

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/08/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Weslei Bruno Botero

**Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*,
um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae)**

Araraquara

2018

WESLEI BRUNO BOTERO

**Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*,
um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius***

Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara

FICHA CATALOGRÁFICA

B748b Botero, Wesley Bruno
Bioprospecção e isolamento de metabólitos de
Microsphaeropsis arundinis, um fungo endofítico de
Paepalanthus planifolius (Eriocaulaceae) / Wesley Bruno Botero. –
Araraquara : [s.n.], 2018
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

1. Fungos endofíticos. 2. Eriocaulaceae. 3. Citotoxicidade.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Biossíntese.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo endofítico de *Paepalanthus p/anifolius*"

AUTOR: WESLEI BRUNO BOTERO**ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Ora. **LOURDES CAMPANER DOS SANTOS**

Departamento de Química Orgânica/ Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profa. D^a. **MAYSA FURLAN**

Departamento de Química Orgânica/ Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. M^r FÉR_ CIDO DA SILVA

Departamento de Alimentos e Medicamentos/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNIFAL - Alfenas

Araraquara , 23 de fevereiro de 2018

“Quando eu era jovem, preferi juntar o pouco dinheiro que tinha para começar esta loja. Pensava em ser rico algum dia para ir a Meca. Passei a ganhar dinheiro, mas não podia deixar ninguém cuidando dos cristais, porque os cristais são coisas delicadas. Ao mesmo tempo, via passar defronte a minha loja muitas pessoas que seguiam na direção de Meca. Havia alguns peregrinos ricos, mas a maior parte das pessoas era muito mais pobre do que eu era.

Por que não vai a Meca agora? - Perguntou o rapaz.

Porque Meca é o que me mantém vivo. É o que me faz aguentar todos estes dias iguais, estes vasos calados nas prateleiras, o almoço e o jantar naquele restaurante horrível. Tenho medo de realizar meu sonho, e depois não ter mais motivos para continuar vivo.

Você sonha com ovelhas e com pirâmides. É diferente de mim, porque deseja realizar seus sonhos. Eu quero apenas sonhar com Meca. ”

-O Alquimista

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as realizações e oportunidades que tenho em minha vida.

Agradeço aos meus pais Edna e Eduardo por todo o apoio, confiança e amor. Sei que posso contar com vocês em todos os momentos

À minha orientadora Prof^a. Lourdes um agradecimento especial por todos os anos de orientação, ensinamentos e amizade. Sempre levarei você no meu coração e sei que tenho uma amiga para a vida toda.

Agradeço aos membros da examinadora pela contribuição e ajuda no trabalho.

Agradeço a minha namorada Ana por estar comigo e fazer todos meus dias mais felizes.

Ao meu irmão Wander e demais familiares, um obrigado por toda ajuda e cumplicidade.

Aos meus avós, que sempre cuidaram de mim, gratidão e muitas saudades.

Agradeço também aos meus amigos da faculdade Gabriel, Naira, Renan, Rodrigo, Raphael, Augusto, João, Douglas, Luís, Thaís e Camila por todos os momentos de alegria durante essa caminhada.

Agradeço também aos alunos do laboratório de fitoquímica que sempre se mostraram prestativos e atenciosos comigo. Obrigado Marcelo, Felipe, Talita, Felipe Gregório, Ana Zanatta, Daylin, Alexander, Carla, Giulia, Joao, Thayná. Um agradecimento especial aos meus amigos Léo Inácio e Andressa Nascimento por me acompanharem nessa caminhada.

Por fim agradeço aos servidores do Instituto de Química, em especial ao Nivaldo, Lucinéia, João, Juliana Rodrigues, Albertinho, Marquinhos e aos amigos da biblioteca.

RESUMO

As espécies da família Eriocaulaceae apresentam estudos químicos na literatura que descrevem a presença de substâncias com potencial biológico, com destaque para a planifolina em *Paepalanthus planifolius*. Apesar disso, existem poucos dados sobre a química dos microrganismos associados a essas espécies, como fungos endofíticos. Para esse estudo, selecionamos o fungo endofítico *Microsphaeropsis arundinis*, isolado dos capítulos de *P. planifolius*. O endófito foi cultivado em meios de cultivo líquido (Caldo Batata Dextrose, Caldo YM, Extrato de Malte, Caldo Nutrient e Caldo Czapek-Dox) e sólido (arroz parboilizado e milho canjica) e os extratos acetato de etila obtidos foram analisados quimicamente quanto a seu perfil cromatográfico por HPLC-PDA e biologicamente a partir da atividade antitumoral contra linhagens de câncer de mama e de câncer de pulmão. O extrato acetato de etila cultivado em arroz parboilizado demonstrou-se o mais ativo frente as linhagens de adenocarcinoma de mama murino ($IC_{50} = 39,91 \mu\text{g mL}^{-1}$) e adenocarcinoma de mama humano ($IC_{50} = 51,93 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo cultivado em escala ampliada e estudado fitoquimicamente buscando-se o isolamento das substâncias produzidas. A utilização de técnicas espectroscópicas e espectrométricas permitiu a identificação de oito substâncias, sendo as substâncias **1** (ácido (2Z, 5E)-4,7,9-triidroxideca-2,5-dienóico), **2** (ácido (2Z, 5E)-4-acetóxi-7,9-diidroxideca-2,5-dienóico), **3** (ácido (2Z,5E)-7-acetóxi-4,9-diidroxideca-2,5-dienóico) e **7** (1-(2,5-diidroxifenil)-3'-oxobutan-2''-il acetato) inéditas na literatura e a substância **5** (1-(2,5-diidroxifenil)-3-hidroxibutanona) descrita pela primeira vez como produto natural. Uma análise biossintética mostra que as substâncias são provenientes da via do acetato.

Palavras-chave: *Microsphaeropsis arundinis*; *Paepalanthus planifolius*; bioprospecção; atividade antitumoral.

ABSTRACT

Species of Eriocaulaceae family showed some chemical studies that describe the presence of compounds with biological potential, such as planifolin in *Paepalanthus planifolius*. Despite these compounds, there are few data about the chemistry of the microorganisms associated with these species, such as endophytic fungi. For this study, we selected the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis*, isolated from *P. planifolius* capitula. The endophyte was cultivate in liquid culture media (Potato Dextrose Broth, YM Broth, Malt Extract, Nutrient Broth and Czapek-Dox Broth) and solid culture media (parboiled rice and corn) and the ethyl acetate extracts were chemically analyzed by HPLC-PDA and biologically evaluated against adenocarcinoma cell lines using MTT assay. The ethyl acetate extract cultivated in parboiled rice was the most active one against murine breast adenocarcinoma ($IC_{50} = 39,91 \mu\text{g mL}^{-1}$) and human breast adenocarcinoma ($IC_{50} = 51,93 \mu\text{g mL}^{-1}$), being select to cultivated on an enlarged scale and fractionated result in the isolation of major compounds. The use of spectroscopic and spectrometric techniques result in the identification of eight compounds, with **1** ((2Z, 5E)-4,7,9-trihydroxy-2,5-decadienoic acid) **2** ((2Z, 5E)-4-acetoxy-7,9-dihydroxydeca-2,5-dienoic acid), **3** ((2Z,5E)-7-acetoxy-4,9-dihydroxydeca-2,5-dienoic acid) and **7** (1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3'-oxobutan-2"-yl acetate) unpublished in the literature. The compound **5** (1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3-hydroxybutanone) was described for the first time as a natural product. A biosynthetic analysis shows that this compounds come from the acetate pathway.

Keywords: *Microsphaeropsis arundinis*; *Paepalanthus planifolius*; bioprospecting; antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partes aéreas de <i>P. planifolius</i> coletada na Serra do Cipó.....	11
Figura 2 – Compostos isolados de espécies do gênero <i>Paepalanthus</i>	12
Figura 3 - Metabólitos isolados de espécies do gênero <i>Microsphaeropsis</i>	14
Figura 4 - Endófito <i>Microsphaeropsis arundinis</i> e substâncias isoladas do fungo endofítico já descritas na literatura.....	15
Figura 5 - Endófito inoculado em diferentes meios de cultivo líquido.....	18
Figura 6 - Representação da clivagem do anel tetrazólio do MTT na presença de desidrogenases de células viáveis.....	20
Figura 7 - Placa após a adição de isopropanol. Os pontos onde há viabilidade celular apresentam-se em violeta.....	21
Figura 8 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo Batata Dextrose	27
Figura 9 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo YM. Condições.....	28
Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Extrato de Malte.	28
Figura 11 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo Nutrient	29
Figura 12 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em Caldo Czapek-Dox	29
Figura 13 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em arroz parboilizado.....	30
Figura 14 - Perfil cromatográfico do extrato AcOEt cultivado em milho canjica.	30
Figura 15 - Cromatograma no UV e cromatograma pico base obtidos na análise por HPLC-MS em modo positivo	31
Figura 16 - Substâncias isoladas a partir do extrato cultivado em arroz parboilizado.	32
Figura 17 – Separação cromatográfica obtida no HPLC-RI	32
Figura 18 - Espectro de massas da substância 1	34
Figura 19 - Espectro de massas da substância 2	36
Figura 20 - Espectro de massas da substância 3	38
Figura 21 - Cromatograma otimizado para o extrato acetato de etila do endófito cultivado em arroz parboilizado.	39
Figura 22 - Espectro de massas da substância 4	41
Figura 23 - Espectro de massas da substância 5	43
Figura 24 - Proposta para a fragmentação do íon molecular da substância 5	43
Figura 25 - Espectro de massas da substância 6	45
Figura 26 - Espectro de massas da substância 7	47
Figura 27 - Proposta para a fragmentação do íon molecular da substância 7	48
Figura 28 - Espectro de massas da substância 8	49
Figura 29 – Primeira etapa da biossíntese pela via do acetato.....	50
Figura 30 - Esquema para a biossíntese de ácidos graxos	51

Figura 31 - Proposta de biossíntese para os derivados do ácido decanóico isolados.....	52
Figura 32 - Proposta para a biossíntese da substância 4.	52
Figura 33 - Produção de ácido orselínico ou floracetofenona a partir do poli-β-ceto éster...	53
Figura 34 - Proposta de biossíntese para os policetídeos isolados.	53
Figura 35 – Esquema de biossíntese simplificado das naftopiranonas a partir da condensação de unidades de acetato.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de IC ₅₀ para os extratos acetato de etila frente ao ensaio antitumoral ...	25
Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo utilizados e rendimentos obtidos para os extratos acetato de etila.	27
Tabela 3 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 1	34
Tabela 4 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 2	36
Tabela 5 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 3	38
Tabela 6 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 4	41
Tabela 7 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 5	43
Tabela 8 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 6	45
Tabela 9 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 7	47
Tabela 10 - Dados de deslocamento químico e correlações para a substância 8	49

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fluxograma para o preparo dos extratos do endófito cultivado nos diferentes meios líquidos	18
Fluxograma 2 - Fluxograma para o preparo dos extratos do endófito cultivado nos meios sólidos	19

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

COSY – Espectroscopia de correlação homonuclear

d - dubleto

ESI – *electrospray*

gHMBC – Espectroscopia de correlação de desvio heteronuclear espaçado por várias ligações via correlação heteronuclear de múltiplas ligações

gHSQC – Espectroscopia de correlação de desvio heteronuclear espaçado por uma ligação via correlação heteronuclear de quantum-simples

Hex - hexano

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

HPLC-PDA – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-RI – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração

IC – Concentração inibitória

LM3 – Linhagem de adenocarcinoma de mama murino

LP-07 – Linhagem de adenocarcinoma de pulmão murino

m - multiplete

m/z – razão massa carga

MCF-7 – Linhagem de adenocarcinoma de mama humano

MeOH – metanol

MS – Espectrometria de massas

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NMR – Ressonância Magnética Nuclear

ppm – partes por milhão

PTFE - politetrafluoretileno

s - simpleto

t - tripleto

TFA – ácido trifluoroacético

TOF – Tempo de voo

T_R – Tempo de retenção

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A família Eriocaulaceae e <i>Paepalanthus planifolius</i>	11
1.2 Fungos endofíticos e <i>Microsphaeropsis arundinis</i>	13
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Coleta e identificação do material vegetal	17
3.2 Obtenção da cepa fúngica e identificação do endófito	17
3.3 Obtenção dos extratos acetato de etila	17
3.3.1 <i>Escala reduzida</i>	18
3.3.2 <i>Escala ampliada</i>	19
3.4 Avaliação da atividade antitumoral	19
3.5 Fracionamento, Isolamento e Identificação das substâncias	21
3.5.1 <i>Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos acetato de etila por HPLC-PDA analítico</i>	21
3.5.2 <i>Obtenção do perfil cromatográfico do extrato mais ativo por HPLC-MS</i>	22
3.5.3 <i>Fracionamento do extrato mais ativo por HPLC-PDA semipreparativo</i>	23
3.5.4 <i>Fracionamento do extrato mais ativo por HPLC-RI semipreparativo</i>	23
3.5.5 <i>Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear</i>	24
3.5.6 <i>Análise das substâncias isoladas por Espectrometria de Massas (MS)</i>	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 Prospecção biológica	25
4.1.1 <i>Avaliação do potencial antitumoral</i>	25
4.1.2 <i>Cultivo do endófito em diferentes meios de cultivo</i>	26
4.2 Fracionamento, Isolamento e Identificação de substâncias	31
4.2.1 <i>Isolamento e identificação de derivados do ácido decanóico</i>	32
4.2.1.1 <i>Identificação da substância 1</i>	33
4.2.1.2 <i>Identificação da substância 2</i>	35
4.2.1.3 <i>Identificação da substância 3</i>	37
4.2.2 <i>Isolamento e identificação de policetídeos</i>	39
4.2.1.1 <i>Identificação da substância 4</i>	40
4.2.1.2 <i>Identificação da substância 5</i>	42
4.2.1.3 <i>Identificação da substância 6</i>	44
4.2.1.3 <i>Identificação da substância 7</i>	46
4.2.1.3 <i>Identificação da substância 8</i>	48
4.3 Análise biossintética dos metabólitos	50
4.3.1 <i>Síntese de derivados do ácido decanóico</i>	50
4.3.1 <i>Síntese das demais substâncias</i>	52
5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Eriocaulaceae e *Paepalanthus planifolius*

A família Eriocaulaceae é uma das famílias mais citadas nas listas vermelhas de espécies em extinção e é composta por 1200 espécies atualmente divididas em 10 gêneros (ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012). As espécies pertencentes a essa família possuem distribuição pantropical, sendo encontradas em nosso país principalmente na região da Cadeia do Espinhaço, um dos maiores centros de diversidade da família com aproximadamente 629 espécies, sendo a maioria endêmica (SANO et al., 2015).

Nessa região temos um bioma de cerrado e uma vegetação de campos rupestres, de modo que as espécies crescem em um clima seco e árido e na presença de um solo formado principalmente por quartzito e arenito, sendo o mesmo ácido e pobre em nutrientes (MOREIRA & CAMELIER, 1997). Devido a essas características do ambiente, as espécies armazenam moléculas de água em ceras epicuticulares, o que faz com que as mesmas apresentem um aspecto de vivo por muitos anos após a coleta, fazendo com que sejam conhecidas popularmente como “sempre-vivas”.

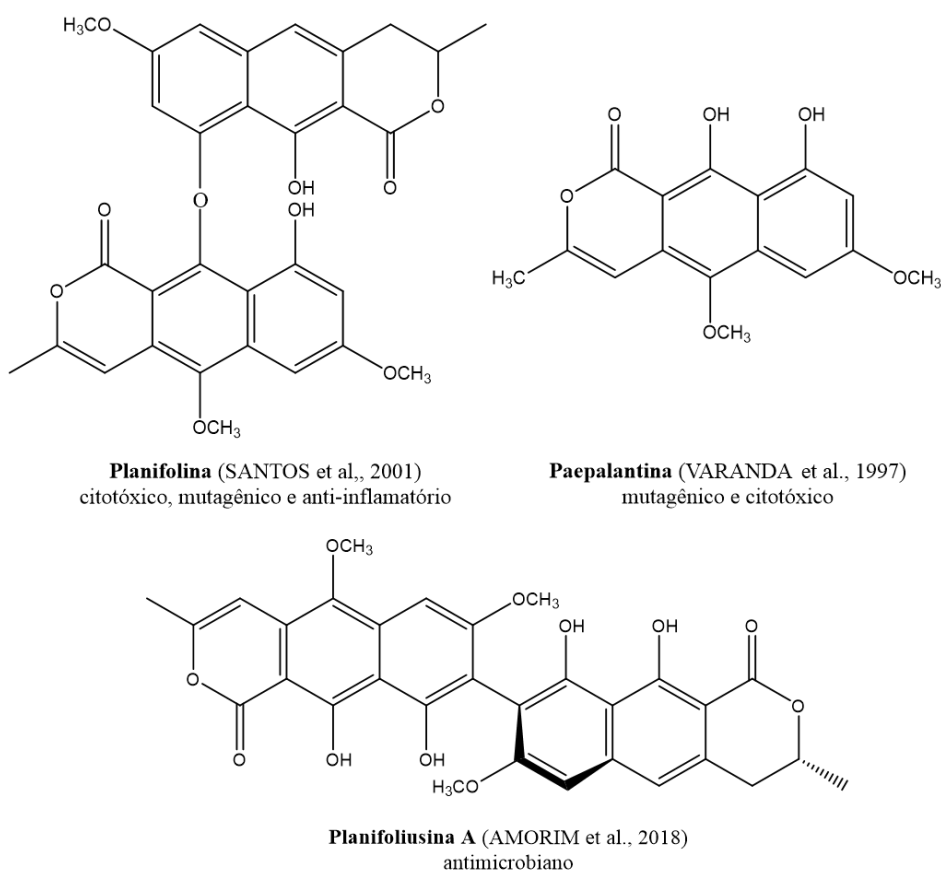
O gênero *Paepalanthus* possui 460 espécies, sendo 200 delas endêmicas em nosso país e presentes na região da Cadeia do Espinhaço. É o segundo maior gênero dentro da família e se distingue morfológicamente dos demais pela presença de folhas em forma de roseta na base do material vegetal e pelas inflorescências capituliformes envoltas por brácteas (Figura 1) (SCHMIDT et al., 2007; COSTA et al., 2008; TROVÓ & SANO, 2010).

Figura 1 - Partes aéreas de *P. planifolius* coletada na Serra do Cipó. Fonte: TROVÓ, M.



No aspecto químico e biológico podemos identificar a presença de flavonoides nos capítulos e escapos do material vegetal e naftopiranonas majoritariamente nos capítulos, com destaque para o potencial biológico de algumas espécies bem como atividade antioxidante (DAMASCENO et al., 2015), citotóxica (KITAGAWA et al., 2015), mutagênica (VARANDA et al., 2006), anti-inflamatória (CESTARI et al., 2009), entre outras. Dentre essas substâncias podemos destacar a paepalantina isolada de *Paepalanthus vellozioides* (VARANDA et al., 1997), a planifolina e a planifoliusina A isoladas de *Paepalanthus planifolius* (SANTOS et al., 2001; AMORIM et al., 2018, no prelo) (Figura 2).

Figura 2 – Compostos isolados de espécies do gênero *Paepalanthus*.



Apesar da grande quantidade de estudos já realizados com espécies da família, existem poucos dados publicados sobre a produção metabólica de microrganismos associados a essas espécies vegetais. De acordo com Strobel e Daisy (2003) existem alguns critérios para a seleção da planta hospedeira para o isolamento e estudo dos microrganismos endofíticos, dentro os quais *P. planifolius* destaca-se por pertencer a uma região de grande diversidade e endemismo. Além disso, temos que dímeros de naftopiranonas com monômeros semelhantes ao da vioxantina e paepalantina

também são encontrados em fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (HILL, 1986). Desse modo, nesse trabalho realizamos o estudo químico e prospecção biológica dos endófitos associados à *P. planifolius*.

1.2 Fungos endofíticos e *Microsphaeropsis arundinis*

Entre as várias fontes de moléculas naturais, os microrganismos como fungos e bactérias podem ser considerados uma fonte rica de metabólitos biologicamente ativos. Quando associados a organismos terrestres e marinhos, esses podem colonizar os órgãos internos (endofíticos) ou externos (epifíticos) do hospedeiro.

Fungos endofíticos se associam a um organismo hospedeiro em uma associação simbiótica onde não exercem efeitos patogênicos aparentes (REKHA et al., 2013). Nessa associação, a planta protege e alimenta o endófito que em troca compartilha material genético ou produz metabólitos que auxiliam no crescimento, na competitividade e na proteção do hospedeiro contra herbívoros e patógenos (GUNATILAKA, 2006). Como exemplo dessa associação podemos citar a associação de fungos micorrízicos com as raízes de plantas, onde os microrganismos auxiliam na absorção de água e sais minerais do solo, bem como a presença de bactérias nas raízes que auxiliam na fixação de nitrogênio e outros nutrientes.

