

SESQUITERPENOS PRODUZIDOS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Phomopsis cassiae* COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INIBIDORA DE ACETILCOLINESTERASE[#]

Lisinéia M. Zanardi, Vanderlan da S. Bolzani, Alberto J. Cavalheiro, Dulce H. Siqueira Silva, Henrique C. Trevisan[†] e Angela R. Araujo*

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara – SP, Brasil

Geraldo H. Silva

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 Aracajú – SE, Brasil

Helder L. Teles

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Mato Grosso, 78735-901 Rondonópolis – MT, Brasil

Maria Cláudia M. Young

Secção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 24/4/12; aceito em 24/8/12; publicado na web em 28/9/12

SESQUITERPENES PRODUCED BY ENDOPHYTIC FUNGUS *Phomopsis cassiae* WITH ANTIFUNGAL AND ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION ACTIVITIES. Two new diastereoisomeric cadinanes sesquiterpenes 3,9-dihydroxycalamenene (**1-2**), along with the known 3-hydroxycalamen-8-one (**3**) and aristelegone-A (**4**), were isolated from ethyl acetate extract of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. Their structures, including relative stereochemistry, were determined on the basis of detailed interpretation of 2D NMR spectra and comparison with related known compounds. Compounds **1-4** displayed antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, as well as inhibition of acetylcholinesterase.

Keywords: *Phomopsis cassiae*; endophytic fungus; sesquiterpenes.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos representam uma interessante fonte de produtos naturais estruturalmente diversos e farmacologicamente ativos, com vasta aplicação como agroquímicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasíticos e agentes anticancerígenos.¹⁻⁶ Entre estes encontram-se os fungos endofíticos, que são micro-organismos que residem nos espaços inter e intracelulares de plantas vasculares durante um período do seu ciclo de vida, não causando efeitos patogênicos ao hospedeiro.¹⁻⁶ Por meio dessa associação simbiótica, a planta hospedeira protege e nutre o endófito. Este, por sua vez, produz metabólitos que favorecem o crescimento e melhoram a competitividade da planta, além de protegê-la de herbívoros e fitopatógenos.¹⁻⁶ Apesar da importância deste nicho de micro-organismos na produção de metabólitos secundários bioativos e novos, este é ainda muito pouco explorado, sobretudo quando em associações com espécies vegetais brasileiras.

Em continuidade ao projeto de “Prospecção Química e Biológica em Fungos Endofíticos Isolados de Espécies Vegetais de Cerrado”,⁷⁻¹¹ o fungo endofítico *Phomopsis cassiae*, que se mostrou um excelente produtor de metabólitos novos e bioativos quando cultivado em meio líquido de dextrose batata (PDB),^{7,10} foi selecionado para estudo químico em extrato de malte (EM). O interesse no estudo da produção metabólica de *P. cassiae* em extrato de malte foi avaliar a produção metabólica em diferentes condições nutricionais, como observado em trabalho anterior.⁹

O estudo químico do extrato bruto AcOEt produzido pelo fungo endofítico *P. cassiae* resultou no isolamento de quatro sesquiterpenos da classe dos cadinanos, sendo dois novos estereoisômeros

Rel. (7*R*,9*S*,10*R*)-3,9-di-hidroxicalameneno (**1**) e *Rel.* (7*R*,9*R*,10*R*)-3,9-di-hidroxicalameneno (**2**) e os conhecidos *Rel.* (7*S*,10*R*)-3-hidroxicalamen-8-ona (**3**) e aristelegona-A (**4**).

As estruturas das substâncias foram determinadas ou elucidadas pela análise dos espectros de infravermelho, EM, RMN de ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais.

As substâncias **1-4** foram avaliadas quanto ao potencial antifúngico e inibidor de acetilcolinesterase.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram registrados em espectrofotômetro da Nicolet, modelo IMPACT-400, em pastilhas de KBr. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C e experimentos bidimensionais foram realizados em espectrômetro da Varian, modelo Inova-500 (11,7 Tesla) operando na frequência de 500 MHz para o núcleo de ¹H e 125 MHz para ¹³C; TMS foi utilizado como referência interna. Os espectros de massas de alta e baixa resolução foram registrados em espectrômetro da Micromass, modelo tripló quadrupolo (Quattro-LC, Manchester, UK). As amostras foram introduzidas utilizando uma seringa de fluxo (10 µL min⁻¹).

As análises e separações cromatográficas por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foram realizadas em equipamento da Varian, modelo Prostar, acoplado ao detector ProStar 330 de arranjos de diodos, utilizando coluna analítica Phenomenex Fenil-Hexil (250 x 4,60 mm; 5 µm) e coluna Phenomenex Fenil-Hexil (250 x 21,20 mm; 10 µm), em modo preparativo. Nas separações cromatográficas em coluna aberta sob pressão foi utilizada sílica gel C-18 (Merck Lichroprep®FR-18, 25-40 µm) em coluna 20 x 3,7cm.

O cultivo de *P. cassiae* em meio líquido em escala ampliada foi conduzido em 28 frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 6,0 g de

*e-mail: araujoar@iq.unesp.br

[†]In Memoriam

[#]Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

EM (extrato de malte) (DIFCO), e 300 mL de água ultrapura (Mili-Q), que foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 40 min.

Material vegetal

Folhas de *C. spectabilis* foram coletadas em junho de 2001, em Araraquara-SP. A identificação botânica foi realizada pela Dra. M. C. M. Young e uma exsicata (SILVA-193) encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil.

Isolamento da cepa fúngica

O fungo endófito *P. cassiae* foi isolado de acordo com procedimento previamente descrito.^{7,10}

Cultivo do micro-organismo e obtenção do extrato bruto

O fungo endófito *P. cassiae*¹⁰ foi identificado pelo Prof. Dr. L. H. Pfenning e depositado na Coleção Micológica da Universidade Federal de Lavras como CML-292.

P. cassiae foi repicado para placas de Petri contendo batata, dextrose e ágar (PDA) e incubado por 8 dias à temperatura ambiente. A seguir, foi inoculado em meio de cultivo EM, perfazendo um total de 8,4 L, e mantido em incubadora rotatória a 150 rpm e 25 °C por 28 dias. Após este período, o caldo foi separado do micélio por filtração e particionado com AcOEt (3 x 4,2 L). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrada, fornecendo 658,1 mg de extrato bruto.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

O extrato bruto (658,1 mg) foi fracionado em coluna cromatográfica (20 x 3,7 cm) usando-se sílica gel de fase reversa C-18. Primeiramente eluída com gradiente de H₂O-MeOH (90:10→100% MeOH), forneceu 14 frações; a seguir, com MeOH:AcOEt 50:50 e AcOEt puro, forneceu mais 2 frações. Após criteriosa análise por CCDC (cromatografia em camada delgada comparativa) de sílica gel, usando-se Hex:AcOEt (3:97) e AcOEt:MeOH (98:2) como eluente, as frações Pc-EM-07 (49,0 mg) e Pc-EM-09 (55,0 mg) foram selecionadas para fracionamento cromatográfico por CLAE_{prep} (cromatografia líquida de alta eficiência preparativa). A fração Pc-EM-09 foi submetida à CLAE_{prep} em fase reversa [λ = 220 nm; 12,0 mL min⁻¹; CH₃CN:H₂O (50:50→30:70), 25 min], fornecendo **1** (3,1 mg, t_R = 13,5 min), **2** (2,0 mg, t_R = 13,0 min) e **3** (2,3 mg, t_R = 16,5). A fração Pc-EM-07 foi submetida à CLAE_{prep} em fase reversa [λ = 254 nm; 15 mL min⁻¹; CH₃CN:H₂O (35:65)], fornecendo **4** (2,3 mg, t_R = 18 min).

Bioensaio

Ensaio para avaliação da atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto AcOEt e das substâncias **1-4** contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foi utilizada a metodologia descrita anteriormente.¹² Os ensaios foram realizados nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹, usando nistatina (1 µg mL⁻¹) como controle positivo.

Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase por CCDC

Para avaliação da atividade anticolinesterásica das substâncias **1-4** foi utilizado o método colorimétrico de Ellman em cromatografia em camada delgada.¹³ Os ensaios foram realizados nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 60 µM das substâncias puras, usando galantamina (1 µM) como controle positivo.

Rel. (7R,9S,10R)-3,9-di-hidroxicalameneno (1)

Óleo amarelo claro (3,1 mg); [α]_D²⁵ -79,6 (c 0,25, MeOH); IV (KBr) cm⁻¹: 3442, 1633, 1460. HRESI-MS: m/z 257,1511 [M+Na]⁺, m/z 217,1602 [M-H₂O+H]⁺. Calcd. para C₁₅H₂₂O₂ 217,1592. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 2,65 (q, J = 6,5 Hz, H-10), 3,88 (q, J = 6,5 e 5,5 Hz, H-9), 1,72 (ddd, J = 13,0; 7,0 e 6,5 Hz, H-8), 1,75 (ddd, J = 13,0; 7,0 e 3,0 Hz, H-8), 2,72 (m, H-7), 6,91 (s, H-5), 6,48 (s, H-2), 2,20 (m, H-11), 0,67 (d, J = 6,5 Hz, H-12), 0,95 (d, J = 7,0 Hz, H-13), 1,18 (d, J = 7,0 Hz, H-14), 2,13 (s, H-15). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 41,5 (C-10), 71,2 (C-9), 26,9 (C-8), 39,0 (C-7), 130,4 (C-6), 130,2 (C-5), 39,0 (C-7), 152,0 (C-3), 115,1 (C-2), 138,6 (C-1), 31,3 (C-11), 17,2 (C-12), 21,1 (C-13), 21,4 (C-14), 15,5 (C-15).

Rel. (7R,9R,10R)-3,9-di-hidroxicalameneno (2)

Óleo amarelo claro (2,0 mg); [α]_D²⁵ - 80,5 (c 0,25, MeOH); IV (KBr) cm⁻¹: 3440, 1625, 1460. HRESI-MS: m/z 257,1509 [M+Na]⁺, m/z 273,1239 [M+K]⁺, m/z 217,1593 [M-H₂O+H]⁺. Calcd. para C₁₅H₂₂O₂ 217,1592. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 2,83 (m, H-10), 3,99 (ddd, J = 12,0; 4,5; 4,5 Hz, H-9), 1,58 (m, H-8), 1,70 (m, H-8), 2,80 (m, H-7), 6,93 (s, H-5), 6,43 (s, H-2), 2,35 (m, H-11), 0,98 (d, J = 7,0 Hz, H-12), 0,59 (d, J = 7,0 Hz, H-13), 1,11 (d, J = 7,0 Hz, H-14), 2,13 (s, H-15). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 39,9 (C-10), 70,2 (C-9), 26,0 (C-8), 42,5 (C-7), 130,3 (C-6), 129,5 (C-5), 122,2 (C-4), 151,9 (C-3), 115,2 (C-2), 141,4 (C-1), 31,1 (C-11), 21,0 (C-12), 16,4 (C-13), 15,9 (C-14), 15,9 (C-15).

Rel. (7S,10R)-3-hidroxicalamen-8-ona (3)

Óleo amarelo claro (2,3 mg); [α]_D²⁵ + 9,9 (c 0,25, MeOH); IV (KBr) cm⁻¹: 3448, 1635, 1460. HRESI-MS: m/z 233,1542 [M+H]⁺, m/z 255,1452 [M+Na]⁺, m/z 271,1201 [M+K]⁺. Calcd. para C₁₅H₂₀O₂ 233,1542. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 3,27 (m, H-10), 2,62 (dd, J = 17,5; 5,5 Hz, H-9_A), 2,05 (dd, J = 17,5; 11,5 Hz, H-9_B), 2,91 (d, J = 8,0; Hz, H-7), 6,74 (s, H-5), 6,67 (s, H-2), 2,13 (m, H-11), 0,91 (d, J = 7,0 Hz, H-12), 0,78 (d, J = 6,5 Hz, H-13), 1,24 (d, J = 7,0 Hz, H-14), 2,12 (s, H-15). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 31,0 (C-10), 213,0 (C-8), 62,0 (C-7), 133,0 (C-5), 123,0 (C-4), 153,0 (C-3), 113,0 (C-2), 140,0 (C-10), 32,0 (C-11), 15,1 (C-12), 19,0 (C-13), 21,0 (C-14), 15,5 (C-15).

