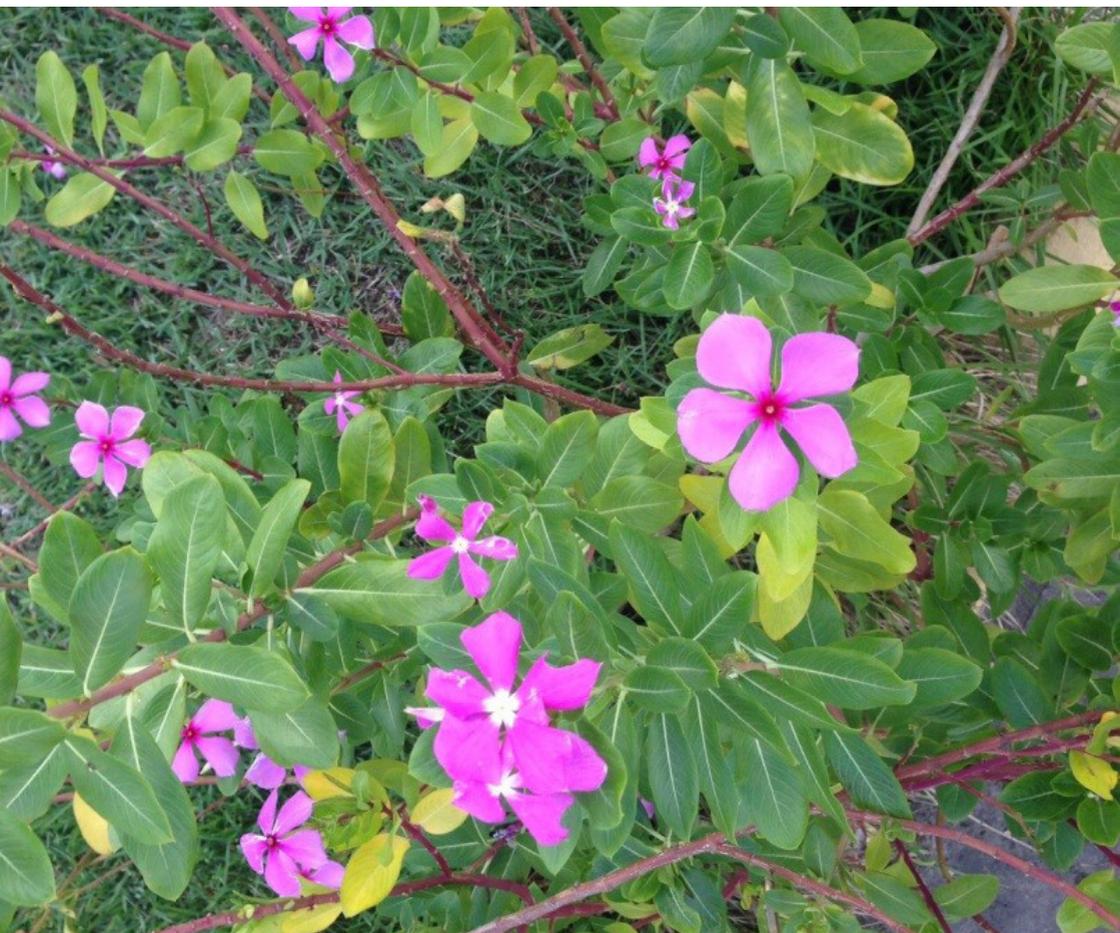


**$\alpha$ -Pironas de *Nodulisporium* sp.,  
um Fungo Endofítico Isolado de  
*Catharanthus roseus* (Boa-noite)**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 125***

## **$\alpha$ -Pironas de *Nodulisporium* sp., um Fungo Endofítico Isolado de *Catharanthus roseus* (Boa-noite)**

*Akenaton Onassis Cardoso Viana Gomes  
Kirley Marques Canuto  
Francisco das Chagas Oliveira Freire  
Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Francisca Samara Assunção Araújo  
Edy Sousa de Brito*

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Fortaleza, CE  
2017

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição:**

Embrapa Agroindústria Tropical  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*  
Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*  
Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*  
Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Ana Elisa Galvão Sidrim*  
Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*  
Normalização: *Rita de Cassia Costa Cid*  
Foto da capa: *Kirley Marques Canuto*  
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

**1ª edição**

On-line (2017)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroindústria Tropical

---

$\alpha$ -Pironas do *Nodulisporium* sp., um fungo endofítico isolado de *Catharanthus roseus* ("boa-noite") / Akenaton Onassis Cardoso Viana Gomes... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017.

22 p. : il. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 125).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1.  $\alpha$ -Pironas. 2. RMN. 3. *Catharanthus roseus*. 4. *Nodulisporium*. I. Gomes, Akenaton Onassis Cardoso Viana. II. Canuto, Kirley Marques. III. Freire, Francisco das Chagas Oliveira. IV. Rodrigues, Tigressa Helena Soares. V. Araújo, Francisca Samara Assunção. VI. Brito, Edy Sousa de. VII. Série.