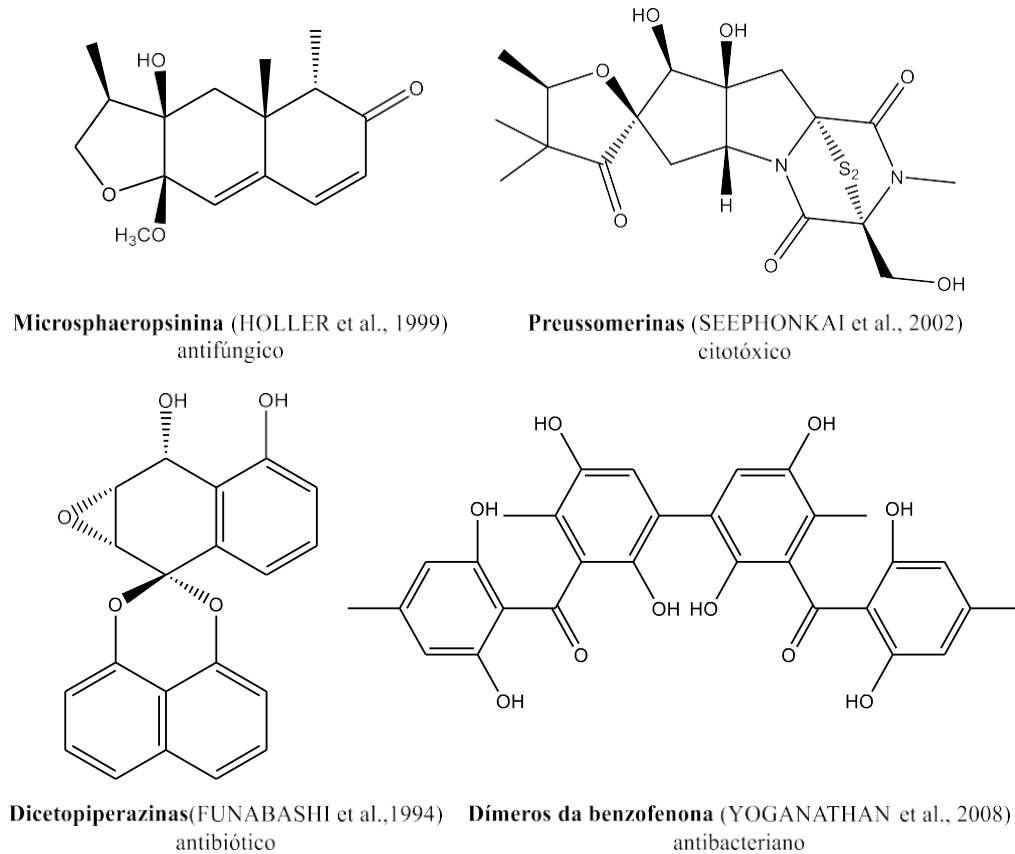
Os fungos endofíticos são um grupo polifilético de grande diversidade metabólica estando presentes em praticamente todos os organismos. Sua produção metabólica varia de acordo com o meio de cultivo em que o microrganismo está inoculado, de modo que a diferença dos tipos de nutrientes presentes no meio altera a eficiência e a ativação de diferentes vias biossintéticas, resultando na produção de diferentes substâncias (KHARWAR et al., 2011).

Nesse trabalho, realizamos o estudo do endófito *Microsphaeropsis arundinis*, isolado de *P. planifolius*, avaliando a produção metabólica a partir do cultivo em diferentes meios.

Endófitos pertencentes ao gênero *Microsphaeropsis* são normalmente encontrados em plantas, esponjas e sedimentos marinhos, o que demonstra sua grande capacidade de adaptação. No aspecto químico temos a produção de substâncias pertencentes a diferentes classes de compostos, como preussomerinas (SEEPHONKAI et al., 2002), dicetopiperazinas (FUNABASHI et al., 1994) e dímeros

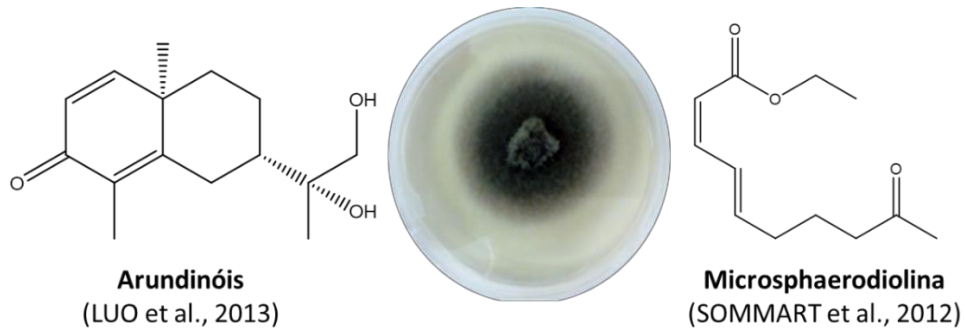
da benzofenona (YOGANATHAN et al., 2008), com a presença de atividades biológicas (Figura 3).

Figura 3 - Metabólitos isolados de espécies do gênero *Microsphaeropsis*.



O endófito de estudo foi identificado como *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo pertencente à classe dos Coelomycetes que se distingue dos demais pela presença de conídios pequenos cilíndricos com paredes lisas. Estudos realizados demonstram que o endófito é patógeno para mamíferos, principalmente para humanos imunocomprometidos e gatos com lesões nos tecidos, sendo responsável por infecções de pele de difícil identificação devido à baixa esporulação do fungo (KLUGER et al., 2004; CRAWFORD et al., 2015). No aspecto químico, temos o isolamento de sesquiterpenóides e macrolídeos como o arundinol e a microsphaerodiolina (SOMMART et al., 2012; LUO et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 - Endófito *Microsphaeropsis arundinis* e substâncias isoladas do fungo endofítico já descritas na literatura. Fonte: Imagem fornecida pelo autor.



De acordo com as atividades descritas para os metabólitos da planta, em especial a planifolina, optou-se por realizar uma bioprospecção antitumoral dos extratos acetato de etila do endófito *M. arundinis* em busca da seleção do mais ativo e posterior isolamento de novos metabólitos com potencial biológico. É a primeira vez que um estudo desse tipo é realizado com uma espécie do gênero e espera-se que o mesmo ajude na elucidação das relações entre o endófito e o hospedeiro.

5 CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho foi possível avaliar a variabilidade do cultivo do fungo *Microsphaeropsis arundinis* em diferentes meios, onde verificou-se a partir do perfil cromatográfico as diferenças nas quantidades e nos tipos de metabólitos produzidos. Os extratos acetato de etila obtidos foram também avaliados quanto a seu potencial antitumoral, o que demonstrou que o endófito cultivado em arroz parboilizado produz os metabólitos mais ativos, principalmente contra as linhagens de câncer de mama murino ($IC_{50} = 39,91 \mu\text{g mL}^{-1}$) e humano ($IC_{50} = 51,93 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O extrato mais ativo foi fracionado cromatograficamente e obteve-se oito substâncias, dentre as quais três derivados do ácido decanóico inéditos na literatura (**1-3**), dois policetídeos descritos pela primeira vez (**5 e 7**) e três substâncias já conhecidas como produtos naturais de endófitos (**4, 6 e 8**). Uma análise das classes de compostos isoladas demonstra que esses metabólitos são provenientes da via do acetato, sendo essa a principal rota biossintética para o endófito dentre o extrato estudado.

6 REFERÊNCIAS

- AMORIM, M. R.; HILÁRIO, F.; SANO, P. T.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Antimicrobial activity of *Paepalanthus planifolius* and its Major Components against Selected Human Pathogens. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 766-774, 2018.
- AMORIM, M. R.; SOMENSI, A.; ARAUJO, A. R.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. D. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an Endophytic Fungus Isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1048–1054, 2016.
- ANDRADE, M. J. G. D.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; VAN DEN BERG, C. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: Morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178–184, 2011.
- BISKUP, I.; ZACZYNSKA, E.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; FECKA, I. Evaluation of cytotoxicity of 5-n-alkylresorcinol homologs and fraction on mouse fibroblast cell line L929. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 7, p. 1137–1148, 2017.
- CESTARI, S. H.; BASTOS, J. K.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of baccharis dracunculifolia in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2009.
- COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade - Cadeia do Espinhaço: avaliação do conhecimento científico e prioridades de conservação**, v. 4, n. 1–2, p. 91–99, 2008.
- CRAWFORD, S. J.; CHEN, S. C.-A.; HALLIDAY, C.; RANGAN, G. K.; GOTTLIEB, T.; REID, A. B. *Microspheeropsis arundinis* skin and soft tissue infection in renal transplant recipients: three case reports and a review of the literature. **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, n. 1, p. 915–921, 2015.
- DAMASCENO, J. P. L.; GIUBERTI, C. DOS S.; GONÇALVES, R. DE C. R.; KITAGAWA, R. R. Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 395–400, 2015.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2002. Cap. 3-4, p. 35-151.
- DONNER, C. D. Naphthopyranones – isolation, bioactivity, biosynthesis and synthesis. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 4, p. 578–604, 2015.
- FUNABASHI, Y.; HORIGUCHI, T.; TANIDA, S.; HARADA, S.; IINUMA, S. the Relationship of Their Functional Groups and Biological Activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1202–1218, 1994.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N.; PARRA, L. R.; DE ANDRADE, M. J. G.; VAN DEN BERG, C.; HARLEY, R. M. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50–56, 2012.

GUNATILAKA, L. A. A. Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509–526, 2006.

HILL, R. A. Naturally occurring isocoumarins. **Fortschritte der Chemie Organischer**, v. 49, n. 1, p. 1-78, 1986.

IKECHI–NWOGU, C. G. Comparative Evaluation of Growth Media for the Cultivation of Fungal Cultures. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 3–6, 2012.

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

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C. DOS; VILEGAS, W. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1487–8, 2004.

KITAGAWA, R. R.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G. Evaluation of mutagenicity and metabolism-mediated cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin from *Paepalanthus latipes*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 1, p. 16–21, 2015.

KLUGER, E. K.; DELLA TORRE, P. K.; MARTIN, P.; KROCKENBERGER, M. B.; MALIK, R. Concurrent *Fusarium chlamydosporum* and *Microsphaeropsis arundinis* infections in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 4, p. 271–277, 2004.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 1, p. 1–26, 1999.

LUO, J.; LIU, X.; LI, E.; GUO, L.; CHE, Y. Arundinols A-C and arundinones A and B from the plant endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 1, p. 107–112, 2013.

MOREIRA, A. A. N.; CAMELIER, C. Relevô. In: GALVÃO, M. G. **Geografia do Brasil, Região Sudeste**. Editora: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1977. p. 1-50.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

- REKHA, K. J.; BALA, M.; ARYA, V. Endophytic fungus : a potential source of biologically synthesized nanoparticle. **Basic Research Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2013.
- SAENGCHANTARA, S. T.; WALLACE, T. W.; SALFORD, M. Conjugate Addition t 3-(p-tolylsulphanyl)chromone: A route to 2-substitued chromones and chiral 2-substituted chroman-4-ones. **Tetrahedron**, v. 46, n. 18, p. 6553–6564, 1990.
- SANO, P. T.; COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; ECHTERNACHT, L. *Paepalanthus magistrae* (Eriocaulaceae), a remarkable new species in honor of Ana Maria Giulietti-Harley. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 299–303, 2015.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; ALBERT, K.; DACHTLER, M.; VILEGAS, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 122–124, 2001.
- SANTOS, L. C. **Estudo químico de plantas de Eriocaulaceae**. 187 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
- SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SCARIOT, A. Ethnobotany and Effects of Harvesting on the Population Ecology of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), a NTFP from Jalapão Region, Central Brazil. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 73–85, 2007.
- SEEPHONKAI, P.; ISAKA, M.; KITTA KOOP, P.; PALITTAPONGARNPIM, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 45–48, 2002.
- SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TADPETCH, K.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; SAKAYAROJ, J. Modiolin and phthalide derivatives from the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18. **Tetrahedron**, v. 68, n. 48, p. 10005–10010, 2012.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 67, n. 4, p. 491–402, 2003.
- TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section Diphyomene (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, n. 1, p. 49–55, 2010.
- TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Modiolides A and B, two new 10-membered macrolides from a marine-derived fungus. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 412–415, 2003.
- VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DE LUZ DIAS, F.; ARAÚJO, M. C. P.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85–95, 1997.

VARANDA, E. A.; VARELLA, S. D.; RAMPAZO, R. A.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: A naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 664–668, 2006.

YOGANATHAN, K.; CAO, S.; CRASTA, S. C.; AITIPAMULA, S.; WHITTON, S. R.; NG, S.; BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. Microsphaerins A-D, four novel benzophenone dimers with activity against MRSA from the fungus *Microsphaeropsis* sp. **Tetrahedron**, v. 64, n. 44, p. 10181–10187, 2008.

ANEXOS

Substância 1

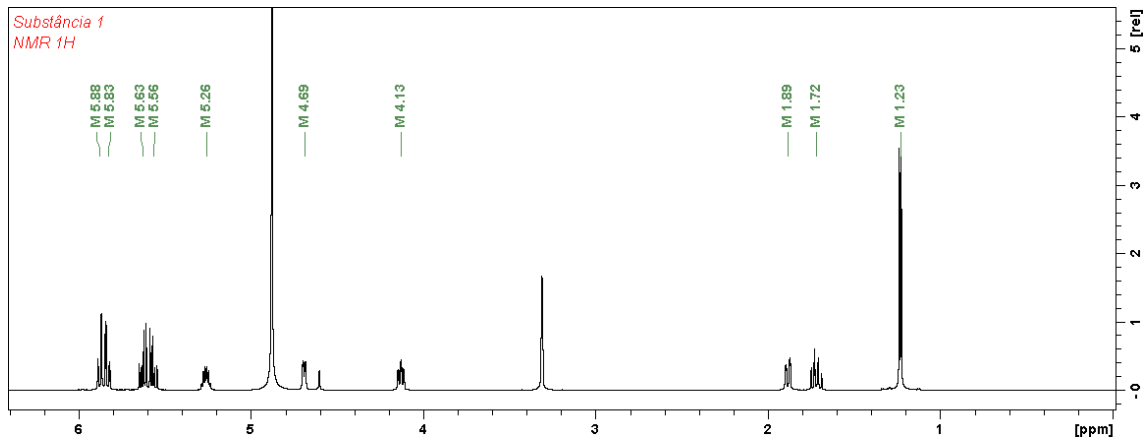
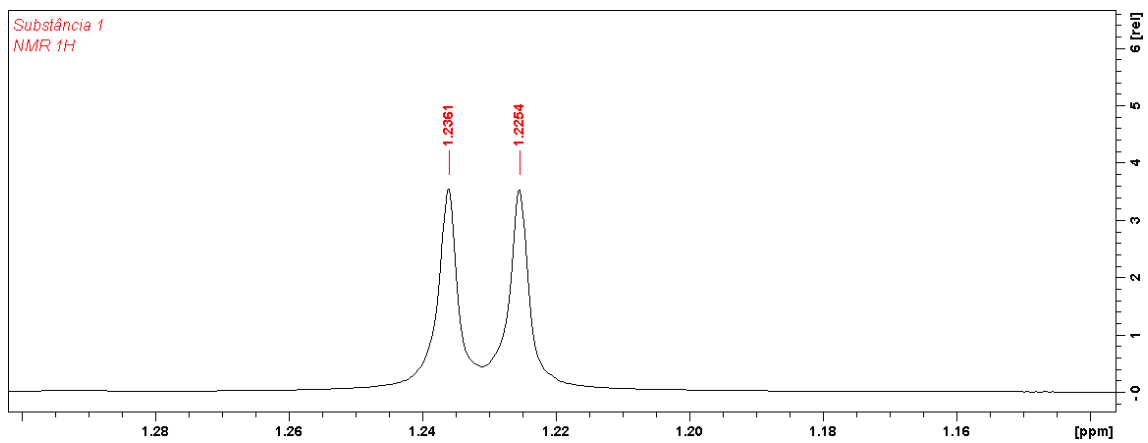
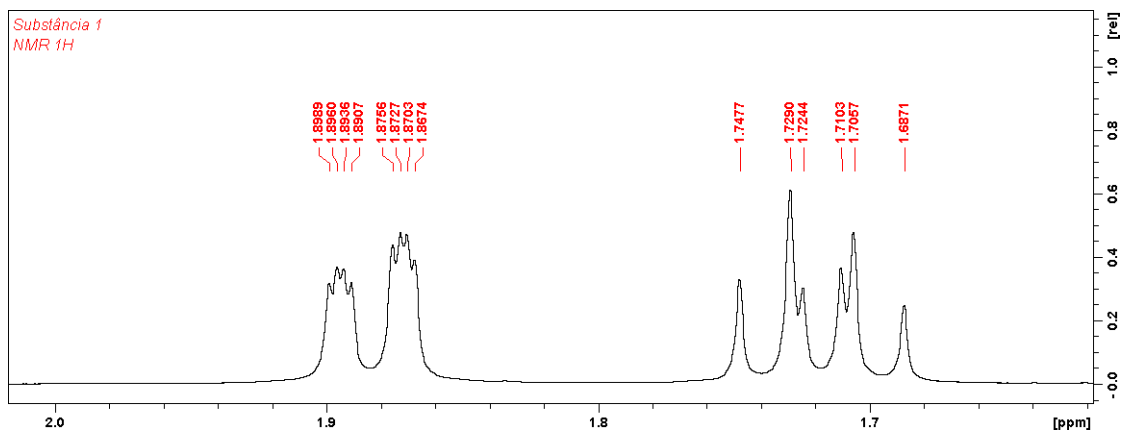
Figura 36 - Espectro de NMR ^1H da substância 1.Figura 37 - Espectro de NMR ^1H da substância 1 (expansão da região de δ_{H} 1,16-1,28 ppm).Figura 38 - Espectro de NMR ^1H da substância 1 (expansão da região de δ_{H} 1,60-2,00 ppm).

Figura 39 – Espectro de NMR ^1H da substância 1 (expansão da região de δ_{H} 4,00-4,80 ppm).

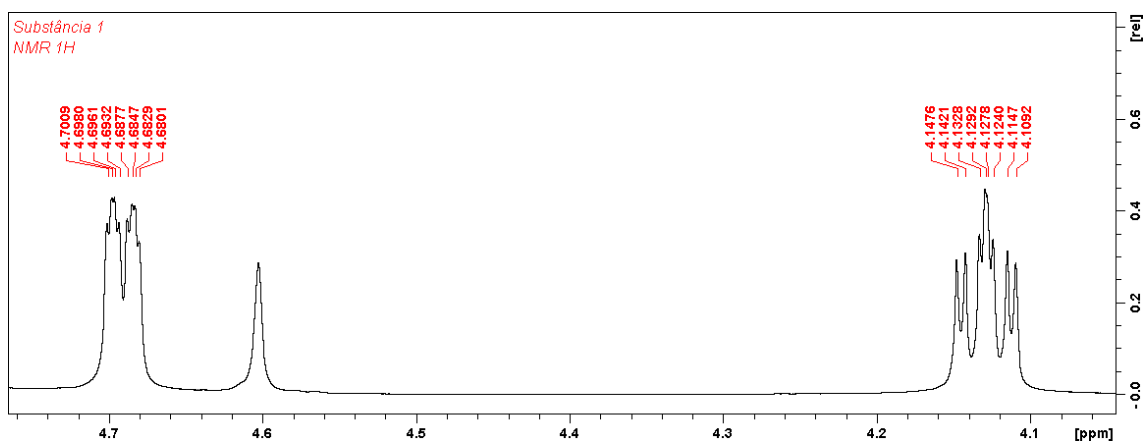


Figura 40 - Espectro de NMR ^1H da substância 1 (expansão da região de δ_{H} 5,20-6,00 ppm).

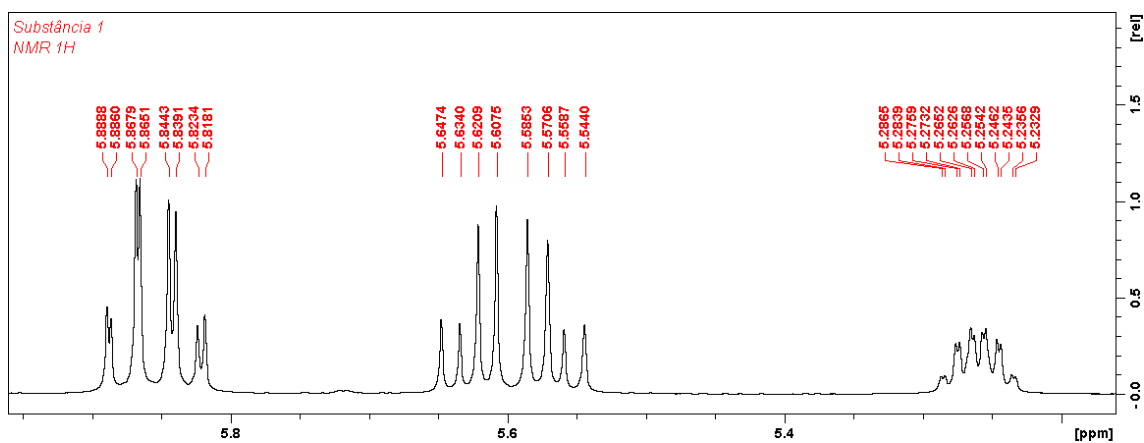


Figura 41 - Espectro de NMR ^{13}C da substância 1.

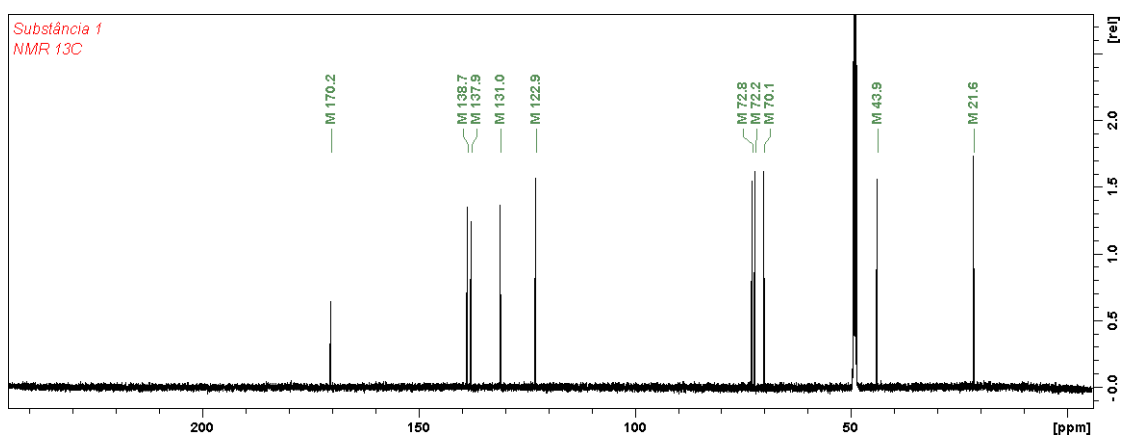


Figura 42 - Espectro de DEPT-135 da substância 1.