Aristelegona-A (4)

Óleo amarelo claro (2,3 mg); [α]_D²⁵ + 32,6 (c 0,25, MeOH); IR (KBr) cm⁻¹: 3458, 1652, 1600. HRESI-MS: m/z 191,1131 [M+H]⁺, m/z 213,0954 [M+Na]⁺. Calcd. para C₁₂H₁₄O₂ 191,1073. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 2,47 (ddd, J = 17,0; 8,5; 4,5 Hz, H-2_A), 2,65 (ddd, J = 17,0; 8,0; 4,5 Hz, H-2_B), 1,79 (dddd, J = 13,0; 8,5; 7,5; 4,5 Hz, H-3_A), 2,13 (dddd, J = 13,0; 8,5; 4,5; 4,5 Hz, H-3_B), 2,92 (m, H-4), 6,62 (s, H-5), 7,78 (s, H-8), 2,18 (s, H-9), 1,29 (d, 6,5 Hz, H-10). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ : 197,4 (C-1), 36,3 (C-2), 30,9 (C-3), 32,6 (C-4), 149,5 (C-4a), 112,8 (C-5), 158,7 (C-6), 125,5 (C-7), 130,6 (C-8), 122,5 (C-8a), 15,1 (C-9), 20,6 (C-10).nb

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de IV do sesquiterpeno **1** apresentou bandas em 3442, 1633 e 1460 cm⁻¹, consistentes com a presença de hidroxila e grupo fenólico. O espectro de massas HRESI-MS (+), apresentou o pico base m/z 217,1602 (100%), indicando a formação do aduto [M-H₂O+H]⁺. A massa para [M-H₂O+H]⁺ foi calculada em 217,1593 o que, com auxílio dos espectros de RMN de ¹³C e DEPT (135° e 90°), permitiu propor a fórmula molecular C₁₅H₂₂O₂.

O espectro de RMN de ¹³C, com auxílio do DEPT (135° e 90°) indicou a presença de seis carbonos aromáticos (δ _C 115,1; 121,6; 130,2; 130,4; 138,6 e 152,0), quatro metílicos (δ _C 17,2; 21,1; 21,4 e

15,5), quatro metínicos, sendo um carbinólico (δ_C 41,5; 39,0; 31,3 e 71,2) e um metilênico (δ 26,9).

O espectro de RMN de ^1H de **1** revelou a presença de dois singletos, em δ_H 6,48 (s, 1H) e δ_H 6,91 (s, 1H), orientados *para*, evidenciando um sistema aromático tetrassubstituído, também sugerido por RMN de ^{13}C . Também apresentou uma porção alifática, com três dubletos, em δ_H 1,18 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, δ_C 21,4), δ_H 0,67 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, δ_C 17,2), e δ_H 0,95 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, δ_C 21,1), além de seis sinais em δ_H 2,65 (q; $J = 6,5$ Hz; 1H, δ_C 41,5), δ_H 3,88 (q; $J = 6,5$ Hz; 1H, δ_C 71,2), δ_H 1,72 (ddd, $J = 13,0$; 7,0 e 6,5 Hz, 1H, δ_C 26,9), δ_H 1,75 (ddd, $J = 13,0$; 7,0 e 3,0 Hz, 1H, δ_C 26,9), δ_H 2,72 (m, 1H, δ_C 39,0) e δ_H 2,20 (m, 1H, δ_C 31,3). As correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de gCOSY, entre H-14/H-10, H-10/H-9, H-9/H-8, H-8/H-7, H-7/H-11, H-11/H-12 e H-11/H-13, aliadas às correlações observadas nos mapas de contorno dos experimentos de gHMBC entre H-14 \leftrightarrow C-10/C-9, H-12 e 13 \leftrightarrow C-11/C-7 permitiram propor a unidade alifática para o sesquiterpeno **1**. Com base nas análises dos mapas de contorno do experimento gHMBC, foi possível atribuir todos os hidrogênios aos respectivos carbonos.

As correlações 3J e 2J observadas no experimento gHMBC de H-2 \leftrightarrow C-3/C-1/C-6 e de H-5 \leftrightarrow C-1/C-3/C-15, permitiram posicionar os substituintes no anel aromático, sendo corroborado pela correlação espacial observada em NOESY 1D, entre H-5 e Me-15. Os valores de deslocamento químico observados em RMN de ^{13}C para este padrão de substituição aromático estão de acordo com modelos da literatura.¹⁴

A junção dos anéis entre C-10 e C-1 foi realizada mediante as correlações observadas no experimento de HMBC entre H-14 \leftrightarrow C-1 e a correlação espacial de H-2 (δ_H 6,48) com δ_H 1,18 (Me-14) e com δ_H 2,65 (H-10), no experimento NOESY. A ciclização do anel alifático foi efetuada pela correlação entre H-5 \leftrightarrow C-7 por HMBC e, também, através da correlação espacial entre H-5 e H-7, observada por NOESY.

A estereoquímica relativa de **1** foi estabelecida com base nas interações observadas em NOESY entre H-14 (δ_H 1,18) com H-13 (δ_H 0,95) e H-12 (δ_H 0,65), colocando H-14 e o grupo isopropil em uma relação *cis*.

A configuração relativa de C-9 foi realizada por HOMODEC, onde irradiação em H-10 mostrou H-9 como um duplo dubleto largo em δ_H 3,88 ($J_{9\text{eq},8\text{ax}}$ 3,0 Hz e $J_{9\text{eq},8\text{eq}}$ 2,5 Hz). Estas observações foram confirmadas por NOESY utilizando $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, sendo observada a interação entre H-12 e H-11 com H-9, colocando-os em uma relação 1,3 *pseudo* diaxial (*cis*) e permitindo estabelecer a estereoquímica relativa de **1**. Esta é uma nova substância denominada *Rel.*(-)-(7*R*,9*S*,10*R*)-3,9-di-hidroxicalameneno, estereoisômero de *Rel.* (7*R*,9*S*,10*S*)-3,9-di-hidroxicalameneno isolado de *Heterotheca subaxiliaris*.¹⁵

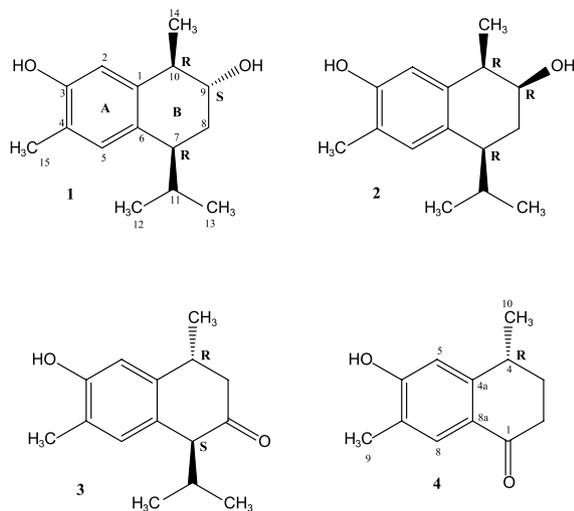


Figura 1. Substâncias produzidas por *Phomopsis cassiae*

O espectro de massas de 3,9-di-hidroxicalameneno (**2**) HRESI-MS (+) apresentou o pico base m/z 217,1593 (100%), indicando a formação do aduto $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. A massa para $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ foi calculada em 217,15924, o que com auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (90°, 135°) permitiu confirmar a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$.

As análises dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHMBC e gCOSY indicaram que **2** possui a mesma estrutura planar que **1**. A estereoquímica relativa de **2** foi determinada através do experimento NOESY em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, sendo observadas interações H-14 e H-12, permitindo posicioná-los, assim como **1**, em uma relação *cis*. A estereoquímica relativa de H-9 foi definida com base nas constantes de acoplamento entre H-9 e H-10/H-8, onde se verificou um duplo tripleto em δ 3,99 ($J_{9\text{ax},8\text{ax}}$ 12,0 Hz; $J_{9\text{ax},8\text{eq}}$ 4,5 Hz; $J_{9\text{ax},10\text{eq}}$ 4,5 Hz), estabelecendo a configuração entre H-9 e H_3C -14. A substância **2**, *Rel.*(-)-(7*R*,9*R*,10*R*)-3,9-di-hidroxicalameneno é um sesquiterpeno inédito na literatura, também estereoisômero de *Rel.* (7*R*,9*S*,10*S*)-di-hidroxicalameneno, isolado de *Heterotheca subaxiliaris*.¹⁵

A estrutura da substância **3** foi definida com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com valores descritos na literatura.¹⁶ A substância **3** foi isolada como um óleo amarelo claro (2,3 mg); $[\alpha]_D^{25} + 9,9$ (c 0,25, MeOH). Submetida à espectrometria de massas HRESI-MS (-) apresentou o pico base m/z 233,1542 (100%) relativo à formação do aduto $[\text{M}+\text{H}]^+$.

As análises dos dados de RMN de ^1H , HMBC, HMBC e COSY de **3** evidenciaram uma grande semelhança com **1** e **2**, sugerindo tratem-se de análogos. A ausência de H-8 carbinólico em δ_H 3,99 (δ_C 71,4) e a presença de uma carbonila em δ_C 213,0 evidenciaram uma diferenciação estrutural. O posicionamento da carbonila em C-8 foi definido pela análise dos dados de COSY e HMBC. No primeiro, foram visualizadas as correlações de H-10 \leftrightarrow H-9/H-14, H-12 \leftrightarrow H-11/H-13, H-11 \leftrightarrow H-7/H-12/H-13, que aliadas às observadas em gHMBC de H-10 \leftrightarrow C-9/C-8, H-11/C-8 permitiram o posicionamento inequívoco da carbonila em C-8. Esta constatação foi corroborada pela observação dos duplos dubletos em δ_H 2,62 (dd; $J = 17,5$; 5,5 Hz; 1H) e δ_H 2,05 (dd; $J = 17,5$; 11,5 Hz; 1H), atribuídos a H-9_{ax} e H-9_{eq}, em posição vicinal a H-10.

A configuração relativa de **3** foi definida após avaliação dos experimentos de NOESY, onde se observou uma forte correlação entre H-10 e H_3C -11, permitindo posicionar o grupo isopropil em relação *trans* a H_3C -14. Esta substância foi identificada como *Rel.* (+)-(7*S*,10*R*)-3-hidroxicalamen-8-ona (**3**), previamente isolada do coral australiano *Lemnalina cervicornis*.¹⁶

A estrutura da substância **4** foi definida com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com valores descritos na literatura.¹⁷ Esta foi isolada como um óleo amarelo claro (2,3 mg) e $[\alpha]_D^{25} + 32,6$ (c 0,25, MeOH). Submetida à espectrometria de massas HRESI-MS (+) apresentou o pico base m/z 191,10728 (100%) relativo à formação do aduto $[\text{M}+\text{H}]^+$.

O espectro de RMN de ^1H de **4** apresentou dois singletos em δ_H 6,62 (s; 1H) e δ_H 7,78 (s, 1H), sugerindo um anel aromático tetrassubstituído, com dois hidrogênios orientados *para* e um singlete em 2,18 (s, 3H), atribuído a uma metila aromática. Foram visualizados também dois duplos duplos dubletos em δ_H 2,47 (ddd; $J = 17,0$; 8,5 e 4,5 Hz; 1H) e δ_H 2,65 (ddd; $J = 17,0$; 8,0 e 4,5 Hz; 1H), atribuídos aos hidrogênios geminais H-2. Na região alifática, foram observados um duplete em δ_H 1,29 (d; $J = 6,5$ Hz; 3H), um multiplete em δ_H 2,92 (m, 1H) e dois sinais em δ_H 2,13 (dddd; $J = 13,0$; 8,5; 7,5 e 4,5 Hz, 1H) e δ_H 1,79 (dddd; $J = 13,0$; 8,5; 4,5 e 4,5 Hz 1H), atribuídos a H_3C -10, H-4 e aos hidrogênios diastereotópicos H-3.

O espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de seis carbonos aromáticos, um metílico aromático e outro alifático, um metínico benzílico, dois metilênicos e um carbonílico, confirmando a

aromaticidade de **4**. Com base na análise do mapa de contorno do experimento gHMQC foi possível atribuir os átomos de hidrogênios aos respectivos carbonos.

As correlações ^1H - ^1H observadas no experimento COSY entre H-10/H-4 e H-2/H-3, juntamente com as correlações observadas no experimento gHMBC entre H-2 \leftrightarrow C-1/C-3/C-4, H-4 \leftrightarrow C-4a, H-5 \leftrightarrow C-4/C-6/C-7/C-8a, H-8 \leftrightarrow C-6/C-9/C-1, H-9 \leftrightarrow C-6/C-7/C-8/C-8^a e H-10 \leftrightarrow C-3/C-4, permitiram a confirmação dos valores atribuídos aos carbonos e estabelecer a estrutura planar, identificando a substância **4** como a tetralona aristelegona-A, isolada de *Aristolochia elegans*.¹⁷

As substâncias **1-4** foram submetidas a ensaio para avaliação das atividades antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e anticolinesterásica. Os resultados dos limites de detecção das substâncias **1-4** estão apresentados na Tabela 1. Este é o primeiro relato do potencial antifúngico e anticolinesterásico demonstrado por estas substâncias.