CDD 632.4

---

© Embrapa 2017

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>10</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>21</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>21</b>
<b>Referências .....</b>	<b>21</b>

# **$\alpha$ -Pironas de *Nodulisporium* sp., um Fungo Endofítico Isolado de *Catharanthus roseus* (Boa-noite)**

***Akenaton Onassis Cardoso Viana Gomes*<sup>1</sup>**

***Kirley Marques Canuto*<sup>2</sup>**

***Francisco das Chagas Oliveira Freire*<sup>3</sup>**

***Tigressa Helena Soares Rodrigues*<sup>4</sup>**

***Francisca Samara Assunção Araújo*<sup>5</sup>**

***Edy Sousa de Brito*<sup>6</sup>**

## **Resumo**

Os fungos endofíticos são microrganismos que residem nos tecidos das plantas sem lhes causar nenhum dano aparente. Muitas dessas espécies têm atraído a atenção devido às atividades biológicas identificadas em seus metabólitos em ação antimicrobiana, inseticida e citotóxica, o que permite explorar usos potenciais na agricultura e na medicina. Nesse sentido, foi realizado um estudo químico do fungo *Nodulisporium* sp. encontrado nas folhas de *Catharanthus roseus* (boa-noite). O extrato acetato de etila do fungo, obtido por partição líquido-líquido, foi cromatografado em Sephadex LH-20 seguido de cromatografia a líquido de alta eficiência resultando no isolamento de uma mistura de duas  $\alpha$ -pironas. Análises espectrométricas por ressonância magnética nuclear (incluindo técnicas bidimensionais tais

---

<sup>1</sup> Químico, professor da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>2</sup> Farmacêutico, doutor em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, kirley.canuto@embrapa.br

<sup>3</sup> Agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Francisco.o.freire@embrapa.br

<sup>4</sup> Engenheira química, doutora em Engenharia Química, técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, tigressa.rodrigues@embrapa.br

<sup>5</sup> Farmacêutica, técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, samara.oliveira@embrapa.br

<sup>6</sup> Químico, doutor em Ciência de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, edy.brito@embrapa.br

como COSY, HSQC e HMBC), combinada com espectrometrias de massas de alta resolução e de infravermelho, permitiram identificar tais compostos como sendo cladobotrina IV e (2E)-3-[5-(hidroximetil)-4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il]-acrilato de metila, uma substância inédita na literatura.

Termos para indexação:  $\alpha$ -pironas, RMN, *Catharanthus roseus*, *Nodulisporium*.

# **$\alpha$ -Pyrones from *Nodulisporium* sp., an Endophytic Fungus of *Catharanthus roseus* (rosy periwinkle)**

## **Abstract**

*Endophytic fungi are microorganisms that reside within plant tissue causing no apparent damage. These species have attracted a great attention due to several biological activities demonstrated by their metabolites such as antimicrobial, insecticidal and cytotoxic, hence showing considerable potential uses in agriculture and medicine. In this context, we performed a chemical study of the *Nodulisporium* sp. fungus found on leaves from *Catharanthus roseus* (rosy periwinkle). The ethyl acetate extract, obtained previously by liquid-liquid partition, was chromatographed on Sephadex LH-20 followed by high performance liquid chromatography, yielding a mixture of two  $\alpha$ -pyrones. Spectral analysis by nuclear magnetic resonance (including 2D techniques such as COSY, HSQC e HMBC) combined with high resolution mass spectrometry and infrared permitted to identify these compounds as cladobotrin IV and methyl (2E)-3-[5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl]-acrylate, which is being reported for the first time in literature.*

*Index terms:  $\alpha$ -pyrones, NMR, *Catharanthus roseus*, *Nodulisporium*.*

## Introdução

Os fungos endofíticos são microrganismos que residem nos tecidos das plantas sem lhes causar nenhum dano aparente. Muitas dessas espécies têm atraído uma grande atenção devido às várias atividades biológicas demonstradas por seus metabólitos, tais como antimicrobiana, inseticida e citotóxica, exibindo usos potenciais na agricultura e na medicina (KUSARI et al., 2014; ZHAO et al., 2011).

Em razão disso, os laboratórios de Fitopatologia e Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical vêm estudando, desde 2011, fungos endofíticos de plantas encontradas no Semiárido cearense, principalmente aquelas da Caatinga, visando descobrir novas fontes de substâncias bioativas. Em uma das prospecções, foi isolado o fungo *Nodulisporium* das folhas de *Catharanthus roseus* (boa-noite). A princípio, a ideia era verificar a presença de alguns compostos biologicamente ativos e/ou de alto valor agregado comumente associado ao gênero *Nodulisporium* ou à espécie *C. roseus*, visto que vários fungos endofíticos são capazes de biossintetizar compostos originalmente produzidos pela planta-hospedeira. Um exemplo é a ocorrência de fungos endofíticos produtores de paclitaxel (Taxol) na planta *Taxus brevifolia*, fonte genuína desse diterpeno anticancerígeno (ZHOU et al., 2010).

*Nodulisporium* despertou o nosso interesse porque as espécies desse gênero costumam produzir uma classe de diterpenos indólicos chamados ácidos nodulispóricos, que demonstram potente ação inseticida sem, contudo, apresentar efeitos colaterais em mamíferos (SINGH et al., 2005; ZOU et al., 2015). Além disso, das folhas de *C. roseus* são extraídos dois importantes alcaloides de uso clínico no tratamento de vários tipos de câncer: vincristina e vimblastina (HEIJDEN et al., 2004; ALMAGRO et al., 2015).

Entretanto, uma análise preliminar do extrato do fungo *Nodulisporium* (dados não publicados), utilizando-se um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas (CLAE-EM), não detectou massa correspondente à dos alcaloides e dos

ácidos nodulispóricos já relatados na literatura. Tendo em vista que a composição química dos fungos endofíticos é fortemente influenciada por diversos fatores tais como as condições ambientais (incluindo o tipo e o habitat da planta-hospedeira) e de cultivo do fungo no laboratório (ZHAO et al., 2011; STROBEL; DAISY, 2003), concluiu-se que, por algum dos motivos referidos acima, os compostos de interesse não foram biossintetizados pela cepa em estudo.

Por outro lado, após sucessivas separações cromatográficas do extrato acetato de etila de *Nodulisporium* sp., foi obtida uma mistura de duas  $\alpha$ -pironas, cujo isolamento e caracterização química estão sendo descritas nesse fungo pela primeira vez na literatura, no presente trabalho. Além disso, um desses dois compostos químicos isolados apresenta uma estrutura química inédita.