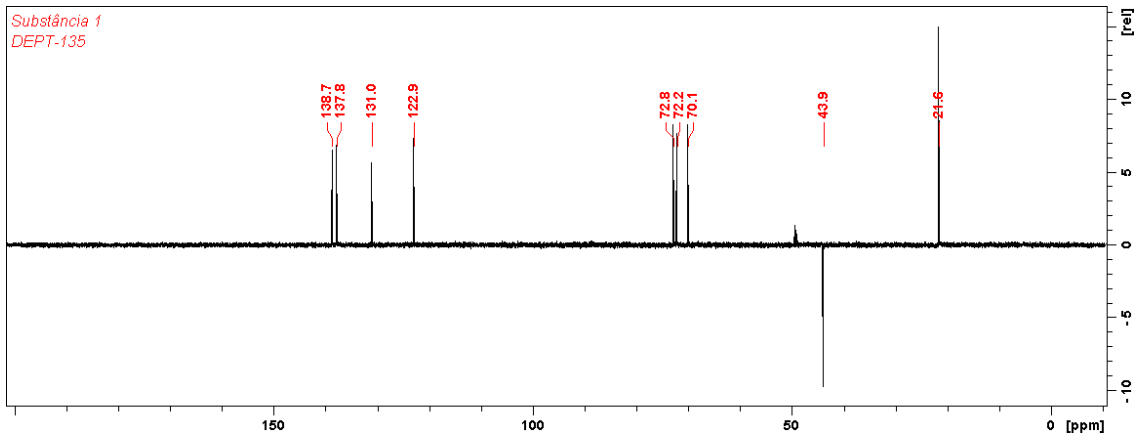


Figura 43 - Espectro de COSY da substância 1.

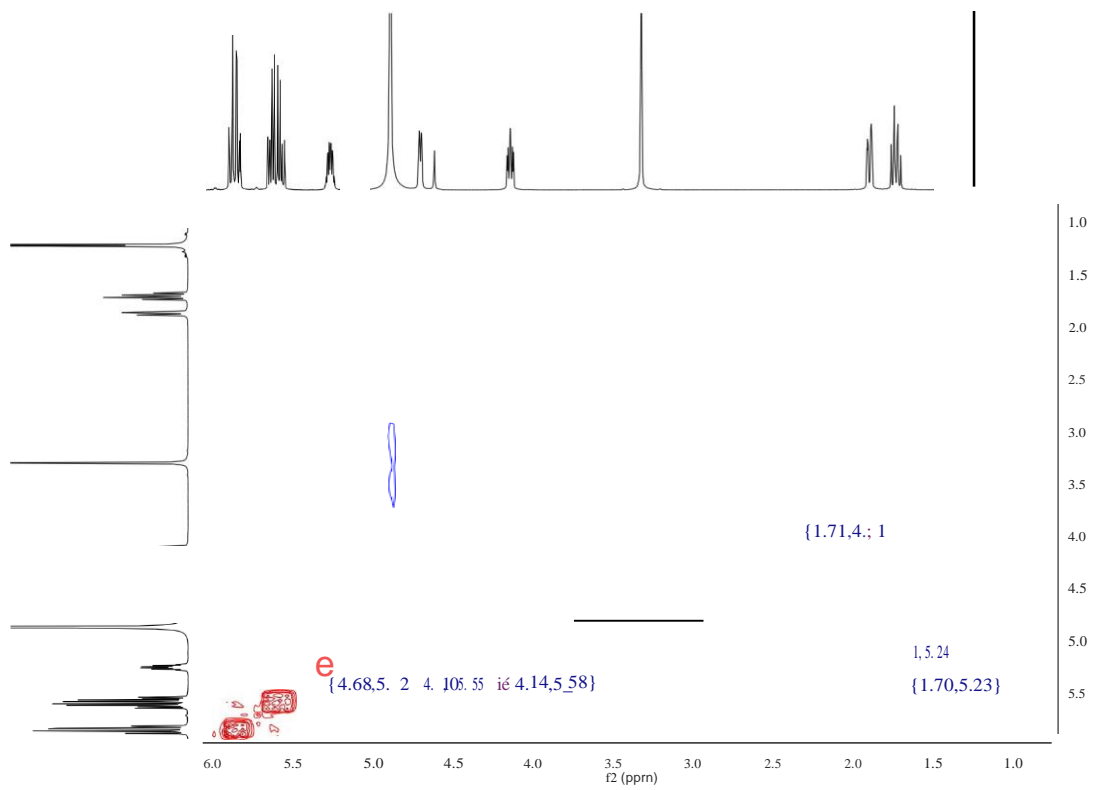


Figura 44 - Espectro de gHSQC da substância 1.

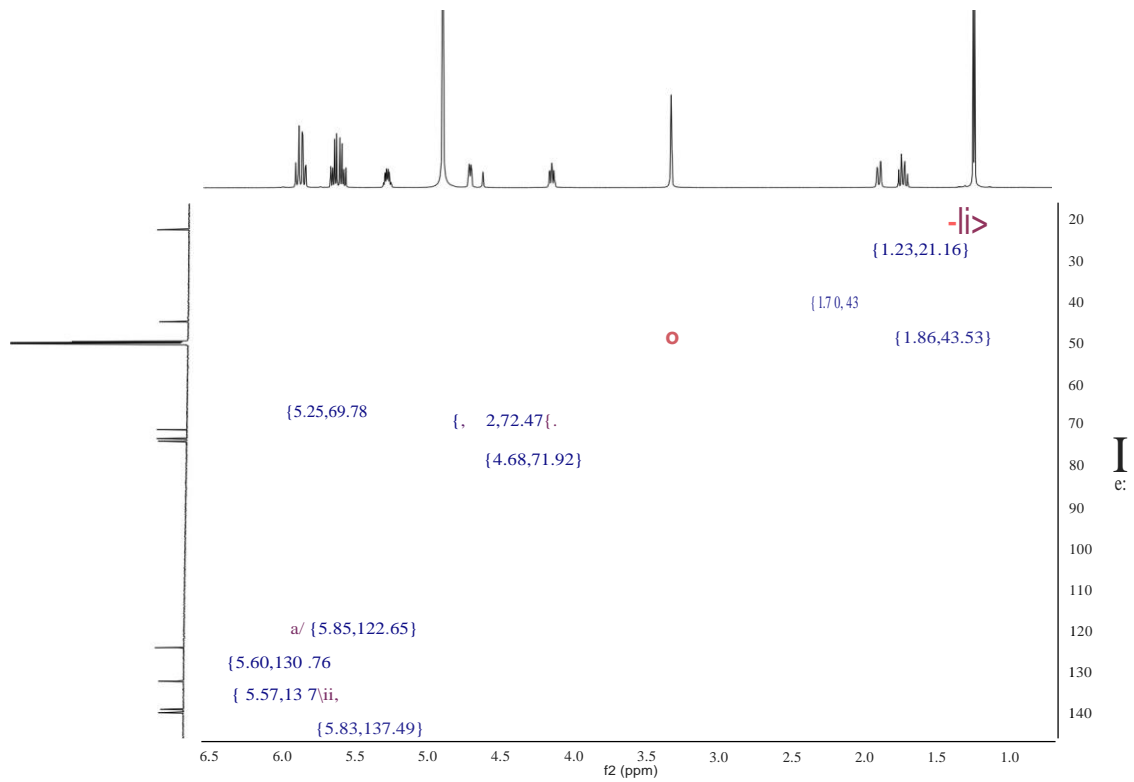
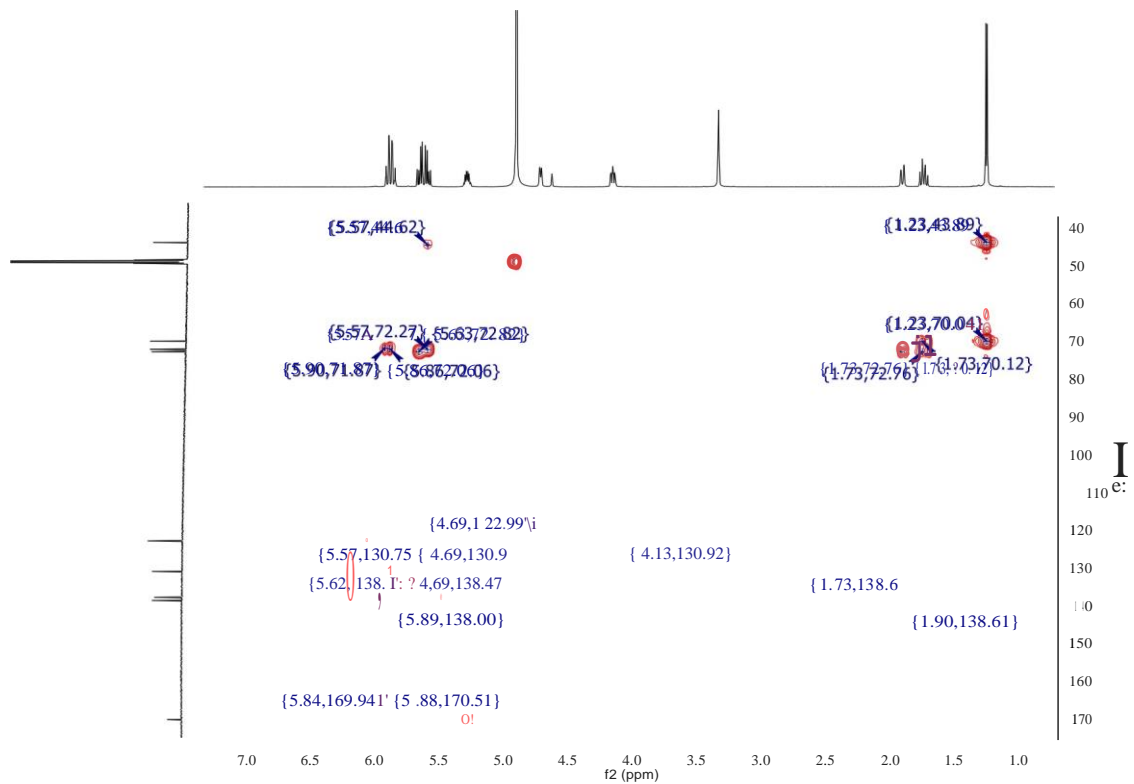


Figura 45 - Espectro de gHMBC da substância 1.



Substância 2

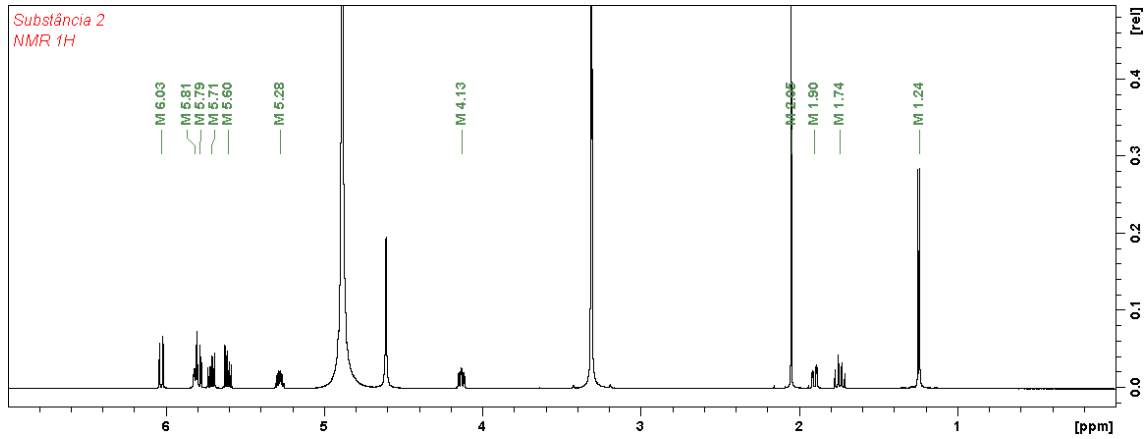
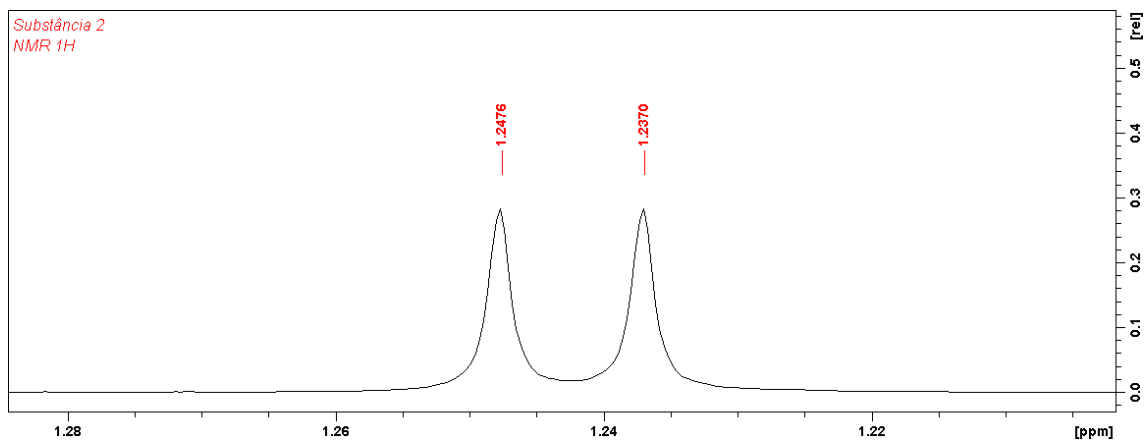
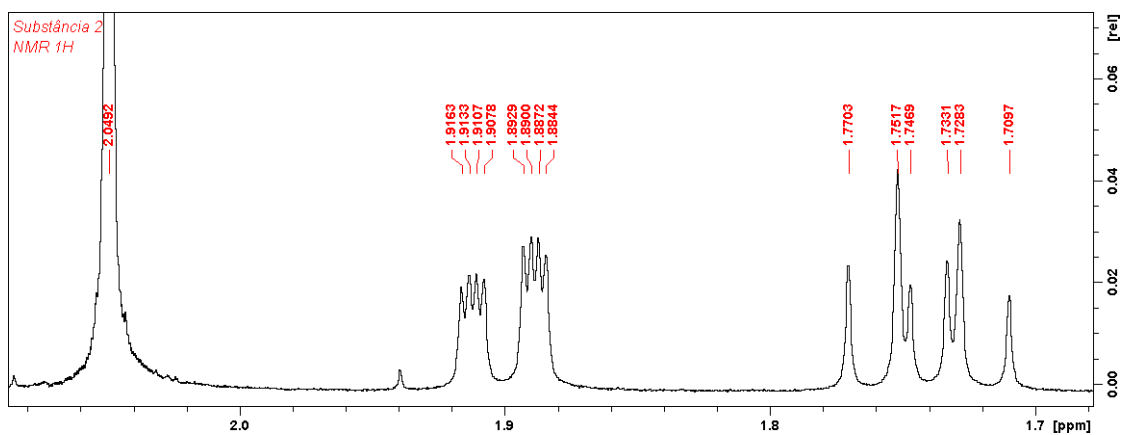
Figura 46 - Espectro de NMR ^1H da substância 2.Figura 47 - Espectro de NMR ^1H da substância 2 (expansão da região de δ_{H} 1,20-1,28 ppm).Figura 48 - Espectro de NMR ^1H da substância 2 (expansão da região de δ_{H} 1,70-2,10 ppm).

Figura 49 - Espectro de NMR ^1H da substância 2 (expansão da região de δ_{H} 5,20-5,80 ppm).

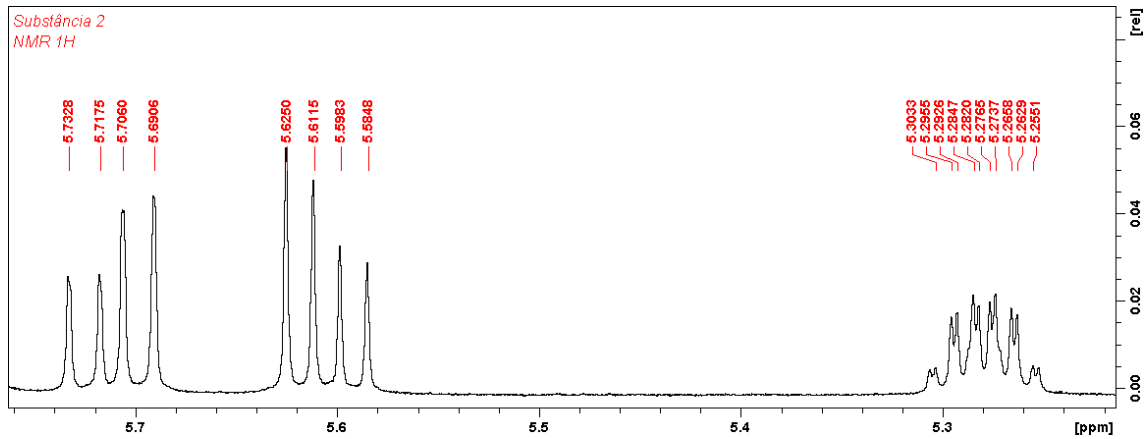


Figura 50 - Espectro de NMR ^1H da substância 2 (expansão da região de δ_{H} 5,75-6,10 ppm).

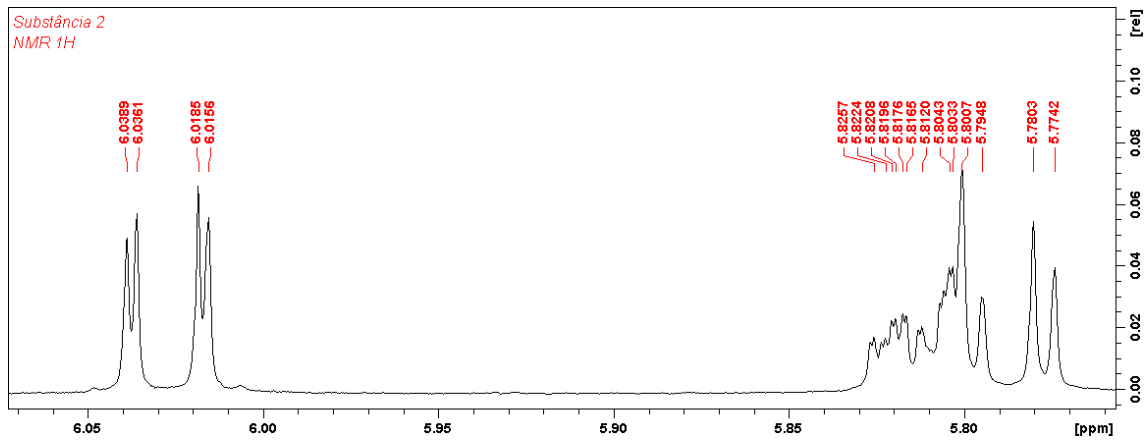


Figura 51 - Espectro de NMR ^{13}C da substância 2.

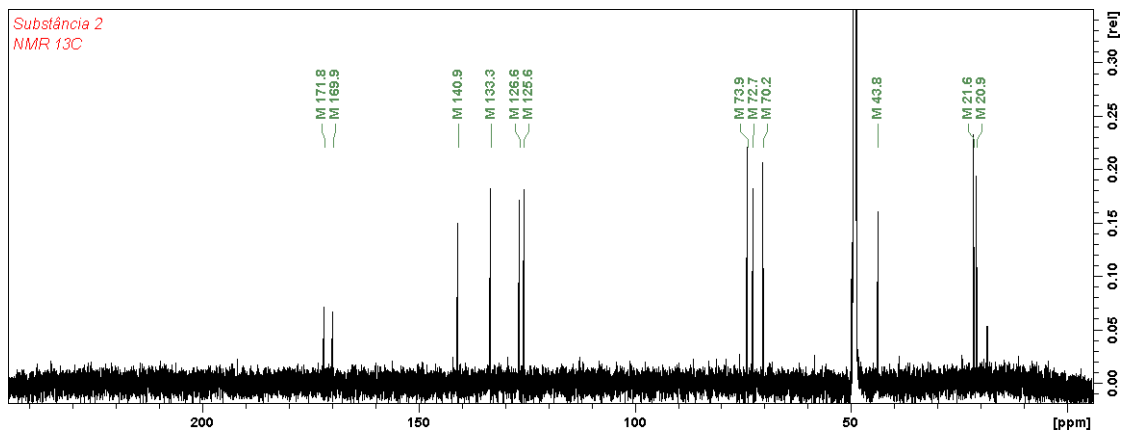


Figura 52 - Espectro de DEPT-135 da substância 2.

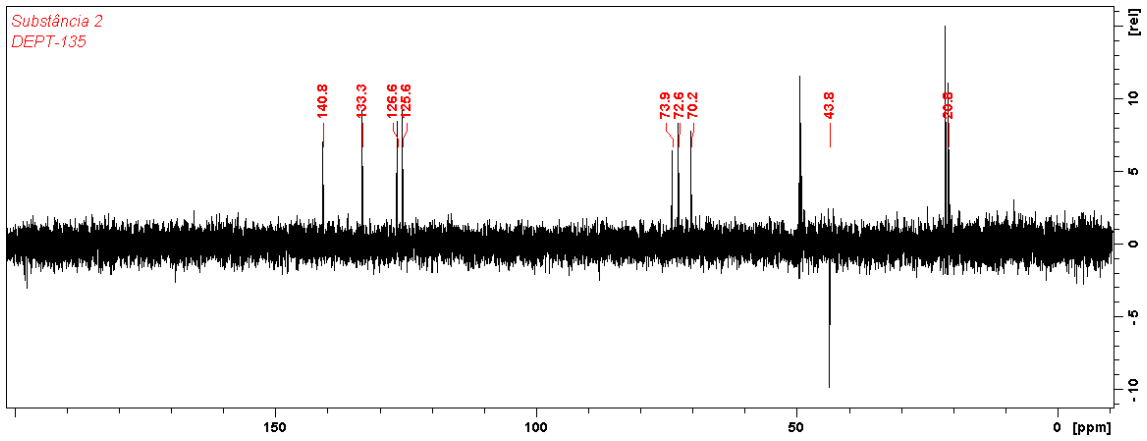


Figura 53 - Espectro de COSY da substância 2.