Tabela 1. Valores dos limites de detecção (μg) obtidos para os ensaios contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e da avaliação da atividade anticolinesterásica

Substâncias	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	Enzima AChE
1	5	5	3
2	5	5	3
3	5	5	3
4	5	5	3
galantamina	–	–	1
nistatina	1	1	–

CONCLUSÃO

As substâncias 3-hidroxicalamen-8-ona (**3**) e aristelegona (**4**) são descritas do coral australiano *Lemnalina cervicornis*¹⁶ e das raízes e talos de *Aristolochia elegans*,¹⁷ sendo este o primeiro relato da produção destes metabólitos por fungos.

As atividades antifúngica e anticolinesterásica apresentadas pelas substâncias **1-4** reforçam as ressalvas que fungos endofíticos são prolíficos produtores de metabólitos bioativos, além de sugerirem uma possível relação de simbiose entre a espécie hospedeira *Cassia spectabilis* e o fungo endofítico *Phomopsis cassiae*, este produzindo substâncias bioativas contra possíveis fitopatógenos.

P. cassiae é um fungo endofítico que tem sido objeto de estudo pelo nosso grupo de pesquisa apresentando resultados excelentes: quando cultivado em meio líquido MDB, produziu sesquiterpenos da classe dos cadalenos, calamenenos¹⁰ e policetídeos,⁷ todos inéditos, com atividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e citotoxicidade contra a linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa). Este é o primeiro relato do cultivo deste endófito em extrato de malte e os resultados alcançados reforçam as observações que a produção metabólica dos micro-organismos é dependente do meio de cultivo. Com este trabalho

queremos evidenciar a urgente necessidade no estudo deste nicho de micro-organismos, considerando a crescente taxa de extinção de espécies vegetais brasileiras.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, em arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, programa Biota-FAPESP (Instituto Virtual da Biodiversidade, www.biota.org) pelo auxílio financeiro, à CAPES pela bolsa concedida a H. L. Teles e ao CNPq pelas bolsas concedidas a L. M. Zanardi, G. H. Silva, V. da S. Bolzani e M. C. M. Young.

REFERÊNCIAS

- Kharwar, R. N.; Mishra, A.; Gond, S. K.; Stierle, A.; Stierle, D.; *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1208.
- Souvik, K. S.; Spitteller, M.; *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1203.
- Aly, A. M.; Debbab, A.; Proksch, P.; *Appl Microbiol Biotechnol.* **2011**, 90, 1829.
- Gunatilaka, A. A. L.; *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 509.
- Strobel, G. A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J.; *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 257.
- Tan, R. X.; Zou, W. X.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 448.
- Silva, G. H.; Teles, H. L.; Trevisan, H. C.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; Eberlin, M. N.; Haddad, R.; Costa Neto, C.; Bolzani, V. S.; Araújo, A. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 1463.
- Teles, H. L.; Silva, G. H.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Pereira, J. O.; Costa Neto, C.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Young, M. C. M.; Araújo, A. R.; *Phytochemistry* **2005**, 66, 2363.
- Cafêu, M. C.; Silva, G. H.; Teles, H. L.; Bolzani, V. S.; Araújo, A. R.; Young, M. C.M.; Pfenning, L. H.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 991.
- Silva, G. H.; Teles, H. L.; Zanardi, L. M.; Young, M. C.M.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Pfenning, L. H.; Claudio Costa-Neto, C. M.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. da S.; Araújo, A. R.; *Phytochemistry* **2006**, 67, 1964.
- Inácio, M. L.; Silva, G. H.; Teles, H. L.; Trevisan, H. C.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. da S.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; Araújo, A. R.; *Biochem. System. Ecol.* **2006**, 34, 822.
- Rhalison, L.; Hamburger, M.; Hostettmann, K.; Monod, M.; Frenk, E.; *Phytochem. Anal.* **1991**, 5, 199.
- Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K.; *Phytochem. Anal.* **2002**, 13, 51.
- Nabeta, K.; Katayama, K.; Nakagawara, S.; Katoh, K.; *Phytochemistry* **1993**, 32, 117.
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; *Phytochemistry* **1979**, 18, 1185.
- Bowden, B. F.; Coll, J. C.; Engelhardt, L. M.; Tapiolas, D. M.; White, A. H.; *Aust. J. Chem.* **1986**, 39, 103.
- Wu, T.S.; Tsai, Y. L.; Damu, A. G.; Kuo, P. C.; Wu, P. L.; *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1522.

SESQUITERPENOS PRODUZIDOS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Phomopsis cassiae* COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INIBIDORA DE ACETILCOLINESTERASE*

Lisinéia M. Zanardi, Vanderlan da S. Bolzani, Alberto J. Cavalheiro, Dulce H. Siqueira Silva, Henrique C. Trevisan† e Angela R. Araujo*

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara – SP, Brasil

Geraldo H. Silva

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 Aracajú – SE, Brasil

Helder L. Teles

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Mato Grosso, 78735-901 Rondonópolis – MT, Brasil

Maria Cláudia M. Young

Secção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970 São Paulo – SP, Brasil

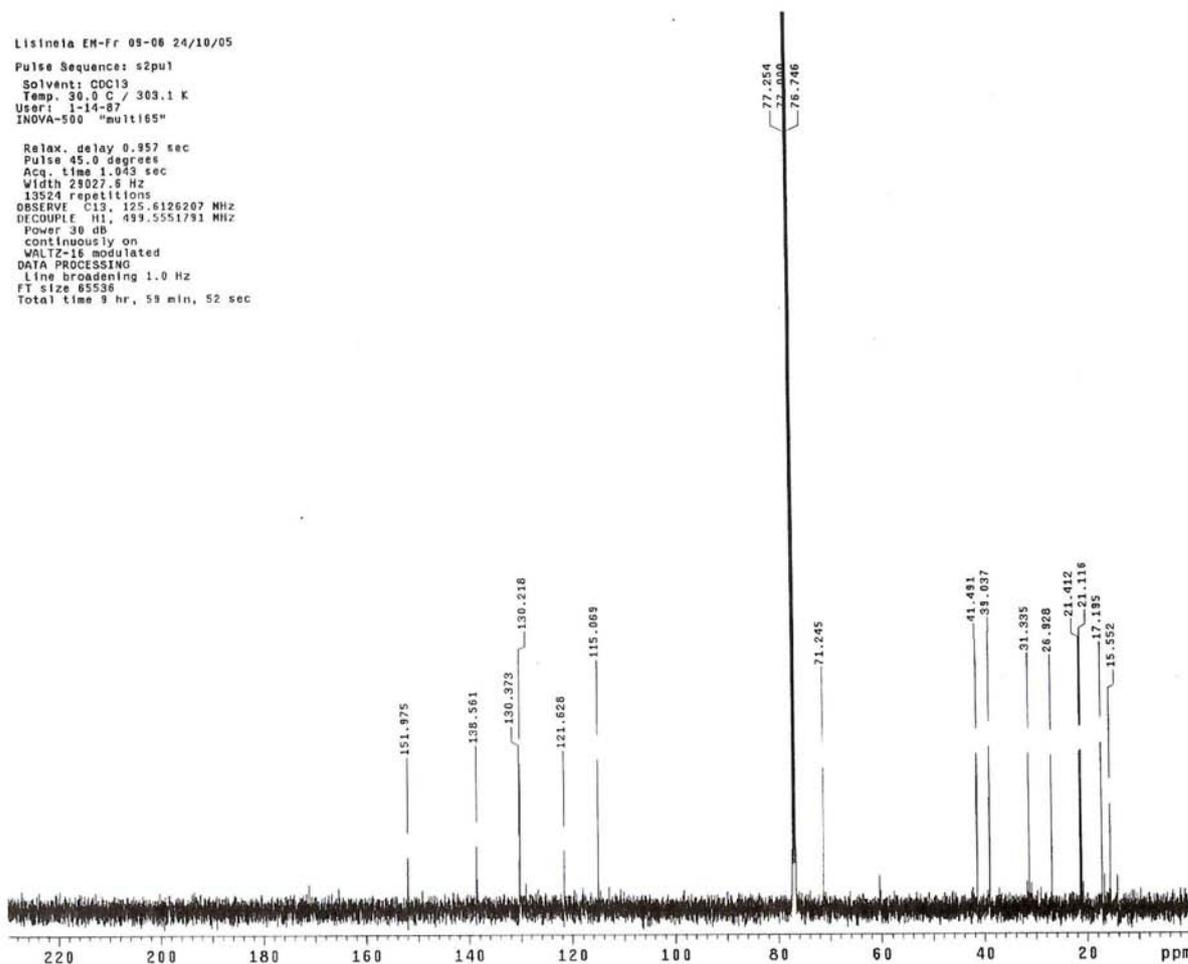


Figura 1S. Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (CDCl_3 , 125 MHz)

*e-mail: araujoar@iq.unesp.br

†In Memoriam

#Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

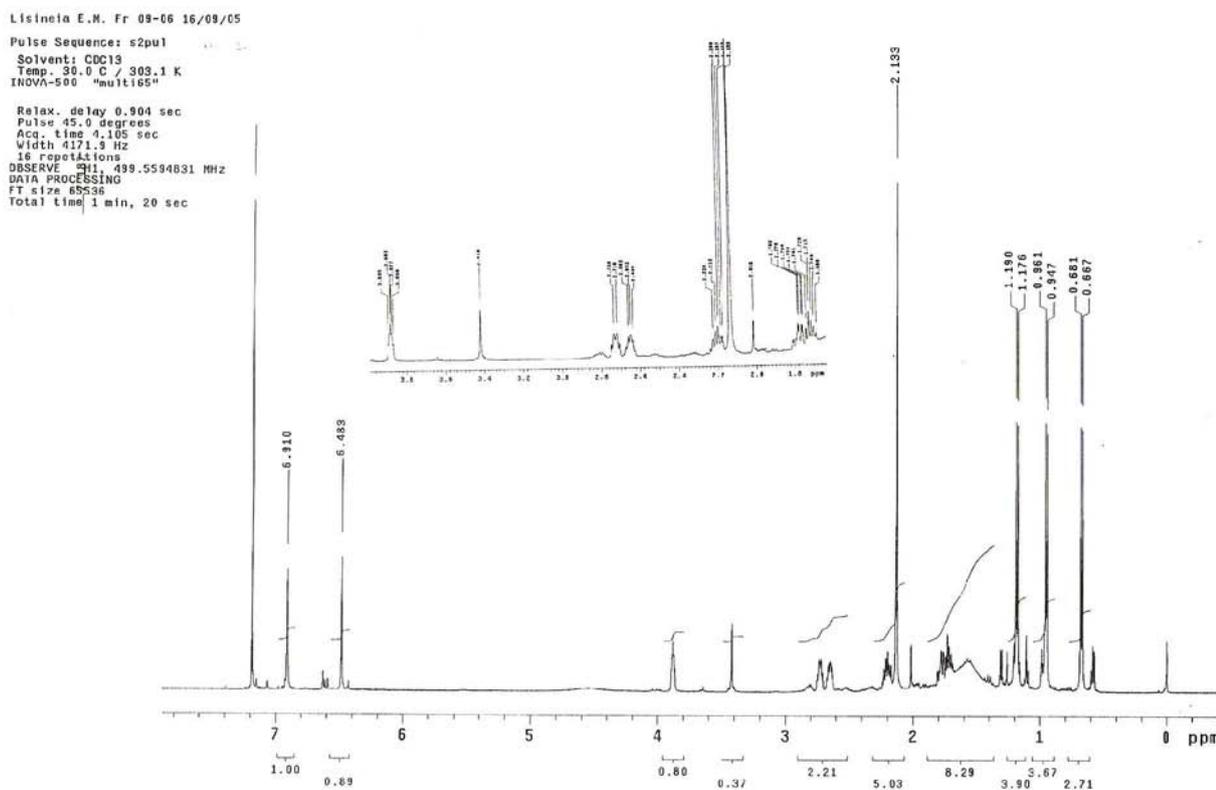


Figura 2S. Espectro de RMN de ^1H de **1** (CDCl_3 , 500 MHz)

