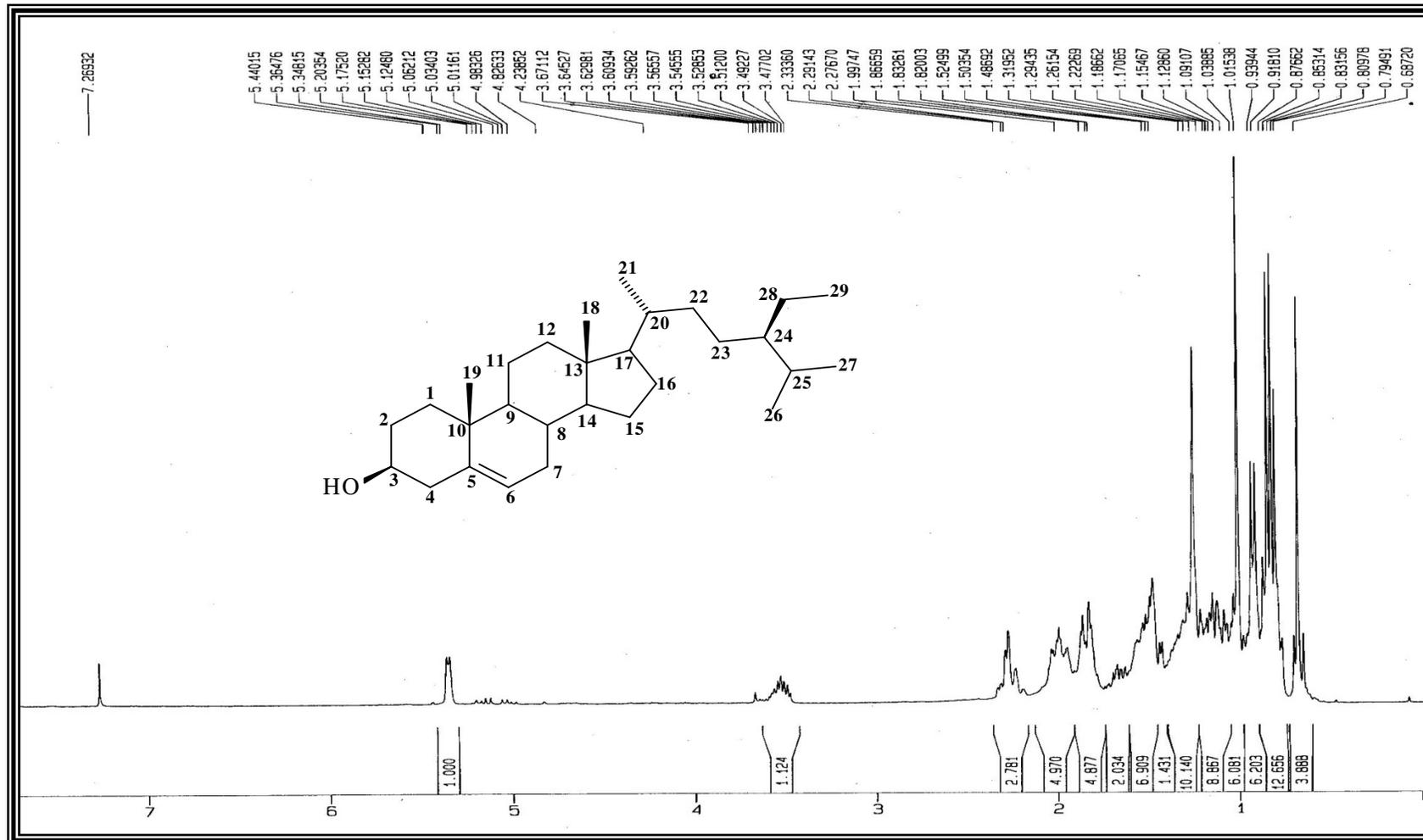


Figura 49-Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de AB2.

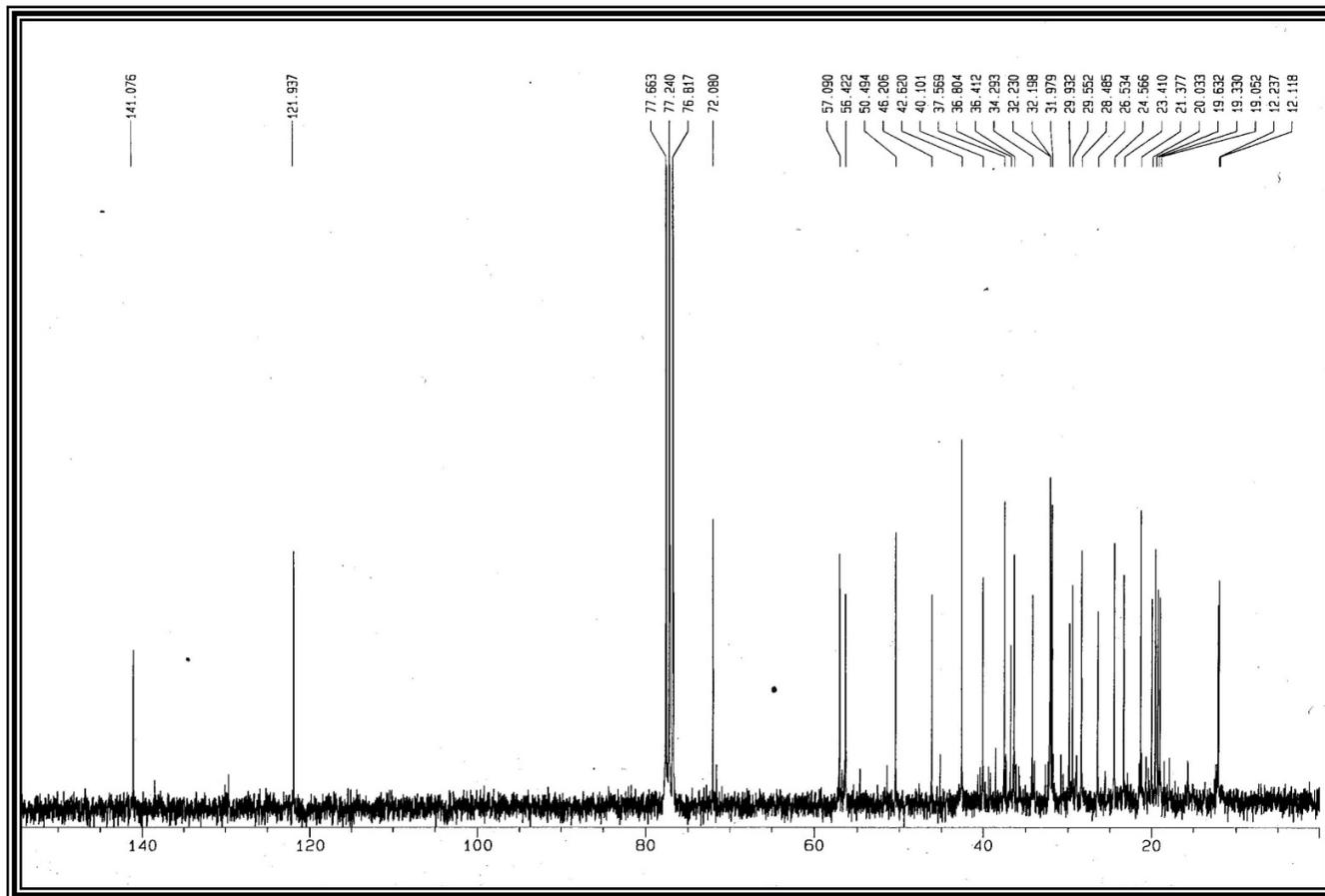


Figura 50-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de AB2.

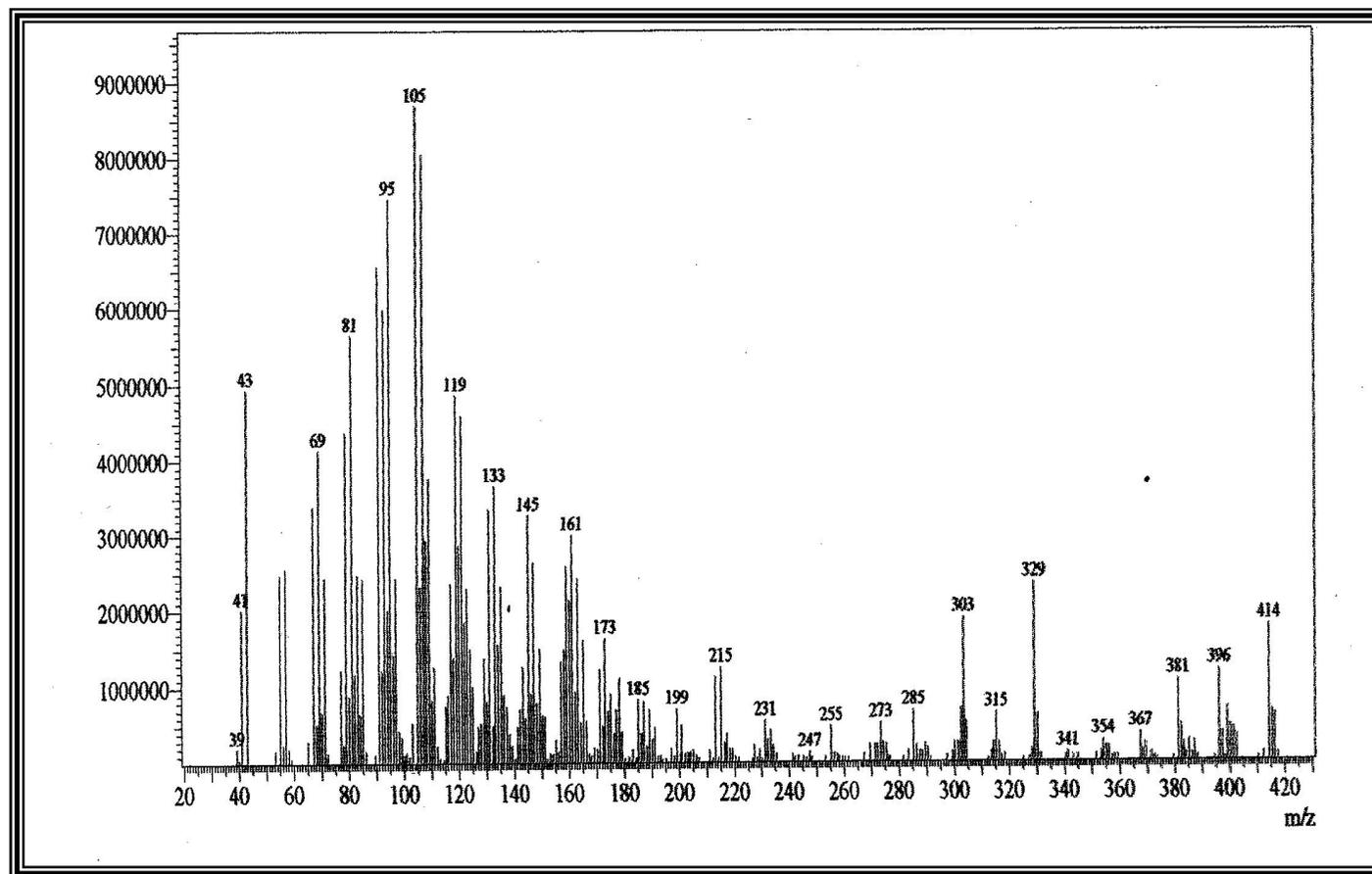


Figura 51-Espectro de massa de AB2 (IE 70 eV).

5.2.1.3 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AB3

A fração ABTM, após fracionamento cromatográfico (Item 6.4.22, p.157), forneceu um sólido amorfo branco, solúvel em piridina e com faixa de fusão de 289,1 - 292,5 °C, denominado de AB3.

O espectro de RMN ^1H de AB3 (Fig.53, p.73), apresentou sinais na região de δ 5,35 a 4,05 compatíveis com hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, característicos de uma unidade glicosídica, um dubleto em δ 5,04 (1H, d, $J=7,3$ Hz) referente a hidrogênio olefínico e sinais de δ 2,73 a 0,66 associados a hidrogênios de esqueleto esteroidal.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 54, p.74) apresentou 36 linhas espectrais, das quais duas foram associadas a carbonos olefinícos em δ 141,3 e 122,2, característicos do esteróide β -sitosterol. Os sinais em δ 78,9, 78,7, 78,5, 75,6, 72,0, 63,2 e 102,9 foram associados a carbonos referentes a uma unidade de glicose, sendo o sinal em δ 102,9 relacionado ao carbono anomérico. Os demais sinais de carbonos de AB3 foram associados a carbonos sp^3 não-funcionalizados.

A comparação dos dados de RMN ^{13}C de AB3 (Fig 52) (Tabela 15, p.72), com os dados da literatura para o esteróide β -sitosterol glicosilado (MACARI; EMERENCIANO e FERREIRA, 1990), permitiu confirmar tratar-se da mesma substância.

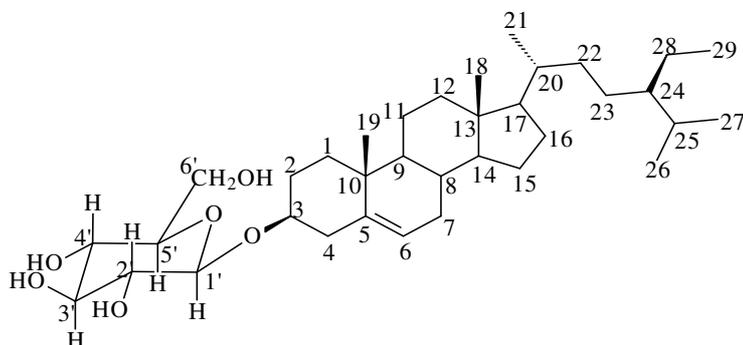


Figura 52-Estrutura de AB3 – β -sitosterol glicosilado.

Tabela 15-Dados RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB3 em comparação com dados do β -sitosterol glicosilado descritos na literatura (MACARI; EMERENCIANO e FERREIRA, 1990).

Carbono	AB3	β -sitosterol glicosilado
1	37,8	37,2
2	30,3	29,5
3	78,9	80,0
4	39,7	38,9
5	141,3	140,3
6	122,4	122,0
7	32,4	31,8
8	32,5	31,8
9	50,7	50,2
10	37,2	36,5
11	21,6	21,1
12	40,3	39,7
13	42,8	42,3
14	57,2	56,7
15	24,8	24,2
16	28,8	28,1
17	56,6	56,1
18	12,5	11,9
19	20,6	19,2
20	36,7	36,0
21	19,3	18,7
22	34,6	34,0
23	26,8	26,1
24	46,4	45,8
25	29,8	29,1
26	19,7	19,6
27	19,6	18,9
28	23,7	23,0
29	12,3	11,0
1'	102,9	100,9
2'	78,5	77,8
3'	78,7	78,1
4'	72,0	71,3
5'	75,6	74,8
6'	69,2	68,4

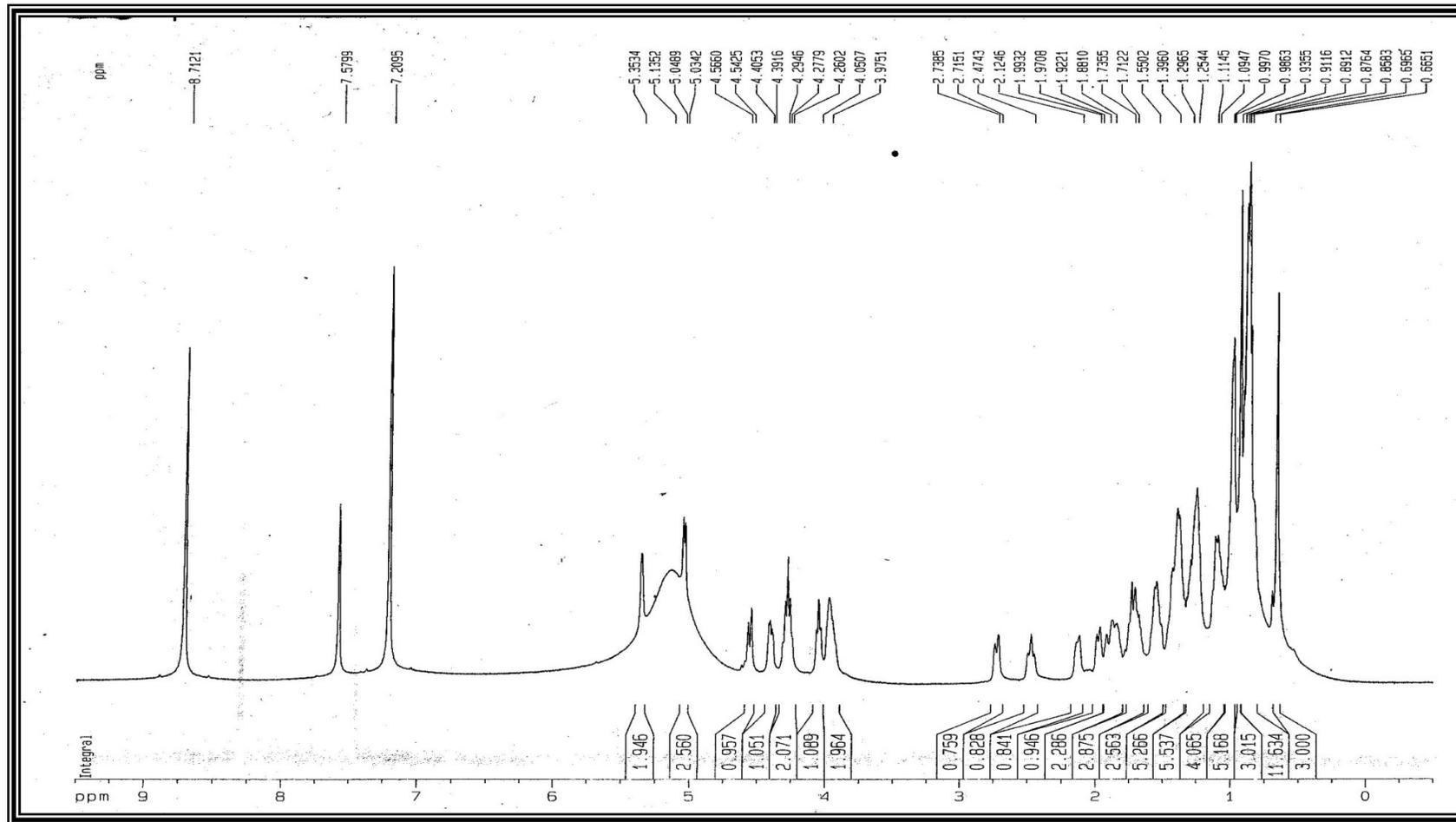


Figura 53-Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB3.

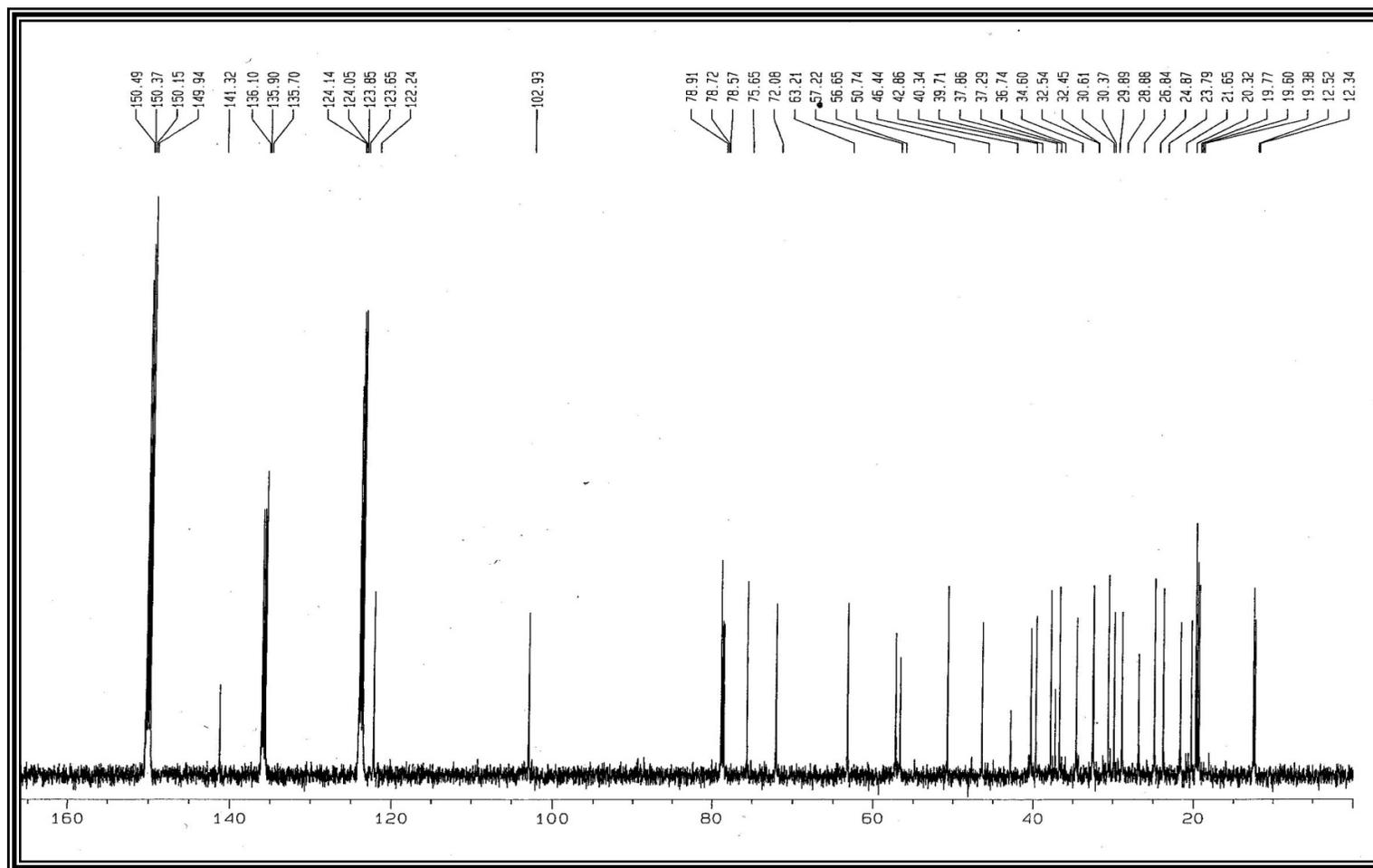


Figura 54-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AB3.

5.2.1.4 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AL1

O tratamento cromatográfico da fração ALFM/C (Item 6.4.23, p.158) resultou no isolamento de um sólido branco amorfo, denominado AL1, sóluvel em piridina e com faixa de fusão de 103,2 – 106,5 °C.

O espectro de RMN ^1H de AL1 (Fig.58, p.79) mostrou sinais com deslocamento químico característico de hidrogênios geminais diastereotópicos ligados a carbonos oxigenados em δ 4,74 (1H, dd, $J= 4,5$ e $11,1$ Hz) e 4,66 (1H, dd, $J= 6,3$ e $11,1$ Hz), além de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ 4,46 (1H, ddt, $J= 4,5$, $5,4$ e $6,3$ Hz), 4,14 (2H, d, $J= 5,4$ Hz) e 3,90 (2H, t, $J= 6,5$ Hz). O sinal em δ 2,38 (2H, t, $J= 7,4$ Hz) foi associado a hidrogênios metilênicos α -carbonílicos. Os sinais em δ 1,78 (2H, q, $J= 7,2$ Hz), 1,66 (2H, q, $J= 7,4$ Hz) e 1,53 (2H, q, $J=7,2$ Hz), bem como o sinal intenso e largo em δ 1,30 foram vinculados à cadeia de ácidos graxos. O espectro não apresentou sinal característico de grupo metila terminal.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig.59, p.80) apresentou 13 linha espectrais, sendo o sinal em δ 174,1 associado à carbonila de éster, os sinais em δ 71,3, 67,1, 64,6 e 62,5 associados a carbonos sp^3 oxigenados e o sinal intenso e largo em δ 30,3 característico de sobreposição de carbonos metilênicos de cadeia carbônica longa. A análise dos dados obtidos permitiram inferir para AL1 a estrutura de um ácido graxo ligado a uma unidade de glicerol, sendo o carbono terminal da cadeia funcionalizado.

A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig.60, p.81) permitiu verificar o padrão de hidrogenação da molécula. O espectro apresentou um carbono metínico oxigenado em δ 71,2; três carbonos metilênicos oxigenados em δ 67,1, 64,6 e 62,5; quatro carbonos metilênicos em δ 34,7, 34,1, 26,9 e 25,6, bem como a sobreposição de sinais de carbonos metilênicos em δ 30,3. O espectro não apresentou sinal característico de grupo metila. Estas informações

ratificam a sugestão da estrutura de um ácido graxo ligado ao glicerol, sendo o carbono terminal oxigenado.

O espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig.61, p.82) mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ 4,46 (1H, ddt, $J= 4,5, 5,4$ e $6,3$ Hz), δ 4,76 (1H, dd, $J= 4,5$ e $11,1$ Hz), 4,66 (1H, dd, $J= 6,3$ e $11,1$ Hz) e 4,14 (2H, t, $J= 5,4$ Hz) pertencentes ao grupo glicerol; a correlação entre o sinal em δ 1,78 (2H, q, $J= 6,6$ Hz) com os sinais em δ 3,90 (2H, t, $J= 6,5$ Hz) e 1,53 (2H, q, $J= 7,2$ Hz); a correlação entre os hidrogênios em δ 1,66 (2H, d, $J= 7,4$ Hz) com os hidrogênios α -carbonílicos em δ 2,38 (2H, t, $J= 7,4$ Hz). Verificou-se ainda a correlação dos sinais em δ 1,66 (2H, d, $J= 7,4$ Hz) e 1,53 (2H, q, $J= 7,2$ Hz) com o sinal intenso e largo em δ 1,30. A Figura 55 mostra as correlações para a possível estrutura de AL1.

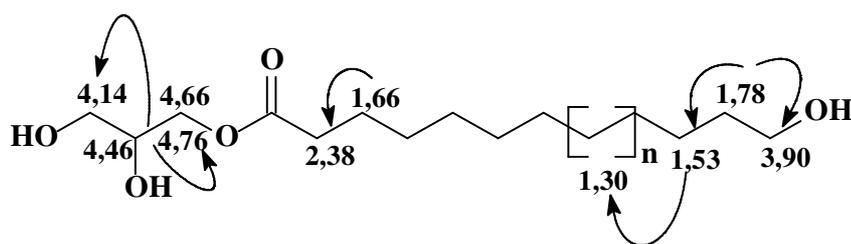


Figura 55-Correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de AL1.

O espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HSQC, Fig. 62, p.83), permitiu associar os hidrogênios a seus respectivos carbonos (Tabela 16, p.78). As principais correlações observadas foram entre os hidrogênios carbinólicos e seus respectivos carbonos: correlações entre os hidrogênios em δ 4,76 (1H) e 4,66 (1H) com o carbono em δ 67,1; do hidrogênio em δ 4,46 (1H) com o carbono em δ 71,3; dos hidrogênios em δ 4,14 (2H) com o carbono em δ 64,6 e dos hidrogênios em δ 3,90 (2H) com o carbono em δ 62,5. O espectro também mostrou a correlação dos hidrogênios em δ 2,38 (2H) com o carbono em δ 34,7, bem como a correlação do sinal dos hidrogênios metilênicos em δ 1,30 com os sinais de carbonos em δ 30,3.

O espectro bidimensional de RMN de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação HMBC (Fig.63, p.84) permitiu posicionar corretamente a ligação entre o glicerol e o ácido graxo através da correlação entre os hidrogênios em δ 4,76 e 4,66 com os carbonos em δ 174,4 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$), 71,3 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 64,6 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$). A correlação dos hidrogênios em δ 3,90 com os carbonos em δ 34,1 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 26,9 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) revelou a estrutura terminal parcial do ácido graxo (Tabela16, p.78).

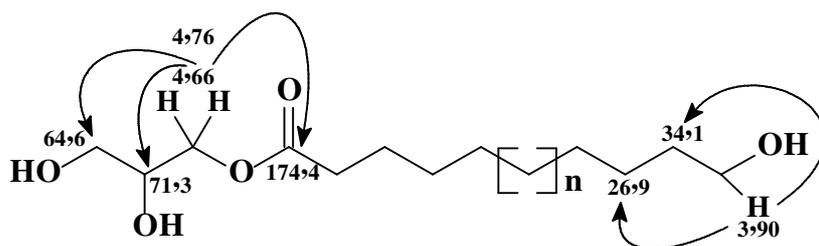


Figura 56-Principais correlações obtidas no espectro bidimensional HMBC para AL1.

A determinação do tamanho da cadeia carbônica do monoacilglicerol foi realizada através de espectrometria de massa. A determinação foi realizada pela reação do monoacilglicerol com o cloreto do ácido nicotínico (Item 6.12.2, p.171) e posterior análise por CL-EM (Fig.64 p.85). A análise permitiu verificar que o composto não se tratava de somente um monoacila, e sim da mistura de três compostos, que fica evidenciado no espectro de massas pelos picos em 528, 500 e 472 Daltons, os quais se referem aos três derivados dos monoacil obtidos na reação, e que diferenciavam entre si de duas unidades de CH_2 , de onde concluiu-se que as cadeias tinha 14 ($n = 5$), 12 ($n = 3$) e 10 ($n = 1$) carbonos respectivamente (Fig. 57).

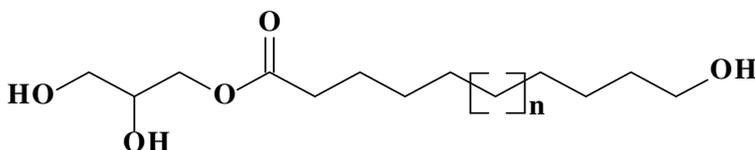


Figura 57-Estrutura de AL1: mistura de três monoacilgliceróis ($n = 5, 3$ e 1).

Ácidos graxos com estrutura similar são utilizados pelas plantas em seu sistema de defesa (formação da cutina) contra penetração de microrganismos, principalmente fungos, formando um barreira primaria. Pesquisa realizada no *Chemical Abstract* revelou o caráter inédito das estruturas de **AL1**.

Tabela 16- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) para o composto AL1 incluindo os resultados obtidos pelas correlações heteronucleares dos espectros 2D HSQC e HMBC.

Carbono	HSQC		HMBC	
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	-	174,4	2H-2, 2H-1'	2H-3, 2H-3
2	2,38 (t, $J= 7,4$ Hz)	34,7	2H-3	
3	1,66 (q, $J= 7,4$ Hz)	25,6	2H-2	
4		-		
5		-		
6		-		
7		-		
8	1,53 (q, $J= 7,2$ Hz)	26,9		2H-10
9	1,78 (q, $J= 7,2$ Hz)	34,1	2H-10	
10	3,90 (t, $J= 6,5$ HZ)	62,5	2H-9	
1'	4,76 (dd, $J= 4,5$ e 11,1 Hz), 4,66 (dd, $J= 6,3$ e 11,1 Hz)	67,1	1H-2'	2H-3'
2'	4,46 ($J= 4,5, 5,4$ e 6,3Hz)	71,3	2H-1', 2H-3'	
3'	4,14 (d, $J= 5,4$ Hz)	64,6	1H-2'	2H-1'

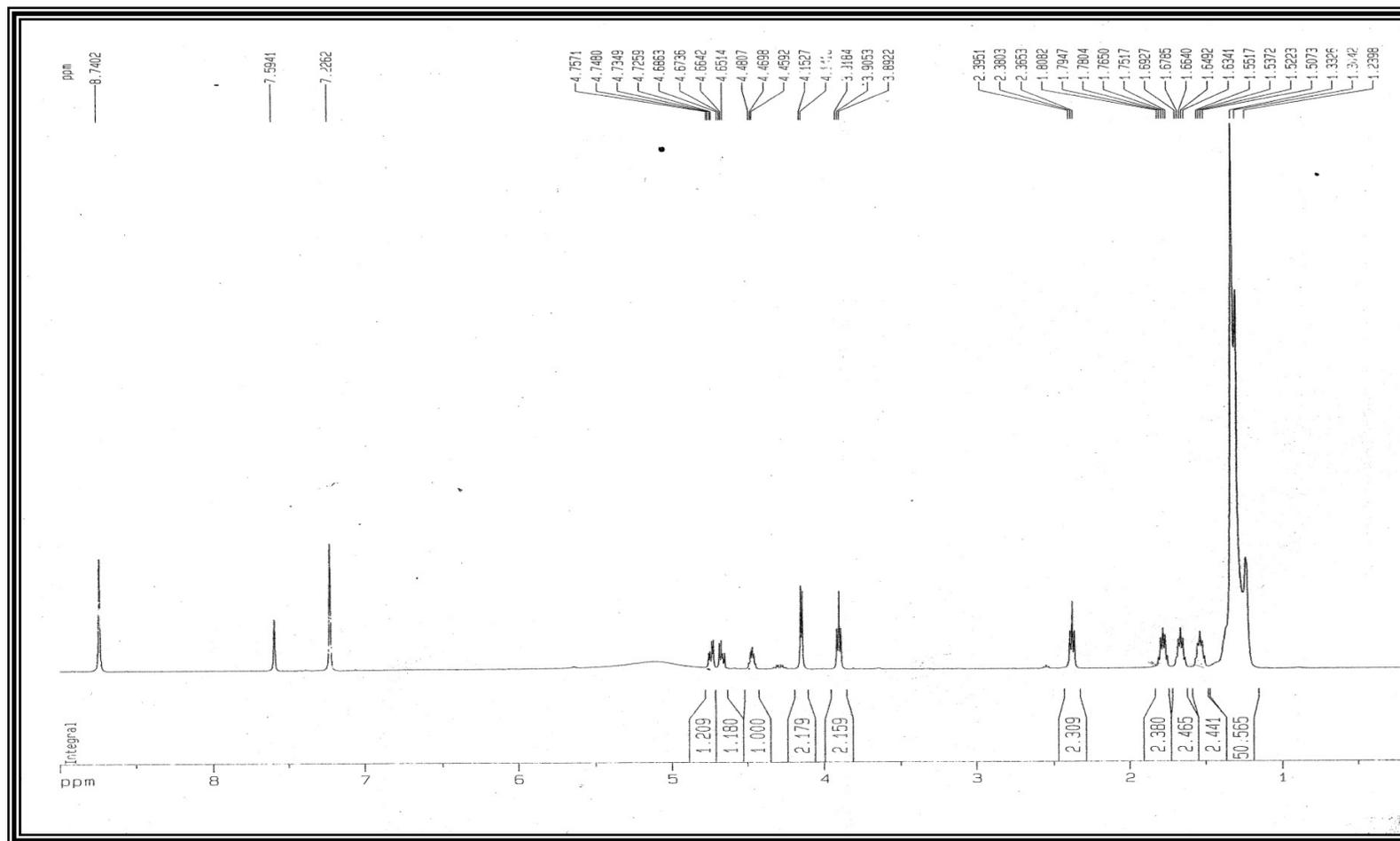


Figura 58-Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.

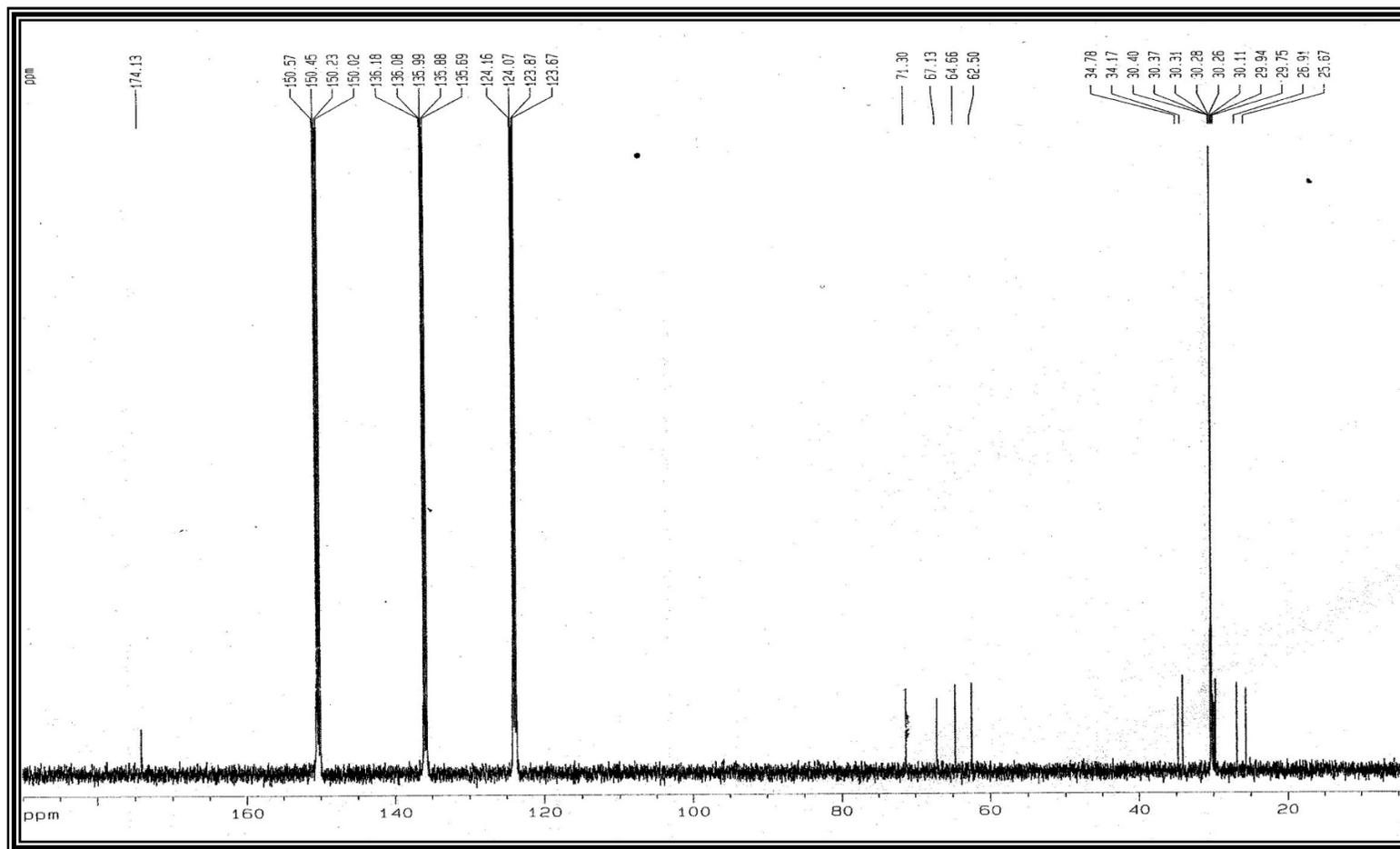


Figura 59-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AL1.