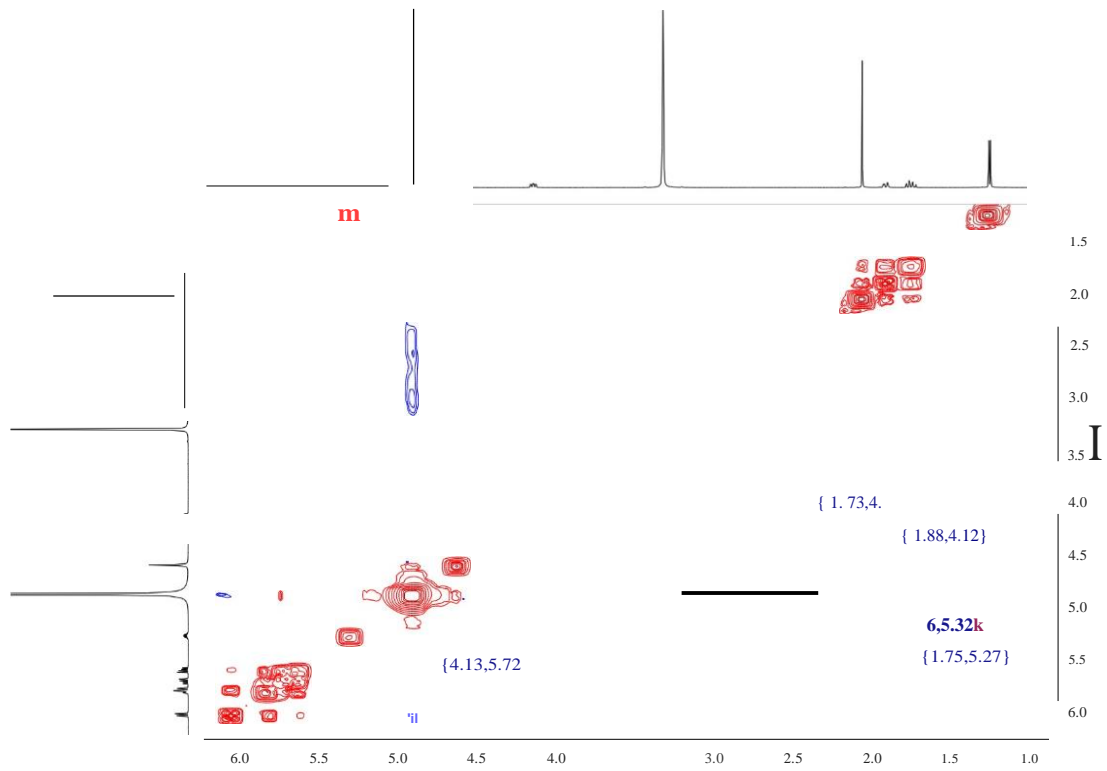


Figura 54 - Espectro de gHSQC da substância 2.

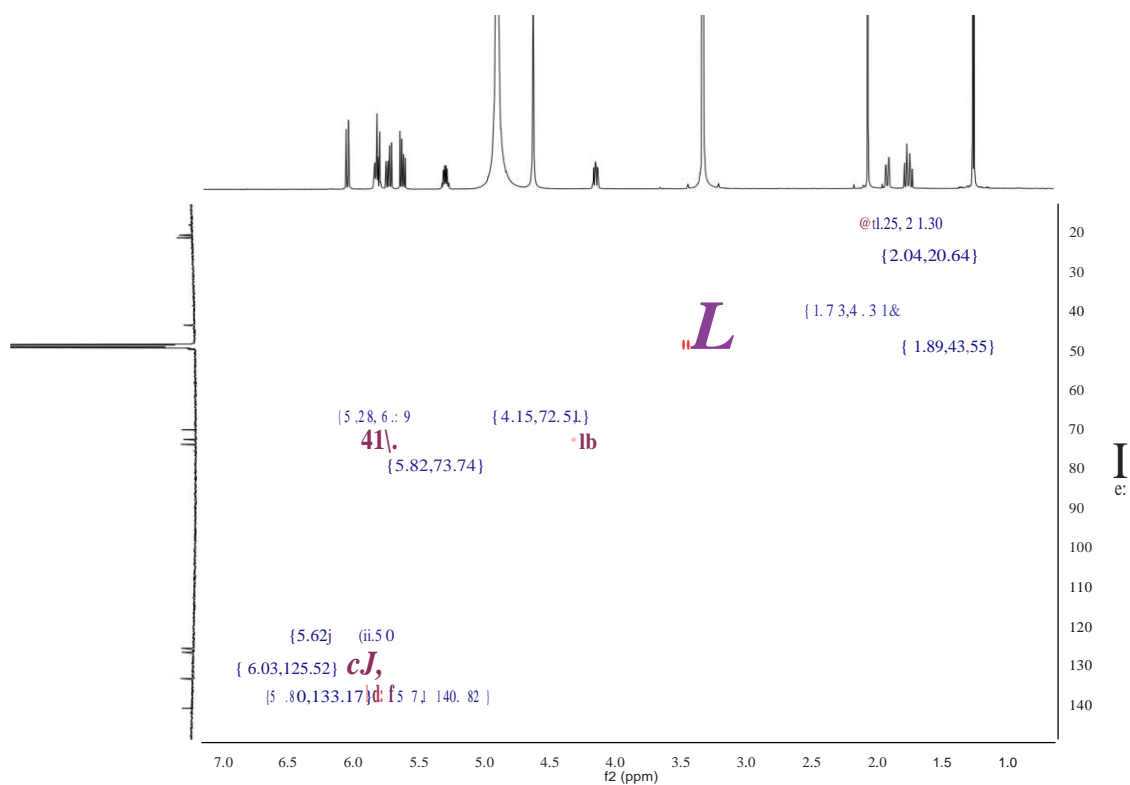
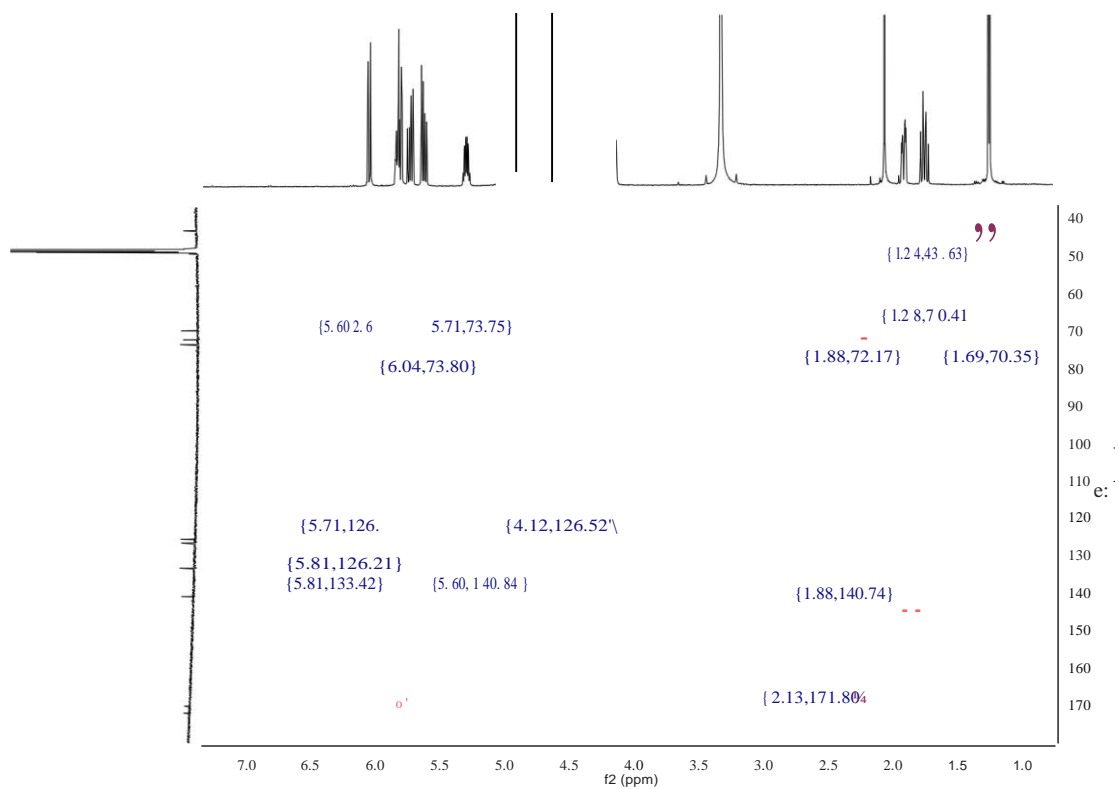


Figura 55 - Espectro de gHMBC da substância 2.



Substância 3

Figura 56 - Espectro de NMR ^1H da substância 3.

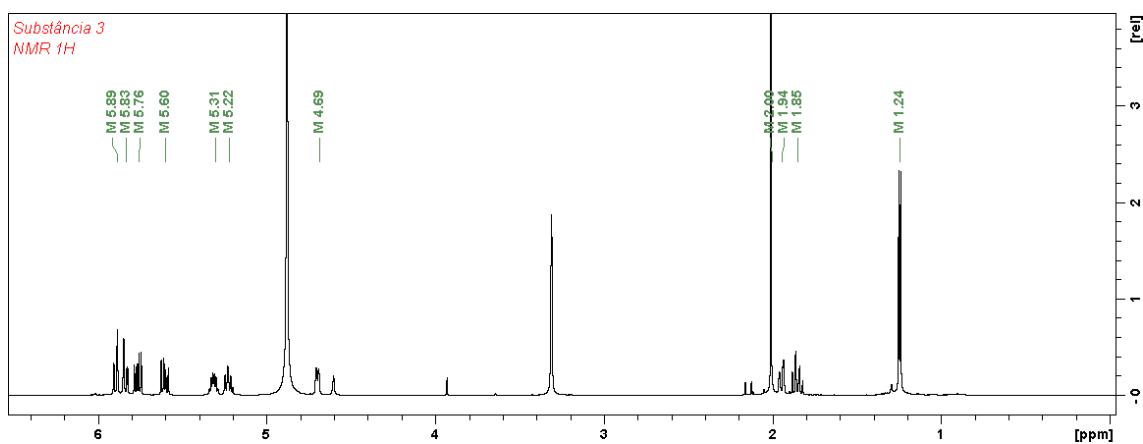


Figura 57 - Espectro de NMR ^1H da substância 3 (expansão da região de δ_{H} 1,10-1,40 ppm).

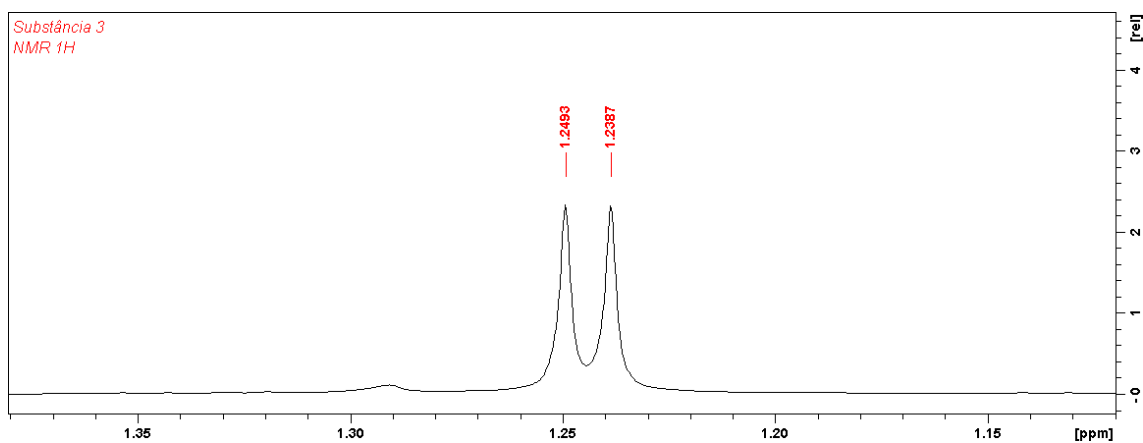


Figura 58 - Espectro de NMR ^1H da substância 3 (expansão da região de δ_{H} 1,80-2,05 ppm).

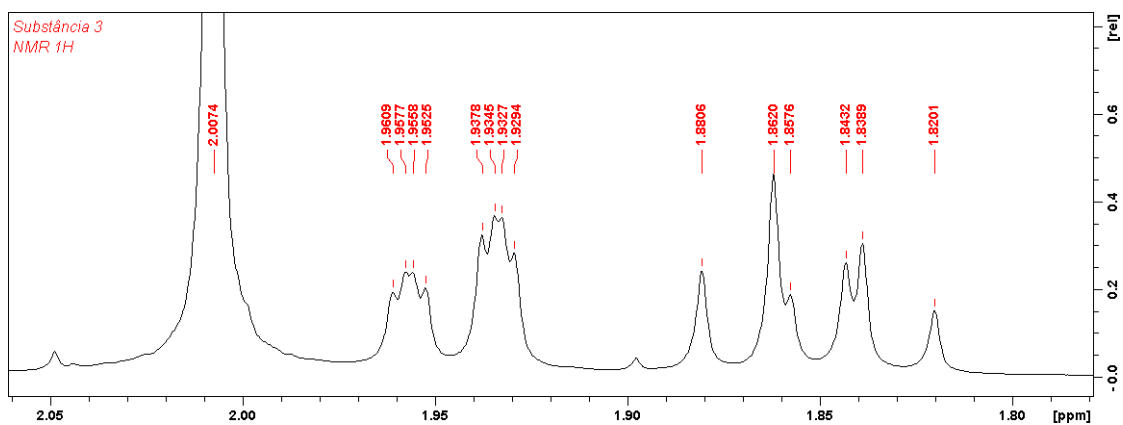


Figura 59 - Espectro de NMR ^1H da substância **3** (expansão da região de δ_{H} 4,70-5,40 ppm).

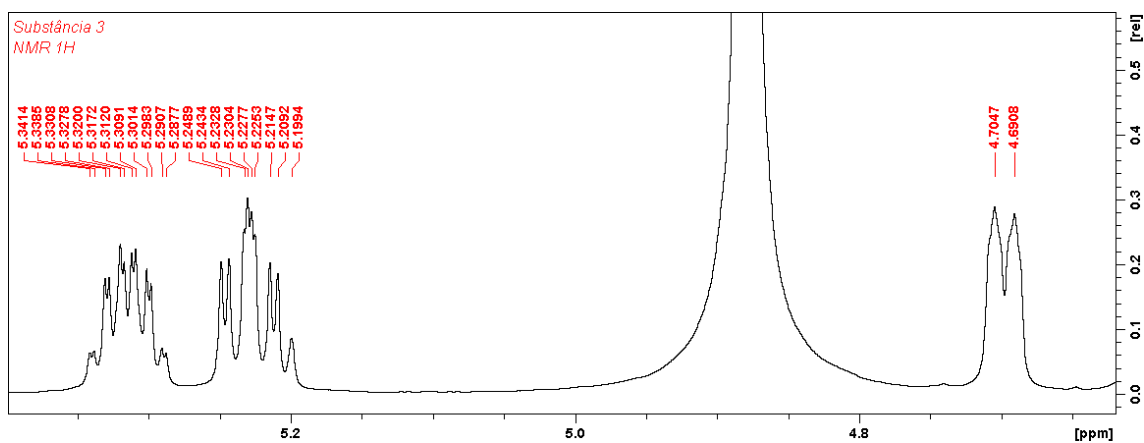


Figura 60 - Espectro de NMR ^1H da substância **3** (expansão da região de δ_{H} 5,50-6,00 ppm).

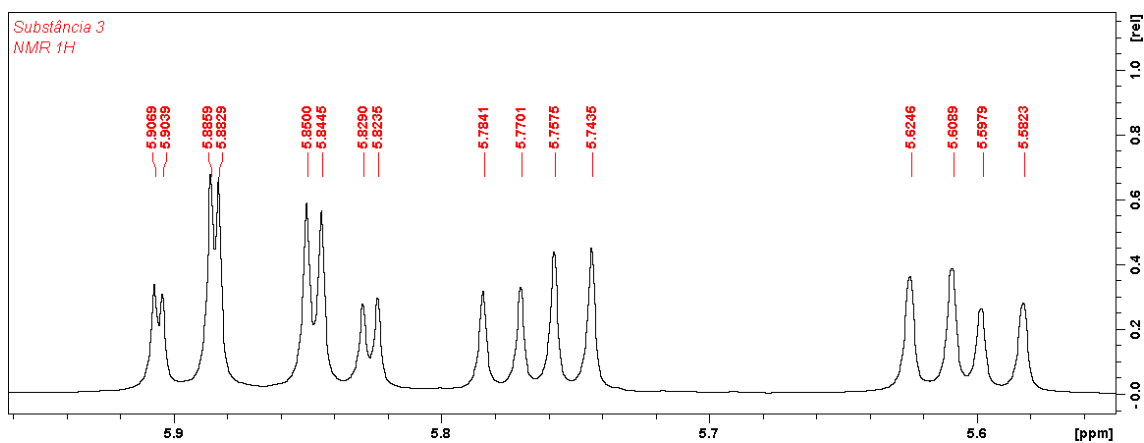


Figura 61 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **3**.

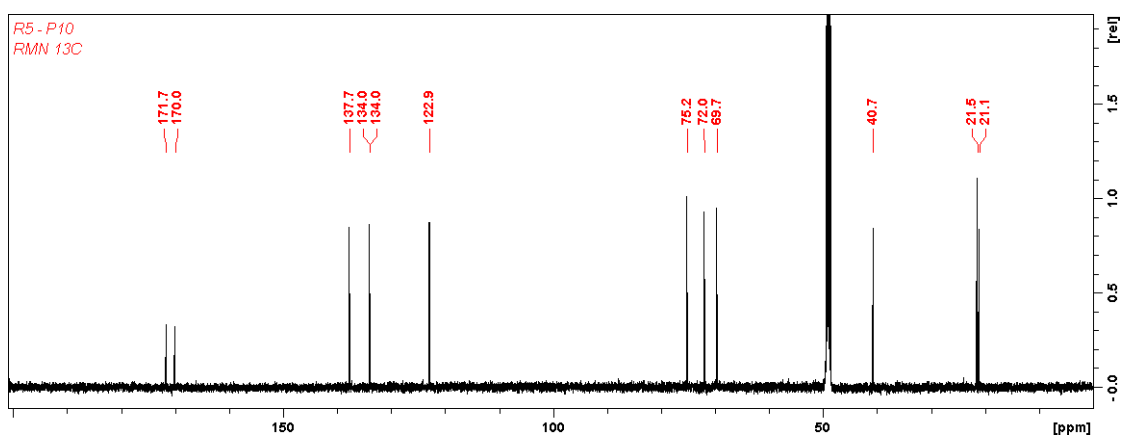


Figura 62 - Espectro de DEPT-135 da substância 3.

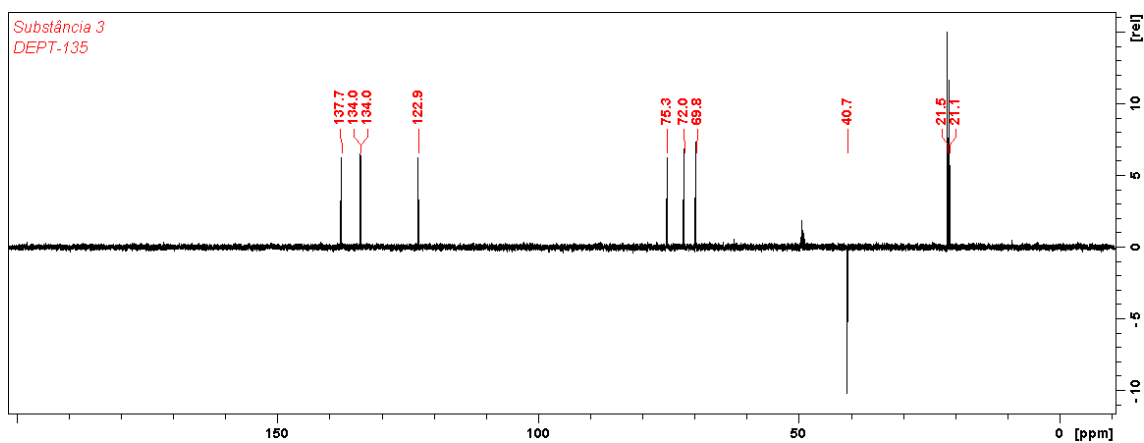


Figura 63 - Espectro de COSY da substância 3.

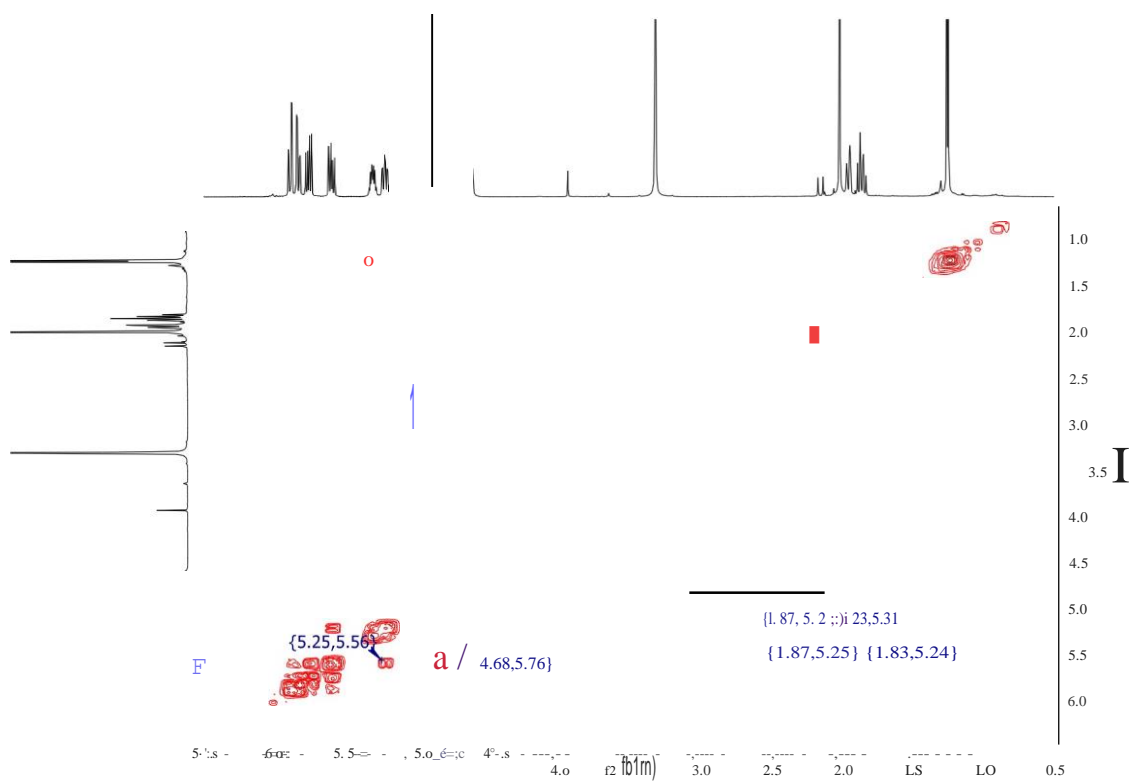


Figura 64 - Espectro de gHSQC da substância 3.