## Materiais e Métodos

### Isolamento e cultivo do fungo

O fungo endofítico foi isolado de folhas de *C. roseus* coletadas em Pentecostes, Ceará, e identificado por exame morfológico como sendo um *Nodulisporium* sp. O fungo foi crescido durante 21 dias a 25 °C ( $\pm 2$  °C) em 6 Erlenmeyers de 2 L, contendo em cada um deles 1 L de extrato de malte (composição: 1 g de peptona, 20 g de dextrose e 20 g de extrato de malte para cada 1.000 mL de água destilada).

### Extração e Isolamento das $\alpha$ -pironas 1 e 2

O meio de cultura foi filtrado a vácuo em um funil de büchner para remoção do micélio e em seguida particionado com acetato de etila (3 vezes de 3 L). A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e seca em rotaevaporador a 40 °C, rendendo um sólido marrom (1,3 g) denominado NOA. O extrato acetato de etila foi dissolvido em metanol (100 mL) e desengordurado com hexano (3 vezes de 70 mL). Depois de seca, a fração metanólica NOA-M (423 mg) foi cromatografada em uma coluna de vidro de Sephadex LH-20 (60 g), utilizando-se metanol como eluente a uma vazão de 1,5 mL/min. Sete subfrações de 10 mL foram coletadas. A primeira subfração, NOA-M1 (290 mg) foi analisada

por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se um cromatógrafo HPLC Polaris 210-Varian acoplado a um detector de UV-Vis e equipado com uma coluna semipreparativa Ascentis-Supelco C-18 (25 cm x 10 mm, 10  $\mu$ m). A amostra foi corrida a uma vazão de 5 mL/min, empregando-se um gradiente de eluição constituído por água e metanol (B), que variou de 20% a 80% de B em 15 min e aumentado para 90% de B em 3 min. Após sucessivas injeções, o pico com tempo de retenção de 14,4 min foi coletado, resultando no isolamento de um sólido amarelo denominado NOA-M1P6 (14,2 mg), formado pela mistura binária dos compostos 1 e 2. As coletas das substâncias foram realizadas com as injeções de 100  $\mu$ L de amostra, previamente filtrada em filtro de PTFE de 0,45  $\mu$ m (Millipore) e monitoradas a 254 nm.

## Caracterização química das $\alpha$ -pironas 1 e 2

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni e bidimensionais, foram obtidos em um espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500. O espectrômetro foi operado nas frequências de 500,13 ( $^1\text{H}$ ) e 125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), sob um campo magnético de 11,744 T, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa. A amostra foi dissolvida em uma alíquota de 0,6 mL de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ , Cambridge Isotope Laboratories, Andover, EUA) e analisada em um tubo de 5 mm (Wilmad Labglass, New Jersey, EUA). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados com relação ao sinal do solvente ( $\delta_{\text{H}}$  7,27 e  $\delta_{\text{C}}$  77,23). As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

Nos experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (*composite pulse decoupling* – CPD), foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 ppm e 260 ppm, número de transientes de 8 ( $^1\text{H}$ ) e 10.240 ( $^{13}\text{C}$ ), largura de pulso de  $90^\circ$  de 9,70  $\mu$ s e  $30^\circ$  de 15,50  $\mu$ s, bem como tempo de relaxação de 1s para ambos os núcleos. Para todos os experimentos

unidimensionais, foram utilizados 65.356 pontos para a aquisição e 32.768 para o processamento, enquanto, para os experimentos bidimensionais, foram utilizados 2.048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 1.024 x 1.024 pontos para o processamento. Nos experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC), foram empregados gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de  $J$  utilizados para esses experimentos foram  $^1J_{\text{H,C}} = 145$ ,  $^nJ_{\text{H,C}} = 7$ , sendo  $n \geq 2$ .

O espectro de massas de alta resolução (EM) foi obtido por injeção direta em um sistema LCMS-IT-TOF Shimadzu, munido de fonte de ionização por *electrospray*. A amostra foi dissolvida em metanol e filtrada em filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ . A análise foi realizada com um volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$  no modo de ionização positivo. O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi registrado em um espectrômetro PerkinElmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando-se pastilhas de KBr.

## Resultados e Discussão

Separação cromatográfica em Sephadex LH-20 seguida de CLAE da fração metanólica, obtida previamente por partição líquido-líquido do extrato acetato de etila (NOA), resultou no isolamento de um sólido amarelo (NOA-M1P6, 14,2 mg) formado pela mistura binária dos compostos 1 e 2. (Figura 1).

O composto 1 apresentou um pico com  $m/z$  255.0868  $[\text{M} + \text{H}]^+$  no seu espectro de EM-AR (Figura 2), correspondente à fórmula molecular de  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_6$ , indicando a existência de seis insaturações. Além disso, alguns fragmentos com  $m/z$  195,0656 e 177,0531 foram observados e atribuídos a perdas neutras de metanol e monóxido de carbono  $[\text{M} + \text{H} - 60]^+$ , bem como metanol + monóxido de carbono e água  $[\text{M} + \text{H} - 78]^+$ , respectivamente. O seu espectro de infravermelho (Figura 3) mostrou uma banda larga em  $3.335 \text{ cm}^{-1}$  e uma banda intensa e aguda em  $1.698 \text{ cm}^{-1}$ , as quais foram associadas a absorções de hidroxila e carbonilas conjugadas, respectivamente.