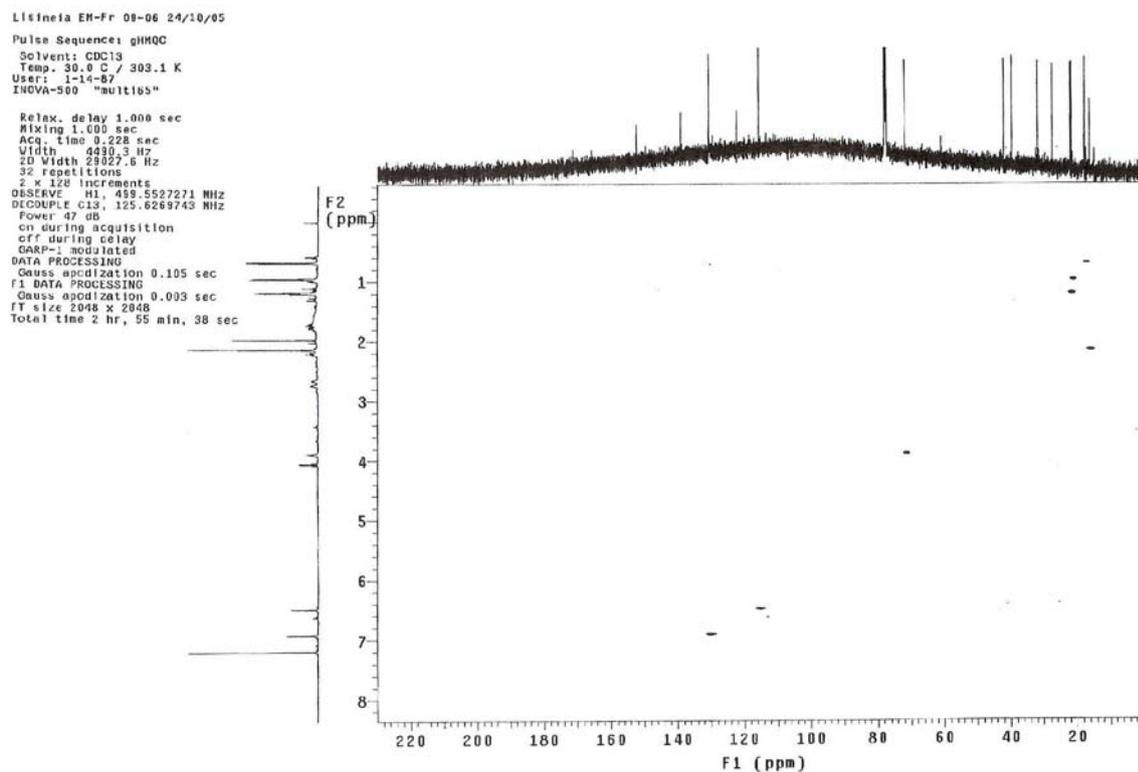


Figura 3S. Mapa de contorno de gHMOC de **1** (CDCl_3 , 125 MHz)

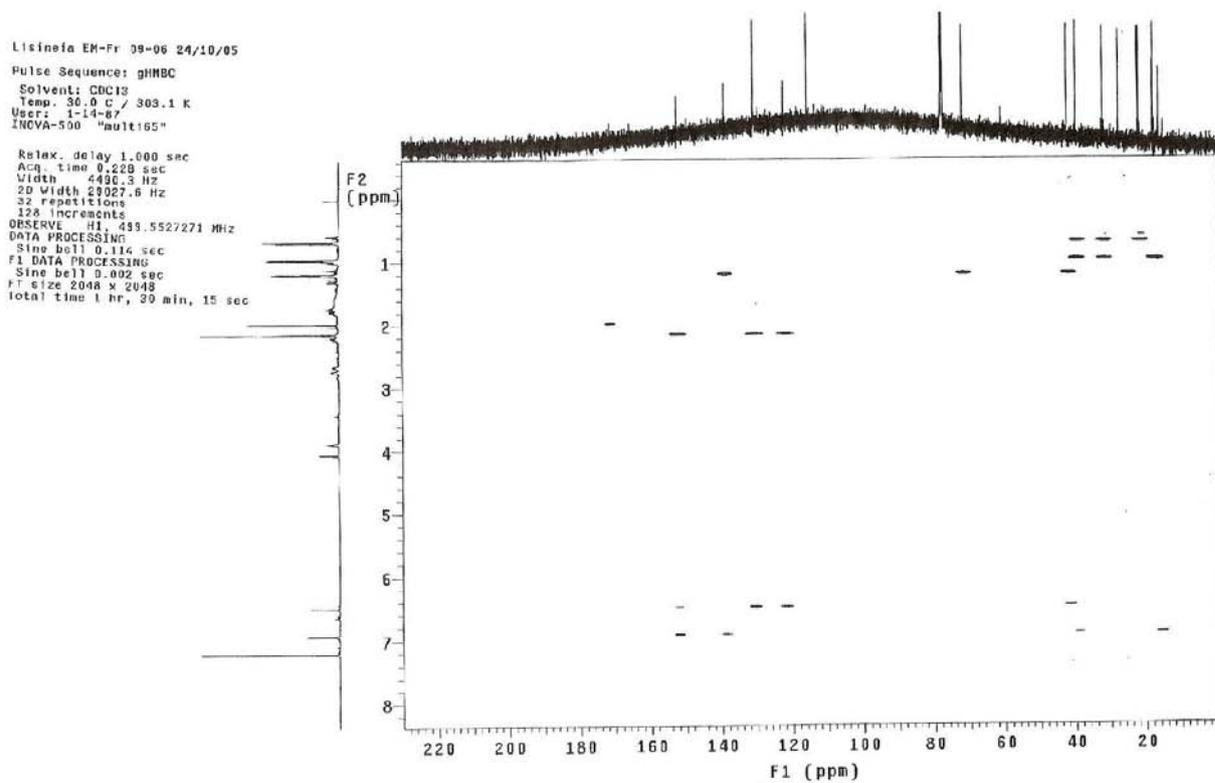
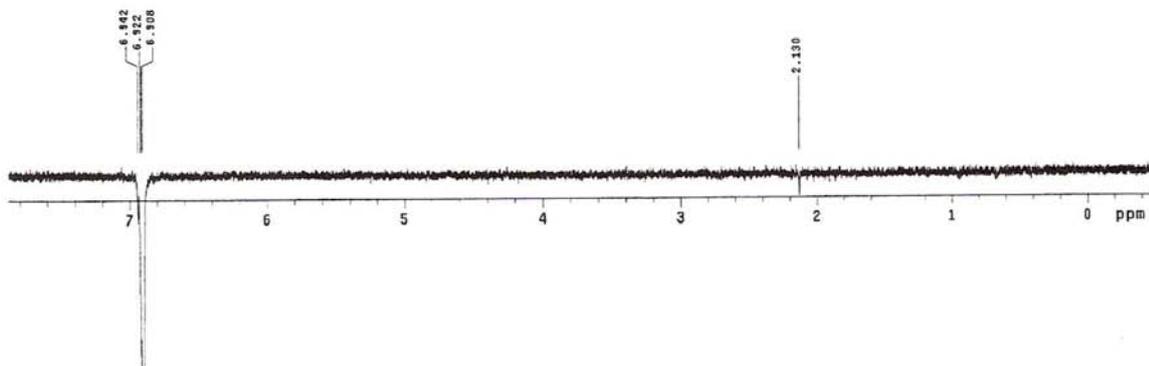


Figura 4S. Mapa de contorno de gHMBC de 1 (CDCl₃, 125 MHz)

Lisinelã EM Fr 09-06 28/09/05
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: CDCl3
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "mult165"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.105 sec
 Width 4171.8 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE H1: 499.5527262 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 6 min, 52 sec



Lisinelã EM Fr 09-06 28/09/05
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: CDCl3
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "mult165"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.105 sec
 Width 4171.8 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE H1: 499.5527262 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 6 min, 51 sec

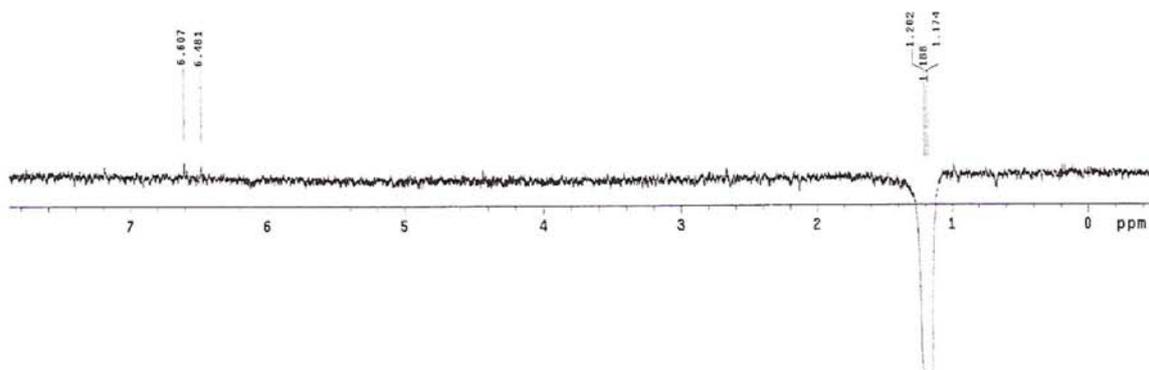


Figura 5S. Espectro de NOESY 1D de **1** (CDCl₃, 500 MHz), hidrogênios irradiados: a) H-6, δ_H 6,91; b) H-14, δ_H 1,18

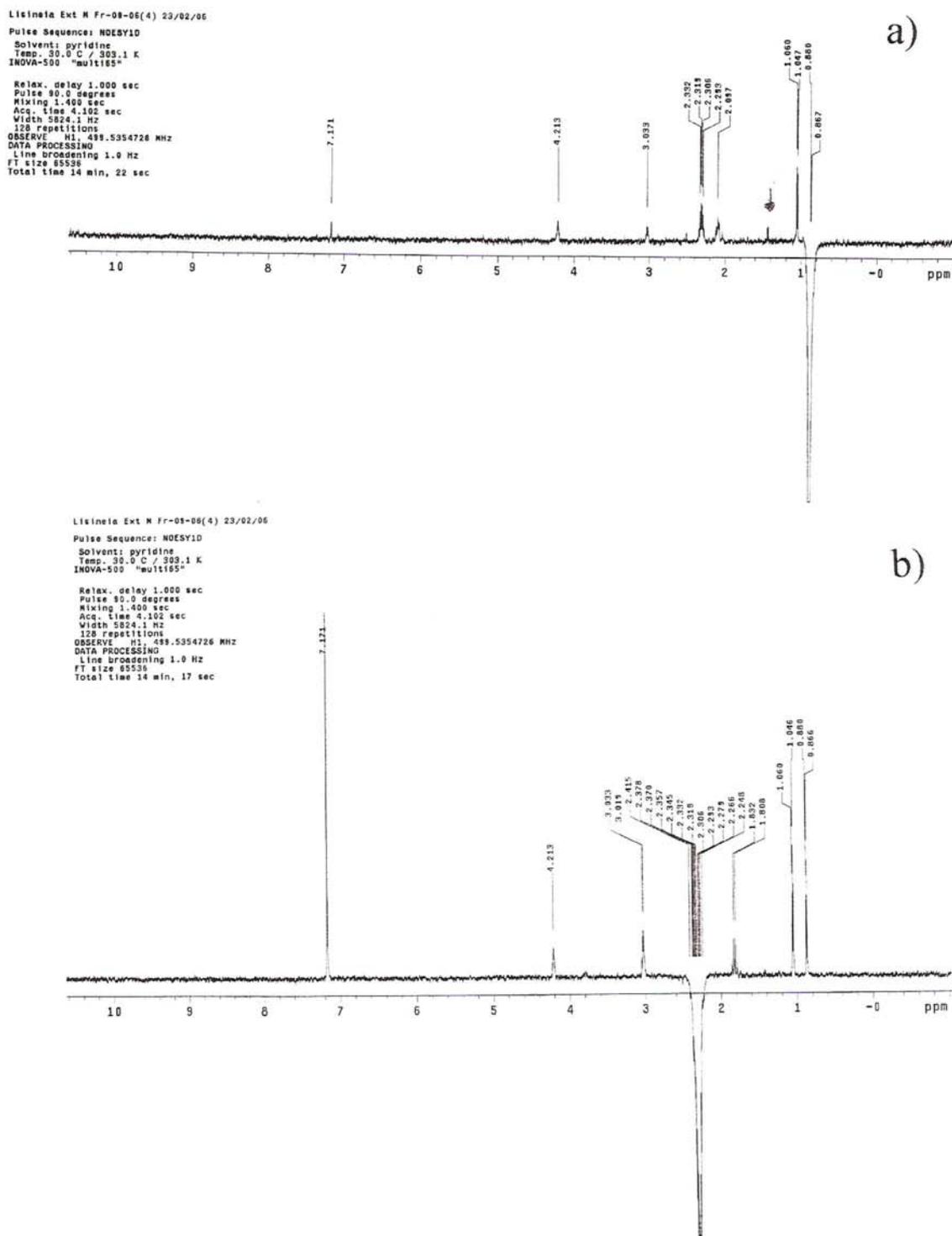


Figura 6S. Espectro de NOESY 1D de **1** (C_3D_3N , 500 MHz), hidrogênios irradiados: a) H-12, δ_H 0,87; b) H-11, δ_H 2,32