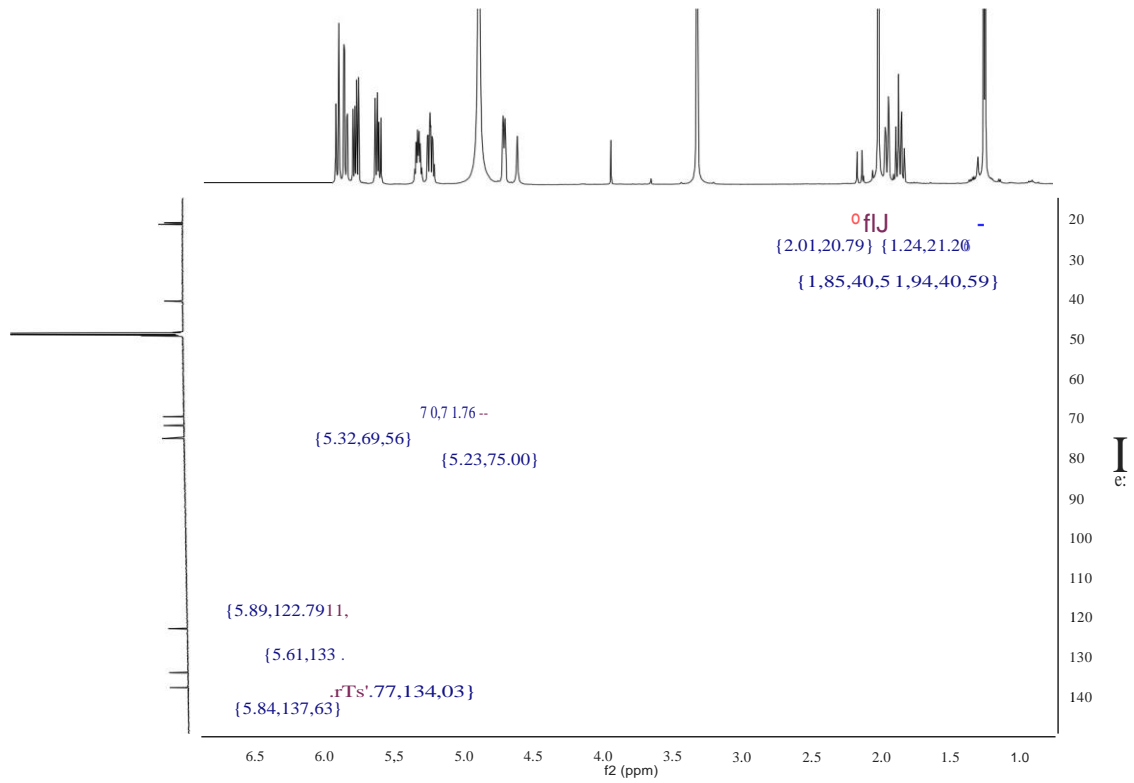
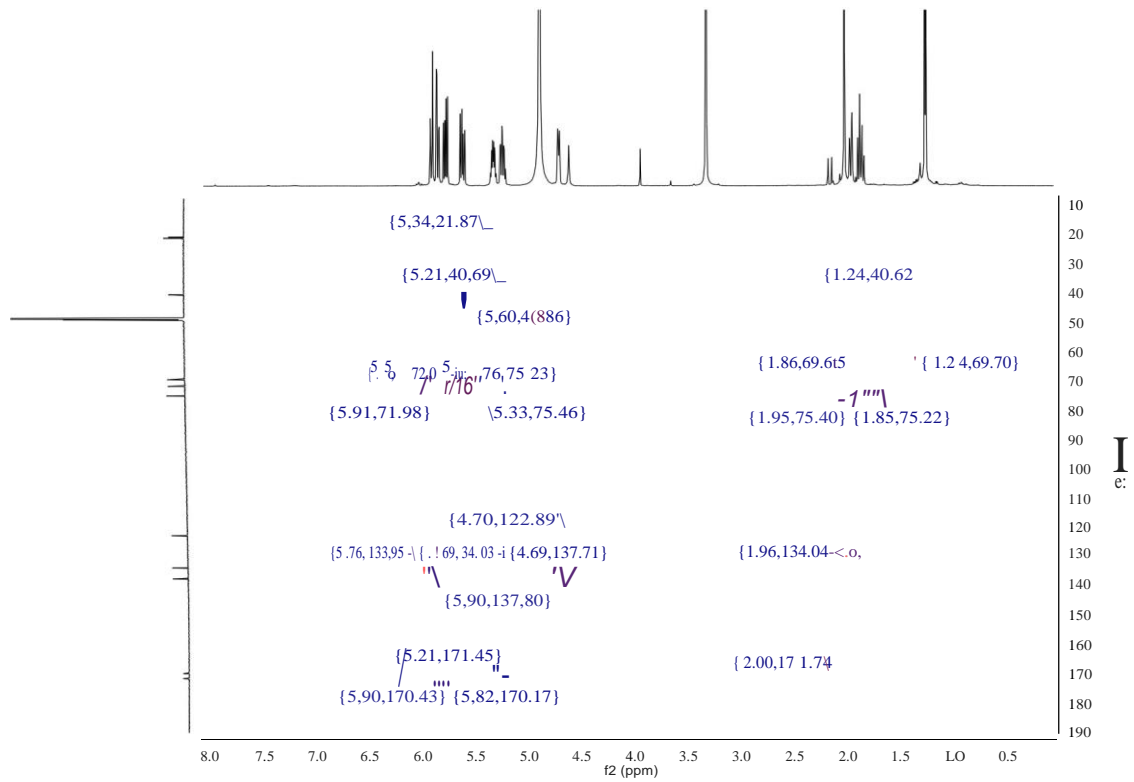


Figura 65 - Espectro de gHMBC da substância 3.



Substância 4

Figura 66 - Espectro de NMR ^1H da substância 4.

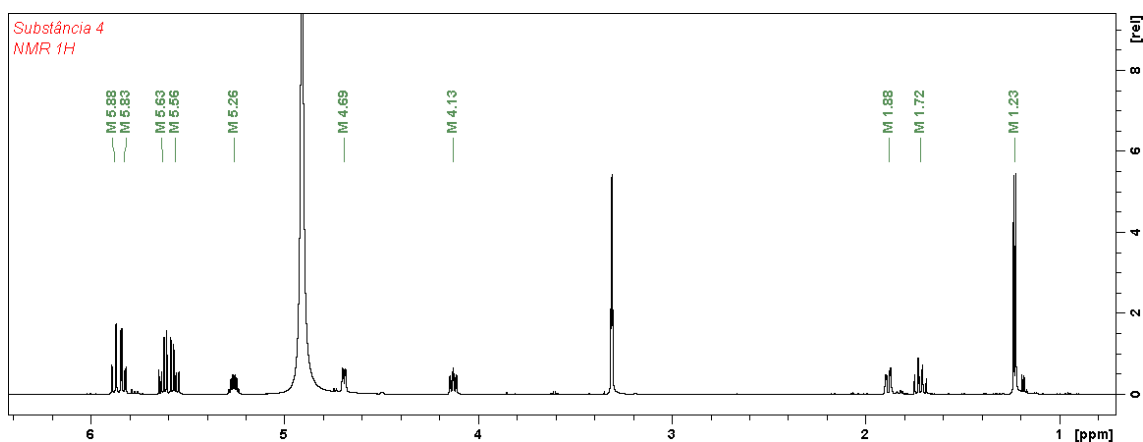


Figura 67 – Espectro de NMR ^1H da substância 4 (expansão da região de δ_{H} 1,16-1,34 ppm).

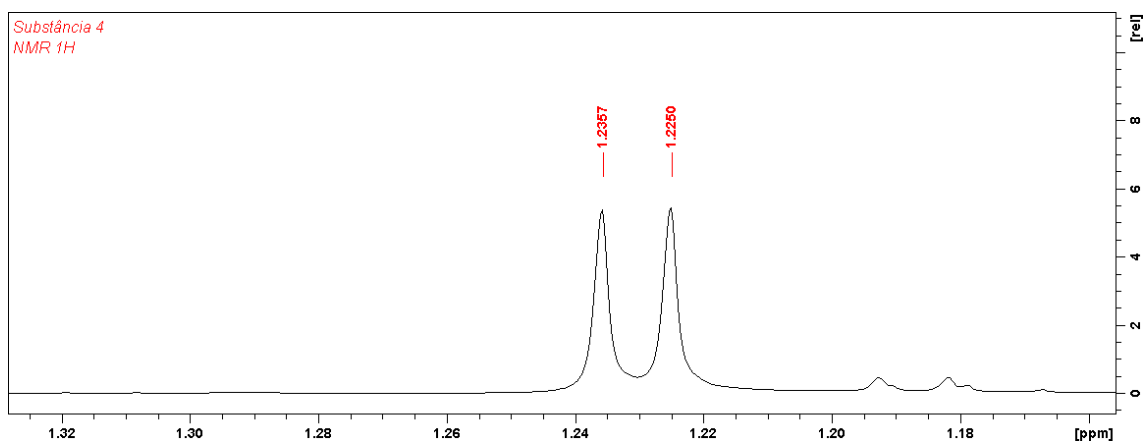


Figura 68 - Espectro de NMR ^1H da substância 4 (expansão da região de δ_{H} 1,60-2,00 ppm).

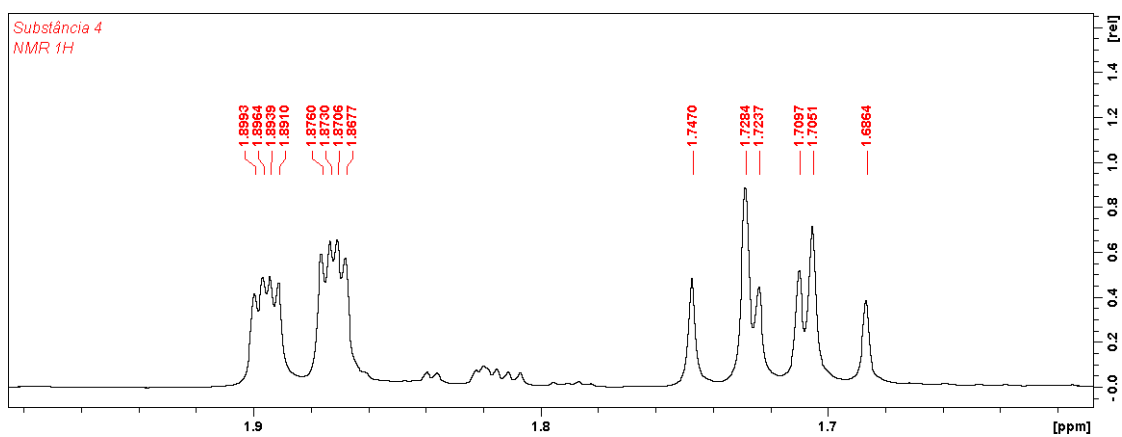


Figura 69 - Espectro de NMR ^1H da substância **4** (expansão da região de δ_{H} 4,10-4,80 ppm).

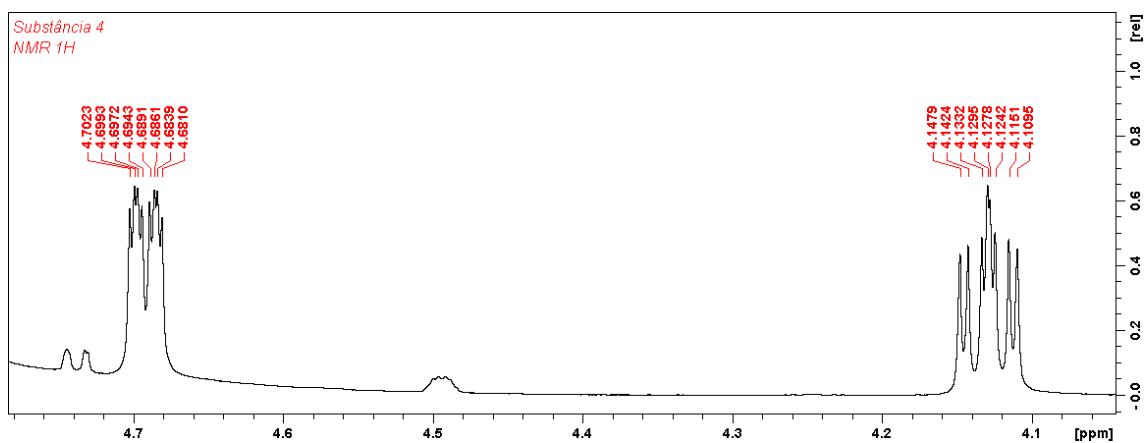


Figura 70 - Espectro de NMR ^1H da substância **4** (expansão da região de δ_{H} 5,20-5,90 ppm).

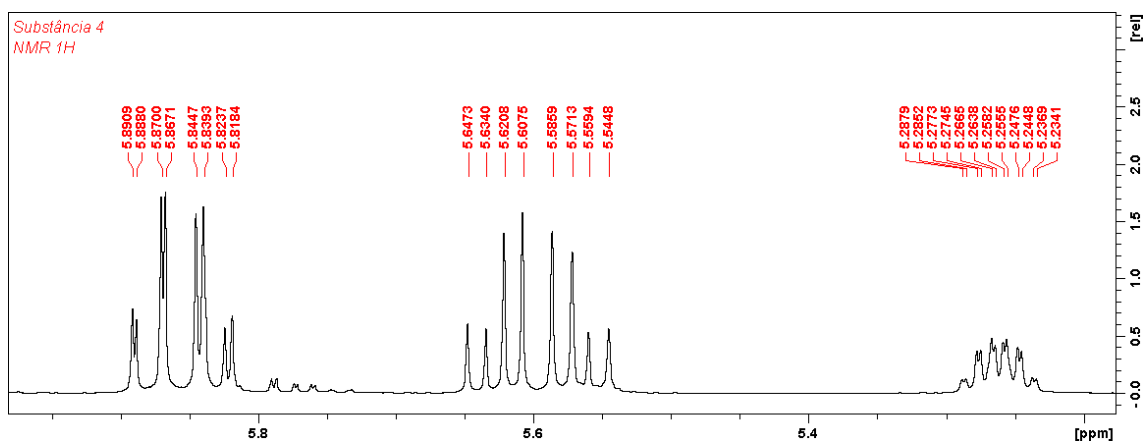


Figura 71 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **4**.

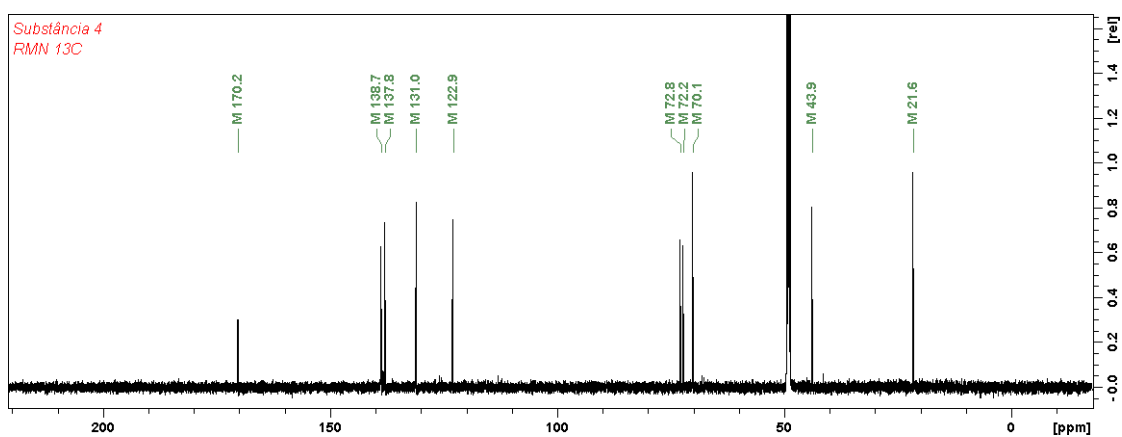


Figura 72 - Espectro de DEPT-135 da substância 4.

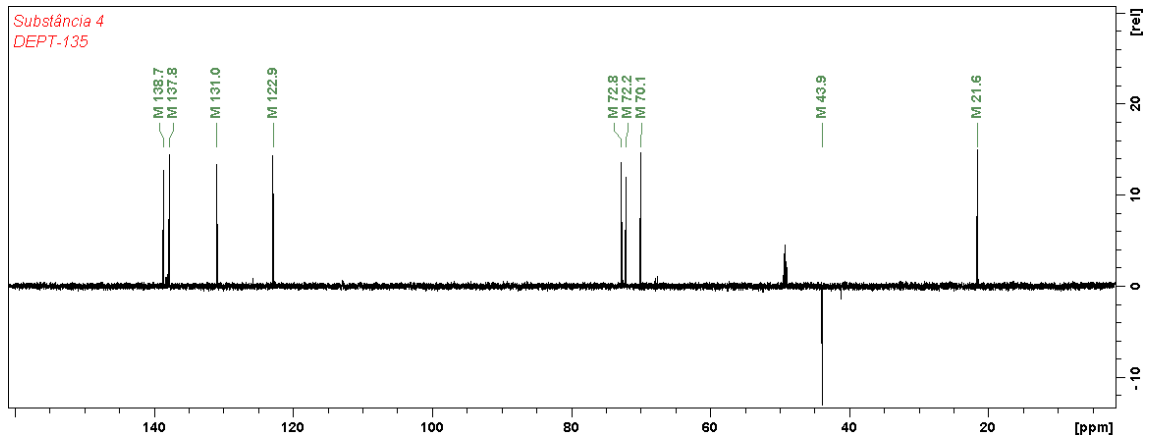


Figura 73 - Espectro de COSY da substância 4.

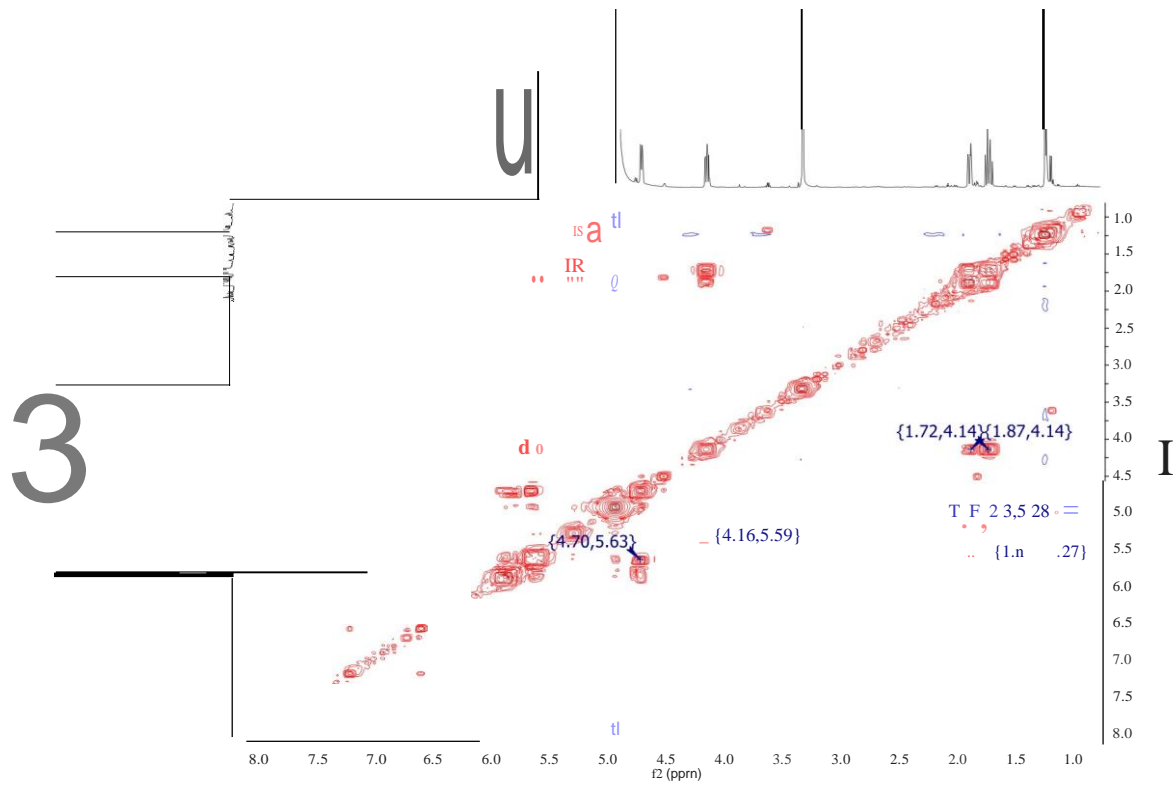


Figura 74 - Espectro de gHSQC da substância 4.