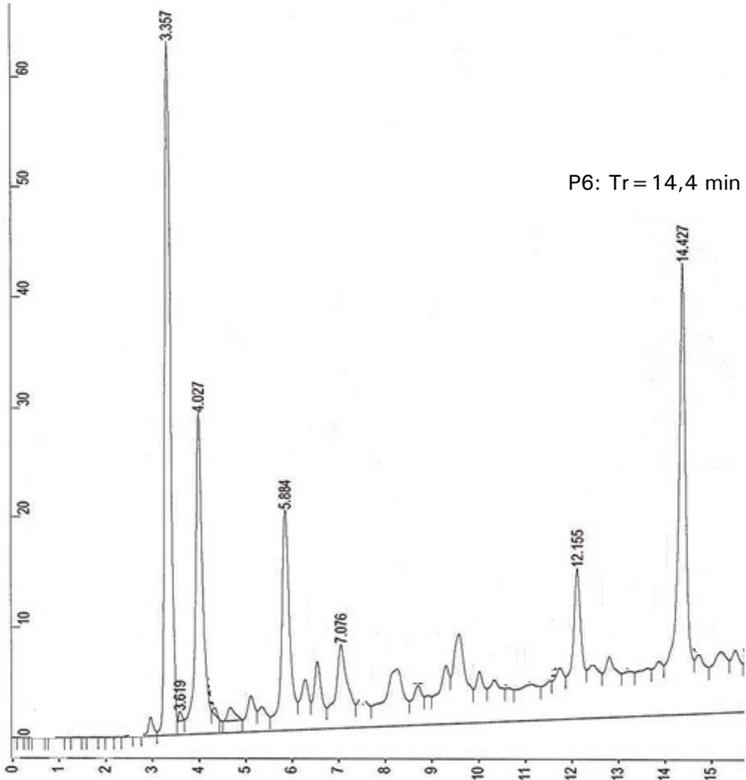


Figura 1. Cromatograma de HPLC-UV da fração NOA-M1 ( $\lambda = 254$  nm).

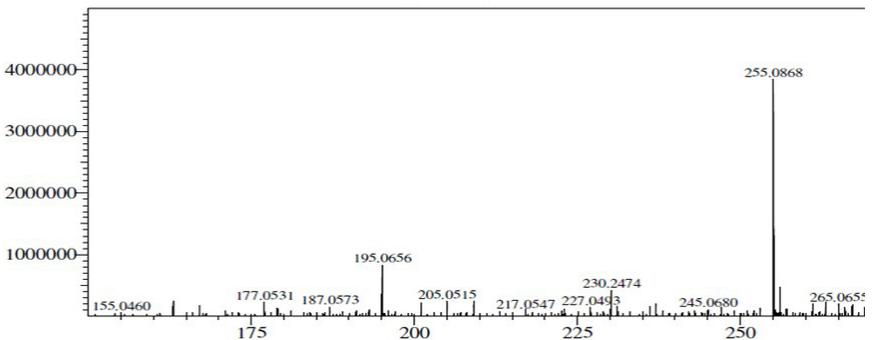
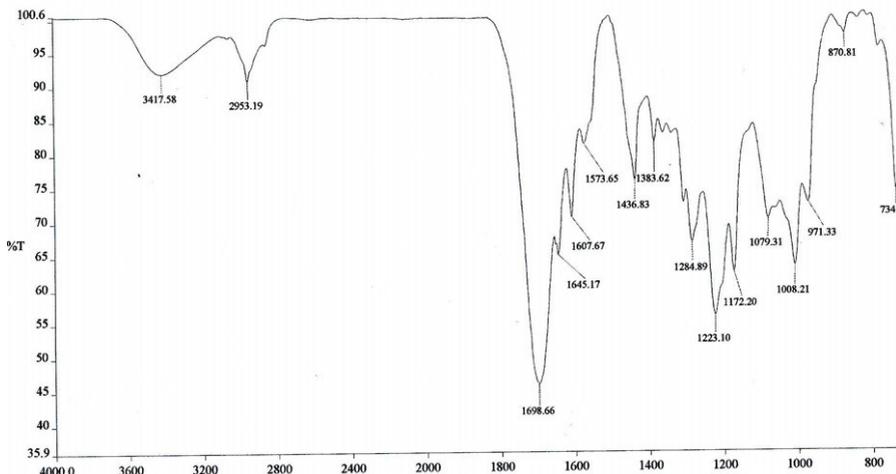


Figura 2. Espectro de massas de alta resolução de NOA-M1P6.



**Figura 3.** Espectro de infravermelho de NOA-M1P6 (pastilha de KBr)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 4) de **1** apresentou um par de dupletos em  $\delta$  7,58 e 6,78 (1H,  $J = 15,4$  Hz) referentes a hidrogênios *trans*-olefínicos, um sinal em 4,61 (2H, s) atribuído a hidrogênios oximetilênicos, dois simpletos em  $\delta$  3,98 e 3,81 (3H, s) característicos de metoxilas, além de um simpleto em  $\delta$  2,13 (3H, s) correspondente à metila. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 5), foram observadas 12 linhas espectrais, das quais oito foram associadas a carbonos  $\text{sp}^2$ . Entre estes, quatro foram identificados como oxigenados:  $\delta$  166,7 (C-9); 166,6 (C-4); 163,8 (C-2) e 152,0 (C-6), sendo dois deles compatíveis com carbonilas de éster e/ou lactona. O sinal em  $\delta$  11,2 ( $3\text{-CH}_3$ ) confirmou a presença da metila, enquanto outras três ressonâncias foram relacionadas a carbonos  $\text{sp}^3$  oxigenados. Dessa forma, foi proposta uma estrutura de uma pirona para o composto **1**.