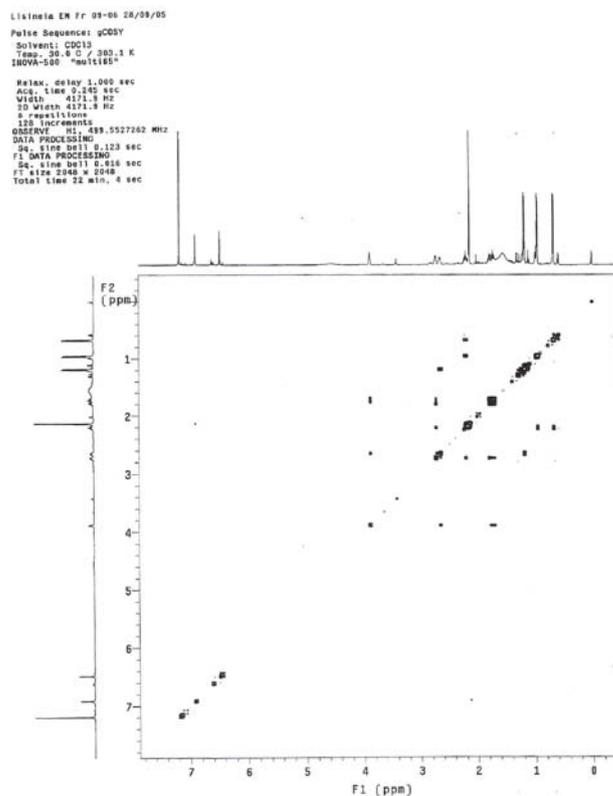


Figura 7S. Espectro de gCOSY de **1** (CDCl_3 , 500MHz)

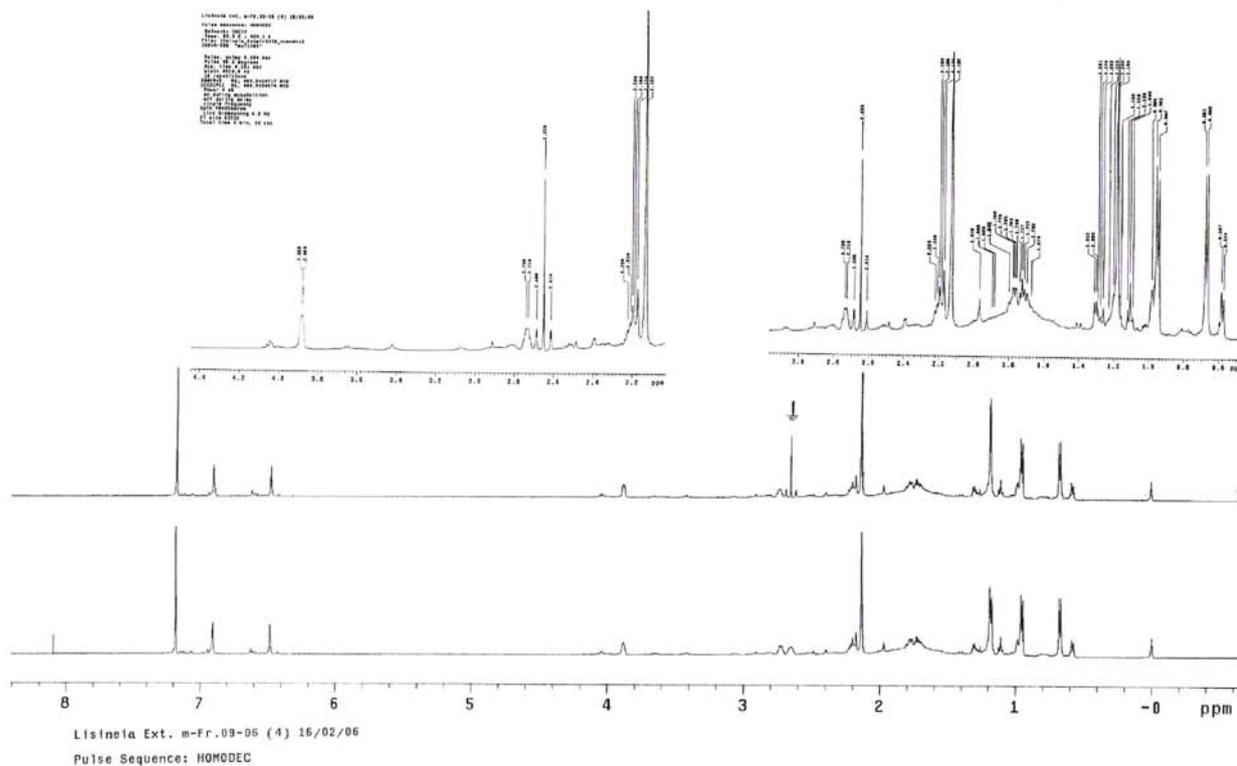


Figura 8S. Espectro de HOMODEC de **1** (CDCl_3 , 500MHz), hidrogênios irradiados H-1, δ_H 2,65

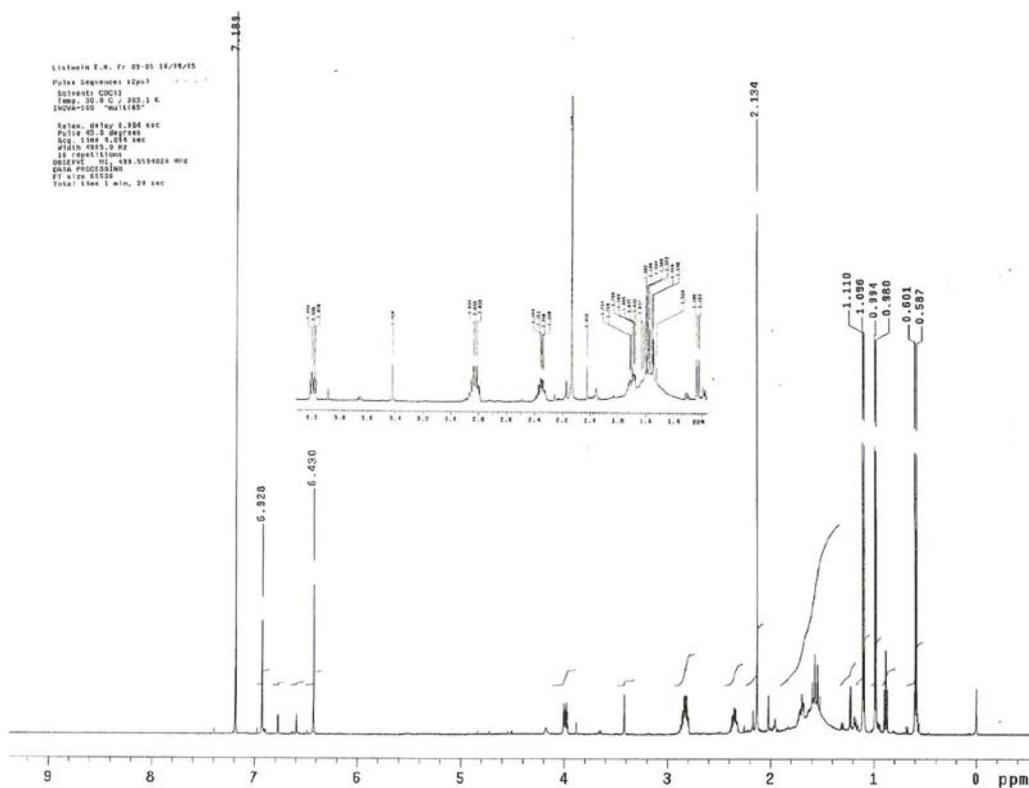


Figura 9S. Espectro de RMN de ¹H de 2 (CDCl₃, 500 MHz)

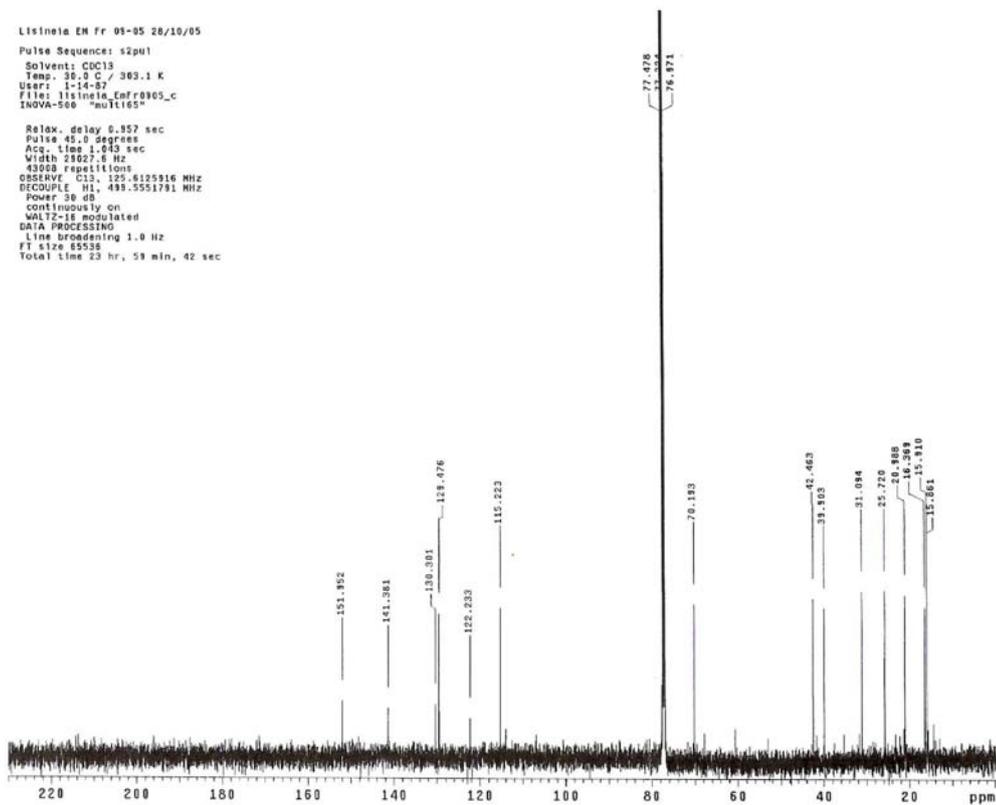


Figura 10S. Espectro de RMN de ¹³C de 2 (CDCl₃, 125 MHz)

Lisínia EM Fr 09-05 28/10/05
 Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: CDCl₃
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 File: lisínia_emfr0905_ghmhc
 INOVA-500 "multis9"

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.238 sec
 Width 4373.5 Hz
 2D Width 29027.6 Hz
 32 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 499.5527271 MHz
 DECOUPLE C13, 125.6269743 MHz
 Power 47 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GMRP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.108 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.003 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 2 hr, 56 min, 28 sec

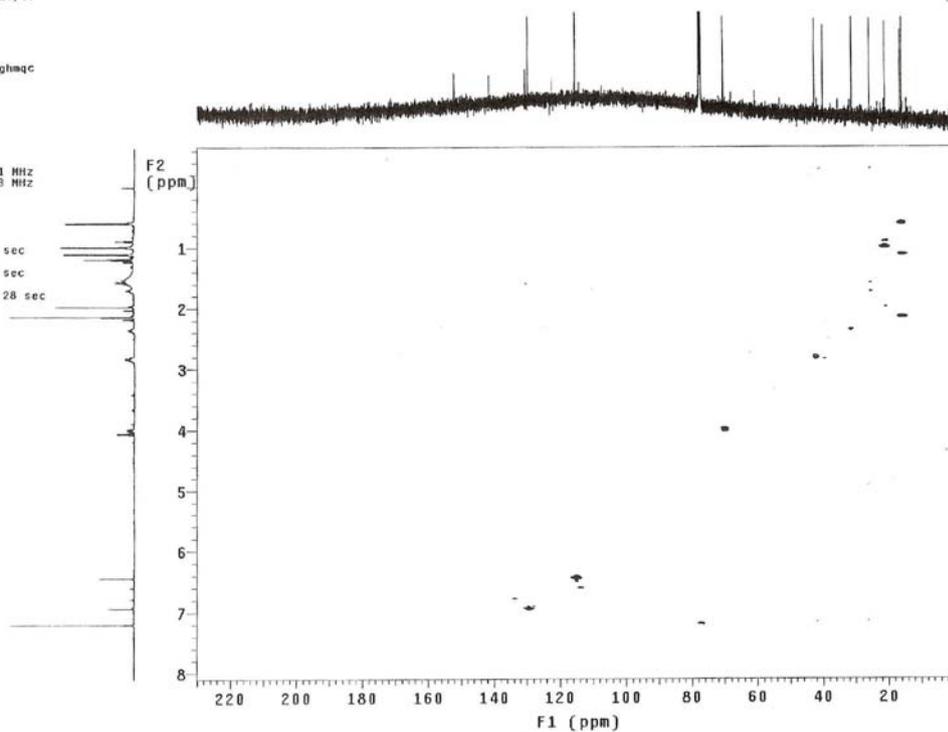


Figura 11S. Mapa de contorno de gHMBC de 2 (CDCl₃, 125 MHz)