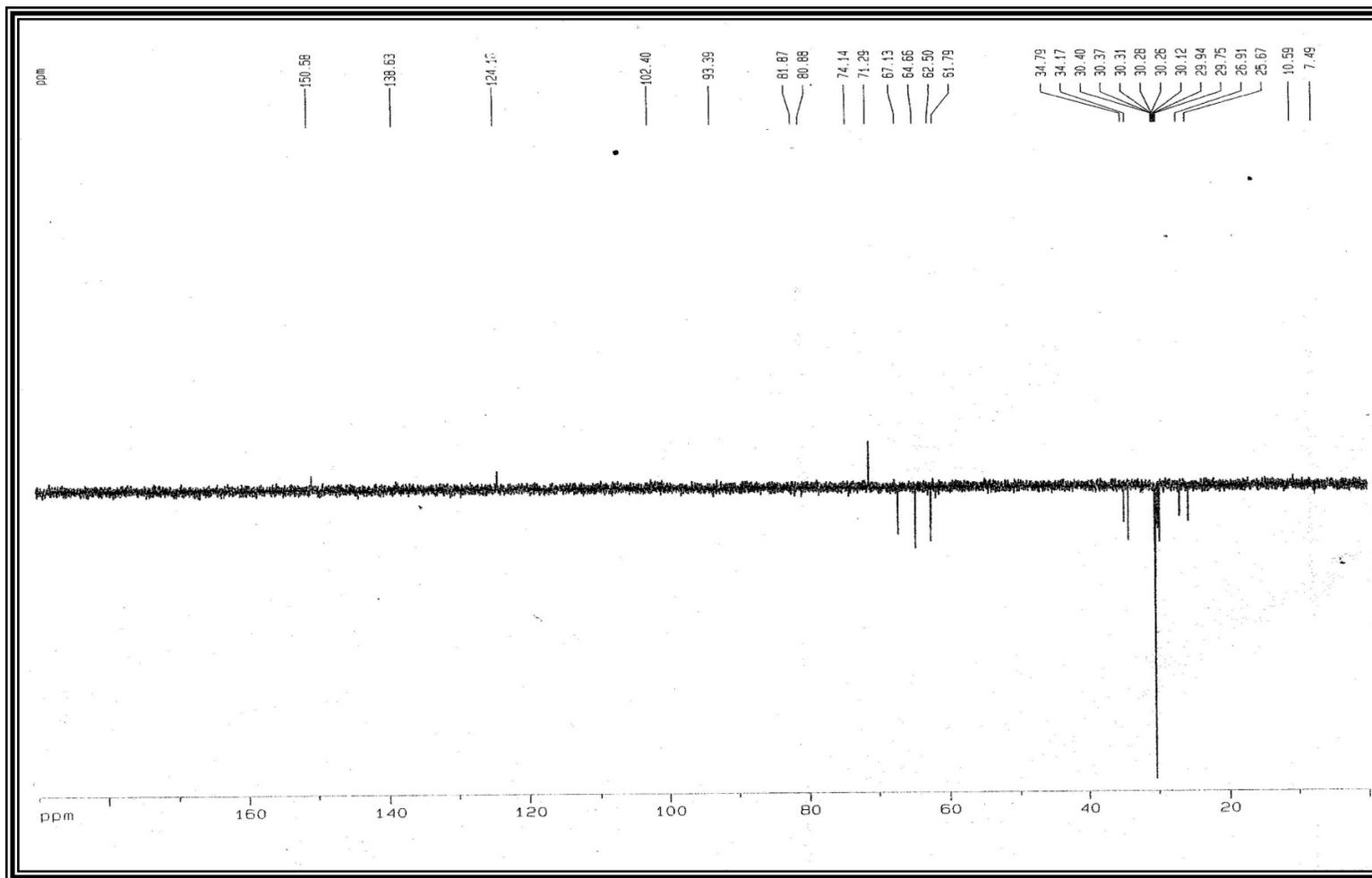


Figura 60-Exspectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **AL1**.

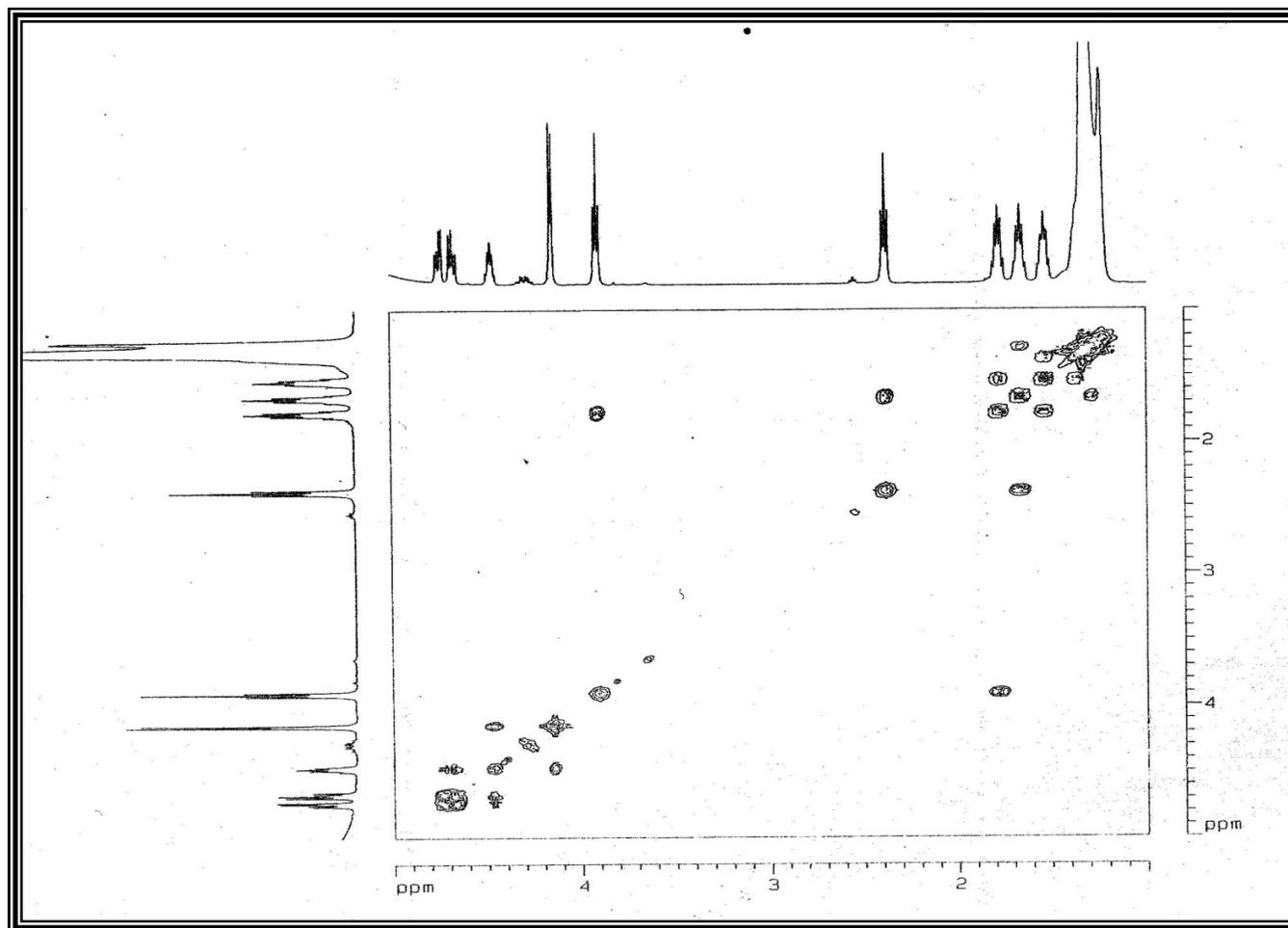


Figura 61-Espectro de RMN bidimensional ¹H,¹H COSY (500 MHz, C₅D₅N) de **AL1**.

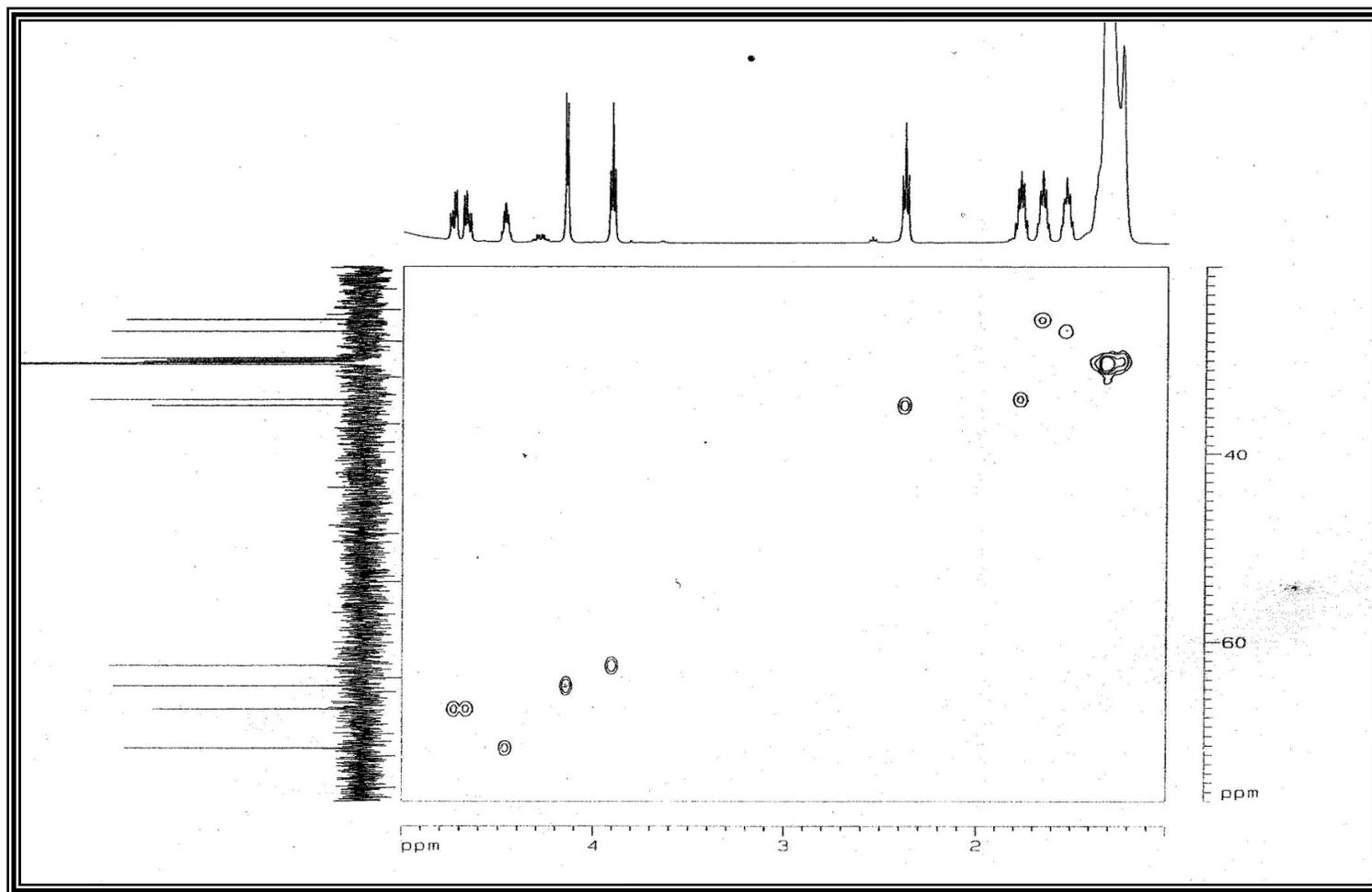


Figura 62-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **AL1**.

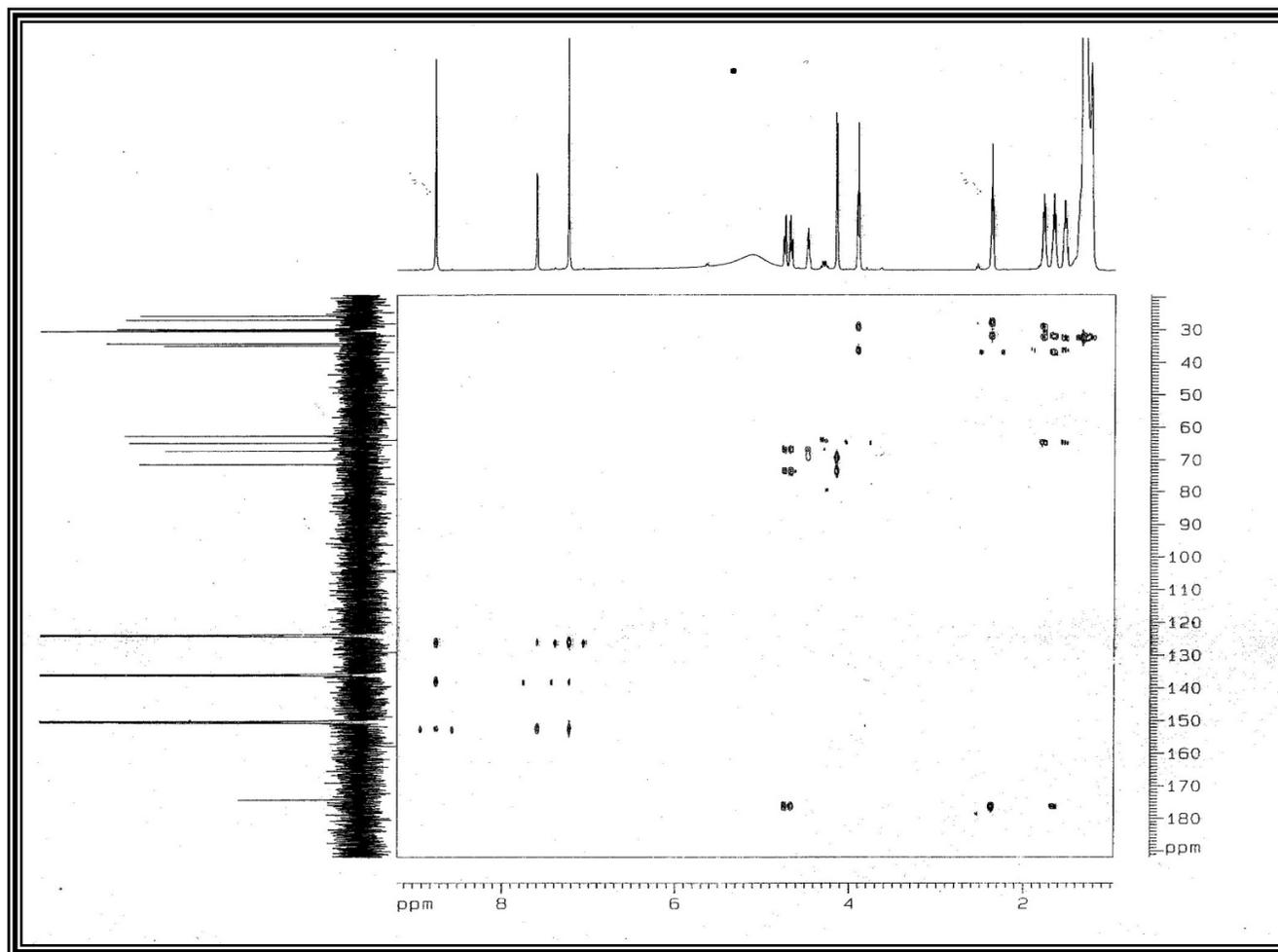


Figura 63-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (500, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **AL1**.

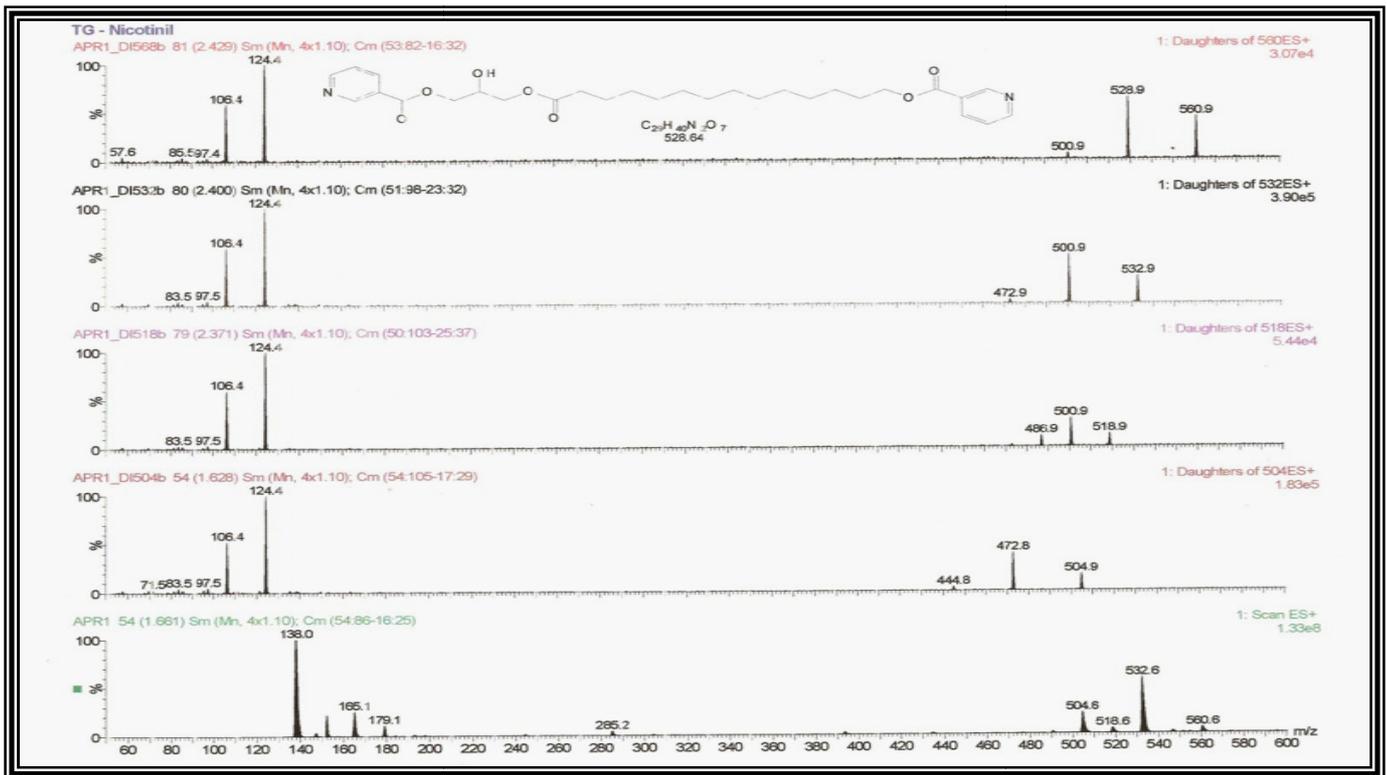
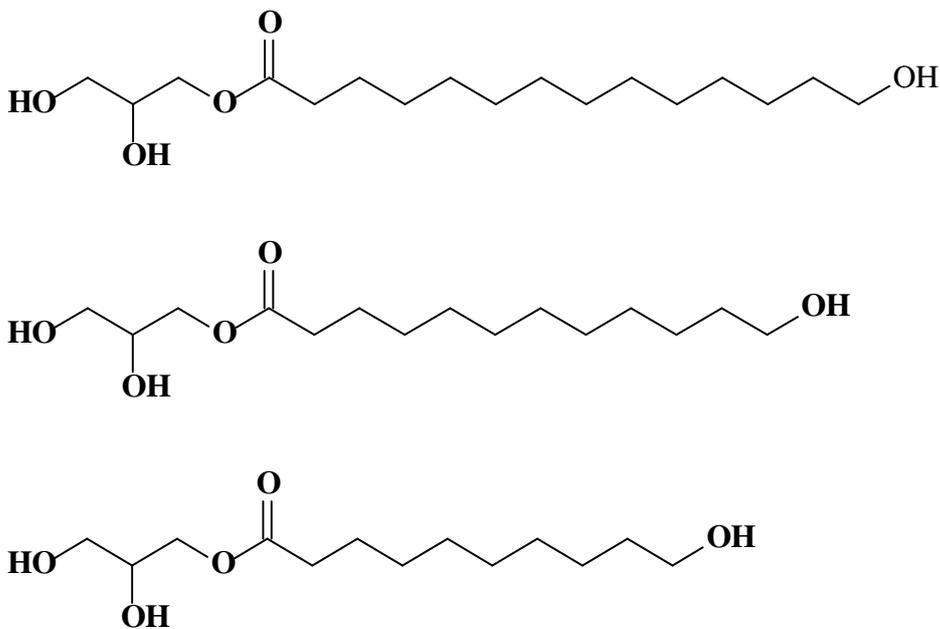


Figura 64-Espectro de Massa de AL1.



5.2.1.5 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AL2

O tratamento cromatográfico da fração ALRM/A, proveniente do extrato metanólico das raízes de *A. lucidus* (Item 6.4.24 p.159), resultou no isolamento de um sólido amorfo branco sóluvel em clorofórmio denominado AL2, com faixa de fusão igual a 151,2 a 153,5.

O espectro de RMN ^1H de AL2 (Fig.67 p.89) apresentou um sinal em δ 9,59 (1H, s) referente a hidrogênio ligado a carbonila de aldeído, dois sinais em δ 7,22 (1H, d, $J= 3,4$ Hz) e 6,52 (1H, d, $J= 3,4$ Hz) associados a dois hidrogênios pertencentes a anel furânico dissubstituído, e um sinal intenso em δ 4,72 (2H, s) associado a um grupo metilênico oxigenado.

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) apresentou seis linhas espectrais (Fig.68 p.90). A análise comparativa com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig.69 p.91) permitiu correlacionar os carbonos a seus respectivos padrões de hidrogenação. O sinal em δ 177,8 referente a um carbono monohidrogenado confirmou presença da carbonila de aldeído. A presença dos sinais em δ 160,7 e 152,7 relacionados a carbonos sp^2 oxigenados não hidrogenados e em δ 122,5 e 110,1 de carbonos sp^2 mono-hidrogenados corroboraram a estrutura do anel furânico dissubstituído. Verificou-se também a presença de um carbono metilênico oxigenado em δ 57,9.

A análise dos dados espectrais permitiu sugerir para AL2 a estrutura do 5-(hidroximetil)-2-furaldeído (Fig.65).

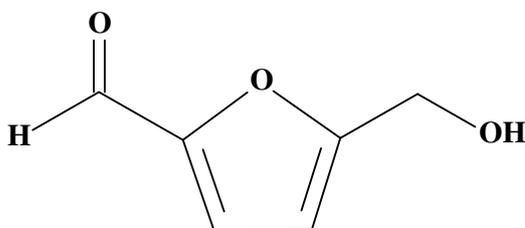


Figura 65-Estrutura de **AL2**: 5-(hidroximetil)-2-furaldeído.

O correto assinalamento da estrutura foi realizado através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação (HMBC)(Fig.70 p.92). As correlações do hidrogênio em δ 9,59 (1H) com o carbono em δ 152,7 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e dos hidrogênios metilênicos em δ 4,72 (2H) com o carbono em δ 160,7 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 110,1 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) confirmaram o posicionamento dos grupos formil e hidroximetil, respectivamente. O espectro também mostrou a correlação do hidrogênio em δ 6,52 (1H) com os carbonos em δ 122,5 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), 152,7 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e 160,7 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e do hidrogênio em δ 7,22 (1H) com os carbonos em δ 110,1 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), 152,7 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 160,7 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) (Fig. 66) (Tabela 17 p. 88).

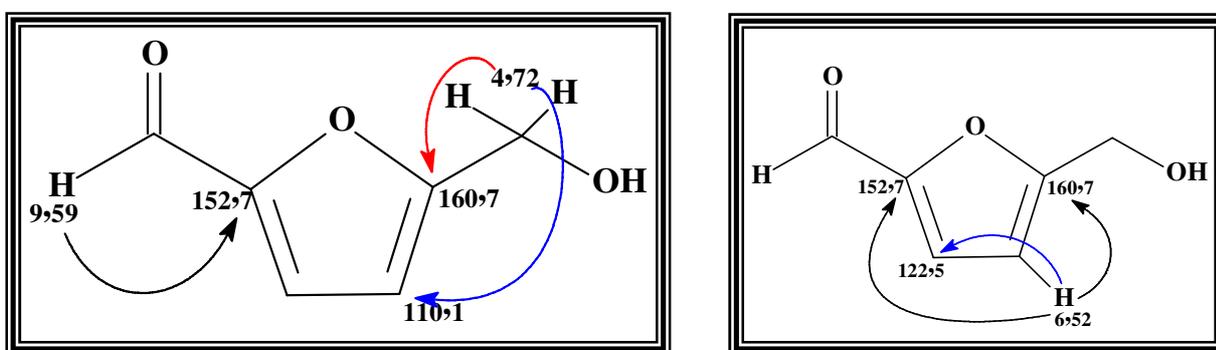
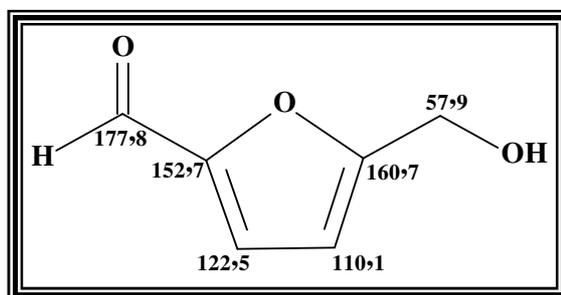


Figura 66-Principais correlações heteronuclear HMBC ^1H , ^{13}C de **AL2**.

A confirmação da estrutura foi realizada através de comparação dos dados de RMN ^{13}C de AL2 com os dados encontrados na literatura (TOMMERAAS *et al*, 2001) para o 5-(hidroximetil)-2-furaldeído. Este composto é, geralmente, formado a partir de açúcares através da reação de Maillard. O composto está sendo isolado pela primeira para espécie.

Tabela 17– Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 , para o composto AL2 incluindo os resultados obtidos por espectro 2D heteronuclear HMBC e o comparativo com dados da literatura para o HMF (TOMMERAAS *et al*, 2001).

Carbono	HMQC		HMBC		HMF
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1	-	160,7	2H-1'', 1H-2	1H-3	160,9
2	6,52 (1H, d, $J=$ 3,4 Hz)	110,1	1H-3	2H-1''	110,2
3	7,22 (1H, d, $J=$ 3,4 Hz)	122,5	1H-2		123,0
4	-	152,7	1H-1', 1H-3	1H-2	152,6
1'	9,59 (1H, s)	177,8			177,9
1''	4,27 (2H, s)	57,9			57,8



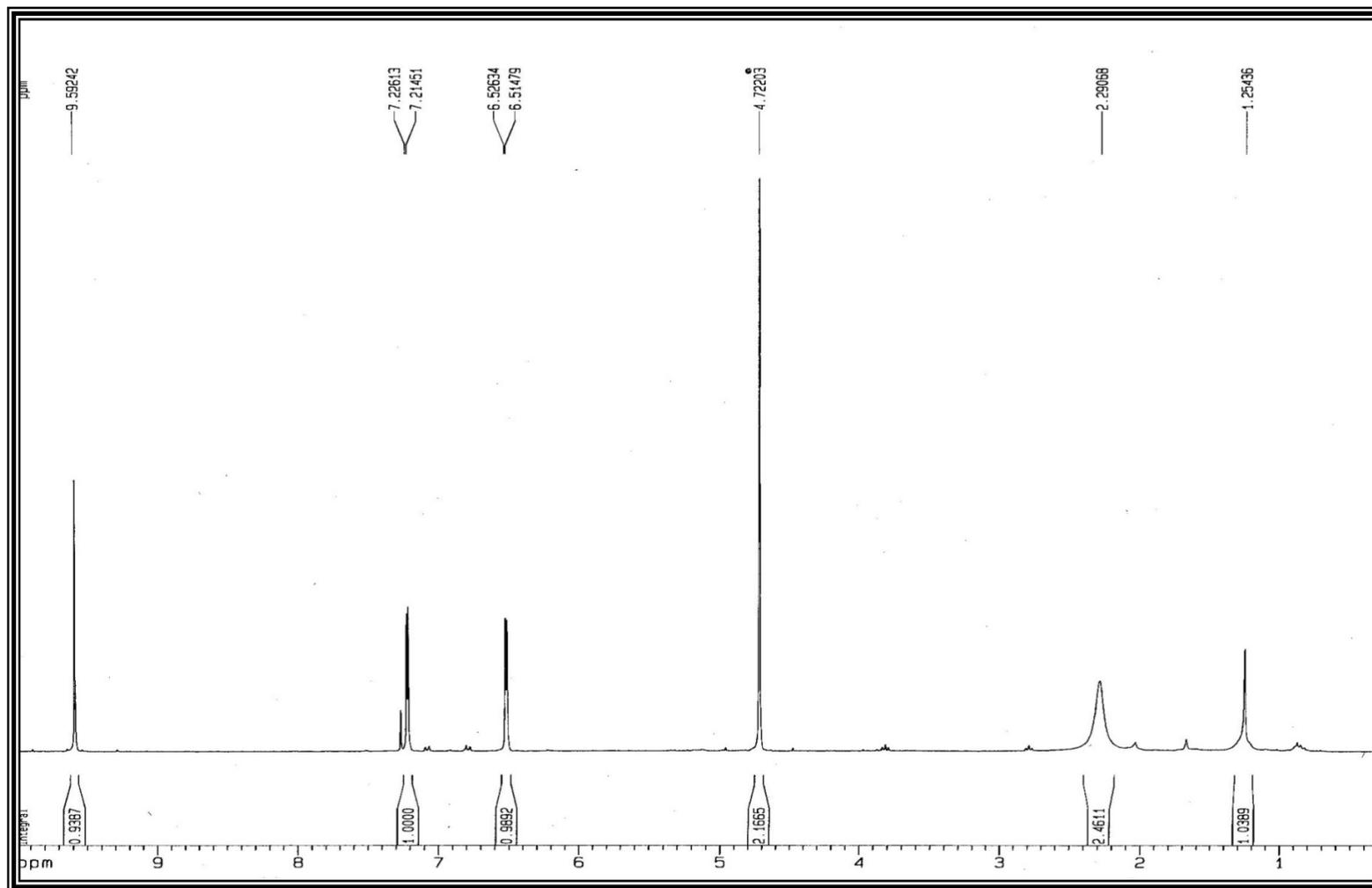


Figura 67-Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AL2.

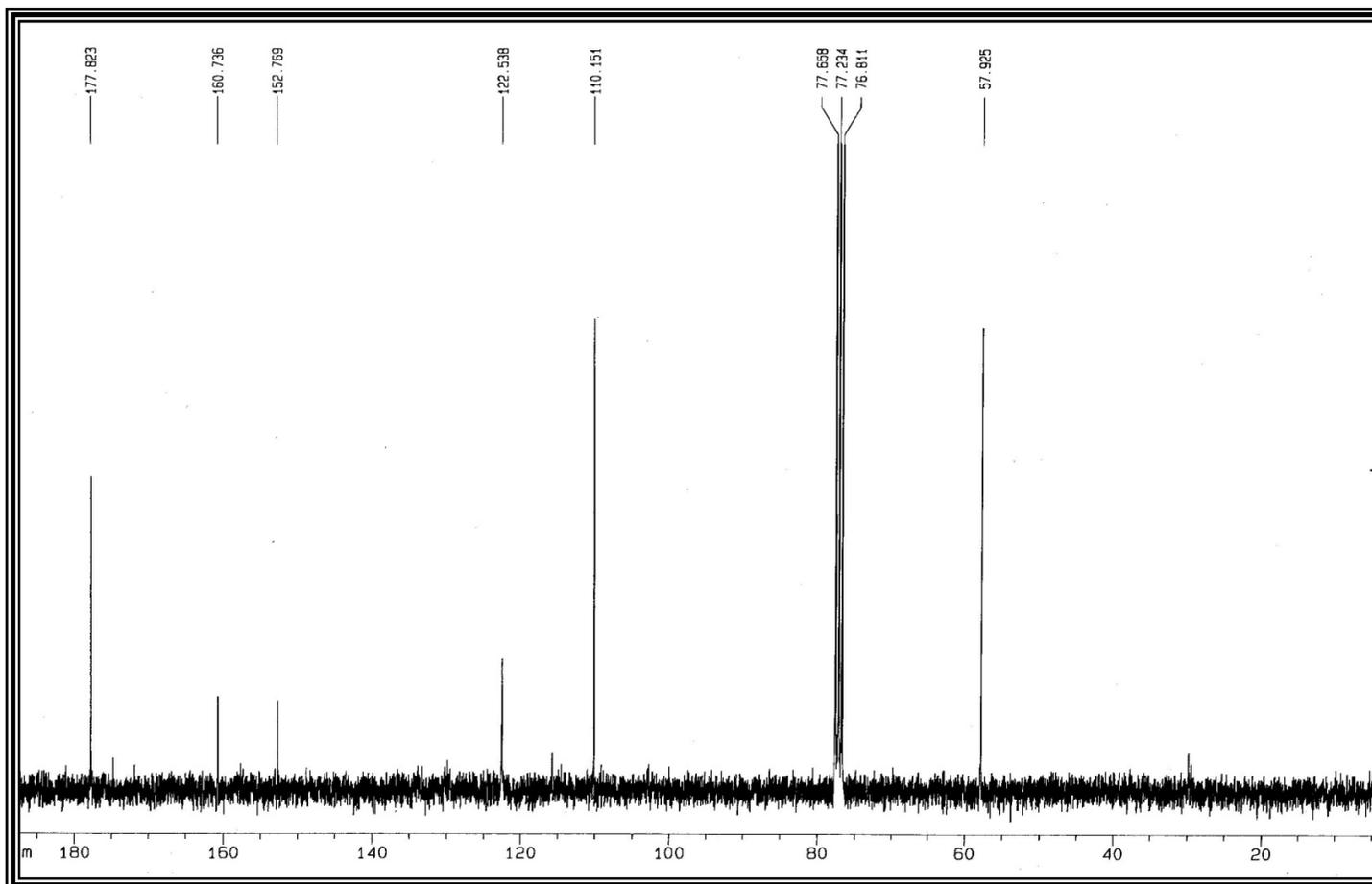


Figura 68-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **AL2**.