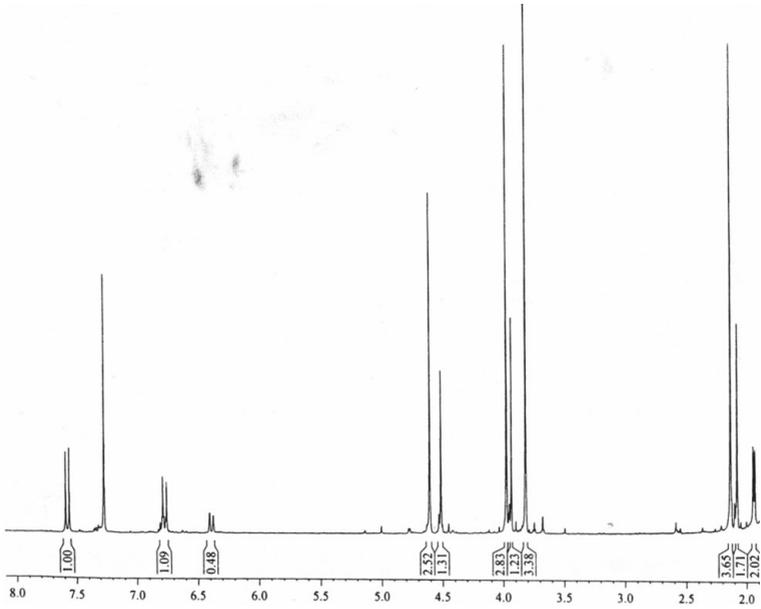


Figura 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de NOA-M1P6 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

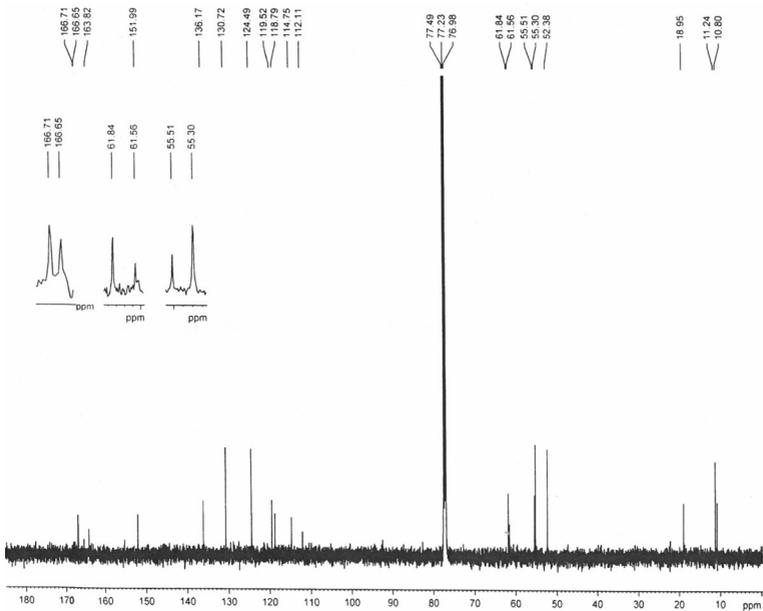


Figura 5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de NOA-M1P6 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 6) exibiu as correlações dos hidrogênios ligados diretamente a seus respectivos carbonos, permitindo-nos realizar o assinalamento inequívoco dos sinais das metoxilas em  $\delta$  61,8 (4-OCH<sub>3</sub>) e 52,4 (9-OCH<sub>3</sub>), do sinal do carbono carbinólico em  $\delta$  55,3 (5-CH<sub>2</sub>OH), bem como dos carbonos *trans*-olefínicos em  $\delta$  130,7 (C-7) e 124,5 (C-8). Adicionalmente, o espectro HSQC revelou os sinais dos carbonos não hidrogenados como sendo aqueles pertencentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  oxigenados, além dos sinais em  $\delta$  118,8 (C-5) e 114,7 (C-3).

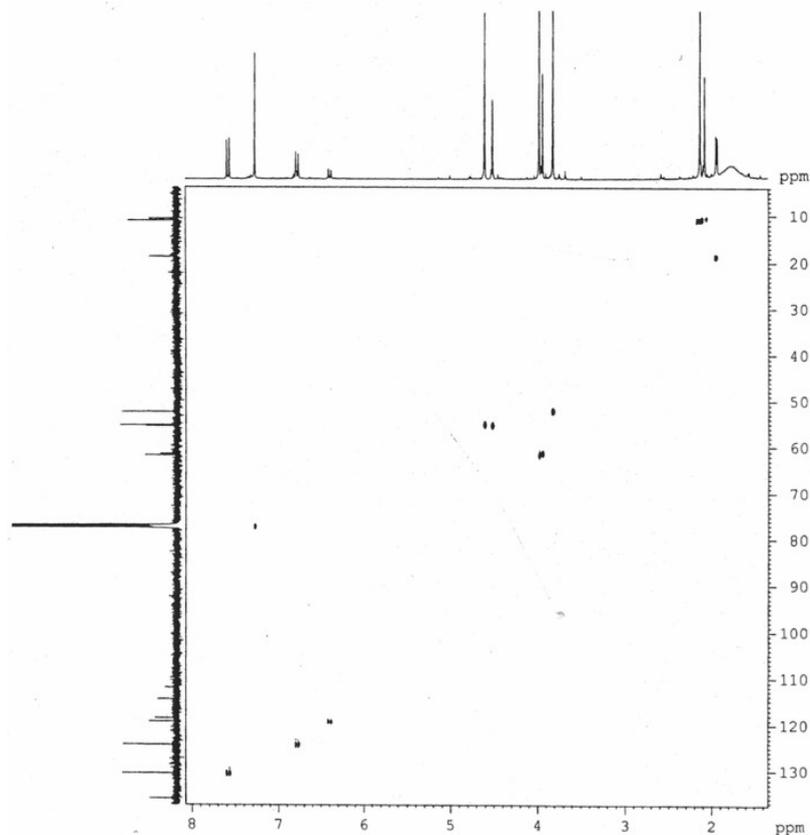
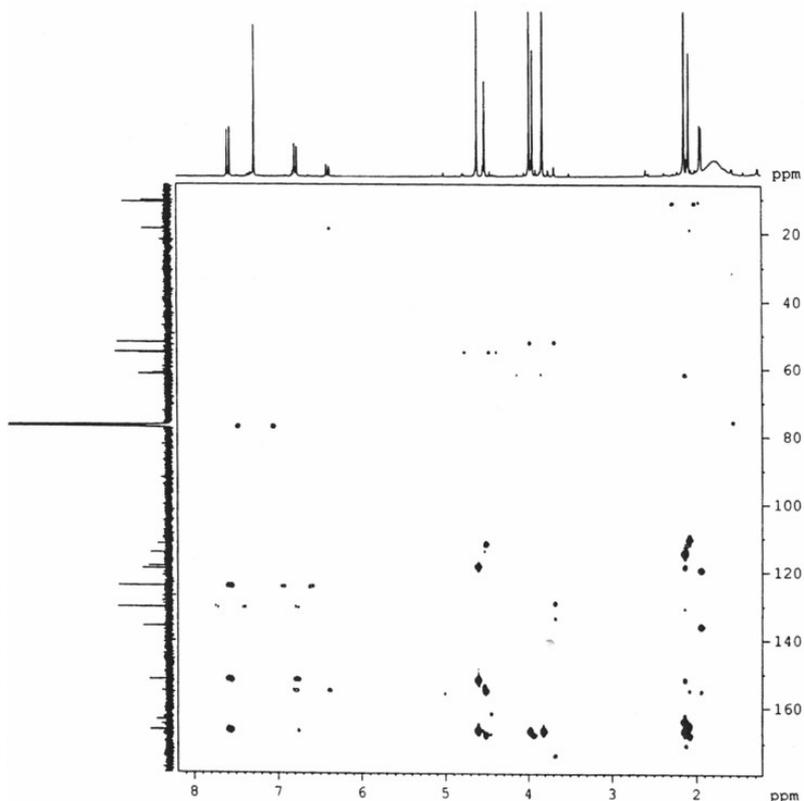