Lisínia EM Fr 09-05 28/10/05
 Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: CDCl₃
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 File: lisínia_emfr0905_ghmhc
 INOVA-500 "multis9"

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.238 sec
 Width 4373.5 Hz
 2D Width 29027.6 Hz
 64 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1, 499.5527271 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.117 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.002 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 3 hr, 40 sec

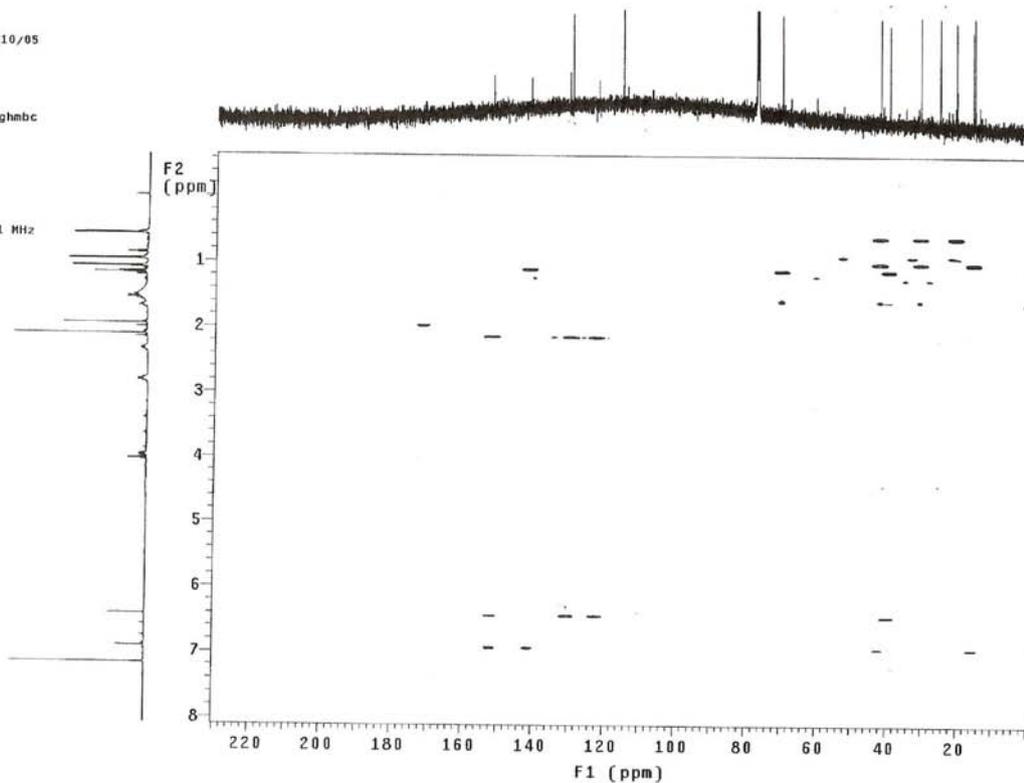


Figura 12S. Mapa de contorno de gHMBC de 2 (CDCl₃, 125 MHz)

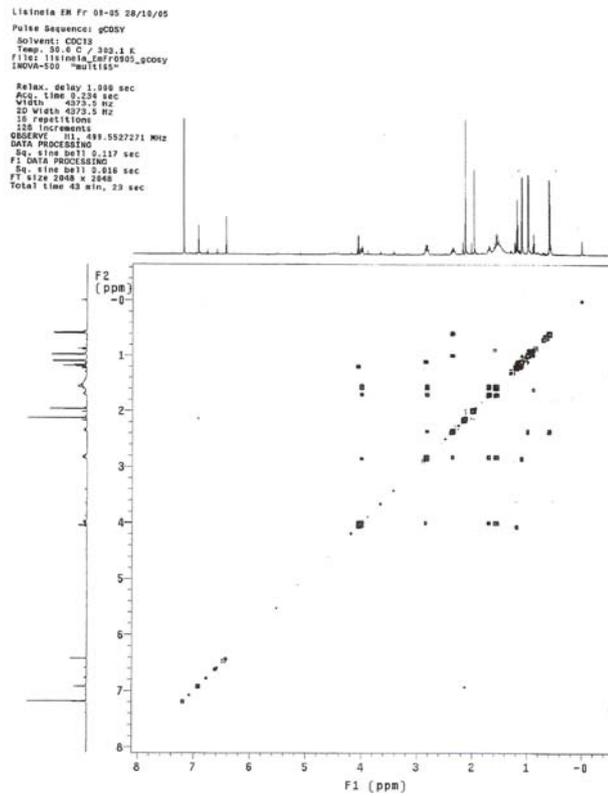


Figura 13S. Espectro de gCOSY de 2 (CDCl_3 , 500MHz)

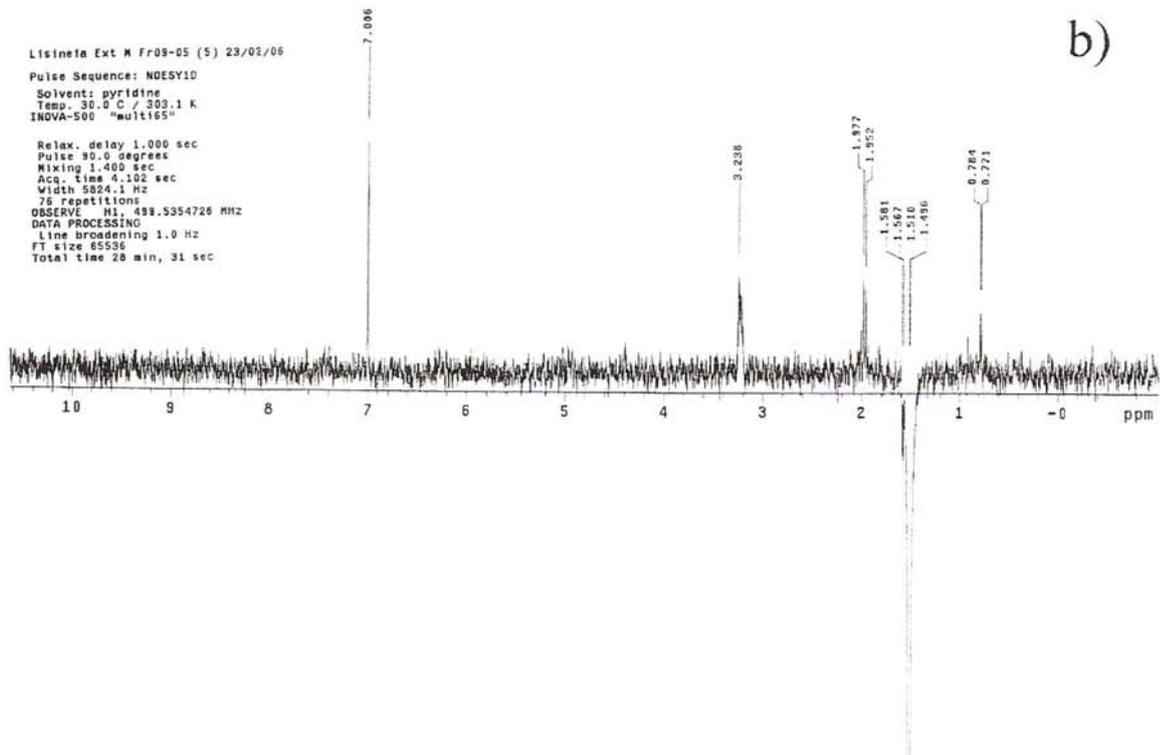
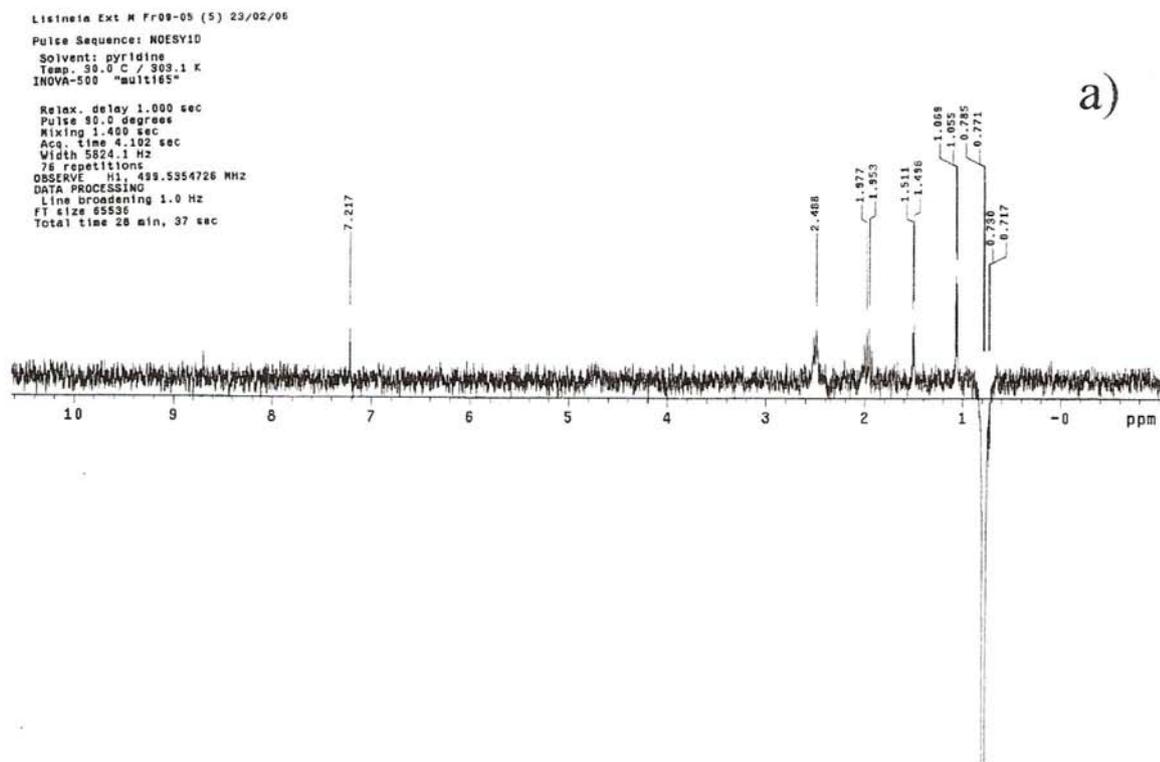


Figura 14S. Espectro de NOESY 1D de 2 (C_5D_5N , 500 MHz), hidrogênios irradiados: a) H-13, δ_H 0,75; b) H-14, δ_H 1,54