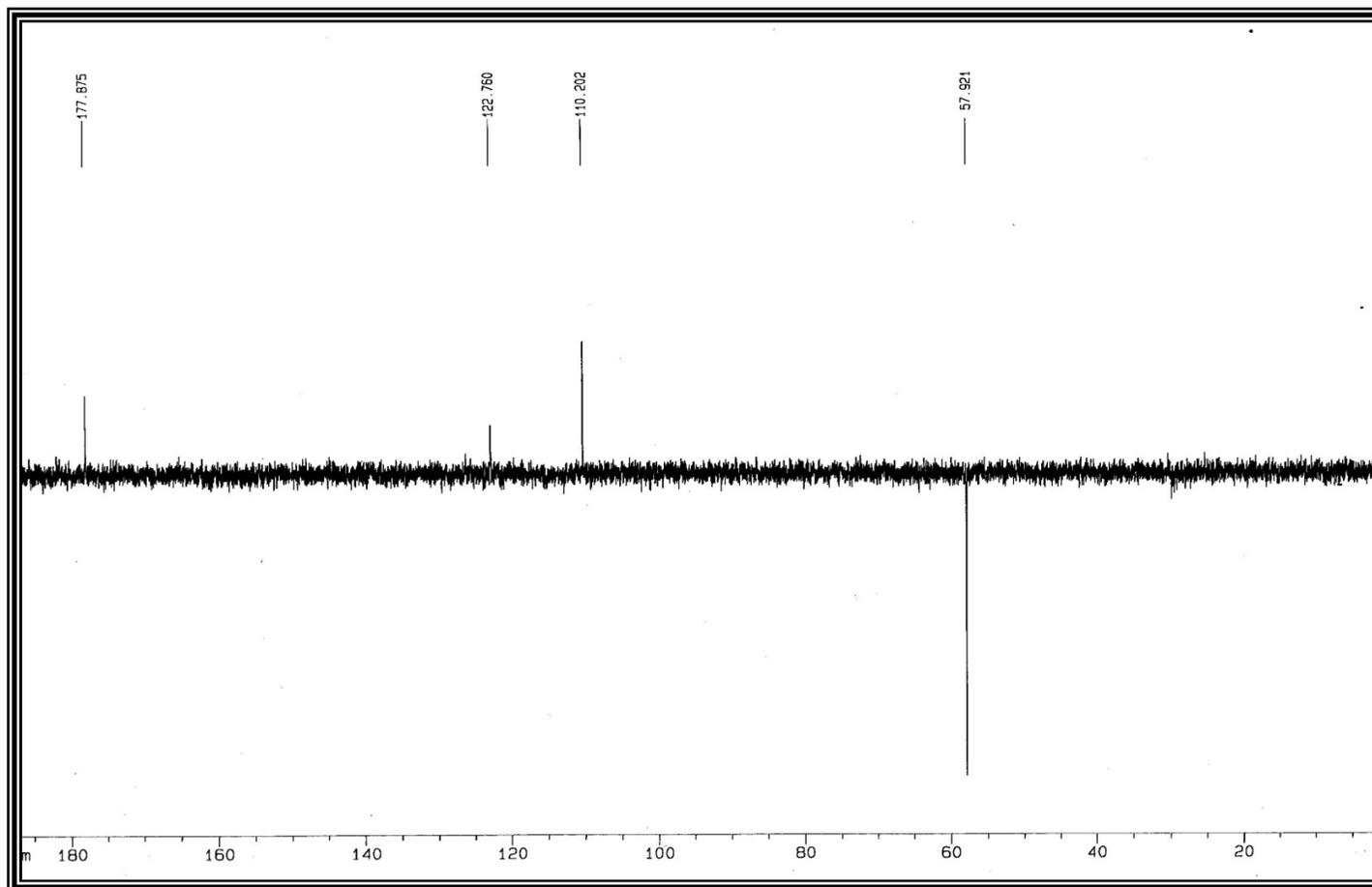


Figura 69-Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de **AL2**.

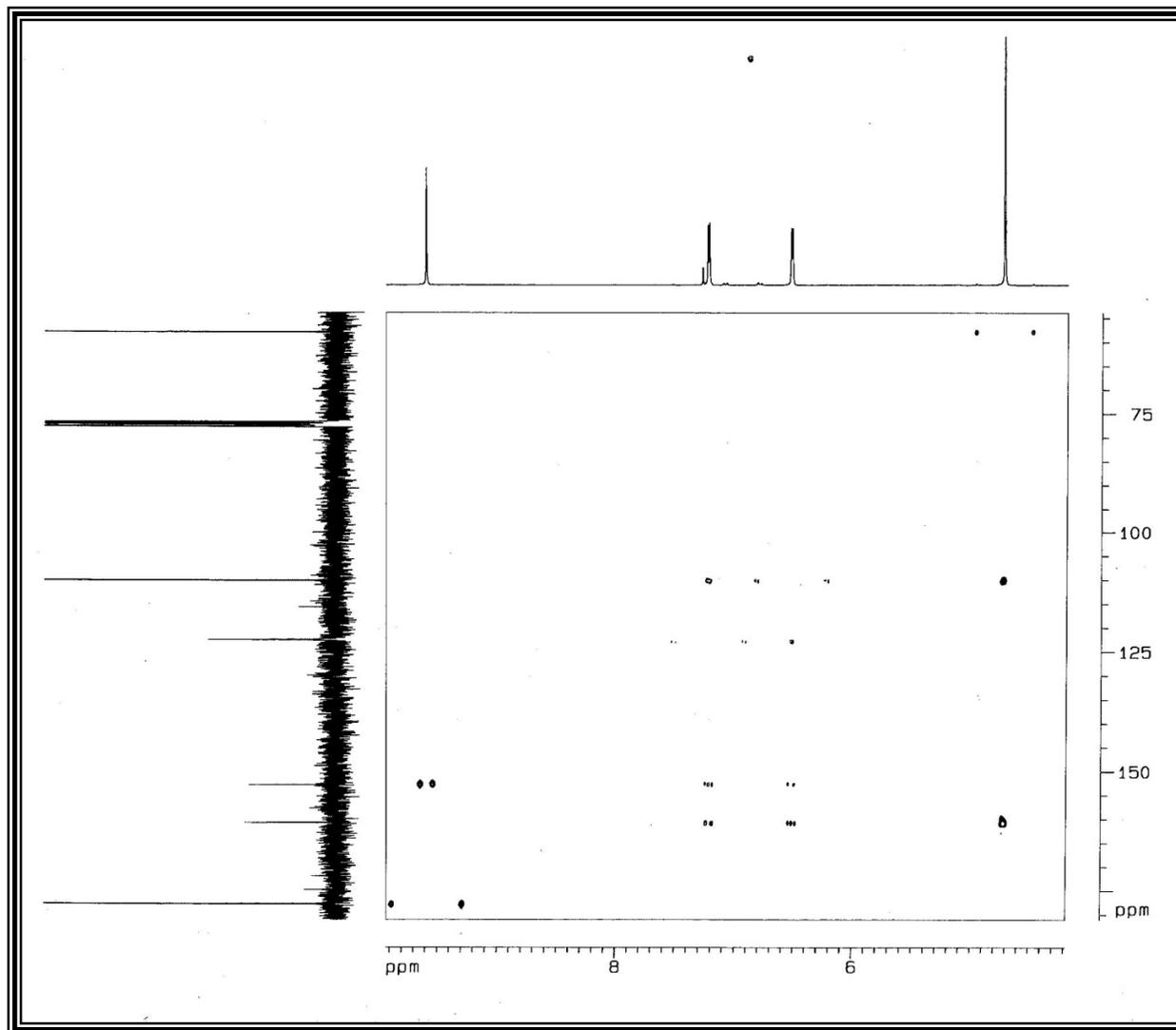


Figura 70-Espectro de RMN ^1H , ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3) HMBC de **AL2**.

5.2.1.6 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE FO1

Da fração clorofórmica do micélio de *Fusarium oxysporum*, após lavagem com metanol (Item 6.11.1, p.170), obteve-se em um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio, denominado FO1 e apresentando faixa de fusão de 174,2 - 175,8 °C.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de FO1 (Fig.73, p.96) apresentou sinais em δ 5,27 (1H, m, $J= 6,3$ e 6,9 Hz), δ 2,61 (1H, dd, $J= 7,4$ e 15,5 Hz), δ 2,48 (1H, dd, $J= 5,8$ e 15,5 Hz) e um sinal intenso em δ 1,27 (3H, d, $J= 6,3$ Hz) referente a um grupo metila.

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Fig.74, p.97) apresentou quatro linhas espectrais. Sua comparação com espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig.75, p.98) permitiu verificar a presença de um carbono não hidrogenado em δ 169,4, associado pelo seu deslocamento químico a uma carbonila de éster, um carbono metínico oxigenado em δ 67,8, um carbono metilênico em δ 41,0 e um carbono metílico em δ 20,0.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H},^{13}\text{C}$ a uma ligação (HSQC) (Fig.77, p.100) exibiu a correlação do sinal em δ 5,27 de hidrogênio carbinólico com o carbono em δ 67,8, dos sinais em δ 2,61 e 2,48 de hidrogênios diastereotópicos e em posição α -carbonílica com o carbono em δ 41,0 e dos hidrogênios metílicos em δ 1,27 com o carbono em δ 20,0.

O espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY (Fig.76, p.99) mostrou a correlação entre o hidrogênios em δ 5,27 com os hidrogênios em δ 2,61, δ 2,48 e δ 1,27, além do acoplamento geminal dos dois hidrogênios em δ 2,61 e 2,48.

A partir dos dados obtidos foi possível sugerir a estrutura da β -lactona proveniente do ácido 3-hidroxi-butírico (Fig.71, p.94), a qual foi confirmada através dos acoplamentos do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear

^1H , ^{13}C (HMBC) (Fig.78, p.101). Neste espectro observou-se a correlação do hidrogênio em δ 5,27 com os carbonos em δ 169,4 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$), 41,0 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 20,0 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), dos hidrogênios em δ 2,61 e 2,48 com os carbonos em δ 169,4 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$), 67,8 ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e 20,0 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) (Tabela 18).

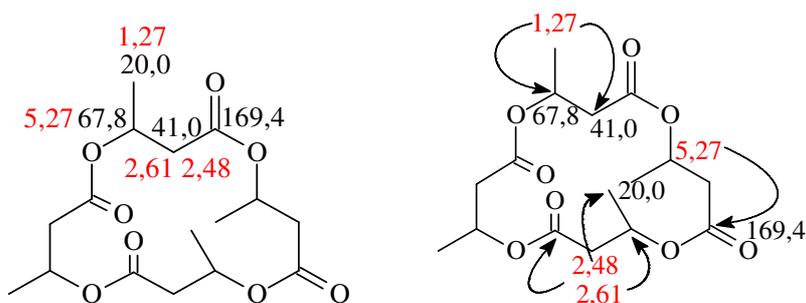


Figura 71-Principais correlações do espectro de HMBC de FO1.

O espectro de massa de FO1 (Fig.79 p.102) apresentou o pico íon molecular com m/z de 344 Daltons. Este valor para o pico íon molecular levou a propor que FO1 se tratava de um macrociclo, resultante da condensação de quatro unidades do ácido 3-hidroxi-butírico. As principais fragmentações para este macrociclo encontram-se descritas na Figura 72 (p.95). A comparação dos dados de RMN ^{13}C de FO1 com os da Tetra-(S)- β -butirolactona (ROELEN, 1992) confirmaram a estrutura proposta para FO1. Este composto é pertencente a classe dos poliidroxi-butiratos, e está sendo isolado pela primeira vez para o gênero *Fusarium*.

Tabela 18-Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CDCl_3) para o composto FO1, incluindo os resultados obtidos pelas correlações heteronucleares dos espectros 2D HSQC e HMBC (ROELEN, 1992).

Carbono	HSQC		HMBC		Tetra[(S)- β -butirolactona
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1	-	169,4	2H-2	1H-3	169,6

2	2,61(dd, $J= 7,4$ e $15,5$ Hz) 2,48 (dd, $J= 5,8$ e $15,5$ Hz)	41,0	1H-3	3H-4	40,9
3	5,27(m)	67,8	2H-2, 3H-4		67,5
4	1,27 (d, $J= 6,3$ Hz)	20,0	1H-3	2H-2	19,6

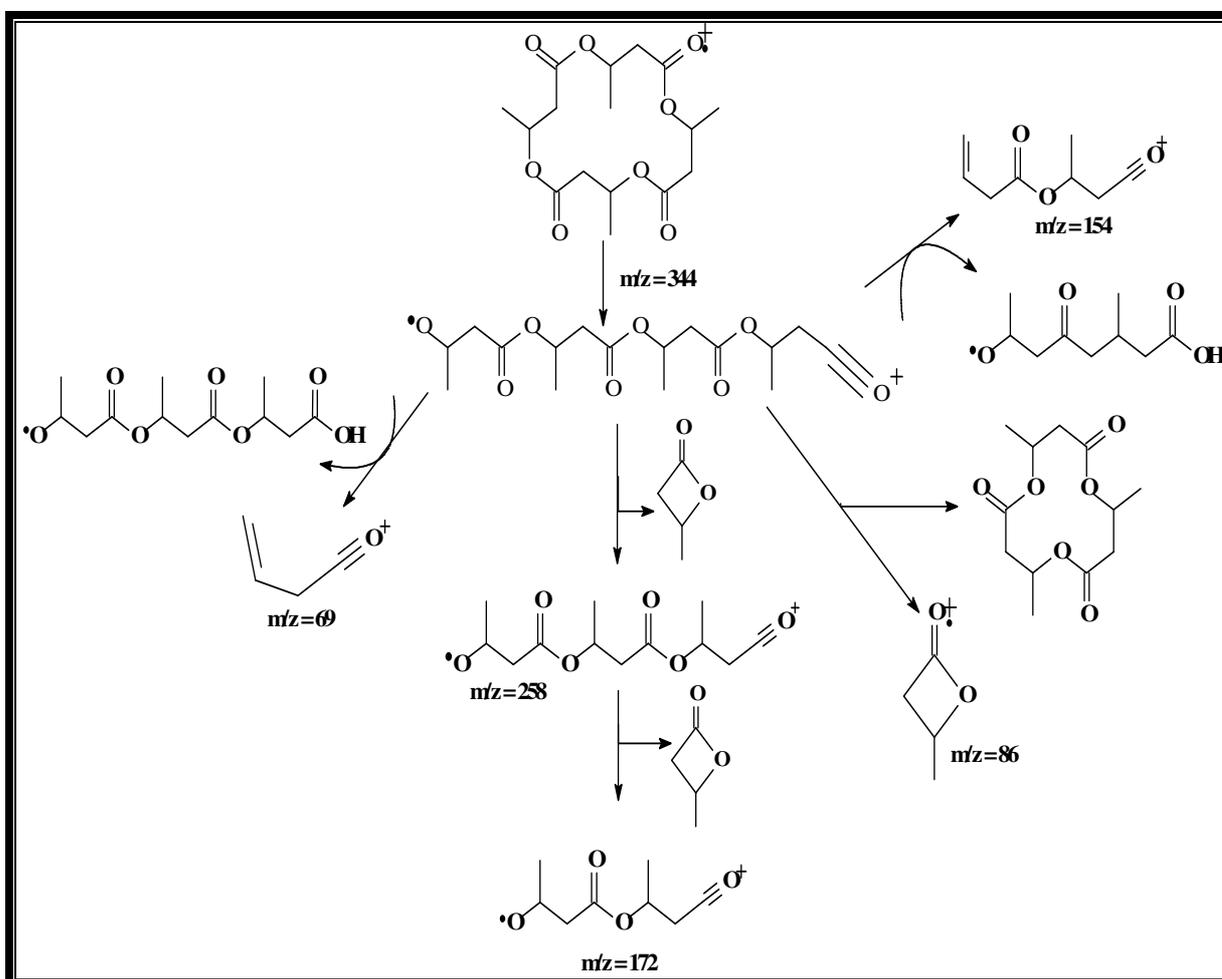


Figura 72-Proposta para as principais fragmentações de massa da molécula FO1.

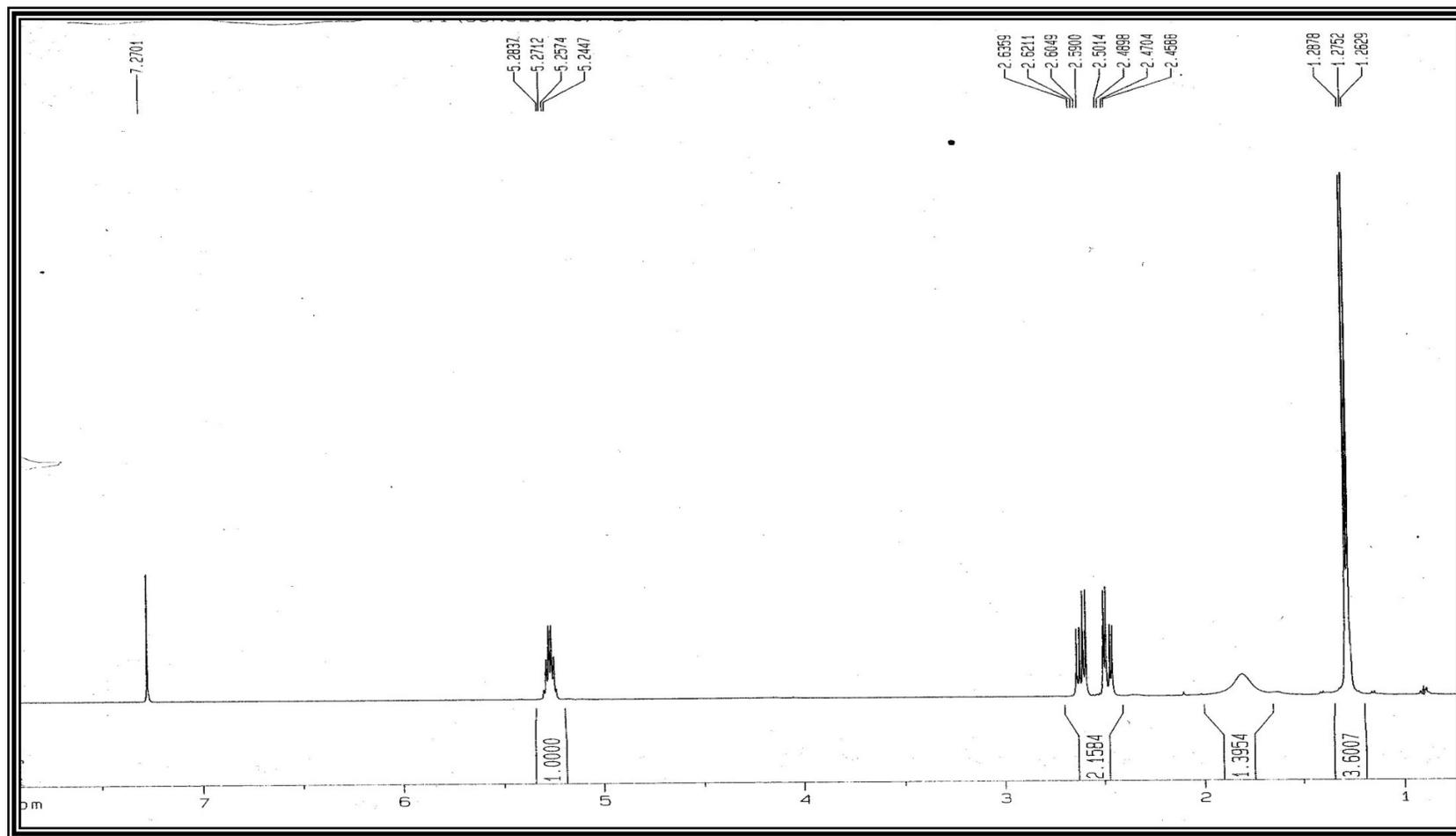


Figura 73-Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de FO1.

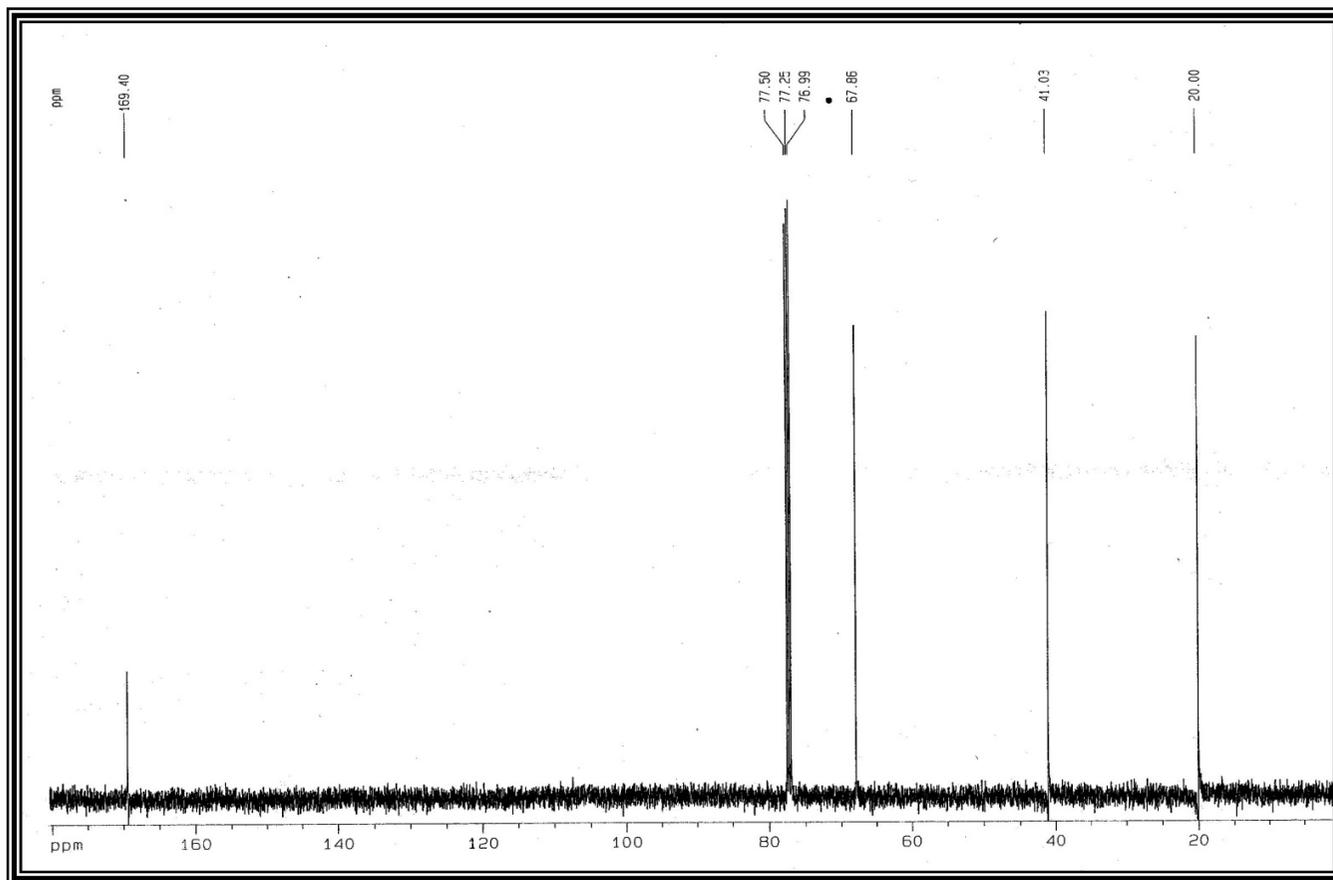


Figura 74-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de FO1.

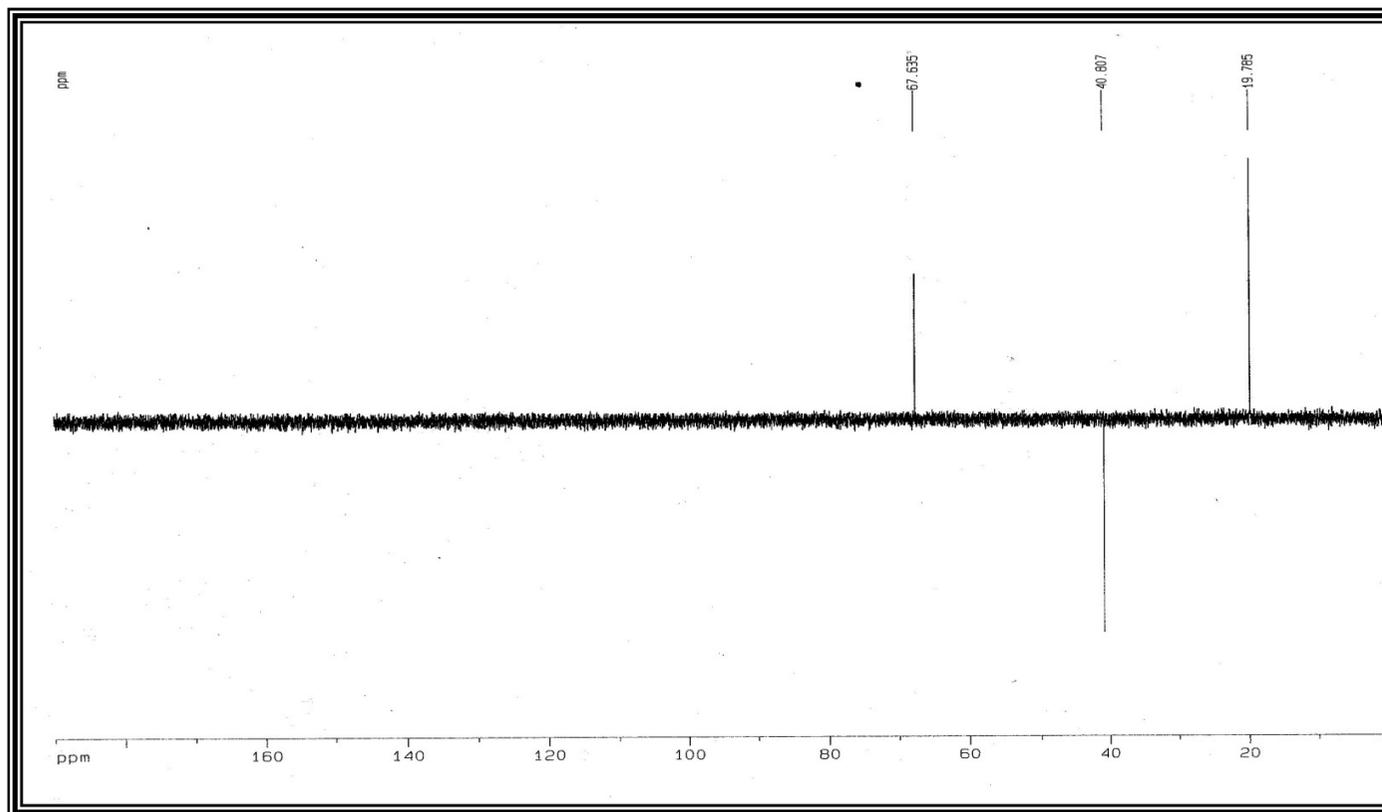


Figura 75-Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de FO1.

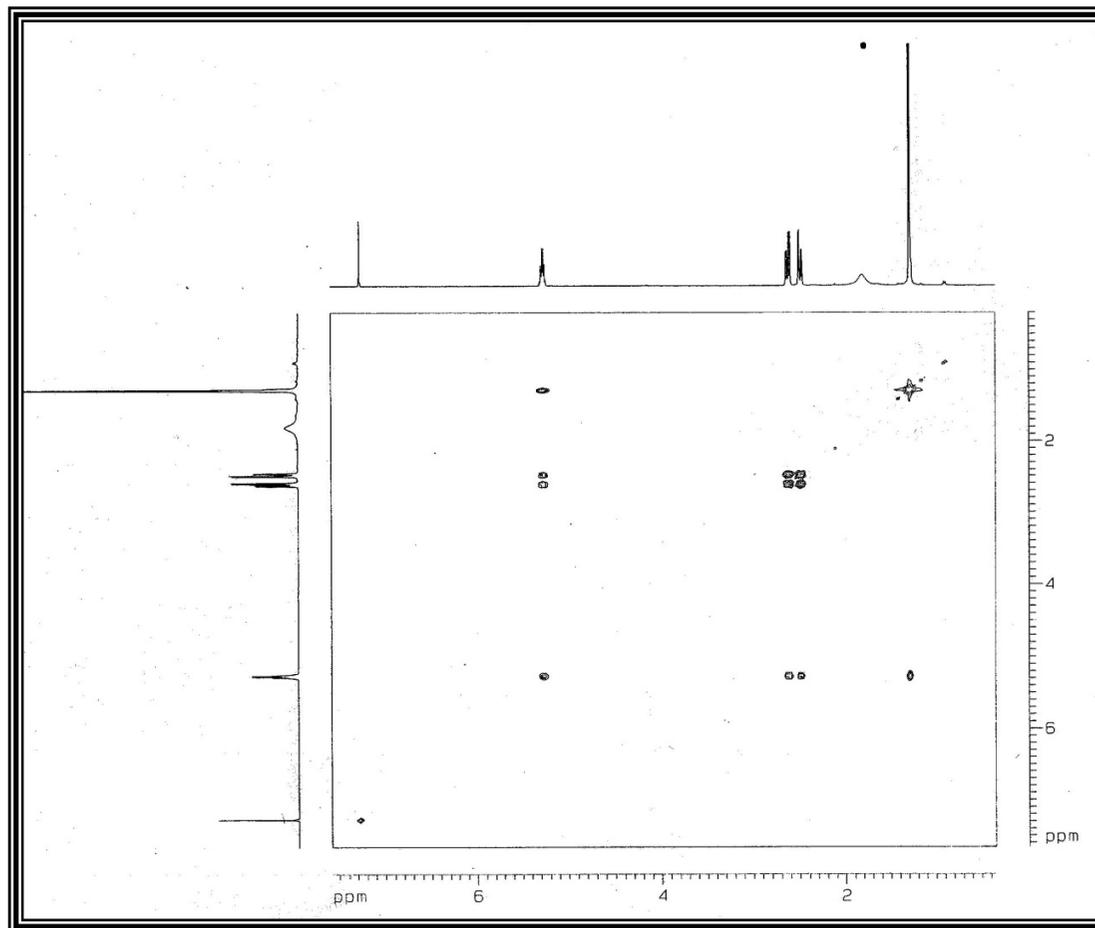


Figura 76-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3) de **FO1**.

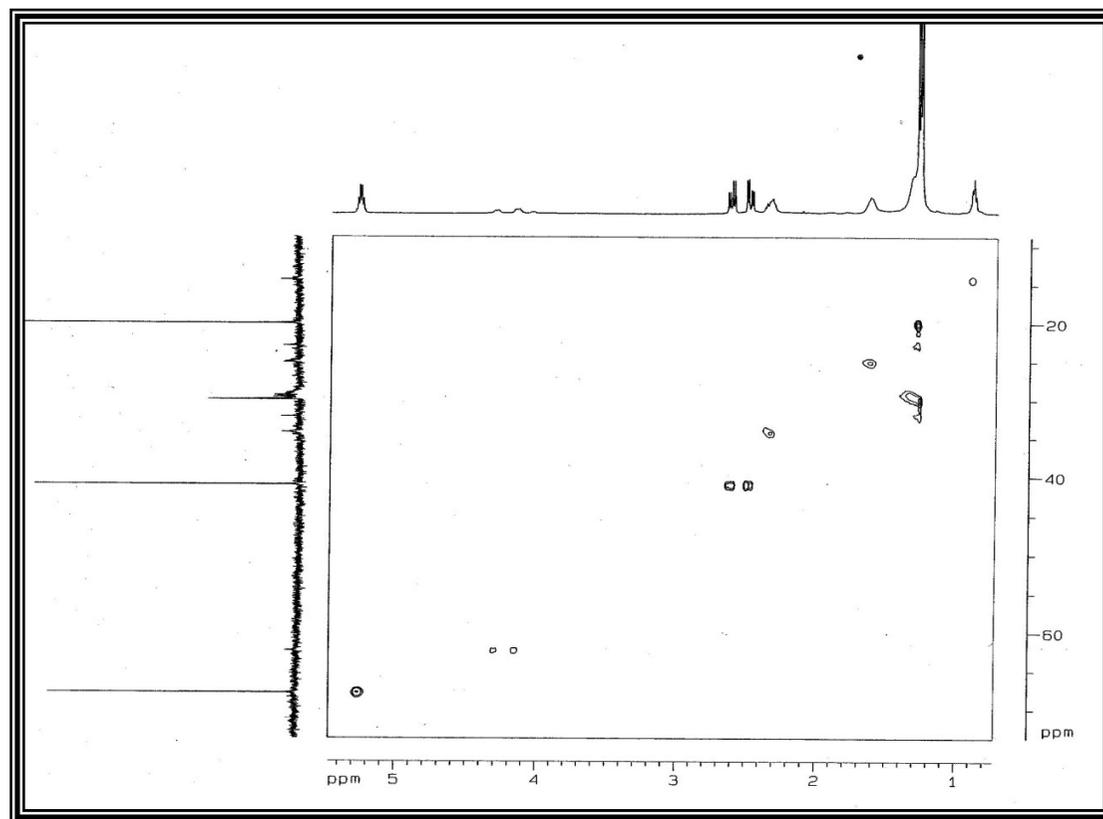


Figura 77-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **FO1**.

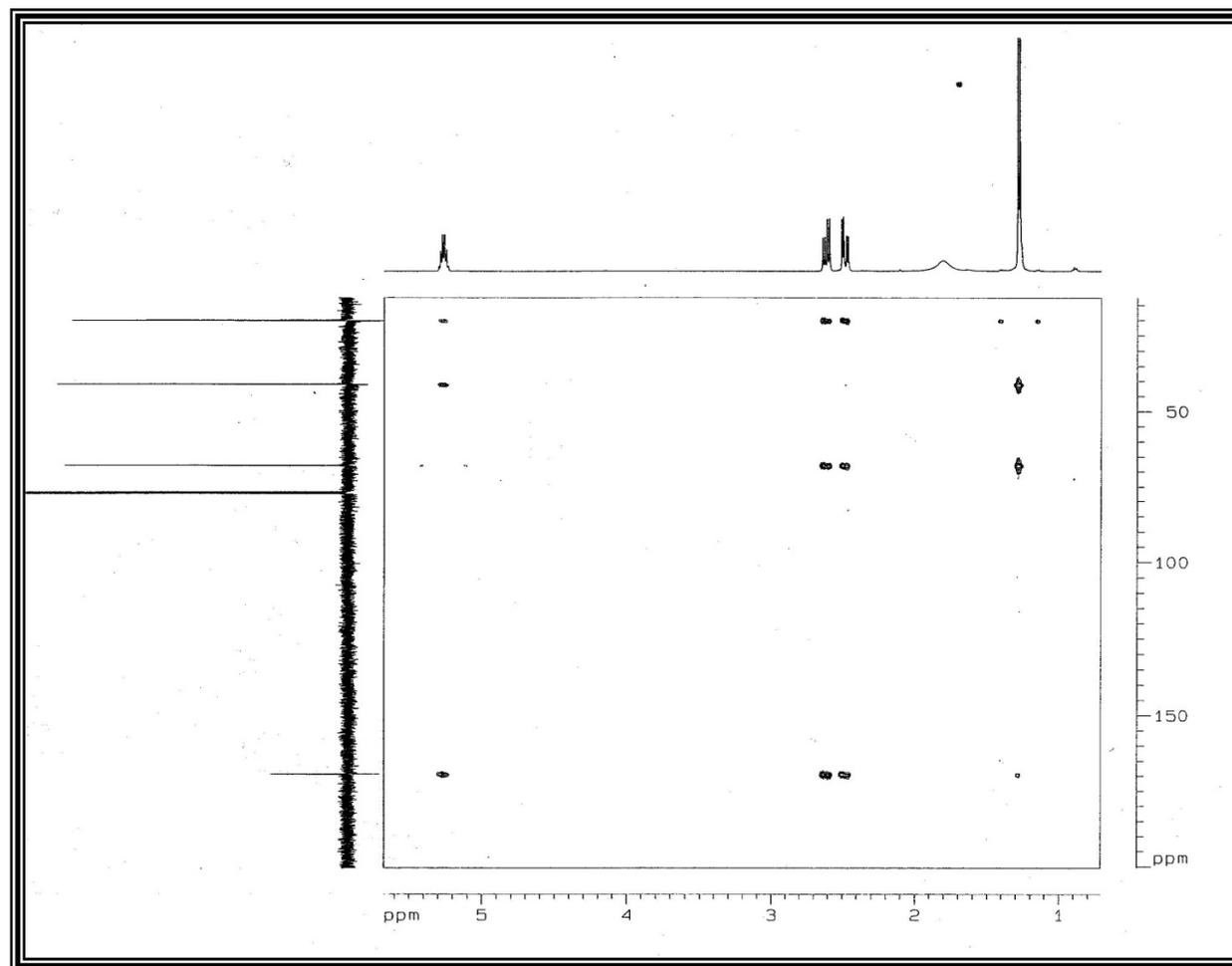


Figura 78-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **FO1**.