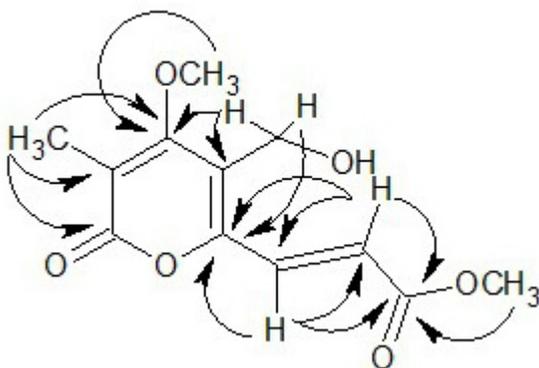
Figura 6. Espectro de RMN-HSQC de NOA-M1P6 (CDCl<sub>3</sub>, 500 x 125 MHz).

O espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Figura 7) mostrou os acoplamentos entre hidrogênios e carbonos a duas e três ligações. As correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  7,58 (H-7), 6,78 (H-8) e 3,81 (9-OCH<sub>3</sub>) com o sinal da carbonila em  $\delta$  166,7 (C-9) evidenciaram a presença de um éster metílico  $\alpha,\beta$ -insaturado na estrutura. Por sua vez, a ligação desse grupamento com o anel  $\delta$ -pirônico foi evidenciado por meio do acoplamento dos hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,58 (H-7) e 6,78 (H-8) com o carbono aromático oxigenado em  $\delta$  152,0 (C-6).



**Figura 7.** Espectro de RMN-HMBC de NOA-M1P6 (CDCl<sub>3</sub>, 500 x 125 MHz).

A correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,13 (3-CH<sub>3</sub>) com os sinais de carbono em  $\delta$  166,6 (C-4), 163,8 (C-2) e 114,7 (C-3) revelou que a metila está posicionada no carbono  $\delta$  à carbonila lactônica. O acoplamento dos hidrogênios metoxílicos em  $\delta$  3,98 (4-OCH<sub>3</sub>) com o carbono em  $\delta$  166,6 (C-4) indicou a metoxila na posição 4, estando, portanto, em consonância com a teoria biogenética que preconiza que  $\delta$ -pironas monoxigenadas são preferencialmente substituídas na posição 4 (NAIR; CAREY, 1975; MCGLACKEN; FAIRLAMB, 2005). Os acoplamentos dos hidrogênios carbinólicos em  $\delta$  4,61 (5-CH<sub>2</sub>OH) com os sinais de carbono em  $\delta$  166,6 (C-4), 152,0 (C-6) e 118,8 (C-5) ratificaram a hidroximetila na posição 5. Com isso, o composto 1 foi identificado como sendo (2E)-3-[5-(hidroximetil)-4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il]-acrilato de metila, inédito na literatura (Figura 8).



**Figura 8.** Estrutura química do composto 1 exibindo acoplamentos H, C à longa distância observados no espectro de RMN-HMBC.

Entretanto, o espectro de RMN <sup>1</sup>H da fração NOA-M1 (Figura 4) mostrou ainda sinais menos intensos com deslocamentos químicos similares aos do composto 1, em uma proporção 2:1, denotando a existência de um componente minoritário com estrutura análoga à da  $\alpha$ -pirona já elucidada. Entre os sinais minoritários, foi possível observar três simpletos em  $\alpha$  4,52; 3,94 e 2,08, os quais foram atribuídos

respectivamente aos hidrogênios dos grupos hidroximetila, metoxila e metila, ligados ao anel  $\alpha$ -pirona. O espectro COSY (Figura 9) exibiu os acoplamentos entre os dupletos de hidrogênios trans-olefínicos em  $\delta$  6,77 (1H,  $J = 15,4; 7,0$  Hz) e 6,39 (1H,  $J = 15,4; 1,5$  Hz) com o hidrogênio metílico em  $\delta$  1,94 (1H,  $J = 7,0; 1,5$  Hz), indicando a existência de um sistema alílico.