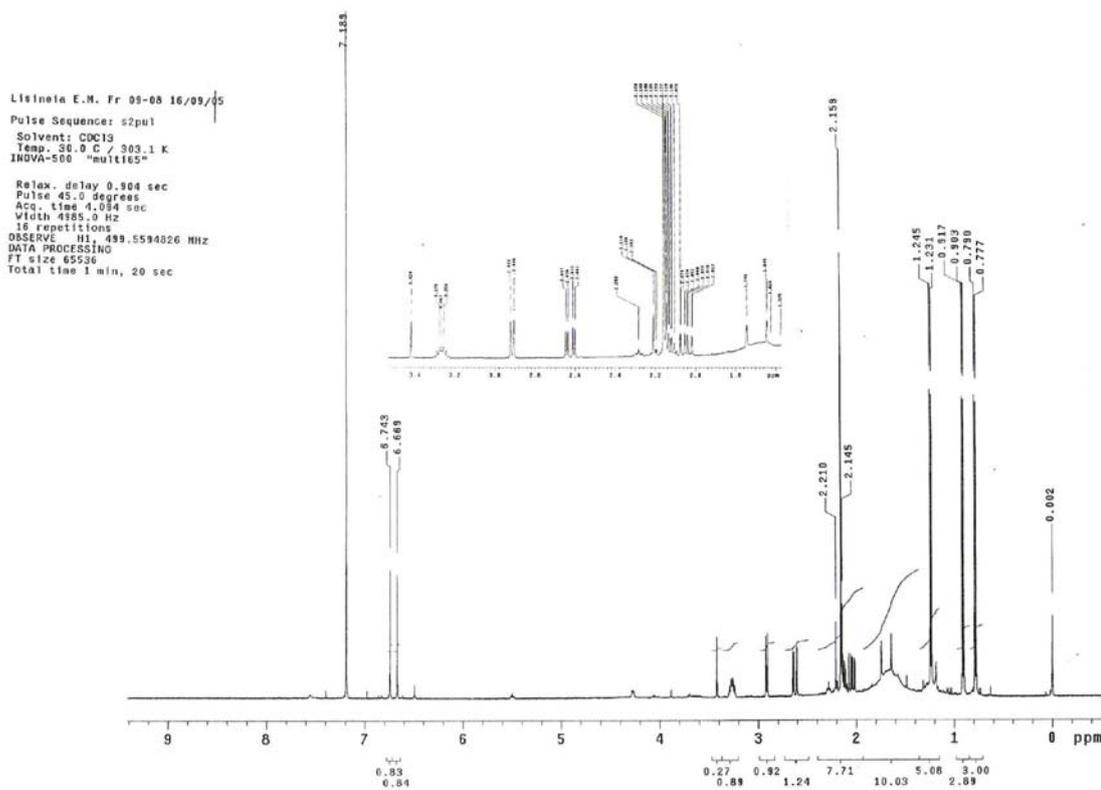


Figura 15S. Espectro de RMN de ¹H de 3 (CDCl₃, 500 MHz)

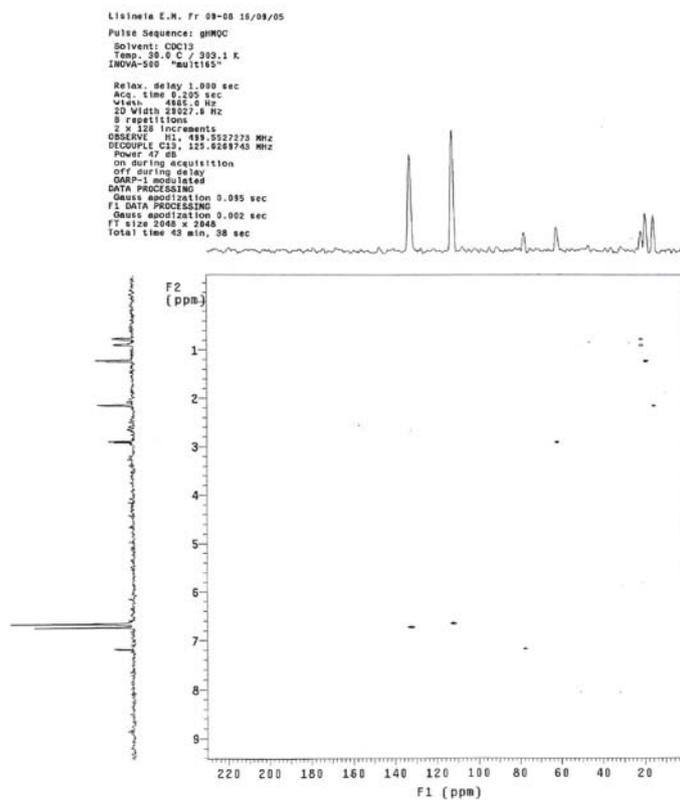


Figura 16S. Mapa de contorno de gHMOC de 3 (CDCl₃, 125 MHz)

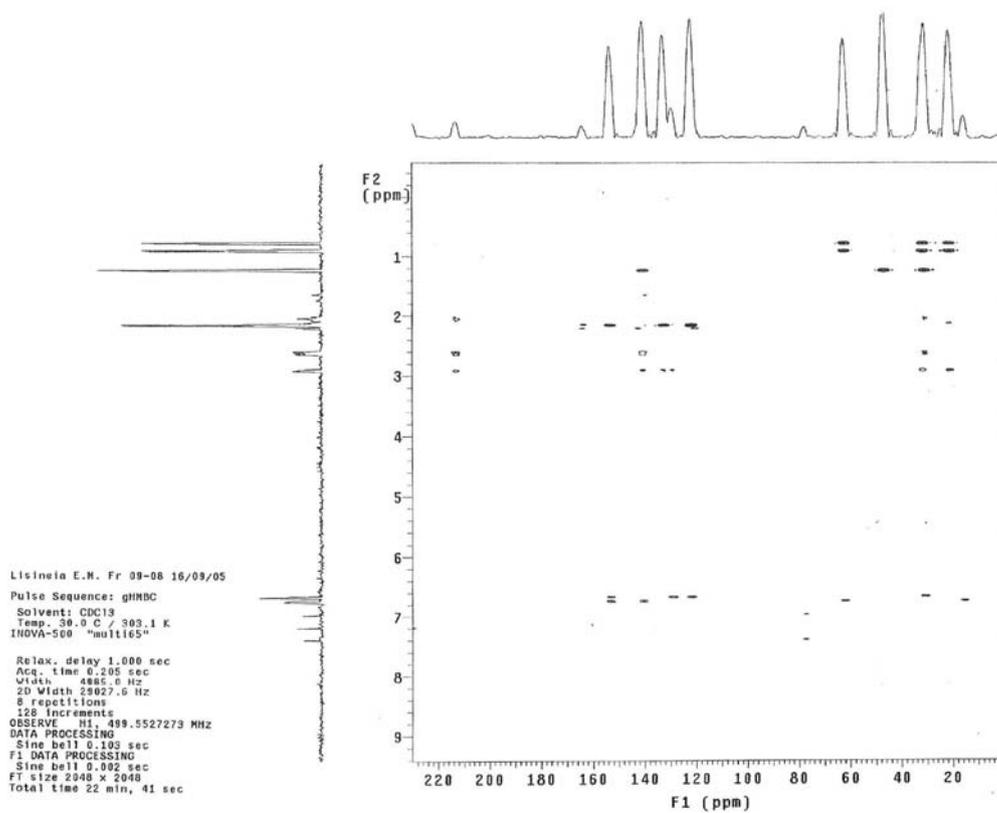


Figura 17S. Mapa de contorno de gHMBC de 3 (CDCl₃, 125 MHz)

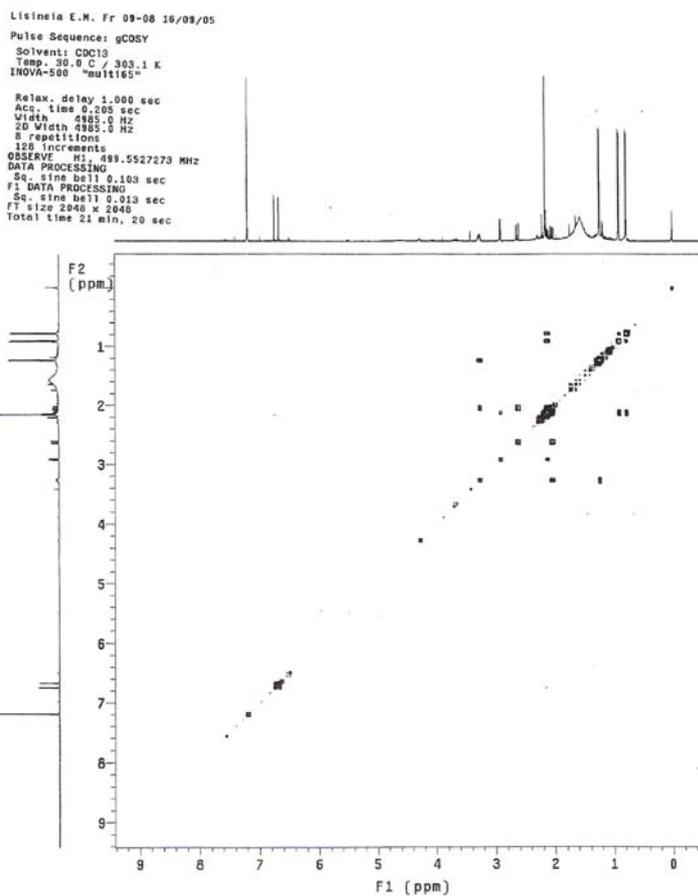


Figura 18S. Espectro de gCOSY de 3 (CDCl₃, 500MHz)

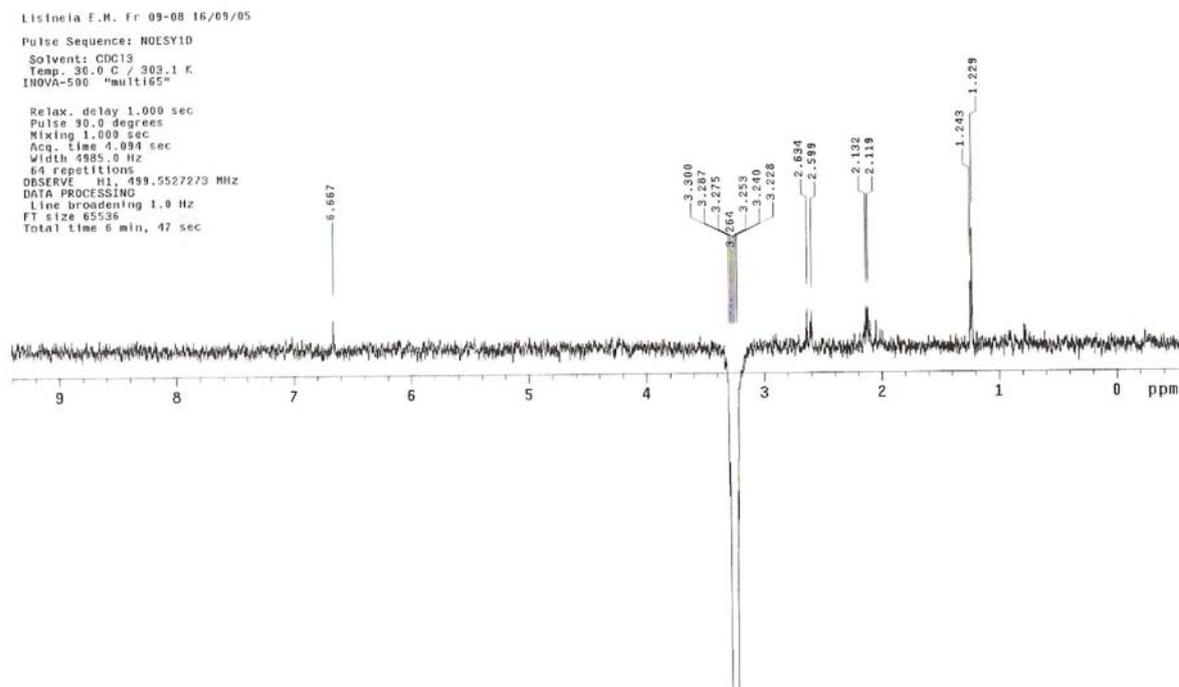


Figura 19S. Espectro de NOESY 1D de **3** (CDCl₃, 500 MHz), Irradiação do H-1, δ_{H} 3,27