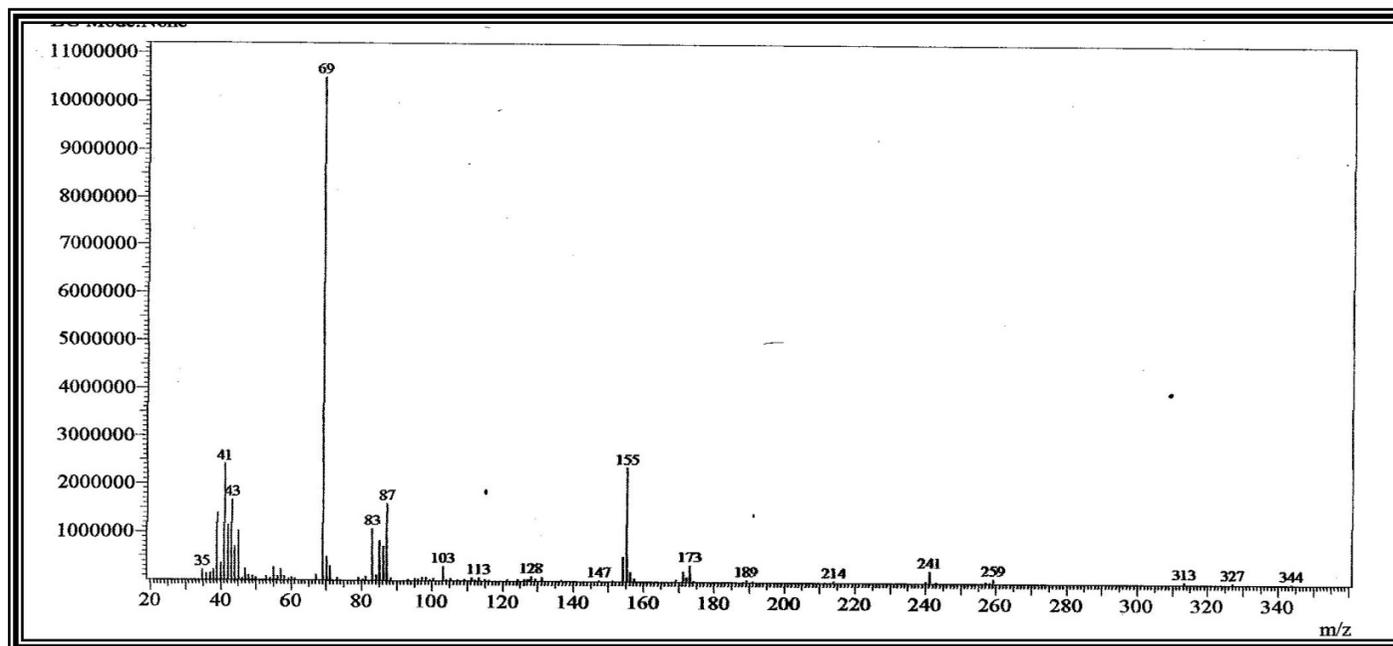


Figura 79-Espectro de massa de FO1 (IE, 70 eV).

5.2.1.7- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE FO2

O fracionamento cromatográfico da fração hexano-acetato 70% de *F. oxysporium* (Item 6.11.2, p.170) resultou em um líquido viscoso, incolor, sólvvel em clorofórmio, denominado de FO2.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de FO2 (Fig.84, p.109) apresentou uma banda larga em 3418 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação O-H, bem como uma absorção em 1196 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação C-O de álcoois; uma absorção intensa em 1766 cm^{-1} referente a deformação axial de carbonila de éster e absorções em 2978 e 2931 cm^{-1} referentes a deformação axial de ligações de hidrogênio a carbono sp^3 .

O Cromatograma (Fig.88, p.113) obtido na análise de FO2 por CG-EM (Item 6.2.2 p.123) apresentou dois picos distintos com tempos de retenção em 8,55 e 8,89 minutos e com porcentagens referentes a área do pico iguais a 29,0 (A) e 71,0 % (B), respectivamente. Os espectros de massa (Fig.89, p.113) mostraram o mesmo pico íon molecular para as duas moléculas ($m/z = 130$). Estas informações permitiram inferir para FO2 uma mistura de substâncias estereoisoméricas.

O espectro de RMN ^1H (Fig.82, p.107) mostrou sinais em δ 4,41 (1H, dt, $J = 3,4$ e $7,3$ Hz), 4,34 (1H, dt, $J = 5,4$ e $7,4$ Hz), 4,13 (2H, dq, $J = 3,4$ e $6,5$ Hz) e 3,78 (1H, dq, $J = 5,5$ e $6,5$ Hz) referentes a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Sinais na faixa de δ 2,63 a 2,50 (4H, m) de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 em posição α à carbonila, sinais em δ 2,03 a 2,05 (m) e dois sinais intensos em δ 1,26 (3H, d, $J = 6,4$ Hz) e 1,20 (3H, d, $J = 6,8$ Hz) referente a dois grupos metila com intensidades diferentes, corroborando as informações obtidas na análise por CG-EM.

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig.85, p.110) permitiu verificar a correlação entre os hidrogênios da metila em δ 1,20 (d, $J = 6,8$ Hz) com os hidrogênios em δ 4,13 (dq, $J = 3,4$ e $6,5$ Hz) e dos hidrogênios da metila em δ 1,26 (d, $J = 6,4$ Hz) com os hidrogênios em δ 3,78

(dq, $J = 5,5$ e $6,5$ Hz), diferenciando os sinais dos hidrogênios para a mistura. Observou-se também o acoplamento entre os hidrogênios em δ 2,63-2,50 com os hidrogênios em δ 2,30-2,05.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig.83, p.108) apresentou doze linhas espectrais. Os sinais em δ 177,3 e 176,9 foram associadas a duas carbonilas de éster; os sinais em δ 84,1, 83,3, 69,9 e 67,4 foram associadas a carbonos oxigenados; os sinais em δ 28,7, 28,6, 24,0 e 20,9 foram associados a carbonos sp^3 não funcionalizados e dois sinais em δ 18,4 e 17,6 associadas a grupos metilas.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC (Fig.86, p.111) permitiu associar os hidrogênios a seus respectivos carbonos. O espectro mostrou a correlação entre os hidrogênios em δ 4,35, 4,41, 4,13 e 3,78 com os carbonos oxigenados em δ 84,1, 83,3, 67,4 e 69,9 respectivamente; os sinais de hidrogênios entre δ 2,63 – 2,50 com os carbonos em δ 28,7 e 28,6; os sinais de hidrogênio em δ 2,30 – 2,05 com os carbonos em δ 24,0 e 20,9, bem como a correlação entre os hidrogênios das metilas em δ 1,26 e 1,20 com os carbonos em δ 18,4 e 17,6, respectivamente (Tabela 19, p. 105). Com os dados obtidos pode-se diferenciar os carbonos correspondentes a cada componente da mistura.

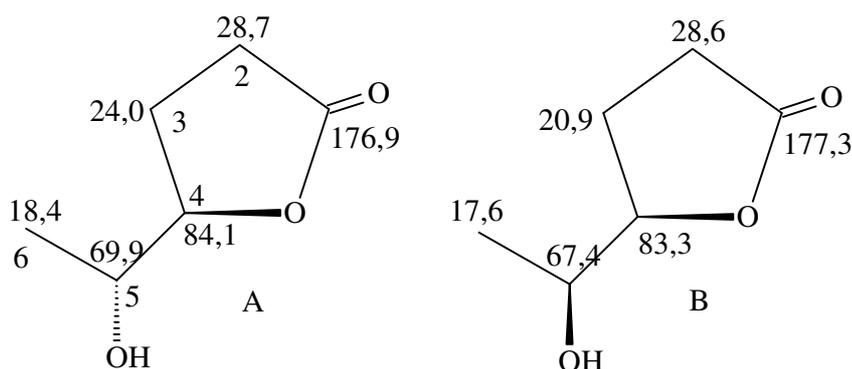


Figura 80-Estruturas de **FO2** com respectivos deslocamentos químicos de carbono-13.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC (Fig.87, p.112) apresentou a correlação entre os hidrogênios da metila em δ 1,20 com os carbonos em δ 67,4 ($^2J_{\text{CH}}$) e 83,3 ($^3J_{\text{CH}}$). Correlações semelhantes foram atribuídas aos hidrogênios da metila em δ 1,26 com os carbonos em δ 69,9 ($^2J_{\text{CH}}$) e 84,1 ($^3J_{\text{CH}}$). O espectro também apresentou a correlação entre os hidrogênios em δ 2,63 – 2,50 com os carbonos em δ 83,3 e 84,1 e dos hidrogênios metínicos em δ 4,41 e 4,35 com os carbonos em δ 177,3 ($^3J_{\text{CH}}$) e 176,9 ($^3J_{\text{CH}}$), respectivamente (Tabela 19, p.105).

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que o composto FO2 tratava-se de uma mistura de dois diastereoisômeros da 5-hidroxi-hexano-4-olida (Fig.80, p.104). A confirmação da estrutura de um dos diastereoisômeros foi obtida através da comparação dos dados de carbono-13 de um dos componentes da mistura com o (4*R*,5*S*)-5-hidroxi-hexano-4-olida (BUCHANAN *et al*, 1995), conforme Tabela 19.

Tabela 19-Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 para o composto FO2, incluindo os resultados obtidos nos espectros 2D heteronucleares HSQC e HMBC (BUCHANAN *et al*, 1995).

Carbono	HSQC		HMBC		(4 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *)-5-hidroxi-hexano-4-olida
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
1A	-	176,9		H-4A	
2A	2,63-2,50	28,7			
3A	2,30-2,05	24,0		H-5A	
4A	4,35	84,1	H-5A	H-6A, H-2A	
5A	3,78	69,9	H-6A		
6A	1,26	18,4	H-5A		
1B	-	177,3		H-4B	177,2
2B	2,63-2,50	28,6			28,6
3B	2,30-2,05	20,9		H-5B	21,0
4B	4,41	83,3	H-5B	H-6B, H-2B	83,3
5B	4,13	67,4	H-6B		67,4
6B	1,20	17,6	H-5B		17,7

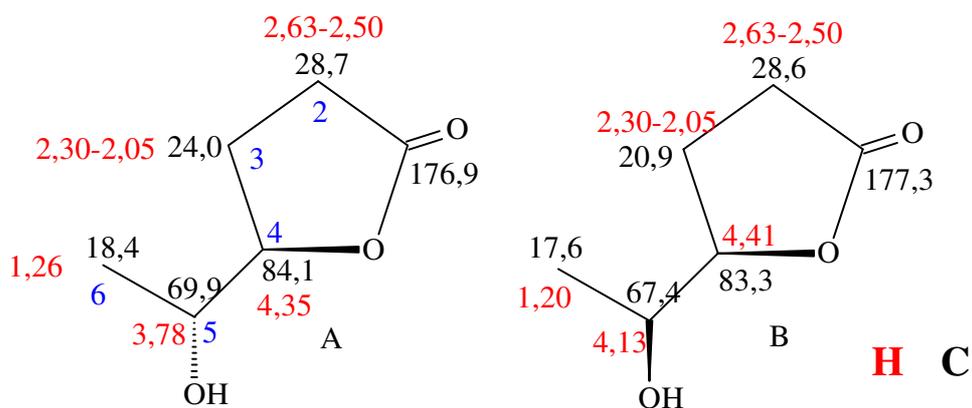


Figura 81-Estrutura de **FO2**: mistura dos estereoisômeros $(4R^*,5R^*)$ -5-hidroxi-hexan-4-olida e $(4R^*,5S^*)$ -5-hidroxi-hexano-4-olida com os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13.

A mistura dos diastereoisômeros está sendo relatado pela primeira vez para o gênero *Fusarium*, sendo o isômero $(4R^*,5S^*)$ -5-hidroxi-hexano-4-olida (leucometina) isolado anteriormente dos fungos *Paxillus atrotomentosus* e *O. japonica*.

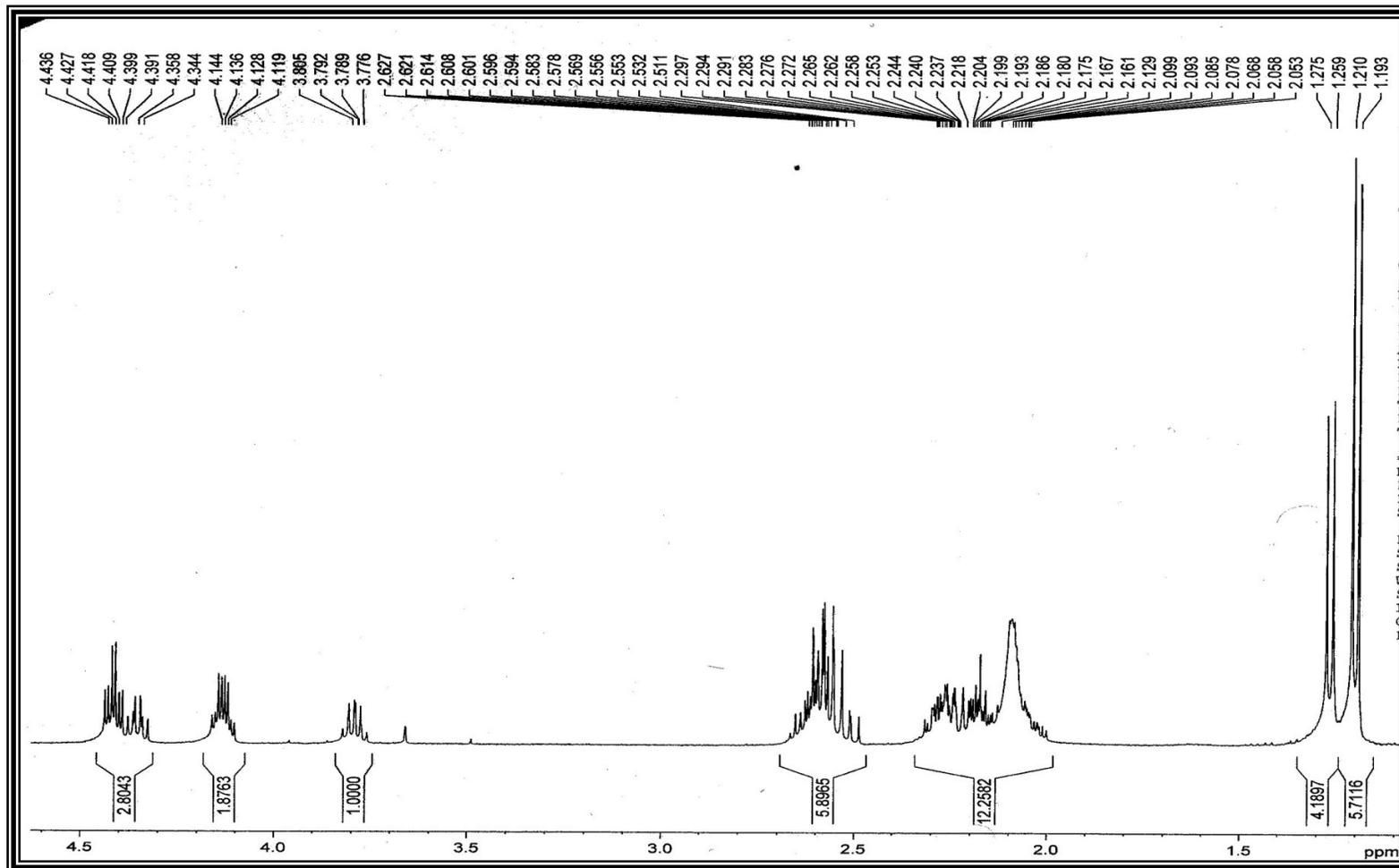


Figura 82-Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de FO2.

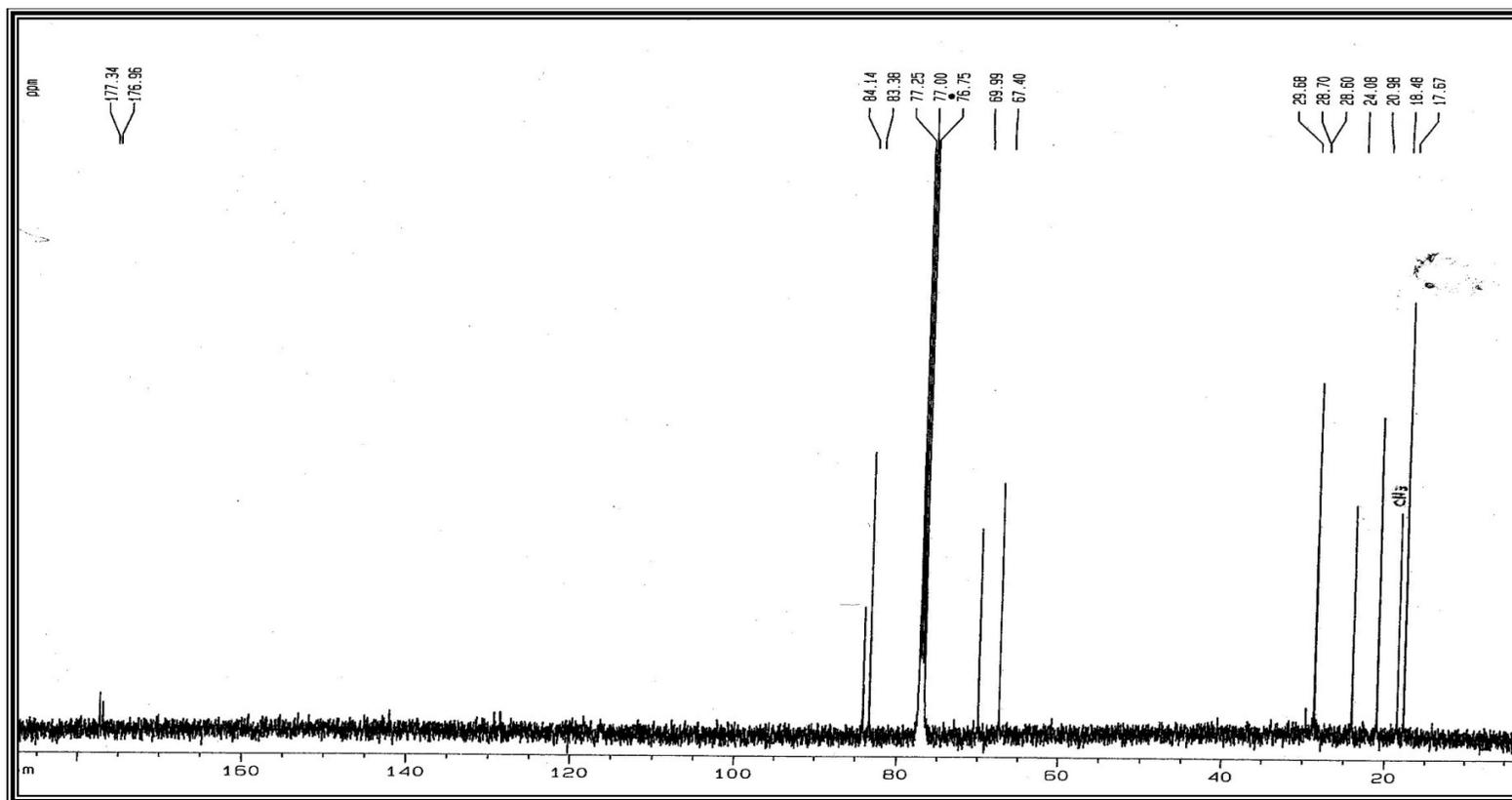


Figura 83-Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de FO2.

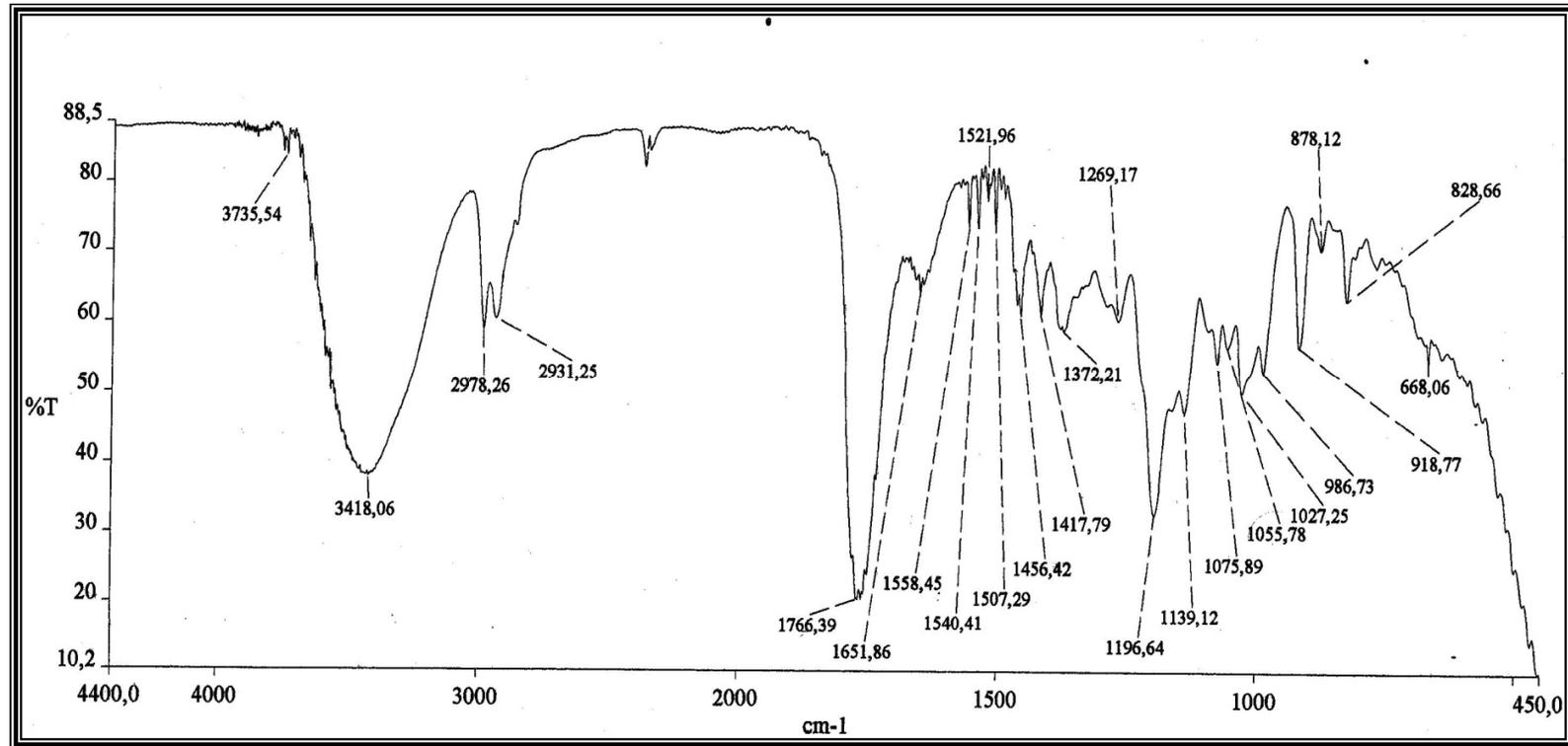


Figura 84-Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl) de FO2.

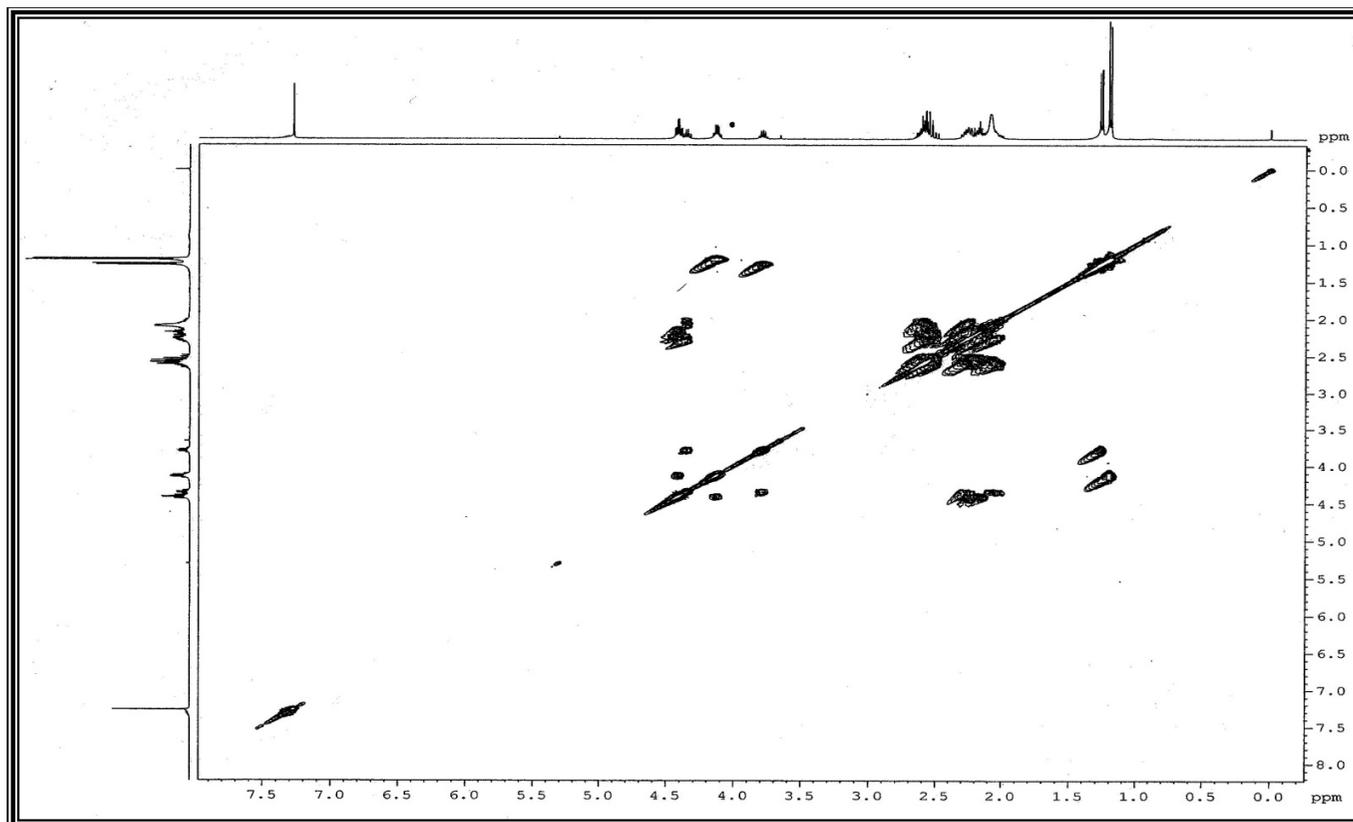


Figura 85-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) de **FO2**.

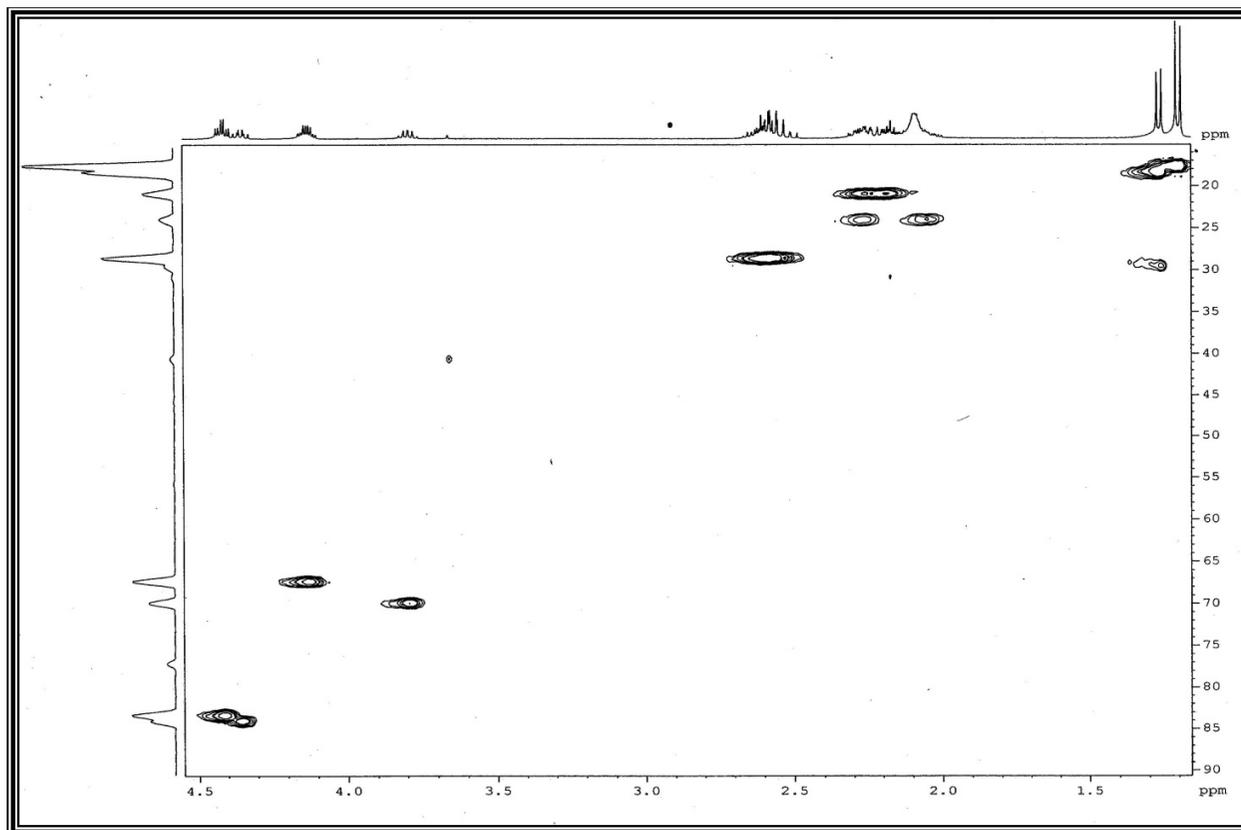


Figura 86-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de **FO2**.

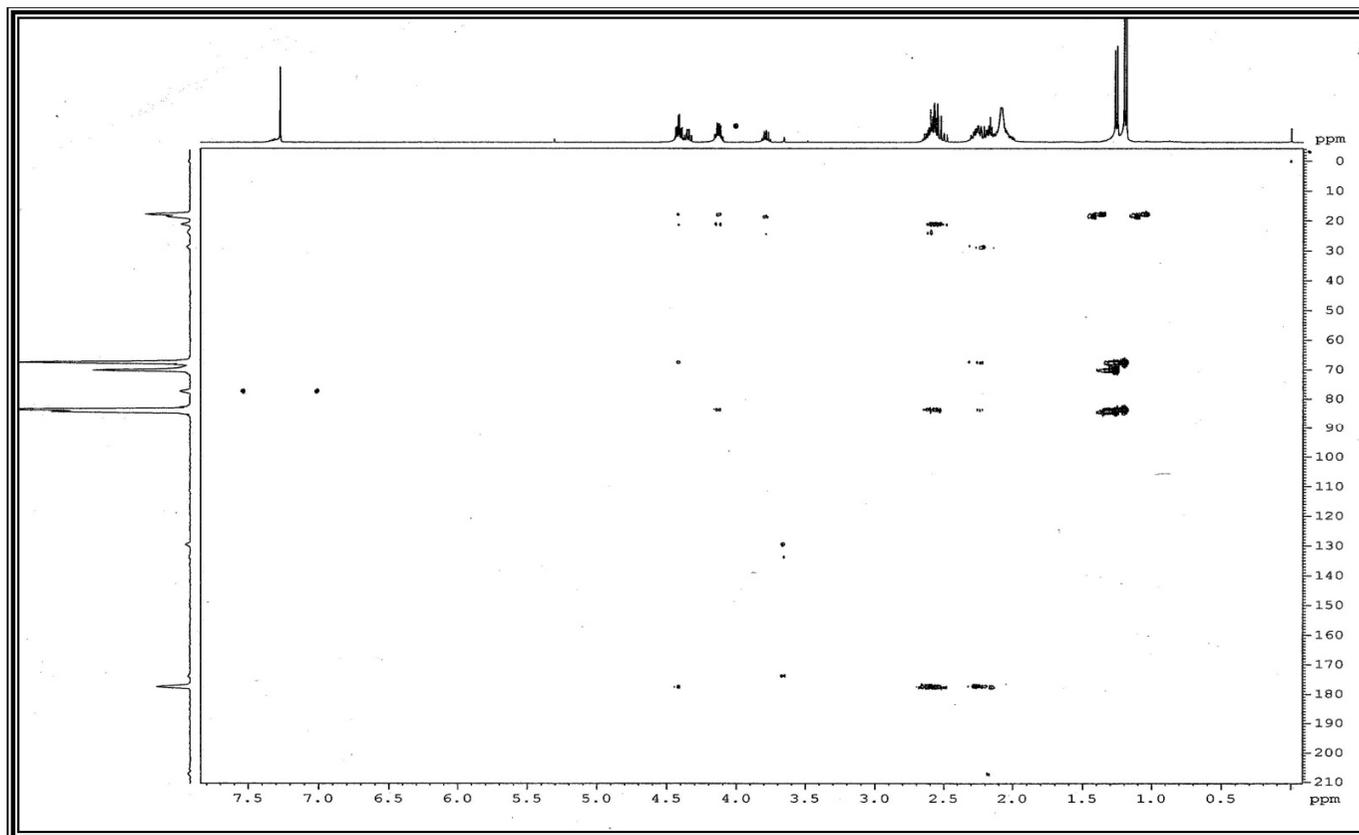


Figura 87-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de FO2.

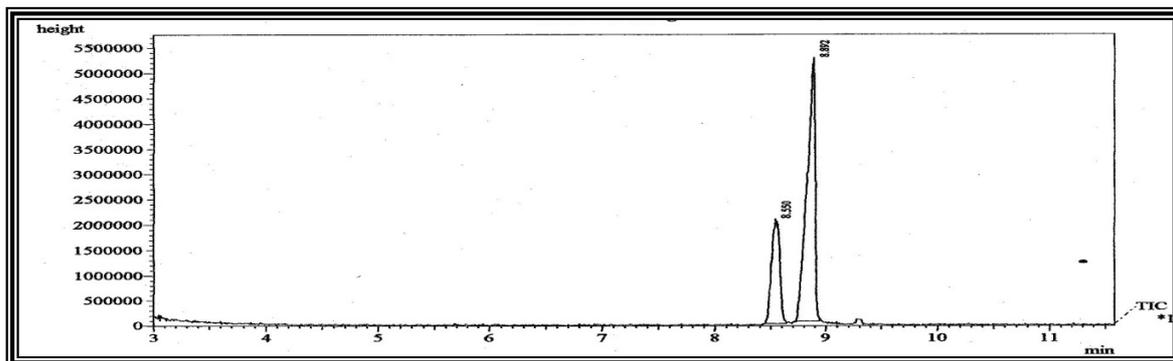


Figura 88- Cromatograma de FO2 obtido por CG.

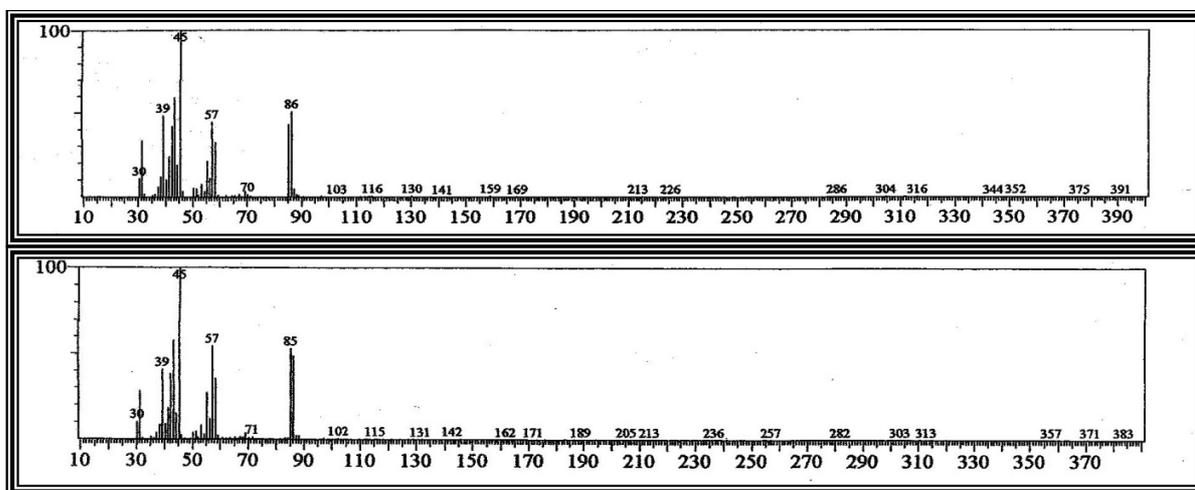


Figura 89- Espectro de massa de FO2 (IE 70 eV).

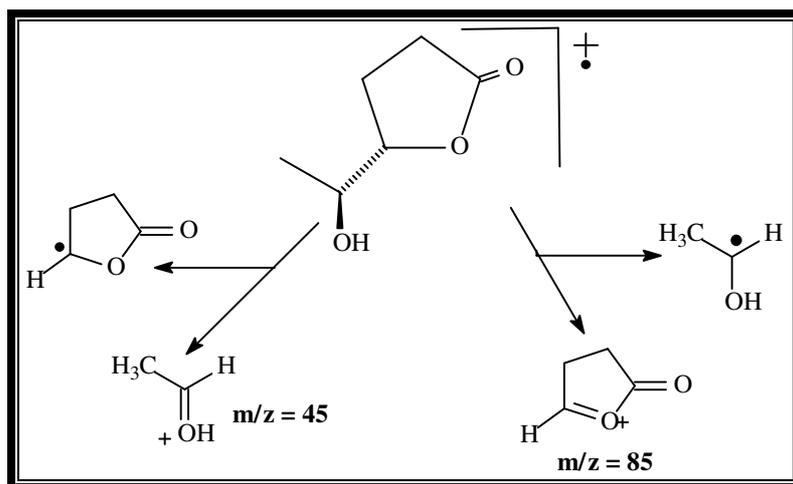


Figura 90- Proposta de fragmentação para FO2.

5.2.1.8-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AC1

O tratamento cromatográfico da fração micélio/meio de *Acremonium curvulum* resultou em um líquido viscoso alaranjado, solúvel em clorofórmio, denominado AC1 (Item 6.10.1, p.168).