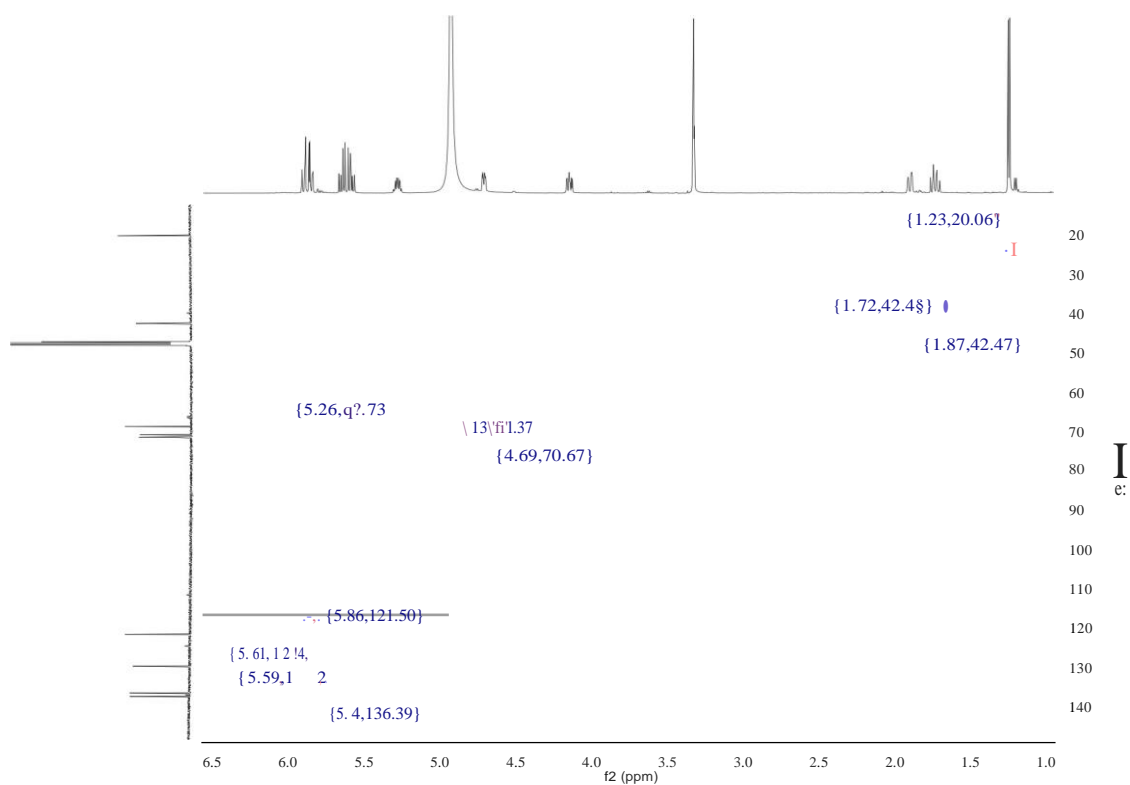
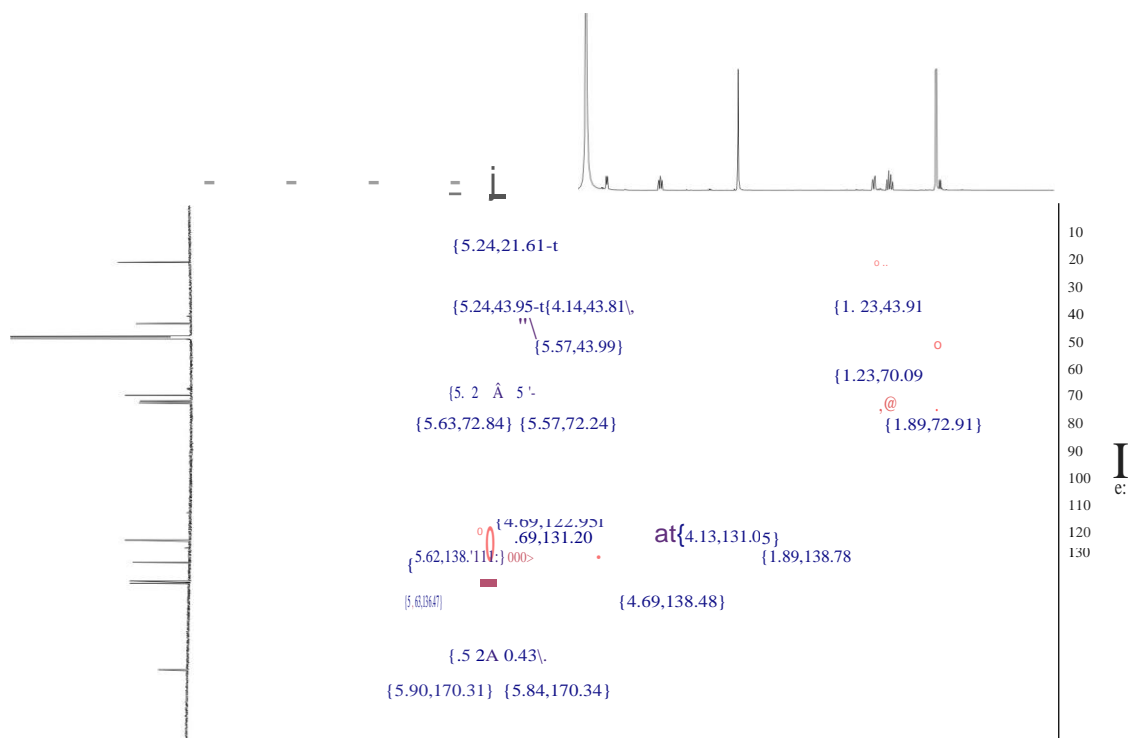


Figura 75 - Espectro de gHMBC da substância 4.



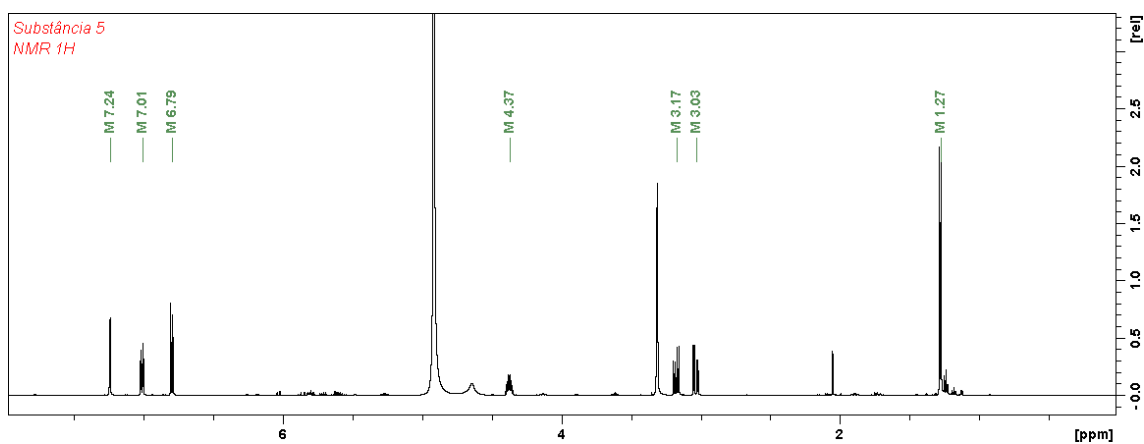
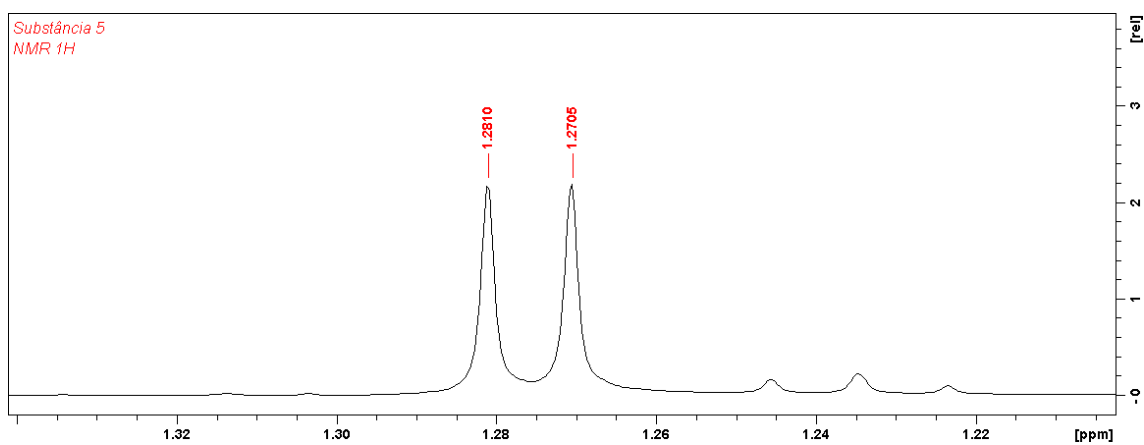
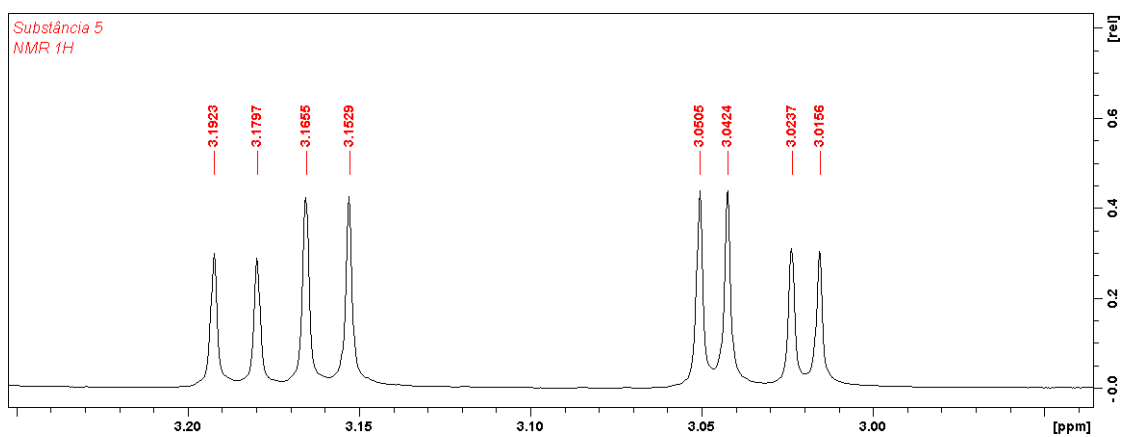
Substância 5**Figura 76** - Espectro de NMR ^1H da substância 5.**Figura 77** - Espectro de NMR ^1H da substância 5 (expansão da região de δ_{H} 1,20-1,34 ppm).**Figura 78** - Espectro de NMR ^1H da substância 5 (expansão da região de δ_{H} 2,80-3,40 ppm).

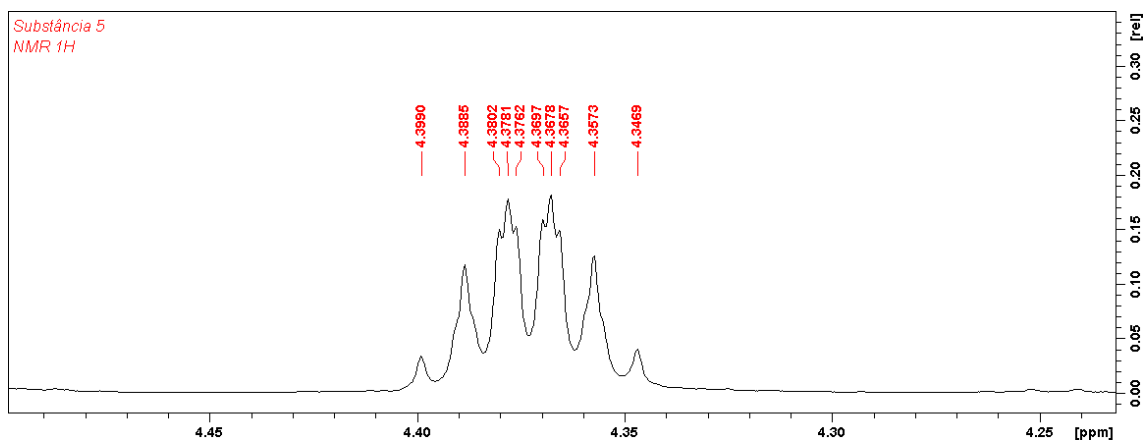
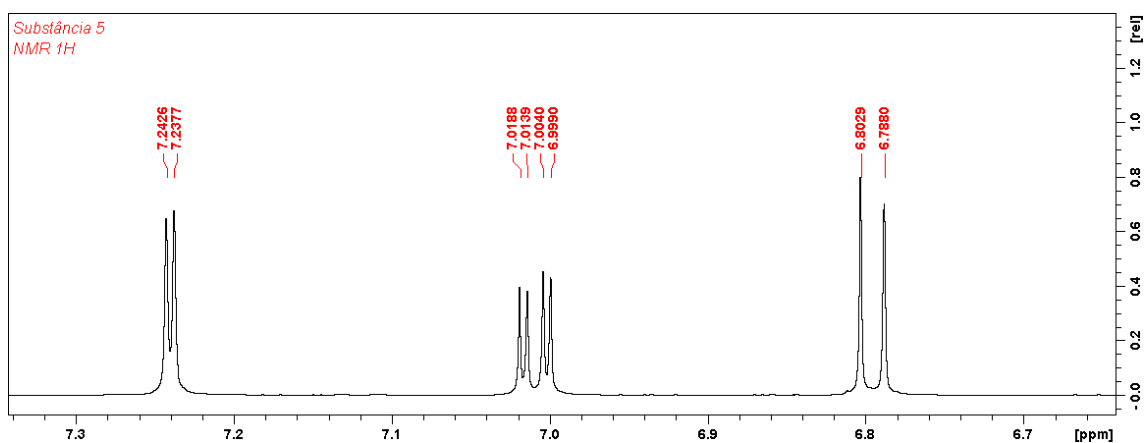
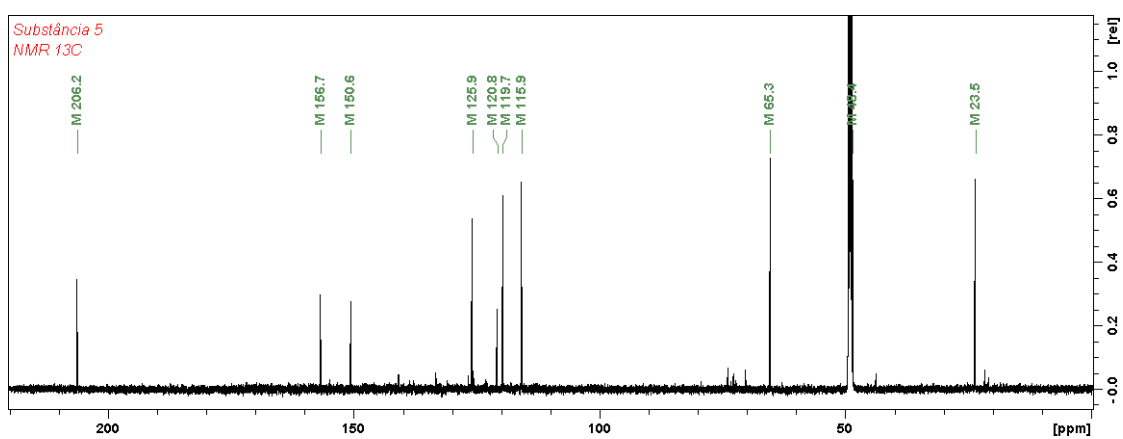
Figura 79 - Espectro de NMR ^1H da substância **5** (expansão da região de δ_{H} 4,20-4,55 ppm).**Figura 80** - Espectro de NMR ^1H da substância **5** (expansão da região de δ_{H} 6,60-7,40 ppm).**Figura 81** - Espectro de NMR ^{13}C da substância **5**.

Figura 84 - Espectro de gHSQC da substância 5.

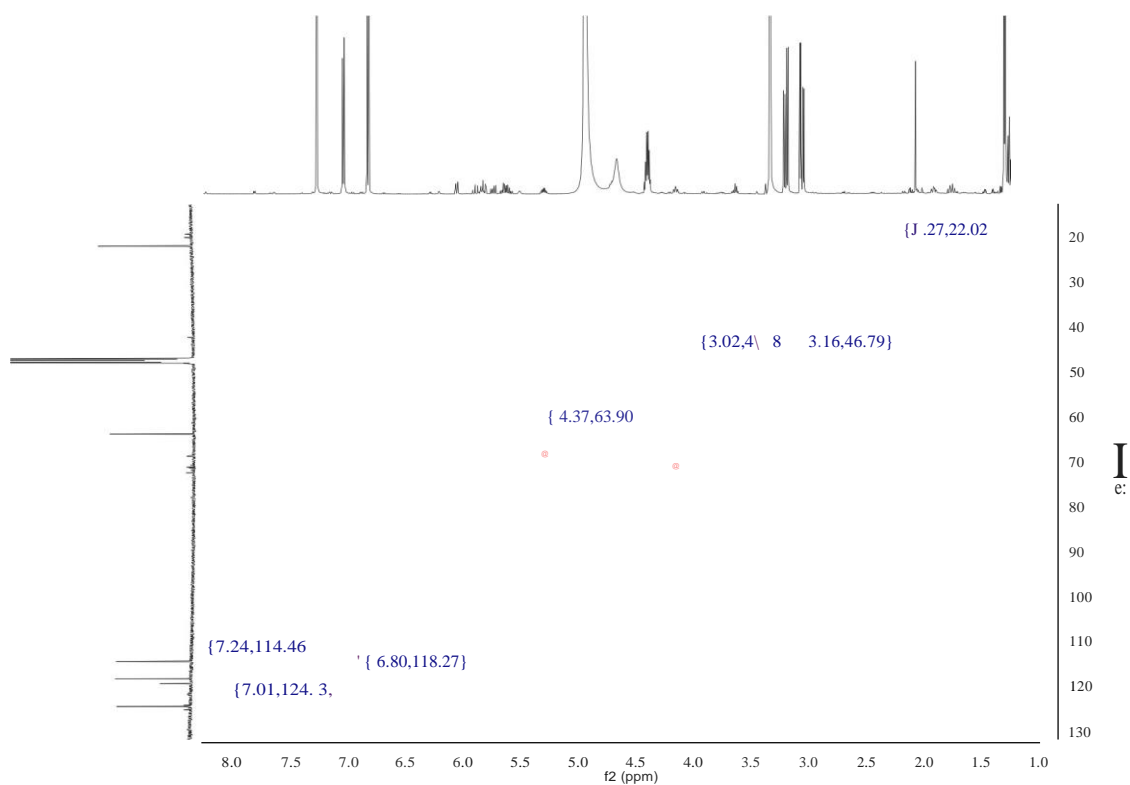
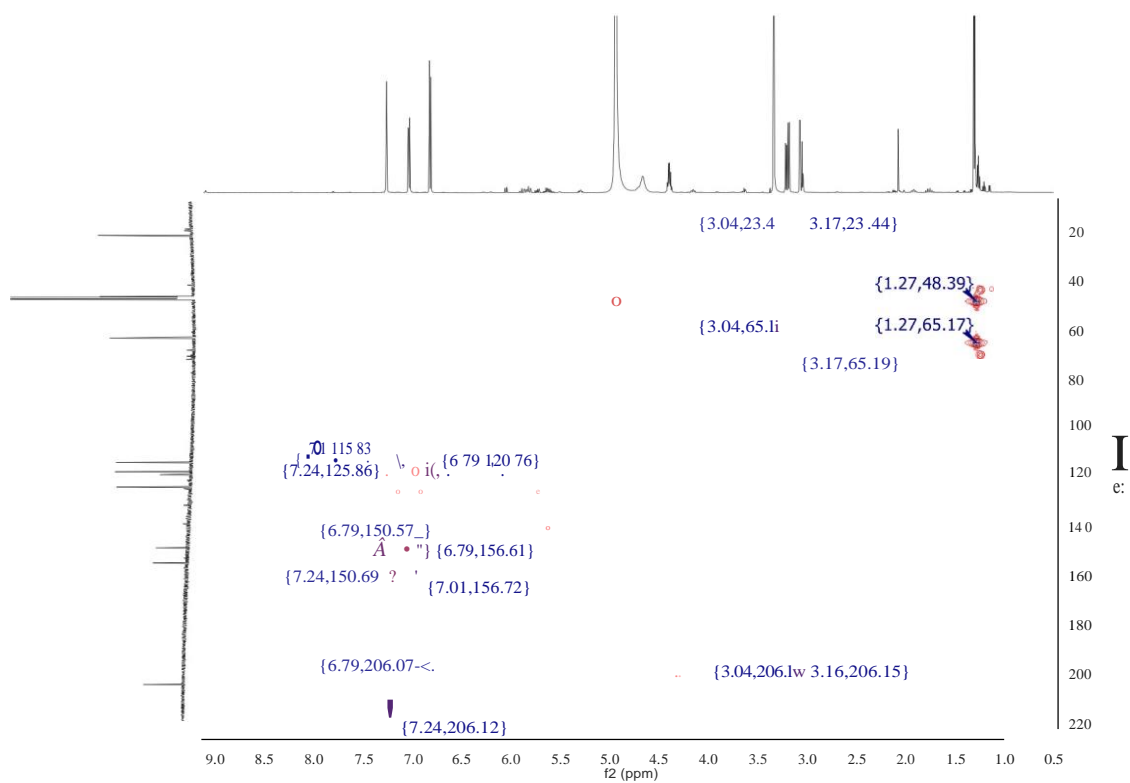


Figura 85 - Espectro de gHMBC da substância 5.