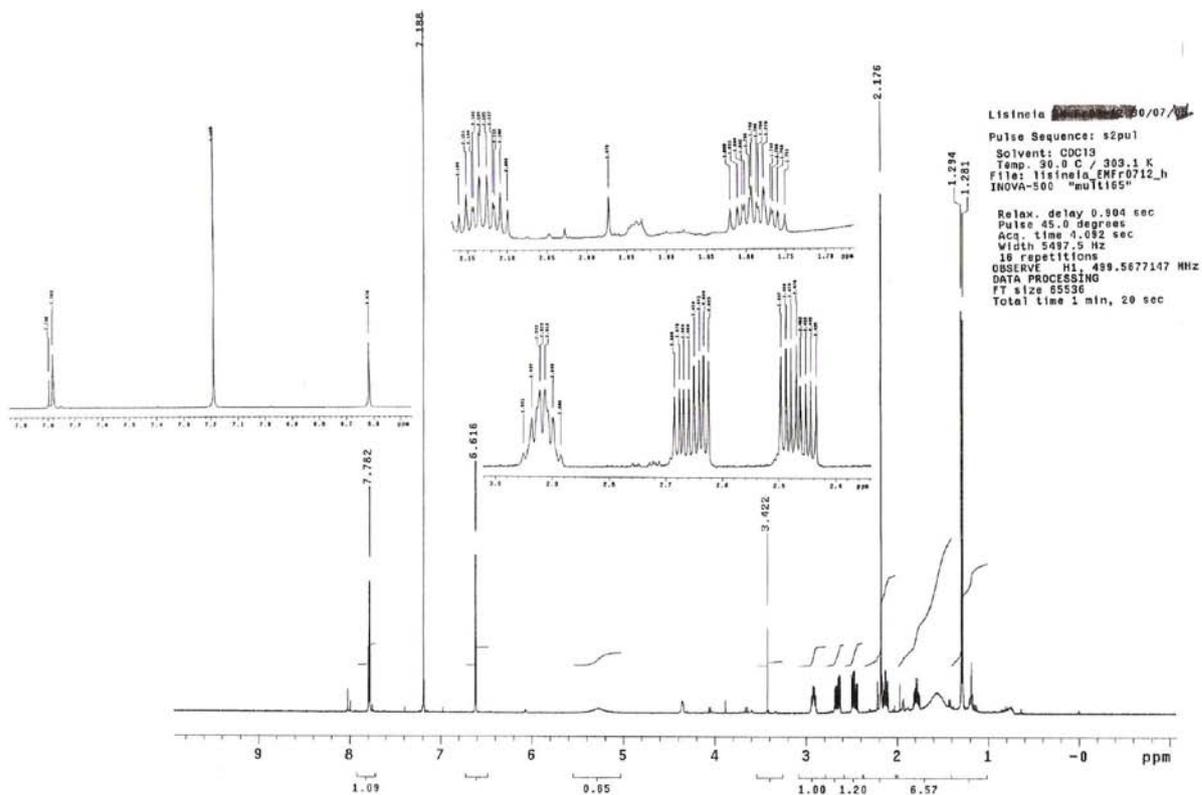


Figura 20S. Espectro de RMN de ¹H de **4** (CDCl₃, 500 MHz)

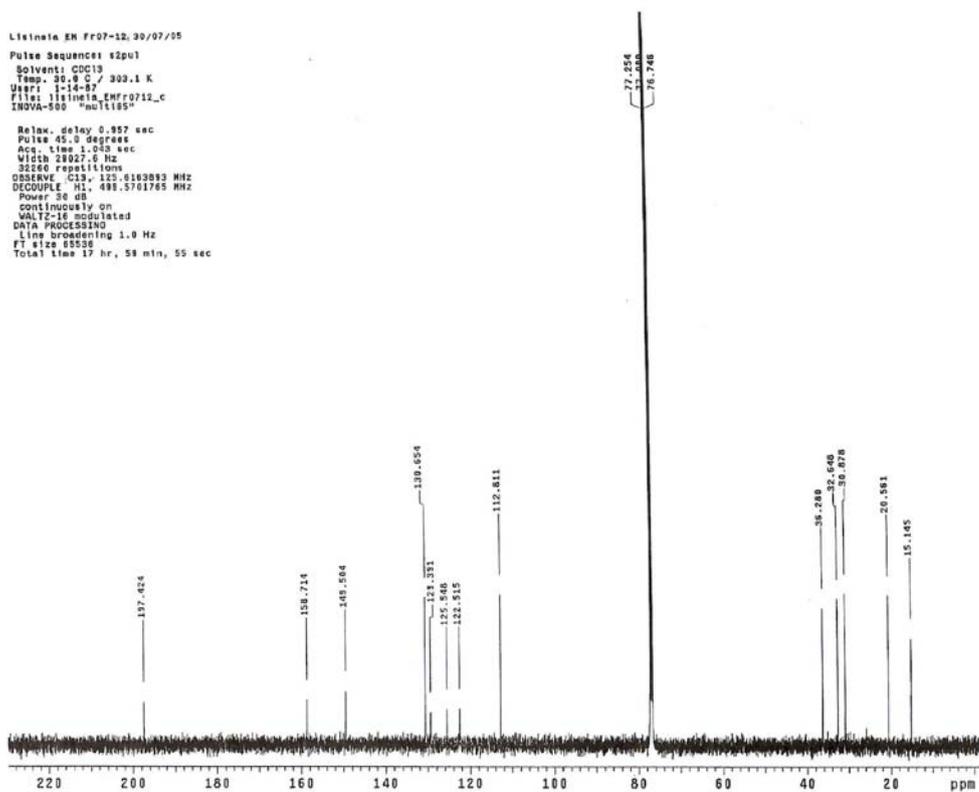


Figura 21S. Espectro de RMN de ^{13}C de **4** (CDCl_3 , 125 MHz)

Lisineia EM Fr07-12 30/07/05
 Pulse Sequence: gHMOC
 Solvent: CDCl3
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-07
 File: lisineia_EMFr0712_gHMQC
 INOVA-500 "mult165"

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.186 sec
 Width 5497.5 Hz
 2D Width 24927.6 Hz
 32 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 499.5677147 MHz
 DECOUPLE C13, 125.8307458 MHz
 Power 47 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.085 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.002 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 2 hr, 49 min, 54 sec

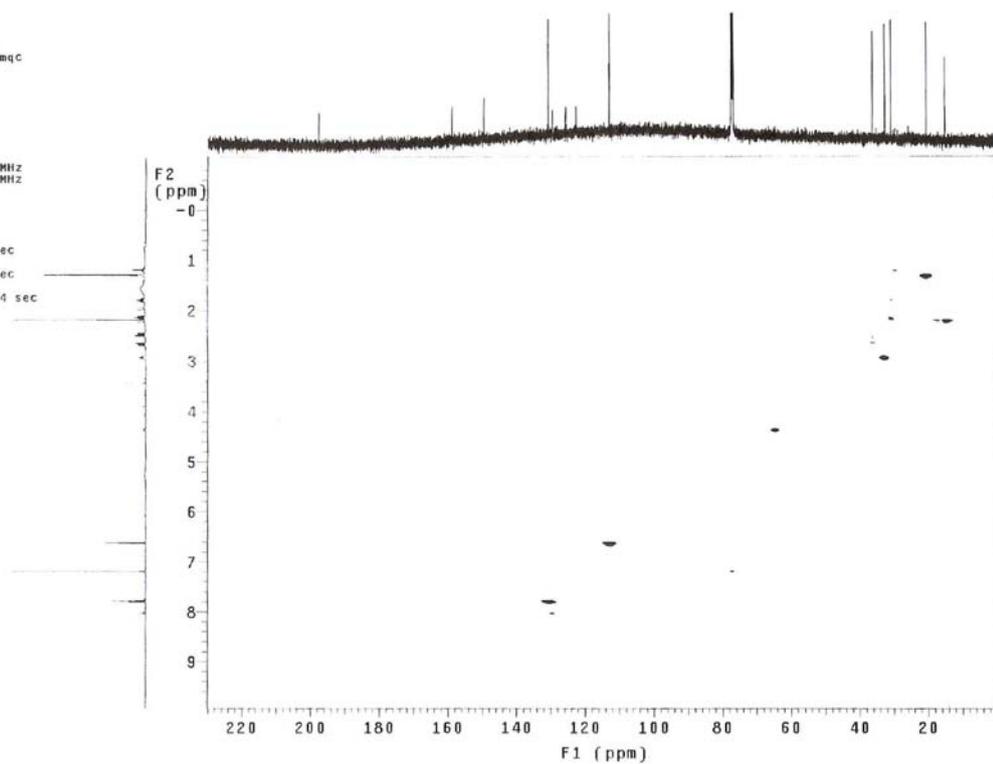


Figura 22S. Mapa de contorno de gHMOC de **4** (CDCl_3 , 125 MHz)

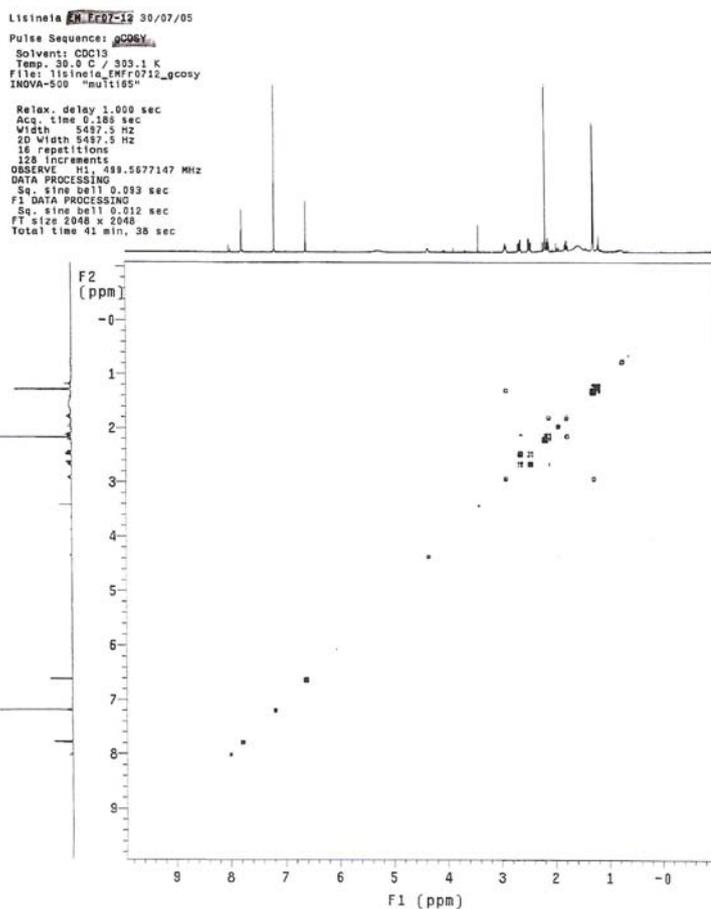


Figura 23S. Espectro de gCOSY de 4 (CDCl₃, 500MHz)

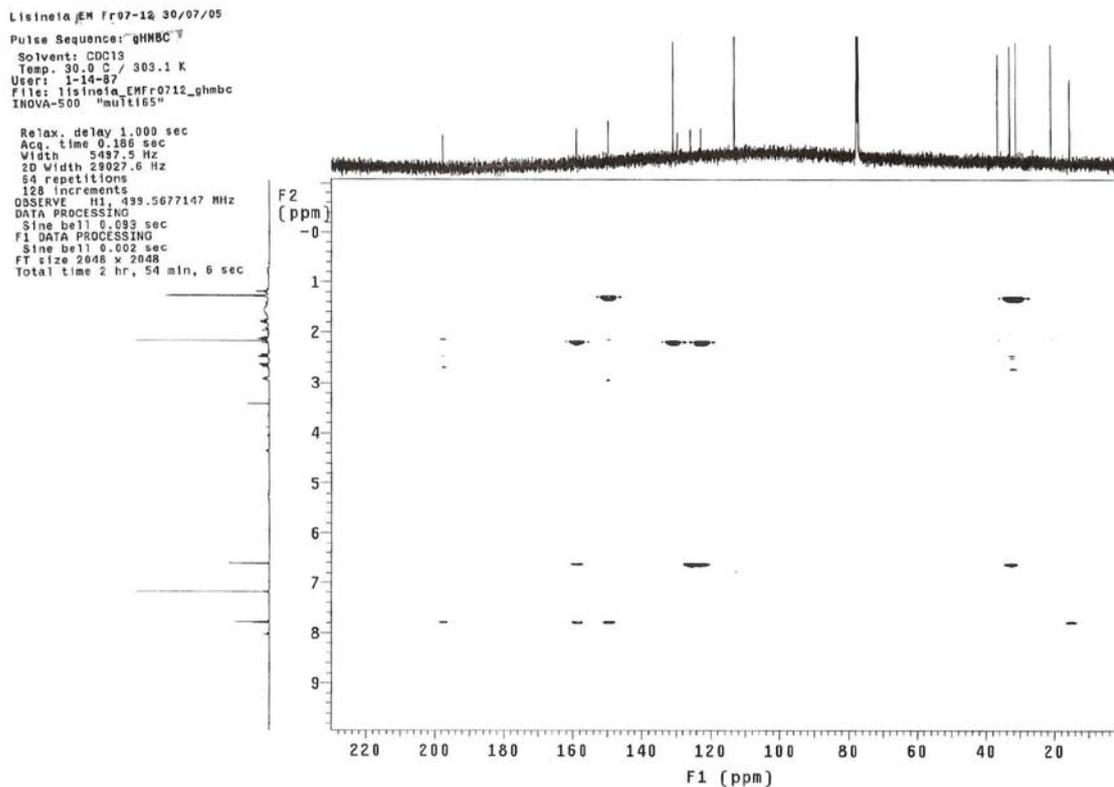


Figura 24S. Mapa de contorno de gHMBC de 4 (CDCl₃, 125 MHz)