O espectro de massa de AC1 apresentou pico íon molecular com razão massa/carga igual a 194 Daltons (Fig.100, p.124).

O espectro de absorção na região do infravermelho de AC1 (Fig.94, p.118) apresentou como principais sinais uma absorção larga em 3444 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação O-H; uma absorção em 1131 cm^{-1} característica da deformação axial da ligação C-O de éster e álcool; absorções em 2926 e 2854 cm^{-1} associadas a deformação axial de grupos CH_2 e CH_3 ; uma absorção em 1731 cm^{-1} evidenciando a presença de uma carbonila de éster e as absorções em 1605 , 1516 e 1497 cm^{-1} associadas a deformação axial da ligação -C=C- de anel aromático, revelando assim o caráter insaturado da molécula.

O espectro de RMN ^1H de AC1 (Fig.93, p.117) confirmou a presença de um anel aromático monosubstituído através dos sinais em δ 7,20 (2H, dt, $J=7,2\text{ Hz}$), 7,30 (2H, tl, $J=7,6\text{ Hz}$) e 2,24 (1H, m). O sinal em δ 4,24 (1H, q, $J=6,8\text{ Hz}$) foi associado a um hidrogênio metínico ligado a carbono oxigenado e a um grupo metila (δ 1,35). Os sinais em δ 2,96 (2H, t, $J=7,2\text{ Hz}$) e 4,42 (2H, td, $J=7,2$ e $10,4\text{ Hz}$) foram associados a dois grupos metilênicos vicinais e isolados, onde o último sinal corresponde ao grupo metilênico oxigenado, e um sinal intenso em δ 1,35 (3H,d, $J=6,8\text{ Hz}$) de um grupo metila ligado a carbono metínico.

O espectro de RMN ^{13}C de AC1 (Fig.95 p.119) apresentou nove linhas espectrais, das quais quatro foram associadas ao sistema aromático δ 137,4 , 128,9; 128,7 e 126,8, sendo os sinais em δ 128,9 e 128,7 associados a dois carbonos cada; uma em δ 175,7 associada a carbonila de éster; duas em δ 66,0 e 34,8 associadas a dois grupos metilênicos, sendo a primeira relacionada a um carbono oxigenado, e um grupo metila em δ 20,1. O padrão de hidrogenação foi

obtido através da comparação com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 $^{\circ}$ (Fig.96, p.120). Os dados permitiram sugerir para AC1 a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ com IDH igual a 5.

O espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig.97, p.121) confirmou os acoplamentos observados no espectro de RMN ^1H através das correlações dos hidrogênios em δ 4,42 com os hidrogênios em δ 2,96 e dos hidrogênios em δ 1,35 com o hidrogênio em δ 4,24, confirmando a vizinhança entre eles.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (Fig.98, p.122) possibilitou a correlação entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos, confirmando as informações deduzidas dos espectros anteriormente analisados.

Os dados apresentados permitiram sugerir para AC1 a estrutura do 2'-hidroxipropanoato de feniletila (Fig. 91).

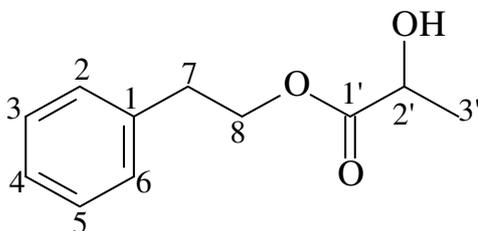


Figura 91-Estrutura de AC1 – 2'-hidroxipropanoato de feniletila.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (Fig.99, p.123) mostrou o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em δ 4,42 com os carbonos em δ 137,4 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) e δ 175,7 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$), bem como acoplamento entre os hidrogênios da metila em δ 1,35 com o carbono em δ 175,7 ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) (Tabela 20, p.116). Estes acoplamento confirmaram o arranjo estrutural proposto para AC1 (Fig.92, p.116).

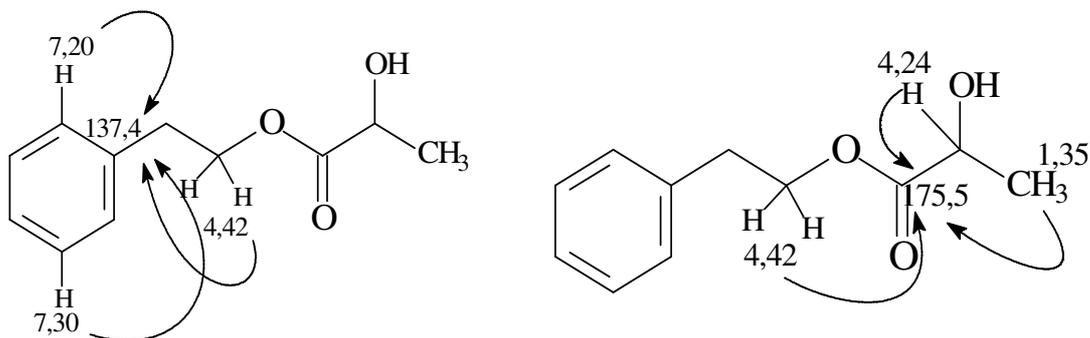


Figura 92-Principais correlações do espectro HMBC de **AC1**.

Tabela 20-Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D/2D, em CDCl_3 , para o composto **AC1**.

	HSQC		HMBC	
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C				
1	-	137,4	H-2/H-6	2H-8; H-3/H-5
1'	-	175,5	H-2'	3H-3'; 2H-8
CH				
2/6	7,20 (dt)	128,9		2H-7
3/5	7,30 (tl)	128,7		
4	7,24 (m)	126,8		H-2/H-6
2'	4,24 (q, $J=6,8$)	66,9	3H-3'	
CH₂				
7	2,96 (t, $J=7,2$)	34,8	2H-8	H-2/H-6
8	4,42 (td, $J=10,4$ e $7,2$)	66,0	2H-7	
CH₃				
3'	1,35 (d, $J=6,8$)	20,1	H-2'	

O 2'-hidroxipropionato de feniletila está sendo isolado pela primeira vez no gênero *Acremonium* e seus dados de RMN ^1H e ^{13}C estão sendo relatados pela primeira vez na literatura.

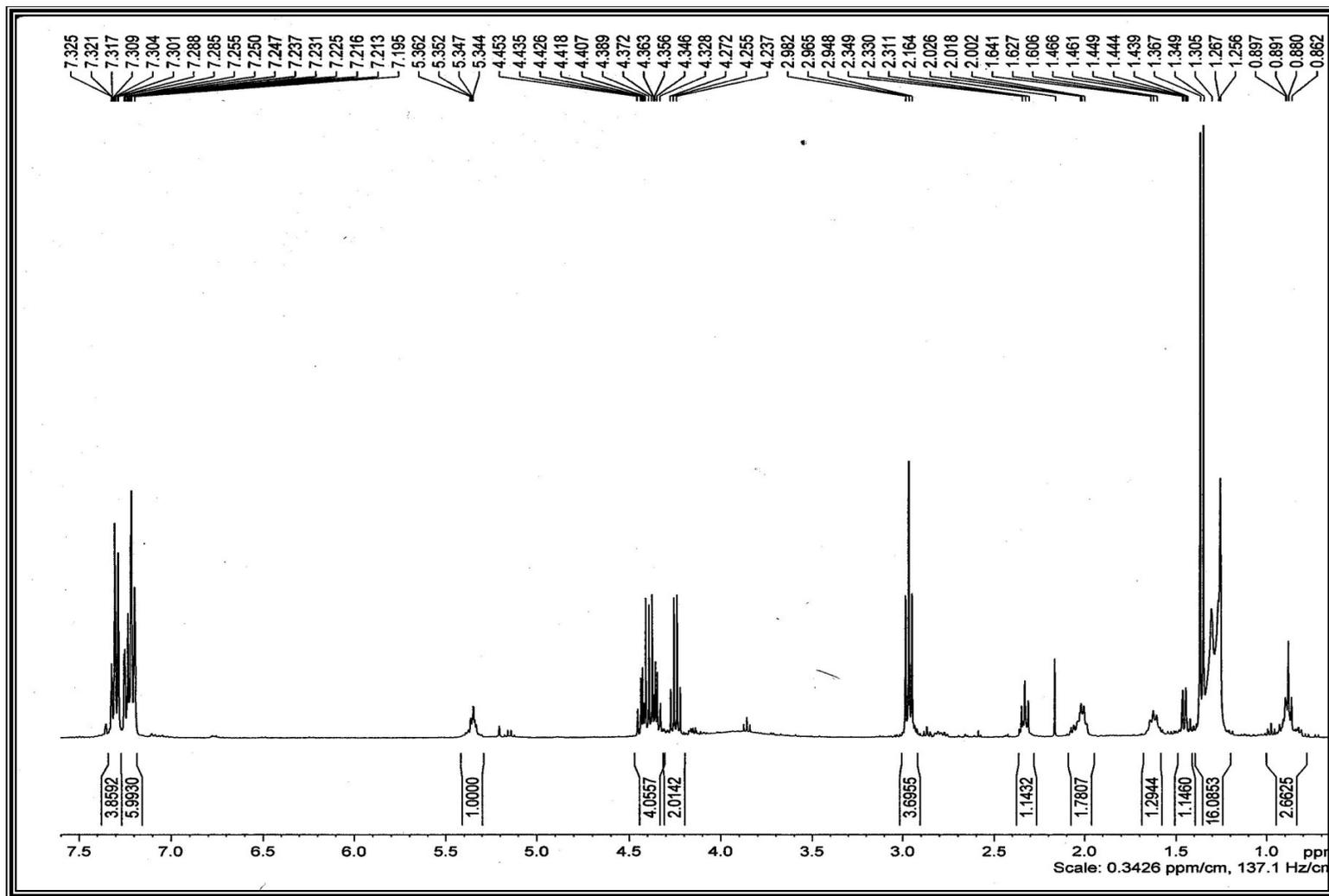


Figura 93-Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **AC1**.

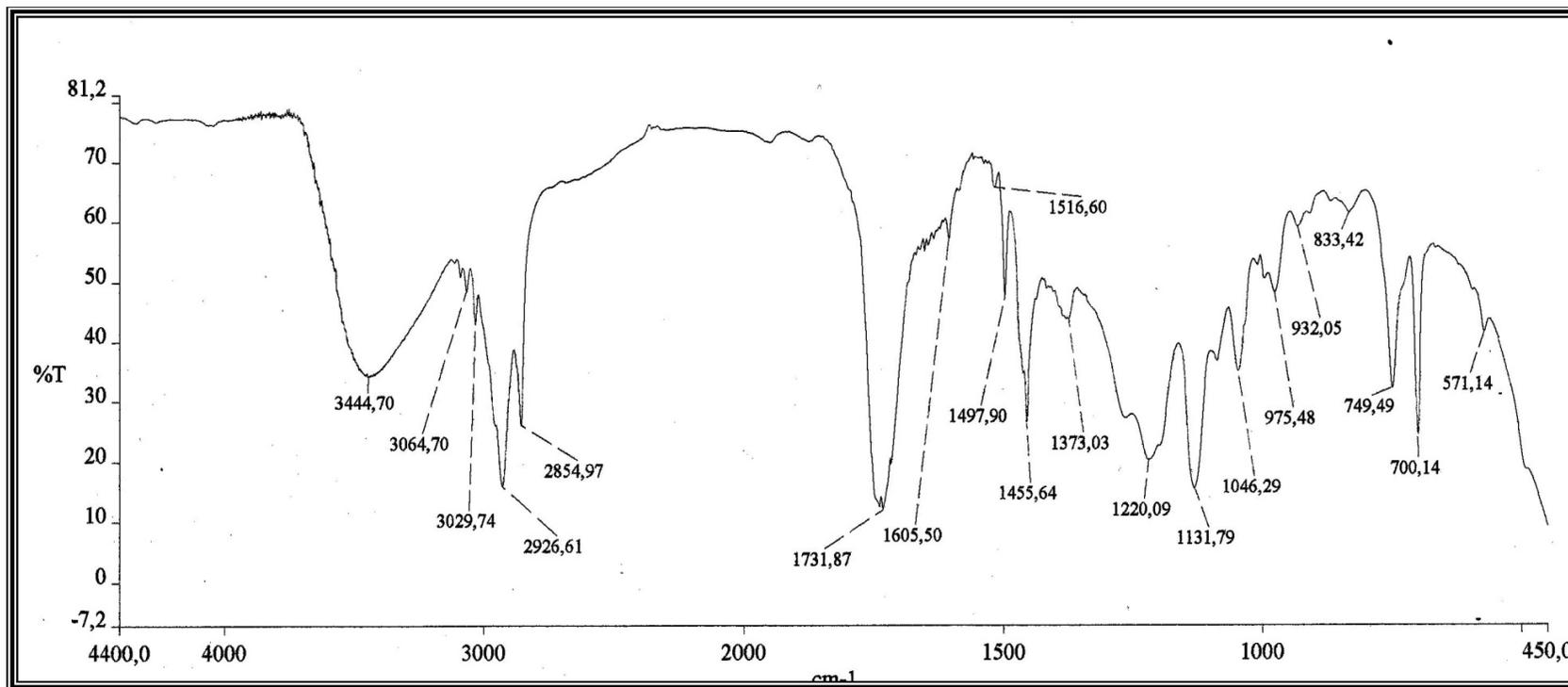


Figura 94-Espectro de IV (NaCl) de AC1.

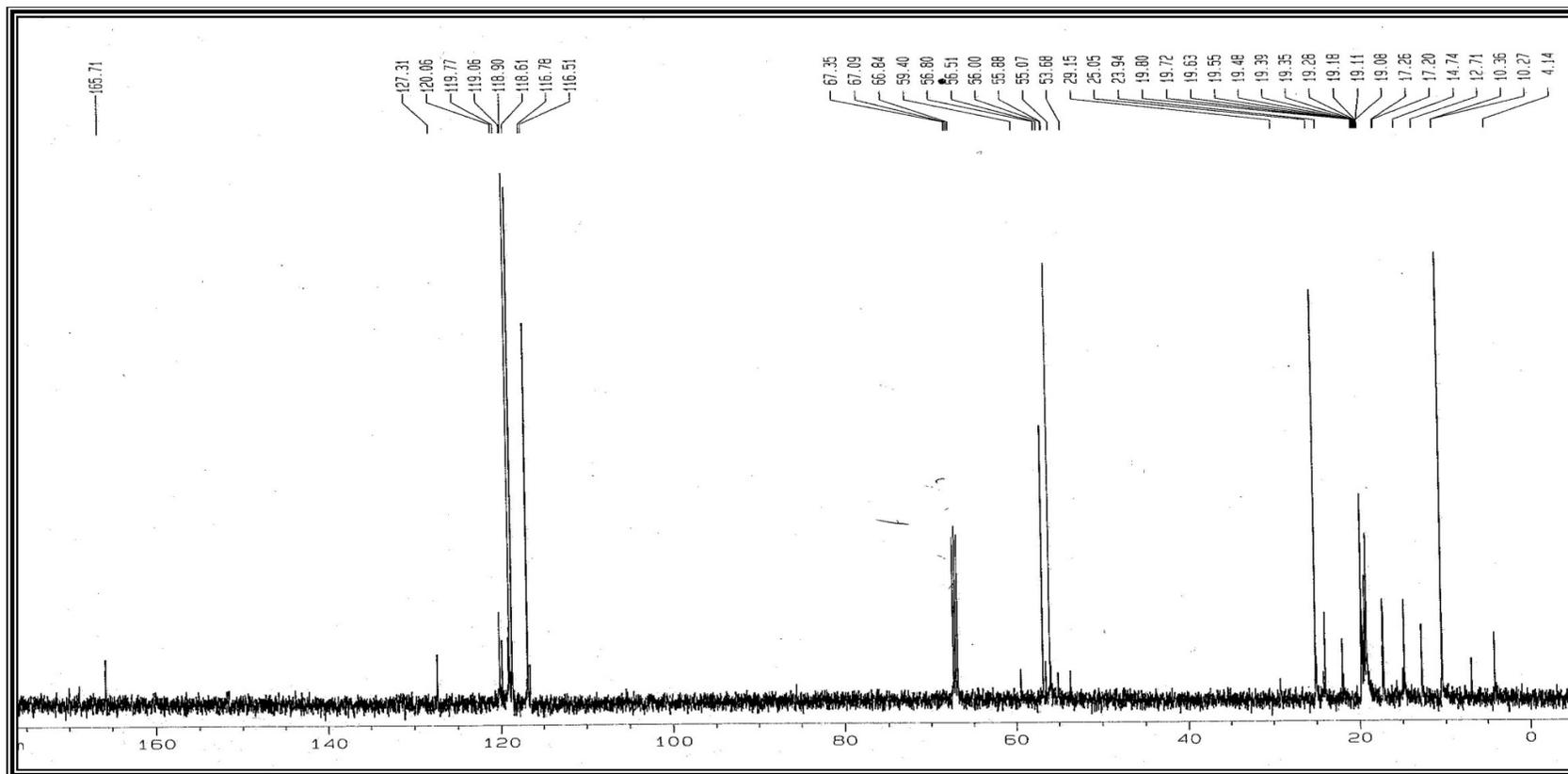


Figura 95-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de AC1.

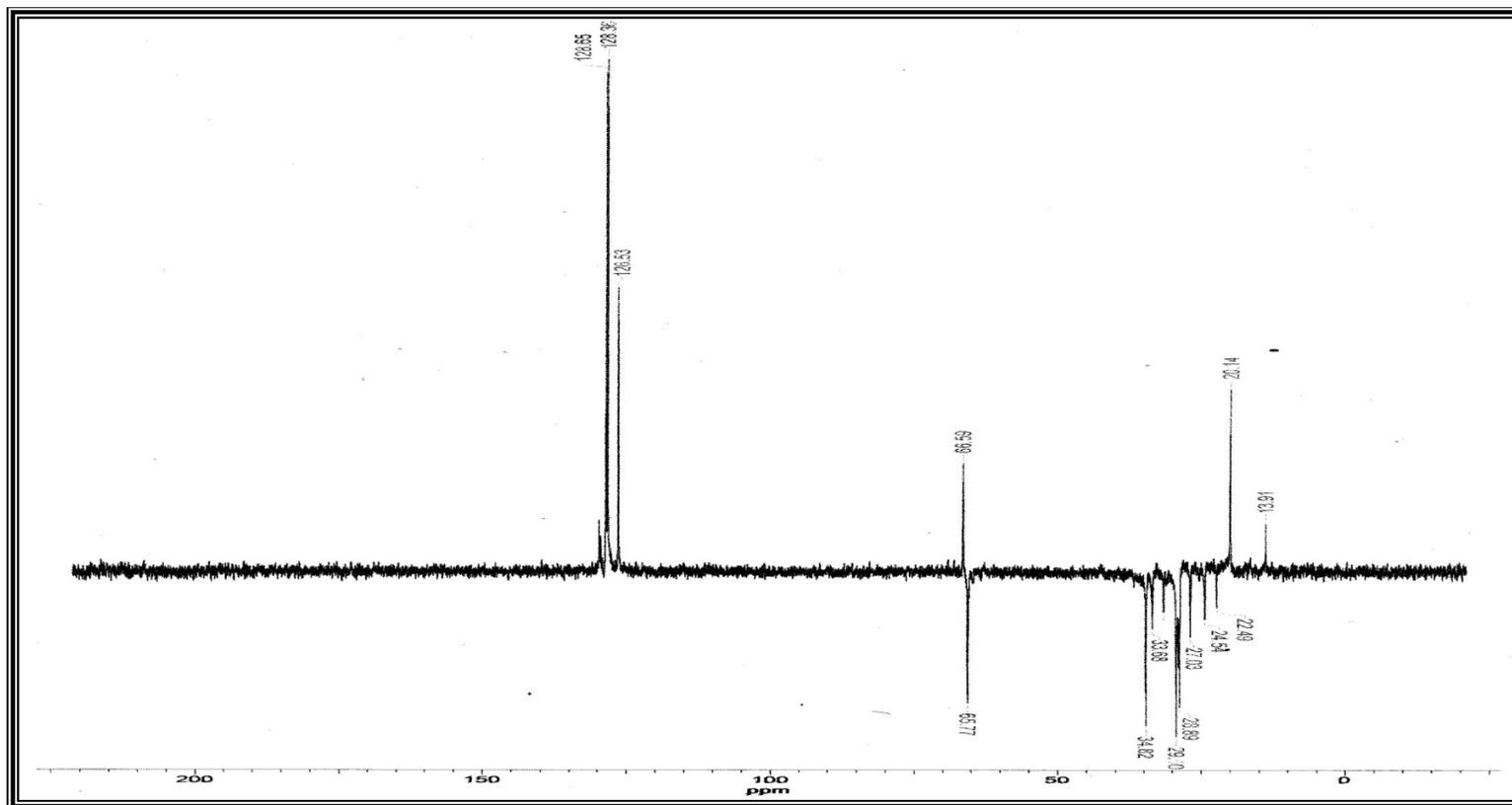


Figura 96-Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de AC1.

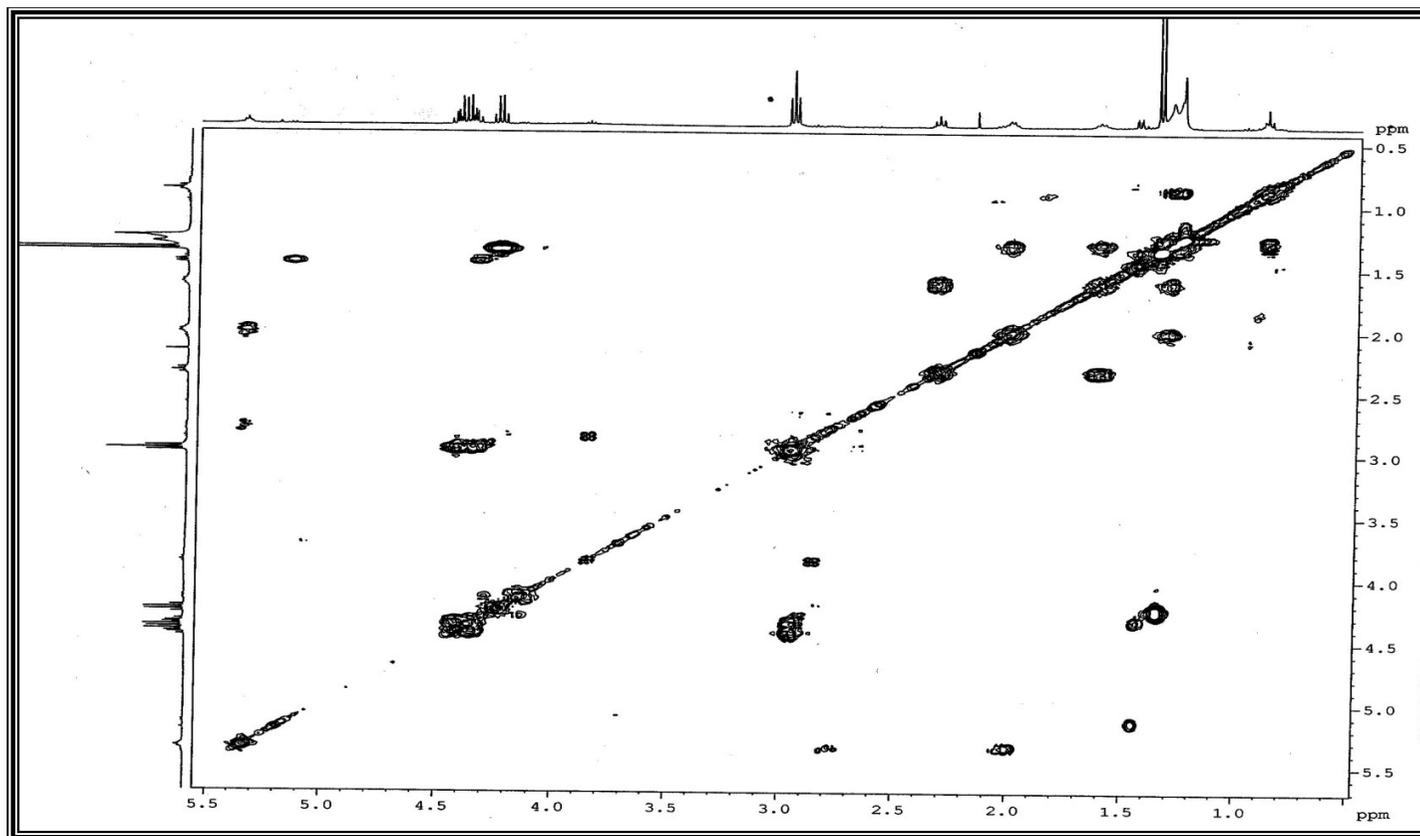


Figura 97-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) de **AC1**.

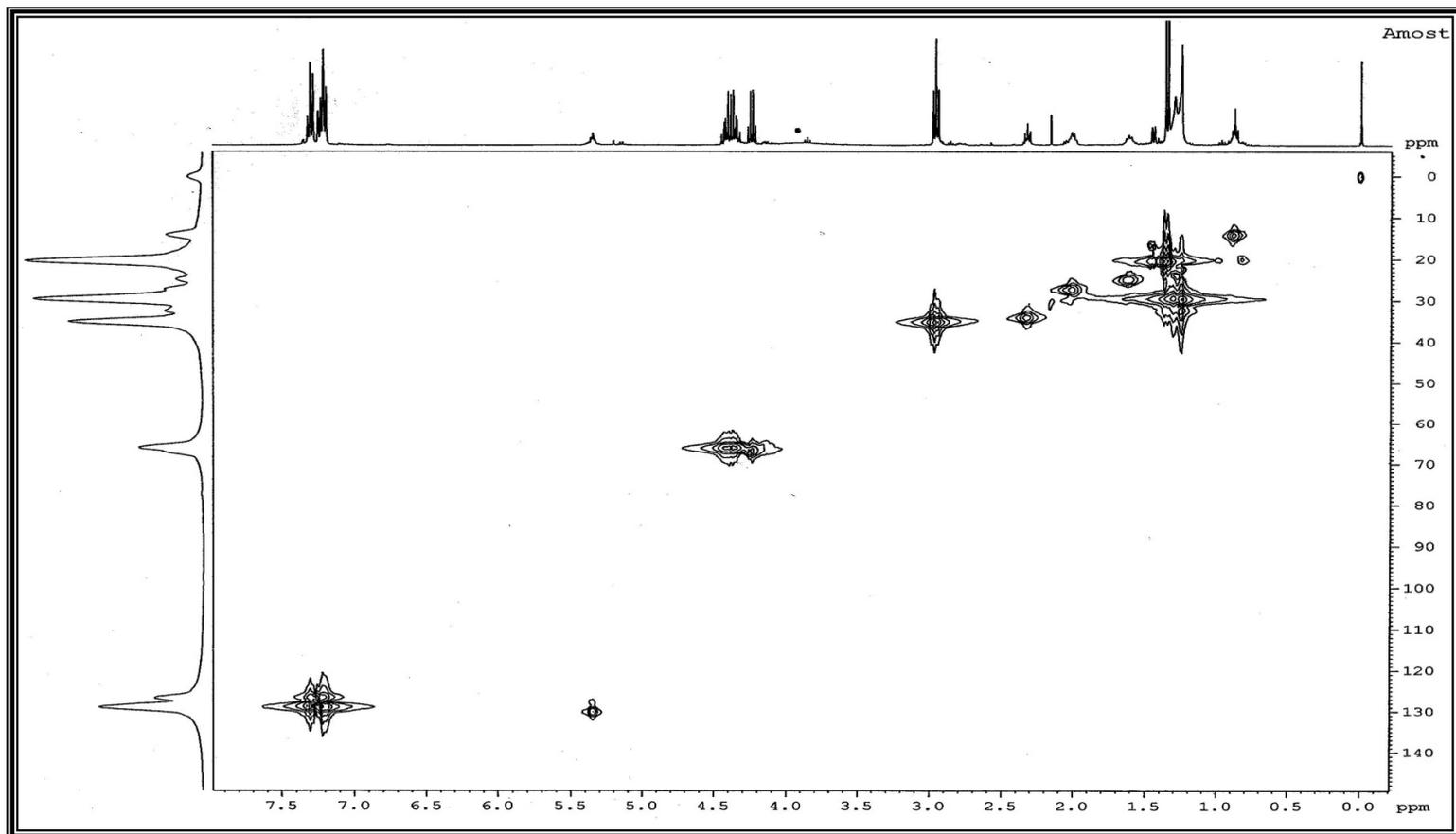


Figura 98-Espectro de correlação bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de **AC1**.

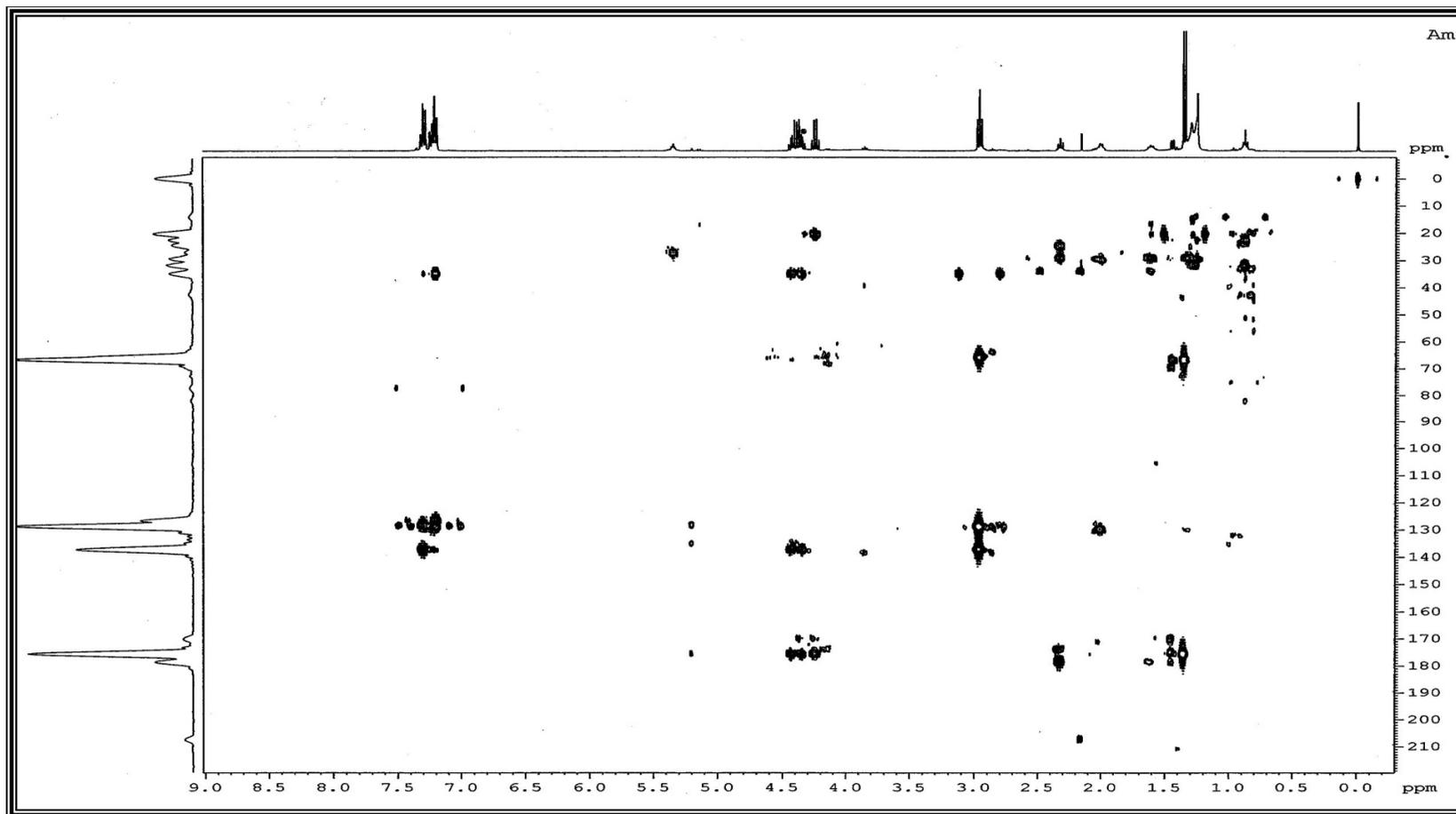


Figura 99-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de AC1.

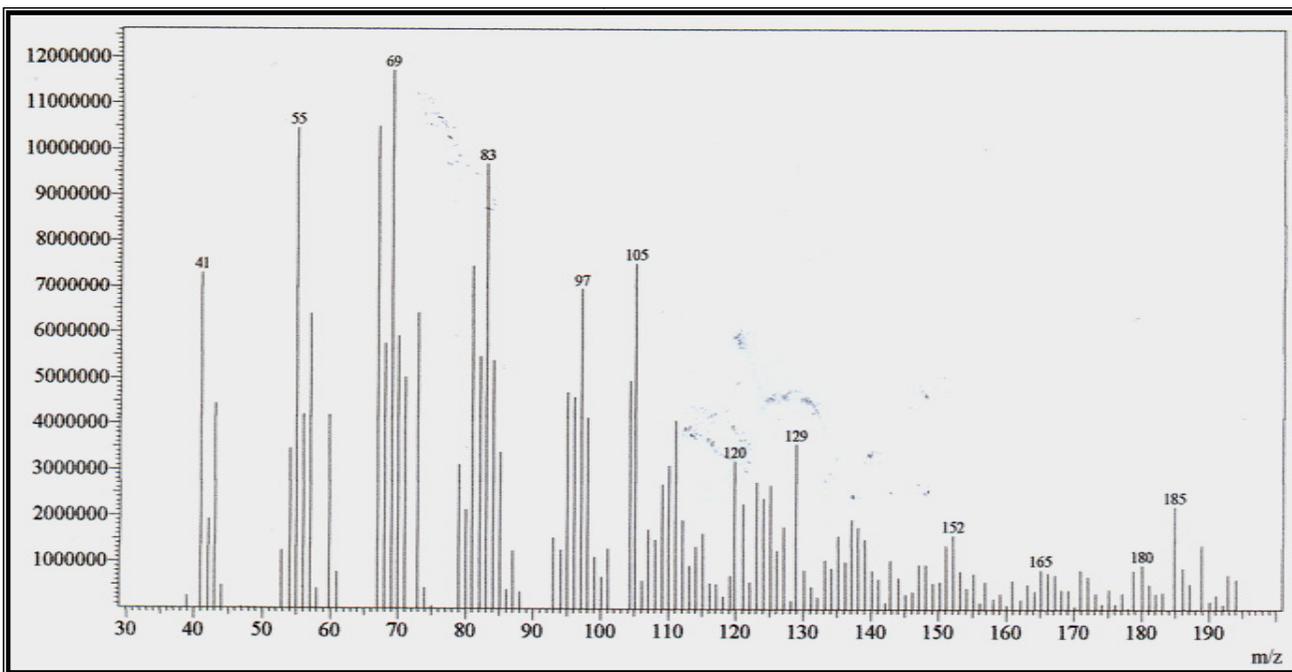


Figura 100- Espectro de massa de **AC1** (IE 70 eV).

5.2.1.9- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AC2

A análise cromatográfica do extrato etanólico do micélio de *A. curvulum* (Item 6.10.2, p.169) resultou em um sólido branco, cristalino e solúvel em clorofórmio, denominado AC2, com faixa de fusão igual a 159,8 a 162,1.

O espectro de massa de AC2 (Fig.105, p.131) apresentou pico íon molecular com m/z igual a 396 Daltons.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig.104, p.130) apresentou absorção em 3444 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação O-H. Absorções em 2955 e 2871 cm^{-1} referentes a deformação axial C-H de carbonos sp^3 .

O espectro de RMN ^1H de AC2 (Fig.102, p.128) apresentou um sinal em δ 3,65 (1H, m) referente a hidrogênio ligado a carbono carbinólico, um sinal em δ 5,21 (2H, m) associados a hidrogênios olefinicos e sinais na faixa de δ 2,44 a 0,62 associados a hidrogênios de esqueleto esteroidal.

O espectro de RMN ^{13}C de AC2 (Fig.103, p.129) apresentou 28 linhas espectrais, sendo seis delas atribuídas a carbonos olefinicos (δ 141,5; 139,5; 135,7; 132,1; 119,7 e 116,4), uma a carbono metínico oxigenado (δ 70,6) e as demais entre δ 56,3 a 12,2 associadas a carbonos sp^3 não funcionalizados de esqueleto esteroidal. A presença de três possíveis ligações duplas no esqueleto esteroidal, bem como a similaridade do espectro de massa com o do ergosterol, direcionou a comparação dos dados de RMN de AC2 com os dados deste esteróide (Tabela 21, p.126) (PONCE *et al*, 2002). A semelhança obtida nos valores de deslocamento químico confirmaram a estrutura de AC2 como sendo a do esteróide ergosterol (Fig.101, P.126). Assim como o β -sitosterol é amplamente distribuído nas plantas, o ergosterol é o composto comumente isolado de fungos.