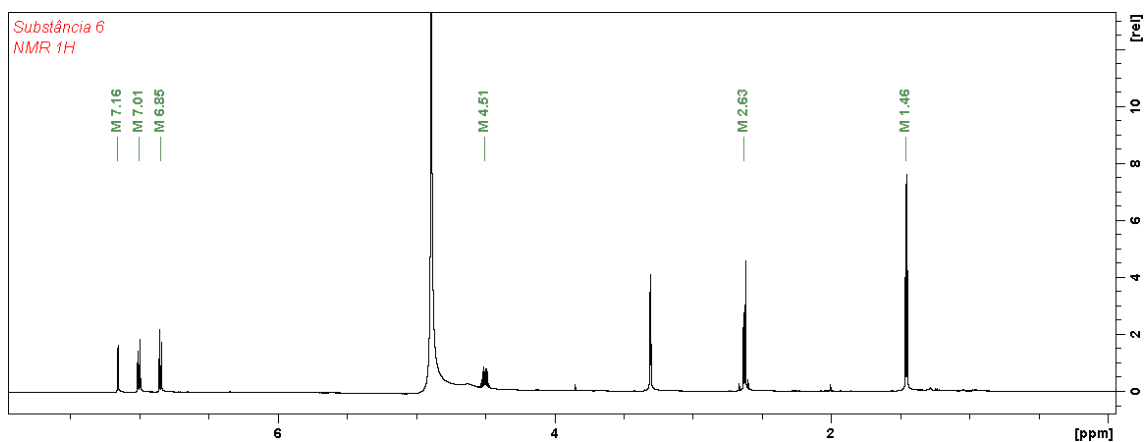
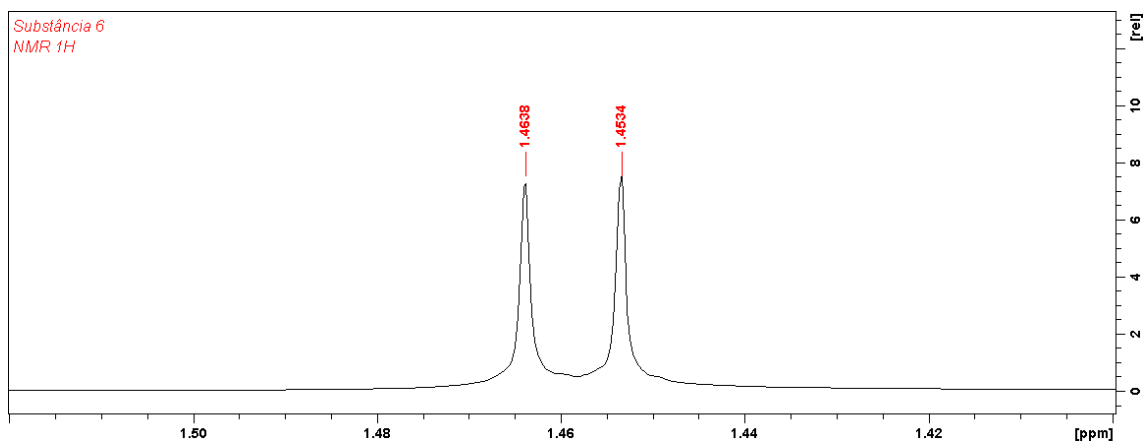
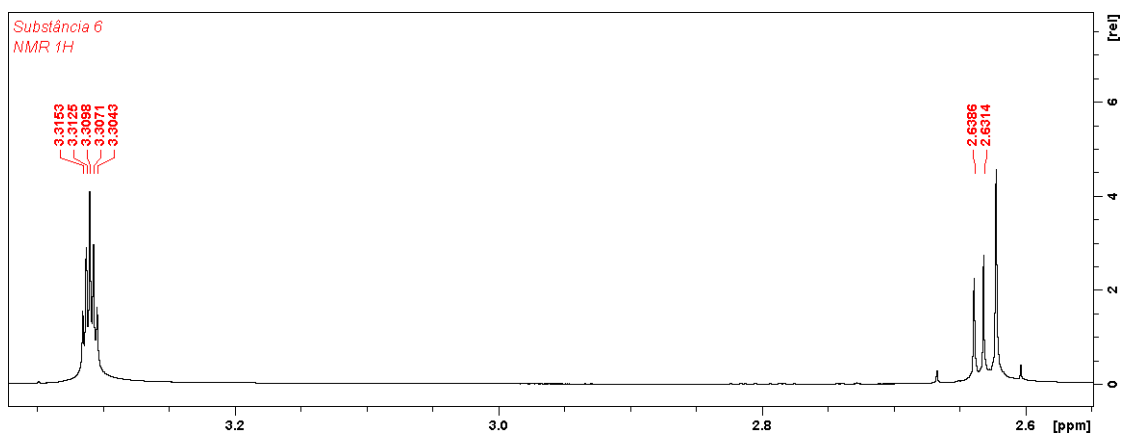
Substância 6**Figura 86** - Espectro de NMR ^1H da substância 6.**Figura 87** - Espectro de NMR ^1H da substância 6 (expansão da região de δ_{H} 1,40-1,60 ppm).**Figura 88** - Espectro de NMR ^1H da substância 6 (expansão da região de δ_{H} 2,60-3,5 ppm).

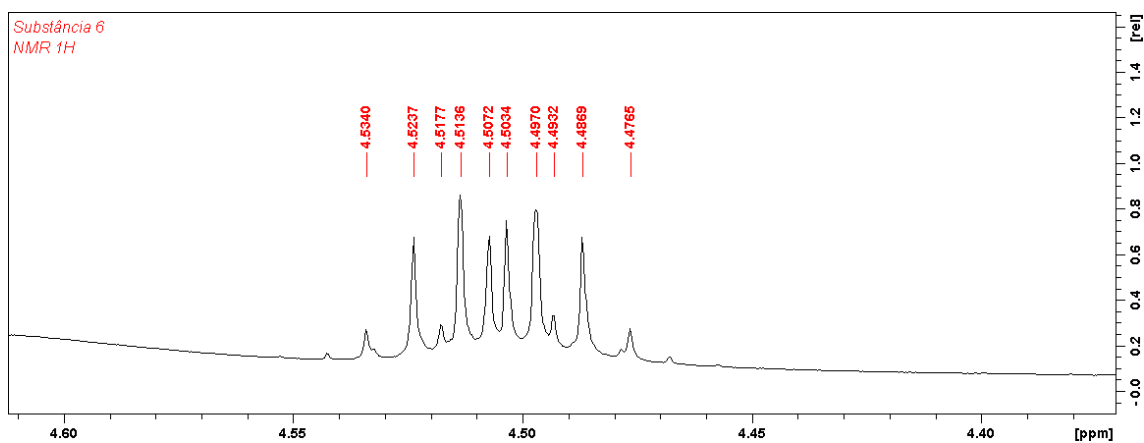
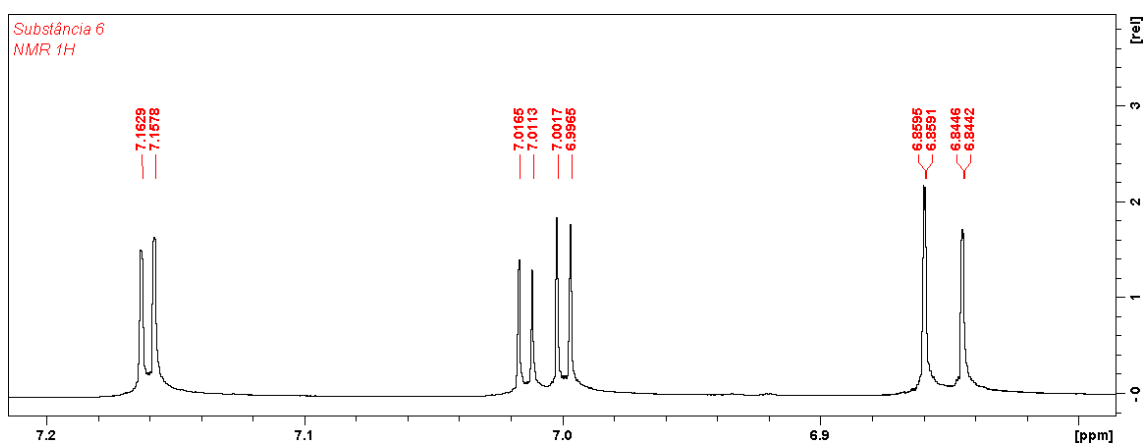
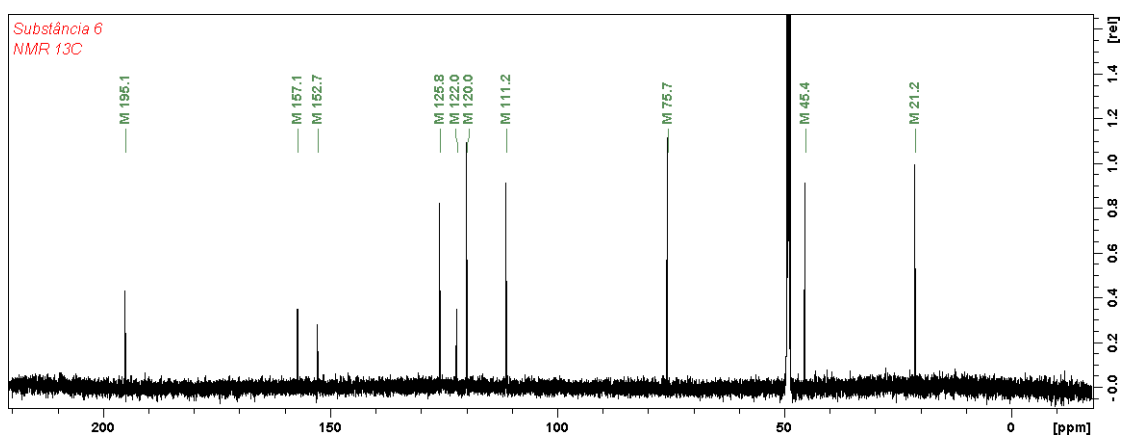
Figura 89 - Espectro de NMR ^1H da substância **6** (expansão da região de δ_{H} 4,30-4,60 ppm).**Figura 90** - Espectro de NMR ^1H da substância **6** (expansão da região de δ_{H} 6,80-7,20 ppm).**Figura 91** - Espectro de NMR ^{13}C da substância **6**.

Figura 92 - Espectro de COSY da substância 6.

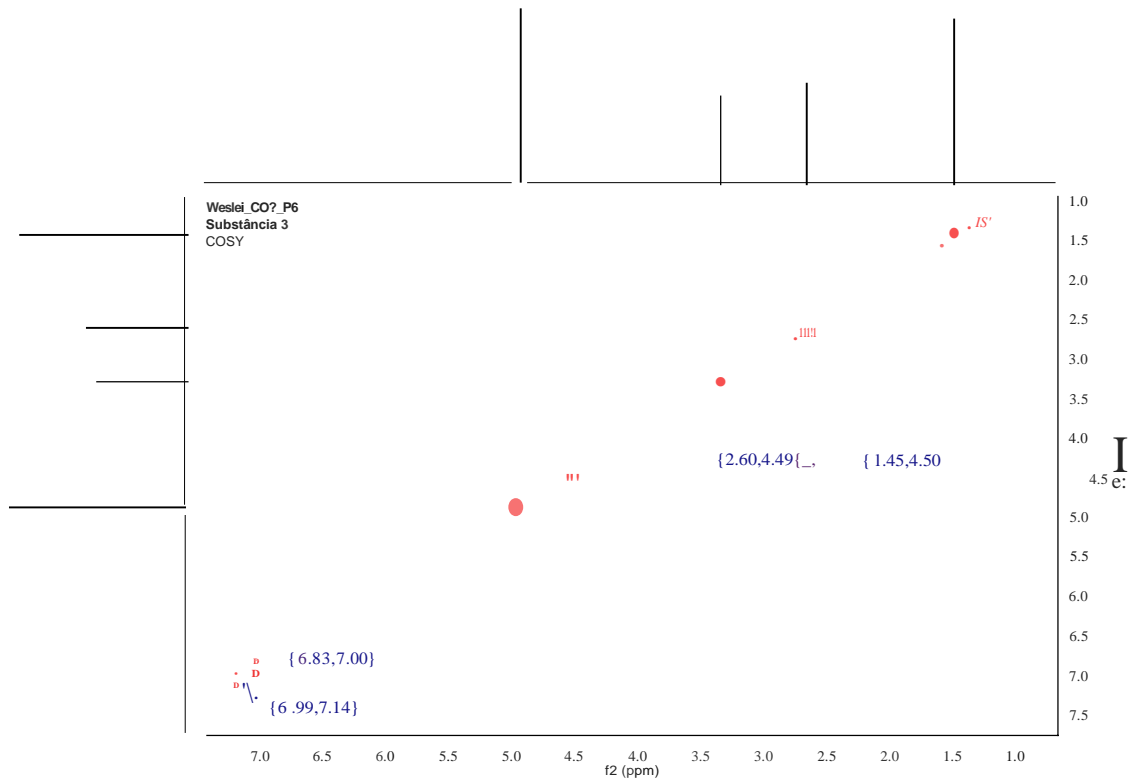


Figura 93 - Espectro de gHSQC da substância 6.

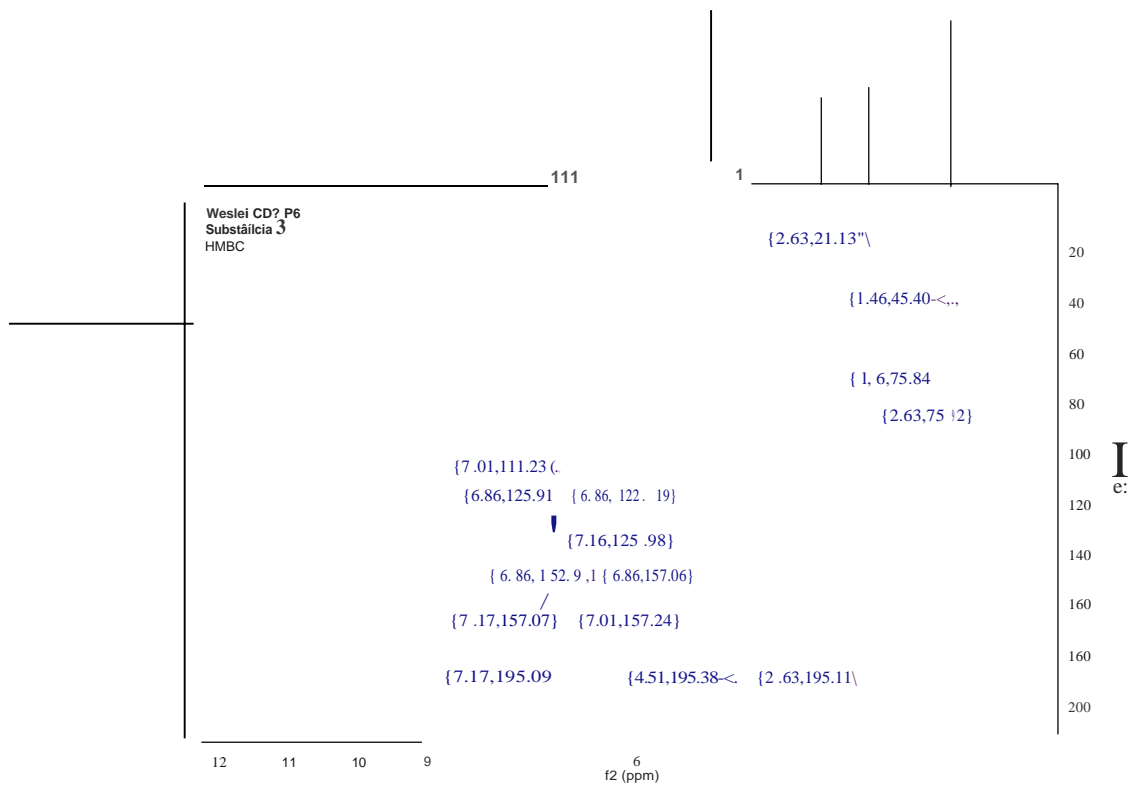
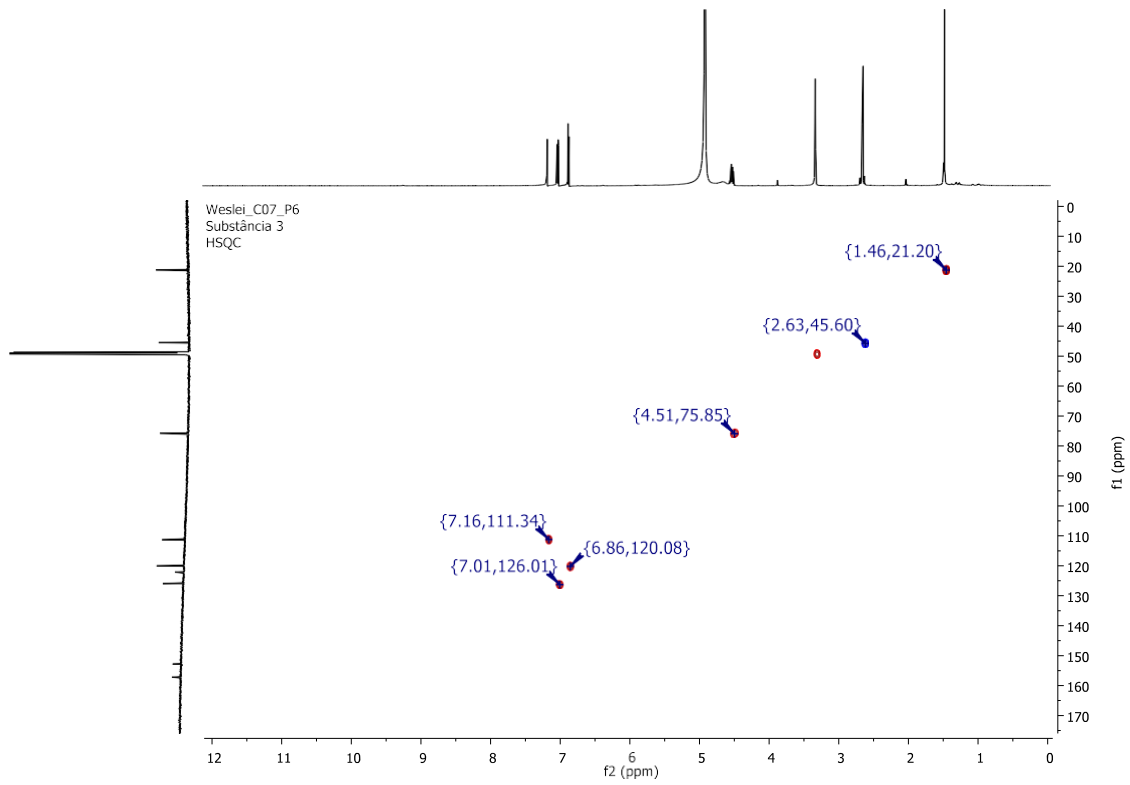


Figura 94 - Espectro de gHMBC da substância 6.

Substância 7

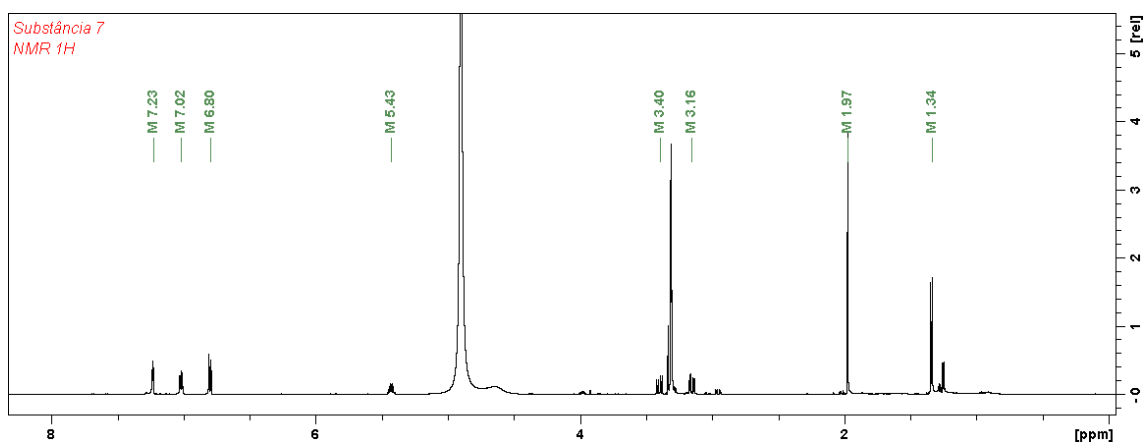
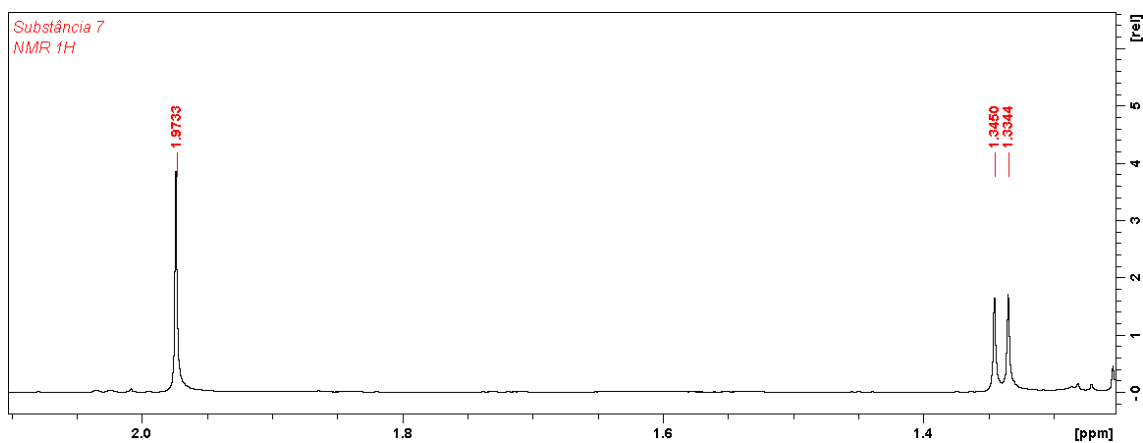
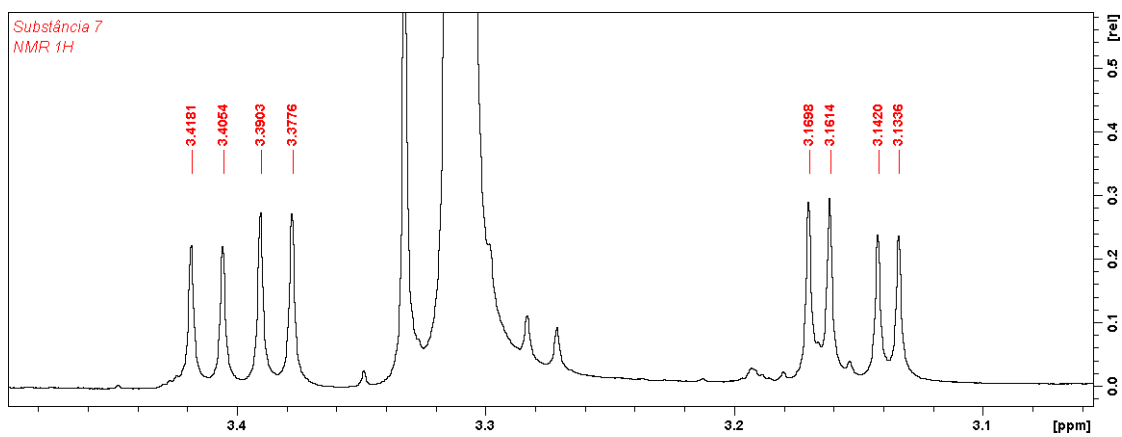
Figura 95 - Espectro de NMR ^1H da substância 7.Figura 96 - Espectro de NMR ^1H da substância 7 (expansão da região de δ_{H} 1,20-2,10 ppm).Figura 97 - Espectro de NMR ^1H da substância 7 (expansão da região de δ_{H} 3,10-3,60 ppm).