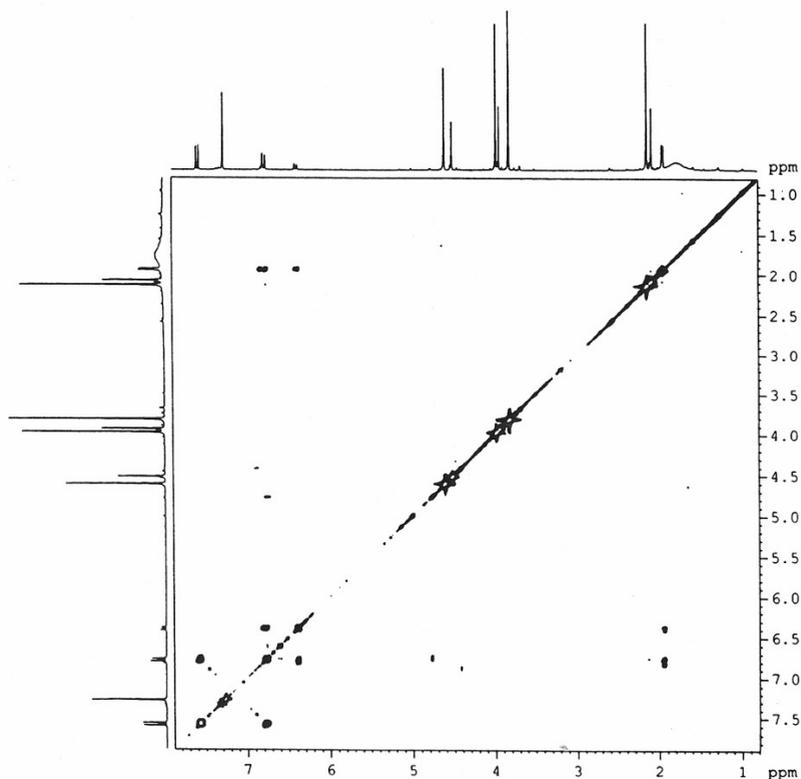
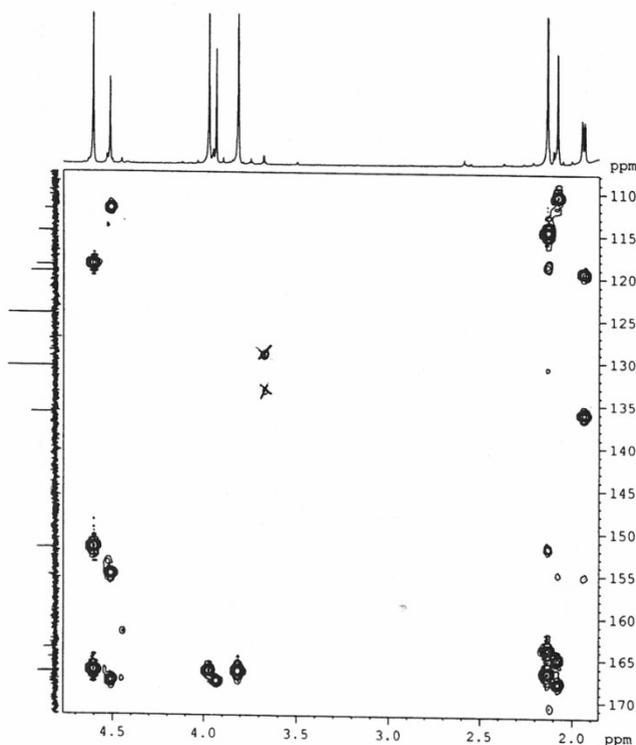


Figura 9. Espectro de RMN de correlação homonuclear H,H (COSY) de NOA-M1P6.

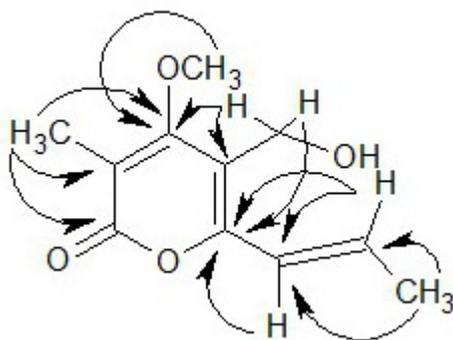
A ausência de sinais “dobrados” em  $\delta_{\text{H}}$  3,81 e  $\delta_{\text{C}}$  52,4, referentes à metoxila do éster, reforçou a hipótese de que o constituinte minoritário seria uma forma reduzida do composto 1, na qual o grupo metoxicarbonila é substituído por uma metila. O espectro HSQC (Figura 6) mostrou a correlação do sinal de hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,94 (H-9) com o respectivo carbono em  $\delta$  18,9 (C-9), além dos hidrogênios olefínicos (H-9). No espectro de RMN-HMBC, expandido (Figura 10), os hidrogênios alílicos em  $\delta$  1,94 (H-9) aparecem correlacionados com os carbonos olefínicos em  $\delta$  136,2 (C-8) e 119,5 (C-7), sendo também observadas correlações entre os hidrogênios vinílicos em  $\delta$  6,77 (C-8) e 6,39 (C-7) com o carbono do anel lactônico em  $\delta$  155,0 (C-6).



**Figura 10.** Espectro de RMN-HMBC de NOA-M1 (expansão da região  $\delta$  108-172 x  $\delta$  1,9-4,7).

As evidências espectroscópicas apontaram para a estrutura do composto **2** (Figura 11), a qual corresponde a uma cladobotrina IV, substância isolada de *Cladobotryum varium* (TEZUKA et al., 1994). Comparações dos dados de RMN de **2** e da cladobotrina mostraram concordância entre os mesmos. Entretanto, há um equívoco no dado de RMN descrito no trabalho de Tezuka et al. (1994) quanto à atribuição dos deslocamentos químicos para os carbonos vinílicos, visto que o C-7 aparece como mais desblindado do que C-8, tal como observado para o composto **1**, cuja carbonila do grupamento éster exerce um forte efeito mesomérico retirador no carbono  $\beta$  (C-7). (Tabela 1).