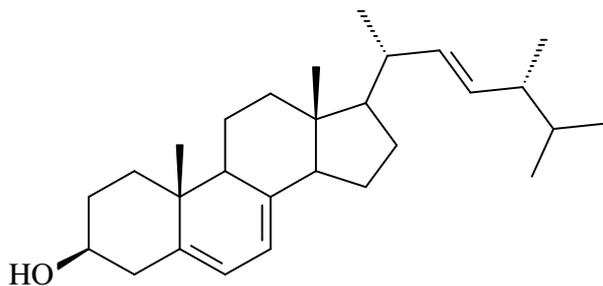


Figura 101– Estrutura de **AC2** (ergosterol).

Tabela 21-Dados comparativos de RMN ^{13}C de AC2 e do Ergosterol (PONCE *et al*, 2002).

AC2	Ergosterol
141,5	141,3
139,9	139,8
135,7	135,6
132,5	132,0
119,9	119,6
116,4	116,3
70,6	70,3
56,4	55,7
55,2	54,5
46,9	46,3
43,4	42,9
41,3	42,8
41,0	40,6
39,9	40,4
39,0	39,1
37,8	37,1
33,7	33,1
32,5	31,8
29,8	29,1
28,9	28,3
24,0	22,9
20,6	21,1
20,3	21,1
18,8	19,9
19,1	19,6
17,1	17,6
16,4	16,3
13,5	13,9
12,2	12,0

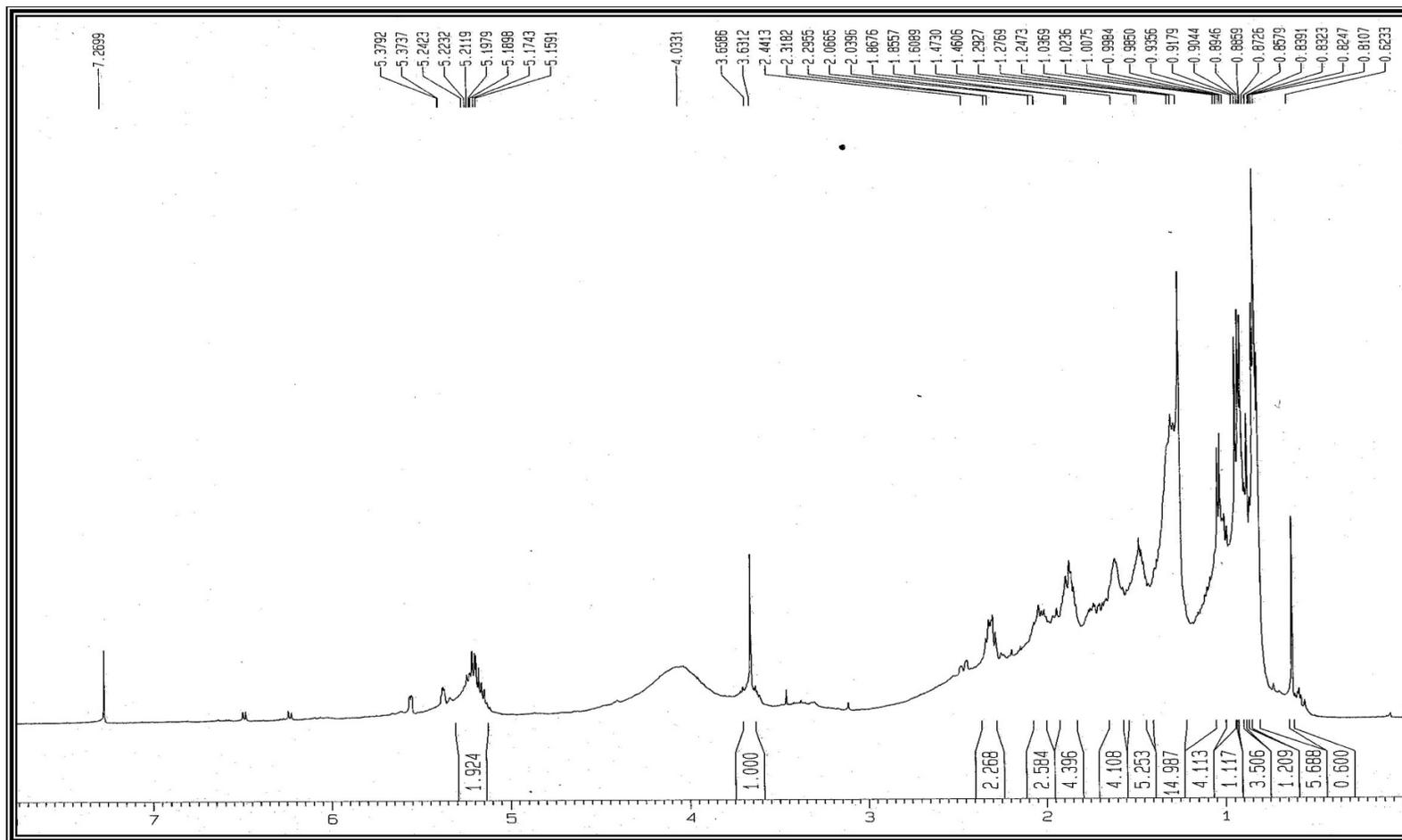


Figura 102-Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AC2.

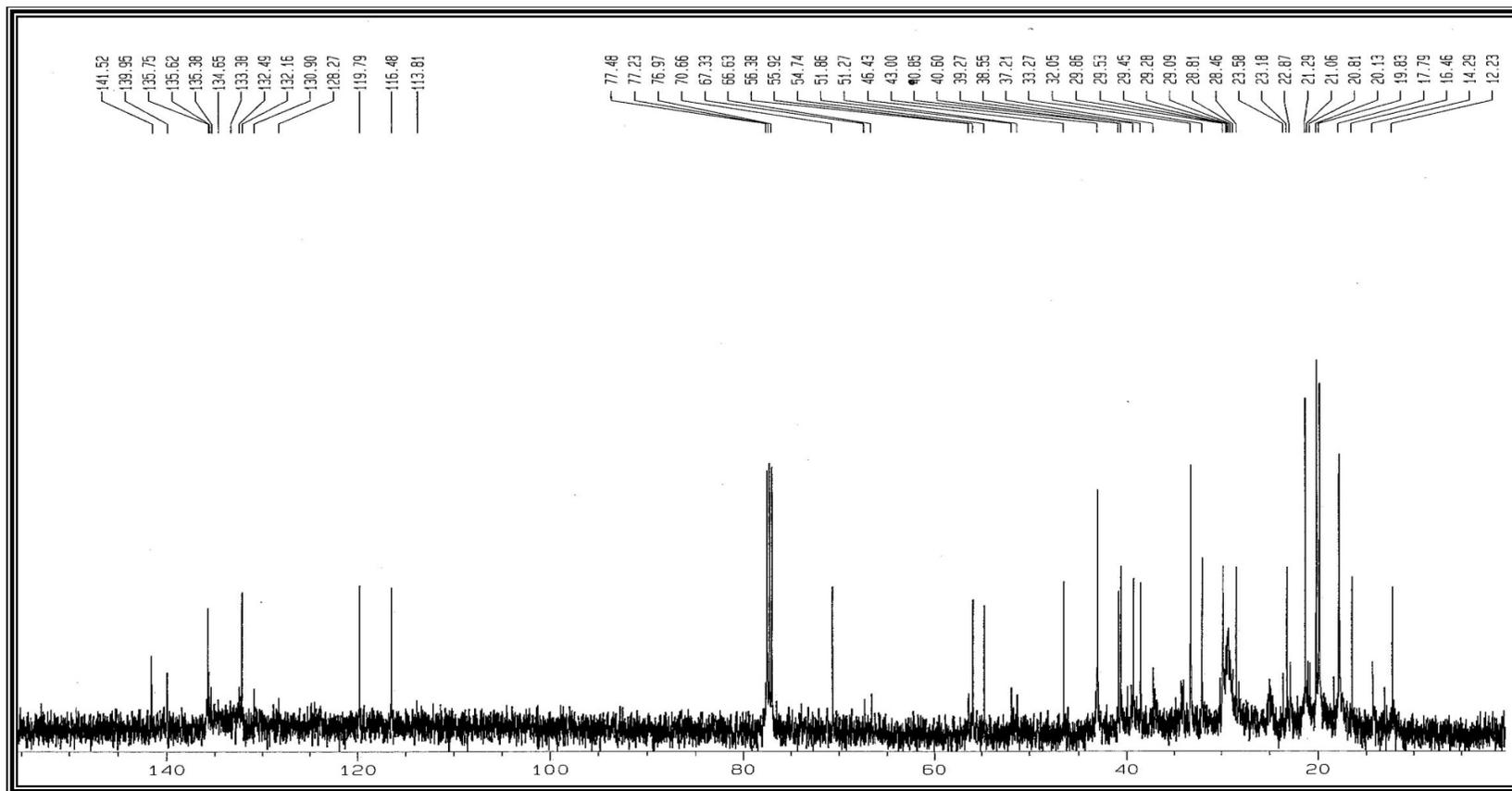


Figura 103-Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de AC2.

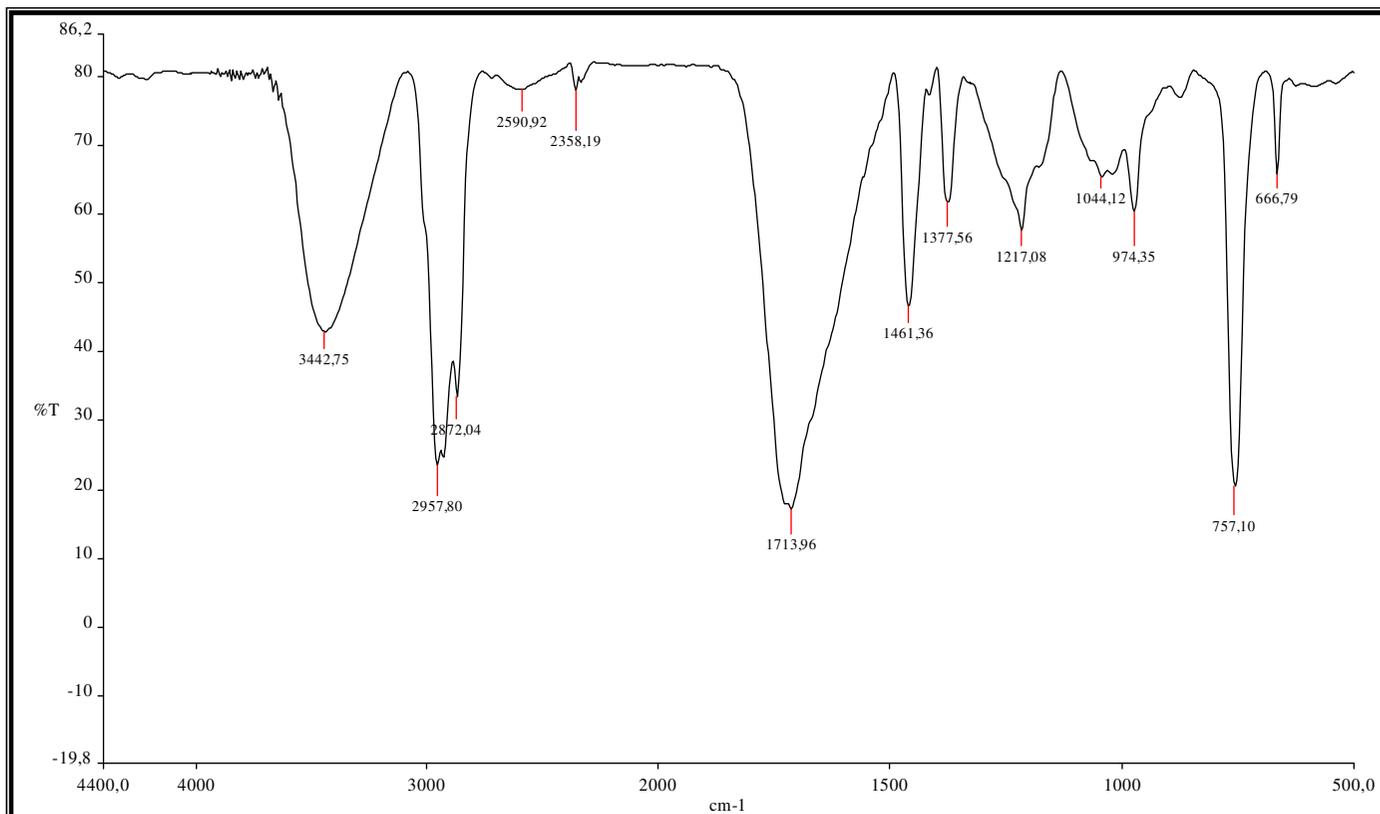


Figura 104-Espectro de IV (NaCl) de AC2.

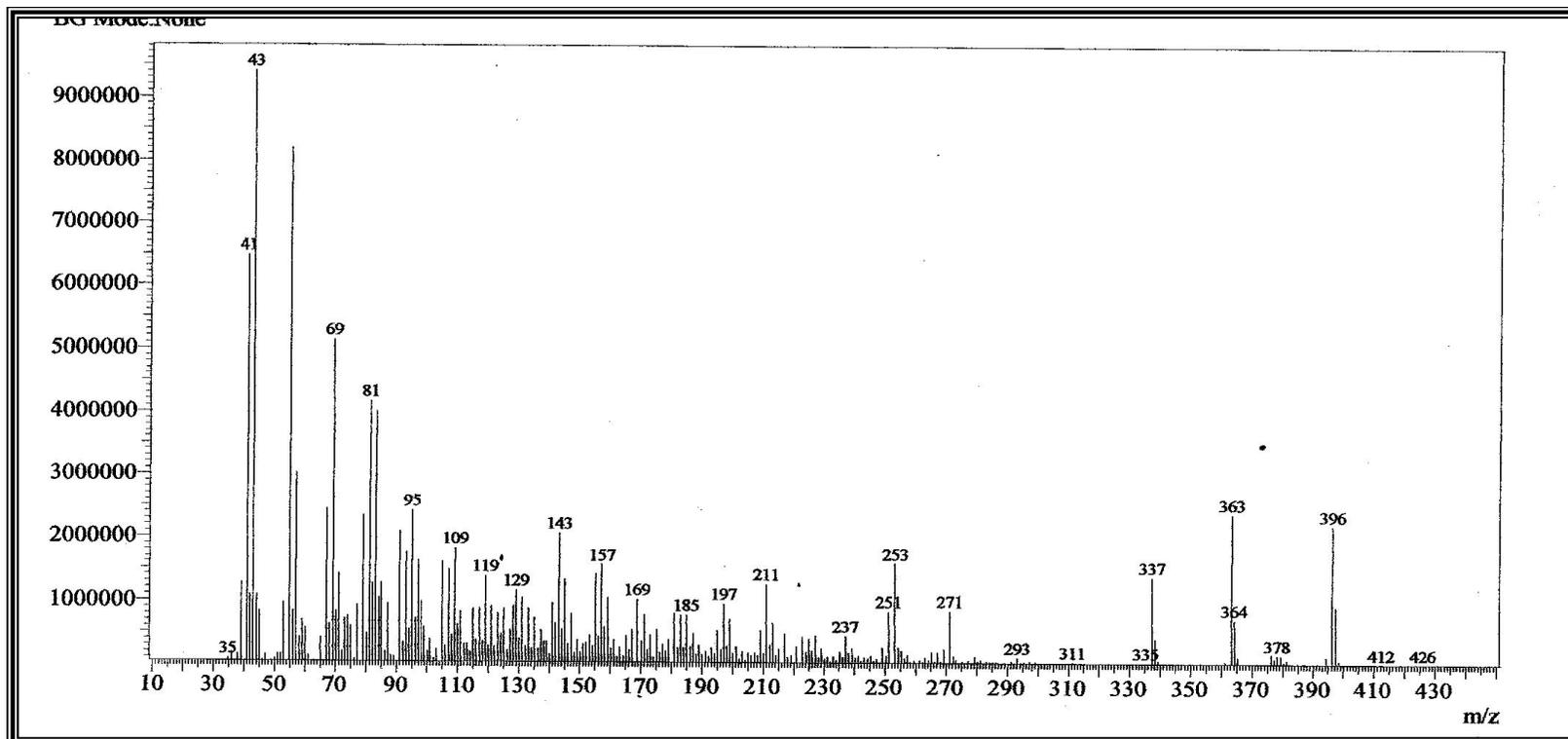


Figura 105-Espectro de massa de AC2 (IE 70 eV).

5.2.1.10-DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE AC3

O tratamento cromatográfico em placa preparativa da fração metanólica do fungo *A. curvulum* (Item 6.10.3, p.169), resultou em um líquido viscoso de coloração amarelada e solúvel em acetona, denominado de AC3.

O espectro de massa de AC3 (Fig.113, p.141) apresentou pico íon molecular com razão massa/carga (m/z) igual a 161 Daltons, indicando a presença de um nitrogênio na molécula.

O espectro de absorção na região do infravermelho de AC3 (Fig.109, p.137) apresentou absorção em 3344 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação O-H, que foi confirmada pela absorção em 1041 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C-O de álcool. As absorções em 2924 e 2854 cm^{-1} foram associadas a deformações angulares de CH_2 e as absorções em 1713 e 1462 cm^{-1} as deformações axiais da ligação C=C de anel aromático.

O espectro de RMN ^1H de AC3 (Fig.108, p.136) apresentou sinais indicativos da presença de anel aromático *orto* dissubstituído em δ 7,56 (1H, dd, $J= 8,4$ Hz), 7,36 (1H, dd, $J= 6,8$ Hz), 7,07 (1H, ddd, $J= 2,4$ e $8,4$ Hz) e 6,99 (1H, ddd, $J= 2,4$ e $6,8$ Hz); um sinal simples em δ 7,16 (1H, sl) e os sinais em δ 3,80 (2H, t, $J= 6,8$ Hz) e 2,95 (2H, dt, $J= 0,8$ e $6,8$ Hz) referentes a hidrogênios metilênicos ligados a carbonos sp^3 vicinais, sendo o primeiro oxigenado.

Os dados de carbono RMN ^{13}C referentes a molécula foram atribuídos através das projeções internas obtidas nos espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C HSQC (Fig.110, p.138) e HMBC (Fig.112, p.140). A análise dos espectros mostrou a presença de oito carbonos sp^2 em δ 138, 129, 123, 122, 119, 118, 113 e 112, onde seis destes foram atribuídos ao sistema aromático, δ 138, 129, 123, 118, 119 e 112 e dois a carbonos de olefina em 122 e 113. Observou-se também a presença de dois carbonos sp^3 em δ 63 e 28 aproximadamente, sendo o primeiro um grupo metilênico oxigenado. Todas as correlações referentes ao espectro de HSQC da molécula encontram-se descritas na Tabela 22 (p.134).

O espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig.111, p.139) confirmou o acoplamento vicinal dos hidrogênios metilênicos em δ 3,80 (2H) com os hidrogênios em δ 2,95 (2H), bem como o acoplamento entre os hidrogênios do sistema aromático em δ 7,56 (1H), δ 7,07 (1H), δ 7,36 (1H) e δ 6,99 (1H).

Com os dados obtidos pode-se verificar a presença de um anel aromático *orto* dissustituído, de uma ligação dupla, a presença de um nitrogênio na molécula e do grupo 2-hidroxietil. Estas informações levaram a proposta da estrutura do triptofol para AC3.

A confirmação da estrutura proposta foi obtida através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (Fig.112, p.140), juntamente com as propostas de fragmentação para molécula (Fig. 114, p.142) . O espectro mostrou o acoplamento do sinal de hidrogênios metilênicos em δ 2,95 com os carbonos em δ 122 ($^3J_{\text{CH}}$), 133 ($^3J_{\text{CH}}$) e 113 ($^2J_{\text{CH}}$), bem como o acoplamento do hidrogênio em δ 7,16 com os carbonos em δ 138 ($^3J_{\text{CH}}$), 129 ($^3J_{\text{CH}}$) e 113 ($^2J_{\text{CH}}$) (Fig.106). Estes acoplamentos confirmam o correto posicionamento da cadeia lateral ao grupo indólico. As demais correlações encontram-se descritas na Tabela 22 (p.134). A comparação dos dados de carbono-13 de AC3 com os do triptofol (GUZMAN-LOPEZ *et al.*, 2007), confirmaram a estrutura proposta.

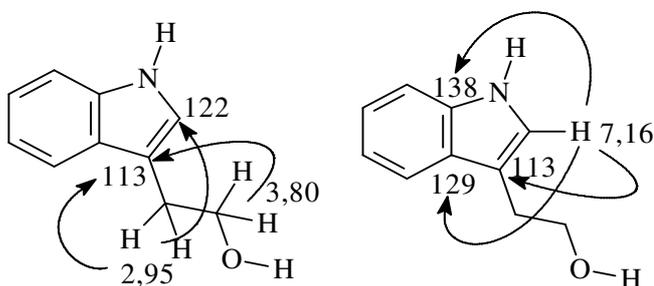
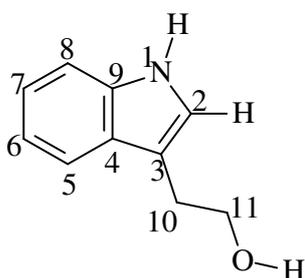


Figura 106-Principais correlações obtidas no espectro de HMBC para **AC3**.

Tabela 22-Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D/2D, em CDCl_3 , para o composto AC3 (GUZMAN-LOPEZ *et al.*, 2007).

	HSQC		HMBC		Triptofol
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
C					
3	-	113	H-2, 2H-10	2H-11	111,1
4	-	129		H-2,H-6; H-8; 2H-10	127,3
9	-	138		H-2; H-5; H-7	136,3
CH					
2	7,16 (sl)	122		2H-10	122,1
5	7,56 (dd)	119		H-7	119,4
6	7,07 (ddd)	118		H-8	118,7
7	6,99 (ddd)	123		H-5	122,4
8	7,36 (dd)	112		H-6	112,1
CH₂					
10	2,95 (dt, $J=$ 6,8 e 0,8 Hz)	28	2H-11		28,8
11	3,80 (t, $J=$ 6,8 Hz)	63	2H-10		62,6

**Figura 107**-Estrutura de **AC3** (Triptofol).

O triptofol foi isolado a partir do meio de cultura de levedura, uma fonte rica em nitrogênio, o que nos leva a inferir a influência do meio de cultura no metabolismo secundário do fungo. O composto está sendo relatado pela primeira vez para o gênero *Acremonium*, tendo sido isolado anteriormente do meio de cultura com levedura do fungo fitopatogênico *Ceratocystis adiposa*.

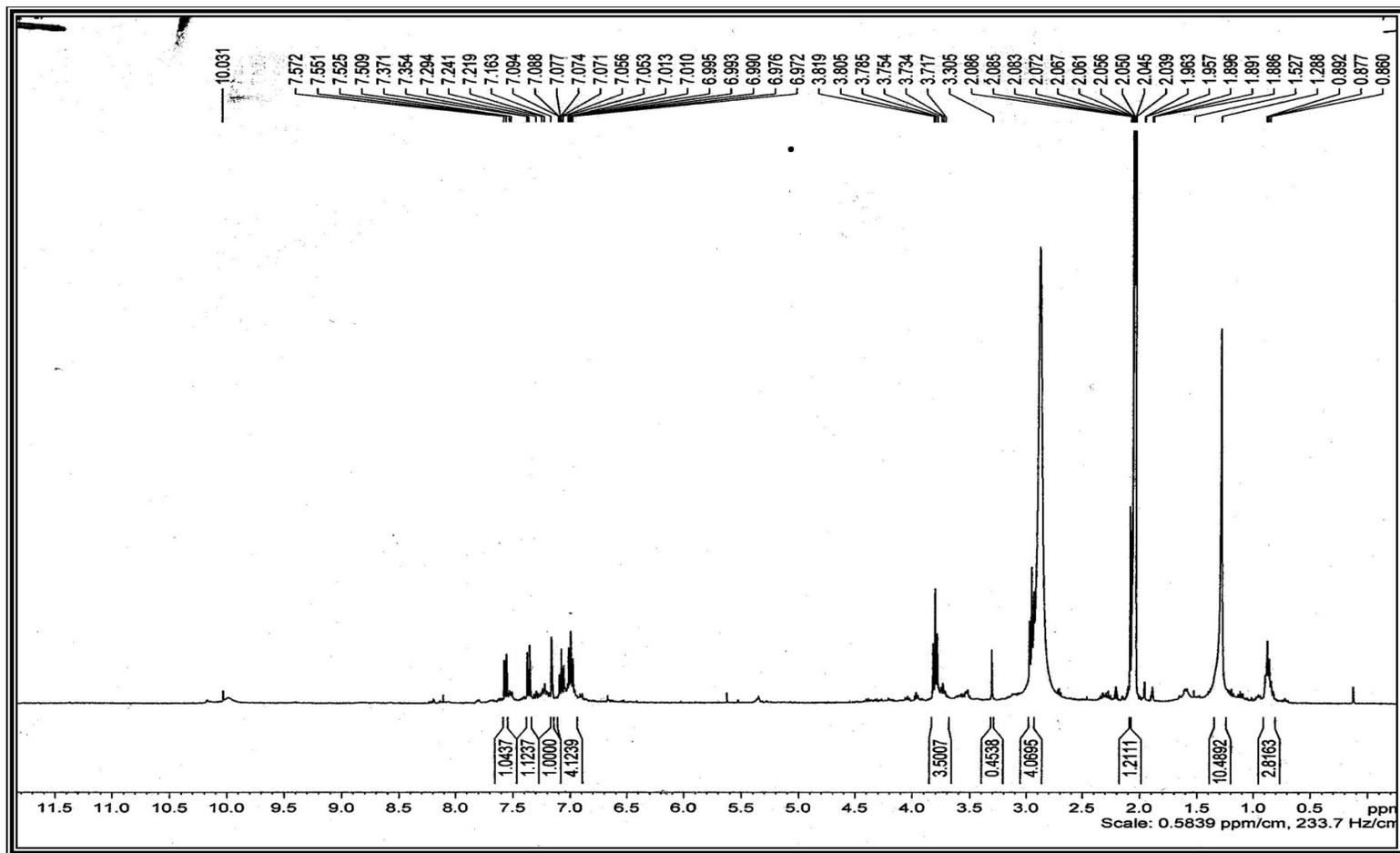


Figura 108-Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **AC3**.

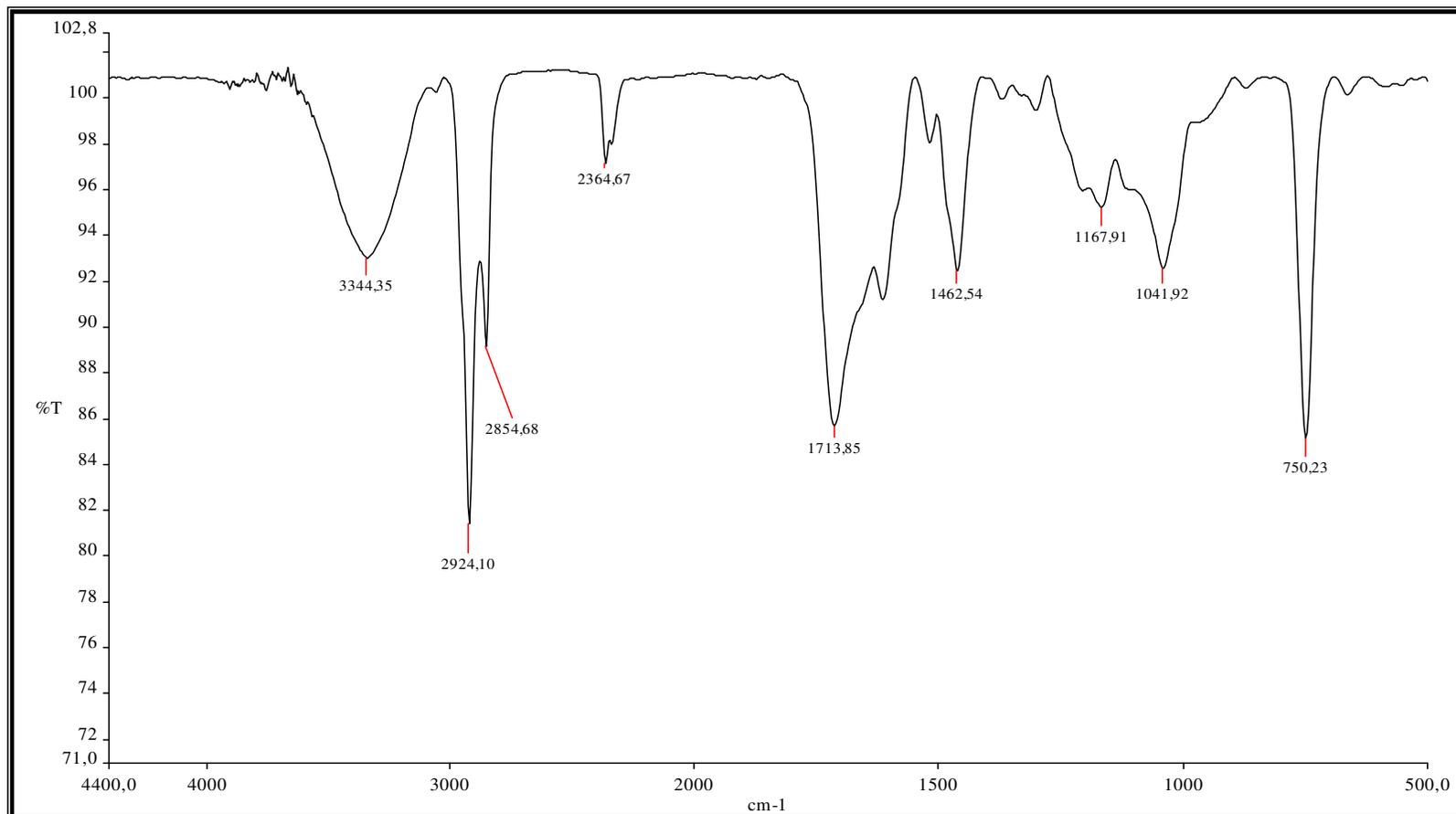


Figura 109-Espectro de IV (NaCl) de AC3.

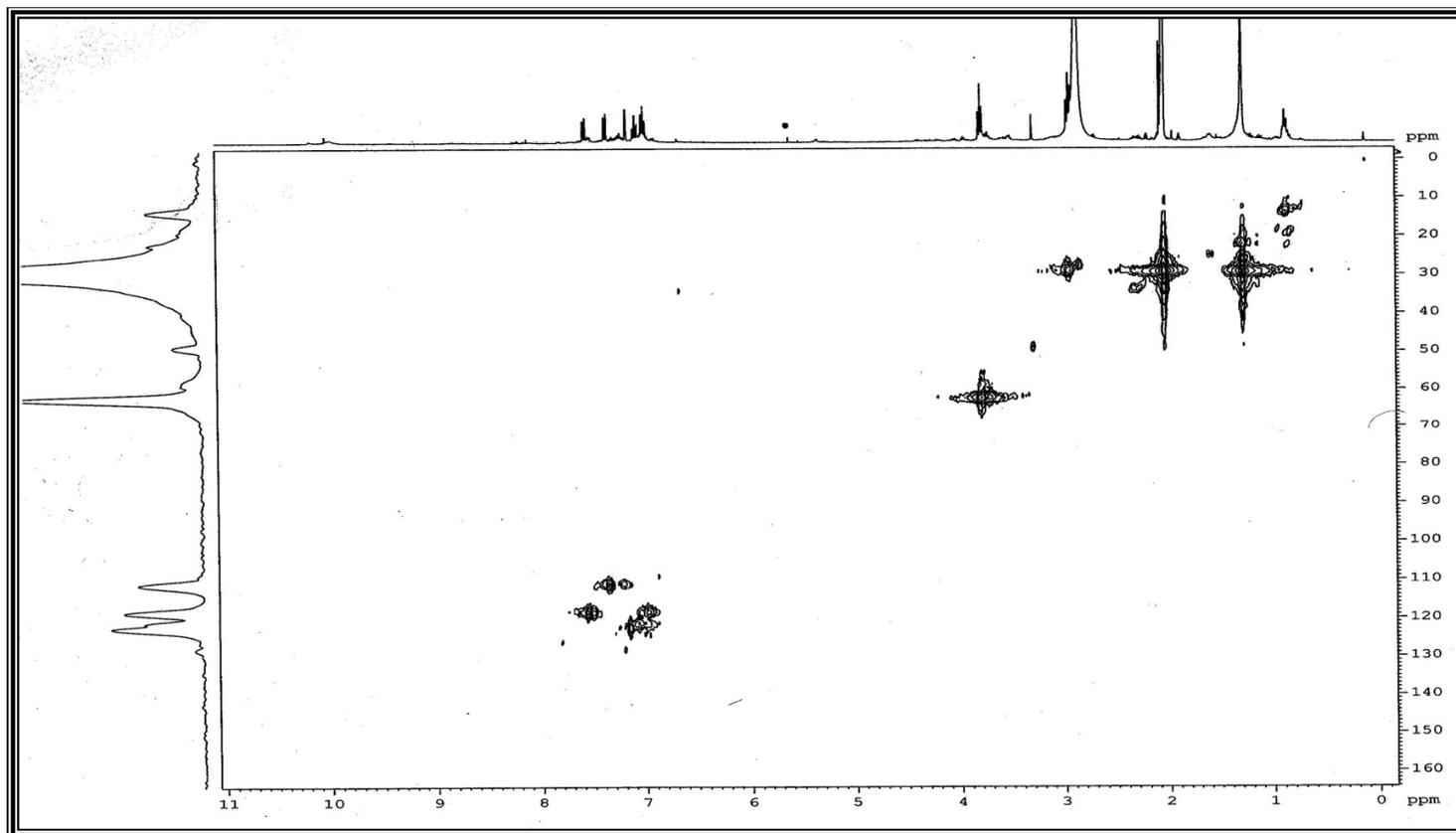


Figura 110-Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HSQC (400 e 100 MHz) de **AC3**.

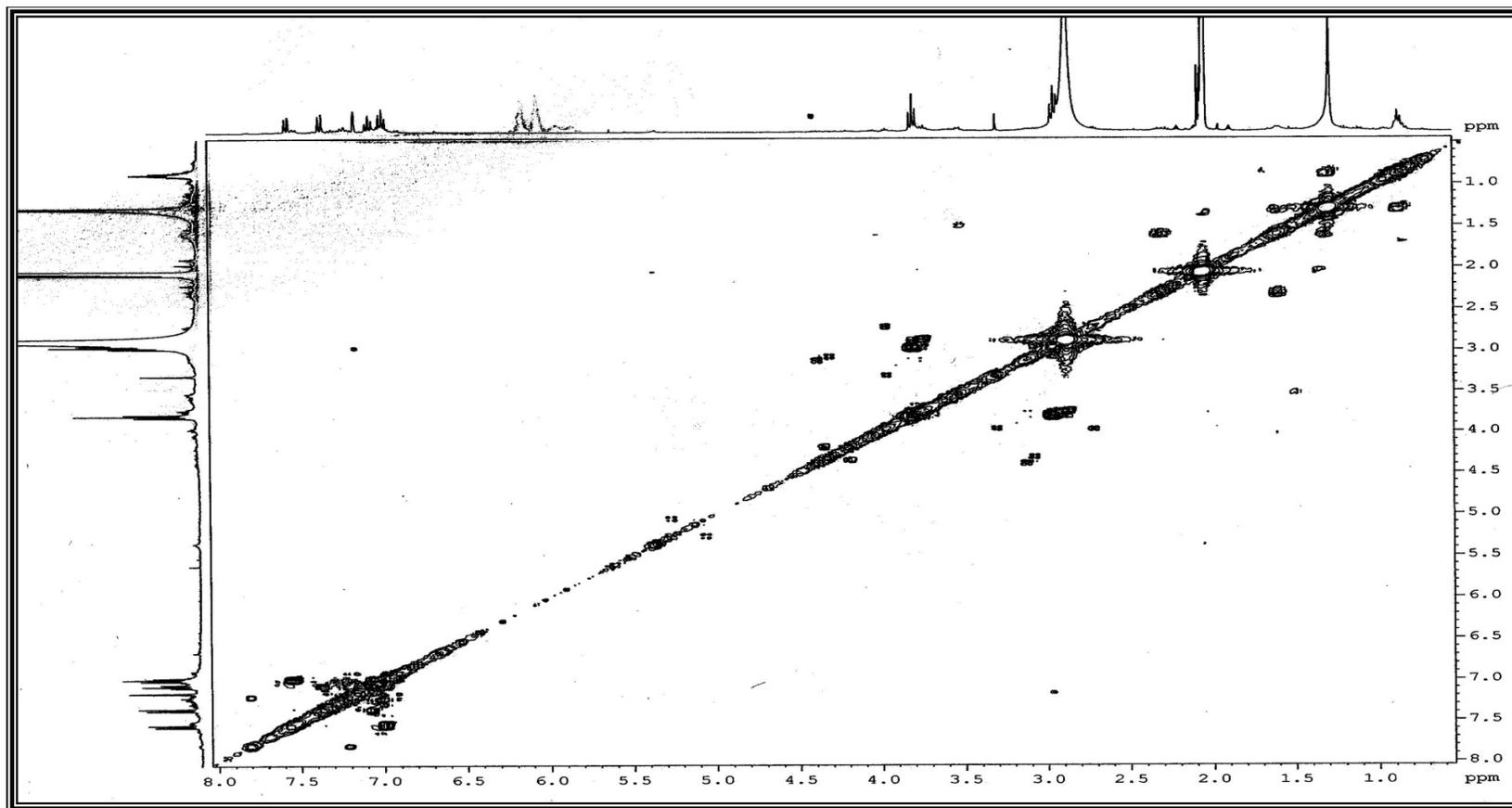


Figura 111-Espectro de RMN ¹H, ¹H COSY de AC3.