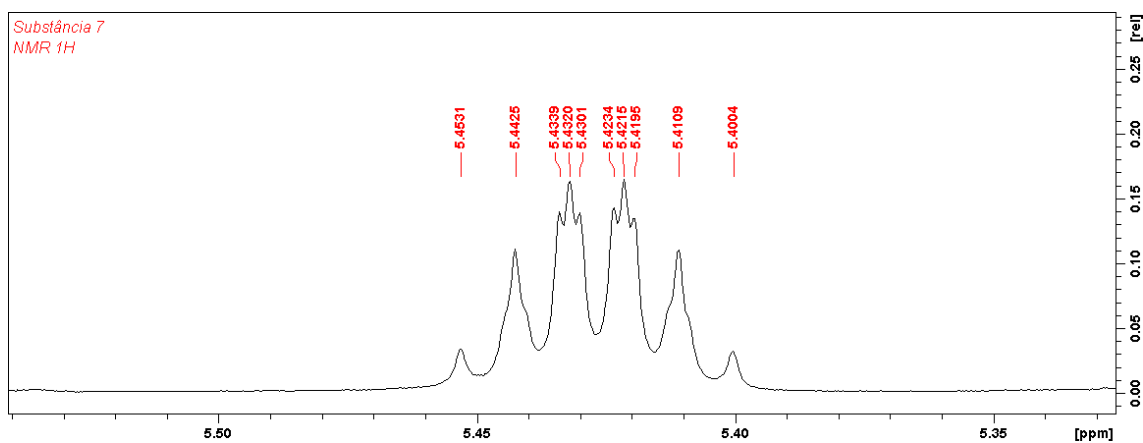
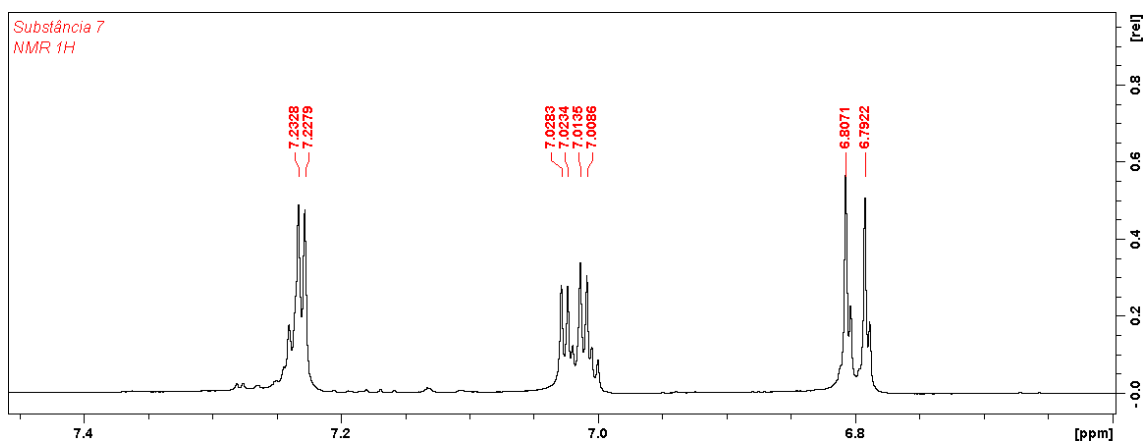
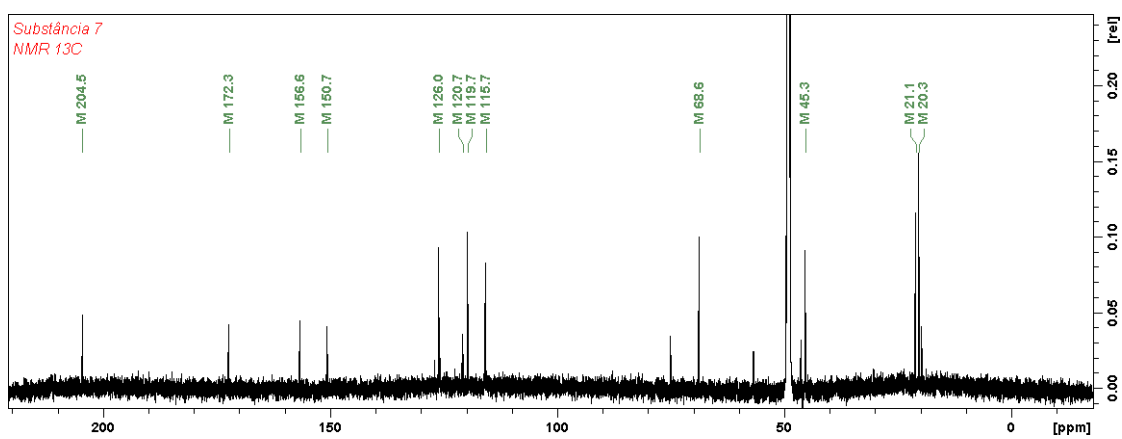
Figura 98 - Espectro de NMR ^1H da substância **7** (expansão da região de δ_{H} 6,30-5,60 ppm).**Figura 99** - Espectro de NMR ^1H da substância **7** (expansão da região de δ_{H} 6,60-7,50 ppm).**Figura 100** - Espectro de NMR ^{13}C da substância **7**.

Figura 101 - Espectro de gHSQC da substância 7.

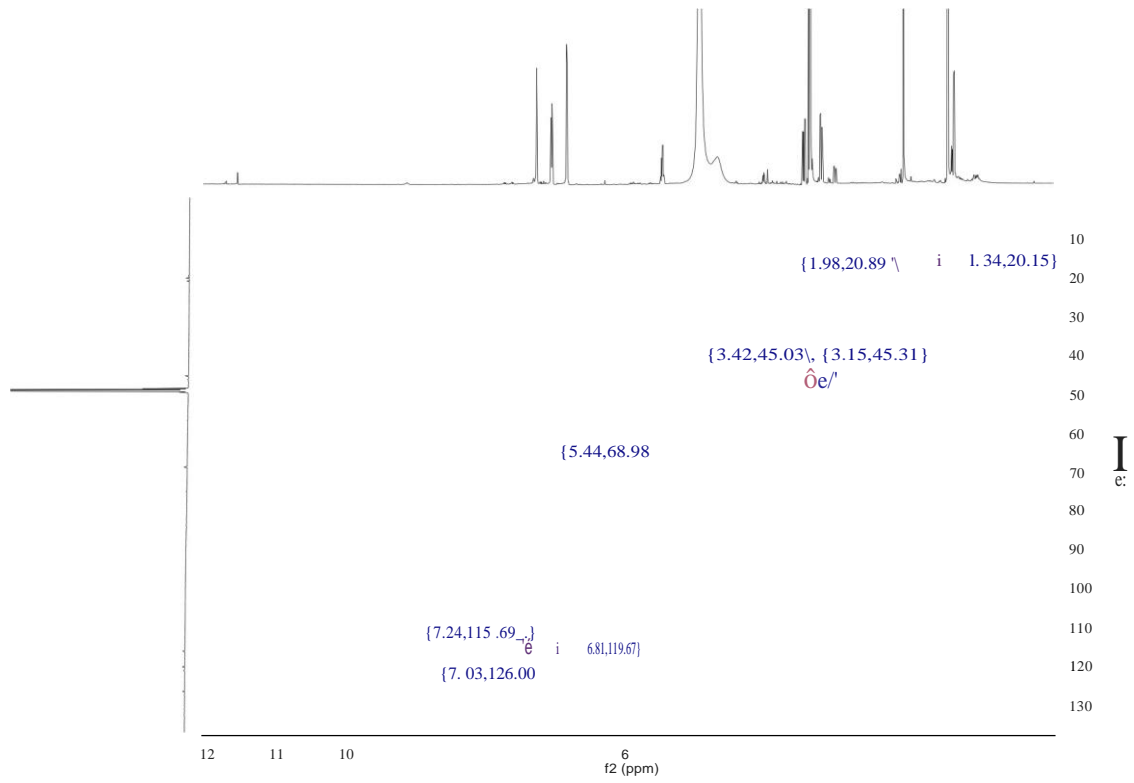
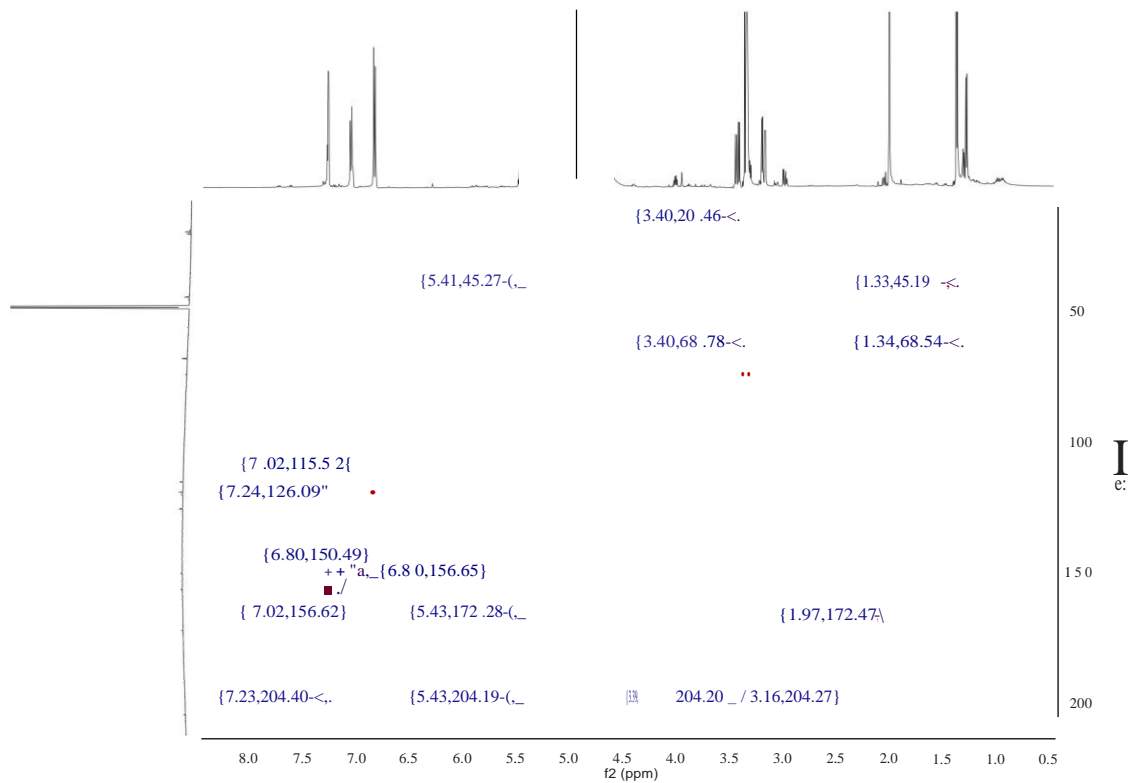


Figura 102 - Espectro de gHMBC da substância 7.



Substância 8

Figura 103 - Espectro de NMR ^1H da substância 8.

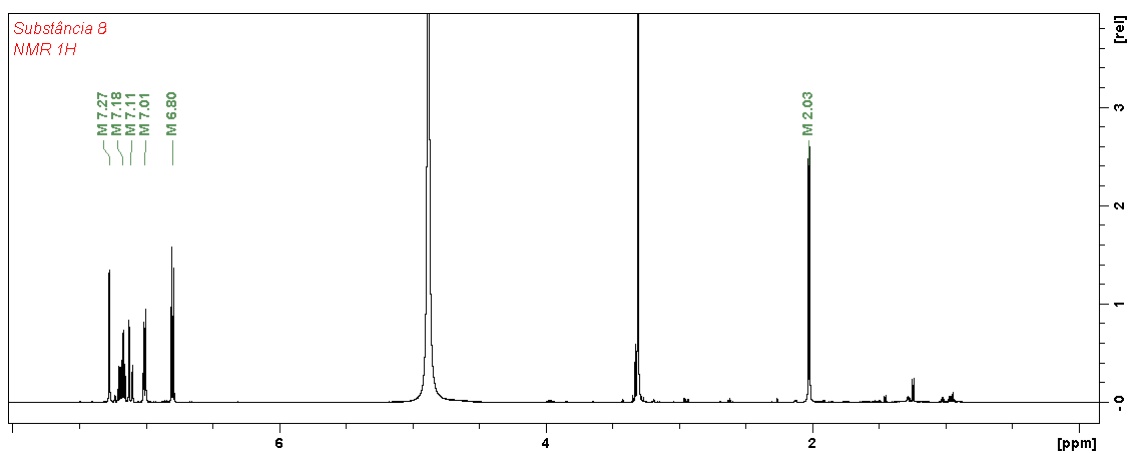


Figura 104 – Espectro de NMR ^1H da substância 8 (expansão da região de δ_{H} 1,80-2,20 ppm).

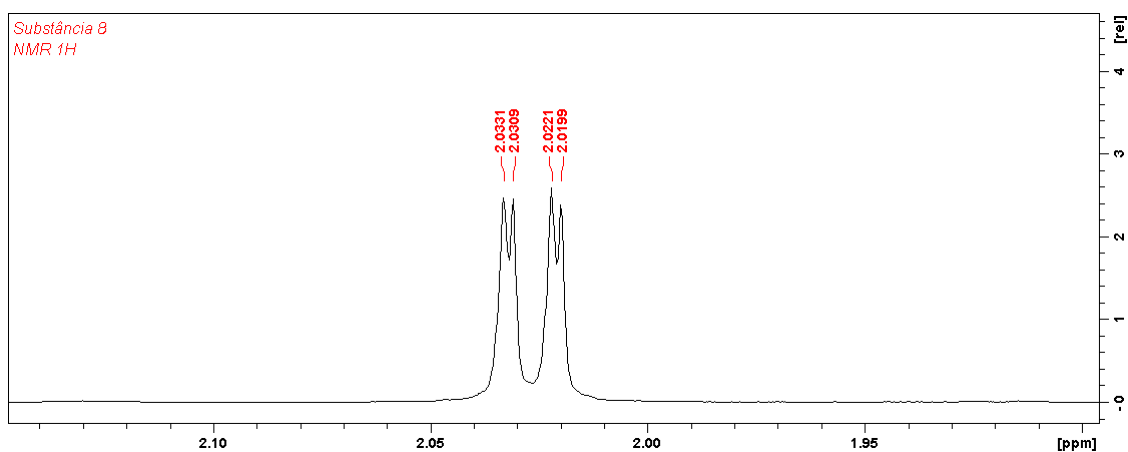


Figura 105 - Espectro de NMR ^1H da substância 8 (expansão da região de δ_{H} 6,70-7,40 ppm).

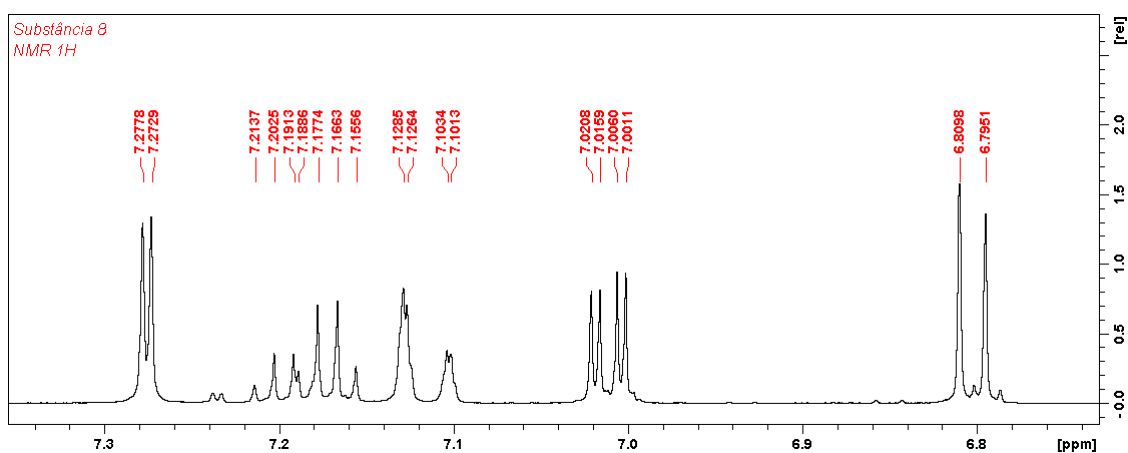


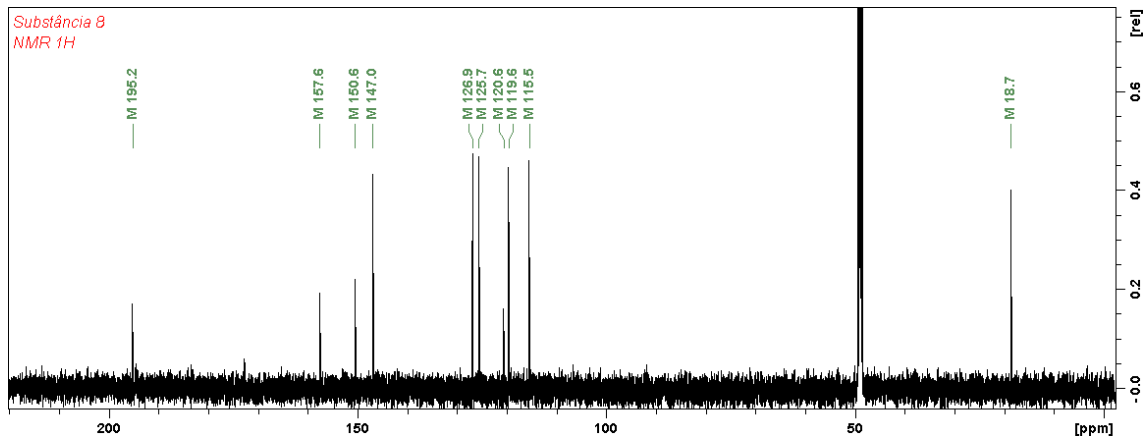
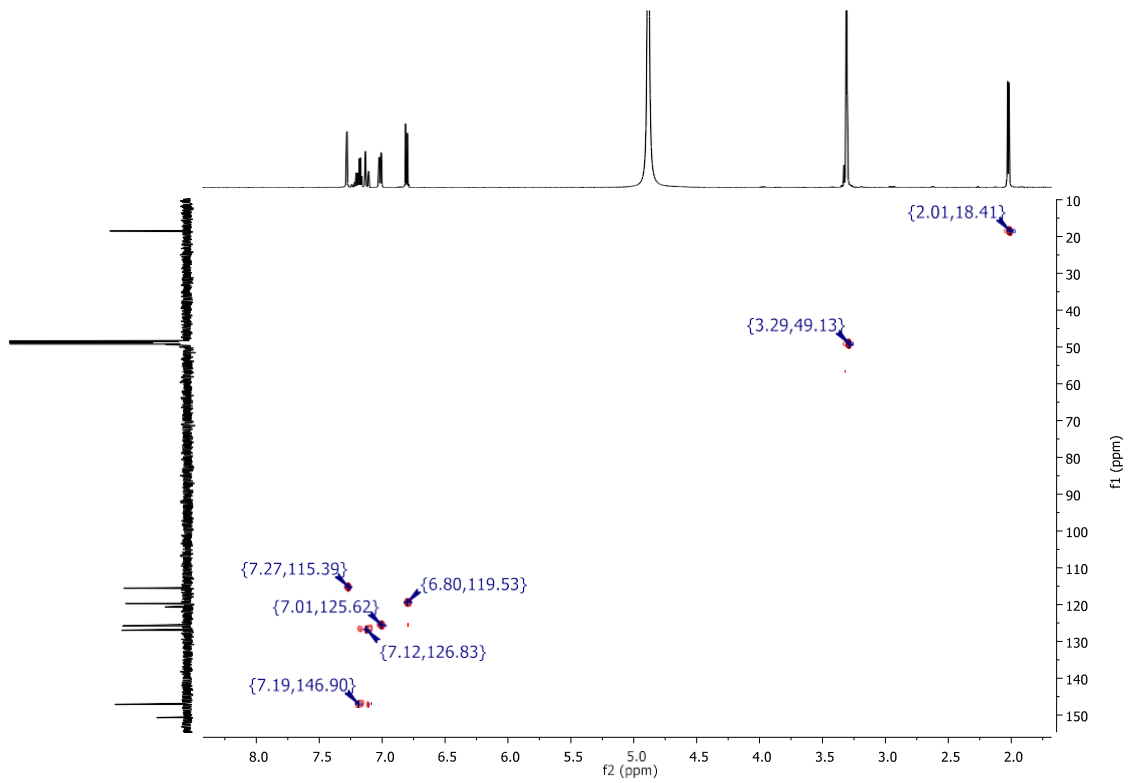
Figura 106 - Espectro de NMR ^{13}C da substância **8**.**Figura 107** - Espectro de gHSQC da substância **8**.

Figura 108 - Espectro de gHMBC da substância 8.