Nesse caso, o espectro HSQC foi fundamental para o correto assinalamento, uma vez que exibiu as correlações dos hidrogênios do sistema alílico com seus respectivos carbonos. O HSQC demonstrou a correlação do carbono olefínico em  $\delta$  119,5 (C-7) com o hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,39 (C-7), cujo sinal aparece como um duplo-duplete com  $J$  compatível com acoplamento alílico (1,5 Hz), enquanto o carbono em 6,77 (C-8) estava correlacionado com o hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,77 (C-8), o qual é um duplo duplete com  $J$  condizente com acoplamento vicinal (7,0 Hz).



**Figura 11.** Estrutura química do composto **2** exibindo acoplamentos H, C à longa distância observados no espectro de RMN-HMBC.

Algumas cladobotrinas e compostos análogos possuem ações antifúngicas e citotóxica (TEZUKA et al., 1994; JADULCO et al., 2002; GU, 2009). Ademais,  $\alpha$ -pironas são grupos funcionais comumente encontrados em esqueletos de compostos naturais e sintéticos bioativos (ex.: bufadienolídeos, fusapironas e cumarinas), exibindo uma ampla gama de aplicações biológicas e médicas, tais como antifúngicos, citotóxicos, inibidores de HIV, mal de Alzheimer e câncer (TIAN et al., 2015; McGLACKEN; FAIRLAMB, 2005).

**Tabela 1.** Dados de RMN (obtidos em  $\text{CDCl}_3$ ) dos compostos 1 e 2 e de cladobotrina IV (TEZUKA et al., 1994).

# C	Composto 1		Composto 2		Cladobotrina IV	
	$\delta_c$	$^{(1)}\delta_H$	$\delta_c$	$^{(1)}\delta_H$	$\delta_c$	$^{(1)}\delta_H$
2	163,8		163,8		164,8	
3	114,7		114,7		110,0	
4	166,6		168,0		167,7	
5	118,8		112,1		112,0	
6	152,0		155,0		155,1	
7	130,7	7,58 (1H, d, 15,4)	119,5	6,39 (1H, dd, 15,4, 1,5)	119,4	6,39 (1H, dd, 15,4, 1,5)
8	124,5	6,78 (1H, d, 15,4)	136,2	6,77 (1H, dd, 15,4; 7,0)	135,8	6,76 (1H, dd, 15,4; 7,0)
9	166,7		18,9	1,94 (3H, d, 7,0; 1,5)	18,7	1,93 (3H, d, 7,0; 1,5)
3-CH <sub>3</sub>	11,2	2,13 (3H, s)	10,8	2,08 (3H, s)	10,8	2,08 (3H, s)
4-OCH <sub>3</sub>	61,8	3,98 (3H, s)	61,6	3,94 (3H, s)	63,7	3,93 (3H, s)
5-CH <sub>2</sub> OH	55,3	4,61 (3H, s)	55,5	4,52 (3H, s)	55,2	4,50 (3H, s)
9-OCH <sub>3</sub>	52,4	3,81 (3H, s)	-		-	

<sup>(1)</sup>Em seguida aos valores de deslocamento químico de hidrogênio em ppm, seguem valores de integração (número de hidrogênios), constante de acoplamento (*J*) expressa em Hz e multiplicidade segundo a convenção: (s) simpleto, (d) duplete e (dd) duplo-duplete.

## Conclusões

A cepa fúngica de *Nodulisporium* sp. isolada das folhas de *C. roseus* não produz ácidos nodulispóricos, todavia é constituída e excreta pelo menos dois metabólitos secundários  $\alpha$ -pirônicos: (2E)-3-[5-(hidroximetil)-4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il]-acrilato de metila, a qual é uma substância inédita na literatura, e cladobotrina IV.

## Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo apoio financeiro concedido ao projeto “Obtenção de metabólitos de fungos endofíticos associados a plantas da Caatinga cearense, com possível aplicação agrícola” (Convênio 7385, SEG 03.11.99.011.00.00). Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) e ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), pertencentes à Universidade Federal do Ceará, pela realização dos espectros de massas, infravermelho e de RMN, respectivamente.

## Referências

- ALMAGRO, L.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; PEDREÑO, M.A. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. **Molecules**, v. 20, 2973-3000, 2015.
- GU, W. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, 677-1683, 2009.
- HEIJDEN, R.; JACOBS, D.I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VERPOORTE, R. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, 607-628, 2004.
- KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: Hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 297-303, 2014.
- JADULCO, R.; BRAUERS, G.; EDRADA, R.A.; EBEL, R.; WRAY, V.; SUDARSONO,

PROKSCH, P. New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, 730-733, 2002.

McGLACKEN, G. P.; FAIRLAMB, J. S. 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterization and biological activity. **Natural Products Review**, v. 22, p. 369-385, 2005.

SINGH, S. B.; ONDEYKA, J. G.; JAYASURIYA, H.; ZINK, D. L.; HA, S. N.; DAHL-ROSHAK, A.; GREENE, J.; KIM, J. A.; SMITH, M. M.; SHOOP, W.; TKACZ, J. S. Nodulisporic acids D-F: structure, biological activities, and biogenetic relationships. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1496-1506, 2005.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

TEZUKA, Y.; HUANG, Q.; KIKUCHI, T.; NISHI, A.; TUBAKI, K. Studies on the metabolites of mycoparasitic fungi I. metabolites of *Cladobotryum varium*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, p. 2612-2617, 1994.

TIAN, J-F.; YU, R-J; LI, X-X; GAO, H.; GUO, L.D.; TANG, J-S; YAO, X-S. 1H and 13C NMR spectral assignments of 2-pyrone derivatives from an endophytic fungus of sarcosomataceae. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 53, p. 866-871, 2015.

ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, 159-168, 2011.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1707-1717, 2010.

ZOU, Y.; MELVIN, J.E.; GONZALES, S.S.; SPAFFORD, M.J.; SMITH, A.B. Total Synthesis of (-)-Nodulisporic Acid D. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 22, p. 7095-7098, 2015.

**Embrapa**

---

*Agroindústria Tropical*



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