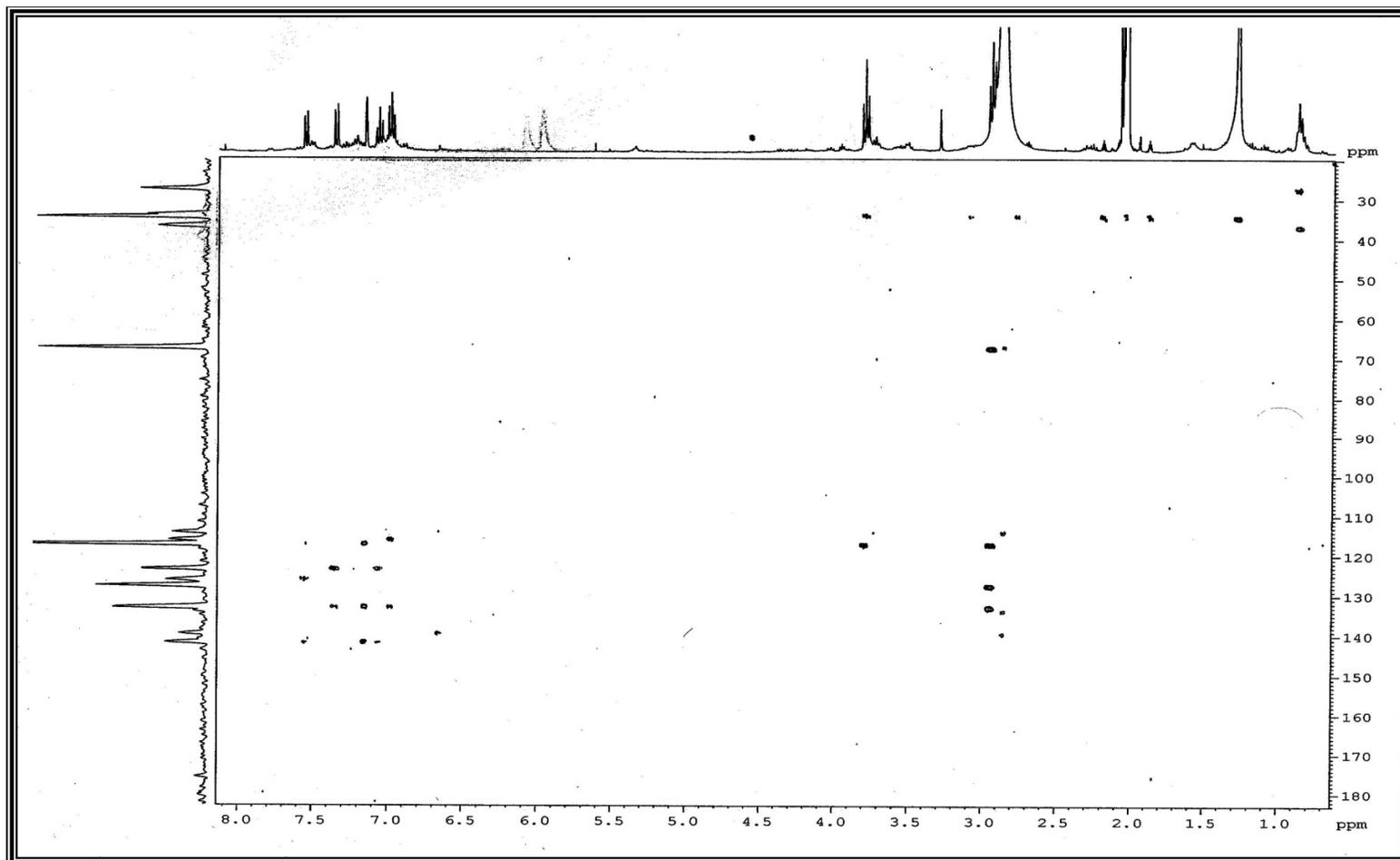


Figura 112- Espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz) de **AC3**.

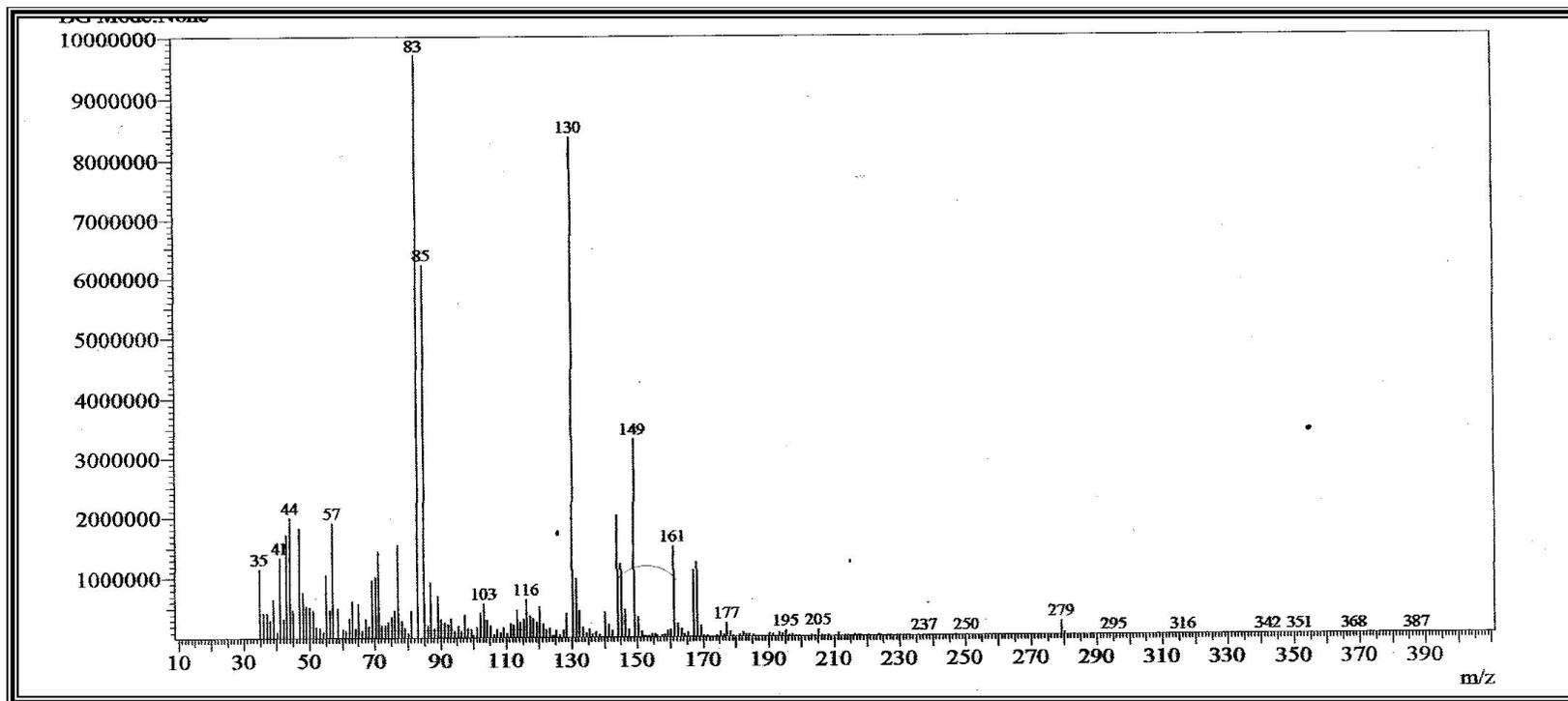


Figura 113-Espectro de massa de **AC3** (IE 70 eV).

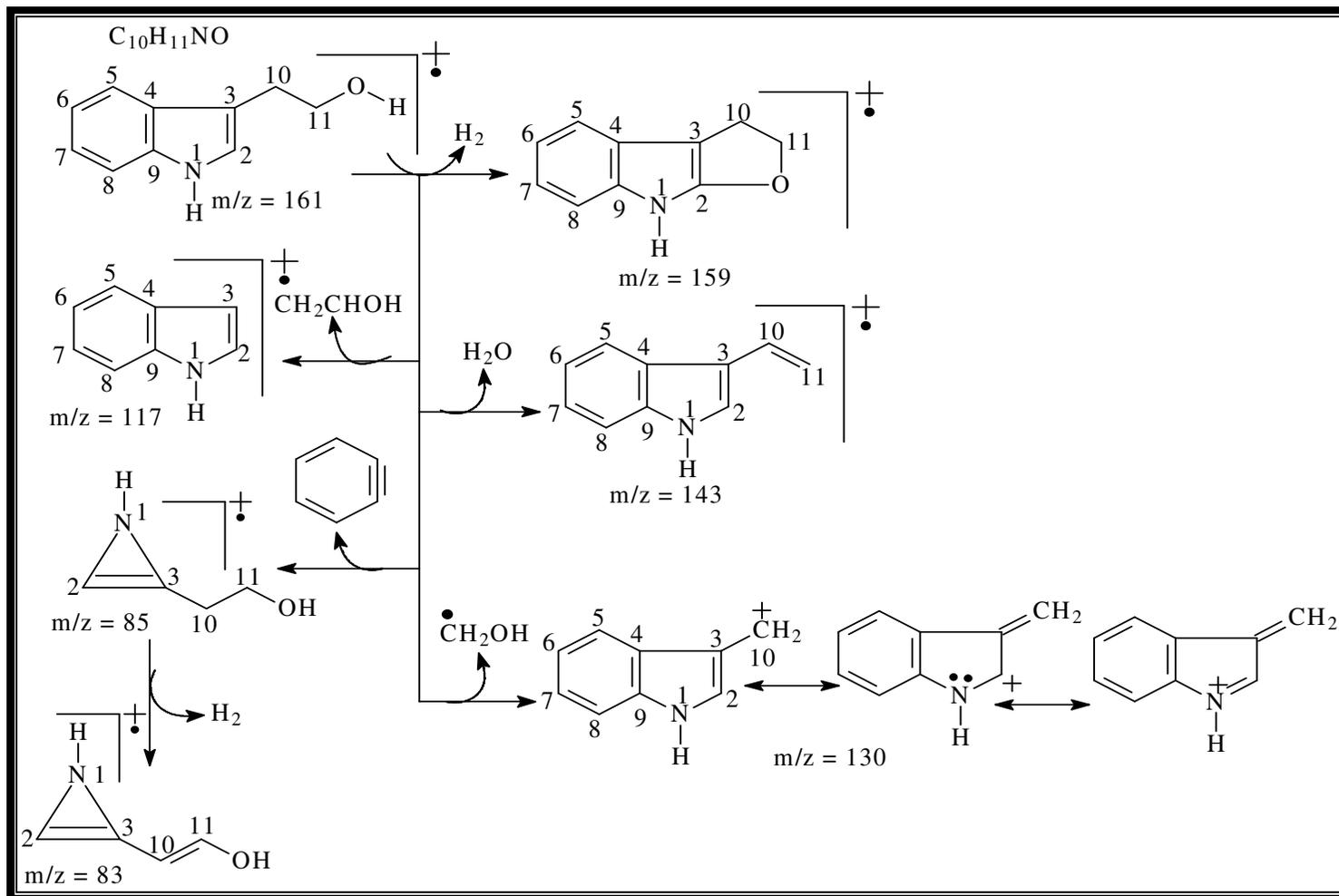


Figura 114-Proposta para as principais fragmentações de massa de AC3.

6-PARTE EXPERIMENTAL

6.1-MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

6.1.1-Cromatografia Líquida em Coluna Aberta (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas utilizando gel de sílica 60 da Merck (\varnothing μm 63-200) Art. 7734. O tamanho das colunas (comprimento e diâmetro) variou de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia.

Cartuchos de sílica gel SUPELCO de 6mL – Supelclean LC-SI também foram empregados.

6.1.2-Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

Nas cromatografias em camada delgada analítica (CCDA), utilizou-se gel de sílica S da Carlo Erba (cod. 45335) e cromatoplasas de gel de sílica sobre poliéster com indicador de fluorescência (254 nm, T-6770, 60 Å, \varnothing 2-25 μm) da Sigma Chemical Company.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram realizadas através da exposição destas à irradiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, (lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Ligth) e/ou pela borrifação com solução de vanilina 5 g/100 mL de solução de ácido perclórico (0,75 M/100 mL de EtOH), seguida de aquecimento em estufa (\approx 150 °C), por aproximadamente 3 minutos, ou ainda pela exposição a vapores de iodo.

6.1.3-Cromatografia por Exclusão Molecular (Shephadex)

Foi utilizado na cromatografia por exclusão molecular gel de dextrana Shephadex LH-20 da PHARMACIA. O tamanho da coluna foi variado, de acordo com a quantidade da amostra.

6.2-MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISES

Os dados espectrais deste trabalho foram obtidos nos equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e da Universidade Federal de São Carlos.

6.2.1-Ponto de fusão (p.f.)

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da METTLER TOLEDO, provido de uma estação de aquecimento FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min e os pontos de fusão não foram corrigidos.

6.2.2-Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massa dos ésteres metílicos foram obtidos em sistema GC/MS SHIMADZU, modelo QP5050 localizado na central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI-UFC), provido de coluna capilar DB-1 com 30,0 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro externo, utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 5 °C/min de 80 a 180 °C e 20 °C/min de 180 a 280°C, sob fluxo de 0,7mL/min, sendo a temperatura do injetor de 280°C. Os espectros de baixa resolução foram obtidos em aparelho Shimadzu DI 50 QP-5000, por inserção direta das amostras.

Os espectros de ESI MS/MS foram adquiridos no laboratório de espectrometria de massas da Universidade Federal de São Carlos (UFScar) sob responsabilidade do professor Dr. Edson Rodrigues Filho. Os espectros foram adquiridos em modo de íon negativo ou positivo em espectrômetro Quatro LC triplo quadropolo micromass, equipado com fonte de íons Z-API e um probe eletrospray megaflexo. As amostras foram diretamente introduzidas na fonte de ionização por uma bomba seringa Carlo Erba (Phoniex 40) usada para liberar soluções de MeOH:H₂O (7:3) dos compostos a 70 µL/min para o espectrômetro de massas. Em ambos os casos, a desolvatação e a temperatura no bloco da fonte de íons foram mantidas em 300 e 125 °C respectivamente. Gás N₂ foi usado para nebulizar (80 L/H) e desolvatar (500 L/H). As voltagens utilizadas no probe e

componentes da fonte de íons para produzir intensidade máxima de íons $[M-H]^+$ foi 3.1kV para o capilar de aço, 31 V para o cone modelo e 8 V para o cone extrator. A obtenção de íons pais e filhos (MS/MS) foram realizados com adição de Ar na cela de colisão para produzir pressão de $1,5 \times 10^{-3}$ mBar para a indução de dissociação por colisão (CID). A energia de colisão usada para decompor os íons $[M-H]^+$ foi 15-30 eV.

6.2.3-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, em espectrômetro BRUKER, modelos DPX-300 e DRX-500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio e para carbono 75 e 125 MHz, respectivamente, e no laboratório de Ressonância magnética nuclear do departamento de química da Universidade Federal de São Carlos (UFScar) em espectrômetro BRUKER, modelo DRX400, operando na frequência de 400 MHz para o hidrogênio e 100 MHz para o carbono.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio ($CDCl_3$), acetona [$(CD_3)_2CO$], e piridina (C_5D_5N), todos das marcas Merck, Aldrich ou Norell. As soluções de aproximadamente 0,5 mL, foram colocadas em tubos de ressonância de 5 mm, à temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN 1H pelo pico do hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente: clorofórmio δ (7,27), acetona δ (2,45) e piridina δ (7,22; 7,58; 8,74). Para o RMN ^{13}C -BB o padrão foi o sinal do carbono-13 do clorofórmio em δ (77,23), acetona δ (25,3) e piridina δ (123,87; 135,91; 150,35). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), ddd (duplo dubleto dubleto) hep (hepteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de mutação de 135° , CH e CH_3 com amplitude em oposição

ao CH₂. Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro BB (Broad Band) e DEPT e segundo convenção, as terminologias metílico, metilênico e metínico, foram aplicadas para os grupos CH₃, CH₂ e CH, respectivamente.

6.2.4-Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho foi o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT da central analítica do departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI-UFC). Os espectros foram obtidos na forma de filmes em pastilhas de NaCl.

6.3-Material vegetal

As espécies vegetais *Ananas comosus*, *A. lucidus* e *A. bracteatus*, cultivadas no campo, foram coletadas no sítio Pan Flora, situado no município de Aquiraz, a 50Km de Fortaleza no estado do Ceará.

As espécies vegetais, *A. lucidus* e *A. bracteatus*, cultivadas *in vitro*, foram fornecidas pela Dra. Ana Cristina Portugal Pinto, pesquisadora da EMBRAPA agroindústria tropical.

6.4-Isolamento dos constituintes fixos de *A. comosus*, *A. bracteatus* e *A.lucidus*

6.4.1-Obtenção dos extratos metanólicos

As folhas, talos e raízes de cada espécie foram separadas, trituradas, e secadas à temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) por três dias. Após secagem do material, este foi submetido à extração a frio com metanol por 48 horas. A destilação do solvente foi realizada sob pressão reduzida, fornecendo os respectivos extratos (Tabela 23 p. 147).

Tabela 23-Rendimento dos extratos brutos das três espécies de *Ananas*

Espécie	Matérial(Kg)	MeOH (L)	Massa(g)	Aspectos
<i>A. comosus</i>				
Folhas	1,20	5,00	122,7	Verde escuro
Talos	0,80.	4,00	48,8	Marron escuro
Raiz	0,40	2,00	22,7	Marron escuro
<i>A.bracteatus</i>				
Folhas	1,00	6,00	111,0	Verde escuro
Talos	0,20	1,50	10,8	Marron
Raiz	0,25	2,00	23,6	Marron escuro
<i>A.lucidus</i>				
Folhas	0,55	3,00	71,9	Marron
Talos	----	----	----	----
Raiz	0,20	1,50	15,8	Marron escuro

Os talos de *A. lucidus* não foram submetidos à extração por não fornecerem quantidade suficiente de material.

6.4.2-Participação do extrato das folhas de *Ananas comosus* (ACFM)

Do extrato bruto das folhas de *A. comosus* (ACFM) foi retirada uma alíquota de 65,0g, a qual foi dissolvida em 180 mL de metanol e acrescida de 30 mL de água destilada.

A solução resultante foi submetida à partição líquido-líquido com hexano (5 x 200 mL), clorofórmio (7 x 200 mL) e acetato de etila (5 x 200 mL) em funil de separação de 1,0 L. As massas das quatro frações obtidas encontram-se descritas na Tabela 24.

Tabela 24-Rendimento obtido da partição do extrato das folhas de *A. comosus* (ACFM).

Solvente	Fração	Massa(g)
Hexano	ACFM / H	6,1
Clorofórmio	ACFM / C	35,0
AcOEt	ACFM / A	3,7
Resíduo	ACFM / R	17,3

6.4.3-Partição líquido-líquido do extrato dos talos de *A. comosus* (ACTM)

Das 48,8 g de ACTM, foi retirada uma alíquota de 35,0 g e dissolvida em 150 mL de metanol e acrescida de 25 mL de água destilada. A solução foi submetida a partição líquido-líquido com hexano (4 x 200 mL), clorofórmio (7 x 200 mL) e acetato de etila (4 x 200 mL) em funil de separação de 1,0 L. A partição gerou quatro frações apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25-Rendimentos obtidos da partição de ACTM

Solvente	Fração	massa(g)
Hexano	ACTM / H	5,0
Clorofórmio	ACTM / C	17,8
AcOEt	ACTM / A	4,9
Resíduo	ACTM / R	5,9

6.4.4-Partição líquido-líquido do extrato dos raízes de *A. comosus* (ACRM)

Uma alíquota de 19,0 g de ACRM foi redissolvida em 150 mL de metanol, resultando em uma solução bastante escura. Foram acrescentados 35,0 mL de H₂O à solução. A solução resultante foi submetida a partição líquido-líquido em funil de separação de 500 mL com os seguintes solventes: hexano (5 x 200 mL), clorofórmio (5 x 200 mL) e acetato de etila (4 x 200 mL).

Os rendimentos obtidos estão sumariados na tabela 26.

Tabela 26-Rendimentos obtidos da partição de ACRM.

Solvente	Fração	Massa(g)
Hexano	ACRM / H	5,1
Clorofórmio	ACRM / C	10,6
AcOEt	ACRM / A	2,8
Resíduo	ACRM / R	0,2

6.4.5-Partição do extrato das raízes de *A. bracteatus* (ABRM)

Do extrato das raízes de *A. bracteatus* (ABRM) foi retirado uma alíquota de 20,0 g e esta foi dissolvida em 180 mL de metanol e acrescidos de 40 mL de água. A solução resultante foi submetida a partição líquido-líquido em funil de separação de 1L com o seguintes solventes: hexano (4 x 200 mL), clorofórmio (4 x 200 mL) e acetato de etila (4 x 200 mL). A partição forneceu os seguintes rendimentos sumariados na Tabela 27 (p. 149).

Tabela 27-Rendimentos obtidos da partição de ABRM

Solvente	Fração	Massa(g)
Hexano	ABRM / H	3,0
Clorofórmio	ABRM / C	12,0
AcOEt	ABRM / A	0,7
Resíduo	ABRM / R	4,0

6.4.6-Partição do extrato das folhas de *A. Bracteatus* (ABFM)

Uma alíquota de 80,0 g de extrato das folhas *A. bracteatus* (ABRM) foi dissolvida em 200 mL de metanol, acrescidas de 40 mL de água e submetida a partição líquido-líquido com hexano (5 x 200 mL), clorofórmio (5 x 200 mL) e acetato de etila (5 x 200 mL). Os rendimentos obtidos encontram-se sumariados na Tabela 28.

Tabela 28-Rendimentos obtidos da partição de ABFM

Solvente	Fração	Massa(g)
Hexano	ABFM / H	15,6
Clorofórmio	ABFM / C	42,4
AcOEt	ABFM / A	2,0
Resíduo	ABFM / R	18,2

6.4.7-Partição do extrato das folhas de *A. lucidus* (ALFM)

Uma alíquota de 66,0 g de extrato das folhas *A. lucidus* (ALFM) foi solubilizada em 200 mL de metanol e acrescidos 35 mL de água. A solução resultante foi submetida à partição líquido-líquido com hexano (5 x 200 mL), clorofórmio (5 x 200 mL) e acetato de etila (5 x 200 mL). Os rendimentos obtidos encontram-se sumariados na Tabela 29.

Tabela 29-Rendimentos obtidos da partição de ALFM.

Solvente	Fração	Massa(g)
Hexano	ALFM / H	7,8
Clorofórmio	ALFM / C	28,9
AcOEt	ALFM / A	0,8
Resíduo	ALFM / R	17,5

6.4.8-Partição do extrato das raízes de *A. lucidus* (ALRM)

Do extrato das raízes de *A. lucidus* (ALFM), foi retirado uma alíquota de 15,0 g e esta foi solubilizada em 200 mL de metanol e 30 mL de água. A solução resultante foi submetida a partição líquido-líquido com hexano (5x 200 mL), clorofórmio (5 x 200 mL) e acetato de etila (5 x 200 mL). Os rendimentos obtidos estão relacionados na Tabela 30.

Tabela 30-Rendimentos obtidos da partição de ALRM.

Solvente	Fração	Massa(g)
Hexano	ALRM / H	6,4
Clorofórmio	ALRM / C	2,5
AcOEt	ALRM / A	3,3
Resíduo	ALRM / R	1,3

6.4.9-Obtenção dos extratos hexânicos de *A. bracteatus* e *A. lucidus* cultivados *In vitro*

As mudas de *A. lucidus* e *A. bracteatus* foram retiradas manualmente dos meios de cultura (Murashige Skoog), e em seguida suas raízes foram lavadas e secadas. As mudas inteiras e frescas foram colocadas em erlenmeyers de um litro (4 erlenmeyers para cada espécie, com 12 mudas cada) onde foram submetidas a extração a frio com hexano (800 mL por frasco), por 48 horas. Após esse tempo, a solução foi filtrada em papel de filtro e o solvente foi destilado sob pressão reduzida para obtenção dos respectivos extratos (Aliv: 264,2 mg e ABiv: 326,7 mg).

6.4.10-Obtenção dos ésteres metílicos de ALFM/H

Uma alíquota de 1,0 g da fração ALFM/H foi acondicionada em um balão de 100 mL, juntamente com 20 mL de uma solução de KOH/MeOH (5 g/100 mL).

O sistema foi mantido sob refluxo durante uma hora. Em seguida foram acrescentadas ao balão 30 mL de água destilada, e a solução resultante foi submetida a partição líquido-líquido com éter de petróleo (3 x 20 mL), para extração dos compostos insaponificáveis. a solução hidroalcoólica restante foi acidificada com ácido clorídrico 12 mol/L, até atingir pH entre 2 e 3, para obtenção dos ácidos graxos livres.

A solução foi submetida a partição líquido-líquido com éter de petróleo (5 x 20 mL) e a fração orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. Após evaporação do solvente, o material resultante (ácidos graxos livres) foi submetido à reação de metilação com 30 mL de solução metanólica de ácido clorídrico (10%) sob refluxo por 90 minutos. Ao final da reação, o material foi concentrado sob pressão reduzida e o material resultante (ALFM/H) foi submetido à coluna cromatográfica em gel de sílica (Item 6.4.12 p. 152).

A metodologia descrita acima, também foi utilizada para obtenção dos ésteres metílicos das seguintes frações: ACFM/H, ABFM/H, ALRM/H, ACRM/H e ABRM/H e os rendimentos encontram-se listados na Tabela 31.

Tabela 31-Rendimentos dos ésteres metílicos das espécies de *Ananas*.

Frações	Massa (mg)
ALFM/H	252,2
ALRM/H	82,3
ACFM/H	221,0
ACRM/H	151,6
ABFM/H	200,1
ABRM/H	115,2

6.4.11-Obtenção dos ésteres metílicos de *A. lucidus* (ALIV/H) e *A. bracteatus* (ABIV/H) cultivadas *in vitro*

A metodologia descrita no Item 6.4.10 (p. 150) também foi empregada na obtenção dos ésteres metílicos de ALiv/H e ABiv/H. Neste caso, foram utilizadas alíquotas de 200,0 mg do extrato hexânico e 20,0 mL de solução de KOH/MeOH (1 g/100 mL) para processo de saponificação.

6.4.12-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ALFM/H

A fração dos ésteres metílicos de ALFM/H 252,2 mg (Item 6.4.10, p. 150) foram adsorvidos em 1g de sílica gel e cromatografados sobre 9g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, conforme descrito na Tabela 32 (p. 152).

Tabela 32-Rendimentos obtido do fracionamento cromatográfico de ALFM/H.

Solvente		Fração	Massa (mg)
Hexano	100%	1 - 2	1,4
Hexano/Clorofórmio	10%	3 - 7	94,2
Hexano/Clorofórmio	20%	8 - 9	50,2
Hexano/Clorofórmio	50%	10 - 27	10,8
Hexano/Clorofórmio	1 : 2	28 a 33	13,1
Clorofórmio/ AcOEt	1 : 1	34 a 37	12,3
AcOEt	100%	38 a 40	4,6
AcOEt /Metanol	1 : 1	41 a 43	44,2
Total			230,3

As frações de 1 a 9 foram reunidas e submetidas a análise em CG/EM.

6.4.13-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ACFM/H

Os ésteres metílicos (221,0 mg) proveniente da fração ACFM/H foram adsorvidos em 600 mg de gel de sílica e cromatografados sobre 5g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias, e gerou as 23 frações apresentadas na Tabela 33.

Tabela 33-Rendimentos obtidos no fracionamento cromatográfico de ACFM/H

Solvente		Fração	Massa (mg)
Hexano		1 a 4	11,5
Hexano/Clorofórmio	20%	5 a 8	5,7
Hexano/Clorofórmio	40%	9 a 13	12,6
Clorofórmio	100%	14 a 16	112,5
Clorofórmio/AcOEt.	1:1	17 a 19	58,4
AcOEt./ Metanol	1 : 1	20 a 23	5,2
Total			205,9

As frações de 1 a 16 (142,3 mg) foram reunidas e submetidas à análise em CG/EM.

6.4.14-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ABFM/H

O material seco (200,1 mg) resultante da reação de metilação dos ácidos graxos de ABFM/H foi submetido à cromatografia. O material foi absorvido em 600 mg de sílica e cromatografados sob 5 g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias e gerou 20 frações (Tabela 34).

Tabela 34-Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ABFM/H.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	1 a 4	---
Hexano./Clorofórmio20%	5 a 8	122,7
Hexano/Clorofórmio 40%	10 a 13	2,7
Clorofórmio 100%	14 a 15	6,7
Clorofórmio/AcOEt. 1:1	16 a 18	8,3
AcOEt/ Metanol 1 : 1	19 a 20	5,6
Total		146,0

As frações de 5 a 13 foram reunidas e submetidas à análise em CG/EM.

6.4.15-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ACRM/H

Os ésteres metílicos (151,6 mg) obtidos de ACRM/H foram purificados por cromatografia em coluna. O material foi previamente adsorvido em 500 mg de sílica e cromatografados sob 5 g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias. Nesse processo foram obtidas 25 frações (Tabela 35) e as frações de 11 a 19 foram reunidas e analisadas por CG/EM.

Tabela 35-Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ACRM/H.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	1 a 10	5,3
Hexano/Clorofórmio20%	11 a 13	9,4
Hexano/Clorofórmio 40%	14 a 17	80,0
Clorofórmio 100%	18 a 19	8,3
Clorofórmio/ AcOEt. 1:1	20 a 22	5,1
AcOEt./ Metanol 1 : 1	23 a 25	4,2
Total		112,3

6.4.16-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ABRM/H

Os ésteres metílicos (115,2 mg) obtidos de ABRM/H foram submetidos à coluna cromatográfica. O material foi absorvido em 400 mg de sílica e cromatografados sob 5g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias. Foram obtidas 21 frações (Tabela 36), e as frações de 12 a 15 foram reunidas e analisadas por CG/EM.

Tabela 36-Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ABRM/H.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	1 a 6	----
Hexano/Clorofórmio20%	7 a 11	----
Hexano/Clorofórmio 40%	12 a 13	45,4
Clorofórmio 100%	14 a 15	34,7
Clorofórmio/ AcOEt 1:1	16 a 18	13,4
AcOEt/ Metanol 1 : 1	19 a 21	8,7
Total		102,2

6.4.17-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ALRM/H

Os ésteres metílicos (82,3 mg) provenientes de ALRM/H foram submetidos à coluna cromatográfica. O material foi absorvido em 300 mg de sílica e cromatografados sob 5g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias. O processo rendeu 15 frações (Tabela 37), e as frações 7 a 9 foram analisadas por CG/EM.

Tabela 37– Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ALRM/H.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	1 a 3	----
Hexano/Clorofórmio20%	4 a 6	----
Hexano/Clorofórmio 20%	7 a 9	38,0
Clorofórmio 1;1	10 a 12	7,3
Clorofórmio/ AcOEt 100%	13	6,2
AcOEt /Metanol 10%	14 a 15	9,1
Total		60,6

6.4.18-Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ALiv/H

Os ésteres metílicos (22,7mg) de Aliv, foram purificados por cromatografia em coluna. O material foi absorvido em 80 mg de sílica e cromatografados sob 5 g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias. O processo rendeu 7 frações (Tabela 38), sendo as frações 1 a 5 reunidas e analisadas por CG/EM.

Tabela 38-Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ALiv/H.

Eluente	Fração	Massa (mg)
---------	--------	------------

Clorofórmio 100%	1 – 5	15,1
AcOEt	6	2,6
Metanol	7	2,1
Total		19,9

6.4.19- Coluna cromatográfica para purificação dos ésteres metílicos de ABiv/H

Os ésteres metílicos (21,5 mg) de ABiv, foram purificados em coluna cromatográfica. O material foi absorvido em 80 mg de sílica e cromatografados sob 5 g da mesma sílica. A eluição foi realizada utilizando como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas binárias. Nesse processo foram obtidas 5 frações (Tabela 39).

Tabela 39-Rendimento obtidos no fracionamento cromatográfico de ABiv/H.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Clorofórmio	1 – 3	14,7
AcOEt	4	2,0
Metanol	5	3,1
Total		19,8

As frações de 1 a 4 foram reunidas e submetidas a análise em CG/EM.

6.4.20- Fracionamento cromatográfico de ABRM/C: Isolamento de AB1

Uma alíquota de 2g de ABRM/C foi adsorvida em 3,0 g de sílica e cromatografada sobre 70 g da mesma sílica em coluna de 3,0 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando-se diclometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias. Após comparação por CCD as frações foram reunidas conforme descrito na Tabela 40 (p.156).

Tabela 40-Rendimentos obtidos no fracionamento cromatográfico de ABRM/C

Eluente	Fração	Massa (mg)
Diclometano	1 - 23	14,9
Diclometano/ AcOEt 10%	24 - 31	36,9
Diclometano/ AcOEt 10%	32 – 41	42,0
Diclometano/ AcOEt 20%	42 – 49	29,9
Diclometano/ AcOEt 30%	50 – 51	12,4
Diclometano/ AcOEt 30%	52 – 67	135,7
Diclometano/ AcOEt 40%	68 – 72	14,3
Diclometano/ AcOEt 40%	73 – 82	228,9
Diclometano/ AcOEt 1:1	83 – 84	13,7
Diclometano/ AcOEt 1:1	85 – 91	104,2
Diclometano/ AcOEt 70%	92 - 96	54,2
Diclometano/ AcOEt 70%	97 - 106	18,6

Diclometano/ AcOEt 70%	107 - 111	16,4
Diclometano / AcOEt 70%	112 - 118	103,5
Diclometano / AcOEt 70%	119 -130	217,3
AcOEt 100%	131	302,1
AcOEt / metanol 1:1	132	253,6
Total		1698,0

A fração 32 – 41 denominada AB1 apresentou-se como um sólido esverdeado amorfo, que foi analisado por IV, RMN ¹H, RMN ¹³C e EM e caracterizado como flavonóide cumataquenina.

6.4.21-Fracionamento cromatográfico de ABFM/C: Isolamento de AB2

2,05 g de ABFM/C foram adsorvidos em 3,0 g de sílica e cromatografados sobre 70 g da mesma sílica em coluna de 3,0 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando como eluentes benzeno, acetona e metanol puros ou em misturas binárias.

Após comparação por CCD as frações foram reunidas conforme apresentado na Tabela 41 (p.157).

Tabela 41– Rendimento obtido no fracionamento cromatográfico de ABFM/C.

Eluente	Fração	Massa(mg)
Benzeno	1 – 10	16,4
Benzeno/Acetona10%	11 – 20	14,6
Benzeno/Acetona10%	21 – 29	52,0
Benzeno/Acetona 10%	30 – 35	21,0
Benzeno/Acetona 20%	36 – 42	24,0
Benzeno/Acetona 20%	43 – 46	14,3
Benzeno/Acetona 20%	47 – 52	34,3
Benzeno/Acetona 20%	53 – 62	153,2
Benzeno/Acetona 20%	63 – 79	133,4
Benzeno/Acetona 30%	80 a 102	193,2
Benzeno/Acetona 40%	103 a 119	156,5
Benzeno/Acetona 1:1	120 a 129	124,9
Benzeno/Acetona 70%	130 a 143	162,5
Metanol 100%	144	695,3
Total		1795,6

Na fração 130 a 143 observou-se um precipitado branco, que após lavagem com metanol, levou ao isolamento de um sólido branco amorfo denominado de

AB2. A análise de AB2 por RMN ^1H e RMN ^{13}C permitiu sua caracterização como sendo o sitosterol glicosilado.

6.4.22-Fracionamento cromatográfico de ABTM: isolamento de AB3

6,2 g de ABTM foram adsorvidas em 8,0 g de sílica gel e cromatografados sobre 70,0 g da mesma sílica em coluna de 3,5 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias com aumento de polaridade. Após comparação por CCD as frações foram reunidas conforme Tabela 42 (p.157).

Tabela 42-Rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico de ABTM.

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano/Diclorometano 10%	1-14	257,2
Hexano/Diclorometano 20%	15-24	263,7
Hexano/Diclorometano 30%	25-29	42,1
Hexano/Diclorometano 40%	30-35	53,7
Hexano/Diclorometano 40%	36-41	51,0
Hexano/Diclorometano 40%	42-45	38,9
Hexano/Diclorometano 40%	46-51	47,8
Hexano/Diclorometano 60%	52-55	50,7
Hexano/Diclorometano 60%	56-63	68,7
Hexano/Diclorometano 80%	64-73	81,8
Hexano/Diclorometano 80%	74-77	70,5
Hexano/Diclorometano 80%	78-87	92,8
Hexano/Diclorometano 80%	88-90	32,1
Diclorometano 100%	91-98	58,7
Diclorometano 100%	99-105	51,3
Diclorometano 100%	106-120	183,1
Diclorometano 100%	121-127	141,5
Diclorometano 100%	128-137	152,4
Diclorometano/Acetato de etila5%	138-142	121,3
Diclorometano/Acetato de etila5%	143-158	201,7
Diclorometano/Acetato de etila10%	159-183	249,5
Diclorometano/Acetato de etila20%	184-187	91,2
Diclorometano/Acetato de etila20%	188-196	127,7
Diclorometano/Acetato de etila20%	197-205	81,1
Diclorometano/Acetato de etila50%	206-209	91,2
Diclorometano/Acetato de etila50%	210-225	312,3
Acetato de etila100%	226	1523,0
Metanol100%	227	1050,2
total		5605,2

Nas frações 91 a 98 observou-se um sólido branco amorfo, o qual foi lavado com metanol, e denominado de AB3. Este foi submetido à análise por RMN ^1H e ^{13}C , e caracterizado como o esteróide sitosterol.

6.4.23-Fracionamento cromatográfico de ALFM/C: isolamento de AL1

Uma alíquota de 5,0 g de ALFM/C foi adsorvida em 7,0 g de gel de sílica e cromatografada sobre 80,0 g da mesma sílica em coluna de 3,5 cm de diâmetro. A eluição foi realizada com hexano, benzeno, acetona e metanol puros ou em misturas binárias com aumento da polaridade. Após comparação por CCD as frações foram reunidas conforme Tabela 43.

Tabela 43-Rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico de ALFM/C.

Eluente	Fração	Massa(mg)
Hexano/Benzeno 70%	1-30	152,3
Benzeno100%	31-38	54,2
Benzeno/Acetona10%	39-57	121,2
Benzeno/Acetona20%	58-60	28,5
Benzeno/Acetona40%	61-78	820,2
Acetona 100%	79	160,8
Metanol100%	80	3502,1
Total		4839,3

Nas frações de 61 a 78 observou-se um sólido branco, que após lavagem com acetona e metanol, permitiu o isolamento de 10,5 mg de um sólido amorfo branco denominado de AL1. As análises por RMN ^1H e ^{13}C desse material mostraram que se tratava de uma mistura de monoacilglicerol.

6.4.24-Fracionamento cromatográfico de ALRM/A: isolamento de AL2

1,77 g de ALRM/A foi adsorvido em 2,5 g de gel de sílica e cromatografados sobre 50,4 g da mesma sílica em coluna de 2,0 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Após comparação por CCD as frações foram reunidas conforme Tabela 44.

Tabela 44-Rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico de ALRM/A.

Eluente	Fração	Massa(mg)
Hexano/AcOEt 30%	1-30	25,5
Hexano/ AcOEt 30%	31-38	70,4

Hexano/ AcOEt 50%	39-40	120,3
Hexano/ AcOEt 50%	41-50	51,2
Hexano/ AcOEt 50%	51-60	362,7
Hexano/ AcOEt 50%	61-70	387,8
Metanol 100%	71	523,1
Total		1541,0

Nas frações de 41 a 50 observou-se um sólido branco amorfo, que foi reunido e submetido a análise por RMN ^1H e ^{13}C , sendo caracterizada como o 5-(hidroximetil)-2-furaldeído.

6.5-Isolamento de Fungos Endofíticos de *A. lucidus*

Inicialmente, os talos de *A. lucidus* cultivados foram separados das folhas e raízes manualmente, e lavados com água destilada. Após a lavagem estes foram levados para câmara de fluxo laminar, onde se encontrava um sistema de quatro Beckers de 1000 mL cada contendo água destilada (becker1), álcool 70% (becker 2), hipoclorito de sódio 2,5% (becker 3) e água destilada (becker 4). Este sistema foi utilizado para lavagem e esterilização (eliminação dos fungos epifíticos) da parte externa dos talos.

O primeiro passo foi a imersão do talo no becker 1 por três minutos, em seguida, este era retirado e imerso becker 2 por mais três minutos, daí para o becker 3 por mais três minutos, e por ultimo, no becker 4 por cinco minutos.

Após o processo de lavagem e esterilização dos talos, estes foram cortados longitudinalmente para permitir o acesso ao seu sistema vascular. Com o talo aberto, foram retirados fragmentos os quais foram transferidos para placas de Petri contendo meio semi-sólido BDA (Item 6.6.1 p.161). Foram transferidos três fragmentos por placa, totalizando sete placas. Estas foram incubadas por quatro dias a 28°C.

Após este período, foi feita uma seleção das placas mais promissoras (com duas ou três espécies fúngicas). Seleccionadas as placas, estas foram submetidas a repiques sucessivos para obtenção da cultura pura dos fungos.

As duas culturas puras obtidas foram enviadas para identificação taxonômica na Universidade Federal de Lavras em Minas Gerais. A identificação

foi realizada pelo Dr. Cristiano Souza Lima e as espécies foram descritas como sendo os fungos endofíticos *Acremonium curvulum* e *Fusarium oxysporium*.

6.6 - Meios de Cultura Para Crescimento Fúngico

6.6.1 - Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Para o preparo do meio foram utilizadas 200g de batata inglesa descascadas, cortadas em cubos e cozidas em 500 mL de água destilada por vinte minutos em forno de microondas (potência de 80 W).

Em seguida, filtrou-se o caldo obtido para um erlenmayer de 1 L, onde foram acrescentados 20,0 g de dextrose e, após sua dissolução, adicionou-se 15,0 g de Ágar bacteriológico à mistura, homogeneizando e completando o volume para um litro com água destilada.

O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, foi vertido em placas de Petri previamente esterilizadas.

6.6.2-Meio Líquido Czapeck's

6.6.2.1- Meio base

Os nutrientes utilizados para o preparo de 1 L de meio de cultivo Czapeck tiveram as massas determinadas conforme descrito abaixo.

Nutrientes	Massa (g)
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Glicose	30,0

Após determinada as massas, os nutrientes foram colocados em um erlenmayer de 1L e dissolvidos com água destilada, sob agitação constante,

completando-se o volume final de 1 L com água destilada. Para a esterilização, o meio foi dividido em volumes iguais de acordo com a quantidade e volumes utilizados nos frascos. Assim, estes foram autoclavados por 15 minutos à 120°C e 1 atm de pressão.

Para os meios líquidos Czapeck enriquecidos com extrato de levedura foram acrescentados 20 g deste para cada litro do meio.

6.6.2.2-Meio enriquecido com aminoácidos

Foram preparados 3 L de meio Czapeck's (Item 6.6.2.1 p.161). Estes foram divididos em volumes iguais de 150,0 mL em 20 erlenmeyers de 500 mL.

A cada erlenmayer foram adicionados 30 mg de uma mistura dos seguintes aminoácidos (10 mg de cada): L-triptofano, L-fenilalanina e L-isoleucina.

Os meios foram esterilizados em autoclave à 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos.

6.6.2.3-Meio preparado com extrato de levedura e caldo de batata

Na busca de um melhor meio de cultivo para o crescimento do *Acremonium curvulum*, foi feita uma pesquisa na literatura e visto que alguns meios utilizavam o caldo da batata. Com isto, resolveu-se fazer um cultivo utilizando o caldo da batata, acrescidos dos nutrientes do meio Czapeck e extrato de levedura.

Para isto, foram utilizados 1,0 Kg de batata descascadas e cortadas em cubos, que foram cozidas em microondas (potencia de 80 W) por 15 minutos em 3,0 L de água destilada. Após o cozimento, o caldo foi filtrado e os nutrientes do meio Czapeck foram adicionados, juntamente com 100 g de extrato de levedura. Após solubilização sob agitação constante, o volume foi completado com água destilada para 5 L.

A mistura resultante foi separada em volumes iguais de 150,0 mL em 33 erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados por 15 minutos à 120°C e 1 atm de pressão.

6.6.2.4-Meio líquido de Peptona

O meio de cultura de peptona foi preparado utilizando glicose (39 g/L), peptona G (1,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), $\text{MgSnO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g/L). O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, após ser distribuídos em erlenmeyers.

6.6.2.5-Meio sólido de Arroz

Em 15 erlenmeyers de 500 mL foram colocados 100 g de arroz parboilizado Uncle Bens® em cada e acrescentados 90 mL de água destilada por frasco. Em seguida, estes foram autoclavados por 40 minutos à 120°C e 1 atm de pressão. Depois do resfriamento total da autoclave, e sem que esta fosse aberta, o material foi novamente submetido à temperatura de 120°C e 1 atm de pressão por mais 40 minutos. A finalidade da repetição do processo é garantir a esterilização e o cozimento total do arroz.

6.7- Inoculação dos fungos

Os fungos endofíticos de *A. lucidus* (Item 6.5 p. 160), foram reativados através da técnica de semeadura em superfície, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA, em ambiente asséptico e incubados à temperatura ambiente (25°C), durante sete dias. Após seu crescimento, selecionaram-se as melhores placas para serem usadas no cultivo dos mesmos em diferentes meios.

6.8-Cultivo dos Microrganismos

Os fungos foram cultivados no Laboratório de Biotransformação e Síntese orgânica (LaBS) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LABIOMMI) da Universidade Federal de São Carlos (UFScar).

6.8.1- *Acremonium curvulum*

O fungo *A. curvulum* foi cultivado em meio Czapeck com extrato de levedura e caldo de batata. O preparo do meio, bem como a sua esterilização e volumes por frascos estão descritos no Item 6.6.2.3 (p. 162).

Após o meio ser esterilizado este foi levado para câmara de fluxo laminar, onde foram deixados resfriar até temperatura ambiente (25°C) sob luz UV. Em seguida, foram transferidos dois fragmentos (de 5 mm de diâmetro cada) contidos em placas de Petri com meio BDA para 30 erlenmeyers, mantendo-se 3 como controle.

Esses frascos foram incubados à 25°C de modo estático e na ausência de luz por um período de 20 dias.

Este mesmo fungo foi cultivado em meio Czapeck enriquecido com mistura de aminoácidos, como descrito no Item 6.6.2.2 (p. 161).

Após os meios serem esterilizados, os frascos foram levados para câmara de fluxo e lá deixados, sob luz UV, até atingirem à temperatura ambiente (25°C).

Após atingir a temperatura desejada, dois fragmentos (de 5 mm de diâmetro cada) contidos em placas de Petri com meio BDA foram transferidos para 17 erlenmeyers, mantendo-se 3 como controle.

Os frascos foram incubados por um período de 30 dias, de modo estático e na ausência da luz.

6.8.2–*Fusarium oxysporium*

O fungo *Fusarium oxysporium* foi cultivado em meio líquido de peptona, preparado conforme descrito no Item 6.6.2.4 (p. 162).

Após a esterilização dos meios de cultura, os erlenmeyers foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram deixados sob luz UV até atingirem a temperatura ambiente (28°C). Transferiu-se dois fragmentos (discos de 5 mm) de micélio previamente crescido em placas de Petri do microrganismo para cada erlenmayer, num total de 15 frascos.

Esses frascos foram incubados por um período de 15 dias. A partir do 15º dia realizou-se a retirada de três frascos do fungo. Este procedimento foi realizado

mais quatro vezes em períodos de sete dias, totalizando cinco extrações para verificação da massa micelial.

O fungo *F. oxysporium* foi ainda cultivado em meio sólido de arroz. Após o processo de cozimento e esterilização do arroz (Item 6.6.2.5 p. 162), os erlenmeyers foram levados para câmara de fluxo e lá deixados sob luz UV até atingirem a temperatura ambiente (25°C).

Estabelecida a temperatura desejada, 3 fragmentos do fungo (com cerca de 5 mm de diâmetro cada) contidos em placas de Petri com meio BDA foram transferidos assepticamente para 12 frascos contendo o substrato, mantendo-se 3 frascos como controle de esterilidade. O fungo inoculado em arroz sofreu agitação manual uma vez por dia para evitar o crescimento do fungo em um único ponto. O microrganismo foi incubado por um período de 15 dias, na ausência da luz.

6.9 - Extrações dos fungos

6.9.1-Extração do *Acremonium curvulum* do meio Czapeck com extrato de levedura e caldo de batata

A massa micelial foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo. Após a filtração, o micélio foi acondicionado em erlenmayer de 500 mL e submetido a duas extrações a frio com 300,0 mL de etanol por 48 horas.

Transcorrido o tempo de extração, o solvente foi filtrado e destilado sob pressão reduzida para obtenção do extrato etanólico do micélio (ACMEb).

Os cinco litros de meio filtrados a vácuo foram divididos em dois volumes de 2,5 L, e submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila (4 x 1L, para cada 2,5 L) em funil de separação de 5 L.

Após a partição, o material aquoso resultante foi passado em coluna de XAD-7(500g), cromatografados em coluna de 4,0 cm de diâmetro. Após passar todo material aquoso (5L), foi feita a eluição do material adsorvido com metanol e acetato de etila.

Os rendimentos obtidos com a extração do micélio, da partição do meio de cultura com acetato e da coluna de XAD-7 com metanol e acetato de etila estão sumariados na Tabela 45.

Tabela 45-Rendimentos obtidos da extração do fungo *A. curvulum*

Solvente	Micélio (g)	Partição (g)	XAD-7 (g)
Acetato de etila	-----	0,264	0,153
Metanol	-----	-----	0,281
Etanol	5,60	-----	-----

6.9.2-Extração do *Acremonium curvulum* do meio Czapeck com aminoácidos

A massa micelial foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo. Esta foi colocada em erlenmayer de 500 mL e extraído duas vezes a frio com 250 mL de etanol por 48 horas. Após este período, o sistema foi filtrado e o solvente destilado sob pressão reduzida para obtenção do extrato do micélio (ACMEam).

O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 1 L) e butanol (3 x 1 L) em funil de separação de 5 litros.

As fases orgânicas foram concentradas para obtenção dos respectivos extratos. A fase aquosa foi desprezada.

Os rendimentos obtidos com a extração do micélio, da partição do meio de cultura com acetato de etila e butanol estão sumariados na Tabela 46.

Tabela 46-Rendimentos obtidos da extração do fungo *A. curvulum*.

Solvente	Micélio (g)	Partição (g)
Acetato de etila	-----	0,200
Etanol	1,052	-----
N-butanol	-----	0,221

As frações referentes ao extrato etanólico do micélio e da partição do meio com acetato de etila, após comparação por CCD, foram reunidas por se mostrarem bastante semelhantes.

6.9.3-Extração do *Fusarium oxysporium* do meio líquido de peptona

No 15º dia de crescimento do fungo, foram retirados três frascos para análise da massa micelial formada. O micélio foi separado do meio líquido por filtração a vácuo.

Em seguida o micélio foi colocado em placas de Petri, e levados à estufa a temperatura média de 50°C por 4 horas.

Após a secagem, estes foram pesados e acondicionados em erlenmayer de 500 mL, onde foram adicionados 200 mL de clorofórmio para extração a frio por 48 horas.

Depois da primeira extração, o micélio seco foi submetido à extração com acetato de etila, seguido de metanol.

O meio líquido filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com clorofórmio (3 x 300 mL) e acetato de etila (3 x 300 mL). As frações orgânicas foram concentradas para obtenção dos respectivos extratos. A fase aquosa foi desprezada.

Os demais frascos foram retirados da mesma forma de 7 em 7 dias após a primeira extração, totalizando cinco extrações.

As massas de micélio obtidas, bem como os dias de extração estão especificadas na Tabela 47.

Tabela 47-Massa de micélio do *Fusarium oxysporium*.

<i>F. oxysporium</i>	
Dias	Massa(g)
15	0,6818
22	1,1275
29	1,0974
36	1,0588
43	1,9234

Os rendimentos obtidos provenientes das partições do meio e extrações do micélio estão relacionados na Tabela 48.

Tabela 48-Rendimentos obtidos das partições do meio e extração do micélio.

<i>F. oxysporium</i>					
Micélio			Meio		
Dias /Solvente	CHCl ₃ (mg)	AcOEt (mg)	MeOH (mg)	CHCl ₃ (mg)	AcOEt (mg)
15	51,3	41,2	63,7	42,3	38,7
22	72,5	53,2	71,2	53,0	45,5
29	70,4	53,7	67,1	51,0	49,8
36	66,5	51,0	60,1	52,1	51,7
43	73,1	52,1	61,7	48,4	52,4

6.9.4-Extração do *Fusarium oxysporium* do meio sólido - arroz

Após os 15 dias de cultivo do fungo, foi adicionado a cada frasco 200 mL de etanol para parar o crescimento. Em seguida, o material foi triturado mecanicamente, frasco por frasco. O material triturado permaneceu em etanol por 48 horas para extração dos metabólitos secundários produzidos.

O material submetido à extração foi filtrado a vácuo, e a solução resultante foi concentrada para obtenção do extrato etanólico do microrganismo. Foi obtido 25,6 g de extrato de *Fusarium oxysporium* (FOA).

6.10-Isolamento dos constituintes químicos de *Acremonium curvulum*

6.10.1-Isolamento de AC1

O extrato proveniente do micélio (ACMEam) e da partição do meio líquido com acetato de etila do fungo cultivado em Czapeck com aminoácidos foram reunidas como descrito no Item 6.9.2 (p.165).

Uma alíquota de 1,1 g do extrato resultante foi adsorvida em 3,0 g de gel de sílica e cromatografadas sobre 80,0 g da mesma sílica em coluna aberta de 3,0 cm de diâmetro.

A eluição foi realizada utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em mistura binária, resultando em 142 frações, as quais foram reunidas após comparação por CCD (Tabela 49).

Tabela 49-Rendimentos obtidos da coluna cromatográfica do extrato do micélio em Czapeck com aminoácidos.

Eluente	Fração	Massa(mg)
Hexano/Diclorometano 50%	1 - 69	35,2
Hexano/Diclorometano 70%	70- 89	25,5
Diclorometano 100%	90 - 106	65,0
Diclorometano/AcOEt 10%	107 -140	80,8
AcOEt 100%	141	258,7
Metanol 100%	142	501,2
Total		966,4

A fração 90 a 106 apresentou-se como um líquido viscoso alaranjado, que foi denominado de AC1 e submetido a análise por RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e EM. Este foi caracterizado como o 2'-hidroxipropanoato de fenetila.

6.10.2-Isolamento de AC2

Do extrato do micélio cultivado em Czapeck com caldo de batata e extrato de levedura (ACMEb) foram separados 5,5 g, os quais foram submetidos à coluna filtrante a vácuo sobre 40,0g de sílica gel, em coluna de 5,0 cm de diâmetro.

A eluição foi realizada utilizando hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias com aumento gradual de polaridade, resultando em 10 frações, conforme Tabela 50 (p.169).

Tabela 50-Rendimentos obtidos da coluna filtrante do extrato do micélio em Czapeck's com batata e levedura.

Fração	Massa (g)
Hexano 100%	0,44
Hexano/AcOEt 9:1	0,46
Hexano/ AcOEt 7:3	0,03
Hexano/ AcOEt 1:1	0,01
Hexano/ AcOEt 3:7	0,03
AcOEt 100%	0,09
AcOEt /Metanol 9:1	0,05
AcOEt /Metanol 7:3	2,20
AcOEt /Metanol 1:1	1,51
Metanol 100%	0,62
Total	5,44

A fração hexano/ AcOEt 9:1 apresentou um precipitado branco na forma de cristais, os quais foram submetidos à recristalização com acetona, em balão de fundo cônico, resultando em cristais brancos que foi denominado de AC2 (15 mg).

AC2 foi submetido a análise por RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e EM e caracterizado como sendo o ergosterol.

6.10.3–Isolamento de AC3

Uma alíquota de 50,0 mg da fração metanólica obtida através da coluna de XAD-7(Item 6.9.1 p.165), foi submetida à cromatografia em placa preparativa. O material aplicado a 2,0cm da base da placa (20 x 20 cm) foi eluido com uma mistura binária de diclorometano / acetato de etila 40%.

Após a eluição, o material foi revelado sob luz UV em comprimento de onda de 254nm e 365nm. Foi possível verificar quatro faixas distintas, que foram separadas através de raspagem da sílica da placa, e submetidas à extração individual do material da sílica com metanol, e denominadas de frações 1, 2, 3 e 4. A fração três apresentou-se como um líquido viscoso amarelado que foi denominado de AC3 (8,3 mg). Este foi submetido a análise por RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e EM e caracterizado como sendo o Triptofol.

6.11–Isolamento dos constituintes de *Fusarium oxysporium*

6.11.1 – Isolamento de FO1

Da fração clorofórmica do micélio de *F.oxysporium*, com 22 (72,5 mg) e 29 (70,4 mg) dias, obtida no Item 6.9.3 (p.166), após lavagem com metanol foi possível o isolamento de FO1, em 8,1 e 5,3 mg respectivamente, na forma de um sólido amorfo branco. Este foi submetido a análise por RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e EM, e foi caracterizado como o tetra (S)- β -butirolactona.

6.11.2–Isolamento de FO2

Uma alíquota de 5,3 g do extrato etanólico de *F. oxysporium* (FOA) cultivado em arroz, foi submetida à coluna filtrante a vácuo sob 25,0g de gel de

sílica. O material foi adsorvido em sílica e eluído com hexano, acetato de etila e metanol puro ou em misturas binárias. Os rendimentos obtidos do fracionamento cromatográfico estão relacionados na Tabela 51.

Tabela 51-Rendimentos do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de *F. oxysporium*.

Eluente	Massa(g)
Hexano 100%	0,04
Hexano/AcOEt 10%	0,05
Hexano/ AcOEt 30%	0,10
Hexano/ AcOEt 50%	0,20
Hexano/ AcOEt 70%	0,10
AcOEt 100%	0,32
AcOEt /metanol 30%	1,21
Metanol 100%	2,51
Total	4,55

A fração hexano/acetato de etila 70% (100 mg) foi submetida à cromatografia em cartucho de gel de sílica, em tubos de 6mm de diâmetro. O material foi eluído com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puro ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

O eluente, bem como os rendimentos obtidos no fracionamento, está descritos na Tabela 52 (p. 171).

Tabela 52-Rendimentos do fracionamento cromatográfico fração hexano /acetato 70%.

Eluente	Fração	Massa(mg)
Hexano/diclorometano 20%	1-4	25,5
Hexano/diclorometano 50%	5-6	26,7
Diclorometano 100%	7	9,5
Diclorometano 100%	8-10	6,1
Diclorometano/acetato 2%	11	7,2
Acetato 100%	12	5,3
Metanol 100%	13	15,8

As frações de 8-10 apresentaram-se como um líquido viscoso transparente, e foi denominada de FR2. Esta foi submetida a análise por RMN ^1H e ^{13}C e EM e foi caracterizada como sendo uma mistura estereoisomérica de duas

hidroxilactonas - (4*R**, 5*S**)-5-hidroxi-hexano-4-olida) e (4*R**, 5*R**)-5-hidroxi-hexano-4-olida.

6.12-Preparo do éster do ácido nicotínico com o monoacilglicerol

6.12.1-Preparo do cloreto do ácido nicotínico

0,56 mmol do ácido nicotínico, os quais foram acondicionados em balão de 50 mL, em seguida adicionados 32 mmol de cloreto de tionila. O sistema foi deixado sob refluxo a 80 °C por 3 horas. Em seguida o excesso de cloreto de tionila foi destilado sob pressão reduzida.

6.12.2-Reação de Esterificação do monoacilglicerol

O monoacilglicerol foi transferido para o balão, o qual continha o cloreto de ácido, onde foram adicionados 3 mL de clorofórmio. O sistema foi deixado sob refluxo por 1 hora a 50 °C. O solvente foi destilado sob pressão reduzida e o material foi analisado por LC/MS.

7-CONCLUSÕES

O estudo comparativo de ácidos graxos realizados com as espécies *A. comosus*, *A. bracteatus* e *A. lucidus* cultivadas no campo e com plântulas cultivadas *in vitro* de *A. lucidus* e *A. bracteatus*, levou a identificação de 21 ácidos graxos através da análise de seus ésteres metílicos por CG/EM, sendo destes 16 (76%) saturados e 5 (24%) insaturados. Através deste estudo, pode-se confirmar que no estágio de plântula (cultivo *in vitro*), o ácido palmítico (16:0) é o principal constituinte (>60%), o que corrobora dados da literatura que apontam este ácido graxo como precursor da maioria dos ácidos graxos saturados e insaturados. Foi ainda possível verificar que as espécies de *Ananas* estudadas apresentam um perfil de ácidos graxos diferenciado, podendo servir como marcador para a identificação das espécies.

O estudo dos constituintes não-voláteis de *A. bracteatus* levou ao isolamento de três compostos micromoleculares, o flavonóide cumataquenina e os esteróides β -sitosterol e seu glicosídeo. Dentre estes, o flavonóide está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Ananas*, o que representa uma contribuição à quimiotaxonomia deste gênero.

Da espécie *A. lucidus* foi isolado a mistura de três monoacilgliceróis, inéditos na literatura, e do 5-(hidroximetil)-2-furaldeído. O isolamento dos monoacilgliceróis de *Ananas* é descrito pela primeira vez e representa uma contribuição à química deste gênero, uma vez que essa classe de ácido graxo é conhecida por desenvolver vários papéis essenciais em plantas.

Foi possível isolar dois fungos endofíticos majoritários de *A. lucidus*, *A. curvulum* e *F.oxysporum*, sendo o primeiro um inibidor de crescimento de alguns fungos e isolado pela primeira vez de *Ananas*, e o segundo um fitopatógeno.

O cultivo de *A. curvulum* em meio Czapek levou ao isolamento do 2-hidroxiopropanoato de feniletila, do esteroide ergosterol e do triptofol. O 2-hidroxiopropanoato de feniletila e triptofol, apesar de serem conhecidos na literatura, foram isolados pela primeira vez de *Acremonium*. Adicionalmente, os

dados de RMN ^1H e ^{13}C de 2-hidroxiopropanoato de feniletila estão sendo descritos pela primeira vez na literatura.

A prospecção química realizada com *Fusarium oxysporum* levou ao isolamento dos compostos tetra(*S*)-butirolactona, um macrociclo lactônico formado por 4 unidades do ácido 3-hidroxiбутírico, e da mistura diastereoisomérica do ($4R^*$, $5S^*$)-5-hidroxiheptan-4-olida e ($4R^*$, $5R^*$)-5-hidroxihexan-4-olida. Todos estes compostos estão sendo descritos pela primeira vez para o gênero.

Portanto, a investigação química das espécies de *Ananas* e seus fungos endofíticos permitiram não só identificar novas moléculas naturais, mas também contribuir para a quimiotaxonomia dos gêneros estudados.

8 - REFERÊNCIAS

ABDEL-LATEFF, Ahmed et al. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 11, p. 1605-1611, 2002.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001. 456 p.

AFIYATULLOV, S. Sh et al. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 5, p. 641-644, 2002.

AFIYATULLOV, S. Sh et al. New diterpenic altrosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, p. 848-850, 2000.

AFIYATULLOV, S. Sh et al. New diterpenic altrosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. **Journal of Natural Products**, v. 68, n.8, p. 1308, 2005.

AFIYATULLOV, S. Sh et al. New glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 1047-1051, 2004.

ALMEIDA, F. P. F.; AKY, A. Y. Grande crescimento no mercado de flores. **Agroanalysis**, v. 15, n. 9, p. 8-11, 1995.

ARAGÃO, P. C. et al. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 254-259, 1990.

ARNONE, A. et al. Acremine G, dimeric metabolite from cultures of *Acremonium byssoides* A20. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 146-149, 2008.

ASSANTE, G. et al. Acremines A-F, novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic *Acremonium*, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. **Tetrahedron**, v. 61, n. 32, p. 7686-7692, 2005.

BAKER, K.; COLLINS, J. L. Notes on the distribution and ecology of Ananas and Pseudananas in South American. **America Journal of Botany**, v. 26, p. 697-702, 1999.

BERG, A. et al. Acremonol and acremodiol, new fungal bislactones. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 7, p. 660-662, 2002.

BEZERRA, F. C.; PAIVA, W. O. **O agronegócio de flores no estado do Ceará: situação atual e perspectivas**. Fortaleza: EMBRAPA agroindústria tropical, 1997. p. 3.

BIGELIS, R. et al. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 815-826, 2006.

BOOT, C. M. et al. Four classes of structurally unusual peptides from two marine-derived fungi: Structures and bioactivities. **Tetrahedron**, v. 63, n. 39, p. 9903-9914, 2007.

BUCHANAN, M. S. et al. (+)-Osmundalactone, γ -lactones and spiromentins from the fungus *Paxillus atrotomentosus*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1251-1257, 1995.

BUNYAPAIBOONSRI, T. et al., Phenolic glycosides from the filamentous fungus *Acremonium sp.* BCC 14080, **Journal Natral Products**, v.71, p. 891-894, 2008.

CLOUGH, S. et al. Structure elucidation and synthesis of (4S,5S,6Z,8E)-5-hydroxydeca-6,8-dien-4-olide [(S,S)-sapinofuranone B] a novel γ -lactone metabolite of *Acremonium strictum*. **Perkin Transactions**, v. 1, n. 15, p. 2475-2481, 2000.

COLLIER, L.; BALOWS A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 9. ed. New York: Edward Arnold, 1998. 4 v.

DONG, H. et al., Eicosenones and methylated flavonols from *Amomum koeniggi*, **Phytochemistry**, v.50, p. 899-902, 1999.

ENGEL, B. et al. Sesquicillin, an inhibitor of glucocorticoid mediated signal transduction. **Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 5, p. 518-521, 1998.

EVANS, L. et al. An antibacterial hydroxy fusidic acid analogue from *Acremonium crocinigenum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2110-2114, 2006.

GALLARDO, G. L. et al. Antimicrobial metabolites produced by an intertidal *Acremonium furcatum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2403-2410, 2006.

GEHRT, A. et al. Thiacremonone, a new inducer of differentiation of mammalian cells from an *Acremonium* sp. **Natural Product Letters**, v. 14, n. 4, p. 281-284, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. p. 183- 260.

GUZMAN-LOPEZ, A. et al. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adipose*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 1473-1477, 2007.

HE, H. et al. Acremonidins, new polyketide-derived antibiotics produced by *Acremonium* sp., LL-Cyan 416. **Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 11, p. 923-930, 2003.

JANG, Jae-hyuk et al. Awajanomycin, a cytotoxic γ -lactone- δ -lactam metabolite from marine-derived *Acremonium* sp. AWA16-1. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 9, p. 1358-1360, 2006a.

JANG, Jae-hyuk et al. New dihydrobenzofuran derivative, awajanoran, from marine-derived *Acremonium* sp. AWA16-1. **Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 7, p. 428-431, 2006b.

KIM, J. et al., Verlamelim, na antifungal compound produced by a mycoparasite, *Acremonium strictum*. **The Plant Pathology Journal**, v. 18, n. 2, p. 102-105. 2002.

KLEINWACHTER, P. et al. Spirobenzofuran, a new bioactive metabolite from *Acremonium* sp. HKI 0230. **Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 6, p. 526-527, 2001.

KO, Hack Ryong; CRM646-A and -B, novel fungal metabolites that inhibit heparinase. **Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 2, p. 211-214, 2000.

LEAL-BERTIOLE, S. C. de M. O. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual Patologia de Plantas**, v. 6, p. 197-230, 1998.

MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia Albicans* Triana através de análise por microcomputador. **Química nova**, v.13, n. 4, p. 260-262, 1990.

MARTIN, JUAN, F; CASQUEIRO, J; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 282-293, 2005.

MASUOKA, Y. et al. Phoenistatin, a new gene expression-enhancing substance produced by *Acremonium fusigerum*. **Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 2, p. 187-190, 2001.

MENDES, M. A. S. et al. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CENARGEM, 1998.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Imprensa Universitária: UFRPE, 1993. 277 p.

MERCIER, H; KERBAUY, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads. **High-Tech and Micropropagation**, v. 57, p. 40-43, 1997.

MILES, C. O. et al. Large-Scale Isolation of Lolitrem B and Structure Determination of Lolitrem E. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1488-1492, 1994.

MITSCHER, L. A. et al. Amorphastilbol, an antimicrobial agent from *Amorpha nana*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1481-1483, 1985.

MORI, H. et al. FR235222, a fungal metabolite, is a novel immunosuppressant that inhibits mammalian histone deacetylase (HDAC). I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 2, p. 72-79, 2003.

MULLER, A. C., MACEDO, M. F. Patentes de fitomedicamentos: como garantir o compartilhamento dos benefícios de P&D e do uso sustentável de recursos genéticos. **Revista Fitos**, v.1, p. 25-29, 2005.

MUNDAY-FINCH, S. C. et al. Isolation and Structure Elucidation of Lolilline, a Possible Biosynthetic Precursor of the Lolitrem Family of Tremorgenic Mycotoxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 199-204, 1997.

MUNDAY-FINCH, S. C. et al. Structure Elucidation of Lolitrem F, a Naturally Occurring Stereoisomer of the Tremorgenic Mycotoxin Lolitrem B, Isolated from *Lolium perenne* Infected with *Acremonium lolii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2782-2788, 1996.

MURAKAMI-NAKAI, Chikako; The effects of dehydroaltenusin, a novel mammalian DNA polymerase α inhibitor, on cell proliferation and cell cycle progression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1674, n. 2, p. 193-199, 2004.

NAKAI, R. et al. UCS 1025A, a novel antibiotic produced by *Acremonium* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 3, p. 294-296, 2000.

OLIVEIRA, M.K.T. et al., Propagação "in vitro" da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller), **Revista caatinga**, v.20, n3, p. 167-171, 2007.

PINTO, A. C. et al.. produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POLING, S.M. et al. *Acremonium zeae*, a Protective Endophyte of Maize, Produces Dihydroresorcylide and 7-Hydroxydihydroresorcylides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3006-3009, 2008.

PONCE, M. A. et al. A new look into the reaction between ergosterol and singlet oxygen *in vitro*. **Photochem Photobiol**, v.1, p.749-756, 2002.

PONTIUS, Alexander; Aromatic Polyketides from Marine Algicolous Fungi. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 272-274, 2008.

QUEIROZ, Claudia, R. P; LOREZONI, Márcio M; FERREIRA, Francisco, R; CABRAL, José, R. S; **Catálogo de caracterização e avaliação de germoplasma de abacaxi**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 30 p.

RATNAYAKE, R. et al. Acremolides A-D, lipodepsipeptides from an Australian marine-derived fungus, *Acremonium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 3, p. 403-408, 2008.

RAUH, W. **The bromeliad lexicon**. London: Blandford, 1990.

ROCHA, F. D.; KAPLAN, M.A. Secondary metabolites from *Ananas bracteatus* LINDLEY (Bromeliaceae). **Anais. Academia Brasileira Ciências** V. 72, n. 2, 2000.

ROELENS, S. Macrocyclic poly lactones by catalyzed cyclooligomerization. Tetra[(S)- β -butyrolactone]. **Journal Organic Chemistry**, v. 57, p. 1472-1476, 1992.

ROY, K. et al. Orbuticin, a new secondary metabolite from *Acremonium butyri*. **Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 11, p. 1186-1187, 1996.

SANTOS, R. M. G. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moliniforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. Universidade Federal de São Carlos, 1998.

SASSA, T. et al. Acremolactone A, a novel herbicidal epoxydihydropyranyl γ -lactone from *Acremonium roseum* I4267. **Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 10, p. 967-969, 1998.

SASSA, Takeshi; OOI, Takahiro; KINOSHITA, Hiroshi. Isolation and structures of acremolactones B and C, novel plant-growth inhibitory γ -lactones from *Acremonium roseum* I4267. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 12, p. 2633-2636, 2004.

SHARMAN, G. J. et al. Structural elucidation of XR586, a peptaibol-like antibiotic from *Acremonium persicinum*. **Biochemical Journal**, v. 320, n. 3, p. 723-728, 1996.

SRIKRISHNA, A.; LAKSHMI, B. Vasantha. The first total synthesis of a bioactive metabolite, a spirobenzofuran isolated from the fungi *Acremonium* sp. HKI 0230. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 41, p. 7029-7031, 2005.

THOMSON, R. H. **The Chemistry of Natural Products**. Blackie & Son Ltd, 1985.

TOMMERAAS, K. et al., Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans, **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

TOUSSON, T.; NELSON, P. E. Variation and specilization in the Fusaria Annual. **Review. Phytopathology**, v. 13, p. 71-82, 1975.

UHLIG, S. et al. Identification of cytotoxic principles from *Fusarium avenaceum* using bioassay-guided fractionation. **Toxicon**, v. 46, n. 2, p. 150-159, 2005.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: chave para identificação. **Revisão anual de patologia de plantas**, 2000.

VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: Importância e ocorrência em alimentos. **Química nova**, v. 19, n. 4, p. 400-407, 1996.

WICKLOW, DONALD T. et al. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, n. 5, p. 610-618, 2005.

XU, L. et al. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 68-72, 2008.

YAMADA-HADA, J. et al. Structural elucidation of novel phosphocholine-containing glycosylinositol-phosphoceramides in filamentous fungi: (2). Spectral analysis of the sugar-inositol portion by 2D-NMR. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 4, p. 473-476, 2004.